

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7273417号

(P7273417)

(45)発行日 令和5年5月15日(2023.5.15)

(24)登録日 令和5年5月2日(2023.5.2)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/113(2010.01)

C 1 2 N 15/113

Z

A 6 1 K 31/7105(2006.01)

A 6 1 K 31/7105

Z N A

A 6 1 K 31/7115(2006.01)

A 6 1 K 31/7115

A 6 1 K 31/713(2006.01)

A 6 1 K 31/713

A 6 1 P 31/20 (2006.01)

A 6 1 P 31/20

請求項の数 26 (全124頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-529638(P2020-529638)

(86)(22)出願日 平成30年11月29日(2018.11.29)

(65)公表番号 特表2021-503941(P2021-503941 A)

(43)公表日 令和3年2月15日(2021.2.15)

(86)国際出願番号 PCT/CN2018/118300

(87)国際公開番号 WO2019/105435

(87)国際公開日 令和1年6月6日(2019.6.6)

審査請求日 令和3年11月25日(2021.11.25)

(31)優先権主張番号 201711249378.5

(32)優先日 平成29年12月1日(2017.12.1)

(33)優先権主張国・地域又は機関

中国(CN)

(31)優先権主張番号 201711478933.1

(32)優先日 平成29年12月29日(2017.12.29)

最終頁に続く

(73)特許権者 517452453

スーチョウ リボ ライフ サイエンス カ
ンパニー、リミテッドSUZHOU RIBO LIFE SC
IENCE CO., LTD.

中華人民共和国 チアンスー 2 1 5 3 0

0、クンシャン シティ、ユイシャン

タウン、ユアンフォン ロード ナンバー
1 6 8

(74)代理人 110000729

弁理士法人ユニアス国際特許事務所

(72)発明者 チャン、ホンイエン

中華人民共和国 チアンスー 2 1 5 3 0

0、クンシャン シティ、ユイシャン

タウン、ユアンフォン ロード ナンバー
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 核酸、当該核酸を含む組成物および複合体ならびに調製方法と使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

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

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

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

ただし、Z は A であり、Z' は U であり、

前記ヌクレオチド配列 A に、位置が Z に対応するヌクレオチド Z_A が含まれ、前記ヌクレオチド配列 B に、位置が Z' に対応するヌクレオチド Z_B' が含まれ、前記 Z_B' が、前記アンチセンス鎖の 5' 末端の 1 番目のヌクレオチドであり、

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

前記フルオロ修飾ヌクレオチドが、ヌクレオチド配列 A とヌクレオチド配列 B に位置し

、5'末端から3'末端に向かって、前記ヌクレオチド配列Aの第7、8、9位のヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであり、5'末端から3'末端に向かって、前記ヌクレオチド配列Bの第2、6、14、16位のヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドである、s i R N A。

【請求項2】

ヌクレオチド配列Aが配列番号3に示されるヌクレオチド配列であり、ヌクレオチド配列Bが、配列番号4に示されるヌクレオチド配列であり、

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

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

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

10

【請求項3】

前記ヌクレオチド配列Iがヌクレオチド配列I I Iをさらに含み、前記ヌクレオチド配列I I Iがヌクレオチド配列I Vをさらに含み、ヌクレオチド配列I I Iとヌクレオチド配列I Vの長さがそれぞれ独立して1~4ヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列I I Iがヌクレオチド配列Aの5'末端に結合され、ヌクレオチド配列I Vがヌクレオチド配列Bの3'末端に結合され、前記ヌクレオチド配列I I Iと前記ヌクレオチド配列I Vは、長さが等しく、実質的に逆相補的又は完全に逆相補的であり、前記実質的に逆相補的であるとは、2つのヌクレオチド配列間に1つ以下の塩基ミスマッチが存在することを指し、完全に逆相補的であるとは、2つのヌクレオチド配列間にミスマッチがないことを指す、請求項1に記載のs i R N A。

20

【請求項4】

前記ヌクレオチド配列I I IとI Vは、長さがいずれも1ヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列I I Iの塩基がGであり、

或いは、前記ヌクレオチド配列I I IとI Vは、長さがいずれも2ヌクレオチドであり

、5'末端から3'末端に向かって、ヌクレオチド配列I I Iの塩基組成がA Gであり、

或いは、前記ヌクレオチド配列I I IとI Vは、長さがいずれも3ヌクレオチドであり

、5'末端から3'末端に向かって、ヌクレオチド配列I I Iの塩基組成がA A Gであり、

或いは、前記ヌクレオチド配列I I IとI Vは、長さがいずれも4ヌクレオチドであり

、5'末端から3'末端に向かって、ヌクレオチド配列I I Iの塩基組成がC A A Gである、請求項3に記載のs i R N A。

30

【請求項5】

前記ヌクレオチド配列I I Iがヌクレオチド配列Vをさらに含み、ヌクレオチド配列Vは、長さが1~3ヌクレオチドであり、前記アンチセンス鎖の3'末端に結合され、アンチセンス鎖の3'オーバーハング末端を構成する、請求項1に記載のs i R N A。

【請求項6】

前記s i R N Aのセンス鎖が配列番号3に示されるヌクレオチド配列を含み、前記アンチセンス鎖が配列番号5に示されるヌクレオチド配列を含み、

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

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

或いは、前記s i R N Aのセンス鎖が配列番号3に示されるヌクレオチド配列を含み、前記アンチセンス鎖が配列番号6に示されるヌクレオチド配列を含み、

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

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

ただし、前記Z_Bはアンチセンス鎖の5'末端の1番目のヌクレオチドであり、 Δ はA、U、G又はCから選択され、Z_BがZ_Aと相補的なヌクレオチドである、請求項1に記載のs i R N A。

40

【請求項7】

各非フルオロ修飾ヌクレオチドがいずれもメトキシ修飾ヌクレオチドであり、前記メト

50

キシ修飾ヌクレオチドが、リボース基の2'-ヒドロキシ基がメトキシで置換されたヌクレオチドを指す、請求項1に記載の*s i R N A*。

【請求項8】

5'末端から3'末端に向かって、前記*s i R N A*のセンス鎖におけるヌクレオチド配列Aの第5、7、8及び9位のヌクレオチドがフルオ口修飾ヌクレオチドであり、*s i R N A*のセンス鎖の他の位置のヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドであり、5'末端から3'末端に向かって、前記*s i R N A*のアンチセンス鎖におけるヌクレオチド配列Bの第2、6、8、9、14及び16位のヌクレオチドがフルオ口修飾ヌクレオチドであり、*s i R N A*のアンチセンス鎖の他の位置のヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドであり、

或いは、5'末端から3'末端に向かって、前記*s i R N A*のセンス鎖におけるヌクレオチド配列Aの第5、7、8及び9位のヌクレオチドがフルオ口修飾ヌクレオチドであり、*s i R N A*のセンス鎖の他の位置のヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドであり、5'末端から3'末端に向かって、前記*s i R N A*のアンチセンス鎖におけるヌクレオチド配列Bの第2、6、14及び16位のヌクレオチドがフルオ口修飾ヌクレオチドであり、*s i R N A*のアンチセンス鎖の他の位置のヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドであり、

或いは、5'末端から3'末端に向かって、前記*s i R N A*のセンス鎖におけるヌクレオチド配列Aの第7、8及び9位のヌクレオチドがフルオ口修飾ヌクレオチドであり、*s i R N A*のセンス鎖の他の位置のヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドであり、5'末端から3'末端に向かって、前記*s i R N A*のアンチセンス鎖におけるヌクレオチド配列Bの第2、6、14及び16位のヌクレオチドがフルオ口修飾ヌクレオチドであり、*s i R N A*のアンチセンス鎖の他の位置のヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドである、請求項1に記載の*s i R N A*。

【請求項9】

前記*s i R N A*が*s i H B V S 3*、*s i H B V S 4*、*s i H B V S 5*又は*s i H B V S 6*である、請求項1に記載の*s i R N A*：

s i H B V S 3

センス鎖：5'-U m G m C m U m A m U m G f C f C f U m C m A m U m C m U m U m C m U m A m-3'（配列番号9）

アンチセンス鎖：5'-U m A f G m A m A m G f A m U m G m A m G m G m C m A f U m A f G m C m A m G m C m-3'（配列番号10）

s i H B V S 4

センス鎖：5'-U m G m C m U m A m U m G f C f C f U m C m A m U m C m U m U m C m U m A m-3'（配列番号9）

アンチセンス鎖：5'-U m A f G m A m A m G f A m U m G m A m G m G m C m A f U m A f G m C m A m U m U m-3'（配列番号11）

s i H B V S 5

センス鎖：5'-U m G m C m U m A f U m G f C f C f U m C m A m U m C m U m U m C m U m A m-3'（配列番号12）

アンチセンス鎖：5'-U m A f G m A m A m G f A m U f G f A m G m G m C m A f U m A f G m C m A m G m C m-3'（配列番号13）、又は

s i H B V S 6

センス鎖：5'-U m G m C m U m A f U m G f C f C f U m C m A m U m C m U m U m C m U m A m-3'（配列番号12）

アンチセンス鎖：5'-U m A f G m A m A m G f A m U f G f A m G m G m C m A f U m A f G m C m A m U m U m-3'（配列番号14）

ただし、大文字C、G、U、Aはヌクレオチドの塩基組成を表し、小文字mは、当該文字mの左側に隣接する1つのヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドであることを表し、小文字fは、当該文字fの左側に隣接する1つのヌクレオチドがフルオ口修飾ヌクレオチドであることを表す。

【請求項10】

前記 *s i R N A* において、少なくとも一つのリン酸基エステル基がチオリン酸エステル基であり、該チオリン酸エステル基が、

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

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

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

【請求項 11】

前記 *s i R N A* が *s i H B V S 7*、*s i H B V S 8*、*s i H B V S 9* 又は *s i H B V S 10* である、請求項 1 に記載の *s i R N A*：

s i H B V S 7

センス鎖：5' - U m s G m s C m U m A m U m G f C f C f U m C m A m U m C m U m U m C m U m A m - 3' (配列番号 15)

アンチセンス鎖：5' - U m s A f s G m A m A m G f A m U m G m A m G m G m C m A f U m A f G m C m A m s G m s C m - 3' (配列番号 16)

s i H B V S 8

センス鎖：5' - U m s G m s C m U m A m U m G f C f C f U m C m A m U m C m U m U m C m U m A m - 3' (配列番号 15)

アンチセンス鎖：5' - U m s A f s G m A m A m G f A m U m G m A m G m G m C m A f U m A f G m C m A m s U m s U m - 3' (配列番号 17)

s i H B V S 9

センス鎖：5' - U m s G m s C m U m A f U m G f C f C f U m C m A m U m C m U m U m C m U m A m - 3' (配列番号 18)

アンチセンス鎖：5' - U m s A f s G m A m A m G f A m U f G f A m G m G m C m A f U m A f G m C m A m s G m s C m - 3' (配列番号 19)

s i H B V S 10

センス鎖：5' - U m s G m s C m U m A f U m G f C f C f U m C m A m U m C m U m U m C m U m A m - 3' (配列番号 18)

アンチセンス鎖：5' - U m s A f s G m A m A m G f A m U f G f A m G m G m C m A f U m A f G m C m A m s U m s U m - 3' (配列番号 20)

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

【請求項 12】

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

10

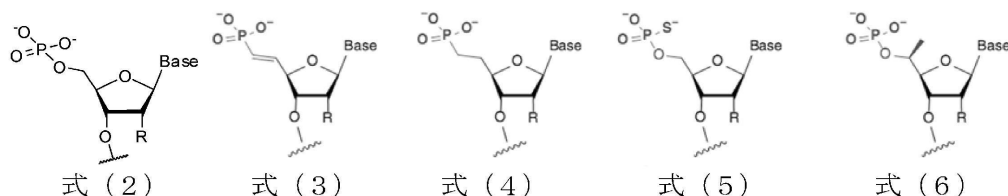
20

30

40

50

【化 1】



ただし、RはH、OH、メトキシ基又はフッ素から選択され、BaseはA、U、C、G又はTから選択される塩基を表す、請求項1に記載のsiRNA。

【請求項13】

前記siRNAがsiHBVS11、siHBVS12、siHBVS13、siHBVS14、siHBVS15、siHBVS16、siHBVS17又はsiHBVS18である、請求項1に記載のsiRNA：

siHBVS11

センス鎖：5' - UmGmCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm - 3' (配列番号9)

アンチセンス鎖：5' - P1 - UmAfGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmGmCm - 3' (配列番号21)

siHBVS12

センス鎖：5' - UmGmCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm - 3' (配列番号9)

アンチセンス鎖：5' - P1 - UmAfGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmUmUm - 3' (配列番号22)

siHBVS13

センス鎖：5' - UmGmCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm - 3' (配列番号12)

アンチセンス鎖：5' - P1 - UmAfGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmGmCm - 3' (配列番号23)

siHBVS14

センス鎖：5' - UmGmCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm - 3' (配列番号12)

アンチセンス鎖：5' - P1 - UmAfGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmUmUm - 3' (配列番号24)

siHBVS15

センス鎖：5' - UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm - 3' (配列番号15)

アンチセンス鎖：5' - P1 - UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsGmsCm - 3' (配列番号25)

siHBVS16

センス鎖：5' - UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm - 3' (配列番号15)

アンチセンス鎖：5' - P1 - UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsUmsUm - 3' (配列番号26)

siHBVS17

センス鎖：5' - UmsGmsCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm - 3' (配列番号18)

アンチセンス鎖：5' - P1 - UmsAfsGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsGmsCm - 3' (配列番号27)

siHBVS18

センス鎖：5' - UmsGmsCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm - 3' (配列番号18)

10

20

30

40

50

UmCmUmAm-3' (配列番号18)

アンチセンス鎖: 5'-P1-UmsAfsGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsUmsUm-3' (配列番号28)

ただし、大文字C、G、U、Aはヌクレオチドの塩基組成を表し、小文字mは、当該文字mの左側に隣接する1つのヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドであることを表し、小文字fは、当該文字fの左側に隣接する1つのヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであることを表し、小文字sは、当該文字の左右2個のヌクレオチド間がチオリン酸エステル基により結合されていることを表し、大文字P1は、当該文字の右側に隣接する1つのヌクレオチドが5'-リン酸ヌクレオチド又は5'-リン酸アナログ修飾ヌクレオチドであることを表す。

【請求項14】

請求項1に記載のsiRNA及び薬学的に許容可能な担体を含む、薬物組成物。

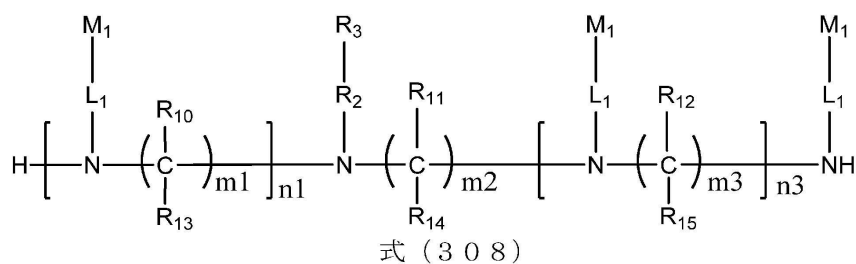
【請求項15】

請求項1に記載のsiRNA及び当該siRNAに複合して結合される複合基を含む、siRNA複合体。

【請求項16】

式(308)に示される構造を有する、請求項15に記載のsiRNA複合体:

【化2】



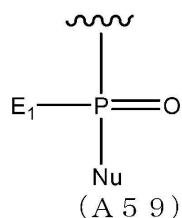
式中、

n1は、1～3から選択される整数であり、n3は、0～4から選択される整数であり、m1、m2及びm3は独立して、2～10から選択される整数であり、

R10、R11、R12、R13、R14及びR15がそれぞれ独立して、Hであり、又はC1-C10アルキル基、C1-C10ハロゲン化アルキル基及びC1-C10アルコキシ基からなる群から選択され、

R3は式A59に示される構造の基であり、

【化3】



式中、E1はOH、SH又はBH2であり、NuがsiRNAであり、

R2は、長さ1～20の炭素原子の直鎖アルキレン基であり、そのうちの1又は複数の炭素原子が、C(O)、NH、O、S、CH=N、S(O)2、C2-C10アルケニレン基、C2-C10アルキニレン基、C6-C10アリーレン基、C3-C18ヘテロシクリレン基及びC5-C10ヘテロアリーレン基からなる群から選択される1又は複数で任意に置換され、R2は、C1-C10アルキル基、C6-C10アリール基、C5-C10ヘテロアリール基、C1-C10ハロゲン化アルキル基、-OC1-C10アルキル基、-OC1-C10アルキルフェニル基、-C1-C10アルキル-OH、-OC1-C10ハロゲン化アルキル基、-SC1-C10アルキル基、-SC1-C10アルキルフェニル基、-

C_1-C_{10} アルキル-SH、 $-SC_1-C_{10}$ ハロゲン化アルキル基、ハロゲン置換基、 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-NH_2$ 、 $-C_1-C_{10}$ アルキル- NH_2 、 $-N(C_1-C_{10}$ アルキル基) $(C_1-C_{10}$ アルキル基)、 $-NH(C_1-C_{10}$ アルキル基)、シアノ基、ニトロ基、 $-CO_2H$ 、 $-C(O)O(C_1-C_{10}$ アルキル基)、 $-CON(C_1-C_{10}$ アルキル基) $(C_1-C_{10}$ アルキル基)、 $-CONH(C_1-C_{10}$ アルキル基)、 $-CONH_2$ 、 $-NHC(O)(C_1-C_{10}$ アルキル基)、 $-NHC(O)$ (フェニル基)、 $-N(C_1-C_{10}$ アルキル) $C(O)(C_1-C_{10}$ アルキル基)、 $-N(C_1-C_{10}$ アルキル) $C(O)$ (フェニル基)、 $-C(O)C_1-C_{10}$ アルキル基、 $-C(O)C_1-C_{10}$ アルキルフェニル基、 $-C(O)C_1-C_{10}$ ハロアルキル基、 $-OC(O)C_1-C_{10}$ アルキル基、 $-SO_2(C_1-C_{10}$ アルキル基)、 $-SO_2$ (フェニル基)、 $-SO_2(C_1-C_{10}$ ハロゲン化アルキル基)、 $-SO_2NH_2$ 、 $-SO_2NH(C_1-C_{10}$ アルキル基)、 $-SO_2NH$ (フェニル基)、 $-NH-SO_2(C_1-C_{10}$ アルキル基)、 $-NH-SO_2$ (フェニル基)及び $-NH-SO_2(C_1-C_{10}$ ハロゲン化アルキル基)からなる群のいずれか1つ又は複数の置換基を任意に有してもよく、

10

各 L_1 は、長さ1~70の炭素原子の直鎖アルキレン基であり、そのうちの1又は複数の炭素原子が、 $C(O)$ 、 NH 、 O 、 S 、 $CH=N$ 、 $S(O)_2$ 、 C_2-C_{10} アルケニレン基、 C_2-C_{10} アルキニレン基、 C_6-C_{10} アリーレン基、 C_3-C_{18} ヘテロシクリレン基及び C_5-C_{10} ヘテロアリーレン基からなる群から選択される1又は複数で任意に置換され、 L_1 は、 C_1-C_{10} アルキル基、 C_6-C_{10} アリール基、 C_5-C_{10} ヘテロアリール基、 C_1-C_{10} ハロゲン化アルキル基、 $-OC_1-C_{10}$ アルキル基、 $-OC_1-C_{10}$ アルキルフェニル基、 $-C_1-C_{10}$ アルキル- OH 、 $-OC_1-C_{10}$ ハロゲン化アルキル基、 $-SC_1-C_{10}$ アルキル基、 $-SC_1-C_{10}$ アルキルフェニル基、 $-C_1-C_{10}$ アルキル-SH、 $-SC_1-C_{10}$ ハロゲン化アルキル基、ハロゲン置換基、 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-NH_2$ 、 $-C_1-C_{10}$ アルキル- NH_2 、 $-N(C_1-C_{10}$ アルキル基) $(C_1-C_{10}$ アルキル基)、 $-NH(C_1-C_{10}$ アルキル基)、シアノ基、ニトロ基、 $-CO_2H$ 、 $-C(O)O(C_1-C_{10}$ アルキル基)、 $-CON(C_1-C_{10}$ アルキル基) $(C_1-C_{10}$ アルキル基)、 $-CONH(C_1-C_{10}$ アルキル基)、 $-CONH_2$ 、 $-NHC(O)(C_1-C_{10}$ アルキル基)、 $-NHC(O)$ (フェニル基)、 $-N(C_1-C_{10}$ アルキル) $C(O)(C_1-C_{10}$ アルキル基)、 $-N(C_1-C_{10}$ アルキル) $C(O)$ (フェニル基)、 $-C(O)C_1-C_{10}$ アルキル基、 $-C(O)C_1-C_{10}$ アルキルフェニル基、 $-C(O)C_1-C_{10}$ ハロアルキル基、 $-OC(O)C_1-C_{10}$ アルキル基、 $-SO_2(C_1-C_{10}$ アルキル基)、 $-SO_2$ (フェニル基)、 $-SO_2(C_1-C_{10}$ ハロゲン化アルキル基)、 $-SO_2NH_2$ 、 $-SO_2NH(C_1-C_{10}$ アルキル基)、 $-SO_2NH$ (フェニル基)、 $-NH-SO_2(C_1-C_{10}$ アルキル基)、 $-NH-SO_2$ (フェニル基)及び $-NH-SO_2(C_1-C_{10}$ ハロゲン化アルキル基)からなる群のいずれか1つ又は複数の置換基を任意に有してもよく、

20

30

~~~~~

は、基が分子の残りの部分に結合される部位を表し、

$M_1$ は標的基を表す。

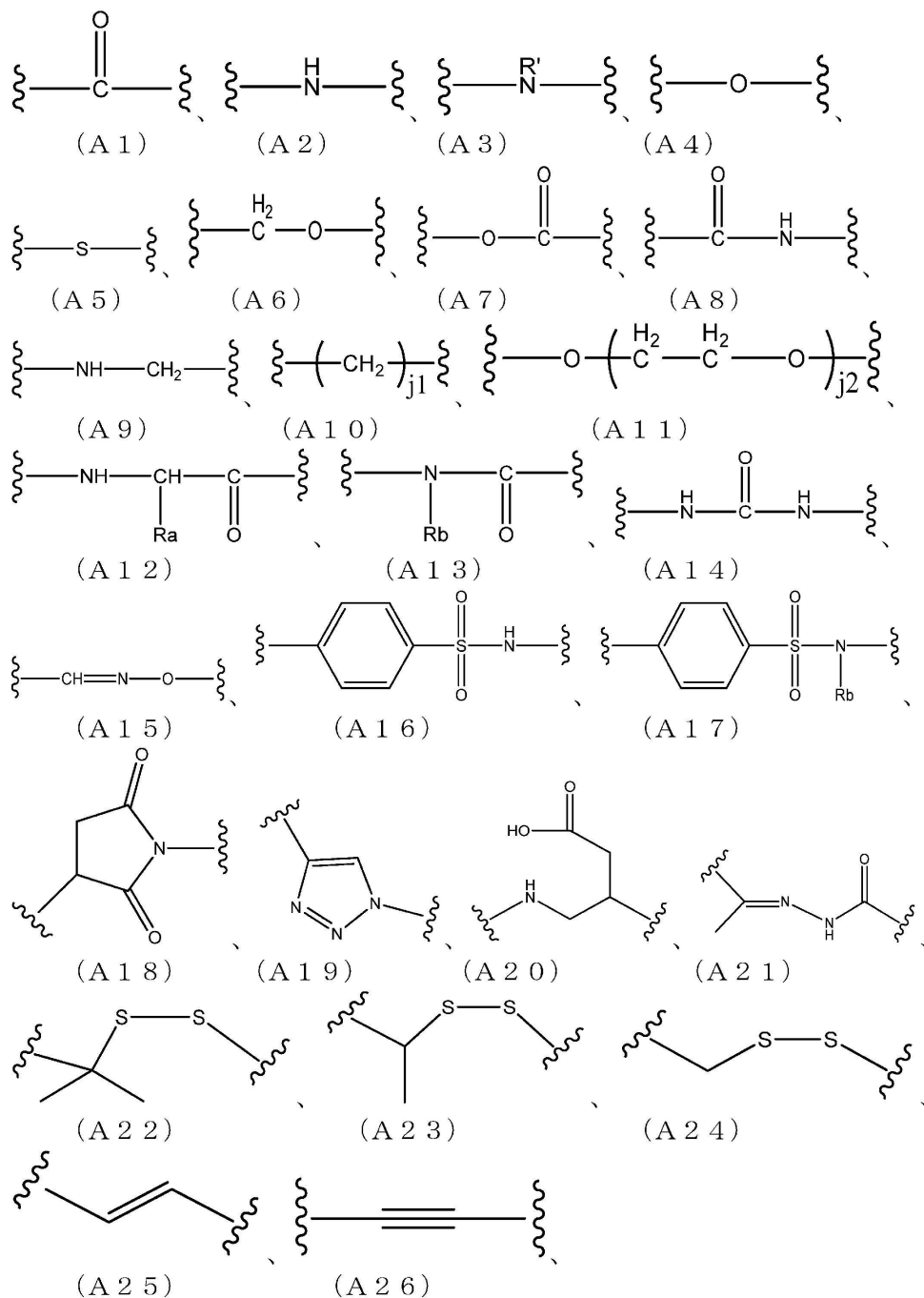
40

【請求項17】

各 $L_1$ が式A1~A26の基から独立して選択される1又は複数の結合の組合せであり、

50

## 【化 4】



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

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

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

10

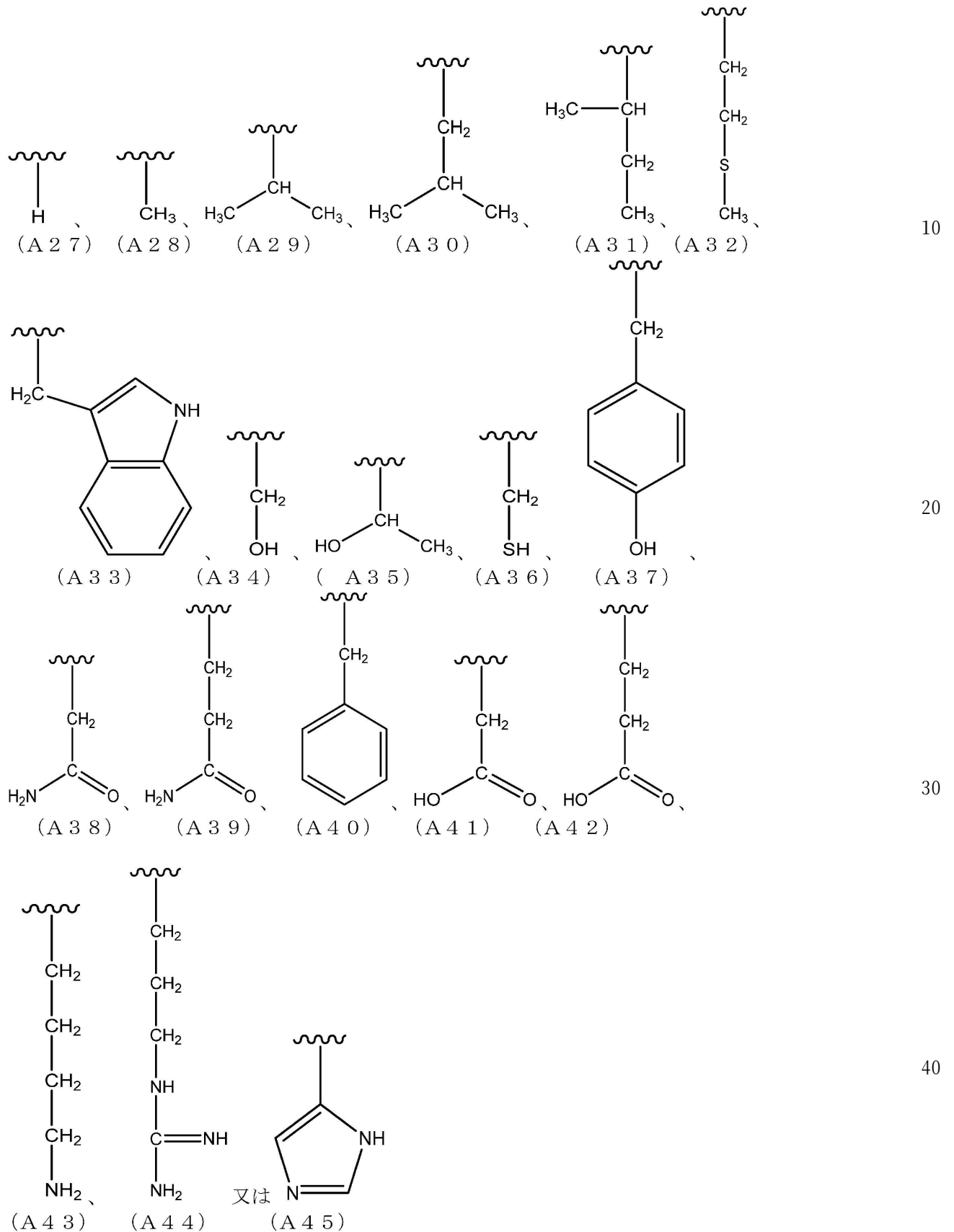
20

30

40

50

## 【化 5】



R bはC<sub>1</sub>－C<sub>10</sub>のアルキル基である、請求項16に記載のsiRNA複合体。

## 【請求項18】

L<sub>1</sub>が、A1、A4、A5、A6、A8、A10、A11、A13から選択される1又

は複数の結合の組合せである、又は、

$L_1$  が、A 1、A 4、A 8、A 10 及び A 11 から選択される少なくとも 2 つの結合の組合せである、請求項 16 に記載の s i R N A 複合体。

【請求項 19】

$L_1$  の長さが 3 ～ 25 個又は 4 ～ 15 個の原子である、請求項 17 に記載の s i R N A 複合体。

【請求項 20】

$m_1$ 、 $m_2$  及び  $m_3$  がそれぞれ独立して 2 ～ 5 の整数である、又は、 $m_1 = m_2 = m_3$  である、請求項 17 に記載の s i R N A 複合体。

【請求項 21】

各前記標的基が独立して哺乳動物の肝細胞表面のアシアロ糖タンパク質受容体 (A S G P R) と親和性のあるリガンドである、請求項 16 に記載の s i R N A 複合体。

【請求項 22】

各前記標的基が独立してアシアロ糖タンパク質又は糖である、請求項 21 に記載の s i R N A 複合体。

【請求項 23】

前記標的基の少なくとも 1 つ又は各々がガラクトース又は N - アセチルガラクトサミンである、請求項 21 に記載の s i R N A 複合体。

【請求項 24】

式 (403)、(404)、(405)、(406)、(407)、(408)、(409)、(410)、(411)、(412)、(413)、(414)、(415)、(416)、(417)、(418)、(419)、(420)、(421) 又は (422) に示される構造を有する、請求項 16 に記載の s i R N A 複合体。

10

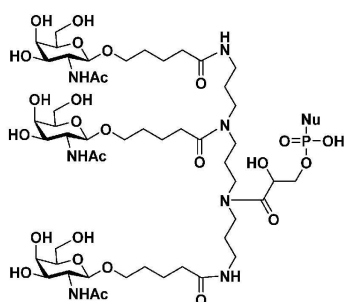
20

30

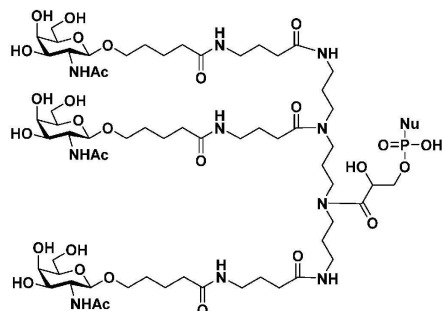
40

50

## 【化 6】

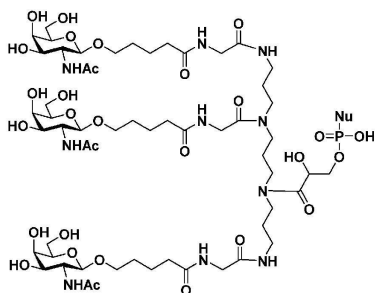


式 (403)

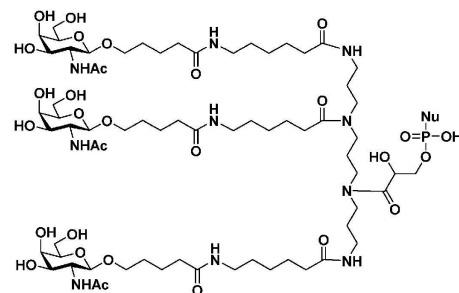


式 (404)

10

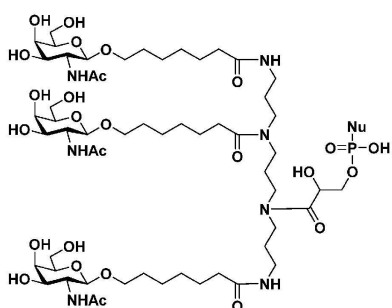


式 (405)

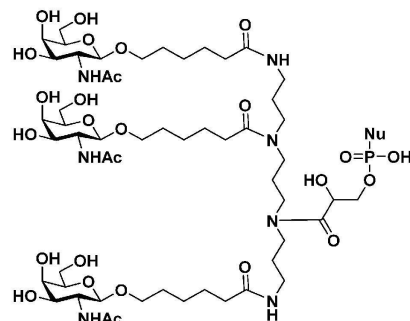


式 (406)

20

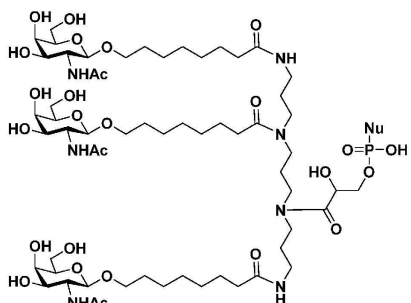


式 (407)

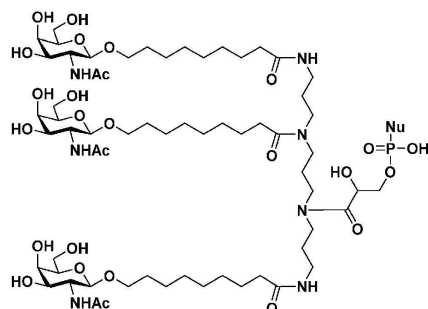


式 (408)

30



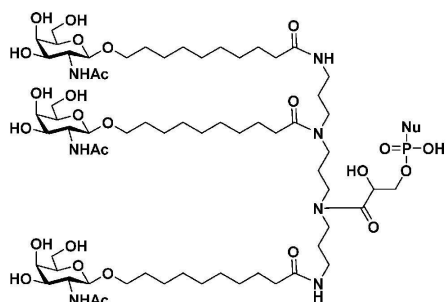
式 (409)



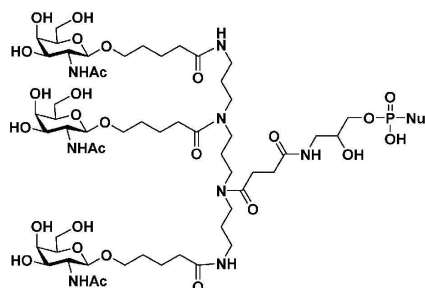
式 (410)

40

50

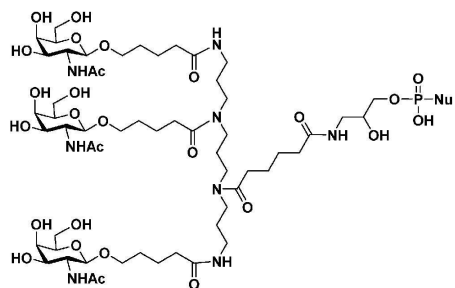


式 (411)

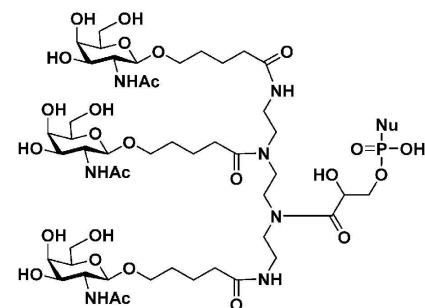


式 (412)

10

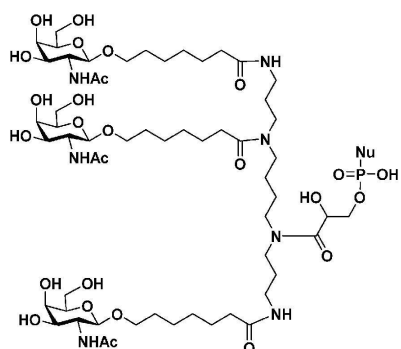


式 (413)

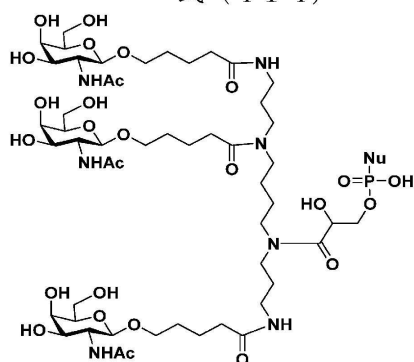


式 (414)

20

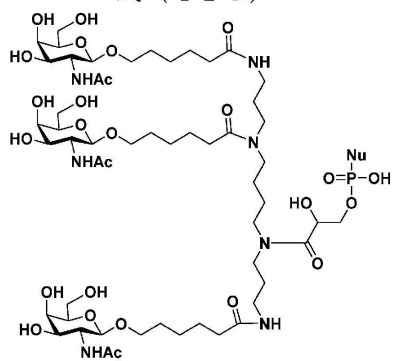


式 (415)

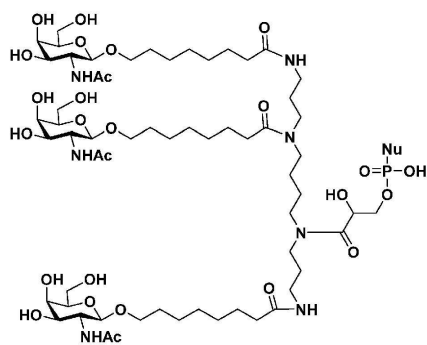


式 (416)

30



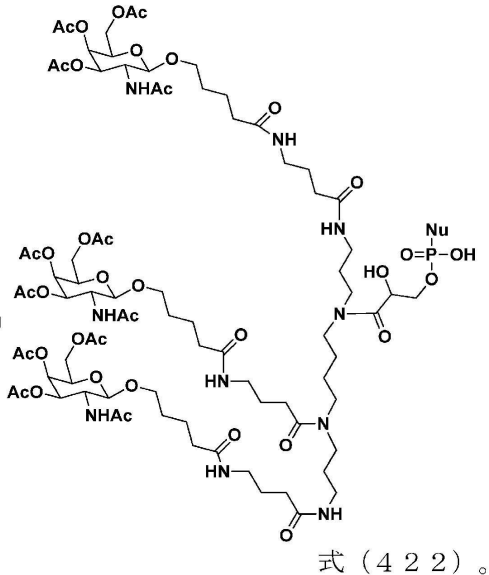
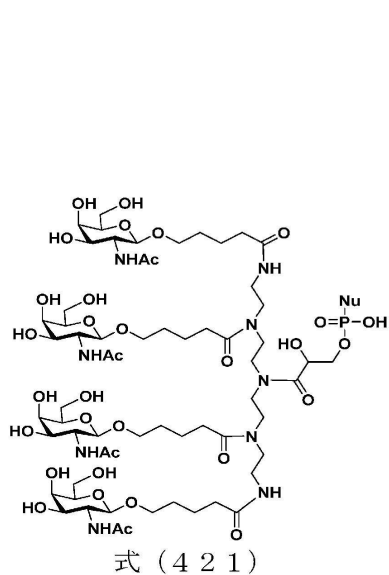
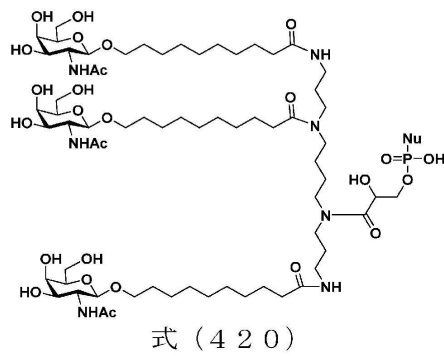
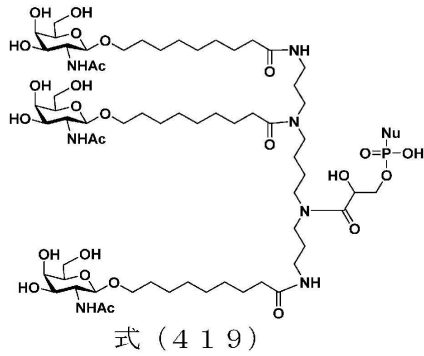
式 (417)



式 (418)

40

50



#### 【請求項 25】

式 A59 における P が前記 s i R N A のセンス鎖の 3' 末端に結合される、請求項 16 に記載の s i R N A 複合体。

#### 【請求項 26】

H B V の感染による病理学的状態又は疾患の治療及び／又は予防のための組成物であって、請求項 1 に記載の s i R N A 及び／又はそれを含む s i R N A 複合体を含有する、組成物。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【技術分野】

#### 【0001】

本開示は、核酸、当該核酸を含む組成物および複合体ならびに調製方法と使用に関する。

#### 【背景技術】

#### 【0002】

B 型ウイルス性肝炎（B 型肝炎とも呼ばれる）は、全世界、特に中国に深刻な脅威を与えている感染症である。現在全世界で公認されている B 型肝炎予防薬としては、インターフェロンとヌクレオシドアナログの 2 種類があるが、この 2 種類の薬物は、使用後薬剤耐性が発生しやすい又は使用に制限がある等の様々な欠点があり、例えば、インターフェロンは、副作用が発生しやすく、ヌクレオシド類薬物は、薬剤耐性および投薬中止後の再発という問題がある。したがって、遺伝子レベルでウイルスの遺伝子発現をサイレンシングし、H B V（B 型肝炎ウイルス）の生成と複製を遮断することにより、根本からウイルスの代謝と肝細胞への感染を低下させることができれば、最も理想的な B 型肝炎の治療手段となることは疑いない。また、低分子干渉 RNA（small interfering RNA、s i R N A）は、RNA 干渉（RNA interference、RNA i）

という機構に基づき、興味あるいずれかの目的とする遺伝子（例えば、がん等の疾患を誘発する遺伝子）の発現を配列特異的に抑制又は遮断し、疾患を治療する目的を達成することができる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

低分子RNA薬物の開発では、siRNAの安定化修飾及びその送達系は、2つのキー技術である。

【課題を解決するための手段】

【0004】

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

5'-UGCUAUGCCUCAUCUUCUZ-3'（配列番号1）、

5'-Z'AGAAAGAUAGGCAUAGCA-3'（配列番号2）、

ただし、ZはAであり、Z'はUであり、

前記ヌクレオチド配列Aに、位置がZに対応するヌクレオチドZ<sub>A</sub>が含まれ、前記ヌクレオチド配列Bに、位置がZ'に対応するヌクレオチドZ<sub>B</sub>'が含まれ、前記Z<sub>B</sub>'は、前記アンチセンス鎖の5'末端の1番目のヌクレオチドである。

【0005】

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

【0006】

いくつかの実施形態において、本開示は、本開示により提供されるsiRNA及び当該siRNAに複合して結合される複合基を含むsiRNA複合体（コンジュゲート）を提供する。

【0007】

いくつかの実施形態において、本開示は、本開示のsiRNA、及び／又は薬物組成物及び／又はsiRNA複合体の、B型肝炎ウイルスの感染による病理学的状態又は疾患の治療及び／又は予防のための薬物の調製への使用を提供する。

【0008】

いくつかの実施形態において、本開示は、本開示のsiRNA、及び／又は薬物組成物及び／又はsiRNA複合体の有効量を、それを必要とする被験体に投与することを含む、B型肝炎ウイルスの感染による病理学的状態又は疾患の治療及び／又は予防方法を提供する。

【0009】

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

【0010】

〔引用による組み込み〕

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

10

20

30

40

50

## 【図面の簡単な説明】

## 【0011】

【図1】複合体25及び複合体26の体外での抑制活性結果を示す。

【図2】複合体2の体外 p s i C H E C K 系における I C 5 0 及びオフターゲット効果の検出結果を示す。

【図3】被験 s i R N A 複合体の体外トリトソーム ( T r i t o s o m e ) における安定性の半定量的検出結果を示す。

【図4】被験 s i R N A 複合体の体外でのヒト血漿における安定性の半定量的検出結果を示す。

【図5】被験 s i R N A 複合体の体外でのサル血漿における安定性の半定量的検出結果を示す。

10

【図6】マウスにおける複合体1による H B V m R N A 発現に対する抑制結果を示す。

【図7】マウスにおける複合体2による H B V m R N A 発現に対する抑制結果を示す。

【図8】マウスにおける複合体1、複合体2及び比較複合体2による H B V m R N A 発現に対する抑制結果を示す。

【図9】前記被験 s i R N A 複合体の H B V トランスジェニックマウスにおける s i R N A の血清 H B s A g 発現量に対する時間関連性試験結果を示す。

【図10】1.28 c o p y マウスにおける複合体2の血清 H B s A g 発現量に対する時間関連性試験結果を示す。

【図11】1.28 c o p y マウスにおける複合体2の H B V D N A の抑制効率に対する時間関連性試験結果を示す。

20

## 【発明を実施するための形態】

## 【0012】

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

## 【0013】

## 定義

本開示において、H B V 遺伝子とは、D N A 配列が G e n b a n k 登録番号 N C \_ 0 0 3 9 7 7 . 1 に示される遺伝子を指す。

30

## 【0014】

文脈において、特に説明がない限り、大文字 C、G、U、A、T は、ヌクレオチドの塩基組成を表し、小文字 d は、当該文字 d の右側に隣接する1つのヌクレオチドがデオキシリボヌクレオチドであることを表し、小文字 m は、当該文字 m の左側に隣接する1つのヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドであることを表し、小文字 f は、当該文字 f の左側に隣接する1つのヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであることを表し、小文字 s は、当該文字 s の左右に隣接する2つのヌクレオチド間がチオリン酸エステル基により結合されていることを表し、P 1 は、当該 P 1 の右側に隣接する1つのヌクレオチドが 5' - リン酸ヌクレオチド又は 5' - リン酸アナログ修飾ヌクレオチド、特に、ビニルリン酸エステル修飾ヌクレオチド（以下の実施例において V P で表される）、5' - リン酸ヌクレオチド（以下の実施例において P で表される）又は 5' - チオリン酸エステル修飾ヌクレオチド（以下の実施例において P s で表される）であることを表す。

40

## 【0015】

文脈において、前記「フルオロ修飾ヌクレオチド」とは、ヌクレオチドのリボース基の 2' 位のヒドロキシ基がフッ素で置換されたヌクレオチドを指し、「非フルオロ修飾ヌクレオチド」とは、ヌクレオチドのリボース基の 2' 位のヒドロキシ基が非フッ素化基で置換されたヌクレオチド又はヌクレオチドアナログを指す。「ヌクレオチドアナログ」とは、核酸においてヌクレオチドの代わりとなることができるが、アデニンリボヌクレオチド、グアニンリボヌクレオチド、シトシンリボヌクレオチド、ウラシルリボヌクレオチド又はチミンデオキシリボヌクレオチドと構造が異なる基を指し、例えば、イソヌクレオチド、架

50

橋ヌクレオチド (bridged nucleic acid、BNAと略称される) 又は非環式ヌクレオチドがある。前記「メトキシ修飾ヌクレオチド」とは、リボース基の2'-ヒドロキシ基がメトキシで置換されたヌクレオチドを指す。

#### 【0016】

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

#### 【0017】

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

#### 【0018】

文脈において、一方のヌクレオチド配列と他方のヌクレオチド配列に「ヌクレオチド差異」が存在するとは、前者が後者に比べて、同じ位置のヌクレオチドの塩基種類が変化したことを指し、例えば、後者において1つのヌクレオチド塩基がAであるとき、前者の同じ位置での、対応するヌクレオチド塩基がU、C、G又はTである場合に、当該位置で2つのヌクレオチド配列間にヌクレオチド差異が存在すると認められている。いくつかの実施形態において、元の位置のヌクレオチドの代わりに無塩基ヌクレオチド又はその等価物を用いる場合、当該位置でヌクレオチド差異が生じたとも考えられる。

#### 【0019】

文脈において、特に本開示の複合分子の調製方法又はsiRNA複合体の調製方法を説明する際に、特に説明がない限り、前記ヌクレオシドモノマー (nucleoside monomer) とは、調製するsiRNA又はsiRNA複合体におけるヌクレオチドの種類と順序に応じてホスホルアミダイト固相合成に用いられる修飾又は未修飾のヌクレオシドホスホルアミダイトモノマー (unmodified or modified RNA phosphoramidites。RNA phosphoramiditesをNucleoside phosphoramiditesともいうことがある) を指す。ホスホルアミダイト固相合成は、当業者に公知のRNA合成に用いられる方法である。本開示に用いられるヌクレオシドモノマーは、いずれも市販品として購入可能である。

#### 【0020】

本明細書で用いられる場合、2つのアルファベット文字間又は記号間のものでないダッシュ (「-」) は、置換基の結合点の位置を示すために用いられている。例えば、-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>アルキル-NH<sub>2</sub>は、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>アルキル基により結合する。

#### 【0021】

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

10

20

30

40

50

いと、当業者に理解される。

【0022】

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

10

【0023】

本明細書で用いられる場合、「アルケニル」とは、少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を有する不飽和分岐鎖又は直鎖アルキルを指し、前記炭素-炭素二重結合は、親アルキルの隣接する炭素原子から1つの水素分子を除去することにより得られる。当該基は、二重結合のシス又はトランス配置にあってもよい。典型的なアルケニルとしては、ビニルと、プロパー1-エン-1-イル、プロパー1-エン-2-イル、プロパー2-エン-1-イル（アリル）、プロパー2-エン-2-イル等のプロペニルと、ブター1-エン-1-イル、ブター1-エン-2-イル、2-メチルプロパー1-エン-1-イル、ブター2-エン-1-イル、ブター2-エン-2-イル、ブター1, 3-ジエン-1-イル、ブター1, 3-ジエン-2-イル等のブテニルと、を含むが、これらに限定されない。ある実施形態において、アルケニルは、2～20個の炭素原子を有するが、他の実施形態において、2～10個、2～8個又は2～6個の炭素原子を有する。アルケニレンは、アルケニルのサブセットであり、アルケニルと同じであるが2つの結合点を有する残基を指す。

20

【0024】

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

30

【0025】

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

40

【0026】

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

【0027】

50

本明細書で用いられる場合、「シクロアルキル」とは、通常 3～7 個の環状炭素原子を有する非芳香族炭素環を指す。環は、飽和であってもよいし、1 又は複数の炭素-炭素二重結合を有してもよい。シクロアルキルの実例としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロペンテニル、シクロヘキシル及びシクロヘキセニル、並びにノルボルナン (norbornane) 等の架橋及びカゴ状環状基を含む。

【0028】

本明細書で用いられる場合、「ハロゲン化」又は「ハロ」とは、フルオロ、クロロ、ブロモ及びヨードを指し、用語「ハロゲン」は、フッ素、塩素、臭素及びヨウ素を含む。

【0029】

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

【0030】

「複素環基」とは、2～12 個の炭素原子と、窒素、酸素及び硫黄から選択される 1～6 個のヘテロ原子とを含む、安定した 3～18 員非芳香族環状基を指す。明細書において特に説明がない限り、複素環基は、単環、二環、三環又は四環系であり、縮合環又は架橋環系を含んでもよい。複素環式ラジカルにおけるヘテロ原子は、任意に酸化されてもよい。1 又は複数の窒素原子（存在する場合）は、任意に 4 級化される。複素環基は、一部飽和又は完全飽和である。複素環基は、環の任意の原子を介して分子の残りの部分に結合することができる。このような複素環基の実例としては、ジオキサニル、チオフェニル [1, 3] ジスルホニル、デカヒドロイソキノリニル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、イソチアゾリジニル、イソオキサゾリジニル、モルホリニル、オクタヒドロインドール、オクタヒドロイソインドール、2-オキサピペラジニル、2-オキサピペリジニル、2-オキサピリミジニル、オキサゾリジニル、ピペリジニル、ピペラジニル、4-ピペリドニル、ピロリジニル、ピラゾリジニル、キヌクリジニル、チアゾリジニル、テトラヒドロフリル、トリスルホニル、テトラヒドロピラニル、チオモルホリニル、チアモルホリニル、1-オキソチオモルホリニル及び 1, 1-ジオキソチオモルホリニルを含むが、これらに限定されない。

【0031】

「ヘテロアリール」とは、2 個～17 個の炭素原子と、窒素、酸素及び硫黄から選択される 1～6 個のヘテロ原子とを含む、3～18 員芳香環ラジカルから誘導される基を指す。本明細書で用いられる場合、ヘテロアリールは、単環、二環、三環又は四環系であってもよく、この環系中の環の少なくとも 1 つは完全不飽和であり、即ち、それは、ヒュッケル理論に従う環状非局在化 ( $4n+2$ )  $\pi$ -電子系を含む。ヘテロアリールは、縮合環又は架橋環系を含む。ヘテロアリールにおけるヘテロ原子は任意に酸化される。1 又は複数の窒素原子（存在する場合）は、任意に 4 級化される。ヘテロアリールは、環中の任意の原子を介して分子の残りの部分に結合する。ヘテロアリールの実例としては、アゼピニル、アクリジニル、ベンゾイミダゾリル、ベンゾインドール、1, 3-ベンゾジオキサゾリル、ベンゾフリル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾ [d] チアゾリル、ベンゾチアジアゾリル、ベンゾ [b] [1, 4] ジオキサゾリル、ベンゾ [b] [1, 4] オキサゾリル、1, 4-ベンゾジオキサゾリル、ベンゾナフトフリル、ベンゾジアゾリル、ベンゾジオキサフェニル (benzodioxaphenyl)、ベンゾピラニル、ベンゾピラノニル (benzopyranonyl)、ベンゾフリル、ベンゾフラノニル、ベンゾチオフェニル、ベンゾチエノ [3, 2-d] ピリミジニル、ベンゾトリアゾリル、ベンゾ [4, 6] イミダゾ [1, 2-a] ピリジニル、カルバゾリル、シンノリル、シクロペンタ [d] ピリミジニル、6, 7-ジヒドロ-5H-シクロペンタ [4, 5] チエノ [2, 3-d] ピリミジニル、5, 6-ジヒドロベンゾ [h] キナゾリニル、5, 6-ジヒドロベンゾ [h] シンノリニル、6, 7-ジヒドロ-5H-ベンゾ [6, 7] シクロヘプタ [1, 2-c] ピリダジニル、ジベンゾフリル、ジベンゾチオフェニル、フリル、フラノニル、フロ [

10

20

30

40

50

3, 2-c] ピリジル、5, 6, 7, 8, 9, 10-ヘキサヒドロシクロヘプタ [d] ピリミジニル、5, 6, 7, 8, 9, 10-ヘキサヒドロシクロオクタ [d] ピリダジニル、5, 6, 7, 8, 9, 10-ヘキサヒドロシクロオクタ [d] ピリジル、イソチアゾリル、インダゾリル、イミダゾリル、インドール、イソインドール、インドリニル、イソインドリニル、イソキノリル、インドリジニル、イソオキサゾリル、5, 8-メタノ-5, 6, 7, 8-テトラヒドロキナゾリニル、ナフチリジノニル、1, 6-ナフチリジノニル、オキサジアゾリル、2-オキサアゼピニル、オキサゾリル、オキシラニル、5, 6, 6a, 7, 8, 9, 10, 10a-オクタヒドロベンゾ [H] キナゾリニル、1-フェニル-1H-ピロリル、フェナジニル、フェノチアジニル、フェノキサジニル、フタロイル、プテリジニル、プリニル、ピロリル、ピラゾリル、ピラゾロ [3, 4-d] ピリミジニル、ピリジル、ピリド [3, 2-d] ピリミジニル、ピリド [3, 4-d] ピリミジニル、ピラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、ピロリル、キナゾリニル、キノキサリニル、キノリル、イソキノリル、テトラヒドロキノリル、5, 6, 7, 8-テトラヒドロキナゾリニル、5, 6, 7, 8-テトラヒドロベンゾ [4, 5] チエノ [2, 3-d] ピリミジニル、6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-5H-シクロヘプタ [4, 5] チエノ [2, 3-d] ピリミジニル、5, 6, 7, 8-テトラヒドロピリド [4, 5-c] ピリダジニル、チアゾリル、チアジアゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、トリアジニル、チエノ [2, 3-d] ピリミジニル、チエノ [3, 2-d] ピリミジニル、チエノ [2, 3-c] プリジニル及びチオフェニルを含むが、これらに限定されない。

#### 【0032】

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

#### 【0033】

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

#### 【0034】

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

## 【0035】

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

## 【0036】

## &lt; s i R N A &gt;

本開示は、B型肝炎ウイルス遺伝子発現を抑制できる s i R N A を提供する。

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

## 【0037】

C N 1 0 2 1 4 0 4 5 8 B には、H B V 遺伝子を特異的に抑制する s i R N A が開示されており、当該 s i R N A の複数種の化学修飾戦略について研究している。当該研究により、修飾戦略が異なると、s i R N A の安定性、生物活性及び細胞毒性等の指標に与える影響が全く異なることが見出された。当該研究では、7種類の有効な修飾方法を実証し、そのうちの1つの修飾方法で得られた s i R N A は未修飾 s i R N A に比べて、血液安定性を向上させるとともに、未修飾 s i R N A と基本的に同等の抑制活性を維持する。

## 【0038】

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

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

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

ただし、Z は A であり、Z' は U であり、

前記ヌクレオチド配列 A に、位置が Z に対応するヌクレオチド Z<sub>A</sub> が含まれ、前記ヌクレオチド配列 B に、位置が Z' に対応するヌクレオチド Z<sub>B</sub>' が含まれ、前記 Z<sub>B</sub>' は、前記アンチセンス鎖の 5' 末端の 1 番目のヌクレオチドである。

## 【0039】

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

## 【0040】

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

## 【0041】

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

## 【0042】

いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列 B と配列番号 2 に示されるヌクレ

オチド配列との間のヌクレオチド差異は、 $Z_B$ の位置での差異を含み、 $Z_B$ が、A、C又はGから選択される。いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド差異は、 $Z_B$ の位置での差異であり、 $Z_B$ がA、C又はGから選択され、 $Z_A$ は、 $Z_B$ と相補的なヌクレオチドである。これらのヌクレオチド差異により、*siRNA*複合体による標的遺伝子抑制能力を顕著に低下させることがなく、これらのヌクレオチド差異を含む*siRNA*複合体も、本開示の保護範囲内にある。

#### 【0043】

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

10

#### 【0044】

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

5'-UGCUAUGCCUCAUCUUCU $\Delta$ -3' (配列番号3)、

5'- $Z_B$ 'AGAAGAUGAGGCAUAGCA-3' (配列番号4)

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

20

#### 【0045】

且つ、前記センス鎖とアンチセンス鎖とは、長さが同じか又は異なり、前記センス鎖の長さが19~23ヌクレオチドであり、アンチセンス鎖の長さが20~26ヌクレオチドである。このように、本開示により提供される*siRNA*のセンス鎖とアンチセンス鎖の長さ比が、 $19/20$ 、 $19/21$ 、 $19/22$ 、 $19/23$ 、 $19/24$ 、 $19/25$ 、 $19/26$ 、 $20/20$ 、 $20/21$ 、 $20/22$ 、 $20/23$ 、 $20/24$ 、 $20/25$ 、 $20/26$ 、 $21/20$ 、 $21/21$ 、 $21/22$ 、 $21/23$ 、 $21/24$ 、 $21/25$ 、 $21/26$ 、 $22/20$ 、 $22/21$ 、 $22/22$ 、 $22/23$ 、 $22/24$ 、 $22/25$ 、 $22/26$ 、 $23/20$ 、 $23/21$ 、 $23/22$ 、 $23/23$ 、 $23/24$ 、 $23/25$ 又は $23/26$ であってもよい。いくつかの実施形態において、前記*siRNA*のセンス鎖とアンチセンス鎖の長さ比は $19/21$ 、 $21/23$ 又は $23/25$ である。

30

#### 【0046】

本開示の1つの実施形態によれば、前記センス鎖とアンチセンス鎖とは、長さが同じであり、前記ヌクレオチド配列Iは、ヌクレオチド配列IIをさらに含み、前記ヌクレオチド配列IIは、ヌクレオチド配列IVをさらに含み、ヌクレオチド配列IIIとヌクレオチド配列IVは、長さがそれぞれ独立して1~4ヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列IIIは、ヌクレオチド配列Aの5'末端に結合され、前記ヌクレオチド配列IVは、ヌクレオチド配列Bの3'末端に結合され、前記ヌクレオチド配列IIIと前記ヌクレオチド配列IVは、長さが等しい。

40

#### 【0047】

前記ヌクレオチド配列IIIとヌクレオチド配列IVは、相補的であってもよく、相補的でなくてもよく、*siRNA*の安定性を向上させるために、いくつかの実施形態において、ヌクレオチド配列IIIとヌクレオチド配列IVは、少なくとも一部で相補的であり、いくつかの実施形態において、ヌクレオチド配列IIIとヌクレオチド配列IVは、80%以上又は90%以上の塩基が相補的であり、いくつかの実施形態において、ヌクレオチド配列IIIとヌクレオチド配列IVは、実質的に完全に逆相補的又は完全に逆相補的である。前記実質的に完全に逆相補的であるとは、2つのヌクレオチド配列間に1つ以下の塩基ミスマッチが存在することを指し、完全に逆相補的であるとは、2つのヌクレオチ

50

ド配列間にミスマッチがないことを指し、いくつかの実施形態において、ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠとヌクレオチド配列ⅠⅤは完全に逆相補的である。これにより、前記 s i R N A のセンス鎖とアンチセンス鎖は、長さが等しく、その長さ比が  $20/20$ 、 $21/21$ 、 $22/22$  又は  $23/23$  である。いくつかの実施形態において、前記 s i R N A のセンス鎖とアンチセンス鎖の長さ比が  $21/21$  又は  $23/23$  である。

【0048】

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

【0049】

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

【0050】

いくつかの実施形態において、前記センス鎖とアンチセンス鎖は、長さが異なり、前記ヌクレオチド配列ⅠⅠは、ヌクレオチド配列Ⅴをさらに含み、ヌクレオチド配列Ⅴは、長さが1~3ヌクレオチドであり、前記アンチセンス鎖の3'末端に結合され、アンチセンス鎖の3'オーバーハング末端を構成する。これにより、本開示により提供される s i R N A のセンス鎖とアンチセンス鎖の長さ比が、 $19/20$ 、 $19/21$ 、 $19/22$ 、 $20/21$ 、 $20/22$ 、 $20/23$ 、 $21/22$ 、 $21/23$ 、 $21/24$ 、 $22/23$ 、 $22/24$ 、 $22/25$ 、 $23/24$ 、 $23/25$  又は  $23/26$  であってもよい。いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列Ⅴは、長さが2ヌクレオチドであり、これにより、本開示により提供される s i R N A のセンス鎖とアンチセンス鎖の長さ比が、 $19/21$ 、 $21/23$  又は  $23/25$  であってもよい。

【0051】

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

【0052】

いくつかの実施形態において、前記 s i R N A のセンス鎖は、配列番号3に示されるヌクレオチド配列を含み、前記 s i R N A のアンチセンス鎖は、配列番号5に示されるヌク

10

20

30

40

50

レオチド配列を含み、

5' - UGCUAUGCCUCAUCUUCU $\Delta$ -3' (配列番号3)、

5' - Z<sub>B</sub>'AGAAGAUGAGGCAUAGCAGC-3' (配列番号5)

或いは、前記 s i R N A のセンス鎖は、配列番号3に示されるヌクレオチド配列を含み、前記 s i R N A のアンチセンス鎖は、配列番号6に示されるヌクレオチド配列を含み、

5' - UGCUAUGCCUCAUCUUCU $\Delta$ -3' (配列番号3)、

5' - Z<sub>B</sub>'AGAAGAUGAGGCAUAGCAUU-3' (配列番号6)

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

【0053】

本開示のいくつかの具体的な実施例によれば、本開示に記載された s i R N A は s i H B V S 1 又は s i H B V S 2 である。

s i H B V S 1

センス鎖：5' - UGCUAUGCCUCAUCUUCUZ-3' (配列番号1)

アンチセンス鎖：5' - Z'AGAAGAUGAGGCAUAGCAGC-3' (配列番号7)

s i H B V S 2

センス鎖：5' - UGCUAUGCCUCAUCUUCUZ-3' (配列番号1)

アンチセンス鎖：5' - Z'AGAAGAUGAGGCAUAGCAUU-3' (配列番号8)。

【0054】

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

【0055】

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

【0056】

いくつかの実施形態において、本開示により提供される s i R N A のセンス鎖又は前記アンチセンス鎖は、少なくとも1つのヌクレオチドが修飾ヌクレオチドであり、及び／又は少なくとも1つのリン酸エステル基が、修飾基を有するリン酸エステル基である。言い換えれば、前記センス鎖と前記アンチセンス鎖において少なくとも1本の一本鎖のリン酸-糖骨格中のリン酸エステル基及び／又はリボース基の少なくとも一部は、修飾基を有するリン酸エステル基及び／又は修飾基を有するリボース基である。

【0057】

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

## 【0058】

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

## 【0059】

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

10

## 【0060】

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

## 【0061】

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

20

## 【0062】

本開示の文脈において、「フルオロ修飾ヌクレオチド」とは、ヌクレオチドのリボース基の2'位のヒドロキシ基がフッ素で置換された、以下の式(101)に示される構造を有するヌクレオチドを指す。「非フルオロ修飾ヌクレオチド」とは、ヌクレオチドのリボース基の2'位のヒドロキシ基が非フッ素化基で置換されたヌクレオチド又はヌクレオチドアナログを指す。いくつかの実施形態において、各非フルオロ修飾ヌクレオチドは、ヌクレオチドのリボース基の2'位のヒドロキシ基が非フッ素化基で置換されたヌクレオチド又はヌクレオチドアナログのいずれかから独立して選択される1つである。

30

## 【0063】

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

## 【0064】

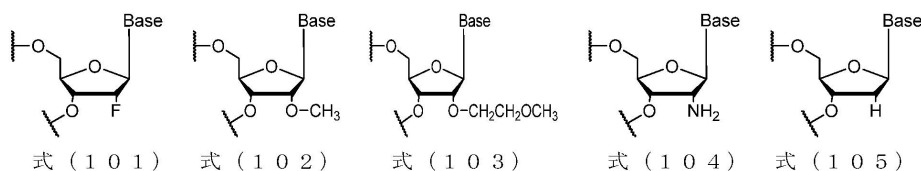
いくつかの実施形態において、2'-アルコキシ修飾ヌクレオチドは、式(102)に示される、メトキシ修飾ヌクレオチド(2'-OMe)である。2'-置換アルコキシ修飾ヌクレオチドは、例えば、式(103)に示される2'-O-メトキシエチル修飾ヌクレオチド(2'-MOE)であってよい。2'-アミノ修飾ヌクレオチド(2'-NH<sub>2</sub>)は式(104)に示される。2'-デオキシヌクレオチド(DNA)は式(105)に示される。

40

## 【0065】

50

## 【化 1】



## 【0066】

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

10

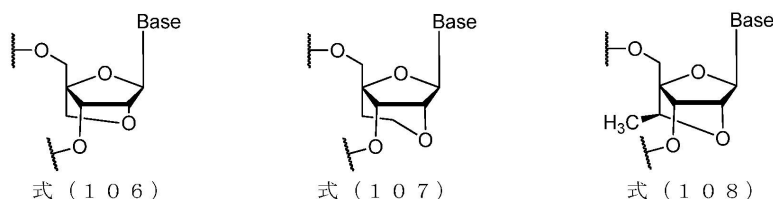
## 【0067】

BNAとは、拘束された又は近づけないヌクレオチドを指す。BNAは、五員環、六員環、又は七員環の、「固定された」C3'-エンド糖パッカリングを有する架橋構造を含んでもよい。通常当該橋を当該リボースの2'-、4'-位に導入して2', 4'-BNAヌクレオチド、例えば、式(106)に示されるLNA、式(107)に示されるENA、式(108)に示されるcET BNA等を提供する。

20

## 【0068】

## 【化 2】



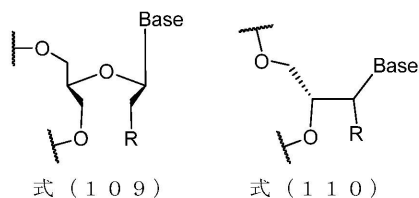
## 【0069】

非環式ヌクレオチドは、ヌクレオチドの糖環が開環されたヌクレオチド、例えば、式(109)に示されるアンロックド核酸 (UNA)、又は式(110)に示されるグリセロール核酸 (GNA) であってもよい。

30

## 【0070】

## 【化 3】



40

## 【0071】

上記式(109)及び式(110)中、Rは、H、OH又はアルコキシ (O-アルキル) から選択される。

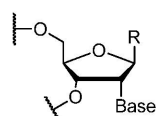
## 【0072】

イソヌクレオチドとは、ヌクレオチドにおいて塩基のリボース環における位置が変化した化合物を指し、例えば、式(111)又は(112)に示される、塩基がリボース環の1'-位から2'-位又は3'-位に移行した化合物であってもよい。

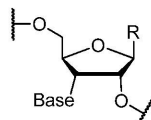
## 【0073】

50

## 【化 4】



式 (111)



式 (112)

## 【0074】

上記式 (111) ~ 式 (112) の化合物において、Base は、A、U、G、C 又は T 等の塩基を表し、R は、H、OH、F 又は上述した非フッ素化基から選択される。

10

## 【0075】

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

## 【0076】

文脈において、「フルオロ修飾ヌクレオチド」、「2'-フルオロ修飾ヌクレオチド」、「リボース基の 2'-ヒドロキシ基がフッ素で置換されたヌクレオチド」及び「2'-フルオロリボース基」は、意味が同じであり、いずれもヌクレオチドの 2'-ヒドロキシ基がフッ素で置換された、式 (207) に示される構造を有する化合物を指し、「メトキシ修飾ヌクレオチド」、「2'-メトキシ修飾ヌクレオチド」、「リボース基の 2'-ヒドロキシ基がメトキシで置換されたヌクレオチド」及び「2'-メトキシリボース基」は、意味が同じであり、いずれもヌクレオチドのリボース基の 2'-ヒドロキシ基がメトキシで置換された、式 (208) に示される構造を有する化合物を指す。

20

## 【0077】

いくつかの実施形態において、本開示の siRNA は、以下の修飾を有する siRNA である。すなわち、5'末端から 3'末端に向かって、前記センス鎖において、前記ヌクレオチド配列 A の第 7、8、9 位又は第 5、7、8、9 位のヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであり、前記センス鎖において他の位置のヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドであり、前記アンチセンス鎖において、前記ヌクレオチド配列 B の第 2、6、14、16 位又は第 2、6、8、9、14、16 位のヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであり、前記アンチセンス鎖において他の位置のヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドである。

30

## 【0078】

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

40

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

50

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

【0079】

言い換えれば、当該*s i R N A*のリン酸-糖骨格中のリボース基は、それぞれ以下の修飾基を有する。5'末端から3'末端に向かって、前記*s i R N A*のセンス鎖におけるヌクレオチド配列Aの第5、7、8及び9位のグリコシル基が2'-フルオロリボース基であり、*s i R N A*のセンス鎖の他の位置のヌクレオチドのグリコシル基が2'-メトキシリボース基であり、また、5'末端から3'末端に向かって、前記*s i R N A*のアンチセンス鎖におけるヌクレオチド配列Bの第2、6、8、9、14及び16位のグリコシル基が2'-フルオロリボース基であり、*s i R N A*のアンチセンス鎖の他の位置のヌクレオチドのグリコシル基が2'-メトキシリボース基であり、

或いは、5'末端から3'末端に向かって、前記*s i R N A*のセンス鎖におけるヌクレオチド配列Aの第5、7、8及び9位のグリコシル基が2'-フルオロリボース基であり、*s i R N A*のセンス鎖の他の位置のヌクレオチドのグリコシル基が2'-メトキシリボース基であり、また、5'末端から3'末端に向かって、前記*s i R N A*のアンチセンス鎖におけるヌクレオチド配列Bの第2、6、14及び16位のグリコシル基が2'-フルオロリボース基であり、*s i R N A*のアンチセンス鎖の他の位置のヌクレオチドのグリコシル基が2'-メトキシリボース基であり、

或いは、5'末端から3'末端に向かって、前記*s i R N A*のセンス鎖におけるヌクレオチド配列Aの第7、8及び9位のグリコシル基が2'-フルオロリボース基であり、*s i R N A*のセンス鎖の他の位置のヌクレオチドのグリコシル基が2'-メトキシリボース基であり、また、5'末端から3'末端に向かって、前記*s i R N A*のアンチセンス鎖におけるヌクレオチド配列Bの第2、6、14及び16位のグリコシル基が2'-フルオロリボース基であり、*s i R N A*のアンチセンス鎖の他の位置のヌクレオチドのグリコシル基が2'-メトキシリボース基である。

【0080】

いくつかの実施形態において、本開示により提供される*s i R N A*は、*s i H B V S 3*、*s i H B V S 4*、*s i H B V S 5*又は*s i H B V S 6*である。

*s i H B V S 3*

センス鎖：5'-UmGmCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm-3'（配列番号9）

アンチセンス鎖：5'-UmAfGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmGmCm-3'（配列番号10）

*s i H B V S 4*

センス鎖：5'-UmGmCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm-3'（配列番号9）

アンチセンス鎖：5'-UmAfGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmUmUm-3'（配列番号11）

*s i H B V S 5*

センス鎖：5'-UmGmCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm-3'（配列番号12）

アンチセンス鎖：5'-UmAfGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmGmCm-3'（配列番号13）

*s i H B V S 6*

センス鎖：5'-UmGmCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm-3'（配列番号14）

CmUmAm-3' (配列番号12)

アンチセンス鎖: 5'-UmAfGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmUmUm-3' (配列番号14)

ただし、大文字C、G、U、Aはヌクレオチドの塩基組成を表し、小文字mは、当該文字mの左側に隣接する1つのヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドであることを表し、小文字fは、当該文字fの左側に隣接する1つのヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであることを表す。

【0081】

上記修飾を有するsiRNAは、コストが低だけでなく、血中のリボヌクレアーゼで核酸を切断しにくくことができ、これにより、核酸の安定性を向上させ、核酸により強いヌクレアーゼ加水分解耐性という性能を持たせることができる。

10

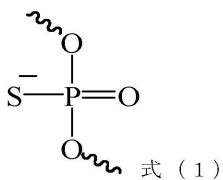
【0082】

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

【0083】

20

【化5】



【0084】

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

30

【0085】

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

40

前記センス鎖の5'末端(末端端部)から1番目のヌクレオチドと2番目のヌクレオチドとの間、

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

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

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

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

、

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

、

50

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

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

#### 【0086】

いくつかの実施形態において、当該 siRNA のセンス鎖の 5' 末端から 1 番目のヌクレオチドと 2 番目のヌクレオチドとの間、当該 siRNA のセンス鎖の 5' 末端から 2 番目のヌクレオチドと 3 番目のヌクレオチドとの間、当該 siRNA のアンチセンス鎖の 5' 末端から 1 番目のヌクレオチドと 2 番目のヌクレオチドとの間、当該 siRNA のアンチセンス鎖の 5' 末端から 2 番目のヌクレオチドと 3 番目のヌクレオチドとの間、当該 siRNA のアンチセンス鎖の 3' 末端から 1 番目のヌクレオチドと 2 番目のヌクレオチドとの間、及び当該 siRNA のアンチセンス鎖の 3' 末端から 2 番目のヌクレオチドと 3 番目のヌクレオチドとの間は、いずれもチオリン酸エステル基により結合されている。

#### 【0087】

いくつかの実施形態において、本開示により提供される siRNA は、siHBVS7、siHBVS8、siHBVS9 又は siHBVS10 である。

##### siHBVS7

センス鎖：5' - Ums Gms CmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm - 3' (配列番号 15)

アンチセンス鎖：5' - Ums Afs GmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfgmCmAms Gms Cm - 3' (配列番号 16)

##### siHBVS8

センス鎖：5' - Ums Gms CmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm - 3' (配列番号 15)

アンチセンス鎖：5' - Ums Afs GmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfgmCmAms Ums Um - 3' (配列番号 17)

##### siHBVS9

センス鎖：5' - Ums Gms CmUmA fUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm - 3' (配列番号 18)

アンチセンス鎖：5' - Ums Afs GmAmAmGfAmU fGfAmGmGmCmAfUmAfgmCmAms Gms Cm - 3' (配列番号 19)

##### siHBVS10

センス鎖：5' - Ums Gms CmUmA fUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm - 3' (配列番号 18)

アンチセンス鎖：5' - Ums Afs GmAmAmGfAmU fGfAmGmGmCmAfUmAfgmCmAms Ums Um - 3' (配列番号 20)

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

#### 【0088】

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

#### 【0089】

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

#### 【0090】

10

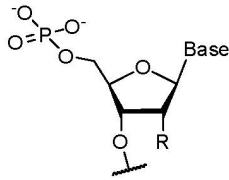
20

30

40

50

## 【化 6】



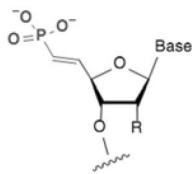
式 ( 2 )

## 【0091】

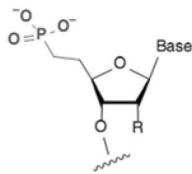
また、例えば、Anastasia Khvorova and Jonathan K. Watts, The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility. Nature Biotechnology, 2017, 35 (3) : 238~48には、以下の4種類の5'-リン酸アナログ修飾ヌクレオチドが開示されている。

## 【0092】

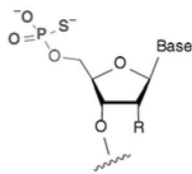
## 【化 7】



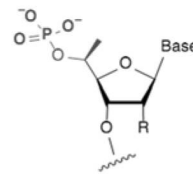
式 ( 3 )



式 ( 4 )



式 ( 5 )



式 ( 6 )

ただし、RはH、OH、メトキシ、フッ素から選択され、BaseはA、U、C、G又はTから選択される塩基を表す。

## 【0093】

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

## 【0094】

いくつかの実施形態において、本開示により提供されるsiRNAは、siHBVS11、siHBVS12、siHBVS13、siHBVS14、siHBVS15、siHBVS16、siHBVS17又はsiHBVS18である。

siHBVS11

センス鎖：5'-UmGmCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm-3' (配列番号9)

アンチセンス鎖：5'-P1-UmAfGmAmaGfAmUmGmAmaGmGmCmAfUmAfgmCmAmaGmCm-3' (配列番号21)

siHBVS12

センス鎖：5'-UmGmCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm-3' (配列番号9)

アンチセンス鎖：5'-P1-UmAfGmAmaGfAmUmGmAmaGmGmCmAfUmAfgmCmAmaUmUm-3' (配列番号22)

siHBVS13

センス鎖：5'-UmGmCmUmAfgmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm-3' (配列番号12)

アンチセンス鎖：5'-P1-UmAfGmAmaGfAmUfgfAmGmGmCm

10

20

30

40

50

A f U m A f G m C m A m G m C m - 3' (配列番号 23)

s i H B V S 14

センス鎖: 5' - U m G m C m U m A f U m G f C f C f U m C m A m U m C m U m U m C m U m A m - 3' (配列番号 12)

アンチセンス鎖: 5' - P 1 - U m A f G m A m A m G f A m U f G f A m G m G m C m A f U m A f G m C m A m U m U m - 3' (配列番号 24)

s i H B V S 15

センス鎖: 5' - U m s G m s C m U m A m U m G f C f C f U m C m A m U m C m U m U m C m U m A m - 3' (配列番号 15)

アンチセンス鎖: 5' - P 1 - U m s A f s G m A m A m G f A m U m G m A m G m G m C m A f U m A f G m C m A m s G m s C m - 3' (配列番号 25)

s i H B V S 16

センス鎖: 5' - U m s G m s C m U m A m U m G f C f C f U m C m A m U m C m U m U m C m U m A m - 3' (配列番号 15)

アンチセンス鎖: 5' - P 1 - U m s A f s G m A m A m G f A m U m G m A m G m G m C m A f U m A f G m C m A m s U m s U m - 3' (配列番号 26)

s i H B V S 17

センス鎖: 5' - U m s G m s C m U m A f U m G f C f C f U m C m A m U m C m U m U m C m U m A m - 3' (配列番号 18)

アンチセンス鎖: 5' - P 1 - U m s A f s G m A m A m G f A m U f G f A m G m G m C m A f U m A f G m C m A m s G m s C m - 3' (配列番号 27)

s i H B V S 18

センス鎖: 5' - U m s G m s C m U m A f U m G f C f C f U m C m A m U m C m U m U m C m U m A m - 3' (配列番号 18)

アンチセンス鎖: 5' - P 1 - U m s A f s G m A m A m G f A m U f G f A m G m G m C m A f U m A f G m C m A m s U m s U m - 3' (配列番号 28)

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

【0095】

本開示の発明者は、本開示により提供される s i R N A が、顕著に向上した血漿とリソソーム安定性を有するだけでなく、非常に高い遺伝子抑制活性を維持することを意外にも見出した。

【0096】

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

【0097】

＜薬物組成物＞

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

【0098】

前記薬学的に許容可能な担体は、s i R N A 投与分野で通常用いられる担体であっても

よく、例えば、磁性ナノ粒子 (magnetic nanoparticles、例えば、 $\text{Fe}_3\text{O}_4$  又は  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  に基づくナノ粒子)、カーボンナノチューブ (carbon nanotubes)、メソポーラスシリコン (mesoporous silicon)、リン酸カルシウムナノ粒子 (calcium phosphate nanoparticles)、ポリエチレンイミン (polyethylenimine、PEI)、ポリアミドアミンデンドリマー (polyamidoamine (PAMAM) dendrimer)、ポリリジン (poly (L-lysine)、PLL)、キトサン (chitosan)、1, 2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン (1, 2-di-oleoyl-3-trimethylammonium-propane、DOTAP)、ポリD-又はL-乳酸/グリコール酸共重合体 (poly (D&L-lactic/glycolic acid) copolymer、PLGA)、ポリ (アミノエチルエチレンリン酸エステル) (poly (2-aminoethyl ethylene phosphate)、PPEEA) 及びポリ (N, N-ジメチルアミノエチルメタクリレート) (poly (2-dimethylaminoethyl methacrylate)、PDMAEMA) 並びにこれらの誘導体の1又は複数があるが、これらに限定されない。

10

#### 【0099】

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

20

#### 【0100】

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

#### 【0101】

前記 pH 値緩衝液は、pH 7.5~8.5 のトリスヒドロキシメチルアミノメタン塩酸塩緩衝液 (tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride buffer) 及び/又は pH 5.5~8.5 のリン酸塩緩衝液であってもよく、例えば、pH 5.5~8.5 のリン酸塩緩衝液であってもよい。

30

#### 【0102】

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

#### 【0103】

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

40

#### 【0104】

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

#### 【0105】

いくつかの実施形態において、前記薬物組成物は、リポソーム製剤の形式であってもよい。いくつかの実施形態において、前記リポソーム製剤に用いられる薬学的に許容可能な

50

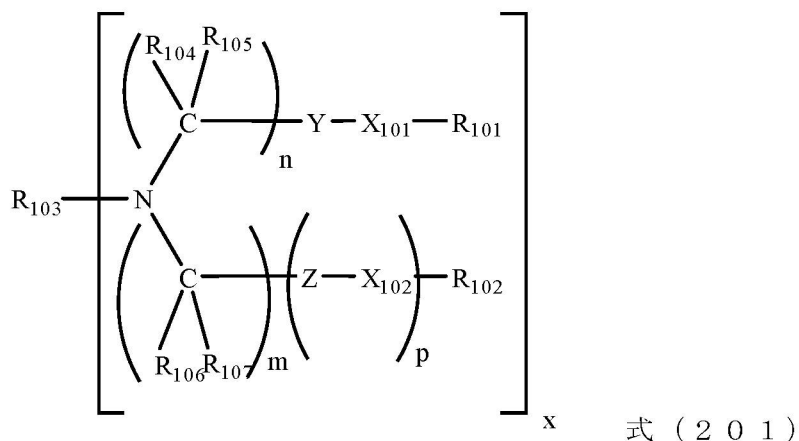
担体は、アミン含有トランスフェクション化合物（以下、有機アミンともいう）、補助脂質及び／又はPEG化（ポリエチレングリコール化）脂質を含む。ここで、前記有機アミン、補助脂質及びPEG化脂質は、それぞれCN103380113A（引用によりその全体を本明細書に組み込む）に記載されたアミン含有トランスフェクション化合物又はその薬学的に許容できる塩又は誘導体、補助脂質及びPEG化脂質からそれぞれ選択される1種又は複数種であってもよい。

【0106】

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

【0107】

【化8】



式中、

$X_{101}$ 及び $X_{102}$ はそれぞれ独立してO、S、N-A又はC-Aであり、Aは水素又は $C_1-C_{20}$ 炭化水素鎖であり、

Y及びZはそれぞれ独立してC=O、C=S、S=O、CH-OH又はSO<sub>2</sub>であり、

$R_{101}$ 、 $R_{102}$ 、 $R_{103}$ 、 $R_{104}$ 、 $R_{105}$ 、 $R_{106}$ 及び $R_{107}$ はそれぞれ独立して水素、環式又は非環式の、置換又は無置換の、分岐鎖又は直鎖脂肪族基、環式又は非環式の、置換又は無置換の、分岐鎖又は直鎖ヘテロ脂肪族基、置換又は無置換の、分岐鎖又は直鎖アシル基、置換又は無置換の、分岐鎖又は直鎖アリール基、置換又は無置換の、分岐鎖又は直鎖ヘテロアリール基であり、

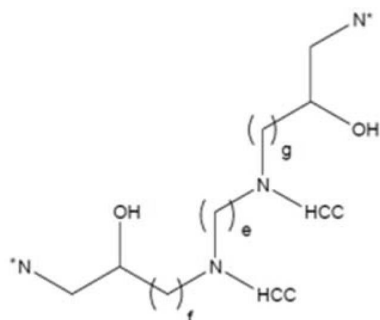
xは1～10の整数であり、

nが1～3の整数であり、mが0～20の整数であり、pが0又は1であり、ここで、 $m=p=0$ である場合、 $R_{102}$ は水素であり、

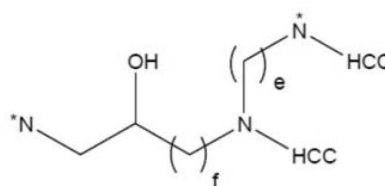
n又はmの少なくとも1つが2である場合、 $R_{103}$ と式（201）における窒素とが、式（202）又は式（203）に示される構造を形成する。

【0108】

## 【化 9】



式 (202)、



式 (203)

10

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

## 【0109】

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

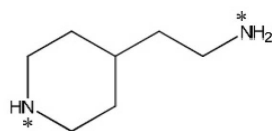
20

## 【0110】

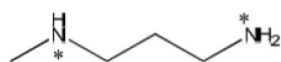
いくつかの実施形態において、n と m のそれぞれが独立して 1 又は 3 の値である場合、R<sub>103</sub> は、下記式 (204)～式 (213) のいずれか 1 つであってもよい。

## 【0111】

## 【化 10】

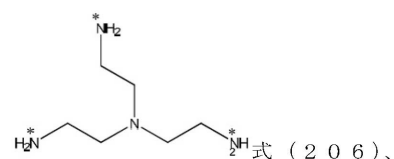


式 (204)、

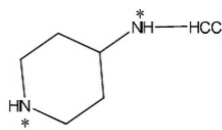


式 (205)、

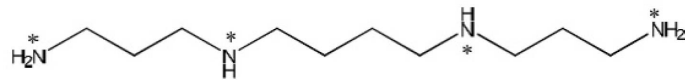
30



式 (206)、



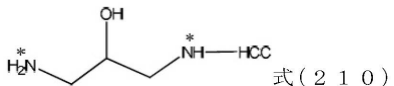
式 (207)、



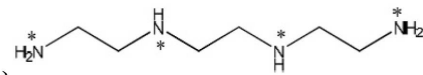
式 (208)、



式 (209)、

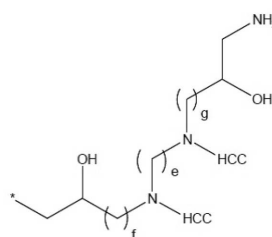


式 (210)、

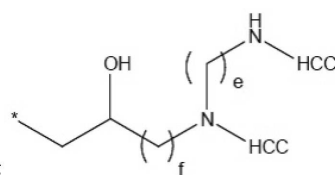


式 (211)、

40



式 (212) 及び



式 (213)

## 【0112】

式 (204)～式 (213) 中、g、e 及び f はそれぞれ独立して 1～6 の整数であり

50

、各「HCC」は炭化水素鎖を表し、各\*は $R_{103}$ と式(201)における窒素原子との結合可能点を示し、任意の\*位置上の各Hは、式(201)における窒素原子と結合するために置換されてもよい。

【0113】

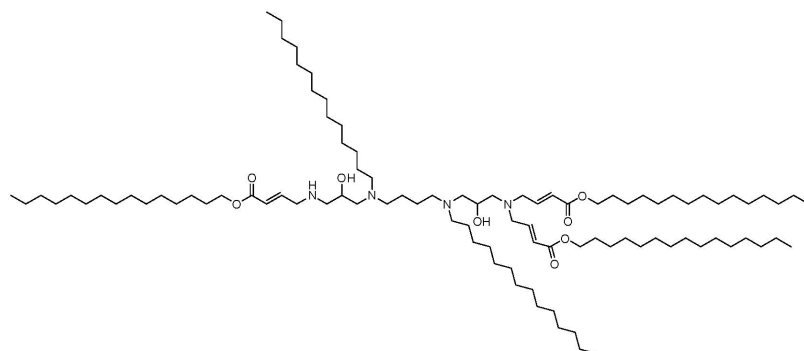
式(201)に示される化合物は、CN103380113Aの記載により調製されてもよい。

【0114】

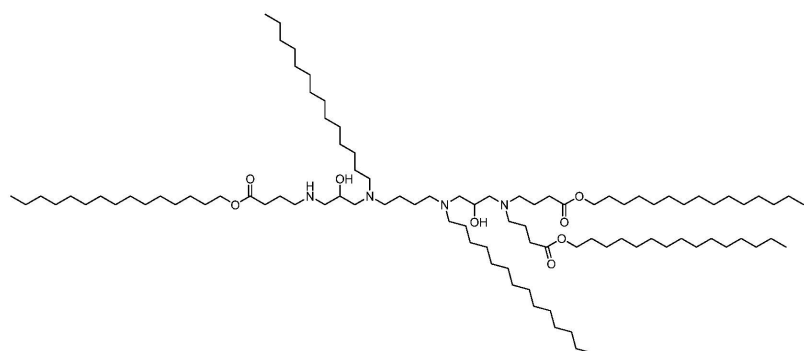
いくつかの実施形態において、前記有機アミンは、式(214)に示される有機アミン及び／又は式(215)に示される有機アミンである。

【0115】

【化11】



式(214)、



式(215)

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

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

【0116】

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

【0117】

いくつかの実施形態において、本開示のsiRNAと上記アミン含有トランスフェクション試薬により形成された薬物組成物粒子は、約30nm~約200nmの平均径を有し、一般に約40nm~約135nmであり、より一般的には、当該リポソーム粒子の平均径は約50nm~約120nm、約50nm~約100nm、約60nm~約90nm又は約70nm~約90nmであり、例えば、当該リポソーム粒子の平均径は、約30、4

10

20

30

40

50

0、50、60、70、75、80、85、90、100、110、120、130、140、150又は160nmである。

【0118】

いくつかの実施形態において、本開示の siRNA と上記アミン含有トランスフェクション試薬により形成された薬物組成物において、siRNA と全脂質（例えば有機アミン、補助脂質及び／又は PEG 化脂質）の重量比（重量／重量比）は、約 1：1～約 1：50、約 1：1～約 1：30、約 1：3～約 1：20、約 1：4～約 1：18、約 1：5～約 1：17、約 1：5～約 1：15、約 1：5～約 1：12、約 1：6～約 1：12 又は約 1：6～約 1：10 の範囲内にあり、例えば、本開示の siRNA と全脂質の重量比は約 1：5、1：6、1：7、1：8、1：9、1：10、1：11、1：12、1：13、1：14、1：15、1：16、1：17 又は 1：18 である。

10

【0119】

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

【0120】

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

20

【0121】

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

30

【0122】

脂質溶液と siRNA 水溶液を混合した後、得られた生成物を 40～60℃で少なくとも 2 分間、例えば、5～30 分間培養し、培養したリポソーム製剤を得る。脂質溶液と siRNA 水溶液の体積比は 1：（2～5）、例えば、1：4 であってもよい。

【0123】

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

40

【0124】

ここで、濃縮又は希釈は、不純物を除去する前、不純物を除去した後又は同時に行われてもよい。不純物を除去する方法としては、従来の各種の方法を採用してもよく、例えば、タンジェンシャルフロー系、中空系カラムを用い、100 kDa の条件で限外濾過し、

50

限外濾過交換溶液をpH7.4のリン酸塩緩衝液(PBS)としてもよい。除菌方法としては、従来の各種の方法を採用してもよく、例えば、0.22 μmのフィルターで濾過して除菌してもよい。

【0125】

＜第1種のsiRNA複合体＞

1つの態様において、本開示は、上記のsiRNA及び当該siRNAに結合される複合基を含む第1種のsiRNA複合体を提供する。

【0126】

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

【0127】

本開示は、上記のsiRNA及び当該siRNAに結合される複合基を含む第1種のsiRNA複合体を提供する。一般的には、第1種のsiRNA複合体については、前記複合基は、薬学的に許容できる少なくとも1つの標的基及び任意のリンカー(linker)を含み、前記siRNA、前記リンカー及び前記標的基は順に結合されている。1つの実施形態において、前記標的基が1～6個である。1つの実施形態において、前記標的基が2～4個である。前記siRNA分子は、前記複合基に非共有結合的又は共有結合的に複合されてもよく、例えば、前記複合基に共有結合的に複合されてもよい。siRNAと複合基との複合部位は、siRNAのセンス鎖の3'端又は5'端にあってもよく、アンチセンス鎖の5'端にあってもよく、siRNAの内部配列にあってもよい。いくつかの実施形態において、前記siRNAと複合基との複合部位は、siRNAのセンス鎖の3'端にある。いくつかの実施形態において、前記複合基は、ヌクレオチドのリン酸基、2'-位のヒドロキシ基又は塩基に結合されてもよい。いくつかの実施形態において、前記複合基は、3'-位のヒドロキシ基に結合されてもよく、この場合、ヌクレオチド間が2'-5'リン酸ジエステル結合により結合されている。複合基は、siRNA鎖の末端に結合される場合、通常ヌクレオチドのリン酸基に結合され、siRNAの内部配列に結合される場合、通常リボース糖環或いは塩基に結合される。各種の結合方法については、Muthiah Manoharan et. al. siRNA conjugates carrying sequentially assembled trivalent N-acetyl galactosamine linked through nucleoside select robust gene silencing in vivo in hepatocytes. ACS Chemical biology, 2015, 10 (5): 1181～7.を参照することができる。

【0128】

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

【0129】

いくつかの実施形態において、前記薬学的に許容できる標的基は、siRNA投与分野で通常用いられるリガンド、例えば、WO2009082607A2に記載された各種の

10

20

30

40

50

リガンドであってもよく、引用によりその開示内容が全体として本明細書に組み込まれる。

【0130】

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

10

【0131】

いくつかの実施形態において、前記各リガンドは、細胞表面の受容体と結合できるリガンドから独立して選択される。いくつかの実施形態において、少なくとも1つのリガンドは、肝細胞表面の受容体と結合できるリガンドである。いくつかの実施形態において、少なくとも1つのリガンドは、哺乳動物の肝細胞表面の受容体と結合できるリガンドである。いくつかの実施形態において、少なくとも1つのリガンドは、ヒト肝細胞表面の受容体と結合できるリガンドである。いくつかの実施形態において、少なくとも1つのリガンドは、肝表面のアシアロ糖タンパク質受容体（ASGPR）と結合できるリガンドである。これらのリガンドの種類は、当業者に公知であり、その作用として、一般的に標的細胞表面の特異的受容体と結合し、リガンドに結合される siRNA の標的細胞への送達を媒介する。

20

【0132】

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

【0133】

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

30

40

【0134】

いくつかの実施形態において、各前記リガンドは、D-マンノピラノース、L-マンノピラノース、D-アラビノース、D-キシロフラノース、L-キシロフラノース、D-グルコース、L-グルコース、D-ガラクトース、L-ガラクトース、 $\alpha$ -D-マンノフラノース、 $\beta$ -D-マンノフラノース、 $\alpha$ -D-マンノピラノース、 $\beta$ -D-マンノピラノース、 $\alpha$ -D-グルコピラノース、 $\beta$ -D-グルコピラノース、 $\alpha$ -D-グルコフラノース、 $\beta$ -D-グルコフラノース、 $\alpha$ -D-フルクトフラノース、 $\alpha$ -D-フルクトピラノース、 $\alpha$ -D-ガラクトピラノース、 $\beta$ -D-ガラクトピラノース、 $\alpha$ -D-ガラクトフ

50

ラノース、 $\beta$ -D-ガラクトフラノース、グルコサミン、シアル酸、ガラクトサミン、N-アセチルガラクトサミン、N-トリフルオロアセチルガラクトサミン、N-プロピオンガラクトサミン、N-n-ブチリルガラクトサミン、N-イソブチリルガラクトサミン、2-アミノ-3-O-[(R)-1-カルボキシエチル]-2-デオキシ- $\beta$ -D-グルコピラノース、2-デオキシ-2-メチルアミノ-L-グルコピラノース、4,6-ジデオキシ-4-ホルムアミド-2,3-ジ-O-メチル-D-マンノピラノース、2-デオキシ-2-スルホアミノ-D-グルコピラノース、N-グリコリル- $\alpha$ -ノイラミン酸、5-チオ- $\beta$ -D-グルコピラノース、メチル2,3,4-トリス-O-アセチル-1-チオ-6-O-トリチル- $\alpha$ -D-グルコピラノシド (methyl 2,3,4-tris-O-acetyl-1-thio-6-O-trityl- $\alpha$ -D-glucopyranoside)、4-チオ- $\beta$ -D-ガラクトピラノース、エチル3,4,6,7-テトラ-O-アセチル-2-デオキシ-1,5-ジチオ- $\alpha$ -D-グルコヘプトピラノシド、2,5-アンヒドロ-D-アロニトリル、リボース、D-リボース、D-4-チオリボース、L-リボース又はL-4-チオリボースから独立して選択されてもよい。前記リガンドの他の選択肢は、例えば、CN105378082Aの記載を参照してもよく、引用によりその開示内容が全体として本明細書に組み込まれる。

#### 【0135】

いくつかの実施形態において、前記第1種のsiRNA複合体における、薬学的に許容できる標的基は、ガラクトース又はN-アセチルガラクトサミンであってもよく、ガラクトース又はN-アセチルガラクトサミン分子は、1価、2価、3価、4価であってもよい。ここでいう1価、2価、3価、4価は、それぞれsiRNA分子と、標的基としてのガラクトース又はN-アセチルガラクトサミン分子を含む複合基から形成されたオリゴヌクレオチド複合体におけるsiRNA分子とガラクトース又はN-アセチルガラクトサミン分子とのモル比が1:1、1:2、1:3又は1:4であることを指すと理解すべきである。いくつかの実施形態において、前記薬学的に許容できる標的基はN-アセチルガラクトサミンである。いくつかの実施形態において、本開示に記載されたsiRNAがN-アセチルガラクトサミンを含む複合基と複合する場合、N-アセチルガラクトサミン分子は3価又は4価である。いくつかの実施形態において、本開示に記載されたsiRNAがN-アセチルガラクトサミンを含む複合基と複合する場合、N-アセチルガラクトサミン分子は3価である。

#### 【0136】

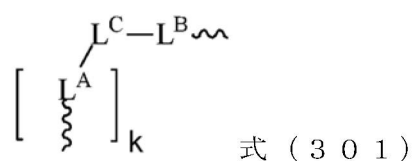
本開示に記載されたsiRNAと複合分子を複合する場合、複合分子は、適切なリンカーを介してsiRNA分子に結合されてもよく、当業者は、標的基の具体的な種類により適切なリンカーを選択することができる。これらの複合基、リンカー、標的基の種類及びsiRNAへの結合方法については、WO2015006740A2の開示内容を参照してもよく、引用によりその内容が全体として本明細書に組み込まれる。

#### 【0137】

いくつかの実施形態において、前記標的基がN-アセチルガラクトサミンである場合、適切なリンカーは、式(301)に示される構造であってもよい。

#### 【0138】

#### 【化12】



式中、

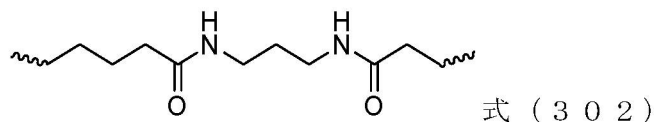
kは1～3の整数であり、

$L^A$ は、式(302)に示される構造を有するアミド結合を含む鎖状部であり、各前記

$L^A$ は、その両端でそれぞれ1つの前記標的基及び前記  $L^C$  部にエーテル結合により結合される。

【0139】

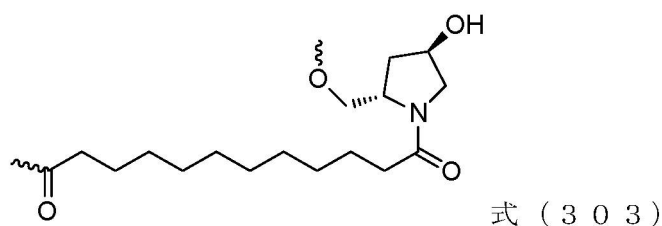
【化13】



$L^B$ は、式(303)に示される構造を有するN-アシルピロリジンを含む鎖状部であり、前記鎖状部は、その一端にカルボニル基を有し、前記  $L^C$  部にアミド結合により結合され、他端に酸素基を有し、前記 siRNA にリン酸エステル結合により結合される。

【0140】

【化14】



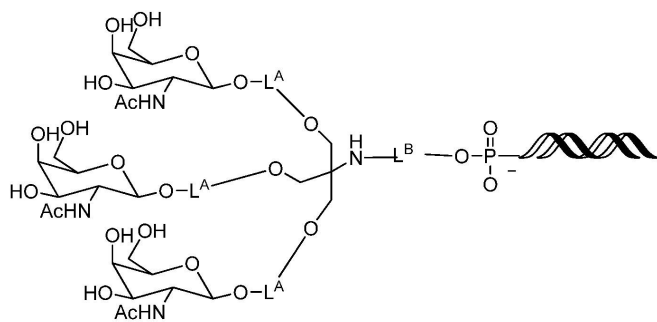
$L^C$ は、ヒドロキシメチルアミノメタン、ジヒドロキシメチルアミノメタン又はトリヒドロキシメチルアミノメタンに基づく2~4個のリンカー基であり、前記  $L^C$  は、酸素原子を介してエーテル結合により各前記  $L^A$  部に結合されるとともに、窒素原子を介してアミド結合により前記  $L^B$  部に結合される。

【0141】

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

【0142】

【化15】



式中、二重螺旋構造は siRNA を表す。

【0143】

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

【0144】

いくつかの実施形態において、本開示に記載された siRNA のセンス鎖の3'末端は、

10

20

30

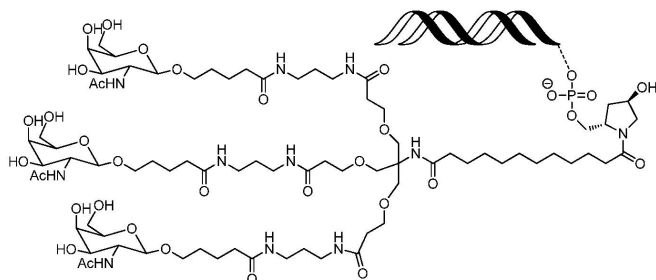
40

50

リンカー（ $L^A$ ） $_3$ トリヒドロキシメチルアミノメタン- $L^B$ -により3個のN-アセチルガラクトサミン（GalNAc）分子に共有結合的に複合され、siRNA分子とGalNAc分子とのモル比が1：3である、構造が以下の式（305）に示されるsiRNA複合体（以下、（GalNAc） $_3$ -1-siRNAともいう）を得る。

【0145】

【化16】



式（305）

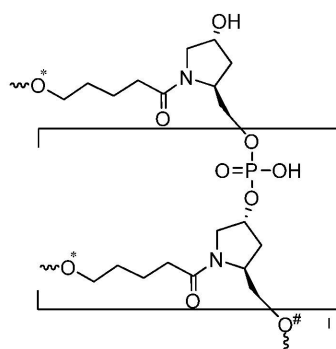
式中、二重螺旋構造は前記siRNAを表し、前記リンカーは前記siRNAのセンス鎖の3'末端に結合される。

【0146】

いくつかの実施形態において、前記標的基がN-アセチルガラクトサミンである場合、適切なリンカーは、式（306）に示される構造であってもよい。

【0147】

【化17】



式（306）

式中、

lは0～3の整数であり、

\*は、リンカーにおいてエーテル結合により標的基に結合される部位を表し、

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

【0148】

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

【0149】

10

20

30

40

50

式 (307)

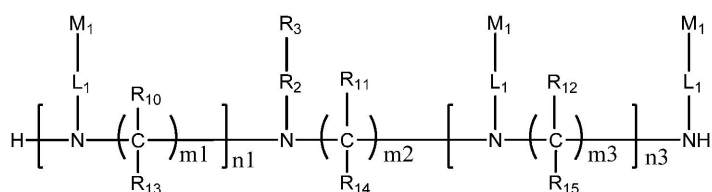
**【 0 1 5 0 】**

**【 0 1 5 1 】**

いくつかの実施形態において、前記 *s i R N A* 複合体は、式 (308) に示される構造を有する第2種の *s i R N A* 複合体である。

**【 0 1 5 2 】**

【化 1 9】

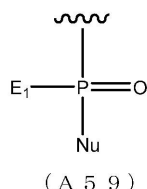


式 (308)

R<sub>10</sub>、R<sub>11</sub>、R<sub>12</sub>、R<sub>13</sub>、R<sub>14</sub>及びR<sub>15</sub>は、それぞれ独立して、Hであり、又はC<sub>1</sub>－C<sub>10</sub>アルキル基、C<sub>1</sub>－C<sub>10</sub>ハロゲン化アルキル基及びC<sub>1</sub>－C<sub>10</sub>アルコキシ基からなる群から選択され、

**【 0 1 5 3 】**

## 【化 20】



式中、 $E_1$ はOH、SH又は $BH_2$ であり、Nuは本開示のs iRNAである。

## 【0154】

$R_2$ は、長さ1～20の炭素原子の直鎖アルキレン基であり、1又は複数の炭素原子は、 $C(O)$ 、NH、O、S、 $CH=N$ 、 $S(O)_2$ 、 $C_2-C_{10}$ アルケニレン基、 $C_2-C_{10}$ アルキニレン基、 $C_6-C_{10}$ アリーレン基、 $C_3-C_{18}$ ヘテロシクリレン基及び $C_5-C_{10}$ ヘテロアリーレン基からなる群から選択される1又は複数で任意に置換され、 $R_2$ は、 $C_1-C_{10}$ アルキル基、 $C_6-C_{10}$ アリール基、 $C_5-C_{10}$ ヘテロアリール基、 $C_1-C_{10}$ ハロゲン化アルキル基、 $-OC_1-C_{10}$ アルキル基、 $-OC_1-C_{10}$ アルキルフェニル基、 $-C_1-C_{10}$ アルキル-OH、 $-OC_1-C_{10}$ ハロゲン化アルキル基、 $-SC_1-C_{10}$ アルキル基、 $-SC_1-C_{10}$ アルキルフェニル基、 $-C_1-C_{10}$ アルキル-SH、 $-SC_1-C_{10}$ ハロゲン化アルキル基、ハロゲン置換基、-OH、-SH、-NH<sub>2</sub>、 $-C_1-C_{10}$ アルキル-NH<sub>2</sub>、 $-N(C_1-C_{10}$ アルキル基) $(C_1-C_{10}$ アルキル基)、 $-NH(C_1-C_{10}$ アルキル基)、シアノ基、ニトロ基、 $-CO_2H$ 、 $-C(O)O(C_1-C_{10}$ アルキル基)、 $-CON(C_1-C_{10}$ アルキル基) $(C_1-C_{10}$ アルキル基)、 $-CONH(C_1-C_{10}$ アルキル基)、 $-CONH_2$ 、 $-NHC(O)(C_1-C_{10}$ アルキル基)、 $-NHC(O)$ (フェニル基)、 $-N(C_1-C_{10}$ アルキル) $C(O)(C_1-C_{10}$ アルキル基)、 $-N(C_1-C_{10}$ アルキル) $C(O)$ (フェニル基)、 $-C(O)C_1-C_{10}$ アルキル基、 $-C(O)C_1-C_{10}$ アルキルフェニル基、 $-C(O)C_1-C_{10}$ ハロアルキル基、 $-OC(O)C_1-C_{10}$ アルキル基、 $-SO_2(C_1-C_{10}$ アルキル基)、 $-SO_2$ (フェニル基)、 $-SO_2(C_1-C_{10}$ ハロゲン化アルキル基)、 $-SO_2NH_2$ 、 $-SO_2NH(C_1-C_{10}$ アルキル基)、 $-SO_2NH$ (フェニル基)、 $-NH(SO_2(C_1-C_{10}$ アルキル基))、 $-NH(SO_2(C_1-C_{10}$ ハロゲン化アルキル基))からなる群のいずれか1つ又は複数の置換基を任意に有してもよい。

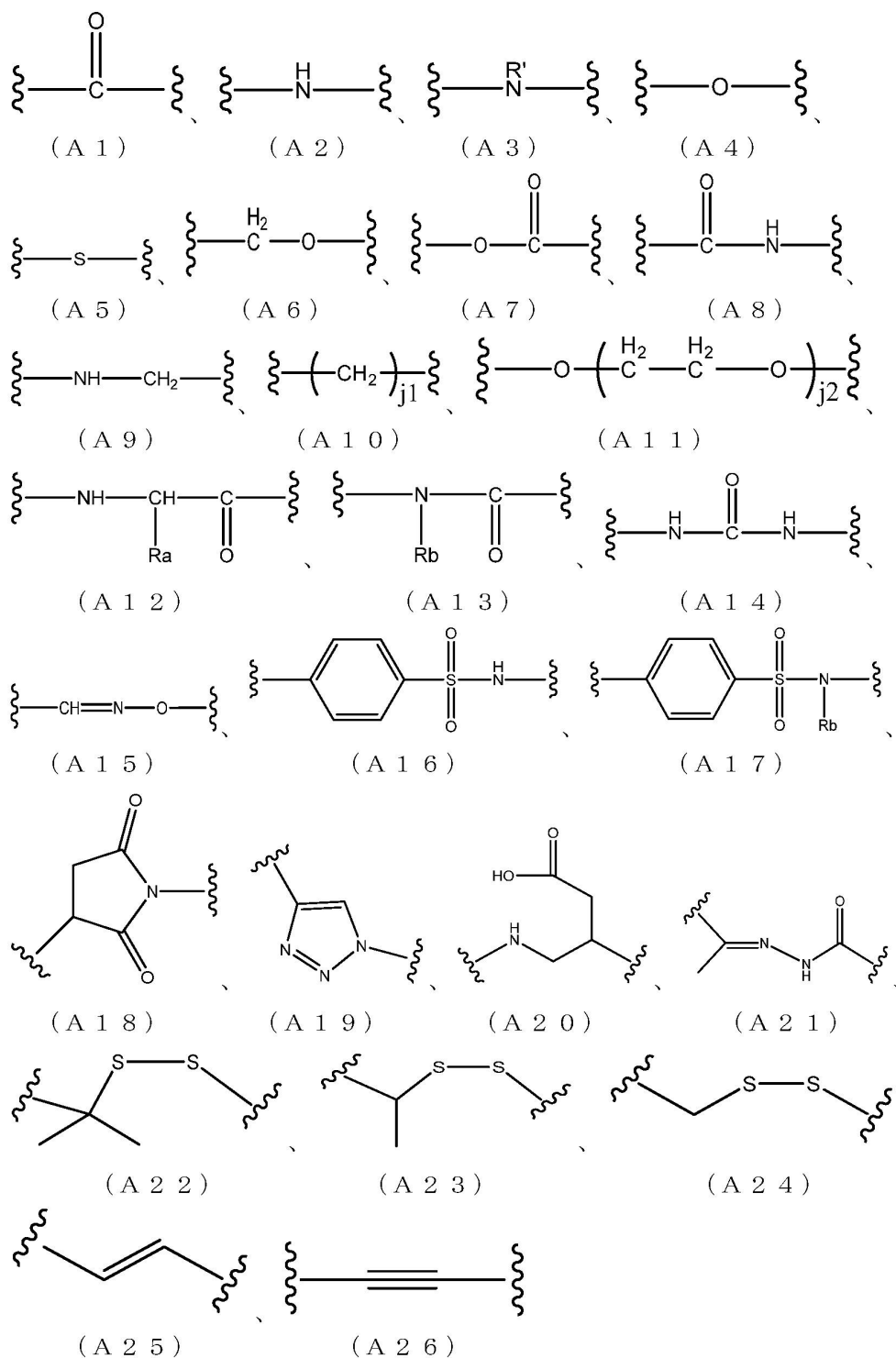
## 【0155】

各 $L_1$ は、長さ1～70の炭素原子の直鎖アルキレン基であり、1又は複数の炭素原子は、 $C(O)$ 、NH、O、S、 $CH=N$ 、 $S(O)_2$ 、 $C_2-C_{10}$ アルケニレン基、 $C_2-C_{10}$ アルキニレン基、 $C_6-C_{10}$ アリーレン基、 $C_3-C_{18}$ ヘテロシクリレン基及び $C_5-C_{10}$ ヘテロアリーレン基からなる群から選択される1又は複数で任意に置換され、 $L_1$ は、 $C_1-C_{10}$ アルキル基、 $C_6-C_{10}$ アリール基、 $C_5-C_{10}$ ヘテロアリール基、 $C_1-C_{10}$ ハロゲン化アルキル基、 $-OC_1-C_{10}$ アルキル基、 $-OC_1-C_{10}$ アルキルフェニル基、 $-C_1-C_{10}$ アルキル-OH、 $-OC_1-C_{10}$ ハロゲン化アルキル基、 $-SC_1-C_{10}$ アルキル基、 $-SC_1-C_{10}$ アルキルフェニル基、 $-C_1-C_{10}$ アルキル-SH、 $-SC_1-C_{10}$ ハロゲン化アルキル基、ハロゲン化、-OH、-SH、-NH<sub>2</sub>、 $-C_1-C_{10}$ アルキル-NH<sub>2</sub>、 $-N(C_1-C_{10}$ アルキル基) $(C_1-C_{10}$ アルキル基)、 $-NH(C_1-C_{10}$ アルキル基)、シアノ基、ニトロ基、 $-CO_2H$ 、 $-C(O)O(C_1-C_{10}$ アルキル基)、 $-CON(C_1-C_{10}$ アルキル基) $(C_1-C_{10}$ アルキル基)、 $-CONH(C_1-C_{10}$ アルキル基)、 $-CONH_2$ 、 $-NHC(O)(C_1-C_{10}$ アルキル基)、 $-NHC(O)$ (フェニル基)、 $-N(C_1-C_{10}$ アルキル) $C(O)(C_1-C_{10}$ アルキル基)、 $-N(C_1-C_{10}$ アルキル) $C(O)$ (フェニル基)、 $-C(O)C_1-C_{10}$ アルキル基、 $-C(O)C_1-C_{10}$ アルキルフェニル基、 $-C(O)C_1-C_{10}$ ハロアルキル基、 $-OC(O)C_1-C_{10}$ アルキル基、

—SO<sub>2</sub> (C<sub>1</sub>—C<sub>10</sub>アルキル基)、—SO<sub>2</sub> (フェニル基)、—SO<sub>2</sub> (C<sub>1</sub>—C<sub>10</sub>ハロゲン化アルキル基)、—SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、—SO<sub>2</sub>NH (C<sub>1</sub>—C<sub>10</sub>アルキル基)、—SO<sub>2</sub>NH (フェニル基)、—NH—SO<sub>2</sub> (C<sub>1</sub>—C<sub>10</sub>アルキル基)、—NH—SO<sub>2</sub> (フェニル基) 及び—NH—SO<sub>2</sub> (C<sub>1</sub>—C<sub>10</sub>ハロゲン化アルキル基) からなる群のいずれか1つ又は複数の置換基を任意に有してもよい。いくつかの実施形態において、L<sub>1</sub>は、A<sub>1</sub>～A<sub>26</sub>の基又はその任意の組合せからなる群から選択されてもよく、A<sub>1</sub>～A<sub>26</sub>の構造と定義は以下のとおりである。

【0156】

【化21】



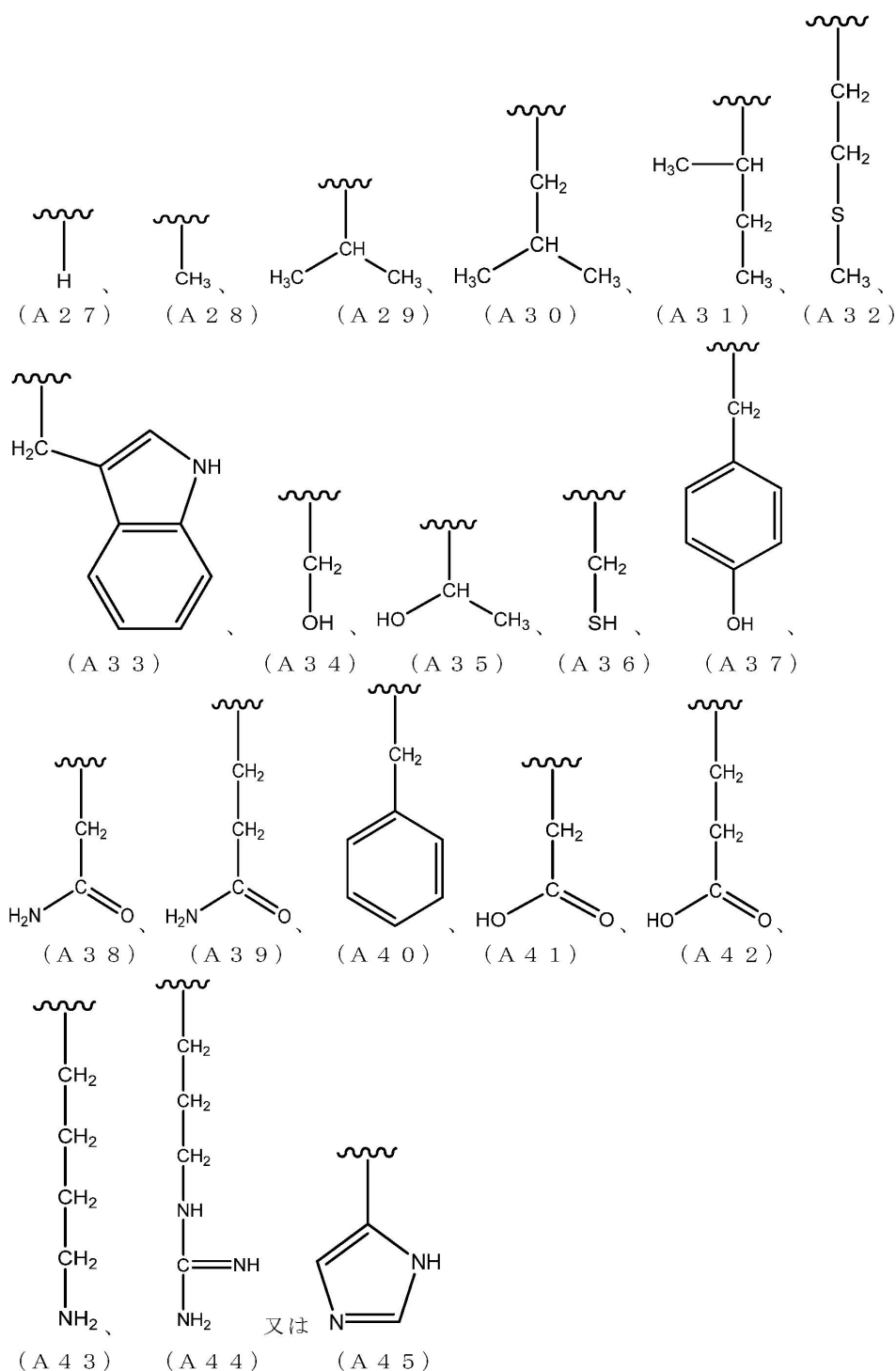
ただし、j<sub>1</sub>は1～20の整数であり、j<sub>2</sub>は1～20の整数であり、

R' は  $C_{1-10}$  のアルキル基であり、

Ra は、式 A 2 7 ~ A 4 5 の基からなる群から選択される 1 つである。

【0157】

【化22】



Rb は  $C_{1-10}$  のアルキル基であり、



は、基が分子の残りの部分に結合される部位を表す。

【0158】

10

20

30

40

50

便宜上、 $L_1$ は、線形アルキレン基として定義されるが、例えば上述の取替及び／又は置換によって生じるアミンやアルケニル基で、線形基ではない、又は名称が異なる可能性があることは、当業者に理解される。本開示内容の目的のために、 $L_1$ の長さは、2つの結合点を結合する鎖における原子数である。この目的のために、前記直鎖アルキレンの炭素原子を置換して得られた環（例えば、ヘテロシクリレン又はヘテロアリーレン）を、1個の原子とする。

【0159】

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

10

【0160】

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

20

【0161】

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

30

【0162】

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

【0163】

本開示により提供される第2種のsiRNA複合体によれば、 $R_3$ は、式A59に示される構造の基であり、そのうち、 $E_1$ はOH、SH又は $BH_2$ であり、調製原料の入手しやすさを考慮し、いくつかの実施形態において、 $E_1$ はOH又はSHである。

40

【0164】

いくつかの実施形態において、 $R_2$ は、窒素含有骨格上のNとA59との結合を実現するために選択される。本開示の文脈において、「窒素含有骨格」とは、 $R_{10}$ 、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$ 、 $R_{13}$ 、 $R_{14}$ 及び $R_{15}$ が結合された炭素原子とNが互いに結合している鎖状構造を指す。したがって、 $R_2$ は、適当な方法でA59基を窒素含有骨格上のNに結合することができる任意のリンカー基であってもよい。いくつかの実施形態において、固相合成プロセスにより本開示のsiRNA複合体を調製する場合に、 $R_2$ 基には、窒素含有骨格上のNに結合される結合部位及び $R_3$ におけるPに結合される結合部位がともに含まれる必

50

【化 2 3】



30

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

L<sub>1</sub>は、M<sub>1</sub>リガンドと窒素含有骨格上のNを結合し、本開示の第2種のsiRNA複合体に肝標的機能を提供するという役割を果たす。いくつかの実施形態において、L<sub>1</sub>は、式A1～A26の基から選択される1又は複数の結合の組合せである。いくつかの実施形態において、L<sub>1</sub>は、A1、A4、A5、A6、A8、A10、A11及びA13から選択される1又は複数の結合の組合せである。いくつかの実施形態において、L<sub>1</sub>は、A1、A4、A8、A10及びA11から選択される少なくとも2つの結合の組合せである。いくつかの実施形態において、L<sub>1</sub>は、A1、A8、A10から選択される少なくとも2つの結合の組合せである。

40

50

## 【0169】

いくつかの実施形態において、 $j_1$ は2～10の整数であり、いくつかの実施形態において、 $j_1$ は3～5の整数である。 $j_2$ は2～10の整数であり、いくつかの実施形態において、 $j_2$ は3～5の整数である。 $R'$ はC1～C4のアルキル基であり、いくつかの実施形態において、 $R'$ は、メチル基、エチル基及びイソプロピル基の1つである。 $R_a$ は、A27、A28、A29、A30及びA31の1つであり、いくつかの実施形態において、 $R_a$ は、A27又はA28である。 $R_b$ は、C1～C5のアルキル基であり、いくつかの実施形態において、 $R_b$ は、メチル基、エチル基、イソプロピル基及びブチル基の1つである。いくつかの実施形態において、式A1～A26においてそれぞれ $j_1$ 、 $j_2$ 、 $R'$ 、 $R_a$ 、 $R_b$ を選択することにより、 $M_1$ リガンドと窒素含有骨格上のNとの結合を実現し、 $M_1$ リガンド間の空間位置を $M_1$ リガンドと肝表面のアシアロ糖タンパク質受容体との結合に更に適合させる。

10

## 【0170】

いくつかの実施形態において、本開示のsiRNA複合体は、式(403)、(404)、(405)、(406)、(407)、(408)、(409)、(410)、(411)、(412)、(413)、(414)、(415)、(416)、(417)、(418)、(419)、(420)、(421)又は(422)に示される構造を有する。

## 【0171】

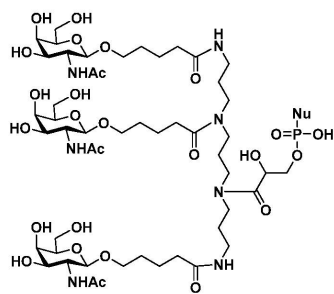
20

30

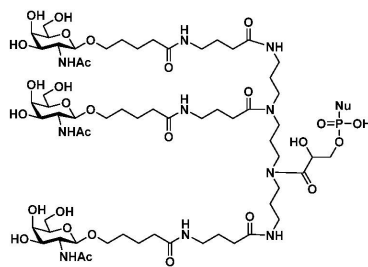
40

50

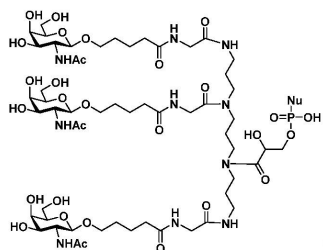
## 【化 2 4】



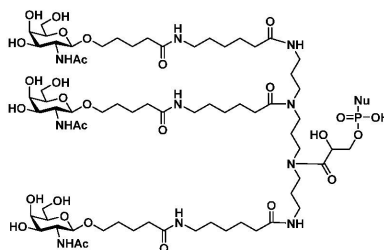
式(403)



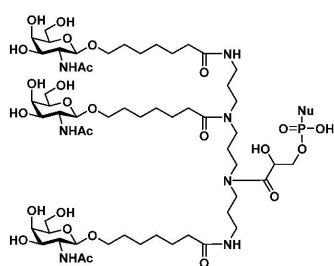
式(404)



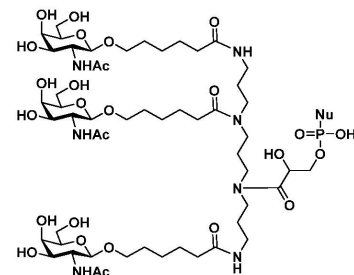
式(405)



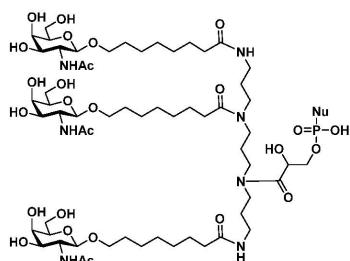
式(406)



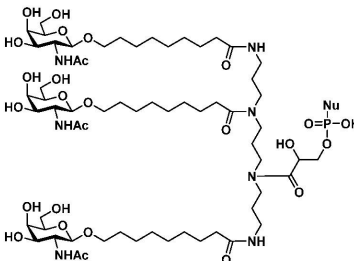
式(407)



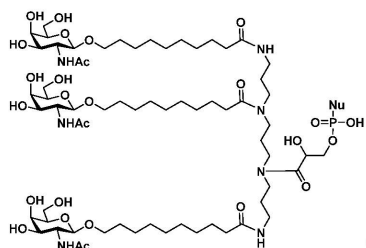
式(408)



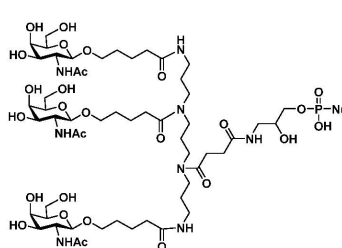
式(409)



式(410)



式(411)



式(412)

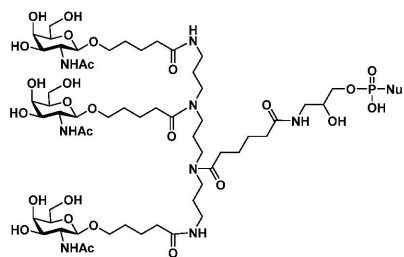
10

20

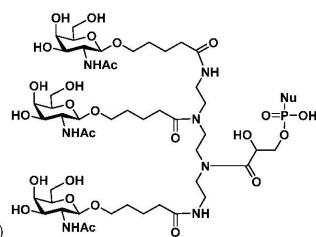
30

40

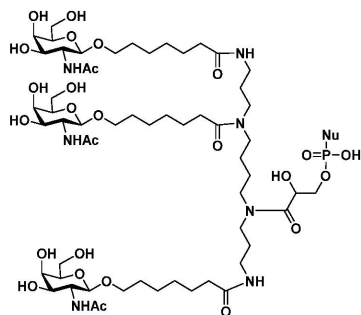
50



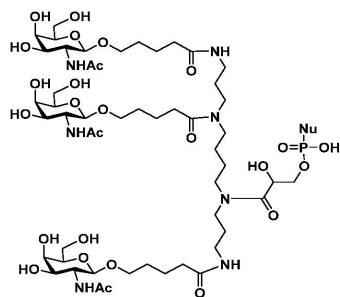
式(413)



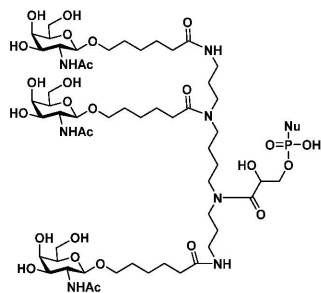
式(414)



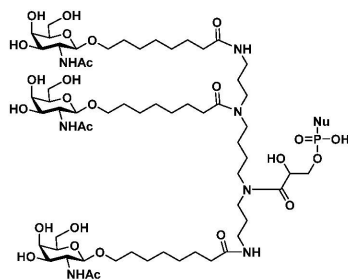
式(415)



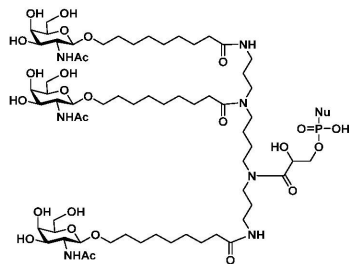
式(416)



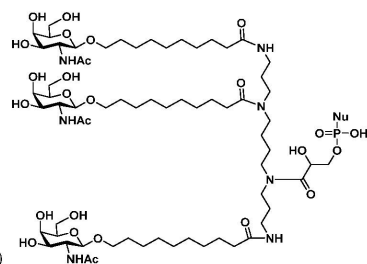
式(417)



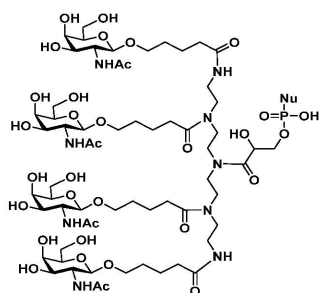
式(418)



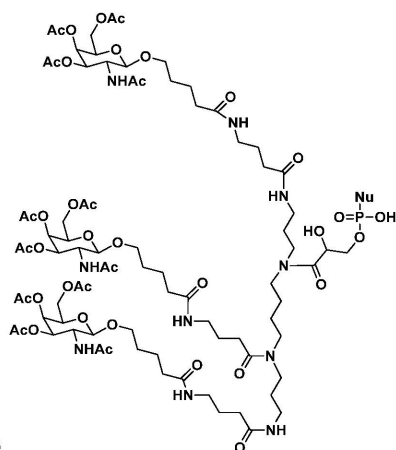
式(419)



式(420)



式(421)



式(422)

いくつかの実施形態において、式A59におけるPは、Nuに示されるs i RNA配列における任意の可能な位置に結合されてもよく、例えば、式A59におけるPは、Nuに示されるs i RNAのセンス鎖又はアンチセンス鎖のいずれか1つのヌクレオチドに結合されてもよく、いくつかの実施形態において、式A59におけるPは、Nuに示されるs i RNAのセンス鎖のいずれか1つのヌクレオチドに結合される。いくつかの実施形態において、式A59におけるPは、Nuに示されるs i RNAのセンス鎖又はアンチセンス鎖の端部に結合され、いくつかの実施形態において、式A59におけるPは、Nuに示されるs i RNAのセンス鎖の端部に結合される。Nuに示されるs i RNAの端部とは、Nuに示されるs i RNAのセンス鎖又は前記アンチセンス鎖においてその一端から前の4個のヌクレオチドを指す。いくつかの実施形態において、式A59におけるPは、Nuに示されるs i RNAのセンス鎖又はアンチセンス鎖の末端に結合され、いくつかの実施形態において、式A59におけるPは、Nuに示されるs i RNAのセンス鎖の3'末端に結合される。Nuに示されるs i RNAのセンス鎖の上記位置に結合される場合に、第2種のs i RNA複合体は、細胞に入り込んだ後、巻き戻されるときに、単独のs i RNAのアンチセンス鎖を放出し、HBVのmRNAがタンパク質を翻訳する過程を遮断し、B型肝炎ウイルス(h e p a t i t i s B v i r u s、HBV)遺伝子発現を抑制することができる。

#### 【0173】

式A59におけるPは、Nuに示されるs i RNAにおけるヌクレオチド上の任意の可能な位置、例えば、ヌクレオチドの5'位、ヌクレオチドの2'位、ヌクレオチドの3'位又はヌクレオチドの塩基に結合されてもよい。いくつかの実施形態において、式A59におけるPは、リン酸ジエステル結合を形成することによりNuに示されるs i RNAにおけるヌクレオチドの2'位、3'位又は5'位に結合されてもよい。いくつかの実施形態において、式A59におけるPは、Nuに示されるs i RNAのセンス鎖の3'末端ヌクレオチドの3'ヒドロキシ基を脱水素した酸素原子に結合され、或いは、式A59におけるPは、Nuに示されるs i RNAのセンス鎖における1つのヌクレオチドの2'-ヒドロキシ基中の水素を置換することによりヌクレオチドに結合され、或いは、式A59におけるPは、Nuに示されるs i RNAのセンス鎖の5'末端ヌクレオチドの5'ヒドロキシ基中の水素を置換することによりヌクレオチドに結合される。

#### 【0174】

本開示に記載されたs i RNA又はs i RNA複合体において、各隣接するヌクレオチド間がリン酸ジエステル結合又はチオリン酸ジエステル結合により結合され、リン酸ジエステル結合又はチオリン酸ジエステル結合における非架橋酸素原子又は硫黄原子は、負電荷を帯び、ヒドロキシ基又はスルフヒドリル基として存在してもよく、ヒドロキシ基又はスルフヒドリル基における水素イオンは、一部又は全部がカチオンで置換されてもよい。前記カチオンは、任意のカチオン、例えば、金属カチオン、アンモニウムイオン $\text{NH}_4^+$ 、有機アンモニウムカチオンの1つであってもよい。溶解性の向上を考慮して、1つの実施形態において、前記カチオンは、アルカリ金属イオン、第3級アミンにより形成されたアンモニウムカチオン及び4級アンモニウムカチオンから選択される1種又は複数種である。アルカリ金属イオンは、 $\text{K}^+$ 及び/又は $\text{Na}^+$ であってもよく、第3級アミンにより形成されたカチオンは、トリエチルアミンにより形成されたアンモニウムイオン、及び/又はN,N-ジイソプロピルエチルアミンにより形成されたアンモニウムイオンであってもよい。したがって、本開示に記載されたs i RNA又は第1種や第2種のs i RNA複合体は、少なくとも一部が塩として存在してもよい。1つの形態において、リン酸ジエステル結合又はチオリン酸ジエステル結合における非架橋酸素原子又は硫黄原子は、少なくとも一部がナトリウムイオンに結合され、本開示に記載されたs i RNA又は第1種や第2種のs i RNA複合体は、ナトリウム塩又は部分ナトリウム塩として存在する。

#### 【0175】

当業者であれば明らかに知っているように、対応する修飾を有するヌクレオシドモノマーを用いることにより修飾ヌクレオチド基を本開示に記載されたs i RNAに導入するこ

10

20

30

40

50

とができる。対応する修飾を有するヌクレオシドモノマーを調製する方法、及び修飾ヌクレオチド基を *s i R N A* に導入する方法も、当業者によく知られている。全ての修飾ヌクレオシドモノマーは、市販品を購入してもよく、既知の方法により調製してもよい。

【0176】

<第2種の *s i R N A* 複合体の調製>

任意の合理的な合成経路により本開示の第2種の *s i R N A* 複合体を調製してもよい。

【0177】

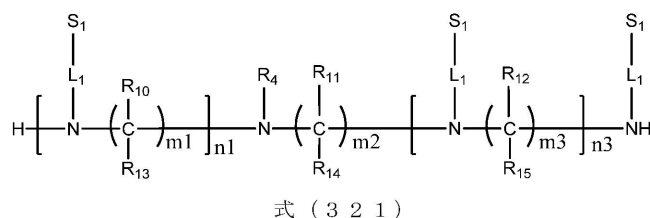
いくつかの実施形態において、第2種の *s i R N A* 複合体は、以下の方法により調製することができる。当該方法は、ホスホルアミダイト固相合成の条件で、それぞれ *s i R N A* のセンス鎖及びアンチセンス鎖のヌクレオチド種類と順序により、3'から5'に向かって、ヌクレオシドモノマーを順に結合し、各ヌクレオシドモノマーの結合が脱保護、カップリング、キャッピング、酸化又は硫化の4つの反応を含み、*s i R N A* のセンス鎖及びアンチセンス鎖を単離し、アニールを行うことを含み、Nuに示される *s i R N A* は、上記本開示の *s i R N A* である。

【0178】

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

【0179】

【化25】



式中、

$R_4$  は、Nuに示される *s i R N A* に結合できる部分である。いくつかの実施形態において、 $R_4$  は、共有結合によりNuに示される *s i R N A* に結合することができる部分である。いくつかの実施形態において、 $R_4$  は、反応を経てリン酸ジエステル結合によりNuに示される *s i R N A* の任意の官能基に複合されることができる部分であり、

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

【0180】

$n1$ 、 $n3$ 、 $m1$ 、 $m2$ 、 $m3$ 、 $R_{10}$ 、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$ 、 $R_{13}$ 、 $R_{14}$ 、 $R_{15}$ 、 $L_1$ 、 $M_1$  それぞれの定義と選択可能な範囲は、前述したとおりである。

【0181】

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

【0182】

いくつかの実施形態において、 $R_4$  は、Nuに示される *s i R N A* 又はヌクレオシドモノマー上の基と亜リン酸エステルを形成することができる第1の官能基、及びヒドロキシ

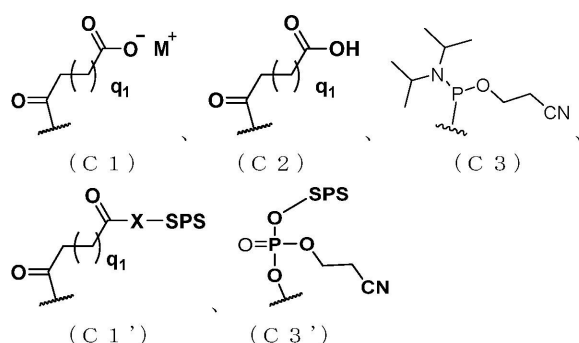
基又はアミノ基と反応させて共有結合を形成することができる第2の官能基を含み、或いは、前記共有結合により結合された固相担体を含む。いくつかの実施形態において、前記第1の官能基は、ホスホルアミダイト、ヒドロキシ基又は保護されたヒドロキシ基である。いくつかの実施形態において、前記第2の官能基は、ホスホルアミダイト、カルボン酸又はカルボン酸塩である。いくつかの実施形態において、前記第2の官能基は、共有結合を介して分子の他の部分に結合される固相担体であり、前記共有結合は、ヒドロキシ基又はアミノ基により形成されている。いくつかの実施形態において、前記固相担体は、リン酸エステル結合、カルボン酸エステル結合又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

#### 【0183】

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

#### 【0184】

#### 【化26】



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



は、基が共有結合的に結合する部位を表す。

#### 【0185】

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

#### 【0186】

いくつかの実施形態において、前記第1の官能基は、保護されたヒドロキシ基を含む。いくつかの実施形態において、前記第2の官能基は、固相担体と反応できる基を含み、前記反応により固相担体を含む複合分子を提供する。いくつかの実施形態において、前記第2の官能基は、式(C1)、(C2)又は(C3)に示されるように、カルボキシ基、カルボン酸塩又はホスホルアミダイトを含む。前記第2の官能基がカルボキシ基又はカルボ

ン酸塩を含む場合、式(321)の化合物と固相担体、例えば、樹脂におけるヒドロキシ基又はアミノ基をエステル化反応又はアミド化反応させ、カルボン酸エステル結合により結合された、又はアミド結合により結合された、固相担体を含む複合分子を形成する。前記第2の官能基がホスホルアミダイト官能基を含む場合、式(321)の化合物と汎用の固相担体、例えば、樹脂におけるヒドロキシ基をカップリング反応させ、酸化されてリン酸ジエステル結合により結合された、固相担体を含む複合分子を形成する。その後、上記固相担体が結合された生成物を出発とし、ホスホルアミダイト固相合成方法に従いヌクレオシドモノマーを順に結合し、複合基が結合されたs i RNAのセンス鎖又はアンチセンス鎖を得る。ホスホルアミダイト固相合成過程において、前記第1の官能基は、脱保護され、その後、カップリング反応条件下でヌクレオシドモノマーにおけるホスホルアミダイト基とカップリングさせる。

10

【0187】

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

【0188】

20

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

30

【0189】

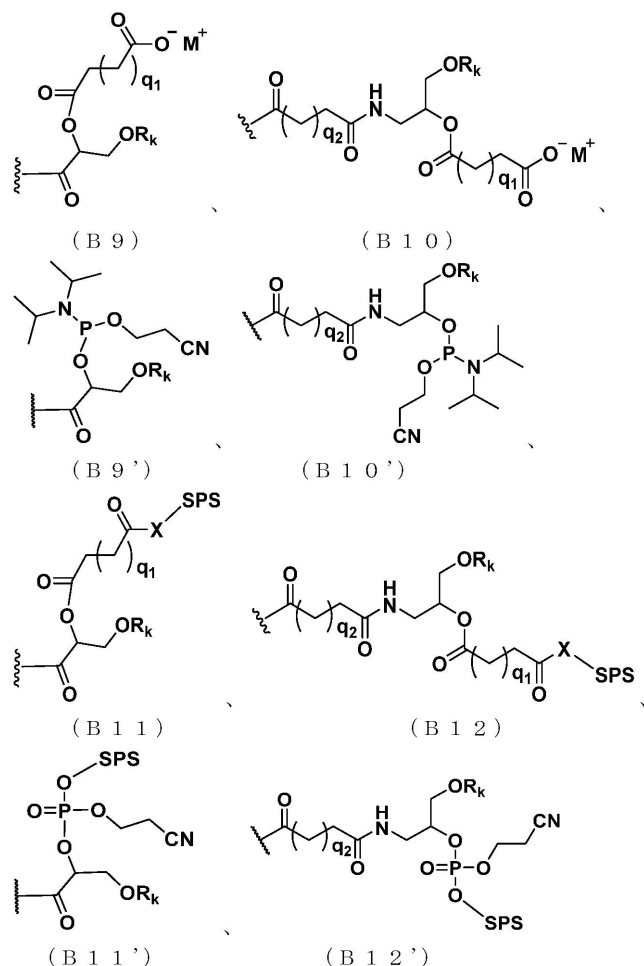
いくつかの実施形態において、 $R_4$ は、式(B9)、(B10)、(B9')、(B10')、(B11)、(B12)、(B11')又は(B12')に示される構造を含む。

【0190】

40

50

## 【化 2 7】



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



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

## 【0191】

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

## 【0192】

$L_1$  の定義は、前述したとおりである。

## 【0193】

いくつかの実施形態において、 $L_1$  は、 $M_1$  リガンドを窒素含有骨格上の N 原子に結合し、オリゴヌクレオチド複合体に肝標的機能を提供するために用いられる。いくつかの実施形態において、 $L_1$  は、A 1 ～ A 26 のいずれか 1 つ又はその組合せを含む。

## 【0194】

上記記載により、当業者であれば容易に理解できるように、本分野で公知のホスホルア

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

#### 【0195】

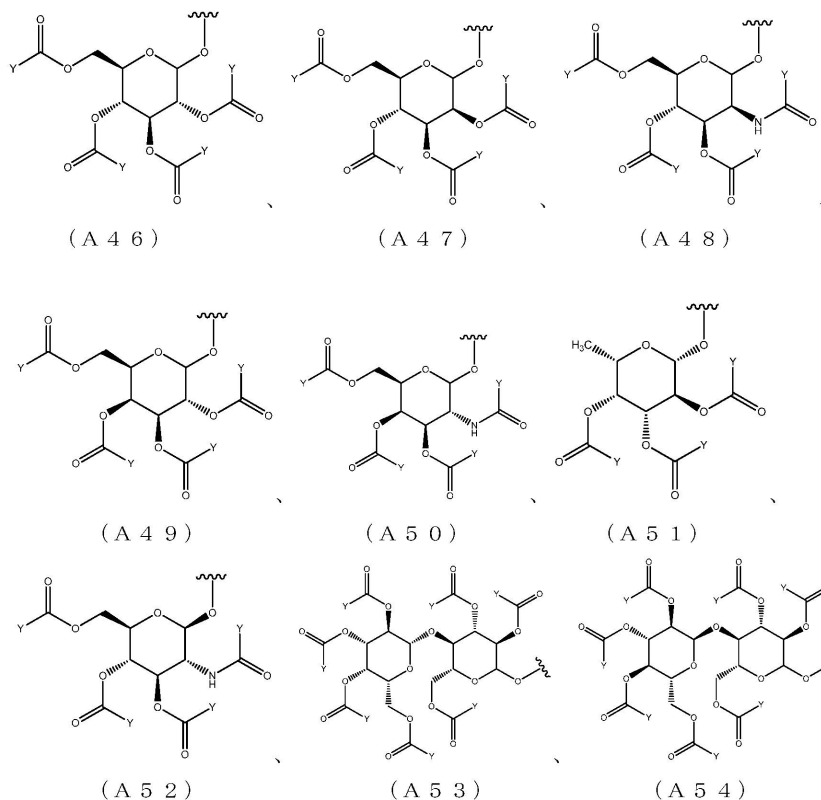
いくつかの実施形態において、各  $S_1$  は、独立して  $M_1$  である。いくつかの実施形態において、各  $S_1$  は、独立して  $M_1$  において少なくとも1つの活性ヒドロキシ基がヒドロキシ保護基で保護された基である。いくつかの実施形態において、各  $S_1$  は、独立して  $M_1$  に存在する活性ヒドロキシ基が全てヒドロキシ保護基で保護された基である。いくつかの実施形態において、当業者に既知のあらゆるヒドロキシ保護基を、 $M_1$  における活性ヒドロキシ基を保護するために用いることができる。いくつかの実施形態において、保護されたヒドロキシ基は、式  $YCOO-$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

#### 【0196】

いくつかの実施形態において、各  $S_1$  は、それぞれ独立して式 A 4 6 ~ A 5 4 からなる群から選択される。

#### 【0197】

#### 【化28】



## 【0198】

いくつかの実施形態において、 $S_1$ は式A49又はA50である。

## 【0199】

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

## 【0200】

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

## 【0201】

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

## 【0202】

いくつかの実施形態において、第2種の*s i R N A*複合体の調製方法は、当該二本鎖*s i R N A*におけるセンス鎖又はアンチセンス鎖のヌクレオチドの種類と順序により、3'から5'に向かってヌクレオシドモノマーを順に結合し、センス鎖及びアンチセンス鎖を合成し、各ヌクレオシドモノマーの結合が脱保護、カップリング、キャッピング、酸化又は硫化の4つの反応を含み、固相担体に結合されたセンス鎖、及び固相担体に結合されたアンチセンス鎖を得る工程と、カップリング反応条件下及びカップリング試薬の存在下で、式（321）に示される化合物を、固相担体に結合されたセンス鎖又は固相担体に結合されたアンチセンス鎖と接触させ、 $R_4$ にホスホルアミダイト基である第1の官能基が含まれる式（321）の化合物をセンス鎖又はアンチセンス鎖に結合させる工程と、保護基を除去して固相担体から切断し、それぞれ単離精製し、複合分子が結合された*s i R N A*のセンス鎖又はアンチセンス鎖を得、アニールを行う工程を含む。

## 【0203】

いくつかの実施形態において、式 A 5 9 における P は、s i R N A におけるセンス鎖の 3' 末端に結合され、本開示の s i R N A 複合体の調製方法は、

(1) 式 (3 2 1) の化合物 (式 (3 2 1) の化合物は、 $R_k$  に、保護されたヒドロキシ基  $OR_k$  を含む第 1 の官能基、及び式 (C 1') 又は (C 3') に示される構造を有する第 2 の官能基が含まれる化合物である) におけるヒドロキシ保護基  $R_k$  を除去し、カップリング反応条件下及びカップリング試薬の存在下で、脱保護された生成物をヌクレオシドモノマーと接触させ、複合分子により固相担体に結合されるヌクレオシドモノマーを得ること、

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

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

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

#### 【0 2 0 4】

工程 (1) において、式 (3 2 1) の化合物における保護基  $R_k$  を除去する方法は、脱保護条件で、式 (3 2 1) の化合物を脱保護試薬と接触させることを含む。脱保護条件としては、温度が 0 ~ 5 0 °C であり、いくつかの実施形態において、1 5 ~ 3 5 °C であり、反応時間が 3 0 ~ 3 0 0 秒であり、いくつかの実施形態において、5 0 ~ 1 5 0 秒であり、脱保護試薬は、トリフルオロ酢酸、トリクロロ酢酸、ジクロロ酢酸、クロロ酢酸から選択される 1 種又は複数種であってもよく、いくつかの実施形態において、ジクロロ酢酸である。脱保護試薬と式 (3 2 1) の化合物とのモル比が 1 0 : 1 ~ 1 0 0 0 : 1 であり、1 つの実施形態において、5 0 : 1 ~ 5 0 0 : 1 である。

#### 【0 2 0 5】

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

#### 【0 2 0 6】

いくつかの実施形態において、前記カップリング反応の条件としては、反応温度が 0 ~ 5 0 °C であり、いくつかの実施形態において、1 5 ~ 3 5 °C である。式 (3 2 1) の化合物とヌクレオシドモノマーとのモル比が 1 : 1 ~ 1 : 5 0 であり、いくつかの実施形態において、1 : 2 ~ 1 : 5 であり、式 (3 2 1) の化合物とカップリング試薬とのモル比が 1 : 1 ~ 1 : 5 0 であってもよく、いくつかの実施形態において、1 : 3 ~ 1 : 1 0 であり、反応時間が 2 0 0 ~ 3 0 0 0 秒であり、いくつかの実施形態において、5 0 0 ~ 1 5 0 0 秒である。カップリング試薬は、1 H-テトラゾール、5-エチルチオ 1 H-テトラゾール、5-ベンジルチオ 1 H-テトラゾールから選択される 1 種又は複数種であり、いくつかの実施形態において、5-エチルチオ 1 H-テトラゾールである。前記カップリング反応は、有機溶剤で行われてもよく、前記有機溶剤は、無水アセトニトリル、無水 DM F、無水ジクロロメタンから選択される 1 種又は複数種であり、いくつかの実施形態において、無水アセトニトリルである。式 (3 2 1) の化合物に対して、前記有機溶剤の用量が 3 ~ 5 0 L / m o l であり、いくつかの実施形態において、5 ~ 2 0 L / m o l である。

#### 【0 2 0 7】

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

#### 【0 2 0 8】

工程 (2) 及び (3) における前記固相合成の他の条件としては、ヌクレオシドモノマーの脱保護条件、脱保護試薬の種類と用量、カップリング反応条件、カップリング試薬の

10

20

30

40

50

種類と用量、カップリング反応の条件、カップリング試薬の種類と用量、酸化反応条件、酸化試薬の種類と用量、硫化反応条件、硫化試薬及び用量を含み、本分野で通常用いられる各種の試薬、用量及び条件を採用する。

【0209】

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

【0210】

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

【0211】

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

【0212】

カップリング反応条件としては、温度が0～50℃であり、いくつかの実施形態において、15～35℃であり、反応時間が5～500秒であり、いくつかの実施形態において、10～100秒であり、カップリング試薬の選択は、前記と同じである。カップリング試薬の総量と固相担体に結合される核酸配列とのモル比が1：100～100：1であり、いくつかの実施形態において、1：10～10：1である。カップリング試薬として等モル量の酢酸無水物とN-メチルイミダゾールを用いる場合に、酢酸無水物、N-メチルイミダゾール及び固相担体に結合される核酸配列のモル比が1：1：10～10：10：1であり、いくつかの実施形態において、1：1：2～2：2：1である。

【0213】

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

【0214】

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

10

20

30

40

50

【0215】

合成されたヌクレオチド配列を固相担体から切断し、塩基上、リン酸基上及びリガンド上の保護基を除去するには、*s i R N A*合成において通常の切断と脱保護方法により行われてもよい。例えば、得られた固相担体が結合されたヌクレオチド配列を濃アンモニア水と接触させ、脱保護過程において、 $A46 \sim A54$ 基の保護基 $YCOO-$ をヒドロキシ基に変換させ、 $S_1$ 基を対応する $M_1$ 基に変換させ、式(308)に示される複合体を生成する。ここで、前記濃アンモニア水は、25~30重量%のアンモニア水であってもよく、濃アンモニア水の用量は、目的とする*s i R N A*配列に対して $0.2\text{ ml} / \mu\text{mol} \sim 0.8\text{ ml} / \mu\text{mol}$ であってもよい。

【0216】

合成されたヌクレオチド配列に少なくとも1つの2'-*TBDMS*保護がある場合、前記方法は、固相担体が除去されたヌクレオチド配列をトリエチルアミン三フッ化水素酸塩と接触させることにより、当該2'-*TBDMS*保護を除去することをさらに含む。この場合、得られた目的とする*s i R N A*配列には、遊離の2'-ヒドロキシ基の対応するヌクレオチドを有する。純粋なトリエチルアミン三フッ化水素酸塩の用量は、目的とする*s i R N A*配列に対して $0.4\text{ ml} / \mu\text{mol} \sim 1.0\text{ ml} / \mu\text{mol}$ である。このように式(308)の*s i R N A*複合体を得ることができる。

【0217】

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

【0218】

このように得られた*s i R N A*複合体において、ヌクレオチド間のリン酸ジエステル結合又はチオリン酸ジエステル結合における非架橋酸素原子又は硫黄原子は、基本的にナトリウムイオンに結合されており、*s i R N A*複合体は、基本的にナトリウム塩として存在する。熟知のイオン交換方法により、水素イオン及び／又は他のカチオンで前記ナトリウムイオンを置換し、他の形式の*s i R N A*複合体を得ることができる。前記カチオンは、前述したとおりである。

【0219】

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

【0220】

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

【0221】

本開示の複合体を得た後、いくつかの実施形態において、例えば、液体クロマトグラフィータンデム質量分析等の方法を用いて、分子量検出等により合成された*s i R N A*複合体の特徴を明らかにし、合成された*s i R N A*複合体が、目的設計の*s i R N A*複合体であるとともに、合成された*s i R N A*の配列が、合成しようとする*s i R N A*の配列と一致し、例えば表1に示される配列の1つであると確認することもできる。

【0222】

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

10

20

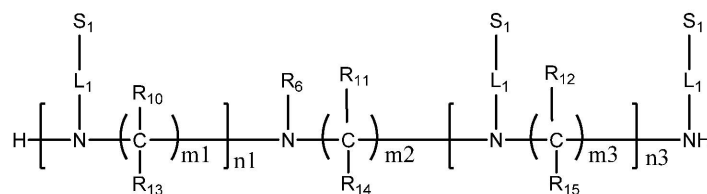
30

40

50

【0223】

【化29】



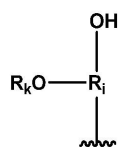
式(313)

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

$R_6$ は、式(321)における $R_4$ を提供する基である。いくつかの実施形態において、 $R_6$ は、式(A61)に示される構造を有する。

【0224】

【化30】



(A61)

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

【0225】

前記エステル化反応条件としては、反応温度が0～100℃であり、反応時間が8～48時間であり、いくつかの実施形態において、前記エステル化反応条件としては、反応温度が10～40℃であり、反応時間が20～30時間である。

【0226】

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

【0227】

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

【0228】

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

## 【0229】

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

## 【0230】

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

## 【0231】

任意の適切な単離方法により反応混合物から式(321)の化合物を単離することができる。いくつかの実施形態において、溶剤を蒸発除去した後、クロマトグラフィー方法により式(321)の化合物を単離することができ、例えば、(1)順相精製シリカゲル: 200~300メッシュのシリカゲル充填剤を、1wt%トリエチルアミンを含むジクロロメタン:メタノール=100:18~100:20で勾配溶出する、又は、(2)逆相精製: C<sub>18</sub>、C<sub>8</sub>逆相充填剤を、メタノール:アセトニトリル=0.1:1~1:0.1で勾配溶出するというクロマトグラフィー条件で単離することができる。いくつかの実施形態において、溶剤を直接に除去して式(321)の化合物の粗製品を得ることができ、当該粗製品は、そのまま後の反応に用いることができる。

## 【0232】

いくつかの実施形態において、式(321)の化合物の調製方法は、縮合反応条件下で、有機溶剤において、縮合剤と第3級アミン類有機塩基の存在下で、上記イオン交換反応により得られた生成物を、さらにアミノ基又はヒドロキシ基を含む固相担体と接触させることをさらに含む。この場合、R<sub>4</sub>に第1の官能基及び第2の官能基が含まれ、第1の官能基がヒドロキシ保護基を含み、第2の官能基が式(C1')に示される構造を含む式(321)の化合物が得られる。

## 【0233】

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

## 【0234】

前記有機溶剤は、当業者に既知の任意の適切な溶剤又は混合溶剤であってもよい。いくつかの実施形態において、前記有機溶剤は、アセトニトリル、エポキシ類溶剤、エーテル類溶剤、ハロゲン化アルキル類溶剤、ジメチルスルホキシド、N, N-ジメチルホルムアミド及びN, N-ジイソプロピルエチルアミンの1種又は複数種である。いくつかの実施形態において、前記エポキシ類溶剤は、ジオキサン及び/又はテトラヒドロフランであり

10

20

30

40

50

、前記エーテル類溶剤は、エチルエーテル及び／又はメチル *t e r t* -ブチルエーテルであり、前記ハロゲン化アルキル類溶剤は、ジクロロメタン、トリクロロメタン及び 1, 2-ジクロロエタンの 1 種又は複数種である。いくつかの実施形態において、前記有機溶剤は、アセトニトリルである。式 (321) の化合物に対して、前記有機溶剤の用量が 20 ~ 200 L / mol であり、いくつかの実施形態において、50 ~ 100 L / mol である。

#### 【0235】

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

#### 【0236】

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

#### 【0237】

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

#### 【0238】

いくつかの実施形態において、前記キャッピング試薬は、キャッピング試薬 1 (*c a p* 1) 及びキャッピング試薬 2 (*c a p* 2) からなり、キャッピング試薬 1 は、*N*-メチルイミダゾールであり、いくつかの実施形態において、*N*-メチルイミダゾールのピリジン／アセトニトリル混合溶液として提供され、ピリジンとアセトニトリルとの体積比が 1 : 10 ~ 1 : 1 であり、いくつかの実施形態において、1 : 3 ~ 1 : 1 であり、ピリジンとアセトニトリルの総体積と *N*-メチルイミダゾールの体積との比が 1 : 1 ~ 10 : 1 であり、いくつかの実施形態において、3 : 1 ~ 7 : 1 である。前記キャッピング試薬 2 は、酢酸無水物であり、いくつかの実施形態において、酢酸無水物のアセトニトリル溶液として提供され、酢酸無水物とアセトニトリルとの体積が 1 : 1 ~ 1 : 10 であり、いくつかの実施形態において 1 : 2 ~ 1 : 6 である。

#### 【0239】

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

#### 【0240】

いくつかの実施形態において、キャッピング試薬としては、等モル量の酢酸無水物と *N*-メチルイミダゾールを用いる。前記有機溶剤は、アセトニトリル、エポキシ類溶剤、エ

10

20

30

40

50

ーテル類溶剤、ハロゲン化アルキル類溶剤、ジメチルスルホキシド、N，N－ジメチルホルムアミド及びN，N－ジイソプロピルエチルアミンの1種又は複数種である。いくつかの実施形態において、前記有機溶剤は、アセトニトリルである。式(321)の化合物に対して、前記有機溶剤の用量が10～50 L/molであり、いくつかの実施形態において、5～30 L/molである。

#### 【0241】

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

10

#### 【0242】

任意の適切な単離方法により反応混合物から式(321)の化合物を単離することができる。いくつかの実施形態において、有機溶剤で十分に洗浄し、濾過し、未反応の反応物、過剰なカップリング試薬及び他の不純物を除去することにより、式(321)の化合物を得ることができる。前記有機溶剤は、アセトニトリル、ジクロロメタン、メタノールから選択され、いくつかの実施形態において、アセトニトリルである。

#### 【0243】

いくつかの実施形態において、式(321)に示される複合分子の調製方法は、有機溶剤において、カップリング反応条件下で、カップリング試薬の存在下で、式(313)に示される化合物をホスホルジアミダイトと接触させ、単離して式(321)に示される化合物を得ることを含む。この場合、R<sub>4</sub>に第1の官能基及び第2の官能基が含まれ、第1の官能基がヒドロキシ保護基を含み、第2の官能基が式(C3)に示される構造を含む式(321)の化合物が得られる。

20

#### 【0244】

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

30

40

#### 【0245】

いくつかの実施形態において、式(321)の化合物の調製方法は、カップリング反応条件下で、有機溶剤において、カップリング試薬の存在下で、単離して得られた生成物を、さらにヒドロキシ基含有固相担体と接触させる工程をさらに含む。その後、カップリング反応、酸化反応を行い、単離して式(321)の化合物を得る。この場合、R<sub>4</sub>に第1の官能基及び第2の官能基が含まれ、第1の官能基がヒドロキシ保護基を含み、第2の官能基が式(C3')に示される構造を有する式(321)の化合物が得られる。

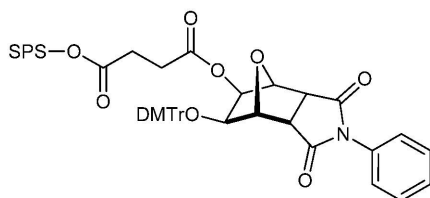
50

## 【0246】

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

## 【0247】

## 【化31】



(B80)

10

## 【0248】

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

20

## 【0249】

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

30

## 【0250】

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

## 【0251】

酸化反応条件としては、温度が0～50℃であり、例えば、15～35℃であってもよく、反応時間が1～100秒、例えば、5～50秒であってもよく、酸化試薬は、例えば、ヨウ素であってもよい（いくつかの実施形態において、ヨウ素水として提供する）。いくつかの実施形態において、酸化試薬と亜リン酸エステル基とのモル比が1：1～100：1であり、例えば、5：1～50：1であってもよい。いくつかの実施形態において、前記酸化反応は、テトラヒドロフラン：水：ピリジン＝3：1：1～1：1：3の混合溶剤で行われる。

40

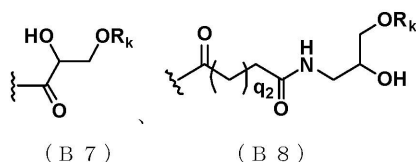
## 【0252】

いくつかの実施形態において、R<sub>6</sub>は、式B7又はB8の基の1つである。

## 【0253】

50

## 【化 3 2】



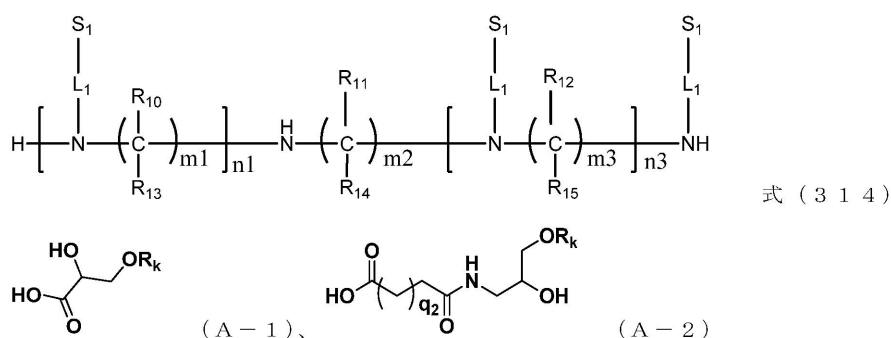
式中、 $q_2$  の定義は、前述したとおりである。

## 【 0 2 5 4 】

この場合、式 ( 3 1 3 ) に示される化合物は、有機溶剤において、アミド化反応条件下及びアミド化反応縮合剤と第 3 級アミン類有機塩基の存在下で、式 ( 3 1 4 ) に示される化合物を式 ( A - 1 ) に示される化合物又は式 ( A - 2 ) の化合物と接触させ、その後単離する、という調製方法により得ることができる。

## 【 0 2 5 5 】

## 【化 3 3】



式中、 $n_1$ 、 $n_3$ 、 $m_1$ 、 $m_2$ 、 $m_3$ 、 $R_{10}$ 、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$ 、 $R_{13}$ 、 $R_{14}$ 、 $R_{15}$ 、 $L_1$ 、 $S_1$ 、 $q_2$  及び  $R_k$  それぞれの定義と選択可能な範囲は、前述したとおりである。

## 【 0 2 5 6 】

前記アミド化反応条件としては、反応温度が  $0 \sim 100^\circ\text{C}$  であり、反応時間が  $1 \sim 48$  時間であってもよく、いくつかの実施形態において、前記アミド化反応条件としては、反応温度が  $10 \sim 40^\circ\text{C}$  であり、反応時間が  $2 \sim 16$  時間である。

## 【 0 2 5 7 】

いくつかの実施形態において、前記有機溶剤は、アルコール類溶剤、エポキシ類溶剤、エーテル類溶剤、ハロゲン化アルキル類溶剤、ジメチルスルホキシド、 $N$ 、 $N$ -ジメチルホルムアミド及び  $N$ 、 $N$ -ジイソプロピルエチルアミンの 1 種又は複数種である。前記アルコール類溶剤は、いくつかの実施形態において、メタノール、エタノール、プロパノールの 1 種又は複数種であり、いくつかの実施形態において、エタノールである。前記エポキシ類溶剤は、いくつかの実施形態において、ジオキサン及び／又はテトラヒドロフランである。前記エーテル類溶剤は、いくつかの実施形態において、エチルエーテル及び／又はメチル *tert*-ブチルエーテルである。前記ハロゲン化アルキル類溶剤は、いくつかの実施形態において、ジクロロメタン、トリクロロメタン及び 1, 2-ジクロロエタンの 1 種又は複数種である。いくつかの実施形態において、前記有機溶剤は、ジクロロメタンである。式 ( 3 1 4 ) の化合物に対して、有機溶剤の用量が  $3 \sim 50 \text{ L/mol}$  であり、いくつかの実施形態において  $3 \sim 20 \text{ L/mol}$  である。

## 【 0 2 5 8 】

いくつかの実施形態において、前記アミド化反応縮合剤は、(ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ)トリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート、3-ジエトキシホスホリル-1, 2, 3-ベンゾオキサゾール 4 (3H)-オン、4-(4, 6-ジメトキシトリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリン塩酸塩 (4-(4, 6-dime

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

【0259】

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

【0260】

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

【0261】

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

【0262】

上記と同様に、任意の適切な単離方法により反応混合物から式 (313) の化合物を単離することができる。いくつかの実施形態において、溶剤を蒸発除去した後、クロマトグラフィー方法により式 (313) の化合物を単離することができ、例えば、(1) 順相精製シリカゲル: 200~300メッシュのシリカゲル充填剤を、石油エーテル: 酢酸エチル: ジクロロメタン: N, N-ジメチルホルムアミド=1:1:1:0.5~1:1:1:0.6で勾配溶出する、(2) 逆相精製: C<sub>18</sub>、C<sub>8</sub>逆相充填剤を、メタノール: アセトニトリル=0.1:1~1:0.1で勾配溶出するという2つのクロマトグラフィー条件で単離することができる。いくつかの実施形態において、溶剤を直接に除去して式 (313) の化合物の粗製品を得ることができ、当該粗製品は、そのまま後の反応に用いることができる。

【0263】

いくつかの実施形態において、式 (314) に示される化合物は、有機溶剤において、脱保護反応条件下で、式 (315) に示される化合物をハロ酢酸と接触させた後、単離することを含む調製方法により得ることができる。

【0264】

10

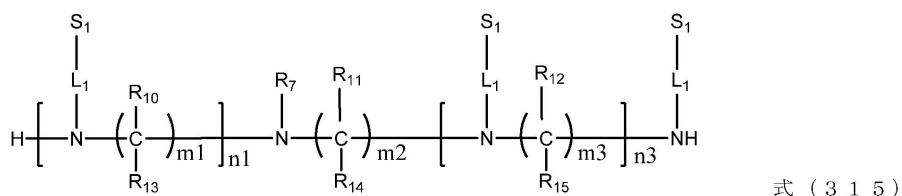
20

30

40

50

## 【化 3 4】

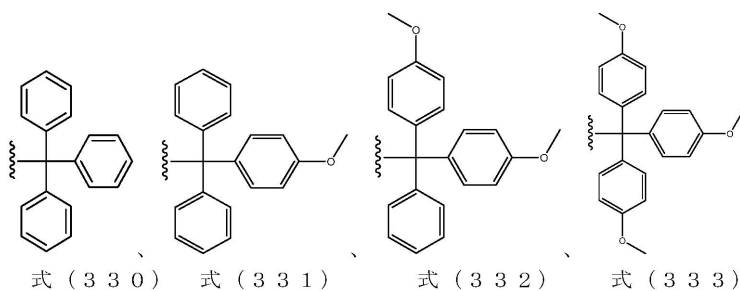


式中、 $R_7$ は、式(330)、(331)、(332)又は(333)に示される基から選択され、いくつかの実施形態において、 $R_7$ の構造が式(330)に示される。

10

## 【0265】

## 【化 3 5】



20

## 【0266】

$n_1$ 、 $n_3$ 、 $m_1$ 、 $m_2$ 、 $m_3$ 、 $R_{10}$ 、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$ 、 $R_{13}$ 、 $R_{14}$ 、 $R_{15}$ 、 $L_1$ 、 $S_1$ それぞれの定義と選択可能な範囲は、前述したとおりである。

## 【0267】

前記ハロ酢酸は、ジクロロ酢酸、トリクロロ酢酸、クロロ酢酸及びトリフルオロ酢酸から選択される1種又は複数種であってもよく、いくつかの実施形態において、ジクロロ酢酸である。

## 【0268】

前記脱保護反応条件としては、反応温度が0～100℃であり、反応時間が0.1～24時間であり、いくつかの実施形態において、反応温度が10～40℃であり、反応時間が0.5～16時間である。

30

## 【0269】

いくつかの実施形態において、前記有機溶剤は、エポキシ類溶剤、エーテル類溶剤、ハロゲン化アルキル類溶剤、ジメチルスルホキシド、N,N-ジメチルホルムアミド及びN,N-ジイソプロピルエチルアミンの1種又は複数種である。前記エポキシ類溶剤は、いくつかの実施形態において、ジオキサン及び／又はテトラヒドロフランであり、前記エーテル類溶剤は、いくつかの実施形態において、エチルエーテル及び／又はメチル tert-ブチルエーテルであり、前記ハロゲン化アルキル類溶剤は、いくつかの実施形態において、ジクロロメタン、トリクロロメタン及び1,2-ジクロロエタンの1種又は複数種であり、いくつかの実施形態において、前記有機溶剤は、ジクロロメタンである。式(315)の化合物に対して、有機溶剤の用量が3～50 L/molであり、いくつかの実施形態において、5～20 L/molである。

40

## 【0270】

前記ハロ酢酸と前記式(315)に示される化合物とのモル比が5：1～100：1であり、いくつかの実施形態において、10：1～50：1である。

## 【0271】

上記と同様に、任意の適切な単離方法により反応混合物から式(314)の化合物を単離することができる。いくつかの実施形態において、溶剤を蒸発除去した後、クロマトグラフィー方法により式(314)の化合物を単離することができ、例えば、(1)順相精

50

製シリカゲル：２００～３００メッシュのシリカゲル充填剤を、ジクロロメタン：メタノール＝１００：３０～１００：４０で勾配溶出する、（２）逆相精製：Ｃ<sub>１８</sub>、Ｃ<sub>８</sub>逆相充填剤を、メタノール：アセトニトリル＝０．１：１～１：０．１で勾配溶出するという２つのクロマトグラフィー条件で単離することができる。いくつかの実施形態において、溶剤を直接に除去して式（３１４）の化合物の粗製品を得ることができ、当該粗製品は、そのまま後の反応に用いることができる。

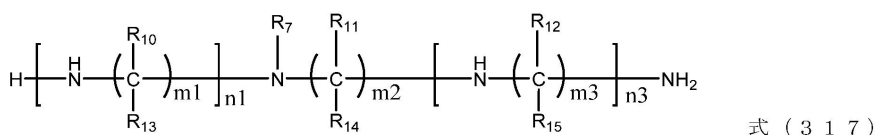
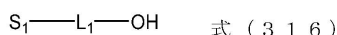
【０２７２】

式（３１５）に示される化合物は、有機溶剤において、アミド化反応縮合剤と第３級アミン類有機塩基の存在下で、縮合反応条件下で、式（３１７）に示される化合物を式（３１６）に示される化合物と接触させた後、単離することを含む調製方法により得ることができる。

10

【０２７３】

【化３６】



20

式中、 $n_1$ 、 $n_3$ 、 $m_1$ 、 $m_2$ 、 $m_3$ 、 $R_7$ 、 $R_{10}$ 、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$ 、 $R_{13}$ 、 $R_{14}$ 、 $R_{15}$ 、 $L_1$ 、 $S_1$ それぞれの定義と選択可能な範囲は、前述したとおりである。

【０２７４】

式（３１６）の化合物としては、例えば、*J. Am. Chem. Soc.* 2014, 136, 16958-16961に開示された化合物を用いてもよく、或いは、式（３１６）の化合物は、当業者が各種の方法により調製することができ、例えば、米国特許US8106022B2の実施例１に開示された方法を参照していくつかの式（３１６）の化合物を調製することができ、引用により上記文献の全ての内容が全体として本明細書に組み込まれる。

【０２７５】

いくつかの実施形態において、前記縮合反応条件としては、反応温度が０～１００℃であり、反応時間が０．１～２４時間であり、いくつかの実施形態において、反応温度が１０～４０℃であり、反応時間が０．５～１６時間である。

30

【０２７６】

前記式（３１６）に示される化合物と前記式（３１７）に示される化合物とのモル比が２：１～１０：１であってもよく、いくつかの実施形態において、２．５：１～５：１である。

【０２７７】

いくつかの実施形態において、前記有機溶剤は、アセトニトリル、エポキシ類溶剤、エーテル類溶剤、ハロゲン化アルキル類溶剤、ジメチルスルホキシド、*N*，*N*-ジメチルホルムアミド及び*N*，*N*-ジイソプロピルエチルアミンの１種又は複数種であり、前記エポキシ類溶剤は、いくつかの実施形態において、ジオキサン及び／又はテトラヒドロフランであり、前記エーテル類溶剤は、いくつかの実施形態において、エチルエーテル及び／又はメチル tert-ブチルエーテルであり、前記ハロゲン化アルキル類溶剤は、いくつかの実施形態において、ジクロロメタン、トリクロロメタン及び１，２-ジクロロエタンの１種又は複数種であり、いくつかの実施形態において、前記有機溶剤は、アセトニトリルである。式（３１７）の化合物に対して、前記有機溶剤の用量が３～５０Ｌ／molであり、いくつかの実施形態において、５～２０Ｌ／molである。

40

【０２７８】

前記アミド化反応縮合剤は、（ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ）トリピロリジノ

50

ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート、3-ジエトキシホスホリル-1,2,3-ベンゾオキサゾール4(3H)-オン(DEPBT)、O-ベンゾトリアゾール-4-メチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート又は4-(4,6-ジメトキシトリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリン塩酸塩であり、いくつかの実施形態において、4-(4,6-ジメトキシトリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリン塩酸塩である。前記アミド化反応縮合剤と式(317)に示される化合物とのモル比が2:1~10:1であり、いくつかの実施形態において、2.5:1~5:1である。

【0279】

前記第3級アミン類有機塩基は、N-メチルモルホリン、トリエチルアミン又はN,N-ジイソプロピルエチルアミンであり、いくつかの実施形態において、N-メチルモルホリンであり、前記第3級アミン類有機塩基と式(317)に示される化合物とのモル比が3:1~20:1であり、いくつかの実施形態において、5:1~10:1である。

【0280】

上記と同様に、任意の適切な単離方法により反応混合物から式(315)の化合物を単離することができる。いくつかの実施形態において、溶剤を蒸発除去した後、クロマトグラフィー方法により式(315)の化合物を単離することができ、例えば、(1)順相精製シリカゲル:200~300メッシュのシリカゲル充填剤を、ジクロロメタン:メタノール=100:5~100:7で勾配溶出する、(2)逆相精製:C<sub>18</sub>、C<sub>8</sub>逆相充填剤を、メタノール:アセトニトリル=0.1:1~1:0.1で勾配溶出するという2つのクロマトグラフィー条件で単離することができる。いくつかの実施形態において、溶剤を直接に除去して式(315)の化合物の粗製品を得ることができ、当該粗製品は、そのまま後の反応に用いることができる。

【0281】

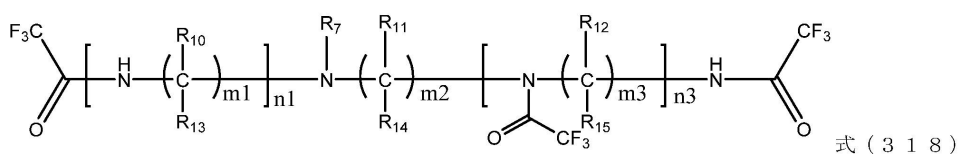
いくつかの実施形態において、式(317)の化合物と十分な量の式(316)の化合物を一度反応させるだけで所望の式(315)の化合物を生成する。この場合、各S<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>部分同士が同じである。いくつかの実施形態において、必要に応じて、式(317)の化合物を、異なる式(316)の化合物、即ち、L<sub>1</sub>及び/又はS<sub>1</sub>が異なる式(316)の化合物とバッチ反応させることにより、生成された式(315)の化合物に2種類以上のS<sub>1</sub>及び/又はL<sub>1</sub>を含ませることができる。例えば、1eqの式(317)の化合物に対して、それを2eqの第1の式(316)の化合物と接触させ、式(317)の化合物における2つの末端第一級アミン基に第1のS<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>部分を結合した後、続いて(n<sub>3</sub>+n<sub>1</sub>-1)eqの第2の式(316)の化合物と接触させ、(n<sub>3</sub>及びn<sub>1</sub>の定義と値の範囲は、前述したとおりである)、式(317)の化合物における(n<sub>3</sub>+n<sub>1</sub>-1)個の第二級アミン基に第2のS<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>部分を結合することができる。

【0282】

いくつかの実施形態において、式(317)に示される化合物は、有機溶剤の存在下で、脱保護反応条件下で、式(318)に示される化合物をメチルアミン水溶液と接触させた後、単離することを含む調製方法により得ることができる。

【0283】

【化37】



式中、n<sub>1</sub>、n<sub>3</sub>、m<sub>1</sub>、m<sub>2</sub>、m<sub>3</sub>、R<sub>7</sub>、R<sub>10</sub>、R<sub>11</sub>、R<sub>12</sub>、R<sub>13</sub>、R<sub>14</sub>、R<sub>15</sub>それぞれの定義と選択可能な範囲は、前述したとおりである。

【0284】

前記脱保護反応条件としては、反応温度が0~150℃であり、反応時間が5~72時

間であり、いくつかの実施形態において、反応温度が20～80℃であり、反応時間が10～30時間である。

【0285】

前記有機溶剤は、アルコールから選択され、いくつかの実施形態において、メタノール、エタノール及びイソプロパノールの1つであり、いくつかの実施形態において、メタノールであり、式(318)の化合物に対して、前記有機溶剤の用量が1～20L/molであり、いくつかの実施形態において、1.5～10L/molである。

【0286】

前記メチルアミン水溶液の濃度が30～40質量%であってもよく、メチルアミンと式(318)に示される化合物とのモル比が10:1～500:1であってもよく、いくつかの実施形態において、50:1～200:1である。

【0287】

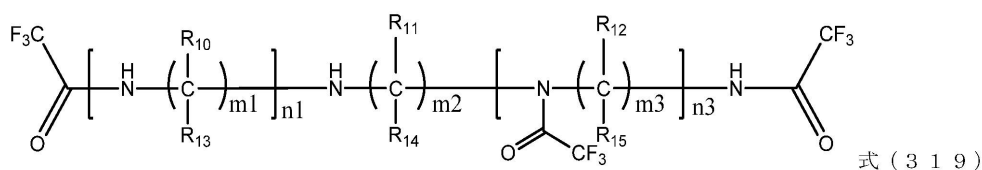
上記と同様に、任意の適切な単離方法により反応混合物から式(317)の化合物を単離することができる。いくつかの実施形態において、溶剤を蒸発除去した後、クロマトグラフィー方法により式(317)の化合物を単離することができ、例えば、順相精製シリカゲル：(1)200～300メッシュのシリカゲル充填剤を、ジクロロメタン：メタノール：アンモニア水(25wt%)=1:1:0.05～1:1:0.25で勾配溶出する、(2)逆相精製：C<sub>18</sub>、C<sub>8</sub>逆相充填剤を、メタノール：アセトニトリル=0.1:1～1:0.1で勾配溶出するという2つのクロマトグラフィー条件で単離することができる。いくつかの実施形態において、溶剤を直接に除去して式(317)の化合物の粗製品を得ることができ、当該粗製品は、そのまま後の反応に用いることができる。

【0288】

いくつかの実施形態において、式(318)に示される化合物は、有機溶剤の存在下で、置換反応条件下で、式(319)に示される化合物を、トリフェニルクロロメタン(TrCl)、ジフェニルエチルフェニルクロロメタン、フェニルジエチルフェニルクロロメタン又はトリエチルフェニルクロロメタン、いくつかの実施形態においてトリフェニルクロロメタン(TrCl)と接触させた後、単離することを含む調製方法により得ることができる。

【0289】

【化38】



式中、n1、n3、m1、m2、m3、R<sub>10</sub>、R<sub>11</sub>、R<sub>12</sub>、R<sub>13</sub>、R<sub>14</sub>、R<sub>15</sub>それぞれの定義と選択可能な範囲は、前述したとおりである。

【0290】

前記置換反応条件としては、反応温度が0～100℃であり、反応時間が5～72時間であってもよく、いくつかの実施形態において、反応条件としては、反応温度が10～40℃であり、反応時間が10～30時間である。

【0291】

トリフェニルクロロメタン(TrCl)、ジフェニルエチルフェニルクロロメタン、フェニルジエチルフェニルクロロメタン又はトリエチルフェニルクロロメタンは、市販品を購入することができ、トリフェニルクロロメタン(TrCl)、ジフェニルエチルフェニルクロロメタン、フェニルジエチルフェニルクロロメタン又はトリエチルフェニルクロロメタンと式(319)に示される化合物とのモル比が1:1～10:1であってもよく、いくつかの実施形態において、1:1～3:1である。

【0292】

前記有機溶剤は、エポキシ類溶剤、エーテル類溶剤、ハロゲン化アルキル類溶剤、ジメチルスルホキシド、N，N－ジメチルホルムアミド及びN，N－ジイソプロピルエチルアミンの1種又は複数種であってもよい。前記エポキシ類溶剤は、いくつかの実施形態において、ジオキサン及び／又はテトラヒドロフランであり、前記エーテル類溶剤は、いくつかの実施形態において、エチルエーテル及び／又はメチルtert－ブチルエーテルであり、前記ハロゲン化アルキル類溶剤は、いくつかの実施形態において、ジクロロメタン、トリクロロメタン及び1，2－ジクロロエタンの1種又は複数種であり、いくつかの実施形態において、前記有機溶剤は、ジクロロメタンである。式(319)の化合物に対して、前記有機溶剤の用量が3～50L/molであってもよく、いくつかの実施形態において、5～20L/molである。

10

#### 【0293】

上記と同様に、任意の適切な単離方法により反応混合物から式(318)の化合物を単離することができる。いくつかの実施形態において、溶剤を蒸発除去した後、クロマトグラフィー方法により式(318)の化合物を単離ことができ、例えば、(1)順相精製シリカゲル：200～300メッシュのシリカゲル充填剤を、メタノール：ジクロロメタン＝0.01：1～0.5：1で、又はメタノール：ジクロロメタン：酢酸エチル：石油エーテル＝0.1：1：1：1～1：1：1：1で勾配溶出する、(2)逆相精製：C<sub>18</sub>、C<sub>8</sub>逆相充填剤を、メタノール：アセトニトリル＝0.1：1～1：0.1で勾配溶出するという2つのクロマトグラフィー条件で単離することができる。いくつかの実施形態において、溶剤を直接に除去して式(318)の化合物の粗製品を得ることができ、当該粗製品は、そのまま後の反応に用いることができる。

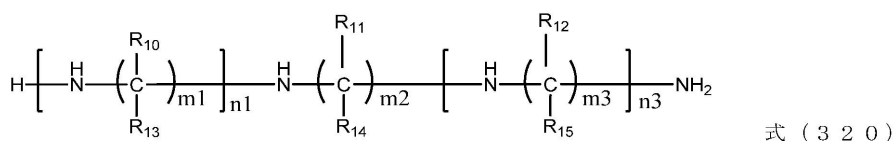
20

#### 【0294】

いくつかの実施形態において、式(319)に示される化合物は、有機溶剤において、置換反応条件下で、式(320)に示される化合物をトリフルオロ酢酸エチルと接触させた後、単離することを含む調製方法により得ることができる。

#### 【0295】

#### 【化39】



30

式中、n1、n3、m1、m2、m3、R<sub>10</sub>、R<sub>11</sub>、R<sub>12</sub>、R<sub>13</sub>、R<sub>14</sub>、R<sub>15</sub>それぞれの定義と選択可能な範囲は、前述したとおりである。

#### 【0296】

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

40

#### 【0297】

前記置換反応条件としては、反応温度が0～100℃であり、反応時間が5～72時間であってもよく、いくつかの実施形態において、前記置換反応条件としては、反応温度が10～40℃であり、反応時間が10～30時間である。

50

## 【0298】

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

## 【0299】

前記トリフルオロ酢酸エチルと式(320)に示される化合物とのモル比が2:1~10:1であり、いくつかの実施形態において、3:1~5:1である。

## 【0300】

上記と同様に、任意の適切な単離方法により反応混合物から式(319)の化合物を単離することができる。いくつかの実施形態において、溶剤を蒸発除去した後、クロマトグラフィー方法により式(319)の化合物を単離することができ、例えば、(1)順相精製シリカゲル:200~300メッシュのシリカゲル充填剤を、メタノール:ジクロロメタン=0.01:1~0.5:1で、又はメタノール:ジクロロメタン:酢酸エチル:石油エーテル=0.1:1:1:1~1:1:1:1で勾配溶出する、(2)逆相精製:C<sub>18</sub>、C<sub>8</sub>逆相充填剤を、メタノール:アセトニトリル=0.1:1~1:0.1で勾配溶出するという2つのクロマトグラフィー条件で単離することができる。いくつかの実施形態において、溶剤を直接に除去して式(319)の化合物の粗製品を得ることができ、当該粗製品は、そのまま後の反応に用いることができる。

## 【0301】

本開示の第1種又は第2種のsiRNA複合体は、薬学的に許容できる他の添加剤と併用してもよく、当該添加剤は、本分野で通常採用される各種の製剤又は化合物の1種又は複数種であってもよく、詳細は、上述した本開示の薬物組成物に関する記載を参照のこと。

## 【0302】

<本開示のsiRNA、当該siRNAを含む薬物組成物、第1種のsiRNA複合体及び第2種のsiRNA複合体の使用>

いくつかの実施形態において、本開示は、siRNA、当該siRNAを含む薬物組成物、第1種のsiRNA複合体及び第2種のsiRNA複合体の、前記B型肝炎ウイルスの感染による病理学的状態又は疾患の治療及び／又は予防のための薬物の調製への使用を提供する。

## 【0303】

本開示の1つの実施形態によれば、本開示は、被験体に本開示により提供されるsiRNA、薬物組成物、第1種のsiRNA複合体及び第2種のsiRNA複合体を投与することを含む、B型肝炎ウイルスの感染による病理学的状態又は疾患の治療方法を提供する。

## 【0304】

本開示の別の実施形態によれば、本開示は、本開示により提供されるsiRNA、薬物組成物、第1種のsiRNA複合体及び第2種のsiRNA複合体を、慢性B型肝炎ウイルスに感染した肝炎細胞と接触させることを含む、前記慢性B型肝炎ウイルスに感染した肝炎細胞におけるB型肝炎ウイルス遺伝子の発現の抑制方法を提供する。

## 【0305】

前記B型肝炎ウイルスの感染による病理学的状態又は疾患は、慢性肝疾患、肝炎、肝線維性疾患及び肝過形成性疾患から選択される。

## 【0306】

本開示のsiRNA及び／又は薬物組成物、第1種のsiRNA複合体及び第2種のsiRNA複合体を、それを必要とする被験体に投与することにより、RNA干渉機構によりB型肝炎を治療する目的を達成することができる。したがって、本開示のsiRNA及び／又は薬物組成物、第1種のsiRNA複合体及び第2種のsiRNA複合体は、B型肝炎の予防及び／又は治療に用いられ、又はB型肝炎の予防及び／又は治療のための薬物の調製に用いることができる。

## 【0307】

本明細書で用いられる用語「薬剤投与／投与」とは、s i R N A、薬物組成物、第1種のs i R N A複合体及び／又は第2種のs i R N A複合体を少なくとも一部、所望の部位に局在化することにより所望の効果を生じさせる方法又は経路により、s i R N A、薬物組成物、第1種のs i R N A複合体及び／又は第2種のs i R N A複合体を被験体の体内に入れることを指す。本開示の方法に適した投与経路は、局所投与と全身投与を含む。一般的には、局所投与により、被験体の全身よりも多くのs i R N A又は薬物組成物、第1種のs i R N A複合体及び第2種のs i R N A複合体が特定の部位に送達されるが、全身投与により、前記s i R N A又は薬物組成物、第1種のs i R N A複合体及び第2種のs i R N A複合体が被験体のほぼ全身に送達される。本開示がB型肝炎の予防及び／又は治療手段を提供することを意図することを考慮すると、薬物を肝臓に送達することができる投与方法が好ましい。

10

#### 【0308】

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

#### 【0309】

本開示に記載されたs i R N A又は薬物組成物、第1種のs i R N A複合体及び第2種のs i R N A複体の用量は、本分野における通常の用量であってもよく、前記用量は、各種のパラメーター、特に被験体の年齢、体重及び性別により決定されてもよい。細胞培養又は実験動物で標準薬学的手順により毒性と治療効果を測定し、例えば、LD50（50%の群体を死亡させる用量）及びED50（定量的反応において、50%の最大反応強度を引き起こすことができる用量を指し、定性的反応において、50%の実験対象に陽性反応が発生する場合の用量を指す）を測定してもよい。毒性と治療効果との間の用量比は、治療指数であり、LD50／ED50の比で表されてもよい。高い治療指数を示すs i R N A又は薬物組成物、第1種のs i R N A複合体及び第2種のs i R N A複合体が好ましい。細胞培養分析及び動物研究により得られたデータに基づいてヒト用量の範囲を得ることができる。

20

#### 【0310】

本開示に記載された薬物組成物、第1種のs i R N A複合体及び第2種のs i R N A複合体を投与する場合、例えば、雄性又は雌性、6～12週齢、体重18～25gのC57BL／6J又はC3H／HeNCrlVrマウスに対して、前記薬物組成物又はs i R N A複合体におけるs i R N Aの量として、(i) s i R N A及び薬学的に許容可能な担体により形成された薬物組成物について、そのs i R N A用量が0.001～50mg／kg体重であってもよく、さらなる実施形態において、0.01～10mg／kg体重であり、よりさらなる実施形態において、0.05～5mg／kg体重であり、またさらなる実施形態において、0.1～3mg／kg体重であり、(ii) s i R N A及び薬学的に許容できる複合分子により形成された第1種及び／又は第2種のs i R N A複合体について、そのs i R N A用量が0.001～100mg／kg体重であってもよく、さらなる実施形態において、0.01～50mg／kg体重であり、よりさらなる実施形態において、0.05～20mg／kg体重であり、またさらなる実施形態において、0.1～10mg／kg体重である。本開示に記載されたs i R N Aを投与する場合、好ましくは上記用量である。

30

40

#### 【0311】

また、本開示のs i R N A及び／又は薬物組成物、第1種のs i R N A複合体及び第2種のs i R N A複合体を、慢性HBVに感染した肝炎細胞に導入することにより、さらにはRNA干渉機構により、慢性HBVに感染した肝炎細胞におけるHBV遺伝子の発現を抑制する目的を達成することもできる。いくつかの好ましい実施形態において、前記細胞はHepG2.2.15細胞である。

50

## 【0312】

本開示により提供される方法により細胞におけるHBV遺伝子の発現を抑制する。提供されるsiRNAを用いても、薬物組成物を用いても、第1種のsiRNA複合体及び第2種のsiRNA複合体を用いても、siRNA用量は、一般的に、標的遺伝子の発現を低減でき、標的細胞表面では1pM～1μM、0.01nM～100nM、0.05nM～50nM、又は0.05nM～約5nMの細胞外濃度となる量である。当該局所濃度を達成するのに必要な量は、送達方法、送達部位、送達部位と標的細胞又は組織との間の細胞層の数、送達するのが局所か全身か等を含む、各種の因子により変化する。送達部位における濃度は、標的細胞又は組織の表面における濃度よりも顕著に高くてもよい。

## 【0313】

## &lt;キット&gt;

本開示は、本開示のsiRNA、薬物組成物、第1種のsiRNA複合体及び第2種のsiRNA複合体の少なくとも1種の有効量を含むキットを提供する。

## 【0314】

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

## 【0315】

本開示のキットにおいて、前記修飾siRNA及び薬学的に許容可能な担体及び／又は添加剤、並びに、前記修飾siRNA、薬物組成物、第1種のsiRNA複合体及び／又は第2種のsiRNA複合体及び／又は複合体、及び／又は薬学的に許容できる添加剤は、任意の形式、例えば、液体形式、乾燥形式又は凍結乾燥形式として提供されてもよい。いくつかの実施形態において、前記修飾siRNA及び薬学的に許容可能な担体及び／又は添加剤、並びに、前記薬物組成物、及び／又は複合体及び薬学的に許容できる任意の添加剤は、基本的にクリーン及び／又は無菌である。いくつかの実施形態において、本開示のキットで無菌水を提供することができる。

## 【0316】

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

## 【0317】

## (発明の効果)

いくつかの実施形態において、本開示により提供されるsiRNA、組成物又はsiRNA複合体は、体内でより高い安定性、より低い毒性及び／又はより高い活性を有することができる。いくつかの実施形態において、本開示により提供されるsiRNA、siRNA組成物又はsiRNA複合体は、体内で少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は95%のHBV遺伝子発現抑制率を示す。いくつかの実施形態において、本開示により提供されるsiRNA、siRNA組成物又はsiRNA複合体は、体内で少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は95%の肝内HBV遺伝子発現抑制率を示す。いくつかの実施形態において、本開示により提供されるsiRNA、siRNA組成物又はsiRNA複合体は、体内で少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は95%のHBV表面抗原発現抑制率を示す。いくつかの実施形態において、本開

10

20

30

40

50

示により提供される s i R N A、組成物又は s i R N A 複合体は、明らかなオフターゲット効果を示していない。オフターゲット効果は、例えば、標的遺伝子でない遺伝子の正常発現の抑制であってもよい。オフターゲット遺伝子発現の結合／抑制がオンターゲット遺伝子効果に比べて 50%、40%、30%、20%又は10%を下回る場合、当該オフターゲット効果が顕著ではないと考えられている。

【0318】

いくつかの実施形態において、本開示により提供される s i R N A 複合体は、良好な体外抑制活性を有する。

【0319】

いくつかの実施形態において、本開示により提供される s i R N A 複合体は、優れた標的 mRNA 抑制効果を有するとともに、さらに低いオフターゲット効果を示す。

10

【0320】

いくつかの実施形態において、本開示により提供される s i R N A 複合体は、トリトソームにおいて長時間分解されずに維持し、非常に良好な安定性を示すことができる。

【0321】

いくつかの実施形態において、本開示により提供される s i R N A 複合体は、ヒト血漿において 72 h 分解されず、優れたヒト血漿における安定性を示す。

【0322】

いくつかの実施形態において、本開示により提供される s i R N A 複合体は、カニクイザル血漿において 72 h 分解されず、優れたサル血漿における安定性を示す。

20

【0323】

いくつかの実施形態において、本開示により提供される s i R N A 複合体は、標的 mRNA に対して良好な抑制効果を示し、1 mg / kg で、抑制効率が 81.73%~89.22%であり、異なる HBV mRNA に対する抑制効果が基本的に一致している。

【0324】

いくつかの実施形態において、本開示により提供される s i R N A 複合体は、85 日間にわたって HBsAg 及び HBV DNA に対する効率的な抑制を示し続ける。

【0325】

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

30

【実施例】

【0326】

以下に実施例により本開示を詳しく説明する。特に説明がない限り、以下の実施例で用いられる試薬、培地は、いずれも市販品であり、用いられる核酸電気泳動、real-time PCR 等の操作は、いずれも Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) の記載を参照して行われる。

【0327】

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

40

【0328】

用いられる動物モデルは以下のとおりである。

HBV トランスジェニックマウス C57BL / 6-HBV: 品種名: B6-Tg HBV / Vst (1.28 copy, genotype A)、北京維通達生物技術有限公司から購入する。実験前に COI > 10<sup>4</sup> のマウスを選択した (以下、単に 1.28 copy マウスということもある)。

AAV-HBV 低濃度トランスジェニックマウス: 文献の方法 (董小岩ら、Chin J Biotech 2010, May 25, 26 (5): 679-686) により AAV-HBV モデルを作製した。rAAV8-1.3HBV、D 型 (ayw) ウイルス (北京五加和分子医学研究所有限公司から購入、1 × 10<sup>12</sup> ウイルスゲノム (v. g.) / mL

50

、ロット番号2016123011)を無菌PBSで $1 \times 10^{11}$  v. g. / mLに希釈し、1匹のマウスあたり100  $\mu$  Lの希釈後のrAAV8-1.3HBVを注射した(即ち、1匹のマウスあたり $1 \times 10^{10}$  v. g. を注射した)。以下、AAV-HBV低濃度モデルマウスということもあり、又は単にAAV-HBVという。

【0329】

(調製例1) 複合体1~2、15~16の調製

本調製例では、複合体1(以下、L10-siHB1M1SVP複合体ともいう)及び複合体2(以下、L10-siHB2M1SVP複合体ともいう)を合成したが、複合体15(以下、L10-siHB1M1SPともいう)及び複合体16(以下、L10-siHB1M1SPsともいう)を合成することを意図した。前記複合体は、L-9複合分子がそれぞれ番号siHB1M1SVP、siHB2M1SVP、siHB1M1SP又はsiHB1M1SPsのsiRNAと複合した後に形成された複合体である。当該複合体に複合されたsiRNAの配列は、表1に示される。

【0330】

(1-1) L-10化合物の合成

以下の方法に従い、L-10化合物を合成した。

【0331】

10

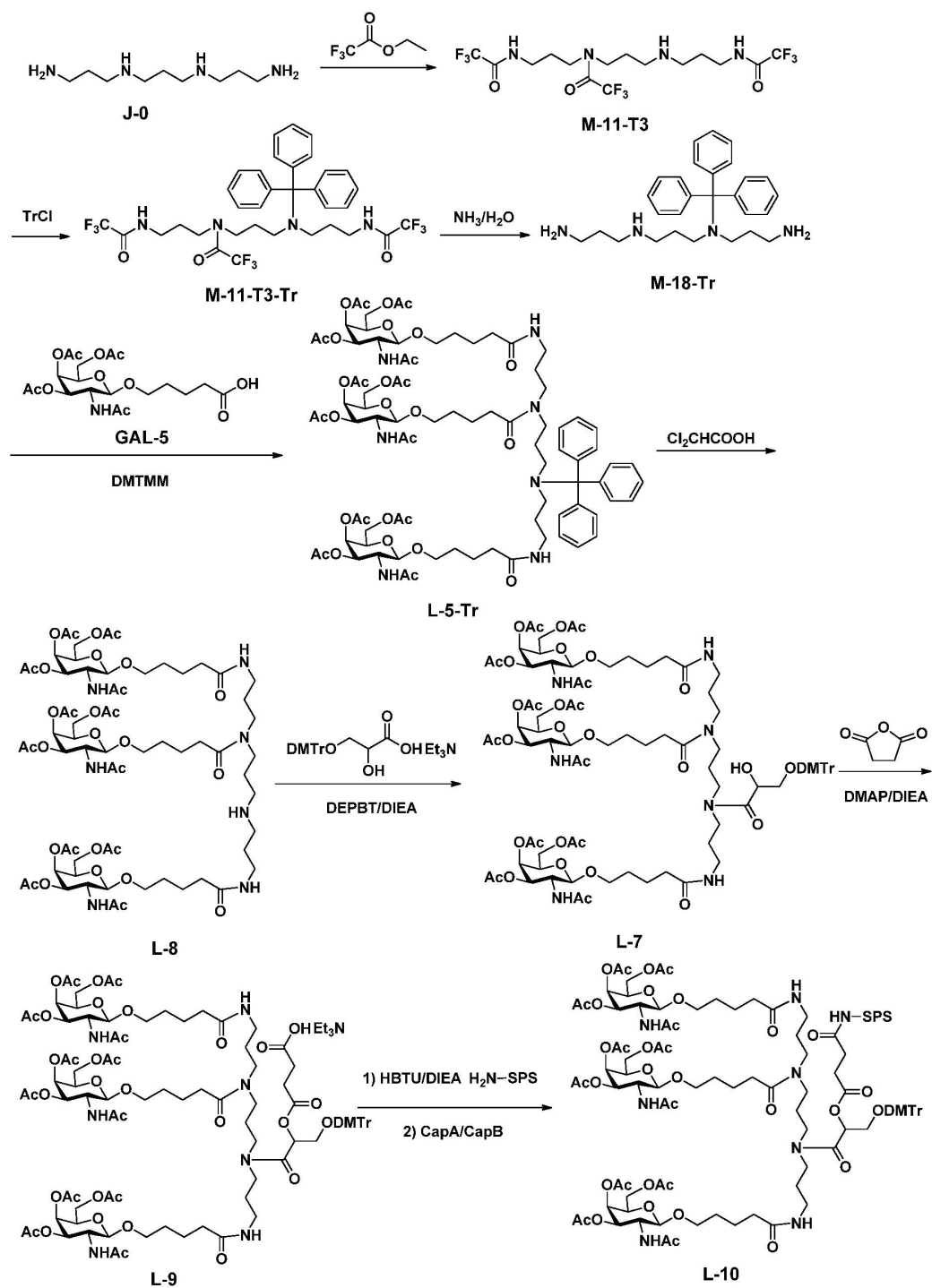
20

30

40

50

## 【化 4 0】



## 【 0 3 3 2】

(1-1-1) 複合末端セグメント GAL-5 の合成

## 【 0 3 3 3】

10

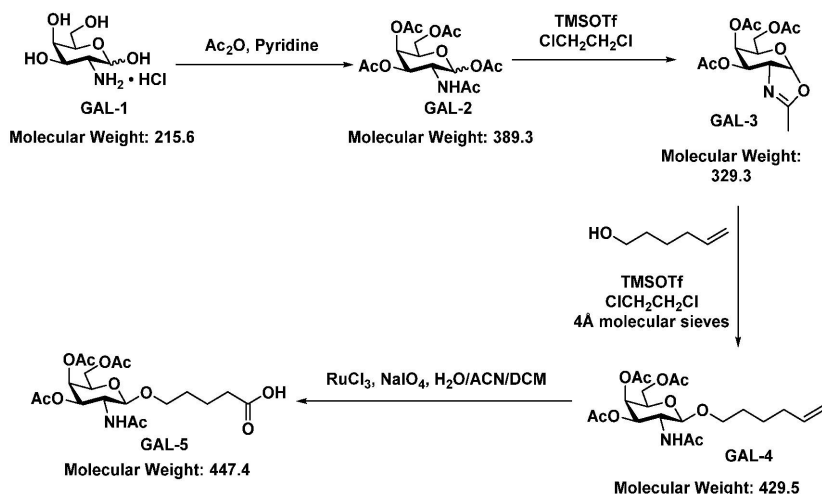
20

30

40

50

## 【化 4 1】



## (1-1-1 a) GAL-2 の合成

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

## 【0334】

## (1-1-1 b) GAL-3 の合成

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

## 【0335】

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

## 【0336】

## (1-1-1 c) GAL-4 の合成

工程 (1-1-1 b) で得られた GAL-3 (26.9 g、81.7 mmol) を 136 ml の無水 1,2-ジクロロエタンに溶解させ、乾燥した 4 Å 分子篩粉 30 g を加え、9.0 g の 5-ヘキセン-1-オール (CAS 番号: 821-41-0、Adamas-beta 社から購入、89.9 mmol) を加え、室温で 30 分間攪拌し、氷浴下で窒素保護下で 9.08 g の TMSOTf (40.9 mmol) を加え、室温で一晩攪拌反応させた。4 Å 分子篩粉を濾過除去し、濾液に 300 ml のジクロロメタンを加えて希釈し、珪藻土で濾過し、500 ml の飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて 10 分間攪拌し洗浄し、有機相を分離し、水相を 300 ml のジクロロエタンで 1 回抽出し、有機相をあわせ、それぞれ 300 ml の飽和炭酸水素ナトリウム水溶液及び 300 ml の飽和食塩水で洗浄し、有機相を分離し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶剤を減圧蒸発乾固し、41.3 g の黄色水飴状製品 GAL-4 を得、精製することなく、そのまま次の酸化反応を行った。

## 【0337】

(1-1-1d) GAL-5の合成

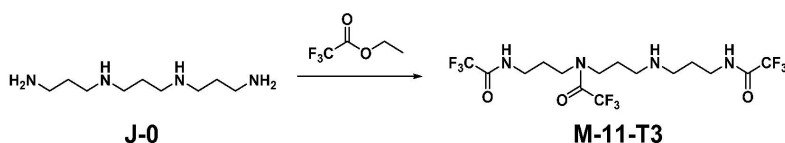
工程(1-1-1c)に記載された方法により得られたGAL-4(14.9g、34.7mmol)を77mlのジクロロメタンと77mlのアセトニトリルの混合溶剤に溶解させ、それぞれ103mlの脱イオン水及び29.7gの過ヨウ素酸ナトリウム(CAS番号:7790-28-5、Aladdin社から購入、138.8mmol)を加え、氷水浴下で10分間攪拌し、塩化ルテニウム(III)(CAS番号:14898-67-0、Energy社から購入、238mg、1.145mmol)を加え、室温で一晩反応させた。反応液に300mlの水を加えて希釈攪拌し、飽和炭酸水素ナトリウムを加えてpHを約7.5に調整し、有機相を分離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

## 【0338】

(1-1-2) M-11-T3の合成:

## 【0339】

## 【化42】



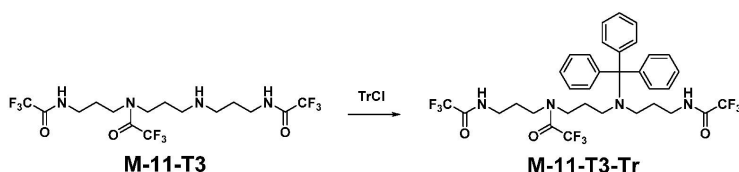
J-0(1.883g、10mmol、アルファ・エーサー社から購入)を25mlのアセトニトリルに溶解させ、トリエチルアミン(4.048g、40mmol)を加えて氷水浴で0℃まで冷却し、トリフルオロ酢酸エチル(5.683g、40mmol)を加え、室温で22h反応させ、溶剤を減圧蒸発乾固し、真空油ポンプで18h発泡乾燥させ、5.342gの固形粗製品M-11-T3を得、さらに精製することなく、そのまま後の反応に用いた。MS m/z: C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>F<sub>9</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>, [M+H]<sup>+</sup>、理論値: 477.35、実測値: 477.65。

## 【0340】

(1-1-3) M-11-T3-Trの合成:

## 【0341】

## 【化43】



M-11-T3粗製品(5.342g、10mmol)を50mlのジクロロメタンに溶解させ、反応液にTrCl(3.345g、12mmol)及びトリエチルアミン(1.518g、15mmol)を加え、室温で20h攪拌反応させ、飽和炭酸水素ナトリウ

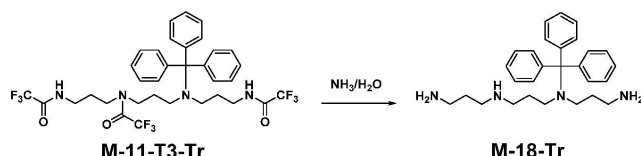
ムで反応液を1回あたり20mlで2回洗浄し、20mlの飽和食塩水で1回洗浄し、有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過した後に有機溶剤を減圧蒸発乾固し、真空油ポンプで一晩発泡乾燥させ、7.763gの固形粗製品M-11-T3-Trを得た。MS m/z:  $C_{34}H_{36}F_9N_4O_3$ ,  $[M+Na]^+$ 、理論値: 741.25、実測値: 741.53。固形粗製品M-11-T3-Trは、精製することなく、引き続き次のM-18-Trの合成に使用した。

【0342】

(1-1-4) M-18-Trの合成:

【0343】

【化44】



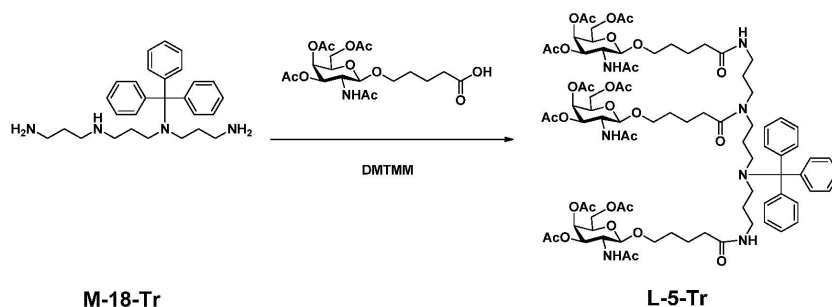
工程(1-1-3)で得られたM-11-T3-Tr粗製品(7.763g、10mmol)を100mlのメタノールに溶解させ、100mlのメチルアミン水溶液(40質量%)を加え、50℃で23h攪拌反応させ、不溶性粒子を濾過除去し、溶剤を減圧蒸発乾固し、200mlの体積比1:1のジクロロメタン:メタノール混合溶剤を加え、50mlの飽和炭酸水素ナトリウムで洗浄し、水相をジクロロメタン(DCM)で1回あたり50mlで3回抽出し、有機相をあわせ、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過した後に溶剤を減圧蒸発乾固し、真空油ポンプで一晩発泡乾燥させ、200~300メッシュの順相シリカゲルカラムで精製し、石油エーテルをカラムに入れ、1wt%トリエチルアミンでシリカゲルの酸性を中和し、ジクロロメタン:メタノール:アンモニア水(25wt%)=1:1:0.05~1:1:0.25で勾配溶出し、生成物溶出液を回収し、溶剤を減圧蒸発乾固し、真空油ポンプで発泡乾燥させて2.887gの純粋なM-18-Trを得た。 $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO)  $\delta$  7.47 – 7.39 (m, 6H), 7.32 – 7.24 (m, 6H), 7.19 – 7.12 (m, 3H), 2.60 – 2.47 (m, 4H), 2.46 – 2.19 (m, 13H), 1.70 – 1.55 (m, 4H), 1.40 (p, J = 6.8 Hz, 2H). MS m/z:  $C_{28}H_{39}N_4$ ,  $[M+H]^+$ 、理論値: 431.65、実測値: 432.61。

【0344】

(1-1-5) L-5-Trの合成:

【0345】

【化45】



工程(1-1-4)で得られたM-18-Tr(2.02g、4.69mmol)と工程(1-1-1)で得られたGAL-5(6.93g、15.48mmol)とを混合して47mlのアセトニトリルに溶解させ、N-メチルモルホリン(3.13g、30.96mmol)及び4-(4,6-ジメトキシトリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリン塩酸塩(DMTMM、4.28g、15.48mmol)を加え、室温で2h攪拌反

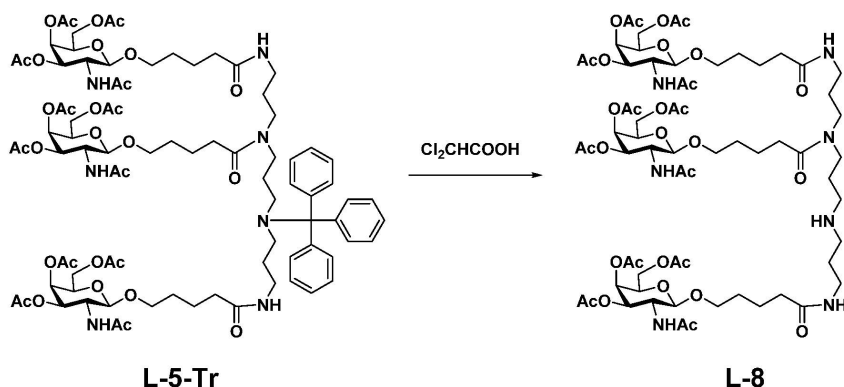
応させた。200 ml のジクロロメタンで反応液を希釈し、100 ml の飽和炭酸水素ナトリウム溶液で有機相を洗浄し、100 ml の飽和食塩水で有機相を洗浄し、有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過した後に溶剤を減圧蒸発乾固して粗製品を得た。200～300 メッシュの順相シリカゲルカラムで精製し、石油エーテルをカラムに入れ、1 wt % トリエチルアミンでシリカゲルの酸性を中和し、ジクロロメタン：メタノール＝100：5～100：7 で勾配溶出し、生成物溶出液を回収し、減圧蒸発乾固して7.49 g の純粋な L-5-Tr を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.83 – 7.10 (m, 4H), 7.67 – 7.60 (m, 1H), 7.44 – 7.34 (m, 6H), 7.33 – 7.24 (m, 6H), 7.20 – 7.15 (m, 3H), 5.22 (s, 3H), 4.97 (d, J = 11.3 Hz, 3H), 4.49 (d, J = 8.4 Hz, 3H), 4.06 – 3.07 (m, 9H), 3.95 – 3.83 (m, 3H), 3.77 – 3.64 (m, 3H), 3.45 – 3.35 (m, 3H), 3.12 – 2.87 (m, 8H), 2.30 – 2.15 (m, 3H), 2.11 – 1.98 (m, 22H), 1.95 – 1.84 (m, 11H), 1.81 – 1.61 (m, 14H), 1.54 – 1.36 (m, 14H). MS m/z : C<sub>85</sub>H<sub>119</sub>N<sub>7</sub>O<sub>30</sub>, [M+H]<sup>+</sup>、理論値：1718.81、実測値：1718.03。

【0346】

(1-1-6) L-8 の合成：

【0347】

【化46】



工程 (1-1-5) で得られた L-5-Tr (5.94 g、3.456 mmol) を 69 ml のジクロロメタンに溶解させ、ジクロロ酢酸 (13.367 g、103.67 mmol) を加え、室温で 2 h 反応させ、100 ml のジクロロメタンを加えて反応液を希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム溶液を加えて洗浄し pH = 7～8 になるように調節し、水相をジクロロメタンで 1 回あたり 30 ml で 6 回抽出し、有機相をあわせ、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過した後に溶剤を減圧蒸発乾固して粗製品を得た。精製には、200～300 メッシュの順相シリカゲルを用い、10 wt % トリエチルアミンでシリカゲルの酸性を中和し、1 wt % トリエチルアミンでカラムを平衡化し、ジクロロメタン：メタノール＝100：30～100：40 で勾配溶出し、生成物溶出液を回収し、溶剤を減圧蒸発乾固して 4.26 g の純粋な L-8 を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.84 (d, J = 9.0 Hz, 3H), 7.27 – 7.23 (m, 1H), 7.13 – 7.18 (m, 1H), 5.22 (d, J = 3.1 Hz, 3H), 4.97 (dd, J = 11.3, 3.1 Hz, 3H), 4.48 (d, J = 8.4 Hz, 3H), 4.09 – 3.98 (m, 9H), 3.88 (dd, J = 19.3, 9.3 Hz, 3H), 3.75 – 3.66 (m, 3H), 3.44 – 3.38 (m, 3H), 3.17 – 3.30 (m, 4H), 3.10 – 2.97 (m, 4H), 2.35 – 2.20 (m, 6H), 2.15 – 2.08 (m, 9H), 2.07 – 1.98 (m, 13H), 1.94 – 1.87 (m, 9

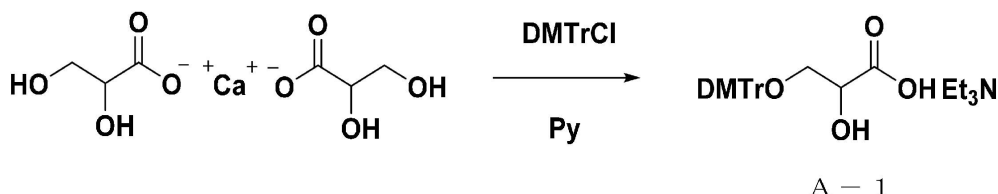
H), 1.81 – 1.74 (m, 9H), 1.65 – 1.42 (m, 18H). MS m/z: C<sub>85</sub>H<sub>119</sub>N<sub>7</sub>O<sub>30</sub>, [M+H]<sup>+</sup>、理論値: 1477.59、実測値: 1477.23。

【0348】

(1-1-7a) A-1の合成

【0349】

【化47】



10

DMTrCl (4,4'-ビスメトキシトリチルクロリド、38.12 g、112.5 mmol) を450 mlの無水ピリジンに溶解させ、DL-グリセリン酸カルシウム水和物 (12.88 g、45.0 mmol) を加え、45℃で22 h反応させ、反応液を濾過し、ケーキを200 mlのDCMでリンスし、濾液を完全に乾燥するまで減圧濃縮し、残りを500 mlのジクロロメタンに改めて溶解させ、0.5 M トリエチルアミンリン酸塩 (pH=7~8) で1回あたり200 mlで2回洗浄し、水相をジクロロメタンで1回あたり200 mlで2回抽出し、有機相をあわせ、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、溶剤を減圧蒸発乾固し、200~300メッシュの順相シリカゲルカラムで精製し、石油エーテル:酢酸エチル:ジクロロメタン:メタノール=1:1:1:0.35~1:1:1:0.55で勾配溶出し、生成物溶出液を回収し、溶剤を減圧蒸発乾固し、500 mlのジクロロメタンに改めて溶解させ、200 mlの0.5 M トリエチルアミンリン酸塩で1回洗浄し、水相をジクロロメタンで1回あたり200 mlで2回抽出し、有機相をあわせ、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、溶剤を減圧蒸発乾固し、真空油ポンプで一晩減圧し、20.7 gの白色固形製品A-1を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.46 (ddd, J = 6.5, 2.3, 1.1 Hz, 1H), 7.40 – 7.28 (m, 7H), 6.89 – 6.81 (m, 4H), 4.84 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 4.36 – 4.24 (m, 1H), 4.29 (s, 6H), 3.92 (dd, J = 12.4, 7.0 Hz, 1H), 3.67 (dd, J = 12.3, 7.0 Hz, 1H), 2.52 (q, J = 6.3 Hz, 6H), 1.03 (t, J = 6.3 Hz, 9H). MS m/z: C<sub>24</sub>H<sub>23</sub>O<sub>6</sub>, [M-H]<sup>-</sup>、理論値: 407.15、実測値: 406.92。

20

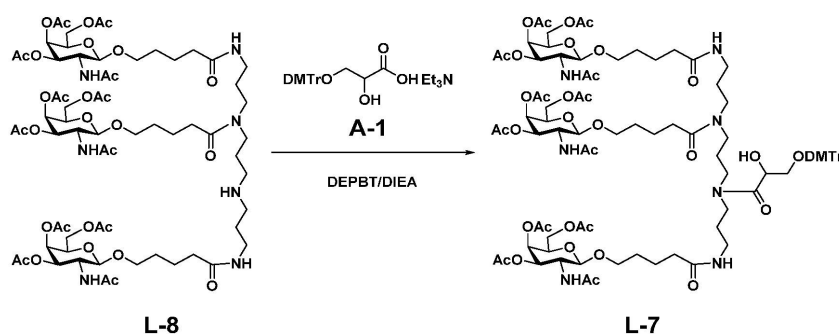
30

【0350】

(1-1-7b) L-7の合成:

【0351】

【化48】



40

工程 (1-1-6) で得られた L-8 (2.262 g、1.532 mmol) と工程 (

50

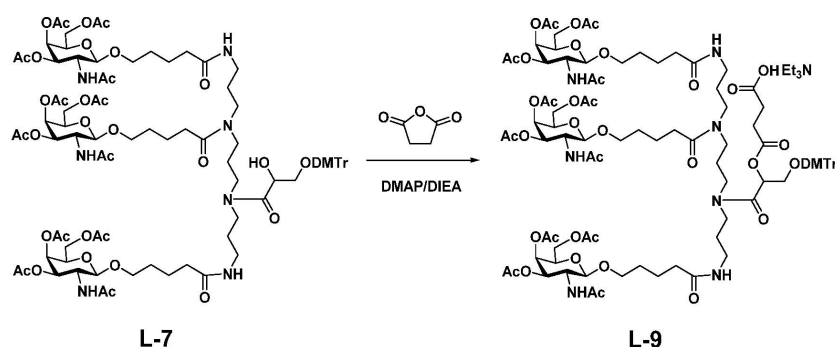
1-1-7a) で得られた A-1 (2.342 g、4.596 mmol) とを混合し、16 ml のジクロロメタンに溶解させ、3-ジエトキシホスホリル-1, 2, 3-ベンゾオキサゾール 4 (3H)-オン (DEPBT) (1.375 g、4.596 mmol) を加え、さらにジイソプロピルエチルアミン (1.188 g、9.191 mmol) を加え、25℃で2h 攪拌反応させ、10 ml の飽和炭酸水素ナトリウムで有機相を洗浄し、水相をジクロロメタンで1回あたり10 ml で3回抽出し、10 ml の飽和食塩水で有機相を洗浄し、水相をジクロロメタンで1回あたり10 ml で2回抽出し、有機相をあわせ、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過した後に溶剤を減圧蒸発乾固し、真空油ポンプで一晩発泡乾燥させ、4.900 g の粗製品を得た。カラム精製には、120 g の200~300メッシュの順相シリカゲルを用い、20 ml のトリエチルアミンでシリカゲルの酸性を中和し、1 wt % トリエチルアミンを含む石油エーテルでカラムを平衡化し、石油エーテル：酢酸エチル：ジクロロメタン：N, N-ジメチルホルムアミド=1:1:1:0.5~1:1:1:0.6で勾配溶出し、生成物溶出液を回収し、溶剤を減圧蒸発乾固して2.336 g の純粋な L-7 を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.90 - 7.78 (m, 4H), 7.75 - 7.64 (m, 1H), 7.38 - 7.18 (m, 9H), 6.91 - 6.83 (m, 4H), 5.25 - 5.10 (m, 4H), 4.97 (dd, J = 11.2, 3.2 Hz, 3H), 4.48 - 4.30 (m, 4H), 4.02 (s, 9H), 3.93 - 3.84 (m, 3H), 3.76 - 3.66 (m, 9H), 3.45 - 3.35 (m, 3H), 3.24 - 2.98 (m, 10H), 2.30 - 2.20 (m, 2H), 2.11 - 1.88 (m, 31H), 1.80 - 1.40 (m, 28H). MS m/z : C<sub>90</sub>H<sub>128</sub>N<sub>7</sub>O<sub>35</sub>, [M-DMTr]<sup>+</sup>、理論値：1564.65、実測値：1564.88。

【0352】

(1-1-8) L-9 複合分子の合成：

【0353】

【化49】



工程 (1-1-7b) で得られた L-7 (2.300 g、1.26 mmol)、コハク酸無水物 (0.378 g、3.78 mmol) 及び 4-ジメチルアミノピリジン (DMA P、0.462 g、3.78 mmol) を混合して13 ml のジクロロメタンに溶解させ、さらにジイソプロピルエチルアミン (DIEA、0.814 g、6.30 mmol) を加え、25℃で24h 攪拌し、5 ml の0.5 M トリエチルアミンリン酸塩で反応液を洗浄し、水相をジクロロメタンで1回あたり5 ml で3回抽出し、有機相をあわせ減圧蒸発乾固して2.774 g の粗製品を得た。カラム精製には、60 g の200~300メッシュの順相シリカゲルを用い、1 wt % トリエチルアミンでシリカゲルの酸性を中和し、ジクロロメタンでカラムを平衡化し、1 wt % トリエチルアミンを含むジクロロメタン：メタノール=100:18~100:20で勾配溶出し、生成物溶出液を回収し、溶剤を減圧蒸発乾固して1.874 g の純粋な L-9 複合分子を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.58 (d, J = 4.2 Hz, 1H), 7.94 - 7.82 (m, 3H), 7.41 - 7.29 (m, 5H), 7.22 (d, J =

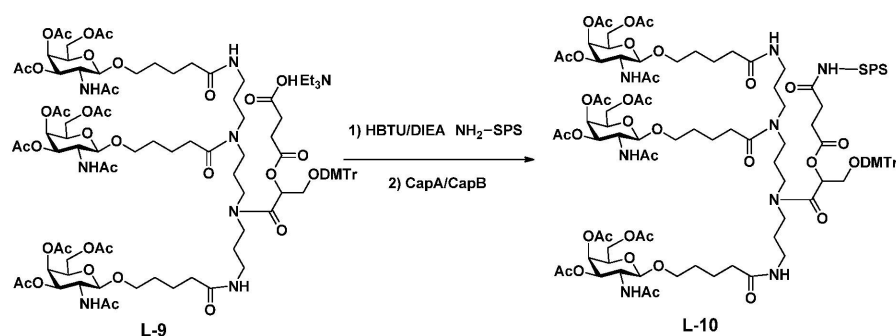
8.1 Hz, 5H), 6.89 (d,  $J = 8.3$  Hz, 4H), 5.49 – 5.37 (m, 1H), 5.21 (d,  $J = 3.0$  Hz, 3H), 4.97 (d,  $J = 11.1$  Hz, 3H), 4.49 (d,  $J = 8.2$  Hz, 3H), 4.02 (s, 9H), 3.88 (dd,  $J = 19.4, 9.4$  Hz, 3H), 3.77 – 3.65 (m, 9H), 3.50 – 3.39 (m, 6H), 3.11 – 2.90 (m, 5H), 2.61 – 2.54 (m, 4H), 2.47 – 2.41 (m, 2H), 2.26 – 2.17 (m, 2H), 2.15 – 1.95 (m, 22H), 1.92 – 1.84 (m, 9H), 1.80 – 1.70 (m, 10H), 1.65 – 1.35 (m, 17H), 1.31 – 1.19 (m, 4H), 0.96 (t,  $J = 7.1$  Hz, 9H). MS  $m/z$ :  $C_{94}H_{132}N_7O_{38}$ , [M – DMTr]<sup>+</sup>, 理論値: 1664.72、実測値: 1665.03。

【0354】

(1-1-9) L-10化合物の合成:

【0355】

【化50】



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

【0356】

工程(1-1-8)で得られたL-9複合分子(0.233 g、0.1126 mmol)、O-ベンゾトリアゾール-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート(HBTU、0.064 g、0.1689 mmol)及びジイソプロピルエチルアミン(DIEA、0.029 g、0.2252 mmol)を混合し、19 mlのアセトニトリルに溶解させ、室温で5分間攪拌し、反応液にアミノメチル樹脂(0.901 g、100~200メッシュ、アミノ基担持量400  $\mu\text{mol/g}$ 、南開和成社から購入)を加え、25℃でシェーカーで反応を行い、回転数220回転/分間、15 h反応させた後に濾過し、ケーキをDCMで1回あたり30 mlで2回リンスし、アセトニトリルで1回あたり30 mlで3回リンスし、30 mlのエチルエーテルで1回リンスし、真空油ポンプで2 h乾燥させ、その後、表2に示す配合割合に従い原料(CapA、CapB、4-ジメチルアミノピリジン(DMAP)及びアセトニトリル)を加えてキャッピング反応を行った。25℃でシェーカーに放置し、回転数200回転/分間で5 h反応させ、反応液を濾過し、ケーキをアセトニトリルで1回あたり30 mlで3回リンスし、完全に乾燥するまで吸引濾過し、真空油ポンプで一晩減圧乾燥させさせ、1.100 g、担持量90.8  $\mu\text{mol/g}$ のL-10化合物(即ち、固相担体に結合されたL-9複合分子)を得た。

【0357】

10

20

30

40

50

【表 2】

キャッピング反応における配合割合

| 原料      | 用量        | 仕様       | ロット番号             | メーカー          |
|---------|-----------|----------|-------------------|---------------|
| C a p A | 2 0 m l   | —        | —                 | —             |
| C a p B | 2 . 3 m l | —        | —                 | —             |
| D M A P | 0 . 0 1 g | 分析試薬     | I 1 4 2 2 1 3 9   | A l a d d i n |
| アセトニトリル | 2 . 3 m l | スペクトル純試薬 | O 1 5 1 6 1 0 0 1 | 上海星可          |

ここで、C a p AとC a p Bは、キャッピング試薬溶液であり、C a p Aは、2 0 体積 %のN－メチルイミダゾールのピリジン／アセトニトリル混合溶液であり、ピリジンとアセトニトリルとの体積比が3：5であり、C a p Bは、2 0 体積 %酢酸無水物のアセトニトリル溶液であった。

## 【0 3 5 8】

(1－2) 複合体1～2、1 5～1 6のセンス鎖の合成

複合体1～2、1 5～1 6のセンス鎖配列が同じであるので、その調製方法も同じであった。

## 【0 3 5 9】

固相ホスホルアミダイト法により、上記工程で調製されたL－1 0化合物を出発として循環させ、センス鎖のヌクレオチドの並び順に従い3'－5'方向に一つずつヌクレオシドモノマーを結合した。ヌクレオシドモノマーを結合するごとに、脱保護、カップリング、キャッピング、酸化又は硫化の4つの反応を行った。2個のヌクレオチド間がリン酸エステルにより結合される場合、次のヌクレオシドモノマーを結合するとき、脱保護、カップリング、キャッピング、酸化の4つの反応を行った。2個のヌクレオチド間がチオリン酸エステルにより結合される場合、次のヌクレオシドモノマーを結合するとき、脱保護、カップリング、キャッピング、硫化の4つの反応を行った。合成条件は、以下のように規定された。

## 【0 3 6 0】

ヌクレオシドモノマーを0 . 1 M濃度のアセトニトリル溶液で提供し、各脱保護反応の条件が同じであり、即ち、温度が2 5℃であり、反応時間が7 0秒であり、脱保護試薬は、ジクロロ酢酸のジクロロメタン溶液（3 % v / v）であり、ジクロロ酢酸と固相担体における4，4'－ジメトキシトリチル保護基とのモル比が5：1であった。

## 【0 3 6 1】

各カップリング反応条件は、いずれも同じであり、温度が2 5℃であり、固相担体に結合される核酸配列とヌクレオシドモノマーとのモル比が1：1 0であり、固相担体に結合される核酸配列とカップリング試薬とのモル比が1：6 5であり、反応時間が6 0 0秒であり、カップリング試薬は、5－エチルチオ－1 H－テトラゾールの0 . 5 Mアセトニトリル溶液であった。

## 【0 3 6 2】

各キャッピング条件は、いずれも同じであり、温度が2 5℃であり、反応時間が1 5秒であった。キャッピング試薬溶液は、モル比が1：1であるC a p AとC a p Bの混合溶液であり、キャッピング試薬と固相担体に結合される核酸配列とのモル比が、酢酸無水物：N－メチルイミダゾール：固相担体に結合される核酸配列＝1：1：1であった。

## 【0 3 6 3】

各酸化反応条件は同じであり、温度が2 5℃であり、反応時間が1 5秒であり、酸化試薬が濃度0 . 0 5 Mのヨウ素水であった。ヨウ素と、カップリング工程において固相担体に結合される核酸配列とのモル比が3 0：1であった。反応をテトラヒドロフラン：水：ピリジン＝3：1：1の混合溶剤で行った。

## 【0 3 6 4】

各硫化反応の条件は同じであり、温度が2 5℃であり、反応時間が3 0 0秒であり、硫化試薬がキサンタンヒドリドであった。硫化試薬と、カップリング工程において固相担体に結合される核酸配列とのモル比が1 2 0：1であった。反応をアセトニトリル：ピリジ

ン＝１：１の混合溶剤で行った。

【０３６５】

切断と脱保護条件は以下のとおりである。合成された担体が結合されたヌクレオチド配列を、濃度２５ｗｔ％のアンモニア水に加え、アンモニア水の用量が０．５ｍｌ／μｍｏｌであり、５５℃で１６ｈ反応させ、液体を除去し、完全に乾燥するまで真空濃縮した。

【０３６６】

精製と脱塩：分取用イオンクロマトグラフィー精製カラム（Ｓｏｕｒｃｅ １５Ｑ）により、ＮａＣｌによる勾配溶出で、核酸の精製を完成した。具体的には、溶出剤Ａ：２０ｍＭリン酸ナトリウム（ｐＨ ８．１）、溶剤が水／アセトニトリル＝９：１（体積比）であり、溶出剤Ｂ：１．５Ｍ塩化ナトリウム、２０ｍＭリン酸ナトリウム（ｐＨ ８．１）であり、溶剤が水／アセトニトリル＝９：１（体積比）であり、溶出勾配：溶出剤Ａ：溶出剤Ｂ＝１００：０～５０：５０で勾配溶出した。製品溶出液を回収してからあわせ、逆相クロマトグラフィー精製カラムにより脱塩し、具体的な条件としては、デキストラングエルカラムにより脱塩し、充填剤がデキストラングエルＧ２５であり、脱イオン水で溶出した。

【０３６７】

検出：イオン交換クロマトグラフィー（ＩＥＸ－ＨＰＬＣ）を用いて純度を検出し、液体クロマトグラフィー質量分析（ＬＣ－ＭＳ）により分子量を分析した。

【０３６８】

複合体１のセンス鎖の分子量について、理論値７４０７．２２、実測値７４０６．４であった。複合体２のセンス鎖の分子量について、理論値７４０７．２２、実測値７４０６．５であった。実測値が理論値に一致しており、３’末端にＬ－９複合分子が複合されたセンス鎖Ｓが合成されたことを示した。

【０３６９】

（１－３）複合体１～２のアンチセンス鎖の合成

（１－３Ａ）複合体１～２のアンチセンス鎖の調製

固相ホスホルアミダイト法により、汎用の固相担体（ＵｎｙＬｉｎｋｅｒ™ ｌｏａｄｅｄ ＮｉｔｔｏＰｈａｓｅ（登録商標）ＨＬ Ｓｏｌｉｄ Ｓｕｐｐｏｒｔｓ、Ｋｉｎｏｖａｔｅ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ社）を出発として循環させ、複合体１及び複合体２のアンチセンス鎖ＡＳを合成した。固相合成方法における脱保護、カップリング、キャッピング、酸化又は硫化反応条件、切断と脱保護、精製と脱塩条件は、センス鎖の合成と同じであった。

【０３７０】

検出：純度をイオン交換クロマトグラフィー（ＩＥＸ－ＨＰＬＣ）により検出し、分子量を液体クロマトグラフィー質量分析（ＬＣ－ＭＳ）により分析した。複合体１について、理論値７２０８．７７、実測値７２０８．１であった。複合体２について、理論値７１７０．７２、実測値７１７０．１であった。実測値が理論値に一致しており、目的配列を有するアンチセンス鎖ＡＳが合成されたことを示した。

【０３７１】

ここで、ビニルリン酸エステルで修飾された２’－メトキシ修飾ウラシルヌクレオシドモノマー（ＶＰ－Ｕｍ）は、以下の方法に従い合成された。

【０３７２】

10

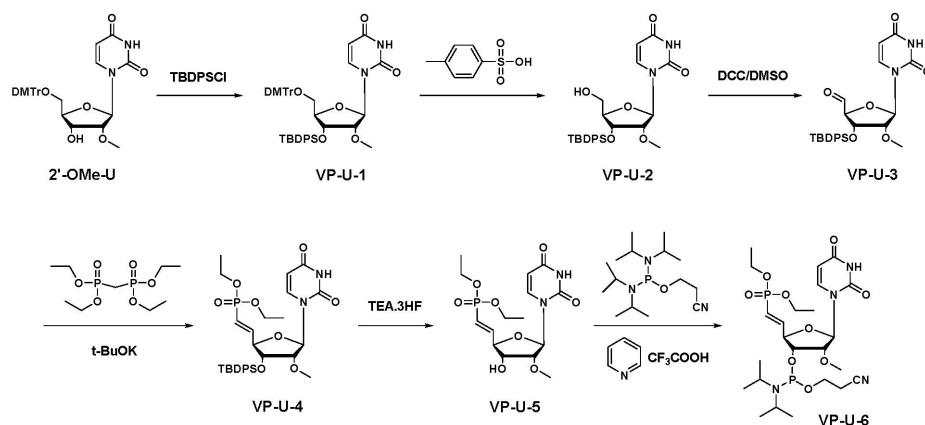
20

30

40

50

## 【化 5 1】



10

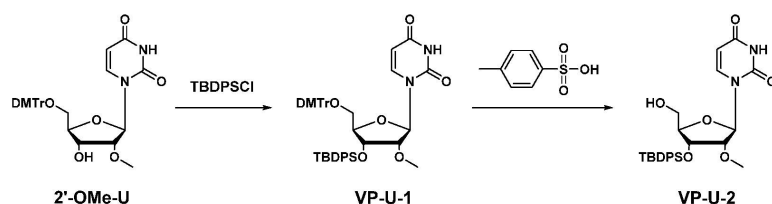
## 【 0 3 7 3 】

## ( 1 - 3 - 1 ) VP-U-2 の合成

以下の方法に従い、VP-U-2 分子を合成した。

## 【 0 3 7 4 】

## 【化 5 2】



20

2'-メトキシ修飾ウラシルヌクレオシド (2'-methoxy modified uracil nucleoside) (2'-OMe-U、51.30g、91.6mmol)、tert-ブチルジフェニルクロロシラン (TBDPSCI、50.35g、183.2mmol)、イミダゾール (12.47g、183.2mmol) を混合して450mlのN,N-ジメチルホルムアミド (DMF) に溶解させ、室温で20h 攪拌反応させた。DMFを留去し、600mlのジクロロメタンで溶解した後300mlの飽和炭酸水素ナトリウムを加えて洗浄し、水相をジクロロメタン (DCM) で1回あたり300mlで3回抽出し、有機相をあわせ、5%シュウ酸で水相をpH<5になるまで洗浄し、完全に乾燥するまで溶剤を蒸発させた後VP-U-1粗製品を得、そのまま後のVP-U-2の合成に用いた。

30

## 【 0 3 7 5 】

VP-U-1粗製品を100mlのジクロロメタンで溶解した後、氷浴を施して10分間攪拌し、さらに、予め4℃の冷蔵庫で冷蔵された450mlの2%p-トルエンスルホン酸溶液 (溶剤が、体積比3:7のメタノール-ジクロロメタン混合溶剤である) を加え、10分間反応させた。さらに200mlの飽和炭酸水素ナトリウムを加えて反応をクエンチングし、有機相に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えてpH=8になるまで洗浄した。水相をあわせ、ジクロロメタンで1回あたり200mlで2回抽出し、有機相をあわせ、さらに200mlの飽和食塩水で1回洗浄し、完全に乾燥するまで溶剤を蒸発させた。200~300メッシュの順相シリカゲルカラムで精製し、石油エーテルをカラムに入れ、石油エーテル:酢酸エチル:ジクロロメタン:メタノール=1:1:1:0.05~1:1:1:0.25で勾配溶出し、生成物溶出液を回収し、溶剤を減圧蒸発乾固し、真空油ポンプで発泡乾燥させて計40.00gの純粋なVP-U-2を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.96 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.64 (dtd, J = 5.1, 4.0, 2.2 Hz, 4H), 7.41-7.

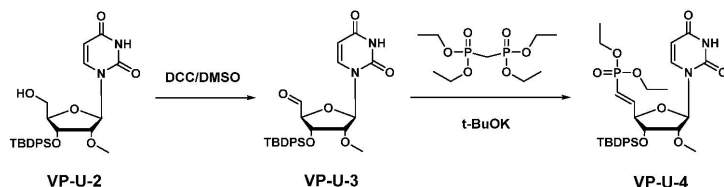
40

50

【 0 3 7 6 】

【 0 3 7 7 】

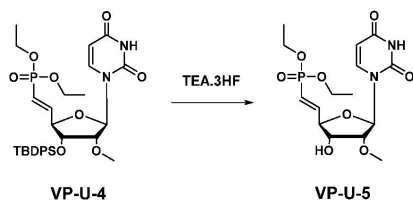
【化 5 3】



【 0 3 7 8 】

【 0 3 7 9 】

## 【化 5 4】



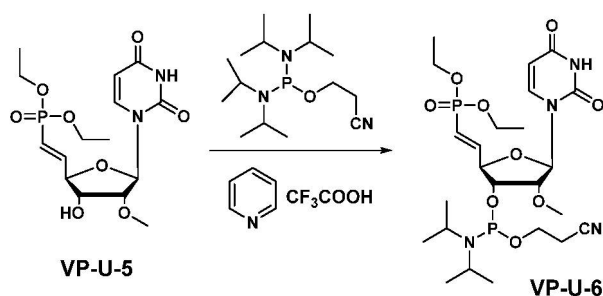
VP-U-4 (14.00 g、22.29 mmol) を 100 ml のテトラヒドロフランに溶解させ、トリエチルアミン三フッ化水素酸 (17.96 g、111.45 mmol) を加え、室温で 20 h 攪拌して完全に反応させた。そのまま完全に乾燥するまで溶剤を蒸発させ、50 ml のジクロロメタンで溶解した後で蒸発乾固する操作を 2 回繰り返し、粗製品を得た。200~300 メッシュの順相シリカゲルカラムで精製し、石油エーテルをカラムに入れ、石油エーテル：酢酸エチル：ジクロロメタン：メタノール = 1 : 1 : 1 : 0.05 ~ 1 : 1 : 1 : 0.25 で勾配溶出し、生成物溶出液を回収し、溶剤を減圧蒸発乾固し、真空油ポンプで発泡乾燥させて計 6.70 g の純粋な VP-U-5 を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.96 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 6.77 (dd, J = 15.0, 6.2 Hz, 1H), 5.99 – 5.82 (m, 2H), 5.73 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 5.27 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 5.10 (dd, J = 5.3, 4.7 Hz, 1H), 4.29 (ddq, J = 9.8, 8.6, 7.0 Hz, 2H), 4.17 (dd, J = 6.2, 5.2, 1.0 Hz, 1H), 4.12 – 3.98 (m, 3H), 3.39 (s, 2H), 1.32 (td, J = 6.9, 0.6 Hz, 6H)。MS m/z : C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>P, [M+H]<sup>+</sup>、理論値 : 391.13、実測値 : 391.38。

## 【0380】

(1-3-4) VP-U-6 の合成：

## 【0381】

## 【化 5 5】



アルゴン保護条件下で 10 ml の無水ジクロロメタンに VP-U-5 (391 mg、1.0 mmol)、ピリジントリフルオロアセテート (0.232 g、1.2 mmol)、N-メチルイミダゾール (0.099 g、1.2 mmol)、ビス(ジイソプロピルアミノ)(2-シアノエトキシ)ホスフィン (0.452 g、1.5 mmol) を加え、室温で 5 時間攪拌反応させた。完全に乾燥するまで溶剤を留去し、カラムクロマトグラフィーにより精製し (200~300 メッシュの順相シリカゲルを、ジクロロメタン：アセトニトリル (0.5 wt% トリエチルアミンを含む) = 3 : 1 ~ 1 : 3 で勾配溶出した)、生成物溶出液を回収し、溶剤を濃縮除去し、計 508 mg の目的生成物 VP-U-6 を得た。<sup>31</sup>P NMR (161 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 150.34, 150.29, 17.07, 15.50。MS m/z : C<sub>24</sub>H<sub>41</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>P<sub>2</sub>, [M+H]<sup>+</sup>、理論値 : 591.23、実測値 : 591.55。VP-U-6 が目的生成物 VP-Um であり、

ヌクレオシドモノマーとしてRNA鎖の合成に関与することを示した。

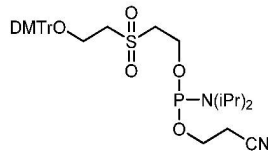
【0382】

(1-3B) 複合体15のアンチセンス鎖の調製

複合体15のアンチセンス鎖と複合体1のアンチセンス鎖の区別は、5'-末端の1番目のヌクレオチド修飾が異なることのみであった。固相ホスホルアミダイト法によりアンチセンス鎖を調製する場合、最後に結合されたヌクレオシドモノマーが2'-メトキシ修飾ウラシルヌクレオシドモノマー(Um)であり、脱保護、カップリング、キャッピング、酸化の4つの反応を行ってCPR-Iモノマー(蘇州吉瑪、番号Cat#13~2601-X)をアンチセンス鎖の5'-末端に結合し、5'-リン酸エステル修飾を形成した。

【0383】

【化56】



(CPR-I)

【0384】

合成において用いられた汎用の固相担体、脱保護、カップリング、キャッピング、酸化又は硫化反応条件、切断と脱保護、精製と脱塩条件は、センス鎖の合成と同じであった。

【0385】

(1-3C) 複合体16のアンチセンス鎖の調製

CPR-Iモノマーを結合した場合、上記酸化反応条件の代わりに硫化反応条件を用いたこと以外、複合体15のアンチセンス鎖と同じ合成プロセスを採用した。5'-チオリン酸エステル修飾を有する複合体16のアンチセンス鎖を製造できると予期した。

【0386】

(1-4) 複合体1~2及び15~16の合成

複合体1に対して、S鎖とAS鎖をそれぞれ注射用水に溶解させ、40mg/mLの溶液を得、等モル比で混合し、50°Cで15min加熱し、室温で冷却した後、これらを水素結合により二本鎖構造を形成させた。超純水(Milli-Q超純水装置で自作、抵抗率18.2MΩ\*cm(25°C))を用いて複合体を濃度が0.2mg/mLになるまで希釈した後、液体クロマトグラフィー質量分析計(LC-MS、Liquid Chromatography-Mass Spectrometry、Waters社から購入、型番:LC-TPremier)により分子量を検出した。実測値が理論値と一致しており、合成された複合体1が、L-9複合分子を含む目的設計の二本鎖核酸配列であることが示された。

【0387】

複合体2に対して、同じ方法により調製し分子量を検出したところ、実測値が理論値と一致しており、合成された複合体2が、L-9複合分子を含む目的設計の二本鎖核酸配列であることが示された。

【0388】

複合体15、16に対して、同じ方法によりアニールし、目的の複合体を製造できると予期した。

【0389】

複合体1と複合体2、及び複合体15、複合体16の構造は、式(403)に示される。

【0390】

(調製例2) 複合体3~14及び比較複合体2の調製

1) 前記siRNAが、それぞれ表1に示される複合体3~14及び比較複合体2に対応する配列であり、2) 目的配列に未修飾ヌクレオチドが含まれる場合、切断と脱保護条件で、アンモニア水により処理した後、一本鎖核酸の量に対して、0.4mL/μmol

のN-メチルピロリドンにより製品を溶解させた後、0.3 ml/μmolのトリエチルアミン及び0.6 ml/μmolのトリエチルアミン三フッ化水素酸塩を加え、リボースにおける2'-TBDMS保護を除去したこと以外、調製例1と同じ方法により、表題複合体を製造できると予期した。

【0391】

表題複合体に複合されたsiRNAの配列を表1に示した。

【0392】

【表1】

| siRNA複合体 |                |             |                                                    |
|----------|----------------|-------------|----------------------------------------------------|
| 実施例      | 番号             | 配列方向5' - 3' | 配列番号                                               |
| 複合体1     | L10-siHB1M1SVP | センス鎖        | UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm           |
|          |                | アンチセンス鎖     | VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfgmCmAm sGmsCm |
| 複合体2     | L10-siHB2M1SVP | センス鎖        | UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm           |
|          |                | アンチセンス鎖     | VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfgmCmAm sUmsUm |
| 複合体3     | L10-siHB1M1S   | センス鎖        | UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm           |
|          |                | アンチセンス鎖     | UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfgmCmAm sGmsCm    |
| 複合体4     | L10-siHB2M1S   | センス鎖        | UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm           |
|          |                | アンチセンス鎖     | UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfgmCmAm sUmsUm    |
| 複合体5     | L10-siHB1M2    | センス鎖        | UmGmCmUmAfgmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm             |
|          |                | アンチセンス鎖     | UmAfgmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfgmCmAmGmCm         |
| 複合体6     | L10-siHB2M2    | センス鎖        | UmGmCmUmAfgmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm             |
|          |                | アンチセンス鎖     | UmAfgmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfgmCmAmUmUm         |
| 複合体7     | L10-siHB1M2SVP | センス鎖        | UmsGmsCmUmAfgmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm           |
|          |                | アンチセンス鎖     | VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfgmCmAm sGmsCm |
| 複合体8     | L10-siHB2M2SVP | センス鎖        | UmsGmsCmUmAfgmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm           |
|          |                | アンチセンス鎖     | VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfgmCmAm sUmsUm |
| 複合体9     | L10-siHB1M5SVP | センス鎖        | UmsGmsCmUmAfgmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm           |
|          |                | アンチセンス鎖     | VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfgmCmAm sGmsCm |
| 複合体10    | L10-siHB1M3S   | センス鎖        | UmsGmsCmUmAfgmGfCmCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm           |
|          |                | アンチセンス鎖     | VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUmG                             |

10

20

30

40

50

|            |                                      |             |                                                                                                                 |     |
|------------|--------------------------------------|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|            | V P                                  | ンス鎖         | m A m G m G m C m A f U m A f G m C m A m s<br>G m s C m                                                        |     |
| 複合体<br>1 1 | L 1 0 -<br>s i H B<br>1 M 4 S<br>V P | センス鎖        | U m s G m s C m U m A m U m G f C f C f U m<br>C m A m U m C m U m U m C m U m A m                              | 1 5 |
|            |                                      | アンチセ<br>ンス鎖 | V P - U m s A f s G m A m A m G f A m U f G<br>m A m G m G m C m A f U m A f G m C m A m s<br>G m s C m         | 3 3 |
| 複合体<br>1 2 | L 1 0 -<br>s i H B<br>4 M 1 S<br>V P | センス鎖        | G m s C m s U m G m C m U m A m U m G f C f<br>C f U m C m A m U m C m U m U m C m U m A m                      | 3 4 |
|            |                                      | アンチセ<br>ンス鎖 | V P - U m s A f s G m A m A m G f A m U m G<br>m A m G m G m C m A f U m A f G m C m A m G<br>m C m s G m s C m | 3 5 |
| 複合体<br>1 3 | L 1 0 -<br>s i H B<br>1              | センス鎖        | U G C U A U G C C U C A U C U U C U A                                                                           | 3 6 |
|            |                                      | アンチセ<br>ンス鎖 | U A G A A G A U G A G G C A U A G C A G C                                                                       | 3 7 |
| 複合体<br>1 4 | L 1 0 -<br>s i H B<br>2              | センス鎖        | U G C U A U G C C U C A U C U U C U A                                                                           | 3 8 |
|            |                                      | アンチセ<br>ンス鎖 | U A G A A G A U G A G G C A U A G C A U U                                                                       | 3 9 |
| 複合体<br>1 5 | L 1 0 -<br>s i H B<br>1 M 1 S<br>P   | センス鎖        | U m s G m s C m U m A m U m G f C f C f U m<br>C m A m U m C m U m U m C m U m A m                              | 1 5 |
|            |                                      | アンチセ<br>ンス鎖 | P - U m s A f s G m A m A m G f A m U m G m<br>A m G m G m C m A f U m A f G m C m A m s G<br>m s C m           | 4 0 |
| 複合体<br>1 6 | L 1 0 -<br>s i H B<br>1 M 1 S<br>P s | センス鎖        | U m s G m s C m U m A m U m G f C f C f U m<br>C m A m U m C m U m U m C m U m A m                              | 1 5 |
|            |                                      | アンチセ<br>ンス鎖 | P s - U m s A f s G m A m A m G f A m U m G<br>m A m G m G m C m A f U m A f G m C m A m s<br>G m s C m         | 4 1 |
| 複合体<br>1 7 | P 1 0 -<br>s i H B<br>2 M 1 S<br>V P | センス鎖        | U m s G m s C m U m A m U m G f C f C f U m<br>C m A m U m C m U m U m C m U m A m                              | 1 5 |
|            |                                      | アンチセ<br>ンス鎖 | V P - U m s A f s G m A m A m G f A m U m G<br>m A m G m G m C m A f U m A f G m C m A m s<br>U m s U m         | 3 0 |
| 複合体<br>1 8 | R 5 - s<br>i H B 2<br>M 1 S V<br>P   | センス鎖        | U m s G m s C m U m A m U m G f C f C f U m<br>C m A m U m C m U m U m C m U m A m                              | 1 5 |
|            |                                      | アンチセ<br>ンス鎖 | V P - U m s A f s G m A m A m G f A m U m G<br>m A m G m G m C m A f U m A f G m C m A m s<br>U m s U m         | 3 0 |
| 複合体<br>1 9 | L A 5 -<br>s i H B<br>2 M 1 S<br>V P | センス鎖        | U m s G m s C m U m A m U m G f C f C f U m<br>C m A m U m C m U m U m C m U m A m                              | 1 5 |
|            |                                      | アンチセ<br>ンス鎖 | V P - U m s A f s G m A m A m G f A m U m G<br>m A m G m G m C m A f U m A f G m C m A m s<br>U m s U m         | 3 0 |
| 複合体<br>2 0 | L B 5 -<br>s i H B<br>2 M 1 S<br>V P | センス鎖        | U m s G m s C m U m A m U m G f C f C f U m<br>C m A m U m C m U m U m C m U m A m                              | 1 5 |
|            |                                      | アンチセ<br>ンス鎖 | V P - U m s A f s G m A m A m G f A m U m G<br>m A m G m G m C m A f U m A f G m C m A m s<br>U m s U m         | 3 0 |
| 複合体<br>2 1 | V 8 - s<br>i H B 2                   | センス鎖        | U m s G m s C m U m A m U m G f C f C f U m<br>C m A m U m C m U m U m C m U m A m                              | 1 5 |

10

20

30

40

50

|                 |                                      |             |                                                                                                         |     |
|-----------------|--------------------------------------|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|                 | M 1 S V<br>P                         | アンチセ<br>ンス鎖 | V P - U m s A f s G m A m A m G f A m U m G<br>m A m G m G m C m A f U m A f G m C m A m s<br>U m s U m | 3 0 |
| 複合体<br>2 2      | W 8 - s<br>i H B 2<br>M 1 S V<br>P   | センス鎖        | U m s G m s C m U m A m U m G f C f C f U m<br>C m A m U m C m U m U m C m U m A m                      | 1 5 |
|                 |                                      | アンチセ<br>ンス鎖 | V P - U m s A f s G m A m A m G f A m U m G<br>m A m G m G m C m A f U m A f G m C m A m s<br>U m s U m | 3 0 |
| 複合体<br>2 3      | X 8 - s<br>i H B 2<br>M 1 S V<br>P   | センス鎖        | U m s G m s C m U m A m U m G f C f C f U m<br>C m A m U m C m U m U m C m U m A m                      | 1 5 |
|                 |                                      | アンチセ<br>ンス鎖 | V P - U m s A f s G m A m A m G f A m U m G<br>m A m G m G m C m A f U m A f G m C m A m s<br>U m s U m | 3 0 |
| 複合体<br>2 4      | Z 5 - s<br>i H B 2<br>M 1 S V<br>P   | センス鎖        | U m s G m s C m U m A m U m G f C f C f U m<br>C m A m U m C m U m U m C m U m A m                      | 1 5 |
|                 |                                      | アンチセ<br>ンス鎖 | V P - U m s A f s G m A m A m G f A m U m G<br>m A m G m G m C m A f U m A f G m C m A m s<br>U m s U m | 3 0 |
| 複合体<br>2 5      | F I N -<br>s i H B<br>1 M 1 S<br>V P | センス鎖        | U m s G m s C m U m A m U m G f C f C f U m<br>C m A m U m C m U m U m C m U m A m                      | 1 5 |
|                 |                                      | アンチセ<br>ンス鎖 | V P - U m s A f s G m A m A m G f A m U m G<br>m A m G m G m C m A f U m A f G m C m A m s<br>G m s C m | 2 9 |
| 複合体<br>2 6      | F I N -<br>s i H B<br>2 M 1 S<br>V P | センス鎖        | U m s G m s C m U m A m U m G f C f C f U m<br>C m A m U m C m U m U m C m U m A m                      | 1 5 |
|                 |                                      | アンチセ<br>ンス鎖 | V P - U m s A f s G m A m A m G f A m U m G<br>m A m G m G m C m A f U m A f G m C m A m s<br>U m s U m | 3 0 |
| 比較複<br>合体 1     | F I N -<br>N C                       | センス鎖        | U U C U C C G A A C G U G U C A C G U                                                                   | 4 2 |
|                 |                                      | アンチセ<br>ンス鎖 | A C G U G A C A C G U U C G G A G A A U U                                                               | 4 3 |
| 比較例<br>複合体<br>2 | L 1 0 -<br>s i H B<br>3 M 1 S<br>V P | センス鎖        | G m s C m s U m G m C m U m A f U f G f C m<br>C m U m C m A m U m C m U m U m A m                      | 4 4 |
|                 |                                      | アンチセ<br>ンス鎖 | V P - U m s A f s A m G m A m U f G m A m G<br>m G m C m A m U m A f G m C f A m G m C m s<br>A m s G m | 4 5 |
| 比較複<br>合体 3     | F I N -<br>s i H B<br>3 M 1 S<br>V P | センス鎖        | G m s C m s U m G m C m U m A f U f G f C m<br>C m U m C m A m U m C m U m U m A m                      | 4 4 |
|                 |                                      | アンチセ<br>ンス鎖 | V P - U m s A f s A m G m A m U f G m A m G<br>m G m C m A m U m A f G m C f A m G m C m s<br>A m s G m | 4 5 |

10

20

30

## 【0393】

(調製例3) P10-s i H B 2 M 1 S V P (複合体17) の調製

(3-1) P-10化合物の合成

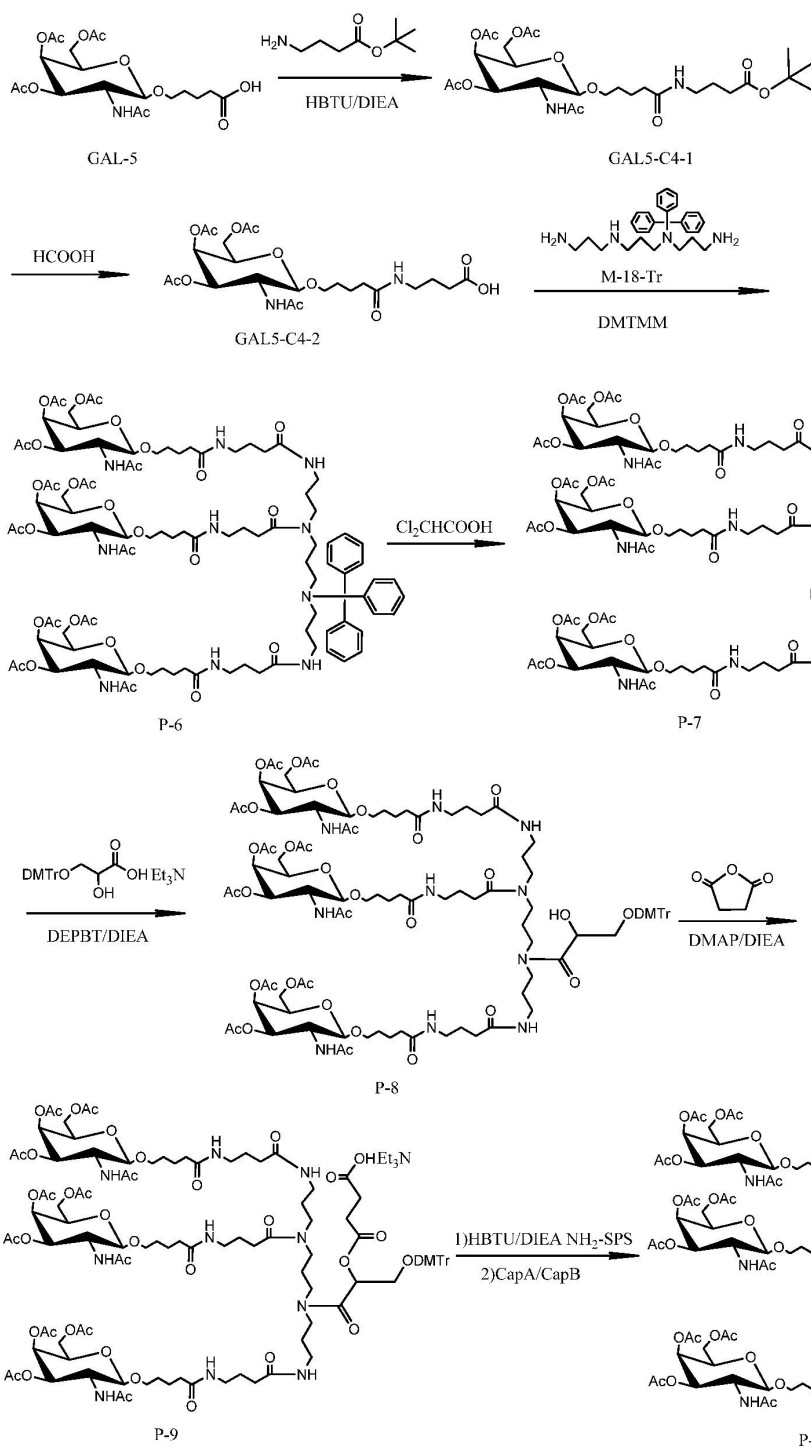
以下の方法に従い、P-10化合物を合成した。

## 【0394】

40

50

## 【化 5 7】



10

20

30

40

## 【0395】

## (3-1-1) GAL5-C4-1の合成

40 ml の N, N-ジメチルホルムアミドに上記 (1-1-1) に記載された方法により得られた GAL-5 (13.43 g、30.0 mmol)、4-アミノ酸 tert-ブチルエステル塩酸塩 (5.87 g、30.0 mmol)、O-ベンゾトリアゾール-4-yl-メチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート (13.65 g、36.0 mmol) 及びジイソプロピルエチルアミン (11.63 g、90.0 mmol) を加え、均一に溶解させた後に室温で 5 時間攪拌反応させた。反応液に 300 ml の飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルで 1 回あたり 200 ml で 3 回抽出し、有機相をあわせ、20

50

0 m l の飽和食塩水で 1 回洗浄し、有機相を分離し、さらに無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、完全に乾燥するまで溶剤を減圧留去して 30.3 g の油状物粗製品 G A L 5 - C 4 - 1 を得、そのまま次の反応を行った。

【0396】

(3-1-2) G A L 5 - C 4 - 2 の合成

工程 (3-1-1) で得られた G A L 5 - C 4 - 1 粗製品 (30.3 g、30 mmol) を 180 m l ギ酸に溶解させ、室温で 16 時間攪拌反応させた。完全に乾燥するまで溶剤を蒸発させ、カラムクロマトグラフィーにより精製し (200~300 メッシュの順相シリカゲルを、ジクロロメタン：メタノール = 100 : 18~100 : 20 で勾配溶出した)、反応溶出液を回収し、溶剤を濃縮除去し、計 14.84 g の目的生成物 G A L 5 - C 4 - 2 を得た。

10

【0397】

(3-1-3) P-6 の合成：

工程 (1-1-4) に記載された方法により得られた M-18-Tr (2.02 g、4.69 mmol) と工程 (3-1-2) で得られた G A L 5 - C 4 - 2 (8.24 g、15.48 mmol、2 バッチの生成物をあわせたもの) を混合して 47 m l のアセトニトリルに溶解させ、さらに N-メチルモルホリン (3.13 g、30.96 mmol) を加え、最後に 4-(4,6-ジメトキシトリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリン塩酸塩 (DMTMM、4.28 g、15.48 mmol) を加え、室温で 2 h 攪拌反応させた。20 m l のジクロロメタンで反応液を希釈し、10 m l の飽和炭酸水素ナトリウム溶液で有機相を洗浄し、10 m l の飽和食塩水で有機相を洗浄し、有機相をあわせ、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過した後で溶剤を減圧蒸発乾固して粗製品を得、200~300 メッシュの順相シリカゲルカラムで精製し、石油エーテルをカラムに入れ、1 wt % トリエチルアミンでシリカゲルの酸性を中和し、ジクロロメタン：メタノール = 100 : 5~100 : 7 で勾配溶出し、生成物溶出液を回収し、減圧蒸発乾固して計 8.27 g の純粋な P-6 を得た。

20

【0398】

(3-1-4) P-7 の合成：

上記 (3-1-3) で得られた P-6 (6.82 g、3.456 mmol) を 69 m l のジクロロメタンに溶解させ、ジクロロ酢酸 (13.367 g、103.67 mmol) を加え、室温で 2 h 反応させた。100 m l のジクロロメタンを加えて反応液を希釈し、さらに飽和炭酸水素ナトリウム溶液を加えて洗浄し pH = 7~8 になるように調節し、水相をジクロロメタンで 1 回あたり 30 m l で 6 回抽出し、有機相をあわせ、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過した後で溶剤を減圧蒸発乾固して粗製品を得た。200~300 メッシュの順相シリカゲルで精製し、10 wt % トリエチルアミンでシリカゲルの酸性を中和し、1 wt % トリエチルアミンでカラムを平衡化し、ジクロロメタン：メタノール = 100 : 30~100 : 40 で勾配溶出し、生成物溶出液を回収し、溶剤を減圧蒸発乾固して計 4.82 g の P-7 を得た。MS m/z : C<sub>78</sub>H<sub>127</sub>N<sub>10</sub>O<sub>33</sub>, [M+H]<sup>+</sup>、理論値：1732.91、実測値：1735.73。

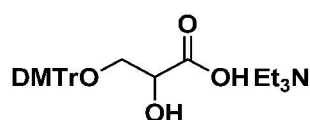
30

【0399】

(3-1-5) P-8 の合成：

【0400】

【化58】



(A-1)

40

P-7 (2.653 g、1.532 mmol) と A-1 (2.342 g、4.596 m

50

mol) を混合して 16 ml のジクロロメタンに溶解させ、3-ジエトキシホスホリル-1, 2, 3-ベンゾオキサゾール 4 (3H)-オン (DEPBT) (1.375 g、4.596 mmol) を加え、さらにジイソプロピルエチルアミン (1.188 g、9.191 mmol) を加え、25℃で 2 h 攪拌反応させた。10 ml の飽和炭酸水素ナトリウムで有機相を洗浄し、水相をジクロロメタンで 1 回あたり 10 ml で 3 回抽出し、10 ml の飽和食塩水で有機相を洗浄し、水相をジクロロメタンで 1 回あたり 10 ml で 2 回抽出し、有機相をあわせ、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過した後で溶剤を減圧蒸発乾固し、真空油ポンプで一晩発泡乾燥させて粗製品を得た。カラム精製には、120 g の 200~300 メッシュの順相シリカゲルを用い、20 ml のトリエチルアミンでシリカゲルの酸性を中和し、1 wt% トリエチルアミンを含む石油エーテルでカラムを平衡化し、石油エーテル：酢酸エチル：ジクロロメタン：N, N-ジメチルホルムアミド = 1 : 1 : 1 : 0.5 ~ 1 : 1 : 1 : 0.6 で勾配溶出し、生成物溶出液を回収し、溶剤を減圧蒸発乾固して計 2.793 g の純粋な P-8 を得た。

【0401】

(3-1-6) P-9 の合成：

P-8 (490 mg、0.231 mmol)、コハク酸無水物 (69 mg、0.693 mmol) 及び 4-ジメチルアミノピリジン (DMAP、68 mg、0.554 mmol) を混合して 2.3 ml のジクロロメタンに溶解させ、さらにジイソプロピルエチルアミン (DIPEA、149 mg、1.155 mmol) を加え、25℃で 21 h 攪拌反応させた。50 ml のジクロロメタンで反応液を希釈し、さらに 100 ml の 0.5 M トリエチルアミンリン酸塩を加えて反応液を洗浄し、水相をジクロロメタンで 1 回あたり 10 ml で 3 回抽出し、有機相をあわせ、減圧蒸発乾固して粗製品を得た。カラム精製には、80 g の 200~300 メッシュの順相シリカゲルを用い、1 wt% トリエチルアミンでシリカゲルの酸性を中和し、ジクロロメタンでカラムを平衡化し、1 wt% トリエチルアミンを含むジクロロメタン：メタノール = 100 : 18 ~ 100 : 20 で勾配溶出し、生成物溶出液を回収し、溶剤を減圧蒸発乾固して計 200 mg の純粋な P-9 複合分子を得た。MS m/z : C<sub>106</sub>H<sub>153</sub>N<sub>10</sub>O<sub>41</sub>, [M-DMTr]<sup>+</sup>、理論値：1921.05、実測値：1920.97。

【0402】

(3-1-7) P-10 の合成

L-9 複合分子の代わりに P-9 複合分子を用い、固相担体に結合された P-9 複合分子を得たこと以外、調製例 1 における工程 (1-1-9) と同じ方法により、P-10 を調製した。

【0403】

(3-2) P10-siHB2M1SV P 複合体の合成

出発として L-10 化合物の代わりに P-10 化合物を用いてセンス鎖を合成したこと以外、調製例 1 における工程 (1-2)、(1-3A)、(1-4) と同じ方法により、複合体 17 を調製した。構造が式 (404) に示される P10-siHB2M1SV P 複合体を得ることができると予期した。

【0404】

(調製例 4) R5-siHB2M1SV P 複合体 (複合体 18) の調製

(4-1) R-5 化合物の合成

以下の方法に従い、R-5 化合物を合成した。

【0405】

10

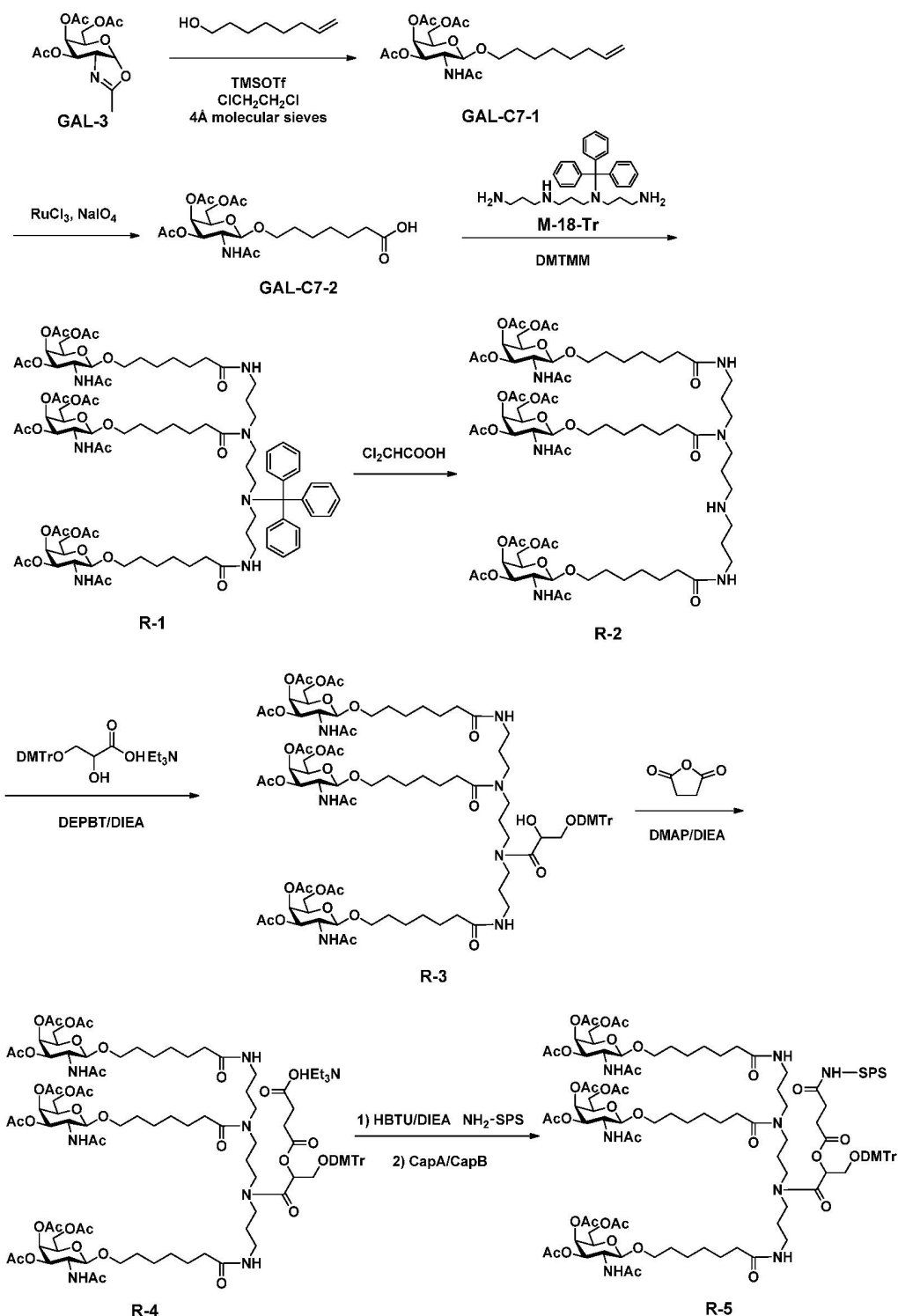
20

30

40

50

## 【化 5 9】



## 【0406】

## (4-1-1) GAL-C7-1の合成

工程(1-1-1b)に記載された方法により得られたGAL-3(26.4g、80.2mmol)を134mlの無水1,2-ジクロロエタンに溶解させ、60gの4Å分子篩粉を加え、さらに7-オクテン-1-オール(11.3g、88.2mmol)を加え、室温で10分間攪拌反応させ、氷浴下で窒素保護下でトリフルオロメタンスルホン酸トリメチルシリル(8.9g、40.1mmol)を加え、室温で24時間攪拌反応させた。4Å分子篩粉を濾過除去し、濾液に500mlの飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて洗浄し、有機相を分離し、水相を100mlのジクロロメタンで1回抽出し、有機相

をあわせ、250 mlの飽和食塩水で1回洗浄し、有機相を分離し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、完全に乾燥するまで溶剤を減圧留去して33.3 gの黄色水飴状製品GAL-C7-1を得、精製することなく、そのまま次の酸化反応を行った。

#### 【0407】

##### (4-1-2) GAL-C7-2の合成

工程(4-1-1)で得られたGAL-C7-1(33.3 g、72.8 mmol)を160 mlのジクロロメタンと160 mlのアセトニトリルの混合溶剤に溶解させ、それぞれ216 mlの水及び固形過ヨウ素酸ナトリウム(62.3 g、291.2 mmol)を加え、氷水浴下で10分間攪拌し、触媒である塩化ルテニウム(III)(498 mg、2.4 mmol)を加えて自然に室温まで昇温して23時間攪拌反応させた。反応液に200 mlの水を加えて希釈攪拌し、飽和炭酸水素ナトリウムを加えてpHを7.5に調節し、有機相を分離し、水相をジクロロメタンで3回抽出し、有機相を捨て、水相を固形クエン酸でpHを約3に調節し、ジクロロメタンで1回あたり200 mlで3回抽出し、有機相をあわせ、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶剤を減圧留去した後でカラムクロマトグラフィー(200~300メッシュの順相シリカゲルを、ジクロロメタン：メタノール=100：18~100：20で勾配溶出した)により精製して22.4 gの白色泡状固形製品GAL-C7-2を得た。MS m/z:  $C_{21}H_{32}NO_{11}$ ,  $[M+H]^+$ 、理論値：476.50、実測値：475.94。

#### 【0408】

##### (4-1-3) R-1の合成：

工程(1-1-4)に記載された方法により得られたM-18-Tr(2.02 g、4.69 mmol)とGAL-C7-2(7.36 g、15.48 mmol)を混合して47 mlのアセトニトリルに溶解させ、さらにN-メチルモルホリン(3.13 g、30.96 mmol)を加え、最後に4-(4,6-ジメトキシトリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリン塩酸塩(DMTMM、4.28 g、15.48 mmol)を加え、室温で2 h攪拌反応させた。200 mlのジクロロメタンで反応液を希釈し、100 mlの飽和炭酸水素ナトリウム溶液で有機相を洗浄し、100 mlの飽和食塩水で有機相を洗浄し、有機相をあわせ、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過した後で溶剤を減圧蒸発乾固して粗製品を得、200~300メッシュの順相シリカゲルカラムで精製し、石油エーテルをカラムに入れ、1 wt%トリエチルアミンでシリカゲルの酸性を中和し、ジクロロメタン：メタノール=100：5~100：7で勾配溶出し、生成物溶出液を回収し、減圧蒸発乾固して7.82 gの純粋なR-1を得た。

#### 【0409】

##### (4-1-4) R-2の合成：

R-1(6.23 g、3.456 mmol)を69 mlのジクロロメタンに溶解させ、ジクロロ酢酸(13.367 g、103.67 mmol)を加え、室温で2 h反応させた。100 mlのジクロロメタンを加えて反応液を希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム溶液を加えて洗浄しpH=7~8になるように調節し、水相をジクロロメタンで1回あたり30 mlで6回抽出し、有機相をあわせ、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過した後で溶剤を減圧蒸発乾固して粗製品を得た。200~300メッシュの順相シリカゲルを用いて、10 wt%トリエチルアミンでシリカゲルの酸性を中和し、1 wt%トリエチルアミンでカラムを平衡化し、ジクロロメタン：メタノール=100：30~100：40で勾配溶出し、溶剤を減圧蒸発乾固して4.49 gの純粋なR-2を得た。

#### 【0410】

##### (4-1-5) R-3の合成：

R-2(2.391 g、1.532 mmol)とA-1(2.342 g、4.596 mmol)を混合して16 mlのジクロロメタンに溶解させ、3-ジエトキシホスホリル-1,2,3-ベンゾオキサゾール4(3H)-オン(DEPBT)(1.375 g、4.596 mmol)を加え、さらにジイソプロピルエチルアミン(1.188 g、9.191 mmol)を加え、25℃で2 h攪拌反応させた。10 mlの飽和炭酸水素ナトリウム

で有機相を洗浄し、水相をジクロロメタンで1回あたり10mlで3回抽出し、10mlの飽和食塩水で有機相を洗浄し、水相をジクロロメタンで1回あたり10mlで2回抽出し、有機相をあわせ、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過した後で溶剤を減圧蒸発乾固し、真空油ポンプで一晩発泡乾燥させて粗製品を得た。カラム精製には、120gの200～300メッシュの順相シリカゲルを用い、20mlのトリエチルアミンでシリカゲルの酸性を中和し、1wt%トリエチルアミンを含む石油エーテルでカラムを平衡化し、石油エーテル：酢酸エチル：ジクロロメタン：N,N-ジメチルホルムアミド=1：1：1：0.5～1：1：1：0.6で勾配溶出し、溶剤を減圧蒸発乾固して2.642gの純粋なR-3を得た。

【0411】

(4-1-6) R-4の合成：

R-3 (795mg、0.4074mmol)、コハク酸無水物 (82mg、0.8148mmol) 及び4-ジメチルアミノピリジン (DMAP、100mg、0.8148mmol) を混合して4mlのジクロロメタンに溶解させ、さらにジイソプロピルエチルアミン (DIPEA、100mg、0.8148mmol) を加え、25℃で18h攪拌反応させた。5mlの0.5Mトリエチルアミンリン酸塩で反応液を洗浄し、水相をジクロロメタンで1回あたり5mlで3回抽出し、有機相をあわせ減圧蒸発乾固して粗製品を得た。カラム精製には、30gの200～300メッシュの順相シリカゲルを用い、1wt%トリエチルアミンでシリカゲルの酸性を中和し、ジクロロメタンでカラムを平衡化し、1wt%トリエチルアミンを含むジクロロメタン：メタノール=100：18～100：20で勾配溶出し、生成物溶出液を回収し、溶剤を減圧蒸発乾固して505mgの純粋なR-4複合分子を得た。

【0412】

(4-1-7) R-5の合成：

L-9複合分子の代わりにR-4複合分子を用い、固相担体に結合されたR-4複合分子を得たこと以外、調製例1における工程(1-1-9)と同じ方法により、R-5を調製した。

【0413】

(4-2) R5-siHB2M1SVP複合体の合成

出発としてL-10化合物の代わりにR-5化合物を用いてセンス鎖を合成したこと以外、調製例1における工程(1-2)、(1-3A)、(1-4)と同じ方法により、複合体18を調製した。構造が式(407)に示されるR5-siHB2M1SVP複合体を得ることができると予期した。

【0414】

(調製例5) LA5-siHB2M1SVP複合体(複合体19)の調製

以下のプロセス経路により、LA-5化合物を合成できると予期した。

【0415】

10

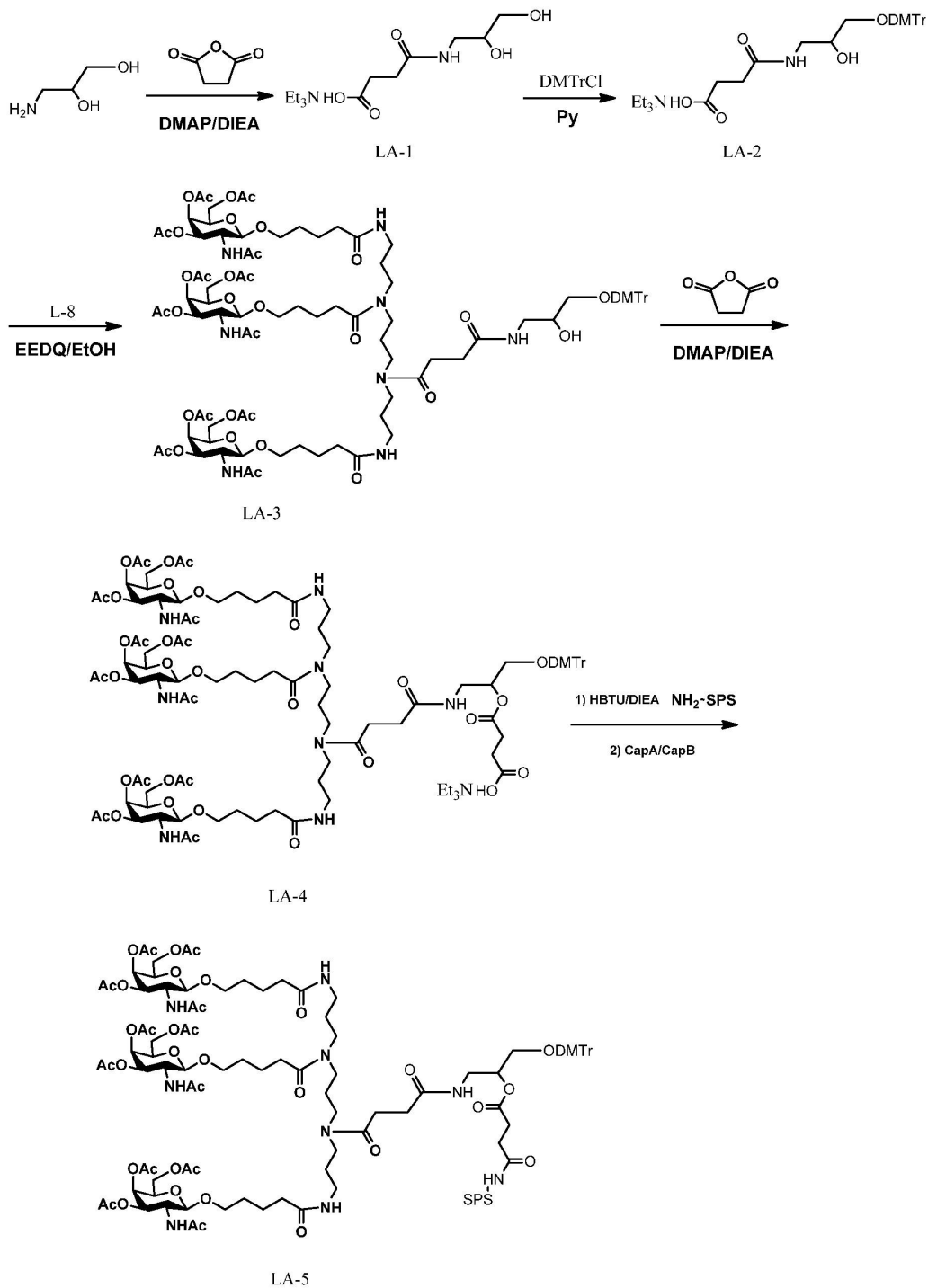
20

30

40

50

## 【化 6 0】



## 【0 4 1 6】

出発として L-10 化合物の代わりに LA-5 化合物を用いてセンス鎖を合成したこと以外、調製例 1 における工程 (1-2)、(1-3A)、(1-4) と同じ方法により、複合体 19 を調製した。構造が式 (412) に示される LA5-siHB2M1SVP 複合体を得ることができると予期した。

## 【0 4 1 7】

(調製例 6) LB5-siHB2M1SVP 複合体 (複合体 20) の調製

(6-1) LB-5 化合物の合成

以下の方法に従い、LB-5 化合物を合成した。

10

20

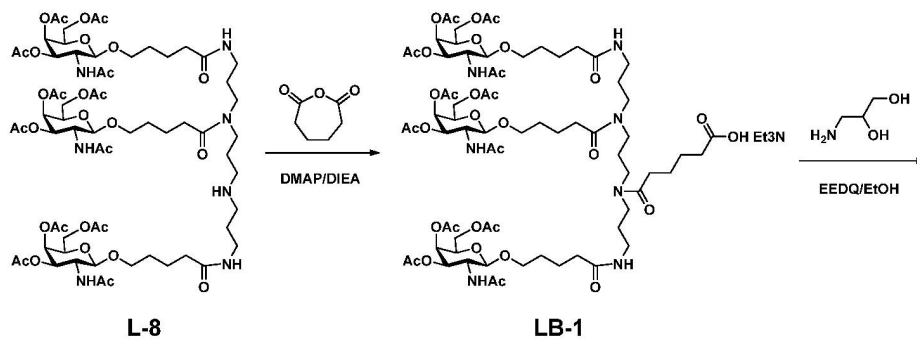
30

40

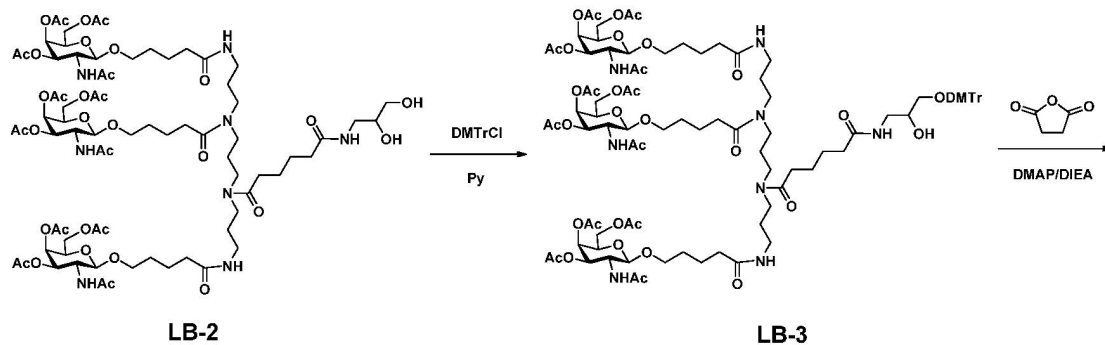
50

【0418】

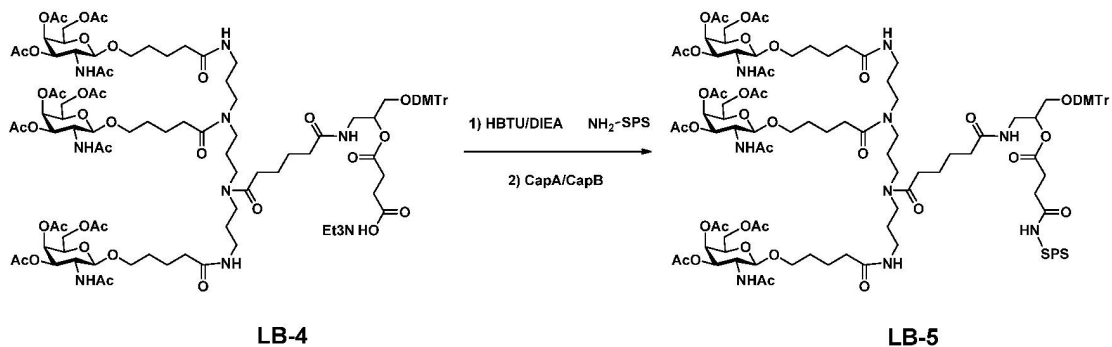
【化61】



10



20



30

【0419】

(6-1-1) LB-1の合成：

工程(1-1-6)に記載された方法により得られたL-8(5.0g、3.386mmol)、アジピン酸無水物(870mg、6.772mmol)及び4-ジメチルアミノピリジン(DMAP、827mg、6.772mmol)を混合して130mlのジクロロメタンに溶解させ、さらにジイソプロピルエチルアミン(DIPEA、2.2g、16.931mmol)を加え、25℃で4h攪拌反応させた。70mlのジクロロメタンを加えて反応液を希釈し、0.5Mトリエチルアミンリン酸塩で反応液を洗浄し、水相をジクロロメタンで1回あたり10mlで4回抽出し、有機相をあわせ減圧蒸発乾固して粗製品を得た。カラム精製には、120gの200~300メッシュの順相シリカゲルを用い、1wt%トリエチルアミンでシリカゲルの酸性を中和し、ジクロロメタンでカラムを平衡化し、石油エーテル：酢酸エチル：ジクロロメタン：メタノール=1：1：1：0.2~1：1：1：1で勾配溶出し、溶剤を減圧蒸発乾固して4.267gの純粋なLB-1を得た。

40

【0420】

(6-1-2) LB-2の合成：

工程(6-1-1)に記載された方法により得られたLB-1(4.697g、2.7

50

53 mmol、2 バッチの生成物をあわせたもの）、3-アミノ-1, 2-プロパンジオール（313 mg、3.442 mmol）、4-（4, 6-ジメトキシトリアジン-2-イル）-4-メチルモルホリン塩酸塩（DMTMM、953 mg、3.442 mmol）及びN-メチルモルホリン（700 mg、6.884 mmol）を順に30 mLのアセトニトリルと3 mLのメタノールの混合液に加え、室温で一晩攪拌反応させた。完全に乾燥するまで溶剤を蒸発させ、カラムクロマトグラフィー（200～300メッシュの順相シリカゲルをジクロロメタン：メタノール＝1：0.07～1：0.5で勾配溶出した）により精製し、生成物溶出液を回収し、溶剤を濃縮除去し、3.27 gの目的生成物LB-2を得た。

#### 【0421】

（6-1-3）LB-3の合成：

LB-2（2.27 g、1.353 mmol）を14 mLの無水ピリジンで溶解させた。さらに4, 4'-ビスメトキシトリチルクロリド（688 mg、2.03 mmol）を加えて室温で一晩攪拌反応させた。150 mLのメタノールを加えてクエンチングし、完全に乾燥するまで溶剤を蒸発させた。カラムクロマトグラフィー（200～300メッシュの順相シリカゲルをジクロロメタン：メタノール＝1：0.05～1：0.2で勾配溶出した）により精製し、生成物溶出液を回収し、溶剤を濃縮除去し、1.647 gの目的生成物LB-3を得た。

#### 【0422】

（6-1-4）LB-4の合成：

LB-3（822 mg、0.415 mmol）、コハク酸無水物（83 g、0.83 mmol）及び4-ジメチルアミノピリジン（DMAP、102 mg、0.83 mmol）を混合して4 mLのジクロロメタンに溶解させ、さらにDIPEA（270 mg、2.075 mmol）を加え、25℃で一晩攪拌反応させた。0.5 M トリエチルアミンリン酸塩で反応液を3回洗浄し、水相をジクロロメタンで1回あたり2 mLで3回抽出し、有機相をあわせ減圧蒸発乾固して粗製品を得た。カラム精製には、200～300メッシュの順相シリカゲルを用い、5 wt% トリエチルアミンでシリカゲルの酸性を中和し、石油エーテルでカラムを平衡化し、1 wt% トリエチルアミンを含むジクロロメタン：メタノール＝100：5～100：20で勾配溶出し、溶剤を減圧蒸発乾固して787 mgの純粋なLB-4複合分子を得た。

#### 【0423】

（6-1-5）LB-5の合成：

L-9複合分子の代わりにLB-4複合分子を用い、固相担体に結合されたLB-4複合分子を得たこと以外、調製例1における工程（1-1-9）と同じ方法により、LB-5を調製した。

#### 【0424】

（6-2）LB5-siHB2M1SVP複合体の合成

出発としてL-10化合物の代わりにLB-5化合物を用いてセンス鎖を合成したこと以外、調製例1における工程（1-2）、（1-3A）、（1-4）と同じ方法により、複合体20を調製した。構造が式（413）に示されるLB5-siHB2M1SVP複合体を得ることができると予期した。

#### 【0425】

（調製例7）V8-siHB2M1SVP複合体（複合体21）の合成

以下のプロセス経路により、V-8化合物を合成できると予期した。

#### 【0426】

10

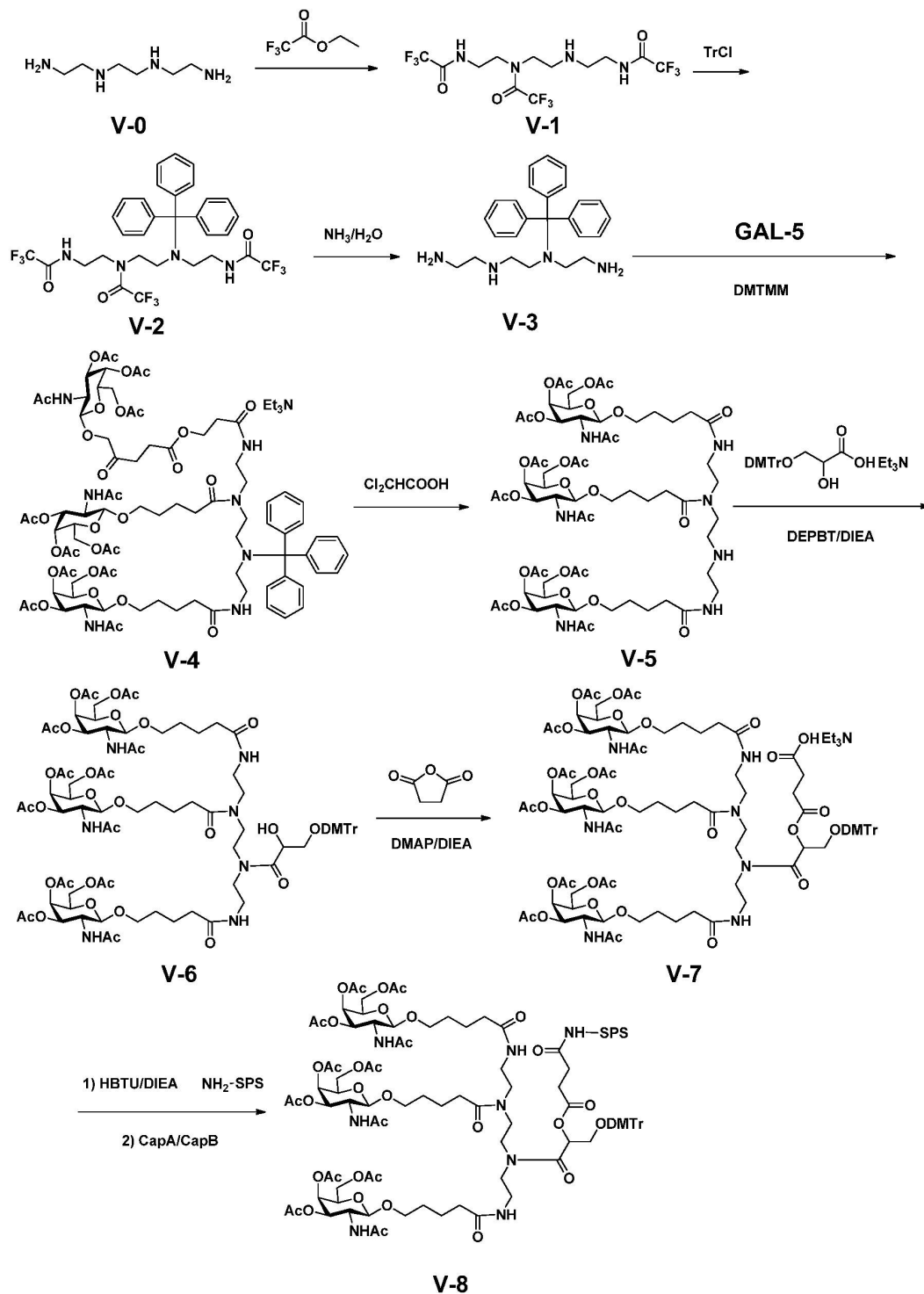
20

30

40

50

## 【化 6 2】



## 【0427】

出発として L-10 化合物の代わりに V-8 化合物を用いてセンス鎖を合成したこと以外、調製例 1 における工程 (1-2)、(1-3A)、(1-4) と同じ方法により、複合体 21 を調製した。構造が式 (414) に示される V8-siHB2M1SVP 複合体を得ることができると予期した。

## 【0428】

(調製例 8) W8-siHB2M1SVP 複合体 (複合体 22) の調製

(8-1) W-8 化合物の合成

以下の方法に従い、W-8 化合物を合成した。

10

20

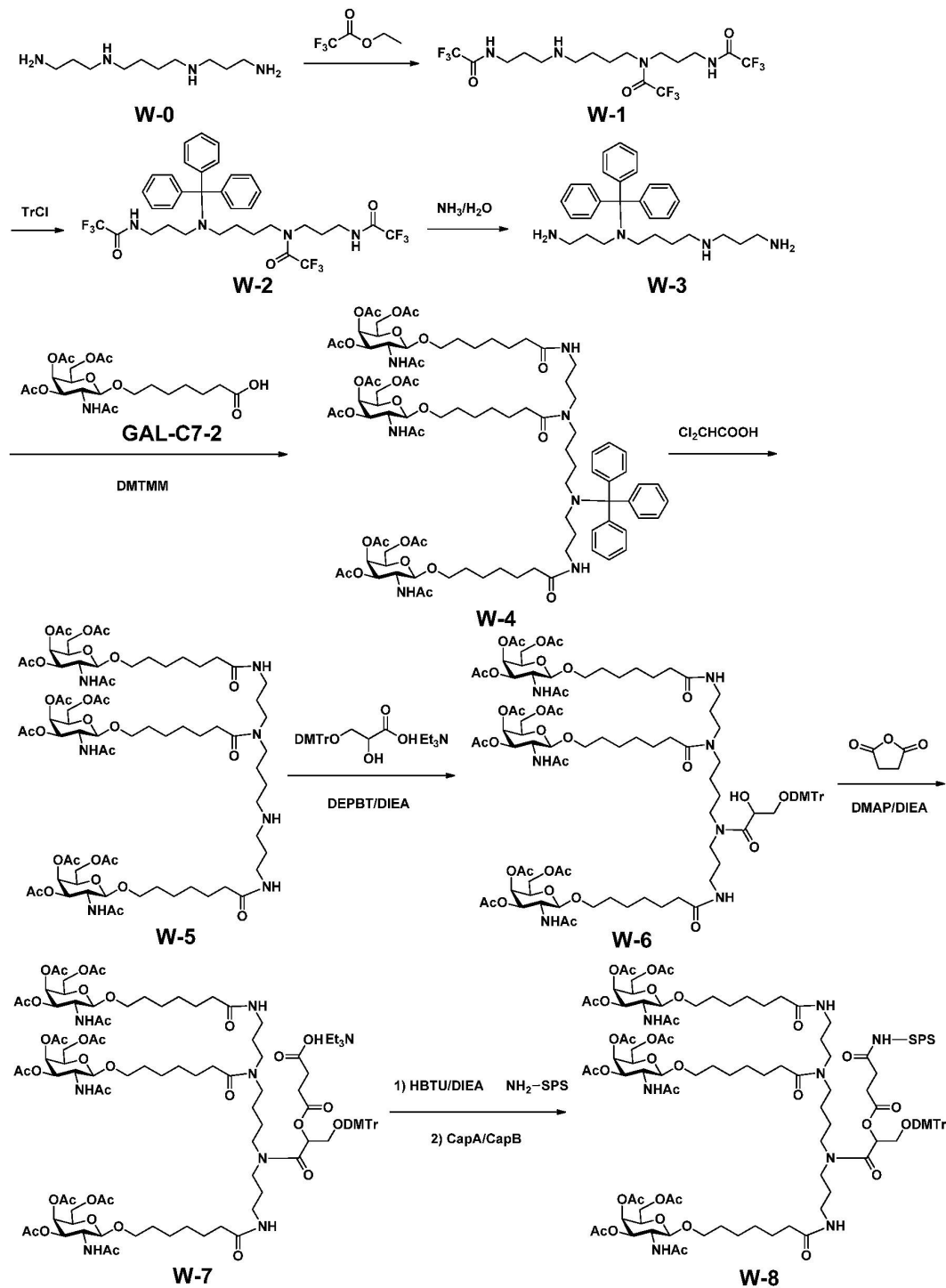
30

40

50

【 0 4 2 9 】

【 化 6 3 】



【 0 4 3 0 】

( 8 - 1 - 1 ) W - 1 の合成 :

W-0 ( 2 . 0 2 4 g 、 1 0 m m o l ) を 2 5 m l の アセトニトリル に 溶 解 さ せ 、 さ ら に トリエチルアミン ( 4 . 0 4 8 g 、 4 0 m m o l ) を 加 え 、 氷 水 浴 で 0 ° C 程 度 ま で 冷 却 し 、 トリフルオロ酢酸エチル ( 5 . 6 8 3 g 、 4 0 m m o l ) を 加 え 、 室 温 で 2 2 h 反 応 さ せ た 。 溶 剤 を 減 圧 蒸 発 乾 固 し 、 真 空 油 ポンプ で 1 8 h 発 泡 乾 燥 さ せ 、 5 . 8 3 5 g の 固 形 粗 製 品 W - 1 を 得 た 。

【 0 4 3 1 】

10

20

30

40

50

## (8-1-2) W-2の合成:

W-1粗製品(5.835 g、10 mmol)を50 mlのジクロロメタンに溶解させ、反応液にTrCl(3.345 g、12 mmol)及びトリエチルアミン(1.518 g、15 mmol)を加え、室温で20 h攪拌反応させた。20 mlの飽和炭酸水素ナトリウムで反応液を2回洗浄し、20 mlの飽和食塩水で1回洗浄し、有機相をあわせ、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過した後で有機溶剤を減圧蒸発乾固し、真空油ポンプで一晩発泡乾燥させ、8.012 gの固形粗製品W-2を得た。処理されることなく、次の脱保護反応を行った。

## 【0432】

## (8-1-3) W-3の合成:

W-2粗製品(8.012 g、10 mmol)を100 mlのメタノールに溶解させ、さらに100 mlのメチルアミン水溶液(40 wt%)を加え、50℃で23 h攪拌反応させた。不溶性粒子を濾過除去し、溶剤を減圧蒸発乾固し、200 mlの体積比1:1のDCM-メタノール混合溶剤を加え、50 mlの飽和炭酸水素ナトリウムで有機相を洗浄し、水相をジクロロメタンで1回あたり50 mlで3回抽出し、有機相をあわせ、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過した後で溶剤を減圧蒸発乾固し、真空油ポンプで一晩発泡乾燥させ、200~300メッシュの順相シリカゲルカラムで精製し、石油エーテルをカラムに入れ、1 wt%トリエチルアミンでシリカゲルの酸性を中和し、ジクロロメタン:メタノール:アンモニア水(25 wt%)=1:1:0.05~1:1:0.25で勾配溶出し、生成物溶出液を回収し、溶剤を減圧蒸発乾固し、真空油ポンプで発泡乾燥させて3.062 gの純粋なW-3を得た。

## 【0433】

## (8-1-4) W-4の合成:

W-3(0.675 g、1.517 mmol)とGAL-C7-2(2.60 g、5.46 mmol)を混合して47 mlのアセトニトリルに溶解させ、さらにジイソプロピルエチルアミン(1.57 g、12.14 mmol)を加え、最後に3-ジエトキシホスホリル-1,2,3-ベンゾオキサゾール4(3H)-オン(DEPBT、1.816 g、6.04 mmol)を加え、室温で2.5 h攪拌反応させた。100 mlのジクロロメタンで反応液を希釈し、80 mlの飽和炭酸水素ナトリウム溶液で有機相を洗浄し、80 mlの飽和食塩水で有機相を洗浄し、有機相をあわせ、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過した後で溶剤を減圧蒸発乾固して粗製品を得、200~300メッシュの順相シリカゲルカラムで精製し、石油エーテルをカラムに入れ、1 wt%トリエチルアミンでシリカゲルの酸性を中和し、ジクロロメタン:メタノール=100:5~100:7で勾配溶出し、生成物溶出液を回収し、減圧蒸発乾固して1.610 gの純粋なW-4を得た。

## 【0434】

## (8-1-5) W-5の合成:

W-4(1.61 g、0.886 mmol)を125 mlのジクロロメタンに溶解させ、さらにジクロロ酢酸(3.5 ml、42.43 mmol)を加え、室温で1 h反応させた。150 mlのピリジンを加えて反応液を中和し、溶剤を減圧蒸発乾固して粗製品を得た。200~300メッシュの順相シリカゲルを用いて、10 wt%トリエチルアミンでシリカゲルの酸性を中和し、1 wt%トリエチルアミンでカラムを平衡化し、ジクロロメタン:メタノール=100:30~100:40で勾配溶出し、生成物溶出液を回収し、溶剤を減圧蒸発乾固して1.26 gの純粋なW-5を得た。

## 【0435】

## (8-1-6) W-6の合成:

W-5(1.25 g、0.793 mmol)と工程(1-1-7a)に記載された方法により得られたA-1(1.21 g、2.38 mmol)を混合して12 mlのジクロロメタンに溶解させ、3-ジエトキシホスホリル-1,2,3-ベンゾオキサゾール4(3H)-オン(DEPBT、0.712 g、2.38 mmol)を加え、さらにジイソプロピルエチルアミン(0.615 g、4.76 mmol)を加え、25℃で3 h攪拌反応さ

せた。80 ml の飽和炭酸水素ナトリウムで有機相を洗浄し、水相をジクロロメタンで1回あたり10 ml で3回抽出し、有機相をあわせ、10 ml の飽和食塩水で洗浄し、有機相をあわせ、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過した後で溶剤を減圧蒸発乾固し、真空油ポンプで一晩発泡乾燥させて粗製品を得た。カラム精製には、185 g の200~300メッシュの順相シリカゲルを用い、20 ml のトリエチルアミンでシリカゲルの酸性を中和し、1 wt % トリエチルアミンを含む石油エーテルでカラムを平衡化し、石油エーテル：酢酸エチル：ジクロロメタン：N, N-ジメチルホルムアミド=1:1:1:0.1~1:1:1:0.7で勾配溶出し、生成物溶出液を回収し、溶剤を減圧蒸発乾固して1.57 g の純粋なW-6を得た。

【0436】

(8-1-7) W-7の合成：

W-6 (1.238 g、0.63 mmol)、コハク酸無水物 (0.189 g、1.89 mmol) 及び4-ジメチルアミノピリジン (DMAP、0.231 g、1.89 mmol) を混合して7 ml のジクロロメタンに溶解させ、さらにDIEA (0.407 g、3.15 mmol) を加え、25℃で24 h 攪拌反応させた。5 ml の0.5 M トリエチルアミンリン酸塩で反応液を洗浄し、水相をジクロロメタンで1回あたり5 ml で3回抽出し、有機相をあわせ減圧蒸発乾固して粗製品を得た。カラム精製には、30 g の200~300メッシュの順相シリカゲルを用い、1 wt % トリエチルアミンでシリカゲルの酸性を中和し、ジクロロメタンでカラムを平衡化し、1 wt % トリエチルアミンを含むジクロロメタン：メタノール=100:18~100:20で勾配溶出し、生成物溶出液を回収し、溶剤を減圧蒸発乾固して1.033 g の純粋なW-7 複合分子を得た。MS m/z: C<sub>101</sub>H<sub>146</sub>N<sub>7</sub>O<sub>38</sub>, [M-DMTr]<sup>+</sup>、理論値: 1763.92、実測値: 1763.21。

【0437】

(8-1-8) W-8の合成：

L-9 複合分子の代わりにW-7 複合分子を用い、固相担体に結合されたW-7 複合分子を得たこと以外、調製例1における工程(1-1-9)と同じ方法により、W-8を調製した。

【0438】

(8-2) W8-siHB2M1SVP 複合体の合成

出発としてL-10化合物の代わりにW-8化合物を用いてセンス鎖を合成したこと以外、調製例1における工程(1-2)、(1-3A)、(1-4)と同じ方法により、複合体22を調製した。構造が式(415)に示されるW8-siHB2M1SVP 複合体を得ることができると予期した。

【0439】

(調製例9) X8-siHB2M1SVP 複合体(複合体23)の調製

以下のプロセス経路により、X-8化合物を合成できると予期した。

【0440】

10

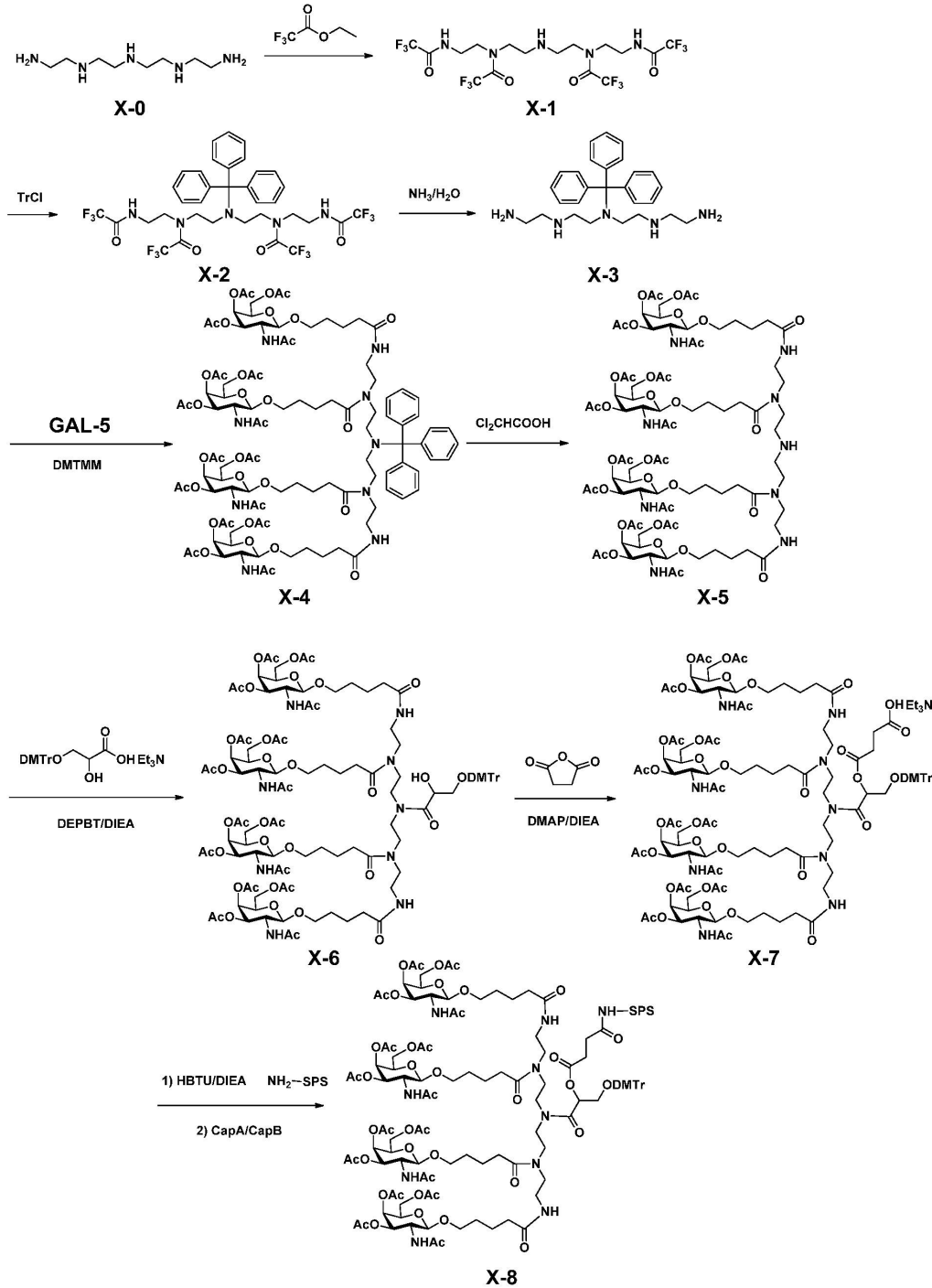
20

30

40

50

## 【化 6 4】



## 【0 4 4 1】

出発として L-10 化合物の代わりに X-8 化合物を用いてセンス鎖を合成したこと以外、調製例 1 における工程 (1-2)、(1-3A)、(1-4) と同じ方法により、複合体 23 を調製した。構造が式 (421) に示される X8-siHB2M1SVP 複合体を得ることができると予期した。

## 【0 4 4 2】

(調製例 10) Z5-siHB2M1SVP 複合体 (複合体 24) の調製

(10~1) Z-5 化合物の合成

以下の方法に従い、Z-5 化合物を合成した。

10

20

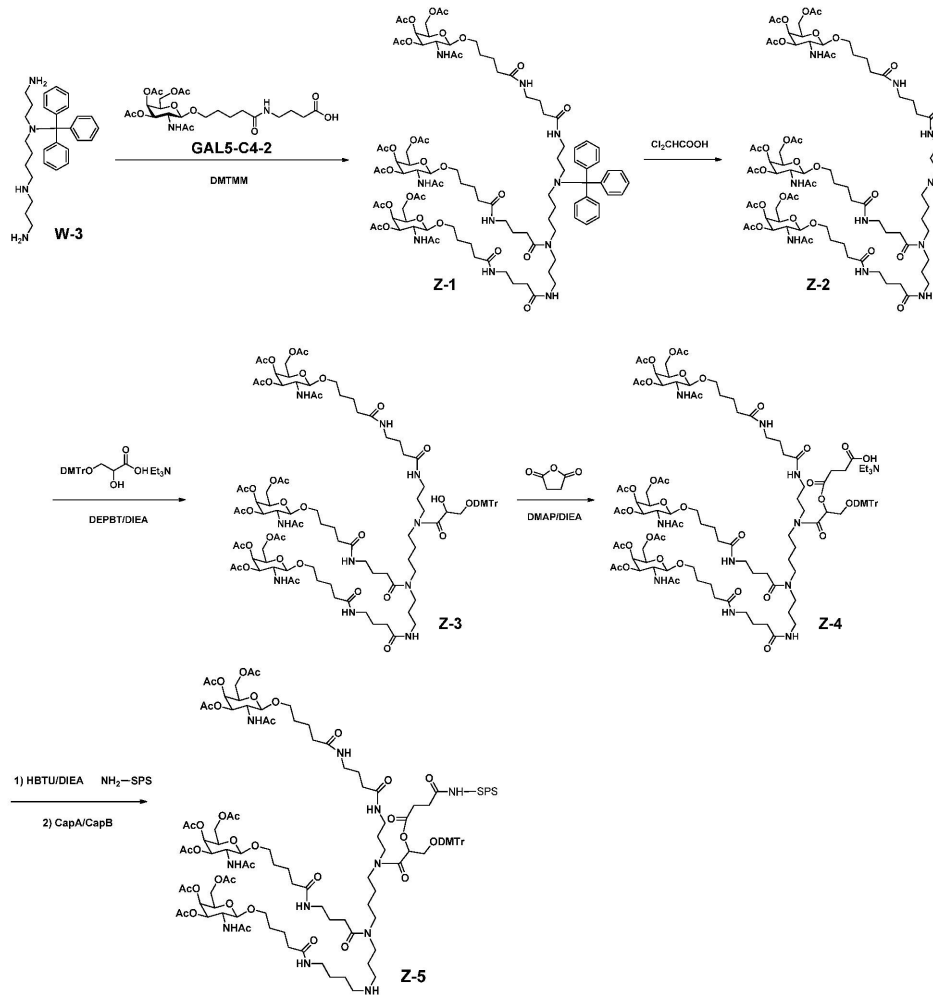
30

40

50

【 0 4 4 3 】

【 化 6 5 】



10

20

30

【 0 4 4 4 】

( 1 0 - 1 - 1 ) Z - 1 の合成 :

工程 ( 8 - 1 - 3 ) に記載された方法により得られた W - 3 ( 1 . 5 0 g 、 3 . 3 7 m m o l ) と工程 ( 3 - 1 - 2 ) に記載された方法により得られた GAL 5 - C 4 - 2 ( 7 . 1 8 g 、 1 3 . 4 8 m m o l ) を混合して 3 4 m l のジクロロメタンに溶解させ、さらにジイソプロピルエチルアミン ( 3 . 4 8 g 、 2 6 . 9 6 m m o l ) を加え、最後に 3 - ジエトキシホスホリル - 1 , 2 , 3 - ベンゾオキサゾール 4 ( 3 H ) - オン ( DEPBT 、 4 . 0 4 g 、 1 3 . 4 8 m m o l ) を加え、室温で 4 . 5 h 攪拌反応させた。100 m l のジクロロメタンで反応液を希釈し、80 m l の飽和炭酸水素ナトリウム溶液で有機相を洗浄し、80 m l の飽和食塩水で有機相を洗浄し、有機相をあわせ、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過した後で溶剤を減圧蒸発乾固して粗製品を得、200 ~ 300 メッシュの順相シリカゲルカラムで精製し、石油エーテルをカラムに入れ、1 w t % トリエチルアミンでシリカゲルの酸性を中和し、ジクロロメタン : メタノール = 3 0 : 1 ~ 1 5 : 1 で勾配溶出し、生成物溶出液を回収し、減圧蒸発乾固して 3 . 9 7 g の純粋な Z - 1 を得た。MS m / z : C<sub>98</sub>H<sub>143</sub>N<sub>10</sub>O<sub>33</sub>, [M + H]<sup>+</sup>、理論値 : 1987 . 98、実測値 : 1987 . 90。

40

【 0 4 4 5 】

( 1 0 - 1 - 2 ) Z - 2 の合成 :

Z - 1 ( 3 . 9 7 g 、 2 . 0 0 m m o l ) を 2 5 0 m l のジクロロメタンに溶解させ、

50

さらにジクロロ酢酸 (10.941 g、84.85 mmol) を加え、室温で 1 h 反応させた。ピリジンを加えて反応液を中性に中和し、溶剤を減圧蒸発乾固して粗製品を得た。220 g の 200~300 メッシュの順相シリカゲルをカラムに入れ、10% ピリジンでシリカゲルの酸性を中和し、1% ピリジンでカラムを平衡化し、ジクロロメタン：メタノール = 10 : 1 ~ 2 : 1 で勾配溶出し、生成物溶出液を回収し、溶剤を減圧蒸発乾固して 3.49 g の純粋な Z-2 を得た。MS m/z : C<sub>79</sub>H<sub>129</sub>N<sub>10</sub>O<sub>33</sub>, [M+H]<sup>+</sup>、理論値 : 1746.94、実測値 : 1746.90。

【0446】

(10-1-3) Z-3 の合成 :

Z-2 (3.49 g、2.0 mmol) と工程 (1-1-7a) に記載された方法により得られた A-1 (3.06 g、6.0 mmol) を混合して 30 ml のジクロロメタンに溶解させ、3-ジエトキシホスホリル-1, 2, 3-ベンゾオキサゾール 4 (3H)-オン (DEPBT、1.80 g、6.0 mmol) を加え、さらにジイソプロピルエチルアミン (1.55 g、12.0 mmol) を加え、25℃で 3 h 攪拌反応させた。100 ml のジクロロメタンで反応液を希釈し、飽和炭酸水素ナトリウムで有機相を 1 回あたり 30 ml で 2 回洗浄し、水相を 10 ジクロロメタンで抽出し、有機相をあわせ、50 ml の飽和食塩水で洗浄し、有機相をあわせ無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過した後で溶剤を減圧蒸発乾固し、真空油ポンプで一晩発泡乾燥させて粗製品を得た。カラム精製には、200 g の 200~300 メッシュの順相シリカゲルを用い、20 ml のトリエチルアミンでシリカゲルの酸性を中和し、1 wt% トリエチルアミンを含む石油エーテルでカラムを平衡化し、ジクロロメタン：メタノール = 25 : 1 ~ 15 : 1 で勾配溶出し、生成物溶出液を回収し、溶剤を減圧蒸発乾固して 2.2 g の純粋な Z-3 を得た。MS m/z : C<sub>103</sub>H<sub>151</sub>N<sub>10</sub>O<sub>38</sub>, [M+H]<sup>+</sup>、理論値 : 2136.02、実測値 : 2136.20。

【0447】

(10-1-4) Z-4 の合成 :

Z-3 (2.10 g、0.983 mmol) を DIEA (0.635 g、4.915 mmol) を含む 14.8 ml のジクロロメタンに溶解させ、4-ジメチルアミノピリジン (DMAP、240 mg、1.966 mmol) を加え攪拌して清澄させた後、コハク酸無水物 (197 mg、1.966 mmol) を加え、25℃で 18 h 攪拌反応させた。50 ml のジクロロメタンを加えて反応液を希釈し、80 ml の 0.5 M トリエチルアミンリン酸塩で有機相を洗浄し、水相をジクロロメタンで 1 回あたり 50 ml で 2 回抽出し、有機相をあわせ減圧蒸発乾固して粗製品を得た。カラム精製には、188 g の 200~300 メッシュの順相シリカゲルを用い、1 wt% トリエチルアミンでシリカゲルの酸性を中和し、ジクロロメタンでカラムを平衡化し、1 wt% トリエチルアミンを含むジクロロメタン：メタノール = 10 : 1 ~ 3 : 1 で勾配溶出し、生成物溶出液を回収し、溶剤を減圧蒸発乾固して 1.95 g の純粋な Z-4 複合分子を得た。MS m/z : C<sub>107</sub>H<sub>155</sub>N<sub>10</sub>O<sub>41</sub>, [M+H]<sup>+</sup>、理論値 : 1935.07、実測値 : 1935.29。

【0448】

(10-1-5) Z-5 の合成

L-9 複合分子の代わりに Z-4 複合分子を用い、固相担体に結合された Z-4 複合分子を得たこと以外、調製例 1 における工程 (1-1-9) と同じ方法により、Z-5 を調製した。

【0449】

(10-2) Z5-s i H B 2 M 1 S V P 複合体の合成

出発として L-10 化合物の代わりに Z-5 化合物を用いてセンス鎖を合成したこと以外、調製例 1 における工程 (1-2)、(1-3A)、(1-4) と同じ方法により、複合体 24 を調製した。構造が式 (422) に示される Z5-s i H B 2 M 1 S V P 複合体を得ることができると予期した。

【0450】

## (調製例 11) 複合体 25、26 及び比較複合体 1、3 の調製

本調製例では、複合体 25、26 及び比較複合体 1、3（以下、それぞれ *FIN-siHB1M1SVP*、*FIN-siHB2M1SVP* 及び *FIN-NC*、*FIN-siHB3M1SVP* 複合体ともいう）を合成した。当該複合体に複合された *siRNA* の配列は、表 1 に示される。

## 【0451】

(11-1) *FIN-2* 複合分子の合成

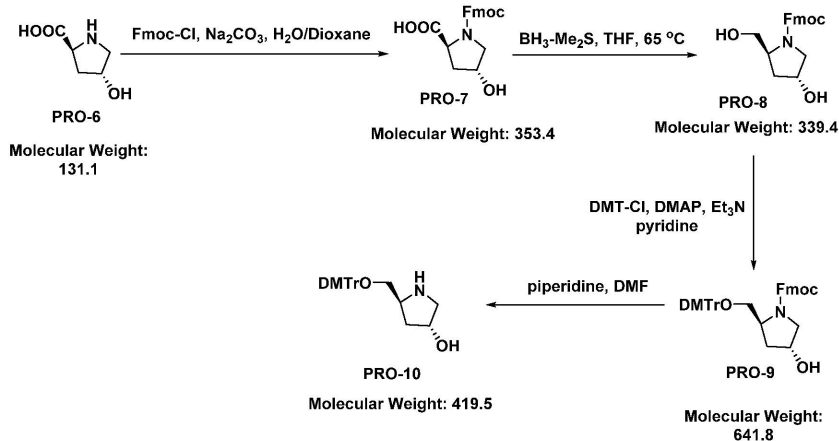
Rajeev ら、*ChemBioChem* 2015, 16, 903-908 に記載された調製方法を参照し、以下のプロセス経路により、*FIN-2* 複合分子を合成した。

## 【0452】

(11-1-1) *PRO-10* の合成

## 【0453】

## 【化 66】

(11-1-1a) *PRO-7* の合成

2.93 g の *PRO-6* (*L*-ヒドロキシプロリン、CAS 番号: 51-35-4、Energy 社から購入、22.4 mmol) を 22.5 ml の 1,4-dioxane (1,4-ジオキサン、CAS 番号: 123-91-1) に溶解させ、34 ml の 10% (w/w)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  の水溶液を加え、懸濁液状態にし、6.95 g の *Fmoc-Cl* (クロロギ酸-9-フルオレニルメチル、CAS 番号: 28920-43-6、Energy 社から購入、26.8 mmol) を 34 ml の 1,4-dioxane に溶解させ、氷浴下で上記懸濁液に加え、自然に室温まで昇温し一晩反応させた。反応液を 150 ml の氷水に注入し、メチル *tert*-ブチルエーテルで 1 回あたり 100 ml で 3 回抽出し、有機相を捨て、水相を濃  $\text{HCl}$  で  $\text{pH} \leq 5$  になるように調節し、100 ml の酢酸エチルで 2 回抽出し、有機相をあわせ、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶剤を減圧蒸発乾固して 7.83 g の白色泡状固形製品 *PRO-7* を得た。 $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  7.91 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 7.67 (d,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 7.48 - 7.39 (m, 2H), 7.38 - 7.27 (m, 2H), 5.17 (s, 1H), 4.27 (s, 2H), 4.23 - 4.11 (m, 2H), 3.55 - 3.41 (m, 3H), 2.31 - 2.10 (m, 1H), 2.08 - 1.88 (m, 1H).  $\text{HRMS}$  (ESI)  $m/z$  理論値  $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{NO}_5$   $[\text{M-H}]^-$  352.1190、実測値 352.1033.

## 【0454】

(11-1-1b) *PRO-8* の合成

7.83 g の *PRO-7* (22.2 mmol) を 80 ml の THF (CAS 番号: 109-99-9) に溶解させ、油浴で 65 °C に加熱し、還流状態で 36.6 ml の 2 mol/L の  $\text{BH}_3\text{-Me}_2\text{S}$  の THF 溶液 (CAS 番号 13292-87-0、J&K Scientific 社から購入、73.2 mmol) を加え、3 時間還流反応を続けた。反応

液を流出させ、メタノールで残りの固体を溶解させ、攪拌下で反応液に気体なくなるまでメタノールを加えてから30分間攪拌し続け、溶剤を減圧留去した後、石油エーテルで3回精製して7.1gの白色固形生成物PRO-8を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.91 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 7.67 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.49 – 7.39 (m, 2H), 7.38 – 7.26 (m, 2H), 5.18 (dd, J = 6.1, 3.8 Hz, 1H), 4.28 (s, 2H), 4.23 – 4.13 (m, 2H), 3.55 – 3.38 (m, 2H), 2.32 – 2.11 (m, 1H), 2.08 – 1.89 (m, 1H). HRMS (ESI) m/z 理論値 C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 362.1368、実測値 362.1012.

10

【0455】

(11-1-1c) PRO-9の合成

7.1gのPRO-8 (21mmol)を100mlのピリジンに溶解させ、14.2gのDMTr-Cl (4,4'-ビスメトキシトリチルクロリド、42mmol)を加え、室温で5時間攪拌反応させた。溶剤を減圧留去し、粗製品を酢酸エチルで溶解した後に塩類不純物を濾過除去し、溶剤を減圧留去した後でシリカゲルカラムで精製し、シリカゲルカラムを予めピリジンでアルカリ化してからDCMで粗製品を溶解させ負荷し、1% (v/v)ピリジンを含むDCMでDMTr-Clを溶出させた後、酢酸エチルで生成物を溶出させ、生成物溶出液を回収し、溶剤を減圧蒸発乾固し、8.2gの白色固形生成物PRO-9を得た。HRMS (ESI) m/z 理論値 C<sub>41</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>6</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 664.2675、実測値 664.2348, C18 RP-HPLC (ロット番号 JJS160324-1) 純度 94.20%。

20

【0456】

(11-1-1d) PRO-10の合成

8.2gのPRO-9 (12.8mmol)を64mlのDMF (N,N-ジメチルホルムアミド)に溶解させ、40mlのピペリジン (384mmol)を加え、室温で30分間攪拌反応させた。反応液を300mlの氷水に注入し、酢酸エチルで1回あたり150mlで3回抽出し、有機相を合わせ、200mlの飽和食塩水で洗浄した後、有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶剤を減圧留去した後でシリカゲルカラムで精製し、シリカゲルカラムを予めピリジンでアルカリ化してからDCMで粗製品を溶解させ負荷し、1% (v/v)ピリジンを含むDCMでFmocを溶出させた後、酢酸エチルで生成物を溶出させ、生成物溶出液を回収し、溶剤を減圧蒸発乾固し、4.65gの白色固形生成物PRO-10を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.40 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.35 – 7.18 (m, 7H), 6.93 – 6.84 (m, 4H), 4.56 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 4.12 (s, 1H), 3.74 (s, 6H), 3.46 – 3.37 (m, 1H), 2.88 (ddd, J = 18.5, 10.0, 5.5 Hz, 2H), 2.75 (dd, J = 8.7, 5.8 Hz, 1H), 2.62 (dd, J = 11.0, 2.7 Hz, 1H), 1.74 – 1.65 (m, 1H), 1.40 (ddd, J = 12.9, 8.5, 5.9 Hz, 1H), HRMS (ESI) m/z 理論値 C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>4</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 442.1994、実測値 442.1999, C18 RP-HPLC (ロット番号 JJS160329-1) 純度 97.07%。

30

40

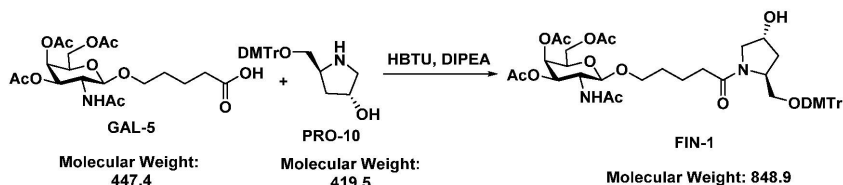
【0457】

(11-1-2) FIN-1の合成

【0458】

50

## 【化 6 7】



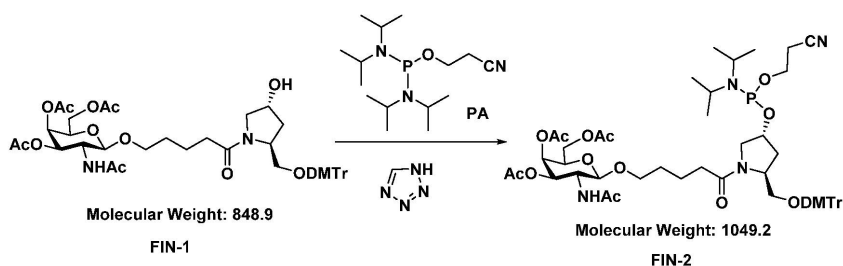
(1-1-1)に記載された方法により得られたGAL-5 (4.5 g、10 mmol) を40 mlのDMFに溶解させ、順に3.9 gのDIPEA (N, N-ジイソプロピルエチルアミン、CAS番号: 7087-68-5、Aladdin社から購入、30 mmol) 及び3.8 gのHBTU (ベンゾトリアゾール-N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート、CAS番号: 94790-37-2、Aladdin社から購入、11 mmol) を加え、室温で10分間攪拌し、工程(11-1-1 d)で得られたPRO-10 (4.2 g、10 mmol) を40 mlのDMFに溶解させた後、上記反応液に加え、反応液に無水硫酸ナトリウムを加えて乾燥させ、室温で2時間攪拌した。反応液を120 mlの氷水に注入し、酢酸エチルで1回あたり60 mlで3回抽出し、有機相をあわせ、それぞれ20 mlの水、20 mlの飽和食塩水で洗浄し、有機相を分離し無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶剤を減圧留去し、シリカゲルカラムで精製し、シリカゲルカラムを予めピリジンでアルカリ化してからそれに試料を負荷し、1体積%トリエチルアミン及び1体積%メタノールを含むジクロロメタン (DCM) 溶液で溶出させ、生成物溶出液を回収し、溶剤を減圧蒸発乾固し、6.5 gの淡黄色泡状固形製品FIN-1を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.83 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.32 (t, J = 6.6 Hz, 4H), 7.20 (td, J = 8.9, 3.5 Hz, 5H), 6.93 - 6.84 (m, 4H), 5.21 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 5.04 - 4.90 (m, 2H), 4.49 (s, 1H), 4.40 (d, J = 4.4 Hz, 0.8H), 4.31 (d, J = 5.0 Hz, 0.2H), 4.15 (s, 1H), 4.03 (s, 3H), 3.93 (s, 1H), 3.74 (s, 7H), 3.59 (dt, J = 12.0, 6.0 Hz, 1H), 3.50 - 3.40 (m, 1H), 3.39 - 3.25 (m, 3H), 3.13 (dd, J = 8.9, 5.2 Hz, 1H), 3.00 (dq, J = 9.3, 5.3, 4.3 Hz, 1H), 2.22 (s, 2H), 2.07 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.90 (s, 4H), 1.74 (s, 3H), 1.50 (s, 3H), 1.36 (s, 1H)。C18 RP-HPLC (ロット番号LJ160422) 純度95.45%。

## 【0459】

(11-1-3) FIN-2の合成

## 【0460】

## 【化 6 8】



工程(11-1-2)で得られたFIN-1 (3.0 g、3.53 mmol) をアセトニトリルと共沸させて水を除去し、減圧吸引乾燥させ、10 mlのDMFに溶解させ、窒素保護下で2.13 gのPA (ビス(ジイソプロピルアミノ)(2-シアノエトキシ)ホ

スフィン、Adamas社から購入、商品番号11356B、7.06mmol)、346mgのテトラゾール(CAS番号:288-94-8、Aladdin社から購入、4.94mmol)を加え、室温で攪拌反応させ、10mlのDMFを追加し、1時間攪拌反応を続けた。溶剤を減圧留去した後でシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、シリカゲルカラムを予めピリジンでアルカリ化してからDCMで粗製品を溶解させ負荷し、酢酸エチルで溶出させ、生成物溶出液を回収し、溶剤を減圧留去し、4.5gの無色シロップ状粗製品を得た。粗製品を50体積%アセトニトリル水溶液で完全に溶解するまで溶解させ、C-18、330g、300Å中圧精製カラムでサンプルを精製し、カラムをまず1体積%ピリジンのアセトニトリル溶液でアルカリ化し、勾配溶出させて製品のピークを回収し、溶剤を減圧留去して2.2gの白色粉末製品FIN-2複合分子を得た。<sup>31</sup>P NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 148.04, 147.94, 147.62, 147.19、リンスペクトル純度92%、C18 RP-HPLC純度90.54%。

10

【0461】

(11-2) FIN-2複合分子の固相担体への結合

核酸固相合成方法により、工程(11-1-3)で得られたFIN-2複合分子を3回循環させることにより、汎用の固相担体(UnyLinker™ loaded NittoPhase(登録商標)HL Solid Supports)に結合し、複合基(FIN\_\_FIN\_\_FIN)のRNAセンス鎖の3'末端への結合を実現した。

【0462】

20

Rajeevら、ChemBioChem 2015, 16, 903-908に記載された調製方法を参照して上記結合を行い、具体的には、まず、上記汎用の固相担体から始まり、固相担体におけるヒドロキシ保護基を除去し、カップリング反応条件下及びカップリング試薬の存在下でFIN-2複合分子と接触させてカップリングさせ、キャッピング反応及び酸化反応を行った後、固相担体に結合されたFIN複合分子を得た。当該固相担体に結合されたFIN複合分子におけるヒドロキシ保護基DMTrを除去し、FIN-2複合分子と接触させてカップリングさせ、キャッピング反応及び酸化反応を行い、再び上記脱保護-カップリング-キャッピング-酸化工程を1回繰り返し、3番目のFIN-2複合分子を結合させ、固相担体に結合された複合基(FIN\_\_FIN\_\_FIN)を得た。

【0463】

30

上記反応において、上述した脱保護、カップリング、キャッピング、酸化は、反応条件、溶剤及び試薬用量が前述した工程(1-2)に記載された核酸固相合成方法と同じであった。

【0464】

(11-3) 複合体25、26及び比較複合体1、3の合成

1) 工程(11-2)で得られた化合物を出発としてセンス鎖を合成し、2) 複合siRNAが表1に示される複合体25、26及び比較複合体1、3に対応する配列を有し、3) 比較複合体1については、目的配列に未修飾ヌクレオチドが含まれるので、切断と脱保護条件で、アンモニア水により処理した後、一本鎖核酸の量に対して、0.4ml/μmolのN-メチルピロリドンにより製品を溶解させた後、0.3ml/μmolのトリエチルアミン及び0.6ml/μmolのトリエチルアミン三フッ化水素酸塩を加え、リボースにおける2'-TBDMS保護を除去したこと以外、調製例1における工程(1-2)、(1-3A)、(1-4)と同じ方法により、表題複合体を調製した。

40

【0465】

液体クロマトグラフィー質量分析計(LC-MS、Liquid Chromatography-Mass Spectrometry、Waters社から購入、型番:LC-TPremier)により分子量を検出した。その結果、実測値が理論値に一致しており、合成された複合体は、構造が式(307)に示される目的設計の化合物であることが確認された。

【0466】

50

上述した本開示の複合体の調製が完了した後、使用するまで、標準的な手段により固体粉末として凍結乾燥させて保存した。使用時、例えば注射用水を用いて改めて溶解させて所望の濃度の溶液として用いてもよい。

【0467】

(実験例1) 本実験では、本開示の siRNA 複合体の体外 (in vitro) での抑制活性を証明した。

【0468】

(実験例1-1) 体外 psiCHECK 系におけるオンターゲット活性

本実験例に用いられる HEK293A 細胞は、北京大学分子医学研究所核酸技術実験室により提供され、20%のウシ胎児血清 (FBS、Hyclone 社) 及び 0.2 体積%のペニシリン-ストレプトマイシン (Penicillin-Streptomycin、Gibco、Invitrogen 社) を含む DMEM 完全培地 (Hyclone 社) で細胞を培養し、37℃で 5% CO<sub>2</sub> / 95% 空気含有インキュベーターにおいて培養した。

【0469】

本実験例では、複合体 25 及び複合体 26 の体外 psiCHECK 系におけるオンターゲット活性 (on-target activity) を調べ、即ち、複合体 25 及び複合体 26 が、完全マッチングした目的配列 (そのヌクレオチド配列が前記複合体アンチセンス鎖の全長ヌクレオチド配列と完全に相補的である) を標的する活性を測定した。

【0470】

Kumico Ui-Tei et. al., Functional dissection of siRNA sequence by systematic DNA substitution: modified siRNA with a DNA seed arm is a powerful tool for mammalian gene silencing with significantly reduced off-target effect. Nucleic Acids Research, 2008. 36 (7), 2136-2151 に記載された方法により、検出プラスミドを構築し、被評価 siRNA 複合体と共に HEK293A 細胞にコトランスフェクションさせ、デュアルルシフェラーゼレポーター遺伝子の発現レベルにより、siRNA 複合体のオンターゲット活性及びオフターゲット効果を反映した。具体的な工程は以下のとおりである。

【0471】

[1] 検出プラスミドの構築

psiCHECK<sup>TM</sup>-2 (Promega<sup>TM</sup>) プラスミドにより、被験複合体におけるアンチセンス鎖の 21 個のヌクレオチド配列の全てと完全に相補的な目的配列を含むオンターゲットプラスミドを構築した。目的配列を psiCHECK<sup>TM</sup>-2 プラスミドの Xho I / Not I 部位にクローニングした。

【0472】

[2] トランスフェクション

96 ウェルプレートに、Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 (Invitrogen 社) の使用説明書により、それぞれ siRNA 複合体及び上記プラスミドをコトランスフェクションした。プラスミドをウェルあたり 10 ng ずつトランスフェクションし、0.2 µL の Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 を用いた。複合体の最終濃度 (siRNA の濃度として算出される) が順に 0.1 nM、0.05 nM 及び 0.01 nM であった。各群では、複合体処理しないものを対照とした。1 群あたり 3 個の複製ウェルがあった。

【0473】

[3] 検出

24 時間コトランスフェクションした後、デュアルルシフェラーゼレポーター遺伝子検出キット (Dual luciferase reporter gene assay kit、Promega 社、cat. E2940) を用い、使用説明書により HEK29

10

20

30

40

50

3 A細胞を溶解させ、デュアルルシフェラーゼレポーター遺伝子の発現レベルを検出した。ホタルルシフェラーゼタンパク質レベルに対するウミシイタケルシフェラーゼタンパク質レベルで標準化した。結果を図1に示した。

【0474】

結果から明らかなように、複合体25及び複合体26は、いずれも良好な体外抑制活性を有する。

【0475】

(実験例1-2) 体外 p s i C H E C K 系における I C 5 0 の測定及びオフターゲットの検出

本実験例では、複合体2の体外 p s i C H E C K 系における I C 5 0 及びオフターゲット効果を調べた。

【0476】

Kumico Ui-Tei et. al., Functional dissection of siRNA sequence by systematic DNA substitution: modified siRNA with a DNA seed arm is a powerful tool for mammalian gene silencing with significantly reduced off-target effect. Nucleic Acids Research, 2008. 36 (7), 2136-2151 に記載された方法により、検出プラスミドを構築し、被験複合体と共に H E K 2 9 3 A 細胞にコトランスフェクションさせ、デュアルルシフェラーゼレポーター遺伝子の発現レベルにより、複合体のオンターゲット活性及びオフターゲット効果を反映した。具体的な工程は以下のとおりである。

【0477】

[1] 検出プラスミドの構築

p s i C H E C K <sup>TM</sup>-2 (P r o m e g a <sup>TM</sup>) プラスミドにより4つの組換えプラスミドを構築した。そのうち、G S C M は、オンターゲットプラスミドを表し、P S C M、G S S M、P S S M は、オフターゲットプラスミドを表す。

(1) G S C M は、複合体2におけるアンチセンス鎖の21個のヌクレオチド配列の全てと完全に相補的な目的配列を含む。

(2) P S C M は、複合体2におけるアンチセンス鎖の21個のヌクレオチド配列の全てと完全に一致している目的配列を含む。

(3) G S S M は、被験 s i R N A においてアンチセンス鎖の5'端から1~8位のヌクレオチド配列と完全に相補的であり、残りの部分が被験 s i R N A においてアンチセンス鎖の5'端から9~21位のヌクレオチド配列に対応し、その配列が全く相補的ではない、即ち、被験 s i R N A においてアンチセンス鎖の5'端から9~21位のいずれかのヌクレオチドがG、C、A又はUである場合、目的配列における対応する位置のヌクレオチドがそれぞれT、A、C又はGである目的配列を含む。

(4) P S S M は、被験 s i R N A においてセンス鎖の5'端から1~8位のヌクレオチド配列と完全に相補的であり、残部が被験 s i R N A においてセンス鎖の5'端から9~19位のヌクレオチド配列に対応し、その配列が全く相補的ではない、即ち、被験 s i R N A においてセンス鎖の5'端から9~19位のいずれかのヌクレオチドがG、C、A又はUである場合、目的配列における対応する位置のヌクレオチドがそれぞれT、A、C又はGである目的配列を含む。G S S M の標的配列の長さに等しくするために、目的配列の3'末端に順にヌクレオチドC、Cを加えた。

【0478】

目的配列を p s i C H E C K <sup>TM</sup>-2 プラスミドの X h o I / N o t I 部位にクローニングした。

【0479】

[2] トランスフェクション

96ウェルプレートに、L i p o f e c t a m i n e <sup>TM</sup> 2000 (I n v i t r o g

10

20

30

40

50

en社)の使用説明書により、それぞれ複合体及び上記各プラスミドをコトランスフェクションした。プラスミドをウェルあたり10ngずつトランスフェクションし、0.2μLのLipofectamine™ 2000を用いた。siRNA複合体の最終濃度 (siRNAの量として) が0.1nMから、0.0001nMに倍加希釈し、プラスミドごとに11群のsiRNA濃度が対応し、1群あたり3個の複製ウェルがあった。

【0480】

### 〔3〕 検出

HEK293A細胞を24時間培養した後、デュアルルシフェラーゼレポーター遺伝子検出キット (Dual luciferase reporter gene assay kit、Promega社、cat. E2940) を用い、使用説明書により細胞を溶解させ、デュアルルシフェラーゼレポーター遺伝子の発現レベルを検出した。各特定の濃度の複合体試験群では、複合体未処理群を対照とした。ホタルルシフェラーゼタンパク質レベル (Fir) に対するウミシイタケルシフェラーゼタンパク質レベル (Ren) で標準化した。siRNAの異なる濃度で測定された活性結果から、Graphpad 5.0ソフトウェアlog (inhibitor) vs. response-Variable slope機能により用量-効果曲線をフィッティングし、用量-効果曲線から以下の算出方法により被験siRNAのGSCMを標的したIC50値を算出した。

【0481】

【数1】

$$Y = \text{Bot} + \frac{\text{Top} - \text{Bot}}{1 + 10^{(\text{LogIC50} - X) \times \text{HillSlope}}}$$

式中、

Yは、残存mRNAの発現レベルであり、

Xは、トランスフェクションsiRNAの濃度の対数値であり、

Botは、定常期の最低のY値であり、

Topは、定常期の最高のY値であり、

LogIC50は、Yが最低と最高との間の半分にある場合のX値であり、HillSlopeは、曲線の傾きであった。結果を図2に示した。

【0482】

図2から分かるように、複合体2は、優れた標的mRNA抑制効果を有するとともに、さらに低いオフターゲット効果を示した。

【0483】

(実験例2) 本実験では、本開示のsiRNA複合体の安定性を証明した。

【0484】

(実験例2-1) siRNA複合体の体外リソソーム溶解液における安定性

リソソーム溶解液で処理された試験サンプルの調製：複合体1及び複合体2 (それぞれsiRNA濃度が20μMの0.9%塩化ナトリウム水溶液として提供され、1群あたり6μL) をそれぞれ27.2μLのクエン酸ナトリウム水溶液 (pH5.0)、4.08μLの脱イオン水及び2.72μLのトリトソーム (Xenotech社から購入、番号R0610LT、ロット番号1610069、最終濃度0.2mU/μL) と均一に混合した。37℃で恒温培養した。それぞれ0h、5min、15min、30min、1h、2h、4h、8hに5μLの試料を取り出し、それぞれ15μLの9M尿素に加えて変性させた後、4μLの6×試料負荷緩衝液 (Solarbio社、番号20160830) を加え、直ちに-80℃の冷蔵庫に冷凍して反応を停止させた。0時間は、被験サンプルとリソソーム溶解液を均一に混合した後、直に取り出した時点を表す。

【0485】

リソソーム溶解液で処理されていない参照サンプルの調製：等モル量の複合体4 (20

$\mu\text{M}$ )を $1.5\mu\text{L}$ とり、 $7.5\mu\text{L}$ のクエン酸ナトリウム水溶液( $\text{pH}5.0$ )、 $1\mu\text{L}$ の脱イオン水と均一に混合し、 $30\mu\text{L}$ の $9\text{M}$ 尿素溶液を加えて変性させた後、 $8\mu\text{L}$ の $6\times$ 試料負荷緩衝液を加えて均一に混合し、直ちに $-80^\circ\text{C}$ の冷蔵庫に冷凍して反応を停止させた。参照サンプルは、電気泳動図においてConと記される。

【0486】

$16$ 重量%の非変性ポリアクリルアミドゲルを配合し、上記試験サンプル及び参照サンプルをそれぞれ $20\mu\text{L}$ とり、ゲルに負荷させ、 $20\text{mA}$ の定電流条件で $10\text{min}$ 電気泳動した後、 $40\text{mA}$ の定電流条件で $30\text{min}$ 電気泳動し続けた。電気泳動終了後、ゲルをシェーカーに放置し、Gel red染料(BioTium社、番号13G1203)で $10\text{min}$ 染色した。ゲルイメージングを行い観察して撮影し、結果を図3に示した。

【0487】

図3は、被験siRNA複合体の体外リソソームにおける安定性の半定量的検出結果を示す。結果から、本開示の複合体は、リソソームにおいて長時間維持して分解されず、非常に良好な安定性を示すことができることが示された。

【0488】

(実験例2-2) siRNA複合体のヒト血漿における安定性

複合体1、複合体2(それぞれsiRNA濃度が $20\mu\text{M}$ の $0.9\%$ 塩化ナトリウム水溶液として提供され、 $1$ 群あたり $12\mu\text{L}$ )及び比較配列1( $20\mu\text{M}$ 、 $12\mu\text{L}$ )をそれぞれ $108\mu\text{L}$ の $90\%$ ヒト血漿(Human plasma、PBSで希釈)と均一に混合した。 $37^\circ\text{C}$ で恒温培養した。それぞれ $0$ 、 $2$ 、 $4$ 、 $6$ 、 $8$ 、 $24$ 、 $48$ 、 $72$ 時間で $10\mu\text{L}$ のサンプルを取り出し、直ちに液体窒素により急速冷凍し、 $-80^\circ\text{C}$ の冷蔵庫に冷凍して保存した。各時点でサンプリングした後、上記冷凍保存サンプルをそれぞれ $1\times\text{PBS}$ ( $\text{pH}7.4$ )で $5$ 倍希釈した後、各サンプルを $10\mu\text{L}$ ずつとして使用に備えた。同時に、等モル量のsiRNA( $2\mu\text{M}$ 、 $2\mu\text{L}$ )又はsiRNA複合体(siRNA濃度が $2\mu\text{M}$ 、 $2\mu\text{L}$ )をとり、 $8\mu\text{L}$ の $1\times\text{PBS}$ ( $\text{pH}7.4$ )と均一に混合し、ヒト血漿処理されていない $10\mu\text{L}$ のサンプルとして調製し、Conと記した。

【0489】

$20$ 重量%の非変性ポリアクリルアミドゲルを配合し、上記予備サンプルにおける各群の全てのサンプルと $4\mu\text{L}$ の試料負荷緩衝液( $20\text{mM}$ のEDTA、 $36$ 重量%グリセリン、 $0.06$ 重量%プロムフェノールブルーの水溶液)を混合した後、前述したゲルに負荷させ、 $80\text{mA}$ の定電流条件で $60$ 分間電気泳動した。電気泳動終了後、 $1\times\text{Sybr Gold}$ 染料(Invitrogen、Cat. 11494)で $15$ 分間染色した後イメージングを行った。結果を図4に示した。

比較配列1:

センス鎖:CCUUGAGGCAUACUUCAAA(配列番号46)

アンチセンス鎖:UUUGAAGUAUGCCUCAAGGUU(配列番号47)

【0490】

図4には、被験複合体の体外でのヒト血漿における安定性の半定量的検出結果が示された。

【0491】

図4の結果から分かるように、本開示の複合体は、ヒト血漿において $72\text{h}$ までも分解されておらず、優れたヒト血漿における安定性を示した。

【0492】

(実験例2-3) siRNA複合体のサル血漿における安定性

他の実験において、実験例2-2と同じ方法により複合体1、複合体2及び比較配列1のサル血漿(Monkey plasma、鴻泉生物から購入、HQ70082、PBSで希釈)における安定性を検出した。結果を図5に示した。

【0493】

図5には、被験siRNA複合体の体外でのサル血漿における安定性の半定量的検出結果が示された。

## 【0494】

図5の結果から分かるように、本開示の*siRNA*複合体は、カニクイザル血漿において72hまでも分解されておらず、優れたサル血漿における安定性を示した。

## 【0495】

(実験例3) 本実験例では、マウスにおいて本開示の複合体によるHBV mRNA発現に対する抑制を証明した。

## 【0496】

本実験例では、HBVトランスジェニックマウスC57BL/6J-Tg (Alb1HBV) 44Bri/Jにおいて複合体1及び比較複合体2によるHBV mRNA発現量に対する抑制効率を調べた。

## 【0497】

C57BL/6J-Tg (Alb1HBV) 44Bri/Jマウスは、北京大学医学部実験動物科学部から購入し、B型肝炎ウイルス表面抗原診断キット(酵素結合免疫吸着測定法)(上海科華生物)を用いてマウス血清におけるHBsAgの含有量を検出し、S/COV>10のマウスを選択し、マウスを4匹/群でランダムに分け(いずれも雌性)、それぞれ番号を付け、さらに生理食塩水NS対照群を追加した。全ての動物について、体重に応じて投与量を算出し、皮下注射により単回投与し、それぞれ1mg/kg及び0.1ml/kgの異なる用量で複合体1を投与し(0.2mg/ml及び0.02mg/mlの0.9%塩化ナトリウム水溶液として提供される)、投与体積が5ml/kgであった。薬剤投与後7日目に動物を死亡させ、肝臓を回収し、RNA later (Sigma Aldrich社)で保存し、組織ホモジナイザーで肝組織をホモジナイズし、さらにTrizolで全RNA抽出の標準操作手順により抽出して全RNAを得た。

## 【0498】

蛍光定量的リアルタイムPCRにより肝組織におけるHBV mRNAの発現量を検出した。具体的には、ImProm-RT<sup>TM</sup>逆転写キット(Promega社)を用いてその説明書により抽出した全RNAをcDNAに逆転写し、続いて、蛍光定量的PCRキット(北京康為世紀生物科技有限公司)を用い、*siRNA*による肝組織におけるHBV mRNA発現量に対する抑制効率を検出した。当該蛍光定量的PCR法では、GAPDH遺伝子を内因性参照遺伝子とし、HBV Xに対するプライマー及びGAPDHに対するプライマーを用いてそれぞれHBV及びGAPDHを検出した。

## 【0499】

検出プライマーの配列は、表3に示される。

## 【0500】

## 【表3】

検出プライマーの配列

| 遺伝子   | 上流プライマー                               | 下流プライマー                                    |
|-------|---------------------------------------|--------------------------------------------|
| HBV X | 5'-CCGTCTGTGCTTCTCATCT-3'<br>(配列番号48) | 5'-TAATCTCCTCCCCCACTCC-3'<br>(配列番号49)      |
| GAPDH | 5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGGCTC-3'(配列番号50) | 5'-TGGAAGAGTGGGAGTTGCTGTTGA-3'<br>(配列番号51) |

## 【0501】

当該蛍光定量的PCR法では、HBV mRNAの発現量は、HBV X遺伝子発現残量で表され、以下の等式により算出された。

## 【0502】

HBV X遺伝子発現残量 = (試験群HBV X遺伝子のコピー数/試験群β-アクチンのコピー数) / (対照群HBV X遺伝子のコピー数/対照群β-アクチンのコピー数) × 100%。図においてHBV X/β-アクチン mRNA発現量と記した。

## 【0503】

その後、下式により複合体によるmRNAに対する抑制率を算出した。

【0504】

複合体によるmRNAに対する抑制率 =  $(1 - \text{HBV X 遺伝子発現残量}) \times 100\%$ 。

【0505】

対照群は、本実験においてNSが施された対照群マウスであり、各試験群は、それぞれ異なるsiRNA複合体が施された投与群マウスであった。結果を図6に示した。

【0506】

図6の結果から分かるように、上記本開示の複合体1は、1mg/kgの投与量で、標的mRNAに対する抑制率が81.73%に達し、良好な抑制効果を示した。

【0507】

他の実験においては、投与されたsiRNA複合体を複合体2に変更して試験を行い、7日目に検出データを収集したこと以外、上記と同じ方法により、マウスHBV mRNA発現量を検出した。結果を図7に示した。

【0508】

他の実験においては、投与されたsiRNA複合体を複合体1、複合体2及び比較複合体2に変更して試験を行い、複合体1及び比較複合体2について、それぞれ1mg/kg及び0.1mg/kgの2つの用量で投与し、複合体2を1mg/kgの用量で投与し、検出配列を表4に示される配列に変更したこと以外、上記と同じ方法により、マウスHBV mRNA発現量を検出した。結果を図8に示した。

【0509】

【表4】

| 検出プライマーの配列 |                                               |                                                |
|------------|-----------------------------------------------|------------------------------------------------|
| 遺伝子        | 上流プライマー                                       | 下流プライマー                                        |
| HBV<br>S   | 5'-CGTTTCTCTCCTGGCTC<br>AGTTTA-3'<br>(配列番号52) | 5'-CAGCGGTAAAAAGGG<br>ACTCAA-3'<br>(配列番号53)    |
| GAPD<br>H  | 5'-AACTTTGGCATTGTG<br>GAAGGGCTC-3' (配列番号50)   | 5'-TGGAAGAGTGGGAGT<br>TGCTGTTGA-3'<br>(配列番号51) |

【0510】

図7及び図8の結果から分かるように、上記本開示の複合体は、標的mRNAに対して、いずれも良好な抑制効果を示し、かつ、異なるHBV mRNAに対する抑制効果が基本的に一致した。

【0511】

(実験例4) 本実験では、本開示のsiRNA複合体のHBVトランスジェニックマウスにおけるsiRNAの血清HBsAg発現量及びHBV DNAに対する抑制効率の時間関連性試験を説明した。

【0512】

AAV-HBV低濃度モデルマウスに対して、血清におけるHBsAgの含有量に従ってランダムに分け(5匹/群)、それぞれ複合体2及びNSブランク対照を投与した。全ての動物について、体重に応じて投与量を算出し、単回皮下投与し、用量が3mg/kg及び1mg/kgの2群であり、薬物を0.6mg/ml及び0.2mg/mlの0.9%塩化ナトリウム水溶液として提供し、投与体積が5ml/kgであった。薬剤投与前(D0と記する)及び薬剤投与後7、14、21、28、56、84、98、112、126、140日目にマウスに対して眼窩静脈叢採血を行い、各時点で血清HBsAgレベルを検出した。

【0513】

1回あたり約100μl眼窩採血し、遠心後の血清が20μl以上であった。HBsAg CLIAキット(安図生物、CLO310)により血清におけるHBsAgの含有量を検出した。

10

20

30

40

50

## 【0514】

標準化された血清HBsAgレベル＝（薬剤投与後の試験群におけるHBsAgの含有量／薬剤投与前の試験群におけるHBsAgの含有量）×100％。

## 【0515】

HBsAg抑制率＝（1－薬剤投与後の試験群におけるHBsAgの含有量／薬剤投与前の試験群におけるHBsAgの含有量）×100％。ここで、HBsAgの含有量は、血清1ミリリットル（ml）あたりに含まれるHBsAgの当量（UI）で表される。

## 【0516】

結果を図9に示した。

## 【0517】

図9の結果から分かるように、薬剤投与後の異なる時点で、NS陰性対照群は、いずれの抑制作用も示さなかったのに対して、複合体2は、薬剤投与後の異なる時点でHBsAgに対して、いずれも優れたHBsAg抑制効果を示し、100日間程度の長期間、高い血清HBsAg抑制率を示し続け、長期間にわたってHBV遺伝子の発現を安定的かつ効率的に抑制することができることを示した。

## 【0518】

さらなる実験では、上記方法により、1.28 copyマウスにおいて、複合体2を用い、3mg/kg及び1mg/kgの2つの用量群で投与し、投与時間を85日間まで維持し、上記の方法によりHBsAgの抑制効果を検出した。結果を図10に示した。

## 【0519】

QIAamp 96 DNA Blood Kit説明書を参照して血清中DNAを抽出し、定量PCRを行い、HBV DNAの発現レベルを検出した。結果を図11に示した。

## 【0520】

標準化された血清HBV DNAレベル＝（薬剤投与後の試験群におけるHBV DNAの含有量／薬剤投与前の試験群におけるHBV DNAの含有量）×100％。

## 【0521】

HBV DNA抑制率＝（1－薬剤投与後の試験群におけるHBV DNAの含有量／薬剤投与前の試験群におけるHBV DNAの含有量）×100％。

## 【0522】

ここで、HBV DNA含有量は、血清1ミリリットル（ml）あたりに含まれるHBV DNAのコピーで表される。

## 【0523】

図10及び11の結果から分かるように、1.28 copyマウスにおいて、本開示の複合体2は、85日間にわたってHBV遺伝子発現及びHBV DNAに対する効率的な抑制を示し続けた。

## 【0524】

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

## 【0525】

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

## 【0526】

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

10

20

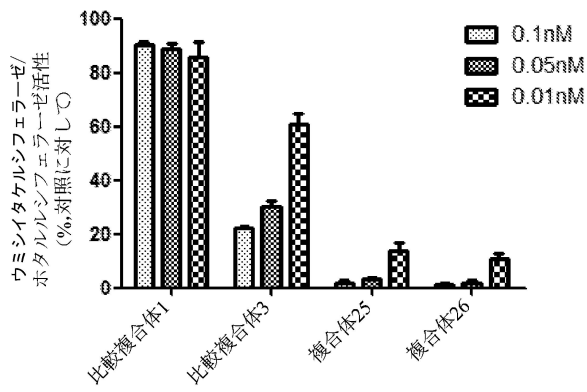
30

40

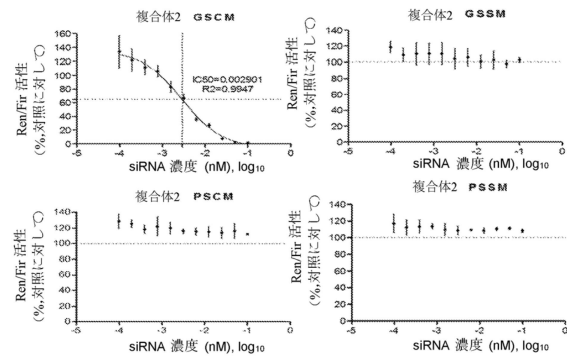
50

【図面】

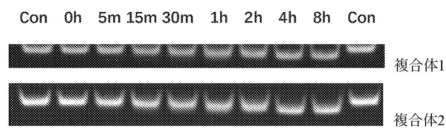
【図 1】



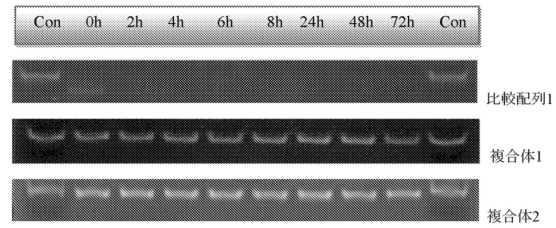
【図 2】



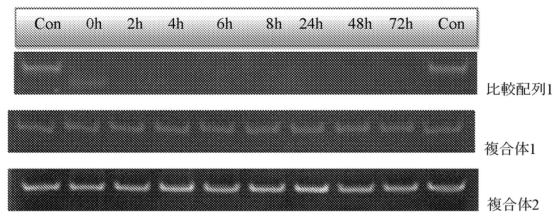
【図 3】



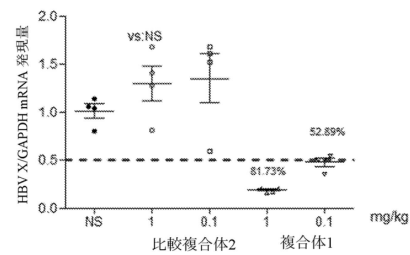
【図 4】



【図 5】



【図 6】



10

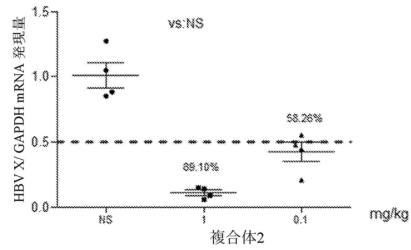
20

30

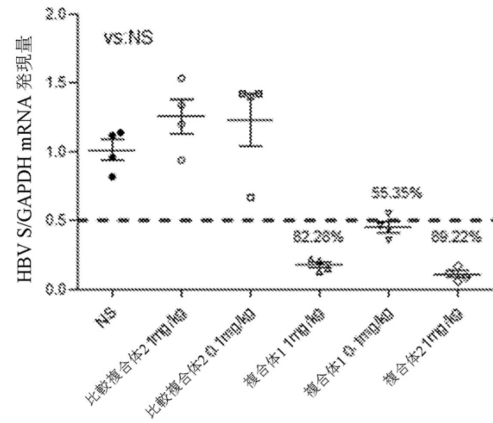
40

50

【図 7】

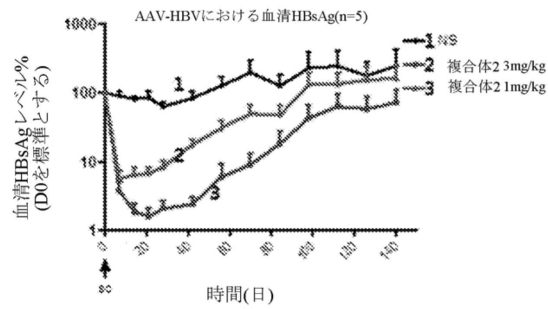


【図 8】

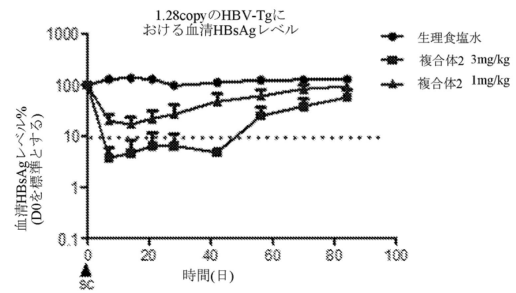


10

【図 9】

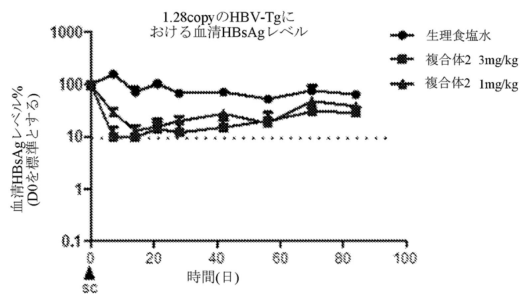


【図 10】



20

【図 11】



30

【配列表】

0007273417000001.app

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 47/56 (2017.01)

A 6 1 K 47/56

A 6 1 K 47/66 (2017.01)

A 6 1 K 47/66

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00

## (33)優先権主張国・地域又は機関

中国(CN)

## 早期審査対象出願

1 6 8

## (72)発明者 カオ、シャン

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

## (72)発明者 カン、タイウー

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

審査官 坂崎 恵美子

## (56)参考文献

米国特許出願公開第 2 0 0 3 / 0 2 0 6 8 8 7 (US, A 1)

国際公開第 2 0 1 7 / 0 1 5 1 7 5 (WO, A 1)

国際公開第 2 0 0 4 / 0 7 8 1 8 1 (WO, A 1)

特表 2 0 1 3 - 5 3 7 4 2 3 (JP, A)

中国特許出願公開第 1 0 1 6 0 3 0 4 2 (CN, A)

## (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 1 1 3

A 6 1 K 3 1 / 7 1 0 5

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

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