(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-504503
(P2024-504503A)
(43)公表日　令和6年1月31日(2024.1.31)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/113 (2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/113	Ｚ ＺＮＡ	４Ｃ０７６
Ａ６１Ｋ	*47/54 (2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/54		４Ｃ０８４
Ａ６１Ｋ	*48/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00		４Ｃ０８６
Ａ６１Ｐ	*43/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１０５	
Ａ６１Ｋ	*31/713 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/713		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全241頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2023-546403(P2023-546403)
(86)(22)出願日　令和4年1月28日(2022.1.28)
(85)翻訳文提出日　令和5年9月28日(2023.9.28)
(86)国際出願番号　PCT/EP2022/052070
(87)国際公開番号　WO2022/162155
(87)国際公開日　令和4年8月4日(2022.8.4)
(31)優先権主張番号　63/143,805
(32)優先日　令和3年1月30日(2021.1.30)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/262,316
(32)優先日　令和3年10月8日(2021.10.8)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/271,684
最終頁に続く

(71)出願人　523288879
イー セラピューティクス パブリック リミテッド カンパニー
イギリス国、ダブリュ２　６ビーディー ロンドン、キングダム ストリート　４、ユニット　４ビー、レヴェル　４
(74)代理人　100136629
弁理士　鎌田 光宜
(74)代理人　100080791
弁理士　高島 一
(74)代理人　100125070
弁理士　土井 京子
(74)代理人　100121212
弁理士　田村 弥栄子
(74)代理人　100174296
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　脱塩基ヌクレオチドを含有する核酸

(57)【要約】
本発明は、疾患の治療又は予防における使用のための核酸分子に関する。
【選択図】なし

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
細胞における標的遺伝子の発現を阻害するための核酸、任意選択でＲＮＡであって、第１の鎖の少なくとも一部分と、前記第１の鎖に少なくとも部分的に相補的である第２の鎖の少なくとも一部分と、を含む少なくとも１つの二本鎖領域を含み、前記第１の鎖が、阻害される前記標的遺伝子から転写されたＲＮＡの少なくとも一部分に少なくとも部分的に相補的であり、
前記第２の鎖が、前記第２の鎖の末端領域に１つ以上の脱塩基ヌクレオチドを含み、前記脱塩基ヌクレオチドが、逆ヌクレオチド間連結を介して隣接するヌクレオチドに接続している、核酸。
【請求項２】
前記第２の鎖が、
ｉ　前記第２の鎖の末端領域における２つ若しくは２つ超の脱塩基ヌクレオチド、及び／又は
ｉｉ　前記第２の鎖の５’若しくは３’末端領域のいずれかにおける２つ若しくは２つ超の脱塩基ヌクレオチド、及び／又は
ｉｉｉ　前記第２の鎖の前記５’若しくは３’末端領域のいずれかにおける２つ若しくは２つ超の脱塩基ヌクレオチドであって、前記脱塩基ヌクレオチドが、本明細書に記載のオーバーハングに存在する、脱塩基ヌクレオチド、及び／又は
ｉｖ　前記第２の鎖の末端領域における２つ若しくは２つ超の連続した脱塩基ヌクレオチドであって、好ましくは、１つのかかる脱塩基ヌクレオチドが、末端ヌクレオチドである、脱塩基ヌクレオチド、及び／又は
ｖ　前記第２の鎖の前記５’若しくは３’末端領域のいずれかにおける２つ若しくは２つ超の連続した脱塩基ヌクレオチドであって、好ましくは、１つのかかる脱塩基ヌクレオチドが、前記第２の鎖の前記５’若しくは３’末端領域のいずれかにおける末端ヌクレオチドである、脱塩基ヌクレオチド、及び／又は
ｖｉ　逆ヌクレオチド間連結が、少なくとも１つの脱塩基ヌクレオチドを、前記第２の鎖の末端領域における隣接する塩基ヌクレオチドに接続し、かつ／又は
ｖｉｉ　逆ヌクレオチド間連結が、少なくとも１つの脱塩基ヌクレオチドを、前記第２の鎖の５’若しくは３’末端領域のいずれかにおける隣接する塩基ヌクレオチドに接続し、かつ／又は
ｖｉｉｉ　前記末端ヌクレオチドではないヌクレオチド（本明細書では末端から３番目の（ａｎｔｅｐｅｎｕｌｔｉｍａｔｅ）ヌクレオチドと呼ばれる）に逆連結を介して接続している末端から２番目の（ｐｅｎｕｌｔｉｍａｔｅ）ヌクレオチドとしての脱塩基ヌクレオチド、及び／又は
ｉｘ　前記鎖をその末端へ向かう方向に読み取る場合、５’－３’連結を介して接続した２つの末端ヌクレオチドとしての脱塩基ヌクレオチド、
ｘ　前記鎖を前記末端ヌクレオチドを含む前記末端に向かう方向で読み取る場合、３’－５’連結を介して接続した前記２つの末端ヌクレオチドとしての脱塩基ヌクレオチド、
ｘｉ　末端２位としての脱塩基ヌクレオチドであって、前記末端から２番目のヌクレオチドが、前記逆連結を介して前記末端から３番目のヌクレオチドに接続し、前記逆連結が、５－５’逆連結若しくは３’－３’逆連結である、脱塩基ヌクレオチド、
ｘｉｉ　前記末端２位としての脱塩基ヌクレオチドであって、前記末端から２番目のヌクレオチドが、前記逆連結を介して前記末端から３番目のヌクレオチドに接続し、
（１）前記逆連結が、５－５’逆連結であり、前記末端及び末端から２番目の脱塩基ヌクレオチドを含む前記末端に向かって読み取る場合、前記末端脱塩基ヌクレオチドと末端から２番目の脱塩基ヌクレオチドとの間の前記連結が、３’５’であるか、又は
（２）前記逆連結が、３－３’逆連結であり、前記末端及び末端から２番目の脱塩基ヌクレオチドを含む前記末端に向かって読み取る場合、前記末端脱塩基ヌクレオチドと末端から２番目の脱塩基ヌクレオチドとの間の前記連結が、５’３’である、脱塩基ヌクレオチ

ドを含む、請求項１に記載の核酸。
【請求項３】
前記逆ヌクレオチド間連結が、３’３逆連結である、請求項１又は２に記載の核酸。
【請求項４】
前記逆ヌクレオチド間連結が、前記第２の鎖の５’末端領域の遠方にある末端領域、又は前記第２の鎖の３’末端領域の遠方にある末端領域にある、請求項３に記載の核酸。
【請求項５】
前記逆ヌクレオチド間連結が、５’５逆連結である、請求項１又は２に記載の核酸。
【請求項６】
前記逆ヌクレオチド間連結が、前記第２の鎖の５’末端領域の遠方にある末端領域、又は前記第２の鎖の３’末端領域の遠方にある末端領域にある、請求項５に記載の核酸。
【請求項７】
ｉ）前記核酸の前記第１の鎖が、１５～３０ヌクレオチド、好ましくは、１９～２５ヌクレオチド、より好ましくは、２３若しくは２５の範囲の長さを有し、かつ／又は
ｉｉ）前記核酸の前記第２の鎖が、１５～３０ヌクレオチド、好ましくは、１９～２５ヌクレオチド、より好ましくは、２３の範囲の長さを有する、請求項１～６のいずれか一項に記載の核酸。
【請求項８】
前記第１の鎖及び／又は前記第２の鎖上の１つ以上のヌクレオチドが、修飾されて、修飾ヌクレオチドを形成する、請求項１～７のいずれか一項に記載の核酸。
【請求項９】
前記修飾が、リボース糖の２’－ＯＨ基での修飾であり、任意選択で、２’－Ｍｅ又は２’－Ｆ修飾から選択される、請求項８に記載の核酸。
【請求項１０】
前記第１の鎖が、前記第２の鎖の１位からカウントして、１４位、２位、６位、又はそれらの任意の組み合わせのうちのいずれかに、２’－Ｆを含む、請求項９に記載の核酸。
【請求項１１】
前記第２の鎖が、前記第２の鎖の１位からカウントして、７及び／又は９、及び／又は１１及び／又は１３位に、２’－Ｆ修飾を含む、請求項９又は１０に記載の核酸。
【請求項１２】
前記第１及び第２の鎖が各々、２’－Ｍｅ及び２’－Ｆ修飾を含む、請求項９～１１のいずれか一項に記載の核酸。
【請求項１３】
前記核酸が、好適には、前記第１の鎖の１～９位のうちの１つ以上、及び／又は前記第１の鎖の１～９位と整列した前記第２の鎖上の位置のうちの１つ以上に、少なくとも１つの熱不安定化修飾を含み、前記不安定化修飾が、修飾ロック解除核酸（ＩＭＵＮＡ）及びグリコール核酸（ＧＮＡ）から選択され、好ましくは、グリコール核酸である、請求項１～１２のいずれか一項に記載の核酸。
【請求項１４】
約４０～８０℃の範囲の融解温度を有する二本鎖分子、好ましくは、二本鎖ＲＮＡである、請求項１３に記載の核酸。
【請求項１５】
前記第１の鎖の７位に少なくとも１つの熱不安定化修飾を含む、請求項１４又は１５に記載の核酸。
【請求項１６】
前記核酸が、前記第２の鎖の１位からカウントして、前記第２の鎖の７～１３位に４、５、６、又は７個の２’－Ｆ修飾など、前記第２の鎖の７～１３位に３つ以上の２’－Ｆ修飾を含む、請求項９～１５のいずれか一項に記載の核酸。
【請求項１７】
前記第２の鎖が、前記第２の鎖の１位からカウントして、前記第２の鎖の１～６位に、

４、５、又は６個などの少なくとも３つの２’－Ｍｅ修飾を含む、請求項９～１６のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項１８】

前記第１の鎖が、前記３’末端領域に少なくとも５つの２’－Ｍｅ連続修飾を含み、好ましくは、前記３’末端領域に前記末端ヌクレオチド、又は前記３’末端領域に前記末端ヌクレオチドから少なくとも１若しくは２ヌクレオチド以内を含む、請求項９～１７のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項１９】

前記第１の鎖が、前記３’末端領域に７つの２’－Ｍｅ連続修飾を含み、好ましくは、前記３’末端領域に前記末端ヌクレオチドを含む、請求項１８に記載の核酸。

【請求項２０】

前記第２の鎖が、以下の修飾パターンを含み、

$$N^{A}-(N)_{3-5}-N^{B}$$

式中、Ｎが、第１の修飾を有するヌクレオチドを表し、

N^{A}が、Ｎの前記第１の修飾とは異なる第２の修飾を有するヌクレオチドを表し、

N^{B}が、Ｎの前記第１の修飾とは異なるが、N^{A}の前記第２の修飾と同じか、又は異なるかのいずれかの第３の修飾を有するヌクレオチドを表し、

前記パターンが、前記第２の鎖に沿って５’から３’の方向性を有する、請求項９～１９のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項２１】

前記第２の鎖が、以下の修飾パターンを含む、請求項２０に記載の核酸：

$$N^{A}-(N)_{3}-N^{B}。$$

【請求項２２】

前記第２の鎖が、以下の修飾パターンを含む、請求項２０に記載の核酸：

$$N^{A}-(N)_{5}-N^{B}。$$

【請求項２３】

前記第２の鎖が、以下の修飾パターンを含む、請求項２１に記載の核酸：

$$Me-(F)_{3}-Me。$$

【請求項２４】

前記第２の鎖が、以下の修飾パターンを含む、請求項２２に記載の核酸：

$$Me-(F)_{5}-Me。$$

【請求項２５】

前記第２の鎖が、以下の修飾パターンを含み、

$$N^{C}-N^{A}-(N)_{3-5}-N^{B}-N^{D}$$

式中、N^{C}及びN^{D}が、同じであっても異なっていてもよく、それぞれ複数の５’及び３’末端領域の化学修飾ヌクレオチドを示し、少なくともNCが、少なくとも２つの異なる修飾ヌクレオチドを含む、請求項２０に記載の核酸。

【請求項２６】

N^{D}が、少なくとも２つの異なる修飾ヌクレオチド、又は各々が同じ修飾、好ましくは、２’－Ｍｅ連続修飾を有する複数のヌクレオチドを含む、請求項２５に記載の核酸。

【請求項２７】

前記第２の鎖が、以下の修飾パターンを含み、

５’　Ａ－Ａ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｆ－Ｆ－Ｆ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ　３’

式中、Ａが、脱塩基修飾を表す、請求項２６に記載の核酸。

【請求項２８】

前記第２の鎖が、以下の修飾パターンを含み、

５’　Ａ－Ａ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｆ－Ｆ－Ｆ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ　３’

式中、Ａが、脱塩基修飾を表す、請求項２６に記載の核酸。

【請求項２９】
前記第２の鎖が、以下の修飾パターンを含み、
５’　Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｆ－Ｆ－Ｆ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ａ－Ａ　３’
式中、Ａが、脱塩基修飾を表す、請求項２６に記載の核酸。
【請求項３０】
前記第２の鎖が、以下の修飾パターンを含み、
５’　Ｍｅ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｆ－Ｆ－Ｆ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ａ－Ａ　３’
式中、Ａが、脱塩基修飾を表す、請求項２６に記載の核酸。
【請求項３１】
前記第１の鎖が、以下の修飾パターンを含み、
$M^A-(M)_{3-5}-M^B$
式中、Ｍが、第１の修飾を有するヌクレオチドを表し、典型的には、$(M)_{3-5}$が、請求項２０に定義される前記第２の鎖における$(N)_{3-5}$と実質的に整列しており、
M^Aが、Ｍの前記第１の修飾とは異なる第２の修飾を有するヌクレオチドを表し、
M^Bが、Ｍの前記第１の修飾とは異なるが、M^Aの前記第２の修飾と同じか、又は異なるかのいずれかの第３の修飾を有するヌクレオチドを表す、請求項９～３０のいずれか一項に記載の核酸。
【請求項３２】
前記第１の鎖が、以下の修飾パターンを含む、請求項３１に記載の核酸：
$M^A-(M)_3-M^B$。
【請求項３３】
前記第１の鎖が、以下の修飾パターンを含む、請求項３１に記載の核酸：
$M^A-(M)_4-M^B$。
【請求項３４】
前記第１の鎖が、以下の修飾パターンを含む、請求項３１に記載の核酸：
$M^A-(M)_5-M^B$。
【請求項３５】
前記第１の鎖が、以下の修飾パターンを含む、請求項３２に記載の核酸：
$F-(Me)_3-F$。
【請求項３６】
前記第１の鎖が、以下の修飾パターンを含む、請求項３３に記載の核酸：
$F-(Me)_4-F$。
【請求項３７】
前記第１の鎖が、以下の修飾パターンを含む、請求項３４に記載の核酸：
$F-(Me)_5-F$。
【請求項３８】
前記第１の鎖が、以下の修飾パターンを含み、
$M^C-M^A-(M)_{3-5}-M^B-M^D$
式中、M^C及びM^Dが、同じであっても異なっていてもよく、それぞれ、各々が少なくとも２つの異なる修飾ヌクレオチドを含む複数の５’及び３’末端領域の化学修飾ヌクレオチドを示す、請求項３１に記載の核酸。
【請求項３９】
前記第１の鎖が、以下の修飾パターンを含む、請求項３８に記載の核酸：
３’　Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｆ－Ｆ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ　５’。
【請求項４０】
前記第１の鎖が、以下の修飾パターンを含む、請求項３８に記載の核酸：
３’　Ｈ－Ｈ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｍｅ－

Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｆ－Ｆ－Ｍｅ　５’。
【請求項４１】
前記第１の鎖が、以下の修飾パターンを含む、請求項３８に記載の核酸：
３’　Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ　５’。
【請求項４２】
前記第２の鎖の５’又は３’近位末端領域における少なくとも３つの連続した位置の間にそれぞれホスホロチオエートヌクレオチド間連結を更に含み、それによって、前記近位末端領域が、好ましくは、前記第２の鎖の前記１つ以上の脱塩基ヌクレオチドが位置する前記末端領域に隣接している、請求項１～４１のいずれか一項に記載の核酸。
【請求項４３】
前記第１の鎖の５’及び／又は３’末端領域における少なくとも３つの連続した位置の間にそれぞれホスホロチオエートヌクレオチド間連結を更に含み、それによって、好ましくは、前記第１の鎖の前記５’及び／又は３’末端領域での末端位置が、ホスホロチオエートヌクレオチド間連結によってその隣接位置に結合している、請求項１～４２のいずれか一項に記載の核酸。
【請求項４４】
細胞における標的遺伝子の発現を阻害するためのコンジュゲートであって、前記コンジュゲートが、核酸部分及び１つ以上のリガンド部分を含み、前記核酸部分が、請求項１～４３のいずれか一項に記載の核酸を含む、コンジュゲート。
【請求項４５】
前記核酸の前記第２の鎖が、前記１つ以上のリガンド部分に直接的又は間接的にコンジュゲートされており、前記リガンド部分が、典型的には、前記第２の鎖の末端領域、好ましくは、その前記３’末端領域に存在する、請求項４４に記載のコンジュゲート。
【請求項４６】
前記リガンド部分が、
ｉ）１つ以上のＧａｌＮＡｃリガンド、及び／又は
ｉｉ）１つ以上のＧａｌＮＡｃリガンド誘導体、及び／又は
ｉｉｉ）リンカーを介して前記核酸にコンジュゲートされた１つ以上のＧａｌＮＡｃリガンドを含む、請求項４４又は４５に記載のコンジュゲート。
【請求項４７】
前記ＧａｌＮＡｃリガンドが、前記核酸の前記第２の鎖の前記５’又は３’末端領域、好ましくは、その前記３’末端領域に直接的又は間接的にコンジュゲートされている、請求項４６に記載のコンジュゲート。
【請求項４８】
請求項１～４３のいずれか一項に記載の核酸又は請求項４４～４７のいずれか一項に記載のコンジュゲートと、生理学的に許容される賦形剤と、を含む、医薬組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、治療的使用に好適な核酸化合物である新規のオリゴヌクレオチド化合物を提供する。加えて、本発明は、これらの化合物を作製する方法、並びに様々な疾患及び状態の治療のためにかかる化合物を使用する方法を提供する。
【背景技術】
【０００２】
オリゴヌクレオチド化合物は、医学において重要な治療用途を有する。オリゴヌクレオチドを、特定の疾患の原因となる遺伝子をサイレンシングさせるために使用することができる。遺伝子サイレンシングは、翻訳を阻害することによってタンパク質の形成を防止する。重要なことに、遺伝子サイレンシング剤は、疾患に関連するタンパク質の機能を阻害する従来の小さい有機化合物の有望な代替物である。ｓｉＲＮＡ、アンチセンスＲＮＡ、

及びマイクロＲＮＡは、遺伝子サイレンシングによってタンパク質の形成を防止するオリゴヌクレオチドである。

【０００３】

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

【０００４】

本発明は、疾患の治療及び／又は予防における使用のための核酸化合物である、かかるオリゴヌクレオチド化合物に関する。

【発明の概要】

【０００５】

細胞における標的遺伝子の発現を阻害するための核酸、任意選択でＲＮＡであって、第１の鎖の少なくとも一部分と、第１の鎖に少なくとも部分的に相補的である第２の鎖の少なくとも一部分と、を含む少なくとも１つの二本鎖領域を含み、当該第１の鎖が、阻害される当該標的遺伝子から転写されたＲＮＡの少なくとも一部分に少なくとも部分的に相補的であり、第２の鎖が、第２の鎖の末端領域に１つ以上の脱塩基ヌクレオチドを含み、当該脱塩基ヌクレオチドが、逆ヌクレオチド間連結を介して隣接するヌクレオチドに接続している、核酸。

【０００６】

細胞における標的遺伝子の発現を阻害するためのコンジュゲートであって、当該コンジュゲートが、核酸部分及び１つ以上のリガンド部分を含み、当該核酸部分が、本明細書に開示される核酸を含む、コンジュゲート。

【０００７】

本明細書に開示される核酸又は本明細書に開示されるコンジュゲートと、生理学的に許容される賦形剤と、を含む、医薬組成物。

【図面の簡単な説明】

【０００８】

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

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

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

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

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

【図６】培養中、各０時間後、２４時間後、４８時間後、及び７２時間後の、初代ヒト肝細胞ＢＨｕｆ１６０８７（左）、ＣＨＦ２１０１（真ん中）及びＣｙＨｕｆ１９００９（右）の３つのバッチ全てにおける、ｈｓＴＴＲ（上段）、ｈｓＣ５（中段）及びｈｓＨＡＯ１（下段）のｍＲＮＡ発現レベルの分析を示す。ｍＲＮＡ発現レベルは、相対光単位［ＲＬＵ］で示される。

【図７】培養中、各０時間後、２４時間後、４８時間後、及び７２時間後の、初代ヒト肝細胞ＢＨｕｆ１６０８７（左）、ＣＨＦ２１０１（真ん中）、及びＣｙＨｕｆ１９００９（右）の３つのバッチ全てにおける、ｈｓＧＡＰＤＨ（上段）及びｈｓＡＨＳＡ１（下段）のｍＲＮＡ発現レベルの分析を示す。ｍＲＮＡ発現レベルは、相対光単位［ＲＬＵ］で示される。

【図８Ａ－Ｂ】実施例１におけるＰＨＨにおけるｈｓＨＡＯ１標的化ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡの用量応答分析の結果を示す。
【図９Ａ－Ｂ】実施例１におけるＰＨＨにおけるｈｓＣ５標的化ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡの用量応答分析の結果を示す。
【図１０Ａ－Ｂ】実施例１におけるＰＨＨにおけるｈｓＴＴＲ標的化ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡの用量応答分析の結果を示す。
【図１１Ａ－Ｂ】実施例３におけるＨｅｐＧ２細胞におけるｈｓＴＴＲ標的化ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡの用量応答分析の結果を示す。
【図１２Ａ－Ｂ】実施例３におけるＨｅｐＧ２細胞におけるｈｓＣ５標的化ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡの用量応答分析の結果を示す。
【図１３Ａ－Ｂ】実施例３におけるＰＨＨにおけるｈｓＨＡＯ１標的化ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡの用量応答分析の結果を示す。
【図１４Ａ－Ｂ】実施例３におけるＰＨＨにおけるｈｓＣ５標的化ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡの用量応答分析の結果を示す。
【図１５Ａ－Ｂ】実施例３におけるＰＨＨにおけるｈｓＴＴＲ標的化ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡの用量応答分析の結果を示す。
【図１６】ＥＴＸ００５の単回用量マウス薬理学。ＨＡＯ１　ｍＲＮＡの発現は、生理食塩水対照群に対して示される。各点は、３匹のマウスの平均及び標準偏差を表す。
【図１７】ＥＴＸ００５の単回用量マウス薬理学。血清グリコレート濃度を示す。各点は、５匹のマウスの群に由来するベースライングリコレート濃度（０日目）を除いて、３匹のマウスの平均及び標準偏差を表す。
【図１８】ＥＴＸ００６の単回用量マウス薬理学。ＨＡＯ１　ｍＲＮＡの発現は、生理食塩水対照群に対して示される。各点は、３匹のマウスの平均及び標準偏差を表す。
【図１９】ＥＴＸ００６の単回用量マウス薬理学。血清グリコレート濃度を示す。各点は、５匹のマウスの群に由来するベースライングリコレート濃度（０日目）を除いて、３匹のマウスの平均及び標準偏差を表す。
【図２０】ＥＴＸ０１４の単回用量マウス薬理学。Ｃ５　ｍＲＮＡの発現は、生理食塩水対照群に対して示される。各点は、３匹のマウスの平均及び標準偏差を表す。
【図２１】ＥＴＸ００１４の単回用量マウス薬理学。血清Ｃ５濃度は、生理食塩水対照群に対して示される。各点は、３匹のマウスの平均及び標準偏差を表す。
【図２２】ＥＴＸ０１５の単回用量マウス薬理学。Ｃ５　ｍＲＮＡの発現は、生理食塩水対照群に対して示される。各点は、３匹のマウスの平均及び標準偏差を表す。
【図２３】ＥＴＸ００１５の単回用量マウス薬理学。血清Ｃ５濃度は、生理食塩水対照群に対して示される。各点は、３匹のマウスの平均及び標準偏差を表す。
【図２４】ＥＴＸ０２３の単回用量ＮＨＰ薬理学。血清ＴＴＲ濃度は、研究の１日目に対して示される。各点は、３匹の動物の平均及び標準偏差を表す。
【図２５】ＥＴＸ０２４の単回用量ＮＨＰ薬理学。血清ＴＴＲ濃度は、研究の１日目に対して示される。各点は、３匹の動物の平均及び標準偏差を表す。
【図２６】ＥＴＸ０１９の単回用量ＮＨＰ薬理学。血清ＴＴＲ濃度は、研究の１日目及び投薬前に対して示される。各点は、３匹の動物の平均及び標準偏差を表す。最大８４日間の時点が示される。
【図２７】ＥＴＸ０２０の単回用量ＮＨＰ薬理学。血清ＴＴＲ濃度は、研究の１日目及び投薬前に対して示される。各点は、３匹の動物の平均及び標準偏差を表す。最大８４日間の時点が示される。
【図２８ａ】ＥＴＸ０２３の単回用量ＮＨＰ薬理学。血清ＴＴＲ濃度は、研究の１日目及び投薬前に対して示される。各点は、３匹の動物の平均及び標準偏差を表す。最大８４日間の時点が示される。
【図２８ｂ】ＥＴＸ０２３の単回１ｍｇ／ｋｇ用量後の肝臓におけるＴＴＲ遺伝子発現の持続的な抑制。ＴＴＲ　ｍＲＮＡは、投薬前に測定されたベースラインレベルに対して示される。各点は、３匹の動物の平均及び標準偏差を表す。最大８４日間の時点が示される

。
【図２８ｃ】単回１ｍｇ／ｋｇ用量のＥＴＸ０２３を投薬された動物の体重。各点は、３匹の動物の平均及び標準偏差を表す。最大８４日間の時点が示される。
【図２８ｄ】単回１ｍｇ／ｋｇ用量のＥＴＸ０２３で処置された動物由来の血清中のＡＬＴ濃度。各点は、３匹の動物の平均及び標準偏差を表す。点線は、本種について正常とみなされる値の範囲を示す（Ｐａｒｋ　ｅｔ　ａｌ．２０１６　Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ　ｖａｌｕｅｓ　ｏｆ　ｃｌｉｎｉｃａｌ　ｐａｔｈｏｌｏｇｙ　ｐａｒａｍｅｔｅｒ　ｉｎ　ｃｙｎｏｍｏｌｇｕｓ　ｍｏｎｋｅｙｓ　ｕｓｅｄ　ｉｎ　ｐｒｅｃｌｉｎｉｃａｌ　ｓｔｕｄｉｅｓ．Ｌａｂ　Ａｎｉｍ　Ｒｅｓ　３２：７９－８６。）最大８４日間の時点が示される。
【図２８ｅ】単回１ｍｇ／ｋｇ用量のＥＴＸ０２３で処置された動物由来の血清中のＡＳＴ濃度。各点は、３匹の動物の平均及び標準偏差を表す。点線は、本種について正常とみなされる値の範囲を示す（Ｐａｒｋ　ｅｔ　ａｌ．２０１６　Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ　ｖａｌｕｅｓ　ｏｆ　ｃｌｉｎｉｃａｌ　ｐａｔｈｏｌｏｇｙ　ｐａｒａｍｅｔｅｒ　ｉｎ　ｃｙｎｏｍｏｌｇｕｓ　ｍｏｎｋｅｙｓ　ｕｓｅｄ　ｉｎ　ｐｒｅｃｌｉｎｉｃａｌ　ｓｔｕｄｉｅｓ．Ｌａｂ　Ａｎｉｍ　Ｒｅｓ　３２：７９－８６。最大８４日間の時点が示される。
【図２９ａ】ＥＴＸ０２４の単回用量ＮＨＰ薬理学。血清ＴＴＲ濃度は、研究の１日目及び投薬前に対して示される。各点は、３匹の動物の平均及び標準偏差を表す。最大８４日間の時点が示される。
【図２９ｂ】ＥＴＸ０２４の単回１ｍｇ／ｋｇ用量後の肝臓におけるＴＴＲ遺伝子発現の持続的な抑制。ＴＴＲ　ｍＲＮＡは、投薬前に測定されたベースラインレベルに対して示される。各点は、３匹の動物の平均及び標準偏差を表す。最大８４日間の時点が示される。
【図２９ｃ】単回１ｍｇ／ｋｇ用量のＥＴＸ０２４を投薬された動物の体重。各点は、３匹の動物の平均及び標準偏差を表す。最大８４日間の時点が示される。
【図２９ｄ】単回１ｍｇ／ｋｇ用量のＥＴＸ０２４で処置された動物由来の血清中のＡＬＴ濃度。各点は、３匹の動物の平均及び標準偏差を表す。点線は、本種について正常とみなされる値の範囲を示す（Ｐａｒｋ　ｅｔ　ａｌ．２０１６　Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ　ｖａｌｕｅｓ　ｏｆ　ｃｌｉｎｉｃａｌ　ｐａｔｈｏｌｏｇｙ　ｐａｒａｍｅｔｅｒ　ｉｎ　ｃｙｎｏｍｏｌｇｕｓ　ｍｏｎｋｅｙｓ　ｕｓｅｄ　ｉｎ　ｐｒｅｃｌｉｎｉｃａｌ　ｓｔｕｄｉｅｓ．Ｌａｂ　Ａｎｉｍ　Ｒｅｓ　３２：７９－８６。）最大８４日間の時点が示される。
【図２９ｅ】単回１ｍｇ／ｋｇ用量のＥＴＸ０２４で処置された動物由来の血清中のＡＳＴ濃度。各点は、３匹の動物の平均及び標準偏差を表す。点線は、本種について正常とみなされる値の範囲を示す（Ｐａｒｋ　ｅｔ　ａｌ．２０１６　Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ　ｖａｌｕｅｓ　ｏｆ　ｃｌｉｎｉｃａｌ　ｐａｔｈｏｌｏｇｙ　ｐａｒａｍｅｔｅｒ　ｉｎ　ｃｙｎｏｍｏｌｇｕｓ　ｍｏｎｋｅｙｓ　ｕｓｅｄ　ｉｎ　ｐｒｅｃｌｉｎｉｃａｌ　ｓｔｕｄｉｅｓ．Ｌａｂ　Ａｎｉｍ　Ｒｅｓ　３２：７９－８６。最大８４日間の時点が示される。
【図３０】ＥＴＸ００５、０１４、０２３のリンカー及びリガンド部分　また、必要に応じて、生成物としてのＥＴＸ００５は、本明細書にも示されるように、オリゴヌクレオチド部分に結合した図３０に具体的に示されるリンカー及びリガンド部分に基づく分子を含むが、このＥＴＸ００５生成物は、代替的に、リンカー及びリガンド部分が、本質的に、図３０に示されるようにオリゴヌクレオチド部分に結合しているが、ＯＨ置換基などの加水分解置換の結果として生じる置換基によって置換されたシクロオクチル環上の図３０に示されるＦ置換基を有する分子を更に含み得るか、又は本質的にそれらからなり得ることも理解されたい。このようにして、（ａ）ＥＴＸ００５は、シクロオクチル環上にＦ置換基を有する、図３０に具体的に示されるようなリンカー及びリガンド部分を有する分子から本質的になり得るか、又は（ｂ）ＥＴＸ００５は、図３０に示されるように本質的にリ

ンカー及びリガンド部分を有するが、ＯＨ置換基などの加水分解置換の結果として生じる置換基によって置換されたシクロオクチル環上の図３０に示されるＦ置換基を有する分子から本質的になり得るか、又は（ｃ）ＥＴＸ００５は、（ａ）及び／若しくは（ｂ）で定義される分子の混合物を含み得る。　また、必要に応じて、生成物としてのＥＴＸ０１４は、本明細書にも示されるように、オリゴヌクレオチド部分に結合した図３０に具体的に示されるリンカー及びリガンド部分に基づく分子を含むが、このＥＴＸ０１４生成物は、代替的に、リンカー及びリガンド部分が、本質的に、図３０に示されるようにオリゴヌクレオチド部分に結合しているが、ＯＨ置換基などの加水分解置換の結果として生じる置換基によって置換されたシクロオクチル環上の図３０に示されるＦ置換基を有する分子を更に含み得るか、又は本質的にそれらからなり得ることも理解されたい。このようにして、（ａ）ＥＴＸ０１４は、シクロオクチル環上にＦ置換基を有する、図３０に具体的に示されるようなリンカー及びリガンド部分を有する分子から本質的になり得るか、又は（ｂ）ＥＴＸ０１４は、図３０に示されるように本質的にリンカー及びリガンド部分を有するが、ＯＨ置換基などの加水分解置換の結果として生じる置換基によって置換されたシクロオクチル環上の図３０に示されるＦ置換基を有する分子から本質的になり得るか、又は（ｃ）ＥＴＸ０１４は、（ａ）及び／若しくは（ｂ）で定義される分子の混合物を含み得る。また、必要に応じて、生成物としてのＥＴＸ０２３は、本明細書にも示されるように、オリゴヌクレオチド部分に結合した図３０に具体的に示されるリンカー及びリガンド部分に基づく分子を含むが、このＥＴＸ０２３生成物は、代替的に、リンカー及びリガンド部分が、本質的に、図３０に示されるようにオリゴヌクレオチド部分に結合しているが、ＯＨ置換基などの加水分解置換の結果として生じる置換基によって置換されたシクロオクチル環上の図３０に示されるＦ置換基を有する分子を更に含み得るか、又は本質的にそれらからなり得ることも理解されたい。このようにして、（ａ）ＥＴＸ０２３は、シクロオクチル環上にＦ置換基を有する、図３０に具体的に示されるようなリンカー及びリガンド部分を有する分子から本質的になり得るか、又は（ｂ）ＥＴＸ０２３は、図３０に示されるように本質的にリンカー及びリガンド部分を有するが、ＯＨ置換基などの加水分解置換の結果として生じる置換基によって置換されたシクロオクチル環上の図３０に示されるＦ置換基を有する分子から本質的になり得るか、又は（ｃ）ＥＴＸ０２３は、（ａ）及び／若しくは（ｂ）で定義される分子の混合物を含み得る。

【図３１】ＥＴＸ００１、０１０、０１９のリンカー及びリガンド部分　また、必要に応じて、生成物としてのＥＴＸ００１は、本明細書にも示されるように、オリゴヌクレオチド部分に結合した図３１に具体的に示されるリンカー及びリガンド部分に基づく分子を含むが、このＥＴＸ００１生成物は、代替的に、リンカー及びリガンド部分が、本質的に、図３１に示されるようにオリゴヌクレオチド部分に結合しているが、ＯＨ置換基などの加水分解置換の結果として生じる置換基によって置換されたシクロオクチル環上の図３１に示されるＦ置換基を有する分子を更に含み得るか、又は本質的にそれらからなり得ることも理解されたい。このようにして、（ａ）ＥＴＸ００１は、シクロオクチル環上にＦ置換基を有する、図３１に具体的に示されるようなリンカー及びリガンド部分を有する分子から本質的になり得るか、又は（ｂ）ＥＴＸ００１は、図３１に示されるように本質的にリンカー及びリガンド部分を有するが、ＯＨ置換基などの加水分解置換の結果として生じる置換基によって置換されたシクロオクチル環上の図３１に示されるＦ置換基を有する分子から本質的になり得るか、又は（ｃ）ＥＴＸ００１は、（ａ）及び／若しくは（ｂ）で定義される分子の混合物を含み得る。　また、必要に応じて、生成物としてのＥＴＸ０１０は、本明細書にも示されるように、オリゴヌクレオチド部分に結合した図３１に具体的に示されるリンカー及びリガンド部分に基づく分子を含むが、このＥＴＸ０１０生成物は、代替的に、リンカー及びリガンド部分が、本質的に、図３１に示されるようにオリゴヌクレオチド部分に結合しているが、ＯＨ置換基などの加水分解置換の結果として生じる置換基によって置換されたシクロオクチル環上の図３１に示されるＦ置換基を有する分子を更に含み得るか、又は本質的にそれらからなり得ることも理解されたい。このようにして、（ａ）ＥＴＸ０１０は、シクロオクチル環上にＦ置換基を有する、図３１に具体的に示さ

れるようなリンカー及びリガンド部分を有する分子から本質的になり得るか、又は（ｂ）ＥＴＸ０１０は、図３１に示されるように本質的にリンカー及びリガンド部分を有するが、ＯＨ置換基などの加水分解置換の結果として生じる置換基によって置換されたシクロオクチル環上の図３１に示されるＦ置換基を有する分子から本質的になり得るか、又は（ｃ）ＥＴＸ０１０は、（ａ）及び／若しくは（ｂ）で定義される分子の混合物を含み得る。また、必要に応じて、生成物としてのＥＴＸ０１９は、本明細書にも示されるように、オリゴヌクレオチド部分に結合した図３１に具体的に示されるリンカー及びリガンド部分に基づく分子を含むが、このＥＴＸ０１９生成物は、代替的に、リンカー及びリガンド部分が、本質的に、図３１に示されるようにオリゴヌクレオチド部分に結合しているが、ＯＨ置換基などの加水分解置換の結果として生じる置換基によって置換されたシクロオクチル環上の図３１に示されるＦ置換基を有する分子を更に含み得るか、又は本質的にそれらからなり得ることも理解されたい。このようにして、（ａ）ＥＴＸ０１９は、シクロオクチル環上にＦ置換基を有する、図３１に具体的に示されるようなリンカー及びリガンド部分を有する分子から本質的になり得るか、又は（ｂ）ＥＴＸ０１９は、図３１に示されるように本質的にリンカー及びリガンド部分を有するが、ＯＨ置換基などの加水分解置換の結果として生じる置換基によって置換されたシクロオクチル環上の図３１に示されるＦ置換基を有する分子から本質的になり得るか、又は（ｃ）ＥＴＸ０１９は、（ａ）及び／若しくは（ｂ）で定義される分子の混合物を含み得る。

【図３２】ＥＴＸ００６、０１５、０２４のリンカー及びリガンド部分。

【図３３】ＥＴＸ００２、０１１、０２０のリンカー及びリガンド部分。

【図３４】単回１ｍｇ／ｋｇ用量のＥＴＸ０２３で処置された動物由来の血清中の総ビリルビン濃度。各点は、３匹の動物の平均及び標準偏差を表す。点線は、本種について正常とみなされる値の範囲を示す（Ｐａｒｋ ｅｔ ａｌ．２０１６ Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ ｖａｌｕｅｓ ｏｆ ｃｌｉｎｉｃａｌ ｐａｔｈｏｌｏｇｙ ｐａｒａｍｅｔｅｒ ｉｎ ｃｙｎｏｍｏｌｇｕｓ ｍｏｎｋｅｙｓ ｕｓｅｄ ｉｎ ｐｒｅｃｌｉｎｉｃａｌ ｓｔｕｄｉｅｓ．Ｌａｂ Ａｎｉｍ Ｒｅｓ ３２：７９－８６。）

【図３５】単回１ｍｇ／ｋｇ用量のＥＴＸ０２３で処置された動物由来の血液尿素窒素（ＢＵＮ）濃度。各点は、３匹の動物の平均及び標準偏差を表す。点線は、本種について正常とみなされる値の範囲を示す（Ｐａｒｋ ｅｔ ａｌ．２０１６ Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ ｖａｌｕｅｓ ｏｆ ｃｌｉｎｉｃａｌ ｐａｔｈｏｌｏｇｙ ｐａｒａｍｅｔｅｒ ｉｎ ｃｙｎｏｍｏｌｇｕｓ ｍｏｎｋｅｙｓ ｕｓｅｄ ｉｎ ｐｒｅｃｌｉｎｉｃａｌ ｓｔｕｄｉｅｓ．Ｌａｂ Ａｎｉｍ Ｒｅｓ ３２：７９－８６。）

【図３６】単回１ｍｇ／ｋｇ用量のＥＴＸ０２３で処置された動物由来のクレアチニン（ＣＲＥＡ）濃度。各点は、３匹の動物の平均及び標準偏差を表す。点線は、本種について正常とみなされる値の範囲を示す（Ｐａｒｋ ｅｔ ａｌ．２０１６ Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ ｖａｌｕｅｓ ｏｆ ｃｌｉｎｉｃａｌ ｐａｔｈｏｌｏｇｙ ｐａｒａｍｅｔｅｒ ｉｎ ｃｙｎｏｍｏｌｇｕｓ ｍｏｎｋｅｙｓ ｕｓｅｄ ｉｎ ｐｒｅｃｌｉｎｉｃａｌ ｓｔｕｄｉｅｓ．Ｌａｂ Ａｎｉｍ Ｒｅｓ ３２：７９－８６）。

【図３７】単回１ｍｇ／ｋｇ用量のＥＴＸ０２４で処置された動物由来の血清中の総ビリルビン濃度。各点は、３匹の動物の平均及び標準偏差を表す。陰影は、研究に使用される施設で正常とみなされる値の範囲を示す。点線は、本種について正常とみなされる値を示す（Ｐａｒｋ ｅｔ ａｌ．２０１６ Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ ｖａｌｕｅｓ ｏｆ ｃｌｉｎｉｃａｌ ｐａｔｈｏｌｏｇｙ ｐａｒａｍｅｔｅｒ ｉｎ ｃｙｎｏｍｏｌｇｕｓ ｍｏｎｋｅｙｓ ｕｓｅｄ ｉｎ ｐｒｅｃｌｉｎｉｃａｌ ｓｔｕｄｉｅｓ．Ｌａｂ Ａｎｉｍ Ｒｅｓ ３２：７９－８６）。

【図３８】単回１ｍｇ／ｋｇ用量のＥＴＸ０２４で処置された動物由来の血液尿素窒素（ＢＵＮ）濃度。各点は、３匹の動物の平均及び標準偏差を表す。陰影は、研究に使用される施設で正常とみなされる値の範囲を示す。点線は、本種について正常とみなされる値を示す（Ｐａｒｋ ｅｔ ａｌ．２０１６ Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ ｖａｌｕｅｓ ｏｆ ｃｌｉｎｉｃａｌ ｐａｔｈｏｌｏｇｙ ｐａｒａｍｅｔｅｒ ｉｎ ｃｙｎｏｍｏｌｇｕ

ｓ ｍｏｎｋｅｙｓ ｕｓｅｄ ｉｎ ｐｒｅｃｌｉｎｉｃａｌ ｓｔｕｄｉｅｓ．Ｌａｂ Ａｎｉｍ Ｒｅｓ ３２：７９－８６）。
【図３９】単回１ｍｇ／ｋｇ用量のＥＴＸ０２４で処置された動物由来のクレアチニン（ＣＲＥＡ）濃度。各点は、３匹の動物の平均及び標準偏差を表す。陰影は、研究に使用される施設で正常とみなされる値の範囲を示す。点線は、本種について正常とみなされる値を示す（Ｐａｒｋ ｅｔ ａｌ．２０１６ Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ ｖａｌｕｅｓ ｏｆ ｃｌｉｎｉｃａｌ ｐａｔｈｏｌｏｇｙ ｐａｒａｍｅｔｅｒ ｉｎ ｃｙｎｏｍｏｌｇｕｓ ｍｏｎｋｅｙｓ ｕｓｅｄ ｉｎ ｐｒｅｃｌｉｎｉｃａｌ ｓｔｕｄｉｅｓ．Ｌａｂ Ａｎｉｍ Ｒｅｓ ３２：７９－８６）。
【図４０－４２】以下に記載する。
【図４３】本明細書に開示されるセンテンス１～１０１に記載される式の詳細を示す。
【図４４】本明細書に開示される項１～５６に記載される式の詳細を示す。
【図４５ａ】本明細書に記載の構築物ＥＴＸ００１、ＥＴＸ００２のセンス（ＳＳ）及びアンチセンス（ＡＳ）鎖の基礎となるヌクレオチド配列を示す。ＥＴＸ００１及びＥＴＸ００２の両方については、ｇａｌｎａｃリンカーが、使用中のセンス鎖の５’末端領域に結合している（図４５ａには示されていない）。ＥＴＸ００１については、図３１に示すようにｇａｌｎａｃリンカーが結合している。ＥＴＸ００２については、図３３に示すようにｇａｌｎａｃリンカーが結合している。 図４５ａのセンス鎖の３’末端領域に示されるｉａｉａは、（ｉ）センス鎖の３’末端領域で末端から２番目及び末端のヌクレオチドとして提供される２つの脱塩基ヌクレオチドを表し、（ｉｉ）センス鎖の末端から３番目の（ａｎｔｅｐｅｎｕｌｔｉｍａｔｅ）ヌクレオチド（すなわち、センス鎖の２１位のＡ、１位はセンス鎖の５’末端ヌクレオチド、すなわち、センス鎖の５’末端領域の末端のＧである）と、隣接する末端から２番目の（ｐｅｎｕｌｔｉｍａｔｅ）脱塩基残基との間に、３’－３’逆連結が提供され、（ｉｉｉ）末端の脱塩基ヌクレオチドと末端から２番目の脱塩基ヌクレオチドとの間の連結は、末端及び末端から２番目の脱塩基ヌクレオチドを含む３’末端領域に向かって読み取る場合、５’－３’である。 図４５ａのセンス鎖について、センス鎖の１位（センス鎖の５’末端ヌクレオチド、すなわち、センス鎖の５’末端領域の末端のＧである）から読み取る場合、したがって、（ｉ）１～６、８、及び１２～２１位のヌクレオチドは、２’Ｏ－メチル修飾された糖を有し、（ｉｉ）７及び９～１１位のヌクレオチドは、２’Ｆ修飾された糖を有し、（ｉｉｉ）脱塩基ヌクレオチドは、１位及び２位にＨを有する糖を有する。 図４５ａのアンチセンス鎖について、アンチセンス鎖の１位（アンチセンス鎖の５’末端ヌクレオチド、すなわち、アンチセンス鎖の５’末端領域の末端のＵである）から読み取る場合、したがって、（ｉ）１、３～５、７、１０～１３、１５、１７～２３位のヌクレオチドは、２’Ｏ－メチル修飾された糖を有し、（ｉｉ）２、６、８、９、１４、１６位のヌクレオチドは、２’Ｆ修飾された糖を有する。
【図４５ｂ】本明細書に記載の構築物ＥＴＸ００５、ＥＴＸ００６のセンス（ＳＳ）及びアンチセンス（ＡＳ）鎖の基礎となるヌクレオチド配列を示す。ＥＴＸ００５及びＥＴＸ００６の両方については、ｇａｌｎａｃリンカーが、使用中のセンス鎖の３’末端領域に結合している（図４５ｂには示されていない）。ＥＴＸ００５については、図３０に示すようにｇａｌｎａｃリンカーが結合している。ＥＴＸ００６については、図３２に示すようにｇａｌｎａｃリンカーが結合している。 図４５ｂのセンス鎖の５’末端領域に示されるｉａｉａは、（ｉ）センス鎖の５’末端領域で末端から２番目及び末端のヌクレオチドとして提供される２つの脱塩基ヌクレオチドを表し、（ｉｉ）センス鎖の末端から３番目のヌクレオチド（すなわち、センス鎖の１位のＧ、センス鎖上のヌクレオチド位置番号付けにおけるセンス鎖の５’末端領域のｉａｉａモチーフは含まない）と、隣接する末端から２番目の脱塩基残基との間に、５’－５’逆連結が提供され、（ｉｉｉ）末端の脱塩基ヌクレオチドと末端から２番目の脱塩基ヌクレオチドとの間の連結は、末端及び末端から２番目の脱塩基ヌクレオチドを含む５’末端領域に向かって読み取る場合、３’－５’である。 図４５ｂのセンス鎖について、センス鎖の１位（センス鎖の５’末端ヌクレオチド、すなわちセンス鎖の５’末端領域の末端のＧであり、センス鎖上のヌクレオチド位置番

号付けにおいてセンス鎖の５’末端領域のｉａｉａモチーフを含まない）から読み取る場合、したがって、（ｉ）１～６、８、及び１２～２１位のヌクレオチドは、２’Ｏ－メチル修飾された糖を有し、（ｉｉ）７及び９～１１位のヌクレオチドは、２’Ｆ修飾された糖を有し、（ｉｉｉ）脱塩基ヌクレオチドは、１位及び２位にＨを有する糖を有する。図４５ｂのアンチセンス鎖について、アンチセンス鎖の１位（アンチセンス鎖の５’末端ヌクレオチド、すなわち、アンチセンス鎖の５’末端領域の末端のＵである）から読み取る場合、したがって、（ｉ）１、３～５、７、１０～１３、１５、１７～２３位のヌクレオチドは、２’Ｏ－メチル修飾された糖を有し、（ｉｉ）２、６、８、９、１４、１６位のヌクレオチドは、２’Ｆ修飾された糖を有する。

【図４６ａ】本明細書に記載の構築物ＥＴＸ０１０、ＥＴＸ０１１のセンス（ＳＳ）及びアンチセンス（ＡＳ）鎖の基礎となるヌクレオチド配列を示す。ＥＴＸ０１０及びＥＴＸ０１１の両方については、ｇａｌｎａｃリンカーが、使用中のセンス鎖の５’末端領域に結合している（図４６ａには示されていない）。ＥＴＸ０１０については、図３１に示すようにｇａｌｎａｃリンカーが結合している。ＥＴＸ０１１については、図３３に示すようにｇａｌｎａｃリンカーが結合している。　図４６ａのセンス鎖の３’末端領域に示されるｉａｉａは、（ｉ）センス鎖の３’末端領域で末端から２番目及び末端のヌクレオチドとして提供される２つの脱塩基ヌクレオチドを表し、（ｉｉ）センス鎖の末端から３番目のヌクレオチド（すなわち、センス鎖の２１位のＡ、１位はセンス鎖の５’末端ヌクレオチド、すなわち、センス鎖の５’末端領域の末端のＡである）と、隣接する末端から２番目の脱塩基残基との間に、３’－３’逆連結が提供され、（ｉｉｉ）末端の脱塩基ヌクレオチドと末端から２番目の脱塩基ヌクレオチドとの間の連結は、末端及び末端から２番目の脱塩基ヌクレオチドを含む３’末端領域に向かって読み取る場合、５’－３’である。　図４６ａのセンス鎖について、センス鎖の１位（センス鎖の５’末端ヌクレオチド、すなわち、センス鎖の５’末端領域の末端のＡである）から読み取る場合、したがって、（ｉ）１、２、４、６、８、１２、１４、１５、１７、１９～２１位のヌクレオチドは、２’Ｏ－メチル修飾された糖を有し、（ｉｉ）３、５、７、９～１１、１３、１６、１８位のヌクレオチドは、２’Ｆ修飾された糖を有し、（ｉｉｉ）脱塩基ヌクレオチドは、１位及び２位にＨを有する糖を有する。　図４６ａのアンチセンス鎖について、アンチセンス鎖の１位（アンチセンス鎖の５’末端ヌクレオチド、すなわち、アンチセンス鎖の５’末端領域の末端のＵである）から読み取る場合、したがって、（ｉ）１、４、６、７、９、１１～１３、１５、１７、１９～２３位のヌクレオチドは、２’Ｏ－メチル修飾された糖を有し、（ｉｉ）２、３、５、８、１０、１４、１６、１８位のヌクレオチドは、２’Ｆ修飾された糖を有し、（ｉｉｉ）アンチセンス鎖の３’末端領域の２４、２５位の末端から２番目及び末端のＴヌクレオチドは、２位にＨを有する糖を有する。

【図４６ｂ】本明細書に記載の構築物ＥＴＸ０１４、ＥＴＸ０１５のセンス（ＳＳ）及びアンチセンス（ＡＳ）鎖の基礎となるヌクレオチド配列を示す。ＥＴＸ０１４及びＥＴＸ０１５の両方については、ｇａｌｎａｃリンカーが、使用中のセンス鎖の３’末端領域に結合している（図４６ｂには示されていない）。ＥＴＸ０１４については、図３０に示すようにｇａｌｎａｃリンカーが結合している。ＥＴＸ０１５については、図３２に示すようにｇａｌｎａｃリンカーが結合している。　図４６ｂのセンス鎖の５’末端領域に示されるｉａｉａは、（ｉ）センス鎖の５’末端領域で末端から２番目及び末端のヌクレオチドとして提供される２つの脱塩基ヌクレオチドを表し、（ｉｉ）センス鎖の末端から３番目のヌクレオチド（すなわち、センス鎖の１位のＡ、センス鎖上のヌクレオチド位置番号付けにおけるセンス鎖の５’末端領域のｉａｉａモチーフは含まない）と、隣接する末端から２番目の脱塩基残基との間に、５’－５’逆連結が提供され、（ｉｉｉ）末端の脱塩基ヌクレオチドと末端から２番目の脱塩基ヌクレオチドとの間の連結は、末端及び末端から２番目の脱塩基ヌクレオチドを含む５’末端領域に向かって読み取る場合、３’－５’である。　図４６ｂのセンス鎖について、センス鎖の１位（センス鎖の５’末端ヌクレオチド、すなわちセンス鎖の５’末端領域の末端のＡであり、センス鎖上のヌクレオチド位置番号付けにおいてセンス鎖の５’末端領域のｉａｉａモチーフを含まない）から読み取る場

合、したがって、（ｉ）１、２、４、６、８、１２、１４、１５、１７、１９～２１位のヌクレオチドは、２’Ｏ－メチル修飾された糖を有し、（ｉｉ）３、５、７、９～１１、１３、１６、１８位のヌクレオチドは、２’Ｆ修飾された糖を有し、（ｉｉｉ）脱塩基ヌクレオチドは、１位及び２位にＨを有する糖を有する。　図４６ｂのアンチセンス鎖について、アンチセンス鎖の１位（アンチセンス鎖の５’末端ヌクレオチド、すなわち、アンチセンス鎖の５’末端領域の末端のＵである）から読み取る場合、したがって、（ｉ）１、４、６、７、９、１１～１３、１５、１７、１９～２３位のヌクレオチドは、２’Ｏ－メチル修飾された糖を有し、（ｉｉ）２、３、５、８、１０、１４、１６、１８位のヌクレオチドは、２’Ｆ修飾された糖を有し、（ｉｉｉ）アンチセンス鎖の３’末端領域の２４、２５位の末端から２番目及び末端のＴヌクレオチドは、２位にＨを有する糖を有する。

【図４７ａ】本明細書に記載の構築物ＥＴＸ０１９、ＥＴＸ０２０のセンス（ＳＳ）及びアンチセンス（ＡＳ）鎖の基礎となるヌクレオチド配列を示す。ＥＴＸ０１９及びＥＴＸ０２０の両方については、ｇａｌｎａｃリンカーが、使用中のセンス鎖の５’末端領域に結合している（図４７ａには示されていない）。ＥＴＸ０１９については、図３１に示すようにｇａｌｎａｃリンカーが結合している。ＥＴＸ０２０については、図３３に示すようにｇａｌｎａｃリンカーが結合している。　図４７ａのセンス鎖の３’末端領域に示されるｉａｉａは、（ｉ）センス鎖の３’末端領域で末端から２番目及び末端のヌクレオチドとして提供される２つの脱塩基ヌクレオチドを表し、（ｉｉ）センス鎖の末端から３番目のヌクレオチド（すなわち、センス鎖の２１位のＡ、１位はセンス鎖の５’末端ヌクレオチド、すなわち、センス鎖の５’末端領域の末端のＵである）と、隣接する末端から２番目の脱塩基残基との間に、３’－３’逆連結が提供され、（ｉｉｉ）末端の脱塩基ヌクレオチドと末端から２番目の脱塩基ヌクレオチドとの間の連結は、末端及び末端から２番目の脱塩基ヌクレオチドを含む３’末端領域に向かって読み取る場合、５’－３’である。　図４７ａのセンス鎖について、センス鎖の１位（センス鎖の５’末端ヌクレオチド、すなわち、センス鎖の５’末端領域の末端のＵである）から読み取る場合、したがって、（ｉ）１～６、８、及び１２～２１位のヌクレオチドは、２’Ｏ－メチル修飾された糖を有し、（ｉｉ）７及び９～１１位のヌクレオチドは、２’Ｆ修飾された糖を有し、（ｉｉｉ）脱塩基ヌクレオチドは、１位及び２位にＨを有する糖を有する。　図４７ａのアンチセンス鎖について、アンチセンス鎖の１位（アンチセンス鎖の５’末端ヌクレオチド、すなわち、アンチセンス鎖の５’末端領域の末端のＵである）から読み取る場合、したがって、（ｉ）１、３～５、７、８、１０～１３、１５、１７～２３位のヌクレオチドは、２’Ｏ－メチル修飾された糖を有し、（ｉｉ）２、６、９、１４、１６位のヌクレオチドは、２’Ｆ修飾された糖を有する。

【図４７ｂ】本明細書に記載の構築物ＥＴＸ０２３、ＥＴＸ０２４のセンス（ＳＳ）及びアンチセンス（ＡＳ）鎖の基礎となるヌクレオチド配列を示す。ＥＴＸ０２３及びＥＴＸ０２４の両方については、ｇａｌｎａｃリンカーが、使用中のセンス鎖の３’末端領域に結合している（図４７ｂには示されていない）。ＥＴＸ０２３については、図３０に示すようにｇａｌｎａｃリンカーが結合している。ＥＴＸ０２４については、図３２に示すようにｇａｌｎａｃリンカーが結合している。　図４７ｂのセンス鎖の５’末端領域に示されるｉａｉａは、（ｉ）センス鎖の５’末端領域で末端から２番目及び末端のヌクレオチドとして提供される２つの脱塩基ヌクレオチドを表し、（ｉｉ）センス鎖の末端から３番目のヌクレオチド（すなわち、センス鎖の１位のＵ、センス鎖上のヌクレオチド位置番号付けにおけるセンス鎖の５’末端領域のｉａｉａモチーフは含まない）と、隣接する末端から２番目の脱塩基残基との間に、５’－５’逆連結が提供され、（ｉｉｉ）末端の脱塩基ヌクレオチドと末端から２番目の脱塩基ヌクレオチドとの間の連結は、末端及び末端から２番目の脱塩基ヌクレオチドを含む５’末端領域に向かって読み取る場合、３’－５’である。　図４７ｂのセンス鎖について、センス鎖の１位（センス鎖の５’末端ヌクレオチド、すなわちセンス鎖の５’末端領域の末端のＵであり、センス鎖上のヌクレオチド位置番号付けにおいてセンス鎖の５’末端領域のｉａｉａモチーフを含まない）から読み取る場合、したがって、（ｉ）１～６、８、及び１２～２１位のヌクレオチドは、２’Ｏ－メチ

ル修飾された糖を有し、（ｉｉ）７及び９～１１位のヌクレオチドは、２’Ｆ修飾された糖を有し、（ｉｉｉ）脱塩基ヌクレオチドは、１位及び２位にＨを有する糖を有する。
図４７ｂのアンチセンス鎖について、アンチセンス鎖の１位（アンチセンス鎖の５’末端ヌクレオチド、すなわち、アンチセンス鎖の５’末端領域の末端のＵである）から読み取る場合、したがって、（ｉ）１、３～５、７、８、１０～１３、１５、１７～２３位のヌクレオチドは、２’Ｏ－メチル修飾された糖を有し、（ｉｉ）２、６、９、１４、１６位のヌクレオチドは、２’Ｆ修飾された糖を有する。

【０００９】

［発明の概要］

本発明は、標的遺伝子の発現に影響を及ぼし得る阻害性ＲＮＡ分子（ｉＲＮＡと称され得る）などの核酸及びそれを含有する組成物を提供する。遺伝子は、細胞、例えば、ヒトなどの対象内の細胞内にあり得る。核酸は、標的遺伝子の発現に関連する医学的状態を予防及び／又は治療するために使用され得る。阻害性ＲＮＡ（ｉＲＮＡ）は、本明細書で好ましい核酸である。

【００１０】

本発明は、第１の態様では、細胞における標的遺伝子の発現を阻害するための核酸、任意選択でＲＮＡであって、第１の鎖の少なくとも一部分と、第１の鎖に少なくとも部分的に相補的である第２の鎖の少なくとも一部分と、を含む少なくとも１つの二本鎖領域を含み、当該第１の鎖が、阻害される当該標的遺伝子から転写されたＲＮＡの少なくとも一部分に少なくとも部分的に相補的であり、第２の鎖が、第２の鎖の末端領域に１つ以上の脱塩基ヌクレオチドを含み、当該脱塩基ヌクレオチドが、逆ヌクレオチド間連結を介して隣接するヌクレオチドに接続している、核酸を提供する。

【００１１】

本発明は、特に、ｄｓＲＮＡが使用される条件下で、相補的であり、ハイブリダイゼーションして二本鎖構造を形成する２つのＲＮＡ鎖を含む二本鎖ＲＮＡ分子（ｄｓＲＮＡ）を含む。ｄｓＲＮＡの一方の鎖（アンチセンス鎖）は、標的配列に実質的に相補的であり、概して、完全に相補的である相補性の領域を含む。標的配列は、目的の遺伝子の発現中に形成されたｍＲＮＡの配列に由来し得る。他方の鎖（センス鎖）は、好適な条件下で組み合わせた場合、２つの鎖がハイブリダイゼーションし、二本鎖構造を形成するように、アンチセンス鎖に相補的である領域を含む。ｄｓＲＮＡの相補的配列はまた、単一の核酸分子の自己相補的領域であってもよい。

【００１２】

定義

本明細書でアンチセンス鎖又はガイド鎖とも称され、本明細書で互換的に使用され得る「第１の鎖」は、核酸鎖、例えば、ｉＲＮＡ、例えば、ｄｓＲＮＡの鎖を指し、それは、標的配列、例えば、ｍＲＮＡに実質的に相補的な領域を含む。本明細書で使用される場合、「相補性の領域」という用語は、配列、例えば、標的配列に実質的に相補的なアンチセンス鎖上の領域を指す。相補性の領域が標的配列に完全には相補的でない場合、ミスマッチは、分子の内部又は末端領域に存在し得る。いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖核酸、例えば、ＲＮＡｉ剤は、アンチセンス鎖にヌクレオチドミスマッチを含む。

【００１３】

リガンド部分を有し、任意選択で、リンカー部分も有する核酸を含む分子の文脈では、本発明の核酸は、オリゴヌクレオチド部分と称される場合がある。

【００１４】

いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖核酸、例えば、ＲＮＡｉ剤は、センス鎖にヌクレオチドミスマッチを含む。いくつかの実施形態では、ヌクレオチドミスマッチは、例えば、核酸、例えば、ｉＲＮＡの３’末端から５、４、３、２、又は１ヌクレオチド以内である。

【００１５】

別の実施形態では、ヌクレオチドミスマッチは、例えば、核酸、例えば、ｉＲＮＡの３

’末端ヌクレオチドにある。
【００１６】
「第２の鎖」（本明細書ではセンス鎖又はパッセンジャー鎖とも称され、本明細書では互換的に使用され得る）は、その用語が本明細書で定義されるアンチセンス鎖の領域に実質的に相補的な領域を含む核酸、例えば、ｉＲＮＡの鎖を指す。
【００１７】
「標的配列」（標的ＲＮＡ又は標的ｍＲＮＡとも称され得る）は、一次転写産物のＲＮＡ処理の産物であるｍＲＮＡを含む、遺伝子の転写中に形成されるｍＲＮＡ分子のヌクレオチド配列の連続部分を指す。
【００１８】
標的配列は、約１０～３５ヌクレオチド長、例えば、約１５～３０ヌクレオチド長であり得る。例えば、標的配列は、約１５～３０ヌクレオチド長から、１５～２９、１５～２８、１５～２７、１５～２６、１５～２５、１５～２４、１５～２３、１５～２２、１５～２１、１５～２０、１５～１９、１５～１８、１５～１７、１８～３０、１８～２９、１８～２８、１８～２７、１８～２６、１８～２５、１８～２４、１８～２３、１８～２２、１８～２１、１８～２０、１９～３０、１９～２９、１９～２８、１９～２７、１９～２６、１９～２５、１９～２４、１９～２３、１９～２２、１９～２１、１９～２０、２０～３０、２０～２９、２０～２８、２０～２７、２０～２６、２０～２５、２０～２４、２０～２３、２０～２２、２０～２１、２１～３０、２１～２９、２１～２８、２１～２７、２１～２６、２１～２５、２１～２４、２１～２３、又は２１～２２ヌクレオチド長であり得る。上記の範囲及び長さに対する中間の範囲及び長さもまた、本発明の一部であることが企図される。
【００１９】
「リボヌクレオチド」又は「ヌクレオチド」という用語はまた、以下で更に詳述されるように、修飾ヌクレオチドを指し得る。
【００２０】
核酸は、ＤＮＡ又はＲＮＡであり得、修飾ヌクレオチドを含み得る。ＲＮＡは、好ましい核酸である。
【００２１】
本明細書で互換的に使用される「ｉＲＮＡ」、「ＲＮＡｉ剤」、及び「ｉＲＮＡ剤」、「ＲＮＡ干渉剤」という用語は、ＲＮＡを含有し、ＲＮＡ誘導サイレンシング複合体（ＲＩＳＣ）経路を介してＲＮＡ転写物の標的化された切断を媒介する薬剤を指す。ｉＲＮＡは、ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）を介したｍＲＮＡの配列特異的分解を指向する。
【００２２】
二本鎖ＲＮＡは、本明細書で、「二本鎖ＲＮＡｉ剤」、「二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）分子」、「ｄｓＲＮＡ剤」、又は「ｄｓＲＮＡ」と称され、これは、標的ＲＮＡに関して「センス」及び「アンチセンス」配向と称される、２つの逆平行で実質的に相補的な核酸鎖を含む二本鎖構造を有するリボ核酸分子の複合体を指す。
【００２３】
核酸、例えば、ｄｓＲＮＡ分子の各鎖のヌクレオチドの大部分は、好ましくは、リボヌクレオチドであるが、その場合、各鎖又は両方の鎖はまた、１つ以上の非リボヌクレオチド、例えば、デオキシリボヌクレオチド又は修飾ヌクレオチドを含み得る。加えて、本明細書で使用される場合、「ｉＲＮＡ」は、化学修飾を有するリボヌクレオチドを含み得る。
【００２４】
「修飾ヌクレオチド」という用語は、独立して、修飾糖部分、修飾ヌクレオチド間連結、若しくは修飾核酸塩基、又はそれらの任意の組み合わせを有するヌクレオチドを指す。したがって、修飾ヌクレオチドという用語は、ヌクレオシド間連結、糖部分、又は核酸塩基への、例えば、官能基又は原子の置換、付加、又は除去を包含する。ｓｉＲＮＡ型分子において使用される任意のかかる修飾は、本明細書及び特許請求の範囲の目的のために、

「ｉＲＮＡ」又は「ＲＮＡｉ剤」によって包含される。

【００２５】

本発明の核酸、例えば、ｄｓＲＮＡの二本鎖領域は、９～３６塩基対長などの約９～４０塩基対長、例えば、約１５～３０塩基対長、例えば、約１５～３０、１５～２９、１５～２８、１５～２７、１５～２６、１５～２５、１５～２４、１５～２３、１５～２２、１５～２１、１５～２０、１５～１９、１５～１８、１５～１７、１８～３０、１８～２９、１８～２８、１８～２７、１８～２６、１８～２５、１８～２４、１８～２３、１８～２２、１８～２１、１８～２０、１９～３０、１９～２９、１９～２８、１９～２７、１９～２６、１９～２５、１９～２４、１９～２３、１９～２２、１９～２１、１９～２０、２０～３０、２０～２９、２０～２８、２０～２７、２０～２６、２０～２５、２０～２４、２０～２３、２０～２２、２０～２１、２１～３０、２１～２９、２１～２８、２１～２７、２１～２６、２１～２５、２１～２４、２１～２３、又は２１～２２塩基対長などの約９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、又は３６塩基対長の範囲であり得る。

【００２６】

二本鎖構造を形成する２本鎖は、１つのより大きな分子の異なる部分であってもよく、又はそれらは、別個の分子、例えば、ＲＮＡ分子であってもよい。

【００２７】

「ヌクレオチドオーバーハング」という用語は、二本鎖核酸の二本鎖構造から延びる少なくとも１つの不対合のヌクレオチドを指す。ｄｓ核酸は、少なくとも１ヌクレオチドのオーバーハングを含み得、代替的に、オーバーハングは、少なくとも２ヌクレオチド、少なくとも３ヌクレオチド、少なくとも４ヌクレオチド、少なくとも５ヌクレオチド以上を含み得る。ヌクレオチドオーバーハングは、デオキシヌクレオチド／ヌクレオシドを含むヌクレオチド／ヌクレオシド類似体を含み得るか、又はそれらからなり得る。オーバーハングは、センス鎖、アンチセンス鎖、又はそれらの任意の組み合わせ上にあり得る。更に、オーバーハングのヌクレオチドは、アンチセンス鎖又はセンス鎖のいずれかの５’末端、３’末端、又は両方の末端に存在し得る。

【００２８】

ある特定の実施形態では、アンチセンス鎖は、３’末端又は５’末端に１～１０ヌクレオチド、例えば、０～３、１～３、２～４、２～５、４～１０、５～１０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０ヌクレオチドのオーバーハングを有する。

【００２９】

「平滑末端（Ｂｌｕｎｔ）」又は「平滑末端（ｂｌｕｎｔ　ｅｎｄ）」は、二本鎖核酸のその末端に不対合のヌクレオチドがないこと、すなわち、ヌクレオチドオーバーハングがないことを意味する。本発明の核酸は、一端にヌクレオチドオーバーハングがないか、又はいずれかの端にもヌクレオチドオーバーハングがないものを含む。

【００３０】

別段指示しない限り、「相補的」という用語は、第２のヌクレオチド配列に関連して第１のヌクレオチド配列を説明するために使用される場合、当業者に理解されるように、ある特定の条件下で、第１のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドが、第２のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドとハイブリダイゼーションし、二本鎖構造を形成する能力を指す。かかる条件は、例えば、ストリンジェントな条件であり得、ストリンジェントな条件は、４００ｍＭのＮａＣｌ、４０ｍＭのＰＩＰＥＳ　ｐＨ６．４、１ｍＭのＥＤＴＡ、５０℃又は７０℃で１２～１６時間、続く洗浄を含み得る（例えば、”Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，Ｓａｍｂｒｏｏｋ，ｅｔ　ａｌ．（１９８９）Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓを参照されたい）。

【００３１】

本明細書に記載の核酸、例えば、ｄｓＲＮＡ内の相補的な配列は、第１のヌクレオチド

配列を含むオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドの、一方又は両方のヌクレオチド配列の全長にわたる第２のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドへの塩基対合を含む。かかる配列は、本明細書で、互いに関して「完全に相補的」と称される場合がある。しかしながら、本明細書では、第１の配列が第２の配列に関して「実質的に相補的」と称される場合、２つの配列は、完全に相補的であり得るか、又はそれらは、それらの最終的な適用、例えば、ＲＩＳＣ経路を介した遺伝子発現の阻害に最も関連する条件下でハイブリダイゼーションする能力を保持しながら、２、４、又は５つのミスマッチ塩基対などだが、好ましくは、５つ以下の１つ以上のミスマッチ塩基対を形成し得る。オーバーハングは、相補性の決定に関してミスマッチとみなされないものとする。例えば、１つのオリゴヌクレオチド１７ヌクレオチド長及び別のオリゴヌクレオチド１９ヌクレオチド長を含む核酸、例えば、ｄｓＲＮＡであって、長いオリゴヌクレオチドが、短いオリゴヌクレオチドに完全に相補的な１７ヌクレオチドの配列を含む核酸は、依然として「完全に相補的」と称され得る。

【００３２】

「相補的」配列はまた、本明細書で使用される場合、ハイブリダイゼーション能力に関する上記の要件が満たされる限り、非ワトソンクリック塩基対又は非天然及び修飾ヌクレオチドから形成される塩基対を含み得るか、又はそれらから完全に形成され得る。かかる非ワトソンクリック塩基対には、Ｇ：Ｕ　Ｗｏｂｂｌｅ又はＨｏｏｇｓｔｅｉｎ塩基対が含まれるが、これに限定されない。

【００３３】

本明細書で「相補的」、「完全に相補的」、及び「実質的に相補的」という用語は、核酸、例えば、ｄｓＲＮＡのセンス鎖とアンチセンス鎖との間、又は二本鎖核酸、例えば、ＲＮＡｉ剤のアンチセンス鎖と標的配列との間の塩基マッチングに関して使用され得る。

【００３４】

本明細書で使用される場合、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）の少なくとも一部に「実質的に相補的」である核酸又はポリヌクレオチドは、目的のｍＲＮＡの連続部分（例えば、遺伝子をコードするｍＲＮＡ）に実質的に相補的であるポリヌクレオチドを指す。例えば、ポリヌクレオチドは、配列が、その遺伝子をコードするｍＲＮＡの非中断部分に実質的に相補的である場合、目的の遺伝子のｍＲＮＡの少なくとも一部に相補的である。

【００３５】

したがって、いくつかの好ましい実施形態では、本明細書に開示されるセンス鎖ポリヌクレオチド及びアンチセンスポリヌクレオチドは、標的遺伝子配列に完全に相補的である。

【００３６】

他の実施形態では、本明細書に開示されるアンチセンスポリヌクレオチドは、標的ＲＮＡ配列に実質的に相補的であり、少なくとも約８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％相補的又は１００％相補的など、標的ＲＮＡ配列の等価領域に対してその全長にわたって少なくとも約８０％相補的である連続したヌクレオチド配列を含む。

【００３７】

いくつかの実施形態では、本発明の核酸、例えば、ｉＲＮＡは、アンチセンスポリヌクレオチドに実質的に相補的であり、同様に標的遺伝子配列に相補的であり、約８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％相補的、又は１００％相補的など、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列の等価領域に対してその全長にわたって少なくとも約８０％相補的である連続したヌクレオチド配列を含むセンス鎖を含む。

【００３８】

いくつかの実施形態では、本発明の核酸、例えば、ｉＲＮＡは標的配列に実質的に相補的であり、約８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％相補的、又は１００％相

補的など、標的配列に対してその全長にわたって少なくとも８０％相補的である連続したヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含む。

【００３９】

本明細書で使用する場合、「対象」とは、標的遺伝子配列が、標的ノックダウンを促進するための核酸、例えば、ｉＲＮＡ剤に対して十分な相補性を有する場合、内因的又は異種的のいずれかで標的遺伝子を発現する、霊長類（ヒト、非ヒト霊長類、例えば、サル及びチンパンジーなど）若しくは非霊長類などの哺乳類、又は鳥などの動物である。ある特定の好ましい実施形態では、対象は、ヒトである。

【００４０】

「治療すること」又は「治療」という用語は、遺伝子発現に関連する１つ以上の症状の緩和又は改善を含むが、これらに限定されない、有益な又は所望の結果を指す。「治療」はまた、治療を行わない場合に予想される生存と比較して、生存を延長することを意味し得る。治療には、併存症の発症の予防、例えば、肝臓感染症を有する対象における肝臓損傷の低減を含み得る。

【００４１】

「治療有効量」は、本明細書で使用される場合、疾患を有する対象を治療するために患者に投与された場合、（例えば、既存の疾患又は疾患の１つ以上の症状又はその関連する併存症を軽減、改善又は維持することによって）疾患の治療に効果を発揮するのに十分である核酸、例えば、ｉＲＮＡの量を含むことを意図する。

【００４２】

「薬学的に許容される」という語句は、本明細書では、合理的な利益／リスク比に見合った、過度の毒性、刺激、アレルギー反応、又は他の問題若しくは合併症なしでヒト対象及び動物対象の組織との接触における使用に好適な、化合物、材料、組成物、又は剤形を指すために用いられる。

【００４３】

本明細書で使用される「薬学的に許容される担体」という語句は、ある臓器又は身体の一部から別の臓器又は身体の一部へと、主題の化合物を運搬又は輸送することに関与する、液体又は固体の充填剤、希釈剤、賦形剤、製造助剤（ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇ ａｉｄ）、又は溶媒カプセル化材料（ｓｏｌｖｅｎｔ ｅｎｃａｐｓｕｌａｔｉｎｇ ｍａｔｅｒｉａｌ）などの薬学的に許容される材料、組成物、又はビヒクルを意味する。各担体は、製剤の他の成分と適合性があり、治療される対象に有害ではないという意味で「許容される」必要がある。

【００４４】

パラメータの値又は値の範囲が記載されている場合、記載された値の中間の値及び範囲もまた、本発明の一部であることを意図する。

【００４５】

「ａ（１つ）」及び「ａｎ（１つ）」という冠詞は、品目の文法的目的のうちの１つ又は１つ超（すなわち、少なくとも１つ）を指すために本明細書で使用される。

【００４６】

「含む」という用語は、本明細書で、「含むが、これに限定されない」という語句を意味するために使用され、互換的に使用される。

【００４７】

「又は」という用語は、別段文脈が明らかに指示しない限り、本明細書では、「及び／又は」という用語を意味するように使用され、かつ「及び／又は」と互換的に使用される。例えば、「センス鎖又はアンチセンス鎖」は、「センス鎖若しくはアンチセンス鎖、又はセンス鎖及びアンチセンス鎖」として理解される。

【００４８】

「約」という用語は、本明細書では、当該技術分野での典型的な許容範囲内を意味するために使用される。例えば、「約」は、平均から約２標準偏差として理解され得る。ある特定の実施形態では、約は、＋１０％を意味する。ある特定の実施形態では、約は、＋５

％を意味する。約が、一連又は範囲の数字の前に存在する場合、「約」は、一連又は範囲における数字の各々を修飾し得ると理解される。

【００４９】

数字又は一連の数字の前の「少なくとも」という用語は、文脈から明らかなように、「少なくとも」という用語に隣接する数字、及び論理的に含まれ得る全ての後続の数字又は整数を含むと理解される。例えば、核酸分子におけるヌクレオチドの数は、整数である必要がある。例えば、「２１ヌクレオチドの核酸分子の少なくとも１８ヌクレオチド」は、１８、１９、２０、又は２１ヌクレオチドが、示された特性を有することを意味する。少なくともが、一連又は範囲の数字の前に存在する場合、「少なくとも」は、一連又は範囲における数字の各々を修飾し得ると理解される。

【００５０】

本明細書で使用される場合、「以下」又は「未満」は、その語句に隣接する値として理解され、論理的には、文脈からゼロまでの論理的な低い値又は整数として理解される。例えば、「２ヌクレオチド以下」のオーバーハングを有する二本鎖は、２、１、又は０ヌクレオチドのオーバーハングを有する。以下が、一連又は範囲の数字の前に存在する場合、「以下」は、一連又は範囲における数字の各々を修飾し得ると理解される。

【００５１】

鎖の末端領域は、５’又は３’末端から最後の５ヌクレオチドである。

【００５２】

本発明の様々な実施形態は、当業者によって適切に決定されるように組み合わされ得る。

【００５３】

脱塩基ヌクレオチド

核酸には、１つ、例えば、２つ、例えば、３つ、例えば、４つ以上の脱塩基ヌクレオチドが存在する。脱塩基ヌクレオチドは、糖部分の１位に通常見られる塩基を欠いているため、修飾ヌクレオチドである。典型的には、本発明による核酸に存在する脱塩基ヌクレオチドの糖部分の１位に水素が存在するであろう。

【００５４】

脱塩基ヌクレオチドは、第２の鎖の末端領域にあり、好ましくは、鎖の末端の末端５ヌクレオチド内に位置する。末端領域は、脱塩基ヌクレオチドを含む末端５ヌクレオチドであり得る。

【００５５】

第２の鎖は、好ましい特徴として以下を含み得る（これらは全て、相互に排他的でない限り、組み合わせて具体的に企図されている）：

第２の鎖の末端領域における２つ若しくは２つ超の脱塩基ヌクレオチド、及び／又は

第２の鎖の５’若しくは３’末端領域のいずれかにおける２つ若しくは２つ超の脱塩基ヌクレオチド、及び／又は

第２の鎖の５’若しくは３’末端領域のいずれかにおける２つ若しくは２つ超の脱塩基ヌクレオチドであって、脱塩基ヌクレオチドが、本明細書に記載のオーバーハングに存在する、脱塩基ヌクレオチド、及び／又は

第２の鎖の末端領域における２つ若しくは２つ超の連続した脱塩基ヌクレオチドであって、好ましくは、１つのかかる脱塩基ヌクレオチドが、末端ヌクレオチドである、脱塩基ヌクレオチド、及び／又は

第２の鎖の５’若しくは３’末端領域のいずれかにおける２つ若しくは２つ超の連続した脱塩基ヌクレオチドであって、好ましくは、１つのかかる脱塩基ヌクレオチドが、第２の鎖の５’若しくは３’末端領域のいずれかにおける末端ヌクレオチドである、脱塩基ヌクレオチド、及び／又は

逆ヌクレオチド間連結が、少なくとも１つの脱塩基ヌクレオチドを、第２の鎖の末端領域における隣接する塩基ヌクレオチドに接続し、かつ／又は

逆ヌクレオチド間連結が、少なくとも１つの脱塩基ヌクレオチドを、第２の鎖の５’若

しくは３’末端領域のいずれかにおける隣接する塩基ヌクレオチドに接続し、かつ／又は
末端ヌクレオチドではないヌクレオチド（本明細書では末端から３番目のヌクレオチドと呼ばれる）に逆連結を介して接続している末端から２番目のヌクレオチドとしての脱塩基ヌクレオチド、及び／又は
鎖を末端ヌクレオチドを含む末端に向かう方向で読み取る場合、５’－３’連結を介して接続した２つの末端ヌクレオチドとしての脱塩基ヌクレオチド、
鎖を末端ヌクレオチドを含む末端に向かう方向で読み取る場合、３’－５’連結を介して接続した２つの末端ヌクレオチドとしての脱塩基ヌクレオチド、
末端２位としての脱塩基ヌクレオチドであって、末端から２番目のヌクレオチドが、逆連結を介して末端から３番目のヌクレオチドに接続し、逆連結が、５－５’逆連結若しくは３’－３’逆連結である、脱塩基ヌクレオチド、
末端２位としての脱塩基ヌクレオチドであって、末端から２番目のヌクレオチドが、逆連結を介して末端から３番目のヌクレオチドに接続し、
（１）逆連結が、５－５’逆連結であり、末端及び末端から２番目の脱塩基ヌクレオチドを含む末端に向かって読み取る場合、末端脱塩基ヌクレオチドと末端から２番目の脱塩基ヌクレオチドとの間の連結が、３’５’であるか、又は
（２）逆連結が、３－３’逆連結であり、末端及び末端から２番目の脱塩基ヌクレオチドを含む末端に向かって読み取る場合、末端脱塩基ヌクレオチドと末端から２番目の脱塩基ヌクレオチドとの間の連結が、５’３’である、脱塩基ヌクレオチド。

【００５６】

好ましくは、第２の鎖の末端に脱塩基ヌクレオチドが存在する。

【００５７】

好ましくは、第２の鎖の末端領域に、好ましくは、末端及び末端から２番目の位置に、２つ又は少なくとも２つの脱塩基ヌクレオチドが存在する。

【００５８】

好ましくは、２つ以上の脱塩基ヌクレオチドは連続しており、例えば、全ての脱塩基ヌクレオチドは、連続し得る。例えば、末端１ヌクレオチド又は末端２ヌクレオチド又は末端３ヌクレオチド又は末端４ヌクレオチドは、脱塩基ヌクレオチドであり得る。

【００５９】

脱塩基ヌクレオチドはまた、末端に脱塩基ヌクレオチドが１つのみ存在する場合を除いて、５’－３’ホスホジエステル連結又は逆連結を介して隣接するヌクレオチドに連結してもよく、その場合、隣接するヌクレオチドへの逆連結を有するであろう。

【００６０】

逆連結（当技術分野でも見られる逆連結とも称され得る）は、ヌクレオチドの隣接する糖部分間に、５’－５’、３’３’、３’－２’又は２’－３’ホスホジエステル連結のいずれかを含む。

【００６１】

末端ではない脱塩基ヌクレオチドは、２つのホスホジエステル結合を有し、１つは各隣接するヌクレオチドとであり、これらは、逆連結であり得るか、又は５’－３ホスホジエステル結合であり得るか、又は各々のうちの１つであり得る。

【００６２】

好ましい実施形態は、第２の鎖の末端及び末端から２番目の位置に２つの脱塩基ヌクレオチドを含み、逆ヌクレオチド間連結は、末端から２番目の（脱塩基）ヌクレオチドと末端から３番目のヌクレオチドとの間に位置する。

【００６３】

好ましくは、第２の鎖の末端及び末端から２番目の位置に２つの脱塩基ヌクレオチドが存在し、末端から２番目のヌクレオチドが、逆ヌクレオチド間連結を介して末端から３番目のヌクレオチドに連結し、（分子の末端の方向で読み取って）５’－３’又は３’－５’ホスホジエステル連結を介して末端ヌクレオチドに連結している。

【００６４】

種々の好ましい特徴は、以下のとおりである。

【００６５】

逆ヌクレオチド間連結は、３’３逆連結である。逆ヌクレオチド間連結は、第２の鎖の５’末端ホスフェートの遠方にある末端領域にある。

【００６６】

逆ヌクレオチド間連結は、５’５逆連結である。逆ヌクレオチド間連結は、第２の鎖の３’末端ヒドロキシドの遠方にある末端領域にある。

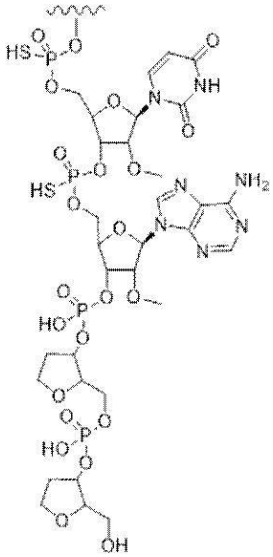
【００６７】

構造の例としては、以下のとおりである（示される特定のＲＮＡヌクレオチドは、限定するものではなく、任意のＲＮＡヌクレオチドであり得る）。

Ａ　３’－３’逆結合（また、分子の末端に向かって読み取って、２つの脱塩基分子間に５’－３方向の最後のホスホジエステル結合を示す）

【００６８】

【化１】

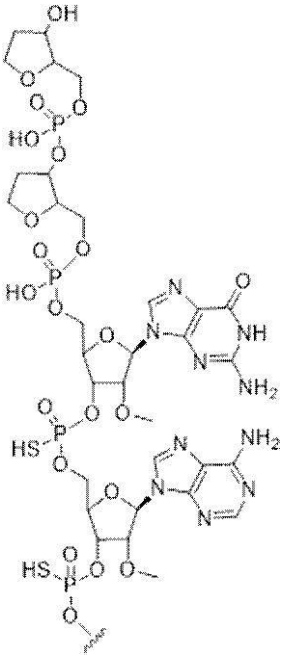


【００６９】

Ｂ　図示する５’－５’逆結合（また、分子の末端に向かって読み取って、２つの脱塩基分子間に３’－５方向の最後のホスホジエステル結合を示す）

【００７０】

【化２】



【００７１】

核酸に存在する脱塩基ヌクレオチドは、逆ヌクレオチド間連結、すなわち、５’－５’又は３’－３’逆ヌクレオチド間連結の存在下で提供される。逆連結は、（ヌクレオチド糖上の環原子の番号付けに関して）従来の５’－３’配向とは対照的に、糖が３’－５’配向を有するように、隣接するヌクレオチド糖の配向の変化の結果として生じる。本発明の核酸に存在する脱塩基ヌクレオチドは、好ましくは、かかる逆ヌクレオチド糖を含む。

【００７２】

逆配向を有する末端ヌクレオチドの場合、したがって、これは、核酸全体の「逆」末端構成をもたらす。本明細書に記載され、言及されるある特定の構造は、（ヌクレオチド糖上の環原子の番号付けに関して）従来の５’－３’方向を使用して表されるが、配向の変化及び近位３’－３’逆連結を有する末端ヌクレオチドの存在は、全体的な５’－５’末端構造を有する核酸をもたらすであろう（すなわち、従来の３’末端ヌクレオチドが５’末端ヌクレオチドになる）ことが理解されるであろう。代替的には、配向の変化を有する末端ヌクレオチド及び近位５’－５’逆連結の存在は、全体的な３’－３’末端構造を有する核酸をもたらすであろうことが理解されるであろう。

【００７３】

本明細書に記載の近位３’－３’又は５’－５’逆連結は、逆配向を有する単一末端ヌクレオチドなどの逆配向を有する末端ヌクレオチドに直接隣接／結合している逆連結を含み得る。代替的には、本明細書に記載される近位３’－３’又は５’－５’逆連結は、末端及び末端から２番目などの逆配向を有する２つ又は２つ超の末端領域ヌクレオチドなどの逆配向を有する２つ又は２つ超のヌクレオチドに隣接する逆連結を含み得る。このようにして、逆連結は、逆配向を有する末端から２番目のヌクレオチドに結合し得る。当業者は、上記の逆配向が、本明細書に記載の全体的な３’－３’又は５’－５’末端構造を有する核酸分子をもたらす可能性があることを理解するであろうが、逆配向を有する１つ以上の追加の逆連結及び／又はヌクレオチドの存在により、核酸全体が、従来の位置にある５’／３’末端に対応する３’－５’末端構造を有し得ることも理解するであろう。

【００７４】

一態様では、核酸は、３’－３’逆連結を有し得、末端糖部分は、その末端糖の５’位に５’ホスフェート基ではなく、５’ＯＨを含み得る。

【００７５】

したがって、当業者は、本明細書に示される（末端ヌクレオチド糖上の環原子の番号付

けに関して）より従来の５’－３’構造の（その末端の方向に読み取って）５’－５’、３’－３’及び３’－５’末端バリアントが、逆連結が存在する本開示の範囲に含まれることを明確に理解するであろう。

【００７６】

例えば、逆ヌクレオチド間連結及び／又は逆配向を有する１つ以上のヌクレオチドの状況では、連結の相対的な位置（例えば、リンカーに対する）又は内部特徴の位置（例えば、修飾ヌクレオチド）は、核酸の５’又は３’末端に対して定義され、したがって、５’又は３’末端は、逆連結が存在していなかった場合に存在したであろう従来の５’若しくは３’末端であり、従来の５’又は３’末端は、核酸内の内部ヌクレオチド連結の大部分の方向性及び／又はヌクレオチド配向を考慮することによって決定される。これらの内部結合及び／又はヌクレオチド配向から、逆連結が非存在の分子の従来の５’及び３’末端（末端ヌクレオチド糖上の環原子の番号付けに関して）を構成する核酸の末端を言うことが可能である。

【００７７】

例えば、以下に示される構造では、「５’」末端に位置する最初の２つの位置に脱塩基残基が存在する。したがって、末端ヌクレオチドが逆配向を有する場合、以下の図に示される従来の５’末端である「５’」末端は、末端位置での逆ヌクレオチドを考慮して、実際には３’ＯＨを含み得る。それにもかかわらず、分子の大部分は、（ヌクレオチド糖上の環原子の番号付けに関して）核酸分子の標準的な５’［ＰＯ４］から３’［ＯＨ］方向で読み取る場合、糖の３’ＯＨから次の糖の５’ホスフェートまで走る従来のヌクレオチド間連結を含み、これを使用して、逆末端構成が存在しないことが見出される従来の５’及び３’末端を決定することができる。

Ａ　５’　Ａ－Ａ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｆ－Ｆ－Ｆ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ　３’

【００７８】

逆結合は、好ましくは、分子のＧａｌＮＡｃ含有部分などのリガンド部分の遠方にある核酸、例えば、ＲＮＡの末端に位置する。

【００７９】

センス鎖上に５’－ＧａｌＮＡｃを有するＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡ構築物は、センス鎖の反対側の末端に逆連結を有し得る。

【００８０】

センス鎖上に３’－ＧａｌＮＡｃを有するＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡ構築物は、センス鎖の反対側の末端に逆連結を有し得る。

【００８１】

核酸の長さ

一態様では、ｉ）核酸の第１の鎖は、１５～３０ヌクレオチド、好ましくは、１９～２５ヌクレオチド、より好ましくは、２３若しくは２５の範囲の長さを有し、かつ／又はｉｉ）核酸の第２の鎖は、１５～３０ヌクレオチド、好ましくは、１９～２５ヌクレオチド、より好ましくは、２３の範囲の長さを有する。

【００８２】

概して、核酸、例えば、ｉＲＮＡの二本鎖構造は、約１５～３０塩基対長、例えば、１５～２９、１５～２８、１５～２７、１５～２６、１５～２５、１５～２４、１５～２３、１５～２２、１５～２１、１５～２０、１５～１９、１５～１８、１５～１７、１８～３０、１８～２９、１８～２８、１８～２７、１８～２６、１８～２５、１８～２４、１８～２３、１８～２２、１８～２１、１８～２０、１９～３０、１９～２９、１９～２８、１９～２７、１９～２６、１９～２５、１９～２４、１９～２３、１９～２２、１９～２１、１９～２０、２０～３０、２０～２９、２０～２８、２０～２７、２０～２６、２０～２５、２０～２４、２０～２３、２０～２２、２０～２１、２１～３０、２１～２９、２１～２８、２１～２７、２１～２６、２１～２５、２１～２４、２１～２３、又は２１～２２塩基対長である。上記の範囲及び長さに対する中間の範囲及び長さもまた、本発

明の一部であることが企図される。

【００８３】

同様に、標的配列に対するアンチセンス配列の相補性の領域及び／又はセンス配列に対するアンチセンス配列の相補性の領域は、約１５～３０ヌクレオチド長、例えば、１５～２９、１５～２８、１５～２７、１５～２６、１５～２５、１５～２４、１５～２３、１５～２２、１５～２１、１５～２０、１５～１９、１５～１８、１５～１７、１８～３０、１８～２９、１８～２８、１８～２７、１８～２６、１８～２５、１８～２４、１８～２３、１８～２２、１８～２１、１８～２０、１９～３０、１９～２９、１９～２８、１９～２７、１９～２６、１９～２５、１９～２４、１９～２３、１９～２２、１９～２１、１９～２０、２０～３０、２０～２９、２０～２８、２０～２７、２０～２６、２０～２５、２０～２４、２０～２３、２０～２２、２０～２１、２１～３０、２１～２９、２１～２８、２１～２７、２１～２６、２１～２５、２１～２４、２１～２３、又は２１～２２ヌクレオチド長である。上記の範囲及び長さに対する中間の範囲及び長さもまた、本発明の一部であることが企図される。

【００８４】

ある特定の好ましい実施形態では、標的配列に対するアンチセンス配列の相補性の領域及び／又はアンチセンス配列のセンス配列に対する相補性の領域は、少なくとも１７ヌクレオチド長である。例えば、アンチセンス鎖と標的との間の相補性の領域は、１９～２１ヌクレオチド長であり、例えば、相補性の領域は、２１ヌクレオチド長である。

【００８５】

好ましい実施形態では、各鎖は、３０ヌクレオチド長以下である。

【００８６】

本明細書に記載の核酸、例えば、ｄｓＲＮＡは、１つ以上の一本鎖ヌクレオチドオーバーハング、例えば、１～４、２～４、１～３、２～３、１、２、３、又は４ヌクレオチドを更に含み得る。ヌクレオチドオーバーハングは、デオキシヌクレオチド／ヌクレオシドを含むヌクレオチド／ヌクレオシド類似体を含み得るか、又はそれらからなり得る。オーバーハングは、センス鎖、アンチセンス鎖、又はそれらの任意の組み合わせ上にあり得る。更に、オーバーハングのヌクレオチドは、核酸、例えば、ｄｓＲＮＡのアンチセンス鎖又はセンス鎖の５’末端、３’末端、又は両方の末端に存在し得る。

【００８７】

ある特定の好ましい実施形態では、少なくとも１つの鎖は、少なくとも１ヌクレオチドの３’オーバーハングを含み、例えば、少なくとも１つの鎖は、少なくとも２ヌクレオチドの３’オーバーハングを含む。オーバーハングは、好適には、アンチセンス／ガイド鎖及び／又はセンス／パッセンジャー鎖上にある。

【００８８】

核酸修飾

ある特定の実施形態では、本発明の核酸、例えば、ＲＮＡ、例えば、ｄｓＲＮＡは、（必要な脱塩基修飾を超えた）更なる修飾、例えば、当該技術分野で既知であり、本明細書に記載の化学修飾又はコンジュゲーションを含まない。

【００８９】

他の好ましい実施形態では、本発明の核酸、例えば、ＲＮＡ、例えば、ｄｓＲＮＡは、安定性又は他の有益な特徴を増強させるために（脱塩基修飾を超えて）更に化学修飾されている。

【００９０】

本発明のある特定の実施形態では、実質的に全てのヌクレオチドが修飾されている。

【００９１】

本発明で特徴付けられた核酸は、”Ｃｕｒｒｅｎｔ ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ ｎｕｃｌｅｉｃ ａｃｉｄ ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，”Ｂｅａｕｃａｇｅ，Ｓ．Ｌ．ｅｔ ａｌ．（Ｅｄｒｓ．），Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ＮＹ，ＵＳＡに記載のものなど、当該技術分野で十分に確立された方法によって合成又

は修飾され得、これは、参照により本明細書に組み込まれる。

【００９２】

修飾には、例えば、末端修飾、例えば、５’末端修飾（リン酸化、コンジュゲーション、逆連結反転）若しくは３’末端修飾（コンジュゲーション、ＲＮＡ内のＤＮＡヌクレオチド、又はＤＮＡ内のＲＮＡヌクレオチド、逆連結など）、塩基修飾、例えば、安定化塩基、不安定化塩基、若しくはパートナー、コンジュゲート塩基の拡大したレパートリーと塩基対合する塩基、糖修飾（例えば、２’位又は４’位）若しくは糖の置換、又はホスホジエステル連結の修飾若しくは置換を含む骨格修飾が挙げられる。

【００９３】

本明細書に記載の実施形態で有用なｉＲＮＡ化合物などの核酸の具体例としては、修飾骨格を含有する、又は天然のヌクレオシド間連結を含有しないＲＮＡが挙げられるが、これらに限定されない。修飾骨格を有するＲＮＡなどの核酸には、とりわけ、骨格にリン原子を有しないものが含まれる。本明細書の目的のために、当該技術分野で時々参照されるように、それらのヌクレオシド間骨格にリン原子を有しない修飾核酸、例えば、ＲＮＡもまた、オリゴヌクレオシドであるとみなされ得る。いくつかの実施形態では、修飾核酸、例えば、ｉＲＮＡは、そのヌクレオシド間骨格にリン原子を有するであろう。

【００９４】

修飾核酸、例えば、ＲＮＡ骨格には、例えば、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、３’－アルキレンホスホネート及びキラルホスホネートを含むメチル及び他のアルキルホスホネート、ホスフィネート、３’－アミノホスホルアミデート及びアミノアルキルホスホルアミデートを含むホスホルアミデート、チオノホスホルアミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、並びにこれらの通常の３’－５’連結、２’－５’連結類似体を有するボラノホスフェート、並びに隣接するヌクレオシドの対の単位が連結した５’－３’又は５’－２’である逆極性を有するものが挙げられる。様々な塩、混合塩、及び遊離酸形態もまた含まれる。

【００９５】

修飾核酸、例えば、ＲＮＡはまた、１つ以上の置換糖部分を含有し得る。本明細書で特徴づけられる核酸、例えば、ｉＲＮＡ、例えば、ｄｓＲＮＡは、２’位に以下のうちの１つを含み得る：ＯＨ；Ｆ；Ｏ－、Ｓ－、若しくはＮ－アルキル；Ｏ－、Ｓ－、若しくはＮ－アルケニル；Ｏ－、Ｓ－、若しくはＮ－アルキニル；又はＯ－アルキル－Ｏ－アルキル、アルキル、アルケニル、及びアルキニルは、置換されているか、又は非置換であり得る。２’Ｏ－メチル及び２’－Ｆは、好ましい修飾である。

【００９６】

ある特定の好ましい実施形態では、核酸は、少なくとも１つの修飾ヌクレオチドを含む。

【００９７】

本発明の核酸は、第１の鎖及び／又は第２の鎖上に１つ以上の修飾ヌクレオチドを含み得る。

【００９８】

いくつかの実施形態では、センス鎖の実質的に全てのヌクレオチド及びアンチセンス鎖の全てのヌクレオチドは、修飾を含む。

【００９９】

いくつかの実施形態では、センス鎖の全てのヌクレオチド及びアンチセンス鎖の実質的に全てのヌクレオチドは、修飾を含む。

【０１００】

いくつかの実施形態では、センス鎖の全てのヌクレオチド及びアンチセンス鎖の全てのヌクレオチドは、修飾を含む。

【０１０１】

一実施形態では、修飾ヌクレオチドのうちの少なくとも１つは、デオキシ－ヌクレオチ

ド、３’－末端デオキシ－チミン（ｄＴ）ヌクレオチド、２’－０－メチル修飾ヌクレオチド（本明細書では２’－Ｍｅとも称され、Ｍｅはメトキシである）、２’－フルオロ修飾ヌクレオチド、２’－デオキシ－修飾ヌクレオチド、ロックヌクレオチド、ロック解除ヌクレオチド、立体構造的に制限されたヌクレオチド、拘束エチルヌクレオチド、脱塩基ヌクレオチド、２’－アミノ－修飾ヌクレオチド、２’－Ｏ－アリル－修飾ヌクレオチド、２’－Ｃ－アルキル－修飾ヌクレオチド、２’－ヒドロキシ－修飾ヌクレオチド、２’－メトキシエチル修飾ヌクレオチド、２’－０－アルキル－修飾ヌクレオチド、モルホリノヌクレオチド、ホスホルアミダート、非天然塩基含有ヌクレオチド、テトラヒドロピラン修飾ヌクレオチド、１，５－アンヒドロヘキシトール修飾ヌクレオチド、シクロヘキセニル修飾ヌクレオチド、ホスホロチオエート基を含むヌクレオチド、メチルホスホネート基を含むヌクレオチド、５’－ホスフェートを含むヌクレオチド、及び５’－ホスフェート模倣物を含むヌクレオチドからなる群から選択される。別の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、３’末端デオキシ－チミンヌクレオチド（ｄＴ）の短い配列を含む。

【０１０２】

ヌクレオチドの修飾は、好ましくは、ＬＮＡ、ＨＮＡ、ＣｅＮＡ、２－メトキシエチル、２’－０－アルキル、２－０－アリル、２’－Ｃ－アリル、２’－フルオロ、２’－デオキシ、２’－ヒドロキシル、及びこれらの組み合わせを含むがこれらに限定されない群から選択され得る。別の実施形態では、ヌクレオチドの修飾は、２－０－メチル（「２－Ｍｅ」）又は２’－フルオロ修飾である。

【０１０３】

１つの好ましい修飾は、リボース糖の２’－ＯＨ基での修飾であり、任意選択で、２’－Ｍｅ又は２’－Ｆ修飾から選択される。

【０１０４】

好ましい核酸は、以下のとおり、修飾されて、修飾ヌクレオチドを形成する第１の鎖及び／又は第２の鎖上の１つ以上のヌクレオチドを含む。

【０１０５】

修飾が、リボース糖の２’－ＯＨ基での修飾であり、任意選択で、２’－Ｍｅ又は２’－Ｆ修飾から選択される、核酸。

【０１０６】

第１の鎖が、上記の第１の鎖の１位からカウントして、１４位、２位、６位、又はそれらの任意の組み合わせのうちのいずれかに、２’－Ｆを含む、核酸。

【０１０７】

第２の鎖が、上記の第２の鎖の１位からカウントして、７及び／又は９及び／又は１１及び／又は１３位に、２’－Ｆ修飾を含む、核酸。

【０１０８】

第２の鎖が、上記の第２の鎖の１位からカウントして、７及び９及び１１位に２’－Ｆ修飾を含む、核酸。

【０１０９】

第１及び第２の鎖が各々、２’－Ｍｅ及び２’－Ｆ修飾を含む、核酸。

【０１１０】

核酸であって、核酸が、好適には、第１の鎖の１～９位のうちの１つ以上、及び／又は第１の鎖の１～９位と整列した第２の鎖上の位置のうちの１つ以上に、少なくとも１つの熱不安定化修飾を含み、不安定化修飾が、修飾ロック解除核酸（ＩＭＵＮＡ）及びグリコール核酸（ＧＮＡ）から選択され、好ましくは、グリコール核酸である、核酸。核酸は、約４０～８０℃の範囲の融解温度を有する二本鎖分子、好ましくは、二本鎖ＲＮＡであり得る。核酸は、第１の鎖の７位に少なくとも１つの熱不安定化修飾を含み得る。

【０１１１】

核酸であって、核酸が、第２の鎖の１位からカウントして、第２の鎖の７～１３位に４、５、６、又は７個の２’－Ｆ修飾など、上記の第２の鎖の７～１３位に３つ以上の２’－Ｆ修飾を含む、核酸。

【０１１２】
第２の鎖が、上記の第２の鎖の１位からカウントして、上記の第２の鎖の１～６位に、４、５、又は６個などの少なくとも３つの２’－Ｍｅ修飾を含む、核酸。
【０１１３】
上記の第１の鎖が、３’末端領域に少なくとも５つの２’－Ｍｅ連続修飾を含み、好ましくは、３’末端領域に末端ヌクレオチド、又は３’末端領域に末端ヌクレオチドから少なくとも１若しくは２ヌクレオチド以内を含む、核酸。
【０１１４】
上記の第１の鎖が、３’末端領域に７つの２’－Ｍｅ連続修飾を含み、好ましくは、３’末端領域に末端ヌクレオチドを含む、核酸。
【０１１５】
好ましい修飾パターンとしては、以下が含まれる。
核酸であって、第２の鎖が、以下の修飾パターンを含み、

$$N^{A}-(N)_{3-5}-N^{B}$$

式中、（上及び下の）Ｎが、第１の修飾を有するヌクレオチドを表し、
N^{A}が、Ｎの第１の修飾とは異なる第２の修飾を有するヌクレオチドを表し、
N^{B}が、Ｎの第１の修飾とは異なるが、N^{A}の第２の修飾と同じか、又は異なるかのいずれかの第３の修飾を有するヌクレオチドを表し、
上記のパターンが、第２の鎖に沿って５’から３’の方向性を有する、核酸。
【０１１６】
第２の鎖が、以下の修飾パターンを含む、核酸：

$$N^{A}-(N)_{3}-N^{B}。$$

【０１１７】
第２の鎖が、以下の修飾パターンを含む、核酸：

$$N^{A}-(N)_{5}-N^{B}。$$

【０１１８】
第２の鎖が、以下の修飾パターンを含む、核酸：

$$Me-(F)_{3}-Me。$$

【０１１９】
第２の鎖が、以下の修飾パターンを含む、核酸：

$$Me-(F)_{5}-Me。$$

【０１２０】
核酸であって、第２の鎖が、以下の修飾パターンを含み、

$$N^{C}-N^{A}-(N)_{3-5}-N^{B}-N^{D}$$

式中、N^{C}及びN^{D}が、同じであっても異なっていてもよく、それぞれ複数の５’及び３’末端領域の化学修飾ヌクレオチドを示し、少なくともN^{C}が、少なくとも２つの異なる修飾ヌクレオチドを含む、核酸。
【０１２１】
N^{D}が、少なくとも２つの異なる修飾ヌクレオチド、又は各々が同じ修飾、好ましくは、２’－Ｍｅ連続修飾を有する複数のヌクレオチドを含む、核酸。
【０１２２】
核酸であって、第２の鎖が、以下の修飾パターンを含み、
５’　Ａ－Ａ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｆ－Ｆ－Ｆ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ　３’
式中、Ａが、脱塩基修飾を表す、核酸。
【０１２３】
核酸であって、第２の鎖が、以下の修飾パターンを含み、
５’　Ａ－Ａ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｆ－Ｆ－Ｆ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ　３’
式中、Ａが、脱塩基修飾を表す、核酸。

【０１２４】
核酸であって、第２の鎖が、以下の修飾パターンを含み、
５’　Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｆ－Ｆ－Ｆ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ａ－Ａ　３’
式中、Ａが、脱塩基修飾を表す、核酸。
【０１２５】
核酸であって、第２の鎖が、以下の修飾パターンを含み、
５’　Ｍｅ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｆ－Ｆ－Ｆ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ａ－Ａ　３’
式中、Ａが、脱塩基修飾を表す、核酸。
【０１２６】
核酸であって、第１の鎖が、以下の修飾パターンを含み、
$$M^{A}-(M)_{3-5}-M^{B}$$
式中、Ｍが、第１の修飾を有するヌクレオチドを表し、典型的には、$(M)_{3-5}$が、上記の第２の鎖における$(N)_{3-5}$と実質的に整列しており、
M^{A}が、Ｍの第１の修飾とは異なる第２の修飾を有するヌクレオチドを表し、
M^{B}が、Ｍの第１の修飾とは異なるが、M^{A}の第２の修飾と同じか、又は異なるかのいずれかの第３の修飾を有するヌクレオチドを表す、核酸。
【０１２７】
第１の鎖が、以下の修飾パターンを含む、核酸：
$$M^{A}-(M)_{3}-M^{B}。$$
【０１２８】
第１の鎖が、以下の修飾パターンを含む、核酸：
$$M^{A}-(M)_{4}-M^{B}。$$
【０１２９】
第１の鎖が、以下の修飾パターンを含む、核酸：
$$M^{A}-(M)_{5}-M^{B}。$$
【０１３０】
第１の鎖が、以下の修飾パターンを含む、核酸：
$$F-(Me)_{3}-F。$$
【０１３１】
第１の鎖が、以下の修飾パターンを含む、核酸：
$$F-(Me)_{4}-F。$$
【０１３２】
第１の鎖が、以下の修飾パターンを含む、核酸：
$$F-(Me)_{5}-F。$$
【０１３３】
核酸であって、第１の鎖が、以下の修飾パターンを含み、
$$M^{C}-M^{A}-(M)_{3-5}-M^{B}-M^{D}$$
式中、M^{C}及びM^{D}が、同じであっても異なっていてもよく、それぞれ、各々が少なくとも２つの異なる修飾ヌクレオチドを含む複数の５’及び３’末端領域の化学修飾ヌクレオチドを示す、核酸。
【０１３４】
第１の鎖が、以下の修飾パターンを含む、核酸：
３’　Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｆ－Ｆ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ　５’。
【０１３５】
第１の鎖が、以下の修飾パターンを含む、核酸：
３’　Ｈ－Ｈ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｆ－Ｆ－Ｍｅ　５’。

【０１３６】
第１の鎖が、以下の修飾パターンを含む、核酸：
３’　Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｍｅ－Ｆ－Ｍｅ　５’。
【０１３７】
第１又は第２の鎖の１位は、核酸の末端に最も近く（任意の脱塩基ヌクレオチドを無視する）、骨格の糖部分間の結合に関して、分子のその末端から離れた方向に読み取って、３’から５’への内部結合を介して隣接するヌクレオチド（２位）に連結する、ヌクレオチドである。
【０１３８】
したがって、「センス鎖の１位」は、センス鎖の従来の５’末端での最も５’のヌクレオチド（脱塩基ヌクレオチドを含まない）であることが分かり得る。典型的には、センス鎖のこの１位のヌクレオチドは、選択された標的核酸配列の５’ヌクレオチドと同等であり、より概して、センス鎖は、センス鎖のこの１位から始まる標的核酸配列のヌクレオチドと同等のヌクレオチドを有する一方で、配列間の許容されるミスマッチも可能にする。
【０１３９】
本明細書で使用される場合、「アンチセンス鎖の１位」は、アンチセンス鎖の従来の５’末端での最も５’のヌクレオチド（脱塩基ヌクレオチドを含まない）である。前述のように、センス鎖とアンチセンス鎖との間に相補性の領域が存在し、このようにして、アンチセンス鎖は、上記のように標的核酸配列に対して相補性の領域も有するであろう。
【０１４０】
ある特定の実施形態では、核酸、例えば、ＲＮＡｉ剤は、少なくとも１つのホスホロチオエート又はメチルホスホネートヌクレオチド間連結を更に含む。例えば、ホスホロチオエート又はメチルホスホネートヌクレオチド間連結は、１つの鎖、すなわち、センス鎖若しくはアンチセンス鎖の３’末端若しくは末端領域、又は両方の鎖、センス鎖及びアンチセンス鎖の末端に存在することができる。
【０１４１】
ある特定の実施形態では、ホスホロチオエート又はメチルホスホネートヌクレオチド間連結は、１つの鎖、すなわち、センス鎖若しくはアンチセンス鎖の５’末端若しくは末端領域、又は両方の鎖、センス鎖及びアンチセンス鎖の末端に存在する。
【０１４２】
ある特定の実施形態では、ホスホロチオエート又はメチルホスホネートヌクレオチド間連結は、１つの鎖、すなわち、センス鎖若しくはアンチセンス鎖の５’及び３’末端の両方若しくは末端領域、又は両方の鎖、センス鎖及びアンチセンス鎖の末端に存在する。
【０１４３】
任意の核酸は、鎖の末端に少なくとも２つのＰＳヌクレオチド間結合などの、核酸内の１つ以上のホスホロチオエート（ＰＳ）修飾を含み得る。
【０１４４】
オリゴリボヌクレオチド鎖のうちの少なくとも１つは、好ましくは、オリゴヌクレオチドの最後の３ヌクレオチドに少なくとも２つの連続したホスホロチオエート修飾を含む。
【０１４５】
したがって、本発明はまた、以下に関する。本明細書に開示される核酸であって、第２の鎖の５’及び／若しくは３’末端領域並びに／又は近位末端領域などの少なくとも２又は３個の連続した位置の間にそれぞれホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含み、それにより、当該近位末端領域は、好ましくは、当該第２の鎖の当該１つ以上の脱塩基ヌクレオチドが位置する当該末端領域に隣接する、核酸。
【０１４６】
本明細書に開示される核酸であって、第１の鎖の５’及び／又は３’末端領域における少なくとも２又は３個の連続した位置の間にそれぞれホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含み、それによって、好ましくは、当該第１の鎖の５’及び／又は３’末端領域での末

端位置が、ホスホロチオエートヌクレオチド間連結によってその隣接位置に結合している、核酸。

【０１４７】

核酸鎖は、２つの末端に位置する脱塩基ヌクレオチドと連続する３ヌクレオチド間のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含むＲＮＡであり得る。

【０１４８】

好ましい核酸は、第２の鎖の５’末端に２つの隣接脱塩基ヌクレオチドと、第２の鎖の反対側の３’末端に１つ以上のＧａｌＮＡｃリガンド部分を含むリガンド部分と、を含む二本鎖ＲＮＡである。更に好ましくは、同じ核酸はまた、第２の鎖の１位から読み取って、第２の鎖の３～４位及び４～５位のヌクレオチド間に、ホスホロチオエート結合を含み得る。更に好ましくは、同じ核酸はまた、第２の鎖の７、９及び１１位に２’Ｆ修飾を含み得る。

【０１４９】

コンジュゲーション

本発明の核酸、例えば、ＲＮＡ、例えば、ｉＲＮＡの別の修飾は、核酸、例えば、ｉＲＮＡを１つ以上のリガンド部分に連結して、例えば、核酸、例えば、ｉＲＮＡの活性、細胞分布、又は例えば、細胞への取り込みを増強することを含む。

【０１５０】

いくつかの実施形態では、記載のリガンド部分は、切断可能又は非切断可能であり得るリンカーを介して、核酸、例えば、ｉＲＮＡオリゴヌクレオチドに結合し得る。「リンカー」又は「連結基」という用語は、化合物の２つの部分を接続する、例えば、化合物の２つの部分を共有結合する有機部分を意味する。

【０１５１】

リガンドは、センス鎖の３’又は５’末端に結合し得る。

【０１５２】

リガンドは、好ましくは、核酸、例えば、ＲＮＡｉ剤のセンス鎖の３’末端にコンジュゲートされる。

【０１５３】

したがって、本発明は、更なる態様では、細胞における標的遺伝子の発現を阻害するためのコンジュゲートであって、当該コンジュゲートが、核酸部分及び１つ以上のリガンド部分を含み、当該核酸部分が、本明細書に開示される核酸を含む、コンジュゲートに関する。

【０１５４】

一態様では、核酸の第２の鎖は、１つ以上のリガンド部分に直接的又は間接的に（例えば、リンカーを介して）コンジュゲートされており、当該リガンド部分は、典型的には、第２の鎖の末端領域、好ましくは、その３’末端領域に存在する。

【０１５５】

ある特定の実施形態では、リガンド部分は、リンカーを介して核酸、例えば、ｄｓＲＮＡに結合したＧａｌＮＡｃ又はＧａｌＮＡｃ誘導体を含む。

【０１５６】

したがって、本発明は、リガンド部分が、

ｉ）１つ以上のＧａｌＮＡｃリガンド、及び／又は

ｉｉ）１つ以上のＧａｌＮＡｃリガンド誘導体、及び／又は

ｉｉｉ）リンカーを介して当該核酸にコンジュゲートされた１つ以上のＧａｌＮＡｃリガンドを含む、コンジュゲートに関する。

【０１５７】

当該ＧａｌＮＡｃリガンドは、核酸の第２の鎖の５’又は３’末端領域、好ましくは、その３’末端領域に直接的又は間接的にコンジュゲートされ得る。

【０１５８】

ＧａｌＮＡｃリガンドは当該技術分野で周知であり、特にＥＰ３７７５２０７Ａ１に記

載されている。
【０１５９】
ベクター及び細胞
一態様では、本発明は、本明細書に記載の阻害ＲＮＡ［ＲＮＡｉ］などの核酸を含有する細胞を提供する。
【０１６０】
一態様では、本発明は、本明細書に記載のベクターを含む細胞を提供する。
【０１６１】
薬学的に許容される組成物
一態様では、本発明は、標的遺伝子の発現を阻害するための医薬組成物であって、本明細書に開示される核酸を含む医薬組成物を提供する。
【０１６２】
薬学的に許容される組成物は、賦形剤及び／又は担体を含み得る。
【０１６３】
薬学的に許容される担体として機能できる材料の例には、（１）ラクトース、グルコース及びスクロースなどの糖、（２）トウモロコシデンプン及びジャガイモデンプンなどのデンプン、（３）カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース、及びセルロースアセテートなどのセルロース及びその誘導体、（４）粉末トラガカント、（５）麦芽、（６）ゼラチン、（７）ステアリン酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウム、及びタルクなどの潤滑剤、（８）ココアバター及び坐剤ワックスなどの賦形剤、（９）ピーナッツ油、綿実油、ベニバナ油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油、及び大豆油などの油、（１０）プロピレングリコールなどのグリコール、（１１）グリセリン、ソルビトール、マンニトール、及びポリエチレングリコールなどのポリオール、（１２）、オレイン酸エチル及びラウリン酸エチルなどのエステル、（１３）寒天、（１４）水酸化マグネシウム及び水酸化アルミニウムなどの緩衝剤、（１５）アルギン酸、（１６）発熱物質を含まない水、（１７）等張生理食塩水、（１８）リンガー溶液、（１９）エチルアルコール、（２０）ｐＨ緩衝溶液、（２１）ポリエステル、ポリカーボネート及び／又はポリ無水物、（２２）ポリペプチド及びアミノ酸などの増量剤、（２３）血清アルブミン、ＨＤＬ、及びＬＤＬなどの血清成分、並びに（２２）医薬製剤に用いられる他の非毒性適合性物質が挙げられる。
【０１６４】
典型的な医薬担体には、結合剤（例えば、アルファ化トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドン、又はヒドロキシプロピルメチルセルロースなど）、充填剤（例えば、ラクトース及び他の糖、微結晶セルロース、ペクチン、ゼラチン、硫酸カルシウム、エチルセルロース、ポリアクリレート、又はリン酸水素カルシウムなど）、潤滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク、シリカ、コロイド状二酸化ケイ素、ステアリン酸、金属ステアリン酸、水素化植物油、トウモロコシデンプン、ポリエチレングリコール、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウムなど）、崩壊剤（例えば、デンプン、デンプングリコール酸ナトリウムなど）、及び湿潤剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウムなど）が含まれるが、これらに限定されない。
【０１６５】
核酸と有害に反応しない、非非経口投与に好適な薬学的に許容される有機又は無機賦形剤を使用して、本発明の組成物を製剤化することもできる。好適な薬学的に許容される賦形剤には、水、塩溶液、アルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、ラクトース、アミロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘性パラフィン、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどが含まれるが、これらに限定されない。
【０１６６】
核酸の局所投与のための製剤は、滅菌及び非滅菌水溶液、アルコールなどの一般的な溶媒中の非水溶液、又は液体若しくは固体油基材中の核酸の溶液を含み得る。溶液はまた、緩衝剤、希釈剤、及び他の好適な添加剤を含有し得る。核酸と有害に反応しない、非非経

口投与に適した薬学的に許容される有機又は無機賦形剤を使用し得る。

【０１６７】

一実施形態では、核酸又は組成物は、非緩衝溶液中で投与される。ある特定の実施形態では、非緩衝溶液は、生理食塩水又は水である。他の実施形態では、核酸、例えば、ＲＮＡｉ剤は、緩衝溶液中で投与される。かかる実施形態では、緩衝液は、アセテート、シトレート、プロラミン、カーボネート、若しくはホスフェート、又はそれらの任意の組み合わせを含み得る。例えば、緩衝液は、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）であり得る。

【０１６８】

投薬量

本発明の医薬組成物は、遺伝子の発現を阻害するのに十分な投薬量で投与され得る。概して、本発明の核酸、例えば、ｉＲＮＡの好適な用量は、１日当たりレシピエントのキログラム体重当たり約０．００１～約２００．０ミリグラムの範囲、概して、１日当たりキログラム体重当たり約１～５０ｍｇの範囲にあるであろう。典型的には、本発明の核酸、例えば、ｉＲＮＡの好適な用量は、約０．１ｍｇ／ｋｇ～約５．０ｍｇ／ｋｇ、例えば、約０．３ｍｇ／ｋｇ及び約３．０ｍｇ／ｋｇの範囲にあるであろう。

【０１６９】

反復用量レジメンは、治療量の核酸、例えば、ｉＲＮＡを隔日又は１年に１回など、定期的に投与することを含み得る。ある特定の実施形態では、核酸、例えば、ｉＲＮＡは、約月に１回～約四半期に１回（すなわち、約３か月に１回）投与される。

【０１７０】

様々な実施形態では、核酸、例えば、ＲＮＡｉ剤は、約０．０１ｍｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇ又は約０．５ｍｇ／ｋｇ～約５０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、核酸、例えば、ＲＮＡｉ剤は、約１０ｍｇ／ｋｇ～約３０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。ある特定の実施形態では、核酸、例えば、ＲＮＡｉ剤は、約０．５ｍｇ／ｋｇ　１ｍｇ／ｋｇ、１．５ｍｇ／ｋｇ、３ｍｇ／ｋｇ、５ｍｇ／ｋｇ、１０ｍｇ／ｋｇ、及び３０ｍｇ／ｋｇから選択される用量で投与される。ある特定の実施形態では、核酸、例えば、ＲＮＡｉ剤は、約０．１ｍｇ／ｋｇ～約５．０ｍｇ／ｋｇの用量で、約１週間に１回、１か月に１回、２か月に１回、又は４半期に１回（すなわち、３か月に１回）投与される。ある特定の実施形態では、核酸、例えば、ＲＮＡｉ剤は、対象に週に１回投与される。ある特定の実施形態では、核酸、例えば、ＲＮＡｉ剤は、対象に月に１回投与される。ある特定の実施形態では、核酸、例えば、ＲＮＡｉ剤は、四半期に１回（すなわち、３か月ごとに）投与される。

【０１７１】

最初の治療レジメンの後、治療は、より少ない頻度で投与され得る。例えば、毎週又は隔週で３か月間の投与の後、投与を月に１回、６か月間、又は１年間、又はそれ以上繰り返すことができる。

【０１７２】

医薬組成物は、１日１回投与され得るか、又は１日を通して適切な間隔で２回、３回、若しくはそれより多いサブ用量として、又は連続注入若しくは制御放出製剤を介した送達さえ使用して投与され得る。その場合、各サブ用量に含有される核酸、例えば、ｉＲＮＡは、１日総投薬量を達成するために、対応して小さい必要がある。投薬量単位はまた、数日間にわたる送達のために、例えば、数日の期間にわたる核酸、例えば、ｉＲＮＡの持続放出を提供する従来の持続放出製剤を使用して、配合されてもよい。持続放出製剤は、当該技術分野で周知であり、本発明の薬剤とともに使用され得るなど、特定の部位での薬剤の送達に特に有用である。この実施形態では、投薬量単位は、対応する複数の１日用量を含有する。

【０１７３】

他の実施形態では、単回用量の医薬組成物は、後続の用量が３、４、又は５日の間隔以下で、又は１、２、３、又は４週間の間隔以下で投与されるように、長く持続し得る。本発明のいくつかの実施形態では、単回用量の本発明の医薬組成物は、週に１回投与される

。本発明の他の実施形態では、単回用量の本発明の医薬組成物は、隔月で投与される。ある特定の実施形態では、ｉＲＮＡは、約月に１回～約四半期に１回（すなわち、約３か月に１回）、又は６か月若しくは１２か月ごとに投与される。

【０１７４】

本発明に包含される個々の核酸、例えば、ｉＲＮＡの有効投薬量及びインビボ半減期の推定は、当技術分野で知られているように、従来の方法論を使用して、又は適切な動物モデルを使用したインビボ試験に基づいて行われ得る。

【０１７５】

本発明の医薬組成物は、局所治療又は全身治療が所望されるかどうか、及び治療される領域に応じて、多くの方法で投与され得る。投与は、局所的｛例えば、経皮パッチによる）、肺、例えば、噴霧器を含む粉末又はエアロゾルの吸入又は送気による、気管内、鼻腔内、表皮及び経皮、経口又は非経口であり得る。非経口投与には、静脈内、動脈内、皮下、腹腔内、若しくは筋肉内注射又は注入、例えば、移植デバイスを介した皮下、又は例えば、実質内、髄腔内、若しくは脳室内投与による頭蓋内が含まれる。ある特定の好ましい実施形態では、組成物は、静脈内注入又は注射によって投与される。ある特定の実施形態では、組成物は、皮下注射によって投与される。

【０１７６】

一実施形態において、核酸、例えば、ＲＮＡｉ剤は、対象に皮下投与される。

【０１７７】

核酸、例えば、ｉＲＮＡは、特定の組織｛例えば、特定の肝臓細胞）を標的とする様式で送達され得る。

【０１７８】

遺伝子発現を阻害するための方法

本発明はまた、細胞における遺伝子の発現を阻害する方法も提供する。本方法は、細胞における遺伝子の発現を阻害するのに有効な量で、細胞を本発明の核酸、例えば、二本鎖ＲＮＡｉ剤などのＲＮＡｉ剤と接触させ、それによって細胞における遺伝子の発現を阻害することを含む。

【０１７９】

核酸、例えば、二本鎖ＲＮＡｉ剤などのｉＲＮＡとの細胞の接触は、インビトロ又はインビボで行われ得る。インビボで細胞を核酸、例えば、ｉＲＮＡと接触させることは、対象、例えば、ヒト対象内の細胞又は細胞の群を、核酸、例えば、ｉＲＮＡと接触させることを含む。細胞を接触させるインビトロ及びインビボ方法の組み合わせもまた可能である。細胞を接触させることは、上で考察されるように、直接的であっても間接的であってもよい。更に、細胞を接触させることは、本明細書に記載されるか、又は当該技術分野で既知の任意のリガンド部分を含む標的化リガンド部分を介して達成され得る。好ましい実施形態では、標的リガンド部分は、炭水化物部分、例えば、ＧａｌＮＡｃ３リガンド、又はＲＮＡｉ剤を目的の部位に指向する任意の他のリガンド部分である。

【０１８０】

「阻害する」という用語は、本明細書で使用される場合、「低減する」、「サイレンシングする」、「下方調節する」、「抑制する」、及び他の同様の用語と互換的に使用され、任意のレベルの阻害を含む。

【０１８１】

本発明の方法のいくつかの実施形態では、遺伝子の発現は、少なくとも３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、若しくは９５％阻害されるか、又はアッセイの検出レベル未満に阻害される。ある特定の実施形態では、本方法は、例えば、遺伝子の発現を低減させるように対象を薬剤で治療した後の臨床的に関連する転帰によって示されるような、標的遺伝子の発現の臨床的に関連する阻害を含む。

【０１８２】

遺伝子の発現の阻害は、好適な対照と比較して、目的の標的遺伝子のｍＲＮＡの量の低

減によって明らかにされ得る。
【０１８３】
他の実施形態では、遺伝子の発現の阻害は、遺伝子発現に機能的に関連したパラメータ、例えば、タンパク質発現又はシグナル伝達経路の低減の観点から評価され得る。
【０１８４】
遺伝子発現に関連する疾患を治療又は予防する方法
本発明はまた、細胞における遺伝子発現を低減又は阻害するために、本発明の核酸、例えば、ｉＲＮＡ又は本発明の核酸、例えば、ｉＲＮＡを含有する組成物を使用する方法も提供する。本方法は、細胞を本発明の核酸、例えば、ｄｓＲＮＡと接触させ、遺伝子のｍＲＮＡ転写産物の分解を得るのに十分な時間細胞を維持し、それによって細胞における遺伝子の発現を阻害することを含む。遺伝子発現の低減は、当該技術分野で既知の任意の方法によって評価され得る。
【０１８５】
本発明の方法では、細胞は、インビトロ又はインビボで接触され得、すなわち、細胞は、対象内に存在し得る。
【０１８６】
本発明の方法を使用する治療に好適な細胞は、疾患に関連する目的の遺伝子を発現する任意の細胞であり得る。
【０１８７】
本発明のインビボ方法は、対象に、本発明の核酸、例えば、ｉＲＮＡを含有する組成物を投与することを含み得、核酸、例えば、ｉＲＮＡは、治療される哺乳動物の遺伝子のＲＮＡ転写産物の少なくとも一部に相補的なヌクレオチド配列を含む。
【０１８８】
本発明は、それを必要とする対象の治療方法を更に提供する。本発明の治療方法は、本発明のｉＲＮＡなどの核酸を、対象、例えば、遺伝子の発現の低減又は阻害から利益を得るであろう対象に、治療上有効な量で、遺伝子を標的とするｉＲＮＡなどの核酸又は遺伝子を標的とする核酸を含む医薬組成物を、投与することを含む。
【０１８９】
本発明の核酸、例えば、ｉＲＮＡは、医薬組成物の非存在下で投与される「遊離」核酸又は「遊離ｉＲＮＡとして投与され得る。裸の核酸は、好適な緩衝液中に存在し得る。緩衝液は、アセテート、シトレート、プロラミン、カーボネート、若しくはホスフェート、又はそれらの任意の組み合わせを含み得る。一実施形態では、緩衝液は、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）である。緩衝液のｐＨ及び浸透圧濃度は、それが対象に投与するのに好適であるように調節され得る。
【０１９０】
代替的には、本発明の核酸、例えば、ｉＲＮＡは、ｄｓＲＮＡリポソーム製剤などの医薬組成物として投与され得る。
【０１９１】
一実施形態では、本方法は、標的遺伝子の発現が、例えば、約１、２、３、４、５、６、７、８、１２、１６、１８、２４時間、２８、３２、又は約３６時間など、低下するように、本明細書に特徴付けられる組成物を投与することを含む。一実施形態では、標的遺伝子の発現は、長期間、例えば、少なくとも約２、３、４日以上、例えば、約１週間、２週間、３週間、又は４週間以上、例えば、約１か月、２か月、又は３か月間減少する。
【０１９２】
対象は、約０．０１ｍｇ／ｋｇ～約２００ｍｇ／ｋｇなど，治療量の核酸、例えば、ｉＲＮＡが投与され得る。
【０１９３】
核酸、例えば、ｉＲＮＡは、一定期間にわたって定期的に静脈内注入によって投与され得る。ある特定の実施形態では、最初の治療レジメンの後、治療はより少ない頻度で投与され得る。ｉＲＮＡの投与は、例えば、患者の細胞又は組織における標的遺伝子産物レベ

ルを、少なくとも約２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、若しくは９５％低減させ得るか、又は使用されるアッセイ方法の検出レベル未満に低減させる。ある特定の実施形態では、投与は、遺伝子関連障害の少なくとも１つの徴候又は症状の臨床的安定化、又は好ましくは臨床的に関連する低減をもたらす。

【０１９４】

代替的に、核酸、例えば、ｉＲＮＡは、皮下、すなわち、皮下注射によって投与され得る。１回以上の注射を使用して、所望の１日用量の核酸、例えば、ｉＲＮＡを対象に送達し得る。注射は、一定期間にわたって繰り返され得る。投与は、定期的に繰り返され得る。ある特定の実施形態では、最初の治療レジメンの後、治療はより少ない頻度で投与され得る。反復用量レジメンは、治療量の核酸を隔日又は１年に１回など、定期的に投与することを含み得る。ある特定の実施形態では、核酸は、約月に１回～約四半期に１回（すなわち、約３か月に１回）投与される。

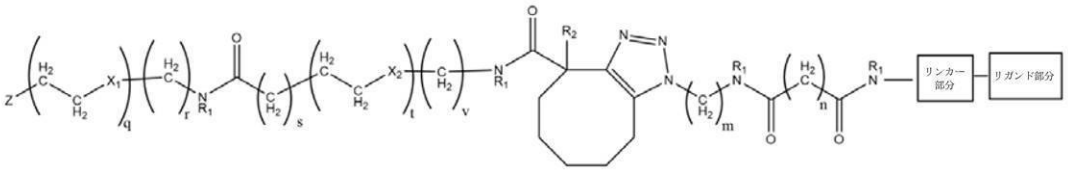
【０１９５】

一態様では、本発明は、１～１０１に番号付けされる以下のセンテンスの化合物、プロセス、組成物又は使用に適用され得る（センテンス１～１０１の任意の式への言及は、センテンス１～１０１内で定義されるそれらの式のみを指す。これらの式を図４３に再現する）

１．　以下の構造を含む、化合物であって、

【０１９６】

【化３】



式（Ｉ）

【０１９７】

式中、

Ｒ１が、各出現で独立して、水素、メチル、及びエチルからなる群から選択され、

Ｒ２が、水素、ヒドロキシ、－ＯＣ１－３アルキル、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＣ１－３アルキル、ハロ及びニトロからなる群から選択され、

Ｘ１及びＸ２が、各出現で独立して、メチレン、酸素、及び硫黄からなる群から選択され、

ｍが、１～６の整数であり、

ｎが、１～１０の整数であり、

ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｖが、独立して、０～４の整数であり、ただし、

（ｉ）ｑ及びｒが両方とも、同時に０であることはできず、

（ｉｉ）ｓ、ｔ及びｖが全て、同時に０であることはできず、

Ｚが、オリゴヌクレオチド部分である、化合物。

２．　Ｒ１が、各出現で水素である、センテンス１による化合物。

３．　Ｒ１が、メチルである、センテンス１による化合物。

４．　Ｒ１が、エチルである、センテンス１による化合物。

５．　Ｒ２が、ヒドロキシである、センテンス１～４のうちのいずれかによる化合物。

６．　Ｒ２が、ハロである、センテンス１～４のうちのいずれかによる化合物。

７．　Ｒ２が、フルオロである、センテンス６による化合物。

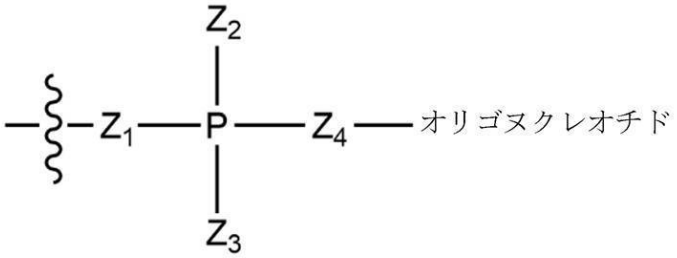
８．　Ｒ２が、クロロである、センテンス６による化合物。

９．　Ｒ２が、ブロモである、センテンス６による化合物。

１０．　Ｒ２が、ヨードである、センテンス６による化合物。

１１．　Ｒ２が、ニトロである、センテンス６による化合物。
１２．　Ｘ１が、メチレンである、センテンス１～１１のうちのいずれかによる化合物。
１３．　Ｘ１が、酸素である、センテンス１～１１のうちのいずれかによる化合物。
１４．　Ｘ１が、硫黄である、センテンス１～１１のうちのいずれかによる化合物。
１５．　Ｘ２が、メチレンである、センテンス１～１４のうちのいずれかによる化合物。
１６．　Ｘ２が、酸素である、センテンス１～１５のうちのいずれかによる化合物。
１７．　Ｘ２が、硫黄である、センテンス１～１６のうちのいずれかによる化合物。
１８．　ｍ＝３である、センテンス１～１７のうちのいずれかによる化合物。
１９．　ｎ＝６である、センテンス１～１８のうちのいずれかによる化合物。
２０．　Ｘ１が、酸素であり、Ｘ２が、メチレンであり、好ましくは、
ｑ＝１、
ｒ＝２、
ｓ＝１、
ｔ＝１、
ｖ＝１である、センテンス１３～１５のうちのいずれかによる化合物。
２１．　Ｘ１及びＸ２が両方とも、メチレンであり、好ましくは、
ｑ＝１、
ｒ＝３、
ｓ＝１、
ｔ＝１、
ｖ＝１である、センテンス１２～１５のうちのいずれかによる化合物。
２２．　Ｚが、以下であり、

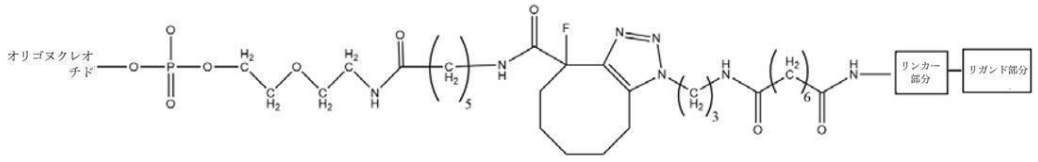
【０１９８】
【化４】



【０１９９】
式中、
Ｚ１、Ｚ２、Ｚ３、Ｚ４が、各出現で独立して、酸素又は硫黄であり、
ＰとＺ２との間、及びＰとＺ３との間の一方の結合が、単結合であり、他方の結合は、二重結合である、センテンス１～２１のうちのいずれかによる化合物。
２３．　当該オリゴヌクレオチドが、標的遺伝子の発現を調節、好ましくは阻害することができるＲＮＡ化合物である、センテンス２２による化合物。
２４．　当該ＲＮＡ化合物は、第１及び第２の鎖を含むＲＮＡ二本鎖を含み、第１の鎖が、標的遺伝子のＲＮＡ配列に少なくとも部分的に相補的であり、第２の鎖が、当該第１の鎖に少なくとも部分的に相補的であり、第１及び第２の鎖の各々が、５’及び３’末端を有する、センテンス２３による化合物。
２５．　ＲＮＡ化合物が、その第２の鎖の５’末端で、隣接するホスフェートに結合している、センテンス２４による化合物。
２６．　ＲＮＡ化合物が、その第２の鎖の３’末端で、隣接するホスフェートに結合している、センテンス２４による化合物。
２７．　式（ＩＩ）の化合物：

【０２００】

【化５】



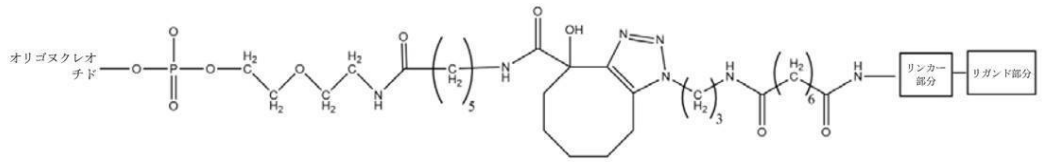
式（ＩＩ）

【０２０１】

２８．　式（ＩＩＩ）の化合物：

【０２０２】

【化６】



式（ＩＩＩ）

【０２０３】

２９．　オリゴヌクレオチドが、第１及び第２の鎖を含むＲＮＡ二本鎖を含み、第１の鎖が、標的遺伝子のＲＮＡ配列に少なくとも部分的に相補的であり、第２の鎖が、当該第１の鎖に少なくとも部分的に相補的であり、第１及び第２の鎖の各々が、５‘及び３‘末端を有し、当該ＲＮＡ二本鎖が、その第２の鎖の５‘末端で、隣接するホスフェートに結合している、センテンス２７又は２８による化合物。

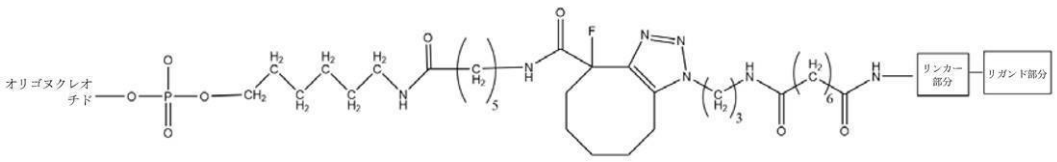
３０．　センテンス２７に定義される式（ＩＩ）の化合物と、任意選択で、センテンス２９に従属する、センテンス２８に定義される式（ＩＩＩ）の化合物と、を含む、組成物。

３１．　センテンス２８に定義される当該式（ＩＩＩ）の化合物が、当該組成物の１０～１５重量％の範囲の量で存在する、センテンス３０による組成物。

３２．　式（ＩＶ）の化合物：

【０２０４】

【化７】



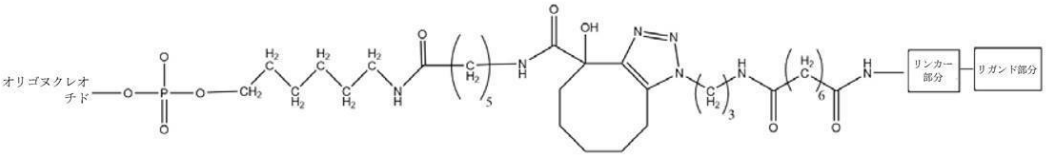
式（ＩＶ）

【０２０５】

３３．　式（Ｖ）の化合物：

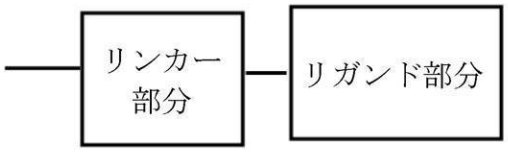
【０２０６】

【化８】

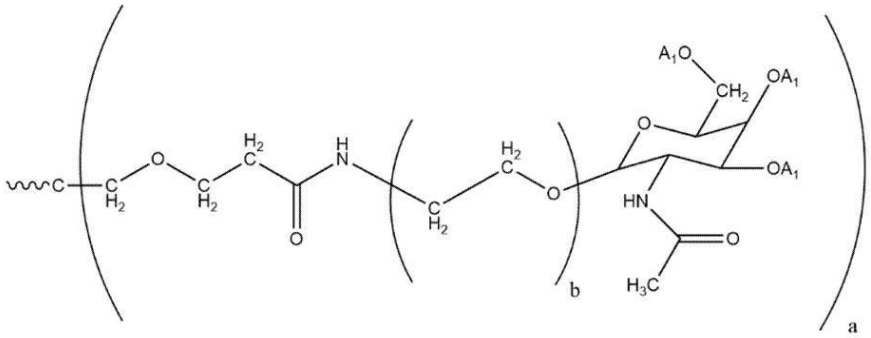


式（Ｖ）

【０２０７】
３４．　オリゴヌクレオチドが、第１及び第２の鎖を含むＲＮＡ二本鎖を含み、第１の鎖が、標的遺伝子のＲＮＡ配列に少なくとも部分的に相補的であり、第２の鎖が、当該第１の鎖に少なくとも部分的に相補的であり、第１及び第２の鎖の各々が、５’及び３’末端を有し、当該ＲＮＡ二本鎖が、その第２の鎖の３’末端で、隣接するホスフェートに結合している、センテンス３２又は３３による化合物。
３５．　センテンス３２に定義される式（ＩＶ）の化合物と、任意選択で、センテンス３４に従属する、センテンス３３に定義される式（Ｖ）の化合物と、を含む、組成物。
３６．　センテンス３３に定義される当該式（Ｖ）の化合物が、当該組成物の１０～１５重量％の範囲の量で存在する、センテンス３５による組成物。
３７．　オリゴヌクレオチドが、２’位で修飾された１つ以上のリボース、好ましくは２’位で修飾された複数のリボースを更に含むＲＮＡ二本鎖を含む、センテンス１～２９及び３２～３４のうちのいずれかによる化合物。
３８．　修飾が、２’－Ｏ－メチル、２’－デオキシ－フルオロ、及び２’－デオキシから選択される、センテンス３７による化合物。
３９．　オリゴヌクレオチドが、１つ以上の末端に１つ以上の分解保護部分を更に含む、センテンス１～２９、及び３２～３４、及び３７～３８のうちのいずれかによる化合物。
４０．　当該１つ以上の分解保護部分が、リガンド部分を担持するオリゴヌクレオチド鎖の末端に存在せず、かつ／又は当該１つ以上の分解保護部分が、ホスホロチオエートヌクレオチド間連結、ホスホロジチオエートヌクレオチド間連結、及び逆脱塩基ヌクレオチドから選択され、当該逆脱塩基ヌクレオチドが、リガンド部分を担持する鎖の遠方の末端に存在する、センテンス３９による化合物。
４１．　センテンス１の式（Ｉ）に示される当該リガンド部分が、１つ以上のリガンドを含む、センテンス１～２９、及び３２～３４、及び３７～４０のうちのいずれかによる化合物。
４２．　センテンス１の式（Ｉ）に示される当該リガンド部分が、１つ以上の炭水化物のリガンドを含む、センテンス４１による化合物。
４３．　当該１つ以上の炭水化物が、単糖、二糖、三糖、四糖、オリゴ糖、又は多糖であり得る、センテンス４２による化合物。
４４．　当該１つ以上の炭水化物が、１つ以上のガラクトース部分、１つ以上のラクトース部分、１つ以上のＮ－アセチルガラクトサミン部分、及び／又は１つ以上のマンノース部分を含む、センテンス４３による化合物。
４５．　当該１つ以上の炭水化物が、１つ以上のＮ－アセチル－ガラクトサミン部分を含む、センテンス４４による化合物。
４６．　２又は３個のＮ－アセチルガラクトサミン部分を含む、センテンス４５による化合物。
４７．　当該１つ以上のリガンドが、線形構成又は分岐構成で結合している、センテンス４１～４６のうちのいずれかによる化合物。
４８．　当該１つ以上のリガンドが、二分岐又は三分岐の分岐構成として結合している、センテンス４７による化合物。
４９．　センテンス１の式（Ｉ）に示される当該部分：
【０２０８】
【化９】

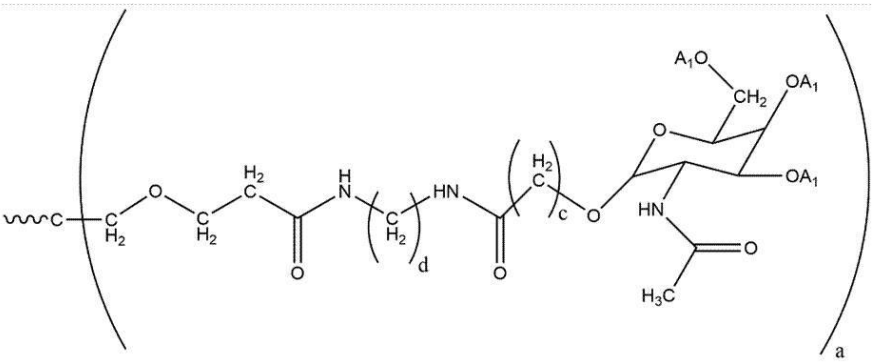


【０２０９】
が、式（ＶＩａ）、（ＶＩｂ）、又は（ＶＩｃ）：
【０２１０】
【化１０】



式（ＶＩａ）

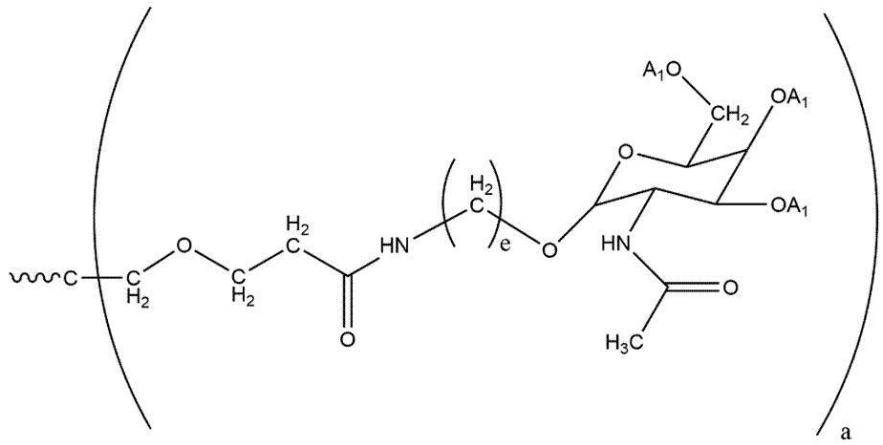
【０２１１】
（式中、
ＡＩが、水素、又は好適なヒドロキシ保護基であり、
ａが、２又は３の整数であり、
ｂが、２～５の整数である）、又は
【０２１２】
【化１１】



式（ＶＩｂ）

【０２１３】
（式中、
ＡＩが、水素、又は好適なヒドロキシ保護基であり、
ａが、２又は３の整数であり、
ｃ及びｄが、独立して、１～６の整数である）、又は
【０２１４】

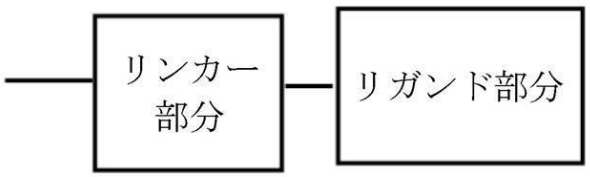
【化１２】



式（ＶＩｃ）

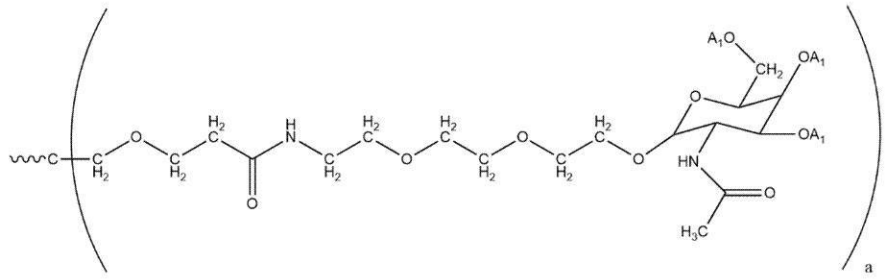
【０２１５】
（式中、
ＡＩが、水素、又は好適なヒドロキシ保護基であり、
ａが、２又は３の整数であり、
ｅが、２～１０の整数である）のうちのいずれか、好ましくは、式（ＶＩａ）である、センテンス４６～４８による化合物。
５０．　センテンス１の式（Ｉ）に示される当該部分：

【０２１６】
【化１３】



【０２１７】
が、式（ＶＩＩ）であり、

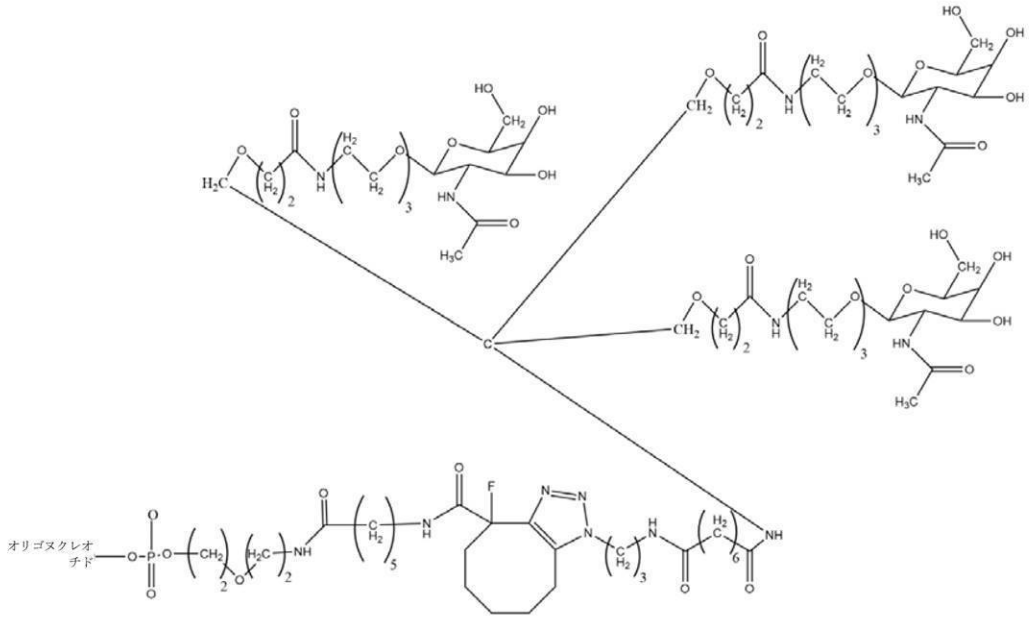
【０２１８】
【化１４】



式（ＶＩＩ）

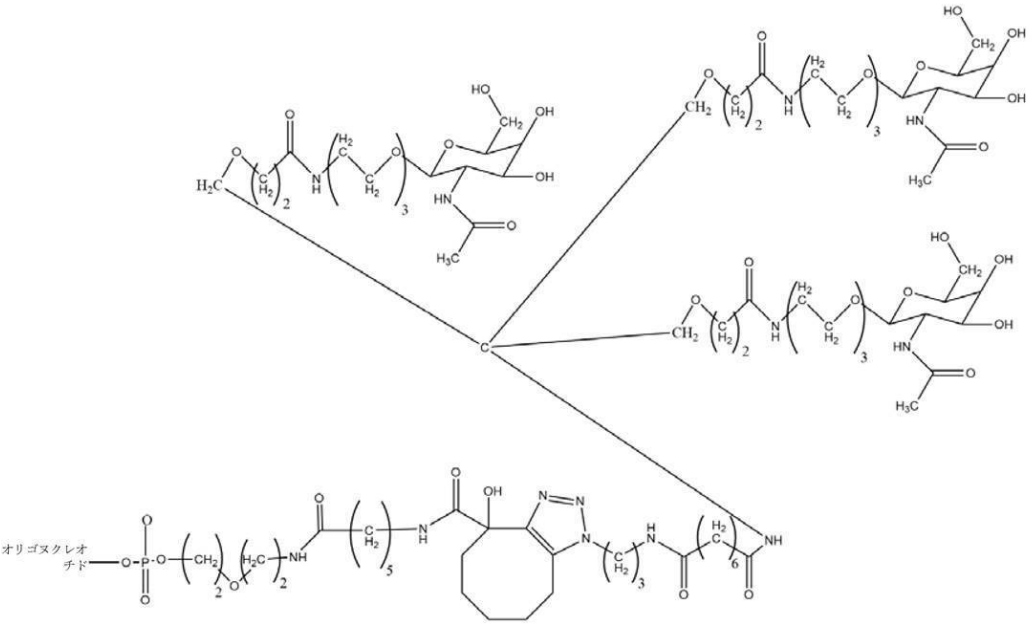
【０２１９】
式中、
ＡＩが、水素であり、
ａが、２又は３の整数である、センテンス４６～４８による化合物。
５１．　ａ＝２である、センテンス４９又は５０による化合物。

５２．　ａ＝３である、センテンス４９又は５０による化合物。
５３．　ｂ＝３である、センテンス４９による化合物。
５４．　式（ＶＩＩＩ）の化合物：
【０２２０】
【化１５】



式（ＶＩＩＩ）

【０２２１】
５５．　式（ＩＸ）の化合物：
【０２２２】
【化１６】



式（ＩＸ）

【０２２３】
５６．　オリゴヌクレオチドが、第１及び第２の鎖を含むＲＮＡ二本鎖を含み、第１の鎖が、標的遺伝子のＲＮＡ配列に少なくとも部分的に相補的であり、第２の鎖が、当該第１の鎖に少なくとも部分的に相補的であり、第１及び第２の鎖の各々が、５’及び３’末端

を有し、当該ＲＮＡ二本鎖が、その第２の鎖の５’末端で、隣接するホスフェートに結合している、センテンス５４又は５５による化合物。

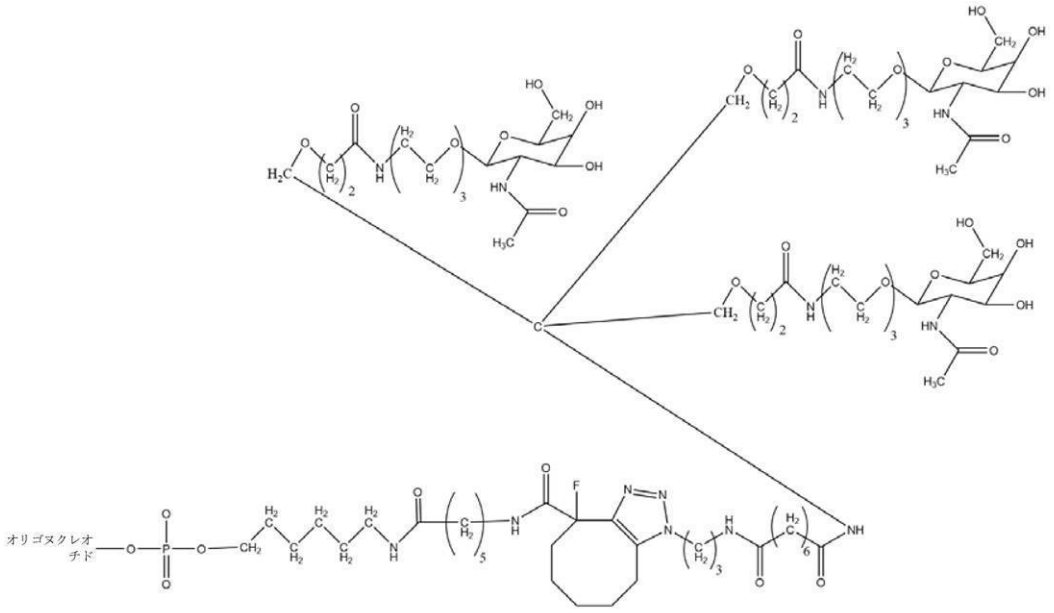
５７．　センテンス５４に定義される式（ＶＩＩＩ）の化合物と、任意選択で、センテンス５６に従属する、センテンス５５に定義される式（ＩＸ）の化合物と、を含む、組成物。

５８．　センテンス５５に定義される当該式（ＩＸ）の化合物が、当該組成物の１０～１５重量％の範囲の量で存在する、センテンス５７による組成物。

５９．　式（Ｘ）の化合物：

【０２２４】

【化１７】



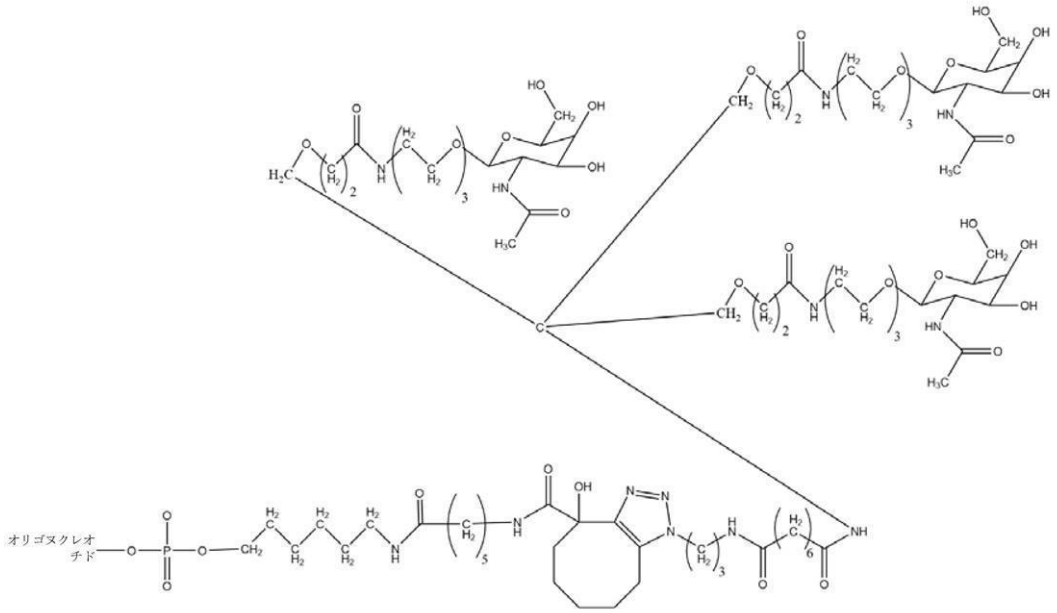
式（X）

【０２２５】

６０．　式（ＸＩ）の化合物：

【０２２６】

【化１８】



式（ＸＩ）

【０２２７】

６１．　オリゴヌクレオチドが、第１及び第２の鎖を含むＲＮＡ二本鎖を含み、第１の鎖が、標的遺伝子のＲＮＡ配列に少なくとも部分的に相補的であり、第２の鎖が、当該第１の鎖に少なくとも部分的に相補的であり、第１及び第２の鎖の各々が、５’及び３’末端を有し、当該ＲＮＡ二本鎖が、その第２の鎖の３’末端で、隣接するホスフェートに結合している、センテンス５９又は６０による化合物。

６２．　センテンス５９に定義される式（Ｘ）の化合物と、任意選択で、センテンス６１に従属する、センテンス６０に定義される式（ＸＩ）の化合物と、を含む、組成物。

６３．　センテンス６０に定義される当該式（ＸＩ）の化合物が、当該組成物の１０～１５重量％の範囲の量で存在する、センテンス６２による組成物。

６４．　オリゴヌクレオチドが、２’位で修飾された１つ以上のリボース、好ましくは２’位で修飾された複数のリボースを更に含むＲＮＡ二本鎖を含む、センテンス５４～６３のうちのいずれかによる化合物。

６５．　修飾が、２’－Ｏ－メチル、２’－デオキシ－フルオロ、及び２’－デオキシから選択される、センテンス６４による化合物。

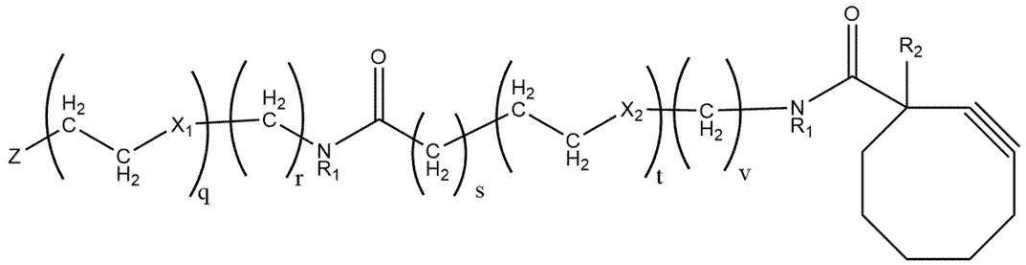
６６．　オリゴヌクレオチドが、１つ以上の末端に１つ以上の分解保護部分を更に含む、センテンス５４～６５のうちのいずれかによる化合物。

６７．　センテンス５４、５５、５９、又は６０のうちのいずれかの式（ＶＩＩＩ）、（ＩＸ）、（Ｘ）又は（ＸＩ）のうちのいずれかに示されるとおり、当該１つ以上の分解保護部分が、リガンド部分を担持するオリゴヌクレオチド鎖の末端に存在せず、かつ／又は当該１つ以上の分解保護部分が、ホスホロチオエートヌクレオチド間連結、ホスホロジチオエートヌクレオチド間連結、及び逆脱塩基ヌクレオチドから選択され、当該逆脱塩基ヌクレオチドが、リガンド部分を担持する鎖の遠方の末端に存在する、センテンス６６による化合物。

６８．　センテンス１～２９、３２～３４、３７～５６、５９～６１、及び６４～６７のうちのいずれかによる化合物、並びに／又はセンテンス３０、３１、３５、３６、５７、５８、６２、６３のうちのいずれかによる組成物を調製するプロセスであって、プロセスが、式（ＸＩＩ）及び（ＸＩＩＩ）の化合物を反応させることであって、

【０２２８】

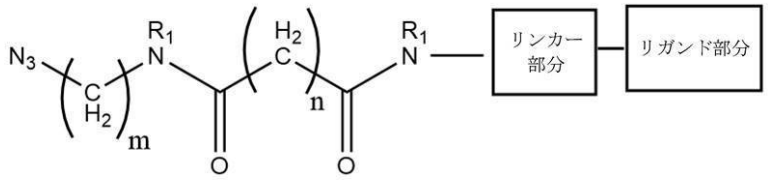
【化１９】



式（ＸＩＩ）

【０２２９】

【化２０】



式（ＸＩＩＩ）

【０２３０】

式中、

Ｒ１が、各出現で独立して、水素、メチル、及びエチルからなる群から選択され、

Ｒ２が、水素、ヒドロキシ、－ＯＣ１－３アルキル、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＣ１－３アルキル、ハロ及びニトロからなる群から選択され、

Ｘ１及びＸ２が、各出現で独立して、メチレン、酸素、及び硫黄からなる群から選択され、

ｍが、１～６の整数であり、

ｎが、１～１０の整数であり、

ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｖが、独立して、０～４の整数であり、ただし、

（ｉ）ｑ及びｒが両方とも、同時に０であることはできず、

（ｉｉ）ｓ、ｔ及びｖが全て、同時に０であることはできず、

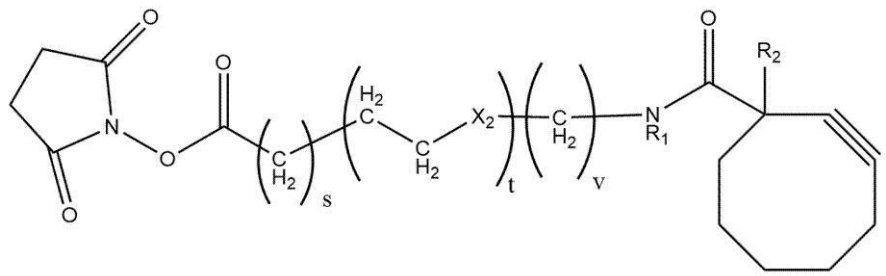
Ｚが、オリゴヌクレオチド部分である、反応させることと、

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

６９．式（ＸＩＩ）の化合物が、式（ＸＩＶ）及び（ＸＶ）の化合物を反応させることによって調製され、

【０２３１】

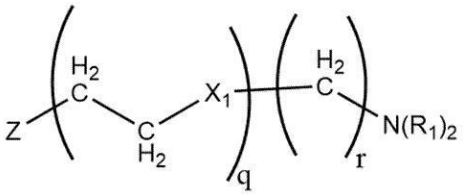
【化２１】



式（ＸＩＶ）

【０２３２】

【化２２】



式（ＸＶ）

【０２３３】

Ｒ１が、各出現で独立して、水素、メチル、及びエチルからなる群から選択され、

Ｒ２が、水素、ヒドロキシ、－ＯＣ１－３アルキル、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＣ１－３アルキル、ハロ及びニトロからなる群から選択され、

Ｘ１及びＸ２が、各出現で独立して、メチレン、酸素、及び硫黄からなる群から選択され、

ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｖが、独立して、０～４の整数であり、ただし、

（ｉ）ｑ及びｒが両方とも、同時に０であることはできず、

（ｉｉ）ｓ、ｔ及びｖが全て、同時に０であることはできず、

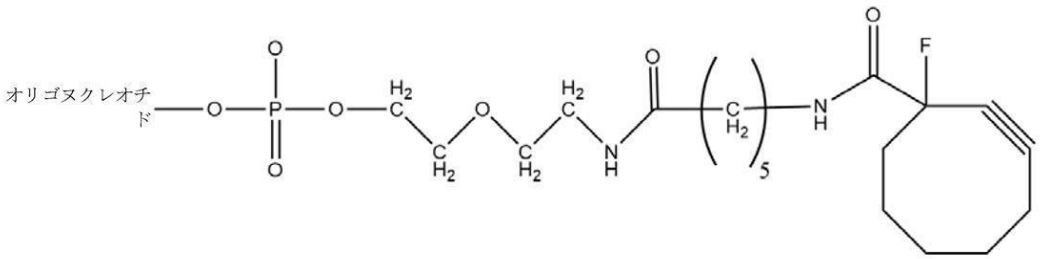
Ｚが、オリゴヌクレオチド部分である、センテンス６８によるプロセス。

７０．

式（ＸＩＩ）の化合物が、式（ＸＩＩａ）であり、

【０２３４】

【化２３】



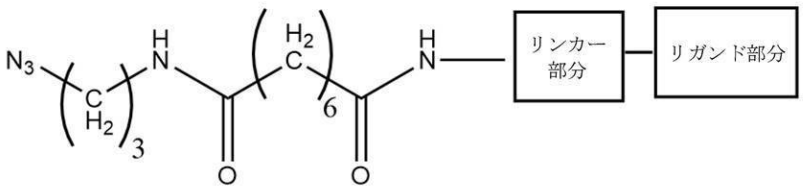
式（ＸＩＩａ）

【０２３５】

式（ＸＩＩＩ）の化合物が、式（ＸＩＩＩａ）であり、

【０２３６】

【化２４】



式（ＸＩＩＩａ）

【０２３７】

オリゴヌクレオチドが、第１及び第２の鎖を含むＲＮＡ二本鎖を含み、第１の鎖が、標的遺伝子のＲＮＡ配列に少なくとも部分的に相補的であり、第２の鎖が、当該第１の鎖に少なくとも部分的に相補的であり、第１及び第２の鎖の各々が、５‘及び３‘末端を有し、当該ＲＮＡ二本鎖が、その第２の鎖の５‘末端で、隣接するホスフェートに結合している、センテンス２０、２５、２７、２９、５４、５６のうちのいずれかによる化合物、及び

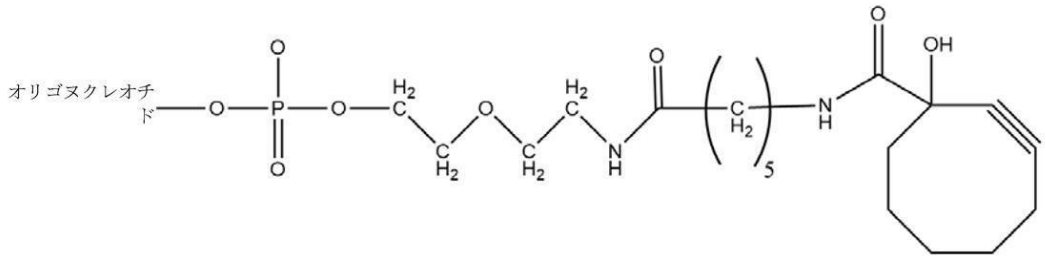
／又はセンテンス３０、３１、５７、５８のうちのいずれかによる組成物の調製のための、センテンス６８によるプロセス。

７１．

式（ＸＩＩ）の化合物が、式（ＸＩＩｂ）であり、

【０２３８】

【化２５】



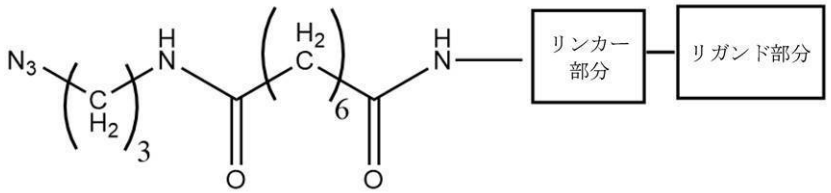
式（ＸＩＩｂ）

【０２３９】

式（ＸＩＩＩ）の化合物が、式（ＸＩＩＩａ）であり、

【０２４０】

【化２６】



式（ＸＩＩＩａ）

【０２４１】

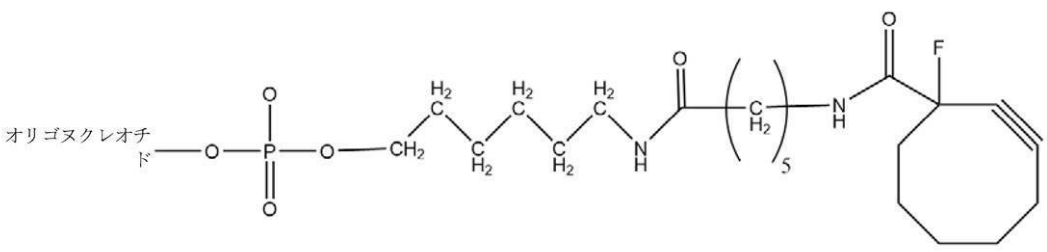
オリゴヌクレオチドが、第１及び第２の鎖を含むＲＮＡ二本鎖を含み、第１の鎖が、標的遺伝子のＲＮＡ配列に少なくとも部分的に相補的であり、第２の鎖が、当該第１の鎖に少なくとも部分的に相補的であり、第１及び第２の鎖の各々が、５‘及び３‘末端を有し、当該ＲＮＡ二本鎖が、その第２の鎖の５‘末端で、隣接するホスフェートに結合している、センテンス２０、２５、２８、２９、５５、５６のうちのいずれかによる化合物、及び／又はセンテンス３０、３１、５７、５８のうちのいずれかによる組成物の調製のための、センテンス６８によるプロセス。

７２．

式（ＸＩＩ）の化合物が、式（ＸＩＩｃ）であり、

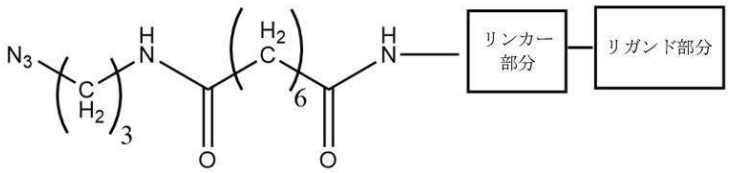
【０２４２】

【化２７】



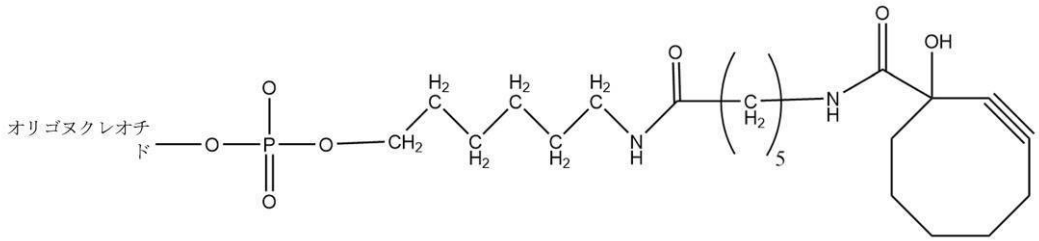
式（ＸＩＩｃ）

【０２４３】
式（ＸＩＩＩ）の化合物が、式（ＸＩＩＩａ）であり、
【０２４４】
【化２８】



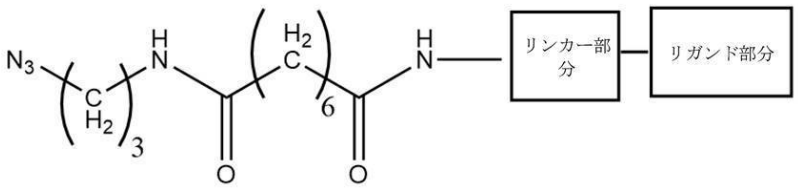
式（ＸＩＩＩａ）

【０２４５】
オリゴヌクレオチドが、第１及び第２の鎖を含むＲＮＡ二本鎖を含み、第１の鎖が、標的遺伝子のＲＮＡ配列に少なくとも部分的に相補的であり、第２の鎖が、当該第１の鎖に少なくとも部分的に相補的であり、第１及び第２の鎖の各々が、５’及び３’末端を有し、当該ＲＮＡ二本鎖が、その第２の鎖の３’末端で、隣接するホスフェートに結合している、センテンス２１、２６、３２、３４、５９、６１のうちのいずれかによる化合物、及び／又はセンテンス３５、３６、６２、６３のうちのいずれかによる組成物を調製するための、センテンス６８によるプロセス。
７３．
式（ＸＩＩ）の化合物が、式（ＸＩＩｄ）であり、
【０２４６】
【化２９】



式（ＸＩＩｄ）

【０２４７】
式（ＸＩＩＩ）の化合物が、式（ＸＩＩＩａ）であり、
【０２４８】
【化３０】



式（ＸＩＩＩａ）

【０２４９】
オリゴヌクレオチドが、第１及び第２の鎖を含むＲＮＡ二本鎖を含み、第１の鎖が、標的遺伝子のＲＮＡ配列に少なくとも部分的に相補的であり、第２の鎖が、当該第１の鎖に少なくとも部分的に相補的であり、第１及び第２の鎖の各々が、５’及び３’末端を有し、当該ＲＮＡ二本鎖が、その第２の鎖の３’末端で、隣接するホスフェートに結合している、センテンス２１、２６、３３、３４、６０、６１のうちのいずれかによる化合物、及び

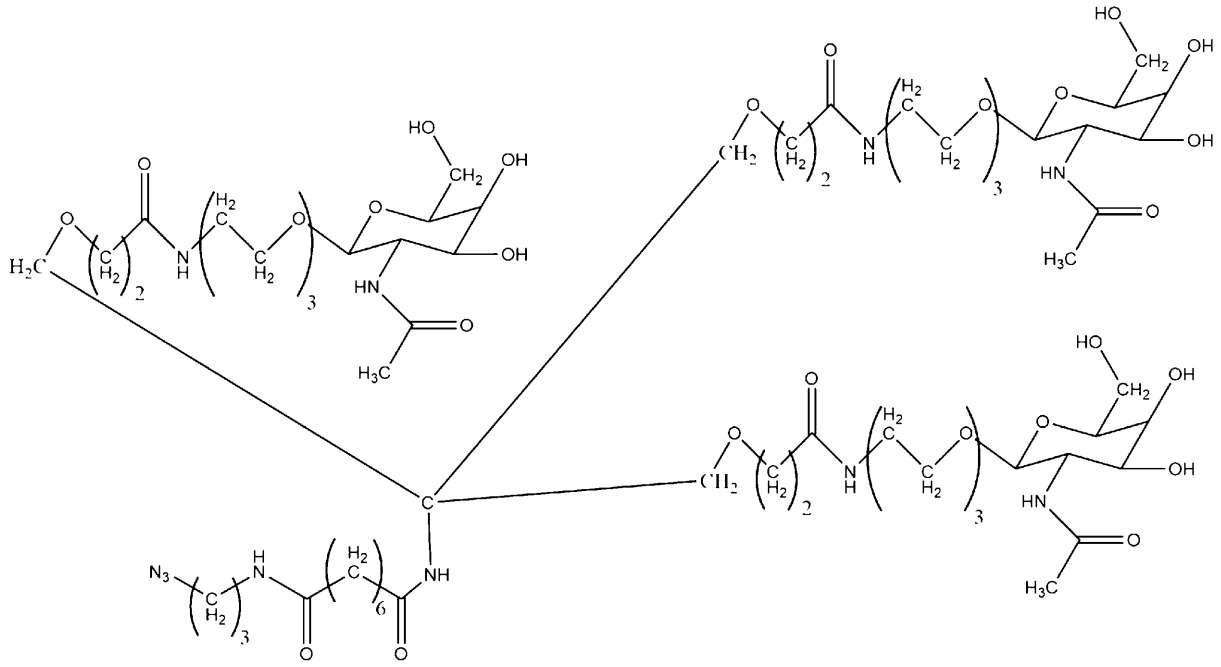
／又はセンテンス３５、３６、６２、６３のうちのいずれかによる組成物を調製するための、センテンス６８によるプロセス。

７４．

式（ＸＩＩＩａ）の化合物が、式（ＸＩＩＩｂ）である、センテンス７０～７３のうちのいずれかによるプロセス。

【０２５０】

【化３１】



式（ＸＩＩＩｂ）

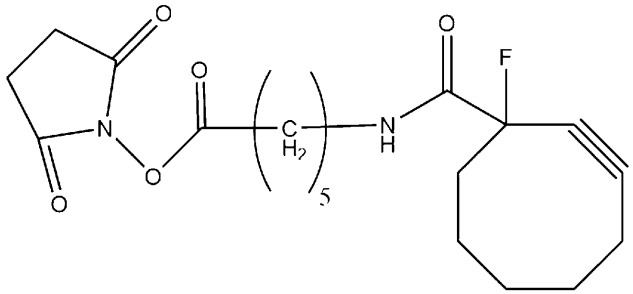
【０２５１】

７５．

式（ＸＩＶ）の化合物が、式（ＸＩＶａ）又は式（ＸＩＶｂ）のいずれかであり、

【０２５２】

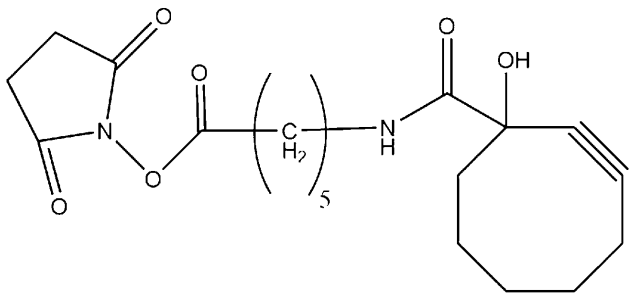
【化３２】



式（ＸＩＶａ）

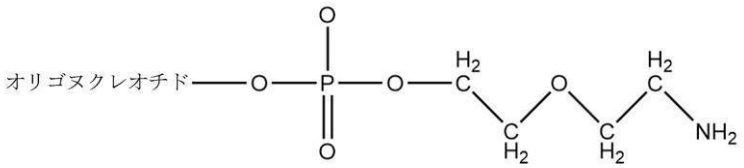
【０２５３】

【化３３】



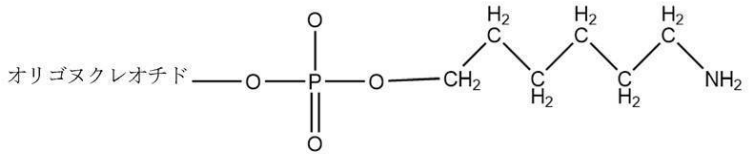
式（ＸＩＶｂ）

【０２５４】
式（ＸＶ）の化合物が、式（ＸＶａ）又は式（ＸＩＶｂ）のいずれかであり、
【０２５５】
【化３４】



式（ＸＶａ）

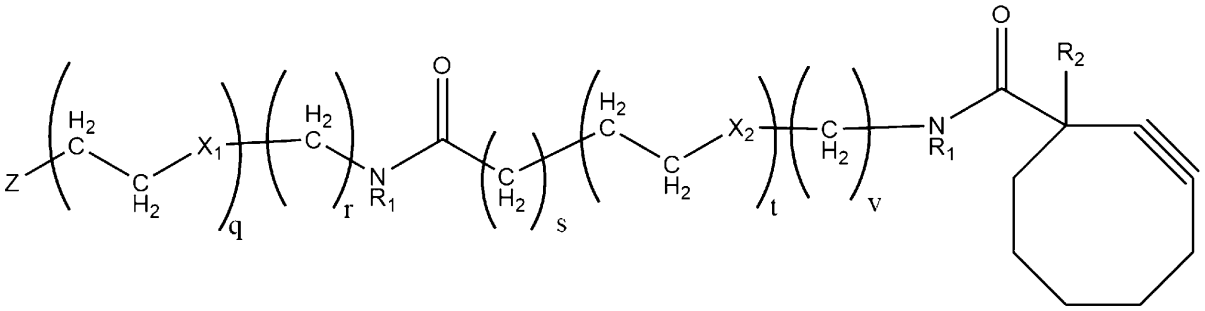
【０２５６】
【化３５】



式（ＸＶｂ）

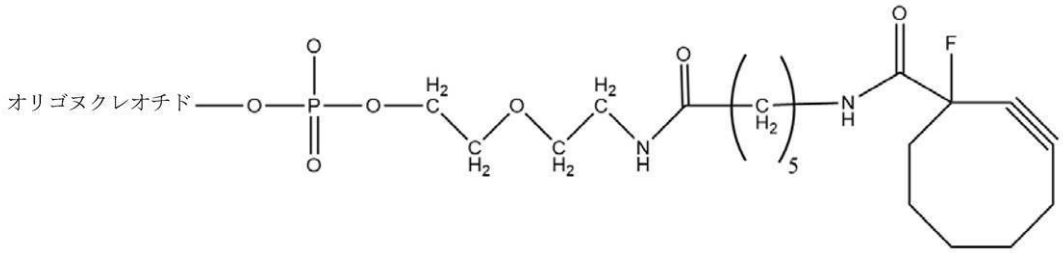
【０２５７】
オリゴヌクレオチドが、第１及び第２の鎖を含むＲＮＡ二本鎖を含み、第１の鎖が、標的遺伝子のＲＮＡ配列に少なくとも部分的に相補的であり、第２の鎖が、当該第１の鎖に少なくとも部分的に相補的であり、第１及び第２の鎖の各々が、５’及び３’末端を有し、（ｉ）当該ＲＮＡ二本鎖が、その第２の鎖の５’末端で、式（ＸＶａ）の隣接するホスフェートに結合しているか、又は（ｉｉ）当該ＲＮＡ二本鎖が、その第２の鎖の３’末端で、式（ＸＶｂ）の隣接するホスフェートに結合している、センテンス７０～７３に従属するセンテンス６９のプロセス。
７６．　式（ＸＩＩ）の化合物であって、
【０２５８】

【化３６】



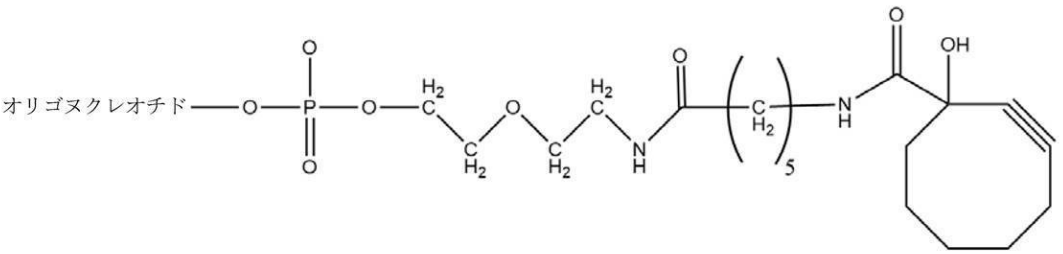
式（ＸＩＩ）

【０２５９】
式中、
Ｒ１が、各出現で独立して、水素、メチル、及びエチルからなる群から選択され、
Ｒ２が、水素、ヒドロキシ、－ＯＣ１－３アルキル、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＣ１－３アルキル、ハロ及びニトロからなる群から選択され、
Ｘ１及びＸ２が、各出現で独立して、メチレン、酸素、及び硫黄からなる群から選択され、
ｑ、ｒ、ｓ、ｔ、ｖが、独立して、０～４の整数であり、ただし、
（ｉ）ｑ及びｒが両方とも、同時に０であることはできず、
（ｉｉ）ｓ、ｔ及びｖが全て、同時に０であることはできず、
Ｚが、オリゴヌクレオチド部分である、化合物。
７７．　式（ＸＩＩａ）の化合物：
【０２６０】
【化３７】



式（ＸＩＩａ）

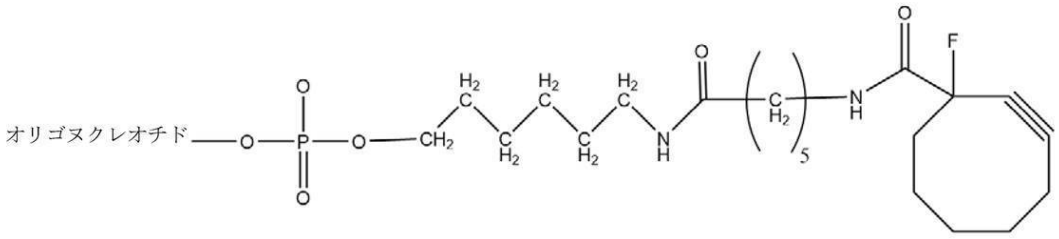
【０２６１】
７８．　式（ＸＩＩｂ）の化合物：
【０２６２】
【化３８】



式（ＸＩＩｂ）

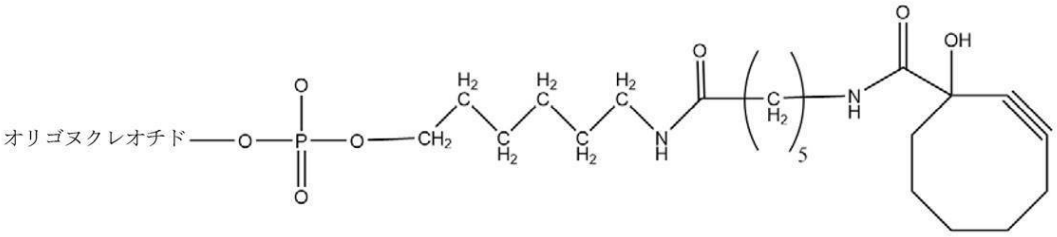
【０２６３】

７９．　式（ＸＩＩｃ）の化合物：
【０２６４】
【化３９】



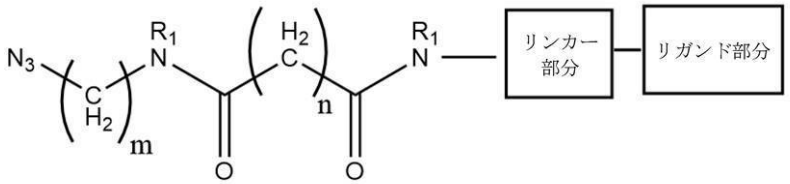
式（ＸＩＩｃ）

【０２６５】
８０．　式（ＸＩＩｄ）の化合物：
【０２６６】
【化４０】



式（ＸＩＩｄ）

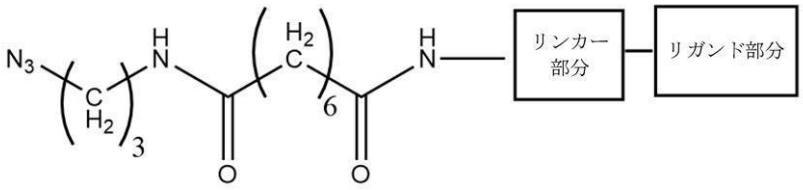
【０２６７】
８１．　式（ＸＩＩＩ）の化合物であって、
【０２６８】
【化４１】



式（ＸＩＩＩ）

【０２６９】
式中、
Ｒ１が、各出現で独立して、水素、メチル、及びエチルからなる群から選択され、
ｍが、１～６の整数であり、
ｎが、１～１０の整数である、化合物。
８２．　式（ＸＩＩＩａ）の化合物：
【０２７０】

【化４２】



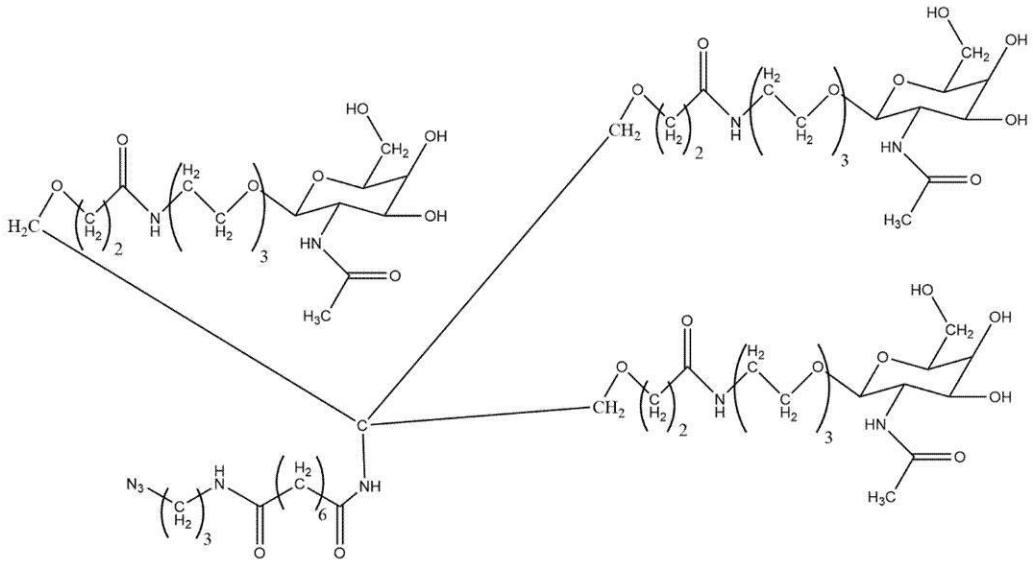
式（ＸＩＩＩａ）

【０２７１】

８３．　式（ＸＩＩＩｂ）の化合物：

【０２７２】

【化４３】



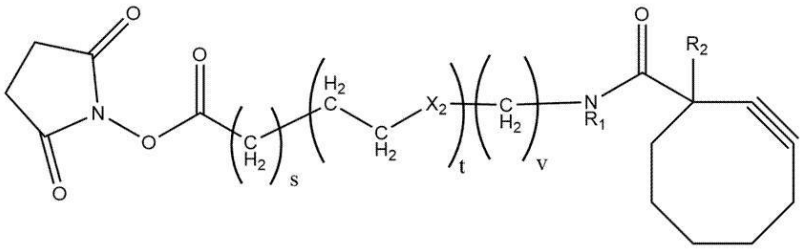
式（ＸＩＩＩｂ）

【０２７３】

８４．　式（ＸＩＶ）の化合物であって、

【０２７４】

【化４４】



式（ＸＩＶ）

【０２７５】

式中、

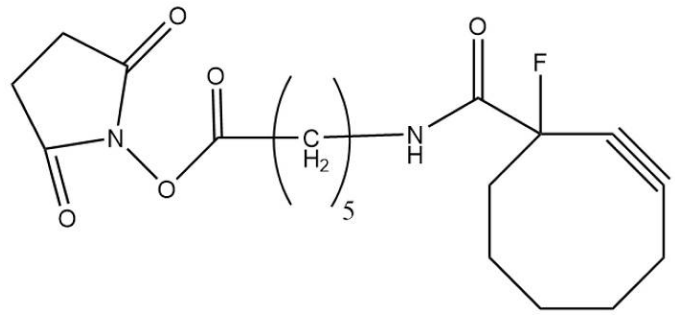
Ｒ１が、水素、メチル、及びエチルからなる群から選択され、

Ｒ２が、水素、ヒドロキシ、－ＯＣ１－３アルキル、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＣ１－３アルキル、ハロ及びニトロからなる群から選択され、

Ｘ２が、メチレン、酸素、及び硫黄からなる群から選択され、

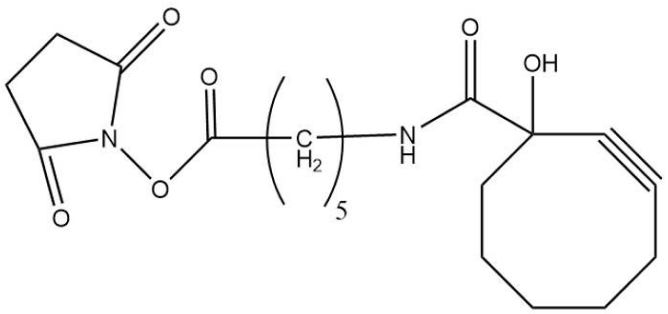
ｓ、ｔ、ｖが、独立して、０～４の整数であり、ただし、ｓ、ｔ及びｖが全て、同時に

０であることはできない、化合物。
８５．　式（ＸＩＶａ）の化合物：
【０２７６】
【化４５】



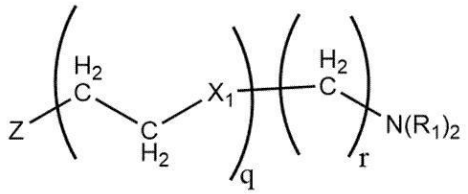
式（ＸＩＶａ）

【０２７７】
８６．　式（ＸＩＶｂ）の化合物：
【０２７８】
【化４６】



式（ＸＩＶｂ）

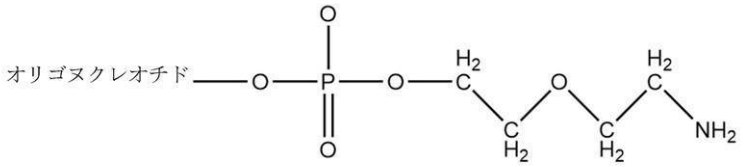
【０２７９】
８７．　式（ＸＶ）の化合物であって、
【０２８０】
【化４７】



式（ＸＶ）

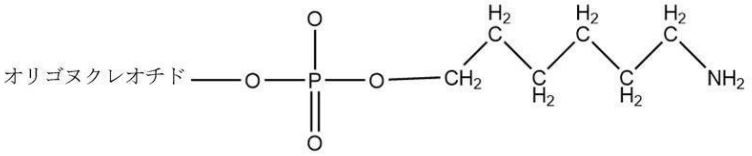
【０２８１】
式中、
Ｒ１が、各出現で独立して、水素、メチル、及びエチルからなる群から選択され、
Ｘ１が、メチレン、酸素、及び硫黄からなる群から選択され、
ｑ及びｒが、独立して、０～４の整数であり、ただし、ｑ及びｒが両方とも、同時に０であることはできず、
Ｚが、オリゴヌクレオチド部分である、化合物。
８８．　式（ＸＶａ）の化合物：

【０２８２】
【化４８】



式（ＸＶａ）

【０２８３】
８９．　式（ＸＶｂ）の化合物：
【０２８４】
【化４９】



式（ＸＶｂ）

【０２８５】
９０．　センテンス１～２９、３２～３４、３７～５６、５９～６１、及び６４～６７のうちのいずれかによる化合物、並びに／又はセンテンス３０、３１、３５、３６、５７、５８、６２、及び６３のうちのいずれかによる組成物の調製のための、センテンス７６、８１～８４、８７のうちのいずれかによる化合物の、使用。
９１．　Ｒ２＝Ｆである、センテンス１～２９、３２～３４、３７～５６、５９～６１、及び６４～６７のうちのいずれかによる化合物、並びに／又はセンテンス３０、３１、３５、３６、５７、５８、６２、及び６３のうちのいずれかによる組成物の調製のための、センテンス８５による化合物の、使用。
９２．　Ｒ２＝ＯＨである、センテンス１～２９、３２～３４、３７～５６、５９～６１、及び６４～６７のうちのいずれかによる化合物、並びに／又はセンテンス３０、３１、３５、３６、５７、５８、６２、及び６３のうちのいずれかによる組成物の調製のための、センテンス８６による化合物の、使用。
９３．　センテンス２０、２５、２７、２９、５４、５６のうちのいずれかによる化合物、及び／又はセンテンス３０、３１、５７、５８のうちのいずれかによる組成物の調製のための、センテンス７７による化合物の、使用。
９４．　センテンス２０、２５、２８、２９、５５、５６のうちのいずれかによる化合物、及び／又はセンテンス３０、３１、５７、５８のうちのいずれかによる組成物の調製のための、センテンス７８による化合物の、使用。
９５．　センテンス２１、２６、３２、３４、５９、６１のうちのいずれかによる化合物、及び／又はセンテンス３５、３６、６２、６３のうちのいずれかによる組成物の調製のための、センテンス７９による化合物の、使用。
９６．　センテンス２１、２６、３３、３４、６０、６１のうちのいずれかによる化合物、及び／又はセンテンス３５、３６、６２、６３のうちのいずれかによる組成物の調製のための、センテンス８０による化合物の、使用。
９７．　センテンス２０、２５、２７～２９、５４～５６のうちのいずれかによる化合物、及び／又はセンテンス３０、３１、５７、５８のうちのいずれかによる組成物の調製のための、センテンス８８による化合物の、使用。
９８．　センテンス２１、２６、３２～３４、５９～６１のうちのいずれかによる化合

物、及び／又はセンテンス３５、３６、６２、６３のうちのいずれかによる組成物の調製のための、センテンス８９による化合物の、使用。

９９．　センテンス６８～７５のうちのいずれかによるプロセスによって得られたか、又は得ることができる化合物又は組成物。

１００．　薬学的に許容される担体、希釈剤、又は賦形剤とともに、センテンス１～２９、３２～３４、３７～５６、５９～６１、及び６４～６７のうちのいずれかによる化合物、並びに／又はセンテンス３０、３１、３５、３６、５７、５８、６２、及び６３のうちのいずれかによる組成物から構成される、医薬組成物。

１０１．　療法における使用のための、センテンス１～２９、３２～３４、３７～５６、５９～６１、及び６４～６７のうちのいずれかによる化合物、並びに／又はセンテンス３０、３１、３５、３６、５７、５８、６２及び６３のうちのいずれかによる組成物。

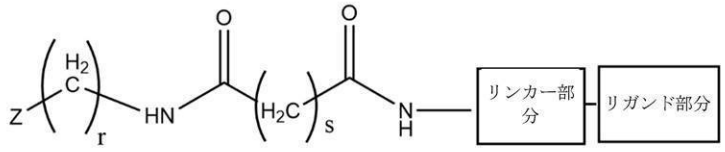
【０２８６】

別の態様では、本発明は、１～５６に番号付けされる以下の項の化合物、プロセス、組成物又は使用に適用され得る（項の任意の式への言及は、項１～５６内で定義されるそれらの式のみを指す。これらの式を図４４に再現する）。

１．　以下の構造を含む、化合物であって、

【０２８７】

【化５０】



式（Ｉ）

【０２８８】

式中、

ｒ及びｓが、独立して、１～１６から選択される整数であり、

Ｚが、オリゴヌクレオチド部分である、化合物。

２．　ｓが、４～１２から選択される整数である、項１による化合物。

３．　ｓが、６である、項２による化合物。

４．　ｒが、４～１４から選択される整数である、項１～３のうちのいずれかによる化合物。

５．　ｒが、６である、項４による化合物。

６．　ｒが、１２である、項４による化合物。

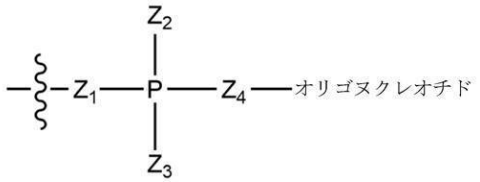
７．　項３に従属する、項５による化合物。

８．　項３に従属する、項６による化合物。

９．　Ｚが、以下であり、

【０２８９】

【化５１】



【０２９０】

式中、

Ｚ１、Ｚ２、Ｚ３、Ｚ４が、各出現で独立して、酸素又は硫黄であり、

ＰとＺ２との間、及びＰとＺ３との間の一方の結合が、単結合であり、他方は、二重結合である、項１～８のうちのいずれかによる化合物。

１０．　当該オリゴヌクレオチドが、標的遺伝子の発現を調節、好ましくは阻害することができるＲＮＡ化合物である、項１～９のうちのいずれかによる化合物。

１１．　当該ＲＮＡ化合物が、第１及び第２の鎖を含むＲＮＡ二本鎖を含み、第１の鎖が、標的遺伝子のＲＮＡ配列に少なくとも部分的に相補的であり、第２の鎖が、当該第１の鎖に少なくとも部分的に相補的であり、第１及び第２の鎖の各々が、５’及び３’末端を有する、項１０のうちのいずれかによる化合物。

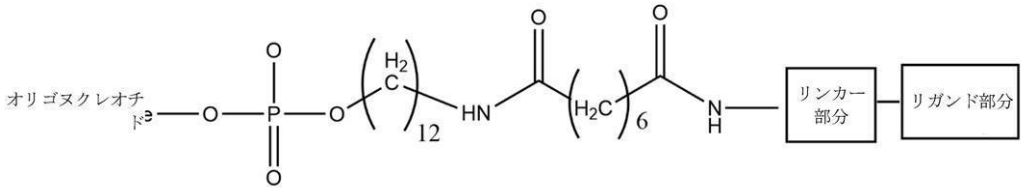
１２．　好ましくはまた、項３及び６に従属し、ＲＮＡ化合物が、その第２の鎖の５’末端で、隣接するホスフェートに結合している、項１１による化合物。

１３．　好ましくはまた、項３及び５に従属し、ＲＮＡ化合物が、その第２の鎖の３’末端で、隣接するホスフェートに結合している、項１１による化合物。

１４．　好ましくは、項１２に従属する、式（ＩＩ）の化合物：

【０２９１】

【化５２】



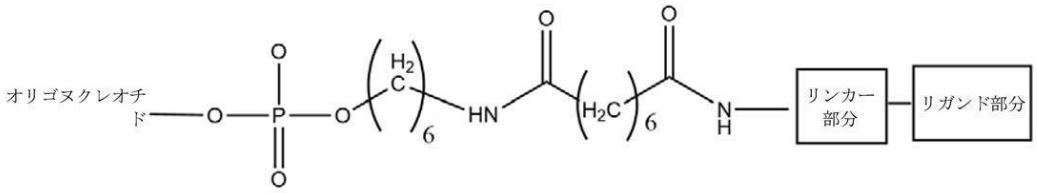
式（ＩＩ）

【０２９２】

１５．　好ましくは、項１３に従属する、式（ＩＩＩ）の化合物：

【０２９３】

【化５３】



式（ＩＩＩ）

【０２９４】

１６．　オリゴヌクレオチドが、２’位で修飾された１つ以上のリボース、好ましくは、２’位で修飾された複数のリボースを更に含むＲＮＡ二本鎖を含む、項１～１５のうちのいずれかによる化合物。

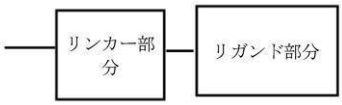
１７．　修飾が、２’－Ｏ－メチル、２’－デオキシ－フルオロ、及び２’－デオキシから選択される、項１６による化合物。

１８．　オリゴヌクレオチドが、１つ以上の末端に１つ以上の分解保護部分を更に含む、項１～１７のうちのいずれかによる化合物。

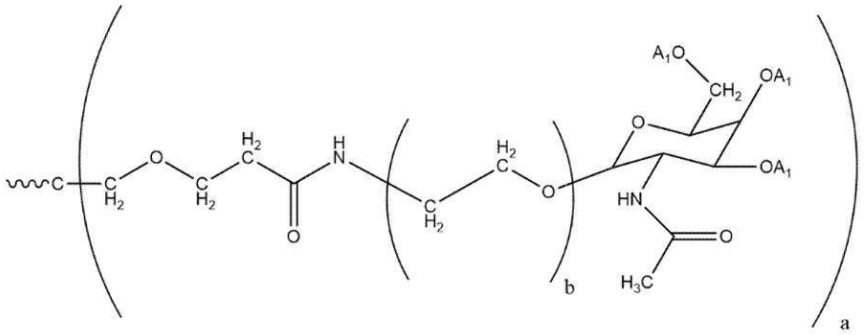
１９．　当該１つ以上の分解保護部分が、リンカー／リガンド部分を担持するオリゴヌクレオチド鎖の末端に存在せず、かつ／又は当該１つ以上の分解保護部分が、ホスホロチオエートヌクレオチド間連結、ホスホロジチオエートヌクレオチド間連結、及び逆脱塩基ヌクレオチドから選択され、当該逆脱塩基ヌクレオチドが、リンカー／リガンド部分を担持する末端に対して、同じ鎖の遠方の末端に存在する、項１８による化合物。

２０．　項１の式（Ｉ）に示される当該リガンド部分が、１つ以上のリガンドを含む、項１～１９のうちのいずれかによる化合物。

２１．　項１の式（Ｉ）に示される当該リガンド部分が、１つ以上の炭水化物のリガンドを含む、項２０による化合物。
２２．　当該１つ以上の炭水化物が、単糖、二糖、三糖、四糖、オリゴ糖、又は多糖であり得る、項２１による化合物。
２３．　当該１つ以上の炭水化物が、１つ以上のガラクトース部分、１つ以上のラクトース部分、１つ以上のＮ－アセチルガラクトサミン部分、及び／又は１つ以上のマンノース部分を含む、項２２による化合物。
２４．　当該１つ以上の炭水化物が、１つ以上のＮ－アセチル－ガラクトサミン部分を含む、項２３による化合物。
２５．　２又は３個のＮ－アセチルガラクトサミン部分を含む、項２４による化合物。
２６．　当該１つ以上のリガンドが、で、線形構成又は分岐構成で結合している、先行項のうちのいずれかによる化合物。
２７．　当該１つ以上のリガンドが、二分岐又は三分岐の分岐構成として結合している、項２６による化合物。
２８．　項１の式（Ｉ）に示される当該部分：
【０２９５】
【化５４】



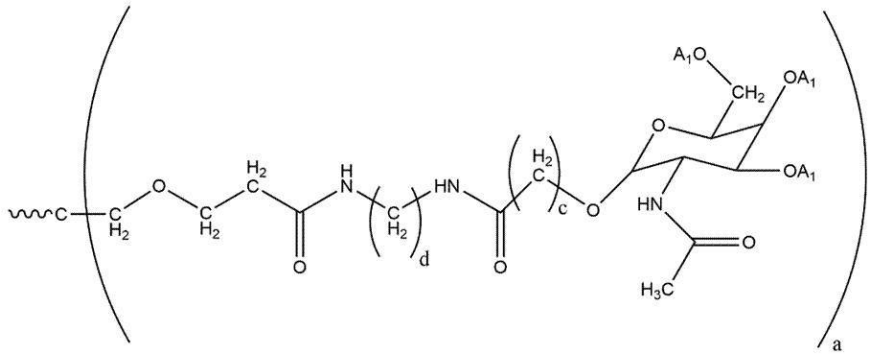
【０２９６】
が、式（ＩＶ）、（Ｖ）、又は（ＶＩ）：
【０２９７】
【化５５】



式（ＩＶ）

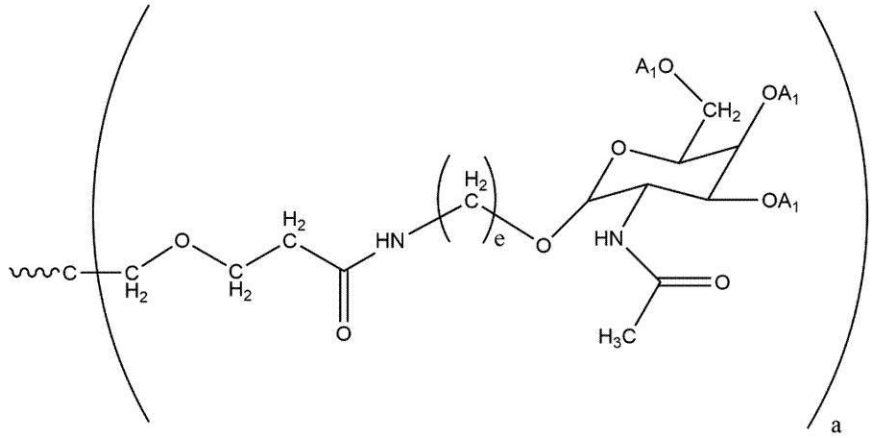
【０２９８】
（式中、
ＡＩが、水素、又は好適なヒドロキシ保護基であり、
ａが、２又は３の整数であり、
ｂが、２～５の整数である）、又は
【０２９９】

【化５６】



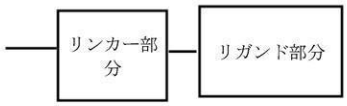
式（Ｖ）

【０３００】
（式中、
ＡＩが、水素、又は好適なヒドロキシ保護基であり、
ａが、２又は３の整数であり、
ｃ及びｄが、独立して、１～６の整数である）、又は
【０３０１】
【化５７】



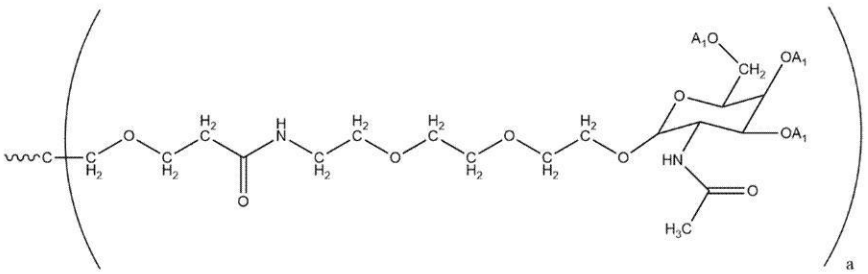
式（ＶＩ）

【０３０２】
（式中、
ＡＩが、水素、又は好適なヒドロキシ保護基であり、
ａが、２又は３の整数であり、
ｅが、２～１０の整数である）のうちのいずれか、好ましくは式（ＩＶ）である、項２０～２７による化合物。
２９．　項１の式（Ｉ）に示される当該部分：
【０３０３】
【化５８】



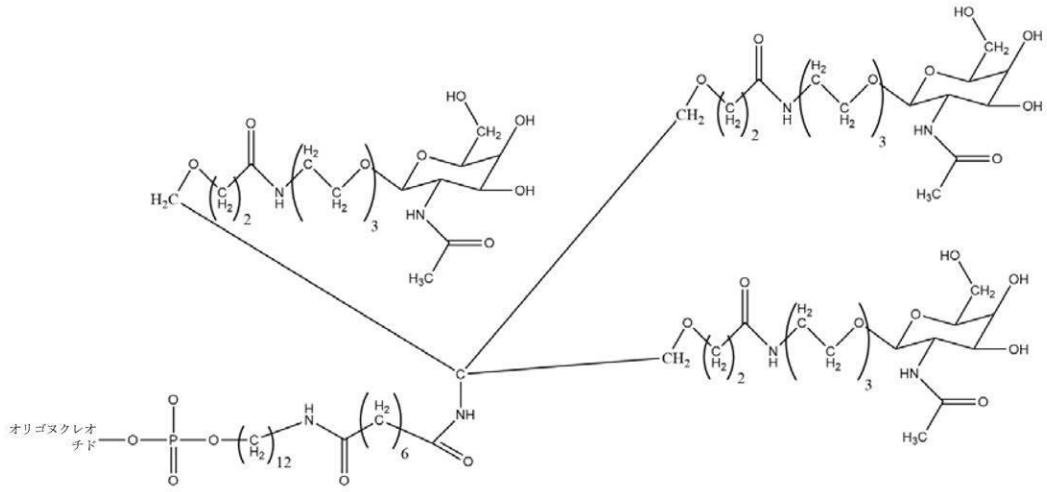
【０３０４】
が、式（ＶＩＩ）であり、
【０３０５】

【化５９】



式（ＶＩＩ）

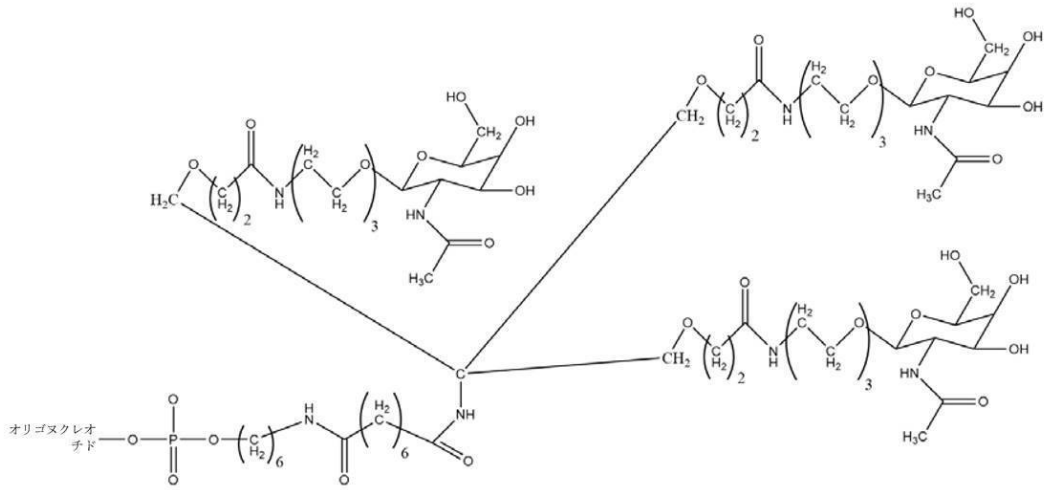
【０３０６】
式中、
ＡＩが、水素であり、
ａが、２又は３の整数である、項１～２８のうちのいずれかによる化合物。
３０．　ａ＝２である、項２８又は２９による化合物。
３１．　ａ＝３である、項２８又は２９による化合物。
３２．　ｂ＝３である、項２８による化合物。
３３．　式（ＶＩＩＩ）の化合物：
【０３０７】
【化６０】



式（ＶＩＩＩ）

【０３０８】
３４．　式（ＩＸ）の化合物：
【０３０９】

【化６１】



式（ＩＸ）

【０３１０】

３５．　オリゴヌクレオチドが、２’位で修飾された１つ以上のリボース、好ましくは２’位で修飾された複数のリボースを更に含むＲＮＡ二本鎖を含む、項３３又は３４のによる化合物。

３６．　修飾が、２’－Ｏ－メチル、２’－デオキシ－フルオロ、及び２’－デオキシから選択される、項３５による化合物。

３７．　オリゴヌクレオチドが、１つ以上の末端に１つ以上の分解保護部分を更に含む、項３３～３６のうちのいずれかによる化合物。

３８．　当該１つ以上の分解保護部分が、リンカー／リガンド部分を担持するオリゴヌクレオチド鎖の末端に存在せず、かつ／又は当該１つ以上の分解保護部分が、ホスホロチオエートヌクレオチド間連結、ホスホロジチオエートヌクレオチド間連結、及び逆脱塩基ヌクレオチドから選択され、当該逆脱塩基ヌクレオチドが、リンカー／リガンド部分を担持する末端に対して、同じ鎖の遠方の末端に存在する、項３７による化合物。

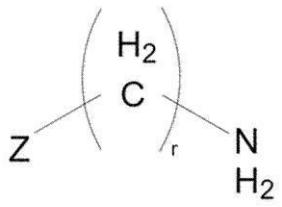
３９．　オリゴヌクレオチドが、第１及び第２の鎖を含むＲＮＡ二本鎖を含み、第１の鎖が、標的遺伝子のＲＮＡ配列に少なくとも部分的に相補的であり、第２の鎖が、当該第１の鎖に少なくとも部分的に相補的であり、第１及び第２の鎖の各々が、５’及び３’末端を有し、当該ＲＮＡ二本鎖が、その第２の鎖の５’末端で、隣接するホスフェートに結合している、項３３による化合物。

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

４１．　式（Ｘ）及び（ＸＩ）の化合物を反応させることであって、

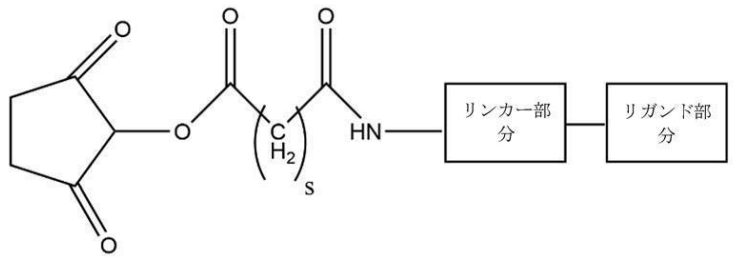
【０３１１】

【化６２】



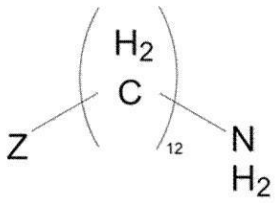
式（Ｘ）

【０３１２】
【化６３】



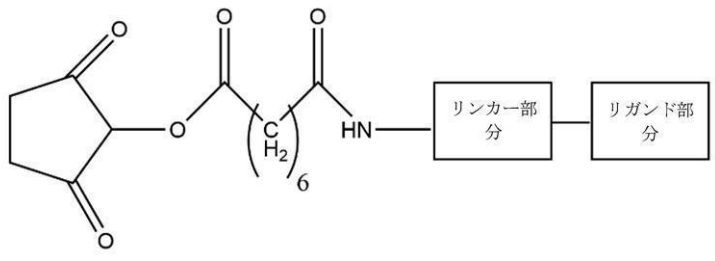
式（ＸＩ）

【０３１３】
式中、
ｒ及びｓが、独立して、１～１６から選択される整数であり、
Ｚが、オリゴヌクレオチド部分である、反応させることと、
必要に応じて、オリゴヌクレオチドのリガンドの脱保護及び／若しくは第２の鎖のアニーリングを実施することと、を含む、項１～４０のうちのいずれかによる化合物を調製する、プロセス。
４２．
式（Ｘ）の化合物は式（Ｘａ）であり、
【０３１４】
【化６４】



式（Ｘａ）

【０３１５】
式（ＸＩ）の化合物が、式（ＸＩａ）であり、
【０３１６】
【化６５】



式（ＸＩａ）

【０３１７】
オリゴヌクレオチドが、第１及び第２の鎖を含むＲＮＡ二本鎖を含み、第１の鎖が、標的遺伝子のＲＮＡ配列に少なくとも部分的に相補的であり、第２の鎖が、当該第１の鎖に少なくとも部分的に相補的であり、第１及び第２の鎖の各々が、５’及び３’末端を有し、当該ＲＮＡ二本鎖が、その第２の鎖の５’末端で、隣接するホスフェートに結合している

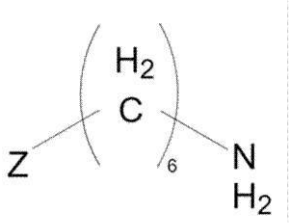
、項６、８～１４、１６～３３、及び３５～４０のうちのいずれかによる化合物を調製するための、項４１によるプロセス。

４３．

式（Ｘ）の化合物が、式（Ｘｂ）であり、

【０３１８】

【化６６】



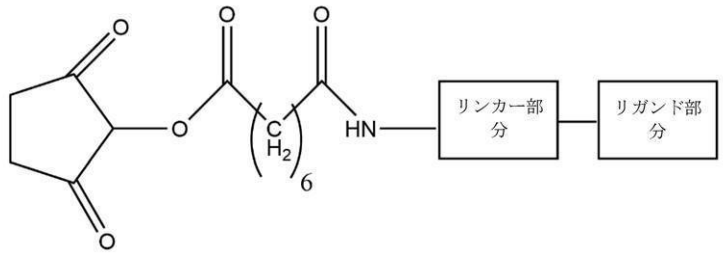
式（Ｘｂ）

【０３１９】

式（ＸＩ）の化合物が、式（ＸＩａ）であり、

【０３２０】

【化６７】



式（ＸＩａ）

【０３２１】

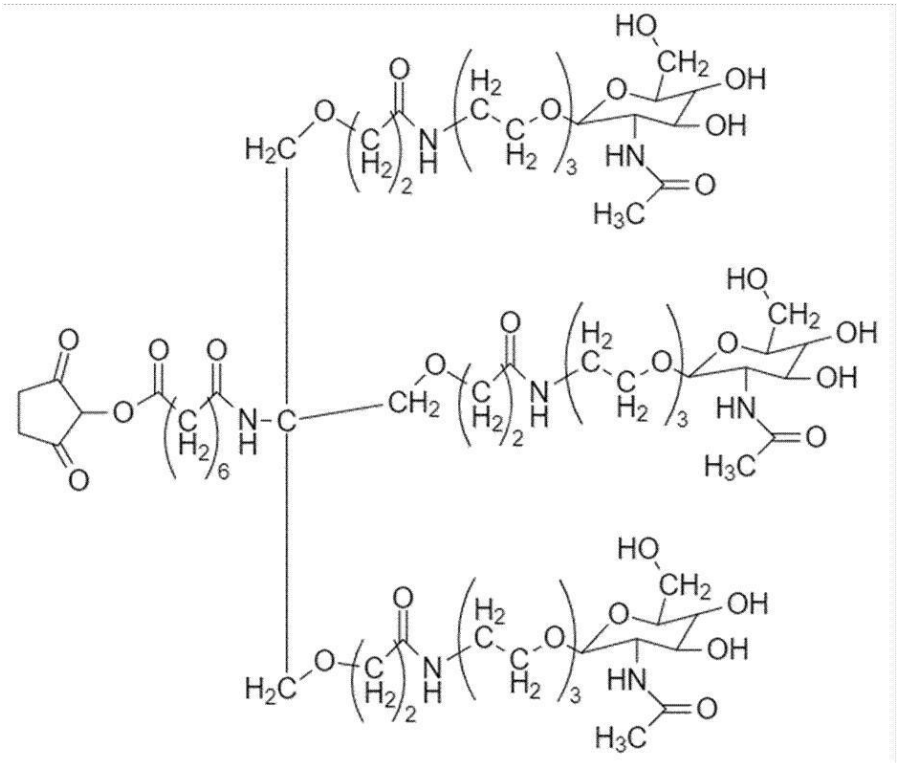
オリゴヌクレオチドが、第１及び第２の鎖を含むＲＮＡ二本鎖を含み、第１の鎖が、標的遺伝子のＲＮＡ配列に少なくとも部分的に相補的であり、第２の鎖が、当該第１の鎖に少なくとも部分的に相補的であり、第１及び第２の鎖の各々が、５’及び３’末端を有し、当該ＲＮＡ二本鎖が、その第２の鎖の３’末端で、隣接するホスフェートに結合している、項５、７、９～１３、１５～３２、及び３４～４０のうちのいずれかによる化合物を調製するための、項４１によるプロセス。

４４．

式（ＸＩａ）の化合物が、式（ＸＩｂ）である、項４２又は４３によるプロセス：

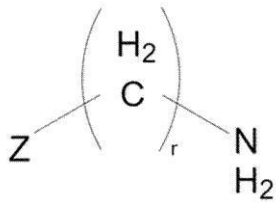
【０３２２】

【化６８】



式（ＸＩｂ）

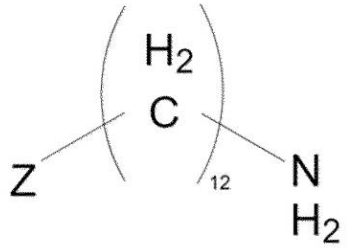
【０３２３】
４５．　式（Ｘ）の化合物であって、
【０３２４】
【化６９】



式（Ｘ）

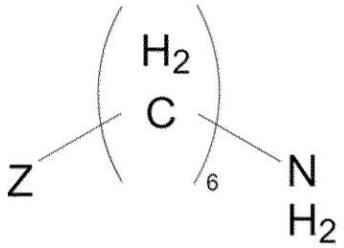
【０３２５】
式中、
ｒが、独立して、１～１６から選択される整数であり、
Ｚが、オリゴヌクレオチド部分である、化合物。
４６．　式（Ｘａ）の化合物：
【０３２６】

【化７０】



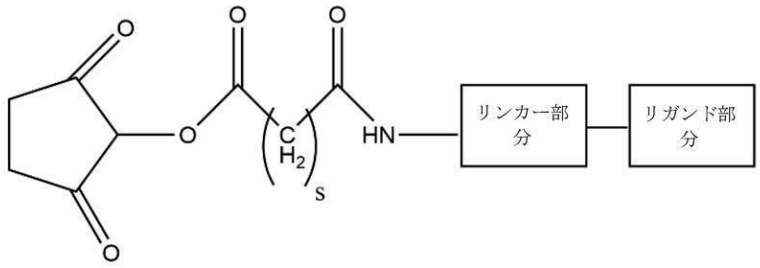
式（Ｘａ）

【０３２７】
４７．　式（Ｘｂ）の化合物：
【０３２８】
【化７１】



式（Ｘｂ）

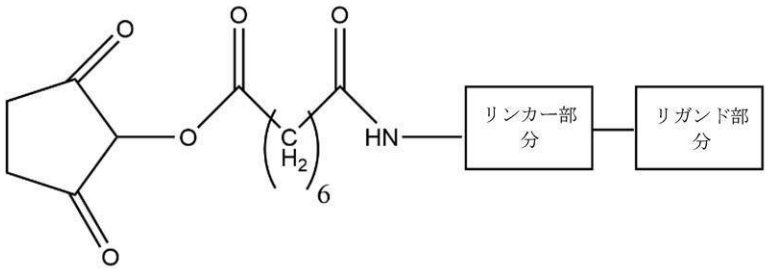
【０３２９】
４８．　式（ＸＩ）の化合物であって、
【０３３０】
【化７２】



式（ＸＩ）

【０３３１】
式中、
ｓが、独立して、１～１６から選択される整数であり、
Ｚが、オリゴヌクレオチド部分である、化合物。
４９．　式（ＸＩａ）の化合物：
【０３３２】

【化７３】



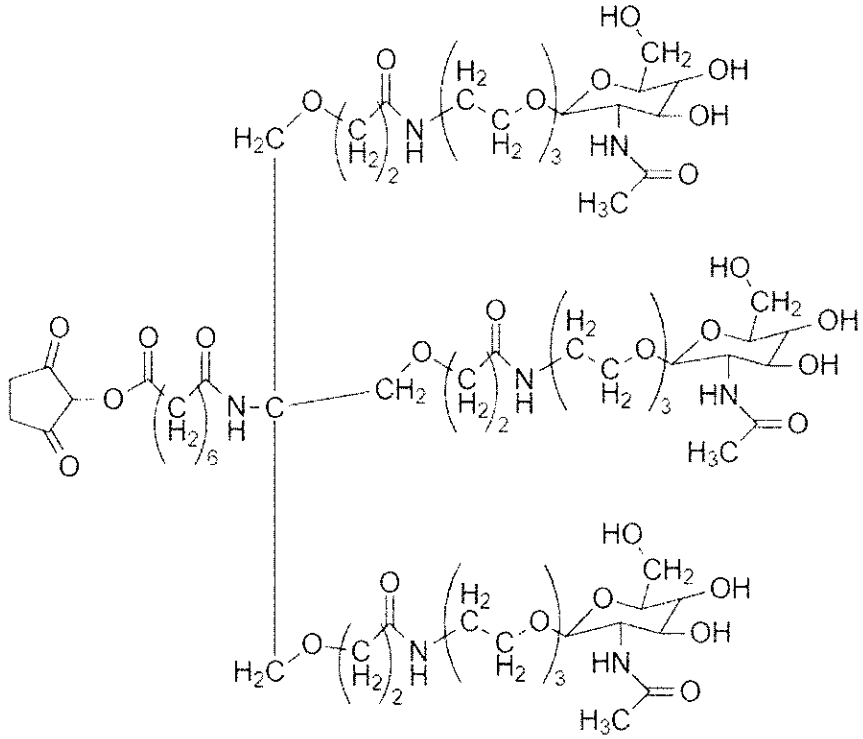
式（ＸＩａ）

【０３３３】

５０．　式（ＸＩｂ）の化合物：

【０３３４】

【化７４】



式（ＸＩｂ）

【０３３５】

５１．　項１～４０のうちのいずれかによる化合物の調製のための、項４５及び４８～５０のうちのいずれかによる化合物の、使用。

５２．　項６、８～１４、１６～３３、及び３５～４０のうちのいずれかによる化合物の調製のための、項４６による化合物の、使用。

５３．　項５、７、９～１３、１５～３２、及び３４～４０のうちのいずれかによる化合物の調製のための、項４７による化合物の、使用。

５４．　項４１～４４のうちのいずれかによるプロセスによって得られたか、又は得ることができる化合物又は組成物。

５５．　薬学的に許容される担体、希釈剤、又は賦形剤とともに、項１～４０のうちのいずれかによる化合物から構成される医薬組成物。

５６．　療法における使用のための、項１～４０のうちのいずれかによる化合物。

［実施例］

【０３３６】

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

【０３３７】

以下の構造が、実施例において使用されている：

【０３３８】

【表１－１】

表 1:

標的	ID	センス配列 5’→3’	アンチセンス配列 5’→3’
hsHAO 1	ETX005	(invabasic)gsascuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(NHC6)(MFCO)(ET-GalNAc-T1N3)	usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaagucscsa
hsHAO 1	ETX001	(ET-GalNAc-T1N3)(MFCO)(NH-DEG)gacuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(invabasic)(invabasic)	usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaagucscsa
hsC5	ETX014	(invabasic)asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfaua(NHC6)(MFCO)(ET-GalNAc-T1N3)	usAfsUfuAfuaAfaAfauaUfcUfuGfcuususudT dT
hsC5	ETX010	(ET-GalNAc-T1N3)(MFCO)(NH-DEG)aaGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfasusa(invabasic)(invabasic)	usAfsUfuAfuaAfaAfauaUfcUfuGfcuususudT dT
hsTTR	ETX019	(ET-GalNAc-T1N3)(MFCO)(NH-DEG)uggguuUfuCfAfUfguaaccaasgsa(invabasic)(invabasic)	usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc

【０３３９】
【表１－２】

hsTTR	ETX023	(invabasic)usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga(NHC6)(MFCO)(ET-GalNAc-T1N3)	usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc

表１において、以下の命名(ET-GalNAc-T1N3)、(MFCO)、及び(NH-DEG)を有する括弧内の構成要素は、リンカーの要素の記述子であり、完全な対応するリンカー構造を本明細書の図３０及び図３１に示す。実際のリンカー構造に対するこの略語の対応は、本明細書における上記の略語の他の全ての言及に同様に適用される。
(invabasic)(invabasic)への言及は　(i)脱塩基性であり、(ii)逆配置で、それによって、末端から２番目のヌクレオチドと末端から３番目のヌクレオチドとの間の結合が、逆連結、すなわち、5-5 又は 3-3 連結のいずれかである糖部分を有する、末端の２ヌクレオチドである、ポリヌクレオチド全体におけるヌクレオチドを指す。繰り返しになるが、これは、本明細書における(invabasic)(invabasic)への他の全ての言及に同様に適用される。

【０３４０】

【表１Ａ－１】

表 1A

標的	**ID**	短い記述子	リンカープラスリガンド 表 1 の SiRNA
hsHAO1	ETX005	3'-GalNAc　T1a 逆脱塩基	図 30 のリンカー＋リガンド

【０３４１】

【表１Ａ－２】

hsHAO1	ETX001	5'-GalNAc　T1b 逆脱塩基	図 31 のリンカー＋リガンド
hsC5	ETX014	3'-GalNAc　T1a 逆脱塩基	図 30 のリンカー＋リガンド
hsC5	ETX010	5'-GalNAc　T1b 逆脱塩基	図 31 のリンカー＋リガンド
hsTTR	ETX019	5'-GalNAc　T1b 逆脱塩基	図 31 のリンカー＋リガンド
hsTTR	ETX023	3'-GalNAc　T1a 逆脱塩基	図 30 のリンカー＋リガンド

また、図 30／図 31 を参照して本明細書に既に説明したように、本発明による製品 ETX001、ETX005、ETX010、ETX014、ETX019、ETX023 のうちのいずれかに存在し得る図 30／図 31 に示されるリンカー部分に対して適切である場合、これらの生成物は、本明細書にも示されるように、オリゴヌクレオチド部分に結合した図 30／図 31 に具体的に示されるリンカー及びリガンド部分に基づく分子を含み得るが、これらの生成物は、代替的に、リンカー及びリガンド部分が、本質的に、図 30／図 31 に示されるようにオリゴヌクレオチド部分に結合しているが、ＯＨ置換基などの加水分解置換の結果として生じる置換基によって置換されたシクロオクチル環上の図 30／図 31 に示されるＦ置換基を有する分子を更に含み得るか、又は本質的にそれらからなり得ることも理解される必要がある。このようにして、(a)これらの生成物は、シクロオクチル環上にＦ置換基を有する、図 30／図 31 に具体的に示されるようなリンカー及びリガンド部分を有する分子から本質的になり得るか、又は(b)これらの生成物は、図 30／図 31 に示されるように本質的にリンカー及びリガンド部分を有するが、ＯＨ置換基などの加水分解置換の結果として生じる置換基によって置換されたシクロオクチル環上の図 30／図 31 に示されるＦ置換基を有する分子から本質的になり得るか、又は(c)これらの生成物は、(a)若しくは(b)で定義される分子の混合物を含み得る。

【０３４２】

以下の対照構造もまた、実施例において使用される：

【０３４３】

【表２－１】

表 2:

標的	ID	センス配列 5’→3’	アンチセンス配列 5’→3’
F-Luc	XD-00914	cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT	UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT
hsFVII	XD-03999	AGAuAuGcAcAcAcAcGGAdTsdT	UCCGUGUGUGUGcAuAUCUdTsdT
hsAHSA1	XD-15421	uscsUfcGfuGfgCfcUfuAfaUfgAfaAf(invdT)	UfsUfsuCfaUfuAfaGfgCfcAfcGfaGfasusu

略語：

AHSA1　　熱ショックタンパク質 ATP アーゼ 1 の活性化因子

【０３４４】

【表２－２】

ASGR1	アシアロ糖タンパク質受容体１
ASO	アンチセンスオリゴヌクレオチド
bDNA	分岐 DNA
bp	塩基対
C5	補体 C5
conc.	濃度
ctrl.	対照
CV	変動係数
dG, dC, dA, dT	ＤＮＡ残基
F	フルオロ
FCS	ウシ胎仔血清
GalNAc	Ｎ－アセチルガラクトサミン
GAPDH	グリセルアルデヒド３-リン酸デヒドロゲナーゼ
G, C, A, U	RNA 残基
g, c, a, u	2'-O-メチル修飾残基
Gf, Cf, Af, Uf	2'-フルオロ修飾残基
h	時間
HAO1	ヒドロキシ酸オキシダーゼ１
HPLC	高性能液体クロマトグラフィー
Hs	Ｈｏｍｏ　ｓａｐｉｅｎｓ
IC50	応答が５０％低減した阻害剤の濃度

【０３４５】

【表２－３】

ID	識別子
KD	ノックダウン
LF2000	Lipofectamine2000
M	モル濃度
Mf	カニクイザル
min	分
MV	平均値
n.a.又はN/A	該当なし
NEAA	非必須アミノ酸
nt QC	ヌクレオチド品質管理
QG2.0	QuantiGene2.0
RLU	相対光単位
RNAi	ＲＮＡ干渉
RT	室温
s	ホスホロチオエート骨格
SAR	構造活性相関
SD	標準偏差
siRNA	低分子干渉ＲＮＡ
TTR	トランスサイレチン

【０３４６】

実施例１

－概要

ｈｓＨＡＯ１、ｈｓＣ５、又はｈｓＴＴＲ　ｍＲＮＡのいずれかを標的とするＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡを合成し、品質管理した。ｓｉＲＮＡのセット全体（ＨＡＯ１を標的とするｓｉＲＮＡを除く）を、最初に、ＲＮＡｉＭＡＸを使用したトランスフェクションによって、ＨｅｐＧ２細胞における用量応答設定において研究し、続いて、初代ヒト肝細胞におけるジムノシスな（ｇｙｍｎｏｔｉｃ）自由取り込み設定において用量応答分析を行った。

【０３４７】

ｈｓＨＡＯ１、ｈｓＣ５又はｈｓＴＴＲ　ｍＲＮＡを標的とするＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡでの初代ヒト肝細胞の直接インキュベーションは、様々な程度に用量依存的なオンターゲットｍＲＮＡサイレンシングをもたらした。

【０３４８】

研究の目的

この一連の実験の目的は、３つの異なるオンターゲット、すなわち、ｈｓＨＡＯ１、ｈｓＣ５又はｈｓＴＴＲ　ｍＲＮＡを標的とするｓｉＲＮＡの状況において、異なるＧａｌＮＡｃリガンドのインビトロ活性を分析することであった。

【０３４９】

この研究のワークパッケージには、（ｉ）ありとあらゆる目的の個々のオンターゲットに特異的なｂＤＮＡプローブセットを設計、合成、及び試験するためのアッセイ開発、（ｉｉ）その後のスクリーニング実験に好適な細胞株の特定、（ｉｉｉ）１つ以上のヒトがん細胞株における潜在的に全ての（トランスフェクションによる）ｓｉＲＮＡの用量応答分析、並びに（ｉｖ）ジムノシスな自由取り込み設定における初代ヒト肝細胞におけるｓｉＲＮＡの用量応答分析が含まれた。両方の設定において、ＩＣ５０値及び最大阻害値が計算され、続いて、それらの効力に従ってｓｉＲＮＡ研究セットのランキング化がされる必要がある。

【０３５０】

材料及び方法

オリゴヌクレオチド合成

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

【０３５１】

細胞培養及びインビトロトランスフェクション実験

細胞培養、トランスフェクション、及びＱｕａｎｔｉＧｅｎｅ２．０分岐ＤＮＡアッセイを以下に記載し、ｓｉＲＮＡ配列を表１及び２に列挙する。ＨｅｐＧ２細胞を、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｉｓｓｕｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）（ＨＢ－８０６５、ロット番号：６３１７６２９４）から供給してもらい、１０％のウシ胎仔血清（ＦＣＳ）を含有するように補充したＡＴＣＣ配合イーグル最小必須培地で培養した。初代ヒト肝細胞（ＰＨＨ）を、Ｐｒｉｍａｃｙｔ（Ｓｃｈｗｅｒｉｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）から調達した（ロット番号：ＣｙＨｕｆ１９００９ＨＥｃ）。細胞は、摘出技術によって悪性膠芽腫腫瘍に由来する。この研究で使用された全ての細胞を、加湿インキュベーター内、５％ＣＯ２の雰囲気中、３７℃で培養した。

【０３５２】

ｈｓＣ５又はｈｓＴＴＲ標的化ｓｉＲＮＡ（及び対照）でのＨｅｐＧ２細胞のトランスフェクションのために、細胞を通常の９６ウェル組織培養プレートに２０．０００細胞／ウェルの密度で播種した。ｓｉＲＮＡでの細胞のトランスフェクションを、製造業者の指示に従い、市販のトランスフェクション試薬ＲＮＡｉＭＡＸ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ／Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して行った。ＨｅｐＧ２細胞において、それぞれ２４、６、１．５、０．４、０．１、０．０３、０．００８、０．００２、０．０００５、及び０．０００１ｎＭの最終ｓｉＲＮＡ濃度で、２０個の候補（１１×ｈｓＣ５、９×ｈｓＴＴＲ）の１０点用量応答実験を行った。

【０３５３】

ＰＨＨ中の用量応答分析は、１．５μＭの最高の最終ｓｉＲＮＡ濃度から始まり、５００ｎＭに続き、そこから２倍希釈ステップで連続的に減少する、ジムノシスな自由取り込み設定における細胞の直接インキュベーションによって行われた。

【０３５４】

対照ウェルをＨｅｐＧ２細胞にトランスフェクションしたか、又は対応するプレート上で研究された最高の試験ｓｉＲＮＡ濃度で初代ヒト肝細胞と直接インキュベーションした。細胞の模擬処理の次の異なるプロジェクトフェーズに含まれる全ての対照ｓｉＲＮＡを要約し、表２に列挙する。各ｓｉＲＮＡ及び対照について、少なくとも４つのウェルを並行してトランスフェクション／直接インキュベーションし、各ウェルから個々のデータポイントを収集した。

【０３５５】

トランスフェクション後、ｓｉＲＮＡとのインキュベーションの２４時間後、培地を除去し、ＨｅｐＧ２細胞を溶解混合物（１体積の溶解緩衝液＋２体積のヌクレアーゼフリー水）中で溶解し、次いで、５３℃で少なくとも４５分間インキュベーションした。ＰＨＨの場合、播種培地を、細胞の処理の５時間後に除去し、続いて、ウェル当たり５０μｌの完全維持培地を添加した。最大で合計７２時間のインキュベーション期間まで、培地を、

そのようにして２４時間ごとに交換した。４時間又は７２時間のいずれかの時点で、細胞培養上清を除去し、続いて、１：１０００ｖ／ｖのプロテイナーゼＫを補充した２００μｌの溶解混合物を添加した。

【０３５６】

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

【０３５７】

アッセイ開発

ＱｕａｎｔｉＧｅｎｅ２．０分岐ＤＮＡ（ｂＤＮＡ）プローブセットを、Ｈｏｍｏ　ｓａｐｉｅｎｓ　ＧＡＰＤＨ、ＡＨＳＡ１、ｈｓＨＡＯ１、ｈｓＣ５、及びｈｓＴＴＲに特異的に設計及び合成した。最初にｂＤＮＡプローブセットを、製造業者の指示に従ってｂＤＮＡ分析によって試験し、初代ヒト肝細胞の次に以下のヒト及びサルがん細胞株の２つの異なる溶解物量、すなわち１０μｌ及び５０μｌにおける目的のｍＲＮＡのレベルを評価した。ＳＪＳＡ－１、ＴＦ１、ＮＣＩ－Ｈ１６５０、Ｙ－７９、Ｋａｓｕｍｉ－１、ＥＡｈｙ９２６、Ｃａｋｉ－１、Ｃｏｌｏ２０５、ＲＰＴＥＣ、Ａ２５３、ＨｅＬａＳ３、Ｈｅｐ３Ｂ、ＢｘＰＣ３、ＤＵ１４５、ＴＨＰ－１、ＮＣＩ－Ｈ４６０、ＩＧＲ３７、ＬＳ１７４Ｔ、Ｂｅ（２）－Ｃ、ＳＷ１５７３、ＮＣＩ－Ｈ３５８、ＴＣ７１、２２Ｒｖ１、ＢＴ４７４、ＨｅＬａ、ＫＢｗｔ、Ｐａｎｃ－１、Ｕ８７ＭＧ、Ａ１７２、Ｃ４２、ＨｅｐＧ２、ＬＮＣａＰ、ＰＣ３、ＳｕｐＴ１１、Ａ５４９、ＨＣＴ１１６、ＨｕＨ７、ＭＣＦ７、ＳＨ－ＳＹ５Ｙ、ＨＵＶＥＣ、Ｃ３３Ａ、ＨＥＫ２９３、ＨＴ２９、ＭＯＬＭ１３、及びＳＫ－ＭＥＬ－２。細胞溶解物を添加しないｂＤＮＡプローブセットのみを含有するウェルを使用して、技術的バックグランド及びノイズ信号を監視した。

【０３５８】

結果

ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡのスクリーニングのための好適な細胞型の特定

図１～図３は、多様なセットのヒトがん細胞株プラス初代ヒト肝細胞の溶解物における、３つの目的のオンターゲット、すなわち、ｈｓＣ５、ｈｓＨＡＯ１、及びｈｓＴＴＲのｍＲＮＡ発現データを示す。溶解物体積当たりの細胞数は、試験された各細胞株と同一であり、これは、異なる細胞型間の発現レベルの比較を可能にするために必要である。図１は、試験された全ての細胞型のｈｓＣ５　ｍＲＮＡ発現データを示す。

【０３５９】

同一の型の細胞も、ｈｓＨＡＯ１　ｍＲＮＡの発現についてスクリーニングし、結果を図２の一部として棒グラフに示す。

【０３６０】

最後に、ｈｓＴＴＲを標的とするＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡのスクリーニングを可能にする好適な細胞型を特定し、それぞれのデータは、図３の一部である。

【０３６１】

要約すると、３つの目的のオンターゲット全てのｍＲＮＡ発現レベルは、初代ヒト肝細胞（ＰＨＨ）において十分に高い。更に、ＨｅｐＧ２細胞を使用して、ｈｓＣ５及びｈｓＴＴＲ　ｍＲＮＡを標的とするＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡをスクリーニングすることができ、対照的に、ｈｓＨＡＯ１　ｍＲＮＡに特異的なｓｉＲＮＡを試験するのに好適であろうがん細胞株は特定されなかった。

【０３６２】

ＨｅｐＧ２細胞におけるｈｓＴＴＲ標的化ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡの用量応答分析

トランスフェクション最適化後、ＲＮＡｉＭＡＸを使用した用量応答設定において、ｈｓＴＴＲ標的化ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡのセット全体（表１を参照）でＨｅｐＧ２細胞をトランスフェクションした。最高の最終ｓｉＲＮＡ試験濃度は、２４ｎＭで、９回の４倍希釈ステップで減少させた。実験は、ＨｅｐＧ２細胞のトランスフェクションの４時間及び２４時間後に終了した。表３は、研究された全てのｈｓＴＴＲ標的化ＧａｌＮＡＣ－ｓｉＲＮＡの活性データを列挙する。

【０３６３】

表３： ＨｅｐＧ２細胞におけるｈｓＴＴＲ標的化ｓｉＲＮＡの標的、インキュベーション時間、外部ＩＤ、ＩＣ２０／ＩＣ５０／ＩＣ８０値、及び最大阻害。列挙は、外部ＩＤに従って整理され、４時間のインキュベーションが上部に列挙され、２４時間のインキュベーションが下部に列挙される。

【０３６４】

【表３】

標的	インキュベーション［時間］	外部 ID	IC20[nM]	IC50[nM]	IC80[nM]	最大阻害[%]
hsTTR	4	ETX019	0,206	3,769	該当なし	58,4
hsTTR	4	ETX023	1,338	該当なし	該当なし	45,9
hsTTR	24	ETX019	0,002	0,016	0,143	96,0
hsTTR	24	ETX023	0,005	0,019	0,081	96,2

【０３６５】

２４時間のインキュベーションの結果をまた、図４Ａ～Ｂにも示す。

【０３６６】

概して、ｈｓＴＴＲ標的化ｓｉＲＮＡでのＨｅｐＧ２細胞のトランスフェクションは、概して、０％サイレンシングから最大阻害までの全活性範囲にわたるオンターゲットｍＲＮＡサイレンシングをもたらす。トランスフェクションの２４時間後に生成されたデータは、トランスフェクションの４時間後にのみ生成されたデータと比較して、より堅牢であり、標準の変動が低い。更に、オンターゲットノックダウンの程度は、概して、インキュベーションの４時間から最大で２４時間まで時間とともに増加する。ｈｓＴＴＲ ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡは、低い２桁のｐＭ範囲におけるＩＣ５０値でオンターゲットｍＲＮＡを９５％超サイレンシングさせることが特定されている。

【０３６７】

ＨｅｐＧ２細胞におけるｈｓＣ５標的化ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡの用量応答分析

ｈｓＴＴＲ ｓｉＲＮＡと同一のリンガー／位置／ＧａｌＮＡｃリガンドバリエーションを共有するが、オンターゲットｈｓＣ５ ｍＲＮＡに特異的な配列であるＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡを用いた、ＲＮＡｉＭＡＸを使用したＨｅｐＧ２細胞のトランスフェクションによって、第２の目的の標的であるｈｓＣ５ ｍＲＮＡを、同一の用量応答設定（しかしながら、最小限の種々の最終ｓｉＲＮＡ試験濃度で）において試験した。

【０３６８】

表４： ＨｅｐＧ２細胞におけるｈｓＣ５標的化ｓｉＲＮＡの標的、インキュベーション時間、外部ＩＤ、ＩＣ２０／ＩＣ５０／ＩＣ８０値、及び最大阻害。列挙は、外部ＩＤに従って整理され、４時間のインキュベーションが上部に列挙され、２４時間のインキュベーションが下部に列挙される。

【０３６９】

【表４】

標的	インキュベーション［時間］	外部 ID	IC20[nM]	IC50[nM]	IC80[nM]	最大阻害[%]
C5	4	ETX010	0,125	0,445	該当なし	71,1
C5	4	ETX014	0,595	2,554	該当なし	52,7
C5	24	ETX010	0,003	0,011	0,064	88,3
C5	24	ETX014	0,003	0,014	0,130	88,3

【０３７０】
２４時間のインキュベーションの結果をまた、図５Ａ～Ｂにも示す。
【０３７１】
ｈｓＣ５に特異的なＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡセットでのＨｅｐＧ２細胞のトランスフェクションでは、用量依存的なオンターゲットｈｓＣ５　ｍＲＮＡサイレンシングが存在する。いくつかのノックダウンは、細胞のトランスフェクションの４時間後で既に検出することができ、より長いインキュベーション期間、すなわち２４時間後に更に高いオンターゲットサイレンシングが観察される。ｈｓＣ５　ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡは、低い１桁のｐＭ範囲におけるＩＣ５０値でオンターゲットｍＲＮＡをほぼ９０％サイレンシングすることが特定されている。
【０３７２】
全てのＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡの試験に好適な初代ヒト肝細胞バッチの特定
ヒトがん細胞株ＨｅｐＧ２における２つのＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡセットの用量応答分析は、全ての新しいＧａｌＮＡｃ－／リンカー／位置／キャップバリアントが、ＡＧＯ２への効率的な結合及びＲＩＳＣへの担持のための基質であり、加えて、標的ｍＲＮＡのＲＮＡｉ媒介切断において機能することが可能であることを実証（及び保証）する必要がある。しかしながら、標的化ＧａｌＮＡｃ－リガンド誘導体が肝細胞への効率的な取り込みを可能にするかどうかを試験するために、用量応答分析実験は、ジムノシスな自由取り込み設定によって、初代ヒト肝細胞で行われ必要がある。肝細胞は、アシアロ糖タンパク質受容体（ＡＳＧＲ１）を高レベルに排他的に発現し、この受容体は、概して、循環から標的糖タンパク質を除去するために肝臓によって使用される。ＧａｌＮＡｃ－リガンドにコンジュゲートされた特定の型のオリゴヌクレオチド、例えば、ｓｉＲＮＡ又はＡＳＯは、この高ターンオーバー受容体によって認識され、クラトリンコーティング小胞を介して細胞質に効率的に取り込まれ、エンドソーム区画への輸送されることは、今では一般的に知られている。エンドソーム脱出は、オリゴヌクレオチド送達の速度制限ステップであると考えられる。
【０３７３】
中間アッセイ開発実験を行い、種々のバッチの初代ヒト肝細胞を目的の関連遺伝子、すなわち、ｈｓＣ５、ｈｓＴＴＲ、ｈｓＨＡＯ１、ｈｓＧＡＰＤＨ、及びｈｓＡＨＳＡ１の発現レベルについて試験した。Ｐｒｉｍａｃｙｔ（Ｓｃｈｗｅｒｉｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）は、試験のために異なる初代ヒト肝細胞バッチの３つのバイアル、すなわちＢＨｕｆ１６０８７、ＣＨＦ２１０１、及びＣｙＨｕｆ１９００９を提供した。細胞をコラーゲンコーティングされた９６ウェル組織培養プレートに播種し、続いて、細胞溶解及びｂＤＮＡ分析の前に細胞を０時間、２４時間、４８時間及び７２時間インキュベーションして、目的のｍＲＮＡレベルを監視した。図６は、初代ヒト肝細胞バッチＢＨｕｆ１６０８７、ＣＨＦ２１０１、及びＣｙＨｕｆ１９００９における、３つの目的のオンターゲット、ｈｓＴ

ＴＲ、ｈｓＣ５、及びｈｓＨＡＯ１全てについての絶対ｍＲＮＡ発現データを示す。ｈｓＧＡＰＤＨ及びｈｓＡＨＳＡ１のｍＲＮＡ発現レベルを図７に示す。

【０３７４】

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

【０３７５】

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

【０３７６】

ＰＨＨにおけるｈｓＨＡＯ１標的化ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡの用量応答分析

初代ヒト肝細胞（ＰＨＨ）の好適なバッチ（ＣｙＨｕｆ１９００９）の特定に続いて、表１に列挙されるｈｓＨＡＯ１標的化ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡのジムノシスな自由取り込み分析を行った。試験された最終ｓｉＲＮＡ濃度は、１．５μＭであり、続いて５００ｎＭであり、８つの２倍連続希釈ステップで、１．９５ｎＭの最も低い最終ｓｉＲＮＡ濃度まで減少させた。実験は、ＰＨＨ細胞の直接インキュベーションの４時間及び７２時間後に終了した。表５は、研究された全てのｈｓＨＡＯ１標的化ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡの活性データを列挙する。この実験に含まれる全ての対照ｓｉＲＮＡを要約し、表２に列挙する。

【０３７７】

表５： 初代ヒト肝細胞（ＰＨＨ）におけるｈｓＨＡＯ１標的化ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡの標的、インキュベーション時間、外部ＩＤ、ＩＣ２０／ＩＣ５０／ＩＣ８０値、及び最大阻害。列挙は、外部ＩＤに従って整理され、４時間及び７２時間のインキュベーションがそれぞれ上部及び下部に列挙されている。

【０３７８】

【表５】

標的	インキュベーション［時間］	外部 ID	IC20[nM]	IC50[nM]	IC80[nM]	最大阻害[%]
hsHAO1(hsGO1)	4	ETX001	該当なし	該当なし	該当なし	3,5
hsHAO1(hsGO1)	4	ETX005	該当なし	該当なし	該当なし	0,7
hsHAO1(hsGO1)	72	ETX001	7,1	514,2	該当なし	54,3
hsHAO1(hsGO1)	72	ETX005	1,5	127,2	該当なし	53,8

【０３７９】

７２時間のインキュベーションの結果をまた、図８Ａ～Ｂにも示す。

【０３８０】

ｈｓＨＡＯ１を標的とするＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡのジムノシスな自由取り込みは、４時間以内に有意なオンターゲットサイレンシングをもたらさなかったが、しかしながら

、７２時間のインキュベーション後、オンターゲットサイレンシングは、最大阻害の３５．５～５８．１％の範囲で見られた。

【０３８１】

ＰＨＨにおけるｈｓＣ５標的化ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡの用量応答分析

前のアッセイで試験されたｈｓＴＴＲ及びｈｓＨＡＯ１と同一のリンカー／位置／ＧａｌＮＡｃリガンドバリエーションを共有するが、オンターゲットｈｓＣ５　ｍＲＮＡに特異的な配列を有するＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡを用いた、ＰＨＨにおけるジムノシスな自由取り込みによって、第２の目的の標的であるｈｓＣ５　ｍＲＮＡを、同一の用量応答設定において試験した。ｈｓＣ５を標的とするＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡの配列、及び対照ｓｉＲＮＡについての全ての配列及び情報を、それぞれ表１及び表２に列挙する。実験は、ＰＨＨの４時間及び７２時間の直接インキュベーション後に終了した。表６は、研究された全てのｈｓＣ５標的化ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡの活性データを列挙する。

【０３８２】

表６：　ＰＨＨにおけるｈｓＣ５標的化ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡの標的、インキュベーション時間、外部ＩＤ、ＩＣ２０／ＩＣ５０／ＩＣ８０値、及び最大阻害。列挙は、外部ＩＤに従って整理され、４時間及び７２時間のインキュベーションがそれぞれ上部及び下部に列挙されている。

【０３８３】

【表６】

標的	インキュベーション［時間］	外部 ID	IC20[nM]	IC50[nM]	IC80[nM]	最大阻害[%]
C5	4	ETX010	該当なし	該当なし	該当なし	-1,3
C5	4	ETX014	51,8	該当なし	該当なし	23,7
C5	72	ETX010	4,3	72,1	該当なし	64,9
C5	72	ETX014	2,2	63,7	該当なし	65,6

【０３８４】

７２時間のインキュベーションの結果をまた、図９Ａ～Ｂにも示す。

【０３８５】

４時間のインキュベーション後、ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡの有意なオンターゲットサイレンシングは見られない。７２時間のインキュベーション期間後に生成されたデータは、最大で６５．５％の最大阻害のより堅牢なオンターゲットサイレンシングを示した。

【０３８６】

ＰＨＨにおけるｈｓＴＴＲ標的化ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡの用量応答分析

最後の目的の標的であるｈｓＴＴＲ　ｍＲＮＡを、標的ｈｓＨＡＯ１及びｈｓＣ５と同一の用量応答設定において、ＰＨＨにおけるジムノシスな自由取り込みで再び試験したが、唯一の違いは、オンターゲットｈｓＴＴＲ　ｍＲＮＡに対する特定のｓｉＲＮＡ配列が使用されたことであった（表１を参照されたい）。

【０３８７】

実験は、ＰＨＨの７２時間の直接インキュベーション後に終了した。表７は、研究された全てのｈｓＴＴＲ標的化ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡの活性データを列挙する。

【０３８８】

表７：　初代ヒト肝細胞（ＰＨＨ）におけるｈｓＴＴＲ標的化ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡの標的、インキュベーション時間、外部ＩＤ、ＩＣ２０／ＩＣ５０／ＩＣ８０値、及び最

大阻害。列挙は、外部ＩＤに従って整理されている。

【０３８９】

【表７】

標的	インキュベーション［時間］	外部 ID	IC20[nM]	IC50[nM]	IC80[nM]	最大阻害[%]
hsTTR	72	ETX019	3,9	29,8	1536,8	82,5
hsTTR	72	ETX023	6,7	377,5	該当なし	54,8

【０３９０】

結果をまた、図１０Ａ～Ｂにも示す。

【０３９１】

ｈｓＴＴＲを標的とするＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡのジムノシスな自由取り込みは、４６～８２．５％の最大阻害の範囲で、７２時間以内に有意なオンターゲットサイレンシングをもたらした。ｈｓＴＴＲ　ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡは、低い２桁ｎＭの範囲のＩＣ５０値でオンターゲットｍＲＮＡをサイレンシングすることが特定された。

【０３９２】

－結論及び議論

本研究の範囲は、３つの異なるオンターゲット、すなわち、ｈｓＨＡＯ１、ｈｓＣ５、及びｈｓＴＴＲ　ｍＲＮＡを標的とするｓｉＲＮＡの状況で使用される場合に、本発明によるＧａｌＮＡｃリガンドのインビトロ活性を分析することであった。各標的に特異的なｓｉＲＮＡセットは、各２つの異なるアンチセンス鎖の状況において、異なるリンカー／キャップ／修飾／ＧａｌＮＡｃリガンド化学を有するｓｉＲＮＡからなった。

【０３９３】

全ての標的について、表１からのＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡが、高い全体的な効力及び低いＩＣ５０値を示したことを特定した。

【０３９４】

１．１　実施例２

合成の経路

ｉ）コンジュゲートビルディングブロックＴｒｉＧａｌＮＡｃの合成

薄層クロマトグラフィー（ＴＬＣ）を、Ｍａｃｈｅｒｅｙ－Ｎａｇｅｌからの蛍光インジケータ２５４ｎｍを有するシリカ被覆アルミニウムプレート上で行った。化合物を、ＵＶ光（２５４ｎｍ）下で、又はメタノール（ＭｅＯＨ）中の５％Ｈ２ＳＯ４若しくはＳｔａｈｌによるニンヒドリン試薬、（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈから）でスプレーし、続いて加熱した後、視覚化した。フラッシュクロマトグラフィーを、Ｂｉｏｔａｇｅ　Ｓｆａｒ　Ｓｉｌｉｃａ１０、２５、５０、又は１００ｇカラム（Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎ）を使用して、二重可変ＵＶ波長検出器（２００～４００ｎｍ）を備えたＢｉｏｔａｇｅ　Ｉｓｏｌｅｒａ　Ｏｎｅフラッシュクロマトグラフィー機器を用いて行った。

【０３９５】

全ての水分感受性反応は、乾燥ガラス器具、無水溶媒、及びアルゴン雰囲気を使用して、無水条件下で実施した。全ての市販の試薬を、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈから購入し、溶媒をＣａｒｌ　Ｒｏｔｈ　ＧｍｂＨ＋Ｃｏ．ＫＧから購入した。Ｄ－ガラクトサミンペンタアセテートをＡＫ　ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃから購入した。

【０３９６】

ＨＰＬＣ／ＥＳＩ－ＭＳを、Ｄｉｏｎｅｘ　ＵｌｔｉＭａｔｅ　３０００　ＲＳ　ＵＨＰＬＣシステム及びＴｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　ＭＳＱ　Ｐｌｕｓ質量分析計

で、ＷａｔｅｒｓからのＡｃｑｕｉｔｙ ＵＰＬＣ Ｐｒｏｔｅｉｎ ＢＥＨ Ｃ４カラム（３００Å、１．７μｍ、２．１×１００ｍｍ）を使用して、６０℃で行った。溶媒系は、０．１％ギ酸を含有するＨ２Ｏを有する溶媒Ａ、及び０．１％ギ酸を含有するアセトニトリル（ＡＣＮ）を有する溶媒Ｂからなった。０．４ｍＬ／分の流量で、１５分間にわたってＢの５～１００％の勾配を用いた。検出器及び条件：コロナ超荷電エアロゾル検出（ｅｓａから）。噴霧器温度：２５℃。Ｎ２圧力：３５．１ｐｓｉ。フィルター：コロナ。

【０３９７】

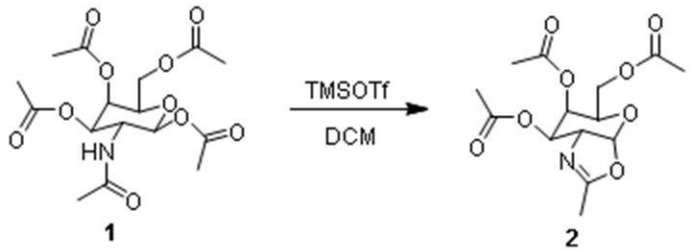
１Ｈ及び１３Ｃ ＮＭＲスペクトルを、５００ＭＨｚ（１Ｈ ＮＭＲ）及び１２５ＭＨｚ（１３Ｃ ＮＭＲ）でＶａｒｉａｎ分光器で室温で記録した。化学シフトは、溶媒残留ピーク（ＣＤＣｌ３－１Ｈ ＮＭＲ：７．２６ｐｐｍでのδ、１３Ｃ ＮＭＲ ７７．２ｐｐｍでのδ、ＤＭＳＯ－ｄ６－１Ｈ ＮＭＲ：２．５０ｐｐｍでのδ、１３Ｃ ＮＭＲ ３９．５ｐｐｍでのδ）を参照したｐｐｍで与えられる。カップリング定数はヘルツで与えられる。信号分割パターンは、一重線（ｓ）、二重線（ｄ）、三重線（ｔ）、又は多重線（ｍ）として記載される。

【０３９８】

ｉｉ）コンジュゲートビルディングブロックＴｒｉＧａｌＮＡｃの合成経路

【０３９９】

【化７５】

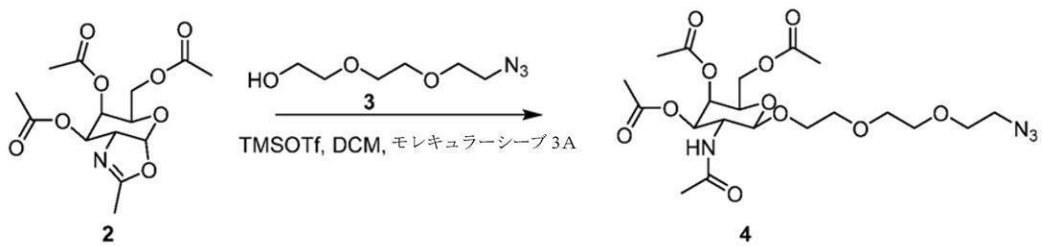


【０４００】

化合物２の調製：Ｄ－ガラクトサミンペンタアセテート（３．００ｇ、７．７１ｍｍｏｌ、１．０当量）を、アルゴン下で無水ジクロロメタン（ＤＣＭ）（３０ｍＬ）に溶解し、トリメチルシリルトリフルオロメタンスルホネート（ＴＭＳＯＴｆ、４．２８ｇ、１９．２７ｍｍｏｌ、２．５当量）を添加した。反応物を室温で３時間撹拌した。反応混合物をＤＣＭ（５０ｍＬ）で希釈し、冷飽和ＮａＨＣＯ３水溶液（１００ｍＬ）及び水（１００ｍＬ）で洗浄した。有機層を分離し、Ｎａ２ＳＯ４で乾燥させ、濃縮して、表題化合物を黄色の油状物として得、これをフラッシュクロマトグラフィー（勾配溶出：１０ＣＶでＤＣＭ中０～１０％のＭｅＯＨ）によって精製した。生成物を無色の油状物として得た（２．５ｇ、９８％、ｒｆ＝０．４５（ＤＣＭ中２％のＭｅＯＨ））。

【０４０１】

【化７６】



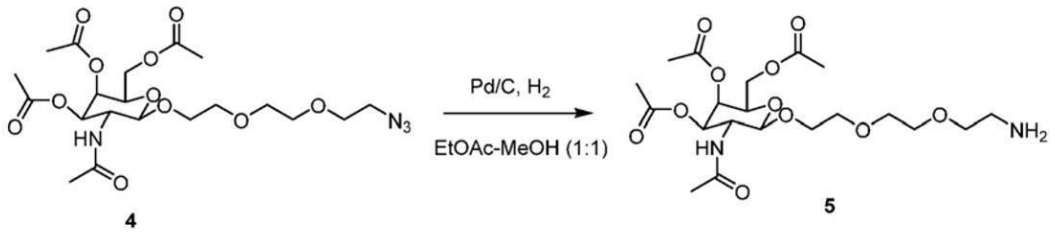
【０４０２】

化合物４の調製：化合物２（２．３０ｇ、６．９８ｍｍｏｌ、１．０当量）及びアジド

－ＰＥＧ３－ＯＨ（１．８３ｇ、１０．５ｍｍｏｌ、１．５当量）を、アルゴン下で無水ＤＣＭ（４０ｍＬ）に溶解し、分子ふるい３Å（５ｇ）を溶液に添加した。混合物を、室温で１時間撹拌した。次いで、ＴＭＳＯＴｆ（０．７７ｇ、３．４９ｍｍｏｌ、０．５当量）を混合物に添加し、反応物を一晩撹拌した。分子ふるいを濾過し、濾液をＤＣＭ（１００ｍＬ）で希釈し、冷飽和ＮａＨＣＯ３水溶液（１００ｍＬ）及び水（１００ｍＬ）で洗浄した。有機層を分離し、Ｎａ２ＳＯ４で乾燥させ、次いで、溶媒を減圧下で除去した。粗物質をフラッシュクロマトグラフィー（勾配溶出：１０ＣＶでＤＣＭ中の０～３％のＭｅＯＨ）によって精製して、表題生成物を淡黄色の油状物として得た（３．１０ｇ、８８％、ｒｆ＝０．２５（ＤＣＭ中２％のＭｅＯＨ））。ＭＳ：Ｃ２０Ｈ３２Ｎ４Ｏ１１の計算値、５０４．２１。実測値５０５．４。１Ｈ ＮＭＲ（５００ ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３） δ ６．２１－６．１４（ｍ，１Ｈ），５．３０（ｄｄ，Ｊ ＝ ３．４，１．１ Ｈｚ，１Ｈ），５．０４（ｄｄ，Ｊ ＝ １１．２，３．４ Ｈｚ，１Ｈ），４．７６（ｄ，Ｊ ＝ ８．６ Ｈｚ，１Ｈ），４．２３－４．０８（ｍ，３Ｈ），３．９１－３．８０（ｍ，３Ｈ），３．７４－３．５９（ｍ，９Ｈ），３．４９－３．４１（ｍ，２Ｈ），２．１４（ｓ，３Ｈ），２．０２（ｓ，３Ｈ），１．９７（ｄ，Ｊ ＝ ４．２ Ｈｚ，６Ｈ）．１３Ｃ ＮＭＲ（１２５ ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３） δ １７０．６（Ｃ），１７０．５（Ｃ），１７０．４（Ｃ），１７０．３（Ｃ），１０２．１（ＣＨ），７１．６（ＣＨ），７０．８（ＣＨ），７０．６（ＣＨ），７０．５（ＣＨ），７０．３（ＣＨ２），６９．７（ＣＨ２），６８．５（ＣＨ２），６６．６（ＣＨ２），６１．５（ＣＨ２），２３．１（ＣＨ３），２０．７（３ｘＣＨ３）．

【０４０３】

【化７７】

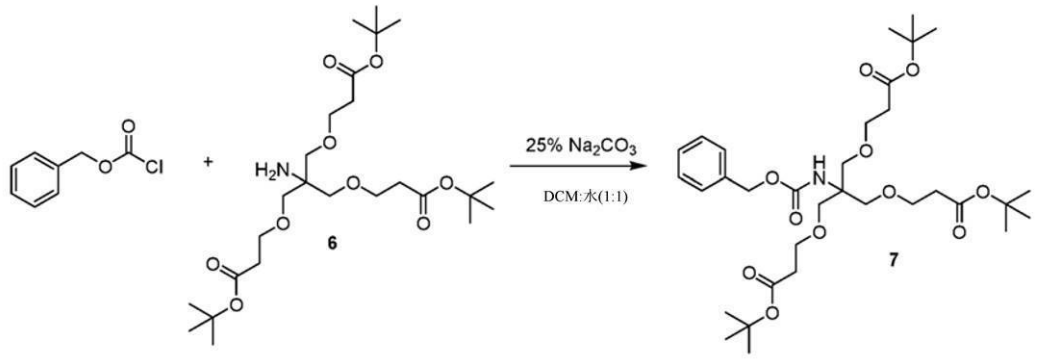


【０４０４】

化合物５の調製：化合物４（１．００ｇ、１．９８ｍｍｏｌ、１．０当量）を、酢酸エチル（ＥｔＯＡｃ）及びＭｅＯＨ（３０ｍＬ １：１ｖ／ｖ）の混合物に溶解し、Ｐｄ／Ｃ（１００ｍｇ）を添加した。反応混合物を、真空／アルゴンサイクル（３ｘ）を使用して脱気し、バルーン圧力下で一晩水素化した。反応混合物をセライトを通して濾過し、ＥｔＯＡｃ（３０ｍＬ）で洗浄した。溶媒を減圧下で除去して、表題化合物を無色の油状物として得た（０．９５ｇ、定量収率、ｒｆ＝０．２５（ＤＣＭ中１０％のＭｅＯＨ））。化合物を更に精製することなく使用した。ＭＳ：Ｃ２０Ｈ３４Ｎ２Ｏ１１の計算値、４７８．２。実測値４７９．４。

【０４０５】

【化７８】

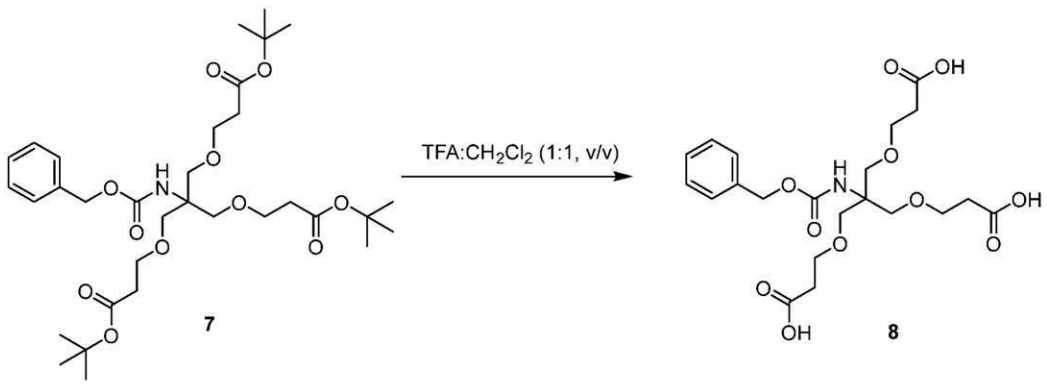


【０４０６】

化合物７の調製：トリス｛［２－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）エトキシ］メチル｝－メチルアミン６（３．３７ｇ、６．６７ｍｍｏｌ、１．０当量）をＤＣＭ／水（４０ｍＬ　１：１ｖ／ｖ）の混合物に溶解し、Ｎａ２ＣＯ３（０．１８ｇ、１．７ｍｍｏｌ、０．２５当量）を激しく撹拌しながら添加した。クロロギ酸ベンジル（２．９４ｍＬ、２０．７ｍｍｏｌ、３．１０当量）を前の混合物に滴加し、反応物を室温で２４時間撹拌した。反応混合物をＣＨ２Ｃｌ２（１００ｍＬ）で希釈し、水（１００ｍＬ）で洗浄した。有機層を分離し、Ｎａ２ＳＯ４で乾燥させた。溶媒を減圧下で除去し、得られた粗物質をフラッシュクロマトグラフィー（勾配溶出：１２ＣＶでシクロヘキサン中の０～１０％のＥｔＯＡｃ）によって精製して、表題化合物を淡黄色の油状物として得た（３．９ｇ、９１％、ｒｆ＝０．５６（シクロヘキサン中１０％のＥｔＯＡｃ））。ＭＳ：Ｃ３３Ｈ５３ＮＯ１１の計算値、６３９．３。実測値６４０．９。１Ｈ　ＮＭＲ（５００　ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）　δ　７．３８－７．２６（ｍ，５Ｈ），４．９７（ｓ，２Ｈ），３．５４（ｔ，６Ｈ），３．５０（ｓ，６Ｈ），２．３８（ｔ，６Ｈ），１．３９（ｓ，２７Ｈ）．　１３Ｃ　ＮＭＲ（１２５　ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）　δ　１７０．３（３ｘＣ），１５４．５（Ｃ），１３７．１（Ｃ），１２８．２（２ｘＣＨ），１２７．７（ＣＨ），１２７．６（２ｘＣＨ），７９．７（３ｘＣ），６８．４（３ｘＣＨ２），６６．８（３ｘＣＨ２），６４．９（Ｃ），５８．７（ＣＨ２），３５．８（３ｘＣＨ２），２７．７（９ｘＣＨ３）．

【０４０７】

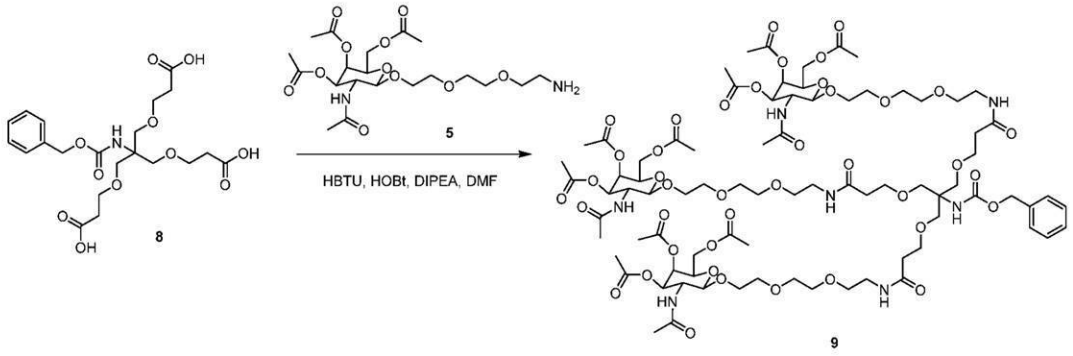
【化７９】



【０４０８】

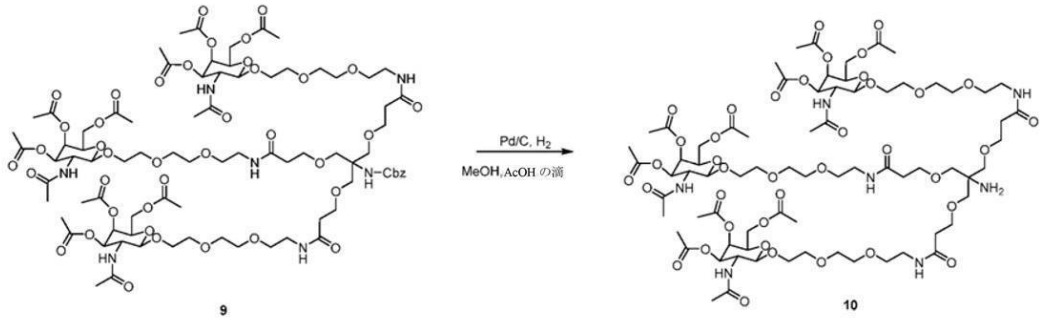
化合物８の調製：Ｃｂｚ－ＮＨ－トリス－Ｂｏｃ－エステル７（０．２０ｇ、０．３９ｍｍｏｌ、１．０当量）をアルゴン下でＣＨ２Ｃｌ２（１ｍＬ）に溶解し、トリフルオロ酢酸（ＴＦＡ、１ｍＬ）を添加し、反応物を室温で１時間撹拌した。溶媒を減圧下で除去し、残渣をトルエン（５ｍＬ）と３回共蒸発させ、高真空下で乾燥させて、化合物をそのＴＦＡ塩として得た（０．１８３ｇ、９８％）。化合物を更に精製することなく使用した

。ＭＳ：Ｃ２１Ｈ２９ＮＯ１１の計算値、４７１．６。実測値４７２．４。
【０４０９】
【化８０】



【０４１０】
化合物９の調製：ＣｂｚＮＨ－トリス－ＣＯＯＨ８（０．７２ｇ、１．４９ｍｍｏｌ、１．０当量）及びＧａｌＮＡｃ－ＰＥＧ３－ＮＨ２５（３．５６ｇ、７．４４ｍｍｏｌ、５．０当量）を、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）（２５ｍＬ）に溶解した。次いで、Ｎ，Ｎ’，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチル－Ｏ－（１Ｈ－ベンゾトリアゾール－１－イル）ウロニウムヘキサフルオロホスフェート（ＨＢＴＵ）（２．７８ｇ、７．４４ｍｍｏｌ、５．０当量）、１－ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物（ＨＯＢｔ）（１．０５ｇ、７．４４ｍｍｏｌ、５．０当量）、及びＮ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（ＤＩＰＥＡ）（２．０７ｍＬ、１１．９ｍｍｏｌ、８．０当量）を溶液に添加し、反応物を７２時間撹拌した。溶媒を減圧下で除去し、残渣をＤＣＭ（１００ｍＬ）に溶解し、飽和ＮａＨＣＯ３水溶液（１００ｍＬ）で洗浄した。有機層をＮａ２ＳＯ４で乾燥させ、溶媒を蒸発させ、粗物質をフラッシュクロマトグラフィー（勾配溶出：１４ＣＶでＤＣＭ中０～５％のＭｅＯＨ）によって精製した。生成物を淡黄色の油状物として得た（１．２ｇ、４３％、ｒｆ＝０．２０（ＤＣＭ中５％のＭｅＯＨ））。ＭＳ：Ｃ８１Ｈ１２５Ｎ７Ｏ４１の計算値、１８５２．９。実測値１８５４．７。１Ｈ　ＮＭＲ（５００　ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）　δ　７．９０－７．８０（ｍ，１０Ｈ），７．６５－７．６２（ｍ，４Ｈ），７．４７－７．４３（ｍ，３Ｈ），７．３８－７．３２（ｍ，８Ｈ），５．２４－５．２２（ｍ，３Ｈ），５．０２－４．９７（ｍ，４Ｈ），４．６０－４．５７（ｍ，３　Ｈ），４．０７－３．９０（ｍ　１０Ｈ），３．６７－３．３６（ｍ，７０Ｈ），３．２３－３．０７（ｍ，２５Ｈ），２．１８（ｓ，１０Ｈ），２．００（ｓ，１３Ｈ），１．８９（ｓ，１１Ｈ），１．８０－１．７８（ｍ，１７Ｈ）．１３Ｃ　ＮＭＲ（１２５　ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）　δ　１７０．１（Ｃ），１６９．８（Ｃ），１６９．７（Ｃ），１６９．４（Ｃ），１６９．２（Ｃ），１６９．１（Ｃ），１４２．７（Ｃ），１２６．３（ＣＨ），１２３．９（ＣＨ），１１８．７（ＣＨ），１０９．７（ＣＨ），１００．８（ＣＨ），７０．５（ＣＨ），６９．８（ＣＨ），６９．６（ＣＨ），６９．５（ＣＨ），６９．３（ＣＨ２），６９．０（ＣＨ２），６８．２（ＣＨ２），６７．２（ＣＨ２），６６．７（ＣＨ２），６１．４（ＣＨ２），２２．６（ＣＨ２），２２．４（３ｘＣＨ３），２０．７（９ｘＣＨ３）．
【０４１１】

【化８１】

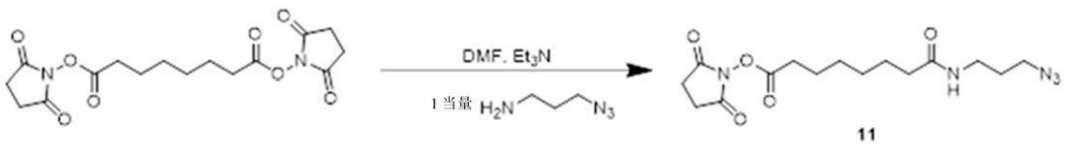


【０４１２】

化合物１０の調製：三分岐ＧａｌＮＡｃ化合物９（０．２７ｇ、０．１４ｍｍｏｌ、１．０当量）をＭｅＯＨ（１５ｍＬ）に溶解し、３滴の酢酸（ＡｃＯＨ）及びＰｄ／Ｃ（３０ｍｇ）を添加した。反応混合物を、真空／アルゴンサイクル（３ｘ）を使用して脱気し、バルーン圧力下で一晩水素化した。反応の完了後、質量分析を行い、得られた混合物をセライトの薄いパッドを通して濾過した。溶媒を蒸発させ、得られた残渣を高真空下で乾燥させ、更に精製することなく次のステップに使用した。生成物を淡黄色の油状物として得た（０．２４ｇ、定量収率）。ＭＳ：Ｃ７３Ｈ１１９Ｎ７Ｏ３９の計算値、１７１８．８。実測値１７１９．３。

【０４１３】

【化８２】

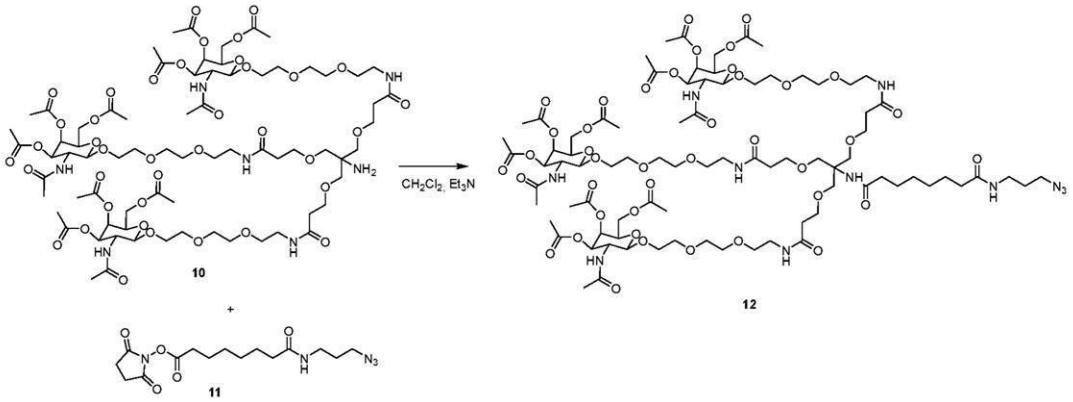


【０４１４】

化合物１１の調製：市販のスベリン酸ビス（Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル）（３．６７ｇ、９．９ｍｍｏｌ、１．０当量）をＤＭＦ（５ｍＬ）に溶解し、トリエチルアミン（１．２ｍＬ）を添加した。この溶液に、ＤＭＦ（５ｍＬ）中の３－アジド－１－プロピルアミン（１．０ｇ、９．９ｍｍｏｌ、１．０当量）の溶液を滴加した。反応物を室温で３時間撹拌した。反応混合物をＥｔＯＡｃ（１００ｍＬ）で希釈し、水（５０ｍＬ）で洗浄した。有機層を分離し、Ｎａ２ＳＯ４で乾燥させ、溶媒を減圧下で除去した。粗物質をフラッシュクロマトグラフィー（勾配溶出：１６ＣＶでＤＣＭ中の０～５％のＭｅＯＨ）によって精製した。生成物を白色の固体として得た（１．５４ｇ、４３％、ｒｆ＝０．７１（ＤＣＭ中５％ＭｅＯＨ））。ＭＳ：Ｃ１５Ｈ２３Ｎ５Ｏ５の計算値、３５３．４。実測値３５４．３。

【０４１５】

【化８３】



【０４１６】

ＴｒｉＧａｌＮＡｃ（１２）の調製：三分岐ＧａｌＮＡｃ化合物１０（０．３５ｇ、０．２４ｍｍｏｌ、１．０当量）及び化合物１１（０．１１ｇ、０．３１ｍｍｏｌ、１．５当量）を、アルゴン下でＤＣＭ（５ｍＬ）に溶解し、トリエチルアミン（０．１ｍＬ、０．６１ｍｍｏｌ、３．０当量）を添加した。反応物を室温で一晩撹拌した。溶媒を減圧下で除去し、残渣をＥｔＯＡｃ（１００ｍＬ）に溶解し、水（１００ｍＬ）で洗浄した。有機層を分離し、Ｎａ２ＳＯ４で乾燥させた。溶媒を蒸発させ、得られた粗物質をフラッシュクロマトグラフィー（勾配溶出：２０ＣＶでＤＣＭ中の０～１０％のＭｅＯＨ）によって精製して、表題化合物を白色のふわふわ固体として得た（０．２７ｇ、６７％、ｒｆ＝０．５（ＤＣＭ中１０％のＭｅＯＨ））。ＭＳ：Ｃ８４Ｈ１３７Ｎ１１Ｏ４１の計算値、１９５７．１。実測値１９５９．６。

【０４１７】

化合物１２を、「クリック化学」を用いたその後のオリゴヌクレオチドコンジュゲート調製に使用した。

【０４１８】

ｉｉｉ）オリゴヌクレオチド合成

【０４１９】

【表８－１】

一本鎖ID	配列5’-3’	RP HPLCによる純度(%)
X91382	(NH2-DEG)gacuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(invabasic)(invabasic)	89.5
X91383	(NH2-DEG)aaGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfasusa(invabasic)(invabasic)	91.6
X91384	(NH2-DEG)ugggauUfuCfAfUfguaaccaasgsa(invabasic)(invabasic)	94.0
X91403	(NH2C12)gacuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(invabasic)(invabasic)	94.2
X91404	(NH2C12)aaGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfasusa(invabasic)(invabasic)	96.5
X91405	(NH2C12)ugggauUfuCfAfUfguaaccaasgsa(invabasic)(invabasic)	91.3
X91415	(invabasic)(invabasic)gsascuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(NH2C6)	96.4
X91416	(invabasic)(invabasic)asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfaua(NH2C6)	77.4
X91417	(invabasic)(invabasic)usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga(NH2C6)	96.7
X91379	gsascuuuCfaUfCfCfuggaaauaua(GalNAc)	92.8
X91380	asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfaua(GalNAc)	95.7
X91446	usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga(GalNAc)	92.1
X38483	usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaagucscsa	91.0
X91381	usAfsUfuAfuaAfaAfauaUfcUfuGfcuusususdTdT	90.0
X38104	usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc	95.4

【０４２０】

【表８－２】

Af、Cf、Gf、Uf:	2’-F RNAヌクレオチド
a、c、g、u:	2’-O-Me RNAヌクレオチド
dT :	DNAヌクレオチド
s:	ホスホロチオエート
invabasic:	1,2-ジデオキシリボース
NH2-DEG:	アミノエトキシエチルリンカー
NH2C12:	アミノドデシルリンカー
NH2C6:	アミノヘキシルリンカー

【０４２１】
オリゴヌクレオチドを、ホスホラミダイトアプローチに従って固相上で合成した。スケールに応じて、Ｍｅｒｍａｄｅ１２（ＢｉｏＡｕｔｏｍａｔｉｏｎ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）又はＡＫＴＡ Ｏｌｉｇｏｐｉｌｏｔ（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）のいずれかを使用した。
【０４２２】
ｉｎｖａｂａｓｉｃ（ＣＰＧ、４８０Å、８６μｍｏｌ／ｇの充填、ＬＧＣ Ｂｉｏｓｅａｒｃｈカタログ番号ＢＣＧ－１０４７－Ｂ）又は２’－ＦＡ（ＣＰＧ、５２０Å、９０μｍｏｌ／ｇの充填、ＬＧＣ Ｂｉｏｓｅａｒｃｈカタログ番号ＢＣＧ－１０３９－Ｂ）又はＮＨ２Ｃ６（ＣＰＧ、５２０Å、８５μｍｏｌ／ｇの充填、ＬＧＣ Ｂｉｏｓｅａｒｃｈカタログ番号ＢＣＧ－１３９７－Ｂ）又はＧａｌＮＡｃ（ＣＰＧ、５００Ａ、５７μｍｏｌ／ｇの充填、Ｐｒｉｍｅｔｅｃｈ）又は２’－Ｏ－メチルＣ（ＣＰＧ、５００Å、８４μｍｏｌ／ｇの充填ＬＧＣ Ｂｉｏｓｅａｒｃｈカタログ番号ＢＣＧ－１０－Ｂ）又は２’－Ｏ－メチルＡ（ＣＰＧ、４９７Å、８５μｍｏｌ／ｇの充填、ＬＧＣ Ｂｉｏｓｅａｒｃｈ、カタログ番号ＢＣＧ－１０２９－Ｂ）又はｄＴ（ＣＰＧ、４９７Å、８７μｍｏｌ／ｇの充填、ＬＧＣ Ｂｉｏｓｅａｒｃｈ、カタログ番号ＢＣＧ－１０５５－Ｂ）のいずれかを充填した、制御された細孔ガラスで作られた市販の固体支持体上で合成を実施した。
【０４２３】
２’－Ｏ－Ｍｅ、２’－Ｆ ＲＮＡホスホラミダイト及び補助試薬を、ＳＡＦＣ Ｐｒｏｌｉｇｏ（Ｈａｍｂｕｒｇ、Ｇｅｒｍａｎｙ）から購入した。
【０４２４】
２’－Ｏ－メチルホスホラミダイトとしては、以下が含まれる：５’－（４，４’－ジメトキシトリチル）－Ｎ－ベンゾイル－アデノシン２’－Ｏ－メチル－３’－［（２－シアノエチル）－（Ｎ，Ｎ－ジイソプロピル）］－ホスホラミダイト、５’－（４，４’－ジメトキシトリチル）－Ｎ－ベンゾイル－シチジン２’－Ｏ－メチル－３’－［（２－シアノエチル）－（Ｎ，Ｎ－ジイソプロピル）］－ホスホラミダイト、５’－（４，４’－ジメトキシトリチル）－Ｎ－ジメチルホルムアミジン－グアノシン２’－Ｏ－メチル－３’－［（２－シアノエチル）－（Ｎ，Ｎ－ジイソプロピル）］－ホスホラミダイト、５’－（４，４’－ジメトキシトリチル）－ウリジン２’－Ｏ－メチル－３’－［（２－シアノエチル）－（Ｎ，Ｎ－ジイソプロピル）］－ホスホラミダイト。
【０４２５】
２’－Ｆホスホラミダイトとしては、以下が含まれる：５’－ジメトキシトリチル－Ｎ－ベンゾイル－デオキシアデノシン２’－フルオロ－３’－［（２－シアノエチル）－（Ｎ，Ｎ－ジイソプロピル）］－ホスホラミダイト、５’－ジメトキシトリチル－Ｎ－アセチル－デオキシシチジン２’－フルオロ－３’－［（２－シアノエチル）－（Ｎ，Ｎ－ジイソプロピル）］－ホスホラミダイト、５’－ジメトキシトリチル－Ｎ－イソブチリル－デオキ

シグアノシン２’－フルオロ－３’－［（２－シアノエチル）－（Ｎ，Ｎ－ジイソプロピル）］－ホスホラミダイト、及び５’－ジメトキシトリチル－デオキシウリジン２’－フルオロ－３’－［（２－シアノエチル）－（Ｎ，Ｎ－ジイソプロピル）］－ホスホラミダイト。

【０４２６】

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

【０４２７】

無水アセトニトリル中の５０％無水ＤＣＭに溶解した２’－Ｏ－メチル－ウリジンホスホラミダイトを除き、全てのビルディングブロックを、分子ふるい（３Å）を含有する無水アセトニトリル（１００ｍＭ（Ｍｅｒｍａｄｅ１２）又は２００ｍＭ（ＡＫＴＡ　Ｏｌｉｇｏｐｉｌｏｔ））に溶解した。ヨウ素（ピリジン／Ｈ２Ｏ　９：１ｖ／ｖ中５０ｍＭ）を酸化試薬として使用した。５－エチルチオテトラゾール（ＥＴＴ、アセトニトリル中５００ｍＭ）を活性化剤溶液として使用した。

【０４２８】

ホスホルチオエート連結の導入のためのチオール化を、アセトニトリル／ピリジン　４：６ｖ／ｖ中の１００ｍＭのキサンタン水素化物（ＴＣＩ、カタログ番号６８４６－３５－１）を使用して実施した。

【０４２９】

カップリング時間は、別段の定めた場合を除いて、５．４分であった。５’アミノ修飾を、各カップリングにつき１１分のカップリング時間を有する二重カップリングステップ（総カップリング時間２２分）を用いて配列に組み込んだ。酸化剤の接触時間を１．２分に設定し、チオール化時間は５．２分であった。

【０４３０】

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

【０４３１】

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

【０４３２】

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

【０４３３】

ＲＰ　ＨＰＬＣ精製は、ＡＫＴＡ　Ｐｕｒｅ機器（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）で、ＸＢｒｉｄｇｅ　Ｃ１８　Ｐｒｅｐ１９×５０ｍｍカラム（Ｗａｔｅｒｓ）を使用して行った。緩衝液Ａは、１００ｍＭのトリエチルアンモニウムアセテート（ＴＥＡＡｃ、Ｂｉｏｓｏｌｖｅ）ｐＨ７であり、緩衝液Ｂは、緩衝液Ａ中の９５％のアセトニトリルを含有した。１０ｍＬ／分の流量及び６０℃の温度を用いた。２８０ｎｍでのＵＶ追跡を記録した。１２０カラム体積で０％Ｂ～１００％Ｂの勾配を用いた。適切な画分をプールし、３Ｍの酢酸ナトリウム（ＮａＯＡｃ）（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、ｐＨ５．２及び８

５％のエタノール（ＶＷＲ）で冷凍庫内で沈殿させた。ペレットを、遠心分離によって単離し、水（５０ｍＬ）に再溶解し、５ＭのＮａＣｌ（５ｍＬ）で処理し、Ｓｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ２５－Ｆｉｎｅ樹脂（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を充填した５０×１６５ｍｍＥＣＯカラム（ＹＭＣ、Ｄｉｎｓｌａｋｅｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を使用して、ＡｋｔａＰｕｒｅ機器でサイズ排除ＨＰＬＣによって脱塩した。

【０４３４】

ＡＥＸ　ＨＰＬＣ精製は、ＡＫＴＡ　Ｐｕｒｅ機器（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）で、ＴＳＫゲルＳｕｐｅｒＱ－５ＰＷ　２０×２００ｍｍ（ＢＩＳＣＨＯＦＦ　Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ）を使用して行った。緩衝液Ａは、２０ｍＭのリン酸ナトリウム（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）　ｐＨ７．８であり、緩衝液Ｂは、１．４Ｍの臭化ナトリウム（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）を添加した緩衝液Ａと同じであった。１０ｍＬ／分の流量、６０℃の温度を用いた。２８０ｎｍでのＵＶ追跡を記録した。２７カラム体積で１０％Ｂ～１００％Ｂの勾配を用いた。適切な画分をプールし、３ＭのＮａＯＡｃ、ｐＨ５．２及び８５％のエタノールで冷凍庫内で沈殿させた。ペレットを、遠心分離によって単離し、水（５０ｍＬ）に再溶解し、５ＭのＮａＣｌ（５ｍＬ）で処理し、サイズ排除クロマトグラフィーによって脱塩した。

【０４３５】

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

【０４３６】

一本鎖を、ＬＣＱ　Ｄｅｃａ　ＸＰ－ｐｌｕｓ　Ｑ－ＥＳＩ－ＴＯＦ質量分析計（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｎｎｉｇａｎ）又はＣｏｍｐａｃｔ　ＥＳＩ－Ｑｑ－ＴＯＦ質量分析計（Ｂｒｕｋｅｒ　Ｄａｌｔｏｎｉｃｓ）のいずれかと組み合わせたＤｉｏｎｅｘ　Ｕｌｔｉｍａｔｅ　３０００（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）ＨＰＬＣシステムで、２．１×５０ｍｍ　ＸＢｒｉｄｇｅ　Ｃ１８カラム（Ｗａｔｅｒｓ）での分析ＬＣ－ＭＳによって分析した。緩衝液Ａは、１６．３ｍＭのトリエチルアミン、１００ｍＭの１，１，１，３，３，３－ヘキサフルオロ－２－プロパノール（ＨＦＩＰ）、及びＨ２Ｏ中の１％のＭｅＯＨであり、緩衝液Ｂは、９５％のＭｅＯＨ中の緩衝液Ａを含有した。２５０μＬ／分の流量、６０℃の温度を用いた。２６０及び２８０ｎｍでのＵＶ追跡を記録した。０．５分以内の１～４０％Ｂの勾配、続いて１３分以内の４０～１００％Ｂの勾配を用いた。メタノール（ＬＣ－ＭＳグレード）、水（ＬＣ－ＭＳグレード）、１，１，１，３，３，３－ヘキサフルオロ－２－プロパノール（ｐｕｒｉｓｓ．ｐ．ａ．）、及びトリエチルアミン（ｐｕｒｉｓｓ．ｐ．ａ．）をＳｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈから購入した。

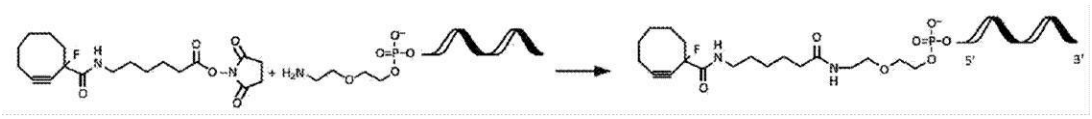
【０４３７】

ｉｖ）５’－又は３’－末端でのモノフルオロシクロオクチン（ＭＦＣＯ）コンジュゲーション

【０４３８】

【化８４】

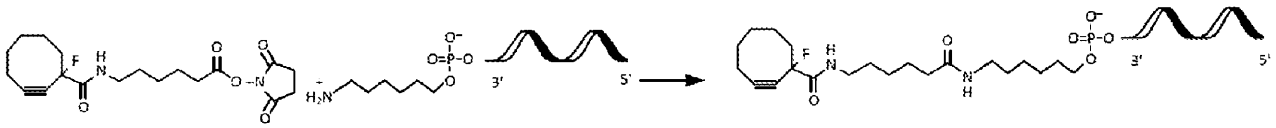
5’－末端ＭＦＣＯコンジュゲーション



【０４３９】

【化８５】

３’－末端ＭＦＣＯコンジュゲーション



【０４４０】

ＭＦＣＯコンジュゲーションの一般的条件：アミン修飾一本鎖を、５０ｍＭの炭酸塩／重炭酸塩緩衝液ｐＨ９．６／ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）４：６（ｖ／ｖ）に７０００Ｄ／ｍＬで溶解し、この溶液に、１モル当量のＤＭＦ中のＭＦＣＯ－Ｃ６－ＮＨＳエステル（Ｂｅｒｒｙ＆Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ、カタログ番号ＬＫ４３００）の３５ｍＭ溶液を添加した。反応を室温で実施し、１時間後に、別のモル当量のＭＦＣＯ溶液を添加した。反応を更に１時間進行させ、ＬＣ／ＭＳによって監視した。出発物質の定量的な消費を達成するために、アミノ修飾オリゴヌクレオチドに対して少なくとも２モル当量過剰のＭＦＣＯ　ＮＨＳエステル試薬が必要であった。反応混合物を水で１５倍に希釈し、Ｓａｒｔｏｒｉｕｓからの１．２μｍフィルターを通して濾過し、次いで、Ａｋｔａ　Ｐｕｒｅ機器（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）で保存相（ＲＰ　ＨＰＬＣ）によって精製した。

【０４４１】

精製は、ＷａｔｅｒｓからのＸＢｒｉｄｇｅ　Ｃ１８　Ｐｒｅｐ　１９×５０ｍｍカラムを使用して実施された。緩衝液Ａは、１００ｍＭのＴＥＡＡｃ　ｐＨ７であり、緩衝液Ｂは、緩衝液Ａ中の９５％のアセトニトリルを含有した。１０ｍＬ／分の流量及び６０℃の温度を用いた。２８０ｎｍでのＵＶ追跡を記録した。６０カラム体積で０～１００％Ｂの勾配を用いた。

【０４４２】

全長コンジュゲートオリゴヌクレオチドを含有する画分をプールし、３ＭのＮａＯＡｃ、ｐＨ５．２及び８５％のエタノールで冷凍庫内で沈殿させ、収集したペレットを水に溶解した。試料をサイズ排除クロマトグラフィーによって脱塩し、ｓｐｅｅｄ－ｖａｃ濃縮器を使用して濃縮して、４０～８０％の単離収率でコンジュゲートオリゴヌクレオチドを得た。

【０４４３】

【表９】

センス鎖ID	センス鎖配列5’-3’	RP HPLCによる純度(%)
X91388	(MFCO)(NH-DEG)gacuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(invabasic)(invabasic)	89.0
X91389	(MFCO)(NH-DEG)aaGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfasusa(invabasic)(invabasic)	91.0
X91390	(MFCO)(NH-DEG)ugggauUfuCfAfUfguaaccaasgsa(invabasic)(invabasic)	90.0
X91421	(invabasic)(invabasic)gsascuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(NHC6)(MFCO)	94.0
X91422	(invabasic)(invabasic)asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfaua(NHC6)(MFCO)	89.0
X91423	(invabasic)(invabasic)usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga(NHC6)(MFCO)	89.0

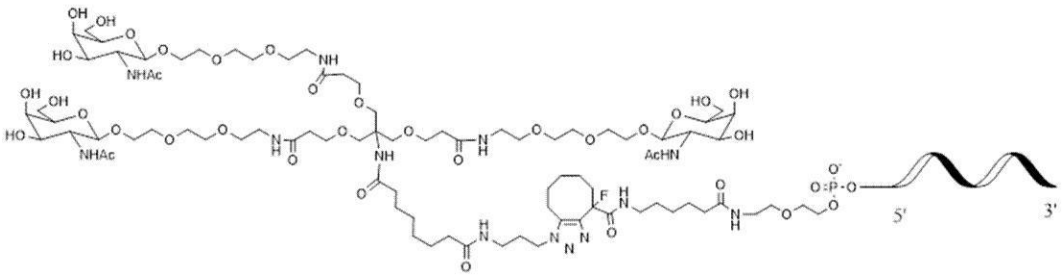
【０４４４】

ｖ）５’又は３’末端でのＴｒｉＧａｌＮＡｃ（ＧａｌＮＡｃ－Ｔ１）コンジュゲーション

【０４４５】

【化８６】

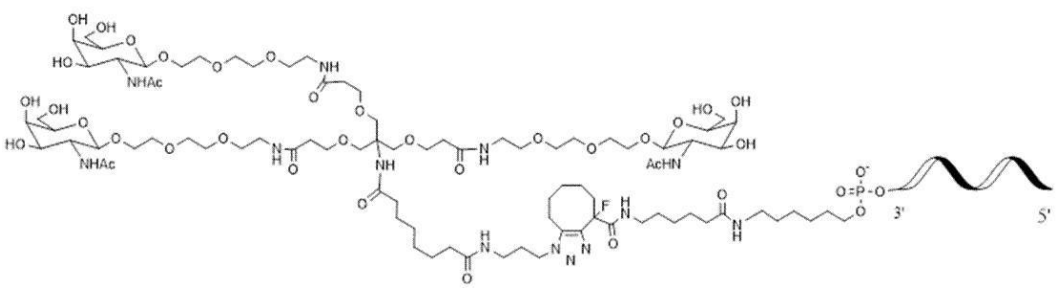
５’－ＧａｌＮＡｃ－Ｔ１コンジュゲート



【０４４６】

【化８７】

３’－ＧａｌＮＡｃ－Ｔ１コンジュゲート



【０４４７】
ＴｒｉＧａｌＮＡｃコンジュゲーションの一般的手順：ＭＦＣＯ修飾一本鎖を水に２０００ＯＤ／ｍＬで溶解させ、この溶液にＤＭＦ中の化合物１２（１０ｍＭ）の１当量溶液を添加した。反応を室温で実施し、３時間後に、０．７モル当量の化合物１２溶液を添加した。反応を一晩進行させ、完了を、ＬＣＭＳによって監視した。コンジュゲートを水に１５倍希釈し、Ｓａｒｔｏｒｉｕｓからの１．２μｍフィルターを通して濾過し、次いで、Ａｋｔａ　Ｐｕｒｅ機器（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）でＲＰ　ＨＰＬＣによって精製した。
【０４４８】
ＲＰ　ＨＰＬＣ精製は、ＷａｔｅｒｓからのＸＢｒｉｄｇｅ　Ｃ１８　Ｐｒｅｐ　１９×５０ｍｍカラムを使用して実施された。緩衝液Ａは、１００ｍＭの酢酸トリエチルアンモニウム　ｐＨ７であり、緩衝液Ｂは、緩衝液Ａ中の９５％のアセトニトリルを含有した。１０ｍＬ／分の流量及び６０℃の温度を用いた。２８０ｎｍでのＵＶ追跡を記録した。６０カラム体積で０～１００％Ｂの勾配を用いた。
【０４４９】
全長コンジュゲートオリゴヌクレオチドを含有する画分をプールし、３ＭのＮａＯＡｃ、ｐＨ５．２及び８５％のエタノールで冷凍庫内で沈殿させ、収集したペレットを水に溶解して、約１０００ＯＤ／ｍＬのオリゴヌクレオチド溶液を得た。２０％アンモニア水を添加することによって、Ｏ－アセテートを除去した。これらの保護基の定量的除去は、ＬＣ－ＭＳによって検証された。
【０４５０】
コンジュゲートを、Ａｋｔａ　Ｐｕｒｅ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）機器で、Ｓｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ２５　Ｆｉｎｅ樹脂（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用してサイズ排除クロマトグラフィーによって脱塩し、単離収率５０～７０％でコンジュゲートヌクレオチドを得た。
【０４５１】
【表１０】

センス鎖ID	センス鎖配列5’-3’	RP HPLCによる純度(%)
X91394	(GalNAc-T1)(MFCO)(NH-DEG)gacuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(invabasic)(invabasic)	80.0
X91395	(GalNAc-T1)(MFCO)(NH-DEG)aaGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfasusa(invabasic)(invabasic)	87.8
X91396	(GalNAc-T1)(MFCO)(NH-DEG)ugggauUfuCfAfUfguaaccaasgsa(invabasic)(invabasic)	87.9
X91427	(invabasic)(invabasic)gsascuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(NHC6)(MFCO)(GalNAc-T1)	88.0
X91428	(invabasic)(invabasic)asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfaua(NHC6)(MFCO)(GalNAc-T1)	82.6
X91429	(invabasic)(invabasic)usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga(NHC6)(MFCO)(GalNAc-T1)	82.9

【０４５２】

ｖｉ）二本鎖アニーリング

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

【０４５３】

Ｄｉｏｎｅｘ Ｕｌｔｉｍａｔｅ ３０００（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）ＨＰＬＣシステムで、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ（商標）７５ Ｉｎｃｒｅａｓｅ５／１５０ＧＬカラム５×１５３－１５８ｍｍ（Ｃｙｔｉｖａ）での分析的ＳＥＣ ＨＰＬＣによって、二本鎖を分析した。移動相は、１０％のアセトニトリルを含有する１×ＰＢＳからなった。定組成勾配を、室温で１．５ｍＬ／分の流量で１０分間実行した。２６０及び２８０ｎｍでのＵＶ追跡を記録した。水（ＬＣ－ＭＳグレード）をＳｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈから購入し、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ、１０倍、ｐＨ７．４）をＧＩＢＣＯ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）から購入した。

【０４５４】

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

【０４５５】

【表１１】

標的	二本鎖ID	ssRN ID	ssRNA 配列 5’-3’	HPLCによる二本鎖純度(%)
GO	ETX001	X91394	(GalNAc-T1)(MFCO)(NHDEG)gacuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(invabasic)(invabasic)	96.8
		X38483	usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaagucscsa	
	ETX005	X91427	(invabasic)(invabasic)gsascuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(NHC6)(MFCO)(GalNAc-T1)	92.8
		X38483	usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaagucscsa	
C5	ETX010	X91395	(GalNAc-T1)(MFCO)(NH-DEG)aaGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfasusa(invabasic)(invabasic)	96.4
		X91381	usAfsUfuAfuaAfaAfauaUfcUfuGfcuususudTdT	
	ETX014	X91428	(invabasic)(invabasic)asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfaua(NHC6)(MFCO)(GalNAc-T1)	97.2
		X91381	usAfsUfuAfuaAfaAfauaUfcUfuGfcuususudTdT	
TTR	ETX019	X91396	(GalNAc-T1)(MFCO)(NH-DEG)ugggauUfuCfAfUfguaaccaasgsa(invabasic)(invabasic)	97.2
		X38104	usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc	
	ETX023	X91429	(invabasic)(invabasic)usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga(NHC6)(MFCO)(GalNAc-T1)	96.3
		X38104	usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc	

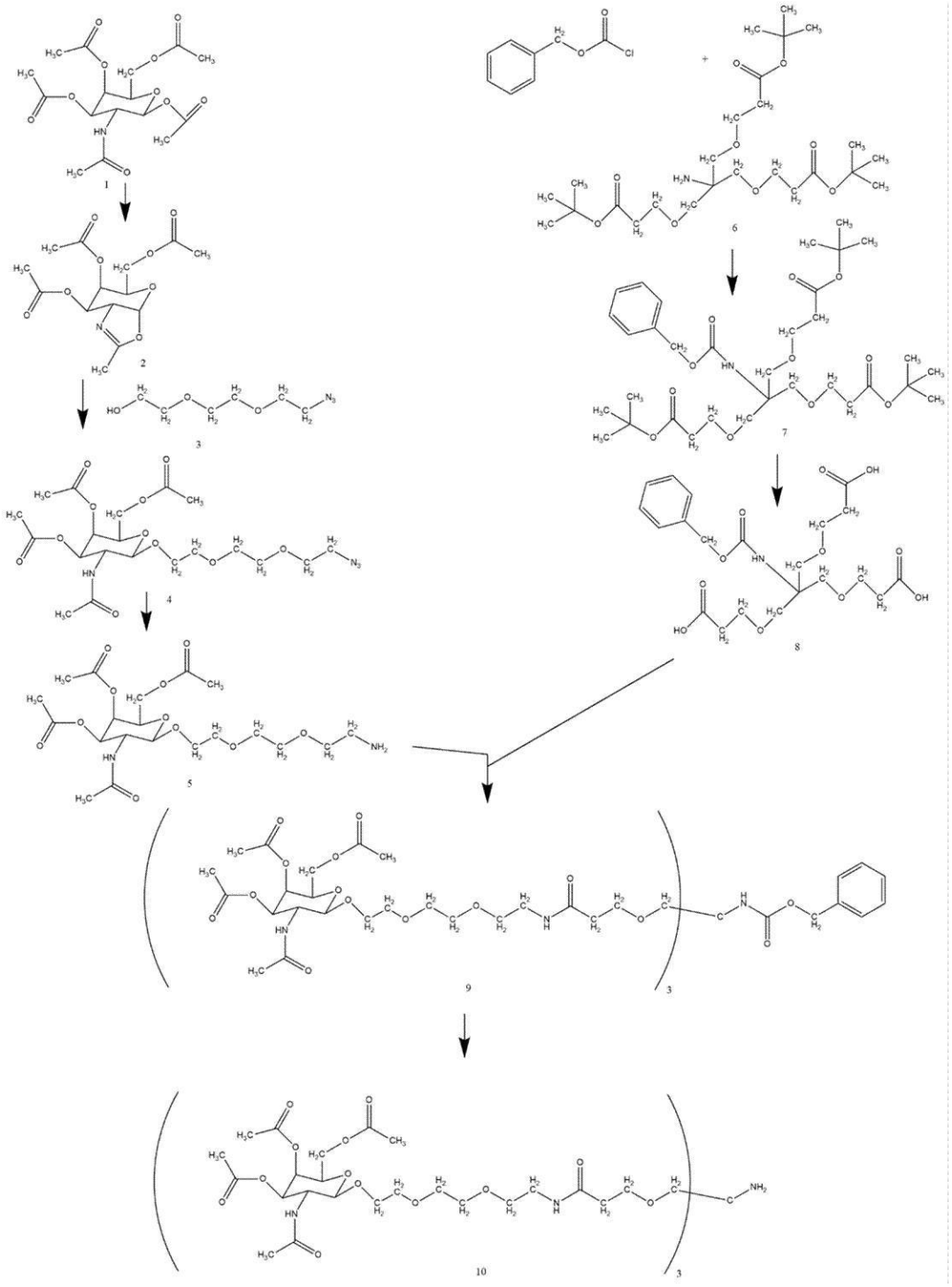
【０４５６】

以下のスキームは、合成の経路を更に提示している。

【０４５７】

【化８８】

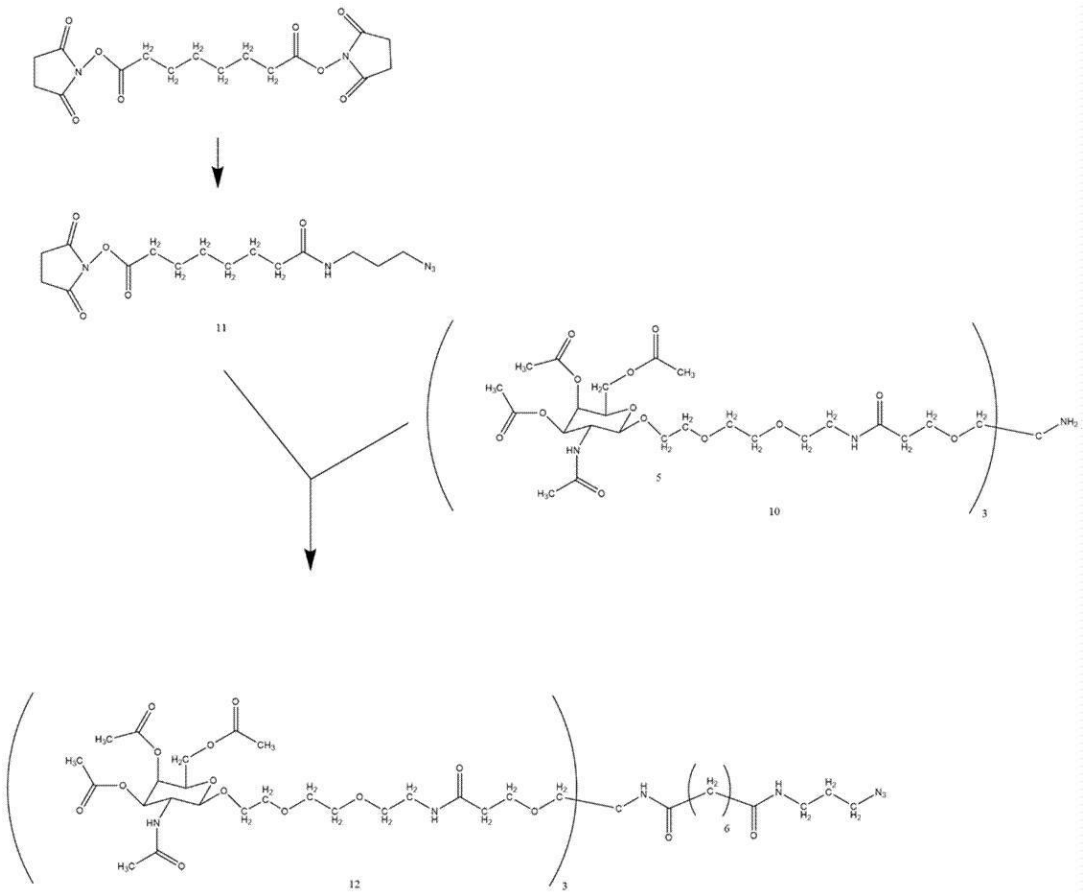
スキーム１：



【０４５８】

【化８９】

スキーム２：

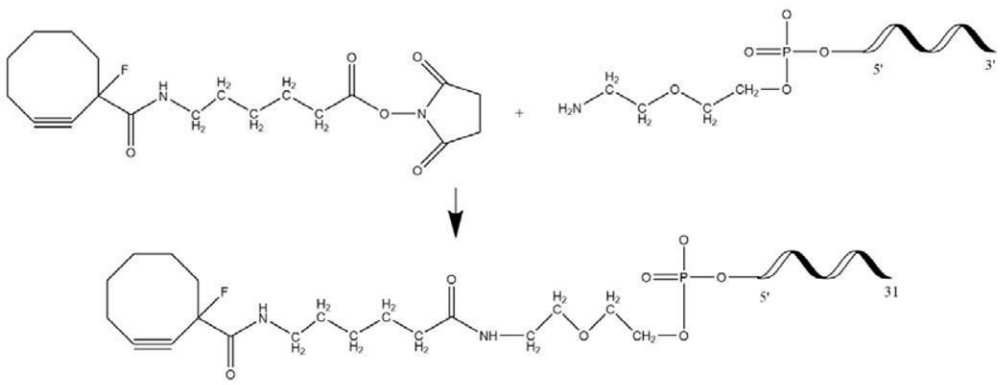


【０４５９】

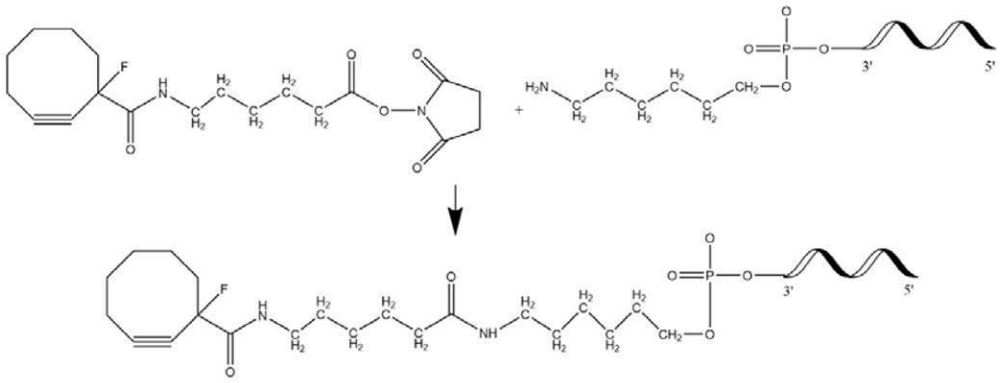
【化９０】

スキーム３：

5’末端 MFCO コンジュゲーション



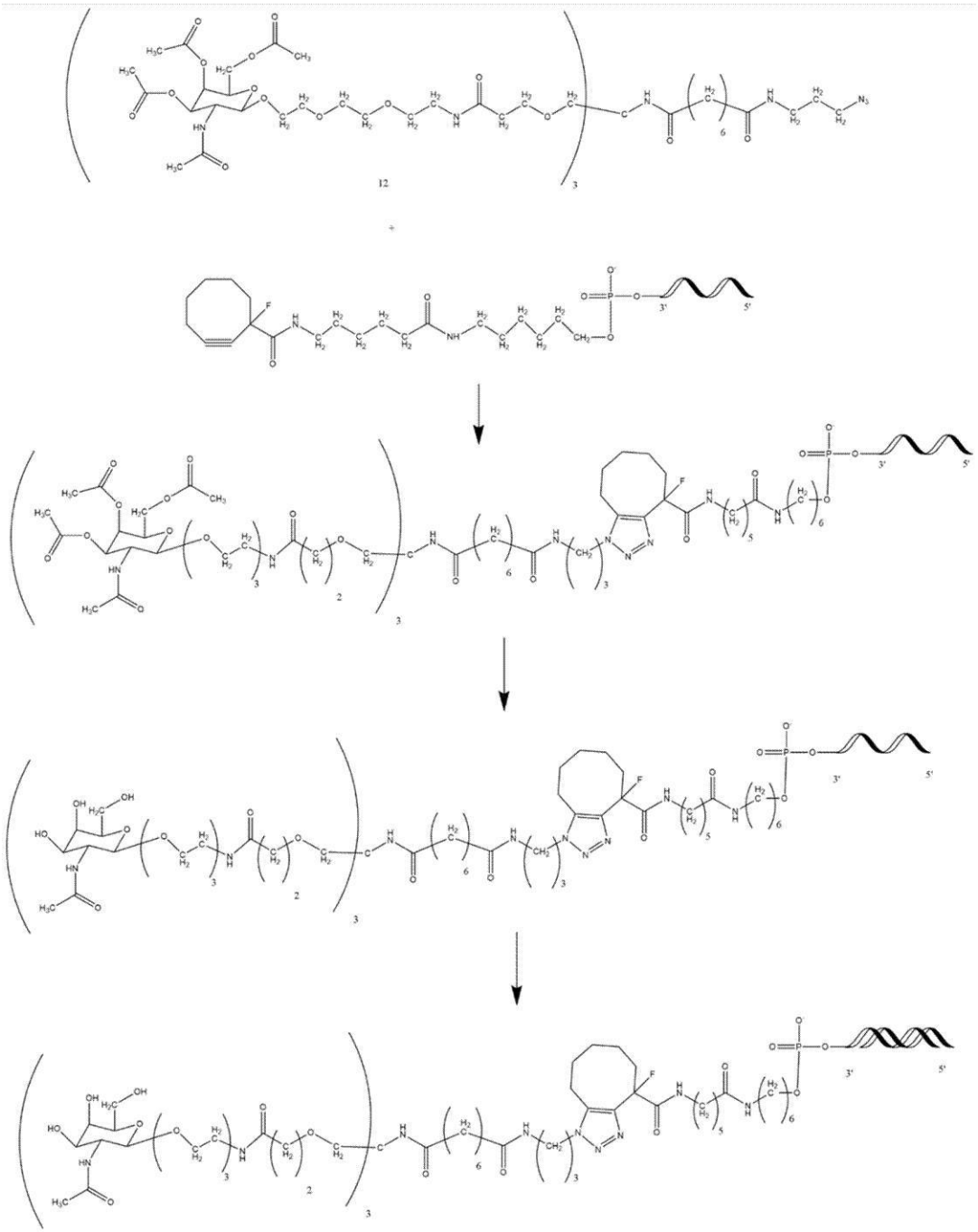
3’末端 MFCO コンジュゲーション



【０４６０】

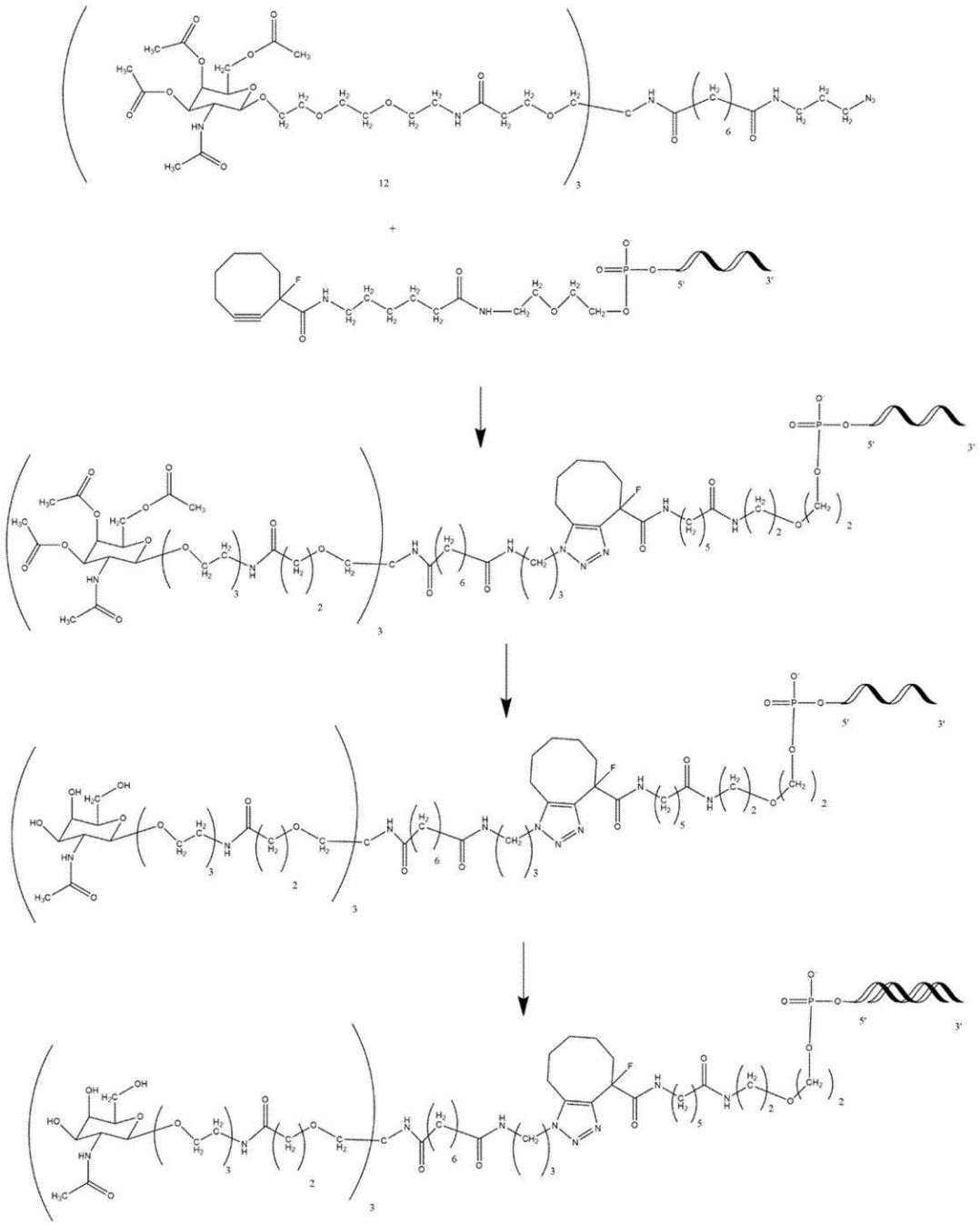
【化９１】

スキーム４：



【０４６１】

【化９２】
スキーム５：



【０４６２】
実施例３
以下の構築物は、実施例３及び４で使用される。
【０４６３】

【表１２－１】

標的	ID	センス配列 5’→3’	アンチセンス配列 5’→3’
hsHAO1	ETX006	(invabasic)(invabasic)gsascuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(NHC6)(ET-GalNAc-T2CO)	usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaagucscsa
hsHAO1	ETX002	(ET-GalNAc-T2CO)(NH2C12)gacuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(invabasic)(invabasic)	usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaagucscsa
hsC5	ETX011	(ET-GalNAc-T2CO)(NH2C12)aaGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfasusa(invabasic)(invabasic)	usAfsUfuAfuaAfaAfauaUfcUfuGfcuususudTdT
hsC5	ETX015	(invabasic)(invabasic)asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfaua(NHC6)(ET-GalNAc-T2CO)	usAfsUfuAfuaAfaAfauaUfcUfuGfcuususudTdT
hsTTR	ETX020	(ET-GalNAc-T2CO)(NH2C12)ugggauUfuCfAfUfguaaccaasgsa(invabasic)(invabasic)	usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc

【０４６４】

【表１２－２】

hsTTR	ETX024	(invabasic)(invabasic)usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga(NHC6)(ET-GalNAc-T2CO)	usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc

表12において、以下の命名(ＮＨＣ６)、(ＮＨ２Ｃ１２)、及び(ＥＴ－ＧａｌＮＡｃ－Ｔ２ＣＯ)を有する括弧内の構成要素は、リンカーの要素の記述子であり、完全な対応するリンカー構造を本明細書の図32及び図33に示す。実際のリンカー構造に対するこの略語の対応は、本明細書における上記の略語の他の全ての言及に同様に適用される。

【０４６５】

【表１２ａ－１】

表 12a

標的	ID	短い記述子	リンカープラスリガンド 表 12 の siRNA
hsHAO1	ETX006	3'-GalNAc　T2a 逆脱塩基	図 32 のリンカー＋リガンド
hsHAO1	ETX002	5'-GalNAc　T2b 逆脱塩基	図 33 のリンカー＋リガンド
hsC5	ETX011	5'-GalNAc　T2b 逆脱塩基	図 33 のリンカー＋リガンド

【０４６６】

【表１２ａ－２】

hsC5	ETX015	3'-GalNAc　T2a 逆脱塩基	図 32 のリンカー＋リガンド
hsTTR	ETX020	5'-GalNAc　T2b 逆脱塩基	図 33 のリンカー＋リガンド
hsTTR	FTX024	3'-GalNAc　T2a 逆脱塩基	図 32 のリンカー＋リガンド

【０４６７】
以下の対照構造もまた、実施例において使用される：
【０４６８】

【表１３－１】

標的	ID	センス配列 5’→3’	アンチセンス配列 5’→3’
F-Luc	XD-00914	cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT	UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT
hsFVII	XD-03999	AGAuAuGcAcAcAcAcGGAdTsdT	UCCGUGUGUGUGcAuAUCUdTsdT
hsAHSA1	XD-15421	uscsUfcGfuGfgCfcUfuAfaUfgAfaAf(invdT)	UfsUfsuCfaUfuAfaGfgCfcAfcGfaGfasusu

【０４６９】

【表１３－２】

略語：

AHSA1	熱ショックタンパク質 ATP アーゼ 1 の活性化因子
ASGR1	アシアロ糖タンパク質受容体 1
ASO	アンチセンスオリゴヌクレオチド
bDNA	分岐 DNA
bp	塩基対
C5	補体 C5
conc.	濃度
ctrl.	対照
CV	変動係数
dG, dC, dA, dT	ＤＮＡ残基
F	フルオロ
FCS	ウシ胎仔血清
GalNAc	Ｎ－アセチルガラクトサミン
GAPDH	グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ
G, C, A, U	RNA 残基
g, c, a, u	2'-O-メチル修飾残基
Gf, Cf, Af, Uf	2'-フルオロ修飾残基
h	時間
HAO1	ヒドロキシ酸オキシダーゼ 1
HPLC	高性能液体クロマトグラフィー

【０４７０】

【表１３－３】

Hs	Ｈｏｍｏ　ｓａｐｉｅｎｓ
IC50	応答が５０％低減した阻害剤の濃度
ID	識別子
KD	ノックダウン
LF2000	Lipofectamine2000
M	モル濃度
Mf	カニクイザル
min	分
MV	平均値
n.a.又はN/A	該当なし
NEAA	非必須アミノ酸
nt	ヌクレオチド
QC	品質管理
QG2.0	QuantiGene2.0
RLU	相対光単位
RNAi	ＲＮＡ干渉
RT	室温
s	ホスホロチオエート骨格修飾
SAR	構造活性相関
SD	標準偏差
siRNA	低分子干渉ＲＮＡ
TTR	トランスサイレチン

【０４７１】
実施例３
－概要
ｈｓＨＡＯ１、ｈｓＣ５、又はｈｓＴＴＲ　ｍＲＮＡのいずれかを標的とするＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡを合成し、品質管理した。ｓｉＲＮＡのセット全体（ＨＡＯ１を標的とするｓｉＲＮＡを除く）を、最初に、ＲＮＡｉＭＡＸを使用したトランスフェクションによって、ＨｅｐＧ２細胞における用量応答設定において研究し、続いて、初代ヒト肝細胞におけるジムノシスな（ｇｙｍｎｏｔｉｃ）自由取り込み設定において用量応答分析を行った。
【０４７２】
ｈｓＨＡＯ１、ｈｓＣ５又はｈｓＴＴＲ　ｍＲＮＡを標的とするＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡでの初代ヒト肝細胞の直接インキュベーションは、様々な程度に用量依存的なオンターゲットｍＲＮＡサイレンシングをもたらした。
【０４７３】
－研究の目的
この一連の実験の目的は、３つの異なるオンターゲット、すなわち、ｈｓＨＡＯ１、ｈｓＣ５又はｈｓＴＴＲ　ｍＲＮＡを標的とするｓｉＲＮＡの状況において、異なるＧａｌＮＡｃリガンドのインビトロ活性を分析することであった。
【０４７４】
この研究のワークパッケージには、（ｉ）ありとあらゆる目的の個々のオンターゲットに特異的なｂＤＮＡプローブセットを設計、合成、及び試験するためのアッセイ開発、（ｉｉ）その後のスクリーニング実験に好適な細胞株の特定、（ｉｉｉ）１つ以上のヒトがん細胞株における潜在的に全ての（トランスフェクションによる）ｓｉＲＮＡの用量応答

分析、並びに（ｉｖ）ジムノシスな自由取り込み設定における初代ヒト肝細胞におけるｓｉＲＮＡの用量応答分析が含まれた。両方の設定において、ＩＣ５０値及び最大阻害値が計算され、続いて、それらの効力に従ってｓｉＲＮＡ研究セットのランキング化がされる必要がある。

【０４７５】

－材料及び方法

オリゴヌクレオチド合成

標準的な固相合成法を使用して、目的のｓｉＲＮＡ（表１２を参照されたい）及び対照（表１３を参照されたい）を化学的に合成した。

【０４７６】

細胞培養及びインビトロトランスフェクション実験

細胞培養、トランスフェクション、及びＱｕａｎｔｉＧｅｎｅ２．０分岐ＤＮＡアッセイを以下に記載し、ｓｉＲＮＡ配列を表１２及び１３に列挙する。ＨｅｐＧ２細胞を、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｉｓｓｕｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）（ＨＢ－８０６５、ロット番号：６３１７６２９４）から供給してもらい、１０％のウシ胎仔血清（ＦＣＳ）を含有するように補充したＡＴＣＣ配合イーグル最小必須培地で培養した。初代ヒト肝細胞（ＰＨＨ）を、Ｐｒｉｍａｃｙｔ（Ｓｃｈｗｅｒｉｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）から調達した（ロット番号：ＣｙＨｕｆ１９００９ＨＥｃ）。細胞は、摘出技術によって悪性膠芽腫腫瘍に由来する。この研究で使用された全ての細胞を、加湿インキュベーター内、５％ＣＯ２の雰囲気中、３７℃で培養した。

【０４７７】

ｈｓＣ５又はｈｓＴＴＲ標的化ｓｉＲＮＡ（及び対照）でのＨｅｐＧ２細胞のトランスフェクションのために、細胞を通常の９６ウェル組織培養プレートに２０．０００細胞／ウェルの密度で播種した。ｓｉＲＮＡでの細胞のトランスフェクションを、製造業者の指示に従い、市販のトランスフェクション試薬ＲＮＡｉＭＡＸ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ／Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して行った。ＨｅｐＧ２細胞において、それぞれ２４、６、１．５、０．４、０．１、０．０３、０．００８、０．００２、０．０００５、及び０．０００１ｎＭの最終ｓｉＲＮＡ濃度で、２０個の候補（１１×ｈｓＣ５、９×ｈｓＴＴＲ）の１０点用量応答実験を行った。

【０４７８】

ＰＨＨ中の用量応答分析は、１．５μＭの最高の最終ｓｉＲＮＡ濃度から始まり、５００ｎＭに続き、そこから２倍希釈ステップで連続的に減少する、ジムノシスな自由取り込み設定における細胞の直接インキュベーションによって行われた。

【０４７９】

対照ウェルをＨｅｐＧ２細胞にトランスフェクションしたか、又は対応するプレート上で研究された最高の試験ｓｉＲＮＡ濃度で初代ヒト肝細胞と直接インキュベーションした。細胞の模擬処理の次の異なるプロジェクトフェーズに含まれる全ての対照ｓｉＲＮＡを要約し、表１３に列挙する。各ｓｉＲＮＡ及び対照について、少なくとも４つのウェルを並行してトランスフェクション／直接インキュベーションし、各ウェルから個々のデータポイントを収集した。

【０４８０】

トランスフェクション後、ｓｉＲＮＡとのインキュベーションの２４時間後、培地を除去し、ＨｅｐＧ２細胞を溶解混合物（１体積の溶解緩衝液＋２体積のヌクレアーゼフリー水）中で溶解し、次いで、５３℃で少なくとも４５分間インキュベーションした。ＰＨＨの場合、播種培地を、細胞の処理の５時間後に除去し、続いて、ウェル当たり５０μｌの完全維持培地を添加した。最大で合計７２時間のインキュベーション期間まで、培地を、そのようにして２４時間ごとに交換した。４時間又は７２時間のいずれかの時点で、細胞培養上清を除去し、続いて、１：１０００ｖ／ｖのプロテイナーゼＫを補充した２００μｌの溶解混合物を添加した。

【０４８１】

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

【０４８２】

アッセイ開発

ＱｕａｎｔｉＧｅｎｅ２．０分岐ＤＮＡ（ｂＤＮＡ）プローブセットを、Ｈｏｍｏ　ｓａｐｉｅｎｓ　ＧＡＰＤＨ、ＡＨＳＡ１、ｈｓＨＡＯ１、ｈｓＣ５、及びｈｓＴＴＲに特異的に設計及び合成した。最初にｂＤＮＡプローブセットを、製造業者の指示に従ってｂＤＮＡ分析によって試験し、初代ヒト肝細胞の次に以下のヒト及びサルがん細胞株の２つの異なる溶解物量、すなわち１０μｌ及び５０μｌにおける目的のｍＲＮＡのレベルを評価した。ＳＪＳＡ－１、ＴＦ１、ＮＣＩ－Ｈ１６５０、Ｙ－７９、Ｋａｓｕｍｉ－１、ＥＡｈｙ９２６、Ｃａｋｉ－１、Ｃｏｌｏ２０５、ＲＰＴＥＣ、Ａ２５３、ＨｅＬａＳ３、Ｈｅｐ３Ｂ、ＢｘＰＣ３、ＤＵ１４５、ＴＨＰ－１、ＮＣＩ－Ｈ４６０、ＩＧＲ３７、ＬＳ１７４Ｔ、Ｂｅ（２）－Ｃ、ＳＷ１５７３、ＮＣＩ－Ｈ３５８、ＴＣ７１、２２Ｒｖ１、ＢＴ４７４、ＨｅＬａ、ＫＢｗｔ、Ｐａｎｃ－１、Ｕ８７ＭＧ、Ａ１７２、Ｃ４２、ＨｅｐＧ２、ＬＮＣａＰ、ＰＣ３、ＳｕｐＴ１１、Ａ５４９、ＨＣＴ１１６、ＨｕＨ７、ＭＣＦ７、ＳＨ－ＳＹ５Ｙ、ＨＵＶＥＣ、Ｃ３３Ａ、ＨＥＫ２９３、ＨＴ２９、ＭＯＬＭ１３、及びＳＫ－ＭＥＬ－２。細胞溶解物を添加しないｂＤＮＡプローブセットのみを含有するウェルを使用して、技術的バックグランド及びノイズ信号を監視した。

【０４８３】

－結果

ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡのスクリーニングのための好適な細胞型の特定

図１～図３は、多様なセットのヒトがん細胞株プラス初代ヒト肝細胞の溶解物における、３つの目的のオンターゲット、すなわち、ｈｓＣ５、ｈｓＨＡＯ１、及びｈｓＴＴＲのｍＲＮＡ発現データを示す。溶解物体積当たりの細胞数は、試験された各細胞株と同一であり、これは、異なる細胞型間の発現レベルの比較を可能にするために必要である。図１は、試験された全ての細胞型のｈｓＣ５　ｍＲＮＡ発現データを示す。

【０４８４】

同一の型の細胞も、ｈｓＨＡＯ１　ｍＲＮＡの発現についてスクリーニングし、結果を図２の一部として棒グラフに示す。

【０４８５】

最後に、ｈｓＴＴＲを標的とするＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡのスクリーニングを可能にする好適な細胞型を特定し、それぞれのデータは、図３の一部である。

【０４８６】

要約すると、３つの目的のオンターゲット全てのｍＲＮＡ発現レベルは、初代ヒト肝細胞（ＰＨＨ）において十分に高い。更に、ＨｅｐＧ２細胞を使用して、ｈｓＣ５及びｈｓＴＴＲ　ｍＲＮＡを標的とするＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡをスクリーニングすることができ、対照的に、ｈｓＨＡＯ１　ｍＲＮＡに特異的なｓｉＲＮＡを試験するのに好適であろうがん細胞株は特定されなかった。

【０４８７】

ＨｅｐＧ２細胞におけるｈｓＴＴＲ標的化ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡの用量応答分析

トランスフェクション最適化後、ＲＮＡｉＭＡＸを使用した用量応答設定において、ｈｓＴＴＲ標的化ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡのセット全体（表１２を参照）でＨｅｐＧ２細胞をトランスフェクションした。最高の最終ｓｉＲＮＡ試験濃度は、２４ｎＭで、９細胞減少させた。表１４は、研究された全てのｈｓＴＴＲ標的化ＧａｌＮＡＣ－ｓｉＲＮＡの

活性データを列挙する。

【０４８８】

表１４：　ＨｅｐＧ２細胞におけるｈｓＴＴＲ標的化ｓｉＲＮＡの標的、インキュベーション時間、外部ＩＤ、ＩＣ２０／ＩＣ５０／ＩＣ８０値、及び最大阻害。列挙は、外部ＩＤに従って整理され、４時間のインキュベーションが上部に列挙され、２４時間のインキュベーションが下部に列挙される。

【０４８９】

【表１４】

標的	インキュベーション［時間］	外部 ID	IC20[nM]	IC50[nM]	IC80[nM]	最大阻害[%]
hsTTR	4	ETX020	1,953	該当なし	該当なし	37,9
hsTTR	4	ETX024	1,952	該当なし	該当なし	48,2
hsTTR	24	ETX020	0,005	0,025	0,133	95,5
hsTTR	24	ETX024	0,008	0,029	0,134	95,5

【０４９０】

２４時間のインキュベーションの結果をまた、図１１Ａ～Ｂにも示す。

【０４９１】

概して、ｈｓＴＴＲ標的化ｓｉＲＮＡでのＨｅｐＧ２細胞のトランスフェクションは、概して、０％サイレンシングから最大阻害までの全活性範囲にわたるオンターゲットｍＲＮＡサイレンシングをもたらす。トランスフェクションの２４時間後に生成されたデータは、トランスフェクションの４時間後にのみ生成されたデータと比較して、より堅牢であり、標準の変動が低い。更に、オンターゲットノックダウンの程度は、概して、インキュベーションの４時間から最大で２４時間まで時間とともに増加する。ｈｓＴＴＲ　ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡは、低い２桁のｐＭ範囲におけるＩＣ５０値でオンターゲットｍＲＮＡを９５％超サイレンシングさせることが特定されている。

【０４９２】

ＨｅｐＧ２細胞におけるｈｓＣ５標的化ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡの用量応答分析

ｈｓＴＴＲ　ｓｉＲＮＡと同一のリンガー／位置／ＧａｌＮＡｃリガンドバリエーションを共有するが、オンターゲットｈｓＣ５　ｍＲＮＡに特異的な配列であるＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡを用いた、ＲＮＡｉＭＡＸを使用したＨｅｐＧ２細胞のトランスフェクションによって、第２の目的の標的であるｈｓＣ５　ｍＲＮＡを、同一の用量応答設定（しかしながら、最小限の種々の最終ｓｉＲＮＡ試験濃度で）において試験した。

【０４９３】

表１５：　ＨｅｐＧ２細胞におけるｈｓＣ５標的化ｓｉＲＮＡの標的、インキュベーション時間、外部ＩＤ、ＩＣ２０／ＩＣ５０／ＩＣ８０値、及び最大阻害。列挙は、外部ＩＤに従って整理され、４時間のインキュベーションが上部に列挙され、２４時間のインキュベーションが下部に列挙される。

【０４９４】

【表１５】

標的	インキュベーション［時間］	外部 ID	IC20[nM]	IC50[nM]	IC80[nM]	最大阻害[%]
C5	4	ETX011	0,091	0,424	該当なし	74,6
C5	4	ETX015	0,407	0,578	該当なし	61,9
C5	24	ETX011	0,001	0,005	0,045	88,4
C5	24	ETX015	0,003	0,013	0,099	88,8

【０４９５】
２４時間のインキュベーションの結果をまた、図１２Ａ～Ｂにも示す。
【０４９６】
ｈｓＣ５に特異的なＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡセットでのＨｅｐＧ２細胞のトランスフェクションでは、用量依存的なオンターゲットｈｓＣ５　ｍＲＮＡサイレンシングが存在する。いくつかのノックダウンは、細胞のトランスフェクションの４時間後で既に検出することができ、より長いインキュベーション期間、すなわち２４時間後に更に高いオンターゲットサイレンシングが観察される。ｈｓＣ５　ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡは、低い１桁のｐＭ範囲におけるＩＣ５０値でオンターゲットｍＲＮＡをほぼ９０％サイレンシングすることが特定されている。
【０４９７】
全てのＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡの試験に好適な初代ヒト肝細胞バッチの特定
ヒトがん細胞株ＨｅｐＧ２における２つのＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡセットの用量応答分析は、全ての新しいＧａｌＮＡｃ－／リンカー／位置／キャップバリアントが、ＡＧＯ２への効率的な結合及びＲＩＳＣへの担持のための基質であり、加えて、標的ｍＲＮＡのＲＮＡｉ媒介切断において機能することが可能であることを実証（及び保証）する必要がある。しかしながら、標的化ＧａｌＮＡｃ－リガンド誘導体が肝細胞への効率的な取り込みを可能にするかどうかを試験するために、用量応答分析実験は、ジムノシスな自由取り込み設定によって、初代ヒト肝細胞で行われ必要がある。肝細胞は、アシアロ糖タンパク質受容体（ＡＳＧＲ１）を高レベルに排他的に発現し、この受容体は、概して、循環から標的糖タンパク質を除去するために肝臓によって使用される。ＧａｌＮＡｃ－リガンドにコンジュゲートされた特定の型のオリゴヌクレオチド、例えば、ｓｉＲＮＡ又はＡＳＯは、この高ターンオーバー受容体によって認識され、クラトリンコーティング小胞を介して細胞質に効率的に取り込まれ、エンドソーム区画への輸送されることは、今では一般的に知られている。エンドソーム脱出は、オリゴヌクレオチド送達の速度制限ステップであると考えられる。
【０４９８】
中間アッセイ開発実験を行い、種々のバッチの初代ヒト肝細胞を目的の関連遺伝子、すなわち、ｈｓＣ５、ｈｓＴＴＲ、ｈｓＨＡＯ１、ｈｓＧＡＰＤＨ、及びｈｓＡＨＳＡ１の発現レベルについて試験した。Ｐｒｉｍａｃｙｔ（Ｓｃｈｗｅｒｉｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）は、試験のために異なる初代ヒト肝細胞バッチの３つのバイアル、すなわちＢＨｕｆ１６０８７、ＣＨＦ２１０１、及びＣｙＨｕｆ１９００９を提供した。細胞をコラーゲンコーティングされた９６ウェル組織培養プレートに播種し、続いて、細胞溶解及びｂＤＮＡ分析の前に細胞を０時間、２４時間、４８時間及び７２時間インキュベーションして、目的のｍＲＮＡレベルを監視した。図６は、初代ヒト肝細胞バッチＢＨｕｆ１６０８７、ＣＨＦ２１０１、及びＣｙＨｕｆ１９００９における、３つの目的のオンターゲット、ｈｓＴ

ＴＲ、ｈｓＣ５、及びｈｓＨＡＯ１全てについての絶対ｍＲＮＡ発現データを示す。ｈｓＧＡＰＤＨ及びｈｓＡＨＳＡ１のｍＲＮＡ発現レベルを図７に示す。

【０４９９】

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

【０５００】

ＰＨＨにおけるｈｓＨＡＯ１標的化ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡの用量応答分析

初代ヒト肝細胞（ＰＨＨ）の好適なバッチ（ＣｙＨｕｆ１９００９）の特定に続いて、表１２に列挙されるｈｓＨＡＯ１標的化ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡのジムノシスな自由取り込み分析を行った。試験された最終ｓｉＲＮＡ濃度は、１．５μＭであり、続いて５００ｎＭであり、８つの２倍連続希釈ステップで、１．９５ｎＭの最も低い最終ｓｉＲＮＡ濃度まで減少させた。実験は、ＰＨＨ細胞の直接インキュベーションの４時間及び７２時間後に終了した。表１６は、研究された全てのｈｓＨＡＯ１標的化ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡの活性データを列挙する。この実験に含まれる全ての対照ｓｉＲＮＡを要約し、表１３に列挙する。

【０５０１】

表１６：　初代ヒト肝細胞（ＰＨＨ）におけるｈｓＨＡＯ１標的化ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡの標的、インキュベーション時間、外部ＩＤ、ＩＣ２０／ＩＣ５０／ＩＣ８０値、及び最大阻害。列挙は、外部ＩＤに従って整理され、４時間及び７２時間のインキュベーションがそれぞれ上部及び下部に列挙されている。

【０５０２】

【表１６】

標的	インキュベーション［時間］	外部 ID	IC20[nM]	IC50[nM]	IC80[nM]	最大阻害[%]
hsHAO1(hsGO1)	4	ETX002	該当なし	該当なし	該当なし	7,2
hsHAO1(hsGO1)	4	ETX006	該当なし	該当なし	該当なし	0,5
hsHAO1(hsGO1)	72	ETX002	23,9	該当なし	該当なし	44,3
hsHAO1(hsGO1)	72	ETX006	27,5	617,1	該当なし	53,6

【０５０３】

７２時間のインキュベーションの結果をまた、図１３Ａ～Ｂにも示す。

【０５０４】

ｈｓＨＡＯ１を標的とするＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡのジムノシスな自由取り込みは、４時間以内に有意なオンターゲットサイレンシングをもたらさなかったが、しかしながら、７２時間のインキュベーション後、オンターゲットサイレンシングは、最大阻害の３５．５～５８．１％の範囲で見られた。

【０５０５】

ＰＨＨにおけるｈｓＣ５標的化ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡの用量応答分析

前のアッセイで試験されたｈｓＴＴＲ及びｈｓＨＡＯ１と同一のリンカー／位置／ＧａｌＮＡｃリガンドバリエーションを共有するが、オンターゲットｈｓＣ５　ｍＲＮＡに特異的な配列を有するＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡを用いた、ＰＨＨにおけるジムノシスな自由取り込みによって、第２の目的の標的であるｈｓＣ５　ｍＲＮＡを、同一の用量応答設定において試験した。ｈｓＣ５を標的とするＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡの配列、及び対照ｓｉＲＮＡについての全ての配列及び情報を、それぞれ表１２及び表１３に列挙する。実験は、ＰＨＨの４時間及び７２時間の直接インキュベーション後に終了した。表１７は、研究された全てのｈｓＣ５標的化ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡの活性データを列挙する。

【０５０６】

表１７：　ＰＨＨにおけるｈｓＣ５標的化ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡの標的、インキュベーション時間、外部ＩＤ、ＩＣ２０／ＩＣ５０／ＩＣ８０値、及び最大阻害。列挙は、外部ＩＤに従って整理され、４時間及び７２時間のインキュベーションがそれぞれ上部及び下部に列挙されている。

【０５０７】

【表１７】

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

【０５０８】

７２時間のインキュベーションの結果をまた、図１４Ａ～Ｂにも示す。

【０５０９】

４時間のインキュベーション後、ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡの有意なオンターゲットサイレンシングは見られない。７２時間のインキュベーション期間後に生成されたデータは、最大で６５．５％の最大阻害のより堅牢なオンターゲットサイレンシングを示した。

【０５１０】

ＰＨＨにおけるｈｓＴＴＲ標的化ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡの用量応答分析

最後の目的の標的であるｈｓＴＴＲ　ｍＲＮＡを、標的ｈｓＨＡＯ１及びｈｓＣ５と同一の用量応答設定において、ＰＨＨにおけるジムノシスな自由取り込みで再び試験したが、唯一の違いは、オンターゲットｈｓＴＴＲ　ｍＲＮＡに対する特定のｓｉＲＮＡ配列が使用されたことであった（表１２を参照されたい）。

【０５１１】

実験は、ＰＨＨの７２時間の直接インキュベーション後に終了した。表１８は、研究された全てのｈｓＴＴＲ標的化ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡの活性データを列挙する。

【０５１２】

表１８：　初代ヒト肝細胞（ＰＨＨ）におけるｈｓＴＴＲ標的化ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡの標的、インキュベーション時間、外部ＩＤ、ＩＣ２０／ＩＣ５０／ＩＣ８０値、及び最大阻害。列挙は、外部ＩＤに従って整理されている。

【０５１３】

【表１８】

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

【０５１４】
結果をまた、図１５Ａ～Ｂにも示す。
【０５１５】
ｈｓＴＴＲを標的とするＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡのジムノシスな自由取り込みは、４６～８２．５％の最大阻害の範囲で、７２時間以内に有意なオンターゲットサイレンシングをもたらした。
【０５１６】
－結論及び議論
本研究の範囲は、３つの異なるオンターゲット、すなわち、ｈｓＨＡＯ１、ｈｓＣ５、及びｈｓＴＴＲ ｍＲＮＡを標的とするｓｉＲＮＡの状況で使用される場合に、本発明によるＧａｌＮＡｃリガンドのインビトロ活性を分析することであった。各標的に特異的なｓｉＲＮＡセットは、各２つの異なるアンチセンス鎖の状況において、異なるリンカー／キャップ／修飾／ＧａｌＮＡｃリガンド化学を有するｓｉＲＮＡからなった。
【０５１７】
全ての標的について、表１２からのＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡが、高い全体的な効力及び低いＩＣ５０値を示したことを特定した。
【０５１８】
実施例４
合成の経路
ｖｉｉ）コンジュゲートビルディングブロックＴｒｉＧａｌＮＡｃの合成
薄層クロマトグラフィー（ＴＬＣ）を、Ｍａｃｈｅｒｅｙ－Ｎａｇｅｌからの蛍光インジケータ２５４ｎｍを有するシリカ被覆アルミニウムプレート上で行った。化合物を、ＵＶ光（２５４ｎｍ）下で、又はメタノール（ＭｅＯＨ）中の５％Ｈ２ＳＯ４若しくはＳｔａｈｌによるニンヒドリン試薬、（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈから）でスプレーし、続いて加熱した後、視覚化した。フラッシュクロマトグラフィーを、Ｂｉｏｔａｇｅ Ｓｆａｒ Ｓｉｌｉｃａ１０、２５、５０、又は１００ｇカラム（Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎ）を使用して、二重可変ＵＶ波長検出器（２００～４００ｎｍ）を備えたＢｉｏｔａｇｅ Ｉｓｏｌｅｒａ Ｏｎｅフラッシュクロマトグラフィー機器を用いて行った。
【０５１９】
全ての水分感受性反応は、乾燥ガラス器具、無水溶媒、及びアルゴン雰囲気を使用して、無水条件下で実施した。全ての市販の試薬を、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈから購入し、溶媒をＣａｒｌ Ｒｏｔｈ ＧｍｂＨ＋Ｃｏ．ＫＧから購入した。Ｄ－ガラクトサミンペンタアセテートをＡＫ ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃから購入した。
【０５２０】
ＨＰＬＣ／ＥＳＩ－ＭＳを、Ｄｉｏｎｅｘ ＵｌｔｉＭａｔｅ ３０００ ＲＳ ＵＨＰＬＣシステム及びＴｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ ＭＳＱ Ｐｌｕｓ質量分析計で、ＷａｔｅｒｓからのＡｃｑｕｉｔｙ ＵＰＬＣ Ｐｒｏｔｅｉｎ ＢＥＨ Ｃ４カラム（３００Å、１．７μｍ、２．１×１００ｍｍ）を使用して、６０℃で行った。溶媒系は、０．１％ギ酸を含有するＨ２Ｏを有する溶媒Ａ、及び０．１％ギ酸を含有するアセト

ニトリル（ＡＣＮ）を有する溶媒Ｂからなった。０．４ｍＬ／分の流量で、１５分間にわたってＢの５～１００％の勾配を用いた。検出器及び条件：　コロナ超荷電エアロゾル検出（ｅｓａから）。噴霧器温度：２５℃。Ｎ２圧力：　３５．１ｐｓｉ。フィルター：コロナ。

【０５２１】

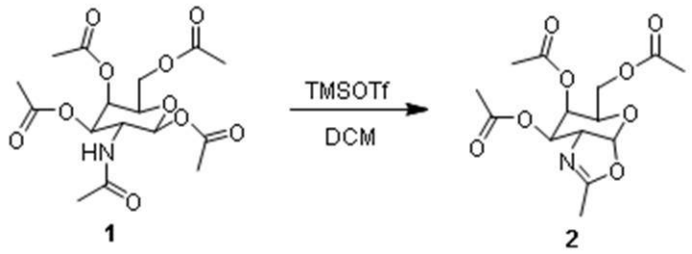
１Ｈ及び１３Ｃ　ＮＭＲスペクトルを、５００ＭＨｚ（１Ｈ　ＮＭＲ）及び１２５ＭＨｚ（１３Ｃ　ＮＭＲ）でＶａｒｉａｎ分光器で室温で記録した。化学シフトは、溶媒残留ピーク（ＣＤＣｌ３－１Ｈ　ＮＭＲ：７．２６ｐｐｍでのδ、１３Ｃ　ＮＭＲ　７７．２ｐｐｍでのδ、ＤＭＳＯ－ｄ６－１Ｈ　ＮＭＲ：２．５０ｐｐｍでのδ、１３Ｃ　ＮＭＲ　３９．５ｐｐｍでのδ）を参照したｐｐｍで与えられる。カップリング定数はヘルツで与えられる。信号分割パターンは、一重線（ｓ）、二重線（ｄ）、三重線（ｔ）、又は多重線（ｍ）として記載される。

【０５２２】

ｖｉｉｉ）コンジュゲートビルディングブロックＴｒｉＧａｌＮＡｃの合成経路

【０５２３】

【化９３】

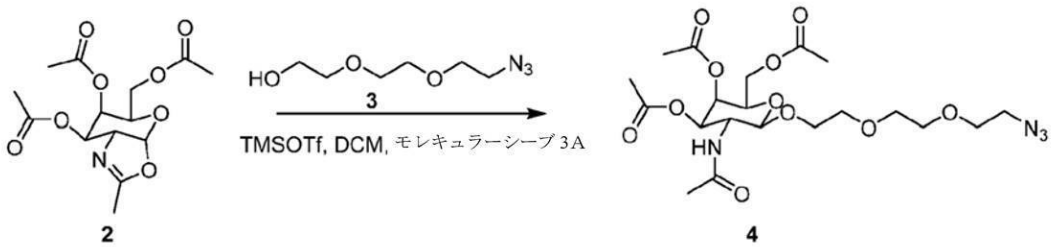


【０５２４】

化合物２の調製：Ｄ－ガラクトサミンペンタアセテート（３．００ｇ、７．７１ｍｍｏｌ、１．０当量）を、アルゴン下で無水ジクロロメタン（ＤＣＭ）（３０ｍＬ）に溶解し、トリメチルシリルトリフルオロメタンスルホネート（ＴＭＳＯＴｆ、４．２８ｇ、１９．２７ｍｍｏｌ、２．５当量）を添加した。反応物を室温で３時間撹拌した。反応混合物をＤＣＭ（５０ｍＬ）で希釈し、冷飽和ＮａＨＣＯ３水溶液（１００ｍＬ）及び水（１００ｍＬ）で洗浄した。有機層を分離し、Ｎａ２ＳＯ４で乾燥させ、濃縮して、表題化合物を黄色の油状物として得、これをフラッシュクロマトグラフィー（勾配溶出：１０ＣＶでＤＣＭ中０～１０％のＭｅＯＨ）によって精製した。生成物を無色の油状物として得た（２．５ｇ、９８％、ｒｆ＝０．４５（ＤＣＭ中２％のＭｅＯＨ））。

【０５２５】

【化９４】



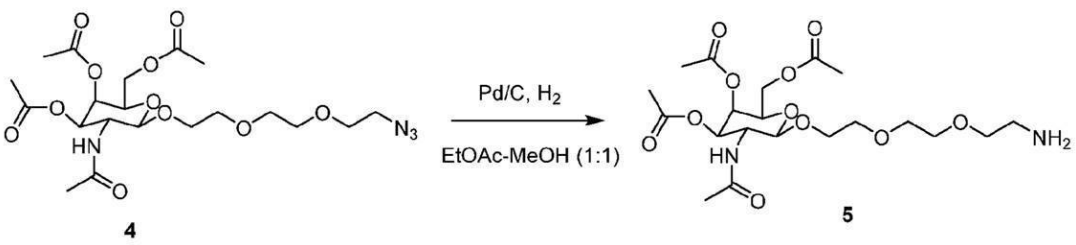
【０５２６】

化合物４の調製：化合物２（２．３０ｇ、６．９８ｍｍｏｌ、１．０当量）及びアジド－ＰＥＧ３－ＯＨ（１．８３ｇ、１０．５ｍｍｏｌ、１．５当量）を、アルゴン下で無水ＤＣＭ（４０ｍＬ）に溶解し、分子ふるい３Å（５ｇ）を溶液に添加した。混合物を、室温で１時間撹拌した。次いで、ＴＭＳＯＴｆ（０．７７ｇ、３．４９ｍｍｏｌ、０．５当

量）を混合物に添加し、反応物を一晩撹拌した。分子ふるいを濾過し、濾液をＤＣＭ（１００ｍＬ）で希釈し、冷飽和ＮａＨＣＯ３水溶液（１００ｍＬ）及び水（１００ｍＬ）で洗浄した。有機層を分離し、Ｎａ２ＳＯ４で乾燥させ、次いで、溶媒を減圧下で除去した。粗物質をフラッシュクロマトグラフィー（勾配溶出：１０ＣＶでＤＣＭ中の０～３％のＭｅＯＨ）によって精製して、表題生成物を淡黄色の油状物として得た（３．１０ｇ、８８％、ｒｆ＝０．２５（ＤＣＭ中２％のＭｅＯＨ））。ＭＳ：Ｃ２０Ｈ３２Ｎ４Ｏ１１の計算値、５０４．２１。実測値５０５．４。１Ｈ ＮＭＲ（５００ ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３） δ ６．２１－６．１４（ｍ，１Ｈ），５．３０（ｄｄ，Ｊ ＝ ３．４，１．１ Ｈｚ，１Ｈ），５．０４（ｄｄ，Ｊ ＝ １１．２，３．４ Ｈｚ，１Ｈ），４．７６（ｄ，Ｊ ＝ ８．６ Ｈｚ，１Ｈ），４．２３－４．０８（ｍ，３Ｈ），３．９１－３．８０（ｍ，３Ｈ），３．７４－３．５９（ｍ，９Ｈ），３．４９－３．４１（ｍ，２Ｈ），２．１４（ｓ，３Ｈ），２．０２（ｓ，３Ｈ），１．９７（ｄ，Ｊ ＝ ４．２ Ｈｚ，６Ｈ）．１３Ｃ ＮＭＲ（１２５ ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３） δ １７０．６（Ｃ），１７０．５（Ｃ），１７０．４（Ｃ），１７０．３（Ｃ），１０２．１（ＣＨ），７１．６（ＣＨ），７０．８（ＣＨ），７０．６（ＣＨ），７０．５（ＣＨ），７０．３（ＣＨ２），６９．７（ＣＨ２），６８．５（ＣＨ２），６６．６（ＣＨ２），６１．５（ＣＨ２），２３．１（ＣＨ３），２０．７（３ｘＣＨ３）．

【０５２７】

【化９５】

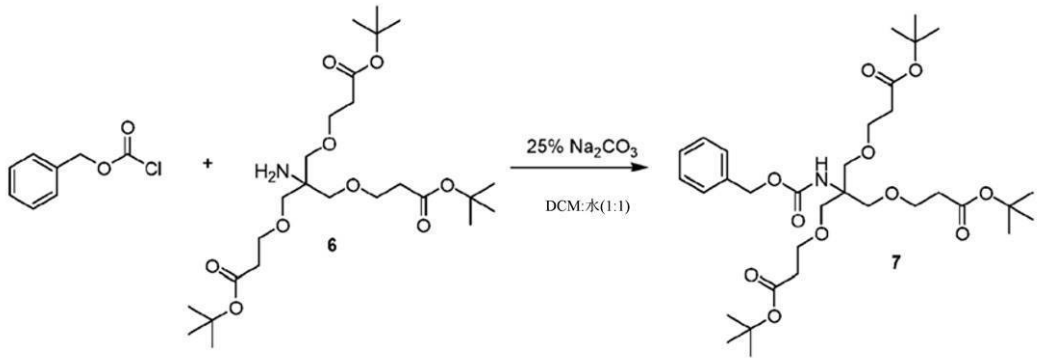


【０５２８】

化合物５の調製：化合物４（１．００ｇ、１．９８ｍｍｏｌ、１．０当量）を、酢酸エチル（ＥｔＯＡｃ）及びＭｅＯＨ（３０ｍＬ １：１ｖ／ｖ）の混合物に溶解し、Ｐｄ／Ｃ（１００ｍｇ）を添加した。反応混合物を、真空／アルゴンサイクル（３ｘ）を使用して脱気し、バルーン圧力下で一晩水素化した。反応混合物をセライトを通して濾過し、ＥｔＯＡｃ（３０ｍＬ）で洗浄した。溶媒を減圧下で除去して、表題化合物を無色の油状物として得た（０．９５ｇ、定量収率、ｒｆ＝０．２５（ＤＣＭ中１０％のＭｅＯＨ））。化合物を更に精製することなく使用した。ＭＳ：Ｃ２０Ｈ３４Ｎ２Ｏ１１の計算値、４７８．２。実測値４７９．４。

【０５２９】

【化９６】

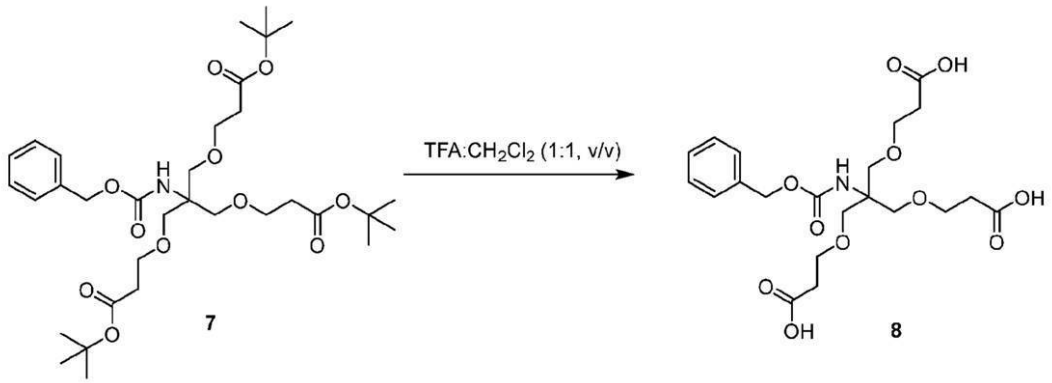


【０５３０】

化合物７の調製：トリス｛［２－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）エトキシ］メチル｝－メチルアミン６（３．３７ｇ、６．６７ｍｍｏｌ、１．０当量）をＤＣＭ／水（４０ｍＬ　１：１ｖ／ｖ）の混合物に溶解し、Ｎａ２ＣＯ３（０．１８ｇ、１．７ｍｍｏｌ、０．２５当量）を激しく撹拌しながら添加した。クロロギ酸ベンジル（２．９４ｍＬ、２０．７ｍｍｏｌ、３．１０当量）を前の混合物に滴加し、反応物を室温で２４時間撹拌した。反応混合物をＣＨ２Ｃｌ２（１００ｍＬ）で希釈し、水（１００ｍＬ）で洗浄した。有機層を分離し、Ｎａ２ＳＯ４で乾燥させた。溶媒を減圧下で除去し、得られた粗物質をフラッシュクロマトグラフィー（勾配溶出：１２ＣＶでシクロヘキサン中の０～１０％のＥｔＯＡｃ）によって精製して、表題化合物を淡黄色の油状物として得た（３．９ｇ、９１％、ｒｆ＝０．５６（シクロヘキサン中１０％のＥｔＯＡｃ））。ＭＳ：Ｃ３３Ｈ５３ＮＯ１１の計算値、６３９．３。実測値６４０．９。１Ｈ　ＮＭＲ（５００　ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）　δ　７．３８－７．２６（ｍ，５Ｈ），４．９７（ｓ，２Ｈ），３．５４（ｔ，６Ｈ），３．５０（ｓ，６Ｈ），２．３８（ｔ，６Ｈ），１．３９（ｓ，２７Ｈ）．　１３Ｃ　ＮＭＲ（１２５　ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）　δ　１７０．３（３ｘＣ），１５４．５（Ｃ），１３７．１（Ｃ），１２８．２（２ｘＣＨ），１２７．７（ＣＨ），１２７．６（２ｘＣＨ），７９．７（３ｘＣ），６８．４（３ｘＣＨ２），６６．８（３ｘＣＨ２），６４．９（Ｃ），５８．７（ＣＨ２），３５．８（３ｘＣＨ２），２７．７（９ｘＣＨ３）．

【０５３１】

【化９７】

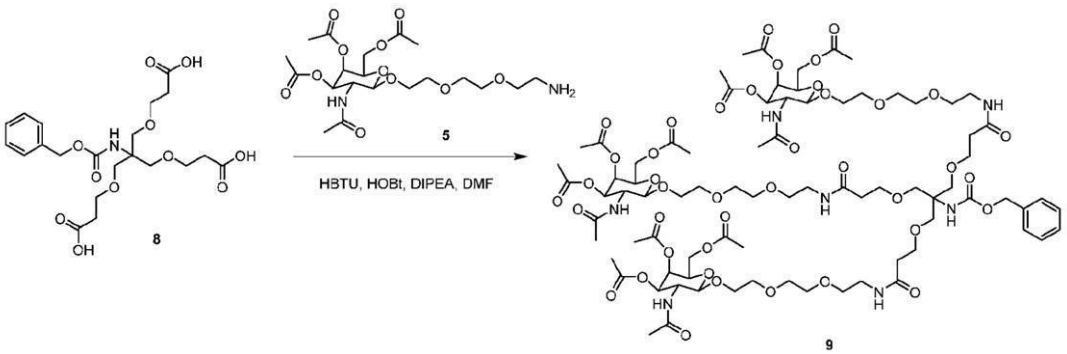


【０５３２】

化合物８の調製：Ｃｂｚ－ＮＨ－トリス－Ｂｏｃ－エステル７（０．２０ｇ、０．３９ｍｍｏｌ、１．０当量）をアルゴン下でＣＨ２Ｃｌ２（１ｍＬ）に溶解し、トリフルオロ酢酸（ＴＦＡ、１ｍＬ）を添加し、反応物を室温で１時間撹拌した。溶媒を減圧下で除去し、残渣をトルエン（５ｍＬ）と３回共蒸発させ、高真空下で乾燥させて、化合物をそのＴＦＡ塩として得た（０．１８３ｇ、９８％）。化合物を更に精製することなく使用した。ＭＳ：Ｃ２１Ｈ２９ＮＯ１１の計算値、４７１．６。実測値４７２．４。

【０５３３】

【化９８】

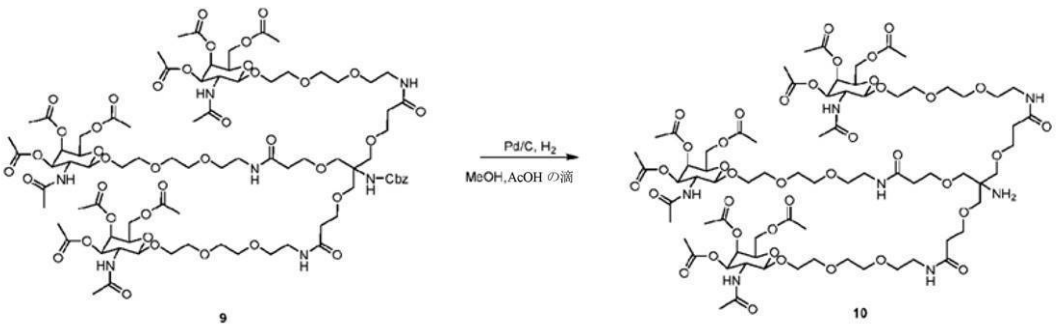


【０５３４】

化合物９の調製：ＣｂｚＮＨ－トリス－ＣＯＯＨ８（０．７２ｇ、１．４９ｍｍｏｌ、１．０当量）及びＧａｌＮＡｃ－ＰＥＧ３－ＮＨ２５（３．５６ｇ、７．４４ｍｍｏｌ、５．０当量）を、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）（２５ｍＬ）に溶解した。次いで、Ｎ，Ｎ’，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチル－Ｏ－（１Ｈ－ベンゾトリアゾール－１－イル）ウロニウムヘキサフルオロホスフェート（ＨＢＴＵ）（２．７８ｇ、７．４４ｍｍｏｌ、５．０当量）、１－ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物（ＨＯＢｔ）（１．０５ｇ、７．４４ｍｍｏｌ、５．０当量）、及びＮ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（ＤＩＰＥＡ）（２．０７ｍＬ、１１．９ｍｍｏｌ、８．０当量）を溶液に添加し、反応物を７２時間撹拌した。溶媒を減圧下で除去し、残渣をＤＣＭ（１００ｍＬ）に溶解し、飽和ＮａＨＣＯ３水溶液（１００ｍＬ）で洗浄した。有機層をＮａ２ＳＯ４で乾燥させ、溶媒を蒸発させ、粗物質をフラッシュクロマトグラフィー（勾配溶出：１４ＣＶでＤＣＭ中０～５％のＭｅＯＨ）によって精製した。生成物を淡黄色の油状物として得た（１．２ｇ、４３％、ｒｆ＝０．２０（ＤＣＭ中５％のＭｅＯＨ））。ＭＳ：Ｃ８１Ｈ１２５Ｎ７Ｏ４１の計算値、１８５２．９。実測値１８５４．７。１Ｈ　ＮＭＲ（５００　ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）　δ　７．９０－７．８０（ｍ，１０Ｈ），７．６５－７．６２（ｍ，４Ｈ），７．４７－７．４３（ｍ，３Ｈ），７．３８－７．３２（ｍ，８Ｈ），５．２４－５．２２（ｍ，３Ｈ），５．０２－４．９７（ｍ，４Ｈ），４．６０－４．５７（ｍ，３　Ｈ），４．０７－３．９０（ｍ　１０Ｈ），３．６７－３．３６（ｍ，７０Ｈ），３．２３－３．０７（ｍ，２５Ｈ），２．１８（ｓ，１０Ｈ），２．００（ｓ，１３Ｈ），１．８９（ｓ，１１Ｈ），１．８０－１．７８（ｍ，１７Ｈ）．１３Ｃ　ＮＭＲ（１２５　ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）　δ　１７０．１（Ｃ），１６９．８（Ｃ），１６９．７（Ｃ），１６９．４（Ｃ），１６９．２（Ｃ），１６９．１（Ｃ），１４２．７（Ｃ），１２６．３（ＣＨ），１２３．９（ＣＨ），１１８．７（ＣＨ），１０９．７（ＣＨ），１００．８（ＣＨ），７０．５（ＣＨ），６９．８（ＣＨ），６９．６（ＣＨ），６９．５（ＣＨ），６９．３（ＣＨ２），６９．０（ＣＨ２），６８．２（ＣＨ２），６７．２（ＣＨ２），６６．７（ＣＨ２），６１．４（ＣＨ２），２２．６（ＣＨ２），２２．４（３ｘＣＨ３），２０．７（９ｘＣＨ３）．

【０５３５】

【化９９】

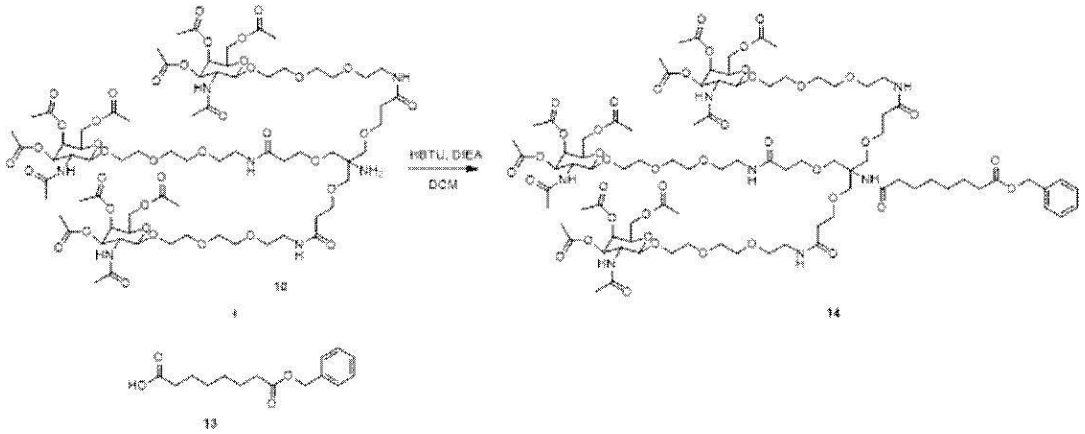


【０５３６】

化合物１０の調製：三分岐ＧａｌＮＡｃ化合物９（０．２７ｇ、０．１４ｍｍｏｌ、１．０当量）をＭｅＯＨ（１５ｍＬ）に溶解し、３滴の酢酸（ＡｃＯＨ）及びＰｄ／Ｃ（３０ｍｇ）を添加した。反応混合物を、真空／アルゴンサイクル（３ｘ）を使用して脱気し、バルーン圧力下で一晩水素化した。反応の完了後、質量分析を行い、得られた混合物をセライトの薄いパッドを通して濾過した。溶媒を蒸発させ、得られた残渣を高真空下で乾燥させ、更に精製することなく次のステップに使用した。生成物を淡黄色の油状物として得た（０．２４ｇ、定量収率）。ＭＳ：Ｃ７３Ｈ１１９Ｎ７Ｏ３９の計算値、１７１８．８。実測値１７１９．３。

【０５３７】

【化１００】

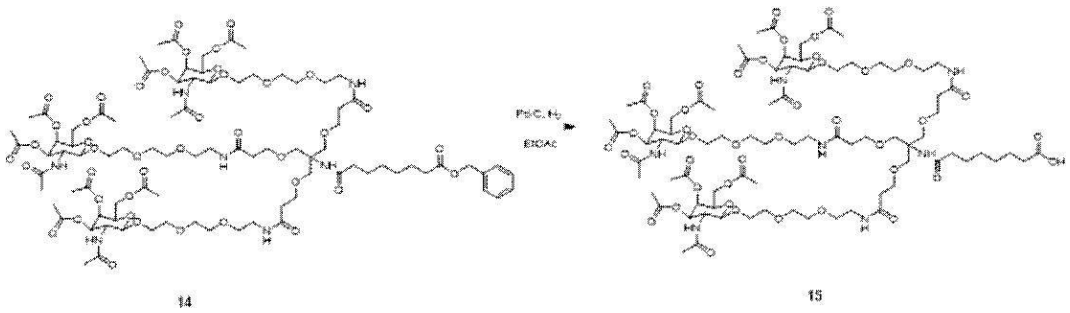


【０５３８】

化合物１４の調製：三分岐ＧａｌＮＡｃ化合物１０（０．４５ｇ、０．２６ｍｍｏｌ、１．０当量）、ＨＢＴＵ（０．１９ｇ、０．５３ｍｍｏｌ、２．０当量）、及びＤＩＰＥＡ（０．２３ｍＬ、１．３ｍｍｏｌ、５．０当量）をアルゴン下でＤＣＭ（１０ｍＬ）に溶解した。この混合物に、ＤＣＭ（５ｍＬ）中の化合物１３（０．１４ｇ、０．５３ｍｍｏｌ、２．０当量）の溶液を滴加した。反応物を室温で一晩撹拌した。溶媒を除去し、残渣をＥｔＯＡｃ（５０ｍＬ）に溶解し、水（５０ｍＬ）で洗浄し、Ｎａ２ＳＯ４で乾燥させた。溶媒を蒸発させ、粗物質をフラッシュクロマトグラフィー（勾配溶出：２０ＣＶでＤＣＭ中０～５％のＭｅＯＨ）によって精製した。生成物を白色のふわふわ固体として得た（０．２５ｇ、４８％、ｒｆ＝０．４（ＤＣＭ中１０％ＭｅＯＨ））。ＭＳ：Ｃ８８Ｈ１３７Ｎ７Ｏ４２の計算値、１９６５．１。実測値１９６５．６。

【０５３９】

【化１０１】



【０５４０】

ＴｒｉＧａｌＮＡｃ（１５）の調製：三分岐ＧａｌＮＡｃ化合物１４（０．３１ｇ、０．１５ｍｍｏｌ、１．０当量）をＥｔＯＡｃ（１５ｍＬ）に溶解し、Ｐｄ／Ｃ（４０ｍｇ）を添加した。反応混合物を、真空／アルゴンサイクル（３ｘ）を使用することによって脱気し、バルーン圧力下で一晩水素化した。反応の完了を質量分析によって監視し、得られた混合物をセライトの薄いパッドを通して濾過した。溶媒を減圧下で除去し、得られた残渣を高真空下で一晩乾燥させた。残渣を、更に精製することなく（０．２８ｇ、定量的収率）、オリゴヌクレオチドへのコンジュゲーションのために使用した。ＭＳ：Ｃ８１Ｈ１３１Ｎ７Ｏ４２の計算値、１８７４．９。実測値１８７５．３。

【０５４１】

ｉｘ）オリゴヌクレオチド合成

【０５４２】

【表１９－１】

一本鎖ID	配列5’-3’	RP HPLCによる純度(%)
X91382	(NH2-DEG)gacuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(invabasic)(invabasic)	89.5
X91383	(NH2-DEG)aaGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfasusa(invabasic)(invabasic)	91.6
X91384	(NH2-DEG)ugggauUfuCfAfUfguaaccaasgsa(invabasic)(invabasic)	94.0
X91403	(NH2C12)gacuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(invabasic)(invabasic)	94.2
X91404	(NH2C12)aaGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfasusa(invabasic)(invabasic)	96.5
X91405	(NH2C12)ugggauUfuCfAfUfguaaccaasgsa(invabasic)(invabasic)	91.3
X91415	(invabasic)(invabasic)gsascuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(NH2C6)	96.4
X91416	(invabasic)(invabasic)asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfaua(NH2C6)	77.4
X91417	(invabasic)(invabasic)usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga(NH2C6)	96.7
X91379	gsascuuuCfaUfCfCfuggaaauaua(GalNAc)	92.8
X91380	asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfaua(GalNAc)	95.7
X91446	usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga(GalNAc)	92.1
X38483	usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaagucscsa	91.0
X91381	usAfsUfuAfuaAfaAfauaUfcUfuGfcuusususdTdT	90.0
X38104	usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc	95.4

【０５４３】

【表１９－２】

Af、Cf、Gf、Uf:	2’-F RNAヌクレオチド
a、c、g、u:	2’-O-Me RNAヌクレオチド
dT:	DNAヌクレオチド
s:	ホスホロチオエート
invabasic:	1,2-ジデオキシリボース
NH2-DEG:	アミノエトキシエチルリンカー
NH2C12:	アミノドデシルリンカー
NH2C6:	アミノヘキシルリンカー

【０５４４】

オリゴヌクレオチドを、ホスホラミダイトアプローチに従って固相上で合成した。スケールに応じて、Ｍｅｒｍａｄｅ１２（ＢｉｏＡｕｔｏｍａｔｉｏｎ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）又はＡＫＴＡ　Ｏｌｉｇｏｐｉｌｏｔ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）のいずれかを使用した。

【０５４５】

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

【０５４６】

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

【０５４７】

２’－Ｏ－メチルホスホラミダイトとしては、以下が含まれる：５’－（４，４’－ジメトキシトリチル）－Ｎ－ベンゾイル－アデノシン２’－Ｏ－メチル－３’－［（２－シアノエチル）－（Ｎ，Ｎ－ジイソプロピル）］－ホスホラミダイト、５’－（４，４’－ジメトキシトリチル）－Ｎ－ベンゾイル－シチジン２’－Ｏ－メチル－３’－［（２－シアノエチル）－（Ｎ，Ｎ－ジイソプロピル）］－ホスホラミダイト、５’－（４，４’－ジメトキシトリチル）－Ｎ－ジメチルホルムアミジン－グアノシン２’－Ｏ－メチル－３’－［（２－シアノエチル）－（Ｎ，Ｎ－ジイソプロピル）］－ホスホラミダイト、５’－（４，４’－ジメトキシトリチル）－ウリジン２’－Ｏ－メチル－３’－［（２－シアノエチル）－（Ｎ，Ｎ－ジイソプロピル）］－ホスホラミダイト。

【０５４８】

２’－Ｆホスホラミダイトとしては、以下が含まれる：５’－ジメトキシトリチル－Ｎ－ベンゾイル－デオキシアデノシン２’－フルオロ－３’－［（２－シアノエチル）－（Ｎ，

Ｎ－ジイソプロピル）］－ホスホラミダイト、５’－ジメトキシトリチル－Ｎ－アセチル－デオキシシチジン２’－フルオロ－３’－［（２－シアノエチル）－（Ｎ，Ｎ－ジイソプロピル）］－ホスホラミダイト、５’－ジメトキシトリチル－Ｎ－イソブチリル－デオキシグアノシン２’－フルオロ－３’－［（２－シアノエチル）－（Ｎ，Ｎ－ジイソプロピル）］－ホスホラミダイト、及び５’－ジメトキシトリチル－デオキシウリジン２’－フルオロ－３’－［（２－シアノエチル）－（Ｎ，Ｎ－ジイソプロピル）］－ホスホラミダイト。

【０５４９】

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

【０５５０】

無水アセトニトリル中の５０％無水ＤＣＭに溶解した２’－Ｏ－メチル－ウリジンホスホラミダイトを除き、全てのビルディングブロックを、分子ふるい（３Å）を含有する無水アセトニトリル（１００ｍＭ（Ｍｅｒｍａｄｅ１２）又は２００ｍＭ（ＡＫＴＡ　Ｏｌｉｇｏｐｉｌｏｔ））に溶解した。ヨウ素（ピリジン／Ｈ２Ｏ　９：１ｖ／ｖ中５０ｍＭ）を酸化試薬として使用した。５－エチルチオテトラゾール（ＥＴＴ、アセトニトリル中５００ｍＭ）を活性化剤溶液として使用した。ホスホルチオエート連結の導入のためのチオール化を、アセトニトリル／ピリジン　４：６ｖ／ｖ中の１００ｍＭのキサンタン水素化物（ＴＣＩ、カタログ番号６８４６－３５－１）を使用して実施した。

【０５５１】

カップリング時間は、別段の定めた場合を除いて、５．４分であった。５’アミノ修飾を、各カップリングにつき１１分のカップリング時間を有する二重カップリングステップ（総カップリング時間２２分）を用いて配列に組み込んだ。酸化剤の接触時間を１．２分に設定し、チオール化時間は５．２分であった。

【０５５２】

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

【０５５３】

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

【０５５４】

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

【０５５５】

ＲＰ　ＨＰＬＣ精製は、ＡＫＴＡ　Ｐｕｒｅ機器（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）で、ＸＢｒｉｄｇｅ　Ｃ１８　Ｐｒｅｐ１９×５０ｍｍカラム（Ｗａｔｅｒｓ）を使用して行った。緩衝液Ａは、１００ｍＭのトリエチルアンモニウムアセテート（ＴＥＡＡｃ、Ｂｉｏｓｏｌｖｅ）ｐＨ７であり、緩衝液Ｂは、緩衝液Ａ中の９５％のアセトニトリルを含有した。１０ｍＬ／分の流量及び６０℃の温度を用いた。２８０ｎｍでのＵＶ追跡を記録した。１２０カラム体積で０％Ｂ～１００％Ｂの勾配を用いた。適切な画分をプールし、３

Ｍの酢酸ナトリウム（ＮａＯＡｃ）（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、ｐＨ５．２及び８５％のエタノール（ＶＷＲ）で冷凍庫内で沈殿させた。ペレットを、遠心分離によって単離し、水（５０ｍＬ）に再溶解し、５ＭのＮａＣｌ（５ｍＬ）で処理し、Ｓｅｐｈａｄｅｘ Ｇ２５－Ｆｉｎｅ樹脂（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を充填した５０×１６５ｍｍ ＥＣＯカラム（ＹＭＣ、Ｄｉｎｓｌａｋｅｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を使用して、ＡｋｔａＰｕｒｅ機器でサイズ排除ＨＰＬＣによって脱塩した。

【０５５６】

ＡＥＸ ＨＰＬＣ精製は、ＡＫＴＡ Ｐｕｒｅ機器（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）で、ＴＳＫゲルＳｕｐｅｒＱ－５ＰＷ ２０×２００ｍｍ（ＢＩＳＣＨＯＦＦ Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ）を使用して行った。緩衝液Ａは、２０ｍＭのリン酸ナトリウム（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ） ｐＨ７．８であり、緩衝液Ｂは、１．４Ｍの臭化ナトリウム（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）を添加した緩衝液Ａと同じであった。１０ｍＬ／分の流量、６０℃の温度を用いた。２８０ｎｍでのＵＶ追跡を記録した。２７カラム体積で１０％Ｂ～１００％Ｂの勾配を用いた。適切な画分をプールし、３ＭのＮａＯＡｃ、ｐＨ５．２及び８５％のエタノールで冷凍庫内で沈殿させた。ペレットを、遠心分離によって単離し、水（５０ｍＬ）に再溶解し、５ＭのＮａＣｌ（５ｍＬ）で処理し、サイズ排除クロマトグラフィーによって脱塩した。

【０５５７】

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

【０５５８】

一本鎖を、ＬＣＱ Ｄｅｃａ ＸＰ－ｐｌｕｓ Ｑ－ＥＳＩ－ＴＯＦ質量分析計（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｎｎｉｇａｎ）又はＣｏｍｐａｃｔ ＥＳＩ－Ｑｑ－ＴＯＦ質量分析計（Ｂｒｕｋｅｒ Ｄａｌｔｏｎｉｃｓ）のいずれかと組み合わせたＤｉｏｎｅｘ Ｕｌｔｉｍａｔｅ ３０００（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）ＨＰＬＣシステムで、２．１×５０ｍｍ ＸＢｒｉｄｇｅ Ｃ１８カラム（Ｗａｔｅｒｓ）での分析ＬＣ－ＭＳによって分析した。緩衝液Ａは、１６．３ｍＭのトリエチルアミン、１００ｍＭの１，１，１，３，３，３－ヘキサフルオロ－２－プロパノール（ＨＦＩＰ）、及びＨ２Ｏ中の１％のＭｅＯＨであり、緩衝液Ｂは、９５％のＭｅＯＨ中の緩衝液Ａを含有した。２５０μＬ／分の流量、６０℃の温度を用いた。２６０及び２８０ｎｍでのＵＶ追跡を記録した。０．５分以内の１～４０％Ｂの勾配、続いて１３分以内の４０～１００％Ｂの勾配を用いた。メタノール（ＬＣ－ＭＳグレード）、水（ＬＣ－ＭＳグレード）、１，１，１，３，３，３－ヘキサフルオロ－２－プロパノール（ｐｕｒｉｓｓ．ｐ．ａ．）、及びトリエチルアミン（ｐｕｒｉｓｓ．ｐ．ａ．）をＳｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈから購入した。

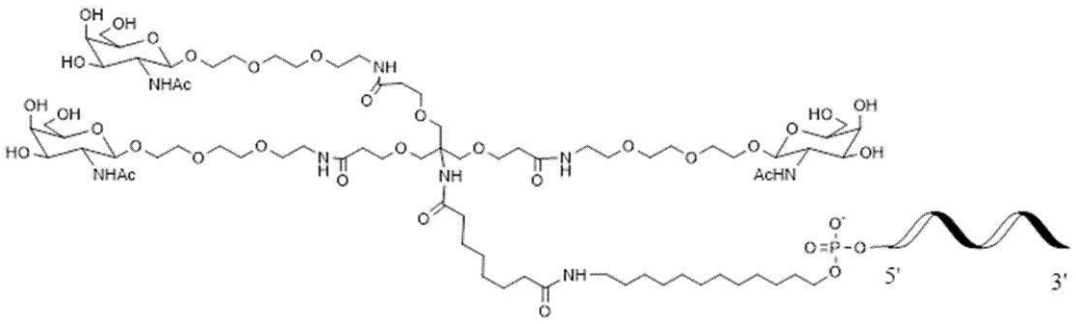
【０５５９】

ｘ）５’末端又は３’末端でのＴｒｉＧａｌＮＡｃテザー２（ＧａｌＮＡｃ－Ｔ２）コンジュゲーション

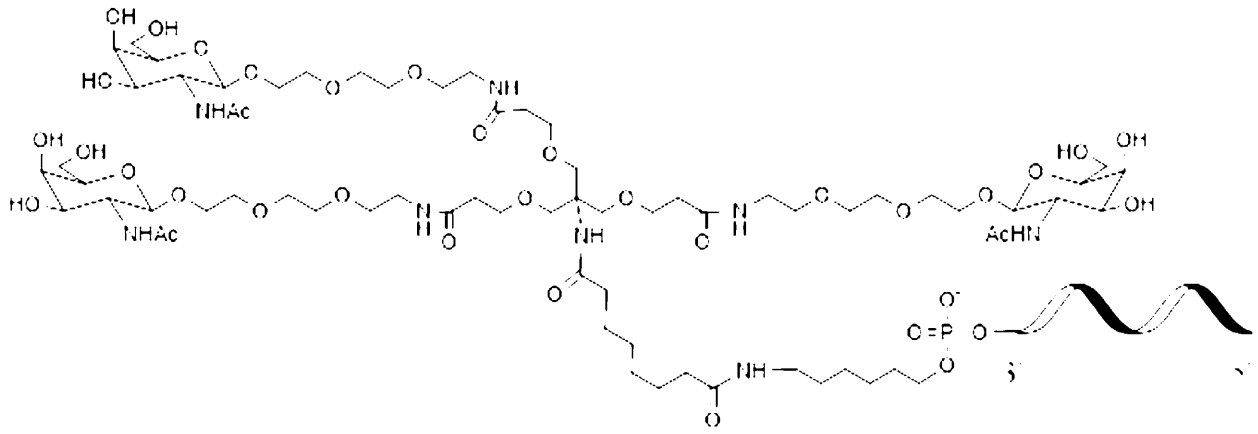
【０５６０】

【化１０２】

５’－ＧａｌＮＡｃ－Ｔ２コンジュゲート



【０５６１】
【化１０３】
３’－ＧａｌＮＡｃ－Ｔ２コンジュゲート



【０５６２】
ＴｒｉＧａｌＮＡｃテザー２ＮＨＳエステルの調製：ＤＭＦ（２．１ｍＬ）中のカルボン酸テザー２（化合物１５、２２７ｍｇ、１２１μｍｏｌ）の溶液に、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）（１５．３ｍｇ、１３３μｍｏｌ）及びＮ，Ｎ’－ジイソプロピルカルボジイミド（ＤＩＣ）（１９．７μＬ、１２７μｍｏｌ）を添加した。溶液を室温で１８時間撹拌し、続くコンジュゲーション反応のために精製することなく使用した。
【０５６３】
ｔｒｉＧａｌＮＡｃテザー２コンジュゲーションの一般的手順：アミン修飾一本鎖を、５０ｍＭの炭酸塩／重炭酸塩緩衝液ｐＨ９．６／ＤＭＳＯ　４：６（ｖ／ｖ）中、７００ＯＤ／ｍＬで溶解し、この溶液に、１モル当量のＤＭＦ中のテザー２ＮＨＳエステル（５７ｍＭ）溶液を添加した。反応を室温で実施し、１時間後に、別のモル当量のＮＨＳエステル溶液を添加した。反応物を１時間超進行させ、反応の進行をＬＣＭＳによって監視した。出発物質の定量的な消費を達成するために、アミノ修飾オリゴヌクレオチドに対して少なくとも２モル当量過剰のＮＨＳエステル試薬が必要であった。反応混合物を水で１５倍に希釈し、Ｓａｒｔｏｒｉｕｓから１．２μｍフィルターを通して１回濾過し、次いで、Ａｋｔａ　Ｐｕｒｅ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）機器で保存相（ＲＰ　ＨＰＬＣ）によって精製した。
【０５６４】
精製は、ＷａｔｅｒｓからのＸＢｒｉｄｇｅ　Ｃ１８　Ｐｒｅｐ　１９×５０ｍｍカラムを使用して実施された。緩衝液Ａは、１００ｍＭのＴＥＥＡｃ　ｐＨ７であり、緩衝液Ｂは、緩衝液Ａ中の９５％のアセトニトリルを含有した。１０ｍＬ／分の流量及び６０℃の温度を用いた。２８０ｎｍでのＵＶ追跡を記録した。６０カラム体積で０～１００％Ｂの勾配を用いた。
【０５６５】
全長コンジュゲートオリゴヌクレオチドを含有する画分を一緒にプールし、３ＭのＮａＯＡｃ、ｐＨ５．２及び８５％のエタノールで冷凍庫内で沈殿させ、次いで、水中に１０００ＯＤ／ｍＬで溶解させた。完了するまで、Ｏ－アセテートを水中の２０％水酸化アンモニウムで除去した（ＬＣ－ＭＳによって監視した）。
【０５６６】
コンジュゲートを、Ａｋｔａ　Ｐｕｒｅ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）機器で、Ｓｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ２５　Ｆｉｎｅ樹脂（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用してサイズ排除クロマトグラフィーによって脱塩し、単離収率６０～８０％でコンジュゲートオリゴヌクレオチドを得た。

【０５６７】
【表２０】

センス鎖ID	センス鎖配列5’-3’	RP HPLCによる純度(%)
X91409	(GalNAc-T2)(NH2C12)gacuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(invabasic)(invabasic)	85.0
X91410	(GalNAc-T2)(NH2C12)aaGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfasusa(invabasic)(invabasic)	92.3
X91411	(GalNAc-T2)(NH2C12)ugggauUfuCfAfUfguaaccaasgsa(invabasic)(invabasic)	92.7
X91433	(invabasic)(invabasic)gsascuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(NHC6)(GalNAc-T2)	85.3
X91434	(invabasic)(invabasic)asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfaua(NHC6)(GalNAc-T2)	85.8
X91435	(invabasic)(invabasic)usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga(NHC6)(GalNAc-T2)	84.0

【０５６８】
コンジュゲートを、Ｃｏｍｐａｃｔ　ＥＳＩ－Ｑｑ－ＴＯＦ質量分析計（Ｂｒｕｋｅｒ　Ｄａｌｔｏｎｉｃｓ）を備えたＤｉｏｎｅｘ　Ｕｌｔｉｍａｔｅ　３０００（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）ＨＰＬＣシステムで、２．１×５０ｍｍ　ＸＢｒｉｄｇｅ　Ｃ１８カラム（Ｗａｔｅｒｓ）を用いたＨＰＬＣ－ＭＳ分析によって特徴付けた。緩衝液Ａは、１６．３ｍＭのトリエチルアミン、Ｈ２Ｏ中の１％のＭｅＯＨ中の１００ｍＭのＨＦＩＰであり、緩衝液Ｂは、緩衝液Ａ中の９５％のＭｅＯＨを含有した。２５０μＬ／分の流量及び６０℃の温度を用いた。２６０及び２８０ｎｍでのＵＶ追跡を記録した。３１分以内の１～１００％Ｂの勾配を用いた。
【０５６９】
ｘｉ）二本鎖アニーリング
所望のｓｉＲＮＡ二本鎖を生成するために、両鎖の等モル水溶液を組み合わせることによって、２つの相補鎖をアニーリングした。混合物を７０℃で５分間水槽に置き、続いて、２時間以内に周囲温度に冷却した。二本鎖を２日間凍結乾燥し、－２０℃で保存した。
【０５７０】
Ｄｉｏｎｅｘ　Ｕｌｔｉｍａｔｅ　３０００（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）ＨＰＬＣシステムで、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ（商標）７５　Ｉｎｃｒｅａｓｅ　５／１５０ＧＬカラム　５×１５３－１５８ｍｍ（Ｃｙｔｉｖａ）での分析的ＳＥＣ　ＨＰＬＣによって、二本鎖を分析した。移動相は、１０％のアセトニトリルを含有する１×ＰＢＳからなった。定組成勾配を、室温で１．５ｍＬ／分の流量で１０分間実行した。２６０及び２８０ｎｍでのＵＶ追跡を記録した。水（ＬＣ－ＭＳグレード）をＳｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈから購入し、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ、１０倍、ｐＨ７．４）をＧＩＢＣＯ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）から購入した。
【０５７１】

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

【０５７２】

【表２１】

標的	二本鎖ID	ssRN ID	ssRNA 配列 5’-3’	HPLCによる二本鎖純度(%)
GO	ETX002	X91409	(GalNAc-T2)(NH2C12)gacuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(invabasic)(invabasic)	94.1
		X38483	usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaagucscsa	
	ETX006	X91433	(invabasic)(invabasic)gsascuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(NHC6)(GalNAc-T2)	94.1
		X38483	usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaagucscsa	
C5	ETX011	X91410	(GalNAc-T2)(NH2C12)aaGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfasusa(invabasic)(invabasic)	93.5
		X91381	usAfsUfuAfuaAfaAfauaUfcUfuGfcuususudTdT	
	ETX015	X91434	(invabasic)(invabasic)asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfaua(NHC6)(GalNAc-T2)	95.3
		X91381	usAfsUfuAfuaAfaAfauaUfcUfuGfcuususudTdT	
TTR	ETX020	X91411	(GalNAc-T2)(NH2C12)ugggauUfuCfAfUfguaaccaasgsa(invabasic)(invabasic)	97.5
		X38104	usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc	
	ETX024	X91435	(invabasic)(invabasic)usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga(NHC6)(GalNAc-T2)	95.3
		X38104	usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc	

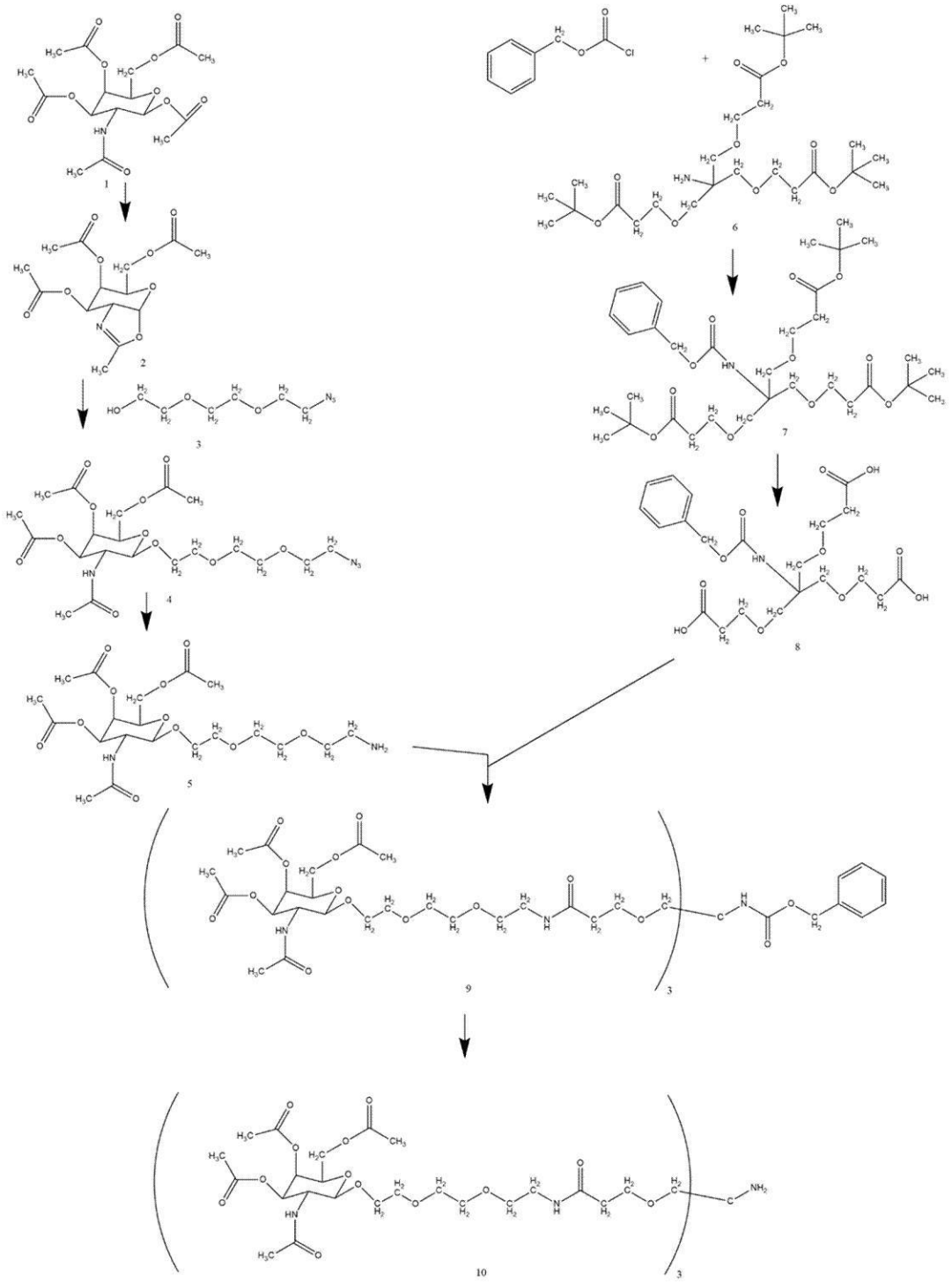
【０５７３】

以下のスキームは、合成の経路を更に提示している。

【０５７４】

【化１０４】

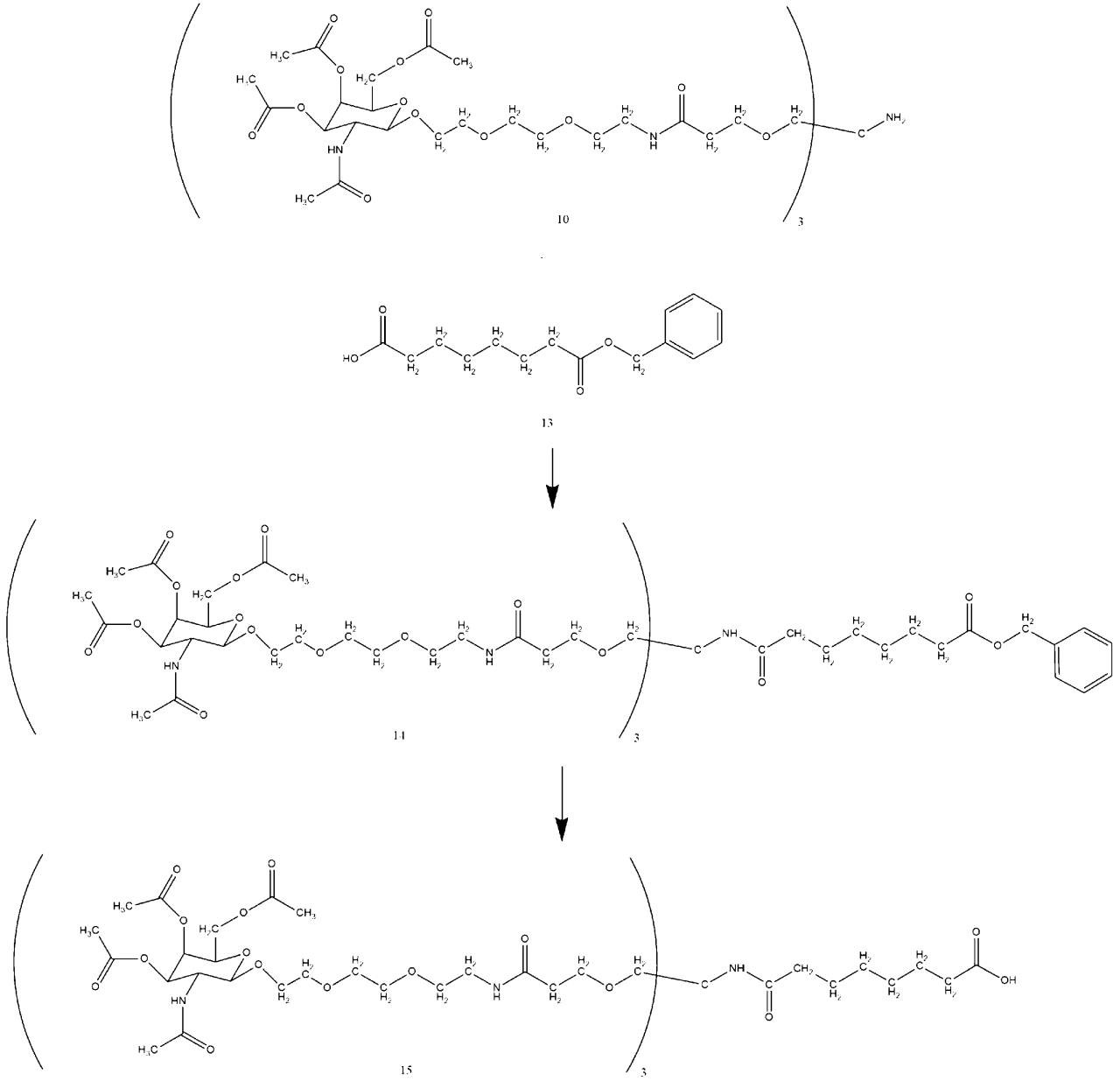
スキーム６：



【０５７５】

【化１０５】

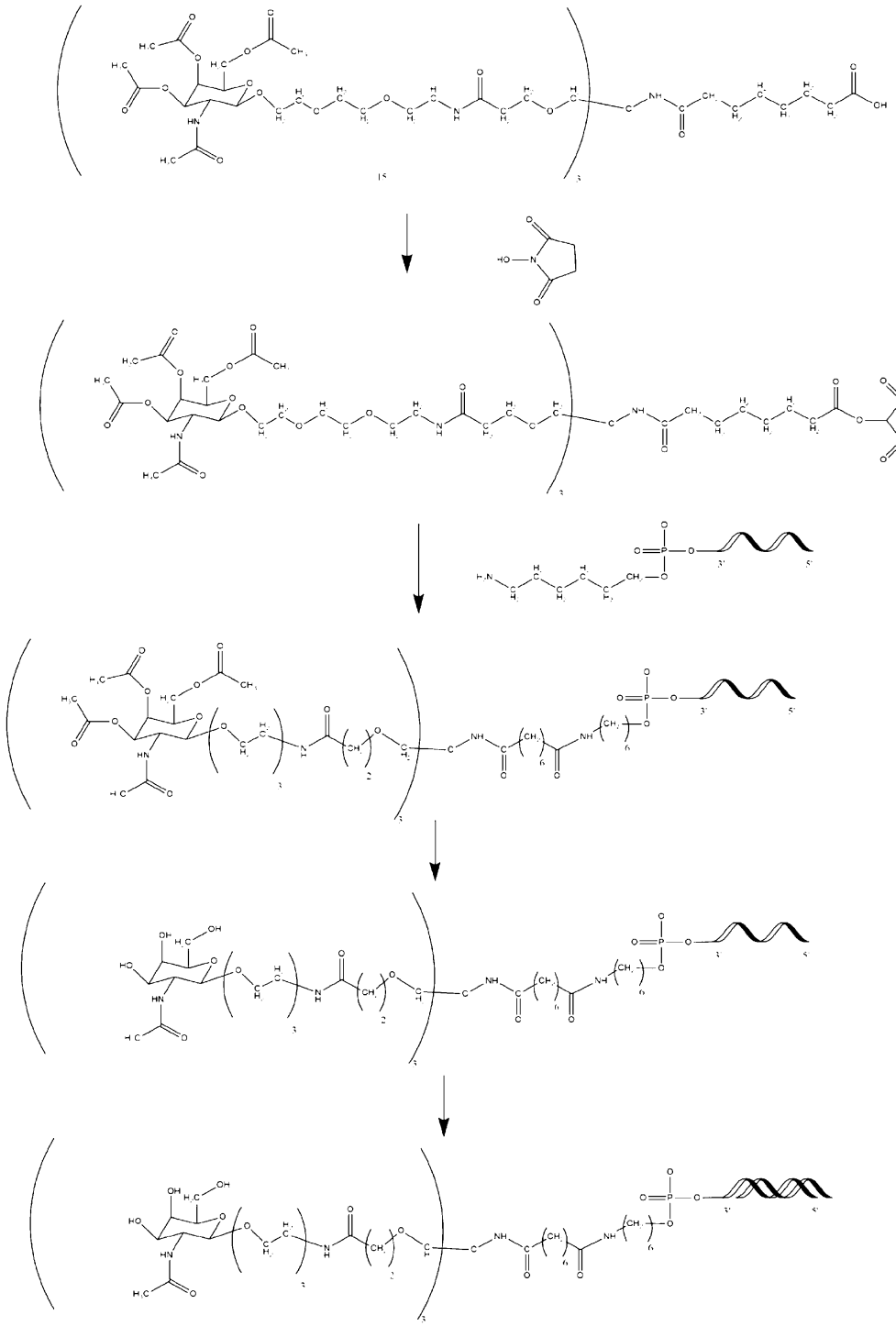
スキーム７：



【０５７６】

【化１０６】

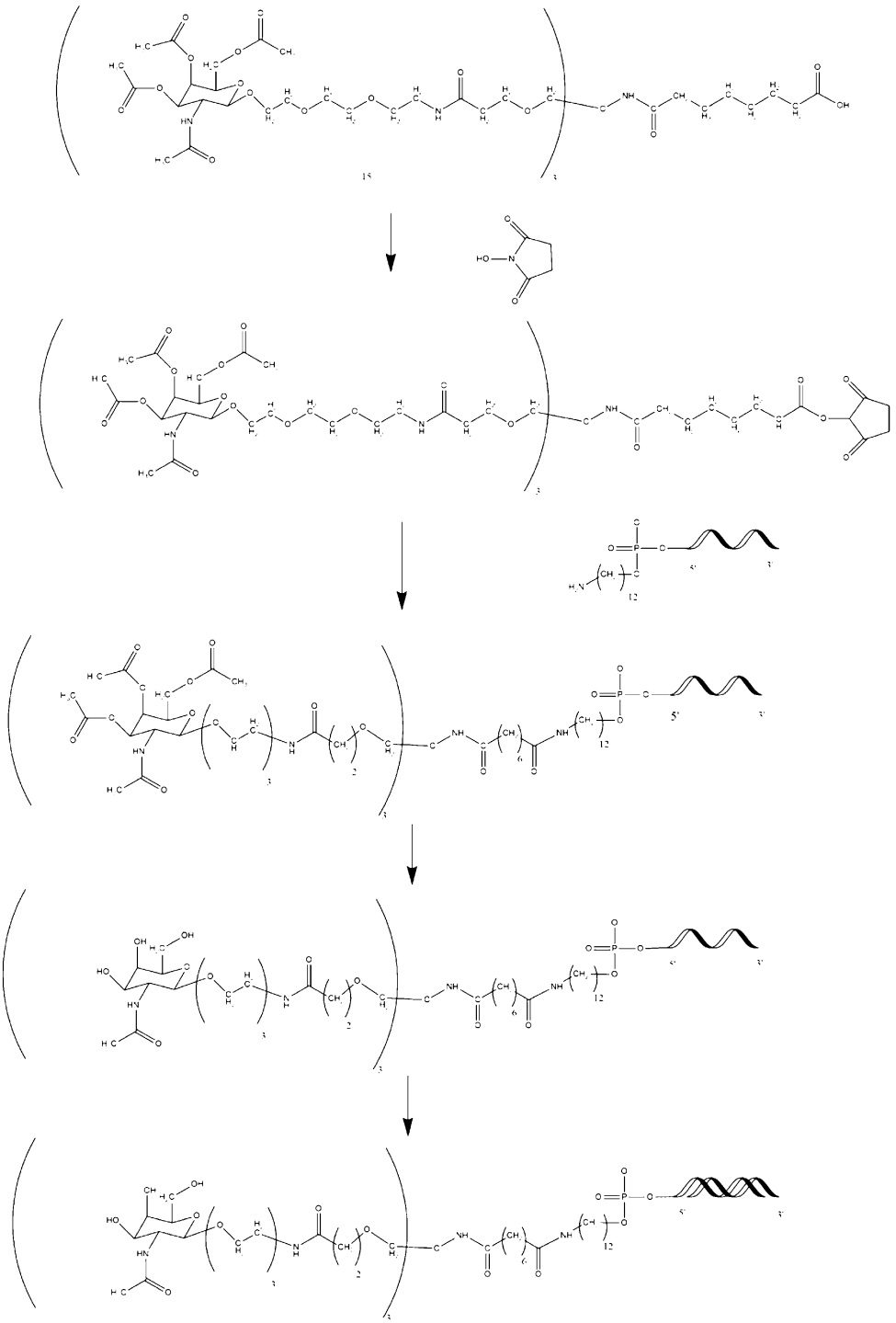
スキーム８：



【０５７７】

【化１０７】

スキーム９：



【０５７８】

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

【０５７９】

実施例５

ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡ構築物ＥＴＸ００５、ＥＴＸ００６、ＥＴＸ０１４、及びＥＴ

Ｘ０１５についてのマウスデータ
ＥＴＸ００５（ＨＡＯ１　ｍＲＮＡを標的とする）Ｔ１ａ逆脱塩基
　インビボマウス薬理学研究を実施し、最大で３ｍｇ／ｋｇのＧａｌＮＡｃコンジュゲート修飾ｓｉＲＮＡ　ＥＴＸ００５の単回皮下用量後の肝臓組織中のＨＡＯ１　ｍＲＮＡのノックダウン、それに伴う血清グリコレートレベルの増加を示した。
【０５８０】
　約８週齢の雄Ｃ５７ＢＬ／６マウスを、２１匹のマウスの群に無作為に割り当てた。研究の０日目に、動物は、０．３若しくは３ｍｇ／ｋｇの単回皮下用量の生理食塩水（滅菌０．９％塩化ナトリウム）中に溶解したＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡ、又は対照として生理食塩水のみを受けた。研究の１日目、２日目、４日目、７日目、１４日目、２１日目、及び２８日目に、各群からの３匹のマウスを安楽死させ、血清及び肝臓試料を採取した。
【０５８１】
　０日目に、５匹の未処置マウスの群から血清を採取して、グリコレート濃度のベースライン測定値を得た。
【０５８２】
　更なる分析まで、血清を－８０℃で保存した。肝試料（約５０ｍｇ）をＲＮＡｌａｔｅｒで処理し、４℃で一晩保存した後、－８０℃で保存した。
【０５８３】
　ＨＡＯ１　ｍＲＮＡ（サーモアッセイＩＤ　Ｍｍ００４３９２４９＿ｍ１）及びハウスキーピング遺伝子ＧＡＰＤＨ　ｍＲＮＡ（サーモアッセイＩＤ　Ｍｍ９９９９９９１５＿ｇ１）について、定量的リアルタイムＰＣＲを使用して、肝臓試料を分析した。デルタデルタＣｔ法を使用して、ＧＡＰＤＨに対して正規化され、生理食塩水対照群に対してＨＡＯ１発現の変化を計算した。
【０５８４】
　単回３ｍｇ／ｋｇ用量のＥＴＸ００５は、７日後にＨＡＯ１　ｍＲＮＡ発現を８０％超阻害した（図１６）。ＨＡＯ１発現の抑制は持続的であり、単回３ｍｇ／ｋｇ用量のＥＴＸ００５が、２８日目の研究の終了で、ＨＡＯ１　ｍＲＮＡの６０％超の阻害を持続した。０．３ｍｇ／ｋｇの単回用量の」ＥＴＸ００５もまた、生理食塩水対照群と比較した場合、ＨＡＯ１発現を阻害し、ＨＡＯ１発現レベルは、研究の２８日目にのみ正常レベルに達した。
【０５８５】
　ＨＡＯ１　ｍＲＮＡ発現の抑制は、血清グリコレートレベルの増加を引き起こすと予想される。ＬＣ－ＭＳ／ＭＳを使用して血清グリコレート濃度を測定した（図１７）。単回３ｍｇ／ｋｇ用量のＥＴＸ００５は、血清グリコレート濃度の有意な増加を引き起こし、投薬の１４日後にピークレベルに達し、２８日目に研究が終了するまでベースラインレベル（０日目）及び生理食塩水対照群よりも高いままであった。単回０．３ｍｇ／ｋｇ用量のＥＴＸ００５は、ベースライン及び生理食塩水対照群で見られるレベルを上回る、血清グリコレート濃度のより小さく、より一時的な増加を示し、非常に少量の用量が血清中の代謝バイオマーカーの濃度に影響を及ぼすのに十分な大きさでＨＡＯ１　ｍＲＮＡを抑制し得ることを実証した。
【０５８６】
　図１６．ＥＴＸ００５の単回用量マウス薬理学。ＨＡＯ１　ｍＲＮＡの発現は、生理食塩水対照群に対して示される。各点は、３匹のマウスの平均及び標準偏差を表す。
【０５８７】
　図１７．ＥＴＸ００５の単回用量マウス薬理学。血清グリコレート濃度を示す。各点は、５匹のマウスの群に由来するベースライングリコレート濃度（０日目）を除いて、３匹のマウスの平均及び標準偏差を表す。
【０５８８】
ＥＴＸ００６（ＨＡＯ１　ｍＲＮＡを標的とする）Ｔ２ａ逆脱塩基
　インビボマウス薬理学研究を実施し、最大で３ｍｇ／ｋｇのＧａｌＮＡｃコンジュゲー

ト修飾ｓｉＲＮＡ　ＥＴＸ００６の単回皮下用量後の肝臓組織中のＨＡＯ１　ｍＲＮＡのノックダウン及び血清グリコレートレベルの併発増加を示した。

【０５８９】

約８週齢の雄Ｃ５７ＢＬ／６マウスを、２１匹のマウスの群に無作為に割り当てた。研究の０日目に、動物は、０．３若しくは３ｍｇ／ｋｇの単回皮下用量の生理食塩水（滅菌０．９％塩化ナトリウム）中に溶解したＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡ、又は対照として生理食塩水のみを受けた。研究の１日目、２日目、４日目、７日目、１４日目、２１日目、及び２８日目に、各群からの３匹のマウスを安楽死させ、血清及び肝臓試料を採取した。

【０５９０】

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

【０５９１】

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

【０５９２】

ＨＡＯ１　ｍＲＮＡ（サーモアッセイＩＤ　Ｍｍ００４３９２４９＿ｍ１）及びハウスキーピング遺伝子ＧＡＰＤＨ　ｍＲＮＡ（サーモアッセイＩＤ　Ｍｍ９９９９９９１５＿ｇ１）について、定量的リアルタイムＰＣＲを使用して、肝臓試料を分析した。デルタデルタＣｔ法を使用して、ＧＡＰＤＨに対して正規化され、生理食塩水対照群に対してＨＡＯ１発現の変化を計算した。

【０５９３】

単回３ｍｇ／ｋｇ用量のＥＴＸ００６は、７日後にＨＡＯ１　ｍＲＮＡ発現を８０％超阻害した（図１８）。ＨＡＯ１発現の抑制は持続的であり、研究の終了まで継続し、ＥＴＸ００６は２８日目にＨＡＯ１　ｍＲＮＡの６０％超の阻害を維持した。０．３ｍｇ／ｋｇの単回用量もまた、生理食塩水対照群と比較した場合、ＨＡＯ１発現を阻害し、ＨＡＯ１発現レベルは、研究の２８日目にのみ正常レベルに達した。

【０５９４】

ＨＡＯ１　ｍＲＮＡ発現の抑制は、血清グリコレートレベルの増加を引き起こすと予想される。ＬＣ－ＭＳ／ＭＳを使用して血清グリコレート濃度を測定した（図１９）。単回３ｍｇ／ｋｇ用量のＥＴＸ００６は、血清グリコレート濃度の有意な増加を引き起こし、投薬の１４日後にピークレベルに達し、２８日目に試験が終了するまでベースラインレベル（０日目）及び生理食塩水対照群よりも高いままであった。単回０．３ｍｇ／ｋｇ用量のＥＴＸ００６は、ベースライン及び生理食塩水対照群で見られるレベルを上回る、血清グリコレート濃度のより小さく、より一時的な増加を示し、非常に少量の用量が血清中の代謝バイオマーカーの濃度にも影響を及ぼす可能性があることを実証した。

【０５９５】

図１８．ＥＴＸ００６の単回用量マウス薬理学。ＨＡＯ１　ｍＲＮＡの発現は、生理食塩水対照群に対して示される。各点は、３匹のマウスの平均及び標準偏差を表す。

【０５９６】

図１９．ＥＴＸ００６の単回用量マウス薬理学。血清グリコレート濃度を示す。各点は、５匹のマウスの群に由来するベースライングリコレート濃度（０日目）を除いて、３匹のマウスの平均及び標準偏差を表す。

【０５９７】

ＥＴＸ０１４（Ｃ５　ｍＲＮＡを標的とする）Ｔ１ａ逆脱塩基

インビボマウス薬理学研究を実施し、最大で３ｍｇ／ｋｇのＧａｌＮＡｃコンジュゲート修飾ｓｉＲＮＡ　ＥＴＸ０１４の単回皮下用量後の肝臓組織中のＣ５　ｍＲＮＡのノックダウンを示し、血清Ｃ５タンパク質濃度の減少をもたらした。

【０５９８】

約８週齢の雄Ｃ５７ＢＬ／６マウスを、２１匹のマウスの群に無作為に割り当てた。研究の０日目に、動物は、０．３、１若しくは３ｍｇ／ｋｇの単回皮下用量の生理食塩水（

滅菌０．９％塩化ナトリウム）中に溶解したＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡ、又は対照として生理食塩水のみを受けた。研究の１日目、２日目、４日目、７日目、１４日目、２１日目、及び２８日目に、各群からの３匹のマウスを安楽死させ、血清及び肝臓試料を採取した。

【０５９９】

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

【０６００】

Ｃ５　ｍＲＮＡ（サーモアッセイＩＤ　Ｍｍ００４３９２７５＿ｍ１）及びハウスキーピング遺伝子ＧＡＰＤＨ　ｍＲＮＡ（サーモアッセイＩＤ　Ｍｍ９９９９９９１５＿ｇ１）について、定量的リアルタイムＰＣＲを使用して、肝臓試料を分析した。デルタデルタＣｔ法を使用して、ＧＡＰＤＨに対して正規化され、生理食塩水対照群に対してＣ５発現の変化を計算した。

【０６０１】

ＥＴＸ０１４は、用量依存的にＣ５　ｍＲＮＡの発現を阻害し（図２０）、３ｍｇ／ｋｇ用量は、１４日目でＣ５　ｍＲＮＡの９０％超の低減を達成した。ＥＴＸ０１４によるＣ５発現の抑制は、持続的であり、３ｍｇ／ｋｇ用量の各分子は、２８日目に研究が終了するまで、Ｃ５　ｍＲＮＡの明確なノックダウンを示した。

【０６０２】

Ｃ５タンパク質レベル分析のために、市販のＣ５　ＥＬＩＳＡキット（Ａｂｃａｍ　ａｂ２６４６０９）を使用して血清試料を測定した。一致する時点での生理食塩水群の平均に対する血清Ｃ５レベルを計算した。

【０６０３】

血清タンパク質データは、ｍＲＮＡ分析を支持する（図２１）。ＥＴＸ０１４による処置は、血清Ｃ５タンパク質濃度の用量依存的減少を引き起こした。ＥＴＸ０１４の全ての用量は、Ｃ５タンパク質レベルを７０％超低減させ、３ｍｇ／ｋｇの用量は、研究の７日目にＣ５レベルをほとんど検出できないレベルに低減させた。血清Ｃ５の低減は、研究終了まで全ての用量によって持続し、０．３ｍｇ／ｋｇの最も低い用量でさえも、依然として２８日目で約４０％の阻害を示した。

【０６０４】

図２０．ＥＴＸ０１４の単回用量マウス薬理学。Ｃ５　ｍＲＮＡの発現は、生理食塩水対照群に対して示される。各点は、３匹のマウスの平均及び標準偏差を表す。

【０６０５】

図２１．ＥＴＸ００１４の単回用量マウス薬理学。血清Ｃ５濃度は、生理食塩水対照群に対して示される。各点は、３匹のマウスの平均及び標準偏差を表す。

【０６０６】

ＥＴＸ０１５（Ｃ５　ｍＲＮＡを標的とする）Ｔ２ａ逆脱塩基

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

【０６０７】

約８週齢の雄Ｃ５７ＢＬ／６マウスを、２１匹のマウスの群に無作為に割り当てた。研究の０日目に、動物は、０．３、１若しくは３ｍｇ／ｋｇの単回皮下用量の生理食塩水（滅菌０．９％塩化ナトリウム）中に溶解したＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡ、又は対照として生理食塩水のみを受けた。研究の１日目、２日目、４日目、７日目、１４日目、２１日目、及び２８日目に、各群からの３匹のマウスを安楽死させ、血清及び肝臓試料を採取した。

【０６０８】

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

【０６０９】
Ｃ５　ｍＲＮＡ（サーモアッセイＩＤ　Ｍｍ００４３９２７５＿ｍ１）及びハウスキーピング遺伝子ＧＡＰＤＨ　ｍＲＮＡ（サーモアッセイＩＤ　Ｍｍ９９９９９９１５＿ｇ１）について、定量的リアルタイムＰＣＲを使用して、肝臓試料を分析した。デルタデルタＣｔ法を使用して、ＧＡＰＤＨに対して正規化され、生理食塩水対照群に対してＣ５発現の変化を計算した。
【０６１０】
ＥＴＸ０１５は、用量依存的にＣ５　ｍＲＮＡの発現を阻害し（図２２）、３ｍｇ／ｋｇ用量は、Ｃ５　ｍＲＮＡの８５％超の低減を達成した。Ｃ５発現の抑制は持続的であり、３ｍｇ／ｋｇ用量の各分子は、２８日目に試験が終了するまで、Ｃ５　ｍＲＮＡの明確なノックダウンを示した。３ｍｇ／ｋｇのＥＴＸ０１５を投薬されたマウスは、依然として、投薬の２８日後に正常な肝臓のＣ５　ｍＲＮＡレベルの５０％未満を示した。
【０６１１】
Ｃ５タンパク質レベル分析のために、市販のＣ５　ＥＬＩＳＡキット（Ａｂｃａｍ　ａｂ２６４６０９）を使用して血清試料を測定した。一致する時点での生理食塩水群の平均に対する血清Ｃ５レベルを計算した。
【０６１２】
血清タンパク質データは、ｍＲＮＡ分析を支持する（図２３）。ＥＴＸ０１５は、血清Ｃ５タンパク質濃度の用量依存的減少を引き起こした。３ｍｇ／ｋｇ及び１ｍｇ／ｋｇ用量のＥＴＸ０１５は、血清Ｃ５タンパク質レベルの９０％超の低減を達成した。最高の用量は、生理食塩水対照と比較して、Ｃ５タンパク質発現の持続的な抑制を示し、研究の２８日目にＣ５が７０％超低減した。
【０６１３】
図２２．ＥＴＸ０１５の単回用量マウス薬理学。Ｃ５　ｍＲＮＡの発現は、生理食塩水対照群に対して示される。各点は、３匹のマウスの平均及び標準偏差を表す。
【０６１４】
図２３．ＥＴＸ００１４の単回用量マウス薬理学。血清Ｃ５濃度は、生理食塩水対照群に対して示される。各点は、３匹のマウスの平均及び標準偏差を表す。
【０６１５】
実施例６
ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡ構築物ＥＴＸ０２３及びＥＴＸ０２４についてのＮＨＰデータ
ＥＴＸ０２３（ＴＴＲ　ｍＲＮＡを標的とする）Ｔ１ａ逆脱塩基
血清トランスサイレチン（ＴＴＲ）タンパク質レベルを定量することによって、非ヒト霊長類（ＮＨＰ）において、ＥＴＸ０２３薬理学を評価した。１ｍｇ／ｋｇの単回皮下用量のＧａｌＮＡｃコンジュゲート修飾ｓｉＲＮＡ　ＥＴＸ０２３は、ＴＴＲタンパク質発現の持続的な抑制を示した。
【０６１６】
雄カニクイザル（３～５歳、２～３ｋｇ）を３匹の動物の群に割り当てた。動物を２週間順応させ、投薬の１４日前に採血して、ベースラインＴＴＲ濃度を得た。肝生検を投薬の１８日又は３８日前に実施して、ベースラインｍＲＮＡレベルを得た。研究の０日目に、動物は、１ｍｇ／ｋｇの単回皮下用量の生理食塩水（滅菌０．９％塩化ナトリウム）中に溶解したＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡ　ＥＴＸ０２３を受けた。研究の３日目、１４日目、２８日目、４２日目、５６日目、７０日目及び８４日目に、肝生検を採取し、ＴＴＲ　ｍＲＮＡの測定のためにＲＮＡを抽出した。研究の１日目、３日目、７日目、１４日目、２８日目、４２日目、５６日目、７０日目、及び８４日目に、血清ＴＴＲ濃度の測定及び臨床血液化学分析のために血液試料を採取した。
【０６１７】
ＴＴＲ　ｍＲＮＡ発現の抑制は、血清ＴＴＲタンパク質レベルの減少を引き起こすと予想される。血清ＴＴＲタンパク質濃度を、市販のＥＬＩＳＡキット（Ａｂｃａｍ　ａｂ２３１９２０）によって測定した。１日目の画分のＴＴＲ濃度を各個々の動物について計算

し、これを３匹の動物の群の平均及び標準偏差としてプロットした（図２４）。
【０６１８】
１ｍｇ／ｋｇの単回用量のＥＴＸ０２３は、血清ＴＴＲ濃度の急速で有意な低減を引き起こし、投薬の２８日後に最も低い状態に達し、７０日目まで抑制されたままであった。
【０６１９】
８４日目までデータを更に得た。ＥＴＸ０１９を使用して同一の実験を行った。８４日間のデータは、ＥＴＸ００１９については図２６に、及びＥＴＸ００２３については図２８ａに提供される。
【０６２０】
ＴＴＲ ｍＲＮＡを、ＴａｑＭａｎ遺伝子発現キットＴＴＲ（Ｔｈｅｒｍｏ、アッセイＩＤ Ｍｆ０２７９９９６３＿ｍ１）を使用して、リアルタイム定量的ＰＣＲによって測定した。ＧＡＰＤＨ発現も測定し（Ｔｈｅｒｍｏ、アッセイＩＤ Ｍｆ０４３９２５４６＿ｇ１）、参照を得た。各動物の相対ＴＴＲ発現を、ΔΔＣｔ法によって、ＧＡＰＤＨに対して正規化し、投薬前レベルに対して計算した。１ｍｇ／ｋｇの単回用量のＥＴＸ０２３はまた、肝臓ＴＴＲ ｍＲＮＡの急速で有意な低減を引き起こし、投薬の１４日後に最も低い状態に達し、８４日目まで抑制されたままであった（図２８ｂ）。
【０６２１】
動物の体重を、研究中に週１回測定した。体重の変動又は減少は、ＥＴＸ０２３の投薬と関連付けられず、動物は研究を通して体重が増加し続けた（図２８ｃ）。
【０６２２】
自動生化学分析装置を使用して、血清を２時間以内に分析した。ＡＬＴ（アラニントランスアミナーゼ）及びＡＳＴ（アスパラギン酸トランスアミナーゼ）の顕著な増加が、肝毒性を実証するために一般に使用される。ＡＬＴ（図２８ｄ）又はＡＬＴ（図２８ｅ）の増加は、ＥＴＸ０２３の投薬と関連しなかった。
【０６２３】
ＥＴＸ０２４（ＴＴＲ ｍＲＮＡを標的とする）Ｔ２ａ逆脱塩基
血清トランスサイレチン（ＴＴＲ）タンパク質レベルを定量することによって、非ヒト霊長類（ＮＨＰ）において、ＥＴＸ０２４薬理学を評価した。１ｍｇ／ｋｇの単回皮下用量のＧａｌＮＡｃコンジュゲート修飾ｓｉＲＮＡ ＥＴＸ０２４は、ＴＴＲタンパク質発現の持続的な抑制を示した。
【０６２４】
雄カニクイザル（３～５歳、２～３ｋｇ）を３匹の動物の群に割り当てた。動物を２週間順応させ、投薬の１４日前に採血して、ベースラインＴＴＲ濃度を得た。肝生検を投薬の１８日又は３８日前に実施して、ベースラインｍＲＮＡレベルを得た。研究の０日目に、動物は、１ｍｇ／ｋｇの単回皮下用量の生理食塩水（滅菌０．９％塩化ナトリウム）中に溶解したＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡ ＥＴＸ０２４を受けた。研究の３日目、１４日目、２８日目、４２日目、５６日目、７０日目及び８４日目に、肝生検を採取し、ＴＴＲ ｍＲＮＡの測定のためにＲＮＡを抽出した。研究の１日目、３日目、７日目、１４日目、２８日目、４２日目、５６日目、７０、及び８４日目に、血清ＴＴＲ濃度の測定及び臨床血液化学分析のために血液試料を採取した。
【０６２５】
ＴＴＲ ｍＲＮＡ発現の抑制は、血清ＴＴＲタンパク質レベルの減少を引き起こすと予想される。血清ＴＴＲタンパク質濃度を、市販のＥＬＩＳＡキット（Ａｂｃａｍ ａｂ２３１９２０）によって測定した。１日目の画分のＴＴＲ濃度を各個々の動物について計算し、これを３匹の動物の群の平均及び標準偏差としてプロットした（図２５）。
【０６２６】
１ｍｇ／ｋｇの単回用量のＥＴＸ０２４は、血清ＴＴＲ濃度の急速で有意な低減を引き起こし、投薬の２８日後に最も低い状態に達し、７０日目まで抑制されたままであった。
【０６２７】
８４日目までＥＴＸ０２４でのデータを更に得た。ＥＴＸ０２０を使用して同一の実験

を行った。８４日間のデータは、ＥＴＸ００２０については図２７に、及びＥＴＸ００２４については図２９ａに提供される。

【０６２８】

ＴＴＲ ｍＲＮＡを、ＴａｑＭａｎ遺伝子発現キットＴＴＲ（Ｔｈｅｒｍｏ、アッセイＩＤ Ｍｆ０２７９９９６３＿ｍ１）を使用して、リアルタイム定量的ＰＣＲによって測定した。ＧＡＰＤＨ発現も測定し（Ｔｈｅｒｍｏ、アッセイＩＤ Ｍｆ０４３９２５４６＿ｇ１）、参照を得た。各動物の相対ＴＴＲ発現を、ΔΔＣｔ法によって、ＧＡＰＤＨに対して正規化し、投薬前レベルに対して計算した。１ｍｇ／ｋｇの単回用量のＥＴＸ０２４は、肝臓ＴＴＲ ｍＲＮＡの急速で有意な低減を引き起こし、投薬の１４日後に最も低い状態に達し、８４日目まで抑制されたままであった（図２９ｂ）。

【０６２９】

動物の体重を、研究中に週１回測定した。体重の変動又は減少は、ＥＴＸ０２４の投薬と関連付けられず、動物は研究を通して体重が増加し続けた（図２９ｃ）。

【０６３０】

自動生化学分析装置を使用して、血清を２時間以内に分析した。ＡＬＴ（アラニントランスアミナーゼ）及びＡＳＴ（アスパラギン酸トランスアミナーゼ）の顕著な増加が、肝毒性を実証するために一般に使用される。ＡＬＴ（図２９ｄ）又はＡＬＴ（図２９ｅ）の増加は、ＥＴＸ０２４の投薬と関連しなかった。

【０６３１】

好ましい態様では、本発明の化合物は、標的タンパク質の血清タンパク質レベルを、最大で０日目後少なくとも約１４日、最大で０日目後少なくとも約２１日、最大で０日目後少なくとも約２８日、最大で０日目後少なくとも約３５日、最大で０日目後少なくとも約４２日、最大で０日目後少なくとも約４９日、最大で０日目後少なくとも約５６日、最大で０日目後少なくとも約６３日、最大で０日目後少なくとも約７０日、最大で０日目後少なくとも約７７日、又は最大で０日目後少なくとも約８４日の期間（以下「用量期間」と称される）にわたって、０日目の初期（開始）濃度未満の値に低下させ得る。本明細書で言及される「０日目」は、患者への本発明の化合物の投薬が開始される日、すなわち、投薬期間又は投薬後の時間の開始である。

【０６３２】

好ましい態様では、本発明の化合物は、標的タンパク質の血清タンパク質レベルを、０日目の初期（開始）濃度の少なくとも約８５％以下、少なくとも約８０％以下、少なくとも約７５％以下、少なくとも約７０％以下、少なくとも約６５％以下、少なくとも約６０％以下、少なくとも約５５％以下、少なくとも約５０％以下、少なくとも約４５％以下、少なくとも約４０％以下、少なくとも約３５％以下、少なくとも約３０％以下、少なくとも約２５％以下、少なくとも約２０％以下、少なくとも約１５％以下、少なくとも約１０％以下、少なくとも約５％以下など、０日目の初期（開始）濃度の少なくとも約９０％以下の値に低下させ得る。典型的には、かかる血清タンパク質の低下は、最大で０日目後少なくとも約１４日、最大で０日目後少なくとも約２１日、最大で０日目後少なくとも約２８日、最大で０日目後少なくとも約３５日、最大で０日目後少なくとも約４２日、最大で０日目後少なくとも約４９日、最大で０日目後少なくとも約５６日、最大で０日目後少なくとも約６３日、最大で０日目後少なくとも約７０日、最大で０日目後少なくとも約７７日、又は最大で０日目後少なくとも約８４日の期間にわたって維持され得る。より好ましくは、最大で０日目後少なくとも約８４日の期間で、血清タンパク質は、０日目の初期（開始）濃度の少なくとも約８５％以下、少なくとも約８０％以下、少なくとも約７５％以下、少なくとも約７０％以下、少なくとも約６５％以下、少なくとも約６０％以下、少なくとも約５５％以下、少なくとも約５０％以下、少なくとも約４５％以下、少なくとも約４０％以下の値など、０日目の初期（開始）濃度の少なくとも約９０％以下の値に低下し得る。

【０６３３】

好ましい態様では、本発明の化合物は、０日目の初期（開始）濃度の少なくとも約４５

％以下、少なくとも約４０％以下、少なくとも約３５％以下、少なくとも約３０％以下、少なくとも約２５％以下、少なくとも約２０％以下、少なくとも約１５％以下、少なくとも約１０％以下、少なくとも約５％以下の値など、０日目の初期（開始）濃度の少なくとも約５０％以下の値に標的タンパク質の血清タンパク質レベルの最大の低下を達成することができる。典型的には、血清タンパク質のかかる最大の低下は、０日目後の約１４日目、０日目後の約２１日目、０日目後の約２８日目、０日目後の約３５日目、又は０日目後の約４２日目に生じる。より典型的には、血清タンパク質のかかる最大の低下は、０日目後の約１４日目、０日目後の約２１日目、又は０日目後の約２８日目に生じる。

【０６３４】

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

【０６３５】

ＥＴＸ０１９は、典型的には、標的タンパク質、典型的にはＴＴＲの血清タンパク質レベルの少なくとも５０％の低下を、典型的には、０日目の約７～２１日後、特に０日目の約１４日後に達成することができ、かつ／又は典型的には、標的タンパク質、典型的にはＴＴＲの血清タンパク質レベルの少なくとも９０％の低下を、最大で０日目後少なくとも約８４日の期間にわたって維持することができる（本明細書で説明されるように、本明細書で言及される「０日目」は、患者への本発明の化合物の投薬が開始される日であり、そのように投薬後の時間を示す）。

【０６３６】

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

【０６３７】

ＥＴＸ０２３は、典型的には、標的タンパク質、典型的にはＴＴＲの血清タンパク質レベルの少なくとも２０％の低下を、典型的には、０日目の約７～２１日後、特に０日目の約１４日後に達成することができ、かつ／又は典型的には、標的タンパク質、典型的にはＴＴＲの血清タンパク質レベルの少なくとも５０％の低下を、最大で０日目後少なくとも約８４日の期間にわたって維持することができる（本明細書で説明されるように、本明細書で言及される「０日目」は、患者への本発明の化合物の投薬が開始される日であり、そのように投薬後の時間を示す）。

【０６３８】

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

【０６３９】

好適には、血清レベルの低下は、生理食塩水（滅菌０．９％塩化ナトリウム）に溶解された１ｍｇ／ｋｇの関連活性剤、例えば、ＥＴＸ００２３又はＥＴＸ００２４のを送達することによって非ヒト霊長類において決定される。好適な方法が本明細書に記載される。これは限定するものではなく、適切な制御を有する他の好適な方法が使用され得ることが理解されるであろう。

【０６４０】
実施例７　ＥＴＸ０２３（ＴＴＲ　ｍＲＮＡを標的とする）Ｔ１ａ逆脱塩基
総ビリルビンレベルは、研究を通して安定したままであった（図３４）。
【０６４１】
研究を通して、尿素（血中尿素窒素、ＢＵＮ）及びクレアチニン濃度の評価によって腎臓の健康状態を監視した。血中尿素濃度（ＢＵＮ）及びクレアチニンレベルの両方は、単回１ｍｇ／ｋｇ用量のＥＴＸ０２３後も安定し、予想される範囲内であった（図３５及び３６）。
【０６４２】
実施例８　ＥＴＸ０２４（ＴＴＲ　ｍＲＮＡを標的とする）Ｔ２ａ逆脱塩基
総ビリルビンレベルは、研究を通して安定したままであった（図３７）。
【０６４３】
研究を通して、尿素（血中尿素窒素、ＢＵＮ）及びクレアチニン濃度の評価によって腎臓の健康状態を監視した。血中尿素濃度（ＢＵＮ）及びクレアチニンレベルの両方は、単回１ｍｇ／ｋｇ用量のＥＴＸ０２４後も安定し、予想される範囲内であった（図３８及び３９）。
【０６４４】
本発明の更なる態様は、以下の図４０～図４２及び実施例９～１８に記載される非限定的な実施例を用いて、以下に説明する。以下に記載される化合物は、別途本開示から直ちに明らかでない限り、例えば、使用、核酸長、定義、薬学的に許容される組成物、投薬、遺伝子発現を阻害する方法、及び遺伝子発現に関連する疾患の治療又は予防方法に関して、上記に開示される態様及び実施形態のうちのいずれかにおける使用に好適である。
【０６４５】
図４０Ａは、三分岐ＧａｌＮＡｃ（Ｎ－アセチルガラクトサミン）単位を示す。
【０６４６】
図４０Ｂは、本発明の一実施形態による代替の三分岐ＧａｌＮＡｃを示し、連結基の変化を示す。
【０６４７】
図４１Ａは、本発明による三分岐ＧａｌＮＡｃコンジュゲートｓｉＲＮＡを示し、連結基における変化を示す。
【０６４８】
図４１Ｂは、本発明の一実施形態による三分岐ＧａｌＮＡｃコンジュゲートｓｉＲＮＡの属を示す。
【０６４９】
図４１Ｃは、本発明の一実施形態による二分岐ＧａｌＮＡｃコンジュゲートｓｉＲＮＡの属を示し、連結基における変化を示す。
【０６５０】
図４１Ｄは、本発明の別の実施形態による二分岐ＧａｌＮＡｃコンジュゲートｓｉＲＮＡの属を示し、連結基における変化を示す。
【０６５１】
図４２Ａは、本発明の一実施形態による三分岐ＧａｌＮＡｃコンジュゲートｓｉＲＮＡの別の実施形態を示す。
【０６５２】
図４２Ｂは、代替の分岐ＧａｌＮＡｃコンジュゲートを有する、図２７Ａに示されるバリアントを示す。
【０６５３】
図４２Ｃは、本発明の一実施形態による三分岐ＧａｌＮＡｃコンジュゲートｓｉＲＮＡの属を示し、連結基における変化を示す。
【０６５４】
図４２Ｄは、本発明の一実施形態による二分岐ＧａｌＮＡｃコンジュゲートｓｉＲＮＡ

の属を示し、連結基における変化を示す。

【０６５５】

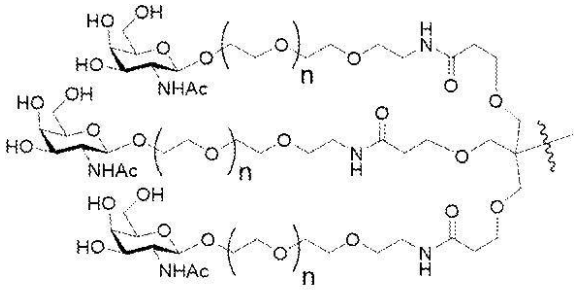
更なる態様は、ＡＳＧＰ－Ｒリガンドコンジュゲート、化学修飾ＲＮＡｉ剤の形態、並びにかかるコンジュゲート分子を作製する方法及びその使用を開示する。

【０６５６】

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

【０６５７】

【化１０８】



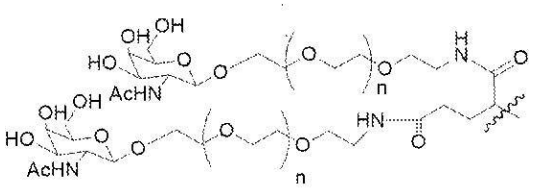
式Ｉ＊

【０６５８】

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

【０６５９】

【化１０９】



式ＩＩ＊－ａ

【０６６０】

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

【０６６１】

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

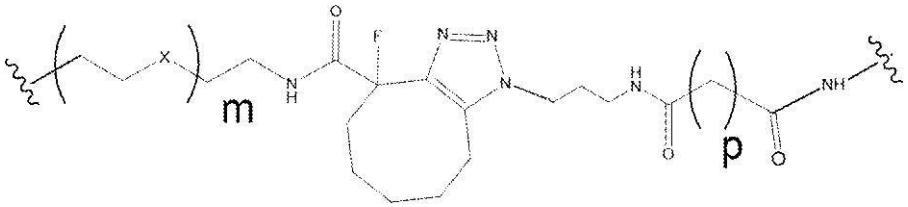
【０６６２】

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

【０６６３】

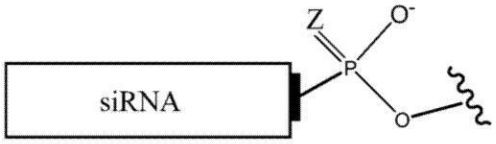
オプション１．更なる実施形態では、ＧａｌＮＡｃ単位は、式（ＩＩＩ＊）に示される

もののようなテザーを介してＲＮＡｉ剤に結合され得る。
【０６６４】
【化１１０】



式ＩＩＩ＊

【０６６５】
式ＩＩＩ＊において、ｍは、０、１、２、３、４、又は５から選択され、ｐは、ｍと独立して、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、又は１４から選択され、Ｘは、ＣＨ２又はＯのいずれかである。
【０６６６】
更なる実施形態では、テザーは、式（ＩＶ＊）に示されるように、ホスフェート（Ｚ＝Ｏ）又はホスホロチオエート基（Ｚ＝Ｓ）を介してオリゴに結合し得る。
【０６６７】
【化１１１】



式ＩＶ＊

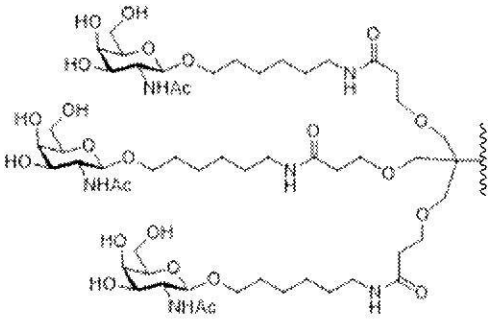
【０６６８】
指定されたテザーを介したＧａｌＮＡｃ分岐単位のかかる結合は、好ましくは、ＲＮＡｉ剤のセンス鎖の３’又は５’末端にある。一実施形態では、ＲＮＡｉ剤の３’への結合は、式（Ｖ＊）に示すように、Ｃ６アミノリンカーを介してである。
【０６６９】
【化１１２】



式Ｖ＊

【０６７０】
このリンカーは、実施例１５に示される合成の出発点である。
【０６７１】
上記と同じリンカー及びテザーを、式ＶＩ＊及びＶＩＩ＊に示される代替の分岐ＧａｌＮＡｃ構造とともに使用し得る。
【０６７２】

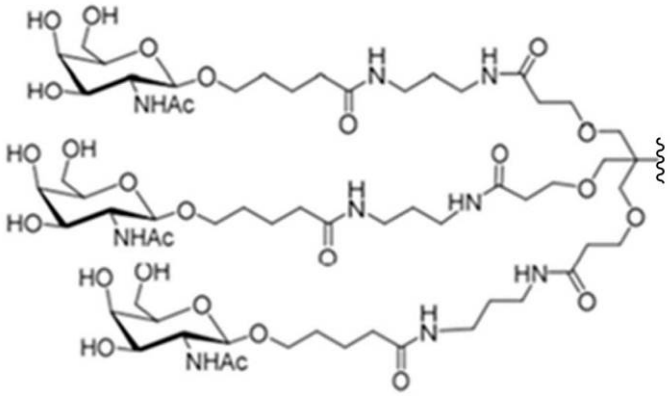
【化１１３】



式ＶＩ＊

【０６７３】

【化１１４】



式ＶＩＩ＊

【０６７４】

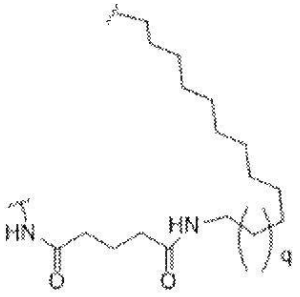
式ＩＩ＊－ａと同様に、式ＶＩ＊及びＶＩＩ＊に基づく二分岐型のリガンドを、本発明の組成物中で使用し得る。

【０６７５】

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

【０６７６】

【化１１５】

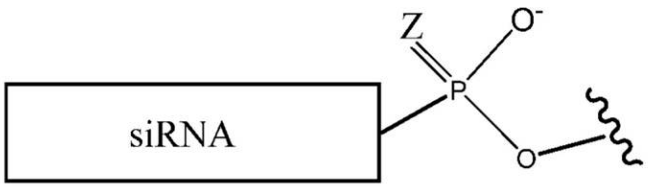


式ＩＩＩ＊―２

【０６７７】

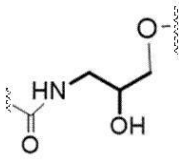
式ＩＩＩ＊－２において、ｑは、１、２、３、４、５、６、７、又は８から選択される。

【０６７８】
更なる実施形態では、テザーは、式（ＩＶ＊）に示されるように、ホスフェート（Ｚ＝Ｏ）又はホスホロチオエート基（Ｚ＝Ｓ）を介してオリゴに結合し得る。
【０６７９】
【化１１６】



式ＩＶ＊

【０６８０】
指定されたテザーを介したＧａｌＮＡｃ分岐単位のかかる結合は、好ましくは、二本鎖ＲＮＡｉ剤のセンス鎖の３’又は５’末端にある。一実施形態では、ＲＮＡｉ剤の３’への結合は、実施例１７に示されるようなものである。一実施形態では、ＧａｌＮＡｃテザーが３’部位に結合している場合、テザーとオリゴの３’末端との間の遷移リンカーは、式（Ｖ＊－ａ、図４２Ｃも参照されたい）の構造を含むか、又は別の好適なリンカー、例えば、式（Ｖ＊－ｂ）に示されるＣ６アミノリンカーが使用され得る。
【０６８１】
【化１１７】



式Ｖ＊－ａ

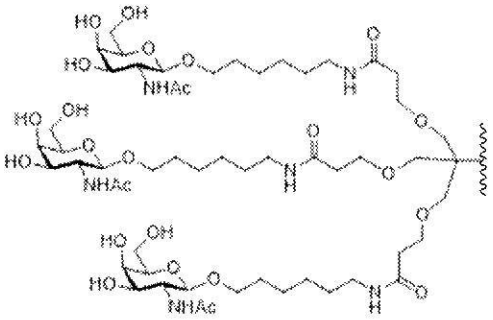
【０６８２】
【化１１８】



式Ｖ＊－ｂ

【０６８３】
追加及び／又は代替のコンジュゲーション部位は、糖残基、ホスフェート基、又は核酸塩基を含む、任意の非末端ヌクレオチドを含み得る。
【０６８４】
式ＶＩ＊－２及びＶＩＩ＊－２に示されるように、同じリンカー及びテザーを、代替の分岐ＧａｌＮＡｃ構造とともに使用し得る。
【０６８５】

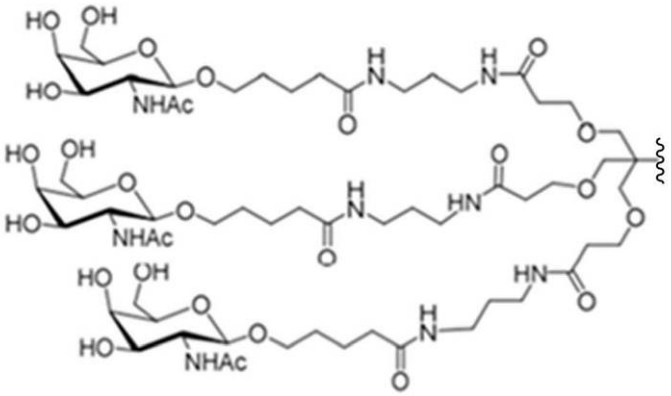
【化１１９】



式ＶＩ＊－２

【０６８６】

【化１２０】



式ＶＩＩ＊－２

【０６８７】

本発明のＲＮＡｉ剤の特性及びそれらの化学修飾

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

【０６８８】

ある特定の実施形態では、二本鎖ＲＮＡｉ剤は、平滑末端であるか、又は一方若しくは両方の末端にオーバーハングを有する。いくつかの実施形態では、オーバーハングは、アンチセンス鎖の１～６、１～５、１～４、１～３、２～４、４、３、２又は１ヌクレオチド（３’末端又は５’末端で）、及びセンス鎖の２～４、３、又は２又は１ヌクレオチド（３’末端又は５’末端で）である。ある特定の例示的な実施形態では、実施例９、構築物９．１、９．２、及び９．３を参照されたく、ＲＮＡｉ剤は、アンチセンス鎖の３’末端に２ヌクレオチドのオーバーハング、及びセンス鎖の３’末端に２ヌクレオチドのオーバー

ハングを含む。ある特定の他の例示的な実施形態では、実施例．１０、構築物１０．１及び１０．３、実施例１１、構築物１１．１及び１１．３、及び実施例１２、構築物１２．１及び１２．３を参照されたく、ＲＮＡｉ剤は、アンチセンス鎖の３’末端に２ヌクレオチドオーバーハングを含み、他方の末端で平滑末端である。ある特定の他の例示的な実施形態では、実施例１０、構築物１０．３を参照されたく、構築物は、両端で平滑末端である。別の例示的な実施形態では、実施例１２の構築物１２．２を参照されたく、ＲＮＡｉ剤は、アンチセンス鎖の３’末端に４ヌクレオチドのオーバーハングを含み、他方の末端に平滑末端を有する。

【０６８９】

ある特定の実施形態では、構築物は、末端キャップ、１つ以上の逆脱塩基ヌクレオチド、１つ以上のホスホロチオエート連結、１つ以上のデオキシヌクレオチド（例えば、Ｄ－リボヌクレオチド、Ｄ－２’－デオキシリボヌクレオチド、又は別の修飾ヌクレオチド）、又はそれらの組み合わせを使用することによって、ヌクレアーゼ切断を予防又は阻害する分解保護部分で修飾される。かかる分解保護部分は、ＡＳＧＰ－Ｒリガンドにコンジュゲートされていない任意の１つ又は全ての末端に存在し得る。ある特定の実施形態では、分解保護部分は、単独で、又は１～４、１～３、１～２、若しくは１個のホスホロチオエート連結、１～４　１～３、１～２、若しくは１個のデオキシヌクレオチド、及び１～４、１～３、１～２、若しくは１個の逆脱塩基ヌクレオチドからなる群から任意の組み合わせとして選択される。ある特定の例示的な実施形態では、分解保護部分は、実施例９～１８に示すように、構築物９．１、９．２、９．３、１０．１、１０．２、１０．３、１１．１、１１．２、１１．３、１２．１、１２．２、及び１２．３のうちの１つにあるように構成される。かかる例示的な保護部分の構成は、本発明の任意のＲＮＡｉ剤と併せて使用され得る。

【０６９０】

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

【０６９１】

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

【０６９２】

ある特定の実施形態では、いくつかの修飾は、例えば、実施例９～１８の構築物に示されるように、又は米国特許第７，４５２，９８７号、同第７，５２８，１８８号、同第８，２７３，８６６号、同第９，１５０，６０６号、及び同第１０，２６６，８２５号に記載されるように、明確なパターンの修飾を提供し、これらの全ては、参照により本明細書に組み込まれる。

【０６９３】

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

【０６９４】

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

【０６９５】

概して、本発明のＲＮＡｉ剤は、治療標的に対して指向されており、その阻害は、望ま

しくない又は病理学的状態を含む疾患の予防、緩和、又は治療をもたらすであろう。かかる標的の多くは、当該技術分野で既知である。かかる標的の非限定的な例としては、以下が含まれる：ＡｐｏＣ、ＡｐｏＢ、ＡＬＡＳ１、ＴＴＲ、ＧＯ、Ｃ５（実施例を参照されたい）など。概して、肝細胞の表面でのＡＳＧＰ－Ｒの豊富な発現により、かかる標的は、好ましくは、肝臓において発現されるが、しかしながら、それらは、他の組織又は器官においても発現される場合がある。好ましい実施形態では、標的はヒトであり、一方、ＲＮＡｉ剤は、かかる標的に完全に又は部分的に相補的なアンチセンス鎖を含む。特定の実施形態では、ＲＮＡｉ剤は、同じ又は異なる標的に対して指向された２つ以上の化学的に連結されたＲＮＡｉ剤を含み得る。

［実施例］

【０６９６】

実施例９：５’－ＧａｌＮＡｃを有する逆脱塩基化学

実施例に示される全てのＲＮＡｉ剤において、以下の慣例が使用される：

ｉａ＝逆脱塩基ヌクレオチド、

ｍ＝２’－Ｏ－メチルヌクレオチド、

ｆ＝２’－デオキシ－２’－フルオロヌクレオチド、

ｓ＝ホスホロチオエートヌクレオチド間連結、

Ｘｄ＝２’－デオキシヌクレオチド、

～＝テザー。

【０６９７】

標準的な合成技術を使用して、以下の構築物を、上記のように、又は図４１Ａ～４２Ｂに示されるように、テザー１及び２、並びに本発明による様々な三分岐ＧａｌＮＡｃ単位を用いて、様々なバージョンで合成する。

９．１．

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

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

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

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

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

【０６９８】

９．２．

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

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

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

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

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

【０６９９】

９．３．

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

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

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

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

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

【０７００】

実施例１０：３’－ＧａｌＮＡｃを有する逆脱塩基化学

標準的な合成技術を使用して、以下の構築物を、上記のように、又は図４１Ａ～４２Ｂに示されるように、本発明によるテザー１及び２、並びに本発明による様々な三分岐ＧａｌＮＡｃ単位を用いて、様々なバージョンで合成する。一貫性のために、実施例９と同じ配列を示す。

１０．１

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

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

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

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

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

【０７０１】

１０．２

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

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

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

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

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

【０７０２】

１０．３．

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

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

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

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

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

【０７０３】
実施例１１：代替修飾パターンを有する５’－ＧａｌＮＡｃを有する逆脱塩基化学
標準的な合成技術を使用して、以下の構築物を、上記のように、又は図４１Ａ～４２Ｂに示されるように、本発明によるテザー１及び２、並びに本発明による様々な三分岐ＧａｌＮＡｃ単位を用いて、様々なバージョンで合成する。一貫性のために、実施例９と同じ配列をここに示す。
１１．１．
（上段の鎖（センス（ｓｓ））：配列番号１３、下段の鎖（アンチセンス）配列番号１４）

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

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

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

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

【０７０４】
１１．２
（上段の鎖（センス（ｓｓ））：配列番号１５、下段の鎖（アンチセンス）配列番号１６）

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

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

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

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

【０７０５】
１１．３．
（上段の鎖（センス（ｓｓ））：配列番号１７、下段の鎖（アンチセンス）配列番号１８）

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

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

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

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

【０７０６】
実施例１２：代替修飾パターンを有する５’－ＧａｌＮＡｃを有する逆脱塩基化学
標準的な合成技術を使用して、以下の構築物を、上記のように、又は図４１Ａ～４２Ｂに示されるように、本発明によるテザー１及び２、並びに本発明による様々な三分岐ＧａｌＮＡｃ単位を用いて、様々なバージョンで合成する。一貫性のために、実施例９と同じ

配列を示す。

１２．１．

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

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

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

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

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

【０７０７】

１２．２

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

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

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

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

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

【０７０８】

１２．３

（上段の鎖（センス（ｓｓ））：配列番号２３、下段の鎖（アンチセンス）配列番号２４）

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

  5′      UfsGmsGf-Gm-Af-Um-Uf-Um-Cf-Am-Uf-Gm-Uf-Am-Af-Cm-Cf-Am-Af-Gm-Af~GalNAc 3′

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

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

【０７０９】

実施例１３：ｓｉＲＮＡ－ＧａｌＮＡｃコンジュゲートのベンチマーク

実施例９～１８において使用される構築物は、それらの数字によって参照され、表２２に列挙される。テザー１及びテザー２は、それぞれ図４１及び４２に示される。

【０７１０】

【表２２】

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

【０７１１】

以下の表２３は、本発明の様々な選択的構築物で実施されるベンチマークを反映する。

【０７１２】

【表２３－１】

表23. ｓｉＲＮＡ－ＧａｌＮＡｃのベンチマークのためのインビトロ実験

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

【０７１３】

【表２３－２】

	逆脱塩基化学					
7	センス鎖の3’末端にテザーオプション1					
	交互化学					
8	センス鎖の3’末端にテザーオプション2					
	交互化学					
9	3'－ＧａｌＮＡｃ対照(例えば、図２５Ａ					

【０７１４】
インビトロ薬力学的特性評価
表１に列挙される８つの構築物（ＧＯ１　ｓｉＲＮＡ－ＧａｌＮＡｃ、Ｃ５　ｓｉＲＮＡ－ＧａｌＮＡｃ、及びＴＴＲ　ｓｉＲＮＡ－ＧａｌＮＡｃ類似体）のインビトロ薬力学活性、結合親和性、及び肝臓取り込みを、これらの分子の臨床的に検証されたバージョンに対してベンチマークする。
【０７１５】
ヒト肝臓細胞株（ＨｅｐＧ２又はＨｅｐ３Ｂ）トランスフェクションアッセイ－－各ＧＯ１　ｓｉＲＮＡ－ＧａｌＮＡｃ、Ｃ５　ｓｉＲＮＡ－ＧａｌＮＡｃ、及びＴＴＲ　ｓｉ

ＲＮＡ－ＧａｌＮＡｃ類似体分子を、トランスフェクション試薬（例えば、ＲＮＡｉＭＡＸ）の存在下で、ヒト肝細胞株において、１０個の異なる濃度で、３７℃で０時間及び２４時間インキュベーションする。各濃度での全てのインキュベーションは、四重で実行される。インキュベーション後、各試料を溶解し、ｂＤＮＡ又はＲＴ－ｑＰＣＲアッセイによってＨＡＯ１　Ｃ５、ＴＴＲ及びハウスキーピング遺伝子（ＧＡＰＤＨなど）のｍＲＮＡ濃度について分析する。得られたｍＲＮＡ濃度データを分析に使用して、ＧＯ１　ｓｉＲＮＡ－ＧａｌＮＡｃ、Ｃ５　ｓｉＲＮＡ－ＧａｌＮＡｃ、及びＴＴＲ　ｓｉＲＮＡ－ＧａｌＮＡｃ分子の各々のサイレンシング活性及びＩＣ５０を決定する。

【０７１６】

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

【０７１７】

インビボ薬力学的特性評価

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

【０７１８】

各類似体のＧＯ１　ｓｉＲＮＡ－ＧａｌＮＡｃのインビボマウスの薬理学について、以下の表２４に提供されるように、０．３又は３ｍｇ／ｋｇの単回皮下用量後に評価する。ＧＯ１　ｓｉＲＮＡ－ＧａｌＮＡｃ類似体の各々が、０．３又は１ｍｇ／ｋｇでＣ５７ＢＬ／６雄マウス（ｎ＝３／時点／群）に皮下投与される２つの用量群が存在する。血清試料及び肝生検試料を得るための血液試料を様々な時点で取得し、ＬＣＭＳによる血清グリコレート濃度を決定し、ＲＴ－ｑＰＣＲ又はｂＤＮＡアッセイによってＨＡＯ１　ｍＲＮＡの濃度を決定する。各指定された時点で各群の動物を　　殺し、血液（約０．５ｍＬ／動物）及び肝臓（約１００ｍｇ）を収集する。群１～９については、投薬の２４、４８、９６、１６８、３３６、５０４、及び６７２時間後に、３匹の動物／時点／群から血液（約０．５ｍＬ／動物）及び肝臓（約１００ｍｇ）を収集する。群１０（ｎ＝３）は、血清グリコレート及びｍＲＮＡ　ＨＡＯ１濃度のベースライン値を提供するための投薬されない対照群である。投薬後の様々な時点での血清グリコレートの増加及び肝臓におけるＨＡＯ１　ｍＲＮＡのサイレンシングの薬力学的効果を、群１０対照の血清及び肝臓試料と比較する。

【０７１９】

【表２４】

表２４．ＧＯ１　ｓｉＲＮＡ－ＧａｌＮＡｃ類似体マウス薬理学研究設計

群	動物の数 雄	投薬経路	用量の回数/動物	標的用量レベル(mg/kg)	標的用量濃度 (mg/mL)	標的用量体積 (mL/kg)
1	21	SC	1	0.3 又は 3	3	1.5
2	21	SC	1	0.3 又は 3	3	1.5
3	21	SC	1	0.3 又は 3	3	1.5
4	21	SC	1	0.3 又は 3	3	1.5
5	21	SC	1	0.3 又は 3	3	1.5
6	21	SC	1	0.3 又は 3	3	1.5
7	21	SC	1	0.3 又は 3	3	1.5
8	21	SC	1	0.3 又は 3	3	1.5
9	21	SC	1	0.3 又は 3	3	1.5
10[a]	5	該当なし	該当なし	該当なし	該当なし	該当なし

表の凡例：

SC　皮下

NA　該当なし

a　群 10 の動物は対照動物であり、投薬されていない。

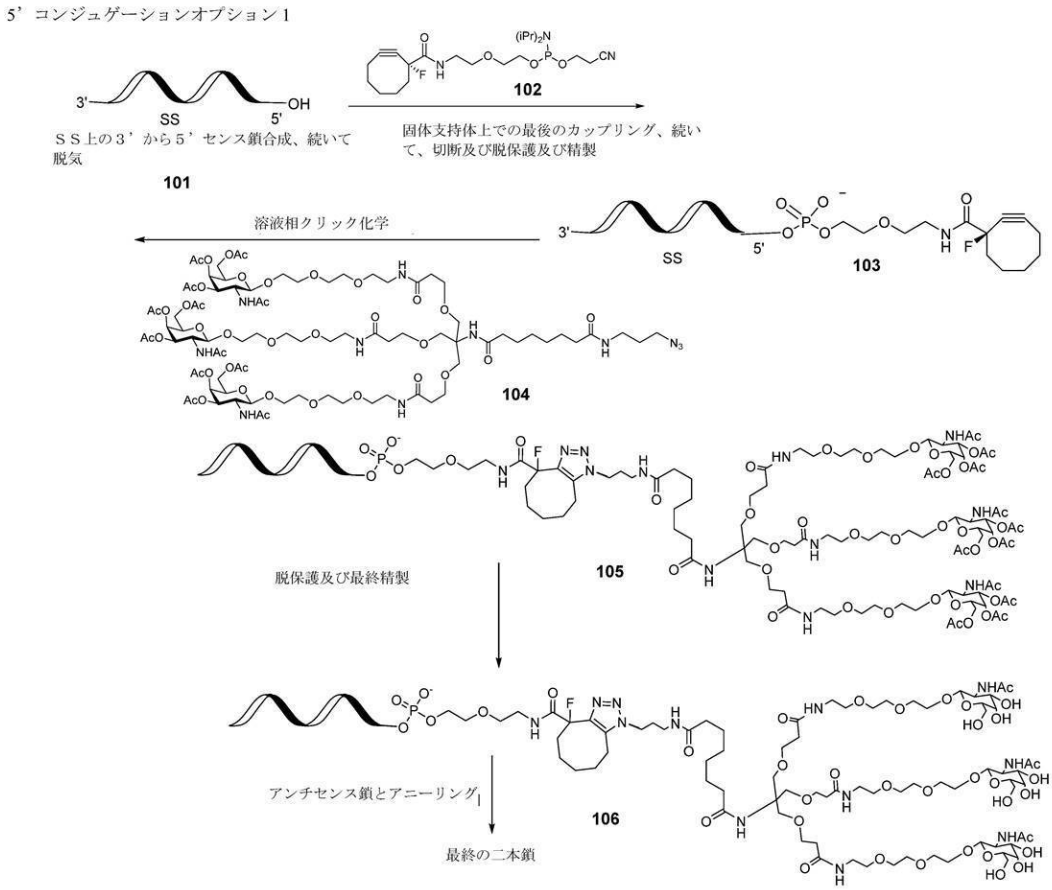
c　群 1~9 の動物は、1 日目に投薬される。

【０７２０】

実施例１４：クリック化学を使用した５’コンジュゲーション（オプション１）

【０７２１】

【化１２１】



【０７２２】

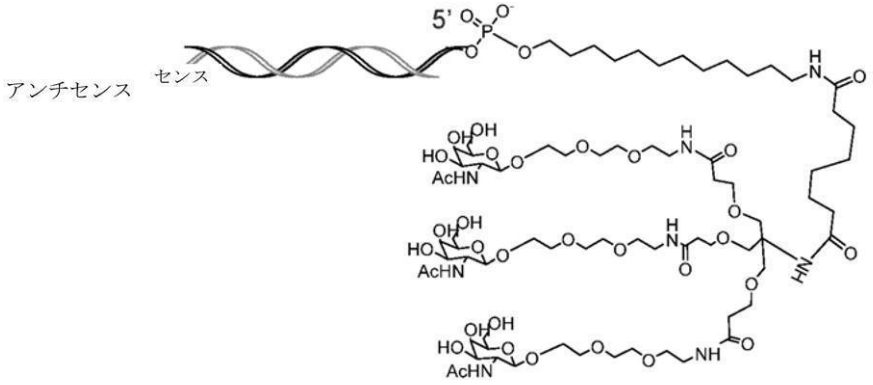
この実施形態では、オリゴヌクレオチド１０１のセンス鎖を、固体支持体上で合成し、市販のオクチンアミダイト１０２とカップリングして、固体支持体上のクリック化学前駆体を有する必要なオリゴヌクレオチドを得る。これは、標準的な切断及び脱保護後に、純粋なオリゴヌクレオチド１０３を得る。アジド１０４をＤＭＳＯ（１５０μＬ／ｍｇ）に溶解し、この溶液を１００μＬの水中の１００ＯＤのオリゴ１０３に添加する。次いで、反応混合物を室温で一晩インキュベーションする。コンジュゲートオリゴ１０５をＧｌｅｎＧｅｌ－Ｐａｋ（商標）で脱塩して有機物を除去し、アセトキシ保護基をメチルアミンでの処理によって除去し、続いて分取ＨＰＬＣ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

【０７２３】

実施例１５：５’コンジュゲーション（オプション２）

【０７２４】

【化１２２】

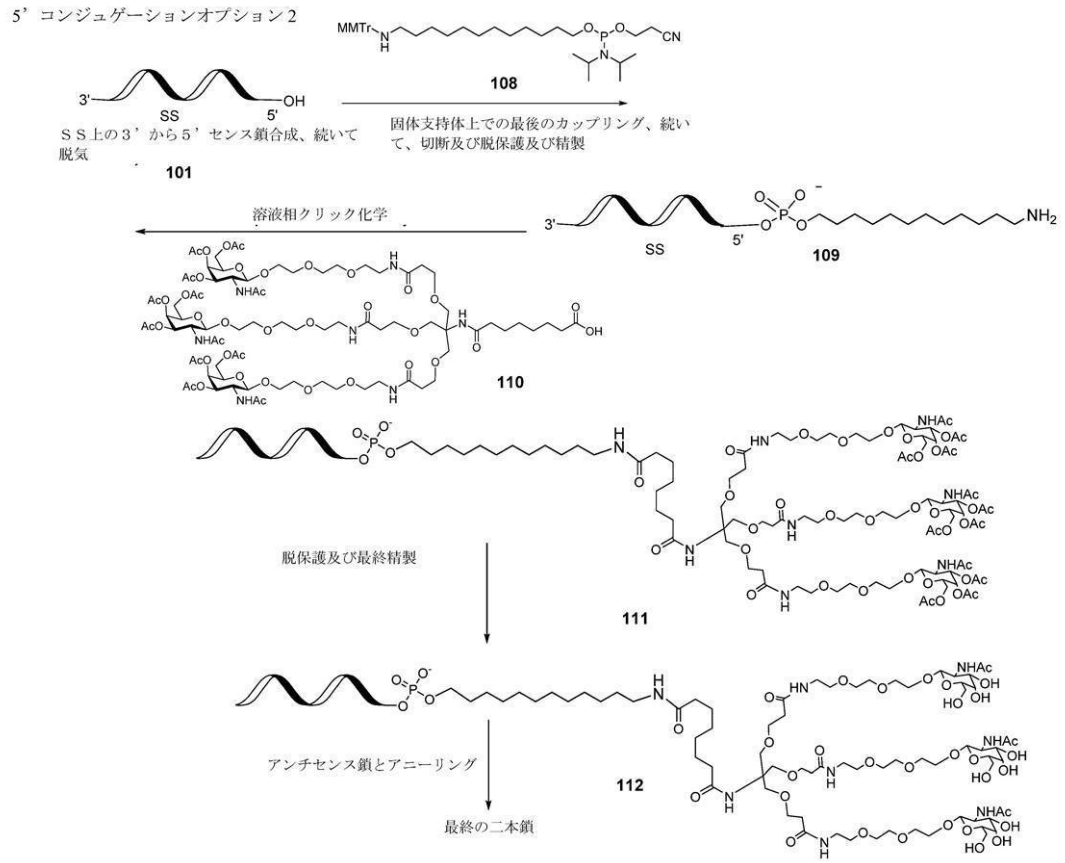


【０７２５】

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

【０７２６】

【化１２３】

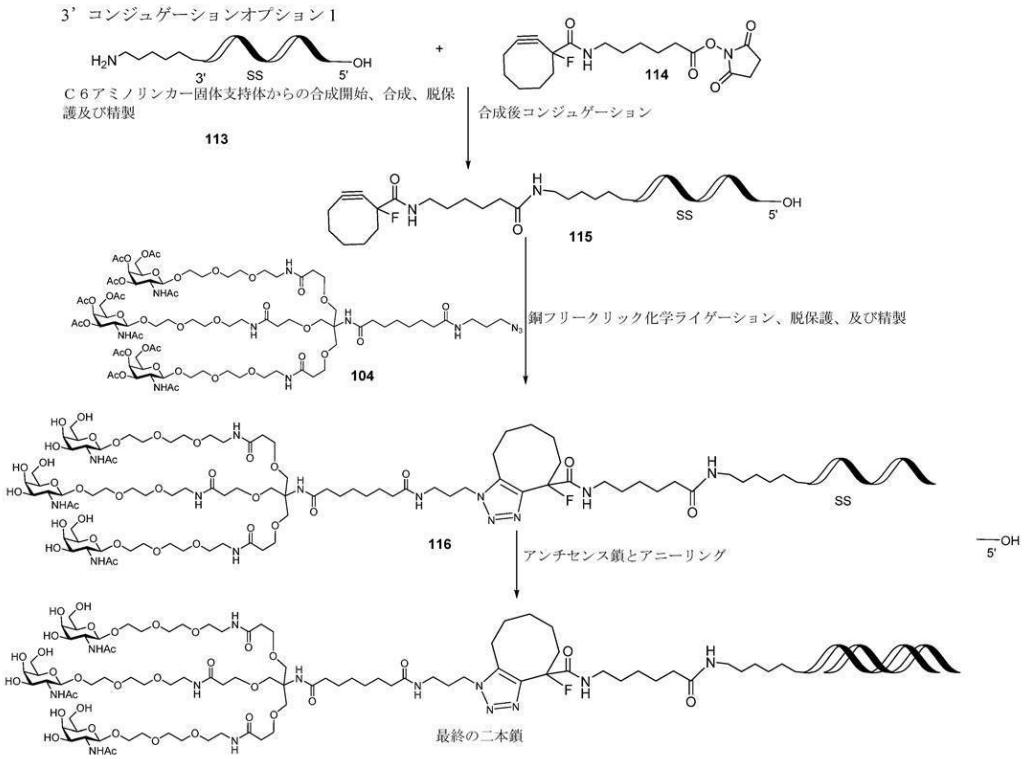


【０７２７】

実施例１６：クリック化学を使用した５’コンジュゲーション（オプション１）

【０７２８】

【化１２４】



【０７２９】

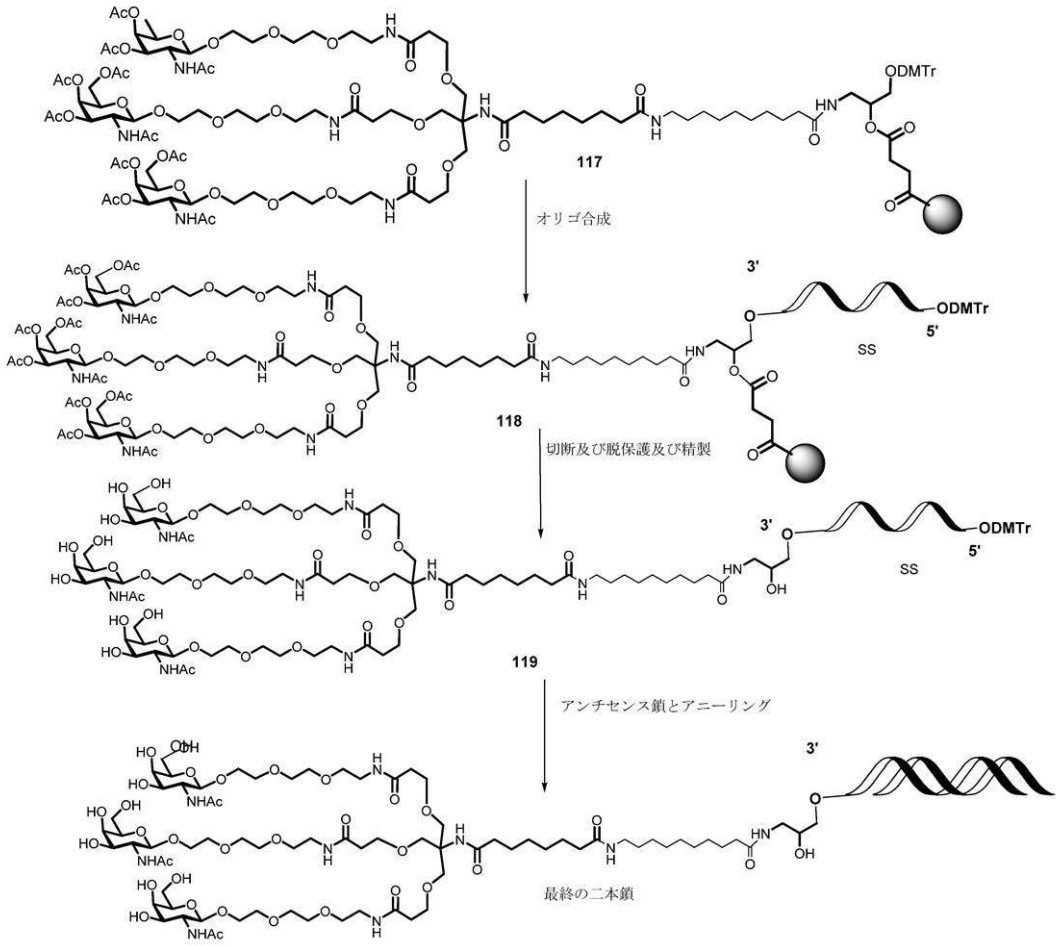
オリゴ構築物１１９の合成については、同様の手法が適合され、三分岐ＧａｌＮＡｃコンジュゲートが固体支持体１１８（ＣＰＧ）に担持され、オリゴ合成が実施される。切断及び脱保護及び精製後、アンチセンス鎖でアニーリングされる純粋なオリゴ１１９が得られ、純粋な形態で必要な最終の二本鎖を得る。別の手法において、３’コンジュゲートはまた、１１６の合成に類似して合成され、アミノ連結オリゴ１１３から出発し、ＧａｌＮＡｃカルボン酸を合成後にコンジュゲートし、コンジュゲートオリゴ１１９を得る。

【０７３０】

実施例１７：３’コンジュゲーション（オプション２）

【０７３１】

【化１２５】



【０７３２】

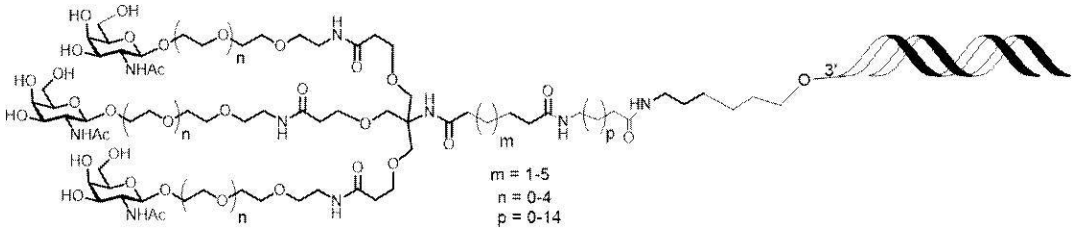
オリゴ構築物１１９の合成については、同様の手法が適合され、三分岐ＧａｌＮＡｃコンジュゲートが固体支持体１１８（ＣＰＧ）に担持され、オリゴ合成が実施される。切断及び脱保護及び精製後、アンチセンス鎖でアニーリングされる純粋なオリゴ１１９が得られ、純粋な形態で必要な最終の二本鎖を得た。別の手法において、３’コンジュゲートはまた、１１６の合成に類似して合成され、アミノ連結オリゴ１１３から出発し、ＧａｌＮＡｃカルボン酸を合成後にコンジュゲートし、コンジュゲートオリゴ１１９を得る。

【０７３３】

実施例１８：合成後コンジュゲーションアプローチ

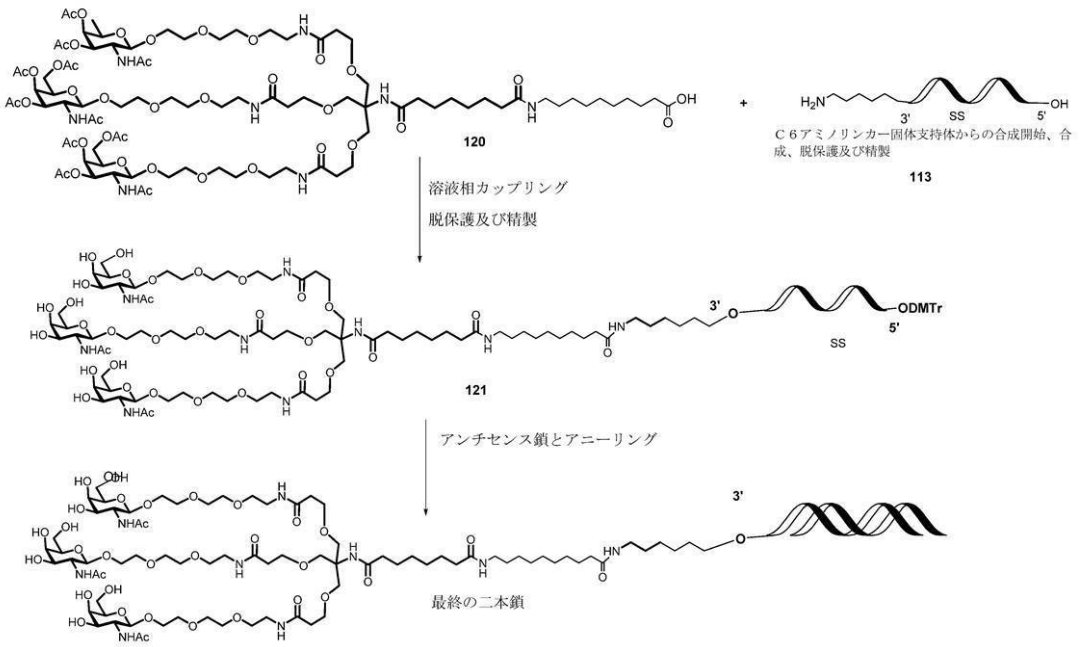
【０７３４】

【化１２６】



【０７３５】

【化１２７】



【０７３６】

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

【０７３７】

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

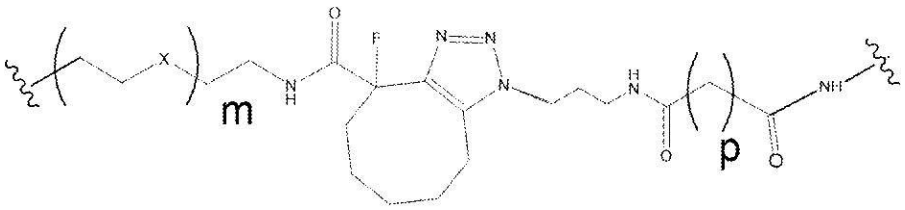
【０７３８】

ステートメント

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

【０７３９】

【化１２８】



（式ＩＩＩ＊）

【０７４０】

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

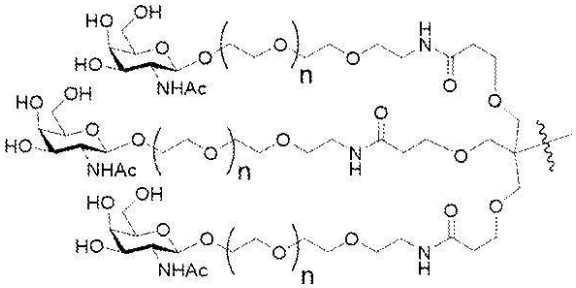
２．　ｍ＝１である、ステートメント１の修飾ＲＮＡｉ剤。

３．　ｘが、Ｏである、ステートメント１の修飾ＲＮＡｉ剤。

４．　ｐ＝６である、ステートメント１の修飾ＲＮＡｉ剤。

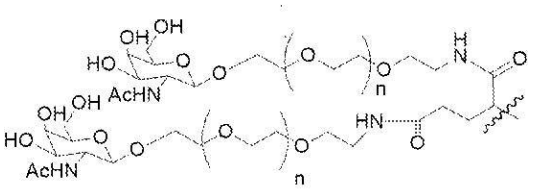
５．　ｍ＝１、ｐ＝６、及びｘが、Ｏである、ステートメント１の修飾ＲＮＡｉ剤。

６．　ＡＳＧＰ－Ｒリガンドが、分岐ＧａｌＮＡｃを含む、ステートメント１の修飾ＲＮＡｉ剤。
７．　分岐ＧａｌＮＡｃが、以下からなる群から選択され、
【０７４１】
【化１２９】



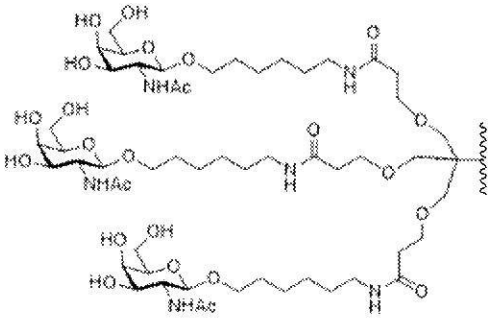
式Ｉ＊

【０７４２】
及び
【０７４３】
【化１３０】



式ＩＩ＊－ａ

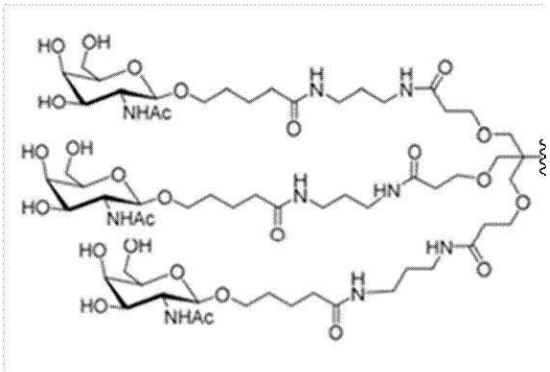
【０７４４】
式中、ｎが、０、１、２、３、又は４である、ステートメント６の修飾ＲＮＡｉ剤。
８．　ｎ＝１である、ステートメント７の修飾ＲＮＡｉ剤。
９．　分岐ＧａｌＮＡｃが
【０７４５】
【化１３１】



式ＶＩ＊、

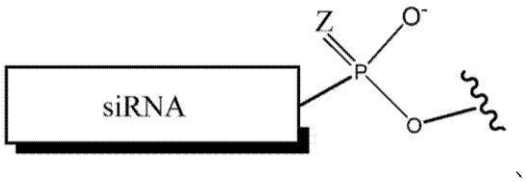
【０７４６】
又はその二分岐形態を含む、ステートメント６の修飾ＲＮＡｉ剤。
１０．　分岐ＧａｌＮＡｃが、又はその二分岐形態を含む、ステートメント６の修飾ＲＮＡｉ剤。
【０７４７】

【化１３２】



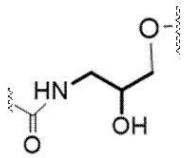
式ＶＩＩ＊、

【０７４８】
又はその二分岐形態。
１１．　テザーが、センス鎖の５’末端に結合している、ステートメント１の修飾ＲＮＡｉ剤。
１２．　テザーが、式ＩＶ＊に示されるように結合しており、
【０７４９】
【化１３３】



、

【０７５０】
式中、Ｚが、Ｐ又はＳである、ステートメント１１の修飾ＲＮＡｉ剤。
１３．　テザーが、センス鎖の３’末端に結合している、ステートメント１１の修飾ＲＮＡｉ剤。
１４．　テザーが、式Ｖ＊－ａ又はＶ＊－ｂに示されるように結合している、ステートメント１３の修飾ＲＮＡｉ剤：
【０７５１】
【化１３４】



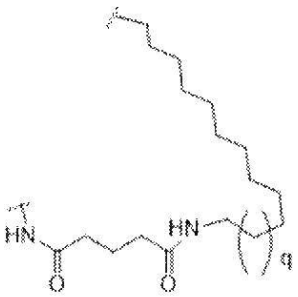
式Ｖ＊－ａ

【０７５２】
【化１３５】



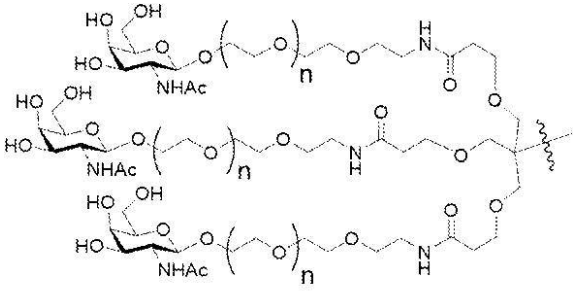
式Ｖ＊－ｂ

【０７５３】
１５．　図４１Ａ、４１Ｂ、４１Ｃ、又は４１Ｄに示される、ステートメント１の修飾ＲＮＡｉ剤。
１６．　ＲＮＡｉ化合物が、２’位で修飾された修飾リボースを含む、ステートメント１５の修飾ＲＮＡｉ剤。
１７．　修飾が、２’－Ｏ－メチル、２’－デオキシ－フルオロ、及び２’－デオキシから選択される、ステートメント１６の修飾ＲＮＡｉ剤。
１８．　ＲＮＡＩ化合物が、ＡＳＧＰ－Ｒリガンドにコンジュゲートされていない任意の末端又は全ての末端に１つ以上の分解保護部分を含有する、ステートメント１の修飾ＲＮＡｉ剤。
１９．　分解保護部分が、１～４個のホスホロチオエート連結、１～４個のデオキシヌクレオチド、及び１～４個の逆脱塩基ヌクレオチドからなる群から単独で、又は任意の組み合わせとして選択される、ステートメント１８の修飾ＲＮＡｉ剤。
２０．　分解保護部分が、以下の構築物９．１、９．２、９．３、１０．１、１０．２、１０．３、１１．１、１１．２、１１．３、１２．１、１２．２、及び１２．３のうちの１つに存在する構成から選択される、ステートメント１９の修飾ＲＮＡｉ剤。
２１．　テザーを介してＡＳＧＰ－ＲリガンドにコンジュゲートされたＲＮＡ干渉化合物（ＲＮＡｉ化合物）を含む修飾ＲＮＡｉ剤であって、テザーが、以下を含み、
【０７５４】
【化１３６】



（式ＩＩＩ＊－２）

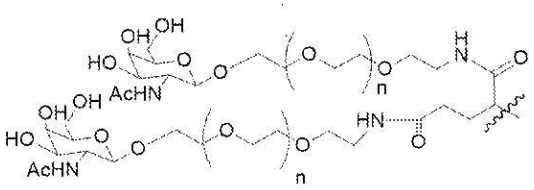
【０７５５】
式中、ｑが、１、２、３、４、５、６、７、又は８から選択される、修飾ＲＮＡｉ剤。
２２．　ｑ＝１である、ステートメント２１の修飾ＲＮＡｉ剤。
２３．　ＡＳＧＰ－Ｒリガンドが、分岐ＧａｌＮＡｃを含む、ステートメント２１の修飾ＲＮＡｉ剤。
２４．　分岐ＧａｌＮＡｃが、以下からなる群から選択され、
【０７５６】
【化１３７】



式Ｉ＊

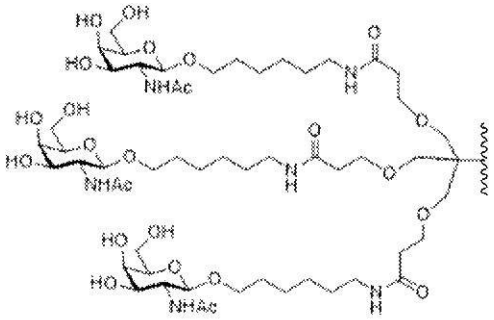
【０７５７】
及び

【０７５８】
【化１３８】



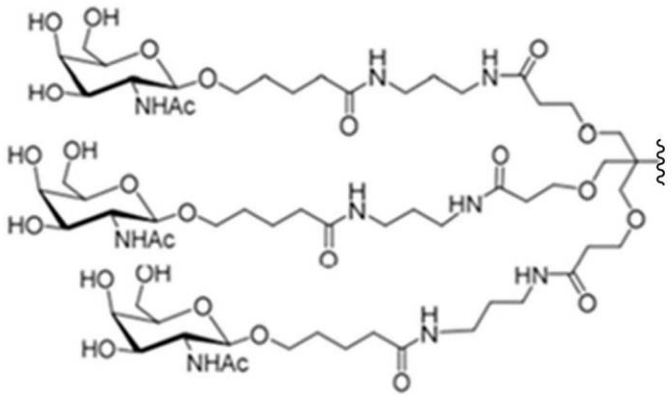
式ＩＩ＊－ａ

【０７５９】
式中、ｎが、０、１、２、３、又は４である、ステートメント２３の修飾ＲＮＡｉ剤。
２５．　ｎ＝１である、ステートメント２４の修飾ＲＮＡｉ剤。
２６．　分岐ＧａｌＮＡｃが、
【０７６０】
【化１３９】



式ＶＩ＊、

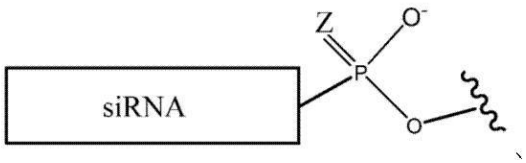
【０７６１】
又はその二分岐形態を含む、ステートメント２３の修飾ＲＮＡｉ剤。
２７．　分岐ＧａｌＮＡｃが、又はその二分岐形態を含む、ステートメント２３の修飾ＲＮＡｉ剤。
【０７６２】
【化１４０】



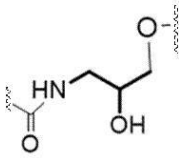
式ＶＩＩ＊、

【０７６３】
又はその二分岐形態。

２８．　テザーが、センス鎖の５’末端に結合している、ステートメント２１の修飾ＲＮＡｉ剤。
２９．　テザーが、式ＩＶ＊に示されるように結合しており、
【０７６４】
【化１４１】



【０７６５】
　式中、Ｚが、Ｐ又はＳである、ステートメント２８の修飾ＲＮＡｉ剤。
３０．　テザーが、センス鎖の３’末端に結合している、ステートメント２８の修飾ＲＮＡｉ剤。
３１．　テザーが、式Ｖ＊－ａ又はＶ＊－ｂに示されるように結合している、ステートメント３０の修飾ＲＮＡｉ剤：
【０７６６】
【化１４２】



式Ｖ＊－ａ

【０７６７】
【化１４３】



式Ｖ＊－ｂ

【０７６８】
３２．　図４２Ａ、４２Ｂ、４２Ｃ、又は４２Ｄに示される、ステートメント３１の修飾ＲＮＡｉ剤。
３３．　ＲＮＡｉ化合物が、２’位で修飾された修飾リボースを含む、ステートメント２１の修飾ＲＮＡｉ剤。
３４．　修飾が、２’－Ｏ－メチル、２’デオキシ－フルオロ、及び２’－デオキシから選択される、ステートメント３３の修飾ＲＮＡｉ剤。
３５．　ｓｉＲＮＡが、ＡＳＧＰ－Ｒリガンドにコンジュゲートされていない任意の末端又は全ての末端に１つ以上の分解保護部分を含有する、ステートメント２１の修飾ＲＮＡｉ剤。
３６．　分解保護部分が、１～４個のホスホロチオエート連結、１～４個のデオキシヌクレオチド、及び１～４個の逆脱塩基ヌクレオチドからなる群から単独で、又は任意の組み合わせとして選択される、ステートメント３５の修飾ＲＮＡｉ剤。
３７．　分解保護部分が、以下の構築物９．１、９．２、９．３、１０．１、１０．２、１０．３、１１．１、１１．２、１１．３、１２．１、１２．２、及び１２．３のうちの

１つに存在する構成から選択される、ステートメント３６の修飾ＲＮＡｉ剤。
３８．　ステートメント１又は２のＲＮＡｉ剤を作製する方法であって、当該方法が、実施例１１～１５に示される、方法。
３９．　対象における疾患を予防、緩和、又は治療する方法であって、方法は、対象に、疾患を予防、緩和、又は治療するのに有効な治療量で、ステートメント１又は２のＲＮＡｉ剤を投与し、それによって、疾患を予防、緩和、又は治療することを含む、方法。
４０．　対象が、ヒトである、ステートメント４０の方法。
【０７６９】
【表２５－１】

表Ａ：配列の概要

配列ID	二本鎖ID	ssRNA ID	センス配列	アンチセンス配列	クリーン配列
1.			5’ GalNAc~Gm-Am-Cm-Um-Um-Cm-Af-Um-Uf-Cf-Cf-Um-Gm-Gm-Am-Am-Am-Um-AmsUmsAm-ia-ia 3’		gacuuucauccuggaaauaua
2.				3’ AmsCms-Cm-Um-Gm-Am-Am-Af-Gm-Uf-Am-Gm-Gm-Am-Cf-Cf-Um-Uf-Um-Am-UmsAfsUm　5’	accugaaaguaggaccuuuauau
3.			5’　GalNAc~Am-Am-Gm-Cm-Af-Am-Gf-Am-Uf-Af-Uf-Um-Uf-Um-Um-Af-Um-Af-AmsUmsAm-ia-ia 3’		aagcaagauauuuuauaaua

【０７７０】

【表２５－２】

配列ID	二本鎖ID	ssRNA ID	センス配列	アンチセンス配列	クリーン配列
4.				3’ Td-Td-UmsUmsUm-Um-Cm-Gf-Um-Uf-Cm-Uf-Am-Um-Am-Af-Am-Af-Am-Um-Af-Um-UfsAfsUm 5’	uuuucguucuauaaaaauauuau
5.			5’GalNAc~Um-Gm-Gm-Gm-Am-Um-Uf-Um-Cf-Af-Uf-Gm-Um-Am-Am-Cm-Cm-Am-AmsGmsAm-ia-ia 3’		ugggauuucauguaaccaaga
6.				3’ CmsUmsAm-Cm-Cm-Cm-Um-Af-Am-Af-Gm-Um-Am-Cm-Af-Um-Um-Gf-Gm-Um-UmsCfsUm 5’	cuacccuaaaguacauuggguucu

【０７７１】

【表２５－３】

配列ID	二本鎖ID	ssRNA ID	センス配列	アンチセンス配列	クリーン配列
7.			5’ ia-ia-Gms AmsCm-Um-Um-Um-Cf-Am-Uf-Cf-Cf-Um-Gm-Gm-Am-Am-Am-Um-Am-Um-Am-GalNAc 3’		gacuuucauccuggaaauaua
8.				3’ AmsCmsCm-Um-Gm-Am-Am-Af-Gm-Uf-Am-Gm-Gm-Am-Cf-Cf-Um-Uf-Um-Am-UmsAfsUm 5’	accugaaaguaggaccuuuauau
9.			5’ ia-ia-AmsAmsGf-Cm-Af-Am-Gf-Am-Uf-Af-Uf-Um-Uf-Um-Um-Af-Um-Af-Am-Um-Am -GalNAc 3’		aagcaagauauuuuuauaaua
10.				3’Td-Td-UmsUmsUm-Um-Cm-Gf-Um-Uf-Cm-Uf-Am-	uuuucguucuauaaaauauuuau

【０７７２】

【表２５－４】

配列ID	二本鎖ID	ssRNA ID	センス配列	アンチセンス配列	クリーン配列
				Um-Am-Af-Am-Af-Am-Um-Af-Um-UfsAfsUm 5’	
11.			5’ ia-ia-UmsGmsGm-Gm-Am-Um-Uf-Um-Cf-Af-Uf-Gm-Um-Am-Am-Cm-Cm-Am-Am-Gm-Am-GalNAc 3’		ugggauuucauguaaccaaga
12.				3’ CmsUmsAm-Cm-Cm-Cm-Um-Af-Am-Af-Gm-Um-Am-Cm-Af-Um-Um-Gf-Gm-Um-UmsCfsUm 5’	cuacccuaaaguacauuggucu
13.			5’GalNAc–Gf-Am-Cf-Um-Uf-Um-Cf-Am-Uf-Cm-Cf-Um-Gf-Gm-Af-Am-Af-Um-AfsUmsAf 3’		gacuuucaucccuggaaauaua
14.				3’ AmsCfsCm-Uf-Gm-Af-Am-Af-Gm-Uf-Am-Gf-Gm-	accugaaaguaggaccuuuauau

【０７７３】

【表２５－５】

配列ID	二本鎖ID	ssRNID	センス配列	アンチセンス配列	クリーン配列
				Af-Cm-Cf-Um-Uf-Um-Af-UmsAfsUm 5’	
15.			5’ GalNAc~Af-Am-Gf-Cm-Af-Am-Gf-Am-Uf-Am-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Am-Uf-Am-AfsUmsAf 3’		aagcaagauauuuuuauaaua
16.				3’ Td-Td-UmsUfsUm-Uf-Cm-Gf-Um-Uf-Cm-Uf-Am-Uf-Am-Af-Am-Af-Am-Uf-Am-Uf-UmsAfsUm 5’	uuuucguucuauaaaaauauuau
17.			5’ GalNAc~ Uf-Gm-Gf-Gm-Af-Um-Uf-Um-Cf-Am-Uf-Gm-Uf-Am-Af-Cm-Cf-Am-AfsGmsAf 3’		ugggauuucauguaaccaaga
18.				3’ CmsUfsAm-Cf-Cm-Cf-Um-Af-Am-Af-Gm-Uf-Am-	cuacccuaaaguacauuggguucu

【０７７４】

【表２５－６】

配列ID	二本鎖ID	ssRNA ID	センス配列	アンチセンス配列	クリーン配列
				Cf-Am-Uf-Um-Gf-Gm-Uf-UmsCfsUm 5’	
19.			5’ GfsAmsCf-Um-Uf-Um-Cf-Am-Uf-Cm-Cf-Um-Gf-Gm-Af-Am-Af-Um-Af-Um-Af-GalNAc 3’		gacuuucauccuggaaauaua
20.				3’ AmsCfsCm-Uf-Gm-Af-Am-Af-Gm-Uf-Am-Gf-Gm-Af-Cm-Cf-Um-Uf-Um-Af-UmsAfsUm 5’	accugaaaguaggaccuuuauau
21.			5’ AfsAmsGf-Cm-Af-Am-Gf-Am-Uf-Am-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Am-Uf-Am-Af-Um-Af-GalNAc 3’		aagcaaguauauuuuauaaua

【０７７５】

【表２５－７】

配列ID	二本鎖ID	ssRNA ID	センス配列	アンチセンス配列	クリーン配列
22.				3’ Td-Td-UmsUfsUm-Uf-Cm-Gf-Um-Uf-Cm-Uf-Am-Uf-Am-Af-Am-Af-Am-Uf-Am-Uf-UmsAfsUm 5’	uuuucguucuauaaaaauauuau
23.			5’ UfsGmsGf-Gm-Af-Um-Uf-Um-Cf-Am-Uf-Gm-Uf-Am-Af-Cm-Cf-Am-Af-Gm-Af-GalNAc 3’		ugggauuucauguaaccaaga
24.				3’ CmsUfsAm-Cf-Cm-Cf-Um-Af-Am-Af-Gm-Uf-Am-Cf-Am-Uf-Um-Gf-Gm-Uf-UmsCfsUm 5’	cuacccuaaaguacauuggguucu

【０７７６】

【表２５－８】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRN ID	センス配列 5’→3’	アンチセンス配列 5’→3’	クリーン配列
25.	ETX005		(invabasic)gsascuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(NHC6)(MFCO)(ET-GalNAc-T1N3)		gacuuucauccuggaaauaua
26.	ETX005			usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaagucscsa	uauauuuccaggaugaaaagucca
27.	ETX001		(ET-GalNAc-T1N3)(MFCO)(NH-DEG)gacuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(invabasic)(invabasic)		gacuuucauccuggaaauaua

【０７７７】

【表２５－９】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRNA ID	センス配列 5’→3’	アンチセンス配列 5’→3’	クリーン配列
28.	ETX001			usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaagucscsa	uauauuuccaggaugaaaagucca
29.	ETX014		(invabasic)(invabasicAsasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfaua(NHC6)(MFCO)(FT-GalNAc-T1N3)		aagcaagauauuuuauauaaua
30.	ETX014			usAfsUfuAfuaAfaAfauaUfcUfuGfcuus usudTdT	uauuauauaaaauauucuugcuuuu
31.	ETX010		(ET-GalNAc-T1N3)(MFCO)(NH-DEG)aaGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfasusa(invabasic)(invabasic)		aagcaagauauuuuauauaaua

【０７７８】

【表２５－１０】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRNA ID	センス配列 5’→3’	アンチセンス配列 5’→3’	クリーン配列
32.	ETX010			usAfsUfuAfuaAfaAfauaUfcUfuGfcuus usudTdT	uauuauaaaaaauaucuugcuuuu
33.	ETX019		(ET-GalNAc-T1N3)(MFCO)(NH-DFG)uggguuUfuCfAfUfguaaccaasgsa(invabasic)(invabasic)		ugggauuucauguaaccaaga
34.	ETX019			usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc	ucuuggguuacaugaaaucccauc
35.	ETX023		(invabasic)(invabasic)usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga(NHC6)(MFCO)(ET-GalNAc-T1N3)		ugggauuucauguaaccaaga

【０７７９】

【表２５－１１】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRNA ID	センス配列 5’→3’	アンチセンス配列 5’→3’	クリーン配列
36.	ETX023			usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc	ucuuugguuacaugaaaucccauc
37.		XD-00914	cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT		cuuacgcugaguacuucga
38.		XD-00914		UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT	ucgaaguacucagcguaag
39.		XD-03999	AGAuAuGcAcAcAcAcGGAdTsdT		agauaugcacacacgga
40.		XD-03999		UCCGUGUGUGUGcAuAUCUdTsdT	uccgugugugugcauaucu

【０７８０】

【表２５－１２】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRNA ID	センス配列 5’→3’	アンチセンス配列 5’→3’	クリーン配列
41.		XD-15421	uscsUfcGfuGfgCfcUfuAfaU fgAfaAf(invdT)		ucucgugccuuaaugaaa
42.		XD-15421		UfsUfsuCfaUfuAfaGfgCfcAfcGfaGfas usu	uuucauuaaggccacgagauu
43.		X9138 2	(NH2-DEG)gacuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(invabasic)(invabasic)		gacuuucauccuggaaauaua
44.		X9138 3	(NH2-DEG)aaGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfasusa(invabasic)(invabasic)		aagcaagauauuuuuauaaaua

【０７８１】

【表２５－１３】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRNA ID	センス配列 5’→3’	アンチセンス配列 5’→3’	クリーン配列
45.		X91384	(NH2-DEG)ugggauUfuCfAfUfguaccaasgsa(invabasic)(invabasic)		ugggauuucauguaaccaaga
46.		X91403	(NH2C12)gacuuuCfaUfCfCfCfuggaaauausa(invabasic)(invabasic)		gacuuucauccuggaaauaua
47.		X91404	(NH2C12)aaGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfasusa(invabasic)(invabasic)		aagcaagauauuuuuauaaua
48.		X91405	(NH2C12)ugggauUfuCfAfUfguaaccaasgsa(invabasic)(invabasic)		ugggauuucauguaaccaaga

【０７８２】

【表２５－１４】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRN ID	センス配列 5’→3’	アンチセンス配列 5’→3’	クリーン配列
49.		X91415	(invabasic)(invabasic)gsascuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(NH2C6)		gacuuucauccuggaaauaua
50.		X91416	(invabasic)(invabasic)asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfaua(NH2C6)		aagcaagauauuuuuauaaua
51.		X91417	(invabasic)(invabasic)usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga(NH2C6)		ugggauuucauguaaccaaga
52.		X91379	gsascuuuCfaUfCfCfuggaaauaua(GalNAc)		gacuuucauccuggaaauaua

【０７８３】

【表２５－１５】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRNA ID	センス配列 5’ →3’	アンチセンス配列 5’ →3’	クリーン配列
53.		X91380	asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfu uAfuAfauu(GalNAc)		aagcaaguauuuuuauaaua
54.		X91446	usgsggauUfuCfAfUfguaacca aga(GalNAc)		ugggauuucauguaaccaaga
55.		X38483	usAfsuauUfuCfCfaggaUfgA faagucscsa		uauauuuccaggaugaaagucca
56.		X91381	usAfsUfuAfuaAfaAfauaUfc UfuGfcuusususdTdT		uauuauaaaaauaucuugcuuuu
57.		X38104	usCfsuugGfuuAfcaugAfaAf ucccasusc		ucuuggguacaugaaaucccauc

【０７８４】

【表２５－１６】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRNA ID	センス配列 5’→3’	アンチセンス配列 5’→3’	クリーン配列
58.		X91388	(MFCO)(NH-DEG)gacuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(invabasic)(invabasic)		gacuuucauccuggaaauaua
59.		X91389	(MFCO)(NH-DEG)aaGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfasusa(invabasic)(invabasic)		aagcaagauauuuuauaaua
60.		X91390	(MFCO)(NH-DEG)uggGauUfuCfAfUfguaaccaasgsa(invabasic)(invabasic)		uggguuucauguaaccaaga

【０７８５】

【表２５－１７】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRNA ID	センス配列 5’→3’	アンチセンス配列 5’→3’	クリーン配列
61.		X91421	(invabasic)gsascuuuCfaUfCfCfuggaaauausa(NHC6) (MFCO)		gacuuucauccuggaaauaua
62.		X91422	(invabasic)asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfaua(NHC6)(MFCO)		aagcaagauauuuuuauaaaua
63.		X91423	(invabasic)usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga(NHC6) (MFCO)		ugggauuucauguaaccaaga
64.		X91394	(GalNAc-T1)(MFCO)(NH-DEG)gacuuuCfaUfCfCfuggaaauausa(invabasic)(invabasic)		gacuuucauccuggaaauaua

【０７８６】

【表２５－１８】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRNA ID	センス配列 5’→3’	アンチセンス配列 5’→3’	クリーン配列
65.		X91395	(GalNAc-T1)(MFCO)(NH-DEG)aaGfcAfaGfaUfAfUfu UfuuAfuAfuAfasusa(invabasic)(invabasic)		aagcaagauauuuuuauaaua
66.		X91396	(GalNAc-T1)(MFCO)(NH-DEG)ugggauUfuCfAfUfgua accaasgsa(invabasic)(invabasic)		ugggauuucauguaaccaaga
67.		X91427	(invabasic)(invabasic)gsascu uuCfaUfCfCfuggaaauasusa(NHC6)(MFCO)(GalNAc-T1)		gacuuucauccuggaaauaua

【０７８７】

【表２５－１９】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRNA ID	センス配列 5’→3’	アンチセンス配列 5’→3’	クリーン配列
68.		X91428	(invabasic)(invabasic)asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfaua(NHC6)(MFCO)(GalNAc-T1)		aagcaagauauuuuauaaua
69.		X91429	(invabasic)(invabasic)usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga(NHC6)(MFCO)(GalNAc-T1)		ugggauuucauguaaccaaga
70.	ETX001	X91394	(GalNAc-T1)(MFCO)(NHDEG)gacuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(invabasic)(invabasic)		gacuuucauccuggaaauaua

【０７８８】

【表２５－２０】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRNA ID	センス配列 5’→3’	アンチセンス配列 5’→3’	クリーン配列
71.		X38483	usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaagucscsa		uauauuuccaggaugaaaguccа
72.	ETX005	X91427	(invabasic)gsascuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(NHC6)(MFCO)(GalNAc-T1)		gacuuucauccuggaaauaua
73.		X38483	usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaagucscsa		uauauuuccaggaugaaaguccа
74.	ETX010	X91395	(GalNAc-T1)(MFCO)(NH-DEG)aaGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfasusa(invabasic)(invabasic)		aagcaagauauuuuauaaua

【０７８９】

【表２５－２１】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRNA ID	センス配列 5’→3’	アンチセンス配列 5’→3’	クリーン配列
75.		X91381	usAfsUfuAfuaAfaAfauaUfc UfuGfcuusususdTdT		uauuauaaaaauaucuugcuuuu
76.	ETX014	X91428	(invabasic)(invabasic)asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfaua(NHC6)(MFCO)(GalNAc-T1)		aagcaagauauuuuuauaaua
77.		X91381	usAfsUfuAfuaAfaAfauaUfc UfuGfcuusususdTdT		uauuauaaaaauaucuugcuuuu
78.	ETX019	X91396	(GalNAc-T1)(MFCO)(NH-DEG)ugggauUfuCfAfUfgua accaasgsa(invabasic)(invabasic)		ugggauuucauguaaccaaga

【０７９０】

【表２５－２２】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRNA ID	センス配列 5’→3’	アンチセンス配列 5’→3’	クリーン配列
79.		X38104	usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfaucccasusc		ucuugguuacaugaaaaucccauc
80.	ETX023	X91429	(invabasic)(invabasic)usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga(NHC6)(MFCO)(GalNAc-T1)		ugggauuucauguaaccaaga
81.		X38104	usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfaucccasusc		ucuugguuacaugaaaaucccauc
82.	ETX006		(invabasic)(invabasic)gsascuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(NHC6)(ET-GalNAc-T2CO)		gacuuucauccuggaaauaua

【０７９１】

【表２５－２３】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRNA ID	センス配列 5’→3’	アンチセンス配列 5’→3’	クリーン配列
83.	ETX006			usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaagucscsa	uauauuuccaggaugaaaagucca
84.	ETX002		(ET-GalNAc-T2CO)(NH2C12)gacuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(invabasic)(invabasic)		gacuuucauccuggaaauaua
85.	ETX002			usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaagucscsa	uauauuuccaggaugaaaagucca
86.	ETX004		(ET-GalNAc-T2CO)(NI2C12)GfaCfuUfuCfaUfcCfuGfgAfaAfuAfsusAf		gacuuucauccuggaaauaua

【０７９２】

【表２５－２４】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRNA ID	センス配列 5’→3’	アンチセンス配列 5’→3’	クリーン配列
87.	ETX004			usAfsuAfuUfuCfcAfgGfaUfgAfaAfgUfcsCfsa	uauauuuccaggaugaaaagucca
88.	ETX008		GfsasCfuUfuCfaUfcCfuGfgAfaAfuAfuAf(NHC6)(ET-GalNAc-T2CO)		gacuuucauccuggaaauaua
89.	ETX008			usAfsuAfuUfuCfcAfgGfaUfgAfaAfgUfcsCfsa	uauauuuccaggaugaaaagucca
90.	ECX008 (低純度)		GfsasCfuUfuCfaUfcCfuGfgAfaAfuAfuAf(NHC6)(ET-GalNAc-T2CO)		gacuuucauccuggaaauaua

【０７９３】

【表２５－２５】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRNA ID	センス配列 5’→3’	アンチセンス配列 5’→3’	クリーン配列
91.	ECX008 (低純度)			usAfsuAfuUfuCfcAfgGfaUfgAfaAfgUfcsCfsa	uauauuuccaggaugaaaguccа
92.	ETX011		(FT-GalNAc-T2CO)(NH2C12)aaGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfasusa(invabasic)(invabasic)	usAfsUfuAfuaAfaAfauaUfcUfuGfcuususudTdT	uauuauaaaaauaucuugcuuuu
93.	ETX011				aagcaagauauuuuauaaaua
94.	ETX015		(invabasic)(invabasic)asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuA		aagcaagauauuuuauaaaua

【０７９４】

【表２５－２６】

配列 ID	一本鎖 ID	ssRN ID	センス配列 5’ →3’	アンチセンス配列 5’ →3’	クリーン配列
95.	ETX0 15		faua(NHC6)(ET-GalNAc-T2CO)	usAfsUfuAfuaAfaAfauaUfcUfuGfcuus ususdTdT	uauuauaaaaauaucuugcuuuu
96.	ETX0 13		(ET-GalNAc-T2CO)(NH2C12)AfaGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfaUfaAfsus Af	usAfsuUfaUfaAfaAfaUfaUfcUfuGfcUf usUfsudTdT	uauuauaaaaauaucuugcuuuu
97.	ETX0 13				

【０７９５】

【表２５－２７】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRNA ID	センス配列 5’→3’	アンチセンス配列 5’→3’	クリーン配列
98.	ETX017		AfsasGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfaUfaAfuAf(NHC6)(FT-GalNAc-T2CO)		aagcaagauauuuuuauaaua
99.	ETX017			usAfsuUfaUfaAfaAfaUfaUfcUfuGfcUfusUfsudTdT	uauuauaaaaauauucuugcuuuu
100.	ETX020		(ET-GalNAc-T2CO)(NH2C12)ugggauUfuCfAfUfguaaccaasgsa(invabasic)		ugggauuucauguaaccaaga
101.	ETX020			usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc	ucuugguuacaugaaaucccauc

【０７９６】

【表２５－２８】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRNA ID	センス配列 5’→3’	アンチセンス配列 5’→3’	クリーン配列
102.	ETX022		(ET-GalNAc-T2CO)(NH2C12)UfgGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfsgsAf		ugggauuucauguaaccaaga
103.	ETX022			usCfsuUfgGfuUfaCfaUfgAfaAfuCfcCfasUfsc	ucuuggguuacaugaaaucccauc
104.	ETX024		(invabasic)(invabasic)usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga(NHC6)(ET-GalNAc-T2CO)		ugggauuucauguaaccaaga
105.	ETX024			usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc	ucuuggguuacaugaaaucccauc

【０７９７】

【表２５－２９】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRNA ID	センス配列 5’→3’	アンチセンス配列 5’→3’	クリーン配列
106.	ETX026		UfsgsGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfgAf(NHC6)(FT-GalNAc-T2CO)		ugggauuucauguaaccaaga
107.	ETX026			usCfsuUfgGfuUfaCfaUfgAfaAfuCfcCfasUfsc	ucuugguuacaugaaaucccauc
108.	XD-00914		cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT		cuuacgcugaguacuucga
109.	XD-00914			UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT	ucgaaguacucagcguaag
110.	XD-03999		AGAuAuGcAcAcAcAcGGAdTsdT		agauaugcacacacacgga

【０７９８】

【表２５－３０】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRNA ID	センス配列 5’→3’	アンチセンス配列 5’→3’	クリーン配列
111.	XD-03999			UCCGUGUGUGUGcAuAUCUdTsdT	uccgugugugugcauaucu
112.	XD-15421		uscsUfcGfuGfgCfcUfuAfaUfgAfaAf(invdT)		ucucguggccuuaaugaaa
113.	XD-15421			UfsUfsuCfaUfuAfaGfgCfcAfcGfaGfasusu	uuucauuaaggccacgagauu
114.		X91382	(NH2-DEG)gacuuuCfaUfCfCfugg aaauasusa(invabasic)(invabasic)		gacuuucauccuggaaauaua
115.		X91383	(NH2-DEG)aaGfcAfaGfaUfAfUfu		aagcaagauauuuuauaaaua

【０７９９】

【表２５－３１】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRNA ID	センス配列 5’→3’	アンチセンス配列 5’→3’	クリーン配列
			UfuuAfuAfasusa(invabasic)(invabasic)		
116.		X91384	(NH2-DEG)uggggauUfuCfAfUfgguaaccaasgsa(invabasic)(invabasic)		uggggauuucauguaaccaaga
117.		X91385	(NI2-DEG)GfaCfuUfuUfuCfaUfcCfuGfgAfaAfuAfsusAf		gacuuucauccuggaaauaua
118.		X91386	(NI2-DEG)AfaGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfaUfaAfsusAf		aagcaagauauuuuuauaaua

【０８００】

【表２５－３２】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRNA ID	センス配列 5’→3’	アンチセンス配列 5’→3’	クリーン配列
119.		X91387	(NH2-DFG)UfgGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfsgsAf		ugggauuucauguaaccaaga
120.		X91403	(NH2C12)gacuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(invabasic)(invabasic)		gacuuucauccuggaaauaua
121.		X91404	(NH2C12)aaGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfasusa(invabasic)(invabasic)		aagcaagauauuuuauaaua
122.		X91405	(NH2C12)ugggauUfuCfAfUfguaaccaasgsa(invabasic)(invabasic)		ugggauuucauguaaccaaga

【０８０１】

【表２５－３３】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRN ID	センス配列 5’ →3’	アンチセンス配列 5’ →3’	クリーン配列
123.		X9140 6	(NH2C12)GfaCfuUfuCfaUf cCfuGfgAfaAfuAfsusAf		gacuuucauccuggaaauaua
124.		X9140 7	(NH2C12)AfaGfcAfaGfaUf aUfuUfuUfaUfaAfsusAf		aagcaagauauuuuuauaaua
125.		X9140 8	(NH2C12)UfgGfgAfuUfuCf aUfgUfaAfcCfaAfsgsAf		ugggauuucauguaaccaaga
126.		X9141 5	(invabasic)(invabasic)gsascu uuCfaUfCfCfuggaaauasusa(NH2C6)		gacuuucauccuggaaauaua
127.		X9141 6	(invabasic)(invabasic)asasGf cAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuA fauua(NH2C6)		aagcaagauauuuuuauaaua

【０８０２】

【表２５－３４】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRNA ID	センス配列 5’→3’	アンチセンス配列 5’→3’	クリーン配列
128.		X91417	(invabasic)(invabasic)usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga(NH2C6)		ugggauuucauguaaccaaga
129.		X91418	GfsasCfuUfuCfaUfcCfuGfgAfaAfuAfuAf(NH2C6)		gacuuucauccuggaaauaua
130.		X91419	AfsasGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfaUfaAfuAf(NH2C6)		aagcaagauauuuuuauaaua
131.		X91420	UfsgsGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfgAf(NH2C6)		ugggauuucauguaaccaaga
132.		X91379	gsascuuuCfaUfCfCfuggaaauaua(GalNAc)		gacuuucauccuggaaauaua

【０８０３】

【表２５－３５】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRNA ID	センス配列 5’→3’	アンチセンス配列 5’→3’	クリーン配列
133.		X91380	asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfu uAfuAfauu(GalNAc)		aagcaaguauuuuuauaaua
134.		X91446	usgsggauUfuCfAfUfguaacca aga(GalNAc)		ugggauuucauguaaccaaga
135.		X38483	usAfsuauUfuCfCfaggaUfgA faagucscsa		uauauuuccaggaugaaagucca
136.		X91381	usAfsUfuAfuaAfaAfauaUfc UfuGfcuusususdTdT		uauuauaaaaauaucuugcuuuu
137.		X38104	usCfsuugGfuuAfcaugAfaAf ucccasusc		ucuuugguacaugaaaucccauc

【０８０４】

【表２５－３６】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRNA ID	センス配列 5’→3’	アンチセンス配列 5’→3’	クリーン配列
138.		X91398	usAfsuAfuUfuCfcAfgGfaUfgAfaAfgUfcsCfsa		uauauuuccaggaugaaaguccа
139.		X91400	usAfsuUfaUfaAfaAfaUfaUfcUfuGfcUfusUfsudTdT		uauuauaaaaauauucuugcuuuu
140.		X91402	usCfsuUfgGfuUfaCfaUfgAfaAfuCfcCfasUfsc		ucuuugguuacaugaaaucccauc
141.		X91409	(GalNAc-T2)(NH2C12)gacuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(invabasic)(invabasic)		gacuuucauccuggaaauaua
142.		X91410	(GalNAc-T2)(NH2C12)aaGfcAfaGfa		aagcaagauauuuuuauaaua

【０８０５】

【表２５－３７】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRNA ID	センス配列 5’→3’	アンチセンス配列 5’→3’	クリーン配列
			UfAfUfuUfuuAfuAfuAfasusa(invabasic)		
143.		X91411	(GalNAc-T2)(NH2C12)ugggauUfuCfAfUfguaaccaasgsa(invabasic)		**ugggauuucauguaaccaaga**
144.		X91412	(GalNAc-T2)(NH2C12)GfaCfuUfuCfaUfcCfuGfgAfaAfuAfsusAf		gacuuucauccuggaaauaua
145.		X91413	(GalNAc-T2)(NH2C12)AfaGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfaUfaAfsusAf		aagcaagauauuuuauaaaua

【０８０６】

【表２５－３８】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRN ID	センス配列 5’→3’	アンチセンス配列 5’→3’	クリーン配列
146.		X91414	(GalNAc-T2)(NH2C12)UfgGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfsgsAf		ugggauuucauguaaccaaga
147.		X91433	(invabasic)(invabasic)gsascuuuCfaUfCfCfuggaaauausa(NHC6)(GalNAc-T2)		gacuuucauccuggaaauaua
148.		X91434	(invabasic)(invabasic)asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfaua(NHC6)(GalNAc-T2)		aagcaagauauuuuuauaaua
149.		X91435	(invabasic)(invabasic)usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga(NHC6)(GalNAc-T2)		ugggauuucauguaaccaaga

【０８０７】

【表２５－３９】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRNA ID	センス配列 5’→3’	アンチセンス配列 5’→3’	クリーン配列
150.		X91436	GfsasCfuUfuCfaUfcCfuGfgAfaAfuAfuAf(NHC6)(GalNAc-T2)		gacuuucauccuggaaauaua
151.		X91437	AfsasGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfaUfaAfuAf(NHC6)(GalNAc-T2)		aagcaagauauuuuuauaaua
152.		X91438	UfsgsGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfgAf(NHC6)(GalNAc-T2)		ugggauuucauguaaccaaga
153.	ETX002	X91409	(GalNAc-T2)(NH2C12)gacuuuCfaUfCfCfuggaaauausa(invabasic)(invabasic)		gacuuucauccuggaaauaua

【０８０８】

【表２５－４０】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRN ID	センス配列 5’→3’	アンチセンス配列 5’→3’	クリーン配列
154.		X3848 3	usAfsuauUfuCfCfaggaUfgA faagucscsa		uauauuuccaggaaaagucca
155.	ETX0 04	X9141 2	(ET-GalNAc-T2CO)(NH2C12)GfaCfuUf uCfaUfcCfuGfgAfaAfuAfsu sAf		gacuuucauccuggaaauaua
156.		X9139 8	usAfsuAfuUfuCfcAfgGfaUf gAfaAfgUfcsCfsa		uauauuuccaggaaaagucca
157.	ETX0 06	X9143 3	(invabasic)(invabasic)gsascu uuCfaUfCfCfuggaaauasusa(NHC6)(GalNAc-T2)		gacuuucauccuggaaauaua

【０８０９】

【表２５－４１】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRNA ID	センス配列 5’→3’	アンチセンス配列 5’→3’	クリーン配列
158.		X38483	usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaagucscsa		uauauuuccaggaugaaagucca
159.	ETX008	X91436	GfsasCfuUfuCfaUfcCfuGfgAfaAfuAfuAf(NHC6)(GalNAc-T2)		gacuuucauccuggaaauaua
160.		X91398	usAfsuAfuUfuCfcAfgGfaUfgAfaAfgUfcsCfsa		uauauuuccaggaugaaagucca
161.	ETX011	X91410	(GalNAc-T2)(NH2C12)aaGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfasusa(invabasic)		aagcaaguauauuuuauaaua

【０８１０】

【表２５－４２】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRNA ID	センス配列 5’→3’	アンチセンス配列 5’→3’	クリーン配列
162.		X9138 1	usAfsUfuAfuaAfaAfauaUfc UfuGfcuususudTdT		uauuauaaaaauaucuugcuuuu
163.	ETX013	X9141 3	(GalNAc-T2)(NH2C12)AfaGfcAfaGf aUfaUfuUfuUfaUfaAfsusAf		aagcaagauauuuuuauaaua
164.		X9140 0	usAfsuUfaUfaAfaAfaUfaUf cUfuGfcUfusUfsudTdT		uauuauaaaaauaucuugcuuuu
165.	ETX015	X9143 4	(invabasic)(invabasic)asasGf cAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuA faua(NHC6)(GalNAc-T2)		aagcaagauauuuuuauaaua
166.		X9138 1	usAfsUfuAfuaAfaAfauaUfc UfuGfcuususudTdT		uauuauaaaaauaucuugcuuuu

【０８１１】

【表２５－４３】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRNA ID	センス配列 5’→3’	アンチセンス配列 5’→3’	クリーン配列
167.	ETX017	X91437	AfsasGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfaUfaAfuAf(NHC6)(GalNAc-T2)		aagcaaguauauuuuauaaua
168.		X91400	usAfsuUfaUfaAfaAfaUfaUfcUfuGfcUfusUfsudTdT		uauuauaaaaauaucuugcuuuu
169.	ETX020	X91411	(GalNAc-T2)(NI2C12)uggguUfuCfAfUfguaaccaasgsa(invabasic)(invabasic)		ugggauuucauguaaccaaga
170.		X38104	usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfuccasusc		ucuuggguacaugaaaucccauc

【０８１２】

【表２５－４４】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRNA ID	センス配列 5’→3’	アンチセンス配列 5’→3’	クリーン配列
171.	ETX022	X91414	(GalNAc-T2)(NH2C12)UfgGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfsgsAf		ugggauuucauguaaccaaga
172.		X91402	usCfsuUfgGfuUfaCfaUfgAfaAfuCfcCfasUfsc		ucuuugguacaugaaaucccauc
173.	ETX024	X91435	(invabasic)(invabasic)usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga(NHC6)(GalNAc-T2)		ugggauuucauguaaccaaga
174.		X38104	usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfuccasusc		ucuugguuacaugaaaucccauc

【０８１３】

【表２５－４５】

配列 ID	二本鎖 ID	ssRNA ID	センス配列 5’→3’	アンチセンス配列 5’→3’	クリーン配列
175.	ETX026	X91438	UfsgsGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfgAf(NHC6)(GalNAc-T2)		ugggauuucauguaaccaaga
176.		X91402	usCfsuUfgGfuUfaCfaUfgAfaAfuCfcCfasUfsc		ucuuggguuacaugaaaucccauc

キー：

配列番号 1～24 のキー

ia	逆脱塩基ヌクレオチド(1，2－ジデオキシリボース)
m	2'-O-メチルヌクレオチド
f	2'－デオキシ－2'－フルオロヌクレオチド

【０８１４】

【表２５－４６】

s	ホスホロチオエートヌクレオチド間連結(ホスホロチオエート骨格修飾)
~	テザー
Td	デオキシチミジン

配列番号 25～176 のキー

dG, dC, dA, dT	ＤＮＡ残基(
GalNAc	Ｎ－アセチルガラクトサミン
G, C, A, U	RNA 残基
g, c, a, u	2'-O-メチル修飾残基
Gf, Cf, Af, Uf	2'-フルオロ修飾残基

s	ホスホロチオエート骨格修飾
siRNA	低分子干渉ＲＮＡ
MFCO	モノフルオロシクロオクチン
invabasic	1,2-ジデオキシリボース

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

【０８１５】

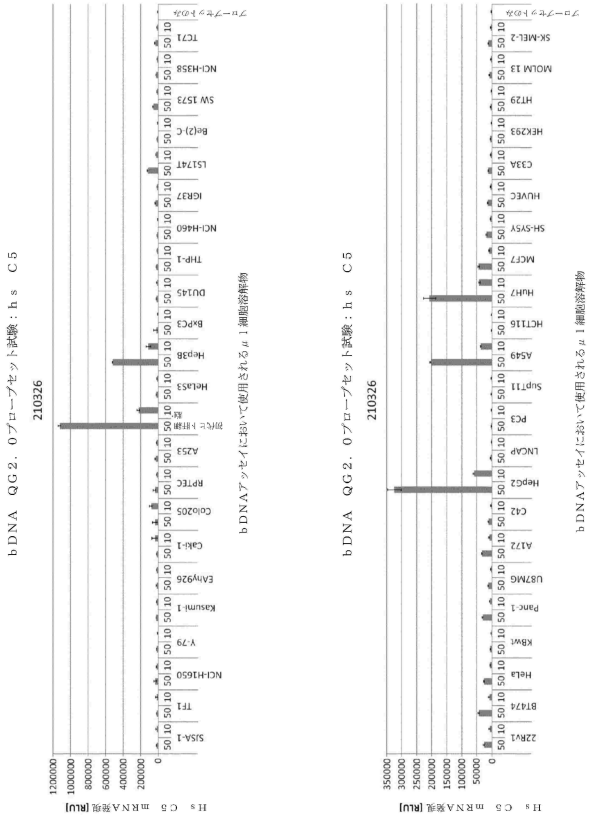
【表２５－４７】

NH2-DEG/NHDEG	アミノエトキシエチルリンカー
NH2C12	アミノドデシルリンカー
NH2C6/NHC6	アミノヘキシルリンカー
ET	(E-治療剤-企業参照)
(ET-GalNAc-T1N3)(MFCO)(NH-DEG)	テザー-T1b
(ET-GalNAc-T2CO)(NH2C12)	テザー-T2b
(NHC6)(MFCO)(ET-GalNAc-T1N3)テザー-T1a	
(NHC6)(ET-GalNAc-T2CO)	テザー-T2a
T1N3	T1 テザー
T2Co	T2 テザー
(GalNAc-)T1	GalNac T1 テザー
(GalNAc-)T2	GalNac T2 テザー

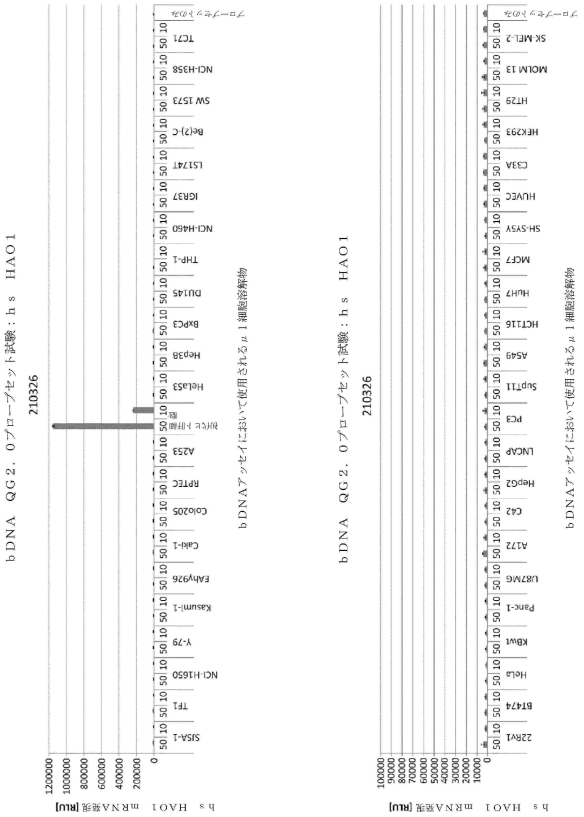
注記：キーは、センス及びアンチセンス配列を指すが、クリーン配列は、基礎となるＲＮＡヌクレオチドのみを含有する。

【図面】

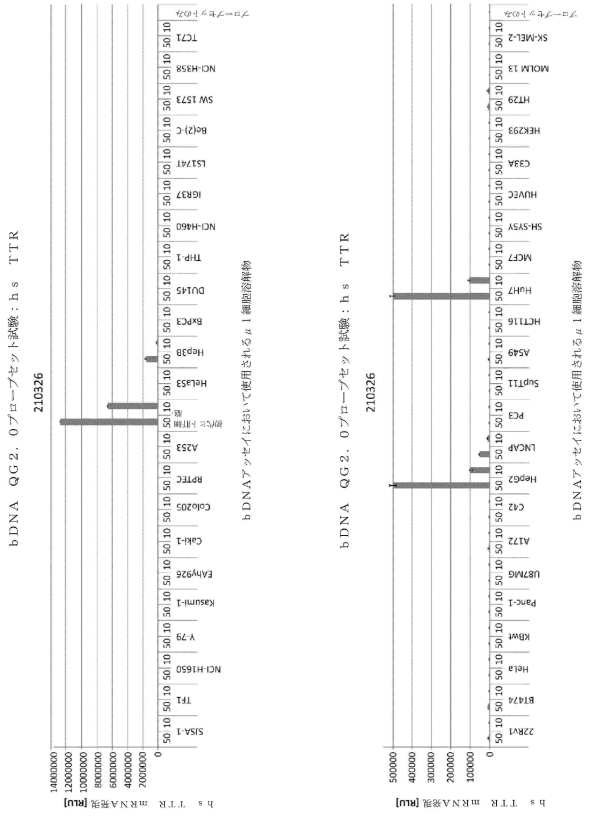
【図１】



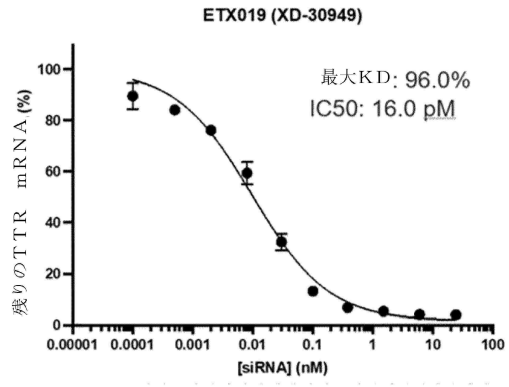
【図２】



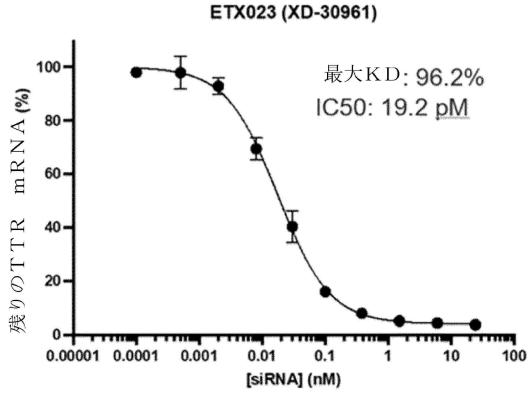
【図３】



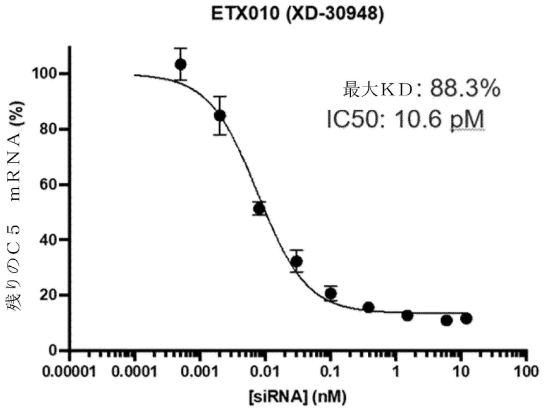
【図４Ａ】



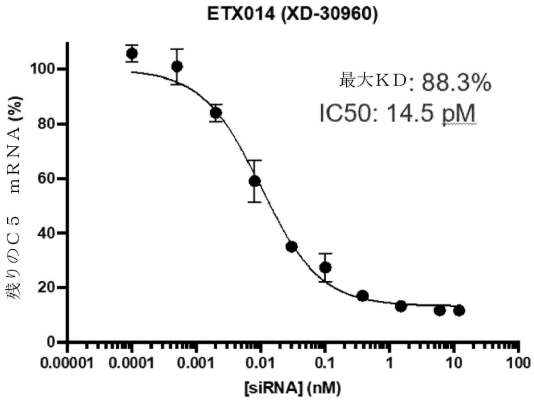
【図４Ｂ】



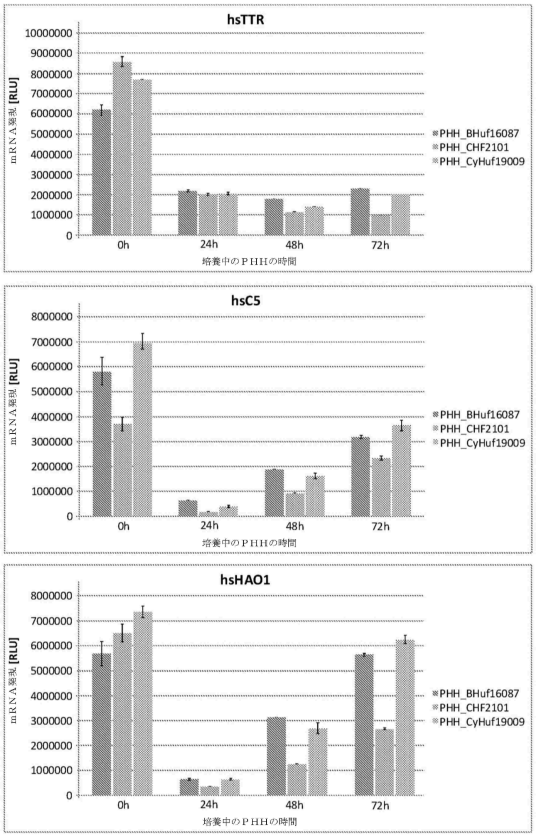
【図５Ａ】



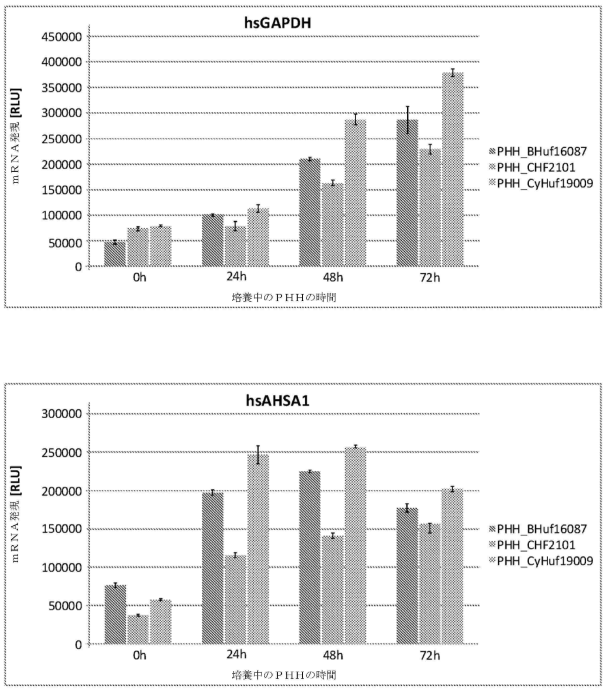
【図５Ｂ】



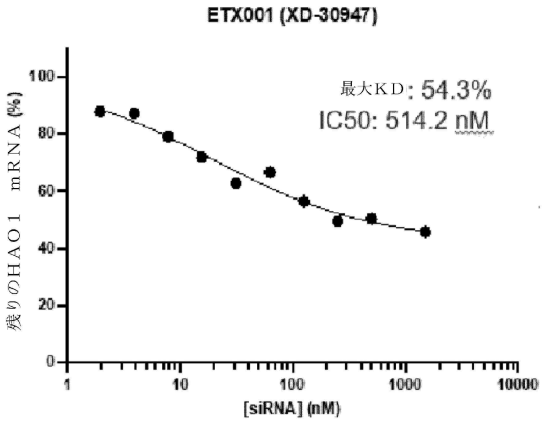
【図６】



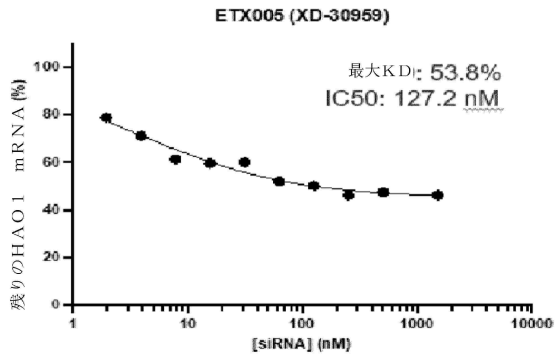
【図７】



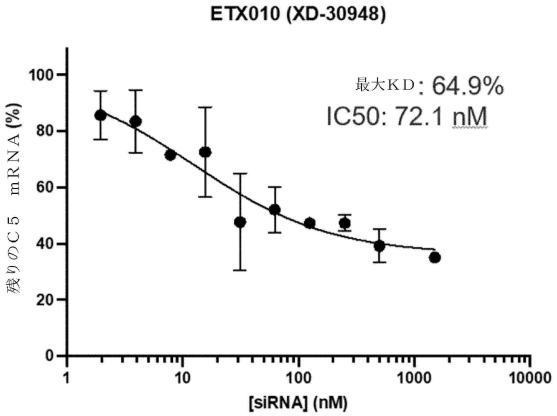
【図８Ａ】



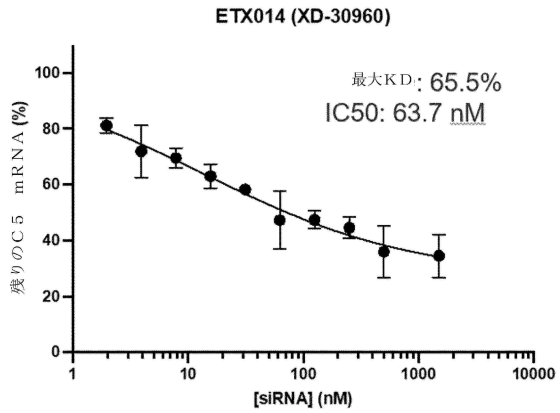
【図８Ｂ】



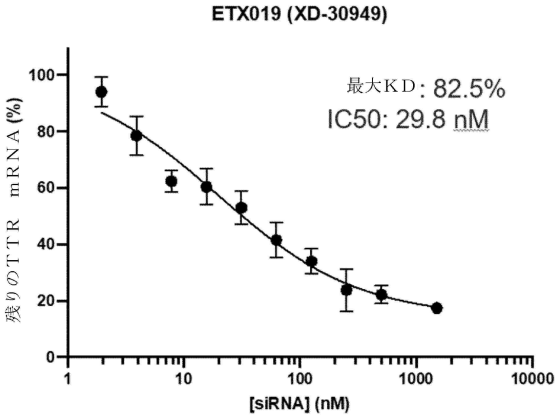
【図９Ａ】



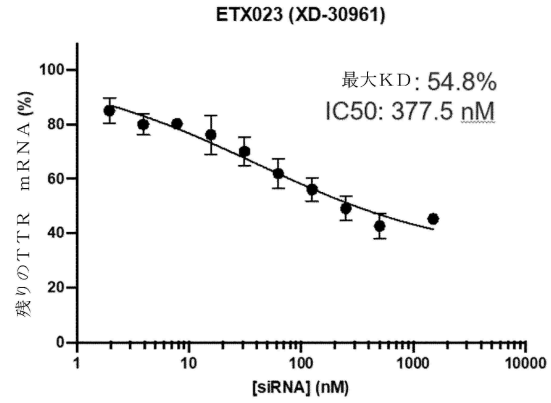
【図９Ｂ】



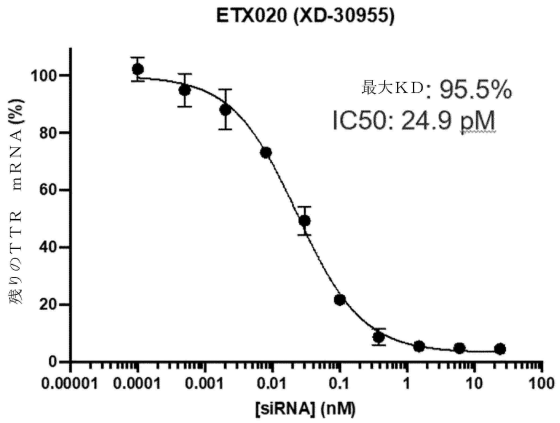
【図１０Ａ】



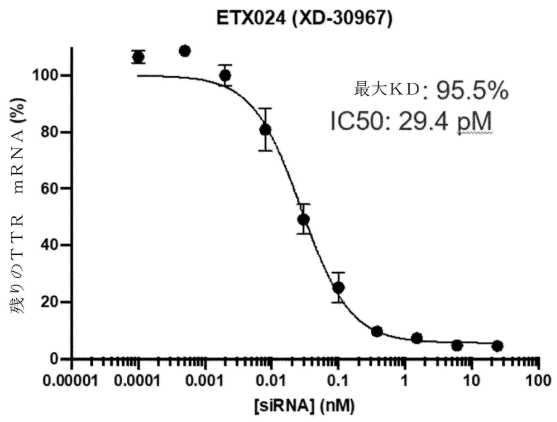
【図１０Ｂ】



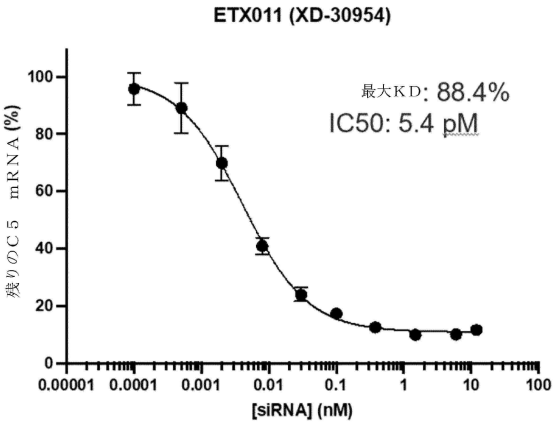
【図１１Ａ】



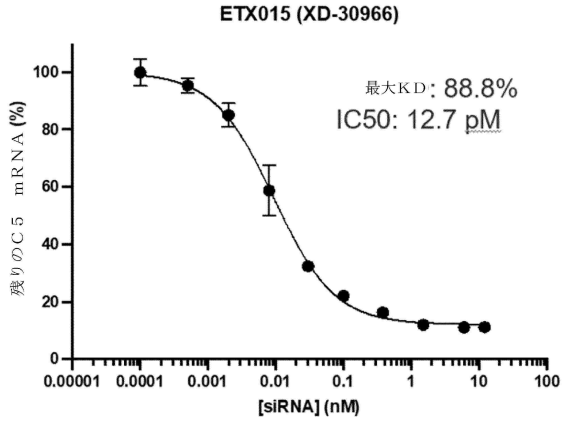
【図１１Ｂ】



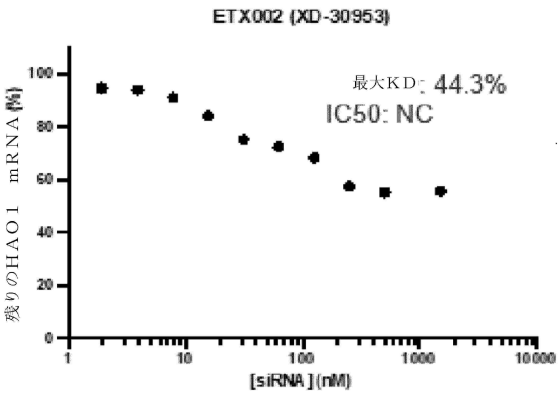
【図１２Ａ】



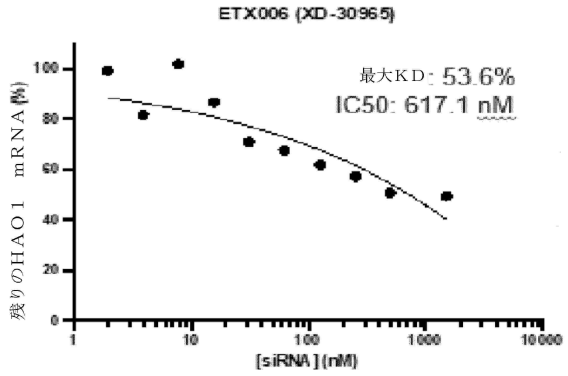
【図１２Ｂ】



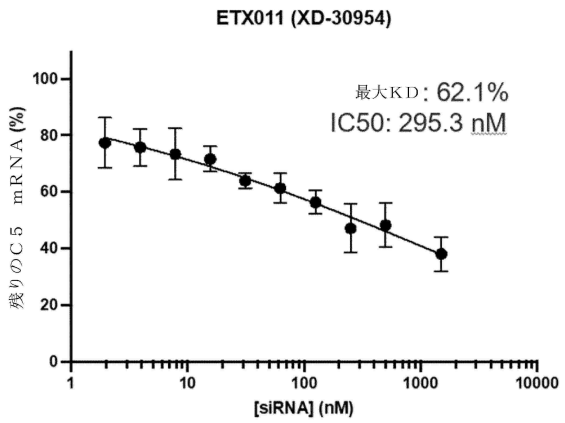
【図１３Ａ】



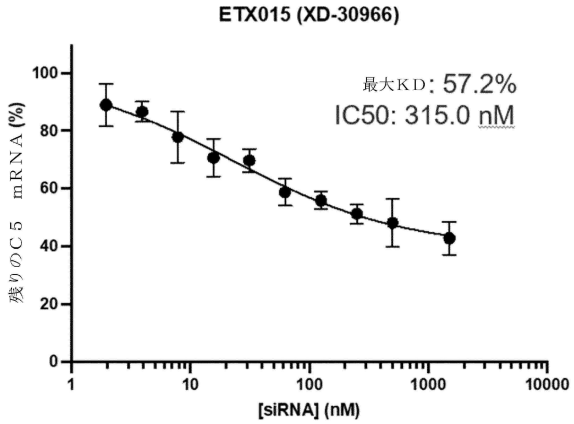
【図１３Ｂ】



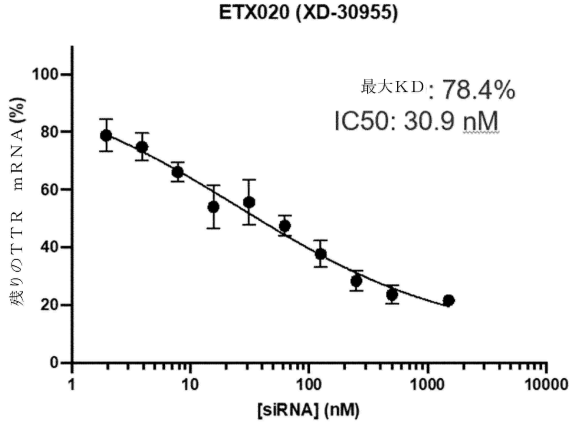
【図１４Ａ】



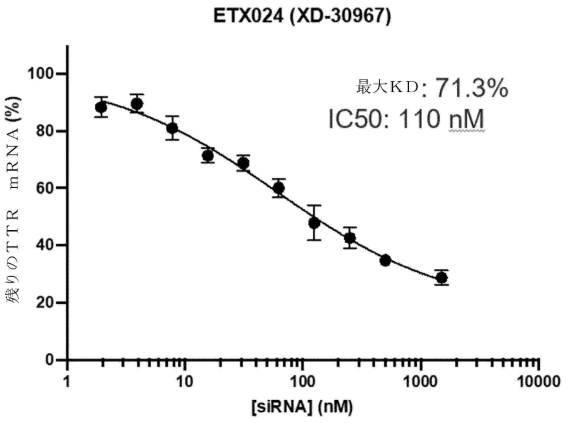
【図１４Ｂ】



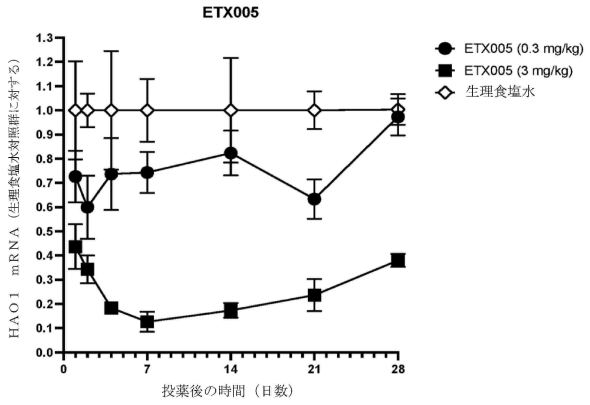
【図１５Ａ】



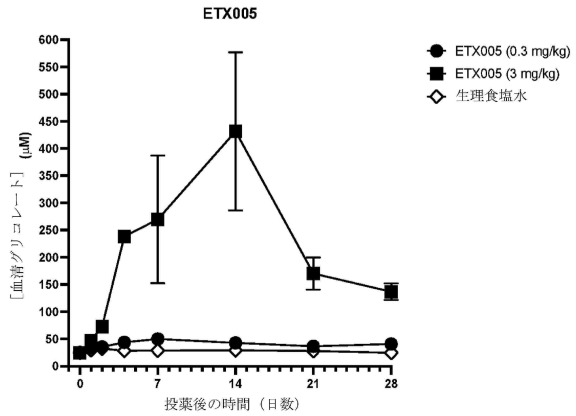
【図１５Ｂ】



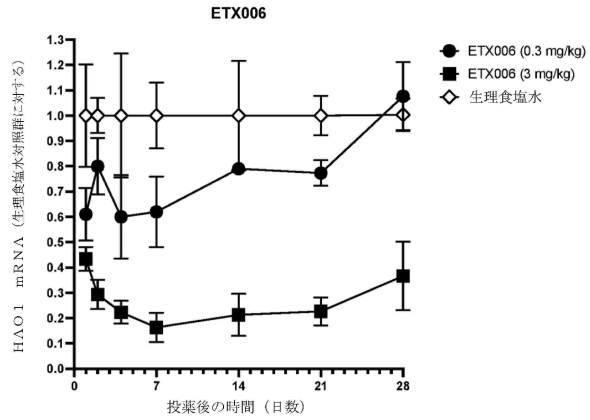
【図１６】



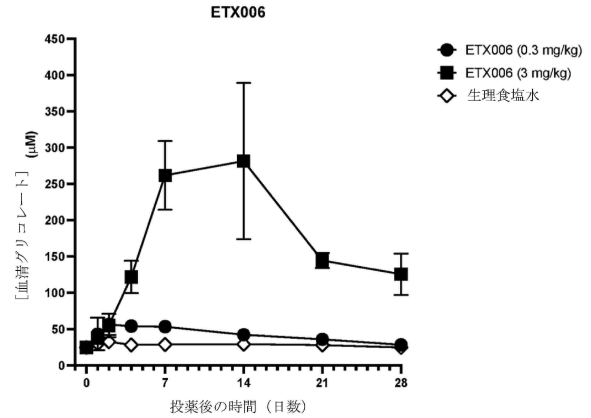
【図１７】



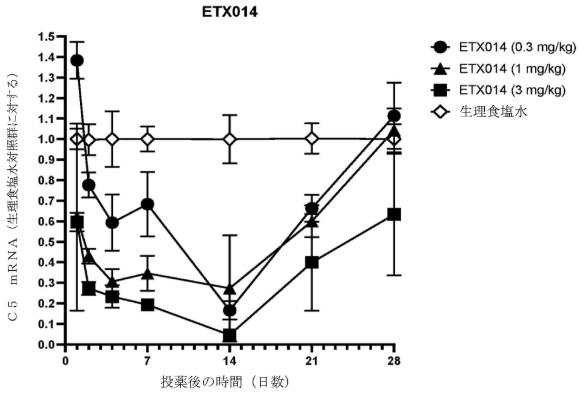
【図１８】



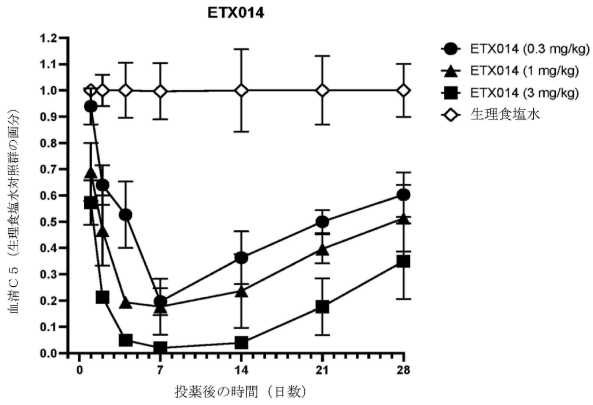
【図１９】



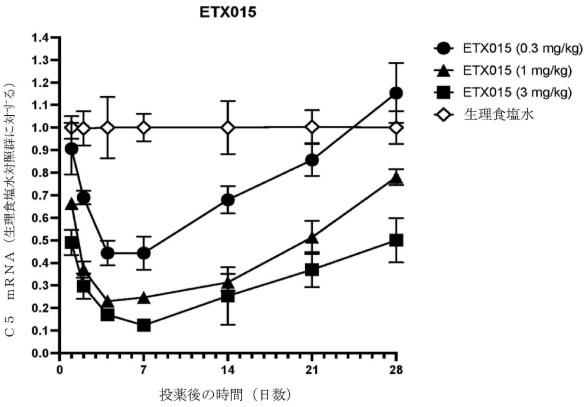
【図２０】



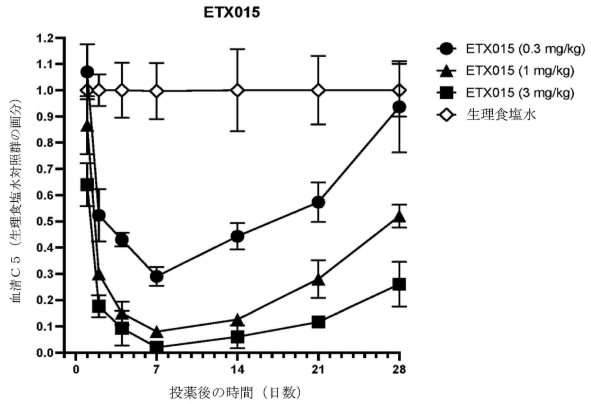
【図２１】



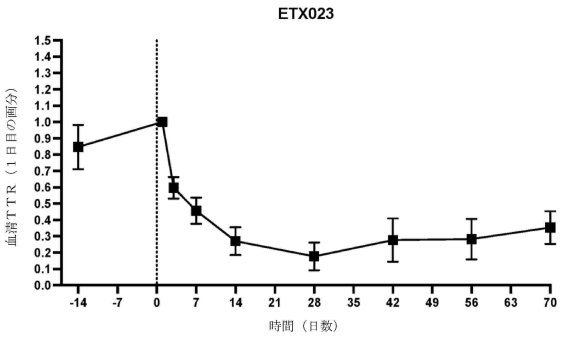
【図２２】



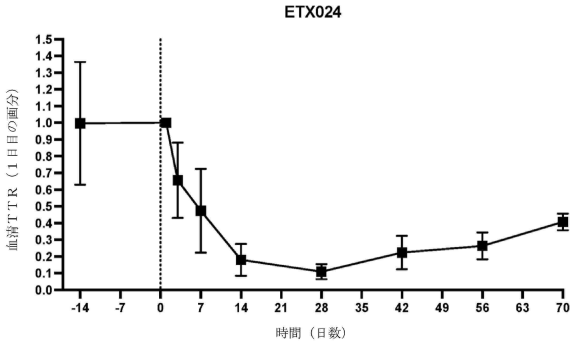
【図２３】



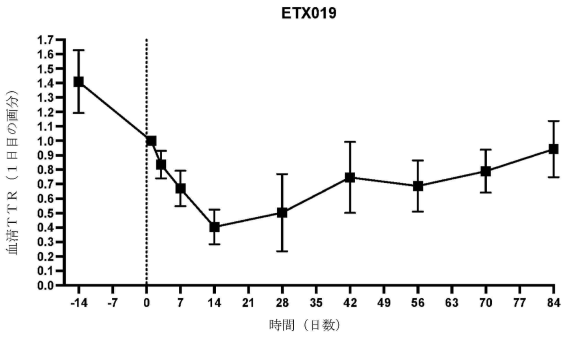
【図２４】



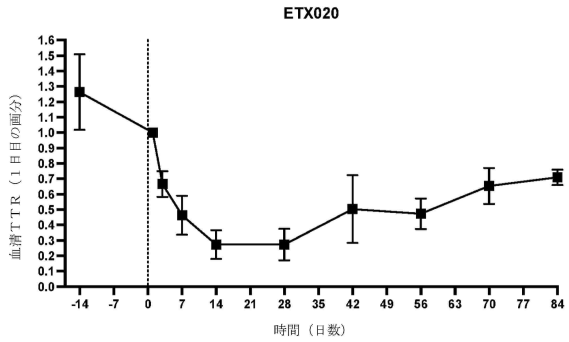
【図２５】



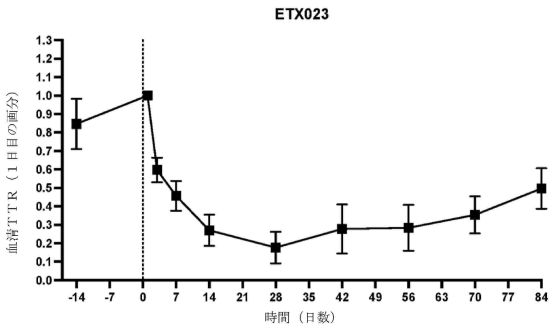
【図２６】



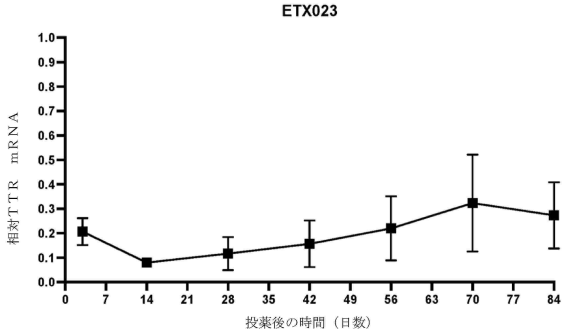
【図２７】



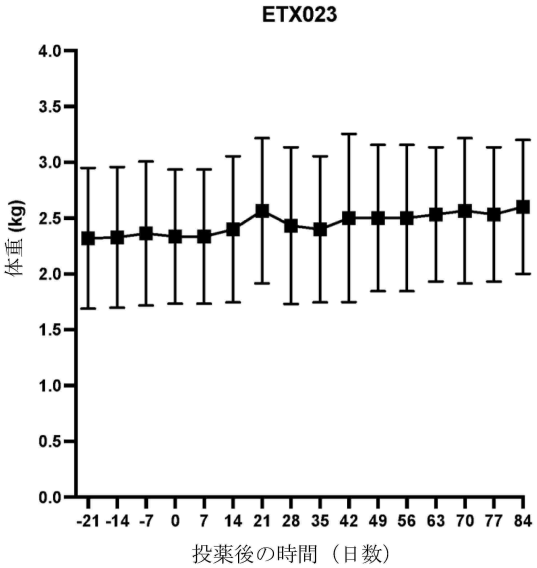
【図２８ａ】



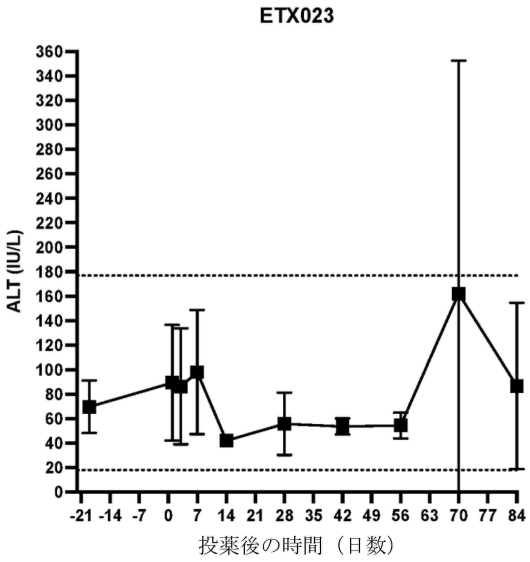
【図２８ｂ】



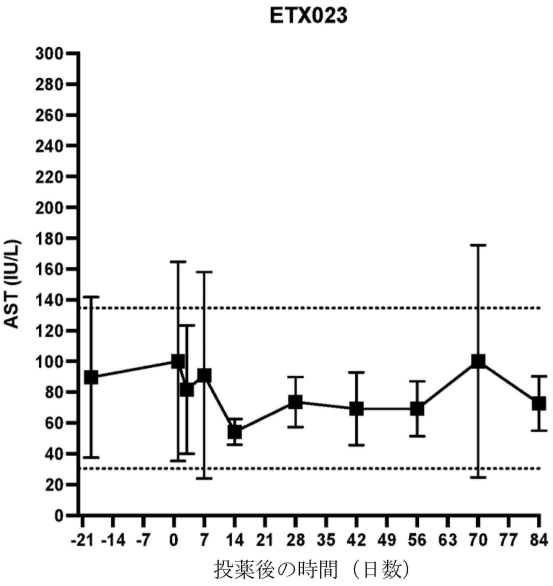
【図２８ｃ】



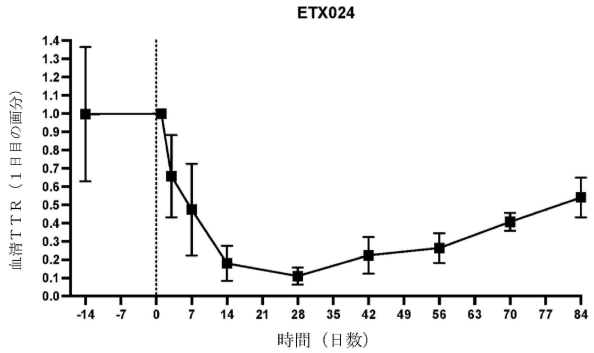
【図２８ｄ】



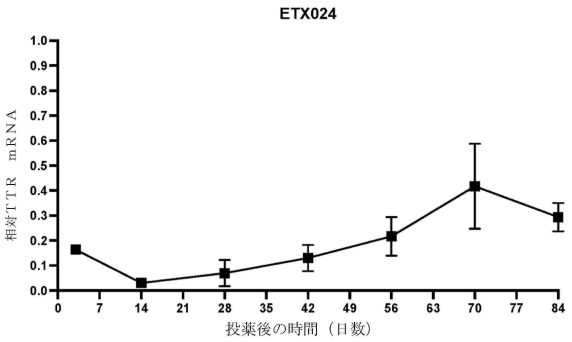
【図２８ｅ】



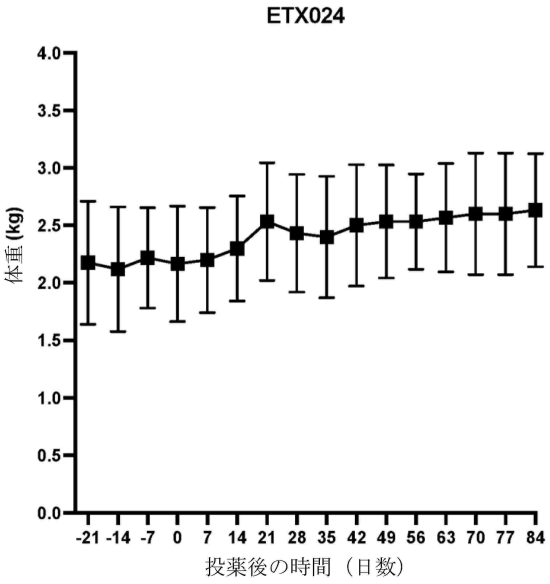
【図２９ａ】



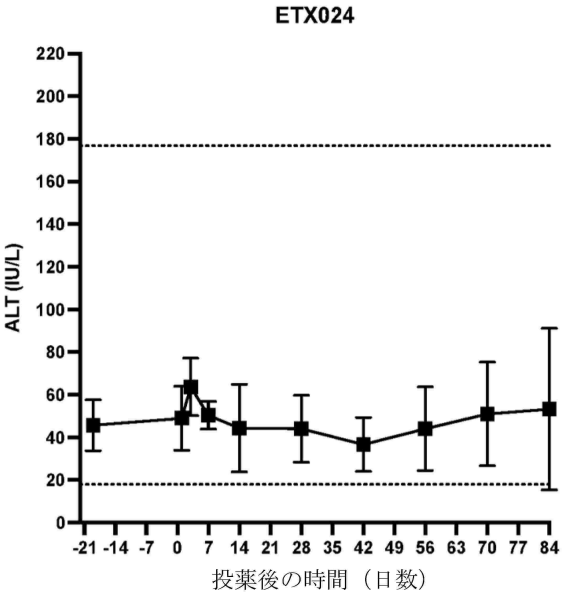
【図２９ｂ】



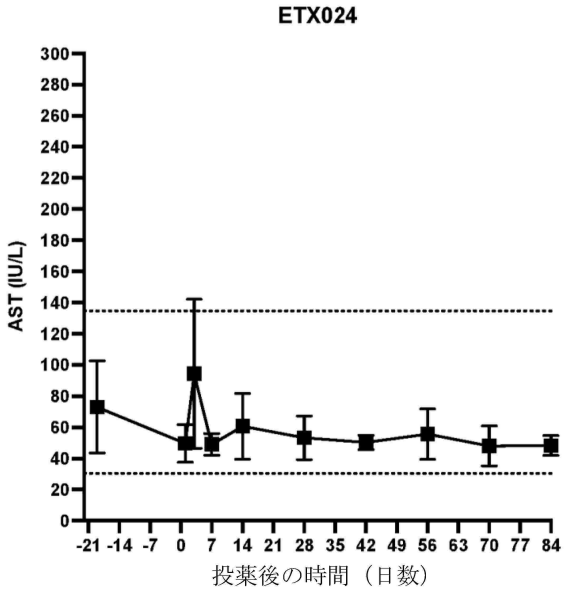
【図２９ｃ】



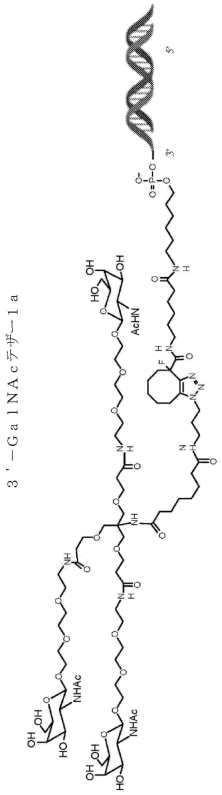
【図２９ｄ】



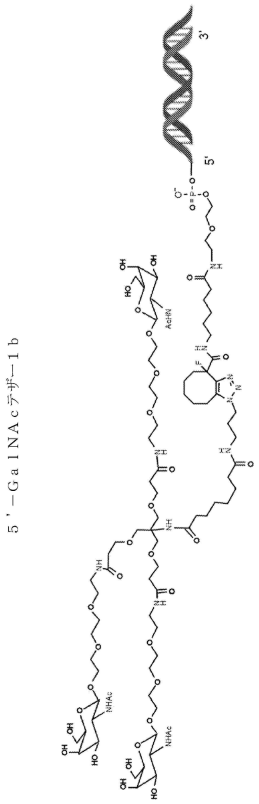
【図２９ｅ】



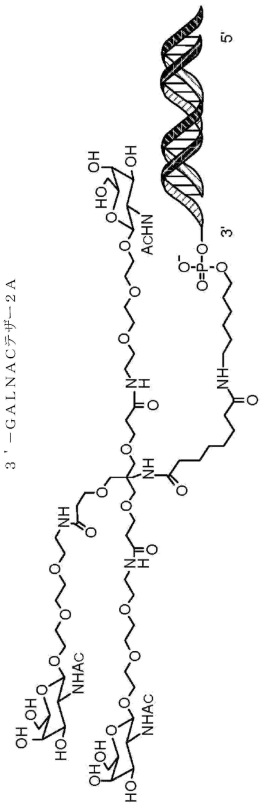
【図３０】



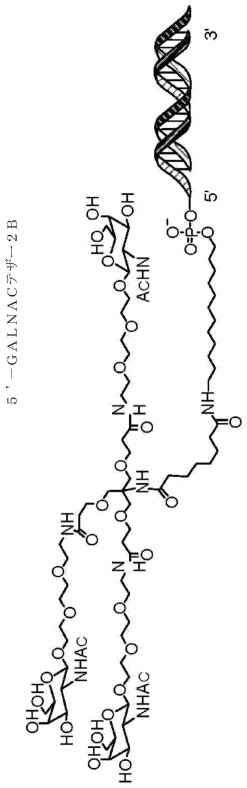
【図３１】



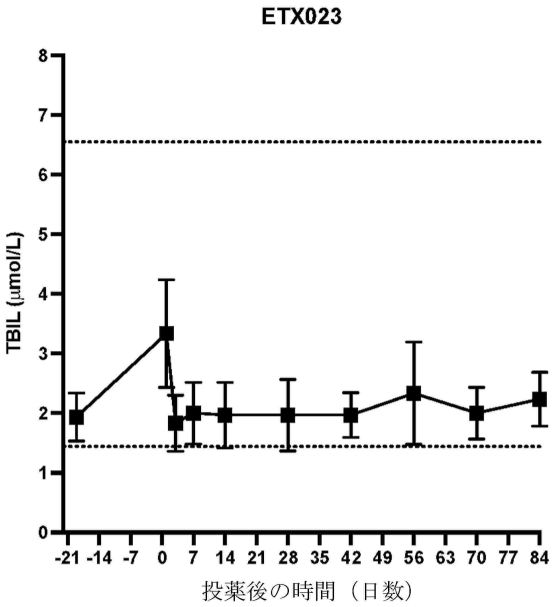
【図３２】



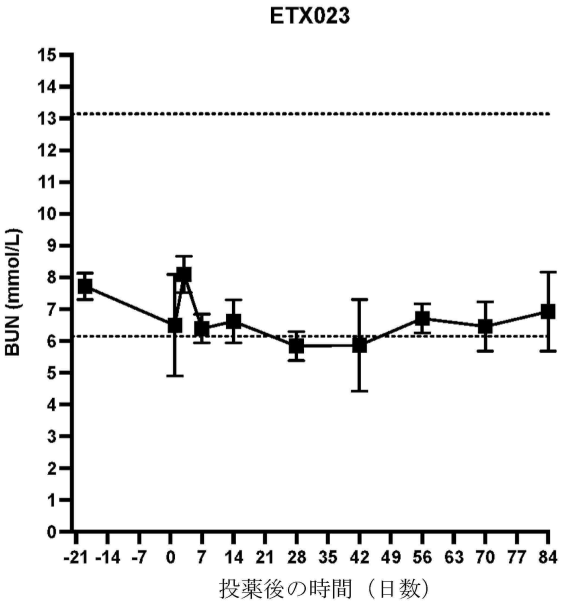
【図３３】



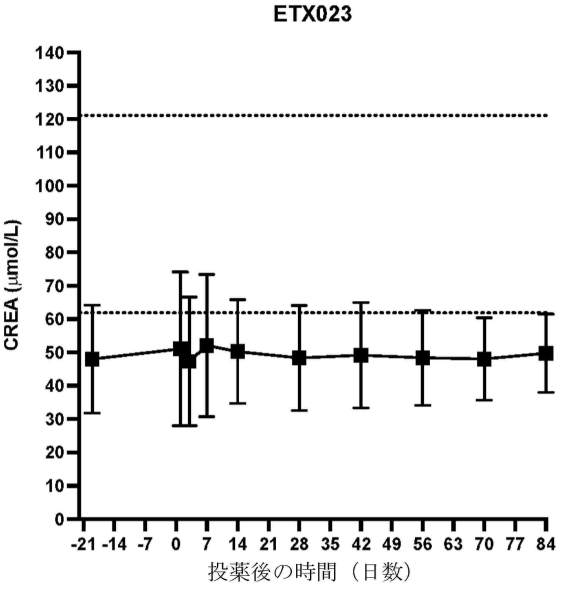
【図３４】



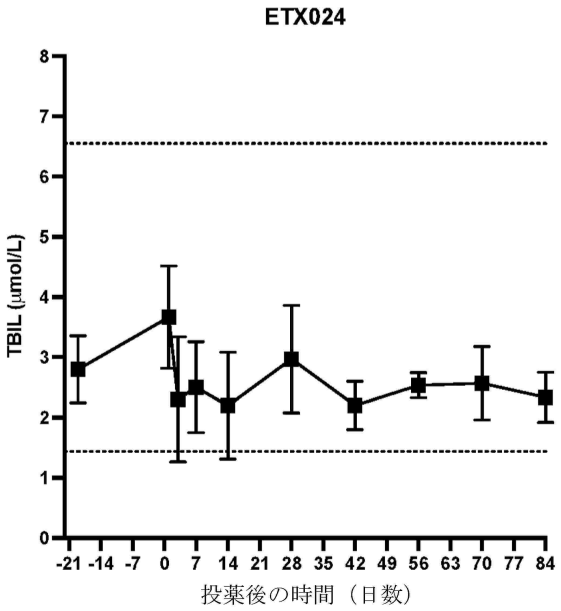
【図３５】



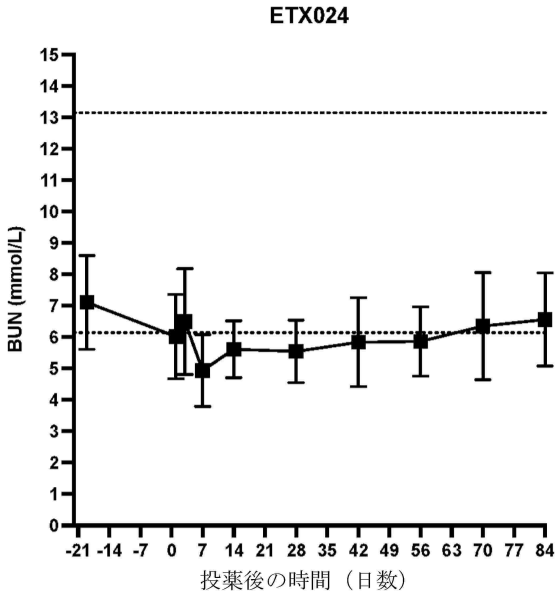
【図３６】



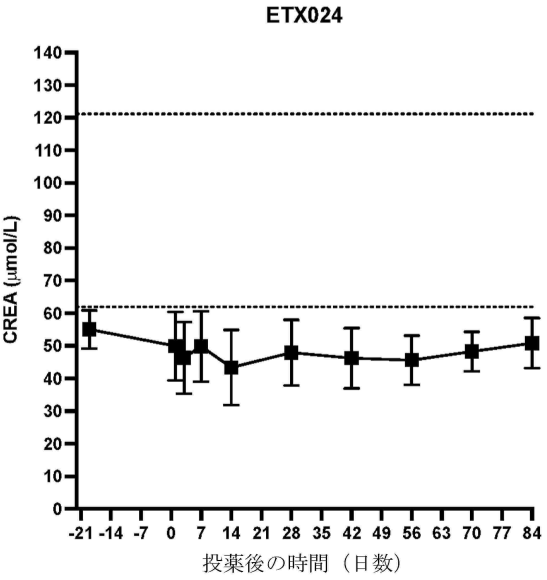
【図３７】



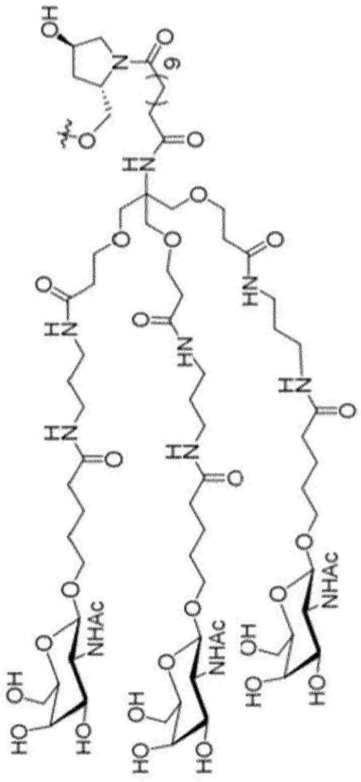
【図３８】



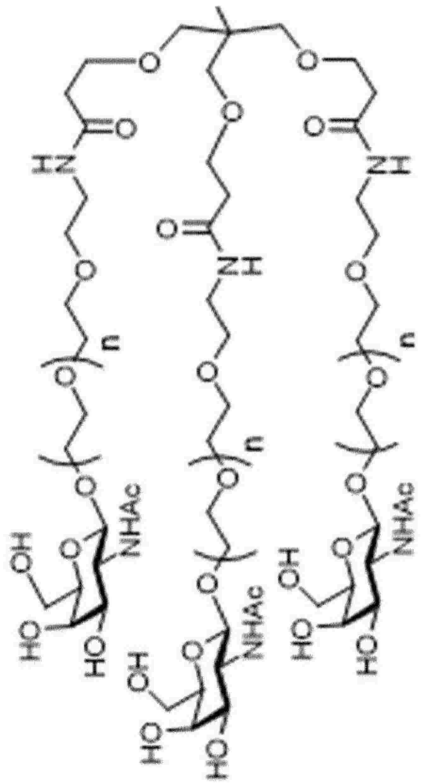
【図３９】



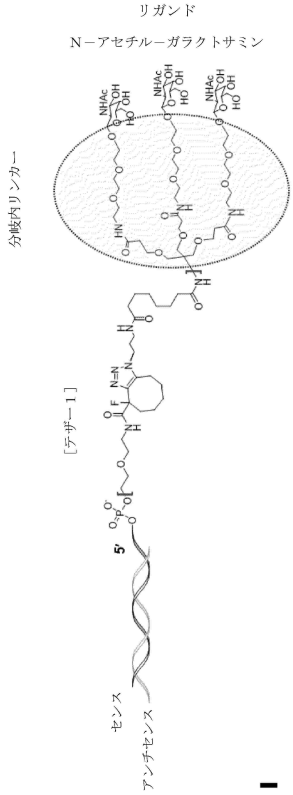
【図４０Ａ】



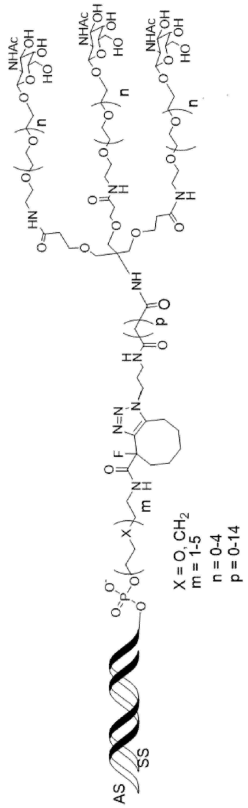
【図４０Ｂ】



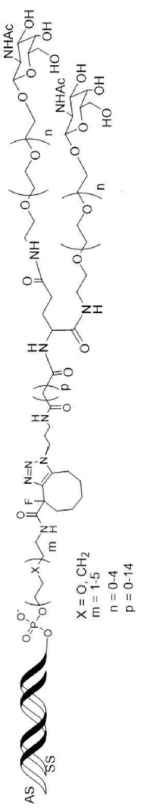
【図４１Ａ】



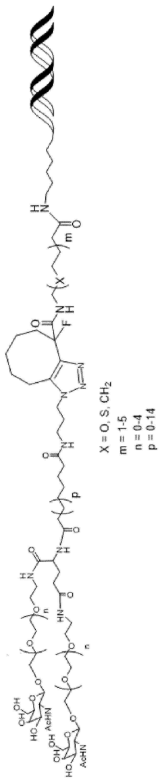
【図４１Ｂ】



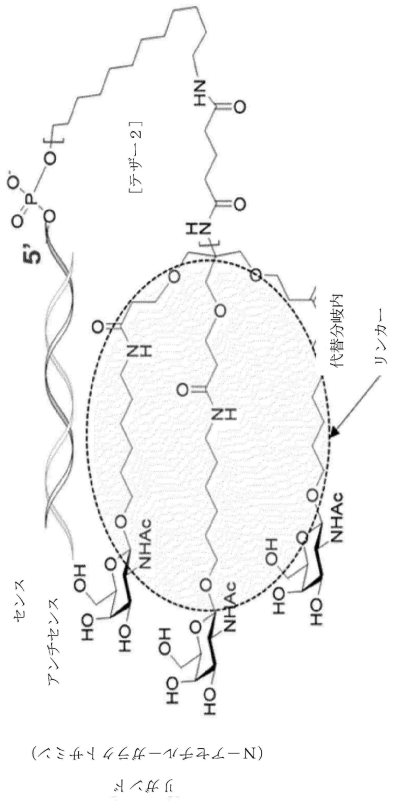
【図４１Ｃ】



【図４１Ｄ】

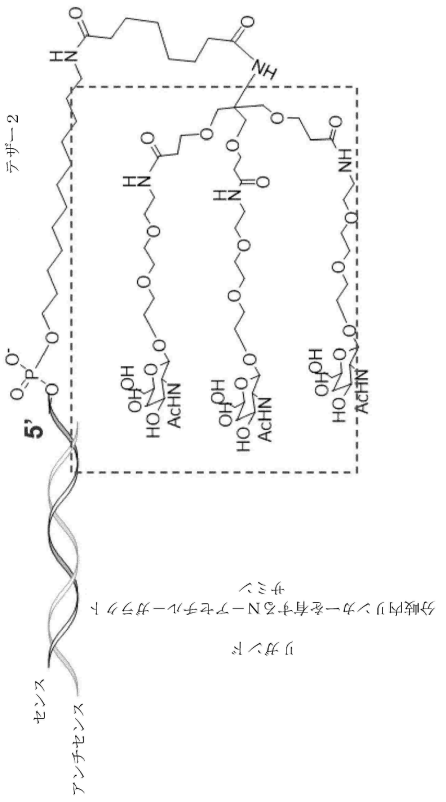


【図４２Ａ】



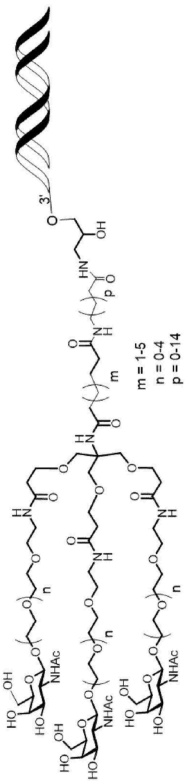
リガンド
（Ｎ－アセチル－ガラクトサミン）

【図４２Ｂ】

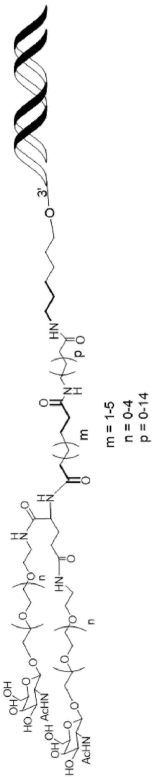


リガンド
分岐内リンカーを有するＮ－アセチル－ガラクトサミン

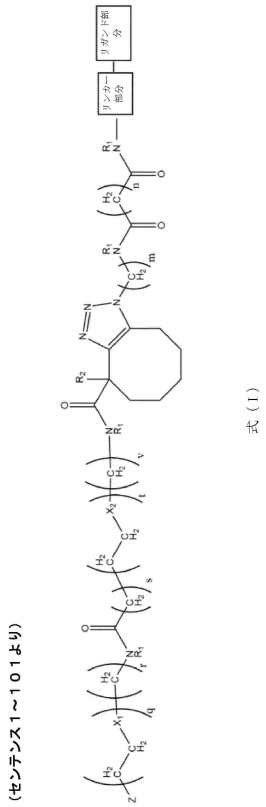
【図４２Ｃ】



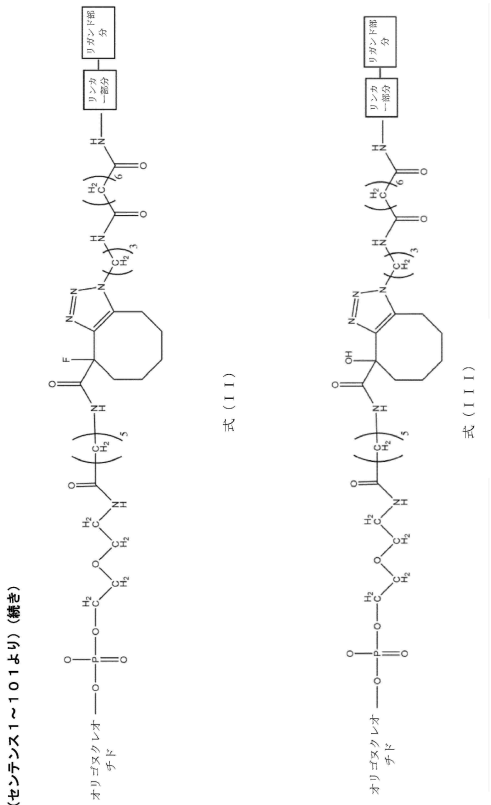
【図４２Ｄ】



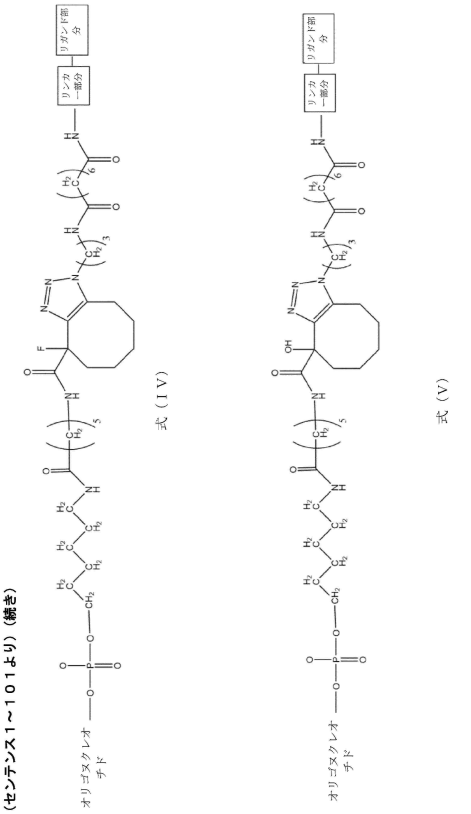
【図４３－１】



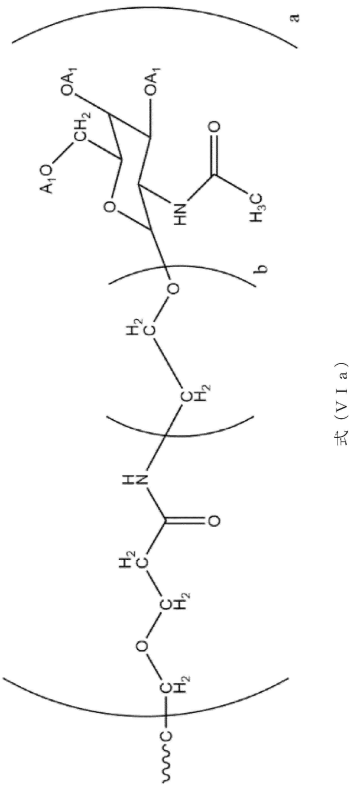
【図４３－２】



【図４３－３】



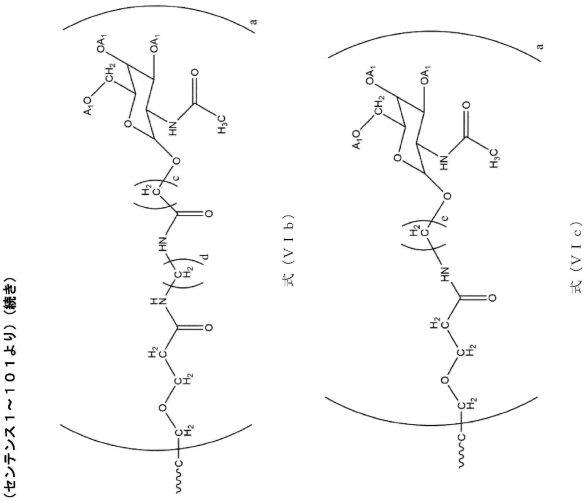
【図４３－４】



（センテンス１～１０１より）（続き）

式（ＶＩａ）

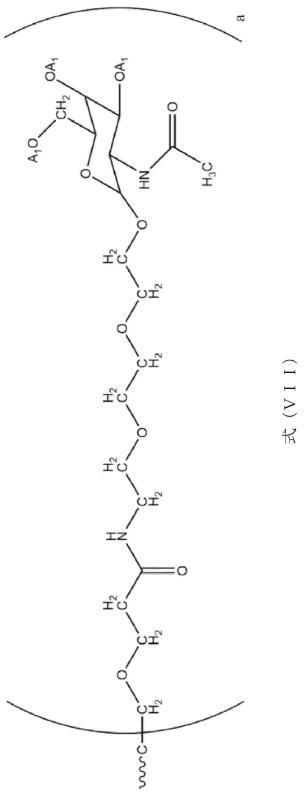
【図４３－５】



（センテンス１～１０１より）（続き）

式（ＶＩｂ）　式（ＶＩｃ）

【図４３－６】



（センテンス１～１０１より）（続き）

式（ＶＩＩ）

【図４３－７】

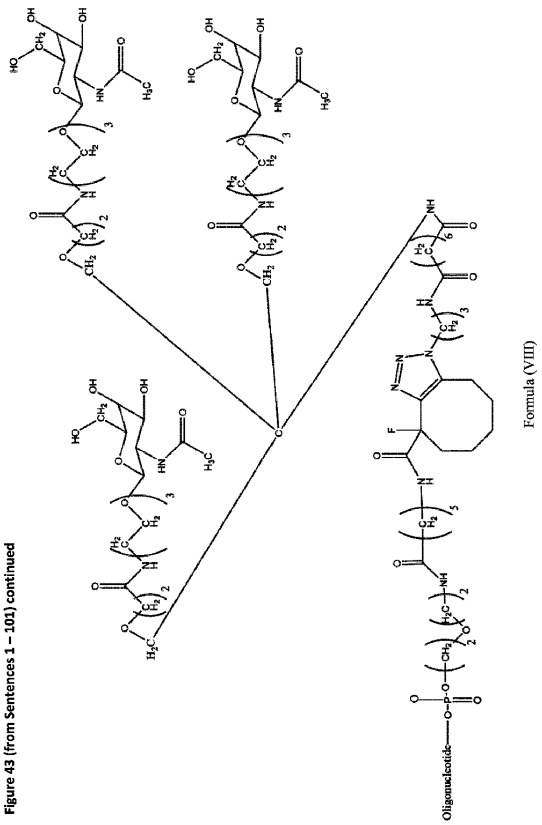
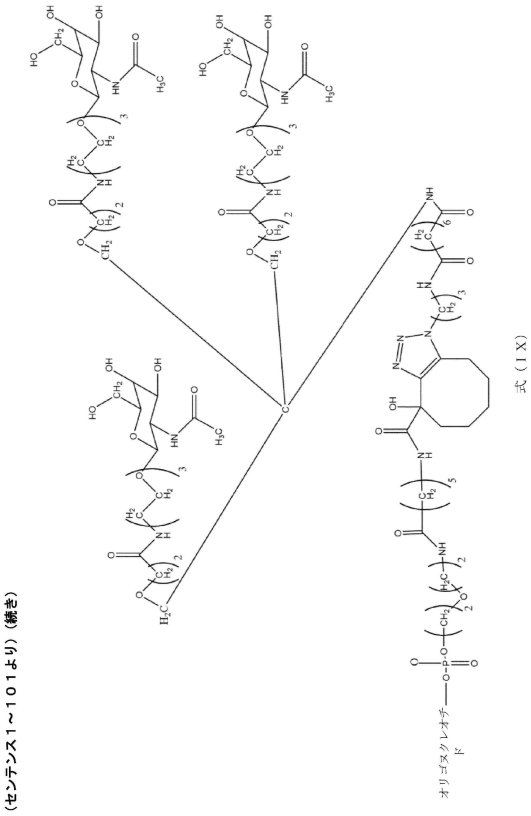


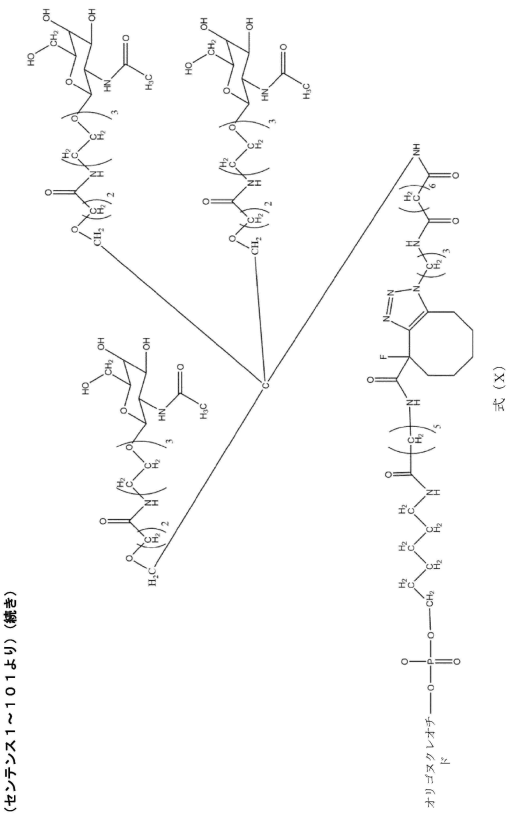
Figure 43 (from Sentences 1 – 101) continued

Formula (VIII)

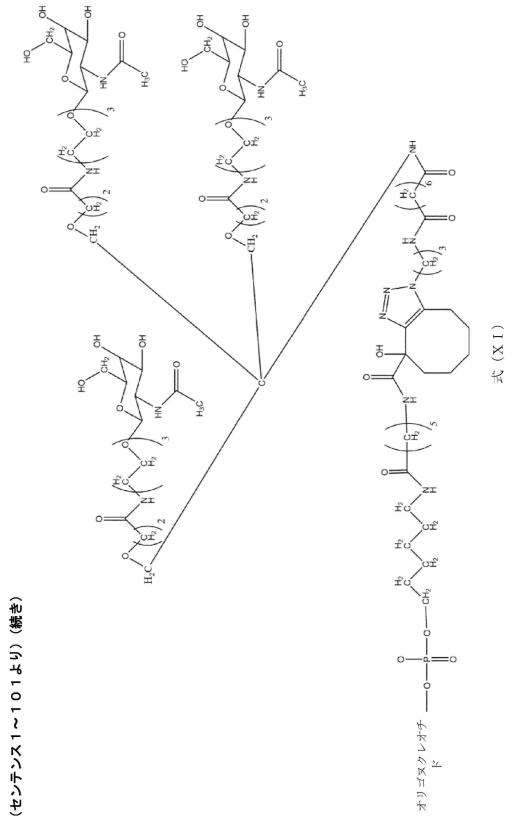
【図４３－８】



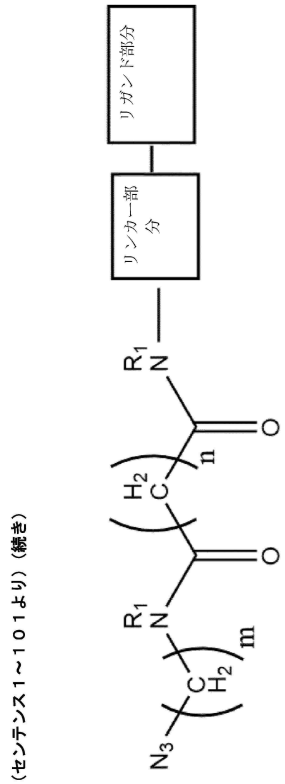
【図４３－９】



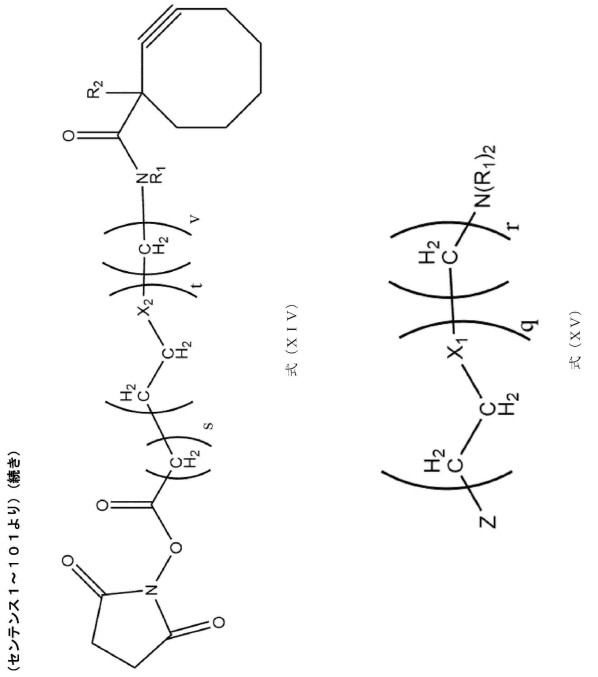
【図４３－１０】



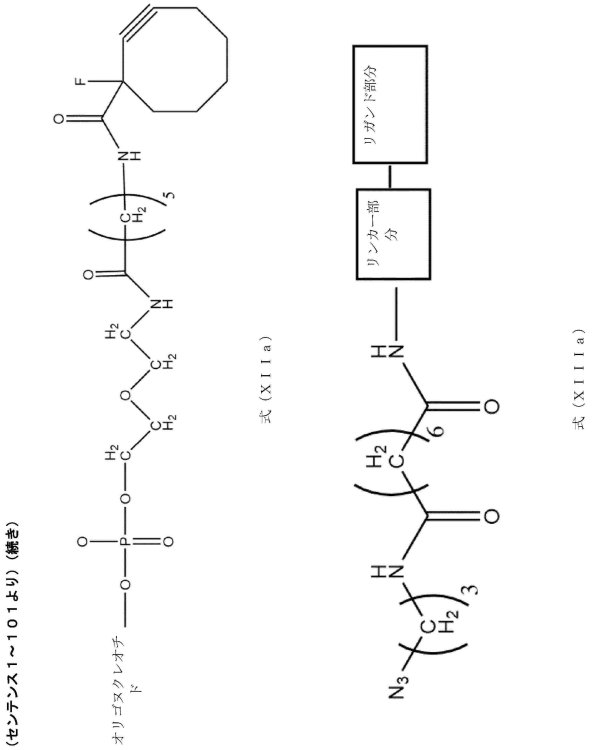
【図４３－１１】



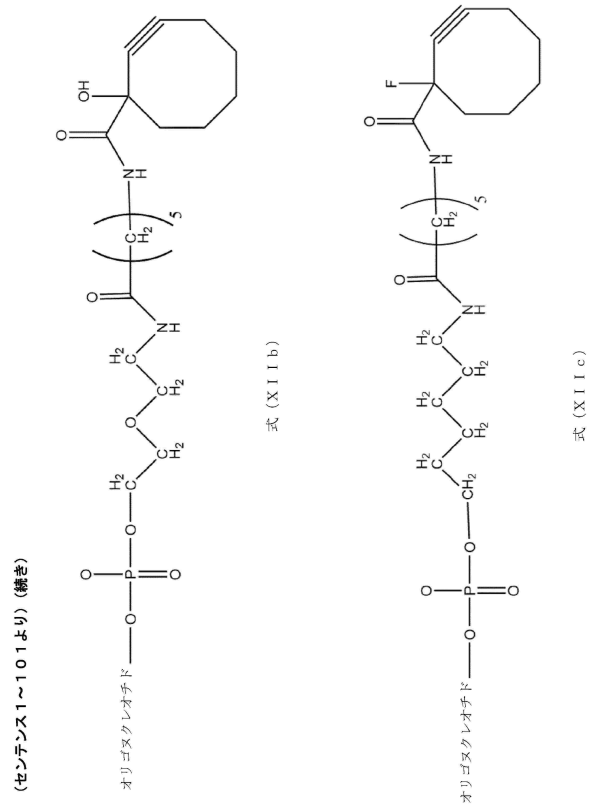
【図４３－１２】



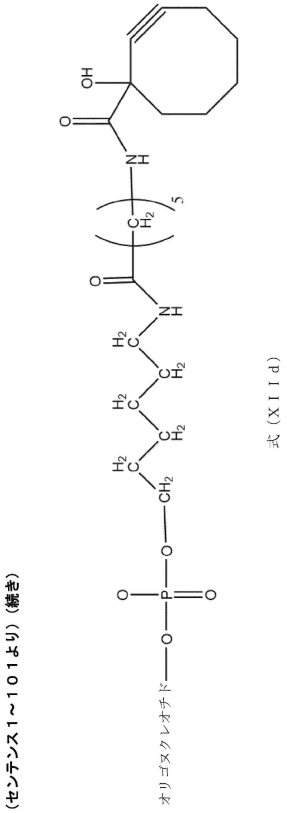
【図４３－１３】



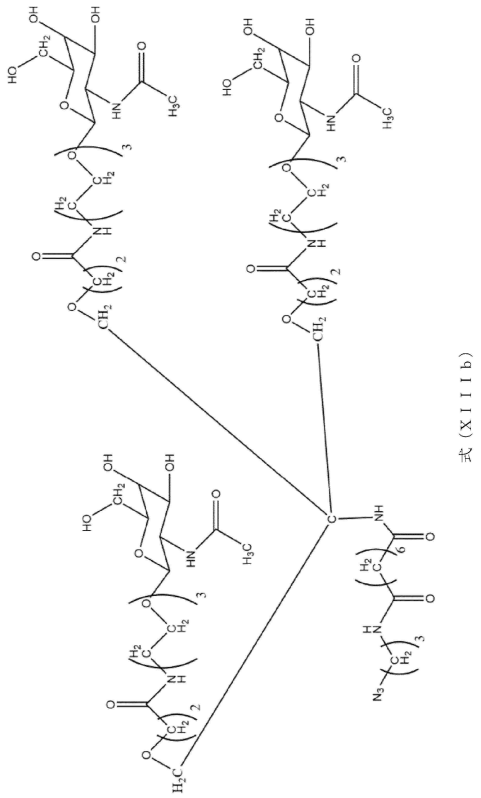
【図４３－１４】



【図４３－１５】



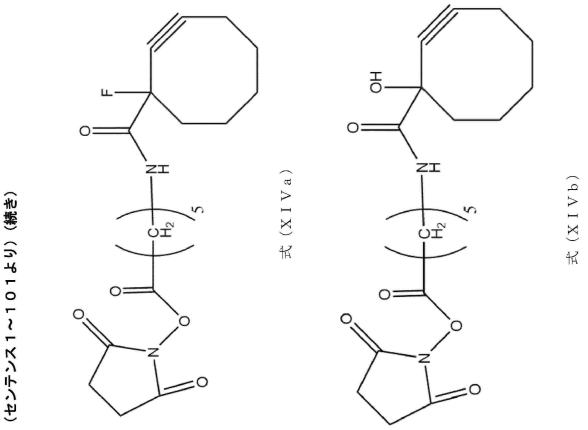
【図４３－１６】



（センテンス１～１０１より）（続き）

式（ＸＩＩＩｂ）

【図４３－１７】

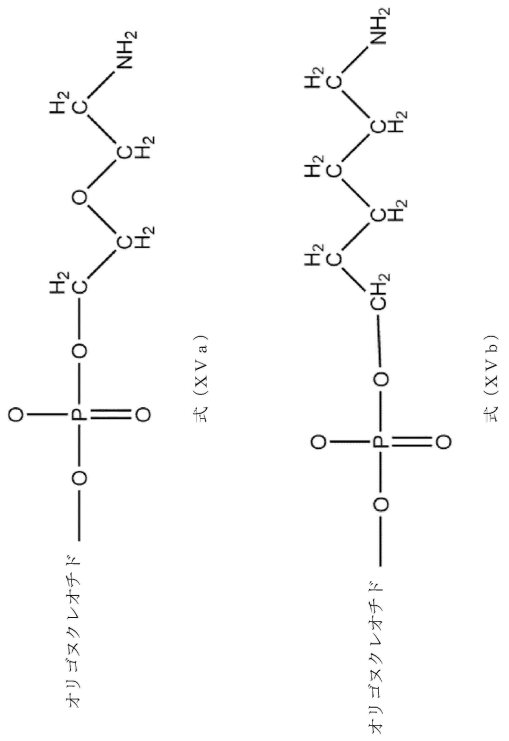


（センテンス１～１０１より）（続き）

式（ＸＩＶａ）

式（ＸＩＶｂ）

【図４３－１８】



（センテンス１～１０１より）（続き）

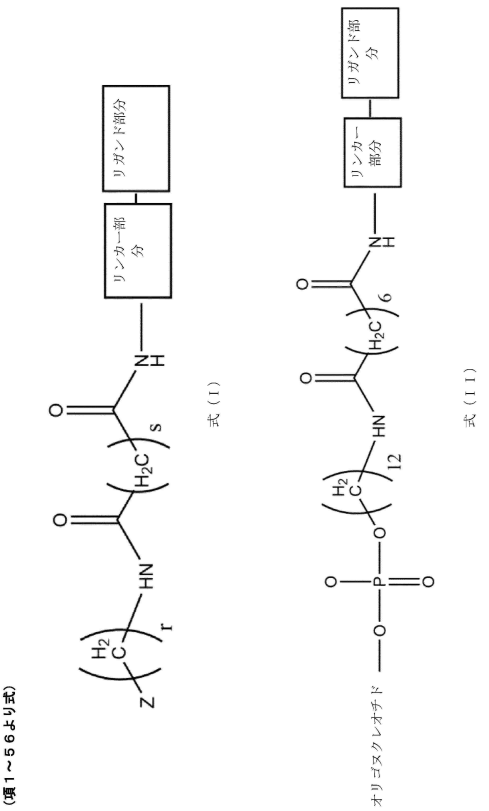
オリゴヌクレオチド

式（ＸＶａ）

オリゴヌクレオチド

式（ＸＶｂ）

【図４４－１】



（項１～５６より式）

リガンド部分

リンカー部分

式（Ｉ）

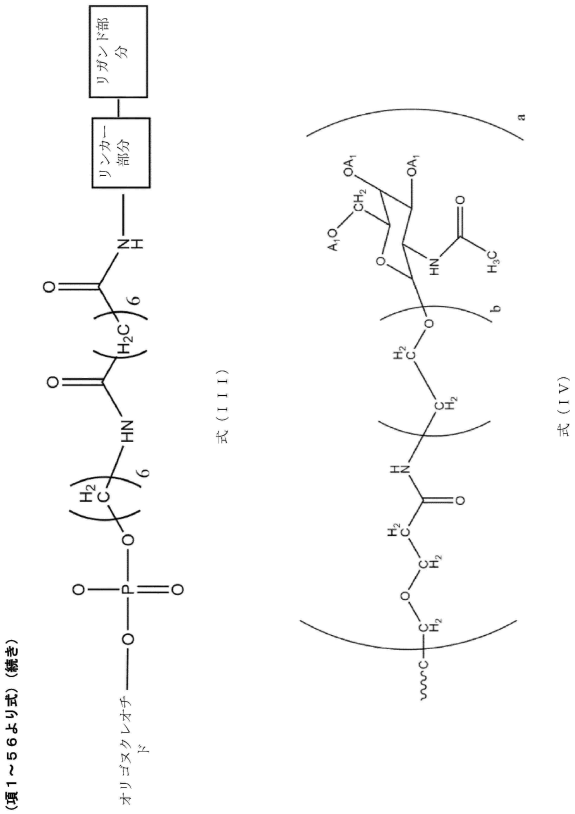
リガンド部分

リンカー部分

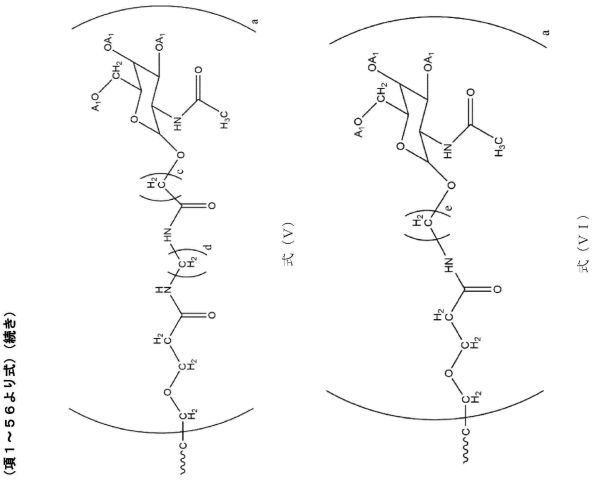
オリゴヌクレオチド

式（ＩＩ）

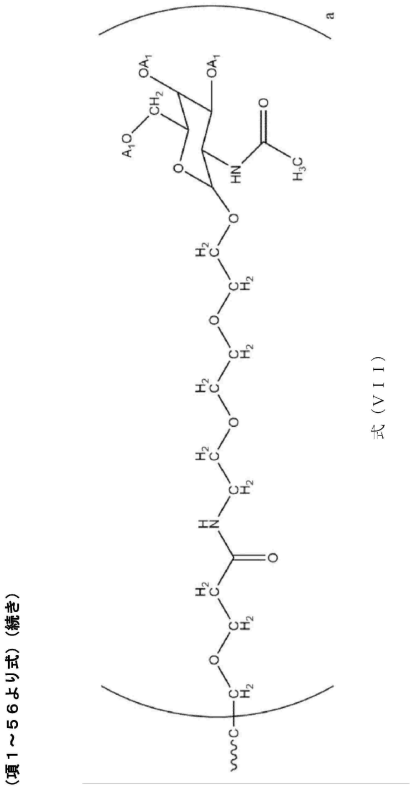
【図４４－２】



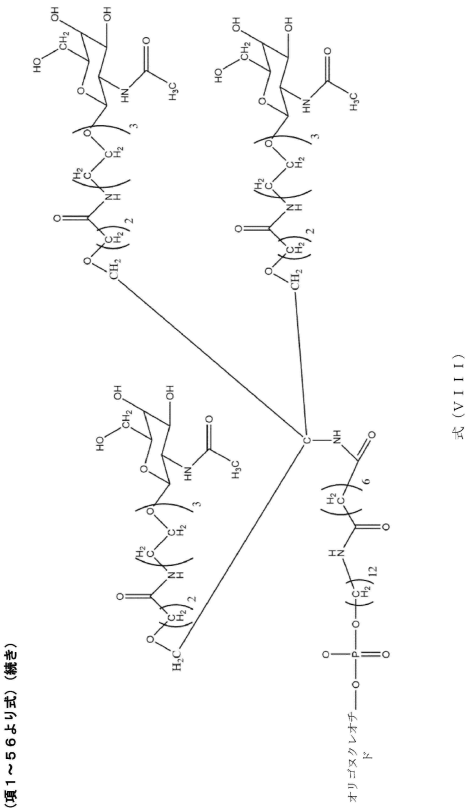
【図４４－３】



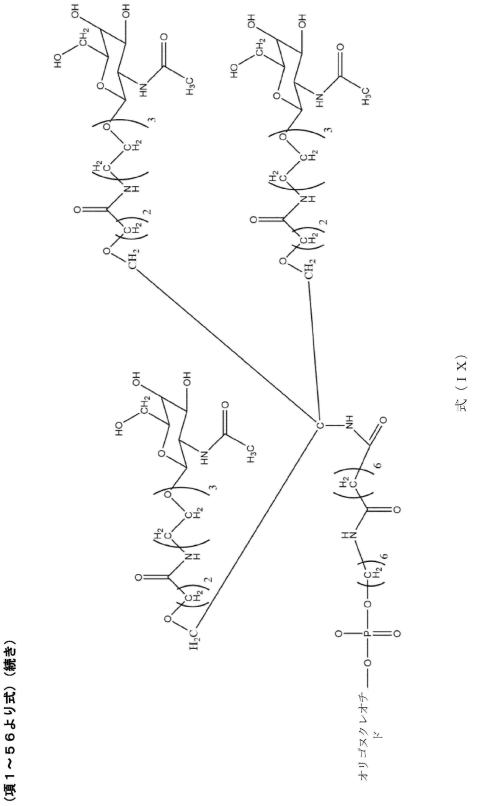
【図４４－４】



【図４４－５】



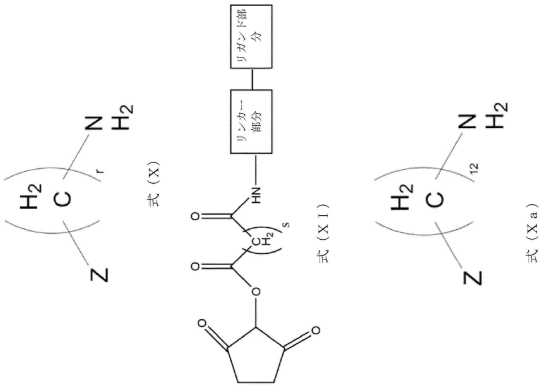
【図４４－６】



式（ＩＸ）

（項１～５６より式）（続き）

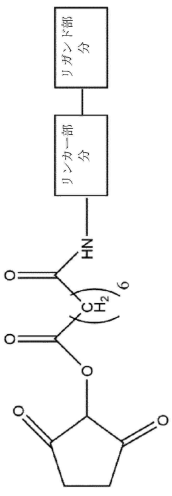
【図４４－７】



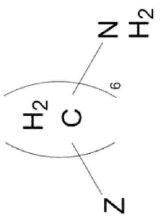
式（Ｘ）　式（ＸＩ）　式（Ｘａ）

（項１～５６より式）（続き）

【図４４－８】



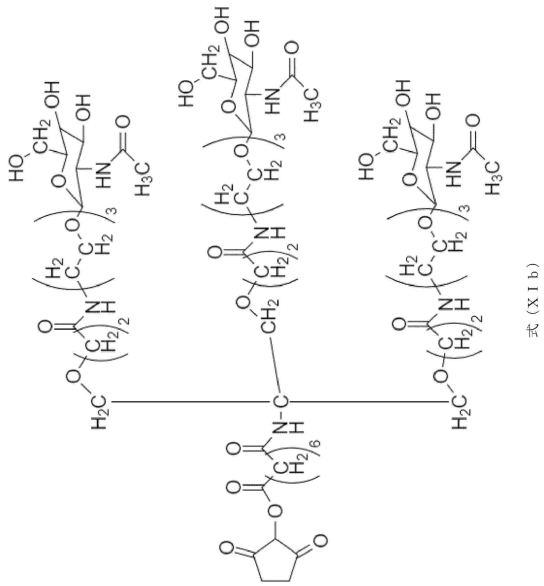
式（ＸＩａ）



式（Ｘｂ）

（項１～５６より式）（続き）

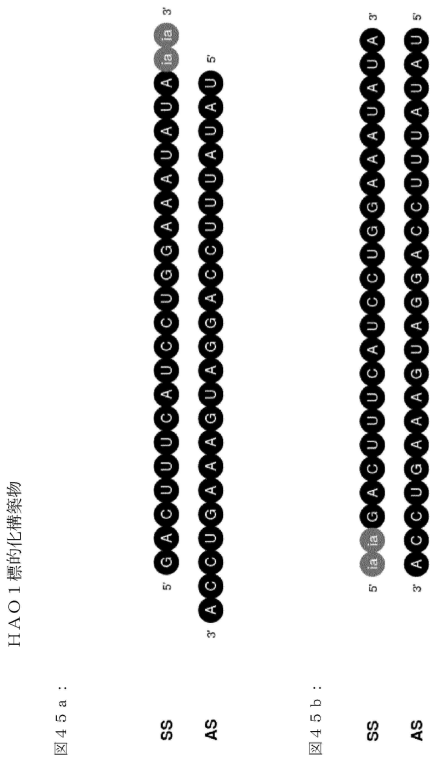
【図４４－９】



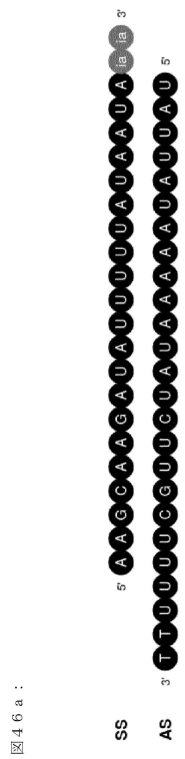
式（ＸＩｂ）

（項１～５６より式）（続き）

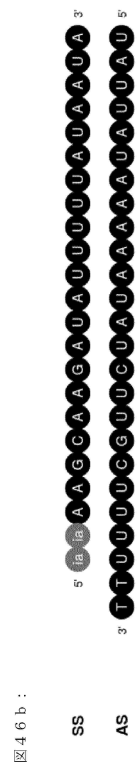
【図４５】



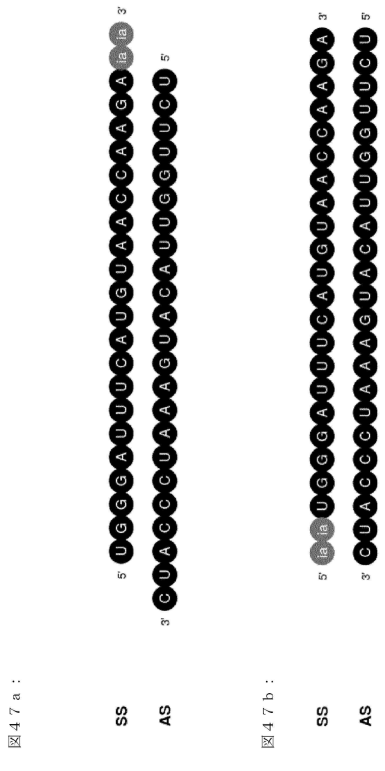
【図４６－１】



【図４６－２】



【図４７】



【配列表】
20245045030000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/052070

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/113 A61K31/713 A61K47/61
ADD. C07H21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07H A61K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2019/051402 A1 (ARROWHEAD PHARMACEUTICALS INC [US]) 14 March 2019 (2019-03-14) the whole document	1-12, 16-21, 23,42-48 13-41
Y	WO 2018/098117 A1 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC [US]) 31 May 2018 (2018-05-31) the whole document	13-41
X	WO 2011/084193 A1 (QUARK PHARMACEUTICALS INC [US]; FEINSTEIN ELENA [IL] ET AL.) 14 July 2011 (2011-07-14) the whole document	1-9,48
A	WO 2010/145778 A1 (QIAGEN GMBH [DE]; HAHN PETER [DE] ET AL.) 23 December 2010 (2010-12-23) the whole document	1-48

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
4 May 2022	17/05/2022

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Andres, Serge

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/052070

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 2015/051366 A2 (NOVARTIS AG [CH]; BARYZA JEREMY LEE [US] ET AL.) 9 April 2015 (2015-04-09) the whole document	1-48
A	J. LIU ET AL: "RNA duplexes with abasic substitutions are potent and allele-selective inhibitors of huntingtin and ataxin-3 expression", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 41, no. 18, 1 October 2013 (2013-10-01), pages 8788-8801, XP055185879, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gkt594 the whole document	1-48
A	EP 3 085 784 A1 (ENCODEGEN CO LTD [KR]) 26 October 2016 (2016-10-26) the whole document	1-48

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2022/052070

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed:

      [X] in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      [ ] on paper or in the form of an image file.

   b. [ ] furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      [ ] in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

      [ ] on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2022/052070

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019051402 A1	14-03-2019	AU 2018329190 A1	23-04-2020
		BR 112020002413 A2	28-07-2020
		CA 3074303 A1	14-03-2019
		CL 2020000593 A1	25-09-2020
		CN 111107853 A	05-05-2020
		CO 2020002586 A2	01-04-2020
		CR 20200108 A	28-06-2020
		EC SP20017905 A	30-06-2020
		EP 3681516 A1	22-07-2020
		JP 2020533334 A	19-11-2020
		KR 20200044013 A	28-04-2020
		PE 20201283 A1	24-11-2020
		PH 12020500332 A1	28-09-2020
		SG 11201912178V A	30-01-2020
		TN 2020000039 A1	04-10-2021
		TW 201920227 A	01-06-2019
		US 2019078088 A1	14-03-2019
		US 2020299690 A1	24-09-2020
		US 2022064646 A1	03-03-2022
		UY 37871 A	29-03-2019
		WO 2019051402 A1	14-03-2019
WO 2018098117 A1	31-05-2018	AU 2017363604 A1	06-06-2019
		BR 112019010342 A2	22-10-2019
		CA 3044562 A1	31-05-2018
		CL 2019001388 A1	04-10-2019
		CN 110114463 A	09-08-2019
		CO 2019005992 A2	28-06-2019
		CR 20190294 A	29-08-2019
		DO P2019000132 A	15-08-2019
		EP 3545093 A1	02-10-2019
		JP 2020500929 A	16-01-2020
		KR 20190082317 A	09-07-2019
		MA 46923 A	02-10-2019
		PH 12019550076 A1	20-01-2020
		RU 2019119242 A	25-12-2020
		SG 10201913877W A	30-03-2020
		TW 201829443 A	16-08-2018
		US 2019316127 A1	17-10-2019
		US 2021269796 A1	02-09-2021
		UY 37494 A	29-06-2018
		WO 2018098117 A1	31-05-2018
WO 2011084193 A1	14-07-2011	CN 102770541 A	07-11-2012
		EP 2521783 A1	14-11-2012
		ES 2640091 T3	31-10-2017
		HK 1178566 A1	13-09-2013
		JP 5824463 B2	25-11-2015
		JP 2013516190 A	13-05-2013
		US 2013035368 A1	07-02-2013
		US 2015159154 A1	11-06-2015
		WO 2011084193 A1	14-07-2011
		WO 2011085056 A1	14-07-2011
WO 2010145778 A1	23-12-2010	EP 2264169 A1	22-12-2010
		US 2012142011 A1	07-06-2012
		WO 2010145778 A1	23-12-2010

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2022/052070

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2015051366 A2	09-04-2015	EP 3052627 A2	10-08-2016
		US 2016244756 A1	25-08-2016
		WO 2015051366 A2	09-04-2015
EP 3085784 A1	26-10-2016	AU 2014367550 A1	07-07-2016
		BR 112016014155 A2	09-01-2018
		CA 2933171 A1	25-06-2015
		CN 105829535 A	03-08-2016
		EP 3085784 A1	26-10-2016
		JP 6748687 B2	02-09-2020
		JP 2017502665 A	26-01-2017
		JP 2019030312 A	28-02-2019
		KR 20150070944 A	25-06-2015
		RU 2016129053 A	23-01-2018
		US 2016304878 A1	20-10-2016

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

フロントページの続き

(51)国際特許分類	ＦＩ	テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ　31/7105(2006.01)	Ａ６１Ｋ　31/7105	

(32)優先日　令和3年10月25日(2021.10.25)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁理士　當麻 博文
(74)代理人　100137729
弁理士　赤井 厚子
(74)代理人　100151301
弁理士　戸崎 富哉
(74)代理人　100152308
弁理士　中 正道
(74)代理人　100201558
弁理士　亀井 恵二郎
(72)発明者　モルタザヴィ、アフマド アリ
イギリス国、ダブリュ２　６ビーディー ロンドン、キングダム ストリート ４、ユニット ４ビー、レヴェル ４、イー セラピューティクス パブリック リミテッド カンパニー内
(72)発明者　マンネラ、ヴィヴィアナ
イギリス国、ダブリュ２　６ビーディー ロンドン、キングダム ストリート ４、ユニット ４ビー、レヴェル ４、イー セラピューティクス パブリック リミテッド カンパニー内
(72)発明者　ジャヤラマン、ムトゥサミー
イギリス国、ダブリュ２　６ビーディー ロンドン、キングダム ストリート ４、ユニット ４ビー、レヴェル ４、イー セラピューティクス パブリック リミテッド カンパニー内

Ｆターム（参考）　4C076　AA95 CC29 DD66 EE59
4C084　AA02 AA13 NA14 ZB211 ZB212
4C086　AA01 AA02 AA04 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB21