

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7704529号

(P7704529)

(45)発行日 令和7年7月8日(2025.7.8)

(24)登録日 令和7年6月30日(2025.6.30)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 47/54 (2017.01)

A 6 1 K 47/54

A 6 1 K 31/7105(2006.01)

A 6 1 K 31/7105

A 6 1 K 45/00 (2006.01)

A 6 1 K 45/00

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00

A 6 1 P 13/12 (2006.01)

A 6 1 P 13/12

請求項の数 16 (全173頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-560257(P2020-560257)

(86)(22)出願日 平成31年4月26日(2019.4.26)

(65)公表番号 特表2021-522269(P2021-522269
A)

(43)公表日 令和3年8月30日(2021.8.30)

(86)国際出願番号 PCT/US2019/029393

(87)国際公開番号 WO2019/210200

(87)国際公開日 令和1年10月31日(2019.10.31)

審査請求日 令和4年4月26日(2022.4.26)

(31)優先権主張番号 62/790,372

(32)優先日 平成31年1月9日(2019.1.9)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/663,763

(32)優先日 平成30年4月27日(2018.4.27)

最終頁に続く

(73)特許権者 512219840

アローヘッド ファーマシューティカルズ

インコーポレイテッド

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 1 1

0 5 , バサデナ , イースト コロラド

ブルバード 1 7 7 , スイート 7 0 0

(74)代理人 100099759

弁理士 青木 篤

(74)代理人 100123582

弁理士 三橋 真二

(74)代理人 100092624

弁理士 鶴田 準一

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100108903

最終頁に続く

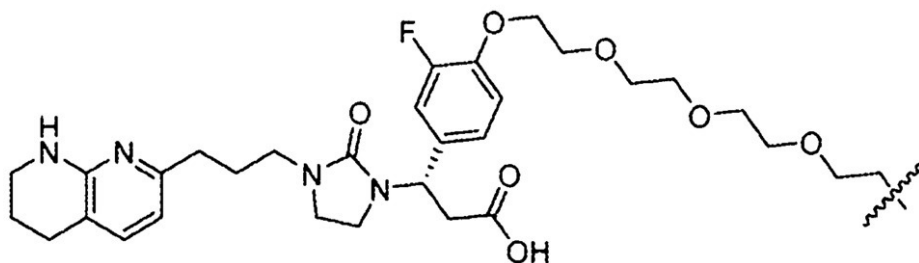
(54)【発明の名称】 インテグリン標的化リガンドとその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下：

【化1】



(構造 2a) ；

の構造を有するインテグリン標的化リガンド及びRNAi剤を含む、化合物またはその薬学的に許容される塩であって、

{ 式中、以下の：

【化 2】

~~~~~

は、前記化合物の残りの部分に対する前記インテグリン標的リガンドの接続点（point of connection）を示す }

化合物またはその薬学的に許容される塩。

## 【請求項 2】

前記化合物が、1つの構造2aのインテグリン標的リガンドを含む、請求項1に記載の化合物。

10

## 【請求項 3】

前記化合物が、2つの構造2aのインテグリン標的リガンドを含む、請求項1に記載の化合物。

## 【請求項 4】

前記化合物が、3つの構造2aのインテグリン標的リガンドを含む、請求項1に記載の化合物。

## 【請求項 5】

前記化合物が、4つの構造2aのインテグリン標的リガンドを含む、請求項1に記載の化合物。

20

## 【請求項 6】

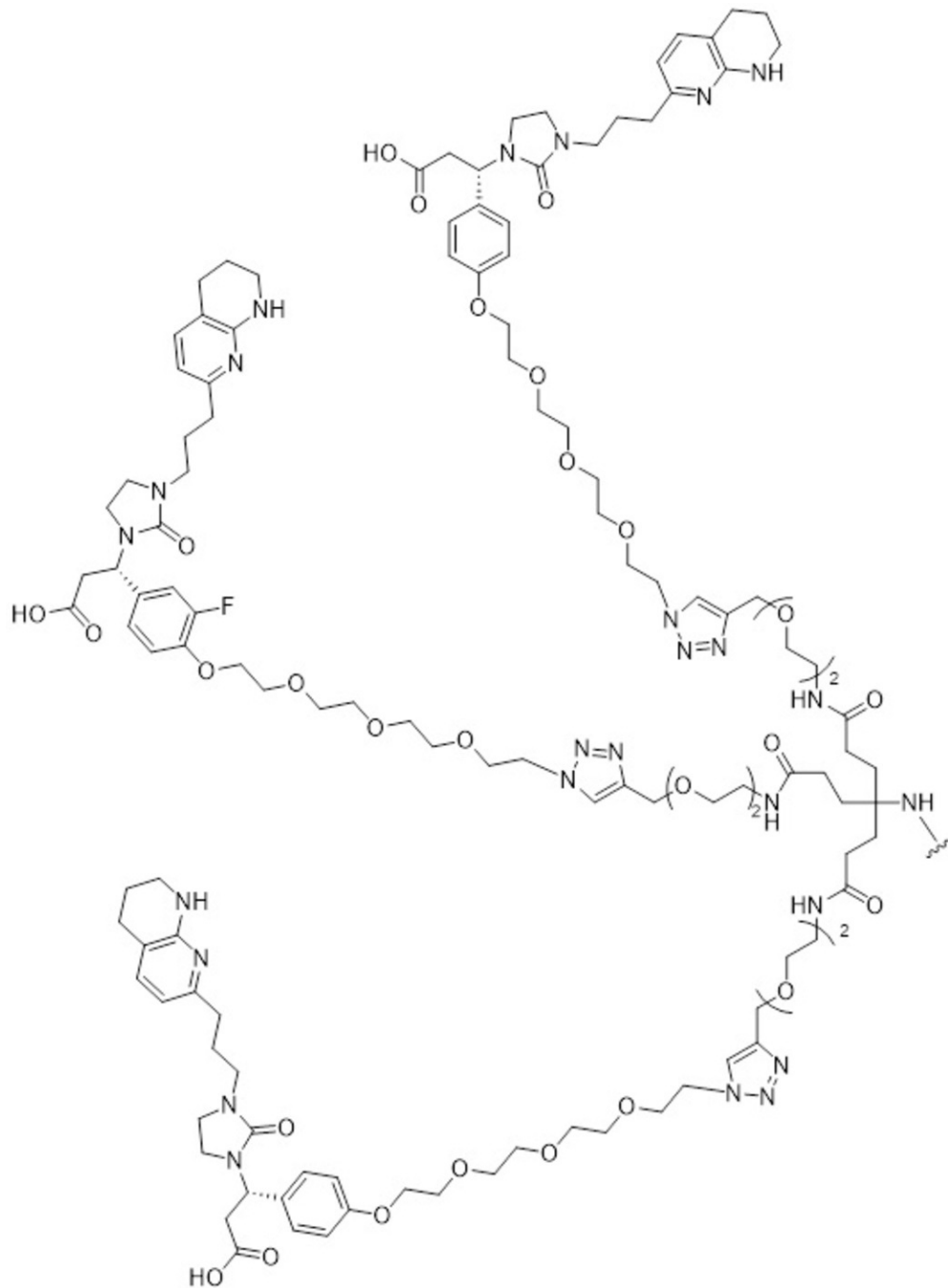
以下の式：

30

40

50

【化 3】



10

20

30

の構造及びRNAi剤を含む、化合物またはその薬学的に許容される塩であって、  
 { 式中、以下の：

【化 4】

40

⋮  
 ⋮  
 ⋮

は、前記化合物の残りの部分に対する前記構造の接続点を示す }  
 化合物またはその薬学的に許容される塩。

【請求項 7】

請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の化合物、および薬学的に許容される賦形剤を含む組成物。

【請求項 8】

50

請求項1～6のいずれか一項に記載の化合物を含む組成物であって、前記RNAi剤が、インテグリンを発現している細胞における標的遺伝子の発現を阻害することができる、組成物。

【請求項9】

前記インテグリンが、インテグリン  $\alpha_3$ 、 $\alpha_5$ 、または  $\alpha_3$ と  $\alpha_5$ の両方である、請求項7または8に記載の組成物。

【請求項10】

対象の、インテグリン  $\alpha_3$ 、 $\alpha_5$ 、または  $\alpha_3$ と  $\alpha_5$ の両方を発現している細胞にRNAi剤を送達するための組成物であって、請求項1～6のいずれか一項に記載の化合物を含む、組成物。

10

【請求項11】

インビボにおいて対象の細胞または組織にRNAi剤を送達するための組成物であって、請求項1～6のいずれか一項に記載の化合物を含む、組成物。

【請求項12】

インビボにおいて、インテグリン  $\alpha_3$ 、インテグリン  $\alpha_5$ 、またはインテグリン  $\alpha_3$ と  $\alpha_5$ の両方を発現する細胞の標的遺伝子の発現を阻害するための組成物であって、有効量の請求項1～6のいずれか一項に記載の化合物を含む、組成物。

【請求項13】

前記標的遺伝子が、EPAS1 (HIF2) である、請求項12に記載の組成物。

【請求項14】

前記細胞が、明細胞腎癌腫瘍細胞である、請求項12または請求項13に記載の組成物。

20

【請求項15】

インビトロまたはエクスビボにおいて、 $\alpha_3$ 、 $\alpha_5$ 、または  $\alpha_3$ と  $\alpha_5$ の両方を含む細胞へのRNAi剤の送達のための、請求項1～6のいずれか一項に記載の化合物、あるいは、請求項7～9のいずれか一項に記載の組成物の使用。

【請求項16】

前記細胞が、腎臓細胞である、請求項15に記載の使用。

【請求項17】

疾患または障害の治療薬の製造のための、請求項7～9のいずれか一項に記載の組成物の使用であって、ここで、該疾患または障害が、 $\alpha_3$ 、 $\alpha_5$ 、または  $\alpha_3$ と  $\alpha_5$ の両方を含む細胞へのRNAi剤の送達によって治療または改善され得る使用。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2018年4月27日に出願された米国仮特許出願第62/663,763号および2019年1月9日に出願された同第62/790,372号に対して優先権を主張し、その全体を参照により本明細書中に援用する。

【0002】

40

発明の分野

インテグリンに親和性を有する化合物、斯かる化合物の合成方法、およびインビボにおけるカーゴ分子を送達するためのリガンドとしての斯かる化合物の使用が、本明細書に開示される。

【背景技術】

【0003】

背景

インテグリンは、細胞-細胞および細胞-マトリックス相互作用を媒介する膜貫通糖タンパク質である。インテグリン  $\alpha_3$  ( $\alpha_3$ ) および  $\alpha_5$  ( $\alpha_5$ ) は、接着分子のインテグリンスーパーファミリーの構成要素であり、かつ、細胞外マトリックス (

50

ECM) タンパク質ビトロネクチンの受容体であることが知られている (Horton, MA, 29(5) Int. J. Biochem. Cell Biol. 721-725 (1997))。インテグリン  $\alpha_3$  およびインテグリン  $\alpha_5$  を含めた特定のインテグリンの変更された発現が、癌進行、侵襲性、および転移に関与すると考えられる。

#### 【0004】

実際には、インテグリン  $\alpha_3$  および  $\alpha_5$  を含めたインテグリンの過剰発現が、多くの腫瘍細胞で報告された (Desgrosellier, JS et al., Nat Rev Cancer, 10(1):9-22 (2010))。  $\alpha_3$  (およびある程度  $\alpha_5$ ) の拮抗薬は、変更されたインテグリン機能に関連するさまざまな疾患における使用が考慮された。例えば、  $\alpha_3$  受容体の阻害が血管新生を阻害し、その結果、腫瘍増殖に必要であると考えられる新生血管の形成を抑えることが示されたので、有望な癌治療として  $\alpha_3$  阻害剤を開発するための試みがなされた (例えば、Brooks et al., 79 Cell 1157-1164 (1994); Mas-Moruno et al., Anticancer Agents Med Chem, 10(10):753-768を参照のこと)。しかしながら、  $\alpha_3$  阻害剤の主な一例である、拮抗薬Cilengitideが、神経膠芽腫に罹患している患者において腫瘍の血管新生および進行を制限することを目的とした臨床検査において効果がないことが示された (例えば、Ley et al., Integrin-based Therapeutics: Biological Basis, Clinical Use and New Drugs, 15(3) Nat. Rev. Drug Discov. 173-183 (2016)を参照のこと)。

#### 【0005】

一般に、インビボにおける所望の細胞および/または組織への治療的に有効な医薬化合物または活性医薬成分を含めたカーゴ分子の送達、治療的に実行可能な医薬品製剤の開発における一般的な挑戦であり続ける。特定の細胞または組織への親和性を有する、および/またはそれらに選択的に結合する安定かつ有効な標的化合物 (そしてそれは、その特定の細胞または組織への治療用カーゴ分子の送達を容易にするためのリガンドとして使用または利用され得る) の必要性は存在し続ける。そのうえ、インテグリン  $\alpha_3$  -  $\alpha_5$  を選択的に標的化することができ、かつ、カーゴ分子にコンジュゲートされるのに好適であり、そして、インビボにおいて、腫瘍細胞などの斯かるインテグリンを発現している細胞にカーゴ分子を送達する化合物に対する固有の必要性が存在している。オリゴヌクレオチド、特にオリゴヌクレオチドベースの治療薬 (例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはRNAi剤などのオリゴヌクレオチドベースの化合物) に関して、インテグリン  $\alpha_3$  -  $\alpha_5$  および/またはインテグリン  $\alpha_3$  -  $\alpha_5$  を標的化し、斯かるインテグリンを発現している細胞へのこれらのオリゴヌクレオチドベースの化合物の送達を容易にすることができるリガンドに対する必要性が存在し続ける。

#### 【発明の概要】

#### 【0006】

##### 概要

化合物または他の分子を結合させるインテグリン  $\alpha_3$  および/または  $\alpha_5$  を発現する細胞または組織に、それらを選択的に向かわせるためのリガンドとして用いられ得る (本明細書中では「インテグリン標的化リガンド」、「  $\alpha_3$  インテグリン標的化リガンド」、「  $\alpha_5$  インテグリンリガンド」または単に「インテグリン標的化リガンド」と呼ばれる)、  $\alpha_3$  および  $\alpha_5$  を含めた特定のインテグリンに対する親和性を有する化合物が本明細書に記載されている。本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドは、血清中で安定しており、そして、これらのインテグリンに対して親和性を有し、特異性をもって結合し得る。本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドは、インテグリン  $\alpha_3$  および/または  $\alpha_5$  を発現する細胞または組織への (単数もしくは複数の) カーゴ分子の送達を容易にするために (単数もしくは複数の) カーゴ分子にコンジュゲートされる。

#### 【0007】

別の態様において、インビボでインテグリン  $\alpha_3$  および/またはインテグリン  $\alpha_5$  を発現している組織および/または細胞にカーゴ分子を送達する方法が本明細書に記載さ

れており、ここで、その方法は、1もしくは複数のカーゴ分子にコンジュゲートされた本明細書に開示される1もしくは複数のインテグリン標的化リガンドを対象に投与することを含む。 v 3インテグリンおよび/または v 5インテグリンを発現している細胞への治療用カーゴ分子（例えば、活性医薬成分）の送達でその対象を治療することができる疾患、症状または障害を患っている対象の治療方法がさらに本明細書に開示され、ここで、その方法は、1もしくは複数の治療用カーゴ分子にコンジュゲートされた、本明細書に開示される1もしくは複数のインテグリン標的化リガンドを対象に投与することを含む。

【0008】

インビトロまたはインビボにおいて細胞での標的遺伝子の発現を阻害する方法がさらに本明細書に記載され、ここで、その方法は、細胞における標的遺伝子の発現を阻害することができるRNAi剤などの1もしくは複数のオリゴヌクレオチドベースの治療薬にコンジュゲートされた、本明細書に開示される1もしくは複数のインテグリン標的化リガンドを含むコンジュゲートの有効量をその細胞に投与することを含む。いくつかの実施形態において、対象の細胞において標的遺伝子の発現を阻害する方法が本明細書に記載され、ここで、その対象には、本明細書に開示される1もしくは複数のインテグリン標的化リガンドにコンジュゲートされた1もしくは複数のオリゴヌクレオチドベースの治療薬（RNAi剤など）の有効量が投与される。

10

【0009】

さらに別の態様において、本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドを含む組成物が本明細書に記載される。本明細書に記載される組成物は、1もしくは複数の、RNAi剤などの治療用カーゴ分子もしくは他のカーゴ分子または治療剤にコンジュゲートされた本明細書に開示される1もしくは複数のインテグリン標的化リガンドを含む医薬組成物または薬剤であり得る。

20

【0010】

いくつかの実施形態において、インテグリン v 3を発現する細胞における標的遺伝子の発現によって少なくとも一部が媒介される疾患または障害を患っている対象の治療方法が本明細書に記載され、ここで、その方法は、それを必要としている対象に有効量の医薬組成物を投与することを含み、ここで、その医薬組成物は、本明細書に開示される1もしくは複数のインテグリン標的化リガンドにコンジュゲートされたRNAi剤など、標的化された遺伝子の発現の阻害を可能にする1もしくは複数のオリゴヌクレオチドベースの治療薬を含む。いくつかの実施形態において、腫瘍細胞における標的遺伝子の発現によって少なくとも一部が媒介される疾患または障害を患っている対象の治療方法が本明細書に記載され、ここで、その方法は、それを必要としている対象に有効量の医薬組成物を投与することを含み、ここで、その医薬組成物は、本明細書に開示される1もしくは複数のインテグリン標的化リガンドにコンジュゲートされたRNAi剤など、標的化された遺伝子の発現を阻害することができる1もしくは複数のオリゴヌクレオチドベースの治療薬を含む。いくつかの実施形態において、明細胞腎癌腫瘍細胞などの腎臓腫瘍細胞における標的遺伝子の発現によって少なくとも一部が媒介される疾患または障害を患っている対象の治療方法が本明細書に記載され、ここで、その方法は、それを必要としている対象に有効量の医薬組成物を投与することを含み、ここで、その医薬組成物は、本明細書に開示される1もしくは複数のインテグリン標的化リガンドにコンジュゲートされたRNAi剤など、標的化された遺伝子の発現を阻害することができる1もしくは複数のオリゴヌクレオチドベースの治療薬を含む。

30

40

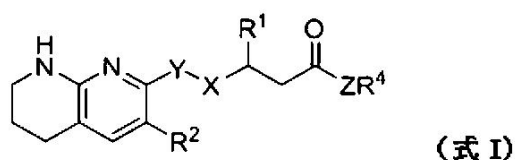
【0011】

第一の態様において、この開示は合成インテグリン標的化リガンドを提供する。

【0012】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドは、以下の式：

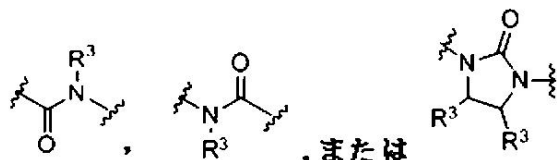
## 【化 1】



{ 式中、

Xは、 $-C(R^3)_2-$ 、 $-NR^3-$ 、

## 【化 2】



であり；

Yは、任意に置換された $C_1 - C_8$ アルキレンであり；

Zは、O、 $NR^3$ 、またはSであり；

nは、1～8の整数であり；

$R^1$ は、任意に置換されたアリール、任意に置換されたヘテロアリール、任意に置換されたヘテロシクリル、任意に置換されたシクロアルキルであるか、または $R^1$ はカーゴ分子を含み；

$R^2$ は、H、任意に置換されたアルキルであるか、または $R^2$ はカーゴ分子を含み；

$R^3$ のそれぞれの場合には独立に、Hおよび任意に置換されたアルキルから成る群から選択されるか、または $R^3$ はカーゴ分子を含み；

$R^4$ は、Hまたは任意に置換されたアルキルであり；そして

ここで、Y、 $R^1$ 、 $R^2$ 、いずれかの場合の $R^3$ 、および $R^4$ のうちの少なくとも1つがカーゴ分子を含む}の構造またはその薬学的に許容される塩を含む。

## 【0013】

本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドのいずれもが、カーゴ分子、反応性基、および/または保護された反応性基に連結され得る。例えば、反応性基への連結は、カーゴ分子へのインテグリン標的化リガンドのコンジュゲーションを容易にするために使用され得る。本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドは、 $\alpha_3$ インテグリンおよび/または $\alpha_5$ インテグリンを含めたインテグリンを発現している細胞へのカーゴ分子の標的化を増強し得る。カーゴ分子は、これだけに限定されるものではないが、医薬的に活性な成分もしくは化合物、プロドラッグ、または治療上の利益が知られている別の物質であり得る。いくつかの実施形態において、カーゴ分子は、これだけに限定されるものではないが、小分子、抗体、抗体フラグメント、免疫グロブリン、モノクローナル抗体、標識もしくはマーカー、脂質、天然もしくは修飾されたオリゴヌクレオチド、修飾されたオリゴヌクレオチドベースの化合物（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドもしくはRNAi剤）、天然もしくは修飾された核酸、ペプチド、アプタマー、ポリマー、ポリアミン、タンパク質、毒素、ビタミン、ポリエチレングリコール、ハプテン、ジゴキシゲニン、ビオチン、放射性原子もしくは分子、またはフルオロフォアであり得る。いくつかの実施形態において、カーゴ分子は、医薬的に活性な成分またはプロドラッグを含む。いくつかの実施形態において、カーゴ分子は、アンチセンス化合物またはRNAi剤などのオリゴヌクレオチドベースの治療薬であるか、またはそれらを含む。いくつかの実施形態において、カーゴ分子は、医薬的に活性な成分であるオリゴヌクレオチドベースの化合物であるか、またはそれらを含む。いくつかの実施形態において、カーゴ分子は、医薬的に活性な成分であるRNAi剤であるか、またはそれらを含む。

## 【0014】

インテグリンを発現する細胞にカーゴ分子を標的化および送達するための本明細書に記載される v 3 / 5 インテグリン標的化リガンドの使用が記載される。カーゴ分子は、インビトロ、インサイチュ、エキスピボ、またはインビボにおいて細胞に送達され得る。

## 【0015】

別の態様において、この開示は、本明細書に記載したインテグリン標的化リガンドうちの1もしくは複数の含む組成物を提供する。例えば、いくつかの実施形態において、本明細書に開示される1もしくは複数のインテグリン標的化リガンドを含む組成物は、インビボにおいて細胞に送達されるべき1もしくは複数のRNAi剤などの1もしくは複数のオリゴヌクレオチドベースの化合物を含む。いくつかの実施形態において、インビボにおいて細胞にRNAi剤を送達するための組成物が本明細書に記載され、ここで、そのRNAi剤は、1

10

## 【0016】

1もしくは複数のインテグリン標的化リガンドを含む組成物が記載される。いくつかの実施形態において、組成物は薬学的に許容される賦形剤を含む。いくつかの実施形態において、1もしくは複数のインテグリン標的化リガンドを含む組成物は、1もしくは複数の他の医薬物質または医薬的な有効成分または化合物を含む。いくつかの実施形態において、1もしくは複数のインテグリン標的化リガンドを含む薬剤が本明細書に記載される。

## 【0017】

本明細書に開示される1もしくは複数のインテグリン標的化リガンドを含む組成物は、インビボまたはインビトロにおいて、例えば、明細胞腎癌腫瘍細胞（例えば、A498）、他の腎臓癌細胞（例えば、ACHN、CAKI - 2、769 - P、786 - O）、黒色腫細胞（例えば、A375）、神経膠芽腫細胞（例えば、U87MG）、膵臓の癌細胞（例えば、PANC - 1）、肺癌細胞（例えば、H460、H661、H1573、H2126）、結腸癌細胞（例えば、HT29、HCT116）、肝臓癌細胞（例えば、Hep2G、Hep3B）、乳癌細胞（例えば、MCF7、SK - BR3）、前立腺癌細胞（例えば、DU145、PC3、LNCaP、MDA - PCa - 2b）、口腔癌細胞（例えば、KB）、舌癌細胞（例えば、CAL27、SCC9）、咽頭部癌細胞（例えば、Detroit562）、および / または卵巣癌細胞（例えば、OVCAR3、SKOV3、A2780）および / または他の患者由来の異種移植物を含めたさまざまな癌細胞に送達され得る。

20

## 【0018】

別の態様において、本開示は、本明細書に記載する1もしくは複数のインテグリン標的化リガンドおよび / または組成物の使用、および所望であれば、開示されるインテグリン標的化リガンドおよび / または組成物を医薬製品としての投与に好適な形態にすることを含む方法を提供する。他の実施形態において、開示は、本明細書に記載されるリガンドおよび組成物、例えば、薬剤の製造方法を提供する。

30

## 【0019】

1もしくは複数のインテグリン標的化リガンドを含む組成物は、例えば、皮下、静脈内、腫瘍内、吸入（エアゾールまたは乾燥粉末製剤）、鼻腔内、腹腔内、皮内、経皮、経口、舌下、または局所投与を含めた、投与されるようになるカーゴ分子の観点から斯かる投与に好適になるように、当該技術分野で知られている投与の経路を使用してインビボで対象に投与され得る。いくつかの実施形態において、1もしくは複数のインテグリン標的化リガンドを含む組成物は、例えば、静脈または皮下投与によって、全身送達のために投与されてもよい。

40

## 【0020】

いくつかの実施形態において、インビボにおける明細胞腎癌腫瘍細胞への1もしくは複数の所望のカーゴ分子の送達方法が本明細書に開示され、ここで、その方法は、その対象に、1もしくは複数のカーゴ分子にコンジュゲートされた1もしくは複数のインテグリン標的化リガンドを投与することを含む。

## 【0021】

いくつかの実施形態において、インビボにおいて腫瘍細胞にオリゴヌクレオチドベース

50



の化合物を送達する方法が本明細書に開示され、ここで、その方法は、その対象に、1もしくは複数のオリゴヌクレオチドベースの化合物にコンジュゲートされた1もしくは複数のインテグリン標的化リガンドを投与することを含む。いくつかの実施形態において、インビボにおいてRNAi剤を腫瘍細胞に送達する方法が本明細書に開示され、ここで、その方法は、その対象に、1もしくは複数のRNAi剤にコンジュゲートされた1もしくは複数のインテグリン標的化リガンドを投与することを含む。いくつかの実施形態において、インビボにおいて明細胞腎癌腫瘍細胞の標的遺伝子の発現を阻害する方法が本明細書に開示され、ここで、その方法は、その対象に、 $\alpha$ 3インテグリンおよび/または $\alpha$ 5インテグリンに対して親和性を有する1もしくは複数のリガンドにコンジュゲートされたRNAi剤を投与することを含む。

10

【0022】

本発明の他の対象、特徴、態様、および利点は、以下の詳細な説明と請求項から明らかになる。

【発明を実施するための形態】

【0023】

詳細な説明

インテグリン標的化リガンド

インテグリンに対して親和性を有し、インビボにおいて血清安定性を示し、かつ、インテグリン $\alpha$ 3および/またはインテグリン $\alpha$ 5などのインテグリンを発現する細胞および/または組織へのカーゴ分子の送達を容易にするリガンドとして使用できる化合物が本明細書に記載される。インテグリン標的化リガンドは、インビトロ、インサイチュ、エクスピボ、および/またはインビボにおいてインテグリンを発現する細胞を標的化するのに使用できる。

20

【0024】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドは、インテグリン $\alpha$ 3および/またはインテグリン $\alpha$ 5を含めたインテグリンを発現する細胞または組織にカーゴ分子を優先的に向け、そして、標的化するように1もしくは複数のカーゴ分子にコンジュゲートされる。いくつかの実施形態において、カーゴ分子は、医薬的に活性な化合物を含むか、またはそれらから成る。いくつかの実施形態において、カーゴ分子は、RNAi剤などのオリゴヌクレオチドベースの化合物を含むか、またはそれらから成る。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドは、インビボにおいて腫瘍細胞にカーゴ分子を向けるためにカーゴ分子にコンジュゲートされる。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドは、インビボにおいて明細胞腎癌腫瘍細胞にカーゴ分子を向けるためにカーゴ分子にコンジュゲートされる。

30

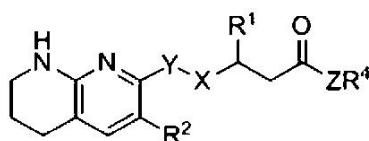
【0025】

式I

一態様において、本発明は、以下の構造：

【化3】

40



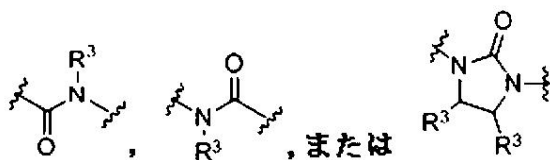
(式 I)

{ 式中、

Xは、 $-C(R^3)_2-$ 、 $-NR^3-$ 、

50

## 【化 4】



であり；

Yは、任意に置換されたアルキレンであり；

Zは、O、NR<sup>3</sup>、またはSであり；

nは、1～8の整数であり；

R<sup>1</sup>は、任意に置換されたアリール、任意に置換されたヘテロアリール、任意に置換されたヘテロシクリル、任意に置換されたシクロアルキルであるか、またはR<sup>1</sup>はカーゴ分子を含み；

R<sup>2</sup>は、H、任意に置換されたアルキルであるか、またはR<sup>2</sup>はカーゴ分子を含み；

R<sup>3</sup>のそれぞれの場合には独立に、Hおよび任意に置換されたアルキルから成る群から選択されるか、またはR<sup>3</sup>はカーゴ分子を含み；

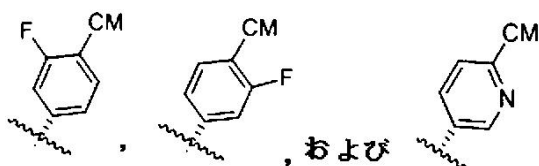
R<sup>4</sup>は、Hまたは任意に置換されたアルキルであり；そして

ここで、Y、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、いずれかの場合のR<sup>3</sup>、およびR<sup>4</sup>のうちの少なくとも1つがカーゴ分子を含む}のインテグリンリガンドを提供する。

## 【0026】

式Iのいくつかの実施形態において、R<sup>1</sup>は、以下の：

## 【化 5】



{ 式中、以下の：

## 【化 6】



は、結合点を示し、およびCMはカーゴ分子を含む}から成る群から選択される。

## 【0027】

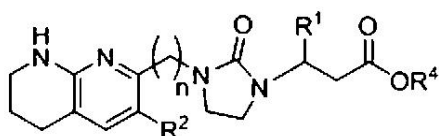
式Iのいくつかの実施形態において、Yは、C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキレンである。

## 【0028】

式II

式Iのいくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドは、以下の式：

## 【化 7】



(式 II)

{ 式中、

$n$ は、1～8の整数であり；

$R^1$ は、任意に置換されたアリール、任意に置換されたヘテロアリール、任意に置換されたヘテロシクリル、任意に置換されたシクロアルキルであるか、または $R^1$ はカーゴ分子を含み；

$R^2$ は、H、任意に置換されたアルキルであるか、または $R^2$ はカーゴ分子を含み；

$R^4$ は、Hまたは任意に置換されたアルキルであり；そして

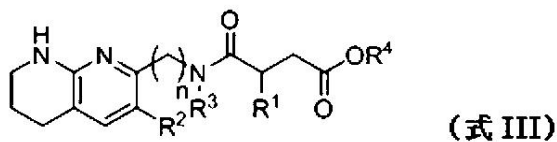
ここで、 $R^1$ または $R^2$ のうちの少なくとも1つがカーゴ分子を含む}の構造またはその薬学的に許容される塩を含む。

【0029】

式III

式Iのいくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドは、以下の式：

【化8】



{ 式中、

$n$ は、1～8の整数であり；

$R^1$ は、任意に置換されたアリール、任意に置換されたヘテロアリール、任意に置換されたヘテロシクリル、任意に置換されたシクロアルキルであるか、または $R^1$ はカーゴ分子を含み；

$R^2$ は、H、任意に置換されたアルキルであるか、または $R^2$ はカーゴ分子を含み；

$R^3$ は、Hおよび任意に置換されたアルキルから成る群から選択されるか、または $R^3$ はカーゴ分子を含み；

$R^4$ は、Hまたは任意に置換されたアルキルであり；そして

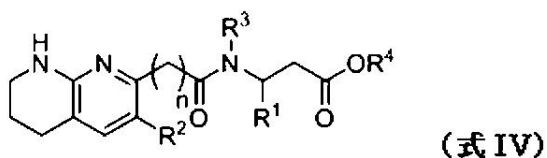
ここで、 $R^1$ 、 $R^2$ および $R^3$ のうちの少なくとも1つがカーゴ分子を含む}の構造またはその薬学的に許容される塩を含む。

【0030】

式IV

式Iのいくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドは、以下の式

【化9】



{ 式中、

$n$ は、1～8の整数であり；

$R^1$ は、任意に置換されたアリール、任意に置換されたヘテロアリール、任意に置換されたヘテロシクリル、任意に置換されたシクロアルキルであるか、または $R^1$ はカーゴ分子を含み；

$R^2$ は、H、任意に置換されたアルキルであるか、または $R^2$ はカーゴ分子を含み；

$R^3$ は、Hおよび任意に置換されたアルキルから成る群から選択されるか、または $R^3$ はカーゴ分子を含み；

$R^4$ は、Hまたは任意に置換されたアルキルであり；そして

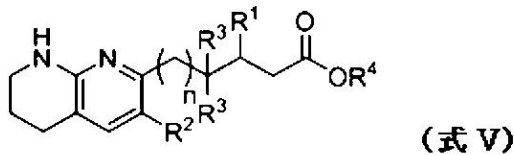
ここで、 $R^1$ 、 $R^2$ および $R^3$ のうちの少なくとも1つがカーゴ分子を含む}の構造またはその薬学的に許容される塩を含む。

【0031】

式V

式Iのいくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドは、以下の式：

【化10】



10

{ 式中、

$n$ は、1～8の整数であり；

$R^1$ は、任意に置換されたアリール、任意に置換されたヘテロアリール、任意に置換されたヘテロシクリル、任意に置換されたシクロアルキルであるか、または $R^1$ はカーゴ分子を含み；

$R^2$ は、H、任意に置換されたアルキルであるか、または $R^2$ はカーゴ分子を含み；

$R^3$ のそれぞれの場合には独立に、Hおよび任意に置換されたアルキルから成る群から選択されるか、または $R^3$ はカーゴ分子を含み；

20

$R^4$ は、Hまたは任意に置換されたアルキルであり；そして

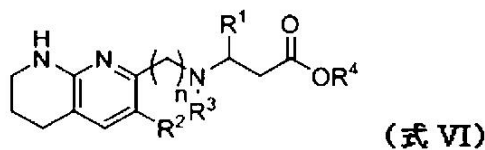
ここで、 $R^1$ 、 $R^2$ および $R^3$ のうちの少なくとも1つがカーゴ分子を含む}の構造またはその薬学的に許容される塩を含む。

【0032】

式VI

式Iのいくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドは、以下の式：

【化11】



30

{ 式中、

$n$ は、1～8の整数であり；

$R^1$ は、任意に置換されたアリール、任意に置換されたヘテロアリール、任意に置換されたヘテロシクリル、任意に置換されたシクロアルキルであるか、または $R^1$ はカーゴ分子を含み；

40

$R^2$ は、H、任意に置換されたアルキルであるか、または $R^2$ はカーゴ分子を含み；

$R^3$ のそれぞれの場合には独立に、Hおよび任意に置換されたアルキルから成る群から選択されるか、または $R^3$ はカーゴ分子を含み；

$R^4$ は、Hまたは任意に置換されたアルキルであり；そして

ここで、 $R^1$ 、 $R^2$ および $R^3$ のうちの少なくとも1つがカーゴ分子を含む}の構造またはその薬学的に許容される塩を含む。

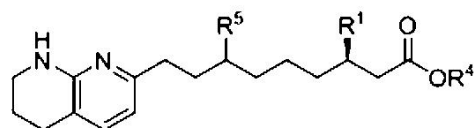
【0033】

式VII

式Iのいくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドは、以下の式：

50

【化 1 2】



(式 VII)

{ 式中、

$R^1$ は、任意に置換されたアリール、任意に置換されたヘテロアリール、任意に置換されたヘテロシクリル、任意に置換されたシクロアルキルであるか、または $R^1$ はカーゴ分子を含み；

10

$R^2$ は、H、任意に置換されたアルキルであるか、または $R^2$ はカーゴ分子を含み；

$R^4$ は、Hまたは任意に置換されたアルキルであり；そして

ここで、 $R^1$ 、 $R^4$ および $R^5$ のうちの少なくとも1つがカーゴ分子を含む}の構造またはその薬学的に許容される塩を含む。

【 0 0 3 4】

 $R^1$ 

式Iの実施形態において、 $R^1$ は、任意に置換されたアリール、任意に置換されたヘテロアリール、任意に置換されたヘテロシクリル、任意に置換されたシクロアルキルであるか、または $R^1$ はカーゴ分子を含む。いくつかの実施形態において、 $R^1$ は、以下の：

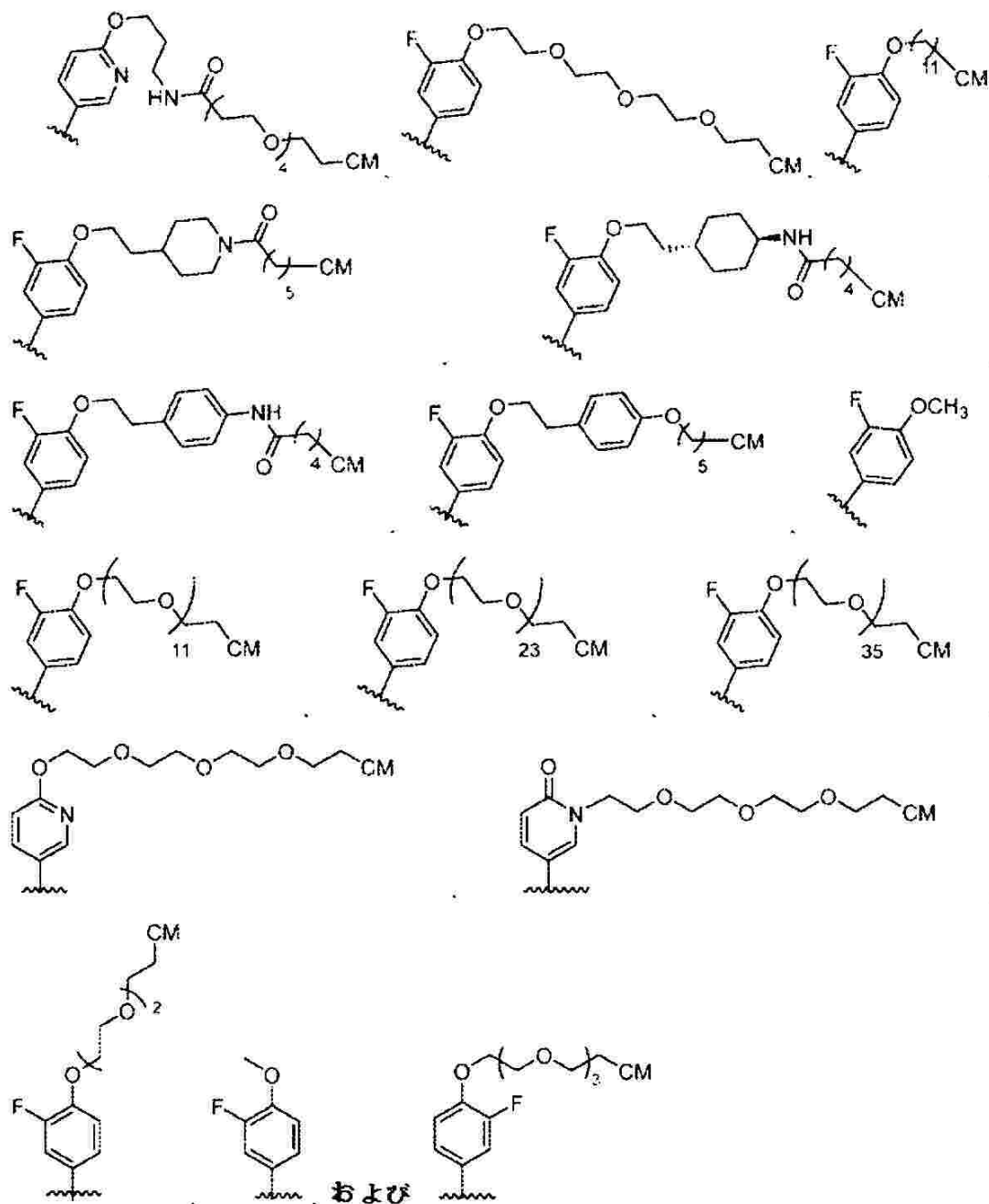
20

30

40

50

【化 1 3】



{ 式中、以下の：

【化 1 4】

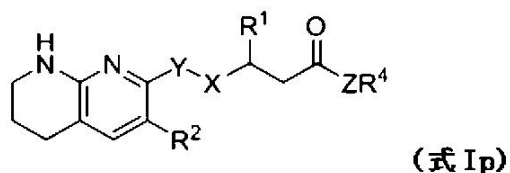
は結合点を示し、およびCMはカーゴ分子を含む } から成る群から選択される。

【 0 0 3 5 】

## インテグリン標的化リガンド前駆体

いくつかの実施形態において、本発明は、カーゴ分子を含む部分にインテグリン標的化リガンドを取り付けるのに使用できるインテグリン標的化リガンド前駆体を提供する。以下の式：

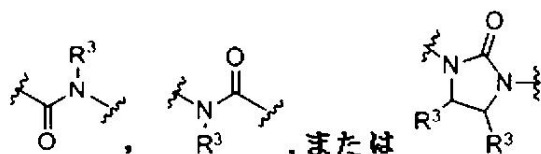
【化 1 5】



{ 式中、

Xは、 $-C(R^3)_2-$ 、 $-NR^3-$ 、

【化 1 6】



であり；

Yは、任意に置換されたアルキレンであり；

Zは、O、 $NR^3$ 、またはSであり；

nは、1～8の整数であり；

$R^1$ は、任意に置換されたアリール、任意に置換されたヘテロアリール、任意に置換されたヘテロシクリル、任意に置換されたシクロアルキルであるか、または $R^1$ はカーゴ分子を含み；

$R^2$ は、H、任意に置換されたアルキルであるか、または $R^2$ はカーゴ分子を含み；

$R^3$ のそれぞれの場合には独立に、Hおよび任意に置換されたアルキルから成る群から選択されるか、または $R^3$ はカーゴ分子を含み；

$R^4$ は、Hまたは任意に置換されたアルキルであり；そして

ここで、Y、 $R^1$ 、 $R^2$ 、いずれかの場合の $R^3$ 、および $R^4$ のうちの少なくとも1つが反応性基を含む}のインテグリン標的化リガンド前駆体が本明細書に提供される。

【0036】

式Ipの化合物のいくつかの実施形態において、反応性基はアジドを含む。

【0037】

式Iの化合物

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドは、以下のものによって表される構造のうちのいずれかを含むか、それらから成るか、または本質的にそれらから成る構造を有する：

10

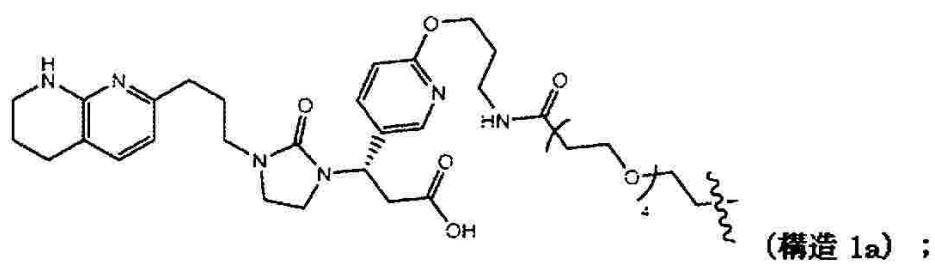
20

30

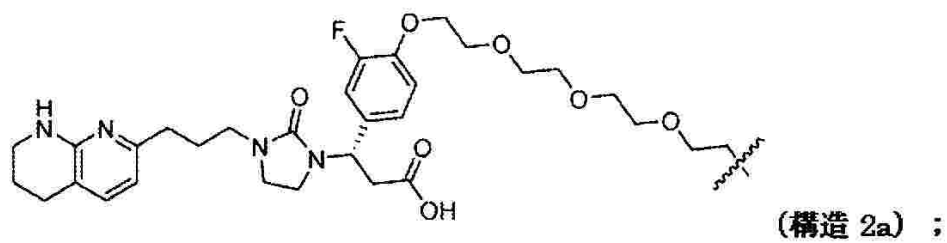
40

50

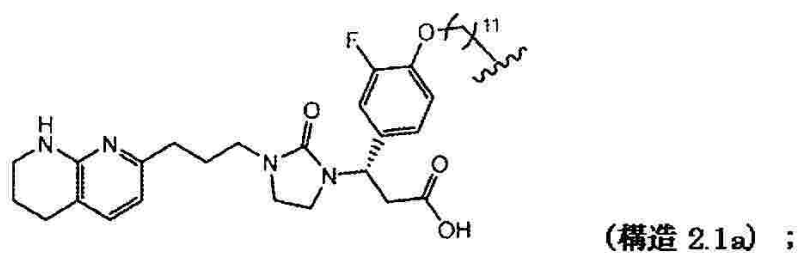
【化 17】



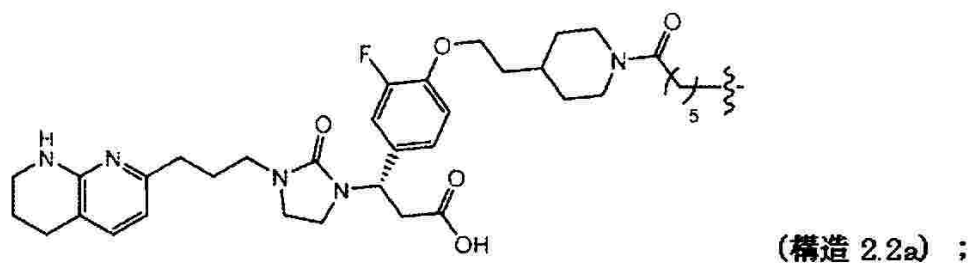
10



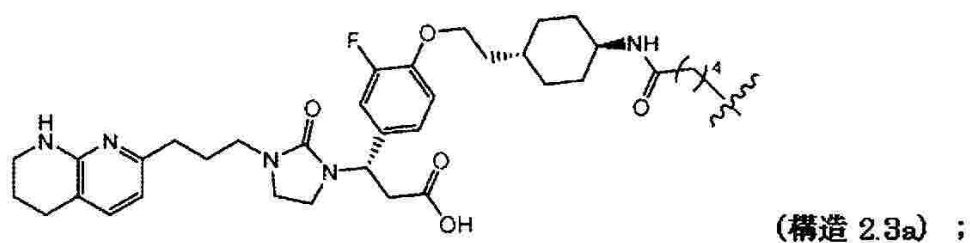
20



30



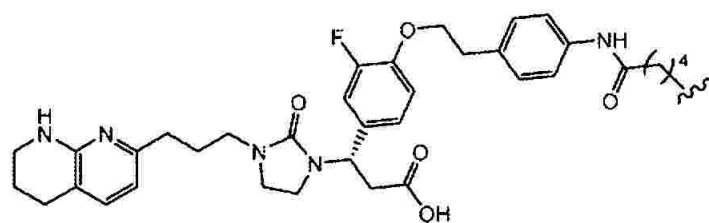
40



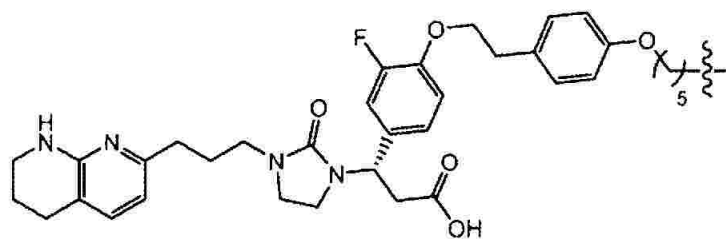
50



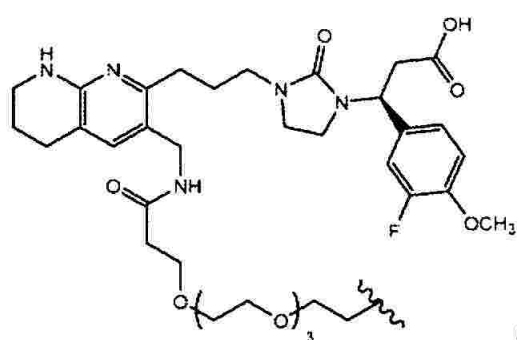
【化 1 8】



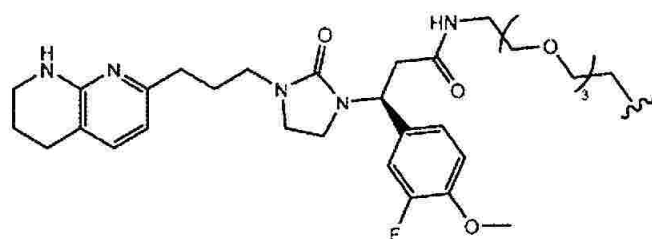
(構造 2.4a) ;



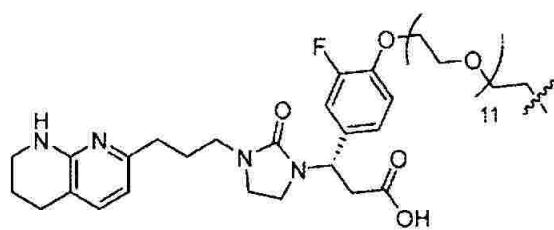
(構造 2.5a) ;



(構造 2.6a) ;



(構造 2.7a) ;



(構造 2.8a) ;

10

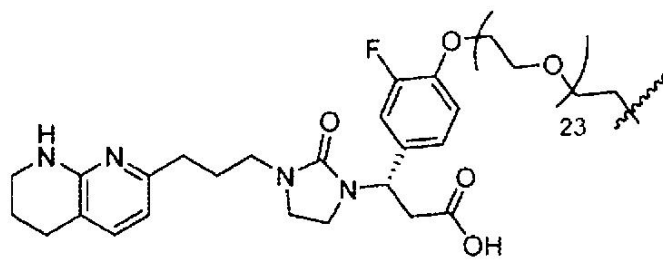
20

30

40

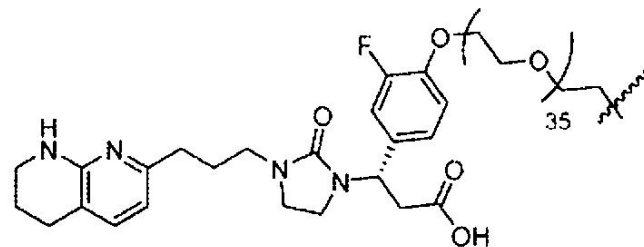
50

【化 19】



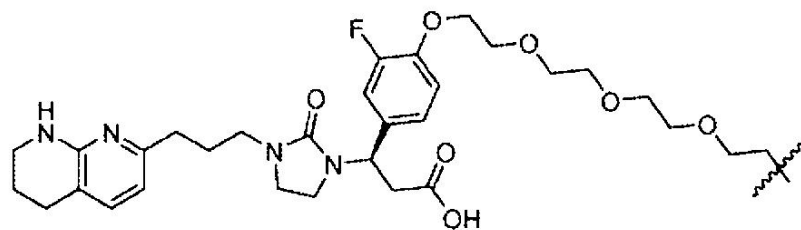
(構造 2.9a) ;

10



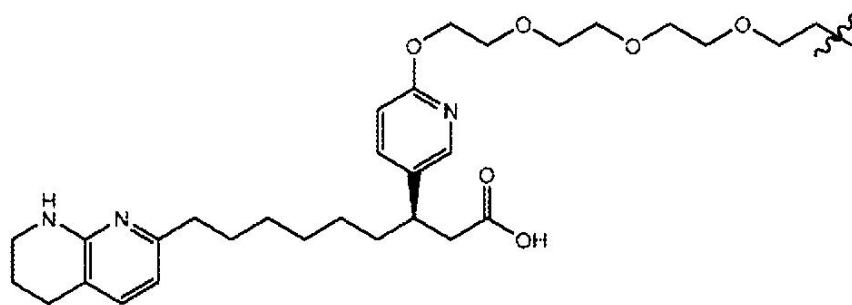
(構造 2.10a) ;

20



(構造 2.11a) ;

30



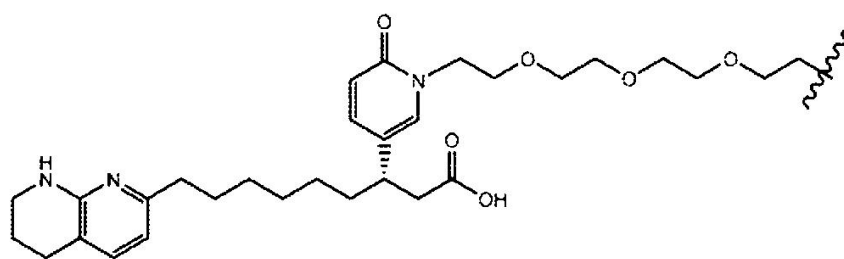
(構造 28a) ;

40

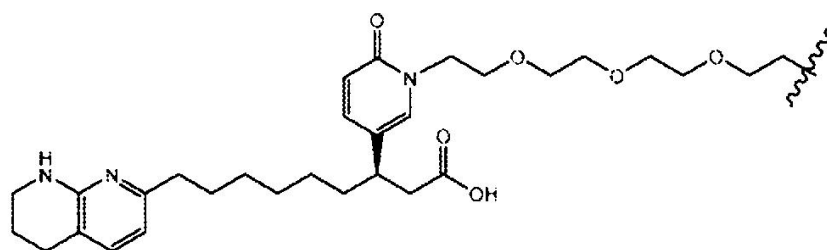
50

CCCCCCCC[C@H](Cc1cccnc1)C(=O)O

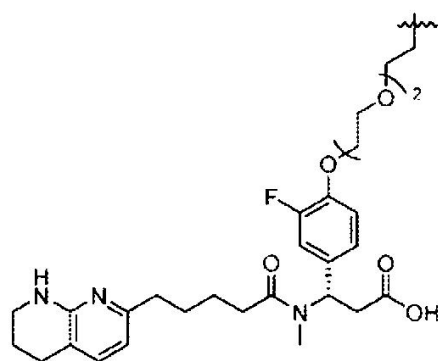
10



20

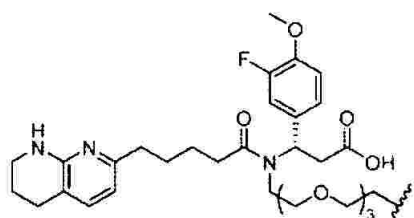


30



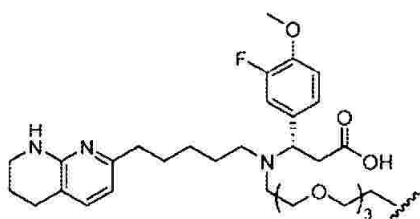
40

【化 2 1】

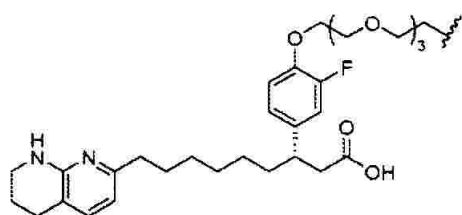


(構造 33a) ;

10

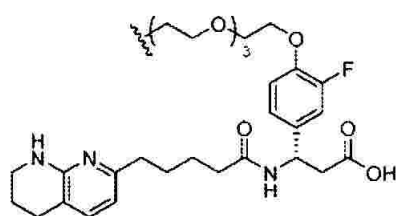


(構造 34a) ;



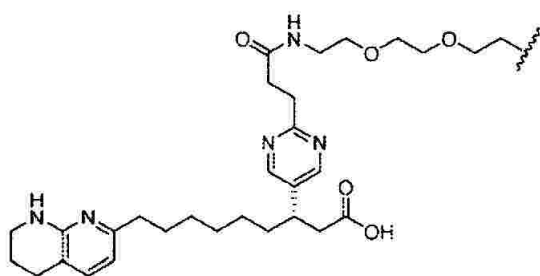
(構造 36a) ;

20



(構造 37a) ;

30

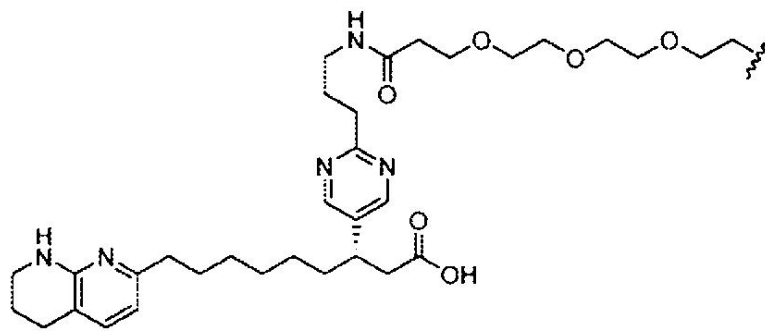


(構造 38a) ;

40

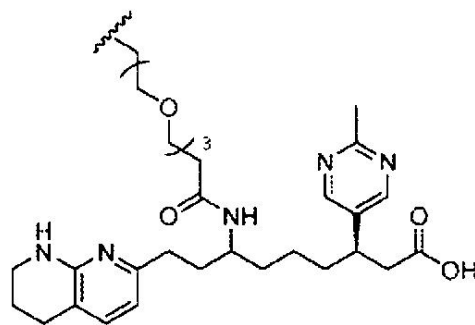
50

## 【化 2 2】



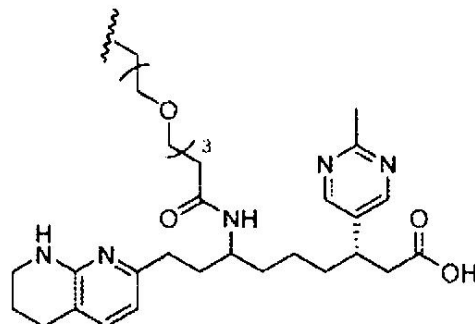
(構造 39a) ;

10



(構造 40a) ; および

20



(構造 41a)

30

## 【 0 0 3 8 】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドが、1もしくは複数（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10；または1～10、2～10、1～9、1～8、1～7、1～6、1～5、1～4、1～3、1～2、2～10、3～10、4～10、5～10、2～5、2～4、もしくは3～5）のカーゴ分子（例えば、本明細書に記載される、または当該技術分野で知られているカーゴ分子のいずれか）にコンジュゲートされる。

40

## 【 0 0 3 9 】

いくつかの実施形態において、2つ以上の、本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンド（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、もしくは30；または1～30、1～25、1～20、1～15、1～10、1～5、5～30、5～25、5～20、5～15、5～10、10～30、10～25、10～20、10～15、15～30、15～25、15～20、20～30、20～25、もしくは25～30のインテグリン標的化リガンド）が、1つのカーゴ分子（例えば、本明細書に記載されるか、または当該技術分野で知られているカーゴ分子のいずれか）にコンジュゲートされる。

## 【 0 0 4 0 】

50

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドは、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）基などの連結基を介して1もしくは複数のカーゴ分子に任意にコンジュゲートされる。

【0041】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドは、各リガンドの少なくとも1つの結合点および各カーゴ分子の少なくとも1つの結合点を含む足場を介して1もしくは複数のカーゴ分子に任意にコンジュゲートされる。いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、1つのカーゴ分子にコンジュゲートされたインテグリン標的化リガンドを含むか、それらから成るか、または本質的にそれらから成る。いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、2つ以上カーゴ分子にコンジュゲートされたインテグリン標的化リガンドを含むか、それらから成るか、または本質的にそれらから成る。

10

【0042】

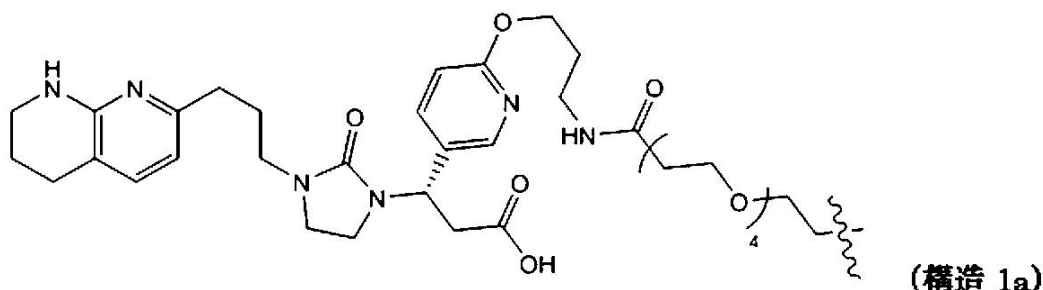
いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、それぞれ本明細書に開示される構造1a、構造2a、構造2.1a、構造2.2a、構造2.3a、構造2.4a、構造2.5a、構造2.6a、構造2.8a、構造2.9a、構造2.10a、構造2.11a、構造28a、構造29a、構造30a、構造31a、構造32a、構造33a、構造34a、構造36a、構造37a、構造38a、構造39a、構造40a、および構造41aを含むか、それらから成るか、または本質的にそれらから成る。

【0043】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドは、以下の構造：

20

【化23】



30

を含む。

【0044】

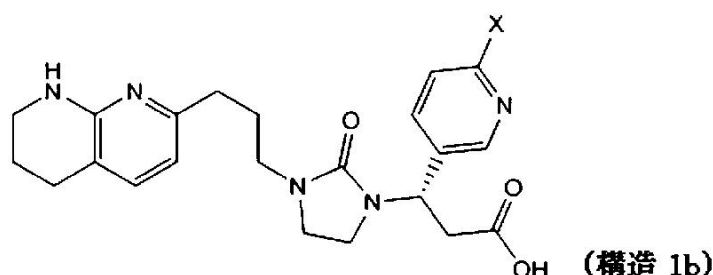
いくつかの実施形態において、構造1aのインテグリン標的化リガンドは、1もしくは複数のカーゴ分子（例えば（単数もしくは複数の）RNAi剤）に連結される。

【0045】

いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、反応性基、保護された反応性基、またはカーゴ分子を含むように合成され得、かつ、以下の構造：

【化24】

40



{ 式中、Xは、反応性基、保護された反応性基、またはカーゴ分子（例えば、RNAi剤）を

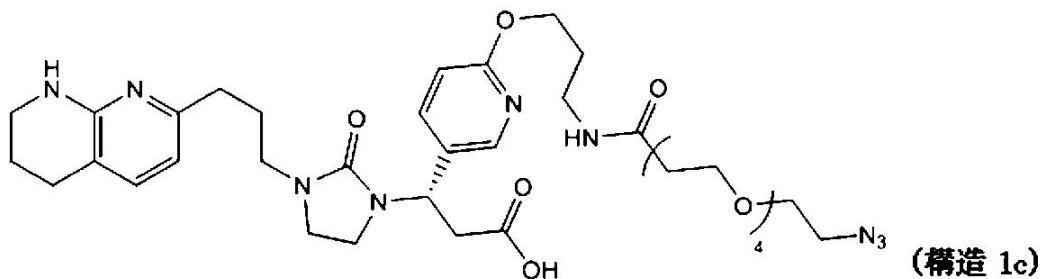
50

含む}を含む。

【0046】

いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンド前駆体は、アジド反応性基を含むように合成され得、かつ、以下の構造：

【化25】



10

を含む。

【0047】

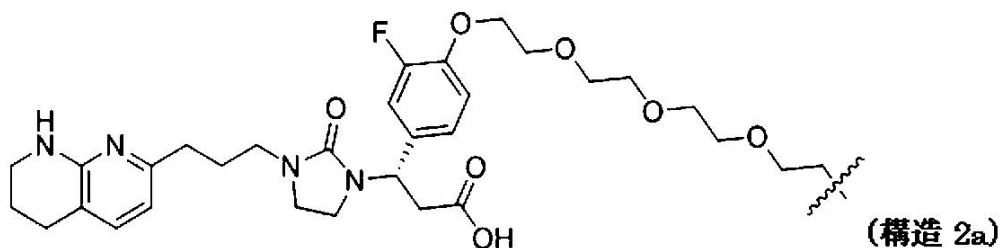
反応性基（または、保護された反応性基）は、（直接的にまたは1もしくは複数の足場および/またはリンカーを介して）着目の分子、例えば、カーゴ分子へのインテグリン標的化リガンドのコンジュゲーションを容易にするために使用され得る。

20

【0048】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドは、以下の構造：

【化26】



30

を含む。

【0049】

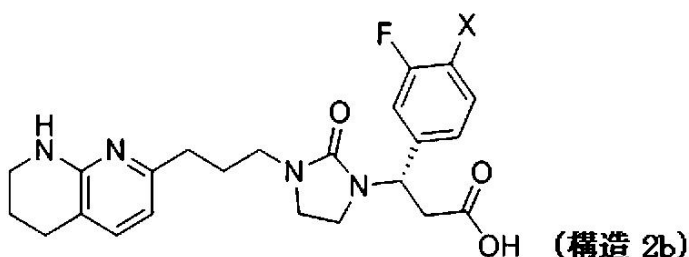
いくつかの実施形態において、構造2aのインテグリン標的化リガンドは、1もしくは複数のカーゴ分子（例えば（単数もしくは複数の）RNAi剤）に連結される。

【0050】

いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、反応性基、保護された反応性基、またはカーゴ分子を含むように合成され得、かつ、以下の構造：

40

【化27】



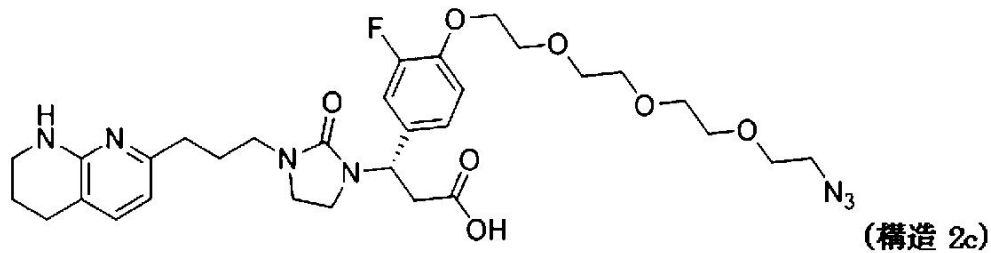
50

{ 式中、Xは、反応性基、保護された反応性基、またはカーゴ分子（例えば、RNAi剤）を含む } を含む。

【 0 0 5 1 】

いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、アジド反応性基を含むように合成され得、かつ、以下の構造：

【 化 2 8 】



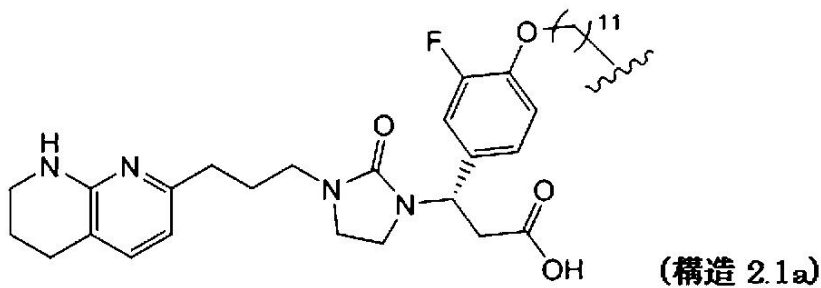
10

を含む。

【 0 0 5 2 】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドは、以下の構造：

【 化 2 9 】



20

を含む。

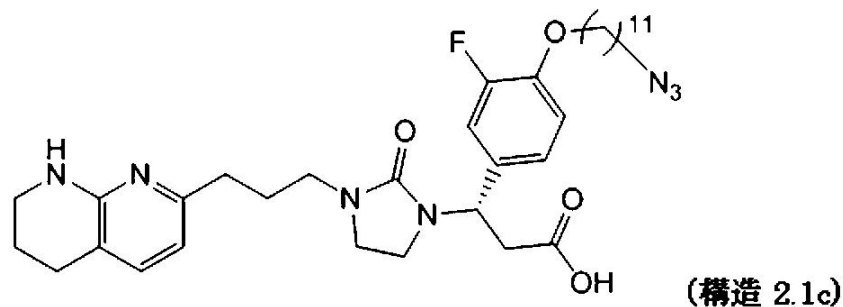
【 0 0 5 3 】

いくつかの実施形態において、構造2.1aのインテグリン標的化リガンドは、1もしくは複数のカーゴ分子（例えば（単数もしくは複数の）RNAi剤）に連結される。

【 0 0 5 4 】

いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、アジド反応性基を含むように合成され得、かつ、以下の構造：

【 化 3 0 】



40

を含む。

【 0 0 5 5 】

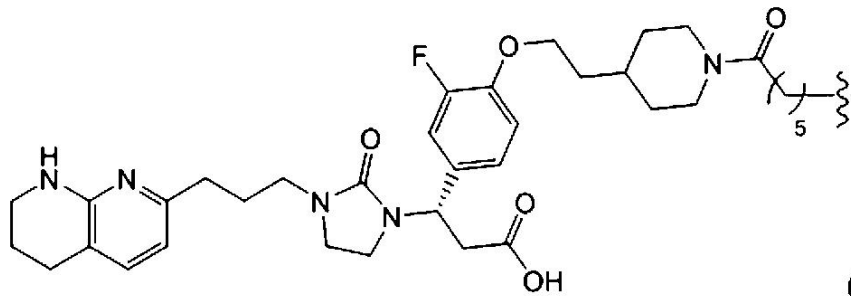
いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドは、

50



以下の構造：

【化 3 1】



(構造 2.2a)

10

を含む。

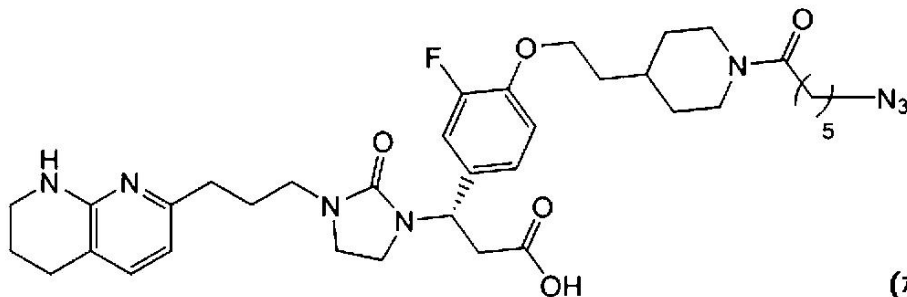
【0056】

いくつかの実施形態において、構造2.2aのインテグリン標的化リガンドは、1もしくは複数のカーゴ分子（例えば（単数もしくは複数の）RNAi剤）に連結される。

【0057】

いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、アジド反応性基を含むように合成され得、かつ、以下の構造：

【化 3 2】



(構造 2.2c)

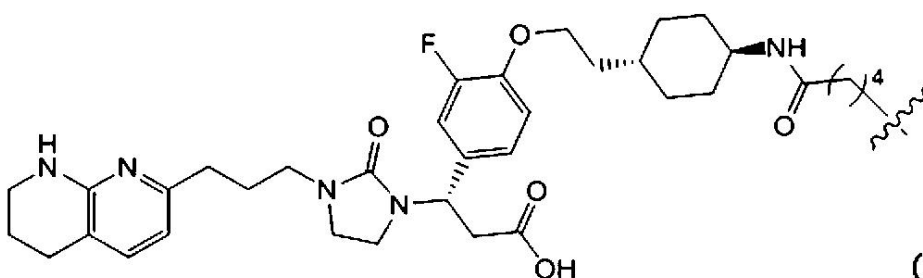
20

を含む。

【0058】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドは、以下の構造：

【化 3 3】



(構造 2.3a)

40

を含む。

【0059】

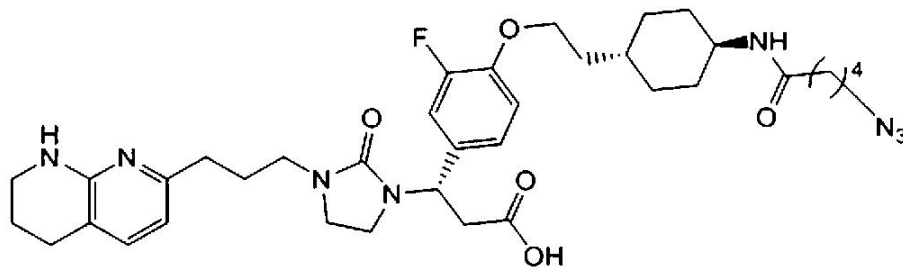
いくつかの実施形態において、構造2.3aのインテグリン標的化リガンドは、1もしくは複数のカーゴ分子（例えば（単数もしくは複数の）RNAi剤）に連結される。

【0060】

50

いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、アジド反応性基を含むように合成され得、かつ、以下の構造：

【化 3 4】



(構造 2.3c)

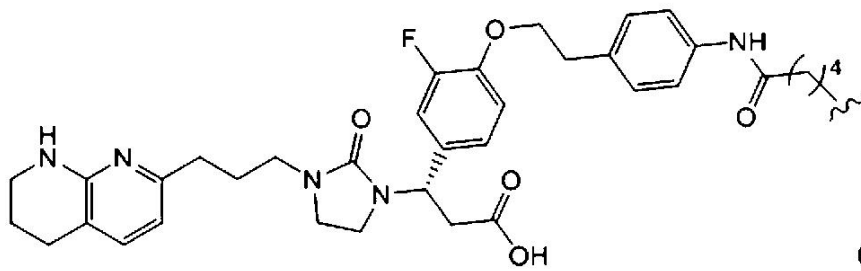
10

を含む。

【0061】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドは、以下の構造：

【化 3 5】



(構造 2.4a)

20

を含む。

【0062】

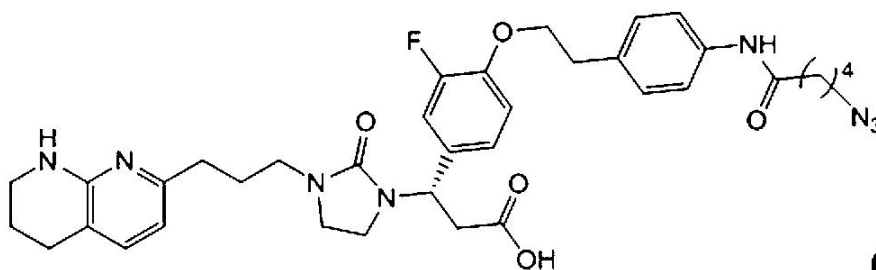
いくつかの実施形態において、構造2.4aのインテグリン標的化リガンドは、1もしくは複数のカーゴ分子（例えば（単数もしくは複数の）RNAi剤）に連結される。

30

【0063】

いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、アジド反応性基を含むように合成され得、かつ、以下の構造：

【化 3 6】



(構造 2.4c)

40

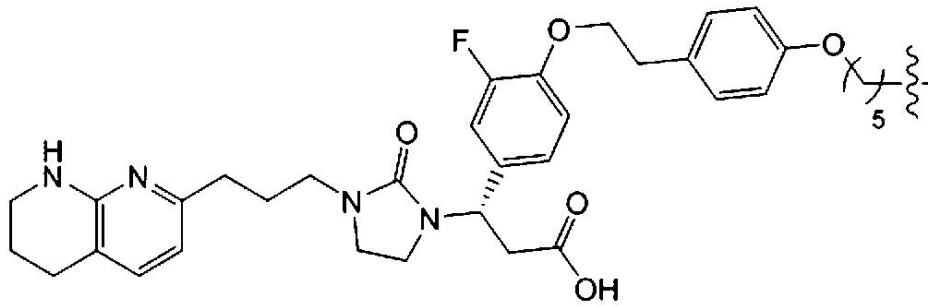
を含む。

【0064】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドは、以下の構造：

50

【化 3 7】



10

を含む。

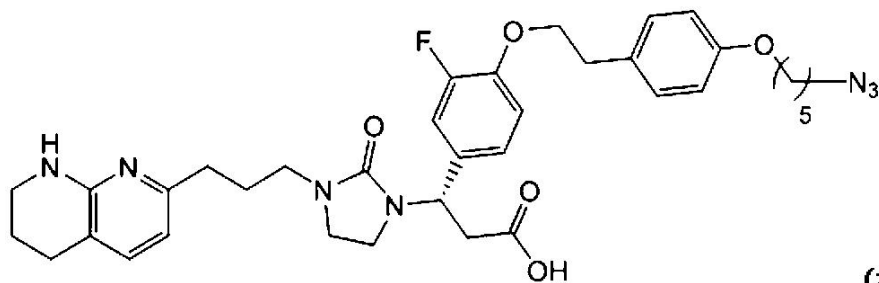
【 0 0 6 5】

いくつかの実施形態において、構造2.5aのインテグリン標的化リガンドは、1もしくは複数のカーゴ分子（例えば（単数もしくは複数の）RNAi剤）に連結される。

【 0 0 6 6】

いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、アジド反応性基を含むように合成され得、かつ、以下の構造：

【化 3 8】



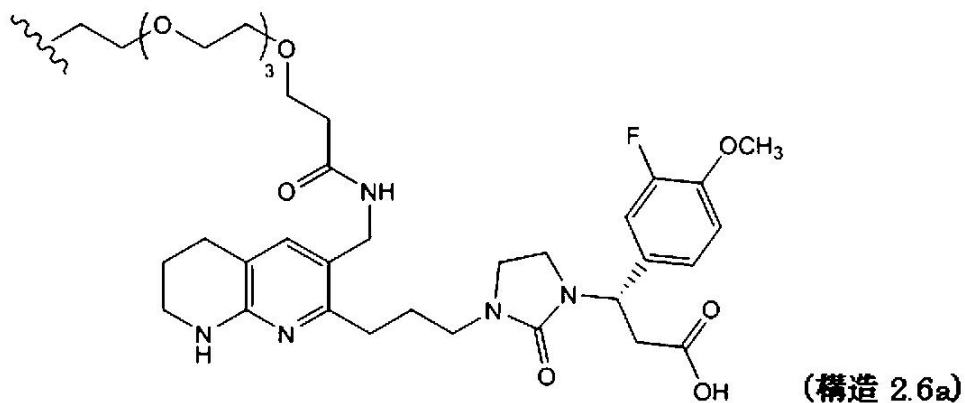
20

を含む。

【 0 0 6 7】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドは、以下の構造：

【化 3 9】



40

を含む。

【 0 0 6 8】

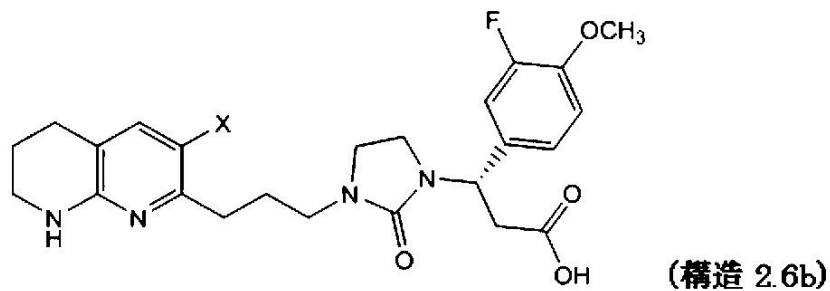
いくつかの実施形態において、構造2.6aのインテグリン標的化リガンドは、1もしくは複数のカーゴ分子（例えば（単数もしくは複数の）RNAi剤）に連結される。

50

## 【 0 0 6 9 】

いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、反応性基、保護された反応性基、またはカーゴ分子を含むように合成され得、かつ、以下の構造：

## 【 化 4 0 】



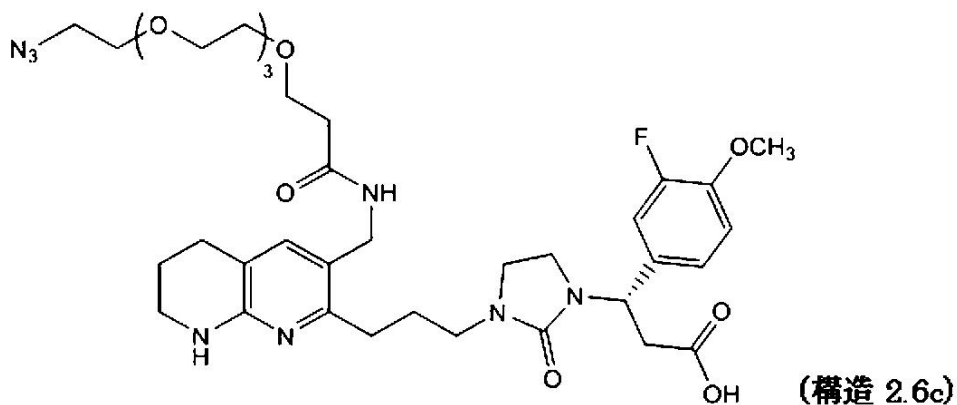
10

{ 式中、Xは、反応性基、保護された反応性基、またはカーゴ分子（例えば、RNAi剤）を含む } を含む。

## 【 0 0 7 0 】

いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、アジド反応性基を含むように合成され得、かつ、以下の構造：

## 【 化 4 1 】



20

30

を含む。

## 【 0 0 7 1 】

反応性基（または、保護された反応性基）は、（直接的にまたは1もしくは複数の足場および/またはリンカーを介して）着目の分子、例えば、カーゴ分子へのインテグリン標的化リガンドのコンジュゲーションを容易にするために使用され得る。

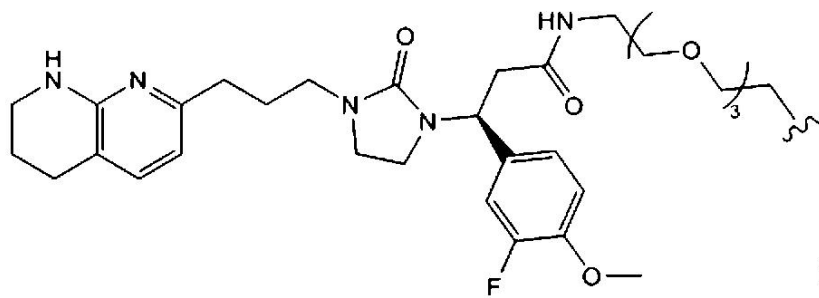
## 【 0 0 7 2 】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドは、以下の構造：

40

50

【化 4 2】



(構造 2.7a)

10

を含む。

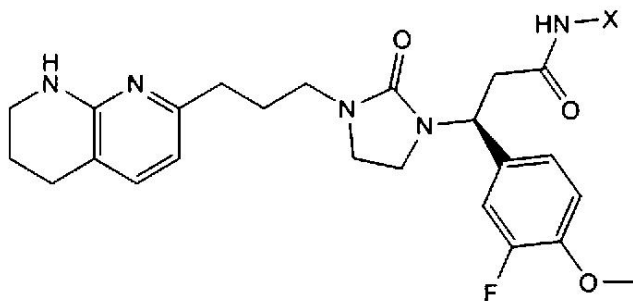
【0073】

いくつかの実施形態において、構造2.7aのインテグリン標的化リガンドは、1もしくは複数のカーゴ分子（例えば（単数もしくは複数の）RNAi剤）に連結される。

【0074】

いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、反応性基、保護された反応性基、またはカーゴ分子を含むように合成され得、かつ、以下の構造：

【化 4 3】



(構造 2.7b)

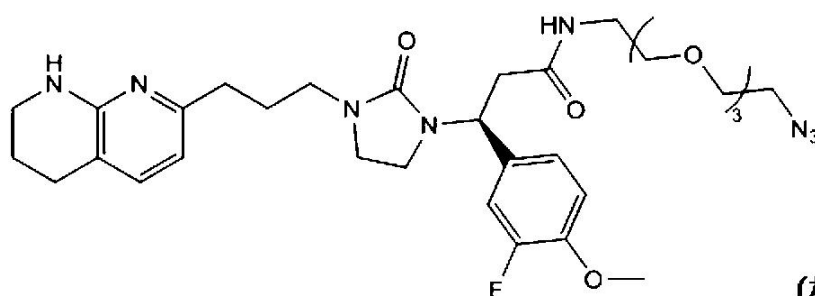
20

{ 式中、Xは、反応性基、保護された反応性基、またはカーゴ分子（例えば、RNAi剤）を含む } を含む。

【0075】

いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、アジド反応性基を含むように合成され得、かつ、以下の構造：

【化 4 4】



(構造 2.7c)

40

を含む。

【0076】

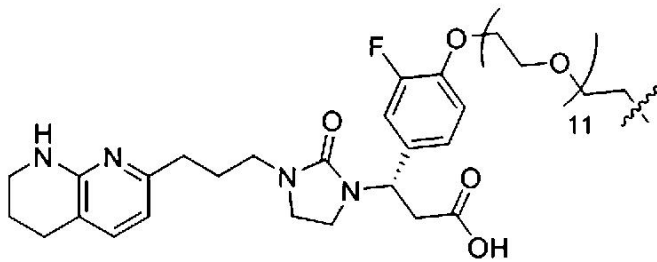
反応性基（または、保護された反応性基）は、（直接的にまたは1もしくは複数の足場および/またはリンカーを介して）着目の分子、例えば、カーゴ分子へのインテグリン標的化リガンドのコンジュゲーションを容易にするために使用され得る。

50

【 0 0 7 7 】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドは、以下の構造：

【化 4 5】



(構造 2.8a)

10

を含む。

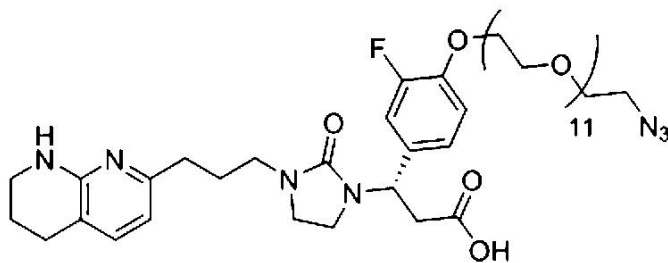
【 0 0 7 8 】

いくつかの実施形態において、構造2.8aのインテグリン標的化リガンドは、1もしくは複数のカーゴ分子（例えば（単数もしくは複数の）RNAi剤）に連結される。

【 0 0 7 9 】

いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、アジド反応性基を含むように合成され得、かつ、以下の構造：

【化 4 6】



(構造 2.8c)

30

を含む。

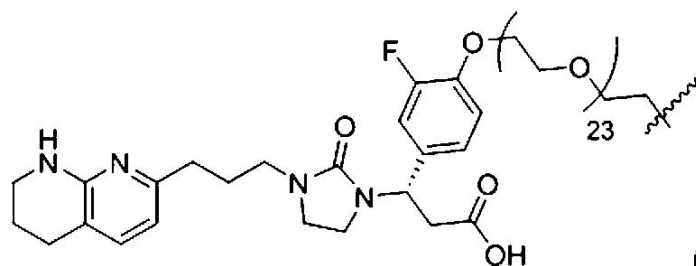
【 0 0 8 0 】

反応性基（または、保護された反応性基）は、（直接的にまたは1もしくは複数の足場および/またはリンカーを介して）着目の分子、例えば、カーゴ分子へのインテグリン標的化リガンドのコンジュゲーションを容易にするために使用され得る。

【 0 0 8 1 】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドは、以下の構造：

【化 4 7】



(構造 2.9a)

40

を含む。

【 0 0 8 2 】

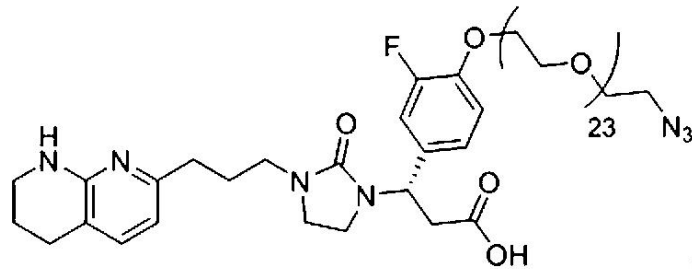
50

いくつかの実施形態において、構造2.9aのインテグリン標的化リガンドは、1もしくは複数のカーゴ分子（例えば（単数もしくは複数の）RNAi剤）に連結される。

【0083】

いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、アジド反応性基を含むように合成され得、かつ、以下の構造：

【化48】



(構造 2.9c)

10

を含む。

【0084】

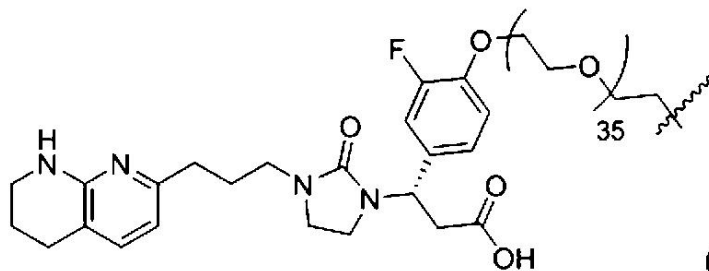
反応性基（または、保護された反応性基）は、（直接的にまたは1もしくは複数の足場および/またはリンカーを介して）着目の分子、例えば、カーゴ分子へのインテグリン標的化リガンドのコンジュゲーションを容易にするために使用され得る。

20

【0085】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドは、以下の構造：

【化49】



(構造 2.10a)

30

を含む。

【0086】

いくつかの実施形態において、構造2.10aのインテグリン標的化リガンドは、1もしくは複数のカーゴ分子（例えば（単数もしくは複数の）RNAi剤）に連結される。

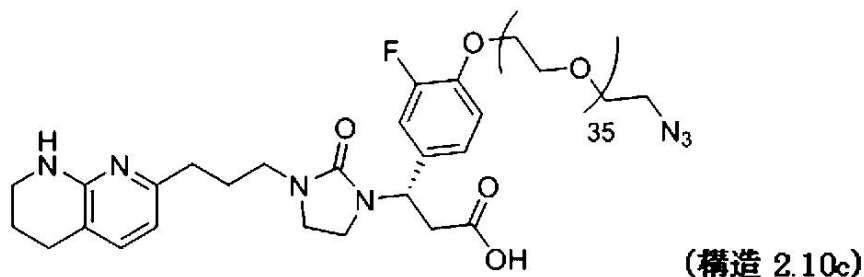
【0087】

いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、アジド反応性基を含むように合成され得、かつ、以下の構造：

40

50

【化 5 0】



10

を含む。

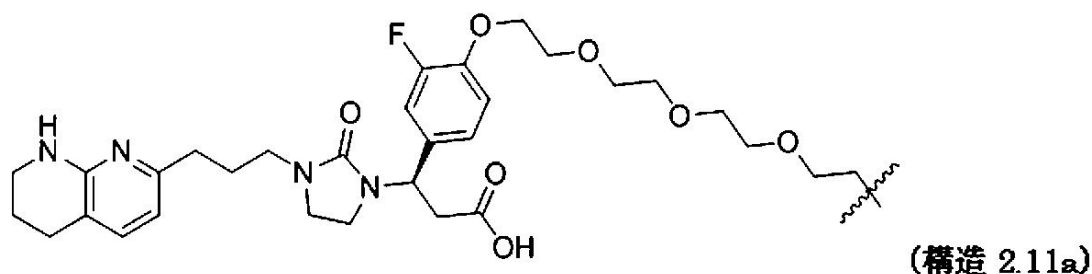
【 0 0 8 8】

反応性基（または、保護された反応性基）は、（直接的にまたは1もしくは複数の足場および/またはリンカーを介して）着目の分子、例えば、カーゴ分子へのインテグリン標的化リガンドのコンジュゲーションを容易にするために使用され得る。

【 0 0 8 9】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドは、以下の構造：

【化 5 1】



20

を含む。

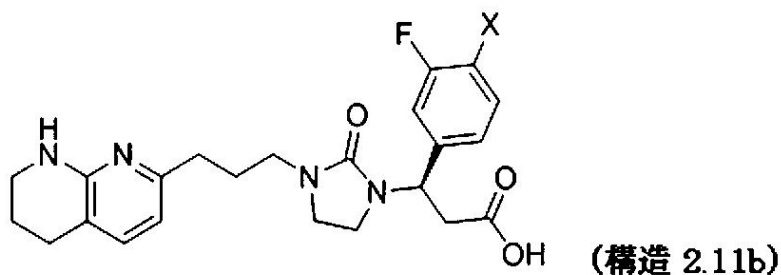
【 0 0 9 0】

いくつかの実施形態において、構造2.11aのインテグリン標的化リガンドは、1もしくは複数のカーゴ分子（例えば（単数もしくは複数の）RNAi剤）に連結される。

【 0 0 9 1】

いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、反応性基、保護された反応性基、またはカーゴ分子を含むように合成され得、かつ、以下の構造：

【化 5 2】



40

{ 式中、Xは、反応性基、保護された反応性基、またはカーゴ分子（例えば、RNAi剤）を含む } を含む。

【 0 0 9 2】

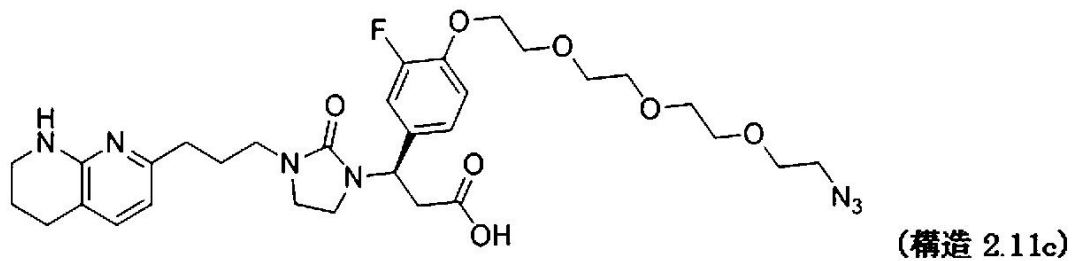
いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、アジド反応性基を含むように合成され得、かつ、以下の構造：

50



【 0 0 9 3 】

【 化 5 3 】



10

を含む。

【 0 0 9 4 】

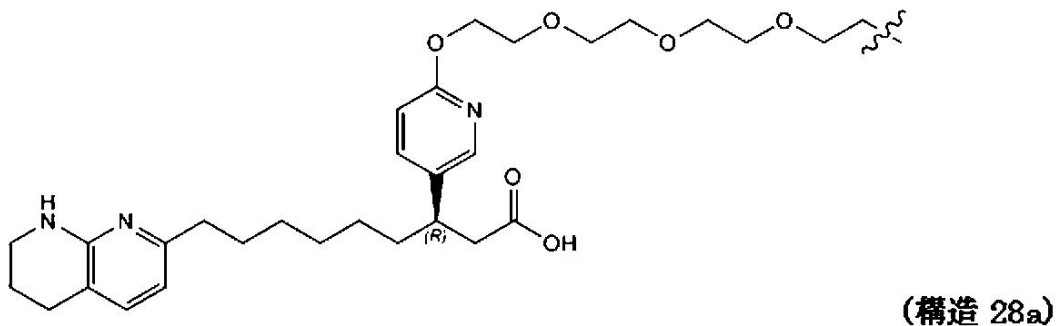
反応性基（または、保護された反応性基）は、（直接的にまたは1もしくは複数の足場および/またはリンカーを介して）着目の分子、例えば、カーゴ分子へのインテグリン標的化リガンドのコンジュゲーションを容易にするために使用され得る。

【 0 0 9 5 】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドは、以下の構造：

【 化 5 4 】

20



30

を含む。

【 0 0 9 6 】

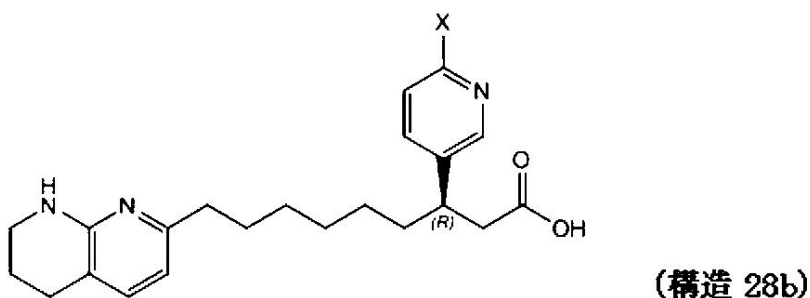
いくつかの実施形態において、構造28aのインテグリン標的化リガンドは、1もしくは複数のカーゴ分子（例えば（単数もしくは複数の）RNAi剤）に連結される。

【 0 0 9 7 】

いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、反応性基、保護された反応性基、またはカーゴ分子を含むように合成され得、かつ、以下の構造：

【 化 5 5 】

40



{ 式中、Xは、反応性基、保護された反応性基、またはカーゴ分子（例えば、RNAi剤）を

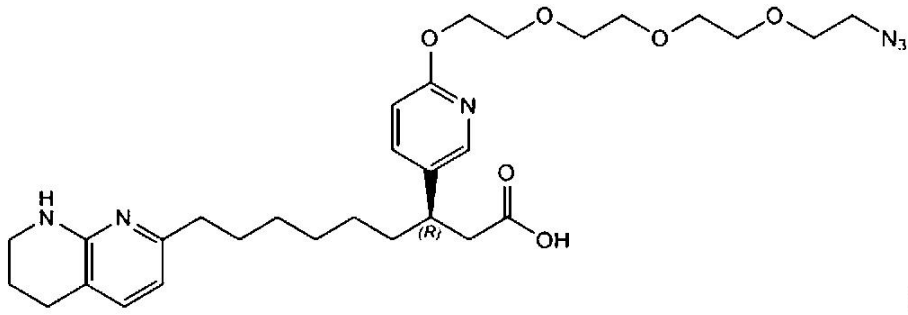
50

含む}を含む。

【0098】

いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、アジド反応性基を含むように合成され得、かつ、以下の構造：

【化56】

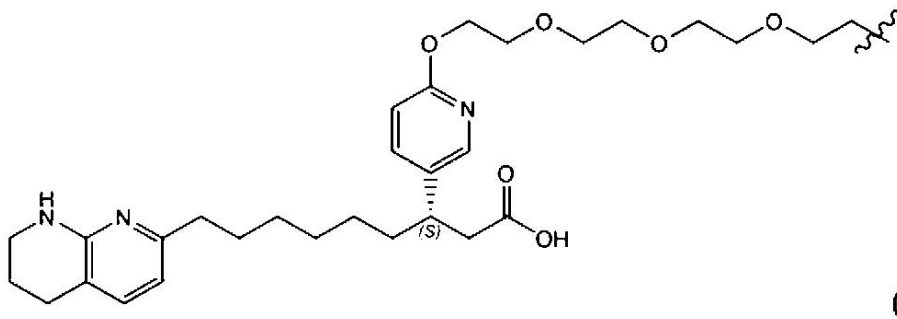


を含む。

【0099】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドは、以下の構造：

【化57】



を含む。

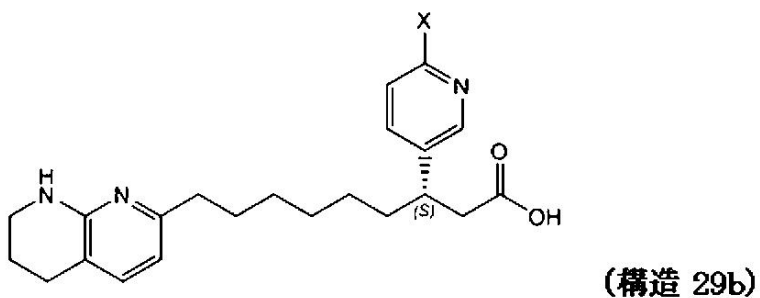
【0100】

いくつかの実施形態において、構造29aのインテグリン標的化リガンドは、1もしくは複数のカーゴ分子（例えば（単数もしくは複数の）RNAi剤）に連結される。

【0101】

いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、反応性基、保護された反応性基、またはカーゴ分子を含むように合成され得、かつ、以下の構造：

【化58】



{ 式中、Xは、反応性基、保護された反応性基、またはカーゴ分子（例えば、RNAi剤）を

10

20

30

40

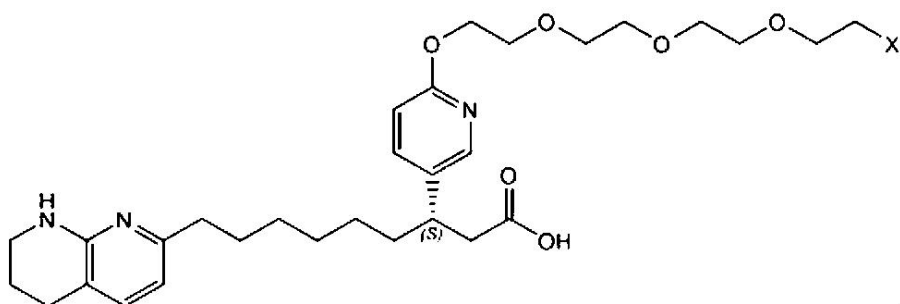
50

含む}を含む。

【0102】

いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、アジド反応性基を含むように合成され得、かつ、以下の構造：

【化59】



(構造 29c)

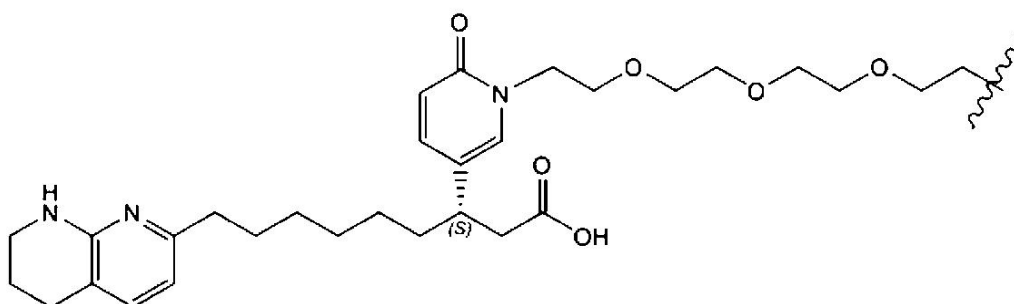
10

を含む。

【0103】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドは、以下の構造：

【化60】



(構造 30a)

30

を含む。

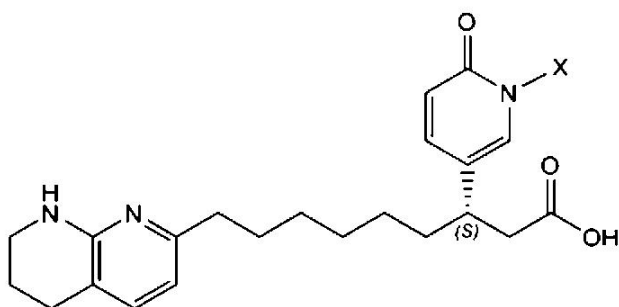
【0104】

いくつかの実施形態において、構造30aのインテグリン標的化リガンドは、1もしくは複数のカーゴ分子（例えば（単数もしくは複数の）RNAi剤）に連結される。

【0105】

いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、反応性基、保護された反応性基、またはカーゴ分子を含むように合成され得、かつ、以下の構造：

【化61】



(構造 30b)

40

{ 式中、Xは、反応性基、保護された反応性基、またはカーゴ分子（例えば、RNAi剤）を

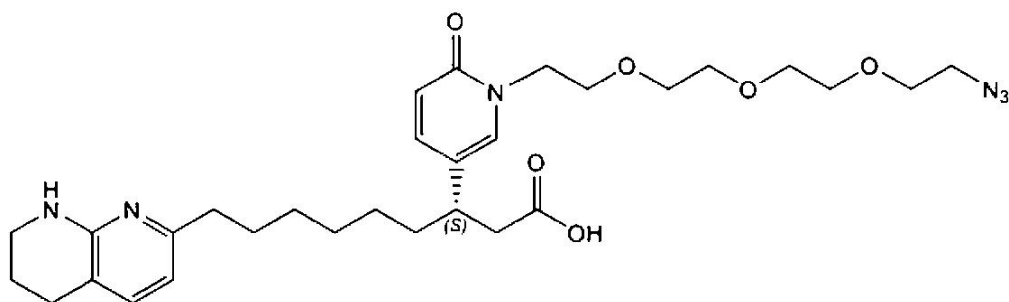
50

含む}を含む。

【0106】

いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、アジド反応性基を含むように合成され得、かつ、以下の構造：

【化62】



10

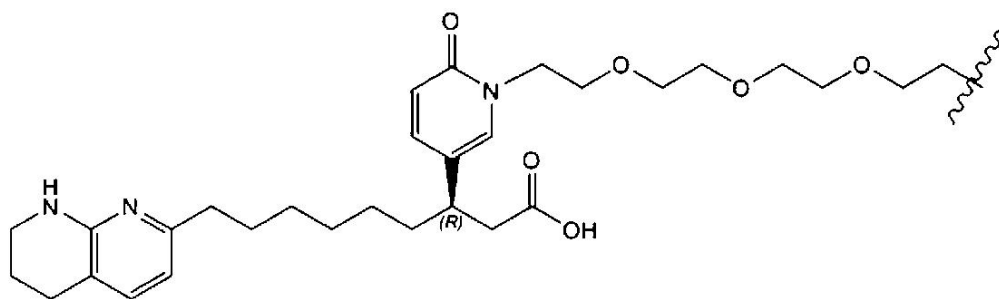
(構造 30c)

を含む。

【0107】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドは、以下の構造：

【化63】



20

(構造 31a)

を含む。

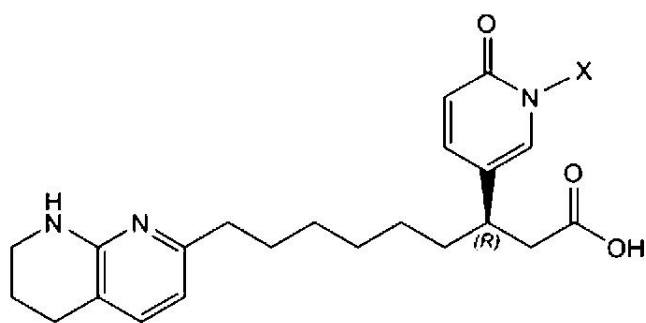
【0108】

いくつかの実施形態において、構造31aのインテグリン標的化リガンドは、1もしくは複数のカーゴ分子（例えば（単数もしくは複数の）RNAi剤）に連結される。

【0109】

いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、反応性基、保護された反応性基、またはカーゴ分子を含むように合成され得、かつ、以下の構造：

【化64】



40

(構造 31b)

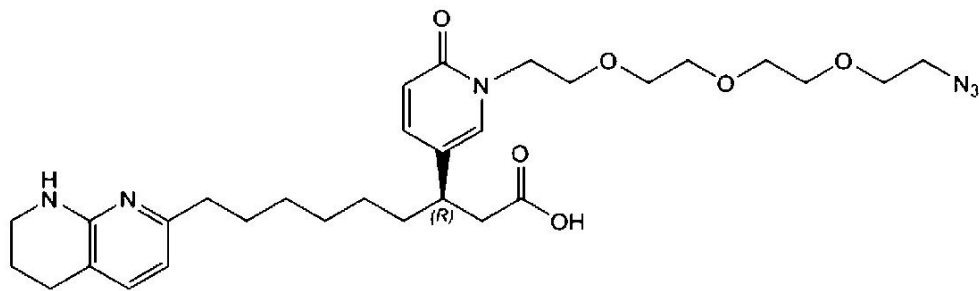
{ 式中、Xは、反応性基、保護された反応性基、またはカーゴ分子（例えば、RNAi剤）を含む } を含む。

50

【 0 1 1 0 】

いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、アジド反応性基を含むように合成され得、かつ、以下の構造：

【化 6 5】



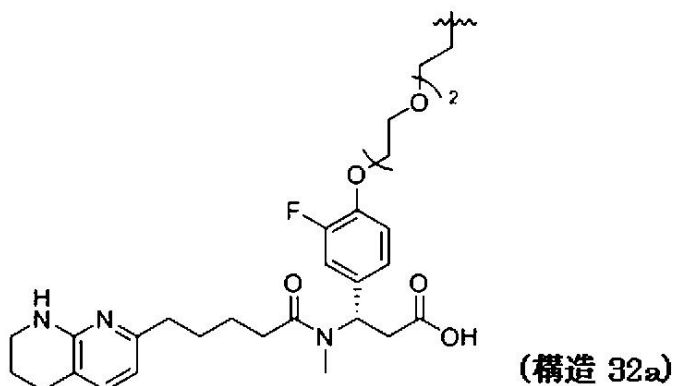
10

を含む。

【 0 1 1 1 】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドは、以下の構造：

【化 6 6】



20

を含む。

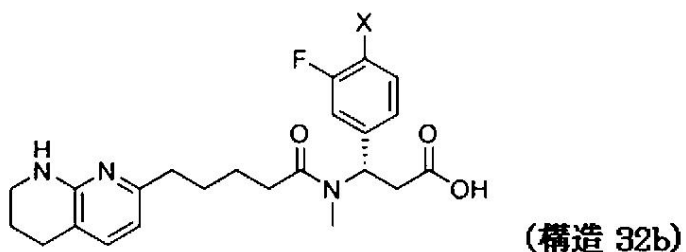
【 0 1 1 2 】

いくつかの実施形態において、構造 32a のインテグリン標的化リガンドは、1 もしくは複数のカーゴ分子（例えば（単数もしくは複数の）RNAi 剤）に連結される。

【 0 1 1 3 】

いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、反応性基、保護された反応性基、またはカーゴ分子を含むように合成され得、かつ、以下の構造：

【化 6 7】



40

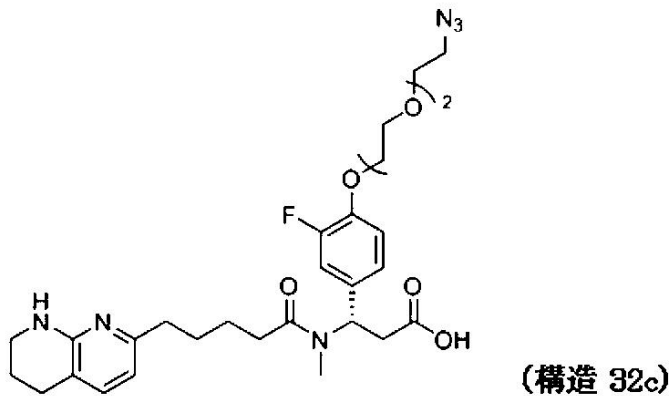
{ 式中、X は、反応性基、保護された反応性基、またはカーゴ分子（例えば、RNAi 剤）を含む } を含む。

50

【 0 1 1 4 】

いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、アジド反応性基を含むように合成され得、かつ、以下の構造：

【化 6 8 】



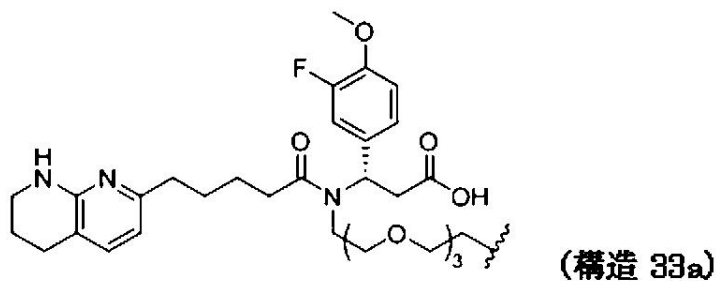
10

を含む。

【 0 1 1 5 】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドは、以下の構造：

【化 6 9 】



20

を含む。

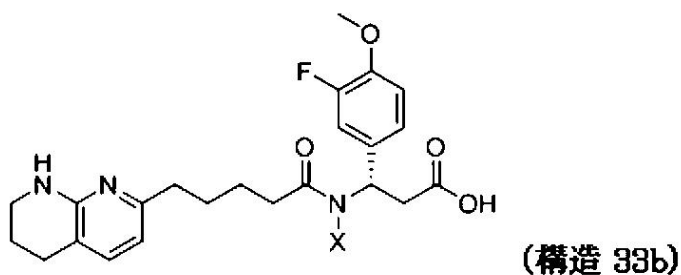
【 0 1 1 6 】

いくつかの実施形態において、構造33aのインテグリン標的化リガンドは、1もしくは複数のカーゴ分子（例えば（単数もしくは複数の）RNAi剤）に連結される。

【 0 1 1 7 】

いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、反応性基、保護された反応性基、またはカーゴ分子を含むように合成され得、かつ、以下の構造：

【化 7 0 】



40

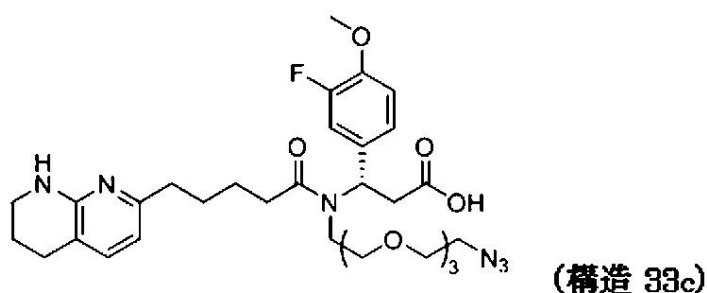
{ 式中、Xは、反応性基、保護された反応性基、またはカーゴ分子（例えば、RNAi剤）を含む } を含む。

【 0 1 1 8 】

50

いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、アジド反応性基を含むように合成され得、かつ、以下の構造：

【化 7 1】



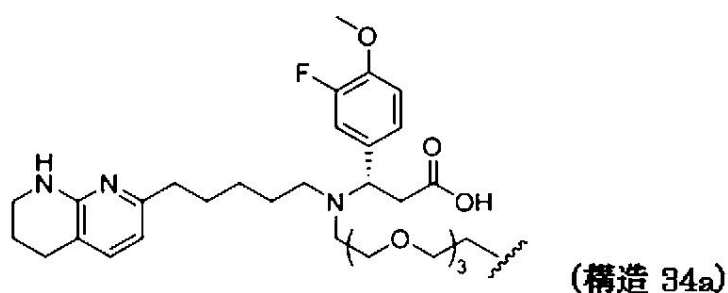
10

を含む。

【 0 1 1 9 】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドは、以下の構造：

【化 7 2】



20

を含む。

【 0 1 2 0 】

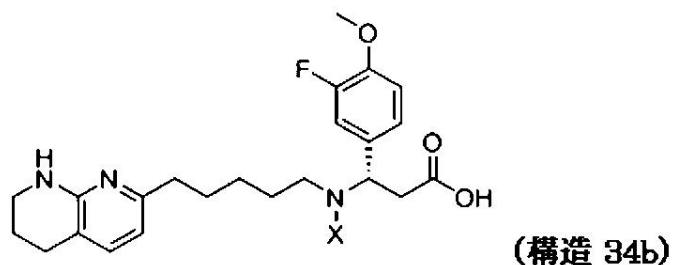
いくつかの実施形態において、構造 34a のインテグリン標的化リガンドは、1 もしくは複数のカーゴ分子（例えば（単数もしくは複数の）RNAi 剤）に連結される。

30

【 0 1 2 1 】

いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、反応性基、保護された反応性基、またはカーゴ分子を含むように合成され得、かつ、以下の構造：

【化 7 3】



40

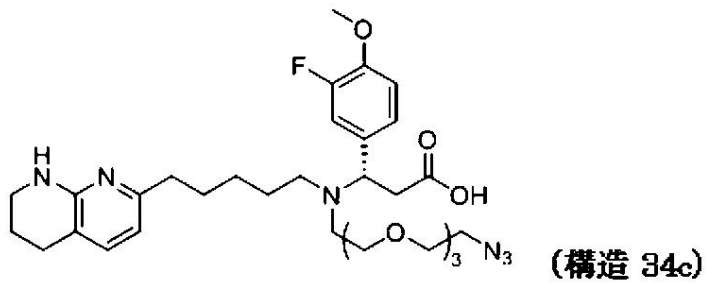
{ 式中、X は、反応性基、保護された反応性基、またはカーゴ分子（例えば、RNAi 剤）を含む } を含む。

【 0 1 2 2 】

いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、アジド反応性基を含むように合成され得、かつ、以下の構造：

50

【化 7 4】



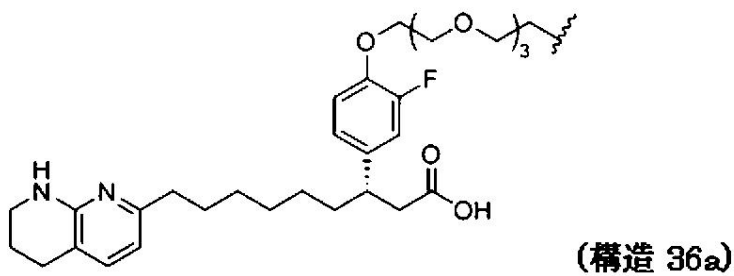
10

を含む。

【 0 1 2 3】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドは、以下の構造：

【化 7 5】



20

を含む。

【 0 1 2 4】

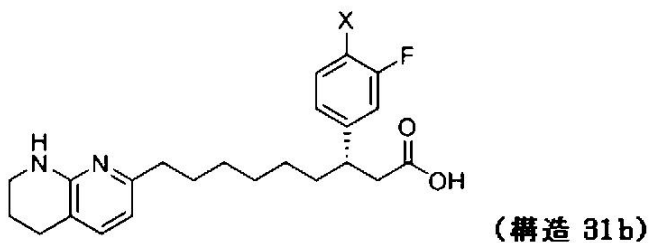
いくつかの実施形態において、構造 36a のインテグリン標的化リガンドは、1 もしくは複数のカーゴ分子（例えば（単数もしくは複数の）RNAi 剤）に連結される。

【 0 1 2 5】

いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、反応性基、保護された反応性基、またはカーゴ分子を含むように合成され得、かつ、以下の構造：

30

【化 7 6】



40

{ 式中、X は、反応性基、保護された反応性基、またはカーゴ分子（例えば、RNAi 剤）を含む } を含む。

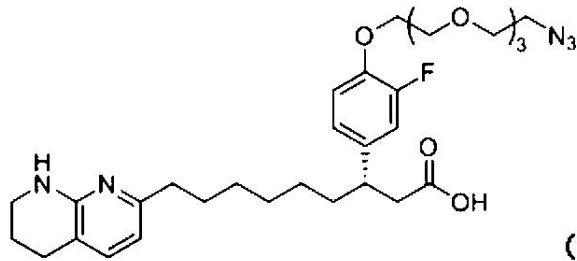
【 0 1 2 6】

いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、アジド反応性基を含むように合成され得、かつ、以下の構造：

50



【化 7 7】



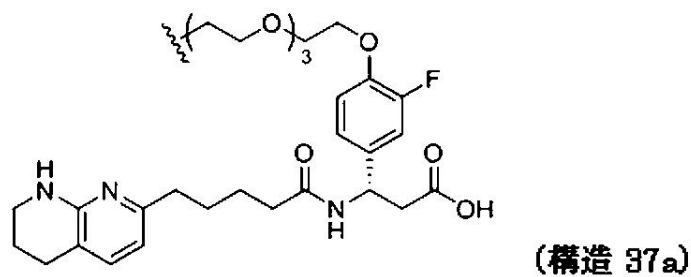
10

を含む。

【0 1 2 7】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドは、以下の構造：

【化 7 8】



20

を含む。

【0 1 2 8】

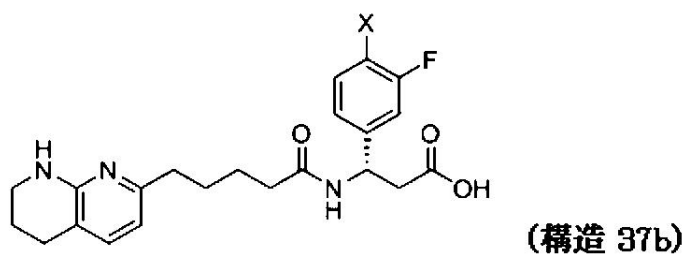
いくつかの実施形態において、構造37aのインテグリン標的化リガンドは、1もしくは複数のカーゴ分子（例えば（単数もしくは複数の）RNAi剤）に連結される。

【0 1 2 9】

いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、反応性基、保護された反応性基、またはカーゴ分子を含むように合成され得、かつ、以下の構造：

30

【化 7 9】



40

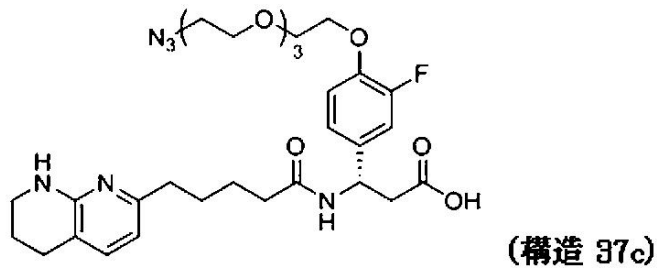
{ 式中、Xは、反応性基、保護された反応性基、またはカーゴ分子（例えば、RNAi剤）を含む } を含む。

【0 1 3 0】

いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、アジド反応性基を含むように合成され得、かつ、以下の構造：

50

【化 8 0】



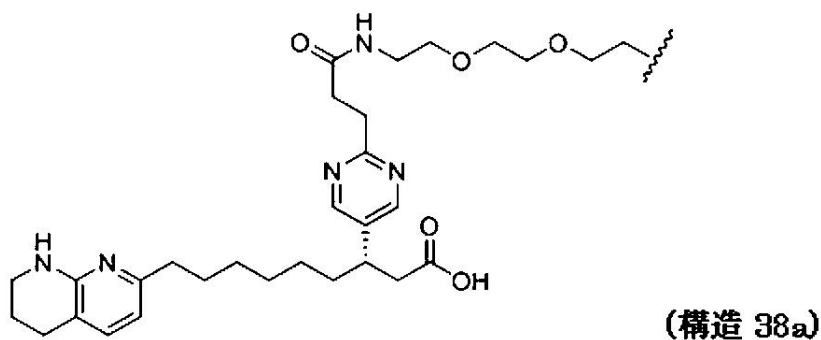
10

を含む。

【 0 1 3 1】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドは、以下の構造：

【化 8 1】



20

を含む。

【 0 1 3 2】

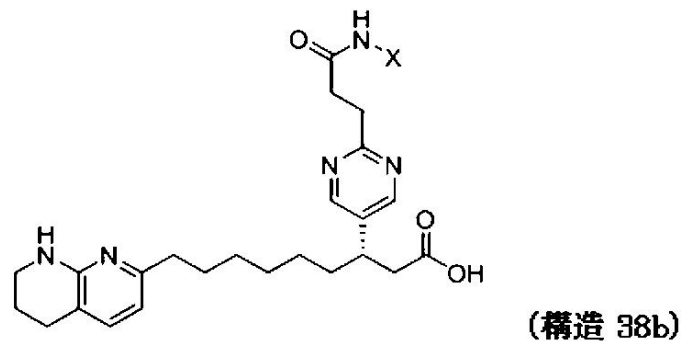
いくつかの実施形態において、構造38aのインテグリン標的化リガンドは、1もしくは複数のカーゴ分子（例えば（単数もしくは複数の）RNAi剤）に連結される。

30

【 0 1 3 3】

いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、反応性基、保護された反応性基、またはカーゴ分子を含むように合成され得、かつ、以下の構造：

【化 8 2】



40

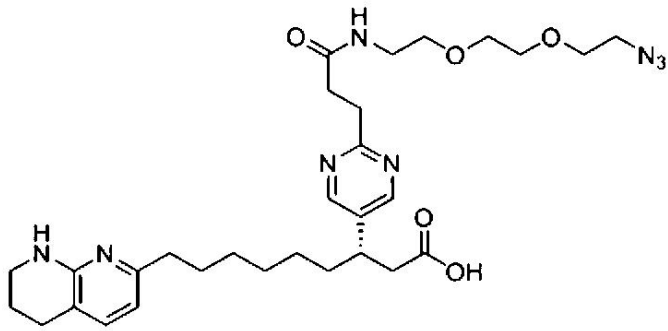
{ 式中、Xは、反応性基、保護された反応性基、またはカーゴ分子（例えば、RNAi剤）を含む } を含む。

【 0 1 3 4】

いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、アジド反応性基を含むように合成され得、かつ、以下の構造：

50

【化 8 3】



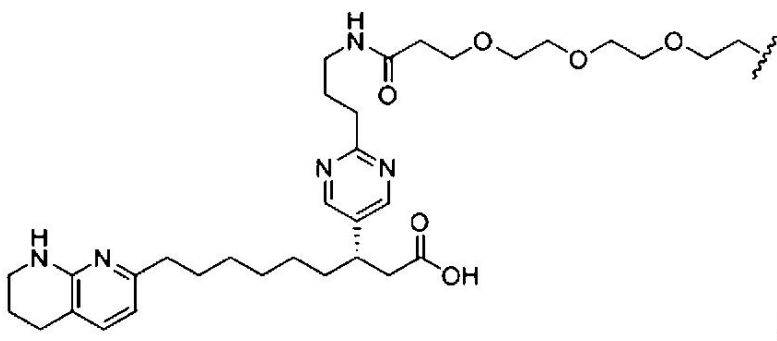
10

を含む。

【0135】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドは、以下の構造：

【化 8 4】



20

を含む。

【0136】

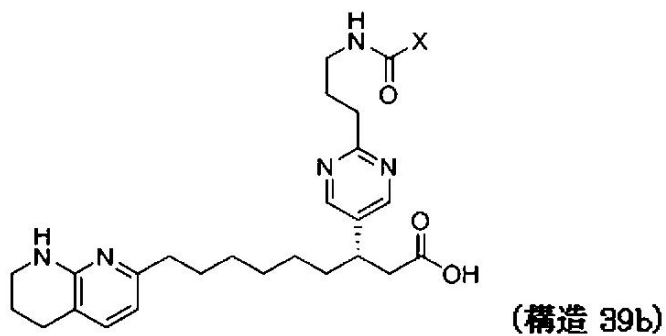
いくつかの実施形態において、構造39aのインテグリン標的化リガンドは、1もしくは複数のカーゴ分子（例えば（単数もしくは複数の）RNAi剤）に連結される。

30

【0137】

いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、反応性基、保護された反応性基、またはカーゴ分子を含むように合成され得、かつ、以下の構造：

【化 8 5】



40

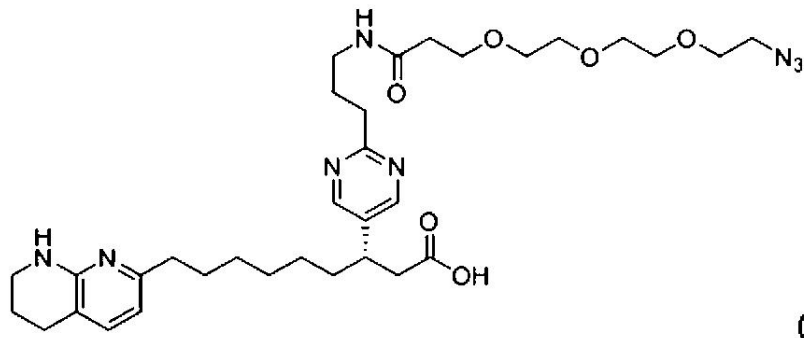
{ 式中、Xは、反応性基、保護された反応性基、またはカーゴ分子（例えば、RNAi剤）を含む } を含む。

【0138】

いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、アジド反応性基を含むように合成され得、かつ、以下の構造：

50

【化 8 6】



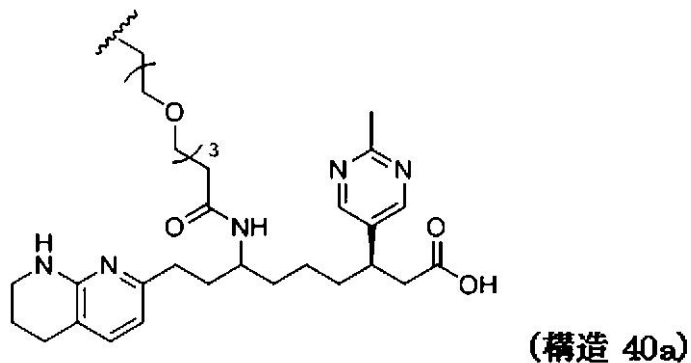
10

を含む。

【0139】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドは、以下の構造：

【化 8 7】



20

を含む。

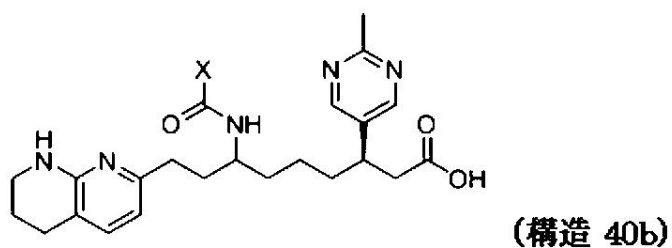
【0140】

いくつかの実施形態において、構造40aのインテグリン標的化リガンドは、1もしくは複数のカーゴ分子（例えば（単数もしくは複数の）RNAi剤）に連結される。

【0141】

いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、反応性基、保護された反応性基、またはカーゴ分子を含むように合成され得、かつ、以下の構造：

【化 8 8】



40

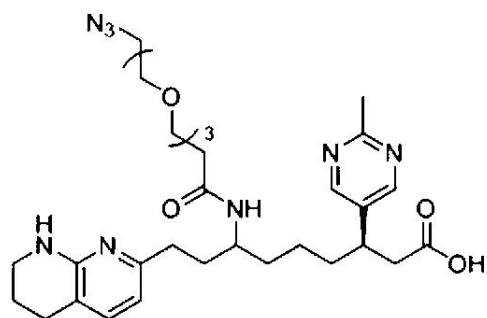
{ 式中、Xは、反応性基、保護された反応性基、またはカーゴ分子（例えば、RNAi剤）を含む } を含む。

【0142】

いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、アジド反応性基を含むように合成され得、かつ、以下の構造：

50

【化 8 9】



(構造 40c)

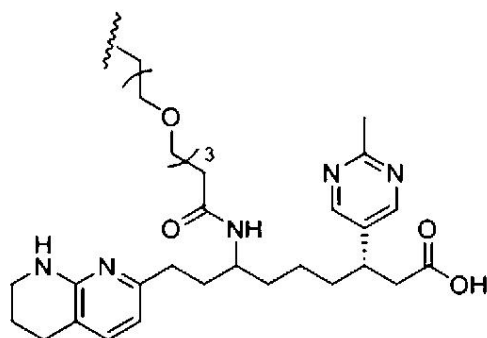
10

を含む。

【 0 1 4 3】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドは、以下の構造：

【化 9 0】



(構造 41a)

20

を含む。

【 0 1 4 4】

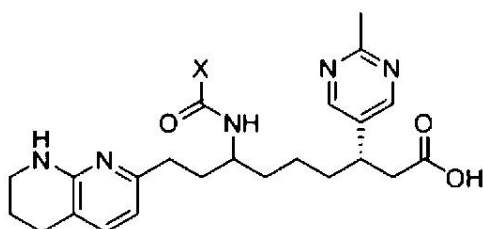
いくつかの実施形態において、構造41aのインテグリン標的化リガンドは、1もしくは複数のカーゴ分子（例えば（単数もしくは複数の）RNAi剤）に連結される。

30

【 0 1 4 5】

いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、反応性基、保護された反応性基、またはカーゴ分子を含むように合成され得、かつ、以下の構造：

【化 9 1】



(構造 41b)

40

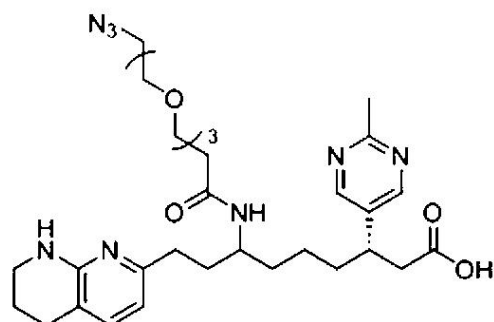
{ 式中、Xは、反応性基、保護された反応性基、またはカーゴ分子（例えば、RNAi剤）を含む } を含む。

【 0 1 4 6】

いくつかの実施形態において、インテグリン標的化リガンドは、アジド反応性基を含むように合成され得、かつ、以下の構造：

50

## 【化 9 2】



(構造 41c)

10

を含む。

## 【 0 1 4 7】

構造 1c、構造 2c、構造 2.1c、構造 2.2c、構造 2.3c、構造 2.4c、構造 2.5c、構造 2.6c、構造 2.7c、構造 2.8c、構造 2.9c、構造 2.10c、構造 2.11c、構造 28c、構造 29c、構造 30c、構造 31c、構造 32c、構造 33c、構造 34c、構造 36c、構造 37c、構造 38c、構造 39c、構造 40c、および構造 41cのいずれかに開示されるアジド反応性基は、着目の分子に、すなわち、RNAi剤などのカーゴ分子にインテグリン標的化リガンドを取り付けるのに使用できる。カーゴ分子は、インテグリンを発現している細胞に対して標的化されることが所望される任意の分子であり得る。

20

## 【 0 1 4 8】

本明細書で使用される場合、用語「アルキル」は、特に指定されない限り、1～10個の炭素原子を有する直鎖または分岐鎖の飽和脂肪族炭化水素基を指す。例えば、「C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルキル」は、直鎖または分岐鎖配置で1、2、3、4、5、または6個の炭素を有するアルキル基を含む。アルキル基の非限定的な例としては、メチル、エチル、イソプロピル、tert - ブチル、n - ヘキシルが挙げられる。本明細書で使用される場合、用語「アミノアルキル」は、通常のアミノ基によって許容されるように1つまたは複数のアミノ基で任意の位置で置換された、上記で定義したアルキル基を指す。アミノ基は非置換、一置換、または二置換であってもよい。アミノアルキル基の非限定的な例としては、アミノメチル、ジメチルアミノメチル、および2 - アミノプロピル - 1 - イルが挙げられる。

30

## 【 0 1 4 9】

本明細書で使用される場合、用語「シクロアルキル」は、特に指定されない限り、3～14個の炭素原子を有する飽和または不飽和な非芳香族炭化水素環基を意味する。シクロアルキル基の非限定的な例としては、これらに限定されるものではないが、シクロプロピル、メチル - シクロプロピル、2,2 - ジメチル - シクロブチル、2 - エチル - シクロペンチル、およびシクロヘキシルが挙げられる。シクロアルキルは、複数のスピロ - または縮合環を含んでもよい。シクロアルキル基は任意により、通常のアミノ基によって許容されるように任意の位置で、一置換、二置換、三置換、四置換、または五置換されている。

## 【 0 1 5 0】

本明細書で使用される場合、用語「アルケニル」は、特に指定されない限り、少なくとも1つの炭素 - 炭素二重結合を含み、かつ2～10個の炭素原子を有する、直鎖または分岐鎖の非芳香族炭化水素基を指す。最大で5個の炭素 - 炭素二重結合がそのような基に存在し得る。例えば、「C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub>」アルケニルは、2～6個の炭素原子を有するアルケニル基として定義される。アルケニル基の例としては、これらに限定されるものではないが、エテニル、プロペニル、ブテニル、およびシクロヘキセニルが挙げられる。アルケニル基の直鎖、分岐鎖、または環状部分は、二重結合を含んでもよく、かつ任意により、通常のアミノ基によって許容されるように任意の位置で、一置換、二置換、三置換、四置換、または五置換されている。用語「シクロアルケニル」は、炭素原子の特定数および少なくとも1つの炭素 - 炭素二重結合を有する単環式炭化水素基を意味する。

40

## 【 0 1 5 1】

50

本明細書で使用される場合、用語「アルキニル」は、特に指定されない限り、2～10個の炭素原子を含み、かつ少なくとも1つの炭素 - 炭素三重結合を含む、直鎖または分岐鎖の炭化水素基を指す。最大で5個の炭素 - 炭素三重結合が含まれ得る。したがって、「C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub>アルキニル」は、2～6個の炭素原子を有するアルキニル基を意味する。アルキニル基の例としては、これらに限定されるものではないが、エチニル、2 - プロピニル、および2 - ブチニルが挙げられる。アルキニル基の直鎖または分岐鎖部分は、任意により、通常の原子価によって許容されるように任意の位置で、一置換、二置換、三置換、四置換、または五置換されていてもよい。

#### 【0152】

本明細書で使用される場合、「アルコキシル」または「アルコキシ」は、炭素原子の示された数を有する - O - アルキル基を指す。例えば、C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルコキシは、C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub>、C<sub>5</sub>、およびC<sub>6</sub>アルコキシ基を含むことを意図している。例えば、C<sub>1</sub> - C<sub>8</sub>アルコキシは、C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub>、C<sub>5</sub>、C<sub>6</sub>、C<sub>7</sub>、およびC<sub>8</sub>アルコキシ基を含むことを意図している。アルコキシの例としては、これらに限定されるものではないが、メトキシ、エトキシ、n - プロポキシ、i - プロポキシ、n - ブトキシ、s - ブトキシ、t - ブトキシ、n - ペントキシ、s - ペントキシ、n - ヘプトキシ、およびn - オクトキシが挙げられる。

10

#### 【0153】

本明細書で使用される場合、「ケト」は、カルボニル架橋を介して結合した本明細書に定義の、任意のアルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロアリール、またはアリール基を指す。ケト基の例としては、これらに限定されるものではないが、アルカノイル（例えばアセチル、プロピオニル、ブタノイル、ペンタノイル、またはヘキサノイル）、アルケノイル（例えば、アクリロイル）、アルキノイル（例えばエチノイル、プロピノイル、ブチノイル、ペンチノイル、またはヘキシノイル）、アリーロイル（例えばベンゾイル）、ヘテロアリーロイル（例えば、ピローロリル、イミダゾロイル、キノリノイル、またはピリジノイル）が挙げられる。

20

#### 【0154】

本明細書で使用される場合、「アルコキシカルボニル」は、カルボニル架橋を介して結合した上記で定義の任意のアルコキシ基を指す（すなわち - C(O)O - アルキル）。アルコキシカルボニル基の例としては、これらに限定されるものではないが、メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、イソプロポキシカルボニル、n - プロポキシカルボニル、t - ブトキシカルボニル、ベンジルオキシカルボニル、またはn - ペントキシカルボニルが挙げられる。

30

#### 【0155】

本明細書で使用される場合、「アリーロキシカルボニル」は、オキシカルボニル架橋を介して結合した本明細書に定義のアリール基を指す（すなわち、- C(O)O - アリール）。アリーロキシカルボニル基の例としては、これらに限定されるものではないが、フェノキシカルボニルおよびナフチロキシカルボニルが挙げられる。

#### 【0156】

本明細書で使用される場合、「ヘテロアリーロキシカルボニル」は、オキシカルボニル架橋を介して結合した本明細書に定義の任意のヘテロアリール基を指す（すなわち、- C(O)O - ヘテロアリール）。ヘテロアリーロキシカルボニル基の例としては、これらに限定されるものではないが、2 - ピリジロキシカルボニル、2 - オキサゾリルオキシカルボニル、4 - チアゾリルオキシカルボニル、またはピリミジニルオキシカルボニルが挙げられる。

40

#### 【0157】

本明細書で使用される場合、「アリール」または「芳香族」は、各環中に最大6個の原子の任意の安定な単環式または多環式炭素環であって、少なくとも1つの環が芳香族である、炭素環を意味する。アリール基の例としては、これらに限定されるものではないが、フェニル、ナフチル、アントラセニル、テトラヒドロナフチル、インダニル、およびビフェニルが挙げられる。アリール置換が二環式であり、かつ1つの環が非芳香族である場合

50

、結合は芳香環を介すると理解される。アリール基は任意により、通常の原子価によって許容されるように任意の位置で、一置換、二置換、三置換、四置換、または五置換されている。

【0158】

本明細書で使用される場合、用語「ヘテロアリール」は、各環中に最大7個の原子の安定な単環式または多環式環を表し、ここで、少なくとも1つの環は芳香族であり、かつO、N、およびSから成る群から選択される1～4個のヘテロ原子を含む。ヘテロアリール基の例としては、これらに限定されるものではないが、アクリジニル、カルバゾリル、シンノリニル、キノキサリニル、ピラゾリル、インドリル、ベンゾトリアゾリル、フラニル、チエニル、ベンゾチエニル、ベンゾフラニル、ベンズイミダゾロニル、ベンゾオキサゾロニル、キノリニル、イソキノリニル、ジヒドロイソインドロニル、イミダゾピリジニル、イソインドロニル、インダゾリル、オキサゾリル、オキサジアゾリル、イソオキサゾリル、インドリル、ピラジニル、ピリダジニル、ピリジニル、ピリミジニル、ピロリル、およびテトラヒドロキノリンが挙げられる。「ヘテロアリール」はまた、任意の窒素含有ヘテロアリールのN - オキシド誘導体を含むと理解される。ヘテロアリール置換が二環式であり、かつ1つの環が非芳香族であるかまたはヘテロ原子を含まない場合、結合は、芳香環を介するかまたはヘテロ原子含有環を介すると理解される。ヘテロアリール基は任意により、通常の原子価によって許容されるように任意の位置で、一置換、二置換、三置換、四置換、または五置換されている。

【0159】

本明細書で使用される場合、用語「複素環」「複素環式」または「ヘテロシクリル」は、多環式基を含む、O、N、およびSから成る群から選択される1～4個のヘテロ原子を含む3 - ~14 - 員の芳香族または非芳香族複素環を意味する。本明細書で使用される場合、用語「複素環式」はまた、用語「複素環」および「ヘテロシクリル」と同義であると考えられ、本明細書に記載された同じ定義を有するとも理解される。「ヘテロシクリル」は、上述のヘテロアリール、ならびにそのジヒドロおよびテトラヒドロアナログを含む。ヘテロシクリル基の例としては、これらに限定されるものではないが、アゼチジニル、ベンズイミダゾリル、ベンゾフラニル、ベンゾフラザニル、ベンゾピラゾリル、ベンゾトリアゾリル、ベンゾチオフェニル、ベンゾオキサゾリル、カルバゾリル、カルボリニル、シンノリニル、フラニル、イミダゾリル、インドリニル、インドリル、インドラジニル、インダゾリル、イソベンゾフラニル、イソインドリル、イソキノリル、イソチアゾリル、イソオキサゾリル、ナフトピリジニル、オキサジアゾリル、オキソオキサゾリジニル、オキサゾリル、オキサゾリン、オキソピペラジニル、オキソピロリジニル、オキソモルホリニル、イソキサゾリン、オキセタニル、ピラニル、ピラジニル、ピラゾリル、ピリダジニル、ピリドピリジニル、ピリダジニル、ピリジル、ピリジノニル、ピリミジル、ピリミジノニル、ピロリル、キナゾリニル、キノリル、キノキサリニル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロチオピラニル、テトラヒドロイソキノリニル、テトラゾリル、テトラゾロピリジル、チアジアゾリル、チアゾリル、チエニル、トリアゾリル、1,4 - ジオキサニル、ヘキサヒドロアゼピニル、ピペラジニル、ピペリジニル、ピリジン - 2 - オニル、ピロリジニル、モルホリニル、チオモルホリニル、ジヒドロベンズイミダゾリル、ジヒドロベンゾフラニル、ジヒドロベンゾチオフェニル、ジヒドロベンゾオキサゾリル、ジヒドロフラニル、ジヒドロイミダゾリル、ジヒドロインドリル、ジヒドロイソオキサゾリル、ジヒドロイソチアゾリル、ジヒドロオキサジアゾリル、ジヒドロオキサゾリル、ジヒドロピラジニル、ジヒドロピラゾリル、ジヒドロピリジニル、ジヒドロピリミジニル、ジヒドロピロリル、ジヒドロキノリニル、ジヒドロテトラゾリル、ジヒドロチアジアゾリル、ジヒドロチアゾリル、ジヒドロチエニル、ジヒドロトリアゾリル、ジヒドロアゼチジニル、ジオキシドチオモルホリニル、メチレンジオキシベンゾイル、テトラヒドロフラニル、およびテトラヒドロチエニル、ならびにそれらのN - オキシドが挙げられる。ヘテロシクリル置換の結合は、炭素原子を介してまたはヘテロ原子を介して起こり得る。ヘテロシクリル基は任意により、通常の原子価によって許容されるように任意の位置で、一置

10

20

30

40

50



換、二置換、三置換、四置換、または五置換されている。

【0160】

本明細書で使用される場合、「治療する」「治療」などの用語は、対象の疾患の1つまたは複数の症状の数、重症度、および/または頻度の軽減または緩和を提供するためにとられる方法またはステップを意味する。本明細書で使用される場合、「治療する」および「治療」は、対象の疾患の1もしくは複数の症状の数、重症度、および/または頻度の予防、管理、予防的治療、および/または阻害を含んでもよい。

【0161】

本明細書で使用される場合、「細胞への送達」などの語句は、カーゴ分子を指すとき、細胞にカーゴ分子を機能的に送達することを意味する。「機能的に送達すること」という語句は、カーゴ分子が予想される生物学的活性を有することを可能にする様式で細胞にカーゴ分子を送達することを意味する。RNAi剤であるカーゴ分子を具体的に言及するとき、例えば、予想される生物学的活性とは、遺伝子発現の配列特異的な阻害である。

10

【0162】

別段に明記しない限り、本明細書で使用される場合、以下の記号

【化93】



の使用は、任意の単数または複数の基が本明細書に記載の発明の範囲によるものに連結され得ることを意味する。

20

【0163】

本明細書で使用される場合、用語「異性体」は、同一の分子式を有するが、それらの原子の結合の性質または順序が異なるか、あるいはそれらの原子の空間配置が異なる化合物を指す。それらの原子の空間配置が異なる異性体は、「立体異性体」と呼ばれる。互いに鏡像ではない立体異性体は、「ジアステレオ異性体」と呼ばれ、重ね合わせることができない鏡像である立体異性体は、「エナンチオマー」または時には光学異性体とも呼ばれる。4つの非同一置換基に結合した炭素原子は、「キラル中心」と呼ばれる。

【0164】

本明細書で使用される場合、連結基は1つまたは複数の原子であり、斯かる1つまたは複数の原子は、1つの分子または分子の一部を、別の第2の分子または分子の第2の一部に接続する。当該技術分野において、連結基およびスペーサーという用語は、時には互換的に使用される。同様に、当該技術分野において使用される場合、足場という用語は、時には、連結基と互換的に使用される。いくつかの実施形態において、いくつかの実施形態において、連結基は、PEG基またはPEG部分を含むかまたはそれから成り得る。

30

【0165】

本明細書で使用される場合、2つの分子間の接続に関して言及する際の実用語「連結される」または「コンジュゲートされる」とは、2つの分子が共有結合によって結合されることが、または2つの分子が非共有結合（例えば、水素結合またはイオン結合）を介して会合されることを意味する。用語「連結された」が、非共有結合を介した2つの分子間の会合を指すいくつかの例では、2つの異なる分子間の会合が、生理学的に許容されるバッファ（例えば、リン酸緩衝生理食塩水）中で $1 \times 10^{-4}$  M未満（例えば、 $1 \times 10^{-5}$  M未満、 $1 \times 10^{-6}$  M未満、または $1 \times 10^{-7}$  M未満）のKDを有する。記述されない限り、本明細書で使用される場合、連結されたという用語は、任意の介在原子または原子団の有無に関わらず、第1の化合物と第2の化合物との間の接続を指し得る。

40

【0166】

本明細書に開示される化合物および組成物は、化合物または組成物が置かれる環境に応じて、プロトン化または脱プロトン化状態で特定の原子（例えばN、OまたはS原子）を含み得ることを当業者は容易に理解および認識するであろう。したがって、本明細書で使用される場合、本明細書に開示される構造は、例えばOH、SH、またはNHのような、特定の

50

官能基が、プロトン化または脱プロトン化され得ることを想定する。本明細書の開示は、当業者によって容易に理解されるように、環境のpHに基づくプロトン化のそれらの状態に関わらず、開示された化合物および組成物を網羅することを意図する。

【0167】

本願の請求項で使用される場合、「から成る」という語句は、請求項に特定されていない任意の要素、ステップ、または成分を排除する。本願の請求項で使用される場合、「から本質的に成る」という語句は、特定の材料またはステップ、ならびに請求項に記載の発明の基本的かつ新規な（単数もしくは複数の）特徴に物質的に影響を及ぼさないものに、請求項の範囲を限定する。

【0168】

別段定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および化学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと類似または等価な方法および材料を、本発明の実施または試験に使用することができるが、好適な方法および材料を以下に記載する。本明細書に記述したすべての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、その全体が参照により組み込まれる。矛盾がある場合には、定義を含む本明細書が優先することになる。さらに、材料、方法、および例は、単なる例示であり、限定することを意図するものではない。

【0169】

多座 v 3インテグリンリガンドおよび足場

本明細書に開示される場合、いくつかの実施形態において、1もしくは複数の v 3 / 5 インテグリンリガンドが、1もしくは複数のカーゴ分子に連結されてもよい。いくつかの実施形態において、1つだけのインテグリンリガンドが、（本明細書では「単座（monodentate form）」または「一価」のリガンドと呼ばれる）カーゴ分子にコンジュゲートされる。いくつかの実施形態において、2つのインテグリンリガンドが、（本明細書では「二座」または「二価」の標的化基と呼ばれる）カーゴ分子にコンジュゲートされる。いくつかの実施形態において、3つのインテグリンリガンドが、（本明細書では「三座」または「三価」の標的化基と呼ばれる）カーゴ分子にコンジュゲートされる。いくつかの実施形態において、4つのインテグリンリガンドが、（本明細書では「四座」または「四価」の標的化基と呼ばれる）カーゴ分子にコンジュゲートされる。いくつかの実施形態において、5つ以上のインテグリンリガンドが、カーゴ分子にコンジュゲートされる。

【0170】

いくつかの実施形態において、1つだけのインテグリンリガンドが、（本明細書では「単座」のリガンドと呼ばれる）カーゴ分子にコンジュゲートされる場合には、そのインテグリンリガンドは、そのカーゴ分子に直接的にコンジュゲートされてもよい。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリンリガンドは、足場または他のリンカー構造を介してカーゴ分子にコンジュゲートされる。

【0171】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリンリガンドは、1もしくは複数の足場を含む。当該技術分野では、連結基またはリンカーと呼ばれることもある足場は、本明細書に開示される1もしくは複数のインテグリンリガンドへの1もしくは複数のカーゴ分子の連結を容易にするのに使用できる。本明細書に開示されるリガンドに適合する有用な足場が、当該技術分野で広く知られている。本明細書に開示される v 3 インテグリンリガンドと共に使用できる、足場の制限されることのない例としては、これだけに限定されるものではないが、ポリマーやポリアミノ酸（例えば、ビス - グルタミン酸、ポリ - L - リジンなど）が挙げられる。いくつかの実施形態において、足場としては、システインリンカーもしくは基、DBCO - PEG<sub>1-24</sub> - NHS、プロパルギル - PEG<sub>1-24</sub> - NHS、および / または多座DBCOおよび / またはプロパルギル部分を挙げることもできる。

【0172】

いくつかの実施形態において、1もしくは複数のカーゴ分子に本明細書に開示される1もしくは複数のインテグリンリガンドを連結するのに使用される足場は、以下の構造：

10

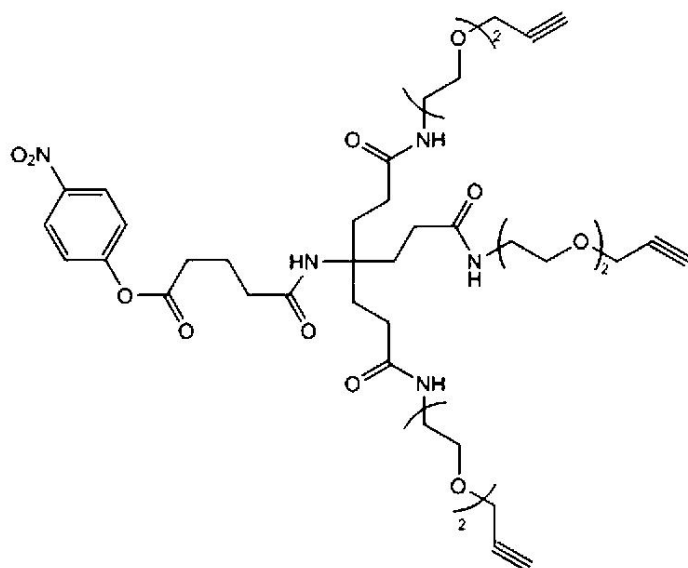
20

30

40

50

【化 9 4】



(足場 1)

を有する。

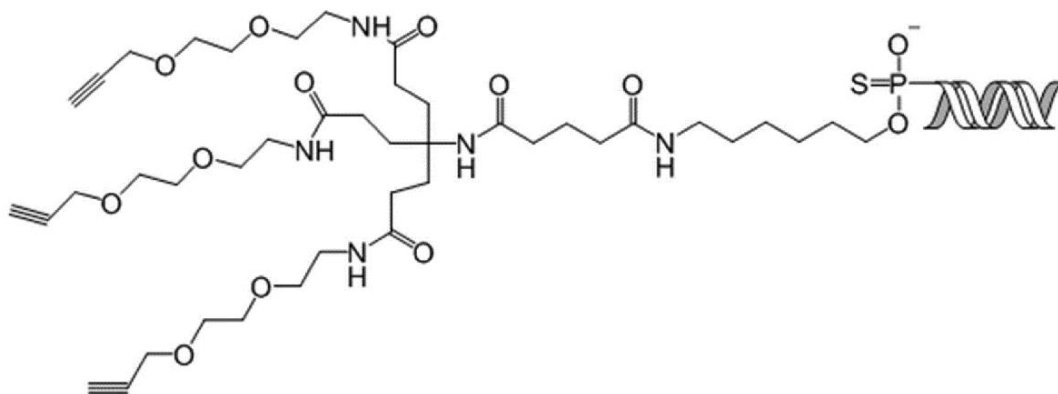
【0173】

例えば、足場1の使用は、インテグリンリガンドモノマーと1もしくは複数のカーゴ分子の両方との効果的なコンジュゲーションを容易にする。足場1は、アミン反応性p-ニトロフェノール(4-ニトロフェノールとも呼ばれる)エステル、アミド連鎖、および3つのPEG<sub>2</sub>ユニットアーム、ならびに末端アルキンを含む。4-ニトロフェノールエステルは、アミド形成によって、末端アミン基(例えば(NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>)を伴って構築されたRNAトリガー上の第一級アミンなどのカーゴ分子上の第一級アミンにコンジュゲートされ得る。末端アルキンは、銅触媒クリック化学反応によって、アジド修飾リガンド(ペプチドと小分子の両方)にコンジュゲートされる。

【0174】

いくつかの実施形態において、カーゴ分子はRNAi剤である。いくつかの実施形態において、足場1は、RNAi剤の末端、例えば、RNAi剤のセンス鎖の5'末端に取り付けられてもよい。例えば、RNAi剤のセンス鎖の5'末端は、RNAi剤の5'末端ヌクレオチドの5'末端に取り付けられたC<sub>6</sub>アミン(-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>)を含むように修飾されてもよい。斯かるC<sub>6</sub>アミン修飾(または、末端アミンをもたらず別の他の修飾)を有するRNAi剤は、以下の構造:

【化 9 5】



(構造 380)

{ 式中、以下の :

10

20

30

40

50

【化 9 6】



は、RNAi剤を示す } における表示によって示されるように、足場1に容易にコンジュゲートされ得る。

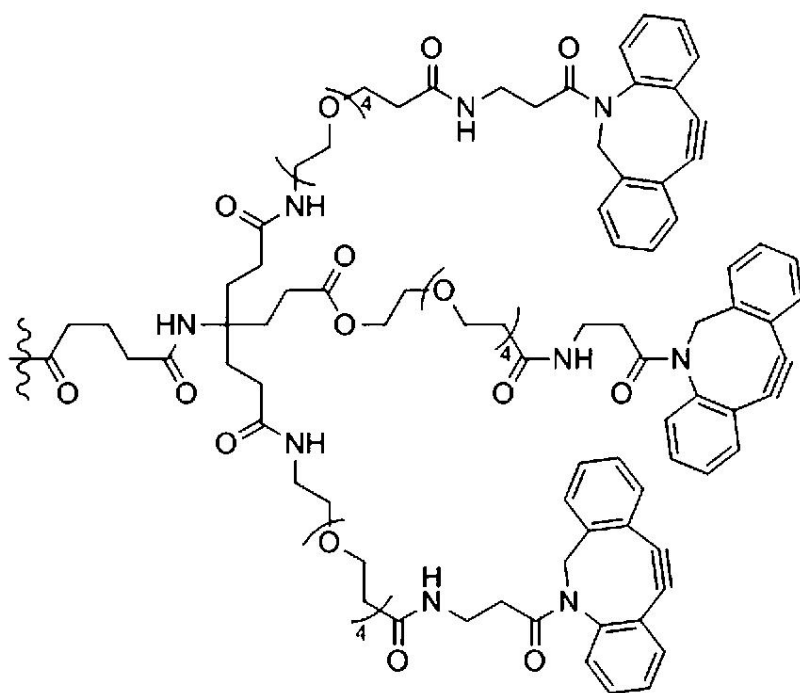
【0175】

そのとき、上記の構造380のアルキン基は、本明細書に開示されるインテグリンリガンドにコンジュゲートされて、三座のインテグリン標的化基を形成し得る。

【0176】

いくつかの実施形態において、足場は、DBCO（ジベンゾシクロオクチン）を使用して合成されてもよく、そしてそれは、以下の構造：

【化 9 7】



(構造 381)

{ 式中、以下の：

【化 9 8】



は、反応性基またはカーゴ分子を含む部分への取り付けを示す } によって表される。

【0177】

いくつかの実施形態において、トリアゾール基は、以下の一般構造：

10

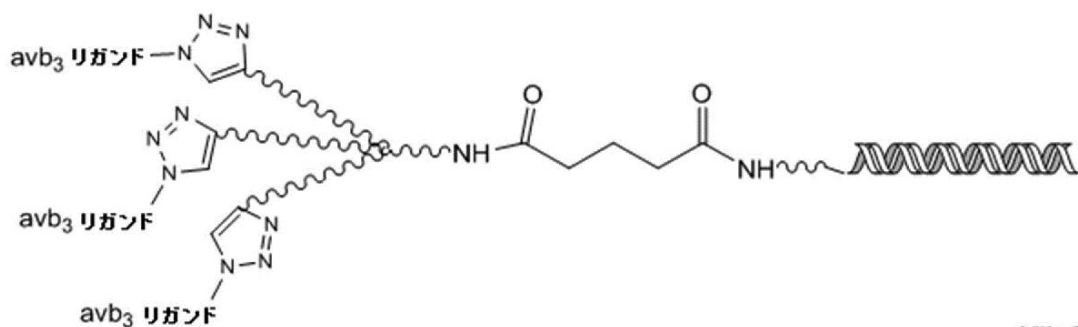
20

30

40

50

【化 9 9】



(構造 390)

10

{ 式中、以下の：

【化 1 0 0】



は、RNAi剤にリガンドを結合するのに使用できる任意の好適な足場またはリンカーを示し、および以下の：

【化 1 0 1】



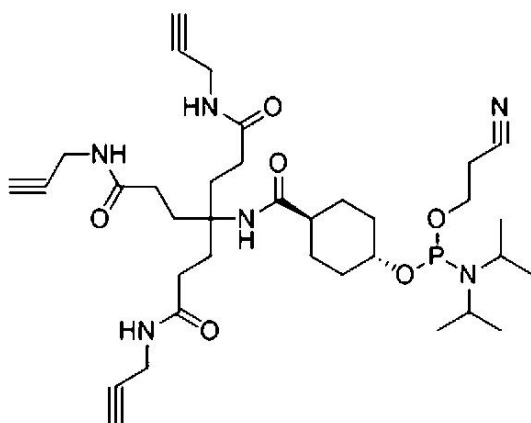
20

は、RNAi剤を示す } に示されるように、RNAi剤と、本明細書に開示されるインテグリンリガンドとの間で形成される。

【 0 1 7 8】

いくつかの実施形態において、足場は、ホスホラミダイト化合物として合成されてもよく、その例は、以下の構造：

【化 1 0 2】



(構造 400)

30

に示される。

【 0 1 7 9】

構造400のトリアルキン化合物は、アジドを含む標的化リガンドとアルキンのクリック反応により、RNAi剤のセンス鎖の5'末端に三座リガンドが容易に連結されることを可能にする。

【 0 1 8 0】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリン標的化基は、構造1a、構造2a、構造2.1a、構造2.2a、構造2.3a、構造2.4a、構造2.5a、構造2.6a、構造2.7

50

【 0 1 8 1 】

【化 1 0 3】



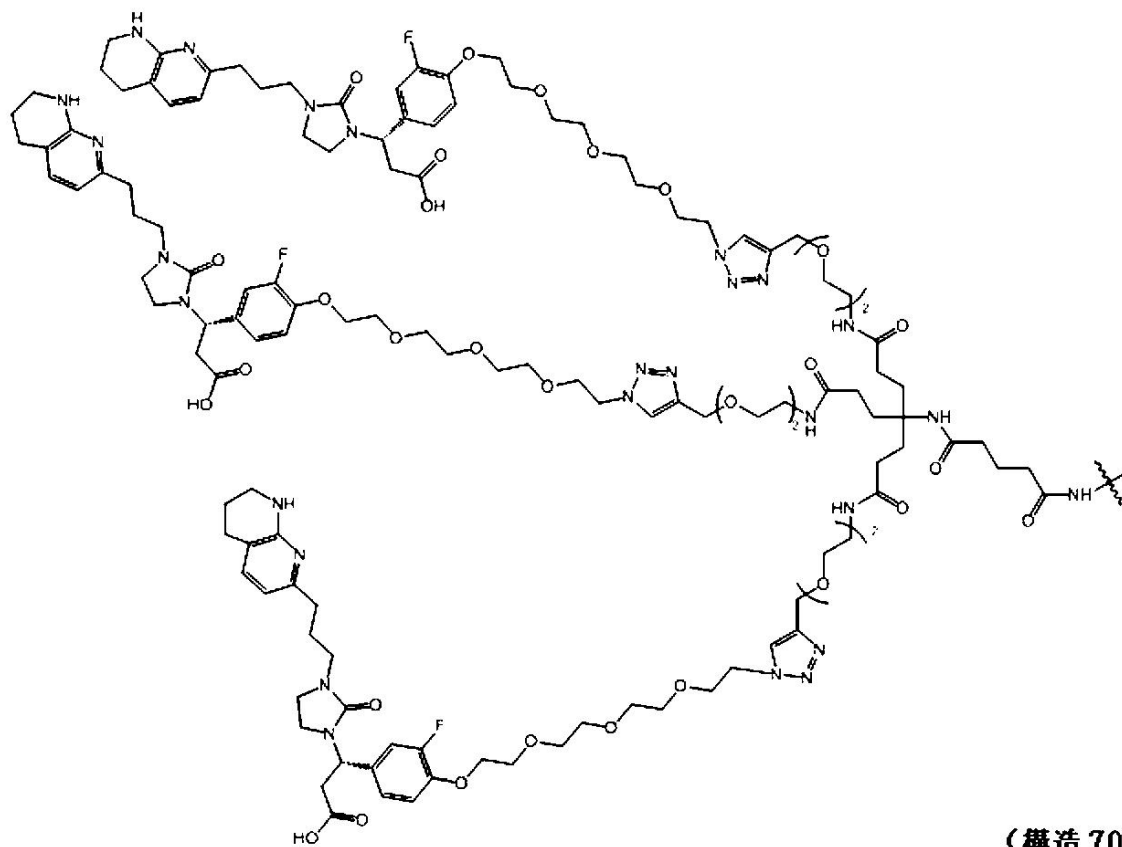
(構造 700)

40

【 0 1 8 2 】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される三座の標的化基は、構造2aの3つのリガンドを含み、かつ、以下の構造：

【化 1 0 4】



(構造 701)

によって表される。

【 0 1 8 3】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される三座の標的化基は、構造2aの3つのリガンドを含み、かつ、以下の構造：

10

20

30

40

50

10



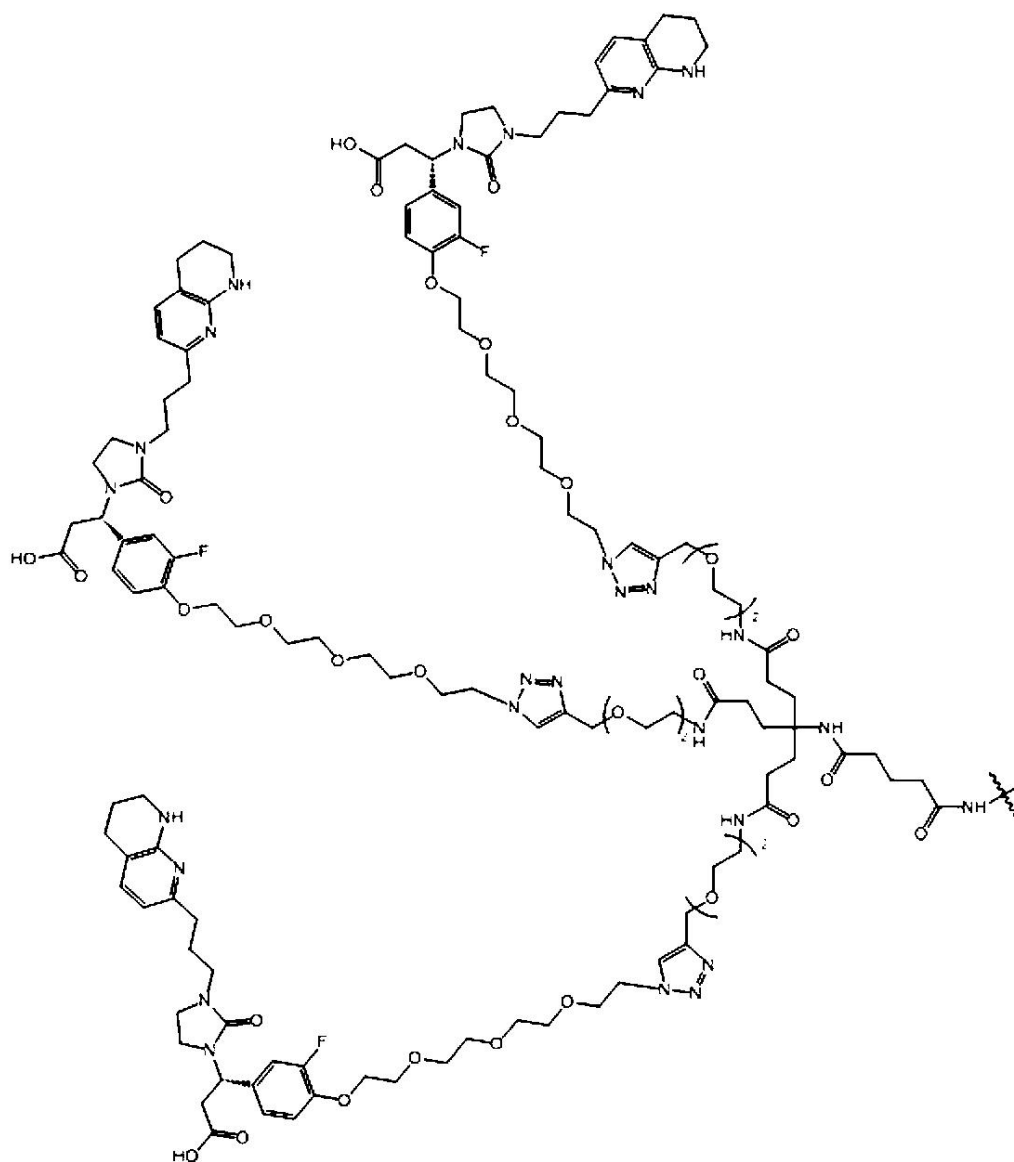
30

40

50



【化 1 0 6】



(構造 701b)

によって表される。

【 0 1 8 5】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される三座の標的化基は、構造2aの3つのリガンドを含み、かつ、以下の構造：

10

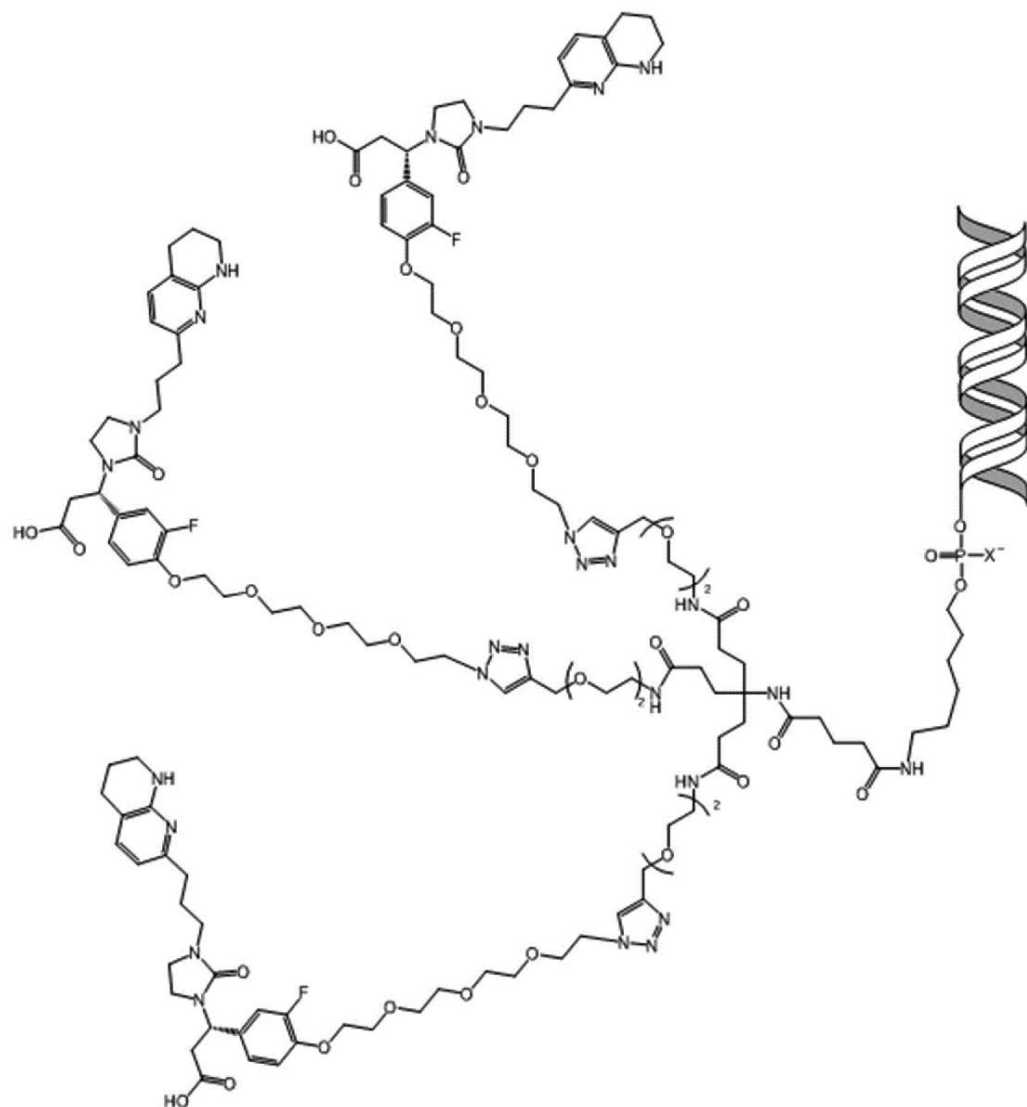
20

30

40

50

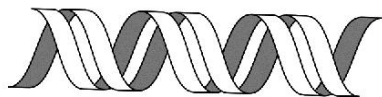
【化 1 0 7】



(構造 701c)

{ 式中、以下の :

【化 1 0 8】



は、RNAi剤を示し、およびX = OまたはSである } によって表される。

【 0 1 8 6】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される三座の標的化基は、構造2aの3つのリガンドを含み、かつ、以下の構造：

10

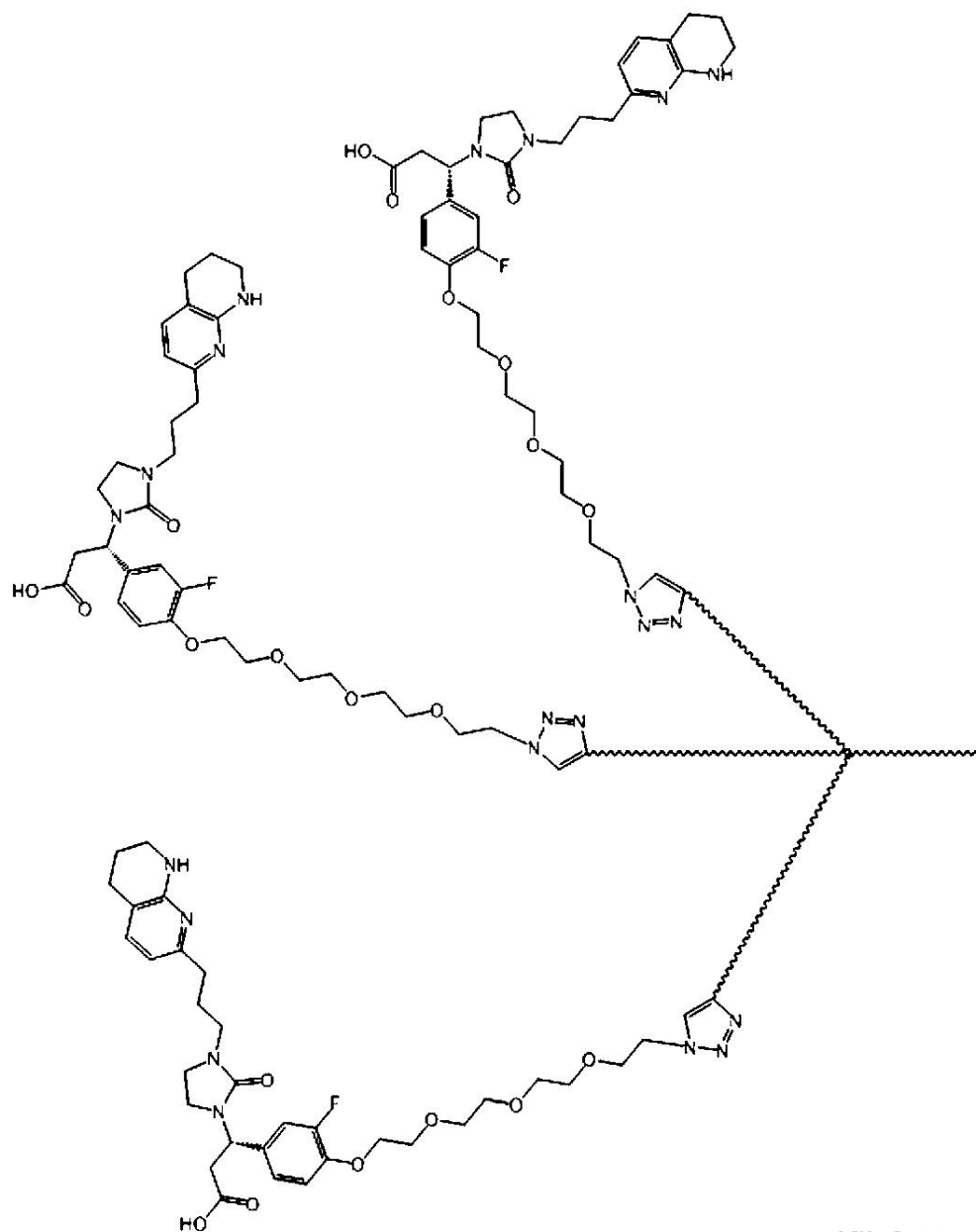
20

30

40

50

【化 1 0 9】



(構造 701d)

{ 式中、以下の :

【化 1 1 0】

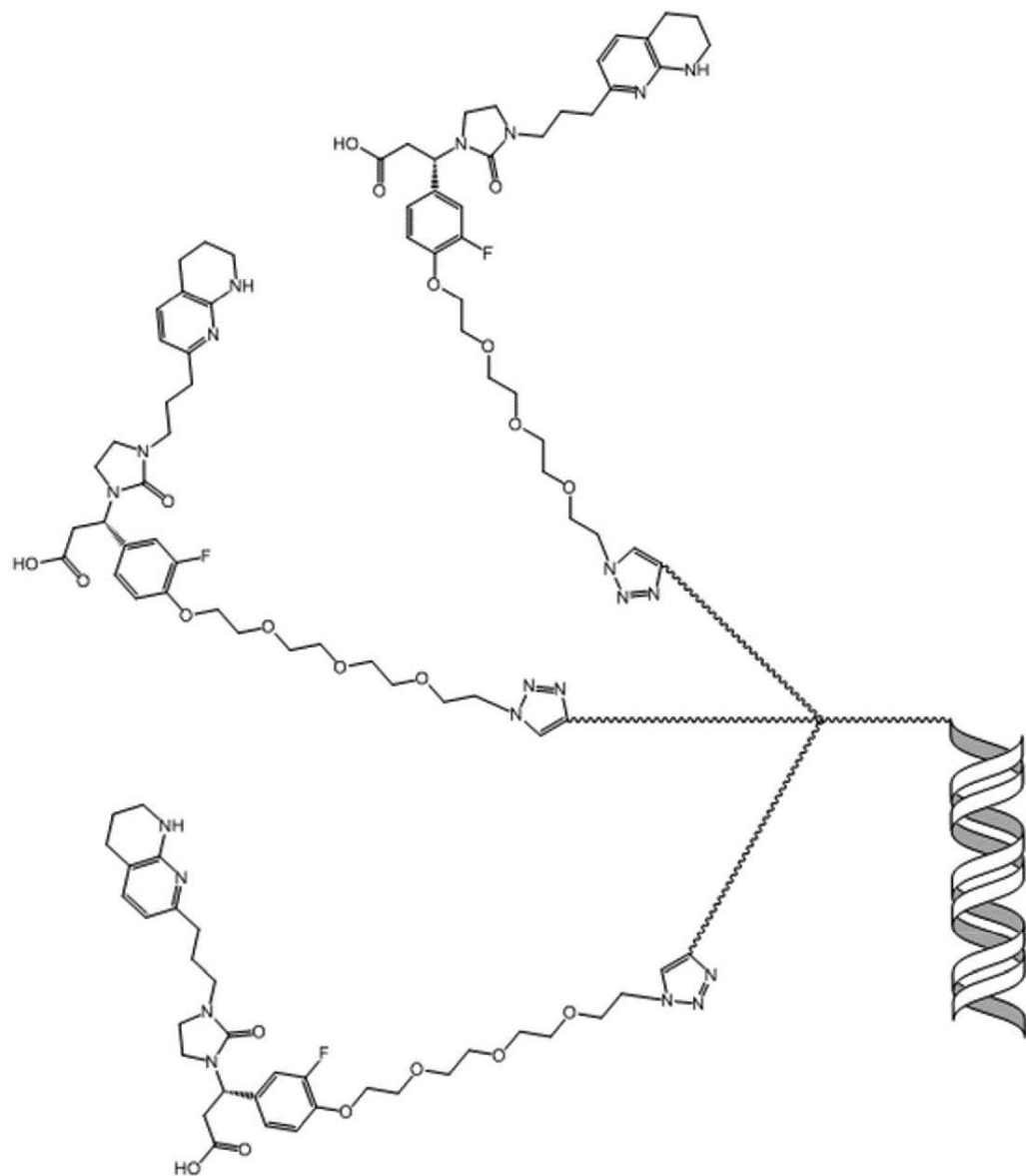
~~~~~

は、リガンドとカーゴ分子を結合するのに使用できる任意の好適な足場またはリンカーを示す } によって表される。

【 0 1 8 7】

いくつかの実施形態において、RNAi剤にコンジュゲートされる v 3三座標的化基は、構造2aの3つのリガンドを含み、以下の構造：

【化 1 1 1】



(構造 701e)

{ 式中、以下の :

【化 1 1 2】

~~~~~

は、リガンドとRNAi剤を結合するのに使用できる任意の好適な足場またはリンカーを示し、および以下の :

【化 1 1 3】



は、RNAi剤を示す } によって表される。

【 0 1 8 8 】

反応性基および保護された反応性基

反応性基は、当該技術分野で良く知られており、2つの分子間または反応物間の共有結

合の形成を提供する。本明細書の発明の範囲における使用に適した反応性基としては、これらに限定されるものではないが：アミノ基、アミド基、カルボン酸基、アジド、アルキン、プロパルギル基、BCN（ビシクロ[6.1.0]ノニン、DBCO（ジベンゾシクロオクチン）チオール、マレイミド基、アミノオキシ基、N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）または他の活性化エステル（例えば、PNP、TFP、PFP）、プロモ基、アルデヒド、カーボネート、トシレート、テトラジン、トランス-シクロオクテン（TCO）、ヒドラジド、ヒドロキシル基、ジスルフィド、およびオルトピリジルジスルフィド基が挙げられる。

#### 【0189】

反応性基の組み込みは、カーゴ分子への本明細書に開示のインテグリンリガンドのコンジュゲーションを促進し得る。コンジュゲーション反応は、当該技術分野で良く知られており、2つの分子間または反応物間の共有結合の形成を提供する。本明細書の発明の範囲における使用に適したコンジュゲーション反応としては、これらに限定されるものではないが、アミドカップリング反応、マイケル付加反応、ヒドラゾン形成反応、およびクリックケミストリー付加環化反応が挙げられる。

#### 【0190】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドは、テトラフルオロフェニル（TFP）エステルとして合成され、これは反応性アミノ基によって置換されて、カーゴ分子にコンジュゲートし得る。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリン標的化リガンドは、アジドとして合成され、そしてそれは、例えば、カーゴ分子を取り付けるための、クリック化学付加環化反応によって、プロパルギルまたはDBCOに結合できる。

#### 【0191】

保護された反応性基も当該技術分野において一般的に使用される。保護基は、非保護基が反応する条件下では反応しない基への、反応性基の一時的な化学変換を提供し、例えば、その後の化学反応における化学選択性を提供する。本明細書の発明の範囲における使用に適した保護された反応性基としては、これらに限定されるものではないが、BOC基（t-ブトキシカルボニル）、Fmoc（9-フルオレニルメトキシカルボニル）、カルボキシベンジル（CBZ）基、ベンジルエステル、およびPBF（2,2,4,6,7-ペンタメチルペンタメチルジヒドロベンゾフラン-5-スルホニル）が挙げられる。

#### 【0192】

カーゴ分子（RNAi剤を含む）

カーゴ分子は、本明細書に記載されるインテグリンリガンドから取り外されるとき、インテグリン受容体を含む細胞に対して望ましい効果を有するであろう任意の分子である。カーゴ分子は、これらに限定されるものではないが、医薬成分、医薬品、プロドラッグ、治療効果を有する物質、小分子、抗体、抗体フラグメント、免疫グロブリン、モノクローナル抗体、ラベルまたはマーカー、脂質、天然もしくは修飾核酸またはポリヌクレオチド、ペプチド、ポリマー、ポリアミン、タンパク質、アプタマー、毒素、ビタミン、PEG、ハプテン、ジゴキシゲニン、ビオチン、放射性原子もしくは分子、またはフルオロフォアであり得る。いくつかの実施形態において、1つまたは複数のカーゴ分子（例えば、同じまたは異なるカーゴ分子）は、1つまたは複数のインテグリンリガンドに連結されて、インテグリン  $\alpha$  3および/またはインテグリン  $\alpha$  5を発現している細胞に対してカーゴ分子を標的化する。

#### 【0193】

いくつかの実施形態において、1つまたは複数のカーゴ分子は、医薬成分または医薬組成物である。いくつかの実施形態において、1つまたは複数のカーゴ分子はオリゴヌクレオチドベースの化合物である。本明細書で使用される場合、「オリゴヌクレオチドベースの化合物」は、約10~50（例えば、10~48、10~46、10~44、10~42、10~40、10~38、10~36、10~34、10~32、10~30、10~28、10~26、10~24、10~22、10~20、10~18、10~16、10~14、10~12、12~50、12~48、12~46、12~44、12~42、12~40、12~38、12~36、12~34、12~32、12~30、12~28

、12～26、12～24、12～22、12～20、12～18、12～16、12～14、14～50、14～48、14～46、14～44、14～42、14～40、14～38、14～36、14～34、14～32、14～30、14～28、14～26、14～24、14～22、14～20、14～18、14～16、16～50、16～48、16～46、16～44、16～42、16～40、16～38、16～36、16～34、16～32、16～30、16～28、16～26、16～24、16～22、16～20、16～18、18～50、18～48、18～46、18～44、18～42、18～40、18～38、18～36、18～34、18～32、18～30、18～28、18～26、18～24、18～22、18～20、20～50、20～48、20～46、20～44、20～42、20～40、20～38、20～36、20～34、20～32、20～30、20～28、20～26、20～24、20～22、22～50、22～48、22～46、22～44、22～42、22～40、22～38、22～36、22～34、22～32、22～30、22～28、22～26、22～24、24～50、24～48、24～46、24～44、24～42、24～40、24～38、24～36、24～34、24～32、24～30、24～28、24～26、26～50、26～48、26～46、26～44、26～42、26～40、26～38、26～36、26～34、26～32、26～30、26～28、28～50、28～48、28～46、28～44、28～42、28～40、28～38、28～36、28～34、28～32、28～30、30～50、30～48、30～46、30～44、30～42、30～40、30～38、30～36、30～34、30～32、32～50、32～48、32～46、32～44、32～42、32～40、32～38、32～36、32～34、34～50、34～48、34～46、34～44、34～42、34～40、34～38、34～36、36～50、36～48、36～46、36～44、36～42、36～40、36～38、38～50、38～48、38～46、38～44、38～42、38～40、40～50、40～48、40～46、40～44、40～42、42～50、42～48、42～46、42～44、44～50、44～48、44～46、46～50、46～48、または48～50

10

20

）個のヌクレオチドまたはヌクレオチド塩基対を含むヌクレオチド配列である。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドベースの化合物は、細胞内の発現された標的核酸または標的遺伝子（例えば、標的遺伝子の遺伝子転写物またはmRNA）におけるコード配列に少なくとも部分的に相補的である核酸塩基配列を有する。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドベースの化合物は、遺伝子を発現している細胞への送達の際に、基礎的遺伝子の発現を阻害することができ、本明細書では「発現阻害オリゴヌクレオチドベースの化合物」と呼ばれる。遺伝子発現はインビトロまたはインビボで阻害され得る。

#### 【0194】

「オリゴヌクレオチドベースの化合物」は、これらに限定されるものではないが：一本鎖オリゴヌクレオチド、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド、短もしくは低分子干渉RNA（siRNA）、二本鎖RNA（dsRNA）、マイクロRNA（miRNA）、短ヘアピン型RNA（shRNA）、リボザイム、干渉RNA分子、およびダイサー基質が挙げられる。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドベースの化合物は、一本鎖オリゴヌクレオチドベースの化合物、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチドなどである。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドベースの化合物は、二本鎖オリゴヌクレオチドベースの化合物である。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドベースの化合物は、RNAi剤である二本鎖オリゴヌクレオチドである。

30

#### 【0195】

いくつかの実施形態において、1つまたは複数のカーゴ分子は「RNAi剤」であり、本明細書に定義されるRNAi剤は、RNAまたはRNA様（例えば、化学修飾されたRNA）オリゴヌクレオチド分子を含む化学組成物であり、斯かる分子は、配列特異的に標的mRNAのメッセンジャーRNA（mRNA）転写産物の分解またはその翻訳を阻害することができる。本明細書で使用される場合、RNAi剤は、RNA干渉メカニズム（すなわち、哺乳動物細胞のRNA干渉経路機構（RNA誘導サイレンシング複合体またはRISC）との相互作用を介してRNA干渉を誘導する）を介して、あるいは任意の代替メカニズムまたは経路によって、動作することができる。その用語が本明細書で使用される場合、RNAi剤は、主にRNA干渉メカニズムを介して動作すると考えられるが、開示されたRNAi剤は、任意の特定の経路または作用メカニズムに拘束または限定されない。本明細書に開示されるRNAi剤は、センス鎖およびアンチセンス鎖から成り、かつ、該RNAi剤としては、これらに限定されるものでは

40

50

ないが：短もしくは低分子干渉RNA ( siRNA )、二本鎖RNA ( dsRNA )、マイクロRNA ( miRNA )、短ヘアピンRNA ( shRNA )、およびダイサー基質が挙げられる。本明細書に記載されるRNAi剤のアンチセンス鎖は、標的化されるmRNAに対して少なくとも部分的に相補的である。RNAi剤は、1もしくは複数の修飾ヌクレオチドおよび/または1もしくは複数の非ホスホジエステル結合を含み得る。

#### 【 0 1 9 6 】

典型的には、RNAi剤は、少なくとも、第1の配列を含むセンス鎖 ( パッセンジャー鎖とも呼ばれる )、および第2の配列を含むアンチセンス鎖 ( ガイド鎖とも呼ばれる ) から構成され得る。RNAi剤のセンス鎖およびアンチセンス鎖の長さはそれぞれ、16 ~ 49ヌクレオチド長であり得る。いくつかの実施形態において、RNAi剤のセンス鎖およびアンチセンス鎖は、独立して、17 ~ 26ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態において、センス鎖およびアンチセンス鎖は、独立して、19 ~ 26ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態において、センス鎖およびアンチセンス鎖は、独立して、21 ~ 26ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態において、センス鎖およびアンチセンス鎖は、独立して、21 ~ 24ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態において、センス鎖およびアンチセンス鎖は、それぞれ21ヌクレオチド長である。センス鎖およびアンチセンス鎖は、同じ長さであってもまたは異なる長さであってもよい。RNAi剤は、標的遺伝子中の配列に少なくとも部分的に相補的であるアンチセンス鎖配列を含み、標的を発現している細胞への送達の際に、RNAi剤は、インピボまたはインピトロで1つまたは複数の標的遺伝子の発現を阻害し得る。

#### 【 0 1 9 7 】

オリゴヌクレオチドベースの化合物は一般に、そしてRNAi剤は特に、修飾ヌクレオチドおよび/または1つまたは複数の非ホスホジエステル結合から構成され得る。本明細書で使用される場合、「修飾ヌクレオチド」は、リボヌクレオチド ( 2' - ヒドロキシルヌクレオチド ) 以外のヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、ヌクレオチドの少なくとも50% ( 例えば、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100% ) が修飾ヌクレオチドである。本明細書で使用される場合、修飾ヌクレオチドとしては、これらに限定されるものではないが、デオキシリボヌクレオチド、ヌクレオチド模倣物、脱塩基ヌクレオチド、2' - 修飾ヌクレオチド、3' から3' への結合 ( 逆位 ) ヌクレオチド、非天然塩基含有ヌクレオチド、架橋ヌクレオチド、ペプチド核酸、2', 3' - セコヌクレオチド模倣物 ( 非ロックド核酸塩基類似体、ロックドヌクレオチド、3' - O - メトキシ ( 2' ヌクレオシド間結合 ) ヌクレオチド )、2' - F - アラビノヌクレオチド、5' - Me, 2' - フルオロヌクレオチド、モルホリノヌクレオチド、ビニルホスホネートデオキシリボヌクレオチド、ビニルホスホネート含有ヌクレオチド、およびシクロプロピルホスホネート含有ヌクレオチドが挙げられる。2' - 修飾ヌクレオチド ( すなわち、5員糖環の2' 位にヒドロキシル基以外の基を有するヌクレオチド ) としては、これらに限定されるものではないが、2' - O - メチルヌクレオチド、2' - デオキシ - 2' - フルオロヌクレオチド、2' - デオキシヌクレオチド、2' - メトキシエチル ( 2' - O - 2 - メトキシエチル ) ヌクレオチド、2' - アミノヌクレオチド、および2' - アルキルヌクレオチドが挙げられる。

#### 【 0 1 9 8 】

また、オリゴヌクレオチドベースの化合物、例えばRNAi剤の1つまたは複数のヌクレオチドは、非標準結合または骨格 ( すなわち、修飾されたヌクレオチド間結合または修飾骨格 ) によって連結され得る。修飾されたヌクレオチド間結合は、非リン酸含有共有ヌクレオチド間結合であり得る。修飾されたヌクレオチド間結合または骨格としては、これらに限定されるものではないが、5' - ホスホロチオエート基、キラルホスホロチオエート、チオホスフェート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキル - ホスホトリエステル、アルキルホスホネート ( 例えば、メチルホスホネートまたは3' - アルキレンホスホネート )、キラルホスホネート、ホスフィネート、ホスホルアミデート ( 例えば、3' - アミノホスホルアミデート、アミノアルキルホスホルアミデート、またはチオノホ

スホルアミデート)、チオノアルキル-ホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステ  
 ル、モルホリノ結合、通常の3'-5'結合を有するボラノホスフェート、ボラノホスフェー  
 トの2'-5'結合アナログ、あるいは、ヌクレオシド単位の隣接する対が3'-5'から5'-3'  
 にまたは2'-5'から5'-2'に連結されている反転した極性を有するボラノホスフェートが  
 挙げられる。

【0199】

所与の化合物のすべての位置が均一に修飾されている必要はない。逆に、2つ以上の修  
 飾を、単一のオリゴヌクレオチドベースの化合物にまたはさらにその単一のヌクレオチド  
 に組み込むことができる。

【0200】

いくつかの実施形態において、カーゴ分子は、HIF-2 (EPAS1) 遺伝子発現を阻害  
 するためのRNAi剤である。カーゴ分子は、国際公開第WO2016/196239号および同第W  
 O2014/134255号(その全体を参照により本明細書に援用する)に記載のRNAi剤であっ  
 てもよい。

【0201】

RNAi剤のセンス鎖およびアンチセンス鎖は、当該技術分野で知られている方法によっ  
 て合成および/または修飾され得る。例えば、HIF-2 発現の阻害に関するRNAi剤の開示  
 は、例えば国際公開第WO2016/196239号(その全体が参照により本明細書に援用する  
 )に見出すことができる。

【0202】

いくつかの実施形態において、1つまたは複数のカーゴ分子は、薬物動態(PK)エンハ  
 ンサーまたはモジュレーターとして作用することができるPEG部分を含むか、それから  
 なり得る。いくつかの実施形態において、1つまたは複数のカーゴ分子は、PEG部分を含  
 んで、スカルPEG部分は約20~900個のエチレンオキシド(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)単位  
 (例えば、20~850、20~800、20~750、20~700、20~650、20~600、20~5  
 50、20~500、20~450、20~400、20~350、20~300、20~250、20~200、2  
 0~150、20~100、20~75、20~50、100~850、100~800、100~750、100~  
 700、100~650、100~600、100~550、100~500、100~450、100~400、10  
 0~350、100~300、100~250、100~200、100~150、200~850、200~800  
 、200~750、200~700、200~650、200~600、200~550、200~500、200~  
 450、200~400、200~350、200~300、200~250、250~900、250~850、25  
 0~800、250~750、250~700、250~650、250~600、250~550、250~500  
 、250~450、250~400、250~350、250~300、300~900、300~850、300~  
 800、300~750、300~700、300~650、300~600、300~550、300~500、30  
 0~450、300~400、300~350、350~900、350~850、350~800、350~750  
 、350~700、350~650、350~600、350~550、350~500、350~450、350~  
 400、400~900、400~850、400~800、400~750、400~700、400~650、40  
 0~600、400~550、400~500、400~450、450~900、450~850、450~800  
 、450~750、450~700、450~650、450~600、450~550、450~500、500~  
 900、500~850、500~800、500~750、500~700、500~650、500~600、50  
 0~550、550~900、550~850、550~800、550~750、550~700、550~650  
 、550~600、600~900、600~850、600~800、600~750、600~700、600~  
 650、650~900、650~850、650~800、650~750、650~700、700~900、70  
 0~850、700~800、700~750、750~900、750~850、750~800、800~900  
 、850~900、または850~900個のエチレンオキシド単位)を有する。いくつかの実  
 施形態において、1つまたは複数のカーゴ分子は、約455個のエチレンオキシド単位(約20  
 キロダルトン(kDa)の分子量)を有するPEG部分から成る。いくつかの実施形態におい  
 て、PEG部分は、約2キロダルトンの分子量を有する。いくつかの実施形態において、PE  
 G部分は、約20キロダルトンの分子量を有する。いくつかの実施形態において、PEG部分  
 は、約40キロダルトンの分子量を有する。本明細書に記載のPEG部分は、直鎖または分岐

10

20

30

40

50



鎖であり得る。PEG部分は、離散的（単分散）または非離散的（多分散）であり得る。PK増強カーゴ分子としての使用のためのPEG部分は、商業的に購入することができる。いくつかの実施形態において、1つまたは複数のカーゴ分子は、PKモジュレーターまたはエンハンサーとして作用し得るPEG部分、ならびに異なるカーゴ分子、例えば薬学的に活性な成分または化合物を含む。

【0203】

記載されたインテグリンリガンドは、塩または溶媒和物を含む。インテグリンリガンドの溶媒和物は、それらの相互の引力により形成するインテグリンリガンドへの不活性な溶媒分子の添加を意味すると解釈される。溶媒和物は、例えば、一水和物または二水和物、あるいは例えばメタノールまたはエタノールなどのアルコールとの付加化合物である。

10

【0204】

遊離アミノ基または遊離ヒドロキシル基は、対応する保護基を有するインテグリンリガンドの置換基として提供され得る。

【0205】

v 3インテグリンリガンドはまた、例えば誘導体、すなわち、インビトロまたは生物内のいずれかで切断される、例えばアルキルもしくはアシル基、糖またはオリゴペプチドで修飾されたインテグリンリガンドを含む。

【0206】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリンリガンドは、リガンド媒介エンドサイトーシス、飲作用を介して、または他の手段のいずれかによって、その表面にインテグリン v 3および/またはインテグリン v 5を提示する細胞のサイトゾルへのカーゴ分子の送達を促進する。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるインテグリンリガンドは、インテグリン v 3および/またはインテグリン v 5を提示する細胞の原形質膜へのカーゴ分子の送達を促進する。

20

【0207】

医薬組成物

いくつかの実施形態において、本開示は、本明細書に開示のインテグリンリガンドの1つまたは複数を含むか、またはそれらから成るか、またはそれらから本質的になる医薬組成物を提供する。

【0208】

本明細書で使用される場合、「医薬組成物」は、薬理学的有効量の活性医薬成分（API）、および任意により1つまたは複数の薬学的に許容される賦形剤を含有する。薬学的に許容される賦形剤（賦形剤）は、薬物送達システムに意図的に含まれる活性医薬成分（API、治療用製品）以外の物質である。賦形剤は、意図された用量で治療効果を発揮しないか、または発揮することを意図しない。賦形剤は、a) 製造中の薬物送達システムの処理を補助し、b) APIの安定性、生物学的利用能または患者の許容性を保護、支持、または増強し、c) 製品同定を補助し、および/または、d) 保管または使用中のAPIの送達の全体的な安全性、有効性の任意の他の属性を増強するように作用し得る。薬学的に許容される賦形剤は、不活性物質であってもなくてもよい。

30

【0209】

賦形剤としては、これらに限定されるものではないが：吸収促進剤、粘着防止剤、消泡剤、酸化防止剤、結合剤、緩衝剤、担体、コーティング剤、着色剤、送達促進剤、送達ポリマー、デキストラン、デキストロース、希釈剤、崩壊剤、乳化剤、増量剤、充填剤、香味剤、流動促進剤、保湿剤、潤滑剤、油、ポリマー、保存剤、食塩水、塩、溶媒、糖、懸濁化剤、徐放性マトリックス、甘味料、増粘剤、等張化剤、ビヒクル、撥水剤、および湿潤剤が挙げられる。

40

【0210】

本明細書に記載の医薬組成物は、医薬組成物に一般的にみられる他の付加的な成分を含むことができる。いくつかの実施形態において、付加的な成分は、薬学的に活性な物質である。薬学的に活性な物質としては、これらに限定されるものではないが：抗搔痒剤、収

50

斂剤、局所麻酔剤、または抗炎症剤（例えば、抗ヒスタミン薬、ジフェンヒドラミン等）、小分子薬、抗体、抗体フラグメント、アプタマー、および/またはワクチンが挙げられる。

#### 【0211】

医薬組成物はまた、保存剤、可溶化剤、安定化剤、湿潤剤、乳化剤、甘味剤、着色剤、着臭剤、浸透圧を変化させるための塩、緩衝剤、コーティング剤、または抗酸化剤も含み得る。それらはまた、既知の治療効果を有する他の剤を含み得る。

#### 【0212】

医薬組成物は、局所治療または全身治療が望ましいのかに応じて、および治療されることとなる領域に応じて、多くの方法で投与することができる。投与は、当該技術分野で一般的に知られている任意の方法、例えば、これらに限定されるものではないが、局所（例えば、経皮パッチにより）、肺内（例えば、ネブライザー、気管内、鼻腔内によるものを含む粉末またはエアロゾルの吸入または通気により）、表皮、経皮的、経口または非経口によって行われ得る。非経口投与としては、これらに限定されるものではないが、静脈内、動脈内、皮下、腹腔内または筋肉内注射または注入；皮下（例えば、埋め込み型装置を介して）、頭蓋内、実質内、くも膜下腔内、および脳室内投与が挙げられる。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の医薬組成物は、静脈内注射、輸液または皮下注射によって投与される。医薬組成物は、例えば錠剤、コーティング錠、糖衣錠、硬または軟ゼラチンカプセル剤、液剤、乳剤あるいは懸濁剤の形態で、経口投与することができる。投与はまた、直腸に、例えば坐剤を用いて；局所的または経皮的に、例えば軟膏、クリーム、ゲル、または溶液を用いて；あるいは非経口的に、例えば注射可能な溶液を用いて行うことができる。

#### 【0213】

注射可能な使用に適した医薬組成物は、滅菌水溶液（水溶性の場合）または分散液、および滅菌注射用溶液または分散液の即時調製のための滅菌粉末を含む。静脈内投与の場合、適切な担体は、生理食塩水、静菌水、Cremophor ELTM（BASF, Parsippany, NJ）またはリン酸緩衝食塩水を含む。それは、製造および保管の条件下で安定であるべきであり、かつ殺菌および真菌のような微生物の汚染作用から保護されるべきである。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコール）を含む溶媒または分散媒体、およびそれらの好適な混合物であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンのようなコーティングの使用により、分散液の場合必要とされる粒子サイズの維持により、および界面活性剤の使用によって維持され得る。多くの場合、組成物中に等張剤、例えば、糖、ポリアルコール、例えばマンニトール、ソルビトール、および塩化ナトリウムを含むことが好ましいであろう。注射用組成物の長期吸収は、組成物中に吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを含めることによってもたらされる。

#### 【0214】

滅菌注射用溶液は、上記に列挙した成分の1つまたは組み合わせと共に、適切な溶媒中に必要量の活性化化合物を組み入れることによって、必要に応じて、続く濾過滅菌によって、調製され得る。一般に、分散液は、塩基性分散媒体および上記に列挙したもののからの必要な他の成分を含む滅菌ビヒクル中に活性化化合物を組み入れることによって調製される。滅菌注射用溶液の調製のための滅菌粉末の場合、調製方法は、真空乾燥および凍結乾燥を含み、これにより、先に滅菌濾過したその溶液から、活性成分に加えて任意のさらなる所望の成分の粉末を得る。

#### 【0215】

関節内投与に適した製剤は、本明細書に記載のリガンドのいずれかの滅菌水性調製物の形態であり得、これは、微結晶形態、例えば水性微結晶懸濁液の形態であり得る。リポソーム製剤または生分解性ポリマー系はまた、関節内および眼科投与の両方のための本明細書に記載のリガンドのいずれかを提示するために使用することができる。

#### 【0216】

10

20

30

40

50

活性化合物は、例えば、インプラントおよびマイクロカプセル化送達システムを含む制御放出製剤のように、身体からの急速な排泄から化合物を保護することになる担体と共に調製され得る。生分解性、成体適合性ポリマー、例えばエチレンビニルアセタート、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸を使用することができる。そのような製剤の調製方法は、当業者に明らかであろう。リボソーム懸濁液も薬学的に許容される担体として使用することができる。これらは、例えば米国特許第4,522,811号に記載されているように、当業者に知られている方法に従って調製することができる。

#### 【0217】

医薬組成物は、医薬組成物に一般的に見られる他の付加的な成分を含み得る。そのような付加的な成分としては、これらに限定されるものではないが：鎮痒剤、収斂剤、局所麻酔剤、または抗炎症剤（例えば、抗ヒスタミン薬、ジフェンヒドラミン等）が挙げられる。本明細書で使用される場合、「薬理学的有効量」「治療上有効量」または単に「有効量」とは、薬理学的、治療的または予防的結果をもたらすための薬学的に活性な薬剤の量を指す。

10

#### 【0218】

v 3インテグリンリガンドを含有する医薬もまた、そのような医薬の製造方法と同様に、本発明の目的であり、斯かる方法は、v 3インテグリンリガンドを含む1つまたは複数の化合物、および所望であれば1つまたは複数の既知の治療効果を有する物質を、薬学的に許容される形態にすることを含む。

20

#### 【0219】

本明細書に記載されたインテグリンリガンド、および開示されたインテグリンリガンドを含有する医薬組成物は、キット、容器、パック、またはディスペンサーに包装されまたは含まれ得る。インテグリンリガンドおよびインテグリンリガンドを含有する医薬組成物は、予め充填されたシリンジまたはバイアルに包装されてもよい。

#### 【0220】

連結基、薬物動態（PK）エンハンサー、薬力学（PD）モジュレーター、デリバリービヒクル、および標的化基

いくつかの実施形態において、v 3リガンドは、これだけに限定されるものではないが、連結基、薬物動態（PK）エンハンサー（PKモジュレーターとも呼ばれる）、薬力学（PD）モジュレーター、送達ポリマー、またはデリバリービヒクルを含めた1もしくは複数の非ヌクレオチド基にコンジュゲートされる。非ヌクレオチド基は、カーゴ分子の標的化、送達、または取り付けを促進できる。標的化基および連結基のための足場の例は本明細書に開示されている。非ヌクレオチド基は、センス鎖および/またはアンチセンス鎖のいずれかの3'および/または5'末端に共有結合により連結できる。カーゴ分子がRNAi剤である実施形態において、そのRNAi剤は、センス鎖の3'および/または5'末端に連結された非ヌクレオチド基を含む。いくつかの実施形態において、非ヌクレオチド基はRNAi剤センス鎖の5'末端に連結される。本明細書に開示されるインテグリンリガンドは、リンカー/連結基を介してカーゴ分子に直接的または間接的に連結できる。いくつかの実施形態において、インテグリンリガンドは、不安定な、切断可能な、または可逆的な結合またはリンカーを介してカーゴ分子に連結される。

30

40

#### 【0221】

いくつかの実施形態において、非ヌクレオチド基は、そのRNAi剤もしくはコンジュゲートの細胞もしくは組織特異的分配および細胞特異的取り込みを改善するためにそれが取り付けられるRNAi剤もしくはコンジュゲートの薬物動態または生体分布特性を高める。いくつかの実施形態において、非ヌクレオチド基は、RNAi剤のエンドサイトーシスを高める。いくつかの実施形態において、非ヌクレオチド基は、そのRNAi剤もしくはコンジュゲートの細胞もしくは組織特異的分配および細胞特異的取り込みを改善するためにそれが取り付けられるRNAi剤もしくはコンジュゲートの薬力学的性質を向上または調節する。

#### 【0222】

50

標的化基または標的化部分は、カーゴ分子の細胞特異的（場合によっては臓器特異的を含む）分配および細胞特異的（もしくは臓器特異的）の取り込みを改善するためにそれらを取り付けられるカーゴ分子の薬物動態または生体分布特性を高める。いくつかの実施形態において、標的化基は、本明細書に記載される  $\nu$  3リガンドを含んでもよい。いくつかの実施形態において、標的化基はリンカーを含む。いくつかの実施形態において、標的化基は、PKエンハンサーを含む。いくつかの実施形態において、 $\nu$  3インテグリンリガンドは、（場合によっては、リンカーとしての役割を果たすことができる）PEGリンカーまたは1、2、もしくは3つの脱塩基および/またはリピトール（脱塩基リボース）残基などのリンカーを使用してカーゴ分子に連結される。標的化基は、1もしくは複数の標的化リガンドを含んでもよい。いくつかの実施形態において、標的化基は、本明細書に開示される1~4つのインテグリンリガンドを含んでもよい。いくつかの実施形態において、標的化基は、三座の標的化基であり、かつ、本明細書に開示されるインテグリンリガンドを3つ含む。

10

#### 【0223】

（本明細書ではアミンとも呼ばれる）アミノ基などの反応性基を有するカーゴ分子が合成できる。カーゴ分子がRNAi剤である実施形態において、反応性基は、5'末端および/または3'末端にて連結されてもよい。反応性基は、それに続いて、当該技術分野で典型的な方法を使用して  $\nu$  3インテグリンリガンドを取り付けるために使用できる。

#### 【0224】

例えばいくつかの実施形態において、そのRNAi剤のセンス鎖の5'末端にNH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>基を有するRNAi剤が合成できる。末端のアミノ基は、それに続いて、例えば、インテグリン標的化リガンドを含む基とのコンジュゲートを形成するためには反応させることができる。いくつかの実施形態において、そのRNAi剤のセンス鎖の5'末端に1もしくは複数のアルキン基を有するRNAi剤が合成される。（単数もしくは複数の）末端アルキン基は、それに続いて、例えば、 $\nu$  3インテグリン標的化リガンドを含む基とのコンジュゲートを形成するように反応させることができる。

20

#### 【0225】

いくつかの実施形態において、連結基は  $\nu$  3リガンドにコンジュゲートされる。連結基は、カーゴ分子、PKエンハンサー、送達ポリマー、またはデリバリービヒクルへの  $\nu$  3リガンドの共有結合を容易にする。連結基の例としては、これだけに限定されるものではないが：Alk-SMPT-C<sub>6</sub>、Alk-SS-C<sub>6</sub>、DBCO-TEG、Me-Alk-SS-C<sub>6</sub>、およびC<sub>6</sub>-SS-Alk-Me、反応性基、例えば、一次アミンおよびアルキン、アルキル基、脱塩基残基/ヌクレオチド、アミノ酸、トリアルキン官能化基、リピトール、および/またはPEG基などが挙げられる。

30

#### 【0226】

リンカーまたは連結基は、1もしくは複数の共有結合を介して、着目の一方の化学基（RNAi剤など）またはセグメントを、着目の別の化学基（ $\nu$  3インテグリンリガンド、PKエンハンサー、PDモジュレーター、または送達ポリマーなど）またはセグメントに連結する2つの原子間の接続である。不安定な連結は、不安定な結合を含有する。連結は、2つのつながり合わされた原子間の距離を増大させるスペーサーを任意に含む。スペーサーは、連結に柔軟性および/または長さをさらに加えてもよい。スペーサーとしては、これだけに限定されるものではないが、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、アラルキル基、アラルケニル基、およびアラルキニル基が挙げられる；そのそれぞれが、1もしくは複数のヘテロ原子、複素環、アミノ酸、ヌクレオチド、およびサッカリドを含有できる。スペーサー基は、当該技術分野で周知なので、先のリストは説明の範囲を制限することを意味しない。

40

#### 【0227】

いくつかの実施形態において、 $\nu$  3リガンドは、追加リンカーを使用せずにカーゴ分子に連結される。いくつかの実施形態において、カーゴ分子への連結を容易にすることを簡単に提示するリンカーを有する  $\nu$  3リガンドが設計される。いくつかの実施形態にお

50

いて、2つ以上のRNAi剤が組成物中に含まれるとき、2以上のRNAi剤が、同じリンカーを使用してそれらのそれぞれの標的化基に連結される。いくつかの実施形態において、2つ以上のRNAi剤が組成物中に含まれるとき、2以上のRNAi剤が、異なったリンカーを使用してそれらのそれぞれの標的化基に連結される。

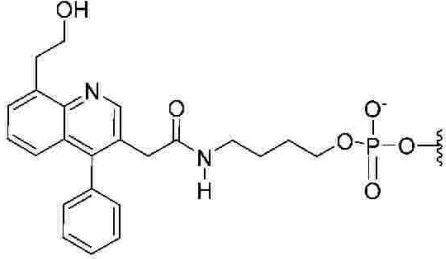
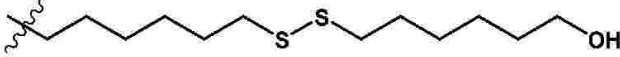
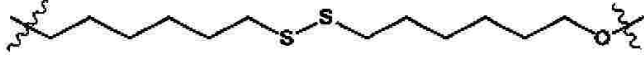
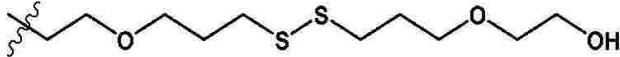
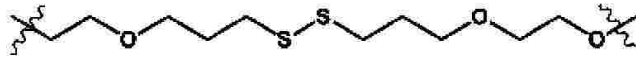
【0228】

特定の連結基および足場の例が表Aに提供される。

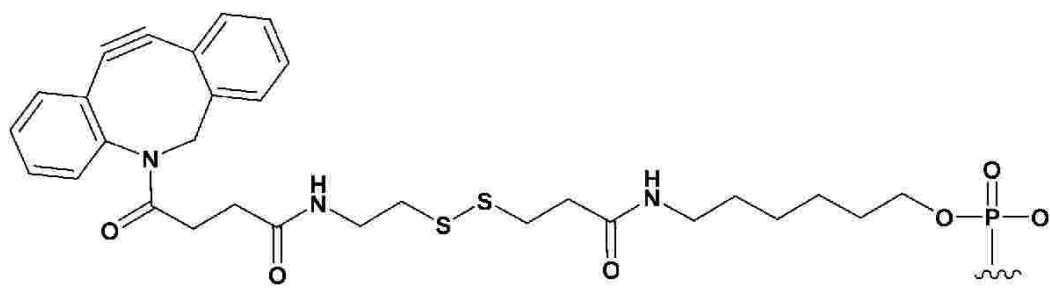
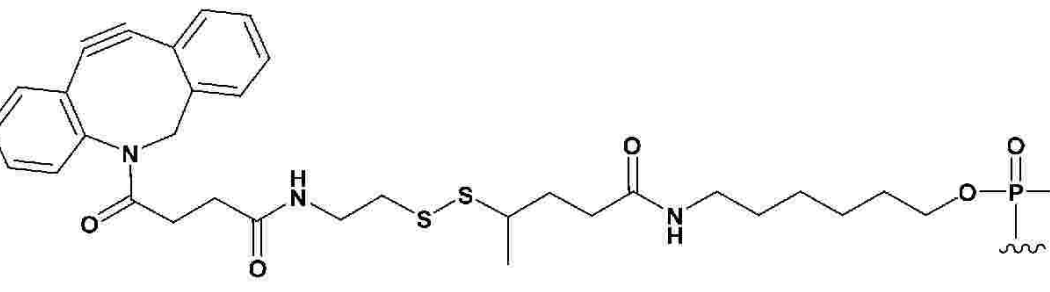
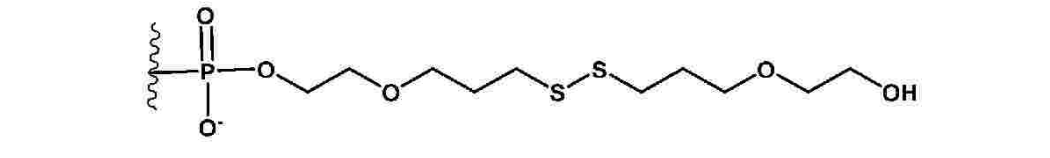
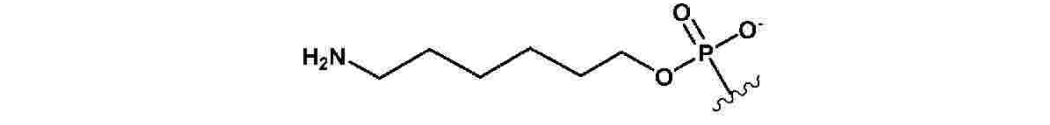
【0229】

【表1-1】

表A. さまざまな連結基および足場を示す構造

|                                                                                                                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|  <p>(PAZ)</p>                                                                                               | 10 |
| <p>オリゴヌクレオチドの3'末端に配置されたとき：</p>  <p>(C6-SS-C6)</p>                                                         | 20 |
| <p>オリゴヌクレオチドに内部的に配置されたとき：</p> <p>オリゴヌクレオチドの5'末端に向かう連結</p>  <p>オリゴヌクレオチドの3'末端に向かう連結</p> <p>(C6-SS-C6)</p> | 30 |
| <p>オリゴヌクレオチドの3'末端に配置されたとき：</p>                                                                           |    |
| <p>オリゴヌクレオチドに内部的に配置されたとき：</p> <p>オリゴヌクレオチドの5'末端に向かう連結</p>  <p>オリゴヌクレオチドの3'末端に向かう連結</p> <p>(6-SS-6)</p>   | 40 |

【表 1 - 2】

|                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|  <p>(C6-SS-Alk) または (Alk-SS-C6)</p> | 10 |
|  <p>(C6-SS-Alk-Me)</p>              | 20 |
|  <p>(PEG-C3-SS)</p>               | 30 |
|  <p>(NH2-C6)</p>                  | 40 |

The figure displays three chemical structures of phosphonate-terminated dendritic polymers, labeled (TriAlk1), (TriAlk1)s, and (TriAlk2).

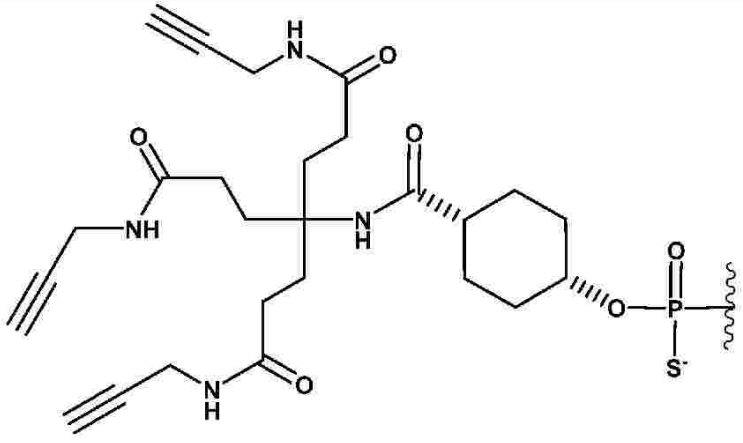
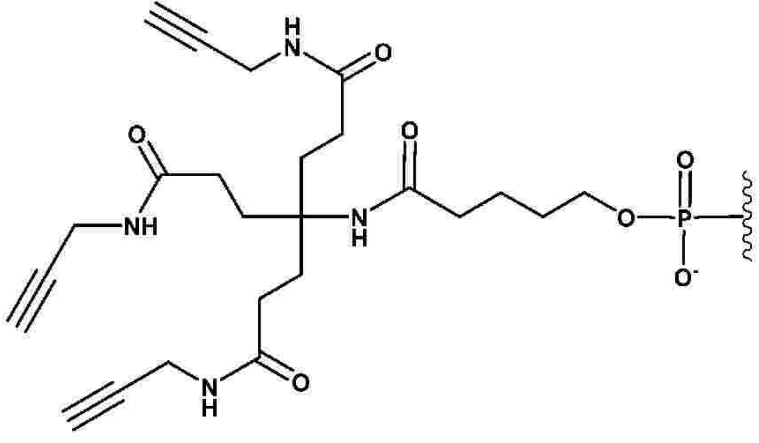
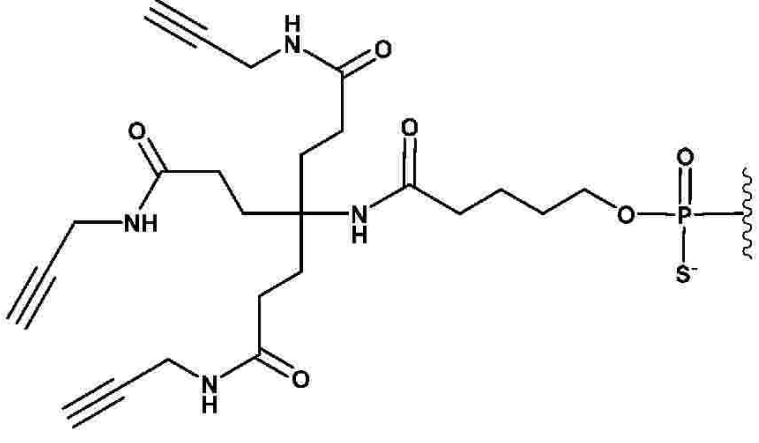
**(TriAlk1):** This structure features a central carbon atom bonded to three 2-ethynylacetamidoethyl groups and one 2-((1-ethoxycyclohexyl)carbamoyl)ethyl group. The ethoxycyclohexyl group is attached to the cyclohexane ring via an oxygen atom, which is part of a phosphonate group ( $\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{O}^-)-\text{R}$ ).

**(TriAlk1)s:** This structure is identical to (TriAlk1), except the phosphonate group is a thio-phosphonate, where the central phosphorus atom is double-bonded to an oxygen and single-bonded to a sulfur atom ( $\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{S}^-)-\text{R}$ ).

**(TriAlk2):** This structure is identical to (TriAlk1), except the 2-((1-ethoxycyclohexyl)carbamoyl)ethyl group is attached to the cyclohexane ring via a direct carbon-carbon bond, with the carbonyl group oriented away from the ring.

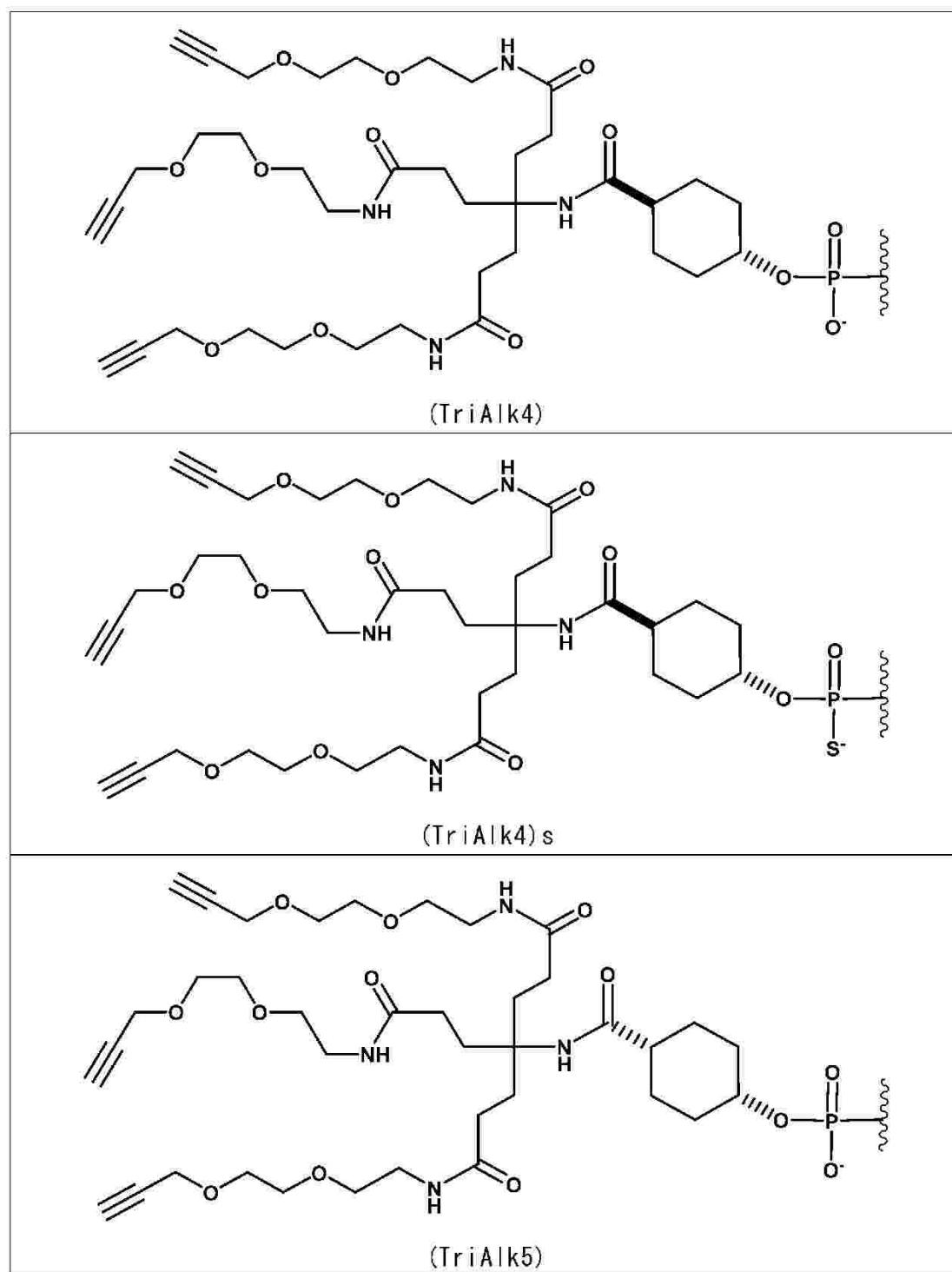
40

【表 1 - 4】

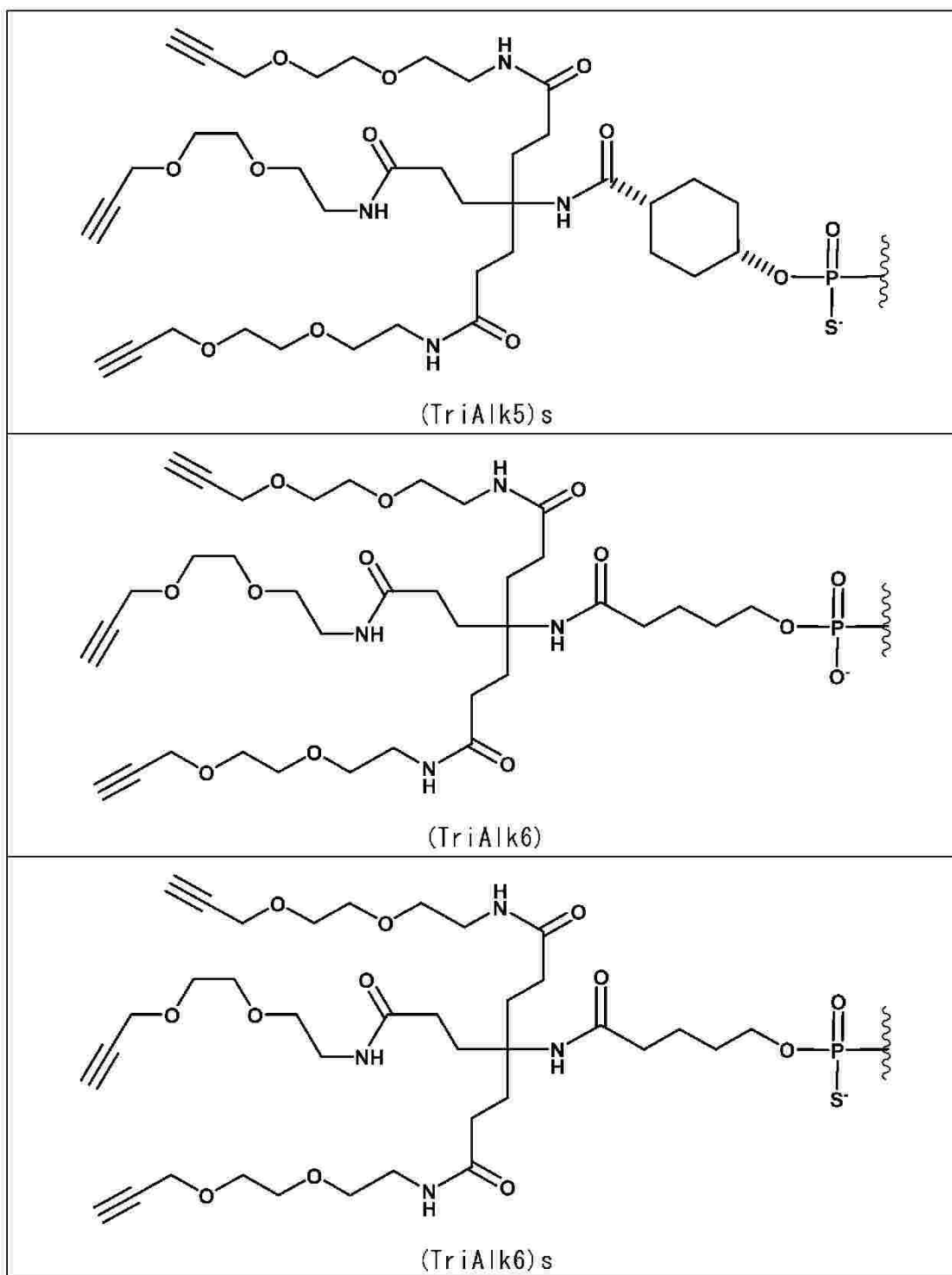
|                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|  <p>(TriAlk2)s</p>   | 10 |
|  <p>(TriAlk3)</p>   | 20 |
|  <p>(TriAlk3)s</p> | 30 |
|                                                                                                        | 40 |



【表 1 - 5】



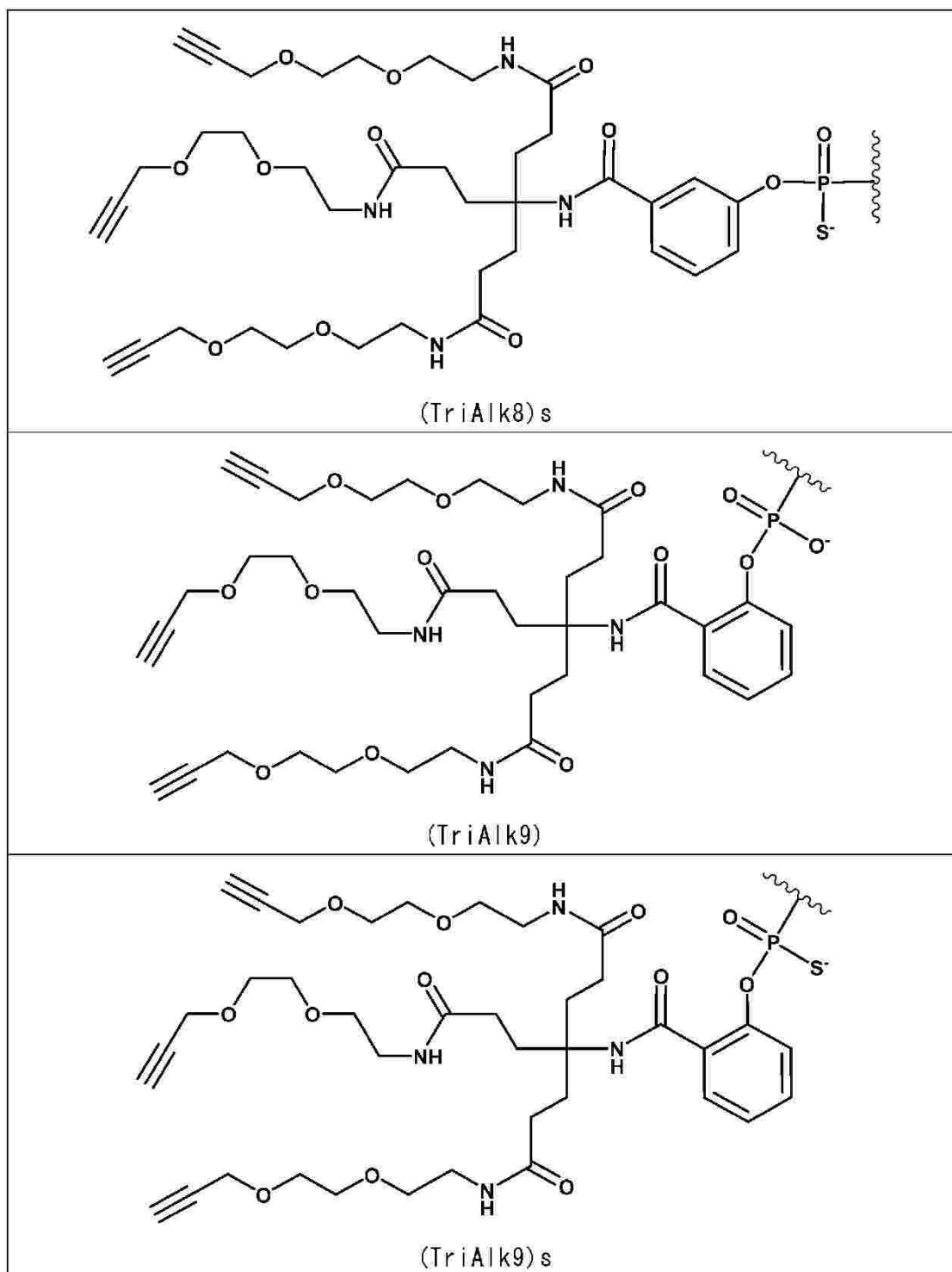
【表 1 - 6】



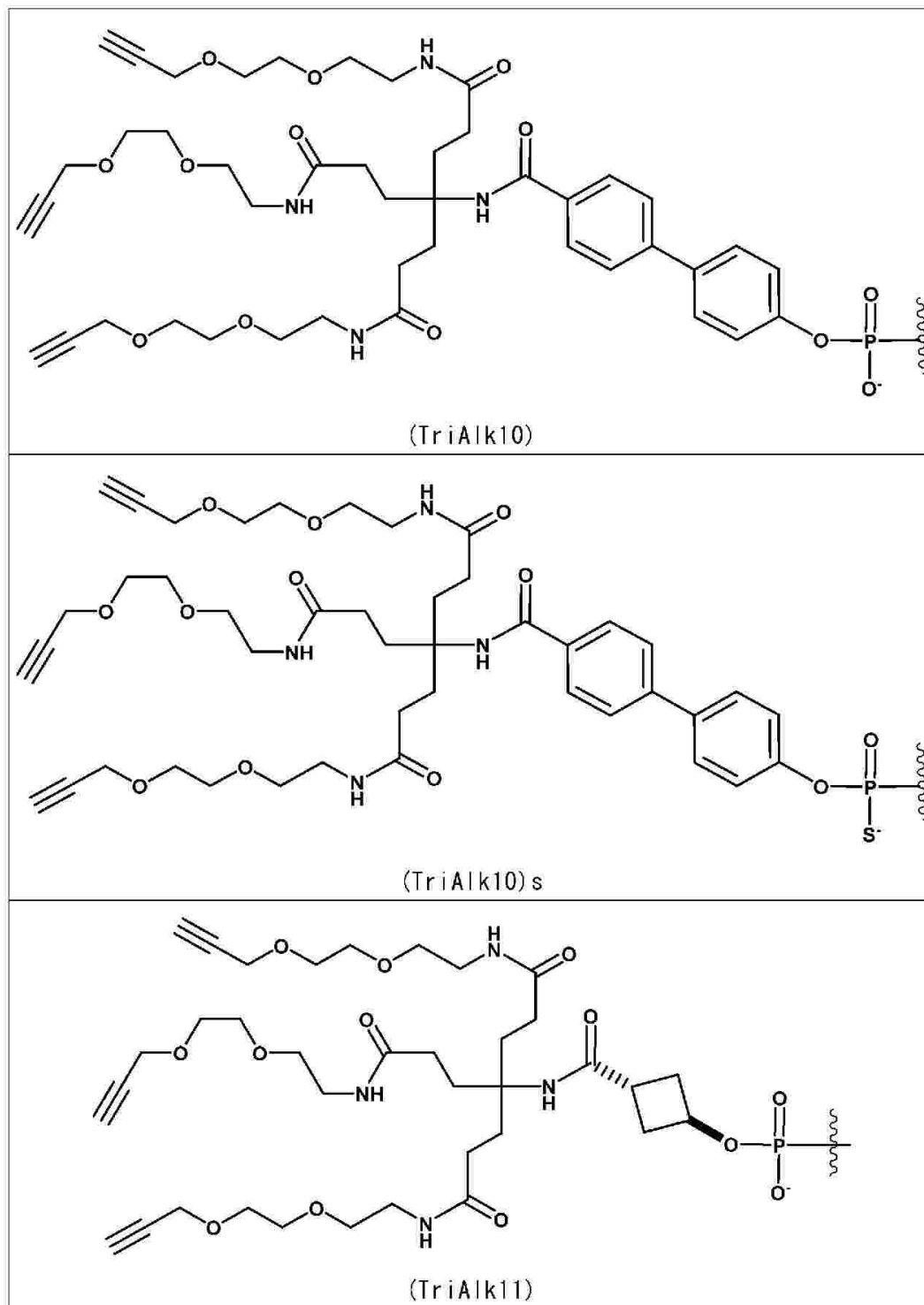
10



【表 1 - 8】



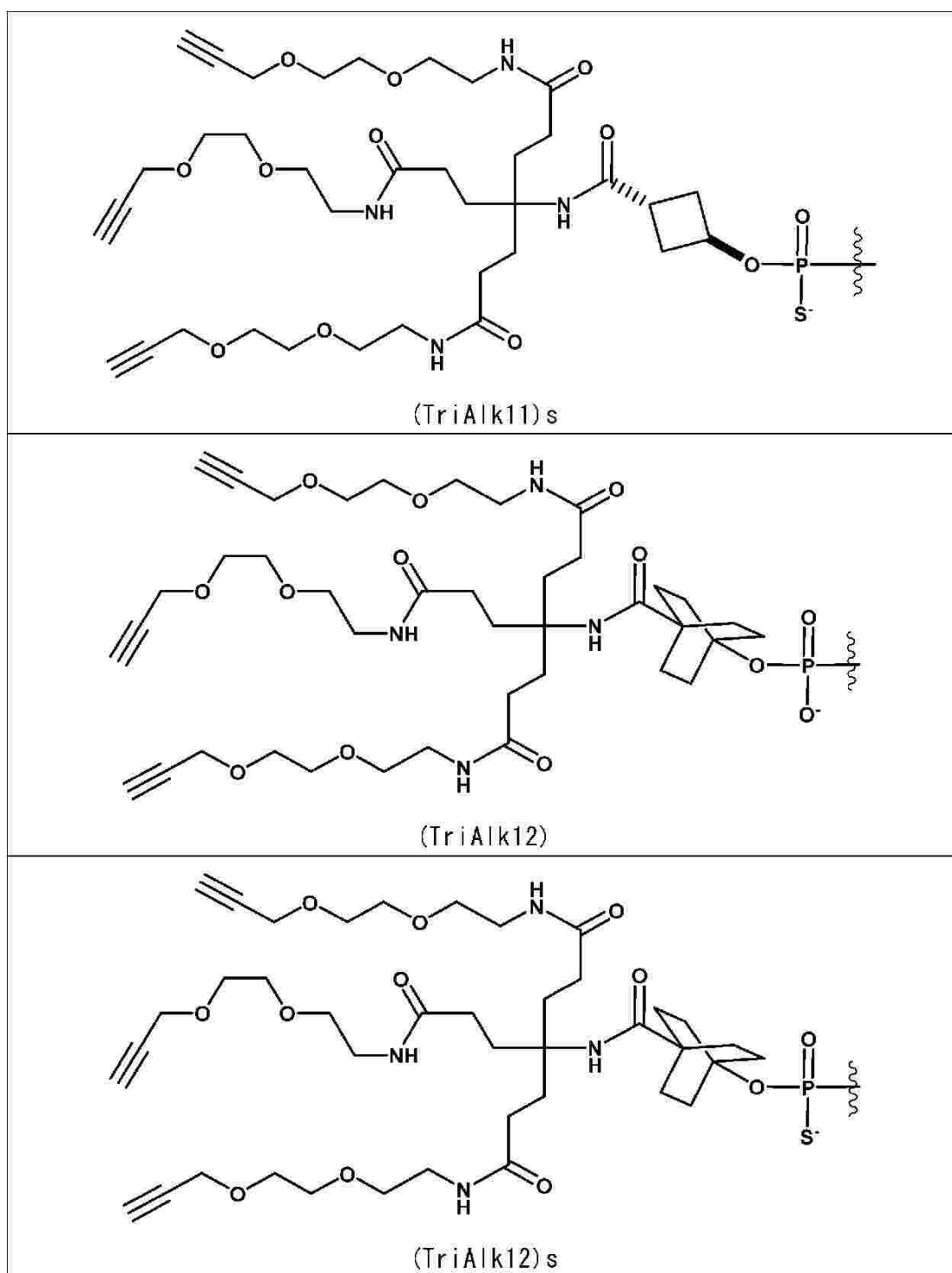
【表 1 - 9】



40

50

【表 1 - 10】



The figure displays three chemical structures, labeled (TriAlk13), (TriAlk13)s, and (TriAlk14), which are dendritic polymers with a central core and multiple terminal alkyne groups.

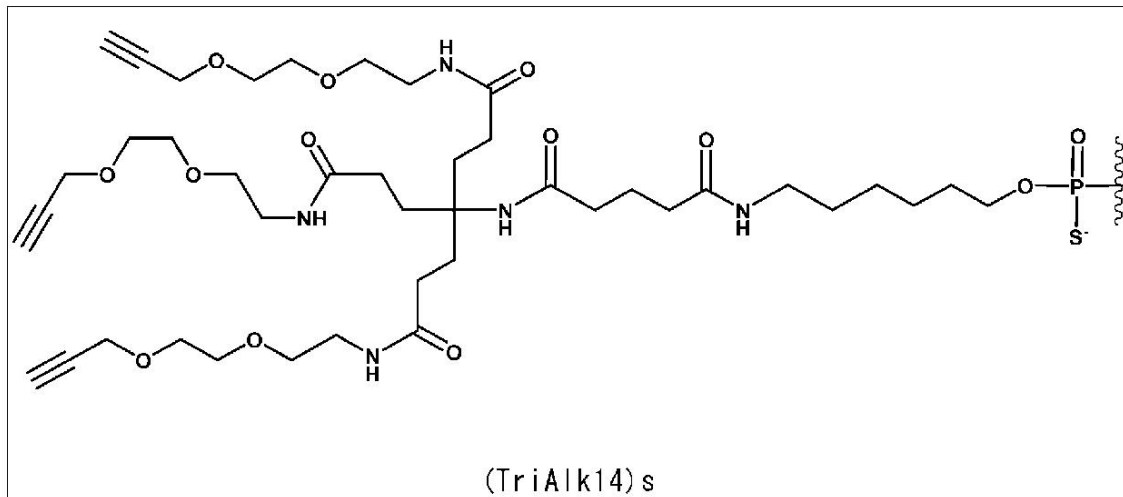
**(TriAlk13)** is a dendritic polymer with a central core consisting of a cyclobutane ring attached to a phosphorus atom (P=O, P-O<sup>-</sup>). The core is connected to three arms, each containing a terminal alkyne group (≡CH) and a phosphate group (P=O, P-O<sup>-</sup>).

**(TriAlk13)s** is a dendritic polymer with a central core consisting of a cyclobutane ring attached to a phosphorus atom (P=O, P-S<sup>-</sup>). The core is connected to three arms, each containing a terminal alkyne group (≡CH) and a phosphate group (P=O, P-S<sup>-</sup>).

**(TriAlk14)** is a dendritic polymer with a central core consisting of a cyclobutane ring attached to a phosphorus atom (P=O, P-O<sup>-</sup>). The core is connected to three arms, each containing a terminal alkyne group (≡CH) and a phosphate group (P=O, P-O<sup>-</sup>).

40

【表 1 - 1 2】



10

【 0 2 3 0】

式中、以下の：

【化 1 1 4】



20

は、カーゴ分子への結合点を示す。

【 0 2 3 1】

あるいは、当該技術分野で知られている他の連結基が使用されてもよい。好適な連結基の例はPCT出願第PCT / US19 / 18232号（その全体として参照により本明細書に援用する）に提供される。

【 0 2 3 2】

先に提供される実施形態および項目は、以下の限定されることのない例によって本明細書に例示される。

30

【 0 2 3 3】

内部連結標的化リガンド

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるインテグリン標的化リガンドがRNAi分子に結合されるかまたは連結されるとき、そのインテグリン標的化リガンドは、センス鎖またはアンチセンス鎖の内部ヌクレオチドに結合されてもよい。いくつかの実施形態において、最大15個の標的化リガンドが、RNAi剤のセンス鎖上の内部ヌクレオチドにコンジュゲートされてもよい。いくつかの実施形態において、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15個の標的化リガンドが、HIF - 2 RNAi剤のセンス鎖上の内部ヌクレオチドにコンジュゲートされてもよい。いくつかの実施形態において、1～5（例えば、1、2、3、4、または5）個の標的化リガンドが、RNAi剤のセンス鎖上の内部ヌクレオチドにコンジュゲートされる。いくつかの実施形態において、3～4個の標的化リガンドが、RNAi剤のセンス鎖上の内部ヌクレオチドにコンジュゲートされる。

40

【 0 2 3 4】

いくつかの実施形態において、内部標的化リガンドの置換は、RNAi剤の有効性または効力に影響を及ぼし得る。RNAi剤に結合される v 3インテグリン標的化リガンドのいくつかの実施形態において、標的化基は、センス鎖の5'末端にコンジュゲートされ、および少なくとも10ヌクレオチドが、センス鎖の5'末端に位置する三座の標的化基と、センス鎖上に位置する次に近い標的化リガンドとの間に配置される。いくつかの実施形態において、少なくとも5つのヌクレオチドが、センス鎖の5'末端に位置する三座の標的化基と、センス鎖上に位置する次に近い標的化リガンドとの間に配置される。

50



## 【 0 2 3 5 】

2つ以上の標的化リガンドがRNAi剤のセンス鎖に位置する内部ヌクレオチドにコンジュゲートされるいくつかの実施形態において、標的化リガンドにコンジュゲートされる2つの内部ヌクレオチドの間に位置する標的化リガンドにコンジュゲートされていない少なくとも1つのヌクレオチドの隙間がある。2つ以上の標的化リガンドがRNAi剤のセンス鎖にコンジュゲートされるいくつかの実施形態において、標的化リガンドにコンジュゲートされていない少なくとも2つのヌクレオチドが、標的化リガンドにコンジュゲートされる2つの内部ヌクレオチドの間に配置される。

## 【 0 2 3 6 】

いくつかの実施形態において、標的化リガンドは、アンチセンス鎖上のヌクレオチドと塩基対を形成する最も遠い3'ヌクレオチドから始まり、3'から5'へと付番されるセンス鎖上の2番目、4番目、および6番目のヌクレオチドにコンジュゲートされる。いくつかの実施形態において、標的化リガンドは、アンチセンス鎖と塩基対を形成するセンス鎖上の3'末端ヌクレオチドから2番目、4番目、6番目、および8番目のヌクレオチド(3' 5')にコンジュゲートされる。

## 【 0 2 3 7 】

内部標的化リガンドを取り付けるための修飾ヌクレオチドの例が以下の表Bに示される：

## 【 0 2 3 8 】

10

20

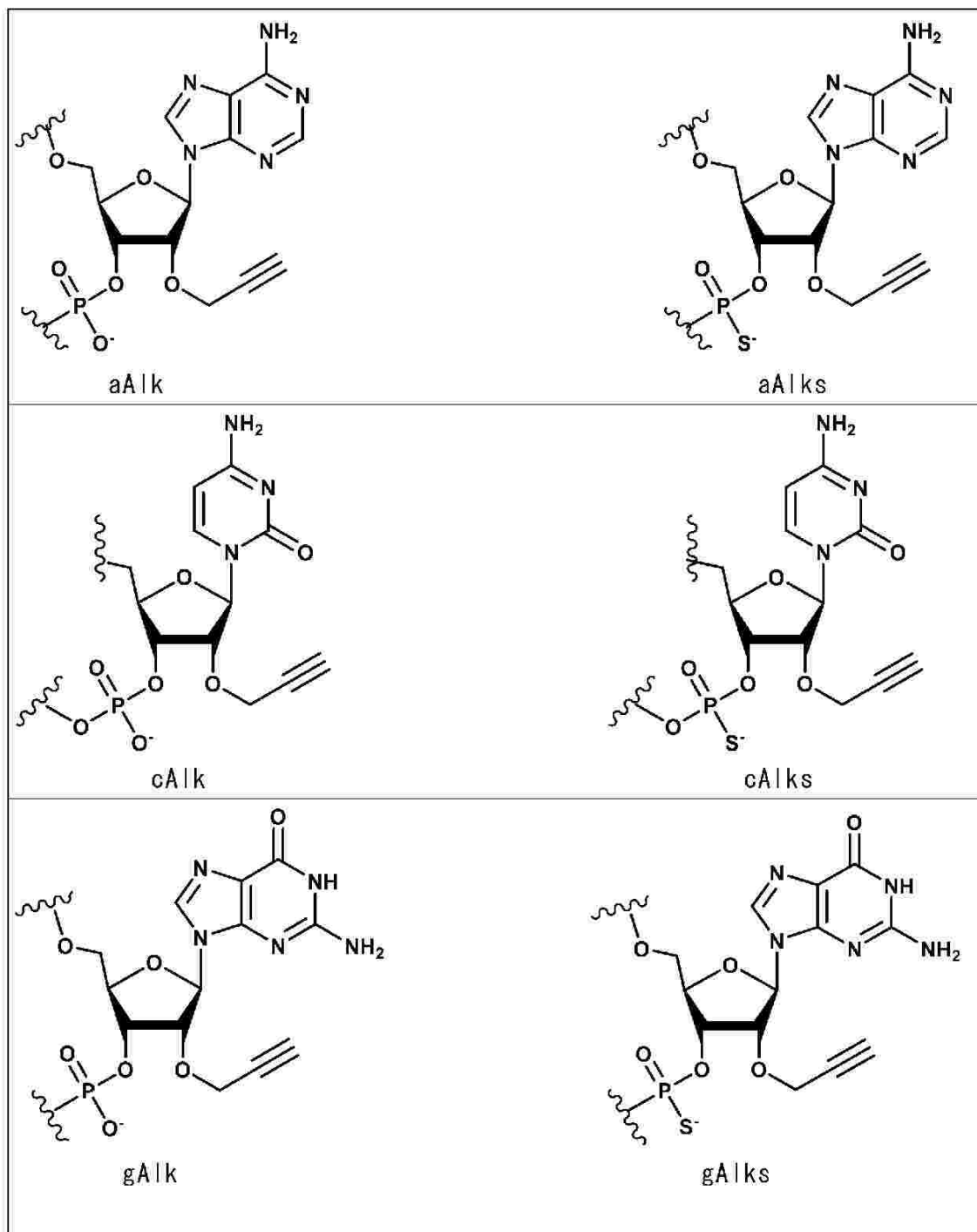
30

40

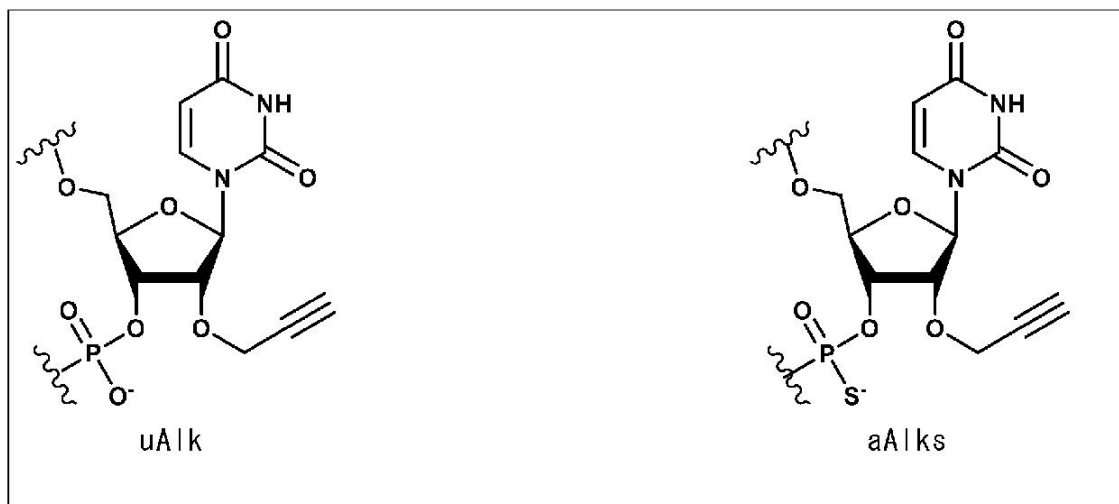
50

【表 2 - 1】

表B. 標的化リグンドを取り付けるための修飾ヌクレオチドを表す構造



【表 2 - 2】



10

## 【実施例】

## 【0239】

以下の実施例は、制限することなく、かつ、本明細書に開示される特定の実施形態を例示することを意図する。

20

## 【0240】

実施例1. インテグリン標的化リガンドの合成。

以下の実施例の合成の実験詳細に使用される略語の一部を、次のように定義する：hまたはhr = (単数もしくは複数の) 時間；min = 分；mol = (単数もしくは複数の) モル；mmol = (単数もしくは複数の) ミリモル；M = モル； $\mu$ M = マイクロモル；g = (単数もしくは複数の) グラム； $\mu$ g = (単数もしくは複数の) マイクログラム；rtまたはRT = 室温；L = (単数もしくは複数の) リットル；mL = (単数もしくは複数の) ミリリットル；wt = 重量；Et<sub>2</sub>O = ジエチルエーテル；THF = テトラヒドロフラン；DMSO = ジメチルスルホキシド；EtOAc = 酢酸エチル；Et<sub>3</sub>NまたはTEA = トリエチルアミン；i-Pr<sub>2</sub>NEt、DIPEAまたはDIEA = ジイソプロピルエチルアミン；CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>またはDCM = 塩化メチレン；CHCl<sub>3</sub> = クロロホルム；CDCl<sub>3</sub> = 重水素化クロロホルム；CCl<sub>4</sub> = 四塩化炭素；MeOH = メタノール；EtOH = エタノール；DMF = ジメチルホルムアミド；BOC = t-ブトキシカルボニル；CBZ = ベンジルオキシカルボニル；TBS = t-ブチルジメチルシリル；TBSClまたはTBDMSCl = t-ブチルジメチルシリルクロリド；TFA = トリフルオロ酢酸；DMAP = 4-ジメチルアミノピリジン；NaN<sub>3</sub> = アジ化ナトリウム；Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 硫酸ナトリウム；NaHCO<sub>3</sub> = 重炭酸ナトリウム；NaOH = 水酸化ナトリウム；MgSO<sub>4</sub> = 硫酸マグネシウム；K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> = 炭酸カリウム；KOH = 水酸化カリウム；NH<sub>4</sub>OH = 水酸化アンモニウム；NH<sub>4</sub>Cl = 塩化アンモニウム；SiO<sub>2</sub> = シリカ；Pd-C = パラジウム炭素；HCl = 塩化水素または塩酸；NMM = N-メチルモルホリン；H<sub>2</sub> = 水素ガス；KF = フッ化カリウム；EDC-HCl = N-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミドヒドロクロリド；MTBE = メチル-tert-ブチルエーテル；MeOH = メタノール；Ar = アルゴン；N<sub>2</sub> = 窒素；SiO<sub>2</sub> = シリカ；R<sub>T</sub> = 保持時間；PTSA = para-トルエンスルホン酸；PPTS = ピリジニウムpara-トルエンスルホナート。

30

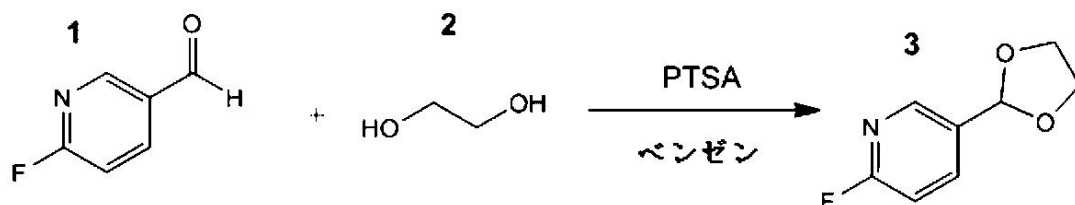
40

## 【0241】

構造1c((S)-3-(6-((1-アジド-15-オキソ-3,6,9,12-テトラオキサ-1,6-アザノナデカン-19-イル)オキシ)ピリジン-3-イル)-3-(2-オキソ-3-(3-(5,6,7,8-テトラヒドロ-1,8-ナフチリジン-2-イル)プロピル)イミダゾリジン-1-イル)プロパン酸)の合成

50

## 【化 1 1 5】

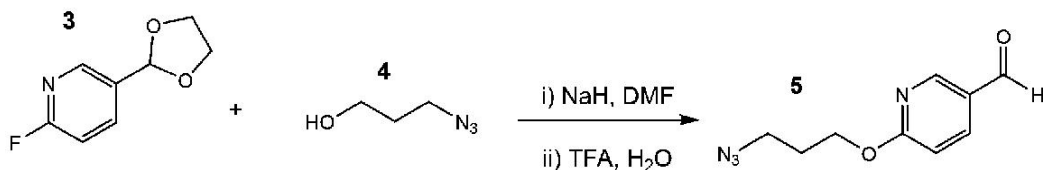


## 【 0 2 4 2】

ベンゼン (25mL) 中の化合物1 (1.03g、8.23mmol)、化合物2 (0.92g 14.8mol)、およびPTSA水和物 (156mg、0.82mmol) を含有する混合物を、ディーンスターク装置内で一晩還流する。次の朝、反応混合物を、飽和重炭酸ナトリウム中に注ぎ入れ、そして、酢酸エチルをそれに続いて加えた。有機相を、分離し、硫酸ナトリウムを介して濾過し、そして、濃縮して、95%の収率で化合物3を得、それに続いて、さらなる精製なしで使用した。

10

## 【化 1 1 6】



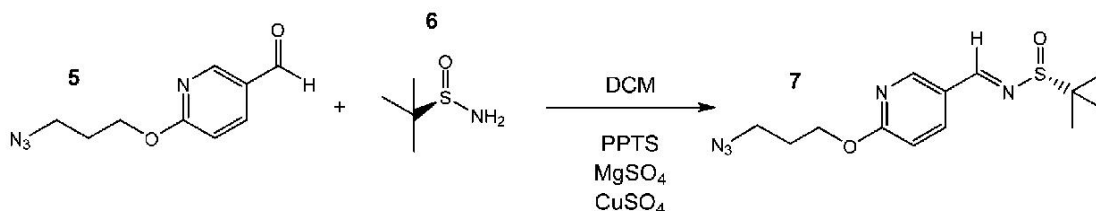
20

## 【 0 2 4 3】

DMF (100mL) 中の化合物4 (5.39g、53.3mmol) および3 モレキュラーシーブを含有する溶液に、水素化ナトリウム (60wt%、2.13g、53.3mmol) を加え、そして、反応を1時間かき混ぜた。DMF (20mL) 中の化合物3 (7.52g、7.52g) の溶液を、それに続いて加え、そして、懸濁液を80 にて一晩加熱した。完了時に、懸濁液を、綿栓を介して濾過し、そして、減圧下で濃縮した。残渣を、ジエチルエーテルと水の間で分配し、および、有機相を分離し、硫酸ナトリウムを介して濾過し、そして、減圧下で濃縮した。残渣を、20mlの、TFA中の10%のH<sub>2</sub>Oで処理し、そして、30分間撹拌した。完了時に、溶液を0 に冷却し、そして、pHを、6MのNaOHで11に調整し、そこで、生成物をオイルとして沈殿させた。化合物5を、ジエチルエーテルによって油性懸濁液から3回抽出した。有機相を合わせ、硫酸ナトリウムを介して濾過し、そして、濃縮した。次に、ヘキサン中の酢酸エチルのグラジエントで溶出するシリカによる分離によって、化合物5を26%の収率で単離した。

30

## 【化 1 1 7】



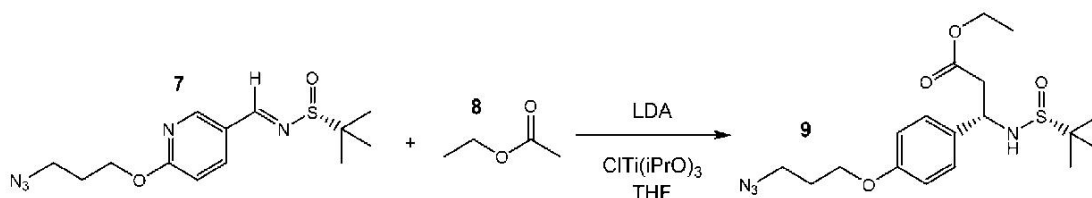
40

## 【 0 2 4 4】

DCM (22mL) 中に化合物5 (2.29g、9.94mmol)、化合物6 (4.82g、39.8mmol)、PPTS (125mg、0.50mmol)、硫酸マグネシウム (3g、24.9mmol)、硫酸銅 (3.97g、24.9mmol)、および3オングストロームのモレキュラーシーブを含有する混合物を、還流温度にて一晩加熱した。完了時に、混合物を、濾過し、そして、減圧下で濃縮した。次に、ヘキサン中の酢酸エチルのグラジエントで溶出するシリカによる分離によって、化合物7を76%の収率で単離した。

50

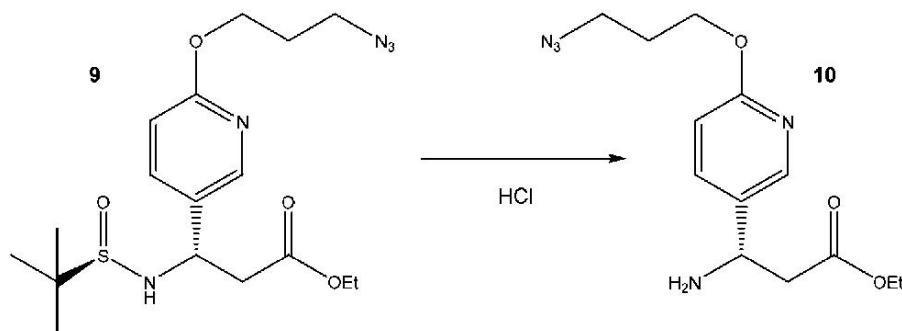
## 【化 1 1 8】



## 【 0 2 4 5】

火力乾燥させたフラスコに、THF (40mL) とジイソプロピルアミン (2.29g、22.6 mmol) を投入した。それを -20 に冷やし、そして、n-BuLi (2.5M、8.64mL、21.6 mmol) を、カニユレを介して加えた。溶液を -20 にて10分間攪拌し、次に、-78 まで冷やした。化合物8 (2.02mL、20.6mmol) を、激しく攪拌しながら滴下して加えた。添加後に、溶液を -78 にて30分間攪拌した。次に、THF (10mL) 中の溶液としての  $\text{ClTi}(\text{iPrO})_3$  (11.26g、43.2mmol) を、激しく攪拌しながら約10分間かけて添加漏斗を介して加えた。反応物を -78 にて30分間攪拌した。最後に、化合物7 (2.29g、6.86mmol) をTHF中の懸濁液として滴下して加え、そして、反応が完了するまで -78 にて1.25時間攪拌した。 -78 にて反応物に、飽和塩化アンモニウム水溶液を加えた。次に、反応物を冷却から外し、そして、その水相を徐々に解凍して、クエンチした (黄橙色が見えなくなる)。混合物をEtOAcと飽和塩化アンモニウム水溶液の間で分配した。有機相を分離し、そして、水相をEtOAcで2回抽出した。有機相を合わせ、塩水を介して、次に、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、次に、濾過し、そして、濃縮した。残渣を、ヘキサン中の酢酸エチルのグラジエントで溶出するシリカによって精製した。精製後に、化合物9を、75%の収率で単一ジアステレオマとして得た。

## 【化 1 1 9】



## 【 0 2 4 6】

MeOH (3.2mL) 中の化合物9 (1.28g、3.21mmol) を、ジオキサン (4M、3.2mL、12.9mmol) 中のHClで処理し、そして、室温にて30分間攪拌した。完了時に、反応混合物を水で希釈し、ジエチルエーテルによって洗浄した。それに続いて、pHを、2NのNaOH水溶液を使用して11に調整し、そして、生成物を酢酸エチルによって抽出した。有機相を、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、そして、濃縮して、化合物10を92%の収率で得、それに続いて、それをさらなる精製なしで使用した。

10

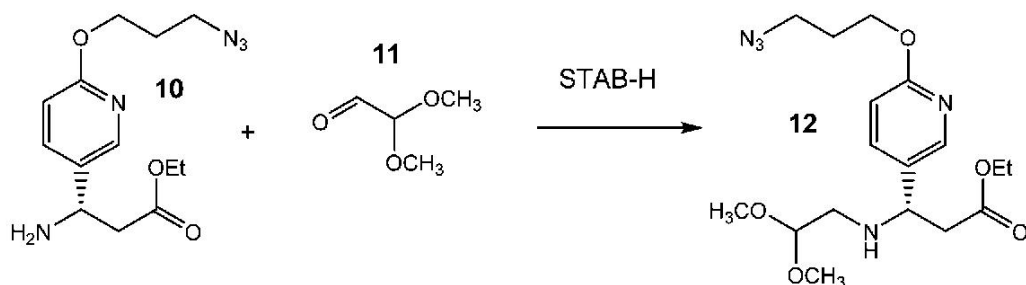
20

30

40

50

## 【化 1 2 0】

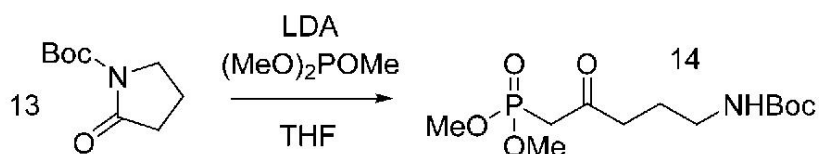


10

## 【 0 2 4 7】

15 にてTHF (6mL) 中の化合物10 (0.78g、2.67mmol) と化合物11 (0.60g、3.46mmol) の混合物に、固体としてSTAB - H (1.29g、6.12mmol) を分割した形で加えた。添加後に、冷却を外し、そして、混合物を完了まで約2.5時間撹拌した。反応物を、重炭酸ナトリウムの飽和水溶液の添加によってクエンチし、そして、pHを9にした。生成物をEtOAcで3回抽出し、有機相を、合わせて、塩水を用いて乾燥させ、次に、硫酸ナトリウムを介して濾過し、そして、濃縮した。ヘキサン中の酢酸エチルのグラジエントで溶出するシリカによる分離によって、化合物12を85%の収率で単離した。

## 【化 1 2 1】



20

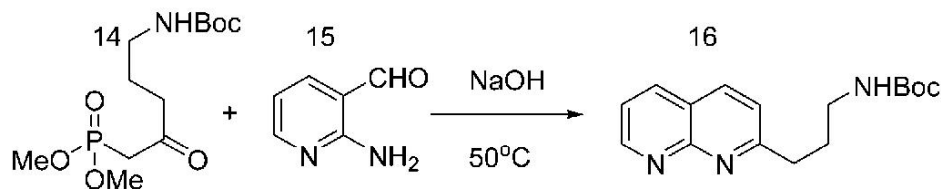
## 【 0 2 4 8】

THF (35mL) 中のDIPEA (7.53mL、53.75mmol) に、オープン乾燥した気密シリンジを介して - 10 にて2分間かけて n - BuLi (2.5M、19.9mL、49.8mmol) を加えた。混合物を、 - 10 にて10分間撹拌し、次に、 - 60 に冷やし、そして、THF (8mL) 中のメチルホスホン酸ジメチル (6.42g、51.8mmol) の溶液を5 ~ 10分間かけて滴下して加えた。 - 60 にて約1時間エイジングした後に、化合物13 (7.37g、39.82mmol) を、THF (15mL) 中の溶液として - 60 にて5分間かけて滴下して加えた。反応混合物を、約 - 60 にて1時間、次に、 - 41 にて1.5時間撹拌した。反応物を、2.6当量のH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2.0M) の添加によってクエンチし、そして、酢酸エチル (~ 50mL) によって3回抽出した。有機相を合わせ、塩水を用いて乾燥させ、硫酸ナトリウムを介して濾過し、簡単に濃縮して、粗生成物の重量を測定して、そして、NMRのためにサンプルを得た。乾燥重量の測定した時点で、化合物14を、さらなる精製なしで次の反応に使用するために、MeOH中に溶解した。75.83%の収率であることを計算した。粗生成物のwt / wt%は、NMRによると76.3%であった。<sup>1</sup>H NMR: 400 MHz CDCl<sub>3</sub> 4.75 (s, 1 H), 3.81 (s, 3 H), 3.78 (s, 3 H), 3.10 - 3.14 (m, 2 H), 3.04 - 3.09 (m, 2 H), 2.68 (t, 2 H), 1.82-1.75 (m, 2 H), 1.44 (s, 9 H)。

30

40

## 【化 1 2 2】



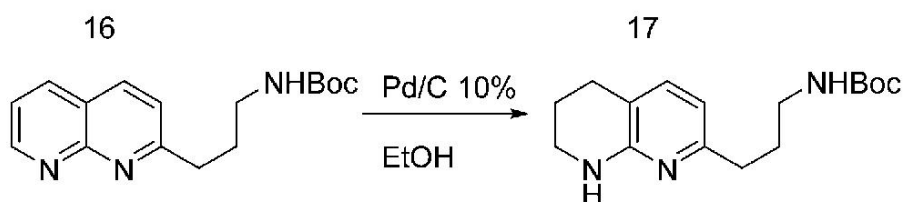
## 【 0 2 4 9】

MeOH (40mL) 中の化合物14 (~ 12gの粗生成物のNMRからの重量で9.33g、30.16

50

mmol) に、水 (1.5 mL) 中の NaOH (1.45 g、36.2 mmol) 水溶液を加えた。混合物を 50 に加熱し、そして、化合物 15 (2.76 g、22.62 mmol) を加えた。30 分間撹拌した後に、化合物 15 (736 mg、6.03 mmol) の第二の部分を加え、そして、反応混合物を 50 にて一晩撹拌した。次に、反応混合物をオイルまで濃縮し、2 倍量の EtOAc と 1 倍量の H<sub>2</sub>O の間で分配した。有機相を分離し、1 倍量の水で洗浄した。水性洗浄物を合わせ、そして、EtOAc で逆抽出した (2x、1 倍量)。合わせた有機相を、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、そして、濃縮した。粗生成物を約 20 g のシリカ上で乾燥させ、1% のトリエチルアミンを含有する、ヘキサン中の酢酸エチルのグラジエントで溶出するシリカによる分離によって、化合物 16 を、69% の収率で単離した。<sup>1</sup>H NMR: 400 MHz CDCl<sub>3</sub> 9.09 (dd, 1 H), 8.17 (dd, 1 H), 8.12 (d, 1 H), 7.46 (dd, 1 H), 7.41 (d, 1 H), 4.78 (s, 1 H), 3.24 (q, 2 H), 3.10 (t, 2 H), 2.12 (quin, 2 H), 1.43 (s, 9 H)。

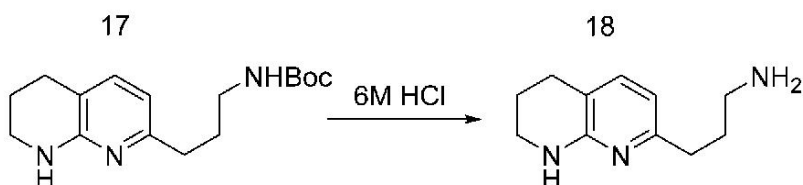
## 【化 1 2 3】



## 【0 2 5 0】

EtOH (50 mL) 中の化合物 16 (5.98 g、20.8 mmol) の溶液に、パラジウム (カーボン上に 10%、2.22 g、2.08 mmol) と 1 気圧にて水素を投入した。反応混合物を室温にて一晩撹拌した。完了時に、反応混合物を、Celite (登録商標) を介して濾過し、そして、濃縮した。1% のトリエチルアミンを含有する、ヘキサン中の酢酸エチルのグラジエントで溶出するシリカによる分離によって、化合物 17 を 79% の収率で単離した。<sup>1</sup>H NMR: 400 MHz CDCl<sub>3</sub> 7.05 (d, 1 H), 6.34 (d, 1 H), 5.48 (s, 1 H), 4.81 (s, 1 H), 3.36 - 3.43 (m, 2 H), 3.16 (q, 2 H), 2.68 (t, 2 H), 2.59 (t, 2 H), 1.90 (dt, 2 H), 1.83 (quin, 2 H), 1.44 (s, 9 H)。

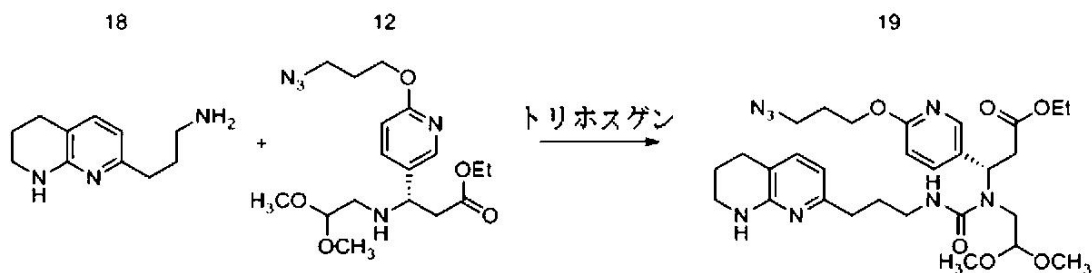
## 【化 1 2 4】



## 【0 2 5 1】

化合物 17 (4.81 g、16.53 mmol) を、6M の HCl (16.4 mL) 水溶液で溶解し、そして、42 にて 2 時間加熱した。次に、6M の HCl (2.8 mL) の追加部分を加え、そして、反応混合物をさらに 2 時間撹拌した。反応物に、塩化ナトリウムを加え、続いて、生成物がオイルとして沈殿するまで 2N の NaOH 水溶液を加えた (pH は 12 超であった)。混合物を 2-ブタノールで 3 回抽出した。合わせた有機相を、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、そして、濃縮した。化合物 18 を 85% の収率で得、続いてさらなる精製なしで使用した。<sup>1</sup>H NMR: 400 MHz CDCl<sub>3</sub> 7.06 (d, 1 H), 6.35 (d, 1 H), 4.83 (s, 1 H), 3.35 - 3.46 (m, 2 H), 2.75 - 2.67 (m, 4 H), 2.58 (t, 2 H), 1.88 - 1.95 (m, 2 H), 1.84 - 1.76 (m, 4 H)。

## 【化 1 2 5】



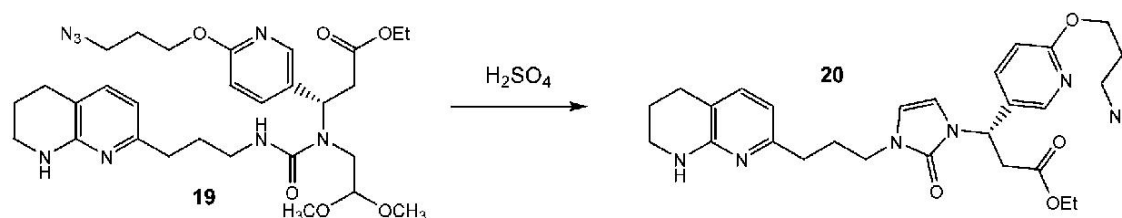
10

## 【 0 2 5 2】

- 10 にて、火力乾燥させたフラスコ内のTHF (0.9mL) 中のトリホスゲン (85mg、0.28mmol) の溶液に、THF (0.5mL) 中の化合物18 (236mg、0.62mmol) とTEA (0.134mL、0.96mmol) の溶液を滴下して加えた。反応混合物を室温に温めた。TLCで反応完了が示された後に、追加のTEA (0.134mL) を加え、続いて、固体として化合物12 (166mg、0.87mmol) を加えた。不均一な混合物を、激しく撹拌しながら50 にて2時間加熱した。完了時に、反応混合物を、1倍量の水でクエンチし、EtOAcで3回抽出した。合わせた有機相を、塩水を用いて乾燥させ、硫酸ナトリウムを介して濾過し、そして、濃縮した。化合物19を100%の収率と仮定して得、それに続いてさらなる精製なしで使用した。

20

## 【化 1 2 6】

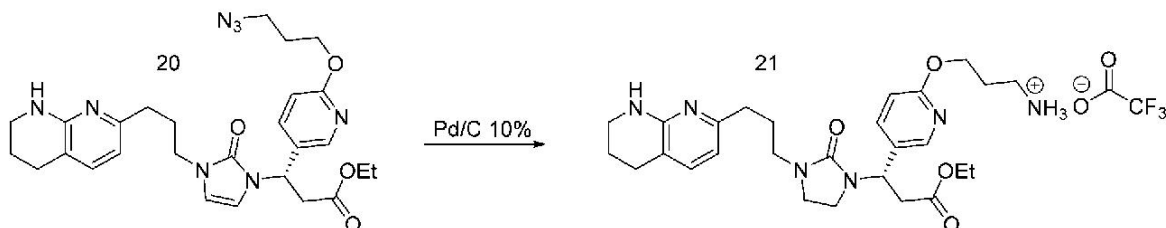


## 【 0 2 5 3】

THF (37mL) 中に溶解した粗化合物19 (400mg、0.62mmolと仮定) にH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2M、0.6mL) を加え、そして、混合物を室温にて一晩撹拌した。次の朝、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.65当量) の追加部分を加えた。4時間後に、反応物は完了した。反応混合物を酢酸エチルで希釈した。有機相を分離し、そして、水相を酢酸エチルで1回逆抽出した。合わせた有機相を、硫酸ナトリウムを介して濾過し、そして、濃縮した。DCM中のMeOHのグラジエントで溶出するシリカによる分離によって、化合物20を75%の収率で単離した。

30

## 【化 1 2 7】



40

## 【 0 2 5 4】

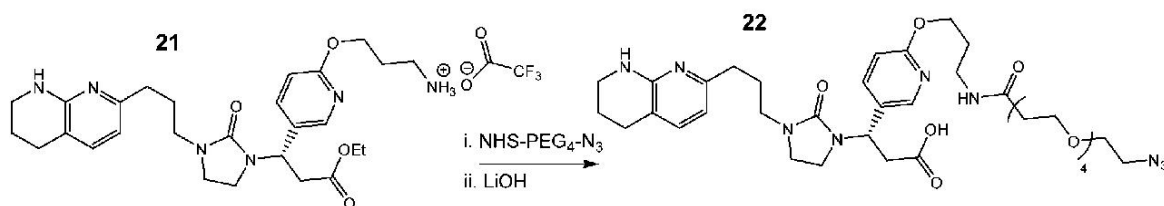
エタノール (9mL) 中の化合物20 (251mg、0.47mmol) とPd/C (10wt%、100mg、0.094mmol) の懸濁液に、1気圧までH<sub>2</sub>を投入し、35 にて一晩撹拌した。完了時に、パラジウムをCelite (登録商標) を介した濾過によって取り除いた。1%のTFAを含有する、H<sub>2</sub>O中のアセトニトリルのグラジエントで溶出するC18 5u 19 x 250mm BEH

50



カラム (Waters Corp.) を使用した逆相HPLC法によって、化合物21を、TFA塩として20%の収率で単離した。

【化128】



10

【0255】

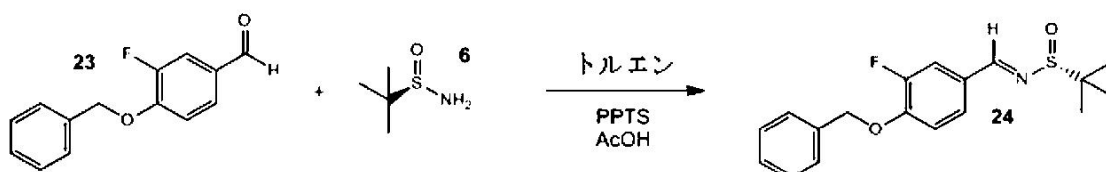
DCM (275  $\mu$ L) 中の化合物21 (61mg、0.097mmol) の溶液に、TEA (8  $\mu$ L、0.24 mmol) を加え、続いてDCM (250  $\mu$ L) 中の溶液としてNHS - PEG<sub>4</sub> - N<sub>3</sub> (41.4mg、0.11mmol) を加えた。反応混合物を15分間攪拌し、LC - MSをチェックしたが、それは反応が完了したことを示した。すべての揮発物を除去し、そして、残渣をEtOH (0.4mL) と水 (0.4mL) で溶解した。LiOH (11.2mg、0.47mmol) を加え、そして、反応混合物を40  $^{\circ}$ Cにて2時間加熱した。完了時に、反応混合物を減圧下で濃縮した。1%のTFAを含有するH<sub>2</sub>O中のアセトニトリルのグラジエントで溶出するC18 5 $\mu$  19 $\times$ 250mm BEH カラム (Waters Corp.) を使用した逆相HPLC法によって、化合物22 (構造1c) を42%の収率で単離した。

20

【0256】

構造2c ( (S) - 3 - (4 - (2 - (2 - (2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ) エトキシ) エトキシ) - 3 - フルオロフェニル) - 3 - (2 - オキソ - 3 - (3 - (5,6,7,8 - テトラヒドロ - 1,8 - ナフチリジン - 2 - イル) プロピル) イミダゾリジン - 1 - イル) プロパン酸) の合成。

【化129】



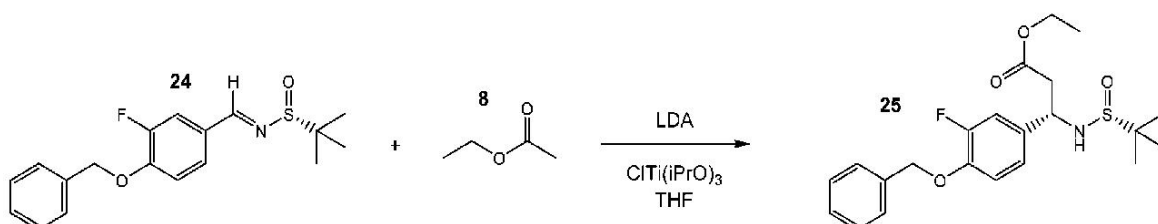
30

【0257】

トルエン (80mL) 中の化合物23 (10g、43.4mmol) の溶液に、化合物6 (21.1g、0.17mol)、PPTS (0.55g、2.2mmol) を加え、次に、酢酸 (1.24mL、21.7mmol) を加えた。反応器にディーンスタークトラップを装着し、次に、一晚還流温度に加熱した。完了時に、反応混合物を、濃縮し、60グラムのシリカ上で乾燥させ、そして、ヘキサン中の酢酸エチルのグラジエントを用いたSiO<sub>2</sub>により精製して、化合物24を66%の収率で得た。<sup>1</sup>H NMR: 400 MHz CDCl<sub>3</sub> 8.47 (s, 1 H), 7.68 (d, 1 H), 7.31 - 7.56 (m, 6 H), 6.98 - 7.16 (m, 1 H), 5.23 (s, 2 H), 1.26 (s, 9 H)。

40

【化130】

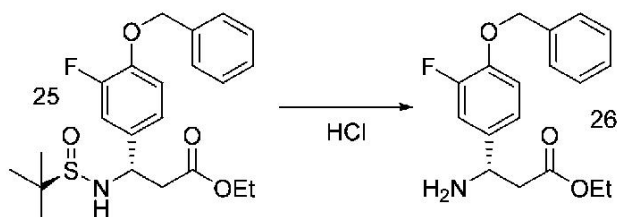


50

## 【 0 2 5 8 】

火力乾燥させたフラスコにTHF (190mL) とDIPEA (9.07g、89.7mmol) を投入し、 $-20^{\circ}\text{C}$  に冷やし、次に、カニューレを介して  $n\text{-BuLi}$  (2.5M、34.2mL、85.6mmol) を投入した。溶液を  $-20^{\circ}\text{C}$  にて10分間攪拌し、次に、 $-78^{\circ}\text{C}$  まで冷やした。化合物8 (8mL、81.5mmol) を、激しく攪拌しながら滴下して加えた。添加後に、 $-78^{\circ}\text{C}$  にて30分間攪拌した。次に、THF (40mL) 中の溶液として  $\text{ClTi}(\text{iPrO})_3$  (44.6g、0.171mol) を10分間かけて添加漏斗を介して加えた。反応物を  $-78^{\circ}\text{C}$  にて30分間攪拌した。最後に、化合物24 (9.06g、27.2mmol) を、THF (20mL) 中の懸濁液として滴下して加え、そして、反応が完了するまで  $-78^{\circ}\text{C}$  にて1.25時間攪拌した。 $-78^{\circ}\text{C}$  にて反応物に、飽和塩化アンモニウム水溶液を加えた。次に、反応物を冷却から外し、そして、その水相を徐々に解凍して、クエンチした (黄橙色が見えなくなる)。混合物を  $\text{EtOAc}$  と飽和塩化アンモニウム水溶液の間で分配した。有機相を分離し、そして、水相を  $\text{EtOAc}$  で2回洗浄した。有機相を合わせ、塩水を介して、次に、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、次に、濾過し、そして、濃縮した。ヘキサン中の酢酸エチルのグラジエントで溶出するシリカによる分離によって、化合物25を単一ジアステレオマとして70%の収率で得た。 $^1\text{H NMR}$ : 400 MHz  $\text{CDCl}_3$  7.31 - 7.48 (m, 5 H), 7.09 (dd, 1 H), 6.89 - 7.04 (m, 2 H), 5.13 (s, 2 H), 4.59 - 4.76 (m, 2 H), 4.13 (q, 2 H), 2.81 (dd, 2 H), 1.21 - 1.25 (m, 12 H)。

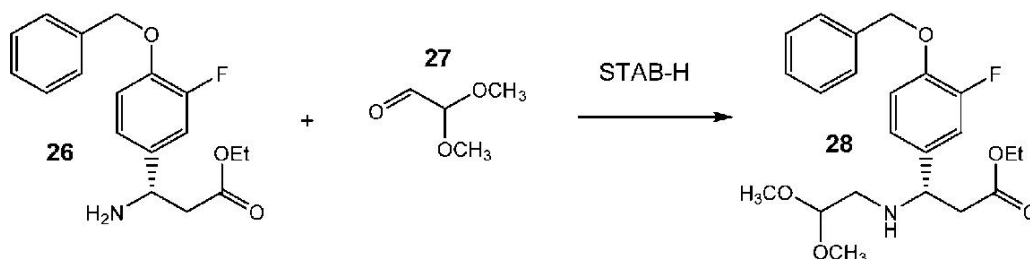
## 【 化 1 3 1 】



## 【 0 2 5 9 】

化合物25 (8.07g、19.1mmol) に、 $\text{HCl}$  水溶液 (6M、20.7mL、0.124mol) を加え、続いて、 $\text{MeOH}$  (60mL) を加えた。均一系溶液を得るまでTHFを加え、そして、反応混合物を室温にて6時間攪拌した。反応混合物を、2Nの $\text{NaOH}$ 水溶液でpH10まで塩基性化し、次に、 $\text{EtOAc}$  で3回抽出した。合わせた有機相を、塩水を用いて乾燥させ、硫酸ナトリウムを介して濾過し、そして、濃縮した。化合物26を95%の収率で得、続いて、それをさらなる精製なしで使用した。 $^1\text{H NMR}$ : 400 MHz  $\text{CDCl}_3$  7.28 - 7.46 (m, 6 H), 7.18 (d, 1 H), 6.99 (t, 1 H), 5.11 (s, 2 H), 4.57 (t, 1 H), 4.09 (q, 2 H), 2.97 - 3.09 (m, 1 H), 2.81 - 2.93 (m, 1 H), 1.18 (t, 3 H)。

## 【 化 1 3 2 】

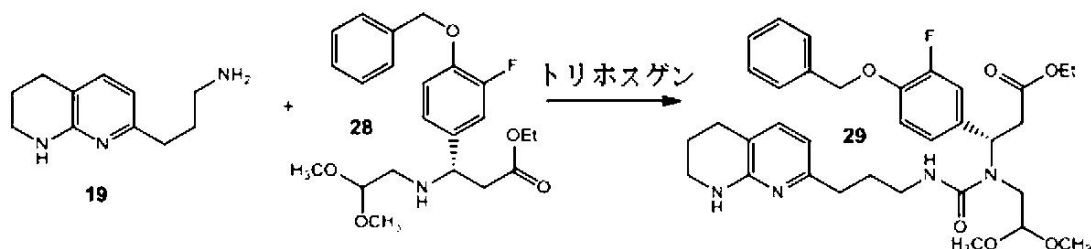


## 【 0 2 6 0 】

$0^{\circ}\text{C}$  にてTHF (40mL) 中の化合物26 (5.76g、18.2mmol) と化合物27 (4.09g、23.6mmol) の混合物に、固体としてSTAB-H (8.85g、41.8mmol) を分割した形で加えた。最後の添加後に、冷却を外し、そして、混合物を完了まで約2.5時間攪拌した。反応混合物を、重炭酸ナトリウムの飽和水溶液の添加によってクエンチした。混合物を  $\text{EtOAc}$

で3回抽出し、合わせた有機相を、塩水を用いて乾燥させ、硫酸ナトリウムを介して濾過し、そして、濃縮した。ヘキサン中の酢酸エチルのグラジエントで溶出するシリカによる分離によって、化合物28を73%の収率で単離した。<sup>1</sup>H NMR: 400 MHz CDCl<sub>3</sub> 7.30 - 7.49 (m, 5 H), 7.11 (dd, 1 H), 6.88 - 7.02 (m, 2 H), 5.13 (s, 2 H), 4.40 (t, 1 H), 4.10 (q, 2 H), 4.00 (dd, 1 H), 3.35 (s, 3 H), 3.31 (s, 3 H), 2.47 - 2.75 (m, 4 H), 1.20 (t, 3 H)。

【化133】



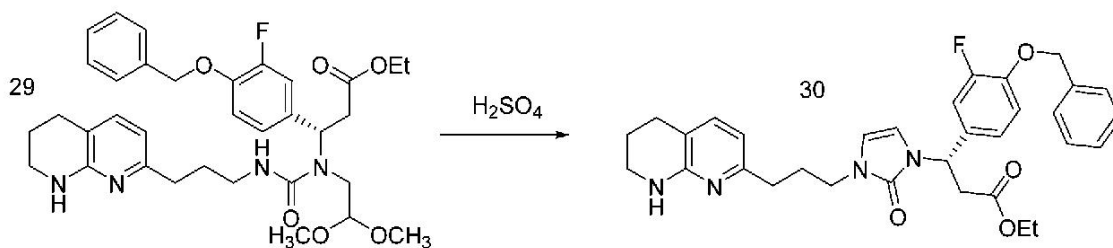
10

【0261】

- 10 にて、火力乾燥させたフラスコ内のTHF (24mL) 中のトリホスゲン (1.2g、4.04mmol) の溶液に、THF (6mL) 中の化合物19 (3.64g、8.99mmol) とTEA (1.94 mmol、13.9mmol) の溶液を滴下して加えた。反応混合物を室温に温めた。TLCで反応完了が示された後に、追加のTEA (3.3mL、23.6mmol) を加え、続いて、固体として化合物28 (2.61g、13.7mmol) を加えた。不均一な混合物を、激しく撹拌しながら50にて2時間加熱した。完了時に、反応混合物を、1倍量の水でクエンチし、EtOAcで3回抽出した。合わせた有機相を、塩水を用いて乾燥させ、硫酸ナトリウムを介して濾過し、そして、濃縮した。化合物29を100%の収率と仮定して得、続いて、粗生成物をさらなる精製なしで使用した。

20

【化134】



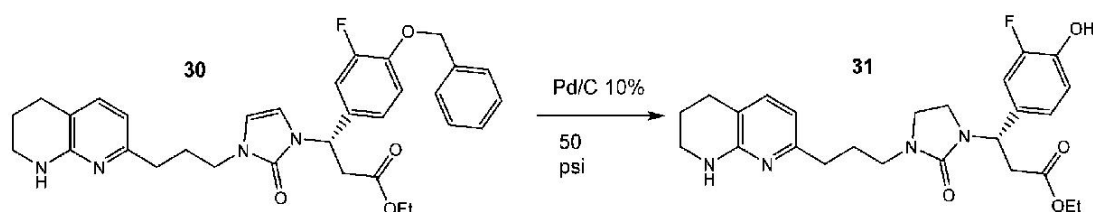
30

【0262】

THF (37mL) 中に溶解した化合物29 (5.59g、8.97mmol) に、水 (0.8mL) とH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2M、8.07ml、16.2mmol) を加え、そして、反応混合物を28 にて一晚撹拌した。次の朝、混合物のpHを、重炭酸ナトリウムを使用して9に調整し、DCMで3回抽出した。合わせた有機相を、塩水を用いて乾燥させ、硫酸ナトリウムを介して濾過し、そして、濃縮した。1%のTEAを含有するDCM中のMeOHのグラジエントで溶出するシリカによる分離によって、化合物30を82%の収率で単離した。

40

【化135】

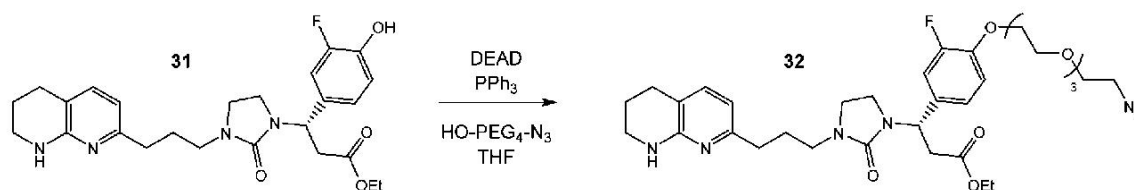


50

## 【0263】

EtOH (30mL) 中に溶解した化合物30 (4.13g、7.39mmol) に、Degussa (登録商標) パラジウム (10wt%、3.15g、2.96mmol) および50psiまで水素を投入した。混合物を室温にて一晩撹拌した。翌日、反応は64%完了した。反応混合物を、Celite (登録商標) を介して濾過し、そして、濃縮した。残渣をEtOH中に溶解し、そして、パラジウム (10wt%、1.57g、1.48mmol) および50psiまで水素を投入した。48時間撹拌した後に、反応混合物を、30 に加熱し、さらに24時間撹拌した。完了時に、懸濁液を、Celite (登録商標) を介して濾過し、そして、すべての揮発物を真空下で除去した。残渣を、DCM中のMeOHのグラジエントで溶出するシリカにより精製して、化合物31を72%の収率で得た。<sup>1</sup>H NMR: 400 MHz DMSO-d<sub>6</sub> 9.88 (s, 1 H), 7.02 - 7.14 (m, 2 H), 6.86 - 6.93 (m, 2 H), 6.50 - 6.76 (m, 1 H), 6.31 (d, 1 H), 5.17 (t, 1 H), 4.00 (q, 2 H), 3.23 - 3.28 (m, 4 H), 2.79 - 3.18 (m, 7 H), 2.61 (t, 2 H), 2.41 (t, 2 H), 1.65 - 1.78 (m, 4 H), 1.09 (t, 3 H)。

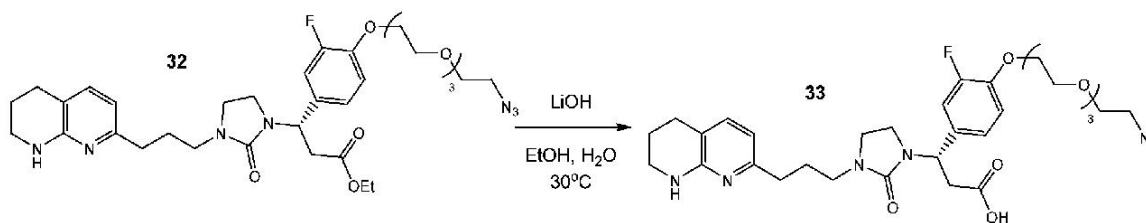
## 【化136】



## 【0264】

- 10 にてTHF (0.47mL) 中のPPh<sub>3</sub> (699mg、2.66mmol) の溶液に、DEADの溶液を滴下して加えた。混合物を室温に温め、そして、化合物31 (600mg、1.33mmol) とHO-PEG<sub>4</sub>-N<sub>3</sub> (466mg、3.06mmol) の純粋な (neat) 混合物に加え、一晩撹拌した。次に、反応混合物を減圧下で濃縮し、そして、残渣を、DCM中のMeOHのグラジエントで溶出するシリカにより精製し、そして、化合物32を50%の収率で得た。<sup>1</sup>H NMR: 400 MHz DMSO-d<sub>6</sub> 7.10 - 7.19 (m, 2 H), 6.97 - 7.06 (m, 2 H), 6.18 - 6.31 (m, 2 H), 5.20 (t, 1 H), 4.13 - 4.16 (m, 1 H), 3.98 - 4.04 (m, 2 H), 3.71 - 3.80 (m, 2 H), 3.52 - 3.61 (m, 8 H), 3.38 - 3.37 (m, 5 H), 3.10 - 3.25 (m, 5 H), 2.79 - 3.08 (m, 5 H), 2.59 (t, 2 H), 2.31 - 2.42 (m, 2 H), 1.65 - 1.75 (m, 4 H), 1.10 (t, 3 H)。

## 【化137】



## 【0265】

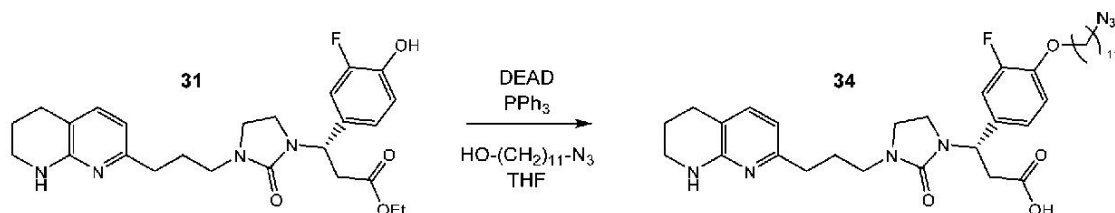
化合物32 (826mg、1.23mmol) に、EtOH (3mL) とH<sub>2</sub>O (3mL) を加え、それに続いて、LiOH (97mg、4.05mmol) を加えた。混合物を30 にて一晩撹拌した。完了時に、混合物を、6MのHCl水溶液を使用してpH = 5に中和し、そして、濃縮した。残渣を、0.1%含有する水中のアセトニトリルのグラジエントで溶出するPhenomenex Gemini C18, 50x250mm, 10μmカラムを用いた逆相HPLCによって精製し、そして、化合物33 (構造2c) を81%の収率で得た。<sup>1</sup>H NMR: 400 MHz D<sub>2</sub>O 7.30 (d, 1 H), 7.01 - 7.19 (m, 3 H), 6.45 (d, 1 H), 5.24 (t, 1 H), 4.14 - 4.32 (m, 2 H), 3.84 - 3.92 (m, 2 H), 3.59 - 3.77 (m, 10 H), 3.14 - 3.45 (m, 8 H), .02 - 3.12 (m, 1 H), 2.97

(d, 2 H), 2.85 (q, 1 H), 2.50 - 2.72 (m, 4 H), 1.68 - 1.94 (m, 4 H)。

【0266】

構造2.1c((S)-3-(4-(11-アジドウンデシル)オキシ)-3-フルオロフェニル)-3-(2-オキソ-3-(3-(5,6,7,8-テトラヒドロ-1,8-ナフチリジン-2-イル)プロピル)イミダゾリジン-1-イル)プロパン酸)の合成

【化138】



10

【0267】

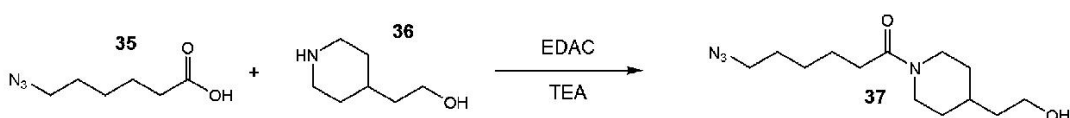
THF中のPPh<sub>3</sub>の溶液に、室温にてDEADの溶液を滴下して加えた。混合物を、化合物31とOH-(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-N<sub>3</sub>の混合物を含有するバイアルに移し、そして、反応混合物を室温にて一晩撹拌した。揮発物を反応混合物から除去し、そして、粗生成物をEtOH中に溶解した。LiOHをH<sub>2</sub>O中の溶液として加え、そして、反応混合物が均一系になるまで、追加の水/EtOHを加えた。室温にて1.5時間撹拌した後に、混合物を、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を用いてpH3に酸性化し、濃縮し、そして、逆相HPLC(Phenomenex Gemini C18, 50x250mm, 10 μm, 0.1%のTFA中のアセトニトリル/水、勾配溶出)によって精製した。

20

【0268】

構造2.2c((S)-3-(4-(2-(1-(6-アジドヘキサノイル)ピペリジン-4-イル)エトキシ)-3-フルオロフェニル)-3-(2-オキソ-3-(3-(5,6,7,8-テトラヒドロ-1,8-ナフチリジン-2-イル)プロピル)イミダゾリジン-1-イル)プロパン酸)の合成

【化139】



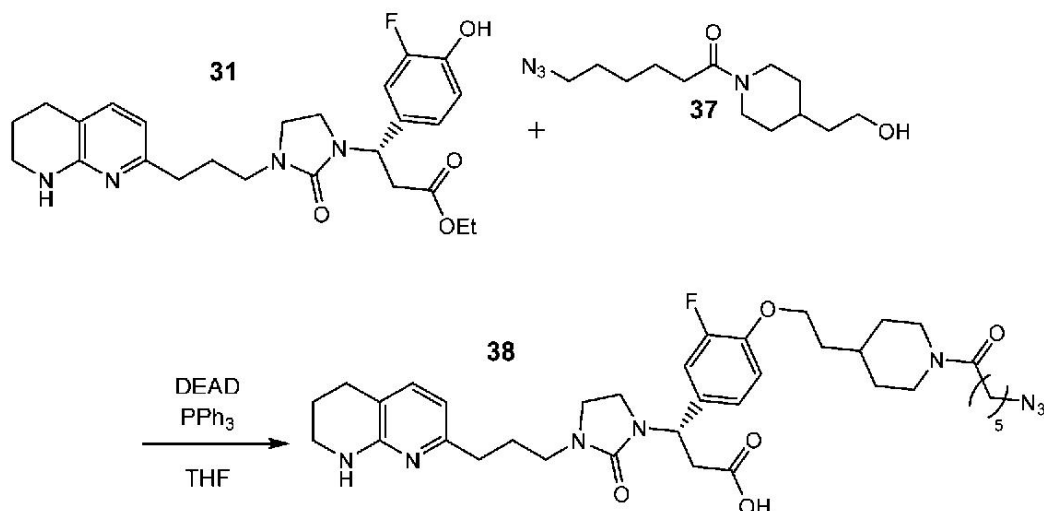
30

【0269】

0 にてDCM中に溶解した化合物35を、EDACで処理し、そして、アセトニトリルを溶解性の補助のために加えた。5分後に、TEAと化合物36を加え、冷却を外し、そして、撹拌を2時間続けた。完了時に、飽和塩化アンモニウムを加え、そして、有機相を、分離し、硫酸ナトリウムを介して濾過し、濃縮した。得られた粗生成物を、それに続いてさらなる精製なしで使用した。

40

## 【化 1 4 0】



10

## 【 0 2 7 0】

THF中の $\text{PPh}_3$ の溶液に、激しく撹拌しながら室温にてDEADの溶液を滴下して加えた。混合物を、化合物31と化合物37の混合物を含有するバイアルに移し、そして、反応混合物を室温にて一晩撹拌した。反応混合物から揮発物を除去し、そして、粗生成物をEtOH中に溶解した。LiOHを $\text{H}_2\text{O}$ 中の溶液として加え、追加の水を、反応混合物が均質になるまで加えた。室温にて1.5時間撹拌した後に、混合物を、 $\text{H}_2\text{SO}_4$ を用いてpH3に酸性化し、濃縮し、そして、逆相HPLC (Phenomenex Gemini C18, 50x250mm, 10  $\mu\text{m}$ , 0.1%のTFA中のアセトニトリル/水、勾配溶出) によって精製し、そして、化合物38 (構造2.2c) を得た。

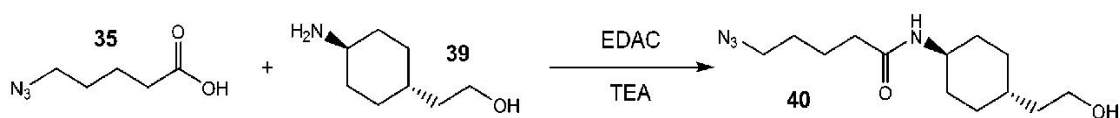
20

## 【 0 2 7 1】

構造2.3c ((S)-3-(4-(2-((1*r*,4*S*)-4-(5-アジドペンタンアミド)シクロヘキシル)エトキシ)-3-フルオロフェニル)-3-(2-オキソ-3-(3-(5,6,7,8-テトラヒドロ-1,8-ナフチリジン-2-イル)プロピル)イミダゾリジン-1-イル)プロパン酸)の合成

30

## 【化 1 4 1】



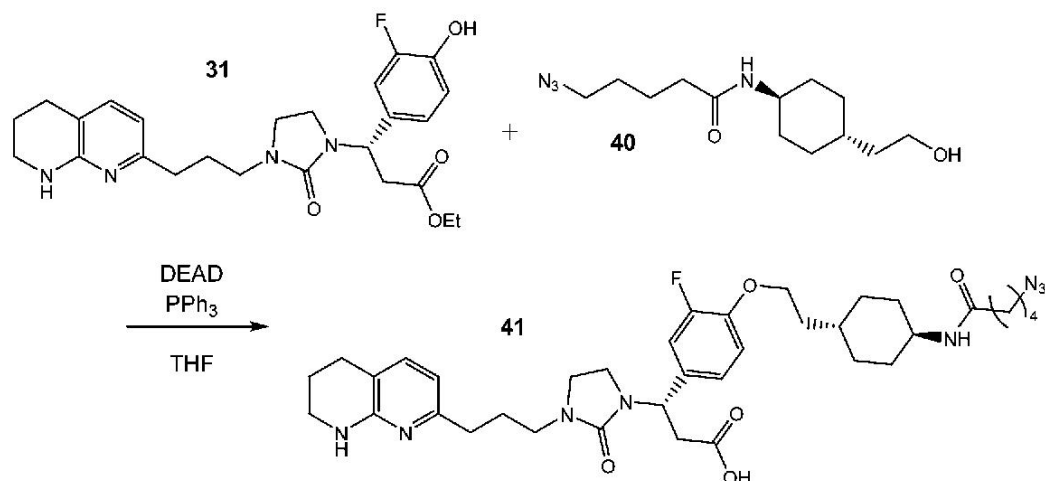
## 【 0 2 7 2】

0 にてDCM中の化合物35はの懸濁液に、DCM中のEDACの溶液を加えた。5分後に、冷却を外し、そして、化合物39を加え、続いて、TEAを加えた。不均一混合物を室温にて一晩撹拌した。翌日、反応物をDCMで希釈し、そして、沈殿物を溶解した。混合物を、5%の $\text{KHSO}_4$ で2回、および塩水で1回洗浄した。有機相を、硫酸ナトリウムを介して濾過し、そして、濃縮した。化合物40を含有する粗残渣を、さらなる精製なしで使用した。

40

50

## 【化 1 4 2】



10

## 【 0 2 7 3】

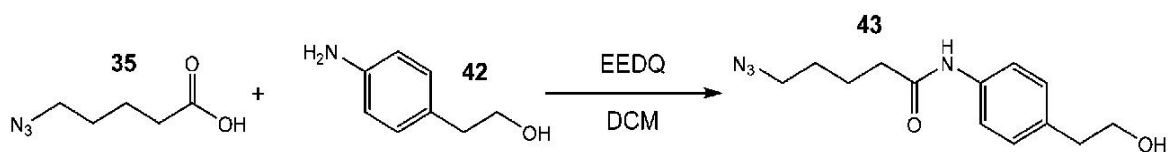
THF中のPPh<sub>3</sub>の溶液に、激しく攪拌しながら室温にてDEADの溶液を滴下して加えた。混合物を、化合物31と化合物40の混合物を含有するバイアルに移し、そして、反応混合物を室温にて一晩攪拌した。反応混合物から揮発物を除去し、そして、粗生成物をEtOH中に溶解した。LiOHをH<sub>2</sub>O中の溶液として加え、追加の水を、反応混合物が均質になるまで加えた。室温にて1.5時間攪拌した後に、混合物を、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を用いてpH3に酸性化し、濃縮し、逆相HPLC (Phenomenex Gemini C18, 50x250mm, 10 μm, 0.1%のTFA中のアセトニトリル/水、勾配溶出) によって精製し、そして、化合物41 (構造2.3c) を得た。

20

## 【 0 2 7 4】

構造2.4c ((S)-3-(4-(4-(5-アジドペンタンアミド)フェネトキシ)-3-フルオロフェニル)-3-(2-オキソ-3-(3-(5,6,7,8-テトラヒドロ-1,8-ナフチリジン-2-イル)プロピル)イミダゾリジン-1-イル)プロパン酸)の合成

## 【化 1 4 3】



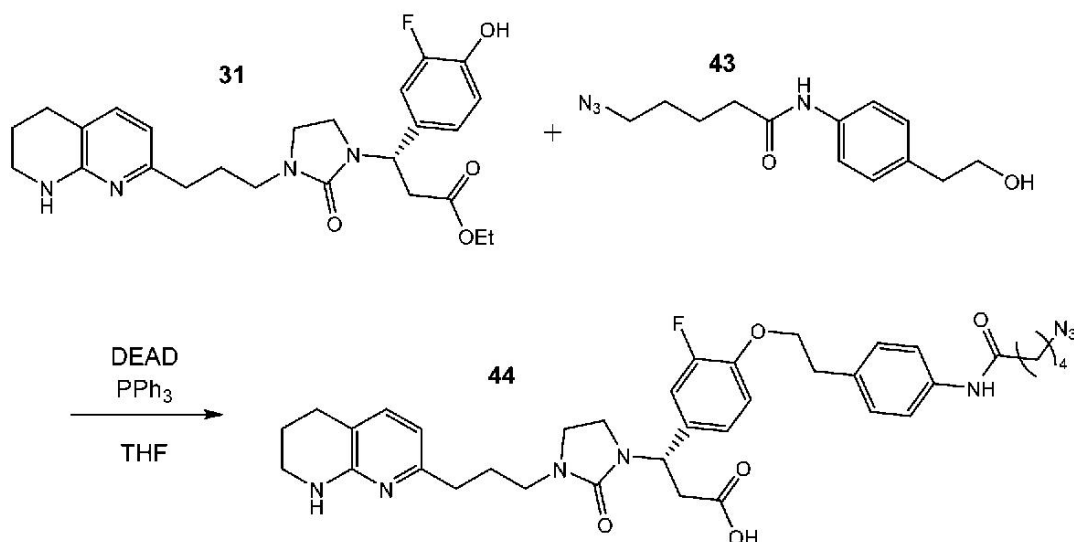
30

## 【 0 2 7 5】

DCM中の化合物35と化合物42の混合物に、EEDQを加え、そして、溶液を室温にて一晩攪拌した。次に、反応混合物を、DCMで希釈し、1MのHClで3回洗浄し、そして、塩水で1回洗浄した。有機相を、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、そして、濃縮した。次に、化合物43をさらなる精製なしで使用した。

40

## 【化 1 4 4】



10

## 【 0 2 7 6】

THF中のPPh<sub>3</sub>の溶液に、激しく攪拌しながら室温にてDEADの溶液を滴下して加えた。混合物を、化合物31と化合物43の混合物を含有するバイアルに移し、そして、反応混合物を室温にて一晩攪拌した。反応混合物から揮発物を除去し、そして、粗生成物をEtOH中に溶解した。LiOHをH<sub>2</sub>O中の溶液として加え、追加の水を、反応混合物が均質になるまで加えた。室温にて1.5時間攪拌した後に、混合物を、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を用いてpH3に酸性化し、濃縮し、逆相HPLC (Phenomenex Gemini C18, 50x250mm, 10 μm, 0.1%のTFA中のアセトニトリル/水、勾配溶出) によって精製し、そして、化合物44 (構造2.4c) を得た。

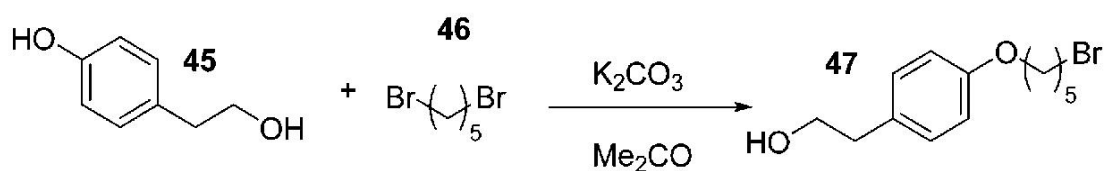
20

## 【 0 2 7 7】

構造2.5c ((S)-3-(4-(4-(5-アジドペンチル)オキシ)フェネトキシ)-3-フルオロフェニル)-3-(2-オキソ-3-(3-(5,6,7,8-テトラヒドロ-1,8-ナフチリジン-2-イル)プロピル)イミダゾリジン-1-イル)プロパン酸)の合成

30

## 【化 1 4 5】

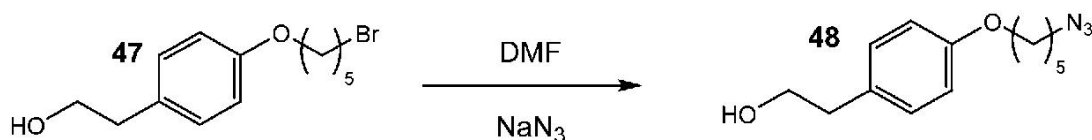


## 【 0 2 7 8】

アセトン中の化合物45と化合物46の溶液に、炭酸カリウムを加えた。混合物を、N<sub>2</sub>保護下、激しく攪拌しながら、懸濁液として密閉バイアル内で65℃に一晩加熱した。次に、反応物を、濾過し、濃縮し、そして、ヘキサン中の酢酸エチルのグラジエントで溶出するシリカにより精製し、化合物47を得た。

40

## 【化 1 4 6】



## 【 0 2 7 9】

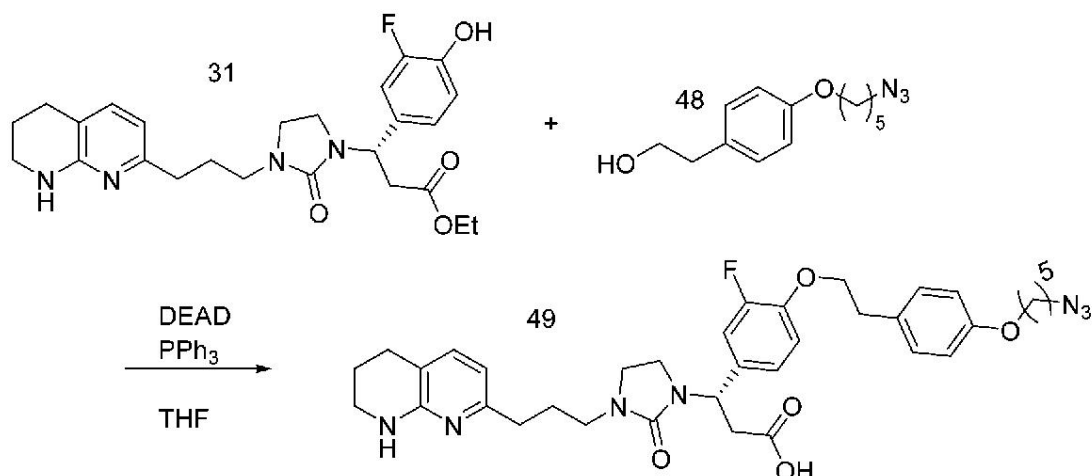
DMF中の化合物47の溶液に、アジ化ナトリウムを加え、そして、混合物を、窒素保護下

50



、密閉バイアル内で80℃にて一晩撹拌した。完了時に、1倍量の水を加え、そして、生成物を酢酸エチルによって抽出した。分離した有機相を、硫酸ナトリウムを介して濾過し、そして、濃縮した。化合物48の粗生成物をさらなる精製なしで使用した。

【化147】



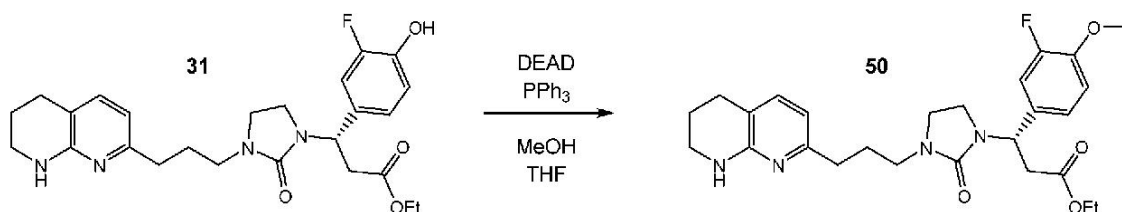
【0280】

THF中のPPh<sub>3</sub>の溶液に、激しく撹拌しながら室温にてDEADの溶液を滴下して加えた。混合物を、化合物31と化合物48の混合物を含有するバイアルに移し、そして、反応混合物を室温にて一晩撹拌した。反応混合物から揮発物を除去し、そして、粗生成物をEtOH中に溶解した。LiOHをH<sub>2</sub>O中の溶液として加え、追加の水を、反応混合物が均質になるまで加え、室温にて1.5時間撹拌した後に、混合物を、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を用いてpH3に酸性化し、濃縮し、逆相HPLC (Phenomenex Gemini C18, 50x250mm, 10 μm, 0.1%のTFA中のアセトニトリル/水、勾配溶出) によって精製し、そして、化合物49 (構造2.5c) を得た。

【0281】

構造2.6c ((S)-3-(3-(3-(3-(17-アジド-3-オキソ-6,9,12,15-テトラオキサ-2-アザヘプタデシル)-5,6,7,8-テトラヒドロ-1,8-ナフチリジン-2-イル)プロピル)-2-オキソイミダゾリジン-1-イル)-3-(3-フルオロ-4-メトキシフェニル)プロパン酸) の合成

【化148】



【0282】

THF中のPPh<sub>3</sub>の溶液に、0℃にてDEADの溶液を滴下して加えた。添加完了後に、混合物を、化合物31とMeOHの純粋な混合物を含有するバイアルに移した。バイアルを、N<sub>2</sub>を入れて封をし、室温にて一晩撹拌した。完了時に、すべての揮発物を除去し、そして、得られた粗生成物を、DCM中のMeOHのグラジエントで溶出するシリカによって精製し、そして、化合物50を得た。

10

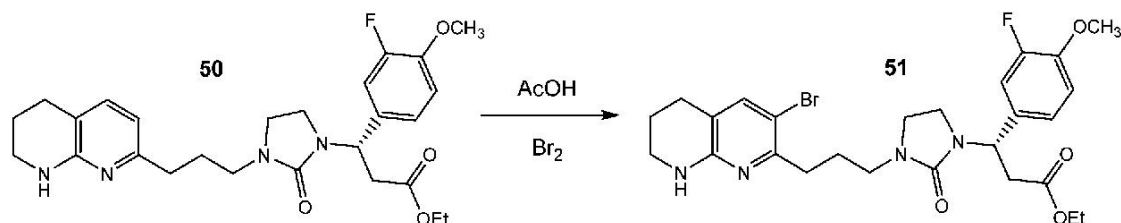
20

30

40

50

## 【化 1 4 9】

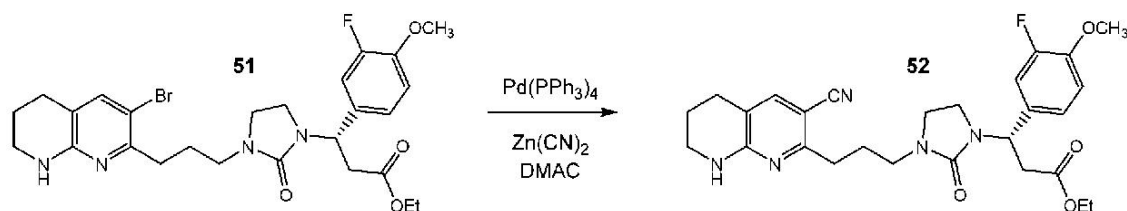


## 【 0 2 8 3】

10

AcOH中の化合物50の溶液に、臭素を加え、そして、混合物を0.5時間撹拌した。完了時に、反応物を、5倍量の酢酸エチルおよび2.5倍量の水で希釈した。水層を、重炭酸ナトリウムの飽和水溶液でpH7に中和し、そして、有機相を分離した。水層を、酢酸エチルによってさらに2回抽出した。合わせた有機相を、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、そして、濃縮した。得られた粗生成物の化合物51を、それに続いて、さらなる精製なしで使用した。

## 【化 1 5 0】



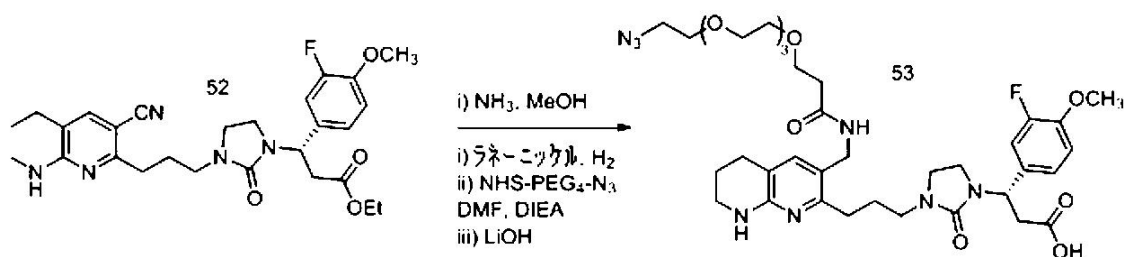
20

## 【 0 2 8 4】

DMAC中の化合物51、Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>、およびZn(CN)<sub>2</sub>の溶液を窒素で30分間脱気した。混合物を、密閉バイアル内で128℃にて一晩加熱した。完了時に、混合物を5倍量のEtOAcで希釈した。次に、有機相を分離し、水で2回洗浄し、塩水で2回洗浄し、次に、有機相を、硫酸ナトリウムを介して濾過し、そして、濃縮した。残渣を100%がEtOAcで溶出するシリカによって精製し、そして、化合物52を得た。

30

## 【化 1 5 1】



40

## 【 0 2 8 5】

MeOH中の化合物52の溶液に、アンモニアを加え、次に、メタノールで3回事前にリンスしたラネーニッケルのスラリーを加えた。Parr（登録商標）フラスコに60psiまで水素を投入し、室温にて16時間撹拌した。完了時に、懸濁液を、濾過し、そして、濃縮した。得られた粗残渣を、DMFで再溶解した。DIEAとNHS-PEG<sub>4</sub>-N<sub>3</sub>を加え、そして、混合物を1時間撹拌した。完了時に、すべての揮発物を除去し、そして、粗残渣を、MeOHとTHFの混合物中に再溶解した。H<sub>2</sub>O中のLiOHを加えた、そして、混合物を室温にて17時間撹拌した。反応完了時に、TFAでpHを3に調整し、混合物を準調製用逆相HPLC（Phenomenex Gemini C18, 250x21.2mm, 5μm, 0.1%のTFA中の水/ACN、勾配溶出）に

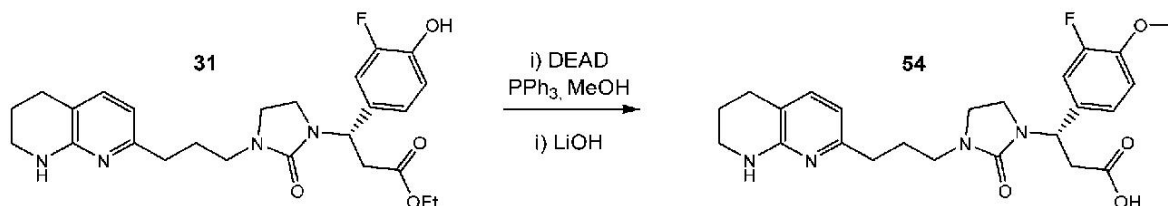
50

直接注入し、そして、化合物53（構造2.6c）を得た。

【0286】

構造2.7c（（S）-N-（2-（2-（2-（2-アジドエトキシ）エトキシ）エトキシ）エチル）-3-（3-フルオロ-4-メトキシフェニル）-3-（2-オキソ-3-（3-（5,6,7,8-テトラヒドロ-1,8-ナフチリジン-2-イル）プロピル）イミダゾリジン-1-イル）プロパンアミド）、構造2.8c、構造2.9c、および構造2.10cの合成

【化152】



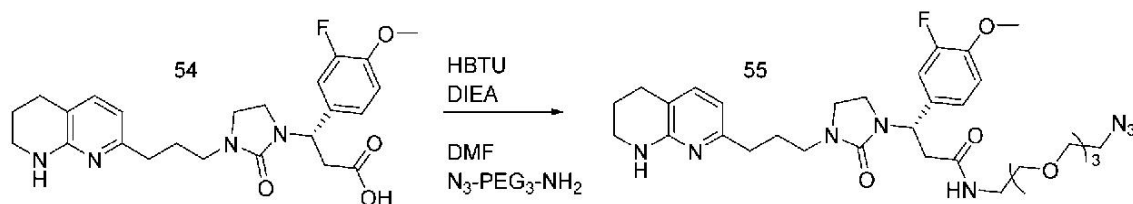
10

【0287】

化合物31に、0 にてTHF、PPh<sub>3</sub>、およびDEADの溶液を連続して滴下して加えた。混合物を室温にて16時間撹拌した。次に、混合物を、1時間 - 20 に冷やし、濾過してトリフェニルホスフィンオキไซด์を取り除いた。濾液を濃縮し、そして、O-アルキル化中間体を、1%のTEAを含有するヘキサン中の酢酸エチルのグラジエントで溶出するシリカによる精製によって単離した。次に、単離した中間体を、THFとH<sub>2</sub>Oの混合物中に懸濁し、H<sub>2</sub>O中のLiOHで処理し、そして、35 にて16時間撹拌した。完了時に、2MのHClでpHを7に調整し、そして、すべての揮発物を除去した。粗生成物をH<sub>2</sub>O中に懸濁した。塩化ナトリウムを加え、そして、化合物54を酢酸エチルによって5回抽出した。有機相を合わせ、硫酸ナトリウムを介して濾過し、そして、濃縮した。化合物54を、それに続いて、さらなる精製なしで使用した。

20

【化153】



30

【0288】

DMF中の化合物54の溶液を、HBTUで処理し、そして、5分間撹拌した。それに続いて、DIEAとN<sub>3</sub>-PEG<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>を加えた、そして、混合物を室温にて16時間撹拌した。完了時に、TFAでpHを3に調整し、そして、化合物55を、準調製用逆相HPLC（Phenomenex Gemini C18, 250x21.2mm, 5 μm, 250, x21.2mm, 5 μm, 水/ACN、勾配溶出による0.1%のTFA）に直接注入することによって単離し、そして、化合物55を得た。

【0289】

類似の手順を用いて、それぞれN<sub>3</sub>-PEG<sub>11</sub>-NH<sub>2</sub>、N<sub>3</sub>-PEG<sub>23</sub>-NH<sub>2</sub>、およびN<sub>3</sub>-PEG<sub>35</sub>-NH<sub>2</sub>を使用して、化合物2.8c、2.9c、および2.10cを合成した。

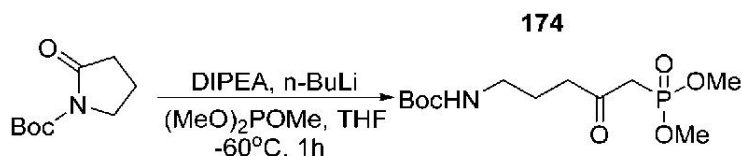
40

【0290】

構造2.11c（（R）-3-（4-（2-（2-（2-（2-アジドエトキシ）エトキシ）エトキシ）エトキシ）-3-フルオロフェニル）-3-（2-オキソ-3-（3-（5,6,7,8-テトラヒドロ-1,8-ナフチリジン-2-イル）プロピル）イミダゾリジン-1-イル）プロパン酸）の合成

50

## 【化 1 5 4】



## 【 0 2 9 1】

窒素の不活性雰囲気でパージし、維持した3-Lの4つ首丸底フラスコ内に、THF (1.50 L)、DIPEA (150.00mL、716.000mmol、0.88equiv)、n-BuLi (430.00mL、680.000mmol、0.84equiv) に入れた。これに続いて、-60 にてトリメチルホスファイト (195.00mL) を加え、そして、-60 にて1時間撹拌した。これに、60 にてtert-ブチル2-オキソピロリジン-1-カルボキシラート (150.00g、809.835mmol、1.00equiv) を加えた。得られた溶液を、液体窒素バス内で-60 にて1時間撹拌した。次に、反応物を、350mLのH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2N) の添加によってクエンチし、そして、1.5LのH<sub>2</sub>Oで希釈した。得られた溶液を2×1Lの酢酸エチルで抽出した。得られた混合物を、1×1LのH<sub>2</sub>Oで洗浄し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、そして、減圧下で濃縮した。これは黄色のオイルとして200g (粗生成物) のtert-ブチルN-[5-(ジメトキシホスホリル)-4-オキソペンチル]カルバマートをもたらした。

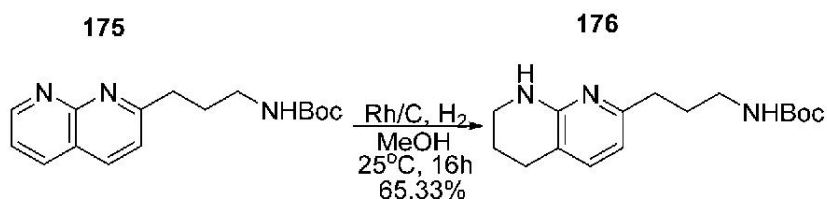
## 【化 1 5 5】



## 【 0 2 9 2】

3-L丸底フラスコ内に、tert-ブチルN-[5-(ジメトキシホスホリル)-4-オキソペンチル]カルバマート (200.00g、1500.00mmol、1.50equiv)、MeOH (1.50L)、2-アミノピリジン-3-カルバルデヒド (53.00g、1000.00mmol、1.00equiv)、NaOH (50.00g、1500.00mmol、1.50equiv) を入れた。得られた溶液を、オイルバス内で50 にて16時間撹拌した。溶液のpH値を、NaHCO<sub>3</sub> (aq.) で8に調整した。得られた混合物を濃縮した。次に、反応物を、1.5Lの水の添加によってクエンチし、そして、2×1.5Lの酢酸エチルで抽出した。合わせた有機層を、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、そして、減圧下で濃縮した。これは黄色のオイルとして160g (粗生成物) のtert-ブチルN-[3-(1,8-ナフチリジン-2-イル)プロピル]カルバマートをもたらした。

## 【化 1 5 6】

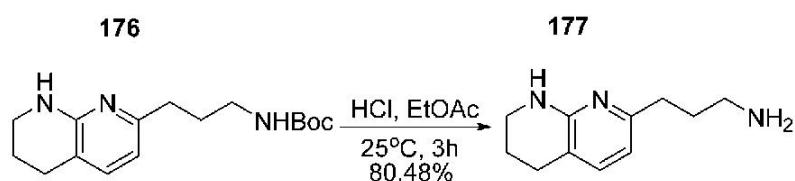


## 【 0 2 9 3】

5-L丸底フラスコ内に、tert-ブチルN-[3-(1,8-ナフチリジン-2-イル)プロピル]カルバマート (160.00g、556.787mmol、1.00equiv)、MeOH (2.00L)、Rh/C (140.00g、1.360mmol)、H<sub>2</sub> (40Psi) を入れた。得られた溶液を25 にて16

時間撹拌した。固形物を濾別した。得られた混合物を濃縮した。これは黄色の固体として106g (65.33%) のtert - ブチルN - [ 3 - ( 5,6,7,8 - テトラヒドロ - 1,8 - ナフチリジン - 2 - イル ) プロピル ] カルバマートをもたらした。

【化157】



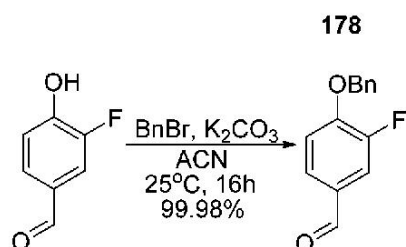
10

【0294】

1 - L丸底フラスコ内に、tert - ブチルN - [ 3 - ( 5,6,7,8 - テトラヒドロ - 1,8 - ナフチリジン - 2 - イル ) プロピル ] カルバマート (106.00g、363.767mmol、1.00equiv)、EtOAc (500.00mL)、EtOAc中のHCl (4M、400.00mL)を入れた。得られた溶液を25℃にて3時間撹拌した。得られた溶液を1LのH<sub>2</sub>Oで希釈した。NaOH (aq.)を用いてpHを11に調整した。得られた溶液を2×1Lの酢酸エチルで抽出した。合わせた有機層を、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、減圧下で濃縮した。これは黄色の固体として56g (80.48%) の3 - ( 5,6,7,8 - テトラヒドロ - 1,8 - ナフチリジン - 2 - イル ) プロパン - 1 - アミンをもたらした。

20

【化158】

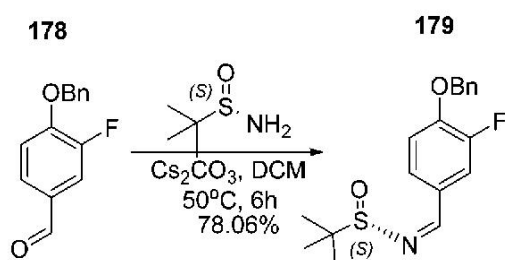


30

【0295】

2 - L丸底フラスコ内に、3 - フルオロ - 4 - ヒドロキシベンズアルデヒド (140.00g、99.194mmol、1.00equiv)、ACN (1000mL)、(プロモメチル)ベンゼン (205.08g、1199.039mmol、1.20equiv)、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (414.28g、2997.581mmol、3.00equiv)を入れた。得られた溶液を25℃にて16時間撹拌した。固形物を濾別した。得られた混合物を濃縮した。これは白色の固体として230g (99.98%) の4 - (ベンジルオキシ) - 3 - フルオロベンズアルデヒドをもたらした。

【化159】



40

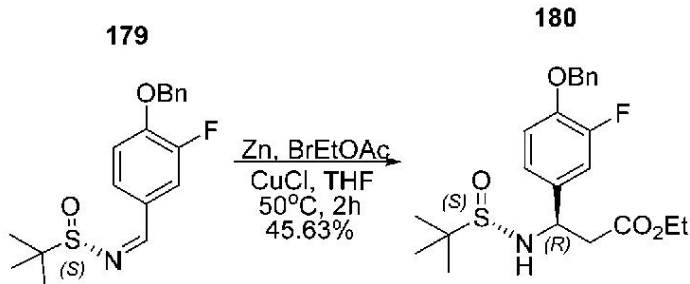
【0296】

3 - L丸底フラスコ内に、4 - (ベンジルオキシ) - 3 - フルオロベンズアルデヒド (230.00g、998.966mmol、1.00equiv)、DCM (1600mL)、(S) - 2 - メチルプロパ

50

ン - 2 - スルフィンアミド (145.29g、1198.762mmol、1.20equiv)、 $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (650.97g、1997.933mmol、2.00equiv)を入れた。得られた溶液をオイルバス内で50にて6時間撹拌した。固形物を濾別した。得られた混合物を濃縮した。これは白色の固体として260g (78.06%) の (S) - N - [ [4 - (ベンジルオキシ) - 3 - フルオロフェニル] メチリデン ] - 2 - メチルプロパン - 2 - スルフィンアミドをもたらした。

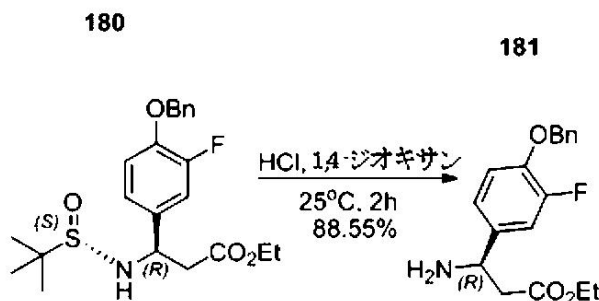
【化160】



【0297】

窒素の不活性雰囲気でパージし、維持した3-L丸底フラスコ内に、THF (2.0L)、Zn (1.02kg、15595.945mmol、20.00equiv)、CuCl (115.80g、1169.696mmol、1.50equiv)、エチル2-ブロモアセタート (325.57g、1949.498mmol、2.50equiv)、(S) - N - [ [4 - (ベンジルオキシ) - 3 - フルオロフェニル] メチリデン ] - 2 - メチルプロパン - 2 - スルフィンアミド (260.00g、779.797mmol、1.00equiv)を入れた。得られた溶液を、水/アイスバス内で0にて30分間撹拌した。得られた溶液を、撹拌しながらさらに2時間反応させ、それと同時に、温度をオイルバス内で50に維持した。固形物を濾別した。得られた混合物を濃縮した。次に、反応物を、2Lの水の添加によってクエンチし、そして、2×2Lの酢酸エチルで抽出した。合わせた有機層を、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、そして、減圧下で濃縮した。これは黄色のオイルとして150g (45.63%) のエチル (3R) - 3 - [4 - (ベンジルオキシ) - 3 - フルオロフェニル] - 3 - [ [(S) - 2 - メチルプロパン - 2 - スルフィニル] アミノ ] プロパノアートをもちた。

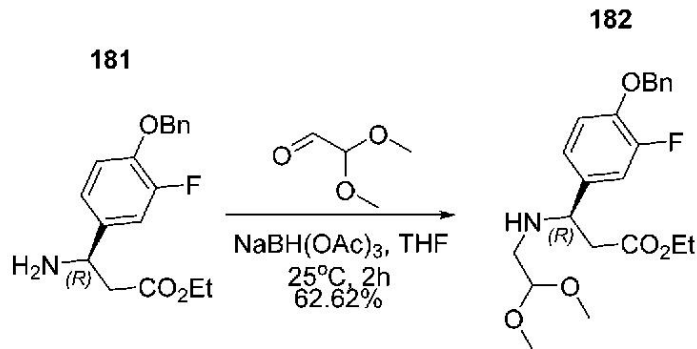
【化161】



【0298】

1-L丸底フラスコ内に、エチル (3R) - 3 - [4 - (ベンジルオキシ) - 3 - フルオロフェニル] - 3 - [ [(S) - 2 - メチルプロパン - 2 - スルフィニル] アミノ ] プロパノアートを (150.00g、355.847mmol、1.00equiv)、HCl中の1,4-ジオキサン (400.00mL、4M)を入れた。得られた溶液を25にて2時間撹拌した。得られた混合物を濃縮した。次に、反応物を、1Lの水の添加によってクエンチした。NaHCO<sub>3</sub> (aq.)を用いて、pHを8に調整した。得られた溶液を、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させた2×1Lの酢酸エチルで抽出し、そして、濃縮した。これは黄色のオイルとして100g (88.55%) のエチル (3R) - 3 - アミノ - 3 - [4 - (ベンジルオキシ) - 3 - フルオロフェニル] プロパノアートをもちた。

## 【化 1 6 2】



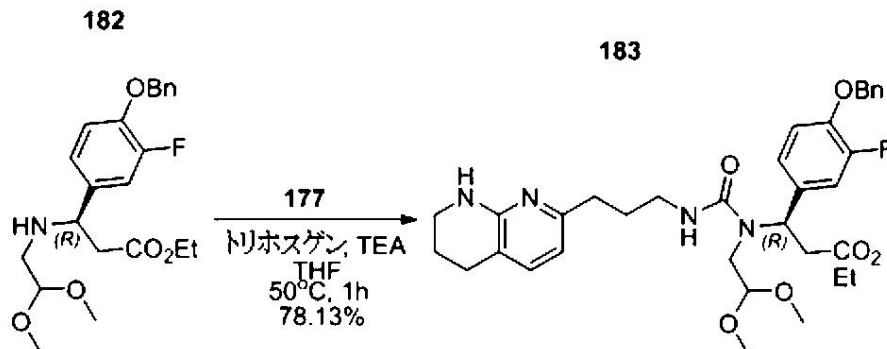
10

## 【 0 2 9 9】

2-L丸底フラスコ内に、エチル(3R)-3-アミノ-3-[4-(ベンジルオキシ)-3-フルオロフェニル]プロパノアート(100.00g、315.100mmol、1.00equiv)、THF(1.00L)、2,2-ジメトキシアセトアルデヒド(49.21g、472.696mmol、1.50equiv)、NaBH(OAc)<sub>3</sub>(133.57g、630.199mmol、2.00equiv)を入れた。得られた溶液を25℃にて2時間撹拌した。そして、反応物を、1Lの水の添加によってクエンチした。得られた溶液を、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上で乾燥させた2×1Lの酢酸エチルで抽出し、そして、減圧下で濃縮した。これは黄色のオイルとして80g(62.62%)のエチル(3R)-3-[4-(ベンジルオキシ)-3-フルオロフェニル]-3-[(2,2-ジメトキシエチル)アミノ]プロパノアートをもたらした。

20

## 【化 1 6 3】



30

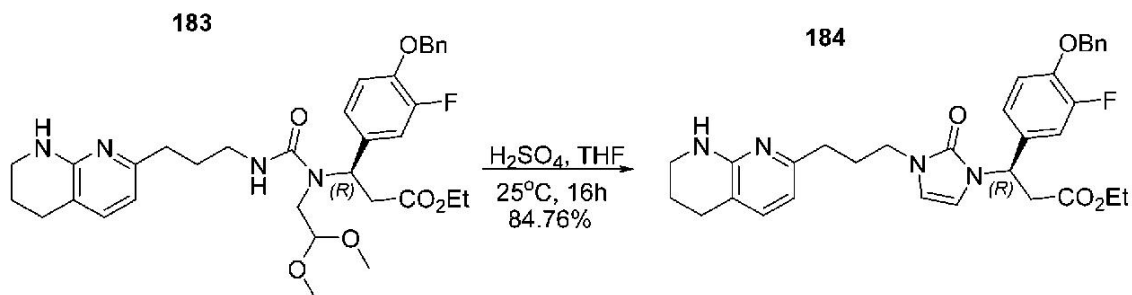
## 【 0 3 0 0】

2-Lの3つ首丸底フラスコ内に、トリホスゲン(22.25g、74.975mmol、0.38equiv)、THF(500mL)、エチル(3R)-3-[4-(ベンジルオキシ)-3-フルオロフェニル]-3-[(2,2-ジメトキシエチル)アミノ]プロパノアート(80.00g、197.304mmol、1.00equiv)、TEA(29.95g、295.956mmol、1.50equiv)、3-(5,6,7,8-テトラヒドロ-1,8-ナフチリジン-2-イル)プロパン-1-アミン(化合物177、33.97g、177.573mmol、0.90equiv)を入れた。得られた溶液を、オイルバス内で50℃にて1時間撹拌した。次に、反応物を、1Lの水の添加によってクエンチした。NaHCO<sub>3</sub>(aq.)を用いて、pHを8に調整した。得られた溶液を、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させた2×1Lの酢酸エチルで抽出し、そして、濃縮した。これは黄色の未精製のオイルとして96g(78.13%)のエチル(3R)-3-[4-(ベンジルオキシ)-3-フルオロフェニル]-3-[(2,2-ジメトキシエチル)アミノ]プロパノアートをもたらした。

40

50

## 【化 1 6 4】



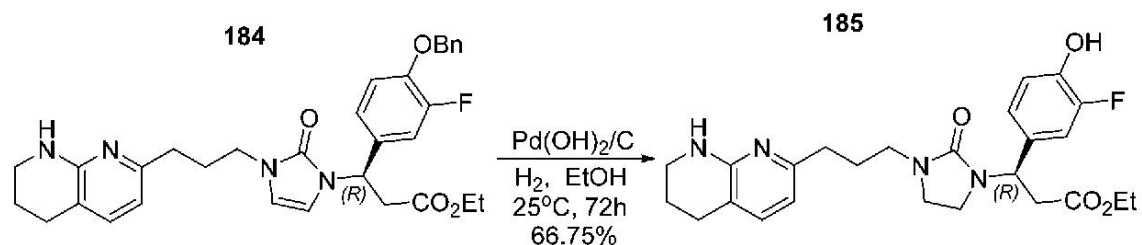
10

## 【 0 3 0 1】

1000mLの丸底フラスコ内に、エチル (3R) - 3 - [ 4 - (ベンジルオキシ) - 3 - フルオロフェニル ] - 3 - [ (2,2 - ジメトキシエチル) ( [ 3 - (5,6,7,8 - テトラヒドロ - 1,8 - ナフチリジン - 2 - イル) プロピル ] カルバモイル ) ] アミノ ] プロパノアート (96.00g、154.158mmol、1.00equiv)、THF (500.00mL)、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (180.00mL、2M) を入れた。得られた溶液を25 にて16時間攪拌した。NaOH (5M) を用いて、pH を8に調整した。得られた溶液を、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させた2×1Lのジクロロメタンで抽出し、そして、濃縮した。残渣を、ジクロロメタン/メタノール (50/1) を用いたシリカゲルカラムに適用した。集めた画分を合わせ、そして、濃縮した。これは黄色のオイルとして73g (84.76%) のエチル (3R) - 3 - [ 4 - (ベンジルオキシ) - 3 - フルオロフェニル ] - 3 - [ 2 - オキソ - 3 - [ 3 - (5,6,7,8 - テトラヒドロ - 1,8 - ナフチリジン - 2 - イル) プロピル ] - 2,3 - ジヒドロ - 1H - イミダゾール - 1 - イル ] プロパノアートをもたらした。

20

## 【化 1 6 5】



30

## 【 0 3 0 2】

3 - L丸底フラスコ内に、エチル (3R) - 3 - [ 4 - (ベンジルオキシ) - 3 - フルオロフェニル ] - 3 - [ 2 - オキソ - 3 - [ 3 - (5,6,7,8 - テトラヒドロ - 1,8 - ナフチリジン - 2 - イル) プロピル ] - 2,3 - ジヒドロ - 1H - イミダゾール - 1 - イル ] プロパノアート (73.00g、130.671mmol、1.00equiv)、EtOH (1.50L)、Pd (OH) <sub>2</sub> / C (60.00g、427.259mmol、3.27equiv)、H<sub>2</sub> (50気圧) を入れた。得られた溶液を25 にて72時間攪拌した。固形物を濾別した。残渣を、ジクロロメタン/メタノール (9/1) を用いたシリカゲルカラムに適用した。集めた画分を合わせ、そして、濃縮した。これは黄色のオイルとして41.0415g (66.75%) のエチル (3R) - 3 - (3 - フルオロ - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - [ 2 - オキソ - 3 - [ 3 - (5,6,7,8 - テトラヒドロ - 1,8 - ナフチリジン - 2 - イル) プロピル ] イミダゾリジン - 1 - イル ] プロパノアートをもたらした。

40

## 【 0 3 0 3】

LCMS - PH - ARP052 - 0 : [ MS + 1 ] + = 471

## 【 0 3 0 4】

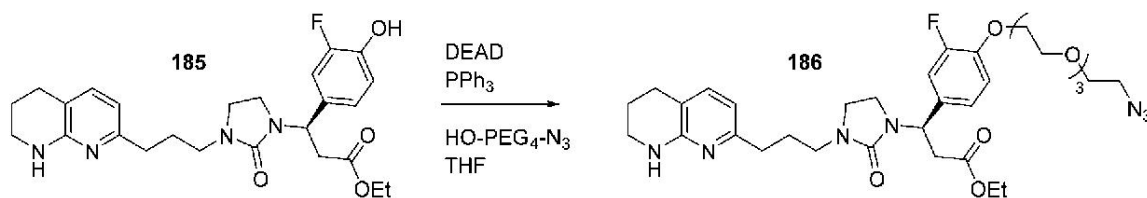
旋光度 [ ]<sub>D</sub><sup>20.0</sup> = +37.5° (C = 1g / 100mlのMeOH中)

H-NMR: (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm) 9.84 (s, 1H), 7.07 - 7.00 (m, 2H), 6.95 - 6.850 (m, 2H), 6.24 (d, 2H), 5.18 (t, 1H), 4.06 - 3.96 (m, 2H), 3.32 - 2.75 (m, 10H), 2.60 (t, 2H), 2.37 (t, 2H), 1.77 - 1.67 (m, 4H), 1.10 (t, 3H)。

50



## 【化 1 6 6】

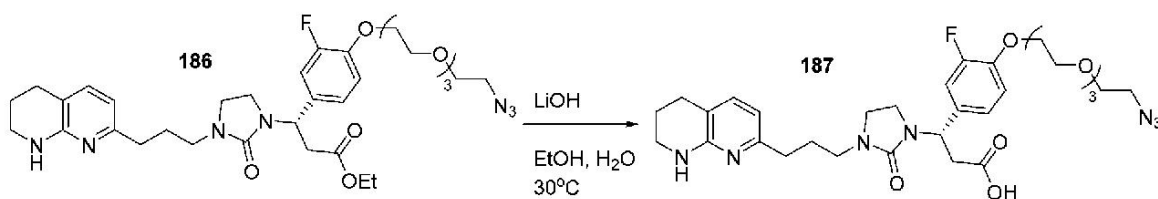


## 【 0 3 0 5】

THF中の $\text{PPh}_3$ の溶液に、 $-10^\circ\text{C}$ にてDEADの溶液を滴下して加えた。混合物を室温に温め、そして、化合物185と $\text{HO-PEG}_4\text{-N}_3$ の純粋な混合物に加え、一晩攪拌した。次に、反応混合物を減圧下で濃縮し、そして、残渣をDCM中のMeOHのグラジエントで溶出するシリカによって精製し、化合物186を得た。

10

## 【化 1 6 7】



20

## 【 0 3 0 6】

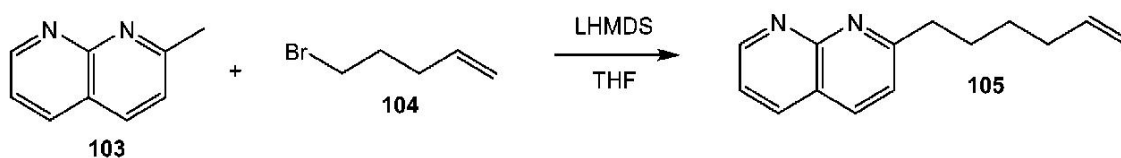
化合物186に、EtOHと $\text{H}_2\text{O}$ を加え、続いて、LiOHを加えた。混合物を $30^\circ\text{C}$ にて一晩攪拌した。完了時に、混合物を、6MのHCl水溶液を使用して $\text{pH} = 5$ に中和し、そして、濃縮した。残渣を、0.1%の水を含有するアセトニトリルのグラジエントで溶出する、Phenomenex Gemini C18, 50x250mm, 10  $\mu\text{m}$ カラムを用いた逆相HPLCによって精製し、そして、化合物187 (構造2.11c)を得た。

## 【 0 3 0 7】

構造28c (化合物118a)、構造29c (化合物118b)、構造31c (化合物119a)、および構造30c (化合物119b)の合成

30

## 【化 1 6 8】

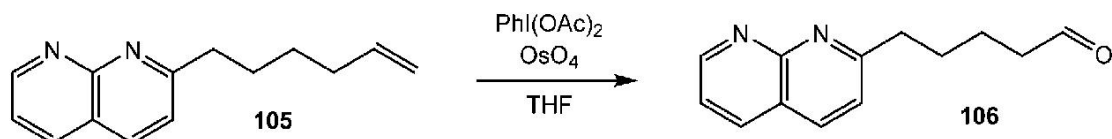


## 【 0 3 0 8】

LHMDS (THF中に1.0M、95mL、95mmol)とTHF (60mL)の溶液に、 $-78^\circ\text{C}$ にてTHF (180mL)中の化合物103 (2-メチル-[1,8]ナフチリジン (12.5g、86.7mmol))の溶液を滴下して加えた。30分間攪拌した後に、THF (120mL)中の化合物104 (5-ブromo-1-ペンテン (19.4g、130mmol))の溶液を反応混合物に滴下して加えた。反応混合物を $0^\circ\text{C}$ に温め、そして、4時間攪拌した。反応混合物を、飽和 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 水溶液 (100mL)および脱イオン水 (100mL)でクエンチし、次に、酢酸エチル (2x400mL)で抽出した。合わせた有機相を、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 上で乾燥させ、濾過し、濃縮し、そして、化合物105を、ヘキサン中の50 - 100%の酢酸エチルのグラジエントで溶出するCombiFlash (登録商標)によって単離した。化合物105の収率: 7.93g (43%)。

40

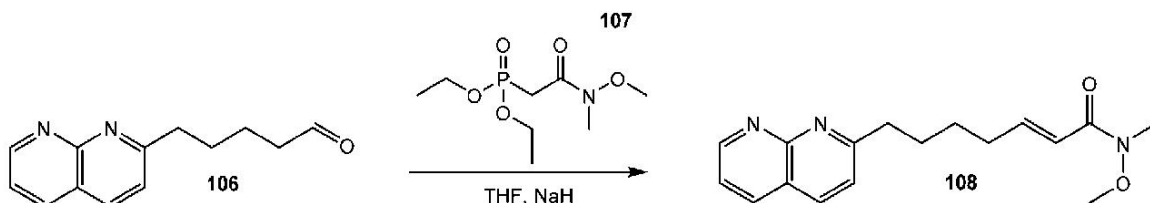
## 【化 1 6 9】



## 【 0 3 0 9】

アセトン（67.5mL）、水（7.5mL）、および2,6ルチジン（2.74mL、23.6mmol）中の化合物105（2.50g、11.8mmol）の溶液に、室温にて4 - メチルモルホリンN - オキシド（2.07g、17.7mmol）および四酸化オスミウム（t - ブタノール中の2.5wt%、2.40g、0.24mmol）を加えた。75分間撹拌した後に、（ジアセトオキシヨード）ベンゼン（5.69g、17.7mmol）を反応混合物に加えた。反応混合物を、2時間撹拌し、次に、飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液（100mL）でクエンチし、そして、酢酸エチル（2x100mL）で抽出した。合わせた有機相を、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上で乾燥させ、濾過し、濃縮し、そして、化合物106を、酢酸エチル中の0 - 5%のメタノールのグラジエントで溶出するCombiFlash（登録商標）によって単離した。化合物106の収率：1.12g（44%）。

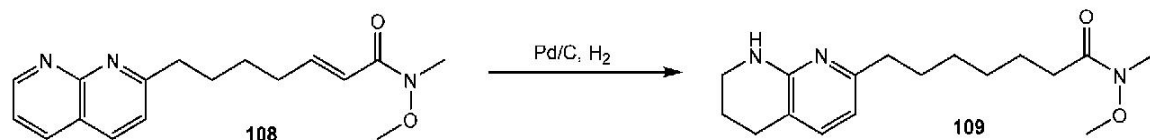
## 【化 1 7 0】



## 【 0 3 1 0】

THF（9mL）中の水素化ナトリウムの懸濁液に（鉱油中の60%の分散液、0.185g、4.64mmol）、0 にてTHF（5mL）中の化合物107（ジエチル（n - メトキシ - N - メチルカルバモイルメチル）ホスホナート）（1.06g、mmolに4）の加えたの溶液をであった。30分間撹拌した後に、THF（9mL）中の化合物106（0.903g、4.21mmol）の溶液を滴下して加えた。反応混合物を0 にて10分間撹拌し、次に、飽和NH<sub>4</sub>Cl水溶液（30mL）でクエンチし、そして、酢酸エチル（3x30mL）によって抽出した。合わせた有機相を、半飽和NaHCO<sub>3</sub>水溶液で2回洗浄した。有機相を、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上で乾燥させ、濾過し、そして、濃縮した。化合物108の収率：1.40g（100%の収率と仮定し、さらなる精製なしでその後のステップに使用した）。

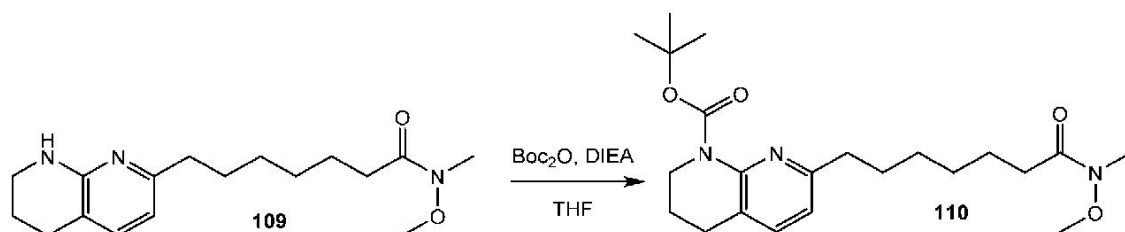
## 【化 1 7 1】



## 【 0 3 1 1】

酢酸エチル（20mL）中の化合物108（1.31g、4.38mmol）の溶液に、Pd / C（10%添加、0.466g、0.44mmol）を加えた。反応器をH<sub>2</sub>を用いて50PSIまで加圧した。3.5時間撹拌した後に、反応混合物を、Celite（登録商標）を介して濾過し、メタノールでリンスした。濾液を濃縮し、そして、化合物109を、1%のトリエチルアミンを含有するヘキサン中の50 - 100%の酢酸エチルのグラジエントで溶出するCombiFlash（登録商標）によって単離した。化合物109の収率：0.833g（62%）。

## 【化 1 7 2】



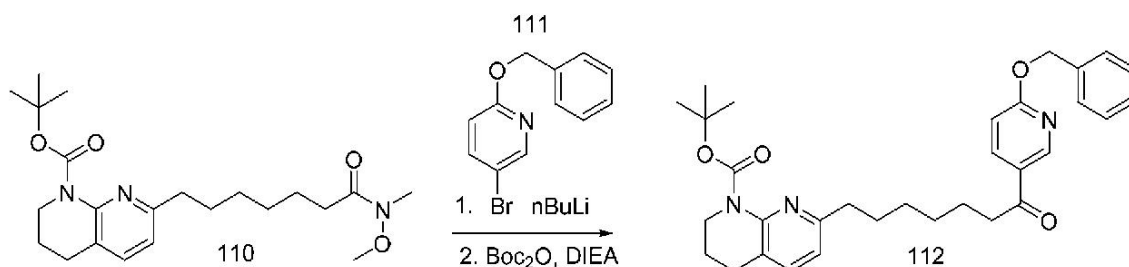
## 【 0 3 1 2】

10

THF (10mL) 中の化合物109 (0.833g、2.73mmol) の溶液に、DIEA (0.590mL、3.41mmol) およびジ - tert - ブチルジカルボナート (0.744g、3.41mmol) を加えた。反応混合物を5時間50℃に加熱した。反応は、LC / MSに基づいて完了していなかったので、DIEA (0.590mL、3.41mmol) およびジ - tert - ブチルジカルボナート (0.744g、3.41mmol) の追加部分を加えた。反応混合物を50℃にてさらに16時間加熱した。反応混合物を濃縮し、そして、化合物110を、ヘキサン中の50 - 100%の酢酸エチルのグラジエントで溶出するCombiFlash (登録商標) によって単離した。化合物110の収率：0.934g (84%)。

## 【化 1 7 3】

20



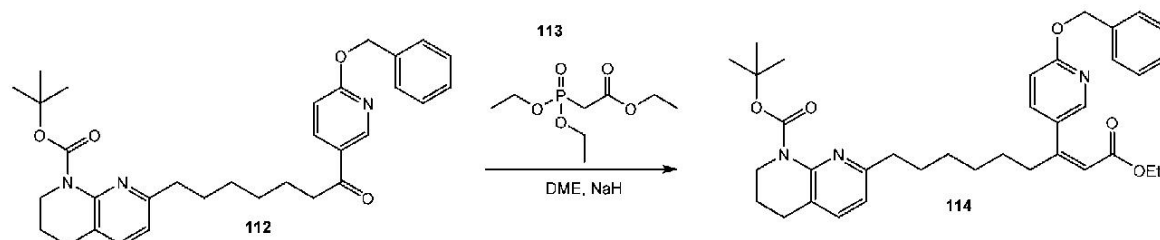
## 【 0 3 1 3】

30

n - ブチルリチウム (ヘキサン中に2.5M、0.70mL、1.8mmol) とTHF (1.5mL) の溶液に、-78℃にて3分間にわたってTHF (0.8mL) 中の化合物111 (5 - ブロモ - 2 - (フェニルメトキシ) ピリジン) (0.465g、1.8mmol) の溶液を滴下して加えた。次に、化合物110 (0.535g、1.3mmol) をTHF (1mL) の溶液として加えた。30分間撹拌した後に、反応物を、0℃に温め、飽和NH<sub>4</sub>Cl水溶液 (10mL) でクエンチし、そして、6MのHCl水溶液でpH7までさらに酸性化した。混合物を、酢酸エチル (3x10mL) によって抽出した。合わせた有機相を、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上で乾燥させ、濾過し、そして、濃縮した。THF (8mL) 中の粗生成物の溶液に、DIEA (0.94mL、5.4mmol) とジ - tert - ブチルジカルボナート (1.18g、5.4mmol) を加えた。混合物を40℃にて一晩撹拌した。反応混合物を濃縮した、そして、化合物112を、ヘキサン中の0 - 40%の酢酸エチルのグラジエントで溶出するCombiFlash (登録商標) によって単離した。化合物112の収率：471mg (50%)。

40

## 【化 1 7 4】



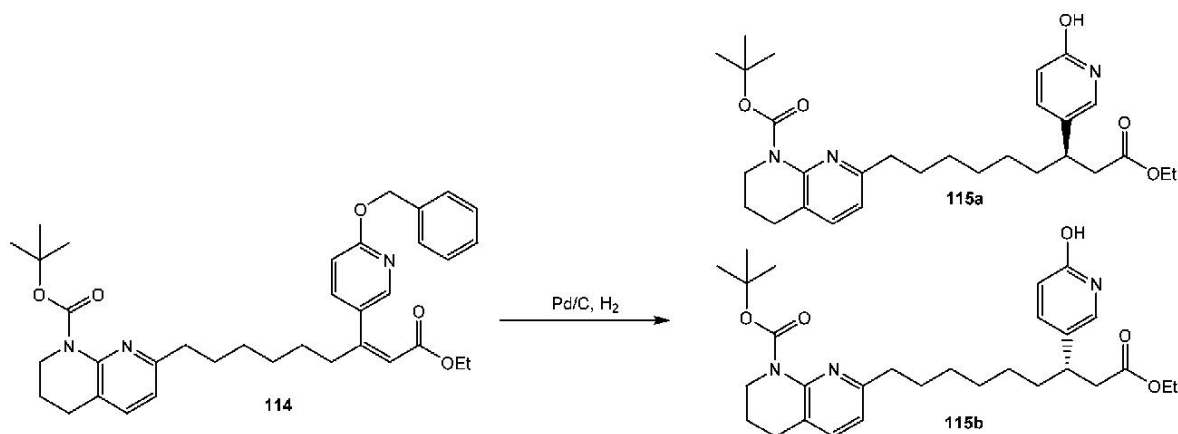
50

## 【0314】

ジメトキシエタン (2mL) 中の水素化ナトリウムの懸濁液 (鉱油中の60%の分散液、0.106g、2.65mmol) に、0 にてジメトキシエタン (1mL) 中の溶液として化合物113 (トリエチルホスホノアセタート) (0.593g、2.65mmol) を加えた。20分間撹拌した後、反応混合物を室温に温め、そして、ジメトキシエタン (2mL) 中の化合物112 (0.467g、0.88mmol) の溶液を加えた。反応混合物を70 にて4時間加熱した。反応を飽和NH<sub>4</sub>Cl水溶液 (10mL) でクエンチし、そして、生成物を酢酸エチル (3x15mL) によって抽出した。有機相を、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上で乾燥させ、濾過し、濃縮し、そして、化合物114を、ヘキサン中の0 - 30%の酢酸エチルのグラジエントで溶出するCombiFlash (登録商標) によって、cis:trans異性体の1:1混合物として単離した。化合物114の収率: 392mg (74%)。

10

## 【化175】



20

## 【0315】

エタノール (6mL) 中の化合物114 (390mg、0.65mmol) の溶液に、Pd/C (10% 添加、69mg、0.07mmol) を加えた。反応器をH<sub>2</sub>を用いて50PSIまで加圧した。4時間撹拌した後に、反応混合物を、Celite (登録商標) を介して濾過し、メタノールでリンスした。濾液を濃縮し、そして、化合物115を、DCM中の0 - 10%のメタノールのグラジエントで溶出するCombiFlash (登録商標) によってラセミ混合物として単離した。化合物115の収率: 95mg (29%)。キラル準調製用HPLC (250x21mm Chiralpak (登録商標) ADカラム, 5 μm, 90/10ヘキサン/EtOH, 40mL/分) を、42mgの第一の溶出R - 異性体 (R<sub>T</sub> = 12 - 14m、>99%のee、化合物115a) および40mgの第二の溶出S - 異性体 (R<sub>T</sub> = 15 - 18m、>98%のee、化合物115b) を単離するために使用した。R - およびS - 異性体の同一性を、Coleman et al. 47 J. Med. Chem. 4834 (2004)によって報告された構造類似化合物の溶出の順序に基づいて割り当てた。

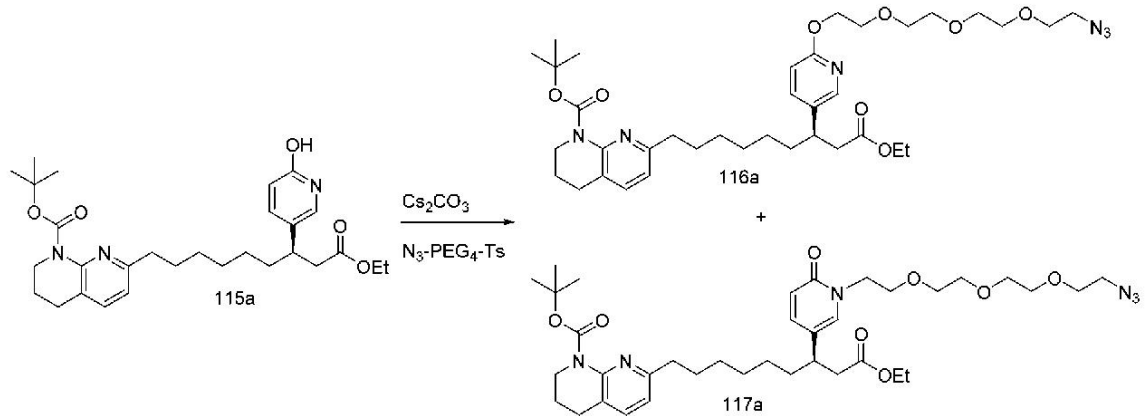
30

## 【0316】

構造28c ((R) - 3 - (6 - (2 - (2 - (2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ) エトキシ) エトキシ) エトキシ) ピリジン - 3 - イル) - 9 - (5,6,7,8 - テトラヒドロ - 1,8 - ナフチリジン - 2 - イル) ノナン酸) および31c ((R) - 3 - (1 - (2 - (2 - (2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ) エトキシ) エチル) - 6 - オキソ - 1,6 - ジヒドロピリジン - 3 - イル) - 9 - (5,6,7,8 - テトラヒドロ - 1,8 - ナフチリジン - 2 - イル) ノナン酸)

40

## 【化 1 7 6】



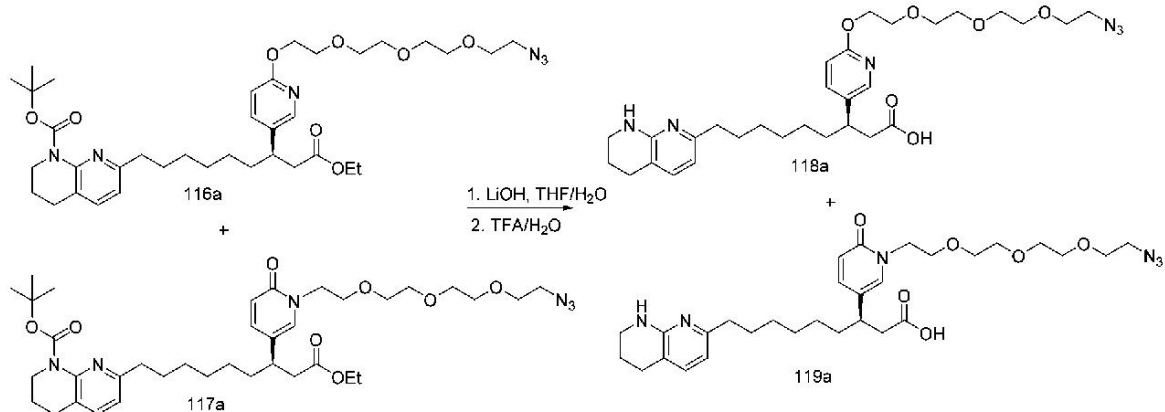
10

## 【 0 3 1 7】

DMF (0.5mL) 中の化合物115a (41mg、0.08mmol) およびN<sub>3</sub>-PEG<sub>4</sub>-OTs (61mg、0.16mmol) の溶液に、炭酸セシウム (53mg、0.16mmol) を加えた。反応混合物を40℃にて1時間撹拌した。反応混合物を、NaHCO<sub>3</sub>水溶液 (1mL) でクエンチし、次に、酢酸エチル (3x3mL) によって抽出した。有機相を減圧下で濃縮した。N-およびO-アルキル化位置異性体の粗混合物を、それに続いてさらなる精製なしで使用した。

20

## 【化 1 7 7】



30

## 【 0 3 1 8】

THF (1.0mL) 中の化合物116aおよび117a (58mg、0.08mmol、9a : 10aの4 : 6混合物) の溶液、ならびに脱イオン水 (1.0mL) に、水酸化リチウム (6mg、0.25mmol) を加えた。反応混合物を、室温にて1時間、そして、35℃にて2時間撹拌した。水酸化リチウムの追加部分 (4mg、0.16mmol) を加え、そして、反応温度を40℃まで高めた。3時間撹拌した後に、水酸化リチウムの最終部分 (4mg、0.25mmol、合計16mg、0.66mmol) を加えた。反応混合物を50℃にて3時間撹拌した。反応混合物を、6NのHCl水溶液でpH7まで酸性化し、そして、減圧下で濃縮した。位置異性体、化合物118aと119aを、0.5%の酢酸を含有するDCM中の0-5%のメタノールのグラジエントで溶出するCombi Flash (登録商標) によって分離した。化合物118aを、逆相HPLC (Thermo Scientific (商標) Aquasil (商標) C18, 250 x 21.2mm, 5 μm, 20mL / 分, 0.1%のTFA中の水 / ACN、勾配溶出) によってさらに精製し、13mgの化合物118a (構造28c) を得た。化合物119aを同じ条件下で精製し、16mgの化合物119a (構造31c) を得た。

40

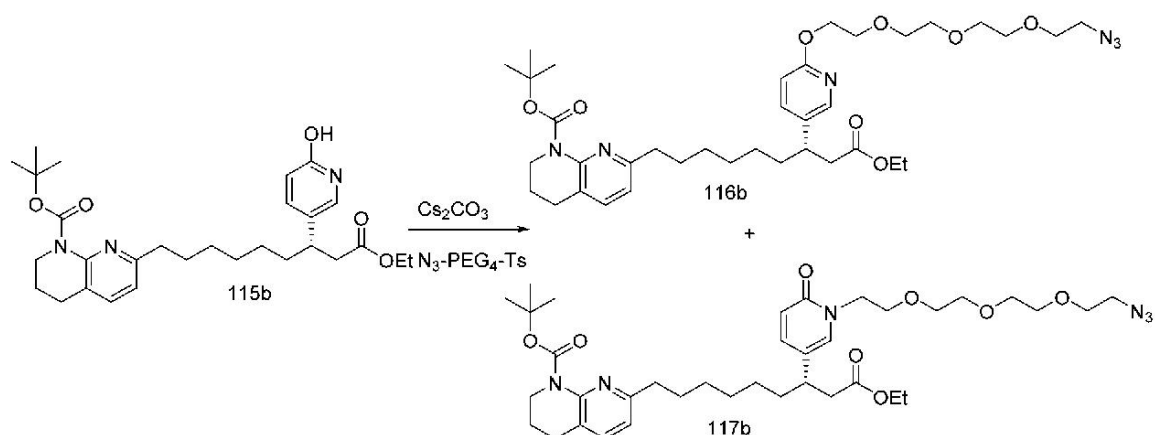
## 【 0 3 1 9】

構造29c ((S)-3-(6-(2-(2-(2-(2-アジドエトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)ピリジン-3-イル)-9-(5,6,7,8-テトラヒドロ-1,8-ナフチリジ

50

ン - 2 - イル) ノナン酸) および 30c ( (S) - 3 - (1 - (2 - (2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ) エトキシ) エチル) - 6 - オキソ - 1,6 - ジヒドロピリジン - 3 - イル) - 9 - (5,6,7,8 - テトラヒドロ - 1,8 - ナフチリジン - 2 - イル) ノナン酸)

【化 1 7 8】



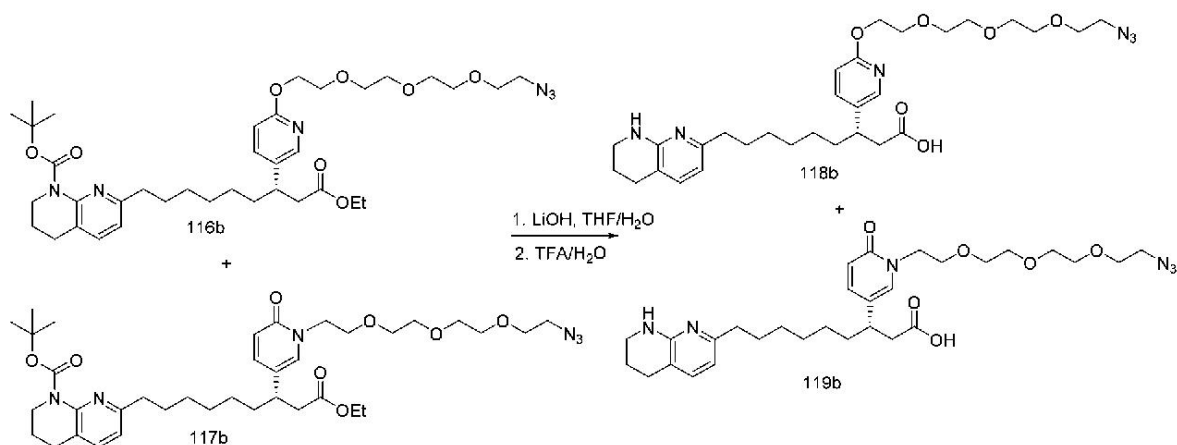
10

【0 3 2 0】

DMF (0.5mL) 中の化合物 115b (40mg、0.08mmol) および  $N_3$  - PEG<sub>4</sub> - OTs (58mg、0.16mmol) の溶液に、炭酸セシウム (51mg、0.16mmol) を加えた。反応混合物を 40℃ にて 30 分間攪拌した。反応混合物を、 $NaHCO_3$  水溶液 (1mL) でクエンチし、次に、酢酸エチル (3x3mL) によって抽出した。有機相を減圧下で濃縮した。N - および O - アルキル化位置異性体の粗混合物を、それに続いてさらなる精製なしで使用した。

20

【化 1 7 9】



30

【0 3 2 1】

THF (0.75mL) 中の化合物 116b と 117b (56mg、0.08mmol、9a : 10a の 4 : 6 混合物) の溶液、ならびに脱イオン水 (0.75mL) に、水酸化リチウム (6mg、0.25mmol) を加えた。反応混合物を、45℃ にて 2.5 時間攪拌した。水酸化リチウムの追加部分 (6mg、0.25mmol) を加え、そして、反応混合物を 2.5 時間攪拌した。反応温度を 35℃ まで下げ、そして、混合物を一晩攪拌した。反応混合物を、6N の HCl 水溶液で pH = 7 まで酸性化し、そして、減圧下で濃縮した。位置異性体、化合物 118b と 119b を、0.5% の酢酸を含有する DCM 中の 0 - 5% のメタノールのグラジエントで溶出する CombiFlash (登録商標) によって分離した。化合物 118b を、逆相 HPLC (Thermo Scientific (商標) Aquasil (商標) C18, 250 x 21.2mm, 5 μm, 20mL / 分、0.1% の TFA 中の水 / ACN、勾配溶出) によってさらに精製し、14mg の化合物 118b (構造 29c) を得た。化合物 119b を同じ条件下で精製し、18mg の化合物 119b (構造 30c) を得た。

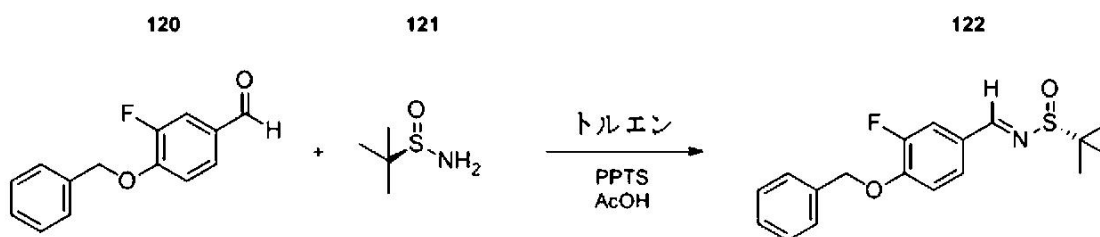
40

【0 3 2 2】

50

構造32c ( (R) - 3 - ( 4 - ( 2 - ( 2 - ( 2 - アジドエトキシ ) エトキシ ) エトキシ ) - 3 - フルオロフェニル ) - 3 - ( N - メチル - 5 - ( 5,6,7,8 - テトラヒドロ - 1,8 - ナフチリジン - 2 - イル ) ペンタンアミド ) プロパン酸 ) の合成

【化180】



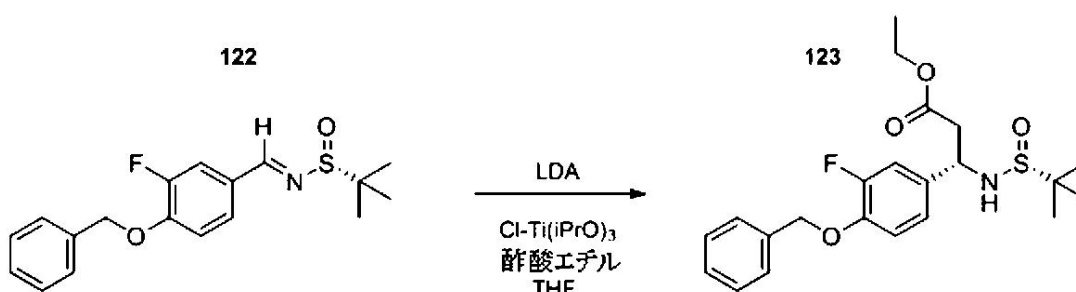
10

【0323】

3 シープを介したトルエン ( 80mL ) 中の化合物120 ( 2.75g、11.94mmol ) に、化合物121 ( 5.79g、47.78mmol )、続いてPPTS ( 300mg、1.19mmol )、次にAcOH ( 683  $\mu$ L、11.94mmol ) を加えた。反応物を一晚還流温度にした。完了時に、反応物を、飽和重炭酸ナトリウムの添加によってクエンチした。有機層を、2倍量の酢酸エチルで希釈し、分離し、硫酸ナトリウムを介して濾過した。生成物を、ヘキサン中の酢酸エチルのグラジエント ( 0 - 30 % ) で溶出するシリカによって単離して、2.054g ( 54 % ) を得た。

20

【化181】



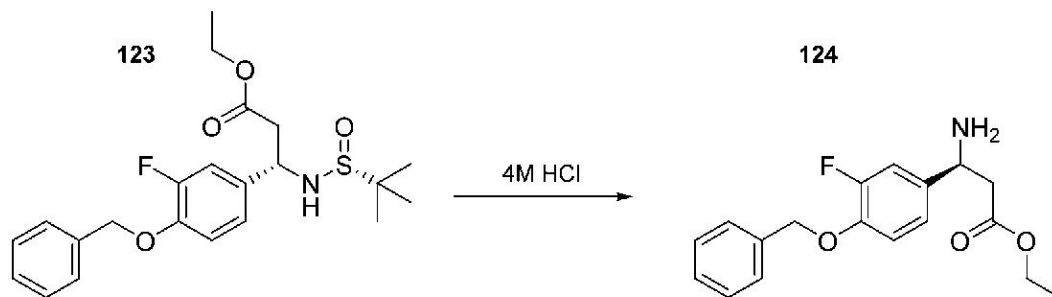
30

【0324】

- 78 にてTHF ( 15mL ) 中のDIA ( 2.85mL、20.33mmol ) に、n - BuLi ( 7.76mL、19.41mmol ) の2.5M溶液を滴下して加えた。攪拌を - 78 にて5分間続け、そして、酢酸エチル ( 1.81mL、18.48mmol ) を滴下して加えた。攪拌を - 78 にてさらに10分間続け、そして、THF ( 10mL ) 中のクロロチタニウムトリイソプロポキシド ( 9.27mL、38.381mmol ) の溶液を滴下して加えた。攪拌を - 78 にてさらに15分間続け、そして、THF ( 10mL ) 中の化合物122 ( 2.054g、6.16mmol ) の溶液を滴下して加えた。攪拌を - 78 にて1.5時間続けた。完了時に、反応物を、飽和重炭酸アンモニウムの添加によってクエンチした。懸濁液を6倍量の酢酸エチルで希釈し、そして、有機層を、分離し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、濃縮した。生成物を、ヘキサン中の酢酸エチルのグラジエントで溶出するシリカによって単離して、1.043g ( 53 % ) を得た。

40

## 【化 1 8 2】

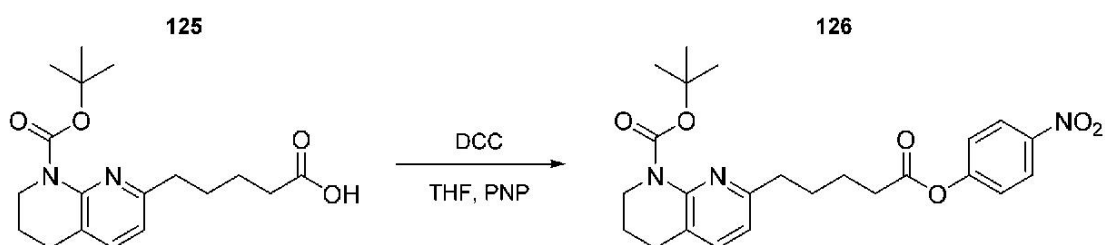


10

## 【 0 3 2 5】

MeOH (3mL) 中で撹拌した化合物123 (1.043g、2.47mmol) に、ジオキサン中の4 MのHCl溶液 (3.09mL、12.37mmol) を加えた。脱保護の完了時に、溶液を水 (8mL) で希釈し、ジエチルエーテル (6mL) で2回洗浄した。続いて、水層を水酸化ナトリウムによってpH11に調整した。沈殿物を酢酸エチルによって抽出し、そして、合わせた有機抽出物を、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、濃縮し、さらなる精製なしで使用する 0.616g (78.5%) の生成物124を得た。

## 【化 1 8 3】



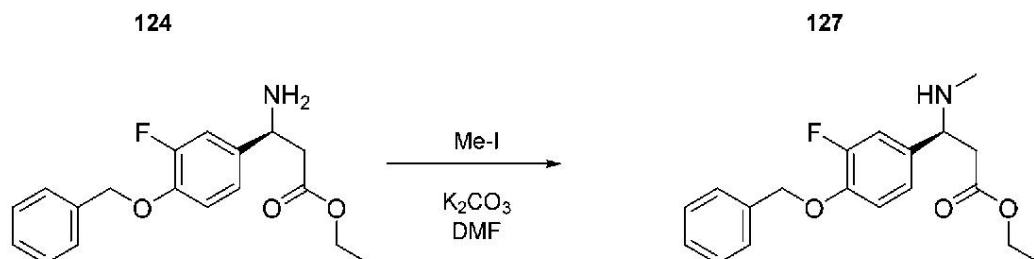
20

## 【 0 3 2 6】

0 にてTHF (1.5mL) 中の化合物125 (92.1mg、0.275mmol) に、DCC (68.1mg、0.331mmol) を加えた。5分後に、PNP (106.1mg、0.331mmol) を加え、アイスバスを外し、そして、撹拌を1時間続けた。完了時に、懸濁液を -20 にて1時間冷却し、そして、濾過によって沈殿を除去した。上清を濃縮し、そして、続いてさらなる精製なしで使用する、129mg (103%) の粗生成物126を得た。

30

## 【化 1 8 4】



40

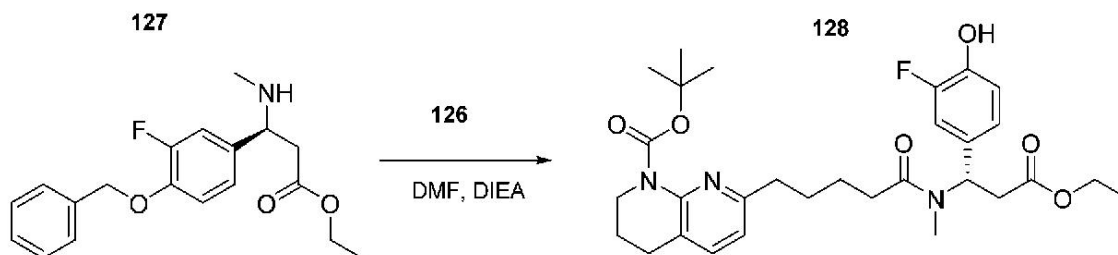
## 【 0 3 2 7】

DMF (2mL) 中の化合物124 (148.6mg、0.468mmol) と炭酸カリウム (129mg、0.937mmol) を含有する混合物を、ヨウ化メチル (66.5mg、0.468mmol) によって処理し、そして、50 にて3時間撹拌した。アルキル化の完了時に、すべての揮発物を除去し、そして、生成物を、それぞれ1%のTEAで緩衝化したヘキサン中の酢酸エチルのグラジエントで溶出するシリカによって単離して、94.6mg (61%) を得た。

50



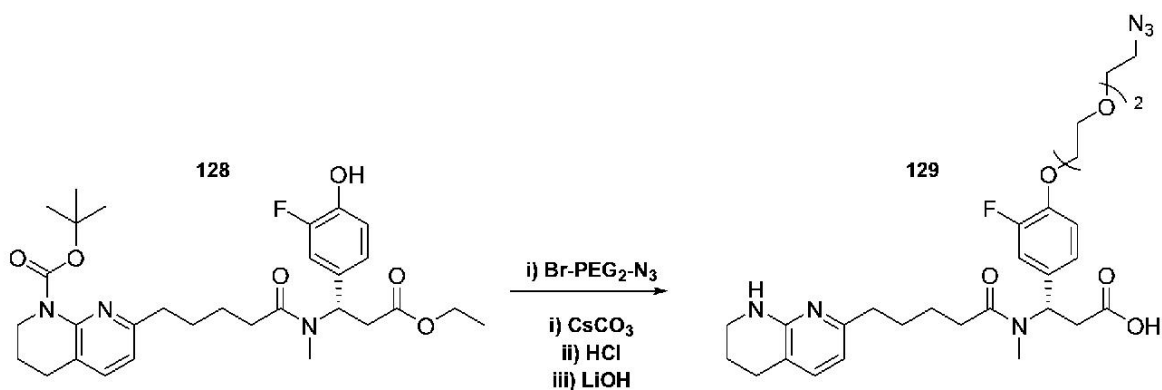
## 【化 1 8 5】



## 【 0 3 2 8】

DMF (2mL) 中の化合物127 (94.5mg、0.285mmol) に、DIEA (149  $\mu$ L、0.856 mmol) に加え、続いて、化合物126 (129.9mg、0.285mmol) を加え、そして、混合物を80  $^{\circ}$ Cにて1時間撹拌した。完了時に、すべての揮発物を除去し、そして、粗生成物を、MeOH (20mg) 中に溶解し、10%のパラジウム炭素で処理し、そのフラスコに60PSIの水素を投入した。完了時に、懸濁液を濾過した。上清を濃縮し、そして、得られた粗生成物を、それに続いてさらなる精製なしで使用した。

## 【化 1 8 6】



## 【 0 3 2 9】

DMF (2mL) 中の化合物128 (159mg、0.285mmol)、ブロモ - PEG<sub>2</sub> - アジド (74.7mg、0.314mmol)、および炭酸セシウム (204mg、0.627mmol) を含有する混合物を、2時間60  $^{\circ}$ Cに加熱した。完了時に、すべての揮発物を除去し、そして、粗生成物を、ジオキサン (0.5mL、2mmol) 中の4MのHClで処理し、3時間40  $^{\circ}$ Cに加熱した。完了時に、すべての揮発物を除去した。粗生成物を、THF (1mL)、MeOH (1.5mL)、およびH<sub>2</sub>O (1.5mL) の混合物中に懸濁し、水酸化リチウム (83.5mg、3.48mmol) で処理し、そして、16時間40  $^{\circ}$ Cに加熱した。完了時に、TFAでpHを3に調整し、そして、生成物を、0.1%のTFAを含有する水中のアセトニトリルのグラジエントで溶出するPhenomenex (登録商標) Gemini (登録商標) C18カラム (21.2x250mm、5ミクロン) を介した分離によって単離して、33.1mg (20%) を得た。

## 【 0 3 3 0】

構造33c ( (R) - 1 - アジド - 1,3 - (3 - フルオロ - 4 - メトキシフェニル) - 12 - (5 - (5,6,7,8 - テトラヒドロ - 1,8 - ナフチリジン - 2 - イル) ペンタノイル) - 3,6,9 - トリオキサ - 12 - アザペンタデカン - 15 - オイック酸) の合成

10

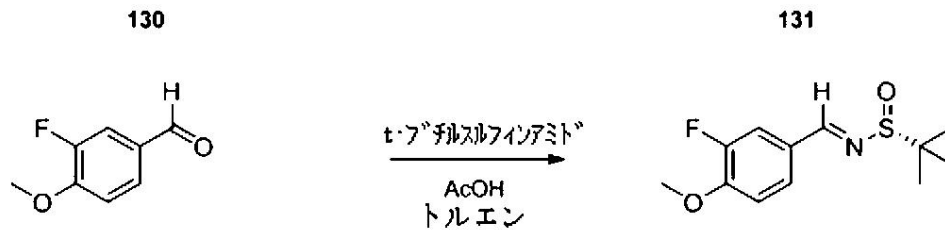
20

30

40

50

## 【化 1 8 7】

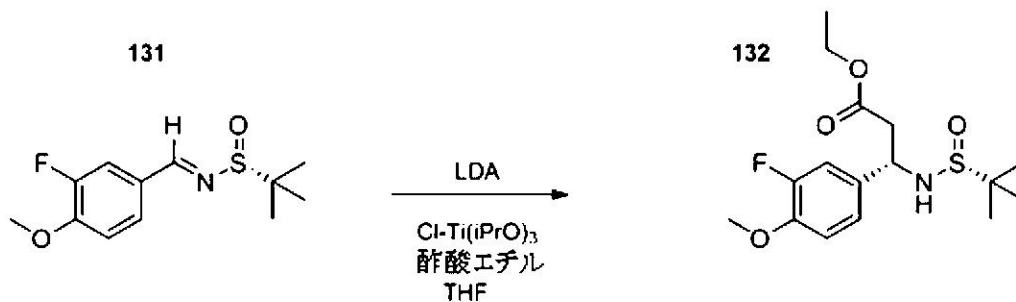


## 【 0 3 3 1】

10

トルエン（45mL）中の化合物130（1.5g、9.73mmol）、（R）*t*-ブチルスルフィンアミド（2.36g、19.46mmol）、およびAcOH（0.14mL）を含有する混合物を、ディーン-スタークトラップを備えたフラスコ内で16時間還流した。完了時に、反応物を、飽和重炭酸ナトリウムの添加によってクエンチした。有機層を、分離し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、そして、濃縮した。生成物を、ヘキサン中の酢酸エチルのグラジエントで溶出するシリカを介した分離によって単離して、1.714g（68.4%）を得た。

## 【化 1 8 8】



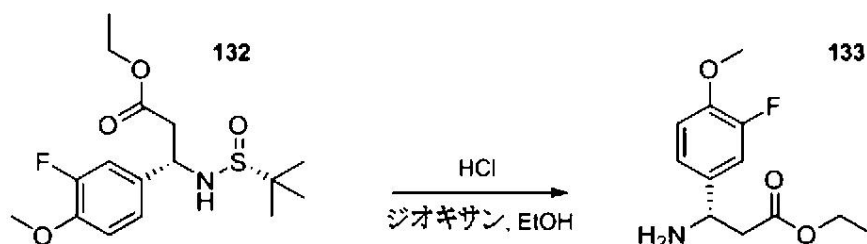
20

## 【 0 3 3 2】

- 78 にてTHF（18mL）中のDIA（3.056mL、21.80mmol）に、*n*-BuLi（8.324mL、20.81mmol）の2.5Mの溶液を滴下して加えた。撹拌を - 78 にて5分間続け、そして、酢酸エチル（1.94mL、19.82mmol）を滴下して加えた。撹拌を - 78 にてさらに10分間続け、そして、THF（10mL）中のクロロチタニウムトリイソプロポキシド（9.94mL、41.62mmol）の溶液を滴下して加えた。撹拌を - 78 にてさらに15分間続け、そして、THF（12mL）中の化合物131（1.70g、6.61mmol）の溶液を滴下して加えた。撹拌を - 78 にて1.5時間続けた。完了時に、反応物を、飽和重炭酸アンモニウムの添加によってクエンチした。懸濁液を、7倍量の酢酸エチルで希釈し、そして、有機層を、分離し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、濃縮した。生成物を、ヘキサン中の酢酸エチルのグラジエントで溶出するシリカによって単離して、0.984g（43%）を得た。

30

## 【化 1 8 9】



40

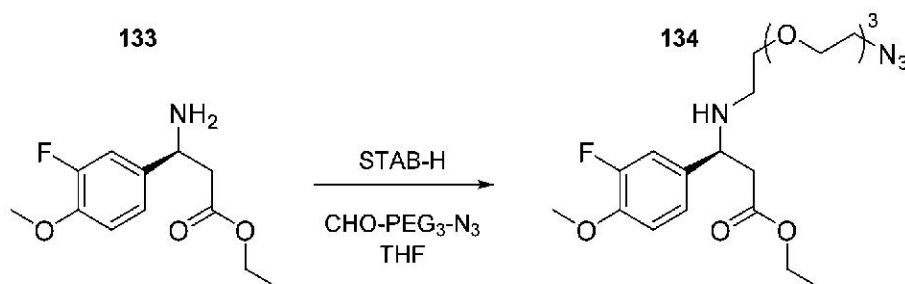
## 【 0 3 3 3】

0 にてEtOH（6mL）中の化合物132（0.975g、2.82mmol）に、ジオキサン中の4MのHCl（2.12mL、8.47mmol）を加え、そして、30分間撹拌した。完了時に、反応物

50

を、水（15mL）で希釈し、そして、ジエチルエーテルで洗浄した。有機層を、分離し、そして、水層のpHを水酸化ナトリウムによって12に調整した。水層を、5倍量の酢酸エチルによって洗浄し、そして、有機層を、分離し、硫酸ナトリウムを介して濾過し、濃縮した。生成物を、1%のTEAを含有するヘキサン中の酢酸エチルのグラジエントで溶出するシリカを介した分離によって単離して、0.434g（64%）を得た。

【化190】



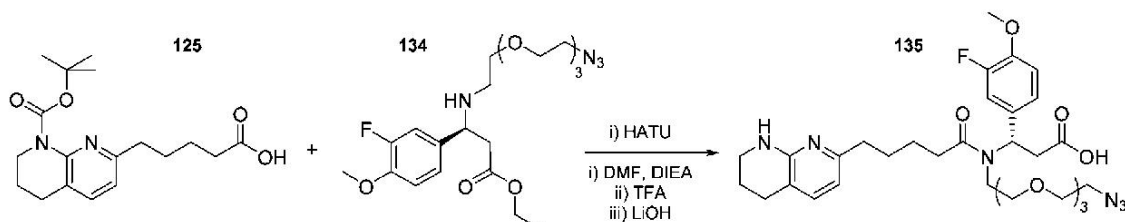
10

【0334】

3Aモレキュラーシーブを用いたTHF（2mL）中の化合物133（0.120g、0.497mmol）とPEG（0.151g、0.696mmol）の混合物に、STAB-H（0.253g、1.19mmol）を加え、そして、懸濁液を室温にて16時間撹拌した。完了時に、反応物を飽和重炭酸ナトリウムの添加によってクエンチし、そして、粗生成物を、三分割した酢酸エチルで抽出した。分離した有機抽出物を、合わせ、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、そして、濃縮した。得られた粗生成物を、それに続いてさらなる精製なしで使用した。

20

【化191】



30

【0335】

DMF（2mL）中の化合物134（0.200g、0.597mmol）を、HATU（0.227g、0.597mmol）で処理し、5分間撹拌した。活性化エステルに、DIEA（0.259mL、1.49mmol）を加え、続いて、DMF（1mL）中の化合物125（0.220g、0.497mmol）を加え、そして、得られた混合物を1時間撹拌した。すべての揮発物を除去し、得られた粗生成物を、純粋なTFA（3.8mL）で処理し、そして、40℃にて3時間撹拌した。BOC除去完了時に、すべての揮発物を除去し、そして、THF（4mL）、水（8mL）、およびMeOH（8mL）の混合物中に粗生成物を懸濁した。得られた混合物を、LiOH（71.6mg、2.98mmol）で処理し、16時間40℃に加熱した。完了時に、TFAでpHを3に調整し、そして、生成物を、0.1%のTFAを含有する、水中のアセトニトリルのグラジエントで溶出するPhenomenex（登録商標）Gemini（登録商標）c18カラム（21.2x250mm、5ミクロン）を介して分離によって単離して、56.2mg（18%、3ステップ）を得た。

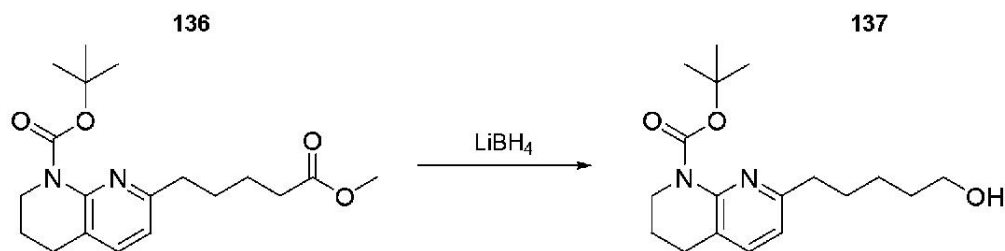
40

【0336】

構造34c（（S）-1-アジド-13-（3-フルオロ-4-メトキシフェニル）-12-（5-（5,6,7,8-テトラヒドロ-1,8-ナフチリジン-2-イル）ペンチル）-3,6,9-トリオキサ-12-アザペンタデカン-15-オイック酸）の合成

50

## 【化 1 9 2】

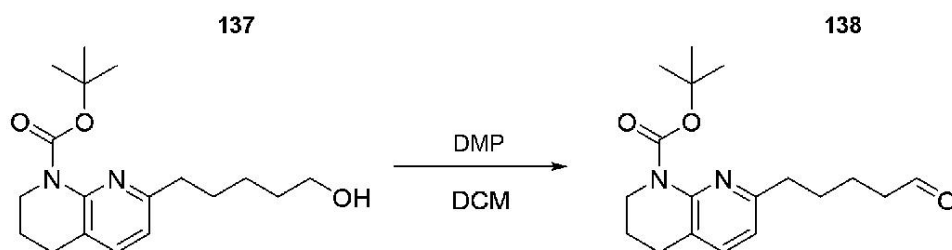


## 【 0 3 3 7】

10

0 にてTHF (9.0mL) とMeOH (0.5mL) の混合物中の化合物**136** (0.500g、1.45 mmol) を、水素化ホウ素リチウム (94.5mg、4.34mmol) で処理した。冷却を外し、そして、ガス放出が止むまで、撹拌を続けた。反応混合物を5倍量のEtOAcで希釈した。有機層を、重炭酸アンモニウムによって洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、そして、濃縮した。生成物を、ヘキサン中の酢酸エチルのグラジエントを使用したシリカを介した溶出によって単離して、309mg (67%) を得た。

## 【化 1 9 3】



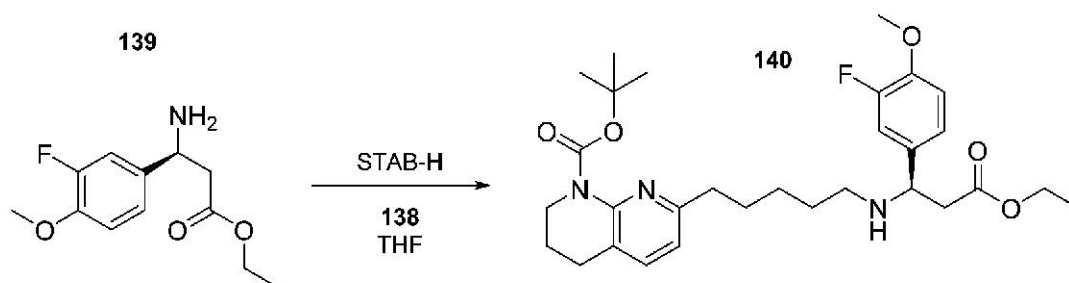
20

## 【 0 3 3 8】

0 にてDCM (9mL) 中の化合物**137** (0.305g、0.952mmol) を含有する溶液に、数個に分割したマーチン試薬を加えた。数滴の水を加え、冷却を外し、そして、反応物を3時間撹拌した。完了時に、混合物を飽和重炭酸ナトリウムで洗浄し、次に、飽和チオ硫酸ナトリウムで洗浄した。分離した有機部分を、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、そして、濃縮した。生成物**138**を、DCM中のMeOHのグラジエントで溶出するシリカを介して分離して、140mg (46%) を得た。

30

## 【化 1 9 4】



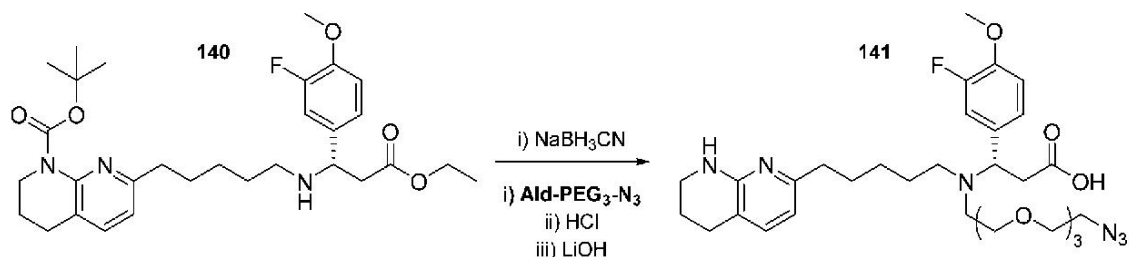
40

## 【 0 3 3 9】

3 モレキュラーシーブを用いたTHF中 (2.5mL) の化合物**1** (85.2mg、0.353mmol) と**138** (134.9mg、0.424mmol) を含有する混合物に、STAB-H (0.150g、0.706 mmol) を加え、そして、得られた懸濁液を16時間40 に加熱した。完了時に、反応物を、5倍量の酢酸エチルで希釈し、飽和重炭酸ナトリウムで処理した。有機層を、分離し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、そして、濃縮した。生成物を、1%のTEAを含有するDCM中のMeOHのグラジエントで溶出するシリカを介した分離によって単離して、64mg (33%) を得た。

50

## 【化 1 9 5】



10

## 【 0 3 4 0】

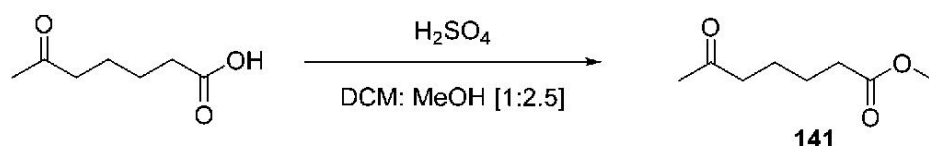
3 モレキュラーシーブを用いたMeOH (1 mL) 中の化合物140 (60 mg、0.110 mmol)、Ald-PEG<sub>3</sub>-N<sub>3</sub> (71.9 mg、0.331 mmol) およびAcOH (3  $\mu\text{L}$ 、0.0276 mmol) を含有する混合物に、シアノ水素化ホウ素ナトリウム (28.9 mg、0.276 mmol) を加え、そして、反応物を40 °Cにて3時間撹拌した。完了時に、混合物を0 °Cに冷やし、そして、水 (0.15 mL) を加えた、そして、その溶液を、ジオキサン中のHCl (4 M) を使用してpH 7に酸性化した。それに続いて、すべてのメタノールを除去し、ジオキサン中の4 MのHCl (0.138 mL、0.552 mmol) を加え、そして、混合物を40 °Cにて2時間撹拌した。BOC除去完了時に、すべての揮発物を除去し、粗生成物を、THF (1 mL)、水 (2 mL)、およびMeOH (2 mL) の混合物中に懸濁し、水酸化リチウム (26.5 mg、1.104 mmol) で処理した。エステル除去完了時に、TFAの添加によってpHを3に調整し、そして、生成物を、0.1%のTFAを含有する、水中のアセトニトリルのグラジエントで溶出するPhenomenex (登録商標) (21.2x250 mm) C18カラムを介した分離によって単離して、16.4 mg (24%、3ステップ) を得た。

20

## 【 0 3 4 1】

構造36c ((S)-3-(4-(2-(2-(2-(2-アジドエトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)-3-フルオロフェニル)-9-(5,6,7,8-テトラヒドロ-1,8-ナフチリジン-2-イル)ノナン酸)の合成

## 【化 1 9 6】



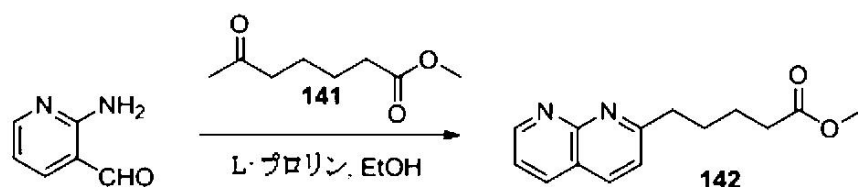
30

## 【 0 3 4 2】

DCM (30 mL) とMeOH (75 mL) 中の6-オキソヘプタン酸 (9.74 g、68 mmol) の溶液に、室温にてconc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0.18 mL、3.4 mmol) を加えた。反応混合物を一晩還流した。次に、反応混合物を、オイルまで濃縮し、DCM (150 mL) 中に再溶解し、そして、飽和 $\text{NaHCO}_3$ 水溶液 (2x40 mL) と塩水 (40 mL) で洗浄した。有機層を、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  上で乾燥させ、濾過し、そして、濃縮した。生成物をさらなる精製なしで次のステップに使用した。化合物141の収率: 10.2 g (95%)。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ): 3.58 (s, 3H), 2.43 (t, 2H), 2.29 (t, 2H), 1.46 (m, 4H)。

40

## 【化 1 9 7】



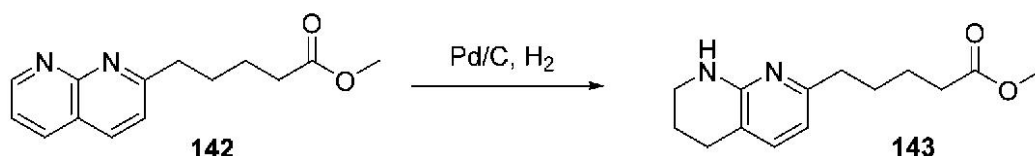
50

## 【 0 3 4 3 】

EtOH (80mL) 中の化合物141 (10.2g、65mmol) と2 - アミノ - 3 - ホルミルピリジン (7.89g、65mmol) の溶液に、L - プロリン (3.72g、32mmol) を加えた。反応混合物を一晩還流温度に加熱した。次に、反応混合物を、濃縮し、EtOAc (50mL) 中に溶解し、水 (3x30mL) で洗浄した。有機相を、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上で乾燥させ、濾過し、そして、濃縮した。残渣を、固定相としてシリカゲルを使用したCombiFlashによって精製し、かつ、DCM中のEtOAcのグラジエント (10 - 100%) で溶出した。化合物142の収率：6.08g (39%)。C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>について計算した質量 [M + H]<sup>+</sup>：245.13、実測値：245.21。

## 【 化 1 9 8 】

10

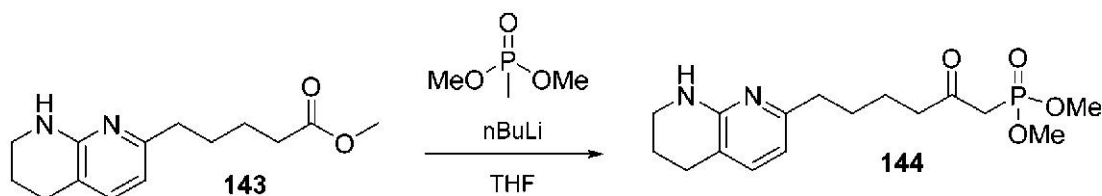


## 【 0 3 4 4 】

MeOH (50mL) 中の化合物142 (6.08g、24.9mmol) の溶液に、Pd / C (10% 添加、Degussa型、1.99g、1.87mmol) を加えた。反応フラスコに、窒素を投入し、排気し、窒素で3回バックフィルした。このプロセスを水素で反復し、最後に反応器に水素 (1atm) を投入し、そして、室温にて一晩攪拌した。反応混合物を、Celite (登録商標) を介して濾過し、パッドをMeOHでリンスし、そして、濾液を濃縮した。生成物、化合物143を、さらなる精製なしに次のステップに使用し、そして、100%の収率と仮定した。C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>について計算した質量 [M + H]<sup>+</sup>：249.16、実測値：249.08。

20

## 【 化 1 9 9 】



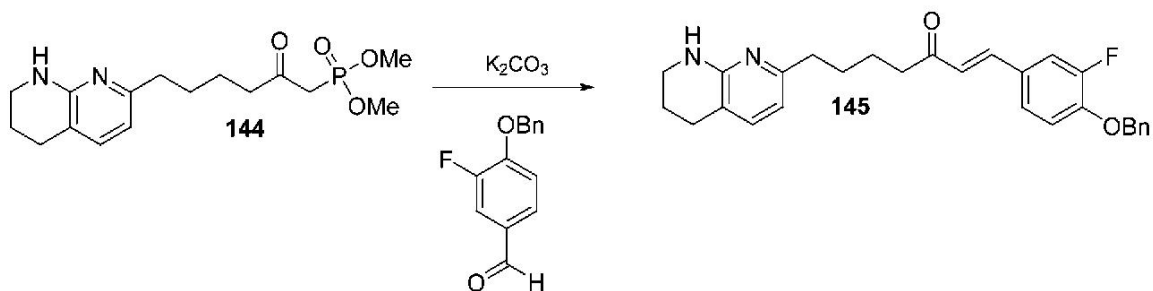
30

## 【 0 3 4 5 】

無水THF (120mL) 中のジメチルメチルホスホン酸エステル (12.3g、100mmol) の溶液に、-78℃にてシリンジポンプを介して1時間かけてn - BuLi溶液 (ヘキサン中に2.5M、40mL、100mmol) を加えた。THF (40mL) 中の化合物143 (6.175g、24.9mmol) の溶液を、-78℃にて45分間かけて反応混合物に加えた。-78℃にて20分間攪拌した後に、反応混合物を、飽和NH<sub>4</sub>Cl水溶液 (200mL) でクエンチし、室温まで温め、そして、EtOAc (400mL) で抽出した。有機層を水 (200mL) と塩水 (200mL) で洗浄した。有機相を、分離し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上で乾燥させ、濾過し、そして、濃縮した。生成物をさらなる精製なしで次のステップに使用した。化合物144の収率：7.86g (93%)。C<sub>16</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Pについて計算した質量 [M + H]<sup>+</sup>：341.17、実測値：341.17。

40

## 【化 2 0 0】



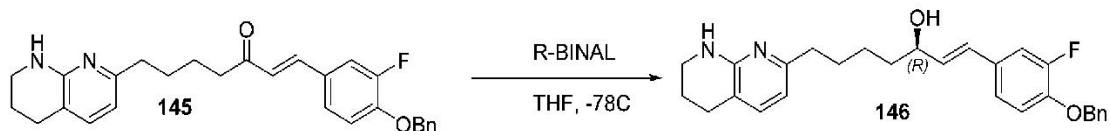
10

## 【 0 3 4 6】

THF (13.5mL) 中の3 - フルオロ - 4 - (フェニルメトキシ) - ベンズアルデヒド (0.38g、1.65mmol)、化合物144 (0.67g、1.98mmol)、および無水炭酸カリウム (0.547g、3.96mmol) の懸濁液を、還流温度にて一晩加熱した。追加の3 - フルオロ - 4 - (フェニルメトキシ) ベンズアルデヒド (0.19g、0.83mmol) と炭酸カリウム (0.23g、1.65mmol) を加え、そして、反応混合物をさらに4時間還流した。混合物を、EtOAc (100mL) で希釈し、水 (30mL) と塩水 (30mL) で洗浄した。有機相を、分離し、 $Na_2SO_4$  上で乾燥させ、濾過し、そして、濃縮した。残渣を、固定相としてシリカゲルを使用したCombiFlashによって精製し、かつ、DCM中のMeOHのグラジエント (0 - 10%) で溶出した。化合物145の収率：446mg (61%)。  $C_{28}H_{29}FN_2O_2$  について計算した質量  $[M+H]^+$ ：445.23、実測値：445.41。

20

## 【化 2 0 1】



## 【 0 3 4 7】

R - BINALの調製：無水THF (34mL) 中のLAH (0.396g、10.4mmol、0.98eq) のスラリーに、10分間かけてTHF (3.2mL) 中の溶液としてEtOH (0.492g、10.65mmol、1.00eq) を加え、それと同時に、内部温度  $< 35^\circ C$  を維持した。30分間エイジングした後に、内部温度  $< 35^\circ C$  (約10分間) を維持しながら、THF (10mL) 中の溶液としてR - BINOL (3.05g、10.65mmol、1.00eq) を加えた。室温にて2時間撹拌した後に、反応混合物をドライアイス / アセトンバス内で  $-78^\circ C$  に冷やした。

30

## 【 0 3 4 8】

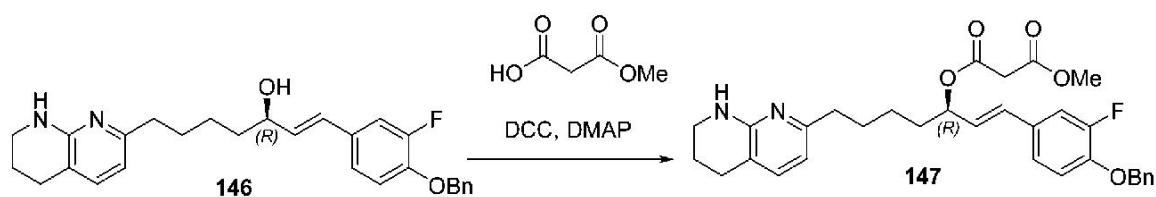
化合物145 (1.18g、2.65mmol) を、無水トルエン (50mL) との共沸で乾燥させ、そして、無水THF (12mL) 中に溶解した。化合物145の溶液を、 $-78^\circ C$  にて45分間かけてシリンジポンプを介してR - BINALの溶液を滴下して加えた。1.5時間後に、反応器を非常に大きいデュワーに移し、ドライアイス / アセトンで満たし、そして、アルミホイルで覆った。反応混合物を  $-78^\circ C$  にて一晩撹拌した。減少の大部分は初めの1.5時間以内に起こり、ごく少量の追加の転換を伴った。反応物を、飽和  $NH_4Cl$  水溶液 (150mL) の添加によってクエンチし、そして、室温に温めた。混合物を、6NのHClを使用して  $pH = 7$  に酸性化し、次に、EtOAc (2x250mL) で抽出した。合わせた有機相を、水 (125mL) と塩水 (125mL) で洗浄した。有機相を、 $Na_2SO_4$  上で乾燥させ、濾過し、そして、濃縮した。残渣を、固定相としてシリカゲルを使用したCombiFlashによって精製し、かつ、DCM中のMeOHのグラジエント (0 - 5%) で溶出した。化合物146の収率：634mg (53%)。キラル純度を、分析用キラルHPLC、Chiralpak AD - Hカラム 4.6x250mm、5ミクロン、EtOH 0.1% のジエチルアミンイソクラティック、1.75mL / 分によって測定した。第一の溶出R異性体は86面積%の純度であり、72%のeeに相当する。化合物6を、キラル準

40

50

調製用HPLC (Chiralpak AD - H 21.2 × 250mm、5ミクロン、EtOH 0.1%のジエチルアミン、20mL/分) によってさらに精製した。化合物146の最終的な収率：445mg (98%のee)。C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>について計算した質量 [M + H]<sup>+</sup>：447.25、実測値：447.30。

【化202】



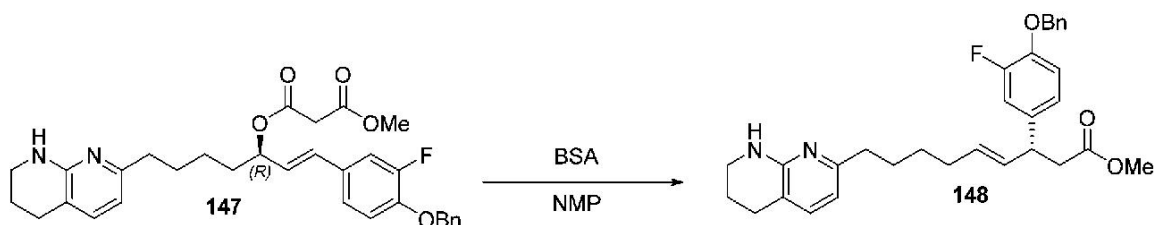
10

【0349】

DCM (3mL) 中の化合物146 (0.325g、0.73mmol) とマロン酸モノメチルエステル (0.103g、0.87mmol) の溶液に、DCM中のDMAP (9mg、0.073mmol) の溶液を加えた。混合物を0℃に冷やし、そして、DCC (0.180g、0.87mmol) を加えた。冷却バスを外し、そして、反応物を室温にて一晩撹拌した。次に、反応混合物を、DCM (10mL) で希釈し、濾過した。濾液を、濃縮し、そして、固定相としてシリカゲルを使用し、DCM中のMeOHのグラジエント (0 - 5%) で溶出するCombiFlashによって精製した。化合物147の収率：142mg (37%)。C<sub>32</sub>H<sub>35</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>について計算した質量 [M + H]<sup>+</sup>：547.26、実測値：547.58。

20

【化203】



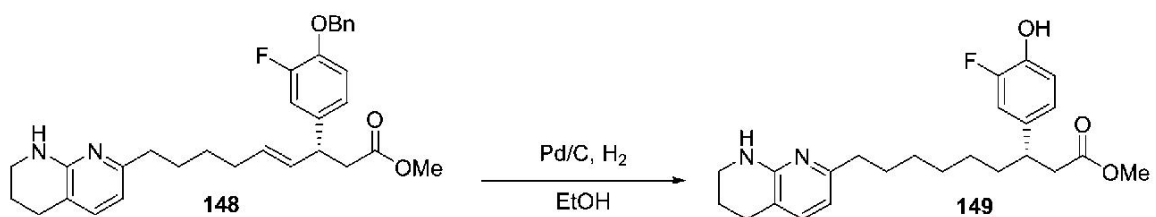
30

【0350】

NMP (0.5mL) 中の化合物147 (0.232g、0.42mmol) の溶液に、室温にてN,O - ビス(トリメチルシリル)アセトアミド (0.229g、1.12mmol) を加えた。混合物を60℃にて30分間加熱した。塩水 (58 μL) を5分間かけて二分割して加えた。次に、反応混合物を90℃にて3時間、次に、室温にて一晩加熱した。反応混合物を、EtOAc (12mL) で希釈し、そして、水 (3mL) で洗浄した。水層を、EtOAc (12mL) で逆抽出した。合わせた有機層を濃縮した。残渣を、固定相としてシリカゲルを使用したCombiFlashによって精製し、かつ、DCM中のMeOHのグラジエントで溶出した。化合物148の収率：140mg (66%)。C<sub>31</sub>H<sub>35</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>について計算した質量 [M + H]<sup>+</sup>：503.27、実測値：503.29。

40

【化204】



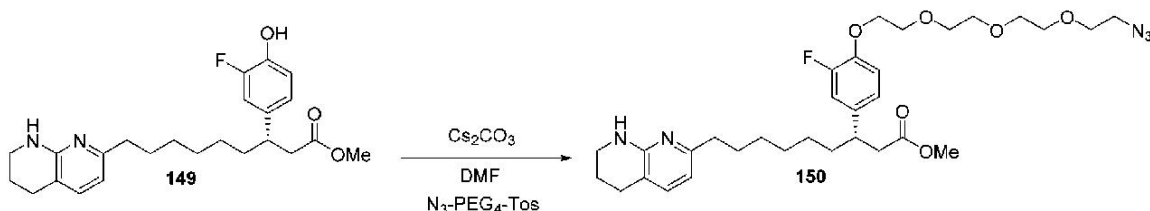
【0351】

50



EtOH (3 mL) 中の化合物148 (0.169g、0.34mmol) の溶液に、EtOH (1 mL) 中の Pd/C (10% 添加、36mg、0.034mmol) のスラリーを加えた。反応器を加圧し、そして、水素で3回換気した。反応器を3時間55psiまで再加圧した。反応混合物を、MeOH (5 mL) で希釈し、そして、濾過した。濾液を濃縮し、そして、生成物、化合物149をさらなる精製なしに次のステップに使用し、100%の収率であると仮定した。C<sub>24</sub>H<sub>31</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>3</sub> について計算した質量 [M + H]<sup>+</sup>: 415.24、実測値: 415.07。

【化 2 0 5】



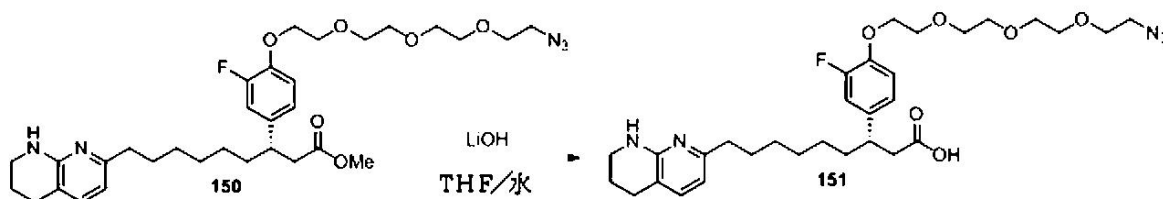
10

【 0 3 5 2】

DMF (2.5 mL) 中の化合物149 (139mg、0.34mmol) とアジド - PEG<sub>4</sub> - トシレート (0.188mg、0.50mmol) の溶液に、炭酸セシウム (164mg、0.50mmol) を加えた。反応混合物を、40 °C にて1時間加熱し、次に、飽和NaHCO<sub>3</sub>水溶液 (3 mL) でクエンチした。混合物をEtOAc (3x10 mL) で抽出した。合わせた有機相を水 (2x5 mL) で洗浄した。有機相を、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上で乾燥させ、濾過し、濃縮し、そして、さらなる精製なしで次のステップに使用した。C<sub>32</sub>H<sub>46</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>6</sub> について計算した質量 [M + H]<sup>+</sup>: 616.35、実測値: 616.90。

20

【化 2 0 6】



30

【 0 3 5 3】

THF (1.5 mL) と水 (1.5 mL) 中の化合物150 (0.207mg、0.34mmol) の溶液に、水酸化リチウム (0.040g、1.68mmol) を加えた。反応混合物を一晩40 °C に加熱した。翌朝に、反応混合物を、6NのHClでpH = 7に酸性化し、そして、減圧下で濃縮した。残渣を、H<sub>2</sub>O、0.1%のTFA中の35%のACNで溶解し、そして、RP - HPLC (Thermo Aquasil C18、250x21mm、5 μm、20 mL / 分、0.1%のTFAを含有するH<sub>2</sub>O中のACNのグラジエント) によって精製した。化合物151 (SM 36) の収率: 125mg (3ステップを通じて52%)。C<sub>31</sub>H<sub>44</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>6</sub> について計算した質量 [M + H]<sup>+</sup>: 602.34、実測値: 602.85。

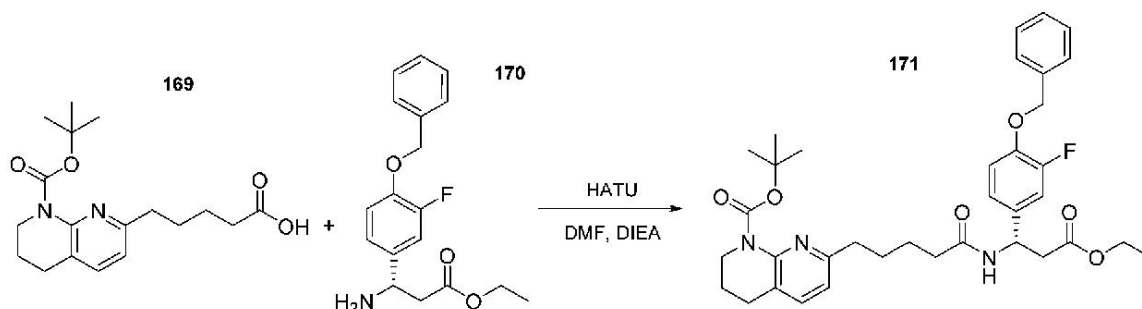
40

【 0 3 5 4】

構造37c ((S) - 3 - (4 - (2 - (2 - (2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ) エトキシ) エトキシ) - 3 - フルオロフェニル) - 3 - (5 - (5,6,7,8 - テトラヒドロ - 1,8 - ナフチリジン - 2 - イル) ペンタンアミド) プロパン酸) の合成

50

## 【化 2 0 7】

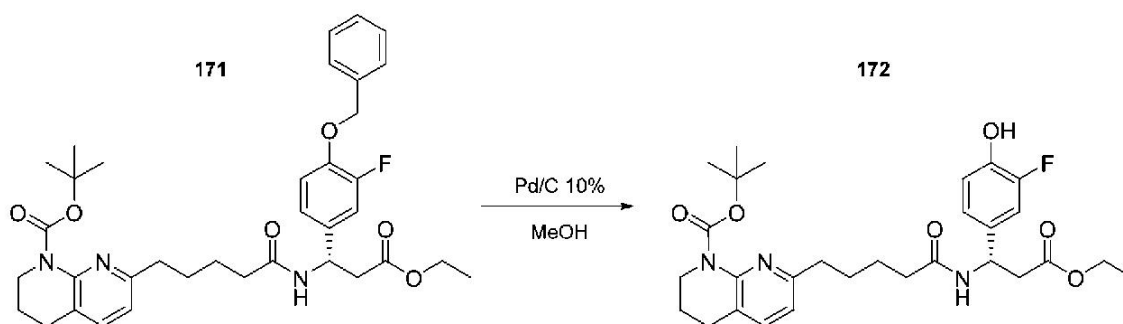


10

## 【 0 3 5 5】

DMF (1.5mL) 中の化合物169 (90mg、0.268mmol) は、HATU (112mg、0.295mmol) で処理し、そして、5分間撹拌した。DMF (0.5) 中の化合物170 (94mg、0.295mmol) とDIEA (0.154mL、0.884mmol) を含有する混合物を、それに続いて加え、そして、撹拌を1時間続けた。完了時に、すべての揮発物を除去した、そして、化合物171を、DCM中のMeOHのグラジエントで溶出するするシリカを介した分離によって単離し、123mg (72%) を得た。

## 【化 2 0 8】



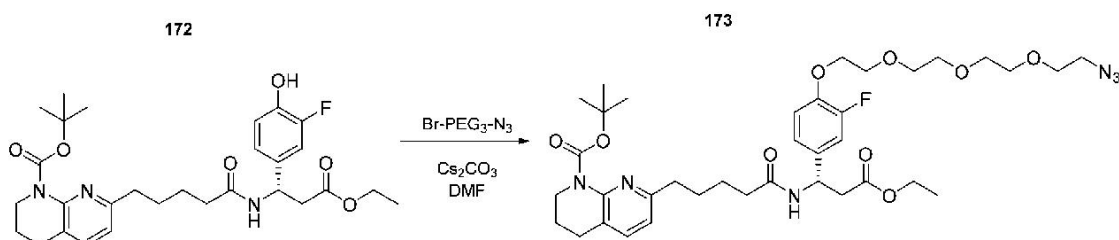
20

## 【 0 3 5 6】

MeOH (2mL) 中のカーボン上の10%のパラジウム (21mg、0.0194mmol) と化合物171 (123mg、0.194mmol) を含有する懸濁液に60PSIの水素を投入し、そして、1時間撹拌した。完了時に、懸濁液を、Celite (登録商標) を介して濾過し、そして、濃縮して、それに続いてさらなる精製なしで使用する88mg (83%) の粗生成物を得た。

30

## 【化 2 0 9】



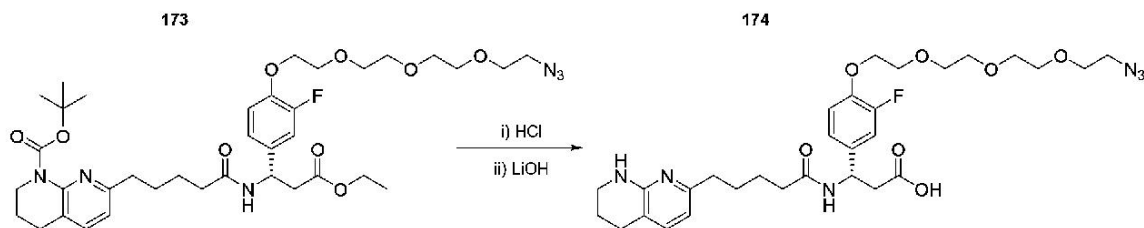
40

## 【 0 3 5 7】

DMF (1mL) 中の化合物172 (87mg、0.160mmol)、Br - PEG<sub>3</sub> - N<sub>3</sub> (50mg、0.176mmol)、および炭酸セシウム (115mg、0.352mmol) を含有する懸濁液を、60に加熱し、そして、2時間撹拌した。完了時に、すべての揮発物を除去し、そして、化合物173を、DCM中のMeOHのグラジエントで溶出するするシリカを介した分離によって単離し、91mg (76%) を得た。

50

## 【化 2 1 0】



## 【 0 3 5 8】

10

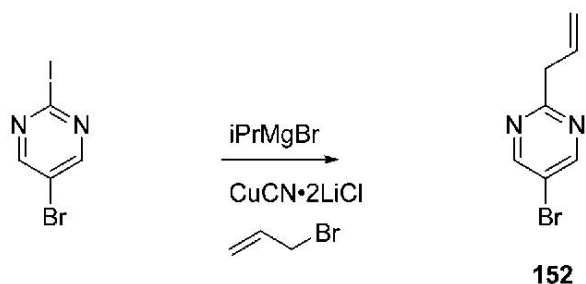
ジオキサン（0.5mL）中の化合物173（50mg、0.067mmol）を、ジオキサン中の4MのHCl（0.671mmol、0.168mL）溶液で処理し、そして、40℃にて3時間撹拌した。完了時に、すべての揮発物を除去した。粗生成物を、H<sub>2</sub>O（0.4mL）、THF（0.2mL）、およびMeOH（0.4mL）の混合物中に溶解し、LiOH（8mg、0.356mmol）で処理し、そして、40℃にて16時間撹拌した。完了時に、TFAでpHを3に調整し、そして、生成物を、0.1%のTFAを含有する水中のアセトニトリルのグラジエントで溶出するPhenomenx Gemini C18カラム（21.2x250mm、5ミクロン）を介した分離によって単離して、25mg（60%、2ステップ）を得た。

## 【 0 3 5 9】

20

構造38c（（S）-3-（2-（3-（（2-（2-（2-アジドエトキシ）エトキシ）エチル）アミノ）-3-オキソプロピル）ピリミジン-5-イル）-9-（5,6,7,8-テトラヒドロ-1,8-ナフチリジン-2-イル）ノナン酸）および構造39c（（S）-3-（2-（1-アジド-12-オキソ-3,6,9-トリオキサ-13-アザヘキサデカン-16-イル）ピリミジン-5-イル）-9-（5,6,7,8-テトラヒドロ-1,8-ナフチリジン-2-イル）ノナン酸）の合成

## 【化 2 1 1】



30

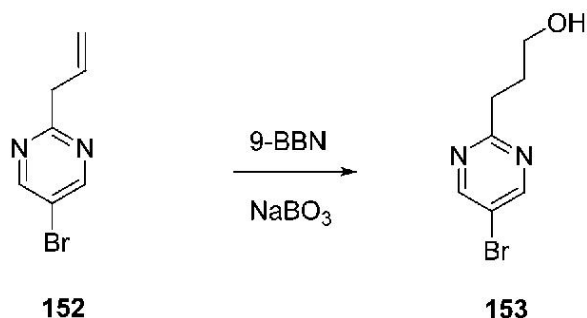
## 【 0 3 6 0】

40

無水THF（95mL）中の5-ブロモ-2-ヨードピリミジン（8.00g、28.1mmol）の溶液に、-78℃にてTHF（0.75M、56mL、42.0mmol）中の*i*-PrMgBrの溶液を加え、それと同時に、内部温度<-70℃（約15分間）を維持した。次に、得られた溶液を15分間撹拌し、その後、THF中のCuCN・2LiCl溶液（1M、31mL、31.0mmol）を加え、次に、THF（10mL）中の溶液として臭化アリル（5.10g、42mmol）を加えた。反応混合物を、室温に温め、そして、1時間撹拌した。反応混合物を、MeOH（40mL）でクエンチし、濃縮した。残渣を、固定相としてシリカゲルを使用したCombiFlashによって精製し、かつ、ヘキサン中のEtOAcのグラジエント（0-20%）で溶出した。化合物152の収率：4.13g（74%）。C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>BrN<sub>2</sub>について計算した質量[M+H]<sup>+</sup>：198.99、実測値：199.05。

50

## 【化 2 1 2】



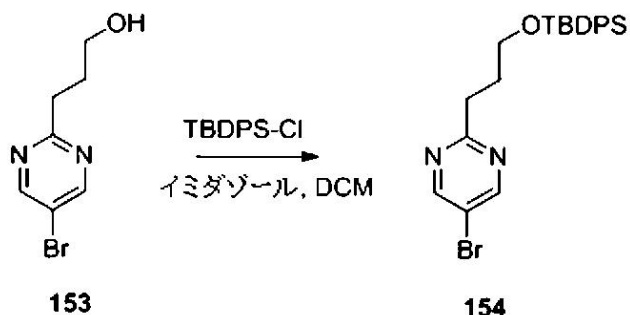
10

## 【0 3 6 1】

THF (115mL) 中の化合物152 (7.70g、38.7mmol) の溶液に、0 にて30分間かけてTHF (0.5M、131mL、65.8mmol) 中の9-BBNの溶液を加えた。反応混合物を、室温に温め、一晚撹拌した。反応混合物に、水 (100mL) 中のNaHCO<sub>3</sub> (48.7g、580mmol) のスラリーを加え、続いて、0 にて水 (100mL) 中のNaBO<sub>3</sub>一水和物 (46.3g、464mmol) のスラリーを加えた。冷却バスを外し、そして、混合物を激しく1時間撹拌した。反応混合物を分液漏斗に移し、そして、層を分離した。水層をEtOAc (200mL) で抽出した。有機相を合わせ、塩水 (100mL) で洗浄した。塩水層を、EtOAc (100mL) で逆抽出した。合わせた有機相を、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上で乾燥させ、濾過し、そして、濃縮して、~15gの未精製の、黄色のオイルを得た。その粗生成物を、固定相としてシリカゲルを使用したCombiFlashによって精製し、かつ、ヘキサン中のEtOAcのグラジエント (50 - 100%) で溶出した。化合物153の収率：3.44g (41%)。C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>BrN<sub>2</sub>Oについて計算した質量 [M + H]<sup>+</sup>：217.00、実測値：216.97。

20

## 【化 2 1 3】



30

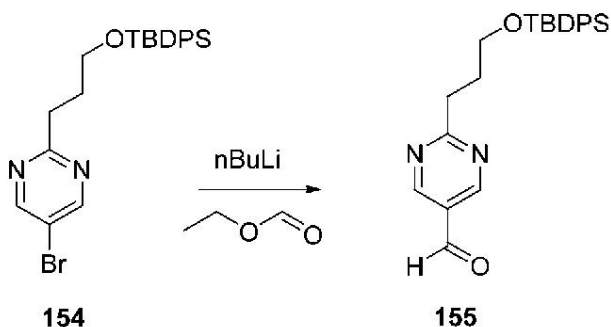
## 【0 3 6 2】

DCM (40mL) 中の化合物153 (3.44g、15.8mmol) の溶液に、0 にてイミダゾール (1.73g、25.4mmol) とDCM (12mL) 中のTBDPSCl (5.23g、19.0mmol) の溶液を加えた。反応物を、室温に温め、そして、一晚撹拌した。反応混合物を、DCM (75mL) で希釈し、水 (50mL) と塩水 (50mL) で洗浄した。有機層を、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上で乾燥させ、濾過し、そして、濃縮した。残渣を、固定相としてシリカゲルを使用したCombiFlashによって精製し、かつ、ヘキサン中のEtOAcのグラジエント (0 - 8%) で溶出した。化合物154の収率：5.56g (77%)。C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>BrN<sub>2</sub>OSiについて計算した質量 [M + H]<sup>+</sup>：455.12、実測値：455.44。

40

50

## 【化 2 1 4】



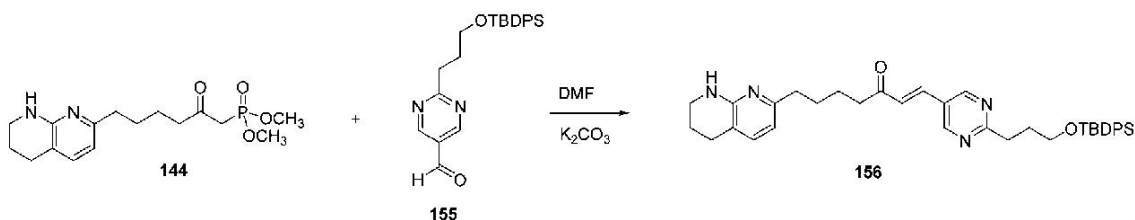
10

## 【 0 3 6 3】

- 75 にてTHF (150mL) 中の化合物154 (6.07g、13.3mmol) の溶液に、内部温度 < - 70 (約10分間) を維持しながら、THF (2.5M、5.6mL、14.0mmol) 中のnBuLiの溶液を滴下して加えた。3分後に、内部温度 < - 70 を維持しながら、THF (5mL) 中のギ酸エチル (1.04g、1.13mL、14.0mmol) の溶液を滴下して加えた。混合物を - 78 にて20分間攪拌し、次に、内部温度 < - 65 を維持しながら、THF (5mL) でさらに希釈したそれを、ジオキサン (4M、3.67mL、14.7mmol) 中のHClでクエンチした。冷却バスを外し、反応物を、周囲温度に温め、そして、濃縮した。残渣を、固定相としてシリカゲルを使用したCombiFlashによって精製し、かつ、ヘキサン中のEtOAcのグラジエント (0 - 20%) で溶出した。化合物155の収率：1.79g (33%)。<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 10.09 (s, 1H), 9.06 (s, 2H), 7.64 (m, 4H), 7.38 (m, 6H), 3.77 (t, 2H), 3.20 (t, 2H), 2.17 (q, 2H), 1.03 (s, 9H)。

20

## 【化 2 1 5】



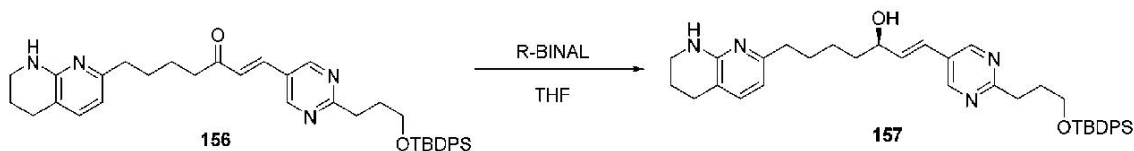
30

## 【 0 3 6 4】

THF (25mL) 中の化合物144 (1.68g、4.15mmol) と化合物155 (1.70g、4.98mmol) の溶液に、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.861g、6.23mmol) を加えた。反応混合物を、2.5時間40 に加熱し、次に、12時間50 に加熱した。反応混合物を、EtOAc (100mL) で希釈し、水 (50mL) と塩水 (50mL) で洗浄した。有機相を、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上で乾燥させ、濾過し、そして、濃縮した。残渣を、固定相としてシリカゲルを使用したCombiFlashによって精製し、かつ、1%のトリエチルアミンを含有する、ヘキサン中のEtOAcのグラジエント (0 - 100%) で溶出した。化合物156の収率：2.04g (79%)。C<sub>38</sub>H<sub>46</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>Siについて計算した質量 [M + H]<sup>+</sup>: 619.35、実測値: 619.69。

40

## 【化 2 1 6】



## 【 0 3 6 5】

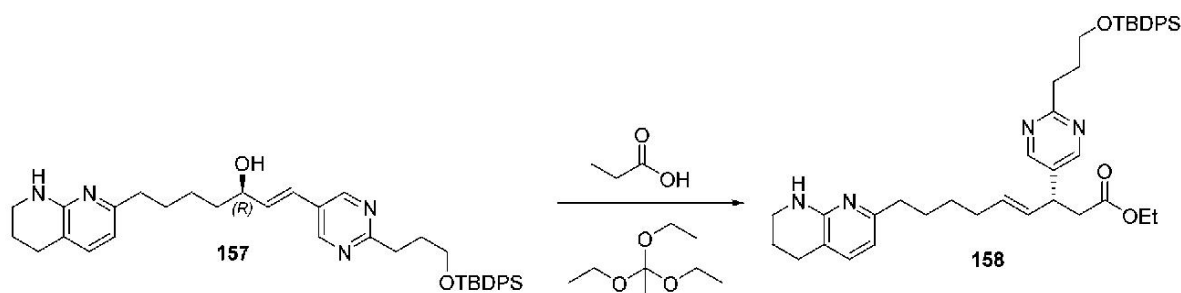
50

R - BINALの調製：LAH (1.169g、30.8mmol) を、無水THF (90mL) 中でスラリー化した。そのスラリーに、 $T_{int} < 40$  を維持しながらTHF (6M、5.2mL、31.4mmol) 中の溶液としてEtOHを加えた。混合物を35 にて40分間エイジングし、次に、30 まで冷やした。 $T_{int} < 40$  を維持しながら、THF (45mL) 中のR - (BINOL) (9.00g、31.4mmol) の溶液を加えた。混合物を、50 にて1時間エイジングし、周囲温度に冷やし、次に、50 に加熱し、そして、TMEDA (14.1mL、11.0g、94.3mmol) を加えた。混合物を、50 にて1時間エイジングし、周囲温度に冷やし、次に、化合物156と共に使用した。

#### 【0366】

THF中のR - BINAL ( ~0.2M、110mL、22.0mmol ) の溶液に、-78 にて5分間かけてTHF (12mL) 中の化合物16 (1.16g、1.88mmol) の溶液を加えた。30分後に、反応混合物を、飽和NH<sub>4</sub>Cl水溶液でクエンチし、室温に温め、そして、生成物を、EtOAc (3x125mL) で抽出した。有機層を、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上で乾燥させ、濾過し、そして、濃縮した。残渣を、固定相としてシリカゲルを使用したCombiFlashによって精製し、かつ、1%のトリエチルアミンを含有するEtOAc中のMeOHのグラジエント (0 - 5%) で溶出した。化合物157の収率：0.96g (82%)。キラル純度を、分析用キラルHPLC (Chiralpak AD - H カラム 4.6x250mm、5ミクロン、25%のEtOH、75%のヘキサン、0.1%のジエチルアミンイソクラティック、2mL / 分) によって測定した。第二の溶出R異性体は~95面積%の純度であり、~90%のeeに相当する。C<sub>38</sub>H<sub>48</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>Siについて計算した質量 [M + H]<sup>+</sup> : 621.36、実測値 : 621.71。

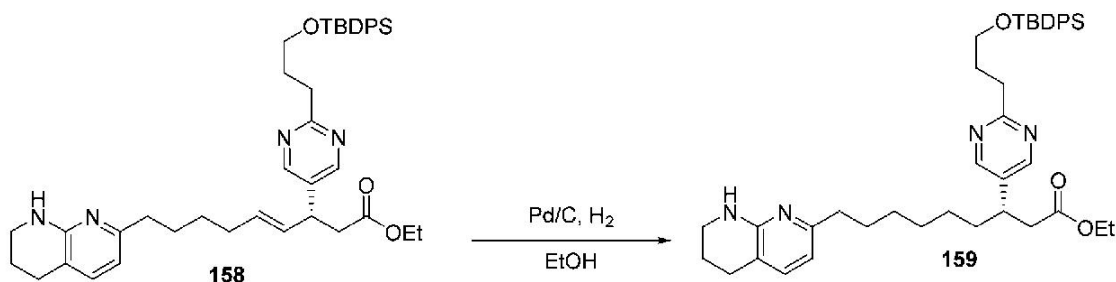
#### 【化217】



#### 【0367】

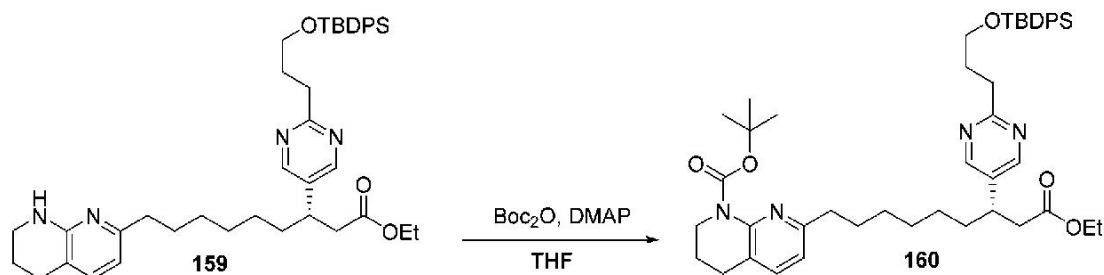
トリエチルオルソアセタート (9.25mL) 中の化合物157 (0.925g、1.49mmol) の溶液に、トリメチルオルソアセタート中のプロピオン酸 (0.15M、0.55mL、0.08mmol) の溶液を加えた。反応混合物を、密閉バイアル内で140 にて1.5時間加熱した。反応混合物を濃縮し、そして、残渣を、固定相としてシリカゲルを使用し、1%のトリエチルアミンを含有するヘキサン中のEtOAcのグラジエント (0 - 50%) で溶出するCombiFlashによって精製した。化合物158の収率：0.898g (87%)。C<sub>42</sub>H<sub>54</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>Siについて計算した質量 [M + H]<sup>+</sup> : 691.41、実測値 : 691.93。

#### 【化218】



#### 【0368】

EtOH (10mL) 中の化合物158 (0.893g、1.30mmol) の溶液に、EtOH (4mL) 中のPd/C (添加の程度：10wt%、0.138g、0.13mmol) のスラリーを加えた。反応混合物に、50psiのH<sub>2</sub>を投入し、そして、4.5時間撹拌した。反応混合物を、濾過し、濃縮し、そして、さらなる精製なしで次のステップに使用した。化合物159の収率：0.885g (99%)。C<sub>42</sub>H<sub>56</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>Siについて計算した質量 [M + H]<sup>+</sup>：693.42、実測値：693.82。  
【化219】



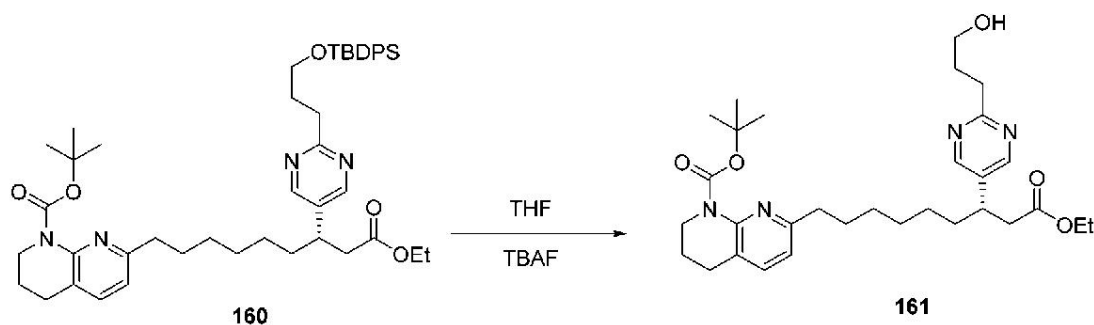
10

## 【0369】

THF (2.5mL) 中のBoc無水物 (0.836g、3.83mmol) の溶液を、化合物159 (0.885g、1.28mmol) に加え、続いて、DMAP (THF中に20mg/mL、155μL、0.0031g、0.026mmol) の溶液に加えた。混合物を6時間60℃に加熱した。反応混合物を濃縮し、そして、残渣を、固定相としてシリカゲルを使用し、ヘキサン中のEtOAcのグラジエント (0 - 50%) で溶出するCombiFlashによって精製した。化合物160の収率：0.721g (71%)。C<sub>47</sub>H<sub>64</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>Siについて計算した質量 [M + H]<sup>+</sup>：793.47、実測値：794.28。  
。

20

## 【化220】



30

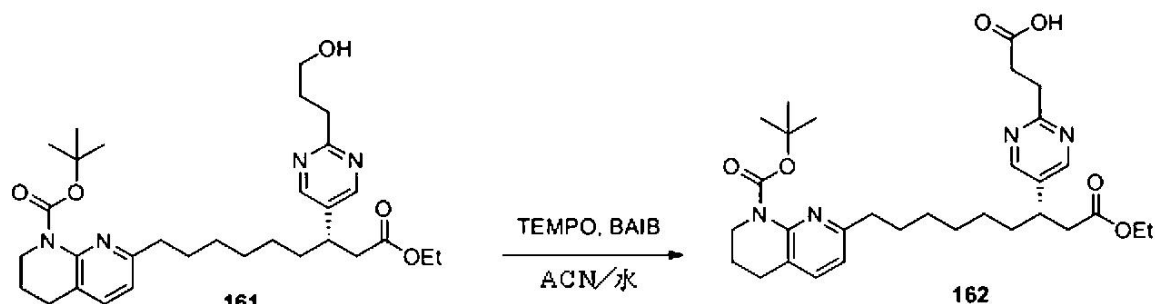
## 【0370】

THF (6mL) 中の化合物160 (0.621g、0.783mmol) の溶液に、0℃にてTHFのTBAF (1M、1.2mL、1.2mmol) の溶液を加えた。反応混合物を、室温に温め、2時間撹拌した。反応混合物を、EtOAc (30mL) で希釈し、飽和NH<sub>4</sub>Cl水溶液 (2x10mL) で洗浄した。有機層を濃縮した。残渣を、固定相としてシリカゲルを使用し、ヘキサン中のEtOAcのグラジエント (50 - 100%) で溶出するCombiFlashによって精製した。化合物21の収率：0.362g (83%)。キラル純度を、分析用キラルHPLC、Chiralpak AD - Hカラム 4.6x250mm、5ミクロン、20%のEtOH、80%のヘキサン、0.1%のジエチルアミン、イソクラティック、1.5mL/分によって測定した。第二の溶出R異性体は93%の純度であり、86%のeeに相当した。化合物161を、キラル準調製用HPLC (Chiralpak AD - H 21.2x250mm、5ミクロン、20%のEtOH、80%のヘキサン、0.1%のジエチルアミン、60mL/分) によってさらに精製した。化合物161の最終的な収率：308mg (99%のee)。C<sub>31</sub>H<sub>46</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>について計算した質量 [M + H]<sup>+</sup>：555.36、実測値：555.72。

40

50

## 【化 2 2 1】

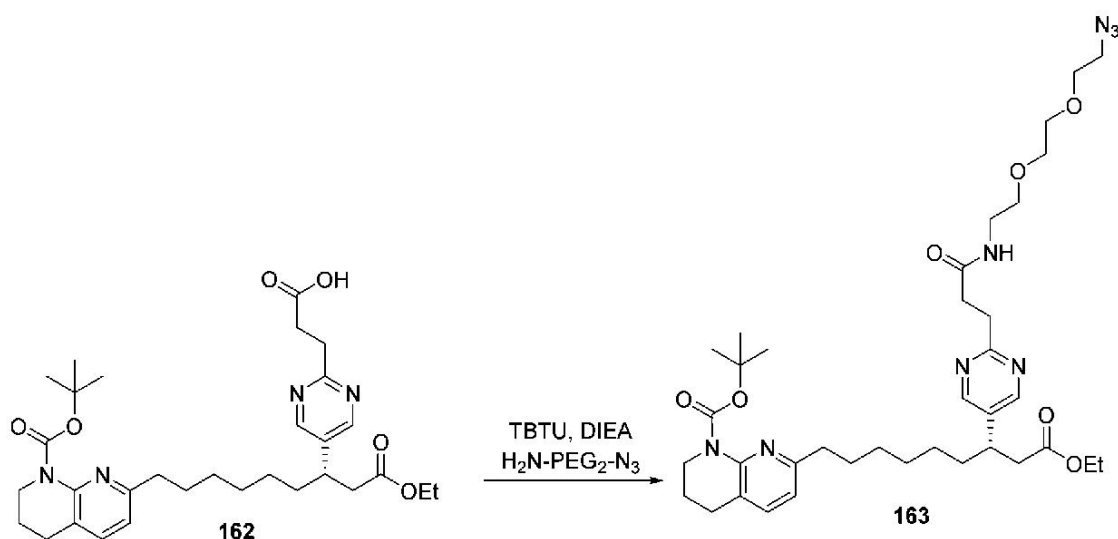


10

## 【 0 3 7 1】

ACN (0.30mL) 中の化合物161 (0.030g、0.054mmol) の溶液に、室温にてBAIB (0.042g、0.130mmol) とTEMPO (2.5mg、0.016mmol) を加え、続いて、水 (0.30mL) を加えた。2時間後、反応混合物を濃縮した。残渣をRP - HPLC (Phenomenex Gemini C18 21.2 × 250mm、5ミクロン、0.1%TFA 水 / ACN、30 - 80%のACNのグラジエント) によって精製した。化合物162の収率：0.030g (97%)。C<sub>31</sub>H<sub>44</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>について計算した質量 [M + H]<sup>+</sup>：569.34、実測値：569.68。

## 【化 2 2 2】



20

30

## 【 0 3 7 2】

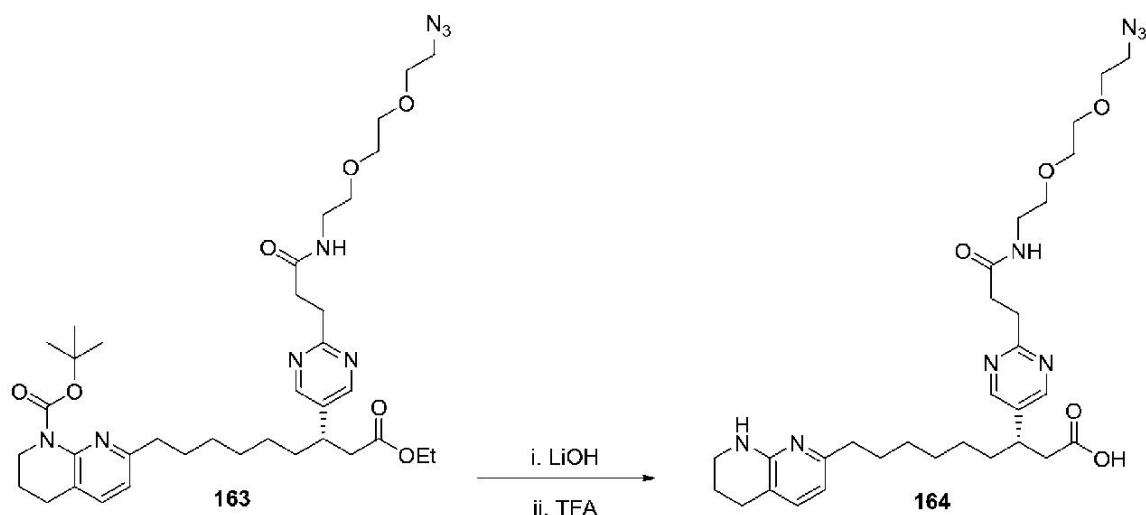
DMF (0.5mL) 中の化合物162 (33mg、0.058mmol) とアミノ - PEG<sub>2</sub> - アジド (15mg、0.087mmol) の溶液に、0 °にてTBTU (32mg、0.099mmol) を加え、次に、DIEA (35 μL、26mg、0.203mmol) を加えた。反応混合物を、室温に温め、そして、30分間攪拌した。反応混合物を濃縮した、そして、生成物、化合物163を精製なしで次のステップに使用した。C<sub>37</sub>H<sub>56</sub>N<sub>8</sub>O<sub>7</sub>について計算した質量 [M + H]<sup>+</sup>：725.44、実測値：725.77。

40

50



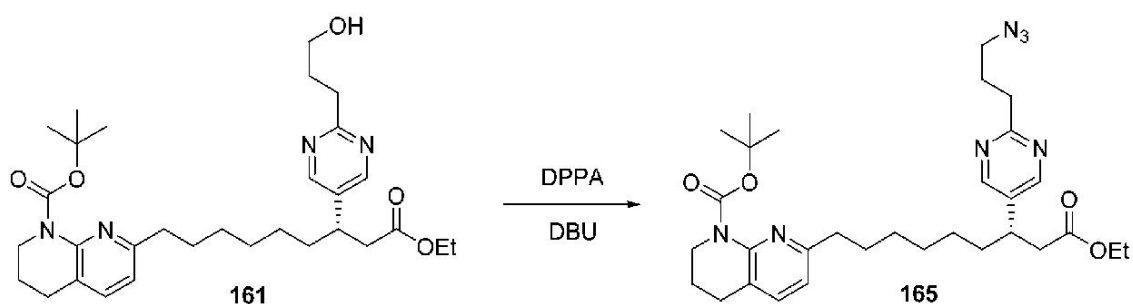
## 【化 2 2 3】



## 【 0 3 7 3】

THF (0.30mL) 中の化合物163 (42mg、0.058mmol) の溶液に、LiOHの1M溶液 (0.174mL、0.174mmol) を加えた。反応混合物を40℃にて1時間加熱した。LiOHの追加部分を加えた (0.174mL、0.174mmol)。3時間後に、反応物を止め、そして、LiOHの追加部分を加えた (0.174mL、0.174mmol)。反応物を、さらに2時間撹拌した (9当量のLiOH、合計5時間)。反応混合物を、3NのHClを使用してpH = 5に中和し、そして、濃縮した。残渣を、TFA : 水 [95 : 5] 中に溶解し、そして、室温にて2時間撹拌した。反応混合物を濃縮し、そして、残渣を、RP - HPLC (Phenomenex Gemini C18 21.2x250mm、5ミクロン、0.1% TFAを含有する水 / ACN、20 - 50%のACNグラジエント) によって精製した。化合物164 (構造38c) の収率 : 23mg (66%)。C<sub>30</sub>H<sub>44</sub>N<sub>8</sub>O<sub>5</sub>について計算した質量 [M + H]<sup>+</sup> : 597.35、実測値 : 597.85。

## 【化 2 2 4】



## 【 0 3 7 4】

THF (150μL) 中の化合物161 (30mg、0.054mmol) の溶液に、0℃にてジフェニルホスホリルアジド (35μL、45mg、0.162mmol) を加え、続いて、DBU (12μL、12mg、0.081mmol) を加えた。反応混合物を、室温に温め、そして、一晩撹拌した。翌朝に、反応混合物を60℃にて7時間加熱した。反応混合物を濃縮し、そして、RP - HPLC (Phenomenex Gemini C18 21.2x250mm、5ミクロン、0.1% TFA 水 / ACN、32 - 60%のACNグラジエント) によって精製した。化合物165の収率 : 14mg (44%)。C<sub>31</sub>H<sub>45</sub>N<sub>7</sub>O<sub>4</sub>について計算した質量 [M + H]<sup>+</sup> : 580.36、実測値 : 580.66。

10

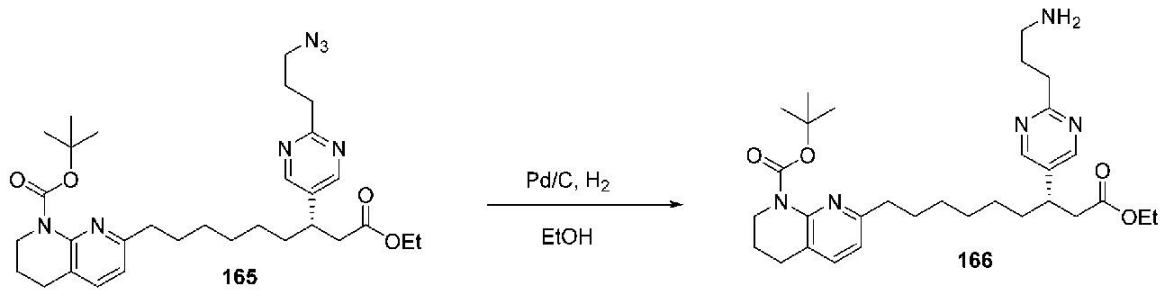
20

30

40

50

## 【化 2 2 5】

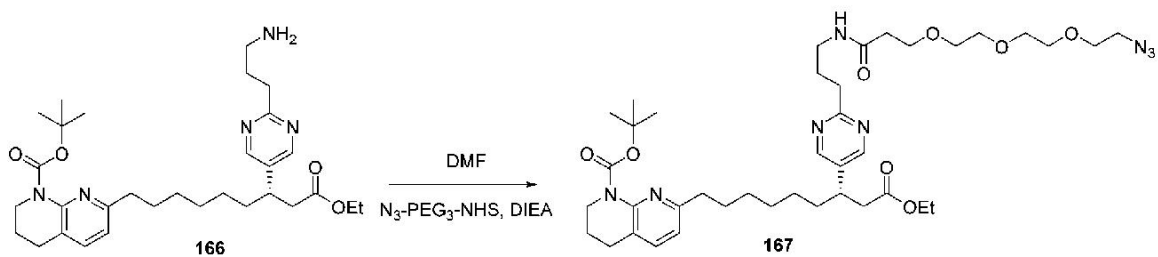


10

## 【 0 3 7 5】

EtOH (100  $\mu$ L) 中の化合物165 (18mg、0.031mmol) の溶液に、EtOH (170  $\mu$ L) 中のPd/C (10%添加、3.3mg、0.003mmol) のスラリーを加えた。反応器にH<sub>2</sub>を投入し、次に、3回排気し、次に、H<sub>2</sub> (1atm) を投入した。30分後に、反応混合物を濾過し、濃縮し、そして、さらなる精製なしで次のステップに使用した。化合物166の収率：17mg (99%)。C<sub>31</sub>H<sub>47</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>について計算した質量 [M + H]<sup>+</sup>：554.37、実測値：554.73。

## 【化 2 2 6】



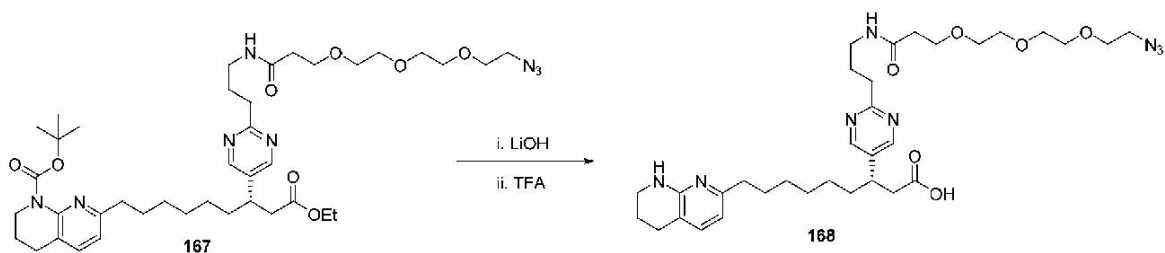
20

## 【 0 3 7 6】

DMF (170  $\mu$ L) 中の化合物166 (17mg、0.031mmol) とアジド - PEG<sub>3</sub> - NHSエステル (14mg、0.040mmol) の溶液に、室温にてDIEA (16  $\mu$ L、12mg、0.092mmol) を加えた。反応混合物を、室温にて1時間攪拌し、濃縮し、次に、精製なしで次のステップに使用した。C<sub>40</sub>H<sub>62</sub>N<sub>8</sub>O<sub>8</sub>について計算した質量 [M + H]<sup>+</sup>：783.48、実測値：783.84。

30

## 【化 2 2 7】



40

## 【 0 3 7 7】

THF (180  $\mu$ L) 中の化合物167 (24mg、0.031mmol) の溶液に、LiOHの1M溶液 (153  $\mu$ L、0.153mmol) を加えた。反応混合物を40℃にて加熱した。1時間後に、LiOHの追加部分 (153  $\mu$ L、0.153mmol、5eq) を加えた。反応混合物を40℃にて3時間、次に、室温にて一晩攪拌した。反応混合物を、3NのHClを使用してpH = 5に中和し、そして、濃縮した。残渣を、TFA：水 [95：5] 中に溶解し、そしてそれは、室温にて3時間攪

50

拌した。反応混合物を濃縮し、そして、残渣をRP - HPLC (Phenomenex Gemini C18 21.2x250mm、5ミクロン、0.1%TFAを含有する水/ACN、15 - 45%のACNグラジエント) によって精製した。化合物168 (構造39c) の収率: 9.8mg (49%)。C<sub>33</sub>H<sub>50</sub>N<sub>8</sub>O<sub>6</sub>について計算した質量 [M + H]<sup>+</sup>: 655.40、実測値: 656.01。

#### 【0378】

実施例2. 三座のインテグリン標的化リガンド、RNAi剤の合成、およびカーゴ分子 (RNAi剤) へのインテグリン標的化リガンドのコンジュゲーション

インテグリンを発現する細胞において1もしくは複数の標的化された遺伝子の発現を阻害するのに有用な1もしくは複数のRNAi剤に、インテグリン標的化リガンドをコンジュゲートさせることができる。本明細書に開示したインテグリン標的化リガンドは、標的細胞および/または組織へのRNAi剤の送達を容易にする。上記の実施例1には、本明細書に開示した特定のインテグリン標的化リガンドの合成を記載した。本明細書に記載した限定されることのない実施例に例示した、特定のインテグリン標的化リガンド - RNAi剤コンジュゲートの合成のための一般的手法を以下に記載する。

#### 【0379】

##### A. RNAi剤の合成。

RNAi剤は、広く当該技術分野で知られている方法を使用して合成できる。本明細書に記載した実施例に例示したRNAi剤の合成において、オリゴヌクレオチド合成に使用される固相上のホスホラミダイト技術に基づいて、RNAi剤のセンス鎖およびアンチセンス鎖を合成した。規模に応じて、MerMade96E (登録商標) (Bioautomation)、a MerMade12 (登録商標) (Bioautomation)、またはOP Pilot 100 (GE Healthcare) が使用された。制御された多孔質ガラス (CPG、500 または600、Prime Synthesis, Aston, P A, USAから入手) でできた固体支持体上で、合成を実施した。すべてのRNAおよび2' 修飾RNAホスホラミダイトは、Thermo Fisher Scientific (Milwaukee, WI, USA) から購入した。具体的には、以下の2' - O - メチルホスホラミダイトが使用された: (5' - O - ジメトキシトリチル - N6 - (ベンゾイル) - 2' - O - メチル - アデノシン - 3' - O - (2 - シアノエチル - N,N - ジイソプロピルアミノ) ホスホラミダイト、5' - O - ジメトキシ - トリチル - N4 - (アセチル) - 2' - O - メチル - シチジン - 3' - O - (2 - シアノエチル - N,N - ジイソプロピル - アミノ) ホスホラミダイト、(5' - O - ジメトキシトリチル - N2 - (イソブチリル) - 2' - O - メチル - グアノシン - 3' - O - (2 - シアノエチル - N,N - ジイソプロピルアミノ) ホスホラミダイト、および5' - O - ジメトキシトリチル - 2' - O - メチル - ウリジン - 3' - O - (2 - シアノエチル - N,N - ジイソプロピルアミノ) ホスホラミダイト。2' - デオキシ - 2' - フルオロ - ホスホラミダイトは、2' - O - メチルアミダイトと同じ保護基を有していた。5' - ジメトキシトリチル - 2' - O - メチル - イノシン - 3' - O - (2 - シアノエチル - N,N - ジイソプロピルアミノ) ホスホラミダイトを、Glen Research (Virginia) から購入した。逆位脱塩基 (3' - O - ジメトキシトリチル - 2' - デオキシリボース - 5' - O - (2 - シアノエチル - N,N - ジイソプロピルアミノ) ホスホラミダイトを、ChemGenes (Wilmington, MA, USA) から購入した。以下のUNAホスホラミダイトを使用した: 5' - (4,4' - ジメトキシトリチル) - N6 - (ベンゾイル) - 2',3' - セコ - アデノシン、2' - ベンゾイル - 3' - [(2 - シアノエチル) - (N,N - ジイソプロピル)] - ホスホラミダイト、5' - (4,4' - ジメトキシトリチル) - N - アセチル - 2',3' - セコ - シトシン、2' - ベンゾイル - 3' - [(2 - シアノエチル) - (N,N - ジイソ - プロピル)] - ホスホラミダイト、5' - (4,4' - ジメトキシトリチル) - N - イソブチリル - 2',3' - セコ - グアノシン、2' - ベンゾイル - 3' - [(2 - シアノエチル) - (N,N - ジイソ - プロピル)] - ホスホラミダイト、および5' - (4,4' - ジメトキシ - トリチル) - 2',3' - セコ - ウリジン、2' - ベンゾイル - 3' - [(2 - シアノエチル) - (N,N - ジイソ - プロピル)] - ホスホラミダイト。商業的にTFA aminolinkホスホラミダイトもまた購入した (Thermo Fisher)。

#### 【0380】

いくつかの実施例において、本明細書に開示したインテグリン標的化リガンドは、トリ

アルキン基を含む足場に成分を連結することによってRNAi剤に、または先の、表Bに示したプロパルギル基を含む修飾ヌクレオチドにコンジュゲートされる。いくつかの実施例において、トリアルキン基は、トリアルキン含有ホスホラミダイトを使用することによって付加され、そしてそれは、RNAi剤のセンス鎖の5'末端にて付加できる。本明細書の特定の実施例で示したRNAi剤に関して使用するとき、トリアルキン含有ホスホラミダイトを、無水ジクロロメタンまたは無水アセトニトリル(50mM)中に溶解し、それに対して、他のすべてのアミダイトを、無水アセトニトリル(50mM)中に溶解し、さらにモレキュラーシープ(3)を加えた。5-ベンジルチオ-1H-テトラゾール(BTT、アセトニトリル中に250mM)または5-エチルチオ-1H-テトラゾール(ETT、アセトニトリル中に250mM)を、活性化剤溶液として使用した。結合時間は10分間(RNA)、90秒間(2'OMe)、および60秒間(2'F)であった。ホスホロチオエート連結を導入するために、3-フェニル1,2,4-ジチアゾリン-5-オン(POS、POS, obtained from PolyOrg, Inc., Leominster, MA, USAから入手)の無水アセトニトリル中100mM溶液を用いた。

#### 【0381】

あるいは、インテグリン標的化リガンドが、ホスホラミダイト法を使用する代わりに、トリアルキン足場を介したRNAi剤にコンジュゲートされる場合、トリアルキン含有化合物を合成後に導入できる(例えば、以下の項目Eを参照のこと)。本明細書に記載した特定の実施例に示したRNAi剤に関して使用する場合、センス鎖の5'末端にトリアルキン基を合成後に結合させたとき、トリアルキン含有足場への取り付けを容易にするために、センス鎖の5'末端ヌクレオチドを、5'末端に第一級アミンを含むヌクレオチドを用いて官能化した。TFA aminolinkホスホラミダイトを無水アセトニトリル(50mM)中に溶解し、さらに、モレキュラーシープ(3)を加えた。5-ベンジルチオ-1H-テトラゾール(BTT、アセトニトリル中に250mM)または5-エチルチオ-1H-テトラゾール(ETT、アセトニトリル中に250mM)を、活性化剤溶液として使用した。結合時間は12分間(RNA)、90秒間(2'OMe)、および60秒間(2'F)であった。ホスホロチオエート連結を導入するために、3-フェニル1,2,4-ジチアゾリン-5-オン(POS、POS, obtained from PolyOrg, Inc., Leominster, MA, USAから入手)の無水アセトニトリル中100mM溶液を用いた。

#### 【0382】

本明細書に記載した実施例において；以下は、二本鎖合成のための修飾ヌクレオチド配列を示す：

二本鎖AD04545：

修飾アンチセンス鎖配列(5' 3)：usUfsusCfaUfgAfaAfuCfGufuAfcGfuUfsg(配列番号1)

修飾センス鎖配列(5' 3)：(NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)scsaacguaaCfGfAfuuucaugaasa(invAb)(配列番号2)

二本鎖AD04546：

修飾アンチセンス鎖配列(5' 3)：usUfsusCfaUfgAfaAfuCfGufuAfcGfuUfsg(配列番号3)

修飾センス鎖配列(5' 3)：(NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)scsaacguaaCfGfAfuuucaugaasa(invAb)(C<sub>6</sub>-S-Mal-X)(配列番号4)

二本鎖AD05971：

修飾アンチセンス鎖配列(5' 3)：usUfsusCfaUfgAfaAfuCfGufuAfcGfuUfsg(配列番号5)

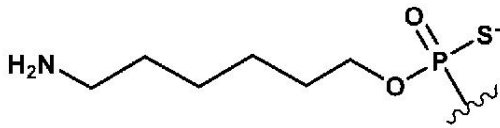
修飾センス鎖配列(5' 3)：(NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)scsaacguaaCfGfAfuuuAlkcaAlkugAlkaaAlksa(invAb)(C<sub>6</sub>-S-Mal-C-18-二酸部分)(配列番号6)

#### 【0383】

先に列挙した修飾ヌクレオチド配列に関して、a、c、g、およびuは、それぞれ2'-O-メチルアデノシン、シチジン、グアノシン、またはウリジンを表し；Af、Cf、Gf、およびUfは、それぞれ2'-フルオロアデノシン、シチジン、グアノシン、またはウリジンを表し

; aAlk、cAlk、gAlk、およびuAlkは、それぞれ2' - O - プロパルギルアデノシン、シチジン、グアノシン、またはウリジンを表し; (invAb) は、逆位脱塩基残基 (逆位脱塩基デオキシリボヌクレオチド) を表し; sは、ホスホロチオアート連結を表し; (NH<sub>2</sub> - C<sub>6</sub>) は、以下の:

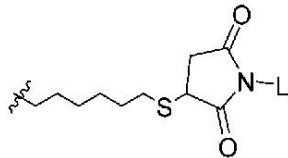
【化 2 2 8】



10

を表し; および (C<sub>6</sub> - S - Mal - L) は、以下の:

【化 2 2 9】



{ 式中、以下の実施例に示されるように、LはPEG鎖またはエチルである } を表す。本明細書の実施形態に関して、それぞれの鎖5' 3' を見ると、デオキシリボースの3' 位をそれぞれの鎖の前述のモノマーの3' 末端にて連結させるように、逆位脱塩基を挿入した。

20

【0 3 8 4】

B. 支持体結合オリゴマーの切断および脱保護。

固相合成を完了させた後、乾燥させた固体支持体を、水中40重量%のメチルアミンと、28% ~ 31%の水酸化アンモニウム溶液 (Aldrich) との体積1:1の溶液で、1.5時間30で処理した。この溶液を蒸発させ、固体残留物を水中で再構成した (下記を参照のこと)。

【0 3 8 5】

C. 精製。

30

TSKgel SuperQ - 5PW 13 μmカラムおよびShimadzu LC - 8システムを用いて、アニオン交換HPLCにより粗オリゴマーを精製した。バッファーAは、20mM Tris、5mM EDTA、pH9.0であり、20%アセトニトリルを含有していた。バッファーBは、バッファーAと同じものに、1.5M塩化ナトリウムを加えたものであった。260nmでUVトレースが記録された。適切な分画をプールしてから、Sephadex G - 25 fineを詰めたGE Healthcare XK 26 / 40カラムを用いて、サイズ排除HPLCに通し、100mM重炭酸アンモニウム (pH6.7) および20%アセトニトリル、または濾過水をランニングバッファーとして用いた。

【0 3 8 6】

D. アニーリング。

相補的鎖を、1 × PBS (リン酸塩緩衝生理食塩水、1 ×、Corning, Cellgro) 中の等モル量のRNA溶液 (センスおよびアンチセンス) を合わせて混合し、RNAi剤を形成した。一部のRNAi剤を凍結乾燥し、-15 ~ -25 で保管した。1 × PBS中でUV - Visスペクトロメーターを用いて溶液吸光度を測定することによりデュプレックス濃度を求めた。次に、260nmでの溶液吸光度に換算係数および希釈係数を掛けて、デュプレックス濃度を求めた。使用した換算係数はすべて、0.037mg / (mL · cm) であり、あるいは、いくつかの実験に関して、実験的に求められた吸光係数から換算係数を計算した。

40

【0 3 8 7】

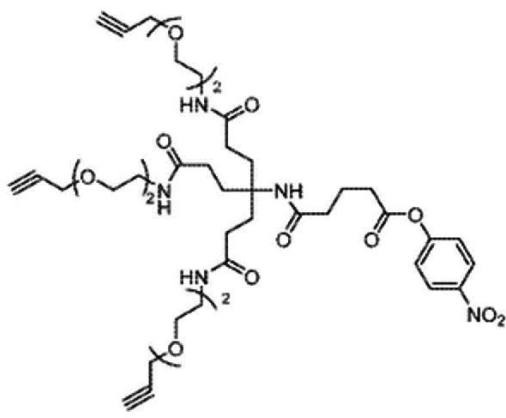
E. トリアルキン足場のコンジュゲーション。

アニーリング前またはアニーリング後のいずれかに、RNAi剤の5' または3' アミン官能化センス鎖をトリアルキン足場にコンジュゲートできる。本明細書に開示した構築物を形成

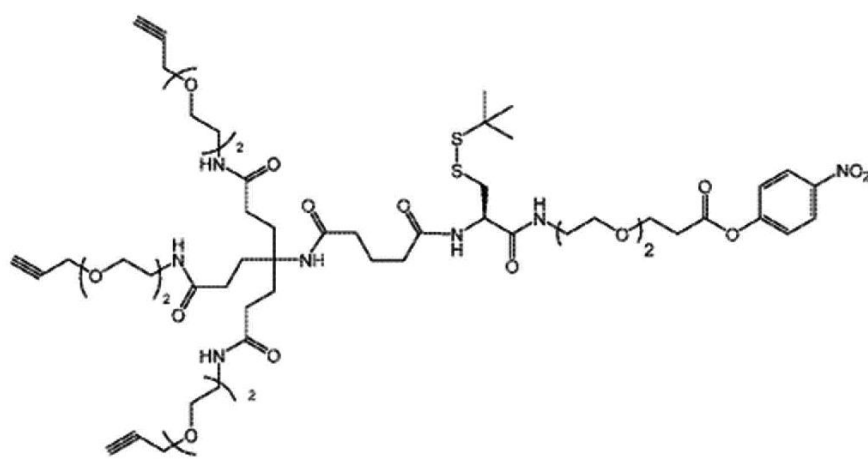
50

する際に使用できる実例トリアルキン骨格構造としては、次のものが挙げられる：

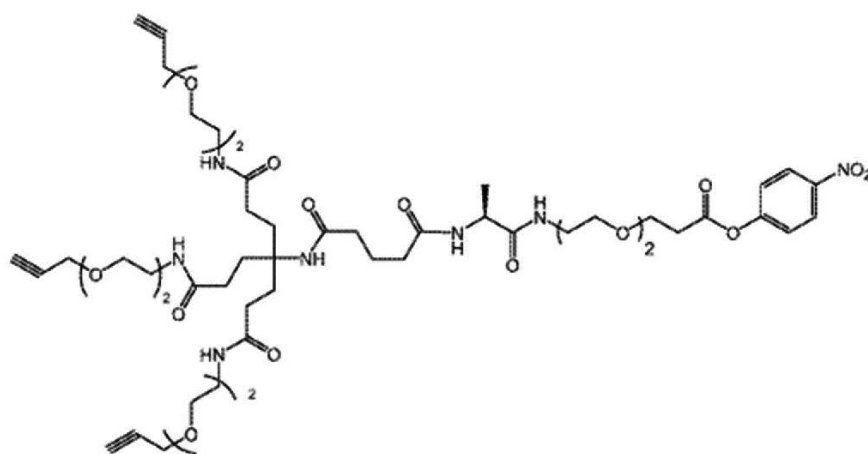
【化 2 3 0】



10



20



30

【 0 3 8 8 】

以下のものは、アニールした二本鎖へのトリアルキン足場のコンジュゲーションを記載する：アミン官能化二本鎖を～50 - 70mg / mLにて90%のDMSO / 10%のH<sub>2</sub>O中に溶解した。40eqのトリエチルアミンを加え、続いて、3eqのトリアルキン - PNPを加えた。完了した時点で、コンジュゲートを、1×リン酸緩衝生理食塩水 / アセトニトリル（1：14の比）の溶媒系中に2回浸漬し、そして、乾燥させた。

【 0 3 8 9 】

F．インテグリン標的化リガンドのコンジュゲーション。

50

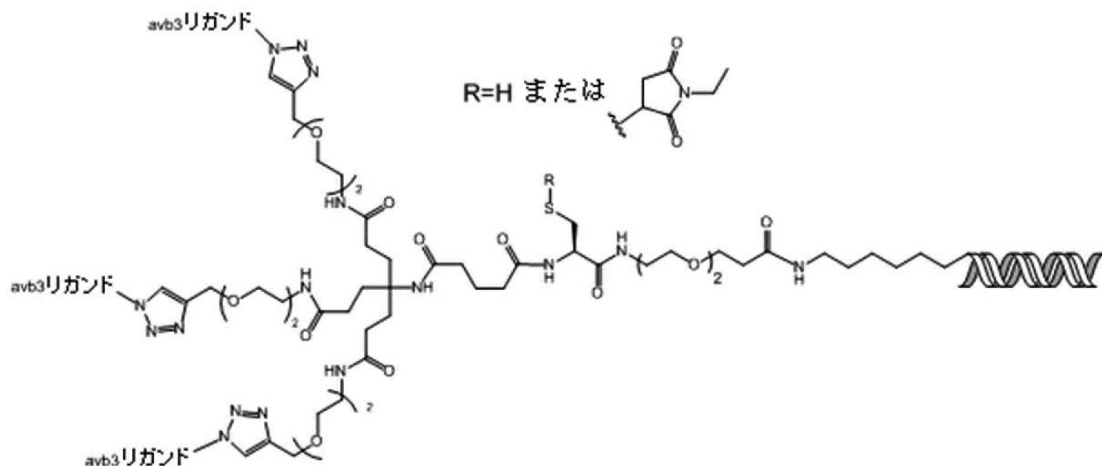
アニーリング前またはアニーリング後のいずれかに、5' または3' の三座アルキン官能化センス鎖をインテグリン標的化リガンドにコンジュゲートする。以下の実施例は、アニーリングした二本鎖への v 3 / 5 インテグリン標的化リガンドのコンジュゲーションを記載する：0.5MのTris (3 - ヒドロキシプロピルトリアゾリルメチル) アミン (THPTA)、0.5MのCu (II) スルファート五水和物 (Cu (II) SO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O)、および2M溶液のアスコルビン酸ナトリウムの原液を、脱イオン水で調製した。DMSO中のインテグリン標的化リガンドの75mg / mLの溶液を作製した。トリアルキン官能化二本鎖 (3mg、75 μL、脱イオン水中に40mg / mL、~15,000g / mol) を入れた1.5mLの遠心分離管内に、25 μLの1M Hepes pH8.5バッファーを加える。ボルテックス処理後に、35 μLのDMSOを加え、そして、その溶液をボルテックス処理した。インテグリン標的化リガンドを反応物 (6eq / 二本鎖、2eq / アルキン、~15 μL) に加え、そして、その溶液をボルテックス処理した。pH紙を使用して、pHをチェックし、pH ~ 8になることを確認した。1.5mLの分割遠心分離管内で、50 μLの0.5MのTHPTAを、10 μLの0.5M Cu (II) SO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>Oを混合し、ボルテックス処理し、そして、室温にて5分間インキュベートした。5分後、THPTA / Cu溶液 (7.2 μL、6eq、5 : 1 THPTA : Cu) を、反応バイアルに加え、そして、ボルテックス処理した。その直後に、2Mのアスコルベート (5 μL、二本鎖あたり50eq、アルキンあたり16.7) を反応バイアルに加え、そして、ボルテックス処理した。反応を完了 (典型的には0.5 ~ 1時間で完了) した時点で、反応物を、非変性陰イオン交換クロマトグラフィーによってすぐに精製した。

【0390】

G. システインリンカー状のチオール基の官能性化。

いくつかの実施形態において、システインリンカーを、RNAi剤へのインテグリン標的化リガンドのコンジュゲーションを容易にするために使用した。アニーリング前またはアニーリング後のいずれかに、5' または3' の三座アルキン - Cys (Stbu) - PEG官能化センス鎖を、マレイミド含有部分を用いて官能化するか、または以下の構造に示したように、還元し、そして、遊離チオールのままにし得る：

【化231】



【0391】

以下の実施例は、N - エチルマレイミドを用いたトリアルキン - Cys (Stbu) - PEG<sub>2</sub> - 二本鎖の修飾を記載する：トリアルキン - Cys (Stbu) - PEG<sub>2</sub> - 二本鎖 (35mg) を、500 μLの脱イオンH<sub>2</sub>O中に溶解した。HEPESバッファー (1M、pH8.5、82 μL) を反応物に加え、そして、その溶液をボルテックス処理した。1Mのジチオスレイトール (DTT、100eq、236 μL) 溶液を加え、そして、その溶液を3時間ボルテックス振盪機上に置いた。RP - HPLCの変性によるジスルフィドの還元の確認後に、コンジュゲートを、1 × リン酸緩衝生理食塩水 / アセトニトリル (1 : 14の比) の溶媒系中で3回沈殿させた。沈殿したペレットを、0.5mLの0.1M HEPES、pH6.5中で再構成し、N - エチルマレイミド (

3mg、10eq)を溶液に追加し、そして、～15分間ボルテックスミキサー上に置いた。反応完了後に、コンジュゲートを、1×リン酸緩衝生理食塩水/アセトニトリル(1:14の比)の溶媒系中で3回沈殿させ、脱塩し、そして、乾燥させた。

#### 【0392】

実施例3. インテグリン標的化リガンドの結合活性

以下の表1で示したように、構造1c、2c、および3cのインテグリン標的化リガンド、ならびにRGD模倣ペプチドに関するIC50結合データを得た：

#### 【0393】

#### 【表3】

表1. IC50結合活性

| 群          | IC50 (nM)          |                    |                    |
|------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|            | $\alpha v \beta 3$ | $\alpha v \beta 5$ | $\alpha v \beta 6$ |
| 構造 1c      | 0.3                | 0.6                | 5.3                |
| 構造 2c      | 0.3                | 5.6                | 8.9                |
| 構造 3c      | 0.8                | 1.8                | 81                 |
| RGD 模倣ペプチド | 1.6                | 2.5                | 81                 |

#### 【0394】

先の表1に示したとおり、それぞれの構造1、2、および3は、例えば、構造2および3が  $\alpha v \beta 3$  インテグリンへの結合に関して特定の選好を示す(それぞれIC50 = 0.3nMおよび0.8nM)、 $\alpha v \beta 3$  インテグリンおよび  $\alpha v \beta 5$  インテグリンへの強力な結合を示した。さらに、それぞれの構造1、2、および3は、RGD模倣ペプチド(例えば、米国特許番号第9,487,556号で開示された模倣RGDリガンド構造を参照のこと)と比較し、 $\alpha v \beta 3$  インテグリンに対してわずかに増大した結合活性を示した。そのうえ、RGD模倣リガンドが結合活性を有することが示された一方で、本開示のインテグリン標的化リガンドは、斯かるペプチドベースのRGD模倣リガンドと比較し、インビボにおける血清安定性およびエクスピボにおける化学的安定性の両方に関して、高い安定性を有する。

#### 【0395】

実施例4. 腎腫瘍担持マウスモデル(同所異種移植)

SEAPを発現する明細胞腎細胞癌(ccRCC)A498細胞の作出

CMVプロモーター下でアルカリフォスファターゼを分泌するレポーター遺伝子(SEAP)を発現するpCR3.1発現ベクターを、Clontech製のpSEAP2ベースベクターからPCR増幅したSEAPコード配列の方向性クローニングによって調製した。都合のよい制限部位を、pCR3.1ベクター(Invitrogen)へのクローニングのためのSEAPコード配列を増幅するのに使用されるプライマー上加えた。得られた構築物pCR3-SEAPを、SEAPを発現するA498 ccRCC細胞株を作出するのに使用した。簡単に言えば、pCR3-SEAPプラスミドを、製造業者の推奨に従って、エレクトロポレーションによってA498 ccRCC細胞内に形質移入した。安定した形質移入体を、G418抵抗性によって選別した。選別したA498-SEAPクローンを、SEAP発現と組み込み安定性について評価した。

#### 【0396】

SEAPを発現する明細胞腎細胞癌(ccRCC)A498細胞の移植

雌の無胸腺ヌードマウスを、～3%のイソフルラン(isoflourane)で麻酔し、右側臥位で据えた。左脇腹において小さい、0.5～1cmの縦方向の腹部切開をおこなう。湿らせた綿棒を使用して、左腎臓を、腹膜から持ち上げ、そして、そっと固定した。注射直前に、1.0mlのシリンジに、細胞/マトリゲル混合物を充填し、そして、27ゲージ針カテーテルをシリンジチップに取り付けた。次に、充填したシリンジをシリンジポンプ(Harvard Apparatus、モデルPHD2000)に取り付け、そして、空気を除去するための準備をした。シリンジに取り付けた27ゲージ針カテーテルのチップを、尾極近くの腎被膜直下に挿入し



、次に、針のチップを、被膜に沿って頭側方に向かって3～4mm慎重に進めた。約300,000個の細胞を含有する、2：1（体積：体積）細胞 / Matrigel（登録商標）混合物の10  $\mu$  lのアリコートをし、シリンジポンプを使用して腎実質内にゆっくり注射した。15～20秒間にわたり針を腎臓に残して、注射が完了するのを確実にした。次に、腎臓から針を除去し、綿棒を注射部上に30秒間置いて、細胞の漏れまたは出血を予防した。次に、腎臓をそつと腹部の元の場所に配置し、そして、腹壁を閉じた。血清を移植後7～14日毎に採取し、市販のSEAPアッセイキットを使用して、腫瘍増殖を観察した。ほとんどの試験に関して、そのとき、腫瘍測定値が通常約4～8mmである、移植の5～6週間後に、腫瘍マウスを使用した。

#### 【0397】

##### HIF2 mRNA発現の測定

本明細書の実施例で報告した試験に関して、注射後の特定の日に、マウスを安楽死させ、そして、全RNAを、製造業者の推奨に従ってTrizol試薬を使用して腎腫瘍から単離した。相対Hif2 mRNAレベルを、以下に記載したとおりRT-qPCRによって測定し、そして、送達バッファー（等張グルコース）だけで処理したマウスと比較した。

#### 【0398】

定量的PCRのための調製において、全RNAを、製造業者のプロトコールに従ってTRIzol Reagent（Molecular Research Center, Cincinnati, OH）で均質化した組織サンプルから単離した。約500ngのRNAを、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit（Life Technologies）を使用して逆転写した。ヒト（腫瘍）Hif2（EPAS1）発現のために、ヒトHif2（カタログ#4331182）とCycA（PPIA）（カタログ#4326316E）の製造前TaqMan遺伝子発現アッセイを、TaqMan Gene Expression Master Mix（Life Technologies）またはVeriQuest Probe Master Mix（Affymetrix）を使用した三連のパイプライン反応に使用した。定量的PCRを、7500 FastまたはStepOnePlusリアルタイムPCRシステム（Life Technologies）を使用することによって実施した。C<sub>T</sub>法を使用して、相対遺伝子発現について計算した。

#### 【0399】

実施例5．腎臓癌を担持しているマウスにおける、HIF-2（EPAS1）を標的化するRNAi剤にしたインテグリン標的化リガンドのインビボ投与

センス鎖とアンチセンス鎖を含んだRNAi剤を、本明細書の実施例2に説明したとおり、当該技術分野で知られている、およびオリゴヌクレオチド合成に一般的に使用される一般手法に従って、固相上のホスホラミダイト技術により合成した。RNAi剤は、HIF-2（Hif2 またはEPAS1）遺伝子に対して少なくとも部分的に相補的な核酸塩基配列を有するアンチセンス鎖を含んでいた。EPAS1は、HIF（低酸素症誘発因子）遺伝子ファミリーのメンバーであり、酸素によって調整される遺伝子誘導に関与する転写因子の半分をコードするが、それは、酸素レベルが低下した場合に誘発され（低酸素症として知られている状態）、かつ、明細胞腎臓癌細胞内で過剰発現されることが多いことが知られている。Hif2 RNAi剤を、配列特異的様式によりHif2 のメッセンジャーRNA（mRNA）転写産物の翻訳を低下または阻害し、その結果、EPAS1遺伝子の発現を阻害できるように設計した。Hif2 RNAi剤は、修飾ヌクレオチドと2つ以上の非ホスホジエステル結合から成っていた。

#### 【0400】

試験1日目に、以下の投与群に従って、腎臓癌担持マウス（実施例4を参照のこと）に、尾静脈注射によって投与した：

#### 【0401】

10

20

30

40

## 【表 4】

表2. 実施例5における腎臓癌担持マウスの投与群

| 群 | RNAi 剤と用量                                                                                                                            | 投与レジメン    |
|---|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 | 等張グルコース（水中の 5% のブドウ糖（d5w））（RNAi 剤なし）                                                                                                 | 1 日目に単回投与 |
| 2 | 等張グルコース中に処方した（インテグリン標的化リガンドを結合していない）40 キロダルトン（kDa）の PEG 部分にコンジュゲートした 7.5mg/kg の Hif2 $\alpha$ RNAi 剤（AD04546）                        | 1 日目に単回投与 |
| 3 | 等張グルコース中に処方した、RGD 模倣ペプチドベースのリガンドにコンジュゲートし、さらに構築物に連結した 40kDa の PEG 部分を含む 7.5mg/kg の Hif2 $\alpha$ RNAi 剤（AD04546）                     | 1 日目に単回投与 |
| 4 | 等張グルコース中に処方した、構造 1a のインテグリン標的化リガンドにコンジュゲートし、さらに構築物に連結した 40kDa の PEG 部分を含む 7.5mg/kg の Hif2 $\alpha$ RNAi 剤（AD04546）                   | 1 日目に単回投与 |
| 5 | 等張グルコース中に処方した、構造 2a のインテグリン標的化リガンドにコンジュゲートし、さらに構築物に連結した 40kDa の PEG 部分を含む 7.5mg/kg の Hif2 $\alpha$ RNAi 剤（AD04546）                   | 1 日目に単回投与 |
| 6 | 等張グルコース中に処方した、4つの、構造 2a のインテグリン標的化リガンド（すなわち、四座の標的化基）にコンジュゲートし、さらに構築物に連結した 40kDa の PEG 部分を含む 7.5mg/kg の Hif2 $\alpha$ RNAi 剤（AD04546） | 1 日目に単回投与 |
| 7 | 等張グルコース中に処方した、（PEG 部分のない）4つの、構造 2a のインテグリン標的化リガンド（すなわち、四座の標的化基）を含有するクラスタにコンジュゲートした 7.5mg/kg の Hif2 $\alpha$ RNAi 剤（AD04545）。         | 1 日目に単回投与 |
| 8 | 等張グルコース中に処方した、構造 2a のインテグリン標的化リガンドにコンジュゲートし、さらに構築物に連結した 20kDa の PEG 部分を含む 7.5mg/kg の Hif2 $\alpha$ RNAi 剤（AD04546）                   | 1 日目に単回投与 |

## 【0402】

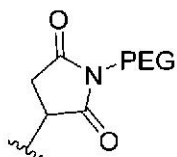
ヒトHif2 遺伝子を標的化するように向けられたヌクレオチド配列を有し、かつ、インテグリン標的化リガンドへの（または群3では、RGD模倣ペプチドベースのリガンドへの）コンジュゲーションを容易にするためのセンス鎖の5'末端に官能化アミン反応性基（NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>）を含む、実施例5のRNAi剤を合成した。RNAi剤の修飾配列を、先の実施例2に示した。群4および5に関しては、単独のインテグリン標的化リガンド（本明細書では「単座」のリガンドと呼ばれる）を、DBCO-PEG<sub>5</sub>-NHSエステルリンカー（BroadPharm）を介してRNAi剤にコンジュゲートした。リンカーはセンス鎖の5'末端の上の末端の第一級アミンにコンジュゲートした。（その後、リンカーのDBCO成分にコンジュゲートされる

）アジド反応性基を有する、それぞれのインテグリン標的化リガンドを合成した（例えば、実施例1を参照のこと）。

【0403】

以下の構造：

【化232】



10

{ 式中、以下の：

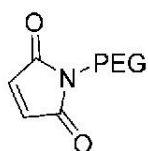
【化233】



が、AD04546（実施例2を参照のこと）に示した $C_6-S$ -群でRNAi剤への結合点を示し、およびPEGが、20kDaまたは40kDaのPEG鎖を示す}を有する「20kDaのPEG部分」または「40kDaのPEG部分」と呼ばれるPKモジュレーターを有するRNAi剤を合成した。表Aに示した $C_6-SS-C_6$ 基（次に、以下の化合物：

20

【化234】



{ 式中、PEGは20kDaまたは40kDaのPEG鎖を示す}を有するマイケル付加を受ける）を還元することによって、PKモジュレーターをセンス鎖の3'末端に結合させた。

【0404】

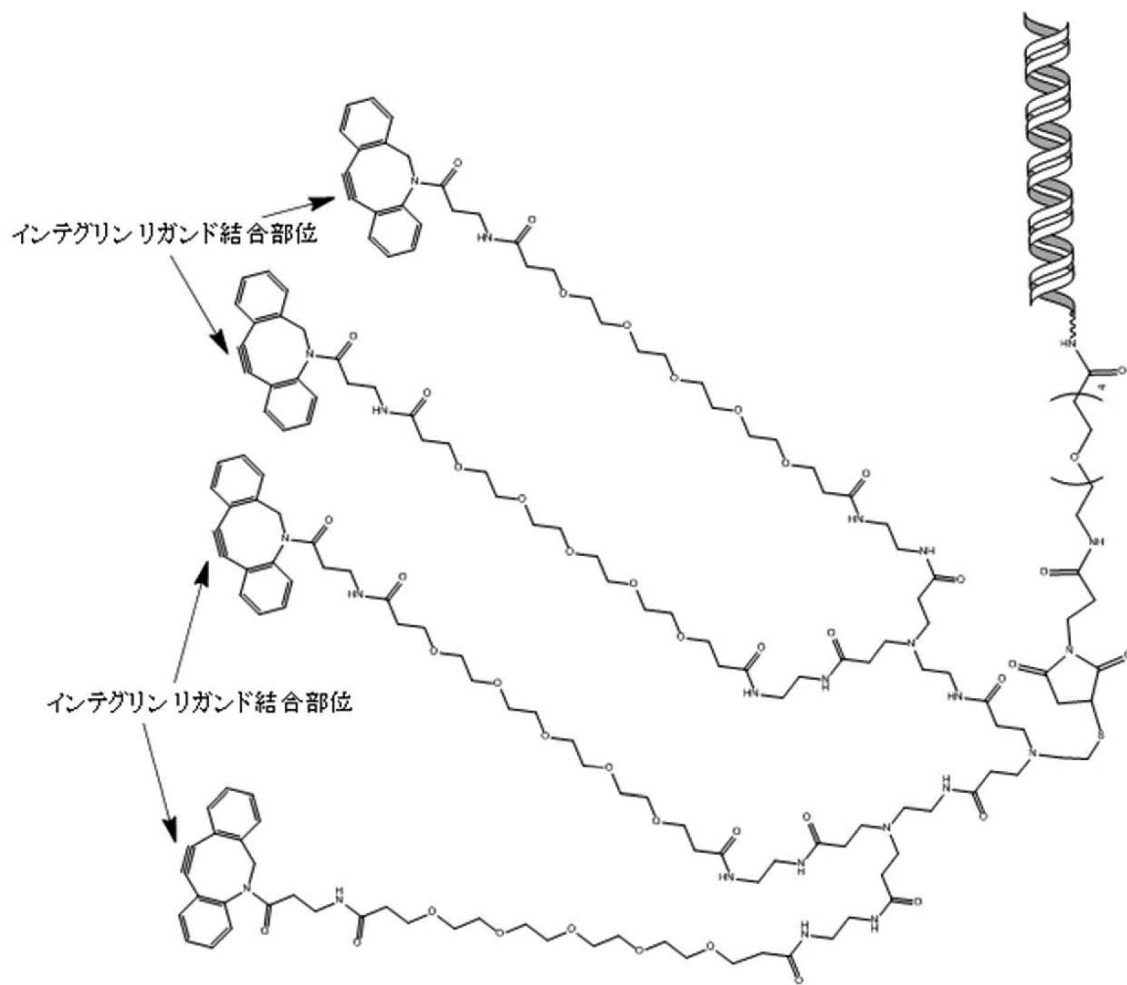
30

群6および7に関しては、4つのインテグリン標的化リガンドを、以下の：

40

50

## 【化 2 3 5】



によって表される一般構造を有するDBCO官能化PAMAM - G1シスタミンコアを含む四座足場を介してコンジュゲートする。

## 【 0 4 0 5】

上記の表2に言及したように、いくつかの群において、40kDaまたは20kDaのPEG部分を、薬物 - 生成物コンジュゲートの循環時間を延長するためのPKエンハンサーとして役立つように取り付けた。40kDaまたは20kDaのPEG部分を、以下の式の試薬を使用して結合した：

## 【 0 4 0 6】

各群において、3匹の担癌マウスに投与した ( $n=3$ )。マウスを注射後の試験8日目に殺し、そして、全RNAを、実施例4に説明した手順に従って、腎腫瘍から単離した。次に、相対ヒトHIF2 mRNA発現を、ヒトCyclophilin A (PPIA) 発現に対して正規化した、プローブベースの定量的PCR (RT - qPCR) によって定量し、そして、実施例4で説明したように、溶媒対照群 (等張グルコース) の分数として表現した (幾何平均、 $+/- 95\%$  の信頼区間)。

## 【 0 4 0 7】

10

20

30

40

50

## 【表 5】

表3. 実施例5の屠殺時の平均相対huHif2 $\alpha$  mRNA発現

| 群 ID                                                                   | 平均相対 huHIF<br>2 $\alpha$ mRNA 発現 | 低値<br>(誤差) | 高値<br>(誤差) |
|------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|------------|------------|
| 群 1 (等張グルコース)                                                          | 1.000                            | 0.069      | 0.074      |
| 群 2 (7.5mg/kg の RNAi 剤) (リガンドなし、<br>40kDa の PEG)                       | 0.563                            | 0.016      | 0.017      |
| 群 3 (7.5mg/kg の RNAi 剤-RGD 模倣ペプチド<br>ベースのリガンド、40kDa の PEG)             | 0.400                            | 0.087      | 0.112      |
| 群 4 (7.5mg/kg の RNAi 剤-構造 1a のインテ<br>グリン標的化リガンド、40kDa の PEG)           | 0.390                            | 0.027      | 0.029      |
| 群 5 (7.5mg/kg の RNAi 剤-構造 2a のインテ<br>グリン標的化リガンド、40kDa の PEG)           | 0.308                            | 0.061      | 0.077      |
| 群 6 (7.5mg/kg の RNAi 剤-インテグリン標的<br>化リガンド構造 2a の四座の標的化基、40kDa<br>の PEG) | 0.289                            | 0.069      | 0.091      |
| 群 7 (7.5mg/kg の RNAi 剤-インテグリン標的<br>化リガンド構造 2a の四座の標的化基)                | 0.589                            | 0.050      | 0.054      |
| 群 8 (7.5mg/kg の RNAi 剤-インテグリン標的<br>化リガンド構造 2a、20kDa の PEG)             | 0.647                            | 0.098      | 0.115      |

## 【0408】

上記の表3に示したとおり、Hif2 RNAi剤のそれぞれは、対照と比較して、マウスにおけるmRNA発現の低減を示した。PKのエンハンサーとしての40kDaのPEG部分の包含は、標的化された遺伝子の発現の阻害をほとんどの場合改善した。そのうえ、群3、4、および5の比較は、本明細書に記載した構造1aのインテグリン標的化リガンドが、v3に対して親和性を有することが知られているRGD模倣ペプチドベースのリガンドに匹敵することを示し、さらに、構造2aのリガンドは、RGD模倣リガンドを超える、ノックダウンにおける約10%の改善を示した。例えば、群3(RGD模倣)は、約60%のノックダウン(0.400)を有し；群4(構造1a)は、約61%のノックダウン(0.390)を有し；群5(構造2a)は、約69%のノックダウン(0.308)を有した。

## 【0409】

重要なことに、データはまた、リガンドを含まない同じ構築物と比較した場合に、本明細書に開示したインテグリン標的化リガンドの包含が改善を示したので、リガンド依存性を示した。例えば、群6(三座のインテグリン標的化リガンド構造2a)は、群2(インテグリン標的化リガンドなし)(約44%のノックダウン(0.563)しか示さなかった)と比較した場合に、約72%のノックダウン(0.289)を示した。

## 【0410】

さらに、群6は、単座リガンドを超える多座リガンドのわずかな優先を示す、群5を超える小さい改善を示した；しかしながら、両形態とも、活性であり、かつ、(RNAi剤による遺伝子発現の阻害によって示されるとおり)RNAi剤を腎臓に送達した。

## 【0411】

実施例6. 腎臓癌を担持しているマウスにおける、HIF-2を標的化するRNAi剤にコンジュゲートしたインテグリン標的化リガンドのインビボ投与

センス鎖とアンチセンス鎖を含んだRNAi剤を、本明細書の実施例2に説明したとおり、

当該技術分野で知られている、およびオリゴヌクレオチド合成に一般的に使用される一般手法に従って、固相上のホスホラミダイト技術により合成した。RNAi剤は、本明細書の実施例2に説明したそれぞれの修飾ヌクレオチド配列を有し、かつ、Hif2（EPAS1）を標的化するように設計した。

【0412】

試験1日目に、以下の投与群に従って、腎臓癌担持マウス（実施例4を参照のこと）に、尾静脈注射によって投与した：

【0413】

【表6】

表4. 実施例6における腎臓癌担持マウスの投与群

| 群 | RNAi 剤と用量                                                                                                         | 投与レジメン    |
|---|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 | 等張グルコース（d5w）（RNAi 剤なし）                                                                                            | 1 日目に単回投与 |
| 2 | 等張グルコース中に処方した、RGD 模倣ペプチドベースのリガンドにコンジュゲートし、さらに構築物に連結した 40kDa の PEG 部分を含む 30mg/kg の Hif2 $\alpha$ RNAi 剤（AD04546）   | 1 日目に単回投与 |
| 3 | 等張グルコース中に処方した、RGD 模倣ペプチドベースのリガンドにコンジュゲートし、さらに構築物に連結した 40kDa の PEG 部分を含む 15mg/kg の Hif2 $\alpha$ RNAi 剤（AD04546）   | 1 日目に単回投与 |
| 4 | 等張グルコース中に処方した、RGD 模倣ペプチドベースのリガンドにコンジュゲートし、さらに構築物に連結した 40kDa の PEG 部分を含む 7.5mg/kg の Hif2 $\alpha$ RNAi 剤（AD04546）  | 1 日目に単回投与 |
| 5 | 等張グルコース中に処方した、構造 2a のインテグリン標的化リガンドにコンジュゲートし、さらに構築物に連結した 40kDa の PEG 部分を含む 30mg/kg の Hif2 $\alpha$ RNAi 剤（AD04546） | 1 日目に単回投与 |
| 6 | 等張グルコース中に処方した、構造 2a のインテグリン標的化リガンドにコンジュゲートし、さらに構築物に連結した 40kDa の PEG 部分を含む 15mg/kg の Hif2 $\alpha$ RNAi 剤（AD04546） | 1 日目に単回投与 |

【0414】

ヒトHif2 遺伝子を標的化するように向けられたヌクレオチド配列を有し、かつ、インテグリン標的化リガンドへの（または群2、3、および4では、RGD模倣ペプチドへの）コンジュゲーションを容易にするためのセンス鎖の5'末端に官能化アミン反応性基（NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>）を含む、RNAi剤を合成した。群5および6に関しては、単独のインテグリン標的化リガンド（「単座」のリガンド）を、以下のDBCO - PEG<sub>5</sub> - NHSエステル：

10

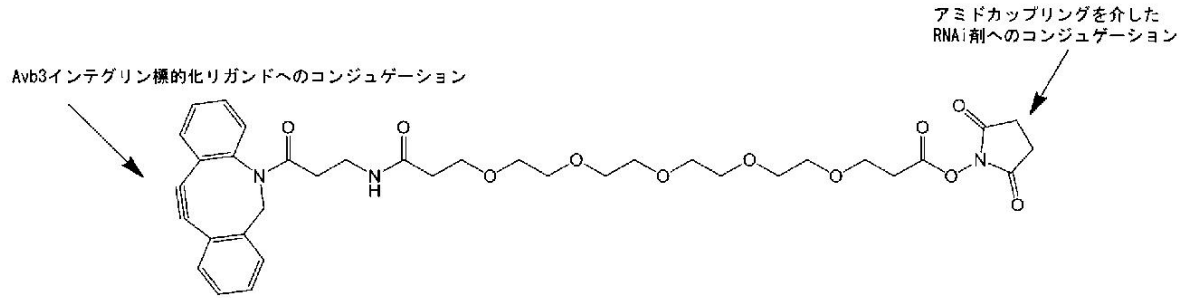
20

30

40

50

## 【化 2 3 6】



10

を介してRNAi剤にコンジュゲートした。

## 【 0 4 1 5】

各群において、3匹の担癌マウスに投与した（ $n = 3$ ）。マウスを注射後の試験8日目に殺し、そして、全RNAを、実施例4に説明した手順に従って、腎腫瘍から単離した。次に、相対ヒトHIF2 mRNA発現を、ヒトCyclophilin A（PPIA）発現に対して正規化した、プローブベースの定量的PCR（RT-qPCR）によって定量し、そして、実施例4で説明したように、溶媒対照群（等張グルコース）の分数として表現した（幾何平均、 $+/- 95\%$ の信頼区間）。

## 【 0 4 1 6】

20

## 【表 7】

表5. 実施例6の屠殺時の平均相対huHif2  $\alpha$  mRNA発現

| 群 ID                                                  | 平均相対 huHIF2 $\alpha$ mRNA 発現 | 低 値<br>(誤差) | 高 値<br>(誤差) |
|-------------------------------------------------------|------------------------------|-------------|-------------|
| 群 1 (等張グルコース)                                         | 1.000                        | 0.072       | 0.078       |
| 群 2 (30mg/kg の RNAi 剤-RGD のペプチドベースのリガンド、40kDa の PEG)  | 0.300                        | 0.041       | 0.047       |
| 群 3 (15mg/kg の RNAi 剤-RGD のペプチドベースのリガンド、40kDa の PEG)  | 0.330                        | 0.080       | 0.106       |
| 群 4 (7.5mg/kg の RNAi 剤-RGD のペプチドベースのリガンド、40kDa の PEG) | 0.446                        | 0.068       | 0.080       |
| 群 5 (30mg/kg の RNAi 剤-インテグリン標的化リガンド構造 2a、40kDa の PEG) | 0.198                        | 0.007       | 0.007       |
| 群 6 (15mg/kg の RNAi 剤-インテグリン標的化リガンド構造 2a、40kDa の PEG) | 0.271                        | 0.012       | 0.012       |

30

## 【 0 4 1 7】

40

上記の表5に示したとおり、Hif2 RNAi剤のそれぞれは、対照と比較して、マウスにおけるmRNA発現の低減を示した。そのうえ、群5および6（本明細書に開示した構造2aのインテグリン標的化リガンドを含有する）は、群2および3のRGD模倣ペプチドベースのリガンドと比較して、Hif2 mRNAのノックダウンにおける改善を示した（例えば、群6（15mg/kgのRNAi剤にて約73%ノックダウン（0.271））の群3（15mg/kgのRNAi剤にて約67%ノックダウン（0.330））との比較）。

## 【 0 4 1 8】

実施例7. 腎臓癌を担持しているマウスにおける、HIF-2 を標的化するRNAi剤にコンジュゲートしたインテグリン標的化リガンドのインビボ投与

センス鎖とアンチセンス鎖を含んだRNAi剤を、本明細書の実施例2に説明したとおり、

50

当該技術分野で知られている、およびオリゴヌクレオチド合成に一般的に使用される一般手法に従って、固相上のホスホラミダイト技術により合成した。RNAi剤は、本明細書の実施例2に説明したそれぞれの修飾ヌクレオチド配列を有し、かつ、Hif2（EPAS1）を標的化するように設計した。

【0419】

試験1日目に、以下の投与群に従って、腎臓癌担持マウス（実施例4を参照のこと）に、尾静脈注射によって投与した：

【0420】

【表8】

表6. 実施例7における腎臓癌担持マウスの投与群

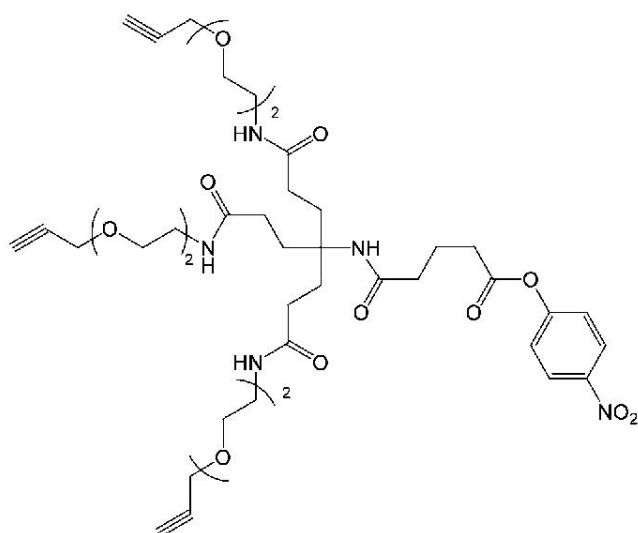
| 群 | RNAi 剤と用量                                                                                                                      | 投与レジメン   |
|---|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| 1 | 等張グルコース（d5w（水中の5%のブドウ糖））（RNAi 剤なし）                                                                                             | 1日目に単回投与 |
| 2 | 等張グルコース中に処方した、構造 2a の三座のインテグリン標的化リガンドにコンジュゲートし、さらに構築物に連結した 40kDa の PEG 部分を含む 7.5mg/kg の Hif2 $\alpha$ RNAi 剤（AD04546）          | 1日目に単回投与 |
| 3 | 等張グルコース中に処方した、構造 2a の三座のインテグリン標的化リガンドにコンジュゲートし、さらに構築物に連結した 40kDa の PEG 部分を含む 30mg/kg の Hif2 $\alpha$ RNAi 剤（AD04546）           | 1日目に単回投与 |
| 4 | 等張グルコース中に処方した、構造 2.8a の三座のインテグリン標的化リガンドにコンジュゲートし、さらに構築物に連結した 40kDa の PEG 部分を含む 7.5mg/kg の Hif2 $\alpha$ RNAi 剤（AD04546）        | 1日目に単回投与 |
| 5 | 等張グルコース中に処方した、構造 2.9a の三座のインテグリン標的化リガンドにコンジュゲートし、さらに構築物に連結した 40kDa の PEG 部分を含む 7.5mg/kg の Hif2 $\alpha$ RNAi 剤（AD04546）        | 1日目に単回投与 |
| 6 | 等張グルコース中に処方した、構造 2.10a の三座のインテグリン標的化リガンドにコンジュゲートし、さらに構築物に連結した 40kDa の PEG 部分を含む 7.5mg/kg の Hif2 $\alpha$ RNAi 剤（AD04546）       | 1日目に単回投与 |
| 7 | 等張グルコース中に処方した、構造 2.10a の三座のインテグリン標的化リガンドにコンジュゲートし、さらにセンス鎖の 3' チオールに結合した N-エチルマレイミドを含む 7.5mg/kg の Hif2 $\alpha$ RNAi 剤（AD04546） | 1日目に単回投与 |
| 8 | 等張グルコース中に処方した、構造 2a の単座のインテグリン標的化リガンドにコンジュゲートし、さらに構築物に連結した 40kDa の PEG 部分を含む 7.5mg/kg の Hif2 $\alpha$ RNAi 剤（AD04546）          | 1日目に単回投与 |

【0421】



ヒトHif2 遺伝子を標的化するように向けられたヌクレオチド配列を有し、かつ、インテグリン標的化リガンドへのコンジュゲーションを容易にするためのセンス鎖の5'末端に官能化アミン反応性基 ( $\text{NH}_2 - \text{C}_6$ ) を含む、RNAi剤を合成した。群2～7に関しては、以下の化合物：

【化 2 3 7】



10

20

を三座の足場とのコンジュゲートを官能化するために使用した。

【 0 4 2 2 】

群8に関しては、アルキン - PEG<sub>4</sub> - NHSエステルを、センス鎖上の5'アミンに単座のインテグリン標的化リガンドを連結するために使用した。本明細書に記載するとおり、群4～7は、様々なPEG長を有するインテグリン標的化リガンドを使用した。

【 0 4 2 3 】

各群において、3匹の担癌マウスに投与した ( $n=3$ )。マウスを注射後の試験8日目に殺し、そして、全RNAを、実施例4に説明した手順に従って、腎腫瘍から単離した。次に、相対ヒトHIF2 mRNA発現を、ヒトCyclophilin A (PPIA) 発現に対して正規化した、プローブベースの定量的PCR (RT-qPCR) によって定量し、そして、実施例4で説明したように、溶媒対照群 (等張グルコース) の分数として表現した (幾何平均、 $\pm 95\%$ の信頼区間)。

30

【 0 4 2 4 】

40

50

## 【表 9】

表7. 実施例7の屠殺時の平均相対huHif2 $\alpha$  mRNA発現

| 群 ID                                                           | 平均相対 huHIF<br>2 $\alpha$ mRNA 発現 | 低値<br>(誤差) | 高値<br>(誤差) |
|----------------------------------------------------------------|----------------------------------|------------|------------|
| 群 1 (等張グルコース)                                                  | 1.000                            | 0.078      | 0.085      |
| 群 2 (7.5mg/kg の RNAi 剤—構造 2a の三座のインテグリン標的化リガンド、40kDa の PEG)    | 0.361                            | 0.025      | 0.026      |
| 群 3 (30mg/kg の RNAi 剤—構造 2a の三座のインテグリン標的化リガンド、40kDa の PEG)     | 0.259                            | 0.024      | 0.026      |
| 群 4 (7.5mg/kg の RNAi 剤—構造 2.8a の三座のインテグリン標的化リガンド、40kDa の PEG)  | 0.428                            | 0.062      | 0.073      |
| 群 5 (7.5mg/kg の RNAi 剤—構造 2.9a の三座のインテグリン標的化リガンド、40kDa の PEG)  | 0.481                            | 0.014      | 0.014      |
| 群 6 (7.5mg/kg の RNAi 剤—構造 2.10a の三座のインテグリン標的化リガンド、40kDa の PEG) | 0.419                            | 0.040      | 0.044      |
| 群 7 (7.5mg/kg の RNAi 剤—構造 2.10a の三座のインテグリン標的化リガンド、N-エチルマレイミド)  | 0.627                            | 0.054      | 0.060      |
| 群 8 (7.5mg/kg の RNAi 剤—構造 2a の単座のインテグリン標的化リガンド、40kDa の PEG)    | 0.537                            | 0.041      | 0.045      |

10

20

30

## 【0425】

上記の表7に示したとおり、Hif2 RNAi剤のそれぞれは、対照と比較して、マウスにおけるmRNA発現の低減を示した。例えば、群2(7.5mg/kgの、(PEG<sub>4</sub>基を含む)構造2aの三座のインテグリン標的化リガンドにコンジュゲートしたRNAi剤の用量を含む)は、Hif2 の約64%ノックダウン(0.361)を示した。さらに、PEG<sub>36</sub>までPEG基の長さを増大した構築物のすべて(例えば、群6および7)がノックダウンを示した一方で、構造2aに存在するPEG<sub>4</sub>基と比較した場合に、利益は見られなかった。

40

## 【0426】

実施例8. 腎臓癌を担持しているマウスにおける、HIF-2 を標的化するRNAi剤にコンジュゲートしたインテグリン標的化リガンドのインビボ投与の用量反応試験

センス鎖とアンチセンス鎖を含んだRNAi剤を、本明細書の実施例2に説明したとおり、当該技術分野で知られている、およびオリゴヌクレオチド合成に一般的に使用される一般手法に従って、固相上のホスホラミダイト技術により合成した。RNAi剤は、本明細書の実施例2に説明したそれぞれの修飾ヌクレオチド配列を有し、かつ、Hif2 (EPAS1)を標的化するように設計した。

## 【0427】

試験1日目に、以下の投与群に従って、腎臓癌担持マウス(実施例4を参照のこと)に、

50

尾静脈注射によって投与した：

【 0 4 2 8 】

【表 1 0】

表8. 実施例8における腎臓癌担持マウスの投与群

| 群 | RNAi 剤と用量                                                                                                             | 投与レジメン    |
|---|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 | 等張グルコース（d5w（水中の 5% のブドウ糖））（RNAi 剤なし）                                                                                  | 1 日目に単回投与 |
| 2 | 等張グルコース中に処方した、構造 2a の三座のインテグリン標的化リガンドにコンジュゲートし、さらに構築物に連結した 40kDa の PEG 部分を含む 7.5mg/kg の Hif2 $\alpha$ RNAi 剤（AD04546） | 1 日目に単回投与 |
| 3 | 等張グルコース中に処方した、構造 2a の三座のインテグリン標的化リガンドにコンジュゲートし、さらに構築物に連結した 40kDa の PEG 部分を含む 10mg/kg の Hif2 $\alpha$ RNAi 剤（AD04546）  | 1 日目に単回投与 |
| 4 | 等張グルコース中に処方した、構造 2a の三座のインテグリン標的化リガンドにコンジュゲートし、さらに構築物に連結した 40kDa の PEG 部分を含む 20mg/kg の Hif2 $\alpha$ RNAi 剤（AD04546）  | 1 日目に単回投与 |
| 5 | 等張グルコース中に処方した、構造 2a の三座のインテグリン標的化リガンドにコンジュゲートし、さらに構築物に連結した 40kDa の PEG 部分を含む 30mg/kg の Hif2 $\alpha$ RNAi 剤（AD04546）  | 1 日目に単回投与 |

【 0 4 2 9 】

ヒトHif2 遺伝子を標的化するように向けられたヌクレオチド配列を有し、かつ、インテグリン標的化リガンドへのコンジュゲーションを容易にするためのセンス鎖の5'末端に官能化アミン反応性基（NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>）を含む、RNAi剤を合成した。それぞれ群は、以下の構造：

10

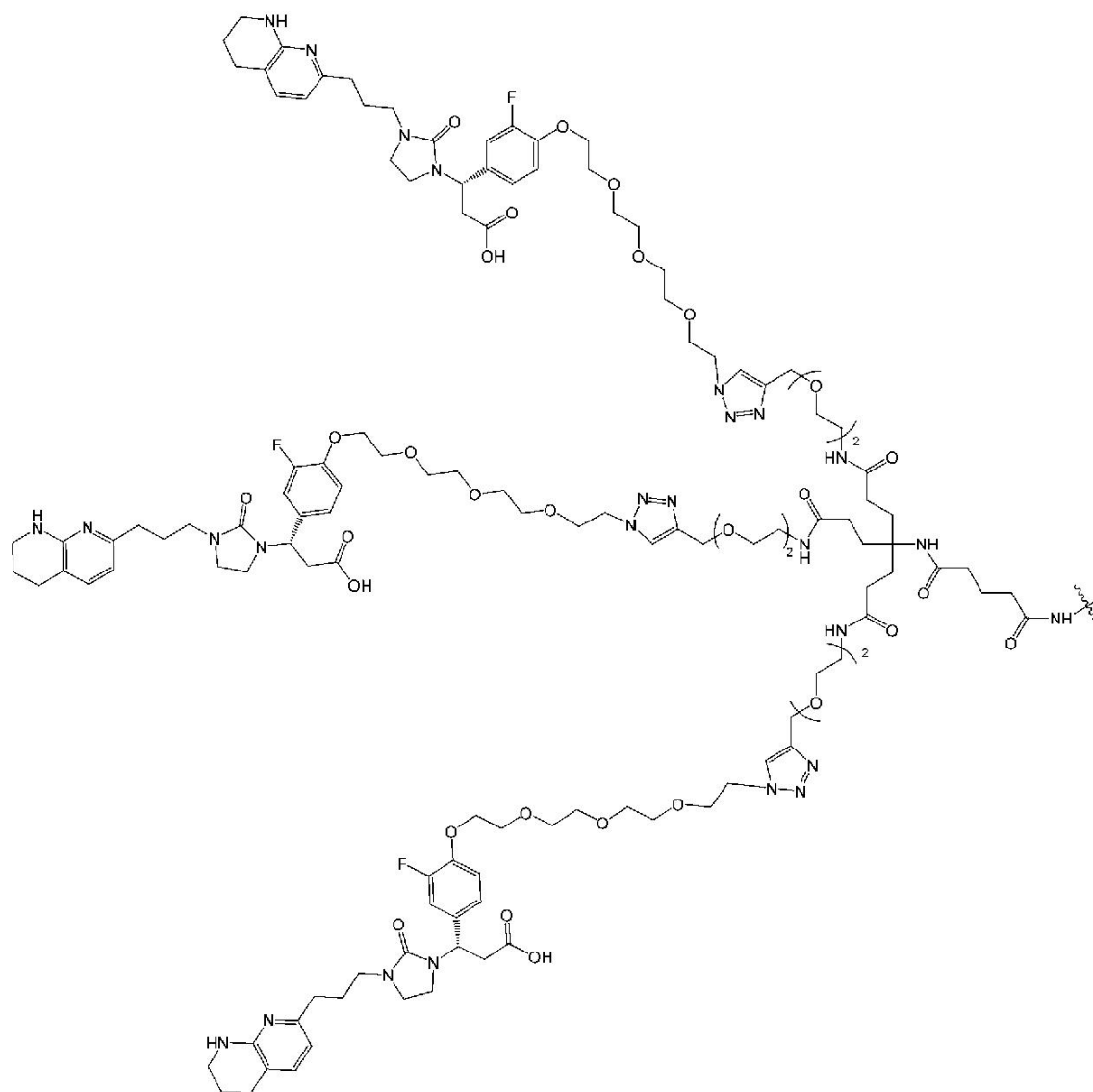
20

30

40

50

【化 2 3 8】



によって示される、構造2aの三座のインテグリンリガンドを有する。

【0430】

各群において、3匹の担癌マウスに投与した ( $n=3$ )。マウスを注射後の試験8日目に殺し、そして、全RNAを、実施例4に説明した手順に従って、腎腫瘍から単離した。次に、相対ヒトHIF2 mRNA発現を、ヒトCyclophilin A (PPIA) 発現に対して正規化した、プローブベースの定量的PCR (RT-qPCR) によって定量し、そして、実施例4で説明したように、溶媒対照群 (等張グルコース) の分数として表現した (幾何平均、 $\pm 9.5\%$  の信頼区間)。

【0431】

10

20

30

40

50

## 【表 1 1】

表9. 実施例8の屠殺時の平均相対huHif2 $\alpha$  mRNA発現

| 群 ID                    | 平均相対 huHIF<br>2 $\alpha$ mRNA 発現 | 低値<br>(誤差) | 高値<br>(誤差) |
|-------------------------|----------------------------------|------------|------------|
| 群 1 (等張グルコース)           | 1.000                            | 0.131      | 0.150      |
| 群 2 (7.5mg/kg の RNAi 剤) | 0.313                            | 0.027      | 0.030      |
| 群 3 (10mg/kg の RNAi 剤)  | 0.349                            | 0.033      | 0.036      |
| 群 4 (20mg/kg の RNAi 剤)  | 0.216                            | 0.040      | 0.050      |
| 群 5 (30mg/kg の RNAi 剤)  | 0.203                            | 0.035      | 0.042      |

10

## 【0 4 3 2】

上記の表9に示したとおり、本明細書に開示した構造2aのインテグリン標的化リガンドにコンジュゲートしたHif2 RNAi剤は、すべての投与量レベルにわたり対照と比較して、マウスにおけるmRNA発現の低減を示した。

## 【0 4 3 3】

実施例9. 腎臓癌を担持しているマウスにおける、インテグリン標的化リガンドにコンジュゲートしたHIF - 2 を標的化するRNAi剤のノックダウンの持続

センス鎖とアンチセンス鎖を含んだRNAi剤を、本明細書の実施例2に説明したとおり、当該技術分野で知られている、およびオリゴヌクレオチド合成に一般的に使用される一般手法に従って、固相上のホスホラミダイト技術により合成した。RNAi剤は、本明細書の実施例2に説明したそれぞれの修飾ヌクレオチド配列を有し、かつ、Hif2 (EPAS1) を標的化するように設計した。

20

## 【0 4 3 4】

試験1日目に、以下の投与群に従って、腎臓癌担持マウス（実施例4を参照のこと）に、尾静脈注射によって投与した：

## 【0 4 3 5】

30

40

50

## 【表 1 2】

表10. 実施例9におけるマウスの投与群

| 群  | RNAi 剤と用量                                                                                                                                               | 投与レジメン    |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1  | 等張グルコース（d5w（5%のブドウ糖液））<br>（RNAi 剤なし）、5 日目に安楽死させたマウス                                                                                                     | 1 日目に単回投与 |
| 1A | 等張グルコース（d5w（5%のブドウ糖液））<br>（RNAi 剤なし）、22 日目に安楽死させたマウス                                                                                                    | 1 日目に単回投与 |
| 2  | 等張グルコース中に処方した、構造 2a の三座の<br>インテグリン標的化リガンドにコンジュゲート<br>し、さらに構築物に連結した 40kDa の PEG 部分<br>を含む 7.5mg/kg の Hif2 $\alpha$ RNAi 剤（AD04546）；<br>マウスは 5 日目に安楽死させた  | 1 日目に単回投与 |
| 3  | 等張グルコース中に処方した、構造 2a の三座の<br>インテグリン標的化リガンドにコンジュゲート<br>し、さらに構築物に連結した 40kDa の PEG 部分<br>を含む 7.5mg/kg の Hif2 $\alpha$ RNAi 剤（AD04546）；<br>マウスは 8 日目に安楽死させた  | 1 日目に単回投与 |
| 4  | 等張グルコース中に処方した、構造 2a の三座の<br>インテグリン標的化リガンドにコンジュゲート<br>し、さらに構築物に連結した 40kDa の PEG 部分<br>を含む 7.5mg/kg の Hif2 $\alpha$ RNAi 剤（AD04546）；<br>マウスは 15 日目に安楽死させた | 1 日目に単回投与 |
| 5  | 等張グルコース中に処方した、構造 2a の三座の<br>インテグリン標的化リガンドにコンジュゲート<br>し、さらに構築物に連結した 40kDa の PEG 部分<br>を含む 7.5mg/kg の Hif2 $\alpha$ RNAi 剤（AD04546）；<br>マウスは 22 日目に安楽死させた | 1 日目に単回投与 |

## 【0 4 3 6】

群1および2のマウスは、注射後の5日目に安楽死させ；群3のマウスは、注射後の8日目に安楽死させ；群4のマウスは、注射後の15日目に安楽死させ；ならびに群1Aおよび5のマウスは、注射後の22日目に安楽死させた。

## 【0 4 3 7】

ビヒクル対照群に関して、群1では2匹のマウスに投与し、そして、群1Aでは3匹のマウスに投与した。RNAi剤 - インテグリン標的化リガンド含有群（すなわち、群2、3、4、および5）に関して、各群において4匹の担癌マウスに投与した（ $n=4$ ）。全RNAを、実施例4に説明した手順に従って、腎腫瘍から単離した。次に、相対ヒトHIF2 mRNA発現を、ヒトCyclophilin A（PPIA）発現に対して正規化した、プローブベースの定量的PCR（RT-qPCR）によって定量し、そして、実施例4で説明したように、溶媒対照群（等張グルコース）の分数として表現した（幾何平均、 $+/-$  95%の信頼区間）。

## 【0 4 3 8】

10

20

30

40

50

## 【表 1 3】

表11. 実施例 9 の屠殺時の平均相対huHif2 $\alpha$  mRNA発現

| 群 ID                                                                   | 平均相対 huHIF<br>2 $\alpha$ mRNA 発現 | 低値<br>(誤差) | 高値<br>(誤差) |
|------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|------------|------------|
| 群 1 (等張グルコース ; 5 日目に屠殺)                                                | 0.741                            | 0.02<br>8  | 0.02<br>9  |
| 群 1A (等張グルコース ; 22 日目に屠殺)                                              | 1.000                            | 0.06<br>6  | 0.07<br>0  |
| 群 2 (7.5mg/kg の RNAi 剤－構造 2a の三座のインテグリン標的化リガンド、40kDa の PEG ; 5 日目に屠殺)  | 0.262                            | 0.02<br>8  | 0.03<br>1  |
| 群 3 (7.5mg/kg の RNAi 剤－構造 2a の三座のインテグリン標的化リガンド、40kDa の PEG ; 5 日目に屠殺)  | 0.202                            | 0.02<br>1  | 0.02<br>3  |
| 群 4 (7.5mg/kg の RNAi 剤－構造 2a の三座のインテグリン標的化リガンド、40kDa の PEG ; 8 日目に屠殺)  | 0.233                            | 0.03<br>4  | 0.03<br>9  |
| 群 5 (7.5mg/kg の RNAi 剤－構造 2a の三座のインテグリン標的化リガンド、40kDa の PEG ; 15 日目に屠殺) | 0.299                            | 0.01<br>7  | 0.01<br>8  |

10

20

## 【0 4 3 9】

上記の表11に示したとおり、Hif2 RNAi剤は、22日目の時点で、対照と比較して、mRNA発現の低減を示し続けた（22日目の時点で約70%ノックダウン（0.299））。

## 【0 4 4 0】

実施例10．腎臓癌を担持しているマウスにおける、HIF - 2 を標的化するRNAi剤にコンジュゲートしたインテグリン標的化リガンドのインピボ投与

30

センス鎖とアンチセンス鎖を含んだRNAi剤を、本明細書の実施例2に説明したとおり、当該技術分野で知られている、およびオリゴヌクレオチド合成に一般的に使用される一般手法に従って、固相上のホスホラミダイト技術により合成した。RNAi剤は、本明細書の実施例2に説明したそれぞれの修飾ヌクレオチド配列を有し、かつ、Hif2（EPAS1）を標的化するように設計した。

## 【0 4 4 1】

試験1日目に、以下の投与群に従って、腎臓癌担持マウス（実施例4を参照のこと）に、尾静脈注射によって投与した：

## 【0 4 4 2】

40

50

## 【表 1 4】

表12. 実施例10におけるマウスの投与群

| 群 | RNAi 剤と用量                                                                                                               | 投与レジメン    |
|---|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 | 等張グルコース（d5w（水中の 5% のブドウ糖））（RNAi 剤なし）                                                                                    | 1 日目に単回投与 |
| 2 | 等張グルコース中に処方した、構造 2a の三座のインテグリン標的化リガンドにコンジュゲートし、さらに構築物に連結した 40kDa の PEG 部分を含む 7.5mg/kg の Hif2 $\alpha$ RNAi 剤（AD04546）   | 1 日目に単回投与 |
| 3 | 等張グルコース中に処方した、構造 2.6a の三座のインテグリン標的化リガンドにコンジュゲートし、さらに構築物に連結した 40kDa の PEG 部分を含む 7.5mg/kg の Hif2 $\alpha$ RNAi 剤（AD04546） | 1 日目に単回投与 |

10

## 【0 4 4 3】

ヒトHif2 遺伝子を標的化するように向けられたヌクレオチド配列を有し、かつ、インテグリン標的化リガンドへのコンジュゲーションを容易にするためのセンス鎖の5'末端に官能化アミン反応性基（NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>）を含む、RNAi剤を合成した。

20

## 【0 4 4 4】

各群において、3匹の担癌マウスに投与した（n=3）。マウスを注射後の試験8日目に殺し、そして、全RNAを、実施例4に説明した手順に従って、腎腫瘍から単離した。次に、相対ヒトHIF2 mRNA発現を、ヒトCyclophilin A（PPIA）発現に対して正規化した、プローブベースの定量的PCR（RT-qPCR）によって定量し、そして、実施例4で説明したように、溶媒対照群（等張グルコース）の分数として表現した（幾何平均、+/- 95%の信頼区間）。

## 【0 4 4 5】

## 【表 1 5】

表13. 実施例10の屠殺時の平均相対huHif2 $\alpha$  mRNA発現

| 群 ID                                                            | 平均相対 huHIF 2 $\alpha$ mRNA 発現 | 低値<br>(誤差) | 高値<br>(誤差) |
|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------|------------|------------|
| 群 1 (等張グルコース)                                                   | 1.000                         | 0.087      | 0.095      |
| 群 2 (7.5mg/kg の RNAi 剤 - 構造 2a の三座のインテグリン標的化リガンド、40kDa の PEG)   | 0.351                         | 0.080      | 0.104      |
| 群 3 (7.5mg/kg の RNAi 剤 - 構造 2.6a の三座のインテグリン標的化リガンド、40kDa の PEG) | 0.441                         | 0.040      | 0.043      |

30

40

## 【0 4 4 6】

上記の表13に示したとおり、Hif2 RNAi剤 - インテグリン標的化リガンドコンジュゲートのそれぞれは、対照と比較して、マウスにおけるmRNA発現の低減を示した。例えば、群2（7.5mg/kgの、構造2aの三座のインテグリン標的化リガンドにコンジュゲートしたRNAi剤の用量を含む）は、Hif2 mRNAの約65%ノックダウン（0.351）を示した。

## 【0 4 4 7】

50



実施例11.  $\alpha$  3 KO A498腎臓癌を担持しているマウスにおける、HIF-2 を標的化するRNAi剤にコンジュゲートしたインテグリン標的化リガンドのインビボ投与

明細胞腎細胞癌 (ccRCC) A498腫瘍細胞は、 $\alpha$  3インテグリンと  $\alpha$  5インテグリンの両方を発現し、なおかつ、フローサイトメトリー分析によると  $\alpha$  3発現が  $\alpha$  5に比べて約4倍多く発現される。このモデルにおいて  $\alpha$  5の寄与を評価するために、 $\alpha$  3ノックアウト (KO) A498細胞を遺伝子編集技術によって合成した。インテグリン  $\alpha$  3のノックアウトをゲノム配列決定および  $\alpha$  3の免疫組織化学染色によって確認し、そしてそれは、染色が  $\alpha$  3 KO A498細胞において陰性であったことを示した。A498 WT ( $\alpha$  3と  $\alpha$  5の両方を有する) 細胞および  $\alpha$  3 KO A498細胞を有する腎臓癌担持マウスを、実施例4において先に記載したとおり調製した。

【0448】

試験1日目に、腎臓癌担持マウスに、尾静脈注射によって投与した。以下の表13に説明した各群において、3匹の担癌マウスに投与した ( $n=3$ )。マウスを注射後の試験8日目に 殺し、そして、全RNAを、実施例4に説明したとおり、腎腫瘍から単離した。次に、相対ヒトHIF2 mRNA発現を、ヒトCyclophilin A (PPIA) 発現に対して正規化した、プローブベースの定量的PCR (RT-qPCR) によって定量し、そして、実施例4で説明したように、溶媒対照群 (等張グルコース) の分数として表現した (幾何平均、 $\pm 95\%$  の信頼区間)。

【0449】

【表16】

表14. 実施例11の屠殺時の平均相対huHif2 $\alpha$  mRNA発現

| 群 ID                                                                                | 腫瘍                           | 平均相対 huHIF2 $\alpha$ mRNA 発現 | 低 値 (誤差) | 高 値 (誤差) |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|------------------------------|----------|----------|
| 群 1 (等張グルコース)                                                                       | A498 WT                      | 1.000                        | 0.084    | 0.092    |
| 群 2 (7.5mg/kg の RNAi 剤 - 構造 2a の三座のインテグリン標的化リガンドと、さらにその構築物に連結された 40kDa の PEG 部分を含む) | A498 WT                      | 0.295                        | 0.040    | 0.046    |
| 群 3 (等張グルコース)                                                                       | A498 $\alpha$ v $\beta$ 3 KO | 1.000                        | 0.232    | 0.302    |
| 群 4 (7.5mg/kg の RNAi 剤 - 構造 2a の三座のインテグリン標的化リガンドと、さらにその構築物に連結された 40kDa の PEG 部分を含む) | A498 $\alpha$ v $\beta$ 3 KO | 0.621                        | 0.068    | 0.077    |

【0450】

上記の表14に示したとおり、Hif2 RNAi剤 - インテグリンリガンドコンジュゲートは、対照 (約71% (0.295) ノックダウン) を比較したA498 WT (野性型) 腫瘍において Hif2 mRNA発現の低減を示した。対照的に、予想したとおり、Hif2 mRNA発現の低減は、A498  $\alpha$  3 KO腫瘍においてそれほど効果的でなかった; しかしながら、低減は、それにもかかわらず、実質的に38% (0.621) ノックダウンであった。このことは、インテグリン  $\alpha$  3とインテグリン  $\alpha$  5の両方が、RNAi剤の送達に寄与することを示す。

【0451】

実施例12．腎臓癌を担持しているマウスにおける、HIF - 2 を標的化するRNAi剤にコンジュゲートしたインテグリン標的化リガンドのインビボ投与

センス鎖とアンチセンス鎖を含んだRNAi剤を、本明細書の実施例2に説明したとおり、当該技術分野で知られている、およびオリゴヌクレオチド合成に一般的に使用される一般手法に従って、固相上のホスホラミダイト技術により合成した。RNAi剤は、本明細書の実施例2に説明したそれぞれの修飾ヌクレオチド配列を有し、かつ、Hif2 (EPAS1) を標的化するように設計した。

【0452】

試験1日目に、以下の投与群に従って、腎臓癌担持マウス（実施例4を参照のこと）に、尾静脈注射によって投与した：

【0453】

【表17】

表15. 実施例12におけるマウスの投与群

| 群 | RNAi 剤と用量                                                                                                            | 投与レジメン   |
|---|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| 1 | 等張グルコース（d5w（水中の5%のブドウ糖））（RNAi 剤なし）                                                                                   | 1日目に単回投与 |
| 2 | 構造 2a の三座のインテグリン標的化リガンドにコンジュゲートし、さらに構築物に連結した C18－二酸部分を含む 7.5mg/kg の Hif2 $\alpha$ RNAi 剤（AD04546）が、等張グルコース中に処方した。    | 1日目に単回投与 |
| 6 | 等張グルコース中に処方した、構造 28a の三座のインテグリン標的化リガンドにコンジュゲートし、さらに構築物に連結した Mal－C18－二酸部分を含む 7.5mg/kg の Hif2 $\alpha$ RNAi 剤（AD04546） | 1日目に単回投与 |
| 7 | 等張グルコース中に処方した、構造 29a の三座のインテグリン標的化リガンドにコンジュゲートし、さらに構築物に連結した Mal－C18－二酸部分を含む 7.5mg/kg の Hif2 $\alpha$ RNAi 剤（AD04546） | 1日目に単回投与 |
| 8 | 等張グルコース中に処方した、構造 30a の三座のインテグリン標的化リガンドにコンジュゲートし、さらに構築物に連結した Mal－C18－二酸部分を含む 7.5mg/kg の Hif2 $\alpha$ RNAi 剤（AD04546） | 1日目に単回投与 |
| 9 | 等張グルコース中に処方した、構造 31a の三座のインテグリン標的化リガンドにコンジュゲートし、さらに構築物に連結した Mal－C18－二酸部分を含む 7.5mg/kg の Hif2 $\alpha$ RNAi 剤（AD04546） | 1日目に単回投与 |

【0454】

ヒトHif2 遺伝子を標的化するように向けられたヌクレオチド配列を有し、かつ、インテグリン標的化リガンドへのコンジュゲーションを容易にするためのセンス鎖の5'末端に

10

20

30

40

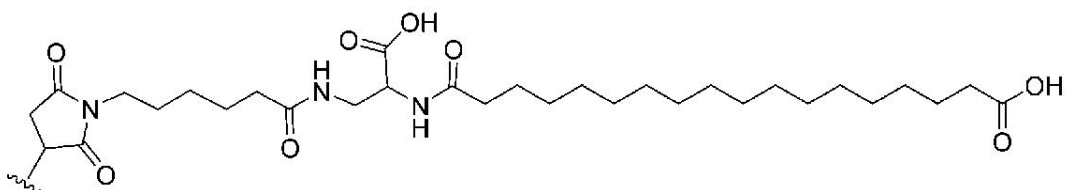
50

官能化アミン反応性基 ( $\text{NH}_2 - \text{C}_6$ ) を含む、RNAi 剤を合成した。

【 0 4 5 5 】

以下の構造：

【 化 2 3 9 】



10

{ 式中、以下の：

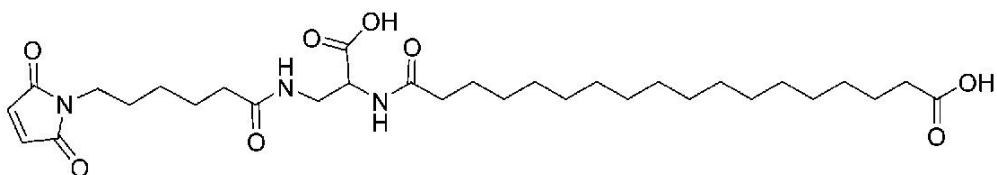
【 化 2 4 0 】



が、AD05971 ( 実施例2を参照のこと ) に示した  $\text{C}_6 - \text{S} -$  基でRNAi 剤への結合点を示す } を有する「Mal - C18 - 二酸部分」とも呼ばれるPDモジュレーターを有するRNAi 剤を合成した。表Aに示した  $\text{C}_6 - \text{SS} - \text{C}_6$  基 ( 次に、以下の化合物：

【 化 2 4 1 】

20



を有するマイケル付加を受ける ) を還元することによって、PDモジュレーターをセンス鎖の3' 末端にコンジュゲートさせた。

【 0 4 5 6 】

30

各群において、3匹の担癌マウスに投与した ( $n = 3$ )。マウスを注射後の試験8日目に殺し、そして、全RNAを、実施例4に説明した手順に従って、腎腫瘍から単離した。次に、相対ヒトHIF2 mRNA発現を、ヒトCyclophilin A ( PPIA ) 発現に対して正規化した、プローブベースの定量的PCR ( RT - qPCR ) によって定量し、そして、実施例4で説明したように、溶媒対照群 ( 等張グルコース ) の分数として表現した ( 幾何平均、 $\pm 95\%$  の信頼区間 ) 。

【 0 4 5 7 】

40

50

## 【表 18】

表16. 実施例12の屠殺時の平均相対huHif2 $\alpha$  mRNA発現

| 群 ID                                                                 | 平均相対 huHIF<br>2 $\alpha$ mRNA 発現 | 低値<br>(誤差) | 高値<br>(誤差) |
|----------------------------------------------------------------------|----------------------------------|------------|------------|
| 群 1 (等張グルコース)                                                        | 1.000                            | 0.077      | 0.083      |
| 群 2 (7.5mg/kg の RNAi 剤 - 構造 2a の<br>三座のインテグリン標的化リガンド、<br>Mal-C18-二酸) | 0.456                            | 0.113      | 0.150      |
| 群 6 (7.5mg/kg の RNAi 剤 - 構造 28a<br>の三座のインテグリン標的化リガンド、<br>Mal-C18-二酸) | 0.649                            | 0.072      | 0.081      |
| 群 7 (7.5mg/kg の RNAi 剤 - 構造 29a<br>の三座のインテグリン標的化リガンド、<br>Mal-C18-二酸) | 0.426                            | 0.054      | 0.062      |
| 群 8 (7.5mg/kg の RNAi 剤 - 構造 30a<br>の三座のインテグリン標的化リガンド、<br>Mal-C18-二酸) | 0.699                            | 0.064      | 0.070      |
| 群 9 (7.5mg/kg の RNAi 剤 - 構造 31a<br>の三座のインテグリン標的化リガンド、<br>Mal-C18-二酸) | 0.580                            | 0.069      | 0.079      |

## 【0458】

上記の表16に示したとおり、Hif2 RNAi剤 - インテグリン標的化リガンドコンジュゲートのそれぞれは、対照と比較してmRNA発現の低減を示した。

## 【0459】

実施例13. 腎臓癌を担持しているマウスにおける、HIF - 2 を標的化するRNAi剤にコンジュゲートしたインテグリン標的化リガンドのインピボ投与

センス鎖とアンチセンス鎖を含んだRNAi剤を、本明細書の実施例2に説明したとおり、当該技術分野で知られている、およびオリゴヌクレオチド合成に一般的に使用される一般手法に従って、固相上のホスホラミダイト技術により合成した。RNAi剤は、本明細書の実施例2に説明したそれぞれの修飾ヌクレオチド配列を有し、かつ、Hif2 (EPAS1) を標的化するように設計した。

## 【0460】

試験1日目に、以下の投与群に従って、腎臓癌担持マウス(実施例4を参照のこと)に、尾静脈注射によって投与した：

## 【0461】

10

20

30

40

50

## 【表 19 - 1】

表17. 実施例13におけるマウスの投与群

| 群 | RNAi 剤と用量                                                                                                                                                                                                                                                                                | 投与レジメン    |
|---|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 | 等張グルコース（d5w（水中の 5% のブドウ糖））（RNAi 剤なし）                                                                                                                                                                                                                                                     | 1 日目に単回投与 |
| 4 | 等張グルコース中に処方した、（アンチセンス鎖と塩基対を形成する第一のヌクレオチドからのヌクレオチド 2、4、6、および 8（3' →5'）のそれぞれの 2' 位にて内部連結した <sup>(i)</sup> 構造 2a のインテグリン標的化リガンドを有する）3 つの、構造 2a のインテグリン標的化リガンドを有する三座の標的化基に、そのセンス鎖の 5' 末端にて連結された、ならびに PD モジュレーター-MaI-C18-二酸に、センス鎖の 3' 末端にてさらに連結された 5.0mg/kg の HIF-2 $\alpha$ RNAi 剤 AD05971   | 1 日目に単回投与 |
| 5 | 等張グルコース中に処方した、（アンチセンス鎖と塩基対を形成する第一のヌクレオチドからのヌクレオチド 2、4、6、および 8（3' →5'）のそれぞれの 2' 位にて内部連結した <sup>(i)</sup> 構造 32a のインテグリン標的化リガンドを有する）3 つの、構造 32a のインテグリン標的化リガンドを有する三座の標的化基に、そのセンス鎖の 5' 末端にて連結された、ならびに PD モジュレーター-MaI-C18-二酸に、センス鎖の 3' 末端にてさらに連結された 5.0mg/kg の HIF-2 $\alpha$ RNAi 剤 AD05971 | 1 日目に単回投与 |
| 6 | 等張グルコース中に処方した、（アンチセンス鎖と塩基対を形成する第一のヌクレオチドからのヌクレオチド 2、4、6、および 8（3' →5'）のそれぞれの 2' 位にて内部連結した <sup>(i)</sup> 構造 33a のインテグリン標的化リガンドを有する）3 つの、構造 33a のインテグリン標的化リガンドを有する三座の標的化基に、そのセンス鎖の 5' 末端にて連結された、ならびに PD モジュレーター-MaI-C18-二酸に、センス鎖の 3' 末端にてさらに連結された 5.0mg/kg の HIF-2 $\alpha$ RNAi 剤 AD05971 | 1 日目に単回投与 |

10

20

30

40

50

【表 19 - 2】

|   |                                                                                                                                                                                                                                                                                         |           |
|---|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 7 | 等張グルコース中に処方した、（アンチセンス鎖と塩基対を形成する第一のヌクレオチドからのヌクレオチド 2、4、6、および 8（3' →5'）のそれぞれの 2' 位にて内部連結した <sup>(i)</sup> 構造 34a のインテグリン標的化リガンドを有する）3つの、構造 34a のインテグリン標的化リガンドを有する三座の標的化基に、そのセンス鎖の 5' 末端にて連結された、ならびに PD モジュレーター Ma1-C18-二酸に、センス鎖の 3' 末端にてさらに連結された 5.0mg/kg の HIF-2 $\alpha$ RNAi 剤 AD05971 | 1 日目に単回投与 |
|---|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|

10

<sup>(i)</sup> avb3標的化リガンドを、（修飾センス鎖配列で aAlk、gAlk、および uAlkによって表される）2'-O-プロパルギルヌクレオチドに連結し、そしてそれは、そのセンス鎖配列上の5' →3' で見たときに、そのセンス鎖上のヌクレオチド14、16、18、および20にて存在する。

【0462】

各群において、3匹の担癌マウスに投与した（n = 3）。マウスを注射後の試験8日目に殺し、そして、全RNAを、実施例4に説明した手順に従って、腎腫瘍から単離した。次に、相対ヒトHIF2 mRNA発現を、ヒトCyclophilin A（PPIA）発現に対して正規化した、プローブベースの定量的PCR（RT-qPCR）によって定量し、そして、実施例4で説明したように、溶媒対照群（等張グルコース）の分数として表現した（幾何平均、+/- 95%の信頼区間）。

20

【0463】

30

40

50

## 【表 20】

表18. 実施例13の屠殺時の平均相対huHif2 $\alpha$  mRNA発現

| 群 ID                                                                                          | 平均相対 huHif2 $\alpha$ mRNA 発現 | 低値(誤差) | 高値(誤差) |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|--------|--------|
| 群 1 (等張グルコース)                                                                                 | 1.000                        | 0.083  | 0.090  |
| 群 4 (5.0mg/kg の RNAi 剤 - 構造 2a の三座のインテグリン標的化リガンド、3 つの、構造 2a の内部リガンド、および C-18-二酸 PD モジュレーター)   | 0.245                        | 0.048  | 0.059  |
| 群 5 (5.0mg/kg の RNAi 剤 - 構造 32a の三座のインテグリン標的化リガンド、3 つの、構造 32a の内部リガンド、および C-18-二酸 PD モジュレーター) | 0.213                        | 0.065  | 0.094  |
| 群 6 (5.0mg/kg の RNAi 剤 - 構造 33a の三座のインテグリン標的化リガンド、3 つの、構造 33a の内部リガンド、および C-18-二酸)            | 0.603                        | 0.117  | 0.146  |
| 群 7 (5.0mg/kg の RNAi 剤 - 構造 34a の三座のインテグリン標的化リガンド、3 つの、構造 34a の内部リガンド、および C-18-二酸)            | 0.528                        | 0.067  | 0.077  |

## 【0464】

上記の表18に示したとおり、最大阻害活性を示す構造2aおよび構造32aのインテグリン標的化リガンドを含む構造を有する、Hif2 RNAi剤 - インテグリン標的化リガンドコンジュゲートのそれぞれは、対照と比較してマウスにおけるmRNA発現の低減を示した。

## 【0465】

実施例14. 腎臓癌を担持しているマウスにおける、HIF-2 を標的化するRNAi剤にコンジュゲートしたインテグリン標的化リガンドのインビボ投与

センス鎖とアンチセンス鎖を含んだRNAi剤を、本明細書の実施例2に説明したとおり、当該技術分野で知られている、およびオリゴヌクレオチド合成に一般的に使用される一般手法に従って、固相上のホスホラミダイト技術により合成した。RNAi剤は、本明細書の実施例2に説明したそれぞれの修飾ヌクレオチド配列を有し、かつ、Hif2 (EPAS1) を標的化するように設計した。

## 【0466】

試験1日目に、以下の投与群に従って、腎臓癌担持マウス(実施例4を参照のこと)に、尾静脈注射によって投与した：

## 【0467】

10

20

30

40

50

## 【表 2 1】

表19. 実施例14におけるマウスの投与群

| 群 | RNAi 剤と用量                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 投与レジメン    |
|---|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 | 等張グルコース（d5w（水中の 5% のブドウ糖））（RNAi 剤なし）                                                                                                                                                                                                                                                         | 1 日目に単回投与 |
| 2 | 等張グルコース中に処方した、（アンチセンス鎖と塩基対を形成する第一のヌクレオチドからのヌクレオチド 2、4、6、および 8（3' →5'）のそれぞれの 2' 位にて内部連結した <sup>(i)</sup> 構造 2.11a のインテグリン標的化リガンドを有する）3 つの、構造 2.11a のインテグリン標的化リガンドを有する三座の標的化基に、そのセンス鎖の 5' 末端にて連結された、ならびに PD モジュレーター-Mal-C18-二酸に、センス鎖の 3' 末端にてさらに連結された 2.0mg/kg の HIF-2 $\alpha$ RNAi 剤 AD05971 | 1 日目に単回投与 |
| 5 | 等張グルコース中に処方した、（アンチセンス鎖と塩基対を形成する第一のヌクレオチドからのヌクレオチド 2、4、6、および 8（3' →5'）のそれぞれの 2' 位にて内部連結した <sup>(i)</sup> 構造 3.6a のインテグリン標的化リガンドを有する）3 つの、構造 3.6a のインテグリン標的化リガンドを有する三座の標的化基に、そのセンス鎖の 5' 末端にて連結された、ならびに PD モジュレーター-Mal-C18-二酸に、センス鎖の 3' 末端にてさらに連結された 2.0mg/kg の HIF-2 $\alpha$ RNAi 剤 AD05971   | 1 日目に単回投与 |
| 6 | 等張グルコース中に処方した、アンチセンス鎖と塩基対を形成する第一のヌクレオチドからのヌクレオチド 2、4、6、および 8（3' →5'）のそれぞれの 2' 位にて内部連結した <sup>(i)</sup> SM37-a vb3 標的化リガンドを有する、インテグリン標的化リガンド SM37-avb3 の構造を有する三座の標的化基に、そのセンス鎖の 5' 末端にて連結された、ならびに PD モジュレーター-Mal-C18-二酸に、センス鎖の 3' 末端にてさらに連結された 2.0mg/kg の HIF-2 $\alpha$ RNAi 剤 AD05971        | 1 日目に単回投与 |

<sup>(i)</sup> avb3標的化リガンドを、（修飾センス鎖配列でaAlk、gAlk、およびuAlkによって表される）2'-O-プロパルギルヌクレオチドに連結し、そしてそれは、そのセンス鎖配列上の5' →3' で見たときに、そのセンス鎖上のヌクレオチド14、16、18、および20にて存在する。

## 【0 4 6 8】

各群において、3匹の担癌マウスに投与した（n = 3）。マウスを注射後の試験8日目に殺し、そして、全RNAを、実施例4に説明した手順に従って、腎腫瘍から単離した。次に、相対ヒトHIF2 mRNA発現を、ヒトCyclophilin A（PPIA）発現に対して正規化した、プローブベースの定量的PCR（RT - qPCR）によって定量し、そして、実施例4で説明したように、溶媒対照群（等張グルコース）の分数として表現した（幾何平均、+ / - 95%の信頼区間）。

## 【0 4 6 9】

10

20

30

40

50



## 【表 2 2】

表20. 実施例14の屠殺時の平均相対huHif2 $\alpha$  mRNA発現

| 群 ID                                                                                 | 平均相対 huHIF<br>2 $\alpha$ mRNA 発現 | 低値<br>(誤差) | 高値<br>(誤差) |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|------------|------------|
| 群 1 (等張グルコース)                                                                        | 1.000                            | 0.090      | 0.099      |
| 群 2 (2.0mg/kg の RNAi 剤－構造 2.11a の三座のインテグリン標的化リガンド、3 つの、構造 2.11a の内部リガンド、および C-18-二酸) | 0.362                            | 0.021      | 0.022      |
| 群 5 (2.0mg/kg の RNAi 剤－構造 36a の三座のインテグリン標的化リガンド、3 つの、構造 36a の内部リガンド、および C-18-二酸)     | 0.617                            | 0.028      | 0.029      |
| 群 6 (2.0mg/kg の RNAi 剤－構造 37a の三座のインテグリン標的化リガンド、3 つの、構造 37a の内部リガンド、および C-18-二酸)     | 0.375                            | 0.081      | 0.103      |

## 【0 4 7 0】

上記の表20に示したとおり、Hif2 RNAi剤 - インテグリン標的化リガンドコンジュゲートのそれぞれは、対照と比較してmRNA発現の低減を示した。

## 【0 4 7 1】

実施例15. 腎臓癌を担持しているマウスにおける、HIF - 2 を標的化するRNAi剤にコンジュゲートしたインテグリン標的化リガンドのインビボ投与

センス鎖とアンチセンス鎖を含んだRNAi剤を、本明細書の実施例2に説明したとおり、当該技術分野で知られている、およびオリゴヌクレオチド合成に一般的に使用される一般手法に従って、固相上のホスホラミダイト技術により合成した。RNAi剤は、本明細書の実施例2に説明したそれぞれの修飾ヌクレオチド配列を有し、かつ、Hif2 (EPAS1) を標的化するように設計した。

## 【0 4 7 2】

試験1日目に、以下の投与群に従って、腎臓癌担持マウス（実施例4を参照のこと）に、尾静脈注射によって投与した：

## 【0 4 7 3】

10

20

30

40

50

## 【表 2 3 - 1】

表21. 実施例15におけるマウスの投与群

| 群 | RNAi 剤と用量                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 投与レジメン    |
|---|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 | 等張グルコース（d5w（水中の 5%のブドウ糖））（RNAi 剤なし）                                                                                                                                                                                                                                                          | 1 日目に単回投与 |
| 2 | 等張グルコース中に処方した、（アンチセンス鎖と塩基対を形成する第一のヌクレオチドからのヌクレオチド 2、4、6、および 8（3' →5' ）のそれぞれの 2' 位にて内部連結した <sup>(i)</sup> 構造 2.11a のインテグリン標的化リガンドを有する）3 つの、構造 2.11a のインテグリン標的化リガンドを有する三座の標的化基に、そのセンス鎖の 5' 末端にて連結された、ならびに PD モジューター-Mal-G18-二酸に、センス鎖の 3' 末端にてさらに連結された 2.0mg/kg の HIF-2 $\alpha$ RNAi 剤 AD05971 | 1 日目に単回投与 |
| 3 | 等張グルコース中に処方した、（アンチセンス鎖と塩基対を形成する第一のヌクレオチドからのヌクレオチド 2、4、6、および 8（3' →5' ）のそれぞれの 2' 位にて内部連結した <sup>(i)</sup> 構造 2.11a のインテグリン標的化リガンドを有する）3 つの、構造 2.11a のインテグリン標的化リガンドを有する三座の標的化基に、そのセンス鎖の 5' 末端にて連結された、ならびに PD モジューター-Mal-G18-二酸に、センス鎖の 3' 末端にてさらに連結された 4.0mg/kg の HIF-2 $\alpha$ RNAi 剤 AD05971 | 1 日目に単回投与 |
| 6 | 等張グルコース中に処方した、（アンチセンス鎖と塩基対を形成する第一のヌクレオチドからのヌクレオチド 2、4、6、および 8（3' →5' ）のそれぞれの 2' 位にて内部連結した <sup>(i)</sup> 構造 38a のインテグリン標的化リガンドを有する）3 つの、構造 38a のインテグリン標的化リガンドを有する三座の標的化基に、そのセンス鎖の 5' 末端にて連結された、ならびに PD モジューター-Mal-G18-二酸に、センス鎖の 3' 末端にてさらに連結された 2.0mg/kg の HIF-2 $\alpha$ RNAi 剤 AD05971     | 1 日目に単回投与 |

10

20

30

40

50

【表 2 3 - 2】

|   |                                                                                                                                                                                                                                                                                         |           |
|---|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 7 | 等張グルコース中に処方した、（アンチセンス鎖と塩基対を形成する第一のヌクレオチドからのヌクレオチド 2、4、6、および 8（3' →5'）のそれぞれの 2' 位にて内部連結した <sup>(i)</sup> 構造 38a のインテグリン標的化リガンドを有する）3つの、構造 38a のインテグリン標的化リガンドを有する三座の標的化基に、そのセンス鎖の 5' 末端にて連結された、ならびに PD モジュレーター-MaI-C18-二酸に、センス鎖の 3' 末端にてさらに連結された 4.0mg/kg の HIF-2 $\alpha$ RNAi 剤 AD05971 | 1 日目に単回投与 |
| 8 | 等張グルコース中に処方した、（アンチセンス鎖と塩基対を形成する第一のヌクレオチドからのヌクレオチド 2、4、6、および 8（3' →5'）のそれぞれの 2' 位にて内部連結した <sup>(i)</sup> 構造 39a のインテグリン標的化リガンドを有する）3つの、構造 39a のインテグリン標的化リガンドを有する三座の標的化基に、そのセンス鎖の 5' 末端にて連結された、ならびに PD モジュレーター-MaI-C18-二酸に、センス鎖の 3' 末端にてさらに連結された 2.0mg/kg の HIF-2 $\alpha$ RNAi 剤 AD05971 | 1 日目に単回投与 |
| 9 | 等張グルコース中に処方した、（アンチセンス鎖と塩基対を形成する第一のヌクレオチドからのヌクレオチド 2、4、6、および 8（3' →5'）のそれぞれの 2' 位にて内部連結した <sup>(i)</sup> 構造 39a のインテグリン標的化リガンドを有する）3つの、構造 39a のインテグリン標的化リガンドを有する三座の標的化基に、そのセンス鎖の 5' 末端にて連結された、ならびに PD モジュレーター-MaI-C18-二酸に、センス鎖の 3' 末端にてさらに連結された 4.0mg/kg の HIF-2 $\alpha$ RNAi 剤 AD05971 | 1 日目に単回投与 |

10

20

30

40

50

【表 2 3 - 3】

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                         |           |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 10 | 等張グルコース中に処方した、（アンチセンス鎖と塩基対を形成する第一のヌクレオチドからのヌクレオチド 2、4、6、および 8（3' →5'）のそれぞれの 2' 位にて内部連結した <sup>(i)</sup> 構造 40a のインテグリン標的化リガンドを有する）3つの、構造 40a のインテグリン標的化リガンドを有する三座の標的化基に、そのセンス鎖の 5' 末端にて連結された、ならびに PD モジュレーター-Ma1-G18-二酸に、センス鎖の 3' 末端にてさらに連結された 2.0mg/kg の HIF-2 $\alpha$ RNAi 剤 AD05971 | 1 日目に単回投与 |
| 11 | 等張グルコース中に処方した、（アンチセンス鎖と塩基対を形成する第一のヌクレオチドからのヌクレオチド 2、4、6、および 8（3' →5'）のそれぞれの 2' 位にて内部連結した <sup>(i)</sup> 構造 40a のインテグリン標的化リガンドを有する）3つの、構造 40a のインテグリン標的化リガンドを有する三座の標的化基に、そのセンス鎖の 5' 末端にて連結された、ならびに PD モジュレーター-Ma1-G18-二酸に、センス鎖の 3' 末端にてさらに連結された 4.0mg/kg の HIF-2 $\alpha$ RNAi 剤 AD05971 | 1 日目に単回投与 |
| 12 | 等張グルコース中に処方した、（アンチセンス鎖と塩基対を形成する第一のヌクレオチドからのヌクレオチド 2、4、6、および 8（3' →5'）のそれぞれの 2' 位にて内部連結した <sup>(i)</sup> 構造 41a のインテグリン標的化リガンドを有する）3つの、構造 41a のインテグリン標的化リガンドを有する三座の標的化基に、そのセンス鎖の 5' 末端にて連結された、ならびに PD モジュレーター-Ma1-G18-二酸に、センス鎖の 3' 末端にてさらに連結された 2.0mg/kg の HIF-2 $\alpha$ RNAi 剤 AD05971 | 1 日目に単回投与 |

10

20

30

40

50

【表 2 3 - 4】

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                          |           |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 13 | 等張グルコース中に処方した、（アンチセンス鎖と塩基対を形成する第一のヌクレオチドからのヌクレオチド 2、4、6、および 8（3' →5'）のそれぞれの 2' 位にて内部連結した <sup>(i)</sup> 構造 41a のインテグリン標的化リガンドを有する）3 つの、構造 41a のインテグリン標的化リガンドを有する三座の標的化基に、そのセンス鎖の 5' 末端にて連結された、ならびに PD モジュレーター Ma1-C18-二酸に、センス鎖の 3' 末端にてさらに連結された 4.0mg/kg の HIF-2 $\alpha$ RNAi 剤 AD05971 | 1 日目に単回投与 |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|

10

<sup>(i)</sup> avb3 標的化リガンドを、（修飾センス鎖配列で aAlk、gAlk、および uAlk によって表される）2' -O-プロパルギルヌクレオチドに連結し、そしてそれは、そのセンス鎖配列上の 5' →3' で見たときに、そのセンス鎖上のヌクレオチド 14、16、18、および 20 にて存在する。

## 【0 4 7 4】

20

各群において、3 匹の担癌マウスに投与した（n = 3）。マウスを注射後の試験 8 日目に殺し、そして、全 RNA を、実施例 4 に説明した手順に従って、腎腫瘍から単離した。次に、相対ヒト HIF2 mRNA 発現を、ヒト Cyclophilin A（PPIA）発現に対して正規化した、プローブベースの定量的 PCR（RT-qPCR）によって定量し、そして、実施例 4 で説明したように、溶媒対照群（等張グルコース）の分数として表現した（幾何平均、+/- 9.5% の信頼区間）。

## 【0 4 7 5】

30

40

50

【表 2 4 - 1】

表22. 実施例15の屠殺時の平均相対huHif2 $\alpha$  mRNA発現

| 群 ID                                                                                 | 平均相対 huHIF<br>2 $\alpha$ mRNA 発現 | 低値<br>(誤差) | 高値<br>(誤差) |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|------------|------------|
| 群 1 (等張グルコース)                                                                        | 1.000                            | 0.247      | 0.327      |
| 群 2 (2.0mg/kg の RNAi 剤—構造 2.11a の三座のインテグリン標的化リガンド、3 つの、構造 2.11a の内部リガンド、および C-18-二酸) | 0.286                            | 0.037      | 0.043      |
| 群 3 (4.0mg/kg の RNAi 剤—構造 2.11a の三座のインテグリン標的化リガンド、3 つの、構造 2.11a の内部リガンド、および C-18-二酸) | 0.263                            | 0.035      | 0.040      |
| 群 6 (2.0mg/kg の RNAi 剤—構造 38a の三座のインテグリン標的化リガンド、3 つの、構造 38a の内部リガンド、および C-18-二酸)     | 0.655                            | 0.050      | 0.054      |
| 群 7 (4.0mg/kg の RNAi 剤—構造 38a の三座のインテグリン標的化リガンド、3 つの、構造 38a の内部リガンド、および C-18-二酸)     | 0.488                            | 0.042      | 0.046      |
| 群 8 (2.0mg/kg の RNAi 剤—構造 39a の三座のインテグリン標的化リガンド、3 つの、構造 39a の内部リガンド、および C-18-二酸)     | 0.609                            | 0.065      | 0.073      |
| 群 9 (4.0mg/kg の RNAi 剤—構造 39a の三座のインテグリン標的化リガンド、3 つの、構造 39a の内部リガンド、および C-18-二酸)     | 0.518                            | 0.050      | 0.055      |
| 群 10 (2.0mg/kg の RNAi 剤—構造 40a の三座のインテグリン標的化リガンド、3 つの、構造 40a の内部リガンド、および C-18-二酸)    | 0.805                            | 0.113      | 0.132      |
| 群 11 (4.0mg/kg の RNAi 剤—構造 40a の三座のインテグリン標的化リガンド、3 つの、構造 40a の内部リガンド、および C-18-二酸)    | 0.738                            | 0.091      | 0.104      |

10

20

30

40

50

【表 2 4 - 2】

| 群 ID                                                                                           | 平均相対 huHIF<br>2 $\alpha$ mRNA 発現 | 低値<br>(誤差) | 高値<br>(誤差) |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|------------|------------|
| 群 12 (2.0mg/kg の RNAi 剤 - 構造 41a<br>の三座のインテグリン標的化リガン<br>ド、3 つの、構造 41a の内部リガン<br>ド、および C-18-二酸) | 0.978                            | 0.082      | 0.090      |
| 群 13 (4.0mg/kg の RNAi 剤 - 構造 41a<br>の三座のインテグリン標的化リガン<br>ド、3 つの、構造 41a の内部リガン<br>ド、および C-18-二酸) | 0.779                            | 0.106      | 0.123      |

10

## 【0 4 7 6】

上記の表 20 に示したとおり、Hif2 RNAi 剤 - インテグリン標的化リガンドコンジュゲートのそれぞれは、対照と比較してマウスにおける mRNA 発現の低減を示した。

## 【0 4 7 7】

実施例 16 . 腎臓癌を担持しているマウスにおける、HIF - 2 を標的化する RNAi 剤にコンジュゲートしたインテグリン標的化リガンドのインビボ投与

20

センス鎖とアンチセンス鎖を含んだ RNAi 剤を、本明細書の実施例 2 に説明したとおり、当該技術分野で知られている、およびオリゴヌクレオチド合成に一般的に使用される一般手法に従って、固相上のホスホラミダイト技術により合成した。RNAi 剤は、本明細書の実施例 2 に説明したそれぞれの修飾ヌクレオチド配列を有し、かつ、Hif2 (EPAS1) を標的化するように設計した。

## 【0 4 7 8】

試験 1 日目に、以下の投与群に従って、腎臓癌担持マウス (実施例 4 を参照のこと) に、尾静脈注射によって投与した :

## 【0 4 7 9】

30

40

50

## 【表 2 5 - 1】

表23. 実施例16におけるマウスの投与群

| 群 | RNAi 剤と用量                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 投与レジメン    |
|---|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 | 生理的食塩水 (0.9%) (RNAi 剤なし)                                                                                                                                                                                                                                                                       | 1 日目に単回投与 |
| 2 | 等張グルコース中に処方した、(アンチセンス鎖と塩基対を形成する第一のヌクレオチドからのヌクレオチド 2、4、6、および 8 (3' →5') のそれぞれの 2' 位にて内部連結した <sup>(i)</sup> 構造 2.11a のインテグリン標的化リガンドを有する) 3つの、構造 2.11a のインテグリン標的化リガンドを有する三座の標的化基に、そのセンス鎖の 5' 末端にて連結された、ならびに PD モジューター Mal-G18-二酸に、センス鎖の 3' 末端にてさらに連結された 2.5mg/kg の HIF-2 $\alpha$ RNAi 剤 AD05971  | 1 日目に単回投与 |
| 3 | 等張グルコース中に処方した、(アンチセンス鎖と塩基対を形成する第一のヌクレオチドからのヌクレオチド 2、4、6、および 8 (3' →5') のそれぞれの 2' 位にて内部連結した <sup>(i)</sup> 構造 2.11a のインテグリン標的化リガンドを有する) 3つの、構造 2.11a のインテグリン標的化リガンドを有する三座の標的化基に、そのセンス鎖の 5' 末端にて連結された、ならびに PD モジューター Mal-G18-二酸に、センス鎖の 3' 末端にてさらに連結された 5.0mg/kg の HIF-2 $\alpha$ RNAi 剤 AD05971  | 1 日目に単回投与 |
| 4 | 等張グルコース中に処方した、(アンチセンス鎖と塩基対を形成する第一のヌクレオチドからのヌクレオチド 2、4、6、および 8 (3' →5') のそれぞれの 2' 位にて内部連結した <sup>(i)</sup> 構造 2.11a のインテグリン標的化リガンドを有する) 3つの、構造 2.11a のインテグリン標的化リガンドを有する三座の標的化基に、そのセンス鎖の 5' 末端にて連結された、ならびに PD モジューター Mal-G18-二酸に、センス鎖の 3' 末端にてさらに連結された 10.0mg/kg の HIF-2 $\alpha$ RNAi 剤 AD05971 | 1 日目に単回投与 |

10

20

30

40

50



【表 2 5 - 2】

|   |                                                                                                                                                                                                                                                                                               |           |
|---|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5 | 等張グルコース中に処方した、（アンチセンス鎖と塩基対を形成する第一のヌクレオチドからのヌクレオチド 2、4、6、および 8（3' →5'）のそれぞれの 2' 位にて内部連結した <sup>(i)</sup> 構造 2.11a のインテグリン標的化リガンドを有する）3 つの、構造 2.11a のインテグリン標的化リガンドを有する三座の標的化基に、そのセンス鎖の 5' 末端にて連結された、ならびに PD モジュレーター-Mal-C18-二酸に、センス鎖の 3' 末端にてさらに連結された 2.5mg/kg の HIF-2 $\alpha$ RNAi 剤 AD05971  | 1 日目に単回投与 |
| 6 | 等張グルコース中に処方した、（アンチセンス鎖と塩基対を形成する第一のヌクレオチドからのヌクレオチド 2、4、6、および 8（3' →5'）のそれぞれの 2' 位にて内部連結した <sup>(i)</sup> 構造 2.11a のインテグリン標的化リガンドを有する）3 つの、構造 2.11a のインテグリン標的化リガンドを有する三座の標的化基に、そのセンス鎖の 5' 末端にて連結された、ならびに PD モジュレーター-Mal-C18-二酸に、センス鎖の 3' 末端にてさらに連結された 5.0mg/kg の HIF-2 $\alpha$ RNAi 剤 AD05971  | 1 日目に単回投与 |
| 7 | 等張グルコース中に処方した、（アンチセンス鎖と塩基対を形成する第一のヌクレオチドからのヌクレオチド 2、4、6、および 8（3' →5'）のそれぞれの 2' 位にて内部連結した <sup>(i)</sup> 構造 2.11a のインテグリン標的化リガンドを有する）3 つの、構造 2.11a のインテグリン標的化リガンドを有する三座の標的化基に、そのセンス鎖の 5' 末端にて連結された、ならびに PD モジュレーター-Mal-C18-二酸に、センス鎖の 3' 末端にてさらに連結された 10.0mg/kg の HIF-2 $\alpha$ RNAi 剤 AD05971 | 1 日目に単回投与 |

10

20

30

40

50

【表 2 5 - 3】

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                         |           |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 8  | 等張グルコース中に処方した、（アンチセンス鎖と塩基対を形成する第一のヌクレオチドからのヌクレオチド 2、4、6、および 8（3' →5'）のそれぞれの 2' 位にて内部連結した <sup>(i)</sup> 構造 2a のインテグリン標的化リガンドを有する）3 つの、構造 2a のインテグリン標的化リガンドを有する三座の標的化基に、そのセンス鎖の 5' 末端にて連結された、ならびに PD モジュレーター Ma1-G18-二酸に、センス鎖の 3' 末端にてさらに連結された 2.5mg/kg の HIF-2 $\alpha$ RNAi 剤 AD05971  | 1 日目に単回投与 |
| 9  | 等張グルコース中に処方した、（アンチセンス鎖と塩基対を形成する第一のヌクレオチドからのヌクレオチド 2、4、6、および 8（3' →5'）のそれぞれの 2' 位にて内部連結した <sup>(i)</sup> 構造 2a のインテグリン標的化リガンドを有する）3 つの、構造 2a のインテグリン標的化リガンドを有する三座の標的化基に、そのセンス鎖の 5' 末端にて連結された、ならびに PD モジュレーター Ma1-G18-二酸に、センス鎖の 3' 末端にてさらに連結された 5.0mg/kg の HIF-2 $\alpha$ RNAi 剤 AD05971  | 1 日目に単回投与 |
| 10 | 等張グルコース中に処方した、（アンチセンス鎖と塩基対を形成する第一のヌクレオチドからのヌクレオチド 2、4、6、および 8（3' →5'）のそれぞれの 2' 位にて内部連結した <sup>(i)</sup> 構造 2a のインテグリン標的化リガンドを有する）3 つの、構造 2a のインテグリン標的化リガンドを有する三座の標的化基に、そのセンス鎖の 5' 末端にて連結された、ならびに PD モジュレーター Ma1-G18-二酸に、センス鎖の 3' 末端にてさらに連結された 10.0mg/kg の HIF-2 $\alpha$ RNAi 剤 AD05971 | 1 日目に単回投与 |

<sup>(i)</sup> avb3 標的化リガンドを、（修飾センス鎖配列で aAlk、gAlk、および uAlk によって表される）2' -O-プロパルギルヌクレオチドに連結し、そしてそれは、そのセンス鎖配列上の 5' →3' で見たときに、そのセンス鎖上のヌクレオチド 14、16、18、および 20 にて存在する。

## 【0 4 8 0】

1 匹のマウスが不完全な注射を受けたと判断されたので 3 匹のマウスしかいなかった群 4 を除いて、各群において、4 匹の担癌マウスに投与した（n = 4）。マウスを注射後の試験 8 日目に 殺し、そして、全 RNA を、実施例 4 に説明した手順に従って、腎腫瘍から単離した。次に、相対ヒト HIF2 mRNA 発現を、ヒト Cyclophilin A（PPIA）発現に対して正規化した、プローブベースの定量的 PCR（RT - qPCR）によって定量し、そして、実施例 4 で説明したように、溶媒対照群（等張グルコース）の分数として表現した（幾何平均、+ / - 95 % の信頼区間）。

## 【0 4 8 1】

10

20

30

40

50

## 【表 2 6 - 1】

表24. 実施例16の屠殺時の平均相対huHif2 $\alpha$  mRNA発現

| 群 ID                                                                                  | 平均相対 huHIF<br>2 $\alpha$ mRNA 発現 | 低値<br>(誤差) | 高値<br>(誤差) |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|------------|------------|
| 群 1 (等張グルコース)                                                                         | 1.000                            | 0.180      | 0.220      |
| 群 2 (2.5mg/kg の RNAi 剤－構造 2.11a の三座のインテグリン標的化リガンド、3 つの、構造 2.11a の内部リガンド、および C-18-二酸)  | 0.278                            | 0.068      | 0.091      |
| 群 3 (5.0mg/kg の RNAi 剤－構造 2.11a の三座のインテグリン標的化リガンド、3 つの、構造 2.11a の内部リガンド、および C-18-二酸)  | 0.229                            | 0.062      | 0.086      |
| 群 4 (10.0mg/kg の RNAi 剤－構造 2.11a の三座のインテグリン標的化リガンド、3 つの、構造 2.11a の内部リガンド、および C-18-二酸) | 0.202                            | 0.014      | 0.015      |
| 群 5 (2.5mg/kg の RNAi 剤－構造 2.11a の三座のインテグリン標的化リガンド、3 つの、構造 2.11a の内部リガンド、および C-18-二酸)  | 0.324                            | 0.035      | 0.040      |
| 群 6 (5.0mg/kg の RNAi 剤－構造 2.11a の三座のインテグリン標的化リガンド、3 つの、構造 2.11a の内部リガンド、および C-18-二酸)  | 0.308                            | 0.018      | 0.019      |
| 群 7 (10.0mg/kg の RNAi 剤－構造 2.11a の三座のインテグリン標的化リガンド、3 つの、構造 2.11a の内部リガンド、および C-18-二酸) | 0.197                            | 0.041      | 0.052      |
| 群 8 (2.5mg/kg の RNAi 剤－構造 2a の三座のインテグリン標的化リガンド、3 つの、構造 2a の内部リガンド、および C-18-二酸)        | 0.218                            | 0.048      | 0.062      |
| 群 9 (5.0mg/kg の RNAi 剤－構造 2a の三座のインテグリン標的化リガンド、3 つの、構造 2a の内部リガンド、および C-18-二酸)        | 0.160                            | 0.065      | 0.109      |

10

20

30

40

50

【表 2 6 - 2】

| 群 ID                                                                                   | 平均相対 huHIF<br>2 $\alpha$ mRNA 発現 | 低値<br>(誤差) | 高値<br>(誤差) |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|------------|------------|
| 群 10 (10.0mg/kg の RNAi 剤－構造 2a<br>の三座のインテグリン標的化リガンド、3つの、構造 2a の内部リガンド、<br>および C-18-二酸) | 0.276                            | 0.053      | 0.066      |

10

## 【0 4 8 2】

上記の表 24 に示したとおり、Hif2 RNAi 剤 - インテグリン標的化リガンドコンジュゲートのそれぞれは、対照と比較してマウスにおける mRNA 発現の低減を示した。

他の実施形態

## 【0 4 8 3】

本発明をその詳細な説明と併せて説明してきたが、前述の説明は例示を意図するものであり、添付の特許請求の範囲によって定義される発明の範囲を限定するものではないことを理解されたい。他の態様、利点、および改変は以下の特許請求の範囲内にある。

## 【配列表】

[0007704529000001.app](#)

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

F I

|         |        |           |         |        |         |
|---------|--------|-----------|---------|--------|---------|
| A 6 1 P | 35/00  | (2006.01) | A 6 1 P | 35/00  |         |
| A 6 1 P | 43/00  | (2006.01) | A 6 1 P | 43/00  | 1 0 5   |
| C 0 7 K | 14/00  | (2006.01) | C 0 7 K | 14/00  |         |
| C 0 7 K | 16/00  | (2006.01) | C 0 7 K | 16/00  |         |
| C 1 2 N | 15/113 | (2010.01) | C 1 2 N | 15/113 | Z Z N A |
| C 1 2 N | 15/115 | (2010.01) | C 1 2 N | 15/115 | Z       |

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

## 前置審査

弁理士 中村 和広

## (74)代理人 100114018

弁理士 南山 知広

## (72)発明者 チェン リー

アメリカ合衆国, ニュージャージー 0 7 0 9 0 , ウェストフィールド, ホウソーン ドライブ 6

## (72)発明者 ジェフリー カールソン

アメリカ合衆国, ウィスコンシン 5 3 7 1 9 , マディソン, サウス ローザ ロード 5 0 2 , ア  
ローヘッド ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド

## (72)発明者 アントニー ニコラス

アメリカ合衆国, ウィスコンシン 5 3 7 1 9 , マディソン, サウス ローザ ロード 5 0 2 , ア  
ローヘッド ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド

## (72)発明者 シアオカイ リー

アメリカ合衆国, ウィスコンシン 5 3 7 1 9 , マディソン, サウス ローザ ロード 5 0 2 , ア  
ローヘッド ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド

## (72)発明者 トンシュイ シュー

アメリカ合衆国, ウィスコンシン 5 3 7 1 9 , マディソン, サウス ローザ ロード 5 0 2 , ア  
ローヘッド ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド

## (72)発明者 マシュー ファウラーワッターズ

アメリカ合衆国, ウィスコンシン 5 3 7 1 9 , マディソン, サウス ローザ ロード 5 0 2 , ア  
ローヘッド ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド

審査官 新留 素子

## (56)参考文献

特表 2 0 1 1 - 5 1 9 3 4 8 ( J P , A )  
 特表 2 0 1 8 - 5 1 0 1 3 9 ( J P , A )  
 国際公開第 2 0 1 6 / 1 7 6 5 3 2 ( W O , A 1 )  
 特表 2 0 0 2 - 5 0 8 3 5 5 ( J P , A )  
 特表 2 0 1 5 - 5 0 6 9 4 6 ( J P , A )  
 特表 2 0 1 6 - 5 1 1 2 5 6 ( J P , A )  
 国際公開第 2 0 1 6 / 1 9 6 2 3 9 ( W O , A 1 )  
 J . Med. Chem. , 2003年 , Vol.46 , pp.4790-4798  
 ACS Med. Chem. Lett. , 2014年 , Vol.5 , pp.1207-1212

## (58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K  
 A 6 1 P  
 C 1 2 N 1 5 / 1 1 3  
 C 1 2 N 1 5 / 1 1 5  
 C 0 7 K 1 6 / 0 0  
 C 0 7 K 1 4 / 0 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 )