

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7384833号
(P7384833)

(45)発行日 令和5年11月21日(2023.11.21)

(24)登録日 令和5年11月13日(2023.11.13)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/113 (2010.01)

C 1 2 N 15/113

Z Z N A

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

請求項の数 22 (全282頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-564156(P2020-564156)

(86)(22)出願日 令和1年5月16日(2019.5.16)

(65)公表番号 特表2021-523720(P2021-523720
A)

(43)公表日 令和3年9月9日(2021.9.9)

(86)国際出願番号 PCT/US2019/032633

(87)国際公開番号 WO2019/222479

(87)国際公開日 令和1年11月21日(2019.11.21)

審査請求日 令和4年5月13日(2022.5.13)

(31)優先権主張番号 62/672,405

(32)優先日 平成30年5月16日(2018.5.16)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/719,291

(32)優先日 平成30年8月17日(2018.8.17)

最終頁に続く

(73)特許権者 511112478

アルニラム・ファーマシューティカルズ

・インコーポレーテッド

アメリカ合衆国・マサチューセッツ・0

2 1 4 2・ケンブリッジ・サード・スト

リート・3 0 0

(74)代理人 100108453

弁理士 村山 靖彦

(74)代理人 100110364

弁理士 実広 信哉

(74)代理人 100133400

弁理士 阿部 達彦

(72)発明者 松田 成夫

アメリカ合衆国・マサチューセッツ・0

2 1 4 2・ケンブリッジ・サード・スト

最終頁に続く

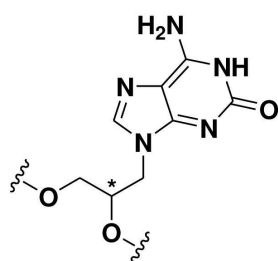
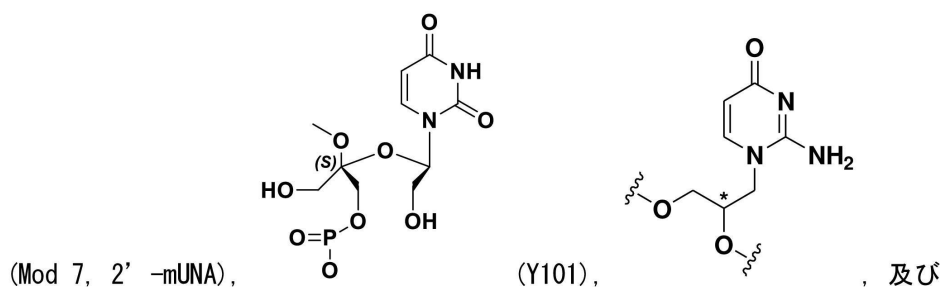
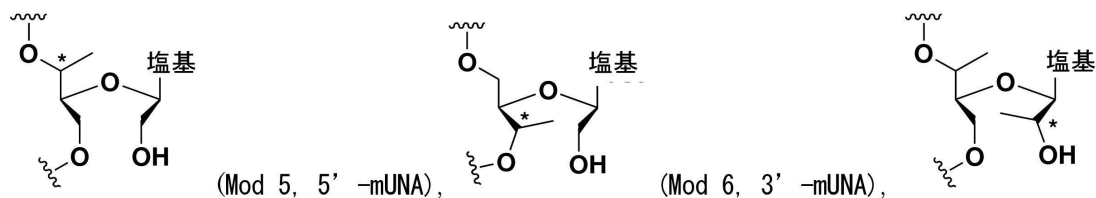
(54)【発明の名称】 オフターゲット効果が低下した修飾RNA剤

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

標的遺伝子の発現を阻害する能力がある二本鎖RNA (dsRNA) 分子であって、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40のヌクレオチドを有し、前記アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために前記標的配列に対して十分な相補性を有し、前記アンチセンス鎖は、前記アンチセンス鎖の5'末端から数えて最初の9つのヌクレオチド位置内に、二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、前記センス鎖は、ASGP Rリガンドを含み、前記不安定化修飾は、

【化 1】

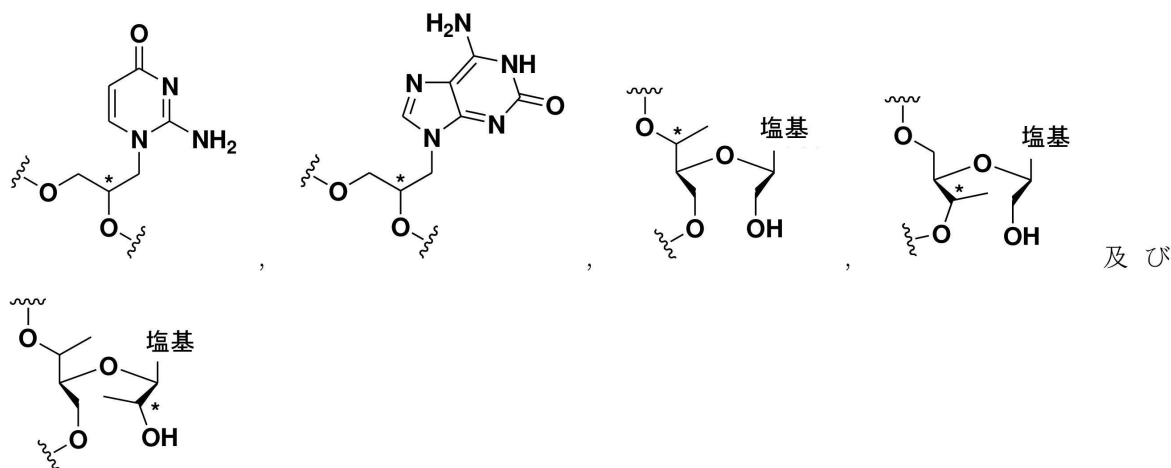


(式中、塩基は、核酸塩基であり、*は、R、S又はラセミのいずれかを表す)
からなる群から選択される、二本鎖RNA (dsRNA) 分子。

【請求項 2】

前記不安定化修飾は、

【化 2】



(式中、塩基は、核酸塩基であり、*は、R、S又はラセミのいずれかを表す)
からなる群から選択される、請求項 1 に記載の dsRNA 分子。

【請求項 3】

前記 1 つの熱不安定化修飾は、

10

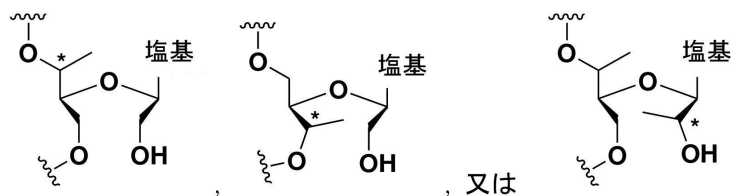
20

30

40

50

【化 3】



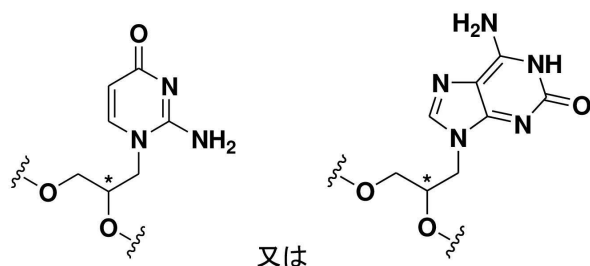
(式中、塩基は、核酸塩基であり、*は、R、S 又はラセミのいずれかを表す)
である、請求項 1 に記載の dsRNA 分子。

10

【請求項 4】

前記 1 つの熱不安定化修飾は、

【化 4】



20

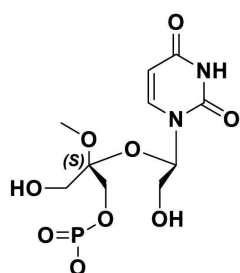
(式中、*は、R、S 又はラセミのいずれかを表し、任意選択で、*は、S - 立体化学を表す)

である、請求項 1 に記載の dsRNA 分子。

【請求項 5】

前記 1 つの熱不安定化修飾は、

【化 5】



30

である、請求項 1 に記載の dsRNA 分子。

【請求項 6】

少なくとも 4 つの 2' - フルオロを含む、請求項 1 に記載の dsRNA 分子。

【請求項 7】

以下の特徴：

a) 前記二本鎖の前記熱不安定化修飾は、前記アンチセンス鎖の前記 5' 領域の 4 ~ 8 位に位置すること；

b) 前記センス及びアンチセンス鎖の各々は、少なくとも 2 つの 2' - フルオロ修飾を含むこと；及び

c) 前記センス鎖のいずれかの末端に結合された ASGPR リガンドを有する、請求項 1 に記載の dsRNA 分子。

【請求項 8】

前記アンチセンス鎖は、以下の特徴：

a) 前記二本鎖修飾の前記熱不安定化修飾は、前記アンチセンス鎖の 4 ~ 8 位に位置す

50

ること；

b) 少なくとも2つの2'-フルオロ修飾；

c) (5'末端から数えて)ヌクレオチド1及び2位間のホスホロチオエートヌクレオチド間結合；

d) 前記アンチセンス鎖は、18～35ヌクレオチド長を有すること
の少なくとも2つを有する、請求項1に記載のdsRNA分子。

【請求項9】

前記センス鎖は、以下の特徴：

a) 前記センス鎖のいずれかの末端に結合された前記ASGPRリガンド；

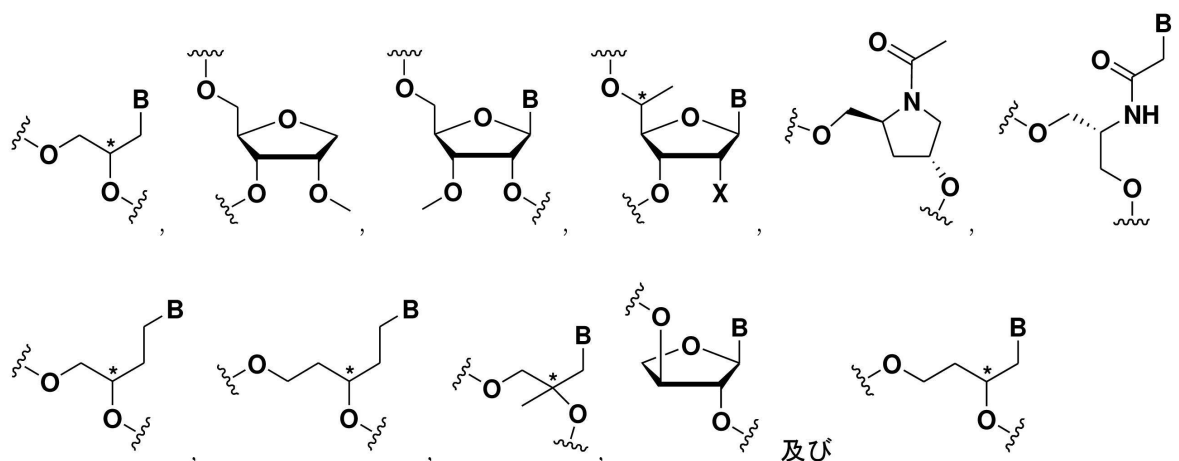
b) 少なくとも2つの2'-フルオロ修飾；

c) 前記センス鎖及び前記アンチセンス鎖は、少なくとも19のヌクレオチド位置にわたる二本鎖領域を形成するのに十分な相補性を示し、前記二本鎖の前記熱不安定化修飾は、前記二本鎖領域内に位置すること

の少なくとも1つを有する、請求項1に記載のdsRNA分子。

【請求項10】

【化6】



(式中、Bは、核酸塩基である)

からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む、請求項1に記載のdsRNA分子。

【請求項11】

前記熱不安定化修飾は、前記アンチセンス鎖の5'-末端から数えて、5、6又は7位に位置する、請求項1に記載のdsRNA分子。

【請求項12】

前記熱不安定化修飾は、前記アンチセンス鎖の7位に位置する、請求項1に記載のdsRNA分子。

【請求項13】

前記ASGPRリガンドは、二価又は三価分岐リンカーを通して結合された1つ以上のGalNAc誘導体である、請求項1に記載のdsRNA分子。

【請求項14】

前記ASGPRリガンドは、

10

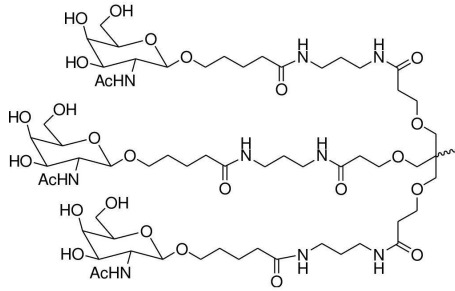
20

30

40

50

【化 7】



10

である、請求項 13 に記載の dsRNA 分子。

【請求項 15】

前記アンチセンス鎖の 3～9 ヌクレオチド位に 2' -フルオロ修飾が存在しない、請求項 1～14 のいずれか一項に記載の dsRNA。

【請求項 16】

前記センス鎖は、21 のヌクレオチドを有し、及び前記アンチセンス鎖は、23 のヌクレオチドを有する、請求項 1～15 のいずれか一項に記載の dsRNA 剤。

【請求項 17】

単独で又は薬学的に許容できる担体若しくは賦形剤と組み合わせて、請求項 1～16 のいずれか一項に記載の dsRNA 剤を含む医薬組成物。

20

【請求項 18】

請求項 1～16 のいずれか一項に記載の dsRNA 分子を含む、細胞における標的遺伝子をサイレンシングするための組成物。

【請求項 19】

皮下又は静脈内投与を通して投与される、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 20】

請求項 1～16 のいずれか一項に記載の dsRNA 分子を含む、dsRNA 分子のアンチセンス鎖によって引き起こされるオフターゲット効果を抑制するための組成物。

【請求項 21】

請求項 1～16 のいずれか一項に記載の dsRNA 剤を含む、対象において特異的標的にポリヌクレオチドを送達するための組成物。

30

【請求項 22】

筋肉内、気管支内、胸膜内、腹腔内、動脈内、リンパ、静脈内、皮下、脳脊髄又はそれらの組み合わせを含む投与手段によって投与される、請求項 21 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本願は、35 U. S. C. § 119 (e) の下で 2018 年 5 月 16 日に出願された米国仮特許出願第 62 / 672, 405 号明細書及び 2018 年 8 月 17 日に出願された米国仮特許出願第 62 / 719, 291 号明細書の利益を主張し、それらの両方の内容は、その全体が参照により本明細書中に援用される。

40

【0002】

本発明は、望まれないオフターゲット効果を低減することによる標的遺伝子発現の阻害にとって有利である特定のモチーフを有する RNAi 二本鎖剤及び治療用途に適した RNAi 組成物に関する。加えて、本発明は、例えば、様々な疾患の治療のために、これらの RNAi 二本鎖剤を投与することによって標的遺伝子の発現を阻害する方法を提供する。

【背景技術】

【0003】

RNA 干渉又は「RNAi」は、二本鎖 RNAi (dsRNA) が遺伝子発現を遮断し

50

得るという観察を記述するため、Fire及び同僚らによって最初に造られた用語である（非特許文献1；非特許文献2）。短いdsRNAは、脊椎動物を含む多くの生物において遺伝子特異的な転写後サイレンシングを誘導し、遺伝子機能を試験するための新しいツールを提供している。RNAiは、そのサイレンシングトリガーに相同なメッセンジャーRNAを破壊する配列特異的な多成分ヌクレアーゼのRNA誘導サイレンシング複合体（RISC）によって媒介される。RISCは、その二本鎖RNAトリガーに由来する短いRNA（約22ヌクレオチド）を有することが知られるが、この活性のタンパク質成分は、未知のままであった。

【0004】

siRNAのオフターゲット効果の1つがmiRNA様効果であり、ここで、RNA干渉におけるコアエフェクターであるアルゴノートタンパク質が、RNA干渉を誘導するために人工的に導入されるsiRNAをmiRNA（マイクロRNA）として処理する（非特許文献3）。miRNAは、遺伝子抑制のため、シード領域（5'末端から2～9位）と標的mRNAとの間の塩基対合を通して標的遺伝子の多くを認識する。siRNAによって引き起こされるオフターゲットは、siRNAのRISC負荷アンチセンス鎖のシード領域と1つ以上のmRNAとの塩基相補性に起因する。siRNAにおけるmiRNA様オフターゲット効果は、幾つかの試験において報告されており、シード領域の配列に応じて多数の遺伝子の発現に影響し、siRNAに基づく表現型スクリーニングにおいて最大30%の陽性ヒットの原因になるほど重大である。加えて、miRNAの場合、シード領域と標的との間の相互作用が弱くなるとき、それらの3'末端領域内での相補的対合（3'相補的対合）を通して標的遺伝子をサイレンシングすることも報告されており、それは、miRNA様オフターゲット効果がかかる機構によって媒介される可能性が高いことを意味する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【文献】Fire et al. (1998) Nature 391, 806-811

【文献】Elbashir et al. (2001) Genes Dev. 15, 188-200

【文献】Lam et al. (2015) Molecular Therapy Nucleic Acids (2015) 4, e252

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

したがって、siRNA遺伝子療法の遺伝子サイレンシングの有効性を損なうことなく、化学修飾の合理的な適用によってsiRNAの設計を調節することにより、siRNAのmiRNA様オフターゲット効果を除去又は低減するような努力が続けられている。本発明は、その効果を対象とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、オフターゲット遺伝子サイレンシング効果を低減しつつ、標的遺伝子発現の阻害にとって有利であるdsRNA分子にとって有効なヌクレオチド又は化学的モチーフ及び治療用途に適したRNAi組成物を提供する。

【0008】

本発明者らは、特に、dsRNA分子が、アンチセンス鎖がシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端から数えて5'末端の2～9位に）二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、及びdsRNA分子が約40℃～約80℃の範囲内の融解温度を有する場合、RNA干渉を媒介するのに、不安定化修飾を欠いている親dsRNA分子よりも有効であり得ることを発見している。一部の実施形態では、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されている修飾アンロック核酸（mUNA）及びグリコール核酸（

10

20

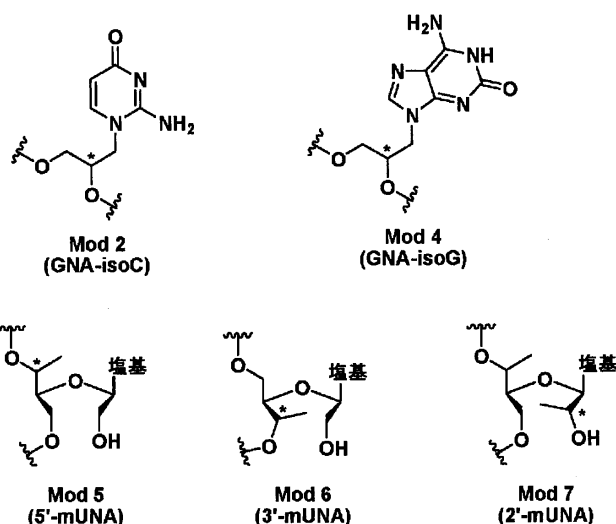
30

40

50

GNA) 構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA、2'-mUNA からなる群から選択され、その構造は、以下の通りである：

【化1】



(式中、塩基は、修飾又は非修飾核酸塩基であり、及び各構造上のアスタリスクは、R、S又はラセミのいずれかを表す)。

【0009】

本明細書に開示されている様々な態様の一部の実施形態では、不安定化修飾は、2'-5' RNA、すなわち Mod 8 である。一部の好ましい実施形態では、不安定化修飾が 2'-5' RNA である場合、不安定化修飾は、アンチセンス鎖の(5'末端から数えて)7位に存在する。

【0010】

本明細書に開示されている様々な態様の一部の実施形態では、5'-mUNAは、5'-(S)-Me-UNA(Y95)又は5'-(R)-Me-UNA(Y97)であり、その構造は、図32に示されている。本明細書に開示されている様々な態様の一部の実施形態では、2'-mUNAは、2'-(S)-Me-UNA(Y96)又は2'-(R)-Me-UNA(Y98)であり、その構造は、図32に示されている。本明細書に開示されている様々な態様の一部の実施形態では、3'-mUNAは、3'-(S)-Me-UNA(Y99)、3'-(R)-Me-UNA(Y100)又は3'-(R)-Me-4'-(S)-ヒドロキシメチル-UNA(Y102)であり、その構造は、図32に示されている。本明細書に開示される様々な態様の一部の実施形態では、4'-(β)-OMe-UNA(Y101)であり、その構造は、図32に示されている。

【0011】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyp-スパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA(ModA-ModK)からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含み、その構造は、以下の通りである：

10

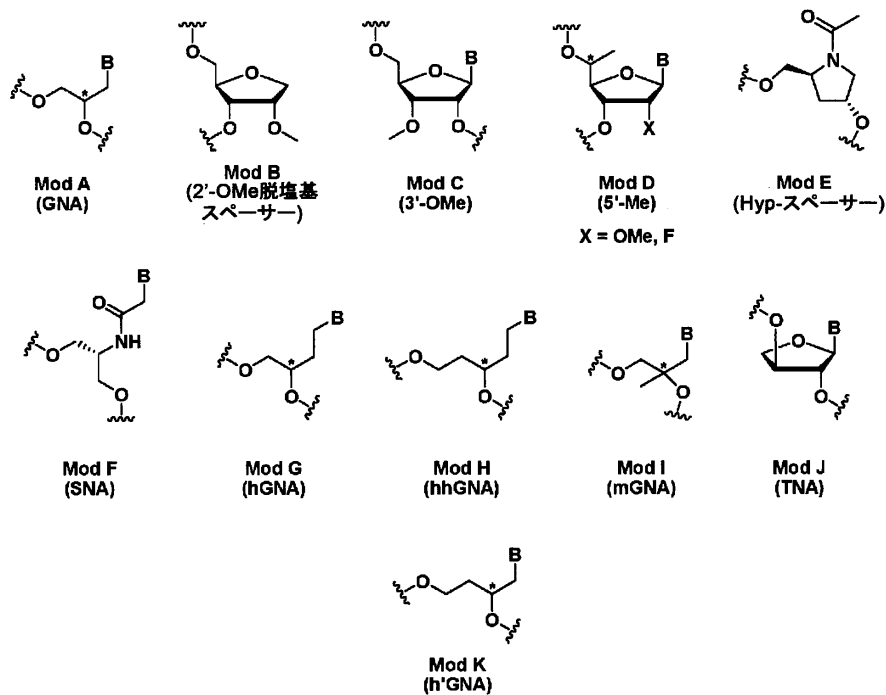
20

30

40

50

【化 2】

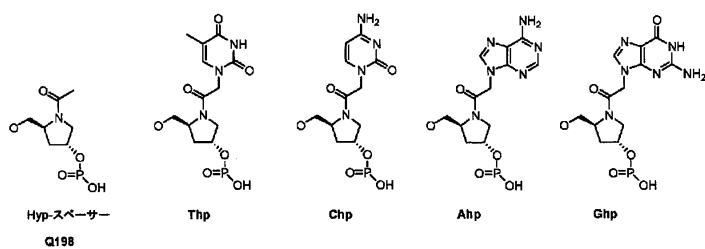


(式中、B は、修飾又は非修飾核酸塩基であり、及び各構造上のアスタリスクは、R、S 又はラセミのいずれかを表す)。

【0012】

例示的な Hyp-スペーサーヌクレオシドは、以下：

【化 3】

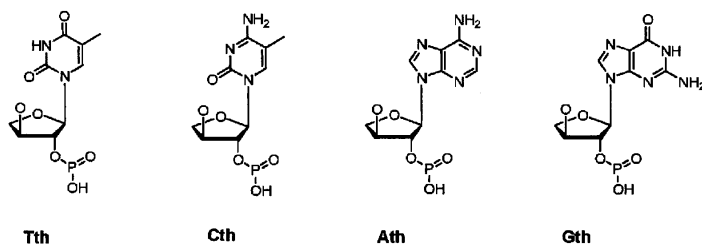


を含む。

【0013】

TNAヌクレオシドの例は、以下：

【化 4】



を含む。

【0014】

不安定化修飾のモノマー及びホスホラミダイトも本明細書に提供される。例えば、モノマー及びホスホラミダイトは、実施例 1～3 に記載されている修飾アンロック核酸 (mUNA) 及びグリコール核酸 (GNA) 構成要素から選択することができる。一部の実施形態では、モノマー又はそのホスホラミダイトは、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA 及び 2'-mUNA からなる群から選択される。本明細書に記載の mUNA 及び／又は GNA モノマーの 1 つ以上を含む核酸も本明細書に提供される。限定はされないが、本明細書に記載の mUNA 及び／又は GNA モノマーの 1 つ以上を含む核酸は、一本鎖、二本鎖、部分的二本鎖、ヘアピン又は環状核酸であり得る。

【0015】

したがって、一態様では、本発明は、標的遺伝子の発現を阻害する能力がある dsRNA 分子であって、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40 のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA 干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、アンチセンス鎖は、シード領域内部に (すなわちアンチセンス鎖の 5' 末端の、5' 末端から数えて 2～9 位に) 二本鎖の少なくとも 1 つの熱不安定化修飾を含み、及び dsRNA は、以下の特徴: (i) 約 40℃～約 80℃の融解温度 (T_m); (ii) アンチセンスは、2、3、4、5 又は 6 つの 2'-フルオロ修飾を含むこと; (iii) アンチセンスは、1、2、3 又は 4 つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと; (iv) センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること; (v) センス鎖は、2、3、4 又は 5 つの 2'-フルオロ修飾を含むこと; (vi) センス鎖は、1、2、3 又は 4 つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと; (vii) dsRNA は、少なくとも 4 つの 2'-フルオロ修飾を含むこと; (viii) dsRNA は、12～40 ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと; 及び (ix) アンチセンス鎖の 5' 末端での平滑末端の少なくとも 1 つ (例えば、1、2、3、4、5、6、7、8 又は 9 つ全部) をさらに有する、dsRNA 分子を提供する。一部の実施形態では、不安定化修飾は、本明細書の実施例 1～3 に記載されている mUNA 及び GNA 構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA 及び 2'-mUNA からなる群から選択される。

【0016】

一部の実施形態では、本発明は、標的遺伝子の発現を阻害する能力がある dsRNA 分子であって、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40 のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA 干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、アンチセンス鎖は、シード領域 (すなわちアンチセンス鎖の 5' 末端の、5' 末端から数えて 2～9 位、好ましくは 3～8 位) 内部に二本鎖の少なくとも 1 つの熱不安定化修飾を含み、及び dsRNA 分子は、以下の特徴: (i) 約 40℃～約 80℃の融解温度 (T_m); (ii) アンチセンスは、6、7、8、9、10、11 又は 12 の 2'-OMe 修飾を含むこと; (iii) アンチセンスは、1、2、3 又は 4 つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと; (iv) センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること; (v) センス鎖は、6、7、8、9、10、11 又は 12 の 2'-OMe 修飾を含むこと; (vi) センス鎖は、1、2、3 又は 4 つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと; (vii) dsRNA は、少なくとも 1、2、3、4 又は 5 つの 2'-デオキシ修飾を含むこと; (viii) dsRNA は、12～40 ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと; 及び (ix) アンチセンス鎖の 5' 末端の平滑末端の少なくとも 1 つ (例えば、1、2、3、4、5、6、7、8 又は 9 つ全部) をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例 1～3 に記載されている mUNA 及び GNA 構成要素から選択される、dsRNA 分子を提供する。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA 及び 2'-mUNA からなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA 分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersperaser、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA 及び h'GNA (ModA-ModK) からなる群

から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0017】

一部の実施形態では、dsRNAは、約40℃、45℃、50℃、55℃、60℃又は65℃からの範囲の下端及び約70℃、75℃又は80℃からの範囲の上端の融解温度を有する。一部の実施形態では、dsRNAは、約55℃～約70℃の範囲内の融解温度を有する。一部の実施形態では、dsRNAは、約57℃～約67℃の範囲内の融解温度を有する。一部の特定の実施形態では、dsRNAは、約60℃～約67℃の範囲内の融解温度を有する。一部のさらなる実施形態では、dsRNAは、約62℃～約66℃の範囲内の融解温度を有する。

【0018】

本発明者らは、少なくとも60℃の融解温度を有するdsRNA分子がインビボ及びインビトロでより有効であることも発見している。したがって、一部の実施形態では、dsRNAは、少なくとも60℃の融解温度を有する。

【0019】

本発明者らは、dsRNA分子がインビボでより有効であるには、投与後、例えばマウス肝臓において、インビボで7日目、アンチセンス鎖が少なくとも40～50%存在する必要があることも発見した。

【0020】

別の態様では、本発明は、本発明のdsRNA分子を、皮下又は静脈内投与によって対象における特異標的に送達するための方法をさらに提供する。本発明は、前記薬剤を皮下又は静脈内投与によって対象における特異標的に送達するための方法における使用を意図した本発明のdsRNA分子をさらに提供する。

【0021】

本特許又は出願ファイルは、色付きで作成された少なくとも1つの図面を有する。カラー図面付きの特許又は特許出願公開のコピーは、請求及び必要料金の支払いに応じて特許庁により提供される。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】本発明の一部の例示的な不安定化修飾を示す。

【図2】本発明の他の例示的な不安定化修飾を示す。

【図3】アンチセンス鎖のシード領域へのGNA-i s o Cの組み込みがHAO1配列においてGNA-Cよりも高い耐容性を有することを示す棒グラフである。

【図4】アンチセンスシード領域への3'-RNAの組み込みがデュアルルシフェラーゼアッセイにおけるオフターゲットの位置特異的減少をもたらすことを示すグラフである。

【図5】アンチセンスシード領域への3'-RNAの組み込みがインビボで十分な耐容性を有することを示す棒グラフである（HAO1配列）。

【図6】アンチセンスシード領域へのMod 5～7つの組み込みがインビボで十分な耐容性を有することを示すグラフである（TTR配列1）。

【図7】アンチセンスシード領域へのMod 5～7つの組み込みがインビボで十分な耐容性を有することを示すグラフである（TTR配列2）。

【図8】非環状／非天然ヌクレオシドアミダイトを有する例示的なsiRNAの概略図である。

【図9】天然に存在する塩基修飾ヌクレオシドを有する例示的なsiRNAの概略図である。

【図10】例示的な銅を含まない「クリック」ケミストリー結合されたBis-RNA i構築物を示すスキームである。

【図11】「クリック」リンカーによるF7ノックダウンを示すグラフである。

【図12】「クリック」リンカーによるTTRノックダウンを示すグラフである。

【図13】トレオース核酸（TNA）及びリボース核酸（RNA）の構造を示す。

【図14】3'-エキソヌクレアーゼに対するTNA修飾オリゴヌクレオチドの安定性を示

10

20

30

40

50

すグラフである。

【図15】5'-エキソヌクレアーゼに対するTNA修飾オリゴヌクレオチドの安定性を示すグラフである。

【図16】インビトロのs iRNA活性に対する単一のTNAヌクレオチドの組み込みの影響を示すグラフである。

【図17】インビトロのs iRNA活性に対する単一のTNA塩基対の組み込みの影響を示すグラフである。

【図18】インビトロ遺伝子サイレンシングアッセイの用量反応曲線を示すグラフである。

【図19-20】血清TTRレベルでTNA修飾s iRNA二本鎖を使用したマウスにおけるインビボの遺伝子サイレンシングの効果を示すグラフである。

【図21】ヒトアルゴノート2タンパク質(hAg o 2)に結合したTNAの構造モデルを示す。

【図22】様々な5'-(R)及び(S)-メチルグアノシン構成要素の構造を示す。

【図23】オリゴヌクレオチド内の5'-C-メチル-ヌクレオシドの構造を示す。

【図24A】PO又はPS結合を有する、グアノシン及び(R)又は(S)-5'-C-メチルグアノシン(C5'-MeG)で5'末端が修飾されたdT20の、5'エキソヌクレアーゼ-ホスホジエステラーゼIIとのインキュベーション時の時間の関数としての減衰曲線である。

【図24B】PO又はPS結合を有する、グアノシン及び(R)又は(S)-5'-C-メチルグアノシン(C5'-MeG)で5'末端が修飾されたdT20の、5'エキソヌクレアーゼ-ホスホジエステラーゼIIとのインキュベーション時の時間の関数としての減衰曲線である。

【図25A】グアノシン及び(R)又は(S)-5'-C-メチルグアノシン(C5'-MeG)で3'末端が修飾されたdT20の、ヘビ毒ホスホジエステラーゼとのインキュベーション時の時間の関数としての減衰曲線を示す。

【図25B】グアノシン及び(R)又は(S)-5'-C-メチルグアノシン(C5'-MeG)で3'末端が修飾されたdT20の、ヘビ毒ホスホジエステラーゼとのインキュベーション時の時間の関数としての減衰曲線を示す。

【図26】2つの5'-(R)-C-Me-2'-F-U又は5'-(S)-C-Me-2'-F-Uヌクレオチドで3'末端が修飾されたdT₁₈の相対エキソヌクレアーゼ安定性を示すプロットである。

【図27】一部の(S)-及び(R)-MTPAエステルの立体構造を示す。

【図28】他の一部の(S)-及び(R)-MTPAエステルの分析に使用される立体構造を示す。

【図29】DNA Pol-γ及びPol-RMTプロトコルを概略的に示す。

【図30A】Pol-RMTによる組み込みアッセイの結果を示す。

【図30B】図30A参照。

【図31A】Pol-γによる組み込みアッセイの結果を示す。

【図31B】図31A参照。

【図32】mUNAモノマーの構造を示す。

【図33】TNAモノマーの構造を示す。

【図34】3'特異的エキソヌクレアーゼ(SVPD)に対するmUNAオリゴ安定性のプロットを示す。

【図35】5'特異的エキソヌクレアーゼ(ホスホジエステラーゼII)に対するmUNAオリゴ安定性のプロットを示す。

【図36】5'-エキソヌクレアーゼ(ホスホジエステラーゼII)分解に対するTNA-Tの安定性の折れ線グラフを示す。

【図37】Hypモノマーの構造を示す。

【図38】100nMでソートされたTTRDW1105フリー取り込みのプロットを示す。

10

20

30

40

50

【図39】Hypベースのヌクレオシドによるインビボの遺伝子サイレンシングを示す折れ線グラフである。

【図40】Hypベースのヌクレオシドによるインビボの遺伝子サイレンシングを示す折れ線グラフである。

【図41】Hypベースのヌクレオシドによるインビボの遺伝子サイレンシングを示す折れ線グラフである。

【図42】(S)-isoGNAの組み込みが(S)-GNAよりも有意に熱不安定性が小さいことを示す確率プロットである。

【図43】(S)-isoGNAの組み込みが一般に(S)-GNAよりもインビボ活性を改善することを示す折れ線グラフである。

【図44】アンチセンスシード領域へのMod8(2'-5'-RNA)の組み込みが、ラット毒性研究における臨床病理学的測定値を改善したことを示す折れ線グラフである。

【発明を実施するための形態】

【0023】

本発明者らは、特に、RNA分子のオフターゲット効果がdsRNAのアンチセンス鎖における特定位置に熱不安定ヌクレオチドを取り込むことにより低減又は阻害され得ることを発見している。アンチセンス鎖における特定位置のこれらの熱不安定化修飾を用いることで、dsRNA分子は、オフターゲット遺伝子サイレンシングを低下させていながら、親dsRNAに類似する遺伝子サイレンシング活性を保持することができた。さらに、これらの熱不安定化修飾を含むdsRNA分子により、下方制御又は上方制御されるオフターゲット遺伝子の数も、親dsRNAと比べて減少する。

【0024】

そのようなことから、一態様では、本発明は、標的遺伝子の発現を阻害する能力がある二本鎖RNAi(dsRNA)剤を提供する。一般に、本発明のdsRNA分子は、オフターゲット遺伝子サイレンシング及び／又は毒性を低減又は最小化しつつ、高度なオンターゲット遺伝子サイレンシングを示す。限定はされないが、本発明のdsRNA分子は、そのdsRNA分子と置換され得、限定はされないが、インビトロ又はインビボ適用を含む、RNA干渉に基づく遺伝子サイレンシング技術において用いることができる。

【0025】

一般に、そのdsRNA分子は、センス鎖(パッセンジャー鎖とも称される)及びアンチセンス鎖(ガイド鎖とも称される)を含む。dsRNA分子の各鎖は、12~40ヌクレオチド長の範囲であり得る。例えば、各鎖は、14~40ヌクレオチド長、17~37ヌクレオチド長、25~37ヌクレオチド長、27~30ヌクレオチド長、17~23ヌクレオチド長、17~21ヌクレオチド長、17~19ヌクレオチド長、19~25ヌクレオチド長、19~23ヌクレオチド長、19~21ヌクレオチド長、21~25ヌクレオチド長又は21~23ヌクレオチド長であり得る。限定はされないが、センス及びアンチセンス鎖は、等しい長さ又は不等な長さであり得る。

【0026】

一部の実施形態では、アンチセンス鎖は、18~35ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、アンチセンス鎖は、21~25、19~25、19~21又は21~23ヌクレオチド長である。一部の特定の実施形態では、アンチセンス鎖は、23ヌクレオチド長である。アンチセンス鎖と同様、センス鎖は、一部の実施形態では、18~35ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、センス鎖は、21~25、19~25、19~21又は21~23ヌクレオチド長である。一部の特定の実施形態では、アンチセンス鎖は、21ヌクレオチド長である。

【0027】

本発明者らは、インビボでより有効であるべきdsRNA分子では、アンチセンス鎖が幾らかの代謝安定性を有するはずであることも発見した。換言すれば、インビボでより有効であるべきdsRNA分子では、幾らかの量のアンチセンス鎖が、投与後しばらく経過して、インビボで存在する必要がある場合がある。したがって、一部の実施形態では、d

10

20

30

40

50

sRNAのアンチセンス鎖の少なくとも40%、例えば少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%又は少なくとも80%が、インビボ投与後5日目、例えばマウス肝臓においてインビボで存在する。一部の実施形態では、dsRNAのアンチセンス鎖の少なくとも40%、例えば少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%又は少なくとも80%が、インビボ投与後6日目、例えばマウス肝臓においてインビボで存在する。一部の実施形態では、dsRNAのアンチセンス鎖の少なくとも40%、例えば少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%又は少なくとも80%が、インビボ投与後7日目、例えばマウス肝臓においてインビボで存在する。一部の実施形態では、dsRNAのアンチセンス鎖の少なくとも40%、例えば少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%又は少なくとも80%が、インビボ投与後8日目、例えばマウス肝臓においてインビボで存在する。一部の実施形態では、dsRNAのアンチセンス鎖の少なくとも40%、例えば少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%又は少なくとも80%が、インビボ投与後9日目、例えばマウス肝臓においてインビボで存在する。一部の実施形態では、dsRNAのアンチセンス鎖の少なくとも40%、例えば少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%又は少なくとも80%が、インビボ投与後10日目、例えばマウス肝臓においてインビボで存在する。一部の実施形態では、dsRNAのアンチセンス鎖の少なくとも40%、例えば少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%又は少なくとも80%が、インビボ投与後11日目、例えばマウス肝臓においてインビボで存在する。一部の実施形態では、dsRNAのアンチセンス鎖の少なくとも40%、例えば少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%又は少なくとも80%が、インビボ投与後12日目、例えばマウス肝臓においてインビボで存在する。一部の実施形態では、dsRNAのアンチセンス鎖の少なくとも40%、例えば少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%又は少なくとも80%が、インビボ投与後13日目、例えばマウス肝臓においてインビボで存在する。一部の実施形態では、dsRNAのアンチセンス鎖の少なくとも40%、例えば少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%又は少なくとも80%が、インビボ投与後14日目、例えばマウス肝臓においてインビボで存在する。一部の実施形態では、dsRNAのアンチセンス鎖の少なくとも40%、例えば少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%又は少なくとも80%が、インビボ投与後15日目、例えばマウス肝臓においてインビボで存在する。

【0028】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14~40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、アンチセンス鎖は、シード領域内部に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の、5'末端から数えて2~9位に）二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、dsRNAは、約40℃~約80℃の融解温度（ T_m ）を有し、及びdsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：（i）アンチセンスは、2、3、4、5又は6つの2'-フルオロ修飾を含むこと；（ii）アンチセンスは、1、2、3又は4つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；（iii）センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること；（iv）センス鎖は、2、3、4又は5つの2'-フ

10

20

30

40

50

ルオ口修飾を含むこと；(v) センス鎖は、1、2、3又は4つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(v i) d s RNAは、少なくとも4つの2'-フルオ口修飾を含むこと；(v i i) d s RNAは、12～40ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；及び(v i i i) アンチセンス鎖の5'末端の平滑末端の少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6、7又は8つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-i s o C、GNA-i s o G、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、d s RNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy p-スパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃～約80℃のT_mは、任意選択的である。

10

【0029】

一部の実施形態では、d s RNA分子は、12～40ヌクレオチド対長の二本鎖領域を有し、ここで、アンチセンス鎖は、シード領域（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の、5'末端から数えて2～9位）内部に二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、d s RNAは、約40℃～約80℃のT_mを有し、及びd s RNAは、任意選択的に、以下の特徴：(i) アンチセンスは、2、3、4、5又は6つの2'-フルオ口修飾を含むこと；(i i) アンチセンスは、1、2、3又は4つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(i i i) センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること；(i v) センス鎖は、2、3、4又は5つの2'-フルオ口修飾を含むこと；(v) センス鎖は、1、2、3又は4つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(v i) d s RNAは、少なくとも4つの2'-フルオ口修飾を含むこと；v i i) アンチセンス鎖の5'末端の平滑末端の少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6又は7つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-i s o C、GNA-i s o G、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、d s RNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy p-スパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃～約80℃のT_mは、任意選択的である。

20

30

【0030】

一部の実施形態では、d s RNA分子は、19、20、21、22又は23ヌクレオチド塩基対長の二本鎖領域を有し、ここで、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）位置する二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を有し、及びd s RNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-i s o C、GNA-i s o G、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、d s RNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy p-スパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃～約80℃のT_mは、任意選択的である。

40

【0031】

一部の実施形態では、d s RNA分子は、19、20、21、22又は23ヌクレオチド塩基対長の二本鎖領域を有し、ここで、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）位置する二本鎖の少なくとも1

50

つの熱不安定化修飾を有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-i so C、GNA-i so G、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy pースペーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含み、dsRNAは、約40℃～約80℃ (例えば、40℃、50℃、60℃、70℃又は80℃) の融解温度を有する。一部の実施形態では、約40℃～約80℃のT_mは、任意選択的である。

【0032】

一部の特定の実施形態では、二本鎖の熱不安定化修飾は、アンチセンス鎖の5'末端から数えて5、6、7又は8位に存在し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-i so C、GNA-i so G、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy pースペーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0033】

一部の特定の実施形態では、二本鎖の熱不安定化修飾は、アンチセンス鎖の5'末端から数えて5位に存在し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-i so C、GNA-i so G、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy pースペーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0034】

一部の特定の実施形態では、二本鎖の熱不安定化修飾は、アンチセンス鎖の5'末端から数えて6位に存在し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-i so C、GNA-i so G、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy pースペーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0035】

一部の特定の実施形態では、二本鎖の熱不安定化修飾は、アンチセンス鎖の5'末端から数えて7位に存在し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-i so C、GNA-i so G、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy pースペーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0036】

一部の特定の実施形態では、二本鎖の熱不安定化修飾は、アンチセンス鎖の5'末端から数えて8位に存在し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-i so C、GNA-i so G、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及

10

20

30

40

50

び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0037】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、アンチセンス鎖は、シード領域（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の、5'末端から数えて2～9位）内部に二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し、及びアンチセンス鎖は、以下の特徴：

(i) 2、3、4、5又は6つの2'-フルオロ修飾；及び

(ii) 1、2、3又は4つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合
の一方又は両方をさらに含み；且つセンス鎖は、以下の特徴：

(i) センス鎖とコンジュゲートされるリガンド；

(ii) 2、3、4又は5つの2'-フルオロ修飾；及び

(iii) 1、2、3又は4つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合
の1つ、2つ又は3つを含み、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。この一部の実施形態では、約40℃～約80℃のT_mは、任意選択的である。

【0038】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、アンチセンス鎖は、5'末端から数えて最初の9つのヌクレオチド位置内に二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、及びリガンドは、センス鎖とコンジュゲートされ、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0039】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40ヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、アンチセンス鎖は、5'末端から数えて最初の9つのヌクレオチド位置内に二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、リガンドは、センス鎖とコンジュゲートされ、dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含み、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選

択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃～約80℃の T_m は、任意選択的である。

【0040】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、及びdsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ口を含み、ここで、前記アンチセンス鎖は、5'末端から数えて最初の9つのヌクレオチド位置内に二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、前記センス鎖は、リガンドを含み、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。この一部のさらなる実施形態では、リガンドは、ASGPRリガンドである。一部の実施形態では、約40℃～約80℃の T_m は、任意選択的である。

【0041】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、前記アンチセンス鎖は、5'末端から数えて4～8位に位置する二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、前記センス鎖は、リガンドを含み、センス及びアンチセンス鎖の各々は、少なくとも2つの2'-フルオロ口修飾を含み、ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。この一部のさらなる実施形態では、リガンドは、ASGPRリガンドである。一部の実施形態では、約40℃～約80℃の T_m は、任意選択的である。

【0042】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、ここで、dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ口を含み、ここで、前記アンチセンス鎖は、5'末端から数えて最初の9つのヌクレオチド位置内に二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、前記センス鎖は、リガンドを含み、ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し、及びアンチセンスは、以下の特徴：(i) 二本鎖の熱不安定化修飾は、アンチセンス鎖の4～8位に位置すること；(ii) 少なくとも2つの2'-フルオロ口修飾；(iii) ヌクレオチドの(5'末端から数えて)1及び2位間のホスホロチオエートヌクレオチド間結合；アンチセンス鎖は、18～35ヌクレオチド長を有することの少なくとも2つをさらに含み、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部のさらなる実施形態では、リガ

ドは、ASGPRリガンドである。一部の実施形態では、約40℃～約80℃の T_m は、任意選択的である。

【0043】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、ここで、dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ口を含み、ここで、前記アンチセンス鎖は、5'末端から数えて最初の9つのヌクレオチド位置内に二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、前記センス鎖は、リガンドを含み、ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し、センス鎖は、以下の特徴：(i) リガンドは、センス鎖の片末端に結合されること；(ii) センス鎖は、少なくとも2つの2'-フルオロ口修飾を含むこと；及び(iii) センス鎖及びアンチセンス鎖は、少なくとも19のヌクレオチド位置にわたる二本鎖領域を形成するための十分な相補性を示し、ここで、二本鎖の熱不安定化修飾は、前記二本鎖領域内に位置することの少なくとも1つを有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy p-スパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃～約80℃の T_m は、任意選択的である。

【0044】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、ここで、dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ口を含み、ここで、前記アンチセンス鎖は、5'末端から数えて最初の9つのヌクレオチド位置内に二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、前記センス鎖は、リガンドを含み、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し、二本鎖の熱不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy p-スパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃～約80℃の T_m は、任意選択的である。

【0045】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、前記アンチセンス鎖は、5'末端から数えて4～8位に位置する二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、前記センス鎖は、リガンドを含み、センス及びアンチセンス鎖の各々は、少なくとも2つの2'-フルオロ口修飾を含み、ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy p-スパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃～約80℃の T_m は、任意選択的である。

【0046】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、ここで、dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ口を含み、前記アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の5'末端から数えて7位に位置する二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、前記センス鎖は、リガンドを含み、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersperaser、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃～約80℃のT_mは、任意選択的である。

【0047】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、前記アンチセンス鎖は、5'末端から数えて7位に位置する二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、前記センス鎖は、リガンドを含み、センス及びアンチセンス鎖の各々は、少なくとも2つの2'-フルオロ口修飾を含み、ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersperaser、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃～約80℃のT_mは、任意選択的である。

【0048】

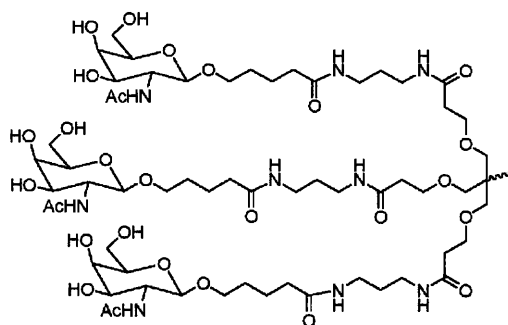
一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、ここで、dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ口を含み、前記アンチセンス鎖は、5'末端から数えて最初の9つのヌクレオチド位置内に二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、前記センス鎖は、リガンドを含み、ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し、ここで、リガンドは、二価又は三価分岐状リンカーを通して結合される1つ以上のGalNAc誘導体を含み、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersperaser、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃～約80℃のT_mは、任意選択的である。

【0049】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、ここで、dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ口を含み、前記アンチセンス鎖は、5'末端から数えて最初の9つのヌクレオ

チド位置内に二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、前記センス鎖は、リガンドを含み、ここで、dsRNAは、任意選択的に、約40℃～約80℃の融解温度を有し、ここで、リガンドは、構造：

【化5】



10

のASGPRリガンドであり、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃～約80℃のT_mは、任意選択的である。

20

【0050】

一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖は、独立して、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長であり；アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを含み、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し；ここで、センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされ、3又は4つの2'-フルオロ修飾を含み、且つ0、1、2又は3つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、アンチセンス鎖は、3、4、5又は6つの2'-フルオロ修飾を含み、且つ2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し；ここで、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：

30

(i) dsRNAは、12～25ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；(ii) dsRNAは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を含むこと；及び(iii) dsRNAは、アンチセンス鎖の3'末端に少なくとも2ヌクレオチドオーバーハングを有することの少なくとも1つ（例えば、1、2又は3つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃～約80℃のT_mは、任意選択的である。

40

【0051】

一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖は、独立して、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長であり；アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを含み、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し

50

；ここで、センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされ、（センス鎖の5'末端から数えて）7、10及び11位又は7、9、10及び11位に2'-フルオロ修飾を含み、任意選択的に、ヌクレオチドの1及び2位間並びにヌクレオチドの2及び3位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、アンチセンス鎖は、3、4、5又は6つの2'-フルオロ修飾を含み、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し；ここで、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：（i）dsRNAは、12～25ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；（ii）dsRNAは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を含むこと；及び（iii）dsRNAは、アンチセンス鎖の3'末端に少なくとも2ヌクレオチドオーバーハングを有することの少なくとも1つ（例えば、1、2又は3つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-i s o C、GNA-i s o G、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy p-スパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA（ModA-ModK）からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃～約80℃のT_mは、任意選択的である。

【0052】

一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖は、独立して、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長であり；アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを含み、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し；ここで、センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされ、3又は4つの2'-フルオロ修飾を含み、且つ0、1、2又は3つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、アンチセンス鎖は、2、6、8、9、14若しくは16位、又は2、6、14若しくは16位、又は2、14及び16位に2'-フルオロ修飾を含み；アンチセンスは、ヌクレオチドの21及び22位間並びにヌクレオチドの22及び23位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し；ここで、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：（i）dsRNAは、12～25ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；（ii）dsRNAは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を含むこと；及び（iii）dsRNAは、アンチセンス鎖の3'末端に少なくとも2ヌクレオチドオーバーハングを有することの少なくとも1つ（例えば、1、2又は3つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-i s o C、GNA-i s o G、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy p-スパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA（ModA-ModK）からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の

【0053】

一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖は、独立して、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長であり；アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを含み、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し；ここで、センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされ、3又は4つの2'-フルオロ修飾を含み、且つ0、1、2又は3つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、アンチセンス鎖は、2、6、8、9、14若しくは16位、又は2、6、14若しくは16位、又は2、14及び16位に2'-フルオロ修飾を含み；アンチセンスは、ヌクレ

オチドの21及び22位間、ヌクレオチドの22及び23位間、ヌクレオチドの1及び2位間、ヌクレオチドの2及び3位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し；ここで、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：(i) dsRNAは、12～25ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；(ii) dsRNAは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を含むこと；及び(iii) dsRNAは、アンチセンス鎖の3'末端に少なくとも2ヌクレオチドオーバーハングを有することの少なくとも1つ（例えば、1、2又は3つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphospacer、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃～約80℃のT_mは、任意選択的である。

【0054】

一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖は、独立して、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長であり；アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを含み、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し；ここで、センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされ、（センス鎖の5'末端から数えて）7、10及び11位又は7、9、10及び11位に2'-フルオロ修飾を含み、任意選択的に、ヌクレオチドの1及び2位間並びにヌクレオチドの2及び3位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、アンチセンス鎖は、2、6、8、9、14若しくは16位、又は2、6、14若しくは16位、又は2、14及び16位に2'-フルオロ修飾を含み；アンチセンスは、ヌクレオチドの21及び22位間並びにヌクレオチドの22及び23位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し；ここで、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：(i) dsRNAは、12～25ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；(ii) dsRNAは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を含むこと；及び(iii) dsRNAは、アンチセンス鎖の3'末端に少なくとも2ヌクレオチドオーバーハングを有することの少なくとも1つ（例えば、1、2又は3つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphospacer、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃～約80℃のT_mは、任意選択的である。

【0055】

一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖は、独立して、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長であり、ここで、アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを含み、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し、ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し、及びdsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：(i) アンチセンスは、2、3、4、5又は6つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(ii) アンチセンスは、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(iii) センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること；(iv) センス鎖は、2、3、4又は5つの2'-フルオロ修飾を含

むこと；(v) センス鎖は、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(vi) dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(vii) dsRNAは、18、19、20、21、22、23、24又は24のヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；及び(viii) dsRNAは、センス鎖の5'末端に平滑末端を含むことの少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6、7又は8つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoc、GNA-isog、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の特定の実施形態では、センス鎖は、19、20又は21又は22ヌクレオチド長であり、且つアンチセンス鎖は、20、21又は22ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、約40℃～約80℃のT_mは、任意選択的である。

【0056】

一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖は、独立して、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長であり；アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを含み、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し；ここで、センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされ、（センス鎖の5'末端から数えて）7、10及び11位又は7、9、10及び11位に2'-フルオロ修飾を含み、任意選択的に、ヌクレオチドの1及び2位間並びにヌクレオチドの2及び3位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、アンチセンス鎖は、2、6、8、9、14若しくは16位、又は2、6、14若しくは16位、又は2、14及び16位に2'-フルオロ修飾を含み；アンチセンスは、ヌクレオチドの21及び22位間、ヌクレオチドの22及び23位間、ヌクレオチドの1及び2位間、ヌクレオチドの2及び3位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し；ここで、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：(i) dsRNAは、12～25ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；(ii) dsRNAは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を含むこと；及び(iii) dsRNAは、アンチセンス鎖の3'末端に少なくとも2ヌクレオチドオーバーハングを有することの少なくとも1つ（例えば、1、2又は3つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoc、GNA-isog、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃～約80℃のT_mは、任意選択的である。

【0057】

一部の実施形態では、dsRNAの一方の末端は、平滑末端であり、且つ他方の末端は、オーバーハングを有し、ここで、アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを含み、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し、ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し、ここで、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：(i) アンチセンスは、2、3、4、5又は6つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(ii) アンチセンスは、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(iii) センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること；(iv) センス鎖は、2、3、4又は5つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(v) セ

ンス鎖は、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(v i) dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含むこと；及び(v i i) dsRNAは、12~40ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むことの少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6又は7つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1~3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、オーバーハングは、アンチセンス鎖の3'末端上に存在し、且つ平滑末端は、アンチセンス鎖の5'末端に存在する。一部の特定の実施形態では、オーバーハングは、2、3又は4ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、約40℃~約80℃のT_mは、任意選択的である。

【0058】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、19、20、21、22又は23ヌクレオチド塩基対長の二本鎖領域を有し、ここで、dsRNAの一方の末端は、平滑末端であり、且つ他方の末端は、オーバーハングを有し、ここで、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2~9位に）位置する二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を有し、ここで、dsRNAは、約40℃~約80℃の融解温度を有し、及びdsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：(i) アンチセンスは、2、3、4、5又は6つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(i i) アンチセンスは、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(i i i) センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること；(i v) センス鎖は、2、3、4又は5つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(v) センス鎖は、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；及び(v i) dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含むことの少なくとも1つ（例えば、1、2、3、5又は6つ全部）をさらに有し、任意選択的に、2ヌクレオチドオーバーハングは、アンチセンス鎖の3'末端上に存在し、平滑末端は、アンチセンス鎖の5'末端に存在し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1~3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、オーバーハングは、アンチセンス鎖の3'末端上に存在し、且つ平滑末端は、アンチセンス鎖の5'末端に存在する。一部の実施形態では、約40℃~約80℃のT_mは、任意選択的である。

【0059】

一部の実施形態では、本発明のdsRNA分子は、dsRNA二本鎖の両末端に2つの平滑末端も有し得る。

【0060】

一部の実施形態では、dsRNAは、二本鎖の両末端に平滑末端を有し、ここで、アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを含み、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2~9位に）存在し、ここで、dsRNAは、約40℃~約80℃の融解温度を有し、及びdsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：(i) アンチセンスは、2、3、4、5又は6つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(i i) アンチセンスは、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(i i i) センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること；(i v) センス鎖は、2、3、4又は5

つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(v)センス鎖は、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(v i) dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含むこと；及び(v i i) dsRNAは、12～40ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むことの少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6又は7つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy p-スパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃～約80℃のT_mは、任意選択的である。

10

【0061】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、19、20、21、22又は23ヌクレオチド塩基対長の二本鎖領域を有し、且つ二本鎖の両末端に平滑末端を有し、ここで、dsRNAの一方の末端は、平滑末端であり、且つ他方の末端は、オーバーハングを有し、ここで、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）位置する二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を有し、ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し、及びdsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：(i) アンチセンスは、2、3、4、5又は6つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(i i) アンチセンスは、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(i i i) センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること；(i v) センス鎖は、2、3、4又は5つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(v) センス鎖は、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；及び(v i) dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含むことの少なくとも1つ（例えば、1、2、3、5又は6つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy p-スパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃～約80℃のT_mは、任意選択的である。

20

30

【0062】

一部の実施形態では、本発明のdsRNA分子は、21ヌクレオチド(nt)センス鎖及び23ヌクレオチド(nt)アンチセンスを含み、ここで、アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを含み、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し、ここで、dsRNAの一方の末端は、平滑末端である一方、他方の末端は、2ntオーバーハングを含み、ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し、及びdsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：(i) アンチセンスは、2、3、4、5又は6つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(i i) アンチセンスは、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(i i i) センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること；(i v) センス鎖は、2、3、4又は5つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(v) センス鎖は、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(v i) dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含むこと；及び(v i i) dsRNAは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を含むことの少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6又は7つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA

40

50

及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-i so C、GNA-i so G、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy p-スパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。好ましくは、2ntオーバーハングは、アンチセンスの3'末端に存在する。一部の実施形態では、約40℃～約80℃のT_mは、任意選択的である。

【0063】

一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖を含む本発明のdsRNA分子において、センス鎖は、25～30ヌクレオチド残基長であり、ここで、前記センス鎖の5'末端ヌクレオチド(1位)から始まる1～23位は、少なくとも8つのリボヌクレオチドを含み；アンチセンス鎖は、36～66ヌクレオチド残基長であり、3'末端ヌクレオチドから始まる、その位置内の少なくとも8つのリボヌクレオチドがセンス鎖の1～23位と対合することで、二本鎖を形成し；ここで、少なくとも、アンチセンス鎖の3'末端ヌクレオチドは、センス鎖と対合せず、最大で6つの連続する3'末端ヌクレオチドは、センス鎖と対合せず、それにより1～6ヌクレオチドの3'-一本鎖オーバーハングを形成し；ここで、アンチセンス鎖の5'末端は、センス鎖と対合しない10～30の連続するヌクレオチドを含み、それにより10～30ヌクレオチドの一本鎖5'-オーバーハングを形成し；ここで、少なくとも、センス鎖の5'末端及び3'末端ヌクレオチドは、センス及びアンチセンス鎖が最大相補性のために整列されるとき、アンチセンス鎖のヌクレオチドと塩基対合され、それによりセンス及びアンチセンス鎖間で実質的に二本鎖の領域を形成し；前記二本鎖核酸が哺乳動物細胞に導入されるとき、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖長の少なくとも19のリボヌクレオチドに沿って標的RNAに対して十分に相補的であることで、標的遺伝子発現を低減し；アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを有し、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に(すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に)存在し、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-i so C、GNA-i so G、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy p-スパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。例えば、熱不安定化ヌクレオチドは、センス鎖の5'末端の14～17位に対して対向的又は相補的な位置間に存在し、ここで、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：(i)アンチセンスは、2、3、4、5又は6つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(ii)アンチセンスは、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(iii)センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること；(iv)センス鎖は、2、3、4又は5つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(v)センス鎖は、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；及び(vi)dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含むこと；及び(vii)dsRNAは、12～30ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むことの少なくとも1つ(例えば、1、2、3、4、5、6又は7つ全部)をさらに有する。一部の実施形態では、約40℃～約80℃のT_mは、任意選択的である。

【0064】

一部の実施形態では、本発明のdsRNA分子は、センス及びアンチセンス鎖を含み、ここで、前記dsRNA分子は、少なくとも25、最大で29ヌクレオチドの長さを有するセンス鎖を含み、最大で30ヌクレオチドの長さを有するアンチセンス鎖は、センス鎖と共に、5'末端から11位で酵素分解を受けやすい修飾ヌクレオチドを含み、ここで、前

記センス鎖の 3' 末端及び前記アンチセンス鎖の 5' 末端は、平滑末端を形成し、前記アンチセンス鎖は、その 3' 末端でセンス鎖よりも 1～4 ヌクレオチド長く、ここで、少なくとも 25 ヌクレオチド長である二本鎖領域では、前記 dsRNA 分子が哺乳動物細胞に導入されるとき、前記アンチセンス鎖は、前記アンチセンス鎖長の少なくとも 19 nt に沿って標的 mRNA に対して十分に相補的であることで、標的遺伝子の発現を低減し、ここで、前記 dsRNA のダイサー切断により、前記アンチセンス鎖の前記 3' 末端を含む siRNA が優先的にもたらされ、それにより哺乳動物における標的遺伝子の発現が低減され、ここで、アンチセンス鎖は、少なくとも 1 つの熱不安定化ヌクレオチドを含み、ここで、少なくとも 1 つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の 5' 末端の 2～9 位に）存在し、ここで、dsRNA は、約 40℃～約 80℃の融解温度を有し、ここで、dsRNA は、任意選択的に、以下の特徴：(i) アンチセンスは、2、3、4、5 又は 6 つの 2' -フルオロ修飾を含むこと；(ii) アンチセンスは、1、2、3、4 又は 5 つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(iii) センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること；(iv) センス鎖は、2、3、4 又は 5 つの 2' -フルオロ修飾を含むこと；(v) センス鎖は、1、2、3、4 又は 5 つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；及び (vi) dsRNA は、少なくとも 4 つの 2' -フルオロ修飾を含むこと；及び (vii) dsRNA は、12～29 ヌクレオチド対長の二本鎖領域を有することの少なくとも 1 つ（例えば、1、2、3、4、5、6 又は 7 つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例 1～3 に記載されている mUNA 及び GNA 構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoc、GNA-isog、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA 及び 2'-mUNA からなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA 分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy spacer、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA 及び h'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも 1 つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約 40℃～約 80℃の T_m は、任意選択的である。

【0065】

一部の実施形態では、アンチセンス鎖は、ヌクレオチドの 21 及び 22 位間並びにヌクレオチドの 22 及び 23 位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、ここで、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の 5' 末端の 2～9 位に）位置する二本鎖の少なくとも 1 つの熱不安定化修飾を有し、ここで、dsRNA は、約 40℃～約 80℃の融解温度を有し、及び dsRNA は、任意選択的に、以下の特徴：(i) アンチセンスは、2、3、4、5 又は 6 つの 2' -フルオロ修飾を含むこと；(ii) アンチセンスは、3、4 又は 5 つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(iii) センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること；(iv) センス鎖は、2、3、4 又は 5 つの 2' -フルオロ修飾を含むこと；(v) センス鎖は、1、2、3、4 又は 5 つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(vi) dsRNA は、少なくとも 4 つの 2' -フルオロ修飾を含むこと；(vii) dsRNA は、12～40 ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；及び (viii) dsRNA は、アンチセンス鎖の 5' 末端に平滑末端を有することの少なくとも 1 つ（例えば、1、2、3、4、5、6、7 又は 8 つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例 1～3 に記載されている mUNA 及び GNA 構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoc、GNA-isog、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA 及び 2'-mUNA からなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA 分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy spacer、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA 及び h'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも 1 つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約 40℃～約 80℃の T_m は、任意選択的である。

【0066】

一部の実施形態では、アンチセンス鎖は、ヌクレオチドの 1 及び 2 位間、ヌクレオチド

の2及び3位間、ヌクレオチドの21及び22位間並びにヌクレオチドの22及び23位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、ここで、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）位置する二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を有し、ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し、及びdsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：（i）アンチセンスは、2、3、4、5又は6つの2'-フルオロ修飾を含むこと；（ii）センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること；（iii）センス鎖は、2、3、4又は5つの2'-フルオロ修飾を含むこと；（iv）センス鎖は、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；（v）dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含むこと；（vi）dsRNAは、12～40ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；（vii）dsRNAは、12～40ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；及び（viii）dsRNAは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を有することの少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6、7又は8つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoc、GNA-isog、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyプーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA（ModA-ModK）からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃～約80℃のT_mは、任意選択的である。

【0067】

一部の実施形態では、センス鎖は、ヌクレオチドの1及び2位間並びにヌクレオチドの2及び3位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、ここで、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）位置する二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を有し、ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し、及びdsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：（i）アンチセンスは、2、3、4、5又は6つの2'-フルオロ修飾を含むこと；（ii）アンチセンスは、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；（iii）センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること；（iv）センス鎖は、2、3、4又は5つの2'-フルオロ修飾を含むこと；（v）センス鎖は、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；（vi）dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含むこと；（vii）dsRNAは、12～40ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；及び（viii）dsRNAは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を有することの少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6、7又は8つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoc、GNA-isog、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyプーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA（ModA-ModK）からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃～約80℃のT_mは、任意選択的である。

【0068】

一部の実施形態では、センス鎖は、ヌクレオチドの1及び2位間並びにヌクレオチドの2及び3位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、アンチセンス鎖は、ヌクレオチドの1及び2位間、ヌクレオチドの2及び3位間、ヌクレオチドの21及び22位間並びにヌクレオチドの22及び23位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、ここで、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）位置する二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を有し、

ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し、及びdsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：(i)アンチセンスは、2、3、4、5又は6つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(ii)センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること；(iii)センス鎖は、2、3、4又は5つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(iv)センス鎖は、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(v)dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(vi)dsRNAは、12～40ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；及び(vii)dsRNAは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を有することの少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6又は7つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃～約80℃のT_mは、任意選択的である。

【0069】

一態様では、本発明は、標的遺伝子の発現を阻害する能力があるdsRNA分子であって、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40ヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、アンチセンス鎖は、シード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端から数えて5'末端の2～9位に）二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、dsRNAは、以下の特徴：

- (i) アンチセンスは、2、3、4、5又は6つの2'-フルオロ修飾を含むこと；
- (ii) アンチセンスは、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；
- (iii) センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること；
- (iv) センス鎖は、2、3、4又は5つの2'-フルオロ修飾を含むこと；
- (v) センス鎖は、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；
- (vi) dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含むこと；
- (vii) dsRNAは、12～40ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；及び
- (viii) アンチセンス鎖の5'末端の平滑末端の少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6、7又は8つ全部）をさらに有する、dsRNA分子を提供する。

【0070】

一部の特定の実施形態では、二本鎖の熱不安定化修飾は、アンチセンス鎖の5'末端から数えて7位に存在し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0071】

一部の実施形態では、二本鎖の熱不安定化修飾は、アンチセンス鎖の、アンチセンス鎖の5'末端から数えて2、3、4、5、6、8又は9位に存在し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。こ

の一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyp-スパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0072】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40ヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、アンチセンス鎖は、シード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端から数えて5'末端の2～9位に）二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、及びアンチセンス鎖は、以下の特徴：

(i) 2、3、4、5又は6つの2'-フルオロ修飾；及び

(ii) 1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合

の一方又は両方をさらに含み、且つセンス鎖は、以下の特徴：

(i) センス鎖とコンジュゲートされたりガンド；

(ii) 2、3、4又は5つの2'-フルオロ修飾；及び

(iii) 1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合

の1、2又は3つを含む。

ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyp-スパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0073】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40ヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、アンチセンス鎖は、5'末端から数えて最初の9つのヌクレオチド位置内に二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、及びリガンドは、センス鎖とコンジュゲートされ、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyp-スパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0074】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40ヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、アンチセンス鎖は、5'末端から数えて最初の9つのヌクレオチド位置内に二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、リガンドは、センス鎖とコンジュゲートされ、dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含み、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyp-スパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0075】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40ヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、ここで、dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ口を含み、前記アンチセンス鎖は、5'末端から数えて最初の9つのヌクレオチド位置内に二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、前記センス鎖は、リガンドを含む。この一部のさらなる実施形態では、リガンドは、ASGPRリガンドであり、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群 10 から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyプースペーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0076】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40ヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、ここで、前記アンチセンス鎖は、5'末端から数えて4～8位に位置する二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、前記センス鎖は、リガンドを含み、ここで、センス及びアンチセンス鎖の各々は、少なくとも2つの 20 2'-フルオロ口修飾を含み、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyプースペーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。この一部のさらなる実施形態では、リガンドは、ASGPRリガンドである。

【0077】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40ヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、ここで、dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ口を含み、前記アンチセンス鎖は、5'末端から数えて最初の9つのヌクレオチド位置内に二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、前記センス鎖は、リガンドを含み、及びアンチセンスは、以下の特徴：(i) 二本鎖の熱不安定化修飾は、アンチセンス鎖の4～8位に位置すること；(ii) 少なくとも2つの2'-フルオロ口修飾；(iii) 30 ヌクレオチドの(5'末端から数えて)1及び2位間のホスホロチオエートヌクレオチド間結合ことの少なくとも2つをさらに含み、且つアンチセンス鎖は、18～35ヌクレオチド長を有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyプースペーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群 40 から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部のさらなる実施形態では、リガンドは、ASGPRリガンドである。

【0078】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、ここで、dsRNAは、少なくとも4つの 50

2'-フルオロを含み、ここで、前記アンチセンス鎖は、5'末端から数えて最初の9つのヌクレオチド位置内に二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、ここで、前記センス鎖は、リガンドを含み、センス鎖は、以下の特徴：(i)リガンドは、センス鎖の片末端に結合されること；(ii)センス鎖は、少なくとも2つの2'-フルオロ修飾を含むこと；及び(iii)センス鎖及びアンチセンス鎖は、少なくとも19のヌクレオチド位置にわたる二本鎖領域を形成するのに十分な相補性を示すことの少なくとも1つを有し、ここで、二本鎖の熱不安定化修飾は、前記二本鎖領域内に位置し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoc、GNA-isog、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA(ModA-ModK)からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0079】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40ヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、ここで、dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロを含み、前記アンチセンス鎖は、5'末端から数えて最初の9つのヌクレオチド位置内に二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、前記センス鎖は、リガンドを含み、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoc、GNA-isog、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA(ModA-ModK)からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0080】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40ヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、ここで、前記アンチセンス鎖は、5'末端から数えて4～8位に位置する二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、前記センス鎖は、リガンドを含み、ここで、センス及びアンチセンス鎖の各々は、少なくとも2つの2'-フルオロ修飾を含み、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoc、GNA-isog、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA(ModA-ModK)からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0081】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、ここで、dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロを含み、前記アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の5'末端から数えて7位に位置する二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、ここで、前記センス鎖は、リガンドを含み、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoc、GNA-isog、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分

子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy p-スパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0082】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14~40ヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、ここで、前記アンチセンス鎖は、5'末端から数えて7位に位置する二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、前記センス鎖は、リガンドを含み、ここで、センス及びアンチセンス鎖の各々は、少なくとも2つの2'-フルオロ修飾を含み、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1~3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy p-スパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

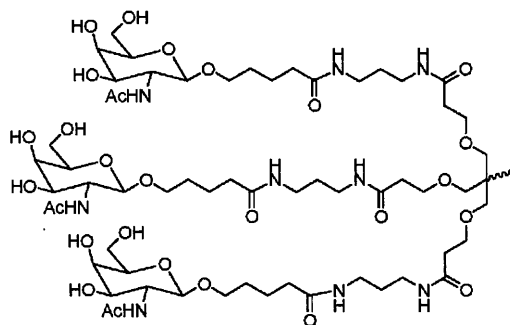
【0083】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14~40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、ここで、dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロを含み、ここで、前記アンチセンス鎖は、5'末端から数えて最初の9つのヌクレオチド位置内に二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、ここで、前記センス鎖は、リガンドを含み、ここで、リガンドは、二価又は三価分岐リンカーを通して結合された1つ以上のGalNAc誘導体を含み、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1~3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy p-スパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0084】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14~40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、ここで、dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロを含み、ここで、前記アンチセンス鎖は、5'末端から数えて最初の9つのヌクレオチド位置内に二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、ここで、前記センス鎖は、リガンドを含み、ここで、リガンドは、構造：

【化6】



10

20

30

40

50

のASGPRリガンドであり、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyプースペーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0085】

一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖は、独立して、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長であり；アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを有し、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し；ここで、センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされ、3又は4つの2'-フルオロ修飾を含み、且つ0、1、2又は3つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、アンチセンス鎖は、3、4、5又は6つの2'-フルオロ修飾を含み、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：(i) dsRNAは、12～25ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；(ii) dsRNAは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を含むこと；及び(iii) dsRNAは、アンチセンス鎖の3'末端に少なくとも2ヌクレオチドオーバーハングを有することの少なくとも1つ（例えば、1、2又は3つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyプースペーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0086】

一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖は、独立して、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長であり；アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを有し、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し；ここで、センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされ、（センス鎖の5'末端から数えて）7、10及び11位又は7、9、10及び11位に2'-フルオロ修飾を含み、任意選択的に、ヌクレオチド1及び2位間並びにヌクレオチド2及び3位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、アンチセンス鎖は、3、4、5又は6つの2'-フルオロ修飾を含み、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：(i) dsRNAは、12～25ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；(ii) dsRNAは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を含むこと；及び(iii) dsRNAは、アンチセンス鎖の3'末端に少なくとも2ヌクレオチドオーバーハングを有することの少なくとも1つ（例えば、1、2又は3つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyプースペーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0087】

一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖は、独立して、19、20、21、2

2、23、24又は25ヌクレオチド長であり；アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを有し、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し；ここで、センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされ、3又は4つの2'-フルオロ修飾を含み、且つ0、1、2又は3つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、アンチセンス鎖は、2、6、8、9、14若しくは16位、又は2、6、14若しくは16位、又は2、14及び16位に2'-フルオロ修飾を含み；アンチセンスは、ヌクレオチド21及び22位間並びにヌクレオチド22及び23位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：(i) dsRNAは、12～25ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；(ii) dsRNAは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を含むこと；及び(iii) dsRNAは、アンチセンス鎖の3'末端に少なくとも2ヌクレオチドオーバーハングを有することの少なくとも1つ（例えば、1、2又は3つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

10

20

【0088】

一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖は、独立して、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長であり；アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを有し、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し；ここで、センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされ、3又は4つの2'-フルオロ修飾を含み、且つ0、1、2又は3つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、アンチセンス鎖は、2、6、8、9、14若しくは16位、又は2、6、14若しくは16位、又は2、14及び16位に2'-フルオロ修飾を含み；アンチセンスは、ヌクレオチド21及び22位間、ヌクレオチド22及び23位間、ヌクレオチド1及び2位間、ヌクレオチド2及び3位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：(i) dsRNAは、12～25ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；(ii) dsRNAは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を含むこと；及び(iii) dsRNAは、アンチセンス鎖の3'末端に少なくとも2ヌクレオチドオーバーハングを有することの少なくとも1つ（例えば、1、2又は3つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

30

40

【0089】

一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖は、独立して、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長であり；アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを有し、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し；ここで、センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされ、（センス鎖の5'末端から数えて）7、10及び11位又は7、9、10及び11位に2'-フルオロ修飾を含み、任意選択的に、ヌクレオチド1及び2位間並びにヌクレオチド2及び3位間にホスホロチオエート

50

ヌクレオチド間結合を含み；ここで、アンチセンス鎖は、2、6、8、9、14若しくは16位、又は2、6、14若しくは16位、又は2、14及び16位に2'-フルオロ修飾を含み；アンチセンスは、ヌクレオチド21及び22位間並びにヌクレオチド22及び23位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：(i) dsRNAは、12～25ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；(ii) dsRNAは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を含むこと；及び(iii) dsRNAは、アンチセンス鎖の3'末端に少なくとも2ヌクレオチドオーバーハングを有することの少なくとも1つ（例えば、1、2又は3つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0090】

一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖は、独立して、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長であり；アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを有し、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し；ここで、センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされ、（センス鎖の5'末端から数えて）7、10及び11位又は7、9、10及び11位に2'-フルオロ修飾を含み、任意選択的に、ヌクレオチド1及び2位間並びにヌクレオチド2及び3位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、アンチセンス鎖は、2、6、8、9、14若しくは16位、又は2、6、14若しくは16位、又は2、14及び16位に2'-フルオロ修飾を含み；アンチセンスは、ヌクレオチド21及び22位間、ヌクレオチド22及び23位間、ヌクレオチド1及び2位間、ヌクレオチド2及び3位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：(i) dsRNAは、12～25ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；(ii) dsRNAは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を含むこと；及び(iii) dsRNAは、アンチセンス鎖の3'末端に少なくとも2ヌクレオチドオーバーハングを有することの少なくとも1つ（例えば、1、2又は3つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0091】

特定の実施形態では、本発明のdsRNA分子は、
 (a) センス鎖であって、
 (i) 21ヌクレオチド長；
 (ii) 三価分岐リンカーを介して結合された3つのGalNAc誘導体を含む、3'末端に結合されたASGPRリガンド；及び
 (iii) (5'末端から数えて) 7、10及び11位の2'-F修飾を有するセンス鎖と、
 (b) アンチセンス鎖であって、
 (i) 23ヌクレオチド長；
 (ii) (5'末端から数えて) 2、6～8、9、14及び16位に2'-F修飾；

(i i i) (5'末端から数えて)ヌクレオチド21及び22位間並びにヌクレオチド22及び23位間のホスホロチオエートヌクレオチド間結合;及び

(i v) (5'末端から数えて)7位の二本鎖の熱不安定化修飾を有するアンチセンス鎖とを含み、ここで、dsRNA分子は、アンチセンス鎖の3'末端に2ヌクレオチドオーバーハング、またアンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1~3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoc、GNA-isog、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。 10

【0092】

別の特定の実施形態では、本発明のdsRNA分子は、

(a) センス鎖であって、

(i) 21ヌクレオチド長;

(i i) 三価分岐リンカーを介して結合された3つのGalNAc誘導体を含む、3'末端に結合されたASGPRリガンド;

(i i i) (5'末端から数えて)7、9、10及び11位の2'-F修飾;及び

(i v) (5'末端から数えて)ヌクレオチド1及び2位間並びにヌクレオチド2及び3位間のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有するセンス鎖と、 20

(b) アンチセンス鎖であって、

(i) 23ヌクレオチド長;

(i i) (5'末端から数えて)2、6、14及び16位の2'-F修飾;

(i i i) (5'末端から数えて)ヌクレオチド1及び2位間、ヌクレオチド2及び3位間、ヌクレオチド21及び22位間並びにヌクレオチド22及び23位間のホスホロチオエートヌクレオチド間結合;及び

(i v) (5'末端から数えて)7位の二本鎖の熱不安定化修飾を有するアンチセンス鎖とを含み、ここで、dsRNA分子は、アンチセンス鎖の3'末端に2ヌクレオチドオーバーハング、またアンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1~3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoc、GNA-isog、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。 30

【0093】

別の特定の実施形態では、本発明のdsRNA分子は、 40

(a) センス鎖であって、

(i) 21ヌクレオチド長;

(i i) 三価分岐リンカーを介して結合された3つのGalNAc誘導体を含む、3'末端に結合されたASGPRリガンド;

(i i i) (5'末端から数えて)7、9、10及び11位の2'-F修飾;及び

(i v) (5'末端から数えて)ヌクレオチド1及び2位間並びにヌクレオチド2及び3位間のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有するセンス鎖と、

(b) アンチセンス鎖であって、

(i) 23ヌクレオチド長; 50

(i i) (5'末端から数えて) 2、14及び16位の2'-F修飾;

(i i i) (5'末端から数えて) ヌクレオチド1及び2位間、ヌクレオチド2及び3位間、ヌクレオチド21及び22位間並びにヌクレオチド22及び23位間のホスホロチオエートヌクレオチド間結合; 及び

(i v) (5'末端から数えて) 6又は7位の二本鎖の熱不安定化修飾

を有するアンチセンス鎖とを含み、ここで、dsRNA分子は、アンチセンス鎖の3'末端に2ヌクレオチドオーバーハング、またアンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1〜3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoc、GNA-isog、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群 10 から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy p-スパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0094】

別の特定の実施形態では、本発明のdsRNA分子は、

(a) センス鎖であって、

(i) 21ヌクレオチド長;

(i i) 三価分岐リンカーを介して結合された3つのGalNAc誘導体を含む、3'末端に結合されたASGPRリガンド;

(i i i) (5'末端から数えて) 7、9、10及び11位の2'-F修飾; 及び

(i v) (5'末端から数えて) ヌクレオチド1及び2位間並びにヌクレオチド2及び3位間のホスホロチオエートヌクレオチド間結合

を有するセンス鎖と、

(b) アンチセンス鎖であって、

(i) 23ヌクレオチド長;

(i i) (5'末端から数えて) 2、6、8、9、14及び16位の2'-F修飾;

(i i i) (5'末端から数えて) ヌクレオチド1及び2位間、ヌクレオチド2及び3位間、ヌクレオチド21及び22位間並びにヌクレオチド22及び23位間のホスホロチオエートヌクレオチド間結合; 及び

(i v) (5'末端から数えて) 7位の二本鎖の熱不安定化修飾

を有するアンチセンス鎖とを含み、ここで、dsRNA分子は、アンチセンス鎖の3'末端に2ヌクレオチドオーバーハング、またアンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1〜3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoc、GNA-isog、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群 30 から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy p-スパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0095】

別の特定の実施形態では、本発明のdsRNA分子は、

(i) (5'末端から数えて) 2、14及び16位の2'-F修飾; 及び

(i i) (5'末端から数えて) 6又は7位の二本鎖の熱不安定化修飾

を有するアンチセンス鎖を含み、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1〜3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoc、GNA-isog、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy p-スパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

20

30

40

50

d K) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0096】

別の特定の実施形態では、本発明の dsRNA 分子は、

(a) センス鎖であって、

(i) 三価分岐リンカーを介して結合された3つの GalNAc 誘導体を含む ASGPR リガンド；

(ii) (5' 末端から数えて) ヌクレオチド1及び2位間並びにヌクレオチド2及び3位間のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有するセンス鎖と、

(b) アンチセンス鎖であって、

(i) (5' 末端から数えて) 2、14及び16位の 2'-F 修飾；

(ii) (5' 末端から数えて) 6又は7位の二本鎖の熱不安定化修飾

を有するアンチセンス鎖とを含み、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1〜3に記載されている mUNA 及び GNA 構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoc、GNA-isog、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA 及び 2'-mUNA からなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA 分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA 及び h'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0097】

別の特定の実施形態では、本発明の dsRNA 分子は、

(a) センス鎖であって、

(i) 三価分岐リンカーを介して結合された3つの GalNAc 誘導体を含む、3' 末端に結合された ASGPR リガンド；

(ii) (5' 末端から数えて) ヌクレオチド1及び2位間並びにヌクレオチド2及び3位間のホスホロチオエートヌクレオチド間結合

を有するセンス鎖と、

(b) アンチセンス鎖であって、

(ii) (5' 末端から数えて) 2、14及び16位の 2'-F 修飾；

(iii) (5' 末端から数えて) ヌクレオチド1及び2位間、ヌクレオチド2及び3位間、ヌクレオチド21及び22位間並びにヌクレオチド22及び23位間のホスホロチオエートヌクレオチド間結合；及び

(iv) (5' 末端から数えて) 6又は7位の二本鎖の熱不安定化修飾

を有するアンチセンス鎖とを含み、ここで、dsRNA 分子は、アンチセンス鎖の3' 末端に2ヌクレオチドオーバーハング、またアンチセンス鎖の5' 末端に平滑末端を有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1〜3に記載されている mUNA 及び GNA 構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoc、GNA-isog、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA 及び 2'-mUNA からなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA 分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA 及び h'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0098】

一部の実施形態では、dsRNA 分子は、少なくとも1つの ASGPR リガンドをさらに含む。例えば、ASGPR リガンドは、二価又は三価分岐リンカーを通じて結合された1つ以上の GalNAc 誘導体、例えば、

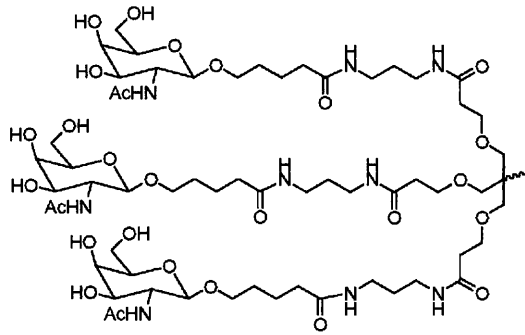
10

20

30

40

【化 7】



10

が挙げられる。

【0099】

一例では、ASGPRリガンドは、センス鎖の3'末端に結合される。

【0100】

場合によっては、アンチセンス鎖のシード領域、例えば2～9位、特に3～9位における2'-フルオロ修飾は、dsRNAのインビトロ効力に対して最小の効果を有しつつ、dsRNAのインビボ活性に悪影響を与え得る。本発明者らは、特に、かかるdsRNAのインビボ活性が、2'-フルオロ修飾の一部又は全部をアンチセンス鎖のシード領域、すなわち5'末端から数えて2～9位、特に3～9位から除去することにより、親dsRNAに対して匹敵するレベルまで回復し得ることを発見している。

20

【0101】

したがって、一部の実施形態では、本発明は、標的遺伝子の発現を阻害する能力があるdsRNA分子であって、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し且つアンチセンス鎖は、シード領域内部に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の、5'末端から数えて2～9位に）二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、dsRNAは、以下の特徴：(i) 約40℃～約80℃の融解温度(T_m)；(ii) アンチセンスは、2、3、4、5、6、7、8、9つ又は10の2'-フルオロ修飾を含むこと；(iii) アンチセンスは、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(iv) センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること；(v) センス鎖は、2、3、4又は5つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(vi) センス鎖は、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(vii) dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(viii) dsRNAは、12～40ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；(ix) アンチセンス鎖の5'末端での平滑末端；(x) センス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9つ又は10のLNA修飾を含むことの少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9つ又は10全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される、dsRNA分子を提供する。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

30

40

【0102】

一部の実施形態では、本発明は、標的遺伝子の発現を阻害する能力があるdsRNA分子であって、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な

50

相補性を有し、アンチセンス鎖は、シード領域内部に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の、5'末端から数えて2～9位に）二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、dsRNAは、以下の特徴：（i）約40℃～約80℃の融解温度（ T_m ）；（ii）アンチセンスは、2、3、4、5、6、7、8、9つ又は10の2'-フルオロ修飾を含むこと；（iii）アンチセンスは、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；（iv）センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること；（v）センス鎖は、2、3、4又は5つの2'-フルオロ修飾を含むこと；（vi）センス鎖は、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；（vii）dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含むこと；（viii）dsRNAは、12～40ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；（ix）アンチセンス鎖の5'末端での平滑末端；及び（x）センス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9つ又は10のLNA修飾を含むことの少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9つ又は10全部）をさらに有し、且つ2'-フルオロ修飾は、アンチセンス鎖の（5'末端から数えて）3～9位に存在しない、dsRNA分子を提供し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoc、GNA-isog、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA（ModA-ModK）からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0103】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、アンチセンス鎖は、シード領域内部に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の、5'末端から数えて2～9位に）二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し、アンチセンス鎖は、以下の特徴：（i）2、3、4、5、6、7、8、9つ又は10の2'-フルオロ修飾（ここで、アンチセンスは、（5'末端から数えて）3～9位に2'-フルオロ修飾を有しない）；及び（ii）1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合の一方又は両方をさらに含み；センス鎖は、以下の特徴：（i）センス鎖とコンジュゲートされたりガンド；（ii）2、3、4又は5つの2'-フルオロ修飾；（iii）1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合；及び（iv）1、2、3、4、5、6、7、8、9つ又は10のLNA修飾の1、2又は3つを含み、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoc、GNA-isog、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA（ModA-ModK）からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃～約80℃の融解温度は、任意選択的である。

【0104】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、アンチセンス鎖は、シード領域内部に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の、5'末端から数えて2～9位に）二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し、アンチセンス鎖は、（i）2、3、4、5、6、7、8、9つ又は10の2'-フルオロ修飾；及び（ii）1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結

合をさらに含み、センス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9つ又は10のLNA修飾を含み、ここで、センス鎖は、任意選択的に、以下の特徴：(i)センス鎖とコンジュゲートされたりガンド；(ii)2、3、4又は5つの2'-フルオロ修飾；(iii)1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合；及び(iv)1、2、3、4、5、6、7、8、9つ又は10のLNA修飾の1、2又は3つを含み、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyプーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA(ModA-ModK)からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃～約80℃の融解温度は、任意選択的である。

【0105】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、アンチセンス鎖は、シード領域内部に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の、5'末端から数えて2～9位に）二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し、アンチセンス鎖は、1、2、3又は4つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合をさらに含み、ここで、アンチセンス鎖は、任意選択的に、2、3、4、5、6、7、8、9つ又は10の2'-フルオロ修飾を含み；センス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9つ又は10のLNA修飾を含み、センス鎖は、任意選択的に、センス鎖とコンジュゲートされたりガンド、2、3、4若しくは5つの2'-フルオロ修飾；及び／又は1、2、3、4若しくは5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyプーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA(ModA-ModK)からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃～約80℃の融解温度は、任意選択的である。

【0106】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、アンチセンス鎖は、シード領域内部に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の、5'末端から数えて2～9位に）二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し、アンチセンス鎖は、1、2、3又は4つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合をさらに含み、ここで、アンチセンス鎖は、任意選択的に、（5'末端から数えて）3～9位に2'-フルオロ修飾が存在しないという条件で、2、3、4、5、6、7、8、9つ又は10の2'-フルオロ修飾を含み；センス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9つ又は10のLNA修飾を含み、センス鎖は、任意選択的に、センス鎖とコンジュゲートされたりガンド、2、3、4若しくは5つの2'-フルオロ修飾；及び／又は1、2、3、4若しくは5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe

、5'-Me、Hy pースパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃～約80℃の融解温度は、任意選択的である。

【0107】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、アンチセンス鎖は、5'末端から数えて最初の9つのヌクレオチド位置内に二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、リガンドは、センス鎖とコンジュゲートされ、dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含み、且つ(5'末端から数えて)アンチセンス鎖の3～9位に2'-フルオロ修飾が存在せず、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy pースパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0108】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、ここで、dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロを含み、ここで、前記アンチセンス鎖は、5'末端から数えて最初の9つのヌクレオチド位置内に二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、前記センス鎖は、リガンドを含み、ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し、且つ(5'末端から数えて)アンチセンス鎖の3～9位に2'-フルオロ修飾が存在せず、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy pースパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。この一部のさらなる実施形態では、リガンドは、ASGPRリガンドである。一部の実施形態では、約40℃～約80℃の融解温度は、任意選択的である。

【0109】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、ここで、前記アンチセンス鎖は、5'末端から数えて4～8位に位置する二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、ここで、前記センス鎖は、リガンドを含み、ここで、センス及びアンチセンス鎖の各々は、少なくとも2つの2'-フルオロ修飾を含み、ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し、且つ(5'末端から数えて)アンチセンス鎖の3～9位に2'-フルオロ修飾が存在せず、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy pースパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。この一部のさらなる実施形

態では、リガンドは、A S G P Rリガンドである。一部の実施形態では、約40℃～約80℃の融解温度は、任意選択的である。

【0110】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、ここで、dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ口を含み、ここで、前記アンチセンス鎖は、5'末端から数えて最初の9つのヌクレオチド位置内に二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、ここで、前記センス鎖は、リガンドを含み、ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し、ここでアンチセンスは、以下の特徴：(i)二本鎖の熱不安定化修飾は、アンチセンス鎖の4～8位に位置すること；(ii)少なくとも2つの2'-フルオロ口修飾；(iii)(5'末端から数えて)ヌクレオチド1及び2位間のホスホロチオエートヌクレオチド間結合；及び(iv)アンチセンス鎖は、18～35ヌクレオチド長を有することの少なくとも2つをさらに含み、且つ(5'末端から数えて)アンチセンス鎖の3～9位に2'-フルオロ口修飾が存在せず、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyプーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA(ModA-ModK)からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部のさらなる実施形態では、リガンドは、A S G P Rリガンドである。一部の実施形態では、約40℃～約80℃の融解温度は、任意選択的である。

【0111】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、ここで、dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ口を含み、ここで、前記アンチセンス鎖は、5'末端から数えて最初の9つのヌクレオチド位置内に二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、ここで、前記センス鎖は、リガンドを含み、ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し、センス鎖は、以下の特徴：(i)リガンドは、センス鎖の片末端に結合されること；(ii)センス鎖は、少なくとも2つの2'-フルオロ口修飾を含むこと；(iii)センス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9つ又は10のLNA修飾を含むこと；及び(iv)センス鎖及びアンチセンス鎖は、少なくとも19のヌクレオチド位置にわたる二本鎖領域を形成するのに十分な相補性を示すことの少なくとも1つを有し、ここで、二本鎖の熱不安定化修飾は、前記二本鎖領域内に位置し、(5'末端から数えて)アンチセンス鎖の3～9位に2'-フルオロ口修飾が存在せず、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyプーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA(ModA-ModK)からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃～約80℃の融解温度は、任意選択的である。

【0112】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、ここで、前記アンチセンス鎖は、5'末端から数えて4～8位に位置する二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、ここで、前記センス鎖は、リガンド、任意選択的に少なくとも1つのLNA修飾を含み、センス及

びアンチセンス鎖の各々は、少なくとも2つの2'-フルオロ修飾を含み、ここで、(5'末端から数えて)アンチセンス鎖の3~9位に2'-フルオロ修飾が存在せず、ここで、dsRNAは、約40℃~約80℃の融解温度を有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1~3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃~約80℃の融解温度は、任意選択的である。

10

【0113】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14~40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、ここで、dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロを含み、前記アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の5'末端から数えて5、6又は7位に位置する二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、ここで、(5'末端から数えて)アンチセンス鎖の3~9位に2'-フルオロ修飾が存在せず、ここで、前記センス鎖は、リガンド、任意選択的に少なくとも1つのLNA修飾を含み、ここで、dsRNAは、約40℃~約80℃の融解温度を有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1~3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

20

【0114】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14~40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、ここで、前記アンチセンス鎖は、5'末端から数えて5、6又は7位に位置する二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、ここで、前記センス鎖は、リガンド、任意選択的に少なくとも1つのLNA修飾を含み、センス及びアンチセンス鎖の各々は、少なくとも2つの2'-フルオロ修飾を含み、ここで、(5'末端から数えて)アンチセンス鎖の3~9位に2'-フルオロ修飾が存在せず、ここで、dsRNAは、約40℃~約80℃の融解温度を有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1~3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃~約80℃の融解温度は、任意選択的である。

30

40

【0115】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14~40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、ここで、dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロを含み、ここで、前記アンチセンス鎖は、5'末端から数えて最初の9つのヌクレオチド位置内に二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、ここで、前記センス鎖は、リガンド、任意選択的に少なくとも1つのLNA修飾を含み、ここで、(5'末

50

端から数えて) アンチセンス鎖の3～9位に2'-フルオロ修飾が存在せず、ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し、ここで、リガンドは、二価又は三価分岐リンカーを通して結合された1つ以上のGalNAc誘導体を含み、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

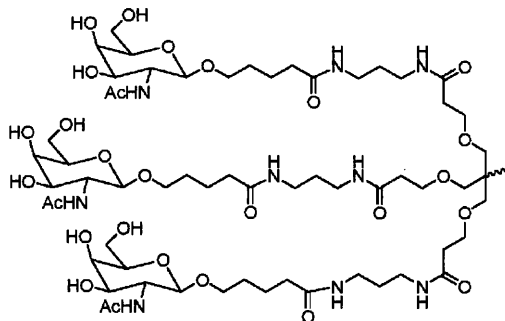
10

【0116】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、ここで、dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロを含み、ここで、前記アンチセンス鎖は、5'末端から数えて最初の9つのヌクレオチド位置内に二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、ここで、前記センス鎖は、リガンド、任意選択的に少なくとも1つのLNA修飾を含み、ここで、(5'末端から数えて) アンチセンス鎖の3～9位に2'-フルオロ修飾が存在せず、ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し、ここで、リガンドは、構造：

20

【化8】



30

のASGPRリガンドであり、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0117】

一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖は、独立して、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長であり；アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを有し、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に(すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に)存在し；ここで、センス鎖は、リガンドとコンジュゲートし、任意選択的に、少なくとも1つのLNA修飾を含み、3又は4つの2'-フルオロ修飾を含み、且つ0、1、2又は3つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、アンチセンス鎖は、(5'末端から数えて) アンチセンス鎖の3～9位に2'-修飾が存在しないという条件で、3、4、5又は6つの2'-フルオロ修飾を含み、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し；ここで、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：(i) dsRNAは、12～25ヌクレオ

40

50

チド対長の二本鎖領域を含むこと；(i i) dsRNAは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を含むこと；及び(i i i) dsRNAは、アンチセンス鎖の3'末端に少なくとも2ヌクレオチドオーバーハングを有することの少なくとも1つ（例えば、1、2又は3つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃～約80℃の融解温度は、任意選択的である。

10

【0118】

一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖は、独立して、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長であり；アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを有し、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し；ここで、センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされ、（センス鎖の5'末端から数えて）7、10及び11位又は7、9、10及び11位に2'-フルオロ修飾を含み、任意選択的に、ヌクレオチド1及び2位間並びにヌクレオチド2及び3位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、任意選択的に、少なくとも1つのLNA修飾を含み；ここで、アンチセンス鎖は、（5'末端から数えて）アンチセンス鎖の3～9位に2'-修飾が存在しないという条件で、3、4、5又は6つの2'-フルオロ修飾を含み、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し；ここで、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：(i) dsRNAは、12～25ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；(i i) dsRNAは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を含むこと；及び(i i i) dsRNAは、アンチセンス鎖の3'末端に少なくとも2ヌクレオチドオーバーハングを有することの少なくとも1つ（例えば、1、2又は3つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃～約80℃の融解温度は、任意選択的である。

20

30

【0119】

一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖は、独立して、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長であり；アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを有し、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し；ここで、センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされ、3又は4つの2'-フルオロ修飾を含み、0、1、2又は3つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、任意選択的に、少なくとも1つのLNA修飾を含み；ここで、アンチセンス鎖は、2、14又は16位に2'-フルオロ修飾を含み；アンチセンスは、ヌクレオチド21及び22位間並びにヌクレオチド22及び23位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し；ここで、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：(i) dsRNAは、12～25ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；(i i) dsRNAは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を含むこと；及び(i i i) dsRNAは、アンチセンス鎖の3'末端に少なくとも2ヌクレオチドオーバー

40

50

ハングを有することの少なくとも1つ（例えば、1、2又は3つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyプースペーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA（ModA-ModK）からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃～約80℃の融解温度は、任意選択的である。

【0120】

一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖は、独立して、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長であり；アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを有し、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し；ここで、センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされ、3又は4つの2'-フルオロ修飾を含み、少なくとも1つのLNA修飾を含み、任意選択的に、0、1、2又は3つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、アンチセンス鎖は、2、14又は16位に2'-フルオロ修飾を含み；アンチセンスは、ヌクレオチド21及び22位間並びにヌクレオチド22及び23位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し；ここで、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：（i）dsRNAは、12～25ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；（ii）dsRNAは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を含むこと；及び（iii）dsRNAは、アンチセンス鎖の3'末端に少なくとも2ヌクレオチドオーバーハングを有することの少なくとも1つ（例えば、1、2又は3つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyプースペーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA（ModA-ModK）からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃～約80℃の融解温度は、任意選択的である。

【0121】

一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖は、独立して、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長であり；アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを有し、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し；ここで、センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされ、3又は4つの2'-フルオロ修飾を含み、0、1、2又は3つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、任意選択的に、少なくとも1つのLNA修飾を含み；ここで、アンチセンス鎖は、2、14又は16位に2'-フルオロ修飾を含み；アンチセンスは、ヌクレオチド21及び22位間、ヌクレオチド22及び23位間、ヌクレオチド1及び2位間、ヌクレオチド2及び3位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し；ここで、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：（i）dsRNAは、12～25ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；（ii）dsRNAは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を含むこと；及び（iii）dsRNAは、アンチセンス鎖の3'末端に少なくとも2ヌクレオチドオーバーハングを有することの少なくとも1つ（例えば、1、2又は3つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'

－mUNA、3'－mUNA及び2'－mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'－OMe、3'－OMe、5'－Me、Hyph spacer、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA－ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃～約80℃の融解温度は、任意選択的である。

【0122】

一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖は、独立して、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長であり；アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを有し、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し；ここで、センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされ、3又は4つの2'－フルオロ修飾を含み、0、1、2又は3つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、少なくとも1つのLNA修飾を含み；ここで、アンチセンス鎖は、2、14又は16位に2'－フルオロ修飾を含み；アンチセンスは、ヌクレオチド21及び22位間、ヌクレオチド22及び23位間、ヌクレオチド1及び2位間、ヌクレオチド2及び3位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し；ここで、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：(i) dsRNAは、12～25ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；(ii) dsRNAは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を含むこと；及び(iii) dsRNAは、アンチセンス鎖の3'末端に少なくとも2ヌクレオチドオーバーハングを有することの少なくとも1つ（例えば、1、2又は3つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA－isoC、GNA－isoG、5'－mUNA、4'－mUNA、3'－mUNA及び2'－mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'－OMe、3'－OMe、5'－Me、Hyph spacer、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA－ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃～約80℃の融解温度は、任意選択的である。

【0123】

一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖は、独立して、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長であり；アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを有し、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し；ここで、センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされ、（センス鎖の5'末端から数えて）7、10及び11位又は7、9、10及び11位に2'－フルオロ修飾を含み、任意選択的に、ヌクレオチド1及び2位間並びにヌクレオチド2及び3位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、任意選択的に、少なくとも1つのLNA修飾を含み；ここで、アンチセンス鎖は、2、14又は16位に2'－フルオロ修飾を含み；アンチセンスは、ヌクレオチド21及び22位間並びにヌクレオチド22及び23位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し；ここで、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：(i) dsRNAは、12～25ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；(ii) dsRNAは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を含むこと；及び(iii) dsRNAは、アンチセンス鎖の3'末端に少なくとも2ヌクレオチドオーバーハングを有することの少なくとも1つ（例えば、1、2又は3つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA－isoC、GNA－isoG、5'－mUNA、4'－mUNA、3'－mUNA及び2'－mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'－OMe、3'－OMe、5'－Me、Hyph spacer、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA

－Mod K）からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃～約80℃の融解温度は、任意選択的である。

【0124】

一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖は、独立して、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長であり；アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを有し、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し；ここで、センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされ、（センス鎖の5'末端から数えて）7、10及び11位又は7、9、10及び11位に2'-フルオロ修飾を含み、少なくとも1つのLNA修飾を含み、任意選択的に、ヌクレオチド1及び2位間並びにヌクレオチド2及び3位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、アンチセンス鎖は、2、14又は16位に2'-フルオロ修飾を含み；アンチセンスは、ヌクレオチド21及び22位間並びにヌクレオチド22及び23位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し；ここで、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：（i）dsRNAは、12～25ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；（ii）dsRNAは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を含むこと；及び（iii）dsRNAは、アンチセンス鎖の3'末端に少なくとも2ヌクレオチドオーバーハングを有することの少なくとも1つ（例えば、1、2又は3つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyプースペーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA（Mod A-Mod K）からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃～約80℃の融解温度は、任意選択的である。

【0125】

一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖は、独立して、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長であり、ここで、アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを有し、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し、ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し、ここで、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：（i）アンチセンスは、（5'末端から数えて）アンチセンス鎖の3～9位に2'-修飾が存在しないという条件で、2、3、4、5又は6つの2'-フルオロ修飾を含むこと；（ii）アンチセンスは、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；（iii）センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること；（iv）センス鎖は、2、3、4又は5つの2'-フルオロ修飾を含むこと；（v）センス鎖は、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；（vi）dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含むこと；（vii）dsRNAは、18、19、20、21、22、23、24又は24ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；（viii）dsRNAは、センス鎖の5'末端に平滑末端を含むこと；及び（ix）センス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9 1つ又は10のLNA修飾を含むことの少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8又は9つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyプースペーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA（Mod A-Mod K）からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさら

に含む。一部の特定の実施形態では、センス鎖は、19、20又は21又は22ヌクレオチド長であり、アンチセンス鎖は、20、21又は22ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、約40℃～約80℃の融解温度は、任意選択的である。

【0126】

一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖は、独立して、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長であり、ここで、アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチド及び1、2、3又は4つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有し、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し、センス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9つ又は10のLNA修飾を含み、ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し、ここで、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：（i）アンチセンスは、（5'末端から数えて）アンチセンス鎖の3～9位に2'-修飾が存在しないという条件で、2、3、4、5又は6つの2'-フルオロ修飾を含むこと；（ii）センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること；（iii）センス鎖は、2、3、4又は5つの2'-フルオロ修飾を含むこと；（iv）センス鎖は、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；（v）dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含むこと；（vi）dsRNAは、18、19、20、21、22、23、24又は24ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；及び（vii）dsRNAは、センス鎖の5'末端に平滑末端を含むことの少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6又は7つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyプーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA（ModA-ModK）からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の特定の実施形態では、センス鎖は、19、20又は21又は22ヌクレオチド長であり、アンチセンス鎖は、20、21又は22ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、約40℃～約80℃の融解温度は、任意選択的である。

【0127】

一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖は、独立して、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長であり；アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを有し、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し；ここで、センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされ、（センス鎖の5'末端から数えて）7、10及び11位又は7、9、10及び11位に2'-フルオロ修飾を含み、任意選択的に、1、2、3、4、5、6、7、8、9つ又は10のLNA修飾を含み、任意選択的に、ヌクレオチド1及び2位間並びにヌクレオチド2及び3位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、アンチセンス鎖は、2、9、14若しくは16位又は2、14若しくは16位に2'-フルオロ修飾を含み；アンチセンスは、ヌクレオチド21及び22位間、ヌクレオチド22及び23位間、ヌクレオチド1及び2位間、ヌクレオチド2及び3位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し；ここで、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：（i）dsRNAは、12～25ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；（ii）dsRNAは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を含むこと；及び（iii）dsRNAは、アンチセンス鎖の3'末端に少なくとも2ヌクレオチドオーバーハングを有することの少なくとも1つ（例えば、1、2又は3つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択され

る。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃～約80℃の融解温度は、任意選択的である。

【0128】

一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖は、独立して、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長であり；アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを有し、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し；ここで、センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされ、（センス鎖の5'末端から数えて）7、10及び11位又は7、9、10及び11位に2'-フルオロ修飾を含み、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10のLNA修飾を含み、任意選択的に、ヌクレオチド1及び2位間並びにヌクレオチド2及び3位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、アンチセンス鎖は、2、9、14若しくは16位又は2、14若しくは16位に2'-フルオロ修飾を含み；アンチセンスは、ヌクレオチド21及び22位間、ヌクレオチド22及び23位間、ヌクレオチド1及び2位間、ヌクレオチド2及び3位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し；ここで、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：(i) dsRNAは、12～25ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；(ii) dsRNAは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を含むこと；及び(iii) dsRNAは、アンチセンス鎖の3'末端に少なくとも2ヌクレオチドオーバーハングを有することの少なくとも1つ（例えば、1、2又は3つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃～約80℃の融解温度は、任意選択的である。

【0129】

一部の実施形態では、dsRNAの一方の末端は、平滑末端であり、且つ他方の末端は、オーバーハングを有し、ここで、アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを有し、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し、ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し、ここで、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：(i) アンチセンスは、2、3、4、5又は6つの2'-フルオロ修飾を含み、ここで、（5'末端から数えて）3～9位に2'-フルオロ修飾が存在しないこと；(ii) アンチセンスは、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(iii) センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること；(iv) センス鎖は、2、3、4又は5つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(v) センス鎖は、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(vi) dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(vii) dsRNAは、12～40ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；及び(viii) センス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10のLNA修飾を含むことの少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6、7又は8つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択され

10

20

30

40

50

る。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、オーバーハングは、アンチセンス鎖の3'末端上に存在し、且つ平滑末端は、アンチセンス鎖の5'末端に存在する。一部の特定の実施形態では、オーバーハングは、2、3又は4ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、約40℃～約80℃の融解温度は、任意選択的である。

【0130】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、19、20、21、22又は23ヌクレオチド塩基対長の二本鎖領域を有し、ここで、dsRNAの一方の末端は、平滑末端であり、且つ他方の末端は、オーバーハングを有し、ここで、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）位置する二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を有し、ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し、ここで、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：(i) アンチセンスは、2、3、4、5又は6つの2'-フルオロ修飾を含み、ここで、(アンチセンス鎖の5'末端から数えて) 3～9位に2'-フルオロ修飾が存在しないこと；(ii) アンチセンス鎖は、1、2、3又は4つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(iii) センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること；(iv) センス鎖は、2、3、4又は5つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(v) センス鎖は、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(vi) dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含むこと；及び(vii) センス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10のLNA修飾を含むことの少なくとも1つ（例えば、1、2、3、5、6又は7つ全部）をさらに有し、任意選択的に、2ヌクレオチドオーバーハングアンチセンス鎖の3'末端側に存在し、且つ平滑末端は、アンチセンス鎖の5'末端に存在し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、オーバーハングは、アンチセンス鎖の3'末端上に存在し、且つ平滑末端は、アンチセンス鎖の5'末端に存在する。一部の実施形態では、約40℃～約80℃の融解温度は、任意選択的である。

【0131】

一部の実施形態では、本発明のdsRNA分子は、dsRNA二本鎖の両末端に2つの平滑末端も有し得る。

【0132】

一部の実施形態では、dsRNAは、二本鎖の両末端に平滑末端を有し、ここで、アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを有し、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し、ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し、ここで、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：(i) アンチセンスは、2、3、4、5又は6つの2'-フルオロ修飾を含み、ここで、(アンチセンス鎖の5'末端から数えて) 3～9位に2'-フルオロ修飾が存在しないこと；(ii) アンチセンス鎖は、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(iii) センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること；(iv) センス鎖は、2、3、4又は5つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(v) センス鎖は、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(vi) dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(vii) dsRNAは、12～40ヌクレオ

チド対長の二本鎖領域を含むこと；及び（v i i i）センス鎖は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9つ又は10のLNA修飾を含むことの少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6、7又は8つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-i s o C、GNA-i s o G、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy p-スパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA（ModA-ModK）からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃～約80℃の融解温度は、任意選択的である。

10

【0133】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、19、20、21、22又は23ヌクレオチド塩基対長の二本鎖領域を有し、且つ二本鎖の両末端に平滑末端を有し、ここで、dsRNAの一方の末端は、平滑末端であり、且つ他方の末端は、オーバーハングを有し、ここで、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）位置する二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を有し、ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し、ここで、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：（i）アンチセンスは、2、3、4、5又は6つの2'-フルオロ修飾を含み、ここで、（アンチセンス鎖の5'末端から数えて）3～9位に2'-フルオロ修飾が存在しないこと；（ii）アンチセンスは、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；（iii）センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること；（iv）センス鎖は、2、3、4又は5つの2'-フルオロ修飾を含むこと；（v）センス鎖は、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；（vi）dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含むこと；及び（vii）センス鎖は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9つ又は10のLNA修飾を含むことの少なくとも1つ（例えば、1、2、3、5、6又は7つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-i s o C、GNA-i s o G、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy p-スパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA（ModA-ModK）からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃～約80℃の融解温度は、任意選択的である。

20

30

【0134】

一部の実施形態では、本発明のdsRNA分子は、21ヌクレオチド（nt）のセンス鎖及び23ヌクレオチド（nt）のアンチセンスを含み、ここで、アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを有し、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し、ここで、dsRNAの一方の末端は平滑である一方、他方の末端は、2ntオーバーハングを含み、ここで、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し、ここで、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：（i）アンチセンスは、2、3、4、5又は6つの2'-フルオロ修飾を含み、ここで、（アンチセンス鎖の5'末端から数えて）3～9位に2'-フルオロ修飾が存在しないこと；（ii）アンチセンスは、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；（iii）センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること；（iv）センス鎖は、2、3、4又は5つの2'-フルオロ修飾を含むこと；（v）センス鎖は、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；（vi）dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含むこと；（vii）dsRNAは、アンチセンス鎖の5'末端

40

50

に平滑末端を含み、好ましくは、2 nt オーバーハングは、アンチセンスの3'末端に存在すること；及び(v i i i) センス鎖は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9つ又は10のLNA修飾を含むことの少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6、7又は8つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-i s o C、GNA-i s o G、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy p スペース、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (Mod A-Mod K) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃～約80℃の融解温度は、任意選択的である。

10

【0135】

一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖を含む本発明のdsRNA分子において、センス鎖は、25～30ヌクレオチド残基長であり、ここで、前記センス鎖の5'末端ヌクレオチド(1位)から始まる1～23位は、少なくとも8つのリボヌクレオチドを含み；アンチセンス鎖は、36～66ヌクレオチド残基長であり、3'末端ヌクレオチドから始まる、その位置内の少なくとも8つのリボヌクレオチドがセンス鎖の1～23位と対合することで、二本鎖を形成し；ここで、少なくとも、アンチセンス鎖の3'末端ヌクレオチドは、センス鎖と対合せず、最大で6つの連続する3'末端ヌクレオチドは、センス鎖と対合せず、それにより1～6ヌクレオチドの3'一本鎖オーバーハングを形成し；ここで、アンチセンス鎖の5'末端は、センス鎖と対合しない10～30の連続するヌクレオチドを含み、それにより10～30ヌクレオチドの一本鎖5'オーバーハングを形成し；ここで、少なくとも、センス鎖の5'末端及び3'末端ヌクレオチドは、センス及びアンチセンス鎖が最大相補性のために整列されるとき、アンチセンス鎖のヌクレオチドと塩基対合され、それによりセンス及びアンチセンス鎖間で実質的に二本鎖の領域を形成し；前記二本鎖核酸が哺乳動物細胞に導入されるとき、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖長の少なくとも19のリボヌクレオチドに沿って標的RNAに対して十分に相補的であることで、標的遺伝子発現を低減し；アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを有し、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に(すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に)存在し、dsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-i s o C、GNA-i s o G、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy p スペース、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (Mod A-Mod K) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

20

30

【0136】

例えば、熱不安定化ヌクレオチドは、センス鎖の5'末端の14～17位に対して対向的又は相補的な位置間に存在し、ここで、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：(i) アンチセンスは、2、3、4、5又は6つの2'-フルオロ修飾を含み、ここで、(アンチセンス鎖の5'末端から数えて)3～9位に2'-フルオロ修飾が存在しないこと；(i i) アンチセンスは、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(i i i) センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること；(i v) センス鎖は、2、3、4又は5つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(v) センス鎖は、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；及び(v i) dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(v i i) dsRNAは、12～30ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；及びセンス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9つ又は10のLNA修飾を含むことの少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6、7又は8つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本

40

50

明細書の実施例 1～3 に記載されている mUNA 及び GNA 構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-i so C、GNA-i so G、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA 及び 2'-mUNA からなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA 分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy p スペース、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA 及び h'GNA (Mod A-Mod K) からなる群から選択される少なくとも 1 つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約 40℃～約 80℃の融解温度は、任意選択的である。

【0137】

一部の実施形態では、本発明の dsRNA 分子は、センス及びアンチセンス鎖を含み、ここで、前記 dsRNA 分子は、少なくとも 25、最大で 29 ヌクレオチドの長さを有するセンス鎖を含み、最大で 30 ヌクレオチドの長さを有するアンチセンス鎖は、センス鎖と共に、5' 末端から 11 位で酵素分解を受けやすい修飾ヌクレオチドを含み、ここで、前記センス鎖の 3' 末端及び前記アンチセンス鎖の 5' 末端は、平滑末端を形成し、前記アンチセンス鎖は、その 3' 末端でセンス鎖よりも 1～4 ヌクレオチド長く、ここで、少なくとも 25 ヌクレオチド長である二本鎖領域では、前記 dsRNA 分子が哺乳動物細胞に導入されるとき、前記アンチセンス鎖は、前記アンチセンス鎖長の少なくとも 19 nt に沿って標的 mRNA に対して十分に相補的であることで、標的遺伝子の発現を低減し、ここで、前記 dsRNA のダイサー切断により、前記アンチセンス鎖の前記 3' 末端を含む siRNA が優先的にもたらされ、それにより哺乳動物における標的遺伝子の発現が低減され、ここで、アンチセンス鎖は、少なくとも 1 つの熱不安定化ヌクレオチドを有し、ここで、少なくとも 1 つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の 5' 末端の 2～9 位に）存在し、ここで、dsRNA は、約 40℃～約 80℃の融解温度を有し、ここで、dsRNA は、任意選択的に、以下の特徴：(i) アンチセンスは、2、3、4、5 又は 6 つの 2'-フルオロ修飾を含み、ここで、(アンチセンス鎖の 5' 末端から数えて) 3～9 位に 2'-フルオロ修飾が存在しないこと；(ii) アンチセンスは、1、2、4 又は 5 つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(iii) センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること；(iv) センス鎖は、2、3、4 又は 5 つの 2'-フルオロ修飾を含むこと；(v) センス鎖は、1、2、3、4 又は 5 つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；及び (vi) dsRNA は、少なくとも 4 つの 2'-フルオロ修飾を含むこと；(vii) dsRNA は、12～29 ヌクレオチド対長の二本鎖領域を有すること；及び (viii) センス鎖は、1、2、3、4、5、7、8、9 つ又は 10 の LNA 修飾を含むことの少なくとも 1 つ（例えば、1、2、3、4、5、6、7 又は 8 つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例 1～3 に記載されている mUNA 及び GNA 構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-i so C、GNA-i so G、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA 及び 2'-mUNA からなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA 分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy p スペース、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA 及び h'GNA (Mod A-Mod K) からなる群から選択される少なくとも 1 つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約 40℃～約 80℃の融解温度は、任意選択的である。

【0138】

一部の実施形態では、アンチセンス鎖は、ヌクレオチド 21 及び 22 位間並びにヌクレオチド 22 及び 23 位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、ここで、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の 5' 末端の 2～9 位に）位置する二本鎖の少なくとも 1 つの熱不安定化修飾を有し、ここで、dsRNA は、約 40℃～約 80℃の融解温度を有し、ここで、dsRNA は、任意選択的に、以下の特徴：(i) アンチセンスは、2、3、4、5 又は 6 つの 2'-フルオロ修飾を含み、ここで、(アンチセンス鎖の 5' 末端から数えて) 3～9 位に 2'-フルオロ修飾が存在し

ないこと；(i i) アンチセンスは、3又は4つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(i i i) センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること；(i v) センス鎖は、2、3、4又は5つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(v) センス鎖は、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(v i) d s RNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(v i i) d s RNAは、12～40ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；(v i i i) d s RNAは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を有すること；及び(i x) センス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10のLNA修飾を含むことの少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8又は9つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-i s o C、GNA-i s o G、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、d s RNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy p-スパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (Mod A-Mod K) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃～約80℃の融解温度は、任意選択的である。

【0139】

一部の実施形態では、アンチセンス鎖は、ヌクレオチド1及び2位間、ヌクレオチド2及び3位間、ヌクレオチド21及び22位間並びにヌクレオチド22及び23位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、ここで、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）位置する二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を有し、ここで、d s RNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し、ここで、d s RNAは、任意選択的に、以下の特徴：(i) アンチセンスは、2、3、4、5又は6つの2'-フルオロ修飾を含み、ここで、（アンチセンス鎖の5'末端から数えて）3～9位に2'-フルオロ修飾が存在しないこと；(i i) センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること；(i i i) センス鎖は、2、3、4又は5つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(i v) センス鎖は、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(v) d s RNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(v i) d s RNAは、12～40ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；(v i i) d s RNAは、12～40ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；(v i i i) d s RNAは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を有すること；及び(i x) センス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10のLNA修飾を含むことの少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8又は9つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-i s o C、GNA-i s o G、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、d s RNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy p-スパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (Mod A-Mod K) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃～約80℃の融解温度は、任意選択的である。

【0140】

一部の実施形態では、センス鎖は、ヌクレオチド1及び2位間並びにヌクレオチド2及び3位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、ここで、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）位置する二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を有し、ここで、d s RNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し、ここで、d s RNAは、任意選択的に、以下の特徴：(i) アンチセンスは、2、3、4、5又は6つの2'-フルオロ修飾を含み、ここで、（アンチセンス鎖の5'末端から数えて）3～9位に2'-フルオロ修飾が存在しないこと；(i

i) アンチセンスは、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(i i i) センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること；(i v) センス鎖は、2、3、4又は5つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(v) センス鎖は、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(v i) d s RNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(v i i) d s RNAは、12〜40ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；(v i i i) d s RNAは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を有すること；及び(i x) センス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10のLNA修飾を含むことの少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8又は9つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1〜3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-i s o C、GNA-i s o G、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、d s RNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy p-スパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (Mod A-Mod K) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃〜約80℃の融解温度は、任意選択的である。

【0141】

一部の実施形態では、センス鎖は、ヌクレオチド1及び2位間並びにヌクレオチド2及び3位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、アンチセンス鎖は、ヌクレオチド1及び2位間、ヌクレオチド2及び3位間、ヌクレオチド21及び22位間並びにヌクレオチド22及び23位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、ここで、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2〜9位に）位置する二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を有し、ここで、d s RNAは、約40℃〜約80℃の融解温度を有し、ここで、d s RNAは、任意選択的に、以下の特徴：(i) アンチセンスは、2、3、4、5又は6つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(i i) センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること；(i i i) センス鎖は、2、3、4又は5つの2'-フルオロ修飾を含み、ここで、(アンチセンス鎖の5'末端から数えて) 3〜9位に2'-フルオロ修飾が存在しないこと；(i v) センス鎖は、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(v) d s RNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(v i) d s RNAは、12〜40ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；(v i i) d s RNAは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を有すること；及び(v i i i) センス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10のLNA修飾を含むことの少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6、7又は8つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1〜3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-i s o C、GNA-i s o G、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、d s RNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy p-スパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (Mod A-Mod K) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃〜約80℃の融解温度は、任意選択的である。

【0142】

一態様では、本発明は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含む、標的遺伝子の発現を阻害する能力があるd s RNA分子であって、各鎖は、14〜40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、アンチセンス鎖は、シード領域内部に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の、5'末端から数えて2〜9位に）二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、d s RNA分子は、以下の特徴：(i) アンチセンスは、2、3、4、5又は6つの2'-フルオロ

修飾を含み、ここで、(5'末端から数えて)3～9位に2'フルオロ修飾が存在しないこと；(i i)アンチセンスは、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(i i i)センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること；(i v)センス鎖は、2、3、4又は5つの2'フルオロ修飾を含むこと；(v)センス鎖は、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(v i) dsRNAは、少なくとも4つの2'フルオロ修飾を含むこと；(v i i) dsRNAは、12～40ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；(v i i i)アンチセンス鎖の5'末端での平滑末端；及び(i x)センス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10のLNA修飾を含むことの少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8又は9つ全部）をさらに有する、dsRNA分子を提供し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃～約80℃の融解温度は、任意選択的である。

【0143】

一部の特定の実施形態では、二本鎖の熱不安定化修飾は、アンチセンス鎖の、アンチセンス鎖の5'末端から数えて5、6又は7位に存在し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0144】

一部の実施形態では、二本鎖の熱不安定化修飾は、アンチセンス鎖の、アンチセンス鎖の5'末端から数えて2、3、4、8又は9位に存在し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0145】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、アンチセンス鎖は、シード領域内部に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の、5'末端から数えて2～9位に）二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、アンチセンス鎖は、以下の特徴：(i) 2、3、4、5又は6つの2'フルオロ修飾（（アンチセンス鎖の5'末端から数えて）3～9位に2'修飾が存在しない）；及び(ii) 1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合の一方又は両方をさらに含み；センス鎖は、以下の特徴：(i) センス鎖とコンジュゲートされたリガンド；(ii) 2、3、4又は5つの2'フルオロ修飾；(iii) 1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合；及び(iv) 1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10のLNA修飾の1、2、3又は4を含み、

ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyプースペーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0146】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、アンチセンス鎖は、5'末端から数えて最初の9つのヌクレオチド位置内に二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、リガンドは、センス鎖とコンジュゲートされ、dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含み、且つ（アンチセンス鎖の5'末端から数えて）アンチセンス鎖の3～9位に2'-修飾が存在せず、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyプースペーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0147】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、ここで、dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含み、ここで、前記アンチセンス鎖は、5'末端から数えて最初の9つのヌクレオチド位置内に二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、前記センス鎖は、リガンドを含み、且つ（アンチセンス鎖の5'末端から数えて）アンチセンス鎖の3～9位に2'-修飾が存在せず、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyプースペーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。この一部のさらなる実施形態では、リガンドは、ASGPRリガンドである。

【0148】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、ここで、前記アンチセンス鎖は、5'末端から数えて4～8位に位置する二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、ここで、前記センス鎖は、リガンドを含み、センス及びアンチセンス鎖の各々は、少なくとも2つの2'-フルオロ修飾を含み、且つ（アンチセンス鎖の5'末端から数えて）アンチセンス鎖の3～9位に2'-修飾が存在せず、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyプースペーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

この一部のさらなる実施形態では、リガンドは、ASGPRリガンドである。

【0149】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、ここで、dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロを含み、ここで、前記アンチセンス鎖は、5'末端から数えて最初の9つのヌクレオチド位置内に二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、ここで、前記センス鎖は、リガンドを含み、ここで、アンチセンスは、以下の特徴：(i)二本鎖の熱不安定化修飾は、アンチセンス鎖の4～8位に位置すること；(ii)少なくとも2つの2'-フルオロ修飾（ここで、（アンチセンス鎖の5'末端から数えて）アンチセンス鎖の3～9位に2'-修飾が存在しない）；(iii)（5'末端から数えて）ヌクレオチド1及び2位間のホスホロチオエートヌクレオチド間結合の少なくとも2つをさらに含み；且つアンチセンス鎖は、18～35ヌクレオチド長を有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyプーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA（ModA-ModK）からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部のさらなる実施形態では、リガンドは、ASGPRリガンドである。

【0150】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、ここで、dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロを含み、ここで、前記アンチセンス鎖は、5'末端から数えて最初の9つのヌクレオチド位置内に二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、ここで、前記センス鎖は、リガンドを含み、センス鎖は、以下の特徴：(i)リガンドは、センス鎖の片末端に結合されること；(ii)センス鎖は、少なくとも2つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(iii)センス鎖及びアンチセンス鎖は、少なくとも19のヌクレオチド位置にわたる二本鎖領域を形成するのに十分な相補性を示すこと；(iv)センス鎖は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9つ又は10のLNA修飾を含むことの少なくとも1つを有し、二本鎖の熱不安定化修飾は、前記二本鎖領域内に位置し、且つ（アンチセンス鎖の5'末端から数えて）アンチセンス鎖の3～9位に2'-修飾が存在せず、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyプーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA（ModA-ModK）からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0151】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、ここで、dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロを含み、ここで、（アンチセンス鎖の5'末端から数えて）アンチセンス鎖の3～9位に2'-修飾が存在せず、ここで、前記アンチセンス鎖は、5'末端から数えて最初の9つのヌクレオチド位置内に二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、ここで、前記センス鎖は、リガンドを含み、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUN

A、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hypersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0152】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14~40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、ここで、前記アンチセンス鎖は、5'末端から数えて4~8位に位置する二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、ここで、前記センス鎖は、リガンドを含み、センス及びアンチセンス鎖の各々は、少なくとも2つの2'-フルオロ修飾を含み、(アンチセンス鎖の5'末端から数えて)アンチセンス鎖の3~9位に2'-修飾が存在せず、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1~3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoc、GNA-isog、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hypersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0153】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14~40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、ここで、dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロを含み、ここで、(アンチセンス鎖の5'末端から数えて)アンチセンス鎖の3~9位に2'-修飾が存在せず、ここで、前記アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の5'末端から数えて5、6又は7位に位置する二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、ここで、前記センス鎖は、リガンドを含み、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1~3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoc、GNA-isog、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hypersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0154】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14~40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、ここで、前記アンチセンス鎖は、5'末端から数えて5、6又は7位に位置する二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、ここで、前記センス鎖は、リガンドを含み、センス及びアンチセンス鎖の各々は、少なくとも2つの2'-フルオロ修飾を含み、(アンチセンス鎖の5'末端から数えて)アンチセンス鎖の3~9位に2'-修飾が存在せず、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1~3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoc、GNA-isog、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hypersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0155】

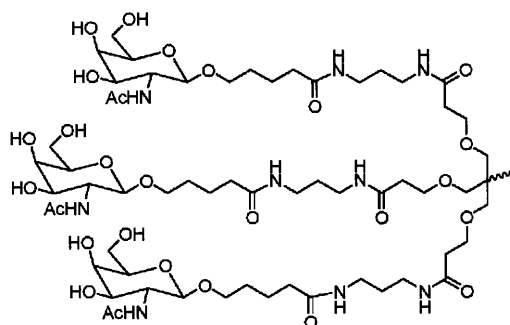
一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は

、14～40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、ここで、dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ口を含み、ここで、（アンチセンス鎖の5'末端から数えて）アンチセンス鎖の3～9位に2'-修飾が存在せず、ここで、前記アンチセンス鎖は、5'末端から数えて最初の9つのヌクレオチド位置内に二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、ここで、前記センス鎖は、リガンドを含み、ここで、リガンドは、二価又は三価分岐リンカーを通して結合された1つ以上のGalNAc誘導体を含み、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy p-スパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA（ModA-ModK）からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0156】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、RNA干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し、ここで、dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ口を含み、ここで、（アンチセンス鎖の5'末端から数えて）アンチセンス鎖の3～9位に2'-修飾が存在せず、ここで、前記アンチセンス鎖は、5'末端から数えて最初の9つのヌクレオチド位置内に二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、ここで、前記センス鎖は、リガンドを含み、ここで、リガンドは、構造：

【化9】



のASGPRリガンドであり、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy p-スパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA（ModA-ModK）からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0157】

一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖は、独立して、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長であり；アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを有し、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し；ここで、センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされ、3又は4つの2'-フルオロ口修飾を含み、且つ0、1、2又は3つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、アンチセンス鎖は、3、4、5又は6つの2'-フルオロ口修飾を含み、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、dsRNAは、任意選択

的に、以下の特徴：(i) dsRNAは、12～25ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；(ii) dsRNAは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を含むこと；及び(iii) dsRNAは、アンチセンス鎖の3'末端に少なくとも2ヌクレオチドオーバーハングを有することの少なくとも1つ（例えば、1、2又は3つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

10

【0158】

一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖は、独立して、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長であり；アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを有し、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し；ここで、センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされ、（センス鎖の5'末端から数えて）7、10及び11位又は7、9、10及び11位に2'-フルオロ修飾を含み、任意選択的に、ヌクレオチド1及び2位間並びにヌクレオチド2及び3位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、任意選択的に、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10のLNA修飾を含み；ここで、アンチセンス鎖は、3、4、5又は6つの2'-フルオロ修飾を含み、ここで、アンチセンス鎖の3～9位に2'-フルオロ修飾が存在せず、2、3又は4つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：(i) dsRNAは、12～25ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；(ii) dsRNAは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を含むこと；及び(iii) dsRNAは、アンチセンス鎖の3'末端に少なくとも2ヌクレオチドオーバーハングを有することの少なくとも1つ（例えば、1、2又は3つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

20

30

【0159】

一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖は、独立して、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長であり；アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを有し、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し；ここで、センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされ、3又は4つの2'-フルオロ修飾を含み、0又は2つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、任意選択的に、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10のLNA修飾を含み；ここで、アンチセンス鎖は、2、14又は16位又は2、14及び16位に2'-フルオロ修飾を含み；アンチセンス鎖は、ヌクレオチド21及び22位間並びにヌクレオチド22及び23位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：(i) dsRNAは、12～25ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；(ii) dsRNAは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を含むこと；及び(iii) dsRNAは、アンチセンス鎖の3'末端に少なくとも2ヌクレオチドオーバーハングを有することの少なくとも1つ（例えば、1、2又は3つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択

40

50

される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-i s o C、GNA-i s o G、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy p-スパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0160】

一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖は、独立して、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長であり；アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを有し、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し；ここで、センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされ、3又は4つの2'-フルオロ修飾を含み、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10のLNA修飾を含み、任意選択的に、0又は2つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、アンチセンス鎖は、2、14又は16位又は2、14及び16位に2'-フルオロ修飾を含み；アンチセンスは、ヌクレオチド21及び22位間並びにヌクレオチド22及び23位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：(i) dsRNAは、12～25ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；(ii) dsRNAは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を含むこと；及び(iii) dsRNAは、アンチセンス鎖の3'末端に少なくとも2ヌクレオチドオーバーハングを有することの少なくとも1つ（例えば、1、2又は3つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-i s o C、GNA-i s o G、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy p-スパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0161】

一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖は、独立して、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長であり；アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを有し、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し；ここで、センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされ、3又は4つの2'-フルオロ修飾を含み、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10のLNA修飾を含み、且つ0、1、2又は3つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、アンチセンス鎖は、2、14又は16位又は2、14及び16位に2'-フルオロ修飾を含み；アンチセンスは、ヌクレオチド21及び22位間並びにヌクレオチド22及び23位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：(i) dsRNAは、12～25ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；(ii) dsRNAは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を含むこと；及び(iii) dsRNAは、アンチセンス鎖の3'末端に少なくとも2ヌクレオチドオーバーハングを有することの少なくとも1つ（例えば、1、2又は3つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-i s o C、GNA-i s o G、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy p-スパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0162】

一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖は、独立して、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長であり；アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを有し、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し；ここで、センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされ、3又は4つの2'-フルオロ修飾を含み、0、1、2又は3つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、任意選択的に、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10のLNA修飾を含み；ここで、アンチセンス鎖は、2、14又は16位に2'-フルオロ修飾を含み；アンチセンスは、ヌクレオチド21及び22位間、ヌクレオチド22及び23位間、ヌクレオチド1及び2位間、ヌクレオチド2及び3位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：(i) dsRNAは、12～25ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；(ii) dsRNAは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を含むこと；及び(iii) dsRNAは、アンチセンス鎖の3'末端に少なくとも2ヌクレオチドオーバーハングを有することの少なくとも1つ（例えば、1、2又は3つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

10

20

【0163】

一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖は、独立して、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長であり；アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを有し、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し；ここで、センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされ、3又は4つの2'-フルオロ修飾を含み、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10のLNA修飾を含み、任意選択的に、0、1、2又は3つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、アンチセンス鎖は、2、14又は16位に2'-フルオロ修飾を含み；アンチセンスは、ヌクレオチド21及び22位間、ヌクレオチド22及び23位間、ヌクレオチド1及び2位間、ヌクレオチド2及び3位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：(i) dsRNAは、12～25ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；(ii) dsRNAは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を含むこと；及び(iii) dsRNAは、アンチセンス鎖の3'末端に少なくとも2ヌクレオチドオーバーハングを有することの少なくとも1つ（例えば、1、2又は3つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

30

40

【0164】

一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖は、独立して、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長であり；アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを有し、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し；ここで、センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされ、3又は4つの2'-フルオロ修飾

50

を含み、1、2、3、4、5、6、7、8、9つ又は10のLNA修飾を含み、0、1、2又は3つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、アンチセンス鎖は、2、14又は16位に2'-フルオロ修飾を含み；アンチセンスは、ヌクレオチド21及び22位間、ヌクレオチド22及び23位間、ヌクレオチド1及び2位間、ヌクレオチド2及び3位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：(i) dsRNAは、12～25ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；(ii) dsRNAは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を含むこと；及び(iii) dsRNAは、アンチセンス鎖の3'末端に少なくとも2ヌクレオチドオーバーハングを有することの少なくとも1つ（例えば、1、2又は3つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoc、GNA-isog、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0165】

一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖は、独立して、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長であり；アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを有し、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し；ここで、センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされ、（センス鎖の5'末端から数えて）7、10及び11位又は7、9、10及び11位に2'-フルオロ修飾を含み、任意選択的に、ヌクレオチド1及び2位間並びにヌクレオチド2及び3位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、任意選択的に、1、2、3、4、5、6、7、8、9つ又は10のLNA修飾を含み；ここで、アンチセンス鎖は、2、14及び16位に2'-フルオロ修飾を含み；アンチセンスは、ヌクレオチド21及び22位間並びにヌクレオチド22及び23位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：(i) dsRNAは、12～25ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；(ii) dsRNAは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を含むこと；及び(iii) dsRNAは、アンチセンス鎖の3'末端に少なくとも2ヌクレオチドオーバーハングを有することの少なくとも1つ（例えば、1、2又は3つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoc、GNA-isog、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0166】

一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖は、独立して、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長であり；アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを有し、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し；ここで、センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされ、（センス鎖の5'末端から数えて）7、10及び11位又は7、9、10及び11位に2'-フルオロ修飾を含み、ヌクレオチド1及び2位間並びにヌクレオチド2及び3位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、任意選択的に、1、2、3、4、5、6、7、8、9つ又は10のLNA修飾を含み；ここで、アンチセンス鎖は、2、14及び16位に2'-フルオロ修飾を含み；アンチセンスは、ヌクレオチド21及び22位間並びにヌクレオチド22及び23位間に

ホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、*dsRNA*は、任意選択的に、以下の特徴：(i) *dsRNA*は、12～25ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；(ii) *dsRNA*は、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を含むこと；及び(iii) *dsRNA*は、アンチセンス鎖の3'末端に少なくとも2ヌクレオチドオーバーハングを有することの少なくとも1つ（例えば、1、2又は3つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されている*mUNA*及び*GNA*構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、*GNA-isoc*、*GNA-isog*、5'-*mUNA*、4'-*mUNA*、3'-*mUNA*及び2'-*mUNA*からなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、*dsRNA*分子は、*GNA*、2'-*OMe*、3'-*OMe*、5'-*Me*、*Hy*ースペーサー、*SNA*、*hGNA*、*hhGNA*、*mGNA*、*TNA*及び*h'GNA (ModA-ModK)*からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0167】

一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖は、独立して、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長であり；アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを有し、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し；ここで、センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされ、（センス鎖の5'末端から数えて）7、10及び11位又は7、9、10及び11位に2'-フルオロ修飾を含み、1、2、3、4、5、6、7、8、9つ又は10の*LNA*修飾を含み、任意選択的に、ヌクレオチド1及び2位間並びにヌクレオチド2及び3位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、アンチセンス鎖は、2、14及び16位に2'-フルオロ修飾を含み；アンチセンスは、ヌクレオチド21及び22位間並びにヌクレオチド22及び23位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、*dsRNA*は、任意選択的に、以下の特徴：(i) *dsRNA*は、12～25ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；(ii) *dsRNA*は、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を含むこと；及び(iii) *dsRNA*は、アンチセンス鎖の3'末端に少なくとも2ヌクレオチドオーバーハングを有することの少なくとも1つ（例えば、1、2又は3つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されている*mUNA*及び*GNA*構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、*GNA-isoc*、*GNA-isog*、5'-*mUNA*、4'-*mUNA*、3'-*mUNA*及び2'-*mUNA*からなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、*dsRNA*分子は、*GNA*、2'-*OMe*、3'-*OMe*、5'-*Me*、*Hy*ースペーサー、*SNA*、*hGNA*、*hhGNA*、*mGNA*、*TNA*及び*h'GNA (ModA-ModK)*からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0168】

一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖は、独立して、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長であり；アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを有し、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し；ここで、センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされ、（センス鎖の5'末端から数えて）7、10及び11位又は7、9、10及び11位に2'-フルオロ修飾を含み、1、2、3、4、5、6、7、8、9つ又は10の*LNA*修飾を含み、ヌクレオチド1及び2位間並びにヌクレオチド2及び3位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、アンチセンス鎖は、2、14及び16位に2'-フルオロ修飾を含み；アンチセンスは、ヌクレオチド21及び22位間並びにヌクレオチド22及び23位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、*dsRNA*は、任意選択的に、以下の特徴：(i) *dsRNA*は、12～25ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；(ii) *dsRNA*は、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を含むこと；及び(iii) *dsRNA*は、アンチセンス鎖の3'末端に少なくとも2ヌクレオチドオーバーハングを有することの少

なくとも1つ（例えば、1、2又は3つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-i so C、GNA-i so G、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy p-スパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (Mod A-Mod K) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0169】

一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖は、独立して、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長であり；アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを有し、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し；ここで、センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされ、（センス鎖の5'末端から数えて）7、10及び11位又は7、9、10及び11位に2'-フルオロ修飾を含み、任意選択的に、ヌクレオチド1及び2位間並びにヌクレオチド2及び3位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、任意選択的に、1、2、3、4、5、6、7、8、9つ又は10のLNA修飾を含み；ここで、アンチセンス鎖は、2、14又は16位に2'-フルオロ修飾を含み；アンチセンスは、ヌクレオチド21及び22位間、ヌクレオチド22及び23位間、ヌクレオチド1及び2位間、ヌクレオチド2及び3位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：(i) dsRNAは、12～25ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；(ii) dsRNAは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を含むこと；及び(iii) dsRNAは、アンチセンス鎖の3'末端に少なくとも2ヌクレオチドオーバーハングを有することの少なくとも1つ（例えば、1、2又は3つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-i so C、GNA-i so G、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy p-スパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (Mod A-Mod K) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0170】

一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖は、独立して、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長であり；アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを有し、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し；ここで、センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされ、（センス鎖の5'末端から数えて）7、10及び11位又は7、9、10及び11位に2'-フルオロ修飾を含み、ヌクレオチド1及び2位間並びにヌクレオチド2及び3位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、任意選択的に、1、2、3、4、5、6、7、8、9つ又は10のLNA修飾を含み；ここで、アンチセンス鎖は、2、14又は16位に2'-フルオロ修飾を含み；アンチセンスは、ヌクレオチド21及び22位間、ヌクレオチド22及び23位間、ヌクレオチド1及び2位間、ヌクレオチド2及び3位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：(i) dsRNAは、12～25ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；(ii) dsRNAは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を含むこと；及び(iii) dsRNAは、アンチセンス鎖の3'末端に少なくとも2ヌクレオチドオーバーハングを有することの少なくとも1つ（例えば、1、2又は3つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では

、不安定化修飾は、 $GNA-i so C$ 、 $GNA-i so G$ 、 $5'-mUNA$ 、 $4'-mUNA$ 、 $3'-mUNA$ 及び $2'-mUNA$ からなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、 $dsRNA$ 分子は、 GNA 、 $2'-OMe$ 、 $3'-OMe$ 、 $5'-Me$ 、 Hyp ースペーサー、 SNA 、 $hGNA$ 、 $hhGNA$ 、 $mGNA$ 、 TNA 及び $h'GNA$ ($ModA-ModK$) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0171】

一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖は、独立して、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長であり；アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを有し、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し；ここで、センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされ、（センス鎖の5'末端から数えて）7、10及び11位又は7、9、10及び11位に2'-フルオロ修飾を含み、任意選択的に、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10のLNA修飾を含み、任意選択的に、ヌクレオチド1及び2位間並びにヌクレオチド2及び3位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、アンチセンス鎖は、2、14又は16位に2'-フルオロ修飾を含み；アンチセンス鎖は、ヌクレオチド21及び22位間、ヌクレオチド22及び23位間、ヌクレオチド1及び2位間、ヌクレオチド2及び3位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み；ここで、 $dsRNA$ は、任意選択的に、以下の特徴：(i) $dsRNA$ は、12～25ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；(ii) $dsRNA$ は、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を含むこと；及び(iii) $dsRNA$ は、アンチセンス鎖の3'末端に少なくとも2ヌクレオチドオーバーハングを有することの少なくとも1つ（例えば、1、2又は3つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されている $mUNA$ 及び GNA 構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、 $GNA-i so C$ 、 $GNA-i so G$ 、 $5'-mUNA$ 、 $4'-mUNA$ 、 $3'-mUNA$ 及び $2'-mUNA$ からなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、 $dsRNA$ 分子は、 GNA 、 $2'-OMe$ 、 $3'-OMe$ 、 $5'-Me$ 、 Hyp ースペーサー、 SNA 、 $hGNA$ 、 $hhGNA$ 、 $mGNA$ 、 TNA 及び $h'GNA$ ($ModA-ModK$) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0172】

一部の実施形態では、 $dsRNA$ 分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、各鎖は、14～40のヌクレオチドを有し、ここで、アンチセンス鎖は、 RNA 干渉を媒介するために標的配列に対して十分な相補性を有し且つアンチセンス鎖は、シード領域内部に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の、5'末端から数えて2～9位に）二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、 $dsRNA$ は、約40℃～約80℃の融解温度 (T_m) を有し、及び $dsRNA$ は、任意選択的に、以下の特徴：(i) アンチセンス鎖は、2、3、4、5又は6つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(ii) アンチセンス鎖は、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(iii) センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること；(iv) センス鎖は、2、3、4又は5つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(v) センス鎖は、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(vi) $dsRNA$ は、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(vii) $dsRNA$ は、12～40ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；(viii) アンチセンス鎖の5'末端での平滑末端；(ix) 但し、アンチセンス鎖の（5'末端から数えて）3～9位に2'-フルオロ修飾が存在しないことの少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8又は9つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されている $mUNA$ 及び GNA 構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、 $GNA-i so C$ 、 $GNA-i so G$ 、 $5'-mUNA$ 、 $4'-mUNA$ 、 $3'-mUNA$ 及び $2'-mUNA$ からなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、 $dsRNA$ 分子は、 GNA

、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy p-スパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (Mod A-Mod K) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃～約80℃の融解温度は、任意選択的である。

【0173】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、12～40ヌクレオチド対長の二本鎖領域を有し、ここで、アンチセンス鎖は、シード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の、5'末端から数えて5'末端の2～9位に）二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、dsRNAは、約40℃～約80℃のT_mを有し、ここで、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：(i) アンチセンスは、2、3、4、5又は6つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(ii) アンチセンスは、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(iii) センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること；(iv) センス鎖は、2、3、4又は5つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(v) センス鎖は、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(vi) dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含むこと；及び(vii) アンチセンス鎖の5'末端での平滑末端、但しアンチセンス鎖の（5'末端から数えて）3～9位に2'-フルオロ修飾が存在しないことの少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6又は7つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy p-スパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (Mod A-Mod K) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃～約80℃の融解温度は、任意選択的である。

【0174】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、19、20、21、22又は23ヌクレオチド塩基対長の二本鎖領域を有し、ここで、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）位置する二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を有し、及びdsRNAは、約40℃～約80℃の融解温度を有し、但しアンチセンス鎖の（5'末端から数えて）3～9位に2'-フルオロ修飾が存在せず、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy p-スパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (Mod A-Mod K) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、約40℃～約80℃の融解温度は、任意選択的である。

【0175】

特定の実施形態では、本発明のdsRNA分子は、
 (a) センス鎖であって、
 (i) 21ヌクレオチド長；
 (ii) 三価分岐リンカーを介して結合された3つのGalNAc誘導体を含む、3'末端に結合されたASGPRリガンド；及び
 (iii) (5'末端から数えて) 7、10及び11位の2'-F修飾を有するセンス鎖と、
 (b) アンチセンス鎖であって、
 (i) 23ヌクレオチド長；
 (ii) (5'末端から数えて) 2、14及び16位の2'-F修飾；

(i i i) (5'末端から数えて)ヌクレオチド21及び22位間並びにヌクレオチド22及び23位間のホスホロチオエートヌクレオチド間結合;及び

(i v) (5'末端から数えて)5、6又は7位の二本鎖の熱不安定化修飾を有するアンチセンス鎖とを含み、ここで、dsRNA分子は、アンチセンス鎖の3'末端に2ヌクレオチドオーバーハング、またアンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1〜3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoc、GNA-isog、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0176】

別の特定の実施形態では、本発明のdsRNA分子は、

(a) センス鎖であって、

(i) 21ヌクレオチド長;

(i i) 三価分岐リンカーを介して結合された3つのGalNAc誘導体を含む、3'末端に結合されたASGPRリガンド;

(i i i) (5'末端から数えて)7、9、10及び11位の2'-F修飾;及び

(i v) (5'末端から数えて)ヌクレオチド1及び2位間並びにヌクレオチド2及び3位間のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有するセンス鎖と、

(b) アンチセンス鎖であって、

(i) 23ヌクレオチド長;

(i i) (5'末端から数えて)2、14及び16位の2'-F修飾;

(i i i) (5'末端から数えて)ヌクレオチド1及び2位間、ヌクレオチド2及び3位間、ヌクレオチド21及び22位間並びにヌクレオチド22及び23位間のホスホロチオエートヌクレオチド間結合;及び

(i v) (5'末端から数えて)5、6又は7位の二本鎖の熱不安定化修飾を有するアンチセンス鎖とを含み、ここで、dsRNA分子は、アンチセンス鎖の3'末端に2ヌクレオチドオーバーハング、またアンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1〜3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoc、GNA-isog、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0177】

別の特定の実施形態では、本発明のdsRNA分子は、

(a) センス鎖であって、

(i) 21ヌクレオチド長;

(i i) 三価分岐リンカーを介して結合された3つのGalNAc誘導体を含む、3'末端に結合されたASGPRリガンド;

(i i i) (5'末端から数えて)7、9、10及び11位の2'-F修飾;及び

(i v) (5'末端から数えて)ヌクレオチド1及び2位間並びにヌクレオチド2及び3位間のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有するセンス鎖と、

(b) アンチセンス鎖であって、

(i) 23ヌクレオチド長;

10

20

30

40

50

(i i) (5'末端から数えて) 2、14及び16位の2'-F修飾;

(i i i) (5'末端から数えて) ヌクレオチド1及び2位間、ヌクレオチド2及び3位間、ヌクレオチド21及び22位間並びにヌクレオチド22及び23位間のホスホロチオエートヌクレオチド間結合; 及び

(i v) (5'末端から数えて) 5、6又は7位の二本鎖の熱不安定化修飾

を有するアンチセンス鎖とを含み、ここで、dsRNA分子は、アンチセンス鎖の3'末端に2ヌクレオチドオーバーハング、またアンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1〜3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoc、GNA-isog、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群 10 から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0178】

別の特定の実施形態では、本発明のdsRNA分子は、

(a) センス鎖であって、

(i) 21ヌクレオチド長;

(i i) 三価分岐リンカーを介して結合された3つのGalNAc誘導体を含む、3'末端に結合されたASGPRリガンド;

(i i i) (5'末端から数えて) 7、9、10及び11位の2'-F修飾; 及び

(i v) 少なくとも1つ(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10又はそれ以上)のLNA修飾

を有するセンス鎖と、

(b) アンチセンス鎖であって、

(i) 23ヌクレオチド長;

(i i) (5'末端から数えて) 2、14及び16位の2'-F修飾;

(i i i) (5'末端から数えて) ヌクレオチド1及び2位間、ヌクレオチド2及び3位間、ヌクレオチド21及び22位間並びにヌクレオチド22及び23位間のホスホロチオエートヌクレオチド間結合; 及び

(i v) (5'末端から数えて) 5、6又は7位の二本鎖の熱不安定化修飾

を有するアンチセンス鎖とを含み、ここで、dsRNA分子は、アンチセンス鎖の3'末端に2ヌクレオチドオーバーハング、またアンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1〜3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoc、GNA-isog、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群 30 から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0179】

別の特定の実施形態では、本発明のdsRNA分子は、

(a) センス鎖であって、

(i) 21ヌクレオチド長;

(i i) 三価分岐リンカーを介して結合された3つのGalNAc誘導体を含む、3'末端に結合されたASGPRリガンド;

(i i i) (5'末端から数えて) 7、9、10及び11位の2'-F修飾; 及び

(i v) (5'末端から数えて) 1、2及び3位の少なくとも1つ(例えば、1、2又は3)のLNA修飾

を有するセンス鎖と、

20

30

40

50

(b) アンチセンス鎖であって、
 (i) 23ヌクレオチド長；
 (ii) (5'末端から数えて) 2、14及び16位の2'-F修飾；
 (iii) (5'末端から数えて) ヌクレオチド1及び2位間、ヌクレオチド2及び3位間、ヌクレオチド21及び22位間並びにヌクレオチド22及び23位間のホスホロチオエートヌクレオチド間結合；及び
 (iv) (5'末端から数えて) 5、6又は7位の二本鎖の熱不安定化修飾
 を有するアンチセンス鎖とを含み、ここで、dsRNA分子は、アンチセンス鎖の3'末端に2ヌクレオチドオーバーハング、またアンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0180】

別の特定の実施形態では、本発明のdsRNA分子は、

(a) センス鎖であって、
 (i) 21ヌクレオチド長；
 (ii) 三価分岐リンカーを介して結合された3つのGalNAc誘導体を含む、3'末端に結合されたASGPRリガンド；
 (iii) (5'末端から数えて) 7、9、10及び11位の2'-F修飾；
 (iv) 少なくとも1つ(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10又はそれ以上)のLNA修飾；及び
 (v) (5'末端から数えて) ヌクレオチド1及び2位間並びにヌクレオチド2及び3位間のホスホロチオエートヌクレオチド間結合
 を有するセンス鎖と、

(b) アンチセンス鎖であって、
 (i) 23ヌクレオチド長；
 (ii) (5'末端から数えて) 2、14及び16位の2'-F修飾；
 (iii) (5'末端から数えて) ヌクレオチド1及び2位間、ヌクレオチド2及び3位間、ヌクレオチド21及び22位間並びにヌクレオチド22及び23位間のホスホロチオエートヌクレオチド間結合；及び
 (iv) (5'末端から数えて) 5、6又は7位の二本鎖の熱不安定化修飾
 を有するアンチセンス鎖とを含み、ここで、dsRNA分子は、アンチセンス鎖の3'末端に2ヌクレオチドオーバーハング、またアンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0181】

別の特定の実施形態では、本発明のdsRNA分子は、

(a) センス鎖であって、
 (i) 21ヌクレオチド長；
 (ii) 三価分岐リンカーを介して結合された3つのGalNAc誘導体を含む、3'末端に結合されたASGPRリガンド；

(i i i) (5'末端から数えて) 7、9、10及び11位の2'-F修飾；及び
 (i v) (5'末端から数えて) 1、2及び3位の少なくとも1つ（例えば、1、2又は3）のLNA修飾
 を有するセンス鎖と、

(b) アンチセンス鎖であって、

(i) 23ヌクレオチド長；

(i i) (5'末端から数えて) 2、14及び16位の2'-F修飾；

(i i i) (5'末端から数えて) ヌクレオチド1及び2位間、ヌクレオチド2及び3位間、ヌクレオチド21及び22位間並びにヌクレオチド22及び23位間のホスホロチオエートヌクレオチド間結合；及び

(i v) (5'末端から数えて) 5、6又は7位の二本鎖の熱不安定化修飾

を有するアンチセンス鎖とを含み、ここで、dsRNA分子は、アンチセンス鎖の3'末端に2ヌクレオチドオーバーハング、またアンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-i so C、GNA-i so G、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy p-スパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (Mod A-Mod K) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0182】

別の特定の実施形態では、本発明のdsRNA分子は、

(a) センス鎖であって、

(i) 21ヌクレオチド長；

(i i) 三価分岐リンカーを介して結合された3つのGalNAc誘導体を含む、3'末端に結合されたASGPRリガンド；

(i i i) (5'末端から数えて) 7、9、10及び11位の2'-F修飾；

(i v) (5'末端から数えて) 1、2及び3位の少なくとも1つ（例えば、1、2又は3）のLNA修飾；及び

(i v) (5'末端から数えて) ヌクレオチド1及び2位間並びにヌクレオチド2及び3位間のホスホロチオエートヌクレオチド間結合

を有するセンス鎖と、

(b) アンチセンス鎖であって、

(i) 23ヌクレオチド長；

(i i) (5'末端から数えて) 2、14及び16位の2'-F修飾；

(i i i) (5'末端から数えて) ヌクレオチド1及び2位間、ヌクレオチド2及び3位間、ヌクレオチド21及び22位間並びにヌクレオチド22及び23位間のホスホロチオエートヌクレオチド間結合；及び

(i v) (5'末端から数えて) 5、6又は7位の二本鎖の熱不安定化修飾

を有するアンチセンス鎖とを含み、ここで、dsRNA分子は、アンチセンス鎖の3'末端に2ヌクレオチドオーバーハング、またアンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-i so C、GNA-i so G、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hy p-スパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (Mod A-Mod K) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0183】

一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖は、独立して、19、20、21、2

2、23、24又は25ヌクレオチド長であり、ここで、アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを有し、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：（i）アンチセンスは、2、3、4、5又は6つの2'-フルオロ修飾を含むこと；（ii）アンチセンスは、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；（iii）センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること；（iv）センス鎖は、2、3、4又は5つの2'-フルオロ修飾を含むこと；（v）センス鎖は、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；（vi）dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含むこと；（vii）dsRNAは、18、19、20、21、22、23、24又は24ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；及び（viii）dsRNAは、センス鎖の5'末端に平滑末端を含むことの少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6、7又は8つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyp-スパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA（ModA-ModK）からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の特定の実施形態では、センス鎖は、19、20又は21又は22ヌクレオチド長であり、アンチセンス鎖は、20、21又は22ヌクレオチド長である。

【0184】

センス鎖及びアンチセンス鎖は、典型的には、二本鎖dsRNAを形成する。dsRNA分子の二本鎖領域は、12～40ヌクレオチド対長であり得る。例えば、二本鎖領域は、14～40ヌクレオチド対長、17～30ヌクレオチド対長、25～35ヌクレオチド対長、27～35ヌクレオチド対長、17～23ヌクレオチド対長、17～21ヌクレオチド対長、17～19ヌクレオチド対長、19～25ヌクレオチド対長、19～23ヌクレオチド対長、19～21ヌクレオチド対長、21～25ヌクレオチド対長又は21～23ヌクレオチド対長であり得る。別の例では、二本鎖領域は、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26及び27ヌクレオチド対長から選択される。

【0185】

一部の実施形態では、本発明のdsRNA分子は、12～40ヌクレオチド対長の二本鎖領域を有し、ここで、アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを有し、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：（i）アンチセンスは、2、3、4、5又は6つの2'-フルオロ修飾を含むこと；（ii）アンチセンスは、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；（iii）センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること；（iv）センス鎖は、2、3、4又は5つの2'-フルオロ修飾を含むこと；（v）センス鎖は、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；及び（vi）dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含むこと；及び（vii）dsRNAは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を含むことの少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6又は7つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyp-スパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA（ModA-ModK）からなる群から選択される少なくとも1つの熱

不安定化修飾をさらに含む。一部の特定の実施形態では、二本鎖領域は、18、19、20、21、22又は23ヌクレオチド対長である。特定の実施形態では、二本鎖領域は、21ヌクレオチド対長である。

【0186】

一部の実施形態では、本発明のdsRNA分子は、鎖の3'末端又は5'末端又は両末端に、dsRNA分子の1つ以上のオーバーハング領域及び／又はキャッピング基を含む。オーバーハングは、1～10ヌクレオチド長、1～6ヌクレオチド長、例えば2～6ヌクレオチド長、1～5ヌクレオチド長、2～5ヌクレオチド長、1～4ヌクレオチド長、2～4ヌクレオチド長、1～3ヌクレオチド長、2～3ヌクレオチド長又は1～2ヌクレオチド長であり得る。オーバーハングは、一方の鎖が他方の鎖よりも長いことの結果又は同じ長さの2本の鎖がねじれ形であることの結果であり得る。オーバーハングは、標的mRNAとミスマッチを形成し得るか、又は標的化されている遺伝子配列に対して相補的であり得るか、又は他の配列であり得る。第1鎖と第2鎖は、例えば、ヘアピンを形成するための追加的塩基又は他の非塩基リンカーによっても連結され得る。

【0187】

一部の実施形態では、本発明のdsRNA分子のオーバーハング領域内のヌクレオチドは、各々独立して、修飾又は非修飾ヌクレオチド、例えば、限定はされないが、2'-糖修飾、例えば2'-フルオロ2'-O-メチル、チミジン(T)、2'-O-メトキシエチル-5-メチルウリジン、2'-O-メトキシエチルアデノシン、2'-O-メトキシエチル-5-メチルシチジン、GNA、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA、h'GNA及びそれらの任意の組み合わせであり得る。例えば、TTは、片鎖上の片末端におけるオーバーハング配列であり得る。オーバーハングは、標的mRNAとミスマッチを形成し得るか、又は標的化されている遺伝子配列に対して相補的であり得るか、又は他の配列であり得る。

【0188】

本発明のdsRNA分子のセンス鎖、アンチセンス鎖又は両鎖での5'又は3'オーバーハングは、リン酸化され得る。一部の実施形態では、オーバーハング領域は、2つのヌクレオチド間にホスホロチオエートを有する2つのヌクレオチドを含み、ここで、2つのヌクレオチドは、同じであるか又は異なり得る。一部の実施形態では、オーバーハングは、センス鎖、アンチセンス鎖又は両鎖の3'末端に存在する。一部の実施形態では、この3'オーバーハングは、アンチセンス鎖内に存在する。一部の実施形態では、この3'オーバーハングは、センス鎖内に存在する。

【0189】

本発明のdsRNA分子は、dsRNAの干渉活性を、その全体的安定性に影響することなく強化し得るような単一オーバーハングのみを含み得る。例えば、一本鎖オーバーハングは、センス鎖の3'末端又は代替的にはアンチセンス鎖の3'末端に位置する。dsRNAは、アンチセンス鎖の5'末端(又はセンス鎖の3'末端)又はその逆に位置する平滑末端も有し得る。一般に、dsRNAのアンチセンス鎖は、3'末端にヌクレオチドオーバーハングを有し、5'末端は平滑末端である。理論によって拘束されないが、アンチセンス鎖の5'末端及びアンチセンス鎖の3'末端オーバーハングでの非対称平滑末端は、RISCプロセスに負荷するガイド鎖を支持する。例えば、単一オーバーハングは、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9又は10ヌクレオチド長を含む。一部の実施形態では、dsRNAは、アンチセンス鎖の3'末端及びアンチセンス鎖の5'末端での平滑末端に2ヌクレオチドオーバーハングを有する。

【0190】

一部の実施形態では、dsRNAの一方の末端は、平滑末端であり、且つ他方の末端は、オーバーハングを有し、ここで、アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを有し、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に(すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に)存在し、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴:(i)アンチセンスは、2、3、4、5又は6つの2'-フルオロ

修飾を含むこと；(i i) アンチセンスは、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(i i i) センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること；(i v) センス鎖は、2、3、4又は5つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(v) センス鎖は、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(v i) dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含むこと；及び(v i i) dsRNAは、12～40ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むことの少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6又は7つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoc、GNA-isog、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、オーバーハングは、アンチセンス鎖の3'末端上に存在し、平滑末端は、アンチセンス鎖の5'末端に存在する。一部の特定の実施形態では、オーバーハングは、2、3又は4ヌクレオチド長である。

【0191】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、19、20、21、22又は23ヌクレオチド塩基対長の二本鎖領域を有し、ここで、dsRNAの一方の末端は、平滑末端であり、且つ他方の末端は、オーバーハングを有し、ここで、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）位置する二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を有し、及びdsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：

(i) アンチセンスは、2、3、4、5又は6つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(i i) アンチセンスは、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(i i i) センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること；(i v) センス鎖は、2、3、4又は5つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(v) センス鎖は、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；及び(v i) dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含み、且つ任意選択的に、2ヌクレオチドオーバーハングは、アンチセンス鎖の3'末端上に存在し、且つ平滑末端は、アンチセンス鎖の5'末端に存在することの少なくとも1つ（例えば、1、2、3、5又は6つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoc、GNA-isog、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。一部の実施形態では、オーバーハングは、アンチセンス鎖の3'末端上に存在し、且つ平滑末端は、アンチセンス鎖の5'末端に存在する。

【0192】

一部の実施形態では、本発明のdsRNA分子は、dsRNA二本鎖の両末端に2つの平滑末端も有し得る。

【0193】

一部の実施形態では、dsRNAは、二本鎖の両末端に平滑末端を有し、ここで、アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを有し、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）存在し、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：(i) アンチセンスは、2、3、4、5又は6つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(i i) アンチセンスは、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(i i i) センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること；(i v) センス鎖は、2、3

、4又は5つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(v)センス鎖は、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(vi)dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含むこと；及び(vii)dsRNAは、12～40ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むことの少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6又は7つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyプーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

10

【0194】

一部の実施形態では、dsRNA分子は、19、20、21、22又は23ヌクレオチド塩基対長の二本鎖領域を有し、二本鎖の両末端に平滑末端を有し、ここで、dsRNAの一方の末端は、平滑末端であり、且つ他方の末端は、オーバーハングを有し、ここで、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）位置する二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を有し、及びdsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：(i)アンチセンスは、2、3、4、5又は6つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(ii)アンチセンスは、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(iii)センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること；(iv)センス鎖は、2、3、4又は5つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(v)センス鎖は、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；及び(vi)dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含むことの少なくとも1つ（例えば、1、2、3、5又は6つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyプーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

20

30

【0195】

熱不安定化修飾

上記の通り、dsRNA分子は、オフターゲット遺伝子サイレンシングを低減又は阻害するため、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）熱不安定化修飾を組み込むことにより、RNA干渉について最適化され得る。本発明者らは、アンチセンス鎖の5'末端から数えて最初の9つのヌクレオチド位置内に二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含むアンチセンス鎖を有するdsRNAが、オフターゲット遺伝子サイレンシング活性を低下させていることを発見している。したがって、一部の実施形態では、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の5'領域の最初の9つのヌクレオチド位置内に二本鎖の少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5又はそれ以上）の熱不安定化修飾を含む。一部の実施形態では、二本鎖の熱不安定化修飾は、アンチセンス鎖の5'末端から2～9位又は好ましくは4～8位に位置する。一部のさらなる実施形態では、二本鎖の熱不安定化修飾は、アンチセンス鎖の5'末端から6、7又は8位に位置する。

40

【0196】

さらに一部のさらなる実施形態では、二本鎖の熱不安定化修飾は、アンチセンス鎖の5'末端から7位に位置する。用語「熱不安定化修飾」は、より低い完全融解温度(T_m)（好ましくは、かかる修飾を有しない場合のdsRNAの T_m よりも1、2、3又は4℃低い T_m を有するdsRNAをもたらすことになる修飾を含む。一部の実施形態では、二本

50

鎖の熱不安定化修飾は、アンチセンス鎖の 5' 末端から 2、3、4、5 又は 9 位に位置する。

【0197】

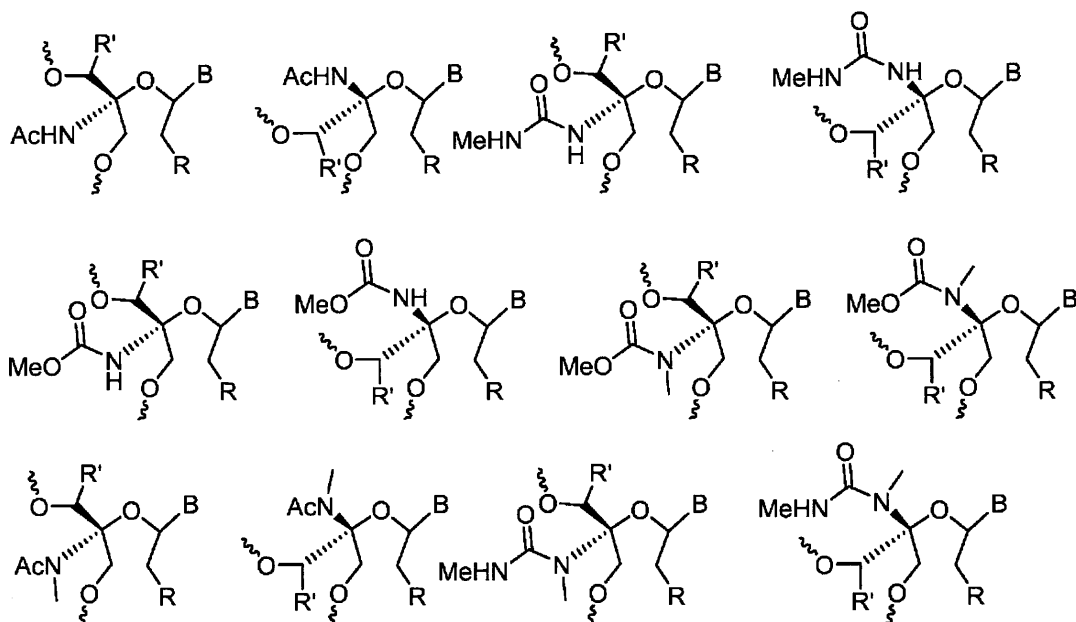
熱不安定化修飾は、限定はされないが、脱塩基修飾；逆鎖における対向するヌクレオチドとのミスマッチ；及び糖修飾、例えば 2'-デオキシ修飾又は非環状ヌクレオチド、例えばアンロックド核酸（UNA）又はグリコール核酸（GNA）を含み得る。例えば、熱不安定化修飾として、限定はされないが、本明細書の実施例 1～3 に記載されている mUNA 及び GNA 構成要素を挙げることができる。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA 及び 2'-mUNA からなる群から選択される。

10

【0198】

一部の実施形態では、不安定化修飾 mUNA は、

【化10】



20

30

（式中、

R は、H、OH；OMe；Cl、F；OH；O-(CH₂)₂OMe；SMe、NMe₂；NH₂；Me；CCH（アルキン）、O-nPr；O-アルキル；又は O-アルキルアミノであり；

R' は、H 又は Me であり、

B は、A；C；5-Me-C；G；I；U；T；Y；2-チオウリジン；4-チオウリジン；C5 修飾ピリミジン；C2 修飾プリン；N8 修飾プリン；フェノキサジン；G クランプ；非正準の単環式、二環式及び三環式複素環；シュードウラシル；isoC；isoG；2,6-ジアミノプリン；シュードシトシン；2-アミノプリン；キサントシン；N6-アルキル-A；O6-アルキル-G；2-チオウリジン；4-チオウリジン；C5 修飾ピリミジン；C2 修飾プリン；N8 修飾プリン；7-デアザプリン、フェノキサジン；G クランプ；又は非正準の単環式、二環式及び三環式複素環であり、及び立体化学は、不特定のキラル中心について R 又は S 及び R と S との組み合わせである）からなる群から選択される。

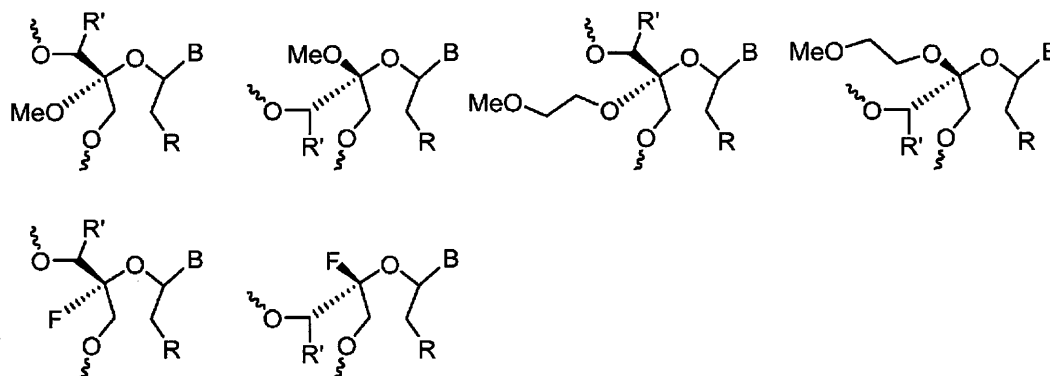
40

【0199】

一部の実施形態では、不安定化修飾 mUNA は、

50

【化 1 1】



10

(式中、

Rは、H、OH；OMe；Cl、F；OH；O-(CH₂)₂OMe；SMe、NMe₂；NH₂；Me；CCH(アルキン)、O-nPr；O-アルキル；又はO-アルキルアミノであり；

R'は、H又はMeであり、

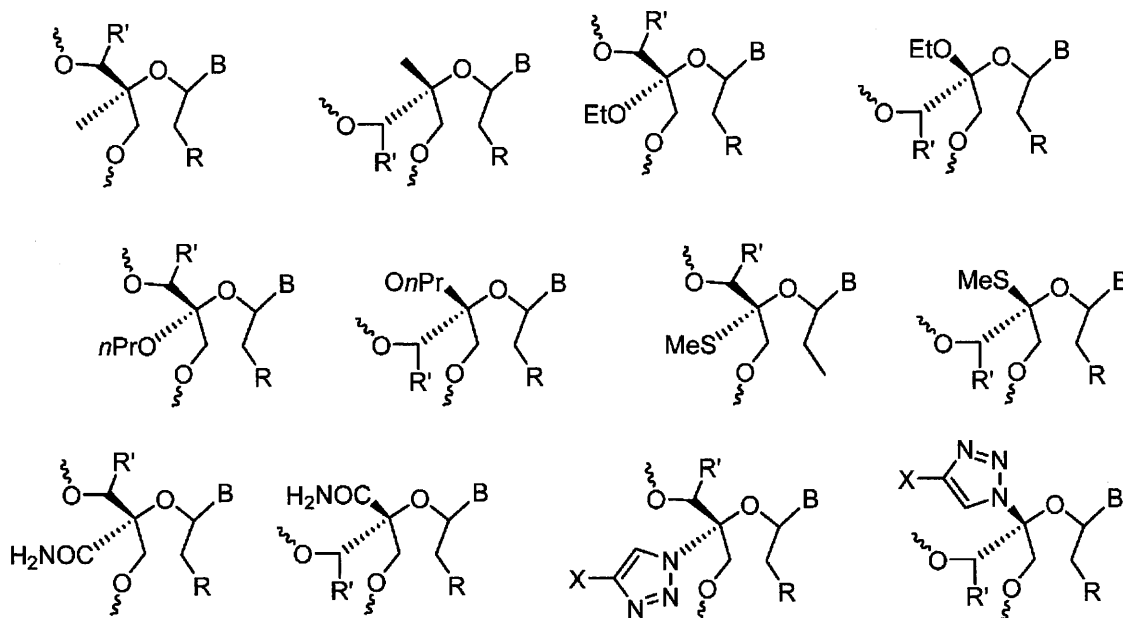
Bは、A；C；5-Me-C；G；I；U；T；Y；2-チオウリジン；4-チオウリジン；C5修飾ピリミジン；C2修飾プリン；N8修飾プリン；フェノキサジン；Gクランプ；非正準の単環式、二環式及び三環式複素環；シュドウラシル；isoC；isoG；2,6-ジアミノプリン；シュードシトシン；2-アミノプリン；キサントシン；N6-アルキル-A；O6-アルキル-G；2-チオウリジン；4-チオウリジン；C5修飾ピリミジン；C2修飾プリン；N8修飾プリン；7-デアザプリン、フェノキサジン；Gクランプ；又は非正準の単環式、二環式及び三環式複素環であり、及び立体化学は、不特定のキラル中心についてR又はS及びRとSとの組み合わせである）からなる群から選択される。

20

【0200】

一部の実施形態では、不安定化修飾mUNAは、

【化 1 2】



40

(式中、

50

Rは、H、OMe；F；OH；O-(CH₂)₂OMe；SMe、NMe₂；NH₂；Me；O-nPr；O-アルキル；又はO-アルキルアミノであり；

R'は、H又はMeであり、

Bは、A；C；5-Me-C；G；I；U；T；Y；2-チオウリジン；4-チオウリジン；C5修飾ピリミジン；C2修飾プリン；N8修飾プリン；フェノキサジン；Gクランプ；非正準の単環式、二環式及び三環式複素環；シュードウラシル；isoC；isoG；2，6-ジアミノプリン；シュードシトシン；2-アミノプリン；キサントシン；N6-アルキル-A；O6-アルキル-G；又は7-デアザプリンであり、及び

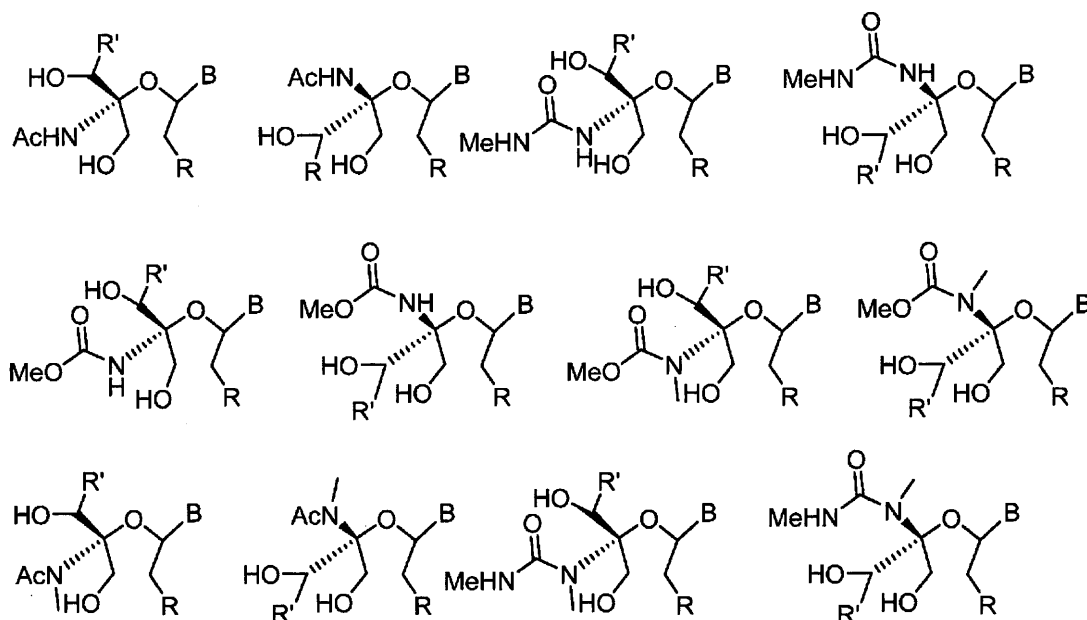
立体化学は、不特定のキラル中心についてR又はS及びRとSとの組み合わせである）
からなる群から選択される。

10

【0201】

一部の実施形態では、不安定化修飾mUNAは、

【化13】



20

30

（式中、

Rは、H、OH；OMe；Cl、F；OH；O-(CH₂)₂OMe；SMe、NMe₂；NH₂；Me；CCH（アルキン）、O-nPr；O-アルキル；又はO-アルキルアミノであり；

R'は、H又はMeであり；

Bは、A；C；5-Me-C；G；I；U；T；Y；2-チオウリジン；4-チオウリジン；C5修飾ピリミジン；C2修飾プリン；N8修飾プリン；フェノキサジン；Gクランプ；非正準の単環式、二環式及び三環式複素環；シュードウラシル；isoC；isoG；2，6-ジアミノプリン；シュードシトシン；2-アミノプリン；キサントシン；N6-アルキル-A；O6-アルキル-G；2-チオウリジン；4-チオウリジン；C5修飾ピリミジン；C2修飾プリン；N8修飾プリン；7-デアザプリン、フェノキサジン；Gクランプ；又は非正準の単環式、二環式及び三環式複素環であり、及び

立体化学は、不特定のキラル中心についてR又はS及びRとSとの組み合わせである）
からなる群から選択される。

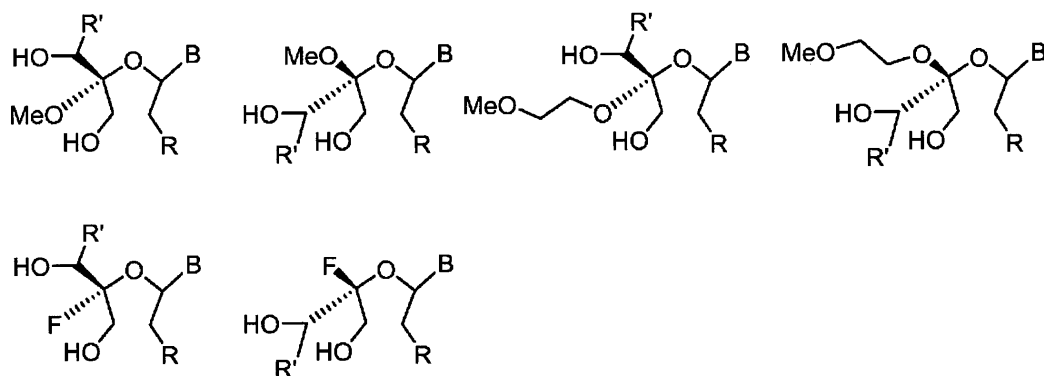
40

【0202】

一部の実施形態では、不安定化修飾mUNAは、

50

【化 1 4】



10

(式中、

Rは、H、OH；OMe；Cl、F；OH；O-(CH₂)₂OMe；SMe、NMe₂；NH₂；Me；CCH(アルキン)、O-nPr；O-アルキル；又はO-アルキルアミノであり；

R'は、H又はMeであり、

Bは、A；C；5-Me-C；G；I；U；T；Y；2-チオウリジン；4-チオウリジン；C5修飾ピリミジン；C2修飾プリン；N8修飾プリン；フェノキサジン；Gクランプ；非正準の単環式、二環式及び三環式複素環；シュドウラシル；isoC；isoG；2,6-ジアミノプリン；シュードシトシン；2-アミノプリン；キサントシン；N6-アルキル-A；O6-アルキル-G；2-チオウリジン；4-チオウリジン；C5修飾ピリミジン；C2修飾プリン；N8修飾プリン；7-デアザプリン、フェノキサジン；Gクランプ；又は非正準の単環式、二環式及び三環式複素環であり、及び立体化学は、不特定のキラル中心についてR又はS及びRとSとの組み合わせである）からなる群から選択される。

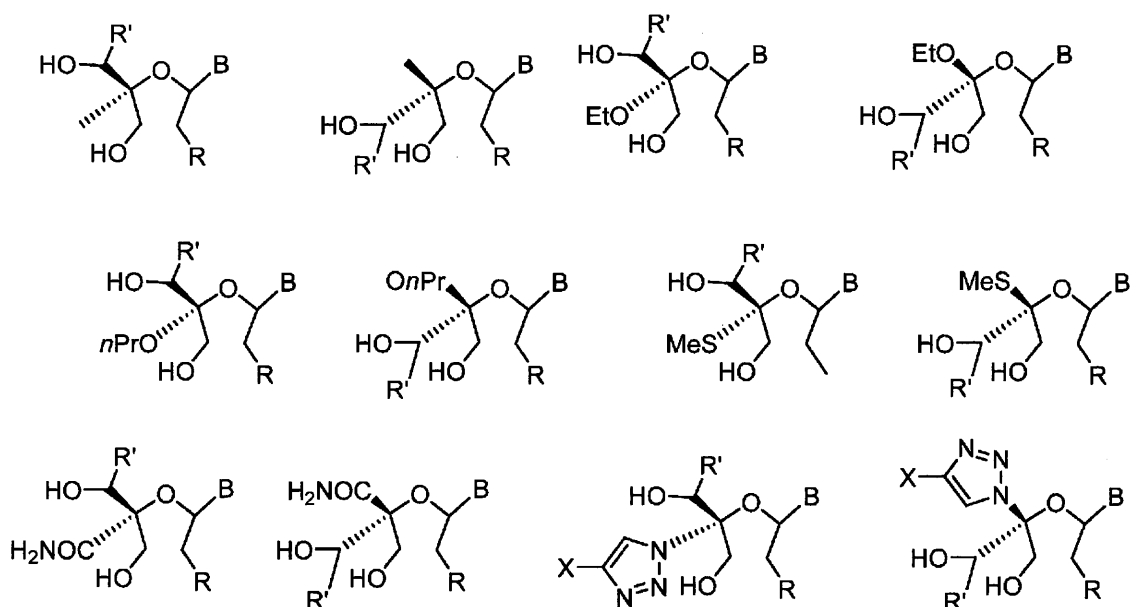
20

【0203】

一部の実施形態では、修飾mUNAは、

【化 1 5】

30



40

(式中、

50

R は、H、OMe；F；OH；O-(CH₂)₂OMe；SMe、NMe₂；NH₂；Me；O-nPr；O-アルキル；又はO-アルキルアミノであり；

R' は、H又はMeであり、

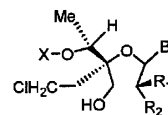
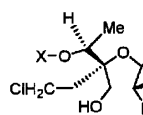
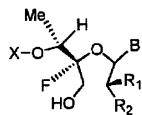
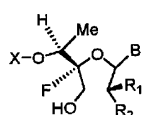
B は、A；C；5-Me-C；G；I；U；T；Y；2-チオウリジン；4-チオウリジン；C5修飾ピリミジン；C2修飾プリン；N8修飾プリン；フェノキサジン；Gクランブ；非正準の単環式、二環式及び三環式複素環；シュードウラシル；isoC；isoG；2,6-ジアミノプリン；シュードシトシン；2-アミノプリン；キサントシン；N6-アルキル-A；O6-アルキル-G；又は7-デアザプリンであり、及び

立体化学は、不特定のキラル中心についてR又はS及びRとSとの組み合わせである）
からなる群から選択される。

【0204】

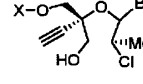
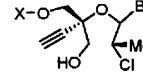
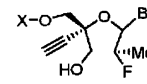
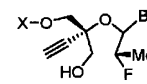
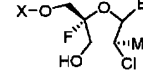
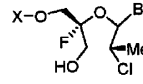
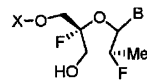
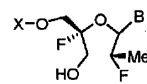
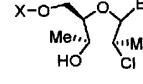
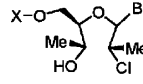
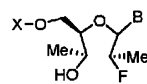
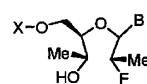
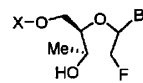
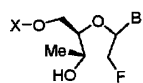
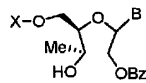
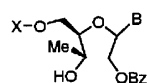
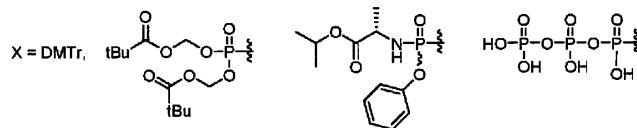
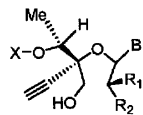
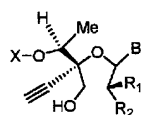
一部の実施形態では、修飾mUNAは、

【化16】



R₁, R₂ = OTBS; F, H, Me, Cl

B=A^{Bz}; C^{Bz}; 5-Me-C^{Bz}; G; I; U; T; Y; 2-チオウリジン; 4-チオウリジン; C5修飾ピリミジン; C2修飾プリン; N8修飾プリン; フェノキサジン; Gクランブ; 非正準の単環式、二環式及び三環式複素環; シュードウラシル isoC; isoG; 2,6-ジアミノプリン; シュードシトシン; 2-アミノプリン; キサントシン; N6-アルキル-A; O6-アルキル-G; 7-デアザプリン



10

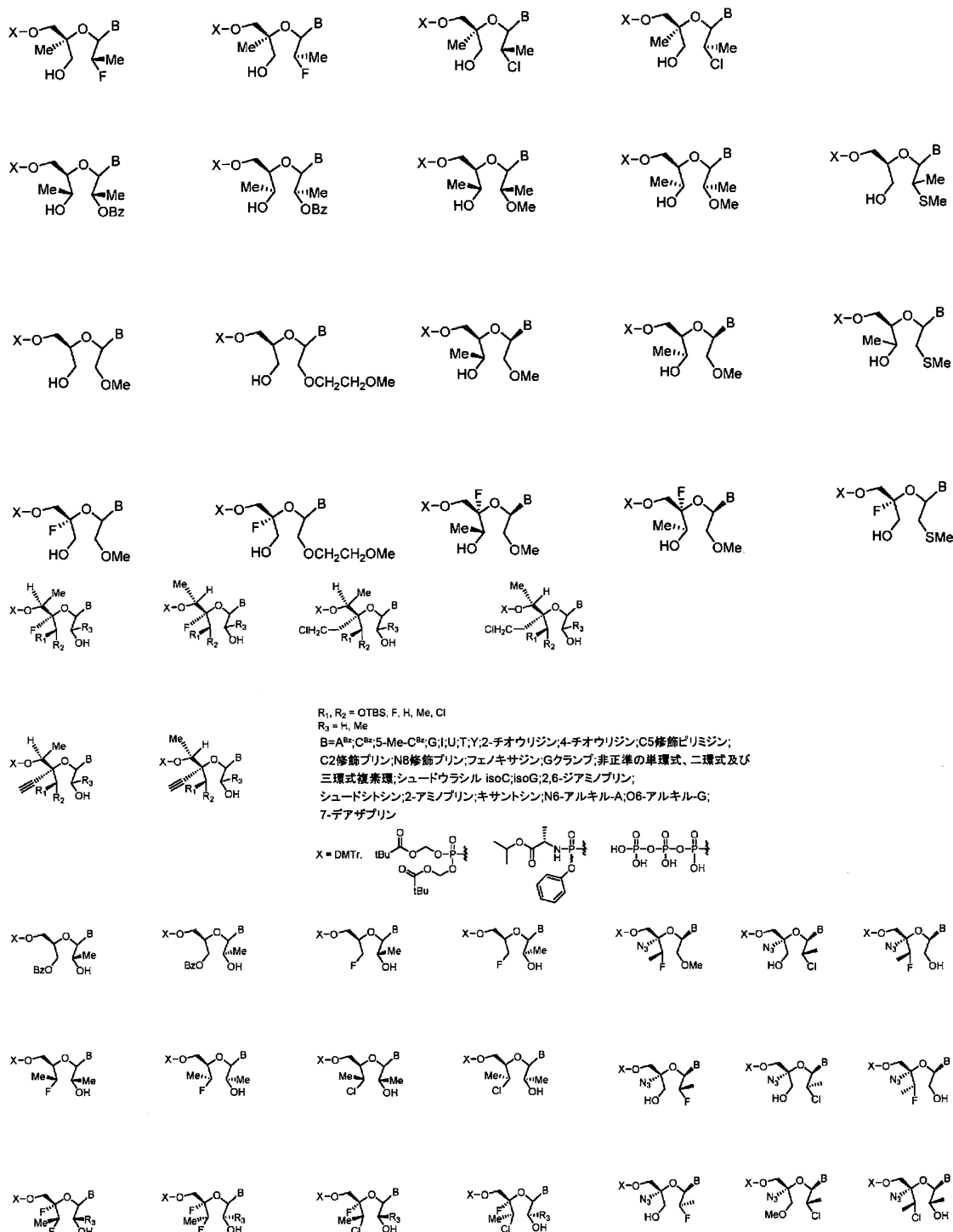
20

30

40

50

【化 17】



10

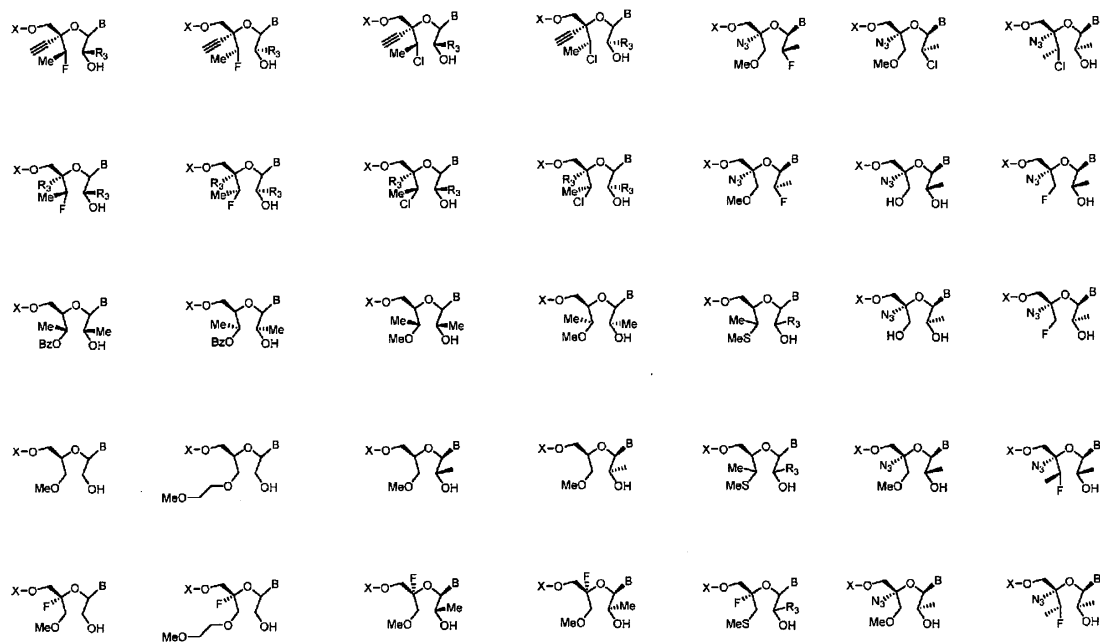
20

30

40

50

【化 18】



10

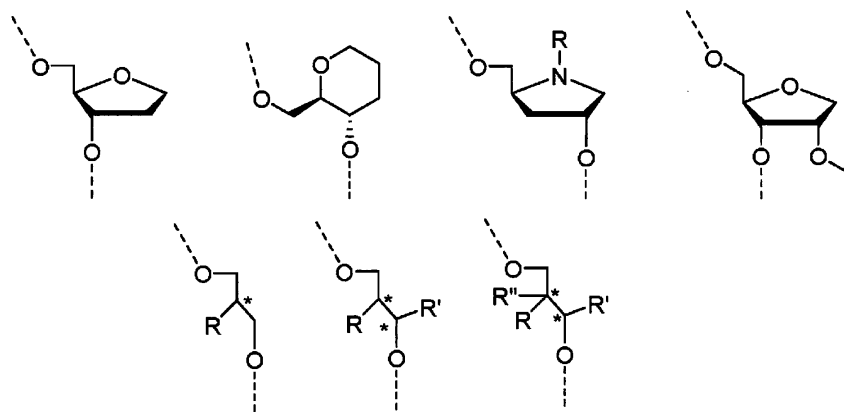
20

からなる群から選択される。

【0205】

例示的な脱塩基修飾は、限定はされないが、以下：

【化 19】



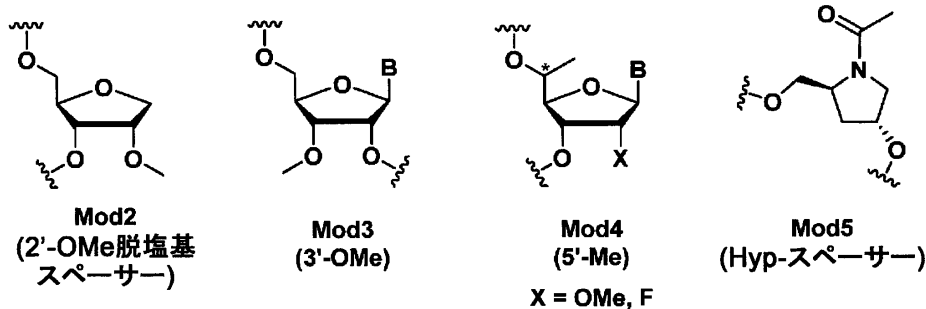
30

(式中、Rは、H、Me、Et又はOMeであり；R'は、H、Me、Et又はOMeであり；R''=H、Me、Et又はOMeである)

40

50

【化 2 0】



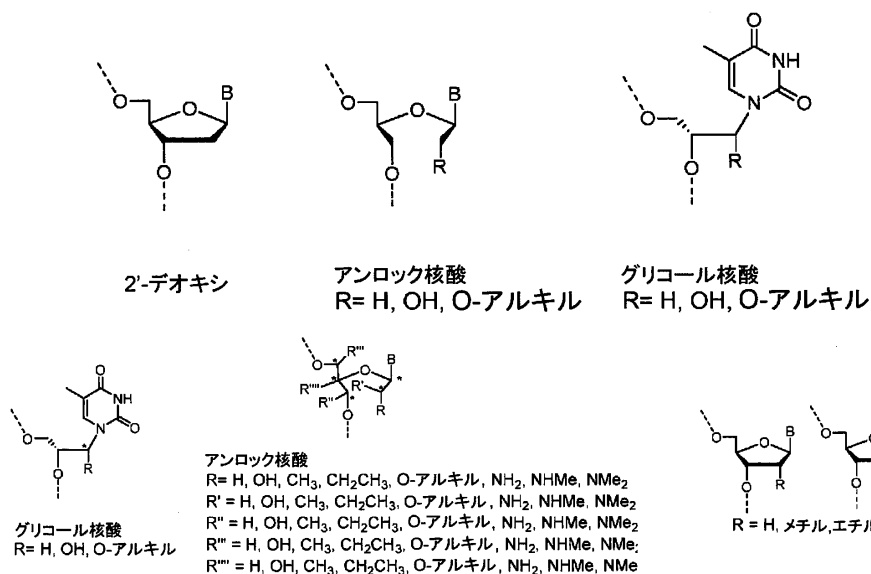
10

(式中、B は、修飾又は非修飾核酸塩基であり、及び各構造上のアスタリスクは、R、S 又はラセミのいずれかを表す)
を含む。

【0 2 0 6】

例示的な糖修飾は、限定はされないが、以下：

【化 2 1】



20

30

(式中、B は、修飾又は非修飾核酸塩基であり、及び各構造上のアスタリスクは、R、S 又はラセミのいずれかを表す)
を含む。

【0 2 0 7】

一部の実施形態では、二本鎖の熱不安定化修飾は、本明細書の実施例 1～3 に記載されている mUNA 及び GNA 構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA 及び 2'-mUNA からなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA 分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyp-スペーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA 及び h'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも 1 つの熱不安定化修飾をさらに含む。

40

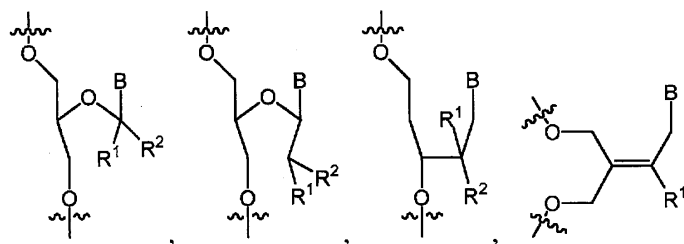
【0 2 0 8】

用語「非環状ヌクレオチド」は、例えば、リボース炭素間の結合のいずれか (例えば、C1'-C2'、C2'-C3'、C3'-C4'、C4'-O4' 又は C1'-O4') が不在であり、且つ／又はリボース炭素若しくは酸素の少なくとも 1 つ (例えば、C1'、C2'、C3'、

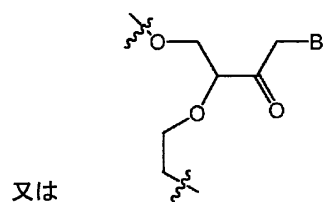
50

、C 4 ' 又は O 4 ') が独立して又は組み合わせてヌクレオチドから不在である場合、非環状リボース糖を有する任意のヌクレオチドを指す。一部の実施形態では、非環状ヌクレオチドは、

【化 2 2】



10



又は

(式中、B は、修飾又は非修飾核酸塩基であり、R¹ 及び R² は、独立して、H、ハロゲン、OR₃ 又はアルキルであり；且つ R₃ は、H、アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール又は糖である)

20

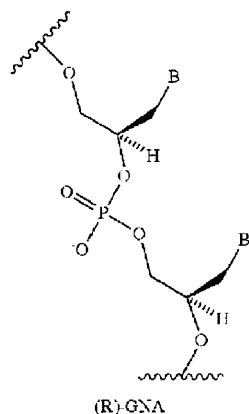
である。用語「UNA」は、アンロックド非環状核酸を指し、ここで、糖の結合のいずれかは除去されており、アンロックド「糖」残基を形成する。一例では、UNA は、C 1 ' - C 4 ' 間の結合（すなわち C 1 ' 及び C 4 ' 炭素間の炭素-酸素-炭素共有結合）が除去されている単量体も包含する。別の例では、糖の C 2 ' - C 3 ' 結合（すなわち C 2 ' 及び C 3 ' 炭素間の炭素-炭素共有結合）が除去される (Mikhailov et. al., Tetrahedron Letters, 26 (17): 2059 (1985)；及び Fluit et al., Mol. Biosyst., 10: 1039 (2009) (ここで、それら全体が参照により援用される) を参照)。非環状誘導体は、ワトソン・クリック対合に影響することなく、より大きい骨格の柔軟性をもたらす。非環状ヌクレオチドは、2 ' - 5 ' 又は 3 ' - 5 ' 結合を介して連結され得る。

30

【0 2 0 9】

用語「GNA」は、DNA 又は RNA に類似するが、その「骨格」の組成においてホスホジエステル結合によって連結される反復グリセロール単位から構成される点で異なるポリマーであるグリコール核酸を指す。

【化 2 3】



(R)-GNA

40

50

【0210】

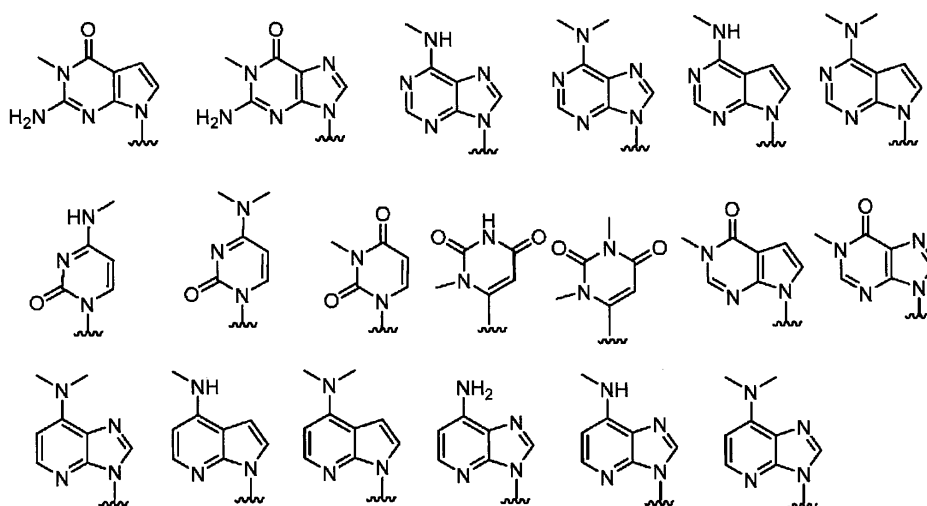
二本鎖の熱不安定化修飾は、dsRNA二本鎖内で、熱不安定化ヌクレオチドと逆鎖内の対向するヌクレオチドとの間でミスマッチ（すなわち非相補性塩基対）であり得る。例示的なミスマッチ塩基対として、G：G、G：A、G：U、G：T、A：A、A：C、C：C、C：U、C：T、U：U、T：T、U：T又はそれらの組み合わせが挙げられる。当技術分野で公知の他のミスマッチ塩基対形成も本発明に従う。ミスマッチは、天然に存在するヌクレオチド又は修飾ヌクレオチドのいずれかのヌクレオチド間で生じ得、すなわちミスマッチ塩基対形成は、ヌクレオチドのリボース糖上の修飾と独立して、各々のヌクレオチドからの核酸塩基間で生じ得る。特定の実施形態では、dsRNA分子は、2'-デオキシ核酸塩基である、ミスマッチ対合における少なくとも1つの核酸塩基を有し；例えば、2'-デオキシ核酸塩基は、センス鎖内に存在する。

10

【0211】

一部の実施形態では、アンチセンス鎖のシード領域内の二本鎖の熱不安定化修飾は、標的mRNA上の相補性塩基に対する障害されたW-C H結合を有するヌクレオチドを含み、例えば、

【化24】



20

30

が挙げられる。

【0212】

脱塩基ヌクレオチド、非環状ヌクレオチド修飾（UNA及びGNAを含む）及びミスマッチ修飾のより多くの例が、国際公開第2011/133876号パンフレット（その全体が参照により本明細書中に援用される）中に詳述されている。

【0213】

熱不安定化修飾は、対向塩基と水素結合を形成する能力が低下又は消失したユニバーサル塩基及びリン酸修飾も含み得る。

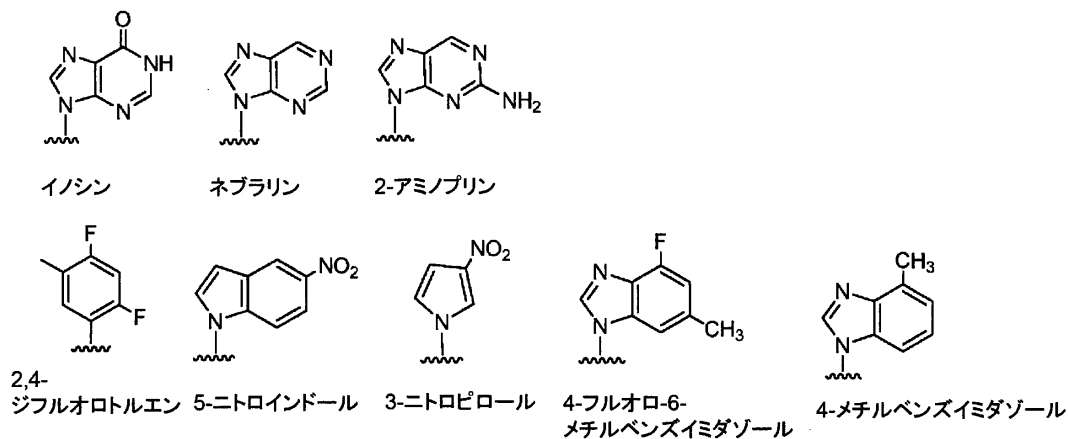
40

【0214】

一部の実施形態では、二本鎖の熱不安定化修飾は、限定はされないが、逆鎖内の塩基と水素結合を形成する能力が損なわれるか又は完全に失われた核酸塩基修飾などの非標準塩基を有するヌクレオチドを含む。これらの核酸塩基修飾は、国際公開第2010/0011895号パンフレット（その全体が参照により本明細書中に援用される）中に記載の通り、dsRNA二本鎖の中心的領域の不安定化について評価されている。例示的な核酸塩基修飾は次の通りである。

50

【化 2 5】

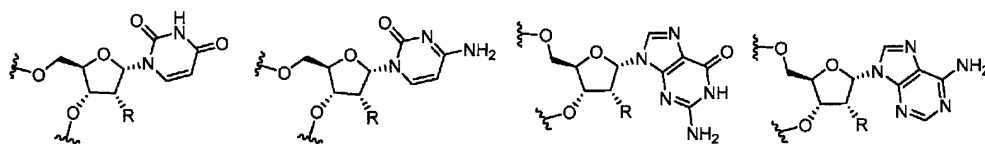


10

【0 2 1 5】

一部の実施形態では、アンチセンス鎖のシード領域内の二本鎖の熱不安定化修飾は、標的 mRNA 上の塩基に対して相補的な 1 つ以上の α -ヌクレオチド、例えば、

【化 2 6】



20

(式中、R は、H、OH、OCH₃、F、NH₂、NHMe、NMe₂ 又は O-アルキルである)

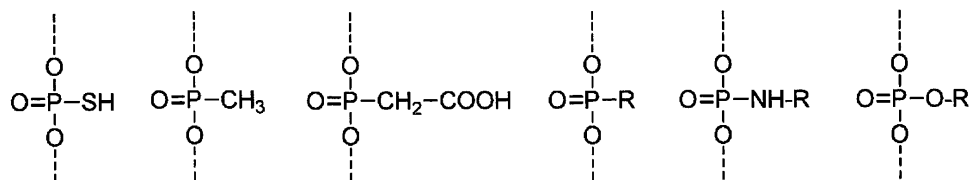
を含む。

【0 2 1 6】

天然リン酸ジエステル結合と比べて、dsRNA 二本鎖の熱安定性を低下させることで知られる例示的なリン酸修飾として、

30

【化 2 7】



R=アルキル

40

が挙げられる。

【0 2 1 7】

R 基におけるアルキルは、C₁~C₆ アルキルである。R 基における具体的なアルキルとして、限定はされないが、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、ペンチル及びヘキシルが挙げられる。

【0 2 1 8】

一部の実施形態では、例示的な不安定化修飾は、図 1 に示される。

【0 2 1 9】

熱不安定化修飾を含むアンチセンス鎖に加えて、dsRNA は、1 つ以上の安定化修飾

50

も含み得る。例えば、dsRNAは、少なくとも2つ（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10又はそれ以上）の安定化修飾を含み得る。限定はされないが、安定化修飾は全て、片鎖内に存在し得る。一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖の両方は、少なくとも2つの安定化修飾を含む。安定化修飾は、センス鎖又はアンチセンス鎖の任意のヌクレオチド上に存在し得る。例えば、安定化修飾は、センス鎖及び／又はアンチセンス鎖上の全てのヌクレオチド上に存在し得るか；各安定化修飾は、センス鎖又はアンチセンス鎖上に交互パターンで存在し得るか；又はセンス鎖又はアンチセンス鎖は、両方の安定化修飾を交互パターンで含む。センス鎖上の安定化修飾の交互パターンは、アンチセンス鎖と同じであるか又は異なり得、センス鎖上の安定化修飾の交互パターンは、アンチセンス鎖上の安定化修飾の交互パターンに対する変化を有し得る。

10

【0220】

一部の実施形態では、アンチセンス鎖は、少なくとも2つ（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10又はそれ以上）の安定化修飾を含む。限定はされないが、アンチセンス鎖における安定化修飾は、任意の位置に存在し得る。一部の実施形態では、アンチセンス鎖は、5'末端から2、6、8、9、14及び16位に安定化修飾を含む。一部の他の実施形態では、アンチセンス鎖は、5'末端から2、6、14及び16位に安定化修飾を含む。さらに一部の他の実施形態では、アンチセンス鎖は、5'末端から2、14及び16位に安定化修飾を含む。

【0221】

一部の実施形態では、アンチセンス鎖は、不安定化修飾に隣接した少なくとも1つの安定化修飾を含む。例えば、安定化修飾は、不安定化修飾の5'末端又は3'末端、すなわち不安定化修飾の位置から-1又は+1位のヌクレオチドであり得る。一部の実施形態では、アンチセンス鎖は、不安定化修飾の5'末端及び3'末端の各々、すなわち不安定化修飾の位置から-1及び+1位に安定化修飾を含む。一部の実施形態では、アンチセンス鎖は、不安定化修飾の3'末端、すなわち不安定化修飾の位置から+1及び+2位に少なくとも2つの安定化修飾を含む。

20

【0222】

一部の実施形態では、センス鎖は、少なくとも2つ（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10又はそれ以上）の安定化修飾を含む。限定はされないが、センス鎖における安定化修飾は、任意の位置に存在し得る。一部の実施形態では、センス鎖は、5'末端から7、10及び11位に安定化修飾を含む。一部の他の実施形態では、センス鎖は、5'末端から7、9、10及び11位に安定化修飾を含む。一部の実施形態では、センス鎖は、アンチセンス鎖の5'末端から数えてアンチセンス鎖の11、12及び15位に対して対向的又は相補的な位置に安定化修飾を含む。一部の他の実施形態では、センス鎖は、アンチセンス鎖の5'末端から数えてアンチセンス鎖の11、12、13及び15位に対して対向的又は相補的な位置に安定化修飾を含む。一部の実施形態では、センス鎖は、2、3又は4つの安定化修飾の遮断を含む。

30

【0223】

一部の実施形態では、センス鎖は、アンチセンス鎖における二本鎖の熱不安定化修飾に対して対向的又は相補的な位置に安定化修飾を含まない。

40

【0224】

例示的な熱安定化修飾として、限定はされないが、2'-フルオロ修飾が挙げられる。他の熱安定化修飾として、限定はされないが、LNAが挙げられる。

【0225】

一部の実施形態では、本発明のdsRNAは、少なくとも4つ（例えば、4、5、6、7、8、9、10又はそれ以上）の2'-フルオロヌクレオチドを含む。限定はされないが、2'-フルオロヌクレオチドの全部が片鎖内に存在し得る。一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖の両方は、少なくとも2つの2'-フルオロヌクレオチドを含む。2'-フルオロ修飾は、センス鎖又はアンチセンス鎖の任意のヌクレオチド上に存在し得る。例えば、2'-フルオロ修飾は、センス鎖及び／又はアンチセンス鎖上の全てのヌクレオチド

50

上に存在し得るか；各 2' -フルオロ修飾は、センス鎖又はアンチセンス鎖上に交互パターンで存在し得るか；又はセンス鎖又はアンチセンス鎖は、両方の 2' -フルオロ修飾を交互パターンで含む。センス鎖上の安定化修飾の交互パターンは、アンチセンス鎖と同じであるか又は異なり得、センス鎖上での 2' -フルオロ修飾の交互パターンは、アンチセンス鎖上の 2' -フルオロ修飾の交互パターンに対する変化を有し得る。

【0226】

一部の実施形態では、アンチセンス鎖は、少なくとも 2 つ（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10 又はそれ以上）の 2' -フルオロヌクレオチドを含む。限定はされないが、アンチセンス鎖における 2' -フルオロ修飾は、任意の位置に存在し得る。一部の実施形態では、アンチセンスは、5' 末端から 2、6、8、9、14 及び 16 位に 2' -フルオロヌクレオチドを含む。一部の他の実施形態では、アンチセンスは、5' 末端から 2、6、14 及び 16 位に 2' -フルオロヌクレオチドを含む。さらに一部の他の実施形態では、アンチセンスは、5' 末端から 2、14 及び 16 位に 2' -フルオロヌクレオチドを含む。

【0227】

一部の実施形態では、アンチセンス鎖は、不安定化修飾に隣接した少なくとも 1 つの 2' -フルオロヌクレオチドを含む。例えば、2' -フルオロヌクレオチドは、不安定化修飾の 5' 末端又は 3' 末端、すなわち不安定化修飾の位置から -1 又は +1 位のヌクレオチドであり得る。一部の実施形態では、アンチセンス鎖は、不安定化修飾の 5' 末端及び 3' 末端の各々、すなわち不安定化修飾の位置から -1 及び +1 位に 2' -フルオロヌクレオチドを含む。

【0228】

一部の実施形態では、アンチセンス鎖は、不安定化修飾の 3' 末端、すなわち不安定化修飾の位置から +1 及び +2 位に少なくとも 2 つの 2' -フルオロヌクレオチドを含む。

【0229】

一部の実施形態では、センス鎖は、少なくとも 2 つ（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10 又はそれ以上）の 2' -フルオロヌクレオチドを含む。限定はされないが、センス鎖における 2' -フルオロ修飾は、任意の位置に存在し得る。一部の実施形態では、アンチセンスは、5' 末端から 7、10 及び 11 位に 2' -フルオロヌクレオチドを含む。一部の他の実施形態では、センス鎖は、5' 末端から 7、9、10 及び 11 位に 2' -フルオロヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、センス鎖は、アンチセンス鎖の 5' 末端から数えてアンチセンス鎖の 11、12 及び 15 位に対して対向的又は相補的な位置に 2' -フルオロヌクレオチドを含む。一部の他の実施形態では、センス鎖は、アンチセンス鎖の 5' 末端から数えてアンチセンス鎖の 11、12、13 及び 15 位に対して対向的又は相補的な位置に 2' -フルオロヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、センス鎖は、2、3 又は 4 つの 2' -フルオロヌクレオチドの遮断を含む。

【0230】

一部の実施形態では、センス鎖は、アンチセンス鎖における二本鎖の熱不安定化修飾に対して対向的又は相補的な位置に 2' -フルオロヌクレオチドを含まない。

【0231】

一部の実施形態では、本発明の dsRNA 分子は、21 ヌクレオチド (nt) のセンス鎖及び 23 ヌクレオチド (nt) のアンチセンスを含み、ここで、アンチセンス鎖は、少なくとも 1 つの熱不安定化ヌクレオチドを含み、ここで、少なくとも 1 つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の 5' 末端の 2 ~ 9 位）に存在し、ここで、dsRNA の一方の末端は平滑である一方、他方の末端は、2 nt オーバーハングを含み、dsRNA は、任意選択的に、以下の特徴：(i) アンチセンスは、2、3、4、5 又は 6 つの 2' -フルオロ修飾を含むこと；(ii) アンチセンスは、1、2、3、4 又は 5 つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(iii) センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること；(iv) センス鎖は、2、3、4 又は 5 つの 2' -フルオロ修飾を含むこと；(v) センス鎖は、1、2、3、4 又は 5 つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(vi) dsRNA は、少な

10

20

30

40

50

くとも4つの2'-フルオロ修飾を含むこと；及び(vii) dsRNAは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を含むことの少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6又は7つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1〜3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。好ましくは、2ntオーバーハングは、アンチセンスの3'末端に存在する。

10

【0232】

一部の実施形態では、センス及びアンチセンス鎖を含む本発明のdsRNA分子において、センス鎖は、25〜30ヌクレオチド残基長であり、ここで、前記センス鎖の5'末端ヌクレオチド（1位）から始まる1〜23位は、少なくとも8つのリボヌクレオチドを含み；アンチセンス鎖は、36〜66ヌクレオチド残基長であり、3'末端ヌクレオチドから始まる、その位置内の少なくとも8つのリボヌクレオチドがセンス鎖の1〜23位と対合することで、二本鎖を形成し；ここで、少なくとも、アンチセンス鎖の3'末端ヌクレオチドは、センス鎖と対合せず、最大で6つの連続する3'末端ヌクレオチドは、センス鎖と対合せず、それにより1〜6ヌクレオチドの3'-一本鎖オーバーハングを形成し；ここで、アンチセンス鎖の5'末端は、センス鎖と対合しない10〜30の連続するヌクレオチドを含み、それにより10〜30ヌクレオチドの一本鎖5'-オーバーハングを形成し；ここで、少なくとも、センス鎖の5'末端及び3'末端ヌクレオチドは、センス及びアンチセンス鎖が最大相補性のために整列されるとき、アンチセンス鎖のヌクレオチドと塩基対合され、それによりセンス及びアンチセンス鎖間で実質的に二本鎖の領域を形成し；前記二本鎖核酸が哺乳動物細胞に導入されるとき、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖長の少なくとも19のリボヌクレオチドに沿って標的RNAに対して十分に相補的であることで、標的遺伝子発現を低減し；ここで、アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを含み、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2〜9位に存在し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1〜3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyphersper、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA (ModA-ModK) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。例えば、熱不安定化ヌクレオチドは、センス鎖の5'末端の14〜17位に対して対向的又は相補的な位置間に存在し、ここで、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：(i) アンチセンスは、2、3、4、5又は6つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(ii) アンチセンスは、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(iii) センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること；(iv) センス鎖は、2、3、4又は5つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(v) センス鎖は、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；及び(vi) dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含むこと；及び(vii) dsRNAは、12〜30ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むことの少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6又は7つ全部）をさらに有する。

20

30

40

【0233】

一部の実施形態では、本発明のdsRNA分子は、センス及びアンチセンス鎖を含み、ここで、前記dsRNA分子は、少なくとも25、最大で29ヌクレオチドの長さを有するセンス鎖を含み、最大で30ヌクレオチドの長さを有するアンチセンス鎖は、センス鎖と共に、5'末端から11位で酵素分解を受けやすい修飾ヌクレオチドを含み、ここで、前

50

記センス鎖の3'末端及び前記アンチセンス鎖の5'末端は、平滑末端を形成し、前記アンチセンス鎖は、その3'末端でセンス鎖よりも1~4ヌクレオチド長く、ここで、少なくとも25ヌクレオチド長である二本鎖領域では、前記dsRNA分子が哺乳動物細胞に導入されるとき、前記アンチセンス鎖は、前記アンチセンス鎖長の少なくとも19ntに沿って標的mRNAに対して十分に相補的であることで、標的遺伝子の発現を低減し、ここで、前記dsRNAのダイサー切断により、前記アンチセンス鎖の前記3'末端を含むsiRNAが優先的にもたらされ、それにより哺乳動物における標的遺伝子の発現が低減され、ここで、アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを含み、ここで、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2~9位に）存在し、ここで、dsRNAは、任意選択的に、以下の特徴：（i）アンチセンスは、2、3、4、5又は6つの2'-フルオロ修飾を含むこと；（ii）アンチセンスは、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；（iii）センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること；（iv）センス鎖は、2、3、4又は5つの2'-フルオロ修飾を含むこと；（v）センス鎖は、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；及び（vi）dsRNAは、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含むこと；及び（vii）dsRNAは、12~29ヌクレオチド対長の二本鎖領域を有することの少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6又は7つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1~3に記載されているmUNA及びGNA構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、GNA-isoc、GNA-isog、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNA及び2'-mUNAからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyプースペーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA及びh'GNA（ModA-ModK）からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0234】

一部の実施形態では、dsRNA分子のセンス鎖及びアンチセンス鎖における全てのヌクレオチドは、修飾され得る。各ヌクレオチドは、同じ又は異なる修飾で修飾され得、その修飾は、非結合リン酸酸素及び／又は1つ以上の結合リン酸酸素の一方又は両方の1つ以上の変更；リボース糖の成分、例えばリボース糖の2'ヒドロキシルの変更；リン酸部分の「デホスホ」リンカーでの大量の置換；天然塩基の修飾又は置換；及びリボースリン酸骨格の置換又は修飾を含み得る。

【0235】

核酸がサブユニットのポリマーであることから、例えば、塩基、又はリン酸部分、又はリン酸部分の非連結Oの修飾といった修飾の多くは、核酸内部で反復される位置で生じる。場合によっては、修飾は核酸中のあらゆる対象位置で生じることになるが、多くの場合、そうならない。例として、修飾は、3'又は5'末端位置に限って生じ得るか、又は末端領域内、例えば末端ヌクレオチド上のある位置又は鎖の最後の2、3、4、5又は10ヌクレオチド中に限って生じ得る。修飾は、二本鎖領域、一本鎖領域又はその両方において生じ得る。修飾は、RNAの二本鎖領域内に限って生じ得るか、又はRNAの一本鎖領域内に限って生じ得る。例えば、非連結O位置でのホスホロチオエート修飾は、一末端又は両末端に限って生じ得るか、末端領域内、例えば末端ヌクレオチド上のある位置又は鎖の最後の2、3、4、5又は10ヌクレオチド中に限って生じ得るか、又は二本鎖及び一本鎖領域内、特に末端で生じ得る。5'末端は、リン酸化され得る。

【0236】

例えば、安定性を増強させるか、オーバーハング中に特定塩基を含めるか、又は一本鎖オーバーハング中、例えば5'若しくは3'オーバーハング中又は両方に修飾ヌクレオチド若しくはヌクレオチド代替物を含めることは可能であり得る。例えば、オーバーハング中にプリンヌクレオチドを含めることが望ましい可能性がある。一部の実施形態では、3'若しくは5'オーバーハング中の塩基の全部若しくは一部を例えば本明細書に記載の修飾で修

飾し得る。修飾は、例えば、リボース糖の2'位での当技術分野で公知の修飾による修飾の使用、例えば核酸塩基のリボ糖に代わるデオキシリボヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロ(2'-F)若しくは2'-O-メチル修飾の使用及びリン酸基における修飾、例えばホスホロチオエート修飾を含み得る。オーバーハングは、標的配列と相同である必要はない。

【0237】

一部の実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖の各残基は、独立してLNA、HNA、CeNA、2'-メトキシエチル、2'-O-メチル、2'-O-アリル、2'-C-アリル、2'-デオキシ又は2'-フルオロで修飾される。それらの鎖は、2つ以上の修飾を含み得る。一部の実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖の各残基は、独立して2'-O-メチル又は2'-フルオロで修飾される。これらの修飾が、アンチセンス鎖に存在する二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾に加えて存在することは理解されるべきである。

10

【0238】

少なくとも2つの異なる修飾は、典型的にはセンス鎖及びアンチセンス鎖上に存在する。それら2つの修飾は、2'-デオキシ、2'-O-メチル又は2'-フルオロ修飾、非環状ヌクレオチド又はその他であり得る。一部の実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖の各々は、2'-O-メチル又は2'-デオキシから選択される、2つの異なって修飾されたヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖の各残基は、独立して、2'-O-メチルヌクレオチド、2'-デオキシヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチド、2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)ヌクレオチド、2'-O-ジメチルアミノエトキシエチル(2'-O-DMAEOE)ヌクレオチド、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)ヌクレオチド又は2'-アラールヌクレオチドで修飾される。再び、これらの修飾が、アンチセンス鎖に存在する二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾に加えて存在することは理解されるべきである。

20

【0239】

一部の実施形態では、本発明のdsRNA分子は、特に、B1、B2、B3、B1'、B2'、B3'、B4'領域内に交互パターンの修飾を含む。用語「交互モチーフ」又は「交互パターン」は、本明細書で用いられるとき、1つ以上の修飾を有するモチーフであって、各修飾が1本の鎖の交互ヌクレオチド上で生じるものを指す。交互ヌクレオチドは、1つ置きにヌクレオチドごとに1つ又は3つのヌクレオチドごとに1つ又は類似パターンを指し得る。例えば、A、B及びCの各々がヌクレオチドに対する1つの修飾タイプを表す場合、交互モチーフは、「ABABABABABAB...」、「AABBAABBAABBB...」、「AABAABAABAAB...」、「AAABBAABAABBB...」又は「ABCABCABCABC...」などであり得る。

30

【0240】

交互モチーフ内に含まれる修飾のタイプは、同じであるか又は異なり得る。例えば、A、B、C、Dの各々がヌクレオチドに対する1つの修飾タイプを表す場合、交互パターン、すなわち1つ置きにヌクレオチドに対する修飾は、同じであり得るが、センス鎖又はアンチセンス鎖の各々は、例えば、「ABABAB...」、「ACACAC...」、「BDBDBD...」又は「CDCDCD...」など、交互モチーフ内部の幾つかの修飾の可能性から選択され得る。

40

【0241】

一部の実施形態では、本発明のdsRNA分子は、センス鎖上の交互モチーフにおける修飾パターンが、アンチセンス鎖上の交互モチーフにおける修飾パターンに対して変化することを含む。センス鎖のヌクレオチドの修飾基がアンチセンス鎖のヌクレオチドの異なる修飾基に対応し、その逆もいえるような変化であり得る。例えば、センス鎖がdsRNA二本鎖におけるアンチセンス鎖と対合するとき、二本鎖領域内部で、センス鎖内の交互モチーフは鎖の5'-3'から「ABABAB」で開始し得、且つアンチセンス鎖内の交互モチーフは鎖の3'-5'から「BABABA」で開始し得る。別の例として、二本鎖領域

50

内部で、センス鎖内の交互モチーフは鎖の 5' - 3' から「A A B B A A B B」で開始し得、且つアンチセンス鎖内の交互モチーフは鎖の 3' - 5' から「B B A A B B A A」で開始し得、それによりセンス鎖とアンチセンス鎖との間に修飾パターンの完全な変化又は部分的变化が存在する。

【0242】

本発明の dsRNA 分子は、少なくとも 1 つのホスホロチオエート又はメチルホスホン酸のヌクレオチド間結合をさらに含み得る。ホスホロチオエート又はメチルホスホン酸のヌクレオチド間結合修飾は、センス鎖若しくはアンチセンス鎖又は両方の、鎖の任意の位置における任意のヌクレオチド上に生じ得る。例えば、ヌクレオチド間結合修飾は、センス鎖及び／又はアンチセンス鎖上の全てのヌクレオチド上に生じ得るか；各ヌクレオチド間結合修飾は、センス鎖又はアンチセンス鎖上に交互パターンで生じ得るか；又はセンス鎖若しくはアンチセンス鎖は、両方のヌクレオチド間結合修飾を交互パターンで含む。センス鎖上のヌクレオチド間結合修飾の交互パターンは、アンチセンス鎖と同じであるか又は異なり得、センス鎖上のヌクレオチド間結合修飾の交互パターンは、アンチセンス鎖上のヌクレオチド間結合修飾の交互パターンに対して変化を有し得る。

【0243】

一部の実施形態では、dsRNA 分子は、オーバーハング領域内にホスホロチオエート又はメチルホスホン酸のヌクレオチド間結合修飾を含む。例えば、オーバーハング領域は、2 つのヌクレオチド間にホスホロチオエート又はメチルホスホン酸のヌクレオチド間結合を有する 2 つのヌクレオチドを含む。ヌクレオチド間結合修飾は、オーバーハングヌクレオチドを二本鎖領域内部の末端の対合ヌクレオチドと連結するためにも設けられ得る。例えば、少なくとも 2、3、4 若しくは全てのオーバーハングヌクレオチドは、ホスホロチオエート又はメチルホスホン酸のヌクレオチド間結合を通じて連結され得、任意選択的に、オーバーハングヌクレオチドをオーバーハングヌクレオチドに隣接する対合ヌクレオチドと連結する、追加的なホスホロチオエート又はメチルホスホン酸のヌクレオチド間結合が存在し得る。例えば、末端の 3 つのヌクレオチド間に少なくとも 2 つのホスホロチオエートのヌクレオチド間結合が存在し得、ここで、3 つのうちの 2 つのヌクレオチドはオーバーハングヌクレオチドであり、且つ 3 つ目はオーバーハングヌクレオチドに隣接する対合ヌクレオチドである。好ましくは、これら末端の 3 つのヌクレオチドは、アンチセンス鎖の 3' 末端に存在し得る。

【0244】

一部の実施形態では、dsRNA 分子のセンス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 又は 16 のリン酸ヌクレオチド間結合によって分離される、2 ~ 10 のホスホロチオエート又はメチルホスホン酸ヌクレオチド間結合の 1 ~ 10 のブロックを含み、ホスホロチオエート又はメチルホスホン酸ヌクレオチド間結合の一方は、オリゴヌクレオチド配列内の任意の位置に配置され、前記センス鎖は、ホスホロチオエート、メチルホスホン酸及びリン酸のヌクレオチド間結合の任意の組み合わせを含むアンチセンス鎖又はホスホロチオエート若しくはメチルホスホン酸若しくはリン酸の結合のいずれかを含むアンチセンス鎖と対合する。

【0245】

一部の実施形態では、dsRNA 分子のアンチセンス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17 又は 18 のリン酸ヌクレオチド間結合によって分離される 2 つのホスホロチオエート又はメチルホスホン酸のヌクレオチド間結合の 2 つのブロックを含み、ここで、ホスホロチオエート又はメチルホスホン酸ヌクレオチド間結合の一方は、オリゴヌクレオチド配列内の任意の位置に配置され、前記アンチセンス鎖は、ホスホロチオエート、メチルホスホン酸及びリン酸のヌクレオチド間結合の任意の組み合わせを含むセンス鎖又はホスホロチオエート若しくはメチルホスホン酸若しくはリン酸の結合のいずれかを含むアンチセンス鎖と対合する。

【0246】

一部の実施形態では、dsRNA 分子のアンチセンス鎖は、1、2、3、4、5、6、

7、8、9、10、11、12、13、14、15又は16のリン酸ヌクレオチド間結合によって分離される3つのホスホロチオエート又はメチルホスホン酸のヌクレオチド間結合の2つのブロックを含み、ここで、ホスホロチオエート又はメチルホスホン酸ヌクレオチド間結合の一方は、オリゴヌクレオチド配列内の任意の位置に配置され、前記アンチセンス鎖は、ホスホロチオエート、メチルホスホン酸及びリン酸のヌクレオチド間結合の任意の組み合わせを含むセンス鎖又はホスホロチオエート若しくはメチルホスホン酸若しくはリン酸の結合のいずれかを含むアンチセンス鎖と対合する。

【0247】

一部の実施形態では、dsRNA分子のアンチセンス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13又は14のリン酸ヌクレオチド間結合によって分離される4つのホスホロチオエート又はメチルホスホン酸のヌクレオチド間結合の2つのブロックを含み、ここで、ホスホロチオエート又はメチルホスホン酸ヌクレオチド間結合の一方は、オリゴヌクレオチド配列内の任意の位置に配置され、前記アンチセンス鎖は、ホスホロチオエート、メチルホスホン酸及びリン酸のヌクレオチド間結合の任意の組み合わせを含むセンス鎖又はホスホロチオエート若しくはメチルホスホン酸若しくはリン酸の結合のいずれかを含むアンチセンス鎖と対合する。

10

【0248】

一部の実施形態では、dsRNA分子のアンチセンス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11又は12のリン酸ヌクレオチド間結合によって分離される5つのホスホロチオエート又はメチルホスホン酸ヌクレオチド間結合の2つのブロックを含み、ここで、ホスホロチオエート又はメチルホスホン酸ヌクレオチド間結合の一方は、オリゴヌクレオチド配列内の任意の位置に配置され、前記アンチセンス鎖は、ホスホロチオエート、メチルホスホン酸及びリン酸のヌクレオチド間結合の任意の組み合わせを含むセンス鎖又はホスホロチオエート若しくはメチルホスホン酸若しくはリン酸の結合のいずれかを含むアンチセンス鎖と対合する。

20

【0249】

一部の実施形態では、dsRNA分子のアンチセンス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10のリン酸ヌクレオチド間結合によって分離される6つのホスホロチオエート又はメチルホスホン酸ヌクレオチド間結合の2つのブロックを含み、ここで、ホスホロチオエート又はメチルホスホン酸ヌクレオチド間結合の一方は、オリゴヌクレオチド配列内の任意の位置に配置され、前記アンチセンス鎖は、ホスホロチオエート、メチルホスホン酸及びリン酸のヌクレオチド間結合の任意の組み合わせを含むセンス鎖又はホスホロチオエート若しくはメチルホスホン酸若しくはリン酸の結合のいずれかを含むアンチセンス鎖と対合する。

30

【0250】

一部の実施形態では、dsRNA分子のアンチセンス鎖は、1、2、3、4、5、6、7又は8つのリン酸ヌクレオチド間結合によって分離される7つのホスホロチオエート又はメチルホスホン酸ヌクレオチド間結合の2つのブロックを含み、ここで、ホスホロチオエート又はメチルホスホン酸ヌクレオチド間結合の一方は、オリゴヌクレオチド配列内の任意の位置に配置され、前記アンチセンス鎖は、ホスホロチオエート、メチルホスホン酸及びリン酸のヌクレオチド間結合の任意の組み合わせを含むセンス鎖又はホスホロチオエート若しくはメチルホスホン酸若しくはリン酸の結合のいずれかを含むアンチセンス鎖と対合する。

40

【0251】

一部の実施形態では、dsRNA分子のアンチセンス鎖は、1、2、3、4、5又は6つのリン酸ヌクレオチド間結合によって分離される8つのホスホロチオエート又はメチルホスホン酸ヌクレオチド間結合の2つのブロックを含み、ここで、ホスホロチオエート又はメチルホスホン酸ヌクレオチド間結合の一方は、オリゴヌクレオチド配列内の任意の位置に配置され、前記アンチセンス鎖は、ホスホロチオエート、メチルホスホン酸及びリン酸のヌクレオチド間結合の任意の組み合わせを含むセンス鎖又はホスホロチオエート若し

50

くはメチルホスホン酸若しくはリン酸の結合のいずれかを含むアンチセンス鎖と対合する。
【0252】

一部の実施形態では、dsRNA分子のアンチセンス鎖は、1、2、3又は4つのリン酸ヌクレオチド間結合によって分離される9つのホスホロチオエート又はメチルホスホン酸ヌクレオチド間結合の2つのブロックを含み、ここで、ホスホロチオエート又はメチルホスホン酸ヌクレオチド間結合の一方は、オリゴヌクレオチド配列内の任意の位置に配置され、前記アンチセンス鎖は、ホスホロチオエート、メチルホスホン酸及びリン酸のヌクレオチド間結合の任意の組み合わせを含むセンス鎖又はホスホロチオエート若しくはメチルホスホン酸若しくはリン酸の結合のいずれかを含むアンチセンス鎖と対合する。

【0253】

一部の実施形態では、本発明のdsRNA分子は、センス及び／又はアンチセンス鎖の末端位置の1～10以内に1つ以上のホスホロチオエート又はメチルホスホン酸のヌクレオチド間結合修飾をさらに含む。例えば、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9つ又は10のヌクレオチドは、センス及び／又はアンチセンス鎖の一端又は両端でホスホロチオエート又はメチルホスホン酸のヌクレオチド間結合を通じて連結され得る。

【0254】

一部の実施形態では、本発明のdsRNA分子は、センス及び／又はアンチセンス鎖各々の二本鎖の内部領域の1～10以内に1つ以上のホスホロチオエート又はメチルホスホン酸のヌクレオチド間結合修飾をさらに含む。例えば、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9つ又は10のヌクレオチドは、二本鎖領域のセンス鎖の5'末端から数えて8～16位でホスホロチオエートメチルホスホン酸ヌクレオチド間結合を通じて連結され得；dsRNA分子は、任意選択的に、1つ以上のホスホロチオエート又はメチルホスホン酸のヌクレオチド間結合修飾を末端1～10位以内にさらに含み得る。

【0255】

一部の実施形態では、本発明のdsRNA分子は、センス鎖の（5'末端から数えて）1～5位以内に1～5つのホスホロチオエート又はメチルホスホン酸のヌクレオチド間結合修飾と18～23位以内に1～5つのホスホロチオエート又はメチルホスホン酸のヌクレオチド間結合修飾並びにアンチセンス鎖の（5'末端から数えて）1及び2位に1～5つのホスホロチオエート又はメチルホスホン酸のヌクレオチド間結合修飾と18～23位以内に1～5つのホスホロチオエート又はメチルホスホン酸のヌクレオチド間結合修飾をさらに含む。

【0256】

一部の実施形態では、本発明のdsRNA分子は、センス鎖の（5'末端から数えて）1～5位以内に1つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾と18～23位以内に1つのホスホロチオエート又はメチルホスホン酸のヌクレオチド間結合修飾並びにアンチセンス鎖の（5'末端から数えて）1及び2位に1つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾と18～23位以内に2つのホスホロチオエート又はメチルホスホン酸のヌクレオチド間結合修飾をさらに含む。

【0257】

一部の実施形態では、本発明のdsRNA分子は、センス鎖の（5'末端から数えて）1～5位以内に2つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾と18～23位以内に1つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾並びにアンチセンス鎖の（5'末端から数えて）1及び2位に1つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾と18～23位以内に2つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾をさらに含む。

【0258】

一部の実施形態では、本発明のdsRNA分子は、センス鎖の（5'末端から数えて）1～5位以内に2つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾と18～23位以内に2つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾並びにアンチセンス鎖の（5'末端から数えて）1及び2位に1つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾と18～23位以内に2つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾をさらに含む。

【0259】

一部の実施形態では、本発明のdsRNA分子は、センス鎖の（5'末端から数えて）1～5位以内に2つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾と18～23位以内に2つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾並びにアンチセンス鎖の（5'末端から数えて）1及び2位に1つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾と18～23位以内に1つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾をさらに含む。

【0260】

一部の実施形態では、本発明のdsRNA分子は、センス鎖の（5'末端から数えて）1～5位以内に1つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾と18～23位以内に1つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾並びにアンチセンス鎖の（5'末端から数えて）1及び2位に2つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾と18～23位以内に2つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾をさらに含む。

10

【0261】

一部の実施形態では、本発明のdsRNA分子は、センス鎖の（5'末端から数えて）1～5位以内に1つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾と18～23位以内に1つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾並びにアンチセンス鎖の（5'末端から数えて）1及び2位に2つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾と18～23位以内に1つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾をさらに含む。

【0262】

一部の実施形態では、本発明のdsRNA分子は、センス鎖の（5'末端から数えて）1～5位以内に1つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾並びにアンチセンス鎖の（5'末端から数えて）1及び2位に2つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾と18～23位以内に1つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾をさらに含む。

20

【0263】

一部の実施形態では、本発明のdsRNA分子は、センス鎖の（5'末端から数えて）1～5位以内に2つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾並びにアンチセンス鎖の（5'末端から数えて）1及び2位に1つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾と18～23位以内に2つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾をさらに含む。

【0264】

一部の実施形態では、本発明のdsRNA分子は、センス鎖の（5'末端から数えて）1～5位以内に2つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾と18～23位以内に1つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾並びにアンチセンス鎖の（5'末端から数えて）1及び2位に2つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾と18～23位以内に1つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾をさらに含む。

30

【0265】

一部の実施形態では、本発明のdsRNA分子は、センス鎖の（5'末端から数えて）1～5位以内に2つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾と18～23位以内に1つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾並びにアンチセンス鎖の（5'末端から数えて）1及び2位に2つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾と18～23位以内に2つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾をさらに含む。

40

【0266】

一部の実施形態では、本発明のdsRNA分子は、センス鎖の（5'末端から数えて）1～5位以内に2つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾と18～23位以内に1つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾並びにアンチセンス鎖の（5'末端から数えて）1及び2位に1つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾と18～23位以内に2つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾をさらに含む。

【0267】

一部の実施形態では、本発明のdsRNA分子は、センス鎖の（5'末端から数えて）1及び2位に2つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾と20及び21位に2つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾並びにアンチセンス鎖の（5'末端から数えて

50

） 1 位に 1 つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾と 2 1 位に 1 つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾をさらに含む。

【 0 2 6 8 】

一部の実施形態では、本発明の d s R N A 分子は、センス鎖の（ 5 ' 末端から数えて） 1 位に 1 つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾と 2 1 位に 1 つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾並びにアンチセンス鎖の（ 5 ' 末端から数えて） 1 及び 2 位に 2 つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾と 2 0 及び 2 1 位に 2 つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾をさらに含む。

【 0 2 6 9 】

一部の実施形態では、本発明の d s R N A 分子は、センス鎖の（ 5 ' 末端から数えて） 1 及び 2 位に 2 つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾と 2 1 及び 2 2 位に 2 つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾並びにアンチセンス鎖の（ 5 ' 末端から数えて） 1 位に 1 つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾と 2 1 位に 1 つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾をさらに含む。

【 0 2 7 0 】

一部の実施形態では、本発明の d s R N A 分子は、センス鎖の（ 5 ' 末端から数えて） 1 位に 1 つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾と 2 1 位に 1 つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾並びにアンチセンス鎖の（ 5 ' 末端から数えて） 1 及び 2 位に 2 つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾と 2 1 及び 2 2 位に 2 つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾をさらに含む。

【 0 2 7 1 】

一部の実施形態では、本発明の d s R N A 分子は、センス鎖の（ 5 ' 末端から数えて） 1 及び 2 位に 2 つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾と 2 2 及び 2 3 位に 2 つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾並びにアンチセンス鎖の（ 5 ' 末端から数えて） 1 位に 1 つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾及び 2 1 位に 1 つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾をさらに含む。

【 0 2 7 2 】

一部の実施形態では、本発明の d s R N A 分子は、センス鎖の（ 5 ' 末端から数えて） 1 位に 1 つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾と 2 1 位に 1 つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾並びにアンチセンス鎖の（ 5 ' 末端から数えて） 1 及び 2 位に 2 つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾と 2 3 及び 2 3 位に 2 つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾をさらに含む。

【 0 2 7 3 】

一部の実施形態では、本発明の化合物は、骨格キラル中心のパターンを含む。一部の実施形態では、骨格キラル中心の共通パターンは、S p 立体配置において少なくとも 5 つのヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、骨格キラル中心の共通パターンは、S p 立体配置において少なくとも 6 つのヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、骨格キラル中心の共通パターンは、S p 立体配置において少なくとも 7 つのヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、骨格キラル中心の共通パターンは、S p 立体配置において少なくとも 8 つのヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、骨格キラル中心の共通パターンは、S p 立体配置において少なくとも 9 つのヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、骨格キラル中心の共通パターンは、S p 立体配置において少なくとも 1 0 のヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、骨格キラル中心の共通パターンは、S p 立体配置において少なくとも 1 1 のヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、骨格キラル中心の共通パターンは、S p 立体配置において少なくとも 1 2 のヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、骨格キラル中心の共通パターンは、S p 立体配置において少なくとも 1 3 のヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、骨格キラル中心の共通パターンは、S p 立体配置において少なくとも 1 4 のヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、骨格キラル中心の共通パターンは、S p 立体配置において少なくとも 1 5 のヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、骨格キラル中心

の共通パターンは、S p 立体配置において少なくとも16のヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、骨格キラル中心の共通パターンは、S p 立体配置において少なくとも17のヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、骨格キラル中心の共通パターンは、S p 立体配置において少なくとも18のヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、骨格キラル中心の共通パターンは、S p 立体配置において少なくとも19のヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、骨格キラル中心の共通パターンは、R p 立体配置において8以下のヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、骨格キラル中心の共通パターンは、R p 立体配置において7以下のヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、骨格キラル中心の共通パターンは、R p 立体配置において6以下のヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、骨格キラル中心の共通パターンは、R p 立体配置において5以下のヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、骨格キラル中心の共通パターンは、R p 立体配置において4以下のヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、骨格キラル中心の共通パターンは、R p 立体配置において3以下のヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、骨格キラル中心の共通パターンは、R p 立体配置において2以下のヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、骨格キラル中心の共通パターンは、R p 立体配置において1以下のヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、骨格キラル中心の共通パターンは、（非限定例として、リン酸ジエステルである）キラルでない8以下のヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、骨格キラル中心の共通パターンは、キラルでない7以下のヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、骨格キラル中心の共通パターンは、キラルでない6以下のヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、骨格キラル中心の共通パターンは、キラルでない5以下のヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、骨格キラル中心の共通パターンは、キラルでない4以下のヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、骨格キラル中心の共通パターンは、キラルでない3以下のヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、骨格キラル中心の共通パターンは、キラルでない2以下のヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、骨格キラル中心の共通パターンは、キラルでない1以下のヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、骨格キラル中心の共通パターンは、S p 立体配置における少なくとも10のヌクレオチド間結合及びキラルでない8以下のヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、骨格キラル中心の共通パターンは、S p 立体配置における少なくとも11のヌクレオチド間結合及びキラルでない7以下のヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、骨格キラル中心の共通パターンは、S p 立体配置における少なくとも12のヌクレオチド間結合及びキラルでない6以下のヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、骨格キラル中心の共通パターンは、S p 立体配置における少なくとも13のヌクレオチド間結合及びキラルでない6以下のヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、骨格キラル中心の共通パターンは、S p 立体配置における少なくとも14のヌクレオチド間結合及びキラルでない5以下のヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、骨格キラル中心の共通パターンは、S p 立体配置における少なくとも15のヌクレオチド間結合及びキラルでない4以下のヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、S p 立体配置におけるヌクレオチド間結合は、任意選択的に、隣接的又は非隣接的である。一部の実施形態では、R p 立体配置におけるヌクレオチド間結合は、任意選択的に、隣接的又は非隣接的である。一部の実施形態では、キラルでないヌクレオチド間結合は、任意選択的に、隣接的又は非隣接的である。

【0274】

一部の実施形態では、本発明の化合物は、立体化学ブロックであるブロックを含む。一部の実施形態では、ブロックは、ブロックの各ヌクレオチド間結合がR p であるようなR p ブロックである。一部の実施形態では、5'-ブロックがR p ブロックである。一部の実施形態では、3'-ブロックがR p ブロックである。一部の実施形態では、ブロックは、ブロックの各ヌクレオチド間結合がS p であるようなS p ブロックである。一部の実施形態では、5'-ブロックがS p ブロックである。一部の実施形態では、3'-ブロックがS p ブロックである。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、R p 及びS p

10

20

30

40

50

ブロックの両方を含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1つ以上のR pを含むが、S pブロックを含まない。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1つ以上のS pを含むが、R pブロックを含まない。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、各ヌクレオチド間結合が天然リン酸結合であるような1つ以上のP Oブロックを含む。

【0275】

一部の実施形態では、本発明の化合物は、5' - ブロックは、各糖部分が2' - F修飾を含むようなS pブロックである。一部の実施形態では、5' - ブロックは、ヌクレオチド間結合の各々が修飾ヌクレオチド間結合であり、且つ各糖部分が2' - F修飾を含むようなS pブロックである。一部の実施形態では、5' - ブロックは、ヌクレオチド間結合の各々がホスホロチオエート結合であり、且つ各糖部分が2' - F修飾を含むようなS pブロックである。一部の実施形態では、5' - ブロックは、4以上のヌクレオシド単位を含む。一部の実施形態では、5' - ブロックは、5以上のヌクレオシド単位を含む。一部の実施形態では、5' - ブロックは、6以上のヌクレオシド単位を含む。一部の実施形態では、5' - ブロックは、7以上のヌクレオシド単位を含む。一部の実施形態では、3' - ブロックは、各糖部分が2' - F修飾を含むようなS pブロックである。一部の実施形態では、3' - ブロックは、ヌクレオチド間結合の各々が修飾ヌクレオチド間結合であり、且つ各糖部分が2' - F修飾を含むようなS pブロックである。一部の実施形態では、3' - ブロックは、ヌクレオチド間結合の各々がホスホロチオエート結合であり、且つ各糖部分が2' - F修飾を含むようなS pブロックである。一部の実施形態では、3' - ブロックは、4以上のヌクレオシド単位を含む。一部の実施形態では、3' - ブロックは、5以上のヌクレオシド単位を含む。一部の実施形態では、3' - ブロックは、6以上のヌクレオシド単位を含む。一部の実施形態では、3' - ブロックは、7以上のヌクレオシド単位を含む。

【0276】

一部の実施形態では、本発明の化合物は、ある領域内にあるタイプのヌクレオシドを含むか、又はオリゴヌクレオチドは、特定タイプのヌクレオチド間結合、例えば天然リン酸結合、修飾ヌクレオチド間結合、R pキラルヌクレオチド間結合、S pキラルヌクレオチド間結合などによって後続される。一部の実施形態では、Aは、S pによって後続される。一部の実施形態では、Aは、R pによって後続される。一部の実施形態では、Aは、天然リン酸結合(P O)によって後続される。一部の実施形態では、Uは、S pによって後続される。一部の実施形態では、Uは、R pによって後続される。一部の実施形態では、Uは、天然リン酸結合(P O)によって後続される。一部の実施形態では、Cは、S pによって後続される。一部の実施形態では、Cは、R pによって後続される。一部の実施形態では、Cは、天然リン酸結合(P O)によって後続される。一部の実施形態では、Gは、S pによって後続される。一部の実施形態では、Gは、R pによって後続される。一部の実施形態では、Gは、天然リン酸結合(P O)によって後続される。一部の実施形態では、C及びUは、S pによって後続される。一部の実施形態では、C及びUは、R pによって後続される。一部の実施形態では、C及びUは、天然リン酸結合(P O)によって後続される。一部の実施形態では、A及びGは、S pによって後続される。一部の実施形態では、A及びGは、R pによって後続される。

【0277】

一部の実施形態では、アンチセンス鎖は、ヌクレオチドの21及び22位間とヌクレオチド22及び23位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、ここで、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖のシード領域内に(すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2〜9位に)位置する二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を有し、及びdsRNAは、任意選択的に、以下の特徴:(i)アンチセンスは、2、3、4、5又は6つの2' - フルオロ修飾を含むこと;(ii)アンチセンスは、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと;(iii)センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること;(iv)センス鎖は、2、3、4又は5つの2' - フルオロ修飾を含むこと;(v)センス鎖は、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこ

と；(v i) d s R N Aは、少なくとも4つの2' -フルオロ修飾を含むこと；(v i i) d s R N Aは、12~40ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；及び(v i i i) d s R N Aは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を有することの少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6、7又は8つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1~3に記載されているm U N A及びG N A構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、G N A - i s o C、G N A - i s o G、5' - m U N A、4' - m U N A、3' - m U N A及び2' - m U N Aからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、d s R N A分子は、G N A、2' - O M e、3' - O M e、5' - M e、H y p - スペーサー、S N A、h G N A、h h G N A、m G N A、T N A及びh' G N A (M o d A - M o d K) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

10

【0278】

一部の実施形態では、アンチセンス鎖は、ヌクレオチドの1及び2位間、ヌクレオチドの2及び3位間、ヌクレオチドの21及び22位間並びにヌクレオチドの22及び23位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、ここで、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2~9位に）位置する二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を有し、及びd s R N Aは、任意選択的に、以下の特徴：(i) アンチセンスは、2、3、4、5又は6つの2' -フルオロ修飾を含むこと；(i i) センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること；(i i i) センス鎖は、2、3、4又は5つの2' -フルオロ修飾を含むこと；(i v) センス鎖は、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(v) d s R N Aは、少なくとも4つの2' -フルオロ修飾を含むこと；(v i) d s R N Aは、12~40ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；(v i i) d s R N Aは、12~40ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；及び(v i i i) d s R N Aは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を有することの少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6、7又は8つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1~3に記載されているm U N A及びG N A構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、G N A - i s o C、G N A - i s o G、5' - m U N A、4' - m U N A、3' - m U N A及び2' - m U N Aからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、d s R N A分子は、G N A、2' - O M e、3' - O M e、5' - M e、H y p - スペーサー、S N A、h G N A、h h G N A、m G N A、T N A及びh' G N A (M o d A - M o d K) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

20

30

【0279】

一部の実施形態では、センス鎖は、ヌクレオチドの1及び2位間とヌクレオチドの2及び3位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、ここで、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2~9位に）位置する二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を有し、及びd s R N Aは、任意選択的に、以下の特徴：(i) アンチセンスは、2、3、4、5又は6つの2' -フルオロ修飾を含むこと；(i i) アンチセンスは、1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(i i i) センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること；(i v) センス鎖は、2、3、4又は5つの2' -フルオロ修飾を含むこと；(v) センス鎖は、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(v i) d s R N Aは、少なくとも4つの2' -フルオロ修飾を含むこと；(v i i) d s R N Aは、12~40ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；及び(v i i i) d s R N Aは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を有することの少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6、7又は8つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1~3に記載されているm U N A及びG N A構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、G N A - i s o C、G N A - i s o G、5' - m U N A、4' - m U N A、3' - m U N A及び2' - m U N Aからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、d s R N A分子は、G N A、2' - O M e、3' - O M e、5' - M e

40

50

、H y p ースペーサー、S N A、h G N A、h h G N A、m G N A、T N A及びh ' G N A (M o d A - M o d K) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0280】

一部の実施形態では、センス鎖は、ヌクレオチドの1及び2位間とヌクレオチドの2及び3位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、アンチセンス鎖は、ヌクレオチドの1及び2位間、ヌクレオチドの2及び3位間、ヌクレオチドの21及び22位間並びにヌクレオチドの22及び23位間にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、ここで、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖のシード領域内に（すなわちアンチセンス鎖の5'末端の2～9位に）位置する二本鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を有し、及びd s R N Aは、任意選択的に、以下の特徴：(i) アンチセンスは、2、3、4、5又は6つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(ii) センス鎖は、リガンドとコンジュゲートされること；(iii) センス鎖は、2、3、4又は5つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(iv) センス鎖は、3又は4つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むこと；(v) d s R N Aは、少なくとも4つの2'-フルオロ修飾を含むこと；(vi) d s R N Aは、12～40ヌクレオチド対長の二本鎖領域を含むこと；及び(vii) d s R N Aは、アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を有することの少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6又は7つ全部）をさらに有し、ここで、不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載されているm U N A及びG N A構成要素から選択される。一部の実施形態では、不安定化修飾は、G N A - i s o C、G N A - i s o G、5'-m U N A、4'-m U N A、3'-m U N A及び2'-m U N Aからなる群から選択される。この一部のさらなる実施形態では、d s R N A分子は、G N A、2'-O M e、3'-O M e、5'-M e、H y p ースペーサー、S N A、h G N A、h h G N A、m G N A、T N A及びh ' G N A (M o d A - M o d K) からなる群から選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾をさらに含む。

【0281】

一部の実施形態では、本発明のd s R N A分子は、二本鎖内部に、標的とのミスマッチ又はその組み合わせを含む。ミスマッチは、オーバーハング領域内又は二本鎖領域内に存在し得る。塩基対は、解離又は融解を促進するその傾向に基づいて順位付けされ得る（例えば、最も簡単な手法は、特定の対合の会合又は解離の自由エネルギーについて、その対合を個別の対合に基づいて検討することであるが、酷似又は類似の分析も用いることができる）。解離を促進する観点では、A：UはG：Cよりも好ましく；G：UはG：Cよりも好ましく；且つI：CはG：Cよりも好ましい（I＝イノシン）。ミスマッチ、例えば非基準若しくは基準以外の対合（本明細書中の他の箇所記載の通り）は、基準（A：T、A：U、G：C）対合よりも好ましく；ユニバーサル塩基を含む対合は、基準の対合よりも好ましい。

【0282】

一部の実施形態では、本発明のd s R N A分子は、二本鎖の5'末端でのアンチセンス鎖の解離を促進するため、A：U、G：U、I：C及びミスマッチ対、例えば非基準若しくは基準以外の対合又はユニバーサル塩基を含む対合の群から独立して選択することができる、アンチセンス鎖の5'末端からの二本鎖領域内部の最初の1、2、3、4若しくは5つの塩基対の少なくとも1つを含む。

【0283】

一部の実施形態では、アンチセンス鎖における5'末端からの二本鎖領域内部の1位のヌクレオチドは、A、d A、d U、U及びd Tからなる群から選択される。代わりに、アンチセンス鎖の5'末端からの二本鎖領域内部の最初の1、2若しくは3つの塩基対の少なくとも1つはA U塩基対である。例えば、アンチセンス鎖の5'末端からの二本鎖領域内部の最初の塩基対はA U塩基対である。

【0284】

本発明者らは、4'修飾及び／又は5'修飾ヌクレオチドを、一本鎖又は二本鎖オリゴヌ

クレオチドの任意の位置でジヌクレオチドのリン酸ジエステル（PO）、ホスホロチオエート（PS）及び／又はジチオリン酸（PS2）結合の3'末端に導入することが、ヌクレオチド間結合に対して立体効果を発揮し、ひいてはそれをヌクレアーゼに対して保護又は安定化し得ることを見出した。

【0285】

一部の実施形態では、5'修飾ヌクレオシドは、一本鎖又は二本鎖siRNAの任意の位置でジヌクレオチドの3'末端に導入される。例えば、一本鎖又は二本鎖siRNAの任意の位置でジヌクレオチドの3'末端に5'-アルキル化ヌクレオシドが導入され得る。リボース糖の5'位置のアルキル基は、ラセミ又はキラル純粋なR若しくはS異性体であり得る。例示的な5'-アルキル化ヌクレオシドが、5'-メチルヌクレオシドである。5'-メチルは、ラセミ又はキラル純粋なR若しくはS異性体のいずれかであり得る。

10

【0286】

一部の実施形態では、4'修飾ヌクレオシドは、一本鎖又は二本鎖siRNAの任意の位置でジヌクレオチドの3'末端に導入される。例えば、4'-アルキル化ヌクレオシドは、一本鎖又は二本鎖siRNAの任意の位置でジヌクレオチドの3'末端に導入され得る。リボース糖の4'位置のアルキル基は、ラセミ又はキラル純粋なR若しくはS異性体であり得る。例示的な4'-アルキル化ヌクレオシドは、4'-メチルヌクレオシドである。4'-メチルは、ラセミ又はキラル純粋なR若しくはS異性体のいずれかであり得る。代わりに、4'-O-アルキル化ヌクレオシドは、一本鎖又は二本鎖siRNAの任意の位置でジヌクレオチドの3'末端に導入され得る。リボース糖の4'-O-アルキルは、ラセミ又はキラル純粋なR若しくはS異性体であり得る。例示的な4'-O-アルキル化ヌクレオシドは、4'-O-メチルヌクレオシドである。4'-O-メチルは、ラセミ又はキラル純粋なR若しくはS異性体のいずれかであり得る。

20

【0287】

一部の実施形態では、5'-アルキル化ヌクレオシドは、dsRNAのセンス鎖又はアンチセンス鎖上の任意の位置に導入され、かかる修飾は、dsRNAの効力を維持又は改善する。5'-アルキルは、ラセミ又はキラル純粋なR若しくはS異性体のいずれかであり得る。例示的な5'-アルキル化ヌクレオシドは、5'-メチルヌクレオシドである。5'-メチルは、ラセミ又はキラル純粋なR若しくはS異性体のいずれかであり得る。

【0288】

一部の実施形態では、4'-アルキル化ヌクレオシドは、dsRNAのセンス鎖又はアンチセンス鎖上の任意の位置に導入され、かかる修飾は、dsRNAの効力を維持又は改善する。4'-アルキルは、ラセミ又はキラル純粋なR若しくはS異性体のいずれかであり得る。例示的な4'-アルキル化ヌクレオシドは、4'-メチルヌクレオシドである。4'-メチルは、ラセミ又はキラル純粋なR若しくはS異性体のいずれかであり得る。

30

【0289】

一部の実施形態では、4'-O-アルキル化ヌクレオシドは、dsRNAのセンス鎖又はアンチセンス鎖上の任意の位置に導入され、かかる修飾は、dsRNAの効力を維持又は改善する。5'-アルキルは、ラセミ又はキラル純粋なR若しくはS異性体のいずれかであり得る。例示的な4'-O-アルキル化ヌクレオシドは、4'-O-メチルヌクレオシドである。4'-O-メチルは、ラセミ又はキラル純粋なR若しくはS異性体のいずれかであり得る。

40

【0290】

一部の実施形態では、本発明のdsRNA分子は、2'-5'結合（2'-H、2'-OH及び2'-OMeを有し、且つP=O又はP=Sを有する）を含み得る。例えば、2'-5'結合修飾は、ヌクレアーゼ耐性を促進するか若しくはセンス鎖のアンチセンス鎖への結合を阻害するために用いることができるか、又はRISCによるセンス鎖活性化を回避するためにセンス鎖の5'末端で用いることができる。

【0291】

別の実施形態では、本発明のdsRNA分子は、L糖（例えば、2'-H、2'-OH及

50

び2'-OMeを有するLリボース、L-アラビノース)を含み得る。例えば、これらのL糖修飾は、ヌクレアーゼ耐性を促進するか若しくはセンス鎖のアンチセンス鎖への結合を阻害するために用いることができるか、又はRISCによるセンス鎖活性化を回避するためにセンス鎖の5'末端で用いることができる。

【0292】

様々な出版物にて、本発明のdsRNAと共に全てを用いることができる多量体siRNAが記載されている。かかる出版物は、国際公開第2007/091269号パンフレット、米国特許第7858769号明細書、国際公開第2010/141511号パンフレット、国際公開第2007/117686号パンフレット、国際公開第2009/014887号パンフレット及び国際公開第2011/031520号パンフレット(それら全体がここで援用される)を含む。

10

【0293】

1つ以上の炭水化物部分のdsRNA分子への結合を含むdsRNA分子は、dsRNA分子の1つ以上の特性を最適化し得る。多くの場合、炭水化物部分は、dsRNA分子の修飾サブユニットに結合されることになる。例えば、dsRNA分子の1つ以上のリボヌクレオチドサブユニットのリボース糖は、別の部分、例えば炭水化物リガンドが結合した非炭水化物(好ましくは環状)担体と置換され得る。サブユニットのリボース糖がそのように置換されているリボヌクレオチドサブユニットは、本明細書中でリボース置換修飾サブユニット(RMS)と称される。環状担体は炭素環式環系であり得、すなわち、全ての環原子は、炭素原子であるか、又は複素環式環系、すなわち1つ以上の環原子は、ヘテロ原子、例えば窒素、酸素、硫黄であり得る。環状担体は、単環式環系であり得るか、又は2つ以上の環、例えば融合環を含み得る。環状担体は、完全飽和環系であり得るか、又は1つ以上の二重結合を含み得る。

20

【0294】

リガンドは、担体によってポリヌクレオチドに付着され得る。担体は、(i)少なくとも1つの「骨格付着点(backbone attachment point)」、好ましくは2つの「骨格付着点」、及び(ii)少なくとも1つの「テザー付着点(tethering attachment point)」を含む。「骨格付着点」は、本明細書で用いられるとき、官能基、例えばヒドロキシル基又は一般にリボ核酸の骨格、例えばリン酸塩の骨格若しくは例えば硫黄を含有する修飾リン酸塩の骨格への担体の組み込みに利用可能であり、且つ適した結合を指す。「テザー付着点」(TAP)は、一部の実施形態では、選択された部分を接続する環状担体の構成環原子、例えば炭素原子又はヘテロ原子(骨格付着点を提供する原子とは異なる)を指す。その部分は、例えば糖質、例えば単糖、二糖、三糖、四糖、オリゴ糖及び多糖であり得る。任意選択的に、選択された部分は、介在テザー(intervening tether)によって環状担体に接続される。したがって、環状担体は、官能基、例えばアミノ基を含むことが多いか、又は一般に別の化学的実体、例えばリガンドの構成環への組み込み又は繫留に適した結合を可能にする。

30

【0295】

一部の実施形態では、本発明のdsRNA分子は、担体を介してリガンドに結合され得、ここで、担体は、環式基又は非環式基であり得；好ましくは、環式基は、ピロリジニル、ピラゾリニル、ピラゾリジニル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、ピペリジニル、ピペラジニル、[1,3]ジオキサラン、オキサゾリジニル、イソキサゾリジニル、モルホリニル、チアゾリジニル、イソチアゾリジニル、キノキサリニル、ピリダジノニル、テトラヒドロフリル及びデカリンから選択され；好ましくは、非環式基は、セリノール骨格又はジエタノールアミン骨格から選択される。

40

【0296】

本発明の二本鎖RNA(dsRNA)剤は、任意選択的に、1つ以上のリガンドにコンジュゲートされ得る。リガンドは、3'末端、5'末端又は両末端で、センス鎖、アンチセンス鎖又は両鎖に結合され得る。例えば、リガンドは、センス鎖、特にセンス鎖の3'末端にコンジュゲートされ得る。

50

【0297】

一部の実施形態では、本発明のdsRNA分子は、5'リン酸化されるか、又は5'プライム末端にホスホリル類似体を含む。5'-リン酸修飾は、RISC媒介遺伝子サイレンシングに適合するものを含む。好適な修飾は、5'-一リン酸 $((\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-5')$ ；5'-二リン酸 $((\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5')$ ；5'-三リン酸 $((\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5')$ ；5'-グアノシンキャップ（7-メチル化又は非メチル化） $(7\text{m}-\text{G}-\text{O}-5'-(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5')$ ；5'-アデノシンキャップ（Appp）及び任意の修飾又は非修飾ヌクレオチドキャップ構造 $(\text{N}-\text{O}-5'-(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5')$ ；5'-モノチオリン酸（ホスホロチオエート； $(\text{HO})_2(\text{S})\text{P}-\text{O}-5'$ ）；5'-モノジチオリン酸（ジチオリン酸； $(\text{HO})(\text{HS})(\text{S})\text{P}-\text{O}-5'$ ）、5'-ホスホロチオエート $((\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{S}-5')$ ；酸素／硫黄が置換された一リン酸、二リン酸及び三リン酸の任意のさらなる組み合わせ（例えば、5'- α -チオ三リン酸、5'- γ -チオ三リン酸など）、5'-ホスホロアミド酸 $((\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{NH}-5'$ 、 $(\text{HO})(\text{NH}_2)(\text{O})\text{P}-\text{O}-5'$ ）、5'-アルキルホスホネート（R=アルキル=メチル、エチル、イソプロピル、プロピルなど、例えば $\text{RP}(\text{OH})(\text{O})-\text{O}-5'-$ 、5'-アルケニルホスホネート（すなわちビニル、置換ビニル）、 $(\text{OH})_2(\text{O})\text{P}-5'-\text{CH}_2-$ ）、5'-アルキルエーテルホスホネート（R=アルキルエーテル=メトキシメチル (MeOCH_2-) 、エトキシメチルなど、例えば $\text{RP}(\text{OH})(\text{O})-\text{O}-5'-$ ）を含む。一例では、修飾は、dsRNA分子のアンチセンス鎖内に配置され得る。

【0298】

リガンド

多種多様な実体が、本発明のオリゴヌクレオチドにカップリングされ得る。好ましい部分は、好ましくは共有結合的に、直接的に又は介在テザーを介して間接的にカップリングされたリガンドである。

【0299】

好ましい実施形態では、リガンドは、それが中に組み込まれる分子の分布、ターゲティング又は寿命を変化させる。好ましい実施形態では、リガンドは、選択される標的、例えば分子、細胞若しくは細胞型、区画、受容体、例えば細胞若しくは臓器区画、組織、臓器又は身体領域に対して、例えばかかるリガンドを有しない種と比べて、増強された親和性をもたらす。選択された標的に対して増強された親和性をもたらすリガンドは、標的化リガンドとも称される。

【0300】

一部のリガンドは、エンドソーム溶解特性を有し得る。エンドソーム溶解リガンドは、エンドソームの溶解及び／又は本発明の組成物若しくはその成分の細胞のエンドソームから細胞質への輸送を促進する。エンドソーム溶解リガンドは、pH依存性の膜活性及び膜融合性を示す、ポリアニオンペプチド又はペプチドミメティックであり得る。一部の実施形態では、エンドソーム溶解リガンドは、エンドソームpHでその活性型立体構造を取る。「活性型」立体構造は、エンドソーム溶解リガンドが、エンドソームの溶解及び／又は本発明の組成物若しくはその成分の細胞のエンドソームから細胞質への輸送を促進するような立体構造である。例示的なエンドソーム溶解リガンドとして、GALAペプチド（Subbarao et al., Biochemistry, 1987, 26:2964-2972、その全体が参照により援用される）、EALAペプチド（Vogel et al., J. Am. Chem. Soc., 1996, 118:1581-1586、その全体が参照により援用される）及びそれらの誘導体（Turk et al., Biochem. Biophys. Acta, 2002, 1559:56-68、その全体が参照により援用される）が挙げられる。一部の実施形態では、エンドソーム溶解成分は、pHの変化に応答して、電荷又はプロトン化にて変化を経ることになる化学基（例えば、アミノ酸）を含有し得る。エンドソーム溶解成分は、線状又は分岐状であり得る。

【0301】

リガンドは、輸送、ハイブリダイゼーション及び特異性特性を改善し得、また得られる天然又は修飾オリゴリボヌクレオチド或いは本明細書に記載の単量体及び／又は天然若しくは修飾リボヌクレオチドの任意の組み合わせを含むポリマー分子のヌクレアーゼ耐性を改善し得る。

【0302】

リガンドは、一般に、例えば取り込みを増強するための治療修飾因子；例えば分布を監視するための診断化合物又はレポーター基；架橋剤；及びヌクレアーゼ耐性を与える部分を含み得る。一般例として、脂質、ステロイド、ビタミン、糖、タンパク質、ペプチド、ポリアミン及びペプチド模倣物が挙げられる。

10

【0303】

リガンドは、天然に存在する物質、例えばタンパク質（例えば、ヒト血清アルブミン（HSA）、低密度リポタンパク質（LDL）、高密度リポタンパク質（HDL）又はグロブリン）；炭水化物（例えば、デキストラン、プルラン、キチン、キトサン、イヌリン、シクロデキストリン又はヒアルロン酸）；又は脂質を含み得る。リガンドは、組換え又は合成分子、例えば合成ポリマー、例えば合成ポリアミノ酸、オリゴヌクレオチド（例えば、アプタマー）でもあり得る。ポリアミノ酸の例として、ポリリジン（PLL）、ポリL-アスパラギン酸、ポリL-グルタミン酸、スチレン-マレイン酸無水物共重合体、ポリ（L-ラクチド-コ-グリコリド）共重合体、ジビニルエーテル-マレイン酸無水物共重合体、N-（2-ヒドロキシプロピル）メタクリルアミド共重合体（HMPA）、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリビニルアルコール（PVA）、ポリウレタン、ポリ（2-アクリル酸エチル）、N-イソプロピルアクリルアミドポリマー又はポリホスファジンであるポリアミノ酸が挙げられる。ポリアミンの例として、ポリエチレンジアミン、ポリリジン（PLL）、スペルミン、スペルミジン、ポリアミン、擬ペプチド-ポリアミン、ペプチドミメティックポリアミン、デンドリマーポリアミン、アルギニン、アミジン、プロタミン、カチオン性脂質、カチオン性ポルフィリン、ポリアミンの四級塩又は α ヘリカルペプチドが挙げられる。

20

【0304】

リガンドは、標的基、例えば細胞又は組織標的化剤、例えばレクチン、糖タンパク質、脂質又はタンパク質、例えば腎細胞などの特定細胞型に結合する抗体も含み得る。標的基は、サイトロトピン、メラノトトロピン、レクチン、糖タンパク質、界面活性剤タンパク質A、ムチン炭水化物、多価ラクトース、多価ガラクトース、N-アセチル-ガラクトサミン、N-アセチル-グルコサミン、多価マンノース、多価フコース、グリコシル化ポリアミノ酸、多価ガラクトース、トランスフェリン、ビスホスホネート、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、脂質、コレステロール、ステロイド、胆汁酸、葉酸塩、ビタミンB12、ビオチン、RGDペプチド、RGDペプチドミメティック又はアプタマーであり得る。

30

【0305】

リガンドのその他の例としては、染料、挿入剤（例えば、アクリジン）、架橋剤（例えば、ソラレン、マイトマイシンC）、ポルフィリン（TPPC4、テキサフィリン、サフィリン）、多環式芳香族炭化水素（例えば、フェナジン、ジヒドロフェナジン）、人工エンドヌクレアーゼ又はキレート剤（例えば、EDTA）、例えばコレステロールなどの親油性分子、コール酸、アダマンタン酢酸、1-ピレン酪酸、ジヒドロテストステロン、1,3-ビス-O（ヘキサデシル）グリセロール、ゲラニルオキシヘキシル基、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メントール、1,3-プロパンジオール、ヘプタデシル基、パルミチン酸、ミリスチン酸、O3-（オレオイル）リトコール酸、O3-（オレオイル）コレン酸、ジメトキシトリチル又はフェノキサジン）及びペプチド複合体（例えば、アンテナペディアペプチド、Tatペプチド）、アルキル化剤、ホスフェート、アミノ、メルカプト、PEG（例えば、PEG-40K）、MPEG、[MPEG]₂、ポリアミノ、アルキル、置換アルキル、放射性標識マーカ、酵素、ハプテン（例えば、ビオチ

40

50

ン)、輸送／吸収促進薬(例えば、アスピリン、ビタミンE、葉酸)、合成リボヌクレアーゼ(例えば、イミダゾール、ビスイミダゾール、ヒスタミン、イミダゾールクラスター、アクリジン-イミダゾール複合体、テトラアザ大環状化合物のEu³⁺複合体)、ジニトロフェニル、HRP又はAPが挙げられる。

【0306】

リガンドは、例えば、糖タンパク質などのタンパク質；又は例えば共リガンドに特異的親和性を有する分子などのペプチド；又は例えばがん細胞、内皮細胞又は骨細胞などの指定された細胞型に結合する抗体などの抗体であり得る。リガンドは、ホルモン及びホルモン受容体も含み得る。それらは、脂質、レクチン、炭水化物、ビタミン、補助因子、多価乳糖、多価ガラクトース、N-アセチル-ガラクトサミン、N-アセチル-グルコサミン多価マンノース、多価フコース又はアプタマーなどの非ペプチド化学種も含み得る。リガンドは、例えば、リポ多糖、p38 MAPキナーゼ活性化因子又はNF-κB活性化因子であり得る。

【0307】

リガンドは、例えば、細胞の微小管、微小繊維及び／又は中間径フィラメントを破壊することで、例えば細胞の細胞骨格を破壊することにより、細胞へのiRNA剤の取り込みを増大させ得る薬剤などの物質であり得る。薬剤は、例えば、タキソン(taxon)、ビンクリスチン、ビンブラスチン、サイトカラシン、ノコダゾール、ジャブラキノリド(japlakinolide)、ラトランクリンA、ファロイジン、スウィンホリドA、インダノシン又はミオセルピンであり得る。

【0308】

リガンドは、オリゴヌクレオチドの細胞への取り込みを、例えば炎症性応答を活性化することにより増強し得る。かかる効果を有することになる例示的リガンドは、腫瘍壊死因子α(TNF-α)、インターロイキン-1β又はγインターフェロンを含む。

【0309】

一態様では、リガンドは、脂質又は脂質に基づく分子である。このような脂質又は脂質ベースの分子は、好ましくは、例えばヒト血清アルブミン(HSA)などの血清タンパク質と結合する。HSA結合リガンドは、例えば、身体の非腎臓標的組織などの標的組織への複合体の分布を可能にする。例えば、標的組織は、肝臓の実質細胞をはじめとする肝臓であり得る。HSAに結合し得るその他の分子もリガンドとして使用され得る。例えば、ナプロキセン又はアスピリンを使用し得る。脂質又は脂質ベースのリガンドは、(a)複合体の分解耐性を増大させ得て、(b)標的細胞又は細胞膜の標的化又はそれへの輸送を増大させ得て、及び／又は(c)例えばHSAなどの血清タンパク質の結合を調節するのに使用し得る。

【0310】

例えば、複合体の標的組織への結合を調節するなど、阻害のために、脂質ベースのリガンドを使用し得る。例えば、より強力にHSAに結合する脂質又は脂質ベースのリガンドは、腎臓に標的化される可能性がより低く、したがって身体から除去される可能性がより低い。より弱くHSAに結合する脂質又は脂質ベースのリガンドは、複合体を腎臓に標的化するのに使用し得る。

【0311】

好ましい実施形態では、脂質ベースのリガンドはHSAに結合する。好ましくは、それは、複合体が好ましくは非腎臓組織に分布するように、十分な親和性でHSAと結合する。しかし、親和性は、HSAリガンド結合が逆転され得ない程度にまで、強力ではないことが好ましい。

【0312】

他の好ましい実施形態では、複合体が好ましくは腎臓に分布するように、脂質ベースのリガンドはHSAと弱く結合するか又は全く結合しない。腎細胞を標的とするその他の部分も、脂質ベースのリガンドに代えて又はそれに加えて使用し得る。

【0313】

10

20

30

40

50

別の態様では、リガンドは、例えば、増殖細胞などの標的細胞に取り込まれる、ビタミンなどの部分である。これらは、例えば、がん細胞などの悪性又は非悪性型などの望まれない細胞増殖によって特徴付けられる障害を治療するのに、特に有用である。例示的なビタミンとしては、ビタミンA、E及びKが挙げられる。その他の例示的なビタミンとしては、例えば、葉酸、B12、リボフラビン、ビオチン、ピリドキサルなどのBビタミン又はがん細胞に取り込まれるその他のビタミン又は栄養素が挙げられる。またHAS及び低密度リポタンパク質(LDL)及び高比重リポタンパク質(HDL)も挙げられる。

【0314】

別の態様では、リガンドは細胞透過剤であり、好ましくはらせん細胞透過剤である。好ましくは、細胞透過剤は両親媒性である。例示的な細胞透過剤は、tat又はアンテノペディアなどのペプチドである。細胞透過剤がペプチドである場合、それはペプチジル模倣薬、逆転異性体、非ペプチド又は偽ペプチド結合及びD-アミノ酸使用をはじめとする、修飾を受け得る。らせん剤は、好ましくは親油性及び疎油性相を有する α -らせん剤である。

【0315】

リガンドは、ペプチド又はペプチド模倣体であり得る。ペプチド模倣薬(本明細書においてオリゴペプチド模倣薬とも称される)は、天然ペプチドに類似する定義された三次元構造に折り畳み可能な分子である。ペプチド又はペプチド模倣薬部分は、例えば、約5、10、15、20、25、30、35、40、45又は50アミノ酸長など、約5~50アミノ酸長であり得る。ペプチド又はペプチド模倣薬は、例えば、細胞透過性ペプチド、カチオン性ペプチド、両親媒性ペプチド又は疎水性ペプチド(例えば、主にTyr、Trp又はPheからなる)であり得る。ペプチド部分は、デンドリマーペプチド、束縛ペプチド又は架橋ペプチドであり得る。別の代案では、ペプチド部分は、疎水性膜移行配列(MTS)を含み得る。例示的な疎水性MTS含有ペプチドは、アミノ酸配列AAVALLPAVLLALLAPを有するRFGFである。疎水性MTSを含有するRFGF類似体(例えば、アミノ酸配列AALLPVLLAAP)も標的部分であり得る。ペプチド部分は、細胞膜を越えて、ペプチド、オリゴヌクレオチド及びタンパク質をはじめとする、多数の極性分子を輸送し得る「送達」ペプチドであり得る。例えば、HIV Tatタンパク質(GRKKRRQRPPQ)及びショウジョウバエ(Drosophila)アンテナペディアタンパク質(RQIKIWFQNRRMKWKK)からの配列は、送達ペプチドとして機能できることが分かっている。ペプチド又はペプチドミメティック、例えばファージディスプレイライブラリー又は1ビーズ1化合物(OBOC)コンビナトリアルライブラリー(Lam et al., Nature, 354:82-94, 1991、その全体が参照により援用される)から同定されるペプチドは、DNAのランダム配列によりコードされ得る。好ましくは、組み込まれた単量体単位を介してiRNA剤に繋ぎ止められたペプチド又はペプチドミメティックは、細胞を標的とするペプチド、例えばアルギニン-グリシン-アスパラギン酸(RGD)-ペプチド又はRGDミミックである。ペプチド部分は、約5アミノ酸長~約40アミノ酸長の範囲であり得る。ペプチド部分は、例えば、安定性を増強するか又は立体構造的特性を導くために構造的修飾を有し得る。下記の構造的修飾のいずれかを用いることができる。腫瘍細胞、例えば内皮腫瘍細胞又は乳がん腫瘍細胞を標的とするため、RGDペプチド部分を用いることができる(Zitzmann et al., Cancer Res., 62:5139-43, 2002、その全体が参照により援用される)。RGDペプチドは、肺、腎臓、脾臓又は肝臓を含む種々の他の組織の腫瘍へのiRNA剤の標的化を促進し得る(Aoki et al., Cancer Gene Therapy 8:783-787, 2001、その全体が参照により援用される)。好ましくは、RGDペプチドは、腎臓へのiRNA剤の標的化を促進することになる。RGDペプチドは、線状又は環状であり得、また特定組織への標的化を促進するため、修飾、例えばグリコシル化又はメチル化がなされ得る。例えば、グリコシル化されたRGDペプチドは、iRNA剤を、 $\alpha V \beta 3$ を発現する腫瘍細胞に送達し得る(Haubner et al., Jour. Nucl. Med., 42:326-336,

10

20

30

40

50

2001、その全体が参照により援用される)。増殖性細胞内に豊富に存在するマーカーを標的にするペプチドを用いることができる。例えば、RGD含有ペプチド及びペプチドミメティックは、がん細胞、特にインテグリンを提示する細胞を標的にし得る。したがって、RGDペプチド、RGDを有する環状ペプチド、D-アミノ酸を含むRGDペプチド並びに合成RGDミミックを用いることができる。RGDに加えて、インテグリンリガンドを標的にする他の部分を用いることができる。一般に、増殖性細胞及び血管新生を制御するため、かかるリガンドを用いることができる。このタイプのリガンドの好ましいコンジュゲートは、PECAM-1、VEGF又は他のがん遺伝子、例えば本明細書に記載のがん遺伝子を標的にする。

【0316】

「細胞透過性ペプチド」は、例えば、細菌又は真菌細胞などの微生物細胞又はヒト細胞などの哺乳類細胞などの細胞に浸透できる。微生物細胞透過性ペプチドは、例えば、 α -らせん直鎖ペプチド（例えば、LL-37又はセクロピン (Ceropin) P1）、ジスルフィド結合含有ペプチド（例えば、 α -デフェンシン、 β -デフェンシン又はバクテネシン）又は1つ又は2つの主要アミノ酸（例えば、PR-39又はインドリシジン）のみを含有するペプチドであり得る。細胞透過性ペプチドは、核局在化シグナル (NLS) も含み得る。例えば、細胞浸透ペプチドは、二連の両親媒性ペプチド、例えばMPGであり得、それはHIV-1 gp41及びSV40ラージT抗原のNLSの融合ペプチドドメインから誘導される (Simeoni et al., Nucl. Acids Res. 31: 2717-2724, 2003、その全体が参照により援用される)。

【0317】

一部の実施形態では、標的化ペプチドは、両親媒性 α -ヘリカルペプチドであり得る。例示的な両親媒性 α -ヘリカルペプチドとして、限定はされないが、セクロピン、リコトキシン、パラダキシン、プフォリン、CPF、ボンビニン様ペプチド (BLP)、カテリシジン、セラトトキシン、S. クラバ (S. Clava) ペプチド、メクラウナギ腸管抗菌ペプチド (HFIAP)、マガイニン、ブレビニン-2、ダーマセプチン、メリチン、プレウロシディン、H₂Aペプチド、アフリカツメガエルのペプチド、エスカレンチン-1及びカエリンが挙げられる。らせん安定性の完全性を維持するため、好ましくは幾つかの要素が考慮されることになる。例えば、最大数のらせん安定化残基が用いられることになり（例えば、Leu, Ala又はLys）、最小数のらせん不安定化残基が用いられることになり（例えば、プロリン又は環状単量体単位。キャッピング残基が検討されることになり（例えば、Glyは例示的なN-キャッピング残基であり、且つ／又はさらなるH結合を提供し、らせんを安定化するため、C末端アミド化を用いることができる。i $\pm$ 3又はi $\pm$ 4位によって分離された、反対の電荷を有する残基間での塩架橋の形成は、安定性をもたらし得る。例えば、リジン、アルギニン、ホモアルギニン、オルニチン又はヒスチジンなどのカチオン性残基は、アニオン性残基のグルタミン酸又はアスパラギン酸と塩架橋を形成し得る。

【0318】

ペプチド及びペプチドミメティックリガンドは、天然又は修飾ペプチド、例えばD又はLペプチド； α 、 β 又は γ ペプチド；N-メチルペプチド；アザペプチド；1つ以上のアミドを有するペプチド、すなわち結合が1つ以上の尿素、チオ尿素、カルバメート又はスルホニル尿素結合と置換されたペプチド；又は環状ペプチドを有するものを含む。

【0319】

標的リガンドは、特定の受容体を標的とする能力がある任意のリガンドであり得る。例として、葉酸塩、GalNAc、ガラクトース、マンノース、マンノース-6P、糖のクラスター、例えばGalNAcクラスター、マンノースクラスター、ガラクトースクラスター又はアプタマーが挙げられる。クラスターは、2つ以上の糖単位の組み合わせである。標的化リガンドは、インテグリン受容体リガンド、ケモカイン受容体リガンド、トランスフェリン、ビオチン、セロトニン受容体リガンド、PSMA、エンドセリン、GCPII、ソマトスタチン、LDL及びHDLリガンドも含む。リガンドは、核酸、例えばアプ

10

20

30

40

50

タマーにも基づき得る。アプタマーは、修飾されないか、又は本明細書に開示される修飾の任意の組み合わせを有し得る。

【0320】

エンドソーム放出剤は、イミダゾール、ポリ又はオリゴイミダゾール、PEI、ペプチド、膜融合ペプチド、ポリカルボキシレート、ポリカチオン、マスク化オリゴ若しくはポリカチオン又はアニオン、アセタール、ポリアセタール、ケタール／ポリケタール、オルトエステル、マスク化若しくは非マスク化カチオン又はアニオン電荷を有するポリマー、マスク化若しくは非マスク化カチオン又はアニオン電荷を有するデンドリマーを含む。

【0321】

PK修飾因子は、薬物動態修飾因子を表す。PK修飾因子は、脂溶性剤 (lipophiles)、胆汁酸、ステロイド、リン脂質類似体、ペプチド、タンパク質結合剤、PEG、ビタミンなどを含む。例示的なPK修飾因子として、限定はされないが、コレステロール、脂肪酸、コール酸、リトコール酸、ジアルキルグリセリド (dialkylglycerides)、ジアシルグリセリド、リン脂質、スフィンゴ脂質、ナプロキセン、イブプロフェン、ビタミンE、ピオチンなどが挙げられる。幾つかのホスホロチオエート結合を含むオリゴヌクレオチドは、血清タンパク質、すなわち短いオリゴヌクレオチド、例えば約5塩基、10塩基、15塩基又は20塩基のオリゴヌクレオチドに結合することも知られており、骨格において複数のホスホロチオエート結合を含むことで、さらにリガンドとして (例えば、PK調節性リガンドとして) 本発明に適する。

【0322】

さらに、血清成分 (例えば、血清タンパク質) に結合するアプタマーもPK調節性リガンドとして本発明に適する。

【0323】

本発明に適した他のリガンドコンジュゲートは、米国特許出願の、2004年8月10日に出願された米国特許出願第10/916,185号明細書；2004年9月21日に出願された米国特許出願第10/946,873号明細書；2007年8月3日に出願された米国特許出願第10/833,934号明細書；2005年4月27日に出願された米国特許出願第11/115,989号明細書及び2007年11月21日に出願された米国特許出願第11/944,227号明細書 (あらゆる目的でそれら全体が参照により援用される) に記載されている。

【0324】

2つ以上のリガンドが存在するとき、リガンドは、全部が同じ特性を有する、全部が異なる特性を有するか、又は一部のリガンドが同じ特性を有する一方、その他は異なる特性を有する可能性がある。例えば、リガンドは、標的化特性を有する、エンドソーム溶解活性を有するか、又はPK調節特性を有する可能性がある。好ましい実施形態では、全てのリガンドが、異なる特性を有する。

【0325】

リガンドは、様々な場所、例えば3'末端、5'末端及び／又は内部位置で、オリゴヌクレオチドにカップリングされ得る。好ましい実施形態では、リガンドは、介在テザー、例えば本明細書に記載の担体を介してオリゴヌクレオチドに結合される。リガンド又はテザーリガンドは、単量体上に、前記単量体が伸長鎖に組み込まれるときに存在し得る。一部の実施形態では、リガンドは、前記「前駆体」単量体が伸長鎖に組み込まれた後、「前駆体」単量体へのカップリングを介して組み込まれ得る。例えば、例えばTAP- (CH₂)_nNH₂などのアミノ末端テザー (すなわち会合されるリガンドを有しない) を有する単量体は、伸長するオリゴヌクレオチド鎖に組み込まれ得る。その後の操作において、すなわち前駆体単量体の鎖への組み込み後、求電子基、例えばペンタフルオロフェニルエステル又はアルデヒド基を有するリガンドは、次いでリガンドの求電子基を前駆体単量体のテザーの末端求核基とカップリングすることにより、前駆体単量体に結合され得る。

【0326】

別の例では、クリックケミストリー反応への関与に適した化学基、例えばアジド又はア

10

20

30

40

50

ルキン終端テザー／リンカーを有する単量体が組み込まれ得る。その後の操作において、すなわち前駆体単量体の鎖への組み込み後、相補的化学基、例えばアルキン又はアジドを有するリガンドは、アルキン及びアジドと一緒にカップリングすることにより、前駆体単量体に結合され得る。

【0327】

二重鎖オリゴヌクレオチドでは、リガンドは、片鎖又は両鎖に結合され得る。一部の実施形態では、二本鎖 iRNA 剤は、センス鎖にコンジュゲートされたリガンドを有する。他の実施形態では、二本鎖 iRNA 剤は、アンチセンス鎖にコンジュゲートされたリガンドを有する。

【0328】

一部の実施形態では、リガンドは、核酸塩基、糖部分又は核酸分子のヌクレオシド間結合にコンジュゲートされ得る。プリン核酸塩基又はその誘導体へのコンジュゲーションは、環内及び環外原子を含む、任意の位置で生じ得る。一部の実施形態では、プリン核酸塩基の2位、6位、7位又は8位は、コンジュゲート部分に結合される。ピリミジン核酸塩基又はその誘導体へのコンジュゲーションも任意の位置で生じ得る。一部の実施形態では、ピリミジン核酸塩基の2位、5位及び6位は、コンジュゲート部分と置換され得る。ヌクレオシドの糖部分へのコンジュゲーションは、任意の炭素原子で生じ得る。コンジュゲート部分に結合され得る糖部分の炭素原子の例として、2'、3' 及び 5' 炭素原子が挙げられる。1' 位も例えば脱塩基残基においてコンジュゲート部分に結合され得る。ヌクレオシド間結合もコンジュゲート部分を有し得る。リン含有結合（例えば、リン酸ジエステル、ホスホロチオエート、ジチオリン酸、ホスホロアミド酸など）では、コンジュゲート部分は、リン原子に直接的に、又はリン原子に結合された O、N 若しくは S 原子に結合され得る。アミン又はアミド含有ヌクレオシド間結合（例えば、PNA）では、コンジュゲート部分は、アミン若しくはアミドの窒素原子又は隣接する炭素原子に結合され得る。

【0329】

一部の実施形態では、リガンドは、センス鎖にコンジュゲートされる。本明細書に記載の通り、リガンドは、センス鎖の3' 末端、5' 末端又は内部位置にコンジュゲートされ得る。一部の実施形態では、リガンドは、センス鎖の3' 末端にコンジュゲートされる。さらに、リガンドは、センス鎖の核酸塩基、糖部分又はヌクレオチド間結合にコンジュゲートされ得る。

【0330】

RNA 干渉の分野における任意の好適なリガンドが用いられ得るが、リガンドは、典型的には、炭水化物、例えば単糖（GalNAc など）、二糖、三糖、四糖、多糖である。

【0331】

リガンドを核酸にコンジュゲートするリンカーは、上で検討されたものを含む。例えば、リガンドは、一価、二価又は三価分岐リンカーを通じて結合された1つ以上の GalNAc（N-アセチルガラクトサミン）誘導体であり得る。

【0332】

一部の実施形態では、本発明の dsRNA は、二価及び三価分岐リンカーにコンジュゲートされ、式 (IV) - (VII)：

10

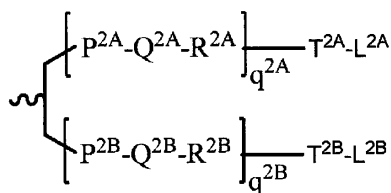
20

30

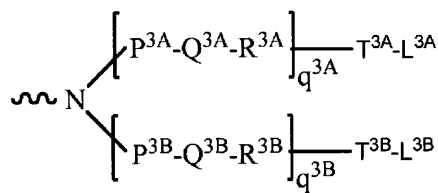
40

50

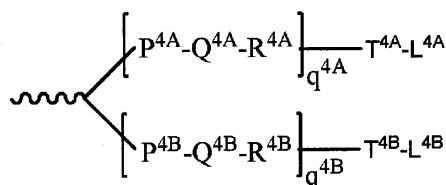
【化 2 8】



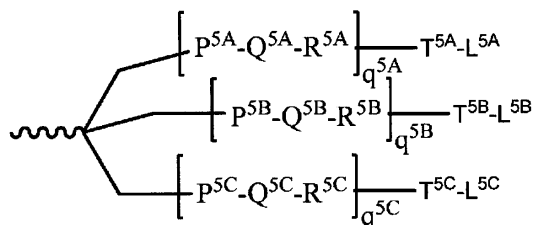
式 (IV)



式 (V)



式 (VI)



式 (VII)

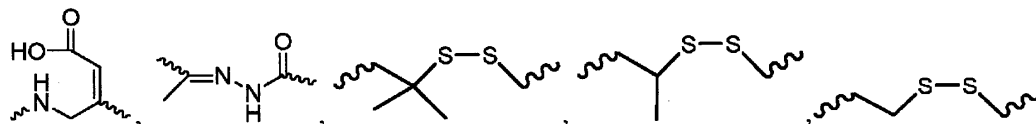
, 又は

(式中、 q^{2A} 、 q^{2B} 、 q^{3A} 、 q^{3B} 、 q^{4A} 、 q^{4B} 、 q^{5A} 、 q^{5B} 及び q^{5C} は、独立して、0~20の各存在を表し、ここで、反復単位は、同じ又は異なる可能性があり； p^{2A} 、 p^{2B} 、 p^{3A} 、 p^{3B} 、 p^{4A} 、 p^{4B} 、 p^{5A} 、 p^{5B} 、 p^{5C} 、 t^{2A} 、 t^{2B} 、 t^{3A} 、 t^{3B} 、 t^{4A} 、 t^{4B} 、 t^{5A} 、 t^{5B} 、 t^{5C} は、各々独立して、不在、C、O、NH、O、S、OC(O)、NHC(O)、CH₂、CH₂NH又はCH₂Oの各存在を表し；

Q^{2A} 、 Q^{2B} 、 Q^{3A} 、 Q^{3B} 、 Q^{4A} 、 Q^{4B} 、 Q^{5A} 、 Q^{5B} 、 Q^{5C} は、独立して、不在、アルキレン、置換アルキレンの各存在を表し、ここで、1つ以上のメチレンが、O、S、S(O)、SO₂、N(R^N)、C(R')=C(R'')、C≡C又はC(O)の1つ以上により中断又は終結され得；

R^{2A} 、 R^{2B} 、 R^{3A} 、 R^{3B} 、 R^{4A} 、 R^{4B} 、 R^{5A} 、 R^{5B} 、 R^{5C} は、各々独立して、不在、NH、O、S、CH₂、C(O)O、C(O)NH、NHCH(R^a)C(O)、-C(O)-CH(R^a)-NH-、CO、CH=N-O、

【化 2 9】



又はヘテロシクリルの各存在を表し；

L^{2A} 、 L^{2B} 、 L^{3A} 、 L^{3B} 、 L^{4A} 、 L^{4B} 、 L^{5A} 、 L^{5B} 及び L^{5C} は、リガンドを表す；すなわち各々独立して、単糖(GalNAcなど)、二糖、三糖、四糖、オリゴ糖又は多糖の各存在を表し；且つ

R^a は、H又はアミノ酸側鎖である)
のいずれかに示される構造を含む。

【0333】

三価コンジュゲートGalNAc誘導体は、標的遺伝子、例えば式(VII)：

10

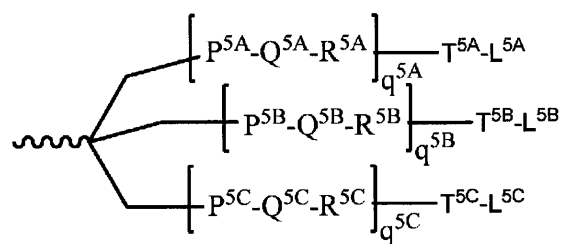
20

30

40

50

【化 3 0】



式 (VII)

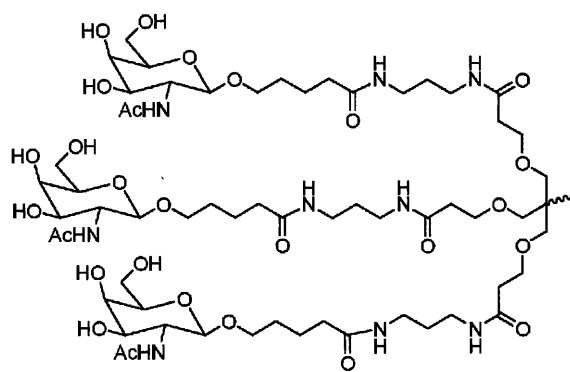
10

(式中、 L^{5A} 、 L^{5B} 及び L^{5C} は、単糖、例えばGalNAc誘導体を表す)のものの発現を阻害するための、RNAi剤との併用において特に有用である。

【0334】

GalNAc誘導体にコンジュゲートする好適な二価及び三価分岐リンカー基の例として、限定はされないが、以下の化合物：

【化 3 1】



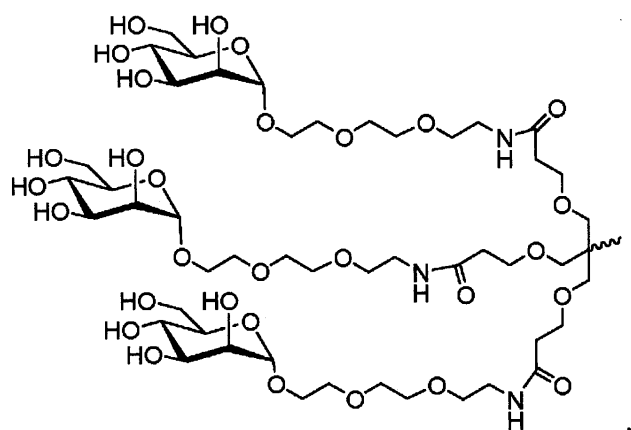
20

30

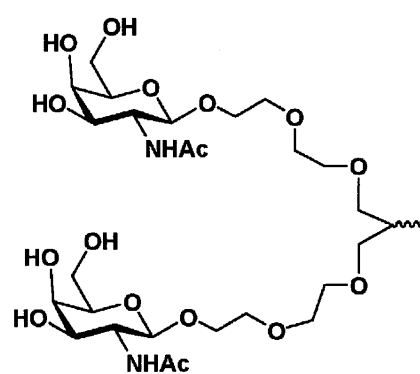
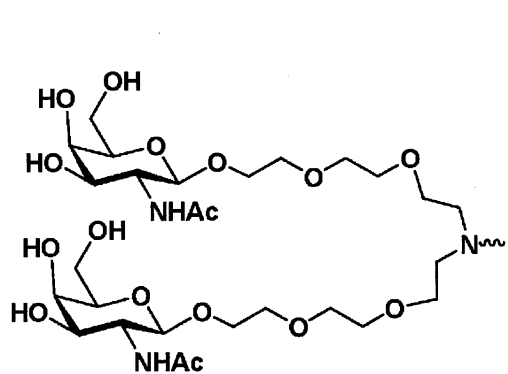
40

50

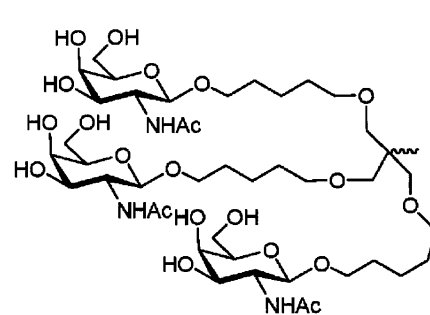
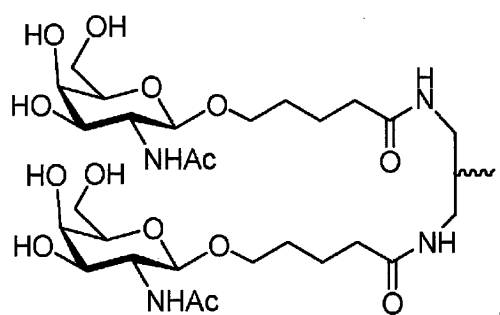
【化 3 2】



10



20

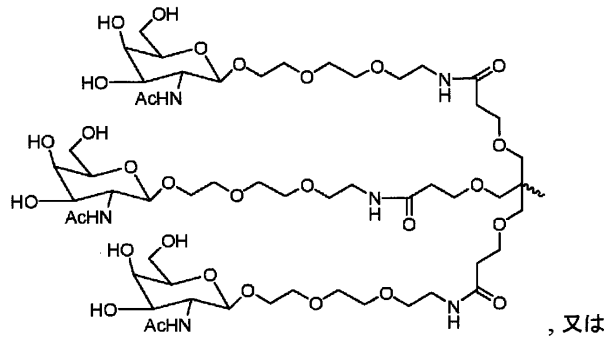


30

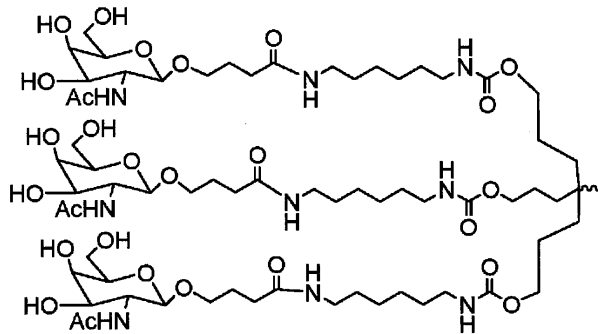
40

50

【化 3 3】



10



20

が挙げられる。

【0335】

定義

本明細書で用いられるとき、用語「dsRNA」、「siRNA」及び「iRNA剤」は、標的RNA、例えばmRNA、例えばタンパク質をコードする遺伝子の転写物のサイレンシングを媒介し得る薬剤と交換可能に用いられる。便宜上、かかるmRNAは、本明細書中でサイレンシング対象のmRNAとも称される。かかる遺伝子は、標的遺伝子とも称される。一般に、サイレンシング対象のRNAは、内因性遺伝子又は病原体遺伝子である。さらに、mRNA以外のRNA、例えばtRNA及びウイルスRNAも標的にされ得る。

30

【0336】

本明細書で用いられるとき、語句「RNAiを媒介する」は、配列特異的様式で標的RNAをサイレンシングする能力を指す。理論によって拘束されることを望まないが、サイレンシングでは、RNAi機構又はプロセス及びガイドRNA、例えば21~23ヌクレオチドのsiRNA剤が用いられることが考えられる。

【0337】

本明細書で用いられるとき、「特異的にハイブリダイズ可能な」及び「相補的な」は、本発明の化合物と標的RNA分子との間に安定且つ特異的な結合が生じるのに十分な程度の相補性を示すように用いられる用語である。特異的な結合は、特異的な結合が所望されるような条件下、すなわちアッセイ若しくは治療的処置の場合又はインビトロアッセイの場合の生理的条件下、アッセイが実施されるような条件下において、オリゴマー化合物の非標的配列への非特異的な結合を回避するのに十分な程度の相補性を必要とする。非標的配列は、典型的には少なくとも5つのヌクレオチド分異なる。

40

【0338】

一部の実施形態では、本発明のdsRNA分子は、標的RNA、例えばdsRNA分子が標的mRNAによってコードされるタンパク質の産生をサイレンシングするような標的mRNAに対して「十分に相補的」である。別の実施形態では、本発明のdsRNA分子

50

は、標的RNAに対して「正確に相補的」であり、例えば、標的RNA及びdsRNA二本鎖剤は、アニールし、例えば専ら正確な相補性の領域内でワトソン・クリック塩基対からなるハイブリッドを形成する。「十分に相補的な」標的RNAは、標的RNAに対して正確に相補的な（例えば、少なくとも10ヌクレオチドの）内部領域を含み得る。さらに、一部の実施形態では、本発明のdsRNA分子は、単一ヌクレオチド差異を特異的に区別する。この場合、dsRNA分子は、正確な相補性が単一ヌクレオチド差異（例えば、その7ヌクレオチド以内の）領域内に見出される場合に限り、RNAiを媒介する。

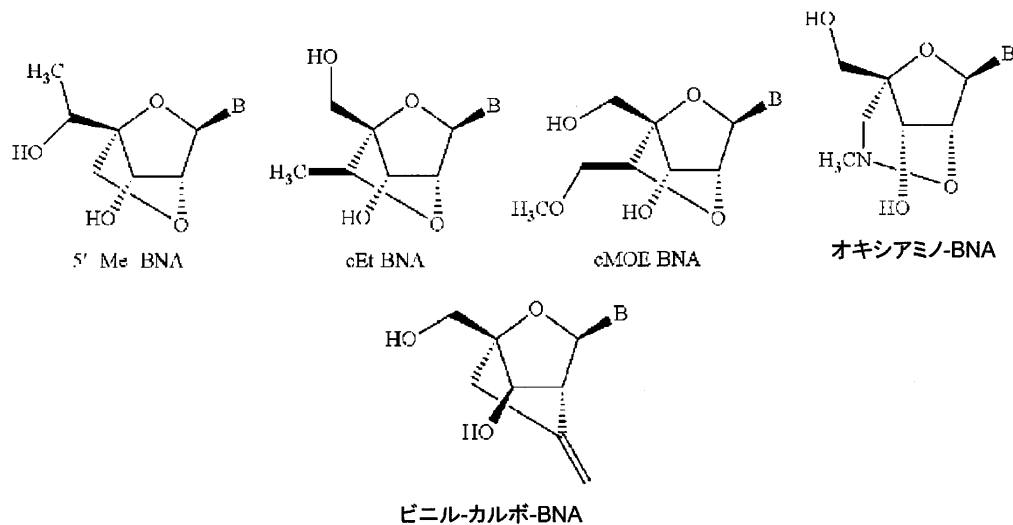
【0339】

本明細書で用いられるとき、用語「オリゴヌクレオチド」は、例えば、100、200、300又は400ヌクレオチドより短い長さの核酸分子（RNA又はDNA）を指す。

【0340】

用語「BNA」は、架橋化核酸を指し、制約された又は接近困難なRNAとして示されることが多い。BNAは、「固定された」C₃'エンドの糖パッカリングを伴う、5員、6員又はさらに7員架橋構造を有し得る。架橋は、典型的にはリボースの2'位、4'位に取り込まれ、2'、4'BNAヌクレオチド（例えば、LNA又はENA）をもたらす。BNAヌクレオチドの例として、以下のヌクレオシド：

【化34】

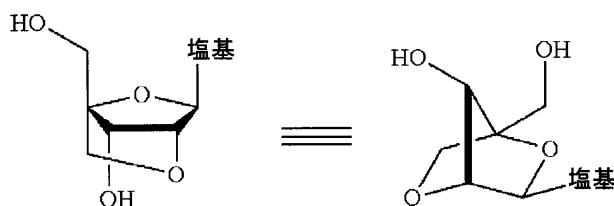


が挙げられる。

【0341】

用語「LNA」は、ロックド核酸を指し、制約された又は接近困難なRNAとして示されることが多い。LNAは、修飾されたRNAヌクレオチドである。LNAヌクレオチドのリボース部分は、2'ヒドロキシルを同じリボース糖の4'炭素に連結する余分な架橋（例えば、メチレン架橋又はエチレン架橋）で修飾される。例えば、架橋は、3'エンドN o r t h) 立体構造：

【化35】



においてリボースを「ロックし」得る。

【0342】

用語「ENA」は、エチレン架橋核酸を指し、制約された又は接近困難なRNAとして示されることが多い。

【0343】

「切断部位」は、本明細書中で、iRNA剤を用いることによるRISC機構によって切断される標的遺伝子又はセンス鎖における骨格結合を意味する。また標的切断部位領域は、切断部位の両側に少なくとも1つ又は少なくとも2つのヌクレオチドを含む。センス鎖では、切断部位は、センス鎖自体がRNAi機構により切断されるべき標的であった場合、切断されることになるセンス鎖における骨格結合である。切断部位は、当技術分野で公知の方法、例えばSoutschek et al., Nature (2004) 432, 173-178 (その全体が参照により援用される) に詳述されるような5'-RACEアッセイを用いて判定され得る。当技術分野で周知であるように、2つの21ヌクレオチド長の鎖(ここで、それらの鎖は、3'末端に2ヌクレオチドの一本鎖オーバーハングを有する19の連続する塩基対の二本鎖領域を形成する)を含む円錐状の二本鎖RNAi剤における切断部位領域の場合、切断部位領域は、センス鎖の5'末端から9~12位に対応する。

10

【0344】

切断可能な連結基

切断可能な連結基は、細胞外部で十分に安定であるが、標的細胞への侵入時、切断され、リンカーと一緒に保持している2つの部分を放出するものである。本発明に従うdsRNA分子の好ましい実施形態では、切断可能な連結基は、標的細胞において、又は第1の参照状態(例えば、細胞内状態を模倣するか又は表すように選択され得る)下において、又は第2の参照状態(例えば、血液又は血清中に見出される状態を模倣するか又は表すように選択され得る)下において、対象の血液中よりも少なくとも10倍以上、好ましくは少なくとも100倍速く切断される。

20

【0345】

切断可能な連結基は、切断剤、例えばpH、酸化還元電位又は分解性分子の存在の影響を受けやすい。一般に、切断剤は、血清又は血液中よりも細胞内部により広く存在しているか、又はより高いレベル若しくは活性で見出される。かかる分解剤の例として、特定の基質のために選択されるか、又は基質特異性を有しないレドックス剤、例えば細胞内に存在する、酸化若しくは還元酵素又は還元によりレドックス切断可能な連結基を分解し得る還元剤、例えばメルカプタン；エステラーゼ；エンドソーム又は酸性環境を創出し得る薬剤、例えば5以下のpHをもたらすもの；一般酸として作用することにより酸切断可能な連結基を加水分解又は分解し得る酵素、ペプチダーゼ(基質特異的であり得る)及びホスファターゼが挙げられる。

30

【0346】

ジスルフィド結合などの切断可能連結基は、pHに対する感受性が高くあり得る。ヒト血清のpHが7.4であるのに対し、細胞内平均pHはわずかにより低く、約7.1~7.3の範囲にわたる。エンドソームは、5.5~6.0の範囲のより酸性のpHを有し、リソソームは、約5.0のさらにより酸性のpHを有する。幾つかのリンカーは、好ましいpHで切断される切断可能連結基を有し、それによって細胞中のリガンドから又は細胞の所望の区画にカチオン性脂質が放出される。

40

【0347】

リンカーは、特定の酵素によって切断可能な切断可能連結基を含み得る。リンカーに組み込まれる切断可能連結基のタイプは、標的とされる細胞に左右され得る。例えば、肝臓を標的化するリガンドは、エステル基を含むリンカーを通じてカチオン性脂質に連結し得る。肝細胞はエステラーゼに富み、したがってリンカーは、エステラーゼが豊富でない細胞型よりも、肝細胞中でより効率的に切断される。エステラーゼに富むその他の細胞型としては、肺、腎皮質及び精巣の細胞が挙げられる。

【0348】

50

ペプチド結合を含有するリンカーは、肝細胞及び滑膜細胞などのペプチダーゼに富んだ細胞型を標的化する際に使用し得る。

【0349】

一般に切断可能連結基の候補の適合性は、候補連結基を切断する分解性作用物質（条件）の能力を検査することで評価し得る。切断可能連結基の候補は、血中において又はその他の非標的組織との接触時、切断に抵抗する能力についても検査することが望ましい。したがって第1の条件が標的細胞中での切断を示すように選択され、第2の条件がその他の組織又は例えば血液又は血清などの生体液中での切断を示すように選択される、第1及び第2の条件間の切断の相対的感受性を判定し得る。評価は、無細胞系中、細胞中、細胞培養中、臓器又は組織培養中又は全身の動物中で実施し得る。無細胞又は培養条件で最初の評価を行い、全身の動物中でのさらなる評価によって確認することが有用なこともあり得る。好ましい実施形態では、有用な候補化合物は、血液又は血清（又は細胞外条件を模倣するように選択された生体外条件下）と比較して、細胞中（又は細胞内条件を模倣するように選択された生体外条件下）で、少なくとも2、4、10又は100倍より迅速に切断される。

【0350】

酸化還元切断可能連結基

切断可能な連結基の1つのクラスは、レドックス切断可能な連結基であり、それは、本発明に従うdsRNA分子において用いられ得、還元又は酸化時に切断される。還元的切断可能連結基の一例は、ジスルフィド連結基（-S-S-）である。切断可能連結基候補が、適切な「還元的切断可能連結基」であるか、又は例えば特定のiRNA部分及び特定の標的作用物質と共に使用するのに適するかどうかを判定するために、本明細書に記載される方法に頼ることができる。例えば、候補は、例えば、標的細胞などの細胞中で観察される切断速度を模倣する、当技術分野で公知の試薬を使用して、ジチオスレイトール（DTT）又はその他の還元剤とのインキュベーションによって評価し得る。候補は、血液又は血清条件を模倣するように選択される条件下でも評価され得る。好ましい実施形態では、1つの候補化合物は、血中で最大で10%切断される。好ましい実施形態では、有用な候補化合物は、血液（又は細胞外条件を模倣するように選択された生体外条件下）と比較して、細胞中（又は細胞内条件を模倣するように選択された生体外条件下）で、少なくとも2、4、10又は約100倍より迅速に分解される。候補化合物の切断速度は、細胞内媒体を模倣するように選択された条件下で標準酵素動態アッセイを使用して、細胞外媒体を模倣するように選択された条件と比較して判定し得る。

【0351】

リン酸ベースの切断可能連結基

リン酸に基づく切断可能な連結基は、本発明に従うdsRNA分子において用いられ得、リン酸基を分解又は加水分解する薬剤により切断される。細胞中でリン酸基を切断する作用物質の一例は、細胞内のホスファターゼなどの酵素である。リン酸ベースの連結基の例は、-O-P(O)(ORk)-O-、-O-P(S)(ORk)-O-、-O-P(S)(SRk)-O-、-S-P(O)(ORk)-O-、-O-P(O)(ORk)-S-、-S-P(O)(ORk)-S-、-O-P(S)(ORk)-S-、-S-P(S)(ORk)-O-、-O-P(O)(Rk)-O-、-O-P(S)(Rk)-O-、-S-P(O)(Rk)-O-、-S-P(S)(Rk)-O-、-S-P(O)(Rk)-S-、-O-P(S)(Rk)-S-である。好ましい実施形態は、-O-P(O)(OH)-O-、-O-P(S)(OH)-O-、-O-P(S)(SH)-O-、-S-P(O)(OH)-O-、-O-P(O)(OH)-S-、-S-P(O)(OH)-S-、-O-P(S)(OH)-S-、-S-P(S)(OH)-O-、-O-P(O)(H)-O-、-O-P(S)(H)-O-、-S-P(O)(H)-O-、-S-P(S)(H)-O-、-O-P(S)(H)-S-、-S-P(O)(H)-S-である。好ましい実施形態は、-O-P(O)(OH)-O-である。これらの候補は、上述したものと類似の方法を使用して評価し得る。

【0352】

酸切断可能連結基

酸切断可能な連結基は、本発明に従う dsRNA 分子において用いられ得、酸性条件下で切断される連結基である。好ましい実施形態では、酸切断可能連結基は、pH 約 6.5 以下（例えば、約 6.0、5.5、5.0 以下）の酸性環境内において又は一般酸として作用し得る酵素などの作用物質によって切断される。細胞内では、エンドソーム及びリソソームなどの特定の低 pH 細胞小器官が、酸切断可能連結基の切断環境を提供し得る。酸切断可能連結基の例としては、ヒドラゾン、エステル及びアミノ酸エステルが挙げられるが、これに限定されるものではない。酸切断可能基は、一般式 $-C=NN-$ 、 $C(O)O$ 又は $-OC(O)$ を有し得る。好ましい実施形態は、炭素がエステルの酸素に付着する場合（アルコキシ基）は、アリール基、置換アルキル基又はジメチルペンチル又はヘプチルなどの三級アルキル基である。これらの候補は、上述したものと類似の方法を使用して評価し得る。

10

【0353】

エステルベースの連結基

エステルに基づく切断可能な連結基は、本発明に従う dsRNA 分子において用いられ得、細胞内でエステラーゼ及びアミダーゼなどの酵素により切断される。エステルベースの切断可能連結基の例としては、アルキレン、アルケニレン及びアルキニレン基のエステルが挙げられるが、これに限定されるものではない。エステル切断可能連結基は、一般式 $-C(O)O-$ 又は $-OC(O)-$ を有する。これらの候補は、上述したものと類似の方法を使用して評価し得る。

20

【0354】

ペプチドベースの切断基

ペプチドに基づく切断可能な連結基は、本発明に従う dsRNA 分子において用いられ得、細胞内でペプチダーゼ及びプロテアーゼなどの酵素により切断される。ペプチドベースの切断可能連結基は、アミノ酸間に形成されて、オリゴペプチド（例えば、ジペプチド、トリペプチドなど）及びポリペプチドを生じる、ペプチド結合である。ペプチドベースの切断可能基には、アミド基 $(-C(O)NH-)$ は含まれない。アミド基は、あらゆるアルキレン、アルケニレン又はアルキニレン間に形成され得る。ペプチド結合は、アミノ酸間に形成されて、ペプチド及びタンパク質を生じる特殊なタイプのアミド結合である。ペプチドベースの切断基は、一般にアミノ酸間に形成されて、ペプチド及びタンパク質を生じるペプチド結合（すなわちアミド結合）に限定され、アミド官能基全体は含まない。ペプチドベースの切断可能連結基は、一般式 $-NHCH(R)A-C(O)NHCH(R)B-C(O)-$ を有し、式中、RA 及び RB は 2 つの隣接するアミノ酸の R 基である。これらの候補は、上述したものと類似の方法を使用して評価し得る。本明細書で用いられるとき、「炭水化物」は、少なくとも 6 つの炭素原子（線状、分岐状又は環状であり得る）を有すると共に、酸素、窒素又は硫黄原子が各炭素原子に結合された、1 つ以上の単糖単位から本質的に構成されるいずれかの炭水化物である化合物；又は一部として、各々が少なくとも 6 つの炭素原子（線状、分岐状又は環状であり得る）を有すると共に、酸素、窒素又は硫黄原子が各炭素原子に結合された、1 つ以上の単糖単位から構成される炭水化物部分を有する化合物を指す。代表的な炭水化物は、糖（約 4～9 の単糖単位を有する単糖、二糖、三糖及びオリゴ糖）並びにデンプン、グリコゲン、セルロース及び多糖類ガムなどの多糖を含む。具体的な単糖として、C₅ 及び上記（好ましくは C₅～C₈）糖が挙げられ；二糖及び三糖として、2 又は 3 の単糖単位を有する糖（好ましくは C₅～C₈）が挙げられる。

30

40

【0355】

本発明は、インビトロで標的遺伝子の発現を阻害するための、本明細書に定義されるような dsRNA 分子の使用にさらに関する。一部の実施形態では、本発明は、標的遺伝子の発現を阻害するための、dsRNA 分子の使用にさらに関する。

【0356】

本発明は、対象における標的遺伝子の発現の阻害における使用を意図した、本明細書に

50

定義されるような dsRNA 分子にさらに関する。対象は、任意の動物、例えば哺乳動物、例えばマウス、ラット、ヒツジ、ウシ、イヌ、ネコ又はヒトであり得る。

【0357】

一部の実施形態では、本発明の dsRNA 分子は、緩衝液中で投与される。

【0358】

一部の実施形態では、本明細書に記載の siRNA 化合物は、対象への投与を意図して配合され得る。配合された siRNA 組成物は、種々の状態を想定可能である。幾つかの例では、その組成物は、少なくとも部分的には、結晶性、均一結晶性及び／又は無水性（例えば、80未満、50、30、20又は10%の水）である。別の例では、siRNA は、水相中、例えば水を含む溶液中に存在する。

10

【0359】

水相又は結晶組成物は、例えば、送達媒体、例えばリポソーム（特に水相用）又は粒子（例えば、結晶組成物に適し得るような微小粒子）中に取り込まれ得る。一般に、siRNA 組成物は、本明細書に記載の通り、意図される投与方法に適合するような様式で配合される。例えば、特定の実施形態では、その組成物は、以下の方法：噴霧乾燥、凍結乾燥、真空乾燥、蒸発、流動層乾燥若しくはこれらの技術の組み合わせ；又は脂質を用いた超音波処理、凍結乾燥、凝縮及び他の自己組織化の少なくとも1つにより調製される。

【0360】

siRNA 製剤は、別の薬剤、例えば別の治療薬又は siRNA を安定化する薬剤、例えば siRNA と複合して iRNP を形成するタンパク質と組み合わせて配合され得る。さらに他の薬剤として、キレート剤、例えば EDTA（例えば、 Mg^{2+} などの二価カチオンを除去するため）、塩、リボヌクレアーゼ阻害剤（例えば、RNAse などの広範特異性リボヌクレアーゼ阻害剤）などが挙げられる。

20

【0361】

一部の実施形態では、siRNA 製剤は、別の siRNA 化合物、例えば第2の遺伝子に関して又は同じ遺伝子に関して RNAi を媒介し得る第2の siRNA を含む。さらに他の製剤として、少なくとも3、5、10、20、50又は100以上の異なる siRNA 種を挙げることができる。かかる siRNA は、類似した数の異なる遺伝子に関して RNAi を媒介し得る。

【0362】

一部の実施形態では、siRNA 製剤は、少なくとも第2の治療薬（例えば、RNA 又は DNA 以外の薬剤）を含む。例えば、ウイルス性疾患、例えば HIV の治療のための siRNA 組成物であれば、既知の抗ウイルス剤（例えば、プロテアーゼ阻害剤又は逆転写酵素阻害剤）を含み得る。別の例では、がんの治療のための siRNA 組成物であれば、化学療法剤をさらに含み得る。

30

【0363】

本発明に従う dsRNA 分子の投与に用いることができる例示的な製剤が、以下に検討される。

【0364】

リポソーム。説明の簡略化のため、このセクションにおける製剤、組成物及び方法は、主に非修飾 siRNA 化合物に関して検討される。しかし、これらの製剤、組成物及び方法が、他の siRNA 化合物、例えば修飾 siRNA と併せて実施可能であり、且つかかる実施が本発明の範囲内に含まれるように理解され得る。siRNA 化合物、例えば二本鎖 siRNA 化合物又は ssRNA 化合物、（例えば、前駆体、例えば ssRNA 化合物にプロセッシング可能なより大きい siRNA 化合物又は siRNA 化合物、例えば二本鎖 siRNA 化合物、若しくは ssRNA 化合物、若しくはその前駆体をコードする DNA）製剤は、膜状分子集合体、例えばリポソーム又はミセルでの送達のために配合され得る。本明細書の用法では、「リポソーム」という用語は、例えば、1つの二重層又は複数の二重層などの、少なくとも1つの二重層に配列された両親媒性脂質から構成される小胞を指す。リポソームは、親油性材料と水性内部から形成される膜を有する、単層の又

40

50

は多重膜小胞を含む。水性部分は、*siRNA*組成物を含有する。親油性材料は、水性内部を水性外部から隔離し、水性外部は、典型的に*siRNA*組成物を含まないが、場合により含み得る。リポソームは、活性成分の作用部位への移行と送達のために有用である。リポソーム膜は生体膜と構造的に類似するため、リポソームを組織に適用すると、リポソーム性二重層は細胞膜の二重層と融合する。リポソームと細胞の融合が進行するにつれて、*siRNA*を含む内部水性内容物が細胞内に送達され、そこでは*siRNA*が標的RNAに特異的に結合し得て、RNAiを媒介し得る。場合によっては、リポソームも特異的に標的化され、例えば*siRNA*を特定の細胞型に誘導する。

【0365】

*siRNA*を含有するリポソームは、多様な方法によって調製し得る。一例では、リポソームの脂質成分は、脂質成分なしでミセルが形成されるように、洗剤に溶解される。例えば、脂質成分は、両親媒性カチオン性脂質又は脂質複合体であり得る。洗剤は、高い臨界ミセル濃度を有し得て、非イオン性であり得る。例示的な洗剤としては、コール酸、CHAPS、オクチルグルコシド、デオキシコール酸及びラウロイルサルコシンが挙げられる。次に*siRNA*調製物は、脂質成分を含むミセルに添加される。脂質上のカチオン基は*siRNA*と相互作用して、*siRNA*周囲で凝縮してリポソームを形成する。凝縮後、例えば透析によって洗剤を除去し、*siRNA*のリポソーム調製物を得る。

【0366】

必要に応じて、例えば凝縮を助ける担体化合物を、制御された添加によって縮合反応中に添加し得る。例えば、担体化合物は、核酸以外のポリマー（例えば、スペルミン又はスペルミジン）であり得る。pHも調節して、凝縮を支援し得る。

【0367】

送達媒体の構成成分としてポリヌクレオチド／カチオン性脂質複合体を組み込んだ安定なポリヌクレオチド送達媒体を作製するための方法についてのさらなる説明は、例えば、国際公開第96／37194号パンフレットに記載されている。リポソーム形成は、Felgner, P. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 8: 7413-7417, 1987; 米国特許第4, 897, 355号明細書; 米国特許第5, 171, 678号明細書; Bangham, et al. M. Mol. Biol. 23: 238, 1965; Olson, et al. Biochim. Biophys. Acta 557: 9, 1979; Szoka, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 75: 4194, 1978; Mayhew, et al. Biochim. Biophys. Acta 775: 169, 1984; Kim, et al. Biochim. Biophys. Acta 728: 339, 1983; 及びFukunaga, et al. Endocrinol. 115: 757, 1984（それら全体が参照により援用される）に記載されている例示的方法の1つ以上の態様も含み得る。送達媒体としての使用を意図した適切な大きさの脂質凝集体を調製するために一般に用いられる技術には、超音波処理及び凍結－解凍＋放出が含まれる（例えば、Mayer, et al. Biochim. Biophys. Acta 858: 161, 1986を参照、その全体が参照により援用される）。一様に小さく（50～200nm）、比較的均一な凝集体が所望されるとき、顕微溶液化を用いることができる（Mayhew, et al. Biochim. Biophys. Acta 775: 169, 1984（その全体が参照により援用される））。これらの方法は、*siRNA*製剤のリポソームへのパッケージングに容易に適応される。

【0368】

pH感受性であるか又は負に帯電したリポソームは、核酸分子を封入し、それらと複合体を形成しない。核酸分子と脂質の両方が同様に帯電されることから、複合体形成ではなく反発が生じる。にもかかわらず、一部の核酸分子は、これらのリポソームの水性内部内に封入される。pH感受性リポソームは、チミジンキナーゼ遺伝子をコードするDNAを培養下で細胞単層に送達するのに用いられている。外因性遺伝子の発現は、標的細胞において検出された（Zhou et al., Journal of Controlled

10

20

30

40

50

Release, 19, (1992) 269-274、その全体が参照により援用される)。

【0369】

1つの主要タイプのリポソーム組成物は、天然由来ホスファチジルコリン以外に、リン脂質を含む。例えば、中性リポソーム組成物は、ジミリストイルホスファチジルコリン (DMPC) 又はジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) から形成され得る。アニオン性リポソーム組成物が、一般にジミリストイルホスファチジルグリセロールから形成されるのに対し、アニオン性融合性リポソームは、主にジオレオイルスファチジルエタノールアミン (DOPE) から形成される。別のタイプのリポソーム組成物は、例えば、ダイズPC及び卵PCなどのホスファチジルコリン (PC) から形成される。別のタイプは、リン脂質及び／又はホスファチジルコリン及び／又はコレステロールの混合物から形成される。

10

【0370】

試験管内で及びリポソームを細胞内に導入するその他の方法の例としては、米国特許第5,283,185号明細書；米国特許第5,171,678号明細書；国際公開第94/00569号パンフレット；国際公開第93/24640号パンフレット；国際公開第91/16024号パンフレット；Felgner, J. Biol. Chem. 269: 2550, 1994；Nabel, Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 11307, 1993；Nabel, Human Gene Ther. 3: 649, 1992；Gershon, Biochem. 32: 7143, 1993；及びStrauss EMBO J. 11: 417, 1992が挙げられる。

20

【0371】

一部の実施形態では、カチオン性リポソームが使用される。カチオン性リポソームは、細胞膜に融合できる利点を有する。非カチオン性リポソームは、原形質膜と効率的に融合できないが、生体内でマクロファージに取り込まれ、siRNAをマクロファージに送達するのに使用され得る。

【0372】

リポソームのさらなる利点としては、以下が挙げられる。天然リン脂質から得られるリポソームは、生体適合性且つ生分解性であり；リポソームには、幅広い水及び脂質可溶性薬剤を組み込み得て；リポソームは、それらの内部区画にカプセル化されたsiRNAを代謝及び分解から保護し得る (Rosoff, "Pharmaceutical Dosage Forms," Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, volume 1, p. 245)。リポソーム製剤の調製における重要な考察は、リポソームの脂質表面電荷、小胞サイズ及び水性容量である。

30

【0373】

正に帯電した合成カチオン性脂質であるN-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウム塩化物 (DOTMA) を使用して、小型リポソームを形成し得て、それは核酸と自然的に相互作用して、組織培養細胞の細胞膜の負に帯電した脂質と融合できる脂質-核酸複合体を形成し、siRNA送達をもたらす (DOTMA及びそのDNAとの併用の説明については、その全体が参照により援用される、例えばFelgner, P. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 84: 7413-7417, 1987及び米国特許第4,897,355号明細書を参照されたい)。

40

【0374】

ADOTMA類似体である1,2-ビス(オレオイルオキシ)-3-(トリメチルアンモニウム)プロパン (DOTAP) をリン脂質と組み合わせて使用し、DNA錯化小胞を形成し得る。リポフェクチン (商標) Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, Md.) は、生体組織培養細胞に、高アニオン性核酸を送達するための効果的薬剤であり、それは負に帯電したポリヌクレオチドと自然的に相互作用して複合体を形成する、正に帯電したDOTMAリポソームを含む。十

50

分に正に帯電したリポソームを使用すれば、得られる複合体上の正味電荷も正である。このようにして調製された正に帯電した複合体は、負に帯電した細胞表面に自然発生的に付着して、原形質膜と融合し、例えば組織培養細胞内に機能性核酸を効率的に送達する。別の市販のカチオン性脂質、1, 2-ビス(オレオイルオキシ)-3, 3-(トリメチルアンモニウム)プロパン(「DOTAP」)(Boehringer Mannheim, Indianapolis, Indiana)は、オレオイル部分がエーテル結合でなくエステルによって結合することで、DOTMAと異なる。

【0375】

その他の報告されたカチオン性脂質化合物としては、2つの脂質タイプの1つと共役するカルボキシスぺルミンをはじめとする、多様な部分と共役しているものが挙げられ、例えば5-カルボキシスぺルミルグリシンジオクタオレオイルアミド(「DOGS」)(Transfectam(商標), Promega, Madison, Wisconsin)及びジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン5-カルボキシスぺルミルアミド(「DPPEs」)などの化合物が挙げられる(例えば、米国特許第5, 171, 678号明細書を参照されたい)。

【0376】

別のカチオン性脂質複合体は、DOPEと組み合わせられてリポソームに調合されているコレステロール(「DC-Chol」)による、脂質の誘導体化を含む(その全体が参照により援用される、Gao, X. and Huang, L., Biochim. Biophys. Res. Commun. 179: 280, 1991を参照されたい)。ポリリジン

ポリリジンをDOPEに共役させて生成されるリポポリリジンが、血清存在下における形質移入に効果的であると報告されている(Zhou, X. et al., Biochim. Biophys. Acta 1065: 8, 1991)。特定の細胞系では、共役するカチオン性脂質を含有するこれらのリポソームは、DOTMA含有組成物より低い毒性を示し、より効率的な形質移入を提供すると言われている。その他の市販のカチオン性脂質製品としては、DMRIE及びDMRIE-HP(Vical, La Jolla, California)及びリポフェクタミン(DOSPA)(Life Technology, Inc., Gaithersburg, Maryland)が挙げられる。オリゴヌクレオチドの送達に適したその他のカチオン性脂質は、国際公開第98/39359号パンフレット及び国際公開第96/37194号パンフレットに記載される。

【0377】

リポソーム製剤は局所投与に特に適しており、リポソームはその他の製剤に優る幾つかの利点を示す。このような利点としては、投与薬剤の高い全身性吸収に関連した副作用の低下、所望標的における投与薬剤の蓄積増大及びsiRNAを皮膚内に投与する能力が挙げられる。幾つかの実装では、リポソームは、siRNAを表皮細胞に送達するのに、また例えば皮膚内などの皮膚組織内へのsiRNAの浸透を高めるのに使用される。例えば、リポソームは、局所的に塗布し得る。リポソームとして調合された治療薬の皮膚への局所送達、実証されている(例えば、その全体が参照により援用される、Weiner et al., Journal of Drug Targeting, 1992, vol. 2, 405-410及びdu Plessis et al., Antiviral Research, 18, 1992, 259-265; Mannino, R. J. and Fould-Fogerite, S., Biotechniques 6: 682-690, 1988; Itani, T. et al. Gene 56: 267-276, 1987; Nicolau, C. et al. Meth. Enz. 149: 157-176, 1987; Straubinger, R. M. and Papahadjopoulos, D. Meth. Enz. 101: 512-527, 1983; Wang, C. Y. and Huang, L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7851-7855, 1987を参照されたい)。

【0378】

非イオン性リポソームシステム、特に非イオン性界面活性剤とコレステロールを含むシ

ステムが研究され、皮膚への薬剤送達におけるそれらの効用が判定されている。Nova some I（ジラウリン酸グリセリル／コレステロール／ポリオキシエチレン－１０－ステアリルエーテル）及びNova some II（ジステアリン酸グリセリル／コレステロール／ポリオキシエチレン－１０－ステアリルエーテル）を含む非イオン性リポソーム製剤が、マウスの皮膚の真皮内に薬剤を送達するのに使用された。siRNAを含むこのような製剤は、皮膚疾患を治療するのに有用である。

【0379】

siRNAを含むリポソームは、高度に変形可能にし得る。このような変形能は、リポソームの平均半径よりも小さい孔を通り抜けて、リポソームが浸透できるようにし得る。例えば、トランスファーソームは、変形可能なりポソームの一種である。トランスファーソームは、通常は界面活性剤である表面エッジ活性化剤を、標準リポソーム組成物に添加して、作成し得る。siRNAを含むトランスファーソームは、皮膚内のケラチノサイトにsiRNAを送達するために、例えば感染によって皮下送達し得る。無傷の哺乳類皮膚を越えるために、脂質小胞は、適切な経皮勾配の影響下で、それぞれ直径が50nm未満の一連の細孔を通過しなくてはならない。さらに脂質特性のために、これらのトランスファーソームは、自己最適化し（例えば、皮膚孔の形状に適應する）、自己修復し得て、断片化することなく頻繁にそれらの標的に到達し得て、自己装填することが多い。

【0380】

本発明に適する他の製剤が、2008年1月2日に出願された米国仮特許出願第61／018,616号明細書；2008年1月2日に出願された米国仮特許出願第61／018,611号明細書；2008年3月26日に出願された米国仮特許出願第61／039,748号明細書；2008年4月22日に出願された米国仮特許出願第61／047,087号明細書及び2008年5月8日に出願された米国仮特許出願第61／051,528号明細書に記載されている。2007年10月3日に出願されたPCT出願の国際出願PCT／US2007／080331号パンフレットも、本発明に適する製剤について記載している。

【0381】

界面活性剤．説明の簡略化のため、このセクションにおける製剤、組成物及び方法は、主に非修飾siRNA化合物に関して検討される。しかし、これらの製剤、組成物及び方法が、他のsiRNA化合物、例えば修飾siRNAと併せて実施可能であり、且つかかる実施が本発明の範囲内に含まれるように理解され得る。界面活性剤では、乳剤（マイクロエマルジョンを含む）及びリポソーム（上記参照）などの製剤において幅広い用途が見出される。siRNA（又は前駆体、例えばsiRNAにプロセッシング可能なより大きいdsiRNA又はsiRNA若しくは前駆体をコードするDNA）組成物は、界面活性剤を含み得る。一部の実施形態では、siRNAは、界面活性剤を含む乳濁液として配合される。天然及び合成両方の多数の異なる界面活性剤型の特性の分類及び格付けの最も一般的な方法は、親水性／親油性バランス（HLB: hydrophile / lipophile balance）の使用による。親水性基の性質は、製剤中で使用される異なる界面活性剤を分類する、最も有用な手段を提供する（Rieger, "Pharmaceutical Dosage Forms", Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1988, p. 285）。

【0382】

界面活性剤分子がイオン化されない場合、それは非イオン性界面活性剤に分類される。非イオン性界面活性剤には、医薬製品における幅広い用途があり、広いpH値範囲にわたって使用できる。一般にそれらのHLB値は、それらの構造に応じて2～約18の範囲である。非イオン性界面活性剤としては、エチレングリコールエステル、プロピレングリコールエステル、グリセリルエステル、ポリグリセリルエステル、ソルビタンエステル、スクロースエステル及びエトキシ化エステルなどの非イオン性エステルが挙げられる。脂肪アルコールエトキシレート、プロポキシ化アルコール及びエトキシ化／プロポキシ化ブロックポリマーなどの非イオン性アルカノールアミド及びエーテルもこのクラスに

10

20

30

40

50

含まれる。ポリオキシエチレン界面活性剤は、非イオン性界面活性剤クラスの最も良く見られる構成員である。

【0383】

界面活性剤分子が、水への溶解又は分散時に負電荷を保有する場合、界面活性剤はアニオン性に分類される。アニオン性界面活性剤としては、石鹼などのカルボン酸塩、ラクチル酸アシル、アミノ酸のアシルアミド、硫酸アルキル及びエトキシ化硫酸アルキルなどの硫酸エステル、アルキルベンゼンスルホネートなどのスルホネート、イセチオン酸アシル、タウリン酸アシル及びスルホコハク酸アシル及びリン酸アシルが挙げられる。アニオン性界面活性剤クラスの最も重要な構成員は、硫酸アルキル及び石鹼である。

【0384】

界面活性剤分子が、水への溶解又は分散時に正電荷を保有する場合、界面活性剤はカチオン性に分類される。カチオン性界面活性剤としては、四級アンモニウム塩及びエトキシ化アミンが挙げられる。四級アンモニウム塩が、このクラスで最も良く使用される構成員である。

【0385】

界面活性剤分子が、陽性又は陰性電荷のいずれかを有する能力を有する場合、界面活性剤は両性に分類される。両性界面活性剤としては、アクリル酸誘導体、置換アルキルアミド、N-アルキルベタイン及びリン脂質が挙げられる。

【0386】

医薬品、製剤中及びエマルション中の界面活性剤の使用については、概説されている (Rieger, "Pharmaceutical Dosage Forms", Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1988, p. 285)。

【0387】

ミセル及び他の膜状製剤。説明の簡略化のため、このセクションにおけるミセル及び他の製剤、組成物及び方法は、主に非修飾 siRNA 化合物に関して検討される。しかし、これらのミセル及び他の製剤、組成物及び方法が、他の siRNA 化合物、例えば修飾 siRNA 化合物と併せて実施可能であり、且つかかる実施が本発明の範囲内に含まれるように理解され得る。siRNA 化合物、例えば二本鎖 siRNA 化合物又は ss siRNA 化合物、(例えば、前駆体、例えば ss siRNA 化合物にプロセシング可能なより大きい siRNA 化合物又は siRNA 化合物、例えば二本鎖 siRNA 化合物、若しくは ss siRNA 化合物、若しくはその前駆体をコードする DNA) 組成物は、ミセル製剤として提供され得る。「ミセル」は、その中で、分子の疎水性部分が全て内側を向き、親水性部分が周囲の水性相に接したままであるように、両親媒性分子が球状構造に配列される、特定タイプの分子アセンブリーと、本明細書で定義される。環境が疎水性であれば、逆の配置が存在する。

【0388】

経皮膜を通じた送達に適した混合ミセル調合物は、siRNA 組成物、アルカリ金属 C₈~C₂₂アルキル硫酸塩及びミセル形成化合物の水溶液を混合して調製され得る。例示的なミセル形成化合物としては、レシチン、ヒアルロン酸、ヒアルロン酸の薬学的に許容可能な塩、グリコール酸、乳酸、カモミール抽出物、キュウリ抽出物、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、モノオレイン、モノオレアート、モノラウレート、ルリチサ油、月見草油、メントール、トリヒドロキシオキソコラニルグリシンとその薬学的に許容可能な塩、グリセリン、ポリグリセリン、リジン、ポリリジン、トリオレイン、ポリオキシエチレンエーテル及びその類似体、ポリドカノールアルキルエーテル及びその類似体、ケノデオキシコール酸、デオキシコール酸及びそれらの混合物が挙げられる。ミセル形成化合物は、アルカリ金属アルキル硫酸塩の添加と同時に又はその後に添加され得る。混合ミセルは、成分を実質的にどのように混合しても形成するが、より小型のミセルを提供するためには、激しく混合される。

【0389】

一方法では、siRNA 組成物と、少なくともアルカリ金属アルキル硫酸塩とを含有す

10

20

30

40

50

る、第1のミセル組成物が調製される。次に第1のミセル組成物は、少なくとも3つのミセル形成化合物と混合されて、混合ミセル組成物が形成する。別の方法では、ミセル組成物は、siRNA組成物、アルカリ金属アルキル硫酸塩及び少なくとも1つのミセル形成化合物を混合して調製され、激しい混合を伴う残りのミセル形成化合物の添加がそれに続く。

【0390】

フェノール及び／又はm-クレゾールを混合ミセル組成物に添加して、調合物を安定化し、細菌増殖から保護し得る。代わりに、ミセル形成成分と共に、フェノール及び／又はm-クレゾールを添加し得る。グリセリンなどの等張剤も混合ミセル組成物形成後に添加され得る。

【0391】

ミセル調合物を噴霧として送達するためには、調合物を煙霧剤計量分配装置に入れて、計量分配装置に噴霧剤を装填し得る。加圧下にある噴霧剤は、計量分配装置内で液体形態である。成分の比率は、水性相と噴霧剤相が1つになるように、すなわち1つの相になるように調節される。2つの相がある場合、例えば定量バルブを通じて内容物の一部を分散する前に、計量分配装置を振盪する必要がある。医薬品の分注用量は、定量バルブから精微噴霧で噴射される。

【0392】

噴霧剤としては、水素含有クロロフルオロカーボン、水素含有フルオロカーボン、ジメチルエーテル及びジエチルエーテルが挙げられる。特定の実施形態では、HFA 134a (1, 1, 1, 2-テトラフルオロエタン) を使用し得る。

【0393】

必須成分の特定濃度は、比較的簡単な実験法によって判定し得る。口腔を通じた吸収のためには、注射を通じた用量又は胃腸管を通じた投与の例えば少なくとも2倍又は3倍に増大させることが、往々にして望ましい。

【0394】

粒子。説明の簡略化のため、このセクションにおける粒子、製剤、組成物及び方法は、主に修飾siRNA化合物に関して検討される。しかし、これらの粒子、製剤、組成物及び方法が、他のsiRNA化合物、例えば非修飾siRNA化合物と併せて実施可能であり、且つかかる実施が本発明の範囲内に含まれるように理解され得る。別の実施形態では、siRNA化合物、例えば二本鎖siRNA化合物又はssRNA化合物、(例えば、前駆体、例えばssRNA化合物にプロセッシング可能なより大きいsiRNA化合物又はsiRNA化合物、例えば二本鎖siRNA化合物、若しくはssRNA化合物、若しくはその前駆体をコードするDNA) 製剤は、粒子、例えば微小粒子に組み込まれ得る。微小粒子が、噴霧乾燥により作製され得るが、凍結乾燥、蒸発、流動層乾燥、真空乾燥又はこれらの技術の組み合わせを含む他の方法によっても作製され得る。

【0395】

医薬組成物

本発明のiRNA剤は、薬学的使用のため、配合され得る。本発明は、本明細書に定義されるようなdsRNA分子を含む医薬組成物にさらに関する。薬学的に許容できる組成物は、単独で摂取されるか、又は1つ以上の薬学的に許容できる担体(添加剤)、賦形剤及び／又は希釈剤と一緒に配合される、先行する実施形態のいずれかにおけるdsRNA分子の1つ以上を治療有効量で含む。

【0396】

医薬組成物は、固体又は液体形態、例えば(1)経口投与、例えば水薬(水溶液又は非水溶液又は懸濁液)、錠剤、例えば頬側、舌下及び全身吸収を標的とするもの、ボラス、散剤、顆粒剤、舌への塗布のためのペースト剤；(2)例えば、例えば無菌溶液若しくは懸濁液又は徐放性製剤としての皮下、筋肉内、静脈内又は硬膜外注射による非経口投与；(3)例えば、皮膚に適用されるクリーム、軟膏剤又は徐放性パッチ若しくはスプレーとしての局所適用；(4)例えば、ペッサリー、クリーム又はフォームとして腔内又は直

10

20

30

40

50

腸内；（５）舌下；（６）眼内；（７）経皮；又は（８）経鼻に適応するものでの投与に特化して配合され得る。皮下又は静脈内方法を用いる送達は、特に有利であり得る。

【０３９７】

語句「治療有効量」は、本明細書で用いられるとき、任意の医学的処置に適用可能な合理的なリスク・ベネフィット比で、少なくとも動物における細胞の亜集団において幾らかの所望される治療効果をもたらすのに有効である本発明の化合物を含む化合物、材料又は組成物の量を意味する。

【０３９８】

語句「薬学的に許容できる」は、合理的なリスク・ベネフィット比に適う、過剰な毒性、刺激作用、アレルギー反応又は他の課題若しくは合併症と伴わない、ヒト及び動物の組織と接触させる使用に適した、健全な医学的判断の範囲内に含まれる、化合物、材料、組成物及び／又は剤形を指すように本明細書中で用いられる。

【０３９９】

語句「薬学的に許容できる担体」は、本明細書で用いられるとき、対象化合物を１つの臓器又は身体の一部から別の臓器又は身体の一部へ運搬又は輸送することに関与する、薬学的に許容できる材料、組成物又は媒体、例えば液体又は固体充填剤、希釈剤、賦形剤、製造助剤（例えば、滑沢剤、タルク、マグネシウム、カルシウム又はステアリン酸亜鉛又はステアリン酸）又は溶媒封入材料を意味する。各担体は、製剤のその他の成分に適合しており、且つ患者に対して有害でないという意味で「許容できる」必要がある。薬学的に許容できる担体として役立ち得る材料の幾つかの例として、（１）糖、例えばラクトース、グルコース及びスクロース；（２）デンプン、例えばコーンスターチ及びジャガイモデンプン；（３）セルロース及びその誘導体、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース及び酢酸セルロース；（４）粉末化トラガカント；（５）麦芽；（６）ゼラチン；（７）平滑剤、例えばマグネシウムステート、ラウリル硫酸ナトリウム及びタルク；（８）賦形剤、例えばココアバター及び坐剤ワックス；（９）油、例えばピーナッツ油、綿実油、ベニバナ油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油及び大豆油；（１０）グリコール、例えばプロピレングリコール；（１１）ポリオール、例えばグリセリン、ソルビトール、マンニトール及びポリエチレングリコール；（１２）エステル、例えばオレイン酸エチル及びラウリン酸エチル；（１３）寒天；（１４）緩衝剤、例えば水酸化マグネシウム及び水酸化アルミニウム；（１５）アルギン酸；（１６）パイロジェンフリー水；（１７）等張食塩水；（１８）リンゲル液；（１９）エチルアルコール；（２０）ｐＨ緩衝液；（２１）ポリエステル、ポリカーボネート及び／又はポリ無水物；（２２）増量剤、例えばポリペプチド及びアミノ酸（２３）血清成分、例えば血清アルブミン、ＨＤＬ及びＬＤＬ；並びに（２２）医薬製剤中に用いられる他の無毒性親和性物質が挙げられる。

【０４００】

製剤は、便宜上、単位剤形で提示され得、また薬学の技術分野で周知の任意の方法により調製され得る。単一剤形を作製するために担体材料と組み合わせ可能な活性成分の量は、治療を受けているホスト、特定の投与様式に応じて変動することになる。単一剤形を作製するために担体材料と組み合わせ可能な活性成分の量は、一般に治療効果をもたらすような化合物の量となる。一般に、１００％中でのこの量は、活性成分が約０．１％～約９９％、好ましくは約５％～約７０％、最も好ましくは約１０％～約３０％の範囲となる。

【０４０１】

特定の実施形態では、本発明の製剤は、シクロデキストリン、セルロース、リボソーム、ミセル形成剤、例えば胆汁酸及び高分子担体、例えばポリエステル及びポリ無水物からなる群から選択される賦形剤；及び本発明の化合物を含む。特定の実施形態では、上記製剤は、本発明の化合物を経口生体利用可能にする。

【０４０２】

iRNA製剤は、別の薬剤、例えば別の治療薬又はiRNAを安定化する薬剤、例えばiRNAと複合してiRNPを形成するタンパク質と組み合わせて配合され得る。さらに

10

20

30

40

50

他の薬剤として、キレート剤、例えばEDTA（例えば、 Mg^{2+} などの二価カチオンを除去するため）、塩、リボヌクレアーゼ阻害剤（例えば、RNAsinなどの広範特異性リボヌクレアーゼ阻害剤）などが挙げられる。

【0403】

これらの製剤又は組成物を調製する方法は、本発明の化合物を担体、任意選択的に1つ以上の付属成分と会合させるステップを含む。一般に、その製剤は、本発明の化合物を液体担体若しくは微粉化された固体担体又は両方と均一且つ緊密に会合させ、次いで必要な場合、生成物を形成させることにより調製される。

【0404】

場合によっては、薬剤の効果を延長させるため、皮下又は筋肉内注射からの薬剤の吸収を遅らせることが望ましい。これは、水難溶性を有する結晶質又は非晶質材料の懸濁液の使用により行われ得る。ここで、薬剤の吸収速度は、その溶解速度に依存し、次いで結晶サイズ及び結晶性形態に依存し得る。代わりに、非経口的に投与される薬剤形態の遅延吸収は、薬剤を油媒体に溶解又は懸濁することによって行われる。

【0405】

本発明に記載の化合物は、他の医薬品に類似して、ヒト又は動物薬において用いられる任意の便宜的方法での投与のために配合され得る。

【0406】

用語「治療」は、予防、治療及び治癒も包含することが意図される。この治療を受けている患者は、一般に、霊長類、特にヒト及び他の哺乳類、例えばウマ、ウシ、ブタ及びヒツジ；並びに家禽及びペットを含む、需要のある任意の動物である。

【0407】

二本鎖RNAi剤は、インビボで細胞において、例えば細胞内に送達される外因性DNA鋳型から作製される。例えば、DNA鋳型は、ベクターに挿入され、遺伝子療法ベクターとして用いられ得る。遺伝子療法ベクターは、例えば、静脈内注射、局所投与により（米国特許第5,328,470号明細書、その全体が参照により援用される）又は定位注射により（例えば、Chen et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3054-3057、その全体が参照により援用される）、対象に送達され得る。遺伝子療法ベクターの薬剤は、許容できる希釈剤中の遺伝子療法ベクターを含み得るか、又は遺伝子送達媒体が包埋される持続放出マトリックスを含み得る。例えば、DNA鋳型は、2つの転写単位、すなわちdsRNA分子のトップ鎖を含む転写物を生成するものとdsRNA分子のボトム鎖を含む転写物を生成するものを含み得る。その鋳型が転写されるとき、dsRNA分子が生成され、遺伝子サイレンシングを媒介するsiRNA剤断片にプロセッシングされる。

【0408】

送達の経路

本明細書で定義されるようなdsRNA分子又は本明細書で定義されるようなdsRNA分子を含む医薬組成物は、異なる送達経路を用いて対象に投与され得る。iRNAを含む組成物は、種々の経路により対象に送達され得る。例示的経路は、静脈内、皮下、局所、直腸、肛門、膣、経鼻、肺、眼内を含む。

【0409】

本発明のiRNA分子及び／又はdsRNA分子は、投与に適した医薬組成物に組み込まれ得る。かかる組成物は、典型的には、iRNAの1種以上及び薬学的に許容できる担体を含む。本明細書で用いられるとき、用語「薬学的に許容できる担体」は、薬学的投与に適合する、ありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング剤、抗菌及び抗真菌剤、等張及び吸収遅延剤などを含むことが意図される。医薬活性物質におけるかかる媒体及び薬剤の使用は、当技術分野で周知である。任意の通常の媒体又は薬剤が活性化合物に不適合でない限り、組成物中でのその使用が検討される。補足的活性化合物も組成物中に組み込まれ得る。

【0410】

本発明の組成物は、局所又は全身治療が所望されるか否かに応じて、また治療されるべき領域に対して、多くの方法で投与され得る。投与は、局所（眼、膣、直腸、鼻腔内、経皮を含む）、経口又は非経口であり得る。非経口投与は、静脈内点滴、皮下、腹腔内若しくは筋肉内注射又はくも膜下腔内若しくは脳室内投与を含む。

【0411】

投与の経路及び部位は、標的化を増強するように選択され得る。例えば、筋細胞を標的にするため、目的の筋肉への筋肉内注射であれば、論理的な選択となる。肺細胞であれば、*iRNA*をエアロゾル形態で投与することにより標的にされ得る。血管内皮細胞であれば、バルーンカテーテルを*iRNA*でコーティングし、*DNA*を機械的に導入することにより標的にされ得る。

【0412】

用量

一態様では、本発明は、*dsRNA*分子、例えば*siRNA*剤を対象（例えば、ヒト対象）に投与する方法を特徴とする。別の態様では、本発明は、対象における標的遺伝子の発現を阻害することにおける使用を意図した、本明細書で定義されるような*dsRNA*分子に関する。その方法又は医学的使用は、*dsRNA*分子、例えば*siRNA*剤、例えば（a）二本鎖部分が14～40ヌクレオチド（nt）長、例えば21～23ntであり、（b）標的RNA（例えば、内因性又は病原体標的RNA）に対して相補的であり、任意選択的に、（c）1～5ヌクレオチド長の少なくとも1つの3'オーバーハングを含む二本鎖*siRNA*剤を単位用量で投与することを含む。一部の実施形態では、単位用量は、RNA剤の10mg/kg体重未満又は10未満、5、2、1、0.5、0.1、0.05、0.01、0.005、0.001、0.0005、0.0001、0.00005若しくは0.00001mg/kg体重及び200nモル未満（例えば、約 4.4×10^1 6コピー）/kg体重又はRNA剤の1500未満、750、300、150、75、15、7.5、1.5、0.75、0.15、0.075、0.015、0.0075、0.0015、0.00075、0.00015nモル/kg体重である。

【0413】

規定量は、疾患又は障害、例えば標的RNAに関連した疾患又は障害を治療又は予防するのに有効な量であり得る。例えば、単位用量は、注射（例えば、静脈内、皮下又は筋肉内）、吸入投与又は局所適用により投与され得る。一部の実施形態では、用量は、10未満、5、2、1又は0.1mg/kg体重であり得る。

【0414】

一部の実施形態では、単位用量は、1日1回よりも少ない、例えば2、4、8又は30日ごとよりも少ない頻度で投与される。別の実施形態では、単位用量は、ある頻度（例えば、定期的頻度）で投与されない。例えば、単位用量は、単回投与され得る。

【0415】

一部の実施形態では、有効用量は、他の伝統的な治療様式で投与される。一部の実施形態では、対象は、ウイルス感染を有し、その様式は、*dsRNA*分子以外、例えば*siRNA*剤以外の抗ウイルス剤である。別の実施形態では、対象は、アテローム性動脈硬化症を有し、*dsRNA*分子、例えば*siRNA*剤は、例えば、外科的介入後、例えば血管形成術と組み合わせて、有効用量で投与される。

【0416】

一部の実施形態では、対象に、*dsRNA*分子、例えば*siRNA*剤（例えば、前駆体、例えば*siRNA*剤にプロセッシング可能なより大きい*dsRNA*分子又は*dsRNA*分子、例えば*siRNA*剤若しくはその前駆体をコードするDNA）が、初期用量及び1回以上の維持用量で投与される。1又は複数の維持用量は、初期用量と同じであるか又は初期用量よりも低い、例えば初期用量よりも半分少ない可能性がある。維持投与計画は、対象を、0.01µg～15mg/kg体重/日の範囲、例えば10、1、0.1、0.01、0.001又は0.00001mg/kg体重/日の1又は複数回用量で治療することを含み得る。維持用量は、例えば、2、5、10又は30日ごとに1回以下、投与され

10

20

30

40

50

る。さらに、治療計画は、一時期続き得、その期間は、患者の特定疾患の性質、その重症度及び全身状態に応じて変動することになる。特定の実施形態では、その用量は、1日1回以下、例えば24、36、48又はより長時間ごとに1回以下、例えば5又は8日ごとに1回以下送達され得る。治療後、患者は、その状態における変化について、また病態の症状の軽減について監視され得る。その化合物の用量は、患者が現在の用量レベルに対して有意に応答しない場合に増加され得るか、又はその用量は、病態の症状の軽減が認められる場合、病態が消失している場合若しくは望まれない副作用が認められる場合に低減され得る。

【0417】

有効用量は、所望されるとき又は特定の環境下で適切と考えられるとき、単回用量又は2回以上の用量で投与され得る。反復又は頻回注入を容易にすることが望まれる場合、送達デバイス、例えばポンプ、半永久ステント（例えば、静脈内、腹腔内、大槽内又は関節内）又はリザーバーの移植が得策である場合がある。

【0418】

一部の実施形態では、その組成物は、複数のdsRNA分子種を含む。別の実施形態では、dsRNA分子種は、天然に存在する標的配列に対して別種と重複せず、またそれらに隣接しない配列を有する。別の実施形態では、複数のdsRNA分子種は、異なる天然に存在する標的遺伝子に特異的である。別の実施形態では、dsRNA分子は、対立遺伝子特異的である。

【0419】

本明細書に記載の本発明のdsRNA分子は、幾つかの方法で、哺乳類、特に非ヒト霊長類又はヒトなどの大型哺乳類に投与され得る。

【0420】

一部の実施形態では、dsRNA分子、例えばsiRNA剤、組成物の投与は、非経口、例えば静脈内（例えば、ボーラス又は拡散注入として）、皮内、腹腔内、筋肉内、髄腔内、脳室内、頭蓋内、皮下、経粘膜、頬側、舌下、内視鏡、直腸、経口、膣、局所、肺、鼻腔内、尿道又は眼内投与である。投与は、対象又は別の人物、例えばヘルスケア提供者によって提供され得る。投薬は、測定用量において又は定量用量を送達する計量分配装置で提供され得る。選択された送達様式は、以下により詳細に検討される。

【0421】

本発明は、本明細書に記載のdsRNA分子の直腸投与又は送達のための方法、組成物及びキットを提供する。

【0422】

特定の実施形態では、本発明は、上記の方法における使用を意図した本発明のdsRNA分子に関する。

【0423】

標的遺伝子の発現を阻害する方法

本発明の実施形態は、標的遺伝子の発現を阻害するための方法にも関する。この方法は、先の実施形態のいずれかにおけるdsRNA分子を、標的遺伝子の発現を阻害するのに十分な量で投与するステップを含む。本発明は、標的細胞における標的遺伝子の発現を阻害するための、本明細書で定義されるようなdsRNA分子の使用にさらに関する。好ましい実施形態では、本発明は、インビトロで標的細胞における標的遺伝子の発現を阻害するためのdsRNA分子の使用にさらに関する。

【0424】

別の態様での本発明は、細胞における標的遺伝子の発現を調節する方法であって、本発明のdsRNA分子を前記細胞に提供することを含む方法に関する。一部の実施形態では、標的遺伝子は、第VII因子、Eg5、PCSK9、TPX2、apoB、SAA、TTR、RSV、PDGFβ遺伝子、Erbb-B遺伝子、Src遺伝子、CRK遺伝子、GRB2遺伝子、RAS遺伝子、MEKKK遺伝子、JNK遺伝子、RAF遺伝子、Erk1/2遺伝子、PCNA（p21）遺伝子、MYB遺伝子、JUN遺伝子、FOS遺伝子、

10

20

30

40

50

BCL-2 遺伝子、ヘプシジン、活性化タンパク質C、サイクリンD 遺伝子、VEGF 遺伝子、EGFR 遺伝子、サイクリンA 遺伝子、サイクリンE 遺伝子、WNT-1 遺伝子、 β -カテニン 遺伝子、c-MET 遺伝子、PKC 遺伝子、NFkB 遺伝子、STAT3 遺伝子、サバイビン 遺伝子、Her2/Neu 遺伝子、トポイソメラーゼI 遺伝子、トポイソメラーゼII α 遺伝子、p73 遺伝子における突然変異、p21 (WAF1/CIP1) 遺伝子における突然変異、p27 (KIP1) 遺伝子における突然変異、PPM1D 遺伝子における突然変異、RAS 遺伝子における突然変異、カベオリンI 遺伝子における突然変異、MIB1 遺伝子における突然変異、MTA1 遺伝子における突然変異、M68 遺伝子における突然変異、腫瘍サプレッサー 遺伝子における突然変異及びp53 腫瘍サプレッサー 遺伝子における突然変異、からなる群から選択される。

10

【0425】

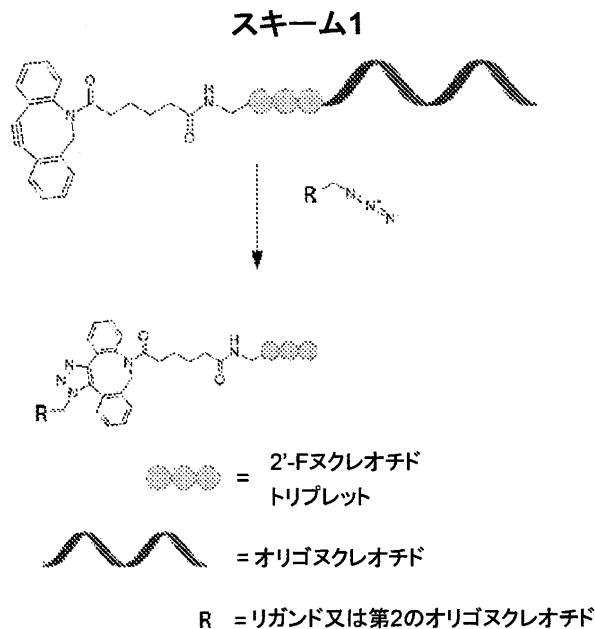
特定の実施形態では、本発明は、上記の方法における使用を意図した本発明の dsRNA 分子に関する。

【0426】

一部の他の態様において、本発明は、リガンド又は第2のオリゴヌクレオチドとコンジュゲートしたオリゴヌクレオチドを調製するための方法に関する。この方法は、銅を含まない「クリック」コンジュゲーションを含む。方法の一般的なバージョンをスキーム1に示す。

【化36】

20



30

【0427】

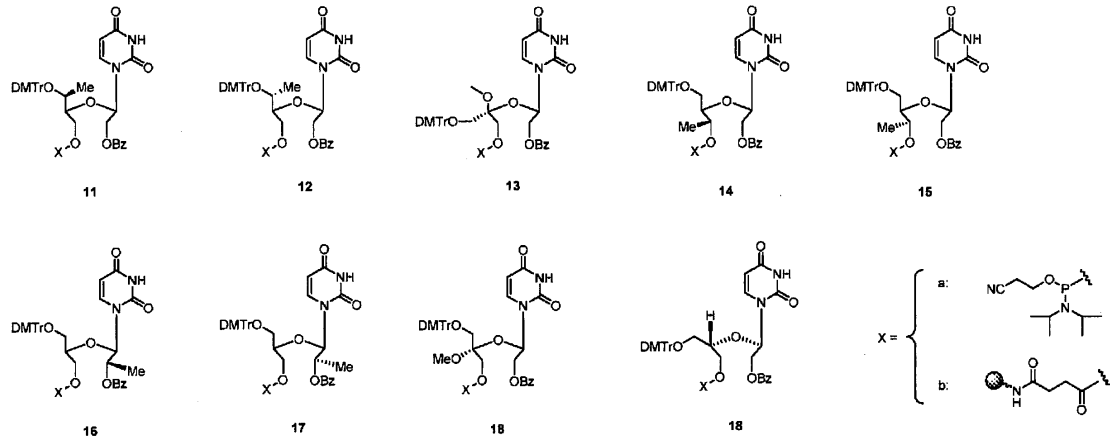
示されるように、ジベンジルシクロオクチン (DBCO) 部分を含む第1のオリゴヌクレオチドは、リガンド又は第2のオリゴヌクレオチドと反応し、ここで、リガンド及び第2のオリゴヌクレオチドは、アジド官能基を含む。コンジュゲートを調製するために、DBCO部分を3'末端又は5'末端のいずれかでオリゴヌクレオチドに結合させることができる。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、3'又は5'末端のいずれかに3つの連続する2'-Fヌクレオチド (例えば、2'-Fヌクレオチドトリプレット) を含み、DBCO部分は、末端2'-Fヌクレオチドにコンジュゲートされる。3つの2'-Fヌクレオチドは、全て同じであるか又は全て異なり得る。代わりに、3つの2'-Fの2つは同一であり得、互いに且つヌクレオチド及びDBCO部分に関して、任意の線形順序で配置され得る。この方法は、Bis-RNAi合成用のロングマー (longmer) 鎖を調製するのに役立ち得る。したがって、DBCO部分は、Bis-RNAiを調製するため

40

50

【化 3 8】

オリゴヌクレオチド合成のためのmUNA構成要素の例

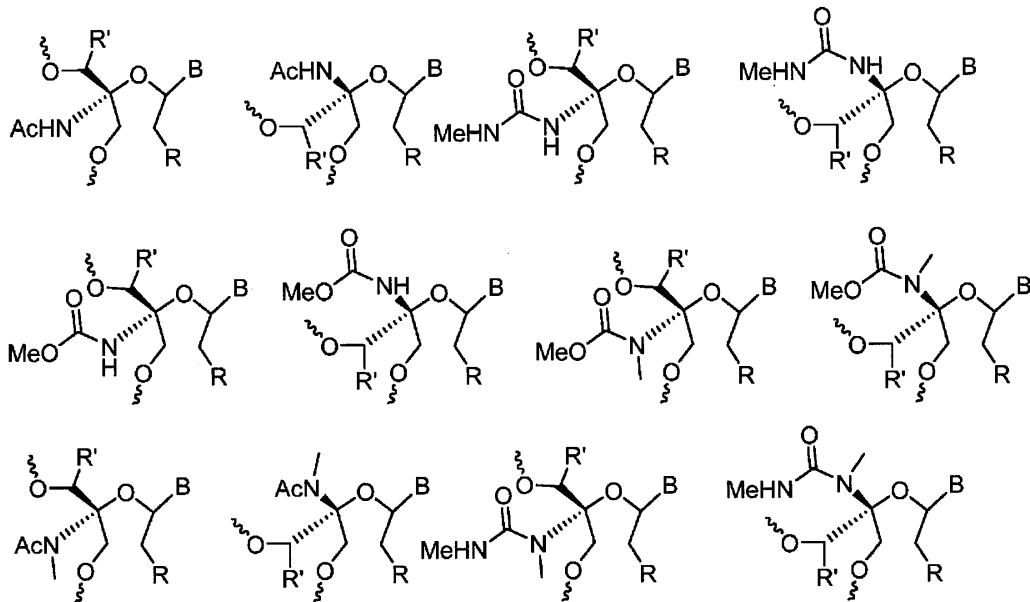


10

【 0 4 3 2】

4' 修飾mUNA構成要素 (1)

【化 3 9】



20

30

(式中、

Rは、H、OH；OMe；Cl、F；OH；O-(CH₂)₂OMe；SMe、NMe₂；NH₂；Me；CCH(アルキン)、O-nPr；O-アルキル；又はO-アルキルアミノであり；

R'は、H又はMeであり；

Bは、A；C；5-Me-C；G；I；U；T；Y；2-チオウリジン；4-チオウリジン；C5修飾ピリミジン；C2修飾プリン；N8修飾プリン；フェノキサジン；Gクランプ；非正準の単環式、二環式及び三環式複素環；シュードウラシル；isoC；isoG；2,6-ジアミノプリン；シュードシトシン；2-アミノプリン；キサントシン；N6-アルキル-A；O6-アルキル-G；2-チオウリジン；4-チオウリジン；C5修飾ピリミジン；C2修飾プリン；N8修飾プリン；7-デアザプリン、フェノキサジン；Gクランプ；又は非正準の単環式、二環式及び三環式複素環であり、及び

40

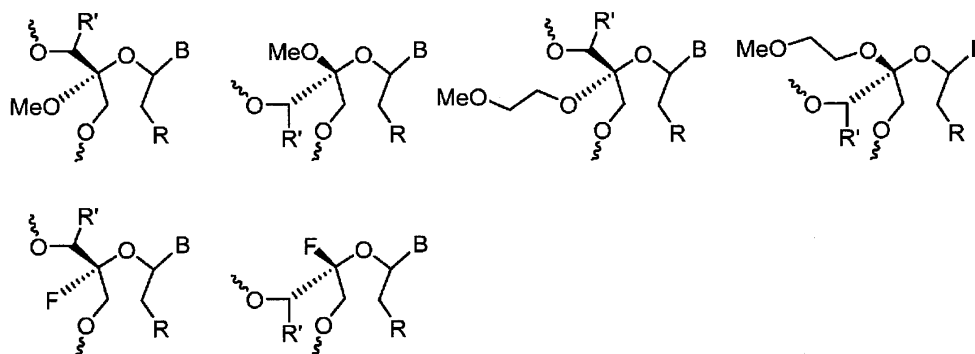
50

立体化学は、不特定のキラル中心についてR又はS及びRとSとの組み合わせである。)

【0433】

4' 修飾mUNA構成要素 (2)

【化40】



10

(式中、

Rは、H、OH；OMe；Cl、F；OH；O-(CH₂)₂OMe；SMe、NMe₂；NH₂；Me；CCH(アルキン)、O-nPr；O-アルキル；又はO-アルキルアミノであり；

20

R'は、H又はMeであり；

Bは、A；C；5-Me-C；G；I；U；T；Y；2-チオウリジン；4-チオウリジン；C5修飾ピリミジン；C2修飾プリン；N8修飾プリン；フェノキサジン；Gクランプ；非正準の単環式、二環式及び三環式複素環；シュードウラシル；isoC；isoG；2，6-ジアミノプリン；シュードシトシン；2-アミノプリン；キサントシン；N6-アルキル-A；O6-アルキル-G；2-チオウリジン；4-チオウリジン；C5修飾ピリミジン；C2修飾プリン；N8修飾プリン；7-デアザプリン、フェノキサジン；Gクランプ；又は非正準の単環式、二環式及び三環式複素環であり、及び

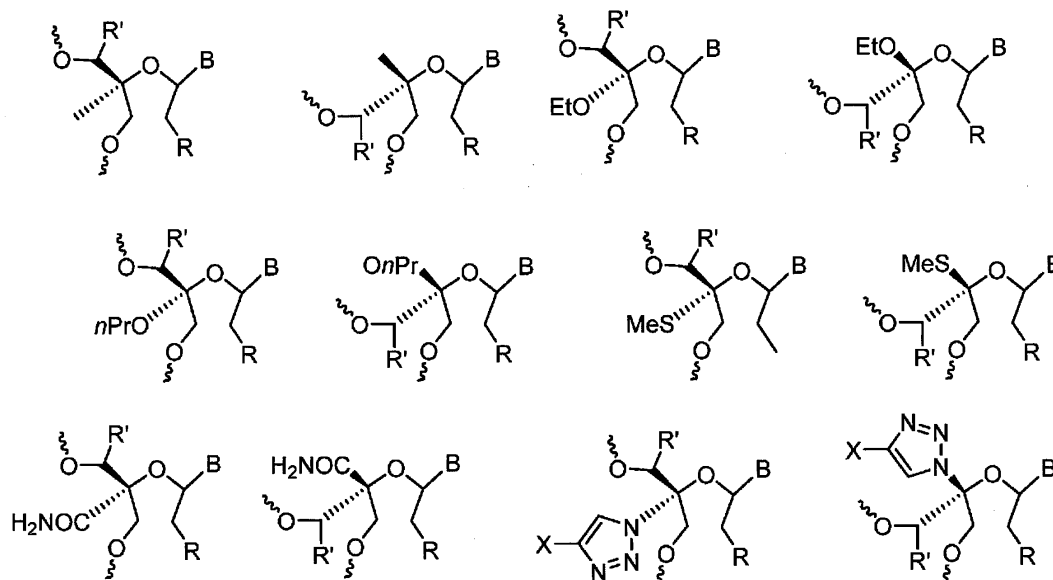
立体化学は、不特定のキラル中心についてR又はS及びRとSとの組み合わせである。)

【0434】

30

4' 修飾mUNA構成要素 (3)

【化41】



40

50

(式中、

Rは、H、OMe；F；OH；O-(CH₂)₂OMe；SMe、NMe₂；NH₂；Me；O-nPr；O-アルキル；又はO-アルキルアミノであり；

R'は、H又はMeであり；

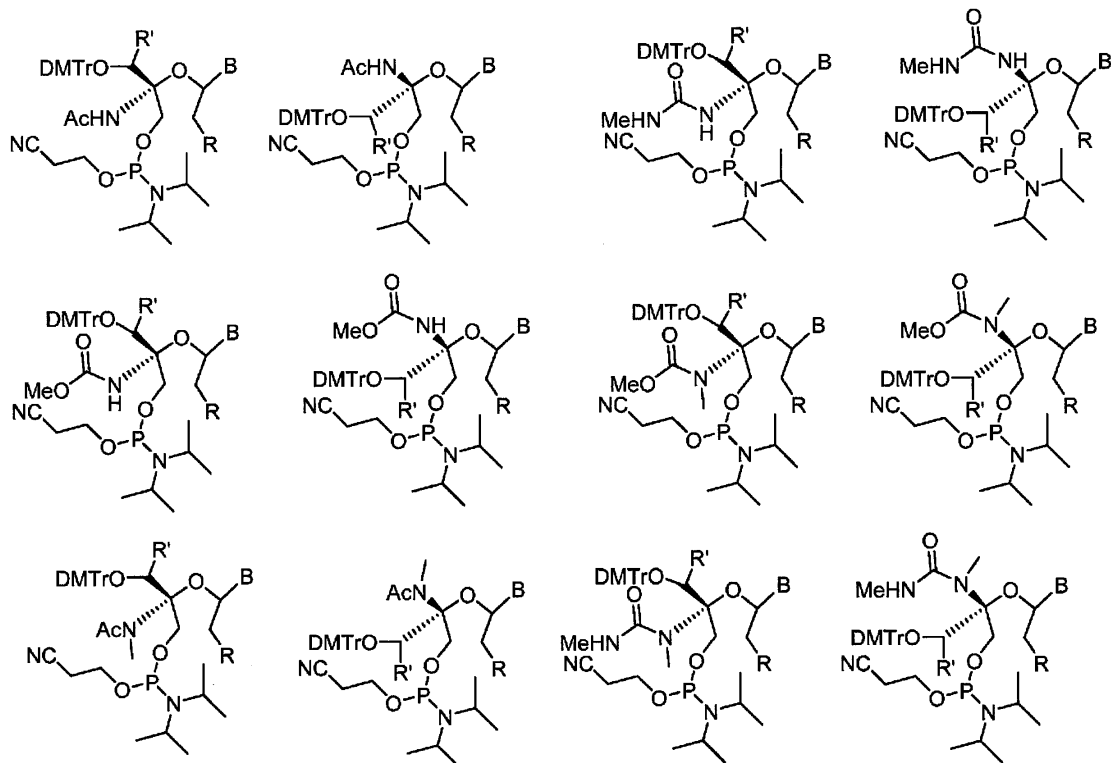
Bは、A；C；5-Me-C；G；I；U；T；Y；2-チオウリジン；4-チオウリジン；C5修飾ピリミジン；C2修飾プリン；N8修飾プリン；フェノキサジン；Gクランプ；非正準の単環式、二環式及び三環式複素環；シュードウラシル；isoC；isoG；2,6-ジアミノプリン；シュードシトシン；2-アミノプリン；キサントシン；N6-アルキル-A；O6-アルキル-G；又は7-デアザプリンであり、及び

立体化学は、不特定のキラル中心についてR又はS及びRとSとの組み合わせである。）

【0435】

4'修飾mUNA構成要素(4)

【化42】



(式中、

Rは、H；OMe；OEt、F；OTBDMS；O-(CH₂)₂OMe；SMe、NMe₂；NPhth；Me；O-nPr；O-アルキル；又はO-アルキルアミノであり；

R'は、H又はMeであり；

B^Pは、A^{B^Z}；C^{A^C}；5-Me-C^{B^Z}；G；I；U；T；Y；2-チオウリジン；4-チオウリジン；C5修飾ピリミジン；C2修飾プリン；N8修飾プリン；フェノキサジン；Gクランプ；非正準の単環式、二環式及び三環式複素環；シュードウラシル isoC；isoG；2,6-ジアミノプリン；シュードシトシン；2-アミノプリン；キサントシン；N6-アルキル-A；O6-アルキル-G；又は7-デアザプリンであり、及び

立体化学は、不特定のキラル中心についてR又はS及びRとSとの組み合わせである。）

【0436】

4'修飾mUNA構成要素(5)

10

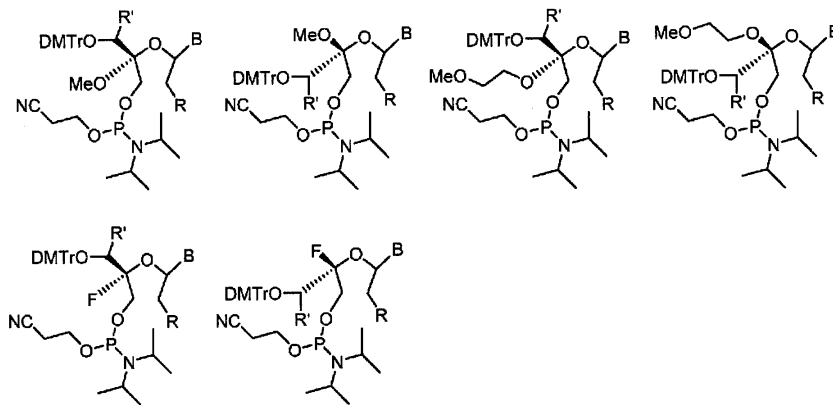
20

30

40

50

【化 4 3】



10

(式中、

Rは、OMe; OEt、F; OTBDMS; O-(CH₂)₂OMe; SMe、NMe₂; NPhth; Me; O-nPr; O-アルキル; 又はO-アルキルアミノであり;

R'は、H又はMeであり;

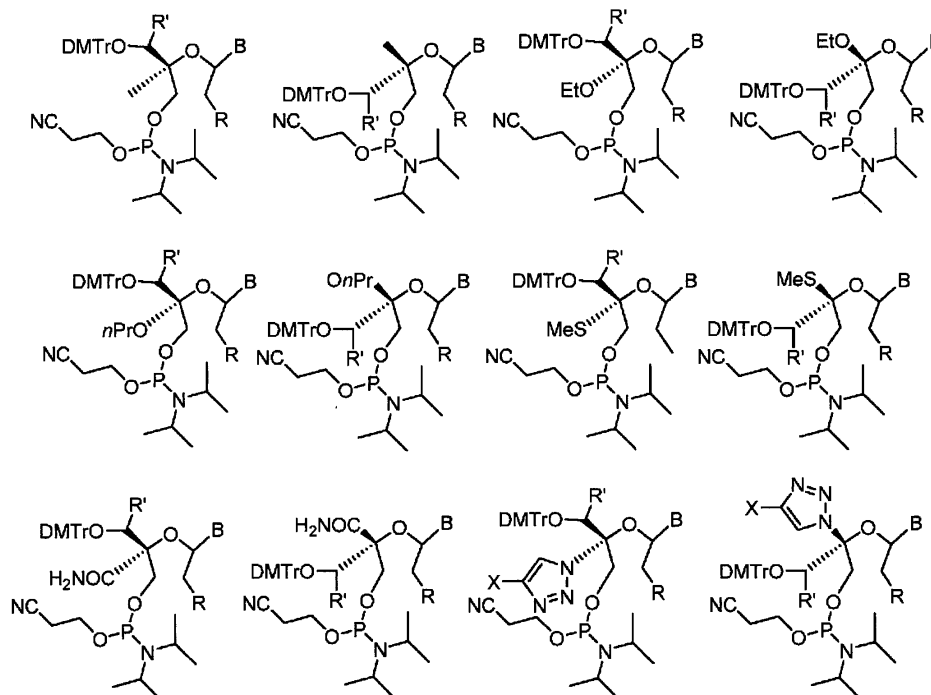
Bは、A^{Bz}; C^{Ac}; 5-Me-C^{Bz}; G; I; U; T; Y; 2-チオウリジン; 4-チオウリジン; C5修飾ピリミジン; C2修飾プリン; N8修飾プリン; フェノキサジン; Gクランプ; 非正準の単環式、二環式及び三環式複素環; シュドウラシル iso C; iso G; 2,6-ジアミノプリン; シュドシトシン; 2-アミノプリン; キサントシン; N6-アルキル-A; O6-アルキル-G; 又は7-デアザプリンであり、及び立体化学は、不特定のキラル中心についてR又はS及びRとSとの組み合わせである。)

20

【0 4 3 7】

4'修飾mUNA構成要素(6)

【化 4 4】



30

40

(式中、

Rは、H、OMe; OEt、F; OTBDMS; O-(CH₂)₂OMe; SMe、NMe

50

2 ; N P h t h ; M e ; O - n P r ; O - アルキル ; 又は O - アルキルアミノであり ;

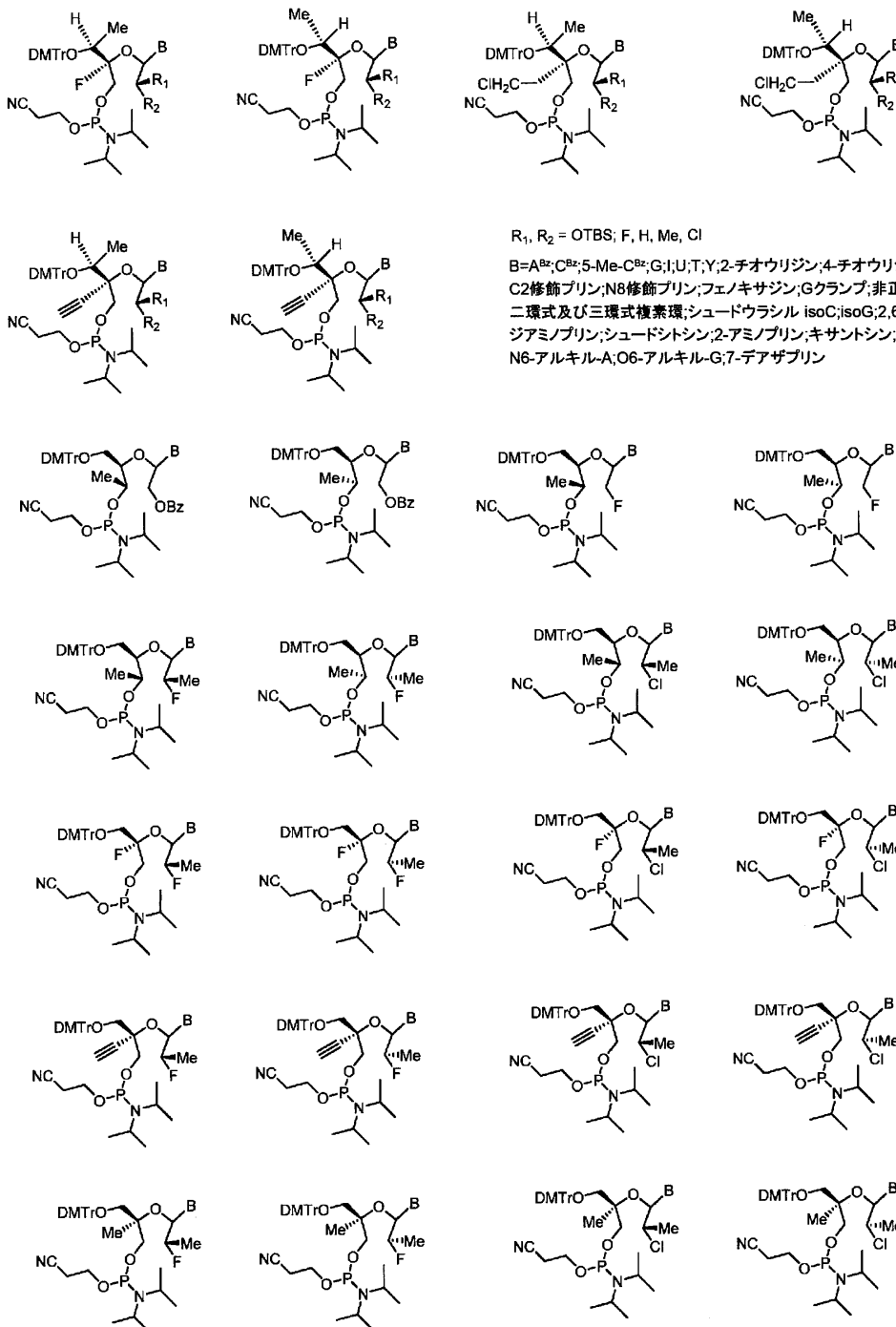
R' は、H又はMeであり、

B^Pは、A^{Bz} ; C^{Ac} ; 5-Me-C^{Bz} ; G ; I ; U ; T ; Y ; 2-チオウリジン ; 4-チオウリジン ; C5修飾ピリミジン ; C2修飾プリン ; N8修飾プリン ; フェノキサジン ; Gクランプ ; 非正準の単環式、二環式及び三環式複素環 ; シュードウラシル isoC ; isoG ; 2,6-ジアミノプリン ; シュードシトシン ; 2-アミノプリン ; キサントシン ; N6-アルキル-A ; O6-アルキル-G ; 又は7-デアザプリンであり、及び立体化学は、不特定のキラル中心についてR又はS及びRとSとの組み合わせである。)

【0438】

3'-ホスホラミダイト基を有する他のmUNA構成要素

【化45】



10

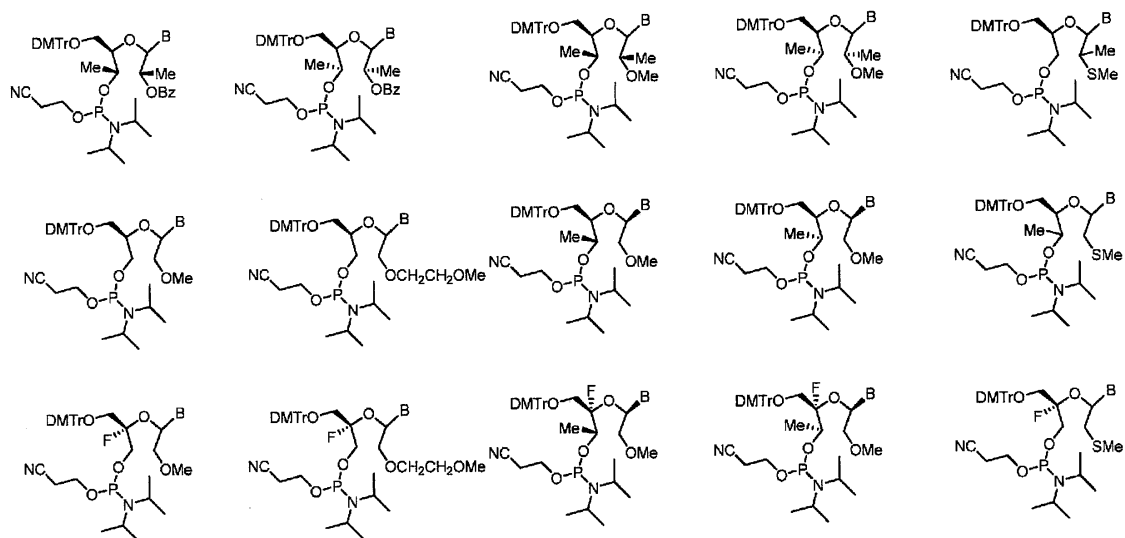
20

30

40

50

【化 4 6】



10

【 0 4 3 9】

2'-ホスホラミダイト基を有する他のmUNA構成要素

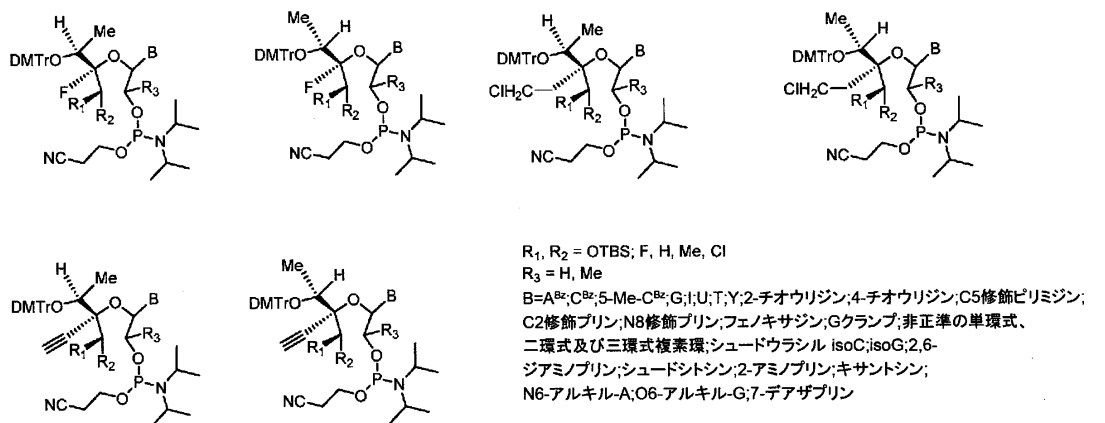
20

30

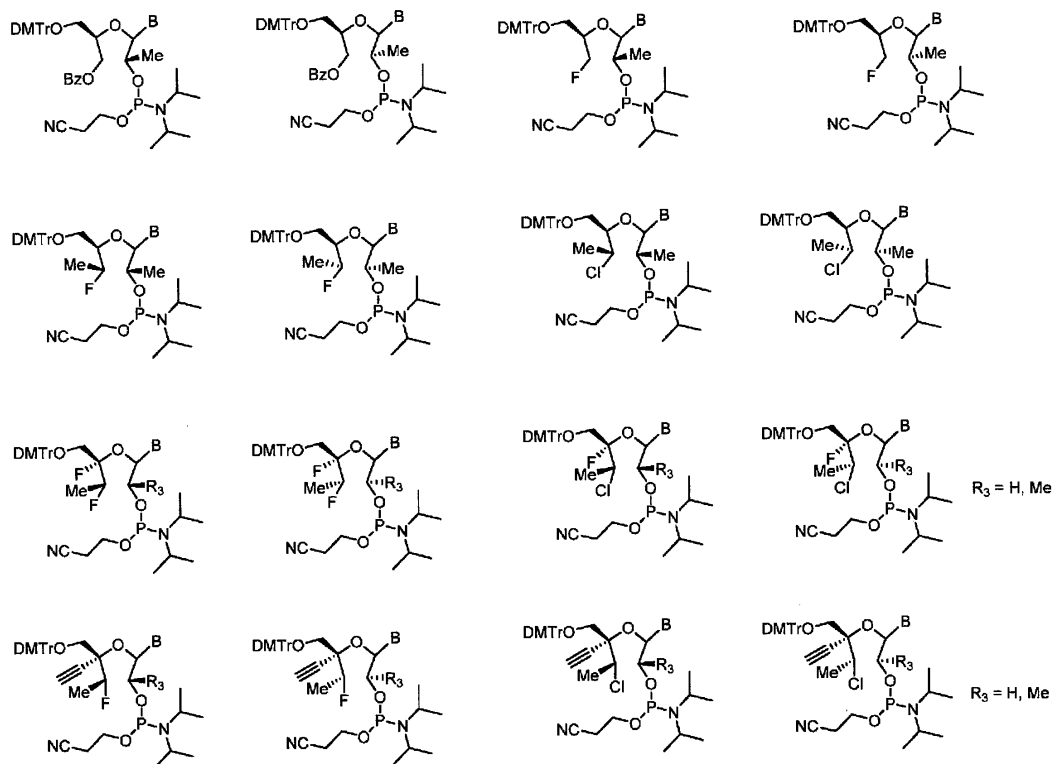
40

50

【化 4 7】



10



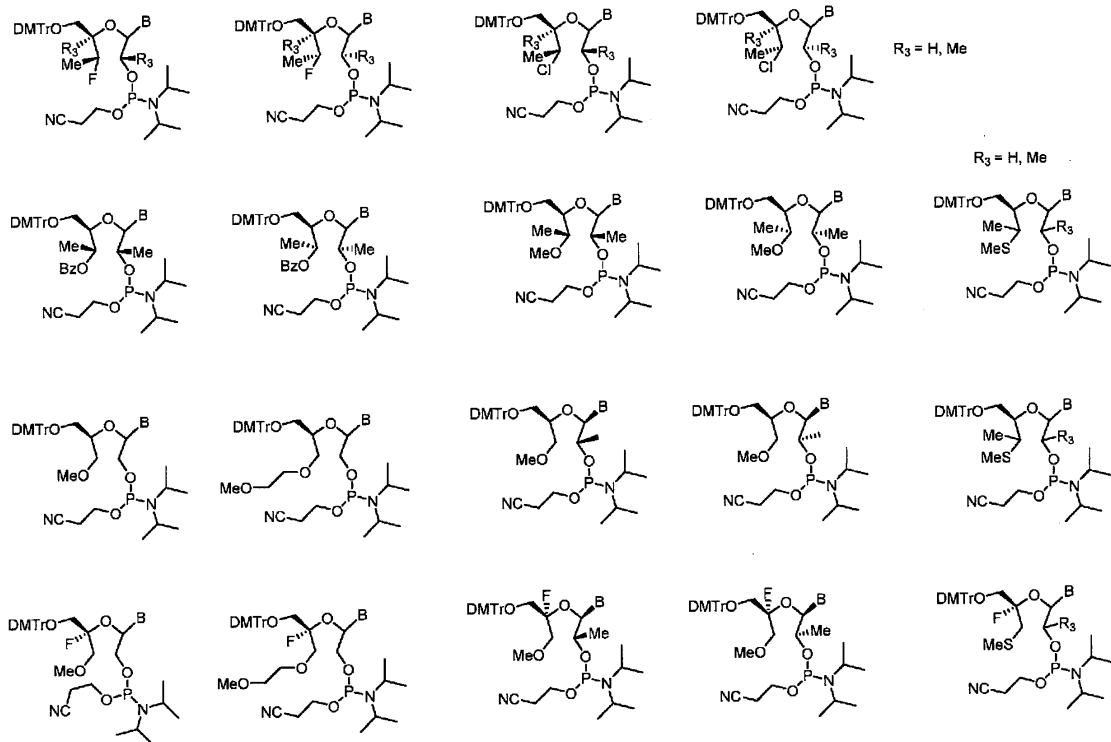
20

30

40

50

【化 4 8】



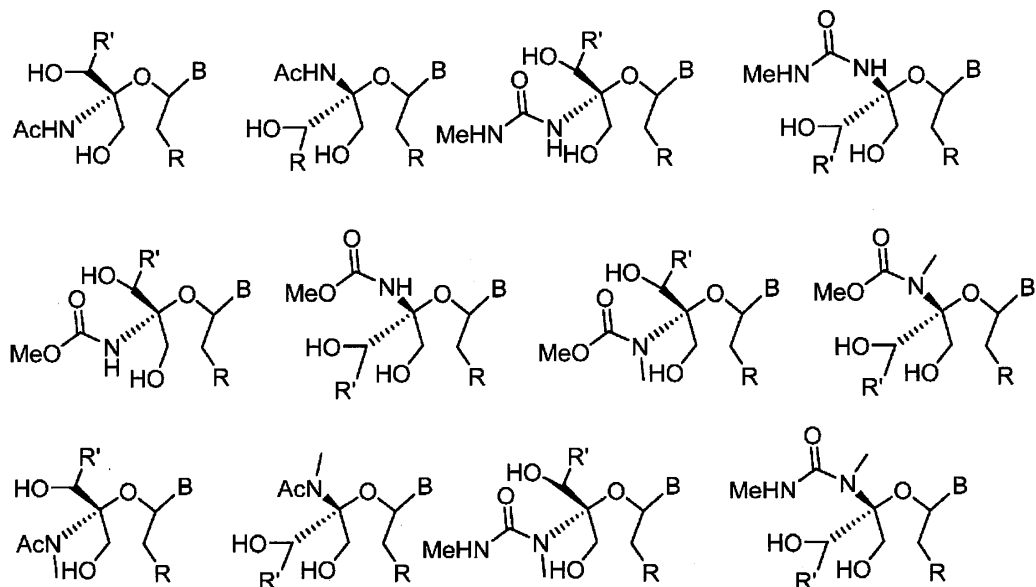
10

20

【 0 4 4 0】

修飾UNAヌクレオシド (1)

【化 4 9】



30

40

(式中、

R は、 H 、 OH ； OMe ； Cl 、 F ； OH ； $O-(CH_2)_2OMe$ ； SMe 、 NMe_2 ； NH_2 ； Me ； CCH (アルキン)、 $O-nPr$ ； O -アルキル；又は O -アルキルアミノであり；

R' は、 H 又は Me であり、

B は、 A ； C ； $5-Me-C$ ； G ； I ； U ； T ； Y ； 2 -チオウリジン； 4 -チオウリジ

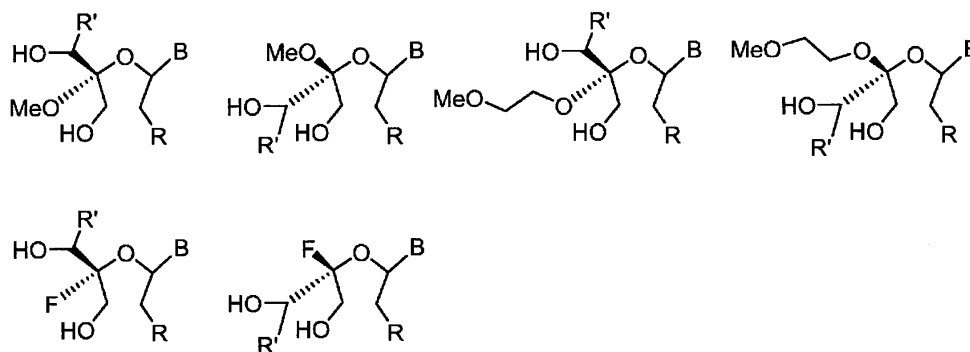
50

ン；C 5 修飾ピリミジン；C 2 修飾プリン；N 8 修飾プリン；フェノキサジン；G クランプ；非正準の単環式、二環式及び三環式複素環；シュードウラシル；i s o C；i s o G；2，6－ジアミノプリン；シュードシトシン；2－アミノプリン；キサントシン；N 6－アルキル－A；O 6－アルキル－G；2－チオウリジン；4－チオウリジン；C 5 修飾ピリミジン；C 2 修飾プリン；N 8 修飾プリン；7－デアザプリン、フェノキサジン；G クランプ；又は非正準の単環式、二環式及び三環式複素環であり、及び
立体化学は、不特定のキラル中心についてR又はS及びRとSとの組み合わせである。）

【0441】

修飾UNAヌクレオシド（32）

【化50】



（式中、

Rは、H、OH；OMe；Cl、F；OH；O－(CH₂)₂OMe；SMe、NMe₂；NH₂；Me；CCH（アルキン）、O－nPr；O－アルキル；O－アルキルアミノであり；

R'は、H又はMeであり；

Bは、A；C；5－Me－C；G；I；U；T；Y；2－チオウリジン；4－チオウリジン；C 5 修飾ピリミジン；C 2 修飾プリン；N 8 修飾プリン；フェノキサジン；G クランプ；非正準の単環式、二環式及び三環式複素環；シュードウラシル；i s o C；i s o G；2，6－ジアミノプリン；シュードシトシン；2－アミノプリン；キサントシン；N 6－アルキル－A；O 6－アルキル－G；2－チオウリジン；4－チオウリジン；C 5 修飾ピリミジン；C 2 修飾プリン；N 8 修飾プリン；7－デアザプリン、フェノキサジン；G クランプ；又は非正準の単環式、二環式及び三環式複素環であり、及び

立体化学は、不特定のキラル中心についてR又はS及びRとSとの組み合わせである。）

【0442】

修飾UNAヌクレオシド（3）

10

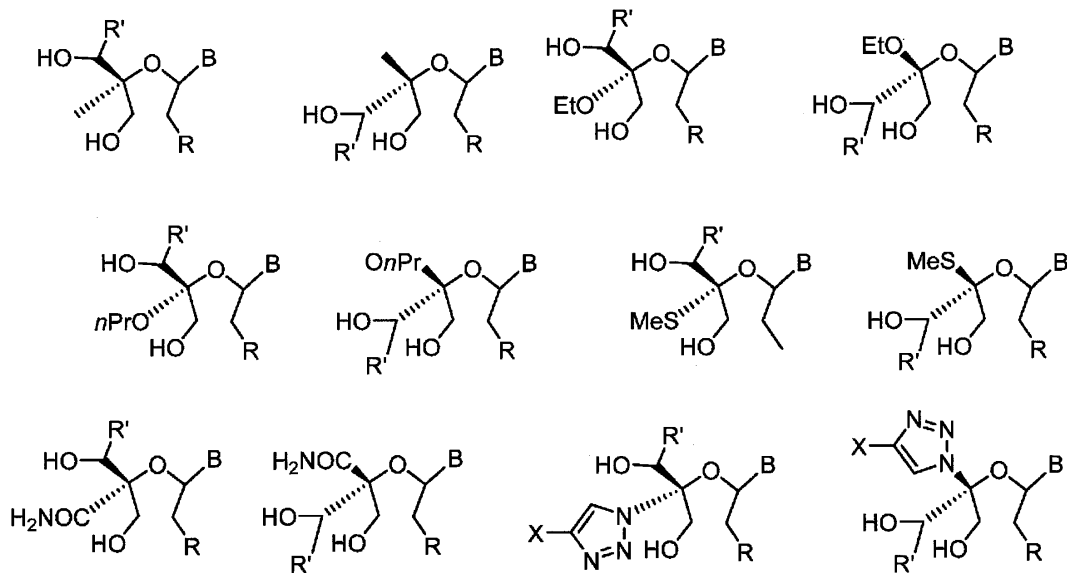
20

30

40

50

【化 5 1】



10

(式中、

Rは、H、OMe；F；OH；O-(CH₂)₂OMe；SMe、NMe₂；NH₂；Me；O-nPr；O-アルキル；又はO-アルキルアミノであり；

20

R'は、H又はMeであり；

Bは、A；C；5-Me-C；G；I；U；T；Y；2-チオウリジン；4-チオウリジン；C5修飾ピリミジン；C2修飾プリン；N8修飾プリン；フェノキサジン；Gクランブ；非正準の単環式、二環式及び三環式複素環；シュードウラシル；isoC；isoG；2，6-ジアミノプリン；シュードシトシン；2-アミノプリン；キサントシン；N6-アルキル-A；O6-アルキル-G；又は7-デアザプリンであり、及び

立体化学は、不特定のキラル中心についてR又はS及びRとSとの組み合わせである。）

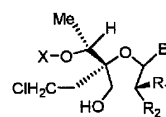
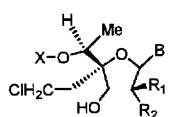
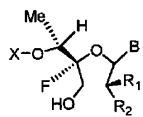
【0443】

5'-リン酸類似体による修飾UNA遊離ヌクレオシド

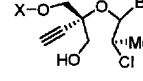
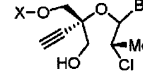
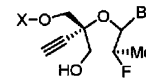
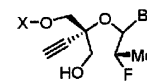
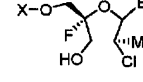
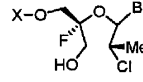
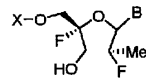
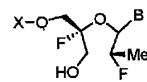
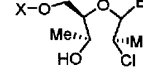
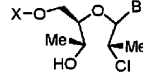
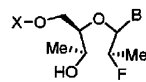
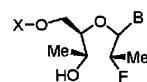
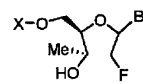
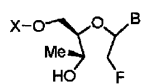
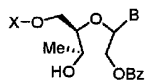
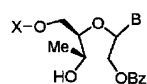
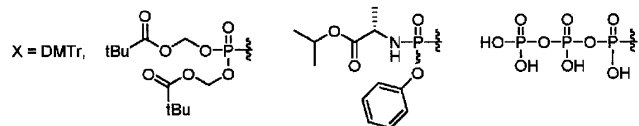
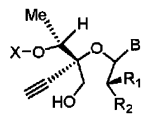
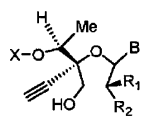
30

40

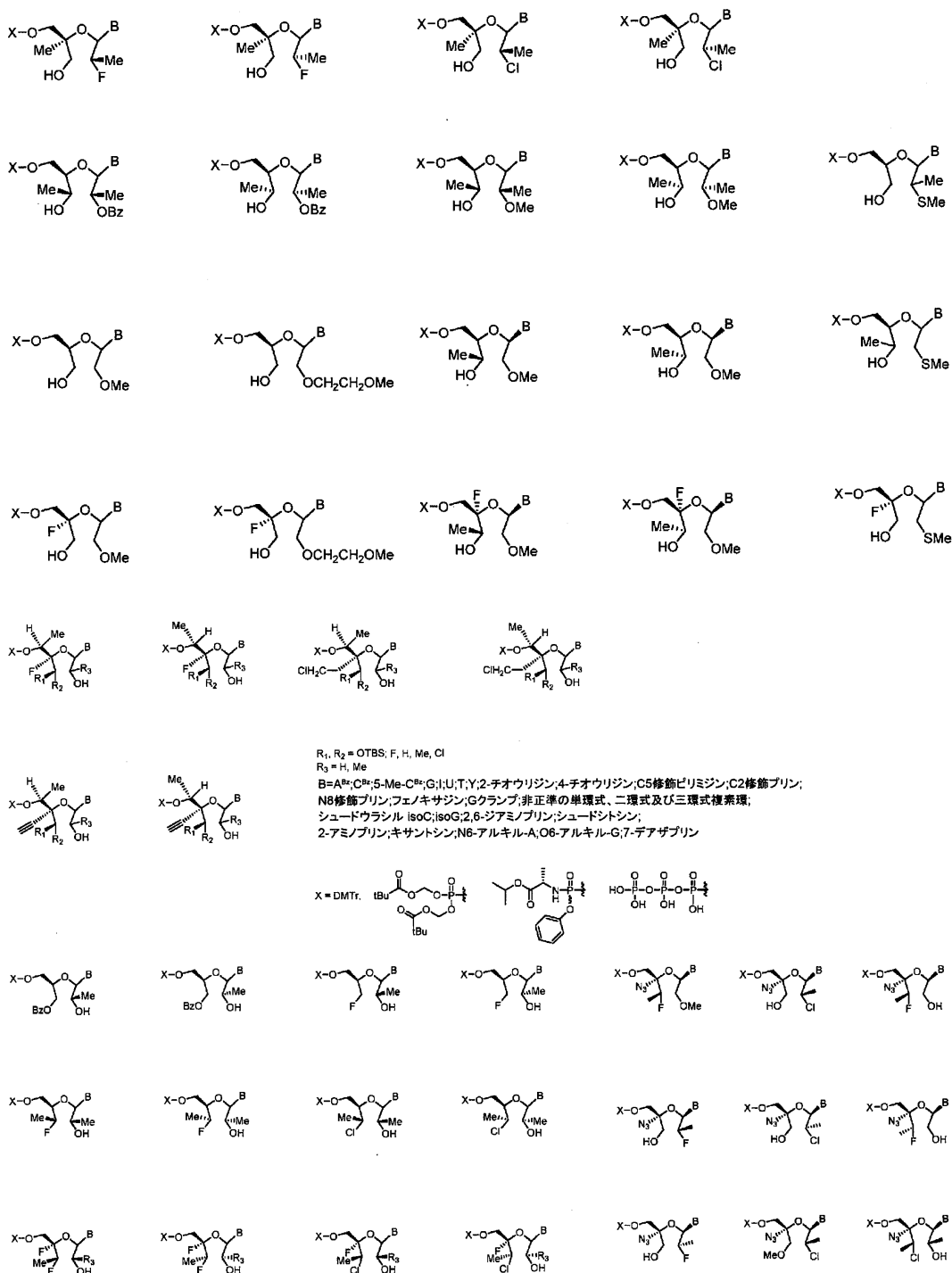
50



B=A^{Bz};C^{Bz};5-Me-C^{Bz};G;I;U;T;Y;2-チオウリジン;4-チオウリジン;C5修飾ピリミジン;C2修飾プリン;N8修飾プリン;フェノキシサンジ;Gクランプ;非正規の単環式、二環式及び三環式複素環;シュードウラシル isoC;isoG;2,6-ジアミノプリン;シュードントシン;2-アミノプリン;キシントシン;N6-アルキル-A;O6-アルキル-G;7-デアザプリン



【化 5 3】



10

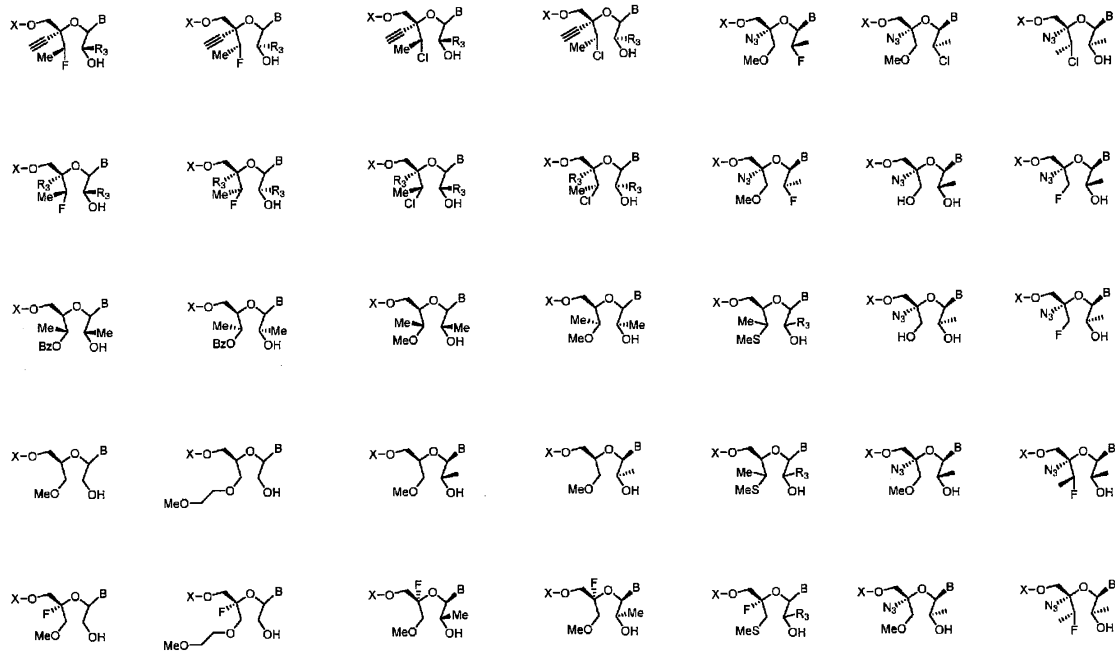
20

30

40

50

【化 5 4】



10

20

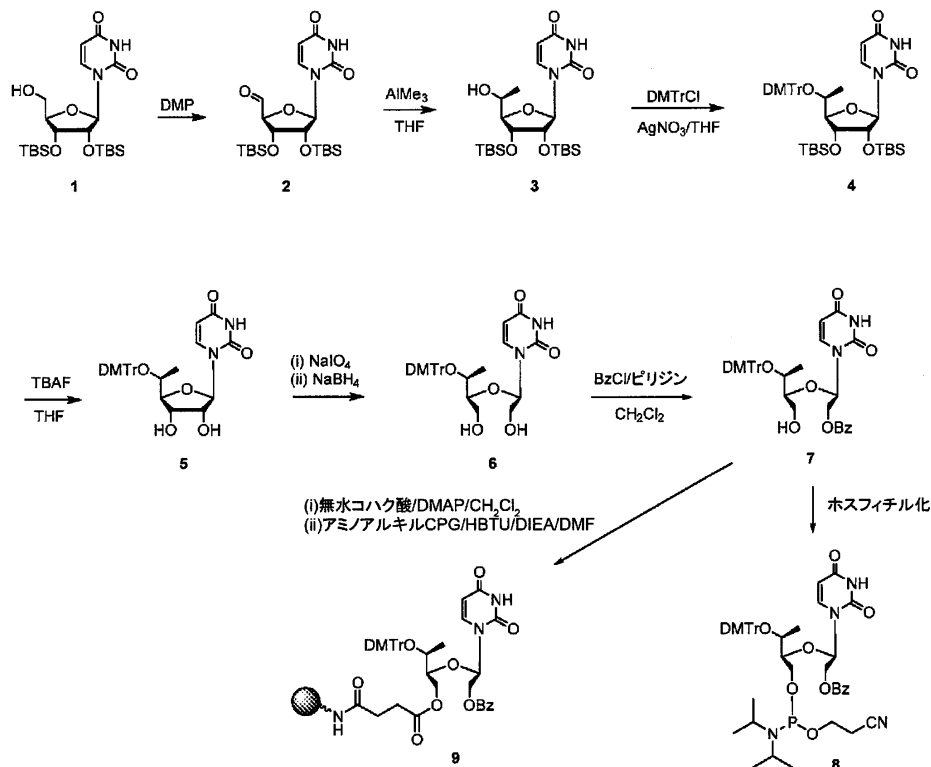
【 0 4 4 4 】

実施例 2：モノマーの合成

5'-(S)-メチル-U-UNA 構成要素の合成

【化 5 5】

スキーム3



30

40

化合物 3 の合成：0℃に冷却した無水ジクロロメタン（500mL）中の化合物 1（2

50

0.0 g、42.3 mmol) の溶液に、デス・マーチン・ペルヨージナン (21.5 g、50.8 mmol、1.2 eq) を添加した。反応物を 0℃ で 1 時間攪拌し、室温に温め、さらに 1.5 時間攪拌した。次に、0℃ で激しく攪拌した 10% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 水溶液 (300 mL) 及び飽和 NaHCO_3 水溶液 (300 mL) の混合物にゆっくりと加えることにより、反応をクエンチし、1 時間攪拌した。クエンチ後、有機層を DCM で 3 回抽出し、無水 Na_2SO_4 で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮した。高真空で乾燥すると、生成物は薄片状の白色固体として得られた。乾燥した粗物質を無水 THF (300 mL) 中に再懸濁し、溶液を 0℃ で THF (300 mL) 中の Me_3Al (トルエン中 2 M、63.5 mL、126.9 mmol、3 eq) の攪拌溶液に、カニューレによって添加した。粗物質フラスコを追加の THF ですすぎ、カニューレを介して反応物に添加した。0℃ で 1 時間攪拌した後、反応物を室温に温め、一晚攪拌した。反応物を 0℃ にし、 H_3PO_4 水溶液 (10%) 及び NH_4Cl 飽和水溶液の 1:1 溶液 20 mL を徐々に添加することによりクエンチした。溶媒を減圧下で除去した後、粗残留物を DCM 及び飽和 NaHCO_3 水溶液で抽出した。有機層を分離し、ブラインで洗浄し、無水 Na_2SO_4 で乾燥及び濾過し、減圧下で濃縮した。粗物質をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン中 0~30% EtOAc、2% トリエチルアミン) で精製して、化合物 3 を白色の泡状物として得た (5.85 g、12.02 mmol、25%; $R_f = 0.48$ 、ヘキサン中 50% EtOAc で展開)。 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 11.35 (s, 1H), 8.07 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 5.83 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 5.71 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 5.27 (d, $J = 4.2$ Hz, 1H), 4.26 (dd, $J = 6.1, 4.4$ Hz, 1H), 4.12 (dd, $J = 4.5, 2.5$ Hz, 1H), 3.88–3.78 (m, 1H), 3.72 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H), 1.14 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H), 0.89 (s, 9H), 0.83 (s, 9H), 0.08 (d, $J = 3.6$ Hz, 6H), –0.04 (s, 3H)。 ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 162.94, 150.74, 140.17, 102.05, 88.54, 86.43, 74.75, 72.90, 65.04, 25.70, 25.59, 19.98, 17.74, 17.60, –4.63, –4.77, –4.84, –5.07。

【0445】

化合物 4 の合成：無水 THF (50 mL) 及び無水ピリジン (10 mL) 中の化合物 3 (5.85 g、12.02 mmol) の溶液に、DMTrCl (12.2 g、36.1 mmol、3 eq) 及び AgNO_3 (4.08 g、24.0 mmol、2 eq) を添加し、混合物を周囲温度で一晩攪拌した。24 時間後、追加の DMTrCl (6.11 g、18.0 mmol、1.5 eq) 及び AgNO_3 (2.04 g、12.0 mmol、1.0 eq) を反応物に添加した。混合物を周囲温度で一晩攪拌した。混合物をセライトで濾過し、濾過ケーキを DCM で洗浄した。濾液を減圧下で濃縮し、残留物を DCM 及び飽和 NaHCO_3 水溶液で抽出した。有機層をブラインで洗浄し、無水 Na_2SO_4 で乾燥及び濾過し、濃縮した。粗残留物をフラッシュカラムクロマトグラフィー (ヘキサン中 0~25% EtOAc、2% トリエチルアミン) で精製して、化合物 4 を黄色の泡状物として得た (8.05 g、10.2 mmol、85%、 $R_f = 0.35$ 、ヘキサン中 33% EtOAc で展開)。

【0446】

化合物 5 の合成：THF (51 mL) 中の化合物 4 (8.05 g、10.2 mmol) の溶液に、TBAF (THF 中 1 M、25.5 mL、25.5 mmol、2 eq) を添加した。室温で一晩攪拌した後、溶媒を減圧下で除去した。粗残留物をフラッシュカラムクロマトグラフィー (ヘキサン中 0~100% EtOAc、次に EtOAc 中 2.5% MeOH、2% トリエチルアミン) で精製して、化合物 5 を黄白色の泡状物として得た (5.84 g、定量的収率; $R_f = 0.50$ 、EtOAc 中 5% MeOH で展開)。 ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 11.41–11.34 (m, 1H), 7.57 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.46–7.40 (m, 2H), 7.30 (t, $J =$

7.9 Hz, 6H), 7.21 (t, $J=7.3$ Hz, 1H), 6.88 (dd, $J=8.8$, 6.7 Hz, 4H), 5.68 (d, $J=5.1$ Hz, 1H), 5.58 (dd, $J=8.0$, 1.6 Hz, 1H), 5.39 (d, $J=5.2$ Hz, 1H), 5.03 (d, $J=5.1$ Hz, 1H), 4.01 (h, $J=5.8$ Hz, 2H), 3.74 (s, 3H), 3.72 (s, 4H), 3.61–3.51 (m, 1H), 0.67 (d, $J=6.2$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 162.93, 158.06, 150.67, 146.11, 140.47, 136.40, 136.30, 130.16, 130.08, 127.95, 127.61, 126.61, 112.99, 101.93, 87.25, 86.43, 85.81, 72.56, 69.24, 68.89, 55.00, 54.99, 17.09.

10

【0447】

化合物6の合成：ジオキサン(135 mL)及び H_2O (25 mL)中の化合物5(5.84 g、10.42 mmol)の溶液に、 H_2O (25 mL)に溶解した NaIO_4 (2.45 g、11.46 mmol、1.1 eq)を添加した。二層の反応混合物を周囲温度で4時間激しく攪拌した。反応混合物を焼結漏斗で濾過し、濾過ケーキを追加のジオキサンで洗浄した。濾液に NaBH_4 (0.434 g、11.46 mmol、1.1 eq)を添加した。周囲温度で2時間攪拌した後、混合物を 0°C に冷却し、次に、1:1 v/vのAcOH:ピリジン緩衝液でクエンチした。溶媒を減圧下で除去した後、粗残留物をEtOAc及び飽和 NaHCO_3 水溶液で抽出した。有機層を分離し、無水 Na_2SO_4 で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮した。粗物質をフラッシュカラムクロマトグラフィー(DCM中0~5% MeOH、2% トリエチルアミン)で精製して、化合物6を白色の泡状物として得た(5.01 g、8.90 mmol、85%; $R_f=0.13$ 、DCM中5% MeOHで展開)。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.14 (d, $J=2.2$ Hz, 1H), 7.35 (dd, $J=8.0$, 1.8 Hz, 3H), 7.30–7.15 (m, 7H), 6.90–6.78 (m, 4H), 5.64 (dd, $J=6.4$, 4.7 Hz, 1H), 5.47 (dd, $J=8.0$, 2.2 Hz, 1H), 5.01 (t, $J=6.0$ Hz, 1H), 4.68 (t, $J=5.4$ Hz, 1H), 3.82 (dd, $J=11.7$, 5.7, 2.2 Hz, 1H), 3.60–3.51 (m, 2H), 3.50–3.39 (m, 2H), 3.24–3.17 (m, 1H), 3.12–3.01 (m, 1H), 2.07 (s, 2H), 1.19 (t, $J=7.3$ Hz, 2H), 0.56 (d, $J=6.3$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 163.08, 158.09, 158.03, 150.80, 145.64, 140.57, 136.49, 136.11, 129.75, 129.60, 127.65, 127.62, 126.68, 113.02, 101.18, 85.80, 84.73, 81.69, 68.82, 61.24, 60.36, 54.98, 45.48, 39.24, 15.38, 8.49, 1.12.

20

30

【0448】

化合物7の合成： -78°C に冷却した、無水DCM(245 mL)及びピリジン(7 mL)中の化合物6(5.01 g、8.90 mmol)の溶液に、塩化ベンゾイル(1.14 mL、9.79 mmol、1.1 eq)をゆっくりと添加した。 -78°C で1時間攪拌した後、反応混合物を 0°C とし、EtOH(5 mL)でクエンチした。混合物をDCM及び飽和 NaHCO_3 水溶液で抽出した。有機層をブラインで洗浄し、分離し、無水 Na_2SO_4 で乾燥させ、濾過し、濃縮した。粗残留物をフラッシュカラムクロマトグラフィー(ヘキサン中0~75% EtOAc)で精製して、化合物7を白色の泡状物として得た(1.31 g、1.96 mmol、22%; $R_f=0.32$ 、ヘキサン中50% EtOAcで発展)。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.29–11.25 (m, 1H), 7.87 (dd, $J=8.4$, 1.4 Hz, 2H), 7.69–7.61 (m, 1H), 7.55–7.46 (m, 3H), 7.39–7.32 (m, 2H), 7.27 (d, $J=1.0$ Hz, 1H), 7.25 (d, $J=1.7$ Hz, 2H), 7.23 (d, $J=2.7$ Hz, 3H), 7.22 (d, $J=2.1$ Hz, 1H), 7.20 (t

40

50

, $J = 1.4 \text{ Hz}$, 1 H), 6.03 (dd , $J = 6.8, 5.0 \text{ Hz}$, 1 H), $5.57 - 5.52$ (m , 1 H), 4.78 (t , $J = 5.3 \text{ Hz}$, 1 H), 4.50 (dd , $J = 11.5, 5.0 \text{ Hz}$, 1 H), 4.33 (dd , $J = 11.5, 6.8 \text{ Hz}$, 1 H), 3.84 (ddd , $J = 11.6, 5.1, 2.2 \text{ Hz}$, 1 H), 3.72 (s , 7 H), 3.59 (ddd , $J = 11.6, 8.4, 5.5 \text{ Hz}$, 1 H), $3.54 - 3.47$ (m , 1 H), 3.12 (ddd , $J = 8.5, 4.6, 2.2 \text{ Hz}$, 1 H), 0.69 (d , $J = 6.3 \text{ Hz}$, 3 H). ^{13}C NMR (101 MHz , $\text{DMSO}-d_6$) δ $164.93, 162.94, 158.12, 158.06, 150.58, 145.59, 139.93, 136.40, 136.10, 133.55, 129.74, 129.62, 129.12, 129.01, 128.77, 127.68, 127.64, 126.71, 113.03, 101.88, 85.88, 81.76, 81.60, 68.74, 63.36, 60.42, 54.98, 39.40, 39.18, 38.97, 15.50$.

【0449】

化合物8の合成: DCM (10 mL) 及び DIPEA (0.66 mL , 5.4 mmol) 中の化合物7 (1.21 g , 1.81 mmol) の溶液に、2-シアノエチル N , N -ジイソプロピルクロロホスホラミダイト (0.695 mL , 2.2 mmol) を 0°C で添加した。混合物を 0°C で2時間撹拌した。反応混合物を CH_2Cl_2 (100 mL) で希釈し、次に、飽和 NaHCO_3 水溶液 (100 mL) で洗浄した。有機層を分離し、無水 Na_2SO_4 で乾燥させ、濾過し、濃縮した。アミダイト8をヘキサンから沈殿させた (1.33 g , 1.5 mmol , 85%)。 ^{31}P NMR (202 MHz , CD_3CN) δ $148.81, 148.58$.

【0450】

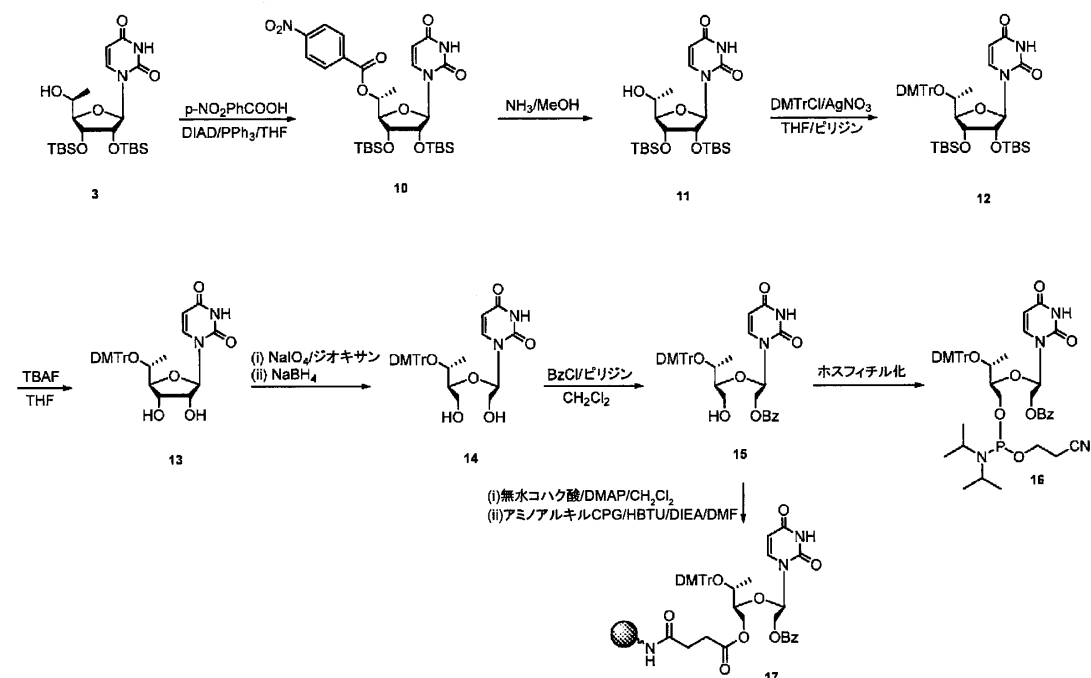
化合物9の合成: CH_2Cl_2 中での無水コハク酸及び DMAP を使用した化合物7の標準的なコハク化と、それに続く DMF 中での HBTU 及び DIPEA を使用した CPG ローディングにより、化合物9が得られる。

【0451】

5'-(R)-メチル-U-UNA構成要素の合成

【化56】

スキーム4



化合物 11 の合成：無水 THF (48.5 mL) 中の化合物 3 (2.36 g、4.85 mmol) の溶液に、p-ニトロ安息香酸 (4.05 g、24.25 mmol、5.0 eq)、トリフェニルホスフィン (6.36 g、24.25 mmol、5.0 eq) 及び DIAD (4.69 mL、24.25 mmol、5.0 eq) を 0℃ で添加した。反応物を周囲温度で一晩撹拌した。溶媒を減圧下で除去した。粗物質をフラッシュカラムクロマトグラフィー (ヘキサン中 0~25% EtOAc) で精製して、化合物 10 を黄白色の泡状物として得た (2.86 g、4.50 mmol、 R_f = 0.37、ヘキサン中 33% EtOAc で展開)。この物質をメタノール溶液 (100 mL) 中の 7N アンモニアに再懸濁し、室温で一晩撹拌した。溶媒を除去し、粗物質をフラッシュカラムクロマトグラフィー (ヘキサン中 0~30% EtOAc) で精製して、化合物 11 を白色の泡状物として得た (1.47 g、3.01 mmol、62%、2 ステップ; R_f = 0.27、ヘキサン中 33% EtOAc で展開)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.37 (s, 1H), 7.85 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 5.89 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.71 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.19 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 4.30 (dd, *J* = 7.8, 4.5 Hz, 1H), 4.21 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 3.82–3.73 (m, 1H), 3.62 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H), 1.11 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 0.89 (s, 9H), 0.81 (s, 9H), 0.10 (d, *J* = 2.9 Hz, 6H), 0.00 (s, 3H), -0.09 (s, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.78, 150.87, 140.66, 102.41, 90.00, 85.75, 73.90, 71.64, 66.39, 39.18, 25.69, 25.56, 20.08, 17.71, 17.57, -4.57, -4.63, -4.70, -5.22.

【0452】

化合物 12 の合成：無水 THF (11.5 mL) 及び無水ピリジン (2.2 mL) 中の化合物 11 (1.40 g、2.88 mmol) の溶液に、DMTrCl (2.92 g、8.63 mmol、3 eq) 及び AgNO₃ (0.97 g、5.75 mmol、2 eq) を添加し、混合物を周囲温度で一晩撹拌した。混合物をセライトで濾過し、濾過ケーキを DCM で洗浄した。濾液を減圧下で濃縮し、残留物を DCM 及び飽和 NaHCO₃ 水溶液で抽出した。有機層をブラインで洗浄し、無水 Na₂SO₄ で乾燥及び濾過し、濃縮した。粗残留物をフラッシュカラムクロマトグラフィー (ヘキサン中 0~25% EtOAc、2% トリエチルアミン) で精製して、化合物 12 を明るい黄色の泡状物として得た (2.03 g、2.57 mmol、89%、 R_f = 0.27、ヘキサン中 33% EtOAc で展開)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.38 (s, 1H), 7.46–7.38 (m, 2H), 7.30 (td, *J* = 8.1, 7.7, 5.7 Hz, 7H), 7.26–7.17 (m, 1H), 6.94–6.84 (m, 4H), 5.66 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H), 5.31 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.11 (dd, *J* = 4.6, 3.2 Hz, 1H), 4.06–4.02 (m, 1H), 3.86 (dd, *J* = 4.6, 3.2 Hz, 1H), 3.74 (s, 6H), 3.49–3.41 (m, 1H), 0.85 (s, 9H), 0.82 (s, 8H), 0.79 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H), 0.06 (d, *J* = 3.2 Hz, 5H), 0.01 (s, 3H), -0.08 (s, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 158.13, 158.09, 150.42, 141.13, 135.84, 130.07, 130.03, 127.75, 127.65, 126.66, 113.09, 113.04, 101.86, 88.28, 87.24, 86.16, 73.32, 71.44, 69.53, 55.00, 25.64, 25.54, 17.62, 17.54, 17.09, -4.45, -4.64, -4.86, -5.07.

【0453】

化合物 13 の合成：THF (12.9 mL) 中の化合物 12 (2.03 g、2.57 mmol) の溶液に、TBAF (5.14 g、5.14 mmol、2 eq) を添加した。室温で一晩撹拌した後、溶媒を減圧下で除去した。粗残留物をシリカゲルに前吸収し (2%

トリエチルアミンで前処理)、次に、フラッシュカラムクロマトグラフィー(ヘキサン中0~100% EtOAc、次にEtOAc中2.5% MeOH、2% トリエチルアミン)により精製して、化合物13を白色の泡状物として得た(1.00g、1.78mmol、69%; $R_f=0.45$ 、EtOAc中5% MeOHで展開)。 ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 11.35 (d, $J=2.1\text{Hz}$, 1H), 7.47–7.40 (m, 2H), 7.31 (ddd, $J=10.1, 7.7, 3.8\text{Hz}$, 7H), 7.25–7.18 (m, 1H), 6.95–6.84 (m, 4H), 5.68 (d, $J=5.9\text{Hz}$, 1H), 5.37 (d, $J=5.8\text{Hz}$, 1H), 5.18 (dd, $J=8.1, 2.0\text{Hz}$, 1H), 5.09 (d, $J=5.5\text{Hz}$, 1H), 4.18 (q, $J=5.3\text{Hz}$, 1H), 3.97 (q, $J=5.9\text{Hz}$, 1H), 3.74 (s, 6H), 3.68 (dd, $J=4.3, 3.1\text{Hz}$, 1H), 3.48–3.39 (m, 1H), 0.76 (d, $J=6.4\text{Hz}$, 3H). ^{13}C NMR (101MHz, DMSO- d_6) δ 162.83, 158.10, 158.08, 150.61, 146.33, 140.77, 136.26, 136.16, 130.13, 130.09, 127.84, 127.69, 126.58, 113.10, 113.06, 101.65, 87.36, 86.92, 85.98, 72.53, 69.67, 68.96, 55.05, 55.03, 17.08.

[0454]

化合物14の合成: ジオキサン(24mL)及び H_2O (3mL)中の化合物13の溶液(1.00g、1.78mmol)に、 H_2O (3mL)に溶解した NaIO_4 (0.42g、1.96mmol、1.1eq)を添加した。二層の反応混合物を周囲温度で4時間激しく攪拌した。反応混合物を濾過し、濾過ケーキを追加のジオキサンで洗浄した。濾液に NaBH_4 (0.074g、1.96mmol、1.1eq)を添加した。周囲温度で2時間攪拌した後、混合物を0℃に冷却し、次に、1:1 v/vのAcOH:ピリジン緩衝液でクエンチした。溶媒を減圧下で除去した後、粗残留物をEtOAc及び飽和 NaHCO_3 水溶液で抽出した。有機層を分離し、無水 Na_2SO_4 で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮した。粗物質をフラッシュカラムクロマトグラフィー(DCM中0~5% MeOH、2% トリエチルアミン)で精製して、化合物14を白色の泡状物として得た(250mg、0.44mmol、25%; $R_f=0.28$ 、DCM中5% MeOHで展開)。 ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 11.22 (d, $J=2.3\text{Hz}$, 1H), 7.65 (d, $J=8.1\text{Hz}$, 1H), 7.37–7.30 (m, 2H), 7.29–7.14 (m, 8H), 6.90–6.77 (m, 4H), 5.65 (t, $J=5.8\text{Hz}$, 1H), 5.53 (dd, $J=8.0, 2.2\text{Hz}$, 1H), 5.10 (t, $J=5.9\text{Hz}$, 1H), 4.64 (t, $J=5.3\text{Hz}$, 1H), 3.73 (s, 7H), 3.63–3.43 (m, 3H), 3.30–3.14 (m, 2H), 3.04–2.95 (m, 1H), 1.23 (t, $J=7.3\text{Hz}$, 1H), 0.77 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 3H). ^{13}C NMR (101MHz, DMSO- d_6) δ 163.30, 157.97, 151.06, 145.81, 141.30, 136.45, 136.36, 129.91, 129.86, 127.90, 127.55, 126.48, 112.98, 112.96, 101.48, 85.79, 84.25, 83.07, 69.00, 61.65, 61.03, 54.98, 15.80, 1.12.

[0455]

化合物15の合成: -78℃に冷却した、無水DCM(215mL)及びピリジン(1.5mL)中の化合物14(4.63g、7.75mmol)の溶液に、塩化ベンゾイル(1.0mL、8.53mmol)を滴下した。-78℃で1時間攪拌した後、反応混合物を0℃とし、EtOH(5mL)でクエンチした。混合物をDCM及び飽和 NaHCO_3 水溶液で抽出した。有機層をブラインで洗浄し、分離し、無水 Na_2SO_4 で乾燥させ、濾過し、濃縮した。粗残留物をフラッシュカラムクロマトグラフィー(ヘキサン中0~75% EtOAc)で精製して、化合物15を白色の泡状物として得た(2.30g、3.45mmol、45%; $R_f=0.54$ 、ヘキサン中50% EtOAcで発展)。 ^1H

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.32 (d, $J=2.2$ Hz, 1H), 7.88 (dd, $J=8.4, 1.4$ Hz, 2H), 7.79 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.70–7.63 (m, 1H), 7.53 (t, $J=7.8$ Hz, 2H), 7.37–7.31 (m, 2H), 7.29–7.15 (m, 7H), 6.87–6.78 (m, 4H), 6.03 (dd, $J=6.7, 5.0$ Hz, 1H), 5.53 (dd, $J=8.0, 2.1$ Hz, 1H), 4.73 (t, $J=5.1$ Hz, 1H), 4.55 (dd, $J=11.4, 5.0$ Hz, 1H), 4.40 (dd, $J=11.4, 6.8$ Hz, 1H), 3.73 (s, 6H), 3.57 (qd, $J=6.4, 1.8$ Hz, 1H), 3.35–3.25 (m, 2H), 3.20 (dt, $J=11.4, 5.0$ Hz, 1H), 2.97–2.91 (m, 1H), 0.85 (d, $J=6.3$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 164.96, 163.08, 158.02, 150.86, 145.75, 140.73, 136.37, 136.24, 133.60, 129.92, 129.85, 129.10, 129.05, 128.83, 127.88, 127.59, 126.54, 113.04, 113.00, 102.08, 85.92, 83.05, 81.25, 68.92, 63.63, 61.13, 55.00, 39.99, 15.74.

【0456】

化合物16の合成：DCM (30 mL) 及びDIPEA (2.30 mL、18.9 mmol) 中の化合物15 (2.30 g、3.45 mmol) の溶液に、2-シアノエチルN, N-ジイソプロピルクロロホスホラミダイト (2.41 mL、7.57 mmol) を0℃で添加した。混合物を0℃で2時間攪拌した。反応混合物を CH_2Cl_2 (100 mL) で希釈し、次に、飽和 NaHCO_3 水溶液 (100 mL) で洗浄した。有機層を分離し、無水 Na_2SO_4 で乾燥させ、濾過し、濃縮した。粗物質をフラッシュカラムクロマトグラフィー (ヘキサン中0～33%酢酸エチル) で精製して、ホスホラミダイト16 (2.31 g、2.66 mmol、77%、 $R_f=0.41$; ヘキサン中50%酢酸エチルで展開) を得た。 ^{31}P NMR (202 MHz, CD_3CN) δ 148.78, 148.74.

【0457】

化合物17の合成： CH_2Cl_2 中での無水コハク酸及びDMAPを使用した化合物15の標準的なコハク化と、それに続くDMF中でのHBTU及びDIPEAを使用したCPGローディングにより、化合物17が得られる。

【0458】

4'-C-(β)-メトキシ-U-UNA構成要素の合成

10

20

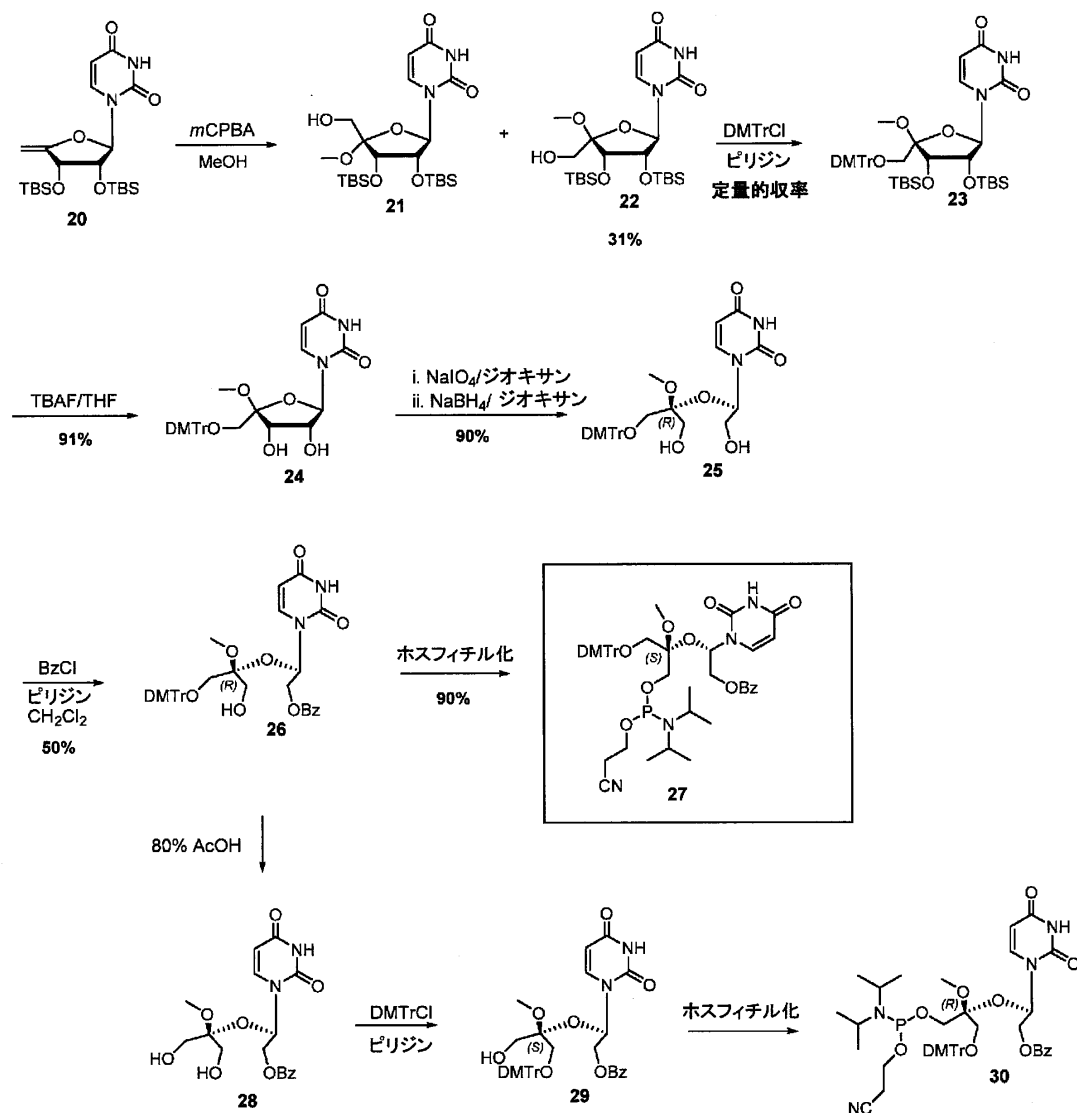
30

40

50

【化 5 7】

スキーム5



化合物 21 及び 22 の合成：mCPBA (19.9 g、116 mmol) を、メタノール (275 ml) 中の化合物 1 (25.0 g、55.9 mmol) の冷却溶液に添加し、混合物を室温で一晩攪拌した。10% Na₂S₂O₃ 水溶液及び飽和 NaHCO₃ 水溶液のそれぞれ約 100 ml を溶液に添加し、15 分間攪拌した。次に、反応混合物を DCM で抽出した (150 ml で 3 回)。有機層を合わせ、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、濃縮した。粗物質をフラッシュカラムクロマトグラフィー (DCM 中 1.7% MeOH) で精製して、化合物 22 (8.8 g、17.5 mmol、31%、R_f = 0.42; DCM 中 5% MeOH で展開) 及び 21 (1.0 g、1.9 mmol、3.6%、R_f = 0.48; DCM 中 5% MeOH で展開) を得た。化合物 22：¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.44 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.42 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.01 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 5.81 (dd, J = 8.1, 2.0 Hz, 1H), 4.74 (t, J = 4.9 Hz, 1H), 4.56 (dd, J = 7.4, 3.7 Hz, 1H), 4.00 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 3.55 (t, J = 4.3 Hz, 2H), 3.31 (s, 1H), 3.29 (s, 3H), 0.86 (d, J = 40.3 Hz, 18H), 0.12 (d, J = 8.3 Hz, 6H), -0.01 (s, 3H), -0.09 (s, 3H)。¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ 162.60, 150.98, 140.16, 109.53, 103.49, 8

6.14, 75.18, 74.91, 55.45, 48.85, 25.82, 25.77, 17.99, 17.77, -4.33, -4.39, -4.97, -5.10. 化合物 21: ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.41 (d, $J=2.2$ Hz, 1H), 7.76 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 5.99 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 5.73 (dd, $J=8.4, 2.4$ Hz, 1H), 5.34 (t, $J=5.6$ Hz, 1H), 4.32 (dd, $J=7.2, 5.2$ Hz, 1H), 4.22 (d, $J=5.2$ Hz, 1H), 3.54-3.41 (m, 2H), 3.30 (s, 3H), 0.90 (s, 9H), 0.80 (s, 9H), 0.07 (d, $J=6.2$ Hz, 6H), -0.01 (s, 3H), -0.10 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 162.60, 150.98, 140.16, 109.53, 103.49, 86.14, 75.18, 74.91, 55.45, 48.85, 25.82, 25.77, 17.99, 17.77, -4.33, -4.39, -4.97, -5.10. [0459]

10

化合物 23 の合成: 無水ピリジン (60 ml) 中の化合物 22 (8.8 g、17.5 mmol) の溶液に、DMTrCl (8.89 g、26.3 mmol) を添加し、混合物を室温で一晩攪拌した。溶媒を除去した後、残留物を DCM 及び飽和 NaHCO₃ 水溶液で抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、濃縮した。粗物質をフラッシュカラムクロマトグラフィーで精製して、化合物 23 (14.1 g、17.9 mmol、99%、 $R_f=0.77$; ヘキサン中 50% EtOAc で展開) を得た。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.46 (s, 1H), 7.61 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 7.46-7.37 (m, 2H), 7.33-7.23 (m, 6H), 7.22-7.15 (m, 1H), 6.86 (dd, $J=9.0, 3.1$ Hz, 4H), 6.01 (d, $J=4.9$ Hz, 1H), 5.80 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 4.43 (t, $J=4.7$ Hz, 1H), 4.03 (d, $J=4.4$ Hz, 1H), 3.71 (s, 6H), 3.65 (d, $J=10.7$ Hz, 1H), 3.45 (s, 3H), 2.88 (d, $J=10.7$ Hz, 1H), 0.71 (s, 8H), 0.63 (s, 8H), -0.03 (s, 3H), -0.04 (d, $J=3.6$ Hz, 6H), -0.19 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 158.07, 150.80, 144.86, 140.29, 135.71, 129.59, 129.57, 127.77, 127.55, 126.57, 113.20, 113.12, 108.03, 102.81, 88.51, 75.64, 74.36, 64.56, 54.97, 52.32, 25.63, 25.50, 17.51, 17.44, -4.33, -4.81, -4.86, -5.18.

20

30

[0460]

化合物 24 の合成: THF (100 ml) 中の化合物 23 (12.1 g、15.0 mmol) の溶液に、THF 中の 1M TBAF 30 ml (30 mmol) を添加した。反応物をアルゴン雰囲気下で一晩攪拌し、翌日、溶媒を真空下で蒸発させた。粗物質を EtOAc 中 2% MeOH でカラムクロマトグラフィーにより精製して、化合物 24 (8.31 g、14.4 mmol、96%、 $R_f=0.48$; DCM 中 10% MeOH で展開) を得た。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.35 (s, 1H), 7.48-7.42 (m, 2H), 7.39 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 7.34-7.17 (m, 8H), 6.87 (d, $J=8.9$ Hz, 3H), 5.98 (d, $J=7.4$ Hz, 1H), 5.71 (d, $J=5.1$ Hz, 2H), 5.52 (d, $J=6.7$ Hz, 1H), 4.44 (td, $J=7.2, 4.2$ Hz, 1H), 4.05 (t, $J=4.4$ Hz, 1H), 3.72 (d, $J=1.3$ Hz, 7H), 3.44 (d, $J=9.8$ Hz, 1H), 3.31 (s, 3H), 2.83 (s, 4H), 2.80 (d, $J=3.5$ Hz, 1H), 1.98 (s, 1H).

40

[0461]

化合物 25 の合成: 化合物 24 (7.28 g、12.6 mmol) をジオキサン (85 ml) 及び水 (15 ml) に溶解した。NaIO₄ (3.24 g、15.2 mmol) を

50

、室温で攪拌しながらこの溶液にゆっくりと添加した。反応混合物を室温で一晩攪拌し、次に濾過し、沈殿物を100mLの追加のジオキサンを使用して洗浄した。濾液にNaBH₄ (0.500g、19.0mmol)を添加し、反応混合物を再び室温で3時間攪拌した。ピリジンと酢酸の1:1混合物20mLで反応をクエンチした。溶媒を除去した後、残留物をDCM及び飽和NaHCO₃水溶液で抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、濃縮した。粗物質をフラッシュカラムクロマトグラフィー (DCM中0~3%MeOH)で精製して、化合物25 (5.40g、9.33mol、74%、R_f=0.26; DCM中5%MeOHで展開)を得た。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 11.12 (s, 1H), 7.47 (d, J=8.0Hz, 1H), 7.42-7.12 (m, 9H), 6.95-6.82 (m, 4H), 5.84 (t, J=5.8Hz, 1H), 5.50 (d, J=8.0Hz, 1H), 5.08 (s, 1H), 4.85 (t, J=3.9Hz, 1H), 3.73 (s, 6H), 3.44 (dd, J=7.1, 3.9Hz, 3H), 3.26 (d, J=9.7Hz, 1H), 2.90 (s, 3H), 2.87 (d, J=9.6Hz, 1H). ¹³C NMR (126MHz, DMSO-d₆) δ 163.40, 158.04, 150.41, 144.66, 141.80, 135.46, 135.09, 129.75, 129.70, 127.78, 127.66, 126.64, 113.15, 113.11, 102.82, 100.91, 75.32, 61.95, 59.63, 58.85, 54.99, 48.13, 45.55, 10.23.

【0462】

化合物26の合成: -78℃のDCM (175mL) 及びピリジン (7mL) 中の化合物25 (4.7g、8.12mmol)の溶液に、DCM (50mL)中のBzCl (1.04mL、8.9mmol)の溶液を30分間にわたって添加した。次に、反応混合物を-78℃で1時間攪拌し、次に、室温に戻し、その時点で、5mLのエタノールを添加して反応をクエンチした。混合物を250mLのNaHCO₃で洗浄し、100mLのDCMで3回抽出した。有機層を合わせ、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濃縮した。カラムクロマトグラフィー (DCM中0~3%MeOH)での精製により、化合物26 (2.73g、4.0mmol、49%、R_f=0.30; DCM中5%MeOHで展開)が得られた。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 11.24 (s, 1H), 7.85-7.77 (m, 2H), 7.68 (d, J=8.1Hz, 1H), 7.66-7.62 (m, 1H), 7.49 (t, J=7.8Hz, 2H), 7.43-7.37 (m, 2H), 7.33-7.14 (m, 7H), 6.86 (d, J=8.9Hz, 3H), 6.22 (t, J=6.2Hz, 1H), 5.59 (d, J=8.1Hz, 1H), 4.99 (t, J=4.2Hz, 1H), 4.38 (d, J=6.1Hz, 2H), 3.73 (dd, J=11.5, 4.1Hz, 1H), 3.70 (s, 6H), 3.47 (dd, J=11.5, 4.1Hz, 1H), 3.26 (d, J=9.9Hz, 1H), 2.98 (d, J=10.2Hz, 1H), 2.96 (s, 3H). ¹³C NMR (126MHz, DMSO-d₆) δ 164.86, 163.13, 158.07, 150.30, 144.52, 141.08, 135.23, 135.01, 133.62, 129.72, 129.70, 129.07, 128.89, 128.79, 127.81, 127.63, 126.68, 113.16, 113.13, 103.38, 101.72, 85.40, 72.77, 63.73, 59.64, 59.36, 54.96, 48.56.

【0463】

化合物27の合成: DCM (20mL)中の化合物26 (2.58g、3.77mmol)の溶液に、DIPEA (1.38mL、11.31mmol)及び2-シアノエチルN,N-ジイソプロピルクロロホスホラミダイト (1.32mL、4.15mmol)を0℃で添加した。反応混合物を室温にし、3時間攪拌した。反応混合物をCH₂Cl₂ (100mL)で希釈し、次に、飽和NaHCO₃水溶液 (100mL)で洗浄した。有機層を分離し、無水Na₂SO₄で乾燥させ、濾過し、濃縮した。純粋な化合物27 (3.89g、4.4mmol、定量的収率)は、粗混合物を沈殿させ、1Lのヘキサン中の最

小限のDCMに溶解して得た。DCMに溶解することにより固体を収集し、次に濃縮して、白色の泡状物にした。 ^{31}P NMR (202 MHz, CD_3CN) δ 148.70, 148.68.

【0464】

化合物28の合成：化合物27 (2.43 g、3.56 mmol) を80% AcOH (80 mL) で処理した。溶媒を除去した後、残留物をフラッシュカラムクロマトグラフィー (1.1 g、2.89 mmol、81%) により精製した。

【0465】

化合物29の合成：化合物29は、化合物23で説明したように、DMTrCl及びピリジンを使用した標準条件を使用して合成される。

【0466】

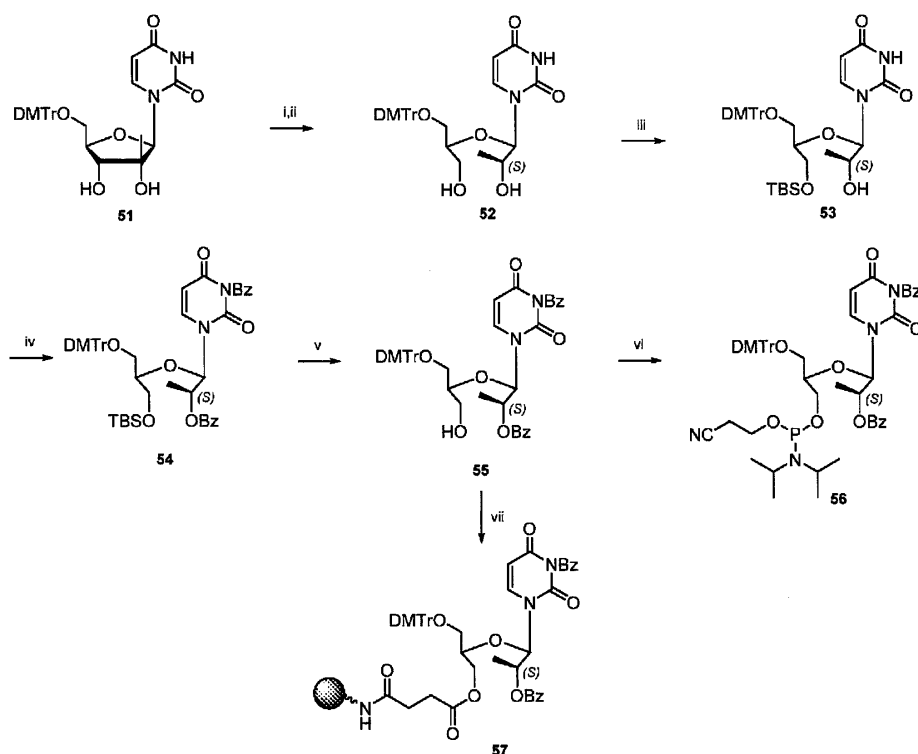
化合物30の合成：化合物30は、化合物27について記載されているように、ホスフィチル化の標準条件を使用して合成される。

【0467】

2'-メチル-UUNA構成要素の合成

【化58】

スキーム5



試薬及び条件：(i) $\text{NaIO}_4/\text{H}_2\text{O}/\text{DCM}$ 、室温、4時間；(ii) RuCl (p-シメン) [(S, S)-Ts-DPEN] / $\text{HCOONa}/\text{H}_2\text{O}/\text{AcOEt}$ 、室温、12時間、2ステップで80%；(iii) $\text{TBSCl}/\text{ピリジン}$ 、室温、3時間、64%；(iv) $\text{BzCl}/\text{Et}_3\text{N}/\text{DCM}$ 、室温、4時間、90%；(v) $\text{NEt}_3 \cdot \text{HF}/\text{THF}$ 、室温、8時間、96%；(vi) 2-シアノエチルN, N-ジイソプロピルクロロホスホラミダイト / DIEA/DCM 、1時間、87%；(vii) (a) 無水コハク酸 / $\text{DMAP}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (b) アミノアルキルCPG / $\text{HBTU}/\text{DIEA}/\text{DM}$ 。

【0468】

化合物52の合成：DCM (10 mL) 中の化合物51 (500 mg、0.893 mmol) の溶液に、 H_2O (10 mL) 中の NaIO_4 (287 mg、1.34 mmol)

を添加した。得られた混合物を4時間激しく攪拌し、反応の完了をTLCでチェックした。有機層を分離し、真空中で蒸発させた。得られたケトアルデヒドの無色泡状物をさらに精製することなく次のステップに使用した。丸底フラスコにη6-(p-シメン)-[5,5]-N-トリエンスルホニル-1,2-ジフェニルエチレンジアミン(1-ルテニウム(II)クロリド(15mg、0.024mmol、2.5mol%)及びケトアルデヒド(500mg、0.893mmol)を入れ、系をArで3回フラッシュした。水(13mL)中のギ酸ナトリウム(2.27g、33.3mmol)の溶液を添加し、続いて酢酸エチル(3mL)を添加した。得られた二相混合物を室温で24時間激しく攪拌した。有機相を分離し、水相をさらに10mLの酢酸エチルで抽出した。合わせた有機層から、減圧下、ロータリーエバポレーターで溶媒を除去した。粗残留物をシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製して、化合物52を無色の泡状物として得た(401mg、2ステップで80%)。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) : δ 11.34 (s, 1H), 7.60 (d, J=8.0Hz, 1H), 7.37-7.08 (m, 9H), 6.85 (d, J=8.4Hz, 4H), 5.48 (dd, J=15.5, 6.5Hz, 2H), 5.08 (d, J=5.3Hz, 1H), 4.72 (s, 1H), 3.72 (s, 7H), 3.55 (s, 3H), 3.10 (s, 2H), 1.03 (d, J=6.4Hz, 3H). ¹³C NMR(126MHz, DMSO-d₆) δ 163.21, 157.99, 151.08, 144.81, 141.57, 135.61, 135.51, 129.61, 129.57, 127.75, 127.63, 126.59, 113.12, 113.09, 101.20, 86.46, 85.50, 79.54, 67.11, 63.64, 60.44, 59.75, 54.99, 39.23, 18.38, 14.09. HRMS; C₃₁H₃₄N₂O₈Naについて計算した[M+Na]⁺, 585.2213; 実測値: 585.2224.

【0469】

化合物53の合成: 乾燥ピリジン(10mL)中の化合物52(520mg、0.925mmol)の溶液に、TBSCl(154mg、1.02mmol)及びDMAP(11mg、0.09mmol)を添加した。反応混合物を室温で3時間攪拌し、次に、得られた混合物をDCMで希釈した。反応を飽和NaHCO₃水溶液でクエンチした。有機層を分離し、ブラインで洗浄し、真空中で濃縮した。粗残留物をシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製して、化合物53を無色の泡状物として得た(400mg、64%)。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ 11.34 (d, J=2.0Hz, 1H), 7.62 (d, J=8.0Hz, 1H), 7.45-7.06 (m, 9H), 7.00-6.69 (m, 4H), 5.62-5.31 (m, 2H), 4.98 (d, J=5.9Hz, 1H), 3.73 (ddd, J=41.8, 11.1, 5.2Hz, 8H), 3.60-3.38 (m, 2H), 3.05 (d, J=5.1Hz, 2H), 1.05 (d, J=6.3Hz, 3H), 0.74 (s, 9H), -0.07 (d, J=6.9Hz, 6H). ¹³C NMR(126MHz, DMSO-d₆) δ 163.21, 158.01, 151.07, 144.76, 141.61, 135.59, 135.41, 129.56, 129.54, 127.71, 127.57, 126.57, 113.09, 113.06, 101.02, 85.92, 85.61, 78.31, 66.87, 63.36, 61.41, 54.96, 25.58, 18.56, 17.70, -5.65, -5.69. HRMS; C₃₇H₄₈N₂O₈SiNaについて計算した[M+Na]⁺, 699.3078; 実測値: 699.3067.

【0470】

化合物54の合成: 乾燥DCM(100mL)中の化合物53(6.6g、9.76mmol)の溶液に、Et₃N(13.5mL、97.6mmol)及びBzCl(5.6mL、48.8mmol)を添加した。反応混合物を室温で4時間攪拌し、次に、得られた混合物をDCMで希釈した。反応を飽和NaHCO₃水溶液でクエンチした。有機層を分離し、ブラインで洗浄し、真空中で濃縮した。粗残留物をシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製して、化合物54を無色の泡状物として得た(7.8g

、90%）。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.07–7.11 (m, 20H), 6.98–6.69 (m, 4H), 6.02 (d, $J=4.6$ Hz, 1H), 5.69–5.27 (m, 2H), 3.81–3.42 (m, 9H), 3.17 (qd, $J=10.7, 4.4$ Hz, 2H), 1.37 (d, $J=6.5$ Hz, 3H), 0.71 (s, 9H), –0.10 (d, $J=12.1$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 169.19, 165.01, 161.61, 158.08, 149.35, 144.66, 141.00, 135.57, 135.52, 135.30, 133.60, 130.92, 130.23, 129.62, 129.47, 129.23, 129.18, 128.73, 127.78, 127.63, 126.71, 113.14, 113.11, 101.19, 85.91, 84.66, 78.65, 69.99, 63.23, 61.81, 54.96, 25.54, 17.67, 14.99, –5.76. HRMS; $\text{C}_{51}\text{H}_{56}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{SiNa}$ について計算した $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 907.3602; 実測値: 907.3611.

[0471]

化合物55の合成: 乾燥THF (83 mL) 中の化合物54 (7.3 g、8.25 mmol) の溶液に、 $\text{Et}_3\text{N} \cdot 3\text{HF}$ (13.4 mL、82.5 mmol) を滴下した。反応混合物を室温で8時間攪拌し、次に、AcOEtで希釈し、飽和 NaHCO_3 水溶液でクエンチした。有機層を分離し、ブラインで洗浄し、真空で濃縮した。粗残留物をシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製して、化合物55を無色の泡状物として得た (6.1 g、96%)。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.05–7.11 (m, 20H), 7.04–6.67 (m, 4H), 6.04 (d, $J=3.9$ Hz, 1H), 5.67–5.25 (m, 2H), 4.85 (t, $J=5.1$ Hz, 1H), 3.72–3.70 (m, 7H), 3.60–3.38 (m, 2H), 3.18 (qd, $J=10.7, 5.1$ Hz, 2H), 1.39 (d, $J=6.5$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 169.19, 165.10, 161.60, 158.05, 149.26, 144.64, 141.00, 135.56, 135.50, 135.37, 133.56, 130.95, 130.19, 129.65, 129.47, 129.21, 129.17, 128.73, 127.78, 127.70, 126.72, 113.14, 113.12, 100.84, 85.83, 84.54, 79.12, 70.06, 63.63, 60.48, 54.97, 14.94. HRMS; $\text{C}_{45}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{Na}$ について計算した $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 793.2737; 実測値: 793.2724.

[0472]

化合物56の合成: 乾燥DCM 8 mL 中の化合物55 (568 mg、0.737 mmol) の溶液に、DIPEA (385 μL 、2.21 mmol) 及び2-シアノエチルクロロ-N,N-ジイソプロピルホスホラミダイト (181 μL 、0.811 mmol) を滴下した。反応混合物を室温で1時間攪拌し、次に、DCMで希釈し、飽和 NaHCO_3 水溶液で反応をクエンチした。有機層を分離し、ブラインで洗浄し、真空で濃縮した。粗残留物をシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製して、化合物56を無色の泡状物として得た (623 mg、87%)。 ^1H NMR (500 MHz, アセトニトリル- d_3) δ 8.09–7.89 (m, 4H), 7.86–7.13 (m, 16H), 6.95–6.74 (m, 4H), 6.01 (dd, $J=8.7, 3.7$ Hz, 1H), 5.45 (dtt, $J=21.1, 8.2, 4.1$ Hz, 2H), 3.90–3.60 (m, 11H), 3.51 (ddq, $J=13.5, 10.3, 6.7$ Hz, 2H), 3.44–3.10 (m, 2H), 2.54 (dt, $J=8.8, 5.9$ Hz, 2H), 1.44 (t, $J=6.2$ Hz, 3H), 1.32–0.93 (m, 12H). ^{13}C NMR (101 MHz, アセトニトリル- d_3) δ 169.12, 165.27, 161.69, 158.37, 149.44, 144.58, 140.43, 135.10, 133.09, 131.14, 129.94, 129.69, 129.67, 129.39, 129.11, 128.33, 127.69, 127.54, 126.57, 118

. 12, 116.96, 112.76, 112.75, 100.82, 84.61, 69.86, 54.58, 42.58, 42.46, 23.67, 23.62, 23.55, 23.48, 19.68, 19.62. ^{31}P NMR (202 MHz, アセトニトリル- d_3) δ 149.67; 149.29. HRMS; $\text{C}_{54}\text{H}_{60}\text{N}_4\text{O}_{11}\text{P}$ について計算した $[\text{M}+\text{H}]^+$, 971.3996; 実測値: 971.3989.

【0473】

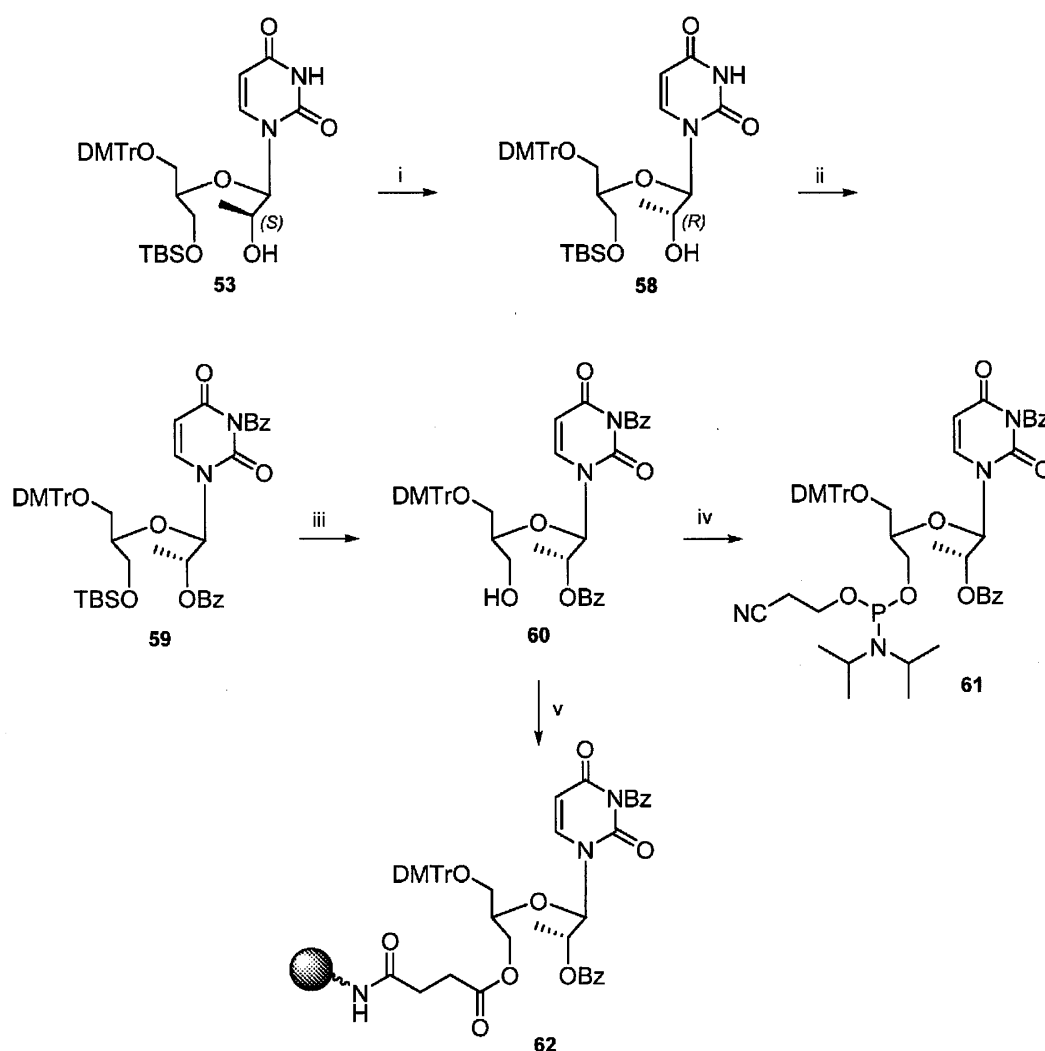
化合物57の合成: CH_2Cl_2 中での無水コハク酸及びDMA Pを使用した化合物55の標準的なコハク化と、それに続くDMF中でのHBTU及びDIPEAを使用したCPGローディングにより、化合物57が得られる。

【0474】

2'-(R)-メチル-U-UNA構成要素の合成

【化59】

スキーム7



試薬及び条件: (i) BzOH、DIAD、PPh₃、THF、室温、3時間; NaOH水溶液、室温、3時間、80%; (ii) BzCl、Et₃N、DCM、室温、4時間、92%; (iii) NEt₃・HF、THF、室温、8時間、97%; (iv) 2-シアノエチルN,N-ジイソプロピルクロロホスホラミダイト、DIEA、DCM、1時間、80%; (v) (a) 無水コハク酸/DMA P/CH₂Cl₂ (b) アミノアルキルCPG/HBTU/DIEA/DMF。

【0475】

化合物58の合成：乾燥THF100mL中の化合物53（2.2g、3.25mmol）の溶液に、PPh₃（4.26g、16.3mmol）、BzOH（1.98g、16.3mmol）及びDIAD（3.15mL、16.3mmol）を滴下した。反応混合物を室温で3時間攪拌し、反応の完了をTLCでチェックした。溶媒を真空で除去した。粗残留物をシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製して、2, 2'-アンヒドロヌクレオシド及びDIAD副生成物の混合物を得た。この混合物をTHF（50mL）に溶解した。混合物の溶液に1N NaOH水溶液（10mL）を滴下した。得られた混合物を3時間攪拌した。溶媒を真空で除去した。粗残留物をシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製して、化合物58を無色の泡状物として得た（1.8g、80%）。¹H NMR（400MHz, DMSO-d₆）δ 11.30（d, J=2.1Hz, 1H）, 7.62（d, J=8.1Hz, 1H）, 7.43-7.04（m, 9H）, 6.96-6.65（m, 4H）, 5.60-5.40（m, 2H）, 5.07（d, J=5.4Hz, 1H）, 3.96-3.44（m, 10H）, 3.11-2.77（m, 2H）, 1.14（d, J=6.2Hz, 3H）, 0.75（s, 9H）, -0.05（s, 6H）。¹³C NMR（126MHz, DMSO-d₆）δ 163.22, 158.00, 157.99, 151.78, 144.75, 141.42, 135.58, 135.38, 129.51, 129.46, 127.70, 127.53, 126.56, 113.10, 113.06, 101.70, 86.25, 85.44, 77.71, 66.11, 63.07, 61.51, 54.96, 25.59, 19.72, 17.73, -5.66, -5.68。HRMS; C₃₇H₄₈N₂O₈ Si Naについて計算した [M+Na]⁺, 699.3078; 実測値: 699.3099.

【0476】

化合物59の合成：乾燥DCM（50mL）中の化合物58（3.3g、4.88mmol）の溶液に、Et₃N（6.8mL、48.8mmol）及びBzCl（2.8mL、24.4mmol）を添加した。反応混合物を室温で4時間攪拌し、次に、得られた混合物をDCMで希釈した。反応を飽和NaHCO₃水溶液でクエンチした。有機層を分離し、ブラインで洗浄し、真空で濃縮した。粗残留物をシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製して、化合物59を無色の泡状物として得た（4.0g、92%）。¹H NMR（400MHz, DMSO-d₆）δ 8.11-7.76（m, 3H）, 7.76-7.56（m, 4H）, 7.48（t, J=7.7Hz, 2H）, 7.39-7.02（m, 11H）, 7.08-6.69（m, 4H）, 6.03（d, J=7.1Hz, 1H）, 5.83（d, J=8.2Hz, 1H）, 5.40（p, J=6.4Hz, 1H）, 3.70（s, 9H）, 3.19-2.93（m, 2H）, 1.41（d, J=6.4Hz, 3H）, 0.75（s, 9H）, -0.06（d, J=1.4Hz, 6H）。¹³C NMR（101MHz, DMSO-d₆）δ 164.48, 161.58, 158.07, 158.05, 149.77, 141.63, 135.50, 135.42, 135.31, 133.72, 130.77, 129.81, 129.61, 129.55, 129.34, 129.21, 128.99, 128.87, 127.77, 127.58, 126.66, 113.16, 113.12, 102.04, 85.74, 78.75, 70.38, 62.97, 61.91, 54.96, 39.97, 25.59, 17.71, 16.19, -5.67, -5.71。HRMS; C₅₁H₅₆N₂O₁₀ Si Naについて計算した [M+Na]⁺, 907.3602; 実測値: 907.3616.

【0477】

化合物60の合成：乾燥THF（43mL）中の化合物60（3.8g、4.30mmol）の溶液に、Et₃N・3HF（6.98mL、43.0mmol）を滴下した。反応混合物を室温で8時間攪拌し、次に、得られた混合物をDCMで希釈した。反応を飽和NaHCO₃水溶液でクエンチした。有機層を分離し、ブラインで洗浄し、真空で濃縮した。粗残留物をシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製して、化

合物60を無色の泡状物として得た(3.2g、97%)。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 7.96 (dd, J=8.2, 1.4Hz, 1H), 7.90 (dt, J=8.3, 1.4Hz, 2H), 7.74-7.61 (m, 4H), 7.48 (t, J=7.7Hz, 2H), 7.40-7.16 (m, 11H), 6.86 (d, J=8.4Hz, 4H), 6.03 (dd, J=7.1, 2.0Hz, 1H), 5.84 (d, J=8.1Hz, 1H), 5.46-5.34 (m, 1H), 4.86 (td, J=5.1, 1.7Hz, 1H), 3.66-3.62 (m, 7H), 3.52 (s, 2H), 3.21-3.01 (m, 2H), 1.48-1.37 (m, 3H)。¹³C NMR (101MHz, DMSO-d₆) δ 169.14, 164.53, 161.60, 158.03, 158.01, 149.76, 144.74, 141.66, 135.50, 135.43, 133.70, 130.82, 129.80, 129.65, 129.57, 129.35, 129.22, 129.02, 128.87, 127.78, 127.64, 126.65, 113.15, 113.13, 101.94, 85.62, 84.94, 79.38, 70.53, 63.44, 60.51, 54.96, 16.33, 14.07。HRMS; C₄₅H₄₂N₂O₁₀Naについて計算した[M+Na]⁺, 793.2737; 実測値: 793.2742。

【0478】

化合物61の合成: 乾燥DCM (7mL) 中の化合物60 (543mg、0.705mmol) の溶液に、DIPEA (368μL、2.12mmol) 及び2-シアノエチルクロロ-N, N-ジイソプロピルホスホラミダイト (173μL、0.776mmol) を滴下した。反応混合物を室温で1時間攪拌し、次に、得られた混合物をDCMで希釈した。反応を飽和NaHCO₃水溶液でクエンチした。有機層を分離し、ブラインで洗浄し、真空で濃縮した。粗残留物をシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製して、化合物61を無色の泡状物として得た(549mg、80%)。¹H NMR (500MHz, アセトニトリル-d₃) δ 7.95 (ddd, J=8.4, 2.7, 1.4Hz, 2H), 7.81-7.56 (m, 5H), 7.52-7.35 (m, 4H), 7.35-7.16 (m, 9H), 6.90-6.77 (m, 4H), 6.04 (dd, J=8.7, 6.8Hz, 1H), 5.39 (dt, J=11.2, 6.5Hz, 1H), 3.86-3.61 (m, 11H), 3.62-3.40 (m, 2H), 3.33-3.11 (m, 2H), 2.56 (q, J=5.9Hz, 2H), 1.45 (dd, J=6.4, 3.9Hz, 3H), 1.30-0.97 (m, 12H)。¹³C NMR (101MHz, アセトニトリル-d₃) δ 166.05, 163.01, 159.76, 151.29, 146.07, 142.03, 142.00, 136.94, 136.84, 136.31, 134.59, 132.37, 131.05, 131.01, 130.97, 130.67, 130.56, 130.44, 129.82, 129.04, 128.91, 127.92, 119.52, 118.35, 114.16, 114.14, 103.32, 87.38, 86.03, 71.83, 71.78, 64.57, 55.98, 44.01, 43.90, 43.88, 25.11, 25.09, 25.02, 24.99, 24.96, 24.89, 21.10, 21.03, 17.08, 17.04, 2.01, 1.80, 1.67。³¹P NMR (202MHz, アセトニトリル-d₃) δ 149.61, 149.29。HRMS; C₅₄H₆₀N₄O₁₁Pについて計算した[M+H]⁺, 971.3996; 実測値: 971.3967。

【0479】

化合物62の合成: CH₂Cl₂中での無水コハク酸及びDMAPを使用した化合物60の標準的なコハク化と、それに続くDMF中でのHBTU及びDIPEAを使用したCPGローディングにより、化合物62が得られる。

【0480】

2'-メチル-UUNAモッシャーエステルの合成

10

20

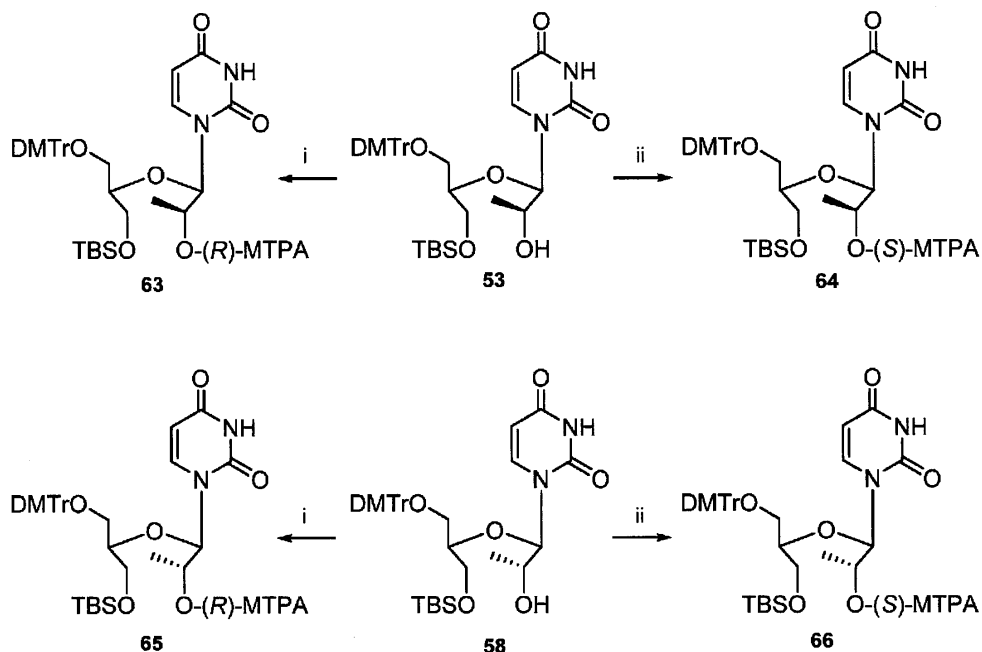
30

40

50

【化 6 0】

スキーム8



試薬及び条件：(i) (S)-MTPACl / DMAP / Et₃N / MeCN、室温、5時間、52～77%；(ii) (R)-MTPACl / DMAP / Et₃N / MeCN、室温、5時間、54～78%。

【0481】

化合物63の合成：乾燥MeCN (2mL) 中の化合物53 (100mg、0.148mmol)、DMAP (1.8mg、0.02mmol)、Et₃N (103μL、0.740mmol) の溶液に、(S)-(+)-MTPACl (33.2μL、0.178mmol) を滴下した。反応混合物を室温で5時間攪拌し、次に、得られた混合物をAcOEtで希釈した。反応を飽和NaHCO₃水溶液でクエンチした。有機層を分離し、ブラインで洗浄し、真空で濃縮した。粗残留物をシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製して、化合物63を無色の泡状物として得た (68mg、52%)。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 11.44 (s, 1H), 7.60–7.08 (m, 15H), 6.84 (dd, J=8.9, 3.5Hz, 4H), 5.86 (d, J=5.9Hz, 1H), 5.48–5.19 (m, 2H), 3.72 (s, 6H), 3.51–3.34 (m, 5H), 2.93 (t, J=4.4Hz, 3H), 1.31 (d, J=6.4Hz, 3H), 0.69 (s, 9H), -0.15 (d, J=9.4Hz, 6H)。¹³C NMR (126MHz, DMSO-d₆) δ 165.03, 162.83, 158.02, 150.90, 144.65, 139.94, 135.42, 135.24, 131.20, 129.81, 129.56, 128.41, 127.68, 127.52, 126.85, 126.59, 113.06, 113.03, 102.06, 85.63, 82.96, 77.67, 72.79, 63.22, 61.07, 55.35, 54.95, 39.23, 25.48, 17.59, 15.09, -5.78, -5.84。HRMS; C₄₇H₅₅F₃N₂O₁₀SiNaについて計算した [M+Na]⁺, 915.3476; 実測値: 915.3485。

【0482】

化合物64の合成：乾燥MeCN (2mL) 中の化合物53 (100mg、0.148mmol)、DMAP (1.8mg、0.02mmol)、Et₃N (103μL、0.

7.40 mmol) の溶液に、(R) - (-) - MTPACL (33.2 μ L、0.178 mmol) を滴下した。反応混合物を室温で5時間攪拌し、次に、得られた混合物を AcOEt で希釈した。反応を飽和 NaHCO₃ 水溶液でクエンチした。有機層を分離し、ブラインで洗浄し、真空で濃縮した。粗残留物をシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製して、化合物64を無色の泡状物として得た (70 mg、54%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.48 (s, 1H); 7.65 (d, J=8.1 Hz, 2H), 7.53-7.02 (m, 13H), 6.94-6.65 (m, 4H), 5.88 (d, J=6.0 Hz, 1H), 5.56-5.27 (m, 2H), 3.87-3.44 (m, 9H), 3.31 (s, 3H), 3.04 (t, J=4.0 Hz, 2H), 1.20 (d, J=6.4 Hz, 3H), 0.68 (s, 9H), -0.15 (d, J=7.4 Hz, 6H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ 158.04, 150.98, 144.67, 135.45, 135.25, 129.94, 129.58, 128.53, 127.71, 127.54, 127.16, 126.61, 113.09, 113.06, 102.30, 77.77, 72.94, 63.27, 61.25, 55.19, 54.97, 39.06, 25.50, 17.62, 14.76, -5.83, -5.86. HRMS; C₄₇H₅₅F₃N₂O₁₀SiNa について計算した [M+Na]⁺, 915.3476; 実測値: 915.3484. [0483]

化合物65の合成: 乾燥 MeCN (2 mL) 中の化合物58 (100 mg、0.148 mmol)、DMAP (1.8 mg、0.02 mmol)、Et₃N (103 μ L、0.740 mmol) の溶液に、(S) - (+) - MTPACL (33.2 μ L、0.178 mmol) を滴下した。反応混合物を室温で5時間攪拌し、次に、得られた混合物を AcOEt で希釈した。反応を飽和 NaHCO₃ 水溶液でクエンチした。有機層を分離し、ブラインで洗浄し、真空で濃縮した。粗残留物をシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製して、化合物65を無色の泡状物として得た (101 mg、77%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.47 (d, J=2.0 Hz, 1H), 7.67 (d, J=8.1 Hz, 1H), 7.56-7.04 (m, 14H), 6.94-6.71 (m, 4H), 5.98 (d, J=7.1 Hz, 1H), 5.62-5.23 (m, 2H), 3.71 (s, 6H); 3.68-3.44 (m, 2H), 3.36 (s, 3H), 3.01 (t, J=5.4 Hz, 2H), 1.30 (d, J=6.2 Hz, 3H), 0.74 (s, 9H), -0.06 (d, J=2.7 Hz, 6H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ 164.68, 162.88, 158.01, 151.25, 144.68, 140.54, 135.48, 135.29, 131.12, 129.96, 129.51, 129.45, 128.61, 127.72, 127.49, 126.86, 126.60, 113.11, 113.07, 102.47, 78.80, 72.30, 62.90, 61.80, 55.01, 54.96, 25.56, 17.68, 15.69, -5.71. HRMS; C₄₇H₅₅F₃N₂O₁₀SiNa について計算した [M+Na]⁺, 915.3476; 実測値: 915.3460. [0484]

化合物66の合成: 乾燥 MeCN (2 mL) 中の化合物58 (100 mg、0.148 mmol)、DMAP (1.8 mg、0.02 mmol)、Et₃N (103 μ L、0.740 mmol) の溶液に、(R) - (-) - MTPACL (33.2 μ L、0.178 mmol) を滴下した。反応混合物を室温で5時間攪拌し、次に、得られた混合物を AcOEt で希釈した。反応を飽和 NaHCO₃ 水溶液でクエンチした。有機層を分離し、ブラインで洗浄し、真空で濃縮した。粗残留物をシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製して、化合物66を無色の泡状物として得た (102 mg、78%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.28 (d, J=2.0 Hz, 1H), 7.56-7.02 (m, 15H), 6.98-6.71 (m, 4H), 5.89 (d, J=7.3 Hz, 1H), 5.54-5.29 (m, 2H), 3.72 (d, J=1.3 Hz, 6H), 3.67-3.44 (m, 3H), 3.40 (s, 3H); 3

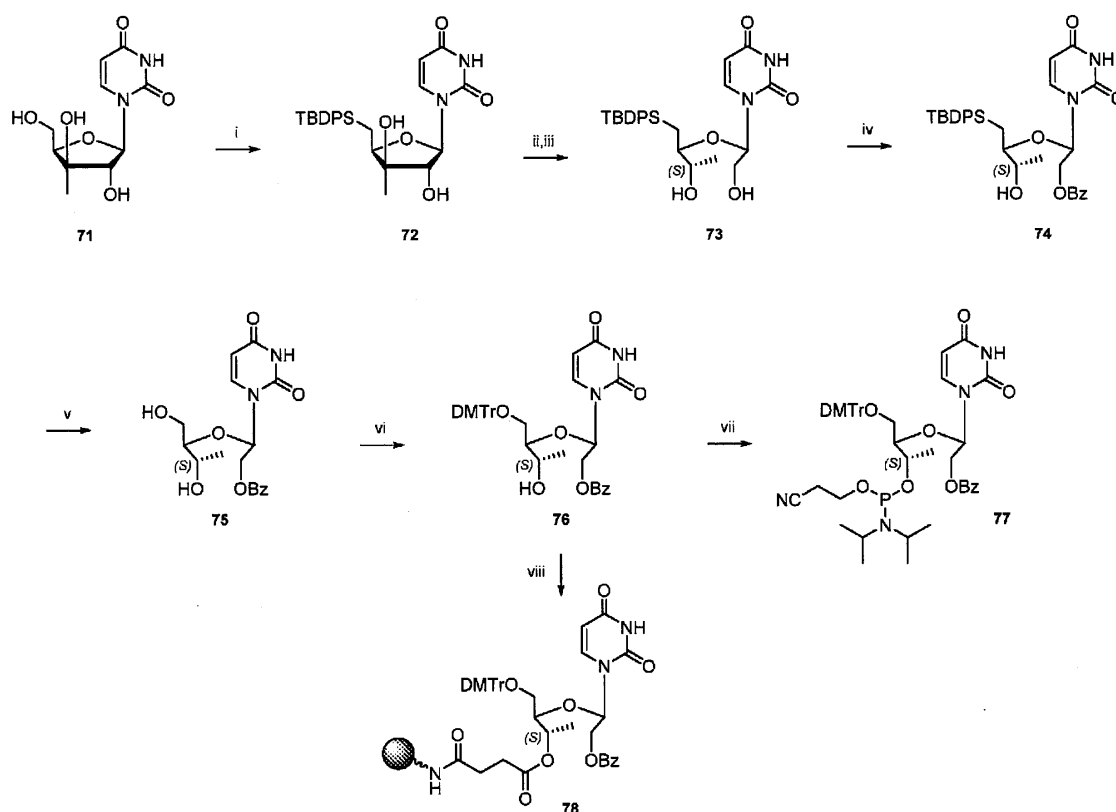
. 11-2.85 (m, 2H), 1.39 (d, $J=6.2$ Hz, 3H), 0.75 (s, 9H), -0.06 (d, $J=1.9$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 164.54, 162.83, 158.02, 158.00, 151.10, 144.68, 135.50, 135.31, 131.00, 129.90, 129.49, 129.43, 128.57, 127.71, 127.49, 126.71, 126.58, 113.12, 113.07, 102.39, 85.54, 78.70, 71.71, 62.82, 61.77, 55.17, 54.97, 39.25, 25.57, 17.70, 16.08, -5.70, -5.72. HRMS; $\text{C}_{47}\text{H}_{55}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_{10}\text{SiNa}$ について計算した $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 915.3476; 実測値: 915.3466.

【0485】

3'-(S)-メチル-U-UNA 構成要素の合成

【化61】

スキーム9



試薬及び条件: (i) TBDPSCl 、 DMAP 、ピリジン、室温、12時間、92% ; (ii) $\text{Pb}(\text{AcO})_4$ 、 DCM 、室温、1時間 ; (iii) $\text{RuCl}(\text{p-シメン})[(\text{R}, \text{R})-\text{Ts-DPEN}]$ 、 HCOONa 、 $\text{H}_2\text{O}/\text{AcOEt}$ 、室温、24時間、2ステップで76% ; (iv) Bz_2O 、 DMAP 、ピリジン、室温、5時間、85% ; (v) TBAF 、 THF 、室温、1時間、95% ; (vi) DMTrCl 、ピリジン、室温、5時間、98% ; (vii) 2-シアノエチル N , N -ジイソプロピルクロロホスホラミダイト、 DIEA 、 DCM 、室温、1~2時間、81~86% ; (viii) (a) 無水コハク酸/ DMAP / CH_2Cl_2 (b) アミノアルキルCPG/ HBTU / DIEA / DMF

【0486】

化合物72の合成: ピリジン (350 mL) 中の化合物71 (9 g、34.9 mmol) の溶液に、 DMAP (426 mg、3.49 mmol) 及び TBDPSCl (13.6

mL、52.4 mmol)を滴下した。得られた混合物を12時間攪拌し、次に、DCMで希釈した。反応を飽和NaHCO₃水溶液でクエンチした。有機層を分離し、ブラインで洗浄し、真空で除去した。粗残留物をシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製して、化合物72を無色の泡状物として得た(16 g、92%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.27 (d, J=2.2 Hz, 1H), 7.84–7.27 (m, 11H), 5.89 (d, J=5.6 Hz, 1H), 5.62 (s, 1H), 5.49 (dd, J=8.2, 2.2 Hz, 1H), 5.04 (s, 1H), 4.02–3.60 (m, 4H), 1.11 (s, 3H), 0.99 (s, 9H)。¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 163.23, 150.43, 141.24, 135.13, 135.08, 132.86, 132.65, 129.89, 127.90, 127.85, 100.27, 91.35, 86.74, 82.40, 77.33, 62.57, 26.57, 18.91, 18.70。HRMS; C₂₆H₃₃N₂O₆Siについて計算した[M+H]⁺, 497.2108; 実測値: 497.2108。

【0487】

化合物73の合成: DCM (240 mL)中の化合物72 (12 g、24.2 mmol)の溶液に、Pb(AcO)₄ (21.5 g、48.4 mmol)を添加した。得られた混合物を1時間激しく攪拌し、反応の完了をTLCでチェックした。反応をブラインでクエンチした。得られた混合物を過剰量のEt₂Oで希釈し、次に不溶性物質を、セライトパッドを通して濾別した。有機層をブラインで洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させ、真空で蒸発させた。得られたケトアルデヒドの無色形態をさらに精製することなく次のステップに使用した。丸底フラスコにη6-(p-シメン)-(S,S)-N-トルエンシルホニル-1,2-ジフェニルエチレンジアミン(1-ルテニウム(II)クロリド(360 mg、0.576 mmol、2.5 mol%)及びケトアルデヒド(12 g、24.2 mmol)を入れ、系をアルゴンで3回フラッシュした。水(300 mL)中のギ酸ナトリウム(54.5 g、800 mmol)の溶液を添加し、続いて酢酸エチル(75 mL)を添加した。得られた二相混合物を室温で24時間激しく攪拌した。有機相を分離し、水相をさらに100 mLの酢酸エチルで抽出した。合わせた有機層から、減圧下、ロータリーエバポレーターで溶媒を除去した。粗残留物をシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製して、化合物73を無色の泡状物として得た(9.2 g、2ステップで76%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.25 (s, 1H), 7.66–7.33 (m, 11H), 7.29–7.06 (m, 1H), 5.88 (dd, J=6.5, 4.9 Hz, 1H), 5.40 (d, J=8.0 Hz, 1H), 5.19–5.00 (m, 1H), 4.77 (d, J=4.8 Hz, 1H), 3.91–3.80 (m, 1H); 3.73–3.64 (m, 1H), 3.60–3.49 (m, 3H); 1.01 (d, J=6.3 Hz, 3H); 0.93 (s, 9H)。¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 163.14, 151.28, 140.87, 134.96, 134.91, 132.73, 132.64, 129.83, 128.85, 128.15, 127.83, 125.26, 101.53, 84.06, 83.20, 65.48, 63.18, 61.16, 26.53, 18.63, 18.05。HRMS; C₂₆H₃₄N₂O₆SiNaについて計算した[M+Na]⁺, 521.2084; 実測値: 521.2076。

【0488】

化合物74の合成: 乾燥ピリジン(72 mL)中の化合物73 (3.6 g、7.23 mmol)の溶液に、DMAP (88 mg、0.72 mmol)及びBz₂O (1.7 mg、7.59 mmol)を添加した。反応混合物を室温で5時間攪拌し、次に、得られた混合物をDCMで希釈した。反応を飽和NaHCO₃水溶液でクエンチした。有機層を分離し、ブラインで洗浄し、真空で除去した。粗残留物をシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製して、化合物74を無色の形態として得た(3.7 g、85%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.37 (d, J=1.9 H

z, 1H), 8.03–7.82 (m, 2H), 7.82–7.29 (m, 14H), 6.31 (t, J=5.6 Hz, 1H), 5.43 (dd, J=8.1, 1.8 Hz, 1H), 4.89 (d, J=4.6 Hz, 1H), 4.63 (dd, J=11.6, 5.1 Hz, 1H), 4.46 (dd, J=11.5, 6.2 Hz, 1H), 3.89 (s, 1H), 3.77–3.42 (m, 3H), 1.03 (d, J=6.5 Hz, 3H), 0.94 (s, 9H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 165.00, 162.97, 150.90, 149.56, 140.29, 135.03, 134.96, 134.92, 133.57, 132.65, 132.57, 129.86, 129.14, 129.11, 128.98, 128.76, 127.85, 127.82, 101.96, 83.37, 81.29, 65.52, 63.47, 63.11, 39.24, 26.53, 18.63, 17.85.

10

【0489】

化合物75の合成：乾燥THF (50 mL) 中の化合物74 (3.8 g、6.31 mmol) の溶液に、THF 溶液 (12.6 mL、12.6 mmol) 中の1M TBAF を添加した。反応混合物を室温で1時間攪拌し、次に、得られた混合物をAcOEt で希釈した。反応物を飽和NH₄Cl 水溶液に注いだ。有機層を分離し、ブラインで洗浄し、真空で除去した。粗残留物をシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製して、化合物75を無色の泡状物として得た (2.2 g、95%)。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.28 (s, 1H), 7.98–7.84 (m, 2H), 7.84–7.44 (m, 4H), 6.25 (t, J=5.8 Hz, 1H), 5.61 (d, J=8.0 Hz, 1H), 4.88–4.70 (m, 1H), 4.58 (dt, J=9.5, 5.4 Hz, 2H), 4.40 (dd, J=11.5, 6.3 Hz, 1H), 3.76 (ddd, J=9.0, 6.5, 4.4 Hz, 1H), 3.55–3.21 (m, 3H), 1.07 (d, J=6.4 Hz, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 165.04, 163.26, 151.03, 140.96, 133.59, 129.33–128.63 (m), 101.46, 84.39, 81.57, 65.83, 63.63, 60.70, 17.95.

20

【0490】

化合物76の合成：乾燥ピリジン (85 mL) 中の化合物75 (3.1 g、8.52 mmol) の溶液に、DMTrCl (3.17 g、9.37 mmol) を添加した。反応混合物を室温で5時間攪拌し、次に、DCM で希釈した。反応を飽和NaHCO₃ 水溶液でクエンチした。有機層を分離し、ブラインで洗浄し、真空で除去した。粗残留物をシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製して、化合物76を無色の泡状物として得た (5.2 g、98%)。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.41 (s, 1H), 7.96–7.82 (m, 2H), 7.82–7.43 (m, 4H), 7.41–7.04 (m, 9H), 7.02–6.73 (m, 4H), 6.32–6.12 (m, 1H), 5.51 (d, J=8.1 Hz, 1H), 4.84 (d, J=4.5 Hz, 1H), 4.65 (dd, J=11.6, 5.2 Hz, 1H), 4.49 (dd, J=11.5, 6.8 Hz, 1H), 3.79–3.61 (m, 8H), 3.17–2.74 (m, 2H), 0.90 (d, J=6.4 Hz, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 164.99, 163.04, 157.97, 157.94, 151.05, 144.70, 140.63, 135.53, 135.44, 133.60, 129.54, 129.45, 129.12, 128.99, 128.80, 127.73, 127.65, 127.57, 126.57, 113.10, 113.08, 102.08, 85.57, 82.77, 81.62, 66.04, 63.31, 62.91, 59.71, 54.96, 39.05, 17.87, 14.05.

30

40

【0491】

化合物77の合成：乾燥DCM (38 mL) 中の化合物76 (2.5 g、3.75 mmol) の溶液に、DIPEA (2 mL、11.3 mmol) 及び2-シアノエチルクロロ-N, N-ジイソプロピルホスホラミダイト (921 μL 、14.13 mmol) を滴下

50

した。反応混合物を室温で1時間攪拌し、次に、DCMで希釈し、飽和NaHCO₃水溶液で反応をクエンチした。有機層を分離し、ブラインで洗浄し、真空で濃縮した。粗残留物をシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製して、化合物77を無色の泡状物として得た(2.8 g、86%)。¹H NMR (500 MHz, アセトニトリル-d₃) δ 9.03 (s, 1H); 7.96 (ddt, J=8.4, 3.1, 1.7 Hz, 2H), 7.73–7.12 (m, 13H), 6.83 (ddd, J=8.9, 4.1, 2.1 Hz, 4H), 6.30 (dt, J=8.8, 5.3 Hz, 1H), 4.61–4.35 (m, 2H), 4.19–3.98 (m, 1H), 3.82–3.40 (m, 12H), 3.28–2.99 (m, 2H), 2.65–2.53 (m, 2H), 1.26–0.89 (m, 15H)。¹³C NMR (126 MHz, アセトニトリル-d₃) δ 159.70, 136.91, 134.49, 131.01, 130.99, 130.94, 130.54, 129.70, 128.98, 128.89, 127.87, 118.36, 114.12, 103.11, 64.81, 64.15, 55.97, 43.97, 43.87, 25.02, 24.95, 24.87, 1.89, 1.33, 1.22, 1.06。³¹P NMR (202 MHz, アセトニトリル-d₃) δ 148.99, 148.80。

【0492】

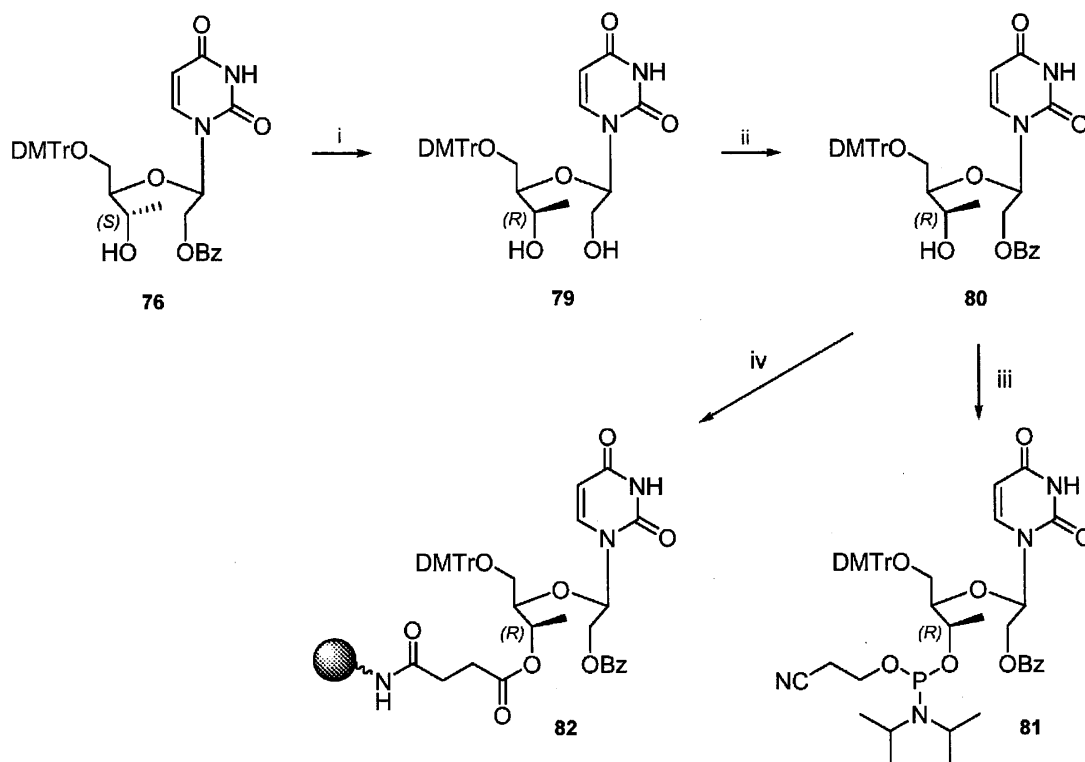
化合物78の合成：CH₂Cl₂中での無水コハク酸及びDMAPを使用した化合物76の標準的なコハク化と、それに続くDMF中でのHBTU及びDIPEAを使用したCPGローディングにより、化合物78が得られる。

【0493】

3'-(R)-メチル-U-UNA構成要素の合成

【化62】

スキーム10



試薬及び条件：(i) BzOH、DIAD、PPh₃、THF、室温、5時間；NaOH水溶液、室温、12時間、77%；(ii) Bz₂O、DMAP、ピリジン、室温、5時間、84%；(iii) 2-シアノエチルN,N-ジイソプロピルクロロホスホラミダイト、DIPEA、DCM、室温、1～2時間、81%；(iv) (a) 無水コハク酸／D

MAP/CH₂Cl₂ (b) アミノアルキルCPG/HBTU/DIEA/DMF。

【0494】

化合物79の合成：乾燥THF (50 mL) 中の化合物76 (3.37 g、5.06 mmol) の溶液に、PPh₃ (2.70 g、15.2 mmol)、BzOH (1.85 g、15.2 mmol) 及びDIAD (2.99 mL、15.2 mmol) を滴下した。反応混合物を室温で5時間攪拌し、反応の完了をTLCでチェックした。溶媒を真空で除去した。粗残留物をシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製して、ジベンゾイル化ヌクレオシドを得た。この化合物をTHF (50 mL) に溶解した。混合物の溶液に1 N NaOH水溶液 (10 mL) を滴下した。得られた混合物を12時間攪拌し、次に、溶媒を真空で除去した。粗残留物をシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製して、化合物79を無色の泡状物として得た (2.2 g、2ステップで77%)。¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 11.48–11.15 (m, 1H), 7.62 (d, J=8.0 Hz, 1H), 7.39–7.04 (m, 8H), 6.97–6.67 (m, 4H), 5.81 (t, J=5.9 Hz, 1H), 5.49 (dd, J=8.0, 1.5 Hz, 1H), 5.17 (t, J=5.9 Hz, 1H), 4.74 (d, J=4.8 Hz, 1H), 3.95–3.40 (m, 10H), 3.11–2.79 (m, 2H), 0.86 (d, J=6.4 Hz, 3H)。¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ 163.21, 157.94, 151.39, 144.76, 141.16, 135.55, 135.54, 129.57, 129.48, 127.71, 127.60, 126.53, 113.08, 113.06, 101.67, 85.29, 84.77, 82.99, 65.87, 62.86, 61.15, 54.97, 39.25, 39.08, 18.53。

【0495】

化合物80の合成：乾燥ピリジン (36 mL) 中の化合物79 (2 g、3.56 mmol) の溶液に、DMAP (44 mg、0.356 mmol) 及びBz₂O (845 mg、3.74 mmol) を添加した。反応混合物を室温で5時間攪拌し、次に、得られた混合物をDCMで希釈した。反応を飽和NaHCO₃水溶液でクエンチした。有機層を分離し、ブラインで洗浄し、真空で除去した。粗残留物をシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製して、化合物80を無色の泡状物として得た (2.0 g、84%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.45 (d, J=2.2 Hz, 1H), 7.99–7.41 (m, 6H), 7.41–7.03 (m, 9H), 6.95–6.58 (m, 4H), 6.20 (t, J=6.0 Hz, 1H), 5.54 (dd, J=8.0, 2.1 Hz, 1H), 4.86 (d, J=4.9 Hz, 1H), 4.70 (dd, J=11.6, 5.5 Hz, 1H), 4.51 (dd, J=11.5, 6.6 Hz, 1H), 3.71 (s, 8H), 3.17–2.80 (m, 2H), 0.84 (d, J=6.4 Hz, 3H)。¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 165.01, 163.07, 157.97, 157.94, 151.08, 144.73, 140.73, 135.51, 135.48, 133.66, 129.59, 129.50, 129.10, 128.99, 128.85, 127.74, 127.61, 126.57, 113.09, 102.18, 85.39, 83.15, 81.89, 65.73, 63.38, 62.73, 59.74, 54.98, 38.97, 18.48, 14.07。

【0496】

化合物81の合成：乾燥DCM (30 mL) 中の化合物80 (2.00 g、3.00 mmol) の溶液に、DIPEA (1.57 mL、9.00 mmol) 及び2-シアノエチルクロロ-N,N-ジイソプロピルホスホラミダイト (737 μL、3.30 mmol) を滴下した。反応混合物を室温で2時間攪拌し、次に、DCMで希釈し、飽和NaHCO₃水溶液で反応をクエンチした。有機層を分離し、ブラインで洗浄し、真空で濃縮した。粗残留物をシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製して、化合物81を無色の泡状物として得た (2.1 g、81%)。¹H NMR (500 MHz, ア

セトニトリル- d_3) δ 7.95 (ddd, $J=8.4, 2.7, 1.4$ Hz, 2H), 7.81-7.56 (m, 5H), 7.52-7.35 (m, 4H), 7.35-7.16 (m, 9H), 6.90-6.77 (m, 4H), 6.04 (dd, $J=8.7, 6.8$ Hz, 1H), 5.39 (dt, $J=11.2, 6.5$ Hz, 1H), 3.86-3.61 (m, 11H), 3.62-3.40 (m, 2H), 3.33-3.11 (m, 2H), 2.56 (q, $J=5.9$ Hz, 2H), 1.45 (dd, $J=6.4, 3.9$ Hz, 3H), 1.30-0.97 (m, 12H). ^1H NMR (500 MHz, アセトニトリル- d_3) δ 9.09 (s, 1H), 7.97 (dt, $J=8.5, 1.6$ Hz, 2H), 7.73-7.11 (m, 17H), 6.96-6.75 (m, 5H), 6.23 (td, $J=5.5, 3.3$ Hz, 1H), 5.50 (dd, $J=8.1, 6.7$ Hz, 1H), 4.67-4.38 (m, 3H), 4.28-3.99 (m, 2H), 3.86-3.40 (m, 15H), 3.25 (ddd, $J=12.7, 10.5, 2.5$ Hz, 1H), 3.18-3.02 (m, 1H), 1.29-0.92 (m, 23H). ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3CN) δ 166.53, 163.82, 159.67, 159.67, 151.98, 146.01, 141.42, 136.92, 134.55, 131.04, 131.04, 130.98, 130.48, 130.48, 129.75, 129.75, 128.86, 128.86, 127.83, 118.37, 114.07, 114.07, 103.32, 87.24, 83.13, 82.91, 70.44, 70.28, 64.81, 64.00, 61.03, 59.35, 55.95, 55.95, 46.01, 44.07, 24.94, 23.15, 21.01, 20.94, 17.81, 14.58, 2.01, 1.81, 1.60, 1.39, 1.19, 0.98, 0.77. ^{31}P NMR (202 MHz, アセトニトリル- d_3) δ 149.12, 148.42.

【0497】

化合物82の合成: CH_2Cl_2 中での無水コハク酸及びDMA Pを使用した化合物80の標準的なコハク化と、それに続くDMF中でのHBTU及びDIPEAを使用したCPGローディングにより、化合物82が得られる。

【0498】

3'-メチル-UUNAモッシャーエステルの合成

10

20

30

40

50

スキーム11

化合物 84 の合成：乾燥 MeCN (3 mL) 中の化合物 76 (150 mg、0.225 mmol)、DMAP (3 mg、0.023 mmol)、Et₃N (157 μL、1.1

3 mmol) の溶液に、(R) - (-) - MTPACL (50.5 μ L、0.27 mmol) を滴下した。反応混合物を室温で3時間攪拌し、次に、AcOEtで希釈した。反応を飽和NaHCO₃水溶液でクエンチした。有機層を分離し、ブラインで洗浄し、真空で除去した。粗残留物をシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製して、化合物84を無色の泡状物として得た(139 mg、70%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.49 (s, 1H), 7.94–6.98 (m, 20H), 6.96–6.61 (m, 4H), 6.16 (t, J=5.8 Hz, 1H), 5.55 (d, J=8.0 Hz, 1H), 5.38 (qd, J=6.4, 2.1 Hz, 1H), 4.40 (ddd, J=40.1, 11.5, 5.7 Hz, 2H), 3.87 (ddd, J=6.8, 3.8, 1.9 Hz, 1H), 3.38 (s, 3H), 3.19–2.85 (m, 2H), 1.03 (d, J=6.6 Hz, 3H)。¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ 164.91, 164.83, 162.98, 158.04, 158.02, 151.07, 144.39, 140.53, 135.23, 135.13, 133.60, 131.46, 129.72, 129.47, 129.41, 129.06, 128.79, 128.75, 128.45, 127.76, 127.51, 126.79, 126.67, 113.13, 113.11, 102.35, 85.96, 81.12, 79.65, 72.78, 63.15, 61.95, 55.27, 54.96, 14.37.

[0501]

化合物85の合成：乾燥MeCN (3 mL) 中の化合物79 (100 mg、0.150 mmol)、DMAP (2 mg、0.02 mmol)、Et₃N (104 μ L、0.750 mmol) の溶液に、(S) - (+) - MTPACL (33.6 μ L、0.180 mmol) を滴下した。反応混合物を室温で5時間攪拌し、次に、AcOEtで希釈した。反応を飽和NaHCO₃水溶液でクエンチした。有機層を分離し、ブラインで洗浄し、真空で除去した。粗残留物をシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製して、化合物85を無色の泡状物として得た(101 mg、76%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.46 (d, J=2.2 Hz, 1H), 8.03–7.74 (m, 2H), 7.80–7.02 (m, 18H), 6.82 (dd, J=8.9, 2.7 Hz, 4H), 6.16 (t, J=5.9 Hz, 1H), 5.47 (ddd, J=54.4, 7.4, 3.0 Hz, 2H), 4.53 (ddd, J=48.6, 11.6, 5.9 Hz, 2H), 4.09–3.95 (m, 2H), 3.71 (d, J=1.7 Hz, 6H), 3.22 (s, 3H), 3.02 (ddd, J=35.9, 10.3, 5.6 Hz, 2H), 1.15–1.06 (m, 3H)。¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ 165.10, 164.92, 162.88, 158.07, 150.86, 144.32, 140.26, 135.11, 135.04, 133.66, 131.08, 129.85, 129.44, 129.39, 129.08, 128.84, 128.80, 128.54, 127.78, 127.46, 127.02, 126.71, 113.14, 113.11, 102.37, 85.81, 82.15, 79.51, 72.05, 63.29, 62.03, 59.72, 55.05, 54.97, 39.24, 20.71, 14.54, 14.04.

[0502]

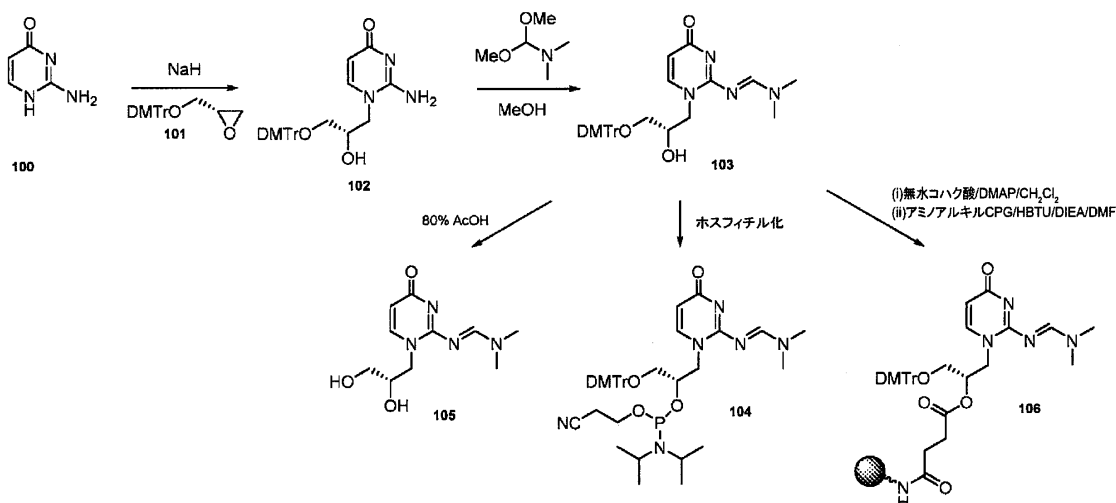
化合物86の合成：乾燥MeCN (3 mL) 中の化合物79 (100 mg、0.150 mmol)、DMAP (2 mg、0.02 mmol)、Et₃N (104 μ L、0.750 mmol) の溶液に、(R) - (-) - MTPACL (33.6 μ L、0.180 mmol) を滴下した。反応混合物を室温で3時間攪拌し、次に、AcOEtで希釈した。反応を飽和NaHCO₃水溶液でクエンチした。有機層を分離し、ブラインで洗浄し、真空で除去した。粗残留物をシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製して、化合物86を無色の泡状物として得た(89 mg、67%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.45 (s, 1H), 7.96–7.80 (m, 2H), 7.72–6.96 (m, 18H), 6.92–6.69 (m, 4H), 6.11

(t, $J=5.9$ Hz, 1H), 5.67–5.21 (m, 2H), 4.55–4.31 (m, 2H), 3.97–3.85 (m, 1H), 3.71 (d, $J=1.4$ Hz, 6H), 3.29 (s, 3H), 2.92 (ddd, $J=50.1, 10.2, 5.5$ Hz, 2H), 1.24 (d, $J=6.5$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 165.05, 164.89, 162.85, 158.04, 150.83, 144.35, 140.12, 135.10, 135.06, 133.69, 131.14, 129.84, 129.45, 129.36, 129.09, 128.87, 128.82, 128.52, 127.74, 127.43, 126.94, 126.80, 126.67, 124.14, 121.85, 113.09, 113.06, 102.37, 85.70, 81.90, 79.45, 72.34, 63.17, 62.10, 59.72, 55.11, 54.97, 39.24, 20.72, 14.88, 14.04. [0503]

isoC-GNA構成要素の合成

【化64】

スキーム12



化合物102の合成：無水DMF (34 mL) 中の化合物100 (1.90 g、5.85 mmol) の溶液に、NaH (鉱油中60%；137 mg、3.42 mmol、0.2 eq) を添加した。反応混合物を室温で1時間攪拌し、次に化合物101 (5.85 g、15.5 mmol) の溶液を添加した。混合物を110℃で18時間加熱した。溶媒を減圧下で除去した後、残留物をEtOAc及びH₂Oで抽出した。有機層を分離し、無水Na₂SO₄で乾燥させ、濾過し、濃縮した。粗物質をシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィー (CH₂Cl₂中0～10% MeOH) で精製して、化合物102を微黄色の泡状物として得た (3.27 g、6.71 mmol、43%、 $R_f=0.44$ ；CH₂Cl₂中8% MeOHで展開)。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.44 (d, $J=7.3$ Hz, 2H), 7.36–7.11 (m, 8H), 6.97–6.83 (m, 4H), 6.73 (s, 2H), 5.47 (dt, $J=14.4, 7.3$ Hz, 2H), 3.93 (brs, 1H), 3.85 (d, $J=3.3$ Hz, 1H), 3.74 (s, 6H), 3.70–3.58 (m, 1H), 2.96 (ddd, $J=28.5, 9.4, 5.0$ Hz, 2H).

【0504】

化合物103の合成：MeOH (40 mL) 中の化合物102 (3.25 g、6.67 mmol) の溶液に、N,N-ジメチルホルムアミドジメチルアセタール (1.77 mL、13.3 mmol) を添加した。反応混合物を室温で一晩攪拌した。減圧下で溶媒を除去した後、残留物をシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィー (CH₂Cl₂

中0～8% MeOH)で精製して、化合物103を微黄色の泡状物として得た(3.47 g、6.39 mmol、96%、 $R_f=0.41$; CH₂Cl₂中8% MeOHで展開)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.59 (s, 1H), 7.40 (d, J=7.3 Hz, 2H), 7.37–7.19 (m, 8H), 6.94–6.82 (m, 4H), 5.59 (d, J=7.5 Hz, 1H), 5.17 (d, J=5.9 Hz, 1H), 4.43 (dd, J=13.4, 3.5 Hz, 1H), 3.97 (s, 1H), 3.74 (s, 6H), 3.51 (dd, J=13.4, 8.6 Hz, 1H), 3.17 (s, 3H), 3.00–2.96 (m, 4H), 2.92–2.82 (m, 1H)。

【0505】

化合物104の合成: CH₂Cl₂ (20 mL) 及びN, N-ジイソプロピルエチルアミン (1.29 mL、7.38 mmol) 中の化合物103 (2.00 g、3.69 mmol) の溶液に、2-シアノエチルN, N-ジイソプロピルクロロホスホラミダイト (1.32 mL、5.90 mmol) を添加した。反応混合物をアルゴン雰囲気下、室温で一晩攪拌した。反応混合物をCH₂Cl₂ (200 mL) で希釈し、次に、飽和NaHCO₃水溶液 (100 mL) で洗浄した。有機層を分離し、無水Na₂SO₄で乾燥させ、濾過し、濃縮した。粗物質をシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィー (ヘキサン中33～100% EtOAc、次にCH₂Cl₂:アセトン:Et₃N=50:50:1) で精製して、化合物104 (880 mg、1.18 mmol、32%、 $R_f=0.41$ 、CH₂Cl₂中8% MeOHで展開) を微黄色の泡状物として得た。³¹P NMR (202 MHz, CD₃CN): δ 150.28, 149.99。

【0506】

化合物105の合成: 化合物103 (250 mg、0.461 mmol) を80% AcOH (10 mL) で一晩処理した。溶媒を除去した後、粗生成物をシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィー (CH₂Cl₂中0～20% MeOH) で精製して、化合物105を得た (83 mg、0.345 mmol、75%、 $R_f=0.26$; CH₂Cl₂中15% MeOHで展開)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.58 (s, 1H), 7.41 (d, J=7.5 Hz, 1H), 5.64 (d, J=7.4 Hz, 1H), 4.96 (d, J=5.7 Hz, 1H), 4.72 (t, J=5.6 Hz, 1H), 4.31 (dd, J=13.4, 3.4 Hz, 1H), 3.74 (ddd, J=9.0, 5.8, 3.4 Hz, 1H), 3.49 (dd, J=13.4, 8.4 Hz, 1H), 3.42–3.24 (m, 1H), 3.17 (s, 3H), 3.03 (s, 3H)。

【0507】

化合物106の合成: CH₂Cl₂中での無水コハク酸及びDMAPを使用した化合物103の標準的なコハク化と、それに続くDMF中でのHBTU及びDIPEAを使用したCPGローディングにより、化合物106が得られる。

【0508】

isoG-GNA構成要素の合成

10

20

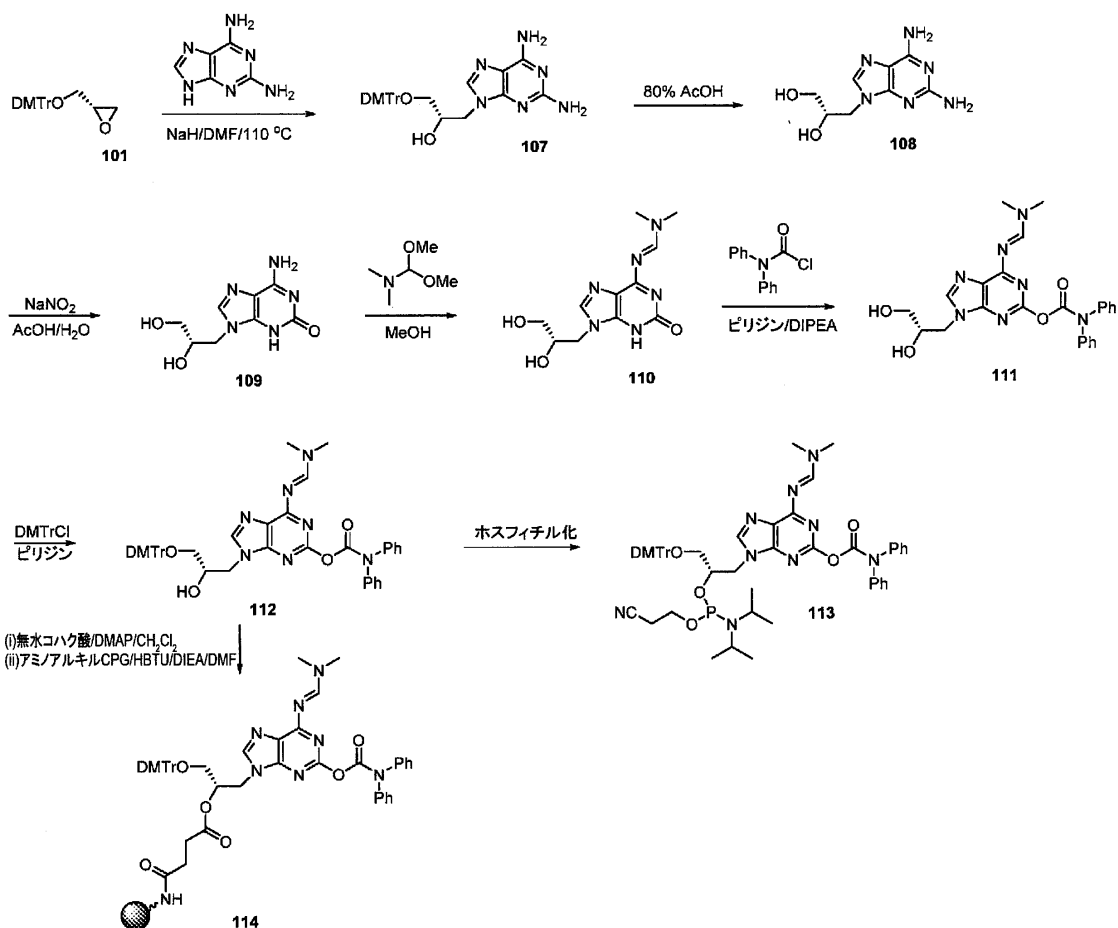
30

40

50

【化 6 5】

スキーム13



化合物 107 の合成：無水 DMF (125 mL) 中の 2,6-ジアミノプリン (9.3 g、62.5 mmol) の懸濁液に、NaH (鉱油中 60% ; 500 mg、12.5 mmol、0.2 eq.) を添加した。反応混合物を室温で 1 時間攪拌し、次に DMF (100 mL) 中の化合物 101 (22.4 g、59.5 mmol) の溶液を添加した。混合物を 110 °C で 2 時間加熱した。減圧下で溶媒を除去した後、粗物質をシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィー (CH₂Cl₂ 中 0~10% MeOH) で精製して、化合物 107 を微黄色の泡状物として得た (19.3 g、36.6 mmol、61%、 $R_f = 0.33$; CH₂Cl₂ 中 8% MeOH で展開)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.57 (s, 1H), 7.46–7.36 (m, 2H), 7.36–7.12 (m, 8H), 6.87 (dd, $J = 8.9, 3.3$ Hz, 4H), 6.61 (s, 2H), 5.71 (s, 2H), 5.43 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H), 4.16–3.88 (m, 3H), 3.74 (s, 6H), 2.96–2.86 (m, 2H)。
【0509】

化合物 108 の合成：化合物 107 (19.0 g、36.1 mmol) を 80% AcOH (500 mL) で一晩処理した。溶媒を除去した後、残留物をトルエン (200 mL) 及び CH₂Cl₂ (100 mL) に溶解した。白色の沈殿物が形成され、濾過された。固体を CH₂Cl₂ で洗浄して、化合物 108 をオフホワイトの粉末として得た (8.68 g、30.5 mmol、酢酸塩として 84%、 $R_f = 0.18$; CH₂Cl₂ 中 20% MeOH で展開)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.61 (s, 1H), 6.65 (s, 2H), 5.79 (s, 2H), 4.09 (dd, $J = 13.8, 3.6$ Hz, 1H), 3.94–3.66 (m, 2H), 3.51–3.06 (m, 2H), 1

. 91 (s, 3H).

【0510】

化合物109の合成：H₂O (250 mL) 中の化合物108 (7.88 g、27.7 mmol) の懸濁液に、50℃でH₂O (47 mL) 中のNaNO₂ (7.41 g、107.4 mmol) の溶液を添加した。次に、AcOH (11.1 mL、193.9 mmol) を滴下した。混合物を50℃で10分間加熱し、次に室温に冷却し、H₂O (250 mL) で希釈した。濃NH₄OHを溶液に添加して、pH8に調整した。溶液を蒸発させ、残留物をH₂O (250 mL) に再懸濁した。得られた沈殿物を濾過し、ケースを真空中で乾燥させた。材料をフラスコに移し、次にトルエンと共蒸発させ、次に真空中で一晩乾燥させて、化合物109を淡紫色の固体として得た (7.61 g、96%)。¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 7.62 (s, 1H), 4.02 (dd, J = 13.9, 3.6 Hz, 1H), 3.81 (dd, J = 14.0, 7.1 Hz, 1H), 3.77-3.68 (m, 1H), 3.34 (dd, J = 11.2, 5.1 Hz, 1H), 3.21 (dd, J = 11.2, 6.4 Hz, 1H), 1.83 (s, 3H).

【0511】

化合物110の合成：MeOH (54 mL) 中の化合物109 (3.03 g、13.5 mmol) の懸濁液に、N,N-ジメチルホルムアミドジメチルアセタール (3.57 mL、26.9 mmol) を添加した。反応混合物を室温で15時間攪拌した。追加のN,N-ジメチルホルムアミドジメチルアセタール (1.8 mL) 及びMeOH (20 mL) を添加し、55℃で3時間加熱した。混合物を蒸発させ、残留物を真空中で乾燥させて、化合物110を灰色の粉末として得た (3.68 g、13.1 mmol、97%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10.97 (s, 1H), 9.20 (s, 1H), 7.77 (s, 1H), 5.14 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 4.95 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 4.16-3.94 (m, 1H), 3.92-3.66 (m, 2H), 3.39-3.20 (m, 2H), 3.20 (s, 3H), 3.10 (s, 3H).

【0512】

化合物111の合成：無水ピリジン (180 mL) 及びN,N-ジイソプロピルエチルアミン (2.97 mL、17.0 mmol) 中の化合物110 (3.66 g、13.1 mmol) の懸濁液に、ジフェニルカルバモイルクロリド (3.04 g、13.1 mmol) を添加した。反応混合物を室温で2時間攪拌し、次に、飽和NaHCO₃水溶液 (50 mL) でクエンチした。混合物をCH₂Cl₂ (300 mL) で抽出し、有機層を分離し、無水Na₂SO₄で乾燥させ、濾過し、濃縮した。粗物質をシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィー (CH₂Cl₂ 中0~8% MeOH) で精製して、111 (2.82 g、5.93 mmol、45%、R_f = 0.24、CH₂Cl₂ 中8% MeOHで展開) を褐色の泡状物として得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.93 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.44-7.28 (m, 10H), 5.09 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 4.82 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.28 (dd, J = 13.9, 3.5 Hz, 1H), 3.99 (dd, J = 13.9, 8.5 Hz, 1H), 3.84-3.80 (m, 1H), 3.44-3.33 (m, 2H), 3.21 (s, 3H), 3.13 (s, 3H).

【0513】

化合物112の合成：ピリジン (4 mL) 中の化合物111 (385 mg、0.810 mmol) の溶液に、DMTrCl (274 mg、0.810 mmol) を添加し、混合物を一晩攪拌した。溶媒を除去した後、残留物をシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィー (CH₂Cl₂ 中0~8% MeOH) で精製して、化合物112を淡黄色の泡状物として得た (392 mg、0.504 mmol、62%、R_f = 0.34、CH₂Cl₂ 中5% MeOH中で展開)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.91 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.47-7.11 (m, 21H), 6.83 (dd, J = 9.0, 3.2 Hz, 4H), 5.33 (d, J = 5.4 Hz, 1H)

, 4.32 (dd, $J=13.6$, 3.6 Hz, 1H), 4.17–3.95 (m, 2H), 3.70 (s, 6H), 3.22 (s, 3H), 3.13 (s, 3H), 3.00 (dd, $J=9.3$, 5.0 Hz, 1H), 2.86 (dd, $J=9.4$, 6.0 Hz, 1H).

【0514】

化合物113の合成：CH₂Cl₂中の2-シアノエチルN,N-ジイソプロピルクロロホスホラミダイト及びDIPEAを使用した化合物112の標準的なホスフィチル化により、化合物113が80%の収率で得られる。³¹P NMR (202 MHz, CD₃CN) δ 150.65, 149.98.

【0515】

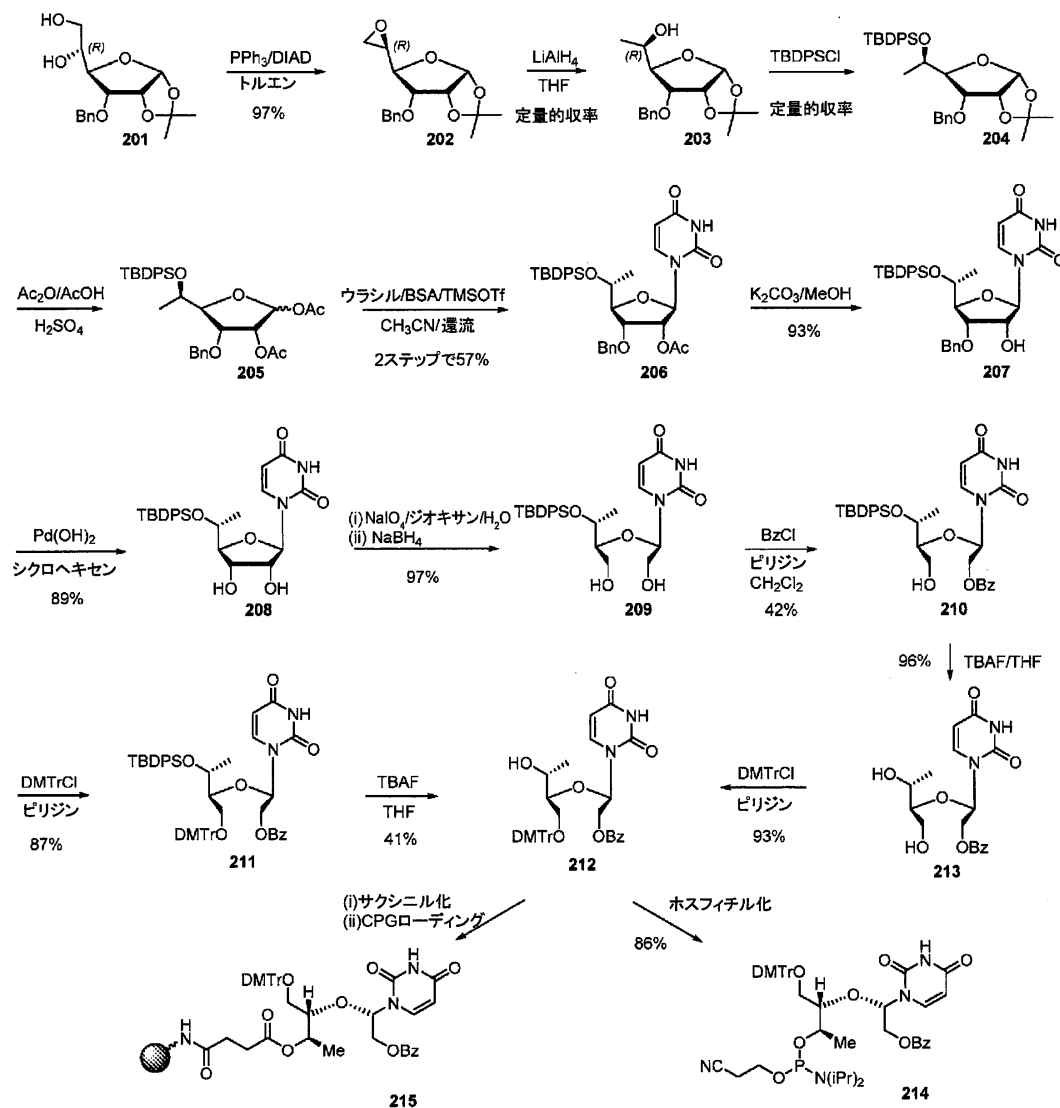
化合物114の合成：CH₂Cl₂中での無水コハク酸及びDMAPを使用した化合物112の標準的なコハク化と、それに続くDMF中でのHBTU及びDIPEAを使用したCPGローディングにより、化合物114が得られる。114のローディング：79 μ mol/g.

【0516】

3'-C-(R)-メチル-4'-(S)-U-UNA構成要素の合成

【化66】

スキーム14



化合物202の合成：無水トルエン（45 mL）中の化合物201（2.00 g、6.

44 mmol) の懸濁液に、 PPh_3 (2.03 g、7.73 mmol) 及び DIAD (1.50 mL、7.73 mmol) を添加した。反応混合物を 110°C で 22 時間撹拌した。溶媒を減圧下で除去した後、残留物を EtOAc 及び飽和 NaHCO_3 水溶液で抽出した。有機層を分離し、無水 Na_2SO_4 で乾燥させ、濾過し、濃縮した。粗物質を精製したシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィー (ヘキサン中 0~33% EtOAc) で化合物 202 (1.83 g、6.26 mmol、97%、 $R_f=0.33$; ヘキサン中 20% EtOAc で展開) を得た。 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 7.44–7.24 (m, 5H), 5.75 (d, $J=3.7$ Hz, 1H), 4.76 (t, $J=4.1$ Hz, 1H), 4.63 (d, $J=11.7$ Hz, 1H), 4.50 (d, $J=11.6$ Hz, 1H), 3.97 (dd, $J=8.9, 3.4$ Hz, 1H), 3.67 (dd, $J=8.9, 4.4$ Hz, 1H), 3.18–3.12 (m, 1H), 2.74 (dd, $J=5.3, 4.3$ Hz, 1H), 2.61 (dd, $J=5.3, 2.7$ Hz, 1H), 1.45 (s, 3H), 1.29 (s, 3H) ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 137.67, 128.26, 127.75, 127.67, 111.90, 103.66, 77.63, 77.08, 76.79, 70.83, 50.23, 43.47, 26.64, 26.52.

【0517】

化合物 203 の合成: THF (40 mL) 中の化合物 202 (1.82 g、6.23 mmol) の溶液に、 THF 中の 2M LiAlH_4 (2.50 mL、4.98 mmol) を 10°C で添加した。反応混合物を -10°C で 30 分間、次に、室温で 2 時間、撹拌した。減圧下で溶媒を除去した後、残留物をシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィー (ヘキサン中 0~50% EtOAc) で精製して、化合物 203 を得た (1.83 g、6.22 mmol、定量的収率、 $R_f=0.42$; ヘキサン中 50% EtOAc で展開)。 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 7.43–7.23 (m, 5H), 5.71 (d, $J=3.8$ Hz, 1H), 4.72 (t, $J=3.8$ Hz, 1H), 4.68–4.60 (m, 2H), 4.50 (d, $J=11.7$ Hz, 1H), 3.88–3.74 (m, 3H), 1.45 (s, 3H), 1.30 (s, 3H), 1.03 (d, $J=6.5$ Hz, 3H) ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 138.10, 128.18, 127.56, 127.49, 111.60, 103.76, 81.96, 77.26, 77.24, 70.82, 65.15, 26.76, 26.71, 18.26.

【0518】

化合物 204 の合成: DMF (20 mL) 中の化合物 203 (2.07 g、7.03 mmol) の溶液に、 TBDPSCl (2.73 mL、10.5 mmol) 及びイミダゾール (1.44 g、21.1 mmol) を添加し、混合物を室温で一晩撹拌した。溶媒を減圧下で除去した後、残留物を CH_2Cl_2 及び飽和 NaHCO_3 水溶液で抽出した。有機層を分離し、無水 Na_2SO_4 で乾燥させ、濾過し、濃縮した。粗物質をシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィー (ヘキサン中 0~10% の EtOAc) で精製して、化合物 204 (4.85 g、定量的収率、 $R_f=0.41$; ヘキサン中 10% EtOAc で展開) を得た。 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 7.70–7.55 (m, 7H), 7.51–7.22 (m, 15H), 5.63 (d, $J=3.7$ Hz, 1H), 4.79 (t, $J=4.1$ Hz, 1H), 4.67 (d, $J=12.1$ Hz, 1H), 4.46 (d, $J=12.1$ Hz, 1H), 4.10–3.92 (m, 3H), 3.88 (dd, $J=8.8, 1.6$ Hz, 1H), 1.42 (s, 3H), 1.30 (s, 3H), 0.953–0.947 (m, 12H).

【0519】

化合物 206 の合成: AcOH (15 mL) 及び Ac_2O (3 mL) 中の化合物 204 (3.00 g、5.63 mmol) の溶液に、 H_2SO_4 (10 滴) を 0°C で添加した。反応混合物を室温で 14 時間撹拌した。溶媒を減圧下で除去し、残留物を EtOAc 及び H_2O で抽出した。有機層を分離し、無水 Na_2SO_4 で乾燥させ、濾過し、濃縮した。粗

物質を CH_3CN と共蒸発させ、次のステップを使用した。 CH_3CN (35 mL) 中の粗物質の溶液に、ウラシル (1.88 g、16.8 mmol) 及び N 、 O ービス(トリメチルシリル) アセトアミド (6.85 mL、28.0 mmol) を添加した。混合物を 40°C で15分間攪拌し、 TMSOTf (1.52 mL、8.40 mmol) を 0°C で添加した。混合物を 80°C で2時間攪拌した。標準的な後処理及びシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィー (ヘキサン中0~50% EtOAc) による精製により、化合物206 (2.01 g、3.20 mmol、57%、 $R_f=0.32$; ヘキサン中50% EtOAc で展開) が得られた。 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 11.43 (s, 1H), 7.66–7.59 (m, 4H), 7.55 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 7.51–7.22 (m, 12H), 5.84 (d, $J=4.9$ Hz, 1H), 5.51 (dd, $J=8.1, 1.4$ Hz, 1H), 5.41 (t, $J=5.4$ Hz, 1H), 4.58–4.43 (m, 2H), 4.40 (t, $J=5.9$ Hz, 1H), 4.14 (dd, $J=6.4, 3.5$ Hz, 1H), 3.87 (dd, $J=5.8, 3.5$ Hz, 1H), 2.06 (s, 3H), 1.07–0.95 (m, 9H), 0.90 (d, $J=6.4$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 169.69, 162.90, 150.26, 141.73, 137.60, 135.40, 135.26, 133.52, 133.27, 129.88, 129.87, 128.27, 127.76, 127.72, 127.70, 102.08, 87.52, 84.90, 74.88, 72.51, 71.92, 68.44, 26.82, 20.53, 18.79, 18.60.

【0520】

化合物207の合成: MeOH (30 mL) 中の化合物206 (1.94 g、3.09 mmol) の溶液に、 0°C で K_2CO_3 (854 mg、6.18 mmol) を添加した。反応混合物を、 MeOH (0.2 mL) を添加して 0°C で3時間攪拌した。 EtOAc (100 mL) 及び H_2O (20 mL) を添加し、次に抽出した。有機層を分離し、無水 Na_2SO_4 で乾燥させ、濾過し、濃縮した。粗物質をシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィー (ヘキサン中0~75% EtOAc) で精製して、化合物207 (1.68 g、2.86 mmol、93%、 $R_f=0.28$; ヘキサン中67% EtOAc で展開) を得た。 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 11.40 (d, $J=2.2$ Hz, 1H), 7.67–7.57 (m, 4H), 7.53–7.24 (m, 12H), 5.77 (d, $J=6.6$ Hz, 1H), 5.59 (d, $J=6.3$ Hz, 1H), 5.48 (dd, $J=8.0, 2.1$ Hz, 1H), 4.73 (d, $J=12.0$ Hz, 1H), 4.53 (d, $J=12.0$ Hz, 1H), 4.22 (q, $J=6.2$ Hz, 1H), 4.13–3.98 (m, 2H), 3.84 (t, $J=4.2$ Hz, 1H), 0.99 (s, 9H), 0.91 (d, $J=6.3$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 162.85, 150.73, 140.84, 138.27, 135.40, 135.22, 133.53, 133.38, 129.88, 128.15, 127.79, 127.74, 127.46, 127.41, 102.01, 87.51, 85.56, 76.32, 71.50, 71.29, 69.02, 26.82, 19.12, 18.82.

【0521】

化合物208の合成: EtOH (150 mL) 中の化合物207 (3.70 g、6.31 mmol) の溶液に、シクロヘキセン (32.1 mL、0.317 mol、50 eq) 及び炭素上の水酸化パラジウム (20重量%ローディング; 2.23 g) を添加した。混合物を 80°C で3時間加熱した。反応混合物をセライトで濾過し、次に、濃縮した。粗物質をシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィー (CH_2Cl_2 中0~5% MeOH) で精製して、化合物208 (2.80 g、5.64 mmol、89%、 $R_f=0.16$; CH_2Cl_2 中5% MeOH で展開) を得た。 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 11.37 (d, $J=2.2$ Hz, 1H), 7.65–7.62 (m, 4H), 7.56–7.26 (m, 7H), 5.72 (d, $J=6.4$ Hz, 1H), 5

. 54–5.30 (m, 2H), 5.11 (d, $J=5.4$ Hz, 1H), 4.23–4.04 (m, 2H), 3.97 (q, $J=6.1$ Hz, 1H), 3.67 (t, $J=4.2$ Hz, 1H), 1.02 (s, 9H), 0.96 (d, $J=6.4$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 162.85, 150.72, 140.85, 135.41, 135.24, 133.71, 133.50, 129.85, 129.83, 127.77, 127.73, 101.97, 87.42, 87.15, 71.88, 69.15, 68.91, 26.84, 19.20, 18.88.

【0522】

化合物209の合成：ジオキサン（70 mL）中の化合物208（2.80 g、5.64 mmol）の溶液に、 NaIO_4 （1.33 g、6.20 mmol） H_2O （12 mL）の溶液を添加した。反応混合物を周囲温度で2時間激しく攪拌した。反応混合物を焼結漏斗で濾過し、濾過ケーキを追加のジオキサンで洗浄した。濾液に NaBH_4 （320 mg、8.46 mmol）を添加した。周囲温度で2時間攪拌した後、溶媒を減圧下で除去した。粗物質をフラッシュカラムクロマトグラフィー（DCM中0～5% MeOH）で精製して、化合物209を白色泡状物として得た（2.73 g、5.47 mmol、97%； $R_f=0.20$ 、DCM中5% MeOHで展開）。 ^1H NMR（400 MHz, DMSO- d_6): δ 11.23 (d, $J=2.1$ Hz, 1H), 7.63–7.53 (m, 4H), 7.51–7.35 (m, 8H), 5.86 (dd, $J=6.7, 5.0$ Hz, 1H), 5.45 (dd, $J=8.0, 2.1$ Hz, 1H), 5.10 (t, $J=5.9$ Hz, 1H), 4.77 (t, $J=5.3$ Hz, 1H), 3.81 (dd, $J=6.4, 3.5$ Hz, 1H), 3.71–3.59 (m, 1H), 3.58–3.44 (m, 4H), 0.95 (s, 9H), 0.87 (d, $J=6.3$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 163.15, 151.33, 140.93, 135.38, 135.31, 133.73, 133.00, 129.81, 129.71, 127.72, 127.61, 101.56, 83.67, 83.58, 68.94, 61.31, 60.21, 26.75, 18.74, 18.54.

【0523】

化合物210の合成： -78°C に冷却した、無水DCM（40 mL）及びピリジン（1.17 mL、14.4 mmol）中の化合物209（720 mg、1.44 mmol）の溶液に、塩化ベンゾイル（0.184 mL、1.58 mmol）をゆっくりと添加した。 -78°C で2時間攪拌した後、反応混合物を 0°C とし、EtOH（1 mL）でクエンチした。混合物をDCM（40 mL）で希釈し、次に飽和 NaHCO_3 水溶液（20 mL）で洗浄した。有機層をブラインで洗浄し、分離し、無水 Na_2SO_4 で乾燥させ、濾過し、濃縮した。粗残留物をフラッシュカラムクロマトグラフィー（ヘキサン中0～80% EtOAc）で精製して、化合物210を白色の泡状物として得た（361 mg、0.599 mmol、42%； $R_f=0.64$ 、ヘキサン中80% EtOAcで発展）。 ^1H NMR（400 MHz, DMSO- d_6): δ 11.34 (s, 1H), 8.02–7.82 (m, 2H), 7.71–7.63 (m, 1H), 7.61–7.50 (m, 7H), 7.49–7.36 (m, 6H), 6.27 (dd, $J=6.6, 5.1$ Hz, 1H), 5.45 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 4.89 (t, $J=5.0$ Hz, 1H), 4.58 (dd, $J=11.5, 5.1$ Hz, 1H), 4.43 (dd, $J=11.5, 6.6$ Hz, 1H), 3.85 (dd, $J=6.4, 2.8$ Hz, 1H), 3.61–3.55 (m, 3H), 0.95 (s, 9H), 0.93 (d, $J=6.4$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 164.98, 162.97, 150.99, 140.24, 135.38, 135.31, 133.69, 133.62, 132.95, 129.85, 129.75, 129.11, 129.03, 128.82, 127.74, 127.63, 102.03, 83.76, 80.95, 69.13, 63.51, 60.35, 26.75, 18.75, 18.45.

【0524】

化合物211の合成：無水ピリジン（5 mL）中の化合物210（585 mg、0.9

71 mmol) の溶液に、DMTrCl (495 mg、1.46 mmol) を添加した。反応混合物を室温で16時間攪拌した。溶媒を除去した後、残留物をCH₂Cl₂ (100 mL) 及び飽和NaHCO₃水溶液 (50 mL) で抽出した。有機層を分離し、無水Na₂SO₄で乾燥させ、濾過し、濃縮した。粗物質をシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィー (ヘキサン中0~33% EtOAc) で精製して、化合物211 (764 mg、0.844 mmol、87%、R_f=0.22、ヘキサン中33% EtOAcで展開) を白色の泡状物として得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) : δ 11.42 (s, 1H), 7.86–7.73 (m, 2H), 7.73–7.59 (m, 1H), 7.52–7.40 (m, 9H), 7.34 (tt, J=7.3, 4.0 Hz, 6H), 7.29–7.14 (m, 7H), 6.80 (dd, J=8.9, 3.1 Hz, 4H), 6.44 (t, J=5.9 Hz, 1H), 5.47 (d, J=8.0 Hz, 1H), 4.47 (dd, J=11.5, 5.5 Hz, 1H), 4.37 (dd, J=11.5, 6.4 Hz, 1H), 3.81 (dt, J=7.9, 4.2 Hz, 1H), 3.69 (d, J=5.9 Hz, 7H), 3.26 (dd, J=10.2, 4.5 Hz, 1H), 3.13 (dd, J=10.2, 7.1 Hz, 1H), 0.83 (s, 9H), 0.78 (d, J=6.3 Hz, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆) : δ 164.79, 162.97, 158.05, 158.01, 151.12, 144.60, 140.14, 135.51, 135.35, 135.30, 133.61, 133.43, 132.73, 129.84, 129.77, 129.58, 129.49, 129.08, 128.90, 128.74, 127.80, 127.68, 127.60, 127.54, 126.64, 113.11, 102.22, 86.15, 81.65, 81.21, 69.53, 63.42, 63.36, 54.97, 54.95, 26.63, 18.74, 18.63.

【0525】

化合物212の合成：THF (8 mL) 中の化合物211 (740 mg、0.818 mmol) を、THF (1.06 mmol、1.06 mL) 中の1M n-TBAFで一晩処理した。溶媒を除去した後、残留物をシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィー (ヘキサン中0~66% EtOAc) で精製して、化合物212を白色の固体として得た (226 mg、0.339 mmol、41%、R_f=0.25、ヘキサン中66% EtOAcで展開)。この化合物は、標準的なジメトキシトリチル化により、93%の収率で化合物213からも合成された。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) : δ 11.38 (s, 1H), 7.88–7.76 (m, 3H), 7.72–7.61 (m, 1H), 7.49 (t, J=7.8 Hz, 2H), 7.44–7.37 (m, 2H), 7.32–7.24 (m, 6H), 7.24–7.16 (m, 1H), 6.84 (dd, J=8.7, 5.8 Hz, 4H), 6.45 (dd, J=7.1, 5.1 Hz, 1H), 5.67 (d, J=8.0 Hz, 1H), 4.64 (d, J=5.2 Hz, 1H), 4.55 (dd, J=11.6, 5.1 Hz, 1H), 4.48 (dd, J=11.5, 7.1 Hz, 1H), 3.69 (d, J=4.9 Hz, 6H), 3.66–3.57 (m, 1H), 3.51 (q, J=5.8 Hz, 1H), 3.27 (dd, J=10.3, 3.2 Hz, 1H), 3.08 (dd, J=10.2, 7.2 Hz, 1H), 0.89 (d, J=6.3 Hz, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆) : δ 164.85, 163.16, 158.02, 157.99, 151.32, 144.74, 141.09, 135.67, 135.54, 133.63, 129.65, 129.59, 129.11, 128.93, 128.79, 127.81, 127.68, 126.64, 113.15, 113.12, 101.91, 85.91, 82.29, 81.26, 65.61, 63.89, 63.28, 54.97, 54.95, 19.18.

【0526】

化合物213の合成：THF (5 mL) 中の化合物210 (361 mg、0.599 mmol) を、THF (0.719 mmol、0.719 mL) 中の1M n-TBAFで2時間処理した。溶媒を除去した後、残留物をシリカゲル上のフラッシュカラムクロマト

グラフィー（ヘキサン中0～100% EtOAc、次にEtOAc中5% MeOH）で精製して、化合物213を白色の固体として得た（209mg、0.574mmol、96%、 $R_f=0.29$ 、EtOAc中5% MeOHで展開）。 ^1H NMR（400MHz, DMSO- d_6 ）： δ 11.31（s, 1H）, 7.95–7.85（m, 2H）, 7.79（d, $J=8.1\text{ Hz}$, 1H）, 7.74–7.61（m, 1H）, 7.53（t, $J=7.8\text{ Hz}$, 2H）, 6.26（dd, $J=7.0, 5.1\text{ Hz}$, 1H）, 5.65（d, $J=8.0\text{ Hz}$, 1H）, 4.77（t, $J=5.4\text{ Hz}$, 1H）, 4.69–4.55（m, 2H）, 4.45（dd, $J=11.5, 7.1\text{ Hz}$, 1H）, 3.61（ddt, $J=13.8, 6.4, 4.5\text{ Hz}$, 2H）, 3.50（dt, $J=11.8, 6.1\text{ Hz}$, 1H）, 3.38–3.30（m, 2H）, 0.99（d, $J=6.3\text{ Hz}$, 3H）。 ^{13}C NMR（126MHz, DMSO- d_6 ） δ 165.00, 163.18, 151.16, 141.11, 133.61, 129.13, 128.84, 101.64, 84.00, 65.12, 63.40, 60.77, 18.80.

【0527】

化合物214の合成：DCM（15mL）及びDIPEA（0.651mL、3.74mmol）中の化合物212（1.25g、1.87mmol）の溶液に、2-シアノエチルN,N-ジイソプロピルクロロホスホラミダイト（0.544mL、2.44mmol）及び1-メチルイミダゾール（0.149mL、1.87mmol）を0℃で添加した。混合物を室温で2時間攪拌した。反応混合物を CH_2Cl_2 （100mL）で希釈し、次に、飽和 NaHCO_3 水溶液（50mL）で洗浄した。有機層を分離し、無水 Na_2SO_4 で乾燥させ、濾過し、濃縮した。粗物質をシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィー（ヘキサン中0～50% EtOAc）で精製して、化合物214（1.40g、1.61mmol、86%、 $R_f=0.20$ 、0.27、ヘキサン中50% EtOAcで展開）をジアステレオマーの混合物として得た。 ^1H NMR（500MHz, CD_3CN ）： δ 9.16（s, 1H）, 7.90–7.87（m, 2H）, 7.64–7.59（m, 2H）, 7.47–7.41（m, 4H）, 7.32–7.19（m, 7H）, 6.84–6.80（m, 4H）, 6.44（q, $J=5.7\text{ Hz}$, 1H）, 5.69（dd, $J=11.9, 8.1\text{ Hz}$, 1H）, 4.51（ddd, $J=23.0, 11.6, 5.3\text{ Hz}$, 1H）, 4.39（ddd, $J=20.8, 11.6, 6.0\text{ Hz}$, 1H）, 4.03–3.15（m, 15H）, 2.59（t, $J=6.0\text{ Hz}$, 1H）, 2.50（t, $J=6.0\text{ Hz}$, 1H）, 1.16–0.94（m, 15H）。 ^{13}C NMR（126MHz, CD_3CN ）： δ 166.34, 163.98, 163.96, 159.66, 159.63, 152.04, 151.98, 146.00, 145.97, 141.59, 141.55, 136.93, 136.82, 136.74, 134.42, 134.39, 130.99, 130.93, 130.88, 130.44, 130.41, 130.39, 129.65, 129.63, 128.96, 128.88, 127.81, 118.29, 114.09, 114.08, 103.09, 103.04, 87.70, 87.66, 83.17, 83.14, 82.89, 82.76, 82.71, 71.45, 71.30, 70.72, 70.58, 64.72, 64.69, 64.67, 64.62, 59.41, 59.34, 59.27, 59.19, 55.87, 43.89, 43.79, 43.75, 43.66, 25.05, 24.99, 24.92, 24.86, 24.81, 24.69, 24.63, 20.99, 20.93, 20.91, 20.85, 18.29, 18.26, 17.65, 17.62。 ^{31}P NMR（202MHz, CD_3CN ）： δ 149.38, 148.56.

【0528】

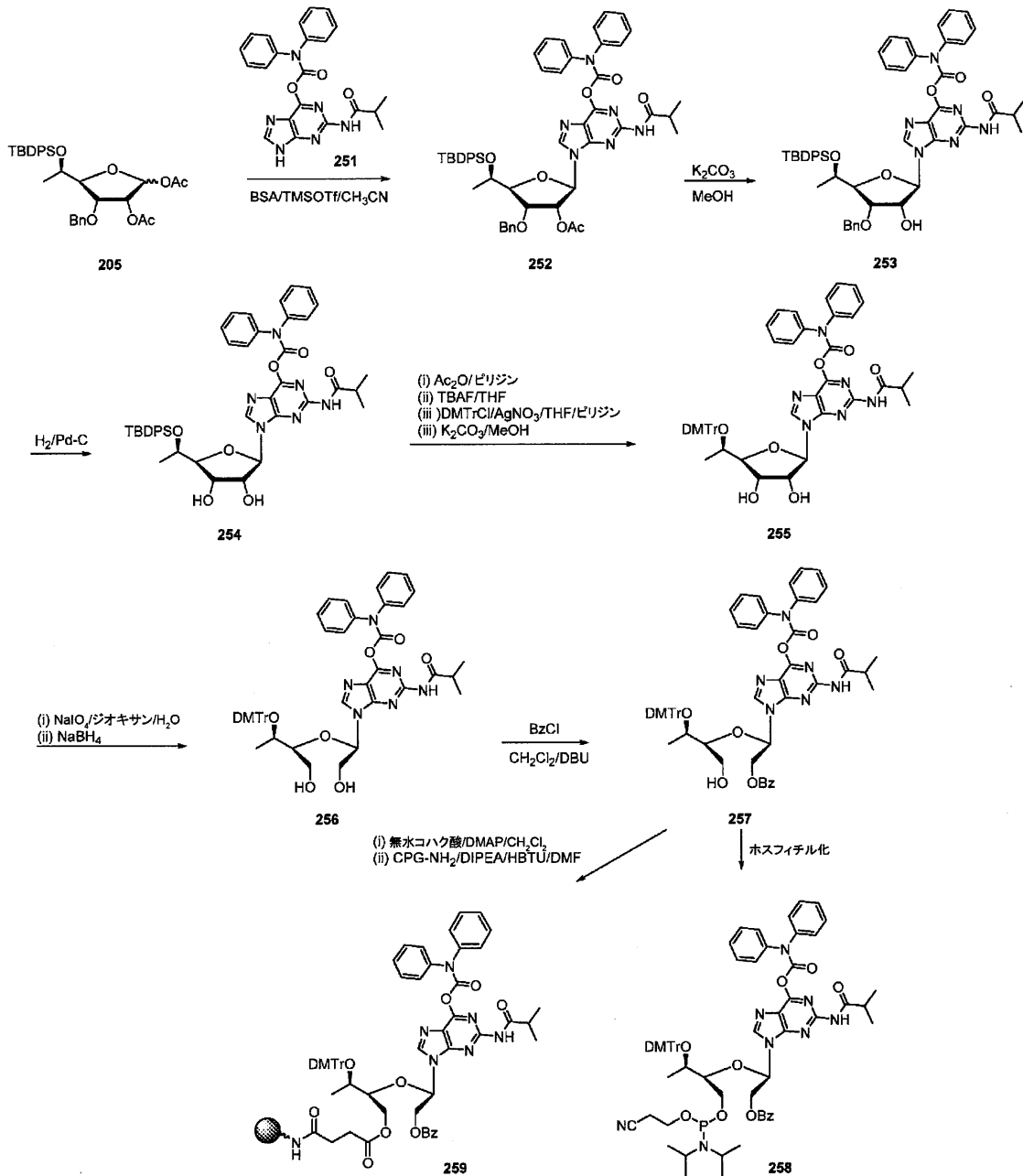
化合物215の合成： CH_2Cl_2 中での無水コハク酸及びDMAPを使用した化合物212の標準的なコハク化と、それに続くDMF中でのHBTU及びDIPEAを使用したCPGローディングにより、化合物215が得られる。

【0529】

実施例3：非環状糖構造を持つグアニン誘導体を有する構成要素の合成

5'-(R)-メチルグアニン-UNA構成要素の合成 【化67】

スキーム15



保護されたグアニン類似体 251 を 205 とカップリングして 252 を得る。アセチル基及びベンジル基の除去により 254 が得られる。TBDPS 基が DMTr 基に変化して 255 が得られ、次に、酸化的開裂とそれに続く還元により 256 が得られる。選択的ベンゾイル化により 257 が得られ、これがアミダイト 258 に変換され、CPG にロードされて、標準条件を使用して 259 が得られる。

【0530】

イノシン-UNA 構成要素の合成

10

20

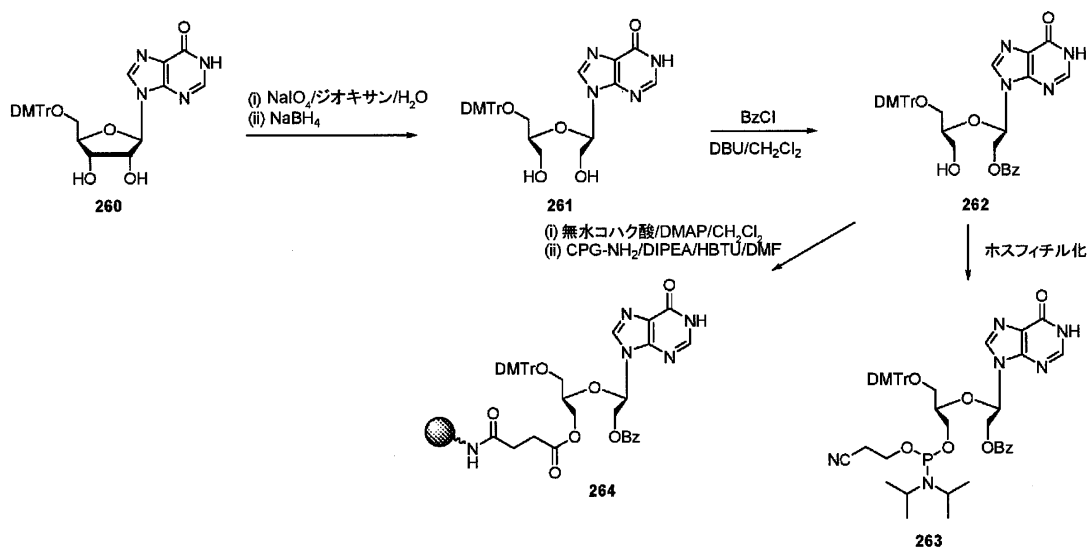
30

40

50

【化 6 8】

スキーム16



10

20

構成要素 263 及び 264 は、上記の他の UNA 誘導体について説明したのと同様の手順を使用して、5'-DMTr で保護されたイノシンリボヌクレオシド 260 から合成される。

【0531】

イノシン-GNA/SNA 構成要素の合成

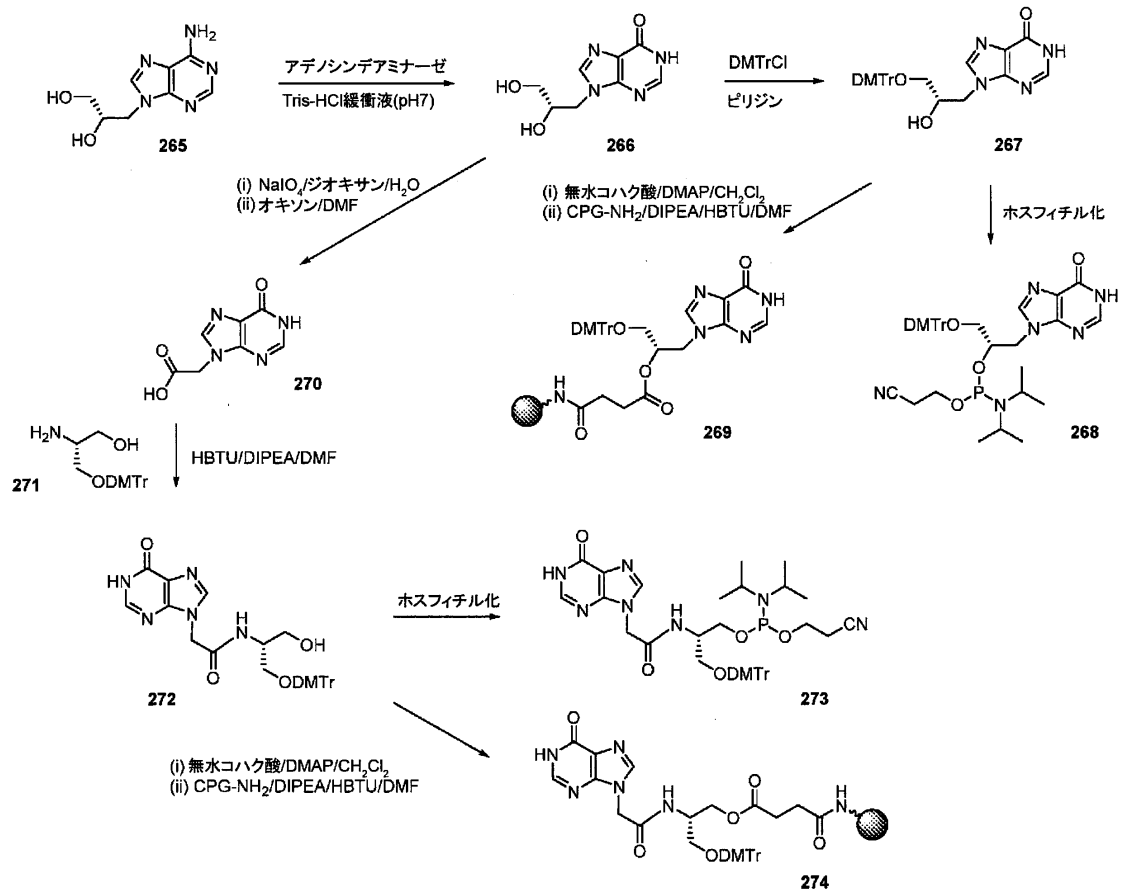
30

40

50

【化 6 9】

スキーム17



化合物266、イノシン-GNAは、アデノシンデアミナーゼで処理することにより、A-GNA 265から合成される。その後のDMTr保護とそれに続くリン酸化及びC
PGローディングにより、268及び269が得られる。266のジオールの酸化的開裂
とそれに続く穏やかな酸化により270が得られ、これが271とカップリングしてイノ
シン-SNA（セリノール核酸）前駆体272が得られる。273及び274は、上記の
ように合成することができる。

【0532】

isoG-UNA構成要素の合成

10

20

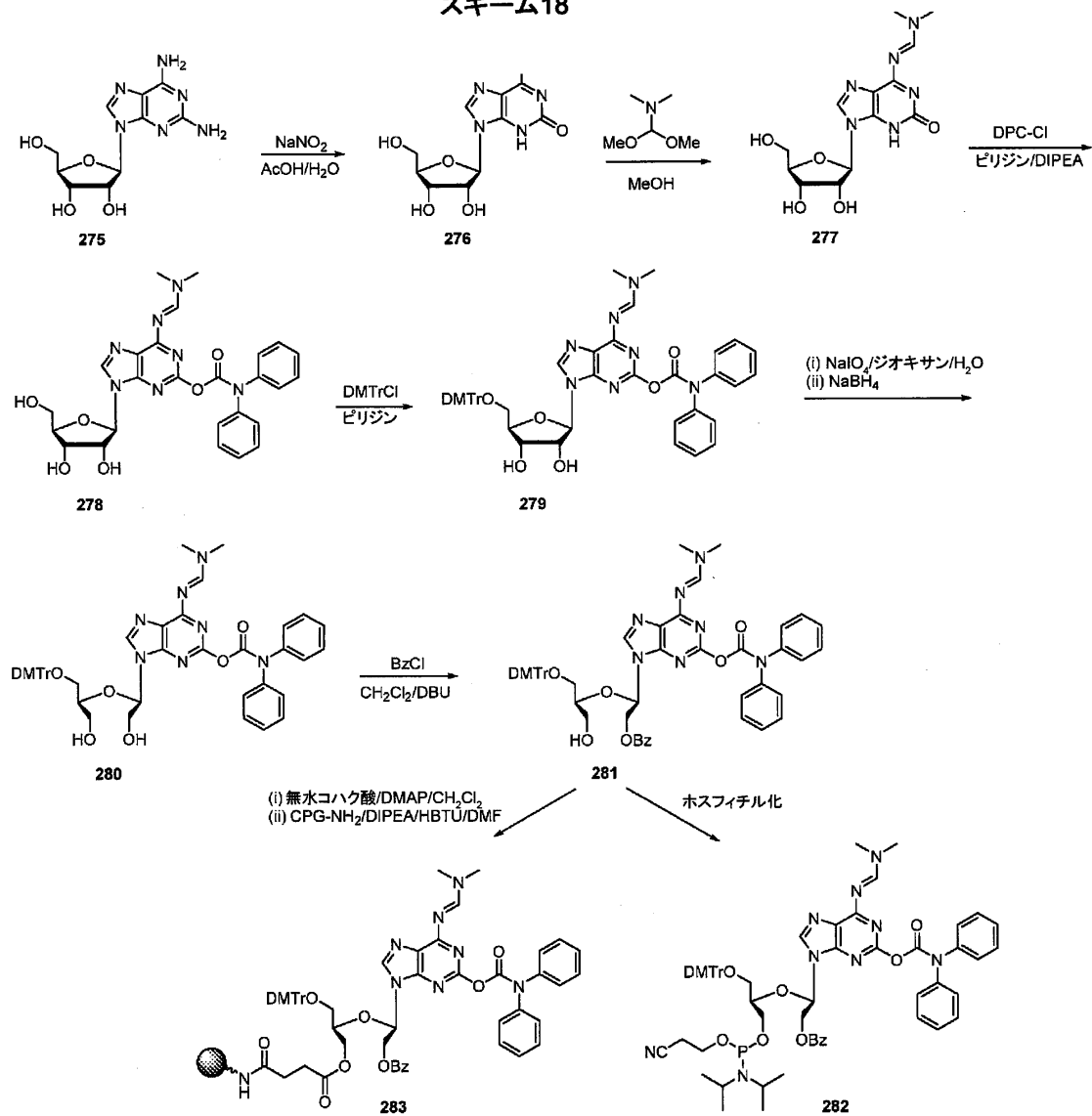
30

40

50

【化 7 0】

スキーム18



ジアミノAリボヌクレオシド275から出発して、スキーム11のisoG-GNAの合成について説明した同様の手順で279が得られる。上記のUNA類似体合成の標準的な生成材料により、isoG-UNA構成要素282及び283を得ることができる。

【0533】

isoG-SNA構成要素の合成

10

20

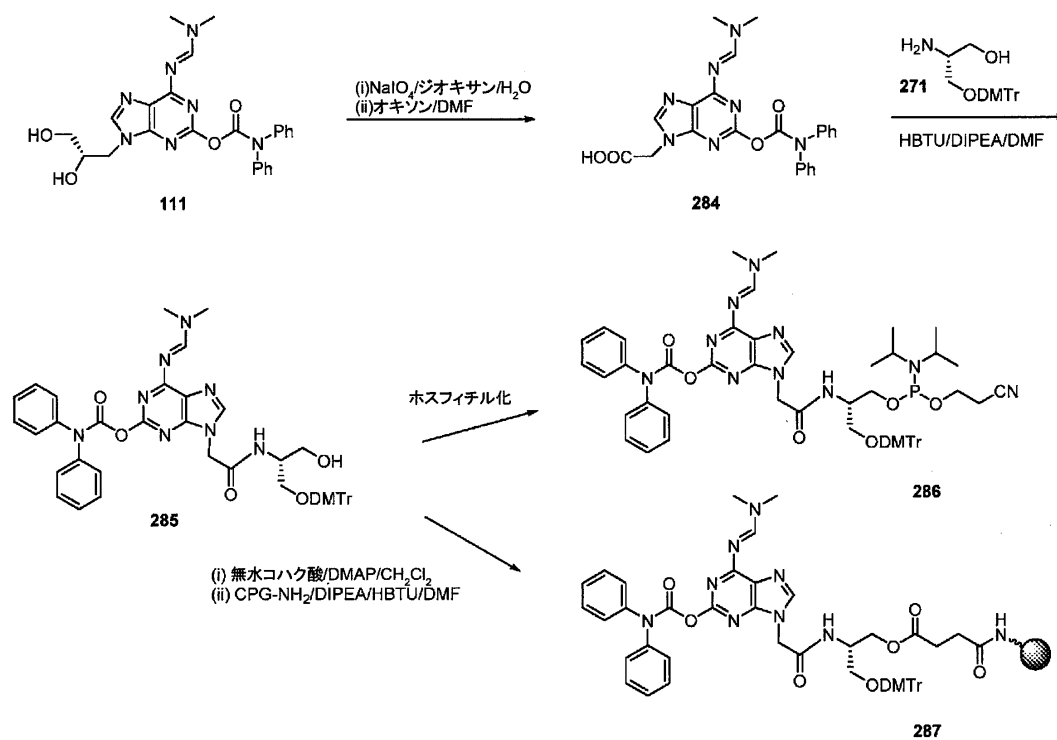
30

40

50

【化 7 1】

スキーム19



111のジオールの酸化的開裂とそれに続く穏やかな酸化により284が得られ、これが271とカップリングしてisoG-SNA（セリノール核酸）前駆体285が得られる。286及び287は、上記のように合成することができる。

【0534】

2-アミノプリン-UNA構成要素の合成

10

20

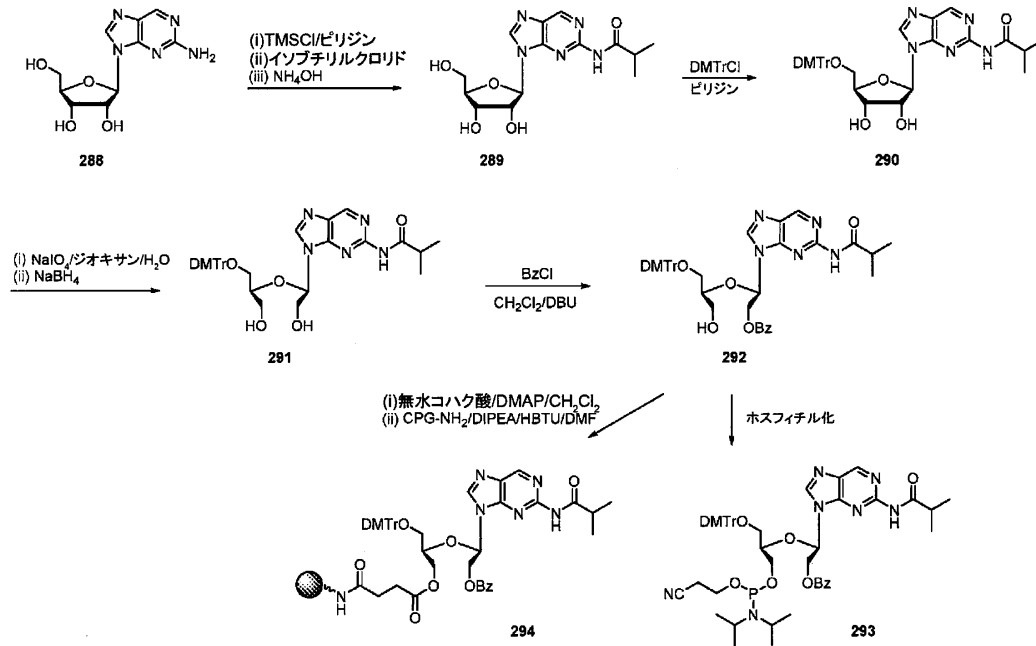
30

40

50

【化 7 2】

スキーム20



2-アミノプリンリボヌクレオシド 288 から出発して、TMS による一過性の保護とそれに続く iBuCl による環外アミノ保護、次いでアルカリ後処理により、289 が得られる。上記の UNA 類似体合成の標準的な生成材料により、2-アミノプリン-UNA 構成要素 293 及び 294 を得ることができる。

【0535】

2-アミノプリン-GNA/SNA 構成要素の合成

10

20

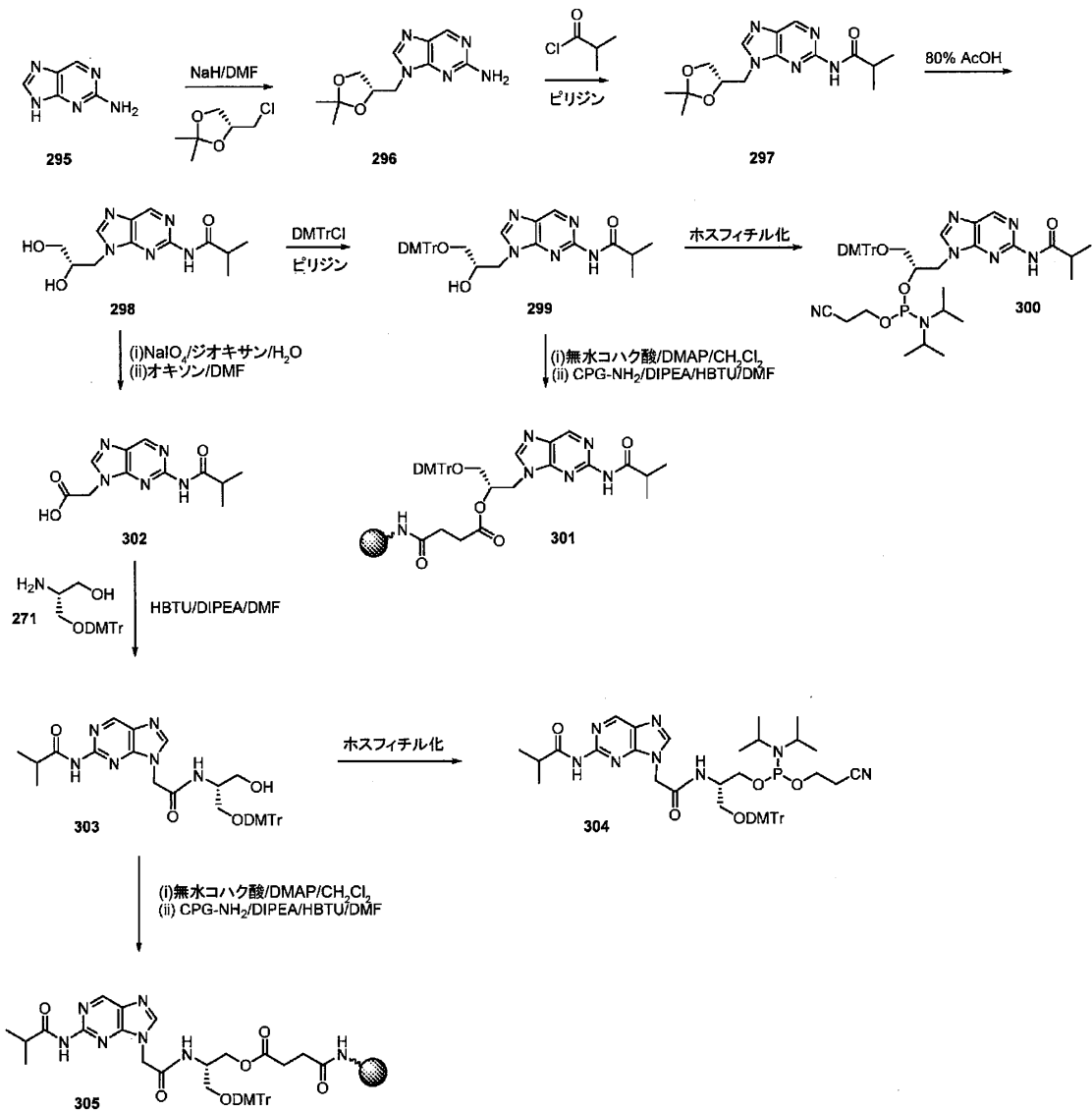
30

40

50

【化 7 3】

スキーム21



アクトニド (actonide) で保護されたクロロ化合物で 295 を N-アルキル化すると、296 が得られる。その後の塩基保護、酸処理及び DMTr 保護により 299 が得られる。300 及び 301 は、上記のように合成することができる。298 のジオールの酸化的開裂とそれに続く穏やかな酸化により酸 302 が得られ、これが 271 とカップリングして 2-アミノプリン-SNA (セリノール核酸) 前駆体 303 が得られる。304 及び 305 は、上記のように合成することができる。

【0536】

キサントシン-UNA 構成要素の合成

10

20

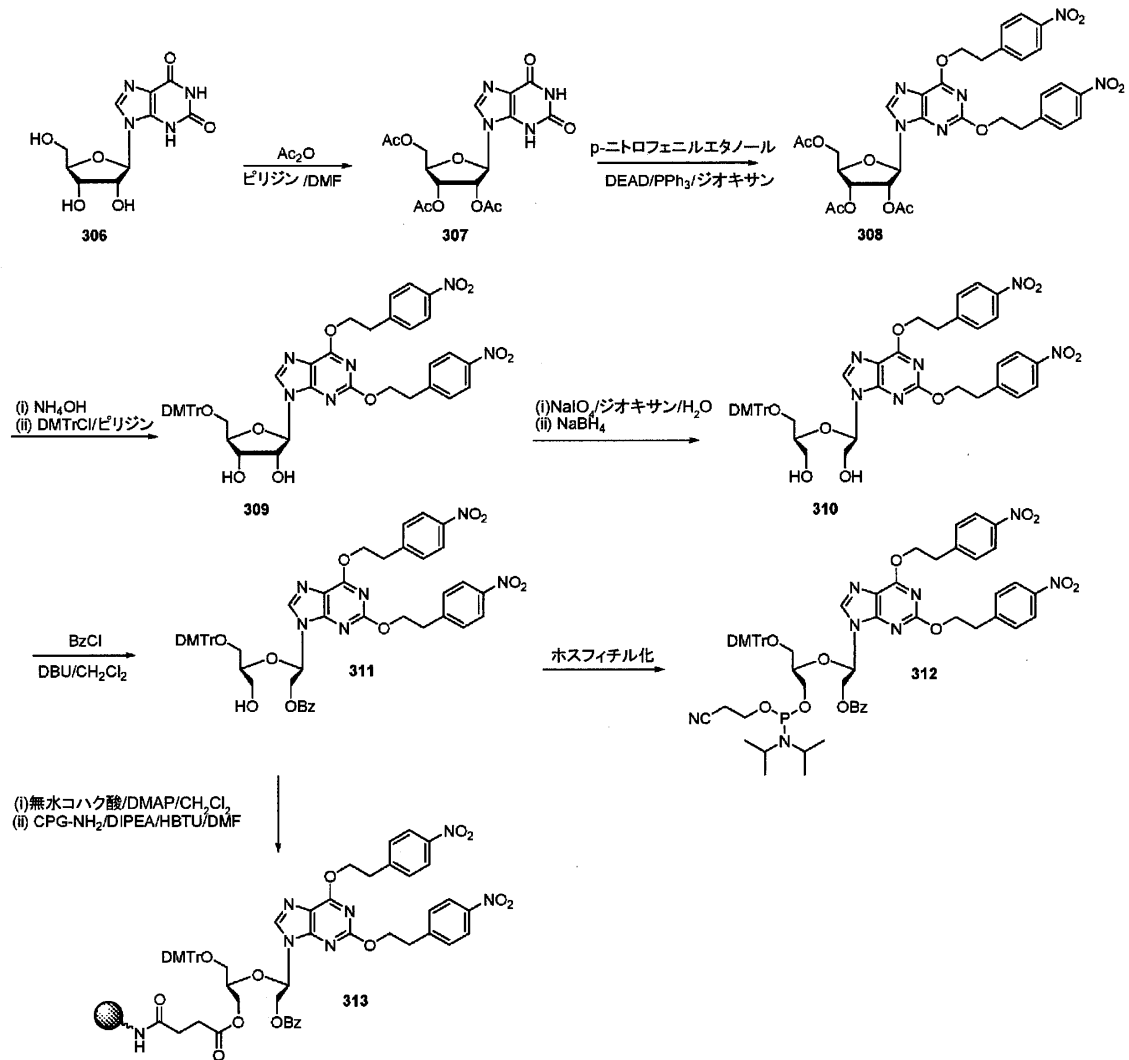
30

40

50

【化 7 4】

スキーム22



キサントシン 306 をアセチル化して 307 を得る。二重光延反応とそれに続くアルカリ処理及び DMT r 保護により 309 が得られる。上記の UNA 類似体合成の標準的な生成材料により、キサントシン-UNA 構成要素 312 及び 313 を得ることができる。

【0537】

キサントシン-GNA 構成要素の合成

10

20

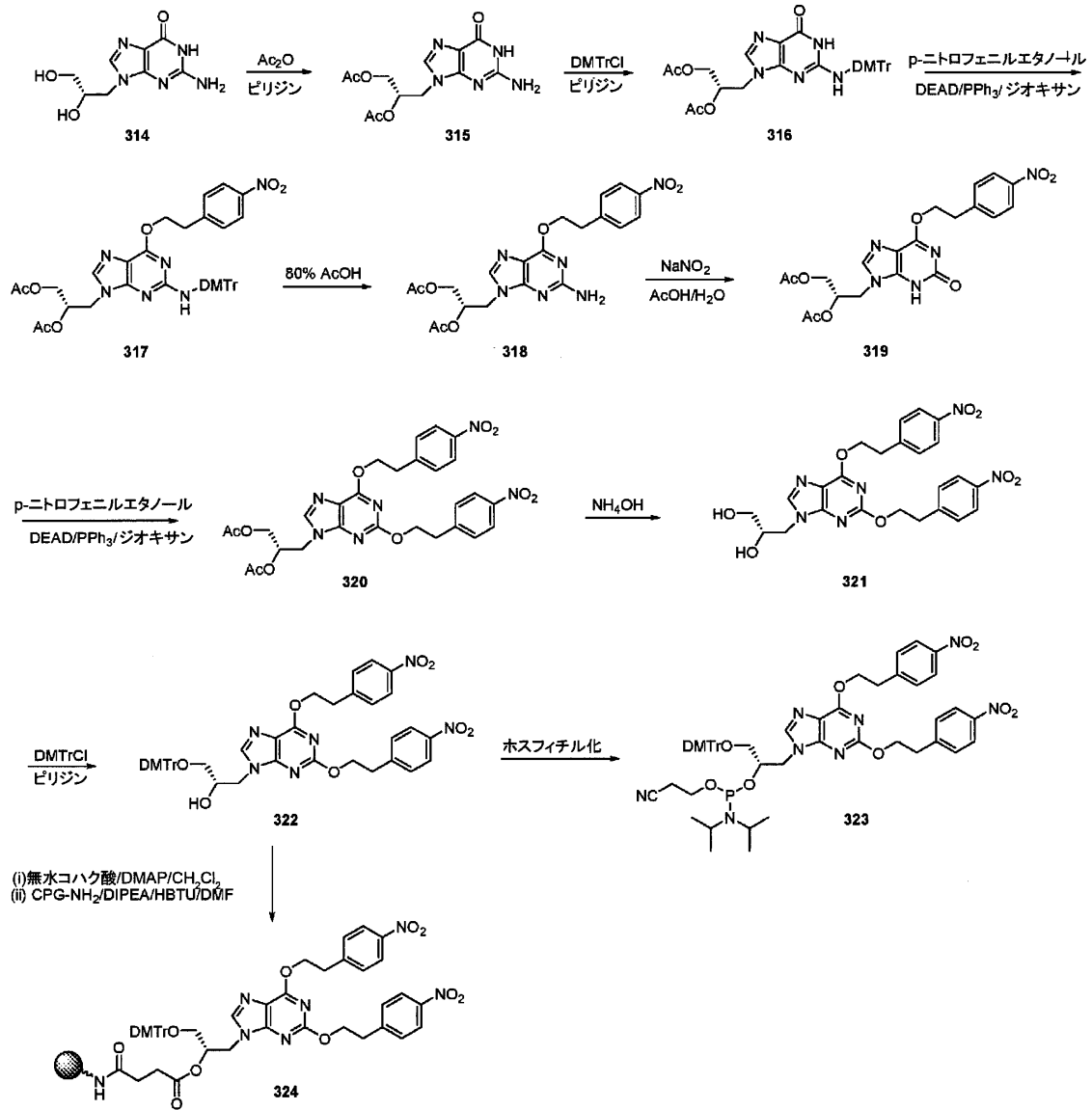
30

40

50

【化 7 5】

スキーム23



G-GNAのアセチル化により315が得られ、環外アミンのDMTr反応の後に316が得られる。光延反応及び酸処理により318が得られる。酸性条件下で亜硝酸ナトリウムにより318を処理することにより、319が得られる。光延反応、アセチル基の除去及びDMTr保護により322が得られる。323及び324は上記のように合成することができる。

【0538】

キサントシン-SNA構成要素の合成

10

20

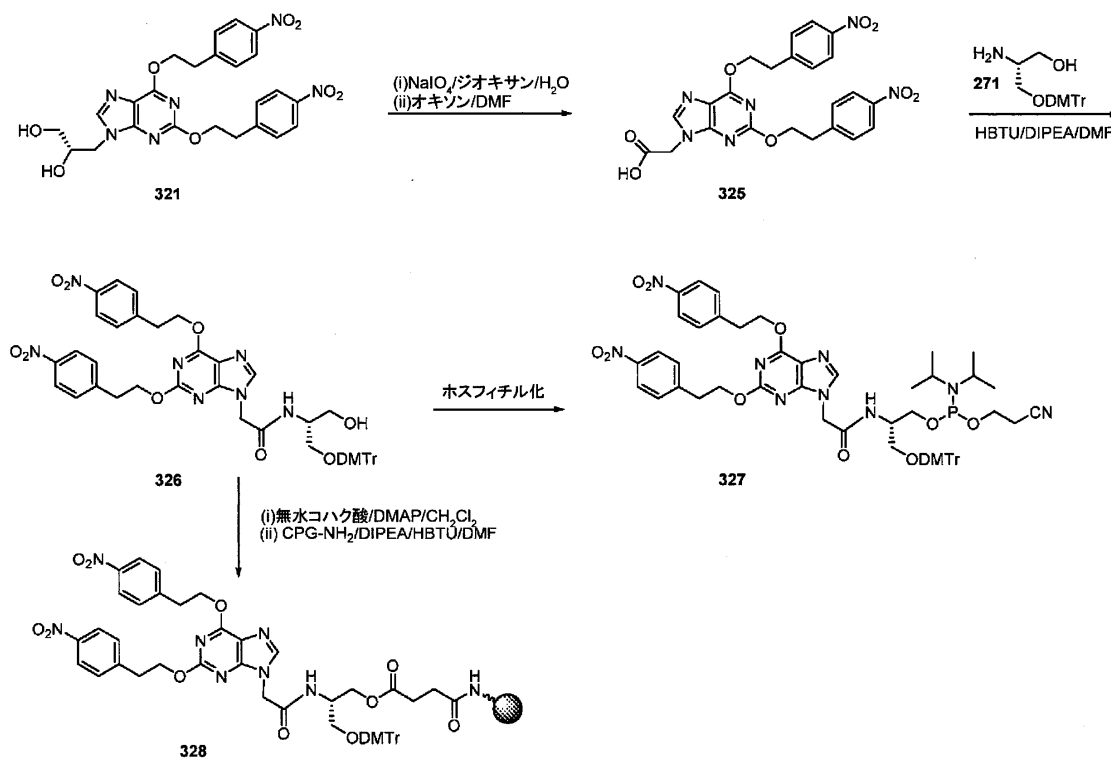
30

40

50

【化 7 6】

スキーム24



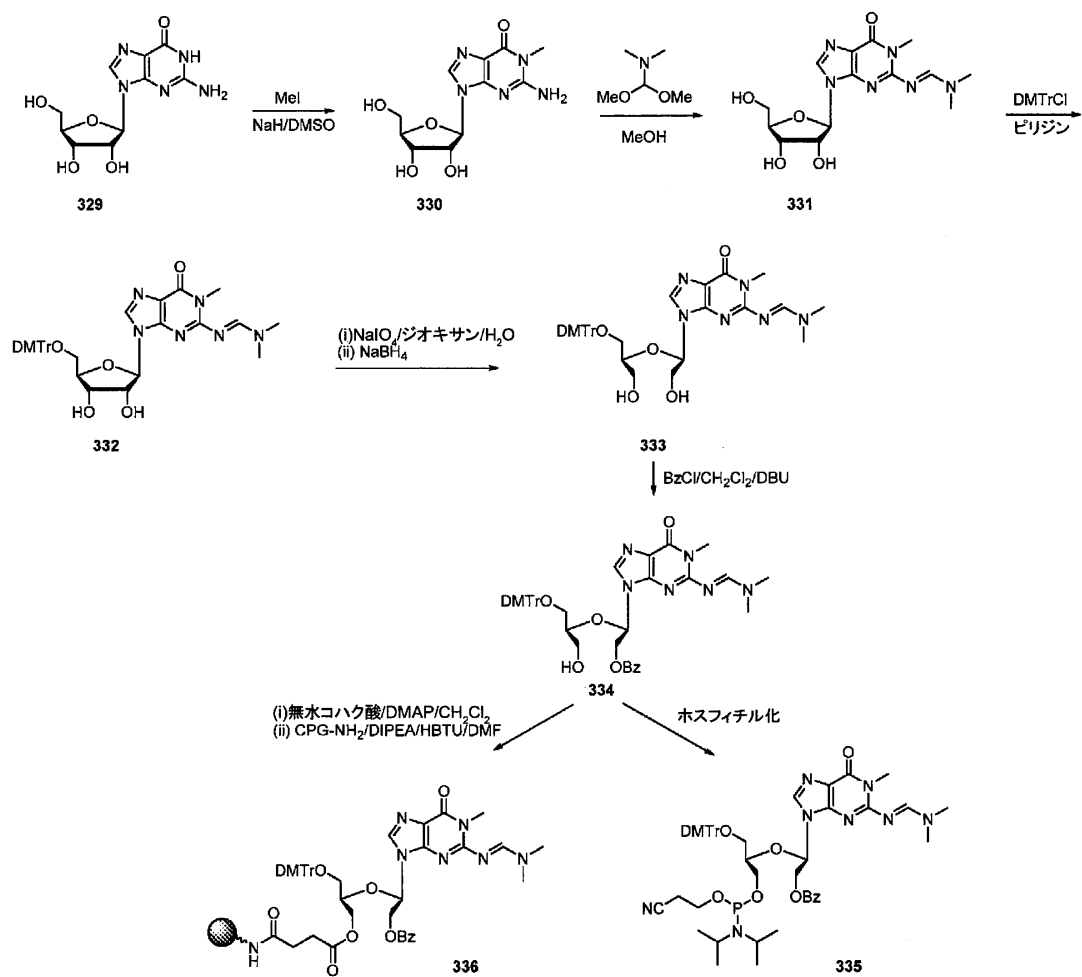
321のジオールの酸化的開裂とそれに続く穏やかな酸化により酸325が得られ、これが271とカップリングしてキサントシン-SNA（セリノール核酸）前駆体326が得られる。327及び328は、上記のように合成することができる。

【0539】

N1-メチル-G-UNA構成要素の合成

【化 7 7】

スキーム25



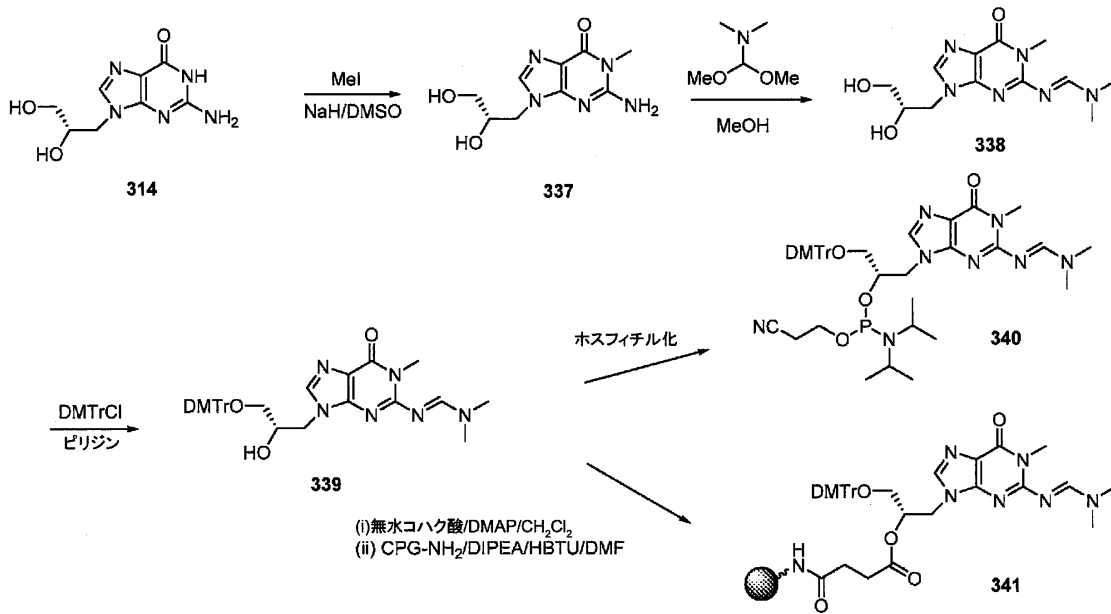
グアノシン329をDMSO中のMeIで処理して330を得る。環外アミノ保護とそれに続くDMTr反応により332が得られる。上記のUNA類似体合成の標準的な生成材料により、N1-メチルG-UNA構成要素335及び336を得ることができる。

【0540】

N1-メチル-G-GNA構成要素の合成

【化 7 8】

スキーム26



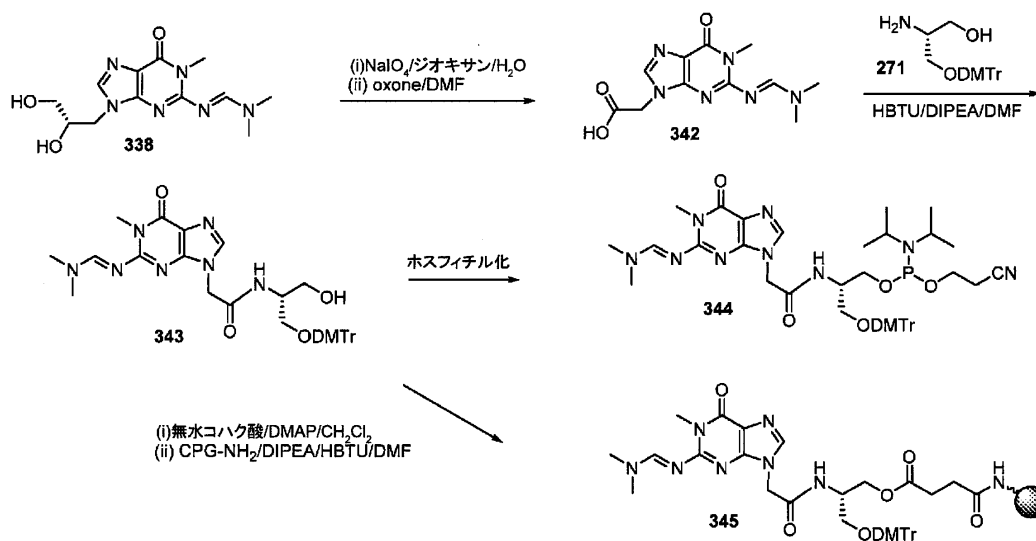
G-GNAのメチル化により314が得られる。環外アミノ基及び5'-ヒドロキシル基の保護により339が得られる。標準的なリン酸化及びコハク化とそれに続くCPGローディングにより、340と341がそれぞれ得られる。

【0541】

N1-メチル-G-SNA構成要素の合成

【化 7 9】

スキーム27



338のジオールの酸化的開裂とそれに続く穏やかな酸化により酸342が得られ、これが271とカップリングしてN1-メチルG-SNA（セリノール核酸）前駆体343が得られる。344及び345は、上記のように合成することができる。

【0542】

O6-アルキル-U NA構成要素の合成

10

20

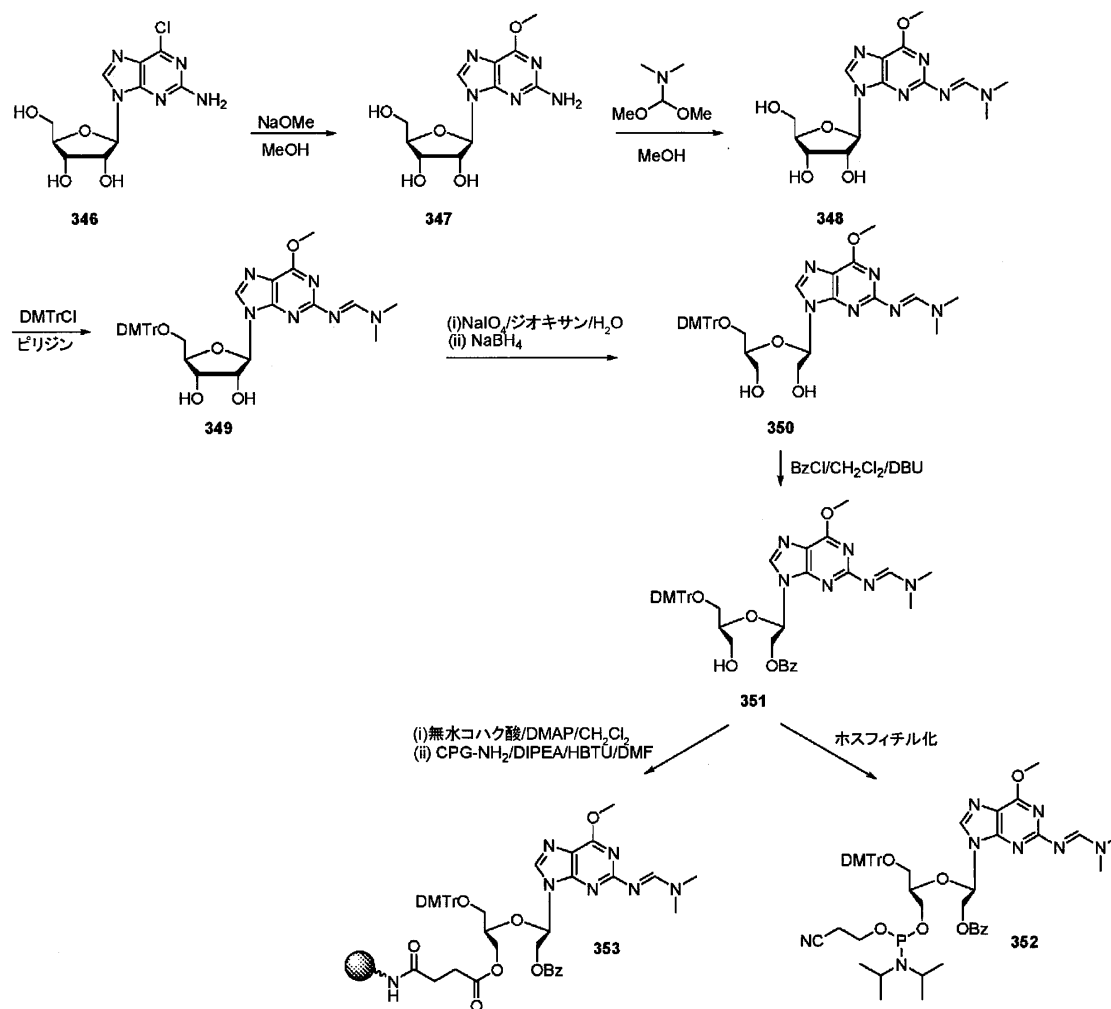
30

40

50

【化 8 0】

スキーム28



346を NaOMe で処理した後、 dmf で保護することにより、348が得られる。その後の DMTr 反応及び上記のUNA類似体合成の標準手順に従うと、O6-アルキル-G-UNA構成要素352及び353を得ることができる。

【0543】

O6-アルキル-GNA／SNA構成要素の合成

10

20

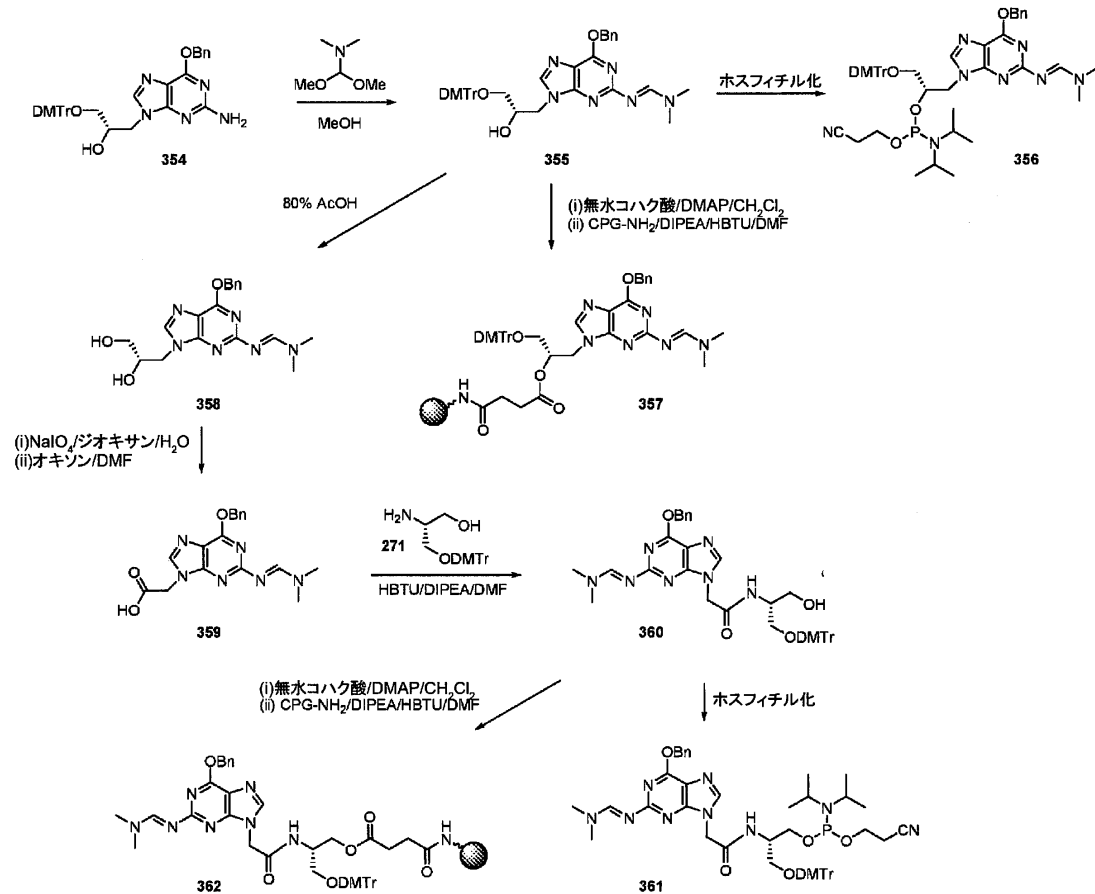
30

40

50

【化 8 1】

スキーム29



354のアミノ基の保護により355が得られる。標準的なリン酸化及びコハク化とそれに続くCPGローディングにより、356と357がそれぞれ得られる。355の酸処理により358が得られる。358のジオールの酸化的開裂とそれに続く穏やかな酸化により酸359が得られ、これが271とカップリングしてO6-アルキル化G-SNA（セリノール核酸）前駆体360が得られる。361及び362は、上記のように合成することができる。

【0544】

実施例4：ヒドロキシプロリノールベースのヌクレオシドアミダイトの合成

10

20

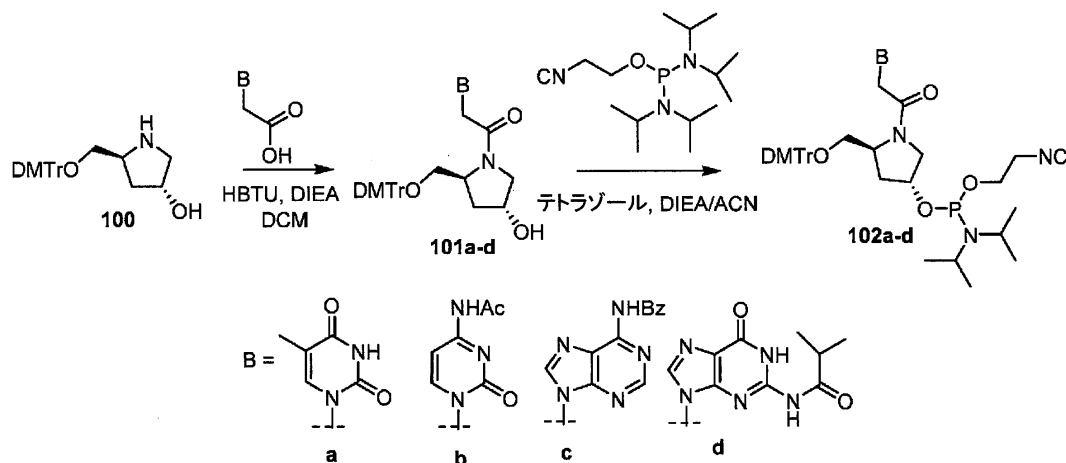
30

40

50

【化 8 2】

スキーム30



化合物(101a)－カルボン酸(5.00g、27.1mmol)及びHBTU(10.27g、27.1mmol)をDMF(100mL)中に取り、反応混合物を、氷水混合物中、アルゴン下で冷却した。DIEA(14.1mL、3eq.)を添加し、溶液を5分間撹拌した。DMF(50mL)中の化合物100(13.18g、27.1mmol)の溶液を上記の混合物に添加し、2時間撹拌した。TLCをチェックし、混合物を氷水混合物に注ぎ、沈殿した化合物を濾過し、真空中で乾燥させた。それをシリカゲルクロマトグラフィー(DCM/MeOH)で精製して、化合物101aをオフホワイトの固体として得た(12.20、76%)。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ 11.28(d, J=17.8Hz, 1H), 7.38–7.25(m, 4H), 7.25–7.13(m, 4H), 6.88(dd, J=9.5, 2.6Hz, 3H), 5.09(d, J=4.1Hz, 1H), 4.56(d, J=16.7Hz, 1H), 4.49–4.40(m, 1H), 4.20–4.09(m, 1H), 3.72(d, J=2.6Hz, 5H), 3.67(dd, J=10.6, 5.3Hz, 1H), 3.37(dd, J=10.4, 4.0Hz, 1H), 3.15(dd, J=8.9, 5.3Hz, 1H), 2.98(dd, J=8.9, 3.2Hz, 1H), 2.05–1.95(m, 1H), 1.95–1.79(m, 1H), 1.74(d, J=1.1Hz, 2H)。

【0545】

化合物(102a)－化合物101a(4.0g、6.83mmol)を反応フラスコに加え、排気し、アルゴンでパージした。出発物質をアセトニトリルに溶解し、ジイソプロピルアミン(1.31mL、7.51mmol)及び2-シアノエチルN,N',N'-テトライソプロピルホスホルジアミダイト(3.38mL、10.25mmol)をシリッジで添加した。1H-テトラゾール(16.7mL、7.51mmol、0.45M)の溶液を添加し、室温で1時間撹拌した。反応をTLC(50%EtOAc/Hex)でチェックし、反応物を減圧下で濃縮した。残留物をジクロロメタンに溶解し、分液漏斗に加え、有機層を飽和重炭酸ナトリウム溶液で洗浄した。有機層を分離し、ブラインで洗浄した。有機層を分離し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。固体を濾別し、母液を濃縮した。残留物をシリカゲル上のフラッシュクロマトグラフィー(20%~100%EtOAc/Hex)で精製し、生成物画分を合わせて減圧濃縮して、102aを得た(4.96g、93%)。¹H NMR(500MHz, アセトニトリル-d₃) δ 9.06(s, 1H), 7.44–7.35(m, 3H), 7.34–7.24(m, 8H), 7.24–7.18(m, 1H), 7.03(t, J=1.5Hz, 1H), 6.91–6.82(m, 5H), 4.75(m, 1H), 4.55–4.32(m, 3H), 4.24(m, 1H), 4.18–3.99(m, 1H), 3.87(dd, J=10.6, 5.8Hz

, 1 H), 3.84–3.78 (m, 1 H), 3.76 (s, 10 H), 3.61 (m, 4 H), 3.54–3.44 (m, 1 H), 3.41–3.28 (m, 2 H), 3.02 (m, 1 H), 2.75 (t, J=5.9 Hz, 1 H), 2.64 (m, 3 H), 2.22–2.15 (m, 1 H), 2.12–1.99 (m, 1 H), 1.82 (d, J=1.2 Hz, 3 H), 1.76 (d, J=1.2 Hz, 1 H), 1.23 (t, J=6.8 Hz, 3 H), 1.21–1.09 (m, 17 H). ³¹P NMR (202 MHz, アセトニトリル-d₃) δ 149.13, 148.63, 148.50, 148.30.

【0546】

化合物(101b)–カルボン酸(5.00 g、23.68 mmol)及びHBTU(8.98 g、23.68 mmol)をDMF(100 mL)中に取り、反応混合物を氷水混合物中、アルゴン下で冷却した。DIEA(12.36 mL、3 eq.)を添加し、溶液を5分間攪拌した。DMF(50 mL)中の化合物100(9.93 g、23.68 mmol)の溶液を上記の混合物に添加し、2時間攪拌した。TLCをチェックし、混合物を氷水混合物に注ぎ、沈殿した化合物を濾過し、真空下で乾燥させた。それをシリカゲルクロマトグラフィー(DCM/MeOH)で精製して、化合物101bを淡黄色の固体として得た(13.1、82%)。¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.20 (s, 1 H), 8.04–7.94 (m, 3 H), 7.66–7.57 (m, 1 H), 7.51 (t, J=7.6 Hz, 2 H), 7.35–7.28 (m, 4 H), 7.25 (d, J=8.8 Hz, 1 H), 7.23–7.14 (m, 4 H), 6.89 (m, 4 H), 5.12 (d, J=4.1 Hz, 1 H), 4.85–4.58 (m, 2 H), 4.47 (m, 1 H), 4.16 (m, 1 H), 3.72 (d, J=2.6 Hz, 7 H), 3.42 (dd, J=10.5, 3.9 Hz, 1 H), 3.17 (dd, J=8.9, 5.3 Hz, 1 H), 3.00 (dd, J=8.9, 3.1 Hz, 1 H), 2.07–1.94 (m, 1 H), 1.87 (m, 1 H).

【0547】

化合物(102b)–化合物101b(2.0 g、2.97 mmol)を反応フラスコに加え、排気し、アルゴンでバージした。出発物質をアセトニトリルに溶解し、ジイソプロピルアミン(0.574 mL、3.3 mmol)及び2-シアノエチルN,N,N',N'-テトライソプロピルホスホルジアミダイト(1.47 mL、4.46 mmol)をシリンジで添加した。1H-テトラゾール(7.33 mL、3.3 mmol、0.45 M)の溶液を添加し、室温で1時間攪拌した。反応をTLC(70% EtOAc/Hex)でチェックし、反応物を減圧下で濃縮した。残留物をジクロロメタンに溶解し、分液漏斗に加え、有機層を飽和重炭酸ナトリウム溶液で洗浄した。有機層を分離し、ブライン溶液で洗浄した。有機層を分離し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。固体を濾別し、母液を濃縮した。残留物をシリカゲル上のフラッシュクロマトグラフィー(20%~100% EtOAc/Hex)で精製し、生成物画分を合わせて減圧濃縮して、102bを得た(2.36 g、91%)。¹H NMR(500 MHz, アセトニトリル-d₃) δ 9.10 (s, 1 H), 7.96 (d, J=7.7 Hz, 1 H), 7.73–7.66 (m, 1 H), 7.67–7.60 (m, 1 H), 7.56–7.48 (m, 2 H), 7.43 (m, 1 H), 7.41–7.37 (m, 1 H), 7.35–7.30 (m, 2 H), 7.30–7.25 (m, 3 H), 7.25–7.18 (m, 1 H), 6.87 (m, 3 H), 4.85–4.69 (m, 1 H), 4.68–4.50 (m, 1 H), 4.24 (m, 1 H), 3.90–3.79 (m, 1 H), 3.76 (s, 5 H), 3.71–3.53 (m, 2 H), 3.53–3.41 (m, 1 H), 3.40–3.28 (m, 1 H), 3.03 (m, 1 H), 2.65 (m, 1 H), 2.23–2.15 (m, 1 H), 2.08 (m, 1 H), 1.23 (t, J=6.8 Hz, 3 H), 1.21–1.14 (m, 8 H). ³¹P NMR(202 MHz, アセトニトリル-d₃) δ 149.13, 148.60, 148.50, 148.30.

【0548】

化合物(101c)–カルボン酸(5.00 g、16.82 mmol)及びHBTU(

6.37 g、16.82 mmol) を DMF (100 mL) 中に取り、反応混合物を氷水混合物中、アルゴン下で冷却した。DIEA (8.80 mL、3 eq.) を添加し、溶液を5分間攪拌した。DMF (50 mL) 中の化合物100 (7.05 g、27.1 mmol) の溶液を上記の混合物に添加し、2時間攪拌した。TLCをチェックし、混合物を氷水混合物に注ぎ、沈殿した化合物を濾過し、真空中で乾燥させた。それをシリカゲルクロマトグラフィー (DCM/MeOH) で精製して、化合物101cを淡褐色の固体として得た (9.30、79%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.16 (s, 1H), 8.68 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.09–8.01 (m, 2H), 7.69–7.59 (m, 1H), 7.55 (dd, J=8.3, 6.9 Hz, 2H), 7.29 (m, 4H), 7.24–7.13 (m, 4H), 6.92–6.79 (m, 4H), 5.33–5.12 (m, 2H), 4.50 (t, J=4.8 Hz, 1H), 4.18 (q, J=4.0 Hz, 1H), 3.81 (dd, J=10.6, 5.2 Hz, 1H), 3.70 (dd, J=6.5, 1.7 Hz, 6H), 3.53 (m, 2H), 3.32 (m, 1H), 3.17 (m, 1H), 3.00 (dd, J=9.0, 3.2 Hz, 1H), 2.04 (m, 1H), 1.90 (m, 1H), 1.31–1.20 (m, 1H), 0.83 (m, 1H)。

[0549]

化合物(102c) – 化合物101c (2.0 g、2.86 mmol) を反応フラスコに加え、排気し、アルゴンでパージした。出発物質をアセトニトリルに溶解し、ジイソプロピルアミン (0.549 mL、3.15 mmol) 及び2-シアノエチルN, N, N', N'-テトライソプロピルホスホルジアミダイト (1.41 mL、4.29 mmol) をシリンジで添加した。1H-テトラゾール (7.0 mL、3.15 mmol、0.45 M) の溶液を添加し、室温で1時間攪拌した。反応をTLC (100% EtOAc) でチェックし、反応物を減圧下で濃縮した。残留物をジクロロメタンに溶解し、分液漏斗に加え、有機層を飽和重炭酸ナトリウム溶液で洗浄した。有機層を分離し、ブライン溶液で洗浄した。有機層を分離し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。固体を濾別し、母液を濃縮した。残留物をシリカゲル上のフラッシュクロマトグラフィー (20%~100% EtOAc/Hex) で精製し、生成物画分を合わせて減圧濃縮して、102cを得た (2.25 g、90%)。¹H NMR (500 MHz, アセトニトリル-d₃) δ 9.74 (s, 1H), 8.60 (d, J=32.4 Hz, 1H), 8.11 (d, J=3.4 Hz, 1H), 8.03 (d, J=7.6 Hz, 2H), 7.64 (t, J=7.5 Hz, 1H), 7.54 (t, J=7.6 Hz, 2H), 7.47–7.41 (m, 1H), 7.38 (m, 2H), 7.33 (m, 1H), 7.30–7.17 (m, 6H), 6.89–6.77 (m, 4H), 5.15–5.09 (m, 1H), 4.79 (m, 1H), 4.25 (dd, J=8.5, 4.6 Hz, 1H), 4.16–4.07 (m, 1H), 4.03 (m, 1H), 3.93 (dd, J=10.9, 5.1 Hz, 1H), 3.90–3.83 (m, 1H), 3.83–3.76 (m, 2H), 3.73 (dd, J=5.5, 2.0 Hz, 7H), 3.63 (m, 3H), 3.57–3.40 (m, 2H), 3.32 (s, 1H), 3.03 (m, 1H), 2.76 (t, J=5.9 Hz, 1H), 2.70 (t, J=5.9 Hz, 1H), 2.65 (m, 1H), 2.37 (dd, J=3.6, 1.8 Hz, 14H), 2.20 (m, 1H), 2.17–2.04 (m, 1H), 1.25–1.13 (m, 19H), 1.10 (d, J=6.7 Hz, 1H)。³¹P NMR (202 MHz, アセトニトリル-d₃) δ 149.52, 149.14, 148.76, 148.67, 148.31。

[0550]

化合物(101d) – カルボン酸 (5.00 g、17.91 mmol) 及びHBTU (6.79 g、17.91 mmol) を DMF (100 mL) 中に取り、反応混合物を氷水混合物中、アルゴン下で冷却した。DIEA (9.34 mL、3 eq.) を添加し、溶液を5分間攪拌した。DMF (50 mL) 中の化合物100 (7.51 g、17.91 mmol) の溶液を上記の混合物に添加し、2時間攪拌した。TLCをチェックし、混合物を

10

20

30

40

50

氷水混合物に注ぎ、沈殿した化合物を濾過し、真空下で乾燥させた。それをシリカゲルクロマトグラフィー（DCM/MeOH）で精製して、化合物101dをオフホワイトの固体として得た（8.10、66%）。¹H NMR（400MHz, DMSO-d₆）δ 12.05（s, 1H）, 11.65（s, 1H）, 7.83（s, 1H）, 7.34–7.26（m, 4H）, 7.26–7.20（m, 1H）, 7.20–7.14（m, 4H）, 6.85（m, 4H）, 5.18（d, J=3.8Hz, 1H）, 5.05–4.96（m, 1H）, 4.91（d, J=17.1Hz, 1H）, 4.44（m, 1H）, 4.14（m, 1H）, 3.70（d, J=1.3Hz, 5H）, 3.68（s, 1H）, 3.63（dd, J=10.7, 4.9Hz, 1H）, 3.44（dd, J=10.6, 3.3Hz, 1H）, 3.20–3.09（m, 1H）, 3.03（dd, J=8.8, 6.0Hz, 1H）, 2.79–2.64（m, 1H）, 2.04（m, 1H）, 1.93（m, 1H）, 1.09（m, 6H）.

【0551】

化合物（102d）－化合物101d（1.4g、2.06mmol）を反応フラスコに加え、排気し、アルゴンでバージした。出発物質をジクロロメタンに溶解し、ジイソプロピルアミン（0.4ml、2.3mmol）及び2-シアノエチルN,N,N',N'-テトライソプロピルホスホルジアミダイト（1.02ml、3.09mmol）をシリンジで添加した。1H-テトラゾール（5.11ml、2.3mmol、0.45M）の溶液を添加し、反応物を室温で1時間攪拌した。反応をTLC（70%EtOAc/Hex）でチェックし、反応物を減圧下で濃縮した。残留物をジクロロメタンに溶解し、分液漏斗に加え、有機層を飽和重炭酸ナトリウム溶液で洗浄した。有機層を分離し、ブライン溶液で洗浄した。有機層を分離し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。固体を濾別し、母液を濃縮した。残留物をシリカゲル上のフラッシュクロマトグラフィー（40%～100%EtOAc/Hex）で精製し、生成物画分を合わせて減圧濃縮して、102dを得た（1.45g、80%）。¹H NMR（500MHz, アセトニトリル-d₃）δ 12.00（s, 1H）, 10.10（s, 1H）, 7.65（d, J=1.5Hz, 1H）, 7.44（dd, J=16.1, 6.9Hz, 1H）, 7.38（dd, J=7.5, 1.8Hz, 2H）, 7.34–7.28（m, 2H）, 7.26（m, 6H）, 7.21（m, 1H）, 6.83（m, 5H）, 4.93–4.80（m, 2H）, 4.80–4.72（m, 1H）, 4.72–4.53（m, 1H）, 4.32–4.20（m, 1H）, 4.14–3.94（m, 1H）, 3.88（m, 1H）, 3.80（m, 2H）, 3.76–3.70（m, 9H）, 3.61（m, 4H）, 3.49（d, J=18.4Hz, 1H）, 3.31（m, 1H）, 3.06（m, 1H）, 2.76（t, J=5.9Hz, 1H）, 2.72–2.61（m, 3H）, 2.57–2.45（m, 2H）, 2.43–2.31（m, 21H）, 2.25–2.03（m, 3H）, 1.22（t, J=6.8Hz, 5H）, 1.17（m, 16H）, 1.07（dd, J=23.6, 6.8Hz, 7H）。³¹P NMR（202MHz, アセトニトリル-d₃）δ 149.25, 149.01, 148.80, 148.22.

【0552】

実施例5：

オリゴヌクレオチド合成及び精製：全てのオリゴヌクレオチドは、汎用的又は習慣的サポートを用いて、1μモルの規模で、MerMade192シンセサイザー上で調製した。全てのホスホラミダイトは、カップリング時間を400秒に延長した点を除き、2-シアノエチルホスホラミダイトのための標準プロトコルを用いて、100%アセトニトリル又は9：1のアセトニトリル：DMFにおける100mMの濃度で用いた。新規に形成された結合の酸化を、9：1のアセトニトリル：水における50mM I₂の溶液を用いて行い、リン酸結合をもたらした。9：1のピリジン：アセトニトリルにおける100mM DDTにより、ホスホロチオエート結合をもたらした。トリチルオフの合成後、カラムを40%水性メチルアミン150μLと共に45分間インキュベートし、溶液を、真空を介して96ウェルプレートに流した。インキュベーションを反復し、水性メチルアミンの

新しい部分を流した後、粗オリゴヌクレオチド溶液を含有するプレートを実験室を密封し、室温でさらに60分間振盪し、全ての保護基を完全に除去した。9:1アセトニトリル:EtOHを1.2mLで各ウェルに添加することにより粗オリゴヌクレオチドの沈殿を得た後、-20℃で一晩インキュベートした。次に、プレートを3000RPMで45分間遠心分離し、各ウェルから上清を除去し、ペレットを950μLの20mM水性NaOAcに再懸濁した。最後に、水を用いてGE Hi-Trap脱塩カラム(Sephadex G25 Superfine)上で各未精製溶液を脱塩し、最終オリゴヌクレオチド生成物を溶出させた。全ての同一性及び純度は、各々、ESI-MS及びIEX HPLCを用いて確認した。

【0553】

温度依存性UV分光法：融解試験は、サーモプログラマーを備えたCary 300分光光度計上での経路長が1cmの石英セルにおいて、0.10×PBS(1.0mM Na/Kリン酸緩衝液、pH7.4、13.7mM NaCl及び0.3mM KClを有する)中、(相補的修飾センス鎖と対合した修飾アンチセンス鎖からなる)1μMの二本鎖濃度で実施した。試料溶液800μLを含有する各キュベットを、軽鉱油200μLでカバーした。1℃/分の加熱速度、15~90℃での融解曲線を260nmで監視した。融解温度(T_m)は、平滑化された加熱曲線の最初の派生物から算出し、報告された値は、少なくとも2つの独立した測定の結果である。

【0554】

インビトロ活性研究

細胞培養及びトランスフェクション：384ウェルプレート内で4.9μLのOpti-MEM+0.1μLのリポフェクタミンRNAiMax/ウェル(Invitrogen、カタログ番号13778-150)を5μLのsiRNA二本鎖/ウェルに添加することにより、Primary Mouse Hepatocytes(Thermo Fisher Scientific/Gibco)をトランスフェクトし、室温で15分間インキュベートした。次に、約5×10³個の細胞を含有する40μLのダルベッコ改変イーグル培地(Hep3b)又はウィリアムズ培地(PMH)をsiRNA混合物に添加した。細胞を37℃で24時間インキュベートし、次にRNA精製のために処理した。実験は、10nM及び0.1nMの用量のsiRNAで実施された。

【0555】

DYNABEADS mRNA単離キットを用いた全RNA単離：RNAは、DYNABEAD(Invitrogen、カタログ番号61012)を使用し、BioTek EL406プラットフォームで自動プロトコルを使用して分離された。簡潔には、70μLの溶解/結合緩衝液と、3μLの磁気ビーズを含有する10μLの溶解緩衝液とを各ウェルに添加した。プレートを電磁シェーカー上で10分間、室温でインキュベートし、次に磁気ビーズを捕捉し、上清を除去した。次に、ビーズに結合したRNAを150μLの洗浄緩衝液Aで2回、洗浄緩衝液Bで1回洗浄した。次に、ビーズを溶出緩衝液150μLで洗浄し、再捕捉し、上清を除去した。

【0556】

ABI高性能cDNA逆転写キット(Applied Biosystems、カタログ番号4368813)を用いたcDNA合成：反応1回あたり、10×緩衝液1.2μL、25×dNTP 0.48μL、10×ランダムプライマー1.2μL、逆転写酵素0.6μL、リボヌクレアーゼ阻害剤0.6μL及びH₂O 7.92μLを含有する12μLのマスタミックスを、上記で単離したRNAに添加した。プレートを密封し、混合し、電磁シェーカー上で、室温で10分間、続いて37℃で2時間インキュベートした。

【0557】

リアルタイムPCR：2μLのcDNAを、2μLの水、0.5μLの適切なGAPDH TaqMan VICプローブ又は標的プローブ及び384ウェルプレート(Roche、カタログ番号04887301001)の1ウェルあたり5μLのLightcycler 480プローブマスタミックス(Roche、カタログ番号048873010

10

20

30

40

50

01) を含有するマスターミックスに添加した。LightCycler 480リアルタイムPCRシステム (Roche) で、リアルタイムPCRを実施した。各二本鎖は四重に試験され、データは非標的化対照 siRNA でトランスフェクトされた細胞に対して正規化された。相対倍率変化を計算するため、リアルタイムデータを $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて分析し、非標的化対照 siRNA をトランスフェクトした細胞を用いて実施したアッセイに対して正規化した。

【0558】

インビトロレポーターアッセイ

Dual-Glo (登録商標) ルシフェラーゼアッセイ: Cos7細胞 (ATCC、Manassas, VA) を、トリプシン処理によりプレートから放出させる前、10% FBS を添加した DMEM (ATCC) 中、5% CO₂ の雰囲気下、37℃でほぼコンフルエントになるまで増殖させた。1ウェルあたり5μLの siRNA 二本鎖と5μLの psiCHECK2 プラスミド及び1ウェルあたり5μLの Opti-MEM と0.1μLのリポフェクタミン2000 (Invitrogen、Carlsbad CA、カタログ# 13778-150) を添加することにより、siRNA 及び psiCHECK2 プラスミドのトランスフェクションを実施し、次に、室温で15分間インキュベートした。次に、混合物を細胞に添加し、35μLの新鮮な完全培地に再懸濁した。トランスフェクトされた細胞は、5% CO₂ の雰囲気下、37℃でインキュベートされた。

【0559】

siRNA 及び psiCHECK2 プラスミドをトランスフェクトしてから48時間後、ホタルルシフェラーゼ (トランスフェクション対照) 及びウミシイタケルシフェラーゼ (標的配列に融合) を測定した。まず、培地を細胞から除去した。次に、培地体積に等しい20μLの Dual-Glo (登録商標) ルシフェラーゼ試薬を各ウェルに添加し混合することにより、ホタルルシフェラーゼ活性を測定した。混合物を室温で30分間インキュベートした後、Spectramax (Molecular Devices) で発光 (500nm) を測定して、ホタルルシフェラーゼシグナルを検出した。ウミシイタケルシフェラーゼ活性は、20μLの室温の Dual-Glo (登録商標) Stop & Glo (登録商標) 試薬を各ウェルに添加して測定し、プレートを10~15分間インキュベートした後、発光を再度測定してウミシイタケルシフェラーゼシグナルを測定した。Dual-Glo (登録商標) Stop & Glo (登録商標) 試薬は、ホタルルシフェラーゼシグナルをクエンチし、ウミシイタケルシフェラーゼ反応の発光を持続させる。siRNA 活性は、各ウェル内のホタル (対照) シグナルに対してウミシイタケシグナルを正規化することによって決定した。次に、同一のベクターでトランスフェクトされたが、siRNA で処理されていないか、又は非標的化 siRNA で処理された細胞と比較して、siRNA 活性の大きさを評価した。全てのトランスフェクションは n = 2 以上で行われた。

【0560】

6. インビボマウス及びラット試験

全ての試験は、適用可能なものとしての地方、州及び連邦規制に合致し、且つ Alnylam Pharmaceuticals での動物実験委員会 (Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)) によって認可されたプロトコルを用いて実施した。

【0561】

マウス薬力学試験では、雌 C57BL/6 マウス (Charles River Laboratories) に、単回用量の媒体対照 (1×PBS 又は 0.9% 塩化ナトリウム) を投与するか、又は siRNA を上背に皮下投与した。採血は、後眼窩採血によって収集した。血清を 13000 rpm、室温で、10分間遠心分離することにより分離した。mRNA 及び siRNA 分析のため、マウス肝臓を収集し、直ぐに液体窒素で急速凍結し、-80℃で貯蔵した。

【0562】

7. mRNA 及び siRNA の定量

miRNeasyキット (Qiagen) を用いて、製造業者の使用説明書に従い、RNAを抽出し、高性能cDNA逆転写キット (Thermo Fisher Scientific) を用いて、製造業者の使用説明書に従い、cDNAに変換し、LightCycler 480 Probes Master (Roche) を用いるRoche LightCycler 480 IIで、遺伝子特異的なTaqmanプローブ (Thermo Fisher Scientific) を用いる定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR) により、mRNAレベルを評価した。

【0563】

siRNAへの曝露を定量化するため、細胞ペレットを、0.25%トリトンX100を含有するリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に再懸濁し、95℃で10分間加熱し、14,000rpm、4℃で10分間遠心分離し、TaqManマイクロRNA逆転写キット (Thermo Fisher Scientific) を用いて、製造業者の使用説明書に従い、上清に対して逆転写を実施した。LightCycler 480 Probes Master (Roche) を用いるRoche LightCycler 480 IIで、製造業者の使用説明書に従い、qPCRを実施した。

【0564】

結果

インビトロ活性

インビトロ活性：インビトロ活性アッセイの結果を表1にまとめる。データが示すように、アンチセンス鎖のシード領域でisoC又はisoGを使用したグリコール酸 (GNA) 修飾は、GNA-C又はGNA-Gよりも効果的にオンターゲット活性を維持する。メチルUNA (mUNA) 及び2'-5'-RNA修飾は、アンチセンス5～8のシード領域の様々な位置に組み込まれたときに、親と比較してオンターゲット活性も保持する。

【0565】

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1. 初代マウス肝細胞における様々な熱不安定化修飾のインビトロ活性データ。

修飾	5 位						6 位					
	配列 1		配列 2		配列 3		配列 1		配列 2		配列 3	
	オン	オフ	オン	オフ	オン	オフ	オン	オフ	オン	オフ	オン	オフ
Mod 1 (S)	0.29	1.15										
Mod 2 (S)	-0.35	0.36										
Mod 3 (S)												
Mod 4 (S)												
Mod 5 (R)					0.45	-0.16						
Mod 5 (S)					-0.03	-0.87			-0.70	-1.07		
Mod 6 (R)					-0.28	-0.78			-1.08	-1.49		
Mod 6 (S)					0.18	-0.38						
Mod 7 (R)					0.50	0.02						
Mod 7 (S)					0.43	-0.10						
Mod 8	-0.15		-0.20				0.54					
UNA					-0.21	-1.14			-0.06			

修飾	7 位						8 位					
	配列 1		配列 2		配列 3		配列 1		配列 2		配列 3	
	オン	オフ	オン	オフ	オン	オフ	オン	オフ	オン	オフ	オン	オフ
Mod 1 (S)												
Mod 2 (S)												
Mod 3 (S)												
Mod 4 (S)												
Mod 5 (S)					0.50	-0.03						
Mod 5 (R)					-0.04	-1.20						
Mod 6 (R)					0.67	-0.32						
Mod 6 (S)					0.06	-0.53						
Mod 7 (R)					0.15	-0.35						
Mod 7 (S)					0.72	-0.02						
Mod 8	-0.17		0.34				0.94		0.71			
UNA					0.40	-0.56						

全ての値は log2 変換され、親に対するものである;TX =トランスフェクションで測定(最終二重鎖濃度 10 nM)、FU =フリー取り込みで測定(最終二重鎖濃度 1 nM)。修飾は図 x に指定されている通りである。 緑の値は次の通りである(残存標的のパーセント);配列 1 (GO1), オンターゲット Tx 0.44 ± 0.06 %, オンターゲット FU 22.39 ± 5.76 %; 配列 2 (TTR), オンターゲット Tx 2.92 ± 1.87 %, オンターゲット FU 25.19 ± 7.65 %; 配列 3 (TTR), オンターゲット Tx 1.19 ± 0.07 %, オンターゲット FU 25.89 ± 3.32 %。

【 0 5 6 6 】

インビトロレポーターアッセイ

オフターゲットレポーターアッセイの結果を表 2 にまとめる。

【 0 5 6 7 】

【表 2】

表 2. アンチセンス鎖修飾二本鎖のインビトロレポーターアッセイ。

		オンターゲット残存 mRNA (%)		オフターゲット IC ₅₀ (nM)
		10 nM siRNA	0.1 nM siRNA	
TTR (配列 2)	親(AD-64958)	2.3	25.5	0.05
	2'-5'-RNA @ AS5	2.0	24.6	0.47
	2'-5'-RNA @ AS6	2.2	30.5	0.02
	2'-5'-RNA @ AS7	2.9	31.1	11.08
	2'-5'-RNA @ AS8	3.7	31.5	0.21
	(S)-isoG-GNA @ AS6	0.8	11.6	0.55
HAO1 (配列 1)	親(AD-65644)	27.7	96.1	0.53
	2'-5'-RNA @ AS5	24.9	104.4	1.03
	2'-5'-RNA @ AS6	40.1	98.5	2.55
	2'-5'-RNA @ AS7	24.7	80.2	>10
	2'-5'-RNA @ AS8	53.0	95.1	1.28
	(S)-isoC-GNA @ AS5			>50

示された濃度でのトランスフェクションを介して初代マウス肝細胞で測定された
 オンターゲット活性。COS-7 細胞に siRNA を同時トランスフェクトした
 ルシフェラーゼレポータープラスミドを使用して測定されたオフターゲット IC₅₀。

【 0 5 6 8 】

温度依存性 UV 分光

温度依存性 UV 分光の結果を表 3 にまとめる。

【 0 5 6 9 】

【表 3】

表 3.一部の例示的な修飾 dsRNA の熱融解温度(T_m)。

修飾	5 位				6 位				7 位			
	配列 1	配列 2	配列 3	配列 4	配列 1	配列 2	配列 3	配列 4	配列 1	配列 2	配列 3	配列 4
Mod 1 (S)		61.8										
Mod 2 (S)		64.0										
Mod 3 (S)						59.0						
Mod 4 (S)						62.3						
Mod 5 (R)											80.3	82.0
Mod 5 (S)											80.3	82.0
Mod 6 (R)											81.2	82.0
Mod 6 (S)											81.1	82.0
Mod 7 (R)											80.0	82.1
Mod 7 (S)											80.0	83.0
Mod 8		64.0	62.5			62.0	61.0		63.5	61.5		
UNA											80.1	82.0

修飾は図 1 に指定されている通りである。親二本鎖の値は次の通りである。配列 1 (GOI) 66.8 °C; 配列 2 (TTR) 66.3 °C (1x PBS 中の 1 μ M 二本鎖濃度で測定); 及び配列 3 (TTR) 87.3 °C, 配列 4 (TTR) 89.0 °C (0.25x PBS 中の 1 μ M デュプレックス濃度で測定)

【0570】

マウスの薬力学的データ

インビボ試験の結果を表 4 にまとめる。GNA-i so C 又は mUNA の修飾は、インビボで効力を維持する。

【0571】

10

20

30

40

50

表 4.GNA-isoC 及び GNA-isoG は、インドがで、それぞれ GNA-C 及び GNA-G よりも効果的に効力を保存する。メチル-UNA 修飾も、アンチセンス 7 位で親と比較して活性を保存する。マウスに単回用量の siRNA を 1mg/kg で投与し、肝臓 mRNA 又はタンパク質のノックダウンを 7 日目に評価した。

修飾	5 位								6 位							
	配列 1		配列 2		配列 3		配列 4		配列 1		配列 2		配列 3		配列 4	
	オン ターゲット外	標準 偏差	オン ターゲット外	標準 偏差	オン ターゲット外	標準 偏差	オン ターゲット外	標準 偏差	オン ターゲット外	標準 偏差	オン ターゲット外	標準 偏差	オン ターゲット外	標準 偏差	オン ターゲット外	標準 偏差
Mod 1 (S)	0.58	0.14														
Mod 2 (S)	0.24	0.02														
Mod 3 (S)							0.25	0.08			0.42	0.25			0.47	0.13
Mod 4 (S)							0.25	0.03			0.24	0.04			0.47	0.05
Mod 5 (R)																
Mod 5 (S)																
Mod 6 (R)																
Mod 6 (S)																
Mod 7 (R)																
Mod 7 (S)																
Mod 8	0.21	0.07	0.28	0.04					0.25	0.02	0.27	0.06				
UNA																
修飾	7 位				8 位				配列 1				配列 2			
	配列 1		配列 2		配列 3		配列 4		配列 1		配列 2		配列 3		配列 4	
	オン ターゲット外	標準 偏差	オン ターゲット外	標準 偏差	オン ターゲット外	標準 偏差	オン ターゲット外	標準 偏差	オン ターゲット外	標準 偏差	オン ターゲット外	標準 偏差	オン ターゲット外	標準 偏差	オン ターゲット外	標準 偏差
Mod 1 (S)																
Mod 2 (S)																
Mod 3 (S)																
Mod 4 (S)																
Mod 5 (R)					0.17	0.02	0.16	0.03								
Mod 5 (S)					0.17	0.03	0.16	0.03								
Mod 6 (R)					0.20	0.07	0.29	0.02								
Mod 6 (S)					0.20	0.03	0.23	0.03								
Mod 7 (R)					0.18	0.05	0.14	0.02								
Mod 7 (S)					0.15	0.04	0.20	0.02								
Mod 8	0.17	0.06	0.20	0.02					0.43	0.10	0.24	0.06				
UNA					0.14	0.03	0.22	0.05								

値は、肝臓又は循環における投与後 7 日目の PBS 対照に関する残存 mRNA (配列 1, GOI) 又はタンパク質 (配列 2~3, TTR) のレベルをそれぞれ表す。指定された用量での親のノックダウンは次の通りであった。配列 1 (GOI) につき 0.129 ± 0.028 ; 配列 2 (TTR) につき 0.19 ± 0.03 ; 配列 3 (TTR) につき 0.123 ± 0.036 ; 配列 4 (TTR) につき 0.215 ± 0.015 。全ての値は、特に明記されていない限り、 $n=3$ の動物を用いた単回実験の結果を表す。修飾は図 1 に指定されている通りである。

表 5. 例示的な siRNA の配列

siRNA 二本鎖	パッセンジャー(5'-3')	ガイド (5'-3')	標的
AD-65644 (配列 1)	g•a•auguGaaAGucaucgacaa(L)	u•U•gucGaUGacuuUcAcauuc•u•g	GO1
AD-64958 (配列 2)	a•a•caguGuUCUugcucuauaa(L)	u•U•auaGagcaagaAcAcuguu•u•u	TTR
AD-125762 (配列 3)	a•g•uguuCuUGCucuauaaaca(L)	u•G•uuuuuagagcaAgAacacu•g•u	TTR
AD-125773 (配列 4)	u•u•cuugCuCUAuaaaccgugu(L)	a•C•acgguuuuuauagAgCaagaa•c•a	TTR

大文字と小文字は、それぞれアデニン、シトシン、グアニン、及びウリジンに対する 2'-F と 2'-OMe を表す。
(L)は、トリ-N-アセチルガラクトサミンリガンドを表す。ホスホロチオエート結合は、記号「●」で示される。

【表 6】

表 6. GNA-isoC 及び GNA-isoG は、それぞれ GNA-C 及び GNA-G と比較して、インビボで効力を改善又は維持する。

配列	siRNA 二本鎖	親 KD (採血前に 対して)	(S)-GNA KD (採 血前に対して)	(S)-isoGNA KD (採血前に対して)
5	a•g•gaucUuGCCaaagcaguuaa(L) u•U•acugcuuuggcAaGauccu•g•g	0.49 ± 0.13	0.46 ± 0.13	0.38 ± 0.03
	a•g•gaucUuGCCaaagcaguuaa(L) u•U•acugcuuuggcAaGauccu•g•g		0.33 ± 0.03	0.40 ± 0.18
6	g•a•ccagGaUCUugccaaagca(L) u•G•cuuuggcaagaUcCugguc•c•u	0.53 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.08 ± 0.03
7	u•g•cuuuGaGCCcucagcuucua(L) u•A•gaagcugaggcUcAaagca•c•u	0.16 ± 0.03	0.43 ± 0.06	0.29 ± 0.03
8	g•g•agccCaAGaagugaaaga(L) u•C•uuuacuuucuUgGgcucc•a•c	0.71 ± 0.05	0.92 ± 0.11	0.78 ± 0.07

大文字と小文字は、それぞれアデニン、シトシン、グアノシン、及びウリジンに対する 2'-F と 2'-OMe を表す。(L) は、トリ-N-アセチルガラクトサミンリガンドを表す。ホスホロチオエート結合は、記号「●」で示される。太字及び下線付きの文字は、(S)-GNA(Mod 1 又は 3)又は(S)-isoGNA(Mod 2 又は 4)で置き換えられたヌクレオチドを表す。マウスに単回用量の siRNA を 1 mg/kg(配列 5 及び 7)又は 3 mg/kg(配列 6 及び 8)で投与し、肝臓 mRNA 又はタンパク質のノックダウンを 7 日目に評価した。

【0574】

実施例 6：銅を含まないクリック結合したビス-RNA i

銅を含まない「クリック」コンジュゲーションを使用して Bis-RNA i を調製するための例示的なアプローチを、図 10 を参照して示す。示されるように、3' 又は 5' 末端にアジド官能基を有する 2 つの個別に合成された鎖は、DBCO で官能化された鎖にカップリングすることができる。このアプローチでは、ヌクレオチドリンカー設計（例えば、2'-F トリプレット）を簡単に組み込むことができる。この方法は、3'-5' 結合又は 5'-5' 結合の設計を可能にする。このアプローチは、各センス鎖を別々に調製することも可能にし、ロングマー鎖で遭遇するより低い収率及び困難な不純物が従来の方

10

20

30

40

50

られることを回避する。

【0575】

ロングマーのコンジュゲーション合成：

3つの異なるリンカー、Q327、Q328及びQ324は、全て歪み促進型アジド-シクロオクチン付加を使用して構築された。スキーム31、32及び33は、これらのリンカーの調製を示す。いずれの場合も、F7センス鎖の5'末端はジベンジルシクロオクチン部分(DBCO)で官能化され、TTRセンス鎖の3'又は5'末端はアジドで官能化された。鎖を「クリック」して合わせるために、等モル量の各鎖(水中0.45M)及び30%0.2Mリン酸緩衝液(pH7.1)を室温で12時間混合した。粗リガンドコンジュゲート及び非コンジュゲートオリゴヌクレオチドは、50mL/分の流速で130分にわたり、30~62%緩衝液Bの直線勾配で、TSK-Gel Super Q-5PW支持体(TOSOH Corp.)を使用した陰イオン交換高速液体クロマトグラフィー(IEX-HPLC)によって精製された(緩衝液A:10%CH₃CN中0.02M Na₂HPO₄、pH11及び緩衝液B:緩衝液A+1M NaBr)。ロングマーは、Sephadex G25(GE Healthcare)をカスタムパックしたAP-2ガラスカラム(20×300mm、Waters)を使用したAKTA Primeクロマトグラフィーシステムによるサイズ排除クロマトグラフィーで脱塩し、ヌクレアーゼを含まない滅菌水で溶出した。

10

【0576】

表7に、銅を含まない「クリック」コンジュゲーションリンカーQ327、Q328及びQ324を使用したBis-RNAiコンジュゲートの一部の例を示す。表8にこれらのコンジュゲートに関する一部の情報をまとめる。

20

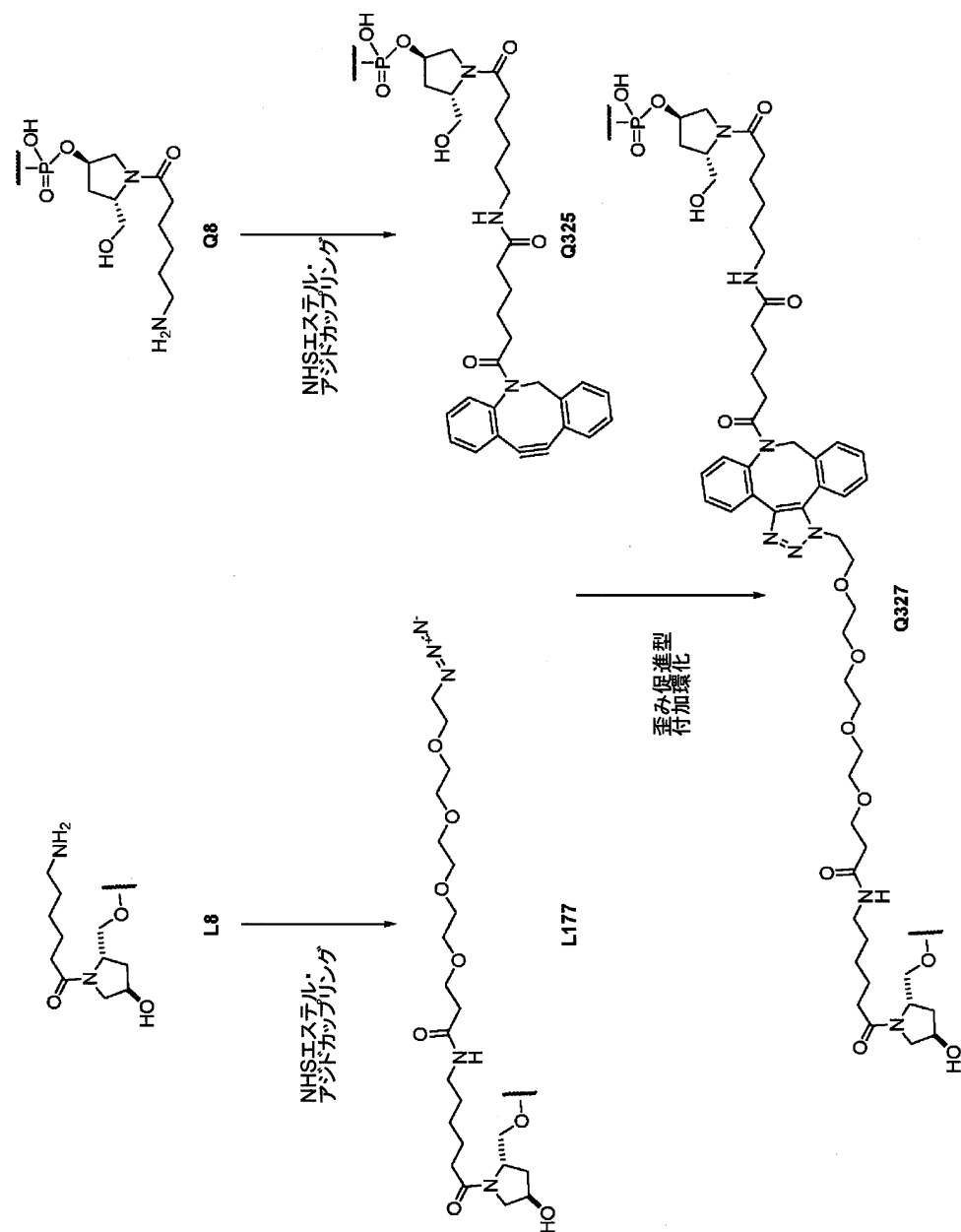
30

40

50

【化 8 3】

スキーム31



10

20

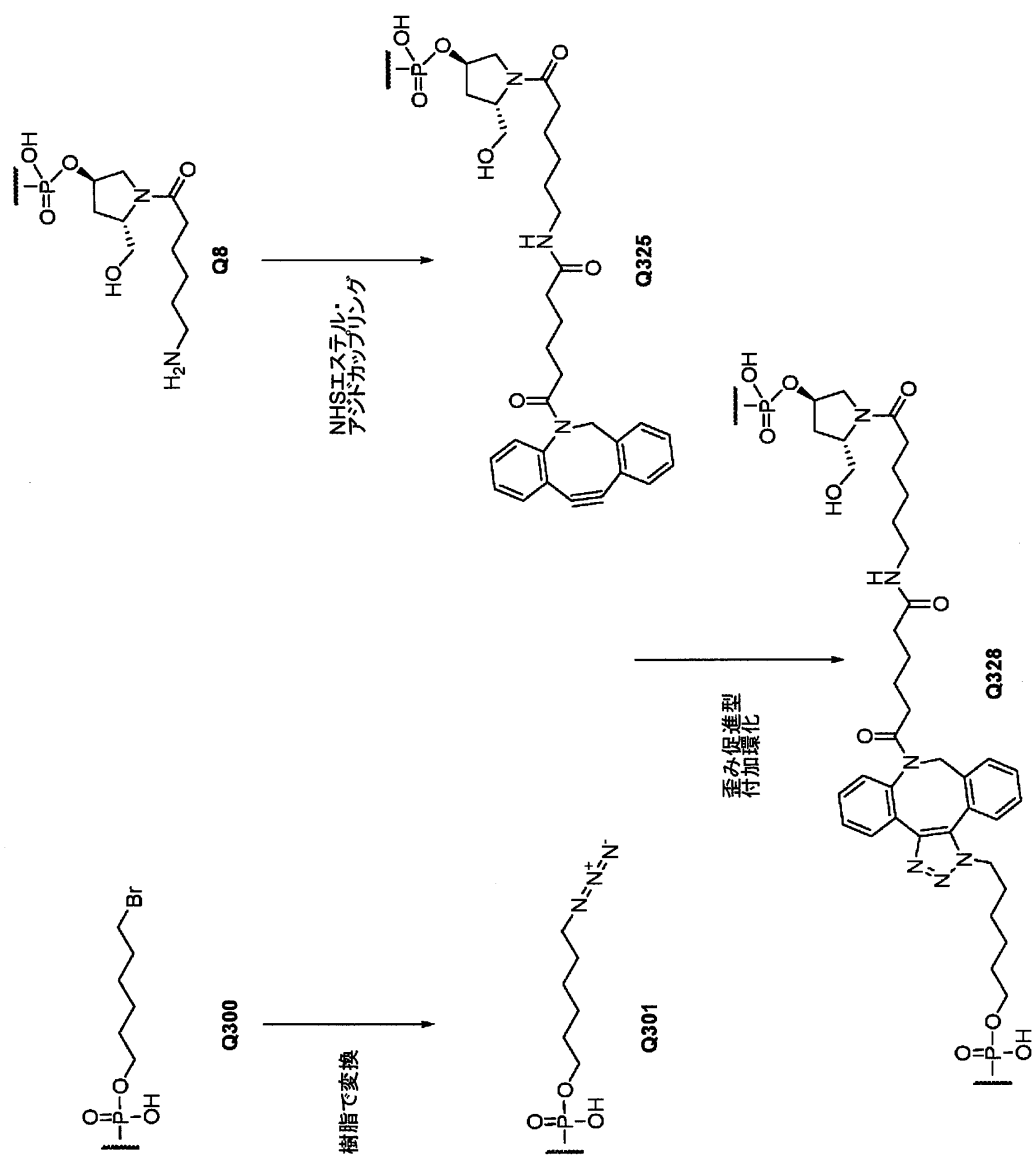
30

40

50

【化 8 4】

スキーム 32



10

20

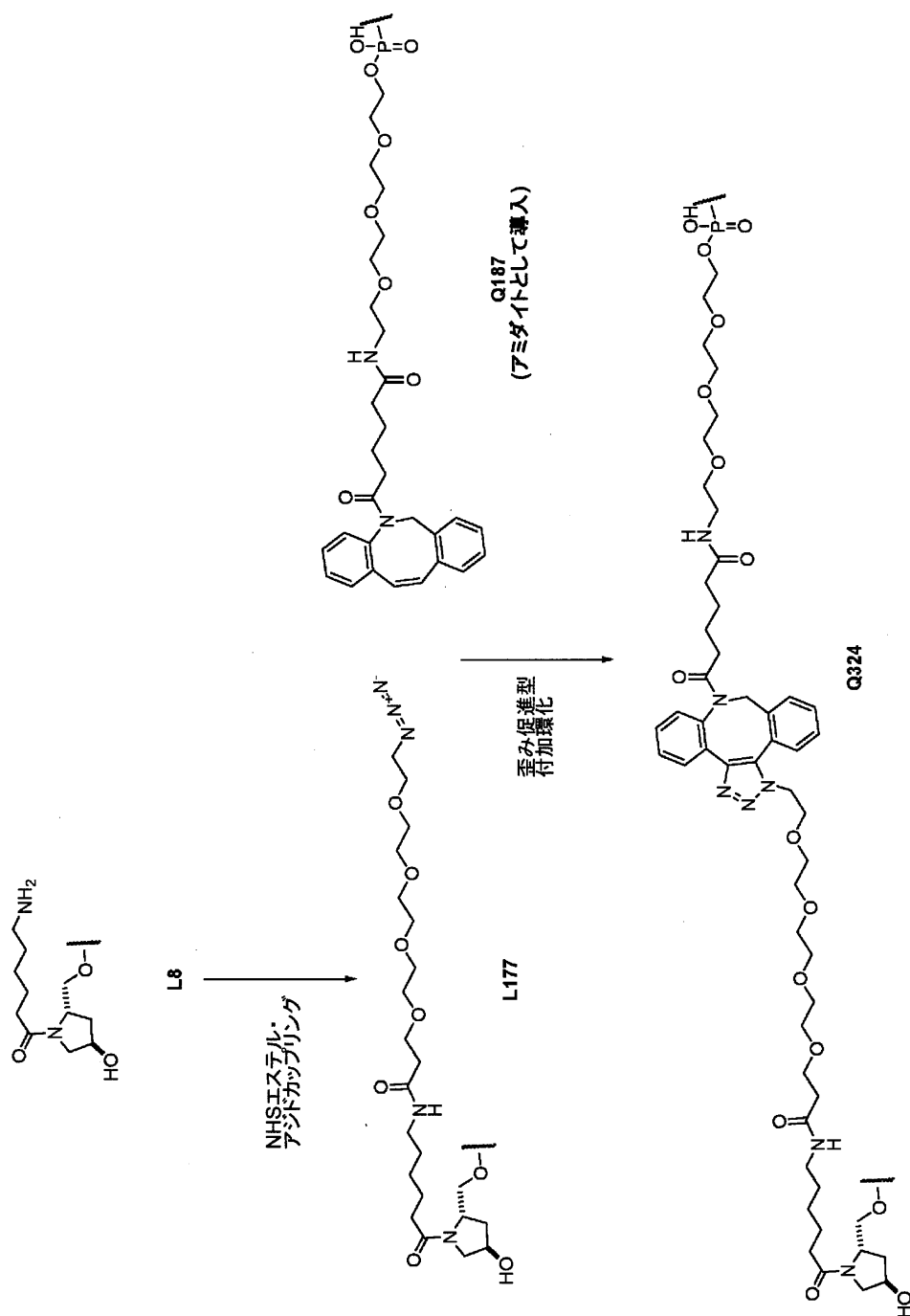
30

40

50

【化 8 5】

スキーム33



【 0 5 7 7 】

10

20

30

40

50

【表 8】

表 8: Bis-RNAi コンジュゲート

鎖/多重鎖 ID	リンカー	結合タイプ	計算質量	観測質量
AM-163	Q327	5'-3'	16416.85	16414.25
AM-164	Q328	5'-5'	16088.45	16086.58
AM-165	Q327	5'-3'	17765.76	17763.06
AM-166	Q324	5'-3'	18037.04	18035.11

10

【0579】

一般的なオリゴヌクレオチド合成：FVII及びmTTR siRNA配列は、固体支持体媒介性ホスホラミダイト化学を使用して、Applied Biosystems ABI 394で、1 μ molスケールで合成された。固体支持体は、カスタムGalNAcリガンド、カスタムL8（アミン基）又は2'-OMe RNA官能化支持体をロードした制御された細孔ガラス（500 Å）であった。補助合成試薬、2'-F及び2'-O-メチルRNA及びデオキシホスホラミダイトは、Thermo-Fisher（Milwaukee, WI）及びHongene（中国）から入手した。カスタムQ8、Q300ブロモヘキシル（Glen Research）及びQ187 DBCO-TEG（Glen Research）は、対応するホスホラミダイトとして導入された。3' GalNAcコンジュゲート一本鎖の合成は、GalNAc修飾CPG支持体上で実施した。カスタムCPGユニバーサル固体支持体をアンチセンス一本鎖の合成に使用した。全てのホスホラミダイト（アセトニトリル中0.15 M）のカップリング時間は、活性剤として5-エチルチオ-1H-テトラゾール（ETT）（アセトニトリル中0.25 M）を使用して10分間であった。ホスホロチオエート結合は、ピリジン中の3-（ジメチルアミノ-メチリデン）アミノ-3H-1, 2, 4-ジチアゾール-3-チオン（DDTT, AM Chemicals, CA, USA）の0.09 M溶液を使用して生成された。酸化時間は3分であった。全ての配列は、DMT基を最終的に除去して合成された（「DMTオフ」）。

20

30

【0580】

固相合成が完了すると、オリゴリボヌクレオチドが固体支持体から切断され、35℃で16時間、5%ジエチルアミン95%アンモニア水溶液で脱保護された。粗リガンドコンジュゲート及び非コンジュゲートオリゴヌクレオチドは、50 mL/分の流速で130分にわたり、22~42%緩衝液Bの直線勾配で、TSK-Gel Super Q-5PW支持体（TOSOH Corp.）を使用した陰イオン交換高速液体クロマトグラフィー（IEX-HPLC）によって精製された（緩衝液A：10%CH₃CN中0.02 M Na₂HPO₄、pH 8.5及び緩衝液B：緩衝液A+1 M NaBr）。全て的一本鎖を、85%を超えるHPLC（260 nm）純度に精製し、次にSephadex G25（GE Healthcare）をカスタムパックしたAP-2ガラスカラム（20×300 mm、Waters）を使用したAKTA Primeクロマトグラフィーシステムによるサイズ排除クロマトグラフィーで脱塩し、ヌクレアーゼを含まない滅菌水で溶出した。

40

【0581】

アジドは、NHSエステル合成後コンジュゲーション（クリックケミストリーツール）又は5'ヘキシルブロモホスホラミダイトからの樹脂上変換により導入した。ブロモヘキシル変換のために、支持体をアセトニトリルで洗浄し、真空下で乾燥させた。支持体をチューブに移し、NaN₃をDMFに添加した。支持体を1.3時間にわたり65℃に加熱し、DMFで3回、DCMで3回洗浄した後、標準条件下で切断した。非アミダイトDBCO修飾は、NHSエステル合成後コンジュゲーション（クリックケミストリーツール）に

50

より導入された。アジド及びDBCO NHSの両方のコンジュゲーションは、50/50アセトニトル0.2Mリン酸緩衝液(pH11)v/v溶液中で3時間実施した。

【0582】

アニERING：3本以下の一本鎖で構成される多重鎖構築物の場合、FVII及びmTTR一本鎖のアニERINGは、センス及びアンチセンス一本鎖の等モル混合物を混合することによって実施した。相補的な一本鎖を組み合わせた後、混合物を凍結乾燥して乾燥させた。次に、粉末を1XPBS緩衝液で再構成した。全ての場合において、非変性IEX-HPLC法は、単一実体の多重鎖構築物に対応する単一のクロマトグラムピークの存在を示した。

【0583】

インビボ研究：全ての動物は病原体のない環境で飼育され、動物を含む全ての手順は、該当する地域、州及び連邦の規制に従って実施され、動物実験委員会(Animal Care and Use Committee)(IACUC)によって承認された。雌C57BL/6マウス(7~8週齢)は、Charles River Labsから入手した。Bis-siRNA化合物(FVII及びTTRを標的とする)を滅菌PBSで適切な濃度に希釈した。マウスは、0日目に10mL/kg容量の皮下(s.c.)注射によりPBS又はBis-siRNA化合物のいずれかを投与された。血液試料は、様々な時点(0日目[投与前]、7日目、14日目、21日目及び28日目)での後眼窩採血によって動物から収集され、血清へと処理された(Microtainer Serum Separator Tubes; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)。第VII因子タンパク質の血清レベルは、活性ベースの発色アッセイ(Biophen FVII, Aniara Corporation, Mason, OH)を使用して決定された。TTRタンパク質の血清レベルは、マウスTTR ELISAを使用して決定された。表9に実験設計をまとめる。

【0584】

10

20

30

40

50

【表 9】

表 9: マウス PD 研究設計; 糖及び「クリック」リンカー

群#	被験物質	リンカー	動物の数	時点	用量 (mg/kg)
1	PBS	-	3	0 日目、7 日目、 14 日目、21 日目、28 日目	-
2	1:1 混合物	-			1+1 mg/kg
3	AM-133	3X Q113:ガラクトース-C5			2 mg/kg
4	AM-137	3X Q115:グルコース-C5			
5	AM-141	3X Q117: NAc グルコサミン-C5			
6	AM-142	2X Q304:GalNAc-C5			
7	AM-143	3X Q304:GalNAc-C5			
8	AM-147	3X Q306:マノース(manose)-C5			
9*	AM-163	Q327GfAfUf:5'-3' 19 mer (4PS)			
10*	AM-164	Q328GfAfUf:5'-5' 19 mer (6PS)			
11*	AM-165	Q327GfAfUf:5'-3' 21 mer (4PS)			
12*	AM-166	Q324Q303Q303Q303dA:5'-3' 21mer (4PS)			
13	AM-156	GfAfUf (6PS)			

*「クリック」多重鎖設計

【0585】

マウス TTR 血清タンパク質法: TTR 血清タンパク質は、市販の酵素結合免疫吸着アッセイ、41-ALBMS-E01 (ALPCO, Salem, NH) を、製造業者の説明書に従って使用して定量した。簡潔には、血清試料を 1X ALPCO キット希釈緩衝液で 4000 倍に希釈した。8 ポイントのマウス TTR 標準曲線は、0~1000 ng/mL の範囲の 2.5 倍段階希釈を使用して作成された。標準物及び試料 (100 uL) をプレートに添加し、室温で 30 分間インキュベートした。プレートを 1X ALPCO キット洗浄緩衝液で洗浄し、安定化緩衝液中の西洋ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲートしたアフィニティー精製抗ブレアルブミン抗体と共に室温で 20 分間インキュベート

した。ALPCOキット1X洗浄緩衝液で洗浄した後、プレート室温、暗所で10分間、pH3.3でクエン酸緩衝液中の3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン (TMB) 及び過酸化水素と共にインキュベートした。1ウェルあたり0.3mLの硫酸100μLで反応をクエンチした。405nmでの吸光度をSpectraMaxプレートリーダーで読み取り、Softmax Proソフトウェアで計算した4パラメーター曲線 ($y = (A - D) / (1 + (x / C)^B) + D$) にデータを適合させて、ug/mLで表される血清TTRタンパク質レベルを決定した。各時点でのタンパク質レベルは、ビヒクル対照血清タンパク質値のそれぞれのグループ平均に対して正規化された。

【0586】

インビボ研究の結果：上記のように、28日目まで毎週の時点で試料採取した。試料をTTF及びF7レベルについて分析し、混合物と比較した。結果を図11及び12に示す。図11は経時的なF7ノックダウンを示し、図12は経時的なTTRノックダウンを示す。

【0587】

実施例7：アンモニア水溶液中のオリゴヌクレオチドを含有する5'-[O, O-ビス(ピバロイルオキシメチル)]-(E)-ビニルホスホネートの脱保護のためのスカベンジャー添加剤としてのN, N-ジエチルアミン

5'-(E)-ビニルホスホネート (VP) は、低分子干渉RNA (siRNA) における天然の5'-リン酸の効果的な生物学的等価体である。VP-siRNAの固相合成には、最適なオリゴヌクレオチド脱保護条件と組み合わせて適切に保護されたVP-ホスホラミダイトの使用が必要である。標準のアンモニア水溶液脱保護条件に3% (v) の原液ジエチルアミンを添加すると、5'-[O, O-ビス(ピバロイルオキシメチル)] (POM) で保護されたVPオリゴヌクレオチドのクリーンで迅速なワンステップ脱保護が可能になり、副反応及び不純物が最小限に抑えられ、VPオリゴヌクレオチド合成の範囲を大幅に拡大する。

【0588】

近年、オリゴヌクレオチド (ON) ベースの治療法、特にRNA干渉 (RNAi) ベースの治療法は、様々な疾患適用に対して臨床的有用性が実証されている [(a) Selvam, C., Mutisya, D., Prakash, S., Ranganna, K. & Thilagavathi, R. Therapeutic potential of chemically modified siRNA: Recent trends. Chem. Biol. Drug Des. 90, 665-678 (2017); (b) Stein, C. A. & Castanotto, D. FDA-Approved Oligonucleotide Therapies in 2017. Molecular Therapy 25, 1069-1075 (2017); (c) Titze-de-Almeida, R., David, C. & Titze-de-Almeida, S. S. The Race of 10 Synthetic RNAi-Based Drugs to the Pharmaceutical Market. Pharm. Res. 34, 1339-1363 (2017)]。最近、遺伝性ATTRアミロイドーシスを有する患者におけるパチシランのAPOLLO第3相臨床試験の肯定的な結果により、患者にRNAiベースの治療法をもたらす見込みが現実化した [(a) Adams, D., Gonzalez-Duarte, A., O'Riordan, W., Yang, C. C., Yamashita, T., Kristen, A., Tournev, I., Schmidt, H., Coelho, T., Berk, J., Lin, K. P., Sweetser, M., Gandhi, P., Chen, J., Gollob, J. & Suhr, O. B. Patisiran, an investigational RNAi therapeutic for the treatment of hereditary ATTR amyloidosis with polyneuropathy: results from the phase 3 APOLLO study. EU ATTR Meeting, November 2, 2017, Paris, <http://www.alnylam.com>

10

20

30

40

50

om/wp-content/uploads/2017/2011/EU-ATTR
2017_APOLLOTRL_CAPELLA_FINAL_2012_Nov201
7.pdf (2017) ; (b) Adams, D. , Suhr, O. B. , Dyck, P
. J. , Litchy, W. J. , Leahy, R. G. , Chen, J. , Gollo
b, J. & Coelho, T. Trial design and rationale
for APOLLO, a Phase 3, placebo-controlled s
tudy of patisiran in patients with heredit
ary ATTR amyloidosis with polyneuropathy.
BMC Neurol 17, 181 (2017)]。siRNAの化学的修飾は、代謝の
不安定性、免疫刺激並びに全体的に不利な生体内分布及び薬物動態に対処することにより
、薬物のような特性をもたらすために必要である [(a) Manoharan, M. & R
ajeev, K. G. Utilizing chemistry to harness
RNA interference pathways for therapeutic
s: chemically modified siRNAs and antagomi
rs. (CRC Press LLC, 2008) ; (b) Shen, X. & Corey,
D. R. Chemistry, mechanism and clinical stat
us of antisense oligonucleotides and dupl
ex RNAs. Nucleic Acids Research, 10.1093/na
r/gkx1239 (2017)]。これは、N-アセチルガラクトサミン (GalNA
c) - siRNAコンジュゲートの開発に特に影響を与え [Nair, J. K. , Wil
loughby, J. L. S. , Chan, A. , Charisse, K. , Alam,
M. R. , Wang, Q. , Hoekstra, M. , Kandasamy, P. , Ke
l' in, A. V. , Milstein, S. , Taneja, N. , O' Shea, J.
 , Shaikh, S. , Zhang, L. , van der Sluis, R. J. , Ju
ng, M. E. , Akinc, A. , Hutabarat, R. , Kuchimanch
i, S. , Fitzgerald, K. , Zimmermann, T. , van Ber
kel, T. J. C. , Maier, M. A. , Rajeev, K. G. & Manoha
ran, M. Multivalent N-Acetylgalactosamine-
Conjugated siRNA Localizes in Hepatocytes
and Elicits Robust RNAi-Mediated Gene Sil
encing. J. Am. Chem. Soc. 136, 16958-16961 (201
4) .]、臨床試験への急速な進展を可能にした [(a) Fitzgerald, K. ,
White, S. , Borodovsky, A. , Bettencourt, B. R. ,
Strahs, A. , Clausen, V. , Wijngaard, P. , Horton
 , J. D. , Taubel, J. , Brooks, A. , Fernando, C. , Ka
uffman, R. S. , Kallend, D. , Vaishnav, A. & Simon
 , A. A highly durable RNAi therapeutic inhi
bitor of PCSK9. N. Engl. J. Med. 376, 41-51 (201
7) ; (b) Pasi, K. J. , Rangarajan, S. , Georgiev, P
. , Mant, T. , Creagh, M. D. , Lissitchkov, T. , Bev
an, D. , Austin, S. , Hay, C. R. , Hegemann, I. , Kaz
mi, R. , Chowdary, P. , Gercheva-Kyuchukova, L.
 , Mamonov, V. , Timofeeva, M. , Soh, C. -H. , Garg,
P. , Vaishnav, A. , Akinc, A. , Sorensen, B. & Ragn
i, M. V. Targeting of Antithrombin in Hemoph
ilia A or B with RNAi Therapy. N Engl J Med
377, 819-828 (2017) ; (c) Zimmermann, T. S. , Kar
sten, V. , Chan, A. , Chiesa, J. , Boyce, M. , Bette
ncourt, B. R. , Hutabarat, R. , Nochur, S. , Vaish
nav, A. & Golllob, J. Clinical Proof of Concept

10

20

30

40

50

for a Novel Hepatocyte-Targeting GalNAc-siRNA Conjugate. *Mol. Ther.* 25, 71-78 (2017)].
[0589]

GalNAc-siRNAコンジュゲートでは、高い*in vivo*効力と作用持続時間を達成するために、2'-O-メチル(OMe)及び2'-デオキシ-2'-フルオロ(F)などのリボース修飾の使用が不可欠であった[(a) Foster, D. J., Brown, C. R., Shaikh, S., Trapp, C., Schlegel, M. K., Qian, K., Sehgal, A., Rajeev, K. G., Jadhav, V., Manoharan, M., Kuchimanchi, S., Maier, M. A. & Milstein, S. Advanced siRNA Designs Further Improve *in vivo* Performance of GalNAc-siRNA Conjugates. *Molecular Therapy*, doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.1012.1021 (2018); (b) Nair, J. K., Attarwala, H., Sehgal, A., Wang, Q., Aluri, K., Zhang, X., Gao, M., Liu, J., Indrakanti, R., Schofield, S., Kretschmer, P., Brown, C. R., Gupta, S., Willoughby, J. L. S., Boshart, J. A., Jadhav, V., Charisse, K., Zimmermann, T., Fitzgerald, K., Manoharan, M., Rajeev, K. G., Akin, A., Hutabarat, R. & Maier, M. A. Impact of enhanced metabolic stability on pharmacokinetics and pharmacodynamics of GalNAc-siRNA conjugates. *Nucleic Acids Res* 45, 10969-10977 (2017)]. しかし、実質的な化学修飾は、siRNAの内因性5'-ターリン酸化を妨げ得る。実際、Clp1キナーゼ媒介性siRNAアンチセンス鎖のリン酸化は、RNA誘導サイレンシング複合体(RISC)のアルゴノート(Ago2)タンパク質への効果的なローディングをもたらして、遺伝子サイレンシングを誘発する、重要なステップである[(a) Weitzer, S. & Martinez, J. The human RNA kinase hClp1 is active on 3' transfer RNA exons and short interfering RNAs. *Nature* 447, 222-226 (2007); (b) Schirle, N. T., Kinberger, G. A., Murray, H. F., Lima, W. F., Prakash, T. P. & MacRae, I. J. Structural Analysis of Human Argonaute-2 Bound to a Modified siRNA Guide. *J. Am. Chem. Soc.* 138, 8694-8697 (2016); (c) Tolia, N. H. & Joshua-Tor, L. Slicer and the Argonautes. *Nat. Chem. Biol.* 3, 36-43 (2006)]. さらに、5'-ターリン酸はリソソームコンパートメント内のホスファターゼによって急速に加水分解されるため、アンチセンス鎖への未修飾の5'-ターリン酸の化学的導入は、このリン酸化の問題を回避しない[Lima, W. F., Prakash, T. P., Murray, H. M., Kinberger, G. A., Li, W., Chappell, A. E., Li, C. S., Murray, S. F., Gaus, H., Seth, P. P., Swayze, E. E. & Crooke, S. T. Single-Stranded siRNAs Activate RNAi in Animals. *Cell* 150, 883-894 (2012)]. 最近、治療用siRNAにおける使用のための幾つかのホスファターゼ安定リン酸模倣体が開発された[(a) Haraszti, R. A., Roux, L., Coles, A. H., Turanov, A. A., Alterman, J. F., Echeverria, D., Godinho, B. M., Aronin, N. & Khvorova, A. 5'-Vinylphosphonate improves tissue accumulation and efficacy of conju

10

20

30

40

50

gated siRNAs in vivo. *Nucleic Acids Research* (2017); (b) Parmar, R., Willoughby, J. L. S., Liu, J., Foster, D. J., Brigham, B., Theile, C. S., Charisse, K., Akin, A., Guidry, E., Pei, Y., Strapps, W., Cancilla, M., Stanton, M. G., Rajeev, K. G., Sepp-Lorenzino, L., Manoharan, M., Meyers, R., Maier, M. A. & Jadhav, V. 5'-(E)-Vinylphosphonate: A Stable Phosphate Mimic Can Improve the RNAi Activity of siRNA-GalNAc Conjugates. *ChemBioChem* 17, 985-989 (2016); (c) Prakash, T. P., Lima, W. F., Murray, H. M., Li, W., Kinberger, G. A., Chappell, A. E., Gaus, H., Seth, P. P., Bhat, B., Crooke, S. T. & Swayze, E. E. Identification of metabolically stable 5'-phosphate analogs that support single-stranded siRNA activity. *Nucleic Acids Res.* 43, 2993-3011 (2015) (d) Zlatev, I., Foster, D. J., Liu, J., Charisse, K., Brigham, B., Parmar, R. G., Jadhav, V., Maier, M. A., Rajeev, K. G., Egli, M. & Manoharan, M. 5'-C-Malonyl RNA: Small Interfering RNAs Modified with 5'-Monophosphate Bioisostere Demonstrate Gene Silencing Activity. *ACS Chemical Biology* 11, 953-960 (2016)]. それらの中で、(E)-ビニルホスホネート (VP) は、天然の5'-リン酸の最も効果的な生物学的等価体であることが証明されている [(a) Elkayam, E., Joshua-Tor, L., Parmar, R., Brown, C. R., Willoughby, J. L., Theile, C. S. & Manoharan, M. siRNA carrying an (E)-vinylphosphonate moiety at the 5' end of the guide strand augments gene silencing by enhanced binding to human Argonaute-2. *Nucleic Acids Res* 45, 3528-3536 (2017); (b) Prakash, T. P., Kinberger, G. A., Murray, H. M., Chappell, A., Riney, S., Graham, M. J., Lima, W. F., Swayze, E. E. & Seth, P. P. Synergistic effect of phosphorothioate, 5'-vinylphosphonate and GalNAc modifications for enhancing activity of synthetic siRNA. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 26, 2817-2820 (2016)]. siRNAのアンチセンス鎖の5'末端に付加した場合、VPは、インビボで代謝安定性の増強及び効力の増強を提供した。

【0590】

VP-siRNAの効率的な固相合成には、最適なON脱保護条件と組み合わせて適切に保護されたVP-ホスホラミダイトが必要である。VP-siRNA合成の第1の反復は、ON合成中の5'-(O, O-ジエチル) VPホスホラミダイトの使用であった。しかし、2つのVPエチル基の除去には、ヨウ化トリメチルシリル及びメルカプトエタノールを使用して、固体支持体に付着したままのONで実施される過酷な脱保護条件が必要であり、これにより、分解及び／又は副生成物が生じ、収率の低下につながる。別のVP保護基である5'-[O, O-ビス(ピバロイルオキシメチル)] (POM) VPは、標準的な固相合成との互換性がより高く、5'-ホスホネート修飾ONの大規模合成を促進及び可能にし得る [Parmar, R., Brown, C. R., Matsuda, S., Wil

Loughby, J. L., Theile, C. S., Charisse, K., Foster, D. J., Zlatev, I., Jadhav, V., Maier, M. A., Egli, M., Manoharan, M. & Rajeev, K. G. Facile Synthesis, Geometry and 2'-Substituent-Dependent In Vivo Activity of 5'-(E)- and 5'-(Z)-Vinylphosphonate-Modified siRNA Conjugates. J. Med. Chem. DOI:10.1021/acs.jmedchem.7b01147 (2018)]。

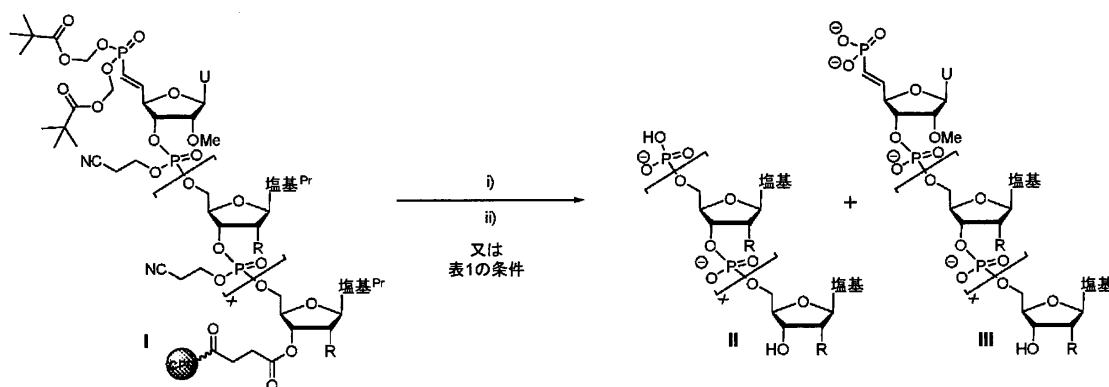
【0591】

結果及び考察

POM VP脱保護の最適条件が本明細書において確立され、クリーンで迅速なワンステップ手順を提供し、副反応及び不純物を最小限に抑え、VP ON合成の範囲を大幅に拡大する。(i) アセトニトリル中の塩基溶液(例えば、ジエチルアミン又はピペリジン)の定常流による支持体結合POM VP ONの処理[Capaldi, D. C., Gaus, H., Krotz, A. H., Arnold, J., Carty, R. L., Moore, M. N., Scozzari, A. N., Lowery, K., Cole, D. L. & Ravikumar, V. T. Synthesis of High-Quality Antisense Drugs. Addition of Acrylonitrile to Phosphorothioate Oligonucleotides: Adduct Characterization and Avoidance. Organic Process Research & Development 7, 832-838 (2003)]、その後の(ii) 飽和(28~30%-w/v)アンモニア水溶液(水酸化アンモニウム溶液)との固体支持体のインキュベーションを含む標準的な2ステップのON脱保護プロトコルが最初に適用された。POM VP 5'末端ヌクレオチドの存在は、塩基媒介性鎖切断を誘導することが見出された: 5'末端ヌクレオチドは、VP化合物Iから失われ、所望の完全長VP化合物IIIの主要な不純物(-317 amu、約20%)として、対応するN-1構造IIに5'-リン酸が付着したままとなる。スキーム34は、脱保護スキーム並びに化合物I、II及びIIIを示す。脱保護は、上記の(i)及び(ii)の2ステッププロトコル又は7(下記)に示す条件を使用することによって行うことができる。

【化86】

スキーム34



塩基=所与の位置のA、C、G、U又はT
塩基Pr:環外保護アミン:A(Bz)、C(Ac)又はG(ibz)、及びT又はU
R = H, F, OMe

【0592】

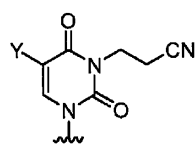
特定のいかなる理論にも拘束されることなく、末端5'-ヌクレオチドにPOM VPホ

スホノトリエステルが存在する場合、VPホスホノトリエステル部分内で結果として生じる負電荷を非局在化する可能性があるため、その4'プロトンは特に塩基に対して不安定であると仮定される。これにより、脱離基が3'-O-リン酸であり、残りがONである、β脱離反応が起こる。一方、支持体上ピペリジン処理を実施しなかった場合（スキーム34、ステップ(ii)のみ）、N-1化合物II（-317 amu）は観察されなかった。しかし、カラム上の塩基処理がない場合、リン酸保護シアノエチル基から放出されたアクリロニトリルを下のウラシル塩基構造AのN¹位に付加することにより得られる、大量のアクリロニトリル付加物（+53 amu）が検出された。

【0593】

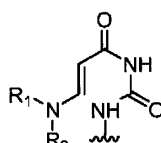
これらのアクリロニトリル付加物を回避する方法は、単一ステップのアンモニア処理を、アクリロニトリルの効果的なスカベンジャーとなると考えられる、より求核性の高い塩基（例えば、メチルアミン）に置き換えることである。しかし、より強力な求核性アミンを使用すると、脱ピリミジン化分解カスケードにおける中間のC-6位へのアミンの求核付加（構造B）によって得られる、別のウラシル塩基不純物が生成され得る [(a) Dellinger, D. J., Timar, Z., Myerson, J., Sierzchala, A. B., Turner, J., Ferreira, F., Kupihar, Z., Dellinger, G., Hill, K. W., Powell, J. A., Sampson, J. R. & Caruthers, M. H. Streamlined Process for the Chemical Synthesis of RNA Using 2'-O-Thionocarbamate-Protected Nucleoside Phosphoramidites in the Solid Phase. Journal of the American Chemical Society 133, 11540-11556 (2011); (b) Shetlar, M. D., Hom, K. & Venditto, V. J. Photohydrate-Mediated Reactions of Uridine, 2'-Deoxyuridine and 2'-Deoxycytidine with Amines at Near Neutral pH. Photochemistry and Photobiology 89, 869-877 (2013)]。

【化87】



A

Y = H, Me



B

R₁ = Me, n-Bu, n-Pr; R₂ = H
R₁, R₂ = Et

【0594】

チミン及びウラシルは、不純物としてA及びBを生成するのに最も感受性の高い核酸塩基であると報告されている。構造Aはウラシル（Y = H）又はチミン（Y = Me）のN¹-シアノエチル付加物であり、構造BはウラシルのC-6アミノ付加物である。「最悪の場合」のON-1、交互の2'-デオキシチミジン-2'-フルオロウリジン20-mer（表9）が実験のために選択された。2'-デオキシチミジンは、アクリロニトリル付加に対して最も感受性の高いヌクレオチドであることがよく知られている [Umemoto, T. & Wada, T. Nitromethane as a scavenger of acrylonitrile in the deprotection of synthetic oligonucleotides. Tetrahedron Letters 46, 4251-4253 (2005)] 一方、2'-フルオロウリジンは、メチルア

ミンなどの強アミン塩基によって容易に分解される。ON-1は、最適な条件をPOM VP ONに変換する前に、核酸塩基不純物A及びBを狭く探索することに焦点を当てた実験を可能にした。

【0595】

制御された細孔ガラス（CPG）固体支持体からのON-1の切断は、最初に4つの一般的に使用される脱保護条件を使用して実施された（表9、エントリー1～4）：エントリー1：35℃で20時間、28～30%アンモニア水溶液との直接インキュベーション；エントリー2：60℃で15分間、40%w/vメチルアミン水溶液とのインキュベーション；エントリー3：室温で3時間、1：1（v/v）のアンモニアとメチルアミン混合物（AMA）とのインキュベーション；エントリー4：ACN中5%ピペリジンのフローで15分間にわたり3回CPGを洗浄することによる前処理の後、35℃で20時間、アンモニア水溶液とのインキュベーション。単一のアンモニアインキュベーション試料は、大量の+53amuアクリロニトリル付加物を示した（エントリー1、表10）。一方、POMで保護されたVP ONの脱保護の現在の標準であるメチルアミンによる迅速な処理は、ウラシル（及びチミン）塩基へのメチルアミンの大量の付加物を示した（エントリー2、表10）。同様の有意なメチルアミン付加物（c. a. 20%）もAMA処理で観察された（エントリー3、表10）。VP ON脱保護（スキーム1）とは互換性がないが、ピペリジンで前処理した支持体条件（エントリー4、表10）は、ON-1にアクリロニトリルもアミン付加物も示さず、本発明者らが将来の最適な脱保護条件を探索する上でエミュレートするベンチマークとして設定された。

【0596】

これらのベンチマーク研究に続いて、本発明者らは、アクリロニトリルを捕捉するために、カラム上のピペリジン処理を、アンモニア脱保護溶液への様々なアミンの直接的付加に置き換えることにした。この処理は、VP関連のN-1不純物を排除すると同時に、全ての核酸塩基付加物不純物を最小限に抑えるように設計されている。

【0597】

メチルアミン、n-ブチルアミン、n-プロピルアミン又はジエチルアミン（これらは全て容易に入手でき、安価である）は、35℃で20時間にわたりON-1を切断する間、スカベンジャー（3%、v/v）としてアンモニア水溶液に添加した（表9）。他のより疎水性の高いアミンは、本発明者らの以前の経験ではリン酸骨格に結合する傾向があり、精製中に分離することが難しいため、これらの研究に含まれなかった。さらに、前述のアクリロニトリルスカベンジャーであるニトロメタンは良好な結果を示したが、培地の色が濃くなり、分析及び精製が困難となった（補足情報に例）。観察された主な副産物（A及びB）は、RP-HPLC/MS分析によって定量化された。滞留時間のシフトが明確であるため、アミン付加物のピークはLC/MS分析で簡単に定量できる一方で、アクリロニトリル付加物は、主生成物のピークと共溶出する傾向があり、LC/MSで測定された相対存在量のみ報告することができた（表10）。

【0598】

【表 10】

表 10:様々な条件での固体支持体結合ポリ-(2'-デオキシチミジン-2'-フルオロウリジン)ON(ON-1)及び POM VP ON(ON-2)の脱保護。

エントリー	ON ^{a,b}	脱保護条件	アクリロニトリル 付加物 A ^c	アミン 付加物 B ^c
1	ON-1	28-30% (w/v) NH ₄ OH, 35 °C, 20 時間	9.9%	n.d. ^d
2	ON-1	40% (w/v) メチルアミン, 35 °C, 20 時間	n.d.	19.2%
3	ON-1	40% (w/v) メチルアミン/NH ₄ OH – 1:1 (v/v, AMA), 室温, 2 時間	n.d.	21.5%
4	ON-1	5% (v/v) ピペリジンによる前処理, 定常流, 3×5 分, 続いて NH ₄ OH, 35°C, 20 時間	n.d.	n.d.
5	ON-1	NH ₄ OH 中 3% (v/v) メチルアミン, 35 °C, 20 時間	7.4%混合物	
6	ON-1	NH ₄ OH 中 3% (v/v) <i>n</i> -プロピルアミン, 35 °C, 20 時間	2.0%	7.7%
7	ON-1	NH ₄ OH 中 3% (v/v) <i>n</i> -ブチルアミン, 35 °C, 20 時間	2.6%	6.7%
8	ON-1	NH ₄ OH 中 3% (v/v) ジエチルアミン, 35 °C, 20 時間	1.9%	1.4%
9	ON-1	NH ₄ OH 中 3% (v/v) ジエチルアミン, 60 °C, 5 時間	2.8%	n.d.
10	ON-1	NH ₄ OH 中 5% (v/v) ジエチルアミン, 35 °C, 20 時間	1.6%	1.4%
11	ON-1	NH ₄ OH 中 5% (v/v) ジエチルアミン, 60 °C, 5 時間	2.1%	2.3%
12	ON-2	40% (w/v) メチルアミン, 60 °C, 15 分	n.d.	5.5%
13	ON-2	5% (v/v) ピペリジンによる前処理, 定常流, 3×5 分, 続いて NH ₄ OH, 35°C, 20 時間	n.d.*	n.d.*
14	ON-2	28-30% (w/v) NH ₄ OH, 35 °C, 20 時間	4.3%	n.d.
15	ON-2	NH ₄ OH 中 3% (v/v) メチルアミン, 35 °C, 20 時間	n.d.	3.8%
16	ON-2	NH ₄ OH 中 3% (v/v) ジエチルアミン, 35 °C, 20 時間	n.d.	n.d.
17	ON-2	NH ₄ OH 中 3% (v/v) ジエチルアミン, 60 °C, 5 時間	n.d.	n.d.

^{a,b} スキーム 1 及び表 1 の条件に従って、50mg の CPG 支持体(約 80μmol/g)を、ON-1 又は ON-2 と共に、脱保護溶液 1000μL でインキュベートした。

^aON-1 の配列:5'-UdTUdTUdTUdTUdTUdTUdTUdTUdTUdTU-3'(式中、U は 2'-フルオロウリジン、dT は 2'-デオキシチミジン、u は 2'-*O*-メチルウリジン)。

^bON-2 の配列:5'-(VP)uUuCGAaUcAaucCaAcAgUagu-3'(式中、小文字のヌクレオチドは 2'-*O*-メチル、大文字斜体のヌクレオチドは 2'-フルオロ)。

^c260nm での UV-LC/MS スペクトルの粗物質のピークを積分することによって計算された不純物のパーセンテージ。RP-LC/MS は C8 カラムで実行した。

^dn.d. – 検出されず (<1.0%)。

*スキーム 34 に記載されているように、19.4%の N-1 生成物(-317.29 amu)の形成。

【0599】

これらの実験から、使用した他のアミンと比較して、3%ジエチルアミン(DEA)は、生成される両方の核酸塩基付加物の量を最小限に抑えながら、生成物の純度及び収率の点で優れた結果をもたらすと判定された(表10、エントリー5~8)。これらの結果に基づいて、プロピルアミン及びブチルアミンはこれ以上考察しなかった。さらに、60°Cで5時間の3%DEAアンモニアとのインキュベーション(表10、エントリー9)は、35°Cで20時間のインキュベーションとほぼ同一の結果を提供し、必要に応じて、柔軟性及び脱保護時間の短縮を可能にした。3%DEA溶液は、全体的に最も効果的であるが、アクリロニトリル付加物を完全には除去しなかった。したがって、本発明者らは、5%

DEA (v/v) 溶液の増加により、35℃及び60℃でON-1によるこのような不純物が減少するかどうかを試験した(表10、エントリー10及び11)。しかし、3% DEA 溶液で観察されたように、ほぼ区別できない結果が得られた。

【0600】

次に、これらの同じ試験条件を、2'-F/OMe 化学修飾を有するオリゴヌクレオチド及びPOM保護VP(ON2、表10)に適用した。この場合も、60℃で15分間のメチルアミン処理の以前の標準では、大量のメチルアミン付加物が示されたが(表10、エントリー12)、ピペリジンによる前処理は、N-1生成物を引き起こし(エントリー13)、純粋なアンモニアは大量のアクリロニトリル付加物があった(表10、エントリー14)。スカベンジャーアミンを3%溶液(メチルアミン及びDEA)として試験した場合、アクリロニトリル付加物はほとんど存在せず、N-1+リン酸塩は見られなかった(表10、エントリー15~16)。しかし、メチルアミンの場合にアミン付加物が観察されたのに対し、DEA条件では検出可能な付加物は観察されなかった。表11に示すように、アンモニア溶液中の3%DEAの結果は、ホスホロチオエート修飾の有無にかかわらず、他の幾つかの2'-F/OMe 修飾配列間で繰り返され、アクリロニトリル又はアミン付加物が形成されていないクリーンなプロファイルを示している。同様に、35℃で20時間と60℃で5時間の脱保護を比較によると、ほぼ同一の結果が示され、したがって、必要に応じてより迅速な脱保護が可能となった。

【0601】

【表11】

表 11:アンモニア水溶液中の最適な 3%ジエチルアミンスカベンジャーを使用した、様々なスケールでの固体支持体結合 POM VP ON の脱保護。35℃で 20 時間(ON-3 ~ ON-6)又は 60℃で 5 時間(ON-7)のインキュベーション。

スケール (μmol)	^a ON	配列 ^b	アクリロニトリル 付加物 A ^c	アミン付加物 B ^c
10	ON-3	(VP)u•U•agaAaUAagugGuAgucac•u•u	n.d. ^d	n.d.
10	ON-4	(VP)u•U•ucuGgCAuuuUcAuuugu•u•a	n.d.	n.d.
100	ON-5	(VP)uAaagCacuuuauUgAguuuc•u•g	n.d.	n.d.
100	ON-6	(VP)uCguuUucaagcAcUuuauu•g•a	n.d.	n.d.
320	ON-7	(VP)u•A•uugAcCCaaaaUuCaacaa•u•g	n.d.	n.d.

^a使用された CPG 支持体の量及びローディングに基づく。

^b小文字のヌクレオチドは 2'-O-メチル、大文字斜体のヌクレオチドは 2'-フルオロである。•は、ヌクレオチド間のホスホロチオエートジエステル結合である。

^c260nm での UV-LC/MS スペクトルの粗物質のピークを積分することによって計算された不純物のパーセンテージ。RP-LC/MS は C8 カラムで実行した。

^dn.d. - 検出されず (<1.0%)。

【0602】

POMで保護されたVP部分は、標準的なオリゴヌクレオチド脱保護試薬を使用して容易に脱保護できる、安定したリン酸模倣体である。望ましくない副生成物を引き起こすジエチルアミン又はピペリジン溶液で前処理する代わりに、本明細書に記載のアンモニア水溶液中のDEAの3%溶液を35℃で20時間又は60℃で5時間の切断に使用して、後続のイオン交換又は逆相精製で良好な収率及び純度の粗ONを得ることができる。本明細書で報告される条件は、従来の脱保護中に観察されるアクリロニトリル及びメチルアミン

付加物を最小限に抑え、より高い収率を提供し、POM保護VPを伴う又は伴わない他のオリゴヌクレオチドの一般的な脱保護として使用され得る。

【0603】

実施例8：siRNAのスレオフラノシル核酸（TNA）遺伝子サイレンシング活性（3'－2'）ホスホジエステル骨格（TNA）を有するα－（L）－スレオフラノシル核酸は、代替の核酸である [Schoning, K. U. et al. Science 2000, 290, 1347]。TNAの糖リン酸骨格と、比較のためにRNAを、図13に示す。TNAは、非天然の4炭素のトレオース糖で構成されており、安定した逆平行のワトソン－クリック二本鎖構造の形成を可能にする固有の糖リン酸骨格を有する。TNAはまた、DNA及びRNAの相補鎖との効率的なクロスヘアリングを示し、生物学的に適切な条件下で強力なヌクレアーゼ安定性を示す。TNAは、その塩基対形成特性及び構造的特徴に関してよく研究されてきたにもかかわらず [(a) Wilds, C. J. et al. J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 13716. (b) Pallan, P. S. et al. Angew. Chem. Int. Ed. 2003, 42, 5893. (c) Anosova I. et al. ChemBioChem 2016, 17, 1705. (d) Ebert, M. O. et al. J. Am. Chem. Soc. 2008, 130, 15105. (e) Schoning, K. U. et al. Helv. Chim. Acta 2002, 85, 399]、短鎖干渉RNA（siRNA）におけるその潜在的な用途についてはほとんど知られていない。

【0604】

例示的なsiRNA修飾は、5'－メチル [Kel'in, A. V. et al. J. Org. Chem. 2016, 81, 2261]、siRNA-GalNAcコンジュゲート [(a) Nair, J. K. et al. J. Am. Chem. Soc. 2014, 136, 16958. (b) Matsuda, S. et al. ACS Chem. Biol., 2015, 10, 1181. (c) Rajeev, K. G. ChemBioChem 2015, 16, 903. (d) Nair, J. K. et al. Nucleic Acids Res. 2017, 45, 10969. (e) Meade, B. R. et al. Nature Biotechnol. 2014, 32, 1256]、4'－修飾 [(a) Liboska, R. et al. Org. Biomol. Chem. 2011, 9, 8261. (b) Martinez-Montero, S. et al. ACS Chem. Biol., 2015, 10, 2016. (c) Malek-Adamian, E. et al. J. Am. Chem. Soc. 2017, 139, 14542. (d) Malek-Adamian, E. et al. J. Org. Chem. 2018, doi:10.1021/acs.joc.8b01329. (e) Harp, J. M. et al. Nucleic Acids Res. 2018, doi:10.1093/nar/gky703]、GNA [(a) Schlegel, M. K. et al. J. Am. Chem. Soc. 2017, 139, 8537. (b) Janas, M. M. et al. Nature Communications 2018, 9, 723] 及びビニルホスホネート [(a) Parmar, R. et al. ChemBioChem 2016, 17, 985. (b) Elkayam, E. et al. Nucleic Acids Res. 2017, 45, 3528. (c) Parmar, R. G. et al. J. Med. Chem. 2018, 61, 734. (d) Schirle, N. T. et al. J. Am. Chem. Soc. 2016, 138, 8694] である。

【0605】

TNAホスホラミダイト構成要素は、スキーム35に示されるように最適化された合成条件を使用して、合成し、siRNAに組み込むことができる [Sau, S. P. et al. J. Org. Chem., 2016, 81, 2302]。オリゴヌクレオチド代謝安定性、二本鎖熱安定性及びsiRNAのインビトロ遺伝子サイレンシング活性に対するTNA組み込みの効果を評価した。

10

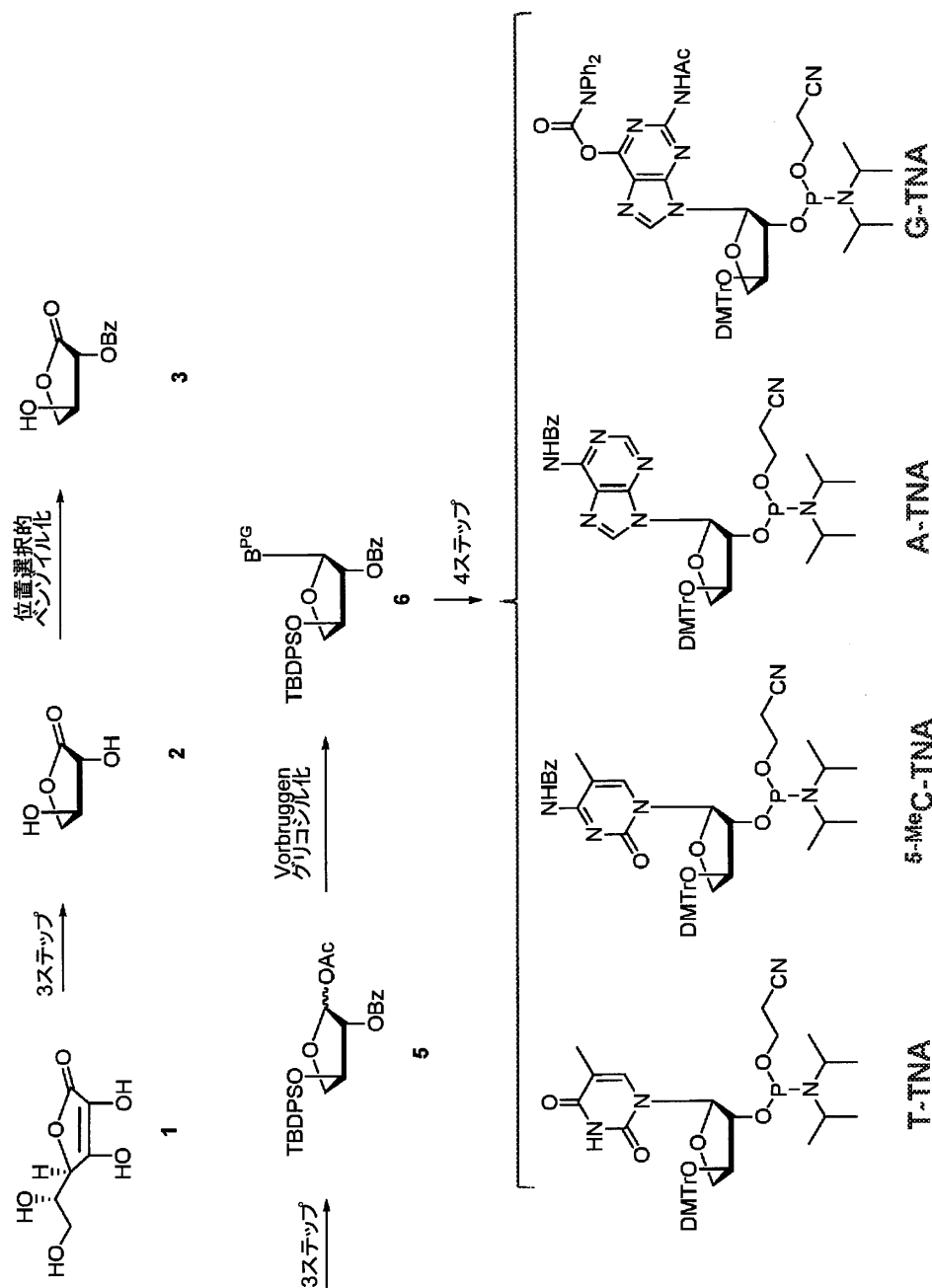
20

30

40

50

【化 8 8】



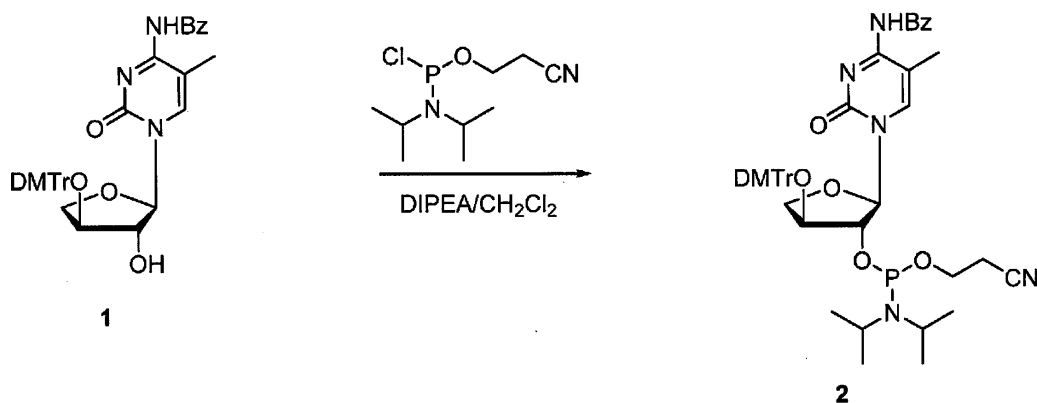
詳細はS. P. *et al.* *J. Org. Chem.*, **2016**, *81*, 2302を参照。

【 0 6 0 6 】

5-MeC-TNA（化合物2）の合成：TNA構成要素5-MeC-TNAの調製例をスキーム36に示す。

【化 8 9】

スキーム36



化合物2の合成：CH₂Cl₂（40mL）中の化合物1（5.00g、7.89mmol）の溶液に、DIPEA（4.13mL、23.7mmol）及び2-シアノエチルN,N-ジイソプロピルクロロホスホラミダイト（2.11mL、9.47mmol）を0℃で添加した。反応混合物を室温にし、3時間撹拌した。反応混合物をCH₂Cl₂（200mL）で希釈し、次に、飽和NaHCO₃水溶液（100mL）で洗浄した。有機層を分離し、無水Na₂SO₄で乾燥させ、濾過し、濃縮した。粗物質をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン中0～33%EtOAc）で精製して、化合物2（5.90g、7.07mmol、90%、R_f=0.36、ヘキサン中33%EtOAcで展開）を淡黄色の泡状物として得た。¹H NMR（400MHz, DMSO-d₆）：δ 13.40（s, 1H）, 8.30（d, J=7.5Hz, 2H）, 7.83–7.09（m, 13H）, 6.94–6.68（m, 4H）, 5.87–5.59（m, 1H）, 4.30–4.24（m, 1H）, 4.15–4.05（m, 2H）, 3.91–3.47（m, 13H）, 2.72–2.33（m, 3H）, 1.29–0.93（m, 12H）。³¹P NMR（162MHz, CD₃CN）：δ 152.98, 151.73。¹³C NMR（126MHz, CD₃CN）：δ 180.24, 161.79, 159.88, 159.85, 148.60, 145.88, 140.44, 138.41, 136.81, 136.75, 136.72, 136.55, 133.35, 130.93, 130.85, 130.81, 130.54, 129.19, 129.17, 129.13, 128.80, 128.70, 127.99, 127.97, 119.58, 119.32, 118.27, 114.58, 114.51, 114.48, 110.44, 110.34, 93.13, 93.07, 92.88, 92.86, 89.09, 89.03, 81.98, 81.84, 81.72, 78.51, 78.46, 78.17, 78.15, 76.46, 76.34, 59.64, 59.48, 59.45, 59.30, 55.95, 55.93, 44.42, 44.31, 44.24, 44.14, 24.90, 24.87, 24.83, 24.82, 24.77, 24.73, 24.68, 20.87, 20.81, 20.72, 20.66, 13.80, 13.78。

【0607】

3'又は5'特異的エキソヌクレアーゼに対する修飾オリゴヌクレオチドの安定性：オリゴヌクレオチドは、50mM Tris（pH7.2）、10mM MgCl₂又は50mM酢酸ナトリウム（pH6.5）のいずれか（10mM MgCl₂は、3'–又は5'–特異的エキソヌクレアーゼのそれぞれに対する安定性を評価するため）の中で、最終濃度0.1mg/mLで調製した。1mL/分の流量で7.5分間にわたる37～52%の移動相（1M NaBr、20mMリン酸ナトリウム、pH11、15%MeCN；固定相：20mMリン酸ナトリウム、15%MeCN、pH11）の勾配を使用したIEX HPLC（dionex DNAPac PA200, 4×250mm）による分析の前に、エ

キソヌクレアーゼ（3' - 安定性について150 mU/mL SVPDE又は5' - 安定性について500 mU/mLホスホジエステラーゼII）を直ちに添加した。所与の時点で試料を最大24時間分析した。完全長オリゴヌクレオチドの量は、 A_{260} での曲線下面積として決定した。完全長オリゴヌクレオチドのパーセントは、 $t=0$ での曲線下面積で割り、100を掛けることによって計算した。酵素の活性は、末端ホスホロチオエート結合を有するオリゴデオキシチミジレートを含めることにより、各実験について検証した（それぞれ、3' - 又は5' - エキソヌクレアーゼ活性について5' - $\text{Ts} \cdot \text{T}$ 又は5' - $\text{T} \cdot \text{Ts}$ ）。酵素の各アリコートは、実験の直前に解凍した。半減期は、一次速度論に適合させることによって決定した。

【0608】

3' - エキソヌクレアーゼに対するTNA修飾オリゴヌクレオチドの安定性の結果を図14に示す。T-TNA（オリゴ5）の単一組み込みは、単一のPS結合3' - dTs dT（オリゴ1）と比較した場合、約5倍の安定性の改善を示した。T-TNA（オリゴ7）の二重組み込みは、3' - dTs dTと比較した場合、3' - エキソヌクレアーゼに対して8倍を超える耐性を有するPO結合の有意な安定化を提供した。TNA-Tは、2' - F-Uと比較して顕著な安定性を示した（オリゴ7対3）。

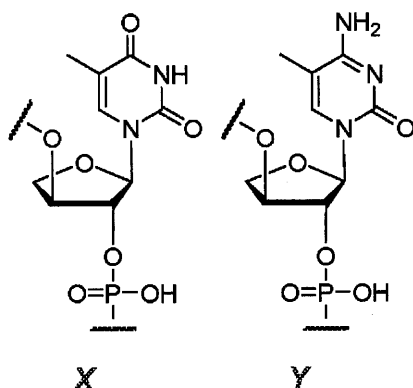
【0609】

5' - エキソヌクレアーゼに対するTNA修飾オリゴヌクレオチドの安定性の結果を図15に示す。T-TNAは、単一のPS結合（5' - dTs dT）と比較して、ホスホジエステラーゼIIによる分解に対して10倍を超える耐性を有するPO結合（オリゴ10）の有意な安定化を提供する。PS結合（オリゴ11）と組み合わせたT-TNAは、これらの条件下での分解に対して著しく耐性がある（24時間で約4%の分解）。

【0610】

UV熱融解温度の決定：熱融解温度は、温度上昇（1°C/分）に伴う A_{260} を監視することにより、 $1 \times \text{PBS}$ （ $[\text{NaCl}] = 137 \text{ mM}$ 、 $[\text{KCl}] = 2.7 \text{ mM}$ 、 $[\text{Na}_2\text{HPO}_4] = 10 \text{ mM}$ 、 $[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 1.8 \text{ mM}$ 、 $\text{pH} 7.4$ ）中の両鎖の等モル濃度（ $2.5 \mu\text{M}$ ）で測定した。値は一次導関数の最大値として報告され、少なくとも2回の実験の平均である。結果を表12及び13に示す。TNAは、DNAのわずかな不安定化と、RNAのより大きい不安定化を示した。構造x及びyを次に示す：

【化90】



【0611】

10

20

30

40

50

【表 1 2】

表 12: TNA 修飾オリゴヌクレオチドの熱安定性。RNA (X)二本鎖。

二本鎖	配列	T _m 値	Δ T _m
RNA-RNA 対照	5'-UACAGUCUAUGU-3' 5'-ACAUAGACUGUA-3'	52.6 °C	-
RNA (X)二本鎖	5'-UACAGXCUAUGU-3' 5'-ACAUAGACUGUA-3'	47.7 °C	-4.9 °C
DNA-DNA 対照	5'- dTdAdCdAdGdTdCdTdTdGdT- 3' 5'- dAdCdAdTdTdAdGdAdCdTdTdA- 3'	43.0 °C	-
DNA (X)二本鎖	5'- dTdAdCdAdGXdCdTdTdTdTdT-3' 5'- dAdCdAdTdTdAdGdAdCdTdTdTdTdT- 3'	40.8 °C	-2.2 °C

10

20

【 0 6 1 2】

【表 1 3】

表 13: TNA 修飾オリゴヌクレオチドの熱安定性。RNA (Y)

二本鎖	配列	T _m 値	Δ T _m
RNA-RNA 対照	5'-UACAGUCUAUGU-3' 5'-ACAUAGACUGUA-3'	52.3 °C	-
RNA (Y)二本鎖	5'-UACAGUYUAUGU-3' 5'-ACAUAGACUGUA-3'	47.1 °C	-5.2 °C
DNA-DNA 対照	5'- dTdAdCdAdGdCdCdTdTdTdTdT- 3' 5'- dAdCdAdTdTdTdTdTdTdTdTdT- 3'	48.3 °C	-
DNA (Y)二本鎖	5'- dTdAdCdAdGYdCdTdTdTdTdT-3' 5'- dAdCdAdTdTdTdTdTdTdTdTdT- 3'	47.8 °C	-0.50 °C

30

40

50

【0613】

Ttr mRNA定量化のためのRT-qPCR：初代マウス肝細胞（PMH）は、10%ウシ胎児血清を含むWilliams E培地で培養した。RNAiMAX試薬を使用した細胞のトランスフェクションは、製造業者の推奨プロトコルに従って行われた。したがって、トランスフェクションの直前に細胞を解凍し、次に約5000細胞／ウェルのシード密度で384ウェルプレートにプレーティングした。前インキュベートした脂質／siRNA複合体（0.1μL RNAiMax、siRNA、5μL Opti-MEM中15分間）を384ウェルコラーゲンコーティングプレート（BioCoat；Corning）に添加し、細胞を37℃で20時間、5%CO₂の雰囲気中でインキュベートした。10~0.036nMの範囲の8つの6倍段階希釈物を使用して、用量反応実験を実施した。細胞を洗浄及び溶解する前に培地を除去した。製造業者のプロトコルに従ってDynabeads mRNA分離キットを使用して、RNAを抽出し、続いてABI高容量cDNA逆転写キットで逆転写した。定量化はリアルタイムPCRによって行われ、cDNA（2μL）は、384ウェル50プレートの1ウェルあたり0.5μLのマウスGAPDH TaqManプローブ、0.5μLのTtr TaqManプローブ及び5μLのLightcycler 480プローブマスターミックスを含有するマスターミックスに添加した。リアルタイムPCRは、ΔΔCt（RQ）アッセイを使用してABI 7900HT RT-PCRシステムで実行された。各二本鎖及び濃度は、4つの生物学的複製で試験した。相対倍率変化を計算するため、リアルタイムデータをΔΔCt法を用いて分析し、非特異的siRNA 10nMをトランスフェクトした細胞を用いて実施したアッセイに対して正規化した。IC50値は、XLFitを使用した4パラメーター適合モデルを使用して計算された。

10

20

【0614】

図16は、インビトロのsiRNA活性に対する単一のTNAヌクレオチドの組み込みの影響を示す。図17は、インビトロのsiRNA活性に対する単一のTNA塩基対の組み込みの影響を示す。図18は、インビトロ遺伝子サイレンシングアッセイの用量反応曲線を示す。

【0615】

インビボスクリーニング：全ての試験は、適用可能な場合、地方、州及び連邦規制に準じたプロトコルを用いて実施され、動物実験委員会（Institutional Animal Care and Use Committee）（IACUC）によって承認された。動物は、PBS中10μL／gの注射量として調製された1mg／kg siRNAの単回の肩甲骨下皮下注射を受けた。投与前又は投与後の示された時間に、動物をイソフルランで麻酔し、後眼窩採血によって血液を得た。TTRタンパク質は、全血から分離された血清からのELISAによって定量化された。ELISAは、血清試料を3025倍に希釈した後、製造業者のプロトコル（ALPCO、41-PALMS-E01）に従って実行した。データは、採血前のTTRレベルに対して正規化した。全ての試料は二重に分析され、各データポイントは各コホート内の全てのマウスの平均である（n=3）。GraphPad Prismでの多重比較のために、Tukey事後検定を用いた両方向ANOVAを使用してデータを分析した。

30

40

【0616】

インビボスクリーニングの結果は図19及び20に示され、血清TTRレベルでTNA修飾siRNA二本鎖を使用したマウスにおけるインビボの遺伝子サイレンシングの効果を示す。図19は結果を示す折れ線グラフであり、図20は結果を示す棒グラフである。

【0617】

T-TNAの単回組み込みにより、3'末端と5'末端の両方でPO結合が大幅に安定化され、単一のPS結合と比較した場合、それぞれ約5倍及び10倍の改善を有する。モデル配列を使用したTm研究は、TNAが、DNAのわずかな不安定化と、RNAのより大きい不安定化を示すことを示した。単一のTNAヌクレオチドをsiRNA二本鎖のシード領域に組み込むと、インビトロで同様のレベルのTTR mRNAのノックダウンが生

50

じた。さらに、シード領域内にTNA塩基対を含有するs iRNAは、対応する親s iRNAと同等のノックダウンをインビトロで示した。インビボ遺伝子サイレンシングは、単一のTNA置換を含む二本鎖のインビトロの結果とよく相関し、構造モデルは、TNAがAgo2に結合した二本鎖によく適応していることを示唆している。hAgo2に結合したTNAの構造モデルを図21に示す。

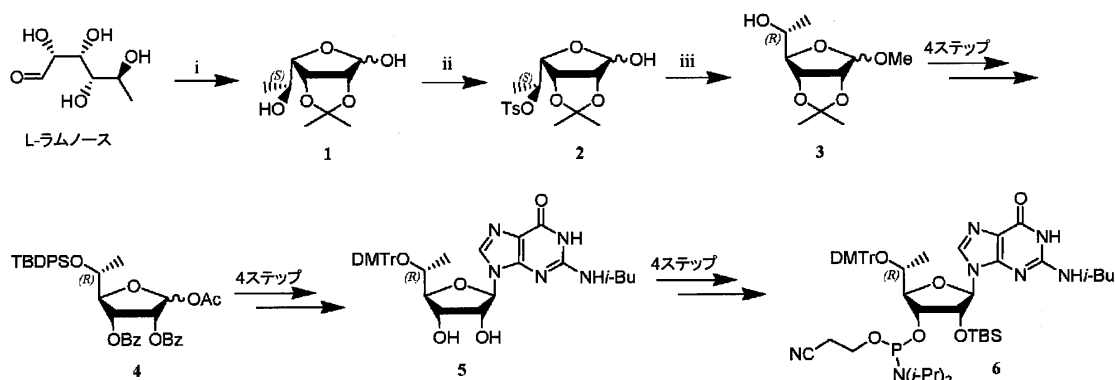
【0618】

実施例9：5'-(R)及び(S)-メチルグアノシンを含有するオリゴヌクレオチド構成要素。

s iRNA鎖を構成するヌクレオシドモノマーの化学修飾は、効力、熱力学的安定性を調節し、これらの核酸ベースの薬剤の生体安定性を高めることができる。それらは、s iRNAのオフターゲット効果を低減する可能性もある。立体異性的に純粋な5'-C-メチル2'-デオキシ及び2'-O-メチル及び2'-フルオロ修飾ヌクレオシドを合成し、これらのモノマーをs iRNAに組み込んだ。5'-C-メチルピリミジンヌクレオシドは、対応する適切に保護された2'修飾又は2'-デオキシヌクレオシド前駆体から調製された [Kel' in, Alexander et al., J. Org. Chem. 2016, 81, 2261-2279]。2'-修飾5'-C-メチルピリミジン含有s iRNAは、5'-C-メチルデオキシ残基を有するs iRNAよりも優れたエキソヌクレアーゼ安定性を示した。5'-(R)-及び(S)-メチルグアノシン構成要素の合成も本明細書において報告されている。5'-C-メチルグアノシンは、スキーム37に示すように、過去にBeigelmanらによってL-ラムノースから開始して合成された [Beigelman, Karpeisky, and Usman, Nucleosides Nucleotides 1995, 14, 901]。そのアプローチとは対照的に、本発明者らはグアノシンから出発し、グアノシンは、スキーム38に示すように、適切に3'保護され、酸化され、5'位でメチル化された。純粋な(R)及び(S)異性体を単離し、対応するホスホラミダイト、制御された細孔ガラス(CPG)及び三リン酸を作製するために使用した。図22に示すように、様々な5'-(R)-及び(S)-メチルグアノシン構成要素がこれらの方法で合成された。s iRNA鎖を構成するヌクレオシドモノマーの化学修飾は、効力を調節することができる。

【化91】

スキーム37

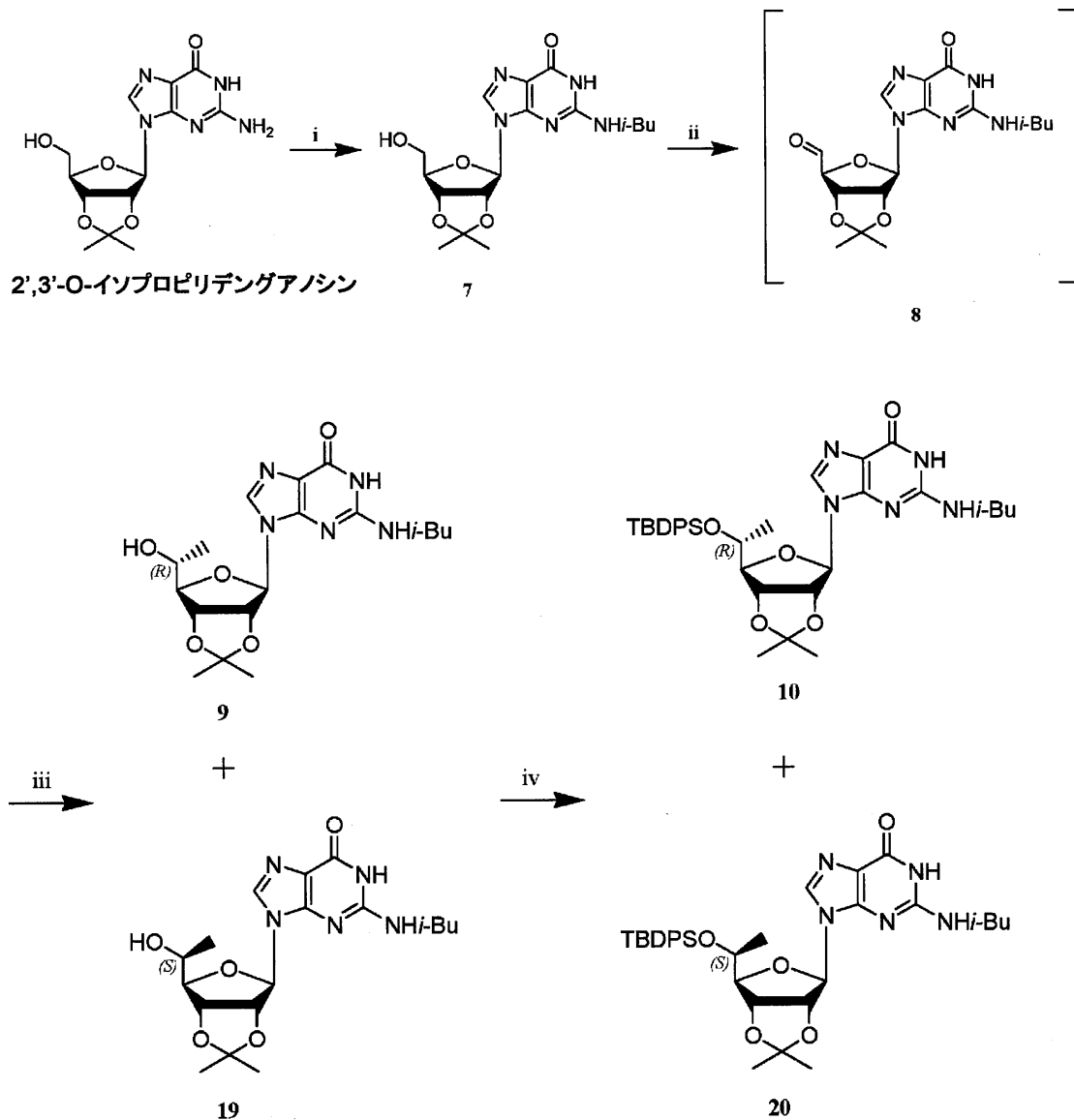


【0619】

スキーム37の試薬及び条件は次の通りである：(i) H_2SO_4 、 CuSO_4 /アセトン、室温 (ii) TsCl /ピリジン、 0°C ～室温 (iii) NaOMe /MeOH、 0°C ～室温。5-(S)-異性体は、5-(R)-異性体3から光延反応により合成された。5'-C-Meで修飾されたA、G及びCを使用して、ハンマーヘッド型リボザイムを修飾した。修飾リボザイムは、野生型リボザイムと同様の活性を有していた。

【化 9 2】

スキーム38



【0620】

スキーム38について使用される試薬及び条件は次の通りである：(i) 1) TMSCL/ピリジン、0℃～室温、1時間。2) *i*-BuCl/ピリジン、0℃～室温、一晚；93%。(ii) デス・マーチン・ペルヨージナン/DCM、0℃～室温、2時間。(iii) MeMgBr/DCM、0℃、30分間；9及び19の混合物として2ステップ33%。9と19は分離できない。(iv) TBDPSCl、イミダゾール/DMF、室温、一晚；10について17%、20について23%。

【0621】

オリゴヌクレオチド内の5'-C-メチル-ヌクレオシドの分子モデリングからの構造結果を図23に示す。図23に示すように、(R)-異性体は、高度に水和された負の静電分極の極性領域に突出しており(青球)、リン酸の水和に干渉(フラッシュ)し、リン酸骨格(矢印)との立体衝突に關与する。メチル基の立体効果による摂動は、(S)-異性体よりも(R)-異性体において顕著である。

【0622】

実施例10：5'-ヌクレアーゼ及び3'-ヌクレアーゼの安定性に対する5'-C-メチル

10

20

30

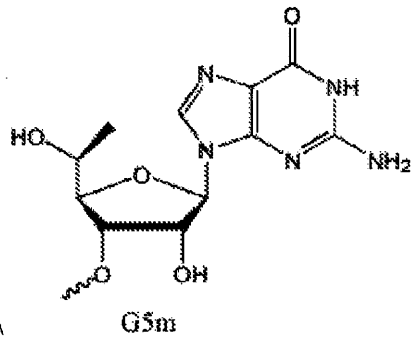
40

50

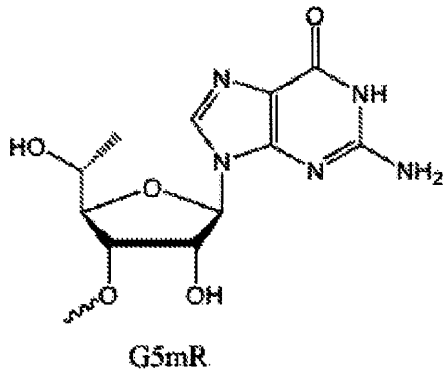
グアノシン修飾の効果

5'-ヌクレアーゼの安定性：エナンチオマー的に純粋な(R)-及び(S)-5'-C-メチル(C5'-Me)グアノシン置換ヌクレオシドの5'-エキソヌクレアーゼ安定性を評価するために、PO又はPS結合による1つの修飾ヌクレオチドにより、dT20テンプレート配列を5'末端で修飾した(表14)。化合物の構造を、比較のためにグアノシンと共に以下に示す。

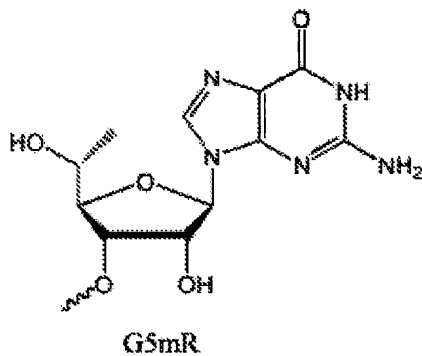
【化93】



(S)-5'-メチルグアノシン



(R)-5'-メチルグアノシン



グアノシン

【0623】

PS結合を有する5'末端dT及びPO又はPS結合を有する5'末端グアノシン(G)を有するdT20テンプレートを対照として使用した。ONをホスホジエステラーゼ-I(500mU/mL)とインキュベートし、各修飾ONの半減期($T_{1/2}$)を、時間の関数としての全長ONのHPLCベースの定量化によって決定した。結果を表14にまとめ、HPLC安定性プロファイルを、PO又はPS結合を有する、グアノシン及び(R)又は(S)-5'-C-メチルグアノシン(C5'-MeG)で5'末端が修飾されたdT

20の、5'エキソヌクレアーゼーホスホジエステラーゼIIとのインキュベーション時の時間の関数としての減衰曲線を示す、図24A及び24Bに示す。図24Aは、以下の条件に対するものである：a) 酵素濃度500mU/mL、オリゴ濃度0.1mg/mL、50mM NaOAc (pH6.5) : 10mM MgCl₂。図24Bは、以下の条件に対するものである：酵素濃度100mU/mL、オリゴ濃度0.1mg/mL、50mM NaOAc (pH6.5) : 10mM MgCl₂。完全長ONのパーセンテージは、所与の時点での完全長ONに対応するピーク下面積を、t=0での完全長で除し、100を掛けることによって計算される。

【0624】

PO結合によりdT19の5'末端に結合した全てのONは、PS結合を有するdT残基と比較して安定性が低く、PE-IIとのインキュベーションの際、最初の時点で分解された。5'末端にグアニンを有する全てのONは、dTpsdT19と比較してより安定していた。PSで結合された単一の(R)-5'-Me-Gにより修飾されたONは、24時間まで劣化を示さず、一方、(S)-5'-C-メチル-Gは、対照Gと比較して、72時間及び41時間のT1/2値でそれぞれより安定であった。PO結合を介して結合した(R)及び(S)-5'-C-メチル異性体の安定性の違いを見出すため、PE-IIの濃度を下げて(100mU/mL)同様の実験を行った。結果を表14にまとめ、HPLC安定性プロファイルを図24Bに示す。(R)-及び(S)-5'-C-Me-グアノシン及び対照Gについて、同様の傾向が観察された。G及び(S)-5'-C-メチル-G異性体は、PE-IIの濃度を下げたインキュベーション時、最初の時点までに分解された一方、(R)-5'-C-メチル-G異性体は、4.3時間のT1/2値で安定であった。dTpsdT19は、この低下した濃度で最も安定した、53時間のT1/2値を有するオリゴである。

【0625】

10

20

30

40

50

【表 14】

表 14: ホスホジエステラーゼ-II の存在下での 5'末端修飾 dT18-mer の半減期 ($T_{1/2}$)

[illegible]

【 0 6 2 6 】

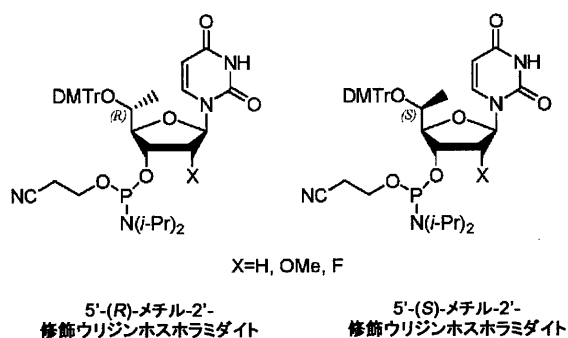
3'-ヌクレアーゼの安定性：エナンチオマ的に純粋な(R)-及び(S)-5'-C-メチル(C5'-Me)グアノシン置換ヌクレオシドの3'-エキソヌクレアーゼ安定性を評価するために、PO又はPS結合による1つ又は2つの修飾ヌクレオチドにより、dT20テンプレート配列を3'末端で修飾した(表14)。PS結合を有する3'末端dT及びPO又はPS結合を有する3'末端グアノシン(G)を有するdT20テンプレートを対照として使用した。ONを50mM Tris-HCl(pH7.2):10mM MgCl₂の存在下でSVPD(ホスホジエステラーゼ-I)(75mU/mL)とインキュベートし、各修飾ONの半減期($T_{1/2}$)を、時間の関数としての全長ONのHPLCベ

ースの定量化によって決定した。結果を表14にまとめ、HPLC安定性プロファイルを図25A及び25Bに示す。図25A及び25Bは、グアノシン及び(R)又は(S)-5'-C-メチルグアノシン(C5'-MeG)で3'末端が修飾されたdT20の、ヘビ毒ホスホジエステラーゼとのインキュベーション時の時間の関数としてのHPLC安定性プロファイルを示す。図25Aは、dTと修飾ヌクレオシドとの間のPO又はPS結合による単一組み込みの場合であり、図25Bは、2つの修飾ヌクレオシド間のPO及びPS結合による二重組み込みの場合である。

【0627】

2'-F-U-2'-F-Uにより3'末端で修飾されたdTと比較して、5'-(S)-C-Me-2'-F-U及び5'-(R)-C-Me-2'-F-Uは、より高い耐性を3' 10'-エキソヌクレアーゼに付与した。(S)異性体は(R)異性体よりも耐性が高かった [Kel'in, A. V.; Zlatev, I.; Harp, J.; Jayaraman, M.; Bisbe, A.; O'Shea, J.; Taneja, N.; Manoharan, R. M.; Khan, S.; Charisse, K.; Maier, M. A.; Egli, M.; Rajeev, K. G.; Manoharan, M. The Journal of Organic Chemistry 2016, 81, 2261]。5'-(S)-C-Me-G及び5'-(R)-C-Me-Gは、Beigelmanらによって報告され、改変リボザイム活性が評価された [Beigelman, L.; Karpeisky, A.; Usman, N. Nucleosides and Nucleotides 1995, 14, 901]。例としてグアニンを使用したsiRNAにおけるこの修飾の有用性を評価した。図26は、ヘビ毒ホスホジエステラーゼとのインキュベーション時に、2つの5'-(R)-C-Me-2'-F-U又は5'-(S)-C-Me-2'-F-Uヌクレオチド(構造は下に示す)により3'末端で修飾された、dT₁₈のHPLC分析結果を時間の関数で示す。dTと修飾ヌクレオチドとの間にホスホロチオエート(PS)結合が存在した。

【化94】



【0628】

30

40

50

0分；15、25について96%。(vi) TBSCl、AgNO₃/THF-ピリジン、室温、一晚；16について50%、26について53%。(vii) i-Pr₂NP(Cl)O(CH₂)₂CN、DIPEA、1-メチルイミダゾール/DCM、室温、2時間；17について88%、27について65%。(viii) 1) 無水コハク酸、DMA P/DCM、室温、一晚。2) LCAA-CPG (孔径500 ÅNH₂、171 μmol/g)、HBTU、DIPEA/DMF、室温、一晚。3) Ac₂O/ピリジン、室温、一晚；ローディング：18について70 μmol/g、28について97 μmol/g。表16は、100-10×³J_{H1'-H2'}として計算された¹H-NMR³J_{H-H}カップリング定数に基づくC3'-endo配座異性体の推定パーセンテージを示す。

【0630】

【表16】

10

表 16: C3'-endo 配座異性体の推定パーセンテージ。

	³ J _{H1'-H2'} (Hz)	%N (C3'-endo)
11	6.60	約30
21	5.30	約50

20

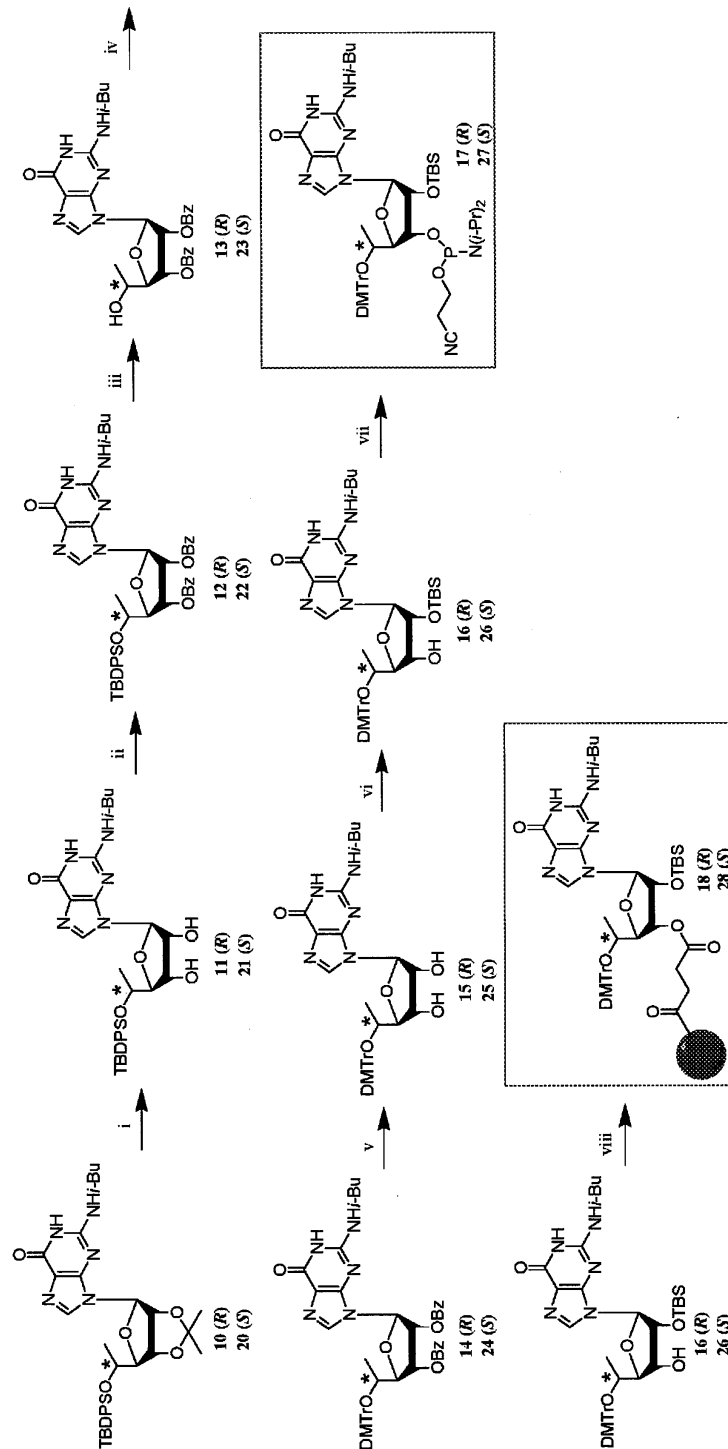
30

40

50

【化 9 5】

スキーム39



【0631】

立体配置の割り当て：立体配置の割り当ては、モッシャーエステル（MTPA）分析の原理を使用して行われた [Hoye, T. R. ; Jeffrey, C. S. ; Shao, F. Nature Protocols 2007, 2, 2451]。

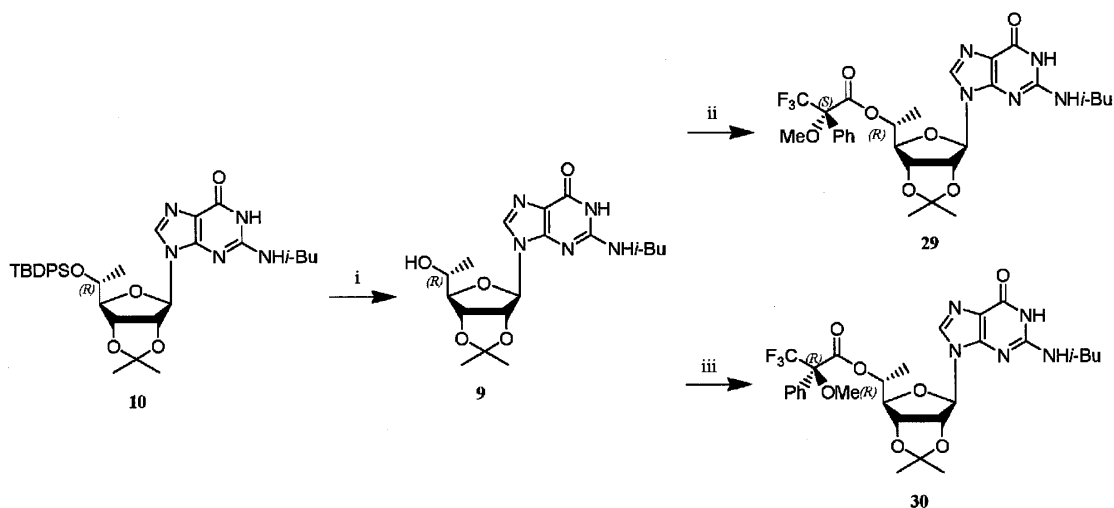
【0632】

MTPAを使用した5'-(R)の割り当てをスキーム40に示す。スキーム40で使
した試薬及び条件は次の通りであった：(i) THF中の1M TBAF/THF、室温
、一晚；82%。(ii) (R)-(-)-MTPACL/DCM-ピリジン、0℃～室
温、2時間；72%。(iii) (S)-(+)-MTPACL/DCM-ピリジン、0

℃～室温、2時間；38%。(S)-及び(R)-MTPAエステル29及び30の分析に使用した立体構造を図27に示す。結果を表17に示す。

【化96】

スキーム40



【0633】

【表17】

表 17:(S)-及び(R)-MTPA エステル 29 及び 30 の Dd^{SR} データ

	29	30	$Dd^{SR} (= d_S - d_R)$	
	d (S)-モツシャーエステル	d (R)-モツシャーエステル	ppm	Hz (400MHz)
3'H	4.98	5.12	-0.14	-56
4'H	4.03	4.09	-0.06	-24
1'H	6.02	6.07	-0.05	-20
2'H	5.35	5.37	-0.02	-8
5'H	5.24	5.24	0	0
5'Me	1.23	1.13	0.1	40

【0634】

MTPAを使用した5'-(S)の割り当てをスキーム41に示す。スキーム41で使用した試薬及び条件は次の通りであった：(i) THF中の1M TBAF/THF、室温、一晚；78%。(ii) (R)-(-)-MTPACL/DCM-ピリジン、0℃～室温、2時間；31%。(iii) (S)-(+)-MTPACL/DCM-ピリジン、0℃～室温、2時間；51%。(S)-及び(R)-MTPAエステル31及び32の分析に使用した立体構造を図28に示す。結果を表18に示す。

10

20

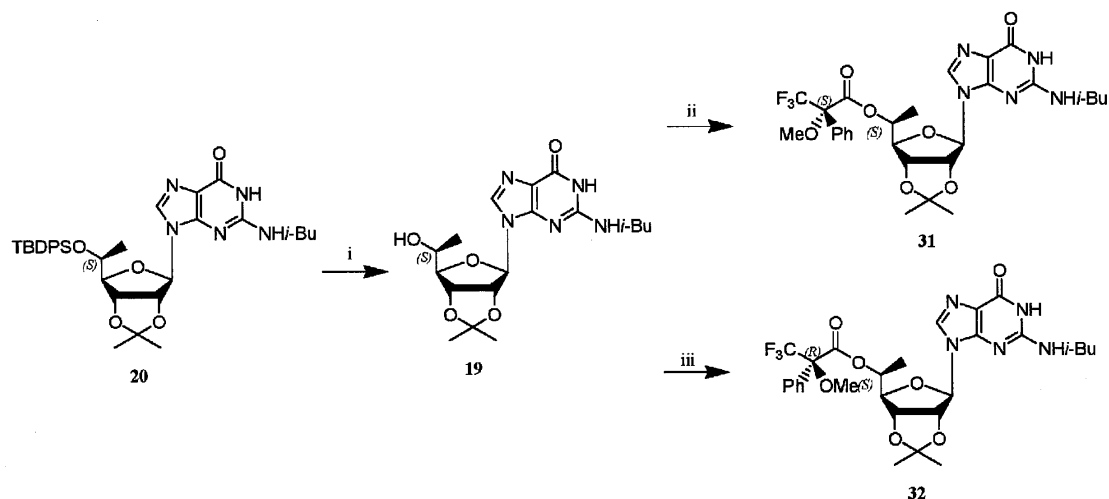
30

40

50

【化 9 7】

スキーム41



【 0 6 3 5】

【表 1 8】

表 18:(S)-及び(R)-MTPA エステル 31 及び 32 の Dd^{SR} データ

	31	32	$Dd^{SR} (= d_S - d_R)$	
	d (S)-モツシャーエステル	d (R)-モツシャーエステル	ppm	Hz (400MHz)
3'H	5.24	4.80	0.44	176
4'H	4.10	4.13	-0.03	-12
1'H	6.19	6.03	0.16	64
2'H	5.33	5.08	0.25	100
5'H	5.33	5.29	0.04	16
5'Me	1.26	1.35	-0.09	-36

【 0 6 3 6】

実施例 11: RNAポリメラーゼ基質としての (R)-及び/又は (S)-異性体の評価

三リン酸の合成: スキーム 42 に示すように三リン酸を合成した [Zlatev, I.; Lackey, J. G.; Zhang, L.; Dell, A.; McRae, K.; Shaikh, S.; Duncan, R. G.; Rajeev, K. G.; Manoharan, M. Bioorganic & Medicinal Chemistry 2013, 21, 722.]. スキーム 42 の試薬及び条件は次の通りであった: (i) ~ (iii) は、表 20 に従って ABI-394 シンセサイザーで実施された。 (iv) 1) $\text{NH}_4\text{OH} / \text{EtOH}$ 、室温、一晚。 2) 1M TBAF / THF、室温、一晚。 3) AMA / H_2O 、室温、一晚; 34 について 28%、38 について 39%。表 19 は、 $100 - 10 \times {}^3J_{\text{H}1, -\text{H}2}$ として計算された ${}^1\text{H-NMR}$ ${}^3J_{\text{H-H}}$ カップリング定数に基づく C3'-endo 配座異性体の推定パーセンテージを示す。表 20 に ABI-394 プロトコルを記載する。

【 0 6 3 7 】

【表 1 9】

表 19:C3'-endo 配座異性体の推定パーセンテージ

	$^3J_{H1'-H2'}$ (Hz)	%N (C3'-endo)
34	7.04	約 30
38	6.08	約 40

10

【 0 6 3 8 】

【表 2 0】

表 20:ABI-394 プロトコル

反応	試薬	送達時間(秒)	待機時間(秒)
i (1)	1M ジフェニルホスファイト/ピリジン	$30 + 10 \times 2$	$150 \times 2 + 300$
i (2)	0.1 M TEAB/H ₂ O-CH ₃ CN	$30 + 10 \times 5$	$60 \times 2 + 450 \times 4$
ii	1 M イミダゾール, 1M BSA / CBrCl ₃ -CH ₃ CN-NEt ₃	$30 + 10 \times 6$	$60 \times 2 + 1800 \times 5$
iii	0.25M ピロリン酸トリブチルアンモニウム /DMF-ACN	$30 \times 2 + 15 \times 2$	$300 \times 4 + 18000$

20

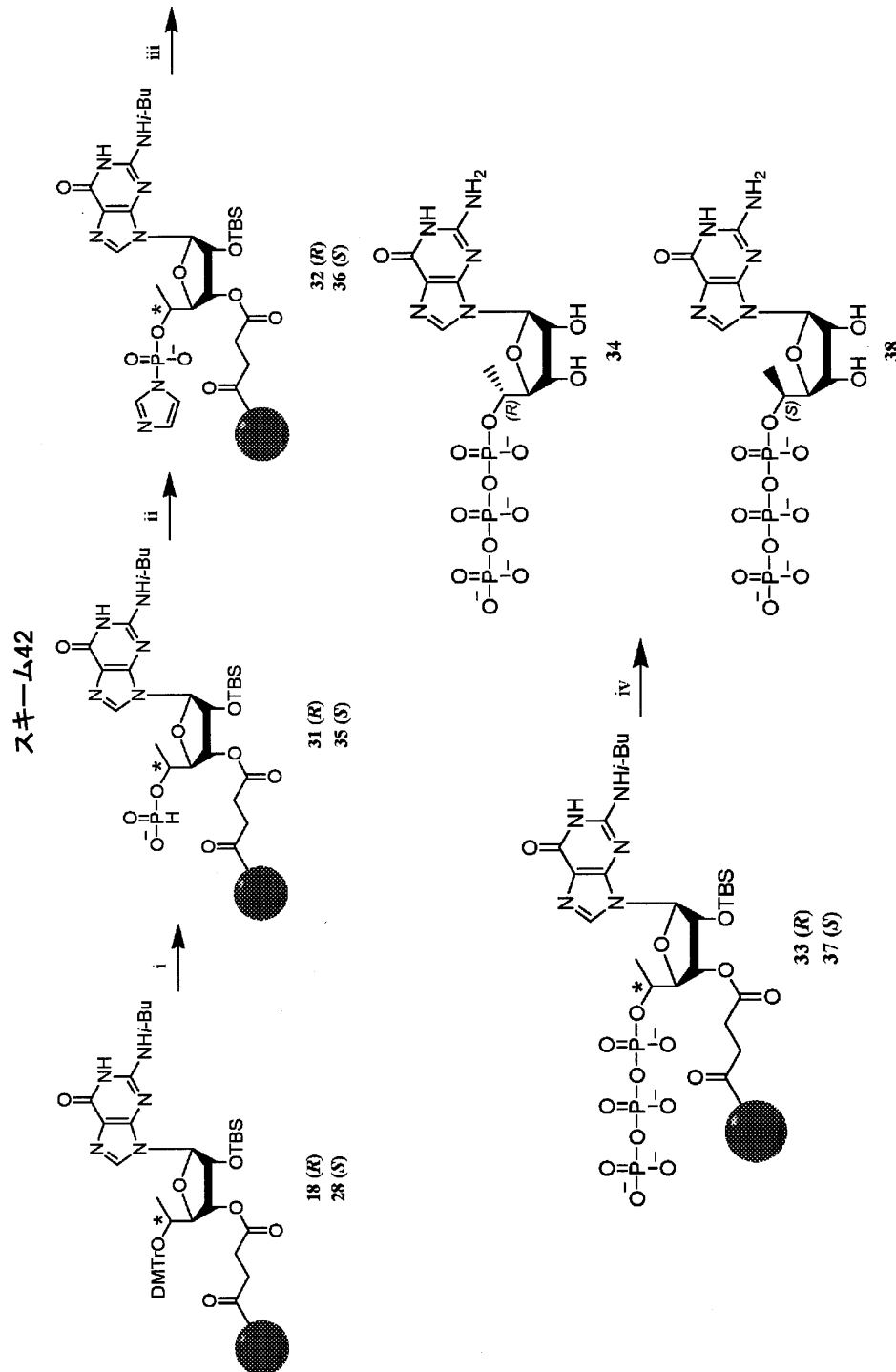
【 0 6 3 9 】

30

40

50

【化 9 8】



5'-(R)-及び(S)-C-Me-グアノシン三リン酸の評価：5'-(R)-及び(S)-C-Me-グアノシン三リン酸は、Pol-RMT及びDNAPol-γで評価した。ミトコンドリア毒性は、ヌクレオシド類似体薬に共通する特徴である（肝臓／代謝効果、ミオパチー、末梢神経障害）。ミトコンドリアの複製は、有糸分裂後の細胞を含む、細胞周期の全ての段階で発生する。有糸分裂後の細胞におけるミト複製（mito replication）は、内因性ヌクレオチドプールを優先的な消費するようになる。ミトコンドリアポリメラーゼ（pol-γ、Pol-RMT）は、制限されたエキソヌクレアーゼ（プルーフリーディング）機能を有する。核DNAに対する変化／効果は、他の試験システムで現れる可能性がより高い。図29は、DNAPol-γ及びPol-RM

T プロトコルを概略的に示す。図 29 に示すように、A t t o - 4 2 5 標識プライマーは、非常に少ない反応量で高感度の蛍光検出を可能にする。プライマー伸長産物の最適な分離のための蛍光検出を備えた分析用 I E X - H P L C が検出に使用され、特に、競合混合物における検出で重要である。このアッセイは、組み込み効率の評価に適用した。

【0640】

図 30 は、P o l - R M T による組み込みアッセイの結果を示す。5' - (S) - C - M e - G 三リン酸 (G T P) は P o l - R M T に高濃度で組み込まれるが、5' - (R) - C - M e - G T P は P o l - R M T に組み込まれていないようである。反応条件は、200 nM テンプレート、50 nM プライマー、300 nM 酵素及び 1 mM 又は 100 μ M N T P、30 分間、35 $^{\circ}$ C であった。

10

【0641】

図 31 は、P o l - γ による組み込みアッセイの結果を示す。5' - (S) も (R) - C - M e - G t p も、高濃度では P o l - γ に組み込まれない。反応条件は、以下の通りであった：反応：100 nM テンプレート、100 nM プライマー、酵素 40 単位及び 1 mM 又は 100 μ M d N T P、30 分間、37 $^{\circ}$ C；5 nM プライマーに希釈し、F L D - I E X - H P L C (E x : 437、E m : 483 nm) で分析した。

【0642】

実施例 12：

mU N A のオリゴ合成及び特性評価：本明細書で説明する修飾ヌクレオシドを有する R N A オリゴヌクレオチドは、標準的なホスホラミダイト化学を用いた A B I 394 D N A / R N A シンセサイザーで、市販のウリジン (U)、4-N-アセチルシチジン (C A c)、6-N-ベンゾイルアデノシン (A^{Bz}) 及び 2-N-イソブチリルグアノシン (G^{iBu}) の 5' - O - (4, 4' - ジメトキシトリチル) - 3' - O - (2 - シアノエチル - N, N - ジイソプロピル) ホスホラミダイトモノマーと、2' - O - t - ブチルジメチルシリル保護ホスホラミダイト、2' - フルオロ置換ホスホラミダイト、2' - O - メチルホスホラミダイト及び本明細書に示す修飾ヌクレオシド構成要素を使用して合成することができる。合成後、オリゴヌクレオチドに結合した C P G のごく一部を、マイクロチューブ (1 mL) 中の 100 μ L のメチルアミン溶液 (水中 40 wt %、A l d r i c h) により 65 $^{\circ}$ C で 10 分間又は濃水酸化アンモニウムにより 55 $^{\circ}$ C で 8 時間、処理する。混合物をドライアイス上で 5 分間冷却し、固体懸濁液を遠心沈殿する。上清 (80 μ L) を別のマイクロチューブにデカントし、120 μ L の T E A $\cdot$ 3 H F (L a n c a s t e r S y n t h e s i s, I n c.) と共に 65 $^{\circ}$ C で 12 分間加熱する。粗オリゴヌクレオチドの純度は R P - H P L C 又は I E X - H P L C で分析し、質量は L C - M S 実験で確認する。図 32 は、mU N A モノマーの構造を示す。

20

30

【0643】

40

50

【表 2 1】

表21:Tm研究のmUNAのオリゴ合成及び特性評価

オリゴID	オリゴ配列	分子量	観測質量
A-126502	UACAGUCUAUGU	3757.27	3755.5
A-126504	dTdAdCdAdGdTdCdTdAdTdGdT	3635.402	3633.6
A-235396	dTdAdCdAdG(Uun)dCdTdAdTdGdT	3639.391	3637.6
A-235403	UACAG(Uun)CUAUGU	3759.286	3757.5
A-637538	UACAGY95CUAUGU	3773.314	3771.5
A-637539	dTdAdCdAdGY95dCdTdAdTdGdT	3653.419	3651.7
A-637540	UACAGY96CUAUGU	3773.314	3771.5
A-637541	dTdAdCdAdGY96dCdTdAdTdGdT	3653.419	3651.7
A-637542	UACAGY97CUAUGU	3773.314	3771.5
A-637543	dTdAdCdAdGY97dCdTdAdTdGdT	3653.419	3651.7
A-637544	UACAGY98CUAUGU	3773.314	3771.5
A-637545	dTdAdCdAdGY98dCdTdAdTdGdT	3653.419	3651.7
A-637546	UACAGY99CUAUGU	3773.314	3771.5
A-637547	dTdAdCdAdGY99dCdTdAdTdGdT	3653.419	3651.7
A-637548	UACAGY100CUAUGU	3773.314	3771.5
A-637549	dTdAdCdAdGY100dCdTdAdTdGdT	3653.419	3651.7
A-637550	UACAGY101CUAUGU	3789.314	3787.5
A-637551	dTdAdCdAdGY101dCdTdAdTdGdT	3669.419	3667.6
A-637552	UACAGY102CUAUGU	3773.314	3771.5
A-637553	dTdAdCdAdGY102dCdTdAdTdGdT	3653.419	3651.7

【 0 6 4 4 】

【表 2 2】

表22:5'-exo研究のmUNAのオリゴ合成及び特性評価

オリゴID	オリゴ配列	分子量	観測質量
A-637472	Y95dTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdT	6039.917	6036.97
A-637473	Y95sdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdT	6055.977	6052.94
A-637480	Y96dTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdT	6039.917	6036.98
A-637481	Y96sdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdT	6055.977	6052.9
A-637488	Y97dTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdT	6039.917	6037.1
A-637489	Y97sdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdT	6055.977	6052.9
A-637496	Y98dTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdT	6039.917	6036.97
A-637497	Y98sdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdT	6055.977	6052.9
A-637504	Y99dTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdT	6039.917	6036.9
A-637505	Y99sdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdT	6055.977	6052.9
A-637512	Y100dTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdT	6039.917	6036.9
A-637513	Y100sdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdT	6055.977	6052.9
A-637520	Y101dTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdT	6055.917	6052.97
A-637521	Y101sdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdT	6071.977	6068.9
A-637528	Y102dTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdT	6039.917	6036.98
A-637529	Y102sdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdT	6055.978	6052.95
A-637536	(Uun)dTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdT	6025.889	6022.96
A-637537	(Uuns)dTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdT	6041.954	6038.94

【 0 6 4 5 】

10

20

30

40

50

【 0 6 4 6 】

表23:3'-exo研究のmUNAのオリゴ合成及び特性評価

[illegible]

【表 2 4】

表24 インビトロ研究のmUNAのオリゴ合成及び特性評価

オリゴID	オリゴ配列	分子量	観測質量
A-173611	usGfsuu(Tgn)auagagcaAfgAfacacusgsu	7649.155	7645.2
A-173769	usGfsuuua(Tgn)agagcaAfgAfacacusgsu	7649.155	7645.2
A-173780	asCfsacgg(Tgn)uuauagAfgCfaagaascsa	7694.25	7690.3
A-265018	usGfsuu(Uun)auagagcaAfgAfacacusgsu	7695.181	7691.2
A-265020	usGfsuuua(Uun)agagcaAfgAfacacusgsu	7695.181	7691.2
A-265053	asCfsacgg(Uun)uuauagAfgCfaagaascsa	7740.276	7736.3
A-432461	asCfsacggY95uuauagAfgCfaagaascsa	7754.304	7750.3
A-432462	asCfsacggY97uuauagAfgCfaagaascsa	7754.304	7750.3
A-432463	asCfsacggY96uuauagAfgCfaagaascsa	7754.304	7750.3
A-432464	asCfsacggY98uuauagAfgCfaagaascsa	7754.304	7750.3
A-432465	asCfsacggY99uuauagAfgCfaagaascsa	7754.304	7750.3
A-432466	asCfsacggY100uuauagAfgCfaagaascsa	7754.304	7750.3
A-432468	usGfsuuY95auagagcaAfgAfacacusgsu	7709.209	7705.2
A-432469	usGfsuuY97auagagcaAfgAfacacusgsu	7709.209	7705.2
A-432470	usGfsuuY96auagagcaAfgAfacacusgsu	7709.209	7705.2
A-432471	usGfsuuY98auagagcaAfgAfacacusgsu	7709.209	7705.2
A-432472	usGfsuuY99auagagcaAfgAfacacusgsu	7709.209	7705.2
A-432473	usGfsuuY100auagagcaAfgAfacacusgsu	7709.209	7705.2
A-432474	usGfsuuY101auagagcaAfgAfacacusgsu	7725.209	7721.2
A-432475	usGfsuuuaY95agagcaAfgAfacacusgsu	7709.209	7705.2
A-432476	usGfsuuuaY97agagcaAfgAfacacusgsu	7709.209	7705.2
A-432477	usGfsuuuaY96agagcaAfgAfacacusgsu	7709.209	7705.2
A-432478	usGfsuuuaY98agagcaAfgAfacacusgsu	7709.209	7705.2
A-432479	usGfsuuuaY99agagcaAfgAfacacusgsu	7709.209	7705.2
A-432480	usGfsuuuaY100agagcaAfgAfacacusgsu	7709.209	7705.2
A-432481	usGfsuuuaY101agagcaAfgAfacacusgsu	7725.209	7721.2

【0 6 4 7】

【表 2 5】

表25: T_m研究のTNAのオリゴ合成及び特性評価

オリゴID	オリゴ配列	分子量	観測質量
A-140220	UACAG(Tth)CUAUGU	3741.272	3739.5
A-140221	dTdAdCdAdG(Tth)dCdTdAdTdGdT	3621.377	3619.6
A-144735	UACAGU(Cth)UAUGU	3741.273	3739.5
A-815960	ACAUA(Gth)ACUGUA	3773.322	3771.6
A-815961	ACAUAG(Ath)CUGUA	3773.327	3771.6
A-815962	dAdCdAdTdA(Gth)dAdCdTdGdTdA	3639.406	3637.7
A-815963	dAdCdAdTdAdG(Ath)dCdTdGdTdA	3639.406	3637.7
A-1036755	dTdAdCdAdGdT(Cth)dTdAdTdGdT	3635.404	3633.7

【0 6 4 8】

10

20

30

40

50

【表 2 6】

表26:5'/3'-exo研究のTNAのオリゴ合成及び特性評価

オリゴID	オリゴ配列	分子量	観測質量
A-140216	dTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdT(Tths)(Tth)	6009.911	6006.9
A-140217	dTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdT(Tth)(Tth)	5993.85	5990.9
A-140218	dTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdT(Tth)	6007.875	6004.9
A-140219	dTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdT(Tth)	6023.941	6020.9
A-555740	(Tth)dTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdT	6007.875	6004.9
A-555741	(Tths)dTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdT	6023.936	6020.9

10

【 0 6 4 9】

20

30

40

50

【表 27】

表27:インビトロ研究のTNAのオリゴ合成及び特性評価

オリゴID	オリゴ配列	分子量	観測質量
A-250711	(Aths)asCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAfl96	8558.15	8553.1
A-250712	Afs(Aths)CfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAfl96	8546.115	8541.8
A-250713	Afsas(Cth)aGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAfl96	8572.181	8567.2
A-250714	AfsasCf(Ath)GfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAfl96	8546.119	8541.5
A-250715	AfsasCfa(Gth)uGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAfl96	8558.155	8553.9
A-250716	AfsasCfaGf(Tth)GfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAfl96	8560.144	8555.8
A-250717	AfsasCfaGfu(Gth)uUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAfl96	8558.155	8553.2
A-250718	AfsasCfaGfuGf(Tth)UfCfUfuGfcUfcUfaUfaAfl96	8560.144	8555.3
A-250719	AfsasCfaGfuGfu(Tth)CfUfuGfcUfcUfaUfaAfl96	8572.18	8567.8
A-250720	AfsasCfaGfuGfuUf(Cth)UfuGfcUfcUfaUfaAfl96	8572.181	8567.2
A-250721	AfsasCfaGfuGfuUfCf(Tth)uGfcUfcUfaUfaAfl96	8572.18	8567.6
A-250722	AfsasCfaGfuGfuUfCfUf(Tth)GfcUfcUfaUfaAfl96	8560.144	8555.3
A-250723	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfu(Gth)cUfcUfaUfaAfl96	8558.155	8553.5
A-250724	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGf(Cth)UfcUfaUfaAfl96	8560.145	8555.7
A-250725	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfc(Tth)cUfaUfaAfl96	8572.18	8567.5
A-250726	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUf(Cth)UfaUfaAfl96	8560.145	8555.4
A-250727	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfc(Tth)aUfaAfl96	8572.18	8567.8
A-250728	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUf(Ath)UfaAfl96	8546.119	8541.9
A-250729	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfa(Tth)aAfl96	8572.18	8567.5
A-250730	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUf(Ath)Afl96	8546.119	8541.8
A-250731	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfa(Ath)L96	8558.155	8553.8
A-250732	(Tths)UfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	7565.908	7562.1
A-250733	us(Tths)aUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	7577.943	7574.1
A-250734	usUfs(Ath)UfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	7551.887	7548
A-250735	usUfsa(Tth)aGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	7577.948	7574.1
A-250736	usUfsaUf(Ath)GfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	7551.887	7548
A-250737	usUfsaUfa(Gth)aGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	7563.923	7560.1
A-250738	usUfsaUfaGf(Ath)GfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	7551.887	7548
A-250739	usUfsaUfaGfa(Gth)cAfagaAfcAfcUfgUfususu	7563.923	7560.1
A-250740	usUfsaUfaGfaGf(Cth)AfagaAfcAfcUfgUfususu	7565.913	7562.1
A-250741	usUfsaUfaGfaGfc(Ath)agaAfcAfcUfgUfususu	7563.923	7560
A-250742	usUfsaUfaGfaGfcAf(Ath)gaAfcAfcUfgUfususu	7551.887	7548
A-250743	usUfsaUfaGfaGfcAfa(Gth)aAfcAfcUfgUfususu	7551.887	7548
A-250744	usUfsaUfaGfaGfcAfag(Ath)AfcAfcUfgUfususu	7551.887	7548
A-250745	usUfsaUfaGfaGfcAfaga(Ath)cAfcUfgUfususu	7563.923	7560.1
A-250746	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAf(Cth)AfcUfgUfususu	7565.913	7562.1
A-250747	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfc(Ath)cUfgUfususu	7563.923	7560.1
A-250748	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAf(Cth)UfgUfususu	7565.913	7562.1
A-250749	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfc(Tth)gUfususu	7577.948	7574.1
A-250750	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUf(Gth)Ufususu	7551.887	7548
A-250751	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfg(Tth)ususu	7577.948	7574.1
A-250752	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUf(Tths)usu	7565.908	7562.1
A-250753	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfus(Tths)u	7565.908	7562.1
A-250754	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfus(Tth)	7565.912	7562.1

【0650】

10

20

30

40

50

【表 28】

表28:HYP-ベース修飾のオリゴ合成及び特性評価

オリゴID	オリゴ配列	分子量	観測質量
A-157540	usUfsguQ198GfaUfGfacuuUfcAfcauucsusg	7439.856	7436
A-157541	usUfsgucQ198aUfGfacuuUfcAfcauucsusg	7411.868	7408.1
A-157542	usUfsgucGfQ198UfGfacuuUfcAfcauucsusg	7415.831	7412
A-157543	usUfsgucGfaQ198GfacuuUfcAfcauucsusg	7450.907	7447.1
A-173412	usUfsauQ198GfagcaagaAfcAfcuguususu	7534.033	7530.2
A-173413	usUfsauaQ198agcaagaAfcAfcuguususu	7530.07	7526.2
A-173414	usUfsauaGfQ198gcaagaAfcAfcuguususu	7534.033	7530.1
A-173415	usUfsauaGfaQ198caagaAfcAfcuguususu	7518.034	7514.2
A-594465	usUfs(Ahp)auaGfagcaagaAfcAfcuguususu	8010.38	8006.3
A-594466	usUfsQ198uaGfagcaagaAfcAfcuguususu	7534.033	7530.2
A-594467	usUfsa(Thp)aGfagcaagaAfcAfcuguususu	7681.172	7677.2
A-594468	usUfsaQ198aGfagcaagaAfcAfcuguususu	7557.073	7553.2
A-594469	usUfsau(Ahp)GfagcaagaAfcAfcuguususu	7667.147	7663.9
A-594470	usUfsaua(Ghp)agcaagaAfcAfcuguususu	7679.183	7675.2
A-594471	usUfsauaGf(Ahp)gcaagaAfcAfcuguususu	7667.147	7663.2
A-594472	usUfsauaGfa(Ghp)caagaAfcAfcuguususu	7667.147	7663.5
A-594473	usUfsauaGfag(Chp)aagaAfcAfcuguususu	7667.146	7663.2
A-594474	usUfsauaGfagQ198aagaAfcAfcuguususu	7558.058	7554.2
A-594475	usUfs(Ghp)ucGfaUfGfacuuUfcAfcauucsusg	7548.945	7545.1
A-594476	usUfsQ198ucGfaUfGfacuuUfcAfcauucsusg	7399.832	7396
A-594477	usUfsg(Thp)cGfaUfGfacuuUfcAfcauucsusg	7562.97	7559.1
A-594478	usUfsgQ198cGfaUfGfacuuUfcAfcauucsusg	7438.871	7435.1
A-594479	usUfsgu(Chp)GfaUfGfacuuUfcAfcauucsusg	7548.944	7545.1
A-594480	usUfsguc(Ghp)aUfGfacuuUfcAfcauucsusg	7560.981	7557.6
A-594481	usUfsgucGf(Ahp)UfGfacuuUfcAfcauucsusg	7548.945	7545.1
A-594482	usUfsgucGfa(Thp)GfacuuUfcAfcauucsusg	7575.006	7571.1
A-594483	usUfsgucGfaUf(Ghp)acuuUfcAfcauucsusg	7560.981	7557.8
A-594484	usUfsgucGfaUfQ198acuuUfcAfcauucsusg	7411.868	7408.1

【0651】

mUNA12-mer二本鎖のUV熱融解温度の決定：熱融解温度は、温度上昇（1℃／分）に伴うA₂₆₀を監視することにより、（a）1×PBS（[NaCl] = 137 mM、[KCl] = 2.7 mM、[Na₂HPO₄] = 8 mM、[KH₂PO₄] = 2 mM、pH 7.4）中又は（b）8×PBS（[NaCl] = 1.1 mM、[KCl] = 22 mM、[Na₂HPO₄] = 64 mM、[KH₂PO₄] = 16 mM、pH 7.4）中の両鎖の等モル濃度（2.0 μM）で測定した。値は一次導関数の最大値として報告され、少なくとも2回の実験の平均である。

【0652】

10

20

30

40

50

【表 29】

表29:UV熱融解温度mUNA12-mer二本鎖

ウェル	試料名	標的	sオリゴ名	sオリゴ配列	ssオリゴ名	ssオリゴ配列	Tm (°C) ^a	ΔTm (°C)	Tm (°C) ^b	ΔTm (°C)
A1	AD-64366.2	N/A	A-126502.7	UACAGUCUAUGU	A-126503.7	ACAUAGACUGUA	52.1	0.0	52.1	0.0
B1	AD-511219.1	N/A	A-637538.2	UACAG96CUAUGU	A-126503.8	ACAUAGACUGUA	35.2	-17.0	43.3	-17.8
C1	AD-511230.1	N/A	A-637540.2	UACAG96CUAUGU	A-126503.9	ACAUAGACUGUA	34.3	-17.8	42.4	-18.7
D1	AD-511221.1	N/A	A-637542.2	UACAG97CUAUGU	A-126503.10	ACAUAGACUGUA	33.4	-18.7	42.5	-18.6
E1	AD-511222.1	N/A	A-637544.2	UACAG98CUAUGU	A-126503.11	ACAUAGACUGUA	33.5	-18.6	42.6	-18.5
F1	AD-511223.1	N/A	A-637546.2	UACAG99CUAUGU	A-126503.12	ACAUAGACUGUA	34.1	-18.0	42.1	-19.0
G1	AD-511224.1	N/A	A-637548.2	UACAG100CUAUGU	A-126503.13	ACAUAGACUGUA	34.2	-18.0	43.3	-17.8
H1	AD-511225.1	N/A	A-637550.2	UACAG101CUAUGU	A-126503.14	ACAUAGACUGUA	36.3	-15.8	45.4	-15.7
A2	AD-511226.1	N/A	A-637552.2	UACAG102CUAUGU	A-126503.15	ACAUAGACUGUA	38.4	-13.7	47.5	-13.6
B2	AD-511227.1	N/A	A-235403.3	UACAG(Uun)CUAUGU	A-126503.16	ACAUAGACUGUA	35.5	-16.6	43.6	-17.5
C2	AD-64367.2	N/A	A-126504.3	dTAdCdAdGdGdCtTdAdTdgGt	A-126505.3	dAdCdAdTAdGdAdCtTdGdGtTGA	43.1		49.1	0.0
D2	AD-511228.1	N/A	A-637539.2	dTAdCdAdGdGdGdCtTdAdTdgGt	A-126505.4	dAdCdAdTAdGdAdCtTdGdGtTGA	<30		22.3	-26.8
E2	AD-511229.1	N/A	A-637541.2	dTAdCdAdGdGdGdCtTdAdTdgGt	A-126505.5	dAdCdAdTAdGdAdCtTdGdGtTGA	<30		23.4	-25.7
F2	AD-511230.1	N/A	A-637543.2	dTAdCdAdGdGdGdCtTdAdTdgGt	A-126505.6	dAdCdAdTAdGdAdCtTdGdGtTGA	<30		23.5	-25.6
G2	AD-511231.1	N/A	A-637545.2	dTAdCdAdGdGdGdCtTdAdTdgGt	A-126505.7	dAdCdAdTAdGdAdCtTdGdGtTGA	<30		23.6	-25.5
H2	AD-511232.1	N/A	A-637547.2	dTAdCdAdGdGdGdCtTdAdTdgGt	A-126505.8	dAdCdAdTAdGdAdCtTdGdGtTGA	<30		25.1	-24.0
A3	AD-511233.1	N/A	A-637549.2	dTAdCdAdGdGdGdCtTdAdTdgGt	A-126505.9	dAdCdAdTAdGdAdCtTdGdGtTGA	<30		22.3	-26.8
B3	AD-511234.1	N/A	A-637551.2	dTAdCdAdGdGdGdCtTdAdTdgGt	A-126505.10	dAdCdAdTAdGdAdCtTdGdGtTGA	<30		23.4	-25.7
C3	AD-511235.1	N/A	A-637553.2	dTAdCdAdGdGdGdCtTdAdTdgGt	A-126505.11	dAdCdAdTAdGdAdCtTdGdGtTGA	<30		26.5	-22.6
D3	AD-511236.1	N/A	A-235396.3	dTAdCdAdGdGdGdCtTdAdTdgGt	A-126505.12	dAdCdAdTAdGdAdCtTdGdGtTGA	<30		23.6	-25.5
E3	AD-511237.1	N/A	A-126502.8	UACAGUCUAUGU	A-126505.13	dAdCdAdTAdGdAdCtTdGdGtTGA	39.1		45.1	0.0
F3	AD-511238.1	N/A	A-637538.3	UACAG95CUAUGU	A-126505.14	dAdCdAdTAdGdAdCtTdGdGtTGA	<30		22.3	-22.8
G3	AD-511239.1	N/A	A-637540.3	UACAG96CUAUGU	A-126505.15	dAdCdAdTAdGdAdCtTdGdGtTGA	<30		23.4	-21.7
H3	AD-511240.1	N/A	A-637542.3	UACAG97CUAUGU	A-126505.16	dAdCdAdTAdGdAdCtTdGdGtTGA	<30		22.5	-22.6
A4	AD-511241.1	N/A	A-637544.3	UACAG98CUAUGU	A-126505.17	dAdCdAdTAdGdAdCtTdGdGtTGA	<30		22.6	-22.5
B4	AD-511242.1	N/A	A-637546.3	UACAG99CUAUGU	A-126505.18	dAdCdAdTAdGdAdCtTdGdGtTGA	<30		27.1	-18.0
C4	AD-511243.1	N/A	A-637548.3	UACAG100CUAUGU	A-126505.19	dAdCdAdTAdGdAdCtTdGdGtTGA	<30		27.3	-17.8
D4	AD-511244.1	N/A	A-637550.3	UACAG101CUAUGU	A-126505.20	dAdCdAdTAdGdAdCtTdGdGtTGA	<30		23.4	-21.7
E4	AD-511245.1	N/A	A-637552.3	UACAG102CUAUGU	A-126505.21	dAdCdAdTAdGdAdCtTdGdGtTGA	<30		26.5	-18.6
F4	AD-511246.1	N/A	A-235403.4	UACAG(Uun)CUAUGU	A-126505.22	dAdCdAdTAdGdAdCtTdGdGtTGA	<30		24.6	-20.5
G4	AD-511247.1	N/A	A-126504.4	dTAdCdAdGdGdGdCtTdAdTdgGt	A-126503.17	ACAUAGACUGUA	42.1		49.1	0.0
H4	AD-511248.1	N/A	A-637539.3	dTAdCdAdGdGdGdCtTdAdTdgGt	A-126503.18	ACAUAGACUGUA	<30		29.2	-20.0
A5	AD-511249.1	N/A	A-637541.3	dTAdCdAdGdGdGdCtTdAdTdgGt	A-126503.19	ACAUAGACUGUA	<30		28.3	-20.9
B5	AD-511250.1	N/A	A-637543.3	dTAdCdAdGdGdGdCtTdAdTdgGt	A-126503.20	ACAUAGACUGUA	<30		26.4	-22.7
C5	AD-511251.1	N/A	A-637545.3	dTAdCdAdGdGdGdCtTdAdTdgGt	A-126503.21	ACAUAGACUGUA	<30		28.6	-20.6
D5	AD-511252.1	N/A	A-637547.3	dTAdCdAdGdGdGdCtTdAdTdgGt	A-126503.22	ACAUAGACUGUA	<30		27.1	-22.0
E5	AD-511253.1	N/A	A-637549.3	dTAdCdAdGdGdGdCtTdAdTdgGt	A-126503.23	ACAUAGACUGUA	<30		27.2	-22.0
F5	AD-511254.1	N/A	A-637551.3	dTAdCdAdGdGdGdCtTdAdTdgGt	A-126503.24	ACAUAGACUGUA	<30		31.3	-17.9
G5	AD-511255.1	N/A	A-637553.3	dTAdCdAdGdGdGdCtTdAdTdgGt	A-126503.25	ACAUAGACUGUA	<30		36.4	-12.7
H5	AD-511256.1	N/A	A-235396.4	dTAdCdAdGdGdGdCtTdAdTdgGt	A-126503.26	ACAUAGACUGUA	<30		28.6	-20.6

【0653】

mUNA21-／23-mer二本鎖のUV熱融解温度の決定：熱融解温度は、温度上昇（1℃／分）に伴うA260を監視することにより、（a）0.25×PBS（[NaCl]=34mM、[KCl]=0.68mM、[Na2HPO4]=2mM、[KH2PO4]=0.5mM、pH7.4）中の両鎖の等モル濃度（1.0μM）で測定した。値は一次導関数の最大値として報告され、少なくとも2回の実験の平均である。

【0654】

10

20

30

40

50

【表 30】

表30:UV熱融解温度mUNA21-/23-mer二本鎖

二本鎖ID	センス鎖	アンチセンス鎖	Tm (°C)	ΔTm (°C)	修飾
AD-125773.8	ususcuuGcFuCfUfAfuaaaaccguguL96	asCfsacgguuuuauagAfgCfaagaascsa	89.02	0	
AD-218916.1	ususcuuGcFuCfUfAfuaaaaccguguL96	asCfsacggY100uuauagAfgCfaagaascsa	81.17	-7.85	Y100
AD-218921.1	asgsuguuGcFuCfUfGfCfucuaauaacaL96	usGfsuuY98auagagcaAfgAfacacsgsu	83.97	-5.05	Y98
AD-218927.1	asgsuguuGcFuCfUfGfCfucuaauaacaL96	usGfsuuuY96agagcaAfgAfacacsgsu	83.02	-6	Y96
AD-126010.4	ususcuuGcFuCfUfAfuaaaaccguguL96	asCfsacgg(Tgn)uuauagAfgCfaagaascsa	88.12	-0.9	GNA-T
AD-218922.1	asgsuguuGcFuCfUfGfCfucuaauaacaL96	usGfsuuY99auagagcaAfgAfacacsgsu	84.02	-5	Y99
AD-218928.1	asgsuguuGcFuCfUfGfCfucuaauaacaL96	usGfsuuuY98agagcaAfgAfacacsgsu	82.12	-6.9	Y98
AD-133768.2	ususcuuGcFuCfUfAfuaaaaccguguL96	asCfsacgg(Uun)uuauagAfgCfaagaascsa	80.12	-8.9	UNA-U
AD-125762.7	asgsuguuGcFuCfUfGfCfucuaauaacaL96	usGfsuuuuauagagcaAfgAfacacsgsu	87.27	0	
AD-218923.1	asgsuguuGcFuCfUfGfCfucuaauaacaL96	usGfsuuY100auagagcaAfgAfacacsgsu	84.07	-3.2	Y100
AD-218929.1	asgsuguuGcFuCfUfGfCfucuaauaacaL96	usGfsuuuY99agagcaAfgAfacacsgsu	81.97	-5.3	Y99
AD-218911.1	ususcuuGcFuCfUfAfuaaaaccguguL96	asCfsacggY95uuauagAfgCfaagaascsa	80.27	-7	Y95
AD-125841.3	asgsuguuGcFuCfUfGfCfucuaauaacaL96	usGfsuu(Tgn)auagagcaAfgAfacacsgsu	84.02	-3.25	GNA-T
AD-218924.1	asgsuguuGcFuCfUfGfCfucuaauaacaL96	usGfsuuY101auagagcaAfgAfacacsgsu	85.17	-2.1	Y101
AD-218930.1	asgsuguuGcFuCfUfGfCfucuaauaacaL96	usGfsuuuY100agagcaAfgAfacacsgsu	81.97	-5.3	Y100
AD-218912.1	ususcuuGcFuCfUfAfuaaaaccguguL96	asCfsacggY97uuauagAfgCfaagaascsa	80.32	-6.95	Y97
AD-133733.2	asgsuguuGcFuCfUfGfCfucuaauaacaL96	usGfsuu(Uun)auagagcaAfgAfacacsgsu	84.07	-3.2	UNA-U
AD-125999.4	asgsuguuGcFuCfUfGfCfucuaauaacaL96	usGfsuuu(Tgn)agagcaAfgAfacacsgsu	83.22	-4.05	GNA-T
AD-218931.1	asgsuguuGcFuCfUfGfCfucuaauaacaL96	usGfsuuuY101agagcaAfgAfacacsgsu	82.97	-4.3	Y101
AD-218913.1	ususcuuGcFuCfUfAfuaaaaccguguL96	asCfsacggY96uuauagAfgCfaagaascsa	80.02	-7.25	Y96
AD-218918.1	asgsuguuGcFuCfUfGfCfucuaauaacaL96	usGfsuuY95auagagcaAfgAfacacsgsu	84.17	-3.1	Y95
AD-133735.2	asgsuguuGcFuCfUfGfCfucuaauaacaL96	usGfsuuu(Uun)agagcaAfgAfacacsgsu	81.97	-5.3	UNA-U
AD-218914.1	ususcuuGcFuCfUfAfuaaaaccguguL96	asCfsacggY98uuauagAfgCfaagaascsa	80.02	-7.25	Y98
AD-218919.1	asgsuguuGcFuCfUfGfCfucuaauaacaL96	usGfsuuY97auagagcaAfgAfacacsgsu	84.22	-3.05	Y97
AD-218925.1	asgsuguuGcFuCfUfGfCfucuaauaacaL96	usGfsuuuY95agagcaAfgAfacacsgsu	81.97	-5.3	Y95
AD-218915.1	ususcuuGcFuCfUfAfuaaaaccguguL96	asCfsacggY99uuauagAfgCfaagaascsa	81.12	-6.15	Y99
AD-218920.1	asgsuguuGcFuCfUfGfCfucuaauaacaL96	usGfsuuY96auagagcaAfgAfacacsgsu	84.27	-3	Y96
AD-218926.1	asgsuguuGcFuCfUfGfCfucuaauaacaL96	usGfsuuuY97agagcaAfgAfacacsgsu	82.02	-5.25	Y97

【0655】

TNA12-mer二本鎖のUV熱融解温度の決定：熱融解温度は、温度上昇（1℃／分）に伴うA₂₆₀を監視することにより、1×PBS（[NaCl] = 137mM、[KCl] = 2.7mM、[Na₂HPO₄] = 8mM、[KH₂PO₄] = 2mM、pH7.4）中の両鎖の等モル濃度（2.0μM）で測定した。値は一次導関数の最大値として報告され、少なくとも2回の実験の平均である。図33は、TNAモノマーの構造を示す。

【0656】

10

20

30

40

50

【表 3 1】

表31:TNA12-mer二本鎖のUV熱融解温度

二本鎖ID	sオリゴID	sオリゴ配列	asオリゴID	asオリゴ配列	Tm (°C)	ΔTm (°C)
AD-64366.3	A-126502.9	UACAGUCUAUGU	A-126503.27	ACAUAGACUGUA	52.57	0
AD-649408.1	A-126502.10	UACAGUCUAUGU	A-815961.2	ACAUAG(Ath)CUGUA	48.07	-4.5
AD-72587.2	A-144735.2	UACAGU(Cth)UAUGU	A-126503.28	ACAUAGACUGUA	47.12	-5.45
AD-649409.1	A-126502.11	UACAGUCUAUGU	A-815960.2	ACAU(Ath)ACUGUA	47.67	-4.9
AD-72585.2	A-140220.2	UACAG(Tth)CUAUGU	A-126503.29	ACAUAGACUGUA	47.745	-4.825
AD-649410.1	A-140220.3	UACAG(Tth)CUAUGU	A-815961.3	ACAUAG(Ath)CUGUA	43.07	-9.5
AD-649411.1	A-144735.3	UACAGU(Cth)UAUGU	A-815960.3	ACAU(Ath)ACUGUA	41.57	-11
AD-64366.4	A-126502.12	UACAGUCUAUGU	A-126503.30	ACAUAGACUGUA	52.62	0
AD-649412.1	A-126502.13	UACAGUCUAUGU	A-163716.4	ACAUAGAfCUGUA	53.17	0.55
AD-649413.1	A-319061.4	UACAGUCfUAUGU	A-126503.31	ACAUAGACUGUA	54.245	1.625
AD-649414.1	A-126502.14	UACAGUCUAUGU	A-818179.3	ACAUAGfACUGUA	53.07	0.45
AD-64980.2	A-129612.3	UACAGUfCUAUGU	A-126503.32	ACAUAGACUGUA	53.14	0.52
AD-649415.1	A-129612.4	UACAGUfCUAUGU	A-163716.5	ACAUAGAfCUGUA	54.22	1.6
AD-649416.1	A-319061.5	UACAGUCfUAUGU	A-818179.4	ACAUAGfACUGUA	55.32	2.7
AD-64367.3	A-126504.5	cTdAdCdAdGdTdCdTdAdTdGdT	A-126505.23	dAdCdAdTdAdGdAdCdTdGdTdA	42.42	0
AD-649417.1	A-126504.6	cTdAdCdAdGdTdCdTdAdTdGdT	A-815963.2	dAdCdAdTdAdG(Ath)dCdTdGdTdA	43.07	0.65
AD-649418.1	A-1036755.2	cTdAdCdAdGdT(Cth)dTdAdTdGdT	A-126505.24	dAdCdAdTdAdGdAdCdTdGdTdA	40.64	-1.78
AD-649419.1	A-126504.7	cTdAdCdAdGdTdCdTdAdTdGdT	A-815962.2	dAdCdAdTdA(Gth)dAdCdTdGdTdA	44.22	1.8
AD-72586.2	A-140221.2	cTdAdCdAdG(Tth)dCdTdAdTdGdT	A-126505.25	dAdCdAdTdAdGdAdCdTdGdTdA	40.32	-2.1
AD-649420.1	A-140221.3	cTdAdCdAdG(Tth)dCdTdAdTdGdT	A-815963.3	dAdCdAdTdAdG(Ath)dCdTdGdTdA	39.92	-2.5
AD-649421.1	A-1036755.3	cTdAdCdAdGdT(Cth)dTdAdTdGdT	A-815962.3	dAdCdAdTdA(Gth)dAdCdTdGdTdA	40.055	-2.365
AD-64367.4	A-126504.8	cTdAdCdAdGdTdCdTdAdTdGdT	A-126505.26	dAdCdAdTdAdGdAdCdTdGdTdA	42.67	0
AD-649422.1	A-126504.9	cTdAdCdAdGdTdCdTdAdTdGdT	A-163712.3	dAdCdAdTdAdGAdCdTdGdTdA	42.27	-0.4
AD-649423.1	A-816165.2	cTdAdCdAdGdTCfdTdAdTdGdT	A-126505.27	dAdCdAdTdAdGdAdCdTdGdTdA	42.345	-0.325
AD-649424.1	A-126504.10	cTdAdCdAdGdTdCdTdAdTdGdT	A-1036756.2	dAdCdAdTdAGfdAdCdTdGdTdA	42.945	0.275
AD-64981.2	A-129613.2	cTdAdCdAdGUfdCdTdAdTdGdT	A-126505.28	dAdCdAdTdAdGdAdCdTdGdTdA	40.055	-2.615
AD-649425.1	A-129613.3	cTdAdCdAdGUfdCdTdAdTdGdT	A-163712.4	dAdCdAdTdAdGAdCdTdGdTdA	40.17	-2.5
AD-649426.1	A-816165.3	cTdAdCdAdGdTCfdTdAdTdGdT	A-1036756.3	dAdCdAdTdAGfdAdCdTdGdTdA	42.77	0.1

【0 6 5 7】

TNA21-／23-mer二本鎖のUV熱融解温度の決定：熱融解温度は、温度上昇（1℃／分）に伴うA₂₆₀を監視することにより、（a）0.1×PBS（[NaCl] = 14mM、[KCl] = 0.27mM、[Na₂HPO₄] = 0.8mM、[KH₂PO₄] = 0.2mM、pH7.4）中の両鎖の等モル濃度（1.0μM）で測定した。値は一次導関数の最大値として報告され、少なくとも2回の実験の平均である。

【0 6 5 8】

10

20

30

40

50

【表 3 2】

表32:TNA21-/23-mer二本鎖のUV熱融解温度

二本鎖ID	センス鎖	アンチセンス鎖	Tm	Δ Tm
AD-57727.134	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAfl96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	79.02	0
AD-126259.1	(Aths)asCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAfl96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	79.12	0.1
AD-126260.1	Afs(Aths)CfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAfl96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	78.22	-0.8
AD-126261.1	Afsas(Cth)aGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAfl96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	76.36	-2.66
AD-126262.1	AfsasCf(Atth)GfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAfl96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	76.57	-2.45
AD-126263.1	AfsasCfa(Gth)uGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAfl96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	75.02	-4
AD-126264.1	AfsasCfaGf(Tth)GfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAfl96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	77.02	-2
AD-126265.1	AfsasCfaGfu(Gth)uUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAfl96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	76.12	-2.9
AD-126266.1	AfsasCfaGfuGf(Tth)UfCfUfuGfcUfcUfaUfaAfl96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	73.22	-5.8
AD-126267.1	AfsasCfaGfuGfu(Tth)CfUfuGfcUfcUfaUfaAfl96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	74.36	-4.66
AD-126268.1	AfsasCfaGfuGfuUf(Cth)UfuGfcUfcUfaUfaAfl96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	75.02	-4
AD-126269.1	AfsasCfaGfuGfuUfCf(Tth)uGfcUfcUfaUfaAfl96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	76.12	-2.9
AD-126270.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUf(Tth)GfdUfcUfaUfaAfl96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	76.27	-2.75
AD-126271.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfu(Gth)cUfcUfaUfaAfl96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	75.42	-3.6
AD-126272.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGf(Cth)UfcUfaUfaAfl96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	77.57	-1.45
AD-126273.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfc(Tth)cUfaUfaAfl96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	75.02	-4
AD-126274.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUf(Cth)UfaUfaAfl96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	76.02	-3
AD-126275.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUf(Cth)aUfaAfl96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	76.12	-2.9
AD-126276.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUf(Cth)UfaAfl96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	77.27	-1.75
AD-126277.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUf(Cth)aAfl96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	77.42	-1.6
AD-126278.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUf(Cth)Afl96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	79.02	0
AD-126279.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUf(Cth)Afl96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	78.52	-0.5
AD-126280.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUf(Cth)Afl96	(Tths)UfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	76.87	-2.15
AD-126281.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUf(Cth)Afl96	us(Tths)aUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	78.53	-0.49
AD-126282.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUf(Cth)Afl96	usUfs(Ath)UfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	78.27	-0.75
AD-126283.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUf(Cth)Afl96	usUfsa(Tth)aGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	77.87	-1.15
AD-126284.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUf(Cth)Afl96	usUfsaUf(Ath)GfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	79.02	0
AD-126285.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUf(Cth)Afl96	usUfsaUfa(Gth)aGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	75.52	-3.5
AD-126286.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUf(Cth)Afl96	usUfsaUfaGf(Ath)GfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	75.87	-3.15
AD-126287.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUf(Cth)Afl96	usUfsaUfaGfa(Gth)cAfagaAfcAfcUfgUfususu	74.53	-4.49
AD-126288.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUf(Cth)Afl96	usUfsaUfaGfaGf(Cth)AfagaAfcAfcUfgUfususu	76.02	-3
AD-126289.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUf(Cth)Afl96	usUfsaUfaGfaGf(Cth)agaAfcAfcUfgUfususu	75.12	-3.9
AD-126290.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUf(Cth)Afl96	usUfsaUfaGfaGf(Cth)gaAfcAfcUfgUfususu	77.22	-1.8
AD-126291.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUf(Cth)Afl96	usUfsaUfaGfaGf(Cth)aAfcAfcUfgUfususu	75.42	-3.6
AD-126292.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUf(Cth)Afl96	usUfsaUfaGfaGf(Cth)AfcAfcUfgUfususu	75.57	-3.45
AD-126293.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUf(Cth)Afl96	usUfsaUfaGfaGf(Cth)cAfcUfgUfususu	76.02	-3
AD-126294.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUf(Cth)Afl96	usUfsaUfaGfaGf(Cth)AfcUfgUfususu	77.02	-2
AD-126295.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUf(Cth)Afl96	usUfsaUfaGfaGf(Cth)cUfgUfususu	77.12	-1.9
AD-126296.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUf(Cth)Afl96	usUfsaUfaGfaGf(Cth)UfgUfususu	77.22	-1.8
AD-126297.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUf(Cth)Afl96	usUfsaUfaGfaGf(Cth)UfgUfususu	73.42	-5.6
AD-126298.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUf(Cth)Afl96	usUfsaUfaGfaGf(Cth)UfgUfususu	77.02	-2
AD-126299.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUf(Cth)Afl96	usUfsaUfaGfaGf(Cth)UfgUfususu	77.12	-1.9
AD-126300.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUf(Cth)Afl96	usUfsaUfaGfaGf(Cth)UfgUfususu	78.32	-0.7
AD-126301.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUf(Cth)Afl96	usUfsaUfaGfaGf(Cth)UfgUfususu	79.52	0.5
AD-126302.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUf(Cth)Afl96	usUfsaUfaGfaGf(Cth)UfgUfususu	77.66	-1.36
AD-57727.135	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUf(Cth)Afl96	usUfsaUfaGfaGf(Cth)UfgUfususu	75.02	0
AD-134022.1	(Aths)asCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUf(Cth)Afl96	usUfsaUfaGfaGf(Cth)UfgUfususu	78.02	3
AD-134023.1	Afs(Aths)CfaGfuGfuUfCfUfuGfcUf(Cth)Afl96	usUfsaUfaGfaGf(Cth)UfgUfususu	77.12	2.1
AD-134024.1	Afsas(Cth)aGfuGfuUfCfUfuGfcUf(Cth)Afl96	usUfsaUfaGfaGf(Cth)UfgUfususu	75.32	0.3
AD-134025.1	AfsasCf(Atth)GfuGfuUfCfUfuGfcUf(Cth)Afl96	usUfsaUfaGfaGf(Cth)UfgUfususu	74.52	-0.5
AD-134026.1	AfsasCfa(Gth)uGfuUfCfUfuGfcUf(Cth)Afl96	usUfsaUfaGfaGf(Cth)UfgUfususu	73.02	-2
AD-134027.1	AfsasCfaGf(Tth)GfuUfCfUfuGfcUf(Cth)Afl96	usUfsaUfaGfaGf(Cth)UfgUfususu	74.12	-0.9
AD-134028.1	AfsasCfaGfu(Cth)uUfCfUfuGfcUf(Cth)Afl96	usUfsaUfaGfaGf(Cth)UfgUfususu	73.32	-1.7
AD-134029.1	AfsasCfaGfuGf(Tth)UfCfUfuGfcUf(Cth)Afl96	usUfsaUfaGfaGf(Cth)UfgUfususu	73.52	-1.5
AD-134030.1	AfsasCfaGfuGfu(Tth)CfUfuGfcUf(Cth)Afl96	usUfsaUfaGfaGf(Cth)UfgUfususu	71.66	-3.36
AD-134031.1	AfsasCfaGfuGfuUf(Cth)UfuGfcUf(Cth)Afl96	usUfsaUfaGfaGf(Cth)UfgUfususu	71.02	-4
AD-134032.1	AfsasCfaGfuGfuUfCf(Tth)uGfcUf(Cth)Afl96	usUfsaUfaGfaGf(Cth)UfgUfususu	74.02	-1
AD-134033.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUf(Tth)GfdUf(Cth)Afl96	usUfsaUfaGfaGf(Cth)UfgUfususu	73.12	-1.9
AD-134034.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUf(Gth)cUf(Cth)Afl96	usUfsaUfaGfaGf(Cth)UfgUfususu	73.52	-1.5
AD-134035.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUf(Gth)cUf(Cth)Afl96	usUfsaUfaGfaGf(Cth)UfgUfususu	71.02	-4
AD-134036.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUf(Gth)cUf(Cth)Afl96	usUfsaUfaGf(Ath)GfaGf(Cth)UfgUfususu		
AD-134037.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUf(Gth)cUf(Cth)Afl96	usUfsaUf(Gth)aGfaGf(Cth)UfgUfususu	72.12	-2.9
AD-134038.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUf(Gth)aUfaAfl96	usUfsaUf(Ath)GfaGf(Cth)UfgUfususu	73.32	-1.7
AD-134039.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUf(Gth)UfaAfl96	usUfsa(Tth)aGfaGf(Cth)UfgUfususu	74.52	-0.5
AD-134040.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUf(Gth)UfaAfl96	usUfs(Ath)UfaGfaGf(Cth)UfgUfususu	76.66	1.64
AD-134041.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUf(Gth)UfaAfl96	us(Tths)aUfaGfaGf(Cth)UfgUfususu	78.02	3
AD-134042.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUf(Gth)UfaAfl96	(Tths)UfsaUfaGfaGf(Cth)UfgUfususu	78.02	3

【0659】

3'又は5'特異的エキソヌクレアーゼに対する修飾オリゴヌクレオチドの安定性：修飾オリゴヌクレオチドは、300mM Tris(pH7.2)、60mM MgCl₂又は300mM酢酸ナトリウム(pH6.5)のいずれか(60mM MgCl₂は、3'-又は5'-特異的エキソヌクレアーゼのそれぞれに対する安定性を評価するため)の中で、最終濃度0.1mg/mLで調製した。1mL/分の流量で16分間にわたる31~52%の移動相(1M NaBr、20mMリン酸ナトリウム、pH11、15%MeCN；固定相：20mMリン酸ナトリウム、15%MeCN、pH11)の勾配を使用したIEX HPLC(dionex DNAPac PA200, 4×250mm)による分析の前に

10

20

30

40

50

、エキソヌクレアーゼ（3'－安定性について15 mU/mL SVPDE又は5'－安定性について500 mU/mLホスホジエステラーゼII）を直ちに添加した。所与の時点で試料を最大24時間分析した。完全長オリゴヌクレオチドの量は、A₂₆₀での曲線下面積として決定した。完全長オリゴヌクレオチドのパーセントは、t=0での曲線下面積で割り、100を掛けることによって計算した。酵素の活性は、末端ホスホロチオエート結合を有するオリゴデオキシチミジレートを含めることにより、各実験について検証した（それぞれ、3'－又は5'－エキソヌクレアーゼ活性について5'－T又は5'－T・T₁₉）。酵素の各アリコートは、実験の直前に解凍した。半減期は、一次速度論に適合させることによって決定した。

【0660】

図34は、3'特異的エキソヌクレアーゼ（SVPD）に対するmUNAオリゴ安定性のプロットを示す。図35は、5'特異的エキソヌクレアーゼ（ホスホジエステラーゼII）に対するmUNAオリゴ安定性のプロットを示す。図36は、5'－エキソヌクレアーゼ（ホスホジエステラーゼII）分解に対するTNA-Tの安定性の折れ線グラフを示す。

【0661】

【表33】

表 33:アンチセンス鎖修飾二本鎖(7 位)のインビトロレポーターアッセイ。

		オンターゲット IC ₅₀ (nM)	オフターゲット IC ₅₀ (nM)
TTR-4	親(AD-125773)	0.136	1.21
	(S)-GNA	0.176	10.8
	5'-(S)-mUNA Mod 5 (S):Y95	0.0421	8.73
	5'-(R)-mUNA Mod 5 (R):Y97	0.0898	8.13
	2'-(S)-mUNA Mod 7 (S):Y96	0.0486	1.35
	2'-(R)-mUNA Mod 7 (R):Y98	0.0277	1.61
	3'-(S)-mUNA Mod 6 (S):Y99	0.0239	3.65
	3'-(R)-mUNA Mod 6 (R):Y100	0.0358	2.86
	UNA	0.0463	1.80

【0662】

示された濃度でのトランスフェクションを介して初代マウス肝細胞で測定されたオンターゲット活性。COS-7細胞にsiRNAを同時トランスフェクトしたルシフェラーゼレポータープラスミドを使用して測定されたオフターゲットIC₅₀。

【0663】

【表 3 4】

表 34. アンチセンス鎖修飾二本鎖(5 位)のインビトロポーターアッセイ。

		オンターゲット IC ₅₀ (nM)	オフターゲット IC ₅₀ (nM)
TTR-3	親(AD-125762)	0.0502	>50
	(S)-GNA	0.00298	>50
	5'-(S)-mUNA Mod 5 (S):Y95	0.00110	>50
	5'-(R)-mUNA Mod 5 (R):Y97	0.00147	>50
	2'-(S)-mUNA Mod 7 (S):Y96	0.00254	>50
	2'-(R)-mUNA Mod 7 (R):Y98	0.00064	>50
	3'-(S)-mUNA Mod 6 (S):Y99	0.00316	>50
	3'-(R)-mUNA Mod 6 (R):Y100	0.00157	>50
	4'-OMe-mUNA: Y101	0.00488	>50
	UNA	0.00064	>50

【0 6 6 4】

示された濃度でのトランスフェクションを介して初代マウス肝細胞で測定されたオンターゲット活性。COS-7 細胞に siRNA を同時トランスフェクトしたルシフェラーゼレポータープラスミドを使用して測定されたオフターゲット IC₅₀。

【0 6 6 5】

【表 3 5】

表 35: アンチセンス鎖修飾二本鎖(7 位)のインビトロポーターアッセイ。

		オンターゲット IC ₅₀ (nM)	オフターゲット IC ₅₀ (nM)
TTR-3	親(AD-125762)	0.0502	>50
	(S)-GNA	0.0160	>50
	5'-(S)-mUNA Mod 5 (S):Y95	0.0150	>50
	5'-(R)-mUNA Mod 5 (R):Y97	0.0138	>50
	2'-(S)-mUNA Mod 7 (S):Y96	0.0235	>50
	2'-(R)-mUNA Mod 7 (R):Y98	0.0186	>50
	3'-(S)-mUNA Mod 6 (S):Y99	0.0322	>50
	3'-(R)-mUNA Mod 6 (R):Y100	0.0348	>50
	4'-OMe-mUNA: Y101	0.0391	>50
	UNA	0.0115	>50

【0 6 6 6】

示された濃度でのトランスフェクションを介して初代マウス肝細胞で測定されたオンターゲット活性。COS-7細胞にsiRNAを同時トランスフェクトしたルシフェラーゼレポータープラスミドを使用して測定されたオフターゲットIC50。

【0667】

HypベースのヌクレオシドによるTTRインビトロ遺伝子サイレンシングを研究した。使用した配列を表36に示す。図37は、Hypモノマーの構造を示す。

【0668】

【表36】

表36: HypベースのヌクレオシドによるTTRインビトロ遺伝子サイレンシング

AD-64958.64	TTR	A-128009.25	asascaguGfuUfCfUfugcucuauaaL96	A-126312.73	usUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguususu
AD-307612.2	TTR	A-128009.25	asascaguGfuUfCfUfugcucuauaaL96	A-594468.1	usUfsaQ198aGfagcaagaAfcAfcuguususu
AD-307611.2	TTR	A-128009.25	asascaguGfuUfCfUfugcucuauaaL96	A-594467.1	usUfsa(Thp)aGfagcaagaAfcAfcuguususu
AD-307614.2	TTR	A-128009.25	asascaguGfuUfCfUfugcucuauaaL96	A-173412.2	usUfsauQ198GfagcaagaAfcAfcuguususu
AD-307613.2	TTR	A-128009.25	asascaguGfuUfCfUfugcucuauaaL96	A-594469.1	usUfsau(Ahp)GfagcaagaAfcAfcuguususu
AD-307616.2	TTR	A-128009.26	asascaguGfuUfCfUfugcucuauaaL96	A-173413.2	usUfsauaQ198agcaagaAfcAfcuguususu
AD-307615.2	TTR	A-128009.26	asascaguGfuUfCfUfugcucuauaaL96	A-594470.1	usUfsaua(Ghp)agcaagaAfcAfcuguususu
AD-133416.3	TTR	A-128009.26	asascaguGfuUfCfUfugcucuauaaL96	A-173414.2	usUfsauaGfQ198gcaagaAfcAfcuguususu
AD-307617.2	TTR	A-128009.26	asascaguGfuUfCfUfugcucuauaaL96	A-594471.1	usUfsauaGf(Ahp)gcaagaAfcAfcuguususu
AD-133417.3	TTR	A-128009.26	asascaguGfuUfCfUfugcucuauaaL96	A-173415.2	usUfsauaGfaQ198caagaAfcAfcuguususu
AD-307618.2	TTR	A-128009.26	asascaguGfuUfCfUfugcucuauaaL96	A-594472.1	usUfsauaGfa(Ghp)caagaAfcAfcuguususu

【0669】

図38は、100nMでソートされたTTRDW1105フリー取り込みのプロットを示す。

【0670】

HypベースのヌクレオシドによるGO1インビトロ遺伝子サイレンシング。使用した配列を表37に示す。トランスフェクションの結果を表38にまとめる。

【0671】

【表37】

表37: Hypベースのヌクレオシドによるインビトロ遺伝子サイレンシングを示す

二本鎖名	センスオリゴ	センスオリゴ配列	アンチセンスオリゴ	アンチセンスオリゴ配列
AD-65644.56	A-131560.208	gsasauguGfaaAfGfucaucgacaaL96	A-131569.40	usUfsgucGfaUfGfacuuUfcAfcuuucsusg
AD-307622.1	A-131560.1	gsasauguGfaaAfGfucaucgacaaL96	A-594476.1	usUfsQ198ucGfaUfGfacuuUfcAfcuuucsusg
AD-307621.1	A-131560.1	gsasauguGfaaAfGfucaucgacaaL96	A-594475.1	usUfs(Ghp)ucGfaUfGfacuuUfcAfcuuucsusg
AD-307624.1	A-131560.1	gsasauguGfaaAfGfucaucgacaaL96	A-594478.1	usUfsgQ198cGfaUfGfacuuUfcAfcuuucsusg
AD-307623.1	A-131560.1	gsasauguGfaaAfGfucaucgacaaL96	A-594477.1	usUfsg(Thp)cGfaUfGfacuuUfcAfcuuucsusg
AD-79731.3	A-131560.214	gsasauguGfaaAfGfucaucgacaaL96	A-157540.2	usUfsguQ198GfaUfGfacuuUfcAfcuuucsusg
AD-307625.1	A-131560.1	gsasauguGfaaAfGfucaucgacaaL96	A-594479.1	usUfsgu(Chp)GfaUfGfacuuUfcAfcuuucsusg
AD-79732.3	A-131560.216	gsasauguGfaaAfGfucaucgacaaL96	A-157541.2	usUfsgucQ198aUfGfacuuUfcAfcuuucsusg
AD-307626.1	A-131560.1	gsasauguGfaaAfGfucaucgacaaL96	A-594480.1	usUfsguc(Ghp)aUfGfacuuUfcAfcuuucsusg
AD-79733.3	A-131560.218	gsasauguGfaaAfGfucaucgacaaL96	A-157542.2	usUfsgucGfQ198UfGfacuuUfcAfcuuucsusg
AD-307627.1	A-131560.1	gsasauguGfaaAfGfucaucgacaaL96	A-594481.1	usUfsgucGf(Ahp)UfGfacuuUfcAfcuuucsusg
AD-79734.2	A-131560.220	gsasauguGfaaAfGfucaucgacaaL96	A-157543.2	usUfsgucGfaQ198GfacuuUfcAfcuuucsusg
AD-307628.1	A-131560.1	gsasauguGfaaAfGfucaucgacaaL96	A-594482.1	usUfsgucGfa(Thp)GfacuuUfcAfcuuucsusg
AD-307630.1	A-131560.1	gsasauguGfaaAfGfucaucgacaaL96	A-594484.1	usUfsgucGfaUfQ198acuuUfcAfcuuucsusg
AD-307629.1	A-131560.1	gsasauguGfaaAfGfucaucgacaaL96	A-594483.1	usUfsgucGfaUf(Ghp)acuuUfcAfcuuucsusg

【0672】

【表 3 8】

表38:トランスフェクションデータの概要

トランスフェクションリポフェクタミンRNAi Max					フリー取り込み			
二本鎖ID	10nM平均	標準偏差	1nM平均	標準偏差	100nM平均	標準偏差	10nM平均	標準偏差
AD-65644.56	29.31	4.57	69.13	11.95	50.83	5.89	75.69	15.45
AD-307622.1	88.33	10.52	95.64	8.55	77.77	9.32	95.75	5.74
AD-307621.1	77.53	6.67	99.29	21.13	71.37	12.67	85.72	12.97
AD-307624.1	46.38	10.86	65.47	4.47	35.79	4.49	70.71	11.88
AD-307623.1	44.82	11.32	58.87	9.56	42.79	12.66	69.34	8.79
AD-79731.3	21.16	5.72	30.52	8.50	23.23	8.11	28.14	3.38
AD-307625.1	13.33	4.62	48.54	6.89	14.25	3.10	29.87	4.60
AD-79732.3	27.23	6.56	66.07	5.19	32.58	4.45	49.26	3.70
AD-307626.1	25.27	4.22	67.26	11.98	29.18	1.39	45.34	9.25
AD-79733.3	20.85	4.68	56.48	3.60	32.37	5.98	54.74	5.19
AD-307627.1	13.48	1.86	61.15	14.49	26.84	8.42	61.67	3.77
AD-79734.2	62.55	12.23	108.90	20.01	74.62	5.98	98.33	9.78
AD-307628.1	31.92	2.64	86.18	14.10	45.23	4.75	72.39	8.91
AD-307630.1	101.07	5.58	131.38	9.03	92.59	10.68	87.94	4.58
AD-307629.1	38.85	10.20	87.79	14.73	55.91	16.56	70.17	5.57

【0 6 7 3】

Hypベースのヌクレオシドによるインビボ遺伝子サイレンシングの結果を図39～41に示す。図42に示すように、(S)-isogNAの組み込みは、(S)-GNAよりも熱不安定性が有意に小さくなる。図43からわかるように、(S)-isogNAの組み込みが一般に(S)-GNAよりもインビボ活性を改善する。

【0 6 7 4】

実施例13：アンチセンスシード領域へのMod8(2'-5'RNA)の組み込み

Mod8(2'-5'RNA)はアンチセンスシード領域に組み込まれ、その効果が研究された。図44は、アンチセンスシード領域へのMod8(2'-5'-RNA)の組み込みが、ラット毒性研究における臨床病理学的測定値を改善したことを示す。親siRNA又は単一のMod8(2'-5'RNA結合)を有するsiRNAの単回用量(30mg/kg)の皮下投与後のラットの臨床病理パラメーターを表39にまとめる。

【0 6 7 5】

10

20

30

40

50

【表 39】

表 39: 親 siRNA 又は単一の Mod8(2'-5'-RNA 結合)を有する siRNA の単回用量 (30mg/kg)の皮下投与後のラットの臨床病理パラメーター

	0.9% NaCl		親(AD-65644)*		2'-5'-RNA @ AS7 (AD-227798)		親(AD-64958)		2'-5'-RNA @ AS7 (AD-227768)	
	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
ALT (U/L)	38	7	47	14	45	10	108	37	49	9
AST (U/L)	91	24	180	55	83	6	332	86	88	12
ALB (g/dL)	3.1	0.1	3.0	0.1	3.1	0.1	2.9	0.1	3.0	0.1
ALP (U/L)	239	35	449	150	275	34	427	110	224	47
BILI (mg/dL)	0.12	0.03	0.52	0.40	0.11	0.01	0.48	0.33	0.12	0.01
CA (mg/dL)	10.0	0.3	10.3	0.2	9.9	0.2	9.9	0.2	10.2	0.2
UREAN (mg/dL)	14.3	1.5	16.8	3.6	14.6	1.2	18.6	2.6	16.5	4.1
CHOL (mg/dL)	58	10	74	18	50	11	43	10	34	10
CL (mmol/L)	100	2	100	3	102	2	102	2	103	2
CREAT (mg/dL)	0.22	0.03	0.23	0.03	0.22	0.02	0.21	0.02	0.23	0.03
GLUC (mg/dL)	118	18	113	12	148	6	124	5	121	7
PHOS (mg/dL)	8.5	0.4	8.8	0.5	8.2	0.4	9.0	1.2	8.8	0.6
TRIG (mg/dL)	65	33	138	88	120	31	51	5	52	7
K (mmol/L)	4.6	0.2	4.3	0.2	4.4	0.1	4.9	0.3	4.8	0.1
NA (mmol/L)	141	1	140	1	142	1	140	1	142	1
GLDH (U/L)	7.7	1.5	77.5	18.4	11.6	6.8	140.8	55.8	16.3	6.6
PROT (g/dL)	6	0.0	6	0.6	6	0.6	5	0.0	6	0.5
GLOB (g/dL)	2.65	0.10	2.63	0.12	2.43	0.17	2.27	0.12	2.63	0.22
A/G	1.1	0.0	1.1	0.1	1.3	0.1	1.3	0.1	1.2	0.1
全ての値は、各コホートの4匹全ての動物の平均を表す。*この群の1匹の動物は、臨床所見に関する問題のために早期に安楽死させ、このデータはこの分析に含まなかった。										

【0676】

実施例 14：代替の 3'-mUNA 合成

スキーム 43 は、3'-メチルUNA-ウリジンホスホラミダイトの合成を示す。

10

20

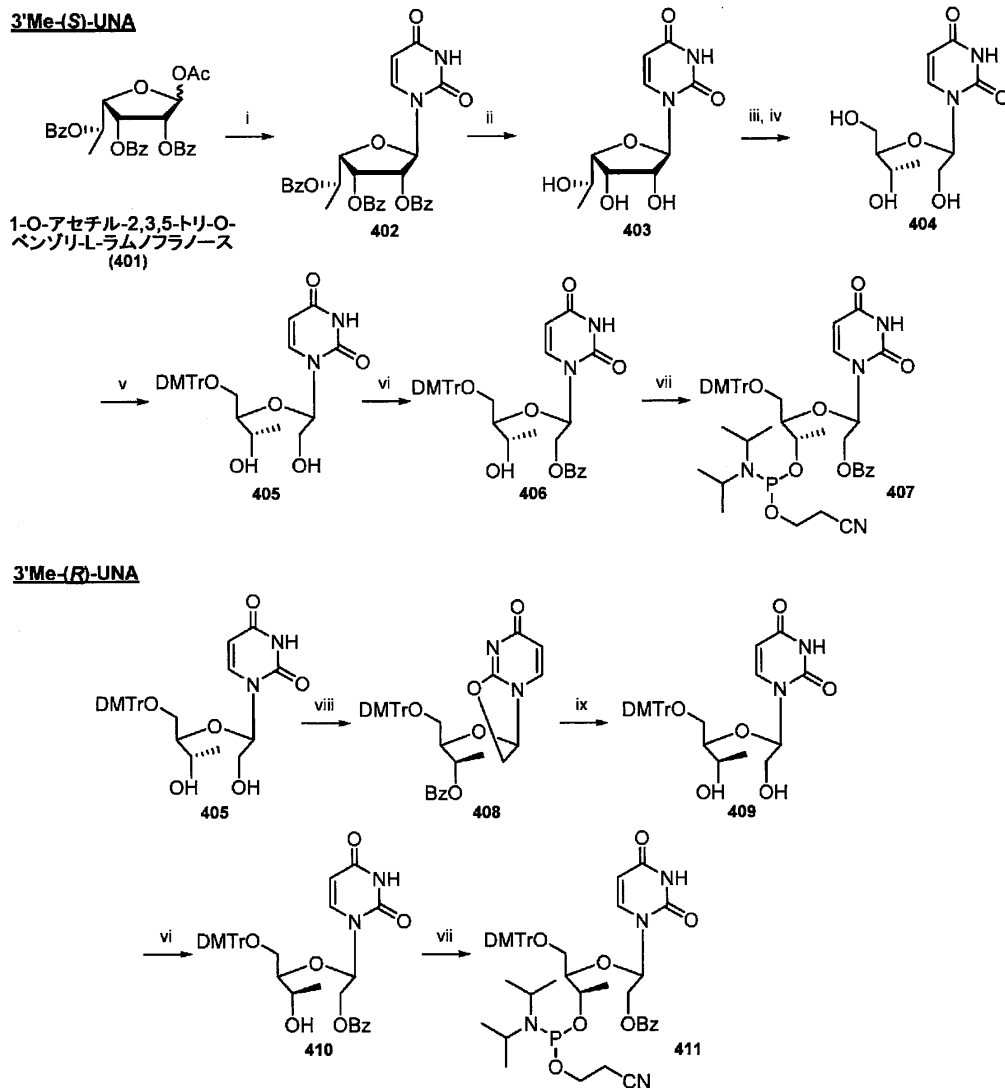
30

40

50

【化 9 9】

スキーム43



試薬及び条件：(i) BSA、TMSOTf、ウラシル、MeCN、還流、1時間、79%；(ii) NH₃、MeOH、室温、3日間、80%；(iii) NaIO₄、1,4-ジオキサン、H₂O、室温、1.5時間；(iv) NaBH₄、2ステップで85%；(v) DMTrCl、DMAP、ピリジン、室温、12時間、30%；(vi) Bz₂O、DMAP、ピリジン、室温、5時間、65～80%；(vii) 2-シアノエチルN,N-ジイソプロピルクロロホスホラミダイト、DIEA、DCM、室温、1～2時間、81～86%；(viii) BzOH、DIAD、PPh₃、THF、室温、5時間；(ix) NaOH水溶液、室温、12時間、2ステップで77%。

【0677】

化合物402：MeCN (80 mL) 中の1-O-アセチル-2,3,5-トリ-O-ベンゾリ-L-ラムノフラノース (401) (3.70 g、7.14 mmol；Lerner, L. M. J. Org. Chem. 1976, 41, 306-310) 及びウラシル (1.61 g、14.3 mmol) の溶液に、N,O-ビス(トリメチルシリル)アセトアミド (10.6 mL、42.9 mmol) を添加した。混合物を1時間還流し、Me₃SiOTf (1.55 mL、8.57 mmol) を室温で滴下した。再び1時間還流した

後、混合物を飽和 NaHCO_3 溶液 (100 mL) でクエンチし、蒸発させ、 CH_2Cl_2 で抽出した。有機層を MgSO_4 で乾燥し、濃縮し、シリカゲル上のカラムクロマトグラフィー (ヘキサン中 25% AcOEt) により精製して、化合物 402 を白色の泡状物として得た (3.22 g、79%、 $R_f=0.15$; ヘキサン中 25% AcOEt で展開)。 ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 11.46 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 7.95–7.30 (m, 16H), 6.26–6.19 (m, 2H), 6.10–6.07 (m, 1H), 5.73 (dd, $J=8.5, 2.0$ Hz, 1H), 5.41–5.34 (m, 1H), 5.05 (dd, $J=8.5, 3.0$ Hz, 1H), 1.43 (d, $J=6.0$ Hz, 3H)。 ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 164.59, 164.53, 164.41, 163.12, 150.61, 142.42, 133.90, 133.83, 133.42, 129.29, 129.22, 129.16, 129.10, 128.82, 128.65, 128.61, 128.59, 128.24, 102.34, 89.13, 81.75, 74.11, 71.96, 67.81, 17.22。 HRMS; $\text{C}_{31}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_9\text{Na}$ について計算した $[\text{M}+\text{H}]^+$, 593.1536; 実測値: 59.

【0678】

化合物 403: 化合物 402 (9.60 g、16.8 mmol) を 1N NH_3MeOH 溶液 (168 mL) に溶解した。得られた混合物を室温で 3 日間攪拌し、次に、蒸発させた。粗残留物をシリカゲル上のカラムクロマトグラフィー (AcOEt 中 10% MeOH) により精製して、化合物 403 を白色の粉末として得た (3.41 g、80%、 $R_f=0.23$; AcOEt 中の 10% MeOH で展開)。 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 11.29 (brs, 1H), 7.75 (d, $J=11.5$ Hz, 1H), 5.77 (d, $J=8.5$ Hz, 1H), 5.64 (d, $J=10.0$ Hz, 1H), 5.33 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 5.03 (d, $J=1.5$ Hz, 1H), 4.56 (d, $J=6.5$ Hz, 1H), 4.39–4.31 (m, 1H), 4.06 (brs, 1H), 3.91 (dd, $J=3.0, 10.5$ Hz, 1H), 3.86–3.76 (m, 1H), 1.05 (d, $J=7.5$ Hz, 3H)。 ^{13}C (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 163.11, 150.95, 141.90, 102.07, 88.24, 85.40, 74.32, 70.52, 63.45, 20.53。 HRMS; $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_6$ について計算した $[\text{M}+\text{H}]^+$, 259.0930; 実測値: 259.0931。

【0679】

化合物 404: 1, 4-ジオキサン (25 mL) 及び水 (5 mL) の混合物中の化合物 403 (640 mg、2.48 mmol) の溶液に、 NaIO_4 (591 mg、2.72 mmol) を添加した。反応混合物を室温で 1.5 時間攪拌し、次に、1, 4-ジオキサンの希釈し、セライトパッドを通して濾過した。固形残留物を 1, 4-ジオキサンで洗浄し、次に、水素化ホウ素ナトリウム (94.0 mg、2.48 mmol) を濾液に添加した。得られた混合物を 15 分間攪拌し、溶媒を真空中で除去した。粗残留物をシリカゲル上のカラムクロマトグラフィー (AcOEt 中 10~20% MeOH) により精製して、化合物 404 を無色の粘着性ガラスとして得た (548 mg、85%、 $R_f=0.34$; AcOEt 中 15% MeOH で展開)。 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 11.16 (brs, 1H), 7.60 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 5.83 (m, 1H), 5.55 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 5.06 (m, 1H), 4.68 (d, $J=5.2$ Hz, 1H), 4.49–4.41 (m, 1H), 3.76–3.67 (m, 1H), 3.65–3.46 (m, 1H), 3.38–3.21 (m, 3H), 1.05 (d, $J=6.4$ Hz, 1H)。 ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 163.49, 151.39, 141.61, 101.00, 84.33, 83.90, 65.85, 61.46, 60.73, 18.25。 HRMS; $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_6\text{Na}$ について計算した $[\text{M}+\text{H}]^+$, 283.0906; 実測値: 283.0916。

【0680】

化合物405：乾燥ピリジン80 mL中の化合物404 (2.04 g、7.84 mmol) の溶液に、DMTrCl (2.89 g、8.63 mmol) 及び4-ジメチルアミノピリジン (95.8 mg、0.784 mmol) を添加した。反応混合物を室温で12時間攪拌し、次に、CH₂Cl₂で希釈した。反応を飽和NaHCO₃水溶液でクエンチした。有機層を分離し、ブラインで洗浄した。溶媒を真空で除去した。粗残留物をシリカゲル上のカラムクロマトグラフィー (AcOEt) により精製して、化合物405を白色の形態として得た (1.32 g、30%、R_f=0.52; AcOEtで展開)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.31 (d, J=1.2 Hz, 1H), 7.58 (d, J=8.0 Hz, 1H), 7.35–7.10 (m, 9H), 6.88–6.81 (m, 4H), 5.89–5.80 (m, 1H), 5.46 (dd, J=1.2, 8.0 Hz, 1H), 5.13–5.06 (m, 1H), 4.72 (d, J=4.8 Hz, 1H), 3.78–3.52 (m, 10H), 3.04–2.78 (m, 2H), 0.87 (d, J=6.4 Hz, 3H)。¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 163.28, 157.98, 157.96, 151.51, 144.82, 141.23, 135.66, 135.54, 129.58, 129.49, 127.77, 127.61, 126.58, 113.14, 113.11, 101.67, 85.45, 84.42, 82.56, 66.08, 63.02, 61.01, 55.03, 55.00, 18.09。HRMS; C₃₁H₃₄N₂O₈Naについて計算した [M+Na]⁺, 585.2213; 実測値: 585.2205。

[0681]

化合物406：乾燥ピリジン8.5 mL中の化合物405 (500 mg、0.890 mmol) の溶液に、無水安息香酸 (211 mg、0.979 mmol) 及び4-ジメチルアミノピリジン (10.9 mg、0.0890 mmol) を0℃で添加した。反応混合物を室温で5時間攪拌し、次に、CH₂Cl₂で希釈した。反応を飽和NaHCO₃水溶液でクエンチした。有機層を分離し、ブラインで洗浄した。溶媒を真空で除去した。粗残留物をシリカゲル上のカラムクロマトグラフィー (ヘキサン中50% AcOEt) により精製して、化合物406を白色の形態として得た (474 g、80%、R_f=0.34; ヘキサン中50% AcOEtで展開)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.43 (d, J=2.0 Hz, 1H), 7.96–7.82 (m, 2H), 7.82–7.43 (m, 4H), 7.41–7.04 (m, 9H), 7.02–6.73 (m, 4H), 6.32–6.12 (m, 1H), 5.51 (d, J=8.1 Hz, 1H), 4.84 (d, J=4.5 Hz, 1H), 4.65 (dd, J=11.6, 5.2 Hz, 1H), 4.49 (dd, J=11.5, 6.8 Hz, 1H), 3.79–3.61 (m, 8H), 3.17–2.74 (m, 2H), 0.90 (d, J=6.4 Hz, 3H)。¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 165.02, 163.10, 157.99, 157.97, 151.10, 144.75, 140.70, 135.56, 135.46, 133.65, 129.58, 129.49, 129.16, 129.01, 128.84, 127.77, 127.60, 126.61, 113.13, 102.13, 85.58, 82.81, 81.64, 66.08, 63.34, 62.94, 55.01, 54.98, 17.91。HRMS; C₃₈H₃₈N₂O₉Naについて計算された [M+Na]⁺, 689.2475; 実測値: 689.2505。

[0682]

化合物407：乾燥DCM38 mL中の化合物406 (2.50 g、3.75 mmol) の溶液に、DIPEA (1.97 mL、11.3 mmol) 及び2-シアノエチルクロロ-N,N-ジイソプロピルホスホラミダイト (921 µL、14.1 mmol) を滴下した。反応混合物を室温で1時間攪拌し、次に、DCMで希釈した。反応を飽和NaHCO₃水溶液でクエンチした。有機層を分離し、ブラインで洗浄した。溶媒を真空で除去した。粗残留物をシリカゲル上のカラムクロマトグラフィーにより精製して、ジアステレオマー407の混合物を無色の形態として得た (2.79 g、86%、R_f=0.23; ヘキサン中40% AcOEtで展開)。¹H NMR (500 MHz, アセトニトリル-d₃

) δ 9.20 (brs, 1H); 7.99–7.93 (m, 2H), 7.64–7.18 (m, 13H), 6.85–6.80 (m, 4H), 6.34–6.28 (m, 1H), 5.49 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 4.59–4.40 (m, 2H), 4.19–4.05 (m, 1H), 3.79–3.48 (m, 12H), 3.19–3.09 (m, 2H), 2.62–2.57 (m, 2H), 1.16–1.01 (m, 15H). ^{13}C NMR (126 MHz, アセトニトリル- d_3) δ 166.44, 163.94, 159.62, 159.59, 151.90, 151.82, 145.97, 145.95, 141.46, 141.41, 136.80, 136.77, 136.73, 134.38, 130.91, 130.89, 130.84, 130.80, 130.46, 130.44, 130.43, 129.60, 128.88, 128.82, 128.79, 127.77, 119.52, 114.03, 114.01, 103.05, 103.00, 87.48, 87.45, 83.30, 83.26, 83.08, 82.99, 82.89, 82.86, 71.64, 71.51, 71.35, 71.21, 64.76, 64.72, 64.09, 64.06, 59.52, 59.37, 59.14, 58.99, 55.87, 55.86, 43.88, 43.87, 43.79, 43.77, 25.05, 24.99, 24.93, 24.87, 24.81, 24.79, 24.73, 21.02, 20.98, 20.96, 20.92, 17.40, 17.39, 17.22, 17.19. ^{31}P NMR (202 MHz, アセトニトリル- d_3) δ 148.94; 148.75. HRMS; $\text{C}_{47}\text{H}_{56}\text{N}_4\text{O}_{10}\text{P}$ について計算した $[\text{M}+\text{H}]^+$, 867.3734; 実測値: 867.3742.

【0683】

化合物409: 乾燥THF 9 mL中の化合物405 (500 g、0.890 mmol)の溶液に、 PPh_3 (622 mg、2.67 mmol)、安息香酸 (543 mg、4.45 mmol) 及びDIAD (526 μL 、2.67 mmol)を滴下した。反応混合物を室温で5時間攪拌し、反応の完了をTLCでチェックした。溶媒を真空で除去した。粗残留物をシリカゲル上のカラムクロマトグラフィー (AcOEt中5~10% MeOH)により精製して、2, 2'-アンヒドロヌクレオシド408 ($R_f=0.11$; AcOEtで展開)を得た。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.93 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.88–7.84 (m, 2H), 7.70–7.64 (m, 1H), 7.53–7.48 (m, 2H), 7.36–7.16 (m, 9H), 6.85–6.76 (m, 4H), 6.13 (dd, $J=5.6, 1.6$ Hz, 1H), 5.76 (dt, $J=7.6, 12.4$ Hz, 1H), 4.67 (dd, $J=10.0, 5.6$ Hz, 1H), 4.51–4.41 (m, 2H), 3.70 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 3.26 (dd, $J=10.0, 3.6$ Hz, 1H), 2.96 (dd, $J=10.4, 5.2$ Hz, 1H), 1.15 (d, $J=7.2$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 171.00, 164.91, 160.23, 158.12, 158.05, 144.55, 136.77, 135.10, 135.05, 133.52, 129.62, 129.48, 129.16, 128.78, 127.86, 127.51, 126.75, 113.18, 108.72, 87.62, 85.63, 80.12, 73.40, 70.49, 62.56, 55.02, 54.98, 54.96, 15.37. HRMS; $\text{C}_{38}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_8$ について計算した $[\text{M}+\text{H}]^+$, 649.2550; 実測値: 649.2546.

【0684】

化合物408をTHF 10 mLに溶解した。混合物の溶液に1 N NaOH水溶液 3 mLを滴下した。得られた混合物を12時間攪拌した。溶媒を真空で除去した。粗残留物をシリカゲル上のカラムクロマトグラフィー (AcOEt中0~5% MeOH)により精製して、化合物409を白色の形態として得た (452 g、2ステップで90%、 $R_f=0.32$; AcOEtで展開)。 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11.39 (brs, 1H), 7.63 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.39–7.04 (m, 9H), 6.97–6.67 (m, 4H), 5.82 (t, $J=5.9$ Hz, 1H)

, 5.49 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 5.23–5.16 (m, 1H), 4.77 (d, $J=4.8$ Hz, 1H), 3.84–3.46 (m, 10H), 3.06–2.84 (m, 2H), 0.86 (d, $J=6.4$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 163.27, 157.97, 157.95, 151.44, 144.81, 141.22, 135.58, 135.56, 129.61, 129.52, 127.75, 127.63, 126.57, 113.10, 101.73, 85.31, 84.80, 83.02, 65.90, 62.88, 61.16, 55.00, 54.98, 18.55. HRMS; $\text{C}_{31}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}$ について計算した $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 585.2213; 実測値: 585.2205.

【0685】

化合物410: 乾燥ピリジン36 mL中の化合物409 (2.00 g、3.56 mmol) の溶液に、DMAP (43.5 mg、0.356 mmol) 及び Bz_2O (845 mg、3.74 mmol) を添加した。反応混合物を室温で5時間攪拌し、次に、得られた混合物をDCMで希釈した。反応を飽和 NaHCO_3 水溶液でクエンチした。有機層を分離し、ブラインで洗浄した。溶媒を真空で除去した。粗残留物をシリカゲル上のカラムクロマトグラフィー (ヘキサン中50% AcOEt) により精製して、化合物410を無色の形態として得た (1.99 g、84%、 $R_f=0.34$; ヘキサン中50% AcOEt で展開)。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.45 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 7.99–7.41 (m, 6H), 7.41–7.03 (m, 9H), 6.95–6.58 (m, 4H), 6.20 (t, $J=6.0$ Hz, 1H), 5.54 (dd, $J=7.6, 1.6$ Hz, 1H), 4.86 (d, $J=5.2$ Hz, 1H), 4.70 (dd, $J=12.0, 5.6$ Hz, 1H), 4.51 (dd, $J=12.0, 5.6$ Hz, 1H), 3.86–3.52 (m, 8H), 3.10–2.91 (m, 2H), 0.84 (d, $J=6.4$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 165.03, 163.10, 157.98, 157.96, 151.11, 144.75, 140.76, 135.52, 135.49, 133.69, 129.61, 129.52, 129.12, 129.00, 128.87, 127.75, 127.62, 126.59, 113.10, 102.20, 85.40, 83.17, 81.90, 65.75, 63.40, 62.73, 55.00, 54.97, 18.49. HRMS; $\text{C}_{38}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_9\text{Na}$ について計算した $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 689.2475; 実測値: 689.2490.

【0686】

化合物411: 乾燥DCM30 mL中の化合物410 (2.00 g、3.00 mmol) の溶液に、DIPEA (1.57 mL、9.00 mmol) 及び2-シアノエチルクロロ-N, N-ジイソプロピルホスホラミダイト (737 μL 、3.30 mmol) を滴下した。反応混合物を室温で2時間攪拌し、次に、DCMで希釈した。反応を飽和 NaHCO_3 水溶液でクエンチした。有機層を分離し、ブラインで洗浄した。溶媒を真空で除去した。粗残留物をシリカゲル上のカラムクロマトグラフィー (ヘキサン中50% AcOEt) により精製して、化合物411を無色の形態として得た (2.11 g、81%、 $R_f=0.65$; ヘキサン中50% AcOEt で展開)。 ^1H NMR (500 MHz, アセトニトリル- d_3) δ 8.00–7.94 (m, 2H), 7.64–7.16 (m, 13H), 6.86–6.81 (m, 4H), 6.28–6.22 (m, 1H), 5.56–5.48 (m, 1H), 4.69–4.44 (m, 3H), 4.23–4.03 (m, 1H), 3.86–3.42 (m, 12H), 3.31–3.04 (m, 2H), 2.61–2.51 (m, 2H), 1.28–0.98 (m, 15H). ^{13}C NMR (126 MHz, アセトニトリル- d_3) δ 166.51, 164.07, 164.04, 159.66, 159.64, 151.98, 145.99, 141.49, 141.43, 136.89, 136.84, 136.83, 136.81, 134.54, 134.52, 131.03, 130.97, 130.47, 129.73, 129.02, 129.00, 128.85, 127.84, 127.82, 119.56, 114.11, 11

4.07, 103.34, 103.30, 87.26, 87.24, 83.19, 83.02, 82.99, 82.96, 82.87, 82.83, 70.43, 70.31, 64.84, 64.82, 64.01, 63.91, 59.32, 59.29, 59.17, 59.14, 58.19, 55.95, 44.06, 44.00, 43.96, 43.90, 25.09, 25.03, 24.99, 24.95, 24.94, 24.89, 24.82, 24.76, 22.03, 21.07, 21.02, 21.00, 20.95, 17.87, 17.84. ^{31}P NMR (202 MHz, アセトニトリル- d_3) δ 149.10; 148.41. HRMS; $\text{C}_{47}\text{H}_{56}\text{N}_4\text{O}_{10}\text{P}$ について計算した $[\text{M}+\text{H}]^+$, 867.3734; 実測値: 867.3760.

【0687】

本明細書中で参照される米国特許、米国特許出願公開、外国特許、外国特許出願及び非特許論文の全てが、それら全体が参照により本明細書中に援用される。実施形態の態様は、さらなる実施形態をさらに提供するため、様々な特許、出願及び公開の概念を利用する必要がある場合、変更され得る。

【0688】

実施形態に対するこれら及び他の変更形態は、上記の詳細な説明のためになされ得る。一般に、以下の特許請求の範囲では、用いられる用語は、特許請求の範囲を、明細書及び特許請求の範囲に開示される具体的な実施形態に限定するように解釈されるべきではないが、かかる特許請求の範囲に権利が付与されている均等物の全範囲と共に、あらゆる考えられる実施形態を含むように解釈されるべきである。したがって、特許請求の範囲は、本開示によって限定されない。

10

20

30

40

50

【図面】

【図 1】

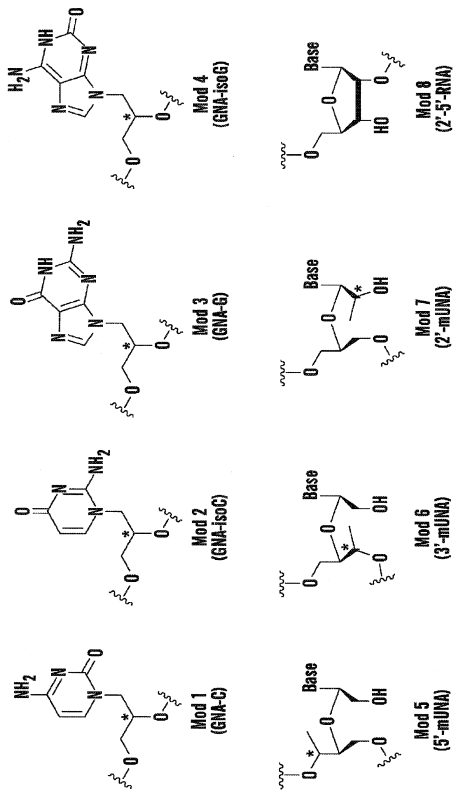


図 1

面立体異性体を試験した

【図 2】

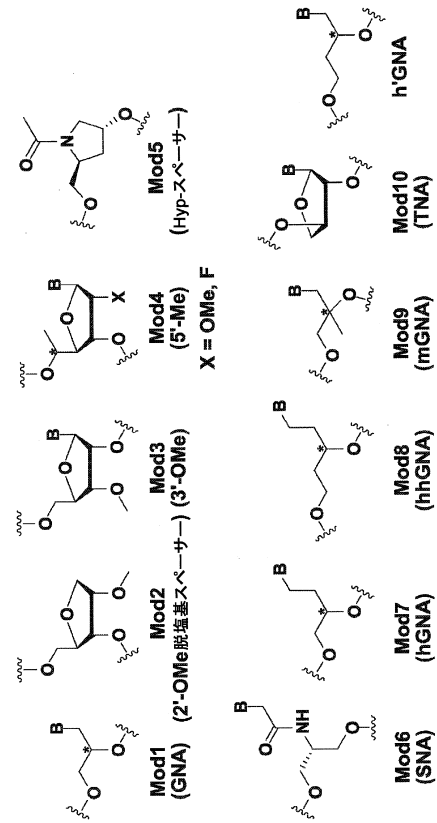


図 2

面立体異性体を試験した

【図 3】

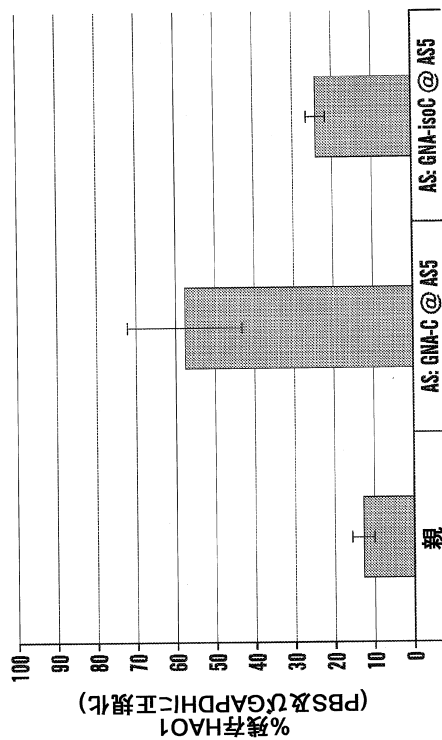


図 3

【図 4】

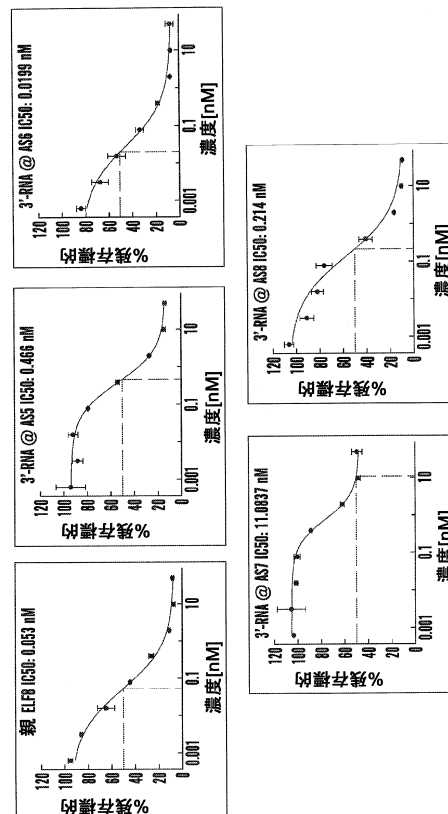


図 4

10

20

30

40

50

【図 5】

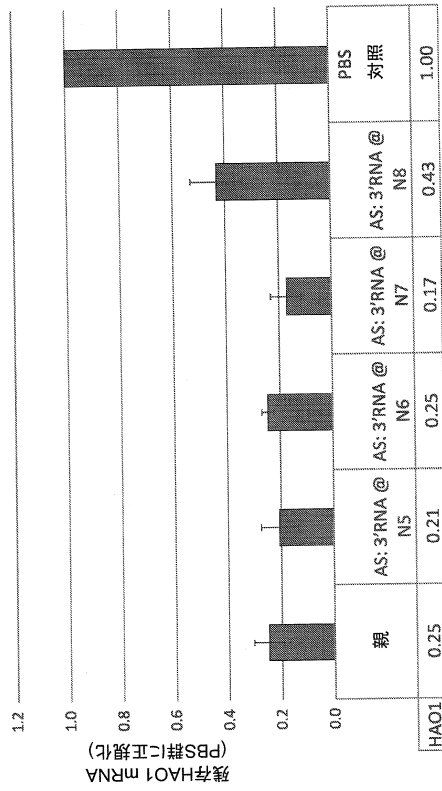


図 5

【図 6】

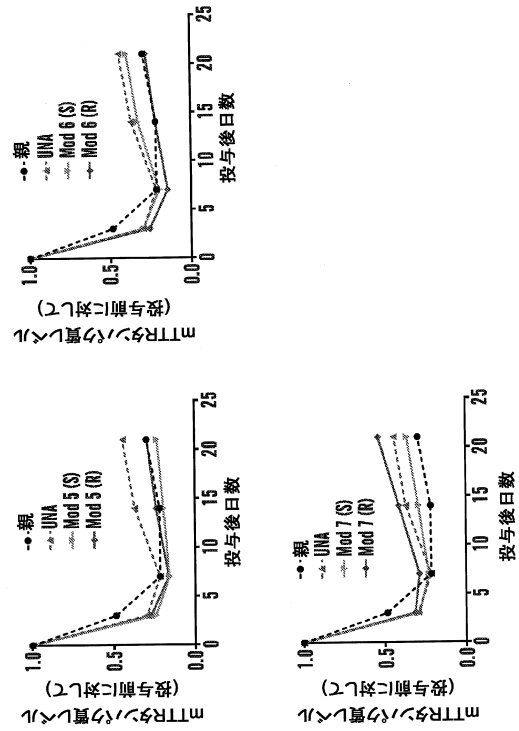


図 6

【図 7】

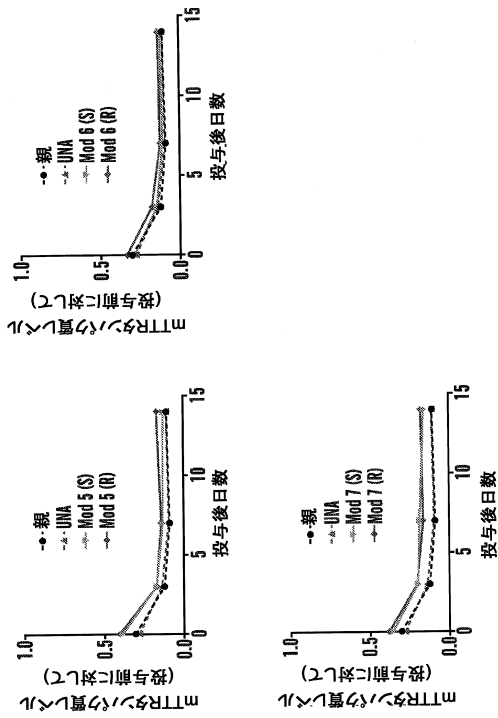


図 7

【図 8】

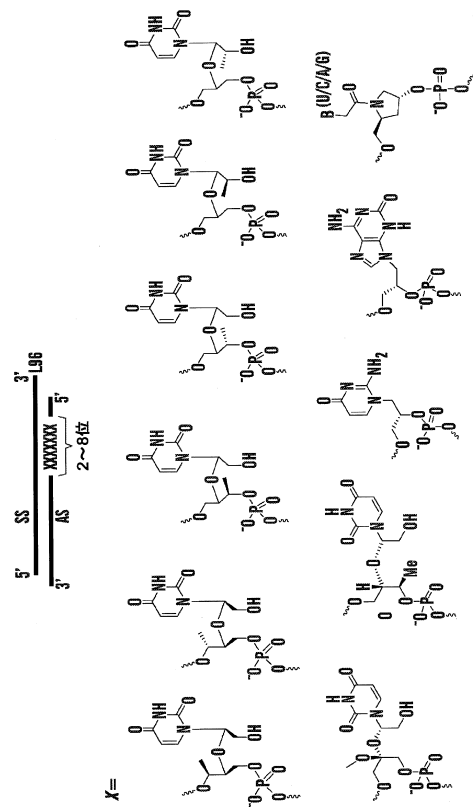
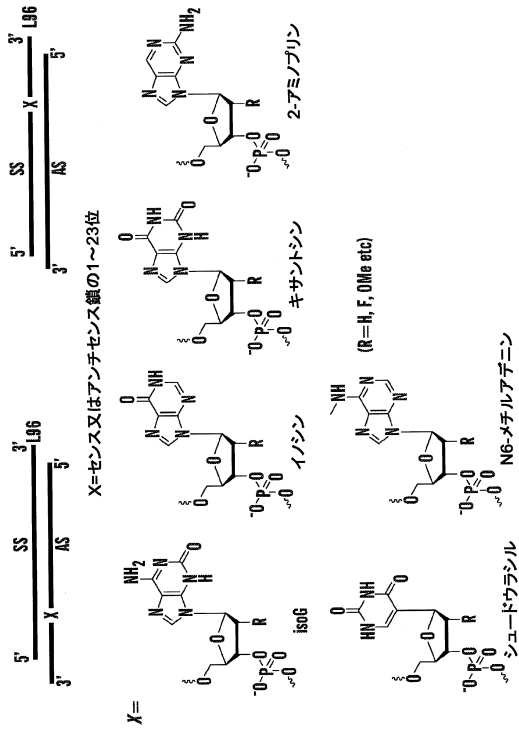
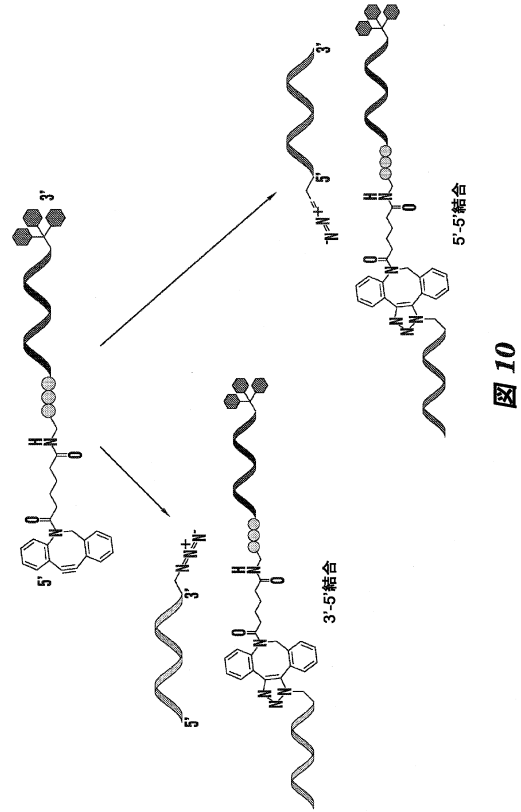


図 8

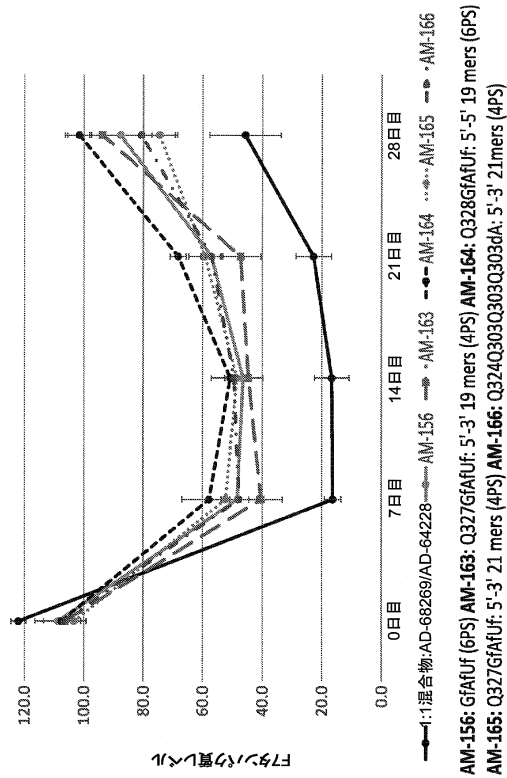
【図 9】



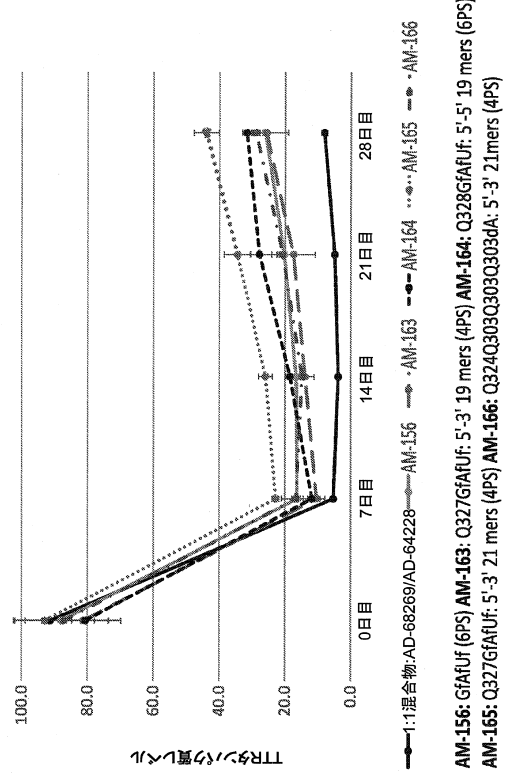
【図 10】



【図 11】



【図 12】



【図 13】

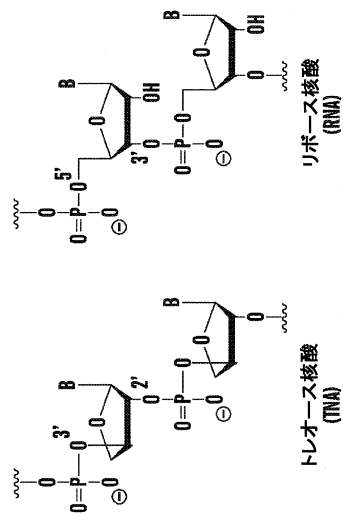


図 13

【図 14】

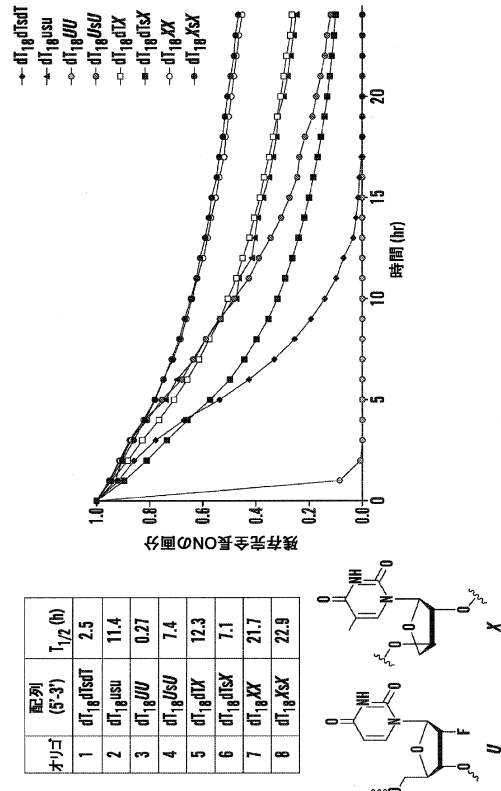


図 14

【図 15】

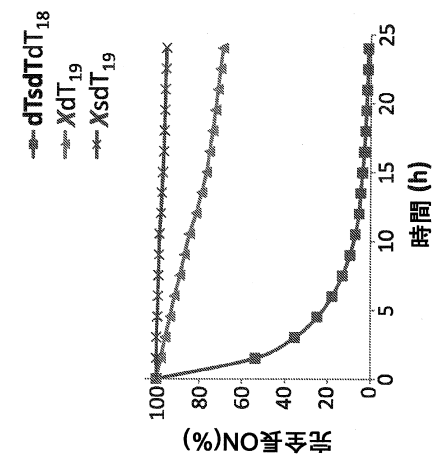


図 15

【図 16】

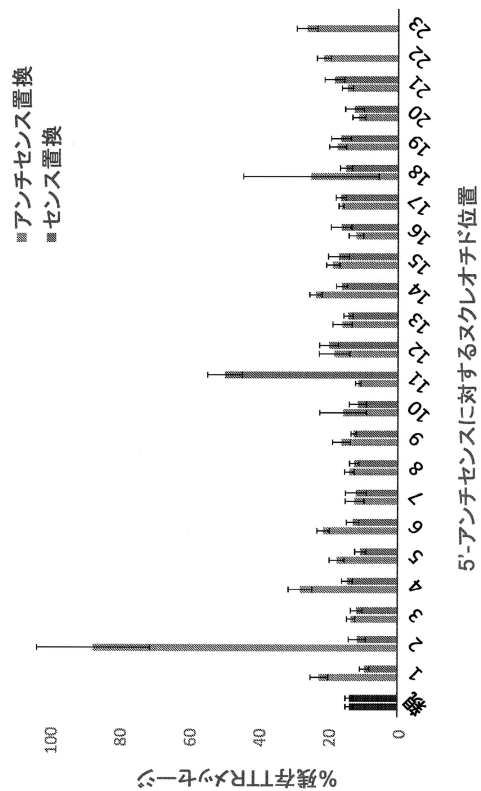
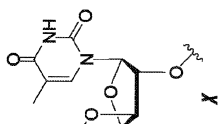


図 16

オリゴ	配列 (5'-3')	$t_{1/2}$ (h)
9	dTsdTdT18	4
10	XdT19	42
11	XsdT19	323



【図 17】

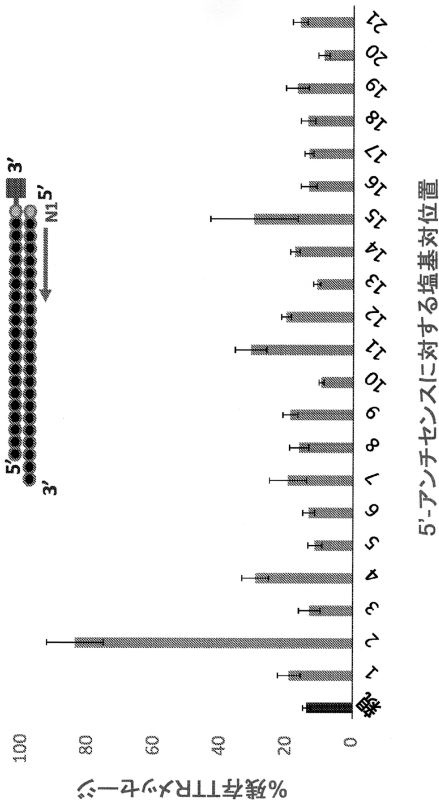


図 17

【図 18】

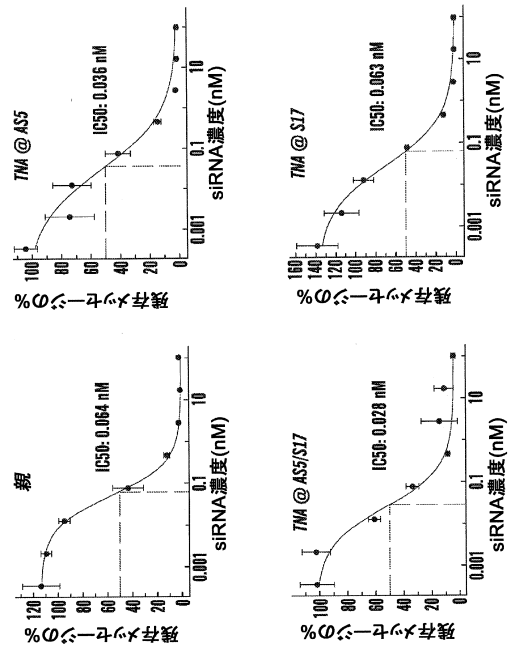


図 18

【図 19】

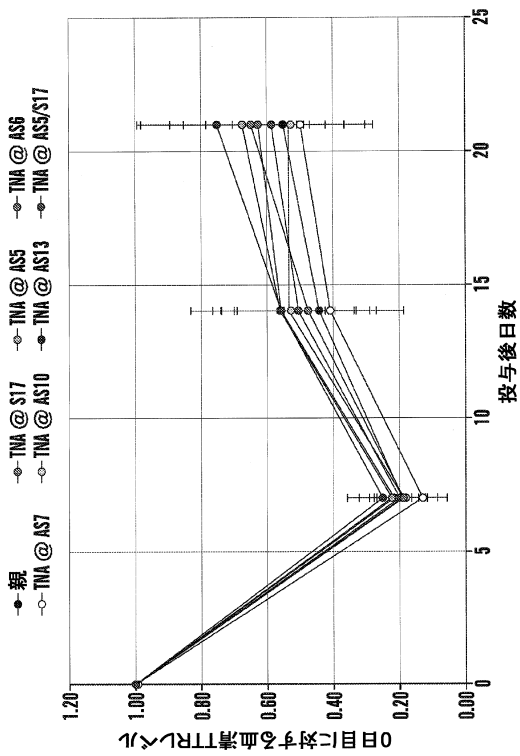


図 19

【図 20】

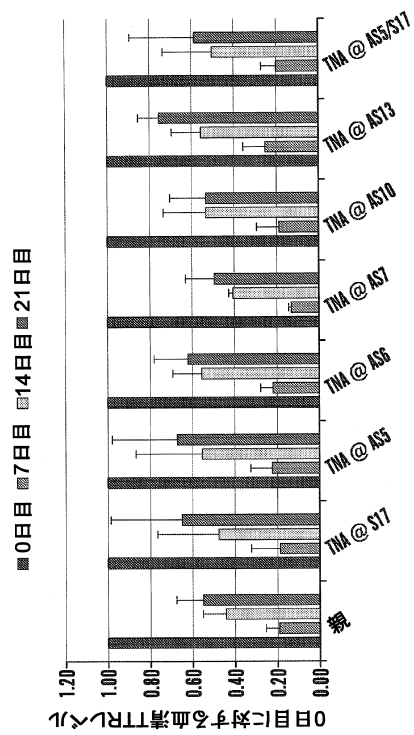


図 20

10

20

30

40

50

【図 2 1】

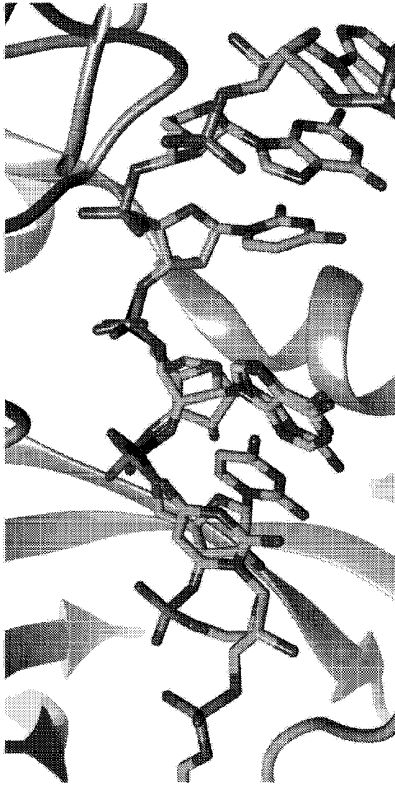


FIG. 21

【図 2 2】

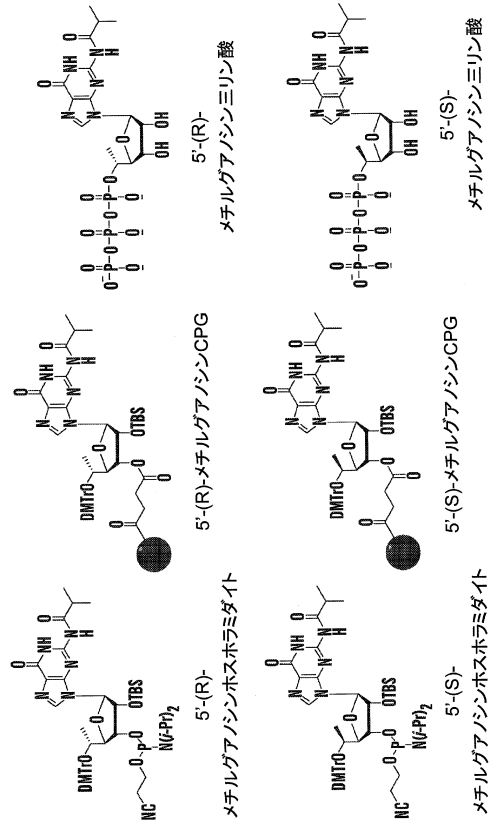


図 22

【図 2 3】

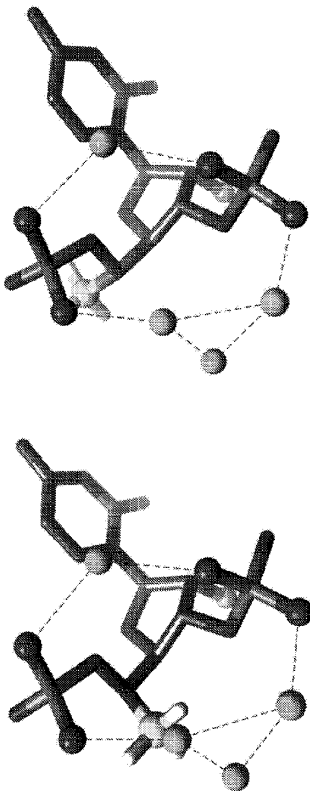


FIG. 23

【図 2 4 A】

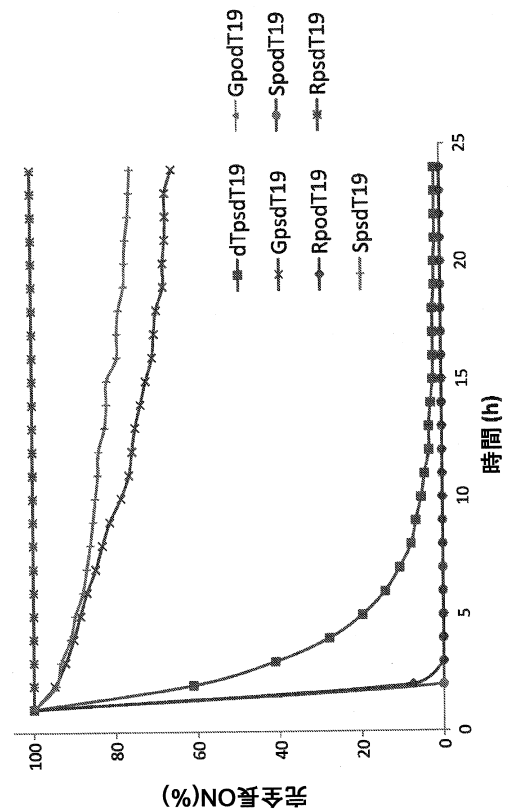


図 24A

【図 24 B】

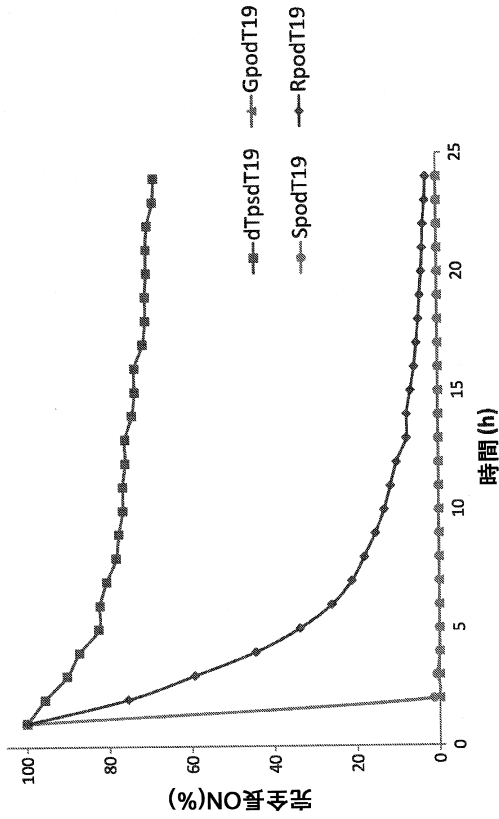


図 24B

【図 25 A】

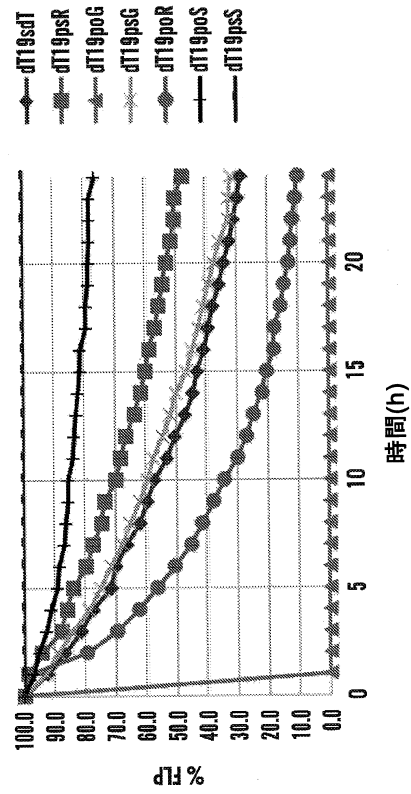


図 25A

【図 25 B】

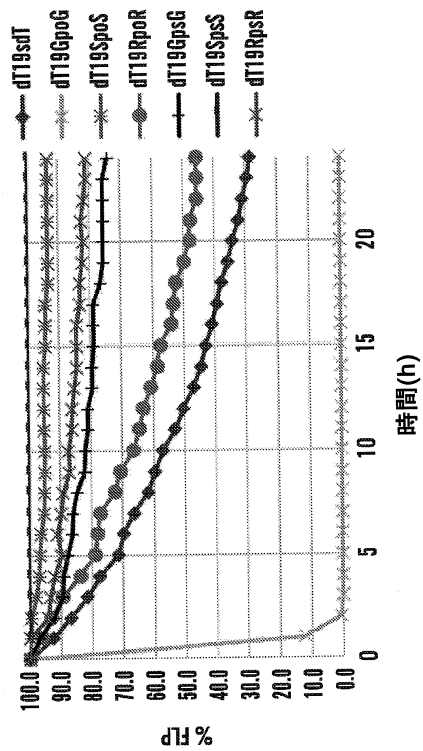


図 25B

【図 26】

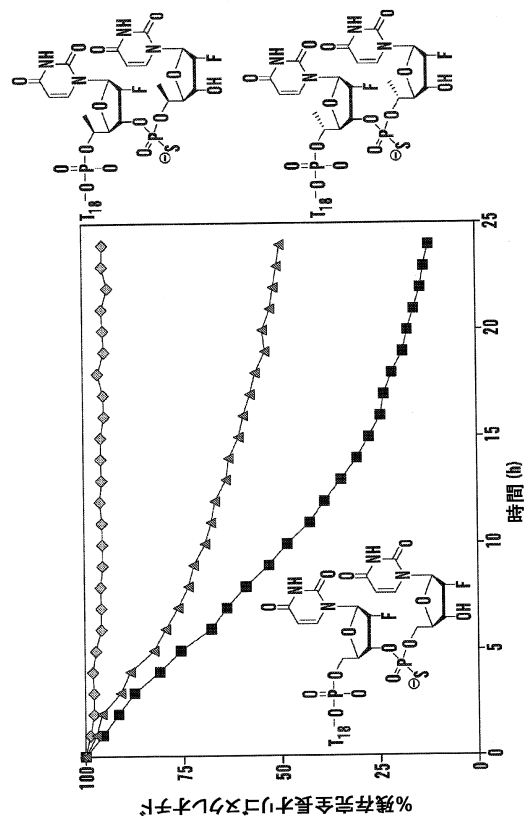


図 26

10

20

30

40

50

【図 27】

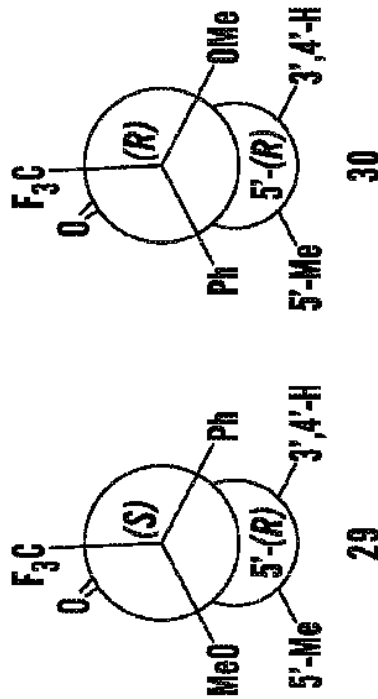


FIG. 27

【図 28】

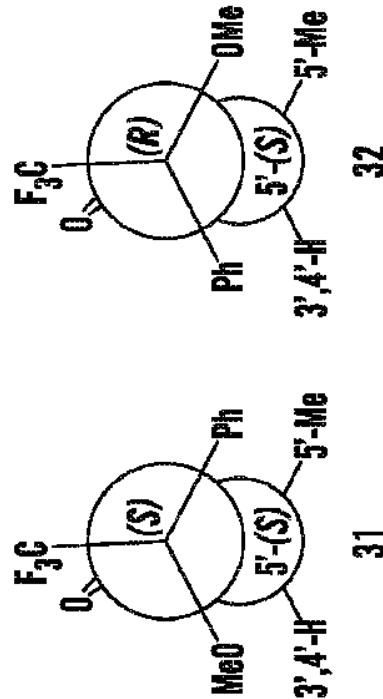
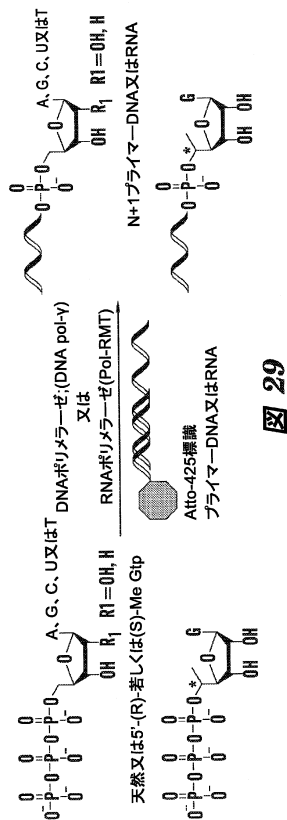


FIG. 28

【図 29】



【図 30 A】

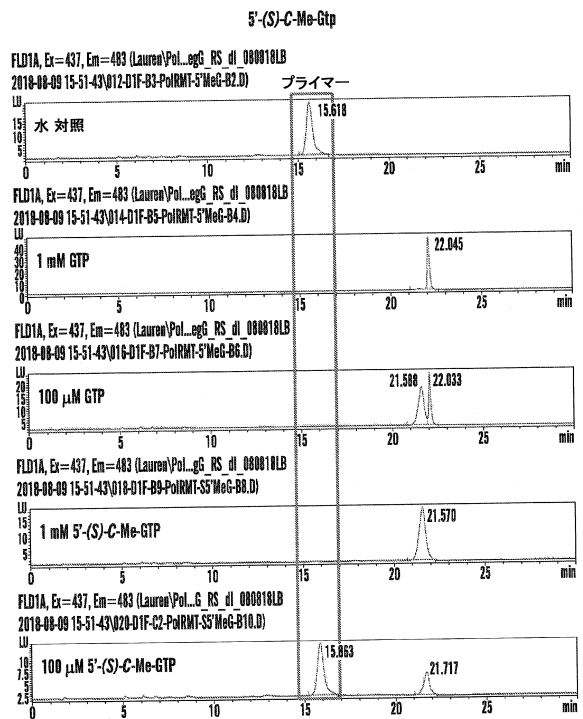


図 30

【図 30 B】

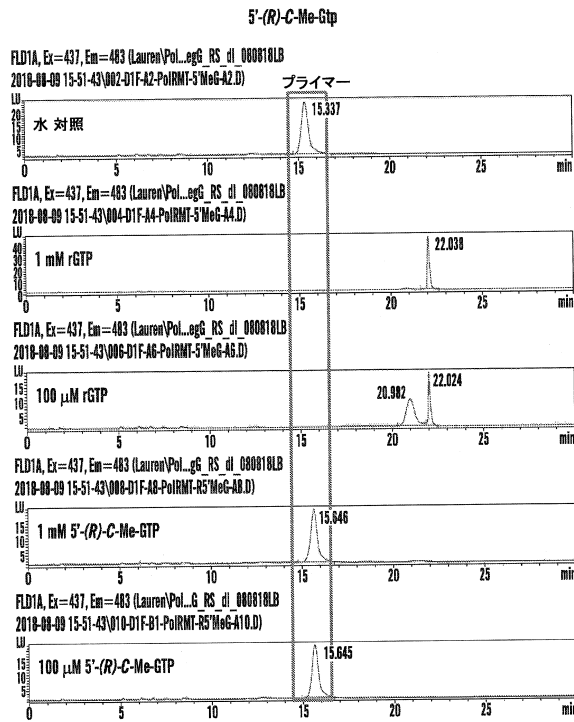


図 30 (続き)

【図 31 A】

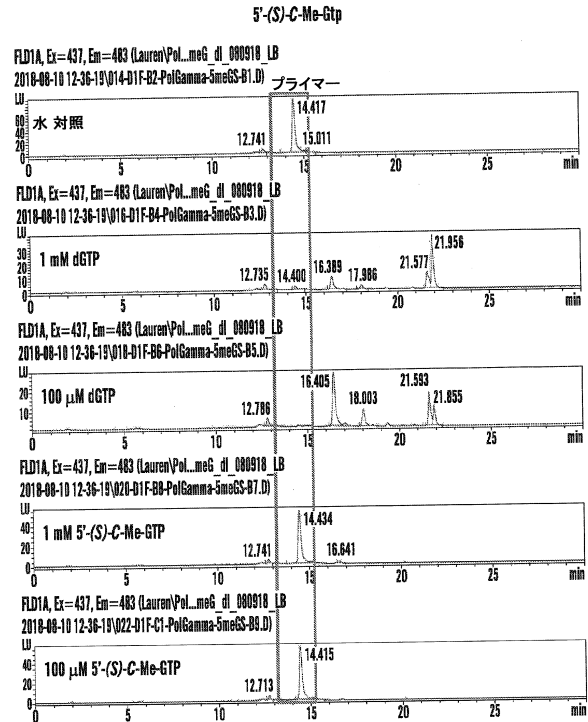


図 31

【図 31 B】

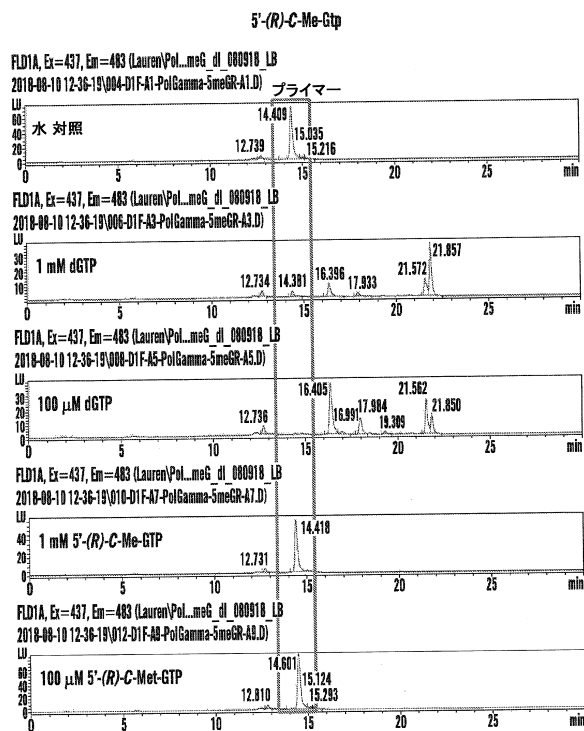


図 31 (続き)

【図 32】

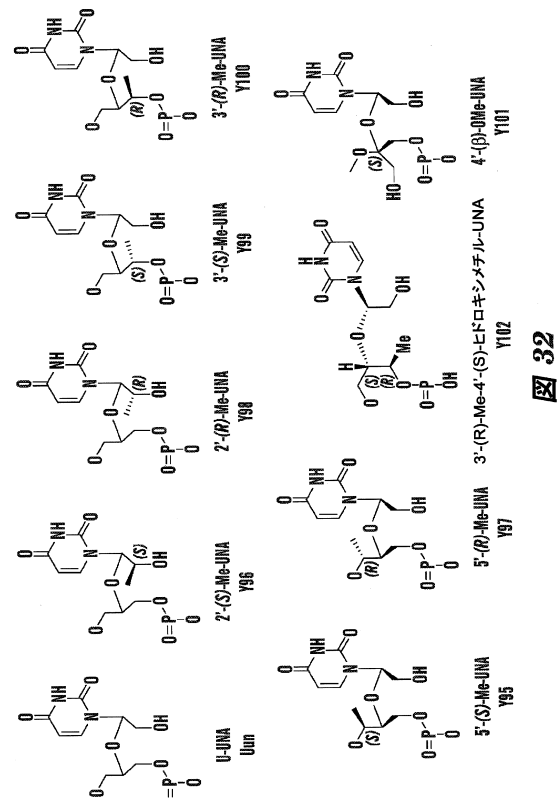


図 32

10

20

30

40

50

【図 3 3】

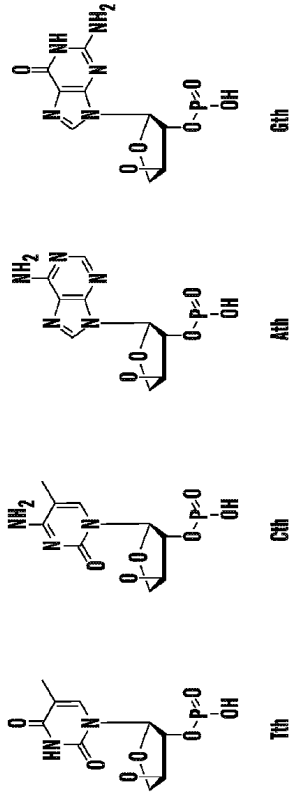


FIG. 33

【図 3 5】

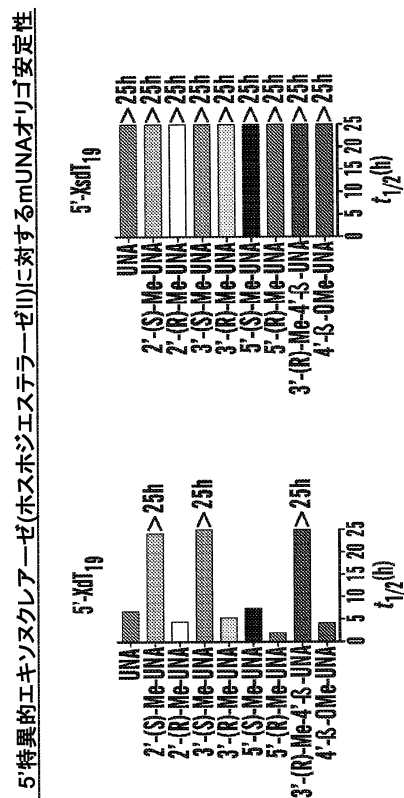


図 35

【図 3 4】

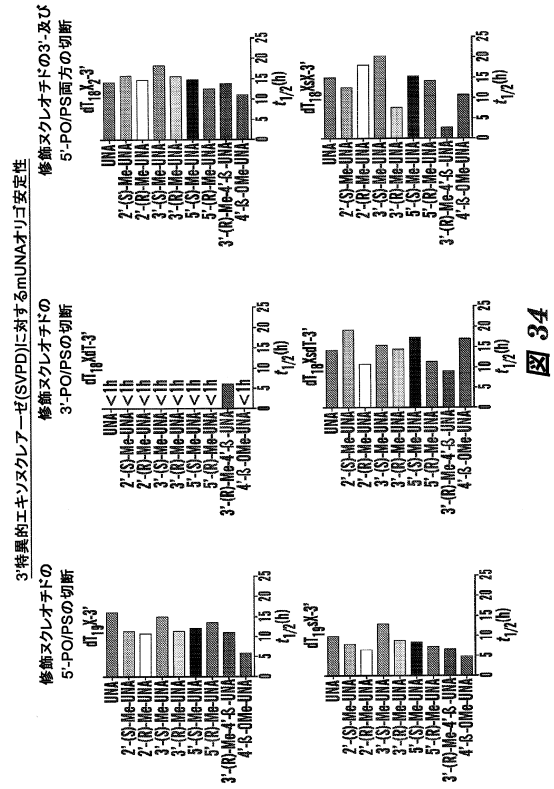


図 34

【図 3 6】

5'特異的エキソヌクレアーゼ(ホスホジエステラーゼII)分解に対するTNA-Tの安定性

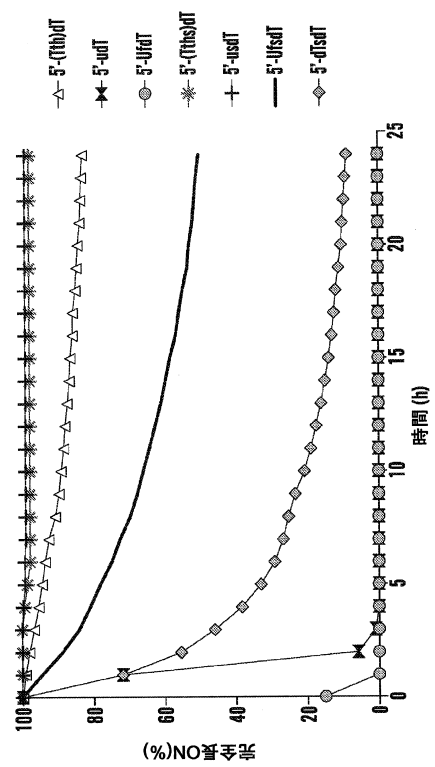


図 36

【図 37】

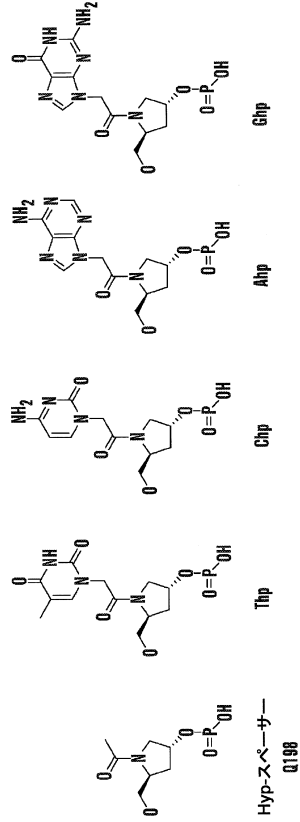


図 37

【図 38】

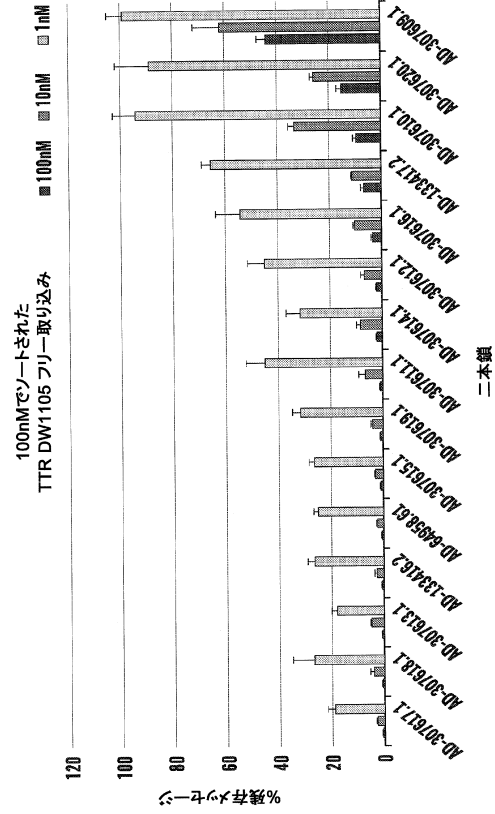


図 38

【図 39】

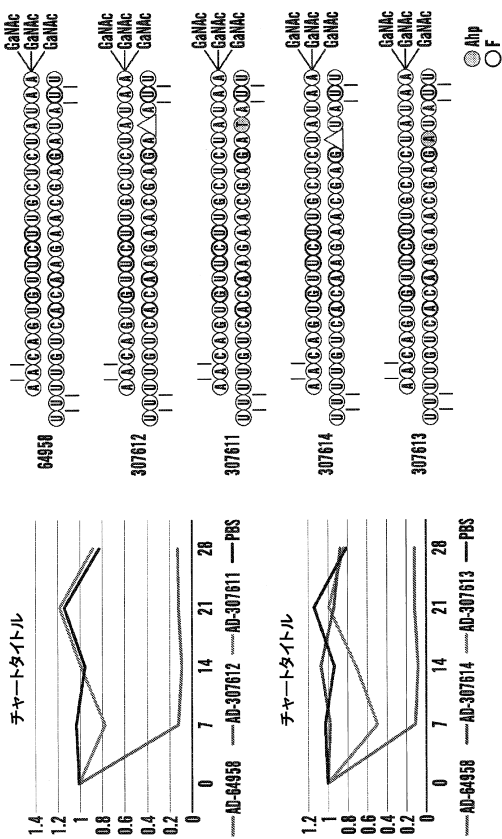


図 39

【図 40】



図 40

【図 4 1】

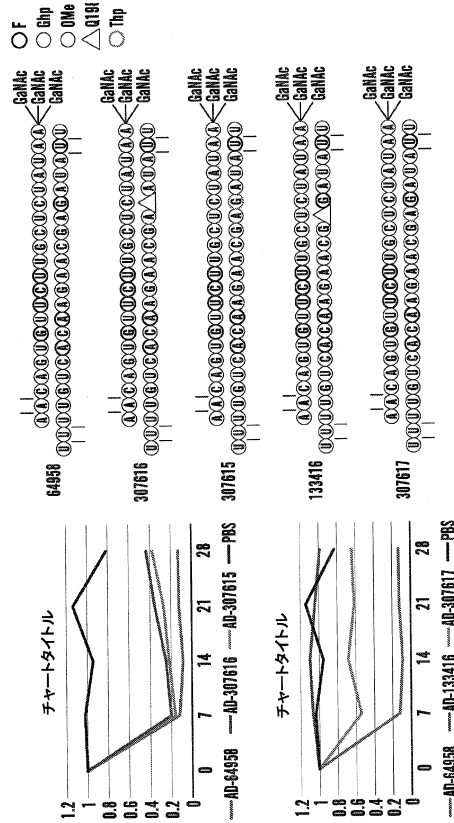


図 41

【図 4 2】

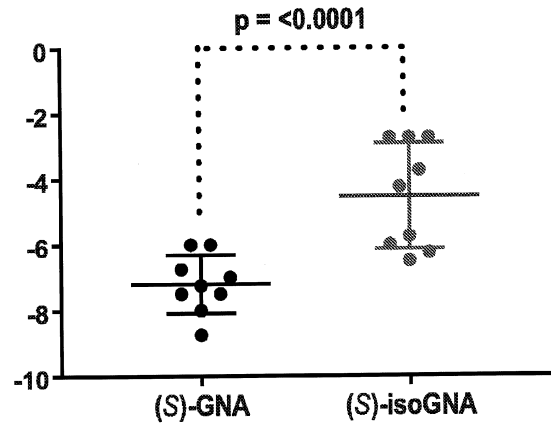


図 42

【図 4 3】

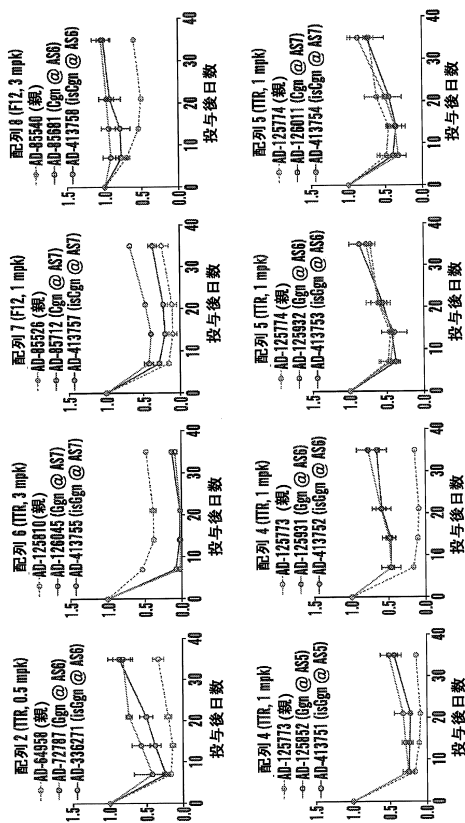


図 43

【図 4 4】

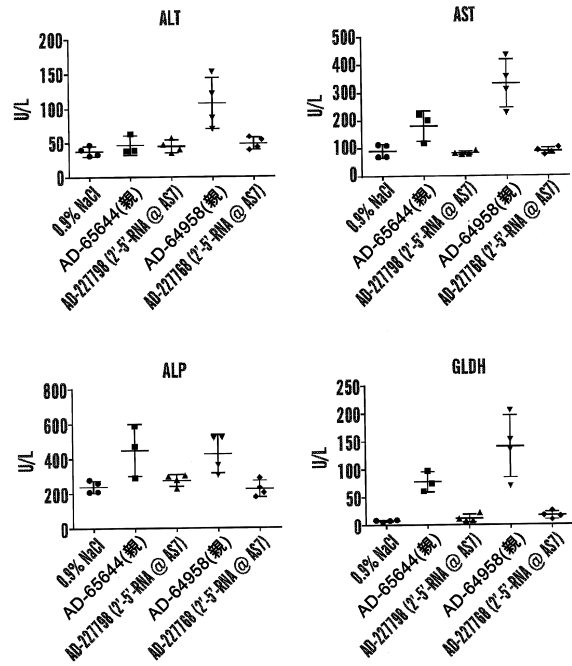


図 44

10

20

30

40

50

【配列表】
0007384833000001.app

10

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 K	31/713 (2006.01)	A 6 1 K	31/713	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
C 0 7 K	14/47 (2006.01)	C 0 7 K	14/47	
C 0 7 K	16/00 (2006.01)	C 0 7 K	16/00	

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

リート・３００・サード・フロア・アルニラム・ファーマシューティカルズ・インコーポレーテッド内

(72)発明者 マーク・ケー・シュレーゲル

アメリカ合衆国・マサチューセッツ・０２１４２・ケンブリッジ・サード・ストリート・３００・サード・フロア・アルニラム・ファーマシューティカルズ・インコーポレーテッド内

(72)発明者 マジャ・ジャンナス

アメリカ合衆国・マサチューセッツ・０２１４２・ケンブリッジ・サード・ストリート・３００・サード・フロア・アルニラム・ファーマシューティカルズ・インコーポレーテッド内

(72)発明者 ヴァサント・アール・ジャダヴ

アメリカ合衆国・マサチューセッツ・０２１４２・ケンブリッジ・サード・ストリート・３００・サード・フロア・アルニラム・ファーマシューティカルズ・インコーポレーテッド内

(72)発明者 マーティン・メイヤー

アメリカ合衆国・マサチューセッツ・０２１４２・ケンブリッジ・サード・ストリート・３００・サード・フロア・アルニラム・ファーマシューティカルズ・インコーポレーテッド内

(72)発明者 クラウス・チャリシー

アメリカ合衆国・マサチューセッツ・０２１４２・ケンブリッジ・サード・ストリート・３００・サード・フロア・アルニラム・ファーマシューティカルズ・インコーポレーテッド内

(72)発明者 ムティアー・マノハラン

アメリカ合衆国・マサチューセッツ・０２１４２・ケンブリッジ・サード・ストリート・３００・サード・フロア・アルニラム・ファーマシューティカルズ・インコーポレーテッド内

(72)発明者 カラントッタティル・ジー・ラジーヴ

アメリカ合衆国・マサチューセッツ・０２１４２・ケンブリッジ・サード・ストリート・３００・サード・フロア・アルニラム・ファーマシューティカルズ・インコーポレーテッド内

(72)発明者 ジャヤブラカシュ・ケー・ナイール

アメリカ合衆国・マサチューセッツ・０２１４２・ケンブリッジ・サード・ストリート・３００・サード・フロア・アルニラム・ファーマシューティカルズ・インコーポレーテッド内

審査官 馬場 亮人

(56)参考文献 特表２０１７－５２５７０５（ＪＰ，Ａ）

国際公開第２０１５／１０６１２８（ＷＯ，Ａ２）

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

C 1 2 N 1 5 / 1 1 3
 C 1 2 N 1 / 1 5
 C 1 2 N 1 / 1 9
 C 1 2 N 1 / 2 1
 C 1 2 N 5 / 1 0
 A 6 1 K 3 1 / 7 1 3
 A 6 1 P 4 3 / 0 0
 A 6 1 K 4 8 / 0 0
 C 1 2 N 1 5 / 6 3
 C 0 7 K 1 4 / 4 7
 C 0 7 K 1 6 / 0 0

C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)