

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-541334

(P2013-541334A)

(43) 公表日 平成25年11月14日(2013.11.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/113 (2010.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A G	4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 31/716 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/716	4 C O 7 6
<b>A 6 1 P 1/16 (2006.01)</b>	A 6 1 P 1/16	4 C O 8 4
<b>A 6 1 P 31/12 (2006.01)</b>	A 6 1 P 31/12	4 C O 8 6
<b>A 6 1 P 31/14 (2006.01)</b>	A 6 1 P 31/14	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 125 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2013-529298 (P2013-529298)  
 (86) (22) 出願日 平成23年9月14日 (2011. 9. 14)  
 (85) 翻訳文提出日 平成25年5月15日 (2013. 5. 15)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/051597  
 (87) 国際公開番号 W02012/037254  
 (87) 国際公開日 平成24年3月22日 (2012. 3. 22)  
 (31) 優先権主張番号 61/383, 250  
 (32) 優先日 平成22年9月15日 (2010. 9. 15)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 506336728  
 アルニラム ファーマスーティカルズ インコーポレイテッド  
 ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 オ  
 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 100073184  
 弁理士 柳田 征史  
 (74) 代理人 100090468  
 弁理士 佐久間 剛

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 修飾された i R N A 剤

## (57) 【要約】

本発明は、i R N A 二重鎖剤のインビゴ送達に都合よい、少なくとも1つのリガンドに結合した R N A 剤のための効果的なモチーフを提供する。その上、本発明は、これらの組成物を製造する方法、並びに、例えば、様々な疾患状態の処置のための、これらの組成物を使用してこれらの i R N A 二重鎖剤を細胞中に導入する方法を提供する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

標的遺伝子をインビボで発現抑制できる iRNA 二重鎖剤であって、

(a) センス鎖であり、

(i) 少なくとも 2 つの異なる化学修飾ヌクレオチドを有する交互モチーフと、

(ii) 少なくとも 1 つのリガンドと、

を含むセンス鎖、および

(b) アンチセンス鎖であり、

(i) 少なくとも 2 つの異なる化学修飾ヌクレオチドを有する交互モチーフ、

を含むアンチセンス鎖、

を含む iRNA 二重鎖剤において、

前記交互モチーフが二重鎖領域内にあり、組成物が必要に応じて 1 つ以上の突出部および/またはキャッピング基をさらに含む、

iRNA 二重鎖剤。

10

**【請求項 2】**

前記アンチセンス鎖の 5' 炭素位置にホスフェートまたはホスフェート誘導体をさらに含む、請求項 1 記載の iRNA 二重鎖剤。

**【請求項 3】**

少なくとも 1 つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合、または少なくとも 1 つのメチルホスホネートヌクレオシド間結合をさらに含む、請求項 1 記載の iRNA 二重鎖剤。

20

**【請求項 4】**

前記化学修飾ヌクレオチドが、LNA、HNA、CeNA、2'-メトキシエチル、2'-OCH<sub>3</sub>、2'-O-アリル、2'-C-アリル、および 2'-フルオロからなる群より選択される、請求項 1 記載の iRNA 二重鎖剤。

**【請求項 5】**

前記化学修飾ヌクレオチドが 2'-OCH<sub>3</sub> および 2'-F である、請求項 1 記載の iRNA 二重鎖剤。

**【請求項 6】**

前記突出部が、長さが少なくとも 2 つのヌクレオチドであり、チミジン(T)、2'-O-メトキシエチル-5-メチルウリジン(Teo)、2'-O-メトキシエチルアデノシン(Aeo)、2'-O-メトキシエチル-5-メチルシチジン(m5Ceo)、およびそれらの組合せからなる群より選択され、必要に応じて、前記 2 つのヌクレオチドの間にホスホロチオエートを含み、該 2 つのヌクレオチドは同じであって異なっても差し支えない、請求項 1 記載の iRNA 二重鎖剤。

30

**【請求項 7】**

前記突出部が、標的 mRNA に対して不一致を形成し得るか、または標的 mRNA と完全に相補性であり得る、請求項 1 記載の iRNA 二重鎖剤。

**【請求項 8】**

前記二重鎖領域が、12~30 の間のヌクレオチドの長さである、請求項 1 記載の iRNA 二重鎖剤。

40

**【請求項 9】**

前記リガンドが前記センス鎖の 3' 末端に結合している、請求項 1 記載の iRNA 二重鎖剤。

**【請求項 10】**

(a) センス鎖であり、

(i) 交互 2'-フルオロ修飾と、

(ii) 3' 末端にある少なくとも 1 つのリガンドと、

を含むセンス鎖、および

(b) アンチセンス鎖であり、

(i) 交互 2'-フルオロ修飾と、

50

( i i ) リン酸化されている 5' 末端アンチセンスヌクレオチドと、  
を含むアンチセンス鎖、  
を含む、請求項 1 記載の iRNA 二重鎖剤。

【請求項 11】

少なくとも 1 つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合、または少なくとも 1 つのメチルホスホネートヌクレオシド間結合をさらに含む、請求項 10 記載の iRNA 二重鎖剤。

【請求項 12】

前記化学修飾ヌクレオチドが、LNA、HNA、CeNA、2'-メトキシエチル、2'-OCH<sub>3</sub>、2'-O-アリル、2'-C-アリル、および 2'-フルオロからなる群より選択される、請求項 10 記載の iRNA 二重鎖剤。

10

【請求項 13】

前記化学修飾ヌクレオチドが 2'-OCH<sub>3</sub> および 2'-F である、請求項 10 記載の iRNA 二重鎖剤。

【請求項 14】

前記突出部が、長さが少なくとも 2 つのヌクレオチドであり、チミジン (T)、2'-O-メトキシエチル-5-メチルウリジン (Teo)、2'-O-メトキシエチルアデノシン (Aeo)、2'-O-メトキシエチル-5-メチルシチジン (m5Ceo)、およびそれらの組合せからなる群より選択され、必要に応じて、前記 2 つのヌクレオチドの間にホスホロチオエートを含み、該 2 つのヌクレオチドは同じであって異なっても差し支えない、請求項 10 記載の iRNA 二重鎖剤。

20

【請求項 15】

前記突出部が、標的 mRNA に対して不一致を形成し得るか、または標的 mRNA と完全に相補性であり得る、請求項 10 記載の iRNA 二重鎖剤。

【請求項 16】

前記センス鎖および前記アンチセンス鎖が Z-X-Y 構造を有する、請求項 10 記載の iRNA 二重鎖剤。

【請求項 17】

前記二重鎖領域が、12~30 の間のヌクレオチドの長さである、請求項 10 記載の iRNA 二重鎖剤。

30

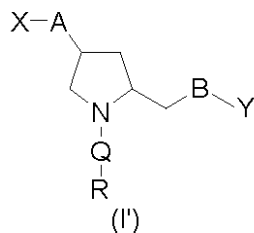
【請求項 18】

前記リガンドが前記センス鎖の 3' 末端に結合している、請求項 10 記載の iRNA 二重鎖剤。

【請求項 19】

式 (I') :

【化 1】



40

に示された構造を有する化合物を含む iRNA 二重鎖剤 :

式中 :

A および B の各々は、各存在毎に独立して、O、N (R<sup>N</sup>) または S であり ;

X および Y の各々は、各存在毎に独立して、H、保護基、リン酸基、ホスホジエステル

50

基、活性化されたリン酸基、活性化された亜リン酸基、ホスホラミダイト、固体担体、 $-P(Z')(Z'')O$ -ヌクレオシド、 $-P(Z')(Z'')O$ -オリゴヌクレオチド、脂質、PEG、ステロイド、ポリマー、ヌクレオチド、ヌクレオシド、 $-P(Z')(Z'')O-R^1-Q'-R^2-OP(Z''')(Z''')O$ -オリゴヌクレオチド、またはオリゴヌクレオチド、 $-P(Z')(Z'')$ -式(I)、 $-P(Z')(Z'')$ -、または $-Q-R$ であり；式中、オリゴヌクレオチドは、

(a) センス鎖であり、

(i) 交互2'-フルオロ修飾と、

(ii) 少なくとも1つのリガンドと、

を含むセンス鎖、および

(b) アンチセンス鎖であり、

(i) 交互2'-ハロゲン修飾と、

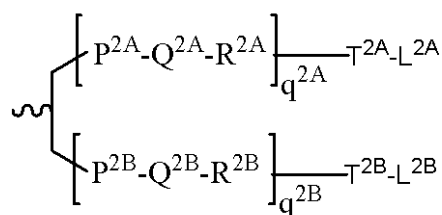
(ii) 5'炭素位置でリン酸化されている第1の5'末端アンチセンスヌクレオチドと、

を含むアンチセンス鎖、

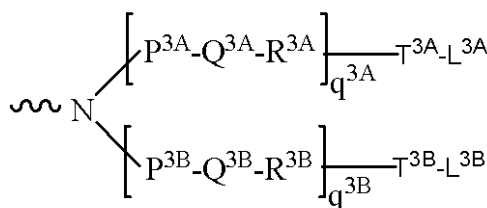
を含み；

Rは、 $L^1$ であるか、または式(II)~(V)：

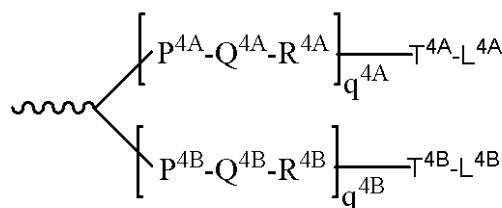
【化2】



式(II)

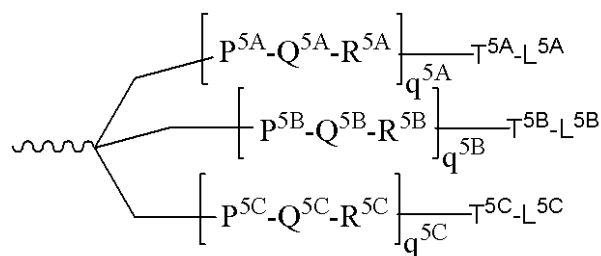


式(III)



式(IV)

、もしくは



式(V)

に示された構造を有し；

$q^{2A}$ 、 $q^{2B}$ 、 $q^{3A}$ 、 $q^{3B}$ 、 $q^{4A}$ 、 $q^{4B}$ 、 $q^{5A}$ 、 $q^{5B}$ および $q^{5C}$ は、各存在毎に独立して、0~20を表し、式中、反復単位は同じであっても、異なってもよく；

QおよびQ'は、各存在毎に独立して、存在しないか、 $-(P^7-Q^7-R^7)_p-T^7-$ 、または $-T^7-Q^7-T^7'-B-T^8'-Q^8-T^8$ であり；

$P^{2A}$ 、 $P^{2B}$ 、 $P^{3A}$ 、 $P^{3B}$ 、 $P^{4A}$ 、 $P^{4B}$ 、 $P^{5A}$ 、 $P^{5B}$ 、 $P^{5C}$ 、 $P^7$ 、 $T^{2A}$ 、 $T^{2B}$ 、 $T^{3A}$ 、 $T^{3B}$ 、 $T^{4A}$ 、 $T^{4B}$ 、 $T^{5A}$ 、 $T^{5B}$ 、 $T^{5C}$ 、 $T^7$ 、 $T^{7'}$ 、 $T^8$ 、および $T^{8'}$ の各々は、各存在毎

10

20

30

40

50

に独立して、存在しないか、 $\text{CO}$ 、 $\text{NH}$ 、 $\text{O}$ 、 $\text{S}$ 、 $\text{OC}(\text{O})$ 、 $\text{NHC}(\text{O})$ 、 $\text{CH}_2$ 、 $\text{CH}_2\text{NH}$ 、または $\text{CH}_2\text{O}$ であり；

$\text{B}$ は、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{B}^{\text{L}})-\text{CH}_2-$ であり；

$\text{B}^{\text{L}}$ は、 $-\text{T}^{\text{B}}-\text{Q}^{\text{B}}-\text{T}^{\text{B}'}-\text{R}^{\text{X}}$ であり；

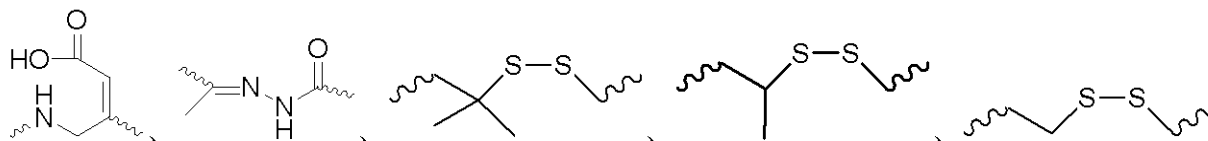
$\text{Q}^{2\text{A}}$ 、 $\text{Q}^{2\text{B}}$ 、 $\text{Q}^{3\text{A}}$ 、 $\text{Q}^{3\text{B}}$ 、 $\text{Q}^{4\text{A}}$ 、 $\text{Q}^{4\text{B}}$ 、 $\text{Q}^{5\text{A}}$ 、 $\text{Q}^{5\text{B}}$ 、 $\text{Q}^{5\text{C}}$ 、 $\text{Q}^7$ 、 $\text{Q}^8$ 、および $\text{Q}^{\text{B}}$ は、各存在毎に独立して、存在しないか、アルキレン、置換アルキレンであり、ここで、1つ以上のメチレンは、 $\text{O}$ 、 $\text{S}$ 、 $\text{S}(\text{O})$ 、 $\text{SO}_2$ 、 $\text{N}(\text{R}^{\text{N}})$ 、 $\text{C}(\text{R}')=\text{C}(\text{R}'')$ 、 $\text{C}=\text{C}$ 、または $\text{C}(\text{O})$ の1つ以上により割り込まれていても、終わらされても差し支えなく；

$\text{T}^{\text{B}}$ および $\text{T}^{\text{B}'}$ の各々は、各存在毎に独立して、存在しないか、 $\text{CO}$ 、 $\text{NH}$ 、 $\text{O}$ 、 $\text{S}$ 、 $\text{OC}(\text{O})$ 、 $\text{OC}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{NHC}(\text{O})$ 、 $\text{NHC}(\text{O})\text{NH}$ 、 $\text{NHC}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{CH}_2$ 、 $\text{CH}_2\text{NH}$ 、または $\text{CH}_2\text{O}$ であり；

$\text{R}^{\text{X}}$ 、親油性物質、ビタミン、ペプチド、炭水化物、エンドソーム溶解成分、ステロイド、テルペン、またはカチオン性脂質であり；

$\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^{2\text{A}}$ 、 $\text{R}^{2\text{B}}$ 、 $\text{R}^{3\text{A}}$ 、 $\text{R}^{3\text{B}}$ 、 $\text{R}^{4\text{A}}$ 、 $\text{R}^{4\text{B}}$ 、 $\text{R}^{5\text{A}}$ 、 $\text{R}^{5\text{B}}$ 、 $\text{R}^{5\text{C}}$ 、 $\text{R}^7$ の各々は、各存在毎に独立して、存在しないか、 $\text{NH}$ 、 $\text{O}$ 、 $\text{S}$ 、 $\text{CH}_2$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{NH}$ 、 $\text{NHCH}(\text{R}^{\text{a}})\text{C}(\text{O})$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}(\text{R}^{\text{a}})-\text{NH}-$ 、 $\text{CO}$ 、 $\text{CH}=\text{N}-\text{O}$ 、

【化3】



20

またはヘテロシクリルであり；

$\text{L}^1$ 、 $\text{L}^{2\text{A}}$ 、 $\text{L}^{2\text{B}}$ 、 $\text{L}^{3\text{A}}$ 、 $\text{L}^{3\text{B}}$ 、 $\text{L}^{4\text{A}}$ 、 $\text{L}^{4\text{B}}$ 、 $\text{L}^{5\text{A}}$ 、 $\text{L}^{5\text{B}}$ 、および $\text{L}^{5\text{C}}$ の各々は、各存在毎に独立して、炭水化物であり；

$\text{R}'$ および $\text{R}''$ の各々は、各存在毎に独立して、 $\text{H}$ 、 $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ アルキル、 $\text{OH}$ 、 $\text{SH}$ 、または $\text{N}(\text{R}^{\text{N}})_2$ であり；

$\text{R}^{\text{N}}$ は、各存在毎に独立して、 $\text{H}$ 、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、またはベンジルであり；

$\text{R}^{\text{a}}$ は、 $\text{H}$ またはアミノ酸側鎖であり；

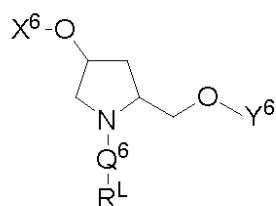
$\text{Z}'$ 、 $\text{Z}''$ 、 $\text{Z}'''$ 、および $\text{Z}''''$ の各々は、各存在毎に独立して、 $\text{O}$ または $\text{S}$ であり；

$p$ は、各存在毎に独立して、 $0\sim 20$ である。

【請求項20】

前記iRNA二重鎖剤が、式(VI)

【化4】



式(VI)

40

50

に示された構造を少なくとも1つ含む、請求項19記載のiRNA二重鎖剤：

式中：

$X^6$ および $Y^6$ の各々は、独立して、H、ヒドロキシル保護基、リン酸基、ホスホジエステル基、活性化リン酸基、活性化亜リン酸基、ホスホラミダイト、固体担体、 $-P(Z')(Z'')O$ -ヌクレオシド、 $-P(Z')(Z'')O$ -オリゴヌクレオチド、脂質、PEG、ステロイド、ポリマー、 $-P(Z')(Z'')O-R^1-Q'-R^2-OP(Z''')(Z'''' )O$ -オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、またはオリゴヌクレオチド、 $-P(Z')(Z'')-$ 式(I)もしくは $-P(Z')(Z'')-$ であり；

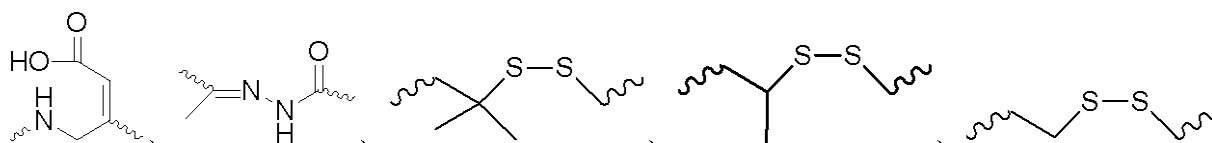
$Q^6$ は、存在しないか、または $-(P^6-Q^6-R^6)_v-T^6-$ であり；

$P^6$ および $T^6$ の各々は、各存在毎に独立して、存在しないか、CO、NH、O、S、O C(O)、NHC(O)、CH<sub>2</sub>、CH<sub>2</sub>NH、またはCH<sub>2</sub>Oであり； 10

$Q^6$ は、各存在毎に独立して、存在しないか、置換アルキレンであり、ここで、1つ以上のメチレンは、O、S、S(O)、SO<sub>2</sub>、N(R<sup>N</sup>)、C(R')=C(R'')、CC、またはC(O)の1つ以上により割り込まれていても、終わらされても差し支えなく；

$R^6$ は、各存在毎に独立して、存在しないか、NH、O、S、CH<sub>2</sub>、C(O)O、C(O)NH、NHCH(R<sup>a</sup>)C(O)、 $-C(O)-CH(R^a)-NH-$ 、CO、CH=N-O、

【化5】



20

またはヘテロシクリルであり；

$R'$ および $R''$ の各々は、各存在毎に独立して、H、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、OH、SH、またはN(R<sup>N</sup>)<sub>2</sub>であり；

$R^N$ は、各存在毎に独立して、H、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、またはベンジルであり；

$R^a$ は、Hまたはアミノ酸側鎖であり；

30

$Z'$ 、 $Z''$ 、 $Z'''$ 、および $Z''''$ の各々は、各存在毎に独立して、OまたはSであり；

$v$ は、各存在毎に独立して、0~20を表し；

$R^L$ は、親油性物質またはカチオン性脂質である。

【請求項21】

$R^L$ が親油性物質である、請求項20記載のiRNA二重鎖剤。

【請求項22】

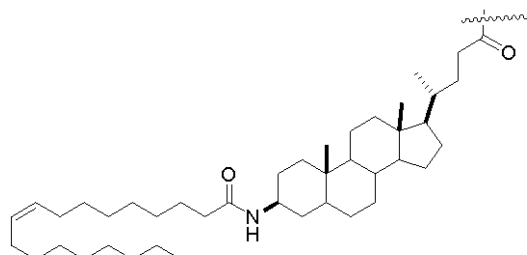
$R^L$ がコレステロールである、請求項20記載のiRNA二重鎖剤。

【請求項23】

$R^L$ が、

40

【化6】



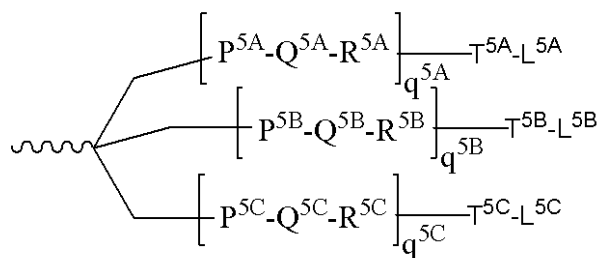
である、請求項20記載のiRNA二重鎖剤。

50

【請求項 24】

R が、式 (V) :

【化 7】



式 (V)

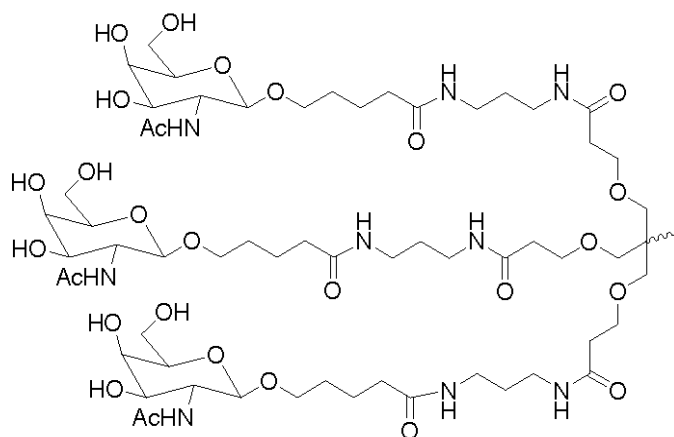
10

の構造を有する、請求項 19 記載の iRNA 二重鎖剤。

【請求項 25】

R が、

【化 8】



20

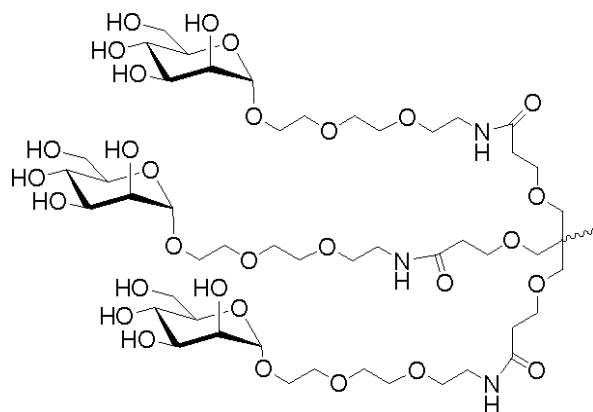
である、請求項 24 記載の iRNA 二重鎖剤。

30

【請求項 26】

R が、

【化 9】



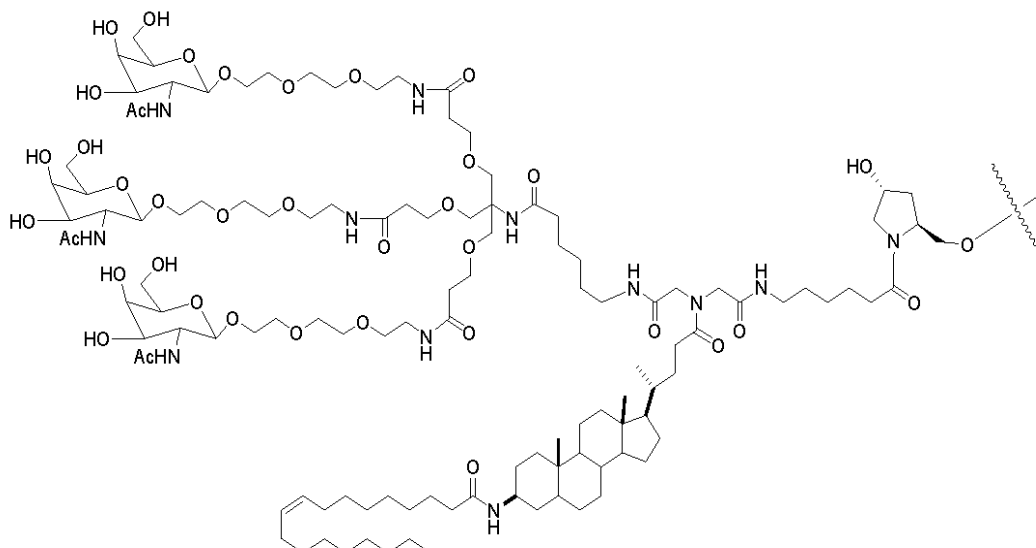
40

である、請求項 24 記載の iRNA 二重鎖剤。

【請求項 27】

前記化合物が、構造

## 【化 1 0】



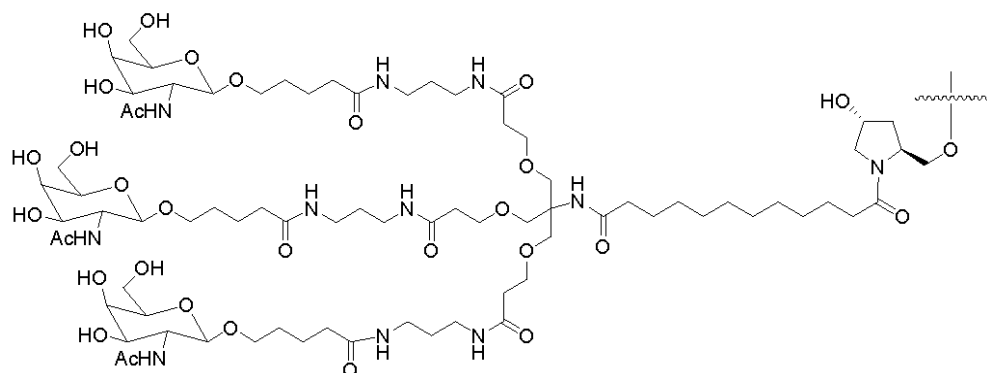
10

を有する、請求項 19 記載の iRNA 二重鎖剤。

## 【請求項 28】

前記化合物が、構造

## 【化 1 1】



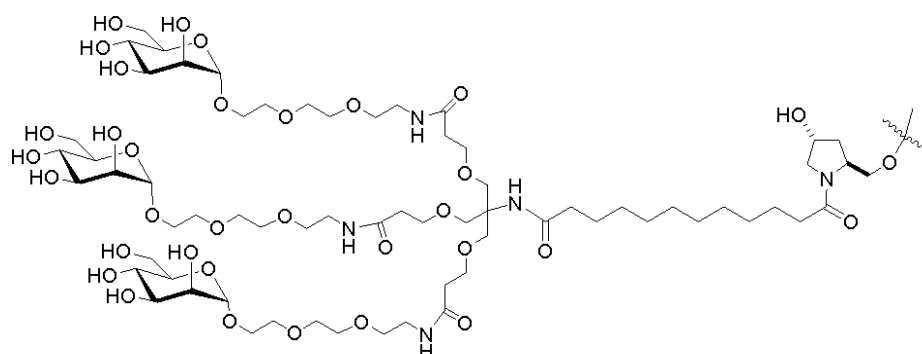
30

を有する、請求項 19 記載の iRNA 二重鎖剤。

## 【請求項 29】

前記化合物が、構造

## 【化 1 2】



40

を有する、請求項 19 記載の iRNA 二重鎖剤。

## 【請求項 30】

(a) センス鎖であり、

50

( i ) 少なくとも 2 つの異なる化学修飾ヌクレオチドを有する交互モチーフと、  
( i i ) 少なくとも 1 つのリガンドと、  
を含むセンス鎖、および  
( b ) アンチセンス鎖であり、  
( i ) 少なくとも 2 つの異なる化学修飾ヌクレオチドを有する交互モチーフ、  
を含むアンチセンス鎖、  
を含む i R N A 二重鎖剤を投与することによって、対象における特定の標的にポリヌクレ  
オチドを送達する方法。

【請求項 3 1】

前記投与する工程が、筋肉内、気管支内、胸腔内、腹膜内、動脈内、リンパ管、静脈内  
、皮下、脳脊髄、またはそれらの組合せを含む投与手段により行われる、請求項 3 0 記載  
の方法。

10

【請求項 3 2】

対象の特定の標的にポリヌクレオチドを送達する方法であって、前記対象に請求項 1 記  
載の i R N A 二重鎖剤を皮下で送達し、よって、前記ポリヌクレオチドが該対象の特定の  
標的に送達される工程を含む方法。

【請求項 3 3】

請求項 1 から 2 9 いずれか 1 項記載の i R N A 二重鎖剤を単独でまたは薬学的に許容さ  
れる担体または賦形剤と共に含む医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

20

【優先権の主張】

【0 0 0 1】

本出願は、その内容をここに全て引用する、2 0 1 0 年 9 月 1 5 日に出願された米国仮  
特許出願第 6 1 / 3 8 3 2 5 0 号の優先権を主張するものである。

【技術分野】

【0 0 0 2】

本発明は、i R N A 二重鎖剤 (duplex agent) のインビボ送達に都合よい、少なくとも 1  
つのリガンドに結合した R N A 剤のための効果的なモチーフ、並びにインビボ治療に使用  
するのに適した i R N A 組成物を提供する。その上、本発明は、これらの組成物を製造す  
る方法、並びに、例えば、様々な疾患状態の処置のための、これらの組成物を使用してこ  
れらの i R N A 二重鎖剤を細胞中に導入する方法を提供する。

30

【背景技術】

【0 0 0 3】

オリゴヌクレオチド化合物には、医療における重要な治療用途がある。オリゴヌクレ  
オチドは、特定の疾患の原因である遺伝子を発現抑制する (silence) ために使用できる。遺  
伝子発現抑制は、翻訳を阻害することによってタンパク質の形成を防ぐ。重要なことに、  
遺伝子発現抑制薬剤 (gene-silencing agent) は、疾患に関連するタンパク質の機能を阻害  
する従来の小さい有機化合物に代わる有望な代替物である。s i R N A、アンチセンス R  
N A、およびマイクロ R N A は、遺伝子発現抑制によってタンパク質の形成を防ぐオリゴ  
ヌクレオチドである。

40

【0 0 0 4】

R N A 干渉または「R N A i」は、二重鎖 R N A ( d s R N A ) が遺伝子発現を遮断で  
きるという観察を記述するために F i r e と共同研究者により最初に作られた用語である  
( 非特許文献 1 ; 非特許文献 2 )。短い d s R N A が、脊椎動物を含む多くの有機体にお  
いて遺伝子特異的な転写後遺伝子発現抑制を命令し、遺伝子機能を研究するための新たな  
ツールを提供してきた。R N A i は、遺伝子発現抑制のトリガーと相同のメッセンジャー  
R N A を破壊する配列特異的な多成分ヌクレアーゼである、R N A 誘発遺伝子発現抑制複  
合体 ( R I S C ) により媒介される。R I S C は、二重鎖 R N A トリガーに由来する短い  
R N A ( 約 2 2 のヌクレオチド ) を含有することが知られているが、この働きのタンパク  
質成分は未知のままであった。

50

## 【 0 0 0 5 】

s i R N A 化合物は、様々な診断目的と治療目的のための有望な薬剤である。s i R N A 化合物は、遺伝子の機能を特定するために使用できる。その上、s i R N A 化合物は、病原遺伝子を発現抑制することによって機能する新たなタイプの薬剤として大きな可能性を提供する。中枢神経系疾患、炎症性疾患、代謝異常、腫瘍学、感染性疾患、および眼疾患を含む多くの疾患の処置のための干渉性 R N A 治療剤を開発するための研究が、現在進行中である。

## 【 0 0 0 6 】

s i R N A は、潜在的な抗ウイルス性治療剤として極めて効果的であることが示されており、数多くの公表された実例が最近見かけられる。ウイルス・ゲノムにおける標的に対して向けられた s i R N A 分子は、インフルエンザ（非特許文献 3；非特許文献 4；非特許文献 5）、呼吸器合胞体ウイルス（R S V）（非特許文献 6）、B 型肝炎ウイルス（H B V）（非特許文献 7）、C 型肝炎ウイルス（非特許文献 8；非特許文献 9）、および S A R S コロナウイルス（非特許文献 10）の動物モデルにおいてウイルス価を劇的に数桁も減少させる。

10

## 【 先行技術文献 】

## 【 非特許文献 】

## 【 0 0 0 7 】

【 非特許文献 1 】 Fire et al. (1998) Nature 391, 806-811

【 非特許文献 2 】 Elbashir et al. (2001) Genes Dev. 15, 188-200

20

【 非特許文献 3 】 Ge et al., (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101, 8676-8681

【 非特許文献 4 】 Tompkins et al. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101, 8682-8686

【 非特許文献 5 】 Thomas et al. (2005) Expert Opin. Biol. Ther. 5, 495-505

【 非特許文献 6 】 Bitko et al. (2005) Nat. Med. 11, 50-55

【 非特許文献 7 】 Morrissey et al. (2005) Nat. Biotechnol. 23, 1002-1007

【 非特許文献 8 】 Kapadia et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100, 2014-2018

【 非特許文献 9 】 Wilson et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100, 2783-2788

【 非特許文献 10 】 Li et al. (2005) Nat. Med. 11, 944-951

## 【 発明の概要 】

## 【 発明が解決しようとする課題 】

30

## 【 0 0 0 8 】

インビボでの細胞への効率的な送達には、特異的ターゲティングおよび細胞外環境、特に血清タンパク質からの実質的な保護が必要である。特異的ターゲティングを行う方法の 1 つは、i R N A 二重鎖剤に標的部分を結合させる (conjugate) ことである。この標的部分は、要求される標的部位に i R N A 二重鎖剤を標的にする上で役立つ。標的部分が送達を改善できる様式の 1 つは、受容体媒介エンドサイトーシス活性によるものである。この摂取機構は、膜構造の陥入による膜によって、または送達系の細胞膜による融合によって、包まれる区域の内部への、膜受容体に結合した i R N A 二重鎖剤の移動を含む。このプロセスは、特異的リガンドの受容体への結合後に、細胞表面または膜受容体の活性化によって開始される。ガラクトース、マンノース、マンノース - 6 - リン酸などの糖、トランスフェリン、アシアロ糖タンパク質などのペプチドおよびタンパク質、ビタミン B 12、インスリンおよび上皮成長因子 (E G F) を認識するものを含む、多くの受容体媒介エンドサイトーシス系が公知であり、研究されてきた。アシアロ糖タンパク質受容体 (A S G P - R) は能力の高い受容体であり、これは、肝細胞上に非常に豊富にある。A S G P - R は、D - G a l よりも N - アセチル - D - ガラクトサミン (G a l N A c) に 50 倍高い親和性を示す。以前の研究では、n M 親和性を達成するために、多価が必要であるのに対し、糖の中での間隔も重要であることが示されてきた。ターゲティングリガンドの使用に関する成功がいくつかあるが、そのような成功は、常にインビボ条件に転換される訳ではない。これまでの成功にもかかわらず、上述したオリゴヌクレオチド治療剤のインビボ送達の欠点に対処した、より良く効く受容体特異的リガンド結合 i R N A 二重鎖剤および

40

50

その調製方法が明確に必要なとされている。本発明は、この非常に重要な目的に向けられる。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は、iRNA二重鎖剤のインビボ送達に都合よい、少なくとも1つのリガンドに結合したRNA剤のための効果的なモチーフ、並びにインビボ治療に使用するのに適したiRNA組成物を提供する。

【0010】

1つの態様において、本発明は、少なくとも1つの炭水化物リガンド、例えば、単糖、二糖、三糖、四糖、オリゴ糖、多糖に結合したiRNA二重鎖剤の効果的なモチーフを提供する。これらの炭水化物結合iRNA二重鎖剤は、特に、肝臓の実質細胞を標的とする。1つの実施の形態において、iRNA二重鎖剤は、複数の、好ましくは2つまたは3つの炭水化物リガンドを含む。1つの実施の形態において、iRNA二重鎖剤は、1つ以上のガラクトース部分を含む。別の実施の形態において、iRNA二重鎖剤は、少なくとも1つの（例えば、2つまたは3つ以上）ラクトース分子（ラクトースは、ガラクトースに結合したグルコースである）を含む。別の実施の形態において、iRNA二重鎖剤は、少なくとも1つの（例えば、2つまたは3つ以上）N - アセチル - ガラクトサミン（GalNAc）、N - Ac - グルコサミン（GlucNAc）、またはマンノース（例えば、マンノース - 6 - リン酸）を含む。1つの実施の形態において、iRNA二重鎖剤は少なくとも1つのマンノースリガンドを含む、このiRNA二重鎖剤はマクロファージを標的とする。

10

20

【0011】

1つの態様において、本発明は、炭水化物リガンドを含むiRNA二重鎖剤を特徴とし、炭水化物リガンドの存在により、iRNA二重鎖剤の肝臓への送達を増加させることができる。それゆえ、炭水化物リガンドを含むiRNA二重鎖剤は、肝臓において発現が望ましくない遺伝子を標的にするのに有用であり得る。例えば、炭水化物リガンドを含むiRNA二重鎖剤は、肝炎ウイルス（例えば、C型肝炎、B型肝炎、A型肝炎、D型肝炎、E型肝炎、F型肝炎、G型肝炎、またはH型肝炎）による核酸発現を標的にできる。

【0012】

1つの態様において、本発明は、対象における特定の標的にポリヌクレオチドを皮下で送達する方法をさらに提供する。

30

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1A】様々な複合体と共に化学修飾モチーフを含有するApoB siRNAのインビボ遺伝子発現抑制を示すグラフ

【図1B】様々な複合体と共に化学修飾モチーフを含有するApoB siRNAのインビボ遺伝子発現抑制を示すグラフ

【図2】Chol - GalNAc<sub>3</sub>複合体と共に化学修飾モチーフを含有するApoB siRNAのインビボ遺伝子発現抑制を示すグラフ

【図3】GalNAc<sub>3</sub>複合体PK研究サンプルのSC投与後のPD - 肝臓遺伝子発現抑制を示すグラフ：100mg / kg、投与後24、48、96および168時間

40

【図4】Chol - GalNAc<sub>3</sub>複合体と共に化学修飾モチーフを含有するPTEN siRNAのインビボ遺伝子発現抑制を示すグラフ

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明は、siRNAにおける二重鎖領域の交互モチーフ(alternating motif)をGalNAc<sub>3</sub>含有リガンドと組み合わせることによって得られた優れた結果に基づく。特に、そのsiRNAは、皮下または静脈内投与によって対象の標的部位に効果的に送達された。

【0015】

50

1つの態様において、本発明は、標的遺伝子をインピボで発現抑制できるiRNA二重鎖剤であって、

(a) センス鎖であり、

(i) 少なくとも2つの異なる化学修飾ヌクレオチドを有する交互モチーフと、

(ii) 少なくとも1つのリガンドと、

を含むセンス鎖、および

(b) アンチセンス鎖であり、

(i) 少なくとも2つの異なる化学修飾ヌクレオチドを有する交互モチーフ、

を含むアンチセンス鎖、

を含むiRNA二重鎖剤において、

前記交互モチーフが二重鎖領域内にあり、組成物が必要に応じて1つ以上の突出部および/またはキャッピング基をさらに含む、

iRNA二重鎖剤を提供する。

【0016】

1つの実施の形態において、本発明のiRNA二重鎖剤は、少なくとも1つのホスホリチオエートヌクレオチド間結合、または少なくとも1つのメチルホスホネートヌクレオシド間結合をさらに含む。

【0017】

1つの実施の形態において、本発明のiRNA二重鎖剤は、LNA、HNA、CeNA、2'-メトキシエチル、2'-OCH<sub>3</sub>、2'-O-アリル、2'-C-アリル、および2'-フルオロからなる群より選択される化学修飾ヌクレオチドを含む。

【0018】

1つの実施の形態において、本発明のiRNA二重鎖剤は、チミジン(T)、2'-O-メトキシエチル-5-メチルウリジン(Teo)、2'-O-メトキシエチルアデノシン(Aeo)、2'-O-メトキシエチル-5-メチルシチジン(m5Ceo)、およびそれらの組合せからなる群より選択される、長さで少なくとも2つのヌクレオチドを含む突出部を含み、必要に応じて、同じであって異なっても差し支えない前記2つのヌクレオチドの間にホスホリチオエートを含む。この突出部は、標的mRNAと不一致を形成できるか、または標的mRNAと完全に相補性であり得る。

【0019】

1つの実施の形態において、リガンドは、センス鎖の3'末端に結合される。

【0020】

1つの実施の形態において、iRNA二重鎖剤は、末端二重鎖安定性の特異修飾(differential modification of the terminal duplex stability)(DMTDS)をさらに含む。

【0021】

末端二重鎖安定性の特異修飾(DMTDS)

その上、本発明は、DMTDSおよびここに記載された別の要素を有するiRNA剤を含む。例えば、本発明は、ここに記載されたiRNA剤、例えば、反復性(palindromic)iRNA剤、非標準対合を有するiRNA剤、ここに記載された遺伝子、例えば、肝臓において活性である遺伝子を標的とするiRNA剤、ここに記載された構成または構造を有するiRNA剤、ここに記載された両親媒性送達薬剤に関連するiRNA、ここに記載された薬物送達モジュールに関連するiRNA、ここに記載されるように投与されるiRNA剤、またはDMTDSも包含する、ここに記載されるように配合されたiRNA剤を含む。

【0022】

iRNA剤は、アンチセンス鎖の二重鎖の5'末端の領域において、二重鎖が解離するまたは溶解する傾向を増す(二重鎖結合の自由エネルギーを減少させる)ことにより最適化できる。このことは、例えば、アンチセンス鎖の5'末端の領域において二重鎖の解離するまたは溶解する傾向を増加させるサブユニットを含ませることによって、行うことが

10

20

30

40

50

できる。このことは、この 5' 末端の領域における二重鎖の解離するまたは溶解する傾向を増加させるリガンドの結合によっても、行うことができる。理論により拘束することを意図するものではないが、その効果は、ヘリカーゼなどの酵素の効果を促進すること、例えば、アンチセンス鎖の 5' 末端の近傍でその酵素の効果を促進することのためである。

#### 【0023】

本願の発明者等は、iRNA 剤は、アンチセンス鎖の二重鎖の 3' 末端の領域における、二重鎖の解離するまたは溶解する傾向を減少させる（二重鎖結合の自由エネルギーを増加させる）ことにより、最適化できることも発見した。このことは、アンチセンス鎖の 3' 末端の領域における二重鎖の解離するまたは溶解する傾向を減少させるサブユニットを含ませることによって、行うことができる。このことは、3' 末端の領域における二重鎖の解離するまたは溶解する傾向を減少させるリガンドの結合によっても、行うことができる。

#### 【0024】

前記二重鎖の 5' 末端の解離する傾向を増加させる修飾は、単独で、またはここに記載された他の修飾と組み合わせて、例えば、この二重鎖の 3' 末端の解離する傾向を減少させる修飾と組み合わせて、使用しても差し支えない。同様に、前記二重鎖の 3' 末端の解離する傾向を減少させる修飾は、単独で、またはここに記載された他の修飾と組み合わせて、例えば、この二重鎖の 5' 末端の解離する傾向を増加させる修飾と組み合わせて、使用しても差し支えない。

#### 【0025】

二重鎖の AS 5' 末端の安定性を減少させる

サブユニット対は、解離または溶解を促進させるそれらの傾向に基づいて（例えば、特定の対の結合または解離の自由エネルギーに基づいて、最も単純な手法は、個々の対の基準で対を調査することであるが、次の隣接する対または類似の分析を使用しても差し支えない）ランク付けすることができる。解離の促進に関して：

A : U が、G : C よりも好ましく；

G : U が、G : C よりも好ましく；

I : C が、G : C よりも好ましく（I = イノシン）；

不一致、例えば、非標準すなわち標準以外の対（このどこかに記載されたような）が、標準（A : T、A : U、G : C）対よりも好ましく；

普遍的塩基を含む対が、標準対よりも好ましい。

#### 【0026】

一般的な ds iRNA 剤は、以下のように図示することができる：

S 5' R<sub>1</sub>N<sub>1</sub>N<sub>2</sub>N<sub>3</sub>N<sub>4</sub>N<sub>5</sub>[N]N<sub>-5</sub>N<sub>-4</sub>N<sub>-3</sub>N<sub>-2</sub>N<sub>-1</sub>R<sub>2</sub> 3'

AS 3' R<sub>3</sub>N<sub>1</sub>N<sub>2</sub>N<sub>3</sub>N<sub>4</sub>N<sub>5</sub>[N]N<sub>-5</sub>N<sub>-4</sub>N<sub>-3</sub>N<sub>-2</sub>N<sub>-1</sub>R<sub>4</sub> 5'

S : AS P<sub>1</sub>P<sub>2</sub>P<sub>3</sub>P<sub>4</sub>P<sub>5</sub>[N]P<sub>-5</sub>P<sub>-4</sub>P<sub>-3</sub>P<sub>-2</sub>P<sub>-1</sub> 5'

S はセンス鎖を表し；AS はアンチセンス鎖を表し；R<sub>1</sub> は随意的な（かつ好ましくはない）5' センス鎖突出部を表し；R<sub>2</sub> は随意的な（好ましい）3' センス鎖突出部を表し；R<sub>3</sub> は随意的な（好ましい）3' アンチセンス鎖突出部を表し；R<sub>4</sub> は随意的な（かつ好ましくはない）5' アンチセンス鎖突出部を表し；N はサブユニットを表し；[N] は、追加のサブユニット対が存在してもよいことを表し；P<sub>x</sub> は、センス N<sub>x</sub> およびアンチセンス N<sub>x</sub> の対を表す。突出部は、P 図には示されていない。いくつかの実施の形態において、このどこかに記載されたように、3' AS 突出部は領域 Z に相当し、その二重鎖領域は領域 X に相当し、3' S 鎖突出部は領域 Y に相当する（この図は、このどこかに指針が提供されている最大または最小長さを暗示することを意図していない）。

#### 【0027】

二重鎖を形成する傾向を減少させる対は、AS 鎖の 5' 末端での二重鎖における 1 つ以上の位置で使用されることが好ましい。末端対（AS 鎖に関しては最も 5' 末端の側）は P<sub>-1</sub> と示され、二重鎖のそれに続く対の位置（AS 鎖に関しては 3' 方向に進む）は、P<sub>-2</sub>

、 $P_{-3}$ 、 $P_{-4}$ 、 $P_{-5}$ など示される。二重鎖の形成を調節するために修飾する好ましい領域は、 $P_{-5}$ から $P_{-1}$ まで、より好ましくは、 $P_{-4}$ から $P_{-1}$ まで、より好ましくは $P_{-3}$ から $P_{-1}$ までである。 $P_{-1}$ での修飾が、単独で、または他の位置での修飾、例えば、今特定した位置のいずれかでの修飾と共に、特に好ましい。列挙された領域の内の対の少なくとも1つ、より好ましくは2つ、3つ、4つ、または5つが、

A : U

G : U

I : C

不一致対、例えば、非標準すなわち標準以外の対もしくは普遍的塩基を含む対の群から独立して選択されることが好ましい。

10

#### 【0028】

好ましい実施の形態において、解離を促進する対を達成するために必要なサブユニットにおける変更はセンス鎖において行われるが、いくつかの実施の形態において、その変更は、アンチセンス鎖に行われる。

#### 【0029】

好ましい実施の形態において、 $P_{-1}$ から $P_{-4}$ までの対の少なくとも2つまたは3つが、解離を促進する対である。

#### 【0030】

好ましい実施の形態において、 $P_{-1}$ から $P_{-4}$ までの対の少なくとも2つまたは3つが、A : Uである。

20

#### 【0031】

好ましい実施の形態において、 $P_{-1}$ から $P_{-4}$ までの対の少なくとも2つまたは3つが、G : Uである。

#### 【0032】

好ましい実施の形態において、 $P_{-1}$ から $P_{-4}$ までの対の少なくとも2つまたは3つが、I : Cである。

#### 【0033】

好ましい実施の形態において、 $P_{-1}$ から $P_{-4}$ までの対の少なくとも2つまたは3つが、不一致対、例えば、非標準すなわち標準以外の対である。

#### 【0034】

好ましい実施の形態において、 $P_{-1}$ から $P_{-4}$ までの対の少なくとも2つまたは3つが、普遍的塩基を含む対である。

30

#### 【0035】

二重鎖のAS3'末端の安定性を増加させる

サブユニット対は、安定性を促進させ、解離または溶解を阻害するそれらの傾向に基づいて(例えば、特定の対の結合または解離の自由エネルギーに基づいて、最も単純な手法は、個々の対の基準で対を調査することであるが、次の隣接する対または類似の分析を使用しても差し支えない)ランク付けすることができる。二重鎖の安定性の促進に関して：

G : Cが、A : Uよりも好ましく；

ワトソン・クリック塩基対(Watson-Crick matches) (A : T、A : U、G : C)が、非標準すなわち標準以外の対よりも好ましく；

40

安定性を増加させる類似体が、ワトソン・クリック塩基対(A : T、A : U、G : C)よりも好ましく；

2 - アミノ - A : Uが、A : Uよりも好ましく；

2 - チオUまたは5 Me - チオ - U : Aが、U : Aよりも好ましく；

G - クランプ(4つの水素結合を有するCの類似体) : Gが、C : Gよりも好ましく；

グアニジニウム - G - クランプ : Gが、C : Gよりも好ましく；

シュードウリジン : Aが、U : Aよりも好ましく；

結合を向上させる、糖修飾、例えば、2'修飾、例えば、2' F、ENA、またはLNAは、非修飾部分よりも好ましく、二重鎖の安定性を向上させるために一方または両方の

50

鎖に存在し得る。二重鎖を形成する傾向を増加させる対が、A S 鎖の 3' 末端で二重鎖の位置の 1 つ以上で使用されることが好ましい。末端対 (A S 鎖に関しては最も 3' 末端の側) は  $P_1$  と示され、二重鎖のそれに続く対の位置 (A S 鎖に関して 5' 方向に進む) は、 $P_2$ 、 $P_3$ 、 $P_4$ 、 $P_5$  などと示される。二重鎖の形成を調節するために修飾する好ましい領域は、 $P_5$  から  $P_1$  まで、より好ましくは、 $P_4$  から  $P_1$  まで、より好ましくは  $P_3$  から  $P_1$  までである。 $P_1$  での修飾が、単独で、または他の位置での修飾、例えば、今特定した位置のいずれかでの修飾と共に、特に好ましい。列挙された領域の内の対の少なくとも 1 つ、より好ましくは 2 つ、3 つ、4 つ、または 5 つが、

G : C

ワトソン・クリック塩基対 (A : T、A : U、G : C) よりも安定性を増加させる類似体  
10

2 - アミノ - A : U

2 - チオUまたは 5 Me - チオ - U : A

G - クランプ (4 つの水素結合を有する C の類似体) : G

グアニジニウム - G - クランプ : G

シュードウリジン : A

一方または両方のサブユニットが、結合を向上させる、糖修飾、例えば、2' 修飾、例えば、2' F、ENA、または LNA を有する対  
の群から独立して選択されることが好ましい。

【0036】

好ましい実施の形態において、 $P_1$  から  $P_4$  までの対の少なくとも 2 つまたは 3 つが、二重鎖の安定性を促進する対である。

【0037】

好ましい実施の形態において、 $P_1$  から  $P_4$  までの対の少なくとも 2 つまたは 3 つが、G : C である。

【0038】

好ましい実施の形態において、 $P_1$  から  $P_4$  までの対の少なくとも 2 つまたは 3 つが、ワトソン・クリック塩基対よりも安定性を増加させる類似体を有する対である。

【0039】

好ましい実施の形態において、 $P_1$  から  $P_4$  までの対の少なくとも 2 つまたは 3 つが、2  
- アミノ - A : U である。

【0040】

好ましい実施の形態において、 $P_1$  から  $P_4$  までの対の少なくとも 2 つまたは 3 つが、2  
- チオUまたは 5 Me - チオ - U : A である。

【0041】

好ましい実施の形態において、 $P_1$  から  $P_4$  までの対の少なくとも 2 つまたは 3 つが、G  
- クランプ : G である。

【0042】

好ましい実施の形態において、 $P_1$  から  $P_4$  までの対の少なくとも 2 つまたは 3 つが、グ  
アニジニウム - G - クランプ : G である。

【0043】

好ましい実施の形態において、 $P_1$  から  $P_4$  までの対の少なくとも 2 つまたは 3 つが、シ  
ュードウリジン : A である。

【0044】

好ましい実施の形態において、 $P_1$  から  $P_4$  までの対の少なくとも 2 つまたは 3 つが、一  
方または両方のサブユニットが、結合を向上させる、糖修飾、例えば、2' 修飾、例えば、2' F、ENA、または LNA を有する対である。

【0045】

G - クランプおよびグアニジニウム - G - クランプが以下の文献に論じられている : Ho  
lmes and Gait, "The Synthesis of 2'-O-Methyl G-Clamp Containing Oligonucleotide  
50

s and Their Inhibition of the HIV-1 Tat-TAR Interaction," Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids, 22:1259-1262, 2003; Holmes et al., "Steric inhibition of human immunodeficiency virus type-1 Tat-dependent trans-activation in vitro and in cells by oligonucleotides containing 2'-O-methyl G-clamp ribonucleoside analogues," Nucleic Acids Research, 31:2759-2768, 2003; Wilds, et al., "Structural basis for recognition of guanosine by a synthetic tricyclic cytosine analogue: Guanidinium G-clamp," Helvetica Chimica Acta, 86:966-978, 2003; Rajeev, et al., "High-Affinity Peptide Nucleic Acid Oligomers Containing Tricyclic Cytosine Analogues," Organic Letters, 4:4395-4398, 2002; Ausin, et al., "Synthesis of Amino- and Guanidino-G-Clamp PNA Monomers," Organic Letters, 4:4073-4075, 2002; Maier et al., "Nuclease resistance of oligonucleotides containing the tricyclic cytosine analogues phenoxazine and 9-(2-aminoethoxy)-phenoxazine ("G-clamp") and origins of their nuclease resistance properties," Biochemistry, 41:1323-7, 2002; Flanagan, et al., "A cytosine analog that confers enhanced potency to antisense oligonucleotides," Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America, 96:3513-8, 1999.

10

# 【 0 0 4 6 】

二重鎖の A S 5 ' 末端の安定性を減少させると同時に、二重鎖の A S 3 ' 末端の安定性を増加させる

先に論じたように、iRNA 剤は、二重鎖の A S 5 ' 末端の安定性を減少させ、かつ二重鎖の A S 3 ' 末端の安定性を増加させるように修飾できる。このことは、二重鎖の A S 5 ' 末端における 1 つ以上の安定性減少修飾を、二重鎖の A S 3 ' 末端における 1 つ以上の安定性増加修飾を組み合わせることによって行うことができる。したがって、好ましい実施の形態は、P<sub>5</sub> から P<sub>1</sub> まで、より好ましくは、P<sub>4</sub> から P<sub>1</sub> まで、より好ましくは P<sub>3</sub> から P<sub>1</sub> までの修飾を含む。P<sub>1</sub> での修飾が、単独で、または他の位置での修飾、例えば、今特定した位置での修飾と共に、特に好ましい。二重鎖領域の A S 5 ' 末端の列挙された領域の内の対の少なくとも 1 つ、より好ましくは 2 つ、3 つ、4 つ、または 5 つが

20

A : U

G : U

I : C

30

不一致対、例えば、非標準すなわち標準以外の対もしくは普遍的塩基を含む対、および P<sub>5</sub> から P<sub>1</sub> まで、より好ましくは、P<sub>4</sub> から P<sub>1</sub> まで、より好ましくは P<sub>3</sub> から P<sub>1</sub> までにおける修飾

の群から独立して選択されることが好ましい。P<sub>1</sub> での修飾が、単独で、または他の位置での修飾、例えば、今特定した位置での修飾と共に、特に好ましい。二重鎖領域の A S 3 ' 末端の列挙された領域の内の対の少なくとも 1 つ、より好ましくは 2 つ、3 つ、4 つ、または 5 つが、

G : C

ワトソン・クリック塩基対 (A : T、A : U、G : C) よりも安定性を増加させる類似体を有する対

40

2 - アミノ - A : U

2 - チオ U または 5 Me - チオ - U : A

G - クランプ (4 つの水素結合を有する C の類似体) : G

グアニジニウム - G - クランプ : G

シュードウリジン : A

一方または両方のサブユニットが、結合を向上させる、糖修飾、例えば、2' 修飾、例えば、2' F、ENA、または LNA を有する対の群から独立して選択されることが好ましい。

# 【 0 0 4 7 】

50

本発明は、DMTDSを有するiRNA剤を選択する方法および製造する方法も含む。例えば、iRNA剤として使用するための候補の配列について標的配列をスクリーニングする場合、ここに記載されたDMTDS特性を有する配列、または所望のレベルのDMTDSを提供するために、特にAS鎖に対して、好ましくはできるだけ少ない変更で、修飾できる配列を選択することができる。

【0048】

本発明は、候補のiRNA剤配列を提供すること、およびDMTDS iRNA剤を提供するために $P_{-5}$ から $P_{+1}$ までの少なくとも1つのPおよび/または $P_5$ から $P_1$ までの少なくとも1つのPを修飾することも含む。

【0049】

DMTDS iRNA剤は、ここに記載された任意の方法に、例えば、ここに開示された任意の遺伝子を発現抑制するために、ここに記載された任意の疾患を処置するために、ここに記載された任意の配合部に、また一般に、このどこかに記載された方法および組成物においておよび/またはそれらに関して、使用することができる。DMTDS iRNA剤は、ここに記載された他の修飾、例えば、標的薬剤の結合または安定性を向上させる修飾の含有、例えば、鎖間の二重鎖構造を形成するために自己解離する一本鎖突出部（例えば、3' AS突出部および/または間3' S鎖突出部）の含有またはヌクレアーゼ抵抗性モノマーの含有を含んで差し支えない。

【0050】

1つの態様において、本発明は、

(a) センス鎖であり、

(i) 少なくとも2つの異なる化学修飾ヌクレオチドを有する交互モチーフと、

(ii) 少なくとも1つのリガンドと、

を含むセンス鎖、および

(b) アンチセンス鎖であり、

(i) 少なくとも2つの異なる化学修飾ヌクレオチドを有する交互モチーフ、

を含むアンチセンス鎖、

を含む前記iRNA二重鎖剤を投与することによって、対象における特定の標的にポリヌクレオチドを送達する方法を提供する。

【0051】

1つの実施の形態において、本発明のiRNA二重鎖剤の送達は、筋肉内、気管支内、胸腔内、腹膜内、動脈内、リンパ管、静脈内、皮下、脳脊髄、またはそれらの組合せを含む投与手段により行われる。

【0052】

1つの態様において、本発明は、対象の特定の標的にポリヌクレオチドを送達する方法であって、対象に本発明のiRNA二重鎖剤を皮下で送達し、よって、そのポリヌクレオチドが対象の特定の標的に送達される工程を含む方法を提供する。

【0053】

1つの態様において、本発明は、先の請求項のiRNA二重鎖剤を単独でまたは薬学的に許容される担体または賦形剤と共に含む医薬組成物を提供する。

【0054】

1つの態様において、iRNA二重鎖剤に炭水化物部分を結合させることにより、そのiRNA二重鎖剤の1つ以上の性質を最適化できる。多くの場合、炭水化物部分は、iRNA二重鎖剤の修飾されたサブユニットに結合される。例えば、iRNA二重鎖剤の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を、別の部分、例えば、炭水化物リガンドが結合される非炭水化物（好ましくは環式）担体と交換できる。そのサブユニットのリボース糖がそのように置換されたりボヌクレオチドサブユニットは、ここでは、リボース置換修飾サブユニット(RRMS)と称される。環式担体は、炭素環式環系（すなわち、全ての環原子は炭素原子である）、または複素環式環系（すなわち、1つ以上の環原子がヘテロ原子、例えば、窒素、酸素、硫黄であってよい）であってよい。環式担体は、単

10

20

30

40

50

環式環系であっても、または2つ以上の環、例えば、縮合環を含んでもよい。環式担体は、完全に飽和された環系であっても、1つ以上の二重結合を含有してもよい。

【0055】

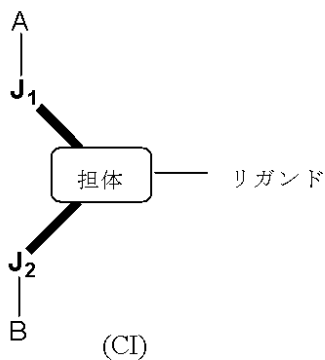
1つの実施の形態において、リガンドは担体を介してポリヌクレオチドに結合される。その担体は、(i)少なくとも1つの「骨格結合点」、好ましくは2つの「骨格結合点」、および(ii)少なくとも1つの「テザリング(tethering)結合点」を含む。ここに用いたような「骨格結合点」は、官能基、例えば、ヒドロキシル基、または一般に、担体をリボ核酸の骨格、例えば、リン酸、または修飾リン酸、例えば、硫黄含有骨格に組み込むのに利用でき、それに適した結合を称する。「テザリング結合点」(TAP)は、いくつかの実施の形態において、選択された部分に接続する環式担体の構成環原子、例えば、炭素原子またはヘテロ原子(骨格結合点を提供する原子から区別される)を称する。その部分は、例えば、炭水化物、例えば、単糖、二糖、三糖、四糖、オリゴ糖および多糖であって差し支えない。必要に応じて、選択された部分は、環式担体に、介在するテザー(tether)によって接続される。それゆえ、環式担体は、しばしば、官能基、例えば、アミノ基を含む、または一般に、別の化学物質、例えば、リガンドの構成環への含有またはテザリングに適した結合を提供する。

10

【0056】

1つの態様において、本発明は、式(C1)

【化1】



20

30

【0057】

に示された構造を有する化合物を特徴とする。

【0058】

AおよびBの各々は、各存在毎に独立して、水素、保護基、必要に応じて置換された脂肪族、必要に応じて置換されたアリール、必要に応じて置換されたヘテロアリール、ポリエチレングリコール(PEG)、ホスフェート、ジホスフェート、トリホスフェート、ホスホネート、ホスホノチオエート、ホスホノジチオエート、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロチオロチオネート、ホスホジエステル、ホスホトリエステル、活性化リン酸基、活性化亜リン酸基、ホスホラミダイト、固体担体、 $-P(Z^1)(Z^2)-O-$ ヌクレオシド、または $-P(Z^1)(Z^2)-O-$ オリゴヌクレオチドであり；式中、 $Z^1$ および $Z^2$ の各々は、各存在毎に独立して、O、S、N(アルキル)または必要に応じて置換されたアルキルであり；式中、オリゴヌクレオチドは、

40

(a) センス鎖であり、

(i) 交互2'-フルオロ修飾と、

(ii) 少なくとも1つのリガンドと、

を含むセンス鎖、および

(b) アンチセンス鎖であり、

(i) 交互2'-ハロゲン修飾と、

(ii) 5'炭素位置でリン酸化されている第1の5'末端アンチセンスヌクレオチドと、

50

を含むアンチセンス鎖、  
を含む。

【 0 0 5 9 】

$J_1$  および  $J_2$  は、独立して、O、S、 $NR^N$ 、必要に応じて置換されたアルキル、 $OC(O)NH$ 、 $NHC(O)O$ 、 $NHC(O)$ 、 $OC(O)$ 、 $C(O)O$ 、 $OC(O)O$ 、 $NHC(O)NH$ 、 $NHC(S)NH$ 、 $OC(S)NH$ 、 $OP(N(R^P)_2)O$ 、または  $OP(N(R^P)_2)$  であり；

担体

10

【 0 0 6 0 】

は、環式基または非環式基であり；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、およびデカリンから選択され；好ましくは、非環式基は、セリノール骨格またはジエタノールアミン骨格から選択される。

【 0 0 6 1 】

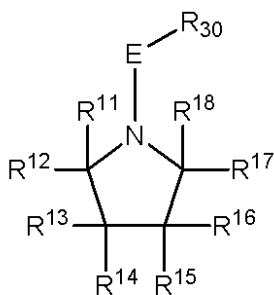
好ましい実施の形態において、リガンドは、炭水化物、例えば、単糖、二糖、三糖、四糖、多糖である。

20

【 0 0 6 2 】

1 つの実施の形態において、前記化合物は、式 ( C I I )

【 化 2 】



式 ( C I I )

30

【 0 0 6 3 】

に示されたピロリン環系であり、式中、

E は、存在しないか、または  $C(O)$ 、 $C(O)O$ 、 $C(O)NH$ 、 $C(S)$ 、 $C(S)NH$ 、 $SO$ 、 $SO_2$ 、または  $SO_2NH$  であり；

$R^{11}$ 、 $R^{12}$ 、 $R^{13}$ 、 $R^{14}$ 、 $R^{15}$ 、 $R^{16}$ 、 $R^{17}$ 、および  $R^{18}$  の各々は、各存在毎に独立して、H、 $-CH_2OR^a$ 、または  $OR^b$  であり、

40

$R^a$  および  $R^b$  の各々は、各存在毎に独立して、水素、ヒドロキシル保護基、必要に応じて置換されたアルキル、必要に応じて置換されたアリール、必要に応じて置換されたシクロアルキル、必要に応じて置換されたアラールキル、必要に応じて置換されたアルケニル、必要に応じて置換されたヘテロアリール、ポリエチレングリコール (PEG)、ホスフェート、ジホスフェート、トリホスフェート、ホスホネート、ホスホノチオエート、ホスホノジチオエート、ホスホロチオエート、ホスホロチオレート、ホスホロジチオエート、ホスホロチオロチオネート、ホスホジエステル、ホスホトリエステル、活性化リン酸基、活性化亜リン酸基、ホスホラミダイト、固体担体、 $-P(Z^1)(Z^2)-O-$ ヌクレオシド、 $-P(Z^1)(Z^2)-O-$ オリゴヌクレオチド、 $-P(Z^1)(O-リンカー-R^L)-$

50

O - ヌクレオシド、または - P ( Z<sup>1</sup> ) ( O - リンカー - R<sup>L</sup> ) - O - オリゴヌクレオチドであり；式中、オリゴヌクレオチドは、

( a ) センス鎖であり、

( i ) 交互 2' - フルオロ修飾と、

( i i ) 少なくとも 1 つのリガンドと、

を含むセンス鎖、および

( b ) アンチセンス鎖であり、

( i ) 交互 2' - ハロゲン修飾と、

( i i ) 5' 炭素位置でリン酸化されている第 1 の 5' 末端アンチセンスヌクレオチドと、

10

を含むアンチセンス鎖、

を含む。

#### 【 0 0 6 4 】

R<sup>30</sup> は、各存在毎に独立して、- リンカー - R<sup>L</sup> または R<sup>31</sup> であり；

R<sup>L</sup> は、水素またはリガンドであり；

R<sup>31</sup> は、- C ( O ) C H ( N ( R<sup>32</sup> )<sub>2</sub> ) ( C H<sub>2</sub> )<sub>h</sub> N ( R<sup>32</sup> )<sub>2</sub> であり；

R<sup>32</sup> は、各存在毎に独立して、H、- R<sup>L</sup>、- リンカー - R<sup>L</sup> または R<sup>31</sup> であり；

Z<sup>1</sup> は、各存在毎に独立して、O または S であり；

Z<sup>2</sup> は、各存在毎に独立して、O、S、N ( アルキル ) または必要に応じて置換されたアルキルであり；

20

h は、各存在毎に独立して、1 ~ 20 である。

#### 【 0 0 6 5 】

ピロリン系クリック (click) 担体について、R<sup>11</sup> は - C H<sub>2</sub> O R<sup>a</sup> であり、R<sup>3</sup> は O R<sup>b</sup> であり；または R<sup>11</sup> は - C H<sub>2</sub> O R<sup>a</sup> であり、R<sup>9</sup> は O R<sup>b</sup> であり；または R<sup>11</sup> は - C H<sub>2</sub> O R<sup>a</sup> であり、R<sup>17</sup> は O R<sup>b</sup> であり；または R<sup>13</sup> は - C H<sub>2</sub> O R<sup>a</sup> であり、R<sup>11</sup> は O R<sup>b</sup> であり；または R<sup>13</sup> は - C H<sub>2</sub> O R<sup>a</sup> であり、R<sup>15</sup> は O R<sup>b</sup> であり；または R<sup>13</sup> は - C H<sub>2</sub> O R<sup>a</sup> であり、R<sup>17</sup> は O R<sup>b</sup> である。ある実施の形態において、C H<sub>2</sub> O R<sup>a</sup> および O R<sup>b</sup> は、ジェミナル置換されていてもよい。4 - ヒドロキシピロリン系担体について、R<sup>11</sup> は - C H<sub>2</sub> O R<sup>a</sup> であり、R<sup>17</sup> は O R<sup>b</sup> である。したがって、ピロリン系および 4 - ヒドロキシピロリン系化合物は、結合の回転がその特定の連結部の周りに限られている、例えば、環の存在から制限が生じている、連結部 (例えば、炭素 - 炭素結合) を含有してもよい。それゆえ、C H<sub>2</sub> O R<sup>a</sup> および O R<sup>b</sup> は、先に描写した対の何れにおいても、互いに対してシスまたはトランスであってもよい。したがって、全てのシス/トランス異性体が明白に含まれる。前記化合物は、1 つ以上の不斉中心も含んでよく、それゆえ、ラセミ化合物およびラセミ混合物、単一の鏡像異性体、個々のジアステレオマーおよびジアステレオマー混合物として生じるであろう。前記化合物のそのような異性形態の全てが明白に含まれる (例えば、C H<sub>2</sub> O R<sup>a</sup> および O R<sup>b</sup> を担持する中心は、両方とも、R 配置を有し得；または両方とも、S 配置を有し得；または一方の中心が R 配置を有し得、他方の中心が S 配置を有し得、またその逆も同様である)。

30

#### 【 0 0 6 6 】

1 つの実施の形態において、R<sup>11</sup> は C H<sub>2</sub> O R<sup>a</sup> であり、R<sup>9</sup> は O R<sup>b</sup> である。

40

#### 【 0 0 6 7 】

1 つの実施の形態において、R<sup>b</sup> は固体担体である。

#### 【 0 0 6 8 】

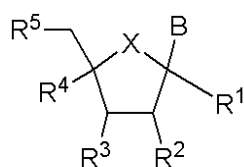
1 つの実施の形態において、式 ( C I I ) の担体は、ホスホラミダイトである、すなわち、R<sup>a</sup> または R<sup>b</sup> の一方が - P ( O - アルキル ) N ( アルキル )<sub>2</sub>、例えば、- P ( O C H<sub>2</sub> C H<sub>2</sub> C N ) N ( i - プロピル )<sub>2</sub> である。1 つの実施の形態において、R<sup>b</sup> が - P ( O - アルキル ) N ( アルキル )<sub>2</sub> である。

#### 【 0 0 6 9 】

実施の形態において、前記化合物は、式 ( C I I I )

50

## 【化 3】



式 (C I I I)

## 【 0 0 7 0 】

10

に示されたりボース環系であり、式中、

X は、O、S、 $\text{NR}^{\text{N}}$ または $\text{CR}^{\text{P}}_2$ であり；

B は、各存在毎に独立して、水素、必要に応じて置換された天然または非天然のヌクレオ塩基、-リンカー- $\text{R}^{\text{L}}$ と結合した必要に応じて置換された天然のヌクレオ塩基、または-リンカー- $\text{R}^{\text{L}}$ と結合した必要に応じて置換された非天然のヌクレオ塩基であり；

$\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$ 、 $\text{R}^4$ および $\text{R}^5$ の各々は、各存在毎に独立して、H、 $\text{OR}^6$ 、F、 $\text{N}(\text{R}^{\text{N}})_2$ 、または-J-リンカー- $\text{R}^{\text{L}}$ であり；

J は、存在しないか、O、S、 $\text{NR}^{\text{N}}$ 、 $\text{OC}(\text{O})\text{NH}$ 、 $\text{NHC}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{NH}$ 、 $\text{NHC}(\text{O})$ 、 $\text{NH}\text{SO}$ 、 $\text{NH}\text{SO}_2$ 、 $\text{NH}\text{SO}_2\text{NH}$ 、 $\text{OC}(\text{O})$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{OC}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{NHC}(\text{O})\text{NH}$ 、 $\text{NHC}(\text{S})\text{NH}$ 、 $\text{OC}(\text{S})\text{NH}$ 、 $\text{OP}(\text{N}(\text{R}^{\text{P}})_2)\text{O}$ 、または $\text{OP}(\text{N}(\text{R}^{\text{P}})_2)$ であり；

20

$\text{R}^6$ は、各存在毎に独立して、水素、ヒドロキシル保護基、必要に応じて置換されたアルキル、必要に応じて置換されたアリール、必要に応じて置換されたシクロアルキル、必要に応じて置換されたアラルキル、必要に応じて置換されたアルケニル、必要に応じて置換されたヘテロアリール、ポリエチレングリコール (PEG)、ホスフェート、ジホスフェート、トリホスフェート、ホスホネート、ホスホノチオエート、ホスホノジチオエート、ホスホロチオエート、ホスホロチオレート、ホスホロジチオエート、ホスホロチオロチオネート、ホスホジエステル、ホスホトリエステル、活性化リン酸基、活性化亜リン酸基、ホスホラミダイト、固体担体、- $\text{P}(\text{Z}^1)(\text{Z}^2)-\text{O}-$ ヌクレオシド、- $\text{P}(\text{Z}^1)(\text{Z}^2)-\text{O}-$ オリゴヌクレオチド、- $\text{P}(\text{Z}^1)(\text{Z}^2)-$ 式 (C I I I)、- $\text{P}(\text{Z}^1)(\text{O}-\text{リンカー}-\text{R}^{\text{L}})-\text{O}-$ ヌクレオシド、- $\text{P}(\text{Z}^1)(\text{O}-\text{リンカー}-\text{R}^{\text{L}})-\text{O}-$ オリゴヌクレオチド、または- $\text{P}(\text{Z}^1)(\text{O}-\text{リンカー}-\text{R}^{\text{L}})-\text{O}-$ 式 (C I I I) であり；式中、オリゴヌクレオチドは、

30

(a) センス鎖であり、

(i) 交互 2' - フルオロ修飾と、

(ii) 少なくとも 1 つのリガンドと、

を含むセンス鎖、および

(b) アンチセンス鎖であり、

(i) 交互 2' - ハロゲン修飾と、

(ii) 5' 炭素位置でリン酸化されている第 1 の 5' 末端アンチセンスヌクレオチドと、

40

を含むアンチセンス鎖、

を含む。

## 【 0 0 7 1 】

$\text{R}^{\text{N}}$ は、各存在毎に独立して、H、必要に応じて置換されたアルキル、必要に応じて置換されたアルケニル、必要に応じて置換されたアルキニル、必要に応じて置換されたアリール、必要に応じて置換されたシクロアルキル、必要に応じて置換されたアラルキル、必要に応じて置換されたヘテロアリールまたはアミノ保護基であり；

$\text{R}^{\text{P}}$ は、各存在毎に独立して、H、必要に応じて置換されたアルキル、必要に応じて置換されたアルケニル、必要に応じて置換されたアルキニル、必要に応じて置換されたアリ

50

ール、必要に応じて置換されたシクロアルキル、または必要に応じて置換されたヘテロアリアルであり；

$R^L$ は、水素またはリガンドであり；

$Z^1$ および $Z^2$ の各々は、各存在毎に独立して、O、S、N（アルキル）または必要に応じて置換されたアルキルである；

但し、 $R^L$ が少なくとも1つ存在するという条件で、さらに $R^L$ が少なくとも1つはリガンドであるという条件である。

【0072】

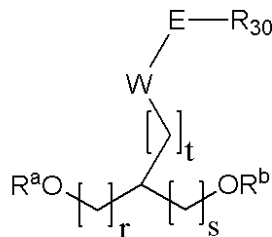
1つの実施の形態において、式（C I）の担体は、非環式基であり、「非環式担体」と称される。好ましい非環式担体は、以下の式（C I V）または式（C V）に示された構造を有し得る。

10

【0073】

1つの実施の形態において、前記化合物は、式（C I V）

【化4】



20

式（C I V）

【0074】

に示された構造を有する非環式担体であり、式中、

Wは、存在しないか、O、SおよびN（ $R^N$ ）であり、式中、 $R^N$ は、各存在毎に独立して、H、必要に応じて置換されたアルキル、必要に応じて置換されたアルケニル、必要に応じて置換されたアルキニル、必要に応じて置換されたアリール、必要に応じて置換されたシクロアルキル、必要に応じて置換されたアラルキル、必要に応じて置換されたヘテロアリールまたはアミノ保護基であり；

30

Eは、存在しないか、またはC（O）、C（O）O、C（O）NH、C（S）、C（S）NH、SO、SO<sub>2</sub>、またはSO<sub>2</sub>NHであり；

$R^a$ および $R^b$ の各々は、各存在毎に独立して、水素、ヒドロキシル保護基、必要に応じて置換されたアルキル、必要に応じて置換されたアリール、必要に応じて置換されたシクロアルキル、必要に応じて置換されたアラルキル、必要に応じて置換されたアルケニル、必要に応じて置換されたヘテロアリール、ポリエチレングリコール（PEG）、ホスフェート、ジホスフェート、トリホスフェート、ホスホネート、ホスホノチオエート、ホスホノジチオエート、ホスホロチオエート、ホスホロチオレート、ホスホロジチオエート、ホスホロチオロチオネート、ホスホジエステル、ホスホトリエステル、活性化リン酸基、活性化亜リン酸基、ホスホラミダイト、固体担体、-P（ $Z^1$ ）（ $Z^2$ ）-O-ヌクレオシド、-P（ $Z^1$ ）（ $Z^2$ ）-O-オリゴヌクレオチド、-P（ $Z^1$ ）（O-リンカー- $R^L$ ）-O-ヌクレオシド、または-P（ $Z^1$ ）（O-リンカー- $R^L$ ）-O-オリゴヌクレオチドであり；式中、オリゴヌクレオチドは、

40

（a）センス鎖であり、

（i）交互2'-フルオロ修飾と、

（ii）少なくとも1つのリガンドと、

を含むセンス鎖、および

（b）アンチセンス鎖であり、

50

( i ) 交互 2' - ハロゲン修飾と、  
 ( i i ) 5' 炭素位置でリン酸化されている第 1 の 5' 末端アンチセンスヌクレオチドと、  
 を含むアンチセンス鎖、  
 を含む。

## 【 0 0 7 5 】

$R^{30}$  は、各存在毎に独立して、- リンカー -  $R^L$  または  $R^{31}$  であり；  
 $R^L$  は、水素またはリガンドであり；  
 $R^{31}$  は、-  $C(O)CH(N(R^{32}))_2(CH_2)_hN(R^{32})_2$  であり；  
 $R^{32}$  は、各存在毎に独立して、H、-  $R^L$ 、- リンカー -  $R^L$  または  $R^{31}$  であり；  
 $Z^1$  は、各存在毎に独立して、O または S であり；  
 $Z^2$  は、各存在毎に独立して、O、S、N (アルキル) または必要に応じて置換されたアルキルであり；  
 h は、各存在毎に独立して、1 ~ 20 であり；  
 r、s および t の各々は、各存在毎に独立して、0、1、2 または 3 である。

10

## 【 0 0 7 6 】

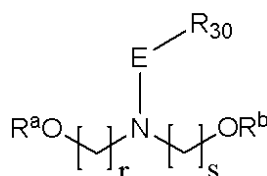
r および s が異なる場合、第三炭素は、R または S 配置のいずれであっても差し支えない。好ましい実施の形態において、x および y は 1 であり、z が 0 である (例えば、担体はセリノールに基づく)。非環式担体は、必要に応じて、例えば、ヒドロキシ、アルコキシ、ペルハロアルキルにより置換されていて差し支えない。

20

## 【 0 0 7 7 】

1 つの実施の形態において、前記化合物は、式 (C V)

## 【 化 5 】



式 (C V)

30

## 【 0 0 7 8 】

に示された構造を有する非環式担体であり、式中、

E は、存在しないか、または C (O)、C (O) O、C (O) NH、C (S)、C (S) NH、S O、S O<sub>2</sub>、または S O<sub>2</sub> NH であり；

$R^a$  および  $R^b$  の各々は、各存在毎に独立して、水素、ヒドロキシル保護基、必要に応じて置換されたアルキル、必要に応じて置換されたアリール、必要に応じて置換されたシクロアルキル、必要に応じて置換されたアラルキル、必要に応じて置換されたアルケニル、必要に応じて置換されたヘテロアリール、ポリエチレングリコール (PEG)、ホスフェート、ジホスフェート、トリホスフェート、ホスホネート、ホスホノチオエート、ホスホノジチオエート、ホスホロチオエート、ホスホロチオレート、ホスホロジチオエート、ホスホロチオロチオネート、ホスホジエステル、ホスホトリエステル、活性化リン酸基、活性化亜リン酸基、ホスホラミダイト、固体担体、- P ( $Z^1$ ) ( $Z^2$ ) - O - ヌクレオシド、- P ( $Z^1$ ) ( $Z^2$ ) - O - オリゴヌクレオチド、- P ( $Z^1$ ) ( $Z^2$ ) - 式 (I)、- P ( $Z^1$ ) (O - リンカー -  $R^L$ ) - O - ヌクレオシド、または - P ( $Z^1$ ) (O - リンカー -  $R^L$ ) - O - オリゴヌクレオチドであり；式中、オリゴヌクレオチドは、

40

( a ) センス鎖であり、

( i ) 交互 2' - フルオロ修飾と、

( i i ) 少なくとも 1 つのリガンドと、

50

を含むセンス鎖、および

(b) アンチセンス鎖であり、

(i) 交互 2' - ハロゲン修飾と、

(ii) 5' 炭素位置でリン酸化されている第 1 の 5' 末端アンチセンスヌクレオチドと、

を含むアンチセンス鎖、

を含む。

#### 【0079】

$R^{30}$  は、各存在毎に独立して、- リンカー -  $R^L$  または  $R^{31}$  であり；

$R^L$  は、水素またはリガンドであり；

$R^{31}$  は、-  $C(O)CH(N(R^{32}))_2(CH_2)_hN(R^{32})_2$  であり；

$R^{32}$  は、各存在毎に独立して、H、-  $R^L$ 、- リンカー -  $R^L$  または  $R^{31}$  であり；

$Z^1$  は、各存在毎に独立して、O または S であり；

$Z^2$  は、各存在毎に独立して、O、S、N (アルキル) または必要に応じて置換されたアルキルであり；

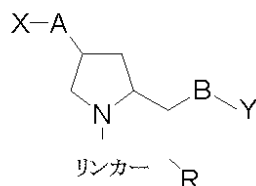
h は、各存在毎に独立して、1 ~ 20 であり；

r および s の各々は、各存在毎に独立して、0、1、2 または 3 である。ここに記載した環式担体に加え、RRMS は、その内容を全ての目的でここに引用する、同一出願人による係属中の、2004 年 8 月 10 日に出願された米国特許出願第 10/916185 号、2004 年 9 月 21 日に出願された米国特許出願第 10/946873 号、2004 年 11 月 9 日に出願された米国特許出願第 10/985426 号、2007 年 8 月 3 日に出願された米国特許出願第 10/833934 号、2005 年 4 月 27 日に出願された米国特許出願第 11/115989 号、および 2005 年 4 月 29 日に出願された米国特許出願第 11/119533 号に記載された環式担体および非環式担体を含み得る。

#### 【0080】

したがって、1 つの態様において、本発明は、式 (I)

#### 【化 6】



#### 【0081】

に示された構造を有するモノマーを特徴とし、式中、

A および B の各々は、各存在毎に独立して、O、N ( $R^N$ ) または S であり；

$R^N$  は、各存在毎に独立して、H または  $C_1 \sim C_6$  アルキルであり；

X および Y の各々は、各存在毎に独立して、水素、保護基、リン酸基、ホスホジエステル基、活性化リン酸基、活性化亜リン酸基、ホスホラミダイト、固体担体、- P ( $Z'$ ) ( $Z''$ ) O - ヌクレオシド、- P ( $Z'$ ) ( $Z''$ ) O - オリゴヌクレオチド、脂質、PEG、ステロイド、ポリマー、ヌクレオチド、ヌクレオシド、- P ( $Z'$ ) ( $Z''$ ) O - リンカー O P ( $Z'''$ ) ( $Z''''$ ) O - オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、- P ( $Z'$ ) ( $Z''$ ) - 式 (I)、- P ( $Z'$ ) ( $Z''$ ) -、または - リンカー - R であり；式中、オリゴヌクレオチドは、

(a) センス鎖であり、

(i) 交互 2' - フルオロ修飾と、

(ii) 少なくとも 1 つのリガンドと、

を含むセンス鎖、および

(b) アンチセンス鎖であり、

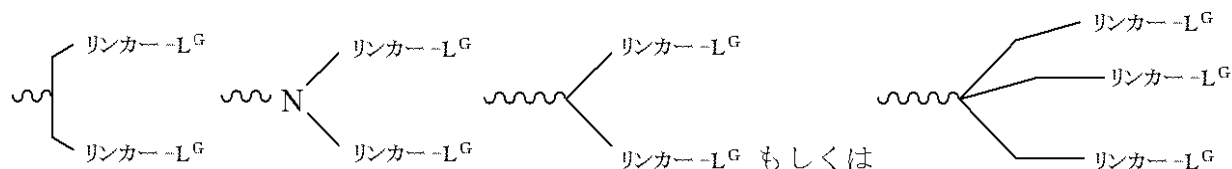
( i ) 交互 2' - ハロゲン修飾と、

( i i ) 5' 炭素位置でリン酸化されている第 1 の 5' 末端アンチセンスヌクレオチドと、  
を含むアンチセンス鎖、  
を含む。

【 0 0 8 2 】

R は、 $L^G$  であるか、または以下：

【 化 7 】



10

【 0 0 8 3 】

に示された構造を有し；

$L^G$  は、各存在毎に独立して、リガンド、例えば、炭水化物、例えば、単糖、二糖、三糖、四糖、多糖であり；

Z'、Z''、Z''' および Z'''' の各々は、各存在毎に独立して、O または S である。

【 0 0 8 4 】

「リンカー」という用語は、化合物の 2 つの部分とを接続する有機部分を意味する。リンカーは、概して、直接の結合、または酸素や硫黄などの原子、 $NR^8$ 、 $C(O)$ 、 $C(O)NH$ 、 $SO$ 、 $SO_2$ 、 $SO_2NH$  などのユニット、または以下に限られないが、置換または未置換アルキル、置換または未置換アルケニル、置換または未置換アルキニル、1 つ以上のメチレンが、O、S、 $S(O)$ 、 $SO_2$ 、 $N(R^8)$ 、 $C(O)$  により割り込まれていても、終わらされても差し支えない、アリアルアルキル、アリアルアルケニル、アリアルアルキニル、ヘテロアリアルアルキル、ヘテロアリアルアルケニル、ヘテロアリアルアルキニル、ヘテロシクリルアルキル、ヘテロシクリルアルケニル、ヘテロシクリルアルキニル、アリアル、ヘテロアリアル、ヘテロシクリル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルキルアリアルアルキル、アルキルアリアルアルケニル、アルキルアリアルアルキニル、アルケニルアリアルアルキル、アルケニルアリアルアルケニル、アルケニルアリアルアルキニル、アルキニルアリアルアルキル、アルキニルアリアルアルケニル、アルキニルアリアルアルキニル、アルキルヘテロアリアルアルキル、アルキルヘテロアリアルアルケニル、アルキルヘテロアリアルアルキニル、アルケニルヘテロアリアルアルキル、アルケニルヘテロアリアルアルケニル、アルケニルヘテロアリアルアルキニル、アルキニルヘテロアリアルアルキル、アルキニルヘテロアリアルアルケニル、アルキニルヘテロアリアルアルキニル、アルキルヘテロシクリルアルキル、アルキルヘテロシクリルアルケニル、アルキルヘテロシクリルアルキニル、アルケニルヘテロシクリルアルキル、アルケニルヘテロシクリルアルケニル、アルケニルヘテロシクリルアルキニル、アルキニルヘテロシクリルアルキル、アルキニルヘテロシクリルアルケニル、アルキニルヘテロシクリルアルキニル、アルキルアリアル、アルケニルアリアル、アルキニルアリアル、アルキルヘテロアリアル、アルケニルヘテロアリアル、アルキニルヘテロアリアル、置換または未置換アリアル、置換または未置換ヘテロアリアル、置換または未置換ヘテロシクリルなどの原子の鎖を含み、式中、 $R^8$  は、水素、アシル、脂肪族または置換脂肪族である。1 つの実施の形態において、リンカーは、1 ~ 24 の原子、好ましくは 4 ~ 24 の原子、好ましくは 6 ~ 18 の原子、より好ましくは 8 ~ 18 の原子、最も好ましくは 8 ~ 16 の原子である。

20

30

40

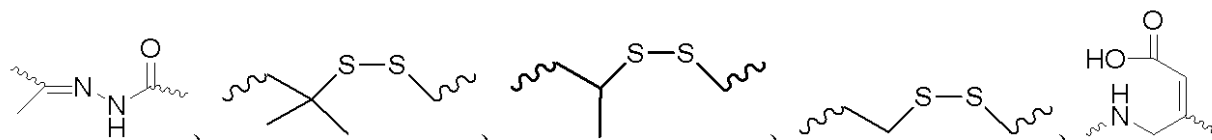
【 0 0 8 5 】

1 つの実施の形態において、リンカーは、 $-[(P-Q''-R)_q-X-(P'-Q'''-R')_{q'}]_{q''}-T-$  であり、式中、P、R、T、P'、R' および T の各々は、各存在毎に独立して、存在しないか、CO、NH、O、S、OC(O)、NHC(O)、CH

50

2、 $\text{CH}_2\text{NH}$ 、 $\text{CH}_2\text{O}$ 、 $\text{NHCH}(\text{R}^a)\text{C}(\text{O})$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}(\text{R}^a)-\text{NH}-$ 、 $\text{CH}=\text{N}-\text{O}$ 、

【化 8】



【0086】

10

またはヘテロシクリルであり；

Q'' および Q''' の各々は、各存在毎に独立して、存在しないか、 $-(\text{CH}_2)_n-$ 、 $-\text{C}(\text{R}^1)(\text{R}^2)(\text{CH}_2)_n-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{R}^1)(\text{R}^2)-$ 、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、または  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$  であり；

X は、存在しないか、または開裂可能な連結基であり；

$\text{R}^a$  は、H またはアミノ酸側鎖であり；

$\text{R}^1$  および  $\text{R}^2$  の各々は、各存在毎に独立して、H、 $\text{CH}_3$ 、OH、SH または  $\text{N}(\text{R}^N)_2$  であり；

$\text{R}^N$  は、各存在毎に独立して、H、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチルまたはベンジルであり；

20

q、q' および q'' の各々は、各存在毎に独立して、0 ~ 20 であり、反復ユニットは、同じでも異なっても差し支えなく；

n は、各存在毎に独立して、1 ~ 20 であり；

m は、各存在毎に独立して、0 ~ 50 である。

【0087】

1つの実施の形態において、リンカーは、少なくとも1つの開裂可能な連結基を含む。

【0088】

ある実施の形態において、リンカーは分岐リンカーである。分岐リンカーの分岐点は、少なくとも三価であってよいが、四価、五価または六価の原子、もしくは多価を示す基であってよい。ある実施の形態において、分岐点は、 $-\text{N}$ 、 $-\text{N}(\text{Q})-\text{C}$ 、 $-\text{O}-\text{C}$ 、 $-\text{S}-\text{C}$ 、 $-\text{SS}-\text{C}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{Q})-\text{C}$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{Q})-\text{C}$ 、 $-\text{N}(\text{Q})\text{C}(\text{O})-\text{C}$ 、または  $-\text{N}(\text{Q})\text{C}(\text{O})\text{O}-\text{C}$  であり、式中、Q は、各存在毎に独立して、H または必要に応じて置換されたアルキルである。他の実施の形態において、分岐点は、グリセロールまたはグリセロール誘導体である。

30

【0089】

開裂可能な連結基

開裂可能な連結基は、細胞の外では十分に安定であるが、標的細胞中に進入した際に、開裂されて、リンカーが一緒に保持している2つの部分を解放するものである。好ましい実施の形態において、開裂可能な連結基は、対象の血液中におけるよりも、標的細胞中で、または第1の標準状態（例えば、細胞内状態を模倣するまたは表すように選択できる）で、もしくは第2の標準状態（例えば、血液中または血清中に見られる状態を模倣するまたは表すように選択できる）で、少なくとも10倍、好ましくは少なくとも100倍速く開裂される。

40

【0090】

開裂可能な連結基は、開裂剤、例えば、pH、酸化還元電位または分解系分子の影響を受けやすい。一般に、開裂剤は、血清中または血液中よりも、細胞の内部でより高いレベルまたは活性で見つかるか、またはより優勢である。そのような分解系剤の例としては、例えば、酸化または還元酵素、もしくは還元によって酸化還元開裂可能な連結基を分解できる、細胞中に存在するメルカプタンなどの還元剤を含む、特定の基質について選択された、または基質特異性を持たない酸化還元剤；エステラーゼ；酸性環境を作り出せるエン

50

ドソームまたは作用物質、例えば、5以下のpHを生じるもの；一般的な酸として機能することによって、酸性開裂可能な連結基を分解または加水分解できる酵素、ペプチダーゼ（基質特異性であり得る）、およびホスファターゼが挙げられる。

#### 【0091】

ジスルフィド結合などの開裂可能な連結基は、pHの影響を受け得る。ヒトの血清のpHは7.4であるのに対し、平均的な細胞内pHは、わずかに低く、約7.1～7.3に及ぶ。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、5.0辺りのさらにより酸性のpHを有する。あるリンカーは、好ましいpHで開裂される開裂可能な連結基を有し、それによって、細胞内部のリガンドから、または細胞の所望の区画中に、陽イオン脂質を放出する。

10

#### 【0092】

リンカーは、特定の酵素によって開裂可能である開裂可能な連結基を含み得る。リンカー中に組み込まれる開裂可能な連結基のタイプは、標的とすべき細胞に依存し得る。例えば、肝臓を標的とするリガンドは、エステル基を含むリンカーによって、陽イオン脂質に連結できる。肝臓細胞は、エステラーゼが豊富であり、したがって、リンカーは、エステラーゼが豊富ではないタイプの細胞中よりも、肝臓細胞中において、より効率的に開裂される。エステラーゼが豊富な他の細胞のタイプとしては、肺、腎皮質、および精巣の細胞が挙げられる。

#### 【0093】

肝臓細胞および滑膜細胞などの、ペプチダーゼが豊富な細胞のタイプを標的にする場合、ペプチド結合を含有するリンカーを使用できる。

20

#### 【0094】

一般に、候補の開裂可能な連結基の適性は、分解剤（または分解状態）の、候補の連結基を開裂する能力を試験することによって評価することができる。血液中におけるまたは他の非標的組織と接触するときの、開裂に抵抗する能力についての候補の開裂可能な連結基を試験することも望ましいであろう。それゆえ、第1の条件が標的細胞中の開裂を示すように選択され、第2の条件が他の組織または生物学的流体、例えば、血液または血清中の開裂を示すように選択されている、第1と第2の条件の間での開裂に対する相対的な感受性を判定することができる。評価は、無細胞系中、細胞中、細胞培養中、臓器または組織培養中、または動物全体において行うことができる。無細胞条件または培養条件で初期評価を行い、動物全体におけるさらなる評価を確認することが有用であろう。好ましい実施の形態において、有用な候補の化合物は、血液または血清（または細胞外条件を模倣するように選択されたインビトロ状態）と比べて、細胞中において少なくとも2、4、10または100倍速く開裂される。

30

#### 【0095】

##### 酸化還元開裂可能な連結基

開裂可能な連結基の1つの部類は、還元または酸化の際に開裂される酸化還元開裂可能な連結基である。還元で開裂可能な連結基の例に、ジスルフィド連結基（-S-S-）がある。候補の開裂可能な連結基が、適切な「還元で開裂可能な連結基」であるか、または例えば、特定のiRNA部分および特定の標的薬剤に使用するのに適しているかを判定するために、ここに記載された方法に目を向けることができる。例えば、候補は、細胞中、例えば、標的細胞中に観察されるであろう開裂の速度を模倣する、当該技術分野に公知の試薬を使用して、ジチオトレイトール（DTT）、または他の還元剤と一緒にインキュベーションにより評価することができる。候補は、血液または血清条件を模倣するように選択された条件下で評価しても差し支えない。好ましい実施の形態において、候補の化合物は、血液中で多くとも10%しか開裂されない。好ましい実施の形態において、有用な候補化合物は、血液（または細胞外条件を模倣するように選択されたインビボ条件下）と比べて、細胞中において少なくとも2、4、10または100倍速く分解される。候補化合物の開裂速度は、細胞内培地を模倣するように選択された条件下で、細胞外培地を模倣するように選択された条件と比べて、標準的な酵素反応速度アッセイを使用して決定できる

40

50

。

## 【0096】

ホスフェート系開裂可能な連結基

ホスフェート系開裂可能な連結基は、リン酸基を分解または加水分解する作用物質によって開裂される。細胞中でリン酸基を開裂する作用物質の例には、細胞中のホスファターゼなどの酵素がある。ホスフェート系連結基の例には、 $-O-P(O)(OR_k)-O-$ 、 $-O-P(S)(OR_k)-O-$ 、 $-O-P(S)(SR_k)-O-$ 、 $-S-P(O)(OR_k)-O-$ 、 $-O-P(O)(OR_k)-S-$ 、 $-S-P(O)(OR_k)-S-$ 、 $-O-P(S)(OR_k)-S-$ 、 $-S-P(S)(OR_k)-O-$ 、 $-O-P(O)(R_k)-O-$ 、 $-O-P(S)(R_k)-O-$ 、 $-S-P(O)(R_k)-O-$ 、 $-S-P(S)(R_k)-O-$ 、 $-S-P(O)(R_k)-S-$ 、 $-O-P(S)(R_k)-S-$ がある。好ましい実施の形態は、 $-O-P(O)(OH)-O-$ 、 $-O-P(S)(OH)-O-$ 、 $-O-P(S)(SH)-O-$ 、 $-S-P(O)(OH)-O-$ 、 $-O-P(O)(OH)-S-$ 、 $-S-P(O)(OH)-S-$ 、 $-O-P(S)(OH)-S-$ 、 $-S-P(S)(OH)-O-$ 、 $-O-P(O)(H)-O-$ 、 $-O-P(S)(H)-O-$ 、 $-S-P(O)(H)-O-$ 、 $-S-P(S)(H)-O-$ 、 $-S-P(O)(H)-S-$ 、 $-O-P(S)(H)-S-$ である。好ましい実施の形態は、 $-O-P(O)(OH)-O-$ 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できる。

10

20

## 【0097】

酸開裂可能な連結基

酸開裂可能な連結基は、酸性条件下で開裂される連結基である。好ましい実施の形態において、酸開裂可能な連結基は、約6.5以下のpH（例えば、約6.0、5.5、5.0、またはそれ未満）の酸性環境において、または一般酸として機能できる酵素などの作用物質によって、開裂される。細胞中で、エンドソームおよびリソソームなどの特定の低pH細胞小器官は、酸開裂可能な連結基の開裂環境を提供できる。酸開裂可能な連結基の例としては、以下に限られないが、ヒドラゾン、エステル、およびアミノ酸のエステルが挙げられる。酸開裂可能な基は、一般式 $-C=NH-$ 、 $C(O)O$ 、または $-OC(O)$ を有し得る。好ましい実施の形態は、エステルの酸素に結合した炭素（アルコキシ基）がアリール基、置換アルキル基、またはジメチルペンチルやt-ブチルなどの第三アルキル基である場合である。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できる。

30

。

## 【0098】

エステル系連結基

エステル系開裂可能な連結基は、細胞中のエステラーゼおよびアミダーゼなどの酵素により開裂される。エステル系開裂可能な連結基の例としては、以下に限られないが、アルキレン基、アルケニレン基およびアルキニレン基のエステルが挙げられる。エステル開裂可能な連結基は、一般式 $-C(O)O-$ または $-OC(O)-$ 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できる。

40

## 【0099】

ペプチド系開裂基

ペプチド系開裂可能な連結基は、細胞中のペプチダーゼおよびプロテアーゼなどの酵素により開裂される。ペプチド系開裂可能な連結基は、オリゴペプチド（例えば、ジペプチド、トリペプチドなど）およびポリペプチドを生じるようにアミノ酸の間に形成されたペプチド結合である。ペプチド系開裂可能な基はアミド基（ $-C(O)NH-$ ）を含まない。アミド基は、アルキレン、アルケニレンまたはアルキニレンの間に形成され得る。ペプチド結合は、ペプチドおよびタンパク質を生成するためにアミノ酸の間に形成される特別なタイプのアミド結合である。ペプチド系開裂可能な基は、概して、アミノ酸の間に形成されて、ペプチドおよびタンパク質を生成するペプチド結合（すなわち、アミド結合）にかぎられ、アミド官能基全体を含むわけではない。ペプチド系開裂可能な連結基は、一般

50

式 - NHCHR<sup>A</sup>C(O)NHCHR<sup>B</sup>C(O) - を有し、式中 R<sup>A</sup> および R<sup>B</sup> 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できる。ここに用いたように、「炭水化物」は、各炭素原子に酸素、窒素または硫黄原子が結合している、少なくとも 6 つの炭素原子を有する 1 つ以上の単糖ユニット（直鎖、分岐鎖または環式であってよい）から構成されたそれ自体が炭水化物である化合物；または各炭素原子に酸素、窒素または硫黄原子が結合している、少なくとも 6 つの炭素原子を有する 1 つ以上の単糖ユニット（直鎖、分岐鎖または環式であってよい）から構成された炭水化物部分をその一部として有する化合物を称する。代表的な炭水化物としては、糖（単糖、二糖、三糖および約 4 ~ 9 の単糖ユニットを含有するオリゴ糖）、およびデンプン、グリコーゲン、セルロースおよび多糖ガムなどの多糖が挙げられる。特別な単糖としては、C<sub>5</sub> 以上（好ましくは C<sub>5</sub> ~ C<sub>8</sub>）の糖が挙げられ；二糖および三糖としては、2 つまたは 3 つの単糖ユニット（好ましくは C<sub>5</sub> ~ C<sub>8</sub>）を有する糖が挙げられる。

10

#### 【0100】

「単糖」という用語は、アロース、アルトロース、アラビノース、クラジノース、エリトロース、エリトルロース、フルクトース、D - フシトール、L - フシトール、フコサミン、フコース、フクロース、ガラクトサミン、D - ガラクトサミニトール、N - アセチル - ガラクトサミン、ガラクトース、グルコサミン、N - アセチル - グルコサミン、グルコサミニトール、グルコース、グルコース - 6 - リン酸、グロース、グリセルアルデヒド、L - グリセロ - D - マンノース - ヘプトース、グリセロール、グリセロン、グロース、イドース、リキソース、マンノサミン、マンノース、マンノース - 6 - リン酸、ブシコース、キノボース、キノボサミン、ラムニトール、ラムノサミン、ラムノース、リボース、リブロース、セドヘブツロース、ソルボース、タガトース、タロース、酒石酸、トレオース、キシロースおよびキシルロースの基を包含する。単糖は、D 型であっても、L 型であっても差し支えない。単糖は、さらに、デオキシ糖（アルコール性ヒドロキシ基が水素で置換されている）、アミノ糖（アルコール性ヒドロキシ基がアミノ基で置換されている）、チオ糖（アルコール性ヒドロキシ基がチオールで置換されている、または C = O が C = S で置換されている、または環形態の環酸素が硫黄で置換されている）、セレノ糖、テルロ糖、アザ糖（環炭素が窒素で置換されている）、イミノ糖（環酸素が窒素で置換されている）、ホスファノ糖（環酸素がリンで置換されている）、ホスファ糖（環炭素がリンで置換されている）、C - 置換単糖（非末端炭素原子で水素が炭素で置換されている）、不飽和単糖、アルジトール（カルボニル基が CHOH 基で置換されている）、アルドン酸（アルデヒド基がカルボキシ基で置換されている）、ケトアルドン酸、ウロン酸、アルダン酸などであってよい。アミノ糖としては、アミノ単糖、好ましくは、ガラクトサミン、グルコサミン、マンノサミン、フコサミン、キノボサミン、ノイラミン酸、ムラミン酸、ラクトースジアミン、アコサミン、バシロサミン、ダウノサミン、デソサミン、フォロサミン、ガロサミン、カノサミン、カンソサミン(kansosamine)、ミカミノース、ミコサミン、ペロサミン、プノイモサミン、プルプロサミン(purpurosamine)、ロドサミンが挙げられる。単糖などは、さらに置換されても差し支えないことが理解される。

20

30

#### 【0101】

「二糖」、「三糖」、および「多糖」という用語は、アベクオース、アクラボース、アミセトース、アミロペクチン、アミロース、アピオース、アルカノース、アスカリロース、アスカルビン酸、ポイビノース、セロビオース、セロトリオース、セルロース、カコトリオース、カルコース、キチン、コリトース、シクロデキストリン、シマロース、デキストリン、2 - デオキシリボース、2 - デオキシグルコース、ジギノース、ジギタロース、ジギトキソース、エバロース、エベミトロース(evemitrose)、フルクトオリゴ糖、ガルトオリゴ糖(galto-oligosaccharide)、ゲンチアノース、ゲンチオビオース、グルカン、グルコーゲン、グリコーゲン、ハマメロース、ヘパリン、イヌリン、イソレボグルコセノン、イソマルトース、イソマルトトリオース、イソパノース、コジビオース、ラクトース、ラクトサミン、ラクトースジアミン、ラミナラビオース、レボグルコサン、レボグルコセノン、 - マルトース、マルトリオース、マンナン - オリゴ糖、マンニトリオース、メ

40

50

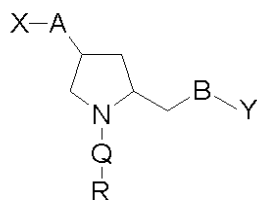
レチトース、メリピオース、ムラミン酸、ミカロース、ミシノース、ノイラミン酸、ニゲロース、ノジリミシン、ノピオース、オレアンドロース、パノース、パラトース、プランテオース、プリメベロース、ラフィノース、ロジノース、ルチノース、サルメントース、セドヘプツロース、セドヘプツロサン、ソラトリオース、ソホロース、スタキオース、ストレプトース、スクロース、  
、  
-トレハロース、トラハロサミン、ツラノース、チベロース、キシロピオース、ウンベリフェロースなどの基を包含する。さらに、「二糖」、「三糖」、および「多糖」などは、さらに置換されても差し支えないことが理解される。二糖には、アミノ糖およびその誘導体、特に、C - 4' 位で誘導体化されたミカミノースまたは C - 6' 位で誘導体化された 4 デオキシ - 3 - アミノグルコースも含まれる。

# 【 0 1 0 2 】

10

1 つの実施の形態において、前記化合物は、式 ( I ' ) :

## 【 化 9 】



式 ( I ' )

20

# 【 0 1 0 3 】

に示された構造を有し、式中、

A および B の各々は、各存在毎に独立して、O、N ( R<sup>N</sup> ) または S であり ;

X および Y の各々は、各存在毎に独立して、H、保護基、リン酸基、ホスホジエステル基、活性化されたリン酸基、活性化された亜リン酸基、ホスホラミダイト、固体担体、- P ( Z ' ) ( Z '' ) O - ヌクレオシド、- P ( Z ' ) ( Z '' ) O - オリゴヌクレオチド、脂質、PEG、ステロイド、ポリマー、ヌクレオチド、ヌクレオシド、- P ( Z ' ) ( Z '' ) O - R<sup>1</sup> - Q' - R<sup>2</sup> - O P ( Z '' ' ) ( Z '' '' ) O - オリゴヌクレオチド、またはオリゴヌクレオチド、- P ( Z ' ) ( Z '' ) - 式 ( I )、- P ( Z ' ) ( Z '' ) -、または - Q - R であり ; 式中、オリゴヌクレオチドは、

30

( a ) センス鎖であり、

( i ) 交互 2' - フルオロ修飾と、

( i i ) 少なくとも 1 つのリガンドと、

を含むセンス鎖、および

( b ) アンチセンス鎖であり、

( i ) 交互 2' - ハロゲン修飾と、

( i i ) 5' 炭素位置でリン酸化されている第 1 の 5' 末端アンチセンスヌクレオチドと、

40

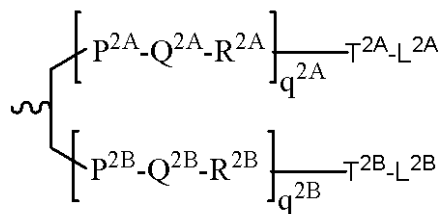
を含むアンチセンス鎖、

を含む。

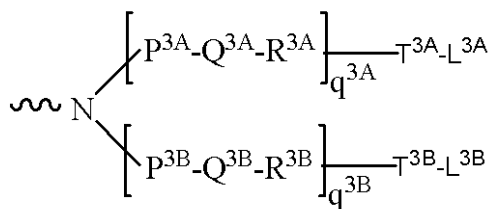
# 【 0 1 0 4 】

R は、L<sup>1</sup>であるか、または式 ( I I ) ~ ( V ) :

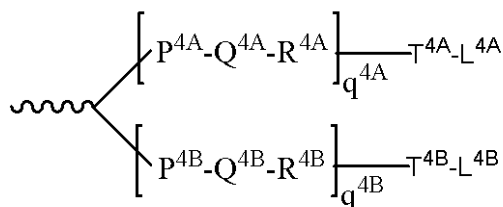
## 【化 1 0】



式 (I I)

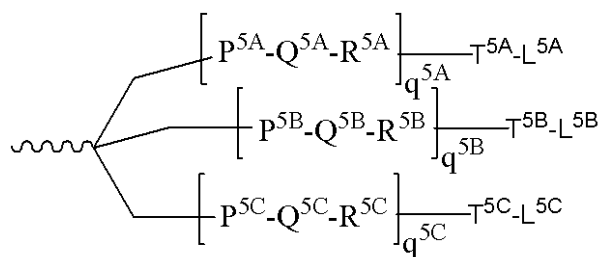


式 (I I I)



式 (I V)

、もしくは



式 (V)

## 【 0 1 0 5】

に示された構造を有し；

$q^{2\text{A}}$ 、 $q^{2\text{B}}$ 、 $q^{3\text{A}}$ 、 $q^{3\text{B}}$ 、 $q^{4\text{A}}$ 、 $q^{4\text{B}}$ 、 $q^{5\text{A}}$ 、 $q^{5\text{B}}$ および $q^{5\text{C}}$ は、各存在毎に独立して、0 ~ 20を表し、式中、反復単位は同じであっても、異なってもよく；

Qおよび $Q'$ は、各存在毎に独立して、存在しないか、 $-(P^7-Q^7-R^7)_p-T^7-$ 、または $-T^7-Q^7-T^{7'}-B-T^{8'}-Q^8-T^8$ であり；

$P^{2\text{A}}$ 、 $P^{2\text{B}}$ 、 $P^{3\text{A}}$ 、 $P^{3\text{B}}$ 、 $P^{4\text{A}}$ 、 $P^{4\text{B}}$ 、 $P^{5\text{A}}$ 、 $P^{5\text{B}}$ 、 $P^{5\text{C}}$ 、 $P^7$ 、 $T^{2\text{A}}$ 、 $T^{2\text{B}}$ 、 $T^{3\text{A}}$ 、 $T^{3\text{B}}$ 、 $T^{4\text{A}}$ 、 $T^{4\text{B}}$ 、 $T^{5\text{A}}$ 、 $T^{5\text{B}}$ 、 $T^{5\text{C}}$ 、 $T^7$ 、 $T^{7'}$ 、 $T^8$ 、および $T^{8'}$ の各々は、各存在毎に独立して、存在しないか、CO、NH、O、S、OC(O)、NHC(O)、CH<sub>2</sub>、CH<sub>2</sub>NH、またはCH<sub>2</sub>Oであり；

Bは、 $-\text{CH}_2-\text{N}(B^L)-\text{CH}_2-$ であり；

$B^L$ は、 $-T^B-Q^B-T^{B'}-R^x$ であり；

$Q^{2\text{A}}$ 、 $Q^{2\text{B}}$ 、 $Q^{3\text{A}}$ 、 $Q^{3\text{B}}$ 、 $Q^{4\text{A}}$ 、 $Q^{4\text{B}}$ 、 $Q^{5\text{A}}$ 、 $Q^{5\text{B}}$ 、 $Q^{5\text{C}}$ 、 $Q^7$ 、 $Q^8$ 、および $Q^B$ は、各存在毎に独立して、存在しないか、アルキレン、置換アルキレンであり、ここで、1つ以上のメチレンは、O、S、S(O)、SO<sub>2</sub>、N(R<sup>N</sup>)、C(R')=C(R')、C-C、またはC(O)の1つ以上により割り込まれていても、終わらされても差し支えなく；

$T^B$ および $T^{B'}$ の各々は、各存在毎に独立して、存在しないか、CO、NH、O、S、OC(O)、OC(O)O、NHC(O)、NHC(O)NH、NHC(O)O、CH<sub>2</sub>、CH<sub>2</sub>NH、またはCH<sub>2</sub>Oであり；

R<sup>x</sup>、親油性物質（例えば、コレステロール、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

10

20

30

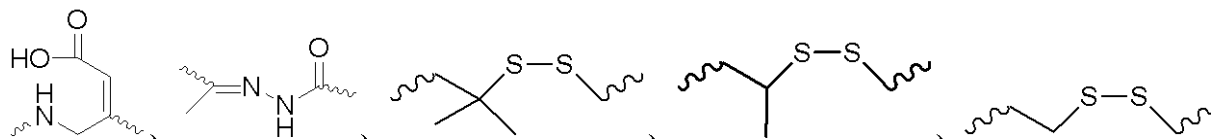
40

50

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、またはフェノキサジン)、ビタミン(例えば、葉酸、ビタミンA、ビタミンE、ビオチン、ピリドキサル)、ペプチド、炭水化物(例えば、単糖、二糖、三糖、四糖、オリゴ糖、多糖)、エンドソーム溶解成分、ステロイド(例えば、ウバオール、ヘシゲニン、ジオスゲニン)、テルペン(例えば、トリテルペン、例えば、サルササボゲニン、フリーデリン、エピフリーデラノール誘導体化リトコール酸)、またはカチオン性脂質であり;

$R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^{2A}$ 、 $R^{2B}$ 、 $R^{3A}$ 、 $R^{3B}$ 、 $R^{4A}$ 、 $R^{4B}$ 、 $R^{5A}$ 、 $R^{5B}$ 、 $R^{5C}$ 、 $R^7$ の各々は、各存在毎に独立して、存在しないか、NH、O、S、 $CH_2$ 、 $C(O)O$ 、 $C(O)NH$ 、 $NHCH(R^a)C(O)$ 、 $-C(O)-CH(R^a)-NH-$ 、CO、 $CH=N-O$ 、

10



# 【0106】

またはヘテロシクリルであり;

$L^1$ 、 $L^{2A}$ 、 $L^{2B}$ 、 $L^{3A}$ 、 $L^{3B}$ 、 $L^{4A}$ 、 $L^{4B}$ 、 $L^{5A}$ 、 $L^{5B}$ 、および $L^{5C}$ の各々は、各存在毎に独立して、炭水化物、例えば、単糖、二糖、三糖、四糖、オリゴ糖、および多糖であり;

20

$R'$  および  $R''$  の各々は、各存在毎に独立して、H、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、OH、SH、または $N(R^N)_2$ であり;

$R^N$ は、各存在毎に独立して、H、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、またはベンジルであり;

$R^a$ は、Hまたはアミノ酸側鎖であり;

$Z'$ 、 $Z''$ 、 $Z'''$ 、および $Z''''$ の各々は、各存在毎に独立して、OまたはSであり;

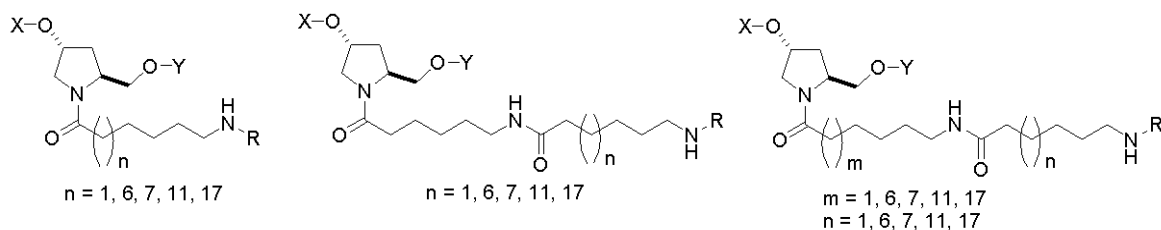
pは、各存在毎に独立して、0 ~ 20である。

30

# 【0107】

いくつかの実施の形態において、式(I')は構造

# 【化12】



40

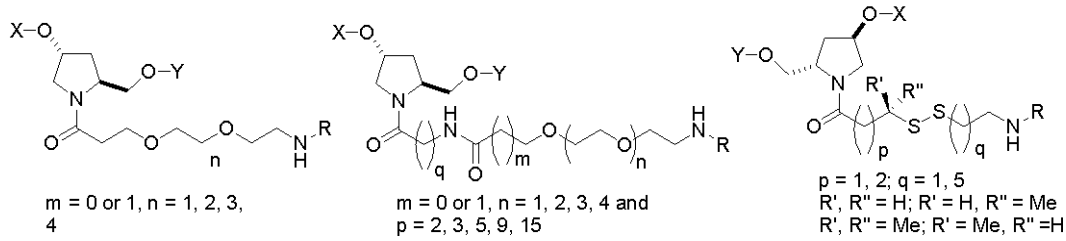
# 【0108】

を有する。

# 【0109】

いくつかの実施の形態において、式(I')は構造

## 【化 1 3】



## 【 0 1 1 0】

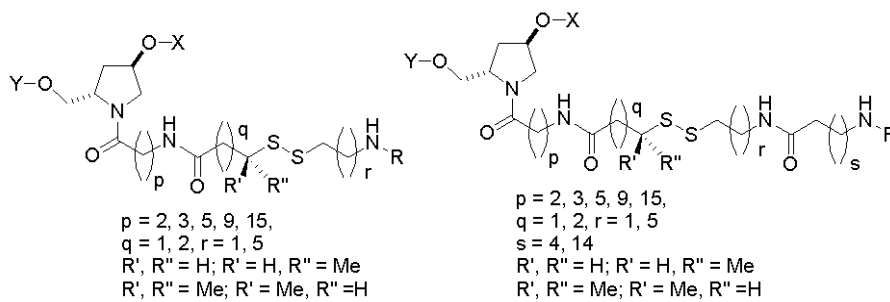
10

を有する。

## 【 0 1 1 1】

いくつかの実施の形態において、式 (I') は構造

## 【化 1 4】



20

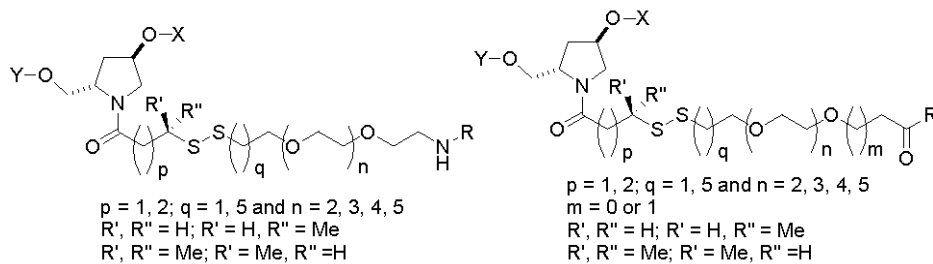
## 【 0 1 1 2】

を有する。

## 【 0 1 1 3】

いくつかの実施の形態において、式 (I') は構造

## 【化 1 5】



30

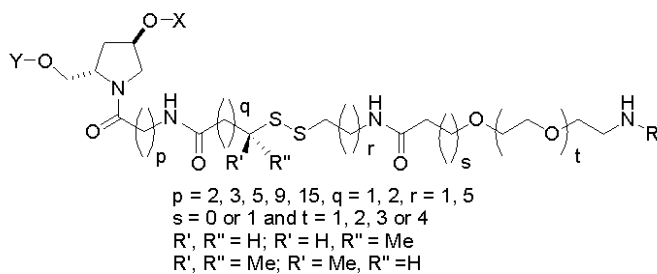
## 【 0 1 1 4】

を有する。

## 【 0 1 1 5】

いくつかの実施の形態において、式 (I') は構造

## 【化 1 6】



50

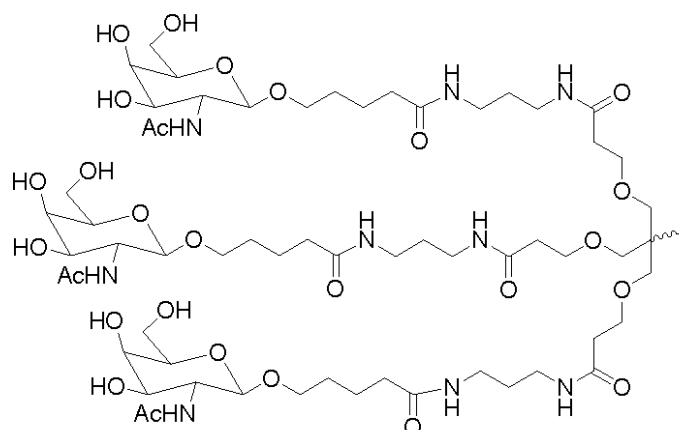
【 0 1 1 6 】

を有する。

【 0 1 1 7 】

いくつかの実施の形態において、Rは

【化17】



10

【 0 1 1 8 】

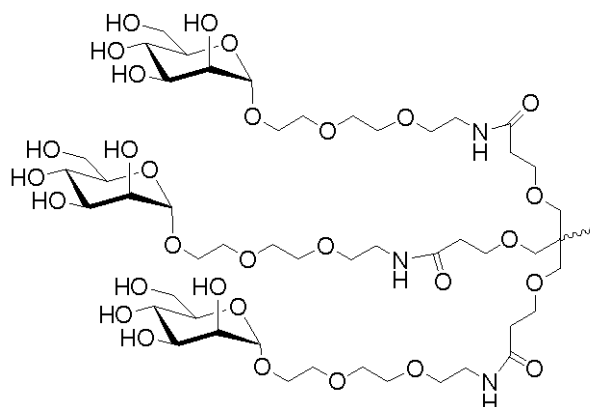
である。

20

【 0 1 1 9 】

いくつかの実施の形態において、Rは

【化18】



30

【 0 1 2 0 】

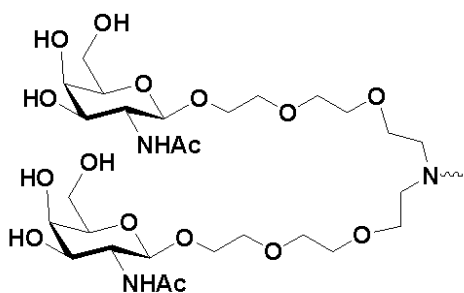
である。

【 0 1 2 1 】

いくつかの実施の形態において、Rは

40

【化19】



50

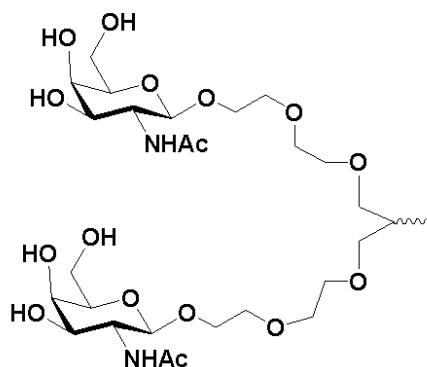
【 0 1 2 2 】

である。

【 0 1 2 3 】

いくつかの実施の形態において、R は

【 化 2 0 】



10

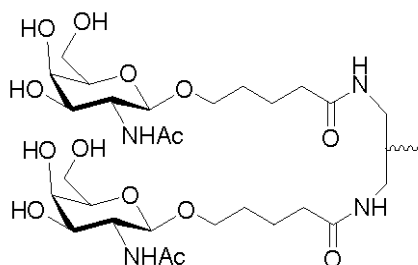
【 0 1 2 4 】

である。

【 0 1 2 5 】

いくつかの実施の形態において、R は

【 化 2 1 】



30

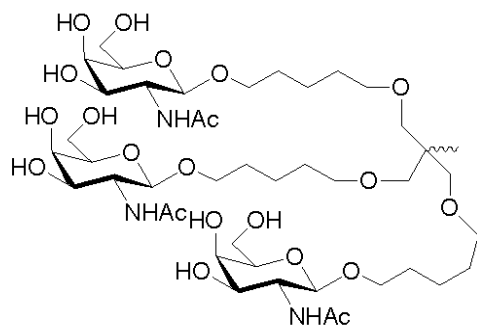
【 0 1 2 6 】

である。

【 0 1 2 7 】

いくつかの実施の形態において、R は

【 化 2 2 】



40

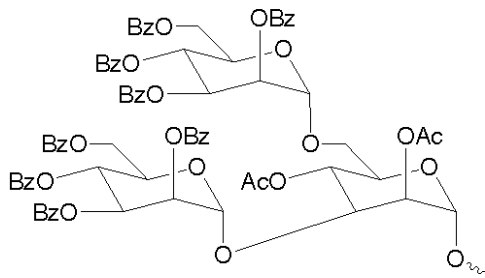
【 0 1 2 8 】

である。

【 0 1 2 9 】

50

いくつかの実施の形態において、Rは  
【化23】



10

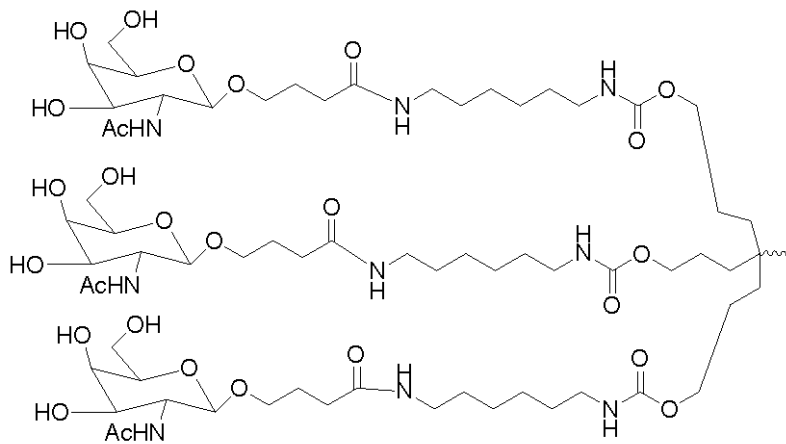
【0130】

である。

【0131】

いくつかの実施の形態において、Rは

【化24】



20

30

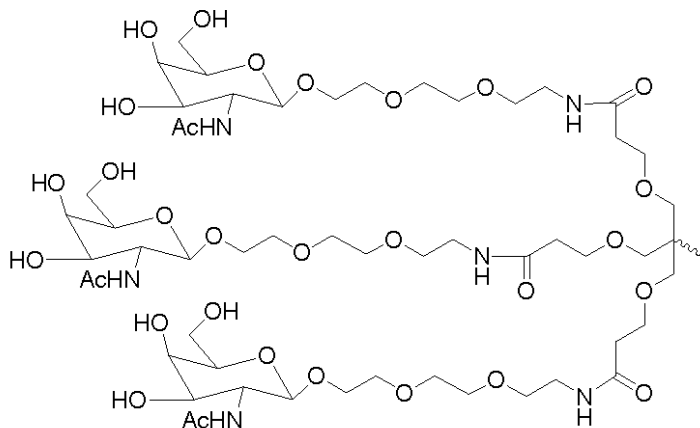
【0132】

である。

【0133】

いくつかの実施の形態において、Rは

【化25】



40

【0134】

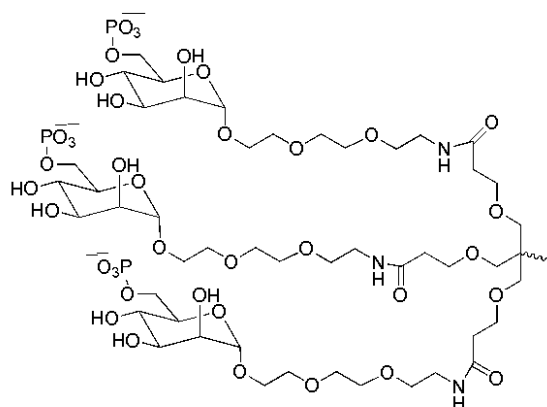
50

である。

【 0 1 3 5 】

いくつかの好ましい実施の形態において、Rは

【 化 2 6 】



10

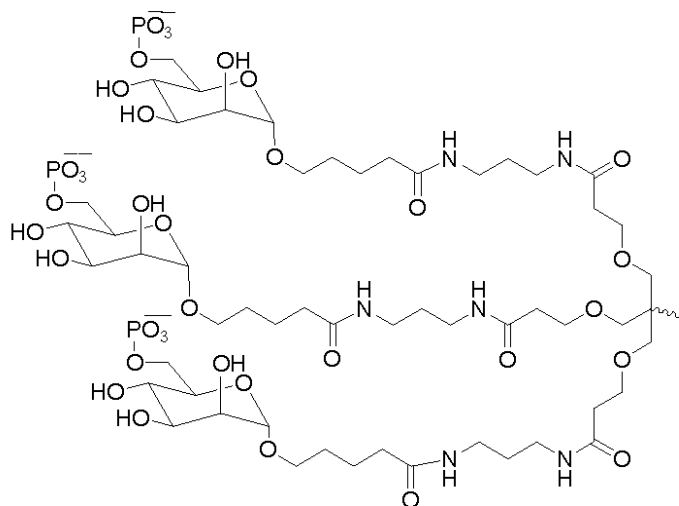
【 0 1 3 6 】

である。

【 0 1 3 7 】

いくつかの好ましい実施の形態において、Rは

【 化 2 7 】



30

【 0 1 3 8 】

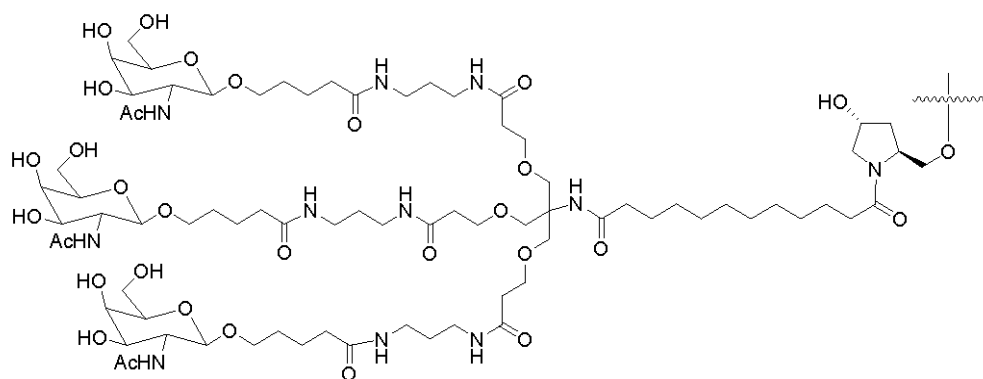
である。

【 0 1 3 9 】

いくつかの好ましい実施の形態において、式 ( I ) は、構造

40

【化 2 8】



10

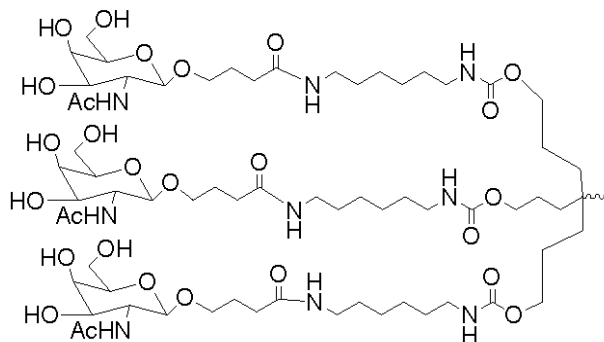
【 0 1 4 0 】

を有する。

【 0 1 4 1 】

いくつかの実施の形態において、Rは

【化 2 9】



20

【 0 1 4 2 】

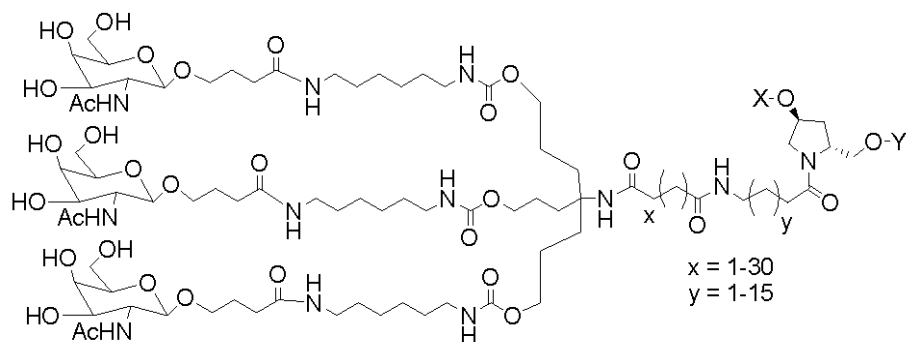
30

である。

【 0 1 4 3 】

いくつかの実施の形態において、式（Ⅰ）のモノマーは、構造

【化 3 0】



40

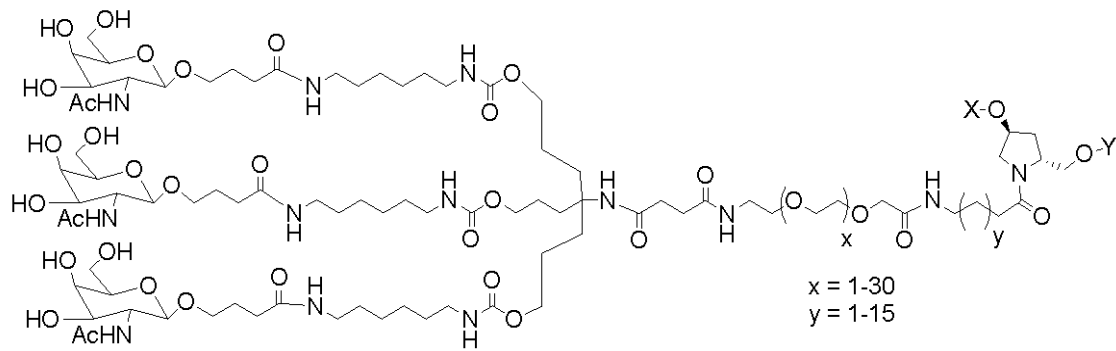
【 0 1 4 4 】

を有する。

【 0 1 4 5 】

いくつかの実施の形態において、式（Ⅰ）のモノマーは、構造

## 【化 3 1】



10

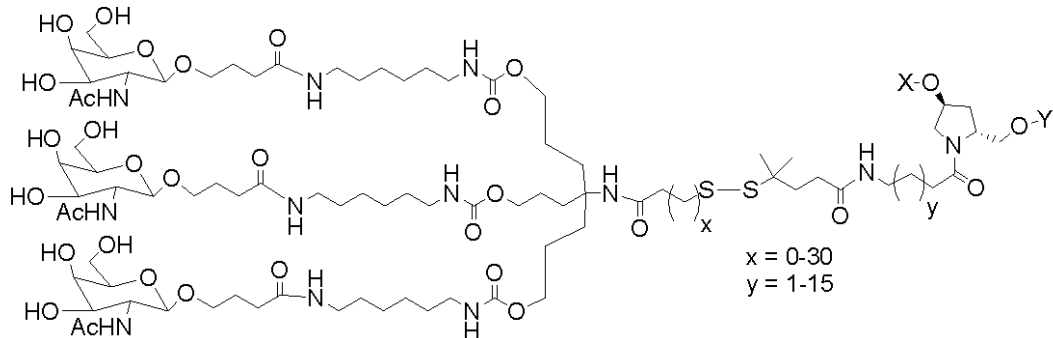
## 【 0 1 4 6 】

を有する。

## 【 0 1 4 7 】

いくつかの実施の形態において、式 ( I ) のモノマーは、構造

## 【化 3 2】



20

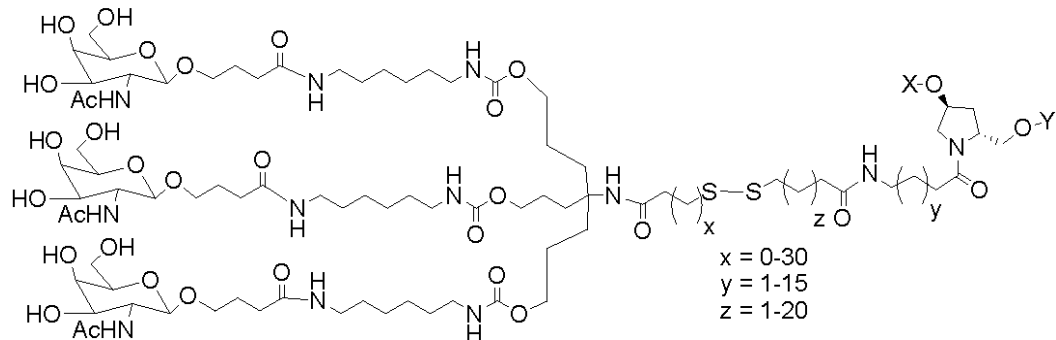
## 【 0 1 4 8 】

を有する。

## 【 0 1 4 9 】

いくつかの実施の形態において、式 ( I ) のモノマーは、構造

## 【化 3 3】



40

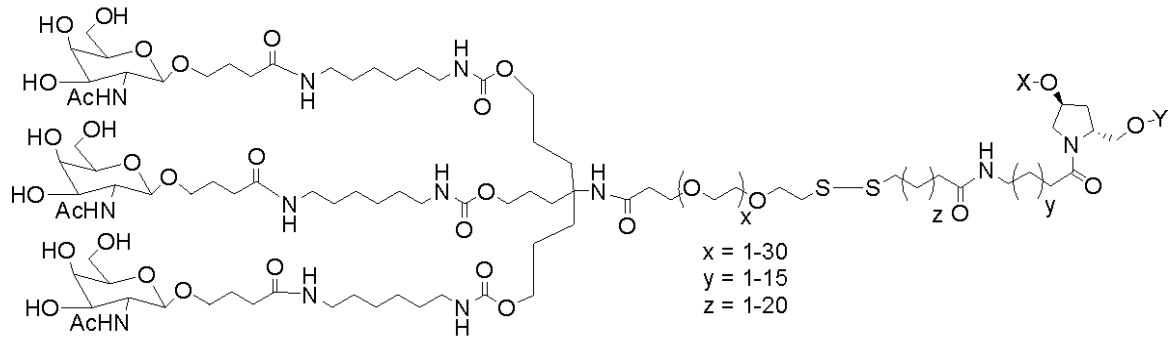
## 【 0 1 5 0 】

を有する。

## 【 0 1 5 1 】

いくつかの実施の形態において、式 ( I ) のモノマーは、構造

## 【化 3 4】



10

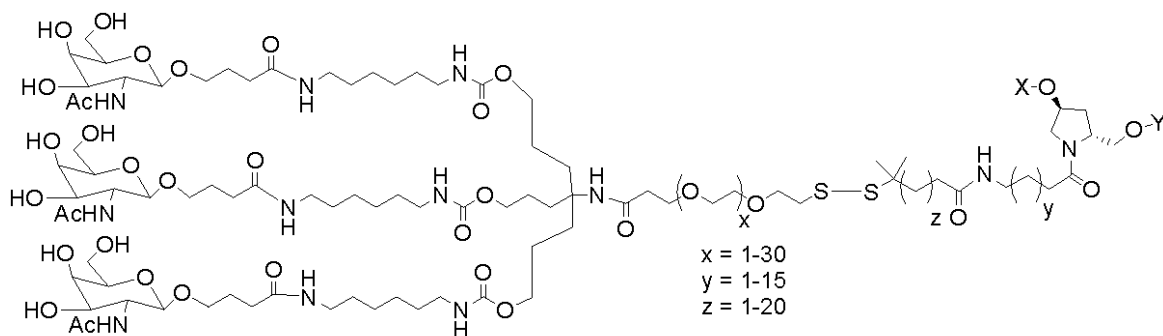
## 【 0 1 5 2】

を有する。

## 【 0 1 5 3】

いくつかの実施の形態において、式 ( I ) のモノマーは、構造

## 【化 3 5】



20

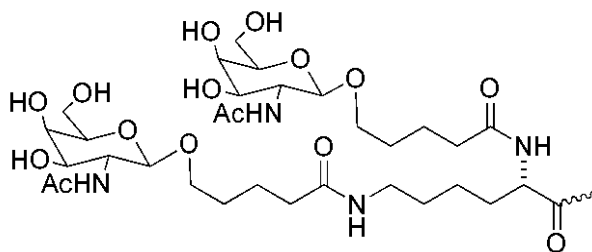
## 【 0 1 5 4】

を有する。

## 【 0 1 5 5】

いくつかの実施の形態において、R は

## 【化 3 6】



40

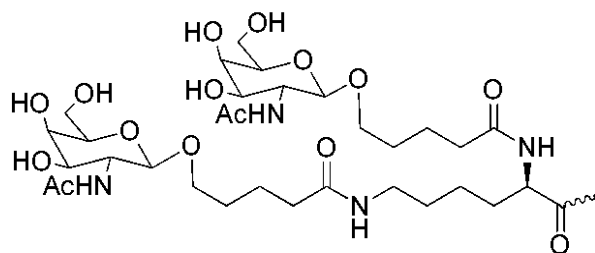
## 【 0 1 5 6】

である。

## 【 0 1 5 7】

いくつかの実施の形態において、R は

【化 3 7】



10

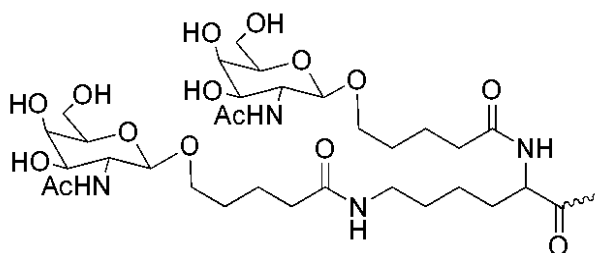
【 0 1 5 8 】

である。

【 0 1 5 9 】

いくつかの実施の形態において、Rは

【化 3 8】



20

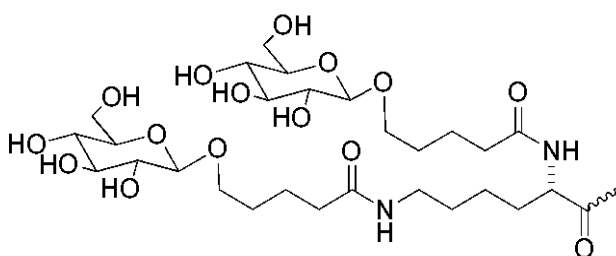
【 0 1 6 0 】

である。

【 0 1 6 1 】

いくつかの実施の形態において、Rは

【化 3 9】



30

【 0 1 6 2 】

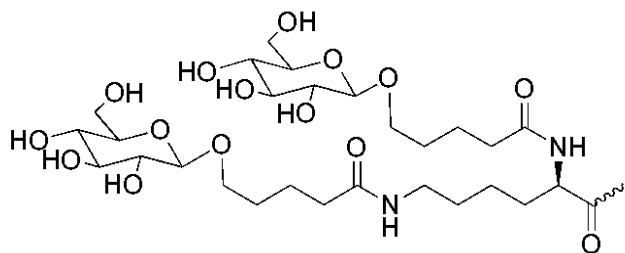
である。

【 0 1 6 3 】

いくつかの実施の形態において、Rは

40

【化 4 0】



10

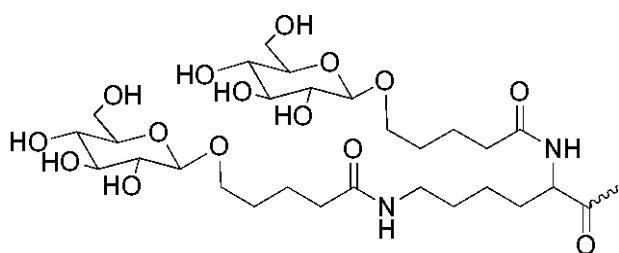
【 0 1 6 4】

である。

【 0 1 6 5】

いくつかの実施の形態において、Rは

【化 4 1】



20

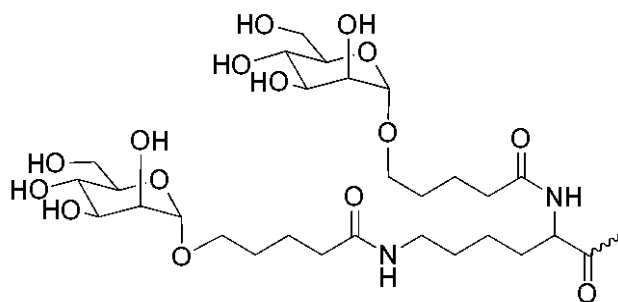
【 0 1 6 6】

である。

【 0 1 6 7】

いくつかの実施の形態において、Rは

【化 4 2】



30

【 0 1 6 8】

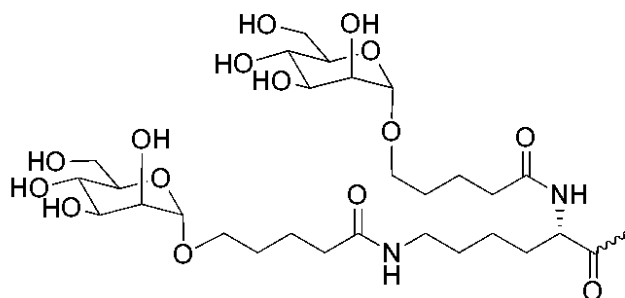
である。

【 0 1 6 9】

いくつかの実施の形態において、Rは

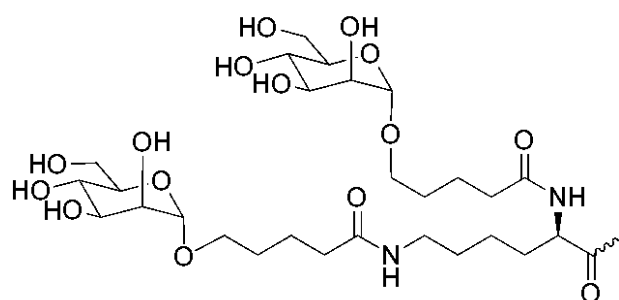
40

10



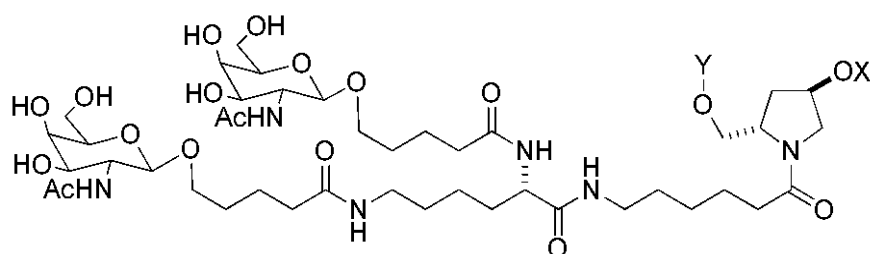
20

【化 4 4】



30

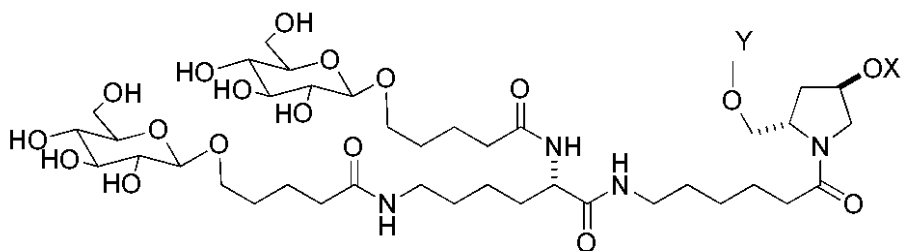
【化 4 5】



40

いくつかの好ましい実施の形態において、式 ( I ) は、構造

【化 4 6】



10

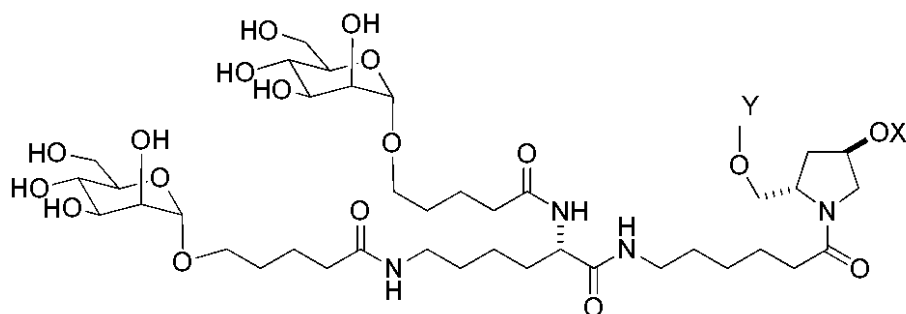
【 0 1 7 6】

を有する。

【 0 1 7 7】

いくつかの好ましい実施の形態において、式 ( I ) は、構造

【化 4 7】



20

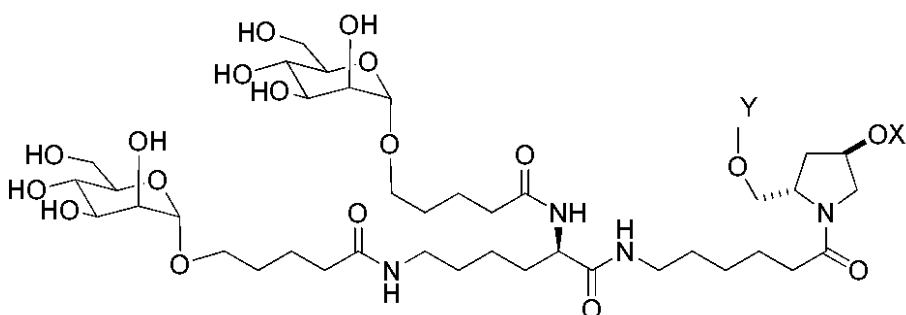
【 0 1 7 8】

を有する。

【 0 1 7 9】

いくつかの好ましい実施の形態において、式 ( I ) は、構造

【化 4 8】



40

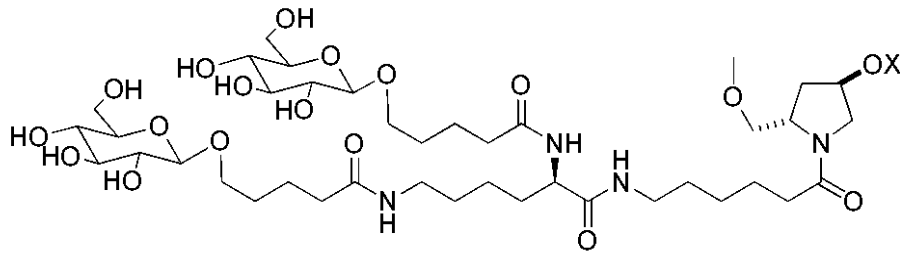
【 0 1 8 0】

を有する。

【 0 1 8 1】

いくつかの好ましい実施の形態において、式 ( I ) は、構造

【化 4 9】



【 0 1 8 2 】

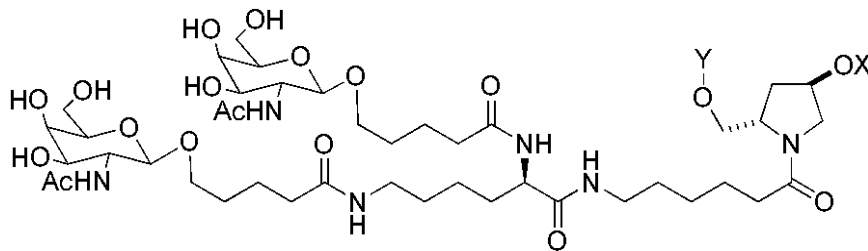
10

を有する。

【 0 1 8 3 】

いくつかの好ましい実施の形態において、式 ( I ) は、構造

【化 5 0】



20

【 0 1 8 4 】

を有する。

【 0 1 8 5 】

いくつかの好ましい実施の形態において、 $L^{2A}$ および $L^{2B}$ の両方とも同じである。

【 0 1 8 6 】

いくつかの実施の形態において、 $L^{2A}$ および $L^{2B}$ の両方とも異なる。

【 0 1 8 7 】

30

いくつかの好ましい実施の形態において、 $L^{3A}$ および $L^{3B}$ の両方とも同じである。

【 0 1 8 8 】

いくつかの実施の形態において、 $L^{3A}$ および $L^{3B}$ の両方とも異なる。

【 0 1 8 9 】

いくつかの好ましい実施の形態において、 $L^{4A}$ および $L^{4B}$ の両方とも同じである。

【 0 1 9 0 】

いくつかの実施の形態において、 $L^{4A}$ および $L^{4B}$ の両方とも異なる。

【 0 1 9 1 】

いくつかの好ましい実施の形態において、 $L^{5A}$ 、 $L^{5B}$ および $L^{5C}$ の全てが同じである。

【 0 1 9 2 】

40

いくつかの実施の形態において、 $L^{5A}$ 、 $L^{5B}$ および $L^{5C}$ の内の2つが同じである。

【 0 1 9 3 】

いくつかの実施の形態において、 $L^{5A}$ および $L^{5B}$ が同じである。

【 0 1 9 4 】

いくつかの実施の形態において、 $L^{5A}$ および $L^{5C}$ が同じである。

【 0 1 9 5 】

いくつかの実施の形態において、 $L^{5B}$ および $L^{5C}$ が同じである。

【 0 1 9 6 】

別の態様において、本発明は、式 ( I ) の少なくとも1つのモノマーを含むiRNA二重鎖剤を特徴とする。

50

## 【 0 1 9 7 】

いくつかの実施の形態において、iRNA二重鎖剤は、式(I)の1つ、2つ、3つ、4つまたは5つのモノマー、より好ましくは、式(I)の1つ、2つまたは3つのモノマー、より好ましくは、式(I)の1つまたは2つのモノマー、さらにより好ましくは、式(I)のたった1つのモノマーを含む。

## 【 0 1 9 8 】

いくつかの実施の形態において、式(I)のモノマーの全ては、二本鎖iRNA二重鎖剤の同じ鎖上にある。

## 【 0 1 9 9 】

いくつかの実施の形態において、式(I)のモノマーは、iRNA二重鎖剤の別個の鎖上にある。

10

## 【 0 2 0 0 】

いくつかの実施の形態において、iRNA二重鎖剤における式(I)の全てのモノマーは同じである。

## 【 0 2 0 1 】

いくつかの実施の形態において、iRNA二重鎖剤における式(I)のモノマーは全て異なる。

## 【 0 2 0 2 】

いくつかの実施の形態において、iRNA二重鎖剤における式(I)のいくつかのモノマーのみが同じである。

20

## 【 0 2 0 3 】

いくつかの実施の形態において、式(I)のモノマーは、iRNA二重鎖剤において互いに隣り合っている。

## 【 0 2 0 4 】

いくつかの実施の形態において、式(I)のモノマーは、iRNA二重鎖剤において互いに隣り合っていない。

## 【 0 2 0 5 】

いくつかの実施の形態において、式(I)のモノマーは、iRNA二重鎖剤の5'末端、3'末端、内部位置、3'末端と5'末端の両方、5'末端と内部位置の両方、3'末端と内部位置の両方、および3つの位置の全て(5'末端と3'末端と内部位置)にある。

30

## 【 0 2 0 6 】

いくつかの好ましい実施の形態において、 $R^X$ はコレステロールである。

## 【 0 2 0 7 】

いくつかの好ましい実施の形態において、 $R^X$ はリトコール酸である。

## 【 0 2 0 8 】

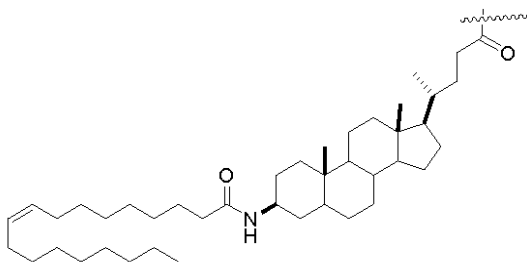
いくつかの好ましい実施の形態において、 $R^X$ はオレイルリトコール酸である。

## 【 0 2 0 9 】

いくつかの好ましい実施の形態において、 $R^X$ は構造

## 【 化 5 1 】

40



50

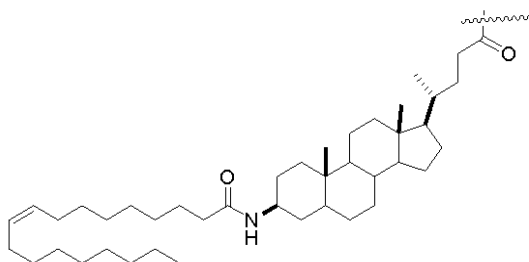
【 0 2 1 0 】

を有する。

【 0 2 1 1 】

いくつかの好ましい実施の形態において、 $B^L$ は構造

【化 5 2】



10

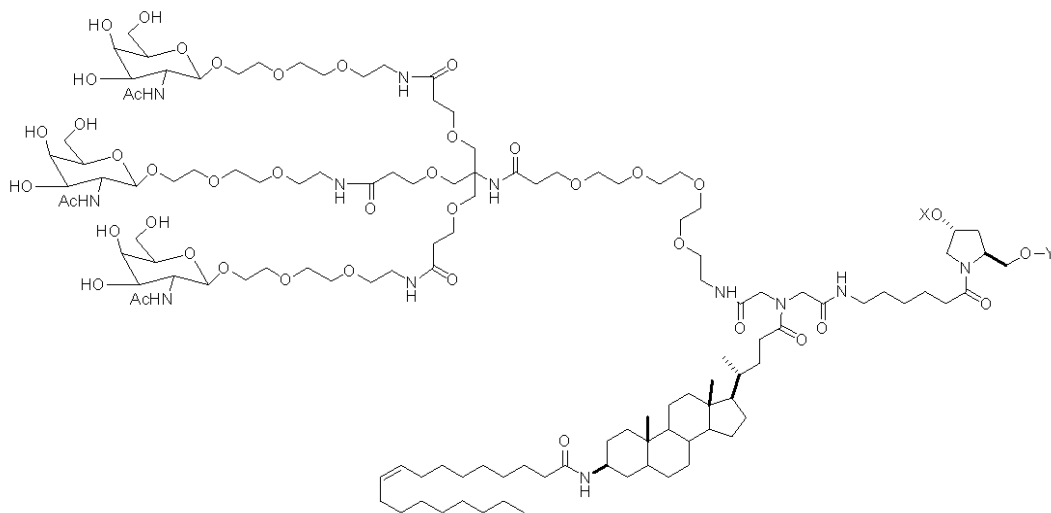
【 0 2 1 2 】

を有する。

【 0 2 1 3 】

いくつかの好ましい実施の形態において、式 ( I ) は構造

【化 5 3】



20

30

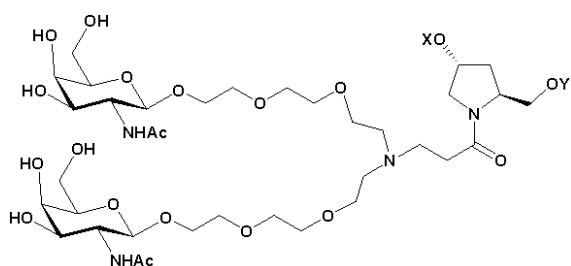
【 0 2 1 4 】

を有する。

【 0 2 1 5 】

いくつかの好ましい実施の形態において、式 ( I ) は構造

【化 5 4】



40

【 0 2 1 6 】

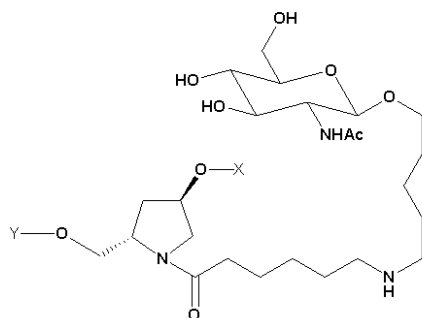
を有する。

50

【 0 2 1 7 】

いくつかの好ましい実施の形態において、式 ( I ) は構造

【 化 5 5 】



10

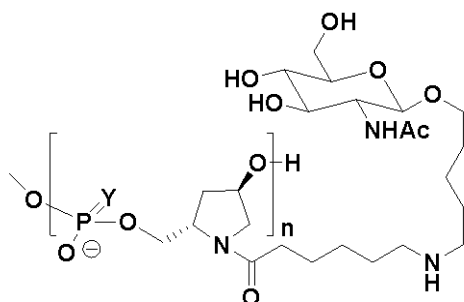
【 0 2 1 8 】

を有する。

【 0 2 1 9 】

いくつかの好ましい実施の形態において、式 ( I ) は構造

【 化 5 6 】



20

【 0 2 2 0 】

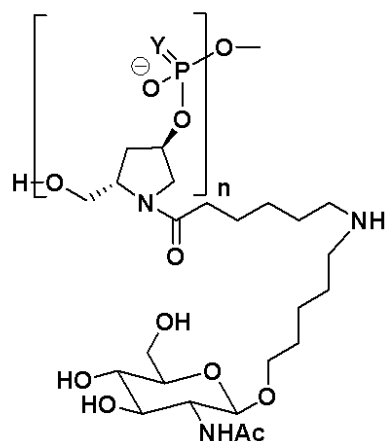
を有し、式中、YはOまたはSであり、nは3～6である。

30

【 0 2 2 1 】

いくつかの好ましい実施の形態において、式 ( I ) は構造

【 化 5 7 】



40

【 0 2 2 2 】

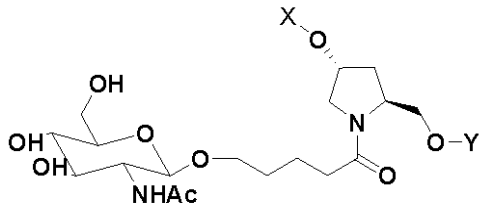
を有し、式中、YはOまたはSであり、nは3～6である。

【 0 2 2 3 】

いくつかの好ましい実施の形態において、式 ( I ) は構造

50

【化 5 8】



【 0 2 2 4】

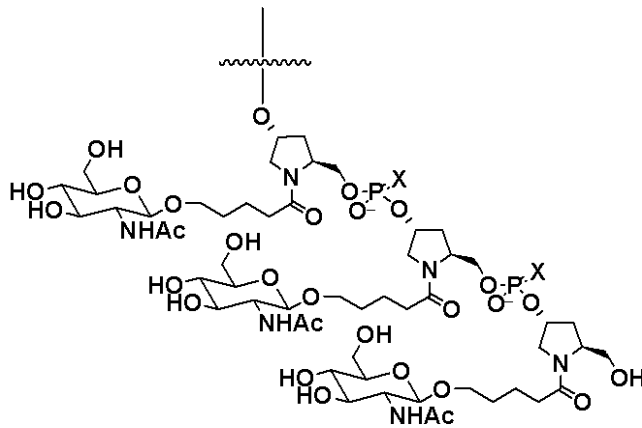
を有する。

10

【 0 2 2 5】

いくつかの好ましい実施の形態において、式 ( I ) は構造

【化 5 9】



20

【 0 2 2 6】

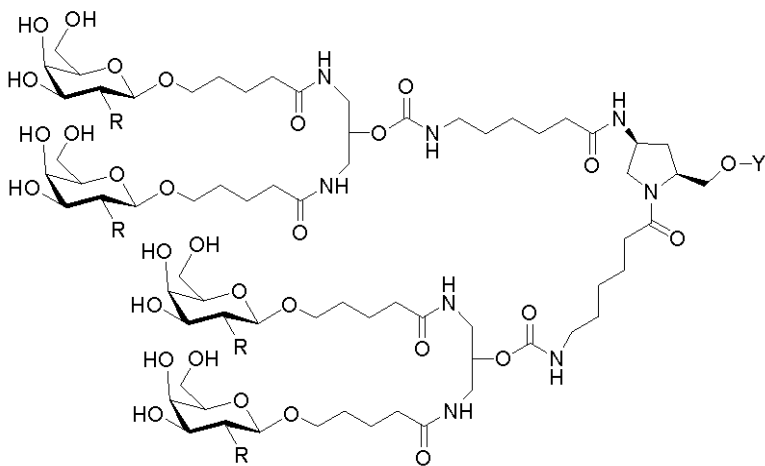
を有し、XはOまたはSである。

【 0 2 2 7】

いくつかの好ましい実施の形態において、式 ( I ) は構造

30

【化 6 0】



40

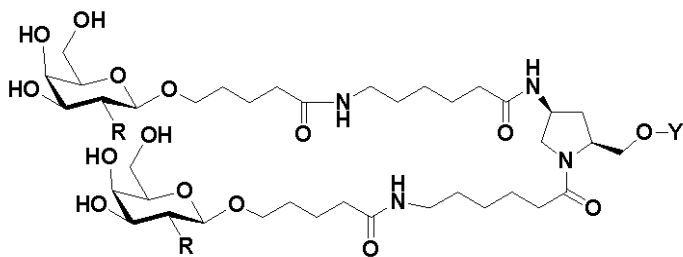
【 0 2 2 8】

を有し、RはOHまたはNHCOOHである。

【 0 2 2 9】

いくつかの好ましい実施の形態において、式 ( I ) は構造

【化 6 1】



【 0 2 3 0】

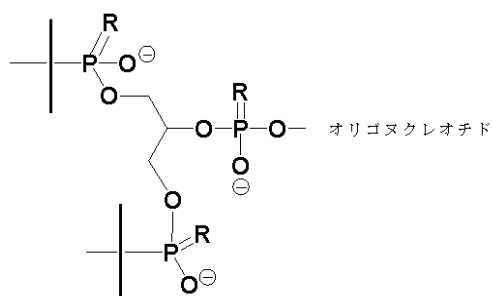
10

を有し、RはOHまたはNHCOOHである。

【 0 2 3 1】

いくつかの好ましい実施の形態において、式(I)のモノマーは、式(VII)

【化 6 2】



20

式(VII)

【 0 2 3 2】

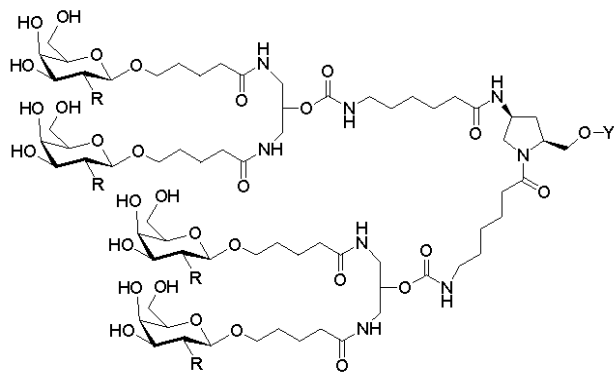
のリンカーを通じてiRNA二重鎖剤に連結されており、RはOまたはSである。

【 0 2 3 3】

いくつかの好ましい実施の形態において、式(I)は構造

【化 6 3】

30



40

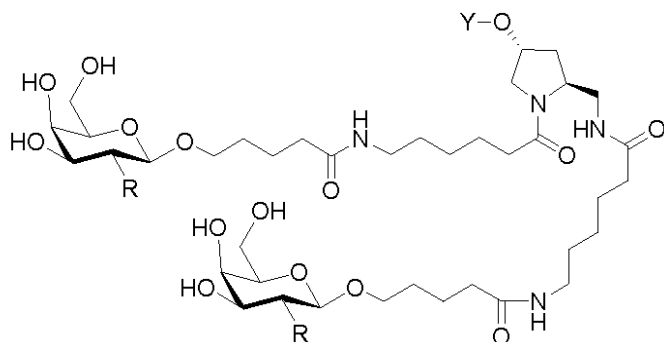
【 0 2 3 4】

を有し、RはOHまたはNHCOOHである。

【 0 2 3 5】

いくつかの好ましい実施の形態において、式(I)は構造

【化 6 4】



10

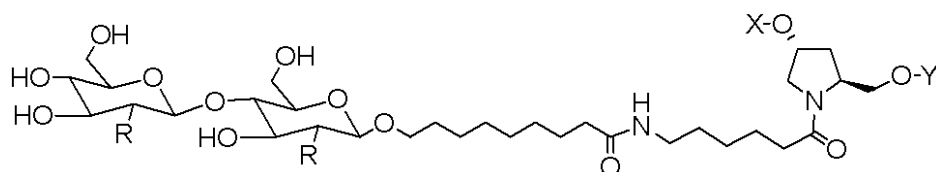
【 0 2 3 6】

を有する。

【 0 2 3 7】

いくつかの好ましい実施の形態において、式 ( I ) は構造

【化 6 5】



20

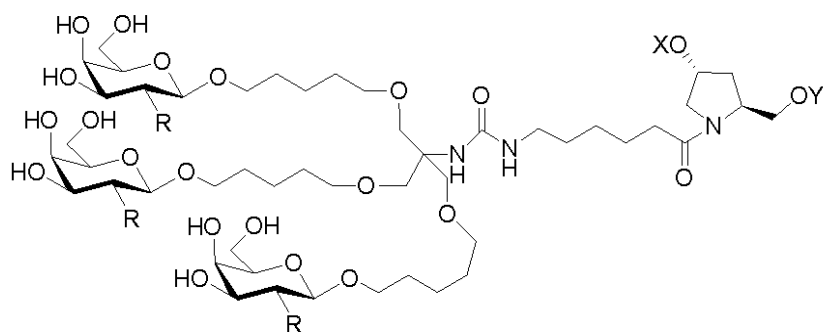
【 0 2 3 8】

を有し、RはOHまたはNHCOOHである。

【 0 2 3 9】

いくつかの好ましい実施の形態において、式 ( I ) は構造

【化 6 6】



30

【 0 2 4 0】

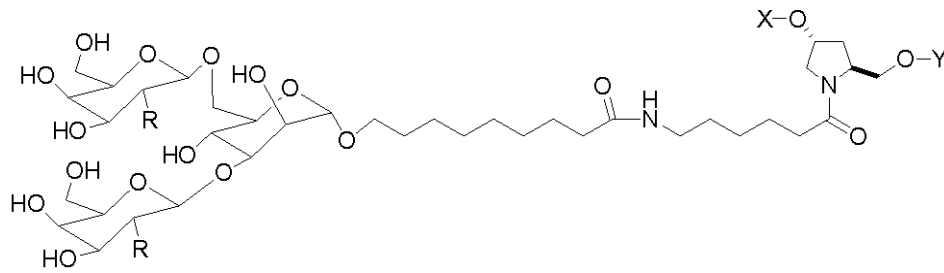
を有し、RはOHまたはNHCOOHである。

【 0 2 4 1】

いくつかの好ましい実施の形態において、式 ( I ) は構造

40

## 【化 6 7】



10

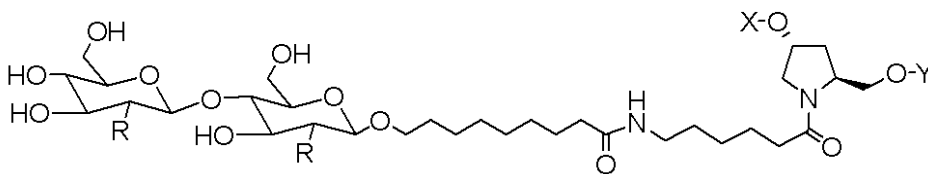
## 【 0 2 4 2】

を有し、RはOHまたはNHCOOHである。

## 【 0 2 4 3】

いくつかの好ましい実施の形態において、式 ( I ) は構造

## 【化 6 8】



20

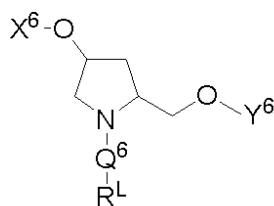
## 【 0 2 4 4】

を有し、RはOHまたはNHCOOHである。

## 【 0 2 4 5】

いくつかの実施の形態において、iRNA二重鎖剤は、式 ( I ) のモノマーに加えて、式 ( V I )

## 【化 6 9】



式 ( V I )

30

## 【 0 2 4 6】

に示された構造を持つモノマーを有し、式中、

$X^6$ および $Y^6$ の各々は、独立して、H、OH、ヒドロキシル保護基、リン酸基、ホスホジエステル基、活性化リン酸基、活性化亜リン酸基、ホスホラミダイト、固体担体、-P(Z')(Z'')O-ヌクレオシド、-P(Z')(Z'')O-オリゴヌクレオチド、脂質、PEG、ステロイド、ポリマー、-P(Z')(Z'')O-R<sup>1</sup>-Q'-R<sup>2</sup>-OP(Z''')(Z''')O-オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、またはオリゴヌクレオチド、-P(Z')(Z'')-式(I)もしくは-P(Z')(Z'')-であり；式中、オリゴヌクレオチドは、

40

(a) センス鎖であり、

(i) 交互2'-フルオロ修飾と、

(ii) 少なくとも1つのリガンドと、

を含むセンス鎖、および

50

(b) アンチセンス鎖であり、

(i) 交互 2' - ハロゲン修飾と、

(ii) 5' 炭素位置でリン酸化されている第 1 の 5' 末端アンチセンスヌクレオチドと、  
を含むアンチセンス鎖、  
を含む。

【0247】

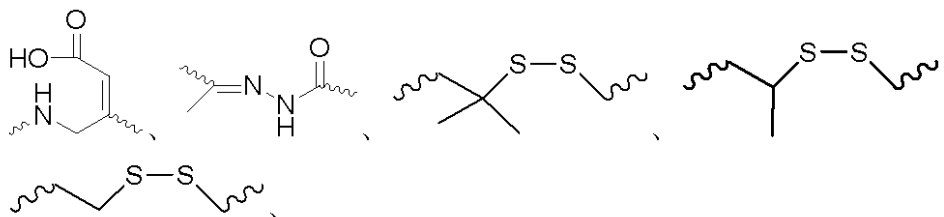
$Q^6$  は、存在しないか、または  $-(P^6 - Q^6 - R^6)_v - T^6 -$  であり；

$P^6$  および  $T^6$  の各々は、各存在毎に独立して、存在しないか、CO、NH、O、S、O  
C(O)、NHC(O)、CH<sub>2</sub>、CH<sub>2</sub>NH、または CH<sub>2</sub>O であり；

$Q^6$  は、各存在毎に独立して、存在しないか、置換アルキレンであり、ここで、1 つ以上  
のメチレンは、O、S、S(O)、SO<sub>2</sub>、N(R<sup>N</sup>)、C(R')=C(R')、C  
C、または C(O) の 1 つ以上により割り込まれていても、終わらされても差し支えなく  
；

$R^6$  は、各存在毎に独立して、存在しないか、NH、O、S、CH<sub>2</sub>、C(O)O、C  
(O)NH、NHCH(R<sup>a</sup>)C(O)、-C(O)-CH(R<sup>a</sup>)-NH-、CO、CH=N  
-O、

【化70】



【0248】

またはヘテロシクリルであり；

$R'$  および  $R''$  の各々は、各存在毎に独立して、H、C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル、OH、SH、  
または N(R<sup>N</sup>)<sub>2</sub> であり；

$R^N$  は、各存在毎に独立して、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、ま  
たはベンジルであり；

$R^a$  は、H または アミノ酸側鎖であり；

Z'、Z''、Z'''、および Z'''' の各々は、各存在毎に独立して、O または S であり  
；

v は、各存在毎に独立して、0 ~ 20 を表し；

$R^L$  は、親油性物質（例えば、コレステロール、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、もしくは  
フェノキサジン)、ビタミン（例えば、葉酸、ビタミン A、ピオチン、ピリドキサル）  
、ペプチド、炭水化物（例えば、単糖、二糖、三糖、四糖、オリゴ糖、多糖）、エンドソ  
ーム溶解成分、ステロイド（例えば、ウバオール、ヘシゲニン、ジオスゲニン）、テルペ  
ン（例えば、トリテルペン、例えば、サルササボゲニン、フリーデリン、エピフリーデラ  
ノール誘導体化リトコール酸）、またはカチオン性脂質である。

【0249】

いくつかの実施の形態において、式 (I) の 1 つ以上、例えば、1 つ、2 つ、3 つ、4  
つ、または 5 つのモノマーに加えて、式 (VI) の 1 つ以上、例えば、1 つ、2 つ、3 つ  
、4 つ、または 5 つのモノマーが、前記 iRNA 二重鎖剤中に存在する。

## 【0250】

いくつかの好ましい実施の形態において、式(I)の1つのモノマーおよび式(VI)の1つのモノマーのみが、前記iRNA二重鎖剤中に存在する。

## 【0251】

いくつかの実施の形態において、 $R^L$ はコレステロールである。

## 【0252】

いくつかの実施の形態において、 $R^L$ はリトコール酸である。

## 【0253】

いくつかの実施の形態において、 $R^L$ はオレイルリトコール酸である。

## 【0254】

いくつかの実施の形態において、式(I)のモノマーは、式(VI)のモノマーと共有結合している。

## 【0255】

いくつかの好ましい実施の形態では、式(I)のモノマーは、リン酸結合、例えば、ホスホジエステル結合、ホスホロチオエート結合、ホスホロジチオエート結合を介して、式(VI)のモノマーと結合している。

## 【0256】

いくつかの好ましい実施の形態において、式(I)のモノマーは、式(VI)のモノマーを介してiRNA二重鎖剤に結合される。

## 【0257】

いくつかの実施の形態において、式(I)のモノマーは、iRNA二重鎖剤と式(VI)のモノマーとの間に介在している。

## 【0258】

いくつかの実施の形態において、式(I)のモノマーおよび式(II)のモノマーは互いに直接結合している。

## 【0259】

いくつかの実施の形態において、式(I)のモノマーおよび式(II)のモノマーは互いに直接結合していない。

## 【0260】

いくつかの実施の形態において、式(I)のモノマーおよび式(VI)のモノマーは、二重鎖iRNA二重鎖剤の別個の鎖上にある。

## 【0261】

いくつかの実施の形態において、式(I)のモノマーおよび式(VI)のモノマーは、iRNA二重鎖剤の反対の末端上にある。

## 【0262】

いくつかの実施の形態において、式(I)のモノマーおよび式(VI)のモノマーは、iRNA二重鎖剤の同じ末端上にある。

## 【0263】

いくつかの実施の形態において、式(I)のモノマーまたは式(VI)のモノマーの一方は内部位置にあるのに対し、他方は、iRNA二重鎖剤の末端位置にある。

## 【0264】

いくつかの実施の形態において、式(I)のモノマーおよび式(VI)のモノマーは両方とも、iRNA二重鎖剤の内部位置にある。

## 【0265】

いくつかの好ましい実施の形態において、式(VI)のモノマーは構造

10

20

30

40

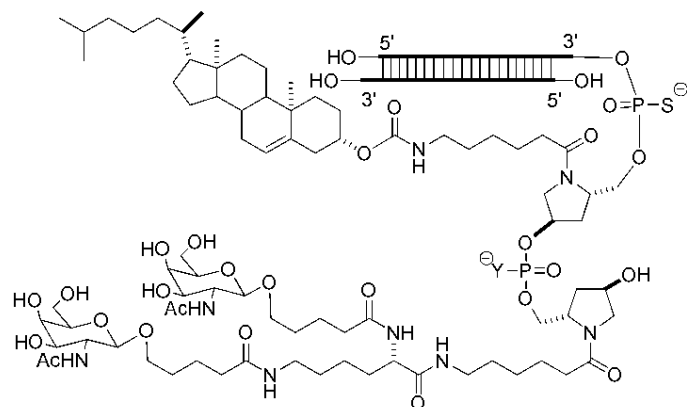
CC(C)CC[C@H](C)[C@H]1CC[C@@H]2[C@@]1(CC[C@H]3[C@H]2CC=C4[C@@]3(CC[C@@H](C4)OCC(=O)NCCCCC(=O)N5C[C@H](C[C@@H]5O)C)C)C

【 0 2 6 6 】

【 0 2 6 7 】

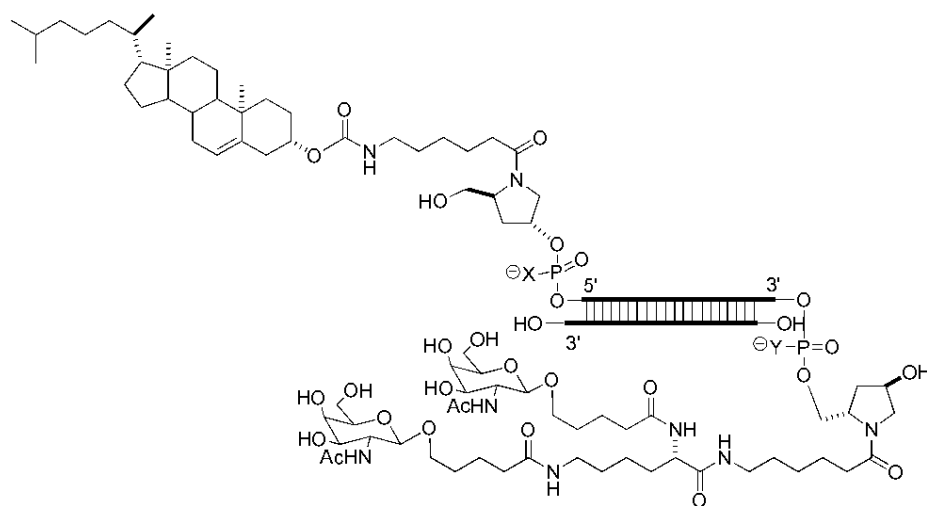
いくつかの実施の形態において、本発明の iRNA 二重鎖剤は、

## 【化 7 2 - 1】



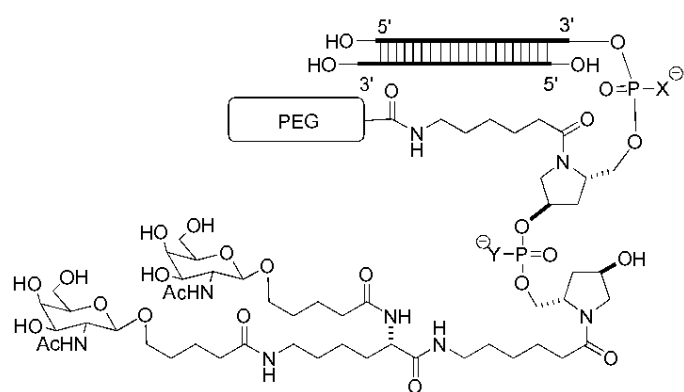
10

;



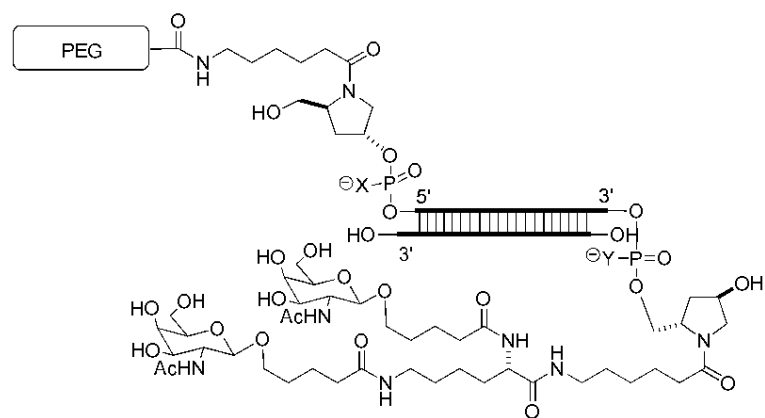
20

;



30

;



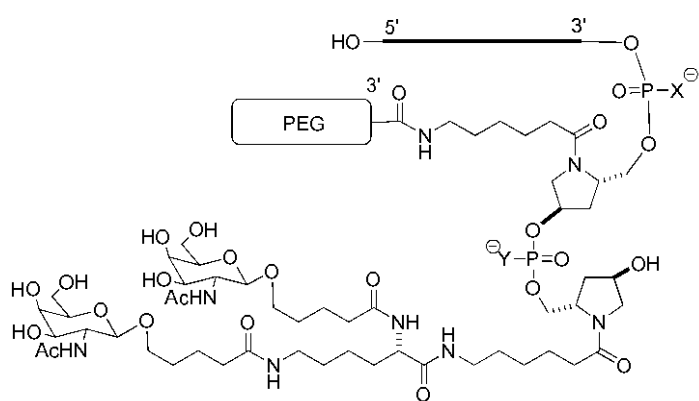
40

;

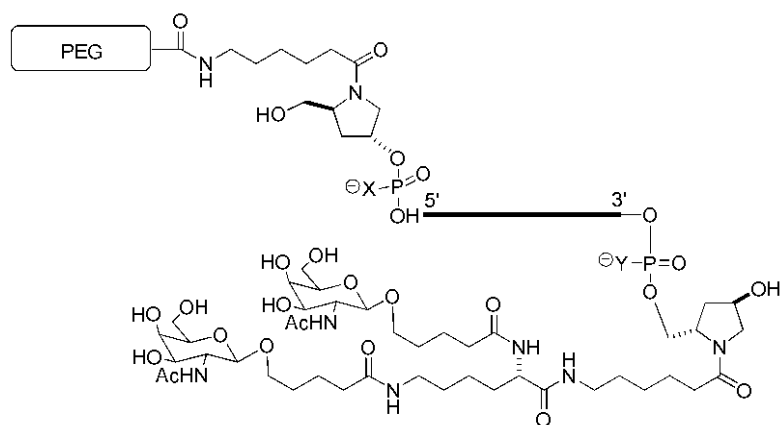
The diagram illustrates a complex chemical structure, likely a conjugate or a modified nucleic acid. Key components include:

- PEG Chain:** A poly(ethylene glycol) chain is attached to the structure via an amide linkage.
- Hydroxyl Group:** A hydroxyl group (HO) is present on a sugar-like moiety.
- Phosphate Group:** A phosphate group (P=O, O<sup>-</sup>) is shown, with a negative charge (X<sup>-</sup>) associated with it.
- Sugar Moieties:** Two sugar rings are depicted, one labeled "AcHN" (acetamido) and another labeled "HO" (hydroxyl).
- Nucleic Acid Sequence:** A segment of a nucleic acid is shown, with a 5' to 3' orientation indicated. The sequence is represented by a series of vertical bars, suggesting a specific nucleotide sequence.
- Amide Linkages:** Several amide bonds (NH-C=O) are present, connecting different parts of the molecule.

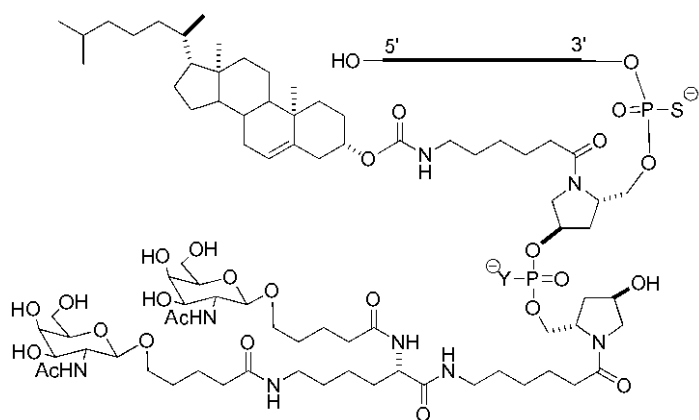
;



-

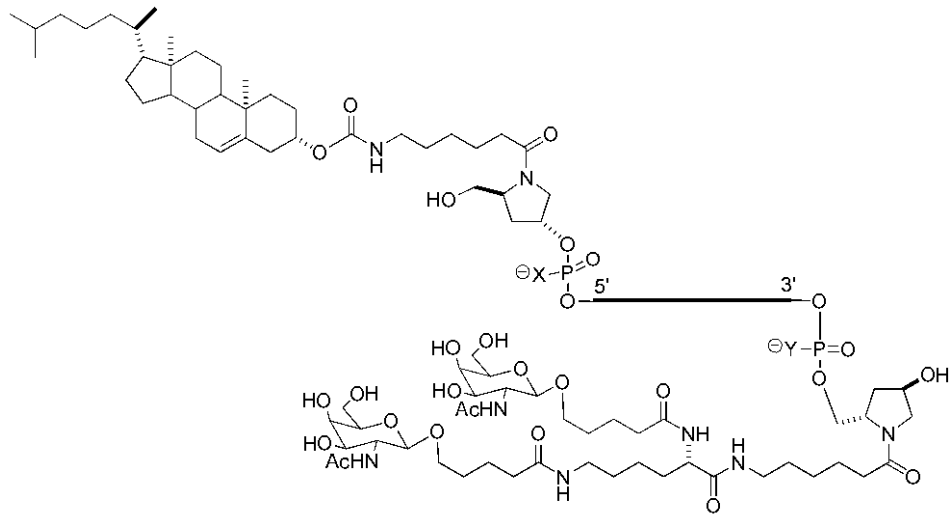


:



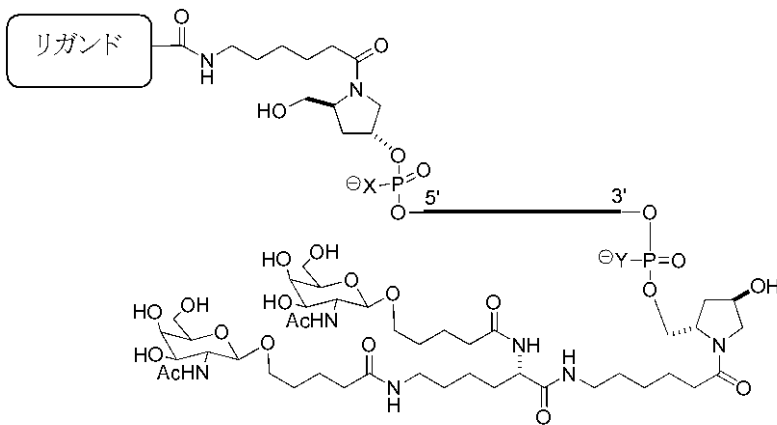
;

## 【化 7 2 - 3】



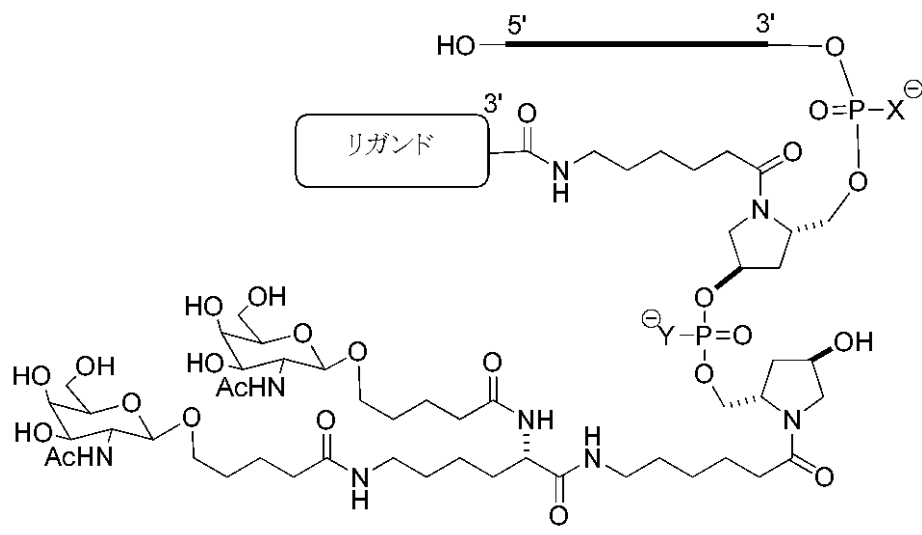
10

;



20

;

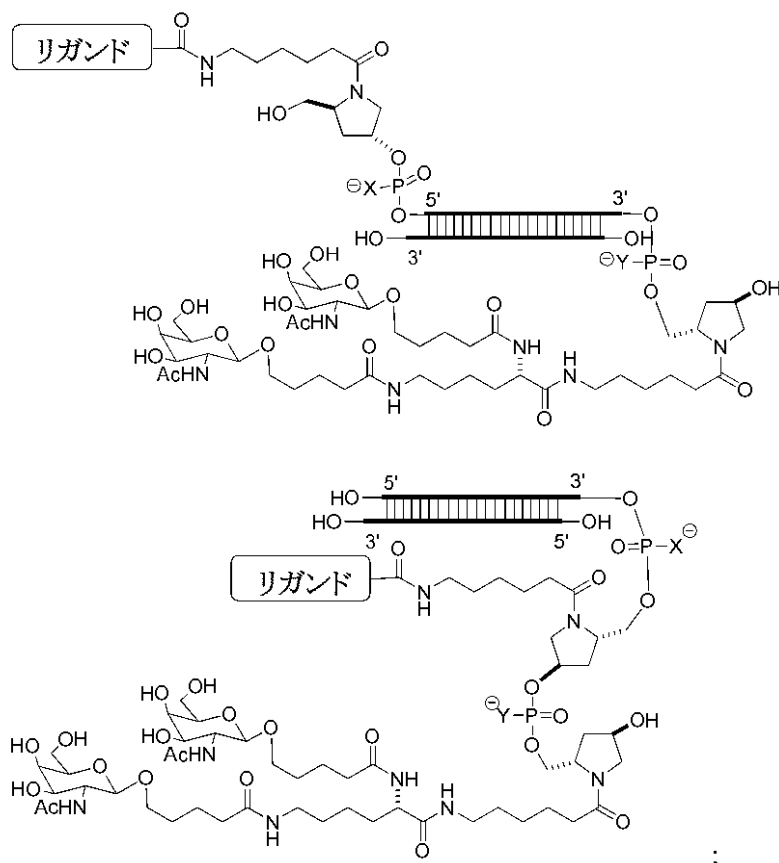


30

40

;

## 【化 7 2 - 4】



10

20

## 【0268】

からなる群より選択され、式中、

リガンドは、PK調節物質であり、 $X = O$ または $S$ であり、 $Y = O$ または $S$ であり、PEGは、分子量(MW)200~100,000の、 $-OH$  PEG、 $-アミノ$  PEG、 $-メトキシ$  PEG、 $-SH$  PEG、 $-プロパルギル$  PEG、 $-アジド$  PEG、および  $-リガンド$  PEGである。

30

## 【0269】

## エンドソーム溶解成分

二重層膜を容易には横切ることができない、巨大分子薬物および親水性薬物分子については、細胞のエンドソーム/リソソーム区画に閉じ込めることが、それらの作用部位に効果的に送達する上での最大の障害であると考えられる。近年、この問題に対処するために、多くの手法や戦略が工夫されてきた。リポソーム製剤については、融合性脂質を製剤中に使用することが最も一般的な手法となっている (Singh, R. S., Goncalves, C. et al. (2004). On the Gene Delivery Efficacies of pH-Sensitive Cationic Lipids via Endosomal Protonation. A Chemical Biology Investigation. Chem. Biol. 11, 713-723.)。プロトン化および/またはpH誘導性の立体構造変化を通じてpH感受性のエンドソーム溶解活性を示す他の成分としては、荷電したポリマーおよびペプチドが挙げられる。その例が、Hoffman, A. S., Stayton, P. S. et al. (2002). Design of "smart" polymers that can direct intracellular drug delivery. Polymers Adv. Technol. 13, 992-999; Kakudo, Chaki, T., S. et al. (2004). Transferrin-Modified Liposomes Equipped with a pH-Sensitive Fusogenic Peptide: An Artificial Viral-like Delivery System. Biochemistry 436, 5618-5628; Yessine, M. A. and Leroux, J. C. (2004). Membrane-destabilizing polyanions: interaction with lipid bilayers and endosomal escape of biomacromolecules. Adv. Drug Deliv. Rev. 56, 999-1021; Oliveira, S., van Roo

40

50

y, I. et al. (2007). Fusogenic peptides enhance endosomal escape improving siRNA-induced silencing of oncogenes. *Int. J. Pharm.* 331, 211-4.に見出すことができる。これらは、リポソームまたはリポプレックスなどの、薬物送達系との関連で一般に使用されてきた。リポソーム製剤を用いる、葉酸受容体を介する送達については、例えば、pH感受性の融合性ペプチドがリポソームに組み込まれ、摂取の過程での薬物の放出を改善することによって活性を向上させることが示されている (Turk, M. J., Reddy, J. A. et al. (2002). Characterization of a novel pH-sensitive peptide that enhances drug release from folate-targeted liposomes at endosomal pHs. *Biochim. Biophys. Acta* 1559, 56-68)。

#### 【0270】

10

ある実施の形態では、本発明のエンドソーム溶解成分は、pH依存性の膜活性および/または融合性を示すポリカチオン性のペプチドまたはペプチド模倣体であってもよい。ペプチド模倣体は、ペプチドを模倣するように設計された、タンパク質様の小さい鎖であってもよい。ペプチド模倣体は、分子の特性を変化させるために既存のペプチドを修飾することによって生じるであろう。ある実施の形態では、これらは、ペプチドと比較して、安定性および/または生物学的活性が向上している。ある実施の形態では、エンドソーム溶解成分は、エンドソームpH (例えば、pH 5 ~ 6) で活性のある立体構造をとる。「活性のある」立体構造とは、エンドソーム溶解成分が、エンドソームの溶解および/または本発明のモジュラー組成物、も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立体構造のことである。

20

#### 【0271】

化合物のライブラリーについては、溶血アッセイを用いて、中性pHに対するエンドソームpHでのそれらの示差的な膜活性についてスクリーニングしてもよい。この方法で単離される有望な候補は、本発明のモジュラー組成物の成分として使用してもよい。本発明の組成物および方法で使用するエンドソーム溶解成分を同定する方法は、化合物のライブラリーを提供する工程；血液細胞をライブラリーのメンバーと接触させる工程であって、接触が起こる培地のpHが制御される工程；これらの化合物が中性pH (例えば、約pH 7 ~ 8) に対して、低いpH (例えば、約pH 5 ~ 6) で血液細胞の示差溶解を誘導するか否かを判定する工程を含み得る。

30

#### 【0272】

例示のエンドソーム溶解成分としては、GALAペプチド (Subbarao et al., *Biochemistry*, 1987, 26: 2964-2972)、EALAペプチド (Vogel et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118: 1581-1586)、およびそれらの誘導體 (Turk et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 2002, 1559: 56-68) が挙げられる。ある実施の形態では、エンドソーム溶解成分は、pHの変化に応答して電荷またはプロトン化が変化する化学基 (例えば、アミノ酸) を含有してもよい。エンドソーム溶解成分は、線状または分岐状であってもよい。エンドソーム溶解成分の例示の一次配列としては、 $H_2N - (A A L E A L A E A L E A L A E A L E A L A E A A A A G G C) - CO_2H$  ;  $H_2N - (A A L A E A L A E A L A E A L A E A L A E A L A E A L A A A A G G C) - CO_2H$  ; および  $H_2N - (A L E A L A E A L E A L A E A A) - CONH_2$  が挙げられる。

40

#### 【0273】

ある実施の形態では、複数のエンドソーム溶解成分を本発明のiRNA二重鎖剤に組み込んでもよい。いくつかの実施の形態では、これには、式(I)のモノマーに加えて、複数の同じエンドソーム溶解成分をiRNA剤に組み込むことを伴う。他の実施の形態では、これには、式(I)のモノマーに加えて、2つ以上の異なるエンドソーム溶解成分をiRNA二重鎖剤に組み込むことを伴う。

#### 【0274】

これらのエンドソーム溶解成分は、例えば、エンドソームpHで立体構造を変化させることによって、エンドソームからの脱出を仲介し得る。ある実施の形態では、エンドソーム

50

ム溶解成分は、中性 pH でランダムコイル立体構造をとって存在し、エンドソーム pH で両親媒性ヘリックスへと再編成してもよい。この立体構造転移の結果として、これらのペプチドがエンドソームの脂質膜に入り込み、エンドソームの内容物を細胞質へと漏れ出させ得る。立体構造転移は pH 依存性であるので、エンドソーム溶解成分は、血液中 (pH 約 7.4) を循環する間、ほとんどまたは全く融合活性を示すことができない。融合活性は、エンドソーム溶解成分による脂質膜の破壊を引き起こす活性と定義される。融合活性の一例は、エンドソーム溶解成分によるエンドソーム膜の破壊であり、これは、エンドソームの溶解、または本発明のモジュラー組成物 (例えば、核酸) の 1 つ以上の成分のエンドソームから細胞質への漏出および輸送をもたらす。

#### 【0275】

本明細書に記載された溶血アッセイに加えて、適切なエンドソーム溶解成分は、当業者により、他の方法を用いて試験および同定することができる。例えば、pH 環境に応答する (例えば、pH 環境によって電荷を変化させる) 化合物の能力を、常法によって (例えば、細胞アッセイで) 試験することができる。ある実施の形態では、試験化合物を、細胞と混合するかまたは細胞と接触させ、例えば、エンドサイトーシスによって、細胞に試験化合物を取り込ませる。次いで、接触させた細胞からエンドソーム調製物を作製し、このエンドソーム調製物を対照細胞からのエンドソーム調製物と比較することができる。対照細胞と比べた、接触させた細胞由来のエンドソーム画分の変化 (例えば、減少) は、試験化合物が融合剤として機能できることを示す。あるいは、接触させた細胞と対照細胞を、例えば、顕微鏡法 (例えば、光学顕微鏡法または電子顕微鏡法) で評価して、細胞内のエンドソーム個体群の違いを決定することができる。試験化合物および / またはエンドソームに標識付けて、例えば、エンドソームの漏出を定量化することができる。

#### 【0276】

別のタイプのアッセイでは、本明細書に記載された iRNA 二重鎖剤を、1 つ以上の試験融合剤または推定融合剤を用いて構築する。iRNA 二重鎖剤は、可視化しやすいように標識付けることができる。一旦 iRNA 剤が細胞に取り込まれたら、エンドソームからの脱出を促進するエンドソーム溶解成分の能力を、エンドソーム調製物の調製によって、または細胞の細胞質中の標識 iRNA 二重鎖剤を可視化することができる顕微鏡技術によって評価することができる。ある他の実施の形態では、遺伝子発現の阻害、または任意の他の生理的パラメータを、エンドソーム脱出の代用マーカーとして使用してもよい。

#### 【0277】

他の実施の形態において、円偏光二色性分光法を用いて、pH 依存的な構造転移を示す化合物を同定することができる。

#### 【0278】

2 段階アッセイを実施することもできる。この 2 段階アッセイにおいては、第 1 のアッセイで、試験化合物だけで pH の変化に応答する能力を評価し、第 2 のアッセイで、試験化合物を含むモジュラー組成物が pH の変化に応答する能力を評価する。

#### 【0279】

#### ペプチド

本発明に使用するのに適したペプチドは、天然ペプチド、例えば、tat ペプチドまたはアンテナペディアペプチド、合成ペプチド、またはペプチド模倣体であって差し支えない。さらに、ペプチドは、修飾ペプチドであって差し支えなく、例えば、ペプチドは、非ペプチド結合または偽ペプチド結合、および D - アミノ酸を含むこともできる。ペプチド模倣体 (ここではオリゴペプチド模倣体とも呼ばれる) は、天然ペプチドと類似の規定された 3 次元構造に折り畳むことができる分子である。ペプチドおよびペプチド模倣体のオリゴヌクレオチドへの結合は、細胞による認識および吸収を高めることなどによって、オリゴヌクレオチドの薬物動態学的分布に影響を及ぼし得る。ペプチド部分またはペプチド模倣体部分の長さは、約 5 ~ 50 アミノ酸、例えば、約 5、10、15、20、25、30、35、40、45、または 50 アミノ酸であって差し支えない (例えば、表 1 参照)。

【表 1】

例示的な細胞透過ペプチド

細胞透過ペプチド	アミノ酸配列	参考文献
ペネトラチン	RQIKIWFQNRRMKWKK	Derossi ら, J. Biol. Chem. 269:10444, 1994
Tat 断片 (48-60)	GRKKRRQRRRPPQC	Vives ら, J. Biol. Chem., 272:16010, 1997
シグナル配列に基づくペプチド	GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV	Chaloin ら, Biochem. Biophys. Res. Commun., 243:601, 1998
PVEC	LLIILRRRIRKQAHASK	Elmquist ら, Exp. Cell Res., 269:237, 2001
トランスポータン	GWTLSAGYLLKINLKALAALAKKIL	Pooga ら, FASEB J., 12:67, 1998
両親媒性モデルペプチド	KLALKLALKALKAALKLA	Oehlke ら, Mol. Ther., 2:339, 2000
Arg <sub>9</sub>	RRRRRRRRR	Mitchell ら, J. Pept. Res., 56:318, 2000
細菌細胞壁透過性	KFFKFFKFFK	
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRN LVPRTES	
セクロピン P1	SWLSKTAKKLENSAKKRISGIAIAIQGGP R	
α-ディフェンシン	ACYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLWAFCC	
b-ディフェンシン	DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQTGTCYRG KAKCKK	
バクテネシン	RKCRIVVIRVCR	
PR-39	RRRPRPPYLPRRPPPPFPFPRLPRIIPPGF PPRFPPRFPGR-NH <sub>2</sub>	
インドリシジン	ILPWKWPWWPWRR-NH <sub>2</sub>	

## 【0280】

ペプチドまたはペプチド模倣体は、例えば、細胞透過ペプチド、カチオン性ペプチド、両親媒性ペプチド、または（例えば、主に Tyr、Trp、または Phe からなる）疎水性ペプチドであり得る。ペプチド部分は、デンドリマーペプチド、拘束されたペプチド、または架橋されたペプチドであり得る。別の代替例において、ペプチド部分は、疎水性の膜転位配列（MTS）を含むことができる。例示の疎水性 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）も標的化部分であって差し支えない。このペプチド部分は、細胞膜を横断して、ペプチド、オリゴヌクレオチド、およびタンパク質を含む大きな極性分子を運ぶことができる、「送達」ペプチドであり得る。例えば、HIV Tat タンパク質由来の配列（GRKKRRQRRRPPQC）およびショウジョウバエのアンテナペディアタンパク質由来の配列（RQIKIWFQNRRMKWKK）は、送達ペプチドとして機能することができることが分かっている。ペプチドまたはペプチド模倣体は、ファージディスプレイライブラリー、または 1 ビーズ 1 化合物（OBOC）コンビナトリアルライブラリーから同定されたペプチドなどの、DNA のランダムな配列によってコードすることができる（Lam et al., Nature, 354:82-84, 1991）。脂質に連結されたペプチドまたはペプチド模倣体は、アルギニン - グリシン

- アスパラギン酸 (R G D) - ペプチド、または R G D 模倣体などの細胞標的化ペプチドであることが好ましい。ペプチド部分の長さは、約 5 のアミノ酸 ~ 約 40 のアミノ酸の範囲に及び得る。ペプチド部分は、例えば、安定性または直接的な立体構造特性を増大させるために、構造的修飾を有することができる。下記の構造的修飾のいずれを利用してもし支えない。

#### 【0281】

R G D ペプチド部分は、内皮腫瘍細胞または乳癌腫瘍細胞などの腫瘍細胞を標的とするために使用することができる (Zitzmann et al., Cancer Res., 62:5139-43, 2002)。R G D ペプチドは、肺、腎臓、脾臓、または肝臓を含む、様々な他の組織の腫瘍への標的化を促進することができる (Aoki et al., Cancer Gene Therapy 8:783-787, 2001)。R G D ペプチドは、脂質粒子の腎臓への標的化を促進することが好ましい。R G D ペプチドは、線状または環状であって差し支えなく、かつ修飾する (例えば、特定の組織への標的化を促進するためにグリコシル化またはメチル化する) ことができる。例えば、グリコシル化された R G D ペプチドは、 $I_V J_3$  を発現する腫瘍細胞を標的とすることができる (Haubner et al., Jour. Nucl. Med., 42:326-336, 2001)。

#### 【0282】

増殖細胞に濃縮されているマーカーを標的とするペプチドを使用することができる。例えば、R G D を含有するペプチドおよびペプチド模倣体は、癌細胞、特に、 $I_V J_3$  インテグリンを提示する細胞を標的とすることができる。このように、R G D ペプチド、R G D を含有する環状ペプチド、D - アミノ酸を含む R G D ペプチド、並びに合成 R G D 模倣体を使用することができる。R G D に加えて、 $I_V - J_3$  インテグリンリガンドを標的とする他の部分を使用することができる。一般に、このようなリガンドは、増殖細胞および血管新生を制御するために使用することができる。

#### 【0283】

「細胞透過ペプチド」は、細胞、例えば、細菌細胞または真菌細胞などの微生物細胞、もしくはヒト細胞などの哺乳類細胞を透過することができる。微生物細胞透過性ペプチドは、例えば、 $\alpha$  - ヘリックス線状ペプチド (例えば、LL - 37 もしくはセロピン P1)、ジスルフィド結合含有ペプチド (例えば、 $\alpha$  - ディフェンシン、 $\beta$  - ディフェンシン、もしくはバクテネシン)、または優勢なアミノ酸を 1 種または 2 種しか含有しないペプチド (例えば、PR - 39 またはインドリシジン) であり得る。細胞透過ペプチドは、核局在シグナル (NLS) を含むこともできる。例えば、細胞透過ペプチドは、HIV - 1 gp41 の融合ペプチドドメインと SV40 ラージ T 抗原の NLS とに由来する、MPG などの、2 つの部分からなる両親媒性ペプチドであり得る (Simeoni et al., Nucl. Acid s Res. 31:2717-2724, 2003)。

#### 【0284】

##### iRNA 二重鎖剤

iRNA 二重鎖剤は、標的遺伝子と十分に相同な領域を含み、かつヌクレオチドに関して、iRNA 剤またはその断片がこの標的遺伝子の下方調節を仲介することができるほどの十分な長さであるべきである。(説明しやすくするために、本明細書では、ヌクレオチドまたはリボヌクレオチドという用語を、RNA 剤の 1 つ以上のモノマーサブユニットに関して使用する場合がある。本明細書での「リボヌクレオチド」または「ヌクレオチド」という用語の用法は、修飾 RNA またはヌクレオチド代用物の場合、修飾ヌクレオチド、または 1 つ以上の位置での代用物置換部分も示すことができるということが理解されよう。)したがって、iRNA 二重鎖剤は、標的 RNA に対して少なくとも部分的に、およびいくつかの実施の形態では、完全に、相補的な領域であるか、またはこのような領域を含む。iRNA 二重鎖剤と標的の間に完全な相補性がある必要はないが、その対応性は、iRNA 二重鎖剤、またはその開裂産物が、例えば、標的 RNA (例えば、mRNA) の RNA i 開裂によって、配列特異的な発現抑制を導くことが可能となる程度に十分でなければならない。相補性、すなわち、標的鎖との相同性の程度は、アンチセンス鎖において最も重要である。特にアンチセンス鎖において、完全な相補性がたいいてい望ましいが、いく

つかの実施の形態は、特にアンチセンス鎖において、(標的RNAに対して)1つ以上の、または例えば、6つ、5つ、4つ、3つ、2つ、もしくはそれより少ない不一致を含むことができる。特にアンチセンス鎖における不一致は、末端領域で最も許容され、かつ、存在する場合は、末端領域(単数または複数)において、例えば、5'末端および/または3'末端から6つ、5つ、4つ、または3つのヌクレオチド以内であり得る。センス鎖に要求されるのは、分子の全体的な二本鎖の性質を維持するためにアンチセンス鎖と十分に相補的であることのみである。

#### 【0285】

本明細書の他の箇所で論じられるように、またその全体が参照により組み入れられる文献において、iRNA二重鎖剤は、たいいてい、修飾されているか、またはヌクレオシド代用物を含む。iRNA二重鎖剤の一本鎖領域は、たいいてい、修飾されているか、またはヌクレオシド代用物を含み、例えば、不對領域またはヘアピン構造の領域(例えば、2つの相補的な領域を繋ぐ領域)は、修飾またはヌクレオシド代用物を有することができる。例えば、エキソヌクレアーゼに対して、iRNA等に重鎖剤の1つ以上の3'末端または5'末端を安定化する修飾またはアンチセンスsiRNA剤がRISCに入るように有利に働く修飾も想定される。修飾としては、C3(またはC6、C7、C12)アミノリンカー、チオールリンカー、カルボキシルリンカー、非ヌクレオチドスペーサ(C3、C6、C7、C12、無塩基、トリエチレングリコール、ヘキサエチレングリコール)、特別なビオチン試薬またはフルオレセイン試薬(これらは、ホスホラミダイトとして生じ、DMT保護ヒドロキシル基を別に有して、RNA合成の最中に複数のカップリングを可能にする)が挙げられる。

#### 【0286】

iRNA二重鎖剤としては次のようなものが挙げられる: インターフェロン応答を誘発するのに十分な長さの分子(これらは、Dicer(Bernstein et al. 2001. Nature, 409:363-366)によって開裂され、RISC(RNAi-誘導発現抑制複合体)内に入ることができる); およびインターフェロン応答を誘発しない程度に十分に短い分子(これらの分子もDicerによって開裂され、および/またはRISC内に入ることができる)、例えば、RISC内に入ることができる大きさの分子(例えば、Dicer開裂産物に類似した分子)。インターフェロン応答を誘発しない程度に十分に短い分子を、本明細書では、「siRNA剤またはより短いiRNA二重鎖剤」と呼ぶ。本明細書で使用される「siRNA剤またはより短いiRNA二重鎖剤」は、例えば、ヒト細胞内で有害なインターフェロン応答を誘導しないぐらい十分に短い、例えば、60、50、40、または30未満のヌクレオチド対の二重鎖領域を有するRNA二重鎖剤(例えば、二本鎖RNA剤または一本鎖剤)を称する。siRNA剤、またはその開裂産物は、例えば、標的RNAに対してRNAiを誘導することによって、標的遺伝子を下方調節することができ、この場合、標的は内在性の標的RNAまたは病原体の標的RNAを含み得る。

#### 【0287】

siRNA剤の各鎖の長さは、30、25、24、23、22、21、または20以下のヌクレオチドであって差し支えない。鎖の長さは、少なくとも19のヌクレオチドであってもよい。例えば、各鎖の長さは、21~25の間のヌクレオチドであることができる。siRNA剤は、17、18、19、29、21、22、23、24、または25ヌクレオチド対の二重鎖領域、および1つ以上の突出部、もしくは1つまたは2つの、2~3ヌクレオチドの3'突出部を有してもよい。

#### 【0288】

1つの実施の形態において、iRNA二重鎖剤はヘアピンである。iRNA二重鎖剤におけるヘアピンは、少なくとも17、18、19、29、21、22、23、24、または25ヌクレオチド対またはそれと等しい二重鎖領域を有する。この二重鎖領域の長さは、200、100、または50以下であってよい。ある実施の形態において、二重鎖領域の長さの範囲は、12~30、17から23、19から23、および19から21のヌクレオチド対である。このヘアピンは、いくつかの実施の形態において3末端で、ある実施の

形態において、ヘアピンのアンチセンス鎖で、一本鎖突出部または末端不對領域を有してもよい。いくつかの実施の形態において、突出部の長さは2～3のヌクレオチドである。

【0289】

二本鎖*iRNA*二重鎖剤のアンチセンス鎖の長さは、少なくとも14、15、16、17、18、19、25、29、40、または60のヌクレオチド、またはそれに等しくてもよい。このアンチセンス鎖の長さは、200、100、または50ヌクレオチド以下であってもよい。長さの範囲は、17から25、19から23、および19から21のヌクレオチドであってよい。

【0290】

二本鎖*iRNA*二重鎖剤のセンス鎖の長さは、少なくとも14、15、16、17、18、19、25、29、40、または60のヌクレオチド、またはそれに等しくてもよい。このセンス鎖の長さは、200、100、または50ヌクレオチド以下であってもよい。長さの範囲は、17から25、19から23、および19から21のヌクレオチドであってよい。

【0291】

二本鎖*iRNA*二重鎖剤の二本鎖部分の長さは、少なくとも14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、29、40、または60のヌクレオチド、またはそれに等しくてもよい。この二本鎖部分の長さは、200、100、または50ヌクレオチド以下であってもよい。長さの範囲は、12～30、17から23、19から23、および19から21のヌクレオチド対であってよい。

【0292】

多くの実施の形態において、*ds iRNA*二重鎖剤は、内在性分子によって（例えば、*Dicer*によって）開裂されて、より小さい*ds iRNA*二重鎖剤（例えば、*siRNA*剤）を産生することができるくらいに十分大きい。

【0293】

二本鎖*iRNA*二重鎖剤のアンチセンス鎖とセンス鎖の一方または両方を修飾することが望ましいであろう。センス鎖とアンチセンス鎖は、同じ修飾または同じ部類の修飾を有することもあれば、異なる修飾を有することもあり、例えば、場合によっては、センス鎖のみを修飾することが望ましい場合がある。例えば、センス鎖を不活性化するために、センス鎖のみを修飾することが望ましい場合があり、例えば、センス鎖を不活性化して、活性のある*siRNA*/タンパク質または*RISC*の形成を妨げるために、センス鎖を修飾することができる。これは、センス鎖の5'-リン酸化を妨げる修飾によって（例えば、5'-O-メチルリボヌクレオチドを用いる修飾によって）行うことができる（Nykaenen et al., (2001) ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. Cell 107, 309-321. 参照）。例えば、単に5'-OHをO-MeではなくHによって置換することなどの、リン酸化を妨げる他の修飾も使用しても差し支えない。あるいは、大きな嵩張る基を5'-ホスフェートに付加して、ホスホジエステル結合に変えてもよいが、ホスホジエステラーゼがこのような結合を開裂して、機能的な*siRNA* 5'末端を放出し得るので、これはあまり望ましくないであろう。アンチセンス鎖修飾としては、5'リン酸化、並びに本明細書で論じられた任意の他の5'修飾、特に、一本鎖*iRNA*分子に関する節において先に論じられた5'修飾が挙げられる。

【0294】

*ds iRNA*二重鎖剤が、分子の一方または両方の末端で一本鎖領域または不對領域を含むように、センス鎖とアンチセンス鎖を選択し得る。したがって、*ds iRNA*二重鎖剤は、突出部、例えば、1つまたは2つの5'突出部、または3'突出部、もしくは2～3ヌクレオチドの3'突出部を含有するように対形成した、センス鎖とアンチセンス鎖を含んでもよい。多くの実施の形態は、3'突出部を有する。ある*siRNA*剤は、一本鎖突出部を有し、いくつかの実施の形態では、各末端に1つまたは2つまたは3つのヌクレオチドの長さの3'突出部を有する。突出部は、一方の鎖が他方の鎖よりも長いこと、または同じ長さの2つの鎖が食い違っていることの結果として生じ得る。5'末端はり

ン酸化されていてもよい。

【0295】

いくつかの実施の形態では、二重鎖領域の長さは、例えば、上で論じられた *siRNA* 剤の範囲において、15と30の間、または18、19、20、21、22、および23のヌクレオチド長である。*siRNA* 剤は、長い *ds siRNA* から天然の *Dicer* によって処理された産物と長さおよび構造が類似していることがあり得る。*siRNA* 剤の2つの鎖が結合（例えば、共有結合）している実施の形態も含まれる。ヘアピン、または所要の二本鎖領域、および3'突出を与える他の一本鎖構造も本発明の範囲内にある。

【0296】

*ds siRNA* 二重鎖剤および *siRNA* 剤を含む、本明細書に記載された単離された *iRNA* 二重鎖剤は、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）の発現抑制を仲介することができる。便宜上、このような *mRNA* を、本明細書では、発現抑制すべき *mRNA* とも呼ぶ。このような遺伝子を標的遺伝子とも呼ぶ。一般に、発現抑制すべき *RNA* は、内在性遺伝子または病原体遺伝子である。さらに、*mRNA* 以外の *RNA*（例えば、*tRNA*）、およびウイルス *RNA* を標的とすることもできる。

【0297】

ここに用いたように、「*RNAi* を仲介する」という語句は、配列特異的な様式で、標的 *RNA* を発現抑制する能力を称する。理論に束縛されることを望まないが、発現抑制では、*RNAi* の機構またはプロセスおよびガイド *RNA*（例えば、21から23のヌクレオチドの *siRNA* 剤）が使用されると考えられている。

【0298】

ここに用いたように、「特異的にハイブリダイズ可能な」または「相補的な」は、本発明の化合物と標的 *RNA* 分子の間で安定かつ特異的な結合が生じるような十分な程度の相補性を示すために使用される用語である。特異的結合には、特異的結合が所望される条件下で、すなわち、インビボアッセイもしくは治療的処置の場合には、生理的条件下で、またはインビトロアッセイの場合には、そのアッセイが行なわれる条件下で、非標的配列に対するオリゴマー化合物の非特異的結合を回避するために十分な程度の相補性が必要とされる。非標的配列は、概して、少なくとも5つのヌクレオチドが異なっている。

【0299】

1つの実施の形態では、*iRNA* 二重鎖剤は、*iRNA* 二重鎖剤が標的 *mRNA* によってコードされるタンパク質の産生を発現抑制するように、標的 *RNA*、例えば、標的 *mRNA* に対して「十分に相補的」である。別の実施の形態では、*iRNA* 二重鎖剤は、標的 *RNA* に対して「厳密に相補的」であり、例えば、標的 *RNA* と *iRNA* 二重鎖剤は、例えば、厳密に相補的な領域でワトソン-クリック塩基対のみからできたハイブリッドを形成するようにアニールする。「十分に相補的な」標的 *RNA* は、標的 *RNA* に厳密に相補的な（例えば、少なくとも10のヌクレオチドの）内部領域を含むことができる。さらに、いくつかの実施の形態では、*iRNA* 二重鎖剤は、単一ヌクレオチドの相違を特異的に区別する。この場合、*iRNA* 二重鎖剤は、厳密な相補性が、単一ヌクレオチドの違いがある（例えば、7ヌクレオチド以内の）領域に見られる場合のみに *RNAi* を仲介する。

【0300】

ここに用いたように、「オリゴヌクレオチド」という用語は、例えば、100、200、300、または400未満のヌクレオチドの長さの核酸分子（*RNA* または *DNA*）を称する。

【0301】

本明細書で論じられる *RNA* 剤としては、未修飾の *RNA*、ならびに、例えば、効力を改善するために修飾された *RNA*、およびヌクレオシド代用物のポリマーが挙げられる。未修飾の *RNA* は、核酸の成分、すなわち、糖、塩基、およびリン酸部分が、天然に存在する、例えば、ヒトの体内に天然に存在するのと同じかまたは実質的に同じである分子を称する。当技術分野では、稀であるかまたは通常とは異なるが、天然に存在する *RNA* を

10

20

30

40

50

修飾RNAと呼ぶことが多く、例えば、Limbach et al., (1994) Summary: the modified nucleosides of RNA, Nucleic Acids Res. 22: 2183-2196を参照されたい。(典型的には転写後修飾の結果であることが明白なので)修飾RNAと呼ばれることが多い、このような稀であるかまたは通常とは異なるRNAは、本明細書で使用される「未修飾のRNA」という用語の範囲内にある。修飾RNAは、1つ以上の核酸の成分、すなわち、糖、塩基、およびリン酸部分が、天然に存在するものと異なる、例えば、ヒトの体内に存在するものと異なる分子を称する。これらは修飾「RNA」と称されるが、当然、修飾されているのでRNAではない分子を含むことになる。ヌクレオシド代用物とは、リボリン酸骨格が非リボリン酸構築物で置換されている分子のことであり、この非リボリン酸構築物は、ハイブリダイゼーションが、リボリン酸骨格の場合に見られるのと実質的に同様(例えば、リボリン酸骨格の非荷電模倣物)であるように、塩基が正しい空間的関係性で提示されることを可能にする。上記の全ての例が本明細書で論じられる。

10

#### 【0302】

以下の考察の大部分は、一本鎖分子について言及するものである。本発明の多くの実施の形態では、二本鎖iRNA二重鎖剤(例えば、部分的二本鎖iRNA二重鎖剤)が想定されている。したがって、以下に記載される一本鎖構造からできた二本鎖構造(例えば、2つの別々の分子が接触して二本鎖領域を形成している場合、または分子内対形成によって二本鎖領域が形成されている場合(例えば、ヘアピン構造))は、本発明の範囲内にある。長さについては、本明細書の他の箇所で記載されている。

#### 【0303】

核酸はサブユニットのポリマーであるので、以下に記載される修飾の多く(例えば、塩基、またはリン酸部分、またはリン酸部分の非結合Oの修飾)は、核酸内で繰り返される位置で生じる。修飾が核酸中のこれらの位置全てで生じる場合もあるが、多くの場合、そうではない。一例として、修飾は、3'末端位置または5'末端位置でのみで生じ得、末端領域で、例えば、末端ヌクレオチド上の位置でまたは鎖の最後の2、3、4、5、もしくは10ヌクレオチドでのみ生じ得る。修飾は、二本鎖領域、一本鎖領域、またはその両方で生じ得る。修飾は、RNAの二本鎖領域でのみ生じて、またはRNAの一本鎖領域でのみ生じてよい。例えば、非結合O位置でのホスホロチオエート修飾は、一方または両方の末端で生じてよく、末端領域で、例えば、末端ヌクレオチド上の位置でまたは鎖の最後の2、3、4、5、もしくは10ヌクレオチドでのみ生じて、または二本鎖領域と一本鎖領域において、特に末端で生じてよい。5'末端(単数または複数)をリン酸化することができる。

20

30

#### 【0304】

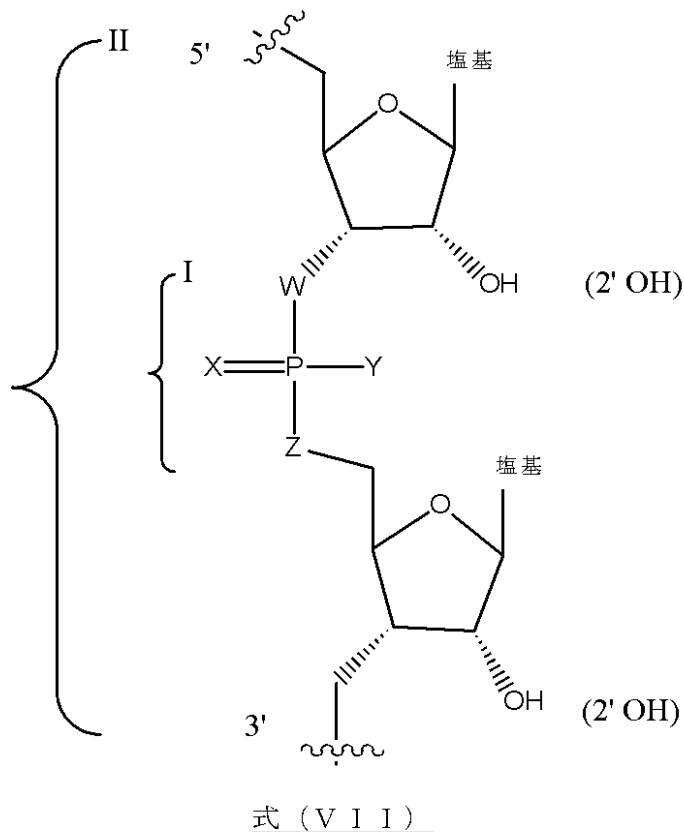
いくつかの実施の形態では、例えば、安定性を高めるために、突出部に特定の塩基を含めるか、または一本鎖突出部(例えば、5'突出部もしくは3'突出部、もしくはその両方)に修飾ヌクレオチドもしくはヌクレオチド代用物を含めることが可能である。例えば、突出部にプリンヌクレオチドを含めることが望ましいことがある。いくつかの実施の形態では、3'突出部または5'突出部中の塩基の全てまたはいくつかを、例えば、本明細書に記載される修飾を用いて、修飾する。修飾としては、例えば、リボース糖の2'OH基での修飾の使用、例えば、リボヌクレオチドの代わりとしてのデオキシリボヌクレオチド(例えば、デオキシチミジン)の使用、およびリン酸基での修飾(例えば、ホスホロチオエート修飾)が挙げられる。突出部が標的配列と相同である必要はない。

40

#### 【0305】

修飾およびヌクレオチド代用物を以下で論じる。

## 【化 7 3】



10

20

## 【0306】

上記の式 V I I に示す足場(scaffold)は、リボ核酸の一部を表す。塩基性成分は、リボース糖、塩基、末端リン酸、およびリン酸ヌクレオチド間リンカーである。塩基が、天然の塩基、例えば、アデニン、ウラシル、グアニン、またはシトシンである場合、糖は、(図示したように)未修飾の 2' ヒドロキシルリボース糖であり、W、X、Y、および Z は全て O であり、式 V I I は、天然の未修飾オリゴリボヌクレオチドを表す。

30

## 【0307】

未修飾のオリゴリボヌクレオチドは、いくつかの用途では最適とは言えない場合があり、例えば、未修飾のオリゴリボヌクレオチドが、例えば、細胞ヌクレアーゼによる分解を受けやすい可能性がある。ヌクレアーゼは、核酸のホスホジエステル結合を加水分解することができる。しかしながら、上記 RNA 成分の 1 つ以上に対する化学修飾は、改善された特性を付与することができ、例えば、ヌクレアーゼに対してオリゴリボヌクレオチドをより安定にすることができる。

## 【0308】

修飾核酸およびヌクレオチド代用物は、以下のうちの 1 つ以上を含むことができる：

( i ) 非結合 ( X および Y ) リン酸酸素の一方もしくは両方、および / または結合 ( W および Z ) リン酸酸素の 1 つ以上の改変 (例えば、置換) (リン酸が末端位置にある場合、位置 W または Z の一方は、天然に存在するリボ核酸中ではさらなる元素にリン酸を結合しない。しかしながら、用語方を単純化するために、別記される場合を除き、核酸の 5' 末端の W 位と核酸の 3' 末端の Z 位とは、本明細書で使用される「結合リン酸酸素」という用語の範囲内にある)；

40

( i i ) リボース糖の構成成分 (例えば、リボース糖の 2' ヒドロキシル) の改変 (例えば、置換)；

( i i i ) リン酸部分 (括弧 I) の、「デホスホ(dephospho)」リンカーによる大規模な置換；

( i v ) 天然に存在する塩基の修飾または置換；

50

(v) リボース - リン酸骨格 (括弧 I I) の置換または修飾 ;

(vi) RNA の 3' 末端または 5' 末端の修飾 (例えば、末端リン酸基の除去、修飾、もしくは置換、または RNA の 3' 末端もしくは 5' 末端のいずれかへの、部分 (例えば、蛍光標識部分) の結合)。

#### 【0309】

この文脈で使用される、置換、修飾、改変などの用語は、プロセス限定を意味するものではなく、例えば、修飾とは、対照リボ核酸または天然に存在するリボ核酸から始めて、それを、修飾リボ核酸を産生するように修飾しなければならないことを意味ものではなく、修飾とは、単に、天然に存在する分子との違いを意味するものである。

#### 【0310】

いくつかの化学物質の実際の電子構造は、ただ 1 つの標準的な型 (すなわち、ルイス構造) によって適切に表すことはできないことが理解される。理論に束縛されることを望まないが、その代わりに、実際の構造は、集合的に共鳴型または共鳴構造として知られている、2 つ以上の標準的な型のあるハイブリッドまたは加重平均であり得る。共鳴構造は、個別の化学物質ではなく、紙の上でのみ存在する。共鳴構造は、特定の化学物質に対する結合電子および非結合電子の配置または「局在」という点においてのみ相互に異なる。ある共鳴構造が他のものよりも高い程度でハイブリッドに寄与することが可能である。したがって、本発明の実施の形態についての記載および図示される説明は、特定の種に対する主要な共鳴型として当技術分野で認識されているものに関してなされる。例えば、任意のホスホロアミデート (非結合酸素の窒素による置換) は、上記の図において  $X = O$  および  $Y = N$  によって表されよう。

#### 【0311】

具体的な修飾を以下に詳細に論じる。

#### 【0312】

##### リン酸基

リン酸基は、負に荷電した種である。電荷は、2 つの非結合酸素原子 (すなわち、上記式 1 中の  $X$  および  $Y$ ) に均等に分布している。しかしながら、リン酸基は、酸素原子の 1 つを異なる置換基で置換することによって修飾しても差し支えない。RNA リン酸骨格に対するこの修飾の 1 つの結果は、ヌクレアーゼ分解に対するオリゴリボヌクレオチドの耐性の増大であり得る。したがって、理論に束縛されることを望まないが、いくつかの実施の形態では、非荷電リンカーまたは非対称の電荷分布を有する荷電リンカーのいずれかを生じさせる改変を導入することが望ましい可能性がある。

#### 【0313】

修飾リン酸基の例としては、ホスホロチオエート、ホスホロセネート、ボラノホスフェート、ボラノリン酸エステル、水素ホスホネート、ホスホロアミデート、アルキルまたはアリールホスホネートおよびホスホトリエステルが挙げられる。ホスホロジチオエートは、両方の非結合酸素が硫黄に置換されている。 $X$  または  $Y$  の一方のみが改変される状況とは異なり、ホスホロジチオエートにおけるリン中心はアキラルであり、アキラルはオリゴリボヌクレオチドのジアステレオマーの形成を妨害する。ジアステレオマー形成により、個々のジアステレオマーがヌクレアーゼに対してさまざまな耐性を示す調製物が生じ得る。さらに、キラルリン酸基を含有する RNA のハイブリダイゼーション親和性は、対応する未修飾の RNA 種と比べてより低い可能性がある。したがって、理論に束縛されることを望まないが、ジアステレオマー混合物を産生することができないという点で、キラル中心を排除する  $X$  と  $Y$  の両方に対する修飾 (例えば、ホスホロジチオエート形成) が望ましいであろう。したがって、 $X$  は、 $S$ 、 $Se$ 、 $B$ 、 $C$ 、 $H$ 、 $N$ 、または  $OR$  ( $R$  はアルキルもしくはアリールである) のいずれか 1 つであり得る。したがって、 $Y$  は、 $S$ 、 $Se$ 、 $B$ 、 $C$ 、 $H$ 、 $N$ 、または  $OR$  ( $R$  はアルキルもしくはアリールである) のいずれか 1 つであり得る。 $X$  および  $Y$  または  $Y$  を硫黄で置換することが可能である。

#### 【0314】

リン酸リンカーは、結合酸素 (すなわち、上記式 1 中の  $W$  または  $Z$ ) を、窒素 (架橋ホ

10

20

30

40

50

スホラロアミデート)、硫黄(架橋ホスホロチオエート)、および炭素(架橋メチレンホスホネート)で置換することによって修飾することもできる。置換は、末端の酸素(位置W(3'))または位置Z(5'))で生じ得る。Wを炭素で置換すること、またはZを窒素で置換することが可能である。

#### 【0315】

候補となる薬剤を、以下に記載するように好適性について評価することができる。

#### 【0316】

##### 糖基

修飾RNAは、リボ核酸の糖基の全てまたはいくつかの修飾を含むことができる。例えば、2'ヒドロキシル基(OH)は、多数の異なる「オキシ」または「デオキシ」置換基で修飾または置換することができる。理論によって束縛されるものではないが、ヒドロキシルはもはや、2'アルコキシドイオンを形成するように脱プロトン化できないので、安定性の向上が予測される。2'アルコキシドは、リンカーのリン原子への分子内求核攻撃による分解を触媒することができる。重ねて、理論によって束縛されることを望まないが、2'位でのアルコキシド形成が可能でない改変を導入することが、いくつかの実施の形態に対して望ましい可能性がある。

#### 【0317】

「オキシ」-2'ヒドロキシル基修飾の例としては、アルコキシまたはアリアルオキシ(OR、例えば、R=H、アルキル、シクロアルキル、アリアル、アラルキル、ヘテロアリアル、または糖)；ポリエチレングリコール(PEG)、O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OR；2'ヒドロキシルが、例えば、メチレン架橋によって同じリボース糖の4'炭素に結合されている「ロックされた」核酸(LNA)；O-AMINE(AMINE=NH<sub>2</sub>；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリアルアミノ、ジアリアルアミノ、ヘテロアリアルアミノ、またはジヘテロアリアルアミノ、エチレンジアミン、ポリアミノ)およびアミノアルコキシ、O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>AMINE(例えば、AMINE=NH<sub>2</sub>；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリアルアミノ、ジアリアルアミノ、ヘテロアリアルアミノ、またはジヘテロアリアルアミノ、エチレンジアミン、ポリアミノ)が挙げられる。メトキシエチル基(MOE)(PEG誘導体である、OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)のみを含有するオリゴヌクレオチドが堅固なホスホロチオエート修飾で修飾されたものに匹敵するヌクレアーゼ安定性を示すことは注目すべきことである。

#### 【0318】

「デオキシ」修飾としては、水素(すなわち、デオキシリボース糖、これは、部分的にdsのRNAの突出部に特に関連する)；ハロ(例えば、フルオロ)；アミノ(例えば、NH<sub>2</sub>；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリアルアミノ、ジアリアルアミノ、ヘテロアリアルアミノ、ジヘテロアリアルアミノ、またはアミノ酸)；NH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH)<sub>n</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-AMINE(AMINE=NH<sub>2</sub>；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリアルアミノ、ジアリアルアミノ、ヘテロアリアルアミノ、またはジヘテロアリアルアミノ)、NHC(O)R(R=アルキル、シクロアルキル、アリアル、アラルキル、ヘテロアリアル、または糖)、シアノ；メルカプト；アルキル-チオ-アルキル；チオアルコキシ；並びにアルキル、シクロアルキル、アリアル、アルケニル、およびアルキニル(これらは任意で、例えば、アミノ官能基で置換されていてもよい)が挙げられる。ある実施の形態の他の置換基としては、2'-メトキシエチル、2'-OCH<sub>3</sub>、2'-O-アリル、2'-C-アリル、および2'-フルオロが挙げられる。

#### 【0319】

糖基は、リボース中の対応する炭素の立体化学的配置とは反対の立体化学的配置を有する1つ以上の炭素を含有することもできる。したがって、修飾RNAは、糖として、例えば、アラビノースを含有するヌクレオチドを含んで差し支えない。

#### 【0320】

修飾RNAは、C-1'にヌクレオ塩基を欠く「無塩基」糖を含むこともできる。これ

10

20

30

40

50

らの無塩基糖は、構成成分の糖原子の1つ以上における修飾をさらに含有することもできる。

#### 【0321】

ヌクレアーゼ耐性を最大にするために、2'修飾を、1つ以上のリン酸リンカー修飾（例えば、ホスホロチオエート）と組み合わせて使用することができる。いわゆる「キメラ」オリゴヌクレオチドは、2つ以上の異なる修飾を含有するオリゴヌクレオチドである。

#### 【0322】

候補となる修飾を下記のように評価することができる。

#### 【0323】

#### リン酸基の置換

リン酸基は、リン以外のものを含有する接続部（上記式1中の括弧I参照）で置換することができる。理論によって束縛されることを望まないが、荷電したホスホジエステル基はヌクレアーゼ分解における反応中心なので、これを中性の構造模倣物で置換することは、向上したヌクレアーゼ安定性を付与するはずであると考えられている。重ねて、理論によって束縛されることを望まないが、いくつかの実施の形態において、荷電したリン酸基が中性部分に置換される改変を導入することが望ましい可能性がある。

#### 【0324】

リン酸基を置換することができる部分の例としては、シロキサン、カーボネート、カルボキシメチル、カルバメート、アミド、チオエーテル、エチレンオキシドリンカー、スルホネート、スルホンアミド、チオホルムアセタール、ホルムアセタール、オキシム、メチレンイミノ、メチレンメチルイミノ、メチレンヒドラゾ、メチレンジメチルヒドラゾ、およびメチレンオキシメチルイミノが挙げられる。ある実施の形態では、置換には、メチレンカルボニルアミノ基およびメチレンメチルイミノ基が含まれてもよい。

#### 【0325】

候補となる修飾を下記のように評価することができる。

#### 【0326】

#### リン酸骨格の置換

リン酸リンカーおよびリボース糖が、ヌクレアーゼ耐性のヌクレオシドまたはヌクレオチドの代用物（式1中の括弧II参照）で置換されているオリゴヌクレオチド模倣足場を構築することもできる。理論によって束縛されることを望まないが、繰り返し荷電された骨格が存在しなければ、ポリアニオンを認識するタンパク質（例えば、ヌクレアーゼ）への結合が減少すると考えられている。重ねて、理論によって束縛されることを望まないが、いくつかの実施の形態において、塩基が中性の代用骨格によって連結される改変を導入することが望ましい可能性がある。

#### 【0327】

例としては、モルホリノ、シクロブチル、ピロリジン、およびペプチド核酸（PNA）というヌクレオシド代用物が挙げられる。ある実施の形態では、PNA代用物を使用してもよい。

#### 【0328】

候補となる修飾を下記のように評価することができる。

#### 【0329】

#### 末端修飾

オリゴヌクレオチドの3'末端および5'末端を修飾することができる。このような修飾は、分子の3'末端、5'末端、または両方の末端においてなされ得る。これらの修飾は、末端のリン酸全体または末端リン酸基の1つ以上の原子の修飾または置換を含むことができる。例えば、オリゴヌクレオチドの3'末端および5'末端を、他の機能的分子実体、例えば、標識部分、例えば、フルオロフォア（例えば、ピレン、TAMRA、フルオレセイン、Cy3色素もしくはCy5色素）または保護基（例えば、硫黄、ケイ素、ホウ素、もしくはエステルをベースにしたもの）に結合することができる。機能的分子実体は、リン酸基および/またはスペーサを介して糖に取り付けることが可能である。スペーサ

10

20

30

40

50

の末端原子は、リン酸基の結合原子または糖の C - 3' もしくは C - 5' の O 基、N 基、S 基、もしくは C 基に接続するかまたはこれらに置き換わることができる。あるいは、スパーサは、ヌクレオチド代用物（例えば、PNA）の末端原子に接続するかまたはこれに置き換わることができる。これらのスパーサまたはリンカーとしては、例えば、 $-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_nN-$ 、 $-(CH_2)_nO-$ 、 $-(CH_2)_nS-$ 、 $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OH$ （例えば、 $n = 3$  または  $6$ ）、無塩基糖、アミド、カルボキシ、アミン、オキシアミン、オキシイミン、チオエーテル、ジスルフィド、チオ尿素、スルホンアミド、もしくはモルホリノ、またはビオチン試薬およびフルオレセイン試薬を挙げることができる。「スパーサ/リン酸 - 機能的分子実体 - スパーサ/リン酸」という配列が、iRNA 二重鎖剤の 2 つの鎖の間に介在するとき、この配列は、ヘアピン型 RNA 剤中のヘアピン RNA ループの代わりになり得る。3' 末端は -OH 基とすることができる。理論に束縛されることを望まないが、特定の部分の結合は、輸送特性、ハイブリダイゼーション特性、および特異性を改善することができると考えられている。重ねて、理論に束縛されることを望まないが、ヌクレアーゼ耐性を改善する末端の改変を導入することが望ましいであろう。末端修飾の他の例としては、色素、挿入剤（例えば、アクリジン）、架橋剤（例えば、プソラレン、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（例えば、EDTA）、親油性担体（例えば、コレステロール、コール酸、アダマンタン酢酸、1 - ビレン酪酸、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、またはフェノキサジン）、およびペプチド複合体（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、放射性標識マーカー、酵素、ハプテン（例えば、ビオチン）、輸送/吸収促進物質（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、テトラアザマクロ環の  $Eu^{3+}$  錯体）が挙げられる。

【0330】

末端修飾は、本明細書の他の箇所で論じられるように、活性を調節するため、または分解に対する耐性を調節するためを含む、多くの理由のために加えることができる。活性を調節するために有用な末端修飾には、リン酸またはリン酸類似体による 5' 末端の修飾が含まれる。例えば、ある実施の形態では、iRNA 二重鎖剤、とりわけアンチセンス鎖は、5' リン酸化されているか、または 5' プライム末端にホスホリル類似体を含む。5' リン酸修飾には、RISC を介した遺伝子発現抑制と適合可能なものが含まれる。好適な修飾としては、5' モノホスフェート（ $(HO)_2(O)P-O-5'$ ）；5' ジホスフェート（ $(HO)_2(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'$ ）；5' トリホスフェート（ $(HO)_2(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'$ ）；5' - グアノシンキャップ（7 - メチル化または非メチル化）（ $7m-G-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'$ ）；5' - アデノシンキャップ（Appp）、および任意の修飾または非修飾ヌクレオチドキャップ構造（ $N-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'$ ）；5' モノチオホスフェート（ホスホロチオエート； $(HO)_2(S)P-O-5'$ ）；5' モノジチオホスフェート（ホスホロジチオエート； $(HO)(HS)(S)P-O-5'$ ）、5' - ホスホロチオレート（ $(HO)_2(O)P-S-5'$ ）；酸素/硫黄置換モノホスフェート、ジホスフェート、およびトリホスフェートの任意のさらなる組合せ（例えば、5' - -チオトリホスフェート、5' - -チオトリホスフェートなど）、5' - ホスホロアミデート（ $(HO)_2(O)P-NH-5'$ 、 $(HO)(NH_2)(O)P-O-5'$ ）、5' - アルキルホスホネート（ $R = \text{アルキル} = \text{メチル、エチ}$

ル、イソプロピル、プロピルなど、例えば、 $RP(OH)(O)-O-5'$ 、 $(OH)_2(O)P-5'-CH_2$ ）、 $5'$ -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、 $RP(OH)(O)-O-5'$ ）が含まれる。

#### 【0331】

末端修飾は、分解に対する耐性を増大させるのに有用であり得る。

#### 【0332】

末端修飾は、分布をモニタするためにも有用であり得るが、このような場合、付加すべき基としては、フルオロフォア（例えば、フルオレセイン）または *Alexa* 色素（例えば、*Alexa 488*）が挙げられる。末端修飾は、摂取を増強するためにも有用であり得るが、このために有用な修飾にはコレステロールが含まれる。末端修飾は、RNA 剤を別の部分に架橋するためにも有用であり得るが、このための有用な修飾にはマイトマイシン C が含まれる。

10

#### 【0333】

候補となる修飾を下記のように評価することができる。

#### 【0334】

#### 塩基

アデニン、グアニン、シトシン、およびウラシルは、RNA に見られる最も一般的な塩基である。これらの塩基は、改善された特性を有する RNA を提供するために修飾または置換することができる。例えば、ヌクレアーゼ耐性オリゴヌクレオチドは、これらの塩基を用いて、または合成および天然のヌクレオ塩基（例えば、イノシン、チミン、キサンチン、ヒポキサンチン、ヌブラリン (nubularine)、イソグアニシン (isoguanisine)、またはツベルシジン）および上記の修飾のいずれか 1 つを用いて調製することができる。あるいは、上記の塩基および「汎用的な塩基」のいずれかの置換類似体または修飾類似体を利用することができる。例としては、2-アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの 6-メチルおよび他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの 2-プロピルおよび他のアルキル誘導体、5-ハロウラシルおよび 5-ハロシトシン、5-プロピニルウラシルおよび 5-プロピニルシトシン、6-アゾウラシル、6-アゾシトシン、および 6-アゾチミン、5-ウラシル（シュードウラシル）、4-チオウラシル、5-ハロウラシル、5-（2-アミノプロピル）ウラシル、5-アミノアリルウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシル、および他の 8-置換アデニンならびにグアニン、5-トリフルオロメチルおよび他の 5-置換ウラシルおよびシトシン、7-メチルグアニン、5-置換ピリミジン、6-アザピリミジン、および N-2 置換プリン、N-6 置換プリン、および O-6 置換プリン（2-アミノプロピルアデニンを含む）、5-プロピニルウラシルおよび 5-プロピニルシトシン、ジヒドロウラシル、3-デアザ-5-アザシトシン、2-アミノプリン、5-アルキルウラシル、7-アルキルグアニン、5-アルキルシトシン、7-デアザアデニン、N6, N6-ジメチルアデニン、2, 6-ジアミノプリン、5-アミノ-アリル-ウラシル、N3-メチルウラシル、置換 1, 2, 4-トリアゾール、2-ピリジノン、5-ニトロインドール、3-ニトロピロール、5-メトキシウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸、5-メトキシカルボニルメチルウラシル、5-メチル-2-チオウラシル、5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウラシル、5-メチルアミノメチル-2-チオウラシル、3-（3-アミノ-3-カルボキシプロピル）ウラシル、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N<sup>4</sup>-アセチルシトシン、2-チオシトシン、N6-メチルアデニン、N6-イソペンチルアデニン、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、N-メチルグアニン、または O-アルキル化塩基が挙げられる。さらなるプリンおよびピリミジンとしては、米国特許第 3 687 808 号明細書に開示されているもの、the Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990 に開示されているもの、および Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613 に開示されているものが挙げられる。

20

30

40

50

## 【0335】

一般に、塩基の変化は、安定性を促進するためには使用されないが、他の理由のために有用である可能性があり、例えば、いくつかのもの（例えば、2, 6 - ジアミノプリンおよび2アミノプリン）は蛍光性である。修飾塩基は、標的特異性を低下させることがあり得る。このことは、iRNA二重鎖剤の設計において考慮されるであろう。

## 【0336】

候補となる修飾を下記のように評価することができる。

## 【0337】

候補RNAの評価

候補RNA剤（例えば、修飾RNA）を、そのRNA剤または修飾分子および対照分子を適当な条件に曝露し、選択された特性の存在について評価することによって、選択された特性について評価することができる。例えば、分解物質に対する耐性は、以下のように評価することができる。候補となる修飾RNA（および対照分子、通常は未修飾形態）を、分解的な条件、例えば、分解作用物質（例えば、ヌクレアーゼ）を含む環境に曝露することができる。例えば、生物学的試料、例えば、治療的使用において遭遇し得る環境、例えば、血液または細胞画分（例えば、無細胞ホモジネートまたは破碎された細胞）と類似の生物学的試料を使用することができる。その後、候補および対照を、多数の手法のいずれによって、分解に対する耐性について評価しても差し支えない。例えば、候補および対照を、例えば、放射性標識もしくは酵素標識、または蛍光標識（例えば、Cy3もしくはCy5）を用いて、曝露の前に標識付けることができる。対照RNAおよび修飾RNAを、分解作用物質、および必要に応じて、対照（例えば、不活化された（例えば、熱不活化された）分解作用物質）とともにインキュベーションすることができる。その後、物理学的パラメータ（例えば、修飾分子および対照分子のサイズ）を決定する。これらのパラメータを、物理学的方法によって（例えば、ポリアクリルアミドゲル電気泳動またはサイズ分画カラムによって）、その分子がそのもとの長さを維持していたかどうかを評価するために決定するか、または機能的に評価することができる。あるいは、ノーザンブロット分析を用いて、未標識の修飾分子の長さを検定することができる。

## 【0338】

機能的アッセイを用いて、候補薬剤を評価することもできる。機能的アッセイは、修飾によって、遺伝子発現を抑制する分子の能力が変化するか否かを決定するために、最初に、または前の非機能的アッセイ（例えば、分解に対する耐性についてのアッセイ）の後で適用することができる。例えば、細胞（例えば、マウスまたはヒトの細胞などの哺乳類細胞）に、蛍光タンパク質（例えば、GFP）を発現するプラスミドと、その蛍光タンパク質をコードする転写物に相同な候補RNA剤を同時トランスフェクションすることができる（例えば、国際公開第00/44914号パンフレット参照）。例えば、GFP mRNAに相同な修飾dsRNAは、トランスフェクションに候補dsRNAを含めなかった対照細胞（例えば、RNA剤が添加されなかった対照、および/または未修飾RNAが添加された対照）と比較して、細胞の蛍光の減少についてモニタすることによって、GFP発現を阻害する能力について検定することができる。遺伝子発現に対する候補薬剤の効力は、修飾dsRNA剤および未修飾dsRNA剤の存在下での細胞の蛍光を比較することによって評価することができる。

## 【0339】

代わりの機能的アッセイにおいて、内在性マウス遺伝子（例えば、c-mosなどの母性発現遺伝子）に相同な候補dsRNA剤を未成熟のマウス卵母細胞に注入して、インビボで遺伝子発現を阻害するiRNA剤の能力を評価することができる（例えば、国際公開第01/36646号パンフレット参照）。卵母細胞の表現型（例えば、第II中期での停止を維持する能力）を、RNA剤が発現を阻害する指標としてモニタすることができる。例えば、dsRNA剤によるc-mos mRNAの開裂は、卵母細胞に中期での停止を抜け出させ、単為生殖的発生を開始させるであろう（Colledge et al. Nature 370: 65-68, 1994; Hashimoto et al. Nature, 370:68-71, 1994）。標的RNAレベルに

10

20

30

40

50

対する修飾RNA剤の効果は、陰性対照と比較して、標的mRNAのレベルの減少について検定するためのノーザンブロット法によって、または標的タンパク質のレベルの減少について検定するためのウェスタンブロット法によって確認することができる。対照としては、RNA剤が添加されない細胞、および/または未修飾RNAが添加される細胞が挙げられる。

#### 【0340】

##### 定義

「ハロ」という用語は、フッ素、塩素、臭素、またはヨウ素のうちの任意の基を称する。「アルキル」という用語は、表示された数の炭素原子を含み、必要に応じてN、O、またはSが挿入され得る、直鎖または分岐鎖であり得る飽和および不飽和の非芳香族炭化水素鎖（これらは、プロピル、アリル、またはプロパルギルを含むが、これらに限定されない）を称する。例えば、 $C_1 \sim C_{10}$ は、この基がその中に1～10個（含む）の炭素原子を有し得ることを意味する。「アルコキシ」という用語は、-O-アルキル基を称する。「アルキレン」という用語は、二価アルキル（すなわち、-R-）を称する。「アルキレンジオキシ」という用語は、-O-R-O-（式中、Rはアルキレンを表す）という構造の二価種を称する。「アミノアルキル」という用語は、アミノで置換されたアルキルを称する。「メルカプト」という用語は、-SH基を称する。「チオアルコキシ」という用語は、-S-アルキル基を称する。

10

#### 【0341】

「アリール基」という用語は、各環の0個、1個、2個、3個、または4個の原子が、置換基によって置換され得る、6炭素の単環式または10炭素の二環式の芳香環系を称する。アリール基の例としては、フェニル、ナフチルなどが挙げられる。「アリールアルキル」または「アラルキル」という用語は、アリールで置換されたアルキルを称する。「アリールアルコキシ」という用語は、アリールで置換されたアルコキシを称する。

20

#### 【0342】

本明細書で用いられる「シクロアルキル」という用語は、3から12個の炭素、例えば、3から8個の炭素、および例えば、3から6個の炭素を有する、飽和または部分飽和の環式炭化水素基を含み、シクロアルキル基はさらに、必要に応じて置換されていてもよい。シクロアルキル基としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロペンテニル、シクロヘキシル、シクロヘキセニル、シクロヘプチル、およびシクロオクチルが挙げられるが、これらに限定されない。

30

#### 【0343】

「ヘテロアリール」という用語は、単環式の場合には1～3個のヘテロ原子を、二環式の場合には1～6個のヘテロ原子を、または三環式の場合には1～9個のヘテロ原子を有する、5～8員の芳香族単環式環系、8～12員の芳香族二環式環系、または11～14員の芳香族三環式環系を称し、そのヘテロ原子は、O、N、またはSから選択され（例えば、単環、二環、または三環の場合、炭素原子と、それぞれ、1～3個、1～6個、または1～9個のN、O、またはSのヘテロ原子）、そこで、各環の0個、1個、2個、3個、または4個の原子は、置換基によって置換されていてもよい。ヘテロアリール基の例としては、ピリジル、フリルまたはフラニル、イミダゾリル、ベンズイミダゾリル、ピリミジニル、チオフェニルまたはチエニル、キノリニル、インドリル、チアゾリルなどが挙げられる。「ヘテロアリールアルキル」という用語または「ヘテロアラルキル」という用語は、ヘテロアリールで置換されたアルキルを称する。「ヘテロアリールアルコキシ」という用語は、ヘテロアリールで置換されたアルコキシを称する。

40

#### 【0344】

「ヘテロシクリル」という用語は、単環式の場合には1～3個のヘテロ原子を、二環式の場合には1～6個のヘテロ原子を、または三環式の場合には1～9個のヘテロ原子を有する、5～8員の非芳香族単環式環系、8～12員の非芳香族二環式環系、または11～14員の非芳香族三環式環系を称し、そのヘテロ原子は、O、N、またはSから選択され（例えば、単環、二環、または三環の場合、炭素原子と、それぞれ、1～3個、1～6個

50

、または 1 ~ 9 個の N、O、または S のヘテロ原子)、そこで、各環の 0 個、1 個、2 個、または 3 個の原子は、置換基により置換されていてもよい。ヘテロシクリル基の例としては、トリゾリル、テトラゾリル、ピペラジニル、ピロリジニル、ジオキサニル、モルホニル、テトラヒドロフラニルなどが挙げられる。

【0345】

「オキシ」という用語は、炭素に結合した場合にはカルボニルを、窒素に結合した場合には N - オキシドを、および硫黄に結合した場合にはスルホキシドまたはスルホン形成する酸素原子を指す。

【0346】

「アシル」という用語は、アルキルカルボニル置換基、シクロアルキカルボニル置換基、アリールカルボニル置換基、ヘテロシクリルカルボニル置換基、またはヘテロアリールカルボニル置換基を称し、これらはいずれも、置換基によってさらに置換されていてもよい。

【0347】

「置換された」という用語は、所定の構造中の 1 つ以上の水素基と、以下に限られないが：

ハロ、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロシクリル、チオール、アルキルチオ、アリールチオ、アルキルチオアルキル、アリールチオアルキル、アルキルスルフォニル、アルキルスルフォニルアルキル、アリールスルフォニルアルキル、アルコキシ、アリールオキシ、アラルコキシ、アミノカルボニル、アルキルアミノカルボニル、アリールアミノカルボニル、アルコキシカルボニル、アリールオキシカルボニル、ハロアルキル、アミノ、トリフルオロメチル、シアノ、ニトロ、アルキルアミノ、アリールアミノ、アルキルアミノアルキル、アリールアミノアルキル、アミノアルキルアミノ、ヒドロキシ、アルコキシアルキル、カルボキシアルキル、アルコキシカルボニルアルキル、アミノカルボニルアルキル、アシル、アラルコキシカルボニル、カルボン酸、スルホン酸、スルホニル、ホスホン酸、アリール、ヘテロアリール、複素環式、および脂肪族を含む、特定の置換基の基との置換を称する。置換基をさらに置換することができることが理解される。

【0348】

パリンドローム

本発明の iRNA 二重鎖剤は、2 つ以上の RNA 領域を標的とすることができる。例えば、iRNA 二重鎖剤は、ハイブリダイズするのに互いに十分に相補的な第 1 の配列と第 2 の配列を含むことができる。第 1 の配列は第 1 の標的 RNA 領域に相補的であることができ、第 2 の配列は第 2 の標的 RNA 領域に相補的であることができる。iRNA 二重鎖剤の第 1 の配列と第 2 の配列が異なる RNA 鎖上にあることができ、かつ第 1 の配列と第 2 の配列の間の不一致が、50 % 未満、40 % 未満、30 % 未満、20 % 未満、10 % 未満、5 % 未満、または 1 % 未満であり得る。iRNA 二重鎖剤の第 1 の配列と第 2 の配列が同じ RNA 鎖上にあることができ、かつ関連する実施の形態では、iRNA 二重鎖剤の 50 % よりも多く、60 % よりも多く、70 % よりも多く、80 % よりも多く、90 % よりも多く、95 % よりも多く、または 1 % よりも多きが、2 分子の形態であることができる。iRNA 二重鎖剤の第 1 の配列と第 2 の配列は、互いに完全に相補的であることができる。

【0349】

第 1 の標的 RNA 領域が第 1 の遺伝子によってコードされることができ、かつ第 2 の標的 RNA 領域が第 2 の遺伝子によってコードされることができ、または第 1 の標的 RNA 領域と第 2 の標的 RNA 領域が単一遺伝子由来の RNA の異なる領域であることができる。第 1 の配列と第 2 の配列は、少なくとも 1 つのヌクレオチド異なり得る。

【0350】

第 1 と第 2 の標的 RNA 領域は、遺伝子の第 1 と第 2 の配列変異体（例えば、第 1 と第 2 の対立遺伝子）によってコードされる転写物上にあることができる。これらの配列変異

体は、例えば、突然変異、または多型であることができる。第1の標的RNA領域は、第2の標的RNA領域と比べて、ヌクレオチドの置換、挿入、もしくは欠失を含むことができる、または第2の標的RNA領域は、第1の標的領域の突然変異体または変異体であることができる。

【0351】

第1と第2の標的RNA領域は、ウイルスRNA領域またはヒトRNA領域を含むことができる。第1と第2の標的RNA領域は、オンコジーンの変異転写物上にあることもでき、または腫瘍抑制遺伝子転写物の異なる突然変異を含むこともできる。さらに、第1と第2の標的RNA領域は、遺伝子変異のホットスポットに対応することができる。

【0352】

本発明の組成物は、iRNA二重鎖剤分子の混合物を含むことができる。例えば、1つのiRNA二重鎖剤が、ハイブリダイズするのに互いに十分に相補的な第1の配列と第2の配列を含有することができ、さらに、第1の配列が第1の標的RNA領域に相補的であり、かつ第2の配列が第2の標的RNA領域に相補的である。その混合物は、ハイブリダイズするのに互いに十分に相補的な第3の配列と第4の配列を含む少なくとも1つの追加のiRNA二重鎖剤種を含むこともでき、この場合、第3の配列が第3の標的RNA領域に相補的であり、かつ第4の配列が第4の標的RNA領域に相補的である。さらに、第1または第2の配列が、第3または第4の配列に対して、互いにハイブリダイズするのに十分に相補的であることができる。第1と第2の配列は同じまたは異なるRNA鎖上にあることができ、第3と第4の配列は同じまたは異なるRNA鎖上にあることができる。

【0353】

標的RNA領域は、ウイルスまたはヒトRNAの変異体配列であることができ、ある実施の形態では、標的RNA領域の少なくとも2つが、オンコジーンまたは腫瘍抑制遺伝子の変異体転写物であることができる。標的RNA領域は、遺伝子のホットスポットに対応することができる。

【0354】

iRNA二重鎖剤組成物を作製する方法は、その領域が（例えば、ヒトにおける）高度の変異性または突然変異頻度を有する、標的遺伝子（例えば、ウイルス遺伝子もしくはヒト遺伝子、またはオンコジーンもしくは腫瘍抑制遺伝子、例えば、p53）のRNAの領域に関する情報を入手または提供することを含むことができる。さらに、その領域内の複数のRNA標的に関する情報を入手または提供することができ、その場合、各々のRNA標的が、遺伝子の異なる変異体または突然変異体（例えば、p53 248Qおよび/またはp53 249Sをコードするコドンを含む領域）に対応する。第1の配列が（例えば、249Qをコードする）複数の変異体RNA標的のうちの第1の標的と相補的であり、第2の配列が（例えば、249Sをコードする）複数の変異体RNA標的のうちの第2の標的と相補的であり、かつ第1と第2の配列がハイブリダイズするのに十分に相補的であり得るように、iRNA二重鎖剤を構築することができる。

【0355】

例えば、標的遺伝子中の共通の突然変異体を同定するために、配列分析を使用して、高度の変異性または突然変異頻度を有する標的遺伝子の領域を同定することができる。高度の変異性または突然変異頻度を有する標的遺伝子の領域は、個体群由来の標的遺伝子についての遺伝子型情報を入手または提供することによって同定することができる。

【0356】

互いにハイブリダイズするのに十分に相補的な第1と第2の配列を有するiRNA二重鎖剤を提供することによって、標的遺伝子の発現を調節する（例えば、下方調節または抑制）することができる。さらに、第1の配列が第1の標的RNA領域に相補的であることができ、かつ第2の配列が第2の標的RNA領域に相補的であることができる。

【0357】

iRNA二重鎖剤は、第1の変異体RNA標的領域に相補的な第1の配列と第2の変異体RNA標的領域に相補的な第2の配列とを含むことができる。この第1と第2の変異体

10

20

30

40

50

R N A 標的領域は、標的遺伝子（例えば、ウイルス遺伝子、腫瘍抑制遺伝子、またはオンコジーン）の第 1 と第 2 の変異体または第 1 と第 2 の突然変異体に対応することができる。第 1 と第 2 の変異体標的 R N A 領域は、標的遺伝子の対立遺伝子変異体、突然変異体（例えば、点突然変異体）、または多型を含むことができる。第 1 と第 2 の変異体 R N A 標的領域は、遺伝子のホットスポットに対応することができる。

#### 【 0 3 5 8 】

複数の i R N A 二重鎖剤（例えば、パネルまたはバンク）を提供することができる。

#### 【 0 3 5 9 】

#### 他の実施の形態

また別の実施の形態では、i R N A 剤は、例えば、細胞に送達される外来の D N A 鋳型から、インビボで細胞において産生される。例えば、D N A 鋳型をベクターに挿入し、遺伝子治療ベクターとして使用することができる。遺伝子治療ベクターは、例えば、静脈内注射、局所投与（米国特許第 5 3 2 8 4 7 0 号明細書）によって、または定位注射（例えば、Chen et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3054-3057 参照）によって、対象に送達することができる。遺伝子治療ベクターの医薬調製物は、許容される希釈剤中に遺伝子治療ベクターを含むことができ、または遺伝子送達ビヒクルが包埋される徐放性マトリクスを含むことができる。例えば、D N A 鋳型は、2 つの転写ユニット、すなわち、i R N A 二重鎖剤の上部の鎖を含む転写物を産生するものと、i R N A 二重鎖剤の下部の鎖を含む転写物を産生するものを含むことができる。鋳型が転写されると、i R N A 二重鎖剤が産生され、プロセッシングを受けて遺伝子発現抑制を仲介する s i R N A 剤断片となる。

#### 【 0 3 6 0 】

#### 生理学的效果

本明細書に記載される i R N A 二重鎖剤は、治療上の毒性の決定が、i R N A 二重鎖剤と、ヒト配列および非ヒト動物配列の両方との相補性によってより容易になされるように設計することができる。これらの方法により、i R N A 二重鎖剤は、ヒト由来の核酸配列および少なくとも 1 種類の非ヒト動物、例えば、非ヒト哺乳類（例えば、齧歯類、反芻類、または霊長類）由来の核酸配列に完全に相補的である配列からなることができる。例えば、非ヒト哺乳類は、マウス、ラット、イヌ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、サル、ビグミーチンパンジー (Pan Paniscus)、ナミチンパンジー (Pan troglodytes)、アカゲザル (Macaca mulatto)、またはカニクイザル (Cynomolgus monkey) であることができる。i R N A 二重鎖剤の配列は、非ヒト哺乳類およびヒトの相同遺伝子（例えば、オンコジーンまたは腫瘍抑制遺伝子）内の配列に相補的であることができる。非ヒト哺乳類における i R N A 二重鎖剤の毒性を決定することによって、ヒトにおける i R N A 二重鎖剤の毒性を推定することができる。より厳しい毒性試験のためには、i R N A 二重鎖剤を、ヒトおよび 2 種類以上（例えば、2 種類または 3 種類またはそれより多く）の非ヒト動物に対して相補的とすることができる。

#### 【 0 3 6 1 】

本明細書に記載された方法は、ヒトに対する i R N A 二重鎖剤の任意の生理学的效果、例えば、任意の望ましくない効果（例えば、毒性効果）、または任意の有益な、もしくは所望の効果と関連させるために使用することができる。

#### 【 0 3 6 2 】

i R N A 調製物は、別の薬剤、例えば、別の治療剤または i R N A を安定化させる薬剤、例えば、i R N A と複合体を形成して i R N P を形成するタンパク質と組み合わせて配合することができる。さらに他の薬剤としては、キレート化剤、例えば、E D T A（例えば、 $Mg^{2+}$  などの二価陽イオンを除去するため）、塩、N R a s e 阻害剤（例えば、R N a s i n（登録商標）などの広い特異性の N R a s e 阻害剤）などが挙げられる。

#### 【 0 3 6 3 】

#### 送達経路

i R N A を含む組成物は種々の経路で対象に送達することができる。例示的な経路とし

ては、静脈内経路、局所経路、経直腸経路、経肛門経路、経膈経路、経鼻経路、経肺経路、および経眼経路が挙げられる。

#### 【0364】

本発明の*iRNA*分子は、投与に適した医薬組成物中に組み入れることができる。このような組成物は、典型的には、1種類以上の*iRNA*と薬学的に許容される担体とを含む。ここに用いたように、「薬学的に許容される担体」という用語は、医薬品の投与に適合する任意かつ全ての溶媒、分散媒、コーティング剤、抗菌剤および抗真菌剤、等張な吸収遅延剤などを含むことが意図されている。薬学的活性のある物質としてこのような媒体および薬剤を使用することは、当技術分野で周知である。従来の媒体および薬剤がいずれも活性化化合物に適合しない場合を除き、組成物に従来の媒体および薬剤を使用することが考  
10

#### 【0365】

本発明の組成物は、局所処置または全身処置のどちらが所望されるかによって、かつ処置すべき領域によって、多くの方法で投与され得る。投与は、局所（経眼、経膈、経直腸、経鼻、経皮を含む）、経口、または非経口であってよい。非経口投与としては、静脈内点滴、皮下注射、腹腔内注射、もしくは筋肉内注射、または髄腔内投与もしくは脳室内投与が挙げられる。

#### 【0366】

投与の経路および部位は標的化を増大させるように選択してもよい。例えば、筋細胞を標的とする場合、対象となる筋肉に筋肉内注射することは、論理的な選択であろう。肺細胞は、エアロゾル形態の*iRNA*を投与することによって標的とし得る。血管内皮細胞は、バルーン・カテーテルを*iRNA*でコーティングし、機械的にDNAを導入することによって標的とすることができる。  
20

#### 【0367】

#### 投薬量

1つの態様では、本発明は、対象（例えば、ヒトの対象）に、*iRNA*二重鎖剤、例えば、*siRNA*剤を投与する方法を特徴とする。本方法は、単位用量の*iRNA*二重鎖剤、例えば、*siRNA*剤、例えば、二本鎖*siRNA*剤であって、（a）二本鎖部分が19~25ヌクレオチド（nt）長、例えば、21~23ntであり、（b）標的RNA（例えば、内在性標的RNAまたは病原体標的RNA）に相補的であり、かつ必要に応じて（c）少なくとも1つの1~5ヌクレオチド長の3'突出部を含むものを投与することを含む。1つの実施の形態では、単位用量は、体重1kg当たり1.4mg未満、または体重1kg当たり10、5、2、1、0.5、0.1、0.05、0.01、0.005、0.001、0.0005、0.0001、0.00005、もしくは0.000001mg未満、および体重1kg当たり200ナノモル未満のRNA剤（例えば、約 $4.4 \times 10^{16}$ コピー）、または体重1kg当たり1500、750、300、150、75、15、7.5、1.5、0.75、0.15、0.075、0.015、0.0075、0.0015、0.00075、0.00015ナノモル未満のRNA剤である。  
30

#### 【0368】

規定量は、疾患または障害、例えば、標的RNAに関連する疾患または障害を、処置または予防するのに有効な量であり得る。単位用量は、例えば、注射（例えば、静脈内または筋肉内）、吸入投与、または局所適用によって投与することができる。いくつかの実施の形態では、投薬量は、体重1kgあたり2、1、または0.1mg未満であってもよい。  
40

#### 【0369】

いくつかの実施の形態では、単位用量は、1日に1回未満の頻度、例えば、2、4、8または30日毎よりも低い頻度で投与される。別の実施の形態では、単位用量は、頻繁には投与されない（例えば、規則正しい頻度では投与されない）。例えば、単位用量は、単回で投与されてもよい。

#### 【0370】

10

20

30

40

50

1つの実施の形態では、有効用量が他の従来の治療モダリティで投与される。1つの実施の形態では、対象はウイルス感染症であり、モダリティは、iRNA二重鎖剤（例えば、siRNA剤）以外の抗ウイルス剤である。別の実施の形態では、対象はアテローム性動脈硬化症であり、有効用量のiRNA二重鎖剤（例えば、siRNA剤）が、組み合わせて、例えば、外科的介入（例えば、血管形成術）の後に投与される。

#### 【0371】

1つの実施の形態では、対象に、初回用量および1回以上の維持用量のiRNA二重鎖剤、例えば、siRNA剤（例えば、前駆体、例えば、siRNA剤へ処理され得るより大きなiRNA二重鎖剤、もしくはiRNA二重鎖剤、例えば、siRNA剤、またはその前駆体をコードするDNA）を投与する。維持用量は、通常、初回用量よりも少ない（例えば、初回用量より半分未満）。維持投与計画は、対象を、1日に体重1kg当たり0.01μgから1.4mgの範囲、例えば、1日に体重1kg当たり10、1、0.1、0.01、0.001、または0.00001mgの用量で処置することを含む。維持用量は、例えば、5、10、または30日毎に1回しか投与されない。さらに、処置投与計画は、ある期間に亘り継続するが、その期間は、特定の疾患の性質、その重症度、および患者の全体的な状態によって変わる。ある実施の形態では、投薬は、1日に1回以下、例えば、24、36、48時間、またはそれを上回る時間に1回以下、例えば、5または8日毎に1回以下しか送達されなくてもよい。処置後、患者を、状態の変化および疾患状態の症状の緩和について、モニタすることができる。患者が現在の投薬量レベルに対してはっきりと応答しない場合、化合物の投薬量を増大させてもよいし、または疾患状態の症状の緩和が認められる場合、疾患状態が取り除かれている場合、もしくは望ましくない副作用が認められる場合には、用量を減らしてもよい。

10

20

#### 【0372】

有効用量は、特定の状況下で所望されるか、または適切と考えられるように、単回投与でまたは2回以上の投与で投与することができる。繰り返しの注入または頻繁な注入を容易にすることが望ましい場合には、送達装置（例えば、ポンプ、半永久ステント（例えば、静脈内、腹腔内、嚢内、もしくは関節内））またはリザーバを埋め込むことが望ましいことがある。

#### 【0373】

1つの実施の形態では、前記組成物は、複数のiRNA二重鎖剤種を含む。別の実施の形態では、iRNA二重鎖剤種は、天然に存在する標的配列に関して別のiRNA二重鎖剤種と重複せずかつ隣接しない配列を有する。別の実施の形態では、複数のiRNA二重鎖剤種は、天然に存在する異なる標的遺伝子に特異的である。別の実施の形態では、iRNA二重鎖剤は対立遺伝子特異的である。

30

#### 【0374】

本願の発明者等は、ここに記載されたiRNA二重鎖剤を、哺乳類、特に、非ヒト霊長類またはヒトなどの大型の哺乳類に様々な様式で投与できることを発見した。

#### 【0375】

1つの実施の形態において、iRNA二重鎖剤（例えば、siRNA剤）の組成物の投与は、非経口、例えば、静脈内（例えば、ボラスとしてまたは拡散注入として）、皮内、腹腔内、筋肉内、髄腔内、脳室内、頭蓋内、皮下、経粘膜、口腔内、舌下、経内視鏡、経直腸、経口、経膈、局所、経肺、鼻腔内、尿道、または経眼で行われる。投与は、対象者によって、または別の人（例えば、医療提供者）によって行われ得る。医薬品は、一定用量で、または定量を送達するディスペンサー中に提供され得る。選択される送達様式については、以下により詳細に論じる。

40

#### 【0376】

本発明は、本明細書に記載されたiRNA二重鎖剤を直腸投与または直腸送達するための方法、組成物およびキットを提供する。

#### 【0377】

したがって、本明細書に記載されたiRNA二重鎖剤、例えば、siRNA剤（例えば

50

、前駆体、例えば、*s i R N A* 剤へ処理され得るより大きな *i R N A* 二重鎖剤、または *i R N A* 二重鎖剤、例えば、*s i R N A* 剤、またはそれらの前駆体をコードする *D N A* )、例えば、本明細書に記載された治療的有効量の *i R N A* 二重鎖剤、例えば、40 未満のヌクレオチド、例えば、30 未満のヌクレオチドの二本鎖領域を有し、1 つまたは 2 つの 1 ~ 3 ヌクレオチドの一本鎖 3' 突出部を有する *i R N A* 二重鎖剤は、直腸投与（例えば、直腸から下部大腸または上部大腸に導入）することができる。この手法は、炎症性障害、望ましくない細胞増殖を特徴とする障害、例えば、ポリープまたは大腸癌を治療する際に、特に有用である。

#### 【0378】

1 つの態様において、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、該細胞に本発明の *i R N A* 二重鎖剤を提供する工程を含む方法を提供する。1 つの実施の形態では、標的遺伝子は、第 *V I I* 因子、*E g 5*、*P C S K 9*、*T P X 2*、*a p o B*、*S A A*、*T T R*、*R S V*、*P D G F* 遺伝子、*E r b - B* 遺伝子、*S r c* 遺伝子、*C R K* 遺伝子、*G R B 2* 遺伝子、*R A S* 遺伝子、*M E K K* 遺伝子、*J N K* 遺伝子、*R A F* 遺伝子、*E r k 1 / 2* 遺伝子、*P C N A ( p 2 1)* 遺伝子、*M Y B* 遺伝子、*J U N* 遺伝子、*F O S* 遺伝子、*B C L - 2* 遺伝子、サイクリン *D* 遺伝子、*V E G F* 遺伝子、*E G F R* 遺伝子、サイクリン *A* 遺伝子、サイクリン *E* 遺伝子、*W N T - 1* 遺伝子、 $\beta$ -カテニン遺伝子、*c - M E T* 遺伝子、*P K C* 遺伝子、*N F K B* 遺伝子、*S T A T 3* 遺伝子、サバイビン遺伝子、*H e r 2 / N e u* 遺伝子、トポイソメラーゼ *I* 遺伝子、トポイソメラーゼ *I I* 遺伝子、*p 7 3* 遺伝子の突然変異、*p 2 1 ( W A F 1 / C I P 1)* 遺伝子の突然変異、*p 2 7 ( K I P 1)* 遺伝子の突然変異、*P P M 1 D* 遺伝子の突然変異、*R A S* 遺伝子の突然変異、カベオリン *I* 遺伝子の突然変異、*M I B I* 遺伝子の突然変異、*M T A I* 遺伝子の突然変異、*M 6 8* 遺伝子の突然変異、腫瘍抑制因子遺伝子の突然変異、および *p 5 3* 腫瘍抑制因子遺伝子の突然変異からなる群から選択される。

#### 【0379】

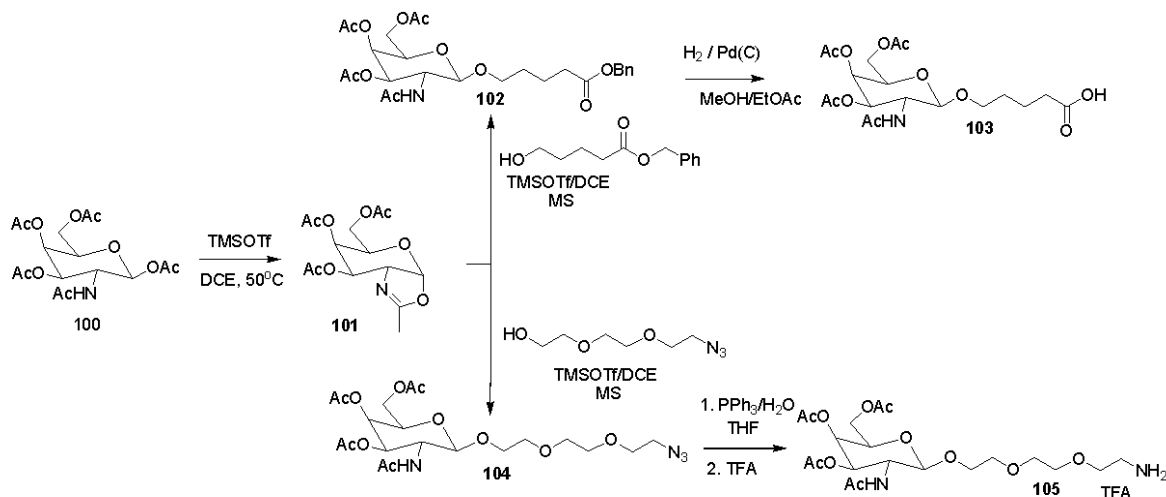
本発明を以下の実施例によってさらに説明するが、これらの実施例はさらに制限するものとみなされるべきではない。本明細書の全体を通じて引用された、参考文献、係属特許出願、および公開特許は全て、参照により本明細書に明示的に組み入れられる。

#### 【実施例】

#### 【0380】

実施例 1 . 炭水化物複合体構成ブロック 110 および 112 の合成

#### 【化 7 4】



#### 【0381】

101 の調製：

ガラクトサミンペンタアセテート 100 (52 . 00 g、133 . 63 ミリモル) を、周

囲温度でジクロロエタン (300 mL) 中に採取した。そこに、TMSOTf (44.5 g、200.44 ミリモル) を添加し、この混合物を 50 で 90 分間、水浴中で撹拌し、加熱を停止し、混合物を室温で一晩撹拌した。これを、氷冷した重炭酸ナトリウム溶液中に注ぎ入れ、ジクロロメタンで抽出し、水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を除去し、残留物を高真空下で一晩乾燥させて、化合物を暗色の粘性物質 (44.50 g、定量的) として得た。これを、さらに精製することなく、次の反応に使用した。<sup>1</sup>H NMR と MALDI で生成物の形成を確認した。MS: C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>8</sub> の計算値 329.11; 実測値 352.1 (M + Na)。

#### 【0382】

102 の調製:

化合物 101 (43.70 g、133.56 ミリモル) とベンジルエステル (41.71 g、200.34 ミリモル) をジクロロエタン (300 mL) に溶解させ、そこに分子ふるい (50 g) を添加し、30 分間撹拌した。そこに TMSOTf (14.50 g、66.78 ミリモル) を添加し、混合物を室温で一晩撹拌した。これを、氷冷した重炭酸ナトリウム溶液中に注ぎ入れ、ジクロロメタンで抽出し、水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を除去し、残留物をクロマトグラフィー (勾配溶出: 20 ~ 100 % の酢酸エチル/ヘキサン) で精製して、所要の化合物を淡褐色の粘着性の液体 (60.50 g、86 %) として得た。<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR MS: C<sub>26</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>11</sub> の計算値 537.22; 実測値 560.21 (M + Na)。

#### 【0383】

103 の調製:

化合物 102 (60.00 g、111.68 ミリモル) を、メタノール/酢酸エチルの混合物に溶解させ、アルゴンで脱気した。Pd/C (6.00 g、10 質量%、Degussa、ウェットタイプ) を添加し、バルーン圧下で一晩水素化した。小型のセライトパッドに通して濾過し、メタノールで洗浄し、高真空下で一晩乾燥させて、生成物 (48.85 g、98 %) を得た。<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR MS: C<sub>19</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>11</sub> の計算値 447.17; 実測値 469.9 (M + Na)。

#### 【0384】

104 の調製:

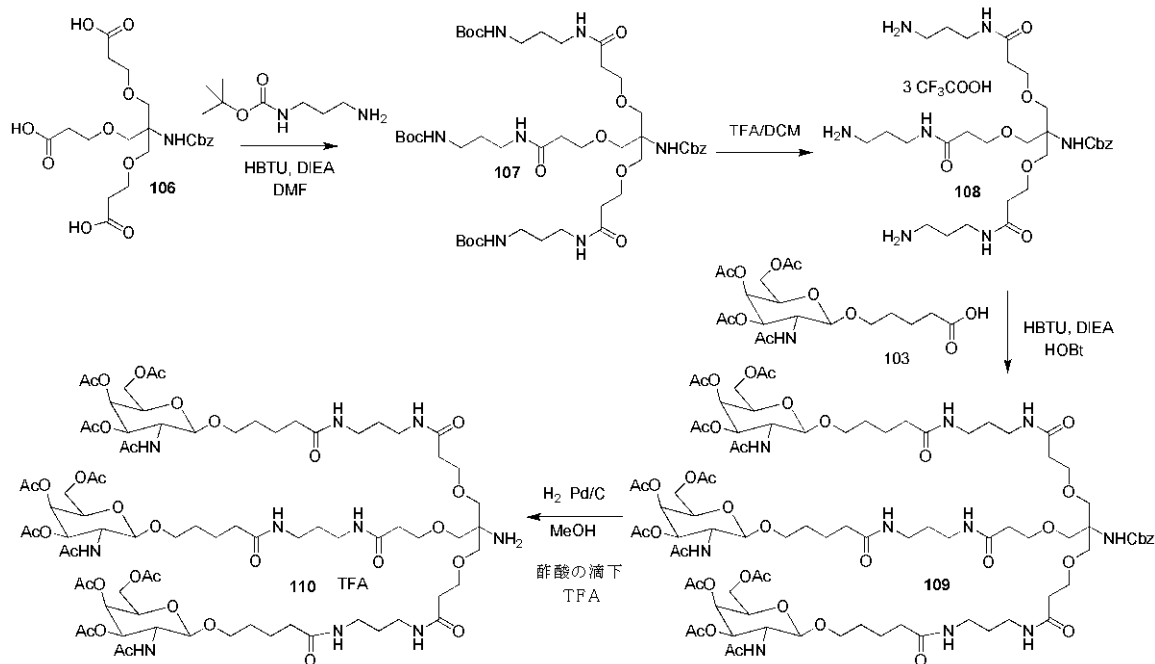
化合物 101 (42.30 g、128.43 ミリモル) とアジドエタノール (26 g、192.45 ミリモル) をジクロロエタン (300 mL) に溶解させ、そこに分子ふるい (50 g) を添加し、30 分間撹拌した。そこに TMSOTf (14.29 g、64.21 ミリモル) を添加し、混合物を室温で一晩撹拌した。これを、氷冷した重炭酸ナトリウム溶液中に注ぎ入れ、ジクロロメタンで抽出し、水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を除去し、残留物をクロマトグラフィー (勾配溶出: 20 % ~ 100 % の酢酸エチル/ヘキサン、次いで 5 % ~ 10 % のメタノール/酢酸エチル) で精製して、所要の化合物を淡褐色の粘着性の液体 (59.23 g、91.00 %) として得た。<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR MS: C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>11</sub> の計算値 504.21; 実測値 527.1 (M + Na)。

#### 【0385】

105 の調製:

化合物 104 (9.33 g、18.50 ミリモル) を THF (100 mL) に溶解させ、そこに PPh<sub>3</sub> (5.97 g、22.2 ミリモル) を添加し、混合物を 48 時間撹拌した。出発材料が完全に消失したことを TLC で確認した。水 (1 mL、55 ミリモル) を添加し、さらに 24 時間撹拌した。TFA (2.85 mL、23.12 ミリモル) とトルエン (40 mL) を添加し、溶媒を減圧下で除去した。残留物をトルエンと 2 回共蒸発させ (2 × 40 mL)、高真空下で乾燥させた。これを同日中に次の反応に使用した。MS: C<sub>20</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>11</sub> の計算値 478.22; 実測値 500.8 (M + Na)。

## 【化 7 5】



10

20

## 【0386】

## 107の調製：

化合物106 (JOC 2002) (6.94 g、14.73ミリモル)とモノboc  
 プロピルアミン (10.26 g、58.89ミリモル)をDMF (100 mL)に溶解  
 せ、そこにHBTU (17.26 g、45.50ミリモル)とDIEA (15.36 mL  
 、88.14ミリモル)を添加し、一晚撹拌した。反応混合物を氷と水の混合物中に入れ  
 、ジクロロメタンで抽出し、重炭酸ナトリウム溶液、ブラインで洗浄し、硫酸ナトリウム  
 で乾燥させた。溶媒を除去し、残留物をクロマトグラフィー (酢酸エチル、次いで2% ~  
 10%のMeOH / DCM)で精製して、生成物を白色の綿毛状の固体 (10.49 g、  
 76%)として得た。MS :  $C_{45}H_{77}N_7O_{14}$ の計算値939.55 ; 実測値940.5  
 3 (M + H)。

30

## 【0387】

## 108の調製：

化合物107 (2.40 g、2.56ミリモル)をジクロロメタン (10 mL)に溶解  
 させ、そこにTFA / DCMの混合物 (1 : 4、10 mL)を添加し、30分間撹拌した  
 。反応を質量スペクトルでモニタした。100 mLのトルエンを添加し、溶媒を減圧下で  
 除去した。残留物をトルエンと2回共蒸発させ (2 x 100 mL)、高真空下で乾燥させ  
 て、化合物をそのTFA塩 (白色の粘性物質、2.47 g、99%)として得た。これを  
 、さらに精製することなく、次の反応に使用した。MS :  $C_{30}H_{53}N_7O_8$ の計算値639  
 .40 ; 実測値640.45 (M + H)。

40

## 【0388】

## 109の調製：

GalNAc酸103 (4.00 g、8.99ミリモル)をDMF (50 mL)に溶解  
 させ、そこにHBTU (3.75 g、9.88ミリモル)、HOBt (1.34 g、9.  
 88ミリモル)、およびDIEA (5 mL、3.2当量)を添加し、3 ~ 4分間撹拌した  
 。そこに108 (2.47 g、2.50ミリモル)のDMF溶液を添加し、反応混合物を  
 一晚撹拌した。TLCで確認し、溶媒を減圧下で除去した。残留物をジクロロメタンに溶  
 解させ、重炭酸ナトリウム溶液 (50 mL)、水 (100 mL)で洗浄し、硫酸ナトリウ

50

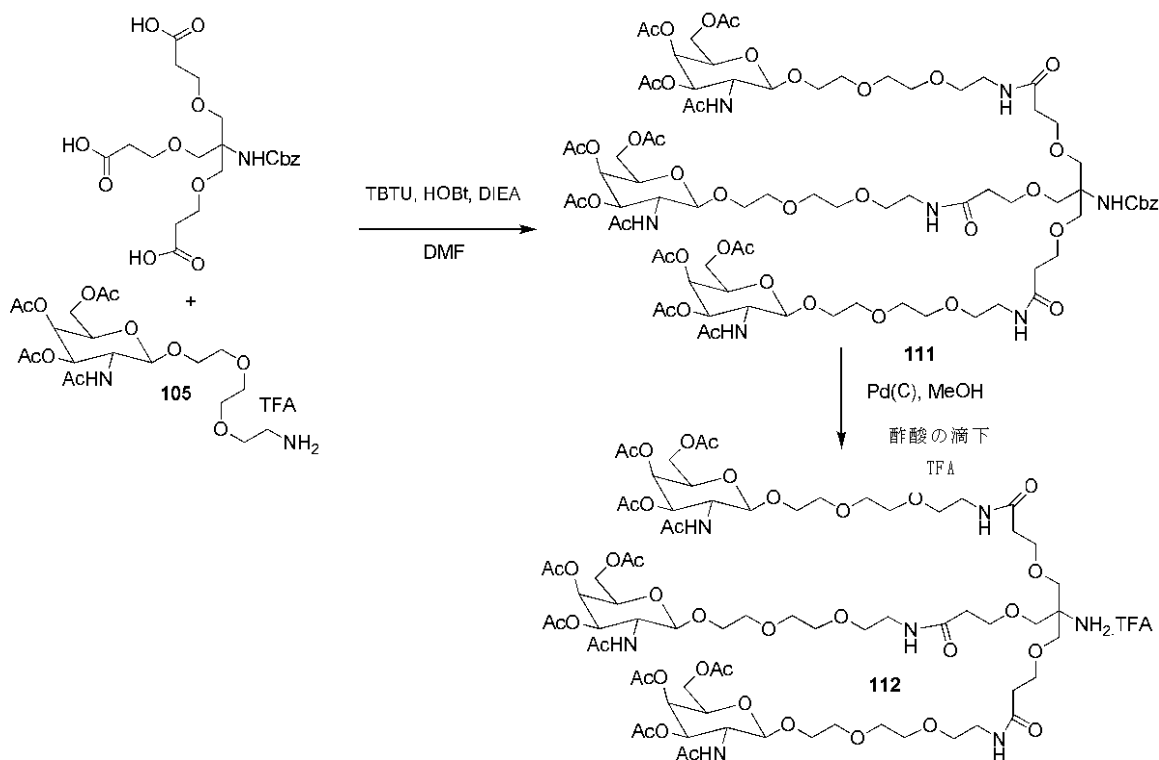
ムで乾燥させた。溶媒を除去し、残留物をクロマトグラフィー（酢酸エチル、次いで勾配溶出 5 % ~ 15 % の MeOH / DCM）で精製して、生成物 109 を白色の固体（4.20 g、87 %）として得た。MS :  $C_{87}H_{134}N_{10}O_{38}$  の計算値 1926.89 ; 実測値 1949.5 (M + Na)。

# 【0389】

110 の調製 :

GalNAc 誘導体 109 (7.50 g、4.18 ミリモル) を、アルゴンで脱気したメタノール (50 mL) 中に入れた。Pd/C (0.800 g、10 質量 % Degussa タイプ、ウェットタイプ) と数滴の酢酸を添加し、混合物をバルーン圧下で一晩水素化した。反応混合物を小型のセライトパッドに通して濾過し、メタノールで洗浄した。TFA (0.465 mL、5.22 ミリモル) を添加し、溶媒を減圧下で除去した。残留物をトルエンと共蒸発させ (2 回)、高真空下で一晩乾燥させて、化合物を TFA 塩 (淡黄色の固体、7.30 g、99 %) として得た。MS :  $C_{79}H_{128}N_{10}O_{36}$  の計算値 1792.85 ; 実測値 1815.9 (M + Na)。

# 【化76】



# 【0390】

111 の調製 :

トリカルボン酸 106 (2.17 g、4.625 ミリモル) とアミン (18.50 ミリモル、先の反応からの粗製物) を DMF (100 mL) に溶解させた。そこに TBTU (5.34 g、16.63 ミリモル)、HOBT (2.24 g、16.59 ミリモル)、および DIEA (5.64 mL、32.36 ミリモル) を添加し、反応混合物を 24 時間攪拌した。24 時間攪拌した後、追加量の DIEA (4 mL) を添加し、攪拌を続けた。48 時間後、溶媒を減圧下で除去し、残留物をジクロロメタンに溶解させ、1 M のリン酸溶液、重炭酸ナトリウム溶液、水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を除去し、残留物をクロマトグラフィー（酢酸エチル、次いで 3 % ~ 15 % の MeOH / DCM）で精製して、所要の化合物 111 を白色の固体 (5.80 g、68 %) として得た。MS :  $C_{81}H_{125}N_7O_{41}$  の計算値 1851.79 ; 実測値 1874.20 (M + Na)。

# 【0391】

## 112の調製:

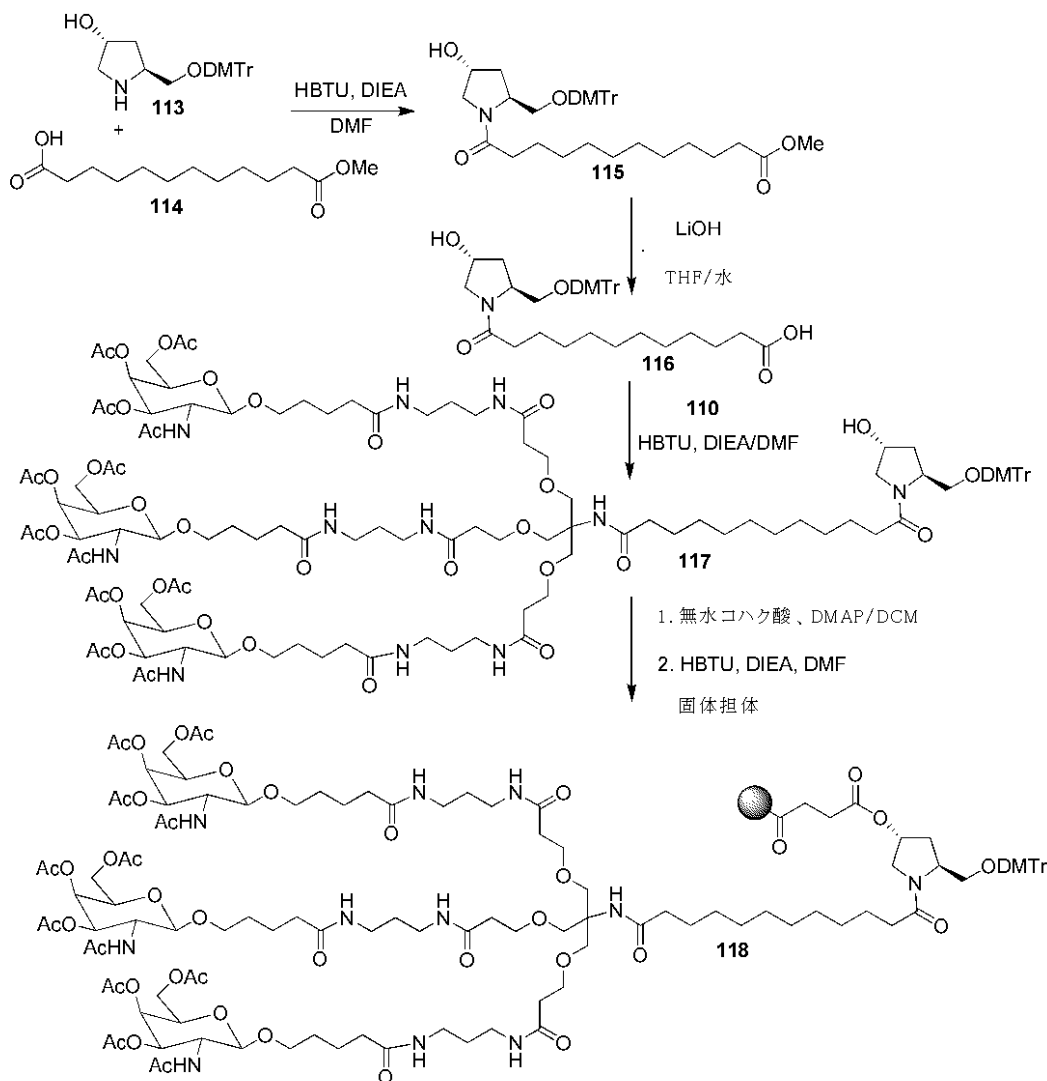
Ga1NAc誘導体111(5.75g、3.09ミリモル)を、アルゴンで脱気したメタノール(100mL)中に入れた。Pd/C(0.600g、10質量% Degussa、ウェットタイプ)と数滴の酢酸を添加し、混合物をバルーン圧下で36時間水素化した。反応混合物を小型のセライトパッドに通して濾過し、メタノールで洗浄した。TFA(0.354mL、1.25当量)とトルエン(30mL)を添加し、溶媒を減圧下で除去した。残留物をトルエンと共蒸発させ(2回)、高真空下で一晩乾燥させて、化合物をTFA塩(5.70g、粗製物)として得た。MS:  $C_{81}H_{125}N_7O_{41}$ の計算値1717.75; 実測値1740.5(M+N<sub>a</sub>)。

## 【0392】

10

実施例2.炭水化物複合体118の合成

## 【化77】



20

30

40

## 【0393】

## 115の調製:

ヒドロキシプロリンアミン(3.00g、7.15ミリモル)とドデカン二酸モノメチルエステル(1.748g、7.15ミリモル)をDMF(50mL)中に一緒に入れた。そこにHBTU(3.25g、8.56ミリモル)とDIEA(3.7mL、21.24ミリモル)を添加し、反応物を一晩攪拌した。反応混合物を氷水混合物中に注ぎ入れ、DCMで抽出した。重炭酸溶液、水、ブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を除去し、残留物をクロマトグラフィー(50%酢酸エチル/ヘキサン、酢酸エチル

50

、次いで5%のMeOH/DCMで溶出)で精製して、所要の化合物115を白色の固体(4.30g、93%)として得た。MS:  $C_{39}H_{51}NO_7$ の計算値645.37; 実測値646.35(M+H)。

#### 【0394】

116の調製:

化合物115(4.25g、6.58ミリモル)をTHF/DCM/水の混合物(50mL、2:1:1)に溶解させた。LiOH(1.90g、45.2ミリモル)を添加し、混合物を一晩撹拌した。TLCで確認し、酢酸を添加して、反応混合物を中和した。溶媒を除去し、残留物をDCMで抽出した。このDCM溶液にTEA(過剰)を添加し、溶液を小型のシリカゲルパッドに通して濾過して、所要の生成物116をそのTEA塩(4.15g、86%)として得た。MS:  $C_{38}H_{49}NO_7$ の計算値631.35; 実測値630.34(M-H)。

10

#### 【0395】

117の調製:

化合物116(1.30g、2.06ミリモル)とHBTU(0.821g、1.05当量)をDMF(30mL)中に一緒に採取した。そこにDIEA(1.07mL、3当量)を添加し、混合物を3~4分間撹拌した。アミン110(3.00g、1.58ミリモル)の溶液、次いで1当量のDIEAを添加した。反応混合物を室温で一晩撹拌した。溶媒を減圧下で除去した。残留物をDCMに溶解させ、重炭酸と水で洗浄した。DCM層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を除去した。残留物をクロマトグラフィー(まず酢酸エチル、次いで5%~20%のMeOH/DCMで溶出)で精製して、生成物117を白色の固体(3.35g、88%)として得た。MS:  $C_{117}H_{175}N_{11}O_{42}$ の計算値2406.19; 実測値2429.10(M+Na)。

20

#### 【0396】

固体担体118の調製:

化合物117(3.30g、1.37モル)、無水コハク酸(0.274g、2当量)、およびDMAP(0.501g、3当量)をDCMに溶解させ、一晩撹拌した。反応混合物をDCMで希釈し、水と冷えた希釈クエン酸溶液で洗浄した。DCM層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を除去した。残留物を小型のシリカゲルパッドに通して濾過して、コハク酸塩を、そのTEA塩としてのオフホワイトの固体(3.81g)として得た。MS:  $C_{121}H_{179}N_{11}O_{45}$ の計算値2506.21; 実測値2529.20(M+Na)。コハク酸塩(2.20g、0.877ミリモル)とHBTU(0.334g、0.877ミリモル)をDMF(100mL)に溶解させた。そこにDIEA(0.457mL、2.62ミリモル)を添加し、反応物を3~4分間旋回させた。そこにポリスチレン担体(12.30g)を添加し、混合物を24時間振盪させた。フリットに通して濾過し、DCM、10%のMeOH/DCM、DCM、およびエーテルで洗浄した。固体担体を真空下で2時間乾燥させた。これを25%のAc<sub>2</sub>O/Py混合物で30分間キャッピングした。同じ洗浄/乾燥手順を繰り返して、固体担体118(13.10g、50.5モル/gの装填量)を得た。

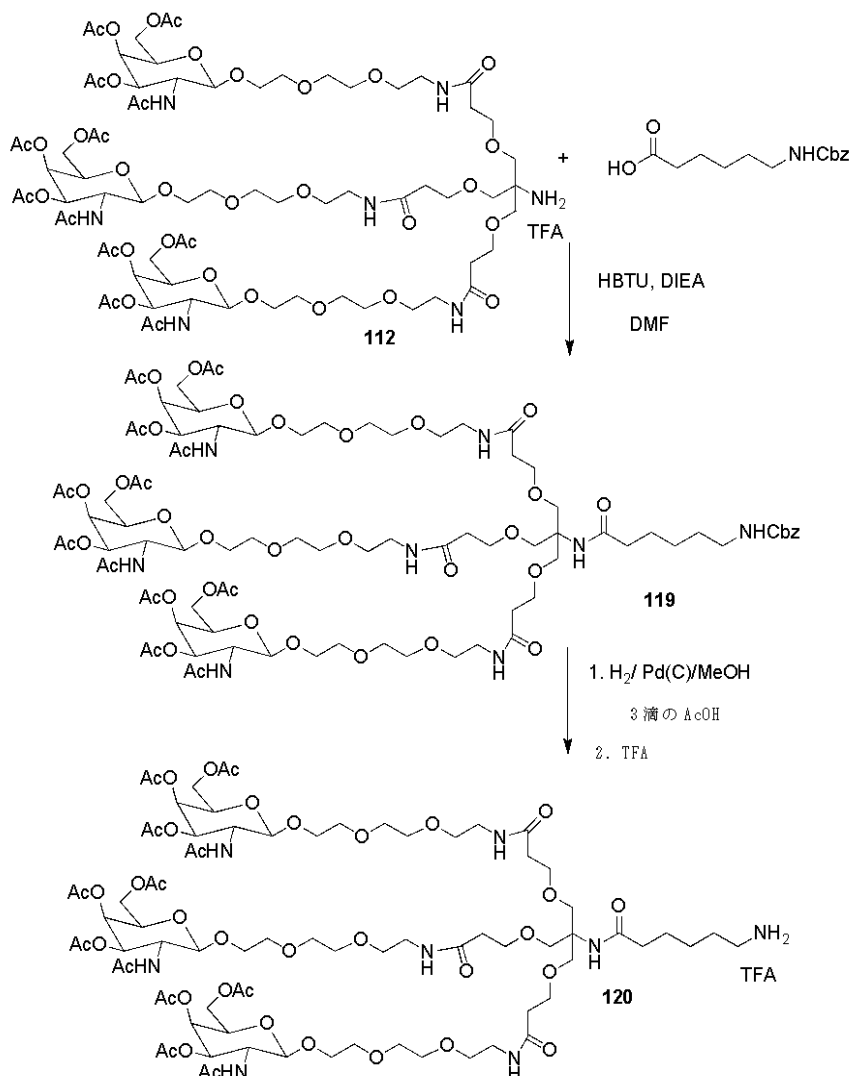
30

#### 【0397】

実施例3.炭水化物複合体122の合成

40

## 【化 7 8】



10

20

30

## 【 0 3 9 8 】

## 1 1 9 の調製：

Z - アミノカプロン酸 ( 2 . 1 9 g 、 8 . 2 5 ミリモル ) を D M F ( 5 0 m L ) に溶解させた。そこに H B T U ( 3 . 1 3 g 、 8 . 2 5 ミリモル ) と D I E A ( 7 . 1 9 m L 、 5 . 0 0 当量 ) を添加し、混合物を数分間撹拌した。G a l N A c アミン 1 1 2 ( 1 0 . 1 0 g 、 5 . 5 2 ミリモル ) を 5 0 m L の D M F に溶解させ、前記混合物に添加し、4 8 時間撹拌した。生成物の形成について T L C と M A L D I を確認した。溶媒を除去し、残留物を D C M に溶解させ、N a H C O <sub>3</sub> 溶液と水で洗浄した。硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧下で除去した。残留物をクロマトグラフィー ( 酢酸エチルによる溶出、次いで 5 % ~ 1 5 % の M e O H / D C M の勾配溶出 ) で精製して、所要の化合物 1 1 3 をオフホワイトの固体 ( 6 . 2 0 g 、 5 7 % ) として得た。M S : C <sub>87</sub> H <sub>136</sub> N <sub>8</sub> O <sub>42</sub> の計算値 1 9 6 4 . 8 8 ; 実測値 1 9 8 7 . 7 5 ( M + N a ) 。

40

## 【 0 3 9 9 】

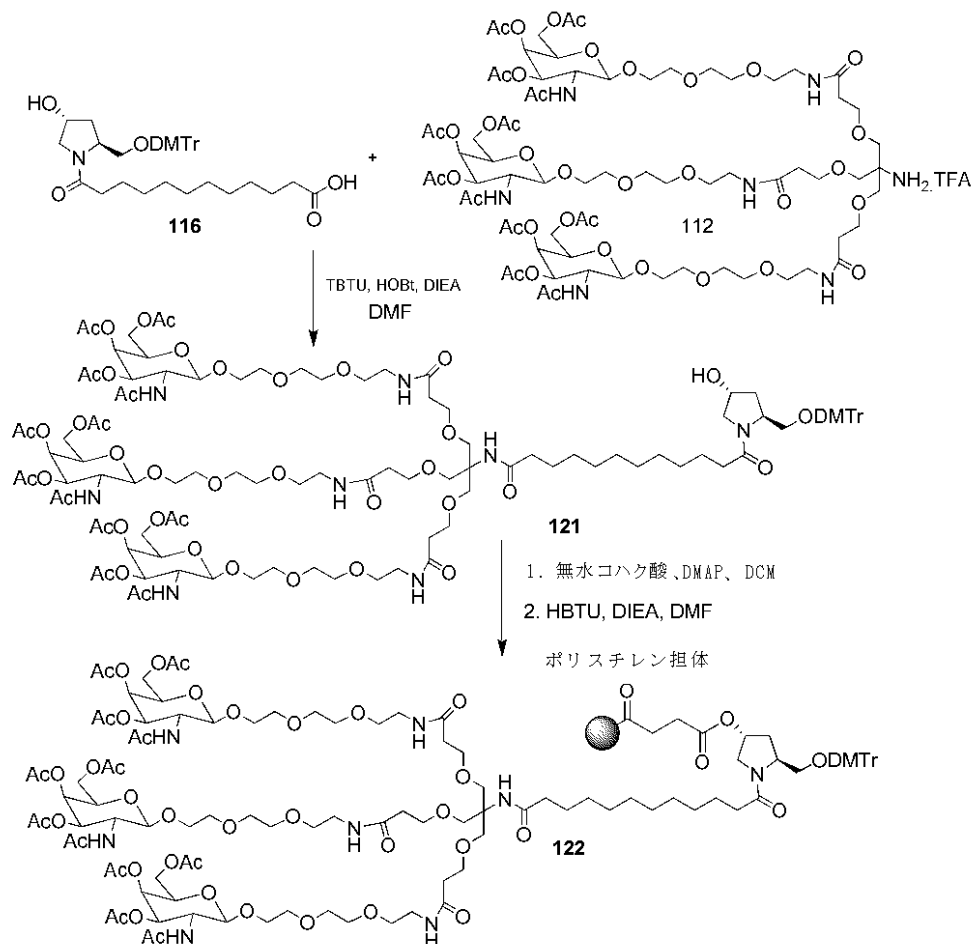
## 1 2 0 の調製：

化合物 1 1 9 ( 6 . 1 0 g 、 3 . 1 0 ミリモル ) をメタノール ( 5 0 m L ) に溶解させ、そこに 1 m L の酢酸を添加した。反応混合物を脱気し、そこに P d / C ( 0 . 7 0 0 g 、 1 0 質量 % D e g u s s a 、ウェットタイプ ) を添加し、バルーン圧下で 3 6 時間水素化した。反応混合物を小型のセライトパッドに通して濾過し、M e O H で洗浄した。そこに 1 . 2 5 当量の T F A とトルエン ( 5 0 m L ) を添加し、溶媒を減圧下で除去した。

50

残留物をトルエンと2回共蒸発させ、高真空下で一晩乾燥させて、所要の化合物をオフホワイトの固体(6.10g、定量的)として得た。この化合物を、さらに精製することなく、そのまま次の反応に使用した。MS:  $C_{79}H_{130}N_8O_{40}$  の計算値 1830.84; 実測値 1853.81 (M + Na)。

【化79】



10

20

30

【0400】

121の調製:

化合物116(5.06g、6.90ミリモル)、GalNAcアミン112(10.55g、5.756ミリモル)、TBTU(2.44g、1.1当量)、およびHOBT(1.025g、1.1当量)をDMF(100mL)中に一緒に採取した。そこにDIEA(6mL、34.51ミリモル)を添加し、混合物を48時間撹拌した。反応をTCLとMALDIでモニタした。溶媒を減圧下で除去した。残留物をDCMに溶解させ、重炭酸と水で洗浄した。DCM層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を除去した。残留物をクロマトグラフィー(まず酢酸エチル、次いで3%~10%のMeOH/DCMで溶出)で精製して、生成物121をオフホワイトの固体(10.50g、79%)として得た。MS:  $C_{111}H_{166}N_8O_{45}$  の計算値 2331.09; 実測値 2354.03 (M + Na)。

40

【0401】

122の調製:

化合物121(2.00g、0.857ミリモル)、無水コハク酸(0.186g、2当量)、DMAP(0.314g、3当量)をDCM中に一緒に採取し、一晩撹拌する。溶媒を除去し、残渣を小型のシリカゲルパッドに通して濾過して、コハク酸塩をそのTE

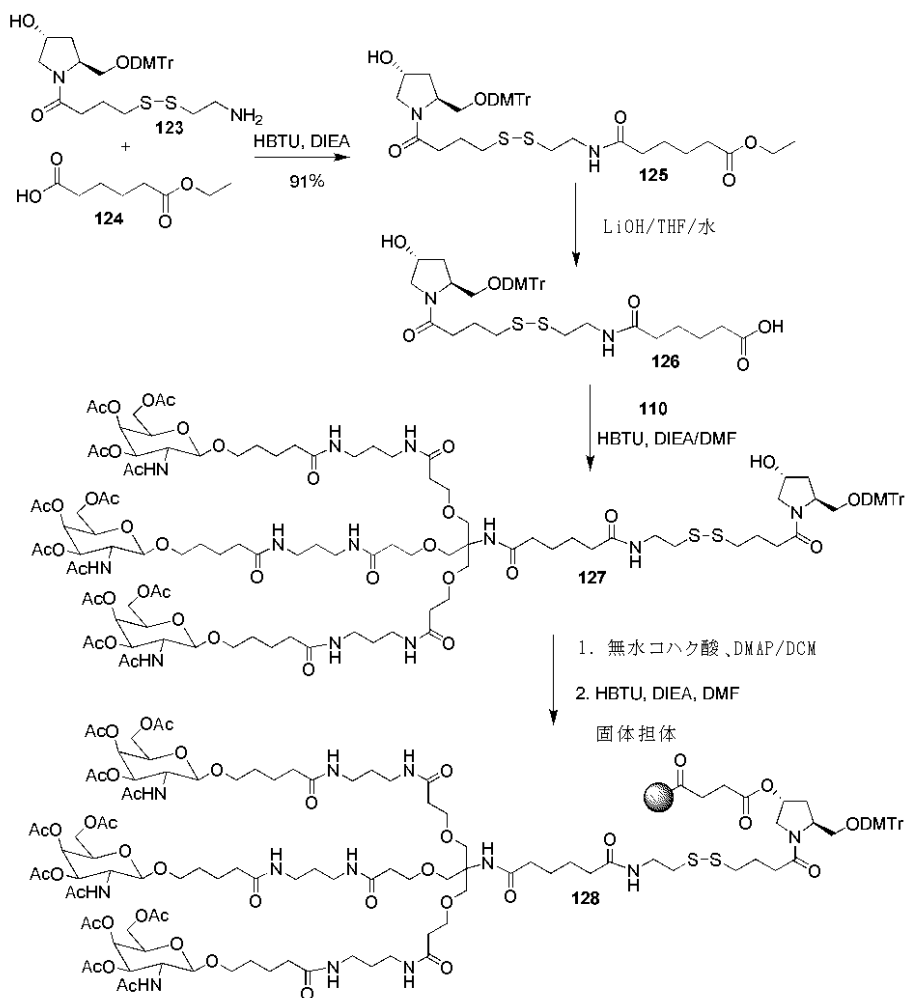
50

A 塩として得る。コハク酸塩 (2.00 g、0.857 ミリモル) と HBTU (0.325 g、0.857 ミリモル) を DMF (100 mL) に溶解させる。そこに DIEA (0.450 mL、2.57 ミリモル) を添加し、反応物を 3 ~ 4 分間巡回させる。そこにポリスチレン担体 (10.00 g) を添加し、混合物を 24 時間振盪させる。フリットに通して濾過し、DCM、10% の MeOH / DCM、DCM、およびエーテルで洗浄し、これを無水酢酸でキャッピングして、固体担体 122 を得る。

#### 【0402】

実施例 4 . 炭水化物複合体 128 の合成

#### 【化 80】



#### 【0403】

125 の調製 :

アミン 123 (2.75 g、4.61 ミリモル) とヘキサン二酸モノエチル (0.886 g、5.09 ミリモル) を DMF (50 mL) に溶解させた。そこに HBTU (2.09 g、5.51 ミリモル) と DIEA (2.88 mL、16.53 ミリモル) を添加し、反応混合物を一晩攪拌した。反応混合物を氷水混合物中に注ぎ入れ、DCM で抽出し、重炭酸溶液で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を除去し、残留物をクロマトグラフィー (50% の EtOAc / ヘキサン、EtOAc、次いで 5% ~ 10% の MeOH / DCM で溶出) で精製して、所要の生成物を綿毛状の白色の固体 (2.25 g、65%) として得た。MS :  $C_{40}H_{52}N_2O_8S_2$  の計算値 752.32 ; 実測値 753.31 (M + Na)。

#### 【0404】

## 126の調製:

化合物125 (2.20 g、2.97ミリモル)をTHF/水の混合物(20 mL、2:1)に溶解させた。LiOH (0.187 g、4.45ミリモル)を添加し、混合物を4時間撹拌した。反応をTLCでモニタし、4時間後に冷却し、クエン酸を添加して、反応混合物の反応を停止させた。溶媒を除去し、残留物をDCMで抽出し、水で洗浄した。硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を除去した。残留物をクロマトグラフィー(EtOAc、3%~20%のMeOH/DCM)で精製して、所要の生成物126 (0.750 g、35%)をそのTEA塩として得た。MS:  $C_{38}H_{48}N_2O_8S_2$ の計算値724.29; 実測値723.28 (M-H)。

## 【0405】

10

## 127の調製:

化合物126 (1.008 g、1.390ミリモル)、110 (1.904 g、1.007ミリモル)、およびHBTU (0.400 g、1.054ミリモル)をDMF (20 mL)に溶解させた。そこにDIEA (0.525 mL、3当量)を添加し、反応物を2日間撹拌した。反応混合物をTLCとMALDIでモニタした。溶媒を除去し、残留物をDCMに溶解させ、水と重炭酸溶液で洗浄した。DCM層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を除去した。その後、これをクロマトグラフィー(まず酢酸エチル、次いで3%~15%のMeOH/DCM)で精製して、所要の生成物を綿毛状のオフホワイトの固体(1.90 g、76%)として得た。MS:  $C_{117}H_{174}N_{12}O_{43}S_2$ の計算値2499.12; 実測値2522.12 (M+Na)。

20

## 【0406】

## 固体担体128の調製:

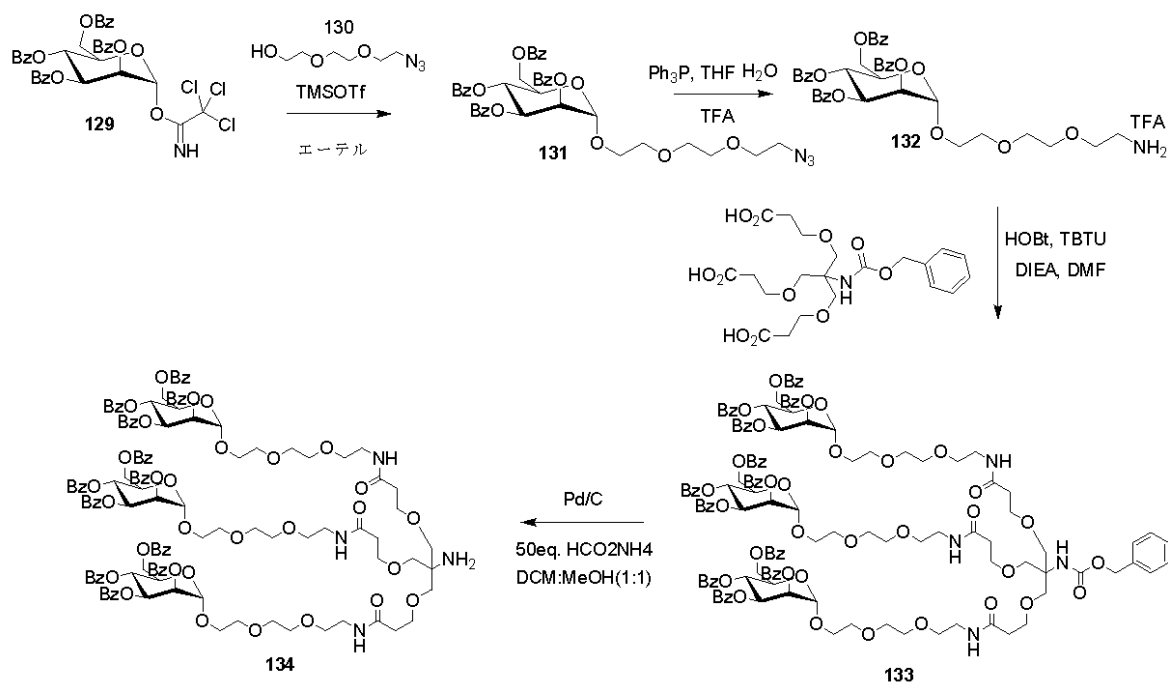
化合物127 (2.00 g、0.800ミリモル)、無水コハク酸 (0.160 g、2当量)、DMAP (0.300 g、3当量)をDCM中に一緒に採取し、一晚撹拌する。溶媒を除去し、残留物を小型のシリカゲルパッドに通して濾過して、コハク酸塩をそのTEA塩として得る。化合物127 (2.00 g、0.769ミリモル)とHBTU (0.290 g、0.769ミリモル)をDMF (100 mL)に溶解させる。そこにDIEA (0.500 mL、3ミリモル)を添加し、反応物を3~4分間旋回させる。そこにポリスチレン担体 (10.00 g)を添加し、混合物を24時間振盪させる。フリットに通して濾過し、DCM、10%のMeOH/DCM、DCM、およびエーテルで洗浄し、これを無水酢酸でキャッピングして、固体担体128を得る。

30

## 【0407】

## 実施例5.炭水化物複合体136の合成

## 【化 8 1】



10

20

## 【 0 4 0 8 】

## 1 3 1 の調製：

マンノーストリクロロアセトイミデート 1 2 9 ( 1 5 . 0 0 g 、 2 0 . 2 4 ミリモル ) とアジドアルコール ( 4 . 2 5 g 、 1 . 2 当量 ) をトルエンに溶解させ、2 回共沸させた。残留物を高真空下で一晩乾燥させた。そこに無水ジエチルエーテル ( 3 0 m L ) と分子ふるい ( 1 0 g ) を添加した。反応混合物を氷水浴中で冷却した。そこに T M S O T f ( 0 . 5 m L 、 0 . 1 当量 ) を添加し、混合物を 1 0 分間攪拌した。反応を T L C でモニタし、T E A で反応停止させた。分子ふるいを濾過し、溶媒を減圧下で除去した。残留物をクロマトグラフィー ( 2 0 % ~ 5 0 % の E t O A c / ヘキサン ) で精製して、化合物を無色の液体 ( 8 . 3 6 g 、 5 5 % ) として得た。MS :  $C_{40}H_{39}N_3O_{12}$  の計算値 7 5 3 . 2 5 ; 実測値 7 7 6 . 2 3 ( M + N a ) 。

30

## 【 0 4 0 9 】

## 1 3 2 の調製：

化合物 1 3 1 ( 8 . 3 0 g 、 1 1 . 0 1 ミリモル ) を無水 T H F ( 7 0 m L ) に溶解させ、そこに  $P P h_3$  ( 3 . 4 6 g 、 1 . 2 当量 ) を添加し、混合物を周囲温度で 2 日間攪拌した。そこに水 ( 1 m L ) を添加し、混合物をさらに 2 4 時間攪拌した。反応を T L C でモニタした。そこにトリフルロ酢酸 ( 1 . 0 6 m L 、 1 . 2 5 当量 ) とトルエン ( 5 0 m L ) を添加した。溶媒を減圧下で除去し、残留物をトルエンと 2 回共蒸発させ、高真空下で乾燥させた。これを、さらに精製することなく、そのまま次の反応に使用した。MS :  $C_{40}H_{41}NO_{12}$  の計算値 7 2 7 . 2 6 ; 実測値 7 5 0 . 2 3 ( M + N a ) 。

40

## 【 0 4 1 0 】

## 1 3 3 の調製：

トリカルボン酸 ( 1 1 . 0 5 g 、 2 3 . 4 5 ミリモル ) とアミン ( 6 8 . 1 9 g 、 9 4 ミリモル、先の反応からの粗製物 ) を D M F ( 2 0 0 m L ) に溶解させた。そこに T B T U ( 2 7 . 0 9 g 、 8 4 ミリモル ) 、 H O B t ( 1 1 . 3 4 g 、 8 4 ミリモル ) 、および D I E A ( 2 8 m L 、 1 6 0 ミリモル ) を添加し、反応混合物を 2 4 時間攪拌した。2 4 時間攪拌した後、追加量の D I E A ( 2 8 m L ) を添加し、攪拌を続けた。4 8 時間後、溶媒を減圧下で除去し、残留物をジクロロメタンに溶解させ、1 M のリン酸溶液、重炭酸

50

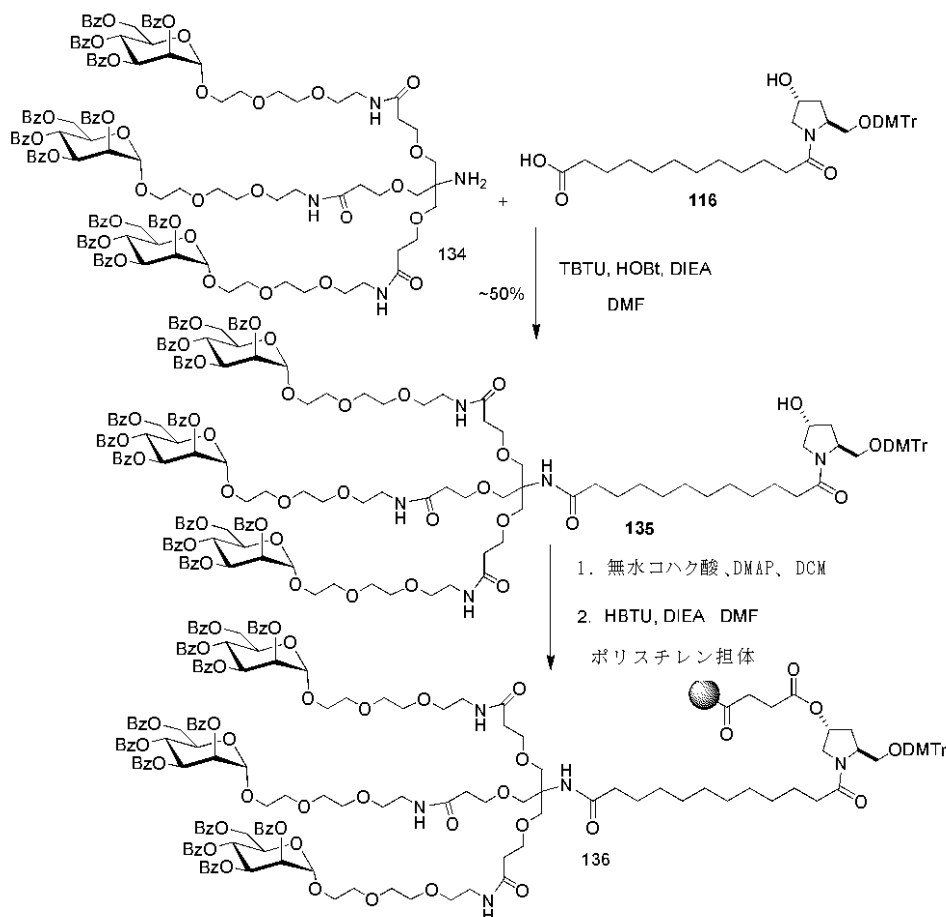
ナトリウム溶液、および水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を除去し、残留物をクロマトグラフィー（酢酸エチル、次いで3%～15%のMeOH/DCM）で精製して、所要の化合物133を白色の固体（41.95g、67%）として得た。MS： $C_{141}H_{146}N_4O_{44}$ の計算値2598.93；実測値2621.89（M+Na）。

【0411】

134の調製：

化合物133（3.05g、1.176ミリモル）をDCM/MeOHの混合物に溶解させた。そこに50当量のギ酸アンモニウム、次いで5%のPd/C（1.5g、50質量%）を添加し、周囲温度で8時間撹拌した。これを小型のセライトパッドに通して濾過し、MeOH/DCMで洗浄し、溶媒を除去し、残留物を高真空下で一晩乾燥させて、化合物を白色の固体（2.65g、92%）として得た。MS： $C_{133}H_{140}N_4O_{42}$ の計算値2464.89；実測値2487.92（M+Na）。

【化82】



【0412】

135の調製：

マンノースアミン（2.076g、0.842ミリモル）、116（0.740g、1.00ミリモル）、およびTBTU（0.0353g、1.1当量）、およびHOBT（0.149g、1.1当量）をDMF（30mL）に溶解させた。そこにDIEA（0.0869mL、5当量）を添加し、反応物を2日間撹拌した。反応混合物をTLCとMALDIでモニタした。溶媒を除去し、残留物をDCMに溶解させ、水と重炭酸ナトリウム溶液で洗浄した。DCM層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を除去した。その後、これをクロマトグラフィー（まず酢酸エチル、次いで2%～4%のMeOH/DCM）で精製して、所要の生成物を綿毛状のオフホワイトの固体（1.48g、57%）。MS： $C_{71}H_{187}N_5O_{48}$ の計算値3078.23；実測値3101.25（M+Na）。

【0413】

固体担体 136 の調製：

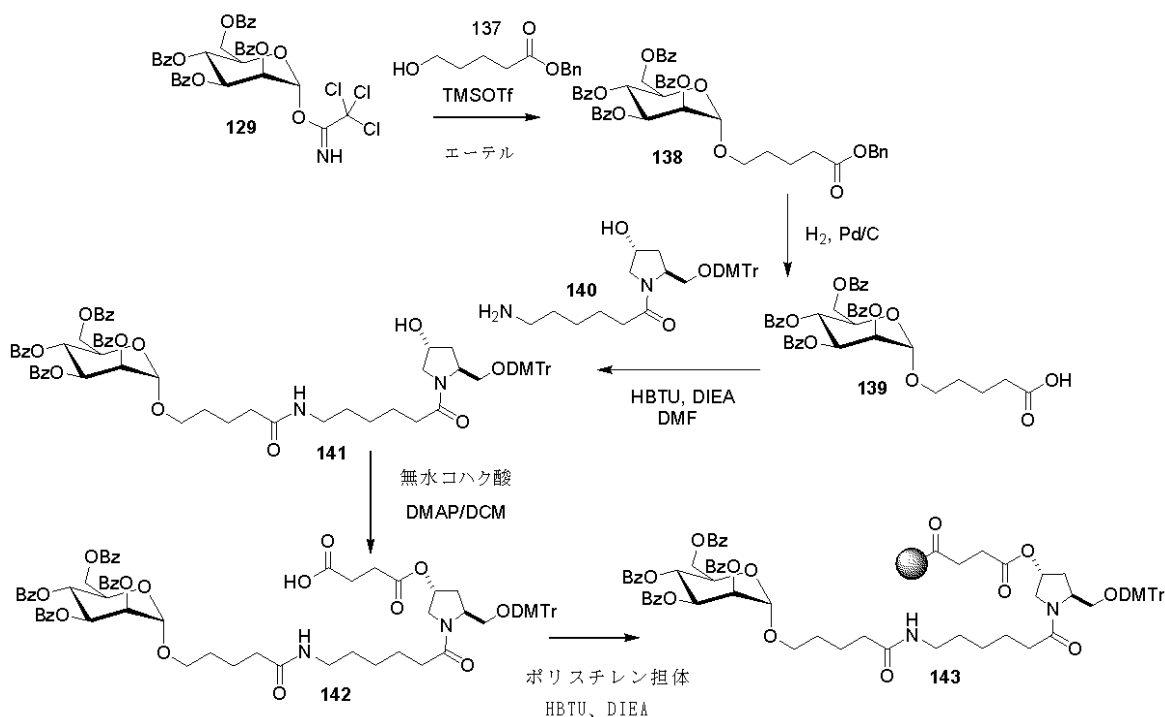
化合物 117 (2.10 g、0.681 ミリモル)、無水コハク酸 (0.136 g、2 当量)、および DMAP (0.249 g、3 当量) を DCM に溶解させ、一晚撹拌した。反応混合物を DCM で希釈し、水と冷えた希釈クエン酸溶液で洗浄した。DCM 層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を除去した。残留物を小型のシリカゲルパッドに通して濾過して、コハク酸塩を、その TEA 塩としてのオフホワイトの固体 (1.56 g) として得た。MS:  $C_{175}H_{191}N_5O_{51}$  の計算値 2506.21; 3178.25; 実測値 3201.20 (M + Na)。コハク酸塩 (1.00 g、0.305 ミリモル) と HBTU (0.138 g、1.2 当量) を DMF (100 mL) に溶解させた。そこに DIEA (0.50 mL、過剰) を添加し、反応物を 3 ~ 4 分間旋回させた。そこにポリスチレン担体 (6.05 g) を添加し、混合物を 24 時間振盪させた。フリットに通して濾過し、DCM、10% の MeOH / DCM、DCM、およびエーテルで洗浄した。固体担体を真空下で 2 時間乾燥させた。これを 25% の  $Ac_2O$  / Py 混合物で 30 分間キャッピングした。同じ洗浄 / 乾燥手順を繰り返して、固体担体 136 (6.70 g、42 マイクロモル / g 装填量) を得た。

10

【0414】

実施例 6 . 炭水化物複合体 143 の合成

【化 83】



20

30

【0415】

138 の調製：

マンノーストリクロロアセトイミデート 129 (15.23 g、20.55 ミリモル) と 137 (4.36 g、1.02 当量) をトルエンに溶解させ、2 回共沸させた。残留物を高真空下で一晩乾燥させた。そこに無水ジエチルエーテル (30 mL) と分子ふるい (10 g) を添加した。反応混合物を氷水浴中で冷却した。そこに TMSOTf (0.5 mL、0.1 当量) を添加し、混合物を 10 分間撹拌した。反応を TLC でモニタし、TEA で反応停止させた。分子ふるいを濾過し、溶媒を減圧下で除去した。残留物をクロマトグラフィー (ヘキサン、15% ~ 25% の EtOAc / ヘキサン) で精製して、化合物を無色の液体 (14.52 g、90%) として得た。MS:  $C_{46}H_{42}O_{12}$  の計算値 786.27; 実測値 809.25 (M + Na)。

40

【0416】

50

## 139の調製：

マンノースベンジルエステル（14.30 g、18.17ミリモル）を酢酸エチル（100 mL）に溶解させ、そこに2滴の酢酸を添加した。脱気し、Pd/C（1.50 g、10質量% Degussa ウェットタイプ）を添加し、バルーン圧下で24時間水素化した。反応をTLCとMALDIでモニタした。これを小型のセライトパッドに通して濾過し、酢酸エチルで洗浄した。溶媒を除去し、残留物を高真空下で乾燥させて、化合物を無色のオイル（11.20 g、90%）として得た。MS：C<sub>39</sub>H<sub>36</sub>O<sub>12</sub>の計算値696.22；実測値719.18（M+Na）。

## 【0417】

## 141の調製：

ヒドロキシプロリンアミン140（3.82 g、7.18ミリモル）、141（5.00 g、7.18ミリモル）、およびHBTU（2.65 g、7.18ミリモル）をDMF（50 mL）に溶解させた。そこにDIEA（3.65 mL、5当量）を添加し、反応物を3時間撹拌した。反応混合物をTLCでモニタした。溶媒を除去し、残留物をDCMに溶解させ、水と重炭酸溶液で洗浄した。DCM層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を除去した。その後、これをクロマトグラフィー（まず、酢酸エチル、次いで5%～10%のMeOH/EtOAc）で精製して、所要の生成物を白色の固体（4.08 g、46%）として得た。MS：C<sub>71</sub>H<sub>74</sub>N<sub>2</sub>O<sub>16</sub>の計算値1210.50；実測値1233.40（M+Na）。

10

## 【0418】

## 固体担体143の調製：

化合物141（2.00 g、1.652ミリモル）、無水コハク酸（0.330 g、2当量）、DMAP（0.604 g、3当量）をDCM中に一緒に採取し、一晚撹拌する。溶媒を除去し、残留物を小型のシリカゲルパッドに通して濾過して、コハク酸塩をそのTEA塩142として得る。コハク酸塩（2.00 g、1.526ミリモル）とHBTU（0.578 g、1.526ミリモル）をDMF（100 mL）に溶解させる。そこにDIEA（1.32 mL、5当量）を添加し、反応物を3～4分間旋回させる。そこにポリスチレン担体（10.00 g）を添加し、混合物を24時間振盪させる。フリットに通して濾過し、DCM、10%のMeOH/DCM、DCM、およびエーテルで洗浄し、これを無水酢酸でキャッピングして、固体担体143を得る。

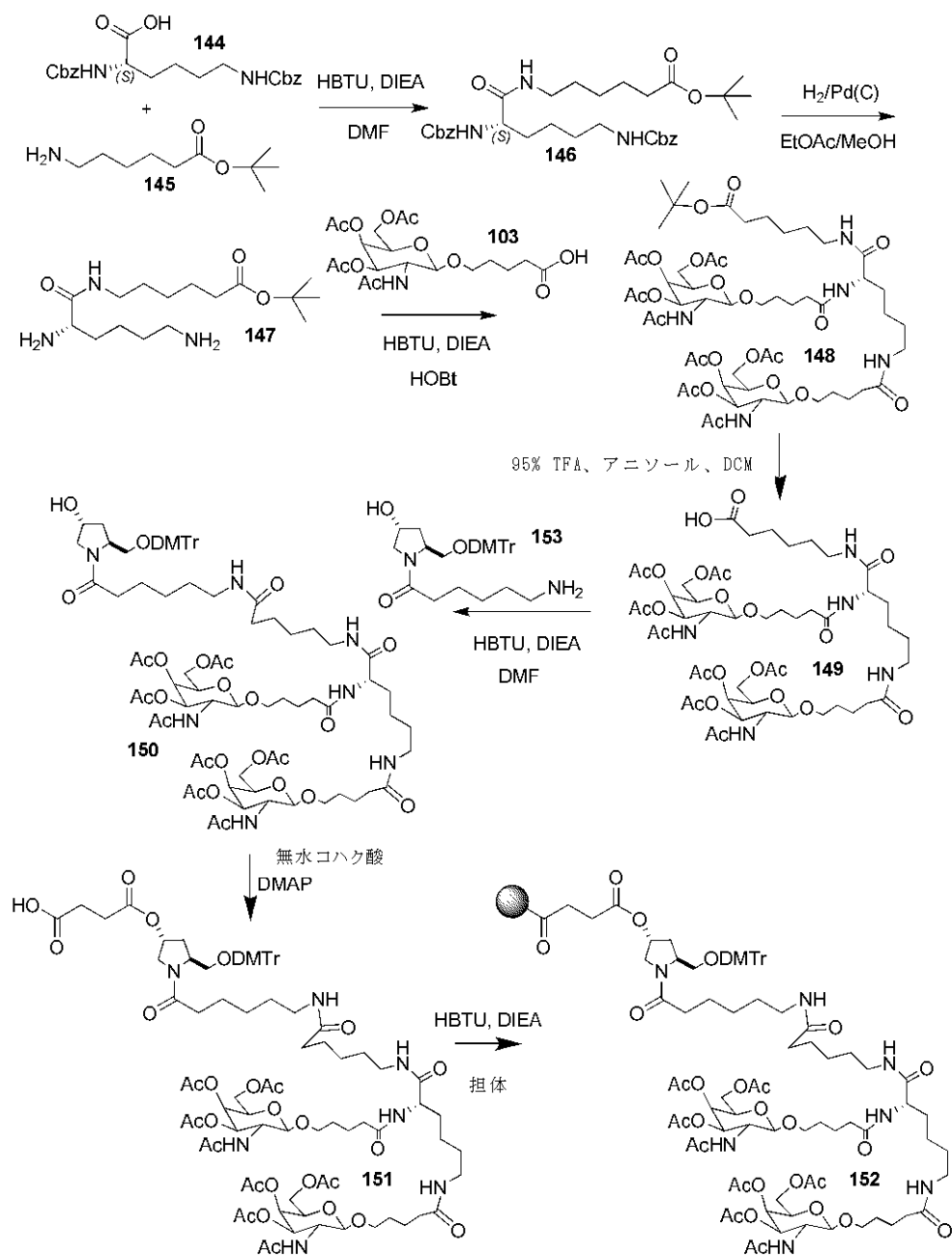
20

30

## 【0419】

## 実施例7．炭水化物複合体152の合成

【化 8 4】



【 0 4 2 0 】

1 4 6 の調製：

化合物 144 (26.55 g、64.06 ミリモル) と 145 (10.00 g、53.43 ミリモル) を DMF (150 mL) に溶解させた。そこに HBTU (24.12 g、64 ミリモル) と DIEA (46 mL、5 当量) を添加し、反応混合物を一晩撹拌した。TLC で確認し、混合物を氷冷水に添加し、エーテルと酢酸エチルの混合物で抽出し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を除去し、粗生成物をクロマトグラフィー (20% ~ 50% の酢酸エチル / ヘキサン) で精製して、所要の生成物をオフホワイトの固体 (23.20 g、74%) として得た。MS:  $C_{32}H_{45}N_3O_7$  の MW 計算値: 583.72、実測値 584.73 (M + H)。

【 0 4 2 1 】

1 4 7 の調製：

化合物 146 ( 3 . 3 0 g、 5 . 6 5 ミリモル ) を酢酸エチル / M e O H の混合物に溶

10

20

30

40

50

解させ、Pd/C (500 mg) を触媒として用いて、バルーン圧下で一晩水素化した。小型のセライトパッドに通して濾過し、溶媒を除去し、この生成物を、さらに精製することなく、次の反応に使用した。MS・C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>のMW計算値：315.25、実測値316.26 (M + H)。

#### 【0422】

148の調製：

化合物147 (5.65ミリモル) とGalNAc酸103 (5.81 g、12.99ミリモル) をDMF (80 mL) に溶解させた。そこにHBTU (4.97 g、13.10ミリモル) とDIEA (7.00 mL, 3当量) を添加し、反応混合物を一晩撹拌した。溶媒を除去し、残留物をDCMに溶解させ、水とブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を除去し、粗生成物をクロマトグラフィー (EtOAc、次いで3% ~ 10%のMeOH / DCM) で精製して、所要の生成物をオフホワイトの固体 (5.25 g、79%) として得た。MS・C<sub>54</sub>H<sub>87</sub>N<sub>5</sub>O<sub>23</sub>のMW計算値：1173.58、実測値1196.60 (M + Na)。

10

#### 【0423】

149の調製：

二分岐のGalNAc誘導体148 (5.15 g、4.40ミリモル) を15 mLの無水DCMに溶解させ、そこに3 mLのアニソールと30 mLのTFAを添加し、この反応混合物を周囲温度で2時間撹拌した。TLCで確認し、反応混合物にトルエンを添加し、溶媒を減圧下で除去した。トルエンと2回共蒸発させ、残留物をDCMに溶解させ、水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。粗生成物を濾過カラム (10%のMeOH / DCM) で精製して、所要の生成物を薄茶色の固体 (4.40 g、91%) として得た。MS・C<sub>50</sub>H<sub>79</sub>N<sub>5</sub>O<sub>23</sub>のMW計算値：1117.52、実測値1140.62 (M + Na)。

20

#### 【0424】

150の調製：

二分岐のGalNAc酸149 (4.30 g、3.84ミリモル) とヒドロキシプロリンアミン153 (2.25 g、1.1当量) をDMF (50 mL) に溶解させた。そこにHBTU (1.46 g、3.84ミリモル) とDIEA (3.3 mL) を添加し、反応混合物を3時間撹拌した。溶媒を除去し、残留物をDCMに溶解させ、水と重炭酸で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を除去し、粗生成物をクロマトグラフィー (3% ~ 10%のMeOH / DCM) で精製して、所要の生成物を白色の固体 (3.25 g、52%) として得た。MS・C<sub>82</sub>H<sub>117</sub>N<sub>7</sub>O<sub>27</sub>のMW計算値：1631.80、実測値1654.45 (M + Na)。

30

#### 【0425】

151の調製：

化合物150 (3.30 g、2.02ミリモル)、無水コハク酸 (0.404 g、2当量)、DMAP (0.740 g、3当量) をDCM (30 mL) 中に一緒に採取し、一晩撹拌する。溶媒を除去し、残留物を小型のシリカゲルパッドに通して濾過して、コハク酸塩をそのTEA塩151として得る。MS・C<sub>86</sub>H<sub>121</sub>N<sub>7</sub>O<sub>30</sub>のMW計算値：1731.82、実測値1753.87 (M + Na)。

40

#### 【0426】

固体担体152の調製：

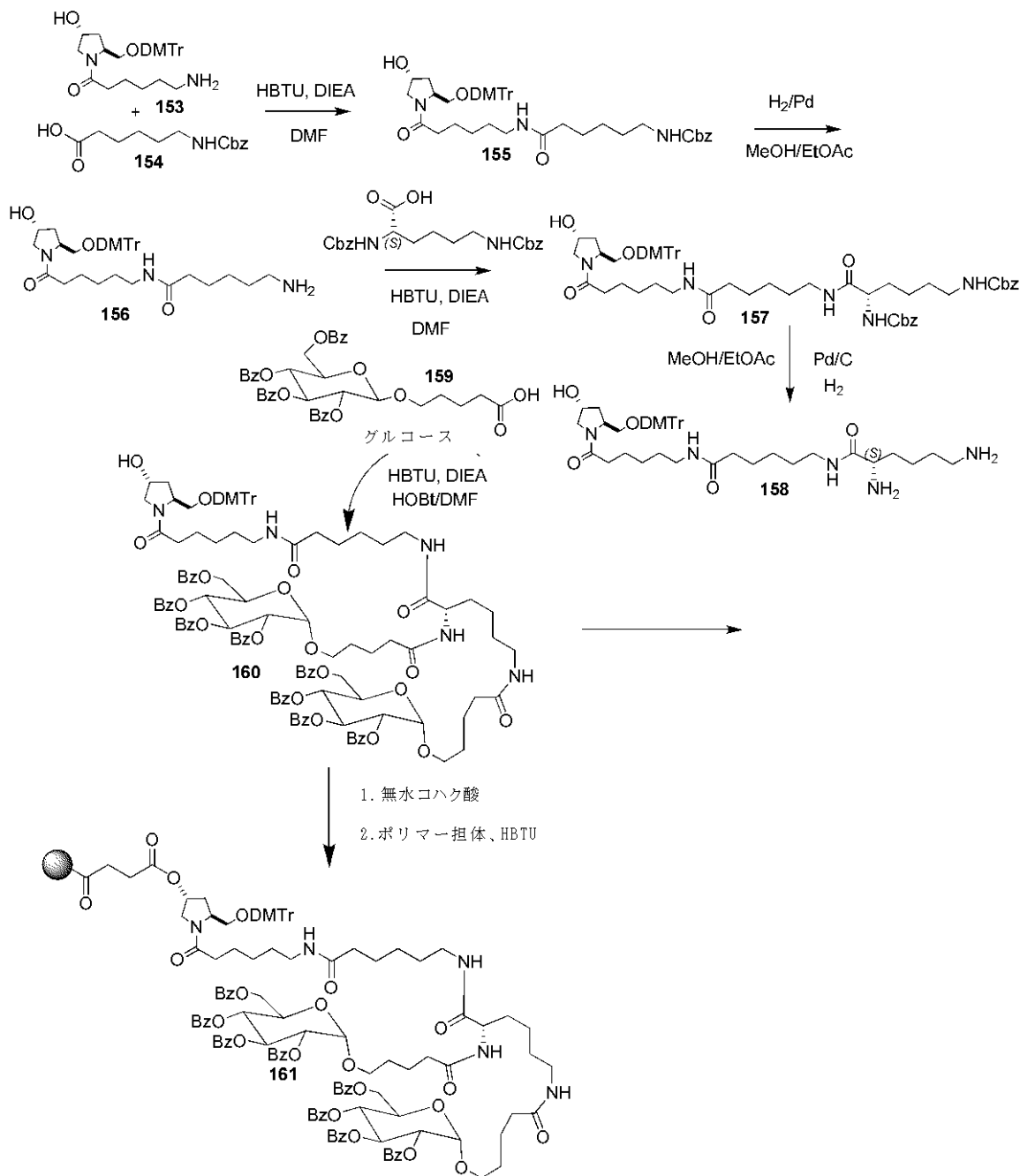
コハク酸塩151 (2.02ミリモル) とHBTU (0.842 g、1.1当量) をDMF (100 mL) に溶解させた。そこにDIEA (1.50 mL、過剰) を添加し、反応物を3 ~ 4分間旋回させた。そこにポリスチレン担体 (28 g) を添加し、混合物を一晩振盪させた。フリットに通して濾過し、DCM、10%のMeOH / DCM、DCM、およびエーテルで洗浄した。固体担体を真空下で2時間乾燥させた。これを25%のAc<sub>2</sub>O / Py混合物で30分間キャッピングした。同じ洗浄 / 乾燥手順を繰り返して固体担体152 (30.10 g、30マイクロモル / g装填量) を得た。

50

## 【 0 4 2 7 】

## 実施例 8 . 炭水化物複合体 1 6 1 の合成

## 【 化 8 5 】



## 【 0 4 2 8 】

## 1 5 5 の調製 :

ヒドロキシプロリンアミン 1 5 3 ( 1 0 . 0 0 g 、 1 8 . 7 6 ミリモル ) と 1 5 4 ( 4 . 9 8 g 、 1 8 . 7 6 ミリモル ) を D M F ( 1 0 0 m L ) に溶解させた。そこに H B T U ( 7 . 8 3 g 、 2 0 . 6 4 ミリモル ) と D I E A ( 9 . 8 1 m L 、 5 6 . 2 9 ミリモル ) を添加し、反応物を 2 時間攪拌した。T L C で確認し、混合物を氷冷水に添加し、エーテルと酢酸エチルの混合物で抽出し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を除去し、粗生成物をクロマトグラフィー ( 0 % ~ 1 5 % の M e O H / D C M ) で精製して、所要の生成物をオフホワイトの固体 ( 1 3 . 2 0 g 、 9 0 % ) として得た。M S .  $C_{46}H_{57}N_3O_8$  の M W 計算値 : 7 7 9 . 4 1 、実測値 7 8 0 . 4 2 ( M + H ) 。

## 【 0 4 2 9 】

10

20

30

40

50

## 156の調製:

化合物155 (13.00 g、16.66ミリモル)を酢酸エチル/MeOHの混合物に溶解させ、少量のトリエチルアミンの存在下、Pd/C (1.50 g)を触媒として用いて、バルーン圧下で一晩水素化した。小型のセライトパッドに通して濾過し、溶媒を除去し、この生成物を、さらに精製することなく、次の反応に使用した (9.93 g、92%)。MS:  $C_{38}H_{51}N_3O_6$ のMW計算値: 645.38、実測値646.40 (M+H)。

## 【0430】

## 157の調製:

化合物156 (9.90 g、15.33ミリモル)とジCbzリシン (6.36 g、15.33ミリモル)をDMF (100 mL)に溶解させた。そこにHBTU (6.11 g、15.33ミリモル)とDIEA (8 mL、過剰)を添加し、反応物を2時間撹拌した。TLCで確認し、混合物を氷冷水に添加し、エーテルと酢酸エチルの混合物で抽出し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を除去し、粗生成物をクロマトグラフィー (0%~10%のMeOH/DCM)で精製して、所要の生成物をオフホワイトの固体 (13.10 g、83%)として得た。MS:  $C_{60}H_{75}N_5O_{11}$ のMW計算値: 1041.55、実測値1042.57 (M+H)。

10

## 【0431】

## 158の調製:

化合物157 (12.90 g、12.37ミリモル)を酢酸エチル/MeOHの混合物に溶解させ、Pd/C (1.30 g)を触媒として用いて、バルーン圧下で水素化した。3時間後にTLCで確認し、小型のセライトパッドに通して濾過し、溶媒を除去し、この生成物を、さらに精製することなく、次の反応に使用した。MS:  $C_{44}H_{63}N_5O_7$ のMW計算値: 773.47、実測値774.50 (M+H)。

20

## 【0432】

## 160の調製:

化合物158 (2.32 g、3ミリモル)とグルコース酸159 (4.50 g、6.45ミリモル)をDMF (60 mL)に溶解させた。そこにHBTU (2.44 g、6.45ミリモル)とDIEA (3.36 mL、3当量)を添加し、反応物を2時間撹拌し、反応混合物を氷冷水中に入れ、EtOAc/DCMで抽出し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を除去し、粗生成物をクロマトグラフィー (EtOAc、次いで0%~10%のMeOH/DCM)で精製して、所要の生成物をオフホワイトの固体 (5.40 g、85%)として得た。MS:  $C_{122}H_{131}N_5O_{29}$ のMW計算値: 2129.89、実測値2152.90 (M+Na)。

30

## 【0433】

## 固体担体161の調製:

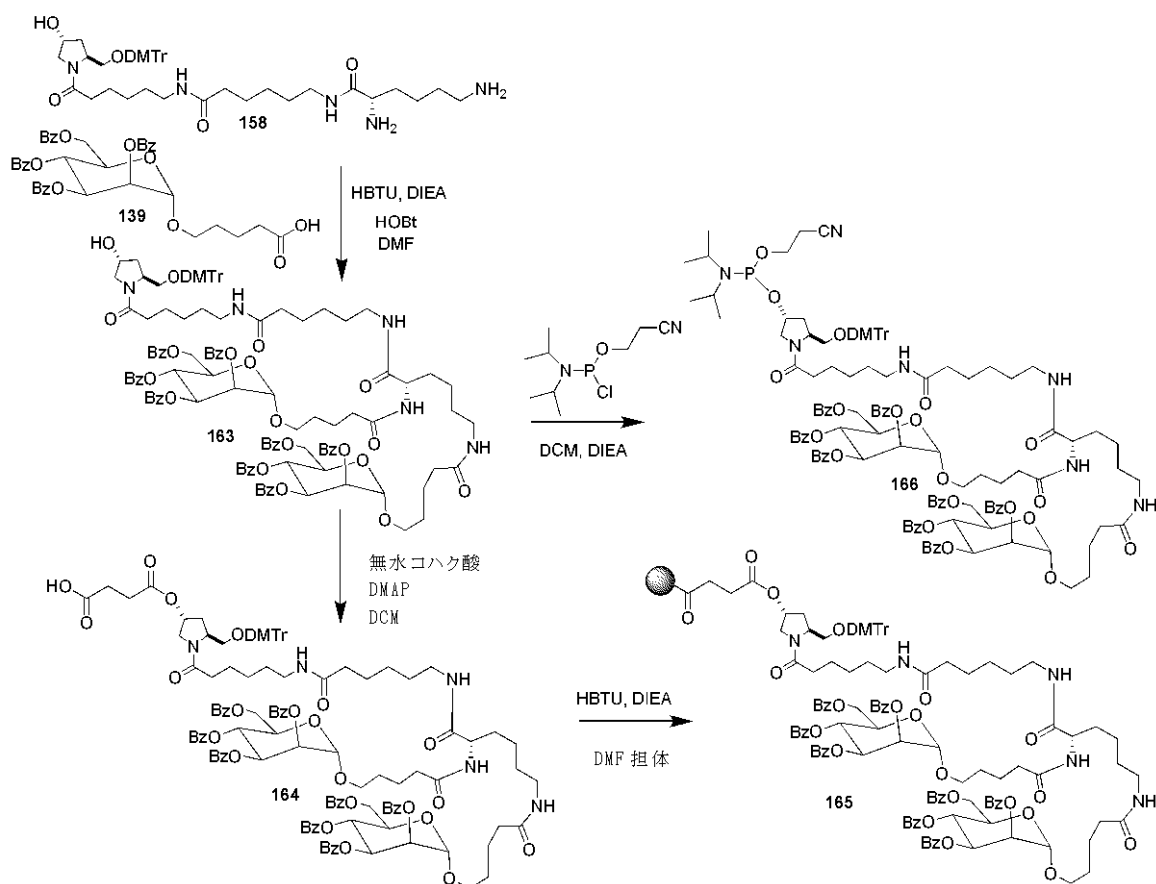
化合物160 (5.20 g、2.44ミリモル)、無水コハク酸 (0.488 g、2当量)、およびDMAP (0.894 g、3当量)をDCMに溶解させ、一晩撹拌した。反応混合物をDCMで希釈し、水と冷えた希釈クエン酸溶液で洗浄した。DCM層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を除去した。残留物を小型のシリカゲルパッドに通して濾過して、コハク酸塩を、そのTEA塩としてのオフホワイトの固体として得た。MS:  $C_{126}H_{135}N_5O_{32}$ のMW計算値: 2229.91、実測値2252.50 (M+Na)。コハク酸塩 (2.44ミリモル)とHBTU (0.925 g、1.2当量)をDMF (200 mL)に溶解させた。そこにDIEA (1.27 mL、過剰)を添加し、反応物を3~4分間旋回させた。そこにポリスチレン担体 (24 g)を添加し、混合物を24時間振盪させた。フリットに通して濾過し、DCM、10%のMeOH/DCM、DCM、およびエーテルで洗浄した。固体担体を真空下で2時間乾燥させた。これを25%のAc<sub>2</sub>O/Py混合物で30分間キャッピングした。同じ洗浄/乾燥手順を繰り返して、固体担体161 (27 g、31マイクロモル/g装填量)を得た。

40

## 【0434】

50

実施例 9 . 炭水化物複合体 165 および 166 の合成  
【化 86】



10

20

【0435】

163の調製:

化合物 158 (5.40 g、6.97 ミリモル) とマンノース酸 139 (9.96 g、14.30 ミリモル) を DMF (100 mL) に溶解させた。そこに HBTU (5.42 g、14.30 ミリモル) と DIEA (7.45 mL、過剰) を添加し、反応物を 2 時間攪拌し、反応混合物を氷冷水に注ぎ、EtOAc / DCM で抽出し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を除去し、粗生成物をクロマトグラフィー (EtOAc、次いで 2% ~ 10% の MeOH / DCM) で精製して、所要の生成物をオフホワイトの固体 (9.20 g、62%) として得た。MS:  $C_{122}H_{131}N_5O_{29}$  の MW 計算値: 2129.89、実測値 2152.65 (M + Na)。

30

【0436】

固体担体 165 の調製:

化合物 163 (3.20 g、1.408 ミリモル)、無水コハク酸 (0.2835 g、2 当量)、および DMAP (0.516 g、3 当量) を DCM に溶解させ、一晚攪拌した。反応混合物を DCM で希釈し、水と冷えた希釈クエン酸溶液で洗浄した。DCM 層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を除去した。残留物を小型のシリカゲルパッドに通して濾過して、コハク酸塩を、その TEA 塩としてのオフホワイトの固体として得た。MS:  $C_{126}H_{135}N_5O_{32}$  の MW 計算値: 2229.91、実測値 2252.90 (M + Na)。コハク酸塩 (1.408 ミリモル) と HBTU (0.640 g、1.2 当量) を DMF (200 mL) に溶解させた。そこに DIEA (1.22 mL、過剰) を添加し、反応物を 3 ~ 4 分間旋回させた。そこにポリスチレン担体 (20 g) を添加し、混合物を 24 時間振盪させた。フリットに通して濾過し、DCM、10% の MeOH / DCM、DCM、およびエーテルで洗浄した。固体担体を真空下で 2 時間乾燥させた。これを 25% の  $Ac_2$

40

50

O / P y 混合物で 30 分間キャッピングした。同じ洗浄 / 乾燥手順を繰り返して、固体担体 161 (23.2 g、54.7 マイクロモル / g 装填量) を得た。

【0437】

166 の調製 :

化合物 163 (4.01 g、1.88 ミリモル) を DCM (50 mL) に溶解させ、DIEA (0.65 mL、3.75 ミリモル) を添加した。この混合物にアミダイト試薬 (0.629 mL、2.822 ミリモル) を添加し、反応混合物を 15 分間撹拌した。TLC で確認し、反応混合物を分液漏斗に移し、水と重炭酸ナトリウム溶液で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を除去した。粗生成物をクロマトグラフィー (30% ~ 80% のアセトン / DCM) で精製して、生成物 (4.20 g、96%) を得た。<sup>31</sup>P NMR (CDCl<sub>3</sub>、400 MHz) = 148.19、147.79、147.33。MS・C<sub>131</sub>H<sub>148</sub>N<sub>7</sub>O<sub>30</sub>P の MW 計算値 : 2330.00、実測値 2353.20 (M + Na)。

10

【0438】

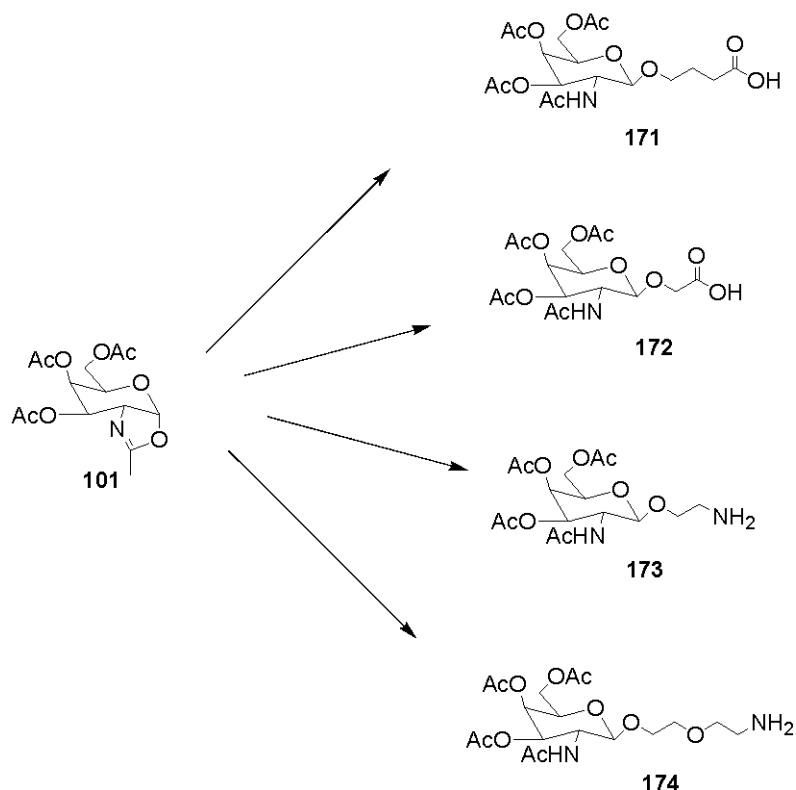
実施例 10 . 炭水化物複合体構成ブロックの合成

171、172、173、および 174 の合成 :

構成ブロック 171 と 172 は、103 の合成手順と同様の手順を用いて合成する。構成ブロック 173 と 174 は、105 の合成手順と同様の手順を用いて合成する。

【化 87】

20



30

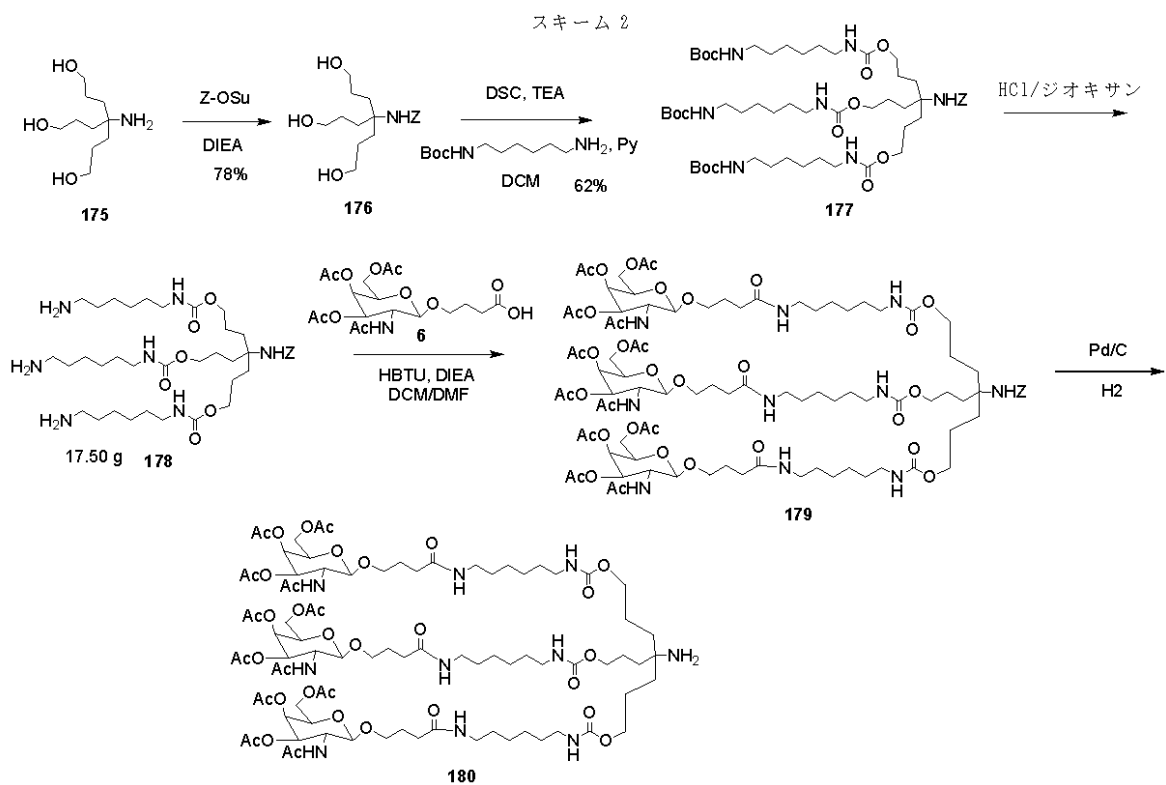
40

【0439】

180 の合成 :

構成ブロック 180 は、110 の合成手順と同様の手順を用いて合成する。

## 【化 8 8】



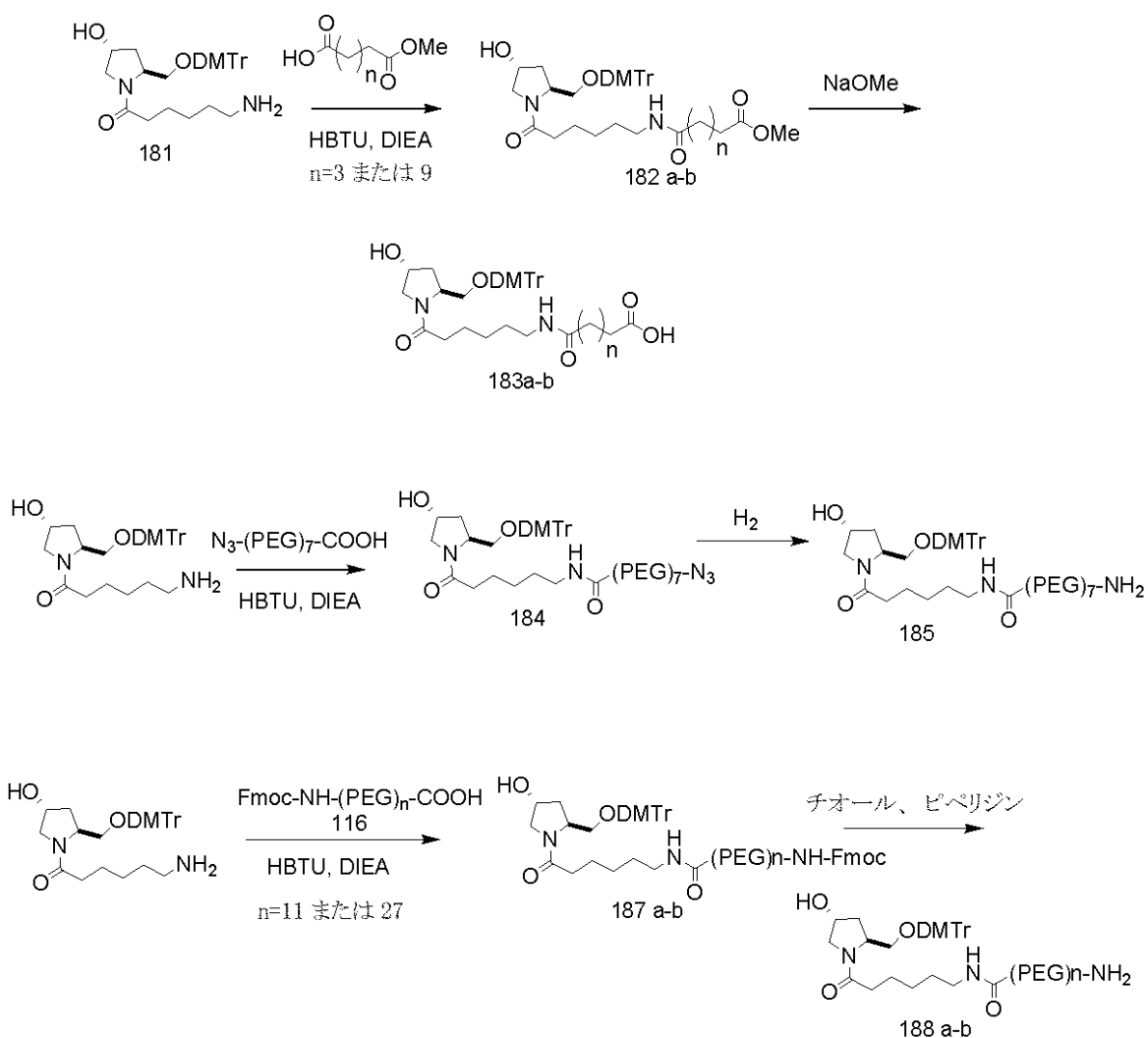
10

20

## 【 0 4 4 0】

構成ブロック 1 8 8 の合成：

【化 8 9】



【 0 4 4 1 】

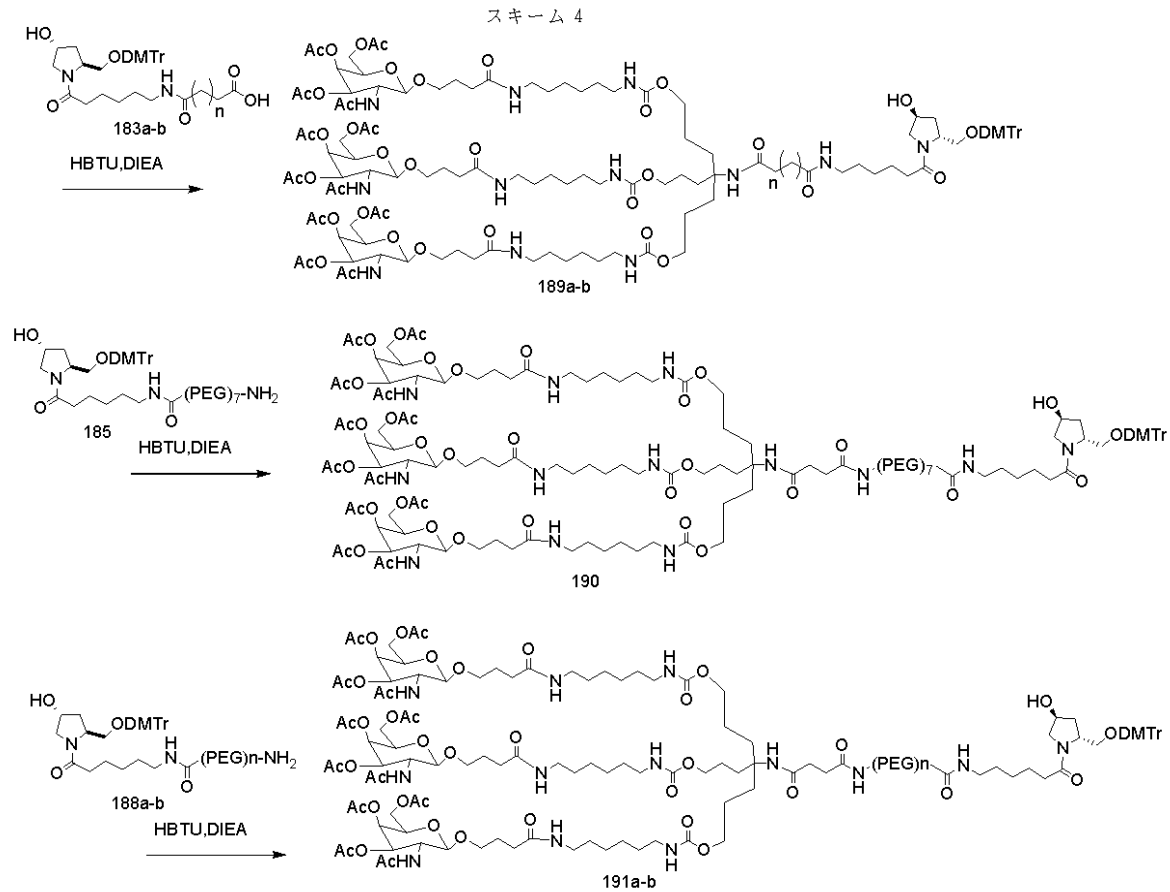
### 実施例 11 . 炭水化物複合体の合成

10

20

30

## 【化 9 0】



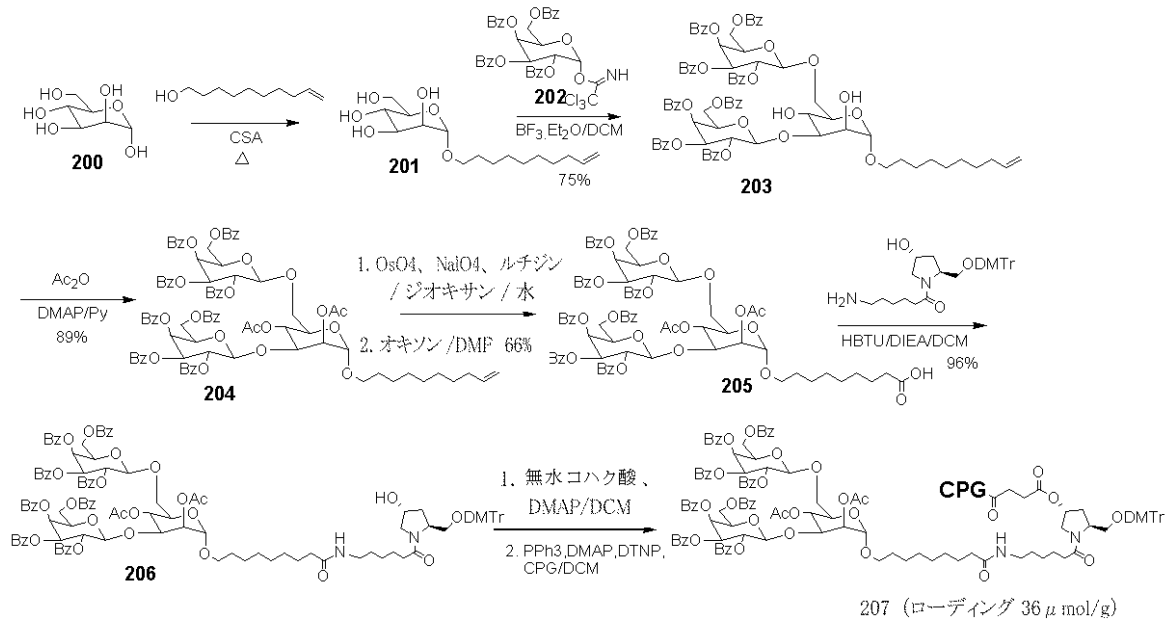
10

20

## 【 0 4 4 2】

構成ブロック 180 をアミン 183、185 および 188 と結合させて、それぞれ、炭水化物複合体 189、190 および 191 を提供する。

## 【化 9 1】



30

40

## 【 0 4 4 3】

201 の調製：

マンノース (10.00 g、55.53 ミリモル) とデシノール (100 g、溶媒) と CSA (500 mg) を 110 で、油浴で一晩撹拌した。デシノールの色は一晩で濃い

50

茶色になった。デシノールの大部分を減圧下で完全蒸留した。残留物をDCMに溶解させ、TEAで中和した。この溶液を水で抽出し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を除去し、残留物を小型のシリカゲルパッドによる濾過（初めに酢酸エチル、次に10%～15%のMeOH/DCM）で精製して、生成物（7.52 g、42%）を得た。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>、400 MHz) = 5.90～5.75 (m, 1H), 5.02～4.85 (m, 2H), 4.00～3.30 (m, 7H), 2.10～1.94 (m, 2H), 1.60～1.49 (m, 2H), 1.41～1.20 (m, 12H)。

#### 【0444】

203の調製：

化合物201（0.172 g、0.541ミリモル）をアルゴン雰囲気下で無水DCM（10 mL）に溶解させた。そこにMSを添加し、反応物を氷浴中で冷却した。BF<sub>3</sub>・Et<sub>2</sub>O（10 μl）を反応混合物に攪拌しながら転化した。ガラクトーストリクロロアセトイミデート202（1.00 g、1.35ミリモル）を15分かけて滴下して添加した。反応をTLCでモニタし、アクセプターがなくなった時点で、反応物をTEAで反応停止させ、DCMで希釈し、MSを濾過で除去し、乾燥させた。残留物をクロマトグラフィー（勾配溶出10%～40%のEtOAc/ヘキサン）で精製して、化合物を白色の綿毛状の固体（0.550 g、69%）として得た。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>、400 MHz) = 7.95～7.20 (m, 40H), 5.90～5.50 (m, 7H), 5.35 (d, J = 8.05 Hz, 1H), 5.17 (d, J = 8.06 Hz, 1H), 4.98～4.81 (m, 3H), 4.65～4.09 (m, 9H), 3.81～3.42 (m, 5H), 3.20 (bs, 1H), 2.79 (bs, 1H), 2.01～1.88 (m, 2H), 1.30～0.92 (m, 12H)。<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>、100 MHz) = 166.28, 166.20, 165.88, 165.76, 165.66, 165.64, 165.40, 139.34, 134.04, 133.82, 133.71, 133.66, 133.42, 133.30, 130.21, 129.99, 129.86, 129.70, 129.59, 129.28, 129.03, 129.00, 128.94, 128.77, 128.73, 128.63, 128.61, 128.54, 128.47, 128.44, 114.37, 102.74, 102.68, 98.81, 85.27, 72.43, 71.96, 71.37, 71.31, 71.01, 70.30, 70.26, 70.05, 68.31, 68.23, 67.41, 66.11, 62.63, 62.08, 33.96, 29.65, 29.58, 29.53, 29.58, 29.08, 26.20。MS・C<sub>84</sub>H<sub>82</sub>O<sub>24</sub>について計算された分子量、計算値1474.52、実測値1497.60 (M + Na)。

#### 【0445】

204の調製：

化合物203（0.104 g、0.07ミリモル）をDCM/Py（10 mL、1:1）とAc<sub>2</sub>O（0.5 mL、過剰）とDMAP（0.050 g）の混合物に溶解させ、反応物を一晩攪拌した。反応物をMeOHで反応停止し、溶媒を除去し、残留物をクロマトグラフィー（勾配溶出10%～30%のEtOAc/ヘキサン）で精製して、化合物を白色の綿毛状の固体（0.108 g、99%）として得た。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>、400 MHz) = 8.10～7.20 (m, 40H), 5.99 (dd, J = 3.1, 7.8 Hz, 2H), 5.88～5.75 (m, 2H), 5.70 (dd, J = 7.82, 10.43 Hz, 1H), 5.65～5.47 (m, 2H), 5.10～4.07 (m, 13H), 3.90～3.80 (m, 1H), 3.69～3.61 (m, 1H), 3.36～3.28 (m, 1H), 2.98～2.81 (m, 1H), 2.08 (s, 3H), 2.10～2.01 (m, 4H), 1.35 (s, 3H), 1.42～1.20 (m, 12H)。<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>、100 MHz) = 170.12, 170.08, 166.16, 165.67, 165.64, 165.48, 165.46, 164.78, 139.29, 133.80, 133.70, 133.70, 133.54, 133.44, 133.41, 133.35, 130.13, 130.02, 129.92, 129

. 69, 129.58, 129.49, 129.40, 129.15, 129.10, 128.88, 128.83, 128.79, 128.73, 128.66, 128.47, 128.40, 114.35, 102.32, 99.58, 96.64, 74.51, 72.11, 71.91, 71.46, 71.21, 69.78, 69.72, 69.51, 69.28, 68.19, 68.03, 67.82, 67.12, 61.97, 61.83, 33.94, 29.63, 29.61, 29.55, 29.49, 29.27, 29.20, 29.05, 26.11, 21.06, 20.02。MS:  $C_{88}H_{86}O_{26}$  について計算された分子量、計算値 1558.54、実測値 1581.8 (M + Na)。

#### 【0446】

205の調製:

10

化合物205 (1.36 g、0.873ミリモル) をジオキサン:水の混合物 (40 mL、3:1) に溶解させた。反応混合物に、ルチジン (0.203 mL、2当量)、次いで  $OsO_4$  溶液 (1 mL、0.05 M の tブタノール溶液) を添加した。過ヨウ素酸ナトリウム (0.774 g、4当量) を添加し、室温で4時間撹拌した。反応を TLC でモニタし、出発材料が消費された時点で、混合物を水で希釈し、DCM (3回) で抽出し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を全て除去し、残留物を次の反応に直接使用した。上記の反応からの残留物を DMF (20 mL) に溶解させ、そこにオキソン (0.590 g、1.05当量) を添加し、周囲温度で3時間撹拌した。出発材料が消費された時点で、2 mL の 1 M の HCl を添加し、酢酸エチルで希釈した。水、ブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を除去し、残留物をクロマトグラフィー (勾配抽出 0% ~ 40% の EtOAc / ヘキサン) で精製して、化合物を白色の固体 (1.08 g、79%) として得た。 $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ 、400 MHz) = 11.96 (s, 1H), 8.00 ~ 7.23 (m, 40H), 5.85 (d, J = 3.41 Hz, 1H), 5.82 (d, J = 3.17 Hz, 1H), 5.79 ~ 5.63 (m, 2H), 5.56 (dd, J = 8.00, 10.01 Hz, 1H), 5.41 (dd, J = 8.00, 10.01 Hz, 1H), 5.25 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 5.15 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 4.90 ~ 4.35 (m, 7H), 4.10 ~ 3.55 (m, 4H), 3.30 ~ 3.20 (m, 1H), 2.96 ~ 2.87 (m, 1H), 2.18 ~ 2.10 (m, 2H), 1.96 (s, 3H), 2.01 ~ 1.95 (m, 1H), 1.51 ~ 1.39 (m, 2H), 1.27 (s, 3H), 1.20 ~ 1.01 (m, 12H)。 $^{13}C$  NMR (CDCl<sub>3</sub>、100 MHz) = 178.68, 178.48, 170.26, 170.16, 166.25, 165.78, 165.73, 165.70, 165.54, 165.53, 164.83, 133.85, 133.75, 133.60, 133.49, 130.18, 130.08, 128.85, 129.61, 129.52, 129.44, 129.20, 129.13, 128.91, 128.89, 128.81, 128.78, 128.71, 128.51, 128.45, 102.34, 99.67, 96.65, 74.60, 72.17, 71.94, 71.49, 71.21, 69.82, 69.79, 69.59, 69.37, 68.22, 68.11, 67.81, 67.20, 64.55, 61.99, 61.85, 60.59, 44.06, 33.96, 30.79, 29.39, 29.31, 29.24, 29.20, 29.17, 29.08, 26.08, 24.85, 24.79, 22.20, 21.24, 21.11, 20.07。MS:  $C_{87}H_{84}O_{28}$  について計算された分子量、計算値 1576.51、実測値 1599.50 (M + Na)。

20

30

40

#### 【0447】

206の調製:

化合物205 (0.850 g、0.539ミリモル)、ヒドロキシプロリンアミン (0.300 g、0.563ミリモル)、および HBTU (0.265 g、0.698ミリモル) をアルゴン雰囲気下で DMF に溶解させた。そこに DIEA (0.281 mL、3当量) を添加し、周囲温度で3時間撹拌した。反応を TLC でモニタし、出発材料が消費された時点で、混合物を氷水混合物中に注ぎ入れ、酢酸エチルで抽出し、水、ブラインで洗

50

浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を除去し、残留物をクロマトグラフィー（まず酢酸エチル、次いで勾配溶出 3% ~ 10% の MeOH / DCM）で精製して、生成物を淡黄色の固体（1.09 g、96%）として得た。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) = 8.00 ~ 7.10 (m, 53 H), 6.90 ~ 6.80 (m, 4 H), 5.85 (d, J = 3.41 Hz, 1 H), 5.82 (d, J = 3.17 Hz, 1 H), 5.79 ~ 5.63 (m, 2 H), 5.56 (dd, J = 8.00, 10.01 Hz, 1 H), 5.41 (dd, J = 8.00, 10.01 Hz, 1 H), 5.25 (d, J = 7.8 Hz, 1 H), 5.15 (d, J = 7.8 Hz, 1 H), 4.97 (d, J = 4.15 Hz, 1 H), 4.90 ~ 4.80 (m, 3 H), 4.70 ~ 4.30 (m, 7 H), 4.20 ~ 4.00 (m, 2 H), 3.95 ~ 3.85 (m, 2 H), 3.70 (s, 6 H), 3.69 ~ 3.50 (m, 1 H), 3.30 ~ 3.20 (m, 2 H), 2.96 ~ 2.87 (m, 1 H), 2.18 ~ 2.10 (m, 2 H), 1.96 (s, 3 H), 2.01 ~ 1.95 (m, 1 H), 1.51 ~ 1.39 (m, 2 H), 1.27 (s, 3 H), 1.20 ~ 1.01 (m, 20 H)。<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) = 171.87, 170.85, 169.46, 169.04, 165.25, 165.21, 165.09, 164.95, 164.48, 164.53, 162.29, 158.09, 157.97, 145.08, 135.87, 135.73, 134.04, 133.74, 133.56, 129.60, 129.18, 129.06, 128.91, 128.84, 128.81, 128.75, 128.67, 128.63, 128.52, 128.41, 127.77, 127.58, 113.19, 113.09, 102.30, 99.60, 96.60, 85.10, 75.68, 71.48, 70.02, 69.81, 68.99, 68.58, 66.55, 61.86, 54.96, 45.74, 38.27, 36.32, 35.76, 35.46, 34.15, 30.74, 28.69, 26.20, 25.34, 26.20, 25.34, 24.15, 20.48, 19.54。MS: C<sub>119</sub>H<sub>122</sub>N<sub>2</sub>O<sub>32</sub> について計算された分子量、計算値 2090.80、実測値 2013.90 (M + Na)。

10

20

#### 【0448】

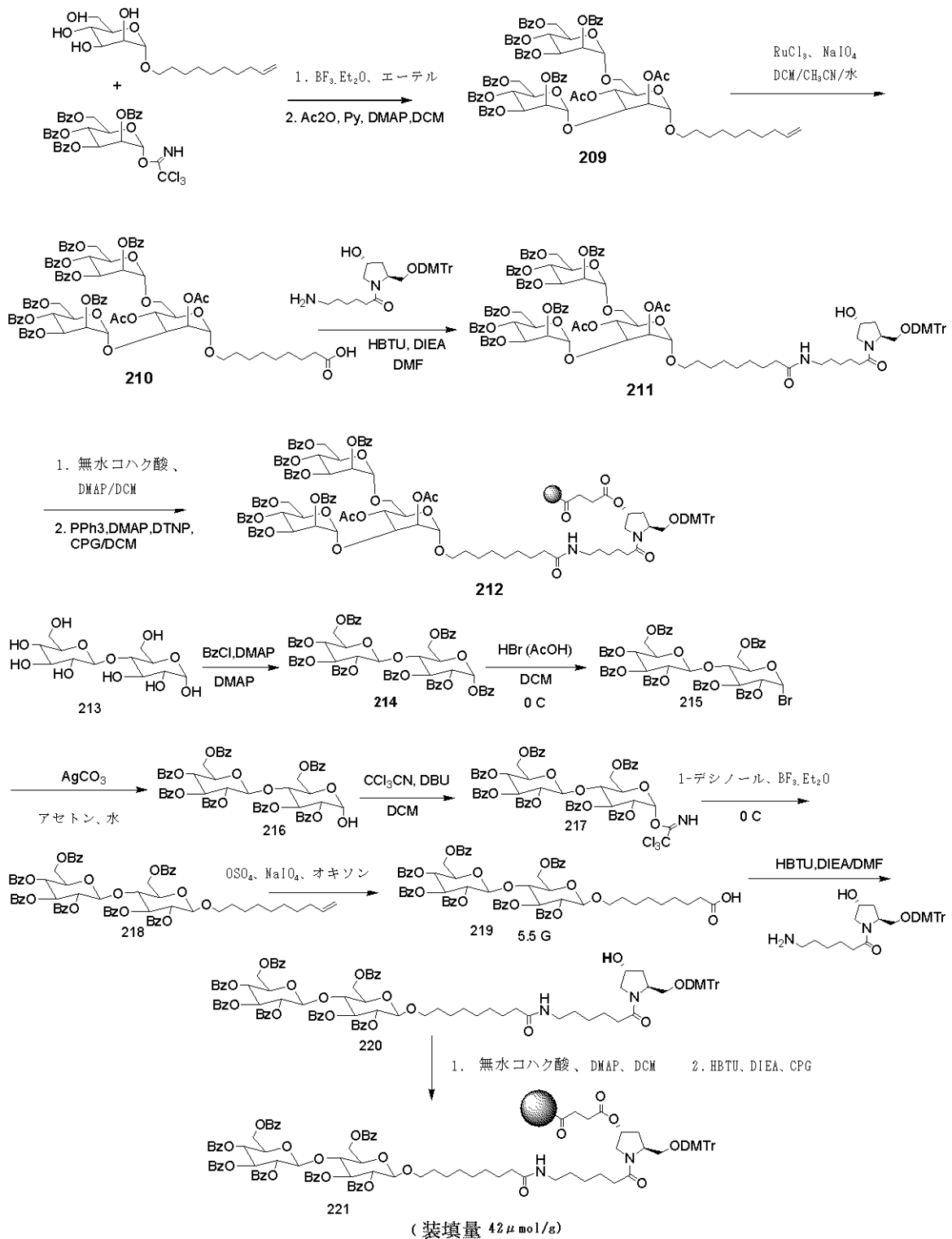
長いアルキル鎖 CPG 207 の調製：

ヒドロキシ誘導体 206 (0.550 g、0.263 ミリモル) を DCM (10 mL) に溶解させ、そこに無水コハク酸 (0.078 g、3 当量) と DMAP (0.128 g、4 当量) を添加し、一晩攪拌した。TLC によって反応が完了したことが示された。反応混合物を DCM (20 mL) で希釈し、冷えた希釈クエン酸溶液と水で連続的に洗浄し (2 回)、硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を除去し、高真空下で乾燥させて、コハク酸塩を得た。PPH<sub>3</sub> (0.90 g、1.3 当量)、DMAP (0.048 g、1.5 当量)、および前工程からのコハク酸塩を、アセトニトリルと DCM の混合物 (6 mL) に溶解させた。上記の溶液に DTNP (0.086 g、1.05 当量) の DCM (1 mL) 溶液を添加した。混合物を 3 ~ 4 分間ゆっくりと振盪させた。長鎖アルキルアミン - CPG (1c aa CPG、1.40 g、133 マイクロモル / g) を混合物に添加し、2 時間穏やかに振盪させた。CPG を濾過し、濾液が無色の状態である間、DCM、MeOH / DCM (1 : 9) の混合物、および DCM で連続的に洗浄し、乾燥させた。乾燥した CPG を別のフラスコに移し、穏やかに振盪させながら、TEA (1 mL) の存在下、ピリジン (25%) 中の Ac<sub>2</sub>O で 15 分間処理した。最後に、CPG を濾過し、DCM、DCM : MeOH (9 : 1)、次いで DCM、およびエーテルで洗浄した。CPG 207 を真空下で一晩乾燥させ、報告されている通りに装填量を測定した (1.48 g、装填量 36 マイクロモル / g)。

30

40

## 【化 9 2】



## 【 0 4 4 9 】

化合物 2 1 7 は、報告されている手順に従って合成した (Martin, C.; Karen, P.; Laurence, V. Chem. Pharm. Bull. 2004, 52, 965-971.)。

## 【 0 4 5 0 】

2 1 8 の調製：

1 - デシノール ( 0 . 3 0 0 g 、 1 . 9 2 ミリモル ) とトリクロロアセトイミデート 2

10

20

30

40

50

17 (2.33 g、1.2当量)をアルゴン雰囲気下で無水DCM (10 mL)に溶解させた。そこにMSを添加し、反応物を氷浴で冷却した。BF<sub>3</sub>・Et<sub>2</sub>O (30 μl)を反応混合物に攪拌しながら添加した。反応をTLCでモニタし、受容体が反応し終わったら、反応物をTEAで反応停止させ、DCMで希釈し、MSを濾過により除去し、乾燥させた。残留物をクロマトグラフィー (勾配溶出10~40%のEtOAc/ヘキサン)により精製して、化合物を白色の綿毛状の固体 (2.01 g、86%)として得た。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>、400 MHz) = 7.80~8.12 (m, 10H), 7.60~7.78 (m, 4H), 7.18~7.60 (m, 21H), 6.20~6.05 (m, 2H), 5.60~5.91 (m, 5H), 5.10~5.43 (m, 3H), 3.80~5.02 (m, 7H), 3.40~3.56 (m, 1H), 1.95~2.10 (m, 4H), 1.00~1.60 (m, 11H)。<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>、100 MHz) = 169.89, 166.51, 166.40, 166.35, 166.32, 166.24, 166.10, 166.03, 165.99, 165.96, 165.86, 165.61, 165.46, 166.38, 165.34, 165.27, 165.23, 163.68, 139.36, 133.71, 133.67, 133.56, 133.40, 133.27, 133.21, 130.12, 130.05, 129.98, 129.95, 129.92, 129.88, 129.80, 129.77, 129.73, 129.68, 129.62, 129.55, 129.50, 129.47, 129.41, 129.40, 129.29, 129.14, 129.11, 129.03, 128.96, 128.87, 128.84, 128.83, 128.78, 128.76, 128.63, 128.56, 128.54, 128.48, 128.37, 128.26, 114.33, 114.26, 100.92, 100.84, 97.04, 96.52, 75.36, 75.17, 74.84, 73.37, 72.95, 72.90, 72.81, 72.57, 72.507, 71.94, 71.58, 71.05, 70.37, 70.27, 70.19, 70.06, 69.86, 69.24, 69.19, 69.02, 63.71, 63.56, 63.20, 62.93, 62.69, 33.96, 33.91, 32.93, 29.60, 29.53, 29.50, 29.46, 29.42, 29.33, 29.30, 29.22, 29.14, 29.06, 29.00。MS: C<sub>71</sub>H<sub>68</sub>O<sub>18</sub>について計算された分子量、計算値1208.44、実測値1231.4 (M+N a)。

10

20

30

#### 【0451】

219の調製:

化合物218 (7.26 g、6ミリモル)をジオキサン:水の混合物 (100 mL、3:1)に溶解させた。反応混合物に、ルチジン (0.7 mL、2当量)を、次いでOsO<sub>4</sub>溶液 (5 mL、0.05 Mのtブタノール溶液)を添加した。過ヨウ素酸ナトリウム (5.11 g、4当量)を添加し、室温で4時間攪拌した。反応をTLCでモニタし、出発材料が消費された時点で、混合物を水で希釈し、DCMで抽出し (3回)、硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を全て除去し、残留物を次の反応に直接使用した。上記の反応からの残留物をDMF (60 mL)に溶解させ、そこにオキソン (3.86 g、1.05当量)を添加し、そして周囲温度で3時間攪拌した。出発材料が消費された時点で、10 mLの1 MのHClを添加し、酢酸エチルで希釈した。水、ブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を除去し、残留物をクロマトグラフィー (勾配溶出20%~40%のEtOAc/ヘキサン)で精製して、化合物219を白色の固体 (5.50 g、75%)として得た。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>、400 MHz) = 12.00 (bs, 1H), 8.42~7.10 (m, 35H), 6.10~4.5 (m, 13H), 4.20~3.30 (m, 3H), 2.20~2.03 (m, 3H), 1.50~0.8 (11H)。<sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>、100 MHz) = 174.55, 174.51, 169.13, 165.59, 165.52, 165.39, 165.27, 165.24, 165.14, 164.99, 164.88, 164.75, 164.70, 164.66, 164.60, 164.54, 164.50, 162.92, 165.59, 16

40

50

5 . 5 1 , 1 6 5 . 3 9 , 1 6 5 . 2 7 , 1 6 5 . 2 4 , 1 6 5 . 1 4 , 1 6 4 . 9 9 ,  
 1 6 4 . 8 8 , 1 6 4 . 7 5 , 1 6 4 . 7 0 , 1 6 4 . 6 0 , 1 6 4 . 5 4 , 1 6 4 . 5  
 0 , 1 3 3 . 8 0 , 1 3 3 . 7 1 , 1 3 3 . 5 8 , 1 3 3 . 4 2 , 1 3 3 . 2 9 , 1 3 3  
 . 1 5 , 1 2 9 . 8 8 , 1 2 9 . 4 2 , 1 2 9 . 3 6 , 1 2 9 . 2 9 , 1 2 9 . 2 3 , 1  
 2 9 . 2 0 , 1 2 9 . 1 2 , 1 2 9 . 0 7 , 1 2 9 . 0 5 , 1 2 9 . 0 3 , 1 2 8 . 9 1  
 , 1 2 8 . 8 8 , 1 2 8 . 7 2 , 1 2 8 . 5 9 , 1 2 8 . 4 8 , 1 2 8 . 3 8 , 9 9 . 9  
 6 , 9 9 . 2 9 , 9 9 . 2 2 , 9 5 . 9 6 , 9 5 . 6 4 , 9 5 . 2 2 , 9 3 . 1 0 , 7 5  
 . 6 1 , 7 4 . 8 6 , 7 4 . 5 7 , 7 4 . 3 7 , 7 4 . 1 5 , 7 3 . 5 9 , 7 3 . 1 4 ,  
 7 2 . 5 8 , 7 1 . 4 6 , 7 1 . 1 5 , 7 0 . 4 8 , 7 0 . 3 1 , 7 0 . 0 9 , 6 9 . 9  
 7 , 6 9 . 0 0 , 6 8 . 8 7 , 6 8 . 2 2 , 6 7 . 8 1 , 6 3 . 6 5 , 6 2 . 4 9 , 6 0  
 . 7 3 , 5 9 . 7 6 , 4 3 . 0 1 , 3 3 . 6 8 , 3 3 . 6 2 , 3 2 . 5 4 , 2 8 . 8 4 ,  
 2 8 . 8 2 , 2 8 . 6 1 , 2 8 . 5 5 , 2 8 . 4 7 , 2 8 . 4 0 , 2 5 . 4 7 , 2 5 . 2  
 1 , 2 4 . 5 2 , 2 4 . 4 3 , 2 0 . 4 5 。 MS .  $C_{70}H_{66}O_{20}$  について計算された分子  
 量、計算値 1 2 2 6 . 4 1 、実測値 1 2 4 9 . 4 ( M + N a ) 。

10

20

30

40

# 【 0 4 5 2 】

2 2 0 の調製 :

化合物 2 1 9 ( 1 . 6 5 g 、 1 . 3 7 ミリモル ) 、ヒドロキシプロリンアミン ( 0 . 9  
 4 5 g 、 1 . 3 当量 ) 、および H B T U ( 0 . 6 2 3 g 、 1 . 6 4 ミリモル ) をアルゴン  
 雰囲気下で D M F に溶解させた。そこに D I E A ( 0 . 7 1 m L 、 3 当量 ) を添加し、周  
 囲温度で 3 時間攪拌した。反応を T L C でモニタし、出発材料が消費された時点で、混合  
 物を氷水混合物中に注ぎ入れ、酢酸エチルで抽出し、水、ブラインで洗浄し、硫酸ナトリ  
 ウムで乾燥させた。溶媒を除去し、残留物をクロマトグラフィー ( まず酢酸エチル、次い  
 で勾配溶出 3 % ~ 1 0 % の M e O H / E t O A c ) で精製して、生成物 2 2 0 を淡黄色の  
 固体 ( 1 . 5 5 g 、 6 5 % ) として得た。  $^1H$  NMR ( DMSO -  $d_6$  、 4 0 0 M H z )  
 = 8 . 2 0 ~ 7 . 3 2 ( m , 3 5 H ) , 7 . 3 2 ~ 7 . 1 0 ( m , 9 H ) , 6 . 9 0 ~  
 6 . 8 2 ( m , 4 H ) , 6 . 0 0 ~ 5 . 6 3 ( m , 4 H ) , 5 . 4 1 ~ 5 . 3 7 ( m , 1  
 H ) , 5 . 2 0 ~ 5 . 0 3 ( m , 2 H ) , 4 . 9 8 ( d , J = 4 . 1 5 H z , 1 H ) ,  
 4 . 9 0 ( d , J = 4 . 1 5 H z , 1 H ) , 4 . 8 8 ~ 4 . 0 5 ( m , 9 H ) , 3 . 7 0  
 ( s , 6 H ) , 3 . 6 5 ~ 2 . 9 3 ( m , 1 0 H ) , 2 . 2 0 ~ 0 . 8 0 ( m , 2 2 H )  
 。  $^{13}C$  NMR ( DMSO -  $d_6$  、 1 0 0 M H z ) = 1 7 1 . 8 1 , 1 7 0 . 9 4 , 1 7  
 0 . 9 0 , 1 7 0 . 8 4 , 1 6 5 . 5 6 , 1 6 5 . 5 3 , 1 6 5 . 4 9 , 1 6 5 . 1 9 ,  
 1 6 5 . 1 2 , 1 6 4 . 8 7 , 1 6 4 . 7 2 , 1 6 4 . 6 3 , 1 6 4 . 5 8 , 1 6 4 . 4  
 6 , 1 5 8 . 0 9 , 1 5 8 . 0 3 , 1 5 7 . 9 6 , 1 4 5 . 0 8 , 1 4 4 . 7 4 , 1 3 5  
 . 8 7 , 1 3 5 . 7 3 , 1 3 5 . 4 8 , 1 3 5 . 4 2 , 1 3 3 . 8 0 , 1 3 3 . 5 7 , 1  
 3 3 . 4 2 , 1 3 3 . 2 9 , 1 2 9 . 6 0 , 1 2 9 . 5 5 , 1 2 9 . 2 6 , 1 2 9 . 2 0  
 , 1 2 9 . 0 4 , 1 2 9 . 0 0 , 1 2 8 . 8 7 , 1 2 8 . 7 4 , 1 2 8 . 6 9 , 1 2 8 .  
 5 9 , 1 2 8 . 3 6 , 1 2 8 . 3 4 , 1 2 8 . 2 7 , 1 2 8 . 0 2 , 1 2 7 . 8 6 , 1 2  
 7 . 7 7 , 1 2 7 . 5 7 , 1 2 6 . 7 4 , 1 2 6 . 5 6 , 1 1 3 . 1 9 , 1 1 3 . 0 9 ,  
 9 9 . 2 6 , 9 5 . 9 4 , 8 5 . 7 7 , 8 5 . 1 0 , 7 4 . 8 3 , 7 3 . 5 8 , 7 2 . 5  
 5 , 7 1 . 4 3 , 7 0 . 4 4 , 7 0 . 0 7 , 6 9 . 0 1 , 6 8 . 8 7 , 6 8 . 5 8 , 6 8  
 . 1 9 , 6 7 . 4 5 , 6 5 . 1 9 , 6 3 . 2 9 , 6 3 . 4 8 , 6 3 . 3 3 , 6 2 . 4 7 ,  
 5 9 . 7 5 , 5 5 . 5 9 , 5 4 . 9 9 , 5 4 . 9 6 , 5 3 . 4 4 , 4 4 . 5 6 , 3 8 . 2  
 1 , 3 6 . 3 0 , 3 5 . 7 6 , 3 5 . 4 1 , 3 4 . 1 5 , 3 2 . 5 2 , 3 0 . 7 4 , 3 0  
 . 1 5 , 2 9 . 0 9 , 2 8 . 8 4 , 2 8 . 6 6 , 2 8 . 5 6 , 2 8 . 5 2 , 2 6 . 1 8 ,  
 2 5 . 2 7 , 2 5 . 2 2 , 2 4 . 5 4 , 2 4 . 1 4 . 2 1 . 2 2 , 2 0 . 7 5 , 2 0 . 7  
 1 , 1 8 . 5 9 , 1 4 . 0 7 , 1 3 . 5 4 。 MS .  $C_{102}H_{104}N_2O_{24}$  について計算され  
 た分子量、計算値 1 7 4 0 . 7 0 、実測値 1 2 6 3 . 7 ( M + N a ) 。

# 【 0 4 5 3 】

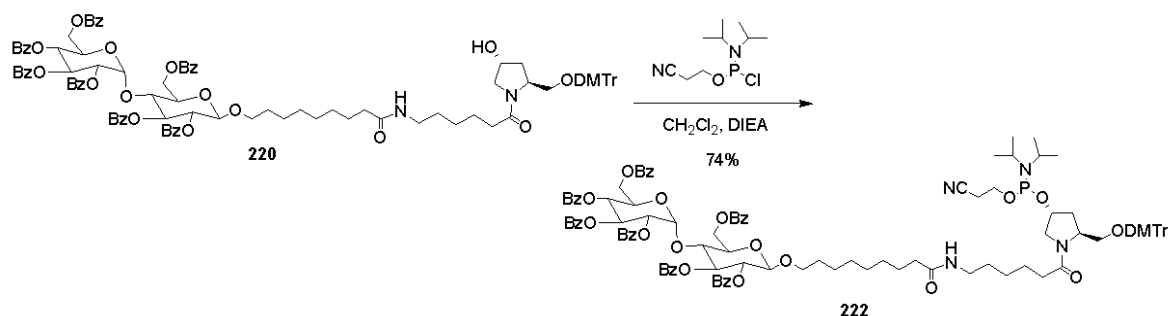
長いアルキル鎖 C P G 2 2 1 の調製 :

ヒドロキシ誘導体 2 2 0 ( 1 . 5 0 g 、 0 . 8 6 2 ミリモル ) を D C M ( 2 0 m L ) に

50

溶解させ、そこに無水コハク酸（0.174 g、2 当量）と DMAP（0.316 g、3 当量）を添加し、一晚撹拌した。TLC によって反応が完了したことが示された。反応混合物を DCM（20 mL）で希釈し、冷えた希釈クエン酸溶液と水で連続的に洗浄し（2 回）、硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を除去し、高真空下で乾燥させて、コハク酸塩を得た。前工程からのコハク酸塩と HBTU（0.392 g、1.2 当量）を DMF（30 mL）に溶解させた。そこに DIEA（0.450 mL）を添加し、混合物をアルゴン雰囲気下で 5 分間撹拌した。長鎖アルキルアミン - CPG（1 caa CPG、5.30 g、133 マイクロモル / g）を混合物に添加し、2 時間穏やかに振盪させた。CPG を濾過し、DMF、DCM / MeOH の混合物、および DCM で連続的に洗浄し、乾燥させた。乾燥した CPG を別のフラスコに移し、穏やかに振盪させながら、TEA（1 mL）の存在下、ピリジン（25%）中の  $\text{Ac}_2\text{O}$  で 15 分間処理した。最後に、CPG を濾過し、DCM、DCM : MeOH（9 : 1）、次いで DCM、およびエーテルで洗浄した。CPG 221 を真空下で一晩乾燥させ、報告されている通りに装填量を測定した（5.62 g、装填量：42 マイクロモル / g）。

### 【化 93】



### 【0454】

ヒドロキシ誘導体 220（0.200 g、0.115 ミリモル）を無水 DCM（5 mL）に溶解させ、そこに DIEA（0.80 mL）とクロロアミダイト試薬（0.068 mL）を添加し、一晚撹拌した。反応を TLC でモニタし、溶媒を減圧下で除去し、（TEA で中和した）シリカゲルカラムに直接充填した。まず 2 : 1（EtOAc / ヘキサン）、次いで EtOAc で溶出して、生成物（0.150 g、67%）を得た。 $^1\text{H NMR}$ （ $\text{CDCl}_3$ 、400 MHz） = 7.10 ~ 8.12（m, 48 H），6.85 ~ 6.75（m, 4 H）6.10（t,  $J = 10.19 \text{ Hz}$ , 1 H），5.80 ~ 5.60（m, 3 H），5.33 ~ 5.20（m, 2 H），5.00 ~ 4.06（m, 12 H），3.77（s, 6 H），3.90 ~ 3.05（m, 16 H），2.80 ~ 1.01（27 H）。 $^{31}\text{P}$ （ $\text{CDCl}_3$ 、161 MHz） = 145.83, 145.41, 144.95。MS・ $\text{C}_{111}\text{H}_{121}\text{N}_4\text{O}_{25}$  について計算された分子量、計算値 1940.81、実測値 1963.80（M + Na）。

### 【0455】

#### 実施例 12. RNA 合成および二重鎖アニーリング

##### 1. オリゴヌクレオチド合成：

オリゴヌクレオチドは全て、AKTA oligopilot 合成機または ABI 394 合成機で合成された。別記されない限り、市販の制御多孔質ガラス固体担体（dT-CPG、500、Prime Synthesis 社製）と、標準的な保護基を有する RNA ホスホラミダイト、すなわち、5'-O-ジメトキシトリチル-N6-ベンゾイル-2'-t-ブチルジメチルシリル-アデノシン-3'-O-N,N'-ジイソプロピル-2'-シアノエチルホスホラミダイト、5'-O-ジメトキシトリチル-N4-アセチル-2'-t-ブチルジメチルシリル-シチジン-3'-O-N,N'-ジイソプロピル-2-

シアノエチルホスホラミダイト、5'-O-ジメトキシトリチル-N<sup>2</sup>-イソブチリル-2'-t-ブチルジメチルシリル-グアノシン-3'-O-N,N'-ジイソプロピル-2'-シアノエチルホスホラミダイト、および5'-O-ジメトキシトリチル-2'-t-ブチルジメチルシリル-ウリジン-3'-O-N,N'-ジイソプロピル-2'-シアノエチルホスホラミダイト(Pierce Nucleic Acids Technologies社製)を、オリゴヌクレオチド合成に使用した。2'-Fホスホラミダイト、5'-O-ジメトキシトリチル-N<sup>4</sup>-アセチル-2'-フルオロ-シチジン-3'-O-N,N'-ジイソプロピル-2'-シアノエチル-ホスホラミダイト、および5'-O-ジメトキシトリチル-2'-フルオロ-ウリジン-3'-O-N,N'-ジイソプロピル-2'-シアノエチル-ホスホラミダイトは、Promega社から購入した。10%のTHF/ANC(v/v)中、0.2Mの濃度で使用したグアノシンを除いて、ホスホラミダイトは全て、アセトニトリル(CH<sub>3</sub>CN)中、0.2Mの濃度で使用した。16分の連結/再利用時間を使用した。活性剤は、5-エチルチオテトラゾール(0.75M、American International Chemicals社製)であり、PO-酸化については、ヨウ素/水/ピリジンを使用し、PS-酸化については、2,6-ルチジン/ACN(1:1 v/v)中のPADS(2%)を使用した。

10

20

30

40

50

#### 【0456】

リガンドが結合した鎖を、対応するリガンドを含有する固体担体を用いて合成した。例えば、配列の3'-末端での炭水化物部分/リガンド(例えば、GalNAcについて)の導入は、対応する炭水化物固体担体を用いて合成を開始することによって行った。同様に、3'-末端のコレステロール部分は、コレステロール担体上で合成を開始することによって導入した。一般に、リガンド部分を、先の実施例に記載されたような最適なテザーを介してトランス-4-ヒドロキシブチリノールに連結させて、ヒドロキシブチリノール-リガンド部分を得た。その後、ヒドロキシブチリノール-リガンド部分を、コハク酸トリリンカーを介して固体担体と連結させるか、または標準的なホスフィチル化条件によってホスホラミダイトに転化し、所望の炭水化物複合体構成ブロックを得た。詳細については実施例1~11を参照されたい。フルオロフォア標識siRNAを、対応するホスホラミダイトまたは固体担体(Biosearch Technologies社から購入)から合成した。オレイルリトコール酸(GalNAc)<sub>3</sub>ポリマー担体は、38.6マイクロモル/グラムの装填量で自家生産した。マンノース(Man)<sub>3</sub>ポリマー担体も、42.0マイクロモル/グラムの装填量で自家生産した。

#### 【0457】

所望の位置での、例えば、配列の5'-末端での、最適なりガンドの結合は、別記されない限り、標準的なホスホラミダイト連結条件下で、対応するホスホラミダイトを、成長中の鎖に連結させることによって行った。固体に結合したオリゴヌクレオチドに対する、5-(エチルチオ)-1H-テトラゾール活性剤の存在下でのホスホラミダイトの0.1M無水CH<sub>3</sub>CN溶液の延長15分の連結。報告されている通りに(1)標準的なヨウ素水を用いて、または結合したオリゴヌクレオチドの10分の酸化待ち時間を伴う、tert-ブチルヒドロペルオキシド/アセトニトリル/水(10:87:3)を用いた処理によって、ヌクレオチド間ホスファイトからホスフェートへの酸化を行なった。ホスホロチオエートは、DDTT(AM Chemicals社から購入)、PADS、および/またはボーケージ試薬などの硫黄転移試薬を用いて、ホスファイトからホスホロチオエートへの酸化によって導入した。コレステロールホスホラミダイトは、自家合成し、ジクロロメタン中、0.1Mの濃度で使用した。コレステロールホスホラミダイトの連結時間は、16分であった。

#### 【0458】

3'-コレステロール-3'-炭水化物を含有するオリゴヌクレオチドの合成を、コレステロールホスホラミダイトの、所望の炭水化物を担持する固体担体への連結と、それに続くヌクレオチドホスホラミダイトへの連結によって行った。第2のリガンドを含むまたは含まないPEG化オリゴヌクレオチドを、対応するPEG-NHSエステルのアミノ結

合配列への合成後結合によって得た。アミノリンカーを、対応するトランス - 4 - ヒドロキシプロピノールに基づくアミノリンカーまたは市販のアミノリンカーを用いて、配列中の所望の位置に導入した。例えば、3' - PEG - 3' - GalNAc 含有オリゴヌクレオチドの合成を、トランス - 4 - ヒドロキシプロピノールアミノリンカーホスホラミダイトの、所望の GalNAc を担持する固体担体への連結と、それに続くヌクレオシドホスホラミダイトへの連結によって行った。こうして得られたオリゴヌクレオチドを、配列の性質に応じて、重炭酸ナトリウム緩衝液中、pH 7.5 ~ 9 での、PEG - NHS エステルとの合成後結合に供した。

#### 【0459】

##### 2. 脱保護 I (ヌクレオ塩基脱保護)

合成が完了した後、担体を 100 mL のガラスビン (VWR) に移した。オリゴヌクレオチドを、80 mL のエタノールアンモニアの混合物 [アンモニア : エタノール (3 : 1)] を用いて、55 で 6.5 時間、塩基とリン酸基を同時に脱保護しながら担体から開裂した。ビンを氷上で短時間冷却し、その後、エタノールアンモニア混合物を濾過して、新しい 250 mL のビンに入れた。CPG を 2 x 40 mL 部のエタノール / 水 (1 : 1 v / v) で洗浄した。その後、ロータリーエバポレーター (rotovap) で混合物の容量を約 30 mL にまで減らした。その後、混合物をドライアイス上で凍結させ、真空下、Speed Vac で乾燥させた。

#### 【0460】

##### 3. 脱保護 II (2' TBDMS 基の除去)

乾燥した残留物を 26 mL のトリエチルアミンとトリエチルアミン三フッ化水素酸塩 (TEA · 3HF) またはピリジン - HF と DMSO (3 : 4 : 6) に再懸濁し、60 で 90 分間加熱して、2' 位の tert - ブチルジメチルシリル (TBDMS) 基を除去した。その後、反応を 50 mL の 20 mM の酢酸ナトリウムで停止させ、pH を 6.5 に合わせ、精製するまでフリーザーで保存した。

#### 【0461】

##### 4. 分析

精製する前に、オリゴヌクレオチドを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析した。緩衝液とカラムの選択は、配列および / または結合されるリガンドの性質によって決まる。

#### 【0462】

##### 5. 炭水化物が結合したオリゴヌクレオチドの PEG 化

アミノリンカーで官能化されたオリゴヌクレオチドを、pH 7.5 と 9.0 の間の重炭酸ナトリウム緩衝液中で、所望の分子量の PEG - NHS エステルで処理した。反応の進行は、HPLC でモニタした。反応が完了した後、PEG 化オリゴヌクレオチドを HPLC で精製し、MS で分析した。

#### 【0463】

##### 6. HPLC 精製

リガンドが結合したオリゴヌクレオチドを逆相分取 HPLC で精製した。結合されていないオリゴヌクレオチドを、自家で充填した TSK ゲルカラムでの陰イオン交換 HPLC で精製した。緩衝液は、10% の CH<sub>3</sub>CN 中の 20 mM のリン酸ナトリウム (pH 8.5) (緩衝液 A) と 10% の CH<sub>3</sub>CN、1 M の NaBr 中の 20 mM リン酸ナトリウム (pH 8.5) (緩衝液 B) であった。全長のオリゴヌクレオチドを含む画分をプールし、脱塩し、凍結乾燥させた。約 0.15 OD の脱塩オリゴヌクレオチドを水で 150 μl に希釈し、その後、CGE と LC / MS 分析用の特殊なバイアルにピペットで分注した。化合物は、最終的に、LC - ESMMS と CGE で分析した。

#### 【0464】

##### 7. siRNA 調製

siRNA の調製のために、等モル量のセンス鎖とアンチセンス鎖を 1 x PBS 中、95 で 5 分間加熱し、ゆっくりと室温まで冷ませた。二重鎖の完全性は、HPLC 分析で

10

20

30

40

50

確認した。

【表 2 - 1】

G a l N A c が 結合した 二重鎖

標的	二重鎖 ID	配列番号	S/AS	配列 5'-3'
PCSK9	AD-3672		A-30693	GccuGGAGuuuAuucGGAAdTdTsL96
			A-18242	PUUCCGAALAAACUCCAGGCdTsdT
PCSK9	AD-3673		A-30693	GccuGGAGuuuAuucGGAAdTdTsL96
			A-30696	PuUfcCfGfAfaUfaAfaCfuCfcAfgGfcdTdTsL10
PCSK9	AD-3674		A-30694	GccuGGAGuuuAuucGGAAdTdTsQ11L96
PCSK9	AD-3718		A-18242	PUUCCGAALAAACUCCAGGCdTsdT
			A-30983	GccuGGAGuuuAuucGGAAdTdTsL101
PCSK9	AD-3627		A-18242	PUUCCGAALAAACUCCAGGCdTsdT
			A-30824	GccuGGAGuuuAuucGGAAdTdTL96
PCSK9	AD-3628		A-18242	PUUCCGAALAAACUCCAGGCdTsdT
			A-30824	GccuGGAGuuuAuucGGAAdTdTL96
PCSK9	AD-3629		A-30682	PuUfcCfGfAfaUfaAfaCfuCfcAfgGfcdTdTL43
			A-16865	GccuGGAGuuuAuucGGAAdTdTsL96
PCSK9	AD-3671		A-18242	PUUCCGAALAAACUCCAGGCdTsdT
			A-16865	GccuGGAGuuuAuucGGAAdTdTsL96
apoB	AD-6490		A-30693	GccuGGAGuuuAuucGGAAdTdTsL96
			A-5296	5' -GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA
apoB	AD-5544		A 5475	uuGGAUCAAAuAuAAGAuUCcsesU
			A-5474	GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAAsL10
apoB	AD-3697		A 5475	uuGGAUCAAAuAuAAGAuUCcsesU
			A-30863	GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAAsL96
apoB	AD-3698		A-5475	uuGGAUCAAAuAuAAGAuUCcsesU
			A-30864	GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAAsQ11L96
apoB	AD-3699		A-5475	uuGGAUCAAAuAuAAGAuUCcsesU
			A-30863	GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAAsL96
apoB	AD-3717		A-30865	uuGGAUCAAAuAuAAGAuUCcsesUsL10
			A-30982	GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAAsL101
apoB	AD-18117		A-5475	uuGGAUCAAAuAuAAGAuUCcsesU
			A-5474	GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAAsL10
apoB	AD-18118		A-31849	Q38uuGGAUCAAAuAuAAGAuUCcsesU
			A-30863	GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAAsL96
apoB	AD-18119		A-31849	Q38uuGGAUCAAAuAuAAGAuUCcsesU
			A-30864	GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAAsQ11L96
apoB	Ad-18648		A-31849	Q38uuGGAUCAAAuAuAAGAuUCcsesU
			A-31644	GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAAsQ11L90
apoB	AD-18649		A-5475	uuGGAUCAAAuAuAAGAuUCcsesU
			A-31649	GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAAsQ51Q11L96
			A 5475	uuGGAUCAAAuAuAAGAuUCcsesU

10

20

30

40

【表 2 - 2】

標的	二重鎖 ID	配列番号	S/AS	配列 5'-3'
apoB	AD-18650		A-32147	GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAAsQ11L80
			A-5475	uuGGAUcAAAuAuAAGAUUCcscsU
apoB	AD-18651		A-32148	Q11-GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAAsL96
			A-5475	uuGGAUcAAAuAuAAGAUUCcscsU
apoB	AD-18652		A-32801	GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAAsQ11L110
			A-5475	uuGGAUcAAAuAuAAGAUUCcscsU
apoB			A-34132	GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAAsQ8L110
			A-5475	uuGGAUcAAAuAuAAGAUUCcscsU
apoB			A-34133	GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAAsQ90L110
			A-5475	uuGGAUcAAAuAuAAGAUUCcscsU
apoB			A-34134	Q8GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAAsL110
			A-5475	uuGGAUcAAAuAuAAGAUUCcscsU
apoB			A-34135	Q90GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAAsL110
			A-5475	uuGGAUcAAAuAuAAGAUUCcscsU
apoB	AD-19031		A-33593	GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAAsQ11L117
			A-5475	uuGGAUcAAAuAuAAGAUUCcscsU
apoB			A-34176	GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAAsL117
			A-5475	uuGGAUcAAAuAuAAGAUUCcscsU
apoB			A-32800	GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAAsL110
			A-5475	uuGGAUcAAAuAuAAGAUUCcscsU
apoB			A-34156	GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAAsL82
			A-5475	uuGGAUcAAAuAuAAGAUUCcscsU
apoB			A 34157	GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAAsL83
			A-5475	uuGGAUcAAAuAuAAGAUUCcscsU
FVII	AD-18572		A-31843	GGAUfcfAUfcfUfcfAAGUfcfUfUfACfdTdTsl96
			A-31848	Q11GUfAAGACfUfUfGAGAUfGAUfcfCfdTsdT
FVII	AD-18567		A-31844	GGAUfcfAUfcfUfcfAAGUfcfUfUfACfdTdTsl96
			A 4724	GUfAAGACfUfUfGAGAUfGAUfcfCfdTsdT
FVII	AD-18568		A-31845	GGAUfcfAUfcfUfcfAAGUfcfUfUfACfdTdTsl96
			A-4724	GUfAAGACfUfUfGAGAUfGAUfcfCfdTsdT
FVII	AD-18569		A-31846	GGAUfcfAUfcfUfcfAAGUfcfUfUfACfdTdTsl96
			A-4724	GUfAAGACfUfUfGAGAUfGAUfcfCfdTsdT
FVII	AD-18570		A-31847	Q11GGAUfcfAUfcfUfcfAAGUfcfUfUfACfdTdTsl96
			A-4724	GUfAAGACfUfUfGAGAUfGAUfcfCfdTsdT
FVII	AD-18571		A-32817	GGAUfcfAUfcfUfcfAAGUfcfUfUfACfdTdTsl110
			A-4724	GUfAAGACfUfUfGAGAUfGAUfcfCfdTsdT
FVII			A-35052	GGAUCAUCUCAAGUCUUACdTsdTsl10
			A 4724	GUfAAGACfUfUfGAGAUfGAUfcfCfdTsdT
FVII			A-33571	GGAUfcfAUfcfUfcfAAGUfcfUfUfACfdTdTsl116
			A-4724	GUfAAGACfUfUfGAGAUfGAUfcfCfdTsdT
FVII			A-33572	GGAUfcfAUfcfUfcfAAGUfcfUfUfACfdTdTsl96
			A-4724	GUfAAGACfUfUfGAGAUfGAUfcfCfdTsdT
FVII			A-4639	GGAUCAUCUCAAGUCUUACdTdT
			A-4640	GUAAGACUUGAGAUGAUCCdTdT

10

20

30

40

【表 2 - 3】

標的	二重鎖 ID	配列番号	S/AS	配列 5'-3'
FVII			A-34128	GGAUFCfAUFCfUfCfAAGUFCfUfUfACfTdTsQ8L110
			A-4724	GUfAAGACfUfUfGAGAUfGAUfCfCfdTsTd
FVII			A 34129	GGAUFCfAUFCfUfCfAAGUFCfUfUfACfTdTsQ90L110
			A-4724	GUfAAGACfUfUfGAGAUfGAUfCfCfdTsTd
FVII			A-34130	Q8GGALfCfAUFCfUfCfAAGUFCfUfUfACfTdTsL110
			A-4724	GUfAAGACfUfUfGAGAUfGAUfCfCfdTsTd
FVII			A-34131	Q90GGAUfCfAUFCfUfCfAAGUFCfUfUfACfTdTsL110
			A-4724	GUfAAGACfUfUfGAGAUfGAUfCfCfdTsTd
FVII	AD-19032		A-33573	GGAUFCfAUFCfUfCfAAGUFCfUfUfACfTdTsQ11L117
			A-4724	GUfAAGACfUfUfGAGAUfGAUfCfCfdTsTd
FVII	AD-19033		A-33570	GGAUFCfAUFCfUfCfAAGUFCfUfUfACfTdTsQ91L96
			A-4724	GUfAAGACfUfUfGAGAUfGAUfCfCfdTsTd
FVII	AD 18047		A 31841	GGAUFCfAUFCfUfCfAAGUFCfUfUfACfTdTsQ11L96
			A-4724	GUfAAGACfUfUfGAGAUfGAUfCfCfdTsTd

注：SはPS結合であり、小文字は2'-O-メチルヌクレオチドであり、Nfは2'-フルオロヌクレオチドであり、Pはリン酸基であり、L10はN-(コレステリルカルボキシアミドカプロイル)-4-ヒドロキシプロリノール(Hyp-C6-Chol)であり、L43はクエーサー570 CPG(BG5-5063, Biosearch Tech)であり、L80はN-[トリス(GalNAc-アルキル)-アミドヘキサノイルカルボキサミドエチル-ジチオ-ブチル]-4-ヒドロキシプロリノール(Hyp-S-S-(GalNAc-アルキル)3)であり、L82はPEG 5KカルボキシメチルNHSであり、L83はPEG 20KカルボキシメチルNHSであり、L96はN-[トリス(GalNAc-アルキル)-アミドデカノイル]-4-ヒドロキシプロリノール(Hyp-(GalNAc-アルキル)3)であり、L110はN-[N', N''-(ビス(GalNAc-アルキル)-リジン)-アミノカプリル]-4-ヒドロキシプロリノール(Hyp-Lys-(GalNAc-アルキル)2)であり、L101はHyp (GalNAc TEG)3 LCOであり、L116はN-(リトコリルカルボキシアミドカプロイル)-4-ヒドロキシプロリノール(Hyp-C6-リトコール酸)であり、Q8はN-(アミノカプロイル)プロリノール-4-リン酸であり、Q11はN-(コレステリルカルボキシアミドカプロイル)プロリノール-4-リン酸であり、Q38はクエーサー570 リン酸(BNS-5063, Biosearch Tech)であり、Q90はN-(PEG(20K)ペンチルカルボキシアミドカプロイル)-4-ヒドロキシプロリノールであり、Q91はN-(ミリスチルカルボキシアミドカプロイル)-4-ヒドロキシプロリノール(Hyp-C6-C14)であり、Q92はN-(リトコリルカルボキシアミドカプロイル)-4-ヒドロキシプロリノール(Hyp-C6-リトコール酸)であり、Q51は6 ヒドロキシヘキシルジチオヘキシルリン酸(Thiol-Modifier C6 S-S Glen Res. 10-1936)であり、L117はN-[N', N''-(ビス(グルコース-アルキル)-リジン)-アミノカプリル]-4-ヒドロキシプロリノール(Hyp-Lys-(Gluc-アルキル)2)である。

## 【0465】

実施例13：apoB siRNAへの様々な化学修飾によるインビトロ発現抑制活性  
各修飾siRNAに関するIC50を、Lipofectamine(登録商標)RNAiMAXを使用した標準的なリバーストランスフェクションによってHep3B細胞において決定した。手短に言えば、ウェル当たり0.5μLの「Lipofectamine」RNAiMAX(カリフォルニア州、カールスバッド所在のInvitrogen社製、カタログ番号13778-150)に加えた10μLのOpti-MENと共に、96ウェルプレートに、ウェル当たり5μLのsiRNA二重鎖剤に5μLのOpti-MENを加え、室温で15~20分間インキュベーションすることによって、リバーストランスフェクションを行った。インキュベーション後、次いで、12,000~15,000のHep3B細胞を含有する、抗生物質を含まない100μLの完全増殖培地を各ウェルに添加した。細胞を、溶解とbDNA(Quantigene)によるApoBおよびGAPDH mRNAの解析の前に、5%のCO<sub>2</sub>雰囲気において37℃で24時間インキュベーションした。10nMから0.6pMに及ぶ7種類の異なるsiRNA濃度を、IC50を決定するために評価し、ApoBトランスフェクト細胞に関するApoB/G

A P D Hを、10 nMのLuc siRNAをトランスフェクトした細胞に正規化した。  
【0466】

		二重鎖	SID	5'-3'	AS ID	AS 5'-3'	IC50 (nM)
親		AD-6490	A-5296	GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	A-5475	uuGGAUCAAAuAuAAGAuUCcsU	0.0401
		AD-5544	A-5474	GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAs-Chol	A-5475	uuGGAUCAAAuAuAAGAuUCcsU	0.5329
		AD-3698	A-30864	GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAs-Chol-GalNAc3	A-5475	uuGGAUCAAAuAuAAGAuUCcsU	0.5677
		AD-3697	A-30863	GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsGalNAc3	A-5475	uuGGAUCAAAuAuAAGAuUCcsU	0.0336
Alt 2'OMe/F		AD-25108	A-56026	GtgAfaUcUfuAfuAfuUfuGfaUfcCfaAf	A-55358	PuUfgGfaUfcAfaAfuAfuAfaGfaUfcCfsCfsu	0.0231
		AD-27816	A-63125	GtgAfaUcUfuAfuAfuUfuGfaUfcCfaAf-Chol	A-55358	PuUfgGfaUfcAfaAfuAfuAfaGfaUfcCfsCfsu	0.0827
		AD-27818	A-63127	GtgAfaUcUfuAfuAfuUfuGfaUfcCfaAf-Chol-GalNAc3	A-55358	PuUfgGfaUfcAfaAfuAfuAfaGfaUfcCfsCfsu	0.054
		AD-27817	A-63126	GtgAfaUcUfuAfuAfuUfuGfaUfcCfaAf-GalNAc3	A-55358	PuUfgGfaUfcAfaAfuAfuAfaGfaUfcCfsCfsu	0.014

10

20

30

40

【0467】

実施例14：親ad-3698 siRNAに対する様々なモチーフを有するコレステロール-(GalNAc)<sub>3</sub>結合apoB siRNAのインビボ発現抑制活性

C57/BL6マウス(5匹/群、8~10週齢、マサチューセッツ州所在のCharles River Laboratories)におけるApoB-Chol/GalNAc3 siRNAの静脈内ボラス投与を、10 µl/gの用量容積で27 G針を使用した少量尾静脈注射によって行った。一回100 mg/kgの用量を投与し、48時間後にマウスを殺した。肝臓を採取し、液体窒素で瞬間冷凍し、その後、-80 で保存した。

【0468】

bDNA解析：

6850 Freezer/Mill Cryogenic Grinder (SPEX CentriPrep, Inc社製)を用いて、凍結した肝臓をすり潰し、解析するまで粉末を-80 で保存した。プロトコルに従って、分岐DNA技術をベースとしたQuantiGene 1.0 Reagent System(米国、カリフォルニア州、フレモント所在のPanomics)を用いて、ApoBとGAPDHのmRNAレベルを検出した。10~20 mgの凍結した肝臓の粉末を、1000 µlの0.3 µg/mlプロテイナーゼK(Epicentre, #MPRK092)を含む組織/細胞溶解溶液(Epicentre, #MTC096H)中、65 で40分間溶解させた。その後、10 µlの溶解産物を90 µlの溶解作用試薬(2容積の水に1容積の溶解混合原液)に添加し、マウスApoBおよびマウスGAPDHに特異的なプローブセットを含むPanomics捕捉プレート(米国所在のPanomics)上で、55 で一晩インキュベーションした。その後、プロトコルに従って、捕捉プレートにシグナルの増幅と検出のための処理を施し、化学発光を、マイクロプレートルミノメーターVictor 2-Light(Perkin Elmer社製)で相対光単位(RLU)として読み取った。肝臓溶解産物におけるApoB mRNA対GAPDH mRNAの比を、各処置群について平均化し、PBSで処置した対照群と比較した。

【0469】

結果：

図2に示されるように、親AD-3698 siRNAと比較して、コレステロール-(GalNAc)<sub>3</sub>が結合したsiRNA(AD-27818)を有する交互モチーフによる処置は、ApoB転写物レベルの低下(PBS対照群に対して正規化したときに、より小さいApoB対GAPDH転写物比で示される、約65%対約40%)をもたらし、コレステロール-(GalNAc)<sub>3</sub>が結合したsiRNAを有する交互モチーフが、優れたノックダウンを有することを示した。

50

【表 3】

表3. コレステロール結合 siRNA およびコレステロール(GalNAc)3 結合 siRNA の配列比較

二重鎖	標的	SID	S'5'-3'	ASID	AS'5'-3'
AD-3598	ApoB	A-30864	GGAAUCuuAuAuuuGAUCCAAQ11L96	A-5475	uuGGAUCAAAuAuAAGAUUCscsu
AD-30522	ApoB	A-63123	GGAAucuuAuAuuuGAuccAAQ11L96	A-5475	uuGGAUCAAAuAuAAGAUUCscsu
AD-27814	ApoB	A-63123	GGAAucuuAuAuuuGAuccAAQ11L96	A-55358	PuUfgGfaUfcAfaAfuAfuAfaGfaUfuCfcCfsu
AD-28383	ApoB	A-63123	GGAAucuuAuAuuuGAuccAAQ11L96	A-62289	PuUfgGfaUfcAfaAfuAfuAfaGfaUfuCfcCfuL131
AD-27822	ApoB	A-63123	GGAAucuuAuAuuuGAuccAAQ11L96	A-55359	PuUfgGfaUfcAfaAfuAfuAfaGfaUfuCfc(Aeos)(Aeo)
AD-27832	ApoB	A-63123	GGAAucuuAuAuuuGAuccAAQ11L96	A-63120	PuUfgGfaUfcAfaAfuAfuAfaGfaUfuCf(m5Ceos)(m5Ceos)U
AD-27818	ApoB	A-63127	GfgAfaUfcUfuAfuAfuUfuGfaUfcCfaAfQ11L96	A-55358	PuUfgGfaUfcAfaAfuAfuAfaGfaUfuCfcCfsu
AD-28389	ApoB	A-63127	GfgAfaUfcUfuAfuAfuUfuGfaUfcCfaAfQ11L96	A-62289	PuUfgGfaUfcAfaAfuAfuAfaGfaUfuCfcCfuL131
AD-27826	ApoB	A-63127	GfgAfaUfcUfuAfuAfuUfuGfaUfcCfaAfQ11L96	A-55359	PuUfgGfaUfcAfaAfuAfuAfaGfaUfuCfc(Aeos)(Aeo)
AD-27836	ApoB	A-63127	GfgAfaUfcUfuAfuAfuUfuGfaUfcCfaAfQ11L96	A-63120	PuUfgGfaUfcAfaAfuAfuAfaGfaUfuCf(m5Ceos)(m5Ceos)U

小文字は 2'-O-Me 修飾ヌクレオチドを表し；Chol はコレステロールであり；L96 は *N*-[トリス (GalNAc-アルキル)-アミド<sup>+</sup>デカイル]-4-ヒドロキシ<sup>+</sup>ポリノール Hyp-(GalNAc-アルキル)<sub>3</sub> であり；L131 は *N*-(ヒドロキシル-4-ヒドロキシ<sup>+</sup>ポリノール(Hyp-C6))であり；Q11 は *N*-(コレステリルカルキアミド<sup>+</sup>カプロイル)<sup>+</sup>ポリノール-4-リン酸であり；s はヌクレオチド結合であり；Aeo は 2'-O-メチルアデノシン-3'-リン酸であり；Aeos は 2'-O-メチルアデノシン-3'-ヌクレオチドであり；m5Ceos は 2'-O-メチルアデノシン-5-メチルシリン-3'-ヌクレオチドであり；P はリン酸である。

## 【0470】

実施例 15：マウス PK 研究

プロトコル：

マウスに、静脈注射または皮下注射により 10  $\mu$ l / g の用量容積（時点当たり  $n = 2$ ）で 100 mg / kg の siRNA 複合体を投与した。下記の表に示された各時点で、2 匹のマウスを殺し、血液を、肝門静脈を通じて採血し、K<sub>2</sub>EDTA 被覆管に採取し、反転により混合し、濡れた氷上に置いた。次いで、この動物を生理食塩水で灌流し、肝臓を採取し、液体窒素で瞬間凍結した。血液を、採血直後の遠心分離（4 で 10 分間の 2,000 g）により血漿に処理した。血漿サンプルを赤血球から分離し、-80 で保存するために、エッペンドルフ（登録商標）チューブに分取した。

## 【0471】

6850 Freezer / Mill Cryogenic Grinder (SPEX CentriPrep, Inc 社製) を用いて、凍結した肝臓をすり潰し、解析するまで粉末を -80 で保存した。A t t o p r o b e アッセイを使用して、肝臓組織 1 g 当たりかつ血漿 mL 当たりの siRNA の量を計量した。

## 【0472】

PK 研究サンプル: 投与から 24, 48, 96 および 168 時間後 100mg/kg

群	二重鎖	用量 (mg/kg)	経路	雌の数	血液と組織の採取時点 (時間)	採集した 組織
1	AD-3698 (Chol-GalNAc3 Parent)	100	i. v. および s. c.	44	.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 96, 168	肝臓、空腸、 腎臓、脾臓、 血漿
2	AD-27818 (Chol-GalNAc3 New)	100	i. v. および s. c.	44		
3	AD-3697 (GalNAc3 Parent)	100	i. v. および s. c.	44		
4	AD-27817 (GalNAc3 New)	100	i. v. および s. c.	44		
5	PBS	-	S.c.			

二重鎖	S ID	S 5'-3'	AS ID	AS 5'-3'
AD-3698	A-30864	GGAAUCuuAuAuuuGAUCCAAQ11L96	A-5475	uuGGAUcAAAuAuAAGAuUCcscsU
AD-3697	A-30863	GGAAUCuuAuAuuuGAUCCAAQ11L96	A-5475	uuGGAUcAAAuAuAAGAuUCcscsU
AD-27818	A-63127	GfgAfaUfcUfuAfuAfuUfuGfaUfcCfaAfQ11L96	A-55358	PuUfgGfaUfcAfaAfuAfuAfaGfaUfuCfcsCfsu
AD-27817	A-63126	GfgAfaUfcUfuAfuAfuUfuGfaUfcCfaAfL96	A-55358	PuUfgGfaUfcAfaAfuAfuAfaGfaUfuCfcsCfsu
		Q11 = コレステロール		
		L96 = GalNAc3		

10

#### 【0473】

図3は、7日目までの持続性発現抑制に関するAD-27818のSCおよびIV投与について同様のレベルの発現抑制を示す。約65%のApoBが、AD-27818 (GalNAc<sub>3</sub>)のSC投与の96時間後に発現抑制する。

20

#### 【0474】

実施例16: 親AD-3698 siRNAに対する、様々なモチーフを有するコレステロール - (GalNAc)<sub>3</sub>結合PTEN siRNAのインビボ発現抑制活性

C57/BL6マウス(5匹/群、8~10週齢、マサチューセッツ州所在のCharles River Laboratories)におけるPTEN-Chol/GalNAc<sub>3</sub> siRNAの静脈内ボラス投与を、10μl/gの用量容積で27G針を使用した少量尾静脈注射によって行った。マウスに一回100、75、50または25mg/kgの用量を静脈投与し、そのマウスを48時間後に殺した。肝臓を採取し、液体窒素で瞬間冷凍し、その後、-80で保存した。

30

#### 【0475】

bDNA解析:

6850 Freezer/Mill Cryogenic Grinder (SPEX CentriPrep, Inc社製)を用いて、凍結した肝臓をすり潰し、解析するまで粉末を-80で保存した。プロトコルに従って、分岐DNA技術をベースとしたQuantigene 2.0 Reagent System (米国、カリフォルニア州、フレモント所在のPanomics)を用いて、PTENとGAPDHのmRNAレベルを検出した。10~20mgの凍結した肝臓の粉末を、10000ulの0.3ug/mlプロテインゼK (Epicentre, #MPRK092)を含む組織/細胞溶解溶液 (Epicentre, #MTC096H)中に65で40分間溶解させた。その後、10ulの溶解産物を90ulの溶解作用試薬(2容積の水に1容積の溶解混合原液)に添加し、マウスPTENおよびマウスGAPDHに特異的なプローブセットを含むPanomics捕捉プレート(米国所在のPanomics)上で、55で一晩インキュベーションした。その後、プロトコルに従って、捕捉プレートにシグナルの増幅と検出のための処理を施し、化学発光を、マイクロプレートルミノメーターVictor 2-Light (Perkin Elmer社製)で相対光単位(RLU)として読み取った。肝臓溶解産物におけるPTEN mRNA対GAPDH mRNAの比を、各処置群について平均化し、PBSで処置した対照群と比較した。

40

#### 【0476】

50

結果：

図4に示されるように、コレステロール-(GalNAc)<sub>3</sub>が結合したPTEN siRNAを有する交互モチーフによる処置は、PTEN転写物レベルの低下(PBS対照群に対して正規化したときに、より小さいPTEN対GAPDH転写物比で示される)をもたらし、コレステロール-(GalNAc)<sub>3</sub>が結合したsiRNAを有する交互モチーフが、優れたノックダウンを有することを示した。最良のPTEN-Chol/GalNAc<sub>3</sub>複合体は、最良の対応するApoB複合体と類似のインビボにおける有効性を示すことが分かり、その複合体と組み合わされたモチーフは配列に依存しないことを示唆している。

【表4】

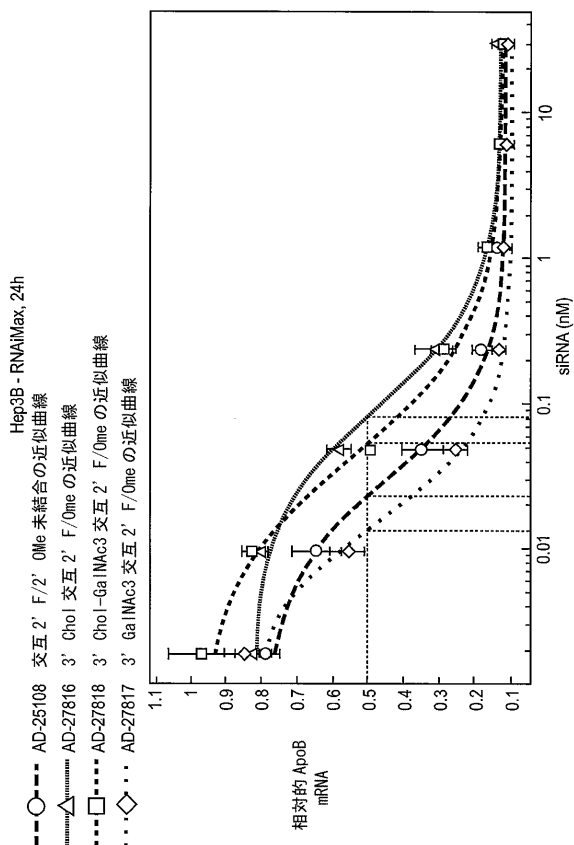
表4. 代わりのモチーフを有するPTENコレステロール-(GalNAc)<sub>3</sub>結合 siRNAs

二重鎖 ID	s ID	配列 5' -3'	AS ID	配列 5' -3'	Hep3B IC50 (nM)
AD-39872	A-80979.1	GlaUfgAfuGfuUfuGfaAfaCfuAfuUfdTdTQ11L96	A-81738.1	aAfuAfgUfuUfcAfaAfcAfuCfaUfcdTsdT	0.013
AD-39873	A-80979.1	GlaUfgAfuGfuUfuGfaAfaCfuAfuUfdTdTQ11L96	A-81739.1	aAfuAfgUfuUfcAfaAfcAfuCfaUfc(Teos)(Teos)G	0.008

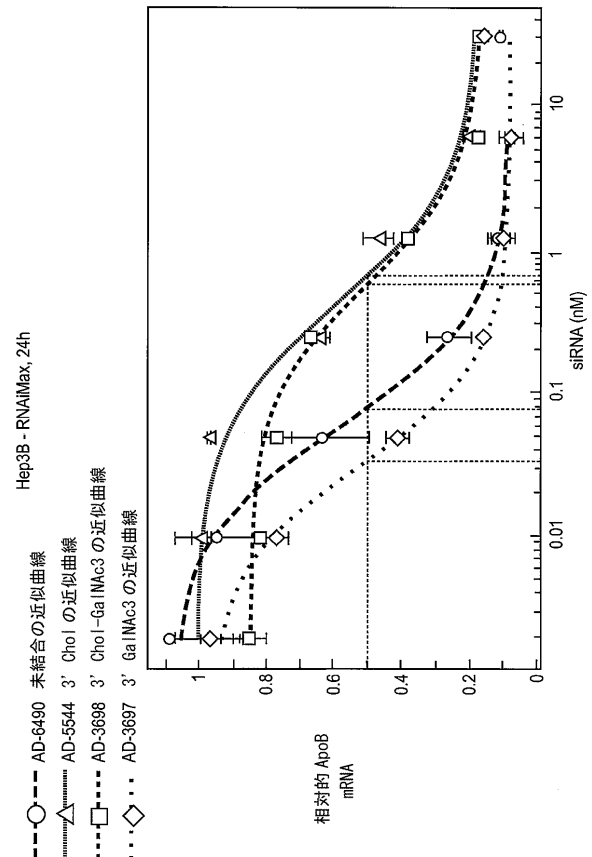
小文字は 2'-O-Me 修飾ヌクレオチドを表し；L96 は *N*-[トリス(GalNAc-アルキル)-アミド・デ・カノイル]-4-ヒドロキシ-ポリノール Hyp-(GalNAc-アルキル)<sub>3</sub> であり；s は叔和チオエーテル結合であり；Teos は 2'-O-メキシル-5-メチルリジン-3'-叔和チオエーテルであり；P はリン酸である。

10

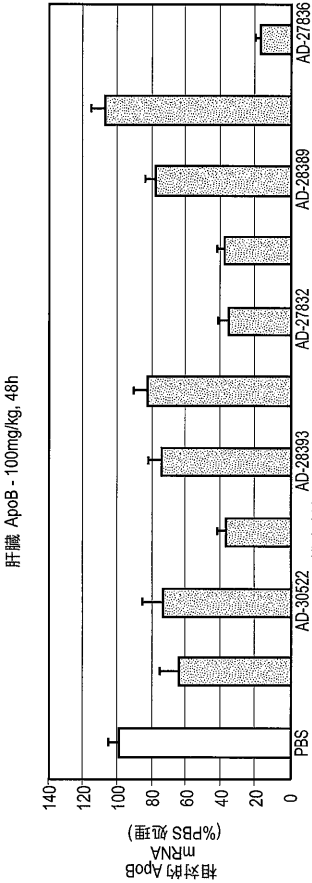
【図1A】



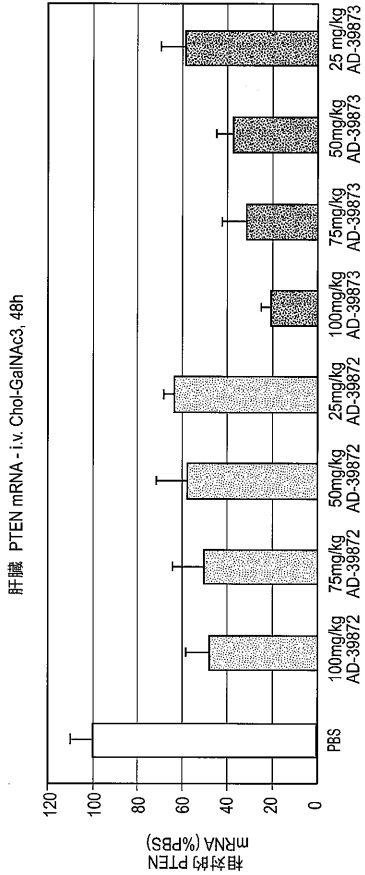
【図1B】



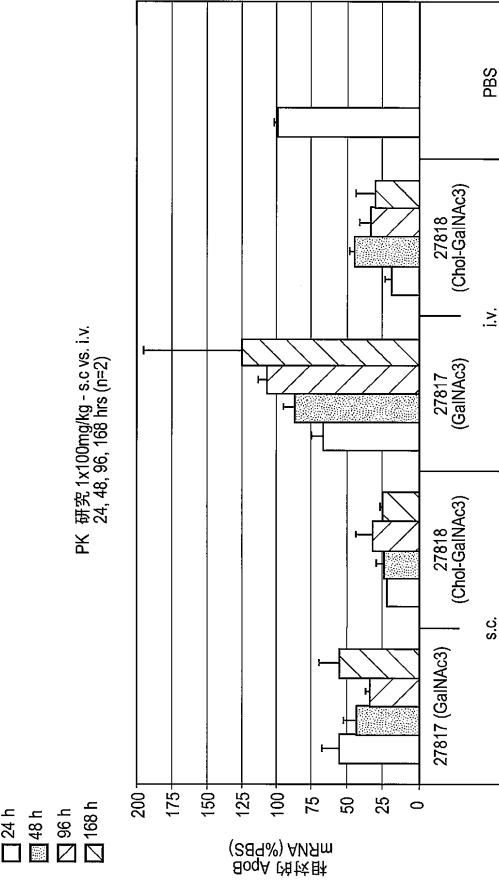
【 図 2 】



【 図 4 】



【 図 3 】



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2011/051597

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C12N15/113 A61K31/713 C12N15/87 ADD. C07H21/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N A61K C07H		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EP0-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/134487 A2 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC [US]; FITZGERALD KEVIN [US]; DE FOUGEROLLE) 5 November 2009 (2009-11-05)	1-33
Y	the whole document	1-33
Y	----- WO 2009/073809 A2 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC [US]; MANOHARAN MUTHIAH [US]; RAJEEV KALLA) 11 June 2009 (2009-06-11)	1-33
	the whole document	
A	----- WO 2009/142822 A2 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC [US]; MANOHARAN MUTHIAH [US]; RAJEEV KALLA) 26 November 2009 (2009-11-26)	1-33
	the whole document	
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
12 January 2012		24/01/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Andres, Serge

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2011/051597

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2004/015107 A2 (ATUGEN AG [DE]; GIESE KLAUS [DE]; KAUFMANN JOERG [DE]; KLIPPEL-GIESE A) 19 February 2004 (2004-02-19) the whole document -----	1-33
A	WO 2009/126933 A2 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC [US]; MANOHARAN MUTHIAH [US]; RAJEEV KALLA) 15 October 2009 (2009-10-15) the whole document -----	1-33
A	WO 2004/044136 A2 (ISIS PHARMACEUTICALS INC [US]; ALLERSON CHARLES [US]; BHAT BALKRISHEN) 27 May 2004 (2004-05-27) the whole document -----	1-33
X, P	WO 2010/148013 A2 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC [US]; FITZGERALD KEVIN [US]; HINKLE GREGOR) 23 December 2010 (2010-12-23) the whole document -----	1-33

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2011/051597

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009134487 A2	05-11-2009	AU 2009241591 A1	05-11-2009
		CA 2713379 A1	05-11-2009
		EP 2245039 A2	03-11-2010
		JP 2011511004 A	07-04-2011
		US 2010010066 A1	14-01-2010
		WO 2009134487 A2	05-11-2009
WO 2009073809 A2	11-06-2009	AU 2008333811 A1	11-06-2009
		AU 2008340355 A1	02-07-2009
		CA 2708153 A1	11-06-2009
		CA 2708173 A1	02-07-2009
		CN 102006890 A	06-04-2011
		EP 2229186 A2	22-09-2010
		EP 2231195 A2	29-09-2010
		JP 2011505425 A	24-02-2011
		JP 2011505426 A	24-02-2011
		US 2009239814 A1	24-09-2009
		US 2009247608 A1	01-10-2009
		WO 2009073809 A2	11-06-2009
		WO 2009082607 A2	02-07-2009
WO 2009142822 A2	26-11-2009	US 2011130440 A1	02-06-2011
		US 2011269814 A1	03-11-2011
		WO 2009120878 A2	01-10-2009
		WO 2009142822 A2	26-11-2009
WO 2004015107 A2	19-02-2004	AT 350473 T	15-01-2007
		AU 2003260370 A1	25-02-2004
		AU 2008207337 A1	04-09-2008
		BR 0313202 A	21-06-2005
		CA 2494930 A1	19-02-2004
		CN 1675359 A	28-09-2005
		DE 60310944 T2	11-10-2007
		DK 1527176 T3	07-05-2007
		EP 1527176 A2	04-05-2005
		EP 1857547 A2	21-11-2007
		EP 2258847 A2	08-12-2010
		ES 2280826 T3	16-09-2007
		JP 2006500014 A	05-01-2006
		JP 2011024592 A	10-02-2011
		KR 20050035877 A	19-04-2005
		MX PA05001355 A	30-09-2005
		PT 1527176 E	30-04-2007
		US 2004180351 A1	16-09-2004
		US 2009186845 A1	23-07-2009
		US 2011118456 A1	19-05-2011
		WO 2004015107 A2	19-02-2004
WO 2009126933 A2	15-10-2009	AU 2009234266 A1	15-10-2009
		CA 2721183 A1	15-10-2009
		EP 2274425 A2	19-01-2011
		JP 2011518784 A	30-06-2011
		US 2011123520 A1	26-05-2011
		WO 2009126933 A2	15-10-2009
WO 2004044136 A2	27-05-2004	AU 2003287502 A1	03-06-2004
		AU 2003290596 A1	03-06-2004
		AU 2003290597 A1	03-06-2004

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2011/051597

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		AU 2003290598 A1	03-06-2004
		AU 2003291755 A1	07-06-2004
		AU 2003295387 A1	03-06-2004
		CA 2504929 A1	27-05-2004
		CA 2505330 A1	27-05-2004
		EP 1560840 A2	10-08-2005
		EP 1578765 A2	28-09-2005
		WO 2004042029 A2	21-05-2004
		WO 2004043979 A2	27-05-2004
		WO 2004044132 A2	27-05-2004
		WO 2004044133 A2	27-05-2004
		WO 2004044136 A2	27-05-2004
		WO 2004044139 A2	27-05-2004
-----			
WO 2010148013 A2	23-12-2010	US 2011015252 A1	20-01-2011
		WO 2010148013 A2	23-12-2010
-----			

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 31/20 (2006.01)	A 6 1 P 31/20	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 47/26 (2006.01)	A 6 1 K 47/26	
A 6 1 K 47/28 (2006.01)	A 6 1 K 47/28	
A 6 1 K 47/22 (2006.01)	A 6 1 K 47/22	
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA

- (72) 発明者 ラジーヴ , カランソッタシル ジー  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 2 ケンブリッジ サード ストリート 3 0 0  
 アルニラム ファーマスーティカルズ インコーポレイテッド
- (72) 発明者 ジーマン , トレーシー  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 2 ケンブリッジ サード ストリート 3 0 0  
 アルニラム ファーマスーティカルズ インコーポレイテッド
- (72) 発明者 マノハラン , ムシアアー  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 2 ケンブリッジ サード ストリート 3 0 0  
 アルニラム ファーマスーティカルズ インコーポレイテッド
- (72) 発明者 メイアー , マーティン  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 2 ケンブリッジ サード ストリート 3 0 0  
 アルニラム ファーマスーティカルズ インコーポレイテッド
- (72) 発明者 フィッツゲラルド , ケヴィン  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 2 ケンブリッジ サード ストリート 3 0 0  
 アルニラム ファーマスーティカルズ インコーポレイテッド

F ターム (参考) 4B024 AA01 BA80 CA11 DA03 HA17  
 4C076 AA95 BB13 BB14 BB15 BB16 BB40 CC29 CC41 DD60 DD66  
 DD70 EE59 FF31 FF34 FF63 FF70  
 4C084 AA13 MA05 MA65 MA66 MA70 NA13 NA14 ZA75 ZB33  
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 MA65 MA70 NA13 NA14 ZA75  
 ZB33