

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7606758号
(P7606758)

(45)発行日 令和6年12月26日(2024.12.26)

(24)登録日 令和6年12月18日(2024.12.18)

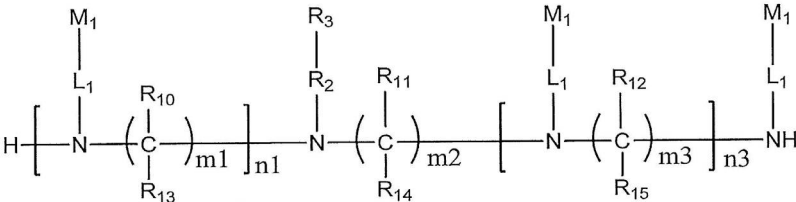
(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113 1 3 0 Z
A 6 1 K	31/713 (2006.01)	A 6 1 K	31/713 Z N A
A 6 1 K	47/56 (2017.01)	A 6 1 K	47/56
A 6 1 P	19/06 (2006.01)	A 6 1 P	19/06
請求項の数 24 (全131頁)			
(21)出願番号	特願2021-569112(P2021-569112)	(73)特許権者	517452453
(86)(22)出願日	令和2年5月21日(2020.5.21)		スーチョウ リボ ライフ サイエンス カ ンパニー、リミテッド
(65)公表番号	特表2022-533419(P2022-533419 A)		S U Z H O U R I B O L I F E S C I E N C E C O . , L T D .
(43)公表日	令和4年7月22日(2022.7.22)		中華人民共和国 チアンスー 2 1 5 3 0
(86)国際出願番号	PCT/CN2020/091485		0、クンシャン シティ、ユイシャン
(87)国際公開番号	WO2020/233651		タウン、ユアンフォン ロード ナンバー
(87)国際公開日	令和2年11月26日(2020.11.26)		1 6 8
審査請求日	令和5年5月19日(2023.5.19)	(74)代理人	110000729
(31)優先権主張番号	201910430586.8		弁理士法人ユニアス国際特許事務所
(32)優先日	令和1年5月22日(2019.5.22)	(72)発明者	チャン、ホンイェン
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)		中華人民共和国 チアンスー 2 1 5 3 0
			0、クンシャン シティ、ユイシャン
			タウン、ユアンフォン ロード ナンバー
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 核酸、薬物組成物及び複合体ならびに調製方法と使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

肝細胞におけるプリンヌクレオシドホスホリラーゼ（PNP）遺伝子の発現を抑制する s i R N A 複合体であって、
前記 s i R N A 複合体は式（308）に示される構造を有し、
【化1】



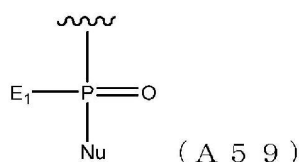
式（308）

式中、

n 1 は、1 ～ 2 から選択される整数であり、n 3 は、0 ～ 1 から選択される整数であり、
n 1 + n 3 = 2 ～ 3 であり、
各 m 1、m 2 又は m 3 はそれぞれ独立して、2 ～ 1 0 から選択される整数であり、
各 R 1 0、R 1 1、R 1 2、R 1 3、R 1 4 又は R 1 5 は、それぞれ独立して、H、メチル基
及びエチル基からなる群より選択され、

R₃は式(A 5 9)に示される構造の基であり、

【化 2】



式中、E₁はOH、SH又はBH₂であり、

Nuはs i RNAであり、

前記s i RNAはセンス鎖とアンチセンス鎖を含むs i RNAであって、前記s i RNAの各ヌクレオチドはそれぞれ独立して修飾又は未修飾のヌクレオチドであり、前記センス鎖はヌクレオチド配列Iを含み、前記アンチセンス鎖はヌクレオチド配列IIを含み、前記ヌクレオチド配列Iと前記ヌクレオチド配列IIとは、逆相補的に二本鎖領域を形成し、前記センス鎖および前記アンチセンス鎖は、同一又は異なる長さを有し、
前記センス鎖は1 9～2 3ヌクレオチドの長さを有し、前記アンチセンス鎖は1 9～2 6
ヌクレオチドの長さを有し、

前記ヌクレオチド配列Iは、配列番号3に示されるヌクレオチド配列のみからなり、前記ヌクレオチド配列IIは、配列番号4に示されるヌクレオチド配列のみからなり、

5' - C C U A U G A A G A U U A U A A G A Z₃ - 3' (配列番号3)、

5' - Z₄ U C U U A U A A U C U U C A U A G G - 3' (配列番号4)

ただし、Z₃は、A、U、G又はCから選択され、Z₄は、前記アンチセンス鎖の5'末端の1番目であってZ₃と相補的なヌクレオチドであり、或いは、

前記ヌクレオチド配列Iは、配列番号63に示されるヌクレオチド配列のみからなり、前記ヌクレオチド配列IIは、配列番号64に示されるヌクレオチド配列のみからなり、

5' - G U A C A G U A C C A G A A G U U A Z₇ - 3' (配列番号63)、

5' - Z₈ U A A C U U C U G G U A C U G U A C - 3' (配列番号64)

ただし、Z₇は、A、U、G又はCから選択され、Z₈は、前記アンチセンス鎖の5'末端の1番目であってZ₇と相補的なヌクレオチドであり、或いは、

前記ヌクレオチド配列Iは、配列番号1 2 3に示されるヌクレオチド配列のみからなり、ヌクレオチド配列IIは、配列番号1 2 4に示されるヌクレオチド配列のみからなり、

5' - C A A A C A A G C U G C A C A G A A Z₁₁ - 3' (配列番号1 2 3)、

5' - Z₁₂ U U C U G U G C A G C U U G U U U G - 3' (配列番号1 2 4)

ただし、Z₁₁は、A、U、G又はCから選択され、Z₁₂は、前記アンチセンス鎖の5'末端の1番目であってZ₁₁と相補的なヌクレオチドであり、或いは、

前記ヌクレオチド配列Iは、配列番号1 8 3に示されるヌクレオチド配列のみからなり、ヌクレオチド配列IIは、配列番号1 8 4に示されるヌクレオチド配列のみからなり、

5' - C A A A C A A G G A C U A A U C C A Z₁₅ - 3' (配列番号1 8 3)、

5' - Z₁₆ U G G A U U A G U C C U U G U U U G - 3' (配列番号1 8 4)

ただし、Z₁₅は、A、U、G又はCから選択され、Z₁₆は、前記アンチセンス鎖の5'末端の1番目であってZ₁₅と相補的なヌクレオチドであり、

R₂は、長さ1～2 0の炭素原子の直鎖アルキレン基であり、1又は複数の炭素原子は、
C(O)、NH、O、S、CH=N、S(O)₂、C₂-C₁₀アルケニレン基、C₂-C₁₀アルキニレン基、C₆-C₁₀アリーレン基、C₃-C₁₈ヘテロシクリレン基及びC₅-C₁₀ヘテロアリーレン基からなる群から選択される1又は複数で任意に置換され、R₂
は、C₁-C₁₀アルキル基、C₆-C₁₀アリール基、C₅-C₁₀ヘテロアリール基、C₁-C₁₀ハロゲン化アルキル基、-OC₁-C₁₀アルキル基、-OC₁-C₁₀アルキルフェニル基、-C₁-C₁₀アルキル-OH、-OC₁-C₁₀ハロゲン化アルキル基、
-SC₁-C₁₀アルキル基、-SC₁-C₁₀アルキルフェニル基、-C₁-C₁₀アルキル-SH、-SC₁-C₁₀ハロゲン化アルキル基、ハロゲン置換基、-OH、-SH、

10

20

30

40

50

$-\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}_1-\text{C}_{10}$ アルキル $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{N}(\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{アルキル基})(\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{アルキル基})$ 、 $-\text{NH}(\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{アルキル基})$ 、 $-\text{N}(\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{アルキル基})(\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{アルキルフェニル基})$ 、 $-\text{NH}(\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{アルキルフェニル基})$ 、シアノ基、ニトロ基、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{アルキル基})$ 、 $-\text{CON}(\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{アルキル基})(\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{アルキル基})$ 、 $-\text{CONH}(\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{アルキル基})$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})(\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{アルキル基})$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})(\text{フェニル基})$ 、 $-\text{N}(\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{アルキル基})\text{C}(\text{O})(\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{アルキル基})$ 、 $-\text{N}(\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{アルキル基})\text{C}(\text{O})(\text{フェニル基})$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{アルキル基}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{アルキルフェニル基}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{ハロアルキル基}$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{アルキル基}$ 、 $-\text{SO}_2(\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{アルキル基})$ 、 $-\text{SO}_2(\text{フェニル基})$ 、 $-\text{SO}_2(\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{ハロゲン化アルキル基})$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}(\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{アルキル基})$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}(\text{フェニル基})$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2(\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{アルキル基})$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2(\text{フェニル基})$ 及び $-\text{NH}\text{SO}_2(\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{ハロゲン化アルキル基})$ からなる群のいずれか 1 又は複数の置換基を任意に有してもよく、
 各 L_1 は独立して、長さ 1～70 の炭素原子の直鎖アルキレンであり、1 又は複数の炭素原子は、 $\text{C}(\text{O})$ 、 NH 、 O 、 S 、 $\text{CH}=\text{N}$ 、 $\text{S}(\text{O})_2$ 、 C_2-C_{10} アルケニレン基、 C_2-C_{10} アルキニレン基、 C_6-C_{10} アリーレン基、 C_3-C_{18} ヘテロシクリレン基及び C_5-C_{10} ヘテロアリーレン基からなる群から選択される 1 又は複数で任意に置換され、 L_1 は、 C_1-C_{10} アルキル基、 C_6-C_{10} アリール基、 C_5-C_{10} ヘテロアリール基、 C_1-C_{10} ハロゲン化アルキル基、 $-\text{OC}_1-\text{C}_{10}\text{アルキル基}$ 、 $-\text{OC}_1-\text{C}_{10}\text{アルキルフェニル基}$ 、 $-\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{アルキル}-\text{OH}$ 、 $-\text{OC}_1-\text{C}_{10}\text{ハロゲン化アルキル基}$ 、 $-\text{SC}_1-\text{C}_{10}\text{アルキル基}$ 、 $-\text{SC}_1-\text{C}_{10}\text{アルキルフェニル基}$ 、 $-\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{アルキル}-\text{SH}$ 、 $-\text{SC}_1-\text{C}_{10}\text{ハロゲン化アルキル基}$ 、ハロゲン置換基、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{アルキル}-\text{NH}_2$ 、 $-\text{N}(\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{アルキル基})(\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{アルキル基})$ 、 $-\text{NH}(\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{アルキル基})$ 、 $-\text{N}(\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{アルキル基})(\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{アルキルフェニル基})$ 、 $-\text{NH}(\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{アルキルフェニル基})$ 、シアノ基、ニトロ基、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{アルキル基})$ 、 $-\text{CON}(\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{アルキル基})(\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{アルキル基})$ 、 $-\text{CONH}(\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{アルキル基})$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})(\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{アルキル基})$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})(\text{フェニル基})$ 、 $-\text{N}(\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{アルキル基})\text{C}(\text{O})(\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{アルキル基})$ 、 $-\text{N}(\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{アルキル基})\text{C}(\text{O})(\text{フェニル基})$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{アルキル基}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{アルキルフェニル基}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{ハロアルキル基}$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{アルキル基}$ 、 $-\text{SO}_2(\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{アルキル基})$ 、 $-\text{SO}_2(\text{フェニル基})$ 、 $-\text{SO}_2(\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{ハロゲン化アルキル基})$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}(\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{アルキル基})$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}(\text{フェニル基})$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2(\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{アルキル基})$ 、 $-\text{NH}\text{SO}_2(\text{フェニル基})$ 及び $-\text{NH}\text{SO}_2(\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{ハロゲン化アルキル基})$ からなる群のいずれか 1 又は複数の置換基を任意に有してもよく、
 ~~~~~

は、基が共有結合的に結合する部位を表し、

$\text{M}_1$  は標的基を表す、 $\text{siRNA}$  複合体。

【請求項 2】

前記センス鎖は、ヌクレオチド配列  $\text{III}$  をさらに含み、前記アンチセンス鎖は、ヌクレオチド配列  $\text{IV}$  をさらに含み、ヌクレオチド配列  $\text{III}$  とヌクレオチド配列  $\text{IV}$  の長さはそれぞれ独立して 1～4 ヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列  $\text{III}$  は配列番号 3、配列番号 63、配列番号 123 又は配列番号 183 で表されるヌクレオチド配列の 5' 末端に結合され、ヌクレオチド配列  $\text{IV}$  は配列番号 4、配列番号 64、配列番号 124 又は配列番号 184 で表されるヌクレオチド配列の 3' 末端に結合され、前記ヌクレオチド配列  $\text{III}$  と前記ヌクレオチド配列  $\text{IV}$  は、長さが等しく逆相補的である、請求項 1 に記載の  $\text{siRNA}$  複合体。

## 【請求項 3】

前記ヌクレオチド配列 I が配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列を有し、前記ヌクレオチド配列 I I I と I V は、長さがいずれも 1 ヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列 I I I の塩基は A であり、又は、前記ヌクレオチド配列 I I I と I V は、長さがいずれも 2 ヌクレオチドであり、5'末端から3'末端に向かって、ヌクレオチド配列 I I I の塩基配列が C A であり、又は、前記ヌクレオチド配列 I I I と I V は、長さがいずれも 3 ヌクレオチドであり、5'末端から3'末端に向かって、ヌクレオチド配列 I I I の塩基配列が A C A であり、又は、前記ヌクレオチド配列 I I I と I V は、長さがいずれも 4 ヌクレオチドであり、5'末端から3'末端に向かって、ヌクレオチド配列 I I I の塩基配列が U A C A であり、

10

或いは、前記ヌクレオチド配列 I が配列番号 6 1 に示されるヌクレオチド配列を有し、前記ヌクレオチド配列 I I I と I V は、長さがいずれも 1 ヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列 I I I の塩基は A であり、又は、前記ヌクレオチド配列 I I I と I V は、長さがいずれも 2 ヌクレオチドであり、5'末端から3'末端に向かって、ヌクレオチド配列 I I I の塩基配列が G A であり、又は、前記ヌクレオチド配列 I I I と I V は、長さがいずれも 3 ヌクレオチドであり、5'末端から3'末端に向かって、ヌクレオチド配列 I I I の塩基配列が U G A であり、又は、前記ヌクレオチド配列 I I I と I V は、長さがいずれも 4 ヌクレオチドであり、5'末端から3'末端に向かって、ヌクレオチド配列 I I I の塩基配列が A U G A であり、

或いは、前記ヌクレオチド配列 I が配列番号 1 2 1 に示されるヌクレオチド配列を有し、前記ヌクレオチド配列 I I I と I V は、長さがいずれも 1 ヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列 I I I の塩基は G であり、又は、前記ヌクレオチド配列 I I I と I V は、長さがいずれも 2 ヌクレオチドであり、5'末端から3'末端に向かって、ヌクレオチド配列 I I I の塩基配列が G G であり、又は、前記ヌクレオチド配列 I I I と I V は、長さがいずれも 3 ヌクレオチドであり、5'末端から3'末端に向かって、ヌクレオチド配列 I I I の塩基配列が U G G であり、又は、前記ヌクレオチド配列 I I I と I V は、長さがいずれも 4 ヌクレオチドであり、5'末端から3'末端に向かって、ヌクレオチド配列 I I I の塩基配列が C U G G であり、

20

或いは、前記ヌクレオチド配列 I が配列番号 1 8 1 に示されるヌクレオチド配列を有し、前記ヌクレオチド配列 I I I と I V は、長さがいずれも 1 ヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列 I I I の塩基は C であり、又は、前記ヌクレオチド配列 I I I と I V は、長さがいずれも 2 ヌクレオチドであり、5'末端から3'末端に向かって、ヌクレオチド配列 I I I の塩基配列が A C であり、又は、前記ヌクレオチド配列 I I I と I V は、長さがいずれも 3 ヌクレオチドであり、5'末端から3'末端に向かって、ヌクレオチド配列 I I I の塩基配列が G A C であり、又は、前記ヌクレオチド配列 I I I と I V は、長さがいずれも 4 ヌクレオチドであり、5'末端から3'末端に向かって、ヌクレオチド配列 I I I の塩基配列が A G A C である、請求項 2 に記載の s i R N A 複合体。

30

## 【請求項 4】

前記アンチセンス鎖は、ヌクレオチド配列 V をさらに含み、ヌクレオチド配列 V は、長さが 1 ～ 3 ヌクレオチドであり、前記アンチセンス鎖の 3'末端に結合され、アンチセンス鎖の 3'突出端を構成し、

40

或いは、前記ヌクレオチド配列 V は、長さが 2 ヌクレオチドであり、

或いは、前記ヌクレオチド配列 V は、連続した 2 個のチミンデオキシリボヌクレオチド又は連続した 2 個のウラシルリボヌクレオチドであり、

或いは、前記ヌクレオチド配列 V は、標的 m R N A の対応する位置のヌクレオチドと相補的である、請求項 1 に記載の s i R N A 複合体。

## 【請求項 5】

前記 s i R N A のセンス鎖は、配列番号 5 に示されるヌクレオチド配列を含み、前記アンチセンス鎖は、配列番号 6 に示されるヌクレオチド配列を含み、

5' - C C U A U G A A G A U U A U A G A 3' (配列番号 5)、

50

5' - Z<sub>4</sub>UCUUAUAAUCUUCAUAGGUG - 3' (配列番号6)

或いは、前記 s i R N A のセンス鎖は、配列番号7に示されるヌクレオチド配列を含み、  
前記アンチセンス鎖は、配列番号8に示されるヌクレオチド配列を含み、

5' - CACCUAUGAAGAUAUAAGA Z<sub>3</sub> - 3' (配列番号7)、

5' - Z<sub>4</sub>UCUUAUAAUCUUCAUAGGUGUA - 3' (配列番号8)

ただし、前記 Z<sub>4</sub>は、アンチセンス鎖の5'末端の1番目のヌクレオチドであり、Z<sub>3</sub>は、  
A、U、G又はCから選択され、Z<sub>4</sub>は、Z<sub>3</sub>と相補的なヌクレオチドであり、

或いは、前記 s i R N A のセンス鎖は、配列番号65に示されるヌクレオチド配列を含み、  
前記アンチセンス鎖は、配列番号66に示されるヌクレオチド配列を含み、

5' - GUACAGUACCAGAAGUUA Z<sub>7</sub> - 3' (配列番号65)、

5' - Z<sub>8</sub>UAACUUCUGGUACUGUACUC - 3' (配列番号66)

或いは、前記 s i R N A のセンス鎖は、配列番号67に示されるヌクレオチド配列を含み、  
前記 s i R N A のアンチセンス鎖は、配列番号68に示されるヌクレオチド配列を含み、

5' - GAGUACAGUACCAGAAGUUA Z<sub>7</sub> - 3' (配列番号67)、

5' - Z<sub>8</sub>UAACUUCUGGUACUGUACUCAU - 3' (配列番号68)

ただし、前記 Z<sub>8</sub>は、アンチセンス鎖の5'末端の1番目のヌクレオチドであり、Z<sub>7</sub>は、  
A、U、G又はCから選択され、Z<sub>8</sub>は、Z<sub>7</sub>と相補的なヌクレオチドであり、

或いは、前記 s i R N A のセンス鎖は、配列番号125に示されるヌクレオチド配列を含み、  
前記 s i R N A のアンチセンス鎖は、配列番号126に示されるヌクレオチド配列を含み、

5' - CAAACAAGCUGCACAGAA Z<sub>11</sub> - 3' (配列番号125)、

5' - Z<sub>12</sub>UUCUGUGCAGCUUGUUUGCC - 3' (配列番号126)

或いは、前記 s i R N A のセンス鎖は、配列番号127に示されるヌクレオチド配列を含み、  
前記 s i R N A のアンチセンス鎖は、配列番号128に示されるヌクレオチド配列を含み、

5' - GGCAACAAGCUGCACAGAA Z<sub>11</sub> - 3' (配列番号127)、

5' - Z<sub>12</sub>UUCUGUGCAGCUUGUUUGCCAG - 3' (配列番号128)

ただし、前記 Z<sub>12</sub>は、アンチセンス鎖の5'末端の1番目のヌクレオチドであり、Z<sub>11</sub>は、  
A、U、G又はCから選択され、Z<sub>12</sub>は、Z<sub>11</sub>と相補的なヌクレオチドであり、

或いは、前記 s i R N A のセンス鎖は、配列番号185に示されるヌクレオチド配列を含み、  
前記 s i R N A のアンチセンス鎖は、配列番号186に示されるヌクレオチド配列を含み、

5' - CAAACAAGGACUAAUCCA Z<sub>15</sub> - 3' (配列番号185)、

5' - Z<sub>16</sub>UGGAUUAGUCCUUGUUUGGU - 3' (配列番号186)

或いは、前記 s i R N A のセンス鎖は、配列番号187に示されるヌクレオチド配列を含み、  
前記 s i R N A のアンチセンス鎖は、配列番号188に示されるヌクレオチド配列を含み、

5' - ACCAAACAAGGACUAAUCCA Z<sub>15</sub> - 3' (配列番号187)、

5' - Z<sub>16</sub>UGGAUUAGUCCUUGUUUGGUCU - 3' (配列番号188)

ただし、前記 Z<sub>16</sub>は、アンチセンス鎖の5'末端の1番目のヌクレオチドであり、Z<sub>15</sub>は、  
A、U、G又はCから選択され、Z<sub>16</sub>は、Z<sub>15</sub>と相補的なヌクレオチドである、請求項1に記載の s i R N A 複合体。

【請求項6】

前記 s i R N A のセンス鎖は、配列番号9に示されるヌクレオチド配列を含み、前記アンチセンス鎖は、配列番号10に示されるヌクレオチド配列を含み、

又は、前記 s i R N A のセンス鎖は、配列番号11に示されるヌクレオチド配列を含み、  
前記アンチセンス鎖は、配列番号12に示されるヌクレオチド配列を含み、

又は、前記 s i R N A のセンス鎖は、配列番号69に示されるヌクレオチド配列を含み、  
前記アンチセンス鎖は、配列番号70に示されるヌクレオチド配列を含み、

10

20

30

40

50

又は、前記 s i R N A のセンス鎖は、配列番号 7 1 に示されるヌクレオチド配列を含み、  
前記アンチセンス鎖は、配列番号 7 2 に示されるヌクレオチド配列を含み、  
又は、前記 s i R N A のセンス鎖は、配列番号 1 2 9 に示されるヌクレオチド配列を含み、  
前記アンチセンス鎖は、配列番号 1 3 0 に示されるヌクレオチド配列を含み、  
又は、前記 s i R N A のセンス鎖は、配列番号 1 3 1 に示されるヌクレオチド配列を含み、  
前記アンチセンス鎖は、配列番号 1 3 2 に示されるヌクレオチド配列を含み、  
又は、前記 s i R N A のセンス鎖は、配列番号 1 8 9 に示されるヌクレオチド配列を含み、  
前記アンチセンス鎖は、配列番号 1 9 0 に示されるヌクレオチド配列を含み、  
又は、前記 s i R N A のセンス鎖は、配列番号 1 9 1 に示されるヌクレオチド配列を含み、  
前記アンチセンス鎖は、配列番号 1 9 2 に示されるヌクレオチド配列を含む、請求項 1  
に記載の s i R N A 複合体。

10

【請求項 7】

前記センス鎖と前記アンチセンス鎖における各ヌクレオチドが、独立してフルオロ修飾ヌクレオチド又は非フルオロ修飾ヌクレオチドであり、

前記フルオロ修飾ヌクレオチドが配列番号 3、配列番号 6 3、配列番号 1 2 3 又は配列番号 1 8 3 で表されるヌクレオチド配列と、配列番号 4、配列番号 6 4、配列番号 1 2 4 又は配列番号 1 8 4 で表されるヌクレオチド配列に位置し、配列番号 3、配列番号 6 3、配列番号 1 2 3 又は配列番号 1 8 3 で表される前記ヌクレオチド配列の 5' 末端から 3' 末端に向かって少なくとも第 7、8、9 位のヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであり、配列番号 4、配列番号 6 4、配列番号 1 2 4 又は配列番号 1 8 4 で表される前記ヌクレオチド配列の 5' 末端から 3' 末端に向かって少なくとも第 2、6、1 4、1 6 位のヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドである、請求項 1 に記載の s i R N A 複合体。

20

【請求項 8】

各非フルオロ修飾ヌクレオチドがいずれもメトキシ修飾ヌクレオチドであり、前記メトキシ修飾ヌクレオチドが、リボース基の 2' -ヒドロキシ基がメトキシで置換されたヌクレオチドを指す、請求項 7 に記載の s i R N A 複合体。

【請求項 9】

5' 末端から 3' 末端に向かって、前記 s i R N A のセンス鎖における配列番号 3、配列番号 6 3、配列番号 1 2 3 又は配列番号 1 8 3 で表される前記ヌクレオチド配列の第 5、7、8 及び 9 位のヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであり、s i R N A のセンス鎖の残りの位置のヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドであり、5' 末端から 3' 末端に向かって、前記 s i R N A のアンチセンス鎖における配列番号 4、配列番号 6 4、配列番号 1 2 4 又は配列番号 1 8 4 で表される前記ヌクレオチド配列の第 2、6、8、9、1 4 及び 1 6 位のヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであり、s i R N A のアンチセンス鎖の残りの位置のヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドであり、

30

或いは、5' 末端から 3' 末端に向かって、前記 s i R N A のセンス鎖における配列番号 3、配列番号 6 3、配列番号 1 2 3 又は配列番号 1 8 3 で表される前記ヌクレオチド配列の第 5、7、8 及び 9 位のヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであり、s i R N A のセンス鎖の残りの位置のヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドであり、5' 末端から 3' 末端に向かって、前記 s i R N A のアンチセンス鎖における配列番号 4、配列番号 6 4、配列番号 1 2 4 又は配列番号 1 8 4 で表される前記ヌクレオチド配列の第 2、6、1 4 及び 1 6 位のヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであり、s i R N A のアンチセンス鎖の残りの位置のヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドであり、

40

或いは、5' 末端から 3' 末端に向かって、前記 s i R N A のセンス鎖における配列番号 3、配列番号 6 3、配列番号 1 2 3 又は配列番号 1 8 3 で表される前記ヌクレオチド配列の第 7、8 及び 9 位のヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであり、s i R N A のセンス鎖の残りの位置のヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドであり、5' 末端から 3' 末端に向かって、前記 s i R N A のアンチセンス鎖における配列番号 4、配列番号 6 4、配列番号 1 2 4 又は配列番号 1 8 4 で表される前記ヌクレオチド配列の第 2、6、1 4 及び 1 6 位のヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであり、s i R N A のアンチセンス

50

【請求項 10】

又は、前記 s i R N A のセンス鎖は、配列番号 203 に示されるヌクレオチド配列を含み

50

50

50

40

50

前記センス鎖の 5' 末端から 2 番目のヌクレオチドと 3 番目のヌクレオチドとの間、  
 前記センス鎖の 3' 末端から 1 番目のヌクレオチドと 2 番目のヌクレオチドとの間、  
 前記センス鎖の 3' 末端から 2 番目のヌクレオチドと 3 番目のヌクレオチドとの間、  
 前記アンチセンス鎖の 5' 末端から 1 番目のヌクレオチドと 2 番目のヌクレオチドとの間

、  
 前記アンチセンス鎖の 5' 末端から 2 番目のヌクレオチドと 3 番目のヌクレオチドとの間

、  
 前記アンチセンス鎖の 3' 末端から 1 番目のヌクレオチドと 2 番目のヌクレオチドとの間  
 、及び

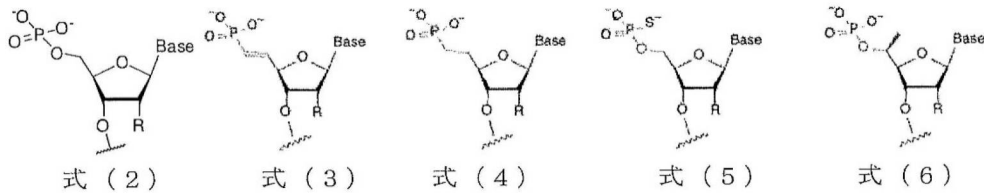
前記アンチセンス鎖の 3' 末端から 2 番目のヌクレオチドと 3 番目のヌクレオチドとの間  
 からなる群より選ばれる少なくとも 1 つに結合されて存在する、請求項 1 に記載の s i R  
N A 複合体。

10

【請求項 1 2】

前記アンチセンス鎖の 5' 末端ヌクレオチドが 5' - リン酸ヌクレオチド又は 5' - リン酸  
 アナログ修飾ヌクレオチドである、又は、前記 5' - リン酸ヌクレオチドが、式 (2) に示  
 される構造を有するヌクレオチドであり、前記 5' - リン酸アナログ修飾ヌクレオチドが、  
 式 (3) ~ 式 (6) のいずれか 1 つに示される構造のヌクレオチドから選択され、

【化 3】



20

ただし、R は H、OH、メトキシ基又はフッ素から選択され、Base は核酸塩基を表  
 し、A、U、C、G 又は T から選択される、請求項 1 に記載の s i R N A 複合体。

【請求項 1 3】

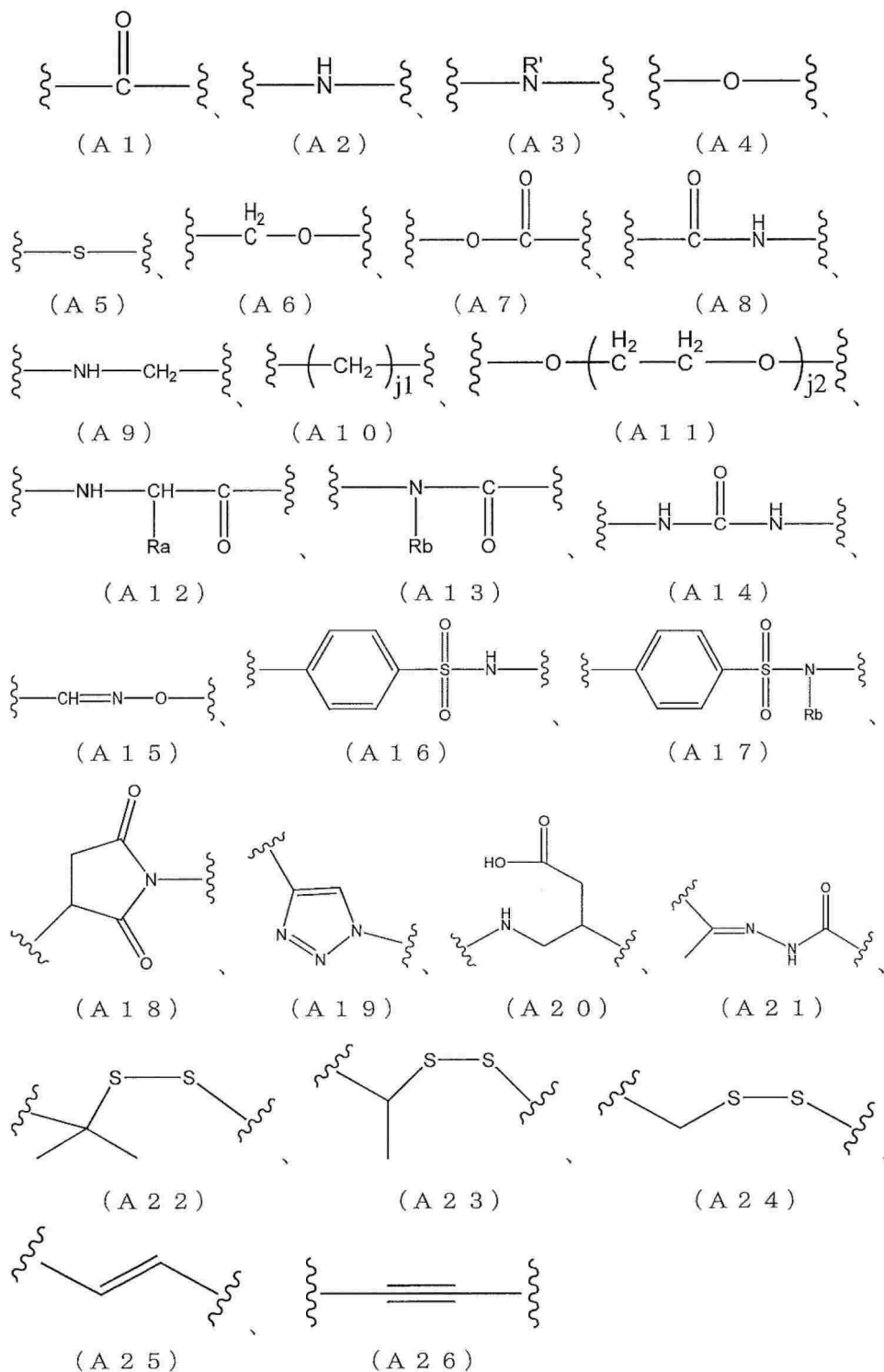
各  $L_1$  は、独立して基 A 1 ~ A 2 6 及びその任意の組合せからなる群から選択され、

30

40

50

## 【化 4】



式中、各  $j_1$  は独立して 1～20 の整数であり、  
 各  $j_2$  は独立して 1～20 の整数であり、  
 各  $R'$  は独立して  $C_1 - C_{10}$  アルキル基であり、  
 各  $R_a$  は、A 27～A 45 及びその任意の組合せからなる群から選択され、

10

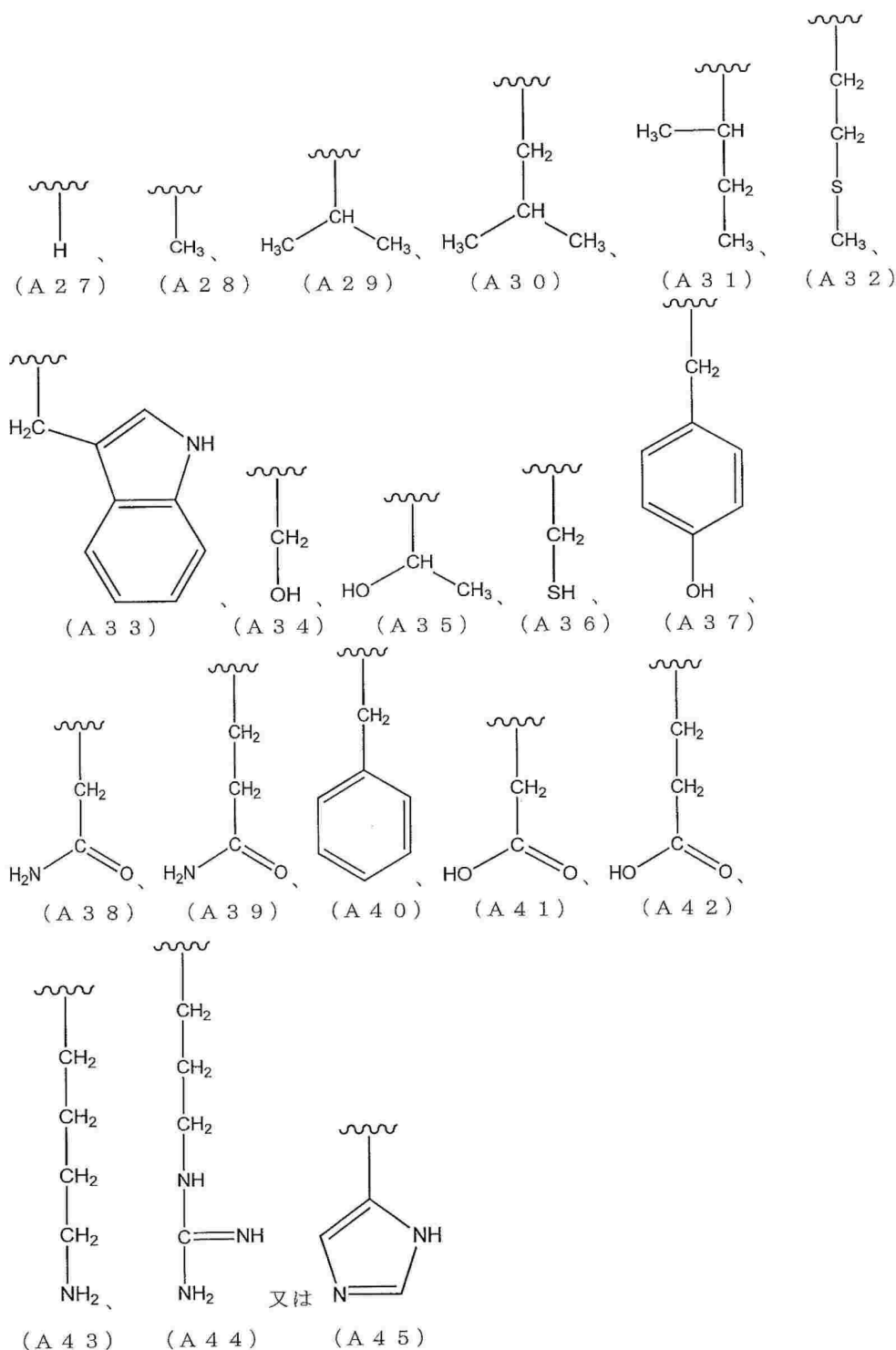
20

30

40

50

## 【化 5】



各 R b は独立して C<sub>1</sub> - C<sub>10</sub> アルキル基であり、

~~~~~

は、基が共有結合的に結合する部位を表す、請求項 1 に記載の s i R N A 複合体。

【請求項 1 4】

L₁ は、基 A 1、A 4、A 5、A 6、A 8、A 10、A 11、A 13 及びその結合の組合せからなる群から選択され、又は、

L₁ は、基 A 1、A 4、A 8、A 10 及び A 11 のうちの少なくとも 2 つの結合の組合せである、請求項 1 3 に記載の s i R N A 複合体。

【請求項 15】

L_1 の長さが 3 ～ 25 個の原子である、請求項 1 に記載の siRNA 複合体。

【請求項 16】

L_1 の長さが 4 ～ 15 個の原子である、請求項 15 に記載の siRNA 複合体。

【請求項 17】

各 m_1 、 m_2 及び m_3 は、それぞれ独立して、2 ～ 5 の整数である、又は $m_1 = m_2 = m_3$ である、請求項 1 に記載の siRNA 複合体。

【請求項 18】

各前記標的基が独立して哺乳動物の肝細胞表面のアシアロ糖タンパク質受容体と親和性のあるリガンドである、又は、

各前記標的基が、D-マンノピラノース、L-マンノピラノース、D-アラビノース、D-キシロフラノース、L-キシロフラノース、D-グルコース、L-グルコース、D-ガラクトース、L-ガラクトース、 α -D-マンノフラノース、 β -D-マンノフラノース、 α -D-マンノピラノース、 β -D-マンノピラノース、 α -D-グルコピラノース、 β -D-グルコピラノース、 α -D-グルコフラノース、 β -D-グルコフラノース、 α -D-フルクトフラノース、 α -D-フルクトピラノース、 α -D-ガラクトピラノース、 β -D-ガラクトピラノース、 α -D-ガラクトフラノース、 β -D-ガラクトフラノース、グルコサミン、シアル酸、ガラクトサミン、N-アセチルガラクトサミン、N-トリフルオロアセチルガラクトサミン、N-プロピオニルガラクトサミン、N-n-ブチリルガラクトサミン、N-イソブチリルガラクトサミン、2-アミノ-3-O-[(R)-1-カルボキシエチル]-2-デオキシ- β -D-グルコピラノース、2-デオキシ-2-メチルアミノ-L-グルコピラノース、4,6-ジデオキシ-4-ホルムアミド-2,3-ジ-O-メチル-D-マンノピラノース、2-デオキシ-2-スルホアミノ-D-グルコピラノース、N-グリコリル- α -ノイラミン酸、5-チオ- β -D-グルコピラノース、メチル2,3,4-トリス-O-アセチル-1-チオ-6-O-トリチル- α -D-グルコピラノシド、4-チオ- β -D-ガラクトピラノース、エチル3,4,6,7-テトラ-O-アセチル-2-デオキシ-1,5-ジチオ- α -D-グルコヘプトピラノシド、2,5-アンヒドロ-D-アロニトリル、リボース、D-リボース、D-4-チオリボース、L-リボース、L-4-チオリボースから独立して選択される1つである、請求項 1 に記載の siRNA 複合体。

【請求項 19】

R_2 には、窒素含有骨格上の N 原子に結合される部位及び R_3 中の P 原子に結合される部位がともに含まれ、かつ、 R_2 上の前記窒素含有骨格上の N 原子に結合される部位が N とアミド結合を形成し、前記 R_3 における P 原子に結合される部位が P とリン酸エステル結合を形成する、又は R_2 が、B5、B6、B5' 又は B6' から選択され、

10

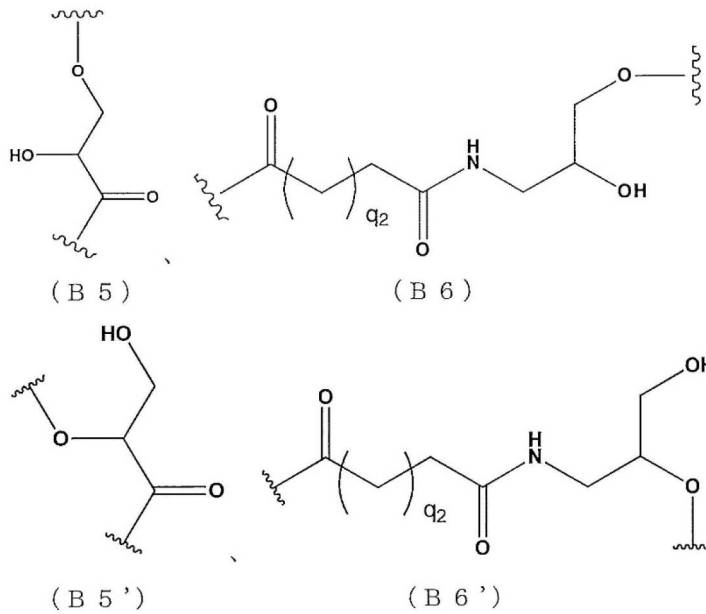
20

30

40

50

【化 6】



式中、



は、

基が共有結合的に結合する部位を表し、 q_2 は 1 ～ 10 の整数である、請求項 1 に記載の siRNA 複合体。

【請求項 20】

当該複合体が、式 (403)、(404)、(405)、(406)、(407)、(408)、(409)、(410)、(411)、(412)、(413)、(414)、(415)、(416)、(417)、(418)、(419)、(420)、(421) 又は (422) に示される構造を有する、請求項 1 に記載の siRNA 複合体。

10

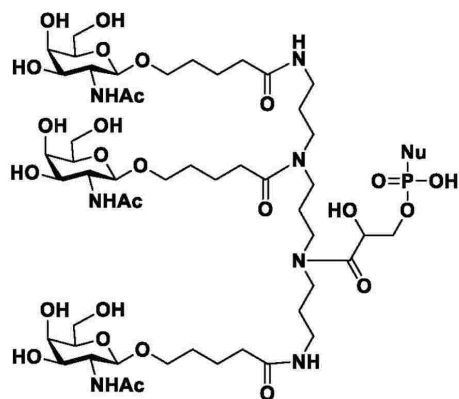
20

30

40

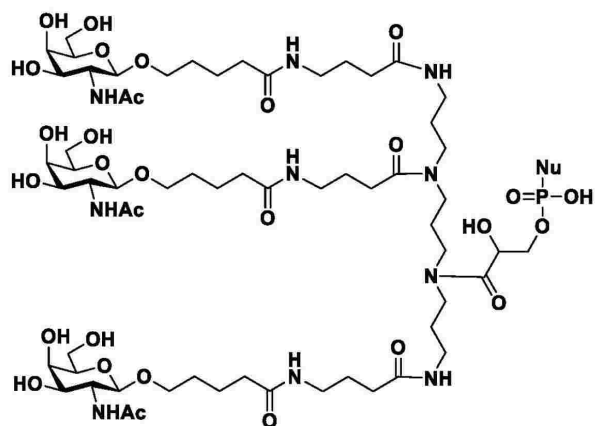
50

【化 7】



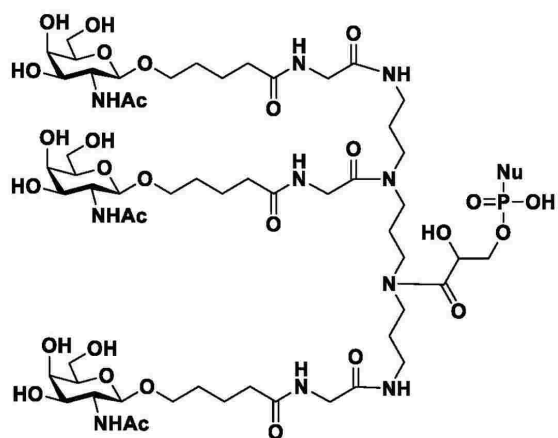
式 (4 0 3)

10



式 (4 0 4)

20



式 (4 0 5)

30

40

50

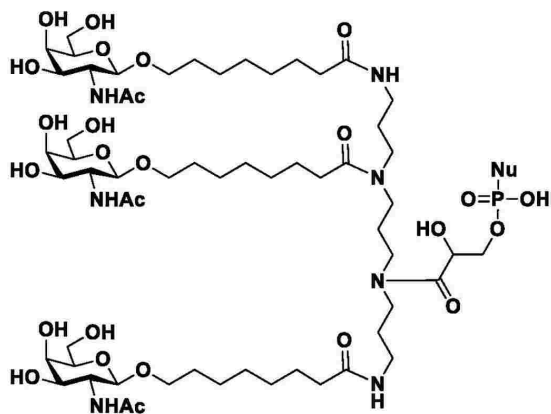


20



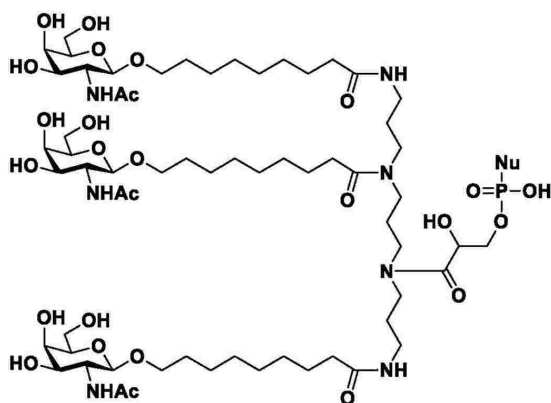
40





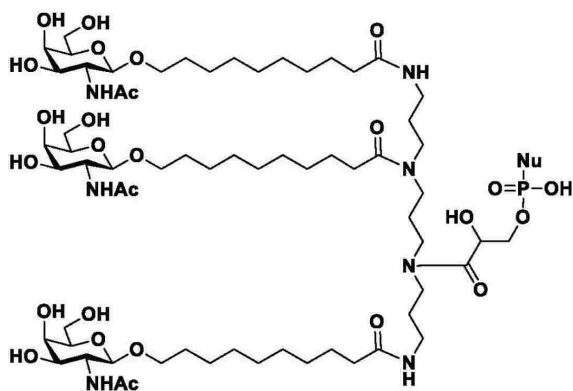
式 (4 0 9)

10



式 (4 1 0)

20

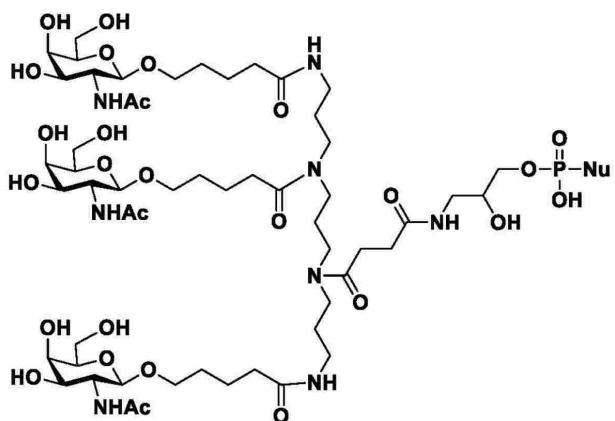


式 (4 1 1)

30

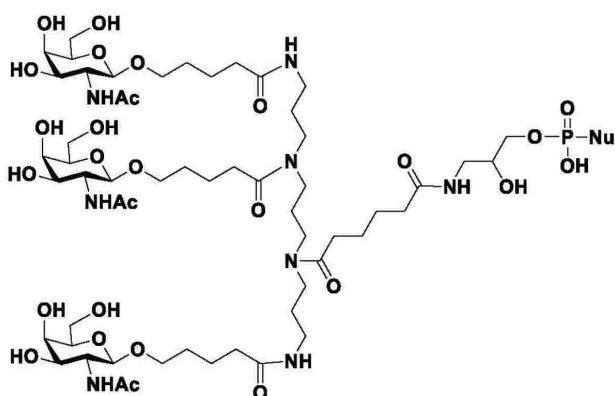
40

50



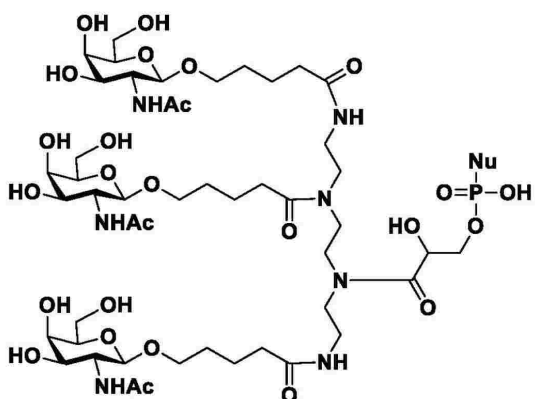
式 (4 1 2)

10



式 (4 1 3)

20

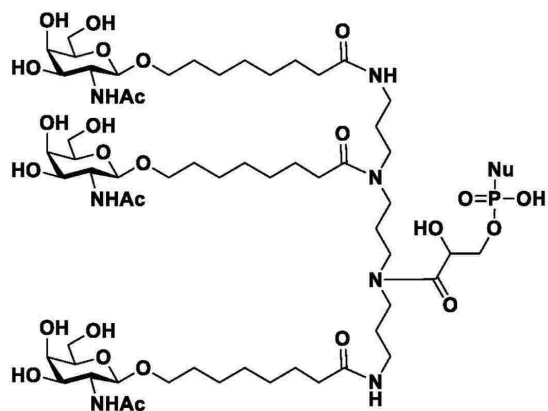


式 (4 1 4)

30

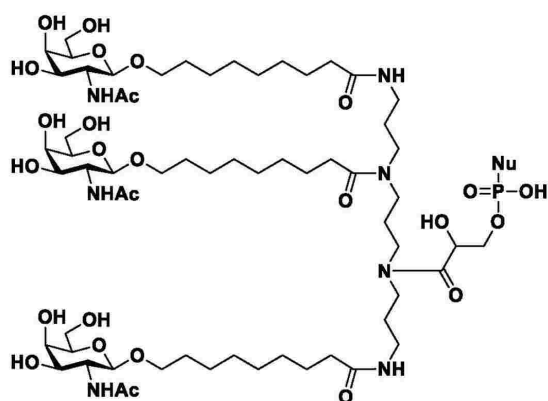
40

50



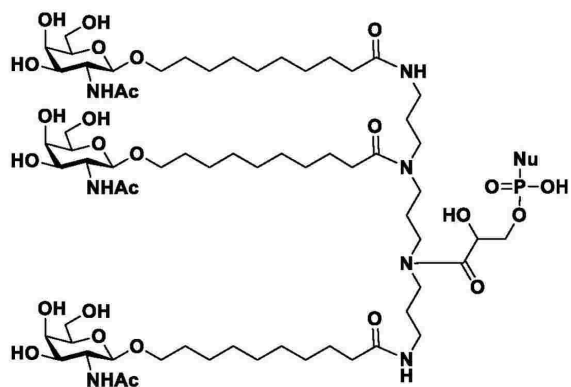
式 (409)

10



式 (410)

20

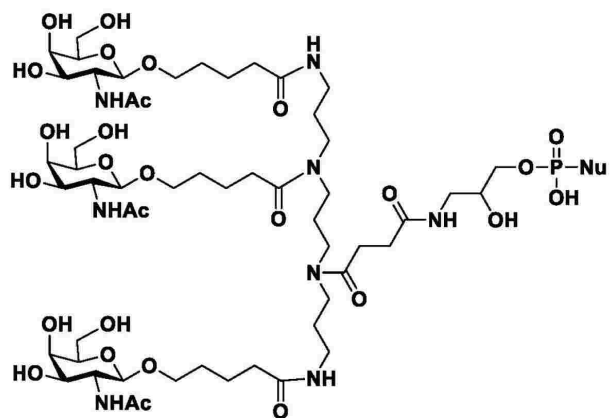


式 (411)

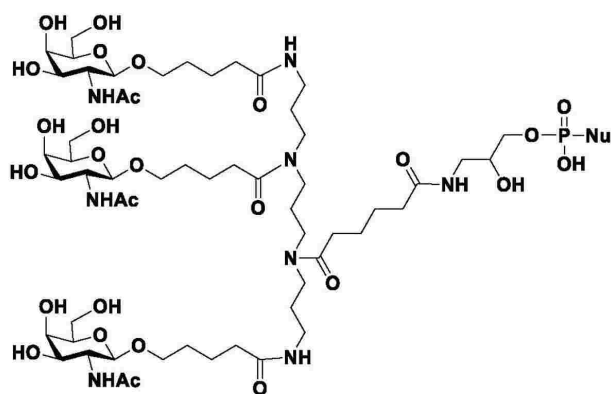
30

40

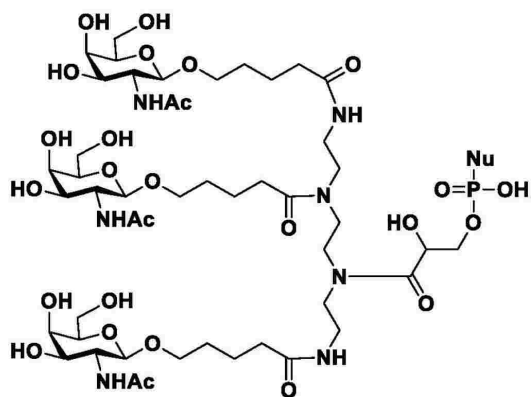
50



式 (4 1 2)



式 (4 1 3)



式 (4 1 4)

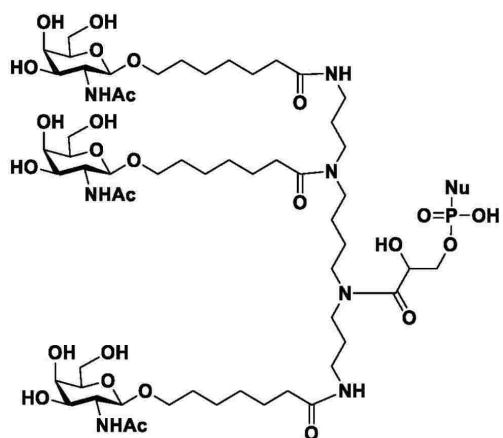
10

20

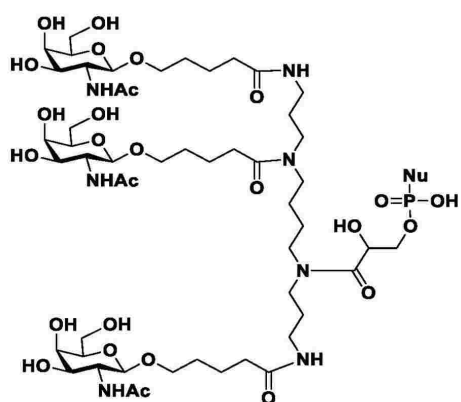
30

40

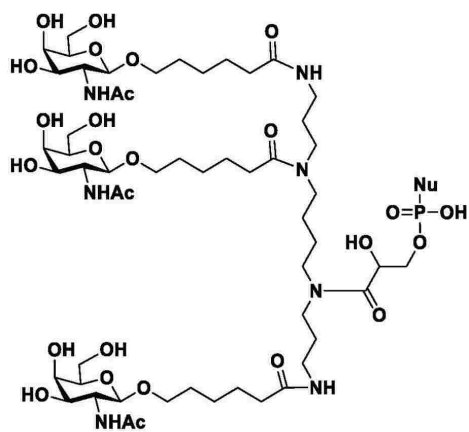
50



式 (4 1 5)



式 (4 1 6)



式 (4 1 7)

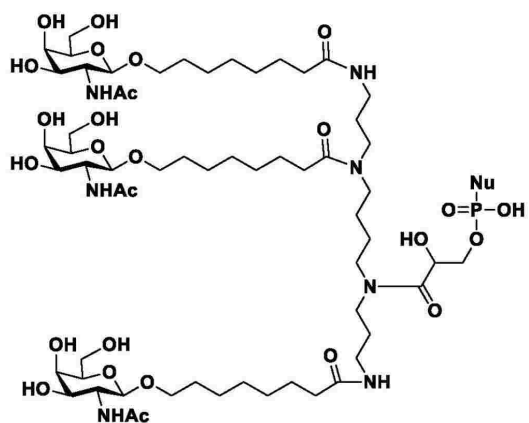
10

20

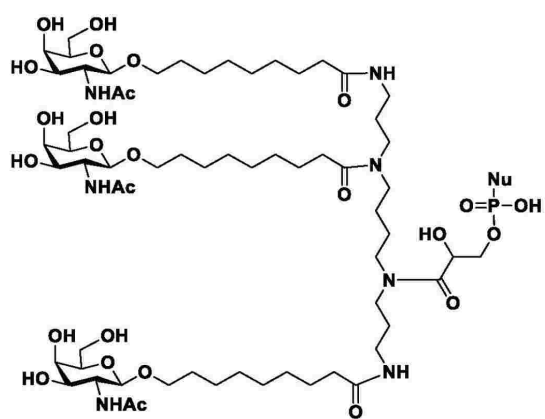
30

40

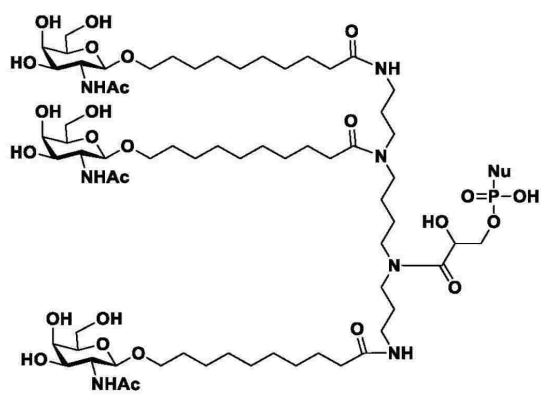
50



式 (4 1 8)



式 (4 1 9)



式 (4 2 0)

10

20

30

40

50



式 (4 2 1)



式 (4 2 2)

40

請求項 1～21 のいずれか 1 項に記載の s i R N A 複合体を含む、尿酸代謝異常又はそれによる疾患又は生理状態の治療及び／又は予防用組成物。

前記尿酸代謝異常による疾患又は生理状態が、高尿酸血症又は痛風症である、請求項2に記載の組成物。

【請求項 24】

請求項 1～21 のいずれか 1 項に記載の s i R N A 複合体を含む、肝細胞における P N P 遺伝子の発現の抑制用組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ（PNP）遺伝子発現を抑制できる核酸、核酸を含む薬物組成物と s i R N A 複合体に関する。本開示は、さらに、当該核酸、薬物組成物及び s i R N A 複合体の調製方法と使用に関する。

【背景技術】

【0002】

痛風は、プリン代謝異常及び／又は尿酸排出の減少による高尿酸血症に直接関連する疾患である。痛風は、かねてより欧米等の先進国でよく見られている疾患であり、第2次世界大戦後、各国の経済発展に従って、その有病率は全世界で年々高まる傾向にあり、かつ、若年化の傾向にある。現在中国の痛風患者は1200万人に上る。

【0003】

プリンヌクレオシドホスホリラーゼ（Purine Nucleotide Phosphorylase、PNP）は、痛風を治療するキーターゲットポイントの一つである。PNP発現を抑制することで、ヒポキサンチン、グアニンの産生を効果的に抑制し、さらに尿酸の産生を減少させ、痛風疾患の進行を緩和して病態を改善する目的を達することができる。PNP遺伝子の発現を抑制することで、細胞レベルで尿酸代謝異常による疾患、特に高尿酸血症及び痛風を予防及び治療することができる。低分子干渉RNA（small interfering RNA、siRNA）は、RNA干渉（RNA interference、RNAi）というメカニズムに基づき、関心対象の任意の目的遺伝子の発現を配列特異的に抑制又は遮断し、疾患を治療する目的を達成することができる。

【0004】

PNP遺伝子発現を抑制し尿酸代謝異常による疾患を治療する s i R N A 薬物の開発において、適切な s i R N A 及びその修飾ならびに有効な送達系は、一つのキー技術である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本開示の発明者は、本開示により提供される以下のような s i R N A 及びその修飾配列を有することで、PNP遺伝子の発現を特異的に抑制することができ、薬物組成物又は s i R N A 複合体は、肝臓を特異的に標的することができ、肝臓での P N P 遺伝子の発現を抑制し、尿酸代謝異常による疾患、特に高尿酸血症及び痛風の治療又は予防を実現することができることを意外にも見出し、本発明を完成した。

【課題を解決するための手段】

【0006】

いくつかの実施形態において、本開示は、PNP遺伝子の発現を抑制できる第1の s i R N A を提供し、当該 s i R N A はセンス鎖とアンチセンス鎖を含み、前記 s i R N A の各ヌクレオチドはそれぞれ独立して修飾又は未修飾のヌクレオチドであり、前記センス鎖はヌクレオチド配列 I を含み、前記アンチセンス鎖はヌクレオチド配列 II を含み、前記ヌクレオチド配列 I と前記ヌクレオチド配列 II とは、少なくとも一部で逆相補的に二本鎖領域を形成し、前記ヌクレオチド配列 I と配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、ヌクレオチド差異が3つ以下であり、前記ヌクレオチド配列 II と配列番号 2 に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、ヌクレオチド差異が3つ以下であり、

5' - C C U A U G A A G A U U A U A A G A Z₁ - 3' （配列番号 1）、

5' - Z₂ U C U U A U A A U C U U C A U A G G - 3' （配列番号 2）

ただし、Z₁はAであり、Z₂はUであり、前記ヌクレオチド配列 I に、位置が Z₁ に対

10

20

30

40

50

応するヌクレオチド Z₃が含まれ、前記ヌクレオチド配列 I I に、位置が Z₂ に対応するヌクレオチド Z₄が含まれ、前記 Z₄は、前記アンチセンス鎖の 5' 末端の 1 番目のヌクレオチドである。

【0007】

いくつかの実施形態において、本開示は、PNP 遺伝子の発現を抑制できる第 2 の siRNA を提供し、当該 siRNA はセンス鎖とアンチセンス鎖を含み、前記 siRNA の各ヌクレオチドはそれぞれ独立して修飾又は未修飾のヌクレオチドであり、前記センス鎖はヌクレオチド配列 I を含み、前記アンチセンス鎖はヌクレオチド配列 I I を含み、前記ヌクレオチド配列 I と前記ヌクレオチド配列 I I とは、少なくとも一部で逆相補的に二本鎖領域を形成し、前記ヌクレオチド配列 I と配列番号 61 に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、ヌクレオチド差異が 3 つ以下であり、前記ヌクレオチド配列 I I と配列番号 62 に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、ヌクレオチド差異が 3 つ以下であり、

5' - GUACAGUACCAGAAGUUA Z₅ - 3' (配列番号 61)、

5' - Z₆UAACUUCUGGUACUGUAC - 3' (配列番号 62)

ただし、Z₅は U であり、Z₆は A であり、前記ヌクレオチド配列 I に、位置が Z₅ に対応するヌクレオチド Z₇が含まれ、前記ヌクレオチド配列 I I に、位置が Z₆ に対応するヌクレオチド Z₈が含まれ、前記 Z₈は、前記アンチセンス鎖の 5' 末端の 1 番目のヌクレオチドである。

【0008】

いくつかの実施形態において、本開示は、PNP 遺伝子の発現を抑制できる第 3 の siRNA を提供し、当該 siRNA はセンス鎖とアンチセンス鎖を含み、前記 siRNA の各ヌクレオチドはそれぞれ独立して修飾又は未修飾のヌクレオチドであり、前記センス鎖はヌクレオチド配列 I を含み、前記アンチセンス鎖はヌクレオチド配列 I I を含み、前記ヌクレオチド配列 I と前記ヌクレオチド配列 I I とは、少なくとも一部で逆相補的に二本鎖領域を形成し、前記ヌクレオチド配列 I と配列番号 121 に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、ヌクレオチド差異が 3 つ以下であり、前記ヌクレオチド配列 I I と配列番号 122 に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、ヌクレオチド差異が 3 つ以下であり、

5' - CAAACAAGCUGCACAGAA Z₉ - 3' (配列番号 121)、

5' - Z₁₀UUCUGUGCAGCUUGUUUG - 3' (配列番号 122)

ただし、Z₉は A であり、Z₁₀は U であり、前記ヌクレオチド配列 I に、位置が Z₉ に対応するヌクレオチド Z₁₁が含まれ、前記ヌクレオチド配列 I I に、位置が Z₁₀ に対応するヌクレオチド Z₁₂が含まれ、前記 Z₁₂は、前記アンチセンス鎖の 5' 末端の 1 番目のヌクレオチドである。

【0009】

いくつかの実施形態において、本開示は、PNP 遺伝子の発現を抑制できる第 4 の siRNA を提供し、当該 siRNA はセンス鎖とアンチセンス鎖を含み、前記 siRNA の各ヌクレオチドはそれぞれ独立して修飾又は未修飾のヌクレオチドであり、前記センス鎖はヌクレオチド配列 I を含み、前記アンチセンス鎖はヌクレオチド配列 I I を含み、前記ヌクレオチド配列 I と前記ヌクレオチド配列 I I とは、少なくとも一部で逆相補的に二本鎖領域を形成し、前記ヌクレオチド配列 I と配列番号 181 に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、ヌクレオチド差異が 3 つ以下であり、前記ヌクレオチド配列 I I と配列番号 182 に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、ヌクレオチド差異が 3 つ以下であり、

5' - CAAACAAGGACUAAUCCA Z₁₃ - 3' (配列番号 181)、

5' - Z₁₄UGGAUUAGUCCUUGUUUG - 3' (配列番号 182)

ただし、Z₁₃は A であり、Z₁₄は U であり、前記ヌクレオチド配列 I に、位置が Z₁₃ に対応するヌクレオチド Z₁₅が含まれ、前記ヌクレオチド配列 I I に、位置が Z₁₄ に対応するヌクレオチド Z₁₆が含まれ、前記 Z₁₆は、前記アンチセンス鎖の 5' 末端の 1

10

20

30

40

50

番目のヌクレオチドである。

【0010】

いくつかの実施形態において、本開示は、本開示の s i R N A 及び薬学的に許容可能な担体を含む薬物組成物を提供する。

【0011】

いくつかの実施形態において、本開示は、本開示により提供される s i R N A 及び当該 s i R N A に複合して結合される複合基を含む s i R N A 複合体を提供する。

【0012】

いくつかの実施形態において、本開示は、本開示の s i R N A、及び／又は薬物組成物及び／又は s i R N A 複合体の、尿酸代謝異常又は尿酸代謝異常による疾患又は生理状態の治療及び／又は予防のための薬物の調製における使用を提供する。

10

【0013】

いくつかの実施形態において、本開示は、本開示の s i R N A、及び／又は薬物組成物及び／又は s i R N A 複合体の有効量を、それを必要とする被験体に投与することを含む、尿酸代謝異常又は尿酸代謝異常による疾患又は生理状態の治療及び／又は予防方法を提供する。

【0014】

いくつかの実施形態において、本開示は、本開示の s i R N A、及び／又は薬物組成物及び／又は s i R N A 複合体の有効量を肝細胞と接触させることを含む、前記肝細胞における P N P 遺伝子の発現の抑制方法を提供する。

20

【0015】

いくつかの実施形態において、本開示は、本開示の s i R N A、及び／又は薬物組成物及び／又は s i R N A 複合体を含むキットを提供する。

【発明の効果】

【0016】

本開示により提供される s i R N A、薬物組成物及び s i R N A 複合体は、安定性に優れ、P N P mRNA 抑制活性が高く、オフターゲット効果が低減されている、及び／又は痛風症状を顕著に治療又は緩和することができる。

【0017】

いくつかの実施形態において、本開示により提供される s i R N A、薬物組成物又は s i R N A 複合体は、体外細胞実験で優れた標的 mRNA 抑制活性を示す。いくつかの実施形態において、本開示により提供される s i R N A、s i R N A 組成物又は s i R N A 複合体は、肝細胞において少なくとも 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 又は 95% の標的 mRNA 抑制率を示す。いくつかの実施形態において、本開示により提供される s i R N A は、濃度 50 nM で、S M M C - 7 7 2 1 細胞において 61.43% ~ 74.83% の P N P mRNA 抑制率を示す。いくつかの実施形態において、本開示により提供される s i R N A は、濃度 50 nM で、H u h 7 細胞において 89.15% と高い P N P mRNA 抑制率を示す。いくつかの実施形態において、本開示により提供される s i R N A は、濃度 50 nM にて、H e p G 2 細胞において 57.35% ~ 65.37% の P N P mRNA 抑制率を示す。いくつかの実施形態において、本開示により提供される s i R N A は、異なる濃度で、S M M C - 7 7 2 1 細胞において高い P N P mRNA 抑制率を示し、濃度 50 nM で、81.23% と高い P N P mRNA 抑制率を示す。いくつかの実施形態において、本開示により提供される s i R N A は、異なる濃度で、H e p G 2 細胞において高い P N P mRNA 抑制率を示し、いくつかの実施形態において、本開示により提供される s i R N A 複合体は、S M M C - 7 7 2 1 細胞において高い P N P mRNA 抑制率を示し、I C₅₀ 値が 0.017 ~ 0.113 nM である。いくつかの実施形態において、本開示により提供される s i R N A 複合体は、異なる濃度で、H e p G 2 細胞において高い P N P mRNA 抑制率を示し、濃度 50 nM で、68.0% と高い P N P mRNA 抑制率を示す。いくつかの実施形態において、本開示により提供される s i R N A 複合体は、濃度 50 nM で、S M M C - 7 7 2 1 細胞にお

30

40

50

いて88.93%と高いPNP mRNA抑制率を示す。いくつかの実施形態において、本開示により提供されるsiRNA複合体は、濃度50nMで、Hu h7細胞において77.89%と高いPNP mRNA抑制率を示す。

【0018】

いくつかの実施形態において、本開示により提供されるsiRNA、薬物組成物又はsiRNA複合体は、体内での安定性がより高く、及び／又はより高い活性を有することができる。いくつかの実施形態において、本開示により提供されるsiRNA、siRNA組成物又はsiRNA複合体は、体内で少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は95%の標的遺伝子発現抑制率を示す。いくつかの実施形態において、本開示により提供されるsiRNA、siRNA組成物又はsiRNA複合体は、体内で少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は95%のPNP遺伝子発現抑制率を示す。いくつかの実施形態において、本開示により提供されるsiRNA、siRNA組成物又はsiRNA複合体は、体内で少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は95%の肝内PNP遺伝子発現抑制率を示す。いくつかの実施形態において、本開示により提供されるsiRNA、siRNA組成物又はsiRNA複合体は、体内で少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は95%の動物モデルにおける肝内PNP遺伝子発現抑制率を示す。いくつかの実施形態において、本開示により提供されるsiRNA、siRNA組成物又はsiRNA複合体は、体内で少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は95%のヒト被験体における肝内PNP遺伝子発現抑制率を示す。いくつかの実施形態において、本開示のsiRNA複合体は、急性高尿酸血症マウスモデルにおいて血尿酸レベルに対する顕著な抑制効果を示す。いくつかの実施形態において、本開示により提供されるsiRNA、薬物組成物又はsiRNA複合体は顕著なオフターゲット効果を示していない。オフターゲット効果とは、例えば非標的遺伝子の正常発現に対する抑制であってよい。オフターゲット遺伝子発現の結合／抑制が、オンターゲット遺伝子効果よりも50%、40%、30%、20%又は10%低くなると、当該オフターゲット効果は顕著ではないと見なされる。

【0019】

このように、本開示により提供されるsiRNA、薬物組成物及びsiRNA複合体は、PNP遺伝子の発現を抑制し、尿酸代謝異常又は尿酸代謝異常による疾患又は生理状態、特に高尿酸血症及び／又は痛風症状を効果的に治療及び／又は予防することができ、応用において明い見通しを有している。

【0020】

本開示の他の特徴と利点については、後述する発明を実施するための形態部分において詳しく説明する。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1A-1D】順に濃度の異なる複合体4~7をトランスフェクションした後、SMMC-7721細胞においてPNP mRNAの相対発現レベルでフィッティングされた用量-効果曲線及びそれより算出したIC₅₀値である。

【図2A】濃度の異なる複合体2をトランスフェクションした後、体外SMMC-7721細胞におけるPNP mRNAの相対発現レベルでフィッティングされた用量-効果曲線及びそれより算出したIC₅₀値を示す。

【図2B】濃度の異なる複合体8をトランスフェクションした後、体外SMMC-7721細胞におけるPNP mRNAの相対発現レベルでフィッティングされた用量-効果曲線及びそれより算出したIC₅₀値を示す。

【図3】ブランク対照マウス、急性高尿酸血症マウスモデル及び複合体13を投与した急性高尿酸血症マウスモデルにおいて、相対血清尿酸含有量の平均の折れ線グラフを示す。

【発明を実施するための形態】

【0022】

以下に本開示の発明を実施するための形態を詳しく説明する。また、ここで説明される発明を実施するための形態は、本開示を説明又は解釈するためのものに過ぎず、本開示を何ら制限するためのものではないと理解すべきである。

【0023】

本開示において、PNP mRNAとは、Genbank登録番号NM_000270.3に示される配列を有するmRNAを指す。さらに、特に説明がない限り、本開示において用いられる用語「標的遺伝子」とは、上記PNP mRNAを転写する遺伝子を指し、用語「標的mRNA」とは、上記PNP mRNAを指す。

【0024】

<定義>

文脈において、特に説明がない限り、大文字C、G、U、Aは、ヌクレオチドの塩基配列を表し、小文字mは、当該文字mの左側に隣接する1つのヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドであることを表し、小文字fは、当該文字fの左側に隣接する1つのヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであることを表し、小文字sは、当該文字sの左右に隣接する2つのヌクレオチド間がチオリン酸エステル基により結合されていることを表し、P1は、当該P1の右側に隣接する1つのヌクレオチドが5'-リン酸ヌクレオチド又は5'-リン酸アナログ修飾ヌクレオチドであることを表し、大文字Pは、当該文字Pの右側に隣接する1つのヌクレオチドが5'-リン酸ヌクレオチドであることを表す。

【0025】

文脈において、前記「フルオロ修飾ヌクレオチド」とは、ヌクレオチドのリボース基の2'位のヒドロキシ基がフッ素で置換されたヌクレオチドを指し、「非フルオロ修飾ヌクレオチド」とは、ヌクレオチドのリボース基の2'位のヒドロキシ基が非フッ素基で置換されたヌクレオチド又はヌクレオチドアナログを指す。「ヌクレオチドアナログ」とは、核酸においてヌクレオチドの代わりとなることができるが、アデニンリボヌクレオチド、グアニンリボヌクレオチド、シトシンリボヌクレオチド、ウラシルリボヌクレオチド又はチミンデオキシリボヌクレオチドと構造が異なる基を指し、例えば、イソヌクレオチド、架橋ヌクレオチド(bridged nucleic acid、BNAと略称される)又は非環式ヌクレオチドがある。前記「メトキシ修飾ヌクレオチド」とは、リボース基の2'-ヒドロキシ基がメトキシで置換されたヌクレオチドを指す。

【0026】

本明細書の文脈において、「相補」及び「逆相補」という用語は、互換的に使用されてもよく、当業者に周知の意味、即ち、二本鎖核酸分子において、一方の鎖の塩基のそれぞれと他方の鎖上の塩基とが相補的に対合するという意味を有する。DNAにおいて、プリン塩基であるアデニン(A)は、常にピリミジン塩基であるチミン(T)(又は、RNAにおいてウラシル(U)である)と対合し、プリン塩基であるグアニン(G)は、常にピリミジン塩基であるシトシン(C)と対合する。各塩基対は、いずれも1つのプリンと1つのピリミジンを含む。一方の鎖上のアデニンが常に他方の鎖上のチミン(又はウラシル)と対合するとともに、グアニンが常にシトシンと対合する場合、両方の鎖同士が相補的である、またその相補鎖の配列から当該鎖の配列を推定できると考えられる。これに応じて、「ミスマッチ」は、本分野では、二本鎖核酸において、対応する位置での塩基が相補的に対合して存在しないことを意味する。

【0027】

文脈において、特に説明がない限り、「基本的に逆相補的」とは、関連する2つのヌクレオチド配列間に3つ以下の塩基ミスマッチが存在することを指し、「実質的に逆相補的」とは、2つのヌクレオチド配列間に1つ以下の塩基ミスマッチが存在することを指し、「完全に逆相補的」とは、2つのヌクレオチド配列間に塩基ミスマッチが存在しないことを指す。

【0028】

文脈において、一方のヌクレオチド配列と他方のヌクレオチド配列に「ヌクレオチド差異」が存在するとは、前者が後者に比べて、同じ位置のヌクレオチドの塩基種類が変化し

10

20

30

40

50

たことを指し、例えば、後者において1つのヌクレオチド塩基がAであるとき、前者の同じ位置での、対応するヌクレオチド塩基がU、C、G又はTである場合に、当該位置で2つのヌクレオチド配列間にヌクレオチド差異が存在すると認められている。いくつかの実施形態において、元の位置のヌクレオチドの代わりに無塩基ヌクレオチド又はその等価物を用いる場合、当該位置でヌクレオチド差異が生じたとも考えられる。

【0029】

文脈において、特に本開示の*s i R N A*、薬物組成物又は*s i R N A*複合体の調製方法を説明する際に、特に説明がない限り、前記ヌクレオシドモノマー (*n u c l e o s i d e m o n o m e r*) とは、調製する*s i R N A*又は*s i R N A*複合体におけるヌクレオチドの種類と順序に応じてホスホルアミダイト固相合成に用いられる修飾又は未修飾のヌクレオシドホスホルアミダイトモノマー (*u n m o d i f i e d o r m o d i f i e d R N A p h o s p h o r a m i d i t e s*。RNA phosphoramiditesをNucleoside phosphoramiditesということもある) を指す。ホスホルアミダイト固相合成は、当業者に公知のRNA合成に用いられる方法である。本開示に用いられるヌクレオシドモノマーは、いずれも市販品として購入可能である。

【0030】

本開示の文脈において、特に説明がない限り、「複合」とは、それぞれ特定の機能を有する2つ以上の化学部分間が共有結合的に互いに結合することを指し、これに応じて、「複合体」とは、当該各化学部分間が共有結合的に結合することにより形成された化合物を指す。さらには、「*s i R N A*複合体」は、特定の機能を有する1又は複数の化学部分が*s i R N A*に共有結合的に結合して形成された化合物を表す。以下の文章では、本開示の*s i R N A*複合体を単に「複合体」ともいうことがある。*s i R N A*複合体は、文脈により、複数の*s i R N A*複合体の総称、又はある化学式に示される*s i R N A*複合体であると理解される。本開示の文脈において、「複合分子」は、反応させることにより*s i R N A*に複合され、最終的に本開示の*s i R N A*複合体を形成することができる特定の化合物であると理解すべきである。

【0031】

本明細書で用いられる場合、「任意の」又は「任意に」とは、続いて記載する事象又は状況が発生してもよく、発生しなくてもよいこと、並びに当該記載が事象又は状況が発生した場合と発生しない場合を含むことを指す。例えば、「任意に置換され」た「アルキル」は、以下の文章で定義される「アルキル」及び「置換アルキル」を含む。1又は複数の置換基を含む任意の基に関して、これらの基が、立体的に非現実的な、合成上実行不可能な及び／又は本質的に不安定な置換又は置換パターンを導入することは意図されないと、当業者に理解される。

【0032】

本明細書で用いられる場合、「アルキル」とは、特定の数の炭素原子を有する直鎖と分岐鎖を指し、前記特定の数は、通常1～20個の炭素原子、例えば、1～10個の炭素原子、1～8個又は1～6個の炭素原子である。例えば、 C_1-C_6 アルキルは、1～6個の炭素原子の直鎖と分岐鎖アルキルを含む。特定の数の炭素を有するアルキル残基に言及する場合、当該数の炭素を有する全ての分岐鎖及び直鎖形式を含むことを意図する。したがって、例えば、「ブチル」は、*n*-ブチル、*sec*-ブチル、イソブチル及び*tert*-ブチルを含むことを意味し、「プロピル」は、*n*-プロピル及びイソプロピルを含む。アルキレンは、アルキルのサブセットであり、アルキルと同じであるが2つの結合点を有する残基を指す。

【0033】

本明細書で用いられる場合、「アルケニル」とは、少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を有する不飽和分岐鎖又は直鎖アルキルを指し、前記炭素-炭素二重結合は、親アルキルの隣接する炭素原子から1つの水素分子を除去することにより得られる。当該基は、二重結合のシス又はトランス配置にあってもよい。典型的なアルケニルとしては、ビニルと、プロパー-1-エン-1-イル、プロパー-1-エン-2-イル、プロパー-2-エン-1-

10

20

30

40

50

イル（アリル）、プロパー２－エン－２－イル等のプロペニルと、ブター１－エン－１－イル、ブター１－エン－２－イル、２－メチルプロパー１－エン－１－イル、ブター２－エン－１－イル、ブター２－エン－２－イル、ブター１，３－ジエン－１－イル、ブター１，３－ジエン－２－イル等のブテニルとを含むが、これらに限定されない。ある実施形態において、アルケニルは、２～２０個の炭素原子を有するが、他の実施形態において、２～１０個、２～８個又は２～６個の炭素原子を有する。アルケニレンは、アルケニルのサブセットであり、アルケニルと同じであるが２つの結合点を有する残基を指す。

【００３４】

本明細書で用いられる場合、「アルキニル」とは、少なくとも１つの炭素－炭素三重結合を有する不飽和分岐鎖又は直鎖アルキル基を指し、前記炭素－炭素三重結合は、親アルキルの隣接する炭素原子から２つの水素分子を除去することにより得られる。典型的なアルキニルとしては、エチニルと、プロパー１－イン－１－イル、プロパー２－イン－１－イル等のプロピニルと、ブター１－イン－１－イル、ブター１－イン－３－イル、ブター３－イン－１－イル等のブチニルとを含むが、これらに限定されない。ある実施形態において、アルキニルは、２～２０個の炭素原子を有するが、他の実施形態において、２～１０、２～８又は２～６個の炭素原子を有する。アルキニレンは、アルキニルのサブセットであり、アルキニルと同じであるが２つの結合点を有する残基を指す。

【００３５】

本明細書で用いられる場合、「アルコキシ」とは、酸素橋により結合した特定の数の炭素原子のアルキルを指し、例えば、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、*n*－ブトキシ、*sec*－ブトキシ、*tert*－ブトキシ、ペンチルオキシ、２－ペンチルオキシ、イソペンチルオキシ、ネオペンチルオキシ、ヘキシルオキシ、２－ヘキシルオキシ、３－ヘキシルオキシ、３－メチルペンチルオキシ等がある。アルコキシは、通常１～１０個、１～８個、１～６個又は１～４個の、酸素橋により結合した炭素原子を有する。

【００３６】

本明細書で用いられる場合、「アリール」とは、芳香族単環式又は多環式炭化水素環系から誘導される、環炭素原子から水素原子を除去して形成された基を指す。前記芳香族単環式又は多環式炭化水素環系は、水素及び６～１８個の炭素原子の炭素のみを含有し、この環系中の環の少なくとも１つは完全不飽和であり、即ち、それは、ヒュッケル理論に従う環状、非局在化（ $4n+2$ ） π －電子系を含む。アリールとしては、フェニル、フルオレニル及びナフチル等の基を含むが、これらに限定されない。アリーレンは、アリールのサブセットであり、アリールと同じであるが２つの結合点を有する残基を指す。

【００３７】

本明細書で用いられる場合、「ハロゲン置換基」又は「ハロ」とは、フルオロ、クロロ、ブロモ又はヨードを指し、用語「ハロゲン」は、フッ素、塩素、臭素又はヨウ素を含む。

【００３８】

本明細書で用いられる場合、「ハロゲン化アルキル」とは、特定の数の炭素原子が１又は複数、最大許容数までのハロゲン原子で置換された、上記のように定義されるアルキル基を指す。ハロゲン化アルキルの実例としては、トリフルオロメチル、ジフルオロメチル、２－フルオロエチル又はペンタフルオロエチルを含むが、これらに限定されない。

【００３９】

「複素環基」とは、２～１２個の炭素原子と、窒素、酸素又は硫黄から選択される１～６個のヘテロ原子とを含む、安定した３～１８員非芳香族環状基を指す。明細書において特に説明がない限り、複素環基は、単環、二環、三環又は四環系であり、縮合環又は架橋環系を含んでもよい。複素環基におけるヘテロ原子は、任意に酸化されてもよい。１又は複数の窒素原子（存在する場合）は、任意に４級化される。複素環基は、一部飽和又は完全飽和である。複素環基は、環の任意の原子を介して分子の残りの部分に結合することができる。このような複素環基の実例としては、ジオキサニル、チオフェニル〔１，３〕ジスルホニル（*thienyl*〔１，３〕*dithianyl*）、デカヒドロイソキノリニル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、イソチアゾリジニル、イソオキサゾリジニル、

10

20

30

40

50

モルホリニル、オクタヒドロインドール、オクタヒドロイソインドール、2-オキサピペラジニル、2-オキサピペリジル、2-オキサピロリジニル、オキサゾリジニル、ピペリジル、ピペラジニル、4-ビペリドニル、ピロリジニル、ピラゾリジル、キヌクリジニル、チアゾリジニル、テトラヒドロフリル、トリスルホニル (trithianyl)、テトラヒドロピラニル、チオモルホリニル (thiomorpholinyl)、チアモルホリニル (thiamorpholinyl)、1-オキソチオモルホリニル (1-oxo-thiomorpholinyl) 及び1,1-ジオキソチオモルホリニル (1,1-dioxo-thiomorpholinyl) を含むが、これらに限定されない。

【0040】

「ヘテロアリアル」とは、2個～17個の炭素原子と、窒素、酸素及び硫黄から選択される1～6個のヘテロ原子とを含む、3～18員芳香環ラジカルから誘導される基を指す。本明細書で用いられる場合、ヘテロアリアルは、単環、二環、三環又は四環系であってもよく、この環系中の環の少なくとも1つは完全不飽和であり、即ち、それは、ヒュッケル理論に従う環状非局在化 ($4n+2$) π -電子系を含む。ヘテロアリアルは、縮合環又は架橋環系を含む。ヘテロアリアルにおけるヘテロ原子は任意に酸化される。1又は複数の窒素原子 (存在する場合) は、任意に4級化される。ヘテロアリアルは、環中の任意の原子を介して分子の残りの部分に結合する。ヘテロアリアルの実例としては、アゼピニル、アクリジニル、ベンゾイミダゾリル、ベンゾインドール、1,3-ベンゾジオキサゾリル、ベンゾフリル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾ [d] チアゾリル、ベンゾチアジアゾリル、ベンゾ [b] [1,4] ジオキセピニル (benzo [b] [1,4] dioxepinylyl)、ベンゾ [b] [1,4] オキサジニル (benzo [b] [1,4] oxazinylyl)、1,4-ベンゾジオキサン (1,4-benzodioxanylyl)、ベンゾナフトフラニル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾジオキソリル (benzodioxolylyl)、ベンゾジオキシニル (benzodioxinylyl)、ベンゾピラニル、ベンゾピロニル、ベンゾフリル、ベンゾフラノニル、ベンゾチオフエニル、ベンゾチエノ [3,2-d] ピリミジニル、ベンゾトリアゾリル、ベンゾ [4,6] イミダゾ [1,2-a] ピリジニル、カルバゾリル、シンノリル (cinnolinylyl)、シクロペンタ [d] ピリミジニル、6,7-ジヒドロ-5H-シクロペンタ [4,5] チエノ [2,3-d] ピリミジニル、5,6-ジヒドロベンゾ [h] キナゾリニル (5,6-dihydrobenzo [h] quinazolinilyl)、5,6-ジヒドロベンゾ [h] シンノリニル (5,6-dihydrobenzo [h] cinnolinylyl)、6,7-ジヒドロ-5H-ベンゾ [6,7] シクロヘプタ [1,2-c] ピリダジニル、ジベンゾフリル、ジベンゾチオフエニル、フリル、フラノニル、フロ [3,2-c] ピリジニル、5,6,7,8,9,10-ヘキサヒドロシクロオクタ [d] ピリミジニル、5,6,7,8,9,10-ヘキサヒドロシクロオクタ [d] ピリダジニル、5,6,7,8,9,10-ヘキサヒドロシクロオクタ [d] ピリジニル、イソチアジアゾリル、イミダゾリル、インダゾリル (indazolilyl)、インドール、イソインドール、インドリニル、イソインドリニル、イソキノリル、インドリジニル (indolizinylyl)、イソオキサゾリル、5,8-メタノ-5,6,7,8-テトラヒドロキナゾリニル (5,8-methano-5,6,7,8-tetrahydroquinazolinilyl)、ナフチリジニル (naphthyridinylyl)、1,6-ナフチリジノニル (1,6-naphthyridinonylyl)、オキサジアゾリル、2-オキソアゼピニル (2-oxoazepinylyl)、オキサゾリル、オキシラニル (oxiranylyl)、5,6,6a,7,8,9,10,10a-オクタヒドロベンゾ [H] キナゾリニル、1-フェニル-1H-ピロリル、フェナジニル、フェノチアジニル、フェノキサジニル、フタラジニル (phthalazinylyl)、プテリジニル (pteridinylyl)、プリニル、ピロリル、ピラゾリル、ピラゾロ [3,4-d] ピリミジニル、ピリジニル、ピリド [3,2-d] ピリミジニル、ピリド [3,4-d] ピリミジニル、ピラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、キナゾリニル、キノキサリニル (quinoxalinylyl)、キノリル、テトラヒドロキノリル、5,6,7,8-テトラヒドロキナゾリニル、5,6,7,8-テトラヒ

10

20

30

40

50

ドロベンゾ [4, 5] チエノ [2, 3-d] ピリミジニル、6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-5H-シクロヘプタ [4, 5] チエノ [2, 3-d] ピリミジニル、5, 6, 7, 8-テトラヒドロピリド [4, 5-c] ピリダジニル、チアゾリル、チアジアゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、トリアジニル、チエノ [2, 3-d] ピリミジニル、チエノ [3, 2-d] ピリミジニル、チエノ [2, 3-c] プリジニル (thieno [2, 3-c] pridinyl) 及びチオフェニル (thiophenyl/thienyl) を含むが、これらに限定されない。

【0041】

本開示において各種のヒドロキシ保護基を用いることができる。一般的には、保護基は、化学官能基を特定の反応条件に不敏感にすることができ、且つ分子の残りの部分を実質的に損傷することなく分子中の当該官能基に付加する、及びそれから除去することができる。代表的なヒドロキシ保護基は、Beaucageら、Tetrahedron 1992, 48, 2223~2311、及びGreene and Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, Chapter 2, 2d ed, John Wiley & Sons, New York, 1991に開示されており、引用により、上記文献は、それぞれ全体として本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態において、保護基は、塩基性条件で安定しているが、酸性条件で除去することができる。いくつかの実施形態において、本明細書で使用するヒドロキシ保護基の非排他的実例としては、ジメトキシトリチル (DMT)、モノメトキシトリチル、9-フェニルキサンテン-9-イル (Pixyl) 又は9-(p-メトキシフェニル) キサンテン-9-イル (Mox) を含む。いくつかの実施形態において、本明細書で使用するヒドロキシ保護基の非排他的実例としては、Tr (トリチル)、MMTr (4-メトキシトリチル)、DMTr (4, 4'-ジメトキシトリチル) 又はTMTr (4, 4', 4'-トリメトキシトリチル) を含む。

【0042】

「被験体」という用語は、本明細書で用いられる場合、任意の動物、例えば、哺乳動物又は有袋動物を指す。本開示の被験体としては、ヒト、非ヒト霊長類 (例えば、アカゲザル又は他の種類のマカク属のサル)、マウス、ブタ、ウマ、ロバ、ウシ、ヒツジ、ラット又は任意の種類の家禽を含むが、これらに限定されない。

【0043】

本明細書で用いられる場合、「治療」とは、有益な又は所望の結果を得る方法を指し、治療効果を含むが、これに限定されない。「治療効果」は、治療される潜在的障害を根絶又は改善することを意味する。また、治療効果は、被験体が依然として潜在的障害の苦痛を受ける可能性があるにもかかわらず、潜在的障害に関連する1又は複数の生理的症状を根絶又は改善することにより、被験体に改善が観察されて得られる。

【0044】

本明細書で用いられる場合、「予防」とは、有益又は所望の結果を得る方法を指し、予防効果を含むが、これに限定されない。「予防効果」を得るために、当該疾患に対する診断が行われていないかもしれないが、siRNA複合体又は薬物組成物を特定の疾患に罹患するリスクのある被験体に投与、又は疾患の1又は複数の病理学的症状が報告された被験体に投与することができる。

【0045】

ある局面では、本開示は、PNP遺伝子の発現を抑制できる第1から第4のsiRNAを提供する。以下、それらについて順に詳しく説明する。

【0046】

本開示のsiRNAは、基本的な構造単位としてヌクレオチド基を含み、前記ヌクレオチド基がリン酸基、リボース基及び塩基を含むことは、当業者に公知であるので、ここで説明を省略する。

【0047】

<第1のsiRNA>

本開示によれば、前記 s i R N A は、第 1 の s i R N A であってもよい。

【0048】

前記第 1 の s i R N A はセンス鎖とアンチセンス鎖を含み、前記第 1 の s i R N A の各ヌクレオチドはそれぞれ独立して修飾又は未修飾のヌクレオチドであり、前記センス鎖はヌクレオチド配列 I を含み、前記アンチセンス鎖はヌクレオチド配列 I I を含み、前記ヌクレオチド配列 I と前記ヌクレオチド配列 I I とは、少なくとも一部で逆相補的に二本鎖領域を形成し、前記ヌクレオチド配列 I と配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、ヌクレオチド差異が 3 つ以下であり、前記ヌクレオチド配列 I I と配列番号 2 に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、ヌクレオチド差異が 3 つ以下である。

10

5' - C C U A U G A A G A U U A U A A G A Z₁ - 3' (配列番号 1)、

5' - Z₂ U C U U A U A A U C U U C A U A G G - 3' (配列番号 2)

ただし、Z₁ は A であり、Z₂ は U であり、

前記ヌクレオチド配列 I に、位置が Z₁ に対応するヌクレオチド Z₃ が含まれ、前記ヌクレオチド配列 I I に、位置が Z₂ に対応するヌクレオチド Z₄ が含まれ、前記 Z₄ は、前記アンチセンス鎖の 5' 末端の 1 番目のヌクレオチドである。

【0049】

文脈において、「位置が対応する」とは、ヌクレオチド配列の同一端から、ヌクレオチド配列において同じ位置にあることを指す。例えば、ヌクレオチド配列 I の 3' 端の 1 番目のヌクレオチドは、位置が配列番号 1 の 3' 端の 1 番目のヌクレオチドに対応するヌクレオチドである。

20

【0050】

いくつかの実施形態において、前記センス鎖は、ヌクレオチド配列 I のみを含み、前記アンチセンス鎖は、ヌクレオチド配列 I I のみを含む。

【0051】

いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列 I と配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列との間にヌクレオチド差異が 1 つ以下であり、及び／又は前記ヌクレオチド配列 I I と配列番号 2 に示されるヌクレオチド配列との間にヌクレオチド差異が 1 つ以下である。

【0052】

いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列 I I と配列番号 2 に示されるヌクレオチド配列との間のヌクレオチド差異は、Z₄ の位置での差異を含み、Z₄ が A、C 又は G から選択される。いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド差異は、Z₄ の位置での差異であり、Z₄ が A、C 又は G から選択される。いくつかの実施形態において、Z₃ は、Z₄ と相補的なヌクレオチドである。上記ヌクレオチド差異を有する s i R N A は、高い標的 mRNA 抑制能力を有し、これらのヌクレオチド差異を含む s i R N A も、本開示の保護範囲内にある。

30

【0053】

いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列 I と前記ヌクレオチド配列 I I は、基本的に逆相補的、実質的に逆相補的又は完全に逆相補的であり、前記基本的に逆相補的とは、2 つのヌクレオチド配列間に 3 つ以下の塩基ミスマッチが存在することを指し、前記実質的に逆相補的とは、2 つのヌクレオチド配列間に 1 つ以下の塩基ミスマッチが存在することを指し、完全に逆相補的とは、2 つのヌクレオチド配列間に塩基ミスマッチがないことを指す。

40

【0054】

いくつかの実施形態において、ヌクレオチド配列 I は、配列番号 3 に示されるヌクレオチド配列であり、ヌクレオチド配列 I I は、配列番号 4 に示されるヌクレオチド配列である。

5' - C C U A U G A A G A U U A U A A G A Z₃ - 3' (配列番号 3)、

5' - Z₄ U C U U A U A A U C U U C A U A G G - 3' (配列番号 4)

50

ただし、前記 Z_4 は、アンチセンス鎖の 5' 末端の 1 番目のヌクレオチドであり、 Z_5 は、A、U、G 又は C から選択され、 Z_4 は、 Z_3 と相補的なヌクレオチドであり、いくつかの実施形態において、 Z_3 は A であり、 Z_4 は U である。

【0055】

いくつかの実施形態において、前記センス鎖は、ヌクレオチド配列 $IIII$ をさらに含み、前記アンチセンス鎖は、ヌクレオチド配列 IV をさらに含み、ヌクレオチド配列 $IIII$ とヌクレオチド配列 IV は、長さがそれぞれ 1~4 ヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列 $IIII$ と前記ヌクレオチド配列 IV は、長さが等しく、実質的に逆相補的又は完全に逆相補的であり、前記ヌクレオチド配列 $IIII$ が前記ヌクレオチド配列 I の 5' 末端に結合され、前記ヌクレオチド配列 IV が前記ヌクレオチド配列 II の 3' 末端に結合される。いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列 IV と二段目のヌクレオチド配列とは、実質的に逆相補的又は完全に逆相補的であり、当該二段目のヌクレオチド配列とは、標的 mRNA における配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列の 5' 末端に隣接し、長さが前記ヌクレオチド配列 IV と等しいヌクレオチド配列を指す。

【0056】

いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列 $IIII$ とヌクレオチド配列 IV は、長さがいずれも 1 ヌクレオチドであり、ヌクレオチド配列 $IIII$ の塩基が A であり、ヌクレオチド配列 IV の塩基が U であり、このとき、センス鎖とアンチセンス鎖の長さ比が $20/20$ であり、或いは、ヌクレオチド配列 $IIII$ と IV は、長さがいずれも 2 ヌクレオチドであり、5' 末端から 3' 末端に向かって、ヌクレオチド配列 $IIII$ の塩基配列が CA であり、ヌクレオチド配列 IV の塩基配列が UG であり、このとき、センス鎖とアンチセンス鎖の長さ比が $21/21$ であり、或いは、ヌクレオチド配列 $IIII$ と IV は、長さがいずれも 3 ヌクレオチドであり、5' 末端から 3' 末端に向かって、ヌクレオチド配列 $IIII$ の塩基配列が ACA であり、ヌクレオチド配列 IV の塩基配列が UGU であり、このとき、センス鎖とアンチセンス鎖の長さ比が $22/22$ であり、或いは、ヌクレオチド配列 $IIII$ と IV は、長さがいずれも 4 ヌクレオチドであり、5' 末端から 3' 末端に向かって、ヌクレオチド配列 $IIII$ の塩基配列が UACA であり、ヌクレオチド配列 IV の塩基配列が UGUA であり、このとき、センス鎖とアンチセンス鎖の長さ比が $23/23$ である。いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列 $IIII$ とヌクレオチド配列 IV は、長さが 2 ヌクレオチドであり、5' 末端から 3' 末端に向かって、ヌクレオチド配列 $IIII$ の塩基配列が CA であり、ヌクレオチド配列 IV の塩基配列が UG であり、このとき、センス鎖とアンチセンス鎖の長さ比が $21/21$ である。

【0057】

いくつかの実施形態において、ヌクレオチド配列 $IIII$ とヌクレオチド配列 IV は、完全に逆相補的であるので、ヌクレオチド配列 $IIII$ の塩基が与えられると、ヌクレオチド配列 IV の塩基も決定される。

【0058】

<第2の siRNA>

本開示によれば、前記 siRNA は、第2の siRNA であってもよい。

【0059】

前記第2の siRNA はセンス鎖とアンチセンス鎖を含み、前記第2の siRNA の各ヌクレオチドはそれぞれ独立して修飾又は未修飾のヌクレオチドであり、前記センス鎖はヌクレオチド配列 I を含み、前記アンチセンス鎖はヌクレオチド配列 II を含み、前記ヌクレオチド配列 I と前記ヌクレオチド配列 II とは、少なくとも一部で逆相補的に二本鎖領域を形成し、前記ヌクレオチド配列 I と配列番号 61 に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、ヌクレオチド差異が 3 つ以下であり、前記ヌクレオチド配列 II と配列番号 62 に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、ヌクレオチド差異が 3 つ以下である。

5' - GUACAGUACCAGAAGUUA Z_5 - 3' (配列番号 61)、

5' - Z_6 UAACUUCUGGUACUGUAC - 3' (配列番号 62)

ただし、 Z_5 は A であり、 Z_6 は U であり、

前記ヌクレオチド配列 I に、位置が Z_5 に対応するヌクレオチド Z_7 が含まれ、前記ヌクレオチド配列 II に、位置が Z_6 に対応するヌクレオチド Z_8 が含まれ、前記 Z_8 は、前記アンチセンス鎖の 5' 末端の 1 番目のヌクレオチドである。

【0060】

いくつかの実施形態において、前記センス鎖は、ヌクレオチド配列 I のみを含み、前記アンチセンス鎖は、ヌクレオチド配列 II のみを含む。

【0061】

いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列 I と配列番号 61 に示されるヌクレオチド配列との間にヌクレオチド差異が 1 つ以下であり、及び／又は前記ヌクレオチド配列 II と配列番号 62 に示されるヌクレオチド配列との間にヌクレオチド差異が 1 つ以下である。

【0062】

いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列 II と配列番号 62 に示されるヌクレオチド配列との間のヌクレオチド差異は、 Z_8 の位置での差異を含み、 Z_8 が A、C 又は G から選択される。いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド差異は、 Z_8 の位置での差異であり、 Z_8 が A、C 又は G から選択される。いくつかの実施形態において、 Z_7 は、 Z_8 と相補的なヌクレオチドである。上記ヌクレオチド差異を有する siRNA は、高い標的 mRNA 抑制能力を有し、これらのヌクレオチド差異を含む siRNA も、本開示の保護範囲内にある。

【0063】

いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列 I と前記ヌクレオチド配列 II は、基本的に逆相補的、実質的に逆相補的又は完全に逆相補的である。

【0064】

いくつかの実施形態において、ヌクレオチド配列 I は、配列番号 63 に示されるヌクレオチド配列であり、ヌクレオチド配列 II は、配列番号 64 に示されるヌクレオチド配列である。

5' - GUACAGUACCAAGUUA Z_7 - 3' (配列番号 63)、

5' - Z_8 UAA CUUCUGGUACUGUAC - 3' (配列番号 64)

ただし、前記 Z_8 は、アンチセンス鎖の 5' 末端の 1 番目のヌクレオチドであり、 Z_7 は A、U、G 又は C から選択され、 Z_8 は、 Z_7 と相補的なヌクレオチドであり、いくつかの実施形態において、 Z_7 は U であり、 Z_8 は A である。

【0065】

いくつかの実施形態において、前記センス鎖は、ヌクレオチド配列 III をさらに含み、前記アンチセンス鎖は、ヌクレオチド配列 IV をさらに含み、ヌクレオチド配列 III とヌクレオチド配列 IV は、長さがそれぞれ 1～4 ヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列 III と前記ヌクレオチド配列 IV は、長さが等しく、実質的に逆相補的又は完全に逆相補的であり、前記ヌクレオチド配列 III が前記ヌクレオチド配列 I の 5' 末端に結合され、前記ヌクレオチド配列 IV が前記ヌクレオチド配列 II の 3' 末端に結合され、前記ヌクレオチド配列 IV と二段目のヌクレオチド配列とは、実質的に逆相補的又は完全に逆相補的であり、当該二段目のヌクレオチド配列とは、標的 mRNA における配列番号 61 に示されるヌクレオチド配列の 5' 末端に隣接し、長さが前記ヌクレオチド配列 IV と等しいヌクレオチド配列を指す。

【0066】

いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列 III とヌクレオチド配列 IV は、長さがいずれも 1 ヌクレオチドであり、ヌクレオチド配列 III の塩基が A であり、ヌクレオチド配列 IV の塩基が U であり、このとき、センス鎖とアンチセンス鎖の長さ比が 20/20 であり、或いは、ヌクレオチド配列 III と IV は、長さがいずれも 2 ヌクレオチドであり、5' 末端から 3' 末端に向かって、ヌクレオチド配列 III の塩基配列が GA であり、ヌクレオチド配列 IV の塩基配列が UC であり、このとき、センス鎖とアンチ

10

20

30

40

50

センス鎖の長さ比が $2\ 1 / 2\ 1$ であり、或いは、ヌクレオチド配列 $I\ I\ I$ と $I\ V$ は、長さがいずれも 3 ヌクレオチドであり、5' 末端から 3' 末端に向かって、ヌクレオチド配列 $I\ I\ I$ の塩基配列が $U\ G\ A$ であり、ヌクレオチド配列 $I\ V$ の塩基配列が $U\ C\ A$ であり、このとき、センス鎖とアンチセンス鎖の長さ比が $2\ 2 / 2\ 2$ であり、或いは、ヌクレオチド配列 $I\ I\ I$ と $I\ V$ は、長さがいずれも 4 ヌクレオチドであり、5' 末端から 3' 末端に向かって、ヌクレオチド配列 $I\ I\ I$ の塩基配列が $A\ U\ G\ A$ であり、ヌクレオチド配列 $I\ V$ の塩基配列が $U\ C\ A\ U$ であり、このとき、センス鎖とアンチセンス鎖の長さ比が $2\ 3 / 2\ 3$ である。いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列 $I\ I\ I$ とヌクレオチド配列 $I\ V$ は、長さが 2 ヌクレオチドであり、5' 末端から 3' 末端に向かって、ヌクレオチド配列 $I\ I\ I$ の塩基配列が $G\ A$ であり、ヌクレオチド配列 $I\ V$ の塩基配列が $U\ C$ であり、このとき、センス鎖とアンチセンス鎖の長さ比が $2\ 1 / 2\ 1$ である。

10

【0067】

いくつかの実施形態において、ヌクレオチド配列 $I\ I\ I$ とヌクレオチド配列 $I\ V$ は、完全に逆相補的であるので、ヌクレオチド配列 $I\ I\ I$ の塩基が与えられると、ヌクレオチド配列 $I\ V$ の塩基も決定される。

【0068】

<第3の $s\ i\ R\ N\ A$ >

本開示によれば、前記 $s\ i\ R\ N\ A$ は、第3の $s\ i\ R\ N\ A$ であってもよい。

【0069】

前記第3の $s\ i\ R\ N\ A$ はセンス鎖とアンチセンス鎖を含み、前記第3の $s\ i\ R\ N\ A$ の各ヌクレオチドはそれぞれ独立して修飾又は未修飾のヌクレオチドであり、前記センス鎖はヌクレオチド配列 I を含み、前記アンチセンス鎖はヌクレオチド配列 $I\ I$ を含み、前記ヌクレオチド配列 I と前記ヌクレオチド配列 $I\ I$ とは、少なくとも一部で逆相補的に二本鎖領域を形成し、前記ヌクレオチド配列 I と配列番号 1 2 1 に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、ヌクレオチド差異が 3 つ以下であり、前記ヌクレオチド配列 $I\ I$ と配列番号 1 2 2 に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、ヌクレオチド差異が 3 つ以下である。

20

5' - $C\ A\ A\ A\ C\ A\ A\ G\ C\ U\ G\ C\ A\ C\ A\ G\ A\ A\ Z_9$ - 3' (配列番号 1 2 1)、

5' - $Z_{10}\ U\ U\ C\ U\ G\ U\ G\ C\ A\ G\ C\ U\ U\ G\ U\ U\ U\ G$ - 3' (配列番号 1 2 2)

ただし、 Z_9 は A であり、 Z_{10} は U であり、

30

前記ヌクレオチド配列 I に、位置が Z_9 に対応するヌクレオチド Z_{11} が含まれ、前記ヌクレオチド配列 $I\ I$ に、位置が Z_{10} に対応するヌクレオチド Z_{12} が含まれ、前記 Z_{12} は、前記アンチセンス鎖の 5' 末端の 1 番目のヌクレオチドである。

【0070】

いくつかの実施形態において、前記センス鎖は、ヌクレオチド配列 I のみを含み、前記アンチセンス鎖は、ヌクレオチド配列 $I\ I$ のみを含む。

【0071】

いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列 I と配列番号 1 2 1 に示されるヌクレオチド配列との間にヌクレオチド差異が 1 つ以下であり、及び／又は前記ヌクレオチド配列 $I\ I$ と配列番号 1 2 2 に示されるヌクレオチド配列との間にヌクレオチド差異が 1 つ以下である。

40

【0072】

いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列 $I\ I$ と配列番号 1 2 2 に示されるヌクレオチド配列との間のヌクレオチド差異は、 Z_{12} の位置での差異を含み、 Z_{12} が A、C 又は G から選択される。いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド差異は、 Z_{12} の位置での差異であり、 Z_{12} が A、C 又は G から選択される。いくつかの実施形態において、 Z_{11} は、 Z_{12} と相補的なヌクレオチドである。上記ヌクレオチド差異を有する $s\ i\ R\ N\ A$ は、高い標的 mRNA 抑制能力を有し、これらのヌクレオチド差異を含む $s\ i\ R\ N\ A$ も、本開示の保護範囲内にある。

【0073】

50

いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列Ⅰと前記ヌクレオチド配列ⅠⅠは、基本的に逆相補的、実質的に逆相補的又は完全に逆相補的である。

【0074】

いくつかの実施形態において、ヌクレオチド配列Ⅰは、配列番号123に示されるヌクレオチド配列であり、ヌクレオチド配列ⅠⅠは、配列番号124に示されるヌクレオチド配列である。

5' - C A A A C A A G C U G C A C A G A A Z₁₋₃ ' (配列番号123)、

5' - Z₂ U U C U G U G C A G C U U G U U U G - 3' (配列番号124)

ただし、前記Z₁₂は、アンチセンス鎖の5'末端の1番目のヌクレオチドであり、Z₁は、A、U、G又はCから選択され、Z₁₂は、Z₁₁と相補的なヌクレオチドであり、いくつかの実施形態において、Z₁₁はAであり、Z₁₂はUである。

【0075】

いくつかの実施形態において、前記センス鎖は、ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠをさらに含み、前記アンチセンス鎖は、ヌクレオチド配列ⅠⅤをさらに含み、ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠとヌクレオチド配列ⅠⅤは、長さがそれぞれ1~4ヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠと前記ヌクレオチド配列ⅠⅤは、長さが等しく、実質的に逆相補的又は完全に逆相補的であり、前記ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠが前記ヌクレオチド配列Ⅰの5'末端に結合され、前記ヌクレオチド配列ⅠⅤが前記ヌクレオチド配列ⅠⅠの3'末端に結合され、前記ヌクレオチド配列ⅠⅤと二段目のヌクレオチド配列とは、実質的に逆相補的又は完全に逆相補的であり、当該二段目のヌクレオチド配列とは、標的mRNAにおける配列番号121に示されるヌクレオチド配列の5'末端に隣接し、長さが前記ヌクレオチド配列ⅠⅤと等しいヌクレオチド配列を指す。

【0076】

いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠとヌクレオチド配列ⅠⅤは、長さがいずれも1ヌクレオチドであり、ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠの塩基がGであり、ヌクレオチド配列ⅠⅤの塩基がCであり、このとき、センス鎖とアンチセンス鎖の長さ比が20/20であり、或いは、ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠとⅠⅤは、長さがいずれも2ヌクレオチドであり、5'末端から3'末端に向かって、ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠの塩基配列がGGであり、ヌクレオチド配列ⅠⅤの塩基配列がCCであり、このとき、センス鎖とアンチセンス鎖の長さ比が21/21であり、或いは、ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠとⅠⅤは、長さがいずれも3ヌクレオチドであり、5'末端から3'末端に向かって、ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠの塩基配列がUGGであり、ヌクレオチド配列ⅠⅤの塩基配列がCCAであり、このとき、センス鎖とアンチセンス鎖の長さ比が22/22であり、或いは、ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠとⅠⅤは、長さがいずれも4ヌクレオチドであり、5'末端から3'末端に向かって、ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠの塩基配列がCUGGであり、ヌクレオチド配列ⅠⅤの塩基配列がCCAGであり、このとき、センス鎖とアンチセンス鎖の長さ比が23/23である。いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠとヌクレオチド配列ⅠⅤは、長さが2ヌクレオチドであり、5'末端から3'末端に向かって、ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠの塩基配列がGGであり、ヌクレオチド配列ⅠⅤの塩基配列がCCであり、このとき、センス鎖とアンチセンス鎖の長さ比が21/21である。

【0077】

いくつかの実施形態において、ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠとヌクレオチド配列ⅠⅤは、完全に逆相補的であるので、ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠの塩基が与えられると、ヌクレオチド配列ⅠⅤの塩基も決定される。

【0078】

いくつかの実施形態において、前記siRNAのセンス鎖は、配列番号125に示されるヌクレオチド配列を含み、前記siRNAのアンチセンス鎖は、配列番号126に示されるヌクレオチド配列を含む。

5' - C A A A C A A G C U G C A C A G A A Z₁₋₃ ' (配列番号125)、

5' - Z₂ U U C U G U G C A G C U U G U U U G C C - 3' (配列番号126)

【0079】

或いは、前記 *siRNA* のセンス鎖は、配列番号 127 に示されるヌクレオチド配列を含み、前記 *siRNA* のアンチセンス鎖は、配列番号 128 に示されるヌクレオチド配列を含む。

5' - G G C A A C A A G C U G C A C A G A A Z_{1-3} ' (配列番号 127)、

5' - Z_{2-2} U U C U G U G C A G C U U G U U U G C C A G - 3' (配列番号 128)

ただし、前記 Z_{1-2} は、アンチセンス鎖の 5' 末端の 1 番目のヌクレオチドであり、 Z_{1-1} は、A、U、G 又は C から選択され、 Z_{1-2} は、 Z_{1-1} と相補的なヌクレオチドである。

【0080】

<第4の *siRNA*>

本開示によれば、前記 *siRNA* は、第4の *siRNA* であってもよい。

【0081】

前記第4の *siRNA* はセンス鎖とアンチセンス鎖を含み、前記第4の *siRNA* の各ヌクレオチドはそれぞれ独立して修飾又は未修飾のヌクレオチドであり、前記センス鎖はヌクレオチド配列 I を含み、前記アンチセンス鎖はヌクレオチド配列 II を含み、前記ヌクレオチド配列 I と前記ヌクレオチド配列 II とは、少なくとも一部で逆相補的に二本鎖領域を形成し、前記ヌクレオチド配列 I と配列番号 181 に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、ヌクレオチド差異が3つ以下であり、前記ヌクレオチド配列 II と配列番号 182 に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、ヌクレオチド差異が3つ以下である。

5' - C A A A C A A G G A C U A A U C C A Z_{3-3} ' (配列番号 181)、

5' - Z_{4-4} U G G A U U A G U C C U U G U U U G - 3' (配列番号 182)

ただし、 Z_{1-3} は A であり、 Z_{1-4} は U であり、

前記ヌクレオチド配列 I に、位置が Z_{1-3} に対応するヌクレオチド Z_{1-5} が含まれ、前記ヌクレオチド配列 II に、位置が Z_{1-4} に対応するヌクレオチド Z_{1-6} が含まれ、前記 Z_{1-6} は、前記アンチセンス鎖の 5' 末端の 1 番目のヌクレオチドである。

【0082】

いくつかの実施形態において、前記センス鎖は、ヌクレオチド配列 I のみを含み、前記アンチセンス鎖は、ヌクレオチド配列 II のみを含む。

【0083】

いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列 I と配列番号 181 に示されるヌクレオチド配列との間にヌクレオチド差異が1つ以下であり、及び／又は前記ヌクレオチド配列 II と配列番号 182 に示されるヌクレオチド配列との間にヌクレオチド差異が1つ以下である。

【0084】

いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列 II と配列番号 182 に示されるヌクレオチド配列との間のヌクレオチド差異は、 Z_{1-6} の位置での差異を含み、 Z_{1-6} が A、C 又は G から選択される。いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド差異は、 Z_{1-6} の位置での差異であり、 Z_{1-6} が A、C 又は G から選択される。いくつかの実施形態において、 Z_{1-5} は、 Z_{1-6} と相補的なヌクレオチドである。上記ヌクレオチド差異を有する *siRNA* は、高い標的 mRNA 抑制能力を有し、これらのヌクレオチド差異を含む *siRNA* も、本開示の保護範囲内にある。

【0085】

いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列 I と前記ヌクレオチド配列 II は、基本的に逆相補的、実質的に逆相補的又は完全に逆相補的である。

【0086】

いくつかの実施形態において、ヌクレオチド配列 I は、配列番号 183 に示されるヌクレオチド配列であり、ヌクレオチド配列 II は、配列番号 184 に示されるヌクレオチド配列である。

5' - C A A A C A A G G A C U A A U C C A Z_{5-5} ' (配列番号 183)、

10

20

30

40

50

5' - Z_{16} U G G A U U A G U C C U U G U U U G - 3' (配列番号 184)

ただし、前記 Z_{16} は、アンチセンス鎖の 5' 末端の 1 番目のヌクレオチドであり、 Z_{15} は、A、U、G 又は C から選択され、 Z_{16} は、 Z_{15} と相補的なヌクレオチドであり、いくつかの実施形態において、 Z_{15} は A であり、 Z_{16} は U である。

【0087】

いくつかの実施形態において、前記センス鎖は、ヌクレオチド配列 I I I をさらに含み、前記アンチセンス鎖は、ヌクレオチド配列 I V をさらに含み、ヌクレオチド配列 I I I とヌクレオチド配列 I V は、長さがそれぞれ 1 ~ 4 ヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列 I I I と前記ヌクレオチド配列 I V は、長さが等しく、実質的に逆相補的又は完全に逆相補的であり、前記ヌクレオチド配列 I I I が前記ヌクレオチド配列 I の 5' 末端に結合され、前記ヌクレオチド配列 I V が前記ヌクレオチド配列 I I の 3' 末端に結合され、前記ヌクレオチド配列 I V と二段目のヌクレオチド配列とは、実質的に逆相補的又は完全に逆相補的であり、当該二段目のヌクレオチド配列とは、標的 mRNA における配列番号 181 に示されるヌクレオチド配列の 5' 末端に隣接し、長さが前記ヌクレオチド配列 I V と等しいヌクレオチド配列を指す。

【0088】

いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列 I I I とヌクレオチド配列 I V は、長さがいずれも 1 ヌクレオチドであり、ヌクレオチド配列 I I I の塩基が C であり、ヌクレオチド配列 I V の塩基が G であり、このとき、センス鎖とアンチセンス鎖の長さ比が 20 / 20 であり、或いは、ヌクレオチド配列 I I I と I V は、長さがいずれも 2 ヌクレオチドであり、5' 末端から 3' 末端に向かって、ヌクレオチド配列 I I I の塩基配列が A C であり、ヌクレオチド配列 I V の塩基配列が G U であり、このとき、センス鎖とアンチセンス鎖の長さ比が 21 / 21 であり、或いは、ヌクレオチド配列 I I I と I V は、長さがいずれも 3 ヌクレオチドであり、5' 末端から 3' 末端に向かって、ヌクレオチド配列 I I I の塩基配列が G A C であり、ヌクレオチド配列 I V の塩基配列が G U C であり、このとき、センス鎖とアンチセンス鎖の長さ比が 22 / 22 であり、或いは、ヌクレオチド配列 I I I と I V は、長さがいずれも 4 ヌクレオチドであり、5' 末端から 3' 末端に向かって、ヌクレオチド配列 I I I の塩基配列が A G A C であり、ヌクレオチド配列 I V の塩基配列が G U C U であり、このとき、センス鎖とアンチセンス鎖の長さ比が 23 / 23 である。いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列 I I I とヌクレオチド配列 I V は、長さが 2 ヌクレオチドであり、5' 末端から 3' 末端に向かって、ヌクレオチド配列 I I I の塩基配列が A C であり、ヌクレオチド配列 I V の塩基配列が G U であり、このとき、センス鎖とアンチセンス鎖の長さ比が 21 / 21 である。

【0089】

いくつかの実施形態において、ヌクレオチド配列 I I I とヌクレオチド配列 I V は、完全に逆相補的であるので、ヌクレオチド配列 I I I の塩基が与えられると、ヌクレオチド配列 I V の塩基も決定される。

【0090】

以下に、ヌクレオチド配列 V、核酸配列、s i R N A におけるヌクレオチド修飾、及び修飾配列の説明は、上記の第 1 ~ 第 4 の s i R N A のいずれか 1 つに適用可能である。即ち、特に明記されていない場合、以下の s i R N A の説明は、第 1 の s i R N A、第 2 の s i R N A、第 3 の s i R N A 及び第 4 の s i R N A を 1 つずつ説明したものと見なされるべきである。例えば、特定の s i R N A が指定されていない場合、「前記 s i R N A は、ヌクレオチド配列 V をさらに含む」とは、「第 1 の s i R N A、第 2 の s i R N A、第 3 の s i R N A 又は第 4 の s i R N A は、ヌクレオチド配列 V をさらに含む」ことを意味する。

【0091】

いくつかの実施形態において、前記センス鎖とアンチセンス鎖は、長さが異なり、前記アンチセンス鎖は、ヌクレオチド配列 V をさらに含み、ヌクレオチド配列 V は、長さが 1 ~ 3 ヌクレオチドであり、前記アンチセンス鎖の 3' 末端に結合され、アンチセンス鎖の 3

、突出端（オーバーハング末端）を構成する。これにより、本開示により提供される s i R N A のセンス鎖とアンチセンス鎖の長さ比が、 $19/20$ 、 $19/21$ 、 $19/22$ 、 $20/21$ 、 $20/22$ 、 $20/23$ 、 $21/22$ 、 $21/23$ 、 $21/24$ 、 $22/23$ 、 $22/24$ 、 $22/25$ 、 $23/24$ 、 $23/25$ 又は $23/26$ であってもよい。いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列 V は、長さが 2 ヌクレオチドであり、これにより、本開示により提供される s i R N A のセンス鎖とアンチセンス鎖の長さ比が、 $19/21$ 、 $21/23$ 又は $23/25$ であってもよい。

【0092】

前記ヌクレオチド配列 V における各ヌクレオチドは、任意のヌクレオチドであってもよく、合成しやすく合成コストを節約するために、前記ヌクレオチド配列 V は、連続した 2 個のチミンデオキシリボヌクレオチド（dTdT）又は連続した 2 個のウラシルリボヌクレオチド（UU）であり、或いは、s i R N A のアンチセンス鎖と標的 m R N A との親和力を向上させるために、ヌクレオチド配列 V は、標的 m R N A の対応する位置のヌクレオチドと相補的である。したがって、いくつかの実施形態において、本開示の s i R N A のセンス鎖とアンチセンス鎖の長さの比は $19/21$ 又は $21/23$ であり、このとき、本開示の s i R N A はより優れた標的 m R N A サイレンシング活性を有する。

【0093】

標的 m R N A の対応する位置のヌクレオチドとは、5' 末端で標的 m R N A の三段目のヌクレオチド配列に隣接するヌクレオチド又はヌクレオチド配列を指し、当該三段目のヌクレオチド配列は、ヌクレオチド配列 I I と実質的に逆相補的又は完全に逆相補的であるヌクレオチド配列であるか、又はヌクレオチド配列 I I 及びヌクレオチド配列 I V から構成されるヌクレオチド配列と実質的に逆相補的又は完全に逆相補的であるヌクレオチド配列である。

【0094】

いくつかの実施形態において、前記第 1 の s i R N A に対して、前記 s i R N A のセンス鎖は、配列番号 5 に示されるヌクレオチド配列を含み、前記 s i R N A のアンチセンス鎖は、配列番号 6 に示されるヌクレオチド配列を含む。

5' - C C U A U G A A G A U U A U A A G A Z₃ - 3' （配列番号 5）、

5' - Z₄ U C U U A U A A U C U U C A U A G G U G - 3' （配列番号 6）

【0095】

或いは、前記 s i R N A のセンス鎖は、配列番号 7 に示されるヌクレオチド配列を含み、前記 s i R N A のアンチセンス鎖は、配列番号 8 に示されるヌクレオチド配列を含む。

5' - C A C C U A U G A A G A U U A U A A G A Z₃ - 3' （配列番号 7）、

5' - Z₄ U C U U A U A A U C U U C A U A G G U G U A - 3' （配列番号 8）

ただし、前記 Z₄ は、アンチセンス鎖の 5' 末端の 1 番目のヌクレオチドであり、Z₃ は、A、U、G 又は C から選択され、Z₄ は、Z₃ と相補的なヌクレオチドである。

【0096】

いくつかの実施形態において、前記第 2 の s i R N A に対して、前記 s i R N A のセンス鎖は、配列番号 65 に示されるヌクレオチド配列を含み、前記 s i R N A のアンチセンス鎖は、配列番号 66 に示されるヌクレオチド配列を含む。

5' - G U A C A G U A C C A G A A G U U A Z₇ - 3' （配列番号 65）、

5' - Z₈ U A A C U U C U G G U A C U G U A C U C - 3' （配列番号 66）

【0097】

或いは、前記 s i R N A のセンス鎖は、配列番号 67 に示されるヌクレオチド配列を含み、前記 s i R N A のアンチセンス鎖は、配列番号 68 に示されるヌクレオチド配列を含む。

5' - G A G U A C A G U A C C A G A A G U U A Z₇ - 3' （配列番号 67）、

5' - Z₈ U A A C U U C U G G U A C U G U A C U C A U - 3' （配列番号 68）

ただし、前記 Z₈ は、アンチセンス鎖の 5' 末端の 1 番目のヌクレオチドであり、Z₇ は、A、U、G 又は C から選択され、Z₈ は、Z₇ と相補的なヌクレオチドである。

【0098】

いくつかの実施形態において、第3の*s i R N A*に対して、前記*s i R N A*のセンス鎖は、配列番号125に示されるヌクレオチド配列を含み、前記*s i R N A*のアンチセンス鎖は、配列番号126に示されるヌクレオチド配列を含む。

5' - C A A A C A A G C U G C A C A G A A Z_{1-3} ' (配列番号125)、

5' - Z_{2-2} U U C U G U G C A G C U U G U U U G C C - 3' (配列番号126)

【0099】

或いは、前記*s i R N A*のセンス鎖は、配列番号127に示されるヌクレオチド配列を含み、前記*s i R N A*のアンチセンス鎖は、配列番号128に示されるヌクレオチド配列を含む。

5' - G G C A A A C A A G C U G C A C A G A A Z_{1-3} ' (配列番号127)、

5' - Z_{2-2} U U C U G U G C A G C U U G U U U G C C A G - 3' (配列番号128)

ただし、前記 Z_{1-2} は、アンチセンス鎖の5'末端の1番目のヌクレオチドであり、 Z_{1-1} は、A、U、G又はCから選択され、 Z_{1-2} は、 Z_{1-1} と相補的なヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、前記第4の*s i R N A*に対して、前記*s i R N A*のセンス鎖は、配列番号185に示されるヌクレオチド配列を含み、前記*s i R N A*のアンチセンス鎖は、配列番号186に示されるヌクレオチド配列を含む。

5' - C A A A C A A G G A C U A A U C C A Z_{5-3} ' (配列番号185)、

5' - Z_{6-6} U G G A U U A G U C C U U G U U U G G U - 3' (配列番号186)

【0100】

或いは、前記*s i R N A*のセンス鎖は、配列番号187に示されるヌクレオチド配列を含み、前記*s i R N A*のアンチセンス鎖は、配列番号188に示されるヌクレオチド配列を含む。

5' - A C C A A A C A A G G A C U A A U C C A Z_{5-3} ' (配列番号187)、

5' - Z_{6-6} U G G A U U A G U C C U U G U U U G G U C U - 3' (配列番号188)

ただし、前記 Z_{1-6} は、アンチセンス鎖の5'末端の1番目のヌクレオチドであり、 Z_{1-5} は、A、U、G又はCから選択され、 Z_{1-6} は、 Z_{1-5} と相補的なヌクレオチドである。

【0101】

いくつかの実施形態において、本開示に記載された*s i R N A*は、表1a～表1dに記載されている*s i P N a 1*、*s i P N a 2*、*s i P N b 1*、*s i P N b 2*、*s i P N c 1*、*s i P N c 2*、*s i P N d 1*又は*s i P N d 2*である。

【0102】

前述したように、本開示の*s i R N A*におけるヌクレオチドは、それぞれ独立して修飾又は未修飾のヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、本開示の*s i R N A*におけるヌクレオチドは、非修飾ヌクレオチドであり、いくつかの実施形態において、本開示の*s i R N A*におけるヌクレオチドの一部又は全部は、修飾ヌクレオチドであり、ヌクレオチド基上のこれらの修飾により、本開示の*s i R N A*がPNP遺伝子発現を抑制する機能を明らかに弱める又は喪失させることはない。

【0103】

いくつかの実施形態において、本開示の*s i R N A*は、少なくとも1つの修飾ヌクレオチドを含む。本開示の文脈において、用いられる用語「修飾ヌクレオチド」とは、ヌクレオチドのリボース基の2'位のヒドロキシ基が他の基で置換されたヌクレオチド又はヌクレオチドアナログ、或いは、修飾された塩基を有するヌクレオチドである。前記修飾ヌクレオチドにより、*s i R N A*が遺伝子発現を抑制する機能を明らかに弱める又は喪失させることはない。例えば、J. K. Watts, G. F. Deleavey, and M. J. Damha, *Chemically modified siRNA: tools and applications*. *Drug Discov Today*, 2008, 13 (19-20): 842-55に開示された修飾ヌクレオチドを選択してもよい。

【0104】

いくつかの実施形態において、本開示により提供される*s i R N A*のセンス鎖又は前記

10

20

30

40

50

アンチセンス鎖は、少なくとも1つのヌクレオチドが修飾ヌクレオチドであり、及び／又は少なくとも1つのリン酸エステル基が、修飾基を有するリン酸エステル基である。言い換えれば、前記センス鎖と前記アンチセンス鎖において少なくとも1本の一本鎖のリン酸－糖骨格中のリン酸エステル基及び／又はリボース基の少なくとも一部は、修飾基を有するリン酸エステル基及び／又は修飾基を有するリボース基である。

【0105】

いくつかの実施形態において、前記センス鎖及び／又は前記アンチセンス鎖におけるヌクレオチドは、全て修飾ヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、本開示により提供される s i R N A のセンス鎖と前記アンチセンス鎖における各ヌクレオチドは、独立してフルオロ修飾ヌクレオチド又は非フルオロ修飾ヌクレオチドである。

10

【0106】

本開示の発明者は、驚くべきことに、本開示に記載された s i R N A により、動物実験において血漿中安定性と遺伝子サイレンシング効率の高度なバランスが取られていることを見出した。

【0107】

いくつかの実施形態において、前記フルオロ修飾ヌクレオチドは、ヌクレオチド配列 I とヌクレオチド配列 I I に位置し、5'末端から3'末端に向かって、前記ヌクレオチド配列 I の少なくとも第7、8、9位のヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであり、5'末端から3'末端に向かって、前記ヌクレオチド配列 I I の少なくとも第2、6、14、16位のヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドである。

20

【0108】

いくつかの実施形態において、前記フルオロ修飾ヌクレオチドは、ヌクレオチド配列 I とヌクレオチド配列 I I に位置し、前記ヌクレオチド配列 I におけるフルオロ修飾ヌクレオチドが5個以下であり、5'末端から3'末端に向かって、前記ヌクレオチド配列 I の少なくとも第7、8、9位のヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列 I I におけるフルオロ修飾ヌクレオチドが7個以下であり、前記ヌクレオチド配列 I I の少なくとも第2、6、14、16位のヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドである。

【0109】

いくつかの実施形態において、5'末端から3'末端に向かって、前記センス鎖において、前記ヌクレオチド配列 I の第7、8、9位又は5、7、8、9位のヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであり、前記センス鎖において残りの位置のヌクレオチドが非フルオロ修飾ヌクレオチドであり、5'末端から3'末端に向かって、前記アンチセンス鎖において、前記ヌクレオチド配列 I I の第2、6、14、16位又は2、6、8、9、14、16位のヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであり、前記アンチセンス鎖において残りの位置のヌクレオチドが非フルオロ修飾ヌクレオチドである。

30

【0110】

本開示の文脈において、「フルオロ修飾ヌクレオチド」とは、ヌクレオチドのリボース基の2'位のヒドロキシ基がフッ素で置換された、以下の式(7)に示される構造を有するヌクレオチドを指す。「非フルオロ修飾ヌクレオチド」とは、ヌクレオチドのリボース基の2'位のヒドロキシ基が非フッ素基で置換されたヌクレオチド又はヌクレオチドアナログを指す。いくつかの実施形態において、各非フルオロ修飾ヌクレオチドは、ヌクレオチドのリボース基の2'位のヒドロキシ基が非フッ素基で置換されたヌクレオチド又はヌクレオチドアナログから独立して選択される1つである。

40

【0111】

これらのリボース基の2'位のヒドロキシ基が非フッ素基で置換されたヌクレオチドは、当業者に公知であり、これらのヌクレオチドは、2'-アルコキシ修飾ヌクレオチド、2'-置換アルコキシ修飾ヌクレオチド、2'-アルキル修飾ヌクレオチド、2'-置換アルキル修飾ヌクレオチド、2'-アミノ修飾ヌクレオチド、2'-置換アミノ修飾ヌクレオチド、2'-デオキシヌクレオチドから選択される1つであってもよい。

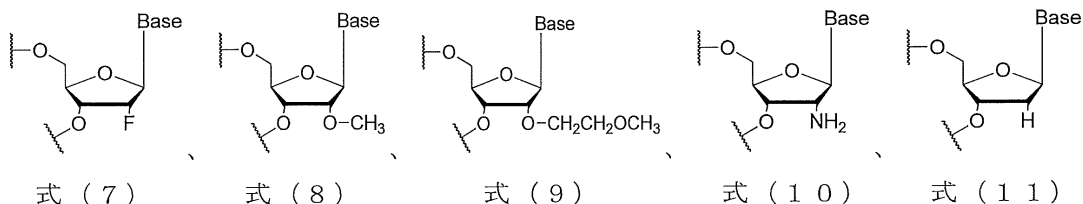
50

【0112】

いくつかの実施形態において、2'-アルコキシ修飾ヌクレオチドは、式(8)に示される2'-メトキシ(2'-OMe)修飾ヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、2'-置換アルコキシ修飾ヌクレオチドは、例えば、式(9)に示される2'-メトキシエチル(2'-MOE)修飾ヌクレオチドであってもよい。いくつかの実施形態において、2'-アミノ(2'-NH₂)修飾ヌクレオチドは式(10)に示す。いくつかの実施形態において、2'-デオキシヌクレオチド(DNA)は式(11)に示すとりである。

【0113】

【化1】



10

【0114】

ヌクレオチドアナログとは、核酸においてヌクレオチドの代わりとなることができるが、アデニンリボヌクレオチド、グアニンリボヌクレオチド、シトシンリボヌクレオチド、ウラシルリボヌクレオチド又はチミンデオキシリボヌクレオチドと構造が異なる基を指す。いくつかの実施形態において、ヌクレオチドアナログは、イソヌクレオチド、架橋ヌクレオチド又は非環式ヌクレオチドであってもよい。

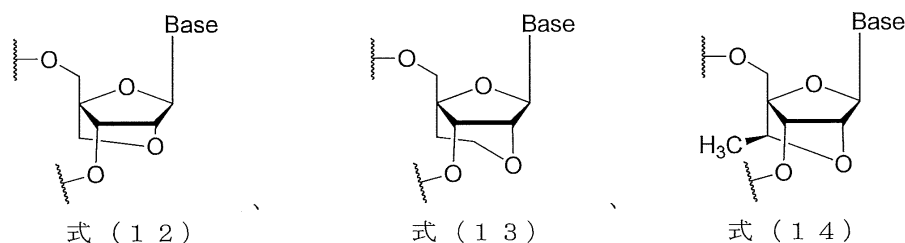
20

【0115】

架橋ヌクレオチド(bridged nucleic acid、BNA)とは、拘束された又は近づけないヌクレオチドを指す。BNAは、五員環、六員環、又は七員環の、「固定された」C3'-エンド糖パッカリングを有する架橋構造を含んでもよい。通常当該橋を当該リボースの2'-、4'-位に導入して2', 4'-BNAヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態において、BNAは、式(12)に示されるLNA、式(13)に示されるENA、式(14)に示されるcET BNA等であってもよい。

【0116】

【化2】



30

【0117】

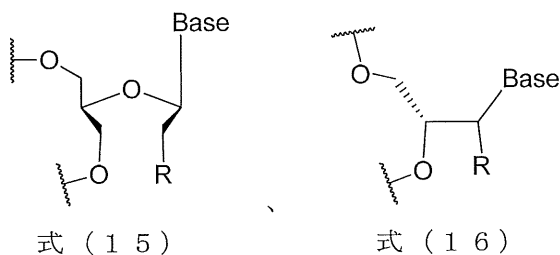
非環式ヌクレオチドは、ヌクレオチドの糖環が開環されたヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、非環式ヌクレオチドは、式(15)に示されるアンロックド核酸(UNA)、又は式(16)に示されるグリセロール核酸(GNA)であってもよい。

40

【0118】

50

【化 3】



【0119】

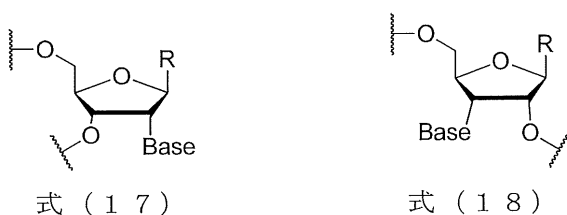
上記式 (15) 及び式 (16) において、R は、H、OH 又はアルコキシ (O-アルキル) から選択される。

【0120】

イソヌクレオチドとは、ヌクレオチドにおいて塩基のリボース環における位置が変化した化合物を指す。いくつかの実施形態において、イソヌクレオチドは、式 (17) 又は (18) に示される、塩基がリボース環の 1'-位から 2'-位又は 3'-位に移行した化合物であってもよい。

【0121】

【化 4】



【0122】

上記式 (17) ~ 式 (18) に示される化合物において、Base は、A、U、G、C 又は T 等の核酸塩基を表し、R は、H、OH、F 又は上述した非フッ素基から選択される。

【0123】

いくつかの実施形態において、ヌクレオチドアナログは、イソヌクレオチド、LNA、ENA、cET、UNA 及び GNA から選択されるいずれか 1 つである。いくつかの実施形態において、各非フルオロ修飾ヌクレオチドは、いずれもメトキシ修飾ヌクレオチドであり、文脈において、前記メトキシ修飾ヌクレオチドは、リボース基の 2'-ヒドロキシ基がメトキシで置換されたヌクレオチドを指す。

【0124】

文脈において、「フルオロ修飾ヌクレオチド」、「2'-フルオロ修飾ヌクレオチド」、「リボース基の 2'-ヒドロキシ基がフッ素で置換されたヌクレオチド」及び「2'-フルオロリボース基を有するヌクレオチド」は、意味が同じであり、いずれもヌクレオチドの 2'-ヒドロキシ基がフッ素で置換された、式 (7) に示される構造を有する化合物を指し、「メトキシ修飾ヌクレオチド」、「2'-メトキシ修飾ヌクレオチド」、「リボース基の 2'-ヒドロキシ基がメトキシで置換されたヌクレオチド」及び「2'-メトキシリボース基を有するヌクレオチド」は、意味が同じであり、いずれもヌクレオチドのリボース基の 2'-ヒドロキシ基がメトキシで置換された、式 (8) に示される構造を有する化合物を指す。

【0125】

いくつかの実施形態において、本開示の siRNA は、以下の修飾を有する siRNA である。すなわち、5' 末端から 3' 末端に向かって、前記センス鎖において、前記ヌクレオチド配列 I の第 7、8、9 位又は第 5、7、8、9 位のヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであり、前記センス鎖において残りの位置のヌクレオチドがメトキシ修飾ヌク

10

20

30

40

50

レオチドであり、前記アンチセンス鎖において、前記ヌクレオチド配列ⅠⅠの第2、6、14、16位又は第2、6、8、9、14、16位のヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであり、前記アンチセンス鎖において残りの位置のヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドである。

【0126】

いくつかの実施形態において、本開示の siRNA は、以下の修飾を有する siRNA である。すなわち、5'末端から3'末端に向かって、前記 siRNA のセンス鎖におけるヌクレオチド配列Ⅰの第5、7、8及び9位のヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであり、siRNA のセンス鎖の残りの位置のヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドであり、また、5'末端から3'末端に向かって、前記 siRNA のアンチセンス鎖におけるヌクレオチド配列ⅠⅠの第2、6、8、9、14及び16位のヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであり、siRNA のアンチセンス鎖の残りの位置のヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドであり、

或いは、5'末端から3'末端に向かって、前記 siRNA のセンス鎖におけるヌクレオチド配列Ⅰの第5、7、8及び9位のヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであり、siRNA のセンス鎖の残りの位置のヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドであり、また、5'末端から3'末端に向かって、前記 siRNA のアンチセンス鎖におけるヌクレオチド配列ⅠⅠの第2、6、14及び16位のヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであり、siRNA のアンチセンス鎖の残りの位置のヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドであり、

或いは、5'末端から3'末端に向かって、前記 siRNA のセンス鎖におけるヌクレオチド配列Ⅰの第7、8及び9位のヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであり、siRNA のセンス鎖の残りの位置のヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドであり、また、5'末端から3'末端に向かって、前記 siRNA のアンチセンス鎖におけるヌクレオチド配列ⅠⅠの第2、6、14及び16位のヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであり、siRNA のアンチセンス鎖の残りの位置のヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドである。

【0127】

いくつかの実施形態において、本開示により提供される siRNA は、表1a～表1d に記載されている siPNa1-M1、siPNa2-M1、siPNa1-M2、siPNa2-M2、siPNa1-M3、siPNa2-M3、siPNb1-M1、siPNb2-M1、siPNb1-M2、siPNb2-M2、siPNb1-M3、siPNb2-M3、siPNC1-M1、siPNC2-M1、siPNC1-M2、siPNC2-M2、siPNC1-M3、siPNC2-M3、siPND1-M1、siPND2-M1、siPND1-M2、siPND2-M2、siPND1-M3、siPND2-M3 のいずれか1つである。

【0128】

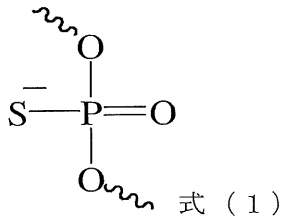
上記修飾を有する siRNA は、コストが低だけでなく、血中のリボヌクレアーゼで核酸を切断しにくくことができ、これにより、核酸の安定性を向上させ、核酸がより強いヌクレアーゼ加水分解耐性という特性を有するようにする。そして、上記修飾 siRNA は、標的 mRNA 抑制活性が高い。

【0129】

いくつかの実施形態において、本開示により提供される siRNA のセンス鎖とアンチセンス鎖において、少なくとも1本の一本鎖のリン酸-糖骨格中のリン酸エステル基の少なくとも一部は、修飾基を有するリン酸エステル基である。いくつかの実施形態において、修飾基を有するリン酸エステル基は、リン酸エステル基におけるリン酸ジエステル結合の少なくとも1つの酸素原子が硫黄原子で置換されたチオリン酸エステル基である。いくつかの実施形態において、前記修飾基を有するリン酸エステル基は、式(1)に示される構造を有するチオリン酸エステル基である。

【0130】

【化 5】



【0131】

このような修飾により、s i R N A の二本鎖構造を安定化させ、塩基対合の高い特異性と高い親和力を維持することができる。

10

【0132】

いくつかの実施形態において、本開示により提供される s i R N A において、チオリン酸エステル基は、センス鎖又はアンチセンス鎖の任意の一端の 1 番目のヌクレオチドと 2 番目のヌクレオチドとの間、センス鎖又はアンチセンス鎖の任意の一端の 2 番目のヌクレオチドと 3 番目のヌクレオチドとの間、又はそれらの任意の組合せからなる群より選ばれる少なくとも 1 つに結合されて存在する。いくつかの実施形態において、チオリン酸エステル基は、センス鎖の 5' 末端を除く全ての上記位置に結合されて存在する。いくつかの実施形態において、チオリン酸エステル基は、センス鎖の 3' 末端を除く全ての上記位置に結合されて存在する。いくつかの実施形態において、チオリン酸エステル基は、以下の位置のうち少なくとも一箇所に結合されて存在する。

20

前記センス鎖の 5' 末端から 1 番目のヌクレオチドと 2 番目のヌクレオチドとの間、
 前記センス鎖の 5' 末端から 2 番目のヌクレオチドと 3 番目のヌクレオチドとの間、
 前記センス鎖の 3' 末端から 1 番目のヌクレオチドと 2 番目のヌクレオチドとの間、
 前記センス鎖の 3' 末端から 2 番目のヌクレオチドと 3 番目のヌクレオチドとの間、
 前記アンチセンス鎖の 5' 末端から 1 番目のヌクレオチドと 2 番目のヌクレオチドとの間

、
 前記アンチセンス鎖の 5' 末端から 2 番目のヌクレオチドと 3 番目のヌクレオチドとの間
 、
 前記アンチセンス鎖の 3' 末端から 1 番目のヌクレオチドと 2 番目のヌクレオチドとの間
 、及び
 前記アンチセンス鎖の 3' 末端から 2 番目のヌクレオチドと 3 番目のヌクレオチドとの間
 。

30

【0133】

いくつかの実施形態において、本開示により提供される s i R N A は、表 1 a ~ 表 1 d に記載されている s i P N a 1 - M 1 S、s i P N a 2 - M 1 S、s i P N a 1 - M 2 S、s i P N a 2 - M 2 S、s i P N a 1 - M 3 S、s i P N a 2 - M 3 S、s i P N b 1 - M 1 S、s i P N b 2 - M 1 S、s i P N b 1 - M 2 S、s i P N b 2 - M 2 S、s i P N b 1 - M 3 S、s i P N b 2 - M 3 S、s i P N c 1 - M 1 S、s i P N c 2 - M 1 S、s i P N c 1 - M 2 S、s i P N c 2 - M 2 S、s i P N c 1 - M 3 S、s i P N c 2 - M 3 S、s i P N d 1 - M 1 S、s i P N d 2 - M 1 S、s i P N d 1 - M 2 S、s i P N d 2 - M 2 S、s i P N d 1 - M 3 S、s i P N d 2 - M 3 S のいずれか 1 つである。

40

【0134】

いくつかの実施形態において、前記 s i R N A のアンチセンス鎖の 5' 末端ヌクレオチドは、5' - リン酸ヌクレオチド又は 5' - リン酸アナログ修飾ヌクレオチドである。

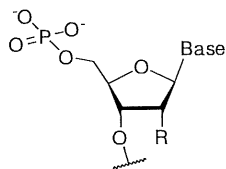
【0135】

慣用の前記 5' - リン酸ヌクレオチド又は 5' - リン酸アナログ修飾ヌクレオチドは、当業者に公知であり、例えば、5' - リン酸ヌクレオチドは、以下の構造を有してもよい。

【0136】

50

【化 6】



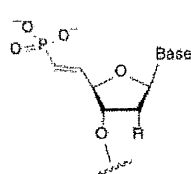
式 (2)

【0137】

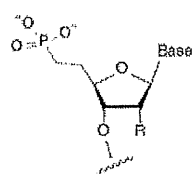
また、例えば、Anastasia Khvorova and Jonathan K. Watts, The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility. Nature Biotechnology, 2017, 35 (3): 238~48には、以下の4種類の5'-リン酸アナログ修飾ヌクレオチドが開示されている。

【0138】

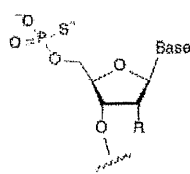
【化 7】



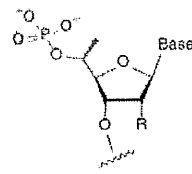
式 (3)



式 (4)



式 (5)



式 (6)

式中、RはH、OH、メトキシ、フッ素から選択され、Baseは核酸塩基を表し、A、U、C、G又はTから選択される。

【0139】

いくつかの実施形態において、5'-リン酸ヌクレオチドは、式(2)に示される、5'-リン酸修飾を含むヌクレオチドであり、5'-リン酸アナログ修飾ヌクレオチドは、式(3)に示される、ビニルリン酸エステル(5'-(E)-vinylphosphonate、E-VP)修飾を含むヌクレオチドであり、又は、式(5)に示される、チオリン酸エステル修飾ヌクレオチドである。

【0140】

いくつかの実施形態において、本開示により提供されるsiRNAは、siPNa1-M1P1、siPNa2-M1P1、siPNa1-M2P1、siPNa2-M2P1、siPNa1-M3P1、siPNa2-M3P1、siPNa1-M1SP1、siPNa2-M1SP1、siPNa1-M2SP1、siPNa2-M2SP1、siPNa1-M3SP1、siPNa2-M3SP1、siPNb1-M1P1、siPNb2-M1P1、siPNb1-M2P1、siPNb2-M2P1、siPNb1-M3P1、siPNb2-M3P1、siPNb1-M1SP1、siPNb2-M1SP1、siPNb1-M2SP1、siPNb2-M2SP1、siPNb1-M3SP1、siPNb2-M3SP1、siPNc1-M1P1、siPNc2-M1P1、siPNc1-M2P1、siPNc2-M2P1、siPNc1-M3P1、siPNc2-M3P1、siPNc1-M1SP1、siPNc2-M1SP1、siPNc1-M2SP1、siPNc2-M2SP1、siPNc1-M3SP1、siPNc2-M3SP1、siPNd1-M1P1、siPNd2-M1P1、siPNd1-M2P1、siPNd2-M2P1、siPNd1-M3P1、siPNd2-M3P1、siPNd1-M1SP1、siPNd2-M1SP1、siPNd1-M2SP1、siPNd2-M2SP1、siPNd1-M3SP1、siPNd2-M3SP1のいずれか1つである。

【0141】

本開示の発明者は、本開示により提供される上記siRNAが血漿とリソソーム安定性

が顕著に向上しているだけでなく、標的mRNA抑制活性が非常に高いことを意外にも見出した。

【0142】

本開示により提供されるsiRNAは、本分野における通常のsiRNA調製方法（例えば、固相合成方法及び液相合成方法）により得ることができる。ここで、固相合成は、既に商用カスタマイズサービスが行われている。対応する修飾を有するヌクレオシドモノマーを用いることにより修飾ヌクレオチド基を本開示に記載されたsiRNAに導入することができ、対応する修飾を有するヌクレオシドモノマーを調製する方法、及び修飾ヌクレオチド基をsiRNAに導入する方法も、当業者によく知られている。

【0143】

<薬物組成物>

本開示は、活性成分として上述したsiRNAと、薬学的に許容可能な担体を含む薬物組成物を提供する。

【0144】

前記薬学的に許容可能な担体は、siRNA投与分野で通常用いられる担体であってもよく、例えば、磁性ナノ粒子（magnetic nanoparticles、例えば、Fe₃O₄又はFe₂O₃に基づくナノ粒子）、カーボンナノチューブ（carbon nanotubes）、メソポーラスシリコン（mesoporous silicon）、リン酸カルシウムナノ粒子（calcium phosphate nanoparticles）、ポリエチレンイミン（polyethylenimine、PEI）、ポリアミドアミンデンドリマー（polyamidoamine（PAMAM） dendrimer）、ポリリジン（poly（L-lysine）、PLL）、キトサン（chitosan）、1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン（1,2-di-oleoyl-3-trimethylammonium-propane、DOTAP）、ポリD-又はL-乳酸／グリコール酸共重合体（poly（D&L-lactic／glycolic acid） copolymer、PLGA）、ポリ（アミノエチルエチレンリン酸エステル）（poly（2-aminoethyl ethylene phosphate）、PPEEA）及びポリ（N,N-ジメチルアミノエチルメタクリレート）（poly（2-dimethylaminoethyl methacrylate）、PDMAEMA）並びにこれらの誘導体の1又は複数があるが、これらに限定されない。

【0145】

前記薬物組成物におけるsiRNA及び薬学的に許容可能な担体の含有量に対して特段の要件はないが、各成分の通常の含有量であってもよい。いくつかの実施形態において、siRNAと薬学的に許容可能な担体との重量比が、1：（1～500）であってもよい。いくつかの実施形態においては、上記重量比が1：（1～50）である。

【0146】

いくつかの実施形態において、前記薬物組成物には、薬学的に許容できる他の添加剤が含まれてもよく、当該添加剤は、本分野で通常採用される各種の製剤又は化合物の1種又は複数種であってもよい。例えば、前記薬学的に許容できる他の添加剤は、pH緩衝液、保護剤及び浸透圧調節剤の少なくとも1種を含んでもよい。

【0147】

前記pH緩衝液は、pH7.5～8.5のトリスヒドロキシメチルアミノメタン塩酸塩緩衝液（tris（hydroxymethyl） aminomethane hydrochloride buffer）及び／又はpH5.5～8.5のリン酸塩緩衝液であってもよく、例えば、pH5.5～8.5のリン酸塩緩衝液であってもよい。

【0148】

前記保護剤は、イノシトール、ソルビトール、スクロース、トレハロース、マンノース、マルトース、ラクトース及びグルコースの少なくとも1種であってもよい。前記薬物組成物の全重量を基準とし、前記保護剤の含有量は0.01～30重量％であってもよい。

10

20

30

40

50

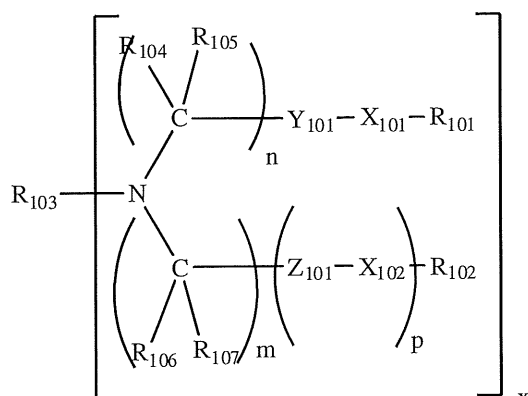
前記浸透圧調節剤は、塩化ナトリウム及び／又は塩化カリウムであってもよい。前記浸透圧調節剤の含有量は、前記薬物組成物の浸透圧が200～700ミリオスモル／キログラム(mOsm/kg)となるように決定される。所望の浸透圧により、当業者は、前記浸透圧調節剤の含有量を容易に決定することができる。

いくつかの実施形態において、前記薬物組成物は、注射液等の液体製剤であってもよく、凍結乾燥粉末注射剤として、投与時に液体添加剤と混合し、液体製剤としてもよい。前記液体製剤は、皮下、筋肉又は静脈注射投与に用いることができるが、これらに限定されず、噴霧により肺に投与、或いは、噴霧により肺を通して他の臓器組織（例えば、肝臓）に投与することもできるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、前記薬物組成物は、静脈注射投与に用いられる。

いくつかの実施形態において、前記薬物組成物は、リポソーム製剤の形式であってもよい。いくつかの実施形態において、前記リポソーム製剤に用いられる薬学的に許容可能な担体は、アミン含有トランスフェクション化合物（以下、有機アミンともいう）、補助脂質及び／又はPEG化（ポリエチレングリコール化）脂質を含む。ここで、前記有機アミン、補助脂質及びPEG化脂質は、CN103380113A（引用によりその全体を本明細書に組み込む）に記載されたアミン含有トランスフェクション化合物又はその薬学的に許容できる塩又は誘導体、補助脂質及びPEG化脂質からそれぞれ選択される1種又は複数種であってもよい。

いくつかの実施形態において、前記有機アミンは、CN103380113Aに記載された式(201)に示される化合物又はその薬学的に許容できる塩であってもよい。

【化 8】



式 (201)

各 X_{101} 又は X_{102} はそれぞれ独立して O、S、N-A 又は C-A であり、A は水素又は $C_{1-C_{20}}$ 炭化水素鎖であり、

各 R₁₀₁、R₁₀₂、R₁₀₃、R₁₀₄、R₁₀₅、R₁₀₆又はR₁₀₇はそれぞれ独立して水素、環式又は非環式の、置換又は無置換の、分岐鎖又は直鎖脂肪族基、環式又は非環式の、置換又は無置換の、分岐鎖又は直鎖ヘテロ脂肪族基、置換又は無置換の、分岐鎖又は直鎖アシル基、置換又は無置換の、分岐鎖又は直鎖アリール基、置換又は無置換の、分岐鎖又は直鎖ヘテロアリール基であり、

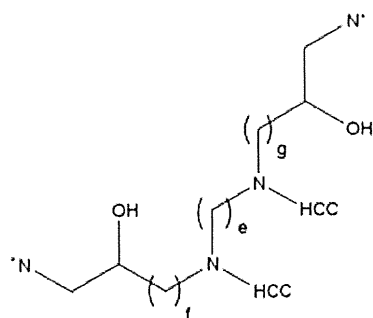
n が 1 ～ 3 の整数であり、 m が 0 ～ 20 の整数であり、 p が 0 又は 1 であり、ここで、

$m = p = 0$ である場合、 R_{102} は水素であり、

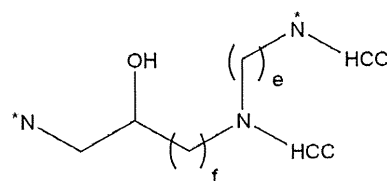
n 又は m の少なくとも1つが2である場合、 R_{103} と式(201)における窒素とが、式(202)又は式(203)に示される構造を形成する。

【0154】

【化9】



式(202)、



式(203)

10

式中、 g 、 e 又は f はそれぞれ独立して1～6の整数であり、「HCC」は炭化水素鎖を表し、各 N^* は式(201)における窒素原子を表す。

【0155】

いくつかの実施形態において、 R_{103} はポリアミンである。他の実施形態において、 R_{103} はケタールである。いくつかの実施形態において、式(201)における R_{101} 及び R_{102} のそれぞれは、独立して、任意に置換又は無置換の、分岐鎖又は直鎖アルキル又はアルケニルであり、前記アルキル又はアルケニルは、3～約20個の炭素原子、例えば、8～約18個の炭素原子、及び0～4個の二重結合、例えば、0～2個の二重結合を有する。

【0156】

いくつかの実施形態において、 n と m のそれぞれが独立して1又は3の値である場合、 R_{103} は、下記式(204)～式(213)のいずれか1つであってもよい。

【0157】

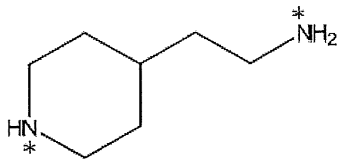
20

30

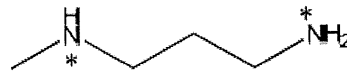
40

50

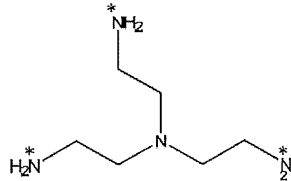
【化 10】



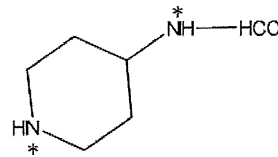
式 (204)、



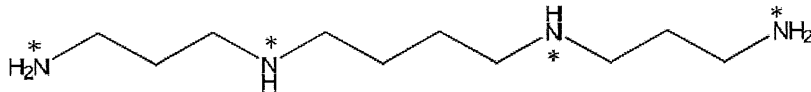
式 (205)、



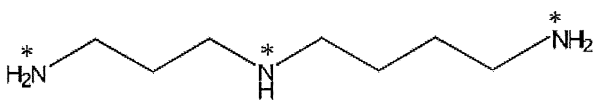
式 (206)、



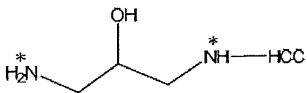
式 (207)、



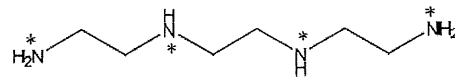
式 (208)、



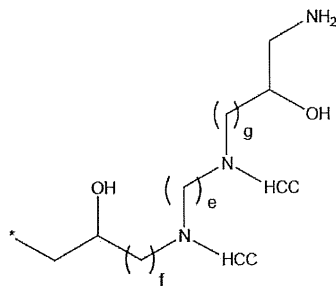
式 (209)、



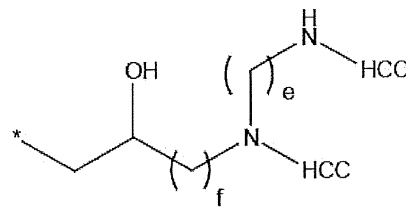
式 (210)、



式 (211)、



式 (212) 及び



式 (213)

【0158】

式 (204) ~ 式 (213) において、 g 、 e 及び f はそれぞれ独立して 1 ~ 6 の整数であり、各「HCC」は炭化水素鎖を表し、各*は R_{103} と式 (201) における窒素原子との結合可能点を示し、任意の*位置上の各Hは、式 (201) における窒素原子と結合するために置換されてもよい。

【0159】

式 (201) に示される化合物は、CN103380113Aの記載により調製されてもよい。

【0160】

いくつかの実施形態において、前記有機アミンは、式 (214) に示される有機アミン及び／又は式 (215) に示される有機アミンである。

【0161】

10

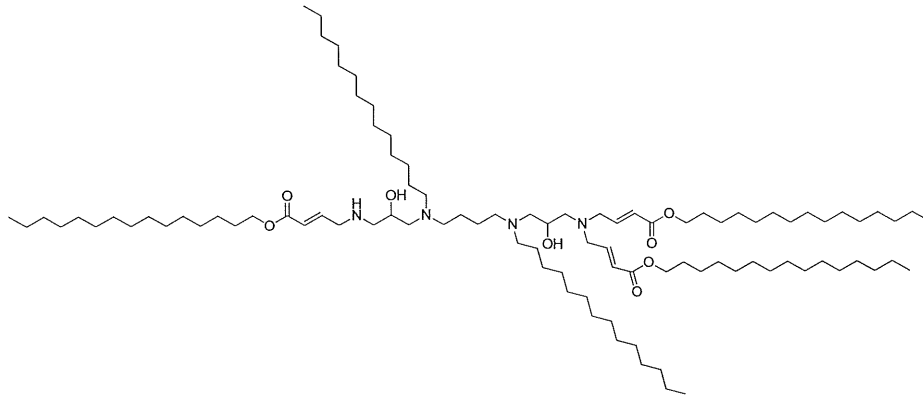
20

30

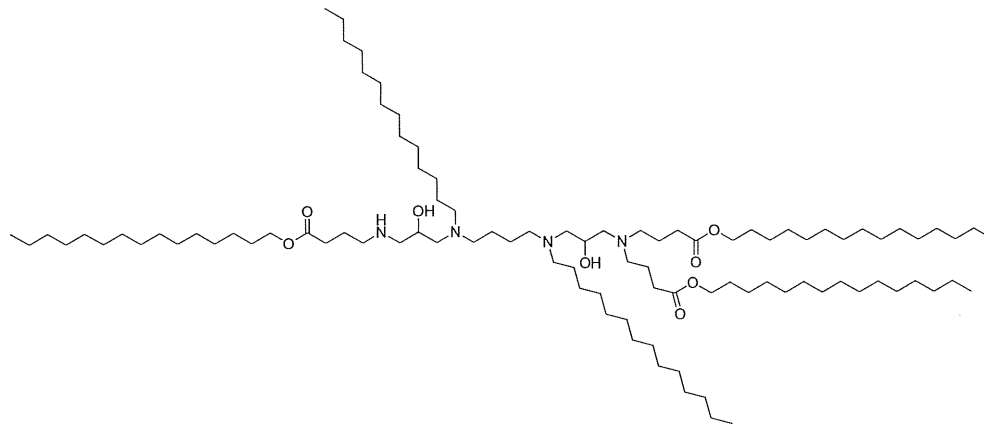
40

50

【化 1 1】



式 (2 1 4)、



式 (2 1 5)

【 0 1 6 2 】

前記補助脂質は、コレステロール、コレステロールのアナログ及び／又はコレステロールの誘導体であり、

前記 PEG 化脂質は、1, 2-ジパルミトアミド-s n-グリセロ-3-ホスファチジルエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)]-2000 (1, 2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine-N-[methoxy (polyethylene glycol)]-2000) である。

【 0 1 6 3 】

いくつかの実施形態において、前記薬物組成物において、前記有機アミン、前記補助脂質、前記 PEG 化脂質のモル比は、(19.7~80) : (19.7~80) : (0.3~50) であり、例えば、(50~70) : (20~40) : (3~20) であってもよい。

【 0 1 6 4 】

いくつかの実施形態において、本開示の siRNA と上記アミン含有トランスフェクション試薬により形成された薬物組成物粒子は、約 30 nm~約 200 nm の平均径を有し、一般に約 40 nm~約 135 nm であり、より一般的には、当該リポソーム粒子の平均径は約 50 nm~約 120 nm、約 50 nm~約 100 nm、約 60 nm~約 90 nm 又は約 70 nm~約 90 nm であり、例えば、当該リポソーム粒子の平均径は、約 30、40、50、60、70、75、80、85、90、100、110、120、130、140、150 又は 160 nm である。

【 0 1 6 5 】

いくつかの実施形態において、本開示の siRNA と上記アミン含有トランスフェクション試薬により形成された薬物組成物において、siRNA と全脂質（例えば有機アミン、補助脂質及び／又は PEG 化脂質）の重量比（重量／重量比）は、約 1 : 1~約 1 : 50、約 1 : 1~約 1 : 30、約 1 : 3~約 1 : 20、約 1 : 4~約 1 : 18、約 1 : 5~

約 1 : 17、約 1 : 5 ~ 約 1 : 15、約 1 : 5 ~ 約 1 : 12、約 1 : 6 ~ 約 1 : 12 又は約 1 : 6 ~ 約 1 : 10 の範囲内にあり、例えば、本開示の s i R N A と全脂質の重量比は約 1 : 5、1 : 6、1 : 7、1 : 8、1 : 9、1 : 10、1 : 11、1 : 12、1 : 13、1 : 14、1 : 15、1 : 16、1 : 17 又は 1 : 18 である。

【0166】

いくつかの実施形態において、前記薬物組成物は、市販時に各成分が独立して存在してもよく、使用時に液体製剤として存在してもよい。いくつかの実施形態において、本開示により提供される s i R N A と上記薬学的に許容可能な担体により形成された薬物組成物は、既知の各種の方法に従い調製されてもよく、従来の s i R N A の代わりに本開示により提供される s i R N A を用いればよい。いくつかの実施形態において、以下の方法に従い調製されてもよい。

10

【0167】

有機アミン、補助脂質及び P E G 化脂質を上記モル比でアルコールに懸濁させ均一に混合して脂質溶液を得る。アルコールの用量は、得られた脂質溶液の総質量濃度が 2 ~ 25 mg / mL、例えば、8 ~ 18 mg / mL となるように決定される。前記アルコールは、薬学的に許容できるアルコール、例えば、エタノール、プロピレングリコール、ベンジルアルコール、グリセリン、ポリエチレングリコール 200、ポリエチレングリコール 300、ポリエチレングリコール 400 など、室温付近で液体であるアルコールから選択される 1 種又は複数種であり、例えばエタノールであってもよい。

【0168】

20

本開示により提供される s i R N A を緩衝塩溶液に溶解し、s i R N A 水溶液を得る。緩衝塩溶液の濃度が 0.05 ~ 0.5 M であり、例えば、0.1 ~ 0.2 M であってもよく、緩衝塩溶液の pH を 4.0 ~ 5.5 に調節し、例えば、5.0 ~ 5.2 であってもよく、緩衝塩溶液の用量は、s i R N A の濃度が 0.6 mg / mL 以下、例えば、0.2 ~ 0.4 mg / mL となるように決定される。前記緩衝塩は、可溶性酢酸塩、可溶性クエン酸塩から選択される 1 種又は複数種であり、例えば、酢酸ナトリウム及び／又は酢酸カリウムであってもよい。

【0169】

脂質溶液と s i R N A 水溶液を混合した後、得られた生成物を 40 ~ 60 °C で少なくとも 2 分間、例えば、5 ~ 30 分間培養し、培養したリポソーム製剤を得る。脂質溶液と s i R N A 水溶液の体積比は 1 : (2 ~ 5) である。

30

【0170】

培養したリポソーム製剤を濃縮又は希釈し、不純物を除去し、除菌し、本開示により提供される薬物組成物を得る。その物理化学的パラメーターとしては、pH が 6.5 ~ 8 であり、封入効率が 80 % 以上であり、粒子径が 40 ~ 200 nm であり、多分散指数が 0.30 以下であり、浸透圧が 250 ~ 400 mOsm / kg であり、例えば、物理化学的パラメーターとしては、pH が 7.2 ~ 7.6、封入効率が 90 % 以上、粒子径が 60 ~ 100 nm、多分散指数が 0.20 以下、浸透圧が 300 ~ 400 mOsm / kg であってもよい。

【0171】

40

ここで、濃縮又は希釈は、不純物を除去する前、不純物を除去した後又は同時に行われてもよい。不純物を除去する方法としては、従来の各種の方法を採用してもよく、例えば、タンジェンシャルフロー系、中空糸カラムを用い、100 KDa の条件で限外濾過し、限外濾過交換溶液を pH 7.4 のリン酸塩緩衝液 (P B S) としてもよい。除菌方法としては、従来の各種の方法を採用してもよく、例えば、0.22 µm のフィルターで濾過して除菌してもよい。

【0172】

s i R N A 複合体

本開示は、上記 s i R N A 及び当該 s i R N A に複合して結合される複合基を含む s i R N A 複合体を提供する。

50

【0173】

一般的には、前記複合基は、薬学的に許容できる少なくとも1つの標的基及び任意のリンカー（linker）を含み、前記siRNA、前記リンカー及び前記標的基は順に結合されている。いくつかの実施形態において、前記標的基は1～6個である。いくつかの実施形態において、前記標的基は2～4個である。前記siRNA分子は、前記複合基に非共有結合的又は共有結合的に複合されてもよく、例えば、前記複合基に共有結合的に複合されてもよい。siRNAと複合基との複合部位は、siRNAのセンス鎖の3'端又は5'端にあってもよく、アンチセンス鎖の5'端にあってもよく、siRNAの内部配列にあってもよい。いくつかの実施形態において、前記siRNAと複合基との複合部位は、siRNAのセンス鎖の3'末端にある。

10

【0174】

いくつかの実施形態において、前記複合基は、ヌクレオチドのリン酸基、2'-一位のヒドロキシ基又は塩基に結合されてもよい。いくつかの実施形態において、前記複合基は、3'-一位のヒドロキシ基に結合されてもよく、この場合、ヌクレオチド間が2'-5'リン酸ジエステル結合により結合されている。複合基は、siRNA鎖の末端に結合される場合、通常ヌクレオチドのリン酸基に結合され、siRNAの内部配列に結合される場合、通常リボース糖環或いは塩基に結合される。各種の結合方法については、Muthiah Manoharan et. al. siRNA conjugates carrying sequentially assembled trivalent N-acetyl galactosamine linked through nucleosides elicit robust gene silencing in vivo in hepatocytes. ACS Chemical biology, 2015, 10 (5): 1181～7. を参照することができる。

20

【0175】

いくつかの実施形態において、前記siRNAと複合基との間が酸不安定又は還元可能な化学結合により結合されてもよく、細胞エンドソームの酸性環境で、これらの化学結合が分解され、siRNAが遊離状態になることができる。分解できない複合方法については、複合基は、siRNAのセンス鎖に結合され、複合によるsiRNA活性への影響をできるだけ低下させることができる。

【0176】

いくつかの実施形態において、前記薬学的に許容できる標的基は、siRNA投与分野で通常用いられるリガンド、例えば、WO2009082607A2に記載された各種のリガンドであってもよく、引用によりその開示内容が全体として本明細書に組み込まれる。

30

【0177】

いくつかの実施形態において、前記薬学的に許容できる標的基は、コレステロール、胆汁酸、ビタミン（例えば、トコフェロール）、鎖長が異なる脂質分子等の親油性分子と、ポリエチレングリコール等のポリマーと、膜透過性ペプチド等のポリペプチドと、アプタマーと、抗体と、量子ドットと、ラクトース、ポリラクトース、マンノース、ガラクトース、N-アセチルガラクトサミン（GalNAc）等の糖類と、葉酸（folate）と、アシアロ糖タンパク質、アシアロ糖残基、リポタンパク（例えば、高密度リポタンパク、低密度リポタンパク等）、グルカゴン、神経伝達物質（例えば、アドレナリン）、成長因子、トランスフェリン等の肝実質細胞に発現する受容体リガンド等の標的分子又はその誘導体により形成されたりガンドから選択される1種又は複数種であってもよい。

40

【0178】

いくつかの実施形態において、前記各リガンドは、細胞表面の受容体と結合できるリガンドから独立して選択される。いくつかの実施形態において、少なくとも1つのリガンドは、肝細胞表面の受容体と結合できるリガンドである。いくつかの実施形態において、少なくとも1つのリガンドは、哺乳動物の肝細胞表面の受容体と結合できるリガンドである。いくつかの実施形態において、少なくとも1つのリガンドは、ヒト肝細胞表面の受容体と結合できるリガンドである。いくつかの実施形態において、少なくとも1つのリガンド

50

は、肝表面のアシアロ糖タンパク質受容体（ASGPR）と結合できるリガンドである。これらのリガンドの種類は、当業者に公知であり、その作用として、一般的に標的細胞表面の特異的受容体と結合し、リガンドに結合される siRNA の標的細胞への送達を媒介する。

【0179】

いくつかの実施形態において、前記薬学的に許容できる標的基は、哺乳動物の肝細胞表面におけるアシアロ糖タンパク質受容体（ASGPR）と結合するいずれか1種のリガンドであってもよい。いくつかの実施形態において、各リガンドは、独立してアシアロ糖タンパク質、例えば、アシアロオロソムコイド（asialoorosomucoid、ASOR）又はアシアロフェチュイン（asialofetuin、ASF）である。いくつかの実施形態において、前記リガンドは、糖又は糖の誘導体である。

【0180】

いくつかの実施形態において、少なくとも1つのリガンドは糖である。いくつかの実施形態において、各リガンドはいずれも糖である。いくつかの実施形態において、少なくとも1つのリガンドは、単糖、多糖、修飾単糖、修飾多糖又は糖誘導体である。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの前記リガンドは、単糖、二糖又は三糖であってもよい。いくつかの実施形態において、少なくとも1つのリガンドは修飾糖である。いくつかの実施形態において、各リガンドは、いずれも独立して多糖、修飾多糖、単糖、修飾単糖、多糖誘導体又は単糖誘導体から選択される。いくつかの実施形態において、リガンドのそれぞれ又は少なくとも1つは、グルコース及びその誘導体、マンナン及びその誘導体、ガラクトース及びその誘導体、キシロース及びその誘導体、リボース及びその誘導体、フコース及びその誘導体、ラクトース及びその誘導体、マルトース及びその誘導体、アラビノース及びその誘導体、フルクトース及びその誘導体並びにシアル酸からなる群から選択される。

【0181】

いくつかの実施形態において、各前記リガンドは、D-マンノピラノース、L-マンノピラノース、D-アラビノース、D-キシロフラノース、L-キシロフラノース、D-グルコース、L-グルコース、D-ガラクトース、L-ガラクトース、 α -D-マンノフラノース、 β -D-マンノフラノース、 α -D-マンノピラノース、 β -D-マンノピラノース、 α -D-グルコピラノース、 β -D-グルコピラノース、 α -D-グルコフラノース、 β -D-グルコフラノース、 α -D-フルクトフラノース、 α -D-フルクトピラノース、 α -D-ガラクトピラノース、 β -D-ガラクトピラノース、 α -D-ガラクトフラノース、 β -D-ガラクトフラノース、グルコサミン、シアル酸、ガラクトサミン、N-アセチルガラクトサミン、N-トリフルオロアセチルガラクトサミン、N-プロピオニルガラクトサミン、N-n-ブチリルガラクトサミン、N-イソブチリルガラクトサミン、2-アミノ-3-O-[(R)-1-カルボキシエチル]-2-デオキシ- β -D-グルコピラノース、2-デオキシ-2-メチルアミノ-L-グルコピラノース、4,6-ジデオキシ-4-ホルムアミド-2,3-ジ-O-メチル-D-マンノピラノース、2-デオキシ-2-スルホアミノ-D-グルコピラノース、N-グリコシル- α -ノイラミン酸、5-チオ- β -D-グルコピラノース、メチル2,3,4-トリ-O-アセチル-1-チオ-6-O-トリチル- α -D-グルコピラノシド、4-チオ- β -D-ガラクトピラノース、エチル3,4,6,7-テトラ-O-アセチル-2-デオキシ-1,5-ジチオ- α -D-グルコヘプトピラノシド、2,5-アンヒドロ-D-アロニトリル、リボース、D-リボース、D-4-チオリボース、L-リボース又はL-4-チオリボースから独立して選択されてもよい。前記リガンドの他の選択肢は、例えば、CN105378082Aの記載を参照してもよく、引用によりその開示内容が全体として本明細書に組み込まれる。

【0182】

いくつかの実施形態において、前記 siRNA 複合体における、薬学的に許容できる標的基は、ガラクトース又はN-アセチルガラクトサミンであってもよく、ガラクトース又

10

20

30

40

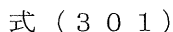
50

10

【 0 1 8 4 】

【 0 1 8 5 】

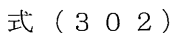
20



30

【 0 1 8 6 】

【化 1 3】

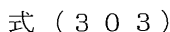


【 0 1 8 7 】

40

【 0 1 8 8 】

【化 1 4】



50

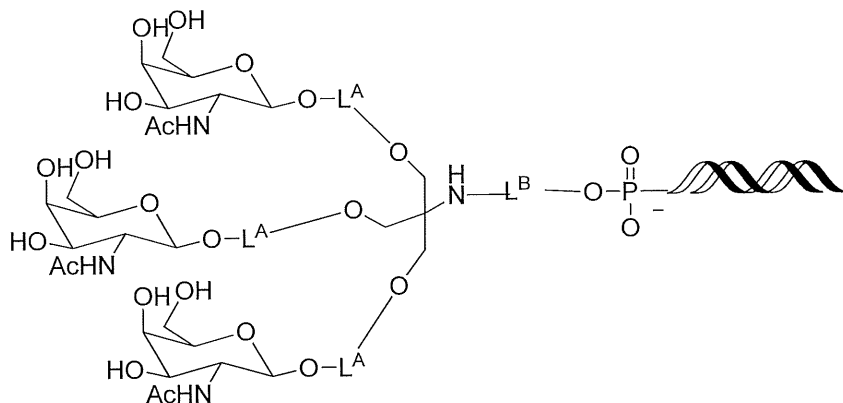
L^C は、ヒドロキシメチルアミノメタン、ジヒドロキシメチルアミノメタン又はトリヒドロキシメチルアミノメタンに基づく2～4個のリンカー基であり、前記 L^C は、酸素原子を介してエーテル結合により各前記 L^A 部に結合されるとともに、窒素原子を介してアミド結合により前記 L^B 部に結合される。

【0190】

いくつかの実施形態において、 $n=3$ であり、 L^C がトリヒドロキシメチルアミノメタンに基づく4個のリンカー基である場合、リンカーとしての $-(L^A)_3$ トリヒドロキシメチルアミノメタン- L^B によりN-アセチルガラクトサミン分子とsiRNA分子を結合して形成されたsiRNA複合体は、その構造が以下の式(304)に示される。

【0191】

【化15】



式(304)

式中、二重螺旋構造はsiRNAを表す。

【0192】

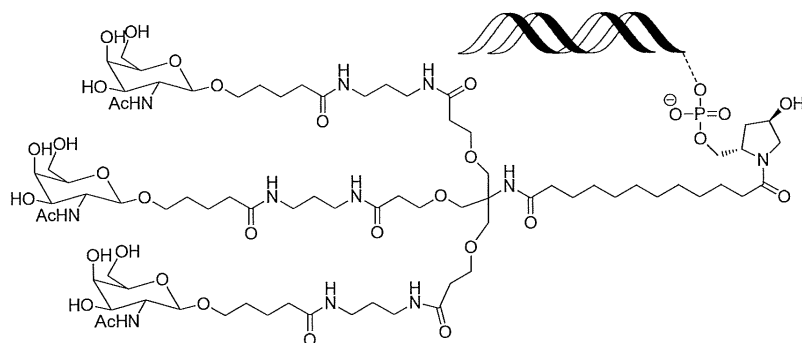
同様に、siRNAと複合基との複合部位は、siRNAのセンス鎖の3'端又は5'端にあってもよく、アンチセンス鎖の5'端にあってもよく、siRNAの内部配列にあってもよい。

【0193】

いくつかの実施形態において、本開示に記載されたsiRNAのセンス鎖の3'末端は、リンカー $-(L^A)_3$ トリヒドロキシメチルアミノメタン- L^B により3個のN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)分子に共有結合的に複合され、siRNA分子とGalNAc分子とのモル比が1:3である、構造が以下の式(305)に示されるsiRNA複合体(以下、 $(GalNAc)_3$ -siRNAともいう)を得る。

【0194】

【化16】



式(305)

式中、二重螺旋構造は前記siRNAを表し、前記リンカーは前記siRNAのセンス鎖の3'末端に結合される。

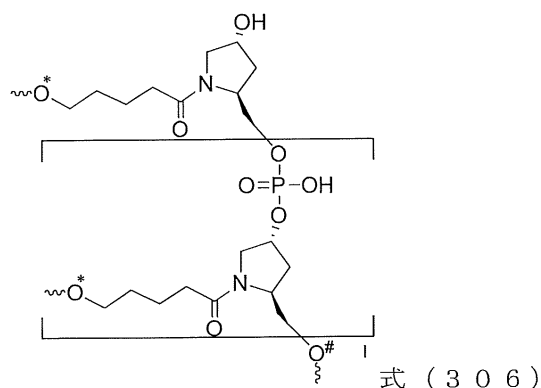
【0195】

いくつかの実施形態において、前記標的基がN-アセチルガラクトサミンである場合、

適切なリンカーは、式（３０６）に示される構造であってもよい。

【０１９６】

【化１７】



10

式中、

l は 0 ～ 3 の整数であり、

* は、リンカーにおいてエーテル結合により標的基に結合される部位を表し、

は、リンカーにおいてリン酸エステル結合により s i R N A に結合される部位を表す。

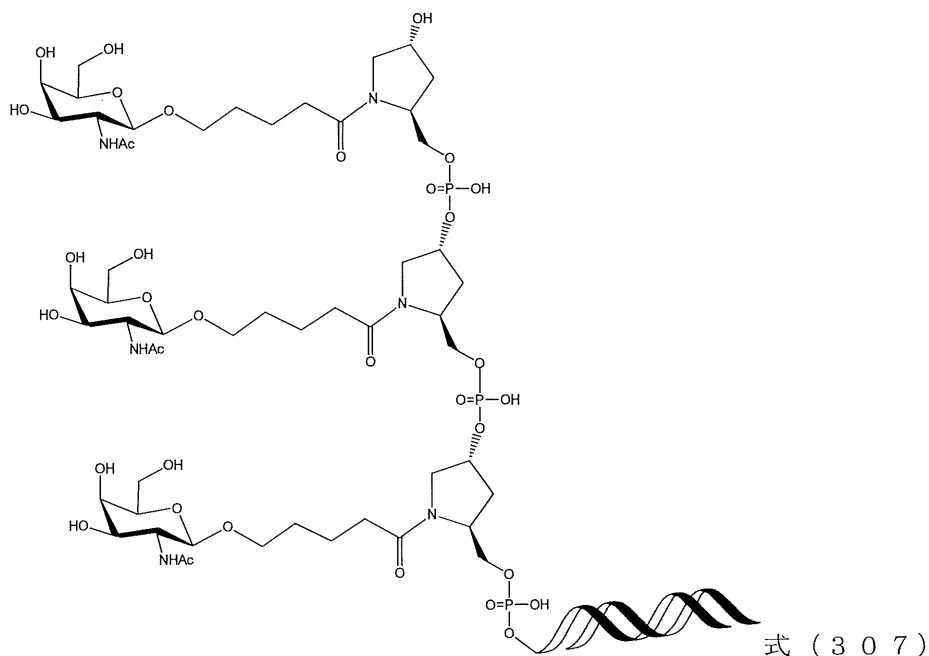
【０１９７】

いくつかの実施形態において、l = 2 である場合、前記 s i R N A 複合体は、式（３０７）に示される構造を有する。

20

【０１９８】

【化１８】



30

40

式中、二重螺旋構造は前記 s i R N A を表し、前記リンカーは前記 s i R N A のセンス鎖の 3' 末端に結合される。

【０１９９】

上記複合体は、従来技術において既に詳しく記載された方法により合成されてもよい。例えば、WO 2015006740 A2 には、複数種の複合体の調製方法が詳しく記載されている。当業者によく知られている方法により、本開示の s i R N A 複合体を得る。例えば、WO 2014025805 A1 には、式（３０５）に示される構造の調製方法が記載されており、Rajeev らは、ChemBioChem 2015, 16, 903-908 に式（３０７）に示される構造の調製方法を記載した。

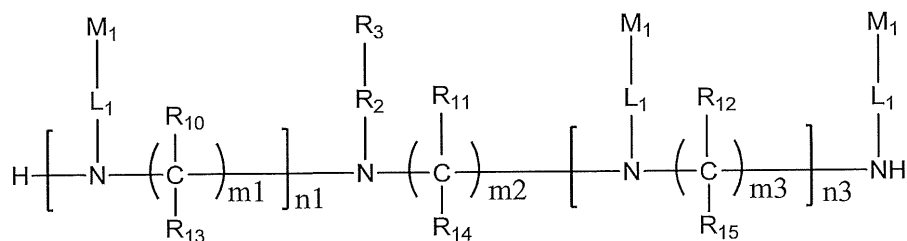
50

【0200】

いくつかの実施形態において、前記 *s i R N A* 複合体は、式 (308) に示される構造を有する。

【0201】

【化19】



式 (308)

10

式中、

$n1$ は、1～3から選択される整数であり、 $n3$ は、0～4から選択される整数であり、各 $m1$ 、 $m2$ 又は $m3$ はそれぞれ独立して、2～10から選択される整数であり、

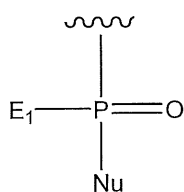
各 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 又は R_{15} は、それぞれ独立して、Hであり、又は C_1-C_{10} アルキル基、 C_1-C_{10} ハロゲン化アルキル基及び C_1-C_{10} アルコキシ基からなる群から選択され、

20

R_3 は式 A59 に示される構造の基である。

【0202】

【化20】



(A59)

式中、 E_1 は OH、SH 又は BH_2 であり、 Nu は本開示の *s i R N A* である。

30

【0203】

R_2 は、長さ1～20の炭素原子の直鎖アルキレン基であり、1又は複数の炭素原子は、 $C(O)$ 、 NH 、 O 、 S 、 $CH=N$ 、 $S(O)_2$ 、 C_2-C_{10} アルケニレン基、 C_2-C_{10} アルキニレン基、 C_6-C_{10} アリーレン基、 C_3-C_{18} ヘテロシクリレン基及び C_5-C_{10} ヘテロアリーレン基からなる群から選択される1又は複数で任意に置換され、 R_2 は、 C_1-C_{10} アルキル基、 C_6-C_{10} アリール基、 C_5-C_{10} ヘテロアリール基、 C_1-C_{10} ハロゲン化アルキル基、 $-OC_1-C_{10}$ アルキル基、 $-OC_1-C_{10}$ アルキルフェニル基、 $-C_1-C_{10}$ アルキル-OH、 $-OC_1-C_{10}$ ハロゲン化アルキル基、 $-SC_1-C_{10}$ アルキル基、 $-SC_1-C_{10}$ アルキルフェニル基、 $-C_1-C_{10}$ アルキル-SH、 $-SC_1-C_{10}$ ハロゲン化アルキル基、ハロゲン置換基、 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-NH_2$ 、 $-C_1-C_{10}$ アルキル- NH_2 、 $-N(C_1-C_{10}$ アルキル基) (C_1-C_{10} アルキル基)、 $-NH(C_1-C_{10}$ アルキル基)、 $-N(C_1-C_{10}$ アルキル基) (C_1-C_{10} アルキルフェニル基)、 $-NH(C_1-C_{10}$ アルキルフェニル基)、シアノ基、ニトロ基、 $-CO_2H$ 、 $-C(O)O(C_1-C_{10}$ アルキル基)、 $-CON(C_1-C_{10}$ アルキル基) (C_1-C_{10} アルキル基)、 $-CONH(C_1-C_{10}$ アルキル基)、 $-CONH_2$ 、 $-NHC(O)(C_1-C_{10}$ アルキル基)、 $-NHC(O)$ (フェニル基)、 $-N(C_1-C_{10}$ アルキル基) $C(O)(C_1-C_{10}$ アルキル基)、 $-N(C_1-C_{10}$ アルキル基) $C(O)$ (フェニル基)、 $-C(O)C_1-C_{10}$ アルキル基、 $-C(O)C_1-C_{10}$ アルキルフェニル基、 $-C(O)C_1-C_{10}$ ハロアルキル基、 $-OC(O)C_1-C_{10}$ アルキル基、 $-SO_2(C_1-C_{10}$ アルキル基)、 $-SO_2$ (

40

50

フェニル基)、 $-\text{SO}_2$ (C_1-C_{10} ハロゲン化アルキル基)、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}$ (C_1-C_{10} アルキル基)、 $-\text{SO}_2\text{NH}$ (フェニル基)、 $-\text{NH}\text{SO}_2$ (C_1-C_{10} アルキル基)、 $-\text{NH}\text{SO}_2$ (フェニル基) 及び $-\text{NH}\text{SO}_2$ (C_1-C_{10} ハロゲン化アルキル基) からなる群のいずれか1又は複数の置換基を任意に有してもよく、

【0204】

各 L_1 は、長さ1~70の炭素原子の直鎖アルキレン基であり、1又は複数の炭素原子は、 C (O)、 NH 、 O 、 S 、 $\text{CH}=\text{N}$ 、 S (O)₂、 C_2-C_{10} アルケニレン基、 C_2-C_{10} アルキニレン基、 C_6-C_{10} アリーレン基、 C_3-C_{18} ヘテロシクリレン基及び C_5-C_{10} ヘテロアリーレン基からなる群から選択される1又は複数の任意に置換され、 L_1 は、 C_1-C_{10} アルキル基、 C_6-C_{10} アリール基、 C_5-C_{10} ヘテロアリール基、 C_1-C_{10} ハロゲン化アルキル基、 $-\text{OC}_1-\text{C}_{10}$ アルキル基、 $-\text{OC}_1-\text{C}_{10}$ アルキルフェニル基、 $-\text{C}_1-\text{C}_{10}$ アルキル- OH 、 $-\text{OC}_1-\text{C}_{10}$ ハロゲン化アルキル基、 $-\text{SC}_1-\text{C}_{10}$ アルキル基、 $-\text{SC}_1-\text{C}_{10}$ アルキルフェニル基、 $-\text{C}_1-\text{C}_{10}$ アルキル- SH 、 $-\text{SC}_1-\text{C}_{10}$ ハロゲン化アルキル基、ハロゲン置換基、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}_1-\text{C}_{10}$ アルキル- NH_2 、 $-\text{N}$ (C_1-C_{10} アルキル基) (C_1-C_{10} アルキル基)、 $-\text{NH}$ (C_1-C_{10} アルキル基)、 $-\text{N}$ (C_1-C_{10} アルキル基) (C_1-C_{10} アルキルフェニル基)、 $-\text{NH}$ (C_1-C_{10} アルキルフェニル基)、シアノ基、ニトロ基、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{C}$ (O) O (C_1-C_{10} アルキル基)、 $-\text{CON}$ (C_1-C_{10} アルキル基) (C_1-C_{10} アルキル基)、 $-\text{CONH}$ (C_1-C_{10} アルキル基)、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NHC}$ (O) (C_1-C_{10} アルキル基)、 $-\text{NHC}$ (O) (フェニル基)、 $-\text{N}$ (C_1-C_{10} アルキル基) C (O) (C_1-C_{10} アルキル基)、 $-\text{N}$ (C_1-C_{10} アルキル基) C (O) (フェニル基)、 $-\text{C}$ (O) C_1-C_{10} アルキル基、 $-\text{C}$ (O) C_1-C_{10} アルキルフェニル基、 $-\text{C}$ (O) C_1-C_{10} ハロアルキル基、 $-\text{OC}$ (O) C_1-C_{10} アルキル基、 $-\text{SO}_2$ (C_1-C_{10} アルキル基)、 $-\text{SO}_2$ (フェニル基)、 $-\text{SO}_2$ (C_1-C_{10} ハロゲン化アルキル基)、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}$ (C_1-C_{10} アルキル基)、 $-\text{SO}_2\text{NH}$ (フェニル基)、 $-\text{NH}\text{SO}_2$ (C_1-C_{10} アルキル基)、 $-\text{NH}\text{SO}_2$ (フェニル基) 及び $-\text{NH}\text{SO}_2$ (C_1-C_{10} ハロゲン化アルキル基) からなる群のいずれか1又は複数の置換基を任意に有してもよい。

【0205】

いくつかの実施形態において、 L_1 は、 $\text{A}_1\sim\text{A}_{26}$ の基又はその任意の結合の組合せからなる群から選択されてもよく、 $\text{A}_1\sim\text{A}_{26}$ の構造と定義は以下のとおりである。

【0206】

10

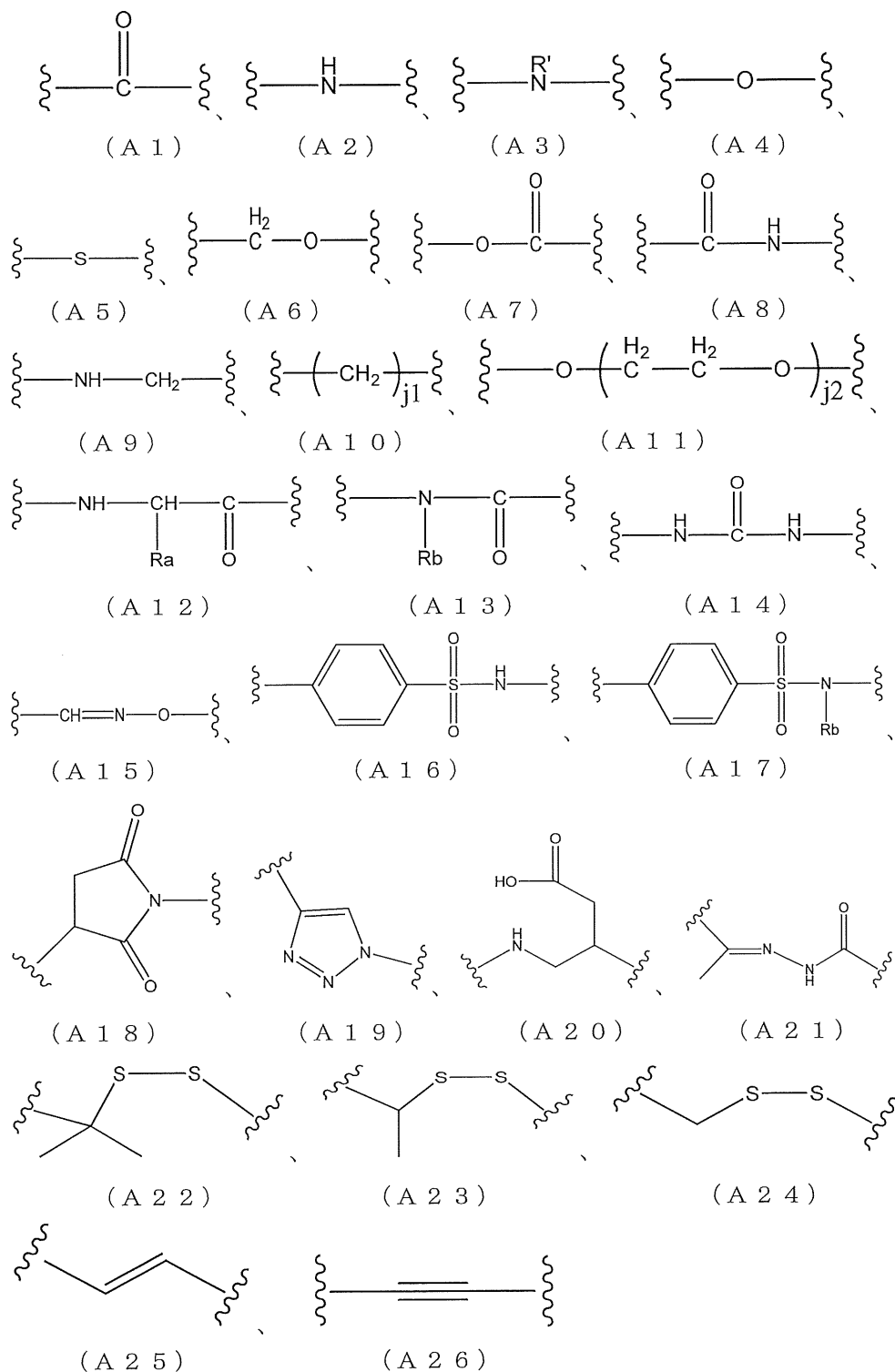
20

30

40

50

【化 2 1】



10

20

30

40

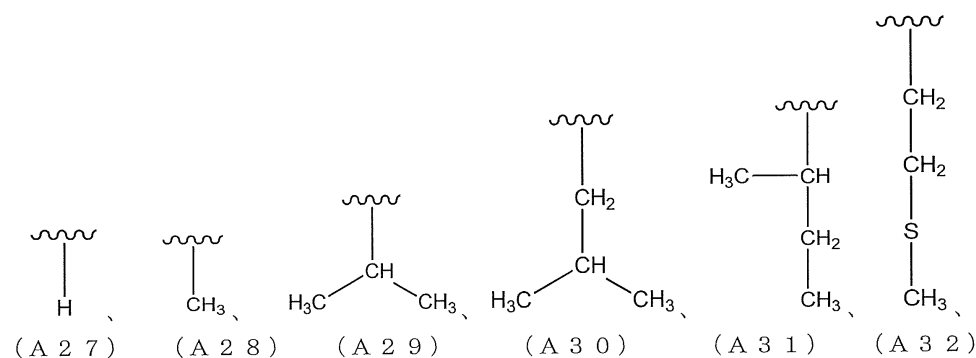
式中、j 1 は 1 ～ 2 0 の整数であり、j 2 は 1 ～ 2 0 の整数であり、

R ' は $\text{C}_1 - \text{C}_{10}$ のアルキル基であり、

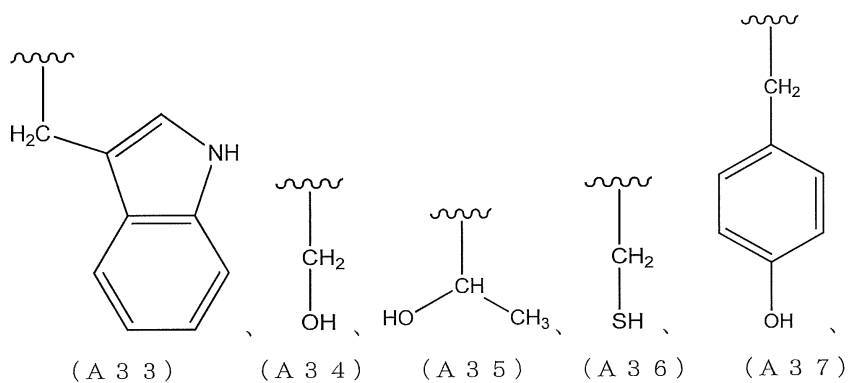
R a は、式 A 2 7 ～ A 4 5 の基又はその任意の結合の組合せからなる群から選択される。

【0 2 0 7】

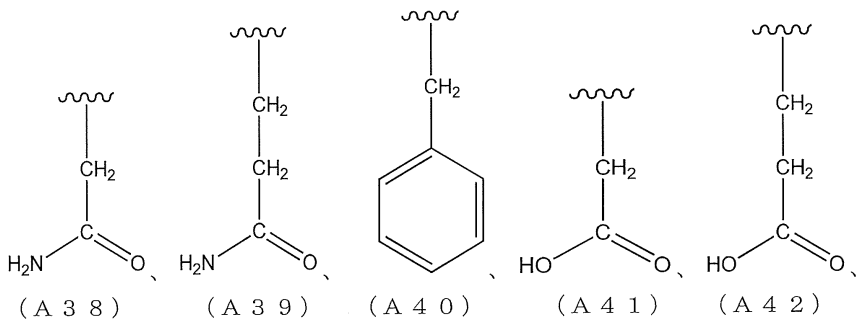
【化 2 2】



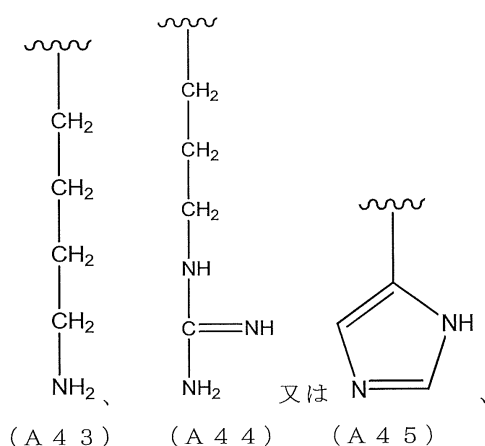
10



20



30



40

R b は C₁ - C₁₀ のアルキル基であり、

は、基が共有結合的に結合する部位を表す。

【0 2 0 8】

便宜上、L₁ は、線形アルキレン基として定義されるが、例えば上述の取替及び／又は置換によって生じるアミンやアルケニル基で、線形基ではない、又は名称が異なる可能性があることは、当業者に理解される。本開示内容の目的のために、L₁ の長さは、2つの結合点を結合する鎖における原子数である。この目的のために、前記直鎖アルキレンの炭

50

素原子を置換して得られた環（例えば、ヘテロシクリレン又はヘテロアリーレン）を、1個の原子とする。

【0209】

M_1 は、標的基を表し、その定義と選択可能な範囲は上記標的基と同じである。いくつかの実施形態において、各 M_1 は、哺乳動物の肝細胞表面におけるアシアロ糖タンパク質受容体に対して親和力を有するリガンドから独立して選択される1つである。

【0210】

M_1 が哺乳動物の肝細胞表面におけるアシアロ糖タンパク質受容体に対して親和力を有するリガンドである場合、いくつかの実施形態において、 n_1 は、1～3の整数であってもよく、 n_3 は、0～4の整数であってもよく、前記複合体における M_1 標的基の個数が少なくとも2であることを確保する。いくつかの実施形態において、 $n_1 + n_3 \geq 2$ であり、これにより、 M_1 標的基の個数が少なくとも3であり、 M_1 標的基と肝表面のアシアロ糖タンパク質受容体をより容易に結合させ、さらに前記複合体がエンドサイトーシス（細胞内取込み）作用により細胞に取り込まれることを促進することができる。実験から分かるように、 M_1 標的基の個数が3個以上である場合、 M_1 標的基と肝表面のアシアロ糖タンパク質受容体との結合の容易さの向上が明らかではないので、合成の容易さ、構造／プロセスコスト及び送達効率等の多方面を総合的に考慮すると、いくつかの実施形態において、 n_1 は1～2の整数であり、 n_3 は0～1の整数であり、かつ、 $n_1 + n_3 = 2 \sim 3$ である。

【0211】

いくつかの実施形態において、各 m_1 、 m_2 又は m_3 は、それぞれ独立して2～10の整数から選択される場合、複数の M_1 標的基間の空間位置を M_1 標的基と肝表面のアシアロ糖タンパク質受容体との結合に適合させることができる。本開示により提供される $siRNA$ 複合体をより簡略化し、より合成しやすく、及び／又はコストを低下させるために、いくつかの実施形態において、各 m_1 、 m_2 又は m_3 は、それぞれ独立して2～5の整数であり、いくつかの実施形態において、 $m_1 = m_2 = m_3$ である。

【0212】

各 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 又は R_{15} が、H、 $C_1 - C_{10}$ アルキル基、 $C_1 - C_{10}$ ハロゲン化アルキル基及び $C_1 - C_{10}$ アルコキシ基からそれぞれ独立して選択される1つである場合、いずれも本開示の $siRNA$ 複合体の性質を変化させることなく、本開示の目的を実現することができることは、当業者に理解され得る。いくつかの実施形態において、各 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 又は R_{15} は、それぞれ独立してH、メチル基又はエチル基から選択される。いくつかの実施形態において、各 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 及び R_{15} は、いずれもHである。

【0213】

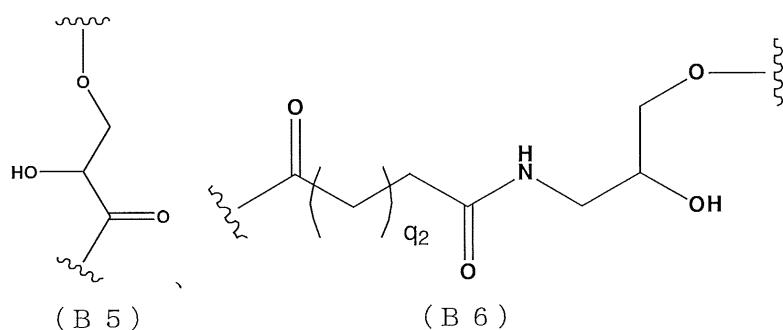
R_3 は、式A59に示される構造の基であり、そのうち、 E_1 はOH、SH又は BH_2 であり、調製原料の入手しやすさを考慮し、いくつかの実施形態において、 E_1 はOH又はSHである。

【0214】

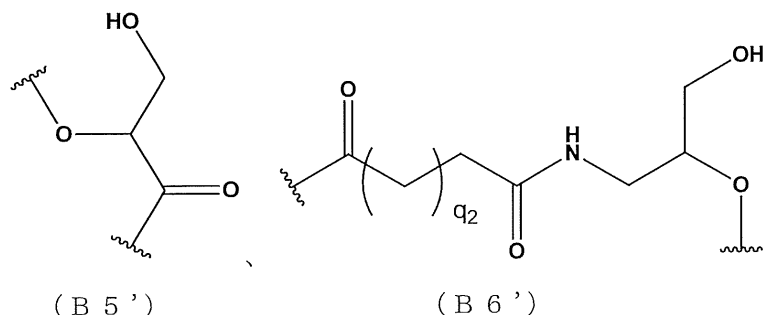
R_2 は、窒素含有骨格上のN原子とA59との結合を実現するために選択される。本開示の文脈において、「窒素含有骨格」とは、 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 及び R_{15} が結合された炭素原子とN原子が互いに結合している鎖状構造を指す。したがって、 R_2 は、適当な方法でA59基を窒素含有骨格上のN原子に結合することができる任意のリンカー基であってもよい。いくつかの実施形態において、固相合成プロセスにより式(308)に示される $siRNA$ 複合体を調製する場合に、 R_2 基には、窒素含有骨格上のN原子に結合される部位及び R_3 におけるP原子に結合される部位がともに含まれる必要がある。いくつかの実施形態において、 R_2 における前記窒素含有骨格上のN原子に結合される部位は、N原子とアミド結合を形成し、前記 R_3 上のP原子に結合される部位は、P原子とリン酸エステル結合を形成し、いくつかの実施形態において、 R_2 は、B5、B6、B5'又はB6'であってもよい。

【0215】

【化23】



10



20

式中、

は、基が共有結合的に結合する部位を表す。

q_2 の値の範囲は、1～10の整数であってもよく、いくつかの実施形態において、 q_2 は1～5の整数である。

【0216】

L_1 は、 M_1 標的基と窒素含有骨格上のN原子を結合し、式(308)に示されるsiRNA複合体に肝標的機能を提供するという役割を果たす。いくつかの実施形態において、 L_1 は、式A1～A26の基から選択される1又は複数の結合の組合せである。いくつかの実施形態において、 L_1 は、A1、A4、A5、A6、A8、A10、A11及びA13から選択される1又は複数の結合の組合せである。いくつかの実施形態において、 L_1 は、A1、A4、A8、A10及びA11から選択される少なくとも2つの結合の組合せである。いくつかの実施形態において、 L_1 は、A1、A8、A10から選択される少なくとも2つの結合の組合せである。

30

【0217】

いくつかの実施形態において、 L_1 の長さは、3～25個の原子、3～20個の原子、4～15個の原子又は5～12個の原子であってもよい。いくつかの実施形態において、 L_1 の長さは、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、30個、35個、40個、45個、50個、55個、60個の原子である。

40

【0218】

いくつかの実施形態において、 j_1 は2～10の整数であり、いくつかの実施形態において、 j_1 は3～5の整数である。いくつかの実施形態において、 j_2 は2～10の整数であり、いくつかの実施形態において、 j_2 は3～5の整数である。 R' は C_1-C_4 のアルキル基であり、いくつかの実施形態において、 R' は、メチル基、エチル基及びイソプロピル基の1つである。 R_a は、A27、A28、A29、A30及びA31の1つであり、いくつかの実施形態において、 R_a は、A27又はA28である。 R_b は、 C_1-C_5 のアルキル基であり、いくつかの実施形態において、 R_b は、メチル基、エチル基、イソ

50

プロピル基及びブチル基の1つである。いくつかの実施形態において、式A 1～A 2 6においてそれぞれj 1、j 2、R'、R a、R bを選択することにより、M₁標的基と窒素含有骨格上のN原子との結合を実現し、M₁標的基間の空間位置をM₁標的基と肝表面のアシアロ糖タンパク質受容体との結合にさらに適合させる。

【0 2 1 9】

いくつかの実施形態において、該複合体は、式(4 0 3)、(4 0 4)、(4 0 5)、(4 0 6)、(4 0 7)、(4 0 8)、(4 0 9)、(4 1 0)、(4 1 1)、(4 1 2)、(4 1 3)、(4 1 4)、(4 1 5)、(4 1 6)、(4 1 7)、(4 1 8)、(4 1 9)、(4 2 0)、(4 2 1)又は(4 2 2)に示される構造を有する。

【0 2 2 0】

10

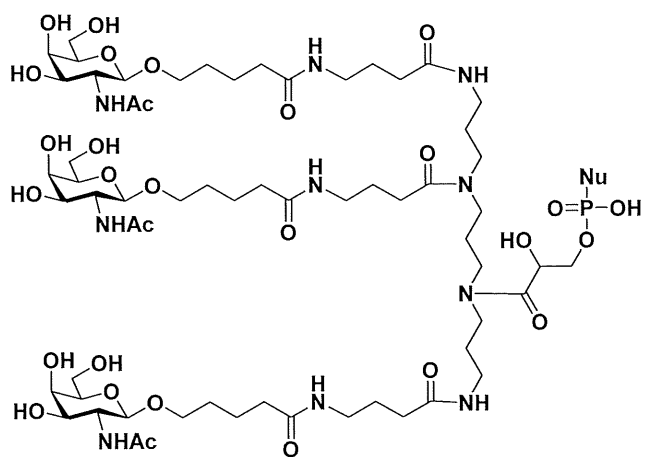
20

30

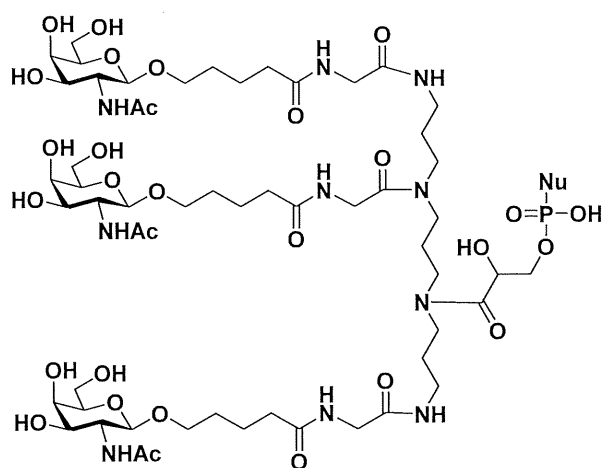
40

50

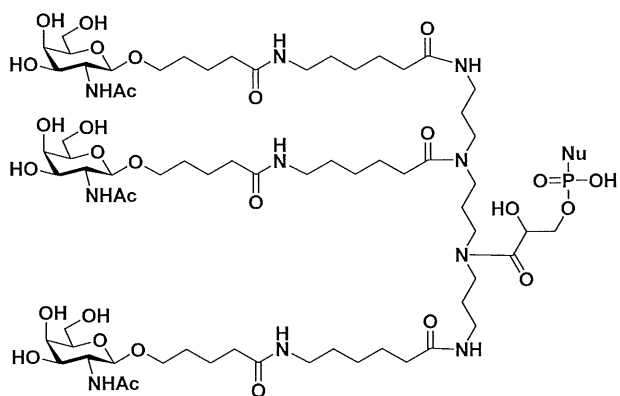
10



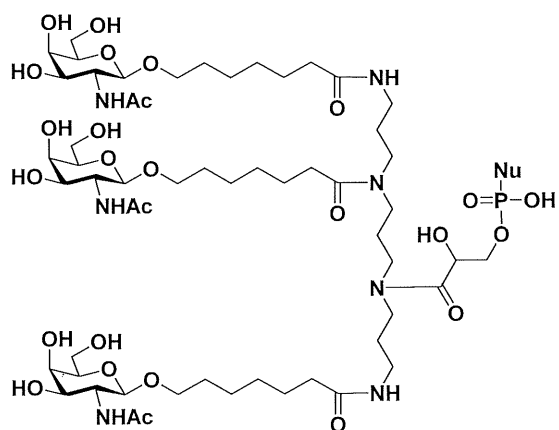
20



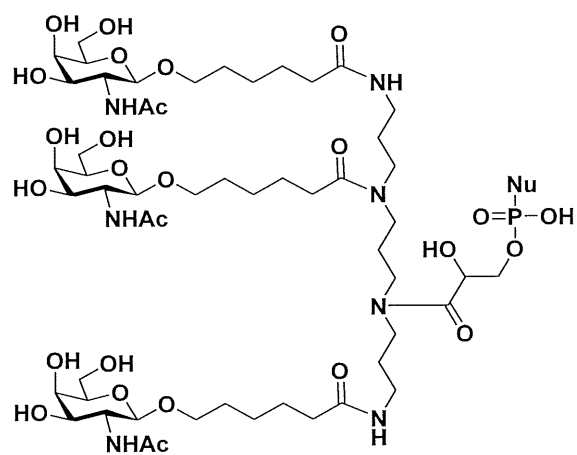
30



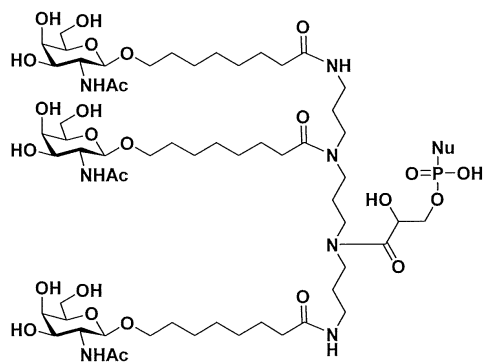
式 (4 0 6)



式 (4 0 7)

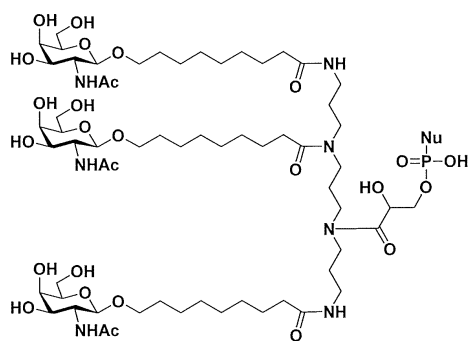


式 (4 0 8)



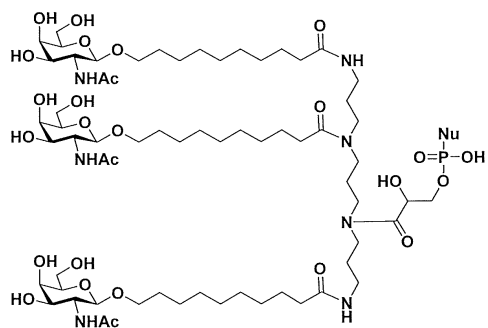
式 (4 0 9)

10



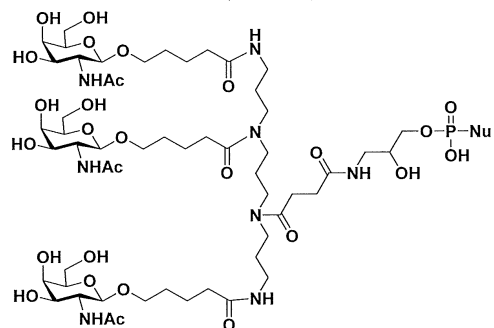
式 (4 1 0)

20



式 (4 1 1)

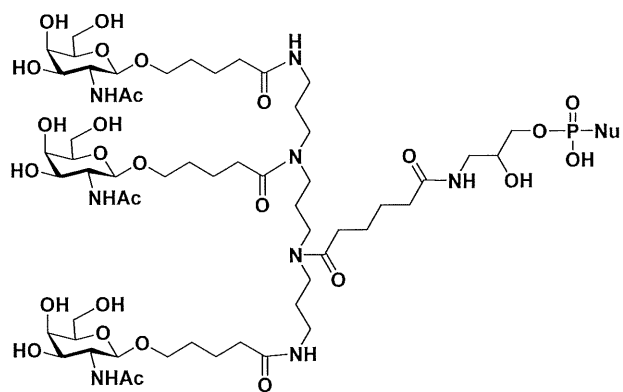
30



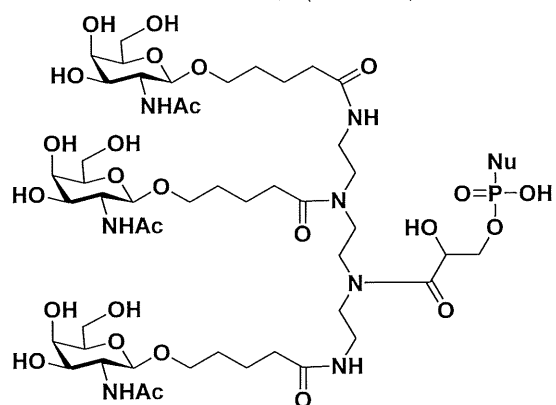
式 (4 1 2)

40

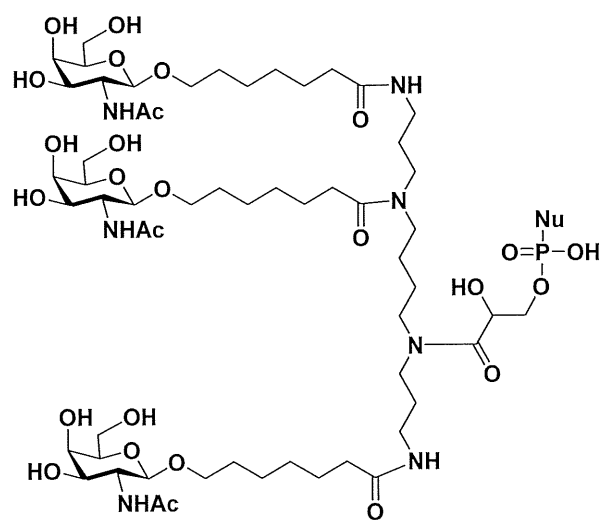
50



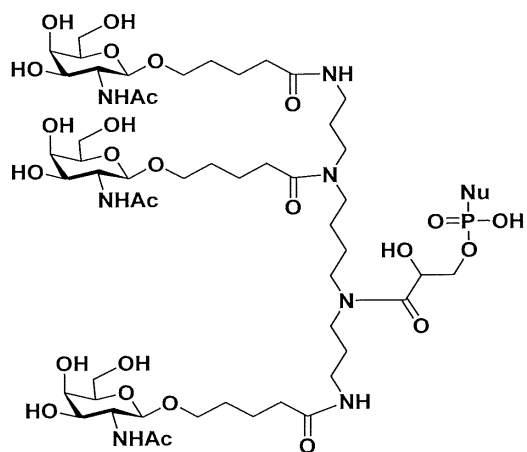
式 (4 1 3)



式 (4 1 4)

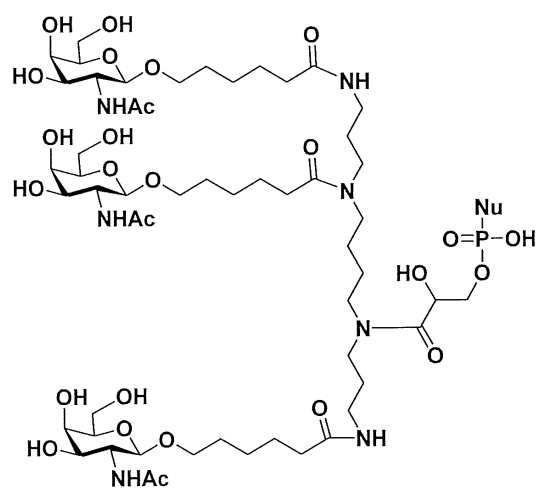


式 (4 1 5)



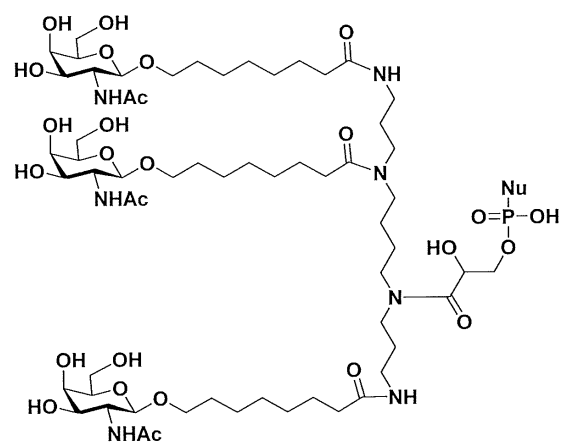
式 (4 1 6)

10



式 (4 1 7)

20

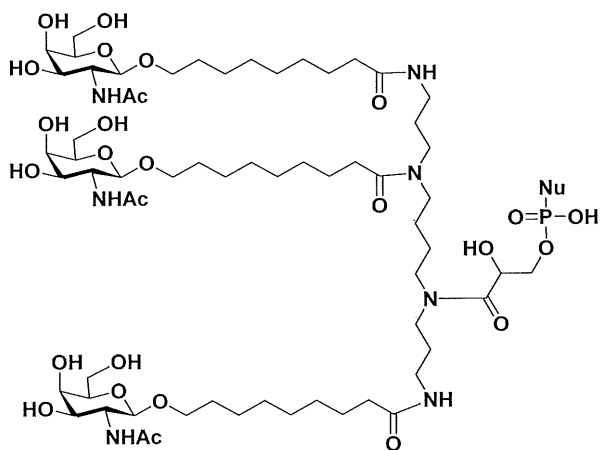


式 (4 1 8)

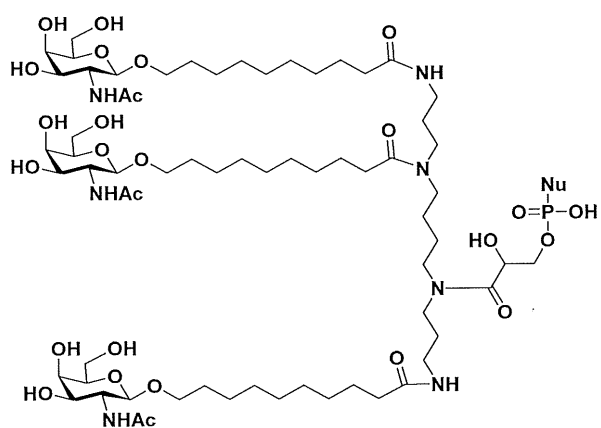
30

40

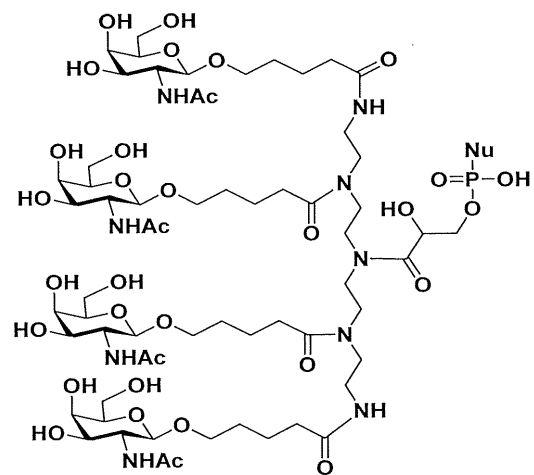
50



式 (4 1 9)



式 (4 2 0)



式 (4 2 1)

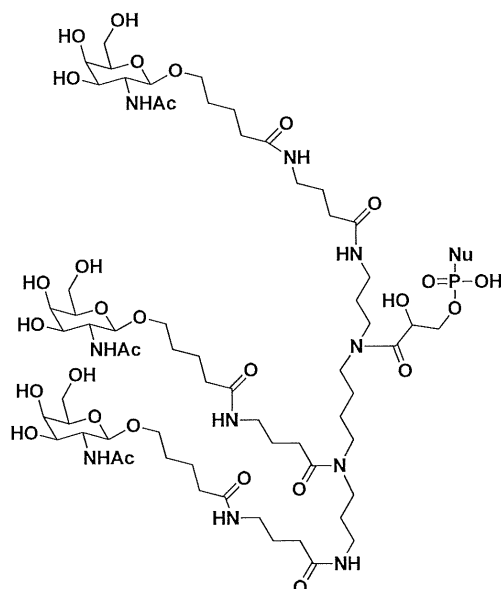
10

20

30

40

50



式 (4 2 2)

【 0 2 2 1 】

いくつかの実施形態において、式 A 5 9 における P 原子は、s i R N A 配列における任意の可能な位置に結合されてもよく、例えば、式 A 5 9 における P 原子は、s i R N A のセンス鎖又はアンチセンス鎖のいずれか 1 つのヌクレオチドに結合されてもよく、いくつかの実施形態において、式 A 5 9 における P 原子は、s i R N A のセンス鎖のいずれか 1 つのヌクレオチドに結合される。いくつかの実施形態において、式 A 5 9 における P 原子は、s i R N A のセンス鎖又はアンチセンス鎖の端部に結合され、いくつかの実施形態において、式 A 5 9 における P 原子は、s i R N A のセンス鎖の端部に結合される。前記端部とは、前記センス鎖又は前記アンチセンス鎖においてその一端から前の 4 個のヌクレオチドを指す。いくつかの実施形態において、式 A 5 9 における P 原子は、s i R N A のセンス鎖又はアンチセンス鎖の末端に結合され、いくつかの実施形態において、式 A 5 9 における P 原子は、s i R N A のセンス鎖の 3' 末端に結合される。s i R N A のセンス鎖の上記位置に結合される場合に、式 (3 0 8) に示される s i R N A 複合体は、細胞に入り込んだ後、巻き戻されるときに、単独の s i R N A のアンチセンス鎖を放出し、P N P m R N A がタンパク質を翻訳する過程を遮断し、P N P 遺伝子発現を抑制することができる。

【 0 2 2 2 】

いくつかの実施形態において、式 A 5 9 における P 原子は、s i R N A におけるヌクレオチド上の任意の可能な位置、例えば、ヌクレオチドの 5' 位、ヌクレオチドの 2' 位、ヌクレオチドの 3' 位又はヌクレオチドの塩基に結合されてもよい。いくつかの実施形態において、式 A 5 9 における P 原子は、リン酸ジエステル結合を形成することにより前記 s i R N A におけるヌクレオチドの 2' 位、3' 位又は 5' 位に結合されてもよい。いくつかの実施形態において、式 A 5 9 における P 原子は、s i R N A のセンス鎖の 3' 末端ヌクレオチドの 3' ヒドロキシ基を脱水素した酸素原子に結合され（このとき、A 5 9 における P 原子は、s i R N A に含まれるリン酸基の P 原子と見なすこともできる）、或いは、式 A 5 9 における P 原子は、s i R N A のセンス鎖における 1 つのヌクレオチドの 2' -ヒドロキシ基中の水素を置換することによりヌクレオチドに結合され、或いは、式 A 5 9 における P 原子は、s i R N A のセンス鎖の 5' 末端ヌクレオチドの 5' ヒドロキシ基中の水素を置換することによりヌクレオチドに結合される。

【 0 2 2 3 】

本開示の発明者は、本開示の s i R N A 複合体は、血漿中安定性が顕著に向上し、オフターゲット効果が低減されているとともに、高い P N P m R N A サイレncing 活性を

さらに示し、さらに高い血中尿酸濃度抑制作用を有することを意外にも見出した。いくつかの実施形態において、本開示の s i R N A は、表 1 a ~ 1 d に示される s i R N A の 1 つであってもよい。これらの s i R N A を含む s i R N A 複合体は、より高い P N P m R N A サイレンシング活性を示す。

【0224】

【表 1 a】

本開示の第 1 の s i R N A 配列

s i R N A 番号	配列番号	配列方向 5' - 3'
s i P N a 1	9	C C U A U G A A G A U U A U A A G A A
	10	U U C U U A U A A U C U U C A U A G G U G
s i P N a 2	11	C A C C U A U G A A G A U U A U A A G A A
	12	U U C U U A U A A U C U U C A U A G G U G U A
s i P N a 1 - M 1	13	C m C m U m A m U m G m A f A f G f A m U m U m A m U m A m A m G m A m A m
	14	U m U f C m U m U m A f U m A m A m U m C m U m U m C f A m U f A m G m G m U m G m
s i P N a 2 - M 1	15	C m A m C m C m U m A m U m G m A f A f G f A m U m U m A m U m A m A m G m A m A m
	16	U m U f C m U m U m A f U m A m A m U m C m U m U m C f A m U f A m G m G m U m G m U m G m
s i P N a 1 - M 2	17	C m C m U m A m U f G m A f A f G f A m U m U m A m U m A m A m G m A m A m
	18	U m U f C m U m U m A f U m A f A f U m C m U m U m C f A m U f A m G m G m U m G m
s i P N a 2 - M 2	19	C m A m C m C m U m A m U f G m A f A f G f A m U m U m A m U m A m A m G m A m A m
	20	U m U f C m U m U m A f U m A f A f U m C m U m U m C f A m U f A m G m G m U m G m U m G m
s i P N a 1 - M 3	21	C m C m U m A m U f G m A f A f G f A m U m U m A m U m A m A m G m A m A m
	22	U m U f C m U m U m A f U m A m A m U m C m U m U m C f A m U f A m G m G m U m G m
s i P N a 2 - M 3	23	C m A m C m C m U m A m U f G m A f A f G f A m U m U m A m U m A m A m G m A m A m
	24	U m U f C m U m U m A f U m A m A m U m C m U m U m C f A m U f A m G m G m U m G m U m G m
s i P N a 1 - M 1 S	25	C m s C m s U m A m U m G m A f A f G f A m U m U m A m U m A m A m G m A m A m
	26	U m s U f s C m U m U m A f U m A m A m U m C m U m U m C f A m U f A m G m G m s U m s G m
s i P N a 2 - M 1 S	27	C m s A m s C m C m U m A m U m G m A f A f G f A m U m U m A m U m A m A m G m A m A m
	28	U m s U f s C m U m U m A f U m A m A m U m C m U m U m C f A m U f A m G m G m U m G m s U m s G m
s i P N a 1 - M 2 S	29	C m s C m s U m A m U f G m A f A f G f A m U m U m A m U m A m A m G m A m A m
	30	U m s U f s C m U m U m A f U m A f A f U m C m U m U m C f A m U f A m G m G m s U m s G m
s i P N a 2 - M	31	C m s A m s C m C m U m A m U f G m A f A f G f A m U m U m A m U m A m A m G m A m A m

10

20

30

40

50

2 S	3 2	U m s U f s C m U m U m A f U m A f A f U m C m U m U m C f A m U f A m G m G m U m G m s U m s G m
s i P N a 1 - M 3 S	3 3	C m s C m s U m A m U f G m A f A f G f A m U m U m A m U m A m A m G m A m A m
	3 4	U m s U f s C m U m U m A f U m A m A m U m C m U m U m C f A m U f A m G m G m s U m s G m
s i P N a 2 - M 3 S	3 5	C m s A m s C m C m U m A m U f G m A f A f G f A m U m U m A m U m A m A m G m A m A m
	3 6	U m s U f s C m U m U m A f U m A m A m U m C m U m U m C f A m U f A m G m G m U m G m s U m s G m
s i P N a 1 - M 1 P 1	3 7	C m C m U m A m U m G m A f A f G f A m U m U m A m U m A m A m G m A m A m
	3 8	P 1 U m U f C m U m U m A f U m A m A m U m C m U m U m C f A m U f A m G m G m U m G m
s i P N a 2 - M 1 P 1	3 9	C m A m C m C m U m A m U m G m A f A f G f A m U m U m A m U m A m A m G m A m A m
	4 0	P 1 U m U f C m U m U m A f U m A m A m U m C m U m U m C f A m U f A m G m G m U m G m U m G m
s i P N a 1 - M 2 P 1	4 1	C m C m U m A m U f G m A f A f G f A m U m U m A m U m A m A m G m A m A m
	4 2	P 1 U m U f C m U m U m A f U m A f A f U m C m U m U m C f A m U f A m G m G m U m G m
s i P N a 2 - M 2 P 1	4 3	C m A m C m C m U m A m U f G m A f A f G f A m U m U m A m U m A m A m G m A m A m
	4 4	P 1 U m U f C m U m U m A f U m A f A f U m C m U m U m C f A m U f A m G m G m U m G m U m G m
s i P N a 1 - M 3 P 1	4 5	C m C m U m A m U f G m A f A f G f A m U m U m A m U m A m A m G m A m A m
	4 6	P 1 U m U f C m U m U m A f U m A m A m U m C m U m U m C f A m U f A m G m G m U m G m
s i P N a 2 - M 3 P 1	4 7	C m A m C m C m U m A m U f G m A f A f G f A m U m U m A m U m A m A m G m A m A m
	4 8	P 1 U m U f C m U m U m A f U m A m A m U m C m U m U m C f A m U f A m G m G m U m G m U m G m
s i P N a 1 - M 1 S P 1	4 9	C m s C m s U m A m U m G m A f A f G f A m U m U m A m U m A m A m G m A m A m
	5 0	P 1 U m s U f s C m U m U m A f U m A m A m U m C m U m U m C f A m U f A m G m G m s U m s G m
s i P N a 2 - M 1 S P 1	5 1	C m s A m s C m C m U m A m U m G m A f A f G f A m U m U m A m U m A m A m G m A m A m
	5 2	P 1 U m s U f s C m U m U m A f U m A m A m U m C m U m U m C f A m U f A m G m G m U m G m s U m s G m
s i P N a 1 - M 2 S P 1	5 3	C m s C m s U m A m U f G m A f A f G f A m U m U m A m U m A m A m G m A m A m
	5 4	P 1 U m s U f s C m U m U m A f U m A f A f U m C m U m U m C f A m U f A m G m G m s U m s G m
s i P N a 2 - M 2 S P 1	5 5	C m s A m s C m C m U m A m U f G m A f A f G f A m U m U m A m U m A m A m G m A m A m
	5 6	P 1 U m s U f s C m U m U m A f U m A f A f U m C m U m

10

20

30

40

50

		U m C f A m U f A m G m G m U m G m s U m s G m
s i P N	5 7	C m s C m s U m A m U f G m A f A f G f A m U m U m A m
a 1 - M		U m A m A m G m A m A m
3 S P 1	5 8	P 1 U m s U f s C m U m U m A f U m A m A m U m C m U m
		U m C f A m U f A m G m G m s U m s G m
s i P N	5 9	C m s A m s C m C m U m A m U f G m A f A f G f A m U m
a 2 - M		U m A m U m A m A m G m A m A m
3 S P 1	6 0	P 1 U m s U f s C m U m U m A f U m A m A m U m C m U m
		U m C f A m U f A m G m G m U m G m s U m s G m

10

20

30

40

50

【表 1 b】

本開示の第 2 の s i R N A 配列

s i R N A 番号	配列番号	配列方向 5' - 3'
s i P N b 1	6 9	G U A C A G U A C C A G A A G U U A U
	7 0	A U A A C U U C U G G U A C U G U A C U C
s i P N b 2	7 1	G A G U A C A G U A C C A G A A G U U A U
	7 2	A U A A C U U C U G G U A C U G U A C U C A U
s i P N b 1 - M 1	7 3	G m U m A m C m A m G m U f A f C f C m A m G m A m A m G m U m U m A m U m
	7 4	A m U f A m A m C m U f U m C m U m G m G m U m A m C f U m G f U m A m C m U m C m
s i P N b 2 - M 1	7 5	G m A m G m U m A m C m A m G m U f A f C f C m A m G m A m A m G m U m U m A m U m
	7 6	A m U f A m A m C m U f U m C m U m G m G m U m A m C f U m G f U m A m C m U m C m A m U m
s i P N b 1 - M 2	7 7	G m U m A m C m A f G m U f A f C f C m A m G m A m A m G m U m U m A m U m
	7 8	A m U f A m A m C m U f U m C f U f G m G m U m A m C f U m G f U m A m C m U m C m
s i P N b 2 - M 2	7 9	G m A m G m U m A m C m A f G m U f A f C f C m A m G m A m A m G m U m U m A m U m
	8 0	A m U f A m A m C m U f U m C f U f G m G m U m A m C f U m G f U m A m C m U m C m A m U m
s i P N b 1 - M 3	8 1	G m U m A m C m A f G m U f A f C f C m A m G m A m A m G m U m U m A m U m
	8 2	A m U f A m A m C m U f U m C m U m G m G m U m A m C f U m G f U m A m C m U m C m
s i P N b 2 - M 3	8 3	G m A m G m U m A m C m A f G m U f A f C f C m A m G m A m A m G m U m U m A m U m
	8 4	A m U f A m A m C m U f U m C m U m G m G m U m A m C f U m G f U m A m C m U m C m A m U m
s i P N b 1 - M 1 S	8 5	G m s U m s A m C m A m G m U f A f C f C m A m G m A m A m G m U m U m A m U m
	8 6	A m s U f s A m A m C m U f U m C m U m G m G m U m A m C f U m G f U m A m C m s U m s C m
s i P N b 2 - M 1 S	8 7	G m s A m s G m U m A m C m A m G m U f A f C f C m A m G m A m A m G m U m U m A m U m
	8 8	A m s U f s A m A m C m U f U m C m U m G m G m U m A m C f U m G f U m A m C m U m C m s A m s U m
s i P N b 1 - M 2 S	8 9	G m s U m s A m C m A f G m U f A f C f C m A m G m A m A m G m U m U m A m U m
	9 0	A m s U f s A m A m C m U f U m C f U f G m G m U m A m C f U m G f U m A m C m s U m s C m
s i P N b 2 - M 2 S	9 1	G m s A m s G m U m A m C m A f G m U f A f C f C m A m G m A m A m G m U m U m A m U m
	9 2	A m s U f s A m A m C m U f U m C f U f G m G m U m A m C f U m G f U m A m C m U m C m s A m s U m

10

20

30

40

50

s i P N b 1 - M 3 S	9 3	G m s U m s A m C m A f G m U f A f C f C m A m G m A m A m G m U m U m A m U m
	9 4	A m s U f s A m A m C m U f U m C m U m G m G m U m A m C f U m G f U m A m C m s U m s C m
s i P N b 2 - M 3 S	9 5	G m s A m s G m U m A m C m A f G m U f A f C f C m A m G m A m A m G m U m U m A m U m
	9 6	A m s U f s A m A m C m U f U m C m U m G m G m U m A m C f U m G f U m A m C m U m C m s A m s U m
s i P N b 1 - M 1 P 1	9 7	G m U m A m C m A m G m U f A f C f C m A m G m A m A m G m U m U m A m U m
	9 8	P 1 A m U f A m A m C m U f U m C m U m G m G m U m A m C f U m G f U m A m C m U m C m
s i P N b 2 - M 1 P 1	9 9	G m A m G m U m A m C m A m G m U f A f C f C m A m G m A m A m G m U m U m A m U m
	1 0 0	P 1 A m U f A m A m C m U f U m C m U m G m G m U m A m C f U m G f U m A m C m U m C m A m U m
s i P N b 1 - M 2 P 1	1 0 1	G m U m A m C m A f G m U f A f C f C m A m G m A m A m G m U m U m A m U m
	1 0 2	P 1 A m U f A m A m C m U f U m C f U f G m G m U m A m C f U m G f U m A m C m U m C m
s i P N b 2 - M 2 P 1	1 0 3	G m A m G m U m A m C m A f G m U f A f C f C m A m G m A m A m G m U m U m A m U m
	1 0 4	P 1 A m U f A m A m C m U f U m C f U f G m G m U m A m C f U m G f U m A m C m U m C m A m U m
s i P N b 1 - M 3 P 1	1 0 5	G m U m A m C m A f G m U f A f C f C m A m G m A m A m G m U m U m A m U m
	1 0 6	P 1 A m U f A m A m C m U f U m C m U m G m G m U m A m C f U m G f U m A m C m U m C m
s i P N b 2 - M 3 P 1	1 0 7	G m A m G m U m A m C m A f G m U f A f C f C m A m G m A m A m G m U m U m A m U m
	1 0 8	P 1 A m U f A m A m C m U f U m C m U m G m G m U m A m C f U m G f U m A m C m U m C m A m U m
s i P N b 1 - M 1 S P 1	1 0 9	G m s U m s A m C m A m G m U f A f C f C m A m G m A m A m G m U m U m A m U m
	1 1 0	P 1 A m s U f s A m A m C m U f U m C m U m G m G m U m A m C f U m G f U m A m C m s U m s C m
s i P N b 2 - M 1 S P 1	1 1 1	G m s A m s G m U m A m C m A m G m U f A f C f C m A m G m A m A m G m U m U m A m U m
	1 1 2	P 1 A m s U f s A m A m C m U f U m C m U m G m G m U m A m C f U m G f U m A m C m U m C m s A m s U m
s i P N b 1 - M 2 S P 1	1 1 3	G m s U m s A m C m A f G m U f A f C f C m A m G m A m A m G m U m U m A m U m
	1 1 4	P 1 A m s U f s A m A m C m U f U m C f U f G m G m U m A m C f U m G f U m A m C m s U m s C m
s i P N b 2 - M 2 S P 1	1 1 5	G m s A m s G m U m A m C m A f G m U f A f C f C m A m G m A m A m G m U m U m A m U m
	1 1 6	P 1 A m s U f s A m A m C m U f U m C f U f G m G m U m A m C f U m G f U m A m C m U m C m s A m s U m
s i P N	1 1 7	G m s U m s A m C m A f G m U f A f C f C m A m G m A

10

20

30

40

b 1 - M 3 S P 1		m A m G m U m U m A m U m
	1 1 8	P 1 A m s U f s A m A m C m U f U m C m U m G m G m U m A m C f U m G f U m A m C m s U m s C m
s i P N b 2 - M 3 S P 1	1 1 9	G m s A m s G m U m A m C m A f G m U f A f C f C m A m G m A m A m G m U m U m A m U m
	1 2 0	P 1 A m s U f s A m A m C m U f U m C m U m G m G m U m A m C f U m G f U m A m C m U m C m s A m s U m

50

【表 1 c】

本開示の第3の s i R N A 配列

s i R N A 番号	配列番号	配列方向 5' - 3'
s i P N c 1	1 2 9	C A A A C A A G C U G C A C A G A A A
	1 3 0	U U U C U G U G C A G C U U G U U U G C C
s i P N c 2	1 3 1	G G C A A A C A A G C U G C A C A G A A A
	1 3 2	U U U C U G U G C A G C U U G U U U G C C A G
s i P N c 1 - M 1	1 3 3	C m A m A m A m C m A m A f G f C f U m G m C m A m C m A m G m A m A m A m
	1 3 4	U m U f U m C m U m G f U m G m C m A m G m C m U m U f G m U f U m U m G m C m C m
s i P N c 2 - M 1	1 3 5	G m G m C m A m A m A m C m A m A f G f C f U m G m C m A m C m A m G m A m A m A m
	1 3 6	U m U f U m C m U m G f U m G m C m A m G m C m U m U f G m U f U m U m G m C m C m A m G m
s i P N c 1 - M 2	1 3 7	C m A m A m A m C f A m A f G f C f U m G m C m A m C m A m G m A m A m A m
	1 3 8	U m U f U m C m U m G f U m G f C f A m G m C m U m U f G m U f U m U m G m C m C m
s i P N c 2 - M 2	1 3 9	G m G m C m A m A m A m C f A m A f G f C f U m G m C m A m C m A m G m A m A m A m
	1 4 0	U m U f U m C m U m G f U m G f C f A m G m C m U m U f G m U f U m U m G m C m C m A m G m
s i P N c 1 - M 3	1 4 1	C m A m A m A m C f A m A f G f C f U m G m C m A m C m A m G m A m A m A m
	1 4 2	U m U f U m C m U m G f U m G m C m A m G m C m U m U f G m U f U m U m G m C m C m
s i P N c 2 - M 3	1 4 3	G m G m C m A m A m A m C f A m A f G f C f U m G m C m A m C m A m G m A m A m A m
	1 4 4	U m U f U m C m U m G f U m G m C m A m G m C m U m U f G m U f U m U m G m C m C m A m G m
s i P N c 1 - M 1 S	1 4 5	C m s A m s A m A m C m A m A f G f C f U m G m C m A m C m A m G m A m A m A m
	1 4 6	U m s U f s U m C m U m G f U m G m C m A m G m C m U m U f G m U f U m U m G m s C m s C m
s i P N c 2 - M 1 S	1 4 7	G m s G m s C m A m A m A m C m A m A f G f C f U m G m C m A m C m A m G m A m A m A m
	1 4 8	U m s U f s U m C m U m G f U m G m C m A m G m C m U m U f G m U f U m U m G m C m C m s A m s G m
s i P N c 1 - M 2 S	1 4 9	C m s A m s A m A m C f A m A f G f C f U m G m C m A m C m A m G m A m A m A m
	1 5 0	U m s U f s U m C m U m G f U m G f C f A m G m C m U m U f G m U f U m U m G m s C m s C m
s i P N c 2 - M 2 S	1 5 1	G m s G m s C m A m A m A m C f A m A f G f C f U m G m C m A m C m A m G m A m A m A m
	1 5 2	U m s U f s U m C m U m G f U m G f C f A m G m C m U m U f G m U f U m U m G m C m C m s A m s G m

10

20

30

40

50

s i P N c 1 - M 3 S	1 5 3	C m s A m s A m A m C f A m A f G f C f U m G m C m A m C m A m G m A m A m A m
	1 5 4	U m s U f s U m C m U m G f U m G m C m A m G m C m U m U f G m U f U m U m G m s C m s C m
s i P N c 2 - M 3 S	1 5 5	G m s G m s C m A m A m A m C f A m A f G f C f U m G m C m A m C m A m G m A m A m A m
	1 5 6	U m s U f s U m C m U m G f U m G m C m A m G m C m U m U f G m U f U m U m G m C m C m s A m s G m
s i P N c 1 - M 1 P 1	1 5 7	C m A m A m A m C m A m A f G f C f U m G m C m A m C m A m G m A m A m A m
	1 5 8	P 1 U m U f U m C m U m G f U m G m C m A m G m C m U m U f G m U f U m U m G m C m C m
s i P N c 2 - M 1 P 1	1 5 9	G m G m C m A m A m A m C m A m A f G f C f U m G m C m A m C m A m G m A m A m A m
	1 6 0	P 1 U m U f U m C m U m G f U m G m C m A m G m C m U m U f G m U f U m U m G m C m C m A m G m
s i P N c 1 - M 2 P 1	1 6 1	C m A m A m A m C f A m A f G f C f U m G m C m A m C m A m G m A m A m A m
	1 6 2	P 1 U m U f U m C m U m G f U m G f C f A m G m C m U m U f G m U f U m U m G m C m C m
s i P N c 2 - M 2 P 1	1 6 3	G m G m C m A m A m A m C f A m A f G f C f U m G m C m A m C m A m G m A m A m A m
	1 6 4	P 1 U m U f U m C m U m G f U m G f C f A m G m C m U m U f G m U f U m U m G m C m C m A m G m
s i P N c 1 - M 3 P 1	1 6 5	C m A m A m A m C f A m A f G f C f U m G m C m A m C m A m G m A m A m A m
	1 6 6	P 1 U m U f U m C m U m G f U m G m C m A m G m C m U m U f G m U f U m U m G m C m C m
s i P N c 2 - M 3 P 1	1 6 7	G m G m C m A m A m A m C f A m A f G f C f U m G m C m A m C m A m G m A m A m A m
	1 6 8	P 1 U m U f U m C m U m G f U m G m C m A m G m C m U m U f G m U f U m U m G m C m C m A m G m
s i P N c 1 - M 1 S P 1	1 6 9	C m s A m s A m A m C m A m A f G f C f U m G m C m A m C m A m G m A m A m A m
	1 7 0	P 1 U m s U f s U m C m U m G f U m G m C m A m G m C m U m U f G m U f U m U m G m s C m s C m
s i P N c 2 - M 1 S P 1	1 7 1	G m s G m s C m A m A m A m C m A m A f G f C f U m G m C m A m C m A m G m A m A m A m
	1 7 2	P 1 U m s U f s U m C m U m G f U m G m C m A m G m C m U m U f G m U f U m U m G m C m C m s A m s G m
s i P N c 1 - M 2 S P 1	1 7 3	C m s A m s A m A m C f A m A f G f C f U m G m C m A m C m A m G m A m A m A m
	1 7 4	P 1 U m s U f s U m C m U m G f U m G f C f A m G m C m U m U f G m U f U m U m G m s C m s C m
s i P N c 2 - M 2 S P 1	1 7 5	G m s G m s C m A m A m A m C f A m A f G f C f U m G m C m A m C m A m G m A m A m A m
	1 7 6	P 1 U m s U f s U m C m U m G f U m G f C f A m G m C m U m U f G m U f U m U m G m C m C m s A m s G m
s i P N	1 7 7	C m s A m s A m A m C f A m A f G f C f U m G m C m A

10

20

30

40

c 1 - M 3 S P 1		m C m A m G m A m A m A m
	1 7 8	P 1 U m s U f s U m C m U m G f U m G m C m A m G m C m U m U f G m U f U m U m G m s C m s C m
s i P N c 2 - M 3 S P 1	1 7 9	G m s G m s C m A m A m A m C f A m A f G f C f U m G m C m A m C m A m G m A m A m A m
	1 8 0	P 1 U m s U f s U m C m U m G f U m G m C m A m G m C m U m U f G m U f U m U m G m C m C m s A m s G m

50

【表 1 d】

本開示の第 4 の s i R N A 配列

s i R N A 番号	配列番号	配列方向 5' - 3'
s i P N d 1	1 8 9	C A A A C A A G G A C U A A U C C A A
	1 9 0	U U G G A U U A G U C C U U G U U U G G U
s i P N d 2	1 9 1	A C C A A A C A A G G A C U A A U C C A A
	1 9 2	U U G G A U U A G U C C U U G U U U G G U C U
s i P N d 1 - M 1	1 9 3	C m A m A m A m C m A m A f G f G f A m C m U m A m A m U m C m C m A m A m
	1 9 4	U m U f G m G m A m U f U m A m G m U m C m C m U m U f G m U f U m U m G m G m U m
s i P N d 2 - M 1	1 9 5	A m C m C m A m A m A m C m A m A f G f G f A m C m U m A m A m U m C m C m A m A m
	1 9 6	U m U f G m G m A m U f U m A m G m U m C m C m U m U f G m U f U m U m G m G m U m C m U m
s i P N d 1 - M 2	1 9 7	C m A m A m A m C f A m A f G f G f A m C m U m A m A m U m C m C m A m A m
	1 9 8	U m U f G m G m A m U f U m A f G f U m C m C m U m U f G m U f U m U m G m G m U m
s i P N d 2 - M 2	1 9 9	A m C m C m A m A m A m C f A m A f G f G f A m C m U m A m A m U m C m C m A m A m
	2 0 0	U m U f G m G m A m U f U m A f G f U m C m C m U m U f G m U f U m U m G m G m U m C m U m
s i P N d 1 - M 3	2 0 1	C m A m A m A m C f A m A f G f G f A m C m U m A m A m U m C m C m A m A m
	2 0 2	U m U f G m G m A m U f U m A m G m U m C m C m U m U f G m U f U m U m G m G m U m
s i P N d 2 - M 3	2 0 3	A m C m C m A m A m A m C f A m A f G f G f A m C m U m A m A m U m C m C m A m A m
	2 0 4	U m U f G m G m A m U f U m A m G m U m C m C m U m U f G m U f U m U m G m G m U m C m U m
s i P N d 1 - M 1 S	2 0 5	C m s A m s A m A m C m A m A f G f G f A m C m U m A m A m U m C m C m A m A m
	2 0 6	U m s U f s G m G m A m U f U m A m G m U m C m C m U m U f G m U f U m U m G m s G m s U m
s i P N d 2 - M 1 S	2 0 7	A m C m C m A m A m A m C m A m A f G f G f A m C m U m A m A m U m C m C m A m A m
	2 0 8	U m s U f s G m G m A m U f U m A m G m U m C m C m U m U f G m U f U m U m G m G m U m s C m s U m
s i P N d 1 - M 2 S	2 0 9	C m s A m s A m A m C f A m A f G f G f A m C m U m A m A m U m C m C m A m A m
	2 1 0	U m s U f s G m G m A m U f U m A f G f U m C m C m U m U f G m U f U m U m G m s G m s U m
s i P N d 2 - M 2 S	2 1 1	A m C m C m A m A m A m C f A m A f G f G f A m C m U m A m A m U m C m C m A m A m
	2 1 2	U m s U f s G m G m A m U f U m A f G f U m C m C m U m U f G m U f U m U m G m G m U m s C m s U m

10

20

30

40

50

s i P N d 1 - M 3 S	2 1 3	C m s A m s A m A m C f A m A f G f G f A m C m U m A m A m U m C m C m A m A m
	2 1 4	U m s U f s G m G m A m U f U m A m G m U m C m C m U m U f G m U f U m U m G m s G m s U m
s i P N d 2 - M 3 S	2 1 5	A m C m C m A m A m A m C f A m A f G f G f A m C m U m A m A m U m C m C m A m A m
	2 1 6	U m s U f s G m G m A m U f U m A m G m U m C m C m U m U f G m U f U m U m G m G m U m s C m s U m
s i P N d 1 - M 1 P 1	2 1 7	C m A m A m A m C m A m A f G f G f A m C m U m A m A m U m C m C m A m A m
	2 1 8	P 1 U m U f G m G m A m U f U m A m G m U m C m C m U m U f G m U f U m U m G m G m U m
s i P N d 2 - M 1 P 1	2 1 9	A m C m C m A m A m A m C m A m A f G f G f A m C m U m A m A m U m C m C m A m A m
	2 2 0	P 1 U m U f G m G m A m U f U m A m G m U m C m C m U m U f G m U f U m U m G m G m U m C m U m
s i P N d 1 - M 2 P 1	2 2 1	C m A m A m A m C f A m A f G f G f A m C m U m A m A m U m C m C m A m A m
	2 2 2	P 1 U m U f G m G m A m U f U m A f G f U m C m C m U m U f G m U f U m U m G m G m U m
s i P N d 2 - M 2 P 1	2 2 3	A m C m C m A m A m A m C f A m A f G f G f A m C m U m A m A m U m C m C m A m A m
	2 2 4	P 1 U m U f G m G m A m U f U m A f G f U m C m C m U m U f G m U f U m U m G m G m U m C m U m
s i P N d 1 - M 3 P 1	2 2 5	C m A m A m A m C f A m A f G f G f A m C m U m A m A m U m C m C m A m A m
	2 2 6	P 1 U m U f G m G m A m U f U m A m G m U m C m C m U m U f G m U f U m U m G m G m U m
s i P N d 2 - M 3 P 1	2 2 7	A m C m C m A m A m A m C f A m A f G f G f A m C m U m A m A m U m C m C m A m A m
	2 2 8	P 1 U m U f G m G m A m U f U m A m G m U m C m C m U m U f G m U f U m U m G m G m U m C m U m
s i P N d 1 - M 1 S P 1	2 2 9	C m s A m s A m A m C m A m A f G f G f A m C m U m A m A m U m C m C m A m A m
	2 3 0	P 1 U m s U f s G m G m A m U f U m A m G m U m C m C m U m U f G m U f U m U m G m s G m s U m
s i P N d 2 - M 1 S P 1	2 3 1	A m C m C m A m A m A m C m A m A f G f G f A m C m U m A m A m U m C m C m A m A m
	2 3 2	P 1 U m s U f s G m G m A m U f U m A m G m U m C m C m U m U f G m U f U m U m G m G m U m s C m s U m
s i P N d 1 - M 2 S P 1	2 3 3	C m s A m s A m A m C f A m A f G f G f A m C m U m A m A m U m C m C m A m A m
	2 3 4	P 1 U m s U f s G m G m A m U f U m A f G f U m C m C m U m U f G m U f U m U m G m s G m s U m
s i P N d 2 - M 2 S P 1	2 3 5	A m C m C m A m A m A m C f A m A f G f G f A m C m U m A m A m U m C m C m A m A m
	2 3 6	P 1 U m s U f s G m G m A m U f U m A f G f U m C m C m U m U f G m U f U m U m G m G m U m s C m s U m
s i P N	2 3 7	C m s A m s A m A m C f A m A f G f G f A m C m U m A

10

20

30

40

d 1 - M 3 S P 1		m A m U m C m C m A m A m
	2 3 8	P 1 U m s U f s G m G m A m U f U m A m G m U m C m C m U m U f G m U f U m U m G m s G m s U m
s i P N d 2 - M 3 S P 1	2 3 9	A m C m C m A m A m A m C f A m A f G f G f A m C m U m A m A m U m C m C m A m A m
	2 4 0	P 1 U m s U f s G m G m A m U f U m A m G m U m C m C m U m U f G m U f U m U m G m G m U m s C m s U m

ただし、大文字C、G、U、Aは、ヌクレオチドの塩基配列を表し、小文字mは、当該

50

文字mの左側に隣接する1つのヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドであることを表し、小文字fは、当該文字fの左側に隣接する1つのヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであることを表し、小文字sは、当該文字の左右の2つのヌクレオチド間がチオリン酸エステル基により結合されていることを表し、P1は、当該P1の右側に隣接する1つのヌクレオチドが5'-リン酸ヌクレオチド又は5'-リン酸アナログ修飾ヌクレオチドであることを表す。いくつかの実施形態において、P1は、特定の修飾がVP、Ps又はPであることを表し、組合せ文字VPは、当該組合せ文字VPの右側に隣接する1つのヌクレオチドがビニルリン酸エステル修飾ヌクレオチドであることを表し、組合せ文字Psは、当該組合せ文字Psの右側に隣接する1つのヌクレオチドがチオリン酸エステル修飾ヌクレオチドであることを表し、大文字Pは、当該文字Pの右側に隣接する1つのヌクレオチドが5'-リン酸ヌクレオチドであることを表す。

10

【0225】

本開示に記載されたsiRNA又はsiRNA複合体において、各隣接するヌクレオチド間がリン酸ジエステル結合又はチオリン酸ジエステル結合により結合され、リン酸ジエステル結合又はチオリン酸ジエステル結合における非架橋酸素原子又は硫黄原子は、負電荷を帯び、ヒドロキシ基又はスルフヒドリル基(Sulfhydryl group)として存在してもよく、ヒドロキシ基又はスルフヒドリル基における水素イオンは、一部又は全部がカチオンで置換されてもよい。前記カチオンは、任意のカチオン、例えば、金属カチオン、アンモニウムイオン NH_4^+ 、有機アンモニウムカチオンの1つであってもよい。溶解性の向上を考慮し、1つの実施形態において、前記カチオンは、アルカリ金属イオン、第3級アミンにより形成されたアンモニウムカチオン及び4級アンモニウムカチオンから選択される1種又は複数種である。アルカリ金属イオンは、 K^+ 及び/又は Na^+ であってもよく、第3級アミンにより形成されたカチオンは、トリエチルアミンにより形成されたアンモニウムイオン、及び/又はN,N-ジイソプロピルエチルアミンにより形成されたアンモニウムイオンであってもよい。したがって、本開示に記載されたsiRNA又はsiRNA複合体は、少なくとも一部が塩として存在してもよい。1つの態様において、リン酸ジエステル結合又はチオリン酸ジエステル結合における非架橋酸素原子又は硫黄原子は、少なくとも一部がナトリウムイオンに結合され、本開示に記載されたsiRNA又はsiRNA複合体は、ナトリウム塩又は部分ナトリウム塩として存在する。

20

【0226】

当業者であれば明らかに知っているように、対応する修飾を有するヌクレオシドモノマーを用いることにより修飾ヌクレオチド基を本開示に記載されたsiRNAに導入することができる。対応する修飾を有するヌクレオシドモノマーを調製する方法、及び修飾ヌクレオチド基をsiRNAに導入する方法も、当業者によく知られている。全ての修飾ヌクレオシドモノマーは、市販品として購入されてもよく、既知の方法により調製されてもよい。

30

【0227】

<式(308)に示されるsiRNA複合体の調製>

任意の合理的な合成経路により式(308)に示されるsiRNA複合体を調製してもよい。

40

【0228】

いくつかの実施形態において、式(308)に示されるsiRNA複合体は、以下の方法により調製することができる。当該方法は、ホスホルアミダイト固相合成の条件で、それぞれsiRNAのセンス鎖及びアンチセンス鎖のヌクレオチド種類と順序により、3'から5'に向かってヌクレオシドモノマーを順に結合し、各ヌクレオシドモノマーの結合が脱保護、カップリング、キャッピング、酸化又は硫化の4つの反応を含み、siRNAのセンス鎖及びアンチセンス鎖を単離し、アニールを行うことを含み、前記siRNAは、上記本開示のsiRNAである。

【0229】

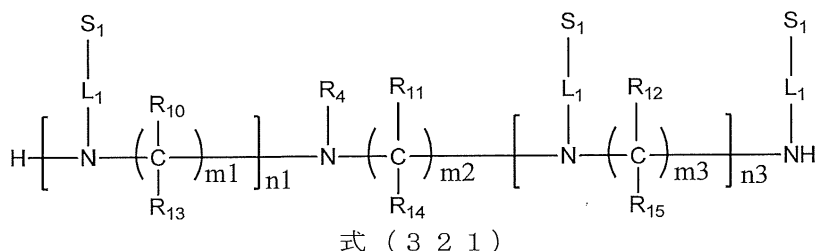
また、当該方法は、カップリング反応条件及びカップリング試薬の存在下で、式(32

50

1) に示される化合物を、ヌクレオシドモノマー又は固相担体に結合されたヌクレオチド配列と接触させ、式(321)に示される化合物をカップリング反応させてヌクレオチド配列に結合することをさらに含む。以下に、式(321)に示される化合物は、複合分子とも呼ばれる。

【0230】

【化25】



10

式中、

R_4 は、式(308)に示される化合物におけるNuに示されるsiRNAに結合可能な基である。いくつかの実施形態において、 R_4 は、共有結合によりNuに示されるsiRNAに結合可能な基である。いくつかの実施形態において、 R_4 は、反応を経てリン酸ジエステル結合によりNuに示されるsiRNAの任意の官能基に複合可能な基であり、

【0231】

20

各 S_1 は、独立して M_1 において全ての活性ヒドロキシ基が $YCOO^-$ 基で置換された基であり、各Yは、メチル基、トリフルオロメチル基、ジフルオロメチル基、フルオロメチル基、トリクロロメチル基、ジクロロメチル基、クロロメチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、フェニル基、ハロフェニル基及びアルキルフェニル基から独立して選択される1つであり、いくつかの実施形態において、Yはメチル基である。

【0232】

n_1 、 n_3 、 m_1 、 m_2 、 m_3 、 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 、 R_{15} 、 L_1 、 M_1 それぞれの定義と選択可能な範囲は、前述したとおりである。

【0233】

R_4 は、窒素含有骨格上のN原子との結合を実現し、式(308)に示されるsiRNA複合体の合成に適切な反応部位を提供するために選択される。いくつかの実施形態において、 R_4 には、 R_2 リンカー基又は保護された R_2 リンカー基、及び反応させることによりsiRNAとA59に示される構造を形成することができる官能基が含まれる。

30

【0234】

いくつかの実施形態において、 R_4 は、Nuに示されるsiRNA又はヌクレオシドモノマー上の基と亜リン酸エステルを形成することができる第1の官能基と、ヒドロキシ基又はアミノ基と反応させて共有結合を形成することができる第2の官能基又は前記共有結合により結合された固相担体とを含む。いくつかの実施形態において、前記第1の官能基は、ホスホルアミダイト、ヒドロキシ基又は保護されたヒドロキシ基である。いくつかの実施形態において、前記第2の官能基は、ホスホルアミダイト、カルボキシ基又はカルボン酸塩である。いくつかの実施形態において、前記第2の官能基は、共有結合を介して分子の他の部分に結合される固相担体であり、前記共有結合は、ヒドロキシ基又はアミノ基により形成されている。いくつかの実施形態において、前記固相担体は、リン酸エステル結合、カルボン酸エステル結合又はアミド結合を介して結合されている。いくつかの実施形態において、前記固相担体は樹脂である。

40

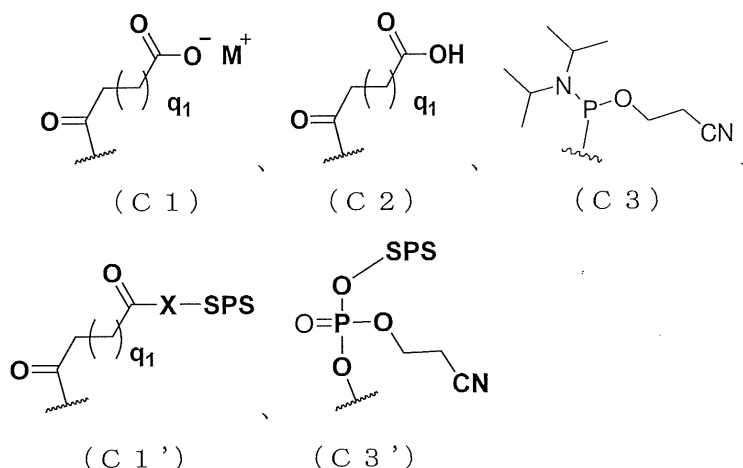
【0235】

いくつかの実施形態において、前記第1の官能基は、ヒドロキシ基、 $-OR_k$ 又は式(C3)に示される基を含み、前記第2の官能基は、式(C1)、(C2)、(C3)、(C1')又は(C3')に示される構造を含む。

【0236】

50

【化 2 6】



式中、 q_1 は1～4の整数であり、XはO又はNHであり、 M^+ はカチオンであり、 R_k はヒドロキシ保護基であり、SPSは固相担体を表し、
 ~~~~~

は、基が共有結合的に結合する部位を表す。

## 【0237】

いくつかの実施形態において、前記第1の官能基は、式(C3)に示されるように、ホスホルアミダイト基を含み、当該ホスホルアミダイト基は、ヌクレオチド上の任意位置のヒドロキシ基、例えば、2'位のヒドロキシ基又は3'位のヒドロキシ基とカップリング反応させて亜リン酸エステルを形成し、酸化又は硫化されて式A59に示されるリン酸ジエステル結合又はチオリン酸エステル結合を形成し、複合分子をsiRNAに複合することができる。この場合、前記第2の官能基が存在しなくても、式(321)に示される化合物は、ヌクレオチドに複合することができ、式(308)に示されるsiRNA複合体の取得に影響することはない。この場合に、ホスホルアミダイト固相合成等の方法によりsiRNAのセンス鎖又はアンチセンス鎖を得た後、式(321)に示される化合物と、ヌクレオチド配列において末端ヌクレオチド上のヒドロキシ基を反応させ、後の酸化又は硫化過程においてリン酸ジエステル結合による結合又はチオリン酸エステル結合を形成し、式(321)に示される化合物をsiRNAに複合させる。

## 【0238】

いくつかの実施形態において、前記第1の官能基は、保護されたヒドロキシ基を含む。いくつかの実施形態において、前記第2の官能基は、固相担体と反応できる基を含み、前記反応により固相担体を含む複合分子を提供する。いくつかの実施形態において、前記第2の官能基は、式(C1)、(C2)又は(C3)に示されるように、カルボキシ基、カルボン酸塩又はホスホルアミダイトを含む。前記第2の官能基がカルボキシ基又はカルボン酸塩を含む場合、式(321)に示される化合物と固相担体、例えば、樹脂におけるヒドロキシ基又はアミノ基をエステル化反応又はアミド化反応させ、カルボン酸エステル結合により結合された、固相担体を含む複合分子を形成する。前記第2の官能基がホスホルアミダイト官能基を含む場合、式(321)に示される化合物と汎用の固相担体、例えば、樹脂におけるヒドロキシ基をカップリング反応させ、酸化されてリン酸ジエステル結合により結合された、固相担体を含む複合分子を形成する。その後、上記固相担体が結合された生成物を出発とし、ホスホルアミダイト固相合成方法に従いヌクレオシドモノマーを順に結合し、複合基が結合されたsiRNAのセンス鎖又はアンチセンス鎖を得る。ホスホルアミダイト固相合成過程において、前記第1の官能基は、脱保護され、その後、カップリング反応条件下でヌクレオシドモノマーにおけるホスホルアミダイト基とカップリングさせる。

## 【0239】

いくつかの実施形態において、前記第1の官能基は、ヒドロキシ基又は保護されたヒドロキシ基を含み、前記第2の官能基は、式(C1')又は(C3')に示されるように、カルボン酸エステル結合により結合された固相担体又はアミド結合により結合された固相担体、又はリン酸エステル結合により結合された固相担体を含む。この場合、出発として固相担体の代わりに式(321)に示される化合物を用い、ホスホルアミダイト固相合成方法に従いヌクレオシドモノマーを順に結合し、複合基が結合されたsiRNAのセンス鎖又はアンチセンス鎖を得る。

【0240】

いくつかの実施形態において、カルボン酸塩は、 $-COO^-M^+$ で表されてもよく、ここで、 $M^+$ はカチオンであり、例えば、金属カチオン、アンモニウムカチオン $NH_4^+$ 、有機アンモニウムカチオンから選択される1つである。1つの実施形態において、前記金属イオンは、アルカリ金属イオンから選択される1つであり、例えば、 $K^+$ 又は $Na^+$ である。溶解性を向上させ、反応をスムーズに行うことを考慮して、いくつかの実施形態において、有機アンモニウムイオンは、第3級アミンにより形成されたアンモニウムカチオン又は4級アンモニウムカチオン、例えば、トリエチルアミンにより形成されたアンモニウムイオン又はN,N-ジイソプロピルエチルアミンにより形成されたアンモニウムイオンである。いくつかの実施形態において、カルボン酸塩は、トリエチルアミンカルボン酸塩又はN,N-ジイソプロピルエチルアミンカルボン酸塩である。

【0241】

いくつかの実施形態において、 $R_4$ は、式(B9)、(B10)、(B9')、(B10')、(B11)、(B12)、(B11')又は(B12')に示される構造を含む。

【0242】

10

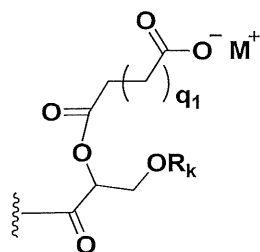
20

30

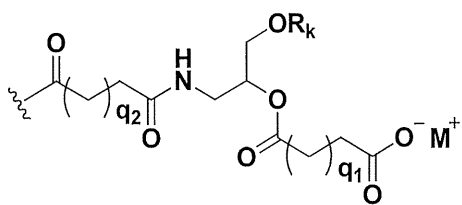
40

50

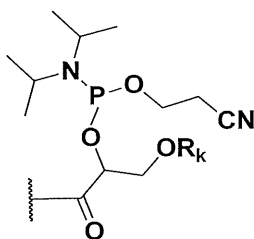
## 【化 2 7】



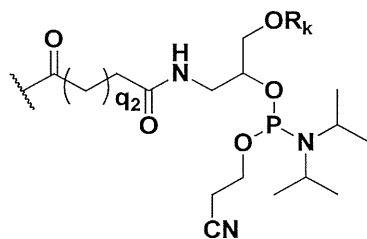
(B 9)



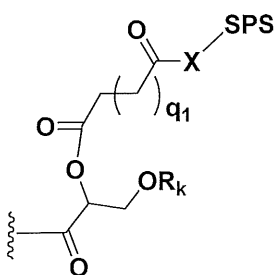
(B 10)



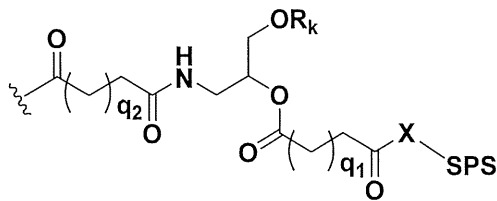
(B 9')



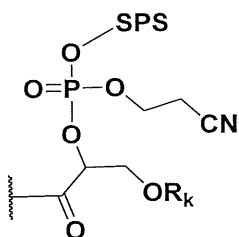
(B 10')



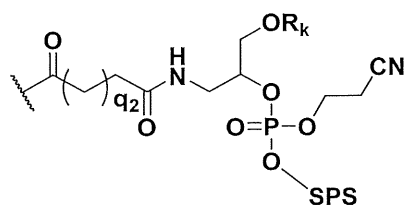
(B 11)



(B 12)



(B 11')



(B 12')

式中、 $q_1$  は 1～4 の整数であり、 $q_2$  は 1～10 の整数であり、 $X$  は  $O$  又は  $NH$  であり、 $M^+$  はカチオンであり、 $R_k$  はヒドロキシ保護基であり、 $SPS$  は固相担体を表し、  


は、基が共有結合的に結合する部位を表す。いくつかの実施形態において、 $q_1$  は 1 又は 2 である。いくつかの実施形態において、 $q_2$  は 1～5 の整数である。いくつかの実施形態において、 $R_k$  は、式 (B 9) 又は (B 10) に示される構造を含む。いくつかの実施形態において、 $R_k$  は、式 (B 11) 又は (B 12) に示される構造を含む。

## 【0 2 4 3】

いくつかの実施形態において、 $R_k$  は、 $Tr$  (トリチル基)、 $MMTr$  (4-メトキシトリチル基)、 $DMTr$  (4, 4'-ビスメトキシトリチル基)、 $TMTTr$  (4, 4', 4'-トリメトキシトリチル基) の 1 又は複数である。いくつかの実施形態において、 $R_k$  は、 $DMTr$ 、即ち、4, 4'-ビスメトキシトリチル (4, 4'-dimethoxytrityl) であってもよい。

## 【0 2 4 4】

$L_1$  の定義は、前述したとおりである。

## 【0245】

いくつかの実施形態において、 $L_1$ は、 $M_1$ 標的基を窒素含有骨格上のN原子に結合し、式(308)に示されるsiRNA複合体に肝標的機能を提供するために用いられる。いくつかの実施形態において、 $L_1$ は、 $A_1 \sim A_{26}$ のいずれか1つ又はその組合せを含む。

## 【0246】

上記記載により、当業者であれば容易に理解できるように、本分野で公知のホスホルアミダイト固相合成方法と比較して、上記第1の官能基及び任意の第2の官能基により、複合分子がヌクレオチド配列の任意の可能な位置、例えば、ヌクレオチド配列の端部、ヌクレオチド配列の末端に結合された、式(308)に示されるsiRNA複合体を得ることができる。これに応じて、特に説明がない限り、以下に複合体及び／又は複合分子の調製に関する記載において、「脱保護」、「カップリング」、「キャッピング」、「酸化」、「硫化」等の反応に言及する場合、本分野で公知のホスホルアミダイト核酸の固相合成方法に係る反応条件と試薬もまた同様にこれらの反応に適用されると理解すべきである。例示的な反応条件と試薬は、以下に詳細に説明する。

## 【0247】

いくつかの実施形態において、各 $S_1$ は、独立して $M_1$ である。いくつかの実施形態において、各 $S_1$ は、独立して $M_1$ において少なくとも1つの活性ヒドロキシ基がヒドロキシ保護基で保護された基である。いくつかの実施形態において、各 $S_1$ は、独立して $M_1$ に存在する活性ヒドロキシ基が全てヒドロキシ保護基で保護された基である。いくつかの実施形態において、当業者に既知のあらゆるヒドロキシ保護基を、 $M_1$ における活性ヒドロキシ基を保護するために用いることができる。いくつかの実施形態において、保護されたヒドロキシ基は、式 $YCOO-$ で表されてもよく、各Yは、独立して $C_1-C_{10}$ アルキル基及び $C_6-C_{10}$ アリール基からなる群から選択され、前記 $C_1-C_{10}$ アルキル基及び $C_6-C_{10}$ アリール基は、1又は複数の置換基で任意に置換され、前記置換基は、ハロゲン及び $C_1-C_6$ アルキル基からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、各Yは、独立して、メチル基、トリフルオロメチル基、ジフルオロメチル基、モノフルオロメチル基、トリクロロメチル基、ジクロロメチル基、クロロメチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、フェニル基、ハロフェニル基及び $C_1-C_6$ アルキルフェニル基からなる群から選択される。

## 【0248】

いくつかの実施形態において、各 $S_1$ は、それぞれ独立して式 $A_{46} \sim A_{54}$ からなる群から選択される。

## 【0249】

10

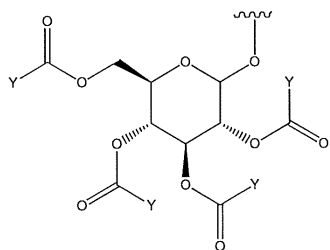
20

30

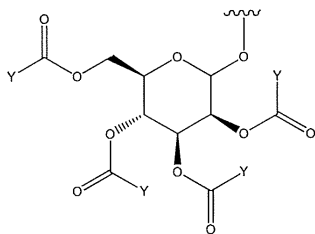
40

50

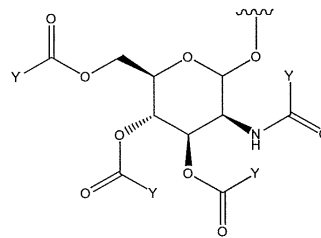
## 【化 2 8】



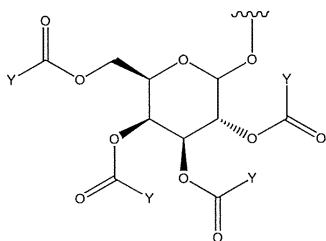
(A 4 6)



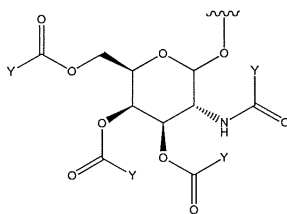
(A 4 7)



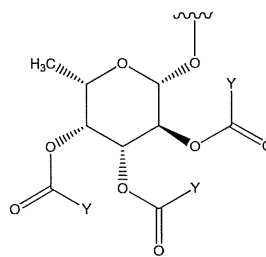
(A 4 8)



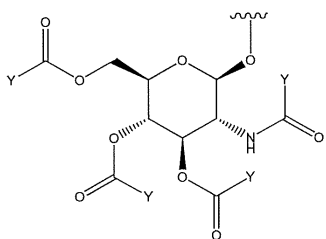
(A 4 9)



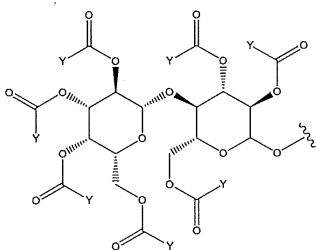
(A 5 0)



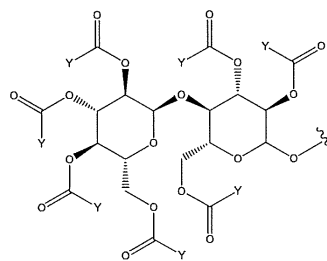
(A 5 1)



(A 5 2)



(A 5 3)



(A 5 4)

## 【0 2 5 0】

いくつかの実施形態において、 $S_1$ は式A 4 9又はA 5 0である。

## 【0 2 5 1】

いくつかの実施形態において、各Yは、メチル基、トリフルオロメチル基、ジフルオロメチル基、フルオロメチル基、トリクロロメチル基、ジクロロメチル基、クロロメチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、フェニル基、ハロフェニル基及びアルキルフェニル基から独立して選択される1つであり、いくつかの実施形態において、Yはメチル基である。

## 【0 2 5 2】

前述したように、式(308)に示されるsiRNA複合体の調製方法は、siRNAの他方の鎖を合成し(例えば、上記工程で、複合分子が結合されたsiRNAのセンス鎖を合成した場合、固相合成方法に従いsiRNAのアンチセンス鎖を合成することをさらに含み、その逆も同様である)、センス鎖及びアンチセンス鎖を単離し、かつ、アニールを行う工程をさらに含む。具体的には、単離工程において、ヌクレオチド配列及び／又は複合分子に結合される固相担体が切断されるとともに、必要な保護基が除去され(この場合、式(321)に示される化合物における各 $S_1$ 基が、対応する $M_1$ 標的基に変換される)、複合分子が結合されたsiRNAのセンス鎖(又はアンチセンス鎖)及び対応するアンチセンス鎖(又はセンス鎖)が得られ、センス鎖とアンチセンス鎖をアニールして二本鎖RNA構造を形成し、式(308)に示されるsiRNA複合体を得る。

## 【0 2 5 3】

いくつかの実施形態において、式(308)に示されるsiRNA複合体の調製方法は、カップリング反応条件及びカップリング試薬の存在下で、式(321)に示される化合物をセンス鎖又はアンチセンス鎖の3'端の1番目のヌクレオシドモノマーと接触させ、式

10

20

30

40

50

(321) に示される化合物を配列における 1 番目のヌクレオチドに結合させ、ホスホルアミダイト固相合成の条件で、所望のセンス鎖又はアンチセンス鎖のヌクレオチドの種類と順序により、3' から 5' に向かってヌクレオシドモノマーを順に結合し、s i R N A のセンス鎖又はアンチセンス鎖を合成する工程であって、式 (321) に示される化合物は、 $R_4$  に、保護されたヒドロキシ基を含む第 1 の官能基、及び式 (C1') 又は (C3') に示される構造を有する第 2 の官能基が含まれる化合物であり、1 番目のヌクレオシドモノマーと結合する前に、式 (321) に示される化合物を脱保護し、各ヌクレオシドモノマーの結合が脱保護、カップリング、キャッピング、酸化又は硫化の 4 つの反応を含み、複合基が結合された核酸のセンス鎖又はアンチセンス鎖を得る工程；ホスホルアミダイト固相合成の条件で、アンチセンス鎖又はセンス鎖のヌクレオチドの種類と順序により、3' から 5' に向かってヌクレオシドモノマーを順に結合し、核酸のアンチセンス鎖又はセンス鎖を合成し、各ヌクレオシドモノマーの結合が脱保護、カップリング、キャッピング、酸化又は硫化の 4 つの反応を含み、保護基を除去して固相担体から切断し、単離精製してセンス鎖及びアンチセンス鎖を得、アニールを行う工程を含む。

#### 【0254】

いくつかの実施形態において、式 (308) に示される s i R N A 複合体の調製方法は、当該二本鎖 s i R N A におけるセンス鎖又はアンチセンス鎖のヌクレオチドの種類と順序により、3' から 5' に向かってヌクレオシドモノマーを順に結合し、センス鎖及びアンチセンス鎖を合成し、各ヌクレオシドモノマーの結合が脱保護、カップリング、キャッピング、酸化又は硫化の 4 つの反応を含み、固相担体に結合されたセンス鎖、及び固相担体に結合されたアンチセンス鎖を得る工程；カップリング反応条件及びカップリング試薬の存在下で、式 (321) に示される化合物を、固相担体に結合されたセンス鎖又は固相担体に結合されたアンチセンス鎖と接触させ、 $R_4$  にホスホルアミダイト基である第 1 の官能基が含まれる式 (321) に示される化合物をセンス鎖又はアンチセンス鎖に結合させ、保護基を除去して固相担体から切断し、それぞれ単離精製し、複合基が結合された s i R N A のセンス鎖又はアンチセンス鎖を得、アニールを行う工程を含む。

#### 【0255】

いくつかの実施形態において、式 A59 における P 原子は、s i R N A におけるセンス鎖の 3' 末端に結合され、式 (308) に示される s i R N A 複合体の調製方法は、

(1) 上記式 (321) に示される化合物 (式 (321) に示される化合物は、 $R_4$  に、保護されたヒドロキシ基  $OR_k$  を含む第 1 の官能基、及び式 (C1') 又は (C3') に示される構造を有する第 2 の官能基が含まれる化合物である) におけるヒドロキシ保護基  $R_k$  を除去し、カップリング反応条件及びカップリング試薬の存在下で、脱保護された生成物をヌクレオシドモノマーと接触させ、複合分子により固相担体に結合されるヌクレオシドモノマーを得ること、

(2) 当該複合分子により固相担体に結合されるヌクレオシドモノマーを出発とし、3' - 5' の方向に、ホスホルアミダイト固相合成方法により s i R N A のセンス鎖を合成すること、

(3) ホスホルアミダイト固相合成方法により、s i R N A のアンチセンス鎖を合成すること、

(4) s i R N A のセンス鎖及びアンチセンス鎖を単離してアニールし、式 (308) に示される s i R N A 複合体を得ることを含む。

#### 【0256】

工程 (1) において、式 (321) に示される化合物における保護基  $R_k$  を除去する方法は、脱保護条件で、式 (321) に示される化合物を脱保護試薬と接触させることを含む。脱保護条件は、温度が 0 ~ 50℃、いくつかの実施形態では 15 ~ 35℃であり、反応時間が 30 ~ 300 秒、いくつかの実施形態では 50 ~ 150 秒であり、脱保護試薬は、トリフルオロ酢酸、トリクロロ酢酸、ジクロロ酢酸、クロロ酢酸から選択される 1 種又は複数種であってもよく、いくつかの実施形態ではジクロロ酢酸である。脱保護試薬と式 (321) に示される化合物とのモル比は 10 : 1 ~ 1000 : 1 であり、いくつかの実

施形態では50:1~500:1である。

【0257】

前記カップリング反応条件とカップリング試薬としては、上記カップリング反応に適した任意の条件と試薬を用いてもよい。いくつかの実施形態において、採用される固相合成方法におけるカップリング反応と同じ条件と試薬を用いてもよい。

【0258】

いくつかの実施形態において、前記カップリング反応の条件として、反応温度は0~50℃、いくつかの実施形態では15~35℃である。式(321)に示される化合物とヌクレオシドモノマーとのモル比は1:1~1:50であり、いくつかの実施形態では1:2~1:5である。式(321)に示される化合物とカップリング試薬とのモル比は1:1~1:50であってもよく、いくつかの実施形態では1:3~1:10であり、反応時間は200~3000秒、いくつかの実施形態では500~1500秒である。カップリング試薬は、1H-テトラゾール、5-エチルチオ1H-テトラゾール、5-ベンジルチオ1H-テトラゾールから選択される1種又は複数種であり、いくつかの実施形態では5-エチルチオ1H-テトラゾールである。前記カップリング反応は、有機溶剤で行われてもよく、前記有機溶剤は、無水アセトニトリル、無水DMF、無水ジクロロメタンから選択される1種又は複数種であり、いくつかの実施形態では無水アセトニトリルである。式(321)に示される化合物に対して、前記有機溶剤の用量は3~50L/mol、いくつかの実施形態では5~20L/molである。

【0259】

工程(2)において、ホスホルアミダイト核酸固相合成方法により、上記工程で調製された複合分子により固相担体に結合されるヌクレオシドモノマーを出発とし、3'-5'の方向に、siRNA複合体のセンス鎖SSを合成する。この場合、複合基は、得られたセンス鎖の3'末端に結合される。

【0260】

工程(2)及び(3)における前記固相合成の他の条件としては、ヌクレオシドモノマーの脱保護条件、脱保護試薬の種類と用量、カップリング反応条件、カップリング試薬の種類と用量、カップリング反応の条件、カップリング試薬の種類と用量、酸化反応条件、酸化試薬の種類と用量、硫化反応条件、硫化試薬の種類と用量を含み、本分野で通常用いられる各種の試薬、用量及び条件を採用する。

【0261】

例えば、いくつかの実施形態において、工程(2)及び(3)において、前記固相合成では、以下の条件を用いてもよい。

【0262】

ヌクレオシドモノマーの脱保護条件としては、温度は0~50℃、いくつかの実施形態では15~35℃であり、反応時間は30~300秒、いくつかの実施形態では50~150秒であり、脱保護試薬は、トリフルオロ酢酸、トリクロロ酢酸、ジクロロ酢酸、クロロ酢酸から選択される1種又は複数種であってもよく、いくつかの実施形態ではジクロロ酢酸である。脱保護試薬と固相担体における4, 4'-ジメトキシトリチル保護基とのモル比は2:1~100:1であってもよく、いくつかの実施形態では3:1~50:1である。

【0263】

カップリング反応条件としては、温度は0~50℃、いくつかの実施形態では15~35℃であり、固相担体に結合される核酸配列とヌクレオシドモノマーとのモル比は1:1~1:50であってもよく、いくつかの実施形態では1:5~1:15であり、固相担体に結合される核酸配列とカップリング試薬とのモル比は1:1~1:100、いくつかの実施形態では1:50~1:80であり、反応時間とカップリング試薬の選択は、前記と同じである。

【0264】

カップリング反応条件としては、温度は0~50℃、いくつかの実施形態では15~3

10

20

30

40

50

5℃であり、反応時間は5～500秒、いくつかの実施形態では10～100秒であり、キャッピング試薬の選択は、前記と同じである。キャッピング試薬の総量と固相担体に結合される核酸配列とのモル比は1：100～100：1、いくつかの実施形態では1：10～10：1である。キャッピング試薬として等モル量の酢酸無水物とN-メチルイミダゾールを用いる場合、酢酸無水物、N-メチルイミダゾール、固相担体に結合される核酸配列のモル比は、1：1：10～10：10：1であってもよく、いくつかの実施形態では1：1：2～2：2：1である。

#### 【0265】

酸化反応条件としては、温度は0～50℃、いくつかの実施形態では15～35℃であり、反応時間は1～100秒、いくつかの実施形態では5～50秒であり、酸化試薬は、いくつかの実施形態ではヨウ素である（いくつかの実施形態ではヨウ素水として提供する）。酸化試薬と、カップリング工程において固相担体に結合される核酸配列とのモル比は、1：1～100：1であってもよく、いくつかの実施形態では5：1～50：1である。いくつかの実施形態では、前記酸化反応は、テトラヒドロフラン：水：ピリジン＝3：1：1～1：1：3の混合溶剤で行われる。硫化反応条件としては、温度は0～50℃、いくつかの実施形態では15～35℃であり、反応時間は50～2000秒、いくつかの実施形態では100～1000秒であり、硫化試薬は、いくつかの実施形態ではキサンタンヒドリドである。硫化試薬と、カップリング工程において固相担体に結合される核酸配列とのモル比は10：1～1000：1であり、いくつかの実施形態では10：1～500：1である。いくつかの実施形態では、前記硫化反応は、アセトニトリル：ピリジン＝1：3～3：1の混合溶剤で行われる。

#### 【0266】

全てのヌクレオシドモノマーを結合した後、アニールする前に、当該方法は、siRNAのセンス鎖及びアンチセンス鎖を単離することをさらに含む。単離方法は、当業者に公知であり、一般的に、合成されたヌクレオチド配列を固相担体から切断し、塩基上、リン酸基上及びリガンド上の保護基を除去し、精製し脱塩することを含む。

#### 【0267】

合成されたヌクレオチド配列を固相担体から切断し、塩基上、リン酸基上及びリガンド上の保護基を除去するには、siRNA合成において通常の切断と脱保護方法により行われてもよい。例えば、得られた固相担体が結合されたヌクレオチド配列を濃アンモニア水と接触させ、脱保護過程において、A46～A54基の保護基YCOO-をヒドロキシ基に変換させ、S<sub>1</sub>基を対応するM<sub>1</sub>基に変換させ、式(308)に示されるsiRNA複合体を生成する。ここで、前記濃アンモニア水は、25～30重量%のアンモニア水であってもよく、濃アンモニア水の用量は、目的とするsiRNA配列に対して0.2ml/μmol～0.8ml/μmolであってもよい。

#### 【0268】

合成されたヌクレオチド配列に少なくとも1つの2'-TBDMS保護がある場合、前記方法は、固相担体が除去されたヌクレオチド配列をトリエチルアミン三フッ化水素酸塩と接触させることにより、当該2'-TBDMS保護を除去することをさらに含む。この場合、得られた目的とするsiRNA配列における対応するヌクレオチドには、遊離の2'-ヒドロキシ基を有する。純粋なトリエチルアミン三フッ化水素酸塩の用量は、目的とするsiRNA配列に対して0.4ml/μmol～1.0ml/μmolであってもよい。このように式(308)に示されるsiRNA複合体を得ることができる。

#### 【0269】

精製及び脱塩する方法は、当業者によく知られている。例えば、分取用イオンクロマトグラフィー精製カラムを用いて、NaBr又はNaClの勾配溶出によって、核酸の精製を完了し、生成物を回収して合わせた後、逆相クロマトグラフィー精製カラムにより脱塩することができる。

#### 【0270】

このように得られた式(308)に示されるsiRNA複合体において、ヌクレオチド

間のリン酸ジエステル結合又はチオリン酸ジエステル結合における非架橋酸素原子又は硫黄原子は、基本的にナトリウムイオンに結合されており、式（308）に示される s i R N A 複合体は、基本的にナトリウム塩として存在する。よく知られたイオン交換方法により、水素イオン及び／又は他のカチオンで前記ナトリウムイオンを置換し、他の形式の式（308）に示される s i R N A 複合体を得ることができる。前記カチオンは、前述したとおりである。

#### 【0271】

合成過程において、常に核酸配列の純度と分子量を検出し、合成品質をよりよく制御することができる。このような検出方法は、当業者に公知である。例えば、イオン交換クロマトグラフィーにより核酸純度を検出し、液体クロマトグラフィータンデム質量分析（L C - M S）により分子量を測定することができる。

#### 【0272】

アニール方法も、当業者によく知られているものである。例えば、簡単に合成されたセンス鎖（S 鎖）とアンチセンス鎖（A S 鎖）を等モル比で注射用水に混合して 70 ～ 95 °C に加熱し、その後室温で冷却し、水素結合により二本鎖構造を形成させることができる。このように式（308）に示される s i R N A 複合体を得ることができる。

#### 【0273】

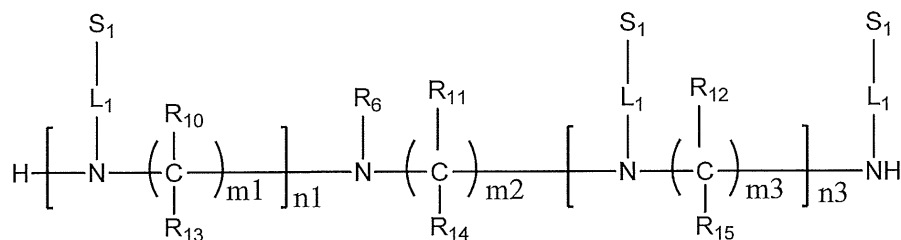
前記複合体を得た後、いくつかの実施形態において、例えば、液体クロマトグラフィータンデム質量分析等の方法を用いて、分子量検出等により合成された式（308）に示される s i R N A 複合体の特徴を明らかにし、合成された s i R N A 複合体が、目的設計の式（308）に示される s i R N A 複合体であるとともに、合成された s i R N A の配列が、所望の s i R N A の配列、例えば表 1 a ～ 表 1 d に示される配列の 1 つであると確認することもできる。

#### 【0274】

式（321）に示される化合物は、有機溶剤において、エステル化反応条件下及び塩基とエステル化触媒の存在下で、式（313）に示される化合物を環状酸無水物と接触させ、イオン交換を行い、単離して式（321）に示される化合物を得ることを含む調製方法により得ることができる。

#### 【0275】

#### 【化29】



式（313）

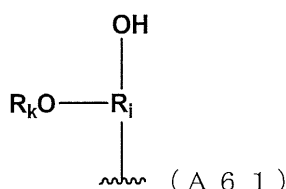
式中、n1、n3、m1、m2、m3、R10、R11、R12、R13、R14、R15、L1、S1それぞれの定義と選択可能な範囲は、前述したとおりであり、

#### 【0276】

R6は、式（321）におけるR4を提供する基である。いくつかの実施形態において、R6は、式（A61）に示される構造を有する。

#### 【0277】

#### 【化30】



式中、 $R_i$ は、窒素含有骨格上のN原子との結合を実現できる、 $R_kO$ と結合して1つの遊離ヒドロキシ基が結合されている任意の基であり、 $R_k$ はヒドロキシ保護基である。この場合、 $R_4$ にヒドロキシ保護基としての第1の官能基と第2の官能基が含まれ、前記第2の官能基が式(C1)又は(C2)に示される構造を含む式(321)に示される化合物が得られる。

【0278】

前記エステル化反応条件としては、反応温度は $0 \sim 100^{\circ}\text{C}$ であり、反応時間は $8 \sim 48$ 時間であり、いくつかの実施形態において、前記エステル化反応条件としては、反応温度は $10 \sim 40^{\circ}\text{C}$ であり、反応時間は $20 \sim 30$ 時間である。

【0279】

いくつかの実施形態において、前記有機溶剤は、エポキシ類溶剤、エーテル類溶剤、ハロゲン化アルキル類溶剤、ジメチルスルホキシド、N、N-ジメチルホルムアミド及びN、N-ジイソプロピルエチルアミンの1種又は複数種を含む。いくつかの実施形態において、前記エポキシ類溶剤は、ジオキサン及び／又はテトラヒドロフランであり、前記エーテル類溶剤は、エチルエーテル及び／又はメチル tert-ブチルエーテルであり、前記ハロゲン化アルキル類溶剤は、ジクロロメタン、トリクロロメタン及び1,2-ジクロロエタンの1種又は複数種である。いくつかの実施形態において、前記有機溶剤は、ジクロロメタンである。前記式(313)に示される化合物に対して、前記有機溶剤の用量が $3 \sim 50 \text{ L/mol}$ であり、いくつかの実施形態において、 $5 \sim 20 \text{ L/mol}$ である。

【0280】

いくつかの実施形態において、前記環状酸無水物は、コハク酸無水物、グルタル酸無水物、アジピン酸無水物又はピメリン酸無水物の1つであり、いくつかの実施形態において、コハク酸無水物である。前記環状酸無水物と前記式(313)に示される化合物とのモル比が $1:1 \sim 10:1$ であり、いくつかの実施形態において、 $2:1 \sim 5:1$ である。

【0281】

前記エステル化触媒は、当該エステル化反応を触媒する任意の触媒であってもよく、例えば、当該触媒は、4-ジメチルアミノピリジンであってもよい。前記触媒と式(313)に示される化合物とのモル比が $1:1 \sim 10:1$ であり、いくつかの実施形態において、 $2:1 \sim 5:1$ である。

【0282】

いくつかの実施形態において、前記塩基は、任意の無機塩基、有機塩基又はこれらの組合せであってもよい。溶解性及び生成物の安定性を考慮すると、前記塩基は、例えば、第3級アミンであってもよい。いくつかの実施形態において、前記第3級アミンは、トリエチルアミン又はN、N-ジイソプロピルエチルアミンである。前記第3級アミンと式(313)に示される化合物とのモル比は $1:1 \sim 20:1$ であり、いくつかの実施形態において、 $3:1 \sim 10:1$ である。

【0283】

前記イオン交換作用は、式(321)に示される化合物を所望のカルボン酸又はカルボン酸塩の形式に変換することであり、イオン交換方法は、当業者に公知であり、適切なイオン交換溶液と交換条件を用い、 $M^+$ カチオンを有する複合分子を得ることができ、ここでは詳しい説明を省略する。いくつかの実施形態において、前記イオン交換反応は、トリエチルアミンリン酸塩溶液を用いて行われ、前記トリエチルアミンリン酸塩溶液の濃度は $0.2 \sim 0.8 \text{ M}$ であり、いくつかの実施形態においては、前記トリエチルアミンリン酸塩溶液の濃度は $0.4 \sim 0.6 \text{ M}$ であり、式(313)に示される化合物に対して、前記トリエチルアミンリン酸塩溶液の用量は $3 \sim 6 \text{ L/mol}$ であり、更なる実施形態においては $4 \sim 5 \text{ L/mol}$ である。

【0284】

任意の適切な単離方法によって、反応混合物から式(321)に示される化合物を単離することができる。いくつかの実施形態において、溶剤を蒸発除去した後、クロマトグラフィー方法により式(321)に示される化合物を単離することができ、例えば、(1)

10

20

30

40

50

順相精製シリカゲル：200～300メッシュのシリカゲル充填剤を、1wt%トリエチルアミンを含むジクロロメタン：メタノール＝100：18～100：20で勾配溶出すること、又は、(2)逆相精製：C18、C8逆相充填剤を、メタノール：アセトニトリル＝0.1：1～1：0.1で勾配溶出することという2つのクロマトグラフィー条件で単離することができる。いくつかの実施形態において、溶剤を直接除去して式(321)に示される化合物の粗製品を得ることができ、当該粗製品は、そのまま後の反応に用いることができる。

【0285】

いくつかの実施形態において、式(321)に示される化合物の調製方法は、縮合反応条件下で、有機溶剤において、縮合剤、縮合触媒及び第3級アミンの存在下で、上記イオン交換反応により得られた生成物を、さらにアミノ基又はヒドロキシ基を含む固相担体と接触させることをさらに含む。この場合、 $R_4$ に第1の官能基及び第2の官能基が含まれ、第1の官能基がヒドロキシ保護基を含み、第2の官能基が式(C1')に示される構造を含む式(321)に示される化合物が得られる。

【0286】

前記固相担体は、siRNAの固相合成に用いられる担体の1つであり、そのうちのいくつかは、当業者に公知である。例えば、前記固相担体は、活性ヒドロキシ基又はアミノ官能基を含む固相担体から選択されてもよく、いくつかの実施形態において、前記固相担体は、アミノ樹脂又はヒドロキシ樹脂である。いくつかの実施形態において、前記アミノ樹脂又はヒドロキシ樹脂は、粒子径100～400メッシュ(mesh)、表面におけるアミノ基又はヒドロキシ基の担持量0.2～0.5mmol/gというパラメーターを有する。前記式(321)に示される化合物と固相担体との用量比は10～400μmol化合物/グラムの固相担体(μmol/g)である。いくつかの実施形態において、前記式(321)に示される化合物と固相担体との用量比は50～200μmol/gである。

【0287】

前記有機溶剤は、当業者に既知の任意の適切な溶剤又は混合溶剤であってもよい。いくつかの実施形態において、前記有機溶剤は、アセトニトリル、エポキシ類溶剤、エーテル類溶剤、ハロゲン化アルキル類溶剤、ジメチルスルホキシド、N,N-ジメチルホルムアミド及びN,N-ジイソプロピルエチルアミンの1種又は複数種である。いくつかの実施形態において、前記エポキシ類溶剤は、ジオキサン及び／又はテトラヒドロフランであり、前記エーテル類溶剤は、エチルエーテル及び／又はメチルtert-ブチルエーテルであり、前記ハロゲン化アルキル類溶剤は、ジクロロメタン、トリクロロメタン及び1,2-ジクロロエタンの1種又は複数種である。いくつかの実施形態において、前記有機溶剤は、アセトニトリルである。式(321)に示される化合物に対して、前記有機溶剤の用量は20～200L/molであり、いくつかの実施形態において、50～100L/molである。

【0288】

いくつかの実施形態において、前記縮合剤は、ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリピロリジノ-ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート/エステル(benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidino phosphonium hexafluorophosphate, PyBop)、3-ジエトキシホスホリル-1,2,3-ベンゾオキサゾール4(3H)-オン(3-(diethoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-one, DEPBT)及び／又はO-ベンゾトリアゾール-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート/エステル(O-benzotriazol-1-yl-tetramethyluronium hexafluorophosphate)であってもよく、いくつかの実施形態において、前記縮合剤は、O-ベンゾトリアゾール-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェートである。前記縮合剤と式(321)に示される化合物とのモル比は1：1～20：1であり、他の実施形態において1：1～5：1である。

【0289】

いくつかの実施形態において、前記第3級アミンは、トリエチルアミン及び／又はN，N-ジイソプロピルエチルアミンであり、いくつかの実施形態において、N，N-ジイソプロピルエチルアミンであり、前記第3級アミンと式(321)に示される化合物とのモル比は1：1～20：1であり、いくつかの実施形態において、1：1～5：1である。

【0290】

いくつかの実施形態において、式(321)に示される化合物の調製方法は、カップリング反応条件下で、有機溶剤において、得られた縮合生成物をカップリング試薬及びアシル化触媒と接触させ、単離して式(321)に示される化合物を得ることをさらに含んでもよい。前記カップリング反応の作用は、後の反応において不必要な副生成物が生じることを避けるために、まだ完全に反応していないあらゆる活性反応官能基を除去することである。前記カップリング反応の条件としては、反応温度は0～50℃、いくつかの実施形態では15～35℃であり、反応時間は1～10h、いくつかの実施形態では3～6hである。カップリング試薬としては、当業者に公知の、siRNA固相合成に用いられるカップリング試薬を用いてもよい。

【0291】

いくつかの実施形態において、前記カップリング試薬は、カップリング試薬1(cap1)及びカップリング試薬2(cap2)からなり、カップリング試薬1は、N-メチルイミダゾールであり、いくつかの実施形態において、N-メチルイミダゾールのピリジン／アセトニトリル混合溶液として提供され、ピリジンとアセトニトリルとの体積比は1：10～1：1であり、いくつかの実施形態において、1：3～1：1であり、ピリジンとアセトニトリルの総体積とN-メチルイミダゾールとの体積比は1：1～10：1であり、いくつかの実施形態において、3：1～7：1である。前記カップリング試薬2は、酢酸無水物である。いくつかの実施形態において、前記カップリング試薬2は、酢酸無水物のアセトニトリル溶液として提供され、酢酸無水物とアセトニトリルとの体積比が1：1～1：10であり、更なる実施形態において1：2～1：6である。

【0292】

いくつかの実施形態において、前記N-メチルイミダゾールのピリジン／アセトニトリル混合溶液の体積と式(321)に示される化合物の質量との比は5ml/g～50ml/gであり、いくつかの実施形態では15ml/g～30ml/gである。前記酢酸無水物のアセトニトリル溶液の体積と式(321)に示される化合物の質量との比は0.5ml/g～10ml/gであり、いくつかの実施形態では1ml/g～5ml/gである。

【0293】

いくつかの実施形態において、カップリング試薬としては、等モル量の酢酸無水物とN-メチルイミダゾールを用いる。いくつかの実施形態において、前記有機溶剤は、アセトニトリル、エポキシ類溶剤、エーテル類溶剤、ハロゲン化アルキル類溶剤、ジメチルスルホキシド、N，N-ジメチルホルムアミド及びN，N-ジイソプロピルエチルアミンの1種又は複数種である。いくつかの実施形態において、前記有機溶剤はアセトニトリルである。式(321)に示される化合物に対して、前記有機溶剤の用量は10～50L/mol、いくつかの実施形態では5～30L/molである。

【0294】

いくつかの実施形態において、前記アシル化触媒は、エステル化縮合又はアミド化縮合に使用できる任意の触媒、例えばアルカリ複素環化合物から選択されてもよい。いくつかの実施形態において、前記アシル化触媒は、4-ジメチルアミノピリジンである。前記触媒と式(321)に示される化合物との質量比は0.001：1～1：1であり、いくつかの実施形態では0.01：1～0.1：1である。

【0295】

いくつかの実施形態において、任意の適切な単離方法により反応混合物から式(321)に示される化合物を単離することができる。いくつかの実施形態において、有機溶剤で十分に洗浄し、濾過し、未反応の反応物、過剰なカップリング試薬及び他の不純物を除去することにより、式(321)に示される化合物を得ることができる。前記有機溶剤は、

アセトニトリル、ジクロロメタン、メタノールから選択され、いくつかの実施形態において、アセトニトリルである。

【0296】

いくつかの実施形態において、式(321)に示される複合分子の調製方法は、有機溶剤において、カップリング反応条件下及びカップリング試薬の存在下で、式(313)に示される化合物をホスホルジアミダイトと接触させ、単離して式(321)に示される化合物を得ることを含む。この場合、 $R_4$ に第1の官能基及び第2の官能基が含まれ、第1の官能基がヒドロキシ保護基を含み、第2の官能基が式(C3)に示される構造を含む式(321)に示される化合物が得られる。

【0297】

いくつかの実施形態において、カップリング反応条件としては、温度は0～50℃であってもよく、例えば15～35℃である。式(313)に示される化合物とホスホルジアミダイトとのモル比は1：1～1：50であってもよく、例えば1：5～1：15であり、式(313)に示される化合物とカップリング試薬とのモル比は1：1～1：100であってもよく、例えば1：50～1：80である。反応時間は200～3000秒であってもよく、例えば500～1500秒である。前記ホスホルジアミダイトは、例えばビス(ジイソプロピルアミノ)(2-シアノエトキシ)ホスフィンを用いてもよく、市販品を購入してもよく、又は本分野で公知の方法により合成されてもよい。カップリング試薬は、1H-テトラゾール、5-エチルチオ1H-テトラゾール、5-ベンジルチオ1H-テトラゾールから選択される1種又は複数種であり、例えば、5-エチルチオ1H-テトラゾールである。前記カップリング反応は、有機溶剤で行われてもよく、前記有機溶剤は、無水アセトニトリル、無水DMF、無水ジクロロメタンから選択される1種又は複数種であり、例えば無水アセトニトリルである。いくつかの実施形態において、式(313)に示される化合物に対して、前記有機溶剤の用量が3～50L/molであり、例えば、5～20L/molであってもよい。当該カップリング反応を行うことにより、式(313)に示される化合物におけるヒドロキシ基とホスホルジアミダイトを反応させてホスホルジアミダイト基を形成する。いくつかの実施形態において、溶剤を直接除去して式(321)に示される化合物の粗製品を得ることができ、当該粗製品は、そのまま後の反応に用いることができる。

【0298】

いくつかの実施形態において、式(321)に示される化合物の調製方法は、カップリング反応条件下で、有機溶剤において、カップリング試薬の存在下で、単離して得られた生成物を、さらにヒドロキシ基含有固相担体と接触させる工程をさらに含む。その後、カップリング反応、酸化反応を行い、単離して式(321)に示される化合物を得る。この場合、 $R_4$ に第1の官能基及び第2の官能基が含まれ、第1の官能基がヒドロキシ保護基を含み、第2の官能基が式(C3')に示される構造を有する式(321)に示される化合物が得られる。

【0299】

いくつかの実施形態において、前記固相担体は、本分野で公知の核酸固相合成に使用できる固相担体であり、例えば、脱保護反応された市販の汎用の固相担体(NitroPhase(登録商標)HL UnyLinker™ 300 Oligonucleotide Synthesis Support、Kinovate Life Sciences社、構造が式B80に示される)であってもよい。

【0300】

10

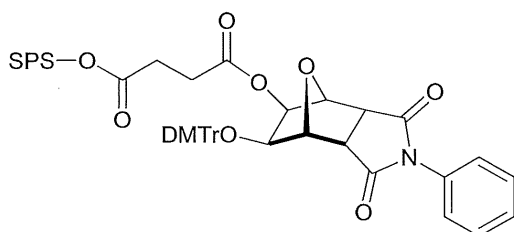
20

30

40

50

## 【化 3 1】



(B 8 0)

10

## 【0 3 0 1】

脱保護反応は、当業者に公知である。いくつかの実施形態において、脱保護条件としては、温度は0～50℃、例えば15～35℃であり、反応時間は30～300秒、例えば50～150秒である。脱保護試薬は、トリフルオロ酢酸、トリクロロ酢酸、ジクロロ酢酸、クロロ酢酸から選択される1種又は複数種であってもよく、いくつかの実施形態において、脱保護試薬は、ジクロロ酢酸である。脱保護試薬と固定相における－DMTr（4，4’－ジメトキシトリチル）保護基とのモル比が2：1～100：1であり、例えば3：1～50：1である。前記脱保護を行うことにより、前記固相担体の表面に反応活性を有する遊離ヒドロキシ基が得られ、次のカップリング反応を行いやすくする。

20

## 【0 3 0 2】

カップリング反応条件及びカップリング試薬の選択は、以上のとおりである。当該カップリング反応を行うことにより、脱保護反応で形成された遊離ヒドロキシ基とホスホロアミダイト基を反応させて亜リン酸エステル結合を形成する。

## 【0 3 0 3】

いくつかの実施形態において、キャッピング反応条件としては、温度は0～50℃、例えば15～35℃であり、反応時間は5～500秒、例えば10～100秒であり、前記キャッピング反応をキャッピング試薬の存在下で行う。キャッピング試薬の選択と用量は、以上のとおりである。

## 【0 3 0 4】

酸化反応条件としては、温度は0～50℃、例えば15～35℃であってもよく、反応時間は1～100秒、例えば5～50秒であってもよく、酸化試薬は、例えばヨウ素であってもよい（いくつかの実施形態ではヨウ素水として提供する）。いくつかの実施形態では、酸化試薬と固相担体に結合される核酸配列とのモル比は1：1～100：1であり、例えば、5：1～50：1であってもよい。いくつかの実施形態では、前記酸化反応は、テトラヒドロフラン：水：ピリジン＝3：1：1～1：1：3の混合溶剤で行われる。

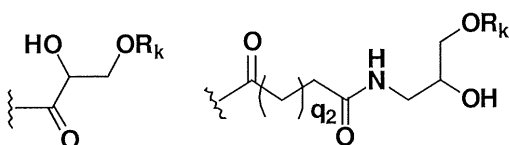
30

## 【0 3 0 5】

いくつかの実施形態において、R<sub>6</sub>は、式B 7又はB 8の基の1つである。

## 【0 3 0 6】

## 【化 3 2】



(B 7)

(B 8)

40

式中、q<sub>2</sub>の定義は、前述したとおりである。

## 【0 3 0 7】

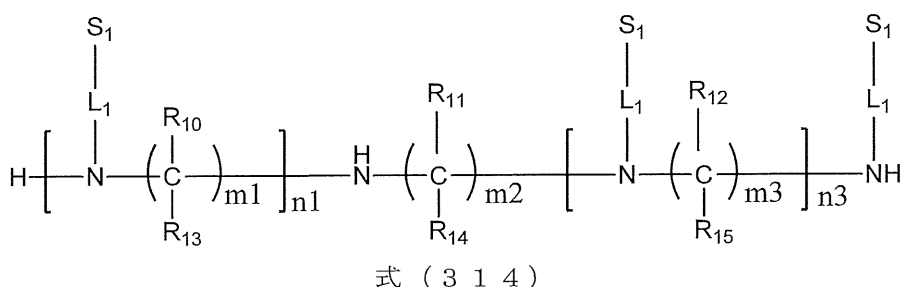
この場合、式（3 1 3）に示される化合物は、有機溶剤において、アミド化反応条件下

50

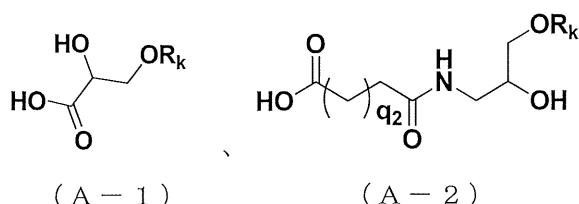
及びアミド化反応縮合剤と第3級アミンの存在下で、式(314)に示される化合物を式(A-1)に示される化合物又は式(A-2)に示される化合物と接触させ、その後単離する、という調製方法により得ることができる。

【0308】

【化33】



10



式中、 $n1$ 、 $n3$ 、 $m1$ 、 $m2$ 、 $m3$ 、 $R_{10}$ 、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$ 、 $R_{13}$ 、 $R_{14}$ 、 $R_{15}$ 、 $L_1$ 、 $S_1$ 、 $q_2$ 及び $R_k$ それぞれの定義と選択可能な範囲は、前述したとおりである。

20

【0309】

前記アミド化反応条件としては、反応温度は0～100℃であり、反応時間は1～48時間であってもよく、いくつかの実施形態では、前記アミド化反応条件としては、反応温度が10～40℃であり、反応時間が2～16時間である。

【0310】

いくつかの実施形態において、前記有機溶剤は、アルコール類溶剤、エポキシ類溶剤、エーテル類溶剤、ハロゲン化アルキル類溶剤、ジメチルスルホキシド、N，N-ジメチルホルムアミド及びN，N-ジイソプロピルエチルアミンの1種又は複数種である。前記アルコール類溶剤は、いくつかの実施形態において、メタノール、エタノール、プロパノールの1種又は複数種であり、いくつかの実施形態において、エタノールである。前記エポキシ類溶剤は、いくつかの実施形態において、ジオキサン及び／又はテトラヒドロフランである。前記エーテル類溶剤は、いくつかの実施形態において、エチルエーテル及び／又はメチルtert-ブチルエーテルである。前記ハロゲン化アルキル類溶剤は、いくつかの実施形態において、ジクロロメタン、トリクロロメタン及び1，2-ジクロロエタンの1種又は複数種である。いくつかの実施形態において、前記有機溶剤は、ジクロロメタンである。式(314)に示される化合物に対して、有機溶剤の用量が3～50L/molであり、更なる実施形態において3～20L/molである。

30

【0311】

いくつかの実施形態において、前記アミド化反応縮合剤は、ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリピロリジノ-ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート／エステル、3-ジエトキシホスホリル-1，2，3-ベンゾオキサゾール4(3H)-オン、4-(4，6-ジメトキシトリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリン塩酸塩(4-(4，6-dimethoxytriazin-2-yl)-4-methylmorpholine hydrochloride)、2-エトキシ-1-エトキシカルボニル-1，2-ジヒドロキノリン(EEDQ)又はO-ベンゾトリアゾール-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェートであり、更なる実施形態において、3-ジエトキシホスホリル-1，2，3-ベンゾオキサゾール4(3H)-オンである。前記アミド化反応縮合剤と式(314)に示される化合物とのモル比が1：1～10：1であってもよく、いくつかの実施形態において、2.5：1～5：1である。

40

50

## 【0312】

いくつかの実施形態において、前記第3級アミンは、トリエチルアミン又はN，N-ジイソプロピルエチルアミンであり、更なる実施形態において、N，N-ジイソプロピルエチルアミンである。前記第3級アミンと式(314)に示される化合物とのモル比が3：1～20：1であり、いくつかの実施形態において、5：1～10：1である。

## 【0313】

いくつかの実施形態において、式(A-1)及び式(A-2)に示される化合物は、任意の適当な方法により調製されてもよい。例えば、R<sub>k</sub>がDMTr基である場合、グリセリン酸カルシウムとDMTrClを反応させて式(A-1)に示される化合物を調製することができる。同様に、3-アミノ-1，2-プロパンジオールと環状酸無水物を接触させた後、DMTrClと反応させて式(A-2)に示される化合物を調製することができ、前記環状酸無水物は、炭素原子数4～13、いくつかの実施形態において4～8の環状酸無水物であってもよい。当業者であれば容易に理解できるように、前記環状酸無水物の選択は、(A-2)に示される化合物におけるq<sub>2</sub>の異なる値に対応しており、例えば、前記環状酸無水物がコハク酸無水物である場合、q<sub>2</sub>=1であり、前記環状酸無水物がグルタル酸無水物である場合、q<sub>2</sub>=2であり、類推してもよい。

## 【0314】

いくつかの変形において、式(314)に示される化合物を、前記環状酸無水物、3-アミノ-1，2-プロパンジオール及びDMTrClと順に反応させることにより、式(313)に示される化合物を調製することもできる。当業者であれば容易に理解できるように、これらの変形は、式(313)に示される化合物の構造と機能に影響を与えることがなく、かつ、当業者が上記方法により容易に実現するものである。

## 【0315】

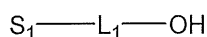
上記と同様に、任意の適切な単離方法により反応混合物から式(313)に示される化合物を単離することができる。いくつかの実施形態において、溶剤を蒸発除去した後、クロマトグラフィー方法により式(313)に示される化合物を単離することができ、例えば、(1)順相精製シリカゲル：200～300メッシュのシリカゲル充填剤を、石油エーテル：酢酸エチル：ジクロロメタン：N，N-ジメチルホルムアミド=1：1：1：0.5～1：1：1：0.6で勾配溶出すること、及び、(2)逆相精製：C18、C8逆相充填剤を、メタノール：アセトニトリル=0.1：1～1：0.1で勾配溶出することという2つのクロマトグラフィー条件で単離することができる。いくつかの実施形態において、溶剤を直接除去して式(313)に示される化合物の粗製品を得ることができ、当該粗製品は、そのまま後の反応に用いることができる。

## 【0316】

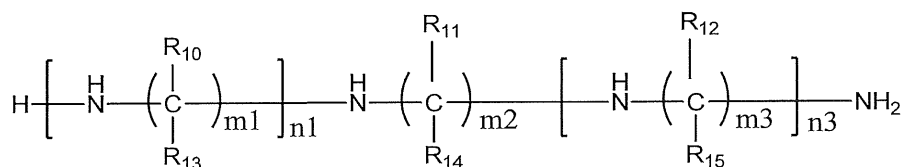
いくつかの実施形態において、式(314)に示される化合物は、有機溶剤において、アミド化反応縮合剤と第3級アミンの存在下で、縮合反応条件下で、式(320)に示される化合物を式(316)に示される化合物と接触させた後、単離することを含む調製方法により得ることができる。

## 【0317】

## 【化34】



式(316)



式(320)

式中、n1、n3、m1、m2、m3、R<sub>10</sub>、R<sub>11</sub>、R<sub>12</sub>、R<sub>13</sub>、R<sub>14</sub>、R<sub>15</sub>

それぞれの定義と選択可能な範囲は、前述したとおりである。

【0318】

式(316)に示される化合物としては、例えば、J. Am. Chem. Soc. 2014, 136, 16958-16961に開示された化合物を用いてもよく、或いは、式(316)に示される化合物は、当業者が各種の方法により調製することができ、例えば、米国特許US 8,106,022 B2の実施例1に開示された方法を参照していくつかの式(316)に示される化合物を調製することができ、引用により上記文献の全ての内容が全体として本明細書に組み込まれる。

【0319】

いくつかの実施形態において、前記縮合反応条件としては、反応温度は0~100℃であり、反応時間は0.1~24時間であり、いくつかの実施形態では、反応温度が10~40℃であり、反応時間が0.5~16時間である。

10

【0320】

所望の生成物である式(314)に示される化合物の構造を考慮すると、前記式(316)に示される化合物と前記式(320)に示される化合物とのモル比は、式(320)におけるn1とn3の和に基づいて決定されるべきである。いくつかの実施形態において、例えば、n1+n3=3の場合、反応が完全であり、過剰ではないことを確保するために、式(316)に示される化合物と前記式(320)に示される化合物とのモル比が3:1~3.5:1であってもよく、いくつかの実施形態において、3.01:1~3.15:1である。

20

【0321】

いくつかの実施形態において、前記有機溶剤は、アセトニトリル、エポキシ類溶剤、エーテル類溶剤、ハロゲン化アルキル類溶剤、ジメチルスルホキシド、N,N-ジメチルホルムアミド及びN,N-ジイソプロピルエチルアミンの1種又は複数種であり、前記エポキシ類溶剤は、いくつかの実施形態において、ジオキサン及び／又はテトラヒドロフランであり、前記エーテル類溶剤は、いくつかの実施形態において、エチルエーテル及び／又はメチルtert-ブチルエーテルであり、前記ハロゲン化アルキル類溶剤は、いくつかの実施形態において、ジクロロメタン、トリクロロメタン及び1,2-ジクロロエタンの1種又は複数種であり、いくつかの実施形態において、前記有機溶剤は、ジクロロメタンである。式(320)に示される化合物に対して、前記有機溶剤の用量は3~50L/molであり、いくつかの実施形態において、5~20L/molである。

30

【0322】

いくつかの実施形態において、前記アミド化反応縮合剤は、ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリピロリジノ-ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート/エステル、3-ジエトキシホスホリル-1,2,3-ベンゾオキサゾール4(3H)-オン(DEPBT)、O-ベンゾトリアゾール-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート、4-(4,6-ジメトキシトリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリン塩酸塩又は1-ヒドロキシベンゾトリアゾールの1種又は複数種であり、更なる実施形態において、ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリピロリジノ-ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート/エステルと1-ヒドロキシベンゾトリアゾールの混合物であり、ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリピロリジノ-ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート/エステルと1-ヒドロキシベンゾトリアゾールが等モル量で使用される。前記全アミド化反応縮合剤と式(316)に示される化合物とのモル比は1:1~3:1であってもよく、いくつかの実施形態において、1.05:1~1.5:1である。

40

【0323】

前記第3級アミンは、N-メチルモルホリン、トリエチルアミン又はN,N-ジイソプロピルエチルアミンであってもよく、いくつかの実施形態において、N-メチルモルホリンであり、前記第3級アミンと式(316)に示される化合物とのモル比は2:1~10:1であってもよく、いくつかの実施形態において、2:1~5:1である。

【0324】

50

上記と同様に、任意の適切な単離方法により反応混合物から式(314)に示される化合物を単離することができる。いくつかの実施形態において、溶剤を蒸発除去した後、クロマトグラフィー方法により式(314)に示される化合物を単離することができ、例えば、(1)順相精製シリカゲル：200～300メッシュのシリカゲル充填剤を、ジクロロメタン：メタノール＝100：5～100：7で勾配溶出すること、及び、(2)逆相精製：C18、C8逆相充填剤を、メタノール：アセトニトリル＝0.1：1～1：0.1で勾配溶出することという2つのクロマトグラフィー条件で単離することができる。いくつかの実施形態において、溶剤を直接除去して式(314)に示される化合物の粗製品を得ることができ、当該粗製品は、そのまま後の反応に用いることができる。

【0325】

式(320)に示される化合物は、市販品として購入して、又は、当業者により既知の方法を用いて得ることができる。例えば、 $m_1 = m_2 = m_3 = 3$ 、 $n_1 = 1$ 、 $n_3 = 2$ であり、各 $R_{10}$ 、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$ 、 $R_{13}$ 、 $R_{14}$ 、 $R_{15}$ がいずれもHである場合、式(320)に示される化合物は、アルファ・エイサー社から市販品として購入することができる。

【0326】

本開示のsiRNA複合体は、薬学的に許容できる他の添加剤と併用してもよく、当該添加剤は、本分野で通常採用される各種の製剤又は化合物の1種又は複数種であってもよく、詳細は、上述した本開示の薬物組成物に関する記載を参照のこと。

【0327】

<本開示のsiRNA、当該siRNAを含む薬物組成物及び複合体の使用>

いくつかの実施形態において、本開示は、本開示のsiRNA、及び／又は薬物組成物及び／又はsiRNA複合体の、尿酸代謝異常又は尿酸代謝異常による疾患又は生理状態の治療及び／又は予防のための薬物の調製における使用を提供する。

【0328】

いくつかの実施形態において、本開示は、本開示のsiRNA、及び／又は薬物組成物及び／又はsiRNA複合体の有効量を、それを必要とする被験体に投与することを含む尿酸代謝異常又は尿酸代謝異常による疾患又は生理状態の予防及び／又は治療方法を提供する。

【0329】

本開示のsiRNA活性成分を、それを必要とする被験体に投与することにより、RNA干渉機構により尿酸代謝異常又は尿酸代謝異常による疾患又は生理状態を予防及び／又は治療する目的を達成することができる。したがって、本開示のsiRNA、及び／又は薬物組成物及び／又はsiRNA複合体は、尿酸代謝異常又は尿酸代謝異常による疾患又は生理状態の予防及び／又は治療に用いられ、又は尿酸代謝異常又は尿酸代謝異常による疾患又は生理状態の予防及び／又は治療のための薬物の調製に用いることができる。

【0330】

いくつかの実施形態において、前記尿酸代謝異常による疾患又は生理状態とは、高尿酸血症又は痛風症を指し、通常、血中尿酸レベルの向上及び当該血中尿酸レベルの向上により直接引き起こされる関節の激しい痛み、動作不自由等の症状として表される。

【0331】

本明細書で用いられる用語「薬剤投与／投与」とは、本開示のsiRNA、薬物組成物及び／又はsiRNA複合体を少なくとも一部、所望の部位に局在化して所望の効果を生じさせる方法又は経路により、本開示のsiRNA、薬物組成物及び／又はsiRNA複合体を被験体の体内に入れることを指す。本開示の方法に適した投与経路は、局所投与と全身投与を含む。一般的には、局所投与により、被験体の体循環よりも多くのsiRNA複合体が特定の部位に送達されるが、全身投与により、本開示のsiRNA、薬物組成物及び／又はsiRNA複合体が被験体の体循環に送達される。本開示が痛風の予防及び／又は治療手段を提供することを意図することを考慮すると、いくつかの実施形態において、薬物を肝臓に送達することができる投与方法を採用する。

10

20

30

40

50

## 【0332】

本分野で既知の任意の適切な経路で被験体に投与することができ、前記経路としては、経口投与又は胃腸外経路、例えば、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、経皮投与、気管内投与（エアロゾル）、肺部投与、鼻部投与、直腸投与及び局所投与（口腔内投与と舌下投与を含む）を含むが、これらのみに限定されない。投与頻度は、1日、1週間、2週間、3週間、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、半年又は1年に1回又は複数回であってもよい。

## 【0333】

本開示に記載された s i R N A、薬物組成物又は s i R N A 複合体の用量は、本分野における通常の用量であってもよく、前記用量は、各種のパラメーター、特に被験体の年齢、体重及び性別により決定してもよい。細胞培養又は実験動物で標準薬学的手順により毒性と治療効果を測定し、例えば、L D<sub>50</sub>（50%の群体を死亡させる用量）及び E D<sub>50</sub>（定量的反応において、50%の最大反応強度を引き起こすことができる用量を指し、定性的反応において、50%の実験対象に陽性反応が発生するときの用量を指す）を測定してもよい。細胞培養分析及び動物研究により得られたデータに基づいて、ヒト用量の範囲を得ることができる。

## 【0334】

本開示に記載された s i R N A、薬物組成物及び／又は s i R N A 複合体を投与する場合、例えば、雄性又は雌性、6～12週齢、体重18～25gのC57BL/6Jマウスに対して、s i R N Aの量として、(i) s i R N A 複合体について、その s i R N A 用量は0.001～100mg/kg体重であってもよく、いくつかの実施形態では0.01～50mg/kg体重であり、いくつかの実施形態では0.05～20mg/kg体重であり、さらにいくつかの実施形態においては0.1～15mg/kg体重であり、さらにいくつかの実施形態においては0.1～10mg/kg体重であり、(ii) s i R N A 及び薬学的に許容可能な担体により形成された薬物組成物について、その s i R N A 用量は0.001～50mg/kg体重であってもよく、いくつかの実施形態では0.01～10mg/kg体重であり、いくつかの実施形態では0.05～5mg/kg体重であり、いくつかの実施形態では0.1～3mg/kg体重である。

## 【0335】

いくつかの実施形態において、本開示は、本開示の s i R N A、及び／又は薬物組成物及び／又は s i R N A 複合体の有効量を肝細胞と接触させ、本開示の s i R N A、及び／又は薬物組成物及び／又は s i R N A 複合体を前記肝細胞に導入し、RNA干渉機構により肝細胞における P N P 遺伝子の発現を抑制する目的を達成することを含む、前記肝細胞における P N P 遺伝子の発現の抑制方法を提供する。前記肝細胞は、S M M C - 7 7 2 1、H e p G 2、H u h 7等の肝がん細胞系又は単離した初代肝細胞から選択されてもよい。いくつかの実施形態において、前記細胞は、S M M C - 7 7 2 1 肝がん細胞である。

## 【0336】

本開示により提供される方法により細胞における P N P 遺伝子の発現を抑制する。提供される修飾 s i R N A、薬物組成物及び／又は s i R N A 複合体における s i R N A 用量は、一般的に、標的遺伝子の発現を低減でき、標的細胞表面では1pM～1μM、0.01nM～100nM、0.05nM～50nM、又は0.05nM～約5nMの細胞外濃度となる量である。当該局所濃度を達成するのに必要な量は、送達方法、送達部位、送達部位と標的細胞又は組織との間の細胞層の数、送達経路（局所か全身か）等を含む、各種の因子により変化する。送達部位における濃度は、標的細胞又は組織の表面における濃度よりも顕著に高くてもよい。

## 【0337】

<キット>

本開示は、本開示の修飾 s i R N A、薬物組成物及び s i R N A 複合体の少なくとも1種の有効量を含むキットを提供する。

## 【0338】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されたキットは、容器で修飾 s i R N A

10

20

30

40

50

を提供することができる。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されたキットは、薬学的に許容できる賦形剤を提供する容器を含んでもよい。いくつかの実施形態において、前記キットには、他の成分、例えば、安定化剤又は防腐剤等が含まれてもよい。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されたキットは、本明細書に記載された修飾 *siRNA* を提供する容器とは別の容器で少なくとも1種の他の治療剤を含んでもよい。いくつかの実施形態において、前記キットは、修飾 *siRNA* と薬学的に許容可能な担体及び／又は添加剤又は他の成分（存在する場合）を混合するための説明書を含んでもよい。

#### 【0339】

本開示のキットにおいて、前記修飾 *siRNA* 及び薬学的に許容可能な担体及び／又は添加剤、並びに、前記修飾 *siRNA*、薬物組成物及び／又は *siRNA* 複合体及び／又は複合体、及び／又は薬学的に許容できる添加剤は、任意の形式、例えば、液体形式、乾燥形式又は凍結乾燥形式として提供されてもよい。いくつかの実施形態において、前記修飾 *siRNA* 及び薬学的に許容可能な担体及び／又は添加剤、並びに、前記薬物組成物、及び／又は複合体及び薬学的に許容できる任意の添加剤は、基本的にクリーン及び／又は無菌である。いくつかの実施形態において、本開示のキットで無菌水を提供することができる。

#### 【0340】

以下に実施例により本開示をさらに説明するが、本開示は、これによって何ら制限されない。

#### 【実施例】

#### 【0341】

特に説明がない限り、以下の実施例で用いられる試薬、培地は、いずれも市販品であり、用いられる核酸電気泳動、*real-time PCR* 等の操作は、いずれも *Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))* に記載された方法を参照して行われる。

#### 【0342】

10%のウシ胎児血清 (FBS、HyClone社) 及び0.2%体積のペニシリン-ストレプトマイシン (Penicillin-Streptomycin、HyClone) を含むH-DMEM完全培地 (HyClone社) でSMMC-7721細胞 (広州吉▲ニー▼欧生物科技有限公司) を5%CO<sub>2</sub>/95%空気含有インキュベーターにおいて37℃で培養した。

#### 【0343】

20%のウシ胎児血清 (FBS、HyClone社) 及び0.2体積%のペニシリン-ストレプトマイシン (Penicillin-Streptomycin、HyClone) を含むH-DMEM完全培地 (HyClone社) で、HepG2細胞 (広州吉▲ニー▼欧生物科技有限公司) を5%CO<sub>2</sub>/95%空気含有インキュベーターにおいて37℃で培養した。

#### 【0344】

10%のウシ胎児血清 (FBS、HyClone社) 及び0.2体積%のペニシリン-ストレプトマイシン (Penicillin-Streptomycin、HyClone) を含むH-DMEM完全培地 (HyClone社) で、Huh7細胞 (広州吉▲ニー▼欧生物科技有限公司) を5%CO<sub>2</sub>/95%空気含有インキュベーターにおいて37℃で培養した。

#### 【0345】

本開示により合成されたPNP遺伝子に対する*siRNA*、*siRNA* 複合体又は陰性対照である*siRNA*、*siRNA* 複合体で細胞をトランスフェクションした場合、トランスフェクション試薬としてLipofectamine™2000 (Invitrogen) 又はINTERFERin (Polyplus) を用い、具体的な操作については、メーカーにより提供される説明書を参照のこと。

#### 【0346】

別に説明がない限り、以下で提供される試薬割合は、いずれも体積比（v / v）として計算される。

【0347】

実験データは、いずれも

【数1】

$\bar{X} \pm SEM$

で表され、データ分析では、Graphpad prism 5.0 統計分析ソフトウェアを採用した。

10

【0348】

調製例1：複合体1の調製

本調製例で、複合体1を合成した。複合体1は、L-9 複合分子が表3における番号 siPNa1M1S の siRNA と複合した後に形成された siRNA 複合体である。

【0349】

(1-1) L-10 化合物の合成

以下の方法に従い、L-10 化合物を合成した。

【0350】

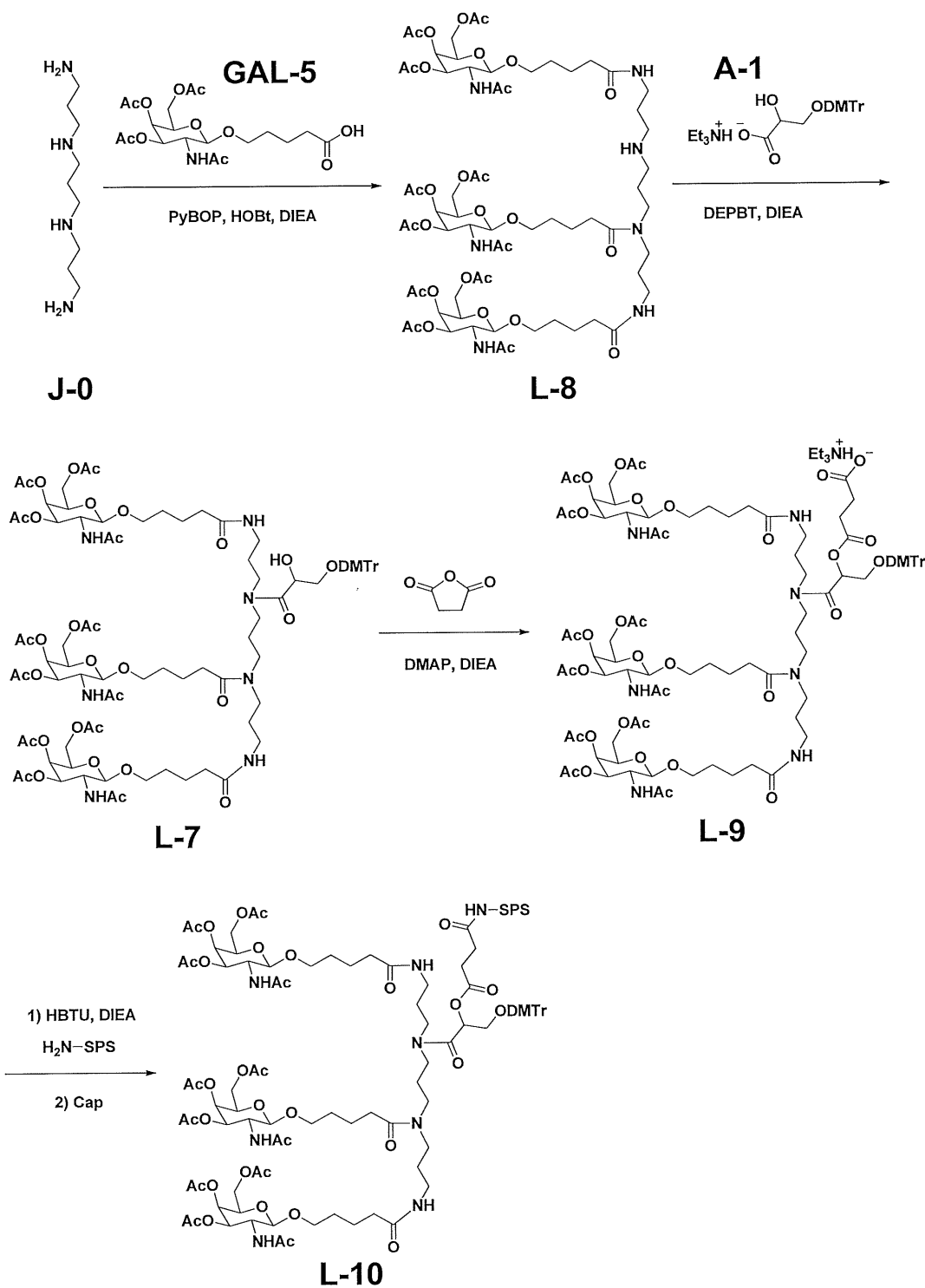
20

30

40

50

【化 3 5】



【 0 3 5 1】

( 1 - 1 - 1 ) 複合末端セグメント G A L - 5 の合成

【 0 3 5 2】

10

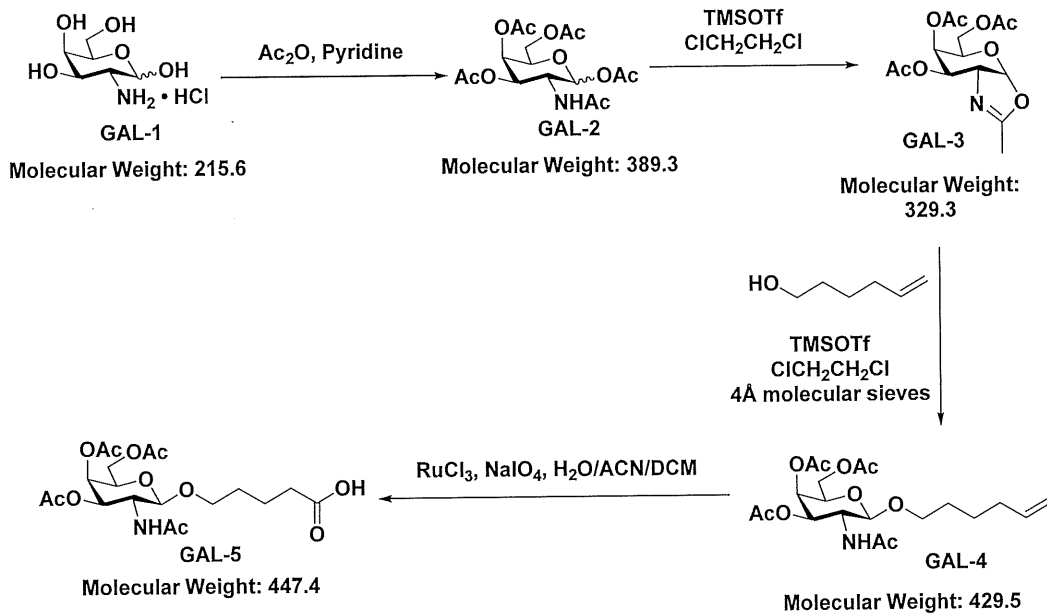
20

30

40

50

## 【化 3 6】



## 【 0 3 5 3 】

## ( 1 - 1 - 1 a ) GAL-2 の合成

100.0 g の GAL-1 (N-アセチル-D-ガラクトサミン塩酸塩、CAS 番号: 1772-03-8、寧波弘翔生化公司から購入、463.8 mmol) を 1000 ml の無水ピリジンに溶解させ、氷水浴下で 540 ml の酢酸無水物 (Enox 社から購入、5565.6 mmol) を加え、室温で 1.5 時間攪拌反応した。反応液を 10 L の氷水に注入し、減圧吸引濾過し、ケーキを 2 L の氷水で洗浄した後、完全に溶解するまでアセトニトリル/トルエン混合溶剤 (アセトニトリル:トルエンの体積比=1:1) を加え、溶剤を蒸発乾固し、130.0 g の白色固形製品 GAL-2 を得た。

## 【 0 3 5 4 】

## ( 1 - 1 - 1 b ) GAL-3 の合成

工程 (1-1-1 a) で得られた GAL-2 (35.1 g、90.0 mmol) を 213 ml の無水 1,2-ジクロロエタンに溶解させ、氷水浴下で、窒素保護条件下で、24.0 g の TMSOTf (CAS 番号: 27607-77-8、マックリン社から購入、108.0 mmol) を加え、室温で一晩反応させた。

## 【 0 3 5 5 】

反応液に 400 ml のジクロロメタンを加えて希釈し、珪藻土で濾過し、1 L の飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、均一に攪拌し、有機相を分離し、水相をジクロロエタンにより 1 回あたり 300 ml で 2 回抽出し、有機相をあわせ、それぞれ 300 ml の飽和炭酸水素ナトリウム水溶液及び 300 ml の飽和食塩水で洗浄し、有機相を分離し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶剤を減圧蒸発乾固し、26.9 g の淡黄色の粘稠な水飴状製品 GAL-3 を得た。

## 【 0 3 5 6 】

## ( 1 - 1 - 1 c ) GAL-4 の合成

工程 (1-1-1 b) で得られた GAL-3 (26.9 g、81.7 mmol) を 136 ml の無水 1,2-ジクロロエタンに溶解させ、乾燥した 4 Å 分子篩粉 30 g を加え、9.0 g の 5-ヘキセン-1-オール (CAS 番号: 821-41-0、Adamas-beta 社から購入、89.9 mmol) を加え、室温で 30 分間攪拌し、氷浴及び窒素保護下で 9.08 g の TMSOTf (40.9 mmol) を加え、室温で一晩攪拌反応させた。4 Å 分子篩粉を濾過除去し、濾液に 300 ml のジクロロメタンを加えて希釈し、珪藻土で濾過し、500 ml の飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて 10 分間攪拌し洗浄し、有機相を分離し、水相を 300 ml のジクロロエタンで 1 回抽出し、有機相をあわ

せ、それぞれ300mlの飽和炭酸水素ナトリウム水溶液及び300mlの飽和食塩水で洗浄し、有機相を分離し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶剤を減圧蒸発乾固し、41.3gの黄色水飴状製品GAL-4を得、精製することなく、そのまま次の酸化反応を行った。

#### 【0357】

##### (1-1-1d) GAL-5の合成

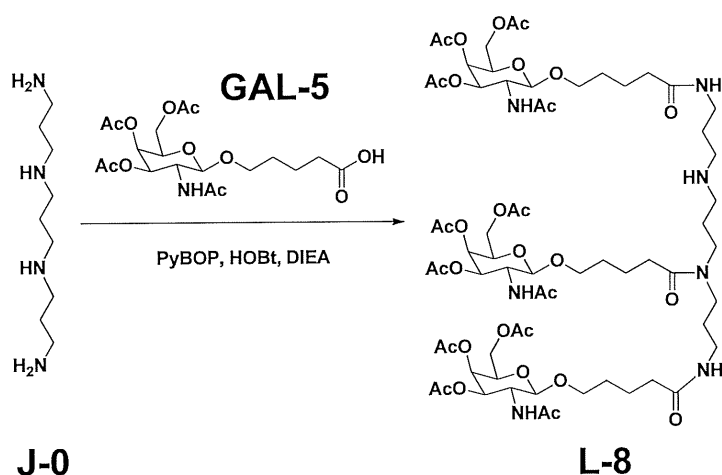
工程(1-1-1c)に記載された方法により得られたGAL-4(14.9g、34.7mmol)を77mlのジクロロメタンと77mlのアセトニトリルの混合溶剤に溶解させ、それぞれ103mlの脱イオン水及び29.7gの過ヨウ素酸ナトリウム(CAS番号:7790-28-5、Aladdin社から購入、138.8mmol)を加え、氷水浴下で10分間攪拌し、塩化ルテニウム(III)(CAS番号:14898-67-0、Energy社から購入、238mg、1.145mmol)を加え、室温で一晩反応させた。反応液に300mlの水を加えて希釈攪拌し、飽和炭酸水素ナトリウムを加えてpHを約7.5に調整し、有機相を分離して捨て、水相をジクロロメタンによって1回あたり200mlで3回抽出し、有機相を捨てた。固形クエン酸により水相のpHを約3に調節し、ジクロロメタンによって1回あたり200mlで3回抽出し、有機相をあわせ、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶剤を減圧蒸発乾固し、6.85gの白色泡状固形製品GAL-5を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.01 (br, 1H), 7.83 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 5.21 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 4.96 (dd, J = 11.2, 3.2 Hz, 1H), 4.49 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 4.07 – 3.95 (m, 3H), 3.92 – 3.85 (m, 1H), 3.74 – 3.67 (m, 1H), 3.48 – 3.39 (m, 1H), 2.20 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.11 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.90 (s, 3H), 1.77 (s, 3H), 1.55 – 1.45 (m, 4H)。

#### 【0358】

##### (1-1-2) L-8の合成

#### 【0359】

#### 【化37】



#### 【0360】

J-0(9.886g、52.5mmol、アルファ・エイサー社から購入)と工程(1-1-1)で得られたGAL-5(72.819g、162.75mmol、複数のロットの製品を組み合わせた)を525mlのジクロロメタンに溶解させ、ジイソプロピルエチルアミン(DIEA、44.782g、346.50mmol)、ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリピロリジノーホスホニウムヘキサフルオロホスフェート/エステル(PyBOP、90.158g、173.25mmol)及びヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT、23.410g、173.25mmol)を加え、室温で4h反応

させ、20 ml の飽和炭酸水素ナトリウム及び200 ml の飽和食塩水を加えて洗浄し、水相をジクロロメタンによって1回あたり100 ml で2回抽出し、有機相をあわせ、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過した後に溶剤を減圧蒸発乾固して粗製品を得た。精製には、200～300メッシュの順相シリカゲルを用い、10 wt % トリエチルアミンでシリカゲルの酸性を中和し、1 wt % トリエチルアミンでカラムを平衡化し、ジクロロメタン：メタノール＝100：25～100：40で勾配溶出し、生成物溶出液を回収し、溶剤を減圧蒸発乾固して38.8 g の純粋なL-8を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.84 (d, J = 9.0 Hz, 3H), 7.27 – 7.23 (m, 1H), 7.13 – 7.18 (m, 1H), 5.22 (d, J = 3.1 Hz, 3H), 4.97 (dd, J = 11.3, 3.1 Hz, 3H), 4.48 (d, J = 8.4 Hz, 3H), 4.09 – 3.98 (m, 9H), 3.88 (dd, J = 19.3, 9.3 Hz, 3H), 3.75 – 3.66 (m, 3H), 3.44 – 3.38 (m, 3H), 3.17 – 3.30 (m, 4H), 3.10 – 2.97 (m, 4H), 2.35 – 2.20 (m, 6H), 2.15 – 2.08 (m, 9H), 2.07 – 1.98 (m, 13H), 1.94 – 1.87 (m, 9H), 1.81 – 1.74 (m, 9H), 1.65 – 1.42 (m, 18H). MS m/z: C<sub>85</sub>H<sub>119</sub>N<sub>7</sub>O<sub>30</sub>, [M+H]<sup>+</sup>, 理論値：1477.59、実測値：1477.23。

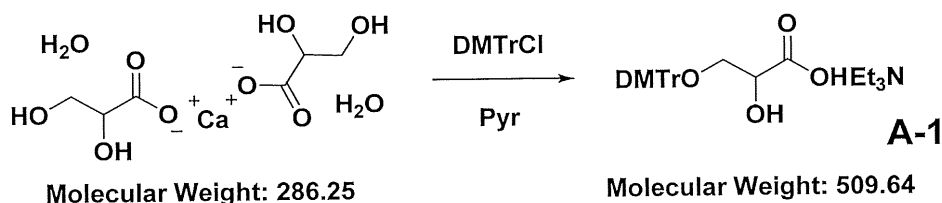
【0361】

(1-1-3) L-7の合成

(1-1-3a) A-1の合成

【0362】

【化38】



【0363】

DMTrCl (4,4'-ビスメトキシトリチルクロリド、101.65 g、300 mmol) を1000 ml の無水ピリジンに溶解させ、DL-グリセリン酸カルシウム水和物 (28.63 g、100 mmol) を加え、45℃で20 h 反応させ、反応液を濾過し、ケーキを200 ml のDCMでリンスし、濾液を乾燥まで減圧濃縮し、残りを500 ml のジクロロメタンに改めて溶解させ、0.5 M トリエチルアミンリン酸塩 (pH = 7～8) によって1回あたり200 ml で2回洗浄し、水相をジクロロメタンにより1回あたり200 ml で2回抽出し、有機相をあわせ、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、溶剤を減圧蒸発乾固し、200～300メッシュの順相シリカゲルカラムで精製し、石油エーテル：酢酸エチル：ジクロロメタン：メタノール＝1：1：1：0.35～1：1：1：0.55で勾配溶出し、生成物溶出液を回収し、溶剤を減圧蒸発乾固し、600 ml のジクロロメタンに改めて溶解させ、200 ml の0.5 M トリエチルアミンリン酸塩で1回洗浄し、水相を200 ml のジクロロメタンで1回抽出し、有機相をあわせ、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、溶剤を減圧蒸発乾固し、真空油ポンプで一晩減圧し、50.7 g の白色固形製品A-1を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.46 (ddd, J = 6.5, 2.3, 1.1 Hz, 1H), 7.40 – 7.28 (m, 7H), 6.89 – 6.81 (m, 4H), 4.84 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 4.36 – 4.24 (m, 1H), 4.29 (s, 6H), 3.92 (dd, J = 12.4, 7.0 Hz, 1H), 3.67 (dd, J = 12.3, 7.0 Hz, 1H), 2.52 (q, J = 6.3 Hz, 6H), 1.03 (t, J = 6.3 Hz, 9H). MS m/z: C<sub>24</sub>H<sub>23</sub>O<sub>6</sub>, [M-

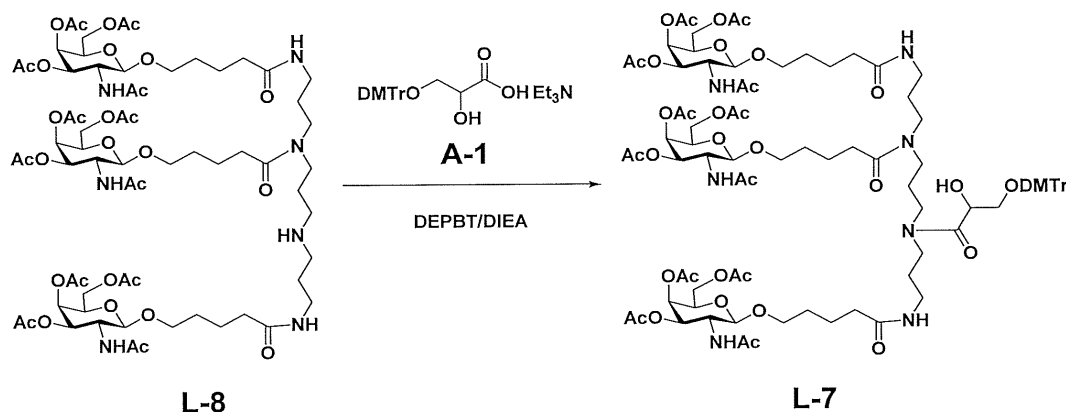
H] -, 理論値：407.15、実測値：406.92。

【0364】

(1-1-3b) L-7の合成

【0365】

【化39】



【0366】

工程(1-1-2)で得られたL-8(40g、27.09mmol、複数のロットの製品を組み合わせた)と工程(1-1-3a)で得られたA-1(41.418g、81.27mmol)とを混合し、271mlのジクロロメタンに溶解させ、3-ジエトキシホスホリル-1,2,3-ベンゾオキサゾール4(3H)-オン(DEPBT)(24.318g、81.37mmol)を加え、さらにジイソプロピルエチルアミン(21.007g、162.54mmol)を加え、25℃で1.5h攪拌反応させ、800mlの飽和炭酸水素ナトリウムで有機相を洗浄し、水相をジクロロメタンによって1回あたり50mlで3回抽出し、150mlの飽和食塩水で有機相を洗浄し、水相を50mlのジクロロメタンにより1回抽出し、有機相をあわせ、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過した後溶剤を減圧蒸発乾固し、真空油ポンプで一晩発泡乾燥させ、粗製品を得た。カラム精製には、2kgの200~300メッシュの順相シリカゲルを用い、200mlのトリエチルアミンでシリカゲルの酸性を中和し、1wt%トリエチルアミンを含む石油エーテルでカラムを平衡化し、石油エーテル：酢酸エチル：ジクロロメタン：N,N-ジメチルホルムアミド=1：1：0.5~1：1：0.6で勾配溶出し、生成物溶出液を回収し、溶剤を減圧蒸発乾固して40.4gの純粋なL-7を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.90 - 7.78 (m, 4H), 7.75 - 7.64 (m, 1H), 7.38 - 7.18 (m, 9H), 6.91 - 6.83 (m, 4H), 5.25 - 5.10 (m, 4H), 4.97 (dd, J = 11.2, 3.2 Hz, 3H), 4.48 - 4.30 (m, 4H), 4.02 (s, 9H), 3.93 - 3.84 (m, 3H), 3.76 - 3.66 (m, 9H), 3.45 - 3.35 (m, 3H), 3.24 - 2.98 (m, 10H), 2.30 - 2.20 (m, 2H), 2.11 - 1.88 (m, 31H), 1.80 - 1.40 (m, 28H). MS m/z: C<sub>90</sub>H<sub>128</sub>N<sub>7</sub>O<sub>35</sub>, [M-DMTr]<sup>+</sup>、理論値：1564.65、実測値：1564.88。

【0367】

(1-1-4) L-9の合成

【0368】

10

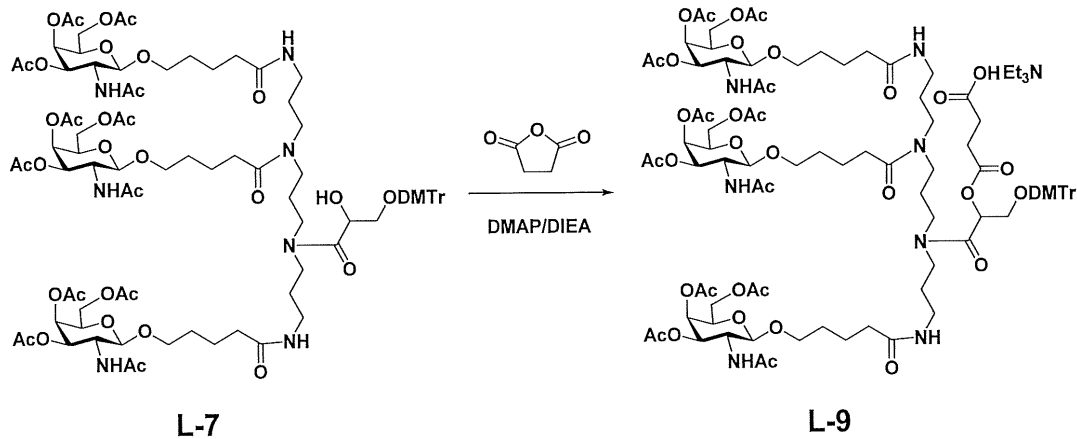
20

30

40

50

## 【化 40】



10

## 【0369】

工程 (1-1-3b) で得られた L-7 (40 g、21.4247 mmol)、コハク酸無水物 (4.288 g、42.8494 mmol) 及び 4-ジメチルアミノピリジン (DMAP、5.235 g、42.8494 mmol) を混合して 215 ml のジクロロメタンに溶解させ、さらにジイソプロピルエチルアミン (DIEA、13.845 g、107.1235 mmol) を加え、25℃で 24 h 攪拌し、800 ml の 0.5 M トリエチルアミンリン酸塩で反応液を洗浄し、水相をジクロロメタンによって 1 回あたり 5 ml で 3 回抽出し、有機相をあわせ、減圧蒸発乾固して粗製品を得た。カラム精製には、1 kg の 200~300 メッシュの順相シリカゲルを用い、1 wt% トリエチルアミンでシリカゲルの酸性を中和し、ジクロロメタンでカラムを平衡化し、1 wt% トリエチルアミンを含むジクロロメタン：メタノール=100:18~100:20 で勾配溶出し、生成物溶出液を回収し、溶剤を減圧蒸発乾固して 31.0 g の純粋な L-9 複合分子を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.58 (d, J = 4.2 Hz, 1H), 7.94 - 7.82 (m, 3H), 7.41 - 7.29 (m, 5H), 7.22 (d, J = 8.1 Hz, 5H), 6.89 (d, J = 8.3 Hz, 4H), 5.49 - 5.37 (m, 1H), 5.21 (d, J = 3.0 Hz, 3H), 4.97 (d, J = 11.1 Hz, 3H), 4.49 (d, J = 8.2 Hz, 3H), 4.02 (s, 9H), 3.88 (dd, J = 19.4, 9.4 Hz, 3H), 3.77 - 3.65 (m, 9H), 3.50 - 3.39 (m, 6H), 3.11 - 2.90 (m, 5H), 2.61 - 2.54 (m, 4H), 2.47 - 2.41 (m, 2H), 2.26 - 2.17 (m, 2H), 2.15 - 1.95 (m, 22H), 1.92 - 1.84 (m, 9H), 1.80 - 1.70 (m, 10H), 1.65 - 1.35 (m, 17H), 1.31 - 1.19 (m, 4H), 0.96 (t, J = 7.1 Hz, 9H). MS m/z: C<sub>94</sub>H<sub>132</sub>N<sub>7</sub>O<sub>38</sub>, [M-DMTr]<sup>+</sup>、理論値: 1664.72、実測値: 1665.03。

20

30

40

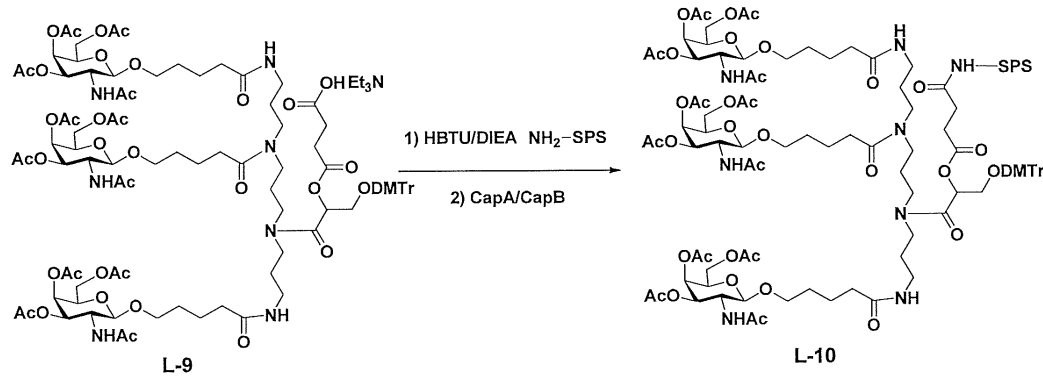
## 【0370】

(1-1-5) L-10 化合物の合成

## 【0371】

50

## 【化 4 1】



10

## 【0372】

この工程において、L-9 複合分子を固相担体に結合することにより、L-10 化合物を調製した。

## 【0373】

工程（1-1-4）で得られた L-9 複合分子（22.751 g、11 mmol）、O-ベンゾトリアゾール-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート（HBTU、6.257 g、16.5 mmol）及びジイソプロピルエチルアミン（DIEA、2.843 g、22 mmol）を混合し、900 ml のアセトニトリルに溶解させ、室温で 5 分間攪拌し、反応液にアミノメチル樹脂（88 g、100～200 メッシュ、アミノ基担持量 400  $\mu\text{mol/g}$ 、南開和成社から購入）を加え、25℃でシェーカーにより反応を行い、回転数 150 回転/分間、18 h 反応させた後で濾過し、ケーキを DCM によって 1 回あたり 300 ml で 2 回リンスし、アセトニトリルによって 1 回あたり 300 ml で 3 回リンスし、真空油ポンプで 18 h 乾燥させ、その後、表 2 に示す配合割合に従い原料（Cap A、Cap B、4-ジメチルアミノピリジン（DMAP）及びアセトニトリル）を加えてキャッピング反応を行った。25℃でシェーカーに静置し、回転数 150 回転/分間で 5 h 反応させ、反応液を濾過し、ケーキをアセトニトリルによって 1 回あたり 300 ml で 3 回リンスし、乾燥まで溶剤を減圧蒸発させ、真空油ポンプで一晩減圧乾燥させ、102 g、担持量 90.8  $\mu\text{mol/g}$  の L-10 化合物（即ち、固相担体に結合された L-9 複合分子）を得た。

20

30

## 【0374】

## 【表 2】

キャッピング反応における配合割合

| 原料      | 用量      | 仕様       | ロット番号     | メーカー    |
|---------|---------|----------|-----------|---------|
| Cap A   | 1980 ml | ---      | ---       | ---     |
| Cap B   | 220 ml  | ---      | ---       | ---     |
| DMAP    | 1.100 g | 分析試薬     | I1422139  | Aladdin |
| アセトニトリル | 220 ml  | スペクトル純試薬 | O15161001 | 上海星可    |

40

## 【0375】

ここで、Cap A と Cap B は、キャッピング試薬溶液であり、Cap A は、20 体積 % の N-メチルイミダゾールのピリジン/アセトニトリル混合溶液であり、ピリジンとアセトニトリルとの体積比が 3：5 であり、Cap B は、20 体積 % 酢酸無水物のアセトニトリル溶液であった。

## 【0376】

## （1-2）複合体 1 のセンス鎖の合成

固相ホスホルアミダイト法により、上記工程で調製された L-10 化合物を出発として循環させ、表 3 に記載されている siRNA 複合体 1 に対応する siRNA のセンス鎖の

50

ヌクレオチドの並び順に従い3' - 5' 方向に一つずつヌクレオシドモノマーを結合した。ヌクレオシドモノマーを結合するごとに、脱保護、カップリング、キャッピング、酸化又は硫化の4つの反応を行った。2個のヌクレオチド間がリン酸エステルにより結合される場合、次のヌクレオシドモノマーを結合するとき、脱保護、カップリング、キャッピング、酸化の4つの反応を行った。2個のヌクレオチド間がチオリン酸エステルにより結合される場合、次のヌクレオシドモノマーを結合するとき、保護、カップリング、キャッピング、硫化の4つの反応を行った。合成条件は、以下のように規定された。

【0377】

ヌクレオシドモノマーを0.1M濃度のアセトニトリル溶液で提供し、各脱保護反応の条件が同じであり、即ち温度が25℃であり、反応時間が70秒であり、脱保護試薬は、ジクロロ酢酸のジクロロメタン溶液（3% v/v）であり、ジクロロ酢酸と固相担体における4, 4'-ジメトキシトリチル保護基とのモル比が5:1であった。

【0378】

各カップリング反応条件は、いずれも同じであり、温度が25℃であり、固相担体に結合される核酸配列とヌクレオシドモノマーとのモル比が1:10であり、固相担体に結合される核酸配列とカップリング試薬とのモル比が1:65であり、反応時間が600秒であり、カップリング試薬は、5-エチルチオ-1H-テトラゾール（5-（E t h y l t h i o）-1 H - t e t r a z o l e、ETT）の0.5Mアセトニトリル溶液であった。

【0379】

各キャッピング条件は、いずれも同じであり、温度が25℃であり、反応時間が15秒であった。キャッピング試薬溶液は、モル比が1:1であるCap AとCap Bの混合溶液であり、キャッピング試薬と固相担体に結合される核酸配列とのモル比が、酢酸無水物：N-メチルイミダゾール：固相担体に結合される核酸配列=1:1:1であった。

【0380】

各酸化反応条件は同じであり、温度が25℃であり、反応時間が15秒であり、酸化試薬が濃度0.05Mのヨウ素水であった。ヨウ素と、カップリング工程において固相担体に結合される核酸配列とのモル比が30:1であった。反応をテトラヒドロフラン：水：ピリジン=3:1:1の混合溶剤で行った。

【0381】

各硫化反応の条件は同じであり、温度が25℃であり、反応時間が300秒であり、硫化試薬がキサンタンヒドリドであった。硫化試薬と、カップリング工程において固相担体に結合される核酸配列とのモル比が120:1であった。反応をアセトニトリル：ピリジン=1:1の混合溶剤で行った。

【0382】

最後のヌクレオシドモノマーの結合が完了した後、固相担体に結合される核酸配列に対して、切断、脱保護、精製、脱塩を順に行った後、凍結乾燥してセンス鎖を得た。切断と脱保護条件は以下のとおりである。合成された担体が結合されたヌクレオチド配列を、濃度25wt%のアンモニア水に加え、アンモニア水の用量が0.5ml/μmolであり、55℃で16h反応させ、残りの担体を濾過除去し、上清を乾燥まで真空濃縮した。

【0383】

精製と脱塩条件は以下のとおりである。分取用イオンクロマトグラフィー精製カラム（Source 15Q）により、NaClによる勾配溶出で、核酸の精製を完了した。具体的には、溶出剤A：20mMリン酸ナトリウム（pH 8.1）、溶剤が水/アセトニトリル=9:1（体積比）であり、溶出剤B：1.5M塩化ナトリウム、20mMリン酸ナトリウム（pH 8.1）、溶剤が水/アセトニトリル=9:1（体積比）であり、溶出勾配：溶出剤A：溶出剤B=100:0~50:50で勾配溶出した。製品溶出液を回収してからあわせ、逆相クロマトグラフィー精製カラムにより脱塩し、具体的な条件としては、デキストランゲルカラムにより脱塩し、充填剤がデキストランゲルG25（Sep had ex G25）であり、脱イオン水で溶出した。

【0384】

検出方法は以下のとおりである。イオン交換クロマトグラフィー（IEX-HPLC）を用いて上記センス鎖の純度を検出し、液体クロマトグラフィー質量分析（LC-MS）により分子量を分析した。実測値が理論値に一致しており、3'末端にL-9複合分子が複合されたセンス鎖SSが合成されたことを示した。

【0385】

（1-3）複合体1のアンチセンス鎖の合成

固相ホスホルアミダイト法により、汎用の固相担体（UnyLinker™ Loaded NittoPhase（登録商標）HL Solid Supports、Kinovate Life Sciences社）を出発として循環させ、表3に記載されている複合体1のsiRNAに対応するアンチセンス鎖配列を有する複合体1のアンチセンス鎖ASを合成した。固相合成方法における脱保護、カップリング、キャッピング、酸化又は硫化反応条件、切断と脱保護、精製と脱塩条件は、センス鎖の合成と同じであった。その後、凍結乾燥してアンチセンス鎖を得た。イオン交換クロマトグラフィー（IEX-HPLC）によりアンチセンス鎖の純度を検出し、液体クロマトグラフィー質量分析（LC-MS）により分子量を分析した。その結果、実測値が理論値に一致しており、目的配列を有するアンチセンス鎖ASが合成されたことを示した。

【0386】

（1-4）複合体1の合成

複合体1に対して、センス鎖とアンチセンス鎖をそれぞれ注射用水に溶解させ、40mg/mLの溶液を得、等モル比で混合し、50℃で15min加熱し、室温で冷却した後、アニールを行った生成物を得、凍結乾燥させて、凍結乾燥粉末を得た。超純水（Milli-Q超純水装置、抵抗率18.2MΩ\*cm（25℃））を用いて複合体を濃度が0.2mg/mLになるまで希釈した後、液体クロマトグラフィー質量分析計（LC-MS、Liquid Chromatography-Mass Spectrometry、Waters社から購入、型番：LCT Premier）により分子量を検出した。実測値が理論値と一致しており、合成されたsiRNA複合体1が、L-9複合分子を含む目的設計の二本鎖核酸配列であることが示された。その構造は、式（403）に示され、当該複合体に含まれるsiRNAは、表3における複合体1に対応するsiRNA配列を有する。

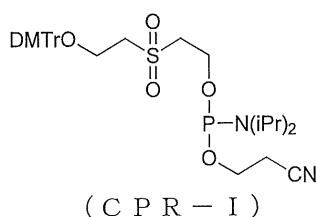
【0387】

調製例2：複合体2～13の調製

1）前記siRNAは、表3に示される複合体2～13にそれぞれ対応する配列であり、2）目的配列においてアンチセンス鎖の5'-末端の1番目のヌクレオチドに5-リン酸を有する場合、固相ホスホルアミダイト法によりアンチセンス鎖を調製する過程において、アンチセンス鎖の最後のヌクレオシドモノマーを結合した後、脱保護、カップリング、キャッピング、酸化の4つの反応を行ってCPR-Iモノマー（蘇州吉瑪、番号Cat#13-2601-XX）をアンチセンス鎖の5'末端に結合し、5'-リン酸エステル修飾を形成したこと以外は、調製例1と同じ方法により、複合体2～13を合成し、分子量を検出した。

【0388】

【化42】



【0389】

当該結合において用いられた脱保護、カップリング、キャッピング、酸化反応の条件、

切断と脱保護、精製と脱塩の条件は、センス鎖の合成と同じであった。表 3 に複合体番号及び s i R N A 配列組成を示した。

【0390】

【表 3】

s i R N A 複合体

| 複合体   | 番号                                   | 配列方向 5' - 3' |                                                                                                       | 配列番号  |
|-------|--------------------------------------|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 複合体 1 | L 1 0 -<br>s i P N<br>a 1 M 1<br>S   | センス鎖         | C m s C m s U m A m U m G m A f A f G f<br>A m U m U m A m U m A m A m G m A m A m                    | 2 4 1 |
|       |                                      | アンチセンス鎖      | U m s U f s C m U m U m A f U m A m A m<br>U m C m U m U m C f A m U f A m G m G m<br>s U m s G m     | 2 4 2 |
| 複合体 2 | L 1 0 -<br>s i P N<br>b 1 M 1<br>S   | センス鎖         | G m s U m s A m C m A m G m U f A f C f<br>C m A m G m A m A m G m U m U m A m U m                    | 2 4 3 |
|       |                                      | アンチセンス鎖      | A m s U f s A m A m C m U f U m C m U m<br>G m G m U m A m C f U m G f U m A m C m<br>s U m s C m     | 2 4 4 |
| 複合体 3 | L 1 0 -<br>s i P N<br>c 1 M 1<br>S   | センス鎖         | C m s A m s A m A m C m A m A f G f C f<br>U m G m C m A m C m A m G m A m A m A m                    | 2 4 5 |
|       |                                      | アンチセンス鎖      | U m s U f s U m C m U m G f U m G m C m<br>A m G m C m U m U f G m U f U m U m G m<br>s C m s C m     | 2 4 6 |
| 複合体 4 | L 1 0 -<br>s i P N<br>a 1 M 1<br>S P | センス鎖         | C m s C m s U m A m U m G m A f A f G f<br>A m U m U m A m U m A m A m G m A m A m                    | 2 4 7 |
|       |                                      | アンチセンス鎖      | P U m s U f s C m U m U m A f U m A m A m<br>m U m C m U m U m C f A m U f A m G m G m<br>s U m s G m | 2 4 8 |
| 複合体 5 | L 1 0 -<br>s i P N<br>b 1 M 1<br>S P | センス鎖         | G m s U m s A m C m A m G m U f A f C f<br>C m A m G m A m A m G m U m U m A m U m                    | 2 4 9 |
|       |                                      | アンチセンス鎖      | P A m s U f s A m A m C m U f U m C m U m<br>m G m G m U m A m C f U m G f U m A m C m<br>s U m s C m | 2 5 0 |
| 複合体 6 | L 1 0 -<br>s i P N<br>c 1 M 1<br>S P | センス鎖         | C m s A m s A m A m C m A m A f G f C f<br>U m G m C m A m C m A m G m A m A m A m                    | 2 5 1 |
|       |                                      | アンチセンス鎖      | P U m s U f s U m C m U m G f U m G m C m<br>m A m G m C m U m U f G m U f U m U m G m<br>s C m s C m | 2 5 2 |
| 複合体 7 | L 1 0 -<br>s i P N<br>d 1 M 1<br>S P | センス鎖         | C m s A m s A m A m C m A m A f G f G f<br>A m C m U m A m A m U m C m C m A m A m                    | 2 5 3 |
|       |                                      | アンチセンス鎖      | P U m s U f s G m G m A m U f U m A m G m<br>m U m C m C m U m U f G m U f U m U m G m<br>s G m s U m | 2 5 4 |
| 複合体 8 | L 1 0 -<br>s i P N<br>d 1 M 1<br>S   | センス鎖         | C m s A m s A m A m C m A m A f G f G f<br>A m C m U m A m A m U m C m C m A m A m                    | 2 5 5 |
|       |                                      | アンチセンス鎖      | U m s U f s G m G m A m U f U m A m G m<br>U m C m C m U m U f G m U f U m U m G m<br>s G m s U m     | 2 5 6 |
| 複合体 9 | L 1 0 -<br>s i P N<br>b 1 M 1        | センス鎖         | G m s U m s A m C m A m G m U f A f C f<br>C m A m G m A m A m G m U m U m A m A m                    | 2 5 7 |
|       |                                      | アンチセ         | U m s U f s A m A m C m U f U m C m U m                                                               | 2 5 8 |

10

20

30

40

50

|           |                                        |         |                                                                                                     |       |
|-----------|----------------------------------------|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
|           | S U                                    | センス鎖    | G m G m U m A m C f U m G f U m A m C m<br>s U m s C m                                              |       |
| 複合体<br>10 | L 1 0 -<br>s i P N<br>b 1 M 1<br>S U U | センス鎖    | G m s U m s A m C m A m G m U f A f C f<br>C m A m G m A m A m G m U m U m A m A m                  | 2 5 9 |
|           |                                        | アンチセンス鎖 | U m s U f s A m A m C m U f U m C m U m<br>G m G m U m A m C f U m G f U m A m C m<br>s U m s U m   | 2 6 0 |
| 複合体<br>11 | L 1 0 -<br>s i P N<br>c 1 M 1<br>S U   | センス鎖    | C m s A m s A m A m C m A m A f G f C f<br>U m G m C m A m C m A m G m A m A m A m                  | 2 6 1 |
|           |                                        | アンチセンス鎖 | U m s U f s U m C m U m G f U m G m C m<br>A m G m C m U m U f G m U f U m U m G m<br>s U m s U m   | 2 6 2 |
| 複合体<br>12 | L 1 0 -<br>s i P N<br>d 1 M 1<br>S U   | センス鎖    | C m s A m s A m A m C m A m A f G f G f<br>A m C m U m A m A m U m C m C m A m A m                  | 2 6 3 |
|           |                                        | アンチセンス鎖 | U m s U f s G m G m A m U f U m A m G m<br>U m C m C m U m U f G m U f U m U m G m<br>s U m s U m   | 2 6 4 |
| 複合体<br>13 | L 1 0 -<br>s i P N<br>e 1 M 1<br>S P   | センス鎖    | G m s C m s A m C m A m G m U f C f C f<br>C m A m G m A m A m G m U m U m A m U m                  | 2 6 5 |
|           |                                        | アンチセンス鎖 | P A m s U f s A m A m C m U f U m C m U<br>m G m G m G m A m C f U m G f U m G m C<br>m s U m s C m | 2 6 6 |

10

20

ただし、大文字C、G、U、Aは、ヌクレオチドの塩基配列を表し、小文字mは、当該文字mの左側に隣接する1つのヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドであることを表し、小文字fは、当該文字fの左側に隣接する1つのヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであることを表し、小文字sは、当該文字sの左右の2つのヌクレオチド間がチオリン酸エステル基により結合されていることを表し、大文字Pは、当該文字Pの右側に隣接する1つのヌクレオチドが5'-リン酸ヌクレオチドであることを表す。

【0391】

調製例3：s i R N A配列の合成

30

固相合成方法により表4に示されるs i R N Aをそれぞれ合成し、DEPC処理水を用い、表4における互いに相補的なセンス鎖とアンチセンス鎖をそれぞれ等モル溶解させた後、アニールを行って本開示により提供されるs i R N A 1～4及び参照s i R N A N Cを得た。

【0392】

40

50

【表 4】

s i R N A 配列

| s i R N A   | 番号                | 配列方向 5' - 3' |                                                                                             | 配列番号  |
|-------------|-------------------|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| s i R N A 1 | s i P N a l M l S | センス鎖         | C m s C m s U m A m U m G m A f A f G f A m U m U m A m U m A m A m G m A m A m             | 2 6 7 |
|             |                   | アンチセンス鎖      | U m s U f s C m U m U m A f U m A m A m U m C m U m U m C f A m U f A m G m G m s U m s G m | 2 6 8 |
| s i R N A 2 | s i P N b l M l S | センス鎖         | G m s U m s A m C m A m G m U f A f C f C m A m G m A m A m G m U m U m A m U m             | 2 6 9 |
|             |                   | アンチセンス鎖      | A m s U f s A m A m C m U f U m C m U m G m G m U m A m C f U m G f U m A m C m s U m s C m | 2 7 0 |
| s i R N A 3 | s i P N c l M l S | センス鎖         | C m s A m s A m A m C m A m A f G f C f U m G m C m A m C m A m G m A m A m A m             | 2 7 1 |
|             |                   | アンチセンス鎖      | U m s U f s U m C m U m G f U m G m C m A m G m C m U m U f G m U f U m U m G m s C m s C m | 2 7 2 |
| s i R N A 4 | s i P N d l M l S | センス鎖         | C m s A m s A m A m C m A m A f G f G f A m C m U m A m A m U m C m C m A m A m             | 2 7 3 |
|             |                   | アンチセンス鎖      | U m s U f s G m G m A m U f U m A m G m U m C m C m U m U f G m U f U m U m G m s G m s U m | 2 7 4 |
| N C         | —                 | センス鎖         | U U C U C C G A A C G U G U C A C G U d T d T                                               | 2 7 5 |
|             |                   | アンチセンス鎖      | A C G U G A C A C G U U C G G A G A A d T d T                                               | 2 7 6 |

ただし、大文字 C、G、U、A は、ヌクレオチドの塩基配列を表し、小文字 m は、当該文字 m の左側に隣接する 1 つのヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドであることを表し、小文字 f は、当該文字 f の左側に隣接する 1 つのヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであることを表し、小文字 s は、当該文字 s の左右の 2 つのヌクレオチド間がチオリン酸エステル基により結合されていることを表し、d T は、チミンデオキシリボヌクレオチドを表す。

## 【0393】

上記配列の調製過程において、目的配列に未修飾ヌクレオチドが含まれる場合、切断と脱保護条件で、アンモニア水で処理した後、一本鎖核酸の量に対して、0.4 ml / μmol の N-メチルピロリドンで製品を溶解させた後、0.3 ml / μmol のトリエチルアミン及び 0.6 ml / μmol のトリエチルアミン三フッ化水素酸塩を加え、リボースでの 2'-TBDMS 保護を除去した。

## 【0394】

上記の本開示の s i R N A 又は複合体の調製が完了した後、標準手段によって固体粉末として凍結乾燥して保存した。使用する場合、例えば、注射用水、生理食塩水 (N S)、リン酸緩衝液 (P B) 又はリン酸塩緩衝液 (P B S) 等を用いて所望の濃度の溶液に改めて溶解させて使用することができた。

## 【0395】

実験例 1: SMMC-7721 細胞における s i R N A の P N P mRNA 発現量に対する抑制効率の検出

SMMC-7721細胞を $7.5 \times 10^4$ 細胞／ウェルで24ウェルプレートに接種し、16h後に細胞成長密度が70～80%になったとき、培養ウェル中のH-DMEM完全培地を全部吸引除去し、1ウェルごとにOpti-MEM培地（GIBCO社）500 $\mu$ lを加えて培養を1.5h継続した。

【0396】

DEPC処理水を用いて、siPNa1M1S、siPNb1M1S、siPNc1M1S又はsiPNd1M1S及び陰性対照NCの各siRNAから、10 $\mu$ MのsiRNA希釈標準溶液（Working Solution）をそれぞれ作製した。

【0397】

各siRNAに対して、上記濃度10 $\mu$ MのsiRNA希釈標準溶液3 $\mu$ l及びOpti-MEM培地50 $\mu$ lを順に含む1A溶液をそれぞれ作製した。

【0398】

1 $\mu$ lのLipofectamine™ 2000及び50 $\mu$ lのOpti-MEM培地を含む1B溶液を作製した。

【0399】

1つの1B溶液と得られた各siRNAの1A溶液をそれぞれ混合し、それぞれ室温で20min培養し、各siRNAのトランスフェクション複合体1Xを得た。

【0400】

1つの1B溶液とOpti-MEM培地50 $\mu$ lを混合し、室温で20min培養し、トランスフェクション複合体1X'を得た。

【0401】

培養ウェルに、仕込み量100 $\mu$ l／ウェルで各siRNAトランスフェクション複合体1Xをそれぞれ加え、均一に混合し、各siRNAの最終濃度がそれぞれ約50nMであるトランスフェクション複合体を得、各siRNAのトランスフェクション複合体1Xでそれぞれ2つの培養ウェルをトランスフェクションし、siRNAを含むトランスフェクション混合物を得、試験群とした。

【0402】

別の2つの培養ウェルに、仕込み量100 $\mu$ l／ウェルでトランスフェクション複合体1X'をそれぞれ加え、siRNAを含まないトランスフェクション混合物を得、ブランク対照群とした。

【0403】

siRNAを含むトランスフェクション混合物とsiRNAを含まないトランスフェクション混合物を培養ウェルで4hトランスフェクションした後、1ウェルごとに1mlの20%FBS含有H-DMEM完全培地を追加した。24ウェルプレートをCO<sub>2</sub>インキュベーターに入れて培養を24h継続した。

【0404】

その後、RNAVzol（Vigorous Biotechnology（北京）有限公司から購入、番号N002）を用い、説明書に記載された方法に従って各ウェルの細胞における全RNAを抽出した。

【0405】

各ウェルの細胞に対して、それぞれ1 $\mu$ gの全RNAを取り、逆転写キットGoldenstar™ RT6 cDNA Synthesis Kit（北京▲チン▼科新業生物技術有限公司から購入、番号TSK301M）より提供される試薬から、Goldenstar™ Oligo（dT）<sub>17</sub>を選択してプライマーとし、キット説明書における逆転写の操作工程に従って逆転写反応系20 $\mu$ lを配置し、各ウェルの細胞における全RNAに対して逆転写を行った。逆転写の条件としては、各逆転写反応系に対して、逆転写反応系を、50℃で50min、次に85℃で5min、最後に4℃で30s培養し、反応が終了した後、逆転写反応系にDEPC処理水80 $\mu$ lを加え、cDNAを含む溶液を得た。

【0406】

10

20

30

40

50

各逆転写反応系に対して、それぞれ上記cDNAを含む溶液5μlをテンプレートとし、NovoStart（登録商標）SYBR qPCR SuperMix Plusキット（近岸蛋白質科技有限公司から購入、番号E096-01B）より提供される試薬を用いてqPCR反応系20μlを配置した。ここで、目的遺伝子PNP及び内因性参照遺伝子GAPDHを増幅するためのPCRプライマー配列を表5に示す。各プライマーの最終濃度は0.25μMであった。各qPCR反応系をABI StepOnePlus Real-Time PCR装置に置き、三段法にて増幅を行い、増幅手順は、95℃で10min予備変性、そして95℃で30s変性、60℃で30sアニール、72℃で30s伸長を行い、上記変性、アニール、伸長の過程を計40回繰り返した後、増幅された目的遺伝子PNP及び内因性参照遺伝子GAPDHを含む生成物Wを得た。そして、生成物Wを95℃で15s、60℃で1min、95℃で15s順に培養し、リアルタイム蛍光定量的PCR装置により、それぞれ生成物Wにおける目的遺伝子PNP及び内因性参照遺伝子GAPDHの融解曲線を得、目的遺伝子PNP及び内因性参照遺伝子GAPDHのCt値を得た。

【0407】

【表5】

プライマー情報

| 遺伝子名称   | プライマー種類 | ヌクレオチド配列（5' → 3'）                       | 配列番号 |
|---------|---------|-----------------------------------------|------|
| ヒトPNP   | 上流プライマー | A C T G G T G T T T G G G T T C C T G A | 277  |
|         | 下流プライマー | T C C T G C T G C A T T G G T G A C T A | 278  |
| ヒトGAPDH | 上流プライマー | G G T C G G A G T C A A C G G A T T T   | 279  |
|         | 下流プライマー | C C A G C A T C G C C C C A C T T G A   | 280  |

【0408】

比較Ct（ΔΔCt）法を用い、各試験群における目的遺伝子PNPについて相対定量計算を行い、計算方法は以下のとおりである。

$\Delta Ct(\text{試験群}) = Ct(\text{試験群の目的遺伝子}) - Ct(\text{試験群の内因性参照遺伝子})$

$\Delta Ct(\text{対照群}) = Ct(\text{対照群の目的遺伝子}) - Ct(\text{対照群の内因性参照遺伝子})$

$\Delta \Delta Ct(\text{試験群}) = \Delta Ct(\text{試験群}) - \Delta Ct(\text{対照群の平均})$

$\Delta \Delta Ct(\text{対照群}) = \Delta Ct(\text{対照群}) - \Delta Ct(\text{対照群の平均})$

【0409】

ここで、ΔCt（対照群の平均）は、対照群における3つの培養ウェルそれぞれのΔCt（対照群）の算術平均である。したがって、試験群及び対照群の各培養ウェルはいずれも1つのΔΔCt値に対応していた。

【0410】

対照群を基準とし、試験群のPNP mRNAの発現レベルを正規化し、ブランク対照群PNP mRNAの発現レベルが100%であると定義した。

試験群のPNP mRNAの相対発現レベル =  $2^{-\Delta \Delta Ct(\text{試験群})} \times 100\%$

試験群PNP mRNA抑制率 =  $(1 - \text{試験群PNP mRNAの相対発現レベル}) \times 100\%$

【0411】

各siRNAのPNP mRNAに対する抑制率を表6にまとめた。同一試験群のsiRNAに対して、mRNA抑制率は、2つの培養ウェルで測定された試験群PNP mRNA抑制率の算術平均である。

【0412】

## 【表 6】

SMMC-7721細胞におけるPNP mRNAの抑制

| s i R N A   | 番号                | m R N A 抑制率% |
|-------------|-------------------|--------------|
| s i R N A 1 | s i P N a 1 M 1 S | 74.83        |
| s i R N A 2 | s i P N b 1 M 1 S | 64.37        |
| s i R N A 3 | s i P N c 1 M 1 S | 61.43        |
| s i R N A 4 | s i P N d 1 M 1 S | 66.15        |
| N C         | —                 | —0.18        |

## 【0413】

表6の結果から分かるように、本開示により提供される修飾s i R N Aは、SMMC-7721細胞系において高い抑制活性を有し、s i R N A濃度50nMで、PNP mRNA抑制率が少なくとも61.43%であり、ひいては74.83%と高くなった。

## 【0414】

実験例2：Huh7細胞におけるs i R N AのPNP mRNA発現量に対する抑制効率の検出

本実験例では、本開示のs i R N Aの、Huh7細胞におけるPNP mRNA発現量に対する抑制効率を検出した。

## 【0415】

SMMC-7721細胞の代わりにHuh7細胞を用いたこと以外は、実験例1と同じ方法によりs i R N Aの抑制率を検出した。各s i R N Aの体外Huh7細胞での抑制活性を表7に示した。

## 【0416】

## 【表 7】

Huh7細胞におけるPNP mRNAの抑制

| s i R N A   | 番号                | m R N A 抑制率% |
|-------------|-------------------|--------------|
| s i R N A 1 | s i P N a 1 M 1 S | 45.17        |
| s i R N A 2 | s i P N b 1 M 1 S | 53.56        |
| s i R N A 3 | s i P N c 1 M 1 S | 66.62        |
| s i R N A 4 | s i P N d 1 M 1 S | 89.15        |
| N C         | —                 | —0.93        |

## 【0417】

表7の結果から分かるように、本開示により提供されるs i R N Aは、Huh7細胞系において抑制活性が高く、特に50nMのs i R N A4のPNP mRNA発現量に対する抑制率が89.15%にも達した。

## 【0418】

実験例3：HepG2細胞におけるs i R N AのPNP mRNA発現量に対する抑制効率の検出

SMMC-7721細胞の代わりにHepG2細胞を用いたこと以外は、実験例1と同じ方法によりs i R N Aの抑制率を検出した。各s i R N Aの体外HepG2細胞での抑制活性を表8に示した。

## 【0419】

10

20

30

40

50

## 【表 8】

Hep G 2 細胞における PNP mRNA の抑制

| s i R N A   | 番号                | m R N A 抑制率 % |
|-------------|-------------------|---------------|
| s i R N A 1 | s i P N a 1 M 1 S | 6 5 . 0 4     |
| s i R N A 2 | s i P N b 1 M 1 S | 5 7 . 3 5     |
| s i R N A 3 | s i P N c 1 M 1 S | 6 5 . 3 7     |
| s i R N A 4 | s i P N d 1 M 1 S | 6 3 . 6 3     |
| N C         | —                 | — 9 . 5 0     |

## 【0 4 2 0】

表 8 の結果から分かるように、本開示により提供される s i R N A は、Hep G 2 細胞系において同様に抑制活性が高く、抑制率が 5 7 . 3 5 % ~ 6 5 . 3 7 % であった。

## 【0 4 2 1】

実験例 4 : S M M C - 7 7 2 1 細胞における異なる用量の s i R N A の P N P mRNA 発現量に対する抑制効率の検出

使用された各 s i R N A に対して、濃度 1 0 μ M 、 1 μ M 及び 0 . 1 μ M の希釈標準溶液をそれぞれ作製し、即ち、それぞれ s i R N A の最終濃度 5 0 n M 、 5 n M 及び 0 . 5 n M で検出したこと以外は、実験例 1 と同じ方法により s i R N A の抑制率を検出した。検出された各 s i R N A の体外 S M M C - 7 7 2 1 細胞での抑制活性を表 9 に示した。

## 【0 4 2 2】

## 【表 9】

S M M C - 7 7 2 1 細胞における濃度の異なる s i R N A による P N P mRNA の抑制

| s i R N A   | 番号                | m R N A 抑制率 % |           |           |
|-------------|-------------------|---------------|-----------|-----------|
|             |                   | 5 0 n M       | 5 n M     | 0 . 5 n M |
| s i R N A 1 | s i P N a 1 M 1 S | 6 8 . 3 7     | 6 7 . 5 5 | 4 3 . 7 5 |
| s i R N A 2 | s i P N b 1 M 1 S | 8 0 . 2 5     | 7 6 . 2 4 | 6 4 . 0 8 |
| s i R N A 3 | s i P N c 1 M 1 S | 7 4 . 8 9     | 7 2 . 9 0 | 7 0 . 1 4 |
| s i R N A 4 | s i P N d 1 M 1 S | 8 1 . 2 3     | 7 0 . 2 2 | 5 2 . 1 5 |
| N C         | —                 | — 0 . 0 6     | —         | —         |

## 【0 4 2 3】

表 9 の結果から分かるように、S M M C - 7 7 2 1 細胞系において、本開示により提供される s i R N A は、いずれの濃度でも高い抑制活性を示した。具体的には、濃度 0 . 5 n M で、本開示の s i R N A が少なくとも 4 3 . 7 5 % ~ 7 0 . 1 4 % の標的 mRNA 抑制率を示し、濃度 5 0 n M では、さらに 8 1 . 2 3 % と高い P N P mRNA 抑制率を示した。

## 【0 4 2 4】

実験例 5 : 濃度の異なる s i R N A の Hep G 2 細胞における P N P mRNA 発現量に対する抑制効率の検出

S M M C - 7 7 2 1 細胞の代わりに Hep G 2 細胞を用い、使用された各 s i R N A に対して、濃度 1 0 μ M 及び 1 μ M の希釈標準溶液をそれぞれ作製し、即ち、それぞれ s i R N A の最終濃度 5 0 n M 及び 5 n M で検出したこと以外は、実験例 1 と同じ方法により s i R N A の抑制率を検出した。検出された各 s i R N A の体外 Hep G 2 細胞での抑制活性を表 1 0 に示した。

## 【0 4 2 5】

10

20

30

40

50

【表 10】

Hep G 2 細胞における濃度の異なる siRNA による PNP mRNA の抑制

| siRNA   | 番号        | mRNA 抑制率 % |      |
|---------|-----------|------------|------|
|         |           | 50 nM      | 5 nM |
| siRNA 1 | siPNa1M1S | 59.5       | 34.0 |
| siRNA 2 | siPNb1M1S | 64.5       | 46.5 |
| siRNA 3 | siPNc1M1S | 64.5       | 29.0 |
| siRNA 4 | siPNd1M1S | 68.0       | 36.0 |
| NC      | —         | 6.5        | —    |

10

## 【0426】

表 10 の結果から分かるように、Hep G 2 細胞系において、本開示により提供される siRNA は、各濃度でも高い抑制活性を示した。

## 【0427】

実験例 6：siRNA 複合体による SMMC-7721 細胞における PNP mRNA に対する IC<sub>50</sub> の測定

本実験例では、リアルタイム蛍光定量的 PCR (Quantitative Real-Time PCR) 方法により、濃度の異なる siRNA 複合体 4、複合体 5、複合体 6 又は複合体 7 をトランスフェクションした後の、SMMC-7721 細胞における PNP mRNA の相対発現レベルを検出し、各 siRNA 複合体による PNP mRNA に対する IC<sub>50</sub> 値を測定した。

20

## 【0428】

SMMC-7721 細胞を  $5 \times 10^4$  細胞／ウェルで 24 ウェルプレートに接種し、16 h 後に細胞成長密度が 70～80% になったとき、培養ウェル中の H-DMEM 完全培地を全部吸引除去し、1 ウェルごとに Opti-MEM 培地 (GIBCO 社) 500  $\mu$ L を加えて培養を 1.5 h 継続した。

## 【0429】

DEPC 処理水を用いて、上記複合体 4～7 の各複合体から、濃度がそれぞれ 50  $\mu$ M、12.5  $\mu$ M、3.125  $\mu$ M、0.7813  $\mu$ M、0.1953  $\mu$ M、0.0488  $\mu$ M、0.0122  $\mu$ M 及び 0.0031  $\mu$ M (siRNA として) である計 8 種の siRNA 複合体希釈標準溶液をそれぞれ作製した。

30

## 【0430】

各複合体に対して、6A1～6A8 溶液をそれぞれ作製し、各 6A1～6A8 溶液は、上記 8 種の濃度の siRNA 複合体希釈標準溶液 3  $\mu$ L 及び Opti-MEM 培地 50  $\mu$ L を順に含む。

## 【0431】

1 つの 1B 溶液と得られた 1 つの各複合体の 6A1～6A8 の溶液をそれぞれ混合し、それぞれ室温で 20 min 培養し、各複合体のトランスフェクション複合体 6X1～6X8 を得た。

## 【0432】

1 つの 1B 溶液と Opti-MEM 培地 50  $\mu$ L を混合し、室温で 20 min 培養し、トランスフェクション複合体 6X' を得た。

40

## 【0433】

上述した SMMC-7721 細胞を培養した培養ウェルに、仕込み量 100  $\mu$ L／ウェルで上記トランスフェクション複合体 6X1～6X8 のうちの 1 つをそれぞれ加え、均一に混合し、複合体の最終濃度 (siRNA として) がそれぞれ 250 nM、60 nM、15.625 nM、3.9065 nM、0.9765 nM、0.244 nM、0.061 nM 及び 0.155 nM であるトランスフェクション混合物を得た。各複合体のトランスフェクション複合体で 2 つの培養ウェルをそれぞれトランスフェクションし、本開示の siRNA 複合体を含むトランスフェクション混合物を得、試験群とした。

50

## 【0434】

別の2つの培養ウェルに、仕込み量100 $\mu$ L／ウェルでトランスフェクション複合体6X'をそれぞれ加え、複合体を含まないトランスフェクション混合物を得、対照群とした。

## 【0435】

上記試験群と対照群のトランスフェクション混合物を培養ウェルで4hトランスフェクションした後、1ウェルごとに1mLの20%FBS含有H-DMEM完全培地を追加した。24ウェルプレートでCO<sub>2</sub>インキュベーターに入れて培養を24h継続した。

## 【0436】

その後、RNAVzol (Vigorous Biotechnology (北京) 有限公司から購入、番号N002)を用い、説明書に記載された方法に従って各ウェルの細胞における全RNAを抽出した。

## 【0437】

各ウェルの細胞に対して、それぞれ1 $\mu$ gの全RNAを取り、逆転写キットGoldenstar<sup>TM</sup> RT6 cDNA Synthesis Kit (北京▲チン▼科新業生物技術有限公司から購入、番号TSK301M)より提供される試薬から、Goldenstar<sup>TM</sup> Oligo (dT)<sub>17</sub>を選択してプライマーとし、キット説明書における逆転写の操作工程に従って逆転写反応系20 $\mu$ Lを作製し、細胞の全RNAに対して逆転写を行った。逆転写の条件としては、逆転写反応系を、50℃で50min、次に85℃で5min、最後に4℃で30s培養し、反応が終了した後、各逆転写反応系にDEPC処理水80 $\mu$ Lを加え、cDNAを含む溶液を得た。

## 【0438】

各逆転写反応系に対して、それぞれ上記cDNAを含む溶液5 $\mu$ Lをテンプレートとし、NovoStart (登録商標) SYBR qPCR SuperMix Plusキット (近岸蛋白質科技有限公司から購入、番号E096-01B)より提供される試薬を用いてqPCR反応系20 $\mu$ Lを配置した。ここで、目的遺伝子PNP及び内因性参照遺伝子GAPDHを増幅するためのPCRプライマー配列は、表5に示したとおりである。各プライマーの最終濃度は0.25 $\mu$ Mであった。各qPCR反応系をABI Step One Plus Real-Time PCR装置に置き、三段法にて増幅を行い、増幅手順は、95℃で10min予備変性、そして95℃で30s変性、60℃で30sアニール、72℃で30s伸長を行い、上記変性、アニール、伸長の過程を計40回繰り返した後、増幅された目的遺伝子PNP及び内因性参照遺伝子GAPDHを含む生成物Wを得た。そして、生成物Wを95℃で15s、60℃で1min、95℃で15s順に培養し、リアルタイム蛍光定量的PCR装置により、それぞれ生成物Wにおける目的遺伝子PNP及び内因性参照遺伝子GAPDHの融解曲線を得、目的遺伝子PNP及び内因性参照遺伝子GAPDHのCt値を得た。

## 【0439】

比較Ct ( $\Delta\Delta Ct$ )法を用い、各試験群における目的遺伝子PNPについて相対定量計算を行い、計算方法は以下のとおりである。

$$\Delta Ct (\text{試験群}) = Ct (\text{試験群の目的遺伝子}) - Ct (\text{試験群の内因性参照遺伝子})$$

$$\Delta Ct (\text{対照群}) = Ct (\text{対照群の目的遺伝子}) - Ct (\text{対照群の内因性参照遺伝子})$$

$$\Delta\Delta Ct (\text{試験群}) = \Delta Ct (\text{試験群}) - \Delta Ct (\text{対照群の平均})$$

$$\Delta\Delta Ct (\text{対照群}) = \Delta Ct (\text{対照群}) - \Delta Ct (\text{対照群の平均})$$

## 【0440】

ここで、 $\Delta Ct$  (対照群の平均)は、対照群における3つの培養ウェルそれぞれの $\Delta Ct$  (対照群)の算術平均である。したがって、試験群及び対照群の各培養ウェルはいずれも1つの $\Delta\Delta Ct$ 値に対応している。

## 【0441】

対照群を基準とし、試験群のPNP mRNAの発現レベルを正規化し、対照群のPNP mRNAの発現レベルが100%であると定義した。

試験群の PNP mRNA の相対発現レベル =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (試験群)  $\times 100\%$

【0442】

Graphpad 5.0 ソフトウェア log (inhibitor) vs. response-Variable slope 機能により前記用量-効果曲線をフィッティングし、用量-効果曲線から、各複合体の PNP mRNA に対する IC<sub>50</sub> 値を算出した。具体的には、フィッティングされた用量-効果曲線は、以下の計算式を満たす。

【0443】

【数2】

$$Y = Bot + \frac{Top - Bot}{1 + 10^{(X' - X) \times HillSlope}}$$

10

式中、

Y は、各試験群の mRNA の相対発現レベルであり、

X は、対応する試験群で用いられる siRNA の最終濃度の対数値であり、

Bot は、定常期の最低の Y 値であり、

Top は、定常期の最高の Y 値であり、

X' は、フィッティングされた、Y が最低と最高との間の半分にあるときの X 値であり、

HillSlope は、フィッティングされた曲線の X' における傾きである。

【0444】

この用量-効果曲線及び対応する計算式から、Y = 50% であるときに対応する X<sub>50</sub> 値を決定し、各 siRNA の IC<sub>50</sub> 値 =  $10^{X_{50}}$  (nM) を算出した。

【0445】

図1A～図1Dは、順に濃度の異なる siRNA 複合体4～7をトランスフェクションした後、SMMC-7721細胞における PNP mRNA の相対発現レベルでフィッティングされた用量-効果曲線である。そのうち、siRNA 濃度の対数値 (lg nM) を横座標とし、PNP mRNA の相対発現レベル (%) を縦座標とし、各黒丸は、2つの複製ウェルにおける PNP mRNA の相対発現レベルの平均を表す。

【0446】

各複合体による PNP mRNA に対する IC<sub>50</sub> 値を表11にまとめた。

【0447】

【表11】

siRNA 複合体の IC<sub>50</sub>

| 複合体  | 番号             | IC <sub>50</sub> |
|------|----------------|------------------|
| 複合体4 | L10-siPNa1M1SP | 0.017 nM         |
| 複合体5 | L10-siPNb1M1SP | 0.045 nM         |
| 複合体6 | L10-siPNc1M1SP | 0.113 nM         |
| 複合体7 | L10-siPNd1M1SP | 0.062 nM         |

30

【0448】

図1A～1D及び表11の結果から分かるように、本開示により提供される siRNA 複合体は、体外 SMMC-7721細胞における PNP mRNA 抑制活性が非常に高く、IC<sub>50</sub> は 0.017～0.113 nM であった。

【0449】

実験例7：HepG2細胞における異なる用量の siRNA の PNP mRNA 発現量に対する抑制効率の検出

(1) 使用された各 siRNA に対して、それぞれ siRNA の最終濃度 50 nM、5 nM 及び 0.5 nM で検出し、(2) INTERFERin をトランスフェクション試薬として用い、(3) 検出された siRNA が表4における siRNA 2～4であり、NC 陰性対照群を追加し、(4) SMMC-7721の代わりに HepG2細胞を用いたこ

40

50

と以外は、実験例 1 と同じ方法により s i R N A の抑制率を検出した。検出された各 s i R N A の体外 H e p G 2 細胞での抑制活性を表 1 2 に示した。

【 0 4 5 0 】

【表 1 2】

H e p G 2 細胞における濃度の異なる s i R N A による P N P m R N A の抑制

| s i R N A   | 番号                | m R N A 抑制率 % |         |           |
|-------------|-------------------|---------------|---------|-----------|
|             |                   | 5 0 n M       | 5 n M   | 0 . 5 n M |
| s i R N A 2 | s i P N b 1 M 1 S | 6 4 . 5       | 4 6 . 5 | 2 5 . 5   |
| s i R N A 3 | s i P N c 1 M 1 S | 6 4 . 5       | 2 9 . 0 | 1 5 . 5   |
| s i R N A 4 | s i P N d 1 M 1 S | 6 8 . 0       | 3 6 . 0 | 1 8 . 5   |
| N C         | —                 | —             | —       | —         |

10

【 0 4 5 1 】

表 1 2 の結果から分かるように、本開示により提供される s i R N A は、H e p G 2 細胞系における抑制活性が高く、特に 5 0 n M の s i R N A 4 による P N P m R N A 発現量に対する抑制率は 6 8 . 0 % にも達した。

【 0 4 5 2 】

実験例 8 : s i R N A 複合体による S M M C - 7 7 2 1 細胞における P N P m R N A 発現量に対する抑制効率の検出

被験 s i R N A の代わりに複合体 2、3 及び 8 を用い、N C 陰性対照群を追加し、s i R N A として濃度を使用したこと以外は、実験例 1 と同じ方法により s i R N A 複合体の抑制率を検出した。検出された各 s i R N A 複合体の体外 S M M C - 7 7 2 1 細胞での抑制活性を表 1 3 に示した。

20

【 0 4 5 3 】

【表 1 3】

s i R N A 複合体による S M M C - 7 7 2 1 細胞における P N P m R N A に対する抑制

| s i R N A | 番号                        | m R N A 抑制率 % |
|-----------|---------------------------|---------------|
| 複合体 2     | L 1 0 - s i P N b 1 M 1 S | 8 0 . 4 6     |
| 複合体 3     | L 1 0 - s i P N c 1 M 1 S | 8 0 . 8 8     |
| 複合体 8     | L 1 0 - s i P N d 1 M 1 S | 8 8 . 9 3     |
| N C       | —                         | — 4 . 9 6     |

30

【 0 4 5 4 】

表 1 3 の結果から分かるように、本開示により提供される s i R N A 複合体は、S M M C - 7 7 2 1 細胞系における抑制活性が高く、特に複合体 8 による P N P m R N A 発現量に対する抑制率は 8 8 . 9 3 % にも達した。

【 0 4 5 5 】

実験例 9 : s i R N A 複合体による H u h 7 細胞における P N P m R N A 発現量に対する抑制効率の検出

40

s i R N A の代わりに複合体 2、3 及び 8 を用い、s i R N A として濃度を使用し、また S M M C - 7 7 2 1 細胞の代わりに H u h 7 細胞を用いたこと以外は、実験例 1 と同じ方法により s i R N A 複合体の抑制率を検出した。検出された各 s i R N A 複合体の体外 H u h 7 細胞での抑制活性を表 1 4 に示した。

【 0 4 5 6 】

50

【表 1 4】

s i R N A 複合体による H u h 7 細胞における P N P m R N A の抑制

| s i R N A | 番号                        | m R N A 抑制率 % |
|-----------|---------------------------|---------------|
| 複合体 2     | L 1 0 - s i P N b 1 M 1 S | 6 0 . 2 2     |
| 複合体 3     | L 1 0 - s i P N c 1 M 1 S | 6 2 . 5 8     |
| 複合体 8     | L 1 0 - s i P N d 1 M 1 S | 7 7 . 8 9     |
| N C       | —                         | 2 . 0 0       |

【0 4 5 7】

表 1 4 の結果から分かるように、本開示により提供される s i R N A 複合体は、H u h 7 細胞系における抑制活性が高く、特に複合体 8 の P N P m R N A 発現量に対する抑制率は 7 7 . 8 9 % に達した。

【0 4 5 8】

実験例 1 0 : s i R N A 複合体による S M M C - 7 7 2 1 細胞における P N P m R N A 発現量に対する抑制効率の検出

s i R N A の代わりに複合体 2、9、1 0、3、1 1、8 及び 1 2 を用い、陰性対照群 N C を追加し、s i R N A の最終濃度として濃度を用いたこと以外は、実験例 1 と同じ方法により s i R N A 複合体の抑制率を検出した。検出された各 s i R N A 複合体の体外 S M M C - 7 7 2 1 細胞での抑制活性を表 1 5 に示した。

【0 4 5 9】

【表 1 5】

s i R N A 複合体による S M M C - 7 7 2 1 細胞における P N P m R N A の抑制

| s i R N A | 番号                            | m R N A 抑制率 % |
|-----------|-------------------------------|---------------|
| 複合体 2     | L 1 0 - s i P N b 1 M 1 S     | 7 8 . 2 8     |
| 複合体 9     | L 1 0 - s i P N b 1 M 1 S U   | 8 1 . 4       |
| 複合体 1 0   | L 1 0 - s i P N b 1 M 1 S U U | 7 5 . 9 3     |
| 複合体 3     | L 1 0 - s i P N c 1 M 1 S     | 7 5 . 9 6     |
| 複合体 1 1   | L 1 0 - s i P N c 1 M 1 S U   | 8 2 . 2 1     |
| 複合体 8     | L 1 0 - s i P N a 1 M 1 S P   | 8 6 . 9 6     |
| 複合体 1 2   | L 1 0 - s i P N d 1 M 1 S U   | 8 2 . 0 7     |
| N C       | —                             | — 5 . 0 4     |

【0 4 6 0】

表 1 5 の結果から分かるように、本開示により提供される s i R N A 複合体はいずれも S M M C - 7 7 2 1 細胞において高い抑制活性を示し、P N P m R N A 抑制率は少なくとも 7 5 . 9 6 % であり、ひいては 8 6 . 9 6 % の高さに達した。

【0 4 6 1】

実験例 1 1 : s i R N A 複合体による H u h 7 細胞における P N P m R N A 発現量に対する抑制効率の検出

s i R N A の代わりに複合体 2、9、1 0、3、1 1、8 及び 1 2 を用い、s i R N A として濃度を用い、陰性対照群 N C を追加し、また S M M C - 7 7 2 1 細胞の代わりに H u h 7 細胞を用いたこと以外は、実験例 1 と同じ方法により s i R N A 複合体の抑制率を検出した。検出された各 s i R N A 複合体の体外 H u h 7 細胞での抑制活性を表 1 6 に示した。

【0 4 6 2】

10

20

30

40

50

【表 16】

s i R N A 複合体による H u h 7 細胞における P N P m R N A の抑制

| s i R N A | 番号                            | m R N A 抑制率% |
|-----------|-------------------------------|--------------|
| 複合体 2     | L 1 0 - s i P N b 1 M 1 S     | 6 9 . 3 1    |
| 複合体 9     | L 1 0 - s i P N b 1 M 1 S U   | 6 9 . 4 6    |
| 複合体 1 0   | L 1 0 - s i P N b 1 M 1 S U U | 6 2 . 8 0    |
| 複合体 3     | L 1 0 - s i P N c 1 M 1 S     | 6 5 . 1 2    |
| 複合体 1 1   | L 1 0 - s i P N c 1 M 1 S U   | 6 1 . 4 6    |
| 複合体 8     | L 1 0 - s i P N a 1 M 1 S     | 7 4 . 4 6    |
| 複合体 1 2   | L 1 0 - s i P N d 1 M 1 S U   | 6 4 . 4 5    |
| N C       | —                             | — 4 . 3 0    |

10

## 【0463】

表 16 の結果から分かるように、本開示により提供される s i R N A 複合体はいずれも H u h 7 細胞において高い抑制活性を示し、P N P m R N A 抑制率は約 6 1 . 4 6 % ~ 7 4 . 4 6 % であった。

## 【0464】

実験例 12 : s i R N A 複合体による S M M C - 7 7 2 1 細胞における P N P m R N A に対する I C <sub>50</sub> の測定

測定された s i R N A 複合体がそれぞれ複合体 2 又は複合体 8 であったこと以外は、実験例 6 と同じ方法により複合体 2 及び複合体 8 による S M M C - 7 7 2 1 細胞における P N P m R N A に対する I C <sub>50</sub> 値を測定した。複合体 2 又は複合体 8 による S M M C - 7 7 2 1 細胞における P N P m R N A の発現抑制及びそれに応じてフィッティングされた用量 - 効果曲線を図 2 A ~ 2 B に示した。同時に、用量 - 効果曲線から、被験 s i R N A が P N P m R N A を標的する I C <sub>50</sub> 値を算出したところ、複合体 2 及び複合体 8 の I C <sub>50</sub> 値はそれぞれ 0 . 4 9 1 n M 及び 0 . 4 0 0 n M であり、優れた P N P m R N A 抑制効果を示した。

20

## 【0465】

実験例 13 : 本開示の s i R N A 複体の急性高尿酸血症マウスモデルにおける抑制活性

濃度 8 m g / m l でアデニンを 0 . 5 w t % カルボキシメチルセルロースナトリウム溶液に溶かし、アデニン溶液を得た。

30

## 【0466】

濃度 4 0 m g / m l でオキソン酸カリウムを 0 . 5 w t % カルボキシメチルセルロースナトリウム溶液に溶かし、オキソン酸カリウム溶液を得た。

## 【0467】

6 ~ 8 週齢の正常雌性マウス C 5 7 B L / 6 J を 5 匹 / 群でランダムに分けた。第 1 群の 5 匹のマウスは、いずれも注射せずにブランク対照 ( B l a n k ) とした。第 2 群の 5 匹のマウスに対して、上記アデニン溶液を 1 2 . 5 m l / k g マウス体重、即ち、アデニンの用量 1 0 0 m g / k g で、3 0 m i n 胃内投与した後、各マウスに上記オキソン酸カリウム溶液を 2 0 0 μ l 皮下注射した。第 3 群の 5 匹のマウスに対して、まず複合体 1 3 ( 5 m g / k g マウス体重、s i R N A として ) を皮下注射し、そして上記アデニン溶液を 1 2 . 5 m l / k g マウス体重、即ち、アデニンの用量 1 0 0 m g / k g で、3 0 m i n 胃内投与した後、各マウスに上記オキソン酸カリウム溶液を 2 0 0 μ l 皮下注射した。それぞれ 0 h、1 h、2 h、4 h に 2 0 0 μ l 眼窩採血し、遠心してから 1 0 0 μ l 血清を取り、各時間点でその中の尿酸含有量を検出した ( 検出は迪安検測会社に委託 ) 。ただし、0 h での採血については、投与する前の 2 h 内に採血を完了した。検出結果を図 3 に示す。その中で、各群の血清尿酸含有量を 0 h 及び各時間点でのブランク対照群の血清尿酸含有量の平均値のデータで正規化し、正規化した相対血清尿酸含有量を縦座標とした。

40

## 【0468】

図 3 から分かるように、アデニン及びオキソン酸カリウムのみを注射した第 2 群のマウ

50

スと比較して、複合体 13、アデニン及びオキソン酸カリウムを注射した第 3 群のマウスは、血清中の尿酸含有量が顕著に低下し、本開示の s i R N A 複合体が高尿酸血症モデルマウスにおける血中尿酸含有量を顕著に低下させることができることが示された。

【0469】

以上、本開示のいくつかの実施形態を詳しく記載したが、本開示は、上記実施形態の具体的な細部に限定されず、本開示の技術的思想の範囲で、本開示の技術的解決手段に対して種々の簡単な変形をすることができ、これらの簡単な変形は、いずれも本開示の保護範囲に属する。

【0470】

このほかに説明すべきこととして、上記いくつかの実施形態に記載された各具体的な技術的特徴は、矛盾がない場合、任意の適切な方法により組み合わせることができ、不必要な重複を避けるために、本開示では各種の可能な組合せ方法を別途説明しない。

10

【0471】

また、本開示の各種の異なる実施形態は任意に組み合わせることもでき、本開示の精神から逸脱しない限り、その組み合わせも同様に、本開示に開示された内容とみなすべきである。

【0472】

＜引用による本明細書への組み込み＞

本明細書で言及される全ての出版物、特許及び特許出願は、各々の出版物、特許又は特許出願が特別にかつ個別に引用により本明細書に組み込まれるのと同じ程度に、引用により本明細書に組み込まれる。

20

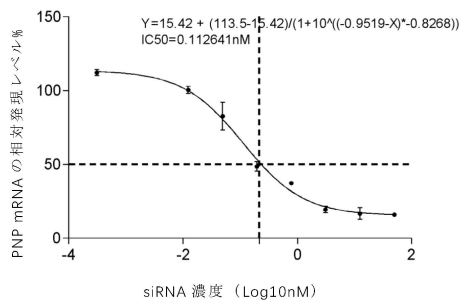
30

40

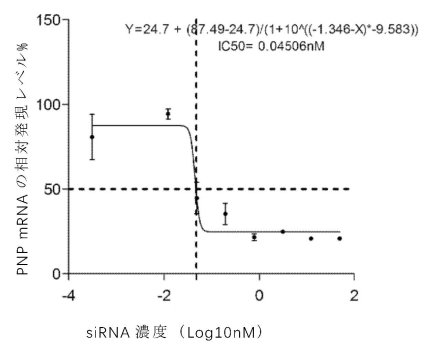
50

## 【図面】

【図 1 A】

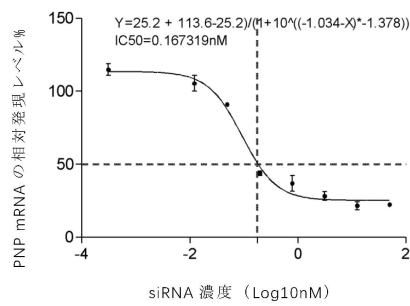


【図 1 B】

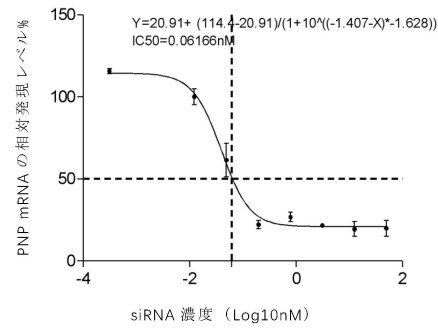


10

【図 1 C】

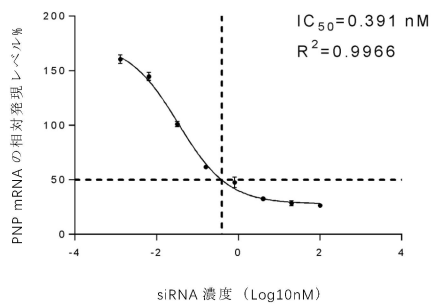


【図 1 D】

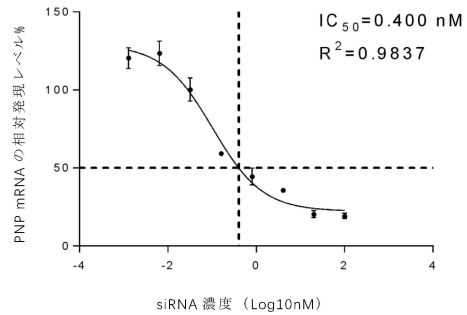


20

【図 2 A】



【図 2 B】

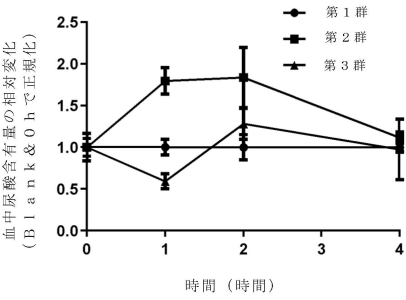


30

40

50

【図 3】



10

20

【配列表】

0007606758000001.app

30

40

50

## フロントページの続き

1 6 8

(72)発明者 カオ、シャン

中華人民共和国 チアンスー 2 1 5 3 0 0、クンシャン シティー、ユイシャン タウン、ユアン  
フォン ロード ナンバー 1 6 8

(72)発明者 カン、タイウー

中華人民共和国 チアンスー 2 1 5 3 0 0、クンシャン シティー、ユイシャン タウン、ユアン  
フォン ロード ナンバー 1 6 8

(72)発明者 リー、ハイタオ

中華人民共和国 チアンスー 2 1 5 3 0 0、クンシャン シティー、ユイシャン タウン、ユアン  
フォン ロード ナンバー 1 6 8

審査官 西 賢二

(56)参考文献

Kojima, S. et al., "Tumour suppressors miR-1 and miR-133a target the oncogenic function  
of purine nucleoside phosphorylase (PNP) in prostate cancer", Br. J. Cancer, 2012年, Vol.  
106, pp. 405-413Yamasaki, T. et al., "Novel molecular targets regulated by tumor suppressors microRNA-1  
and microRNA-133a in bladder cancer", Int. J. Oncol., 2012年, Vol. 40, pp. 1821-1830

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T  
N )