

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-504504
(P2024-504504A)

(43)公表日 令和6年1月31日(2024.1.31)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 H	21/00 (2006.01)	C 0 7 H	21/00	4 C 0 5 7	
A 6 1 K	47/54 (2017.01)	A 6 1 K	47/54	4 C 0 7 6	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	4 C 0 8 4	
A 6 1 K	31/713(2006.01)	A 6 1 K	31/713	4 C 0 8 6	
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全138頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-546404(P2023-546404)	(71)出願人	523288879		
(86)(22)出願日	令和4年1月28日(2022.1.28)		イー セラピューティクス パブリック		
(85)翻訳文提出日	令和5年9月27日(2023.9.27)		リミテッド カンパニー		
(86)国際出願番号	PCT/EP2022/052069		イギリス国、ダブリュ2 6 ビーディー		
(87)国際公開番号	WO2022/162154		ロンドン、キングダム ストリート 4、		
(87)国際公開日	令和4年8月4日(2022.8.4)		ユニット 4ビー、レヴェル 4		
(31)優先権主張番号	63/143,805	(74)代理人	100136629		
(32)優先日	令和3年1月30日(2021.1.30)		弁理士 鎌田 光宣		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100080791		
(31)優先権主張番号	63/262,315		弁理士 高島 一		
(32)優先日	令和3年10月8日(2021.10.8)	(74)代理人	100125070		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 土井 京子		
(31)優先権主張番号	63/271,683	(74)代理人	100121212		
			弁理士 田村 弥栄子		
		(74)代理人	100174296		
		最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 コンジュゲートオリゴヌクレオチド化合物、その作製方法及び使用

(57)【要約】

本発明は、治療的使用に好適な新規のコンジュゲートオリゴヌクレオチド化合物を提供する。加えて、本発明は、これらの化合物を作製する方法、並びに様々な疾患及び状態の治療のためにかかる化合物を使用する方法を提供する。

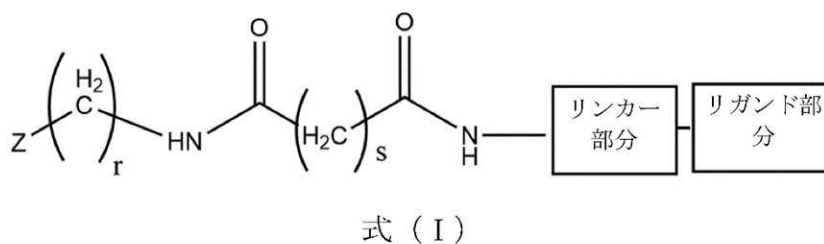
【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の構造を含む、化合物であって、

【化 1】



10

式中、

r 及び s が、独立して、1～16から選択される整数であり、

Z が、オリゴヌクレオチド部分である、化合物。

【請求項 2】

s が、4～12から選択される整数である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

s が、6である、請求項 2 に記載の化合物。

【請求項 4】

r が、4～14から選択される整数である、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の化合物。

20

【請求項 5】

r が、6である、請求項 4 に記載の化合物。

【請求項 6】

r が、12である、請求項 4 に記載の化合物。

【請求項 7】

請求項 3 に従属する、請求項 5 に記載の化合物。

【請求項 8】

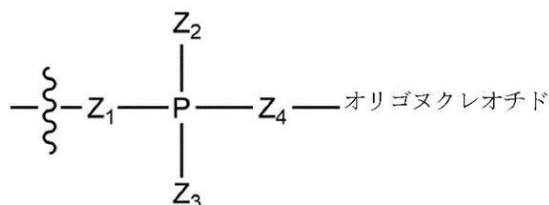
請求項 3 に従属する、請求項 6 に記載の化合物。

30

【請求項 9】

Z が、以下であり、

【化 2】



40

式中、

Z_1 、 Z_2 、 Z_3 、 Z_4 が、各出現で独立して、酸素又は硫黄であり、

P と Z_2 との間、及び P と Z_3 との間の一方向の結合が、単結合であり、他方の結合は、二重結合である、請求項 1～8 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 10】

前記オリゴヌクレオチドが、標的遺伝子の発現を調節、好ましくは阻害することができる RNA 化合物である、請求項 1～9 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 11】

前記 RNA 化合物が、第 1 及び第 2 の鎖を含む RNA 二本鎖を含み、前記第 1 の鎖が、標的遺伝子の RNA 配列に少なくとも部分的に相補的であり、前記第 2 の鎖が、前記第 1

50

の鎖に少なくとも部分的に相補的であり、前記第 1 及び第 2 の鎖の各々が、5' 及び 3' 末端を有する、請求項 10 に記載の化合物。

【請求項 12】

好ましくはまた、請求項 3 及び 6 に従属し、前記 RNA 化合物が、その第 2 の鎖の 5' 末端で、隣接するホスフェートに結合している、請求項 11 に記載の化合物。

【請求項 13】

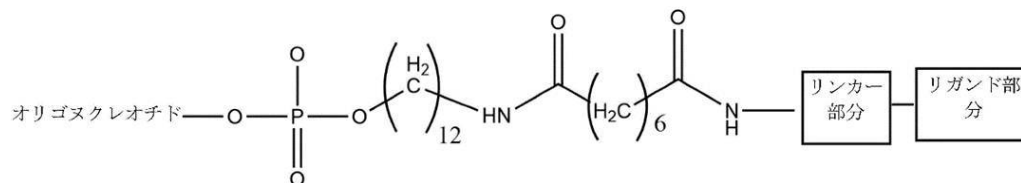
好ましくはまた、請求項 3 及び 5 に従属し、前記 RNA 化合物が、その第 2 の鎖の 3' 末端で、隣接するホスフェートに結合している、請求項 11 に記載の化合物。

【請求項 14】

好ましくは請求項 12 に従属する、式 (I I) の化合物：

10

【化 3】



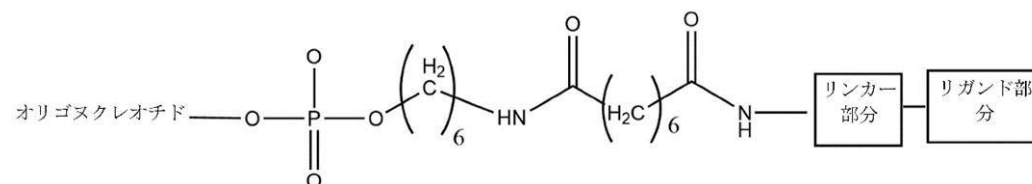
式 (I I)

【請求項 15】

20

好ましくは請求項 13 に従属する、式 (I I I) の化合物：

【化 4】



式 (I I I)

30

【請求項 16】

前記オリゴヌクレオチドが、2' 位で修飾された 1 つ以上のリボース、好ましくは 2' 位で修飾された複数のリボースを更に含む RNA 二本鎖を含む、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 17】

前記修飾が、2' -O-メチル、2' -デオキシフルオロ、及び 2' -デオキシから選択される、請求項 16 に記載の化合物。

【請求項 18】

前記オリゴヌクレオチドが、1 つ以上の末端に 1 つ以上の分解保護部分を更に含む、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の化合物。

40

【請求項 19】

前記 1 つ以上の分解保護部分が、前記リンカー／リガンド部分を担持する前記オリゴヌクレオチド鎖の末端に存在せず、かつ／又は前記 1 つ以上の分解保護部分が、ホスホロチオエートヌクレオチド間連結、ホスホロジチオエートヌクレオチド間連結、及び逆脱塩基ヌクレオチドから選択され、前記逆脱塩基ヌクレオチドが、前記リンカー／リガンド部分を担持する前記末端に対して、同じ鎖の遠方の末端に存在する、請求項 18 に記載の化合物。

【請求項 20】

請求項 1 の式 (I) に示される前記リガンド部分が、1 つ以上のリガンドを含む、請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の化合物。

50

【請求項 2 1】

請求項 1 の式 (I) に示される前記リガンド部分が、1 つ以上の炭水化物のリガンドを含む、請求項 2 0 に記載の化合物。

【請求項 2 2】

前記 1 つ以上の炭水化物が、単糖、二糖、三糖、四糖、オリゴ糖、又は多糖であり得る、請求項 2 1 に記載の化合物。

【請求項 2 3】

前記 1 つ以上の炭水化物が、1 つ以上のガラクトース部分、1 つ以上のラクトース部分、1 つ以上の N-アセチルガラクトサミン部分、及び／又は 1 つ以上のマンノース部分を含む、請求項 2 2 に記載の化合物。

10

【請求項 2 4】

前記 1 つ以上の炭水化物が、1 つ以上の N-アセチル-ガラクトサミン部分を含む、請求項 2 3 に記載の化合物。

【請求項 2 5】

2 又は 3 個の N-アセチルガラクトサミン部分を含む、請求項 2 4 に記載の化合物。

【請求項 2 6】

前記 1 つ以上のリガンドが、線形構成又は分岐構成で結合している、先行請求項のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 2 7】

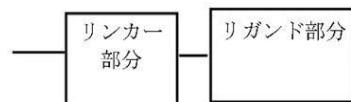
前記 1 つ以上のリガンドが、二分岐又は三分岐の分岐構成として結合している、請求項 2 6 に記載の化合物。

20

【請求項 2 8】

請求項 1 の式 (I) に示される前記部分：

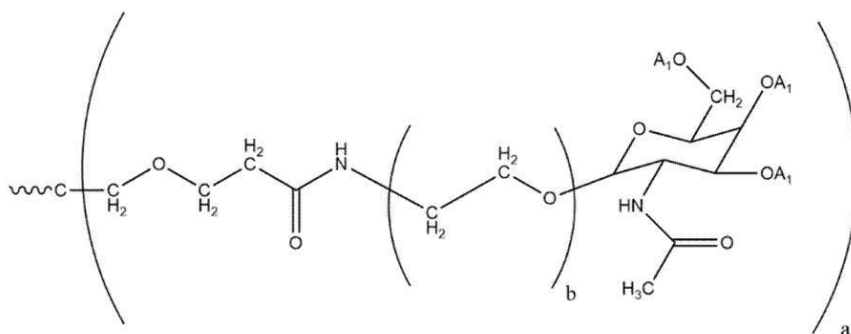
【化 5】



が、式 (IV)、(V)、又は (VI)：

30

【化 6】



式 (IV)

40

(式中、

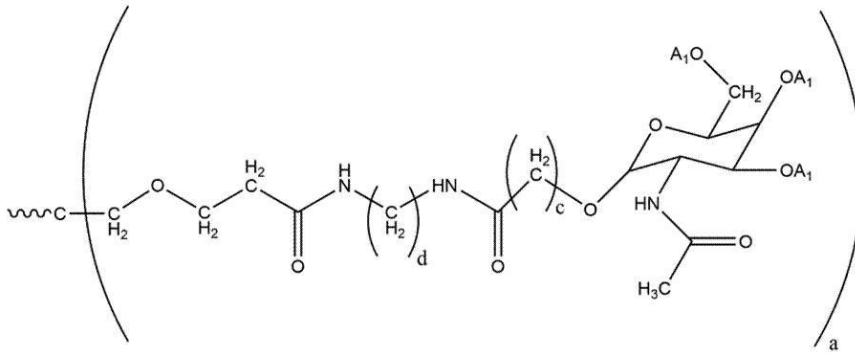
A_1 が、水素、又は好適なヒドロキシ保護基であり、

a が、2 又は 3 の整数であり、

b が、2 ~ 5 の整数である)、又は

50

【化 7】



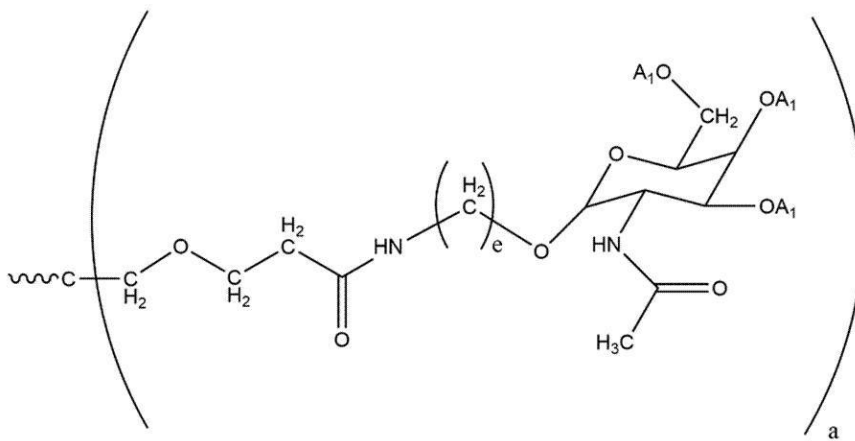
式 (V)

10

(式中、

 A_1 が、水素、又は好適なヒドロキシ保護基であり、 a が、2又は3の整数であり、 c 及び d が、独立して、1～6の整数である)、又は

【化 8】



式 (VI)

20

(式中、

 A_1 が、水素、又は好適なヒドロキシ保護基であり、 a が、2又は3の整数であり、 e が、2～10の整数である)のうちのいずれか、好ましくは式 (I V) である、請求項 20～27のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 29】

請求項 1 の式 (I) に示される前記部分：

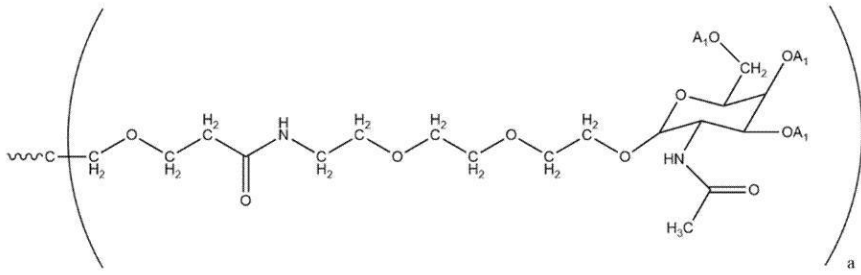
【化 9】



40

が、式 (VII) であって、

50



式 (VII)

10

式中、

A_1 が、水素であり、

a が、2 又は 3 の整数である、請求項 1 ～ 28 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 30】

$a = 2$ である、請求項 28 又は 29 に記載の化合物。

【請求項 31】

$a = 3$ である、請求項 28 又は 29 に記載の化合物。

【請求項 32】

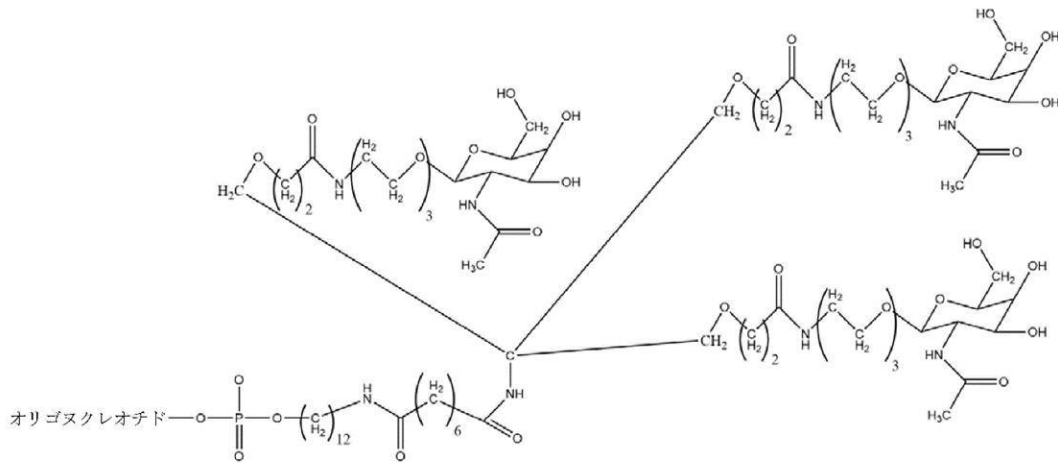
$b = 3$ である、請求項 28 に記載の化合物。

【請求項 33】

式 (VIII) の化合物：

【化 10】

20



式 (VIII)。

30

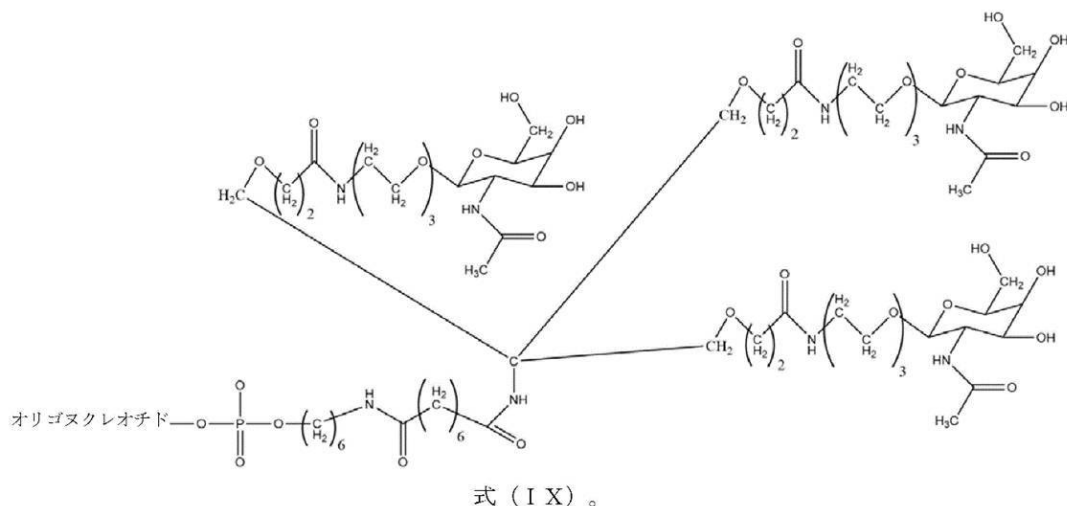
【請求項 34】

式 (IX) の化合物：

40

50

【化 1 1】



10

【請求項 3 5】

前記オリゴヌクレオチドが、2'位で修飾された1つ以上のリボース、好ましくは2'位で修飾された複数のリボースを更に含むRNA二本鎖を含む、請求項33又は34に記載の化合物。

【請求項 3 6】

前記修飾が、2'-O-メチル、2'-デオキシフルオロ、及び2'-デオキシから選択される、請求項35に記載の化合物。

20

【請求項 3 7】

前記オリゴヌクレオチドが、1つ以上の末端に1つ以上の分解保護部分を更に含む、請求項33～36のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 3 8】

前記1つ以上の分解保護部分が、前記リンカー／リガンド部分を担持する前記オリゴヌクレオチド鎖の末端に存在せず、かつ／又は前記1つ以上の分解保護部分が、ホスホロチオエートヌクレオチド間連結、ホスホロジチオエートヌクレオチド間連結、及び逆脱塩基ヌクレオチドから選択され、前記逆脱塩基ヌクレオチドが、前記リンカー／リガンド部分を担持する末端に対して、同じ鎖の遠方の末端に存在する、請求項37に記載の化合物。

30

【請求項 3 9】

前記オリゴヌクレオチドが、第1及び第2の鎖を含むRNA二本鎖を含み、前記第1の鎖が、標的遺伝子のRNA配列に少なくとも部分的に相補的であり、前記第2の鎖が、前記第1の鎖に少なくとも部分的に相補的であり、前記第1及び第2の鎖の各々が、5'及び3'末端を有し、前記RNA二本鎖が、その第2の鎖の5'末端で、隣接するホスフェートに結合している、請求項33に記載の化合物。

【請求項 4 0】

前記オリゴヌクレオチドが、第1及び第2の鎖を含むRNA二本鎖を含み、前記第1の鎖が、標的遺伝子のRNA配列に少なくとも部分的に相補的であり、前記第2の鎖が、前記第1の鎖に少なくとも部分的に相補的であり、前記第1及び第2の鎖の各々が、5'及び3'末端を有し、前記RNA二本鎖が、その第2の鎖の3'末端で、隣接するホスフェートに結合している、請求項34に記載の化合物。

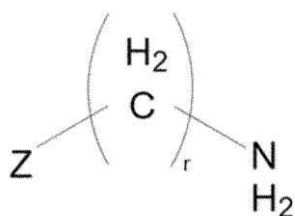
40

【請求項 4 1】

請求項1～40のいずれか一項に記載の化合物を調製するプロセスであって、前記プロセスが、式(X)及び(XI)の化合物を反応させることであって、

50

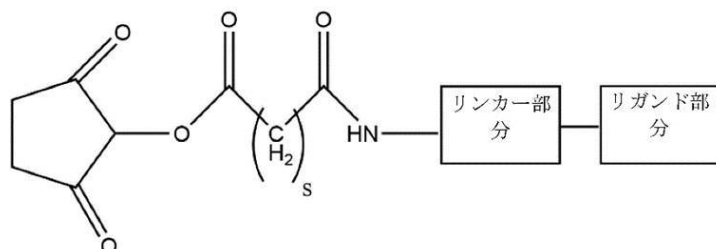
【化 1 2】



式 (X)

10

【化 1 3】



式 (X I)

20

式中、

r 及び s が、独立して、1～16から選択される整数であり、

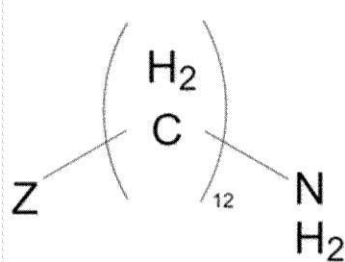
Z が、オリゴヌクレオチド部分である、反応させることと、

必要に応じて、前記オリゴヌクレオチドの前記リガンドの脱保護及び／若しくは第2の鎖のアニリングを実施することと、を含む、プロセス。

【請求項 4 2】

式 (X) の化合物が、式 (X a) であり、

【化 1 4】

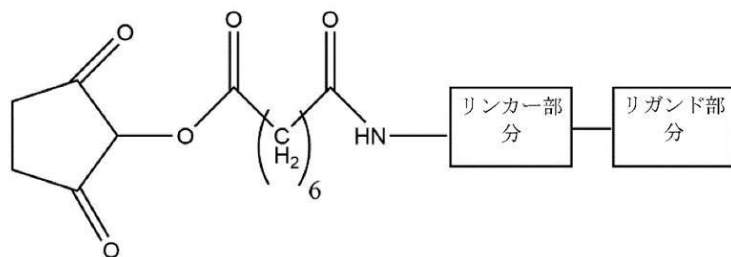


式 (X a)

30

式 (X I) の化合物が、式 (X I a) であり、

【化 1 5】



式 (X I a)

40

前記オリゴヌクレオチドが、第1及び第2の鎖を含むRNA二本鎖を含み、前記第1の

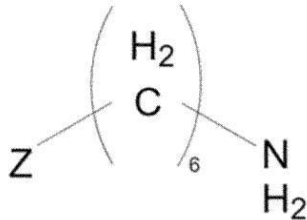
50

鎖が、標的遺伝子のRNA配列に少なくとも部分的に相補的であり、前記第2の鎖が、前記第1の鎖に少なくとも部分的に相補的であり、前記第1及び第2の鎖の各々が、5'及び3'末端を有し、前記RNA二本鎖が、その第2の鎖の5'末端で、隣接するホスフェートに結合している、請求項6、8～14、16～33、及び35～40のいずれか一項に記載の化合物を調製するための、請求項41に記載のプロセス。

【請求項43】

式(X)の化合物が、式(Xb)であり、

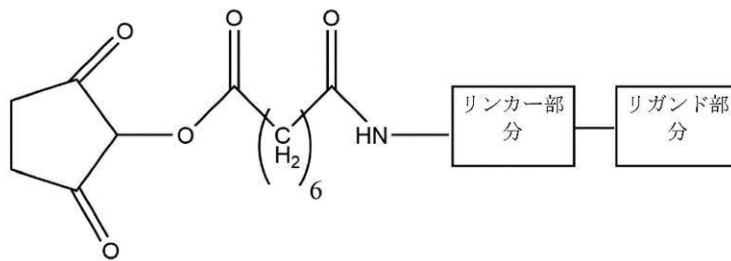
【化16】



式(Xb)

式(XI)の化合物が、式(XIa)であり、

【化17】



式(XIa)

前記オリゴヌクレオチドが、第1及び第2の鎖を含むRNA二本鎖を含み、前記第1の鎖が、標的遺伝子のRNA配列に少なくとも部分的に相補的であり、前記第2の鎖が、前記第1の鎖に少なくとも部分的に相補的であり、前記第1及び第2の鎖の各々が、5'及び3'末端を有し、前記RNA二本鎖が、その第2の鎖の3'末端で、隣接するホスフェートに結合している、請求項5、7、9～13、15～32、及び34～40のいずれか一項に記載の化合物を調製するための、請求項41に記載のプロセス。

【請求項44】

式(XIa)の化合物が、式(XIb)である、請求項42又は43に記載のプロセス

：

10

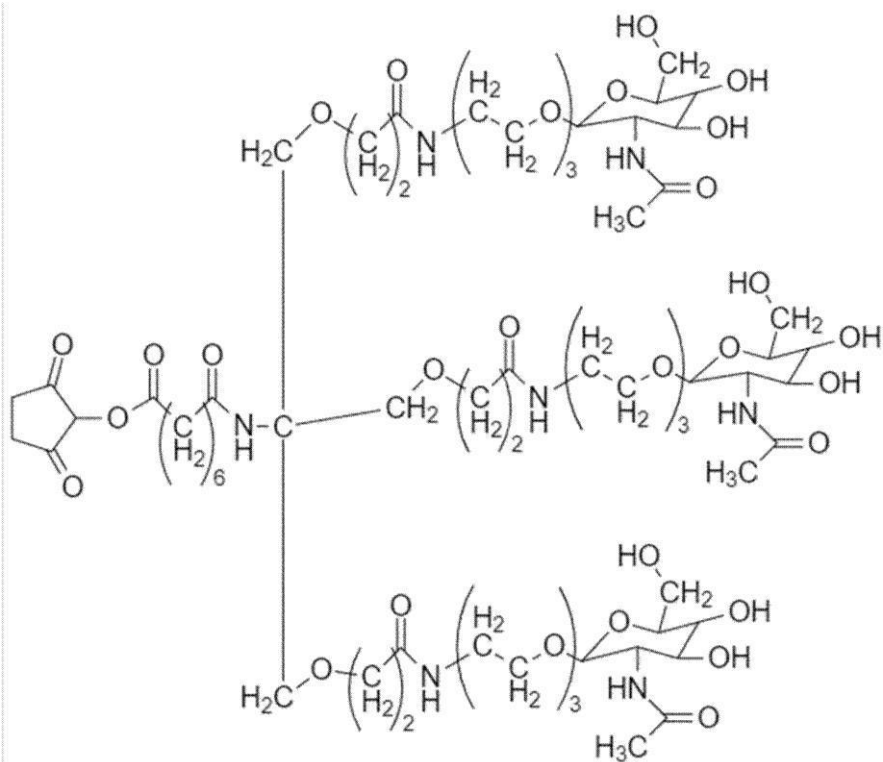
20

30

40

50

【化 1 8】

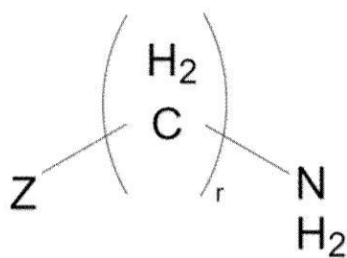


式 (X I b)

【請求項 4 5】

式 (X) の化合物であって、

【化 1 9】



式 (X)

式中、

r が、独立して、1 ~ 16 から選択される整数であり、

Z が、オリゴヌクレオチド部分である、化合物。

【請求項 4 6】

式 (X a) の化合物：

10

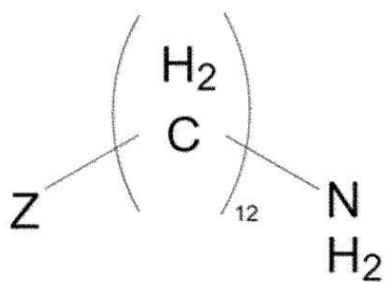
20

30

40

50

【化 2 0】



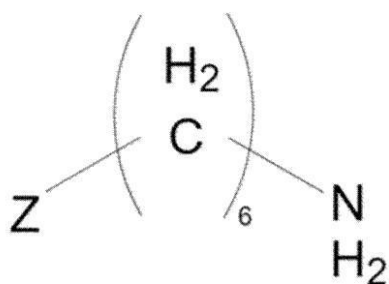
式 (X a)。

10

【請求項 4 7】

式 (X b) の化合物：

【化 2 1】



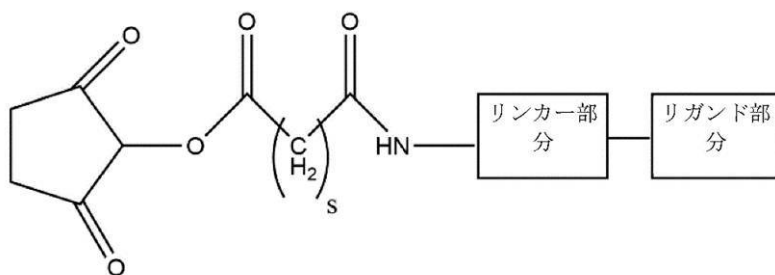
式 (X b)。

20

【請求項 4 8】

式 (X I) の化合物であって、

【化 2 2】



式 (X I)

30

式中、

s が、独立して、1～16から選択される整数であり、
Z が、オリゴヌクレオチド部分である、化合物。

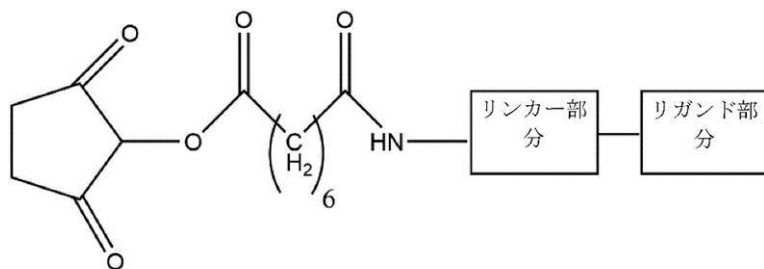
40

【請求項 4 9】

式 (X I a) の化合物：

50

【化 2 3】



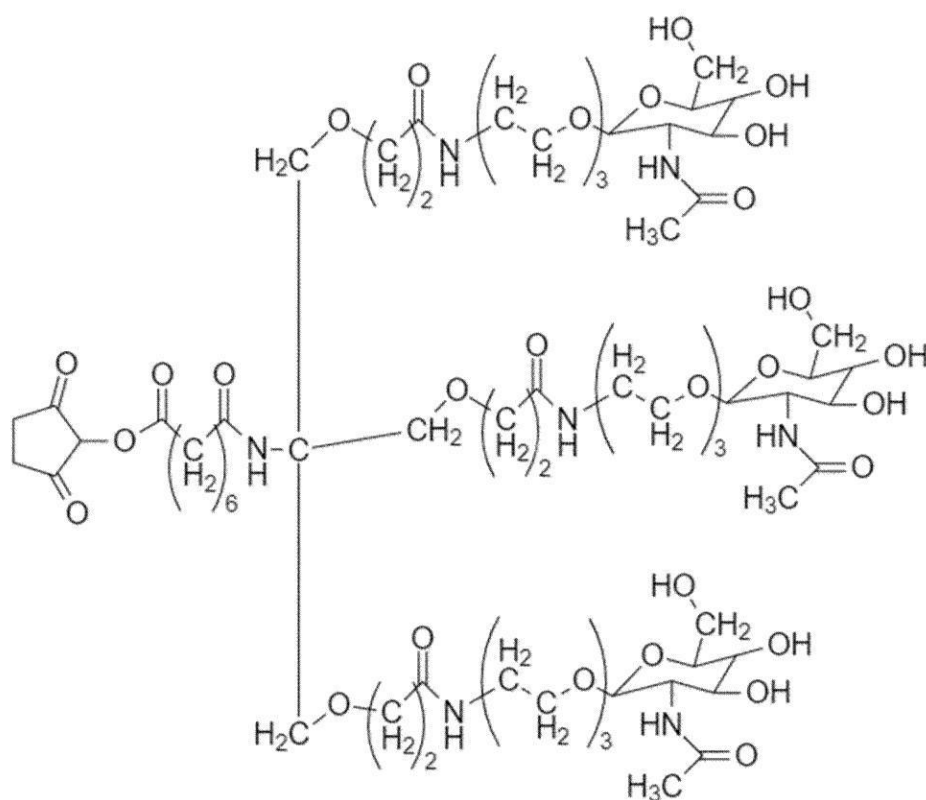
式 (X I a)。

10

【請求項 5 0】

式 (X I b) の化合物：

【化 2 4】



式 (X I b)。

20

30

【請求項 5 1】

請求項 1 ～ 4 0 のいずれか一項に記載の化合物の調製のための、請求項 4 5 及び 4 8 ～ 5 0 のいずれか一項に記載の化合物の、使用。

40

【請求項 5 2】

請求項 6 、 8 ～ 1 4 、 1 6 ～ 3 3 、 及び 3 5 ～ 4 0 のいずれか一項に記載の化合物の調製のための、請求項 4 6 に記載の化合物の、使用。

【請求項 5 3】

請求項 5 、 7 、 9 ～ 1 3 、 1 5 ～ 3 2 、 及び 3 4 ～ 4 0 のいずれか一項に記載の化合物の調製のための、請求項 4 7 に記載の化合物の、使用。

【請求項 5 4】

請求項 4 1 ～ 4 4 のいずれか一項に記載のプロセスによって得られたか、又は得ることができる化合物又は組成物。

50

【請求項 55】

薬学的に許容される担体、希釈剤、又は賦形剤とともに、請求項 1～40 のいずれか一項に記載の化合物から構成される医薬組成物。

【請求項 56】

療法における使用のための、請求項 1～40 のいずれか一項に記載の化合物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、治療的使用に好適な新規のコンジュゲートオリゴヌクレオチド化合物を提供する。加えて、本発明は、これらの化合物を作製する方法、並びに様々な疾患及び状態の治療のためにかかる化合物を使用する方法を提供する。

10

【背景技術】

【0002】

オリゴヌクレオチド化合物は、医学において重要な治療用途を有する。オリゴヌクレオチドを、特定の疾患の原因となる遺伝子をサイレンシングさせるために使用することができる。遺伝子サイレンシングは、翻訳を阻害することによってタンパク質の形成を防止する。重要なことに、遺伝子サイレンシング剤は、疾患に関連するタンパク質の機能を阻害する従来の小さい有機化合物の有望な代替物である。siRNA、アンチセンスRNA、及びマイクロRNAは、遺伝子サイレンシングによってタンパク質の形成を防止するオリゴヌクレオチドである。

20

【0003】

特に、過去20年間、多くの修飾siRNA化合物が、中枢神経系疾患、炎症性疾患、代謝障害、腫瘍学、感染症、及び眼疾患を含む様々な疾患の治療のためのsiRNA/RNAi治療薬を含む、診断及び治療目的のために開発されてきた。

【0004】

インビボでの細胞へのオリゴヌクレオチドの効率的な送達、特定の標的化及び細胞外環境、特に血清タンパク質からの実質的な保護を必要とする。特定の標的化を達成する1つの方法は、リガンド標的化部分をオリゴヌクレオチド剤にコンジュゲートすることである。リガンド標的化部分は、オリゴヌクレオチドを必要な標的部位に送達するのに役立つ。例えば、末端ガラクトース又はその誘導体を含むリガンド標的部分をオリゴヌクレオチドに結合させることは、アシアロ糖タンパク質受容体(ASGPR)への結合を介した肝細胞への標的化の助けとなる。

30

【0005】

新規のリガンドコンジュゲートオリゴヌクレオチド、及びそれらの調製方法が必要とされている。

【発明の概要】

【0006】

本発明は、新規のリガンドコンジュゲートオリゴヌクレオチド化合物、それらの化合物の作製方法、及びその使用を提供する。

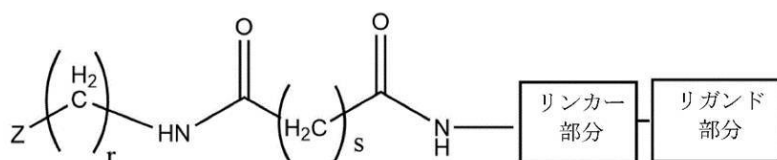
【0007】

40

本明細書では、以下の構造を含む化合物であって、

【0008】

【化1】



式 (I)

50

【 0 0 0 9 】

式中、

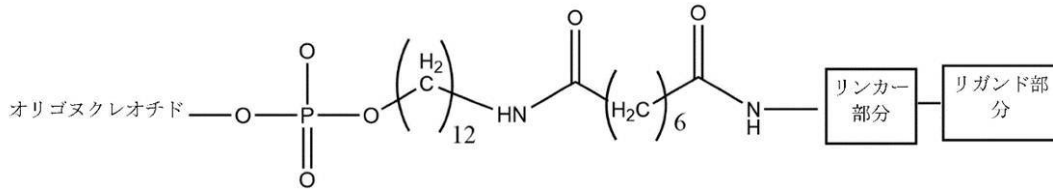
r 及び s が、独立して、1～16から選択される整数であり、
Z が、オリゴヌクレオチド部分である、化合物が提供される。

【 0 0 1 0 】

本明細書では、式 (I I) の化合物が提供される：

【 0 0 1 1 】

【化 2】



10

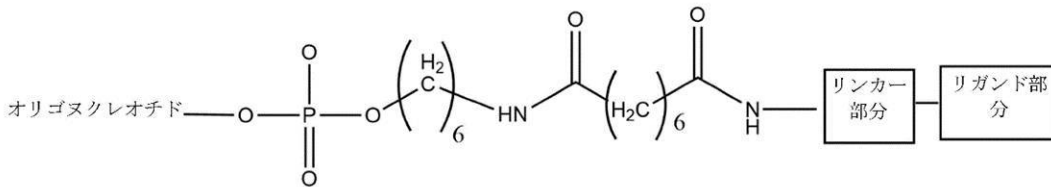
式 (I I)

【 0 0 1 2 】

本明細書では、式 (I I I) の化合物が提供される：

【 0 0 1 3 】

【化 3】



20

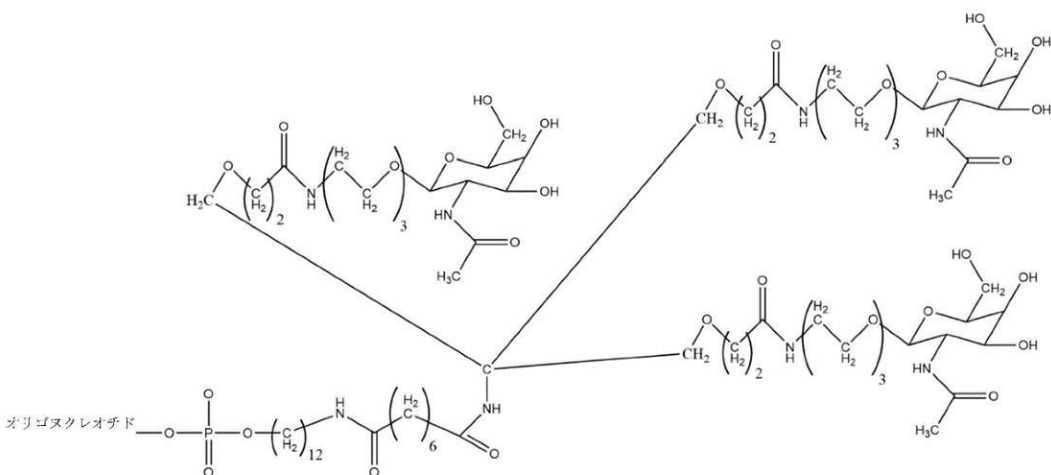
式 (I I I)

【 0 0 1 4 】

本明細書では、式 (V I I I) の化合物が提供される：

【 0 0 1 5 】

【化 4】



30

40

式 (V I I I)

【 0 0 1 6 】

本明細書では、式 (I X) の化合物が提供される：

【 0 0 1 7 】

50

10

20

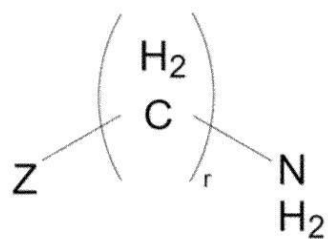
30

40

50

【 0 0 2 3 】

【 化 8 】



式 (X)

10

【 0 0 2 4 】

式中、

 r が、独立して、1 ～ 1 6 から選択される整数であり、 Z が、オリゴヌクレオチド部分である、化合物が提供される。

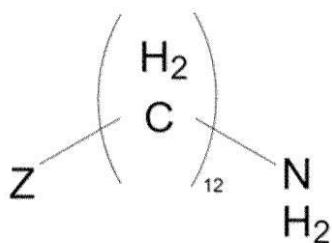
【 0 0 2 5 】

本明細書では、式 (X a) の化合物が提供される：

【 0 0 2 6 】

【 化 9 】

20



式 (X a)

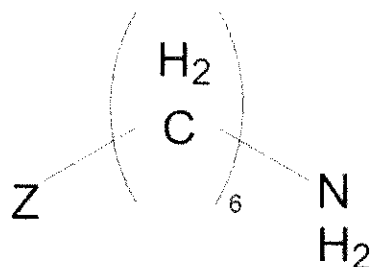
【 0 0 2 7 】

本明細書では、式 (X b) の化合物が提供される：

【 0 0 2 8 】

【 化 1 0 】

30



式 (X b)

40

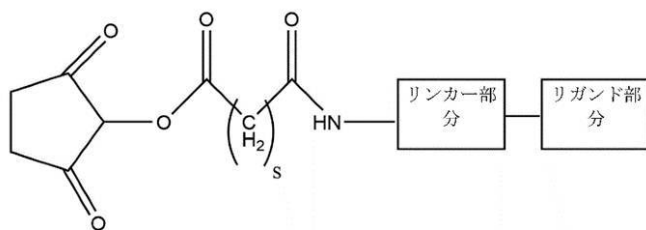
【 0 0 2 9 】

本明細書では、式 (X I) の化合物であって、

【 0 0 3 0 】

50

【化 1 1】



式 (X I)

10

【0 0 3 1】

式中、

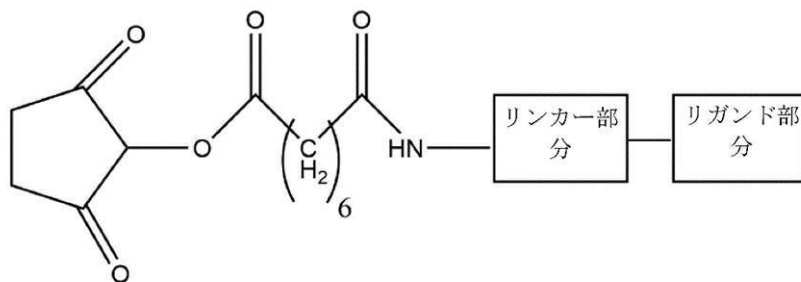
s が、独立して、1～16から選択される整数であり、
 Z が、オリゴヌクレオチド部分である、化合物が提供される。

【0 0 3 2】

本明細書では、式 (X I a) の化合物が提供される：

【0 0 3 3】

【化 1 2】



式 (X I a)

20

【0 0 3 4】

本明細書では、式 (X I b) の化合物が提供される：

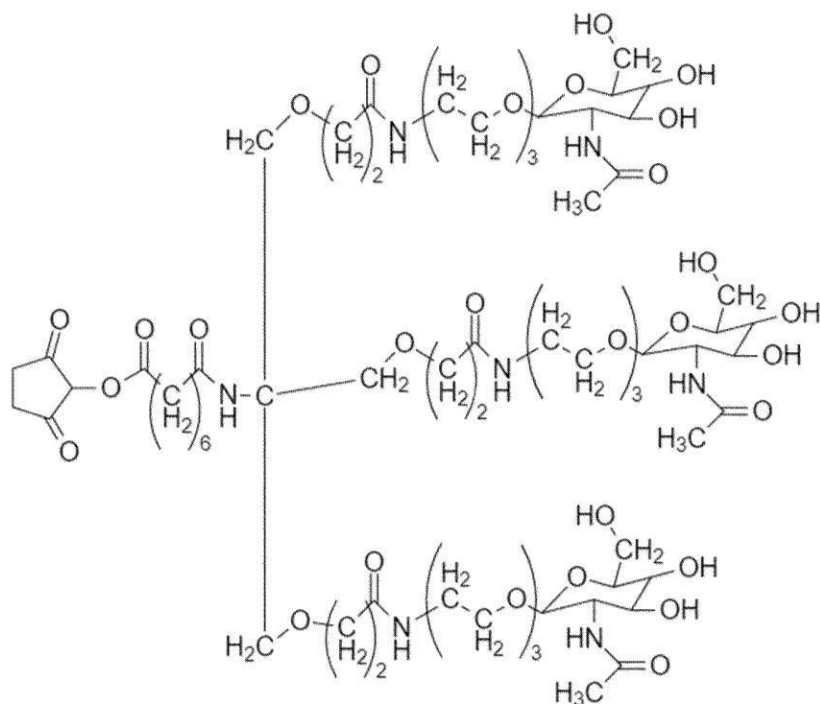
30

【0 0 3 5】

40

50

【化 1 3】



式 (X1b)

【0036】

本明細書では、本明細書の任意の場所に記載の化合物の調製のための、本明細書の任意の場所に記載の化合物の使用が提供される。

【0037】

本明細書では、本明細書の任意の場所に記載のプロセスによって得られたか、又は得ることができる化合物が提供される。

【0038】

本明細書では、薬学的に許容される担体、希釈剤、又は賦形剤とともに、本明細書の任意の場所に記載の化合物から構成される医薬組成物が提供される。

【0039】

本明細書では、療法における使用のための、本明細書の任意の場所に記載の化合物が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0040】

【図1】合計45個のヒト由来がん細胞溶解物及び初代ヒト肝細胞（PHH）の溶解物におけるhsC5 mRNA発現レベルの分析を示す。mRNA発現レベルは、相対光単位[RLU]で示される。

【図2】合計45個のヒト由来がん細胞溶解物及び初代ヒト肝細胞（PHH）の溶解物におけるhsHAO1 mRNA発現レベルの分析を示す。mRNA発現レベルは、相対光単位[RLU]で示される。

【図3】合計45個のヒト由来がん細胞溶解物及び初代ヒト肝細胞（PHH）の溶解物におけるhsTTR mRNA発現レベルの分析を示す。mRNA発現レベルは、相対光単位[RLU]で示される。

【図4A-D】実施例1におけるHepG2細胞におけるhsTTR標的化GalNAc-siRNAの用量応答分析の結果を示す。

【図5A-D】実施例1におけるHepG2細胞におけるhsC5標的化GalNAc-siRNAの用量応答分析の結果を示す。

【図6】培養中、各0時間後、24時間後、48時間後、及び72時間後の、初代ヒト肝

細胞 B H u f 1 6 0 8 7 (左)、C H F 2 1 0 1 (真ん中) 及び C y H u f 1 9 0 0 9 (右) の 3 つのバッチ全てにおける、h s T T R (上段)、h s C 5 (中段) 及び h s H A O 1 (下段) の m R N A 発現レベルの分析を示す。m R N A 発現レベルは、相対光単位 [R L U] で示される。

【図 7】培養中、各 0 時間後、24 時間後、48 時間後、及び 72 時間後の、初代ヒト肝細胞 B H u f 1 6 0 8 7 (左)、C H F 2 1 0 1 (真ん中)、及び C y H u f 1 9 0 0 9 (右) の 3 つのバッチ全てにおける、h s G A P D H (上段) 及び h s A H S A 1 (下段) の m R N A 発現レベルの分析を示す。m R N A 発現レベルは、相対光単位 [R L U] で示される。

【図 8 A - D】実施例 1 における P H H における h s H A O 1 標的化 G a l N A c - s i R N A の用量応答分析の結果を示す。10

【図 9 A - D】実施例 1 における P H H における h s C 5 標的化 G a l N A c - s i R N A の用量応答分析の結果を示す。

【図 10 A - D】実施例 1 における P H H における h s T T R 標的化 G a l N A c - s i R N A の用量応答分析の結果を示す。

【図 11】E T X 0 0 6 の単回用量マウス薬理学。H A O 1 m R N A の発現は、生理食塩水対照群に対して示される。各点は、3 匹のマウスの平均及び標準偏差を表す。

【図 12】E T X 0 0 6 の単回用量マウス薬理学。血清グリコレート濃度を示す。各点は、5 匹のマウスの群に由来するベースライングリコレート濃度 (0 日目) を除いて、3 匹のマウスの平均及び標準偏差を表す。20

【図 13】E T X 0 1 5 の単回用量マウス薬理学。C 5 m R N A の発現は、生理食塩水対照群に対して示される。各点は、3 匹のマウスの平均及び標準偏差を表す。

【図 14】E T X 0 0 1 5 の単回用量マウス薬理学。血清 C 5 濃度は、生理食塩水対照群に対して示される。各点は、3 匹のマウスの平均及び標準偏差を表す。

【図 15】E T X 0 2 4 の単回用量 N H P 薬理学。血清 T T R 濃度は、研究の 1 日目に対して示される。各点は、3 匹の動物の平均及び標準偏差を表す。

【図 16】E T X 0 2 0 の単回用量 N H P 薬理学。血清 T T R 濃度は、研究の 1 日目及び投薬前に対して示される。各点は、3 匹の動物の平均及び標準偏差を表す。最大 84 日間の時点が示される。

【図 17】E T X 0 2 2 の単回用量 N H P 薬理学。血清 T T R 濃度は、研究の 1 日目及び投薬前に対して示される。各点は、3 匹の動物の平均及び標準偏差を表す。最大 84 日間の時点が示される。30

【図 18 a】E T X 0 2 4 の単回用量 N H P 薬理学。血清 T T R 濃度は、研究の 1 日目及び投薬前に対して示される。各点は、3 匹の動物の平均及び標準偏差を表す。最大 84 日間の時点が示される。

【図 18 b】E T X 0 2 4 の単回 1 m g / k g 用量後の肝臓における T T R 遺伝子発現の持続的な抑制。T T R m R N A は、投薬前に測定されたベースラインレベルに対して示される。各点は、3 匹の動物の平均及び標準偏差を表す。最大 84 日間の時点が示される。

【図 18 c】単回 1 m g / k g 用量の E T X 0 2 4 を投薬された動物の体重。各点は、3 匹の動物の平均及び標準偏差を表す。最大 84 日間の時点が示される。40

【図 18 d】単回 1 m g / k g 用量の E T X 0 2 4 で処置された動物由来の血清中の A L T 濃度。各点は、3 匹の動物の平均及び標準偏差を表す。点線は、本種について正常とみなされる値の範囲を示す (P a r k e t a l . 2 0 1 6 R e f e r e n c e v a l u e s o f c l i n i c a l p a t h o l o g y p a r a m e t e r i n c y n o m o l g u s m o n k e y s u s e d i n p r e c l i n i c a l s t u d i e s . L a b A n i m R e s 3 2 : 7 9 - 8 6 .) 最大 84 日間の時点が示される。

【図 18 e】単回 1 m g / k g 用量の E T X 0 2 4 で処置された動物由来の血清中の A S T 濃度。各点は、3 匹の動物の平均及び標準偏差を表す。点線は、本種について正常とみ50

なされる値の範囲を示す (Park et al. 2016 Reference values of clinical pathology parameter in cynomolgus monkeys used in preclinical studies. Lab Anim Res 32:79-86。最大84日間の時点が示される。

【図19】ETX026の単回用量NHP薬理学。血清TTR濃度は、研究の1日目及び投薬前に対して示される。各点は、3匹の動物の平均及び標準偏差を表す。最大84日間の時点が示される。

【図20】ETX006、008、0015、0016、0024、及び0026のリンカー及びリガンド部分。

10

【図21】ETX002、004、0011、0013、0020、及び0022のリンカー及びリガンド部分。

【図22】単回1mg/kg用量のETX024で処置された動物由来の血清中の総ビリルビン濃度。各点は、3匹の動物の平均及び標準偏差を表す。陰影は、研究に使用される施設で正常とみなされる値の範囲を示す。点線は、本種について正常とみなされる値を示す (Park et al. 2016 Reference values of clinical pathology parameter in cynomolgus monkeys used in preclinical studies. Lab Anim Res 32:79-86。)

【図23】単回1mg/kg用量のETX024で処置された動物由来の血液尿素窒素 (BUN) 濃度。各点は、3匹の動物の平均及び標準偏差を表す。陰影は、研究に使用される施設で正常とみなされる値の範囲を示す。点線は、本種について正常とみなされる値を示す (Park et al. 2016 Reference values of clinical pathology parameter in cynomolgus monkeys used in preclinical studies. Lab Anim Res 32:79-86。)

20

【図24】単回1mg/kg用量のETX024で処置された動物由来のクレアチニン (CREA) 濃度。各点は、3匹の動物の平均及び標準偏差を表す。陰影は、研究に使用される施設で正常とみなされる値の範囲を示す。点線は、本種について正常とみなされる値を示す (Park et al. 2016 Reference values of clinical pathology parameter in cynomolgus monkeys used in preclinical studies. Lab Anim Res 32:79-86。)

30

【図25-27】以下でより詳細に記載される。

【図28】本明細書に開示される式の詳細を示す。

【図29】図29aは、本明細書に記載の構築物ETX002のセンス (SS) 及びアンチセンス (AS) 鎖の基礎となるヌクレオチド配列を示す。ETX002については、galnacリンカーが、使用中のセンス鎖の5'末端領域に結合している (図29aには示されていない)。ETX002については、図21に示すようにgalnacリンカーが結合している。以下の段落における図29aへの言及は、ETX002の配列、構築物設計及び修飾パターンへの言及である。図29aのセンス鎖の3'末端領域に示されるiaiaは、(i)センス鎖の3'末端領域で末端から2番目及び末端のヌクレオチドとして提供される2つの脱塩基ヌクレオチドを表し、(ii)センス鎖の末端から3番目のヌクレオチド (すなわち、センス鎖の21位のA、1位はセンス鎖の5'末端ヌクレオチド、すなわち、センス鎖の5'末端領域の末端のGである) と、隣接する末端から2番目の脱塩基残基との間に、3'-3'逆連結が提供され、(iii)末端の脱塩基ヌクレオチドと末端から2番目の脱塩基ヌクレオチドとの間の連結は、末端及び末端から2番目の脱塩基ヌクレオチドを含む3'末端領域に向かって読み取ると、5'-3'である。図29aのセンス鎖について、センス鎖の1位 (センス鎖の5'末端ヌクレオチド、すなわち、センス鎖の5'末端領域の末端のGである) から読み取る場合、したがって、(i) 1~6

40

50

、8、及び12～21位のヌクレオチドは、2' O-メチル修飾された糖を有し、(ii) 7及び9～11位のヌクレオチドは、2' F修飾された糖を有し、(iii) 脱塩基ヌクレオチドは、1位及び2位にHを有する糖を有する。図29aのアンチセンス鎖について、アンチセンス鎖の1位(アンチセンス鎖の5'末端ヌクレオチド、すなわち、アンチセンス鎖の5'末端領域の末端のUである)から読み取る場合、したがって、(i) 1、3～5、7、10～13、15、17～23位のヌクレオチドは、2' O-メチル修飾された糖を有し、(ii) 2、6、8、9、14、16位のヌクレオチドは、2' F修飾された糖を有する。本明細書に記載のETX004は、図29aのETX002に示されるものと同じ基礎配列並びにgalnacリンカー及び結合を有するが、末端iaiaモチーフを含まず、ヌクレオチドの糖上に完全に交互になる2' O-メチル/2' F修飾パターンを有する。センス鎖については、完全に交互になる修飾パターンは、センス鎖の5'末端領域での1位の2' F修飾から始まる。アンチセンス鎖については、完全に交互になる修飾パターンは、アンチセンス鎖の5'末端領域での1位の2' O-メチル修飾から始まる。図29bは、本明細書に記載の構築物ETX006のセンス(SS)及びアンチセンス(AS)鎖の基礎となるヌクレオチド配列を示す。ETX006については、galnacリンカーが、使用中のセンス鎖の3'末端領域に結合している(図29bには示されていない)。ETX006については、図20に示すようにgalnacリンカーが結合している。以下の段落における図29bへの言及は、ETX006の配列、構築物設計及び修飾パターンへの言及である。図29bのセンス鎖の5'末端領域に示されるiaiaは、(i) センス鎖の5'末端領域で末端から2番目及び末端のヌクレオチドとして提供される2つの脱塩基ヌクレオチドを表し、(ii) センス鎖の末端から3番目のヌクレオチド(すなわち、センス鎖の1位のG、センス鎖上のヌクレオチド位置番号付けにおけるセンス鎖の5'末端領域のiaiaモチーフは含まない)と、隣接する末端から2番目の脱塩基残基との間に、5'-5'逆連結が提供され、(iii) 末端の脱塩基ヌクレオチドと末端から2番目の脱塩基ヌクレオチドとの間の連結は、末端及び末端から2番目の脱塩基ヌクレオチドを含む5'末端領域に向かって読み取ると、3'-5'である。図29bのセンス鎖について、センス鎖の1位(センス鎖の5'末端ヌクレオチド、すなわちセンス鎖の5'末端領域の末端のGであり、センス鎖上のヌクレオチド位置番号付けにおいてセンス鎖の5'末端領域のiaiaモチーフを含まない)から読み取る場合、したがって、(i) 1～6、8、及び12～21位のヌクレオチドは、2' O-メチル修飾された糖を有し、(ii) 7及び9～11位のヌクレオチドは、2' F修飾された糖を有し、(iii) 脱塩基ヌクレオチドは、1位及び2位にHを有する糖を有する。図29bのアンチセンス鎖について、アンチセンス鎖の1位(アンチセンス鎖の5'末端ヌクレオチド、すなわち、アンチセンス鎖の5'末端領域の末端のUである)から読み取る場合、したがって、(i) 1、3～5、7、10～13、15、17～23位のヌクレオチドは、2' O-メチル修飾された糖を有し、(ii) 2、6、8、9、14、16位のヌクレオチドは、2' F修飾された糖を有する。本明細書に記載のETX008は、図29bのETX006に示されるものと同じ基礎配列並びにgalnacリンカー及び結合を有するが、末端iaiaモチーフを含まず、ヌクレオチドの糖上に完全に交互になる2' O-メチル/2' F修飾パターンを有する。センス鎖については、完全に交互になる修飾パターンは、センス鎖の5'末端領域での1位の2' F修飾から始まる。アンチセンス鎖については、完全に交互になる修飾パターンは、アンチセンス鎖の5'末端領域での1位の2' O-メチル修飾から始まる。

【図30】図30aは、本明細書に記載の構築物ETX011のセンス(SS)及びアンチセンス(AS)鎖の基礎となるヌクレオチド配列を示す。ETX011については、galnacリンカーが、使用中のセンス鎖の5'末端領域に結合している(図30aには示されていない)。ETX011については、図21に示すようにgalnacリンカーが結合している。以下の段落における図30aへの言及は、ETX011の配列、構築物設計及び修飾パターンへの言及である。図30aのセンス鎖の3'末端領域に示されるiaiaは、(i) センス鎖の3'末端領域で末端から2番目及び末端のヌクレオチドと

して提供される2つの脱塩基ヌクレオチドを表し、(i i)センス鎖の末端から3番目のヌクレオチド(すなわち、センス鎖の21位のA、1位はセンス鎖の5'末端ヌクレオチド、すなわち、センス鎖の5'末端領域の末端のAである)と、隣接する末端から2番目の脱塩基残基との間に、3'-3'逆連結が提供され、(i i i)末端の脱塩基ヌクレオチドと末端から2番目の脱塩基ヌクレオチドとの間の連結は、末端及び末端から2番目の脱塩基ヌクレオチドを含む3'末端領域に向かって読み取ると、5'-3'である。図30aのセンス鎖について、センス鎖の1位(センス鎖の5'末端ヌクレオチド、すなわち、センス鎖の5'末端領域の末端のAである)から読み取る場合、したがって、(i)1、2、4、6、8、12、14、15、17、19~21位のヌクレオチドは、2'オームethyl修飾された糖を有し、(i i)3、5、7、9~11、13、16、18位のヌクレオチドは、2'F修飾された糖を有し、(i i i)脱塩基ヌクレオチドは、1位及び2位にHを有する糖を有する。図30aのアンチセンス鎖について、アンチセンス鎖の1位(アンチセンス鎖の5'末端ヌクレオチド、すなわち、アンチセンス鎖の5'末端領域の末端のUである)から読み取る場合、したがって、(i)1、4、6、7、9、11~13、15、17、19~23位のヌクレオチドは、2'オームethyl修飾された糖を有し、(i i)2、3、5、8、10、14、16、18位のヌクレオチドは、2'F修飾された糖を有し、(i i i)アンチセンス鎖の3'末端領域の24、25位の末端から2番目及び末端のTヌクレオチドは、2位にHを有する糖を有する。本明細書に記載のETX013は、図30aのETX011に示されるものと同じ基礎配列並びにgalnacリンカー及び結合を有するが、末端iaiaモチーフを含まず、ヌクレオチドの糖(2位にHを有する末端のTヌクレオチドを除く)上に完全に交互になる2'オームethyl/2'F修飾パターンを有する。センス鎖については、完全に交互になる修飾パターンは、センス鎖の5'末端領域での1位の2'F修飾から始まる。アンチセンス鎖については、完全に交互になる修飾パターンは、アンチセンス鎖の5'末端領域での1位の2'オームethyl修飾から始まる。図30bは、本明細書に記載の構築物ETX015のセンス(SS)及びアンチセンス(AS)鎖の基礎となるヌクレオチド配列を示す。ETX015については、galnacリンカーが、使用中のセンス鎖の3'末端領域に結合している(図30bには示されていない)。ETX015については、図20に示すようにgalnacリンカーが結合している。以下の段落における図30bへの言及は、ETX015の配列、構築物設計及び修飾パターンへの言及である。図30bのセンス鎖の5'末端領域に示されるiaiaは、(i)センス鎖の5'末端領域で末端から2番目及び末端のヌクレオチドとして提供される2つの脱塩基ヌクレオチドを表し、(i i)センス鎖の末端から3番目のヌクレオチド(すなわち、センス鎖の1位のA、センス鎖上のヌクレオチド位置番号付けにおけるセンス鎖の5'末端領域のiaiaモチーフは含まない)と、隣接する末端から2番目の脱塩基残基との間に、5'-5'逆連結が提供され、(i i i)末端の脱塩基ヌクレオチドと末端から2番目の脱塩基ヌクレオチドとの間の連結は、末端及び末端から2番目の脱塩基ヌクレオチドを含む5'末端領域に向かって読み取ると、3'-5'である。図30bのセンス鎖について、センス鎖の1位(センス鎖の5'末端ヌクレオチド、すなわちセンス鎖の5'末端領域の末端のAであり、センス鎖上のヌクレオチド位置番号付けにおいてセンス鎖の5'末端領域のiaiaモチーフを含まない)から読み取る場合、したがって、(i)1、2、4、6、8、12、14、15、17、19~21位のヌクレオチドは、2'オームethyl修飾された糖を有し、(i i)3、5、7、9~11、13、16、18位のヌクレオチドは、2'F修飾された糖を有し、(i i i)脱塩基ヌクレオチドは、1位及び2位にHを有する糖を有する。図30bのアンチセンス鎖について、アンチセンス鎖の1位(アンチセンス鎖の5'末端ヌクレオチド、すなわち、アンチセンス鎖の5'末端領域の末端のUである)から読み取る場合、したがって、(i)1、4、6、7、9、11~13、15、17、19~23位のヌクレオチドは、2'オームethyl修飾された糖を有し、(i i)2、3、5、8、10、14、16、18位のヌクレオチドは、2'F修飾された糖を有し、(i i i)アンチセンス鎖の3'末端領域の24、25位の末端から2番目及び末端のTヌクレオチドは、2位にHを有する糖を有する。本明細書に

記載の E T X 0 1 7 は、図 3 0 b の E T X 0 1 5 に示されるものと同じ基礎配列並びに g a l n a c リンカー及び結合を有するが、末端 i a i a モチーフを含まず、ヌクレオチドの糖（2 位に H を有する末端の T ヌクレオチドを除く）上に完全に交互になる 2' オーメチル／2' F 修飾パターンを有する。センス鎖については、完全に交互になる修飾パターンは、センス鎖の 5' 末端領域での 1 位の 2' F 修飾から始まる。アンチセンス鎖については、完全に交互になる修飾パターンは、アンチセンス鎖の 5' 末端領域での 1 位の 2' オーメチル修飾から始まる。

【図 3 1】図 3 1 a は、本明細書に記載の構築物 E T X 0 2 0 のセンス（S S）及びアンチセンス（A S）鎖の基礎となるヌクレオチド配列を示す。E T X 0 2 0 については、g a l n a c リンカーが、使用中のセンス鎖の 5' 末端領域に結合している（図 3 1 a には示されていない）。E T X 0 2 0 については、図 2 1 に示すように g a l n a c リンカーが結合している。以下の段落における図 3 1 a への言及は、E T X 0 2 0 の配列、構築物設計及び修飾パターンへの言及である。図 3 1 a のセンス鎖の 3' 末端領域に示される i a i a は、(i) センス鎖の 3' 末端領域で末端から 2 番目及び末端のヌクレオチドとして提供される 2 つの脱塩基ヌクレオチドを表し、(i i) センス鎖の末端から 3 番目のヌクレオチド（すなわち、センス鎖の 2 1 位の A、1 位はセンス鎖の 5' 末端ヌクレオチド、すなわち、センス鎖の 5' 末端領域の末端の U である）と、隣接する末端から 2 番目の脱塩基残基との間に、3' - 3' 逆連結が提供され、(i i i) 末端の脱塩基ヌクレオチドと末端から 2 番目の脱塩基ヌクレオチドとの間の連結は、末端及び末端から 2 番目の脱塩基ヌクレオチドを含む 3' 末端領域に向かって読み取ると、5' - 3' である。図 3 1 a のセンス鎖について、センス鎖の 1 位（センス鎖の 5' 末端ヌクレオチド、すなわち、センス鎖の 5' 末端領域の末端の U である）から読み取る場合、したがって、(i) 1 ~ 6、8、及び 1 2 ~ 2 1 位のヌクレオチドは、2' オーメチル修飾された糖を有し、(i i) 7 及び 9 ~ 1 1 位のヌクレオチドは、2' F 修飾された糖を有し、(i i i) 脱塩基ヌクレオチドは、1 位及び 2 位に H を有する糖を有する。図 3 1 a のアンチセンス鎖について、アンチセンス鎖の 1 位（アンチセンス鎖の 5' 末端ヌクレオチド、すなわち、アンチセンス鎖の 5' 末端領域の末端の U である）から読み取る場合、したがって、(i) 1、3 ~ 5、7、8、1 0 ~ 1 3、1 5、1 7 ~ 2 3 位のヌクレオチドは、2' オーメチル修飾された糖を有し、(i i) 2、6、9、1 4、1 6 位のヌクレオチドは、2' F 修飾された糖を有する。本明細書に記載の E T X 0 2 2 は、図 3 1 a の E T X 0 2 0 に示されるものと同じ基礎配列並びに g a l n a c リンカー及び結合を有するが、末端 i a i a モチーフを含まず、ヌクレオチドの糖上に完全に交互になる 2' オーメチル／2' F 修飾パターンを有する。センス鎖については、完全に交互になる修飾パターンは、センス鎖の 5' 末端領域での 1 位の 2' F 修飾から始まる。アンチセンス鎖については、完全に交互になる修飾パターンは、アンチセンス鎖の 5' 末端領域での 1 位の 2' オーメチル修飾から始まる。図 3 1 b は、本明細書に記載の構築物 E T X 0 2 4 のセンス（S S）及びアンチセンス（A S）鎖の基礎となるヌクレオチド配列を示す。E T X 0 2 4 については、g a l n a c リンカーが、使用中のセンス鎖の 3' 末端領域に結合している（図 3 1 b には示されていない）。E T X 0 2 4 については、図 2 0 に示すように g a l n a c リンカーが結合している。以下の段落における図 3 1 b への言及は、E T X 0 2 4 の配列、構築物設計及び修飾パターンへの言及である。図 3 1 b のセンス鎖の 5' 末端領域に示される i a i a は、(i) センス鎖の 5' 末端領域で末端から 2 番目及び末端のヌクレオチドとして提供される 2 つの脱塩基ヌクレオチドを表し、(i i) センス鎖の末端から 3 番目のヌクレオチド（すなわち、センス鎖の 1 位の U、センス鎖上のヌクレオチド位置番号付けにおけるセンス鎖の 5' 末端領域の i a i a モチーフは含まない）と、隣接する末端から 2 番目の脱塩基残基との間に、5' - 5' 逆連結が提供され、(i i i) 末端の脱塩基ヌクレオチドと末端から 2 番目の脱塩基ヌクレオチドとの間の連結は、末端及び末端から 2 番目の脱塩基ヌクレオチドを含む 5' 末端領域に向かって読み取ると、3' - 5' である。図 3 1 b のセンス鎖について、センス鎖の 1 位（センス鎖の 5' 末端ヌクレオチド、すなわちセンス鎖の 5' 末端領域の末端の U であり、センス鎖上のヌクレオチド位置番号付けにお

てセンス鎖の 5' 末端領域の *i a i a* モチーフを含まない) から読み取る場合、したがって、(i) 1~6、8、及び 12~21 位のヌクレオチドは、2' オーメチル修飾された糖を有し、(ii) 7 及び 9~11 位のヌクレオチドは、2' F 修飾された糖を有し、(iii) 脱塩基ヌクレオチドは、1 位及び 2 位に H を有する糖を有する。図 31b のアンチセンス鎖について、アンチセンス鎖の 1 位 (アンチセンス鎖の 5' 末端ヌクレオチド、すなわち、アンチセンス鎖の 5' 末端領域の末端の U である) から読み取る場合、したがって、(i) 1、3~5、7、8、10~13、15、17~23 位のヌクレオチドは、2' オーメチル修飾された糖を有し、(ii) 2、6、9、14、16 位のヌクレオチドは、2' F 修飾された糖を有する。本明細書に記載の ETX026 は、図 31b の ETX024 に示されるものと同じ基礎配列並びに *g a l n a c* リンカー及び結合を有するが、末端 *i a i a* モチーフを含まず、ヌクレオチドの糖上に完全に交互になる 2' オーメチル/2' F 修飾パターンを有する。センス鎖については、完全に交互になる修飾パターンは、センス鎖の 5' 末端領域での 1 位の 2' F 修飾から始まる。アンチセンス鎖については、完全に交互になる修飾パターンは、アンチセンス鎖の 5' 末端領域での 1 位の 2' オーメチル修飾から始まる。

10

【発明を実施するための形態】

【0041】

本発明は、新規のリガンドコンジュゲートオリゴヌクレオチド化合物、それらの化合物の作製方法、及びその使用を提供する。

20

【0042】

本発明の化合物は、本明細書に開示されるオリゴヌクレオチド部分及び/若しくはリンカー及び/若しくはリガンド部分、又はそれらの一部を含む。好ましくは、本発明の化合物は、オリゴヌクレオチド部分、リンカー、及びリガンド部分を含む。これらの部分は、オリゴヌクレオチド部分がリンカーを介してリガンド部分に共有結合するように、ともに共有結合し得る。

【0043】

本発明の化合物は、本明細書の任意の場所に記載の任意のオリゴヌクレオチド部分、及び/又は本明細書の任意の場所に記載の任意のリンカー、及び/又は本明細書の任意の場所に記載の任意のリガンド部分を組み合わせることができることが理解されよう。

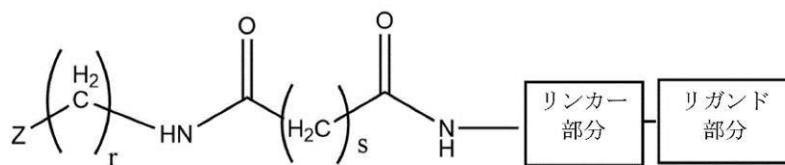
30

【0044】

本発明の例示的な化合物は、以下の一般的な構造であって、

【0045】

【化 14】



式 (I)

40

【0046】

式中、

r 及び s が、独立して、1~16 から選択される整数であり、

Z が、オリゴヌクレオチド部分である、構造を含む。

【0047】

1. リガンド部分

本発明の例示的な化合物は、式 (I) に示される「リガンド部分」を含む。

【0048】

いくつかの実施形態では、式 (I) に示されるリガンド部分は、1 つ以上のリガンドを含む。

50

【0049】

いくつかの実施形態では、式（I）に示されるリガンド部分は、1つ以上の炭水化物リガンドを含む。

【0050】

いくつかの実施形態では、1つ以上の炭水化物は、単糖類、二糖類、三糖類、四糖類、オリゴ糖類及び／又は多糖類であり得る。

【0051】

いくつかの実施形態では、1つ以上の炭水化物は、1つ以上のガラクトース部分、1つ以上のラクトース部分、1つ以上のN-アセチルガラクトサミン部分、及び／又は1つ以上のマンノース部分を含む。

10

【0052】

いくつかの実施形態では、1つ以上の炭水化物は、1つ以上のN-アセチル-ガラクトサミン部分を含む。

【0053】

いくつかの実施形態では、本明細書の任意の場所に記載の化合物は、2又は3個のN-アセチルガラクトサミン部分を含む。

【0054】

いくつかの実施形態では、1つ以上のリガンドは、線形構成又は分岐構成で結合しており、例えば、各構成は、全体的なリンカー内の分岐点にそれぞれ結合している。

【0055】

20

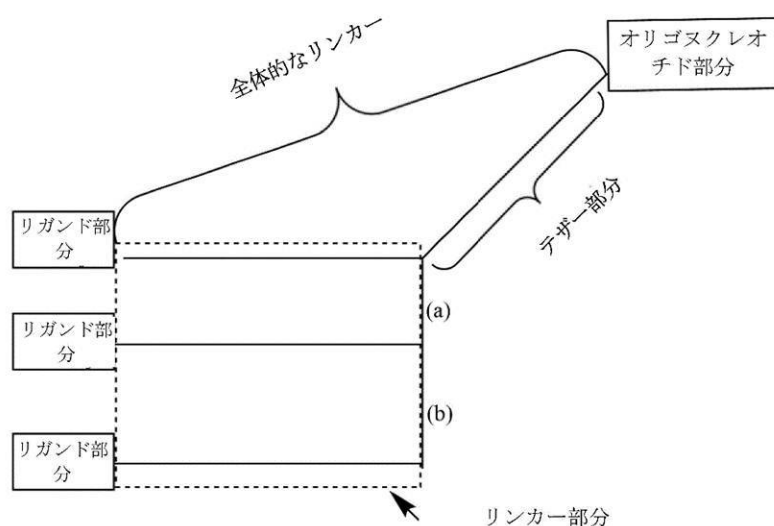
以下のセクション2、3、及び4で更に説明されるような命名法を使用して、リガンド部分の例示的な線形構成又は分岐構成を以下のように示すことができる。

【0056】

例示的な線形構成：

【0057】

【化15】



30

【0058】

式中、（a）及び／又は（b）は、典型的には、ホスフェート又はホスホロチオエート基などの結合又は基を表すことができ、点線ボックスは、リンカー部分を包含する。

【0059】

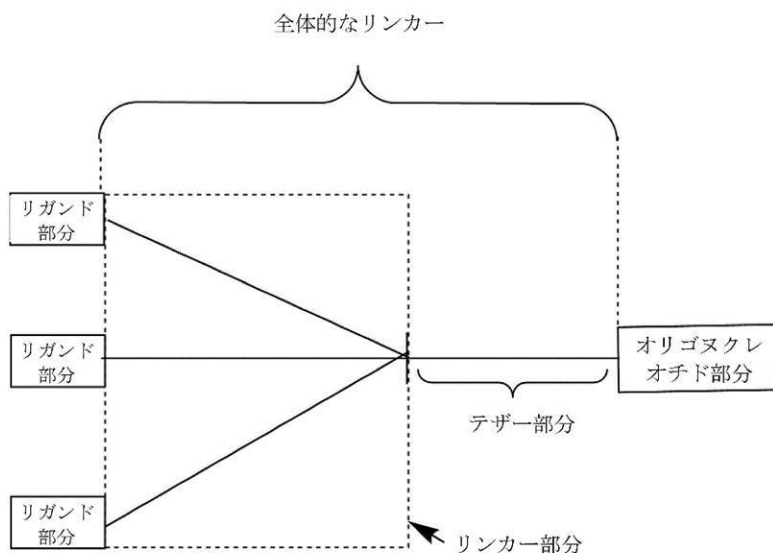
例示的な分岐構成：

【0060】

40

50

【化 1 6】



10

【0061】

式中、点線ボックスはリンカー部分を包含する。

【0062】

いくつかの実施形態では、1つ以上のリガンドは、二分岐又は三分岐の分岐構成として結合している。典型的には、N-アセチルガラクトサミン三分岐の分岐構成などの三分岐構成が好ましい場合がある。

20

【0063】

2. リンカー

本発明の例示的な化合物は、全体的な「リンカー」の一部である、式(I)に示される「リンカー部分」を含む。

【0064】

当該技術分野で更に理解されるように、本発明の例示的な化合物は、これらの化合物のオリゴヌクレオチド部分とリガンド部分との間に位置する全体的なリンカーを含む。全体のリンカーは、それによって、オリゴヌクレオチド部分とリガンド部分とを互いに「連結する」。

30

【0065】

全体的なリンカーは、多くの場合、1つ以上のリンカー構築ブロックを含むと概念上想定される。例えば、リガンド部分に隣接して配置され、典型的には分岐点を介して、リガンド部分を、オリゴヌクレオチド部分に直接又は間接的に結合する、式(I)に表される「リンカー部分」として示されるリンカー部分が存在する。式(I)に示されるリンカー部分はまた、多くの場合、全体のリンカーの「リガンドアーム又はアーム」と称され得る。必ずしもそうではないが、オリゴヌクレオチド部分と分岐点との間には、オリゴヌクレオチド部分をコンジュゲート化合物の残りの部分に「つなぐ」、多くの場合、全リンカーの「テザー部分」と呼ばれる、更なるリンカー部分も存在し得る。かかる「リガンドアーム」及び／又は「リンカー部分」及び／又は「テザー部分」は、上記の線形及び／又は分岐構成を参照することによって想定され得る。

40

【0066】

特許請求の範囲及び特許明細書の残りの部分から分かるように、本発明の範囲は、線形又は分岐構成にまで及び、存在し得る個々のリガンドの数に限定されない。更に、受け取る者はまた、最先端技術及びオリゴヌクレオチド化学者の専門知識に基づいて、リンカー部分として使用され得る多くの構造が存在することを認識するであろう。

【0067】

特許請求の範囲に記載される全体的なリンカーの残りの部分（リンカー部分を除く）、

50

及び特許明細書の残りの部分は、本発明者が本発明に特に特有であると考える式（Ⅰ）におけるその化学構成要素によって示される。しかしながら、より一般的な用語では、これらの化学構成要素は、本明細書に前に記載される「テザー部分」として説明され得、「テザー部分」は、式（Ⅰ）に示される Z、すなわちオリゴヌクレオチド部分と、リンカー部分との間の原子の基を含む全体的なリンカーの部分である。

【0068】

2.1 テザー部分

式（Ⅰ）に関して、「テザー部分」は、Z、すなわちオリゴヌクレオチド部分と、リンカー部分との間の原子の基を含む。

【0069】

いくつかの実施形態では、s は、4～12 から選択される整数である。いくつかの実施形態では、s は、6 である。

【0070】

いくつかの実施形態では、r は、4～14 から選択される整数である。いくつかの実施形態では、r は、6 である。いくつかの実施形態では、r は、12 である。

【0071】

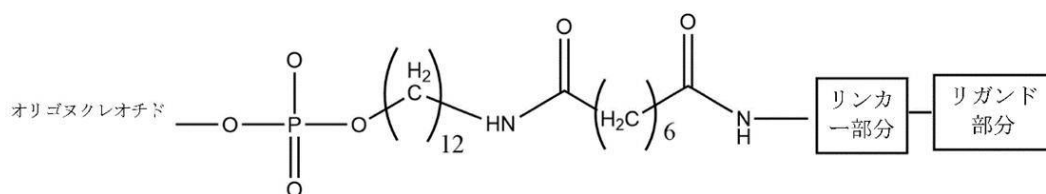
いくつかの実施形態において、r は、12 であり、s は、6 である。

【0072】

したがって、いくつかの実施形態では、本発明の例示的な化合物は、以下の構造を含む：

【0073】

【化17】



式（ⅠⅠ）

【0074】

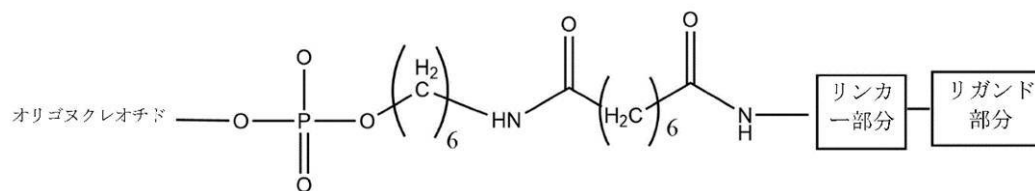
いくつかの実施形態において、r は、6 であり、s は、6 である。

【0075】

したがって、いくつかの実施形態では、本発明の例示的な化合物は、以下の構造を含む：

【0076】

【化18】



式（ⅠⅠⅠ）

【0077】

2.2 リンカー部分

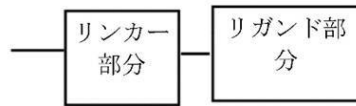
式（Ⅰ）に関して、式（Ⅰ）に示される「リンカー部分」は、本明細書の任意の場所に記載のテザー部分と、本明細書の任意の場所に記載のリガンド部分との間に位置する原子の基を含む。

【 0 0 7 8 】

いくつかの実施形態では、本明細書の任意の場所に記載の式（Ⅰ）に示される部分：

【 0 0 7 9 】

【 化 1 9 】

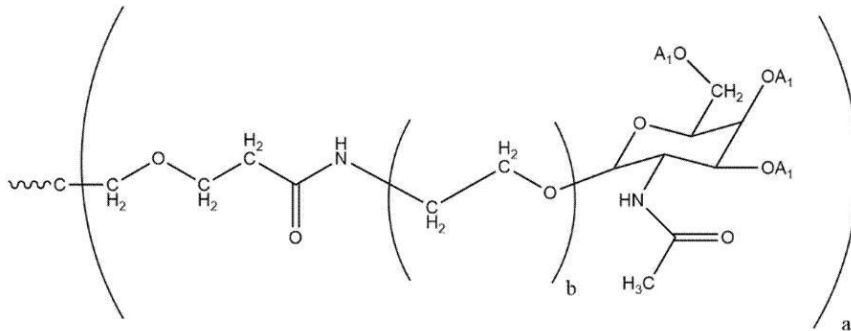


【 0 0 8 0 】

は、式（Ⅳ）、（Ⅴ）、又は（Ⅵ）：

【 0 0 8 1 】

【 化 2 0 】



式（Ⅳ）

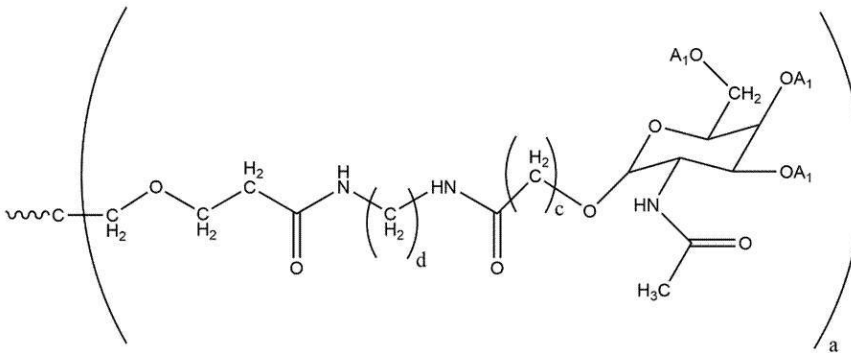
【 0 0 8 2 】

（式中、

 A_I が、水素、又は好適なヒドロキシ保護基であり、 a が、2又は3の整数であり、 b が、2～5の整数である）、又は

【 0 0 8 3 】

【 化 2 1 】



式（Ⅴ）

【 0 0 8 4 】

（式中、

 A_I が、水素、又は好適なヒドロキシ保護基であり、 a が、2又は3の整数であり、 c 及び d が、独立して、1～6の整数である）、又は

【 0 0 8 5 】

10

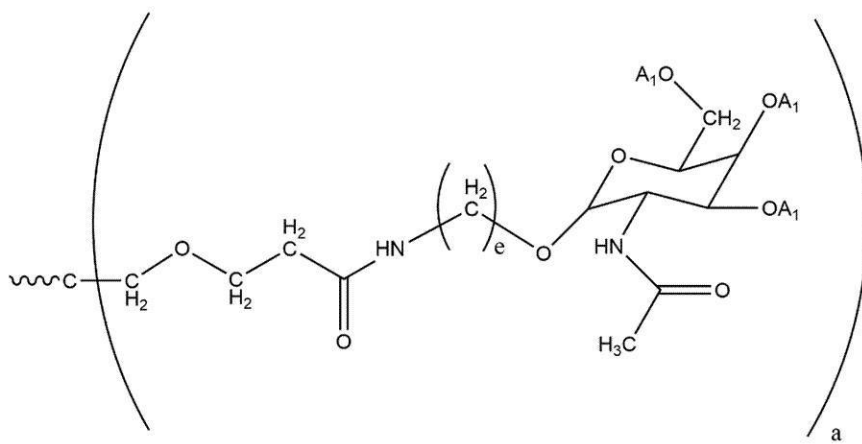
20

30

40

50

【化 2 2】



式 (V I)

10

【0086】

(式中、

 A_1 が、水素、又は好適なヒドロキシ保護基であり、 a が、2 又は3の整数であり、 e が、2～10の整数である)のうちのいずれか、好ましくは式 (I V) である。

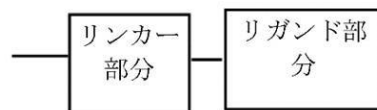
20

【0087】

いくつかの実施形態では、式 (I) に示される部分：

【0088】

【化 2 3】



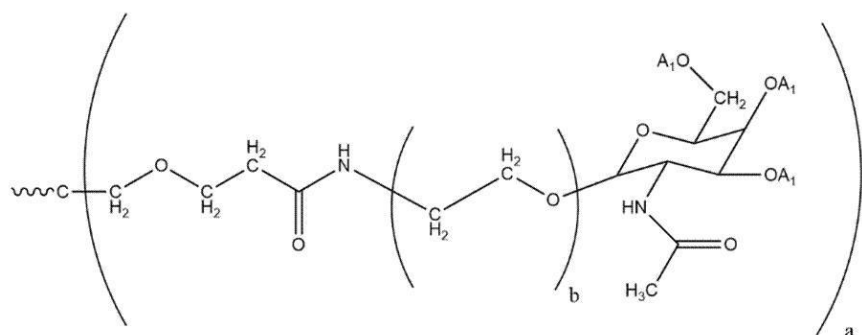
【0089】

は、式 (V I a) であり、

30

【0090】

【化 2 4】



式 (V I a)

40

【0091】

式中、

 A_1 が、水素、又は好適なヒドロキシ保護基であり、 a が、3であり、 b が、3の整数である。

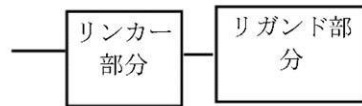
【0092】

50

いくつかの実施形態では、本明細書の任意の場所に記載の式（Ⅰ）に示される部分：

【0093】

【化25】

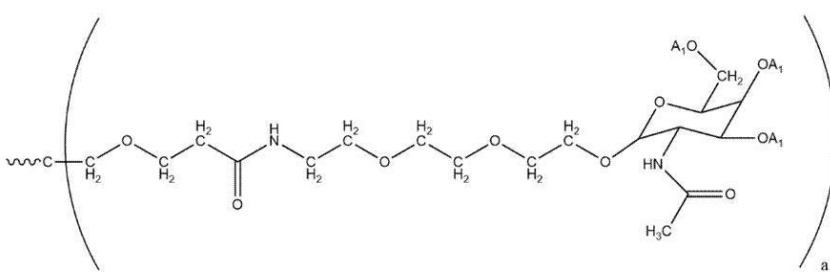


【0094】

は、式（ⅤⅠⅠ）であり、

【0095】

【化26】



式（ⅤⅠⅠ）

【0096】

式中、

A_1 が、水素であり、

a が、2又は3の整数である。

【0097】

いくつかの実施形態では、 $a = 2$ である。いくつかの実施形態では、 $a = 3$ である。いくつかの実施形態では、 $b = 3$ である。

【0098】

3. オリゴヌクレオチド部分

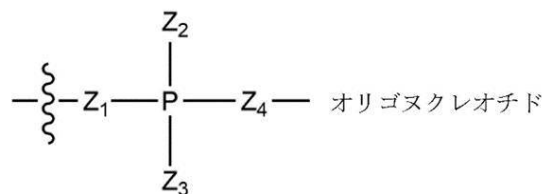
本発明の例示的な化合物は、式（Ⅰ）において「Z」として示されるオリゴヌクレオチド部分を含む。

【0099】

いくつかの実施形態では、Zは、以下であり、

【0100】

【化27】



【0101】

式中、

Z_1 、 Z_2 、 Z_3 、 Z_4 が、各出現で独立して、酸素又は硫黄であり、

Pと Z_2 との間、及びPと Z_3 との間の一方の結合が、単結合であり、他方の結合は、二重結合である。

【0102】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を調節することが

10

20

30

40

50

できるRNA化合物である。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を阻害することができるRNA化合物である。

【0103】

いくつかの実施形態では、RNA化合物は、第1及び第2の鎖を含むRNA二本鎖を含み、第1の鎖が、標的遺伝子のRNA配列に少なくとも部分的に相補的であり、第2の鎖が、当該第1の鎖に少なくとも部分的に相補的であり、第1及び第2の鎖の各々が、5'及び3'末端を有する。

【0104】

いくつかの実施形態では、第1の鎖は、第1の鎖の長さにわたって100%相補的など、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%相補的など、標的遺伝子のRNA配列に少なくとも80%相補的である。

10

【0105】

いくつかの実施形態では、RNA化合物は、その第2の鎖の5'末端で、隣接するホスフェートに結合する。

【0106】

いくつかの実施形態では、RNA化合物は、その第2の鎖の3'末端で、隣接するホスフェートに結合する。

【0107】

RNA化合物が第2の鎖の5'末端に結合している場合、オリゴヌクレオチドをリンカー部分に接続するホスフェート基（すなわち、Z₁、Z₂Z₃及びZ₄に接続した「P」）は、オリゴヌクレオチドの5'末端リボースからの天然に生じるホスフェート基であることが理解されるであろう。

20

【0108】

RNA化合物が第2の鎖の3'末端に結合している場合、オリゴヌクレオチドをリンカー部分に接続するホスフェート基（すなわち、Z₁、Z₂Z₃及びZ₄に接続した「P」）は、3'位に天然に存在するヒドロキシ基を置換するようにオリゴヌクレオチドの3'末端リボースに対して操作されることが理解されるであろう。

【0109】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、2'位で修飾された1つ以上のリボースを更に含むRNA二本鎖を含む。いくつかの実施形態では、RNA二本鎖は、2'位で修飾された複数のリボースを含む。いくつかの実施形態では、修飾は、2'-O-メチル、2'-デオキシフルオロ、及び2'-デオキシから選択される。

30

【0110】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、1つ以上の末端に1つ以上の分解保護部分を更に含む。いくつかの実施形態では、当該1つ以上の分解保護部分は、リンカー／リガンド部分を担持するオリゴヌクレオチド鎖の末端に存在しない。いくつかの実施形態では、当該1つ以上の分解保護部分は、式(I)、(VII)、(IX)、(X)又は(XI)に示される化合物の残りの部分に隣接するオリゴヌクレオチド鎖の末端に存在しない。いくつかの実施形態では、当該1つ以上の分解保護部分は、ホスホロチオエートヌクレオチド間連結、ホスホロジチオエートヌクレオチド間連結、及び逆脱塩基ヌクレオチドから選択され、当該逆脱塩基ヌクレオチドが、リンカー／リガンド部分を担持する末端に対して、同じ鎖の遠方の末端に存在する。

40

【0111】

4. 例示的な化合物

本発明の化合物は、本明細書の任意の場所に記載の任意のオリゴヌクレオチド部分、本明細書の任意の場所に記載の任意のリンカー部分、及び／若しくは本明細書の任意の場所に記載の任意のリガンド部分、又はそれらの一部を組み合わせる。

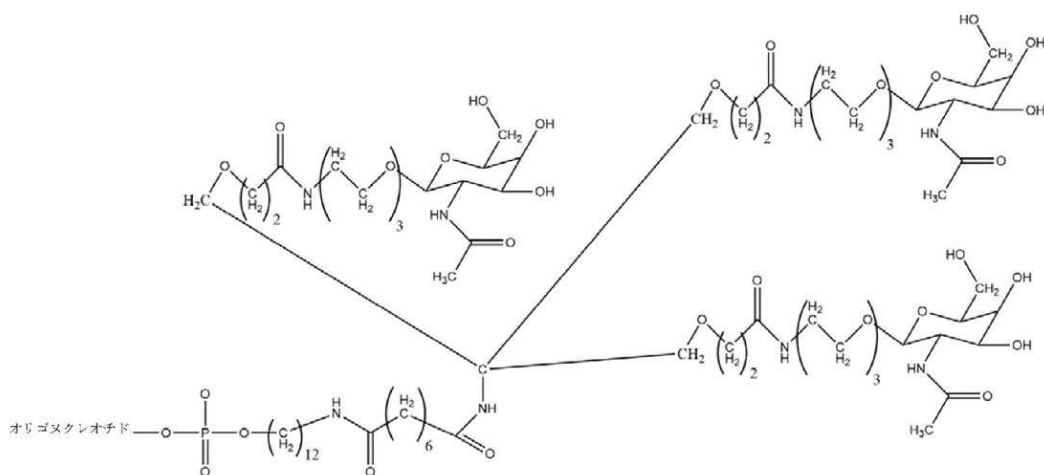
【0112】

50

いくつかの実施形態では、化合物は、式（VII）を含む：

【0113】

【化28】



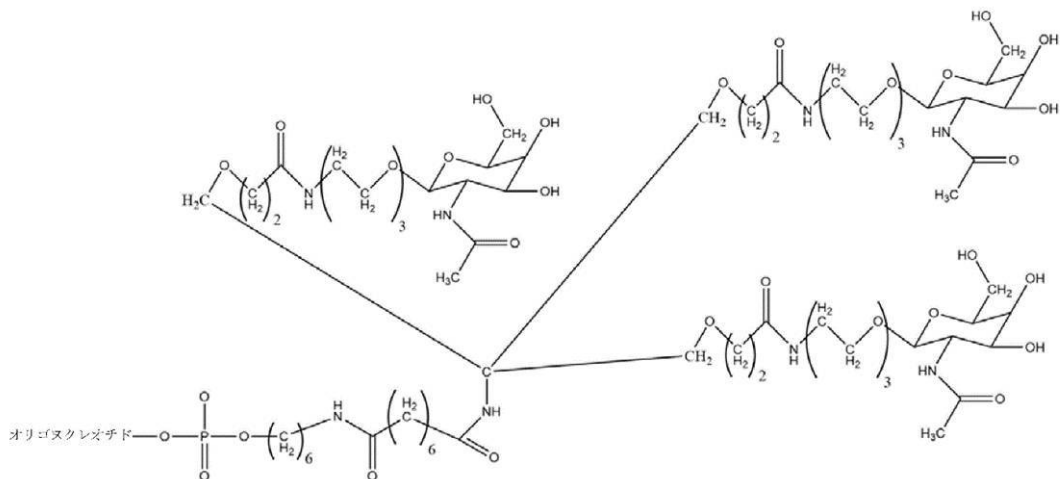
10

【0114】

いくつかの実施形態では、化合物は、式（IX）を含む：

【0115】

【化29】



30

【0116】

4.1 中間化合物

本発明の化合物はまた、本明細書の任意の場所に記載の化合物を生成するために、本明細書の任意の場所に記載の本発明の生産プロセス中に生成又は使用される中間化合物を含む。

40

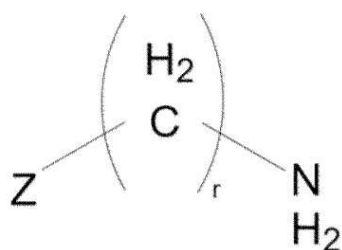
【0117】

したがって、いくつかの実施形態では、化合物は、式（X）を含み、

【0118】

50

【化 3 0】



式 (X)

10

【0 1 1 9】

式中、

r が、独立して、1 ~ 16 から選択される整数であり、

Z が、オリゴヌクレオチド部分である。

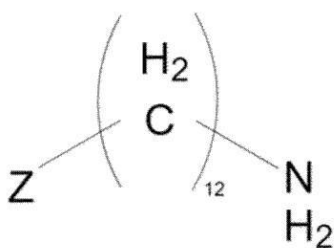
【0 1 2 0】

いくつかの実施形態では、化合物は、式 (X a) を含む：

【0 1 2 1】

【化 3 1】

20



式 (X a)

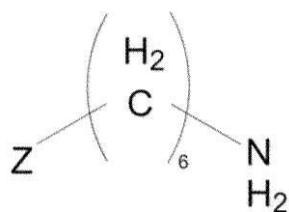
【0 1 2 2】

30

いくつかの実施形態では、化合物は、式 (X b) を含む：

【0 1 2 3】

【化 3 2】



式 (X b)

40

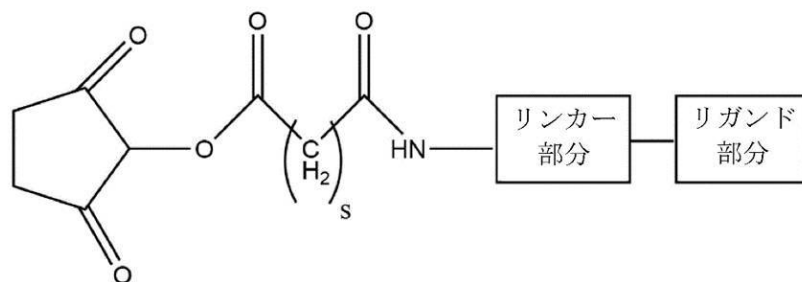
【0 1 2 4】

いくつかの実施形態では、化合物は、式 (X I) を含む、

【0 1 2 5】

50

【化 3 3】



式 (X I)

10

【0 1 2 6】

式中、

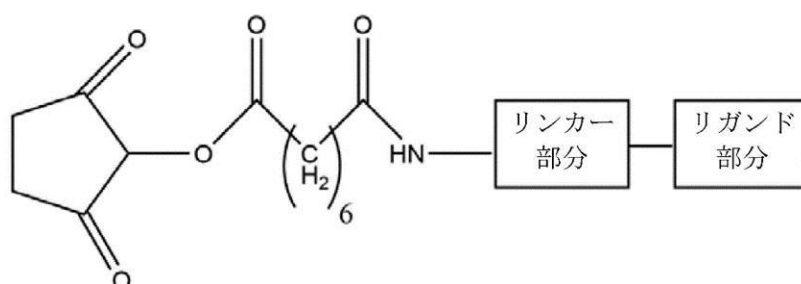
 s が、独立して、1 ~ 16 から選択される整数であり、 Z が、オリゴヌクレオチド部分である。

【0 1 2 7】

いくつかの実施形態では、化合物は、式 (X I a) を含む：

【0 1 2 8】

【化 3 4】



式 (X I a)

20

【0 1 2 9】

いくつかの実施形態では、化合物は、式 (X I b) を含む：

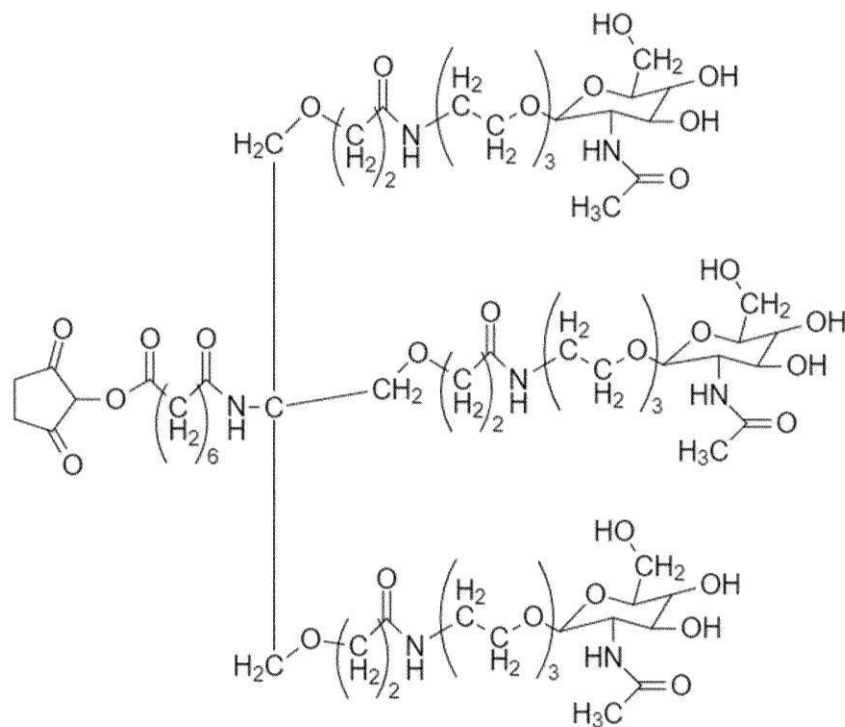
【0 1 3 0】

30

40

50

【化 3 5】



式 (X I b)

【0 1 3 1】

5. 生成プロセス

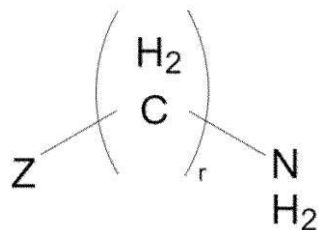
本発明は、本明細書の任意の場所に記載の化合物を調製するプロセスを更に提供する。
 本発明は、本明細書の任意の場所に記載の組成物を調製するプロセスを更に提供する。

【0 1 3 2】

いくつかの実施形態では、本プロセスは、式 (X) 及び (X I) の化合物を反応させる
 ことであって、

【0 1 3 3】

【化 3 6】



式 (X)

【0 1 3 4】

10

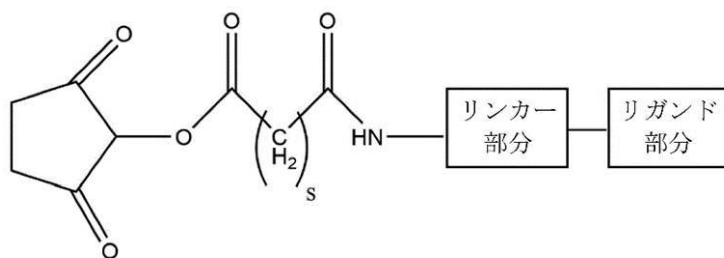
20

30

40

50

【化 3 7】



式 (X I)

10

【0 1 3 5】

式中、

 r 及び s が、独立して、1～16から選択される整数であり、 Z が、オリゴヌクレオチド部分である、反応させることと、

必要に応じて、オリゴヌクレオチドのリガンドの脱保護及び／若しくは第2の鎖のアニールリングを実施することと、を含む。

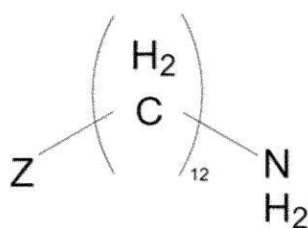
【0 1 3 6】

いくつかの実施形態では、式 (X) は、式 (X a) であり、

【0 1 3 7】

20

【化 3 8】



式 (X a)

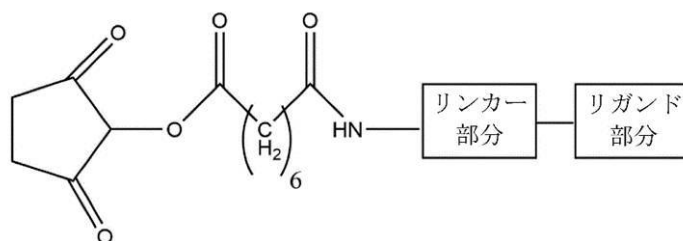
30

【0 1 3 8】

式 (X I) の化合物は、式 (X I a) であり、

【0 1 3 9】

【化 3 9】



式 (X I a)

40

【0 1 4 0】

オリゴヌクレオチドは、第1及び第2の鎖を含むRNA二本鎖を含み、第1の鎖は、標的遺伝子のRNA配列に少なくとも部分的に相補的であり、第2の鎖は、当該第1の鎖に少なくとも部分的に相補的であり、第1及び第2の鎖の各々は、5'及び3'末端を有し、当該RNA二本鎖は、その第2の鎖の5'末端で、隣接するホスフェートに結合している。

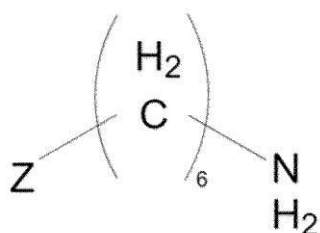
【0 1 4 1】

50

いくつかの実施形態では、式 (X) は、式 (X b) であり、

【0142】

【化40】



式 (X b)

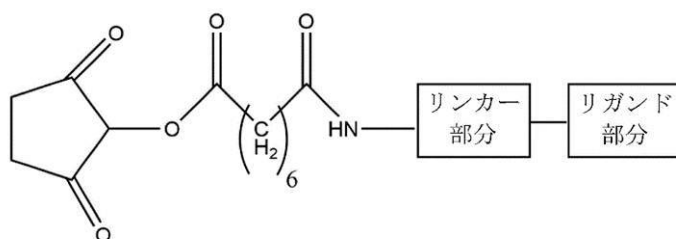
10

【0143】

式 (XI) の化合物は、式 (XI a) であり、

【0144】

【化41】



式 (XI a)

20

【0145】

オリゴヌクレオチドは、第1及び第2の鎖を含むRNA二本鎖を含み、第1の鎖は、標的遺伝子のRNA配列に少なくとも部分的に相補的であり、第2の鎖は、当該第1の鎖に少なくとも部分的に相補的であり、第1及び第2の鎖の各々は、5'及び3'末端を有し、当該RNA二本鎖は、その第2の鎖の3'末端で、隣接するホスフェートに結合している。

30

【0146】

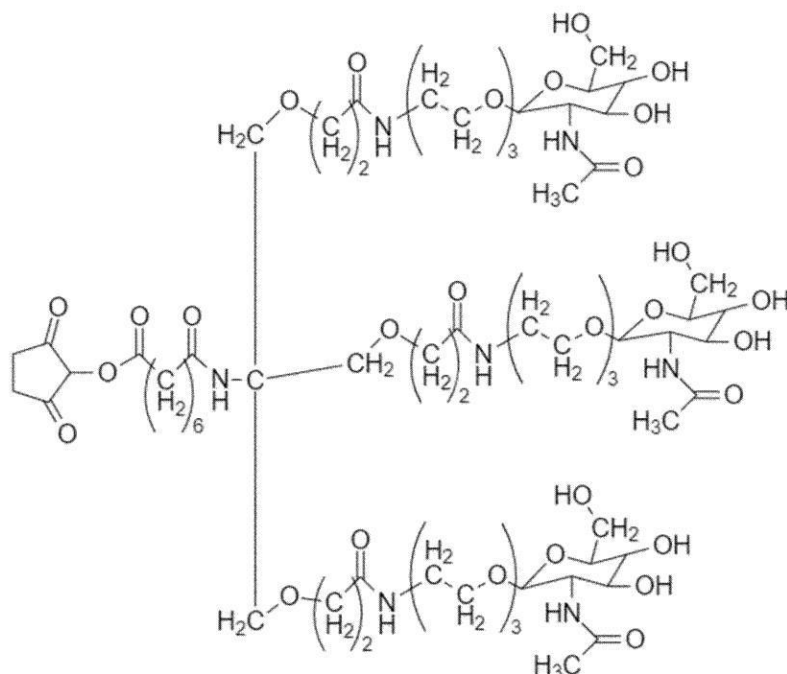
いくつかの実施形態では、式 (XI a) は、式 (XI b) である：

【0147】

40

50

【化 4 2】



式 (X I b)

【 0 1 4 8 】

6. 使用

本発明は、本明細書の任意の場所に記載の化合物及び組成物の使用に関する。

【 0 1 4 9 】

本発明はまた、本明細書の任意の場所に記載の別の化合物の調製のための、本明細書の任意の場所に記載の化合物の使用に関する。

【 0 1 5 0 】

本発明はまた、本明細書の任意の場所に記載のプロセスによって得られたか、又は得ることができる化合物に関する。

【 0 1 5 1 】

したがって、本発明は、薬学的に許容される担体、希釈剤、又は賦形剤とともに、本明細書の任意の場所に記載の化合物から構成される医薬組成物に関する。

【 0 1 5 2 】

本発明はまた、療法における使用のための、本明細書の任意の場所に記載の化合物又は医薬組成物に関する。

【 0 1 5 3 】

好適な投薬量、製剤、投与経路、組成物、剤形、他の治療剤との組み合わせ、プロドラッグ製剤もまた、本発明に包含される。

【 0 1 5 4 】

本発明の化合物は、例えば、診断、治療、及び予防のための研究試薬として利用される。

【 0 1 5 5 】

療法において、本発明の化合物を使用して、細胞における標的タンパク質の合成を特異的に調節し得る。これは、当該標的タンパク質の mRNA を分解、サイレンシング、又は阻害し、それによって、当該タンパク質の形成を防止することによって達成され得る。代替的には、本発明の化合物を使用して、細胞及び実験動物の細胞内のメカニズムに調節効果を及ぼす非コード DNA 又は RNA 分子を調節し、それによって、標的の機能分析又は治療的介入の標的としてのその有用性の評価を容易にし得る。

【0156】

好ましい実施形態では、標的タンパク質は、肝臓細胞（liver cell）、特に肝細胞（hepatocyte）などの表面上のアシアロ糖タンパク質受容体（ASPR）を含む標的細胞において存在する。

【0157】

したがって、本発明の化合物は、疾患又は障害を有すると疑われる動物又はヒトにおける療法として使用され得、これは、当該動物又はヒトにおける哺乳類標的ポリペプチドをコードするDNA又はRNAを調節することによって緩和又は治療され得る。

【0158】

好ましい実施形態では、標的核酸は、遺伝子、メッセンジャーRNA（mRNA）又はマイクロRNA（miRNA）である。

10

【0159】

治療又は予防有効量の本発明の化合物又は組成物のうちの1つ以上を投与することによって、疾患又は状態を有しているか又はその傾向にあると疑われるヒトを治療するなどの、哺乳動物を治療する方法が更に提供される。

【0160】

本発明はまた、障害の治療のための薬剤の製造のための記載される本発明の化合物若しくはコンジュゲートの使用、又は標的核酸の調節によって影響を受ける障害としての治療の方法を提供する。

【0161】

本発明はまた、障害を治療するための方法を提供し、当該方法は、本発明による化合物及び／又は本発明による医薬組成物を、それを必要とする患者に投与することを含む。

20

【0162】

治療される障害の例は、肝炎（HBV又はHCVなどのウイルス性肝炎を含む）、脂肪肝症、アテローム性動脈硬化症、高脂血症、高コレステロール血症、家族内高コレステロール血症、例えば、アポリポタンパク質Bの機能変異の増加、HDL／LDLコレステロールの不均衡、脂質異常症、例えば、家族性高脂血症（FCHL）、後天性高脂血症、スタチン抵抗性高コレステロール血症、冠動脈疾患（CAD）及び冠動脈心疾患（CHD）、肝硬変、並びにがんなどの肝疾患である。

【0163】

30

7. 定義

別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語、表記及び他の技術的及び科学的用語又は専門用語は、請求された主題が関係する技術分野の当業者に一般に理解される意味と同じ意味を有することが意図される。いくつかの場合では、一般に理解される意味を有する用語は、明確にするために、及び／又はすぐに参照するために本明細書に定義され、本明細書にそのような定義を含めることは、必ずしも、当該技術分野で概して理解されるものと実質的な違いを表すと解釈されるべきではない。

【0164】

本発明は特定の組成物又は生物学的システムに限定されず、これは、当然、変動し得ることが理解される必要がある。本明細書で使用される用語は、特定の実施形態を説明することのみを目的とし、限定することを意図したものではないことも理解される必要がある。本明細書及び添付の特許請求の範囲で 사용되는場合、単数形の「a」、「an」、及び「the」は、別途内容が明らかに指示しない限り、複数の指示対象を含む。

40

【0165】

本明細書で使用される「約」という用語は、本技術分野の当業者に容易に知られているそれぞれの値の通常の誤差範囲を指す。本明細書における値又はパラメータの「約」への言及は、その値又はパラメータ自体に指向されている実施形態を含む（及びそれを説明する）。

【0166】

本明細書に記載される本発明の態様及び実施形態は、態様及び実施形態を「含む」、「

50

からなる」、及び「本質的にからなる」ことを含むことが理解される。

【0167】

本明細書で使用される場合、「及び／又は」という用語は、その用語が関連付けられている項目のうちの任意の1つ、項目の任意の組み合わせ、又は項目の全てを指す。例えば、「A、B、及び／又はC」という語句は、以下の実施形態の各々を包含することが意図される。A、B、及びC；A、B、又はC；A又はB；A又はC；B又はC；A及びB；A及びC；B及びC；A及びB又はC；B及びA又はC；C及びA又はB；A（単独）；B（単独）；並びにC（単独）。

【0168】

「相補的」という用語は、一方の配列が他方の配列に逆平行で結合することができ、各配列の3'末端が他方の配列の5'末端に結合し、次いで一方の配列の各A、T（U）、G、及びCが、他方の配列のT（U）、A、C、及びGとそれぞれ整列する場合、2つの配列が相補的であることを意味する。

【実施例】

【0169】

8. 実施例

本発明は、以下の実施例を参照することによってより完全に理解されるであろう。しかしながら、それらは、本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。本明細書に記載される例及び実施形態は、例示的な目的のためだけのものであり、そのための様々な修正又は変更が当業者に提案され、本出願の趣旨及び範囲並びに添付の特許請求の範囲内に含まれることが理解される。

【0170】

以下の構成が、実施例において使用されている：

【0171】

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1 :

標的	ID	センス配列 5' →3'	アンチセンス配列 5' →3'
hsHAO1	ETX006	(invabasic)(invabasic)gsascuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(NHC6)(ET-GalNAc-T2CO)	usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaagucscsa
hsHAO1	ETX002	(ET-GalNAc-T2CO)(NH2C12)gacuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(invabasic)(invabasic)	usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaagucscsa
hsHAO1	ETX004	(ET-GalNAc-T2CO)(NH2C12)GfaCfuUfuCfaUfcCfuGfgAfaAfuAfsusAf	usAfsuAfuUfuCfCfagGfaUfgAfaAfgUfcsCfsa
hsHAO1	ETX008	GfsasCfuUfuCfaUfcCfuGfgAfaAfuAfuAf(NHC6)(ET-GalNAc-T2CO)	usAfsuAfuUfuCfCfagGfaUfgAfaAfgUfcsCfsa
hsHAO1	ECX008(低純度)	GfsasCfuUfuCfaUfcCfuGfgAfaAfuAfuAf(NHC6)(ET-GalNAc-T2CO)	usAfsuAfuUfuCfCfagGfaUfgAfaAfgUfcsCfsa
hsC5	ETX011	(ET-GalNAc-T2CO)(NH2C12)aaGfcAfaGfaUfAfUfuUfuAfuAfasusa(invabasic)(invabasic)	usAfsUfuAfaAfaAfaUfcUfuGfcuusudTdT
hsC5	ETX015	(invabasic)(invabasic)asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuAfuAfaAfa(NHC6)(ET-GalNAc-T2CO)	usAfsUfuAfaAfaAfaUfcUfuGfcuusudTdT
hsC5	ETX013	(ET-GalNAc-T2CO)(NH2C12)AfaGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfaUfaAfsusAf	usAfsuUfaUfaAfaAfaUfaUfcUfuGfcUfusUfsudTdT
hsC5	ETX017	AfsasGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfaUfaAfuAf(NHC6)(ET-GalNAc-T2CO)	usAfsuUfaUfaAfaAfaUfaUfcUfuGfcUfusUfsudTdT
hsTTR	ETX020	(ET-GalNAc-T2CO)(NH2C12)ugggauUfuCfAfUfguaaccaasgsa(invabasic)(invabasic)	usCfsuugGfuUfcaugAfaAfuccasusc
hsTTR	ETX022	(ET-GalNAc-T2CO)(NH2C12)UfgGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfsGsAf	usCfsuUfgGfuUfaCfaUfgAfaAfuCfcCfasUfsc
hsTTR	ETX024	(invabasic)(invabasic)usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga(NHC6)(ET-GalNAc-T2CO)	usCfsuugGfuUfcaugAfaAfuccasusc
hsTTR	ETX026	UfsgsGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfgAf(NHC6)(ET-GalNAc-T2CO)	usCfsuUfgGfuUfaCfaUfgAfaAfuCfcCfasUfsc

【0172】

表 1 において、以下の命名 (NHC6)、(NH2C12)、及び (ET-GalNAc-T2CO) を有する括弧内の構成要素は、リンカーの要素の記述子であり、完全な対応するリンカー構造を本明細書の図 20 及び図 21 に示す。実際のリンカー構造に対するこの略語の対応は、本明細書における上記の略語の他の全ての言及に同様に適用される。

(invabasic)(invabasic)への言及は、末端の 2 つの糖部分が脱塩基であり、かつ逆配置であり、末端から 2 番目の糖部分と末端から 3 番目の糖との間の結合が、逆結合 (5-5 又は 3-3 結合) であるポリヌクレオチドを指す。

【0173】

10

20

30

40

50

【表 2】

表 1 A

標的	ID	短い記述子	リンカープラスリガンド 表 1 の siRNA
hsHAO1	ETX006	3'-GalNAc T2a 逆脱塩基	図 20 のリンカー+リガンド
hsHAO1	ETX002	5'-GalNAc T2b 逆脱塩基	図 21 のリンカー+リガンド
hsHAO1	ETX004	5'-GalNAc T2b 交互	図 21 のリンカー+リガンド
hsHAO1	ETX008	3'-GalNAc T2a 交互	図 20 のリンカー+リガンド
hsHAO1	ECX008(低 純度)	3'-GalNAc T2a 交互	図 20 のリンカー+リガンド
hsC5	ETX011	5'-GalNAc T2b 逆脱塩基	図 21 のリンカー+リガンド
hsC5	ETX015	3'-GalNAc T2a 逆脱塩基	図 20 のリンカー+リガンド
hsC5	ETX013	5'-GalNAc T2b 交互	図 21 のリンカー+リガンド
hsC5	ETX017	3'-GalNAc T2a 交互	図 20 のリンカー+リガンド
hsTTR	ETX020	5'-GalNAc T2b 逆脱塩基	図 21 のリンカー+リガンド
hsTTR	ETX022	5'-GalNAc T2b 交互	図 21 のリンカー+リガンド
hsTTR	ETX024	3'-GalNAc T2a 逆脱塩基	図 20 のリンカー+リガンド
hsTTR	ETX026	3'-GalNAc T2a 交互	図 20 のリンカー+リガンド

10

20

【0174】

以下の対照構造もまた、実施例において使用される：

【0175】

【表 3】

表 2：

標的	ID	センス配列 5' →3'	アンチセンス配列 5' →3'
F-Luc	XD-00914	cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTs dT	UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsd T
hsFVII	XD-03999	AGAuAuGcAcAcAcAcGGAd TsdT	UCCGUGUGUGUGcAuAUCUdTsd dT
hsAHSA 1	XD-15421	uscsUfcGfuGfgCfcUfuAfaUfg AfaAf(invdT)	UfsUfsuCfaUfuAfaGfgCfcAfcGfaGf asusu

40

【0176】

略語：

A H S A 1 熱ショックタンパク質 ATPアーゼ 1 の活性化因子

A S G R 1 アシアロ糖タンパク質受容体 1

50

A S O	アンチセンスオリゴヌクレオチド	
b D N A	分岐 D N A	
b p	塩基対	
C 5	補体 C 5	
c o n c .	濃度	
c t r l .	対照	
C V	変動係数	
d G、d C、d A、d T	D N A 残基	
F	フルオロ	
F C S	ウシ胎児血清	10
G a l N A c	N-アセチルガラクトサミン	
G A P D H	グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ	
G、C、A、U	R N A 残基	
g、c、a、u	2'-O-メチル修飾残基	
G f、C f、A f、U f	2'-フルオロ修飾残基	
h	時間	
H A O 1	ヒドロキシ酸オキシダーゼ 1	
H P L C	高速液体クロマトグラフィー	
H s	ヒト	
I C 5 0	応答が 5 0 % 低減した阻害剤の濃度	20
I D	識別子	
K D	ノックダウン	
L F 2 0 0 0	L i p o f e c t a m i n e 2 0 0 0	
M	モル濃度	
M f	カニクイザル	
m i n	分	
M V	平均値	
n . a .	又は N / A 該当なし	
N E A A	非必須アミノ酸	
n t	ヌクレオチド	30
Q C	品質管理	
Q G 2 . 0	Q u a n t i G e n e 2 . 0	
R L U	相対光単位	
R N A i	R N A 干渉	
R T	室温	
s	ホスホロチオエート骨格修飾	
S A R	構造活性相関	
S D	標準偏差	
s i R N A	低分子干渉 R N A	
T T R	トランスサイレチン	40
【 0 1 7 7 】		

8. 1 実施例 1

ー概要

h s H A O 1、h s C 5、又は h s T T R m R N A のいずれかを標的とする G a l N A c-s i R N A を合成し、品質管理した。s i R N A のセット全体（H A O 1 を標的とする s i R N A を除く）を、最初に、R N A i M A X を使用したトランスフェクションによって、H e p G 2 細胞における用量応答設定において研究し、続いて、初代ヒト肝細胞におけるジムノシスな（g y m n o t i c）自由取り込み設定において用量応答分析を行った。

【 0 1 7 8 】

10

20

30

40

50

h s H A O 1、h s C 5 又は h s T T R m R N A を標的とする G a l N A c - s i R N A での初代ヒト肝細胞の直接インキュベーションは、様々な程度に用量依存的なオンターゲット m R N A サイレンシングをもたらした。

【0179】

ー研究の目的

この一連の実験の目的は、3つの異なるオンターゲット、すなわち、h s H A O 1、h s C 5 又は h s T T R m R N A を標的とする s i R N A の状況において、異なる G a l N A c リガンドのインビトロ活性を分析することであった。

【0180】

この研究のワークパッケージには、(i) ありとあらゆる目的の個々のオンターゲットに特異的な b D N A プローブセットを設計、合成、及び試験するためのアッセイ開発、(ii) その後のスクリーニング実験に好適な細胞株の特定、(iii) 1つ以上のヒトがん細胞株における潜在的に全ての(トランスフェクションによる) s i R N A の用量応答分析、並びに(iv) ジムノシスな自由取り込み設定における初代ヒト肝細胞における s i R N A の用量応答分析が含まれた。両方の設定において、I C 5 0 値及び最大阻害値が計算され、続いて、それらの効力に従って s i R N A 研究セットのランキング化がされる必要がある。

10

【0181】

ー材料及び方法

オリゴヌクレオチド合成

標準的な固相合成法を使用して、目的の s i R N A (表1を参照されたい) 及び対照(表2を参照されたい)を化学的に合成した。

20

【0182】

細胞培養及びインビトロトランスフェクション実験

細胞培養、トランスフェクション、及び Q u a n t i G e n e 2 . 0 分岐 D N A アッセイを以下に記載し、s i R N A 配列を表1及び2に列挙する。H e p G 2 細胞を、A m e r i c a n T i s s u e C u l t u r e C o l l e c t i o n (A T C C) (H B - 8 0 6 5、ロット番号: 6 3 1 7 6 2 9 4) から供給してもらい、10%のウシ胎児血清(FCS)を含有するように補充したA T C C 配合イーグル最小必須培地で培養した。初代ヒト肝細胞(PHH)を、P r i m a c y t (S c h w e r i n, G e r m a n y) から調達した(ロット番号: C y H u f 1 9 0 0 9 H e c)。細胞は、摘出技術によって悪性膠芽腫腫瘍に由来する。この研究で使用された全ての細胞を、加湿インキュベーター内、5% C O 2 の雰囲気中、37℃で培養した。

30

【0183】

h s C 5 又は h s T T R 標的化 s i R N A (及び対照)でのH e p G 2 細胞のトランスフェクションのために、細胞を通常の96ウェル組織培養プレートに20,000細胞/ウェルの密度で播種した。s i R N A での細胞のトランスフェクションを、製造業者の指示に従い、市販のトランスフェクション試薬R N A i M A X (I n v i t r o g e n / L i f e T e c h n o l o g i e s) を使用して行った。H e p G 2 細胞において、それぞれ 2 4、6、1.5、0.4、0.1、0.03、0.008、0.002、0.0005、及び0.0001 n M の最終 s i R N A 濃度で、20個の候補(11×h s C 5、9×h s T T R)の10点用量応答実験を行った。

40

【0184】

P H H 中の用量応答分析は、1.5 μ M の最高の最終 s i R N A 濃度から始まり、500 n M に続き、そこから2倍希釈ステップで連続的に減少する、ジムノシスな自由取り込み設定における細胞の直接インキュベーションによって行われた。

【0185】

対照ウェルをH e p G 2 細胞にトランスフェクションしたか、又は対応するプレート上で研究された最高の試験 s i R N A 濃度で初代ヒト肝細胞と直接インキュベーションした。細胞の模擬処理の次の異なるプロジェクトフェーズに含まれる全ての対照 s i R N A を

50

要約し、表 2 に列挙する。各 s i R N A 及び対照について、少なくとも 4 つのウェルを並行してトランスフェクション／直接インキュベーションし、各ウェルから個々のデータポイントを集めた。

【0186】

トランスフェクション後、s i R N A とのインキュベーションの 24 時間後、培地を除去し、Hep G2 細胞を溶解混合物（1 体積の溶解緩衝液＋2 体積のヌクレアーゼフリー水）中で溶解し、次いで、53℃で少なくとも 45 分間インキュベーションした。PHH の場合、播種培地を、細胞の処理の 5 時間後に除去し、続いて、ウェル当たり 50 μ l の完全維持培地を添加した。最大で合計 72 時間のインキュベーション期間まで、培地を、そのようにして 24 時間ごとに交換した。4 時間又は 72 時間のいずれかの時点で、細胞培養上清を除去し、続いて、1：1000 v / v のプロテイナーゼ K を補充した 200 μ l の溶解混合物を添加した。

10

【0187】

分枝 DNA (bDNA) アッセイを、製造業者の指示に従って行った。暗闇中の基質の存在下での 30 分間のインキュベーション後、発光を、1420 発光カウンター (WALLAC VICTOR Light, Perkin Elmer, Rodgau-Jugesheim, Germany) を使用して読み取った。各ウェルについて、オンターゲット mRNA レベルを h s G A P D H mRNA レベルに対して正規化した。任意の s i R N A の活性を、対照ウェルにわたる平均オンターゲット mRNA 濃度 (h s G A P D H mRNA に対して正規化) に対する、処置された細胞におけるオンターゲット mRNA 濃度 (h s G A P D H mRNA に対して正規化) のパーセントとして表した。

20

【0188】

アッセイ開発

Quant i Gene 2.0 分岐 DNA (bDNA) プロブセットを、ヒト G A P D H、A H S A 1、h s H A O 1、h s C 5、及び h s T T R に特異的に設計及び合成した。最初に bDNA プロブセットを、製造業者の指示に従って bDNA 分析によって試験し、初代ヒト肝細胞の次に以下のヒト及びサルがん細胞株の 2 つの異なる溶解物量、すなわち 10 μ l 及び 50 μ l における目的の mRNA のレベルを評価した：S J S A - 1、T F 1、N C I - H 1 6 5 0、Y - 7 9、K a s u m i - 1、E A h y 9 2 6、C a k i - 1、C o l o 2 0 5、R P T E C、A 2 5 3、H e L a S 3、H e p 3 B、B x P C 3、D U 1 4 5、T H P - 1、N C I - H 4 6 0、I G R 3 7、L S 1 7 4 T、B e (2) - C、S W 1 5 7 3、N C I - H 3 5 8、T C 7 1、2 2 R v 1、B T 4 7 4、H e L a、K B w t、P a n c - 1、U 8 7 M G、A 1 7 2、C 4 2、H e p G 2、L N C a P、P C 3、S u p T 1 1、A 5 4 9、H C T 1 1 6、H u H 7、M C F 7、S H - S Y 5 Y、H U V E C、C 3 3 A、H E K 2 9 3、H T 2 9、M O L M 1 3、及び S K - M E L - 2。細胞溶解物を添加しない bDNA プロブセットのみを含有するウェルを使用して、技術的バックグラウンド及びノイズ信号を監視した。

30

【0189】

ー結果

G a l N A c - s i R N A のスクリーニングのための好適な細胞型の特定

40

図 1 ～ 図 3 は、多様なセットのヒトがん細胞株プラス初代ヒト肝細胞の溶解物における、3 つの目的のオンターゲット、すなわち、h s C 5、h s H A O 1、及び h s T T R の mRNA 発現データを示す。溶解物体積当たりの細胞数は、試験された各細胞株と同一であり、これは、異なる細胞型間の発現レベルの比較を可能にするために必要である。図 1 は、試験された全ての細胞型の h s C 5 mRNA 発現データを示す。

【0190】

同一の型の細胞も、h s H A O 1 mRNA の発現についてスクリーニングし、結果を図 2 の一部として棒グラフに示す。

【0191】

最後に、h s T T R を標的とする G a l N A c - s i R N A のスクリーニングを可能に

50

する好適な細胞型を特定し、それぞれのデータは、図 3 の一部である。

【 0 1 9 2 】

要約すると、3つの目的のオンターゲット全てのmRNA発現レベルは、初代ヒト肝細胞（PHH）において十分に高い。更に、Hep G 2細胞を使用して、hsC5及びhsTTR mRNAを標的とするGalNAc-siRNAをスクリーニングすることができ、対照的に、hsHAO1 mRNAに特異的なsiRNAを試験するのに好適であろうがん細胞株は特定されなかった。

【 0 1 9 3 】

Hep G 2細胞におけるhsTTR標的化GalNAc-siRNAの用量応答分析

トランスフェクション最適化後、RNAiMAXを使用した用量応答設定において、hsTTR標的化GalNAc-siRNAのセット全体（表 1を参照）でHep G 2細胞をトランスフェクションした。最高の最終siRNA試験濃度は、24 nMで、9回の4倍希釈ステップで減少させた。実験は、Hep G 2細胞のトランスフェクションの4時間及び24時間後に終了した。表 3は、研究された全てのhsTTR標的化GalNAc-siRNAの活性データを列挙する。

【 0 1 9 4 】

【表 4】

表 3：Hep G 2細胞におけるhsTTR標的化siRNAの標的、インキュベーション時間、外部ID、IC20／IC50／IC80値、及び最大阻害。列挙は、外部IDに従って整理され、4時間のインキュベーションが上部に列挙され、24時間のインキュベーションが下部に列挙される。

標的	インキュベーション[時間]	外部 ID	IC20[nM]	IC50[nM]	IC80[nM]	最大阻害 [%]
hsTTR	4	ETX020	1,953	該当なし	該当なし	37,9
hsTTR	4	ETX022	該当なし	該当なし	該当なし	15,9
hsTTR	4	ETX024	1,952	該当なし	該当なし	48,2
hsTTR	4	ETX026	該当なし	該当なし	該当なし	0,8
hsTTR	24	ETX020	0,005	0,025	0,133	95,5
hsTTR	24	ETX022	0,007	0,045	0,371	94,9
hsTTR	24	ETX024	0,008	0,029	0,134	95,5
hsTTR	24	ETX026	0,015	0,075	0,383	92,2

【 0 1 9 5 】

24時間のインキュベーションの結果をまた、図 4 A～Dにも示す。

【 0 1 9 6 】

概して、hsTTR標的化siRNAでのHep G 2細胞のトランスフェクションは、概して、0％サイレンシングから最大阻害までの全活性範囲にわたるオンターゲットmRNAサイレンシングをもたらす。トランスフェクションの24時間後に生成されたデータは、トランスフェクションの4時間後にのみ生成されたデータと比較して、より堅牢であり、標準の変動が低い。更に、オンターゲットノックダウンの程度は、概して、インキュ

ベーションの4時間から最大で24時間まで時間とともに増加する。h s T T R G a l N A c - s i R N A は、低い2桁のp M 範囲におけるI C 5 0 値でオンターゲットm R N A を95%超サイレンシングさせることが特定されている。

【0197】

H e p G 2 細胞におけるh s C 5 標的化G a l N A c - s i R N A の用量応答分析

h s T T R s i R N A と同一のリンガー／位置／G a l N A c リガンドバリエーションを共有するが、オンターゲットh s C 5 m R N A に特異的な配列であるG a l N A c - s i R N A を用いた、R N A i M A X を使用したH e p G 2 細胞のトランスフェクションによって、第2の目的の標的であるh s C 5 m R N A を、同一の用量応答設定（しながら、最小限の種々の最終s i R N A 試験濃度で）において試験した。

【0198】

【表5】

表4：H e p G 2 細胞におけるh s C 5 標的化s i R N A の標的、インキュベーション時間、外部ID、I C 2 0 / I C 5 0 / I C 8 0 値、及び最大阻害。列挙は、外部IDに従って整理され、4時間のインキュベーションが上部に列挙され、24時間のインキュベーションが下部に列挙される。

標的	インキュベーション[時間]	外部 ID	IC20[nM]	IC50[nM]	IC80[nM]	最大阻害 [%]
C5	4	ETX011	0,091	0,424	該当なし	74,6
C5	4	ETX013	0,377	1,174	該当なし	66,5
C5	4	ETX015	0,407	0,578	該当なし	61,9
C5	4	ETX017	1,024	3,328	該当なし	60,4
C5	24	ETX011	0,001	0,005	0,045	88,4
C5	24	ETX013	0,002	0,012	0,166	86,7
C5	24	ETX015	0,003	0,013	0,099	88,8
C5	24	ETX017	0,005	0,019	0,164	83,8

【0199】

24時間のインキュベーションの結果をまた、図5A～Dにも示す。

【0200】

h s C 5 に特異的なG a l N A c - s i R N A セットでのH e p G 2 細胞のトランスフェクションでは、用量依存的なオンターゲットh s C 5 m R N A サイレンシングが存在する。いくつかのノックダウンは、細胞のトランスフェクションの4時間後で既に検出することができ、より長いインキュベーション期間、すなわち24時間後に更に高いオンターゲットサイレンシングが観察される。h s C 5 G a l N A c - s i R N A は、低い1桁のp M 範囲におけるI C 5 0 値でオンターゲットm R N A をほぼ90%サイレンシングすることが特定されている。

【0201】

全てのG a l N A c - s i R N A の試験に好適な初代ヒト肝細胞バッチの特定

ヒトがん細胞株H e p G 2 における2つのG a l N A c - s i R N A セットの用量応答

分析は、全ての新しいGalNAc-リンカー/位置/CAPバリエーションが、AGO2への効率的な結合及びRISCへの担持のための基質であり、加えて、標的mRNAのRNAi媒介切断において機能することが可能であることを実証（及び保証）する必要がある。しかしながら、標的化GalNAc-リガンド誘導体が肝細胞への効率的な取り込みを可能にするかどうかを試験するために、用量応答分析実験は、ジミノシスな自由取り込み設定によって、初代ヒト肝細胞で行われる必要がある。肝細胞は、アジア糖タンパク質受容体（ASGR1）を高レベルに排他的に発現し、この受容体は、概して、循環から標的糖タンパク質を除去するために肝臓によって使用される。GalNAc-リガンドにコンジュゲートされた特定の型のオリゴヌクレオチド、例えば、siRNA又はASOは、この高ターンオーバー受容体によって認識され、クラトリンコーティング小胞を介して細胞質に効率的に取り込まれ、エンドソーム区画への輸送されることは、今では一般的に知られている。エンドソーム脱出は、オリゴヌクレオチド送達速度制限ステップであると考えられる。

10

【0202】

中間アッセイ開発実験を行い、種々のバッチの初代ヒト肝細胞を目的の関連遺伝子、すなわち、hsc5、hsttr、hsha01、hsgapdh、及びhsahsa1の発現レベルについて試験した。Primacyt（Schwerin, Germany）は、試験のために異なる初代ヒト肝細胞バッチの3つのバイアル、すなわちBHuf16087、CHF2101、及びCyHuf19009を提供した。細胞をコラーゲンコーティングされた96ウェル組織培養プレートに播種し、続いて、細胞溶解及びbDNA分析の前に細胞を0時間、24時間、48時間及び72時間インキュベーションして、目的のmRNAレベルを監視した。図6は、初代ヒト肝細胞バッチBHuf16087、CHF2101、及びCyHuf19009における、3つの目的のオンターゲット、hsttr、hsc5、及びhsha01全てについての絶対mRNA発現データを示す。hsgapdh及びhsahsa1のmRNA発現レベルを図7に示す。

20

【0203】

図6及び7において、各データセット三連の左側の列は、BHuf16087であり、中央の列は、CHF2101であり、右側の列は、CyHuf19009である。

【0204】

全体として、初代ヒト肝細胞バッチBHuf16087及びCyHuf19009における3つの目的のオンターゲット全てのmRNA発現は、72時間後、bDNAアッセイを継続するのに十分に高い。更なる実験のために利用可能なバイアルの総量により、バッチCyHuf19009で実験を続けた。

30

【0205】

PHHにおけるhsha01標的化GalNAc-siRNAの用量応答分析

初代ヒト肝細胞（PHH）の好適なバッチ（CyHuf19009）の特定に続いて、表1に列挙されるhsha01標的化GalNAc-siRNAのジミノシスな自由取り込み分析を行った。試験された最終siRNA濃度は、1.5 µMであり、続いて500 nMであり、8つの2倍連続希釈ステップで、1.95 nMの最も低い最終siRNA濃度まで減少させた。実験は、PHH細胞の直接インキュベーションの4時間及び72時間後に終了した。表5は、研究された全てのhsha01標的化GalNAc-siRNAの活性データを列挙する。この実験に含まれる全ての対照siRNAを要約し、表2に列挙する。

40

【0206】

【表 6】

表 5：初代ヒト肝細胞（PHH）における h s H A O 1 標的化 G a l N A c - s i R N A の標的、インキュベーション時間、外部 ID、I C 2 0 / I C 5 0 / I C 8 0 値、及び最大阻害。列挙は、外部 ID に従って整理され、4 時間及び 7 2 時間のインキュベーションがそれぞれ上部及び下部に列挙されている。

標的	インキュベーション[時間]	外部 ID	IC20[nM]	IC50[nM]	IC80[nM]	最大阻害 [%]
hsHAO1(hsGO1)	4	ETX002	該当なし	該当なし	該当なし	7,2
hsHAO1(hsGO1)	4	ETX004	該当なし	該当なし	該当なし	-2,3
hsHAO1(hsGO1)	4	ETX006	該当なし	該当なし	該当なし	0,5
hsHAO1(hsGO1)	4	ETX008	該当なし	該当なし	該当なし	5,4
hsHAO1(hsGO1)	4	ECX008 (低純度)	該当なし	該当なし	該当なし	2,0
hsHAO1(hsGO1)	72	ETX002	23,9	該当なし	該当なし	44,3
hsHAO1(hsGO1)	72	ETX004	2,8	該当なし	該当なし	35,5
hsHAO1(hsGO1)	72	ETX006	27,5	617,1	該当なし	53,6
hsHAO1(hsGO1)	72	ETX008	51,5	該当なし	該当なし	34,7
hsHAO1(hsGO1)	72	ECX008 (低純度)	4,9	260,3	該当なし	58,1

10

20

30

【 0 2 0 7 】

7 2 時間のインキュベーションの結果をまた、図 8 A ～ D にも示す。

【 0 2 0 8 】

h s H A O 1 を標的とする G a l N A c - s i R N A のジムノシスな自由取り込みは、4 時間以内に有意なオンターゲットサイレンシングをもたらさなかったが、しかしながら、7 2 時間のインキュベーション後、オンターゲットサイレンシングは、最大阻害の 3 5 . 5 ～ 5 8 . 1 % の範囲で見られた。

【 0 2 0 9 】

P H H における h s C 5 標的化 G a l N A c - s i R N A の用量応答分析

前のアッセイで試験された h s T T R 及び h s H A O 1 と同一のリンカー／位置／ G a l N A c リガンドバリエーションを共有するが、オンターゲット h s C 5 m R N A に特異的な配列を有する G a l N A c - s i R N A を用いた、P H H におけるジムノシスな自由取り込みによって、第 2 の目的の標的である h s C 5 m R N A を、同一の用量応答設定において試験した。H s C 5 を標的とする G a l N A c - s i R N A の配列、並びに対照 s i R N A についての全ての配列及び情報を、それぞれ表 1 及び表 2 に列挙する。実験は、P H H の 4 時間及び 7 2 時間の直接インキュベーション後に終了した。表 6 は、研究された全ての h s C 5 標的化 G a l N A c - s i R N A の活性データを列挙する。

40

【 0 2 1 0 】

50

【表 7】

表 6 : PHHにおけるh s C 5標的化G a l N A c - s i R N Aの標的、インキュベーション時間、外部ID、I C 2 0 / I C 5 0 / I C 8 0値、及び最大阻害。列挙は、外部IDに従って整理され、4時間及び72時間のインキュベーションがそれぞれ上部及び下部に列挙されている。

標的	インキュベーション[時間]	外部ID	IC20[nM]	IC50[nM]	IC80[nM]	最大阻害[%]
C5	4	ETX011	該当なし	該当なし	該当なし	-2,9
C5	4	ETX013	該当なし	該当なし	該当なし	1,2
C5	4	ETX015	該当なし	該当なし	該当なし	7,6
C5	4	ETX017	該当なし	該当なし	該当なし	4,4
C5	72	ETX011	2,6	295,3	該当なし	62,1
C5	72	ETX013	9,4	322,3	該当なし	57,5
C5	72	ETX015	7,2	315,0	該当なし	57,2
C5	72	ETX017	49,9	該当なし	該当なし	40,0

10

20

【0211】

72時間のインキュベーションの結果をまた、図9A～Dにも示す。

【0212】

4時間のインキュベーション後、G a l N A c - s i R N Aの有意なオンターゲットサイレンシングは見られない。72時間のインキュベーション期間後に生成されたデータは、最大で65.5%の最大阻害のより堅牢なオンターゲットサイレンシングを示した。

30

【0213】

PHHにおけるh s T T R標的化G a l N A c - s i R N Aの用量応答分析

最後の目的の標的であるh s T T R mRNAを、標的h s H A O 1及びh s C 5と同一の用量応答設定において、PHHにおけるジムノシスな自由取り込みで再び試験したが、唯一の違いは、オンターゲットh s T T R mRNAに対する特定のs i R N A配列が使用されたことであった(表1を参照されたい)。

【0214】

実験は、PHHの72時間の直接インキュベーション後に終了した。表7は、研究された全てのh s T T R標的化G a l N A c - s i R N Aの活性データを列挙する。

40

【0215】

【表 8】

表 7：初代ヒト肝細胞（PHH）における h s T T R 標的化 G a l N A c − s i R N A の標的、インキュベーション時間、外部 I D、I C 2 0 / I C 5 0 / I C 8 0 値、及び最大阻害。列挙は、外部 I D に従って整理されている。

標的	インキュベーション [時間]	外部 ID	IC20[nM]	IC50[nM]	IC80[nM]	最大阻害 [%]
hsTTR	72	ETX020	2,2	31,0	該当なし	78,4
hsTTR	72	ETX022	0,7	20,4	該当なし	69,5
hsTTR	72	ETX024	9,5	110,0	該当なし	71,3
hsTTR	72	ETX026	4,8	139,0	該当なし	68,0

10

【 0 2 1 6 】

結果をまた、図 1 0 A ～ D にも示す。

【 0 2 1 7 】

h s T T R を標的とする G a l N A c − s i R N A のジムノシスな自由取り込みは、4 6 ～ 8 2 . 5 % の最大阻害の範囲で、7 2 時間以内に有意なオンターゲットサイレンシングをもたらした。

【 0 2 1 8 】

ー 結論及び議論

本研究の範囲は、3 つの異なるオンターゲット、すなわち、h s H A O 1、h s C 5、及び h s T T R m R N A を標的とする s i R N A の状況で使用される場合に、本発明による G a l N A c リガンドのインビトロ活性を分析することであった。各標的に特異的な s i R N A セットは、各 2 つの異なるアンチセンス鎖の状況において、異なるリンカー／キャップ／修飾／G a l N A c リガンド化学を有する s i R N A からなった。

20

【 0 2 1 9 】

全ての標的について、表 1 からの G a l N A c − s i R N A が、高い全体的な効力及び低い I C 5 0 値を示したことを特定した。

【 0 2 2 0 】

8 . 2 実施例 2

合成の経路

i) コンジュゲートビルディングブロック T r i G a l N A c の合成

薄層クロマトグラフィー（T L C）を、M a c h e r e y − N a g e l からの蛍光インジケータ 2 5 4 n m を有するシリカ被覆アルミニウムプレート上で行った。化合物を、U V 光（2 5 4 n m）下で、又はメタノール（M e O H）中の 5 % H 2 S O 4 若しくは S t a h l によるニンヒドリン試薬、（S i g m a − A l d r i c h から）でスプレーし、続いて加熱した後、視覚化した。フラッシュクロマトグラフィーを、B i o t a g e S f a e r S i l i c a 1 0、2 5、5 0、又は 1 0 0 g カラム（U p p s a l a、S w e d e n）を使用して、二重可変 U V 波長検出器（2 0 0 ～ 4 0 0 n m）を備えた B i o t a g e I s o l e r a O n e フラッシュクロマトグラフィー機器を用いて行った。

30

【 0 2 2 1 】

全ての水分感受性反応は、乾燥ガラス器具、無水溶媒、及びアルゴン雰囲気を使用して、無水条件下で実施した。全ての市販の試薬を、S i g m a − A l d r i c h から購入し、溶媒を C a r l R o t h G m b H + C o . K G から購入した。D − ガラクトサミンペンタアセテートを A K s c i e n t i f i c から購入した。

40

【 0 2 2 2 】

H P L C / E S I − M S を、D i o n e x U l t i M a t e 3 0 0 0 R S U H P L C システム及び T h e r m o S c i e n t i f i c M S Q P l u s 質量分析計で、W a t e r s からの A c q u i t y U P L C P r o t e i n B E H C 4 カラ

50

ム (300 Å、1.7 μm、2.1×100 mm) を使用して、60℃で行った。溶媒系は、0.1%ギ酸を含有するH₂Oを有する溶媒A、及び0.1%ギ酸を含有するアセトニトリル (ACN) を有する溶媒Bからなった。0.4 mL/分の流量で、15分間にわたってBの5~100%の勾配を用いた。検出器及び条件：コロナ超荷電エアロゾル検出 (esaから)。噴霧器温度：25℃。N₂圧力：35.1 psi。フィルター：コロナ。

【0223】

¹H及び¹³C NMRスペクトルを、500 MHz (¹H NMR) 及び125 MHz (¹³C NMR) でVarian分光器で室温で記録した。化学シフトは、溶媒残留ピーク (CDCl₃-¹H NMR: 7.26 ppmでのδ、¹³C NMR 77.2 ppmでのδ、DMSO-d₆-¹H NMR: 2.50 ppmでのδ、¹³C NMR 39.5 ppmでのδ) を参照したppmで与えられる。カップリング定数はヘルツで与えられる。信号分割パターンは、一重線 (s)、二重線 (d)、三重線 (t)、又は多重線 (m) として記載される。

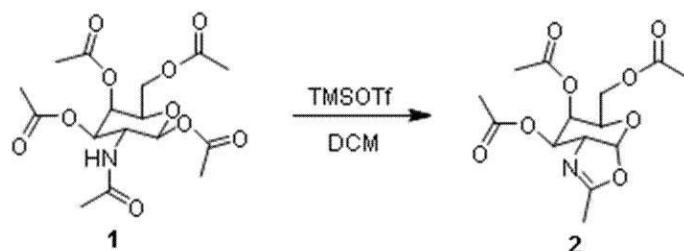
10

【0224】

i i) コンjugateビルディングブロックTriGalNAcの合成経路

【0225】

【化43】



20

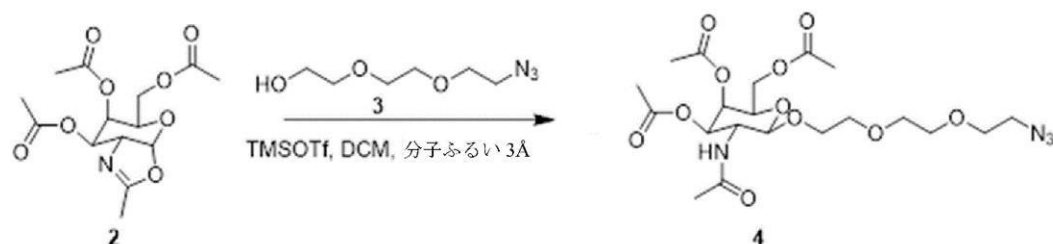
【0226】

化合物2の調製：D-ガラクトサミンペンタアセテート (3.00 g、7.71 mmol、1.0当量) を、アルゴン下で無水ジクロロメタン (DCM) (30 mL) に溶解し、トリメチルシリルトリフルオロメタンスルホネート (TMSOTf、4.28 g、19.27 mmol、2.5当量) を添加した。反応物を室温で3時間攪拌した。反応混合物をDCM (50 mL) で希釈し、冷飽和NaHCO₃水溶液 (100 mL) 及び水 (100 mL) で洗浄した。有機層を分離し、Na₂SO₄で乾燥させ、濃縮して、表題化合物を黄色の油状物として得、これをフラッシュクロマトグラフィー (勾配溶出：10 CVでDCM中0~10%のMeOH) によって精製した。生成物を無色の油状物として得た (2.5 g、98%、rf=0.45 (DCM中2%のMeOH))。

30

【0227】

【化44】



40

【0228】

化合物4の調製：化合物2 (2.30 g、6.98 mmol、1.0当量) 及びアジド-PEG3-OH (1.83 g、10.5 mmol、1.5当量) を、アルゴン下で無水

50

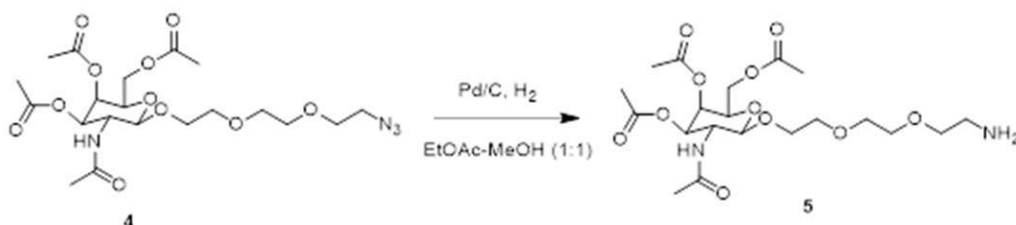
DCM (40 mL) に溶解し、分子ふるい 3 Å (5 g) を溶液に添加した。混合物を、室温で 1 時間攪拌した。次いで、TMSOTf (0.77 g、3.49 mmol、0.5 当量) を混合物に添加し、反応物を一晩攪拌した。分子ふるいを濾過し、濾液を DCM (100 mL) で希釈し、冷飽和 NaHCO₃ 水溶液 (100 mL) 及び水 (100 mL) で洗浄した。有機層を分離し、Na₂SO₄ で乾燥させ、次いで、溶媒を減圧下で除去した。粗物質をフラッシュクロマトグラフィー (勾配溶出: 10 CV で DCM 中の 0~3% の MeOH) によって精製して、表題生成物を淡黄色の油状物とし得た (3.10 g、88%、rf = 0.25 (DCM 中 2% の MeOH))。MS: C₂₀H₃₂N₄O₁₁ の計算値、504.21。実測値 505.4。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 6.21–6.14 (m, 1H), 5.30 (dd, J = 3.4, 1.1 Hz, 1H), 5.04 (dd, J = 11.2, 3.4 Hz, 1H), 4.76 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 4.23–4.08 (m, 3H), 3.91–3.80 (m, 3H), 3.74–3.59 (m, 9H), 3.49–3.41 (m, 2H), 2.14 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.97 (d, J = 4.2 Hz, 6H)。¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 170.6 (C), 170.5 (C), 170.4 (C), 170.3 (C), 102.1 (CH), 71.6 (CH), 70.8 (CH), 70.6 (CH), 70.5 (CH), 70.3 (CH₂), 69.7 (CH₂), 68.5 (CH₂), 66.6 (CH₂), 61.5 (CH₂), 23.1 (CH₃), 20.7 (3 x CH₃)。

10

20

【0229】

【化45】



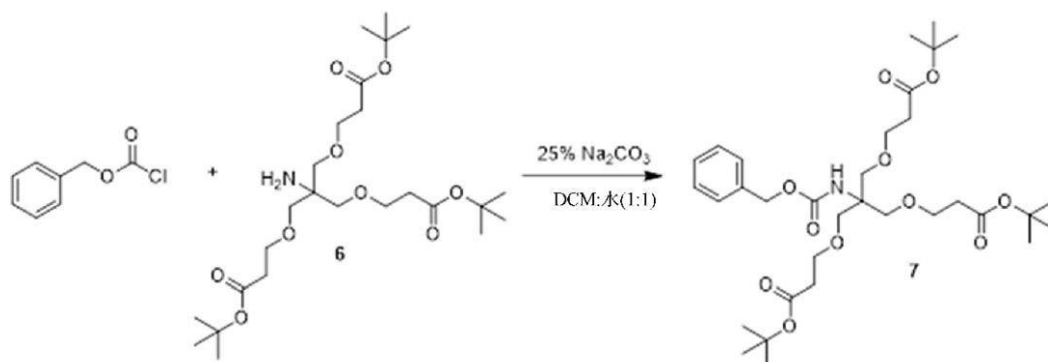
【0230】

化合物 5 の調製: 化合物 4 (1.00 g、1.98 mmol、1.0 当量) を、酢酸エチル (EtOAc) 及び MeOH (30 mL 1:1 v/v) の混合物に溶解し、Pd/C (100 mg) を添加した。反応混合物を、真空/アルゴンサイクル (3 x) を使用して脱気し、バルーン圧力下で一晩水素化した。反応混合物をセライトを通して濾過し、EtOAc (30 mL) で洗浄した。溶媒を減圧下で除去して、表題化合物を無色の油状物として得た (0.95 g、定量収率、rf = 0.25 (DCM 中 10% の MeOH))。化合物を更に精製することなく使用した。MS: C₂₀H₃₄N₂O₁₁ の計算値、478.2。実測値 479.4。

30

【0231】

【化46】



40

50

【0232】

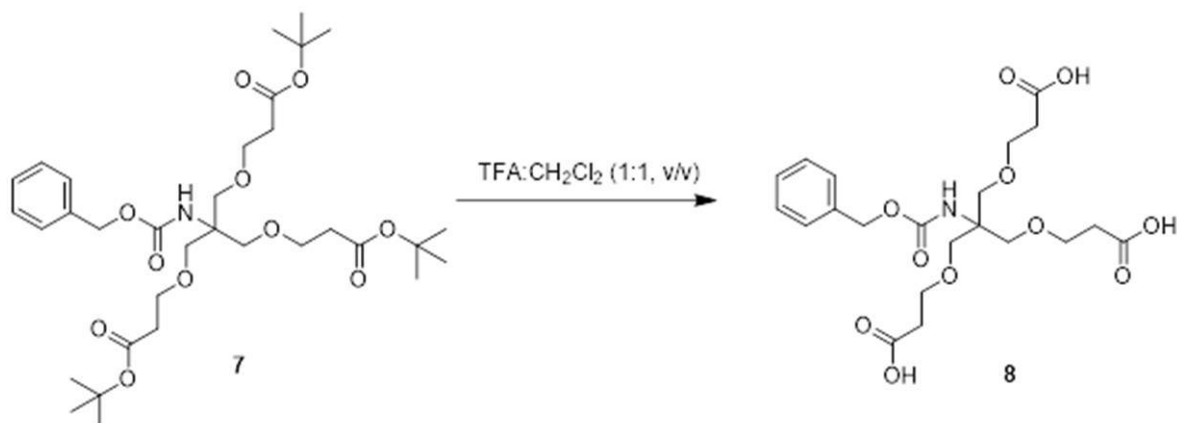
化合物7の調製：トリス{[2-(tert-ブトキシカルボニル)エトキシ]メチル}-メチルアミン6 (3.37 g、6.67 mmol、1.0当量)をDCM/水(40 mL 1:1 v/v)の混合物に溶解し、 Na_2CO_3 (0.18 g、1.7 mmol、0.25当量)を激しく攪拌しながら添加した。クロロギ酸ベンジル(2.94 mL、20.7 mmol、3.10当量)を前の混合物に滴加し、反応物を室温で24時間攪拌した。反応混合物を CH_2Cl_2 (100 mL)で希釈し、水(100 mL)で洗浄した。有機層を分離し、 Na_2SO_4 で乾燥させた。溶媒を減圧下で除去し、得られた粗物質をフラッシュクロマトグラフィー(勾配溶出：12 CVでシクロヘキサン中の0~10%のEtOAc)によって精製して、表題化合物を淡黄色の油状物として得た(3.9 g、91%、rf=0.56(シクロヘキサン中10%のEtOAc))。MS: $\text{C}_{33}\text{H}_{53}\text{NO}_{11}$ の計算値、639.3。実測値640.9。 ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.38–7.26 (m, 5H), 4.97 (s, 2H), 3.54 (t, 6H), 3.50 (s, 6H), 2.38 (t, 6H), 1.39 (s, 27H)。 ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 170.3 (3xC), 154.5 (C), 137.1 (C), 128.2 (2xCH), 127.7 (CH), 127.6 (2xCH), 79.7 (3xC), 68.4 (3xCH₂), 66.8 (3xCH₂), 64.9 (C), 58.7 (CH₂), 35.8 (3xCH₂), 27.7 (9xCH₃)。

10

【0233】

20

【化47】



30

【0234】

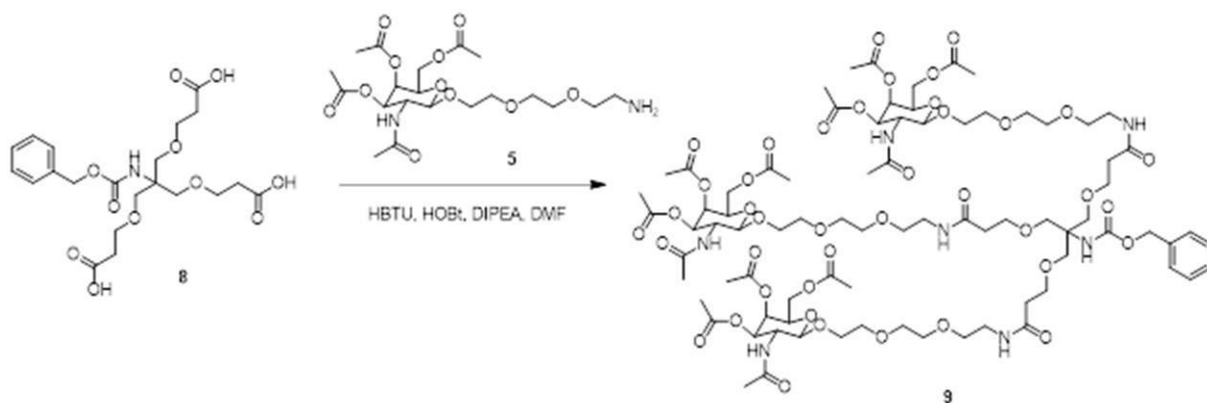
化合物8の調製：Cbz-NH-トリス-Boc-エステル7 (0.20 g、0.39 mmol、1.0当量)をアルゴン下で CH_2Cl_2 (1 mL)に溶解し、トリフルオロ酢酸(TFA、1 mL)を添加し、反応物を室温で1時間攪拌した。溶媒を減圧下で除去し、残渣をトルエン(5 mL)と3回共蒸発させ、高真空下で乾燥させて、化合物をそのTFA塩として得た(0.183 g、98%)。化合物を更に精製することなく使用した。MS: $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{NO}_{11}$ の計算値、471.6。実測値472.4。

40

【0235】

50

【化 4 8】



10

【0236】

化合物9の調製：CbzNH-トリス-COOH8（0.72g、1.49mmol、1.0当量）及びGalNAc-PEG3-NH₂5（3.56g、7.44mmol、5.0当量）を、N,N-ジメチルホルムアミド（DMF）（25mL）に溶解した。次いで、N,N,N',N'-テトラメチル-O-（1H-ベンゾトリアゾール-1-イル）ウロニウムヘキサフルオロホスフェート（HBTU）（2.78g、7.44mmol、5.0当量）、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物（HOBt）（1.05g、7.44mmol、5.0当量）、及びN,N-ジイソプロピルエチルアミン（DIPEA）（2.07mL、11.9mmol、8.0当量）を溶液に添加し、反応物を72時間攪拌した。溶媒を減圧下で除去し、残渣をDCM（100mL）に溶解し、飽和NaHCO₃水溶液（100mL）で洗浄した。有機層をNa₂SO₄で乾燥させ、溶媒を蒸発させ、粗物質をフラッシュクロマトグラフィー（勾配溶出：14CVでDCM中0～5%のMeOH）によって精製した。生成物を淡黄色の油状物として得た（1.2g、43%、rf=0.20（DCM中5%のMeOH））。MS：C₈₁H₁₂₅N₇O₄₁の計算値、1852.9。実測値1854.7。¹H NMR（500 MHz, DMSO-d₆）δ7.90–7.80（m, 10H），7.65–7.62（m, 4H），7.47–7.43（m, 3H），7.38–7.32（m, 8H），5.24–5.22（m, 3H），5.02–4.97（m, 4H），4.60–4.57（m, 3H），4.07–3.90（m, 10H），3.67–3.36（m, 70H），3.23–3.07（m, 25H），2.18（s, 10H），2.00（s, 13H），1.89（s, 11H），1.80–1.78（m, 17H）。¹³C NMR（125 MHz, DMSO-d₆）δ170.1（C），169.8（C），169.7（C），169.4（C），169.2（C），169.1（C），142.7（C），126.3（CH），123.9（CH），118.7（CH），109.7（CH），100.8（CH），70.5（CH），69.8（CH），69.6（CH），69.5（CH），69.3（CH₂），69.0（CH₂），68.2（CH₂），67.2（CH₂），66.7（CH₂），61.4（CH₂），22.6（CH₂），22.4（3xCH₃），20.7（9xCH₃）。

20

30

40

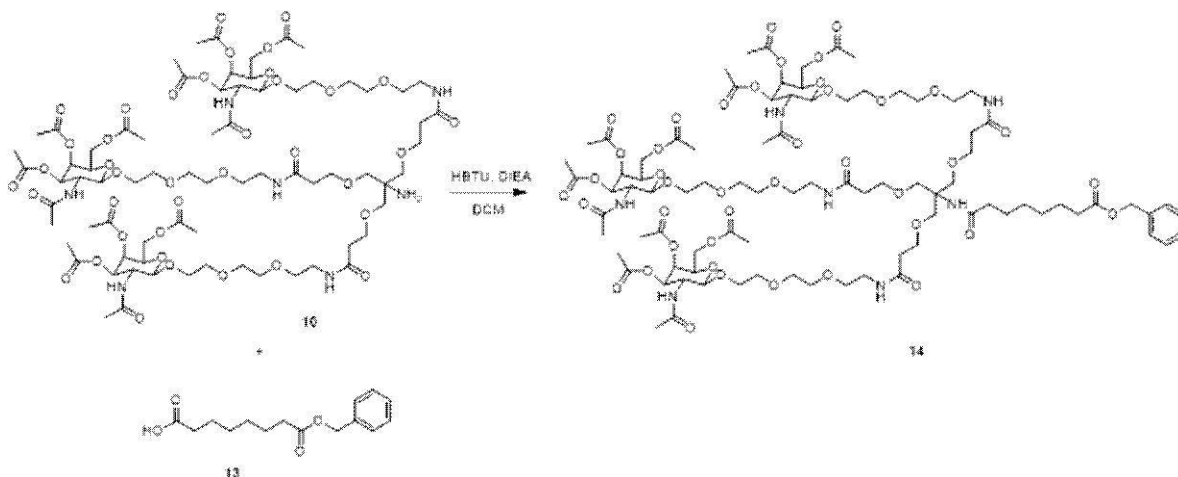
【0237】

化合物10の調製：三分岐GalNAc化合物9（0.27g、0.14mmol、1.0当量）をMeOH（15mL）に溶解し、3滴の酢酸（AcOH）及びPd/C（30mg）を添加した。反応混合物を、真空／アルゴンサイクル（3x）を使用して脱気し、バルーン圧力下で一晩水素化した。反応の完了後、質量分析を行い、得られた混合物をセライトの薄いパッドを通して濾過した。溶媒を蒸発させ、得られた残渣を高真空下で乾燥させ、更に精製することなく次のステップに使用した。生成物を淡黄色の油状物として得た（0.24g、定量収率）。MS：C₇₃H₁₁₉N₇O₃₉の計算値、1718.8。実測値1719.3。

50

【0238】

【化49】



10

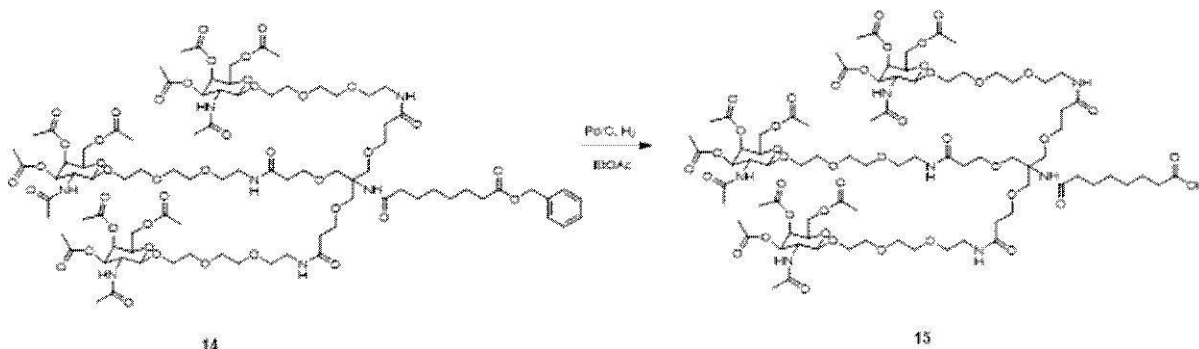
【0239】

化合物14の調製：三分岐GalNAc化合物10（0.45g、0.26mmol、1.0当量）、HBTU（0.19g、0.53mmol、2.0当量）、及びDIPEA（0.23mL、1.3mmol、5.0当量）をアルゴン下でDCM（10mL）に溶解した。この混合物に、DCM（5mL）中の化合物13（0.14g、0.53mmol、2.0当量）の溶液を滴加した。反応物を室温で一晩攪拌した。溶媒を除去し、残渣をEtOAc（50mL）に溶解し、水（50mL）で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させた。溶媒を蒸発させ、粗物質をフラッシュクロマトグラフィー（勾配溶出：20CVでDCM中0～5%のMeOH）によって精製した。生成物を白色のふわふわ固体として得た（0.25g、48%、rf=0.4（DCM中10%MeOH））。MS：C₈₈H₁₃₇N₇O₄₂の計算値、1965.1。実測値1965.6。

20

【0240】

【化50】



30

【0241】

TriGalNAc（15）の調製：三分岐GalNAc化合物14（0.31g、0.15mmol、1.0当量）をEtOAc（15mL）に溶解し、Pd/C（40mg）を添加した。反応混合物を、真空／アルゴンサイクル（3x）を使用することによって脱気し、バルーン圧力下で一晩水素化した。反応の完了を質量分析によって監視し、得られた混合物をセライトの薄いパッドを通して濾過した。溶媒を減圧下で除去し、得られた残渣を高真空下で一晩乾燥させた。残渣を、更に精製することなく（0.28g、定量的収率）、オリゴヌクレオチドへのコンジュゲーションのために使用した。MS：C₈₁H₁₃₁N₇O₄₂の計算値、1874.9。実測値1875.3。

40

i i i) オリゴヌクレオチド合成

【0242】

50

表 8 :

一本鎖ID	配列5'-3'	RP HPLCによる純度(%)
X91382	(NH2-DEG)gacuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(invabasic)(invabasic)	89.5
X91383	(NH2-DEG)aaGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfuAfaAfasusa(invabasic)(invabasic)	91.6
X91384	(NH2-DEG)ugggauUfuCfaUfUfguaaccaasgsa(invabasic)(invabasic)	94.0
X91385	(NH2-DEG)GfaCfuUfuCfaUfcCfuGfgAfaAfuAfsusAf	90.6
X91386	(NH2-DEG)AfaGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfaUfaAfsusAf	91.2
X91387	(NH2-DEG)UfgGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfsusAf	88.7
X91403	(NH2C12)gacuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(invabasic)(invabasic)	94.2
X91404	(NH2C12)aaGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfuAfaAfasusa(invabasic)(invabasic)	96.5
X91405	(NH2C12)ugggauUfuCfaUfUfguaaccaasgsa(invabasic)(invabasic)	91.3
X91406	(NH2C12)GfaCfuUfuCfaUfcCfuGfgAfaAfuAfsusAf	95.0
X91407	(NH2C12)AfaGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfaUfaAfsusAf	97.0
X91408	(NH2C12)UfgGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfsusAf	90.0
X91415	(invabasic)(invabasic)gsascuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(NH2C6)	96.4
X91416	(invabasic)(invabasic)asasGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfuAfaAfaa(NH2C6)	77.4
X91417	(invabasic)(invabasic)usgsggauUfuCfaUfUfguaaccaaga(NH2C6)	96.7
X91418	GfsasCfuUfuCfaUfcCfuGfgAfaAfuAfuAf(NH2C6)	96.0
X91419	AfsasGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfaUfaAfuAf(NH2C6)	91.8
X91420	UfsgsGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfgAf(NH2C6)	93.1
X91379	gsascuuuCfaUfCfCfuggaaauaaua(GalNAc)	92.8
X91380	asasGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfuAfaAfaa(GalNAc)	95.7
X91446	usgsggauUfuCfaUfUfguaaccaaga(GalNAc)	92.1
X38483	usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaagucscsa	91.0
X91381	usAfsUfuAfaAfaAfaaUfcUfuGfcuusudTdT	90.0
X38104	usCfsuugGfuUfaAfaAfaAfaAfuuccasusc	95.4
X91398	usAfsuAfuUfuCfcAfgGfaUfgAfaAfgUfcsCfsa	90.0
X91400	usAfsuUfaUfaAfaAfaUfaUfcUfuGfcUfusUfsudTdT	88.7
X91402	usCfsuUfgGfuUfaCfaUfgAfaAfuCfcCfasUfsc	89.6

20

30

40

NH₂C₆: アミノヘキシルリンカー

【0244】

オリゴヌクレオチドを、ホスホラミダイトアプローチに従って固相上で合成した。スケールに応じて、Merma de 12 (Bio Automation Corporation) 又は AKTA Oligo pilot (GE Healthcare) のいずれかを使用した。

【0245】

invabasic (CPG、480 Å、86 µmol/g の充填、LGC Bio search カタログ番号 BCG-1047-B) 又は 2'-FA (CPG、520 Å、90 µmol/g の充填、LGC Bio search カタログ番号 BCG-1039-B) 又は NH₂C6 (CPG、520 Å、85 µmol/g の充填、LGC Bio search カタログ番号 BCG-1397-B) 又は GalNAc (CPG、500 Å、57 µmol/g の充填、Primetech) 又は 2'-O-メチルC (CPG、500 Å、84 µmol/g の充填 LGC Bio search カタログ番号 BCG-10-B) 又は 2'-O-メチルA (CPG、497 Å、85 µmol/g の充填、LGC Bio search、カタログ番号 BCG-1029-B) 又は dT (CPG、497 Å、87 µmol/g の充填、LGC Bio search、カタログ番号 BCG-1055-B) のいずれかを充填した制御された細孔ガラスから作られた市販の固体支持体上で合成を行った。

10

【0246】

2'-O-Me、2'-F RNA ホスホラミダイト及び補助試薬を、SAFC Pro ligo (Hamburg, Germany) から購入した。

20

【0247】

具体的には、以下の 2'-O-メチルホスホラミダイトを使用した：5'-(4,4'-ジメトキシトリチル)-N-ベンゾイル-アデノシン 2'-O-メチル-3'-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホラミダイト、5'-(4,4'-ジメトキシトリチル)-N-ベンゾイル-シチジン 2'-O-メチル-3'-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホラミダイト、5'-(4,4'-ジメトキシトリチル)-N-ジメチルホルムアミジン-グアノシン 2'-O-メチル-3'-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホラミダイト、5'-(4,4'-ジメトキシトリチル)-ウリジン 2'-O-メチル-3'-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホラミダイト。

30

【0248】

以下の 2'-F ホスホラミダイトを使用した：5'-ジメトキシトリチル-N-ベンゾイル-デオキシアデノシン 2'-フルオロ-3'-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホラミダイト、5'-ジメトキシトリチル-N-アセチル-デオキシシチジン 2'-フルオロ-3'-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホラミダイト、5'-ジメトキシトリチル-N-イソブチル-デオキシグアノシン 2'-フルオロ-3'-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホラミダイト、及び 5'-ジメトキシトリチル-デオキシウリジン 2'-フルオロ-3'-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホラミダイト。

40

【0249】

オリゴヌクレオチドの 5' 末端に必要なアミノリンカーを導入するために、2-[2-(4-モノメトキシトリチル)アミノエトキシ]エチル-(2-シアノエチル)-N,N-ジイソプロピル]-ホスホラミダイト (Glen Research カタログ番号 1905) 及び 12-(トリフルオロアセチルアミノ)ドデシル-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホラミダイト (ChemGenes カタログ番号 CLP-1575) を用いた。invabasic 修飾を、5-O-ジメトキシトリチル-1,2-ジデオキシリボース-3'-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホラミダイト (ChemGenes カタログ番号 ANP-1422) を使用して、導入した。

50

【0250】

無水アセトニトリル中の50%無水DCMに溶解した2'-O-メチル-ウリジンホスホラミダイトを除き、全てのビルディングブロックを、分子ふるい(3 Å)を含有する無水アセトニトリル(100mM(Mer made 12)又は200mM(AKTA Oligopilot))に溶解した。ヨウ素(ピリジン/H₂O 9:1 v/v中50mM)を酸化試薬として使用した。5-エチルチオテトラゾール(ETT、アセトニトリル中500mM)を活性化剤溶液として使用した。ホスホルチオエート連結の導入のためのチオール化を、アセトニトリル/ピリジン 4:6 v/v中の100mMのキサンタン水素化物(TCI、カタログ番号6846-35-1)を使用して実施した。

【0251】

カップリング時間は、別段の定めた場合を除いて、5.4分であった。5'アミノ修飾を、各カップリングにつき11分のカップリング時間を有する二重カップリングステップ(総カップリング時間22分)を用いて配列に組み込んだ。酸化剤の接触時間を1.2分に設定し、チオール化時間は5.2分であった。

【0252】

NH₂DEG配列からのMMT基を除き、最終のDMT基を除去して配列を合成した。

【0253】

合成の終わりに、28~30%水酸化アンモニウム(Sigma-Aldrich、カタログ番号221228)及び40%メチルアミン水溶液(Sigma-Aldrich、カタログ番号8220911000)の1:1体積溶液を使用して、6℃で16時間、オリゴヌクレオチドを固体支持体から切断した。次いで、固体支持体を濾過し、濾過器をH₂Oで完全に洗浄し、合わせた溶液の体積を減圧下での蒸発によって低減させた。得られた溶液のpHを、10%のAcOH(Sigma-Aldrich、カタログ番号A6283)でpH7に調整した。

【0254】

粗物質を、逆相(RP)HPLC又はアニオン交換(AEX)HPLCのいずれかによって精製した。

【0255】

RP HPLC精製は、AKTA Pure機器(GE Healthcare)で、XBridge C18 Prep 19×50mmカラム(Waters)を使用して行った。緩衝液Aは、100mMのトリエチルアンモニウムアセテート(TEAAc、Biosolve)pH7であり、緩衝液Bは、緩衝液A中の95%のアセトニトリルを含有した。10mL/分の流量及び60℃の温度を用いた。280nmでのUV追跡を記録した。120カラム体積で0%B~100%Bの勾配を用いた。適切な画分をプールし、3Mの酢酸ナトリウム(NaOAc)(Sigma-Aldrich)、pH5.2及び85%のエタノール(VWR)で冷凍庫内で沈殿させた。ペレットを、遠心分離によって単離し、水(50mL)に再溶解し、5MのNaCl(5mL)で処理し、Sephadex G25-Fine樹脂(GE Healthcare)を充填した50×165mm ECOカラム(YMC、Dinslaken, Germany)を使用して、Akt a Pure機器でサイズ排除HPLCによって脱塩した。

【0256】

AEX HPLC精製は、AKTA Pure機器(GE Healthcare)で、TSKゲルSuperQ-5PW 20×200mm(BISCHOFF Chromatography)を使用して行った。緩衝液Aは、20mMのリン酸ナトリウム(Sigma-Aldrich)pH7.8であり、緩衝液Bは、1.4Mの臭化ナトリウム(Sigma-Aldrich)を添加した緩衝液Aと同じであった。10mL/分の流量、60℃の温度を用いた。280nmでのUV追跡を記録した。27カラム体積で10%B~100%Bの勾配を用いた。適切な画分をプールし、3MのNaOAc、pH5.2及び85%のエタノールで冷凍庫内で沈殿させた。ペレットを、遠心分離によって単離し、水(50mL)に再溶解し、5MのNaCl(5mL)で処理し、サイズ排除クロマ

10

20

30

40

50

トグラフィーによって脱塩した。

【0257】

MMT基を、水中の25%酢酸で除去した。反応が完了したら、溶液を中和し、試料をサイズ排除クロマトグラフィーによって脱塩した。

【0258】

一本鎖を、LCQ Deca XP-plus Q-ESI-TOF質量分析計(Thermo Finnigan)又はCompact ESI-Qq-TOF質量分析計(Bruker Daltonics)のいずれかと組み合わせたDionex Ultimate 3000(Thermo Fisher Scientific)HPLCシステムで、2.1×50mm XBridge C18カラム(Waters)での分析LC-MSによって分析した。緩衝液Aは、16.3mMのトリエチルアミン、100mMの1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール(HFIP)、及びH₂O中の1%のMeOHであり、緩衝液Bは、95%のMeOH中の緩衝液Aを含有した。250μL/分の流量、60℃の温度を用いた。260及び280nmでのUV追跡を記録した。0.5分以内の1~40%Bの勾配、続いて13分以内の40~100%Bの勾配を用いた。メタノール(LC-MSグレード)、水(LC-MSグレード)、1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール(puriss. p. a.)、及びトリエチルアミン(puriss. p. a.)をSigma-Aldrichから購入した。

10

iv) 5'末端又は3'末端でのTriGalNAcテザー2(GalNAc-T2)コン

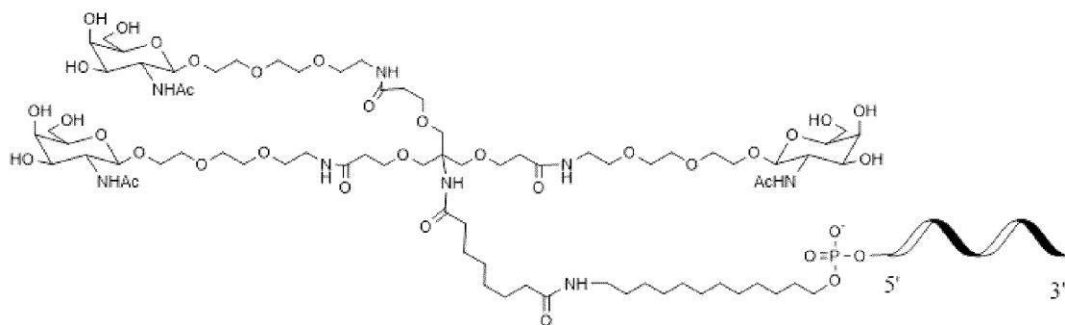
20

ジュゲーション

5'-GalNAc-T2コンジュゲート

【0259】

【化51】



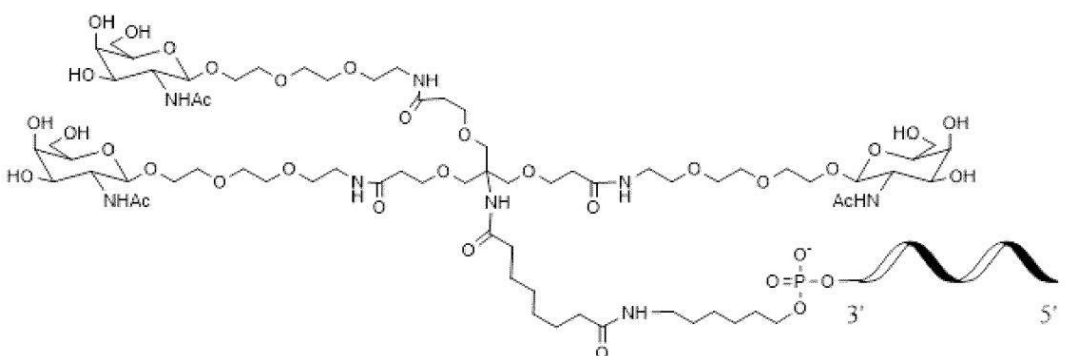
30

【0260】

3'-GalNAc-T2コンジュゲート

【0261】

【化52】



40

【0262】

50

TriGalNAcテザー2 NHSエステルの調製：DMF（2.1 mL）中のカルボン酸テザー2（化合物15、227 mg、121 μ mol）の溶液に、N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）（15.3 mg、133 μ mol）及びN,N'-ジイソプロピルカルボジイミド（DIC）（19.7 μ L、127 μ mol）を添加した。溶液を室温で18時間攪拌し、続くコンジュゲーション反応のために精製することなく使用した。

【0263】

triGalNAcテザー2コンジュゲーションの一般的手順：アミン修飾一本鎖を、50 mMの炭酸塩／重炭酸塩緩衝液 pH 9.6／DMSO 4：6（v／v）中、700 OD／mLで溶解し、この溶液に、1モル当量のDMF中のテザー2 NHSエステル（57 mM）溶液を添加した。反応を室温で実施し、1時間後に、別のモル当量のNHSエステル溶液を添加した。反応物を1時間超進行させ、反応の進行をLCMSによって監視した。出発物質の定量的な消費を達成するために、アミノ修飾オリゴヌクレオチドに対して少なくとも2モル当量過剰のNHSエステル試薬が必要であった。反応混合物を水で15倍に希釈し、Sartoriusから1.2 μ mフィルターを通して1回濾過し、次いで、Akta Pure（GE Healthcare）機器で保存相（RP HPLC）によって精製した。

10

【0264】

精製は、WatersからのXBridge C18 Prep 19×50 mmカラムを使用して実施された。緩衝液Aは、100 mMのTEEA pH 7であり、緩衝液Bは、緩衝液A中の95%のアセトニトリルを含有した。10 mL／分の流量及び60℃の温度を用いた。280 nmでのUV追跡を記録した。60カラム体積で0～100% Bの勾配を用いた。

20

【0265】

全長コンジュゲートオリゴヌクレオチドを含有する画分と一緒にプールし、3 MのNaOAc、pH 5.2及び85%のエタノールで冷凍庫内で沈殿させ、次いで、水中に1000 OD／mLで溶解させた。完了するまで、O-アセテートを水中の20%水酸化アンモニウムで除去した（LC-MSによって監視した）。

【0266】

コンジュゲートを、Akta Pure（GE Healthcare）機器で、Sephadex G25 Fine樹脂（GE Healthcare）を使用してサイズ排除クロマトグラフィーによって脱塩し、単離収率60～80%でコンジュゲートオリゴヌクレオチドを得た。

30

【0267】

40

50

【表 10】

表 9 :

センス鎖ID	センス鎖配列5'-3'	RP HPLCによる 純度(%)
X91409	(GalNAc-T2)(NH ₂ C12)gacuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(invabasic)(invabasic)	85.0
X91410	(GalNAc-T2)(NH ₂ C12)aaGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfuAfaAfasusa(invabasic)(invabasic)	92.3
X91411	(GalNAc-T2)(NH ₂ C12)ugggauUfuCfaUfUfguaaccaasgsa(invabasic)(invabasic)	92.7
X91412	(GalNAc-T2)(NH ₂ C12)GfaCfuUfuCfaUfcCfuGfgAfaAfuAfsusAf	89.7
X91413	(GalNAc-T2)(NH ₂ C12)AfaGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfaUfaAfsusAf	85.1
X91414	(GalNAc-T2)(NH ₂ C12)UfgGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfsGsAf	85
X91433	(invabasic)(invabasic)gsascuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(NHC6)(GalNAc-T2)	85.3
X91434	(invabasic)(invabasic)asasGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfuAfaAfaA(NHC6)(GalNAc-T2)	85.8
X91435	(invabasic)(invabasic)usgsggauUfuCfaUfUfguaaccaaga(NHC6)(GalNAc-T2)	84.0
X91436	GfsasCfuUfuCfaUfcCfuGfgAfaAfuAfuAf(NHC6)(GalNAc-T2)	80.0
X91437	AfsasGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfaUfaAfuAf(NHC6)(GalNAc-T2)	87.5
X91438	UfsgsGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfgAf(NHC6)(GalNAc-T2)	85.2

10

20

【0268】

コンジュゲートを、Compact ESI-Qq-TOF 質量分析計 (Bruker Daltonics) を備えた Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific) HPLC システムで、2.1×50 mm X Bridge C18 カラム (Waters) を用いた HPLC-MS 分析によって特徴付けた。緩衝液 A は、16.3 mM のトリエチルアミン、H₂O 中の 1% の MeOH 中の 100 mM の HFIP であり、緩衝液 B は、緩衝液 A 中の 95% の MeOH を含有した。250 μL / 分の流量及び 60 °C の温度を用いた。260 及び 280 nm での UV 追跡を記録した。31 分以内の 1 ~ 100% B の勾配を用いた。

30

【0269】

v) 二本鎖アニーリング

所望の siRNA 二本鎖を生成するために、両鎖の等モル水溶液を組み合わせることによって、2つの相補鎖をアニーリングした。混合物を 70 °C で 5 分間水槽に置き、続いて、2 時間以内に周囲温度に冷却した。二本鎖を 2 日間凍結乾燥し、-20 °C で保存した。

40

【0270】

Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific) HPLC システムで、Superdex (商標) 75 Increase 5 / 150 GL カラム 5×153-158 mm (Cytiva) での分析的 SEC HPLC によって、二本鎖を分析した。移動相は、10% のアセトニトリルを含有する 1×PBS からなった。定組成勾配を、室温で 1.5 mL / 分の流量で 10 分間実行した。260 及び 280 nm での UV 追跡を記録した。水 (LC-MS グレード) を Sigma-Aldrich から購入し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS、10 倍、pH 7.4) を GIBCO (Thermo Fisher Scientific) から購入した。

【0271】

50

調製された G a l N A c コンジュゲートを以下の表にまとめる。これらは、3つの異なる標的遺伝子に対して指向された。対応する一本鎖とともに s i R N A コード、配列情報、及び二本鎖の純度が捕捉される。

【 0 2 7 2 】

【表 1 1 - 1 】

表 1 0 :

標的	二本鎖 ID	ssRN ID	ssRNA 配列 5'-3'	HPLC による二本鎖純度 (%)
G O	ETX002	X91409	(GalNAc-T2)(NH ₂ C12)gacuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(invabasic)(invabasic)	94.1
		X38483	usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaagucscsa	
	ETX004	X91412	(ET-GalNAc-T2CO)(NH ₂ C12)GfaCfuUfuCfaUfcCfuGfgAfaAfuAfsusAf	96.4
		X91398	usAfsuAfuUfuCfcAfgGfaUfgAfaAfgUfcsCfsa	
	ETX006	X91433	(invabasic)(invabasic)gsascuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(NHC6)(GalNAc-T2)	94.1
		X38483	usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaagucscsa	
	ETX008	X91436	GfsasCfuUfuCfaUfcCfuGfgAfaAfuAfuAf(NHC6)(GalNAc-T2)	96.7
		X91398	usAfsuAfuUfuCfcAfgGfaUfgAfaAfgUfcsCfsa	
C5	ETX011	X91410	(GalNAc-T2)(NH ₂ C12)aaGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfaUfaAfsusa(invabasic)(invabasic)	93.5
		X91381	usAfsUfuAfuAfaAfaUfaUfcUfuGfcuusudTdT	
	ETX013	X91413	(GalNAc-T2)(NH ₂ C12)AfaGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfaUfaAfsusAf	95.3
		X91400	usAfsuUfaUfaAfaAfaUfaUfcUfuGfcUfusUfsudTdT	
	ETX015	X91434	(invabasic)(invabasic)asasGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfaUfaAfaUfa(NHC6)(GalNAc-T2)	95.3
		X91381	usAfsUfuAfuAfaAfaUfaUfcUfuGfcuusudTdT	
	ETX017	X91437	AfsasGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfaUfaAfuAf(NHC6)(GalNAc-T2)	97.1
		X91400	usAfsuUfaUfaAfaAfaUfaUfcUfuGfcUfusUfsudTdT	

【 0 2 7 3 】

10

20

30

40

50

【表 1 1 – 2】

T T R	ETX02 0	X9141 1	(GalNAc-T2)(NH ₂ C12)ugggauUfuCfAfUfguaaccaasgsa(invabasic)(invabasic)	97. 5
		X3810 4	usCfsuugGfuuAfaugAfaAfucccasusc	
	ETX02 2	X9141 4	(GalNAc-T2)(NH ₂ C12)UfgGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfsGsAf	91. 9
		X9140 2	usCfsuUfgGfuUfaCfaUfgAfaAfuCfcCfasUfsc	
	ETX02 4	X9143 5	(invabasic)(invabasic)usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga(NHC6)(GalNAc-T2)	95. 3
		X3810 4	usCfsuugGfuuAfaugAfaAfucccasusc	
	ETX02 6	X9143 8	UfsgsGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfgAf(NHC6)(GalNAc-T2)	98. 1
		X9140 2	usCfsuUfgGfuUfaCfaUfgAfaAfuCfcCfasUfsc	

10

【0 2 7 4】

20

以下のスキームは、合成の経路を更に提示している。

スキーム 1：

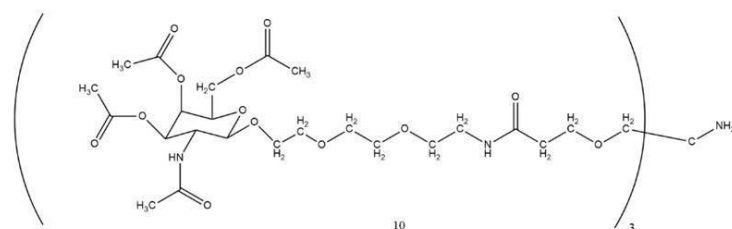
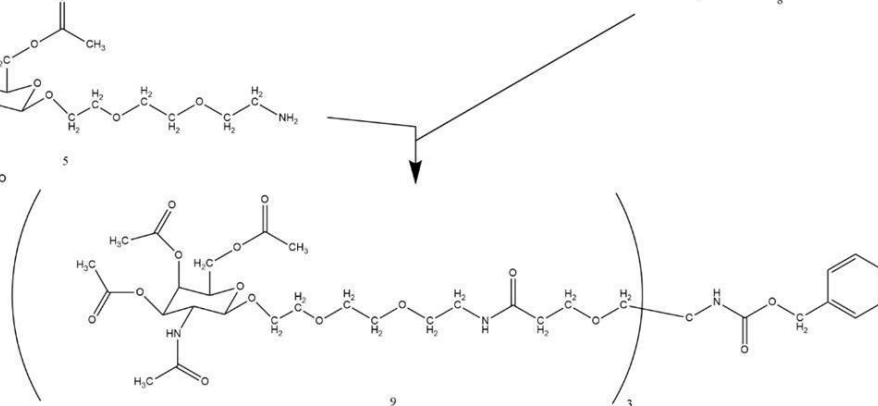
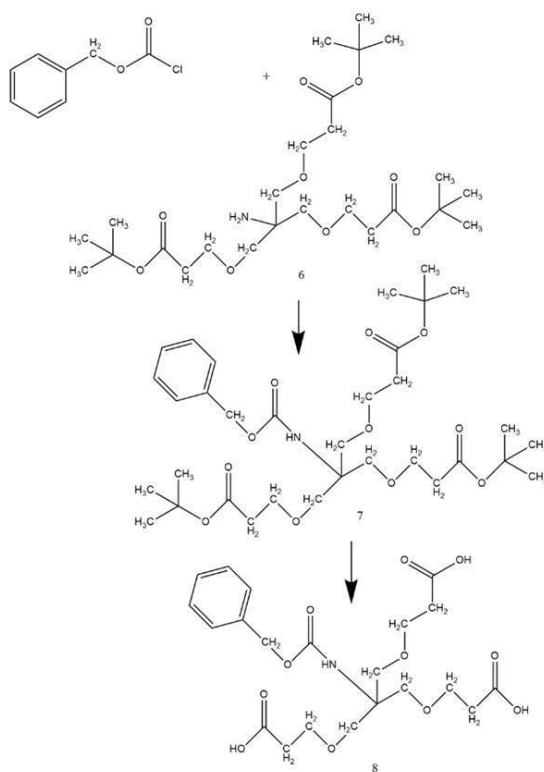
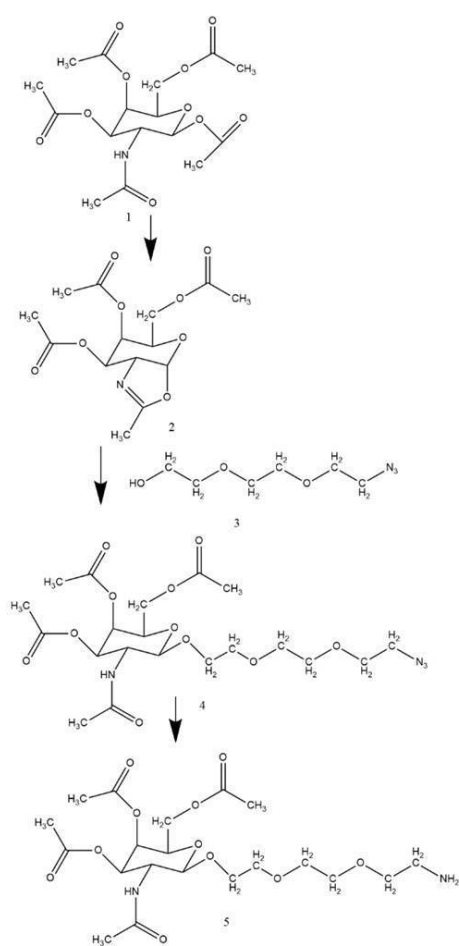
【0 2 7 5】

30

40

50

【化 5 3】



10

20

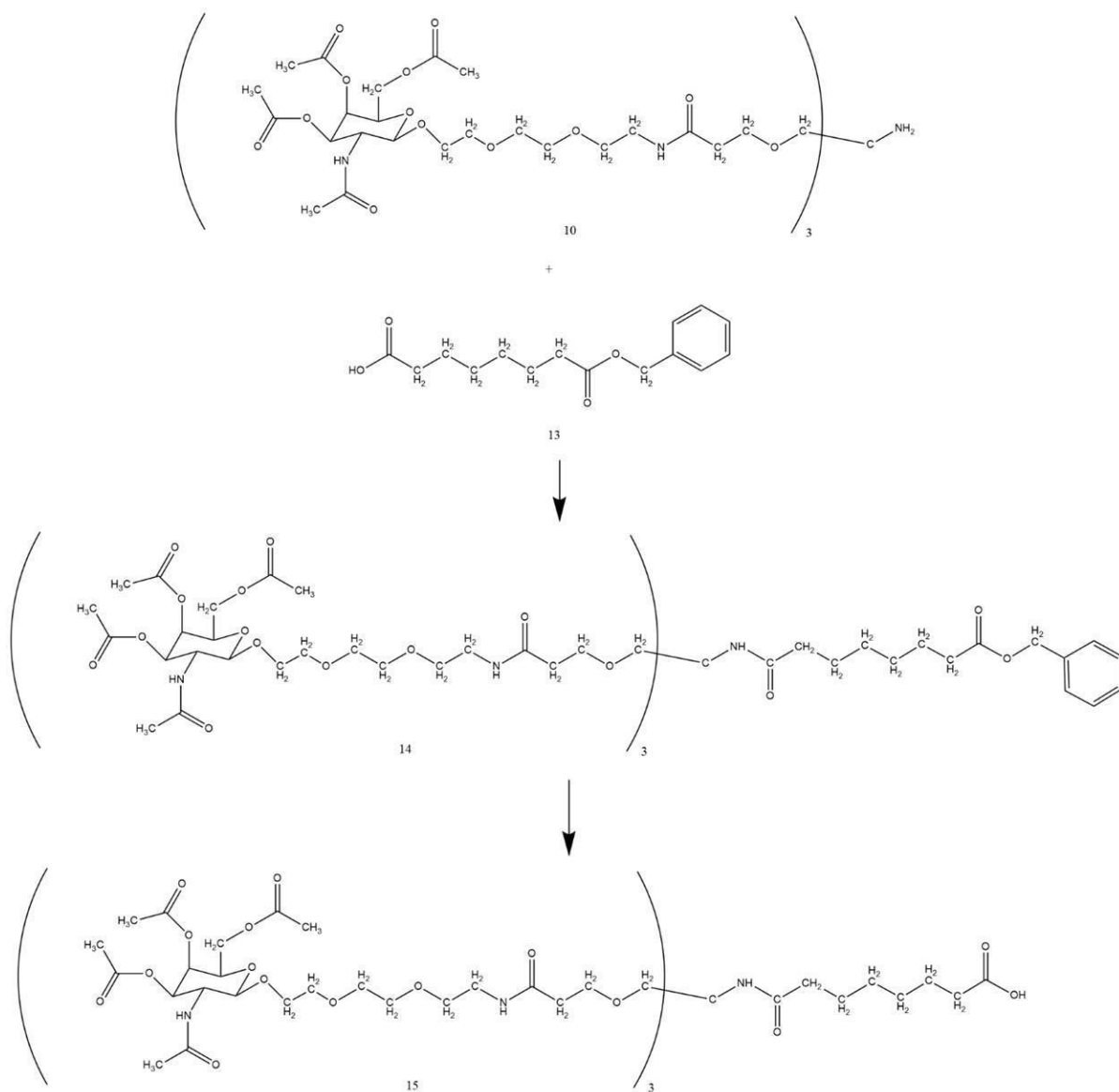
30

40

【 0 2 7 6 】
 スキーム 2 :
 【 0 2 7 7 】

50

【化 5 4】



10

20

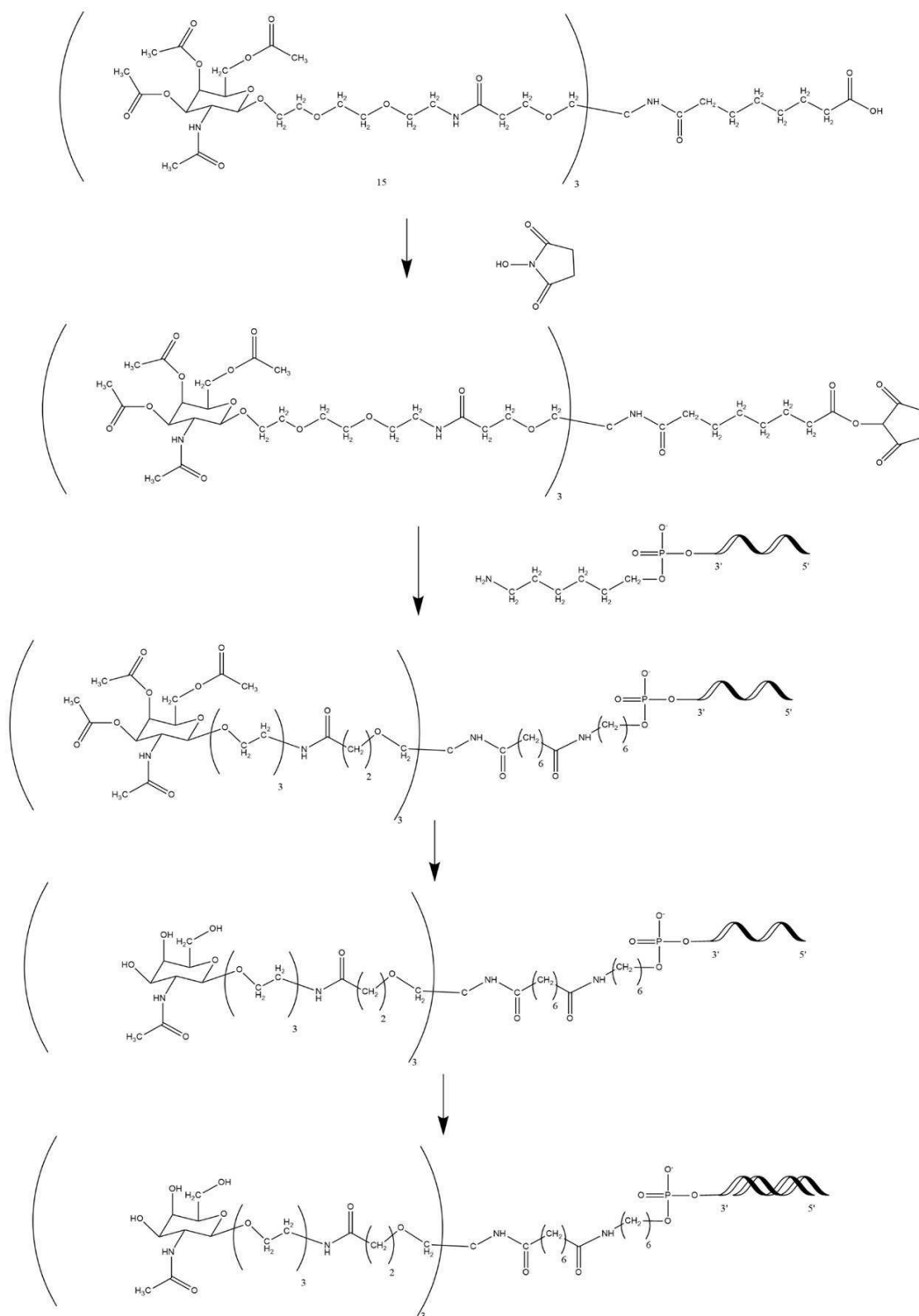
30

40

50

【 0 2 7 8 】
 スキーム 3 :
 【 0 2 7 9 】

【化 5 5】



10

20

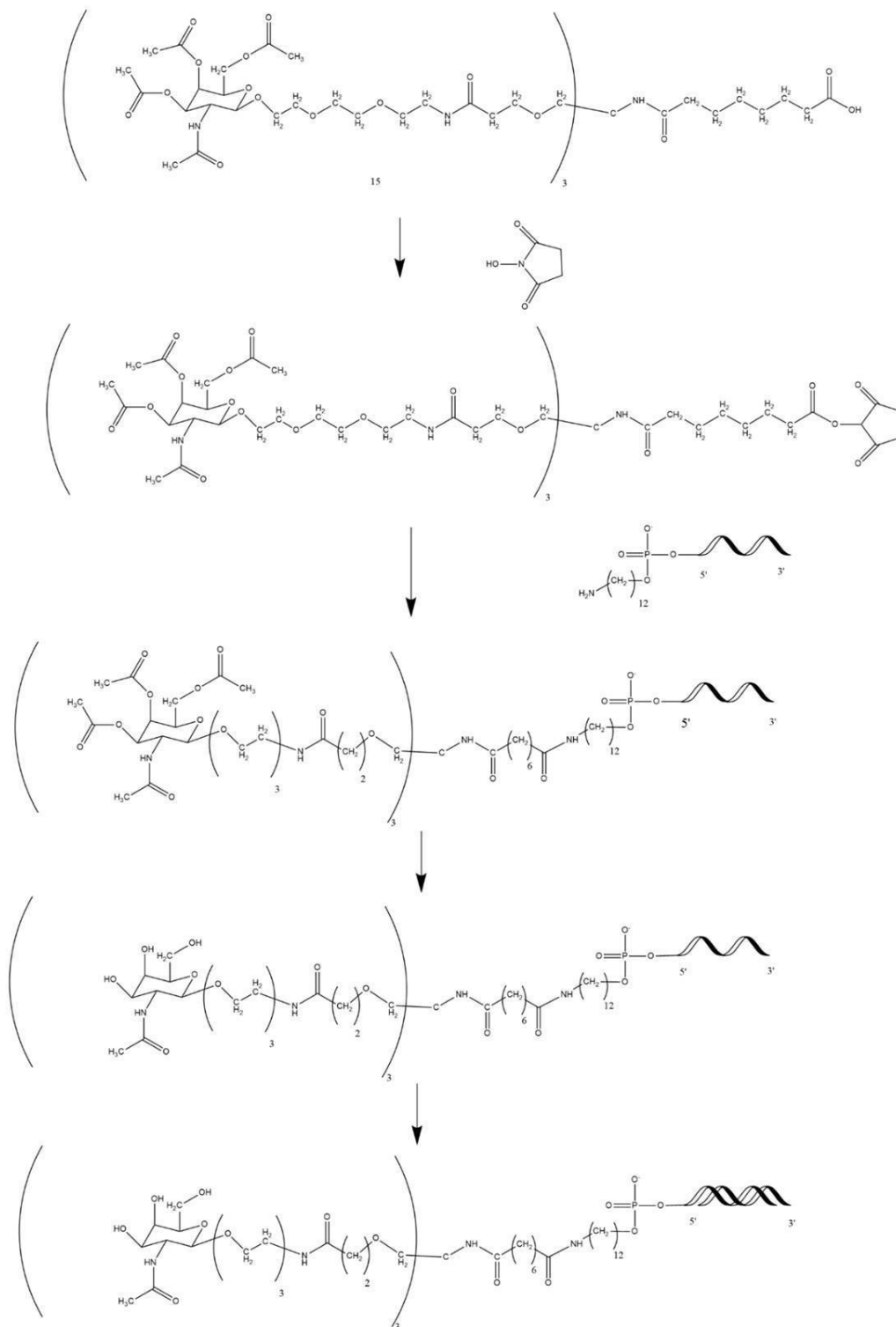
30

40

【0280】
 スキーム 4 :
 【0281】

50

【化 5 6】



【0282】

実施例 3

GalNAc-siRNA 構築物 ETX006 及び ETX015 についてのマウスデータ
ETX006 (HAO1 mRNA を標的とする) T2a 逆脱塩基

インビボマウス薬理学研究を実施し、最大で 3 mg / kg の GalNAc コンjugate 修飾 siRNA ETX006 の単回皮下用量後の肝臓組織中の HAO1 mRNA のノックダウン及び血清グリコレートレベルの併発増加を示した。

【0283】

約 8 週齢の雄 C57BL / 6 マウスを、21 匹のマウスの群に無作為に割り当てた。研

究の0日目に、動物は、0.3若しくは3mg/kgの単回皮下用量の生理食塩水（滅菌0.9%塩化ナトリウム）中に溶解したGalNAc-siRNA、又は対照として生理食塩水のみを受けた。研究の1日目、2日目、4日目、7日目、14日目、21日目、及び28日目に、各群からの3匹のマウスを安楽死させ、血清及び肝臓試料を採取した。

【0284】

0日目に、5匹の未処置マウスの群から血清を採取して、グリコレート濃度のベースライン測定値を得た。

【0285】

更なる分析まで、血清を-80℃で保存した。肝臓試料（約50mg）をRNA laterで処理し、4℃で一晩保存した後、-80℃で保存した。

【0286】

HAO1 mRNA（サーモアッセイID Mm00439249__m1）及びハウスキーピング遺伝子GAPDH mRNA（サーモアッセイID Mm99999915__g1）について、定量的リアルタイムPCRを使用して、肝臓試料を分析した。デルタデルタCt法を使用して、GAPDHに対して正規化され、生理食塩水対照群に対してHAO1発現の変化を計算した。

【0287】

単回3mg/kg用量のETX006は、7日後にHAO1 mRNA発現を80%超阻害した（図11）。HAO1発現の抑制は持続的であり、研究の終了まで継続し、ETX006は28日目にHAO1 mRNAの60%超の阻害を維持した。0.3mg/kgの単回用量もまた、生理食塩水対照群と比較した場合、HAO1発現を阻害し、HAO1発現レベルは、研究の28日目にのみ正常レベルに達した。

【0288】

HAO1 mRNA発現の抑制は、血清グリコレートレベルの増加を引き起こすと予想される。LC-MS/MSを使用して血清グリコレート濃度を測定した（図12）。単回3mg/kg用量のETX006は、血清グリコレート濃度の有意な増加を引き起こし、投薬の14日後にピークレベルに達し、28日目に試験が終了するまでベースラインレベル（0日目）及び生理食塩水対照群よりも高いままであった。単回0.3mg/kg用量のETX006は、ベースライン及び生理食塩水対照群で見られるレベルを上回る、血清グリコレート濃度のより小さく、より一時的な増加を示し、非常に少量の用量が血清中の代謝バイオマーカーの濃度にも影響を及ぼす可能性があることを実証した。

【0289】

ETX015（C5 mRNAを標的とする）T2a逆脱塩基

インビボマウス薬理学的研究を実施し、最大で3mg/kgのGalNAcコンジュゲート修飾siRNA ETX015の単回皮下用量後の肝臓組織中のC5 mRNAのノックダウンを示し、血清C5タンパク質濃度の減少をもたらした。

【0290】

約8週齢の雄C57BL/6マウスを、21匹のマウスの群に無作為に割り当てた。研究の0日目に、動物は、0.3、1若しくは3mg/kgの単回皮下用量の生理食塩水（滅菌0.9%塩化ナトリウム）中に溶解したGalNAc-siRNA、又は対照として生理食塩水のみを受けた。研究の1日目、2日目、4日目、7日目、14日目、21日目、及び28日目に、各群からの3匹のマウスを安楽死させ、血清及び肝臓試料を採取した。

【0291】

更なる分析まで、血清を-80℃で保存した。肝臓試料（約50mg）をRNA laterで処理し、4℃で一晩保存した後、-80℃で保存した。

【0292】

C5 mRNA（サーモアッセイID Mm00439275__m1）及びハウスキーピング遺伝子GAPDH mRNA（サーモアッセイID Mm99999915__g1）について、定量的リアルタイムPCRを使用して、肝臓試料を分析した。デルタデルタ

10

20

30

40

50

C t 法を使用して、G A P D H に対して正規化され、生理食塩水対照群に対して C 5 発現の変化を計算した。

【0293】

E T X 0 1 5 は、用量依存的に C 5 m R N A の発現を阻害し（図 1 3）、3 m g / k g 用量は、C 5 m R N A の 8 5 % 超の低減を達成した。C 5 発現の抑制は持続的であり、3 m g / k g 用量の各分子は、2 8 日目に試験が終了するまで、C 5 m R N A の明確なノックダウンを示した。3 m g / k g の E T X 0 1 5 を投薬されたマウスは、依然として、投薬の 2 8 日後に正常な肝臓の C 5 m R N A レベルの 5 0 % 未満を示した。

【0294】

C 5 タンパク質レベル分析のために、市販の C 5 E L I S A キット（A b c a m a b 2 6 4 6 0 9）を使用して血清試料を測定した。一致する時点での生理食塩水群の平均に対する血清 C 5 レベルを計算した。

【0295】

血清タンパク質データは、m R N A 分析を支持する（図 1 4）。E T X 0 1 5 は、血清 C 5 タンパク質濃度の用量依存的減少を引き起こした。3 m g / k g 及び 1 m g / k g 用量の E T X 0 1 5 は、血清 C 5 タンパク質レベルの 9 0 % 超の低減を達成した。最高の用量は、生理食塩水対照と比較して、C 5 タンパク質発現の持続的な抑制を示し、研究の 2 8 日目に C 5 が 7 0 % 超低減した。

【0296】

実施例 4 G a l N A c - s i R N A 構築物 E T X 0 2 4 の N H P データ

血清トランスサイレチン（T T R）タンパク質レベルを定量することによって、非ヒト霊長類（N H P）において、E T X 0 2 4 薬理学を評価した。1 m g / k g の単回皮下用量の G a l N A c コンジュゲート修飾 s i R N A E T X 0 2 4 は、T T R タンパク質発現の持続的な抑制を示した。

【0297】

雄カニクイザル（3 ~ 5 歳、2 ~ 3 k g）を 3 匹の動物の群に割り当てた。動物を 2 週間順応させ、投薬の 1 4 日前に採血して、ベースライン T T R 濃度を得た。肝生検を投薬の 1 8 日又は 3 8 日前に実施して、ベースライン m R N A レベルを得た。試験の 0 日目に、動物は、1 m g / k g の単回皮下用量の生理食塩水（滅菌 0 . 9 % 塩化ナトリウム）中に溶解した G a l N A c - s i R N A E T X 0 2 4 を受けた。研究の 3 日目、1 4 日目、2 8 日目、4 2 日目、5 6 日目、7 0 日目及び 8 4 日目に、肝生検を採取し、T T R m R N A の測定のために R N A を抽出した。研究の 1 日目、3 日目、7 日目、1 4 日目、2 8 日目、4 2 日目、5 6 日目、7 0、及び 8 4 日目に、血清 T T R 濃度の測定及び臨床血液化学分析のために血液試料を採取した。

【0298】

T T R m R N A 発現の抑制は、血清 T T R タンパク質レベルの減少を引き起こすと予想される。血清 T T R タンパク質濃度を、市販の E L I S A キット（A b c a m a b 2 3 1 9 2 0）によって測定した。1 日目の画分の T T R 濃度を各個々の動物について計算し、これを 3 匹の動物の群の平均及び標準偏差としてプロットした（図 1 5）。

【0299】

1 m g / k g の単回用量の E T X 0 2 4 は、血清 T T R 濃度の急速で有意な低減を引き起こし、投薬の 2 8 日後に最も低い状態に達し、7 0 日目まで抑制されたままであった。

【0300】

8 4 日目まで E T X 0 2 4 でのデータを更に得た。E T X 0 2 0、0 2 2 及び 0 2 6 を使用して同一の実験を行った。データを、図 1 6、1 7、1 8 a 及び 1 9（それぞれ E T X 0 2 0、0 2 2、0 2 4 及び 0 2 6）において 8 4 日間得る。

【0301】

T T R m R N A を、T a q M a n 遺伝子発現キット T T R（T h e r m o、アッセイ I D M f 0 2 7 9 9 9 6 3 _ m 1）を使用して、リアルタイム定量的 P C R によって測定した。G A P D H 発現も測定し（T h e r m o、アッセイ I D M f 0 4 3 9 2 5 4 6

10

20

30

40

50

— g 1)、参照を得た。各動物の相対 T T R 発現を、D D C t 法によって、G A P D H に対して正規化し、投薬前レベルに対して計算した。1 m g / k g の単回用量の E T X 0 2 4 は、肝臓 T T R m R N A の急速で有意な低減を引き起こし、投薬の 1 4 日後に最も低い状態に達し、8 4 日目まで抑制されたままであった (図 1 8 b)。

【 0 3 0 2 】

動物の体重を、研究中に週 1 回測定した。体重の変動又は減少は、E T X 0 2 4 の投薬と関連付けられず、動物は研究を通して体重が増加し続けた (図 1 8 c)。

【 0 3 0 3 】

自動生化学分析装置を使用して、血清を 2 時間以内に分析した。A L T (アラニントランスアミナーゼ) 及び A S T (アスパラギン酸トランスアミナーゼ) の顕著な増加が、肝毒性を実証するために一般に使用される。A L T (図 1 8 d) 又は A L T (図 1 8 e) の増加は、E T X 0 2 4 の投薬と関連しなかった。

10

【 0 3 0 4 】

好ましい態様では、本発明の化合物は、標的タンパク質の血清タンパク質レベルを、最大で 0 日目後少なくとも約 1 4 日、最大で 0 日目後少なくとも約 2 1 日、最大で 0 日目後少なくとも約 2 8 日、最大で 0 日目後少なくとも約 3 5 日、最大で 0 日目後少なくとも約 4 2 日、最大で 0 日目後少なくとも約 4 9 日、最大で 0 日目後少なくとも約 5 6 日、最大で 0 日目後少なくとも約 6 3 日、最大で 0 日目後少なくとも約 7 0 日、最大で 0 日目後少なくとも約 7 7 日、又は最大で 0 日目後少なくとも約 8 4 日の期間 (以下「用量期間」と称される) にわたって、0 日目の初期 (開始) 濃度未満の値に低下させ得る。本明細書で言及される「0 日目」は、患者への本発明の化合物の投薬が開始される日、すなわち、投薬期間又は投薬後の時間の開始である。

20

【 0 3 0 5 】

好ましい態様では、本発明の化合物は、標的タンパク質の血清タンパク質レベルを、0 日目の初期 (開始) 濃度の少なくとも約 8 5 % 以下、少なくとも約 8 0 % 以下、少なくとも約 7 5 % 以下、少なくとも約 7 0 % 以下、少なくとも約 6 5 % 以下、少なくとも約 6 0 % 以下、少なくとも約 5 5 % 以下、少なくとも約 5 0 % 以下、少なくとも約 4 5 % 以下、少なくとも約 4 0 % 以下、少なくとも約 3 5 % 以下、少なくとも約 3 0 % 以下、少なくとも約 2 5 % 以下、少なくとも約 2 0 % 以下、少なくとも約 1 5 % 以下、少なくとも約 1 0 % 以下、少なくとも約 5 % 以下など、0 日目の初期 (開始) 濃度の少なくとも約 9 0 % 以下の値に低下させ得る。典型的には、かかる血清タンパク質の低下は、最大で 0 日目後少なくとも約 1 4 日、最大で 0 日目後少なくとも約 2 1 日、最大で 0 日目後少なくとも約 2 8 日、最大で 0 日目後少なくとも約 3 5 日、最大で 0 日目後少なくとも約 4 2 日、最大で 0 日目後少なくとも約 4 9 日、最大で 0 日目後少なくとも約 5 6 日、最大で 0 日目後少なくとも約 6 3 日、最大で 0 日目後少なくとも約 7 0 日、最大で 0 日目後少なくとも約 7 7 日、又は最大で 0 日目後少なくとも約 8 4 日の期間にわたって維持され得る。より好ましくは、最大で 0 日目後少なくとも約 8 4 日の期間で、血清タンパク質は、0 日目の初期 (開始) 濃度の少なくとも約 8 5 % 以下、少なくとも約 8 0 % 以下、少なくとも約 7 5 % 以下、少なくとも約 7 0 % 以下、少なくとも約 6 5 % 以下、少なくとも約 6 0 % 以下、少なくとも約 5 5 % 以下、少なくとも約 5 0 % 以下、少なくとも約 4 5 % 以下、少なくとも約 4 0 % 以下の値など、0 日目の初期 (開始) 濃度の少なくとも約 9 0 % 以下の値に低下し得る。

30

40

【 0 3 0 6 】

好ましい態様では、本発明の化合物は、0 日目の初期 (開始) 濃度の少なくとも約 4 5 % 以下、少なくとも約 4 0 % 以下、少なくとも約 3 5 % 以下、少なくとも約 3 0 % 以下、少なくとも約 2 5 % 以下、少なくとも約 2 0 % 以下、少なくとも約 1 5 % 以下、少なくとも約 1 0 % 以下、少なくとも約 5 % 以下の値など、0 日目の初期 (開始) 濃度の少なくとも約 5 0 % 以下の値に標的タンパク質の血清タンパク質レベルの最大の低下を達成することができる。典型的には、血清タンパク質のかかる最大の低下は、0 日目後の約 1 4 日目、0 日目後の約 2 1 日目、0 日目後の約 2 8 日目、0 日目後の約 3 5 日目、又は 0 日目後

50

の約 42 日目に生じる。より典型的には、血清タンパク質のかかる最大の低下は、0 日目後の約 14 日目、0 日目後の約 21 日目、又は 0 日目後の約 28 日目に生じる。

【0307】

本発明の特定の化合物は、典型的には、以下のように、最大で少なくとも約 84 日の期間にわたって、標的タンパク質の血清タンパク質レベルの最大の減少%及び／又は減少%を達成し得る。

【0308】

ETX020 は、典型的には、標的タンパク質、典型的には TTR の血清タンパク質レベルの少なくとも 30% の低下を、典型的には、0 日目の約 7～21 日後、特に 0 日目の約 14 日後に達成することができ、かつ／又は典型的には、標的タンパク質、典型的には TTR の血清タンパク質レベルの少なくとも 80% の低下を、最大で 0 日目後少なくとも約 84 日の期間にわたって維持することができる（本明細書で説明されるように、本明細書で言及される「0 日目」は、患者への本発明の化合物の投薬が開始される日であり、そのように投薬後の時間を示す）。

10

【0309】

ETX022 は、典型的には、標的タンパク質、典型的には TTR の血清タンパク質レベルの少なくとも 60% の低下を、典型的には、0 日目の約 7～21 日後、特に 0 日目の約 14 日後に達成することができ、かつ／又は典型的には、標的タンパク質、典型的には TTR の血清タンパク質レベルの少なくとも 80% の低下を、最大で 0 日目後少なくとも約 84 日の期間にわたって維持することができる（本明細書で説明されるように、本明細書で言及される「0 日目」は、患者への本発明の化合物の投薬が開始される日であり、そのように投薬後の時間を示す）。

20

【0310】

ETX024 は、典型的には、標的タンパク質、典型的には TTR の血清タンパク質レベルの少なくとも 20% の低下を、典型的には、0 日目の約 7～21 日後、特に 0 日目の約 14 日後に達成することができ、かつ／又は典型的には、標的タンパク質、典型的には TTR の血清タンパク質レベルの少なくとも 60% の低下を、最大で 0 日目後少なくとも約 84 日の期間にわたって維持することができる（本明細書で説明されるように、本明細書で言及される「0 日目」は、患者への本発明の化合物の投薬が開始される日であり、そのように投薬後の時間を示す）。

30

【0311】

ETX026 は、典型的には、標的タンパク質、典型的には TTR の血清タンパク質レベルの少なくとも 40% の低下を、典型的には、0 日目の約 7～21 日後、特に 0 日目の約 14 日後に達成することができ、かつ／又は典型的には、標的タンパク質、典型的には TTR の血清タンパク質レベルの少なくとも 70% の低下を、最大で 0 日目後少なくとも約 84 日の期間にわたって維持することができる（本明細書で説明されるように、本明細書で言及される「0 日目」は、患者への本発明の化合物の投薬が開始される日であり、そのように投薬後の時間を示す）。好適には、血清レベルの低下は、1 mg / kg の単回皮下用量の生理食塩水（滅菌 0.9% 塩化ナトリウム）に溶解した関連活性薬剤、例えば、ETX0024 の送達により非ヒト霊長類において決定される。好適な方法が本明細書に記載される。これは限定するものではなく、適切な制御を有する他の好適な方法が使用され得ることが理解されるであろう。

40

【0312】

実施例 5 ETX024（TTR mRNA を標的とする）T2a 逆脱塩基

総ビリルビンレベルは、研究を通して安定したままであった（図 22）。

【0313】

研究を通して、尿素（血中尿素窒素、BUN）及びクレアチニン濃度の評価によって腎臓の健康状態を監視した。血中尿素濃度（BUN）及びクレアチニンレベルの両方は、単回 1 mg / kg 用量の ETX024 後も安定し、予想される範囲内であった（図 23 及び 24）。

50

【0314】

本発明は、例えば、本発明の様々な態様を例示するために提供される特定の開示された実施形態に範囲が限定されることを意図しない。記載される組成物及び方法に対する様々な修正が、本明細書の記載及び教示から明らかとなるであろう。かかる変形は、本開示の真の範囲及び趣旨から逸脱することなく実施され得、本開示の範囲内に入ることが意図される。

【0315】

本発明の更なる態様は、以下の図25～図27及び実施例6～15に記載される非限定的な実施例を用いて、以下に説明する。以下に記載される化合物は、別途本開示から直ちに明らかでない限り、例えば、使用、核酸長、定義、薬学的に許容される組成物、投薬、遺伝子発現を阻害する方法、及び遺伝子発現に関連する疾患の治療又は予防方法に関して、上記に開示される態様及び実施形態のうちのいずれかにおける使用に好適である。

10

【0316】

図25Aは、三分岐GalNAc（N-アセチルガラクトサミン）単位を示す。

【0317】

図25Bは、本発明の一実施形態による代替の三分岐GalNAcを示し、連結基の変化を示す。

【0318】

図26Aは、本発明による三分岐GalNAcコンジュゲートsiRNAを示し、連結基における変化を示す。

20

【0319】

図26Bは、本発明の一実施形態による三分岐GalNAcコンジュゲートsiRNAの属を示す。

【0320】

図26Cは、本発明の一実施形態による二分岐GalNAcコンジュゲートsiRNAの属を示し、連結基における変化を示す。

【0321】

図26Dは、本発明の別の実施形態による二分岐GalNAcコンジュゲートsiRNAの属を示し、連結基における変化を示す。

【0322】

図27Aは、本発明の一実施形態による三分岐GalNAcコンジュゲートsiRNAの別の実施形態を示す。

30

【0323】

図27Bは、代替の分岐GalNAcコンジュゲートを有する、図27Aに示されるバリエーションを示す。

【0324】

図27Cは、本発明の一実施形態による三分岐GalNAcコンジュゲートsiRNAの属を示し、連結基における変化を示す。

【0325】

図27Dは、本発明の一実施形態による二分岐GalNAcコンジュゲートsiRNAの属を示し、連結基における変化を示す。

40

【0326】

更なる態様は、ASGP-Rリガンドコンジュゲート、化学修飾RNAi剤の形態、並びにかかるコンジュゲート分子を作製する方法及びその使用を開示する。

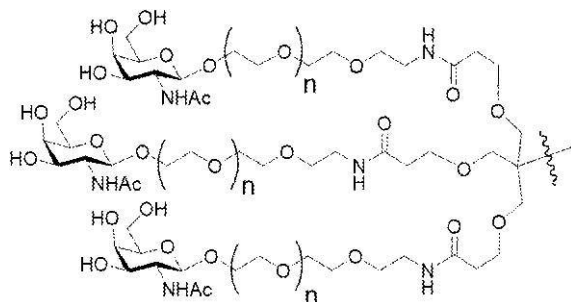
【0327】

特定の実施形態では、ASGP-Rリガンドは、N-アセチルガラクトサミン（GalNAc）を含む。ある特定の実施形態では、本発明は、以下の式（I）のGalNAcの三分岐又は二分岐単位にコンジュゲートしたsiRNAを提供する：

【0328】

50

【化 5 7】



式 I *

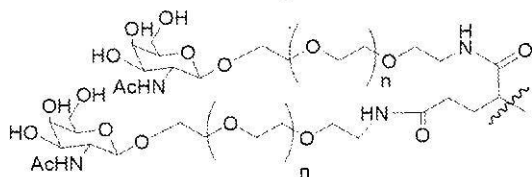
10

【0 3 2 9】

式 I * において、 n は、0、1、2、3、又は 4 である。いくつかの実施形態では、エチレングリコール単位の数は、異なる分岐において互いに独立して変化し得る。例えば、中央の分岐は、 $n = 4$ を有してもよく、一方で、側の分岐は、 $n = 3$ などをも有してもよい。他の実施形態は、式 (I I - a) に示される、2つの分岐のみを含有し得る。

【0 3 3 0】

【化 5 8】



式 I I * - a

20

【0 3 3 1】

式 I I * 及び I I * - a において、 n は、0、1、2、3、又は 4 から選択される。いくつかの実施形態では、エチレングリコール単位の数は、異なる分岐において互いに独立して変化し得る。例えば、一方の分岐は、 $n = 4$ 又は 3 を有してもよく、一方で、他方の分岐は、 $n = 3$ 又は 2 などをも有してもよい。

30

【0 3 3 2】

追加の G a l N A c 分岐を追加することもでき、例えば、4、5、6、7、8、9 分岐 G a l N A c 単位を使用してもよい。

【0 3 3 3】

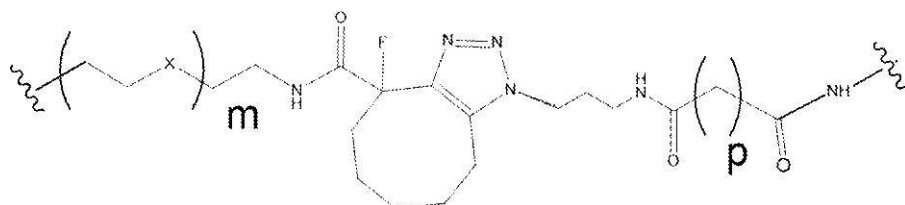
関連する実施形態では、分岐 G a l N A c は、別の標的化部分、例えば、脂質、コレステロール、ステロイド、胆汁酸、ポリペプチド及びタンパク質を含む標的（ポリ）ペプチドの追加することによって化学修飾され得る（例えば、R G D ペプチド、トランスフェリン、ポリグルタメート、ポリアスパラテート、グリコシル化ペプチド、ビオチン、アシアロ糖タンパク質インスリン、及び E G F）。

オプション 1. 更なる実施形態では、G a l N A c 単位は、式 (I I I *) に示されるもののようなテザーを介して R N A i 剤に結合され得る。

40

【0 3 3 4】

【化 5 9】



式 I I I *

50

【0335】

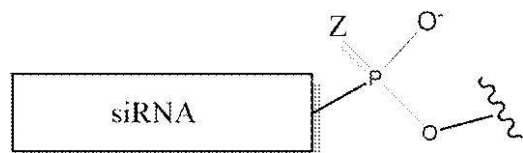
式ⅠⅠⅠ*において、mは、0、1、2、3、4、又は5から選択され、pは、mと独立して、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、又は14から選択され、Xは、CH₂又はOのいずれかである。

【0336】

更なる実施形態では、テザーは、式(ⅠⅤ*)に示されるように、ホスフェート(Z=O)又はホスホロチオエート基(Z=S)を介してオリゴに結合し得る。

【0337】

【化60】



式ⅠⅤ*

10

【0338】

指定されたテザーを介したGalNAc分岐単位のかかる結合は、好ましくは、RNAi剤のセンス鎖の3'又は5'末端にある。一実施形態では、RNAi剤の3'への結合は、式(Ⅴ*)に示すように、C6アミノリンカーを介してである。

【0339】

【化61】



式Ⅴ*

20

【0340】

このリンカーは、実施例12に示される合成の出発点である。

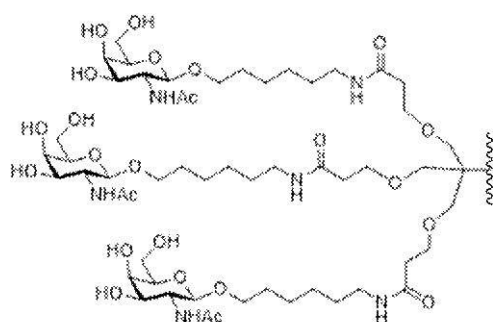
【0341】

上記と同じリンカー及びテザーを、式ⅤⅠ*及びⅤⅠⅠ*に示される代替の分岐GalNAc構造とともに使用し得る。

30

【0342】

【化62】



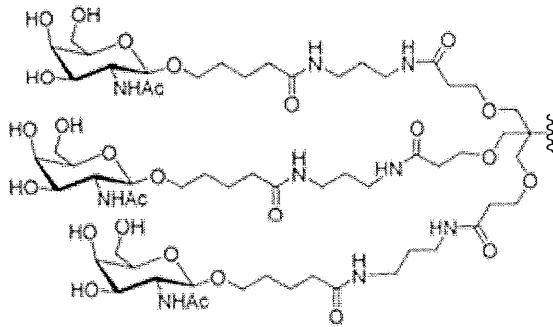
式ⅤⅠ*

40

【0343】

50

【化 6 3】



10

式VII*

【0344】

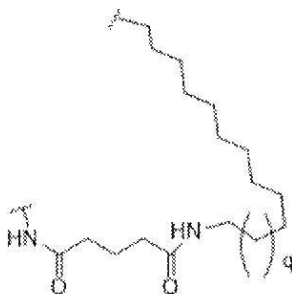
式II*-aと同様に、式VI*及びVII*に基づく二分岐形態のリガンドを、本発明の組成物中で使用し得る。

オプション2. 更なる実施形態では、GalNAc単位は、式(III*-2)に示されるもののようなテザーを介してRNAi剤に結合され得る。

【0345】

20

【化 6 4】



式III*-2

30

【0346】

式III*-2において、qは、1、2、3、4、5、6、7、又は8から選択される。

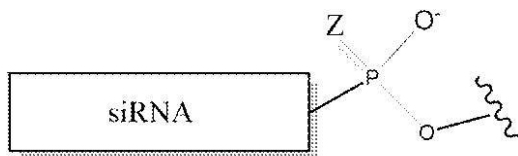
【0347】

更なる実施形態では、テザーは、式(IV*)に示されるように、ホスフェート(Z=O)又はホスホロチオエート基(Z=S)を介してオリゴに結合し得る。

【0348】

【化 6 5】

40



式IV*

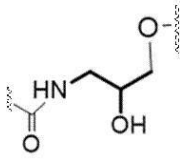
【0349】

指定されたテザーを介したGalNAc分岐単位のかかる結合は、好ましくは、二本鎖RNAi剤のセンス鎖の3'又は5'末端にある。一実施形態では、RNAi剤の3'への結合は、実施例14に示されるようなものである。一実施形態では、GalNAcテザーが3'部位に結合している場合、テザーとオリゴの3'末端との間の遷移リンカーは、式(50

V*—a、図27Cも参照されたい)の構造を含むか、又は別の好適なリンカー、例えば、式(V*—b)に示されるC6アミノリンカーが使用され得る。

【0350】

【化66】



式V*—a

【0351】

【化67】



式V*—b

【0352】

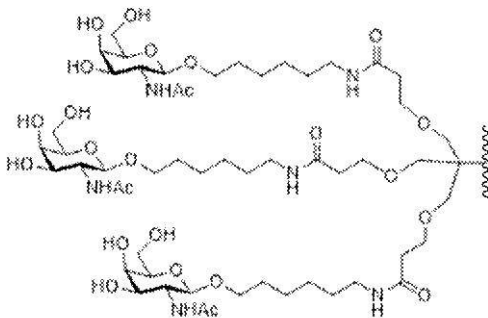
追加及び／又は代替のコンジュゲーション部位は、糖残基、ホスフェート基、又は核酸塩基を含む、任意の非末端ヌクレオチドを含み得る。

【0353】

式VI*—2及びVII*—2に示されるように、同じリンカー及びテザーを、代替の分岐GalNAc構造とともに使用し得る。

【0354】

【化68】



式VI*—2

【0355】

10

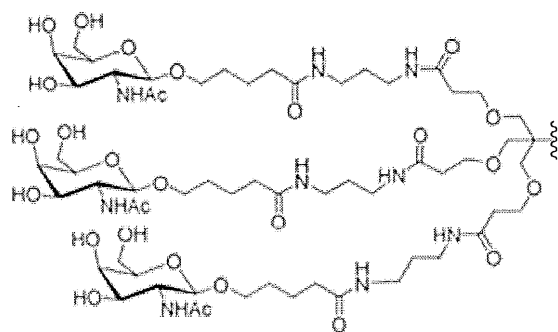
20

30

40

50

【化 6 9】



式VII*-2

【0356】

本発明のRNAi剤の特性及びそれらの化学修飾

ある特定の実施形態では、コンジュゲートオリゴマー化合物（本明細書ではRNA干渉化合物（RNAi化合物）と称される）は、2つの鎖を含み、各々は、アンチセンス鎖又はセンス鎖のいずれかにおいて、8～55個の連結されたヌクレオチドモノマーサブユニット（逆脱塩基（ia）ヌクレオチドを含む）の配列を有する。ある実施形態では、コンジュゲートオリゴマー化合物鎖は、例えば、16～55、53、49、40、25、24、23、21、20、19、18、17、又は最大で（約）18～25、18～23、21～23個の連結されたヌクレオチドモノマーサブユニットの配列を含む。ある特定の実施形態では、本発明のRNAi剤は、上記のように両方の鎖の合わせた長さの一本鎖を有するヘアピン構造を有し得る。（全体にわたって使用される場合、「ヌクレオチド」という用語は、文脈上必要とされる場合、ヌクレオシド（すなわち、ホスフェート／ホスホノチオエート基を含まないヌクレオチド）も指し得る。）

【0357】

ある特定の実施形態では、二本鎖RNAi剤は、平滑末端であるか、又は一方若しくは両方の末端にオーバーハングを有する。いくつかの実施形態では、オーバーハングは、アンチセンス鎖の1～6、1～5、1～4、1～3、2～4、4、3、2又は1ヌクレオチド（3'末端又は5'末端で）、及びセンス鎖の2～4、3、又は2又は1ヌクレオチド（3'末端又は5'末端で）である。ある特定の例示的な実施形態では、実施例6、構築物6.1、6.2、及び6.3を参照されたく、RNAi剤は、アンチセンス鎖の3'末端に2ヌクレオチドのオーバーハング、及びセンス鎖の3'末端に2ヌクレオチドのオーバーハングを含む。ある特定の他の例示的な実施形態では、実施例7、構築物7.1及び7.3、実施例8、構築物8.1及び8.3、並びに実施例9、構築物9.1及び9.3を参照されたく、RNAi剤は、アンチセンス鎖の3'末端に2ヌクレオチドオーバーハングを含み、他方の末端で平滑末端である。ある特定の他の例示的な実施形態では、実施例7、構築物7.3を参照されたく、構築物は、両端で平滑末端である。別の例示的な実施形態では、実施例9の構築物9.2を参照されたく、RNAi剤は、アンチセンス鎖の3'末端に4ヌクレオチドのオーバーハングを含み、他方の末端に平滑末端を有する。

【0358】

ある特定の実施形態では、構築物は、末端キャップ、1つ以上の逆脱塩基ヌクレオチド、1つ以上のホスホロチオエート連結、1つ以上のデオキシヌクレオチド（例えば、D-リボヌクレオチド、D-2'-デオキシリボヌクレオチド、又は別の修飾ヌクレオチド）、又はそれらの組み合わせを使用することによって、ヌクレアーゼ切断を予防又は阻害する分解保護部分で修飾される。かかる分解保護部分は、ASGP-Rリガンドにコンジュゲートされていない任意の1つ又は全ての末端に存在し得る。ある特定の実施形態では、分解保護部分は、単独で、又は1～4、1～3、1～2、若しくは1個のホスホロチオエ

ート連結、1～4 1～3、1～2、若しくは1個のデオキシヌクレオチド、及び1～4、1～3、1～2、若しくは1個の逆脱塩基ヌクレオチドからなる群から任意の組み合わせとして選択される。ある特定の例示的な実施形態では、分解保護部分は、実施例6～15に示すように、構築物6.1、6.2、6.3、7.1、7.2、7.3、8.1、8.2、8.3、9.1、9.2、及び9.3のうちの1つにあるように構成される。かかる例示的な保護部分の構成は、本発明の任意のRNAi剤と併せて使用され得る。

【0359】

ある特定の実施形態では、センス及び／又はアンチセンス鎖におけるヌクレオチドの全て又はいくつかのリボースが修飾される。ある特定の実施形態では、RNAi剤におけるリボースの少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、又はそれ以上（例えば、100%）が修飾される。ある特定の実施形態において、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以上のリボースは、修飾されない。

10

【0360】

好ましい実施形態では、リボース修飾は、2'-O-メチル、及び2'-デオキシフルオロを含む、2'-O-アルキル修飾などの2'置換基を含む。2'-デオキシ、LNA（例えば、2'-O、4'-Cメチレン架橋又は2'-O、4'-Cエチレン架橋）、2'-メトキシトキシ（MOE）、2'-O-(CH₂)OCH₃などを含む追加の修飾が当該技術分野で既知である。

【0361】

ある特定の実施形態では、いくつかの修飾は、例えば、実施例6～15の構築物に示されるように、又は米国特許第7,452,987号、同第7,528,188号、同第8,273,866号、同第9,150,606号、及び同第10,266,825号に記載されるように、明確なパターンの修飾を提供し、これらの全ては、参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0362】

いくつかの実施形態では、siRNAは、1つ以上の熱不安定化ヌクレオチド、例えば、GNA、ENAなどを、例えば、アンチセンス鎖の11位（好ましい）、12位、13位並びに／又はセンス鎖の9位及び10位（好ましい）に含む。

【0363】

加えて、核酸塩基は、例えば、米国特許第10,119,136号に記載されるように、C4位で修飾され得る。

30

【0364】

概して、本発明のRNAi剤は、治療標的に対して指向されており、その阻害は、望ましくない又は病理学的状態を含む疾患の予防、緩和、又は治療をもたらすであろう。かかる標的の多くは、当該技術分野で既知である。かかる標的の非限定的な例としては、以下が含まれる：ApoC、ApoB、ALAS1、TTR、GO、C5（実施例を参照されたい）など。概して、肝細胞の表面でのASGPRの豊富な発現により、かかる標的は、好ましくは、肝臓において発現されるが、しかしながら、それらは、他の組織又は器官においても発現される場合がある。好ましい実施形態では、標的はヒトであり、一方、RNAi剤は、かかる標的に完全に又は部分的に相補的なアンチセンス鎖を含む。特定の

40

実施例

【0365】

実施例6：5'-GalNAcを有する逆脱塩基化学

実施例に示される全てのRNAi剤において、以下の慣例が使用される：

i a = 逆脱塩基ヌクレオチド、

m = 2'-O-メチルヌクレオチド、

f = 2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチド、

s = ホスホロチオエートヌクレオチド間連結、

50

X d = 2' - デオキシヌクレオチド、
～ = テザー。

【0366】

標準的な合成技術を使用して、以下の構築物を、上記のように、又は図26A～27Bに示されるように、テザー1及び2、並びに本発明による様々な三分岐GalNAc単位を用いて、様々なバージョンで合成する。

6. 1.

(上段の鎖(センス(ss)) : 配列番号1、下段の鎖(アンチセンス) 配列番号2)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23

10

5' GalNAc~Gm-Am-Cm-Um-Um-Um-Cf-Am-Uf-Cf-Cf-Um-Gm-Gm-Am-Am-Am-Um-AmsUmsAm-ia-ia 3'

3' AmsCms-Cm-Um-Gm-Am-Am-Af-Gm-Uf-Am-Gm-Gm-Am-Cf-Cf-Um-Uf-Um-Am-UmsAfsUm 5'

23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

6. 2.

(上段の鎖(センス(ss)) : 配列番号3、下段の鎖(アンチセンス) 配列番号4)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23

20

5' GalNAc~Am-Am-Gf-Cm-Af-Am-Gf-Am-Uf-Af-Uf-Um-Uf-Um-Um-Af-Um-Af-AmsUmsAm-ia-ia 3'

3' Td-Td-UmsUmsUm-Um-Cm-Gf-Um-Uf-Cm-Uf-Am-Um-Am-Af-Am-Af-Am-Um-Af-Um-UfsAfsUm 5'

25 25 23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

6. 3.

(上段の鎖(センス(ss)) : 配列番号5、下段の鎖(アンチセンス) 配列番号6)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23

30

5' GalNAc~Um-Gm-Gm-Gm-Am-Um-Uf-Um-Cf-Af-Uf-Gm-Um-Am-Am-Cm-Cm-Am-AmsGmsAm-ia-ia 3'

3' CmsUmsAm-Cm-Cm-Cm-Um-Af-Am-Af-Gm-Um-Am-Cm-Af-Um-Um-Gf-Gm-Um-UmsCfsUm 5'

23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

【0367】

実施例7 : 3' - GalNAcを有する逆脱塩基化学

標準的な合成技術を使用して、以下の構築物を、上記のように、又は図26A～27Bに示されるように、本発明によるテザー1及び2、並びに本発明による様々な三分岐GalNAc単位を用いて、様々なバージョンで合成する。一貫性のために、実施例6と同じ配列を示す。

7. 1

(上段の鎖(センス(ss)) : 配列番号7、下段の鎖(アンチセンス) 配列番号8)

40

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23

5' ia-ia-GmsAmsCm-Um-Um-Um-Cf-Am-Uf-Cf-Cf-Um-Gm-Gm-Am-Am-Am-Um-Am-Um-Am~GalNAc 3'

3' AmsCmsCm-Um-Gm-Am-Am-Af-Gm-Uf-Am-Gm-Gm-Am-Cf-Cf-Um-Uf-Um-Am-UmsAfsUm 5'

23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

7. 2

(上段の鎖 (センス (s s)) : 配列番号 9、下段の鎖 (アンチセンス) 配列番号 10) 10

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23

5' ia-ia-AmsAmsGf-Cm-Af-Am-Gf-Am-Uf-Af-Uf-Um-Uf-Um-Um-Af-Um-Af-Am-Um-Am~GalNAc 3'

3' Td-Td-UmsUmsUm-Um-Cm-Gf-Um-Uf-Cm-Uf-Am-Um-Am-Af-Am-Af-Am-Um-Af-Um-UfsAfsUm 5'

25 24 23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

7. 3.

(上段の鎖 (センス (s s)) : 配列番号 11、下段の鎖 (アンチセンス) 配列番号 12) 20

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23

5' ia-ia-UmsGmsGm-Gm-Am-Um-Uf-Um-Cf-Af-Uf-Gm-Um-Am-Am-Cm-Cm-Am-Am-Gm-Am~GalNAc 3'

3' CmsUmsAm-Cm-Cm-Cm-Um-Af-Am-Af-Gm-Um-Am-Cm-Af-Um-Um-Gf-Gm-Um-UmsCfsUm 5'

23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

【0368】

30

実施例 8 : 代替修飾パターンを有する 5' - GalNAc を有する逆脱塩基化学

標準的な合成技術を使用して、以下の構築物を、上記のように、又は図 26A ~ 27B に示されるように、本発明によるテザー 1 及び 2、並びに本発明による様々な三分岐 GalNAc 単位を用いて、様々なバージョンで合成する。一貫性のために、実施例 6 と同じ配列をここに示す。

8. 1.

(上段の鎖 (センス (s s)) : 配列番号 13、下段の鎖 (アンチセンス) 配列番号 14) 40

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21

5' GalNAc~Gf-Am-Cf-Um-Uf-Um-Cf-Am-Uf-Cm-Cf-Um-Gf-Gm-Af-Am-Af-Um-AfsUmsAf 3'

3' AmsCfsCm-Uf-Gm-Af-Am-Af-Gm-Uf-Am-Gf-Gm-Af-Cm-Cf-Um-Uf-Um-Af-UmsAfsUm 5'

23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

8. 2

(上段の鎖 (センス (s s)) : 配列番号 15、下段の鎖 (アンチセンス) 配列番号 16) 50

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21

5' GalNAc~Af-Am-Gf-Cm-Af-Am-Gf-Am-Uf-Am-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Am-Uf-Am-AfsUmsAf 3'

3' Td-Td-UmsUfsUm-Uf-Cm-Gf-Um-Uf-Cm-Uf-Am-Uf-Am-Af-Am-Af-Am-Uf-Am-Uf-UmsAfsUm 5'

25 24 23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

8. 3.

10

(上段の鎖 (センス (s s)) : 配列番号 17、下段の鎖 (アンチセンス) 配列番号 18)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21

5' GalNAc~Uf-Gm-Gf-Gm-Af-Um-Uf-Um-Cf-Am-Uf-Gm-Uf-Am-Af-Cm-Cf-Am-AfsGmsAf 3'

3' CmsUfsAm-Cf-Cm-Cf-Um-Af-Am-Af-Gm-Uf-Am-Cf-Am-Uf-Um-Gf-Gm-Uf-UmsCfsUm 5'

23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

20

【0369】

実施例9：代替修飾パターンを有する5' - GalNAcを有する逆脱塩基化学

標準的な合成技術を使用して、以下の構築物を、上記のように、又は図26A~27Bに示されるように、本発明によるテザー1及び2、並びに本発明による様々な三分岐GalNAc単位を用いて、様々なバージョンで合成する。一貫性のために、実施例6と同じ配列を示す。

9. 1.

(上段の鎖 (センス (s s)) : 配列番号 19、下段の鎖 (アンチセンス) 配列番号 20)

30

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21

5' GfsAmsCf-Um-Uf-Um-Cf-Am-Uf-Cm-Cf-Um-Gf-Gm-Af-Am-Af-Um-Af-Um-Af~GalNAc 3'

3' AmsCfsCm-Uf-Gm-Af-Am-Af-Gm-Uf-Am-Gf-Gm-Af-Cm-Cf-Um-Uf-Um-Af-UmsAfsUm 5'

23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

9. 2

(上段の鎖 (センス (s s)) : 配列番号 21、下段の鎖 (アンチセンス) 配列番号 22)

40

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21

5' AfsAmsGf-Cm-Af-Am-Gf-Am-Uf-Am-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Am-Uf-Am-Af-Um-Af~GalNAc 3'

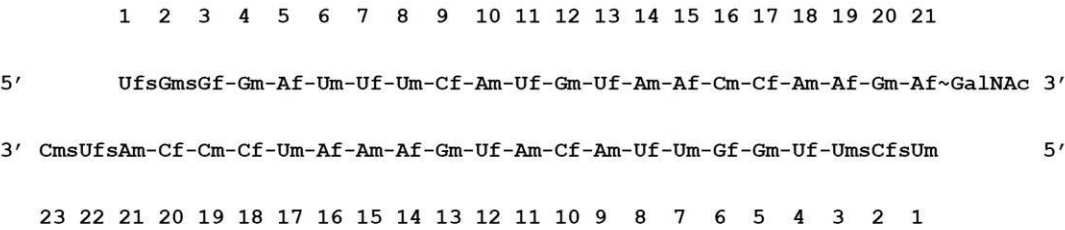
3' Td-Td-UmsUfsUm-Uf-Cm-Gf-Um-Uf-Cm-Uf-Am-Uf-Am-Af-Am-Af-Am-Uf-Am-Uf-UmsAfsUm 5'

25 24 23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

9. 3

50

(上段の鎖（センス（s s））：配列番号 2 3、下段の鎖（アンチセンス）配列番号 2 4)



【0370】
実施例 10：s i R N A − G a l N A c コンジュゲートのベンチマーク
実施例 6 ～ 1 5 において使用される構築物は、それらの数字によって参照され、表 1 1 に列挙される。テザー 1 及びテザー 2 は、それぞれ図 2 6 及び 2 7 に示される。

【0371】
【表 1 2】

表 1 1.

構築物	標的 A(GO)	標的 B(C5)	標的 C(TTR)
テザー1	6.1	6.2	6.3
テザー2	6.1	6.2	6.3
テザー1	8.1	8.2	8.3
テザー2	8.1	8.2	8.3
テザー1	7.1	7.2	7.3
テザー2	7.1	7.2	7.3
テザー1	9.1	9.2	9.3
テザー2	9.1	9.2	9.3
3'-GalNAc 対照(例えば、図 25A を参照されたい)			

【0372】
以下の表 1 2 は、本発明の様々な選択的構築物で実施されるベンチマークを反映する。
【0373】

【表 1 3 - 1】

表 1 2. siRNA-GaINAc のベンチマークのためのインビトロ実験

標的 インビトロ siRNA 基	ベンチマーク RNAi 剤	A		B		C	
		ヒト初代肝細胞 取り込み	ASPGR ヒト肝 細胞結合	ヒト初代肝細胞 取り込み	ASPGR ヒト肝 細胞結合	ヒト初代肝細胞 取り込み	ASPGR ヒト肝 細胞結合
1	センス鎖の 5' 末端にテザー オプション 1 逆脱塩基化学	0,4(取り込み)、及び 24 時間(サイレンシング)インキュベーション、又は 24 時間の RNAiMax を用いた Hep3B トランスフェクション	siRNA-GaINAc の ASPGR 結合の KD を決定する	0,4(取り込み)、及び 24 時間(サイレンシング)インキュベーション、又は 24 時間の RNAiMax を用いた Hep3B トランスフェクション	siRNA-GaINAc の ASPGR 結合の KD を決定する	0,4(取り込み)、及び 24 時間(サイレンシング)インキュベーション、又は 24 時間の RNAiMax を用いた Hep3B トランスフェクション	siRNA-GaINAc の ASPGR 結合の KD を決定する
2	センス鎖の 5' 末端にテザー オプション 2 逆脱塩基化学						
3	センス鎖の 5' 末端にテザー オプション 1 交互化学						
4	センス鎖の 5' 末端にテザー オプション 2 交互化学						
5	センス鎖の 3' 末端にテザー オプション 1 逆脱塩基化学						

10

20

【0 3 7 4】

【表 1 3 - 2】

6	センス鎖の 3' 末端にテザー オプション 2 逆脱塩基化学						
7	センス鎖の 3' 末端にテザー オプション 1 交互化学						
8	センス鎖の 3' 末端にテザー オプション 2 交互化学						
9	3'-GaINAc 対照 (例えば、図 25A を参照されたい)						

30

【0 3 7 5】

インビトロ薬力学的特性評価

表 1 1 に列挙される 8 つの構築物 (GO1 siRNA-GaINAc、C5 siRNA-GaINAc、及び TTR siRNA-GaINAc 類似体) のインビトロ薬力学活性、結合親和性、及び肝臓取り込みを、これらの分子の臨床的に検証されたバージョンに対してベンチマークする。

40

【0 3 7 6】

ヒト肝臓細胞株 (HepG2 又は Hep3B) トランスフェクションアッセイ - 各 GO1 siRNA-GaINAc、C5 siRNA-GaINAc、及び TTR siRNA-GaINAc 類似体分子を、トランスフェクション試薬 (例えば、RNAiMAX) の存在下で、ヒト肝細胞株において、10 個の異なる濃度で、37℃で 0 時間及び 24 時間インキュベーションする。各濃度での全てのインキュベーションは、四重で実行される。インキュベーション後、各試料を溶解し、bDNA 又は RT-qPCR アッセイによって HAO1 C5、TTR 及び 하우스キーピング遺伝子 (GAPDH など) の mRNA 濃度について分析する。得られた mRNA 濃度データを分析に使用して、GO1 si

50

RNA-GalNAc、C5 siRNA-GalNAc、及びTTR siRNA-GalNAc分子の各々のサイレンシング活性及びIC₅₀を決定する。

【0377】

初代ヒト肝細胞取り込みアッセイ—GO1 siRNA-GalNAc、C5 siRNA-GalNAc、及びTTR siRNA-GalNAc分子の各々の肝取り込み及びサイレンシング活性を、初代ヒト肝細胞において評価する。各GO1 siRNA-GalNAc、C5 siRNA-GalNAc、及びTTR siRNA-GalNAc類似体分子を、初代ヒト肝細胞において、10個の異なる濃度で、37℃で0、4、及び72時間インキュベーションする。各濃度での全てのインキュベーションは、四重で実行される。インキュベーション後、各試料を溶解し、bDNA又はRT-qPCRアッセイによってHAO1、C5、TTR及びハウスキーピング遺伝子（GAPDHなど）のmRNA濃度について分析する。得られたmRNA濃度データを分析に使用して、GO1 siRNA-GalNAc、C5 siRNA-GalNAc、及びTTR siRNA-GalNAc分子の各々のサイレンシング活性、取り込み、及びIC₅₀を決定する。

10

【0378】

インビボ薬力学的特性評価

GO1 siRNA-GalNAc、C5 siRNA-GalNAc、及びTTR siRNA-GalNAc類似体の各々8つの構築物についてのインビボ薬力学活性を、雄マウス又はカニクイザルへの単回皮下投与後に各GO1 siRNA-GalNAc、C5 siRNA-GalNAc、及びTTR siRNA-GalNAc分子の臨床的に検証されたインビボ薬力学活性と比較する。

20

【0379】

各類似体のGO1 siRNA-GalNAcのインビボマウスの薬理学について、以下の表13に提供されるように、0.3又は3mg/kgの単回皮下用量後に評価する。GO1 siRNA-GalNAc類似体の各々が、0.3又は1mg/kgでC57BL/6雄マウス（n=3/時点/群）に皮下投与される2つの用量群が存在する。血清試料及び肝生検試料を得るための血液試料を様々な時点で取得し、LCMSによる血清グリコレート濃度を決定し、RT-qPCR又はbDNAアッセイによってHAO1 mRNAの濃度を決定する。各指定された時点で各群の動物を殺し、血液（約0.5mL/動物）及び肝臓（約100mg）を収集する。群1～9については、投薬の24、48、96、168、336、504、及び672時間後に、3匹の動物/時点/群から血液（約0.5mL/動物）及び肝臓（約100mg）を収集する。群10（n=3）は、血清グリコレート及びmRNA HAO1濃度のベースライン値を提供するための投薬されない対照群である。投薬後の様々な時点での血清グリコレートの増加及び肝臓におけるHAO1 mRNAのサイレンシングの薬力学的効果を、群10対照の血清及び肝臓試料と比較する。

30

【0380】

40

50

【表 1 4】

表 1 3. G O 1 s i R N A − G a l N A c 類似体マウス薬理学研究デザイン

群	動物の数	用量 経路	用量の数/動物	標的用量レ ベル (mg/kg)	標的用量 濃度 (mg/mL)	標的用量 体積 (mL/kg)
	雄					
1	21	SC	1	0.3 又は 3	3	1.5
2	21	SC	1	0.3 又は 3	3	1.5
3	21	SC	1	0.3 又は 3	3	1.5
4	21	SC	1	0.3 又は 3	3	1.5
5	21	SC	1	0.3 又は 3	3	1.5
6	21	SC	1	0.3 又は 3	3	1.5
7	21	SC	1	0.3 又は 3	3	1.5
8	21	SC	1	0.3 又は 3	3	1.5
9	21	SC	1	0.3 又は 3	3	1.5
10 ^a	5	該当なし	該当なし	該当なし	該当なし	該当なし

表の凡例:
SC 皮下
NA 該当なし
a 群 10 の動物は対照動物であり、投薬されていない。
c 群 1~9 の動物は、1 日目に投薬される。

【 0 3 8 1 】

実施例 1 1：クリック化学を使用した 5’ コンジュゲーション（オプション 1）

【 0 3 8 2 】

10

20

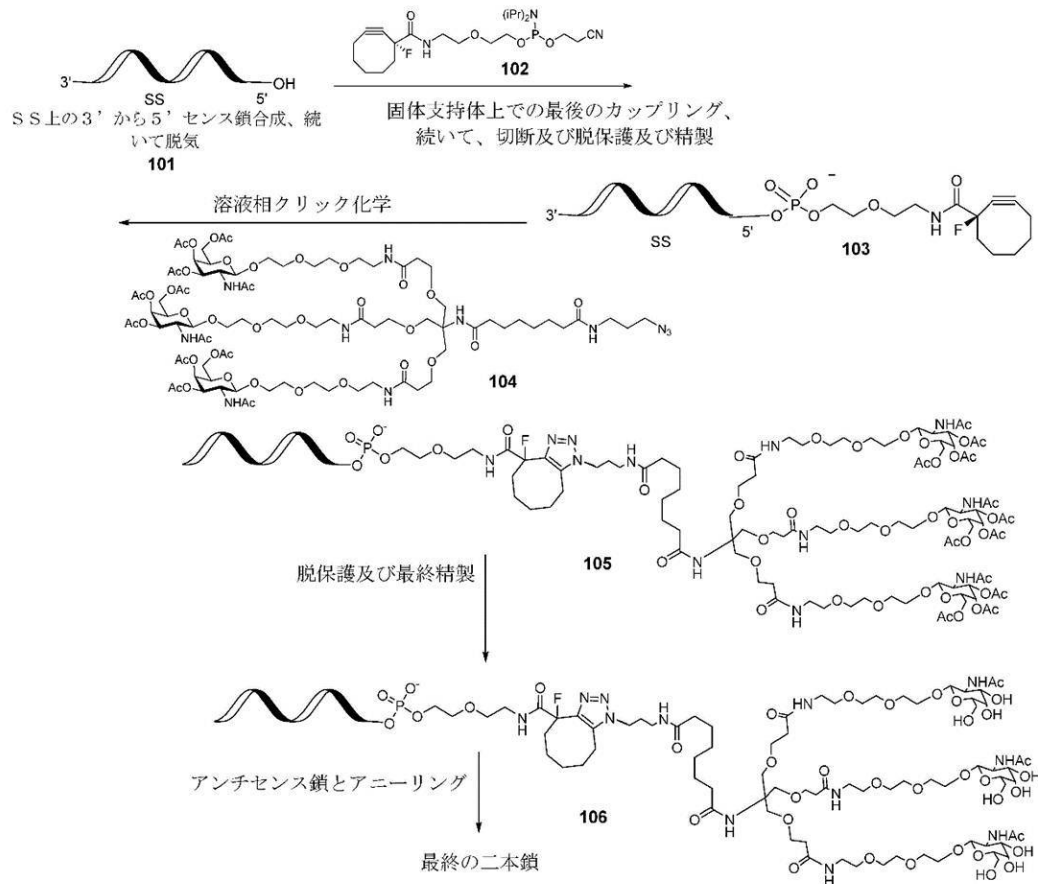
30

40

50

【化 7 0】

5' コンジュゲーションオプション 1



10

20

【 0 3 8 3】

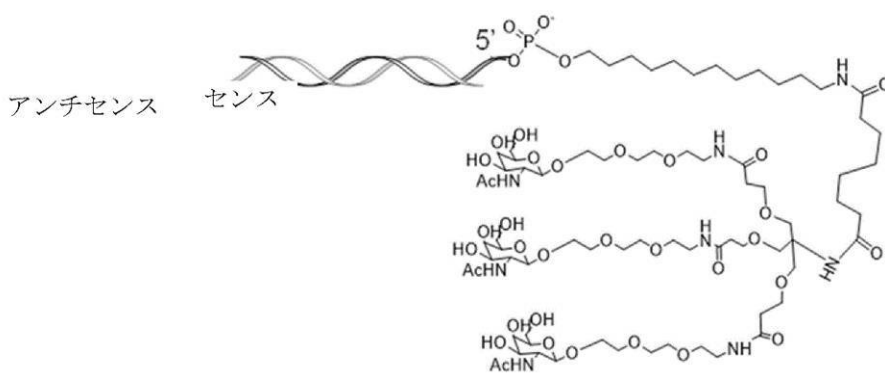
この実施形態では、オリゴヌクレオチド101のセンス鎖を、固体支持体上で合成し、市販のオクチンアミダイト102とカップリングして、固体支持体上のクリック化学前駆体を有する必要なオリゴヌクレオチドを得る。これは、標準的な切断及び脱保護後に、純粋なオリゴヌクレオチド103を得る。アジド104をDMSO (150 μ L / mg) に溶解し、この溶液を100 μ Lの水中の100 ODのオリゴ103に添加する。次いで、反応混合物を室温で一晩インキュベーションする。コンジュゲートオリゴ105をGlen Gel-Pak (商標) で脱塩して有機物を除去し、アセトキシ保護基をメチルアミンでの処理によって除去し、続いて分取HPLCを行って、純粋なオリゴ106を得、これを等モル量のセンス鎖とアニーリングして、最終の二本鎖を得る。

30

実施例 12 : 5' コンジュゲーション (オプション 2)

【 0 3 8 4】

【化 7 1】



40

50

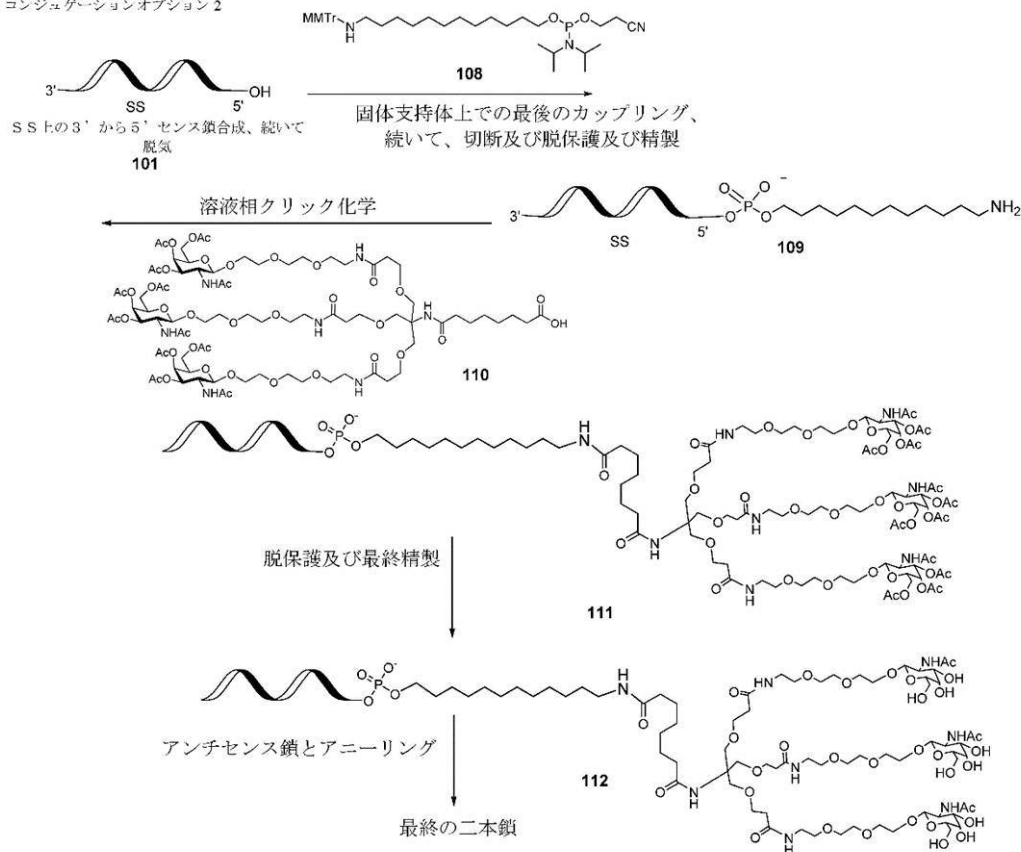
【0385】

この実施形態では、オリゴヌクレオチド101のセンス鎖を、固体支持体上で合成し、市販のアミダイト108とカップリングして、固体支持体上の必要なオリゴヌクレオチドを得る。これは、標準的な切断及び脱保護後に、純粋なオリゴヌクレオチド109を得る。アミン109を水(15 μ L / OD)に溶解し、この溶液をDMSO(100 mL / mg)中の酸110の溶液に添加し、続いて10モル当量のEDC及び10当量のHOBtを添加し、反応混合物を室温で一晩インキュベーションする。次いで、コンジュゲートオリゴ111をGlen Gel-Pak(商標)で脱塩して有機物を除去し、アセトキシ保護基をメチルアミンでの処理によって除去し、続いて分取HPLCを行って、純粋なオリゴ112を得、これを等モル量のセンス鎖とアニーリングして、最終の二本鎖を得る。

【0386】

【化72】

5' コンジュゲーションオプション2



【0387】

実施例13：クリック化学を使用した5'コンジュゲーション(オプション1)

【0388】

10

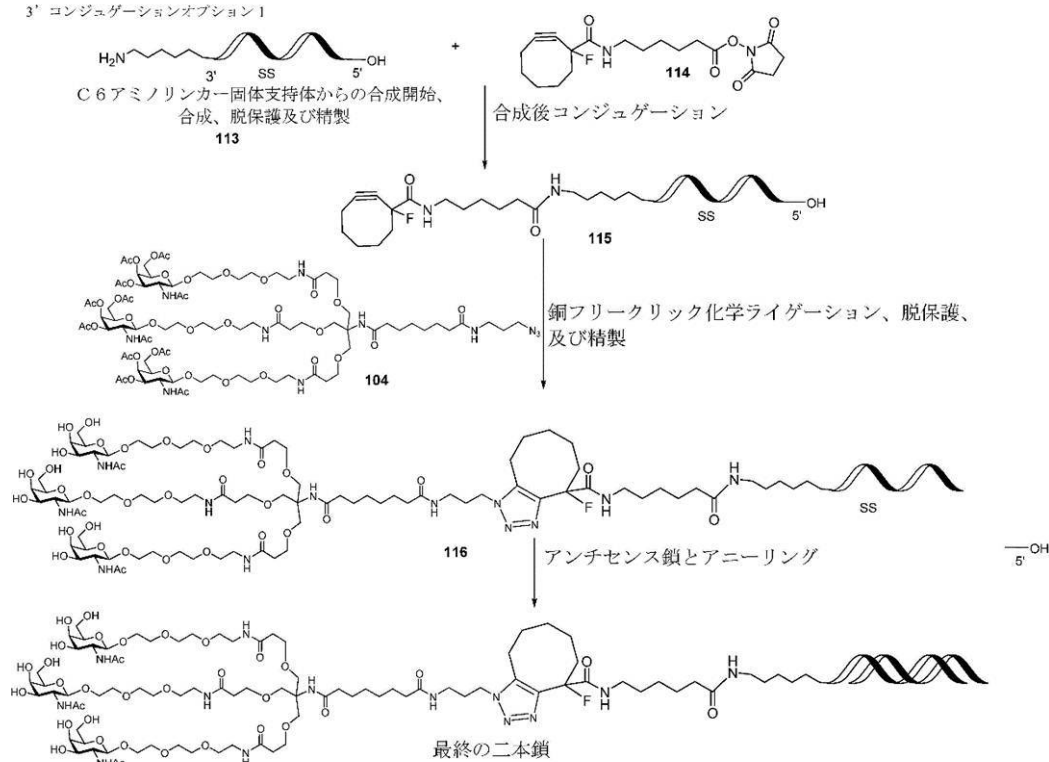
20

30

40

50

3' コンジュゲーションオブション1

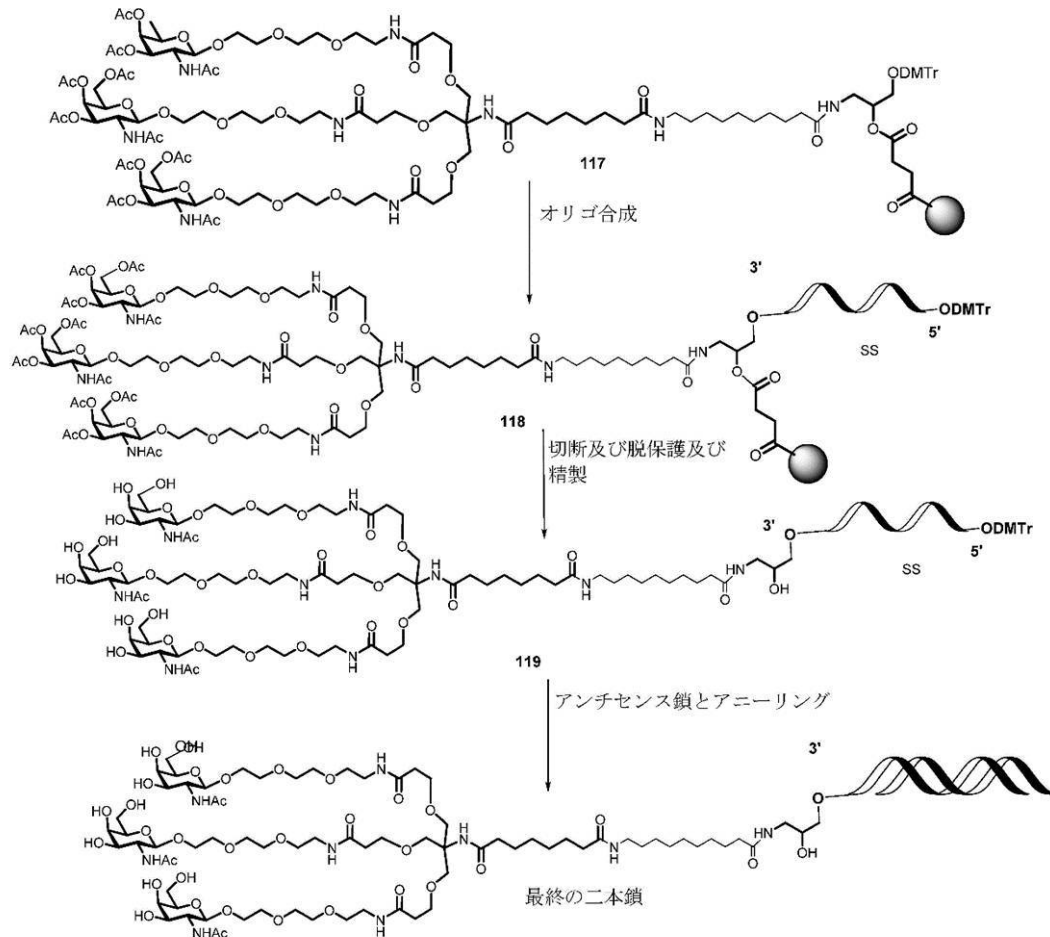


オリゴ構築物 119 の合成については、同様の手法が適合され、三分岐 G a l N A c コンジュゲートが固体支持体 118 (C P G) に担持され、オリゴ合成が実施される。切断及び脱保護及び精製後、アンチセンス鎖でアニーリングされる純粋なオリゴ 119 が得られ、純粋な形態で必要な最終の二本鎖を得る。別の手法において、3' コンジュゲートはまた、116 の合成に類似して合成され、アミノ連結オリゴ 113 から出発し、G a l N A c カルボン酸を合成後にコンジュゲートし、コンジュゲートオリゴ 119 を得る。

実施例 14 : 3' コンジュゲーション (オプション 2)

【 0 3 9 0 】

【化 7 4】



10

20

【0391】

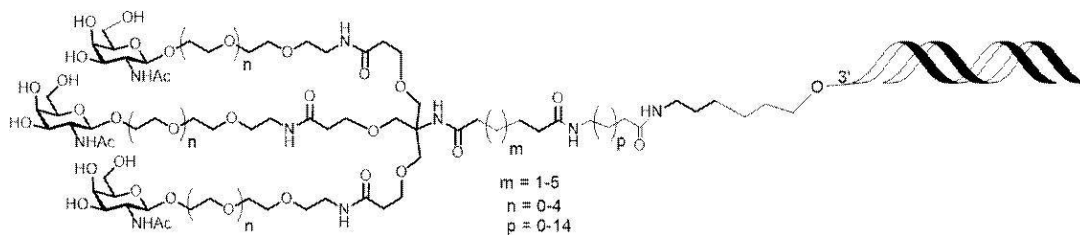
オリゴ構築物 119 の合成については、同様の手法が適合され、三分岐 GalNAc コンジュゲートが固体支持体 118 (CPG) に担持され、オリゴ合成が実施される。切断及び脱保護及び精製後、アンチセンス鎖でアニーリングされる純粋なオリゴ 119 が得られ、純粋な形態で必要な最終の二本鎖を得た。別の手法において、3' コンジュゲートはまた、116 の合成に類似して合成され、アミノ連結オリゴ 113 から出発し、GalNAc カルボン酸を合成後にコンジュゲートし、コンジュゲートオリゴ 119 を得る。

30

実施例 15：合成後コンジュゲーションアプローチ

【0392】

【化 7 5】

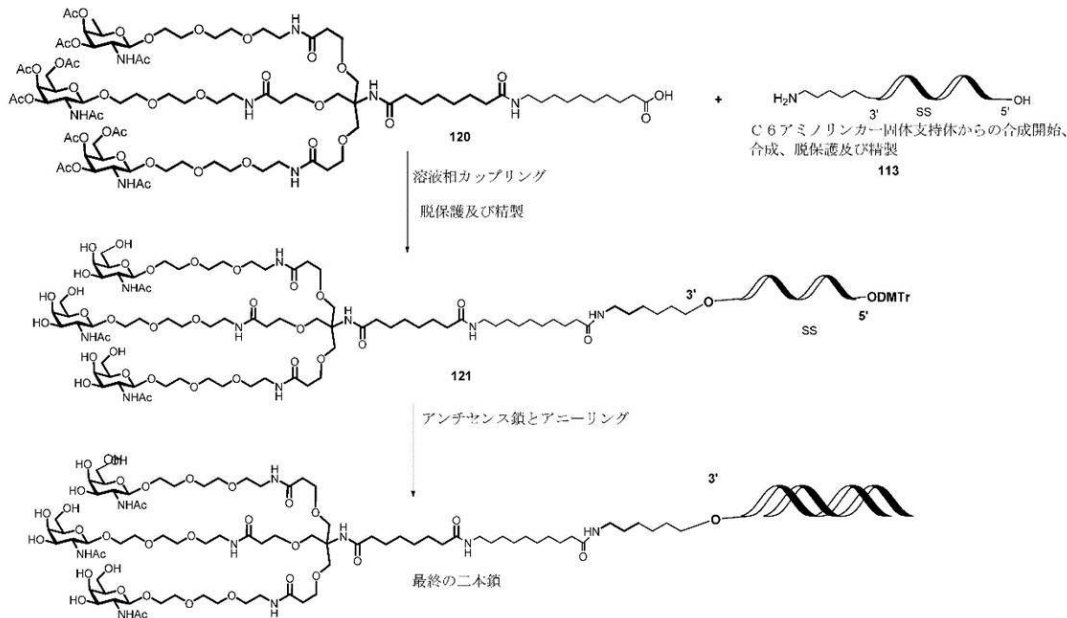


40

【0393】

50

【化 7 6】



10

【0394】

この手法において、3' コンジュゲートはまた、116の合成に類似して合成され、アミノ連結オリゴ113から出発し、GalNAcカルボン酸を合成後にコンジュゲートし、アンチセンス鎖でアニールされるコンジュゲートオリゴ121を得、必要な最終二本鎖を純粋な形態で得る。

20

【0395】

前述の実施例は、限定することを意図するものではない。当業者は、本開示に照らして、開示されている特定の材料に多くの変更を行うことができ、それでも本発明の趣旨及び範囲から逸脱することなく類似又は同様の結果が得られることを理解するであろう。

【0396】

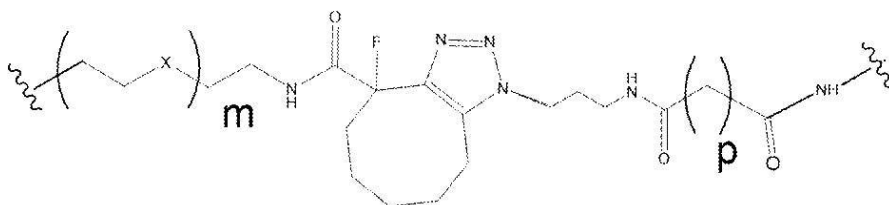
ステートメント

1. テザーを介してASGP-RリガンドにコンジュゲートされたRNA干渉化合物 (RNAi化合物) を含む修飾RNAi剤であって、テザーが、以下を含み、

30

【0397】

【化 7 7】



(式111*)

40

【0398】

式中、mが、0、1、2、3、4、又は5から選択され、pが、mとは独立して、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、又は14から選択され、Xが、O及びCH₂から選択される、修飾RNAi剤。

2. m=1である、ステートメント1の修飾RNAi剤。

3. xが、Oである、ステートメント1の修飾RNAi剤。

4. p=6である、ステートメント1の修飾RNAi剤。

5. m=1、p=6、及びxが、Oである、ステートメント1の修飾RNAi剤。

6. ASGP-Rリガンドが、分岐GalNAcを含む、ステートメント1の修飾RN

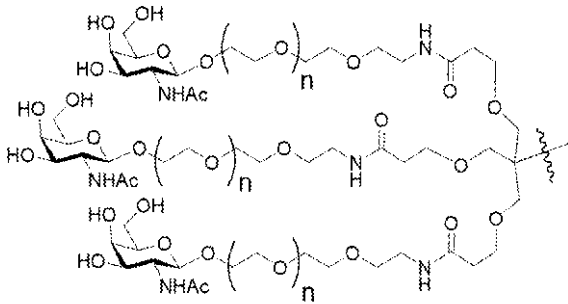
50

A i 剤。

7. 分岐 GalNAc が、以下からなる群から選択され、

【0399】

【化78】

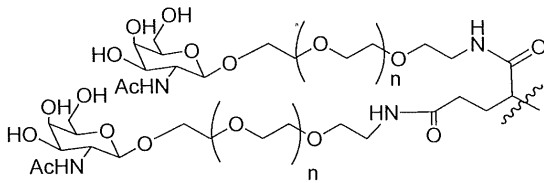


式 I *

及び

【0400】

【化79】



式 I I * - a

【0401】

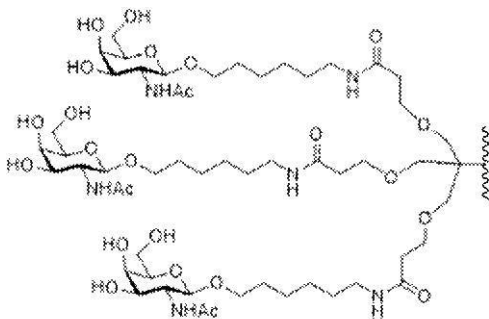
式中、 n が、0、1、2、3、又は4である、ステートメント6の修飾 RNA i 剤。

8. $n = 1$ である、ステートメント7の修飾 RNA i 剤。

9. 分岐 GalNAc が

【0402】

【化80】



式 V I *、

【0403】

又はその二分岐形態を含む、ステートメント6の修飾 RNA i 剤。

10. 分岐 GalNAc が、又はその二分岐形態を含む、ステートメント6に記載の修飾 RNA i 剤。

【0404】

10

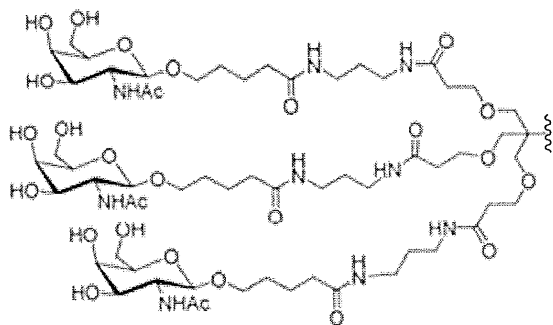
20

30

40

50

【化 8 1】



10

式V I I *、

【 0 4 0 5】

又はその二分岐形態。

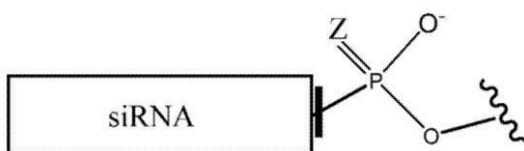
1 1 . テザーが、センス鎖の 5' 末端に結合している、ステートメント 1 の修飾 RNA i 剤。

1 2 . テザーが、式 I V * に示されるように結合しており、

【 0 4 0 6】

20

【化 8 2】



【 0 4 0 7】

30

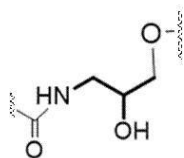
式中、Z が、P 又は S である、ステートメント 1 1 の修飾 RNA i 剤。

1 3 . テザーが、センス鎖の 3' 末端に結合している、ステートメント 1 1 の修飾 RNA i 剤。

1 4 . テザーが、式 V * - a 又は V * - b に示されるように結合している、ステートメント 1 3 の修飾 RNA i 剤：

【 0 4 0 8】

【化 8 3】



40

式V * - a

【 0 4 0 9】

50

【化 8 4】



式 V * - b

【 0 4 1 0】

15. 図 26 A、26 B、26 C、又は 26 D に示される、ステートメント 1 の修飾 RNA i 剤。

16. RNA i 化合物が、2' 位で修飾された修飾リボースを含む、ステートメント 1 5 の修飾 RNA i 剤。 10

17. 修飾が、2'-O-メチル、2'-デオキシーフルオロ、及び 2'-デオキシから選択される、ステートメント 16 の修飾 RNA i 剤。

18. RNA i 化合物が、ASGP-R リガンドにコンジュゲートされていない任意の末端又は全ての末端に 1 つ以上の分解保護部分を含有する、ステートメント 1 の修飾 RNA i 剤。

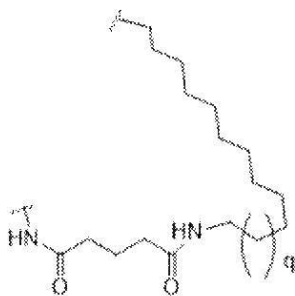
19. 分解保護部分が、1~4 個のホスホロチオエート連結、1~4 個のデオキシヌクレオチド、及び 1~4 個の逆脱塩基ヌクレオチドからなる群から単独で、又は任意の組み合わせとして選択される、ステートメント 18 の修飾 RNA i 剤。

20. 分解保護部分が、以下の構築物 6. 1、6. 2、6. 3、7. 1、7. 2、7. 3、8. 1、8. 2、8. 3、9. 1、9. 2、及び 9. 3 のうちの 1 つに存在する構成から選択される、ステートメント 19 の修飾 RNA i 剤。 20

21. テザーを介して ASGP-R リガンドにコンジュゲートされた RNA 干渉化合物 (RNA i 化合物) を含む修飾 RNA i 剤であって、テザーが、以下を含み、

【 0 4 1 1】

【化 8 5】



(式 I I I * - 2)

【 0 4 1 2】

式中、q が、1、2、3、4、5、6、7、又は 8 から選択される、修飾 RNA i 剤。

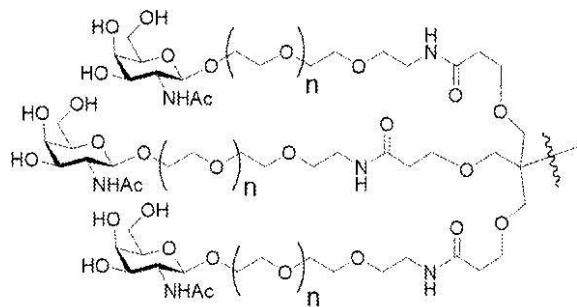
22. q = 1 である、ステートメント 21 の修飾 RNA i 剤。

23. ASGP-R リガンドが、分岐 GalNAc を含む、ステートメント 21 の修飾 RNA i 剤。 40

24. 分岐 GalNAc が、以下からなる群から選択され

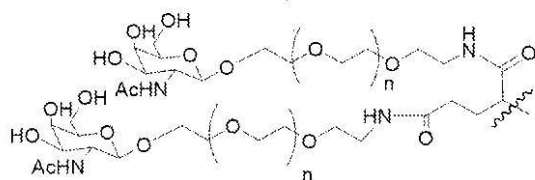
【 0 4 1 3】

【化 8 6】



式 I *

及び



式 I I * - a

【 0 4 1 4】

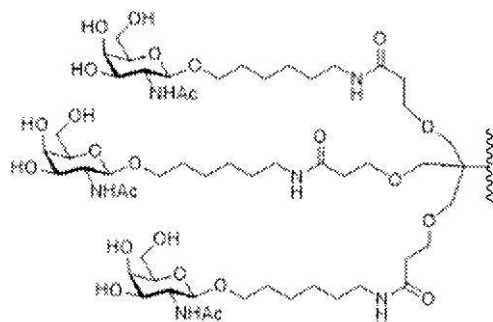
式中、 n が、0、1、2、3、又は4である、ステートメント 2 3 の修飾 RNA i 剤。

2 5 . $n = 1$ である、ステートメント 2 4 の修飾 RNA i 剤。

2 6 . 分岐 GalNAc が、

【 0 4 1 5】

【化 8 8】



式 V I *、

【 0 4 1 6】

又はその二分岐形態を含む、ステートメント 2 3 の修飾 RNA i 剤。

2 7 . 分岐 GalNAc が、又はその二分岐形態を含む、ステートメント 2 3 の修飾 RNA i 剤。

【 0 4 1 7】

10

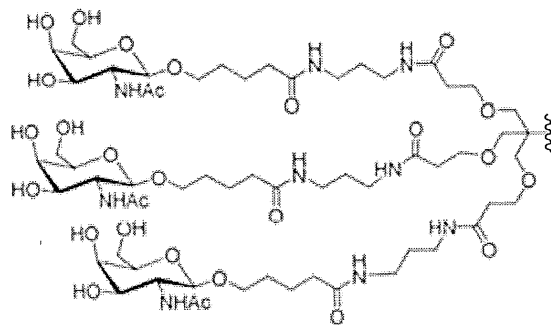
20

30

40

50

【化 8 9】



10

式V I I *、

【 0 4 1 8】

又はその二分岐形態。

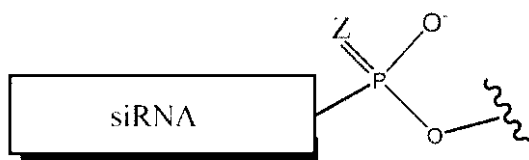
28. テザーが、センス鎖の5'末端に結合している、ステートメント21の修飾RNAi剤。

29. テザーが、式I V *に示されるように結合しており、

【 0 4 1 9】

20

【化 9 0】



【 0 4 2 0】

30

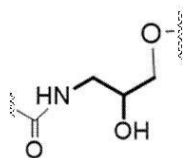
式中、Zが、P又はSである、ステートメント28の修飾RNAi剤。

30. テザーが、センス鎖の3'末端に結合している、ステートメント28の修飾RNAi剤。

31. テザーが、式V * - a又はV * - bに示されるように結合している、ステートメント30の修飾RNAi剤：

【 0 4 2 1】

【化 9 1】



40

式V * - a

【 0 4 2 2】

50

【化 9 2】



式 V * - b

【 0 4 2 3】

32. 図 27A、27B、27C、又は 27D に示される、ステートメント 31 の修飾 RNA i 剤。

33. RNA i 化合物が、2' 位で修飾された修飾リボースを含む、ステートメント 21 の修飾 RNA i 剤。 10

34. 修飾が、2'-O-メチル、2'-デオキシーフルオロ、及び 2'-デオキシから選択される、ステートメント 33 の修飾 RNA i 剤。

35. siRNA が、ASGP-R リガンドにコンジュゲートされていない任意の末端又は全ての末端に 1 つ以上の分解保護部分を含有する、ステートメント 21 の修飾 RNA i 剤。

36. 分解保護部分が、1~4 個のホスホロチオエート連結、1~4 個のデオキシヌクレオチド、及び 1~4 個の逆脱塩基ヌクレオチドからなる群から単独で、又は任意の組み合わせとして選択される、ステートメント 35 の修飾 RNA i 剤。

37. 分解保護部分が、以下の構築物 6.1、6.2、6.3、7.1、7.2、7.3、8.1、8.2、8.3、9.1、9.2、及び 9.3 のうちの 1 つに存在する構成から選択される、ステートメント 36 の修飾 RNA i 剤。 20

39. ステートメント 1 又は 2 の RNA i 剤を作製する方法であって、当該方法が、実施例 11~15 に示される、方法。

40. 対象における疾患を予防、緩和、又は治療する方法であって、方法は、対象に、疾患を予防、緩和、又は治療するのに有効な治療量で、ステートメント 1 又は 2 の RNA i 剤を投与し、それによって、疾患を予防、緩和、又は治療することを含む、方法。

41. 対象が、ヒトである、ステートメント 40 の方法。

【 0 4 2 4】

30

40

50

【表 15-1】

表A：配列の概要

配列 ID	二本鎖 ID	ssRN ID	センス配列	アンチセンス配列	クリーン配列
1.			5' GalNAc~Gm-Am-Cm-Um-Um-Um-Cf-Am-Uf-Cf-Cf-Um-Gm-Gm-Am-Am-Am-Um-AmsUmsAm-ia-ia 3'		gacuuucauccuggaaauaua
2.				3' AmsCms-Cm-Um-Gm-Am-Am-Af-Gm-Uf-Am-Gm-Gm-Am-Cf-Cf-Um-Uf-Um-Am-UmsAfsUm 5'	accugaaaguaggaccuuuauau
3.			5' GalNAc~Am-Am-Gf-Cm-Af-Am-Gf-Am-Uf-Af-Uf-Um-Uf-Um-Um-Af-Um-Af-AmsUmsAm-ia-ia 3'		aagcaagauuuuuuauaua
4.				3' Td-Td-UmsUmsUm-Um-Cm-Gf-Um-Uf-Cm-Uf-Am-Um-Am-Af-Am-Af-Am-Um-Af-Um-UfsAfsUm 5'	uuuucguucuaaaaaauuuau
5.			5'GalNAc~Um-Gm-Gm-Gm-Am-Um-Uf-Um-Cf-Af-Uf-Gm-Um-Am-Am-Cm-Cm-Am-AmsGmsAm-ia-ia 3'		ugggauuucauguaaccaaga
6.				3' CmsUmsAm-Cm-Cm-Cm-Um-Af-Am-Af-Gm-Um-Am-Cm-Af-Um-Um-Gf-Gm-Um-UmsCfsUm 5'	cuaccuaaaguacauugguucu
7.			5' ia-ia-GmsAmsCm-Um-Um-Um-Cf-Am-Uf-Cf-Cf-Um-Gm-Gm-Am-Am-Am-Um-Am-Um-Am~GalNAc 3'		gacuuucauccuggaaauaua
8.				3' AmsCmsCm-Um-Gm-Am-Am-Af-Gm-Uf-Am-Gm-Gm-	accugaaaguaggaccuuuauau

10

20

【0425】

【表 15-2】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRN ID	センス配列	アンチセンス配列	クリーン配列
				Am-Cf-Cf-Um-Uf-Um-Am-UmsAfsUm 5'	
9.			5' ia-ia-AmsAmsGf-Cm-Af-Am-Gf-Am-Uf-Af-Uf-Um-Uf-Um-Um-Af-Um-Af-Am-Um-Am~GalNAc 3'		aagcaagauuuuuuauaua
10.				3'Td-Td-UmsUmsUm-Um-Cm-Gf-Um-Uf-Cm-Uf-Am-Um-Am-Af-Am-Af-Am-Um-Af-Um-UfsAfsUm 5'	uuuucguucuaaaaaauuuau
11.			5' ia-ia-UmsGmsGm-Gm-Am-Um-Uf-Um-Cf-Af-Uf-Gm-Um-Am-Am-Cm-Cm-Am-Am-Gm-Am~GalNAc 3'		ugggauuucauguaaccaaga
12.				3' CmsUmsAm-Cm-Cm-Cm-Um-Af-Am-Af-Gm-Um-Am-Cm-Af-Um-Um-Gf-Gm-Um-UmsCfsUm 5'	cuaccuaaaguacauugguucu
13.			5'GalNAc~Gf-Am-Cf-Um-Uf-Um-Cf-Am-Uf-Cm-Cf-Um-Gf-Gm-Af-Am-Af-Um-AfsUmsAf 3'		gacuuucauccuggaaauaua
14.				3' AmsCfsCm-Uf-Gm-Af-Am-Af-Gm-Uf-Am-Gf-Gm-Af-Cm-Cf-Um-Uf-Um-Af-UmsAfsUm 5'	accugaaaguaggaccuuuauau
15.			5' GalNAc~Af-Am-Gf-Cm-Af-Am-Gf-Am-Uf-Am-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Am-Uf-Am-AfsUmsAf 3'		aagcaagauuuuuuauaua
16.				3' Td-Td-UmsUfsUm-Uf-Cm-Gf-Um-Uf-Cm-Uf-Am-Uf-Am-Af-Am-Af-Am-Uf-Am-Uf-UmsAfsUm 5'	uuuucguucuaaaaaauuuau

30

40

【0426】

50

【表 16-2】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRN ID	センス配列 5' →3'	アンチセンス配列 5' →3'	クリーン配列
33.	ETX019		(ET-GalNAc-T1N3)(MFCO)(NH-DEG)ugggauUfuCfAfUfguaa ccaasgsa(invabasic)(invabasic)		ugggauuucaguaaccaaga
34.	ETX019			usCfsuugGfuufcaugAfaAfuccasusc	ucuugguuacagaaaucccauc
35.	ETX023		(invabasic)(invabasic)usgs ggaUfuCfAfUfguaaccaaga(NHC6)(MFCO)(ET-GalNAc-T1N3)		ugggauuucaguaaccaaga
36.	ETX023			usCfsuugGfuufcaugAfaAfuccasusc	ucuugguuacagaaaucccauc
37.		XD-00914	cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT		cuuacgcugaguacuucga
38.		XD-00914		UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT	ucgaaguacucagcguaag
39.		XD-03999	AGAuAuGcAcAcAcAcGGA dTsdT		agauaugcacacacacgga
40.		XD-03999		UCCGUGUGUGUGcAuAUCUdTsdT	uccgugugugugcauauu
41.		XD-15421	uscsUfcGfuGfgCfcUfuAfaUfgAfaA(invdt)		ucucgugggccuuuaauggaaa
42.		XD-15421		UfsUfsuCfaUfuAfaGfgCfcAfcGfaGfasusu	uuucauuuagggccacgagauu
43.		X91382	(NH2-DEG)gacuuuCfaUfCfCfugga aauasusa(invabasic)(invabasic)		gacuuuauccuggaaaauua

10

20

【0429】

【表 16-3】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRN ID	センス配列 5' →3'	アンチセンス配列 5' →3'	クリーン配列
			c)		
44.		X91383	(NH2-DEG)aaGfcAfaGfaUfAfUfuUfuUfuAfuAfasusa(invabasic)(invabasic)		aagcaagauuuuuuauaaua
45.		X91384	(NH2-DEG)ugggauUfuCfAfUfguaa ccaasgsa(invabasic)(invabasic)		ugggauuucaguaaccaaga
46.		X91403	(NH2C12)gacuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(invabasic)(invabasic)		gacuuuauccuggaaaauua
47.		X91404	(NH2C12)aaGfcAfaGfaUfAfUfuUfuUfuAfuAfasusa(invabasic)(invabasic)		aagcaagauuuuuuauaaua
48.		X91405	(NH2C12)ugggauUfuCfAfUfguaaccaasgsa(invabasic)(invabasic)		ugggauuucaguaaccaaga
49.		X91415	(invabasic)(invabasic)gsascuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(NH2C6)		gacuuuauccuggaaaauua
50.		X91416	(invabasic)(invabasic)asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuUfuAfuAfaa(NH2C6)		aagcaagauuuuuuauaaua
51.		X91417	(invabasic)(invabasic)usgs ggaUfuCfAfUfguaaccaaga(NH2C6)		ugggauuucaguaaccaaga
52.		X9137	gsascuuuCfaUfCfCfuggaaau		gacuuuauccuggaaaauua

30

40

【0430】

50

【表 16-4】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRN ID	センス配列 5' →3'	アンチセンス配列 5' →3'	クリーン配列
		9	aua(GalNAc)		
53.		X91380	asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuAfuAfaa(GalNAc)		aagcaagauuuuuuuauaaua
54.		X91446	usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga(GalNAc)		ugggauuucauguaaccaaga
55.		X38483	usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAf aagucscsa		uaauuuuccaggaugaaagucca
56.		X91381	usAfsUfuAfaAfaAfaUfcUfuGfcuusudTdT		uaauuaaaaaauucugcuuuu
57.		X38104	usCfsuugGfuUfcaugAfaAfu cccasusc		ucuuugguuacaugaaauccauc
58.		X91388	(MFCO)(NH-DEG)gacuuuUfuCfCfugga aauasusa(invabasic)(invabasic)		gacuuuauccuggaauaaua
59.		X91389	(MFCO)(NH-DEG)aaGfcAfaGfaUfAfUfuUfuUfuAfaasusa(invabasic)(invabasic)		aagcaagauuuuuuuauaaua
60.		X91390	(MFCO)(NH-DEG)ugggauUfuCfAfUfguaa ccaasgsa(invabasic)(invabasic)		ugggauuucauguaaccaaga
61.		X91421	(invabasic)(invabasic)gsascuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(NHC6)(MFCO)		gacuuuauccuggaauaaua
62.		X91422	(invabasic)(invabasic)asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuUfuAfuAf		aagcaagauuuuuuuauaaua

10

20

【0431】

【表 16-5】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRN ID	センス配列 5' →3'	アンチセンス配列 5' →3'	クリーン配列
			aua(NHC6)(MFCO)		
63.		X91423	(invabasic)(invabasic)usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga(NHC6)(MFCO)		ugggauuucauguaaccaaga
64.		X91394	(GalNAc-T1)(MFCO)(NH-DEG)gacuuuUfuCfCfugga aauasusa(invabasic)(invabasic)		gacuuuauccuggaauaaua
65.		X91395	(GalNAc-T1)(MFCO)(NH-DEG)aaGfcAfaGfaUfAfUfuUfuUfuAfaasusa(invabasic)(invabasic)		aagcaagauuuuuuuauaaua
66.		X91396	(GalNAc-T1)(MFCO)(NH-DEG)ugggauUfuCfAfUfguaa ccaasgsa(invabasic)(invabasic)		ugggauuucauguaaccaaga
67.		X91427	(invabasic)(invabasic)gsascuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(NHC6)(MFCO)(GalNAc-T1)		gacuuuauccuggaauaaua
68.		X91428	(invabasic)(invabasic)asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuUfuAfuAfaa(NHC6)(MFCO)(GalNAc-T1)		aagcaagauuuuuuuauaaua
69.		X91429	(invabasic)(invabasic)usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga(NHC6)(MFCO)(GalNAc-T1)		ugggauuucauguaaccaaga
70.	ETX001	X91394	(GalNAc-T1)(MFCO)(NHDEG)gacuu		gacuuuauccuggaauaaua

30

40

【0432】

50

【表 16-6】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRN ID	センス配列 5' →3'	アンチセンス配列 5' →3'	ク リ ー ン配列
			uCfaUfCfCfuggaaauasusa(invabasic)(invabasic)		
71.		X38483	usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAf aagucscsa		uauauuuccaggauaagaaagucca
72.	ETX005	X91427	(invabasic)(invabasic)gsascuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(NHC6)(MFCO)(GalNAc-T1)		gacuuucauccugggaaauaaua
73.		X38483	usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAf aagucscsa		uauauuuccaggauaagaaagucca
74.	ETX010	X91395	(GalNAc-T1)(MFCO)(NH-DEG)aaGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfasusa(invabasic)(invabasic)		aagcaagauauuuuuuauaaua
75.		X91381	usAfsUfuAfuAfaAfaUfuUfuGfcuusudTdT		uauuuauaaaaauaucuugcuuuu
76.	ETX014	X91428	(invabasic)(invabasic)asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfaa(NHC6)(MFCO)(GalNAc-T1)		aagcaagauauuuuuuauaaua
77.		X91381	usAfsUfuAfuAfaAfaUfuUfuGfcuusudTdT		uauuuauaaaaauaucuugcuuuu
78.	ETX019	X91396	(GalNAc-T1)(MFCO)(NH-DEG)ugggauUfuCfAfUfguaa ccaasgsa(invabasic)(invabasic)		uggggaauuucauguaaccaaga
79.		X38104	usCfsuugGfuUfcaugAfaAfu cccasusc		uccuugguuacaugaaucaccauc
80.	ETX0	X9142	(invabasic)(invabasic)usgsagg		uggggaauuucauguaaccaaga

10

20

【0433】

【表 16-7】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRN ID	センス配列 5' →3'	アンチセンス配列 5' →3'	ク リ ー ン配列
	23	9	auUfuCfAfUfguaaccaaga(NHC6)(MFCO)(GalNAc-T1)		
81.		X38104	usCfsuugGfuUfcaugAfaAfu cccasusc		uccuugguuacaugaaucaccauc
82.	ETX006		(invabasic)(invabasic)gsascuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(NHC6)(ET-GalNAc-T2CO)		gacuuucauccugggaaauaaua
83.	ETX006			usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaagucscsa	uauauuuccaggauaagaaagucca
84.	ETX002		(ET-GalNAc-T2CO)(NH2C12)gacuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(invabasic)(invabasic)		gacuuucauccugggaaauaaua
85.	ETX002			usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaagucscsa	uauauuuccaggauaagaaagucca
86.	ETX004		(ET-GalNAc-T2CO)(NH2C12)GfaCfuUfuCfaUfcCfuGfgAfaAfuAfsusAf		gacuuucauccugggaaauaaua
87.	ETX004			usAfsuAfuUfuCfcAfgGfaUfgAfaAfgUfc sCfsa	uauauuuccaggauaagaaagucca
88.	ETX008		GfsasCfuUfuCfaUfcCfuGfgAfaAfuAfuAf(NHC6)(ET-GalNAc-T2CO)		gacuuucauccugggaaauaaua
89.	ETX008			usAfsuAfuUfuCfcAfgGfaUfgAfaAfgUfc sCfsa	uauauuuccaggauaagaaagucca
90.	ECX008(低		GfsasCfuUfuCfaUfcCfuGfgAfaAfuAfuAf(NHC6)(ET-		gacuuucauccugggaaauaaua

30

40

【0434】

50

【表 16-8】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRN ID	センス配列 5' →3'	アンチセンス配列 5' →3'	クレーン配列
	純度)		GalNAc-T2CO)		
91.	ECX008(低純度)			usAfsuAfuUfuCfcAfgGfaUfgAfaAfgUfcsCfsa	uauauuuccaggauaaagucca
92.	ETX011		(ET-GalNAc-T2CO)(NH ₂ C12)aaGfcAfaGfaUfAfuUfuUfuAfuAfasusa(invabasic)(invabasic)		aagcaagauauuuuuauaaua
93.	ETX011			usAfsUfuAfuAfaAfaUfaUfcUfuGfcuusudTdT	uauuauaaaaauaucuugcuuuu
94.	ETX015		(invabasic)(invabasic)asasGfcAfaGfaUfAfuUfuUfuAfuAfaa(NHC6)(ET-GalNAc-T2CO)		aagcaagauauuuuuauaaua
95.	ETX015			usAfsUfuAfuAfaAfaUfaUfcUfuGfcuusudTdT	uauuauaaaaauaucuugcuuuu
96.	ETX013		(ET-GalNAc-T2CO)(NH ₂ C12)AfaGfcAfaGfaUfAfuUfuUfaUfaAfsusAf		aagcaagauauuuuuauaaua
97.	ETX013			usAfsuUfaUfaAfaAfaUfaUfcUfuGfcUfUsUfsudTdT	uauuauaaaaauaucuugcuuuu
98.	ETX017		AfsasGfcAfaGfaUfAfuUfuUfaUfaAfuAf(NHC6)(ET-GalNAc-T2CO)		aagcaagauauuuuuauaaua
99.	ETX017			usAfsuUfaUfaAfaAfaUfaUfcUfuGfcUfUsUfsudTdT	uauuauaaaaauaucuugcuuuu

10

20

【0435】

【表 16-9】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRN ID	センス配列 5' →3'	アンチセンス配列 5' →3'	クレーン配列
100.	ETX020		(ET-GalNAc-T2CO)(NH ₂ C12)ugggauUfuCfAfuGuaaccaasgsa(invabasic)(invabasic)		ugggauuucauguaaccaaga
101.	ETX020			usCfsuugGfuUfcaugAfaAfuccasusc	ucuugguuacaugaaauccauc
102.	ETX022		(ET-GalNAc-T2CO)(NH ₂ C12)UfgGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfsGsAf		ugggauuucauguaaccaaga
103.	ETX022			usCfsuUfgGfuUfaCfaUfgAfaAfuCfcCfasUfsc	ucuugguuacaugaaauccauc
104.	ETX024		(invabasic)(invabasic)usgsggauUfuCfAfuGuaaccaaga(NHC6)(ET-GalNAc-T2CO)		ugggauuucauguaaccaaga
105.	ETX024			usCfsuugGfuUfcaugAfaAfuccasusc	ucuugguuacaugaaauccauc
106.	ETX026		UfsgsGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfgAf(NHC6)(ET-GalNAc-T2CO)		ugggauuucauguaaccaaga
107.	ETX026			usCfsuUfgGfuUfaCfaUfgAfaAfuCfcCfasUfsc	ucuugguuacaugaaauccauc
108.	XD-00914		cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT		cuuacgcugaguacuucga
109.	XD-00914			UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT	ucgaaguacucagcguaag
110.	XD-03999		AGAuAuGcAcAcAcAcGGA dTsdT		agauaugcacacacgga

30

40

【0436】

50

【表 1 6 - 1 2】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRN ID	センス配列 5' →3'	アンチセンス配列 5' →3'	クリーン配列
		0	AfcCfaAfgAfh(NH2C6)		
132.		X91379	gsascuuuCfaUfCfCfuggaauaau(GalNAc)		gacuuucauccuggaaaauaa
133.		X91380	asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfaau(GalNAc)		aagcaagauauuuuuauaaaua
134.		X91446	usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga(GalNAc)		uggggaauucauguaaccaaga
135.		X38483	usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAf aagucscsa		uauauuuaccaggauaagucca
136.		X91381	usAfsUfuAfaAfaAfaUfcUfuGfcuusudTdT		uauuaaaaaauaucuugcuuuu
137.		X38104	usCfsuugGfuAfcAugAfaAfu cccasusc		ucuuugguuacaugaaauccauc
138.		X91398	usAfsuAfuUfuCfcAfgGfaUf gAfaAfgUfcsCfsa		uauauuuaccaggauaagucca
139.		X91400	usAfsuUfaUfaAfaAfaUfaUfcUfuGfcUfusUfsudTdT		uauuaaaaaauaucuugcuuuu
140.		X91402	usCfsuUfgGfuUfaCfaUfgAfaAfuCfcCfasUfsc		ucuuugguuacaugaaauccauc
141.		X91409	(GalNAc-T2)(NH2C12)gacuuuCfaUfCfCfuggaauasusa(invabasic)(invabasic)		gacuuucauccuggaaaauaa
142.		X91410	(GalNAc-T2)(NH2C12)aaGfcAfaGfaUfAfUfuUfuAfuAfasusa(invabasic)(invabasic)		aagcaagauauuuuuauaaaua
143.		X9141	(GalNAc-		uggggaauucauguaaccaaga

10

20

【 0 4 3 9 】

【表 1 6 - 1 3】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRN ID	センス配列 5' →3'	アンチセンス配列 5' →3'	クリーン配列
		1	T2)(NH2C12)ugggauUfuCfAfUfguaaccaasgsa(invabasic)(invabasic)		
144.		X91412	(GalNAc-T2)(NH2C12)GfaCfuUfuCfaUfcCfuGfgAfaAfuAfsusAf		gacuuucauccuggaaaua
145.		X91413	(GalNAc-T2)(NH2C12)AfaGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfaUfaAfsusAf		aagcaagauauuuuuauaaua
146.		X91414	(GalNAc-T2)(NH2C12)UfgGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfsusAf		ugggauuucauguaaccaaga
147.		X91433	(invabasic)(invabasic)gsascuuCfaUfcCfcfuggaaauasusa(NHC6)(GalNAc-T2)		gacuuucauccuggaaaua
148.		X91434	(invabasic)(invabasic)asasGfcaAfaGfaUfaAfuUfuUfaAfaAfaa(NHC6)(GalNAc-T2)		aagcaagauauuuuuauaaua
149.		X91435	(invabasic)(invabasic)usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga(NHC6)(GalNAc-T2)		ugggauuucauguaaccaaga
150.		X91436	GfsasCfuUfuCfaUfcCfuGfgAfaAfuAfuAfa(NHC6)(GalNAc-T2)		gacuuucauccuggaaaua
151.		X91437	AfsasGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfaUfaAfaAfa(NHC6)(GalNAc-T2)		aagcaagauauuuuuauaaua
152.		X9143	UfsusGfgAfuUfuCfaUfgUfa		ugggauuucauguaaccaaga

30

40

【 0 4 4 0 】

50

【表 16 - 16】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRN ID	センス配列 5' →3'	アンチセンス配列 5' →3'	クリーン配列
173.	ETX024	X91435	(invabasic)(invabasic)usgsgg auUfuCfAfUfguaaccaaga(NHC6)(GalNAc-T2)		ugggauuucaguaaccaaga
174.		X38104	usCfsuugGfuUfcaugAfaAfu cccasusc		ucuuggguuacauaaaucac
175.	ETX026	X91438	UfsgsGfgAfuUfuCfaUfgUfa AfcCfaAfgAf(NHC6)(GalNAc-T2)		ugggauuucaguaaccaaga
176.		X91402	usCfsuUfgGfuUfaCfaUfgAfa AfuCfcCfasUfsc		ucuuggguuacauaaaucac

10

【0443】

キー：

配列番号 1 ～ 24 のキー

i a 逆脱塩基ヌクレオチド（1，2-ジデオキシリボース）
m 2'-O-メチルヌクレオチド
f 2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチド
s ホスホロチオエートヌクレオチド間連結（ホスホロチオエート骨格修飾）
～ テザー
T d デオキシチミジン

配列番号 25 ～ 176 のキー

d G、d C、d A、d T DNA 残基
G a l N A c N-アセチルガラクトサミン
G、C、A、U RNA 残基
g、c、a、u 2'-O-メチル修飾残基
G f、C f、A f、U f 2'-フルオロ修飾残基
s ホスホロチオエート骨格修飾
s i R N A 低分子干渉 RNA
M F C O モノフルオロシクロオクチン
i n v a b a s i c 1，2-ジデオキシリボース

(i n v a b a s i c) (i n v a b a s i c) (i) 脱塩基性であり、(i i) 逆配置で、それによって、末端から2番目のヌクレオチドと末端から3番目のヌクレオチドとの間の結合が、逆連結、すなわち、5-5又は3-3連結のいずれかである糖部分を有する、末端の2ヌクレオチドである、ポリヌクレオチド全体におけるヌクレオチド。

N H 2 - D E G / N H D E G アミノエトキシエチルリンカー

N H 2 C 1 2 アミノドデシルリンカー

N H 2 C 6 / N H C 6 アミノヘキシルリンカー

E T (E-治療剤-企業参照)

(E T - G a l N A c - T 1 N 3) (M F C O) (N H - D E G) テザー T 1 b

(E T - G a l N A c - T 2 C O) (N H 2 C 1 2) テザー T 2 b

(N H C 6) (M F C O) (E T - G a l N A c - T 1 N 3) テザー T 1 a

(N H C 6) (E T - G a l N A c - T 2 C O) テザー T 2 a

T 1 N 3 T 1 テザー

T 2 C o T 2 テザー

(G a l N A c -) T 1 G a l N a c T 1 テザー

(G a l N A c -) T 2 G a l N a c T 2 テザー

注記：キーは、センス及びアンチセンス配列を指すが、クリーン配列は、基礎となる R N

20

30

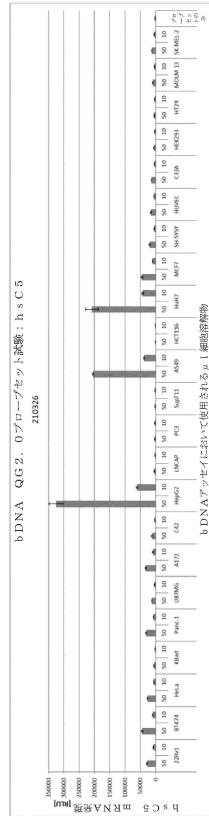
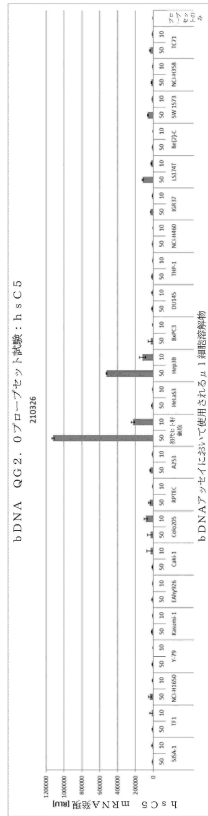
40

50

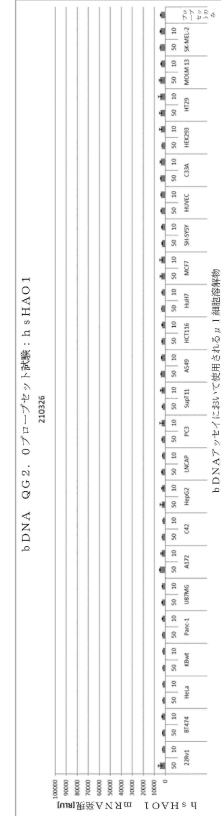
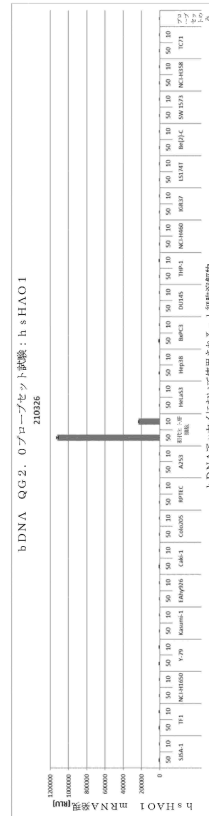
Aヌクレオチドのみを含有する。

【図面】

【図 1】



【圖 2】



10

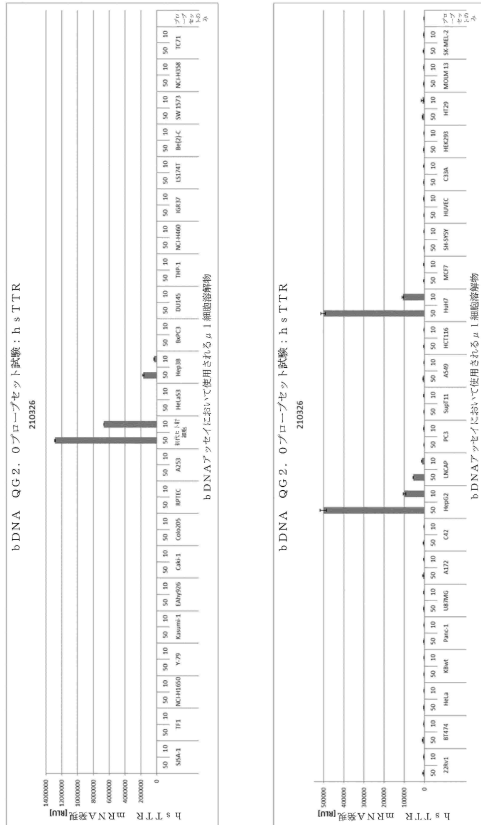
20

30

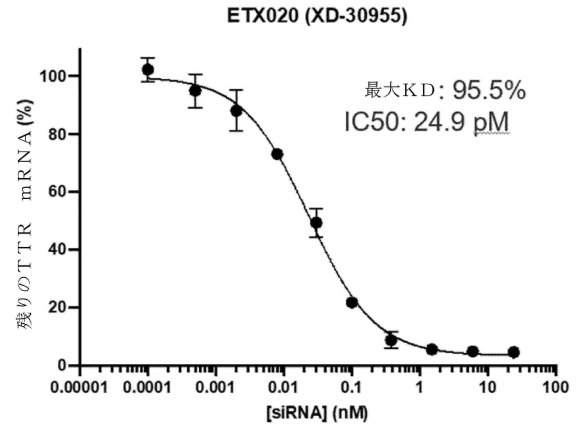
40

50

【図 3】



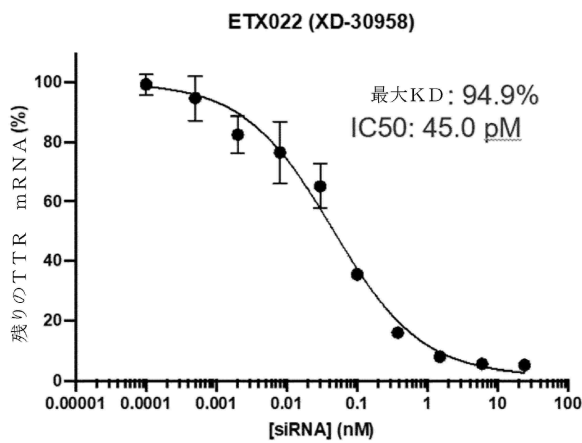
【図 4 A】



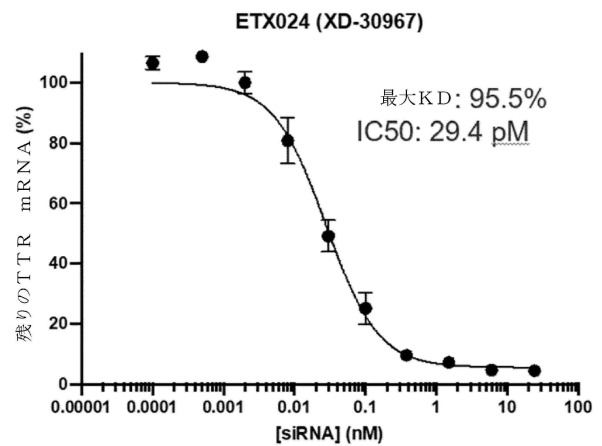
10

20

【図 4 B】



【図 4 C】

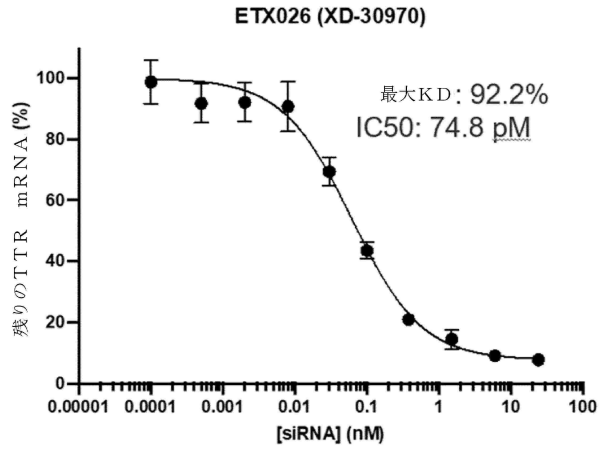


30

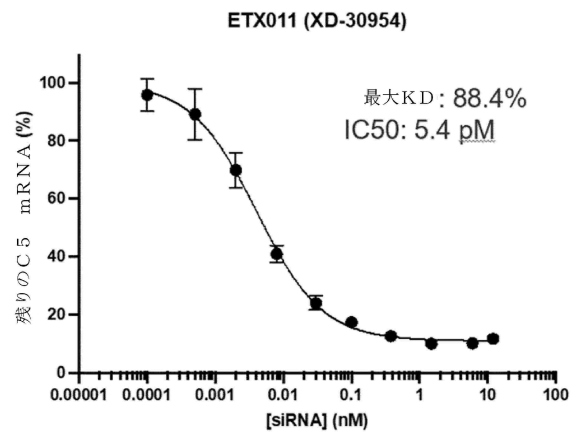
40

50

【図 4 D】

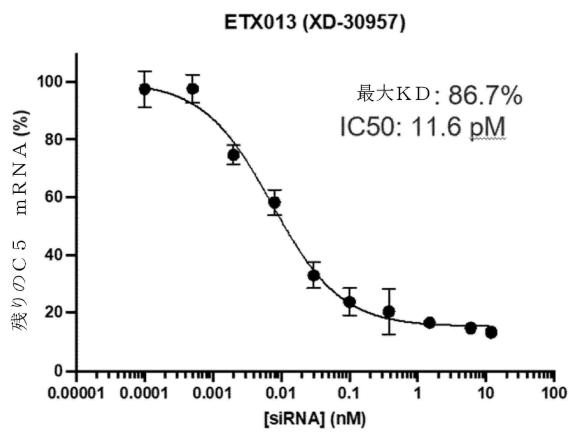


【図 5 A】

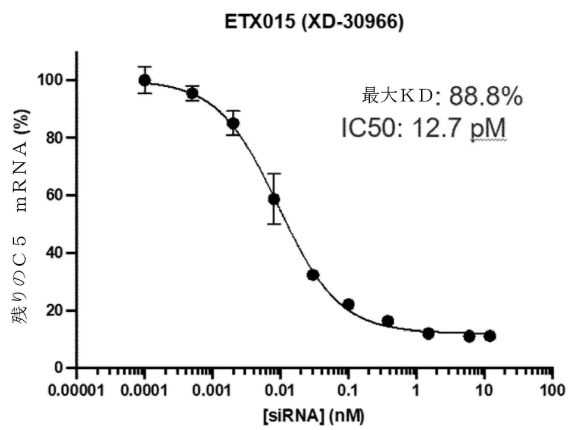


10

【図 5 B】



【図 5 C】



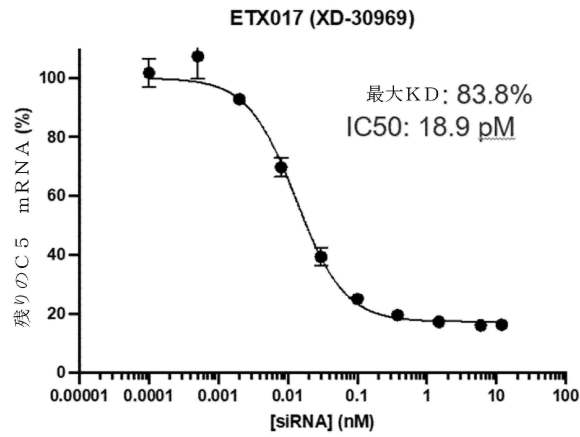
20

30

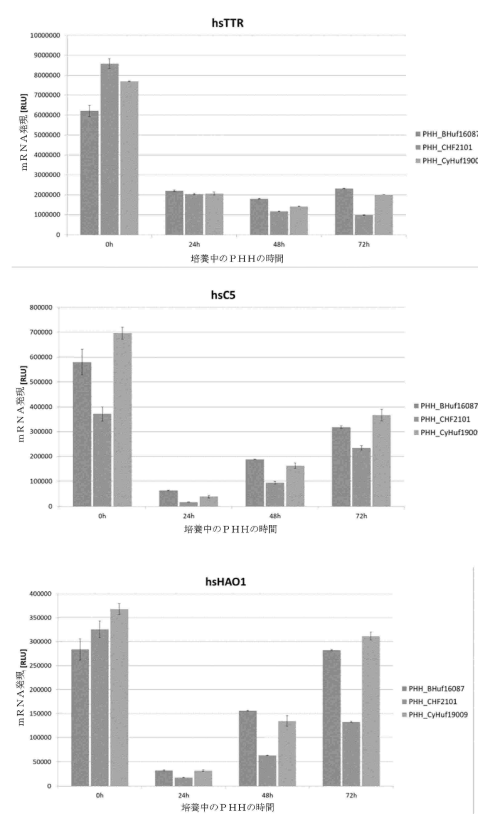
40

50

【図 5 D】



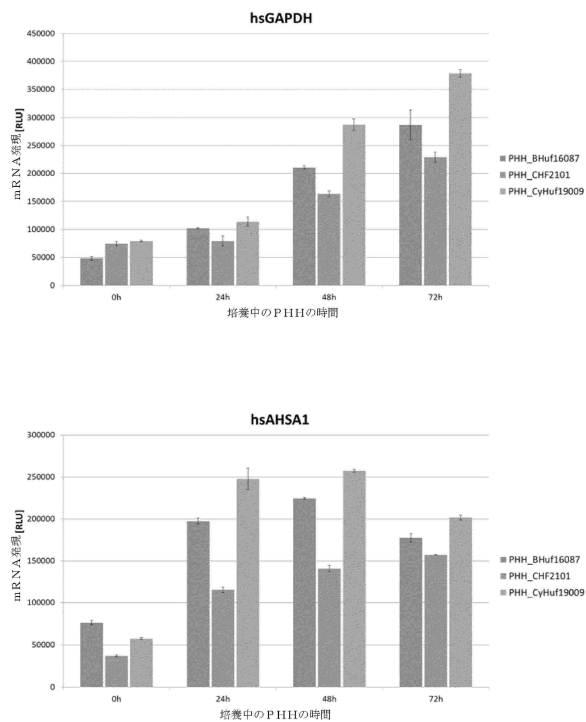
【図 6】



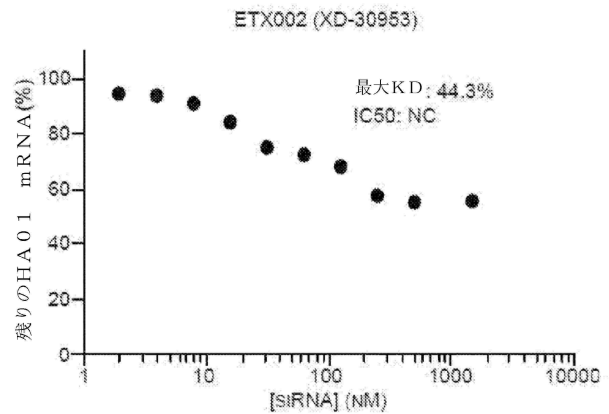
10

20

【図 7】



【図 8 A】

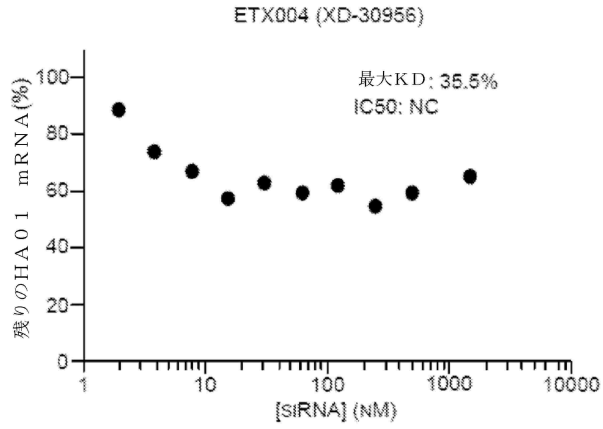


30

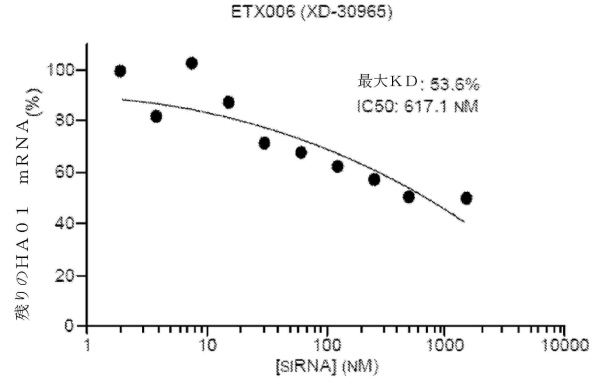
40

50

【図 8 B】

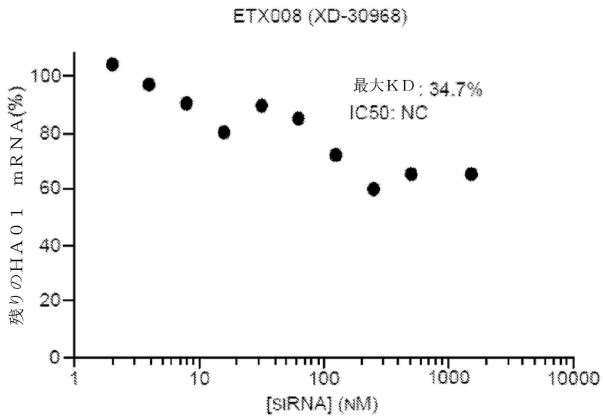


【図 8 C】

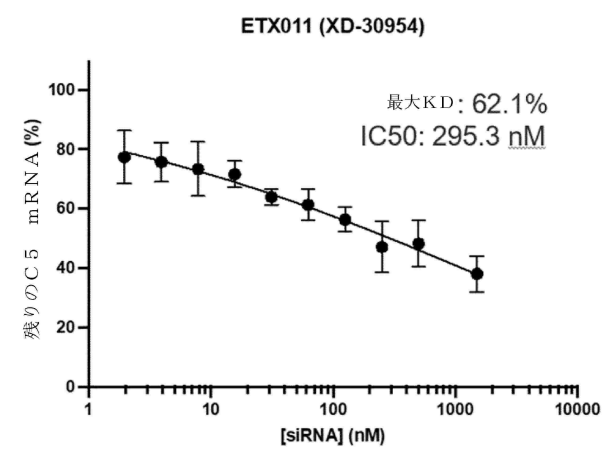


10

【図 8 D】



【図 9 A】



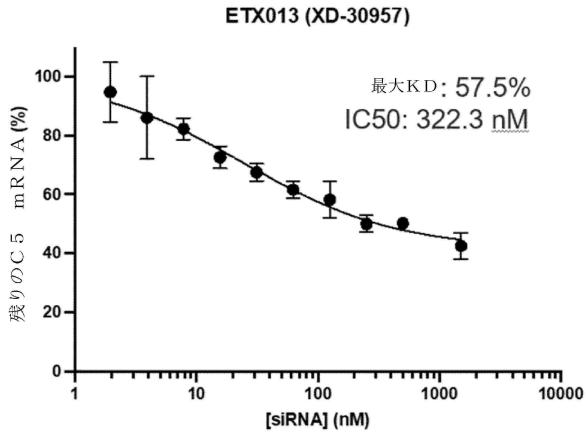
20

30

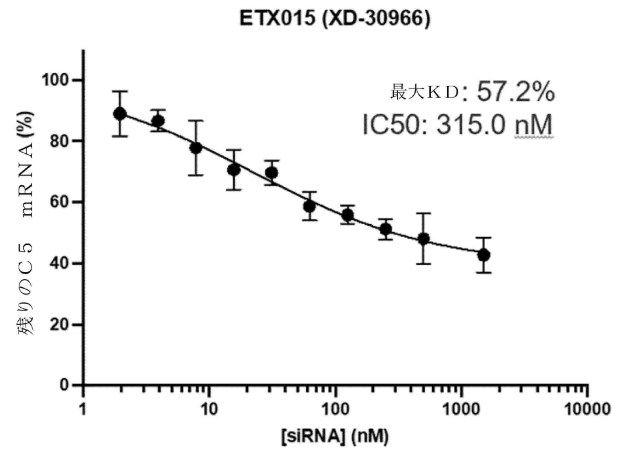
40

50

【図 9 B】

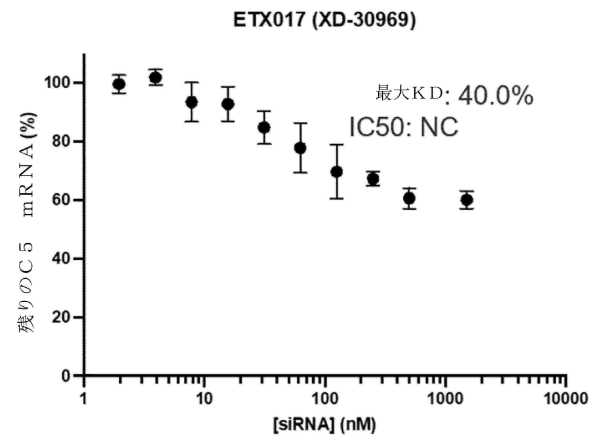


【図 9 C】

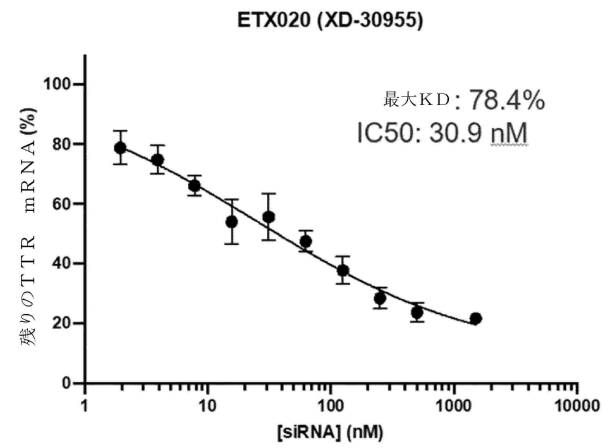


10

【図 9 D】



【図 10 A】



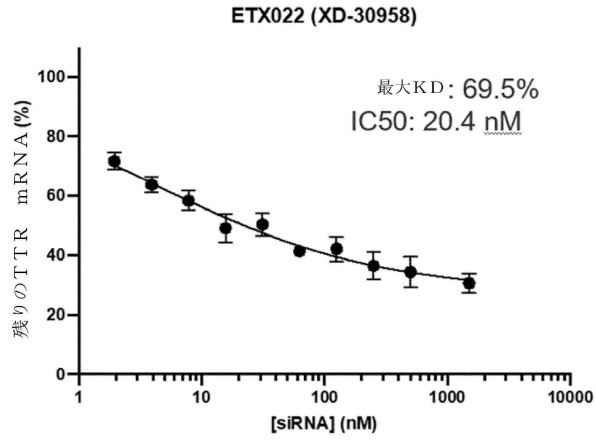
20

30

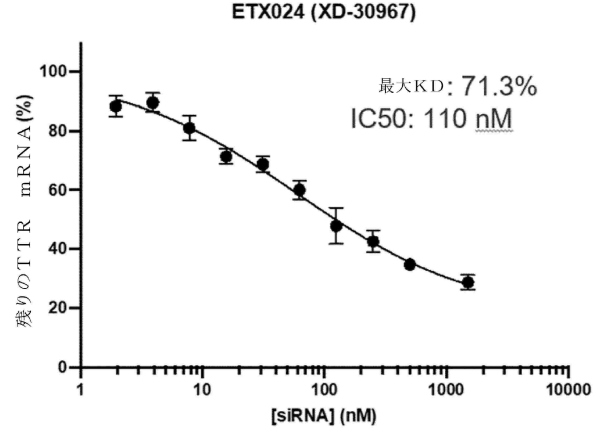
40

50

【図 10 B】

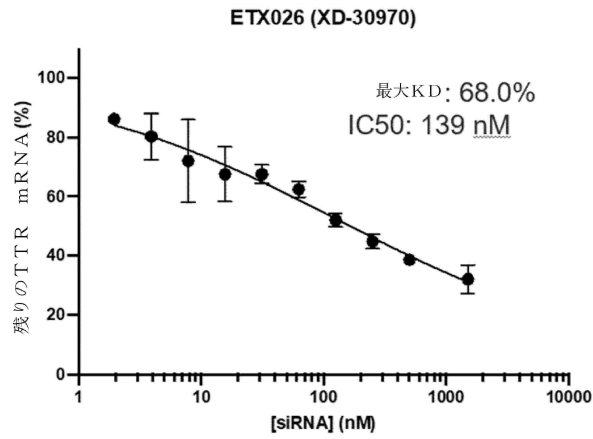


【図 10 C】

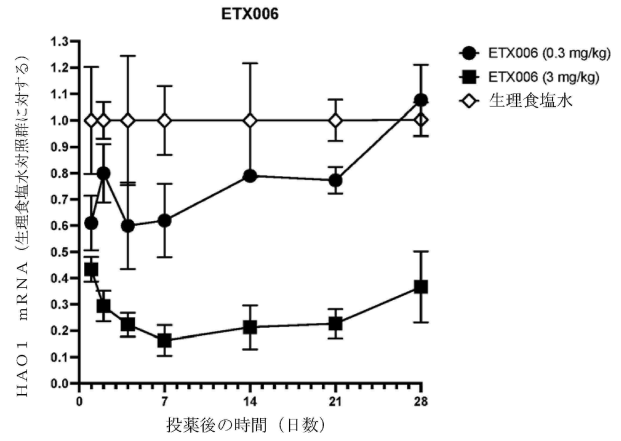


10

【図 10 D】



【図 11】



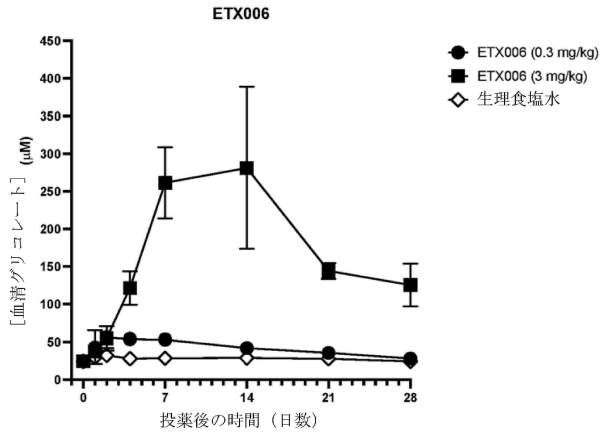
20

30

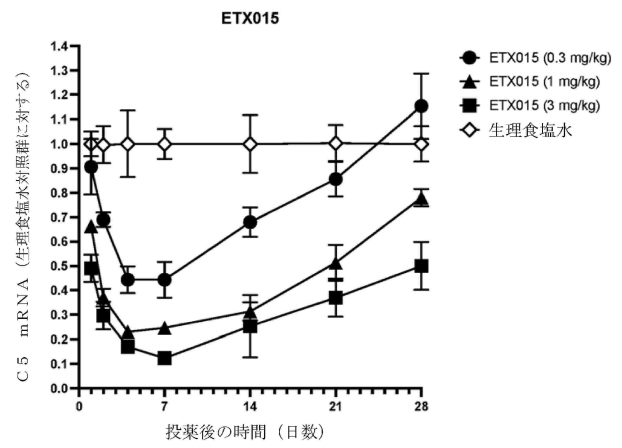
40

50

【図 1 2】

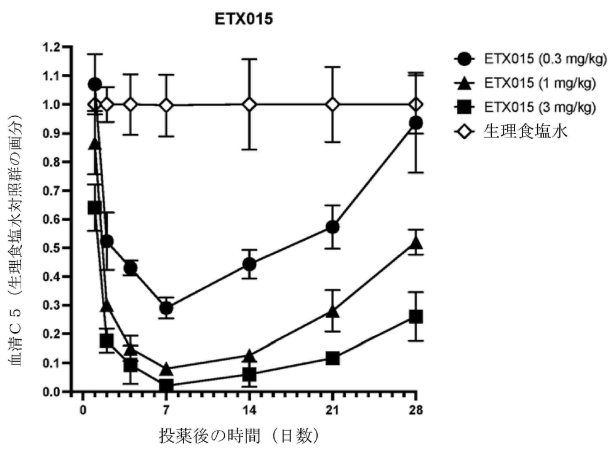


【図 1 3】

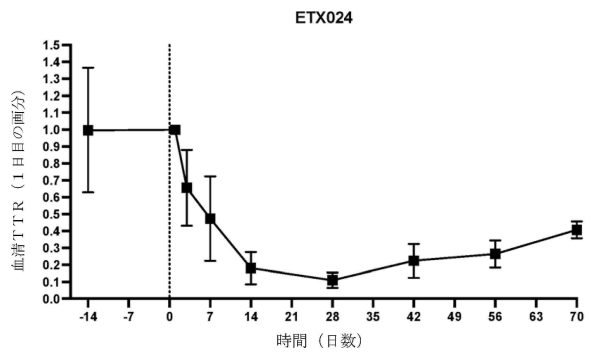


10

【図 1 4】



【図 1 5】



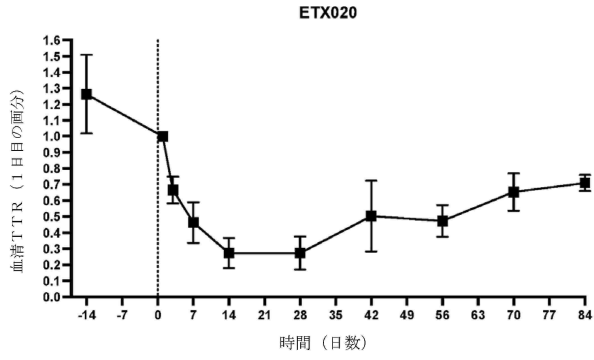
20

30

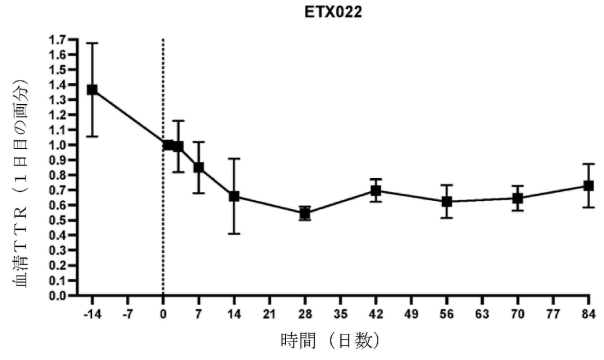
40

50

【図 1 6】

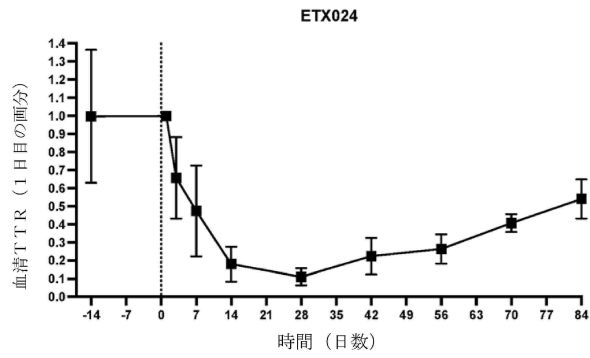


【図 1 7】

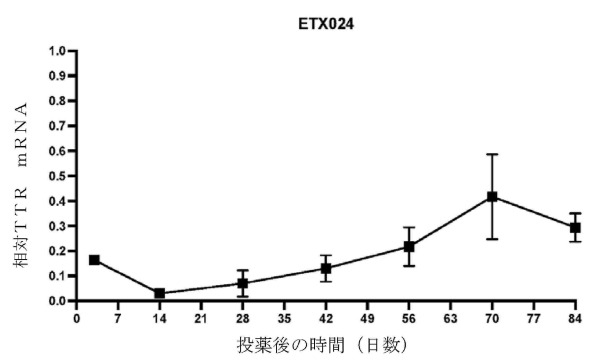


10

【図 1 8 a】



【図 1 8 b】



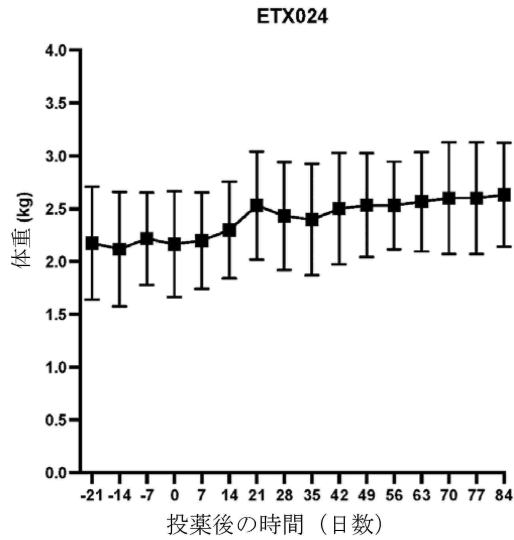
20

30

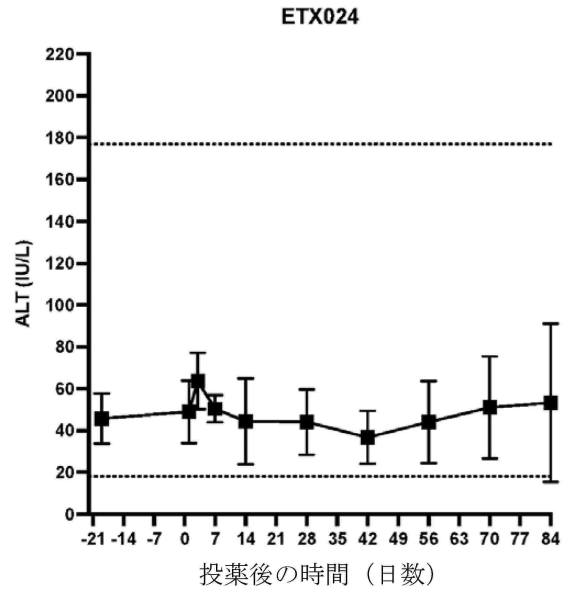
40

50

【図 18 c】



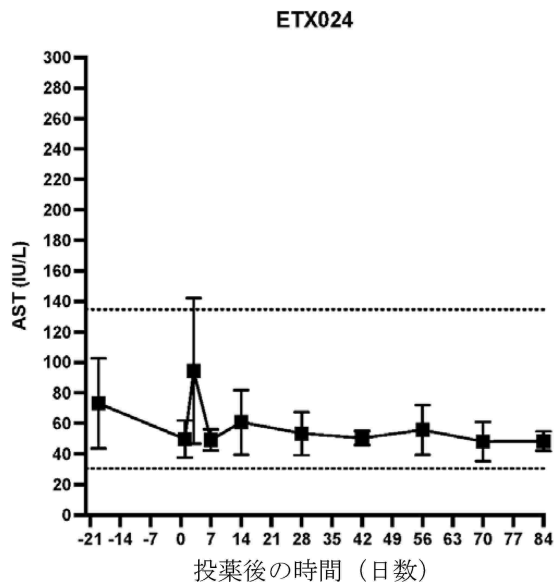
【図 18 d】



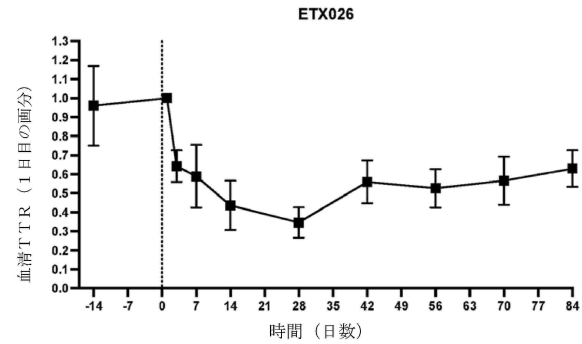
10

20

【図 18 e】



【図 19】

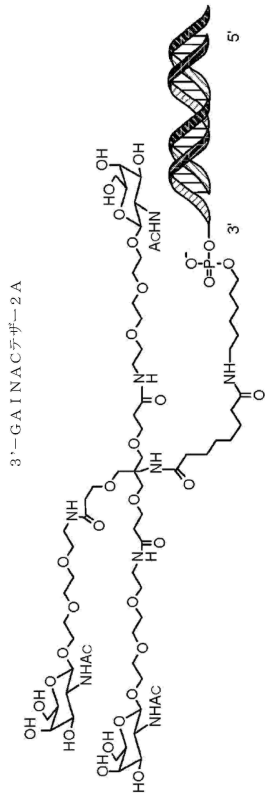


30

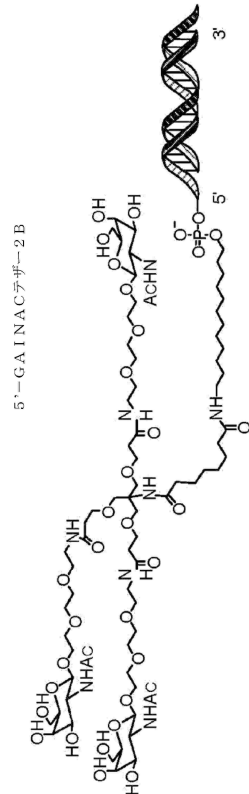
40

50

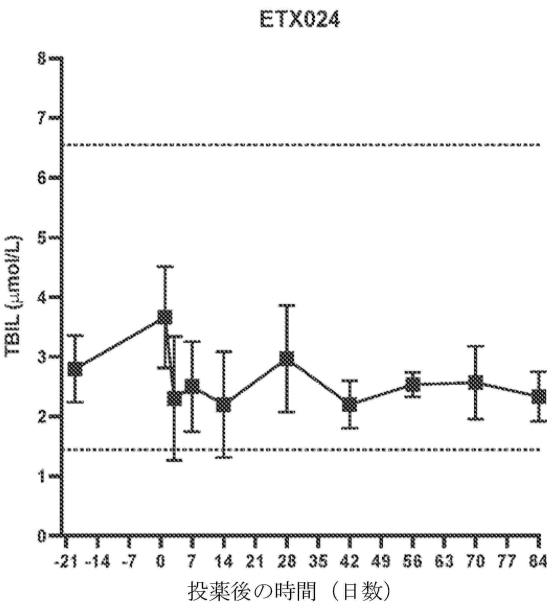
【図 2 0】



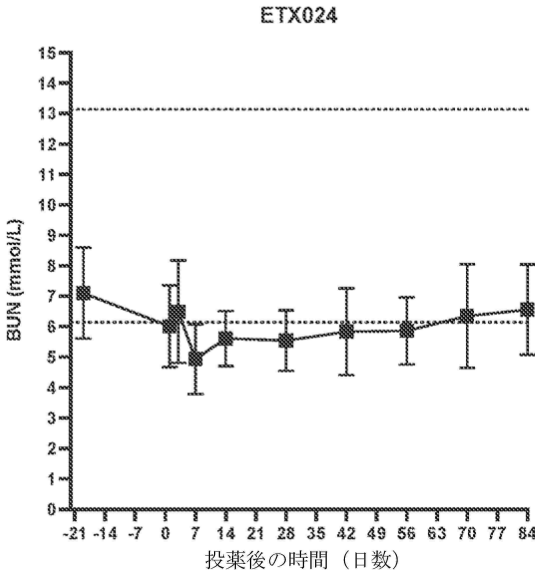
【図 2 1】



【図 2 2】



【図 2 3】



10

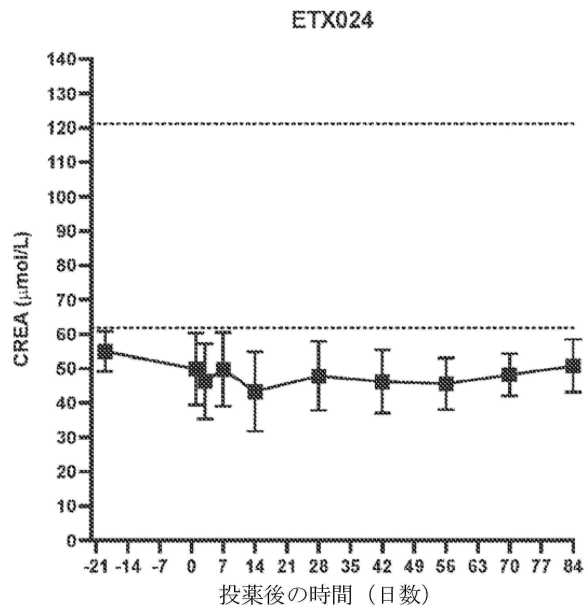
20

30

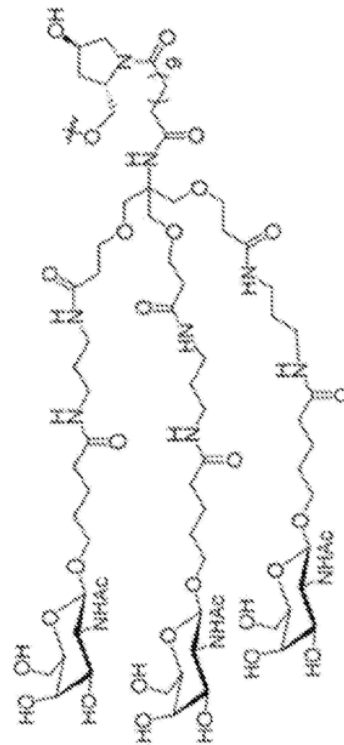
40

50

【図 2 4】



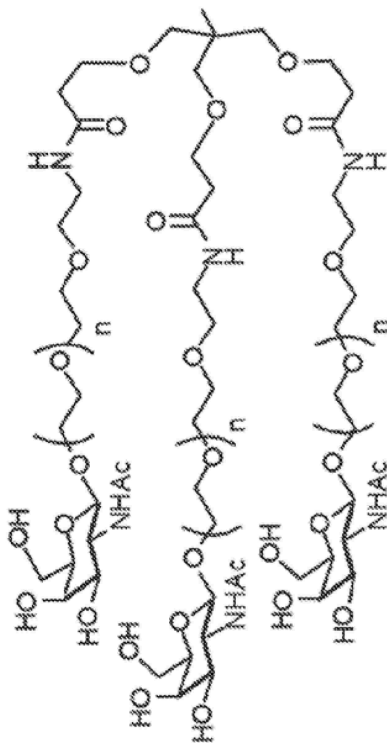
【図 2 5 A】



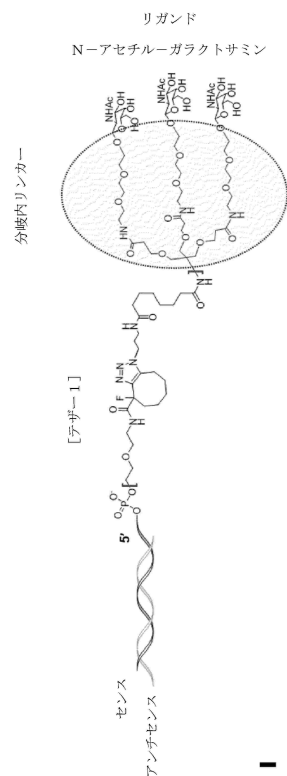
10

20

【図 2 5 B】



【図 2 6 A】

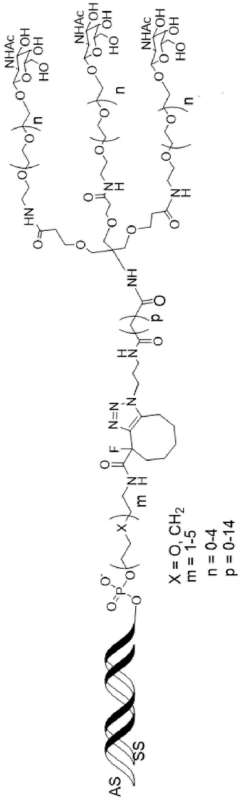


30

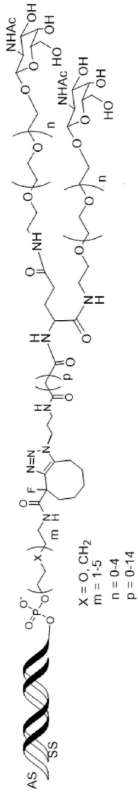
40

50

【図 26 B】



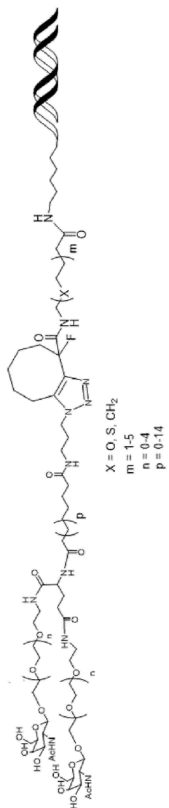
【図 26 C】



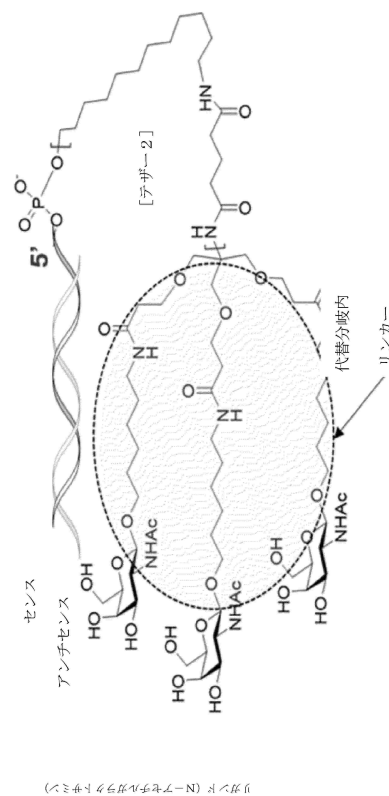
10

20

【図 26 D】



【図 27 A】



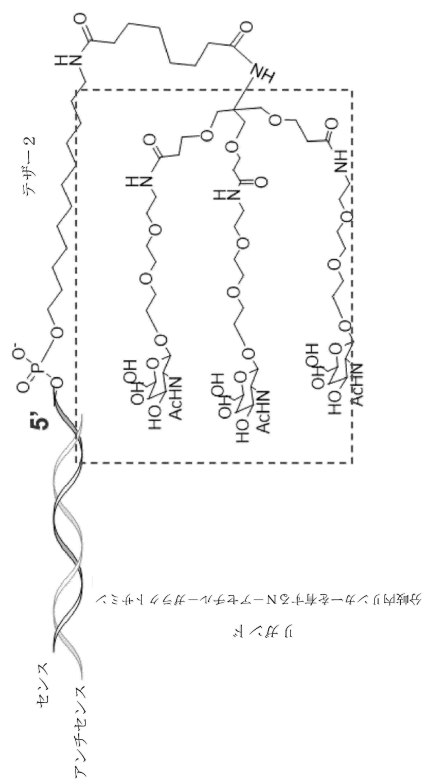
30

40

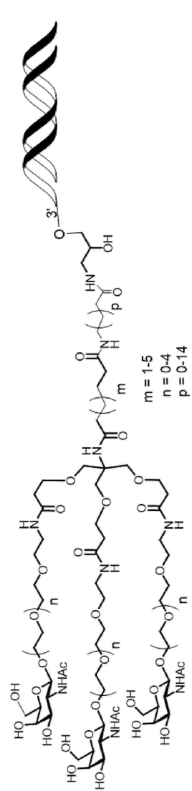
リビド (N-アセチルグルコサミン)

50

【図 2 7 B】



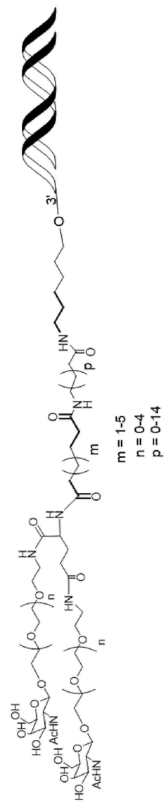
【図 2 7 C】



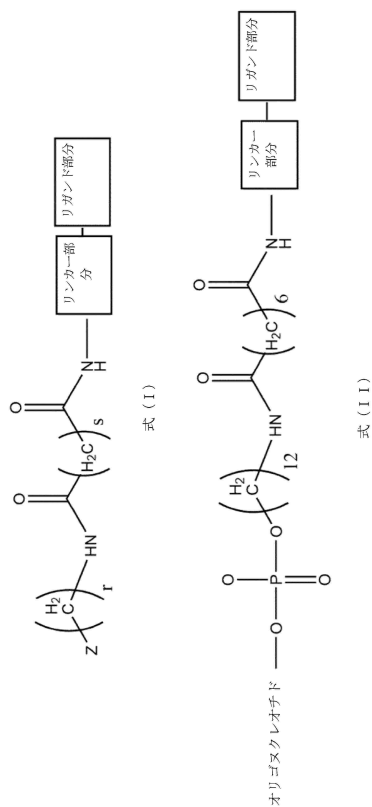
10

20

【図 2 7 D】



【図 2 8 - 1】



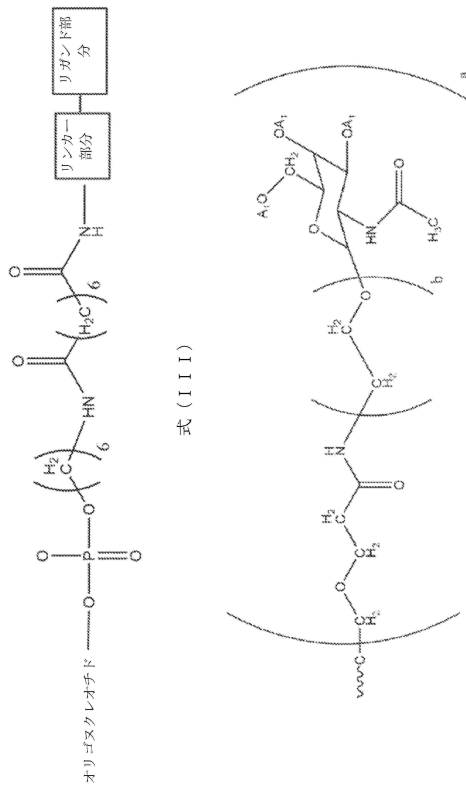
30

40

50

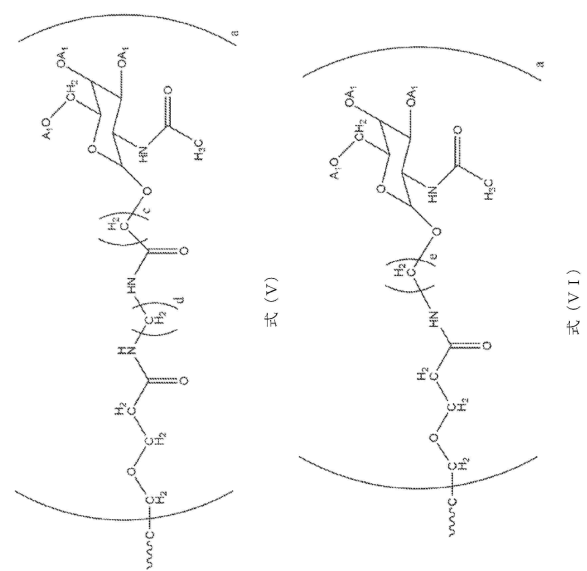
【図 28-2】

(続き)



【図 28-3】

(続き)

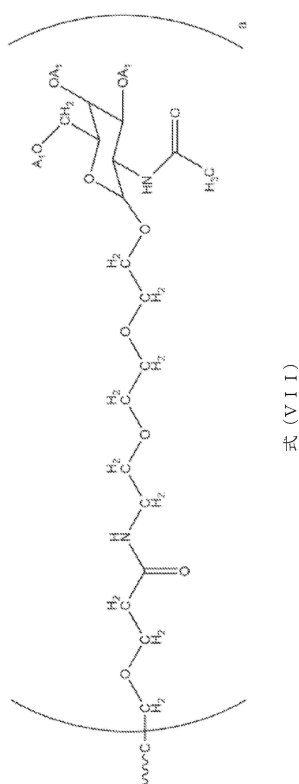


10

20

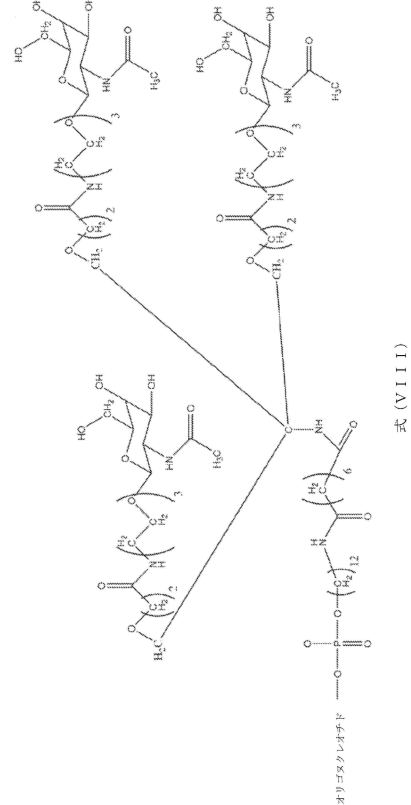
【図 28-4】

(続き)



【図 28-5】

(続き)



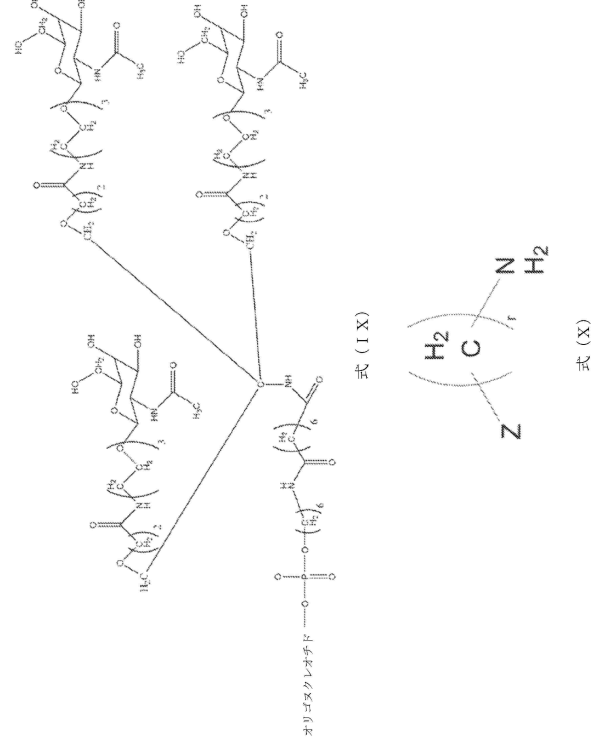
30

40

50

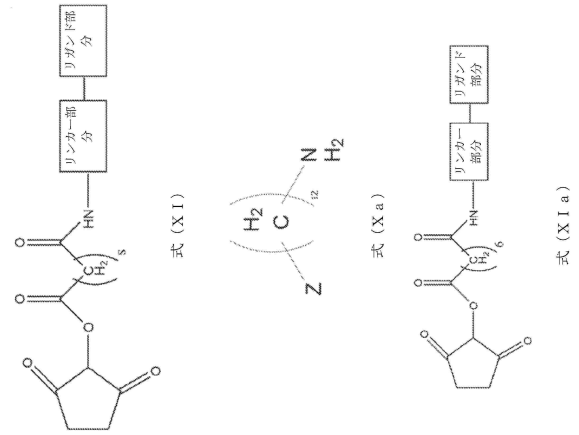
【図 28-6】

(続き)



【図 28-7】

(続き)

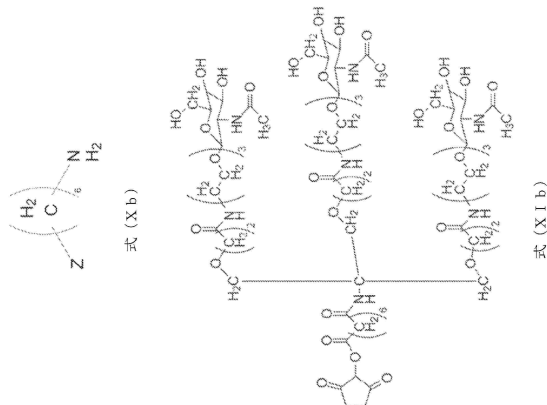


10

20

【図 28-8】

(続き)



【図 29】

HAO 1 標の化構築物

図 29 a :



図 29 b :



【図 30】

C 5 標の化構築物

図 30 a :



図 30 b :



【図 31】

TTR 標の化構築物

図 31 a :



図 31 b :



30

40

50

【配列表】

2024504504000001.app

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/EP2022/052069

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2022/052069**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.: **45-47 (completely); 1-32, 41-43, 48, 49, 51-56 (partially)**
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:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

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:

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 an 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.:

30

40

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

International application No
PCT/EP2022/052069

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. C07H15/04	C07H15/08	C07H21/00
A61K31/713	A61K47/54	C07H21/02
		C07H21/04
ADD.		
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)		
C07H A61K		
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)		
EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2015/042447 A1 (ISIS PHARMACEUTICALS INC [US]) 26 March 2015 (2015-03-26)	1-40,
A	page 1, paragraph 2	51-56
	examples 29, 32-37, 41-43, 46-47, 52-53,	41-44,
	claims 197-208	48-50

X	WO 2020/172755 A1 (DEEP GENOMICS INCORPORATED [CA])	1-40,
	3 September 2020 (2020-09-03)	51-56
A	paragraph [0187]	41-44,
	claims 32-43	48-50

X	WO 2020/097342 A1 (ALIGOS THERAPEUTICS INC [US]) 14 May 2020 (2020-05-14)	1-40,
A	lines 2-5, paragraph 0176	51-56
	paragraph [0178]	41-44,
	figure 4b	48-50
	claim 48	

	---/---	
☒ 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		Date of mailing of the international search report
3 May 2022		12/05/2022
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Fanni, Stefano

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/052069

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 2014/179620 A1 (ISIS PHARMACEUTICALS INC [US]) 6 November 2014 (2014-11-06) example 105 claims 32-37, 158-165, 169-177, 202-209 -----	1-40, 51-56 41-44, 48-50
X A	WO 2014/179626 A2 (ISIS PHARMACEUTICALS INC [US]) 6 November 2014 (2014-11-06) example 105 claims 36-40, 46, 80, 118, 157-159, 162, 168-170 -----	1-4, 51-56 41-44, 48-50
X A	WO 2014/205451 A2 (ISIS PHARMACEUTICALS INC [US]) 24 December 2014 (2014-12-24) claims 3, 115-117, 129, 136, 138-141, 157, 159-162, 164 -----	1-40, 54-56 41-44, 48-53
X A	WO 2018/132432 A1 (ARROWHEAD PHARMACEUTICALS INC [US]) 19 July 2018 (2018-07-19) table 7; compounds (NAG18), (NAG18)s claims 17-23 -----	1-40, 54-56 41-44, 48-53
X A	WO 2018/140920 A1 (ARROWHEAD PHARMACEUTICALS INC [US]) 2 August 2018 (2018-08-02) table 7; compounds (NAG18), (NAG18)s claims 12-16 -----	1-40, 54-56 41-44, 48-53
X A	WO 2020/237391 A1 (DEEP GENOMICS INCORPORATED [CA]) 3 December 2020 (2020-12-03) claims 1, 59, 61-72 -----	1-40, 54-56 41-44, 48-53

3

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2022/052069

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2015042447	A1	26-03-2015	US 2016354476 A1	08-12-2016
			US 2018296684 A1	18-10-2018
			WO 2015042447 A1	26-03-2015
WO 2020172755	A1	03-09-2020	CA 3128577 A1	03-09-2020
			EP 3931323 A1	05-01-2022
			WO 2020172755 A1	03-09-2020
WO 2020097342	A1	14-05-2020	AU 2019376079 A1	27-05-2021
			BR 112021008539 A2	03-08-2021
			CA 3117163 A1	14-05-2020
			CL 2021001202 A1	17-12-2021
			CN 113286803 A	20-08-2021
			CO 2021005762 A2	30-07-2021
			EP 3853240 A1	28-07-2021
			JP 2022512975 A	07-02-2022
			KR 20210090217 A	19-07-2021
			PE 20211783 A1	08-09-2021
			PH 12021551007 A1	04-10-2021
			SG 11202104636X A	29-06-2021
			TW 202031267 A	01-09-2020
			US 2020147124 A1	14-05-2020
			WO 2020097342 A1	14-05-2020
WO 2014179620	A1	06-11-2014	AU 2014259750 A1	22-10-2015
			AU 2014259755 A1	22-10-2015
			AU 2014259756 A1	22-10-2015
			AU 2014259757 A1	22-10-2015
			AU 2014259759 A1	22-10-2015
			AU 2017200365 A1	23-02-2017
			AU 2017200950 A1	02-03-2017
			AU 2017203436 A1	08-06-2017
			AU 2018267625 A1	13-12-2018
			AU 2019200820 A1	28-02-2019
			AU 2019202598 A1	02-05-2019
			AU 2019203674 A1	27-06-2019
			AU 2019204784 A1	25-07-2019
			AU 2020207820 A1	06-08-2020
			AU 2020217347 A1	27-08-2020
			AU 2020233603 A1	01-10-2020
			AU 2021204244 A1	22-07-2021
			BR 112015027319 A2	26-09-2017
			BR 112015027321 A2	26-09-2017
			BR 112015027322 A2	26-09-2017
			BR 112015027369 A2	26-09-2017
			CA 2921162 A1	06-11-2014
			CA 2921167 A1	06-11-2014
			CA 2921509 A1	06-11-2014
			CA 2921514 A1	06-11-2014
			CA 2921518 A1	06-11-2014
			CL 2015003217 A1	08-07-2016
			CL 2016002262 A1	09-06-2017
			CN 105377887 A	02-03-2016
			CN 105378082 A	02-03-2016
			CN 105378085 A	02-03-2016
			CN 105392488 A	09-03-2016
			CN 108064162 A	22-05-2018
			CN 110042098 A	23-07-2019

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2022/052069

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		CN 110066795 A	30-07-2019
		CN 110079524 A	02-08-2019
		CN 111593051 A	28-08-2020
		CN 112921036 A	08-06-2021
		CN 113293163 A	24-08-2021
		CN 114058617 A	18-02-2022
		CR 20150612 A	03-03-2016
		CR 20190269 A	13-09-2019
		DK 2991656 T3	23-03-2020
		DK 2992009 T3	14-09-2020
		DK 2992098 T3	17-06-2019
		DK 3524680 T3	14-12-2020
		DO P2015000268 A	30-11-2015
		DO P2016000287 A	15-02-2017
		DO P2021000095 A	15-09-2021
		EA 201592093 A1	30-06-2016
		EA 201891479 A1	30-11-2018
		EP 2991656 A2	09-03-2016
		EP 2991661 A1	09-03-2016
		EP 2992009 A1	09-03-2016
		EP 2992097 A2	09-03-2016
		EP 2992098 A2	09-03-2016
		EP 3524680 A1	14-08-2019
		EP 3546579 A1	02-10-2019
		EP 3633039 A1	08-04-2020
		EP 3690049 A1	05-08-2020
		EP 3828275 A1	02-06-2021
		ES 2730015 T3	07-11-2019
		ES 2778442 T3	10-08-2020
		ES 2819213 T3	15-04-2021
		ES 2885174 T3	13-12-2021
		HK 1221403 A1	02-06-2017
		HK 1221404 A1	02-06-2017
		HK 1221475 A1	02-06-2017
		HK 1221485 A1	02-06-2017
		HK 1221486 A1	02-06-2017
		HR P20190987 T1	20-09-2019
		HR P20201378 T1	27-11-2020
		HU E043697 T2	30-09-2019
		HU E050394 T2	30-11-2020
		IL 242124 A	28-02-2019
		IL 242125 A	28-02-2019
		IL 242126 A	31-01-2019
		IL 242132 A	31-10-2018
		IL 261901 A	31-05-2020
		IL 263843 A	31-03-2020
		IL 264241 A	30-04-2020
		IL 264580 A	30-04-2020
		IL 270464 A	29-07-2021
		IL 273184 A	29-07-2021
		IL 274064 A	30-06-2021
		JP 6216444 B2	18-10-2017
		JP 6387084 B2	05-09-2018
		JP 6456362 B2	23-01-2019
		JP 6592486 B2	16-10-2019
		JP 6639629 B2	05-02-2020
		JP 6652602 B2	26-02-2020
		JP 6769866 B2	14-10-2020

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2022/052069

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		JP 6866459 B2	28-04-2021
		JP 6995478 B2	14-01-2022
		JP 2016522683 A	04-08-2016
		JP 2016522817 A	04-08-2016
		JP 2016523515 A	12-08-2016
		JP 2016526018 A	01-09-2016
		JP 2016526874 A	08-09-2016
		JP 2018027091 A	22-02-2018
		JP 2018183184 A	22-11-2018
		JP 2019056001 A	11-04-2019
		JP 2020007361 A	16-01-2020
		JP 2020039354 A	19-03-2020
		JP 2020039355 A	19-03-2020
		JP 2020058370 A	16-04-2020
		JP 2020074787 A	21-05-2020
		JP 2021020901 A	18-02-2021
		JP 2021074021 A	20-05-2021
		JP 2021107408 A	29-07-2021
		JP 2022017514 A	25-01-2022
		KR 20160002974 A	08-01-2016
		KR 20160002975 A	08-01-2016
		KR 20160002976 A	08-01-2016
		KR 20160002977 A	08-01-2016
		KR 20160003723 A	11-01-2016
		KR 20180051678 A	16-05-2018
		KR 20190084138 A	15-07-2019
		KR 20200090966 A	29-07-2020
		KR 20210014758 A	09-02-2021
		KR 20210037752 A	06-04-2021
		KR 20210129257 A	27-10-2021
		KR 20210151260 A	13-12-2021
		LT 2992009 T	10-11-2020
		LT 2992098 T	10-07-2019
		ME 03390 B	20-01-2020
		MY 178929 A	23-10-2020
		NZ 631512 A	28-10-2016
		NZ 631537 A	26-05-2017
		NZ 631552 A	24-02-2017
		NZ 712737 A	27-08-2021
		NZ 725538 A	26-02-2021
		NZ 728517 A	24-12-2021
		NZ 753018 A	28-01-2022
		PE 20152002 A1	21-01-2016
		PE 20161430 A1	06-01-2017
		PH 12015502493 A1	22-02-2016
		PH 12018501963 A1	20-07-2020
		PH 12019501191 A1	01-03-2021
		PL 2992009 T3	30-11-2020
		PL 2992098 T3	30-09-2019
		PT 2992009 T	21-09-2020
		PT 2992098 T	05-07-2019
		PT 3524680 T	04-01-2021
		RU 2015151199 A	05-06-2017
		RU 2015151200 A	14-01-2019
		RU 2015151202 A	06-06-2017
		RU 2015151203 A	02-06-2017
		RU 2015151204 A	02-06-2017
		RU 2018112167 A	07-03-2019

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2022/052069

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		RU 2018136140 A	17-12-2018
		RU 2019110030 A	06-05-2019
		RU 2019124314 A	21-08-2019
		SG 10201801507R A	28-03-2018
		SG 10201801813Y A	27-04-2018
		SG 10201906382Q A	27-08-2019
		SG 11201508800W A	27-11-2015
		SG 11201508870V A	27-11-2015
		SI 2992009 T1	30-10-2020
		SI 2992098 T1	28-06-2019
		UA 120287 C2	11-11-2019
		UA 121017 C2	25-03-2020
		US 11299736 B1	12-04-2022
		US 2014343123 A1	20-11-2014
		US 2015126718 A1	07-05-2015
		US 2015126719 A1	07-05-2015
		US 2015126720 A1	07-05-2015
		US 2015176007 A1	25-06-2015
		US 2016017323 A1	21-01-2016
		US 2016076030 A1	17-03-2016
		US 2016076032 A1	17-03-2016
		US 2016090595 A1	31-03-2016
		US 2016090596 A1	31-03-2016
		US 2018002693 A1	04-01-2018
		US 2018044676 A1	15-02-2018
		US 2018273952 A1	27-09-2018
		US 2018273953 A1	27-09-2018
		US 2019055554 A1	21-02-2019
		US 2019367914 A1	05-12-2019
		US 2020224198 A1	16-07-2020
		US 2021024923 A1	28-01-2021
		US 2021087566 A1	25-03-2021
		US 2021130823 A1	06-05-2021
		US 2021395734 A1	23-12-2021
		WO 2014179620 A1	06-11-2014
		WO 2014179625 A1	06-11-2014
		WO 2014179626 A2	06-11-2014
		WO 2014179627 A2	06-11-2014
		WO 2014179629 A2	06-11-2014
		ZA 201507216 B	30-08-2017
WO 2014179626 A2	06-11-2014	AU 2014259750 A1	22-10-2015
		AU 2014259755 A1	22-10-2015
		AU 2014259756 A1	22-10-2015
		AU 2014259757 A1	22-10-2015
		AU 2014259759 A1	22-10-2015
		AU 2017200365 A1	23-02-2017
		AU 2017200950 A1	02-03-2017
		AU 2017203436 A1	08-06-2017
		AU 2018267625 A1	13-12-2018
		AU 2019200820 A1	28-02-2019
		AU 2019202598 A1	02-05-2019
		AU 2019203674 A1	27-06-2019
		AU 2019204784 A1	25-07-2019
		AU 2020207820 A1	06-08-2020
		AU 2020217347 A1	27-08-2020
		AU 2020233603 A1	01-10-2020
		AU 2021204244 A1	22-07-2021

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2022/052069

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		BR 112015027319 A2	26-09-2017
		BR 112015027321 A2	26-09-2017
		BR 112015027322 A2	26-09-2017
		BR 112015027369 A2	26-09-2017
		CA 2921162 A1	06-11-2014
		CA 2921167 A1	06-11-2014
		CA 2921509 A1	06-11-2014
		CA 2921514 A1	06-11-2014
		CA 2921518 A1	06-11-2014
		CL 2015003217 A1	08-07-2016
		CL 2016002262 A1	09-06-2017
		CN 105377887 A	02-03-2016
		CN 105378082 A	02-03-2016
		CN 105378085 A	02-03-2016
		CN 105392488 A	09-03-2016
		CN 108064162 A	22-05-2018
		CN 110042098 A	23-07-2019
		CN 110066795 A	30-07-2019
		CN 110079524 A	02-08-2019
		CN 111593051 A	28-08-2020
		CN 112921036 A	08-06-2021
		CN 113293163 A	24-08-2021
		CN 114058617 A	18-02-2022
		CR 20150612 A	03-03-2016
		CR 20190269 A	13-09-2019
		DK 2991656 T3	23-03-2020
		DK 2992009 T3	14-09-2020
		DK 2992098 T3	17-06-2019
		DK 3524680 T3	14-12-2020
		DO P2015000268 A	30-11-2015
		DO P2016000287 A	15-02-2017
		DO P2021000095 A	15-09-2021
		EA 201592093 A1	30-06-2016
		EA 201891479 A1	30-11-2018
		EP 2991656 A2	09-03-2016
		EP 2991661 A1	09-03-2016
		EP 2992009 A1	09-03-2016
		EP 2992097 A2	09-03-2016
		EP 2992098 A2	09-03-2016
		EP 3524680 A1	14-08-2019
		EP 3546579 A1	02-10-2019
		EP 3633039 A1	08-04-2020
		EP 3690049 A1	05-08-2020
		EP 3828275 A1	02-06-2021
		ES 2730015 T3	07-11-2019
		ES 2778442 T3	10-08-2020
		ES 2819213 T3	15-04-2021
		ES 2885174 T3	13-12-2021
		HK 1221403 A1	02-06-2017
		HK 1221404 A1	02-06-2017
		HK 1221475 A1	02-06-2017
		HK 1221485 A1	02-06-2017
		HK 1221486 A1	02-06-2017
		HR P20190987 T1	20-09-2019
		HR P20201378 T1	27-11-2020
		HU E043697 T2	30-09-2019
		HU E050394 T2	30-11-2020
		IL 242124 A	28-02-2019

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2022/052069

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		IL 242125 A	28-02-2019
		IL 242126 A	31-01-2019
		IL 242132 A	31-10-2018
		IL 261901 A	31-05-2020
		IL 263843 A	31-03-2020
		IL 264241 A	30-04-2020
		IL 264580 A	30-04-2020
		IL 270464 A	29-07-2021
		IL 273184 A	29-07-2021
		IL 274064 A	30-06-2021
		JP 6216444 B2	18-10-2017
		JP 6387084 B2	05-09-2018
		JP 6456362 B2	23-01-2019
		JP 6592486 B2	16-10-2019
		JP 6639629 B2	05-02-2020
		JP 6652602 B2	26-02-2020
		JP 6769866 B2	14-10-2020
		JP 6866459 B2	28-04-2021
		JP 6995478 B2	14-01-2022
		JP 2016522683 A	04-08-2016
		JP 2016522817 A	04-08-2016
		JP 2016523515 A	12-08-2016
		JP 2016526018 A	01-09-2016
		JP 2016526874 A	08-09-2016
		JP 2018027091 A	22-02-2018
		JP 2018183184 A	22-11-2018
		JP 2019056001 A	11-04-2019
		JP 2020007361 A	16-01-2020
		JP 2020039354 A	19-03-2020
		JP 2020039355 A	19-03-2020
		JP 2020058370 A	16-04-2020
		JP 2020074787 A	21-05-2020
		JP 2021020901 A	18-02-2021
		JP 2021074021 A	20-05-2021
		JP 2021107408 A	29-07-2021
		JP 2022017514 A	25-01-2022
		KR 20160002974 A	08-01-2016
		KR 20160002975 A	08-01-2016
		KR 20160002976 A	08-01-2016
		KR 20160002977 A	08-01-2016
		KR 20160003723 A	11-01-2016
		KR 20180051678 A	16-05-2018
		KR 20190084138 A	15-07-2019
		KR 20200090966 A	29-07-2020
		KR 20210014758 A	09-02-2021
		KR 20210037752 A	06-04-2021
		KR 20210129257 A	27-10-2021
		KR 20210151260 A	13-12-2021
		LT 2992009 T	10-11-2020
		LT 2992098 T	10-07-2019
		ME 03390 B	20-01-2020
		MY 178929 A	23-10-2020
		NZ 631512 A	28-10-2016
		NZ 631537 A	26-05-2017
		NZ 631552 A	24-02-2017
		NZ 712737 A	27-08-2021
		NZ 725538 A	26-02-2021
		NZ 728517 A	24-12-2021

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2022/052069

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		NZ 753018 A	28-01-2022
		PE 20152002 A1	21-01-2016
		PE 20161430 A1	06-01-2017
		PH 12015502493 A1	22-02-2016
		PH 12018501963 A1	20-07-2020
		PH 12019501191 A1	01-03-2021
		PL 2992009 T3	30-11-2020
		PL 2992098 T3	30-09-2019
		PT 2992009 T	21-09-2020
		PT 2992098 T	05-07-2019
		PT 3524680 T	04-01-2021
		RU 2015151199 A	05-06-2017
		RU 2015151200 A	14-01-2019
		RU 2015151202 A	06-06-2017
		RU 2015151203 A	02-06-2017
		RU 2015151204 A	02-06-2017
		RU 2018112167 A	07-03-2019
		RU 2018136140 A	17-12-2018
		RU 2019110030 A	06-05-2019
		RU 2019124314 A	21-08-2019
		SG 10201801507R A	28-03-2018
		SG 10201801813Y A	27-04-2018
		SG 10201906382Q A	27-08-2019
		SG 11201508800W A	27-11-2015
		SG 11201508870V A	27-11-2015
		SI 2992009 T1	30-10-2020
		SI 2992098 T1	28-06-2019
		UA 120287 C2	11-11-2019
		UA 121017 C2	25-03-2020
		US 11299736 B1	12-04-2022
		US 2014343123 A1	20-11-2014
		US 2015126718 A1	07-05-2015
		US 2015126719 A1	07-05-2015
		US 2015126720 A1	07-05-2015
		US 2015176007 A1	25-06-2015
		US 2016017323 A1	21-01-2016
		US 2016076030 A1	17-03-2016
		US 2016076032 A1	17-03-2016
		US 2016090595 A1	31-03-2016
		US 2016090596 A1	31-03-2016
		US 2018002693 A1	04-01-2018
		US 2018044676 A1	15-02-2018
		US 2018273952 A1	27-09-2018
		US 2018273953 A1	27-09-2018
		US 2019055554 A1	21-02-2019
		US 2019367914 A1	05-12-2019
		US 2020224198 A1	16-07-2020
		US 2021024923 A1	28-01-2021
		US 2021087566 A1	25-03-2021
		US 2021130823 A1	06-05-2021
		US 2021395734 A1	23-12-2021
		WO 2014179620 A1	06-11-2014
		WO 2014179625 A1	06-11-2014
		WO 2014179626 A2	06-11-2014
		WO 2014179627 A2	06-11-2014
		WO 2014179629 A2	06-11-2014
		ZA 201507216 B	30-08-2017

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2022/052069

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014205451	A2	24-12-2014	AU 2014284152 A1	07-01-2016
			AU 2019284048 A1	23-01-2020
			CA 2916252 A1	24-12-2014
			EP 3011028 A2	27-04-2016
			EP 3564374 A1	06-11-2019
			EP 3730619 A1	28-10-2020
			JP 6694382 B2	13-05-2020
			JP 2016523087 A	08-08-2016
			JP 2020099335 A	02-07-2020
			US 2016122761 A1	05-05-2016
			US 2019127737 A1	02-05-2019
			US 2020270609 A1	27-08-2020
			WO 2014205451 A2	24-12-2014
WO 2018132432	A1	19-07-2018	AU 2018208505 A1	20-06-2019
			BR 112019014282 A2	03-03-2020
			CA 3045045 A1	19-07-2018
			CN 110268060 A	20-09-2019
			EP 3568482 A1	20-11-2019
			JP 2020503070 A	30-01-2020
			KR 20190098748 A	22-08-2019
			TW 201831686 A	01-09-2018
			US 2018195069 A1	12-07-2018
			US 2020208149 A1	02-07-2020
			UY 37565 A	31-07-2018
			WO 2018132432 A1	19-07-2018
			ZA 201903348 B	30-09-2020
WO 2018140920	A1	02-08-2018	AU 2018213379 A1	18-07-2019
			CA 3048661 A1	02-08-2018
			CN 110234326 A	13-09-2019
			EP 3573623 A1	04-12-2019
			JP 2020505415 A	20-02-2020
			US 2019382763 A1	19-12-2019
			WO 2018140920 A1	02-08-2018
WO 2020237391	A1	03-12-2020	CA 3140018 A1	03-12-2020
			EP 3976788 A1	06-04-2022
			WO 2020237391 A1	03-12-2020

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

International Application No. PCT/EP2022/052069

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 45-47 (completely); 1-32, 41-43, 48, 49, 51-56 (partially)

Present claims 1-32, 41-43, 48, 51-56 relates to an extremely large number of possible compounds. Support and disclosure in the sense of Article 6 and 5 PCT is to be found however for only a small proportion of the compounds claimed, namely the compounds of formula (I) for which Z is as defined in claim 9 and wherein the ligand moiety is as defined in claim 23. The same holds for compounds of formula (XI), for which support and disclosure can only be found for those compound for which the ligand moiety is as defined in claim 23.

Concerning present claims 45-47, the initial phase of the search revealed a very large number of documents relevant to the issue of novelty. So many documents were retrieved that it is impossible to determine which parts of these claims may be said to define subject-matter for which protection might legitimately be sought (Article 6 PCT).

The non-compliance with the substantive provisions is to such an extent, that the search was performed taking into consideration the non-compliance in determining the extent of the search of claims 1-32, 41-43, 45-48, 51-56 (PCT Guidelines 9.19 and 9.23).

The search of claims 1-32, 41-43, 48, 51-56 was thus restricted to the subject matter related to the compounds which appear to be supported and a generalisation of their structural formulae, namely to the compounds of formula (I) according to claim 1 for which Z is as defined in claim 9 and the ligand moiety is as defined in claim 23, as well as the compounds of formula XI for which the ligand moiety is as defined in claim 23. The compounds of formula (X) were only search in the context of their use as intermediates for the preparation of the compound of formula I thus only according to the process claims 41-44 and the use claims 51-53 (wherein the limitation described above for the compounds (I) and (XI) applies mutatis mutanda).

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guidelines C-IV, 7.2), should the problems which led to the Article 17(2) PCT declaration be overcome.

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113	Z Z N A

(32)優先日 令和3年10月25日(2021.10.25)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(81)指定国・地域 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,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,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,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,T,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁理士 當麻 博文

(74)代理人 100137729

弁理士 赤井 厚子

(74)代理人 100151301

弁理士 戸崎 富哉

(74)代理人 100152308

弁理士 中 正道

(74)代理人 100201558

弁理士 亀井 恵二郎

(72)発明者 モルタザヴィ、アフマド アリ

イギリス国、ダブリュ 2 6 ビーディー ロンドン、キングダム ストリート 4、ユニット 4 ビー、レヴェル 4、イー セラピューティクス パブリック リミテッド カンパニー内

(72)発明者 マンネラ、ヴィヴィアナ

イギリス国、ダブリュ 2 6 ビーディー ロンドン、キングダム ストリート 4、ユニット 4 ビー、レヴェル 4、イー セラピューティクス パブリック リミテッド カンパニー内

(72)発明者 ジャヤラマン、ムトゥサミー

イギリス国、ダブリュ 2 6 ビーディー ロンドン、キングダム ストリート 4、ユニット 4 ビー、レヴェル 4、イー セラピューティクス パブリック リミテッド カンパニー内

F ターム (参考) 4C057 AA03 MM05

4C076 AA95 CC01 CC05 CC10 CC21 CC27 CC31 EE59 FF36 FF63
FF68

4C084 AA13 NA03 NA13 ZA02 ZA33 ZB11 ZB26 ZB32 ZC21

4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16 MA01 MA04 NA03 NA13 ZA02
ZA33 ZB11 ZB26 ZB32 ZC21