

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-533800

(P2021-533800A)

(43) 公表日 令和3年12月9日(2021.12.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113 1 0 0 Z	4 C 0 5 7
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	4 C 0 7 6
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 5	4 C 0 8 6
A 6 1 P 31/20 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 175 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2021-509880 (P2021-509880)
 (86) (22) 出願日 令和1年8月20日 (2019.8.20)
 (85) 翻訳文提出日 令和3年2月19日 (2021.2.19)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2019/101656
 (87) 国際公開番号 W02020/038377
 (87) 国際公開日 令和2年2月27日 (2020.2.27)
 (31) 優先権主張番号 201810951752.4
 (32) 優先日 平成30年8月21日 (2018.8.21)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 中国 (CN)
 (31) 優先権主張番号 201811165363.5
 (32) 優先日 平成30年9月30日 (2018.9.30)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 中国 (CN)

(71) 出願人 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 21530
 O、クンジャン シティー、ユイジャン
 タウン、ユアンフォン ロード ナンバー
 168
 (74) 代理人 110000729
 特許業務法人 ユニアス国際特許事務所

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸、当該核酸を含む薬物組成物及び複合体ならびにその使用

(57) 【要約】

本開示は、センス鎖とアンチセンス鎖を含む、HBV 遺伝子発現を抑制する siRNA を提供する。前記センス鎖は、ヌクレオチド配列 1 を含み、前記アンチセンス鎖は、ヌクレオチド配列 2 を含み、前記ヌクレオチド配列 1 と前記ヌクレオチド配列 2 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 1 と配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列は、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 2 と配列番号 2 に示されるヌクレオチド配列は、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 1 の第 7、8、9 位及び前記ヌクレオチド配列 2 の第 2、6、14、16 位のヌクレオチドは、フルオロ修飾ヌクレオチドである。本開示は、当該 siRNA を含む薬物組成物及び複合体をさらに提供する。本開示の siRNA、薬物組成物及び複合体は、良好な HBV 遺伝子発現抑制活性を有する。

【選択図】 図 7

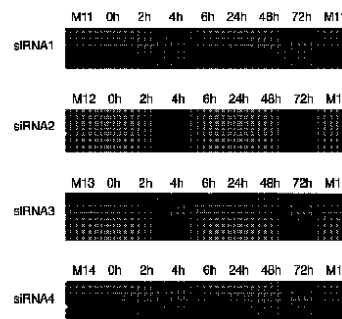


図 7

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

B型肝炎ウイルス遺伝子の発現を抑制できる s i R N A であって、前記 s i R N A はセンス鎖とアンチセンス鎖を含み、前記センス鎖とアンチセンス鎖の各ヌクレオチドはいずれも修飾ヌクレオチドであり、前記センス鎖とアンチセンス鎖はいずれもフルオロ修飾ヌクレオチド及び非フルオロ修飾ヌクレオチドを含み、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し、前記センス鎖は、ヌクレオチド配列 1 を含み、前記アンチセンス鎖は、ヌクレオチド配列 2 を含み、前記ヌクレオチド配列 1 と前記ヌクレオチド配列 2 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 1 と配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列とは、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 2 と配列番号 2 に示されるヌクレオチド配列とは、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' - G A A A G U A U G U C A A C G A A U Z - 3' (配列番号 1)、

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

ただし、Z は U であり、Z' は A であり、

前記ヌクレオチド配列 1 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 2 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 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り、

前記フルオロ修飾ヌクレオチドは、ヌクレオチド配列 1 とヌクレオチド配列 2 に位置し、前記ヌクレオチド配列 1 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 1 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 2 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 2 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】

前記ヌクレオチド配列 1 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 2 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、請求項 1 に記載の s i R N A。

【請求項 3】

前記ヌクレオチド配列 2 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 U、C 又は G から選択される、請求項 1 又は 2 に記載の s i R N A。

【請求項 4】

Z_A は、 Z'_B と相補的なヌクレオチドである、請求項 3 に記載の s i R N A。

【請求項 5】

前記ヌクレオチド配列 1 と前記ヌクレオチド配列 2 は、基本的に逆相補的、基本的に完全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、前記基本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、請求項 1 又は 2 に記載の s i R N A。

【請求項 6】

前記センス鎖は、ヌクレオチド配列 3 をさらに含み、前記アンチセンス鎖は、ヌクレオチド配列 4 をさらに含み、前記ヌクレオチド配列 3 と前記ヌクレオチド配列 4 は、長さがそれぞれ 1 ~ 4 ヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列 3 は、前記ヌクレオチド配列 1 の 5' 末端に結合され、前記ヌクレオチド配列 4 は、前記ヌクレオチド配列 2 の 3' 末

10

20

30

40

50

端に結合され、前記ヌクレオチド配列 3 と前記ヌクレオチド配列 4 は、長さが等しく、基本的に完全に逆相補的又は完全に逆相補的であり、前記基本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、請求項 1 に記載の *siRNA*。

【請求項 7】

前記ヌクレオチド配列 3 と前記ヌクレオチド配列 4 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 3 の塩基が G である、或いは、

前記ヌクレオチド配列 3 と前記ヌクレオチド配列 4 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 3 の塩基が順に U 及び G である、或いは、

前記ヌクレオチド配列 3 と前記ヌクレオチド配列 4 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、前記ヌクレオチド配列 3 の塩基が順に U、U 及び G である、或いは、

前記ヌクレオチド配列 3 と前記ヌクレオチド配列 4 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、前記ヌクレオチド配列 3 の塩基が順に A、U、U 及び G である、請求項 6 に記載の *siRNA*。

【請求項 8】

前記 *siRNA* は、ヌクレオチド配列 5 をさらに含み、前記ヌクレオチド配列 5 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、前記アンチセンス鎖の 3'オーバーハング端を構成する、請求項 1、6 又は 7 に記載の *siRNA*。

【請求項 9】

前記ヌクレオチド配列 5 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、前記ヌクレオチド配列 5 は、連続した 2 個のチミンデオキシリボヌクレオチド、連続した 2 個のウラシルリボヌクレオチド、又は標的 mRNA と相補的な 2 つのヌクレオチドである、請求項 8 に記載の *siRNA*。

【請求項 10】

前記ヌクレオチド配列 1 は、配列番号 3 又は配列番号 4 に示されるヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列 2 は、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7 及び配列番号 8 に示されるヌクレオチド配列からなる群より選ばれるいずれか 1 つのヌクレオチド配列を含む、請求項 9 に記載の *siRNA*。

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

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

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

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

5' - U A U U C G U U G A C A U A C U U U C U U - 3' (配列番号 7)

5' - U A U U C G U U G A C A U A C U U U C C A - 3' (配列番号 8)

【請求項 11】

以下の *siP1* ~ *siP4* のいずれか 1 つである、請求項 10 に記載の *siRNA*。

siP1

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

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

siP2

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

アンチセンス鎖：5' - A A U U C G U U G A C A U A C U U U C C A - 3' (配列番号 6)

siP3

センス鎖：5' - G A A A G U A U G U C A A C G A A U A - 3' (配列番号 4)

アンチセンス鎖：5' - U A U U C G U U G A C A U A C U U U C U U - 3' (配列番号 7)

10

20

30

40

50

号 7)

s i P 4

センス鎖 : 5' - G A A A G U A U G U C A A C G A A U A - 3' (配列番号 4)

アンチセンス鎖 : 5' - U A U U C G U U G A C A U A C U U U C C A - 3' (配列番号 8)

【請求項 1 2】

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 1 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、前記アンチセンス鎖において、前記ヌクレオチド配列 2 の第 2、6、14、16 位又は 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、請求項 1 に記載の s i R N A。

10

【請求項 1 3】

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から独立して選択される 1 つである、請求項 1 又は 1 2 に記載の s i R N A。

【請求項 1 4】

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 つであり、ヌクレオチドアナログは、イソヌクレオチド、L N A、E N A、c E T、U N A 及び G N A から選択される 1 つである、請求項 1 3 に記載の s i R N A。

20

【請求項 1 5】

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、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、請求項 1 4 に記載の s i R N A。

【請求項 1 6】

前記 s i R N A は、表 1 A 内のいずれか 1 つに示される s i R N A である、請求項 1 5 に記載の s i R N A。

30

【請求項 1 7】

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の少なくとも 1 個が、修飾基を有するリン酸エステル基である、請求項 1 ~ 2、4、6 ~ 7、9 ~ 11、12 及び 14 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の s i R N A。

【請求項 1 8】

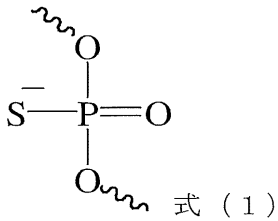
前記修飾基を有するリン酸エステル基は、リン酸エステル基におけるリン酸ジエステル結合の少なくとも 1 つの酸素原子が硫黄原子で置換されたチオリン酸エステル基である、請求項 1 7 に記載の s i R N A。

40

【請求項 1 9】

前記修飾基を有するリン酸エステル基が、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、請求項 1 8 に記載の s i R N A。

【化 1】



【請求項 20】

前記 *siRNA* において、以下のヌクレオチド間の結合からなる群より選ばれる少なくとも 1 つは、チオリン酸エステル基による結合である、請求項 17 に記載の *siRNA* :
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の結合、

10

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の結合、

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の結合、

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の結合、

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の結合、

20

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の結合、

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の結合、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の結合。

【請求項 21】

前記 *siRNA* は、表 1 B 内のいずれか 1 つに示される *siRNA* である、請求項 20 に記載の *siRNA*。

【請求項 22】

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る、請求項 1 ~ 2、4、6 ~ 7、9 ~ 11、12、14 ~ 16 及び 18 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の *siRNA*。

30

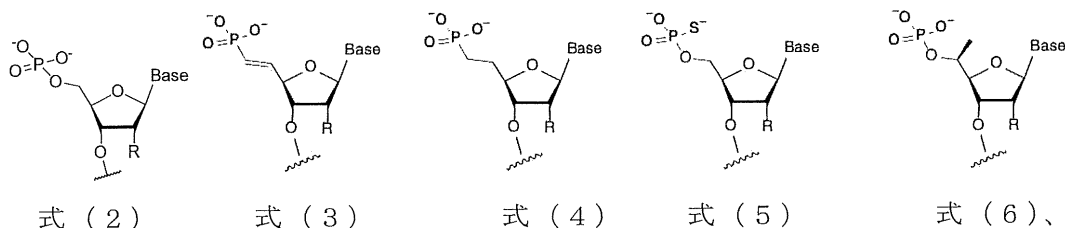
【請求項 23】

前記 *siRNA* は、表 1 C 又は表 1 D 内のいずれか 1 つに示される *siRNA* である、請求項 22 に記載の *siRNA*。

【請求項 24】

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、式 (2) ~ 式 (6) の 1 つに示されるヌクレオチドであり、

【化 2】



40

ただし、R は H、OH、F 及びメトキシ基からなる群から選択される基を表し、

Base は A、U、C、G 又は T から選択される塩基を表す、請求項 22 に記載の *siRNA*。

【請求項 25】

50

請求項 1 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の s i R N A 及び薬学的に許容可能な担体を含むことを特徴とする薬物組成物。

【請求項 26】

前記 s i R N A と前記薬学的に許容可能な担体との重量比が 1 : (1 ~ 500) である、請求項 25 に記載の薬物組成物。

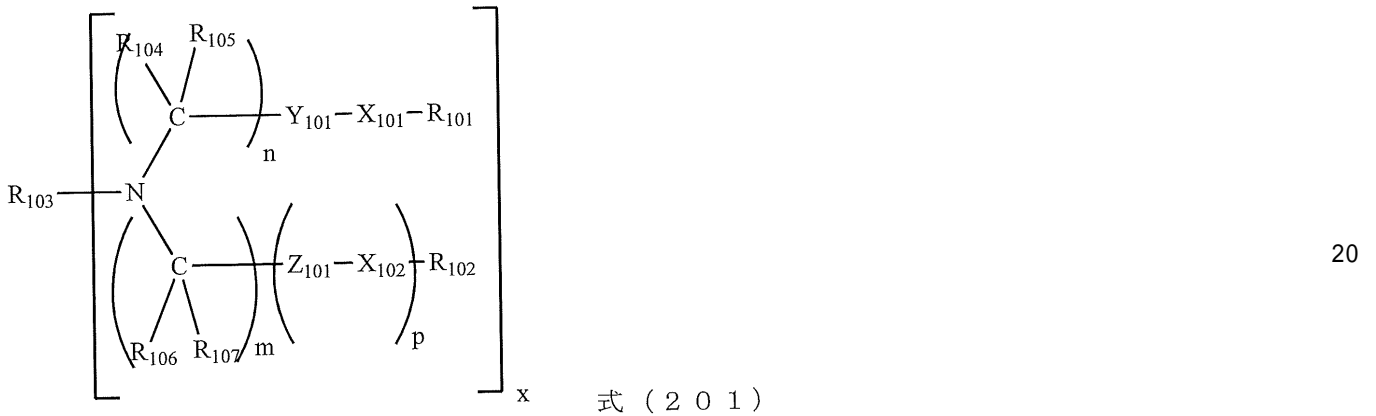
【請求項 27】

前記 s i R N A と前記薬学的に許容可能な担体との重量比が 1 : (1 ~ 50) である、請求項 26 に記載の薬物組成物。

【請求項 28】

前記薬学的に許容可能な担体が、有機アミン、補助脂質及び P E G 化脂質を含み、前記有機アミンが、式 (201) に示される化合物及び / 又はその薬学的に許容できる塩である、請求項 25 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の薬物組成物：

【化 3】



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_{101} 及び Z_{101} はそれぞれ独立して C = O、C = S、S = O、CH - OH 又は $S O_2$ 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、

水素と、

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と、

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と、

置換又は無置換の、分岐鎖又は直鎖アシル基と、

置換又は無置換の、分岐鎖又は直鎖アリール基と、

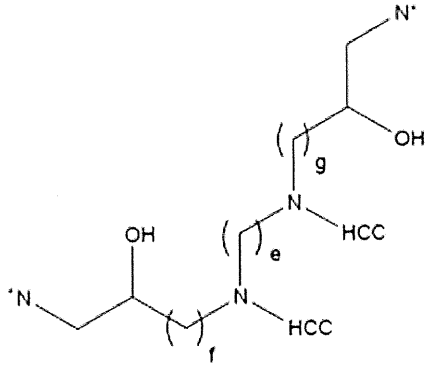
置換又は無置換の、分岐鎖又は直鎖ヘテロアリール基と、から選択され、

x は 1 ~ 10 の整数であり、

n は 1 ~ 3 の整数であり、m は 0 ~ 20 の整数であり、p は 0 又は 1 であり、m 及び p がいずれも 0 である場合、 R_{102} は水素であり、

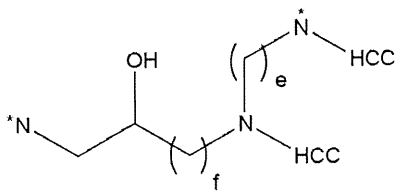
n 又は m の少なくとも 1 つが 2 である場合、 R_{103} と式 (201) における窒素とが、式 (202) 又は式 (203) に示される構造を形成し、

【化4】



式(202)、

10



式(203)

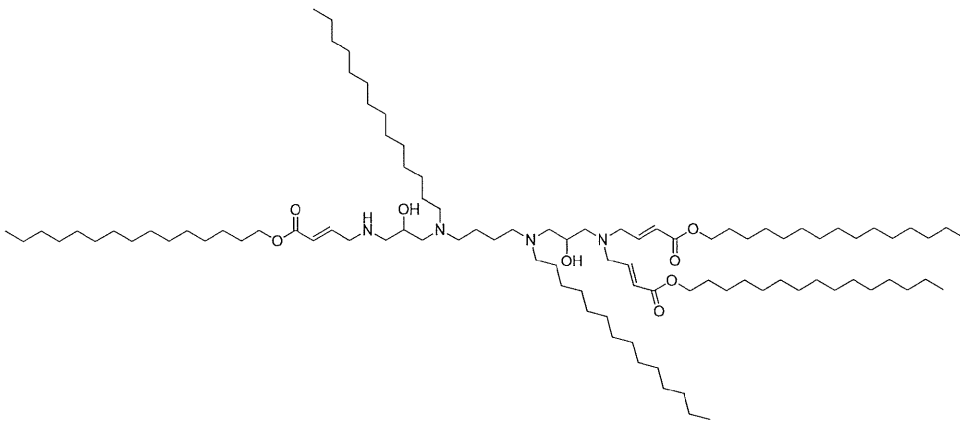
20

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)に示される窒素原子を表す。

【請求項29】

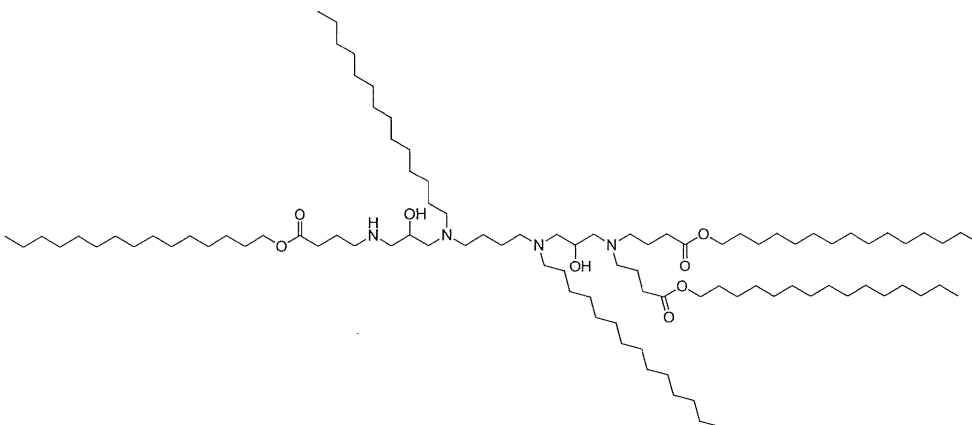
前記有機アミンが、式(214)に示される有機アミン及び/又は式(215)に示される有機アミンであり、

【化5】



式(214)、

30



式(215)

40

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、かつ、

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

50

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である、請求項28に記載の薬物組成物。

【請求項30】

前記有機アミン、前記補助脂質及び前記PEG化脂質のモル比が(19.7~80):(19.7~80):(0.3~50)である、請求項28に記載の薬物組成物。

【請求項31】

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化脂質のモル比が(50~70):(20~40):(3~20)である、請求項30に記載の薬物組成物。

【請求項32】

請求項1~24のいずれか1項に記載のsiRNA及び当該siRNAに複合して結合されるリガンドを含むsiRNA複合体。

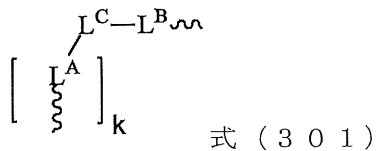
【請求項33】

前記リガンドが薬学的に許容できる複合基であり、前記複合基が薬学的に許容できる標的基とリンカーを含み、前記siRNA、前記リンカー及び前記標的基が順に共有結合的に結合されている、請求項32に記載のsiRNA複合体。

【請求項34】

前記リンカーが式(301)に示される構造を有する、請求項33に記載のsiRNA複合体：

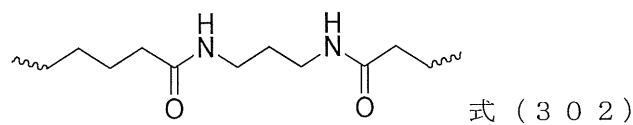
【化6】



式中、kは1~3の整数であり、

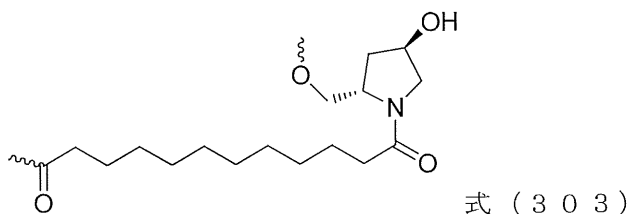
L^Aは、式(302)に示される構造を有するアミド結合を含む鎖状部であり、各前記L^Aは、その両端でそれぞれ1つの前記標的基及び前記L^C部にエーテル結合により結合され、

【化7】



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、他端に酸素原子を有し、前記siRNAにリン酸エステル結合により結合され、

【化8】



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、酸素原子を介して各前記L^A部にエーテル結合により結合され、窒素原子を介して前記L^B部にアミド結合により結合される。

【請求項35】

前記リンカーが前記siRNAのセンス鎖の3'末端に結合される、請求項33又は34に記載のsiRNA複合体。

10

20

30

40

50

【請求項 36】

前記標的基がアシアロ糖タンパク質受容体のリガンドである、請求項 33 又は 34 に記載の s i R N A 複合体。

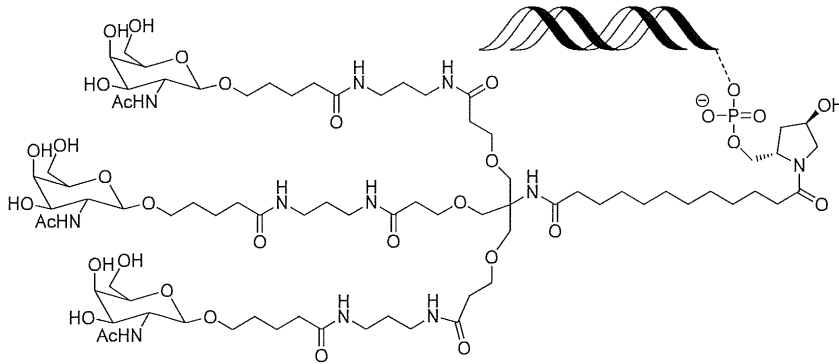
【請求項 37】

前記標的基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 36 に記載の s i R N A 複合体。

【請求項 38】

式 (3 0 5) に示される構造を有し、

【化 9】



10

式中、二重螺旋構造は前記 s i R N A を表し、

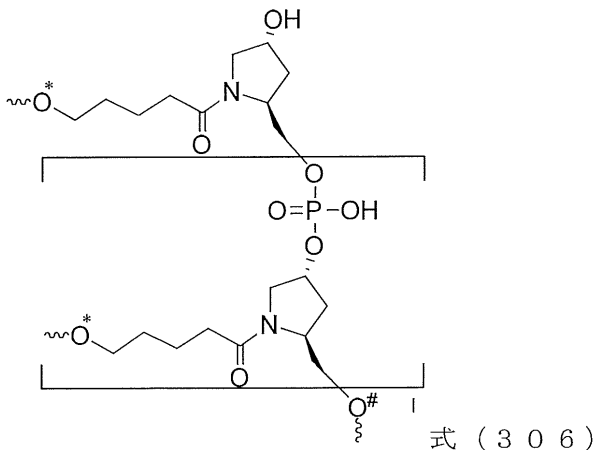
前記リンカーは、前記 s i R N A のセンス鎖の 3' 末端に結合される、請求項 37 に記載の s i R N A 複合体。

20

【請求項 39】

前記リンカーが式 (3 0 6) に示される構造を有し、

【化 10】



30

式中、 l は 0 ~ 3 の整数であり、

* は、前記リンカーにおける、エーテル結合により前記標的基に結合される部位を表し、

40

は、前記リンカーにおける、リン酸エステル結合により前記 s i R N A に結合される部位を表す、請求項 33 に記載の s i R N A 複合体。

【請求項 40】

前記リンカーが前記 s i R N A のセンス鎖の 3' 末端に結合される、請求項 39 に記載の s i R N A 複合体。

【請求項 41】

前記標的基がアシアロ糖タンパク質受容体のリガンドである、請求項 39 に記載の s i R N A 複合体。

【請求項 42】

前記標的基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 41 に記載

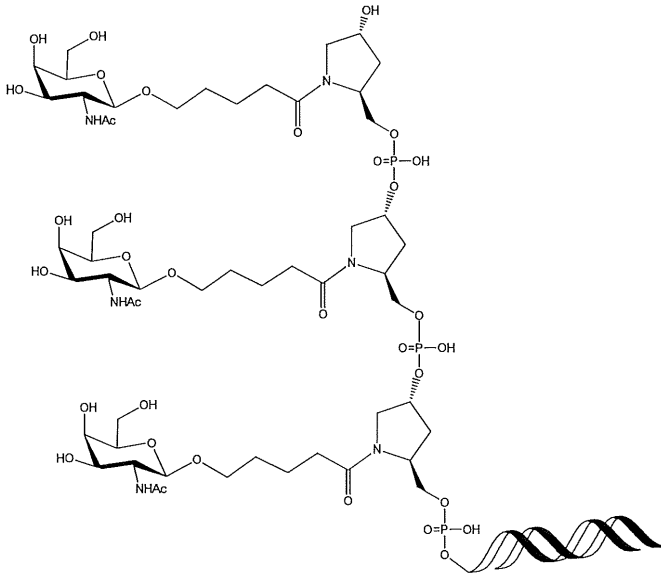
50

の siRNA 複合体。

【請求項 43】

式(307)に示される構造を有し、

【化 11】



式(307)、

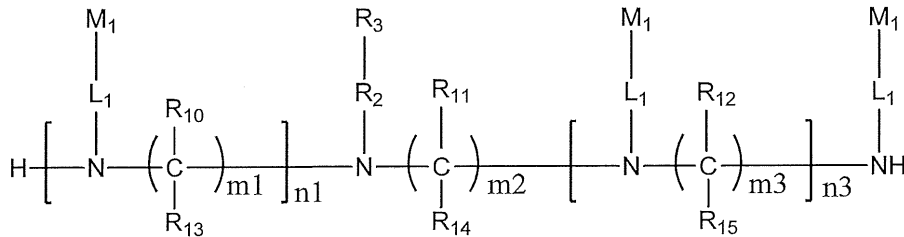
式中、二重螺旋構造は前記 siRNA を表し、

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、請求項 42 に記載の siRNA 複合体。

【請求項 44】

式(401)に示される構造を有する siRNA 複合体：

【化 12】



式(401)

式中、

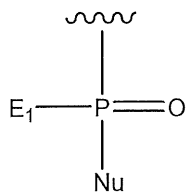
n1 は、1 ~ 3 から選択される整数であり、n3 は、0 ~ 4 から選択される整数であり、

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 はそれぞれ独立して、H、メチル基又はエチル基の 1 つであり、

R3 は式 A59 に示される構造の基であり、

【化 13】

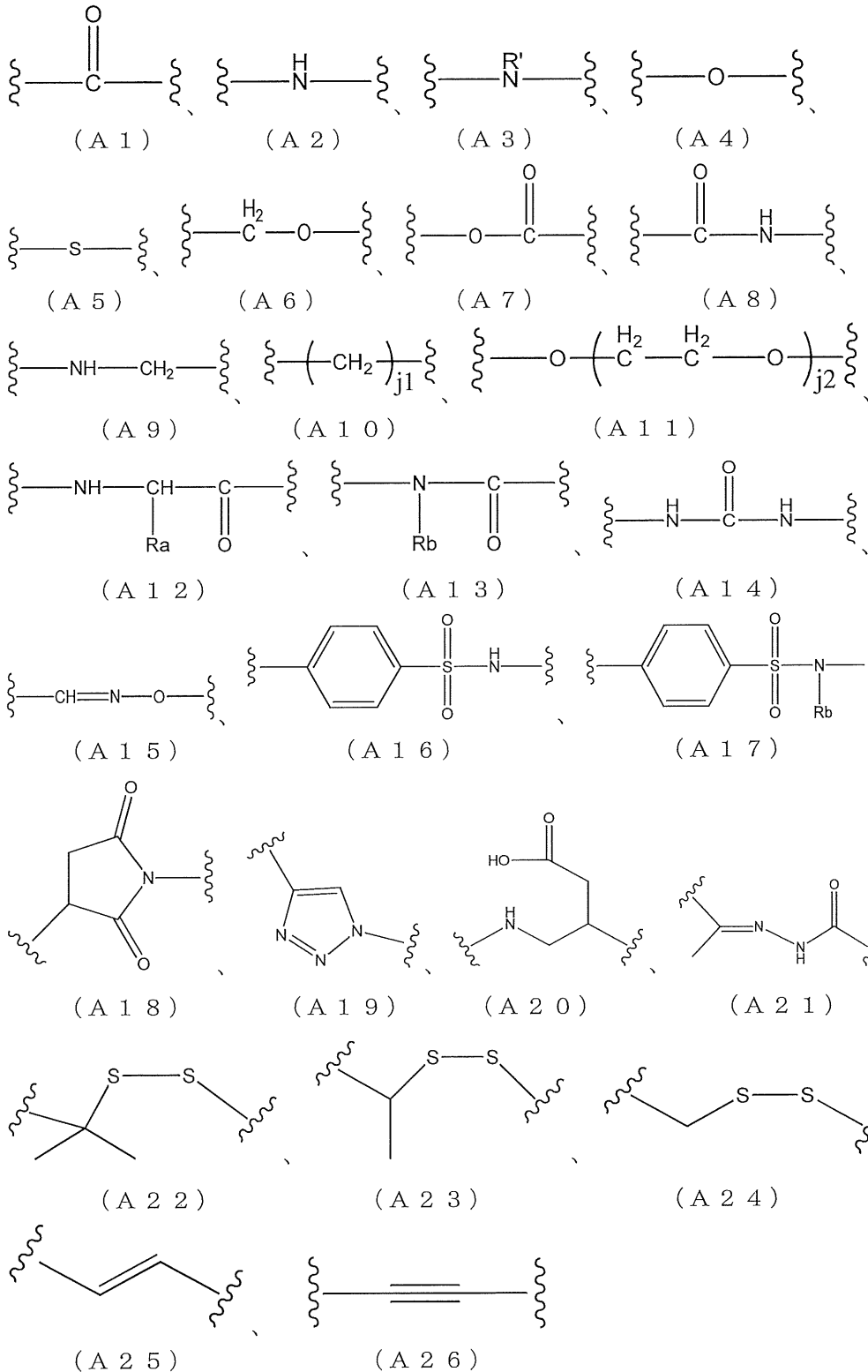


(A59)

式中、E1 は OH、SH 又は BH2 であり、Nu は請求項 1 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の siRNA であり、

R₂ は、窒素含有骨格上の N と A 5 9 との結合を実現できる任意の基であり、
各 L₁ は、式 A 1 ~ A 2 6 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、

【化 1 4】



10

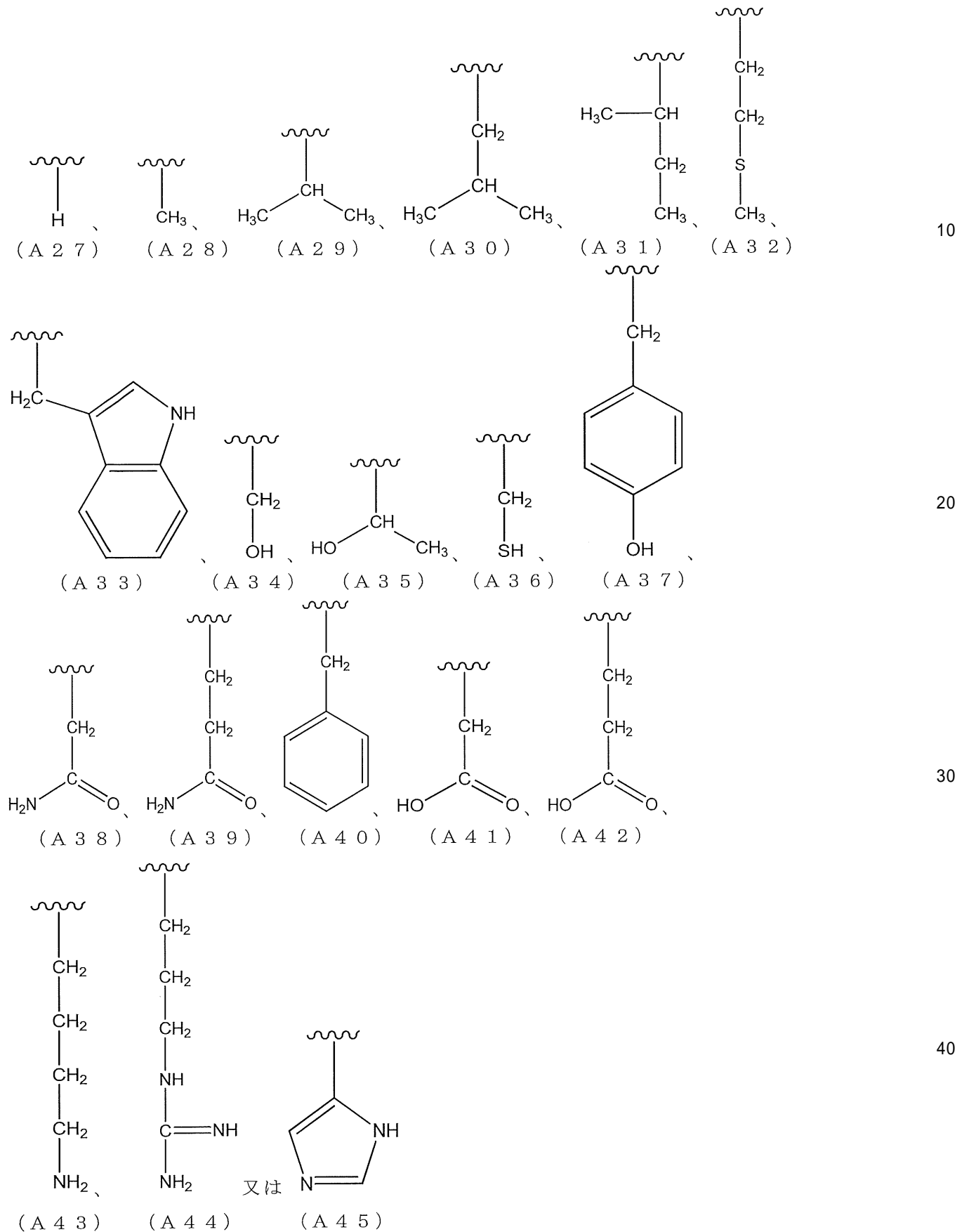
20

30

40

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 C₁ - C₁₀ のアルキル基であり、
Ra は式 A 2 7 ~ A 4 5 の基から選択される 1 つであり、

【化 1 5】



R^b は $C_1 - C_{10}$ のアルキル基であり、
 は、基が共有結合的に結合する部位を表し、

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。

【請求項45】

L_1 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、請求項44に記載の siRNA 複合体。

【請求項46】

L_1 が、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、請求項45に記載の siRNA 複合体。

【請求項47】

L_1 が、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、請求項46に記載の siRNA 複合体。

10

【請求項48】

L_1 の長さが3～25個の原子であり、前記 L_1 の長さとは、窒素含有骨格のN原子に結合される原子から M_1 に結合される原子までの最も長い原子鎖を形成する原子の個数を指す、請求項44～47のいずれか1項に記載の siRNA 複合体。

【請求項49】

L_1 の長さが4～15個の原子である、請求項48に記載の siRNA 複合体。

【請求項50】

j_1 は2～10の整数であり、 j_2 は2～10の整数であり、 R' は $C_1 - C_4$ のアルキル基であり、 R_a は、A27、A28、A29、A30及びA31の1つであり、 R_b は、 $C_1 - C_5$ のアルキル基である、請求項44に記載の siRNA 複合体。

20

【請求項51】

j_1 は3～5の整数であり、 j_2 は3～5の整数であり、 R' はメチル基、エチル基及びイソプロピル基の1つであり、 R_a はA27又はA28であり、 R_b が、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、請求項50に記載の siRNA 複合体。

【請求項52】

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、請求項44に記載の siRNA 複合体。

【請求項53】

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、請求項44に記載の siRNA 複合体。

30

【請求項54】

$m_1 = m_2 = m_3$ である、請求項53に記載の siRNA 複合体。

【請求項55】

各 M_1 が、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、 α -D-マンノフラノース、 β -D-マンノフラノース、 α -D-マンノピラノース、 β -D-マンノピラノース、 α -D-グルコピラノース、 β -D-グルコピラノース、 α -D-グルコフラノース、 β -D-グルコフラノース、 α -D-フルクトフラノース、 β -D-フルクトピラノース、 α -D-ガラクトピラノース、 β -D-ガラクトピラノース、 α -D-ガラクトフラノース、 β -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-プロピオニルガラクトサミン、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- α -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-グリコシル- β -D-ノイラミン酸、5-チオ- α -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- α -D-グ

40

50

ルコピラノシド、4-チオ-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-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、L-4-チオリボースから独立して選択される1つである、請求項44に記載の*siRNA*複合体。

【請求項56】

各 M_1 がいずれもN-アセチルガラクトサミンである、請求項55に記載の*siRNA*複合体。

【請求項57】

R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 及び R_{15} がいずれもHである、請求項44に記載の*siRNA*複合体。

10

【請求項58】

R_2 には、窒素含有骨格中の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、請求項44に記載の*siRNA*複合体。

【請求項59】

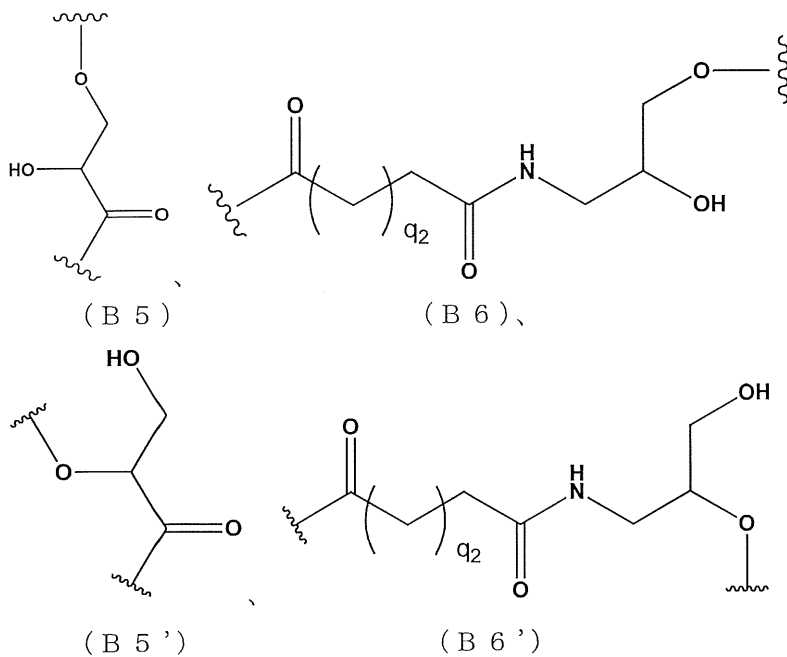
前記 R_2 における窒素含有骨格上のNに結合される部位がNとアミド結合を形成し、前記 R_3 におけるPに結合される部位がPとリン酸エステル結合を形成する、請求項58に記載の*siRNA*複合体。

【請求項60】

R_2 がB5、B6、B5'又はB6'から選択され、

20

【化16】



30

式中、



は、基が共有結合的に結合する部位を表し、 q_2 は1~10の整数である、請求項59に記載の*siRNA*複合体。

40

【請求項61】

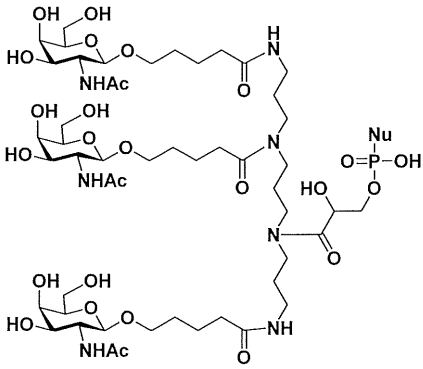
q_2 が1~5の整数である、請求項60に記載の*siRNA*複合体。

【請求項62】

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44~61のいずれか1項に記載の*siRNA*複合体。

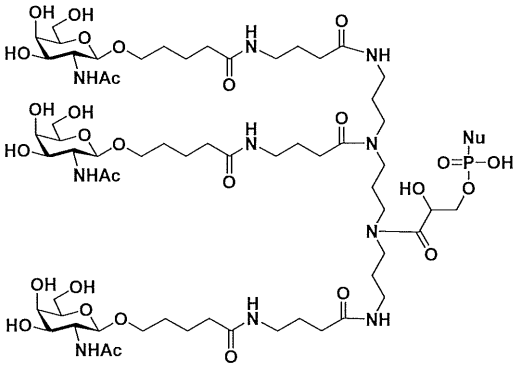
50

【化 1 7】



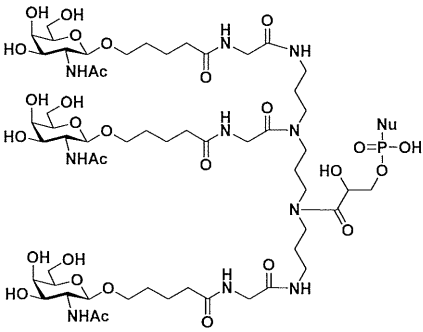
式 (403)

10



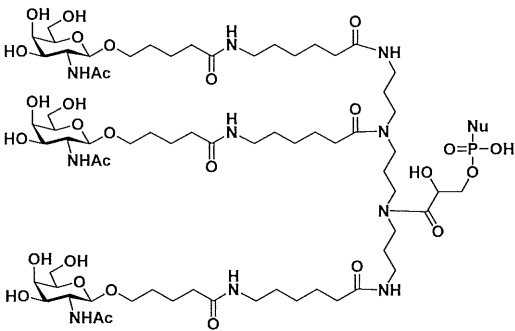
式 (404)

20



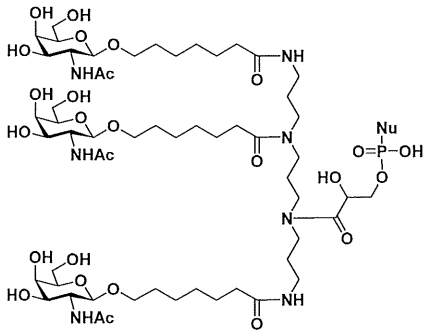
式 (405)

30



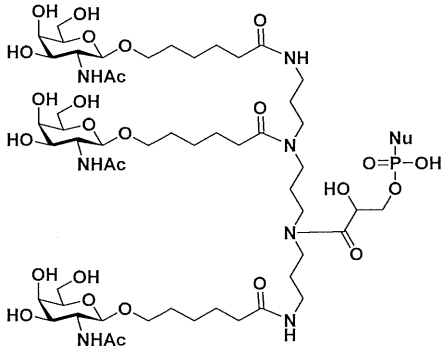
式 (406)

40



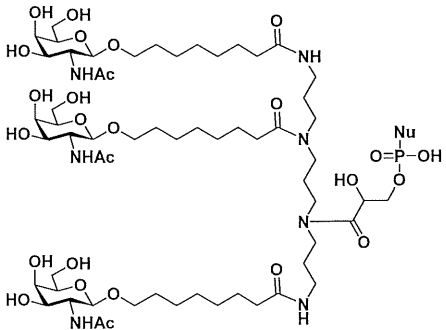
式 (407)

10



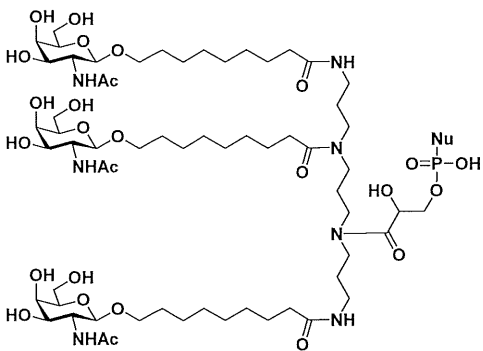
式 (408)

20



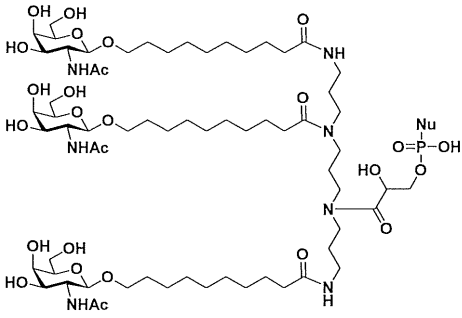
式 (409)

30



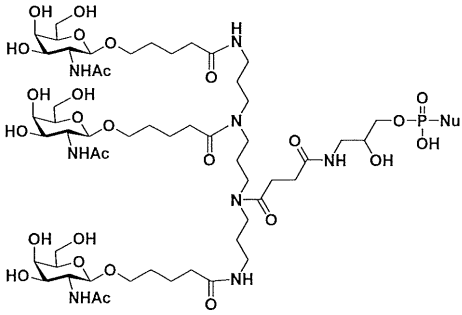
式 (410)

40



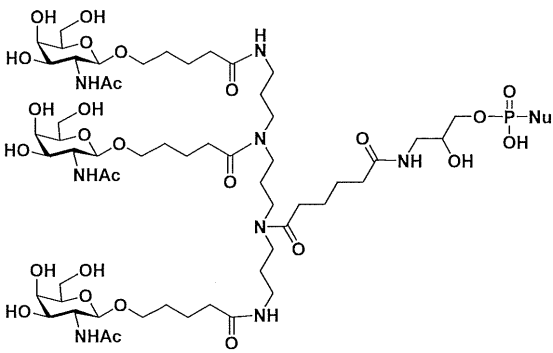
式 (411)

10



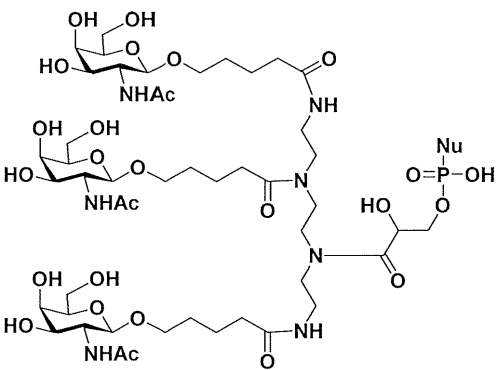
式 (412)

20



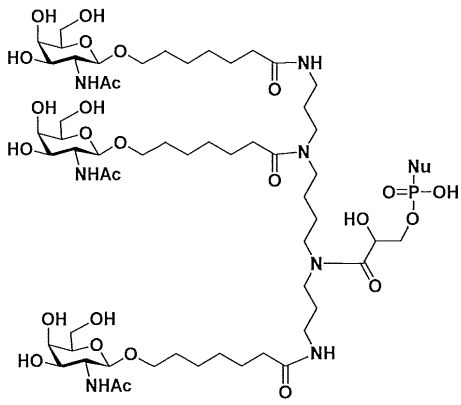
式 (413)

30



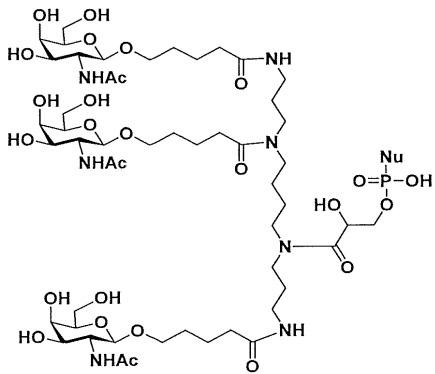
式 (414)

40



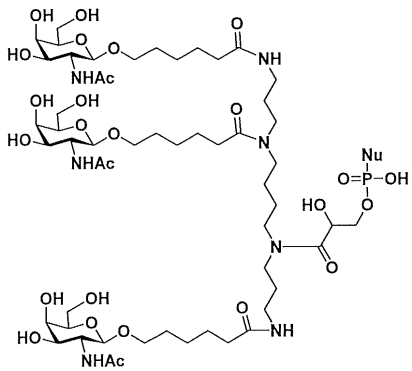
式 (415)

10



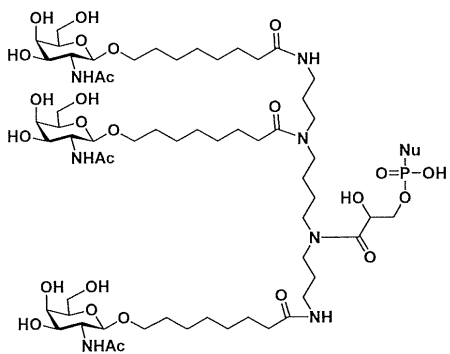
式 (416)

20



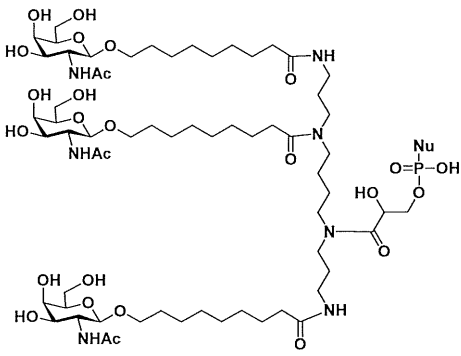
式 (417)

30



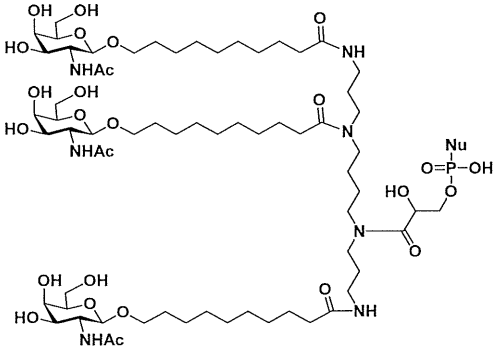
式 (418)

40



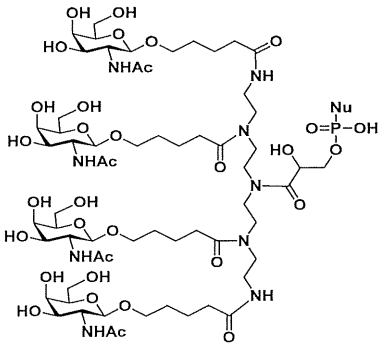
式 (4 1 9)

10



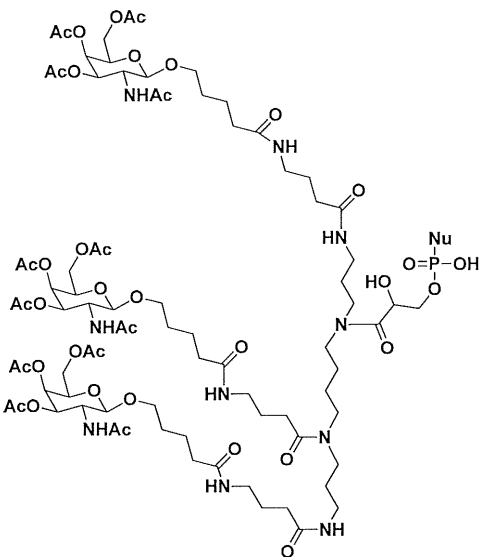
式 (4 2 0)

20



式 (4 2 1)

30



式 (4 2 2)

40

【請求項 6 3】

式 A 5 9 における P が、 s i R N A のセンス鎖又はアンチセンス鎖の端部に結合されており、前記端部とは、前記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

50

個のヌクレオチドを指す、請求項 44 ~ 62 のいずれか 1 項に記載の s i R N A 複合体。

【請求項 64】

式 A 59 における P が、前記センス鎖又は前記アンチセンス鎖の末端に結合される、請求項 63 に記載の s i R N A 複合体。

【請求項 65】

式 A 59 における P が、前記センス鎖の 3' 末端に結合される、請求項 63 に記載の s i R N A 複合体。

【請求項 66】

式 A 59 における P が、リン酸ジエステル結合を形成することにより前記 s i R N A におけるヌクレオチドの 2' 位、3' 位又は 5' 位に結合される、請求項 44 ~ 65 のいずれか 1 項に記載の s i R N A 複合体。

10

【請求項 67】

請求項 1 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の s i R N A、請求項 25 ~ 31 のいずれか 1 項に記載の薬物組成物及び / 又は請求項 32 ~ 66 のいずれか 1 項に記載の s i R N A 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における使用。

【請求項 68】

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が、慢性肝疾患、肝炎、肝線維性疾患又は肝過形成性疾患から選択される、請求項 44 に記載の使用。

【請求項 69】

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 / 又は予防方法であって、請求項 1 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の s i R N A、請求項 25 ~ 31 のいずれか 1 項に記載の薬物組成物及び / 又は請求項 32 ~ 66 のいずれか 1 項に記載の s i R N A 複合体の有効量を患者に投与することを含む、方法。

20

【請求項 70】

B 型肝炎ウイルス遺伝子の発現の抑制方法であって、請求項 1 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の s i R N A、請求項 25 ~ 31 のいずれか 1 項に記載の薬物組成物及び / 又は請求項 32 ~ 66 のいずれか 1 項に記載の s i R N A 複合体の有効量を、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、方法。

【請求項 71】

請求項 1 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の s i R N A、請求項 25 ~ 31 のいずれか 1 項に記載の薬物組成物及び / 又は請求項 32 ~ 66 のいずれか 1 項に記載の s i R N A 複合体を含むキット。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、s i R N A、当該 s i R N A を含む薬物組成物及び複合体ならびにそれらの使用に関する。具体的には、本開示は、B 型肝炎ウイルス (h e p a t i t i s B v i r u s、H B V) 遺伝子の発現を抑制するための s i R N A、当該 s i R N A を活性成分として含む薬物組成物及び複合体、ならびに前記 s i R N A、薬物組成物、複合体の、B 型肝炎の予防及び / 又は治療のための薬物の調製における使用に関する。

40

【背景技術】

【0002】

B 型肝炎ウイルス性肝炎 (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・治療薬としては、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、薬剤耐性及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

50

ングし、HBV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、siRNA) は、RNA干渉 (RNA interference、RNAi) 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、癌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。

10

【課題を解決するための手段】

【0004】

本開示は、HBV遺伝子の4つのオープンリーディングフレームの1つであるP遺伝子領域を特異的に標的し、HBV遺伝子の発現を著しく抑制することができるsiRNAを提供する。

【0005】

本開示により提供されるsiRNAは、センス鎖とアンチセンス鎖を含み、センス鎖とアンチセンス鎖の各ヌクレオチドは、いずれも修飾ヌクレオチドであり、センス鎖とアンチセンス鎖は、いずれもフルオロ修飾ヌクレオチドと非フルオロ修飾ヌクレオチドを含み、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。前記センス鎖は、ヌクレオチド配列1を含み、前記アンチセンス鎖は、ヌクレオチド配列2を含み、前記ヌクレオチド配列1と前記ヌクレオチド配列2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1と配列番号1に示されるヌクレオチド配列とは、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2と配列番号2に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、且つヌクレオチド差異が3つ以下であり、

20

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

30

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

ただし、ZはUであり、Z'はAであり、

前記ヌクレオチド配列1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2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り、

前記フルオロ修飾ヌクレオチドは、ヌクレオチド配列1とヌクレオチド配列2に位置し、ヌクレオチド配列1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1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2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2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。

40

【0006】

前記ヌクレオチド配列1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2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。

【0007】

前記ヌクレオチド配列2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U、C又はGから選択される。

【0008】

Z_Aは、Z'_Bと相補的なヌクレオチドである。

50

【0009】

前記ヌクレオチド配列1と前記ヌクレオチド配列2は、基本的に逆相補的、基本的に完全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、前記基本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。

【0010】

前記センス鎖は、ヌクレオチド配列3をさらに含み、前記アンチセンス鎖は、ヌクレオチド配列4をさらに含み、前記ヌクレオチド配列3と前記ヌクレオチド配列4は、長さがそれぞれ1~4ヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列3は、前記ヌクレオチド配列1の5'末端に結合され、前記ヌクレオチド配列4は、前記ヌクレオチド配列2の3'末端に結合され、前記ヌクレオチド配列3と前記ヌクレオチド配列4は、長さが等しく、基本的に完全に逆相補的又は完全に逆相補的であり、前記基本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

【0011】

前記ヌクレオチド配列3と前記ヌクレオチド配列4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3の塩基はGである、或いは、

前記ヌクレオチド配列3と前記ヌクレオチド配列4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3の塩基は順にU及びGである、或いは、

20

前記ヌクレオチド配列3と前記ヌクレオチド配列4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、前記ヌクレオチド配列3の塩基は順にU、U及びGである、或いは、

前記ヌクレオチド配列3と前記ヌクレオチド配列4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、前記ヌクレオチド配列3の塩基は順にA、U、U及びGである。

【0012】

前記siRNAは、ヌクレオチド配列5をさらに含み、前記ヌクレオチド配列5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、前記アンチセンス鎖の3'オーバーハング端を構成する。

30

【0013】

前記ヌクレオチド配列5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、前記ヌクレオチド配列5は、連続した2個のチミンデオキシリボヌクレオチド、連続した2個のウラシルリボヌクレオチド、又は標的mRNAと相補的な2つのヌクレオチドである。

【0014】

前記ヌクレオチド配列1は、配列番号3又は配列番号4に示されるヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列2は、配列番号5、配列番号6、配列番号7及び配列番号8に示されるヌクレオチド配列からなる群より選ばれるいずれか1つのヌクレオチド配列を含む。

40

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

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

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

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

5' - U A U U C G U U G A C A U A C U U U C U U - 3' (配列番号7)、

5' - U A U U C G U U G A C A U A C U U U C C A - 3' (配列番号8)。

【0015】

いくつかの実施形態において、前記siRNAは、以下のsiP1~siP4のいずれ

50

か1つである。

s i P 1

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

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

s i P 2

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

アンチセンス鎖：5' - A A U U C G U U G A C A U A C U U U C C A - 3' (配列番号6)

s i P 3

センス鎖：5' - G A A A G U A U G U C A A C G A A U A - 3' (配列番号4)、

アンチセンス鎖：5' - U A U U C G U U G A C A U A C U U U C U U - 3' (配列番号7)

s i P 4

センス鎖：5' - G A A A G U A U G U C A A C G A A U A - 3' (配列番号4)、

アンチセンス鎖：5' - U A U U C G U U G A C A U A C U U U C C A - 3' (配列番号8)。

【0016】

なお、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1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、前記アンチセンス鎖において、前記ヌクレオチド配列2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、或いは、

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1の第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非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、前記ヌクレオチド配列2の第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、或いは、

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1の第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非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、前記ヌクレオチド配列2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。

【0017】

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から独立して選択される1つである。

【0018】

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つであり、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から選択される1つである。

【0019】

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、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

10

20

30

40

50

クレオチドを指す。

【0020】

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1個は、修飾基を有するリン酸エステル基である。

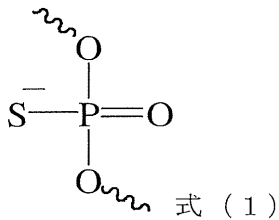
【0021】

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、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。

10

【0022】

【化1】



【0023】

前記 s i R N A において、以下のヌクレオチド間の結合からなる群より選ばれる少なくとも1つは、チオリン酸エステル基による結合である。

20

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の結合、

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の結合、

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の結合、

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の結合、

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の結合、

30

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の結合、

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の結合、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の結合。

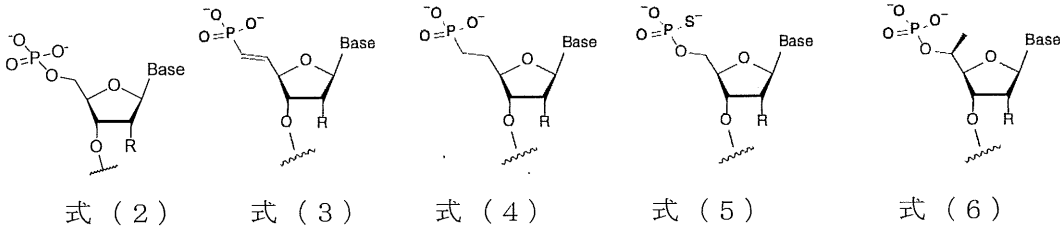
【0024】

いくつかの実施形態において、本開示の s i R N A 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。いくつかの実施形態において、5'末端のヌクレオチドは、以下の式(2)~式(6)のいずれかが1つに示されるヌクレオチドである。

40

【0025】

【化2】



ただし、RはH、OH、F及びメトキシ基からなる群から選択される基を表し、BaseはA、U、C、G又はTから選択される塩基を表す。

10

【0026】

いくつかの具体的な実施形態において、本開示に記載されたsiRNAは、表1A~1D内のいずれか1つに示されるsiRNAである。

【0027】

いくつかの実施形態において、本開示は、活性成分として本開示に記載された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。一実施形態において、前記siRNAと前記薬学的に許容可能な担体との重量比は1:(1~500)であり、例えば、1:(1~50)であってもよい。

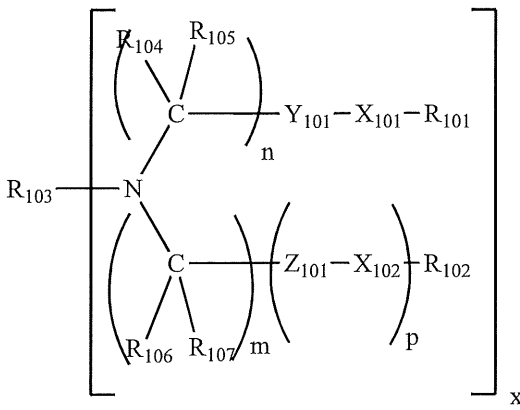
【0028】

いくつかの実施形態において、前記薬学的に許容可能な担体は、有機アミン、補助脂質及びポリエチレングリコール化(PEG化)脂質を含む。ここで、前記有機アミンは、式(201)に示される化合物及び/又はその薬学的に許容できる塩である。

20

【0029】

【化3】



30

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C₁-C₂₀炭化水素鎖であり、

Y_{101} 及び Z_{101} はそれぞれ独立してC=O、C=S、S=O、CH-OH又はSO₂であり、

40

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、

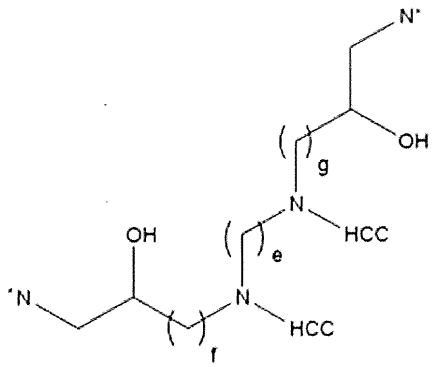
n は1~3の整数であり、 m は0~20の整数であり、 p は0又は1であり、 m 及び p がいずれも0である場合、 R_{102} は水素であり、

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。

50

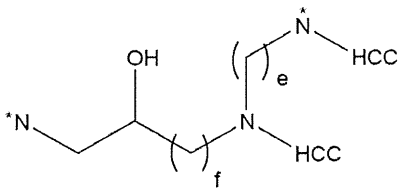
【 0 0 3 0 】

【 化 4 】



式 (2 0 2)、

10



式 (2 0 3)

20

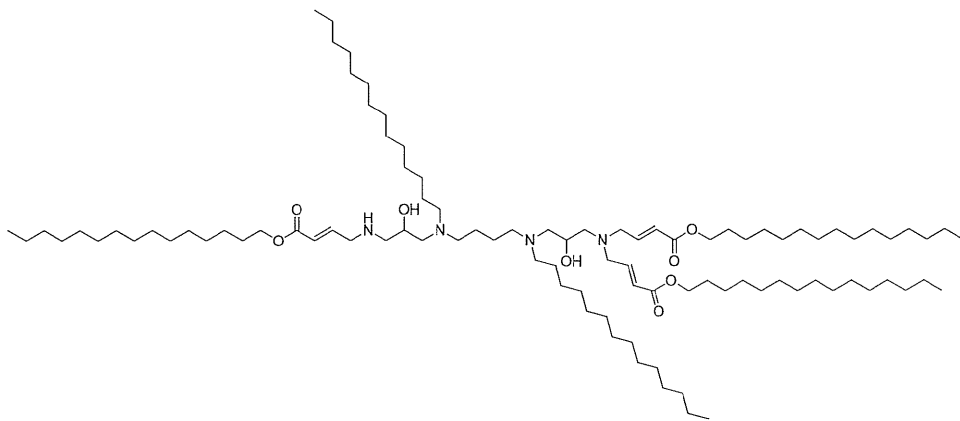
式中、g、e及びfはそれぞれ独立して1～6の整数であり、「HCC」は炭化水素鎖を表し、各*Nは式(201)に示される窒素原子を表す。

【 0 0 3 1 】

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り、

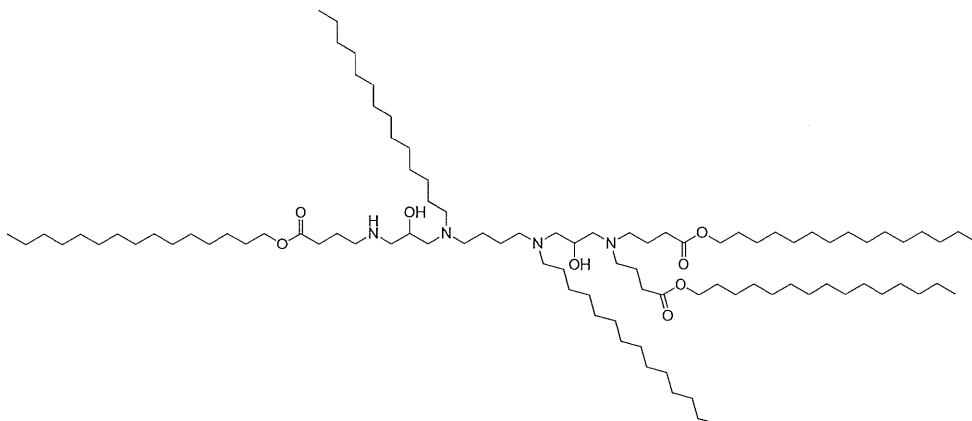
【 0 0 3 2 】

【 化 5 】



式 (2 1 4)、

30



式 (2 1 5)

40

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

50

の誘導体であり、かつ、

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 - glycerol - 3 - phosphatidylethanolamine - N - [methoxy (polyethylene glycol)] - 2000) である。

【0033】

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) である。

【0034】

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 (50 ~ 70) : (20 ~ 40) : (3 ~ 20) である。

【0035】

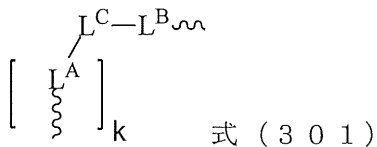
いくつかの実施形態において、本開示は、活性成分として本開示に記載された siRNA と、当該 siRNA に複合して結合されるリガンドとを含む siRNA 複合体を提供する。いくつかの実施形態において、前記リガンドは、薬学的に許容できる複合基であり、前記複合基は、薬学的に許容できる標的基及びリンカーを含み、前記 siRNA、前記リンカー及び前記標的基は順に共有結合的又は非共有結合的に結合されている。

【0036】

前記リンカーは、式 (301) に示される構造を有する。

【0037】

【化6】

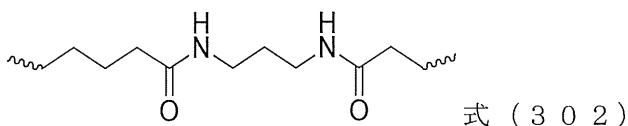


式中、k は 1 ~ 3 の整数であり、

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。

【0038】

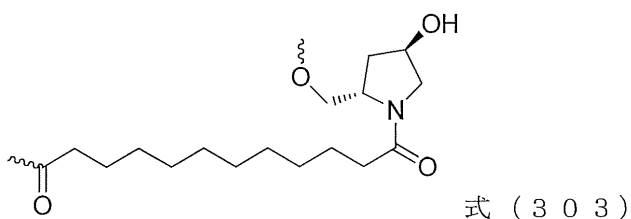
【化7】



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、他端に酸素原子を有し、前記 siRNA にリン酸エステル結合により結合される。

【0039】

【化8】



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 価のリンカー基であり、前記 L^C は、酸素原子を介して各前記 L^A 部にエーテル結合により結合され、窒素原子を介して前記 L^B 部に

10

20

30

40

50

アミド結合により結合される。

【0040】

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。

【0041】

前記標的基は、アシアロ糖タンパク質受容体のリガンドである。

【0042】

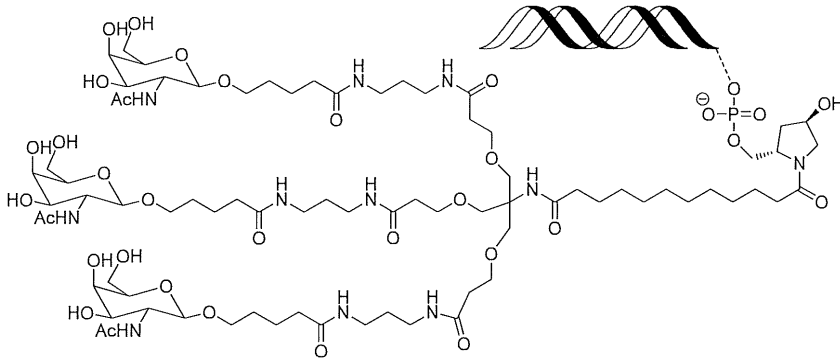
前記標的基は、ガラクトース又は N - アセチルガラクトサミンである。

【0043】

前記 siRNA 複合体は、式 (305) に示される構造を有する。

【0044】

【化9】



式 (305)

式中、二重螺旋構造は前記 siRNA を表し、

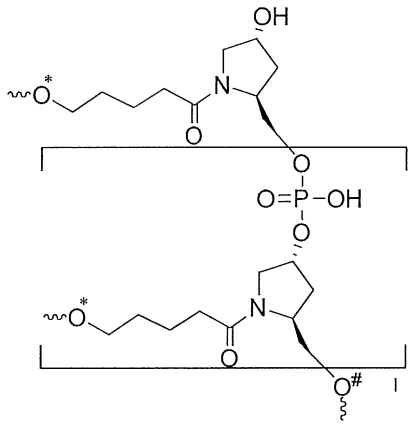
前記リンカーは前記 siRNA のセンス鎖の 3' 末端に結合される。

【0045】

前記リンカーは、式 (306) に示される構造を有する。

【0046】

【化10】



式 (306)

式中、1 は 0 ~ 3 の整数であり、

* は、前記リンカーにおける、エーテル結合により前記標的基に結合される部位を表し

は、前記リンカーにおける、リン酸エステル結合により前記 siRNA に結合される部位を表し、

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。

【0047】

前記標的基は、アシアロ糖タンパク質受容体のリガンドである。

【0048】

前記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る。

【0049】

10

20

30

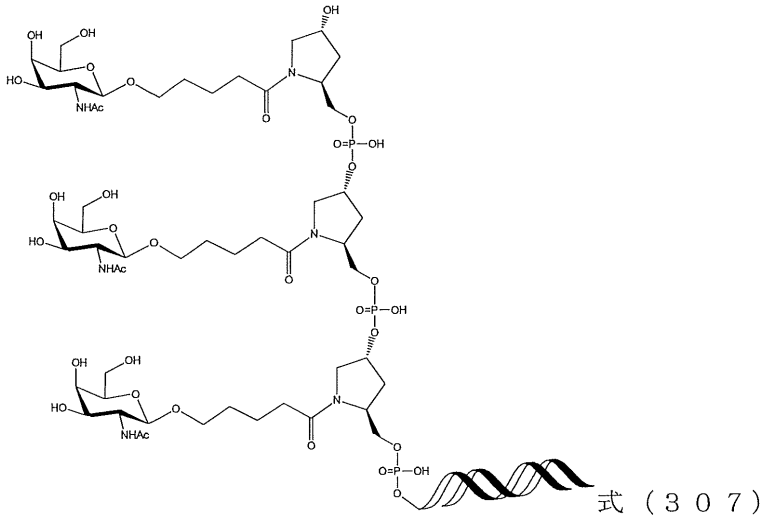
40

50

前記 s i R N A 複合体は、式 (3 0 7) に示される構造を有する。

【 0 0 5 0 】

【 化 1 1 】



10

式中、二重螺旋構造は前記 s i R N A を表し、

前記リンカーは、前記 s i R N A のセンス鎖の 3 ' 末端に結合される。

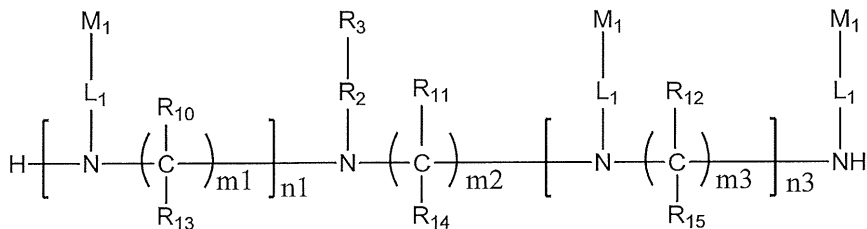
【 0 0 5 1 】

20

いくつかの実施形態において、本開示は、式 (4 0 1) に示される s i R N A 複合体を提供する。

【 0 0 5 2 】

【 化 1 2 】



30

式 (4 0 1)

式中、

n 1 は、 1 ~ 3 から選択される整数であり、 n 3 は、 0 ~ 4 から選択される整数であり

、

m 1、 m 2 及び m 3 は独立して、 2 ~ 1 0 から選択される整数であり、

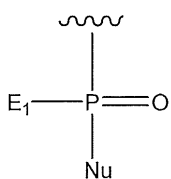
R 1 0、 R 1 1、 R 1 2、 R 1 3、 R 1 4 及び R 1 5 は、はそれぞれ独立して、 H、メチル基又はエチル基の 1 つであり、

R 3 は式 A 5 9 に示される構造の基である。

【 0 0 5 3 】

40

【 化 1 3 】



(A 5 9)

式中、 E 1 は O H、 S H 又は B H 2 であり、 N u は本開示により提供される上記 s i R N A であり、

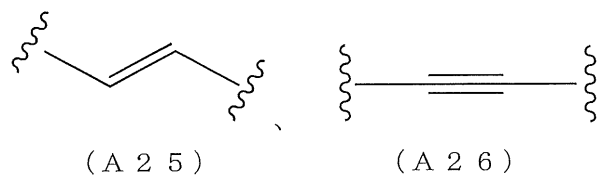
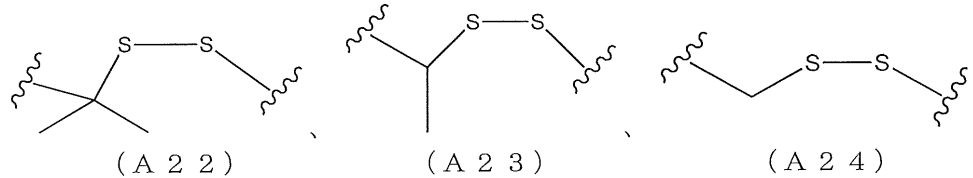
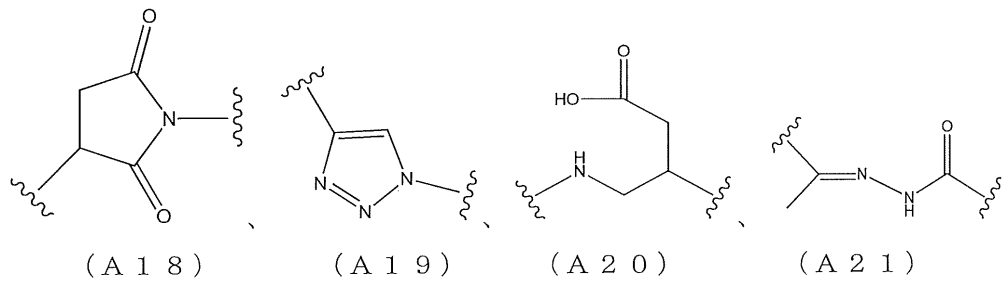
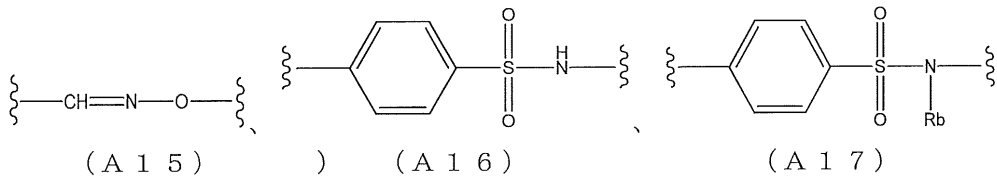
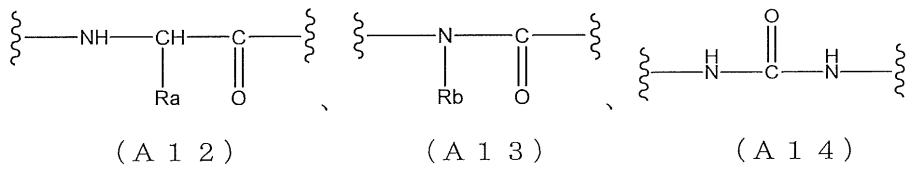
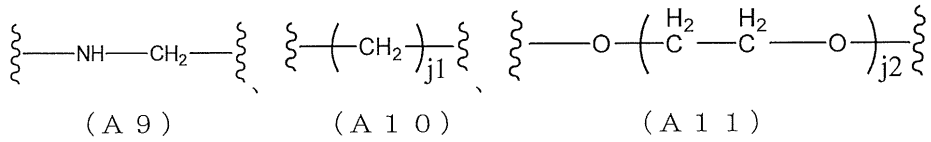
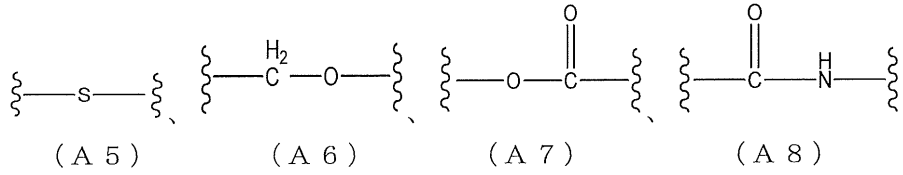
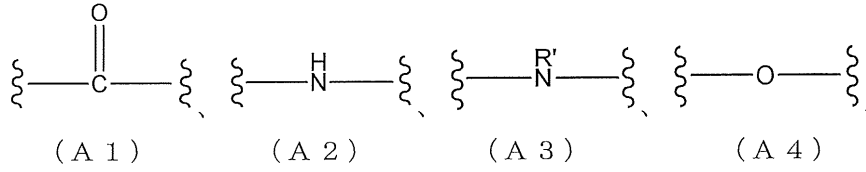
R 2 は、窒素含有骨格上の N と A 5 9 との結合を実現できる任意の基であり、

50

各 L_1 は、式 A 1 ~ A 2 6 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る。

【0054】

【化14】



式中、 j_1 は 1 ~ 20 の整数であり、 j_2 は 1 ~ 20 の整数であり、
 R' は $C_1 - C_{10}$ のアルキル基であり、
 R_a は式 A 27 ~ A 45 の基から選択される 1 つである。

【0055】

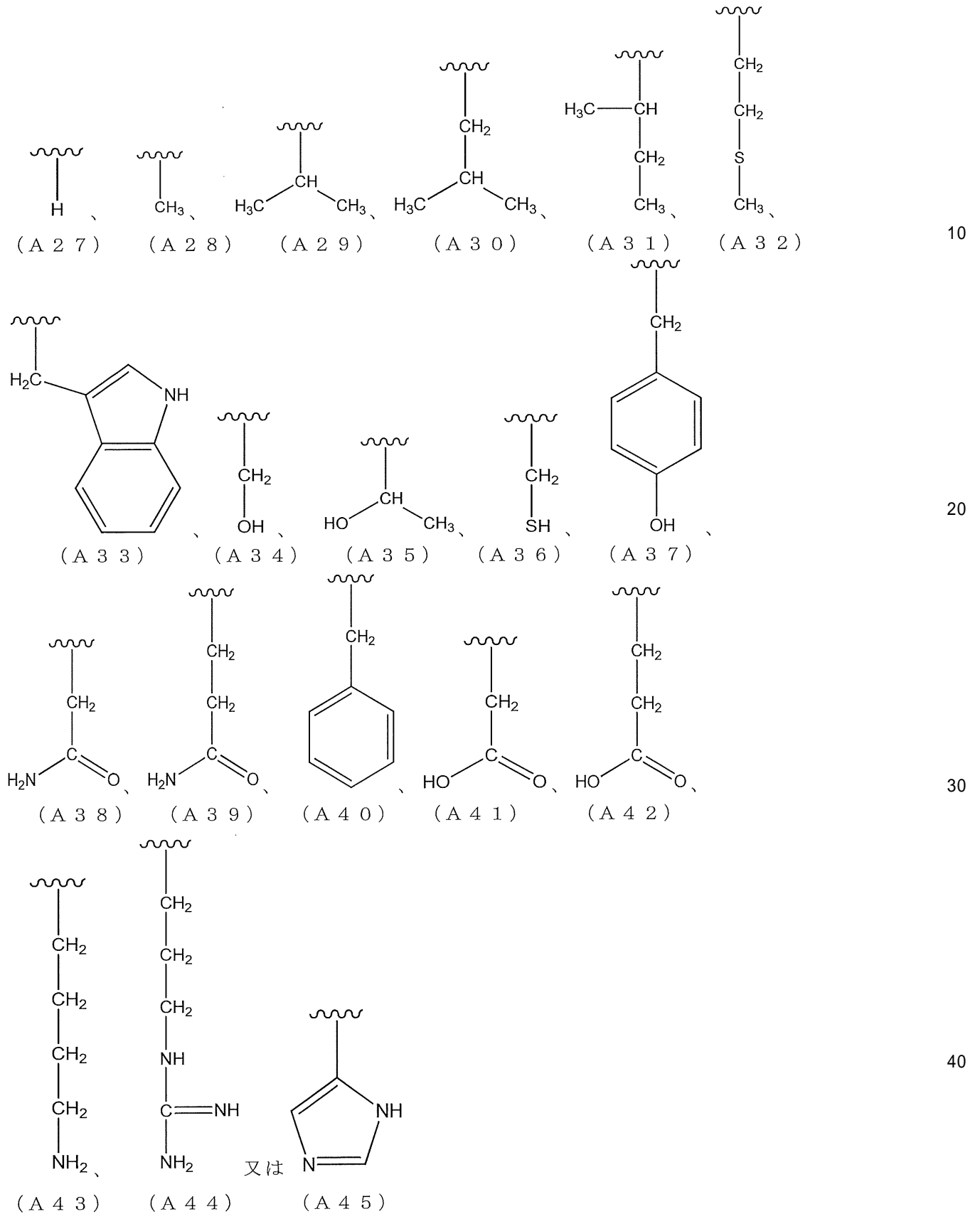
10

20


30

40

【化 1 5】



R b は C₁ - C₁₀ のアルキル基であり、

 は、基が共有結合的に結合する部位を表す。

【 0 0 5 6】

各 M₁ 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

10

20

30

40

50

力を有するリガンドから選択される1つである。

【0057】

いくつかの実施形態において、上述した siRNA 複合体における L_1 は、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り、

或いは、 L_1 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り、

或いは、 L_1 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。

【0058】

いくつかの実施形態において、上述した siRNA 複合体における L_1 の長さは3~25個の原子であり、前記 L_1 の長さとは、窒素含有骨格のN原子に結合される原子から M_1 に結合される原子までの最も長い原子鎖を形成する原子の個数を指し、

或いは、 L_1 の長さは4~15個の原子である。

【0059】

いくつかの実施形態において、上述した siRNA 複合体における j_1 は2~10の整数であり、 j_2 は2~10の整数であり、 R' は $C_1 - C_4$ のアルキル基であり、 R_a は、A27、A28、A29、A30 及び A31 の1つであり、 R_b は、 $C_1 - C_5$ のアルキル基であり、

或いは、 j_1 は3~5の整数であり、 j_2 は3~5の整数であり、 R' はメチル基、エチル基及びイソプロピル基の1つであり、 R_a はA27又はA28であり、 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。

【0060】

いくつかの実施形態において、上述した siRNA 複合体における 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。

【0061】

いくつかの実施形態において、上述した複合体における 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。いくつかの実施形態において、 $m_1 = m_2 = m_3$ である。

【0062】

いくつかの実施形態において、上述した siRNA 複合体における各 M_1 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、 α -D-マンノフラノース、 β -D-マンノフラノース、 α -D-マンノピラノース、 β -D-マンノピラノース、 α -D-グルコピラノース、 β -D-グルコピラノース、 α -D-グルコフラノース、 β -D-グルコフラノース、 α -D-フルクトフラノース、 β -D-フルクトピラノース、 α -D-ガラクトピラノース、 β -D-ガラクトピラノース、 α -D-ガラクトフラノース、 β -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-プロピオニルガラクトサミン、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- β -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- β -D-ノイラミン酸、5-チオ- β -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- β -D-グルコピラノシド、4-チオ- β -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- β -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、L-4-チオリボースから独立して選択される1つである。

【0063】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、各 M_1 はいずれも N - アセチルガラクトサミンである。

【0064】

いくつかの実施形態において、上述した $siRNA$ 複合体における R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 及び R_{15} はいずれも H である。

【0065】

いくつかの実施形態において、上述した $siRNA$ 複合体における R_2 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。

【0066】

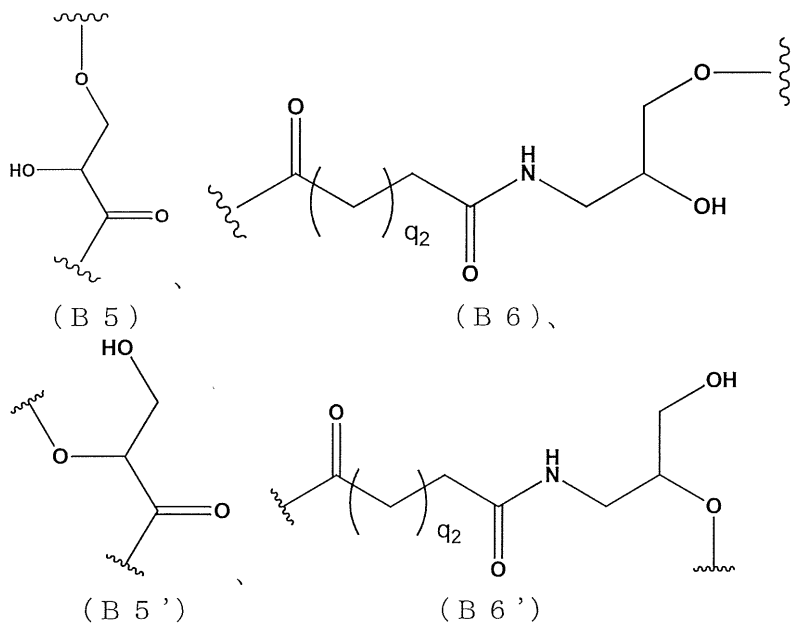
いくつかの実施形態において、 R_2 における前記窒素含有骨格上の N に結合される部位は、 N とアミド結合を形成し、前記 R_3 上の P に結合される部位は、 P とリン酸エステル結合を形成する。

【0067】

いくつかの実施形態において、 R_2 は、 B_5 、 B_6 、 B_5' 又は B_6' から選択されてもよい。

【0068】

【化16】



ただし、



は、基が共有結合的に結合する部位を表し、 q_2 は $1 \sim 10$ の整数である。いくつかの実施形態において、 q_2 は、 $1 \sim 5$ の整数であってもよい。

【0069】

いくつかの実施形態において、上述した $siRNA$ 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。

【0070】

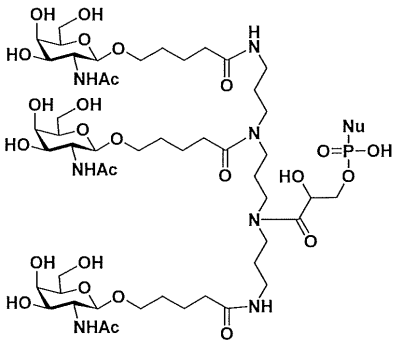
10

20

30

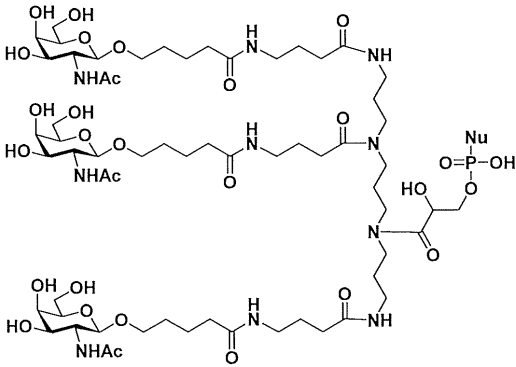
40

【化 17】



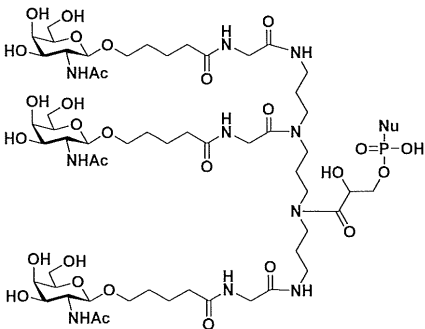
式 (403)

10



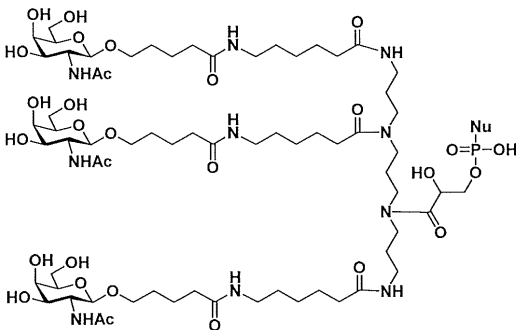
式 (404)

20



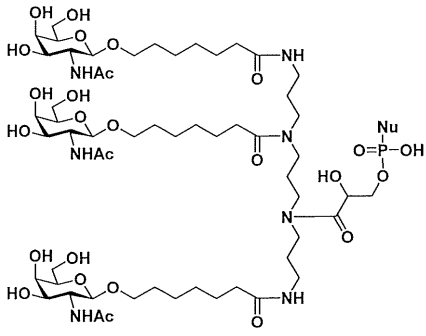
式 (405)

30



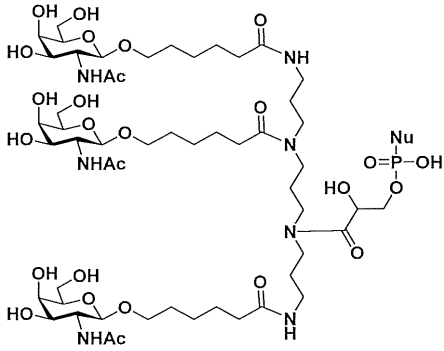
式 (406)

40



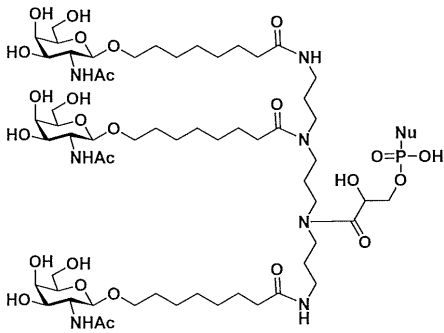
式 (407)

10



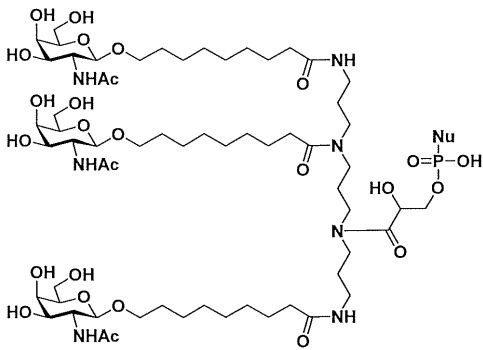
式 (408)

20



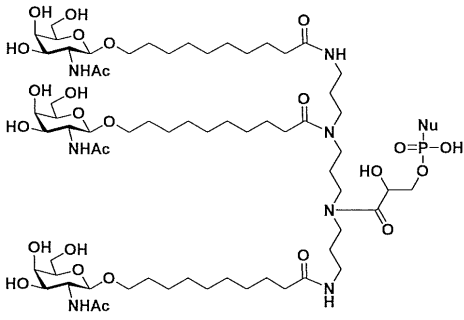
式 (409)

30



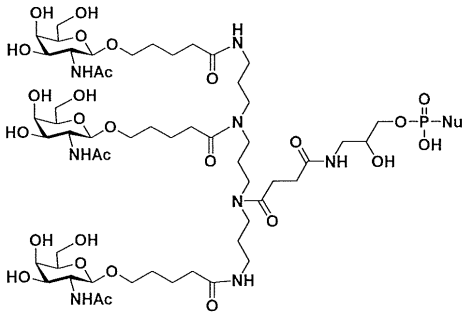
式 (410)

40



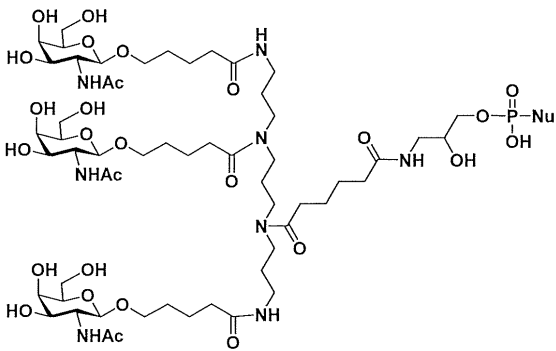
式 (411)

10



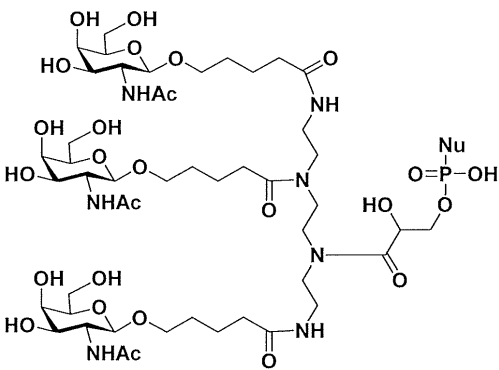
式 (412)

20



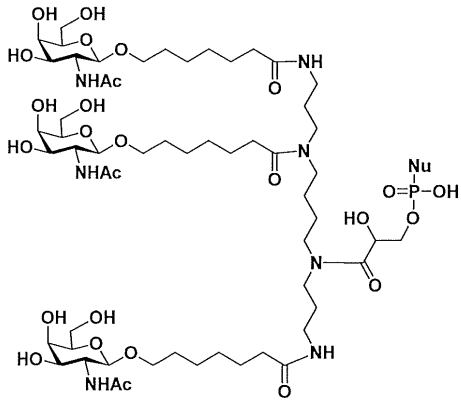
式 (413)

30



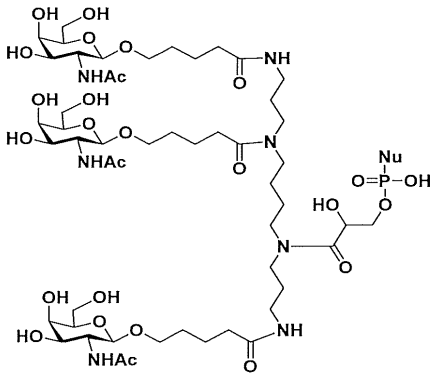
式 (414)

40



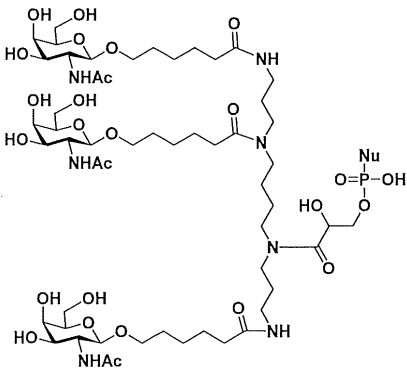
式 (4 1 5)

10



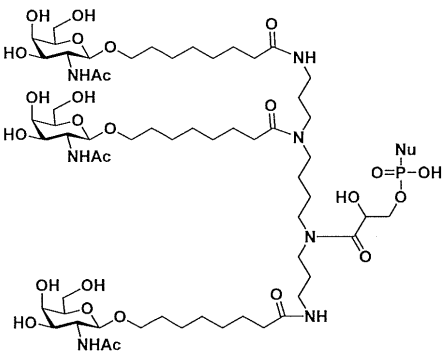
式 (4 1 6)

20



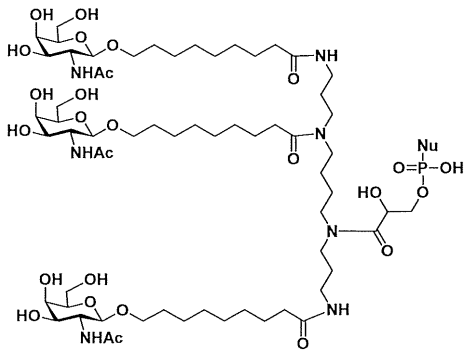
式 (4 1 7)

30



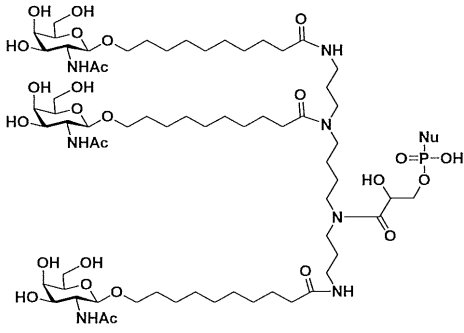
式 (4 1 8)

40



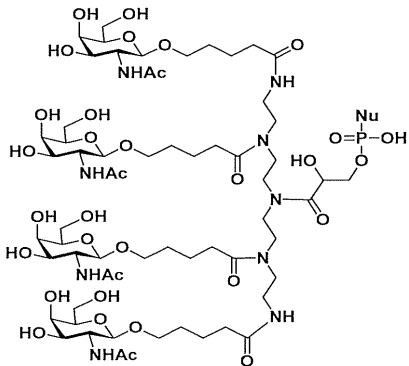
式 (4 1 9)

10



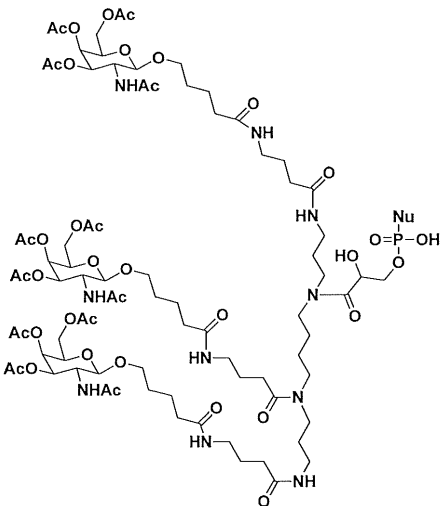
式 (4 2 0)

20



式 (4 2 1)

30



式 (4 2 2)

40

【 0 0 7 1 】

いくつかの実施形態によれば、上述した s i R N A 複合体において、式 A 5 9 における P は、s i R N A のセンス鎖又はアンチセンス鎖の端部に結合されており、前記端部とは、前記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 A 5 9 における P は、前記センス鎖又は前記アン

50

チセンス鎖の末端に結合されており、或いは、式 A 5 9 における P は、前記センス鎖の 3' 末端に結合されている。

【0072】

いくつかの実施形態によれば、上述した s i R N A 複合体において、式 A 5 9 における P が、リン酸ジエステル結合を形成することにより前記 s i R N A におけるヌクレオチドの 2' 位、3' 位又は 5' 位に結合される。

【0073】

いくつかの実施形態において、本開示は、上述の s i R N A、上述の薬物組成物及び / 又は上述の s i R N A 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における使用を提供する。

10

【0074】

いくつかの実施形態において、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が、慢性肝疾患、肝炎、肝線維性疾患又は肝過形成性疾患から選択される。

【0075】

いくつかの実施形態において、本開示は、患者に上述の s i R N A、上述の薬物組成物及び / 又は上述の s i R N A 複合体の有効量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及び / 又は予防方法を提供する。

【0076】

いくつかの実施形態において、本開示は、上述の s i R N A、上述の薬物組成物及び / 又は上述の s i R N A 複合体の有効量を、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、肝炎細胞における H B V 遺伝子の発現の抑制方法を提供する。

20

【0077】

いくつかの実施形態において、本開示は、上述の s i R N A、上述の薬物組成物及び / 又は上述の s i R N A 複合体を含むキットを提供する。

【発明の効果】

【0078】

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、血漿における高い安定性及び良好な抑制活性を有する。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 は、体外でのヒト血漿中で 7 2 時間分解されずに安定的に存在し、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、濃度 0 . 1 n M で、8 0 % 以上の体外抑制活性を有する。

30

【0079】

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 を含む複合体は、低いオフターゲット効果、良好なリソソーム安定性及び / 又は抑制活性を有する。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 を含む複合体は、肝臓を効果的に標的し、優れた H B V 遺伝子発現抑制特性を示すことができる。即ち、低いオフターゲット効果を有するとともに、1 m g / k g の投与量で単回投与することで、B 型肝炎モデルマウスの肝臓における 7 7 . 4 % ~ 8 8 . 3 % の H B V m R N A を抑制することができる。同時に、本開示により提供される s i R N A を含む複合体は、B 型肝炎モデルマウスにおける H B V 表面抗原の発現を効果的に低下させることもでき、3 m g / k g の投与量で単回投与してからの 8 4 日間、H B V 表面抗原及び H B V D N A 抑制率はいずれも 9 0 % 以上に達することができる。観察の最終日である 1 5 4 日目まで、この 2 つの指標は投与前のレベルに戻ることはなく、H B s A g の抑制率は依然として 7 7 . 0 % であり、H B V D N A の抑制率は依然として 8 0 . 1 % である。このことが示すとおり、本開示により提供される s i R N A を含む複合体は、s i R N A 活性成分を肝臓に効果的に送達し、体内で長期間活性を維持することができ、B 型肝炎ウイルスの感染による病理学的状態及び疾患を効果的に治療及び / 又は予防することができ、良好な応用の見通しがある。

40

【0080】

本開示の他の特徴と利点は、後述の発明を実施するための形態部分において詳述する。

50

【図面の簡単な説明】

【0081】

【図1】複合体2とマウス由来のリソソーム溶解液を異なる時間培養した後のPAGE電気泳動図である。

【図2】複合体2とヒト由来のリソソーム溶解液を異なる時間培養した後のPAGE電気泳動図である。

【図3】単剤3mg/kg又は1mg/kgの複合体1を経皮下投与した後、標準化された血清表面抗原レベルの経時的变化図（縦座標が対数座標）である。

【図4】単剤3mg/kg又は1mg/kgの複合体1を経皮下投与した後、標準化された血清e抗原レベルの経時的变化図である。

【図5】単剤3mg/kg又は1mg/kgの複合体1を経皮下投与した後、標準化された血清HBV DNAレベルの経時的变化図（縦座標が対数座標）である。

【図6】siRNA1～4のpsiCHECK系における抑制活性を示す。

【図7】siRNA1～4とヒト血漿を異なる時間培養した後のPAGE電気泳動図である。

【発明を実施するための形態】

【0082】

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。

【0083】

本開示において、HBV遺伝子とは、DNA配列がGenbank登録番号NC_003977.2に示される遺伝子を指す。これに依りて、標的mRNAとは、当該HBV遺伝子が転写されたmRNAを指す。

【0084】

文脈において、特に説明がない限り、大文字のアルファベットC、G、U、A、Tは、ヌクレオチドの塩基配列を表し、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、大文字のアルファベットP1は、当該文字P1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し、アルファベットの組合せVPは、当該アルファベットの組合せVPの右側に隣接する1つのヌクレオチドがビニルリン酸エステル修飾ヌクレオチドであることを表し、アルファベットの組合せPsは、当該アルファベットの組合せPsの右側に隣接するヌクレオチドがチオリン酸エステル修飾ヌクレオチドであることを表し、大文字のアルファベットPは、当該文字Pの右側に隣接するヌクレオチドが5'-リン酸ヌクレオチドであることを表す。

【0085】

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鎖の配列を推知できると考えられる。これに依りて、「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

10

20

30

40

50

在しないことを意味する。

【0086】

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、基本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。

【0087】

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であり、このとき、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。

10

【0088】

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し、ヌクレオチドアナログとは、核酸においてヌクレオチドに取って代わることができるが、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。

20

【0089】

文脈において、前記「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。

30

【0090】

文脈において、特に本開示の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モノマー(unmodified or modified RNA phosphoramidites。RNA phosphoramiditesをNucleoside phosphoramiditesということもある)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、いずれも市販品を購入可能である。

40

【0091】

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」ということもある。より具体的には、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。別に説明がない限り、本開示の具体的な実施形態において、siRNA複合体又は複合体は、第1種のsi

50

RNA複合体と第2種のsiRNA複合体(以下、さらに詳述する)の総称である。

【0092】

<siRNA>

本開示は、HBV遺伝子の発現を選択的かつ効果的に低下させることができるsiRNAを提供する。

【0093】

本開示のsiRNA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。

【0094】

本開示のsiRNAは、センス鎖とアンチセンス鎖を含み、センス鎖とアンチセンス鎖の各ヌクレオチドは、いずれも修飾ヌクレオチドであり、センス鎖及びアンチセンス鎖がいずれもフルオロ修飾ヌクレオチド及び非フルオロ修飾ヌクレオチドを含み、前記センス鎖がヌクレオチド配列1を含み、前記アンチセンス鎖がヌクレオチド配列2を含み、前記ヌクレオチド配列1と前記ヌクレオチド配列2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1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2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、3つ以下のヌクレオチド差異がある。

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

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

ただし、ZはUであり、Z'はAであり、

前記ヌクレオチド配列1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2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る。

【0095】

前記フルオロ修飾ヌクレオチドは、ヌクレオチド配列1とヌクレオチド配列2に位置し、ヌクレオチド配列1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1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2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2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。

【0096】

文脈において、「位置が対応する」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1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。

【0097】

上述した前記ヌクレオチド配列1と配列番号1、及び前記ヌクレオチド配列2と配列番号2のヌクレオチド差異により、siRNAによる標的遺伝子抑制能力が顕著に低下することはなく、したがって、これらのヌクレオチド差異を含むsiRNAも、本開示の保護範囲内にある。

【0098】

いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列1と配列番号1に示されるヌクレオチド配列は、1つ以下のヌクレオチド差異があり、又は差異がなく、及び/又は前記ヌクレオチド配列2と配列番号2に示されるヌクレオチド配列は、1つ以下のヌクレオチド差異があり、又は差異がない。

【0099】

いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列2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U、C

10

20

30

40

50

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U、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。

【0100】

前記ヌクレオチド配列1と前記ヌクレオチド配列2は、二本鎖構造を安定化させる程度に相補的であればよい。したがって、前記ヌクレオチド配列1と前記ヌクレオチド配列2は、一部で逆相補的であってもよい。siRNAをより安定化させるために、いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列1と前記ヌクレオチド配列2は、基本的に逆相補的、基本的に完全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、前記基本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

【0101】

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3をさらに含み、前記アンチセンス鎖は、ヌクレオチド配列4をさらに含み、前記ヌクレオチド配列3と前記ヌクレオチド配列4は、長さがそれぞれ1~4ヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列3は、前記ヌクレオチド配列1の5'末端に結合され、前記ヌクレオチド配列4は、前記ヌクレオチド配列2の3'末端に結合され、前記ヌクレオチド配列3と前記ヌクレオチド配列4は、長さが等しく、基本的に完全に逆相補的又は完全に逆相補的であり、いくつかの具体的な実施形態において、前記ヌクレオチド配列3と前記ヌクレオチド配列4は、完全に逆相補的である。

20

【0102】

したがって、前記センス鎖又はアンチセンス鎖の長さは、独立して19~23ヌクレオチドであってもよい。

【0103】

いくつかの実施形態において、本開示のsiRNAは、以下の群から選択されるヌクレオチド配列3とヌクレオチド配列4を有しても良く、ヌクレオチド配列3とヌクレオチド配列4は、完全に相補的である。

前記ヌクレオチド配列3と前記ヌクレオチド配列4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3の塩基はGである。このとき、前記二本鎖領域の長さは、20ヌクレオチドであってもよく、即ち、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の比が、20/20であってもよく、或いは、

30

前記ヌクレオチド配列3と前記ヌクレオチド配列4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3の塩基は順にU及びGである。このとき、前記二本鎖領域の長さは、21ヌクレオチドであってもよく、即ち、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の比が、21/21であってもよく、或いは、

前記ヌクレオチド配列3と前記ヌクレオチド配列4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、前記ヌクレオチド配列3の塩基は順にU、U及びGである。このとき、前記二本鎖領域の長さは、22ヌクレオチドであってもよく、即ち、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の比が、22/22であってもよく、或いは、

40

前記ヌクレオチド配列3と前記ヌクレオチド配列4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、前記ヌクレオチド配列3の塩基は順にA、U、U及びGである。このとき、前記二本鎖領域の長さは、23ヌクレオチドであってもよく、即ち、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の比が、23/23であってもよい。

【0104】

1つの具体的な実施形態において、前記ヌクレオチド配列3は、長さが2ヌクレオチド

50

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3の塩基は順にU及びGである。

【0105】

上記各群において、ヌクレオチド配列3と前記ヌクレオチド配列4は、長さが同じであり、相補的であるので、ヌクレオチド配列3の塩基が与えられると、ヌクレオチド配列4の塩基も決定される。

【0106】

いくつかの実施形態において、本開示の*s i R N A*には、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、前記アンチセンス鎖の3'オーバーハング端を構成するヌクレオチド配列5がさらに含まれる。

【0107】

このように、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の比は、19/19、19/20、19/21、19/22、20/20、20/21、20/22、20/23、21/21、21/22、21/23、21/24、22/22、22/23、22/24、22/25、23/23、23/24、23/25又は23/26であってもよい。

【0108】

いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列5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、前記ヌクレオチド配列5は、連続した2個のチミンデオキシリボヌクレオチド、連続した2個のウラシルリボヌクレオチド、又は標的*m R N A*と相補的な2つのヌクレオチドである。

【0109】

したがって、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、本開示により提供される*s i R N A*は、より良好なHBV *m R N A*サイレンシング活性及び/又は表面抗原HBsAgの発現を効果的に低下させる活性を有する。

【0110】

いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列1は、配列番号3又は配列番号4に示されるヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列2は、配列番号5、配列番号6、配列番号7及び配列番号8に示されるヌクレオチド配列からなる群より選ばれりいずれか1つのヌクレオチド配列を含む。

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

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

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

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

5' - U A U U C G U U G A C A U A C U U U C U U - 3' (配列番号7)、

5' - U A U U C G U U G A C A U A C U U U C C A - 3' (配列番号8)

【0111】

いくつかの具体的な実施形態において、本開示の*s i R N A*は、以下の*s i P 1*~*s i P 4*のいずれか1つである。

s i P 1

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

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

s i P 2

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

アンチセンス鎖：5' - A A U U C G U U G A C A U A C U U U C C A - 3' (配列番号6)

s i P 3

センス鎖：5' - G A A A G U A U G U C A A C G A A U A - 3' (配列番号4)

10

20

30

40

50

アンチセンス鎖：5' - U A U U C G U U G A C A U A C U U U C U U - 3' (配列番号7)

s i P 4

センス鎖：5' - G A A A G U A U G U C A A C G A A U A - 3' (配列番号4)

アンチセンス鎖：5' - U A U U C G U U G A C A U A C U U U C C A - 3' (配列番号8)

【0112】

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、前記ヌクレオチド配列1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各ヌクレオチドが独立して非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、前記ヌクレオチド配列2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各ヌクレオチドが独立して非フルオロ修飾ヌクレオチドである。

10

【0113】

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、式(101)に示されるヌクレオチドを指す。ここで、Baseは、C、G、A又はUから選択される塩基を表す。

【0114】

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から独立して選択されるいずれか1つである。

20

【0115】

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、例えば、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つであってもよい。

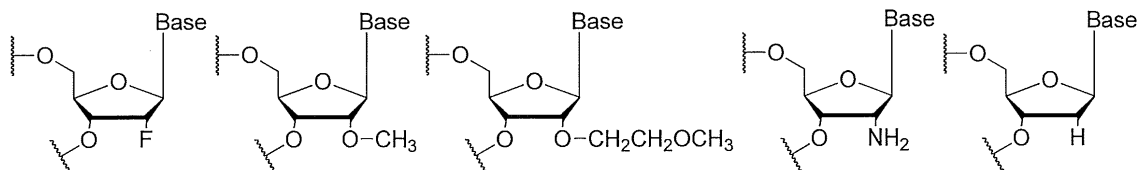
30

【0116】

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)であってもよい。2'-置換アルコキシ修飾ヌクレオチドは、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)であってもよい。2'-アミノ修飾ヌクレオチド(2'-NH₂)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。

【0117】

【化18】



式(101)

式(102)

式(103)

式(104)

式(105)

40

【0118】

ヌクレオチドアナログとは、核酸においてヌクレオチドに取って代わることができるが、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。例えば、イソヌクレオチド、架橋ヌクレオチド(bridged nucleic acid)

50

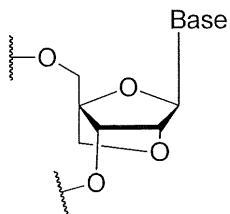
c i d、BNAと略称される)又は非環式ヌクレオチドである。

【0119】

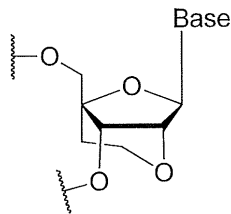
BNAとは、拘束された又は近づけないヌクレオチドを指す。BNAは、五員環、六員環、又は七員環の、「固定された」C3'-エンド糖パッキングを有する架橋構造を含んでもよい。通常当該橋を当該リボースの2'-、4'-位に導入して2',4'-BNAヌクレオチド、例えば、式(106)に示されるLNA、式(107)に示されるENA、式(108)に示されるcET BNA等を提供する。

【0120】

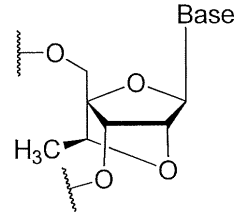
【化19】



式(106)



式(107)



式(108)

10

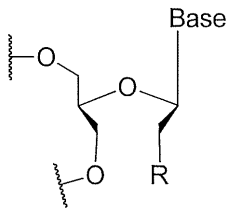
【0121】

非環式ヌクレオチドとは、ヌクレオチドの糖環が開環された「開環」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)を指す。

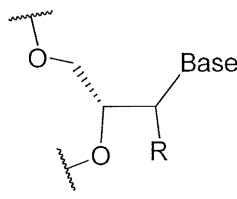
20

【0122】

【化20】



式(109)



式(110)

【0123】

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。

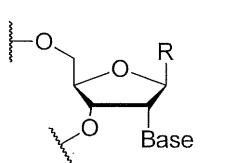
30

【0124】

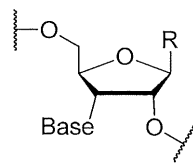
イソヌクレオチドとは、ヌクレオチドにおいて塩基のリボース環における位置が変化した化合物、例えば、式(111)又は式(112)に示される、塩基がリボース環の1'-位から2'-位又は3'-位に移行した化合物を指す。

【0125】

【化21】



式(111)



式(112)

40

【0126】

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。

【0127】

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から選択されるいずれか1つである。いくつかの実施

50

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。

【0128】

本開示の siRNA は、血中のリボヌクレアーゼによる切断に抵抗することにより、核酸の血液安定性を向上させ、核酸の有するヌクレアーゼ加水分解耐性を高めるとともに、高いHBV遺伝子抑制活性を維持することができる。

【0129】

いくつかの実施形態によれば、本開示に記載された siRNA は、動物実験において血漿における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おり、より簡便で、コストがより低いという利点を有するものもある。以下はいくつかの例である。

10

【0130】

いくつかの実施形態によれば、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1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2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。

【0131】

20

いくつかの実施形態によれば、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1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2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、或いは、

いくつかの実施形態によれば、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1の第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2の第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、或いは、

30

いくつかの実施形態によれば、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1の第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2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。

【0132】

いくつかの具体的な実施形態において、本開示の siRNA は、表1A内のいずれか1つに示される siRNA である。

40

【0133】

【表 1 A】

本開示のいくつかの具体的な s i R N A 配列

番号	配列方向 5' - 3'	配列番号	
s i H B 1 M 1	センス鎖	G m A m A m A m G m U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m U m	1 1
	アンチセンス鎖	A m A f U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m U m U m	1 3
s i H B 2 M 1	センス鎖	G m A m A m A m G m U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m U m	1 1
	アンチセンス鎖	A m A f U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m C m A m	1 4
s i H B 3 M 1	センス鎖	G m A m A m A m G m U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	1 2
	アンチセンス鎖	U m A f U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m U m U m	1 5
s i H B 4 M 1	センス鎖	G m A m A m A m G m U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	1 2
	アンチセンス鎖	U m A f U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m C m A m	1 6
s i H B 1 M 2	センス鎖	G m A m A m A m G f U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m U m	1 7
	アンチセンス鎖	A m A f U m U m C m G f U m U f G f A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m U m U m	1 9
s i H B 2 M 2	センス鎖	G m A m A m A m G f U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m U m	1 7
	アンチセンス鎖	A m A f U m U m C m G f U m U f G f A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m C m A m	2 0
s i H B 3 M 2	センス鎖	G m A m A m A m G f U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	1 8
	アンチセンス鎖	U m A f U m U m C m G f U m U f G f A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m U m U m	2 1
s i H B 4 M 2	センス鎖	G m A m A m A m G f U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	1 8
	アンチセンス鎖	U m A f U m U m C m G f U m U f G f A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m C m A m	2 2
s i H B 1 M 3	センス鎖	G m A m A m A m G f U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m U m	1 7
	アンチセンス鎖	A m A f U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m U m U m	1 3
s i H B 2 M 3	センス鎖	G m A m A m A m G f U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m U m	1 7
	アンチセンス鎖	A m A f U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m C m A m	1 4
s i H B 3 M 3	センス鎖	G m A m A m A m G f U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	1 8
	アンチセンス鎖	U m A f U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m U m U m	1 5
s i H B	センス鎖	G m A m A m A m G f U m A f U f G f U m C m A m A m C m	1 8

10

20

30

40

4 M 3		G m A m A m U m A m	
	アンチセンス鎖	U m A f U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m C m A m	1 6
s i H B 5 M 1	センス鎖	U m G m G m A m A m A m G m U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	5 1
	アンチセンス鎖	U m A f U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m C m A m U m U m	5 2
s i H B 6 M 2	センス鎖	U m G m G m A m A m A m G f U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	5 1
	アンチセンス鎖	U m A f U m U m C m G f U m U f G f A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m C m A m A m U m	5 3
S i H B 7 M 3	センス鎖	U m G m G m A m A m A m G f U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m U m	5 4
	アンチセンス鎖	A m A f U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m C m A m U m U m	5 5

10

【 0 1 3 4 】

いくつかの実施形態において、本開示の s i R N A は、他の修飾ヌクレオチド基をさらに含むが、前記修飾ヌクレオチド基により、前記 s i R N A が H B V 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はない。

【 0 1 3 5 】

20

現在、本分野では、s i R N A の修飾に使用できる方法が複数あり、上で言及されたりボース基修飾のほか、骨格修飾（例えば、リン酸基修飾）及び塩基修飾等を含む（例えば、Watts, J. K., G. F. Deleavey and M. J. Damha, Chemically modified siRNA: tools and applications. Drug Discov Today, 2008, 13 (19-20): p. 842-55を参照のこと。引用によりその全体を本明細書に組み込む）。本開示に記載された s i R N A のいくつかの実施形態において、前記修飾ヌクレオチド基は、リボース基及び任意のリン酸基が修飾されたヌクレオチド基であるが、これに限定されない。

【 0 1 3 6 】

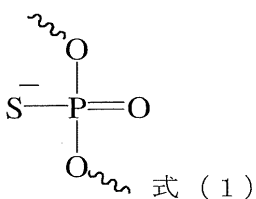
30

いくつかの実施形態によれば、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の少なくとも1個は、修飾基を有するリン酸エステル基である。前記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り、式(1)に示されるチオリン酸(phosphorothioate)構造のように、1つの硫黄原子でリン酸ジエステル結合における非架橋酸素原子を置換することにより、チオリン酸ジエステル結合でリン酸ジエステル結合を置換し、即ち、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てもよい。当該修飾により、s i R N A の構造を安定化させ、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。

40

【 0 1 3 7 】

【 化 2 2 】



【 0 1 3 8 】

いくつかの実施形態によれば、前記 s i R N A において、以下のヌクレオチド間の結合

50

からなる群より選ばれる少なくとも1つは、チオリン酸エステル基による結合である。

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の結合、

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の結合、

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の結合、

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の結合、

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の結合、

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の結合、

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の結合、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の結合。

【0139】

いくつかの具体的な実施形態において、本開示の*siRNA*は、表1B内のいずれか1つに示される*siRNA*である。

【0140】

10

20

【表 1 B】

本開示のいくつかの具体的な s i R N A 配列(チオリン酸エステル基による結合を含む)

番号	配列方向 5' - 3'	配列番号	
s i H B 1 M 1 S	センス鎖	G m s A m s A m A m G m U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m U m	2 3
	アンチセ ンス鎖	A m s A f s U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m s U m s U m	2 5
s i H B 2 M 1 S	センス鎖	G m s A m s A m A m G m U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m U m	2 3
	アンチセ ンス鎖	A m s A f s U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m s C m s A m	2 6
s i H B 3 M 1 S	センス鎖	G m s A m s A m A m G m U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	2 4
	アンチセ ンス鎖	U m s A f s U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m s U m s U m	2 7
s i H B 4 M 1 S	センス鎖	G m s A m s A m A m G m U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	2 4
	アンチセ ンス鎖	U m s A f s U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m s C m s A m	2 8
s i H B 1 M 2 S	センス鎖	G m s A m s A m A m G f U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m U m	2 9
	アンチセ ンス鎖	A m s A f s U m U m C m G f U m U f G f A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m s U m s U m	3 1
s i H B 2 M 2 S	センス鎖	G m s A m s A m A m G f U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m U m	2 9
	アンチセ ンス鎖	A m s A f s U m U m C m G f U m U f G f A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m s C m s A m	3 2
s i H B 3 M 2 S	センス鎖	G m s A m s A m A m G f U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	3 0
	アンチセ ンス鎖	U m s A f s U m U m C m G f U m U f G f A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m s U m s U m	3 3
s i H B 4 M 2 S	センス鎖	G m s A m s A m A m G f U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	3 0
	アンチセ ンス鎖	U m s A f s U m U m C m G f U m U f G f A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m s C m s A m	3 4
s i H B 1 M 3 S	センス鎖	G m s A m s A m A m G f U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m U m	2 9
	アンチセ ンス鎖	A m s A f s U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m s U m s U m	2 5
s i H B 2 M 3 S	センス鎖	G m s A m s A m A m G f U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m U m	2 9
	アンチセ ンス鎖	A m s A f s U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m s C m s A m	2 6
s i H B 3 M 3 S	センス鎖	G m s A m s A m A m G f U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	3 0
	アンチセ ンス鎖	U m s A f s U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m s U m s U m	2 7
s i H B	センス鎖	G m s A m s A m A m G f U m A f U f G f U m C m A m A m	3 0

10

20

30

40

4 M 3 S		C m G m A m A m U m A m	
	アンチセンス鎖	U m s A f s U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m s C m s A m	2 8
s i H B 5 M 1 S	センス鎖	U m s G m s G m A m A m A m G m U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	5 6
	アンチセンス鎖	U m s A f s U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m C m A m U s m s U m	5 7
s i H B 6 M 2 S	センス鎖	U m s G m s G m A m A m A m G f U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	5 6
	アンチセンス鎖	U m s A f s U m U m C m G f U m U f G f A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m C m A m s A m s U m	5 8
S i H B 7 M 3 S	センス鎖	U m s G m s G m A m A m A m G f U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m U m	5 9
	アンチセンス鎖	A m s A f s U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m C m A m s U m s U m	6 0

10

【 0 1 4 1 】

いくつかの実施形態において、前記 s i R N A 分子のアンチセンス鎖配列の 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る。

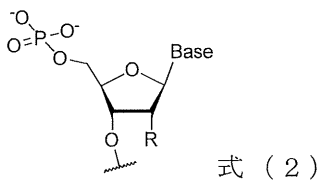
【 0 1 4 2 】

5 ' - リン酸ヌクレオチドが式 (2) に示される構造を有することは、当業者によく知られている。

20

【 0 1 4 3 】

【 化 2 3 】



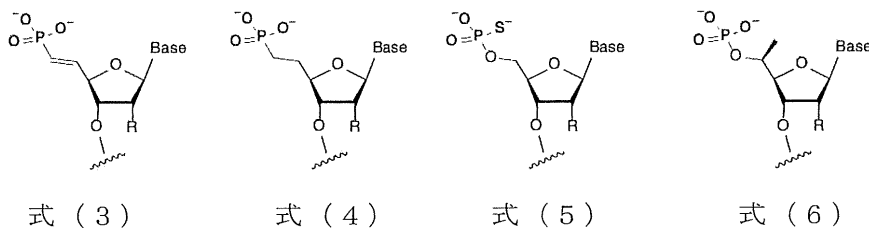
【 0 1 4 4 】

慣用の前記 5 ' - リン酸アナログ修飾ヌクレオチドの種類は、当業者によく知られている。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、以下の式 (3) ~ 式 (6) 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。

30

【 0 1 4 5 】

【 化 2 4 】



40

ただし、R は H、OH、F 及びメトキシ基からなる群から選択される基を表し、Base は A、U、C、G 又は T から選択される塩基を表す。

【 0 1 4 6 】

いくつかの具体的な実施形態において、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 (E - v i n y l p h o s p h o n a t e、E

50

- VP)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を含むヌクレオチドである。

【0147】

いくつかの具体的な実施形態において、本開示の siRNA は、表 1 C 又は表 1 D 内のいずれか 1 つに示される siRNA である。

【0148】

【表 1 C】

本開示のいくつかの具体的な s i R N A 配列（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を含む）

番号	配列方向 5' - 3'	配列番号	
s i H B 1 M 1 P	センス鎖	G m A m A m A m G m U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m U m	1 1
	アンチセ センス鎖	P 1 - A m A f U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m U m U m	3 5
s i H B 2 M 1 P	センス鎖	G m A m A m A m G m U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m U m	1 1
	アンチセ センス鎖	P 1 - A m A f U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m C m A m	3 6
s i H B 3 M 1 P	センス鎖	G m A m A m A m G m U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	1 2
	アンチセ センス鎖	P 1 - U m A f U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m U m U m	3 7
s i H B 4 M 1 P	センス鎖	G m A m A m A m G m U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	1 2
	アンチセ センス鎖	P 1 - U m A f U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m C m A m	3 8
s i H B 1 M 2 P	センス鎖	G m A m A m A m G f U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m U m	1 7
	アンチセ センス鎖	P 1 - A m A f U m U m C m G f U m U f G f A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m U m U m	3 9
s i H B 2 M 2 P	センス鎖	G m A m A m A m G f U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m U m	1 7
	アンチセ センス鎖	P 1 - A m A f U m U m C m G f U m U f G f A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m C m A m	4 0
s i H B 3 M 2 P	センス鎖	G m A m A m A m G f U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	1 8
	アンチセ センス鎖	P 1 - U m A f U m U m C m G f U m U f G f A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m U m U m	4 1
s i H B 4 M 2 P	センス鎖	G m A m A m A m G f U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	1 8
	アンチセ センス鎖	P 1 - U m A f U m U m C m G f U m U f G f A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m C m A m	4 2
s i H B 1 M 3 P	センス鎖	G m A m A m A m G f U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m U m	1 7
	アンチセ センス鎖	P 1 - A m A f U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m U m U m	3 5
s i H B 2 M 3 P	センス鎖	G m A m A m A m G f U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m U m	1 7
	アンチセ センス鎖	P 1 - A m A f U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m C m A m	3 6
s i H B 3 M 3 P	センス鎖	G m A m A m A m G f U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	1 8
	アンチセ センス鎖	P 1 - U m A f U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m U m U m	3 7

10

20

30

40

s i H B 4 M 3 P	センス鎖	G m A m A m A m G f U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	1 8
	アンチセ ンス鎖	P 1 - U m A f U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m C m A m	3 8
s i H B 5 M 1 P	センス鎖	U m G m G m A m A m A m G m U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	5 1
	アンチセ ンス鎖	P 1 - U m A f U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m C m A m U m U m	6 1
s i H B 6 M 2 P	センス鎖	U m G m G m A m A m A m G f U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	5 1
	アンチセ ンス鎖	P 1 - U m A f U m U m C m G f U m U f G f A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m C m A m A m U m	6 2
S i H B 7 M 3 P	センス鎖	U m G m G m A m A m A m G f U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m U m	5 4
	アンチセ ンス鎖	P 1 - A m A f U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m C m A m U m U m	6 3

【 0 1 4 9 】

【表 1 D】

本開示のいくつかの具体的な s i R N A 配列(チオリン酸エステル基による結合及び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を同時に含む)

番号	配列方向 5' - 3'	配列番号	
s i H B 1 M 1 S P	センス鎖	G m s A m s A m A m G m U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m U m	2 3
	アンチセンス鎖	P 1 - A m s A f s U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m s U m s U m	4 3
s i H B 2 M 1 S P	センス鎖	G m s A m s A m A m G m U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m U m	2 3
	アンチセンス鎖	P 1 - A m s A f s U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m s C m s A m	4 4
s i H B 3 M 1 S P	センス鎖	G m s A m s A m A m G m U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	2 4
	アンチセンス鎖	P 1 - U m s A f s U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m s U m s U m	4 5
s i H B 4 M 1 S P	センス鎖	G m s A m s A m A m G m U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	2 4
	アンチセンス鎖	P 1 - U m s A f s U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m s C m s A m	4 6
s i H B 1 M 2 S P	センス鎖	G m s A m s A m A m G f U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m U m	2 9
	アンチセンス鎖	P 1 - A m s A f s U m U m C m G f U m U f G f A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m s U m s U m	4 7
s i H B 2 M 2 S P	センス鎖	G m s A m s A m A m G f U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m U m	2 9
	アンチセンス鎖	P 1 - A m s A f s U m U m C m G f U m U f G f A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m s C m s A m	4 8
s i H B 3 M 2 S P	センス鎖	G m s A m s A m A m G f U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	3 0
	アンチセンス鎖	P 1 - U m s A f s U m U m C m G f U m U f G f A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m s U m s U m	4 9
s i H B 4 M 2 S P	センス鎖	G m s A m s A m A m G f U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	3 0
	アンチセンス鎖	P 1 - U m s A f s U m U m C m G f U m U f G f A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m s C m s A m	5 0
s i H B 1 M 3 S P	センス鎖	G m s A m s A m A m G f U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m U m	2 9
	アンチセンス鎖	P 1 - A m s A f s U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m s U m s U m	4 3
s i H B 2 M 3 S P	センス鎖	G m s A m s A m A m G f U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m U m	2 9
	アンチセンス鎖	P 1 - A m s A f s U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m s C m s A m	4 4
s i H B 3 M 3 S P	センス鎖	G m s A m s A m A m G f U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	3 0
	アンチセンス鎖	P 1 - U m s A f s U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m s U m s U m	4 5

10

20

30

40

s i H B 4 M 3 S P	センス鎖	G m s A m s A m A m G f U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	3 0
	アンチセンス鎖	P 1 - U m s A f s U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m s C m s A m	4 6
s i H B 5 M 1 S P	センス鎖	U m s G m s G m A m A m A m G m U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	5 6
	アンチセンス鎖	P 1 - U m s A f s U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m C m A m s U m s U m	6 4
s i H B 6 M 2 S P	センス鎖	U m s G m s G m A m A m A m G f U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	5 6
	アンチセンス鎖	P 1 - U m s A f s U m U m C m G f U m U f G f A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m C m A m s A m s U m	6 5
S i H B 7 M 3 S P	センス鎖	U m s G m s G m A m A m A m G f U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m U m	5 9
	アンチセンス鎖	P 1 - A m s A f s U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m C m A m s U m s U m	6 6

10

【 0 1 5 0 】

本開示の発明者は、本開示に記載された s i R N A、例えば上記表 1 A ~ 1 D 内に示される s i R N A が、血漿及びリソソームにおける安定性が顕著に向上するとともに、予想外の H B V m R N A サイレンシング活性及び優れた H B s A g 抑制作用をさらに示すことができることを意外にも見出した。

20

【 0 1 5 1 】

当業者であれば明らかに知っているように、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、本開示に記載された s i R N A、例えば上記表 1 A ~ 1 D に示される s i R N A を得ることができる。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チ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チ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。

30

【 0 1 5 2 】

< 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。

【 0 1 5 3 】

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、Fe₃O₄ 又は Fe₂O₃ 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 dendrimer (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 - dioleoyl - 3 - trimethyl ammonium - 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 - dimethyl aminoethyl methacrylate)、PDMAEMA) 並びにこれらの誘導体の 1 又は複数があるが、こ

40

50

れらに限定されない。

【0154】

いくつかの実施形態において、前記薬物組成物における s i R N A 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、s i R N A と薬学的に許容可能な担体との重量比が、1 : (1 ~ 5 0 0) であってもよい。いくつかの具体的な実施形態においては、上記重量比が 1 : (1 ~ 5 0) である。

【0155】

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、p H 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。

10

【0156】

前記 p H 緩衝液は、p H 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 (t r i s (h y d r o x y m e t h y l) a m i n o m e t h a n e h y d r o c h l o r i d e b u f f e r) 及び / 又は p H 5 . 5 ~ 8 . 5 のリン酸塩緩衝液であってもよく、例えば、p H 5 . 5 ~ 8 . 5 のリン酸塩緩衝液であってもよい。

【0157】

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 . 0 1 ~ 3 0 重量 % であってもよい。

20

【0158】

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 2 0 0 ~ 7 0 0 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。

【0159】

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。いくつかの具体的な実施形態において、前記薬物組成物は、静脈注射投与に用いられる。

30

【0160】

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 P E G 化脂質を含む。ここで、前記有機アミン、補助脂質及び P E G 化脂質は、C N 1 0 3 3 8 0 1 1 3 A (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 P E G 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。

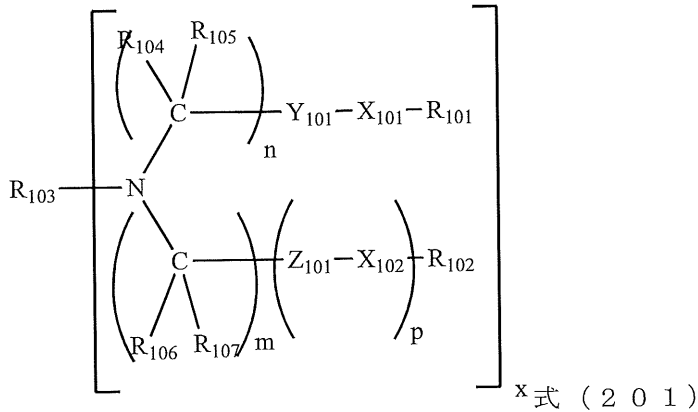
40

【0161】

いくつかの実施形態において、前記有機アミンは、C N 1 0 3 3 8 0 1 1 3 A に記載された式 (2 0 1) 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。

【0162】

【化25】



10

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_{101} 及び Z_{101} はそれぞれ独立して $C=O$ 、 $C=S$ 、 $S=O$ 、 $CH-OH$ 又は SO_2 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、

20

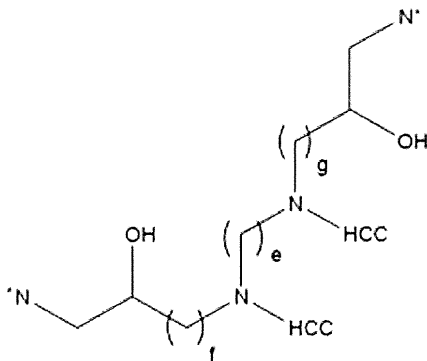
x は 1 ~ 10 の整数であり、

n は 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 及び p がいずれも 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)における窒素とは、式(202)又は式(203)に示される構造を形成する。

【0163】

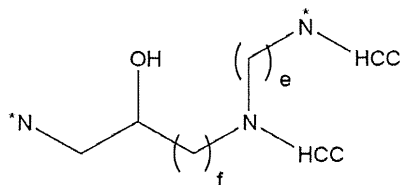
【化26】



30

式(202)、

40



式(203)

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)に示される窒素原子を表す。

【0164】

いくつかの実施形態において、 R_{103} はポリアミンである。他の実施形態において、

50

R₁₀₃ 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 R₁₀₁ 及び R₁₀₂ 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。

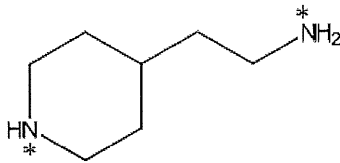
【0165】

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、R₁₀₃ は、下記式(204) ~ 式(213)のいずれか1つであってもよい。

【0166】

【化27】

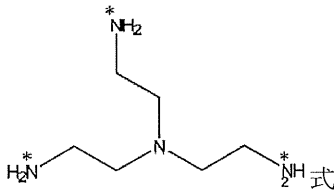
10



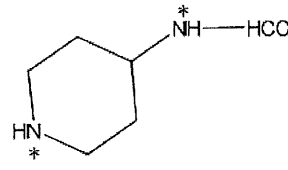
式(204)、



式(205)、

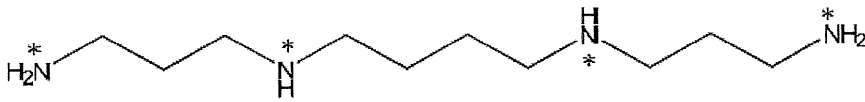


式(206)、

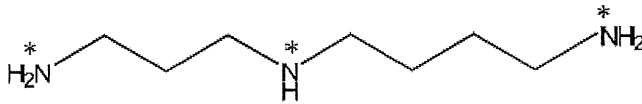


式(207)、

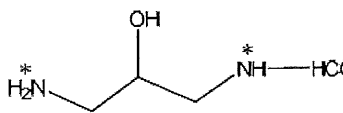
20



式(208)、

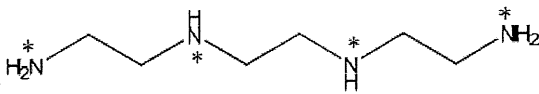


式(209)、

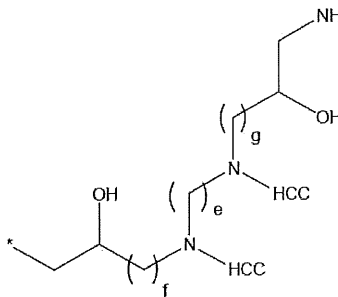


式(210)、

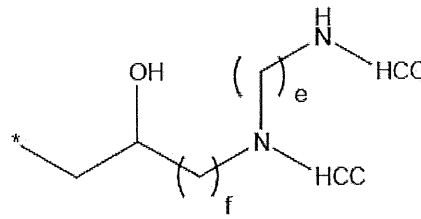
30



式(211)、



式(212)及び



式(213)

40

式(204) ~ 式(213)中、各「HCC」は炭化水素鎖を表し、各*はR₁₀₃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の結合を実現するために置換されてもよい。

【0167】

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。

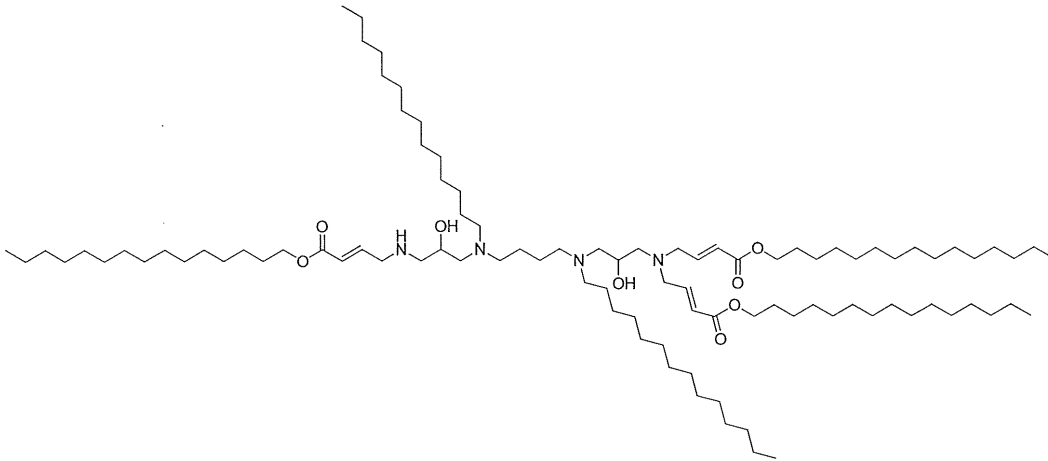
【0168】

いくつかの具体的な実施形態において、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。

50

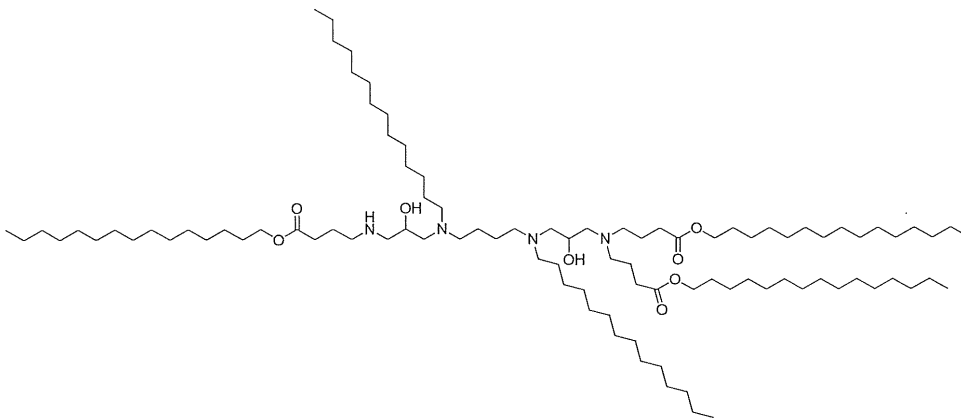
【 0 1 6 9 】

【 化 2 8 】



10

式 (2 1 4)、



20

式 (2 1 5)

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、

30

前記 P E G 化脂質は、1, 2 - ジパルミトアミド - s n - 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 である。

【 0 1 7 0 】

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 P E G 化脂質のモル比は (1 9 . 7 ~ 8 0) : (1 9 . 7 ~ 8 0) : (0 . 3 ~ 5 0) であり、例えば、(5 0 ~ 7 0) : (2 0 ~ 4 0) : (3 ~ 2 0) であってもよい。

【 0 1 7 1 】

いくつかの実施形態において、本開示の s i R N A 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 3 0 n m ~ 約 2 0 0 n m の平均径を有し、一般に約 4 0 n m ~ 約 1 3 5 n m 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 5 0 n m ~ 約 1 2 0 n m、約 5 0 n m ~ 約 1 0 0 n m、約 6 0 n m ~ 約 9 0 n m 又は約 7 0 n m ~ 約 9 0 n m であり、例えば、当該リポソーム粒子の平均径は、約 3 0、4 0、5 0、6 0、7 0、7 5、8 0、8 5、9 0、1 0 0、1 1 0、1 2 0、1 3 0、1 4 0、1 5 0 又は 1 6 0 n m である。

40

【 0 1 7 2 】

いくつかの実施形態において、本開示の s i R N A 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、s i R N A と全脂質 (例えば有機アミン、補助脂質及び / 又は P E G 化脂質) の重量比 (重量 / 重量比) は、約 1 : 1 ~ 約 1 : 5 0、約 1 : 1 ~ 約 1 : 3 0、約 1 : 3 ~ 約 1 : 2 0、約 1 : 4 ~ 約 1 : 1 8、約 1 : 5 ~

50

約 1 : 1 7、約 1 : 5 ~ 約 1 : 1 5、約 1 : 5 ~ 約 1 : 1 2、約 1 : 6 ~ 約 1 : 1 2 又は約 1 : 6 ~ 約 1 : 1 0 の範囲内にあり、例えば、本開示の s i R N A と全脂質の重量比は約 1 : 5、1 : 6、1 : 7、1 : 8、1 : 9、1 : 1 0、1 : 1 1、1 : 1 2、1 : 1 3、1 : 1 4、1 : 1 5、1 : 1 6、1 : 1 7 又は 1 : 1 8 である。

【 0 1 7 3 】

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 s i R N A 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 s i R N A の代わりに本開示により提供される s i R N A を用いればよい。いくつかの具体的な実施形態において、以下の方法に従い調製されてもよい。

10

【 0 1 7 4 】

有機アミン、補助脂質及び P E G 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 ~ 2 5 m g / m L、例えば、8 ~ 1 8 m g / m L 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 2 0 0、ポリエチレングリコール 3 0 0、ポリエチレングリコール 4 0 0 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もよい。

20

【 0 1 7 5 】

本開示により提供される s i R N A を緩衝塩溶液に溶解し、s i R N A 水溶液を得る。緩衝塩溶液の濃度が 0 . 0 5 ~ 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 p H 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、s i R N A の濃度が 0 . 6 m g / m L 以下、例えば、0 . 2 ~ 0 . 4 m g / m L 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もよい。

30

脂質溶液と s i R N A 水溶液を混合した後、得られた生成物を 4 0 ~ 6 0 °C で少なくとも 2 分間、例えば、5 ~ 3 0 分間培養し、培養したりポソーム製剤を得る。脂質溶液と s i R N A 水溶液の体積比は 1 : (2 ~ 5)、例えば、1 : 4 であってもよい。

【 0 1 7 6 】

培養したり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、p H が 6 . 5 ~ 8 であり、封入効率が 8 0 % 以上であり、粒子径が 4 0 ~ 2 0 0 n m であり、多分散指数が 0 . 3 0 以下であり、浸透圧が 2 5 0 ~ 4 0 0 m O s m / k g であり、例えば、物理化学的パラメーターとしては、p H が 7 . 2 ~ 7 . 6、封入効率が 9 0 % 以上、粒子径が 6 0 ~ 1 0 0 n m、多分散指数が 0 . 2 0 以下、浸透圧が 3 0 0 ~ 4 0 0 m O s m / k g であってもよい。

40

【 0 1 7 7 】

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、中空糸カラムを用い、1 0 0 K D a の条件で限外濾過し、限外濾過交換溶液を p H 7 . 4 のリン酸塩緩衝液 (P B S) 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 . 2 2 μ m のフィルターで濾過して除菌してもよい。

【 0 1 7 8 】

< 第 1 種の s i R N A 複合体 >

一実施形態において、本開示は、本開示により提供される上記 s i R N A 及び当該 s i R N A に複合して結合されるリガンドを含む s i R N A 複合体を提供する。以下の記載においては、これらの s i R N A 複合体を第 1 種の s i R N A 複合体ともいう。

50

【0179】

前記リガンドの種類及び結合方式は、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。

【0180】

前記 *siRNA* に複合されるリガンドは、薬学的に許容できる複合基であり、一般的には、前記複合基は、薬学的に許容できる標的分子及び任意のリンカー (linker) を含む。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。いくつかの具体的な実施形態において、前記 *siRNA* と複合基との複合部位は、*siRNA* のセンス鎖の 3' 末端にある。

10

【0181】

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く、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。具体的結合方法については、文献 Muthiah Manoharan et al. *siRNA conjugates carrying sequentially assembled trivalent N-acetylgalactosamine linked through nucleosides elicit 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。

20

【0182】

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。

30

【0183】

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標的分子であってよく、例えば、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、ポリエチレングリコール等の高分子、膜透過性ペプチド等のポリペプチド、アプタマー、抗体、量子ドット、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、葉酸 (folate)、又はアシアロ糖タンパク質、アシアロ糖残基、リポタンパク (例えば、高密度リポタンパク、低密度リポタンパク等)、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の 1 種又は複数種を含むが、これらに限定されない。

40

【0184】

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、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)、アシアロ糖タンパク質受容体 (asialoglycoprotein receptor, ASGPR) のリガンドから選択される 1 種又は複数種であってよい。

【0185】

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、アシアロ糖タンパク質受容体のリガンドであり、前記リガンドは、D - マンノピラノース、L - マンノピラノ

50

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、
 - D - マンノフラノース、
 - D - マンノピラノース、
 - D - マンノピラノース、
 - D - グルコピラノース、
 - D - グルコピラノース、
 - D - グルコフラノース、
 - D - グルコフラノース、
 - D - フルクトフラノース、
 - D - フルクトピラノース、
 - D - ガラクトピラノース、
 - D - ガラクトピラノース、
 - D - ガラクトフラノース、
 - 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 - プロピオニルガラクトサミン、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 -
 - 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 -
 - ノイラミン酸、5 - チオ -
 - 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 -
 - D - グルコピラノシド、4 - チオ -
 - 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 -
 - 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 - チオリボースから選択されてもよい。前記リガンドの他の選択肢は、例えば、CN 1 0 5 3 7 8 0 8 2 A 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。

10

20

【 0 1 8 6 】

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、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 s i R N A 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第 1 種の s i R N A 複合体における s i R N A 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 及び 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 s i R N A が N - アセチルガラクトサミンを含む複合分子と複合する場合、N - アセチルガラクトサミン分子は 3 価又は 4 価である。いくつかの具体的な実施形態において、本開示に記載された s i R N A が N - アセチルガラクトサミンを含む複合分子と複合する場合、N - アセチルガラクトサミン分子は 3 価である。

30

【 0 1 8 7 】

本開示に記載された s i R N A が複合分子と複合する場合、複合分子は、適切なリンカーを介して s i R N A 分子に結合されてもよく、当業者は、標的分子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。

【 0 1 8 8 】

例示的な複合基、リンカー、標的分子の種類及び s i R N A への結合方法については、WO 2 0 1 5 0 0 6 7 4 0 A 2 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。

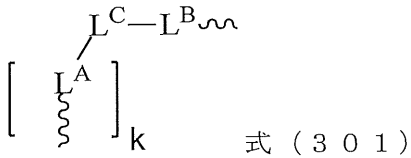
40

【 0 1 8 9 】

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 (3 0 1) に示される構造であってもよい。

【 0 1 9 0 】

【化29】



式中、

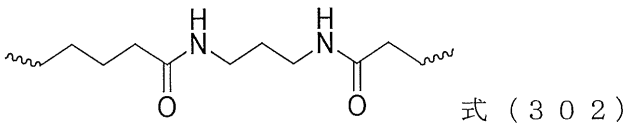
k は 1 ~ 3 の整数であり、

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。

10

【0191】

【化30】

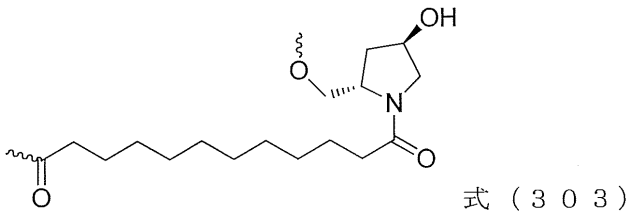


L^B は、式(303)に示される構造を有するN-アシルピロリジンを含む鎖状部であり、前記鎖状部は、その一端にカルボニル基を有し、前記 L^C 部にアミド結合により結合され、他端に酸素基を有し、前記 siRNA にリン酸エステル結合により結合される。

20

【0192】

【化31】



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。

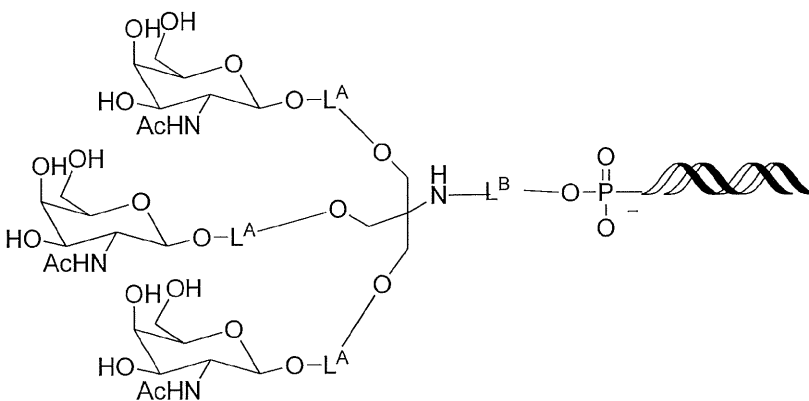
30

【0193】

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。

【0194】

【化32】



40

50

式中、二重螺旋構造は *s i R N A* を表す。

【0195】

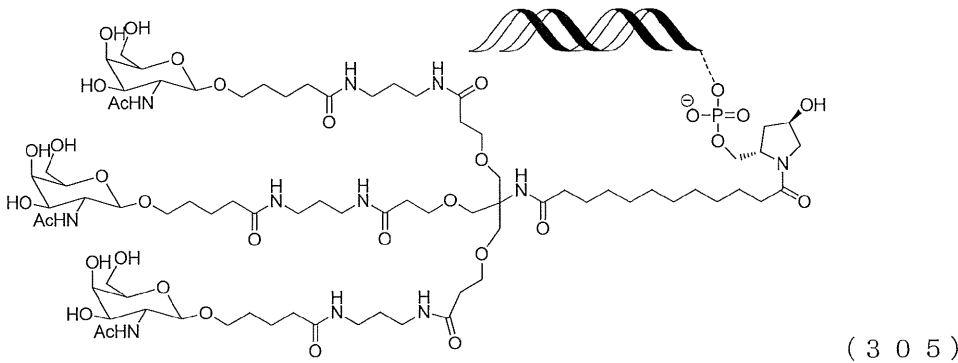
同様に、*s i R N A* と複合分子との複合部位は、*s i R N A* のセンス鎖の3'端又は5'端にあってもよく、アンチセンス鎖の5'端にあってもよく、*s i R N A* の内部配列にあってもよい。

【0196】

いくつかの具体的な実施形態において、本開示に記載された *s i R N A* のセンス鎖の3'末端は、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、*s i R N A* 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 *s i R N A* 複合体 (以下、(GalNAc)₃ - *s i R N A* ともいう) を得る。

【0197】

【化33】



式中、二重螺旋構造は前記 *s i R N A* を表し、

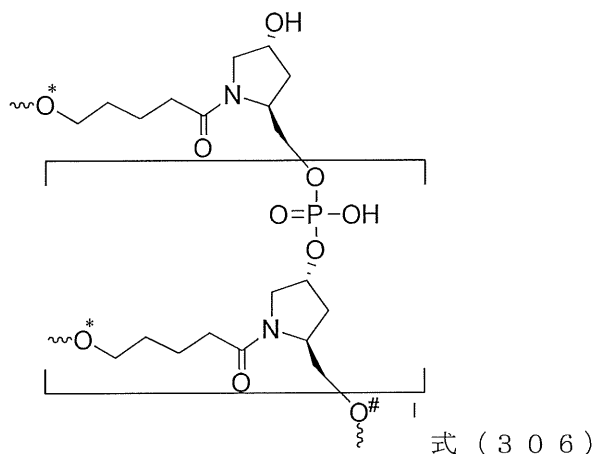
前記リンカーは前記 *s i R N A* のセンス鎖の3'末端に結合される。

【0198】

いくつかの実施形態において、前記標的分子が *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。

【0199】

【化34】



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、

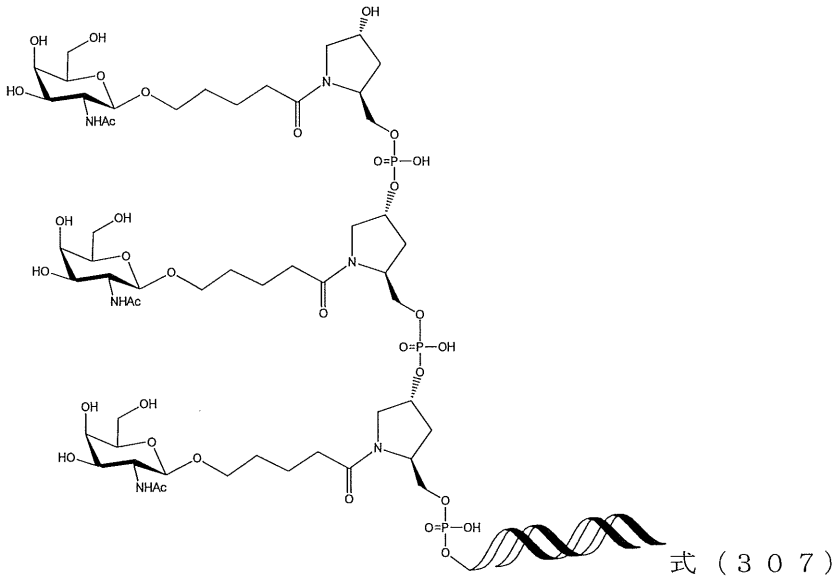
は、リンカーにおいてリン酸エステル結合により *s i R N A* に結合される部位を表す。

【0200】

いくつかの具体的な実施形態において、l = 2 である場合、前記 *s i R N A* 複合体は、式(307)に示される構造を有する。

【 0 2 0 1 】

【 化 3 5 】



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

【 0 2 0 2 】

上記複合分子は、従来技術において既に詳しく記載された方法により合成してもよい。例えば、W O 2 0 1 5 0 0 6 7 4 0 A 2 には、複数種の複合分子の調製が詳しく記載されており、例えば、特に当該開示における実施例 1 4 ~ 1 5 及び実施例 2 1 の記載を参照されたい。また、W O 2 0 1 4 0 2 5 8 0 5 A 1 にも、式 (3 0 5) の複合分子の調製方法が記載されており、例えば、当該開示の明細書における反応式 1 ~ 反応式 8 に示される合成方法、特に実施例 1 ~ 5 の詳しい記載を参照されたい。

【 0 2 0 3 】

当業者によく知られている方法により、本開示の s i R N A を上記複合分子に複合させ、本開示の第 1 種の s i R N A 複合体を得ることができる。

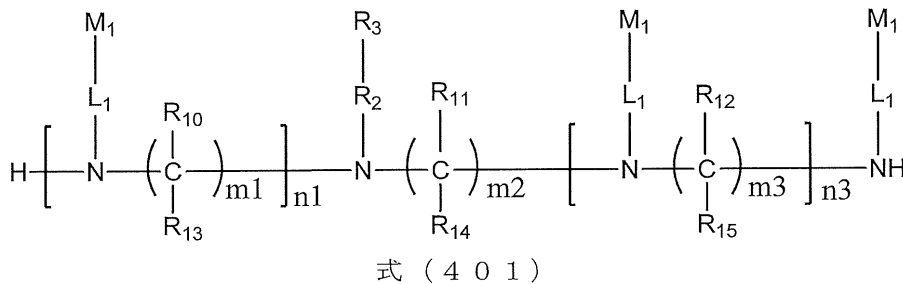
第 2 種の s i R N A 複合体

【 0 2 0 4 】

いくつかの実施形態において、本開示は、式 (4 0 1) に示される構造を有する別の s i R N A 複合体 (以下、第 2 種の s i R N A 複合体ともいう。このような表現形式は、上記第 1 種の s i R N A 複合体と区別して説明しやすくするためのものに過ぎず、両者が範囲又は意味において固有の排他的区別があると認める意味ではない) を提供する。

【 0 2 0 5 】

【 化 3 6 】



式中、

n 1 は、1 ~ 3 から選択される整数であり、n 3 は、0 ~ 4 から選択される整数であり、

m 1、m 2 及び m 3 は独立して、2 ~ 1 0 から選択される整数であり、

R 1 0、R 1 1、R 1 2、R 1 3、R 1 4 及び R 1 5 は、はそれぞれ独立して、H、メ

10

20

30

40

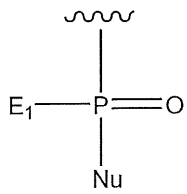
50

チル基又はエチル基の1つであり、

R_3 は式 A 5 9 に示される構造の基である。

【0206】

【化37】



(A 5 9)

10

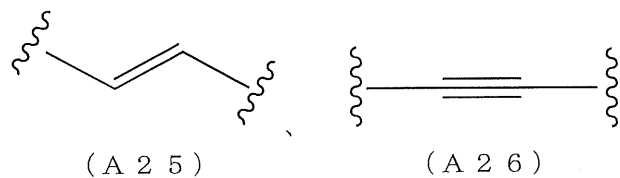
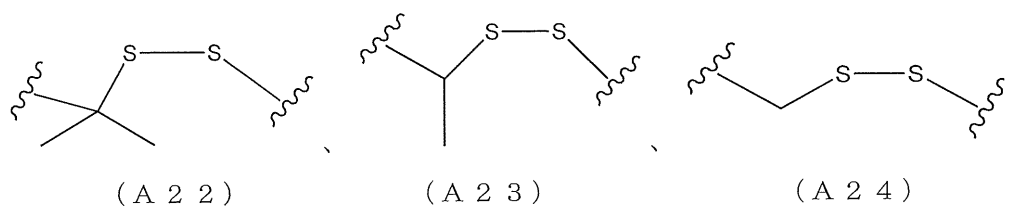
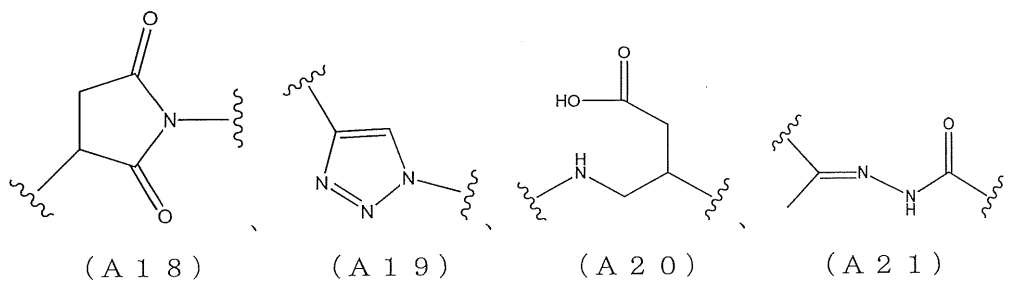
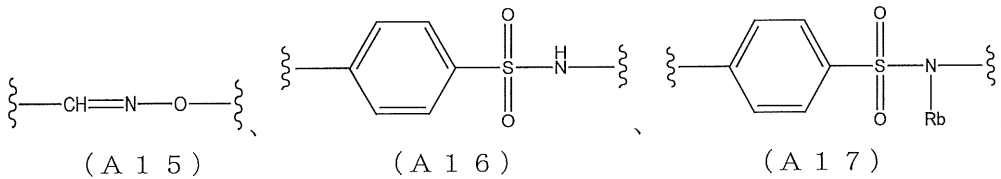
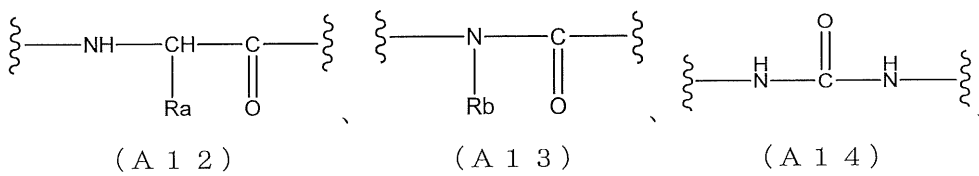
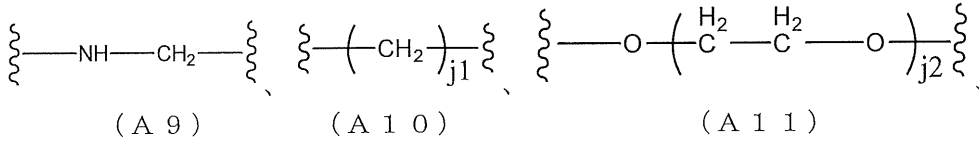
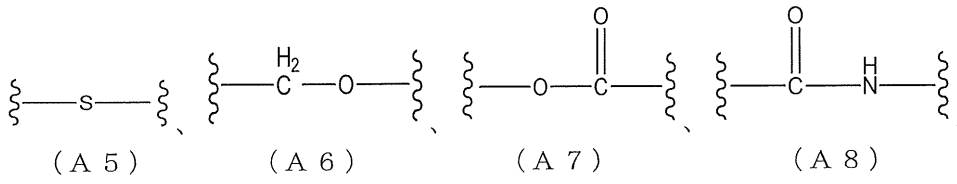
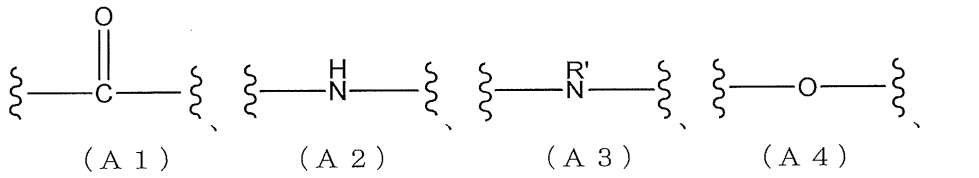
式中、 E_1 は OH、SH 又は BH_2 であり、Nu は本開示により提供される上記 s i R N A であり、

R_2 は、窒素含有骨格上の N と A 5 9 との結合を実現できる任意の基であり、

各 L_1 は、式 A 1 ~ A 2 6 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る。

【0207】

【化 3 8】



ただし、j 1 は 1 ~ 20 の整数であり、j 2 は 1 ~ 20 の整数であり、
 R' は C₁ - C₁₀ のアルキル基であり、
 R_a は、式 A 27 ~ A 45 の基から選択される 1 つである。

【0208】

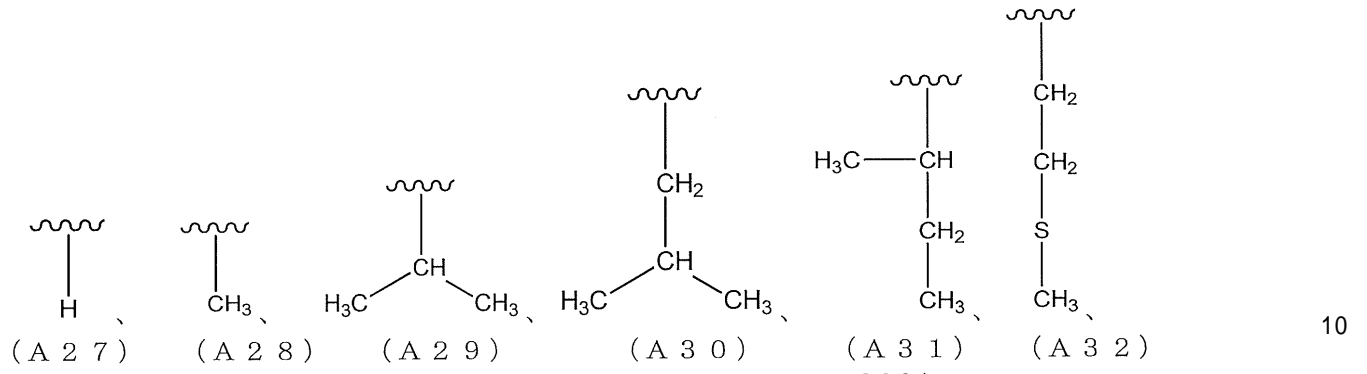
10

20

30

40

【化39】



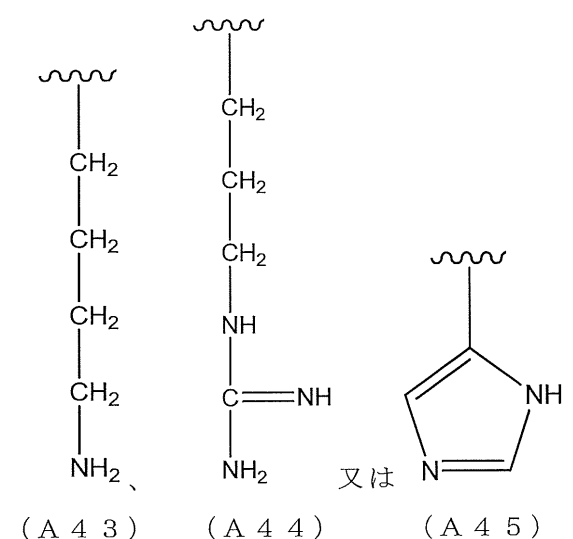
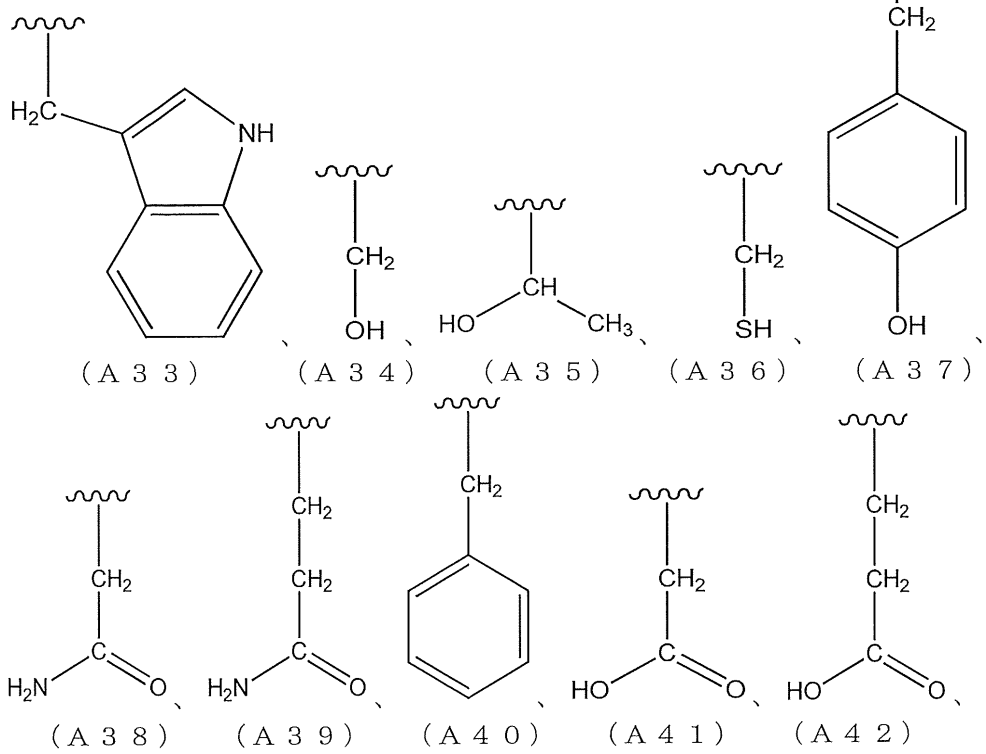
10

20

30

40

50



R bはC₁ - C₁₀のアルキル基であり、
 は、基が共有結合的に結合する部位を表す。

【0209】

各 M_1 は、哺乳動物の肝臓細胞表面におけるアジアロ糖タンパク質受容体 (ASGP-R) に対して親和力を有するリガンドから独立して選択される 1 つである。

【0210】

いくつかの実施形態において、 n_1 は、1 ~ 3 の整数から選択されてもよく、 n_3 は、0 ~ 4 の整数から選択されてもよく、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、 $n_1 + n_3 = 2$ 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。

10

【0211】

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、本開示のいくつかの実施形態によれば、 m_1 、 m_2 及び m_3 は、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。

20

【0212】

当業者に理解され得るように、 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 及び R_{15} が、それぞれ独立して H、メチル基又はエチル基の 1 つである場合、本開示により提供される複合体の性質を変化させることなく、いずれも本開示の目的を実現することができる。しかし、本開示により提供される化合物を簡略化するため、かつ合成しやすくするために、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。

【0213】

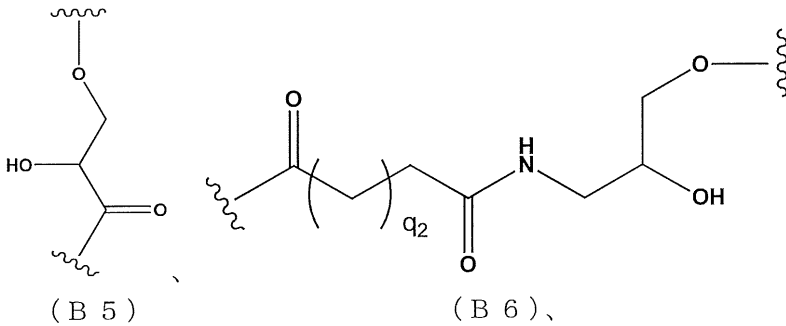
R_2 は、窒素含有骨格上の N と A59 との結合を実現するために選択される。本開示の文脈において、「窒素含有骨格」とは、 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 及び R_{15} が結合された炭素原子と N が互いに結合している鎖状構造を指す。したがって、 R_2 は、適当な方法で A59 基を窒素含有骨格上の N に結合することができる任意のリンカー基であってもよい。いくつかの実施形態において、固相合成プロセスにより本開示の第 2 種の siRNA 複合体を調製する場合に、 R_2 基には、窒素含有骨格上の N に結合される結合部位及び R_3 における P に結合される結合部位がともに含まれる必要がある。いくつかの実施形態において、 R_2 における前記窒素含有骨格中の N に結合される部位は、N とアミド結合を形成し、前記 R_3 上の P に結合される部位は、P とリン酸エステル結合を形成する。いくつかの実施形態において、 R_2 は、B5、B6、B5' 又は B6' であってもよい。

30

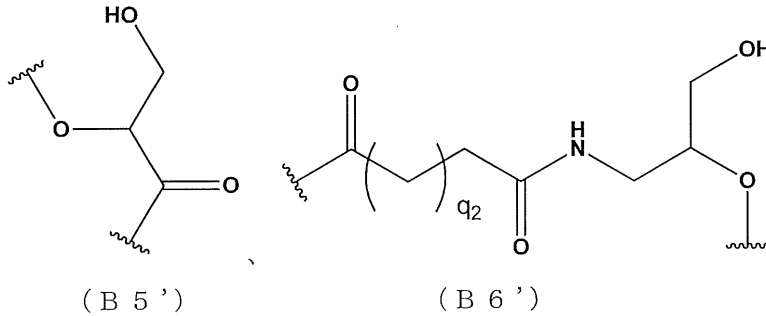
40

【0214】

【化 4 0】



10



ただし、

20

~~~~~

は、基が共有結合的に結合する部位を表す。

## 【0215】

$q_2$  の値の範囲は、1 ~ 10 の整数であってもよく、本開示により提供される複合体を簡略化するために、いくつかの実施形態において、 $q_2$  は 1 ~ 5 の整数である。

## 【0216】

本開示により提供される第 2 種の siRNA 複合体において、調製原料の入手しやすさを考慮すると、一実施形態における  $E_1$  は OH 又は SH である。

## 【0217】

$L_1$  は、 $M_1$  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役割を果たす。 $L_1$  は、式 A 1 ~ A 26 の基から選択される 1 又は複数の結合の組合せである場合、いずれも上記目的を実現できる。 $M_1$  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さらに適合させ、コストを節約するために、いくつかの実施形態において、 $L_1$  は、A 1、A 4、A 5、A 6、A 8、A 10、A 11 及び A 13 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、 $L_1$  は、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。いくつかの実施形態において、 $L_1$  は、A 1、A 8、A 10 から選択される少なくとも 2 つの結合の組合せである。

30

## 【0218】

$L_1$  の上記機能を実現するために、いくつかの実施形態において、 $L_1$  の長さは、3 ~ 25 個の原子、3 ~ 20 個の原子、4 ~ 15 個の原子又は 5 ~ 12 個の原子であってもよい。別に説明がない限り、本明細書の文脈において、前記  $L_1$  の長さとは、 $L_1$  における窒素含有骨格の N 原子に結合される原子から  $M_1$  に結合される原子までの最も長い原子鎖を形成する原子の個数を指す。

40

## 【0219】

式 A 1 ~ A 26 においてそれぞれ  $j_1$ 、 $j_2$ 、 $R'$ 、 $R_a$ 、 $R_b$  の範囲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さらに適合させる。したがって、本開示のいくつかの実施形態において、 $j_1$  は 2 ~ 10 の整数であり、一実施形態において、 $j_1$  は 3 ~ 5 の整数である。 $j_2$  は 2 ~ 10 の整数であり、一実施形態において、 $j_2$  は 3 ~ 5 の整数である。 $R'$  は  $C_1$  -  $C_4$  のアルキル基であり、一実施形

50

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。Raは、A27、A28、A29、A30及びA30の1つであり、一実施形態において、RaはA27又はA28である。Rbは、C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>のアルキル基であり、一実施形態において、Rb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。

#### 【0220】

M<sub>1</sub>は、肝表面のアシアロ糖タンパク質受容体と結合し、複合体が細胞に取り込まれることを促進する役割を果たしているため、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(ASGP-R)に対して親和力を有するリガンドから選択されるいずれか1つであってもよい。これらのリガンドの種類は、当業者に公知である。例えば、各M<sub>1</sub>は、多糖、修飾多糖、単糖又は単糖誘導体から独立して選択されてもよい。いくつかの実施形態において、各M<sub>1</sub>は、グルコース及びその誘導体、マンノース及びその誘導体、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、シアル酸から独立して選択される1つであってもよい。

10

#### 【0221】

いくつかの実施形態において、各M<sub>1</sub>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、  
-D-マンノフラノース、  
-D-マンノピラノース、  
-D-マンノピラノース、  
-D-グルコピラノース、  
-D-グルコピラノース、  
-D-グルコフラノース、  
-D-グルコフラノース、  
-D-フルクトフラノース、  
-D-フルクトピラノース、  
-D-ガラクトピラノース、  
-D-ガラクトピラノース、  
-D-ガラクトフラノース、  
-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-プロピオニルガラクトサミン、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-  
-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-グリコシル-  
-ノイラミン酸、5-チオ-  
-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-  
-D-グルコピラノシド、4-チオ-  
-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-  
-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、L-4-チオリボースから独立して選択されてもよい。いくつかの実施形態において、各M<sub>1</sub>は、いずれもN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)である。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。

20

30

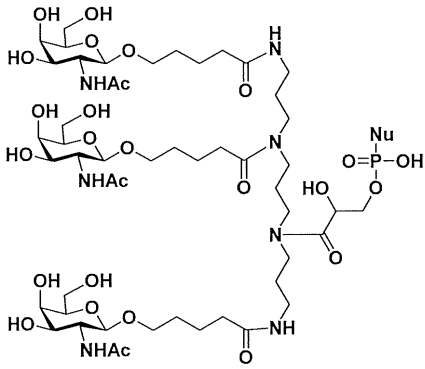
#### 【0222】

本開示のいくつかの具体的な実施形態によれば、本開示の2番目の複合体は、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。

40

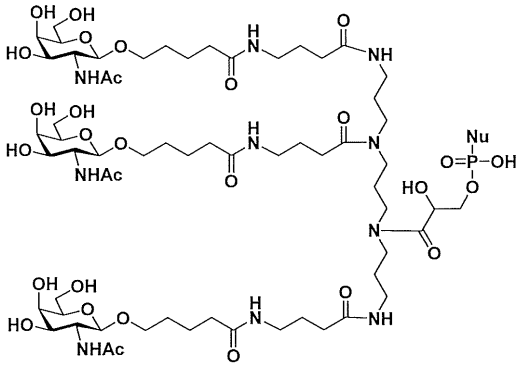
#### 【0223】

【化 4 1】



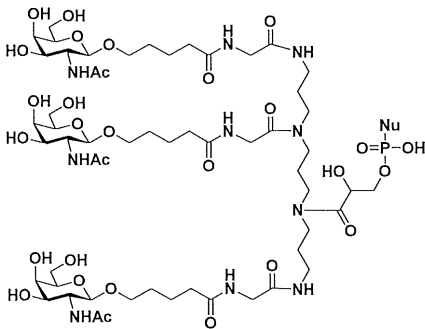
10

式 (403)



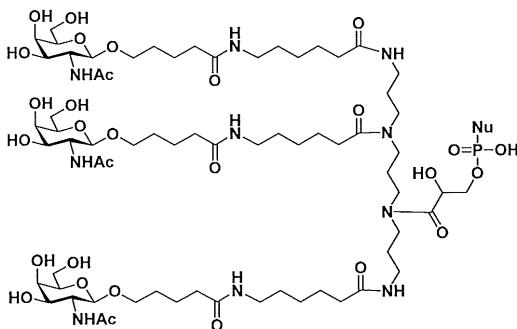
20

式 (404)



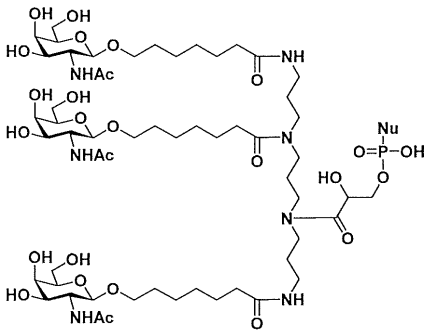
30

式 (405)



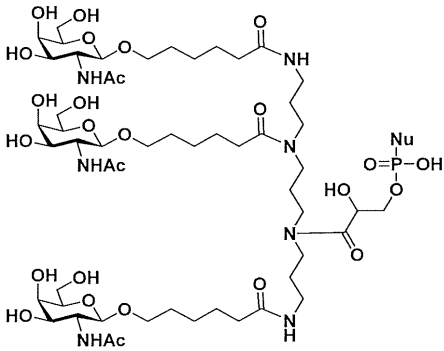
40

式 (406)



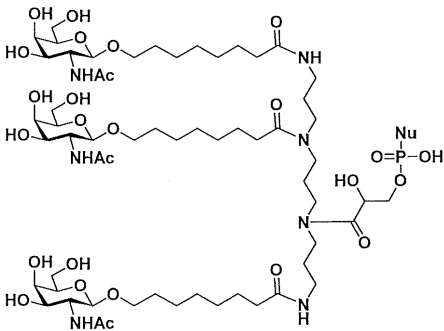
式 (407)

10



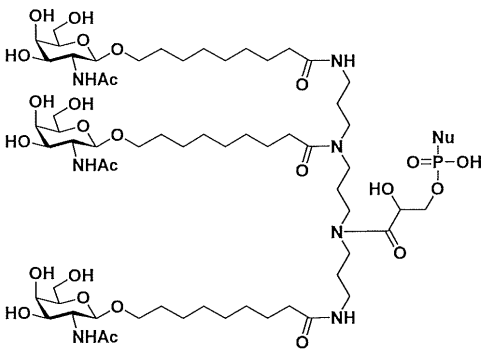
式 (408)

20



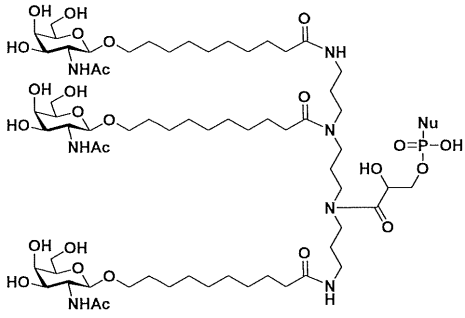
式 (409)

30



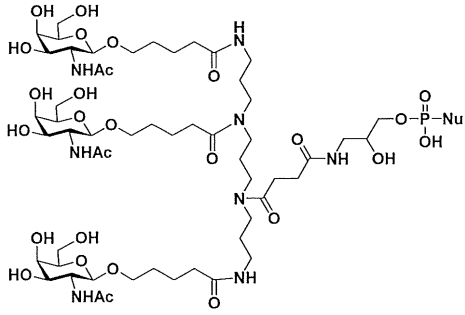
式 (410)

40



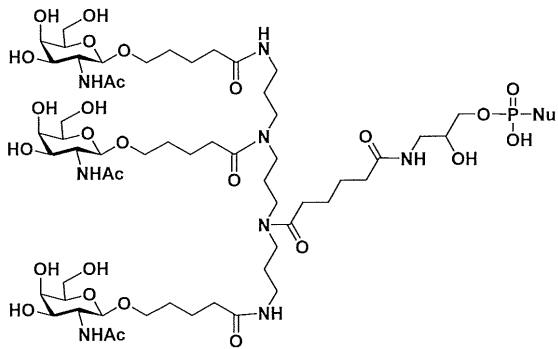
式 (411)

10



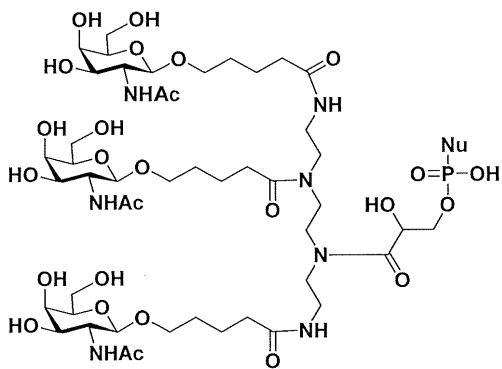
式 (412)

20



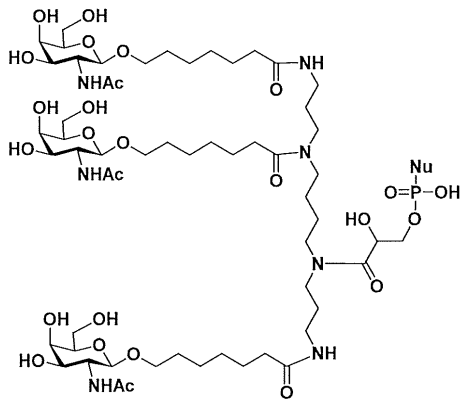
式 (413)

30



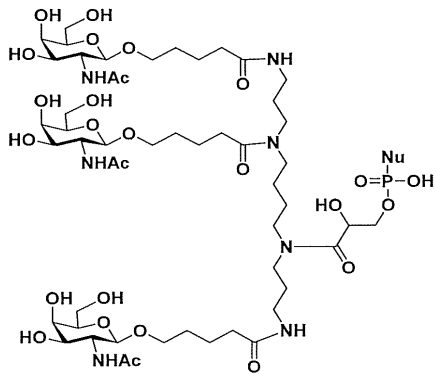
式 (414)

40



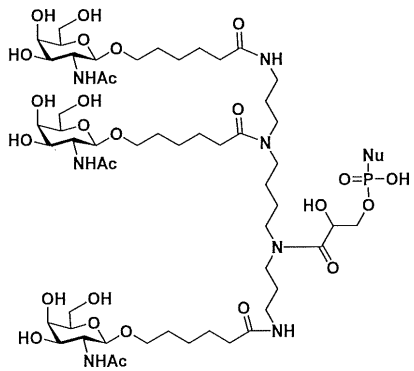
式 ( 4 1 5 )

10



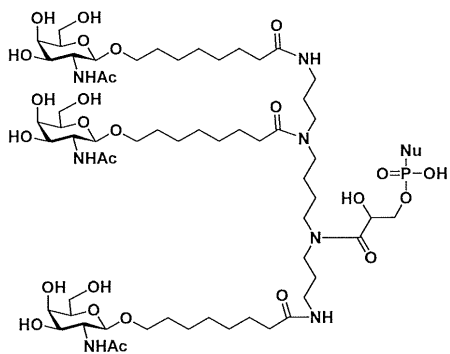
式 ( 4 1 6 )

20



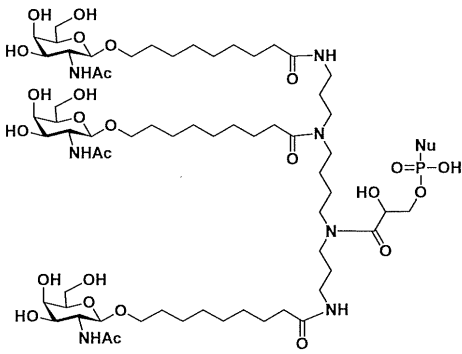
式 ( 4 1 7 )

30



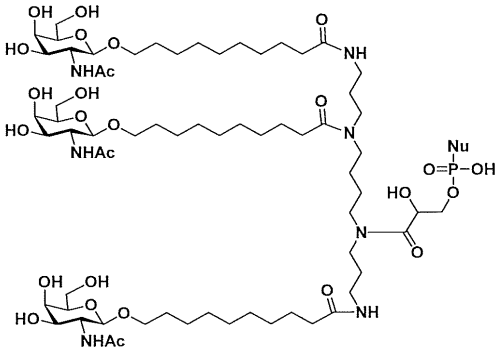
式 ( 4 1 8 )

40



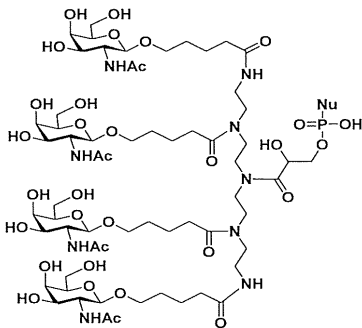
式 ( 4 1 9 )

10



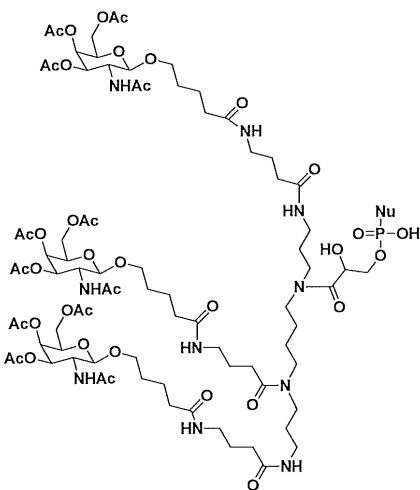
式 ( 4 2 0 )

20



式 ( 4 2 1 )

30



式 ( 4 2 2 )

40

【 0 2 2 4 】

式 A 5 9 における P は、 s i R N A 配列における任意の可能な位置に結合されてもよい。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 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、 P は、 s i R N A 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

50

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 のセンス鎖又はアンチセンス鎖の端部に結合されてもよく、いくつかの実施形態において、P は、s i R N A のセンス鎖の端部に結合される。前記端部とは、前記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 A 5 9 における P は、s i R N A のセンス鎖又はアンチセンス鎖の末端に結合されてもよく、いくつかの実施形態において、P は、s i R N A のセンス鎖の 3 ' 末端に結合される。s i R N A のセンス鎖の上記位置に結合される場合に、本開示により提供される複合体は、細胞に入り込んだ後、巻き戻されるときに、単独の s i R N A のアンチセンス鎖を放出し、H B V の m R N A 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 、 H B V ) 遺伝子発現を抑制することができる。

10

## 【 0 2 2 5 】

式 A 5 9 における P は、s i R N A におけるヌクレオチド上の任意の可能な位置に結合されてもよい。いくつかの実施形態において、式 A 5 9 における P は、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 A 5 9 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前記 s i R N A 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 A 5 9 における P は、s i R N A 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 ( このとき、当該 P 原子及び対応するリン酸エステル基を当該ヌクレオチドに属する P 原子及びリン酸エステル基とみなしてもよい ) 、或いは、式 A 5 9 における P は、s i R N A 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 A 5 9 における P は、s i R N A のセンス鎖の 5 ' 末端のヌクレオチドの 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。

20

## 【 0 2 2 6 】

本開示の発明者は、本開示の第 2 種の s i R N A 複合体、即ち、上記 s i R N A ( 例えば、上記表 1 A ~ 1 D 内に示される s i R N A ) を含む s i R N A 複合体が、顕著に向上した血漿における安定性を有するとともに、明らかに低下していない H B V m R N A サイレンシング活性及び優れた H B s A g と H B V D N A 発現抑制作用をさらに示すことを意外にも見出した。また、本開示の第 2 種の s i R N A 複合体は、さらに低いオフターゲット効果を有する。

30

## 【 0 2 2 7 】

本開示の第 1 種の s i R N A 複合体又は第 2 種の s i R N A 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。

## 【 0 2 2 8 】

< 本開示の第 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。

## 【 0 2 2 9 】

一実施形態において、本開示の第 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、前記 s i R N A は、本開示により提供される上記 s i R N A である。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 ( 3 2 1 ) 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 ( 3 2 1 ) 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 ( 3 2

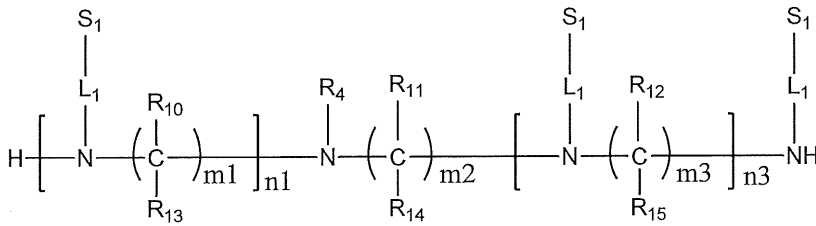
40

50

1) に示される化合物は、複合分子とも呼ばれる。

【0230】

【化42】



式(321)

10

式中、

$R_4$  は、反応させてリン酸ジエステル結合により *siRNA* の任意の官能基に複合することができる基を含み、

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。

【0231】

$n_1$ 、 $n_3$ 、 $m_1$ 、 $m_2$ 、 $m_3$ 、 $R_{10}$ 、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$ 、 $R_{13}$ 、 $R_{14}$ 、 $R_{15}$ 、 $L_1$ 、 $M_1$  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。

【0232】

$R_4$  は、窒素含有骨格上の  $N$  との結合を実現し、式(401)の *siRNA* 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  $R_2$  リンカー基が含まれており、 $R_4$  には、反応させることにより *siRNA* 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。

【0233】

いくつかの実施形態において、 $R_4$  は、*siRNA* 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官能基を含む基1を含み、或いは、基1と基2を含み、基2は、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官能基を含むか、もしくは、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、*siRNA* 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。当該保護されたヒドロキシ基上の保護基は、除去された後、ヒドロキシ基を形成して反応に関与させる。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。前記共有結合を介して結合される固相担体は、リン酸エステル結合を介して結合される固相担体、カルボン酸エステル結合を介して結合される固相担体、又はアミド結合を介して結合される固相担体である。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。

30

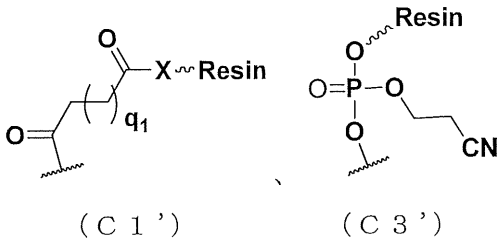
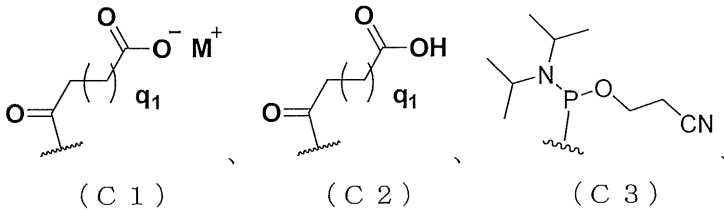
40

【0234】


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

【0235】

## 【化 4 3】



10

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、 $Resin$  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。

## 【0236】

20

いくつかの実施形態において、前記基 1 は、式 (C 3) 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官能基は、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 A 5 9 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  $siRNA$  に複合させることができる。この場合、基 2 が存在しても存在しなくても、式 (4 0 1) に示される  $siRNA$  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  $siRNA$  のセンス鎖又はアンチセンス鎖を得た後、式 (3 2 1) の化合物と、ヌクレオチド配列において末端の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による結合又はチオリン酸エステル結合を形成し、式 (3 2 1) の化合物を  $siRNA$  に複合させる。

30

## 【0237】

いくつかの実施形態において、前記基 1 は、保護されたヒドロキシ基を含み、前記基 2 は、式 (C 1)、(C 2) 又は (C 3) に示されるように、カルボン酸官能基、カルボン酸塩官能基又はホスホルアミダイト官能基を含む。前記基 2 がカルボン酸官能基又はカルボン酸塩官能基を含む場合、式 (3 2 1) 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形成する。前記基 2 がホスホルアミダイト官能基を含む場合、式 (3 2 1) 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、複合分子が結合された  $siRNA$  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、前記基 1 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。

40

## 【0238】

一実施形態において、前記基 1 は、ヒドロキシ基又は保護されたヒドロキシ基を含み、前記基 2 は、式 (C 1') 又は (C 3') 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 (3

50

21) 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る。いくつかの実施形態において、カルボン酸塩官能基は、 $-COO^-M^+$  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。一実施形態において、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、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

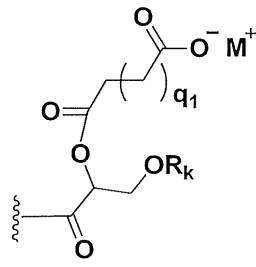
10

【0239】

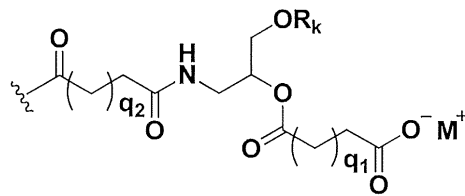
いくつかの実施形態において、 $R_4$  は、式 (B9)、(B10)、(B9')、(B10')、(B11)、(B12)、(B11') 又は (B12') に示される構造を含む。

【0240】

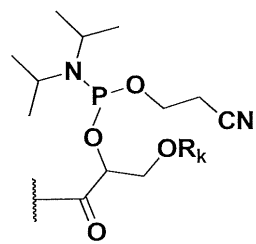
【化44】



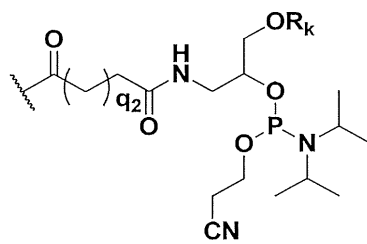
(B9)



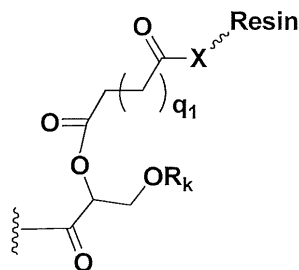
(B10)



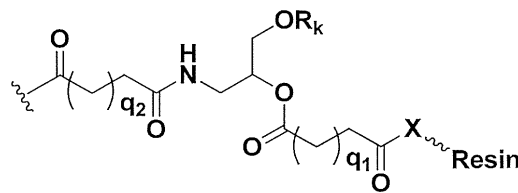
(B9')



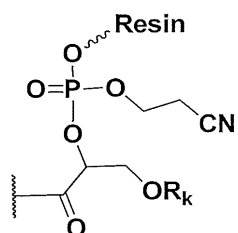
(B10')



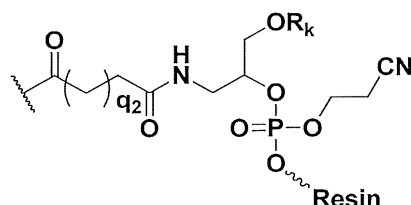
(B11)



(B12)



(B11')



(B12')

20

30

40

50

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、 $Resin$  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。合成しやすさ及びコストを考慮すると、いくつかの実施形態において、 q_1 は 1 又は 2 であり、 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_4 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_4 は、式 (B 11) 又は (B 12) に示される構造を含む。

【0241】

ヒドロキシ保護基 R_k は、 R_4 におけるヒドロキシ基上の水素を置換し、反応活性を有しない基を形成するために選択される。当該保護基 R_k は、後の反応過程において除去され、活性ヒドロキシ基を新たに放出して後の反応に関与させることができる。前記保護基の種類は、当業者に公知である。例えば、前記保護基 R_k は、例えば、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''-トリメトキシトリチル基) 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基 (4, 4'-dimethoxytrityl) であってもよい。

10

【0242】

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、上記基 1 及び任意の基 2 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、siRNA 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。

20

【0243】

各 S_1 は独立して、 M_1 における全ての活性ヒドロキシ基が YCOO-基で置換された基である。式 (321) の化合物により siRNA 複合体を調製する場合、前記 M_1 における活性ヒドロキシ基が YCOO-基で保護されており、前記保護基は、後の工程で除去され、 M_1 リガンドが得られる。

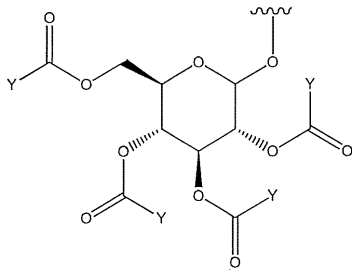
30

【0244】

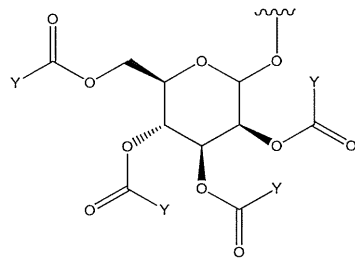
いくつかの実施形態において、各 S_1 は、それぞれ独立して式 A 46 ~ A 54 の基の 1 つである。

【0245】

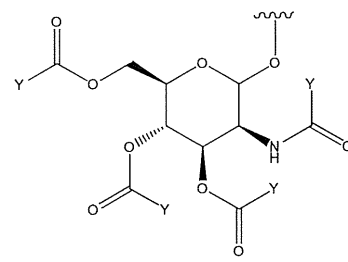
【化 4 5】



(A 4 6)

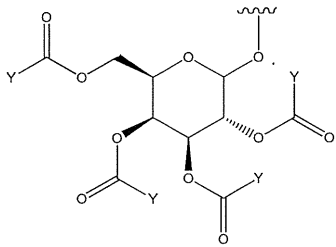


(A 4 7)

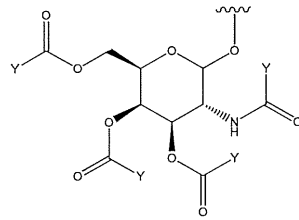


(A 4 8)

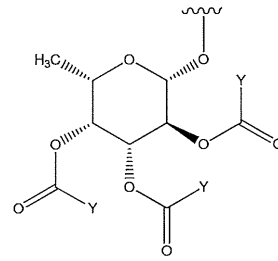
10



(A 4 9)

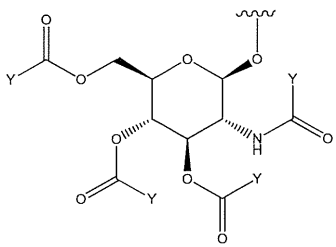


(A 5 0)

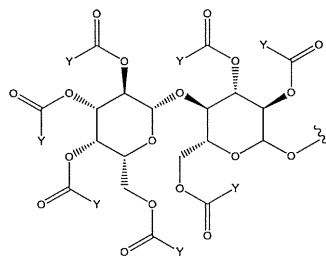


(A 5 1)

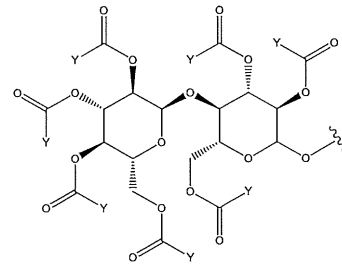
20



(A 5 2)



(A 5 3)



(A 5 4)

【0 2 4 6】

いくつかの実施形態において、 S_1 は式 A 4 9 又は A 5 0 である。

【0 2 4 7】

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、一実施形態において、Y はメチル基である。

30

【0 2 4 8】

前述したように、本開示の第 2 種の *siRNA* 複合体の調製方法は、*siRNA* 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 *siRNA* のセンス鎖を合成した場合、固相合成方法に従い *siRNA* 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 (3 2 1) 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 *siRNA* 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 (4 0 1) に示される *siRNA* 複合体を得る。

40

【0 2 4 9】

いくつかの実施形態において、前記 *siRNA* 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 (3 2 1) 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 (3 2 1) に示

50

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、*siRNA*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基1、及び式(C1')又は(C3')に示される構造を有する基2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

10

【0250】

いくつかの実施形態において、前記*siRNA*複合体の調製方法は、当該二本鎖*siRNA*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；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基1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、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*siRNA*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。

20

【0251】

いくつかの実施形態において、所望の第2種の*siRNA*複合体における*siRNA*配列により、用いられるヌクレオシドモノマーを選択する。例えば、*siRNA*配列にフルオロ修飾又はメトキシ修飾のヌクレオチドが含まれる場合、*siRNA*合成において、対応するフルオロ修飾又はメトキシ修飾のヌクレオシドモノマーを相応に用いる。前述したように、これらのフルオロ修飾又はメトキシ修飾のヌクレオシドモノマーは、本分野において公知であり、容易に市販品を購入することができる。

30

【0252】

一実施形態において、式A59におけるPは、*siRNA*におけるセンス鎖の3'末端に結合され、本開示の第2種の*siRNA*複合体の調製方法は、

(1)式(321)の化合物(式(321)の化合物は、 R_4 に、保護されたヒドロキシ基 OR_k を含む基1、及び式(C1')又は(C3')に示される構造を有する基2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、

40

(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'の方向に従いホスホルアミダイト固相合成方法により*siRNA*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、*siRNA*のアンチセンス鎖を合成すること、

(4)*siRNA*のセンス鎖及びアンチセンス鎖を単離してアニールし、本開示の第2種の*siRNA*複合体を得ることを含む。

【0253】

工程(1)において、式(321)の化合物における保護基 R_k を除去する方法は、脱

50

保護条件で、式(321)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0~50であり、一実施形態において、15~35であり、反応時間が30~300秒であり、一実施形態において、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、一実施形態において、ジクロロ酢酸である。脱保護試薬と式(321)の化合物とのモル比が10:1~1000:1であり、一実施形態において、50:1~500:1である。

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を実現できる任意の条件と試薬を用いてもよい。プロセスの簡略化を考慮すると、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。

10

【0254】

一般的には、前記カップリング反応の条件としては、反応温度が0~50であり、一実施形態において、15~35である。式(321)の化合物とヌクレオシドモノマーとのモル比が1:1~1:50であり、一実施形態において、1:2~1:5であり、式(321)の化合物とカップリング試薬とのモル比が1:1~1:50であり、一実施形態において、1:3~1:10であり、反応時間が200~3000秒であり、一実施形態において、500~1500秒である。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、一実施形態において、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、一実施形態において、無水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3~50L/molであり、一実施形態において、5~20L/molである。

20

【0255】

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'の方向に従いsiRNA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。

【0256】

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。

30

【0257】

例えば、一実施形態において、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。

【0258】

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、一実施形態においては、15~35であり、反応時間が30~300秒であり、一実施形態において、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、一実施形態においては、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は、2:1~100:1であり、一実施形態において、3:1~50:1である。

40

【0259】

カップリング反応条件としては、温度が0~50であり、一実施形態において、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、一実施形態において、1:5~1:15であり、固相担体に結合

50

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、一実施形態において、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。

【0260】

カップリング反応条件としては、温度が0 ~ 50 であり、一実施形態において、15 ~ 35 であり、反応時間が5 ~ 500秒であり、一実施形態において、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、一実施形態において、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、一実施形態において、1 : 1 : 2 ~ 2 : 2 : 1である。

10

【0261】

酸化反応条件としては、温度が0 ~ 50 であり、一実施形態において、15 ~ 35 であり、反応時間が1 ~ 100秒であり、一実施形態において、5 ~ 50秒であり、酸化試薬は、一実施形態において、ヨウ素である（一実施形態において、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であり、一実施形態において、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、一実施形態において、15 ~ 35 であり、反応時間が50 ~ 2000秒であり、一実施形態において、100 ~ 1000秒であり、硫化試薬は、一実施形態において、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であり、一実施形態において、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。

20

【0262】

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。

30

【0263】

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、siRNA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 ~ A54基の保護基YCO - をヒドロキシ基に変換させ、S₁基を対応するM₁基に変換させ、式(401)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%のアンモニア水を指し、濃アンモニア水の用量は、目的とするsiRNA配列に対して0.2 ml / μmol ~ 0.8 ml / μmolである。

40

【0264】

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siRNA配列には、遊離の2' - ヒドロキシ基の対応するヌクレオシドを有する。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siRNA配列に対して0.4 ml / μmol ~ 1.0 ml / μmolである。このように本開示の第2種のsiRNA複合体を得ることができる。

【0265】

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

50

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。

【0266】

このように得られたsiRNA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、siRNA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siRNA複合体を得ることができる。前記カチオンは、以下に詳細に説明する。

10

【0267】

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。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。

【0268】

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第2種のsiRNA複合体を得ることができる。

20

【0269】

本開示の第2種のsiRNA複合体を得た後、一実施形態において、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siRNA複合体の特徴を明らかにし、合成されたsiRNA複合体が、目的設計のsiRNA複合体であるとともに、合成されたsiRNAの配列が、合成しようとするsiRNAの配列、例えば上記表1A～1Dに示される配列と一致すると確認することもできる。

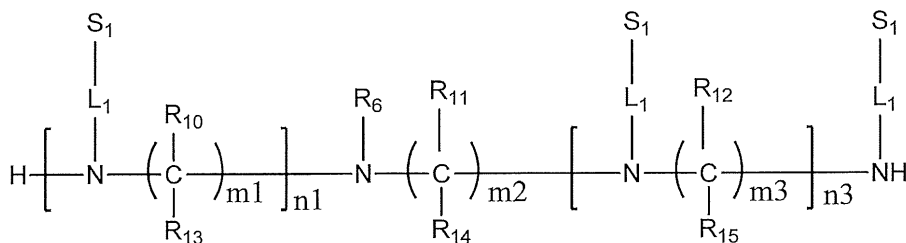
【0270】

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。

30

【0271】

【化46】



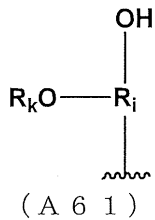
式(313)

40

式中、n1、n3、m1、m2、m3、R₁₀、R₁₁、R₁₂、R₁₃、R₁₄、R₁₅、L₁、S₁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、R₆は、式(A61)に示される構造を有する。

【0272】

【化 4 7】



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_kO 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を含む基 1 と基 2 が含まれ、基 2 が式 (C 1) 又は (C 2) に示される構造を含む式 (3 2 1) の化合物が得られる。

10

【0 2 7 3】

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、一実施形態において、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。

【0 2 7 4】

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。一実施形態において、前記エポキシ類溶剤は、ジオキサン及びノ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ノ又はメチル 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。一実施形態において、前記有機溶剤は、ジクロロメタンである。前記式 (3 1 3) に示される化合物に対して、前記有機溶剤の用量が 3 ~ 50 L / mol であり、一実施形態において、5 ~ 20 L / mol である。

20

【0 2 7 5】

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、一実施形態において、コハク酸無水物である。前記環状酸無水物と前記式 (3 1 3) に示される化合物とのモル比が 1 : 1 ~ 10 : 1 であり、一実施形態において、2 : 1 ~ 5 : 1 である。

30

【0 2 7 6】

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 (3 1 3) に示される化合物とのモル比が 1 : 1 ~ 10 : 1 であり、一実施形態において、2 : 1 ~ 5 : 1 である。

【0 2 7 7】

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。一実施形態において、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 (3 1 3) に示される化合物とのモル比が 1 : 1 ~ 20 : 1 であり、一実施形態において、3 : 1 ~ 10 : 1 である。

40

【0 2 7 8】

前記イオン交換作用は、式 (3 2 1) 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。一実施形態において、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 ~ 0.8 M であり、一実施形態において、0.4 ~ 0.6 M であり、式 (3 1 3) 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 ~ 6 L / mol であり、一実施形

50

態において4～5 L/molである。

【0279】

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)の化合物を単離ことができ、例えば、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；逆相精製：C₁₈、C₈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。

10

【0280】

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、R₄に基1及び基2が含まれ、基1がヒドロキシ保護基を含み、基2が式(C1')に示される構造を含む式(321)の化合物が得られる。

【0281】

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、一実施形態において、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、前記アミノ樹脂又はヒドロキシ樹脂は、一実施形態において、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は10～400μmol/gであり、一実施形態において、50～200μmol/gである。

20

【0282】

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。一実施形態において、前記エポキシ類溶剤は、ジオキサン及びノ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ノ又はメチル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。一実施形態において、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20～200L/molであり、一実施形態において、50～100L/molである。

30

【0283】

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)-オン及びノ又は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、一実施形態において、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、一実施形態において1：1～5：1である。

40

【0284】

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ノ又はN,N-ジイソプロピルエチルアミンであり、一実施形態において、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、一実施形態において、1：1～5：1である。

50

【0285】

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。前記カップリング反応の作用は、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。前記カップリング反応の条件としては、反応温度が0~50であり、一実施形態において、15~35であり、反応時間が1~10hであり、一実施形態において、3~6hである。カップリング試薬としては、当業者に公知の、s i R N A固相合成に用いられるカップリング試薬を用いてもよい。

10

【0286】

いくつかの実施形態において、前記カップリング試薬は、カップリング試薬1(c a p 1)及びカップリング試薬2(c a p 2)からなり、カップリング試薬1は、N-メチルイミダゾールであり、一実施形態において、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は1:10~1:1であり、一実施形態において、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との体積は1:1~10:1であり、一実施形態において、3:1~7:1である。前記カップリング試薬2は、酢酸無水物であり、一実施形態において、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、一実施形態において1:2~1:6である。

20

【0287】

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5ml/g~50ml/gであり、一実施形態において、15ml/g~30ml/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は0.5ml/g~10ml/gであり、一実施形態において、1ml/g~5ml/gである。

【0288】

一実施形態において、カップリング試薬としては、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。一実施形態において、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10~50L/molであり、一実施形態において、5~30L/molである。

30

【0289】

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。一実施形態において、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、一実施形態において、0.01:1~0.1:1である。

40

【0290】

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、一実施形態において、アセトニトリルである。

【0291】

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及び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

50

合物を得ることを含む。この場合、 R_4 に基1及び基2が含まれ、基1がヒドロキシ保護基を含み、基2が式(C3)に示される構造を含む式(321)の化合物が得られる。

【0292】

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であり、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であり、例えば1：50～1：80であり、反応時間が200～3000秒であり、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、市販品を購入してもよく、本分野で公知の方法により合成してもよい。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。式(313)の化合物に対して、前記有機溶剤の用量が3～50L/molであり、例えば、5～20L/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。

10

20

【0293】

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_4 に基1及び基2が含まれ、基1がヒドロキシ保護基を含み、基2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。

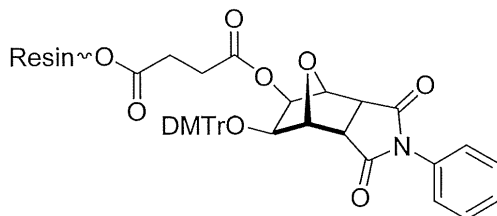
【0294】

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(NitroPhase(登録商標)HL Uny LinkerTM 300 Oligonucleotide Synthesis Support, Kinovate Life Sciences社、構造は式B80に示すとおり)であってもよい。

30

【0295】

【化48】



(B80)

40

【0296】

脱保護反応は、当業者に公知である。一実施形態において、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-DMTTr(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：

50

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。

【0297】

カップリング反応条件及びカップリング試薬の選択は、上述したとおりである。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。

【0298】

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、反応時間が5 ~ 500秒であり、例えば10 ~ 100秒であり、前記カップリング反応をカップリング試薬の存在下で行う。カップリング試薬の選択と用量は、上述したとおりである。

10

【0299】

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)。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。

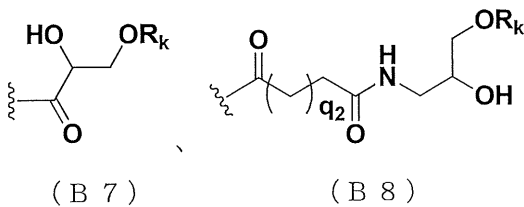
【0300】

一実施形態において、R₆は、式B7又はB8の基の1つである。

20

【0301】

【化49】



式中、q₂の定義は、前述したとおりである。

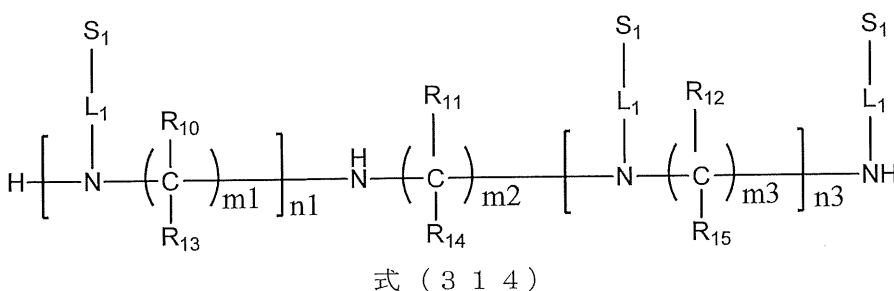
【0302】

30

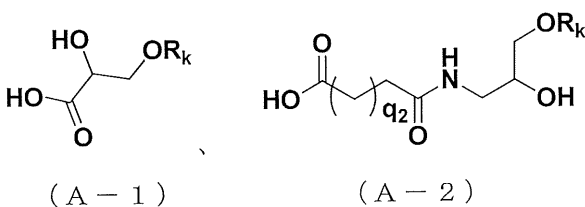
この場合、式(313)に示される化合物は、有機溶剤において、アミド化反応条件下及びアミド化反応縮合剤と第3級アミン類有機塩基の存在下で、式(314)に示される化合物を式(A-1)に示される化合物又は式(A-2)の化合物と接触させ、単離する、という調製方法により得ることができる。

【0303】

【化50】



40



50

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。

【0304】

前記アミド化反応条件としては、反応温度が 0 ~ 100 であり、反応時間が 1 ~ 48 時間であり、一実施形態において、前記アミド化反応条件としては、反応温度が 10 ~ 40 であり、反応時間が 2 ~ 16 時間である。

【0305】

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、一実施形態において、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、一実施形態において、エタノールである。前記エポキシ類溶剤は、一実施形態において、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、一実施形態において、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、一実施形態において、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。一実施形態において、前記有機溶剤は、ジクロロメタンである。式 (314) の化合物に対して、有機溶剤の用量が 3 ~ 50 L/mol であり、一実施形態において 3 ~ 20 L/mol である。

10

【0306】

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-dimethoxytriazin-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、一実施形態において、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 であり、一実施形態において、2.5 : 1 ~ 5 : 1 である。

20

30

【0307】

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、一実施形態において、 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、一実施形態において、5 : 1 ~ 10 : 1 である。

【0308】

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_k 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、一実施形態において 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_2 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、 $q_2 = 1$ 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、 $q_2 = 2$ であり、以下類推すればよい。

40

【0309】

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

50

業者が上記方法により容易に実現するものである。

【0310】

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)の化合物を単離ことができ、例えば、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；逆相精製：C₁₈、C₈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(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。

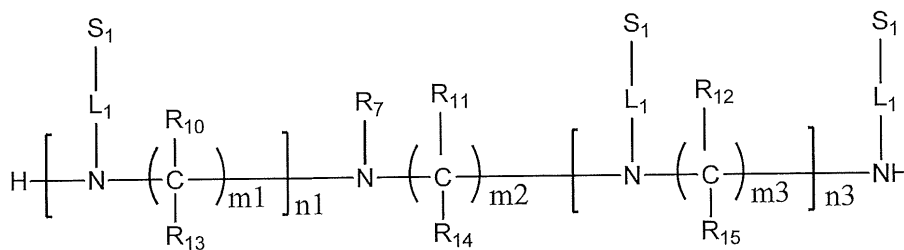
10

【0311】

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、単離することを含む調製方法により得ることができる。

【0312】

【化51】



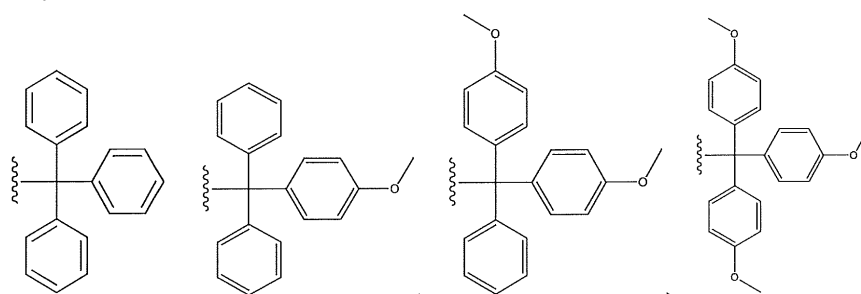
式(315)

20

式中、R₇は、式(330)、(331)、(332)又は(333)に示される基から選択され、一実施形態において、R₇の構造は式(330)に示すとおりである。

【0313】

【化52】



式(330)

式(331)

式(332)

式(333)

30

n₁、n₃、m₁、m₂、m₃、R₁₀、R₁₁、R₁₂、R₁₃、R₁₄、R₁₅、L₁、S₁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。

40

【0314】

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種又は複数種であり、一実施形態において、ジクロロ酢酸である。

【0315】

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、一実施形態において、反応温度が10～40であり、反応時間が0.5～16時間である。

【0316】

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

50

ミンの1種又は複数種である。前記エポキシ類溶剤は、一実施形態において、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、一実施形態において、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、一実施形態において、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、一実施形態において、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、一実施形態において、5 ~ 20 L / molである。

【0317】

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、一実施形態において、10 : 1 ~ 50 : 1である。

10

【0318】

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、クロマトグラフィ方法により式(314)の化合物を単離ことができ、例えば、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 : 30 ~ 100 : 40で勾配溶出する；逆相精製：C₁₈、C₈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。

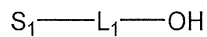
20

【0319】

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及び縮合反応条件下で、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、単離することを含む調製方法により得ることができる。

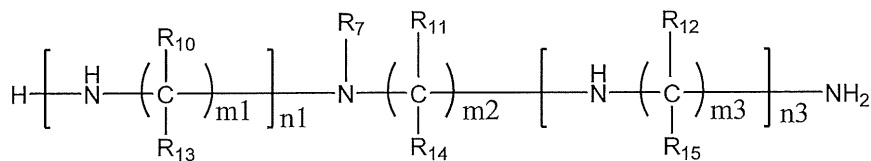
【0320】

【化53】



式(316)

30



式(317)

式中、n1、n3、m1、m2、m3、R₇、R₁₀、R₁₁、R₁₂、R₁₃、R₁₄、R₁₅、L₁、S₁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。

【0321】

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、US 8106022 B2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。

40

【0322】

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、一実施形態において、反応温度が10 ~ 40 であり、反応時間が0.5 ~ 16時間である。

【0323】

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

50

2 : 1 ~ 10 : 1であり、一実施形態において、2 . 5 : 1 ~ 5 : 1である。

【0324】

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、一実施形態において、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、一実施形態において、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、一実施形態において、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、一実施形態において、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 ~ 50 L / molであり、一実施形態において、5 ~ 20 L / molである。

10

【0325】

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(DEPBT)、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、一実施形態において、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、一実施形態において、2 . 5 : 1 ~ 5 : 1である。

20

【0326】

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、一実施形態において、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、一実施形態において、5 : 1 ~ 10 : 1である。

【0327】

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)の化合物を単離ことができ、例えば、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 ; 逆相精製 : C₁₈、C₈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(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。

30

【0328】

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S₁ - L₁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、L₁及び/又はS₁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S₁及び/又はL₁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S₁ - L₁部分を結合した後、続いて(n₃ + n₁ - 1)eqの第2の式(316)の化合物と接触させ、(n₃及びn₁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(n₃ + n₁ - 1)個の第二級アミン基に第2のS₁ - L₁部分を結合することができる。

40

【0329】

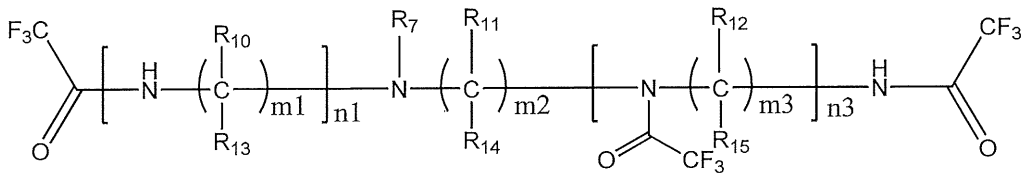
式(317)に示される化合物は、有機溶剤の存在下及び脱保護反応条件下で、式(318)に示される化合物をメチルアミン水溶液と接触させ、単離することを含む調製方法

50

により得ることができる。

【0330】

【化54】



式(318)

式中、 $n1$ 、 $n3$ 、 $m1$ 、 $m2$ 、 $m3$ 、 $R7$ 、 $R10$ 、 $R11$ 、 $R12$ 、 $R13$ 、 $R14$ 、 $R15$ 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。 10

【0331】

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、一実施形態において、反応温度が20～80であり、反応時間が10～30時間である。

【0332】

前記有機溶剤は、アルコールから選択され、一実施形態において、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、一実施形態において、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、一実施形態において、1.5～10L/molである。 20

【0333】

前記メチルアミン水溶液の濃度が30～40質量%であり、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であり、一実施形態において、50:1～200:1である。

【0334】

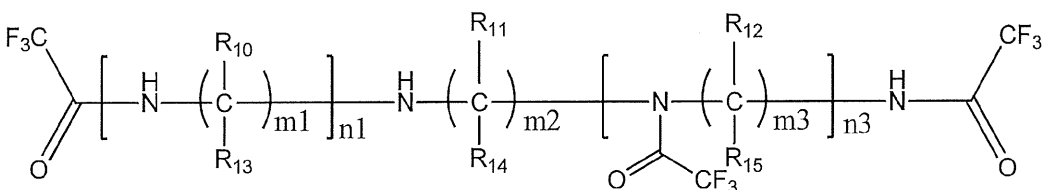
上記と同様に、任意の適切な単離方法により反応混合物から式(317)の化合物を単離することができる。いくつかの実施形態において、溶剤を蒸発除去した後、クロマトグラフィ方法により式(317)の化合物を単離ことができ、例えば、順相精製シリカゲル:200～300メッシュのシリカゲル充填剤を、ジクロロメタン:メタノール:アンモニア水(25wt%)=1:1:0.05～1:1:0.25で勾配溶出する;逆相精製: C_{18} 、 C_8 逆相充填剤を、メタノール:アセトニトリル=0.1:1～1:0.1で勾配溶出するというクロマトグラフィ条件で単離することができる。いくつかの実施形態において、溶剤を直接に除去して式(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。 30

【0335】

式(318)に示される化合物は、有機溶剤の存在下及び置換反応条件下で、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、一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、単離することを含む調製方法により得ることができる。 40

【0336】

【化55】



式(319)

式中、 $n1$ 、 $n3$ 、 $m1$ 、 $m2$ 、 $m3$ 、 $R10$ 、 $R11$ 、 $R12$ 、 $R13$ 、 $R14$ 、 $R15$ 50

15 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。

【0337】

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時間であり、一実施形態において、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。

【0338】

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であり、一実施形態において、1:1～3:1である。

10

【0339】

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、一実施形態において、ジオキサン及びノ又はテトラヒドロフランであり、前記エーテル類溶剤は、一実施形態において、エチルエーテル及びノ又はメチル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、一実施形態において、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、一実施形態において、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であり、一実施形態において、5～20L/molである。

20

【0340】

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)の化合物を単離することができ、例えば、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;逆相精製:C₁₈、C₈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(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。

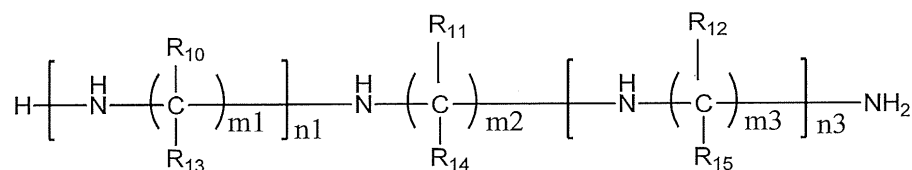
30

【0341】

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、単離することを含む調製方法により得ることができる。

【0342】

【化56】



式(320)

40

式中、n1、n3、m1、m2、m3、R₁₀、R₁₁、R₁₂、R₁₃、R₁₄、R

15 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。

【0343】

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

50

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、一実施形態において、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、一実施形態において、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、一実施形態において、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、一実施形態において、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、一実施形態において、1~20L/molである。

【0344】

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時間であり、一実施形態において、反応温度が10~40であり、反応時間が10~30時間である。

10

【0345】

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1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。

【0346】

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、一実施形態において、3:1~5:1である。

【0347】

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、クロマトグラフィ方法により式(319)の化合物を単離ことができ、例えば、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;逆相精製: C_{18} 、 C_8 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。

20

30

【0348】

本開示により提供されるsiRNA及び当該siRNAを含む複合体において、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、アンモニウムカチオン 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、一実施形態において、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、 K^+ 及び/又は 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siRNA及び複合体は、少なくとも一部が塩として存在してもよい。1つの態様において、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siRNA及び複合体は、ナトリウム塩又は部分ナトリウム塩として存在する。

40

【0349】

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

50

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複合体の s i R N A に導入することができる。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。

【 0 3 5 0 】

< 本開示の s i R N A、薬物組成物及び s i R N A 複合体の使用 >

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 s i R N A、薬物組成物及び / 又は s i R N A 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における使用を提供する。

10

【 0 3 5 1 】

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 s i R N A、薬物組成物及び / 又は s i R N A 複合体の有効量を患者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方法を提供する。

【 0 3 5 2 】

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 s i R N A、薬物組成物及び / 又は s i R N A 複合体の有効量を、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、B 型肝炎ウイルス遺伝子の発現の抑制方法を提供する。

【 0 3 5 3 】

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。

20

【 0 3 5 4 】

本開示の s i R N A 及び / 又は薬物組成物及び / 又は s i R N A 複合体の有効量を、それを必要とする患者に投与することにより、RNA 干渉機構により B 型肝炎を治療及び / 又は予防する目的を達成することができる。したがって、本開示の s i R N A、及び / 又は薬物組成物及び / 又は s i R N A 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。

【 0 3 5 5 】

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 s i R N A、薬物組成物及び / 又は s i R N A 複合体の、任意の遺伝子の過剰発現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における使用を提供する。

30

【 0 3 5 6 】

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 s i R N A、薬物組成物及び / 又は s i R N A 複合体の有効量を患者に投与することを含む、任意の遺伝子の過剰発現による病理学的状態又は疾患の治療方法を提供する。

【 0 3 5 7 】

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 s i R N A、薬物組成物及び / 又は s i R N A 複合体の有効量を、遺伝子を発現する細胞と接触させることを含む、前記遺伝子の発現の抑制方法を提供する。

【 0 3 5 8 】

前記任意の遺伝子の過剰発現による病理学的状態又は疾患は、各種の慢性疾患、炎症、線維性疾患及び過形成性疾患、例えば、癌から選択される。

40

【 0 3 5 9 】

本開示の s i R N A 及び / 又は薬物組成物及び / 又は s i R N A 複合体を、それを必要とする患者に投与することにより、RNA 干渉機構により疾患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 s i R N A 及び / 又は薬物組成物及び / 又は s i R N A 複合体は、任意の遺伝子の過剰発現による疾患の予防及び / 又は治療に用いられ、又は任意の遺伝子の過剰発現による疾患の予防及び / 又は治療のための薬物の調製に用いることができる。

【 0 3 6 0 】

50

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 又は薬物組成物又は 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して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 又は薬物組成物又は s i R N A 複合体を患者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、患者全身よりも多くの s i R N A 又は薬物組成物又は 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 又は薬物組成物又は s i R N A 複合体が患者のほぼ全身に送達される。本開示が B 型肝炎の予防及び/又は治療手段の提供を主に意図することを考慮すると、いくつかの具体的な実施形態において、薬物を肝臓に送達する投与方法を用いる。

【0361】

本分野で既知の任意の適切な経路で患者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、経口投与又は胃腸管外経路（非経口経路）を含むが、これらだけに限定されない。投与頻度は、1日、1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。

【0362】

本開示に記載された s i R N A 又は薬物組成物又は s i R N A 複合体の用量は、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、特に患者の年齢、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。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。

【0363】

本開示に記載された薬物組成物又は 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は、その s i R N A 用量が0.001～50mg/kg体重であってもよく、例えば、0.01～10mg/kg体重、0.05～5mg/kg体重又は0.1～3mg/kg体重であってもよく、(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 s i R N A 複合体については、その s i R N A 用量が0.001～100mg/kg体重であってもよく、例えば、0.01～50mg/kg体重、0.05～20mg/kg体重又は0.1～10mg/kg体重であってもよい。本開示に記載された s i R N A を投与する場合、上記用量を参照することができる。

【0364】

本開示の s i R N A、及び/又は薬物組成物及び/又は 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。いくつかの実施形態において、前記細胞はHepG2.2.15細胞である。

【0365】

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 s i R N A、薬物組成物、s i R N A 複合体のいずれを用いるかにかかわらず、s i R N A 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。

10

20

30

40

50

【0366】

<キット>

本開示は、上述の s i R N A、上述の薬物組成物及び/又は上述の s i R N A 複合体を含むキットを提供する。

【0367】

いくつかの実施形態において、1つの容器で s i R N A を提供し、少なくとも別の1つの容器で薬学的に許容可能な担体及び/又は添加剤を提供してもよい。s i R N A と薬学的に許容可能な担体及び/又は添加剤のほか、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さらに含まれてもよい。前記他の成分は、前記キットに含まれてもよいが、s i R N A と薬学的に許容可能な担体及び/又は添加剤を提供する容器とは別の容器に存在する。これらの実施形態において、前記キットは、s i R N A 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を混合するための説明書を含んでもよい。

10

【0368】

いくつかの実施形態において、s i R N A 複合体を1つの容器に保存してもよく、薬学的に許容できる添加剤を提供する又は提供しない少なくとも別の1つの容器が存在しても存在しなくてもよい。s i R N A 複合体及び薬学的に許容できる任意の添加剤のほか、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さらに含まれてもよい。前記他の成分は、前記キットに含まれてもよいが、s i R N A 複合体と薬学的に許容できる任意の添加剤を提供する容器とは別の容器に存在する。これらの実施形態において、前記キットは、s i R N A 複合体と薬学的に許容できる添加剤(存在する場合)又は他の成分を混合するための説明書を含んでもよい。

20

【0369】

本開示のキットにおいて、前記 s i R N A 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 s i R N A 複合体及び薬学的に許容できる任意の添加剤は、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 s i R N A 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 s i R N A 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。任意に本開示のキットで無菌水を提供することができる。

【0370】

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。

30

【実施例】

【0371】

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)) に記載された方法を参照して行われる。

【0372】

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

40

【0373】

(調製例1) 複合体1~3の調製

本調製例では、複合体1~2(以下、L10-siHB3M1SVP複合体及びL10-siHB3M1SP複合体ともいう)を合成した。複合体3(以下、L10-siHB3M1SPs複合体ともいう)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siHB3M1SVP、siHB3M1SP又はsiHB3M1SPsのs i R N A 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s i R N A の配列は、表3を参照されたい。

【0374】

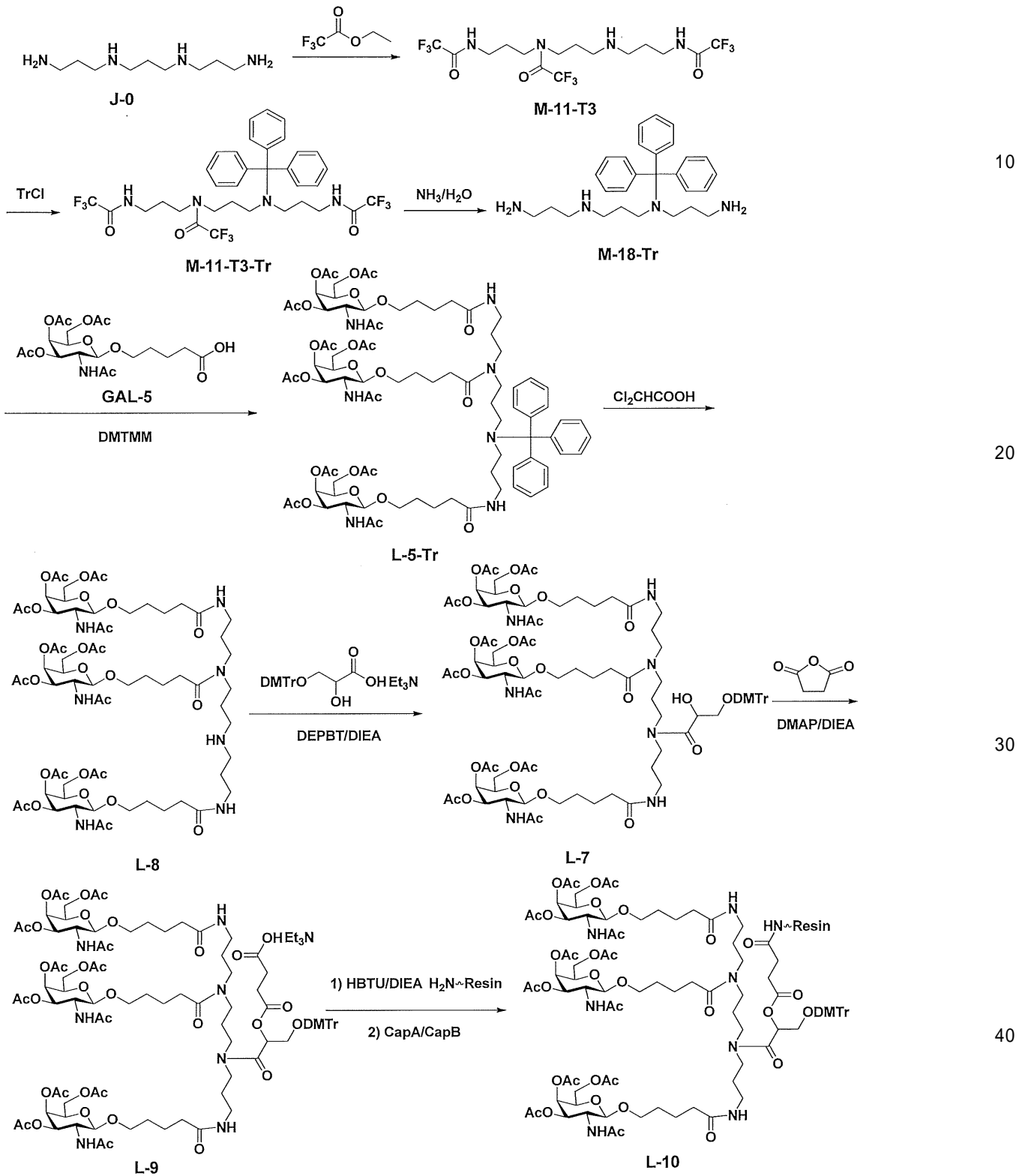
50

(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。

【0375】

【化57】



【0376】

(1-1-1) 複合末端セグメント GAL-5 の合成

【0377】

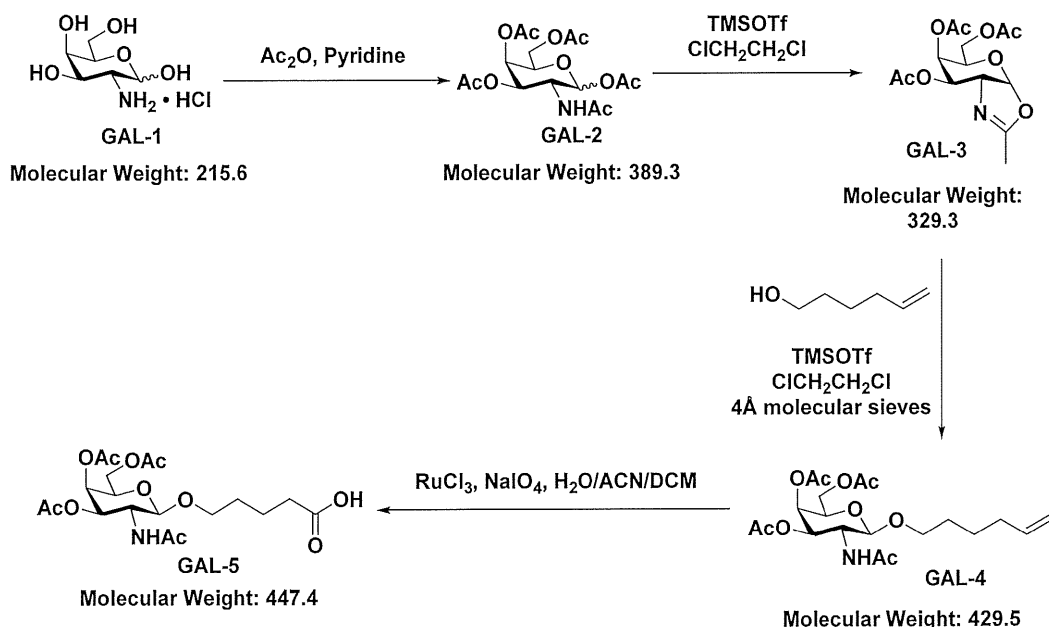
10

20

30

40

【化58】



10

【0378】

(1-1-1a) GAL-2の合成

100.0g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、463.8mmol)を1000mlの無水ピリジンに溶解させ、氷水浴下で540mlの酢酸無水物(Enox社から購入、5565.6mmol)を加え、室温で1.5時間攪拌反応した。反応液を10Lの氷水に注入し、減圧吸引濾過し、ケーキを2L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、130.0gの白色固形製品GAL-2を得た。

20

【0379】

(1-1-1b) GAL-3の合成

工程(1-1-1a)で得られたGAL-2(35.1g、90.0mmol)を213ml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、24.0gのTMSOTf(CAS番号: 27607-77-8、マックリン社から購入、108.0mmol)を加え、室温で一晩反応させた。

30

【0380】

反応液に400mlのジクロロメタンを加えて希釈し、珪藻土で濾過し、1L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300mlで2回抽出し、有機相を合わせ、それぞれ300mlの飽和炭酸水素ナトリウム水溶液及び300ml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、26.9gの淡黄色の粘稠な水飴状製品GAL-3を得た。

40

【0381】

(1-1-1c) GAL-4の合成

工程(1-1-1b)で得られたGAL-3(26.9g、81.7mmol)を136mlの無水1,2-ジクロロエタンに溶解させ、乾燥した4分子篩粉30gを加え、9.0gの5-ヘキセン-1-オール(CAS番号: 821-41-0、Adamas-beta社から購入、89.9mmol)を加え、室温で30分間攪拌し、氷浴下で窒素保護下で9.08gのTMSOTf(40.9mmol)を加え、室温で一晩攪拌反応させた。4分子篩粉を濾過除去し、濾液に300mlのジクロロメタンを加えて希釈し、珪藻土で濾過し、500ml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300mlのジクロロエタンで1回抽出し、有機相を合わ

50

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。

【0382】

(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(14.9 g、34.7 mmol)を77 mlのジクロロメタンと77 mlのアセトニトリルの混合溶剤に溶解させ、それぞれ103 mlの脱イオン水及び29.7 gの過ヨウ素酸ナトリウム(CAS番号: 7790-28-5、Aladdin社から購入、138.8 mmol)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、238 mg、1.145 mmol)を加え、室温で一晩反応させた。反応液に300 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200 ml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200 mlで3回抽出し、有機相を合わせ、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶剤を減圧蒸発乾固し、6.85 gの白色泡状固形製品GAL-5を得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO) 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).

10

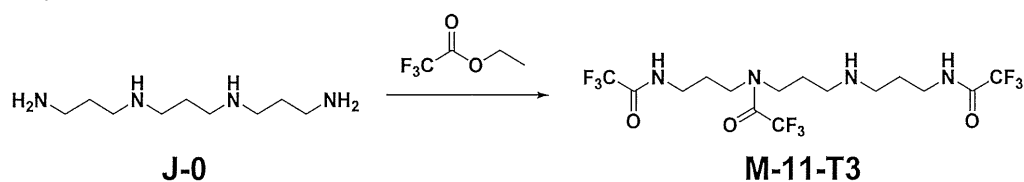
20

【0383】

(1-1-2) M-11-T3の合成:

【0384】

【化59】



30

J-0(1.883 g、10 mmol、アルファ・エイサー社から購入)を25 mlのアセトニトリルに溶解させ、トリエチルアミン(4.048 g、40 mmol)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(5.683 g、40 mmol)を加え、室温で22 h反応させ、溶剤を減圧蒸発乾固し、真空油ポンプで18 h発泡乾燥させ、5.342 g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: C₁₅H₂₂F₉N₄O₃, [M+H]⁺、理論値: 477.35、実測値: 477.65。

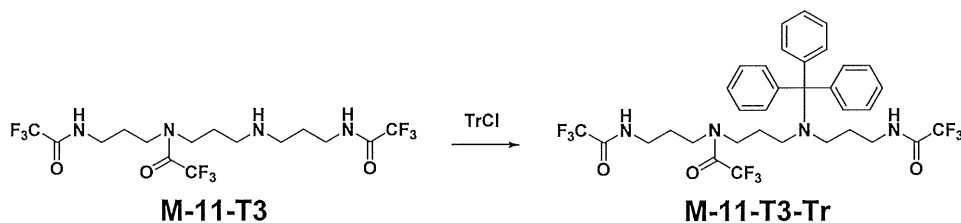
40

【0385】

(1-1-3) M-11-T3-Trの合成:

【0386】

【化60】



M - 11 - T 3 粗製品 (5 . 3 4 2 g 、 1 0 m m o l) を 5 0 m l のジクロロメタンに溶解させ、反応液に TrCl (3 . 3 4 5 g 、 1 2 m m o l) 及びトリエチルアミン (1 . 5 1 8 g 、 1 5 m m o l) を加え、室温で 2 0 h 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 2 0 m l で 2 回洗浄し、2 0 m l 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 . 7 6 3 g の固形粗製品 M - 1 1 - T 3 - T r を得た。MS m / z : C ₃₄ H ₃₆ F ₉ N ₄ O ₃ , [M + N a] ⁺、理論値 : 7 4 1 . 2 5、実測値 : 7 4 1 . 5 3。固形粗製品 M - 1 1 - T 3 - T r は、精製することなく、引き続き次の M - 1 8 - T r の合成に使用した。

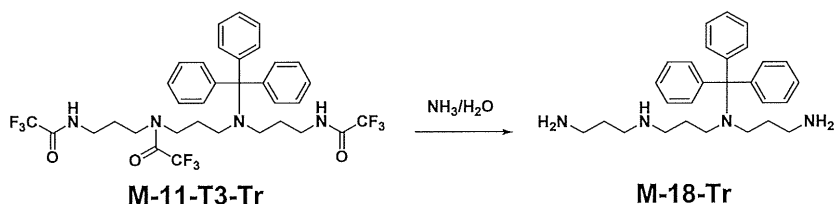
10

【0387】

(1 - 1 - 4) M - 1 8 - T r の合成 :

【0388】

【化61】



20

工程 (1 - 1 - 3) で得られた M - 1 1 - T 3 - T r 粗製品 (7 . 7 6 3 g 、 1 0 m m o l) を 1 0 0 m l のメタノールに溶解させ、1 0 0 m l のメチルアミン水溶液 (4 0 質量 %) を加え、5 0 で 2 3 h 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、2 0 0 m l 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、5 0 m l 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 (D C M) で 1 回あたり 5 0 m l で 3 回抽出し、有機相を合わせ、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、2 0 0 ~ 3 0 0 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 : アンモニア水 (2 5 w t %) = 1 : 1 : 0 . 0 5 ~ 1 : 1 : 0 . 2 5 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 . 8 8 7 g の純粋な M - 1 8 - T r を得た。¹H NMR (4 0 0 M H z , D M S O) 7 . 4 7 - 7 . 3 9 (m , 6 H) , 7 . 3 2 - 7 . 2 4 (m , 6 H) , 7 . 1 9 - 7 . 1 2 (m , 3 H) , 2 . 6 0 - 2 . 4 7 (m , 4 H) , 2 . 4 6 - 2 . 1 9 (m , 1 3 H) , 1 . 7 0 - 1 . 5 5 (m , 4 H) , 1 . 4 0 (p , J = 6 . 8 H z , 2 H) . MS m / z : C ₂₈ H ₃₉ N ₄ , [M + H] ⁺、理論値 : 4 3 1 . 6 5、実測値 : 4 3 2 . 6 1。

30

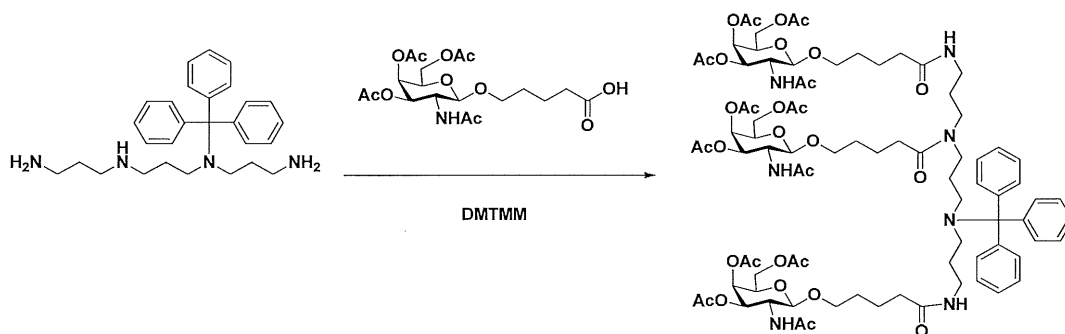
40

【0389】

(1 - 1 - 5) L - 5 - T r の合成 :

【0390】

【化62】



10

M-18-Tr

L-5-Tr

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。200mlのジクロロメタンで反応液を希釈し、100mlの飽和炭酸水素ナトリウム溶液で有機相を洗浄し、100ml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、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=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7.49gの純粋なL-5-Trを得た。¹H NMR(400 MHz, DMSO) 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: C₈₅H₁₁₉N₇O₃₀, [M+H]⁺、理論値：1718.81、実測値：1718.03。

20

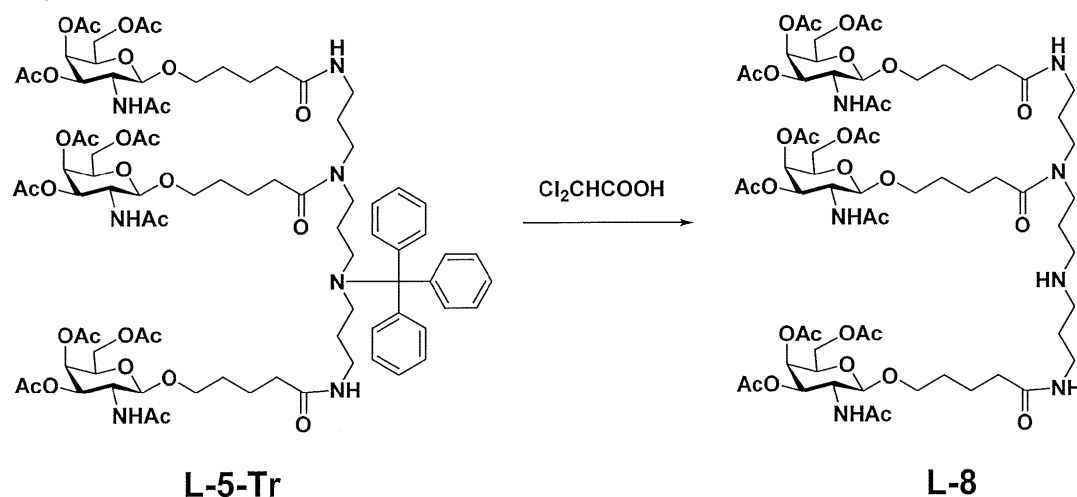
30

【0391】

(1-1-6) L-8の合成：

【0392】

【化63】



40

50

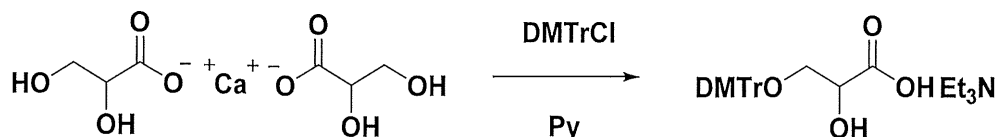
工程(1-1-5)で得られたL-5-Tr(5.94g、3.456mmol)を69mlのジクロロメタンに溶解させ、ジクロロ酢酸(13.367g、103.67mmol)を加え、室温で2h反応させ、100mlのジクロロメタンを加えて反応液を希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム溶液を加えて洗浄しpH=7~8になるように調節し、水相をジクロロメタンで1回あたり30mlで6回抽出し、有機相を合わせ、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過した後に溶剤を減圧蒸発乾固して粗製品を得た。精製には、200~300メッシュの順相シリカゲルを用い、10wt%トリエチルアミンでシリカゲルの酸性を中和し、1wt%トリエチルアミンでカラムを平衡化し、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4.26gの純粋なL-8を得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO) 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, 9H), 1.81 - 1.74 (m, 9H), 1.65 - 1.42 (m, 18H). MS m/z: C₈₅H₁₁₉N₇O₃, [M+H]⁺、理論値：1477.59、実測値：1477.23。

【0393】

(1-1-7a) A-1の合成

【0394】

【化64】



A-1

DMTrCl(4,4'-ビスメトキシトリチルクロリド、38.12g、112.5mmol)を450ml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(12.88g、45.0mmol)を加え、45℃で22h反応させ、反応液を濾過し、ケーキを200mlのDCMでリンスし、濾液を乾燥させるまで減圧濃縮し、残りを500mlのジクロロメタンに改めて溶解させ、0.5Mトリエチルアミンリン酸塩(pH=7~8)で1回あたり200mlで2回洗浄し、水相をジクロロメタンで1回あたり200mlで2回抽出し、有機相を合わせ、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、500mlのジクロロメタンに改めて溶解させ、200mlの0.5M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200mlで2回抽出し、有機相を合わせ、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完全に乾燥するまで吸引濾過し、20.7gの白色固形製品A-1を得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) 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

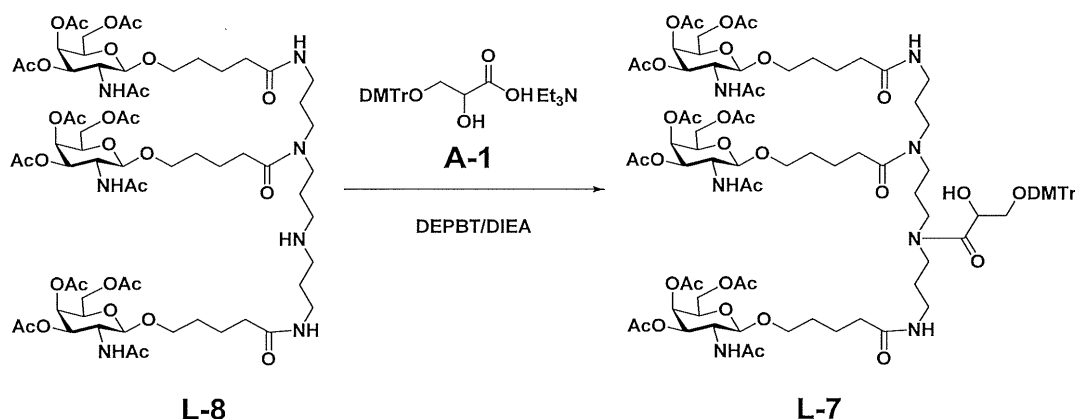
. 3 Hz, 9H). MS m/z: C₂₄H₂₃O₆, [M - H]⁻, 理論値: 407.15、実測値: 406.92。

【0395】

(1-1-7b) L-7の合成:

【0396】

【化65】



10

工程(1-1-6)で得られたL-8(2.262g、1.532mmol)と工程(1-1-7a)で得られたA-1(2.342g、4.596mmol)とを混合し、16ml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)(1.375g、4.596mmol)を加え、さらにジイソプロピルエチルアミン(1.188g、9.191mmol)を加え、25℃で2h攪拌反応させ、10ml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、有機相を合わせ、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、4.900gの粗製品を得た。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、生成物溶出液を回収し、溶剤を減圧蒸発乾固して2.336gの純粋なL-7を得た。¹H NMR(400MHz,DMSO) 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=11.2,3.2Hz,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: C₉₀H₁₂₈N₇O₃₅, [M - DMTr]⁺、理論値: 1564.65、実測値: 1564.88。

20

30

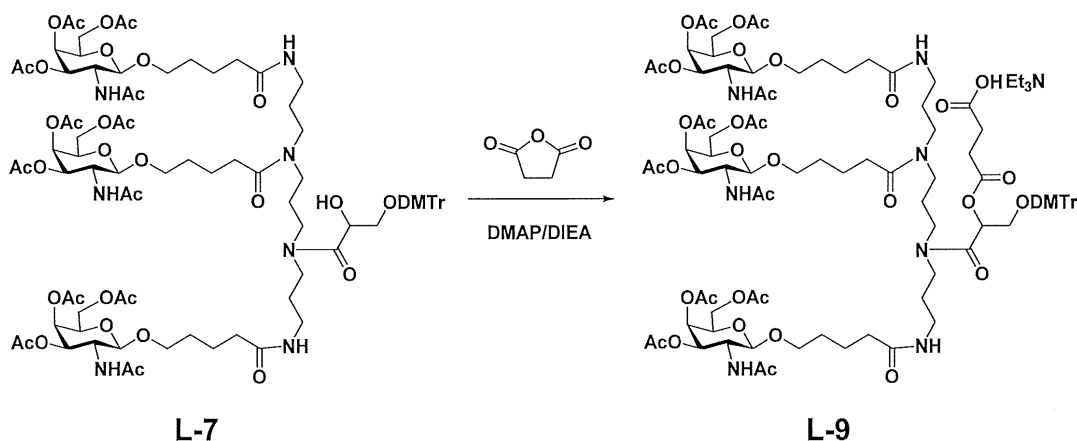
40

【0397】

(1-1-8) L-9複合分子の合成:

【0398】

【化 6 6】



10

工程(1-1-7)で得られたL-7(2.300g、1.26mmol)、コハク酸無水物(0.378g、3.78mmol)及び4-ジメチルアミノピリジン(DMAP、0.462g、3.78mmol)を混合して13ml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、0.814g、6.30mmol)を加え、25℃で24h攪拌し、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、有機相を合わせ減圧蒸発乾固して2.774gの粗製品を得た。カラム精製には、60g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1.874gの純粋なL-9複合分子を得た。¹H NMR(400 MHz, DMSO) 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: C₉₄H₁₃₂N₇O₃₈, [M-DMTr]⁺、理論値：1664.72、実測値：1665.03。

20

30

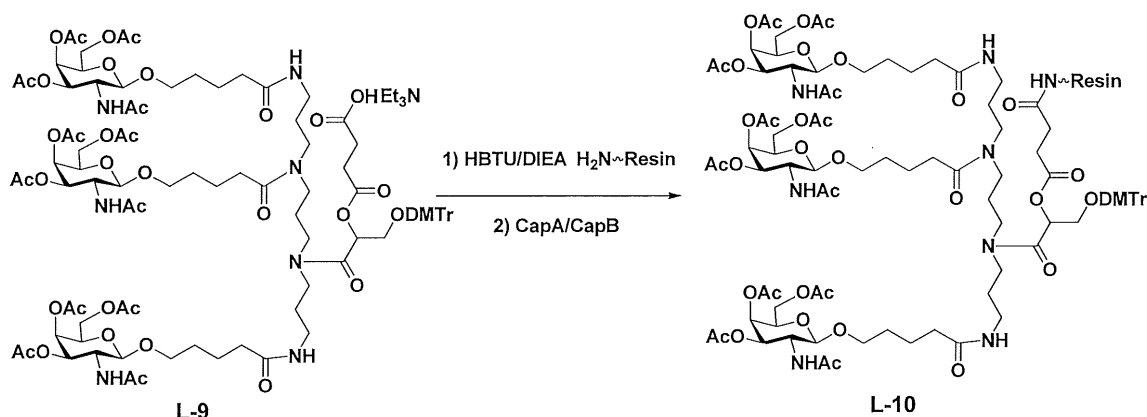
【0399】

(1-1-9) L-10化合物の合成：

40

【0400】

【化67】



10

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。

【0401】

工程(1-1-8)で得られたL-9複合分子(0.233g、0.1126mmol)、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、0.064g、0.1689mmol)及びジイソプロピルエチルアミン(DIEA、0.029g、0.2252mmol)を混合し、19ml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(H₂NResin、0.901g、100~200メッシュ、アミノ基担持量400μmol/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、15h反応させた後に濾過し、ケーキをDCMで1回あたり30mlで2回リンスし、アセトニトリルで1回あたり30mlで3回リンスし、30mlのエチルエーテルで1回リンスし、真空油ポンプで2h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5h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30mlで3回リンスし、乾燥させるまで吸引濾過し、真空油ポンプで一晩乾燥させ、1.100g、担持量90.8μmol/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。

20

30

【0402】

【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
CapA	20ml	--	--	--
CapB	2.3ml	--	--	--
DMAP	0.01g	分析試薬	I1422139	Aladdin
アセトニトリル	2.3ml	スペクトル純試薬	O15161001	上海星可

ここで、CapAとCapBは、キャッピング試薬溶液であり、CapAは、20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、CapBは、20体積%酢酸無水物のアセトニトリル溶液であった。

40

【0403】

(1-2)複合体1~3のセンス鎖の合成

複合体1~3のセンス鎖は、配列が同じであるため、その調製方法も同じである。

【0404】

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-10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

50

、カップリング、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、カップリング、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、保護、カップリング、カップリング、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。

【0405】

ヌクレオシドモノマーを0.1M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25℃であり、反応時間が70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。

10

【0406】

各カップリング反応条件は、いずれも同じであり、温度が25℃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1:10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1:65であり、反応時間が600秒であり、カップリング試薬は、5-エチルチオ-1H-テトラゾールの0.5Mアセトニトリル溶液であった。

【0407】

各カップリング条件は、いずれも同じであり、温度が25℃であり、反応時間が15秒であった。カップリング試薬溶液は、モル比が1:1であるCapAとCapBの混合溶液であり、カップリ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。

20

【0408】

各酸化反応条件は同じであり、温度が25℃であり、反応時間が15秒であり、酸化試薬が濃度0.05M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30:1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。

【0409】

各硫化反応の条件は同じであり、温度が25℃であり、反応時間が300秒であり、硫化試薬がキサントヒドリドであった。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120:1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。

30

【0410】

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/ μ molであり、55℃で16h反応させ、液体を除去し、乾燥させるまで真空濃縮した。

【0411】

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)、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合わせ、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、デキストランゲルカラムにより脱塩し、充填剤がデキストランゲルG25であり、脱イオン水で溶出した。

40

【0412】

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。

【0413】

複合体1のセンス鎖のバッチは、純度90.4%、分子量の理論値7627.5、実測

50

値 7626.6 であった。複合体 2 のセンス鎖のバッチは、純度 94.1%、分子量の理論値 7627.5、実測値 7625.1 であった。実測値が理論値と一致しており、合成されたのは 3' 末端に L-9 複合分子が複合されたセンス鎖 S であることが示された。

【0414】

(1-3) 複合体 1~3 のアンチセンス鎖の合成

(1-3A) 複合体 1 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 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、酸化又は硫化の反応条件、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る。

【0415】

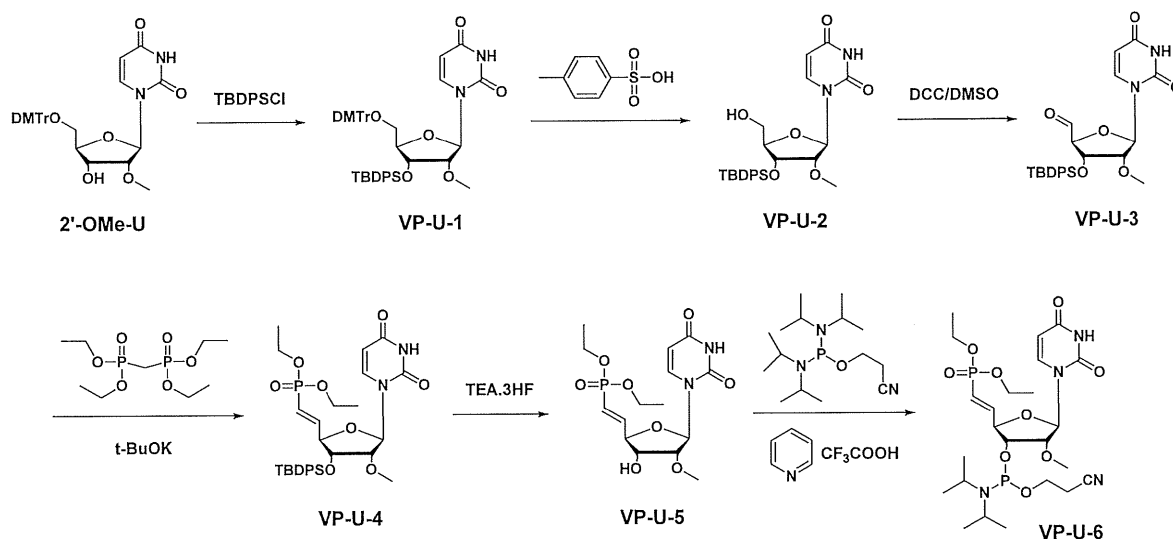
検出：イオン交換クロマトグラフィー (IEX-HPLC) を用いて純度を検出したところ、93.1% であった。液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) により分子量を分析したところ、理論値 6920.17、実測値 6919.9 であった。実測値が理論値と一致しており、合成されたのは標的配列を有するアンチセンス鎖 AS であることが示された。

【0416】

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。

【0417】

【化68】



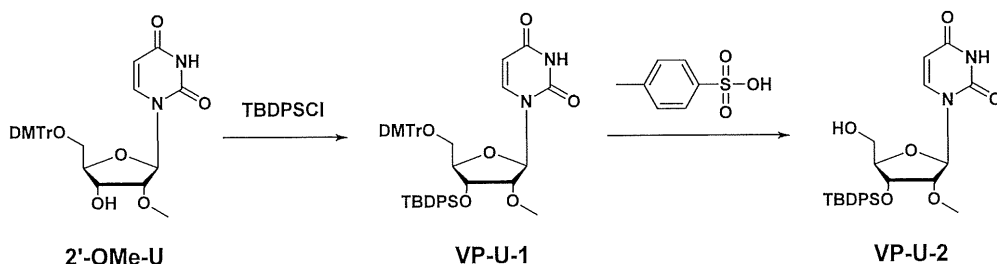
【0418】

(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。

【0419】

【化69】



2'-メトキシ修飾ウラシルヌクレオシド (2'-OMe-U、51.30g、91.

10

20

30

40

50

6 mmol)、tert-ブチルジフェニルクロロシラン (TBDPSCl、50.35 g、183.2 mmol)、イミダゾール (12.47 g、183.2 mmol) を混合して450 mlのN,N-ジメチルホルムアミド (DMF) に溶解させ、室温で20 h 攪拌反応させた。DMFを留去し、600 mlのジクロロメタンで溶解した後、300 ml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300 mlで3回抽出し、有機相を合わせ、5%シュウ酸で水相をpH < 5になるまで洗浄し、乾燥させ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。

【0420】

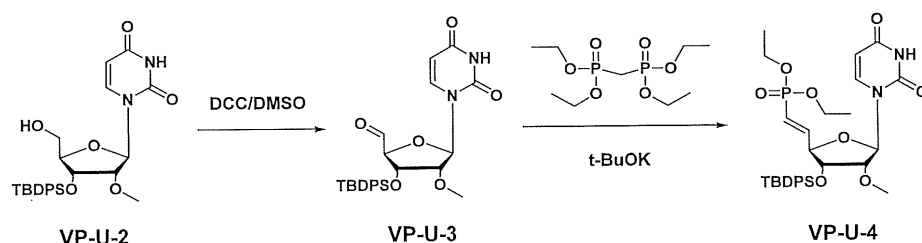
VP-U-1粗製品を100 mlのジクロロメタンで溶解した後、氷浴を施して10分間攪拌し、さらに、予め4の冷蔵庫で冷蔵された450 mlの2% p-トルエンスルホン酸溶液 (溶剤が、体積比3:7のメタノール-ジクロロメタン混合溶剤である) を加え、10分間反応させた。さらに200 mlの飽和炭酸水素ナトリウムを加えて反応をクエンチングし、有機相に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えてpH = 8になるまで洗浄した。水相を合わせ、ジクロロメタンで1回あたり200 mlで2回抽出し、有機相を合わせ、さらに200 mlの飽和食塩水で1回洗浄し、乾燥させるまで溶剤を蒸発させた。200~300メッシュの順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40.00 gの純粋なVP-U-2を得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) 7.96 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.64 (dtd, J = 5.1, 4.0, 2.2 Hz, 4H), 7.41-7.30 (m, 6H), 6.79 (d, J = 4.7 Hz, 1H), 5.73 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.94 (t, J = 7.0 Hz, 1H), 4.12 (td, J = 4.6, 3.9 Hz, 1H), 4.05 (dd, J = 4.8, 4.0 Hz, 1H), 3.96 (t, J = 4.7 Hz, 1H), 3.68 (ddd, J = 11.8, 7.0, 4.6 Hz, 1H), 3.57-3.46 (m, 1H), 3.39 (s, 3H), 1.05 (s, 8H). MS m/z: C₂₆H₃₃N₂O₆Si, [M+H]⁺、理論値: 497.21、実測値: 497.45。

【0421】

(1-3-2) VP-U-4の合成:

【0422】

【化70】



VP-U-2 (19.84 g、40.0 mmol)、ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC、16.48 g、80.0 mmol)、ピリジン (4.20 g、53.2 mmol)、トリフルオロ酢酸 (6.61 g、53.2 mmol) を混合して200 mlのジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解させ、室温で20 h 攪拌反応させた。別に、メチレンジホスホン酸テトラエチル (21.44 g、74.4 mmol) を120 mlのTHFに溶解させ、氷浴で降温させ、氷浴温度でt-BuOK (11.36 g、101.2 mmol) を加え、氷浴温度で10 min 反応させた後、室温まで昇温して0.5 h 反応させ、その後、約1 h かけて前述した反応液に加え、氷浴温度で1 h 反応させた後、室温まで昇温して18 h 反応させた。水を加えて反応をクエンチングし、水相をジクロロメタンで

1回あたり200mlで3回抽出した。有機相を合わせ、200mlの飽和食塩水で1回洗淨した後乾燥させ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=1：1~1：4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14.00gの純粋なVP-U-4を得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) 7.96 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.64 (dtd, J = 5.1, 4.0, 2.2 Hz, 4H), 7.41 - 7.30 (m, 6H), 6.82 - 6.71 (m, 2H), 5.90 (ddd, J = 25.9, 15.0, 1.0 Hz, 1H), 5.73 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.36 - 4.21 (m, 3H), 4.18 (t, J = 4.9 Hz, 1H), 4.05 (ddq, J = 9.7, 8.5, 6.9 Hz, 2H), 3.87 (t, J = 4.8 Hz, 1H), 3.39 (s, 3H), 1.32 (td, J = 6.9, 0.7 Hz, 6H), 1.05 (s, 8H). MS m/z: C₃₁H₄₂N₂O₈PSi, [M+H]⁺、理論値：629.24、実測値：629.51。

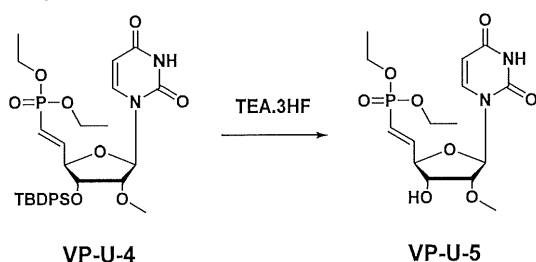
10

【0423】

(1-3-3) VP-U-5の合成：

【0424】

【化71】



20

VP-U-4 (14.00g, 22.29mmol)を100ml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(17.96g, 111.45mmol)を加え、室温で20h攪拌して完全に反応させた。そのまま乾燥させるまで溶剤を蒸発させ、50ml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6.70gの純粋なVP-U-5を得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) 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 (ddd, 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: C₁₅H₂₄N₂O₈P, [M+H]⁺、理論値：391.13、実測値：391.38。

30

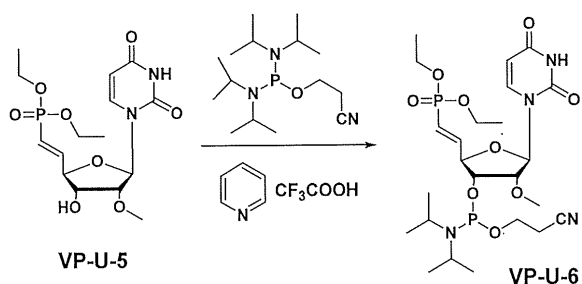
40

【0425】

(1-3-4) VP-U-6の合成：

【0426】

【化72】



アルゴン保護条件で10mlの無水ジクロロメタンにVP-U-5(391mg、1.0mmol)、ピリジントリフルオロアセテート(0.232g、1.2mmol)、N-メチルイミダゾール(0.099g、1.2mmol)、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(0.452g、1.5mmol)を加え、室温で5時間攪拌反応させた。乾燥させ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(0.5wt%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508mgの目的生成物VP-U-6を得た。³¹P NMR(161MHz, DMSO-d₆) 150.34, 150.29, 17.07, 15.50. MS m/z: C₂₄H₄₁N₄O₉P₂, [M+H]⁺、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。

10

20

【0427】

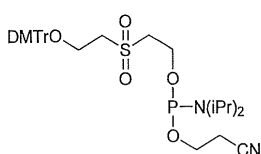
(1-3B)複合体2のアンチセンス鎖の調製

複合体2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-XX)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。

30

【0428】

【化73】



(CPR-I)

【0429】

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、酸化又は硫化の反応条件、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る。

40

【0430】

イオン交換クロマトグラフィー(IEX-HPLC)により純度を検出したところ、99.0%であった。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ところ、理論値6924.43、実測値6924.0であった。実測値が理論値と一致しており、合成されたのは標的配列を有するアンチセンス鎖ASであることが示された。

【0431】

(1-3C)複合体3のアンチセンス鎖の調製

CPR-Iモノマーを結合する場合、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2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

50

酸エステル修飾を有する複合体 3 のアンチセンス鎖を製造できると期待される。

【0432】

(1-4) 複合体 1 と複合体 2 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、40 mg/mL の溶液を得、等モル比で混合し、50 で 15 min 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 18.2 M * cm (25)) を用いて複合体を濃度が 0.2 mg/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: LCT Premier) により分子量を検出した。その結果、理論値 S : 7627.5、AS : 6920.17、実測値 S : 7626.9、AS : 6920.1 であり、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。

10

【0433】

複合体 2 について、同じ方法により調製し、分子量を検出した。その結果、理論値 S : 7627.5、AS : 6924.43、実測値 S : 7626.5、AS : 6923.4 であり、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。

【0434】

複合体 1 と複合体 2 の構造は、式 (403) に示すとおりである。

20

【0435】

(調製例 2) 複合体 4 ~ 12 及び比較複合体 1 の調製

1) 前記 siRNA が、それぞれ表 3 に示される複合体 4 ~ 12 及び比較複合体 1 に対応する配列であり、2) 標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、0.4 ml / 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期待される。

【0436】

表題複合体に複合された siRNA の配列は、表 3 に示すとおりである。比較複合体 1 に含まれる siRNA は、HBV 遺伝子に対して抑制作用のない陰性対照 siRNA である。

30

【0437】

【表 3】

s i R N A 複合体

s i R N A 複合体	番号	配列方向 5' - 3'	配列番号	
複合体 1	L 1 0 - s i H B 3 M 1 S V P	S	G m s A m s A m A m G m U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	2 4
		A S	V P - U m s A f s U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m s U m s U m	6 7
複合体 2	L 1 0 - s i H B 3 M 1 S P	S	G m s A m s A m A m G m U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	2 4
		A S	P - U m s A f s U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m s U m s U m	6 8
複合体 3	L 1 0 - s i H B 3 M 1 S P s	S	G m s A m s A m A m G m U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	2 4
		A S	P s - U m s A f s U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m s U m s U m	6 9
複合体 4	L 1 0 - s i H B 3 M 1 V P	S	G m A m A m A m G m U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	1 2
		A S	V P - U m A f U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m U m U m	7 0
複合体 5	L 1 0 - s i H B 3 M 1 P	S	G m A m A m A m G m U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	1 2
		A S	P - U m A f U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m U m U m	7 1
複合体 6	L 1 0 - s i H B 3 M 1	S	G m A m A m A m G m U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	1 2
		A S	U m A f U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m U m U m	1 5
複合体 7	L 1 0 - s i H B 3 M 1 S	S	G m s A m s A m A m G m U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	2 4
		A S	U m s A f s U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m s U m s U m	2 7
複合体 8	L 1 0 - s i H B 3 M 2 S V P	S	G m s A m s A m A m G f U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	3 0
		A S	V P - U m s A f s U m U m C m G f U m U f G f A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m s U m s U m	7 2
複合体 9	L 1 0 - s i H B 3 M 3 S P	S	G m s A m s A m A m G f U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	3 0
		A S	P - U m s A f s U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m s U m s U m	6 8
複合体 10	L 1 0 - s i H B 2 M 1 S P	S	G m s A m s A m A m G m U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m U m	2 3
		A S	P - A m s A f s U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m s C m s A m	7 3
複合体 11	L 1 0 - s i H B 5 M 1 S V P	S	U m s G m s G m A m A m A m G m U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	5 6
		A S	V P - U m s A f s U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m s U m s U m	7 4

10

20

30

40

			m A m U m A f C m U f U m U m C m C m A m s U m s U m	
複合体 12	L10-s iHB3	S	G A A A G U A U G U C A A C G A A U A	75
		AS	U A U U C G U U G A C A U A C U U U C U U	76
複合体 13	P10-s iHB3M 1SVP	S	G m s A m s A m A m G m U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	24
		AS	V P - U m s A f s U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m s U m s U m	67
複合体 14	R5-s iHB3M 1SVP	S	G m s A m s A m A m G m U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	24
		AS	V P - U m s A f s U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m s U m s U m	67
複合体 15	LA5-s iHB3M 1SVP	S	G m s A m s A m A m G m U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	24
		AS	V P - U m s A f s U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m s U m s U m	67
複合体 16	LB5-s iHB3M 1SVP	S	G m s A m s A m A m G m U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	24
		AS	V P - U m s A f s U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m s U m s U m	67
複合体 17	V8-s iHB3M 1SVP	S	G m s A m s A m A m G m U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	24
		AS	V P - U m s A f s U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m s U m s U m	67
複合体 18	W8-s iHB3M 1SVP	S	G m s A m s A m A m G m U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	24
		AS	V P - U m s A f s U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m s U m s U m	67
複合体 19	X8-s iHB3M 1SVP	S	G m s A m s A m A m G m U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	24
		AS	V P - U m s A f s U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m s U m s U m	67
複合体 20	Z5-s iHB3M 1SVP	S	G m s A m s A m A m G m U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	24
		AS	V P - U m s A f s U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m s U m s U m	67
比較複 合体1	L10-s iNCM 1SP	S	U m s U m s C m U m C m C m G f A f A f C m G m U m G m U m C m A m C m G m U m	77
		AS	P - A m s C f s G m U m G m A f C m A m C m G m U m U m C m G f G m A f G m A m A m s C m s U m	78
比較複 合体2	K4-s iHB3M 1SVP	S	G m s A m s A m A m G m U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	24
		AS	V P - U m s A f s U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m s U m s U m	67

10

20

30

40

【0438】

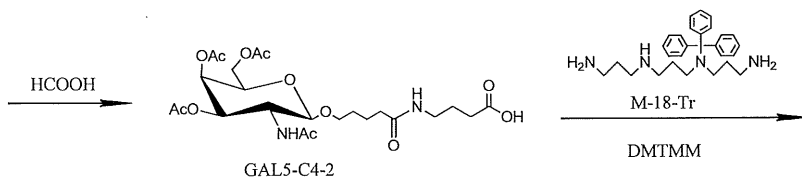
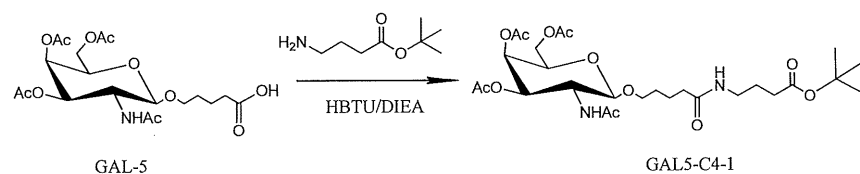
(調製例3) P10-siHB3M1SVP複合体(複合体13)の調製

(3-1) P-10化合物の合成

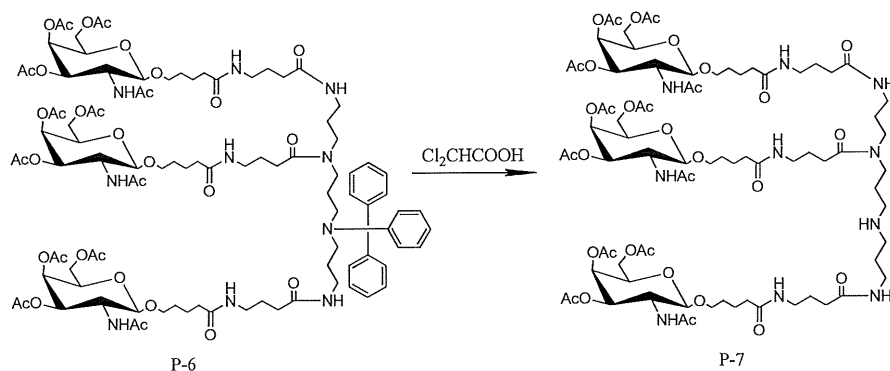
以下の方法に従い、P-10化合物を合成した。

【0439】

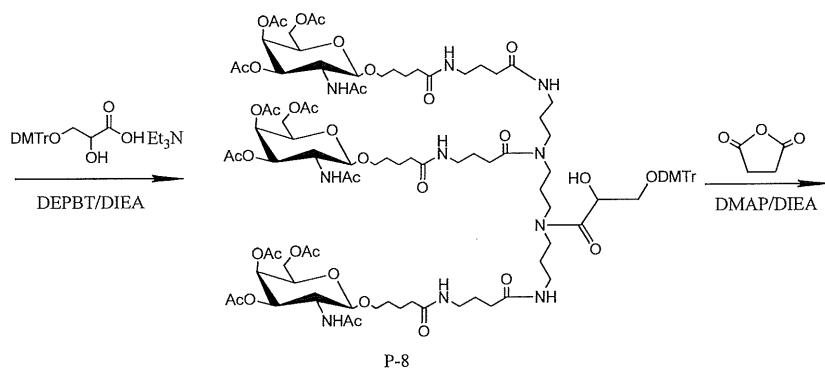
【化74】



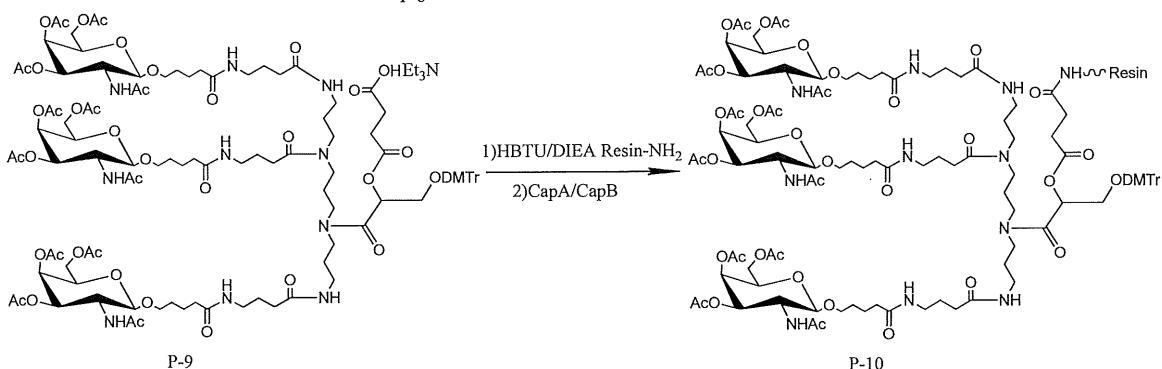
10



20



30



40

【0440】

(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 - テトラ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、有機相を合わせ、200 ml 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

50

せ、溶剤を減圧留去して油ポンプで乾燥させるまで吸引濾過し、30.3 gの油状物粗製品GAL5-C4-1を得、そのまま次の反応を行った。

【0441】

(3-1-2) GAL5-C4-2の合成

工程(3-1-1)で得られたGAL5-C4-1粗製品(30.3 g、30 mmol)を180 mlギ酸に溶解させ、室温で16時間攪拌反応させた。乾燥させ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GAL5-C4-2を得た。

10

【0442】

(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GAL5-C4-2(8.24 g、15.48 mmol、2バッチの生成物を合わせたもの)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。20 mlのジクロロメタンで反応液を希釈し、10 mlの飽和炭酸水素ナトリウム溶液で有機相を洗浄し、10 mlの飽和食塩水で有機相を洗浄し、有機相を合わせ、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

【0443】

(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 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、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 mlで6回抽出し、有機相を合わせ、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：C₇₈H₁₂₇N₁₀O₃₃，[M+H]⁺、理論値：1732.91、実測値：1735.73。

30

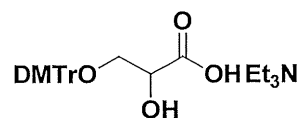
【0444】

(3-1-5) P-8の合成：

40

【0445】

【化75】



(A-1)

P-7(2.653 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.

50

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、有機相を合わせ、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。

【0446】

(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 (DMA P、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、有機相を合わせ、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 : C₁₀₆H₁₅₃N₁₀O₄₁, [M - DMTr]⁺、理論値：1921.05、実測値：1920.97。

【0447】

(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。

【0448】

(3 - 2) P10 - siHB3M1SV 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 - 4) と同じ方法により、複合体 13 を調製した。式 (404) に示す構造の P10 - siHB3M1SV P 複合体を得ることができると期待される。

【0449】

(調製例 4) R5 - siHB3M1SV P 複合体 (複合体 14) 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。

【0450】

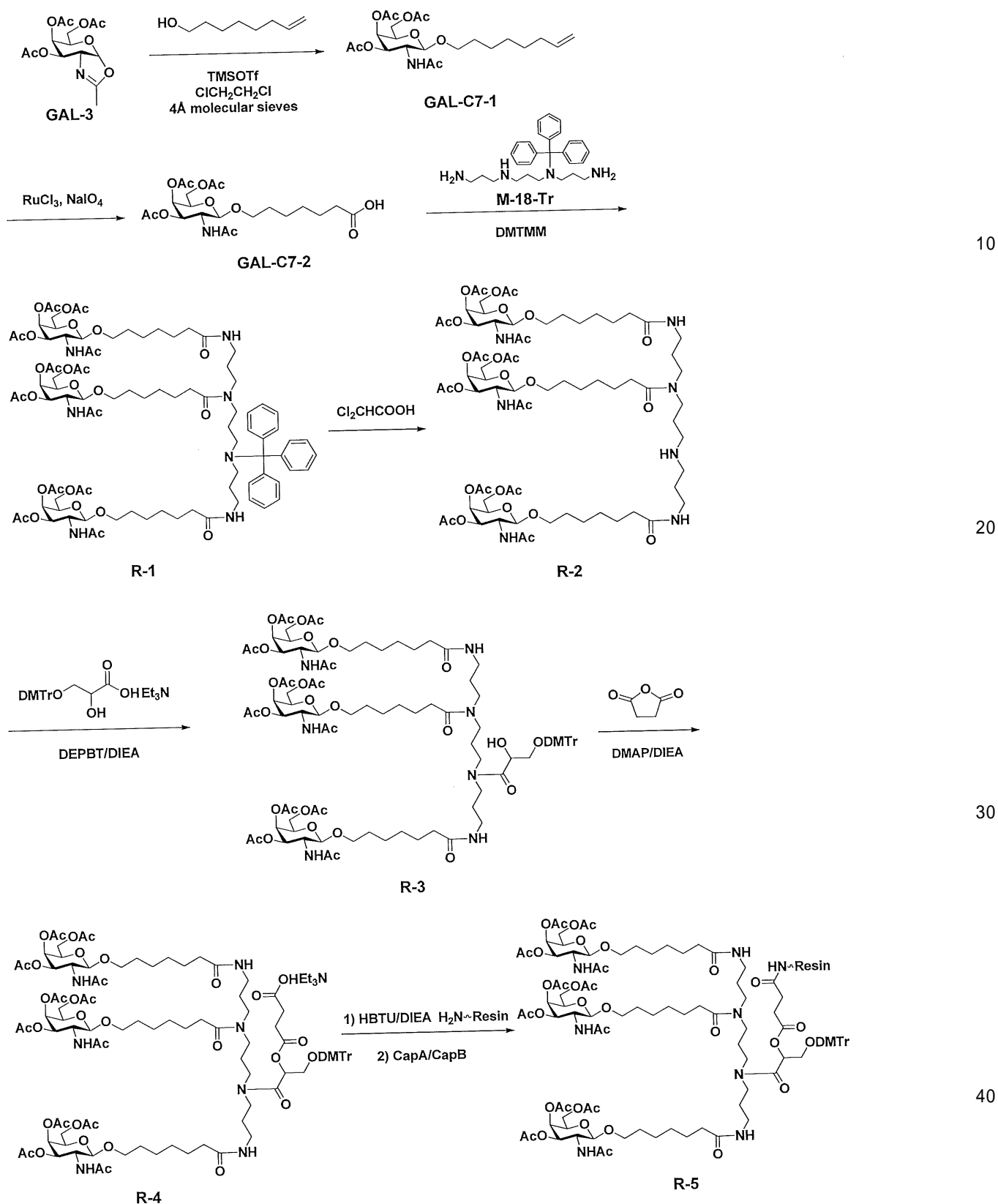
10

20

30

40

【化76】



10

20

30

40

50

【0451】

(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4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 . 9 g、40 . 1 mmol) を加え、室温で24時間攪拌反応させた。4 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、有機相を合わせ、250ml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、溶剤を減圧留去して油ポンプで乾燥させるまで吸引濾過し、33.3g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。

【0452】

(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160mlのジクロロメタンと160mlのアセトニトリルの混合溶剤に溶解させ、それぞれ216ml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23時間攪拌反応させた。反応液に200ml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200mlで3回抽出し、有機相を合わせ、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22.4gの白色泡状固形製品 GAL - C7 - 2 を得た。MS m/z : C₂₁H₃₂NO₁₁, [M+H]⁺、理論値 : 476.50、実測値 : 475.94。

10

20

【0453】

(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47ml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2h攪拌反応させた。200mlのジクロロメタンで反応液を希釈し、100mlの飽和炭酸水素ナトリウム溶液で有機相を洗浄し、100mlの飽和食塩水で有機相を洗浄し、有機相を合わせ、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、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 = 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7.82gの純粋なR - 1を得た。

30

【0454】

(4 - 1 - 4) R - 2 の合成 :

R - 1 (6 . 23 g、3 . 456 mmol) を69ml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2h反応させた。100ml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30mlで6回抽出し、有機相を合わせ、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。200 ~ 300メッシュの順相シリカゲルを用いて、10wt%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4.49gの純粋なR - 2を得た。

40

【0455】

(4 - 1 - 5) R - 3 の合成 :

R - 2 (2 . 391 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、有機相を合わせ、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、溶剤を減圧蒸発乾固して 2.642 g の純粋な R - 3 を得た。

10

【0456】

(4 - 1 - 6) R - 4 の合成 :

R - 3 (795 mg、0.4074 mmol)、コハク酸無水物 (82 mg、0.8148 mmol) 及び 4 - ジメチルアミノピリジン (DMA P、100 mg、0.8148 mmol) を混合して 4 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、100 mg、0.8148 mmol) を加え、25 で 18 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、有機相を合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 505 mg の純粋な R - 4 複合分子を得た。

20

【0457】

(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。

30

【0458】

(4 - 2) R5 - siHB3M1SVP 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 - 4) と同じ方法により、複合体 14 を調製した。式 (407) に示す構造の R5 - siHB3M1SVP 複合体を得ることができると期待される。

【0459】

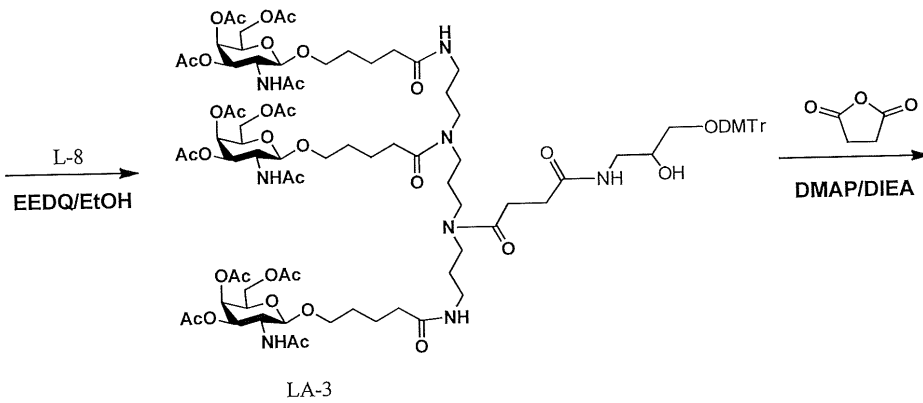
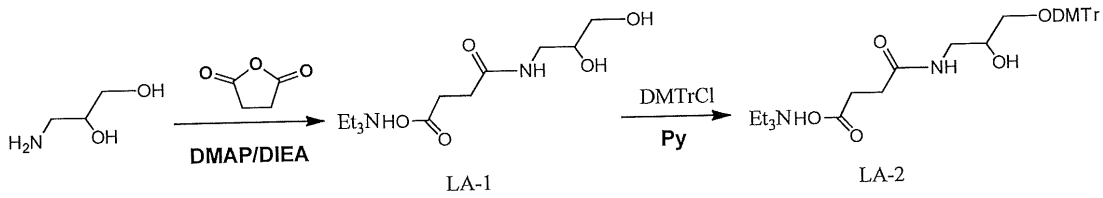
(調製例 5) LA5 - siHB3M1SVP 複合体 (複合体 15) の調製

以下のプロセス経路により、LA - 5 化合物を合成できると期待される。

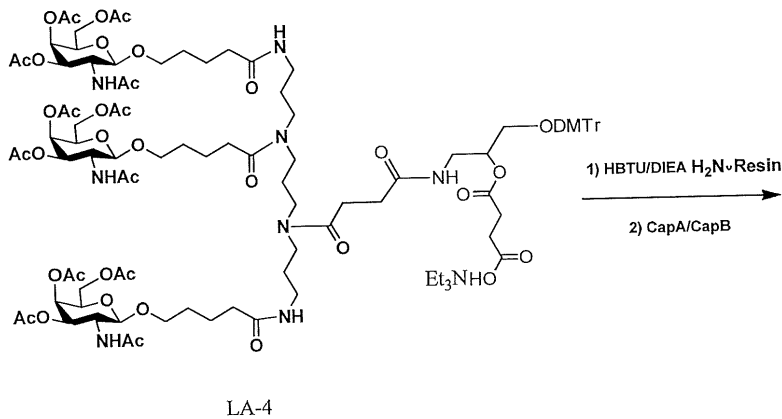
40

【0460】

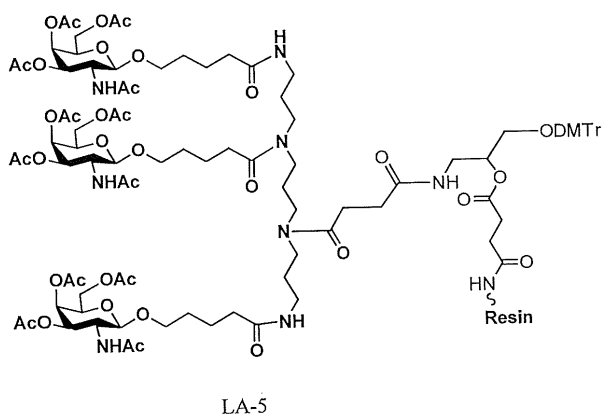
【化77】



10



20



30

40

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 - 4) と同じ方法により、複合体 15 を調製した。式 (4 1 2) に示す構造の LA 5 - s i H B 3 M 1 S V P 複合体を得ることができると期待される。

【0461】

(調製例 6) LB 5 - s i H B 3 M 1 S V P 複合体 (複合体 16) の調製

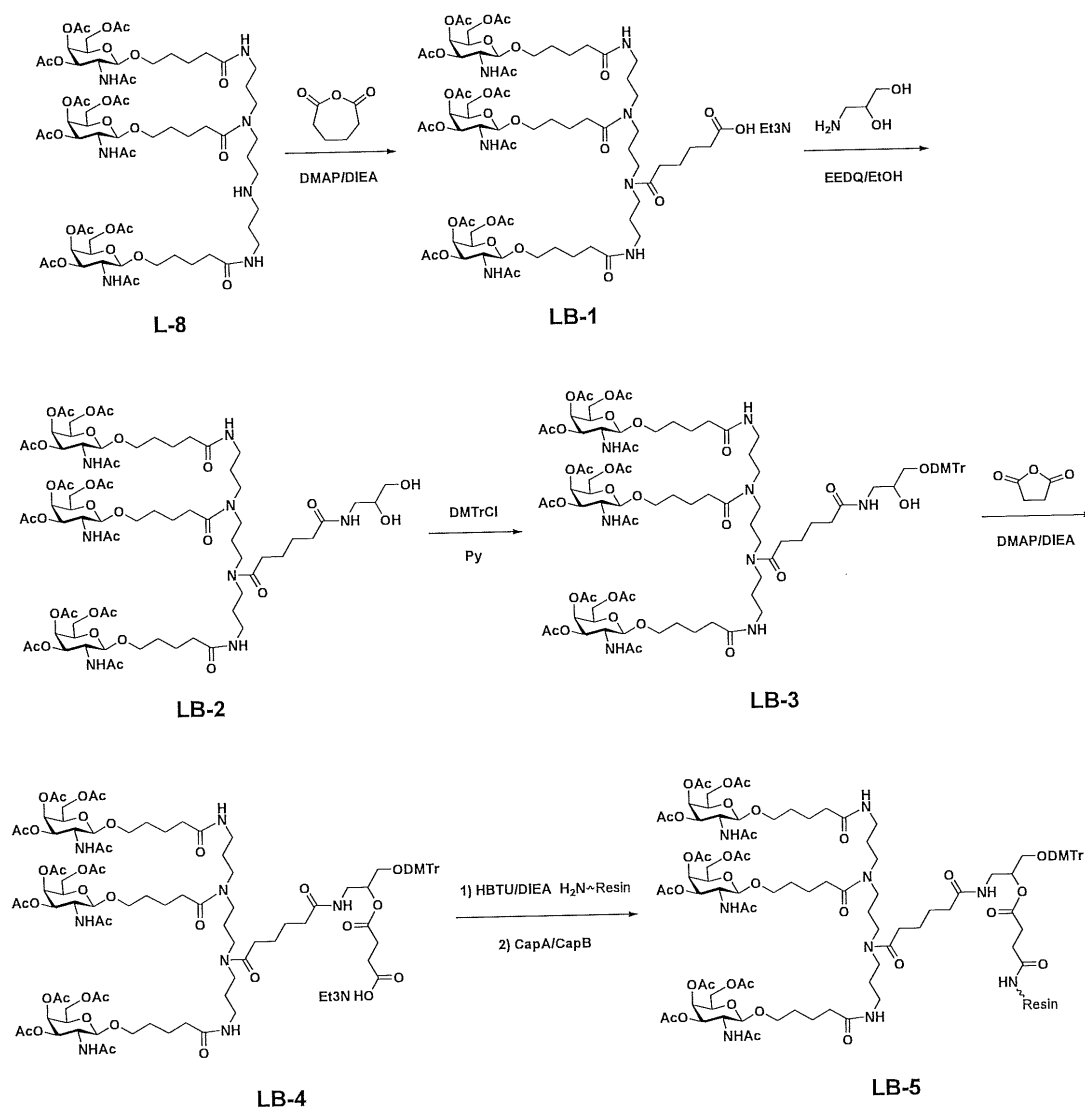
(6 - 1) LB - 5 化合物の合成

以下の方法に従い、LB - 5 化合物を合成した。

【0462】

50

【化78】



10

20

30

【0463】

(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、有機相を合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

【0464】

(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、2.753mmol、2バッチの生成物を合わせたもの)、3-アミノ-1,2-プロパンジオール(313mg、3.442mmol)、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、953mg、3.442mmol)

50

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。乾燥させ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。

【0465】

(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、乾燥させ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。

10

【0466】

(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、有機相を合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。

20

【0467】

(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。

30

【0468】

(6-2) LB5-siHB3M1SVP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)~(1-4)と同じ方法により、複合体16を調製した。式(413)に示す構造のLB5-siHB3M1SVP複合体を得ることができると期待される。

【0469】

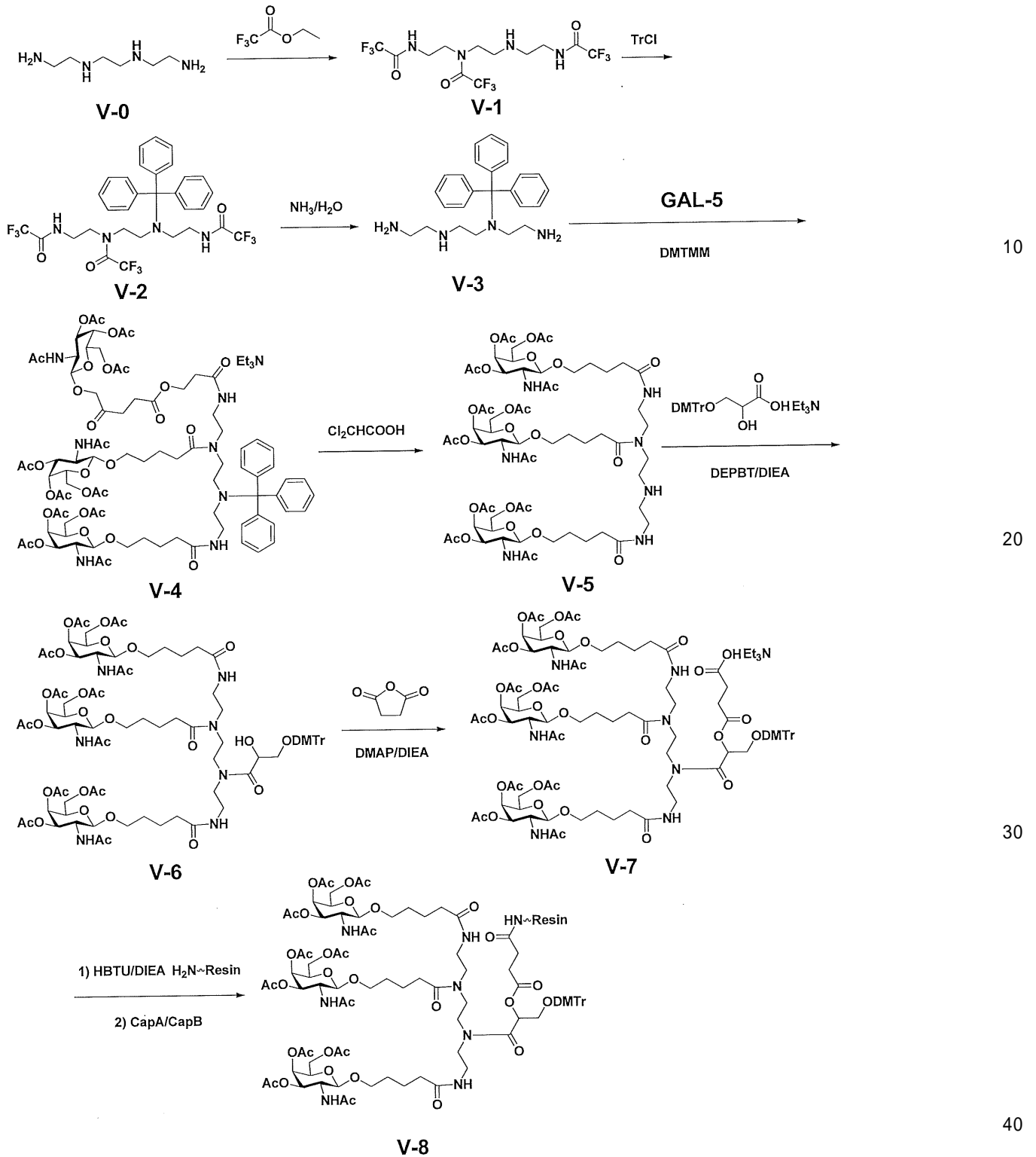
(調製例7) V8-siHB3M1SVP複合体(複合体17)の合成

以下のプロセス経路により、V-8化合物を合成できると期待される。

40

【0470】

【化79】



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) ~ (1-4) と同じ方法により、複合体 17 を調製した。式 (414) に示す構造の V8-siHB3M1SVP 複合体を得ることができると期待される。

【0471】

(調製例 8) W8-siHB3M1SVP 複合体 (複合体 18) 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。

【0472】

10

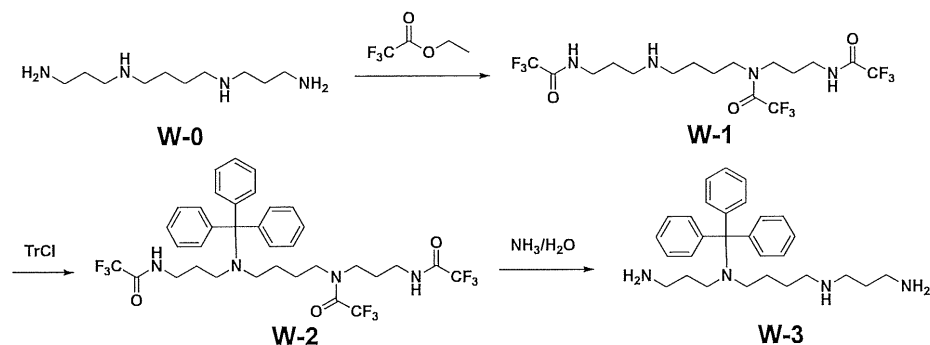
20

30

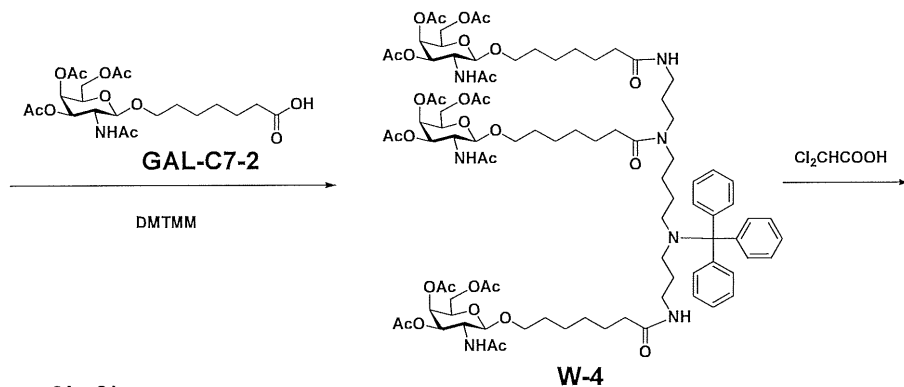
40

50

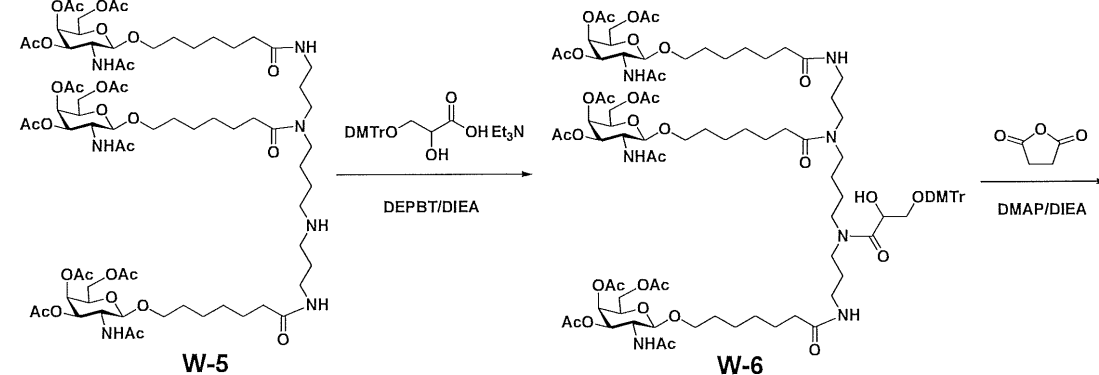
【化 8 0】



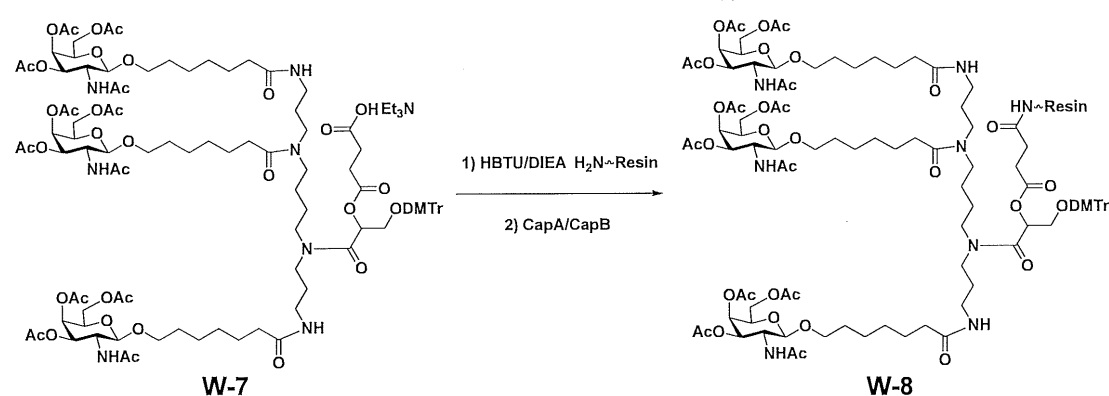
10



20



30



40

【 0 4 7 3 】

(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 度 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 7 4 】

(8 - 1 - 2) W - 2 の合成 :

W - 1 粗 製 品 (5 . 8 3 5 g 、 1 0 m m o l) を 5 0 m l の ジクロロメタン に 溶 解 さ せ

50

、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、有機相を合わせ、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、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。

【0475】

(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、有機相を合わせ、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、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。

10

【0476】

(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、有機相を合わせ、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、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。

20

30

【0477】

(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。

40

【0478】

(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、有機相を合わせ、10 ml の飽和食塩水で洗浄し、有機

50

相を合わせ、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 : 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。

【0479】

(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、有機相を合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 : C₁₀H₁₄N₇O₃, [M - DMT⁺]_r、理論値：1763.92、実測値：1763.21。

10

20

【0480】

(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。

【0481】

(8 - 2) W₈ - siHB₃M₁SV₁P 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 - 4)と同じ方法により、複合体18を調製した。式(415)に示す構造のW₈ - siHB₃M₁SV₁P複合体を得ることができると期待される。

30

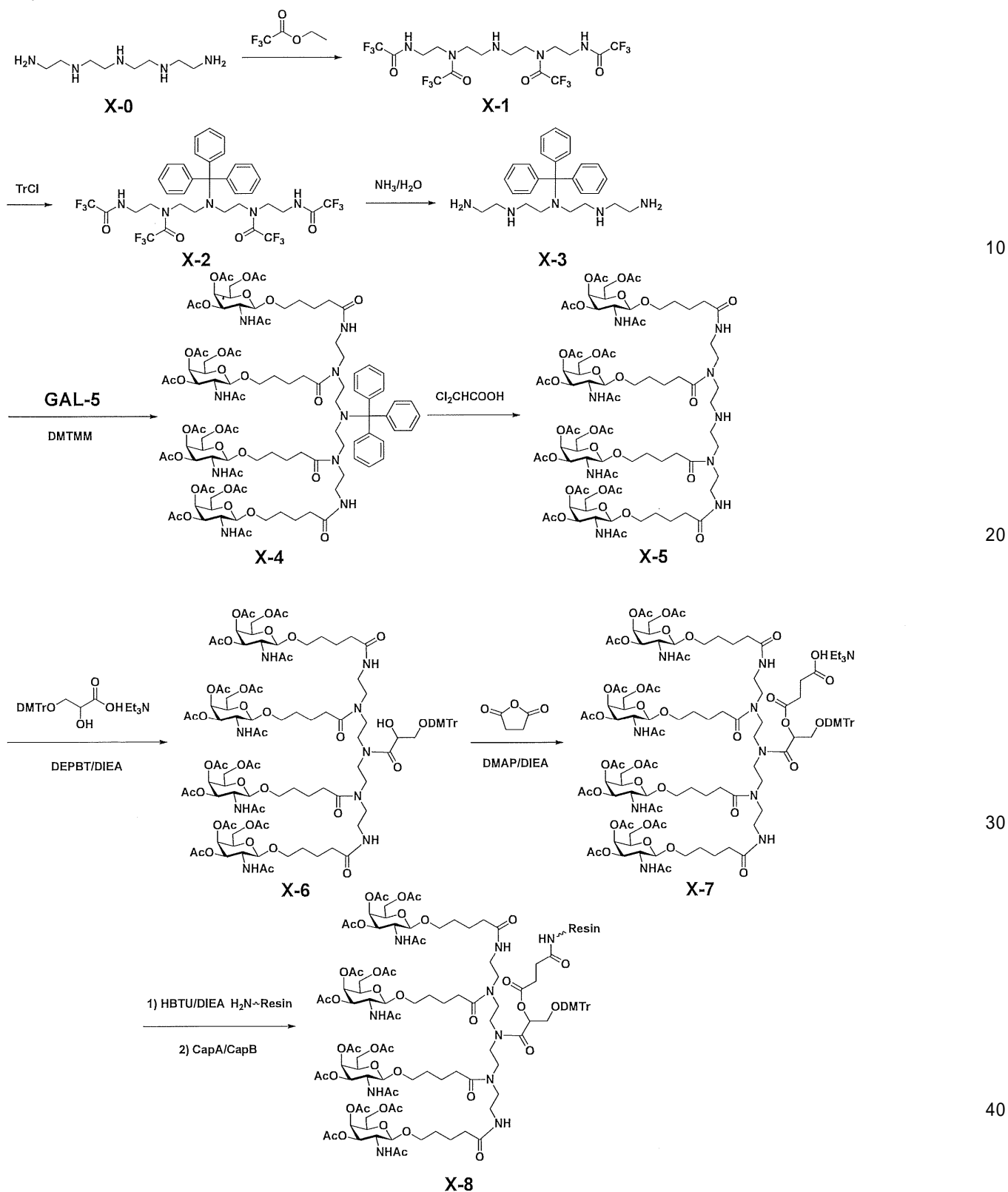
【0482】

(調製例9) X₈ - siHB₃M₁SV₁P 複合体(複合体19)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期待される。

【0483】

【化 8 1】



10

20

30

40

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 - 4) と同じ方法により、複合体 19 を調製した。式 (4 2 1) に示す構造の X 8 - s i H B 3 M 1 S V P 複合体を得ることができると期待される。

【 0 4 8 4 】

(調製例 10) Z 5 - s i H B 3 M 1 S V P 複合体 (複合体 20) の調製

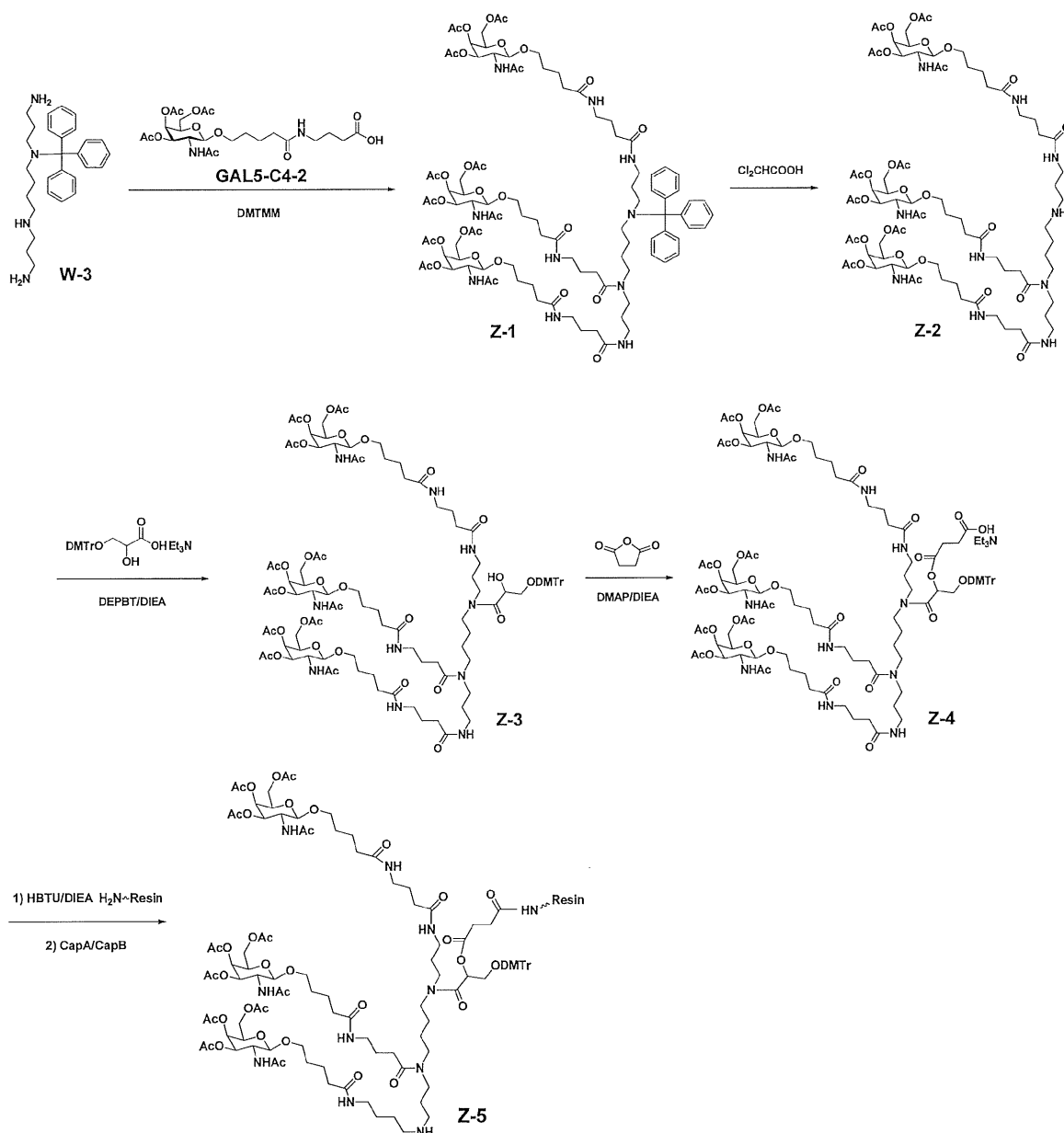
(1 0 - 1) Z - 5 化合物の合成

50

以下の方法に従い、Z-5化合物を合成した。

【0485】

【化82】



10

20

30

【0486】

(10-1-1) 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(1.50g、3.37mmol)と工程(3-1-2)に記載された方法により得られたGAL5-C4-2(7.18g、13.48mmol)を混合して34ml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(3.48g、26.96mmol)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、4.04g、13.48mmol)を加え、室温で4.5h攪拌反応させた。100mlのジクロロメタンで反応液を希釈し、80mlの飽和炭酸水素ナトリウム溶液で有機相を洗浄し、80mlの飽和食塩水で有機相を洗浄し、有機相を合わせ、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、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=30：1~15：1で勾配溶出し、生成物溶出液を回収し、減圧蒸発乾固して3.97gの純粋なZ-1を得た。MS m/z：C₉₈H₁₄₃N₁₀O₃₃，[M+H]⁺、理論値：1987.9

40

50

8、実測値：1987.90。

【0487】

(10-1-2) Z-2の合成：

Z-1 (3.97 g、2.00 mmol) を250 mlのジクロロメタンに溶解させ、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 : C₇₉H₁₂₉N₁₀O₃₃, [M+H]⁺、理論値：1746.94、実測値：1746.90。

10

【0488】

(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、有機相を合わせ、50 mlの飽和食塩水で洗浄し、有機相を合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 : C₁₀₃H₁₅₁N₁₀O₃₈, [M+H]⁺、理論値：2136.02、実測値：2136.20。

20

【0489】

(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 (DMA P、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、有機相を合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 : C₁₀₇H₁₅₅N₁₀O₄₁, [M+H]⁺、理論値：1935.07、実測値：1935.29。

30

40

【0490】

(10-2) 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。

【0491】

(3-2) Z5-siHB3M1SVP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

50

外、調製例 1 における工程 (1 - 2) ~ (1 - 4) と同じ方法により、複合体 2 0 を調製した。式 (4 2 2) に示す構造の Z 5 - s i H B 3 M 1 S V P 複合体を得ることができると期待される。

【 0 4 9 2 】

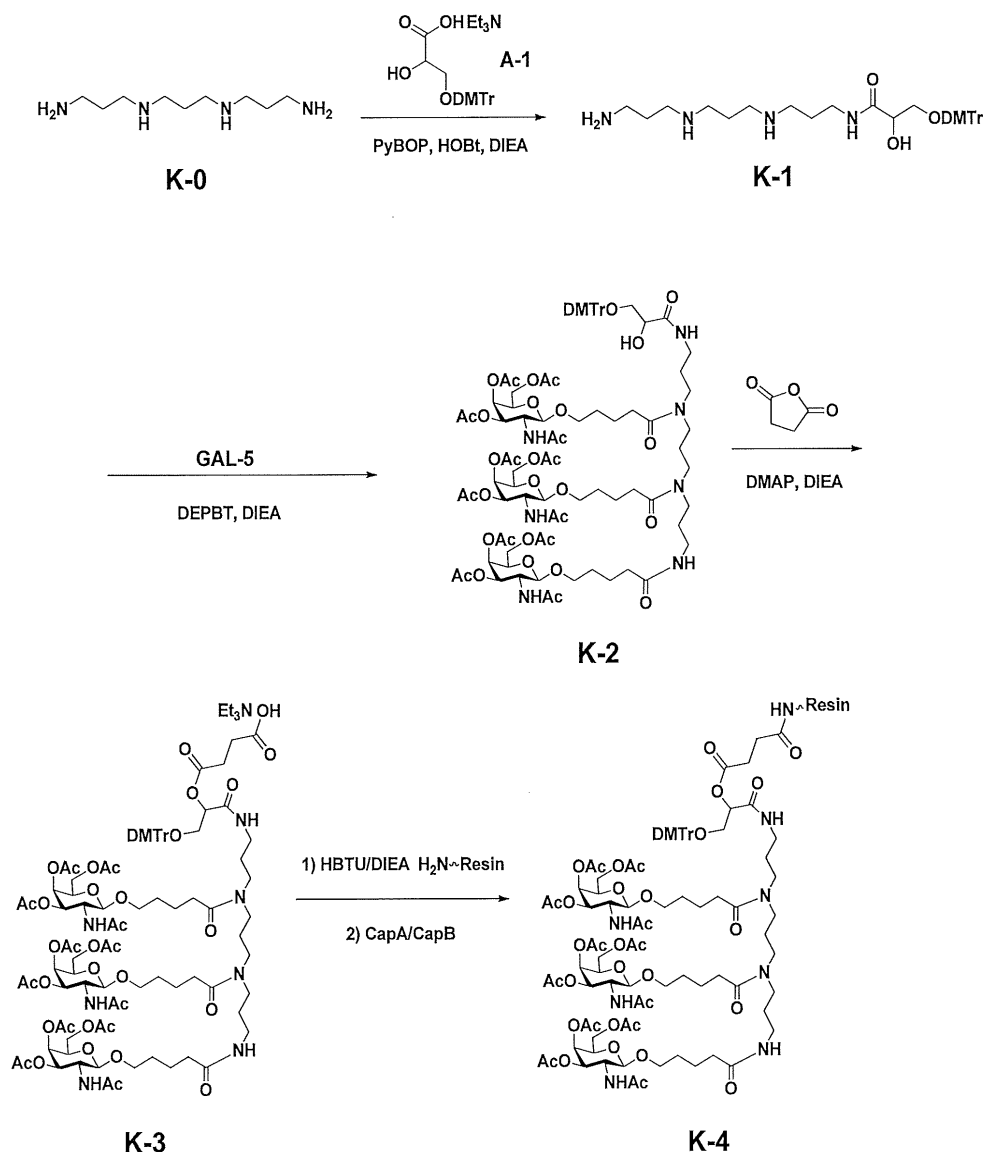
(調製例 1 1) K 4 - s i H B 3 M 1 S V P 複合体 (比較複合体 2) の調製

(1 1 - 1) K - 4 化合物の合成

以下の方法に従い、K - 4 化合物を合成した。

【 0 4 9 3 】

【 化 8 3 】



【 0 4 9 4 】

(1 1 - 1 - 1) K - 1 の合成 :

60 ml のジクロロメタンに、工程 (1 - 1 - 7 a) に記載された方法により得られた A - 1 (3 . 0 g 、 6 . 0 m m o l) 、 P y B O P (6 . 2 g 、 1 2 . 0 m m o l) 、 H O B t (1 . 6 g 、 2 . 0 m m o l) 及びジイソプロピルエチルアミン (D I E A 、 3 . 9 g 、 3 0 . 0 m m o l) を加え、室温で 1 0 分間攪拌反応させた後、上記溶液を K - 0 (5 . 6 g 、 3 0 . 0 m m o l) に加え、室温で 1 時間 5 0 分間反応させた。反応液を 3 0 m l の飽和炭酸水素ナトリウム溶液に入れ、水相をジクロロメタンで 1 回あたり 3 0 m l で 3 回抽出し、有機相を合わせ、飽和塩化ナトリウム溶液で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後に濾過濃縮した。200 ~ 300 メッシュの順相シリカゲルカラムで精製を行い、ジクロロメタン : メタノール : アンモニア水 (2 5 w t %) = 1 0 : 2 : 0 .

50

1 ~ 4 : 4 : 1 で勾配溶出し、生成物溶出液を回収し、溶剤を濃縮除去し、真空油ポンプで発泡乾燥させ、2.2 g の白色固形製品 K - 1 を得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) 8.02 (s, 1H), 7.43 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.34 - 7.17 (m, 7H), 6.87 (d, J = 8.6 Hz, 4H), 4.05 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 3.74 (s, 6H), 3.20 - 3.01 (m, 5H), 2.60 - 2.38 (m, 12H), 1.60 - 1.39 (m, 8H), 1.24 (s, 1H). MS m/z : C₃₃H₄₇N₄O₅、[M+H]⁺、理論 : 579.35、実測 : 579.26。
【0495】

(11-1-2) K - 2 の合成 :

10

3 ml のジクロロメタンに、(1-1-1) に記載された方法により得られた GAL - 5 (483 mg、1.08 mmol)、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 (359 mg、1.2 mmol)、ジイソプロピルエチルアミン (DIEA、310 mg、2.4 mmol) を加え、室温で 30 分間攪拌した後、K - 1 (174 mg、0.3 mmol) を加え、室温で 16 時間反応させた。反応液を 10 ml の飽和炭酸水素ナトリウム溶液に入れ、水相をジクロロメタンで 1 回あたり 10 ml で 3 回抽出し、有機相を合わせ、10 ml の飽和塩化ナトリウム溶液で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後に濾過濃縮した。200 ~ 300 メッシュの順相シリカゲルカラムで精製を行い、ジクロロメタン : メタノール = 20 : 1 で溶出し、生成物溶出液を回収し、溶剤を濃縮除去し、真空油ポンプで乾燥発泡させ、205 mg の黄色固形製品 K - 2 を得た。

20

【0496】

(11-1-3) K - 3 の合成 :

1.1 ml のジクロロメタンに、K - 2 (205 mg、0.11 mmol)、コハク酸無水物 (22 mg、0.22 mmol)、4 - ジメチルアミノピリジン (DMA P、27 mg、0.22 mmol) 及びジイソプロピルエチルアミン (DIEA、71 mg、0.55 mmol) を加え、室温で一晩攪拌反応させた。反応液を 0.5 M トリエチルアミンリン酸塩溶液で 1 回あたり 0.5 ml で 3 回洗浄し、洗浄するたびに水相をジクロロメタン 0.5 ml で 1 回逆抽出し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶剤を濃縮除去し、真空油ポンプで乾燥発泡させ、218 mg の薄黄色固形製品 K - 3 複合分子を得た。

30

【0497】

(11-1-4) K - 4 の合成 :

L - 9 複合分子の代わりに K - 3 複合分子を用い、固相担体に結合された K - 3 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、K - 4 を調製した。

【0498】

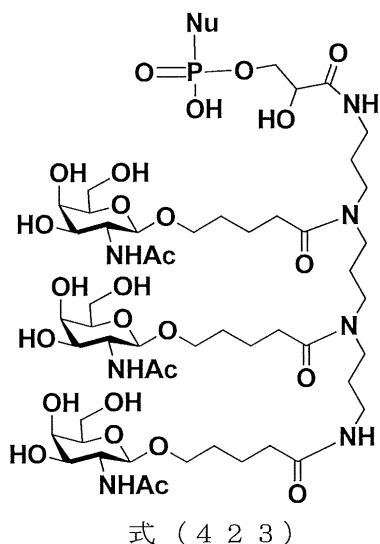
(11-2) K4 - siHB3M1SV P 複合体の合成

L - 10 化合物の代わりに K - 4 化合物を出発とし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) ~ (1-4) と同じ方法により、比較複合体 2 を調製した。式 (423) に示す構造の K4 - siHB3M1SV P 複合体を得ることができると期待される。

40

【0499】

【化 8 4】



ただし、Nuは、K4-siHB3M1SVP複合体におけるsiRNAである。

【0500】

(調製例12) siRNAの調製

通常の高相合成方法によって、表4に示した本開示により提供されるsiRNA配列を得て、DEPC水で等モルのセンス鎖とアンチセンス鎖の混合物を溶解させた後、通常のアニールを行ってsiRNA二本鎖を形成した。

【0501】

【表4】

siRNA配列

siRNA	番号	配列方向5' - 3'		配列番号
siRNA 1	siHB3M1SVP	センス鎖	G m s A m s A m A m G m U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	2 4
		アンチセンス鎖	V P - U m s A f s U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m s U m s U m	6 7
siRNA 2	siHB3M1S	センス鎖	G m s A m s A m A m G m U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	2 4
		アンチセンス鎖	U m s A f s U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m s U m s U m	2 7
siRNA 3	siHB3M1SPs	センス鎖	G m s A m s A m A m G m U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	2 4
		アンチセンス鎖	P s - U m s A f s U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m s U m s U m	6 9
siRNA 4	siHB3M1SP	センス鎖	G m s A m s A m A m G m U m A f U f G f U m C m A m A m C m G m A m A m U m A m	2 4
		アンチセンス鎖	P - U m s A f s U m U m C m G f U m U m G m A m C m A m U m A f C m U f U m U m C m s U m s U m	6 8
NC	siNCM1SP	センス鎖	U m s U m s C m U m C m C m G f A f A f C m G m U m G m U m C m A m C m G m U m	7 7
		アンチセンス鎖	P - A m s C f s G m U m G m A f C m A m C m G m U m U m C m G f G m A f G m A m A m s C m s U m	7 8

【0502】

表4において、siRNA 1~4は、本開示の、HBVのP遺伝子領域を特異的に標的とするsiRNAであり、NCは、HBV遺伝子に対して抑制作用のない陰性対照siRNAである。

【0503】

上記本開示のsiRNA又は複合体の調製を完成した後、標準的な手法により凍結乾燥して固形粉末とし、保存して使用に備えた。使用時には、例えば注射用水、生理食塩水(NS)、リン酸緩衝液(PB)又はリン酸塩緩衝液(PBS)等で新たに溶解させて所望の濃度の溶液として用いる。

【0504】

(実験例1) siRNA複合体の体外psiCHECK系におけるオンターゲット活性及びオフターゲット活性

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%CO₂/95%空気含有インキュベーターにおいて培養した。

【0505】

本実験例では、複合体2の体外psiCHECK系におけるオンターゲット活性(on-target activity)及びオフターゲット効果を調べた。

【0506】

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。

【0507】

[1] 検出プラスミドの構築

psiCHECKTM-2 (PromegaTM) 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、GSCMは、オンターゲットプラスミドを表し、PSCM、GSSM、PSSMは、オフターゲットプラスミドを表す。

(1) GSCMは、複合体2におけるアンチセンス鎖の5'端から2~19位のヌクレオチド配列と完全に相補的な標的配列を含む。GSCMは、アンチセンス鎖のオンターゲット活性を検出するために用いられる。

(2) PSCMは、複合体2におけるセンス鎖の5'端から1~18位のヌクレオチド配列と完全に相補的な標的配列を含む。PSCMは、センス鎖のオフターゲット活性を検出するために用いられる。

(3) GSSMは、複合体2におけるアンチセンス鎖の5'端から2~8位のヌクレオチド配列と完全に相補的であり、残部が複合体2におけるアンチセンス鎖の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、複合体2におけるアンチセンス鎖の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、標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である標的配列を含む。GSSMは、アンチセンス鎖のシード領域のオフターゲット

10

20

30

40

50

ト活性を検出するために用いられる。

(4) P S S Mは、複合体2におけるセンス鎖の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、残部が複合体2におけるセンス鎖の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、複合体2におけるセンス鎖の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、標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である標的配列を含む。P S S Mは、センス鎖のシード領域のオフターゲット活性を検出するために用いられる。

【0508】

上記各標的配列は、いずれも蘇州吉瑪でカスタマイズされており、配列情報は表5に示すとおりである。

【0509】

【表5】

標的配列

プラスミド名称	番号	配列方向 5' - 3'	配列番号
G S C M	G S C M - s	センス鎖 T C G A G T G G A A A G T A T G T C A A C G A A T T G C	7 9
	G S C M - a s	アンチセンス鎖 G G C C G C A A T T C G T T G A C A T A C T T T C C A C	8 0
P S C M	P S C M - s	センス鎖 T C G A G A A T T C G T T G A C A T A C T T T C C A G C	8 1
	P S C M - a s	アンチセンス鎖 G G C C G C T G G A A A G T A T G T C A A C G A A T T C	8 2
G S S M	G S S M - s	センス鎖 T C G A G G T T C C C T G C G T G A A A C G A A T T G C	8 3
	G S S M - a s	アンチセンス鎖 G G C C G C A A T T C G T T T C A C G C A G G G A A C C	8 4
P S S M	P S S M - s	センス鎖 T C G A G C C G G A T G G T C A C G A C T T T C C A G C	8 5
	P S S M - a s	アンチセンス鎖 G G C C G C T G G A A A G T C G T G A C C A T C C G G C	8 6

【0510】

標的配列を p s i C H E C K T M - 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。

【0511】

[2] トランスフェクション

96 ウェルプレートに、LipofectamineTM 2000 (Invitrogen社)の使用説明書により、それぞれsiRNA複合体と、プラスミドごとに若干群の特定の濃度の複合体2が対応している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LipofectamineTM 2000を用いた。G S C M オフターゲットプラスミドについて、複合体2の最終濃度 (siRNAの濃度として算出) が1nMから、0.000977nMまで11個の濃度に倍加希釈した。他の3個のオフターゲットプラスミドについて、複合体2の最終濃度が10nMから、0.000038nMまで10個の濃度に4倍希釈した。各群では、siRNA複合体処理なしを対照とした。1群あたり3個の複製ウェルがあった。

【0512】

[3] 検出

10

20

30

40

50

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、使用明細書によりHEK293A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。異なるsiRNA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 - 効果曲線から複合体2のGSCMを標的したIC50値を算出した。

【0513】

10

【数1】

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

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複合体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、曲線の傾きである。

20

【0514】

その結果から、GSCMに対応して、複合体2のIC50が0.0513nM ($R^2 = 0.9911$) であり、PSCM、GSSM、PSSMに対応して、複合体2は、siRNAの各濃度でいずれも明らかな抑制効果が認められなかったことが示され、本開示のsiRNA複合体は、体外で高い活性を有するとともに、さらに低いオフターゲット効果を有することが証明された。

【0515】

(実験例2) siRNA複合体の体外リソソーム溶解液における安定性

本実験例に用いられる陰性対照siRNA配列は、以下のとおりである。

30

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

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

【0516】

当該siRNAは、固相ホスホルアミダイト法により合成された。0.9%塩化ナトリウム水溶液で陰性対照及び複合体2をそれぞれ濃度20μM (siRNAの濃度として算出) の溶液として調製し、陰性対照及び複合体2と記した。

【0517】

1) マウス由来のリソソーム溶解液における安定性の検出

40

リソソーム溶解液で処理された試験サンプルの調製：各6μlの複合体2及び陰性対照(20μM)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のマウス由来のリソソーム溶解液(Rat Liver Tritosomes、Xenotech社、番号R0610.LT、ロット番号1610069)と均一に混合し、酸性ホスファターゼの最終濃度が0.2mU/μLであった。37℃で恒温培養した。それぞれ0、1、2、4、6、24時間でそれぞれ混合液を5μl取り出し、15μLの9M尿素溶液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直後に取り出した時点を表す。

50

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2及び陰性対照（20 μM）を各1.5 μLとり、それぞれ7.5 μLのクエン酸ナトリウム水溶液（pH 5.0）、1 μLの脱イオン水と均一に混合し、30 μLの9 M尿素溶液を加えて変性させた後、8 μLの6 × 試料負荷緩衝液を加えて均一に混合し、直ちに-80の冷蔵庫に冷凍して反応を停止させた。陰性対照の参照サンプルをM1と記し、複合体2の参照サンプルをM2と記した。

【0518】

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 μLとり、ゲルに負荷し、20 mAの定電流条件で10 min電気泳動した後、40 mAの定電流条件で30 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 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1に示した。

10

【0519】

2) ヒト由来のリソソーム溶解液における安定性の検出

マウス由来のリソソーム溶解液をヒト由来のリソソーム溶解液（Human Liver Lysosomes、Xenotech社、番号H0610.L、ロット番号1610316）に変更したこと以外、1)と同じ方法により陰性対照及び複合体2のヒト由来のリソソーム溶解液における安定性を検出した。結果を図2に示した。

【0520】

結果から明らかなように、本開示のsiRNA複合体は、ヒト由来のリソソーム溶解液及びマウス由来のリソソーム溶解液のいずれにおいても、満足できる安定性を示し、少なくとも24時間分解されずに維持することが可能である。

20

【0521】

（実験例3）siRNA複合体のHBVモデルマウスにおけるHBV mRNA発現量に対する抑制効率

1) 本実験例では、複合体1及び複合体2のHBVモデルマウスC57BL/6J-Tg(Alb1HBV)44Bri/JにおけるHBV mRNA発現量に対する抑制効率を調べた。

【0522】

本実験例に用いられる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た。0.9%塩化ナトリウム水溶液で複合体2を濃度0.2 mg/ml（siRNAの濃度として算出）の溶液として調製した。0.9%塩化ナトリウム水溶液で複合体1を濃度0.2 mg/mlと0.06 mg/ml（siRNAの濃度として算出）の溶液として調製した。

30

【0523】

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中のHBsAgの含有量を検出し、S/COV > 10のマウスを選択し、1群あたり6匹でランダムに2群に分け（いずれも雌性）、それぞれ対照群と試験群と記した。各群の動物は、1日目に各種の薬物を投与体積5 mL/kgで皮下注射した。体重に応じて投与体積を算出した。ここで、対照群には生理食塩水を注射し、試験群の動物には複合体2を、1 mg/kgの投与量で注射した。投与後28日目に全ての動物を死亡させ、動物に対して肉眼解剖を行い、体内臓器に病変があるか否かを観察し、目視で病変が観察された組織を10%ホルマリンで保存し、さらに病理学的観察を行い、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。

40

【0524】

蛍光定量的リアルタイムPCRにより肝組織におけるHBV mRNAの発現レベルを検出した。具体的には、ImProm-1TM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PC

50

Rキット（北京康為世紀生物科技有限公司）を用い、s i R N Aによる肝組織におけるH B V m R N A発現に対する抑制効率を検出した。当該蛍光定量的P C R法では、G A P D H遺伝子を内因性参照遺伝子とし、H B Vに対するプライマー及びG A P D Hに対するプライマーを用いてそれぞれH B V及びG A P D Hを検出した。

【0525】

検出プライマーの配列は、表6に示すとおりである。

【0526】

【表6】

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
H B V	5' - G T C T T T T G G G T T T T G C T G C C - 3' (配列番号87)	5' - G C A A C G G G G T A A A G G T T C A G - 3' (配列番号88)
G A P D H	5' - G G T C G G A G T C A A C G G A T T T - 3' (配列番号89)	5' - C C A G C A T C G C C C C A C T T G A - 3' (配列番号90)

10

【0527】

当該蛍光定量的P C R法では、s i R N A抑制活性は、H B V m R N A抑制率で表され、以下の等式により算出した。

20

$H B V \text{ m R N A 抑制率} = (1 - H B V \text{ 遺伝子発現残量}) \times 100\%$

$H B V \text{ 遺伝子発現残量} = (\text{試験群 H B V 遺伝子のコピー数} / \text{試験群 G A P D H のコピー数}) / (\text{対照群 H B V 遺伝子のコピー数} / \text{対照群 G A P D H のコピー数}) \times 100\%$

結果を以下の表7に示す。

【0528】

同じ方法により、異なる投与量の複合体1の体内(n = 5)でのH B V m R N A発現量に対する抑制効率を検出した。結果を以下の表7に示す。

【0529】

【表7】

s i R N A複合体のマウス肝臓におけるH B V m R N A発現に対する抑制

30

s i R N A 複合体	番号	投与量 (m g / k g)	肝臓におけるH B V P m R N Aに対する 抑制率 (%)
複合体2	L 1 0 - s i H B 3 M 1 S P	1	77.41
複合体1	L 1 0 - s i H B 3 M 1 S V P	1	88.27
複合体1	L 1 0 - s i H B 3 M 1 S V P	0.3	57.95

【0530】

上記結果から分かるように、本開示の各実施例の複合体は、いずれも高いマウス体内H B V m R N A抑制活性を示した。本開示のs i R N A複合体は、良好な体内送達効率を有することも示された。

40

【0531】

2) 1)と同じ方法により、複合体3~複合体20の体内でのH B V m R N Aに対する抑制効率を検出した。s i R N Aの長さが異なり、修飾方法が類似している複合体3~複合体12は、高いm R N A抑制活性を有することを期待でき、また、同じs i R N Aを含み、複合分子が類似している複合体13~複合体20も、高いm R N A抑制活性を有することを期待できる。

【0532】

(実験例4) s i R N A複合体のH B Vモデルマウスにおける血清H B s A g、H B e A g及びH B V D N A発現量に対する抑制効率の時間関連性試験

50

本実験例に用いられるHBVモデルマウスC57B/6N-Tg(1.28HBV)/Vst(遺伝子型A)は、北京維通達生物技術有限公司から購入した。0.9%塩化ナトリウム水溶液で複合体1を濃度0.6mg/ml及び0.2mg/ml(sRNAの濃度として算出)の溶液として調製した。

【0533】

血清HBsAgの含有量が 10^4 COIより大きいマウス(雌雄半々)を選択し、1群あたり6匹でランダムに3群に分け、それぞれ対照群、高投与量群及び低投与量群と記した。各群の動物は1日目に各種の薬物を投与体積5ml/kgで皮下注射した。体重に応じて投与体積を算出した。全ての動物はいずれも午前中に投与し、採血する必要がある場合は、採血後に投与した。ここで、対照群には生理食塩水を注射し、試験群の動物については、異なる投与量の複合体1を、高投与量群は3mg/kg、低投与量群は1mg/kg注射した。薬剤投与前及び薬剤投与後の7、13、21、28、42、56、70、84、98、112、126、140、154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、HBeAg及びHBVDNAレベルを検出した。

【0534】

1回あたり約100 μ l眼窩採血し、遠心後の血清は20 μ l以上であり、PBSで再懸濁して500 μ lとし、北京迪安医学検定センターに送って血清中のHBsAg、HBeAg及びHBVDNAの含有量を検出し、それぞれCOI、COI、IU/mlで表す。

【0535】

被験指標(HBsAg、HBeAg及びHBVDNA)の標準化レベルは、以下の等式により算出した。

被験指標の標準化レベル = 投与後の被験指標の残量 / 投与前の被験指標の含有量 \times 100%

被験指標の抑制率 = (1 - 被験指標の標準化レベル) \times 100%

【0536】

実験データは、いずれも

【数2】

$\bar{X} \pm \text{SEM}$

で表され、データ分析では、Graphpad prism 5.0 統計分析ソフトウェアを採用した。まずデータに対して正規分布と等分散性検定を行った。正規分布を満たす($p > 0.20$)とともに分散が等しい($p > 0.10$)場合、複数の群間の比較では、一元配置分散分析によるLSD法により多重比較し、 $p < 0.05$ である場合、統計学的有意であると考えられる。正規分布を満たしていない、又は分散が等しくない場合、複数の群間の比較では、ノンパラメトリック検定であるKruskal-Wallis H方法を採用し、Kruskal-Wallis H検定結果が有意($p < 0.05$)である場合、データをランク変換した後、複数の群間の対比較を行い、 $p < 0.05$ である場合、統計学的有意であると考えられる。

【0537】

結果を図3~5に示す。

【0538】

図3から分かるように、薬剤投与後の異なる時点で、生理食塩水を与えた陰性対照群は、血清表面抗原に対していかなる抑制作用も示さなかったのに対して、2つの投与量での複合体1は、薬剤投与後の異なる時点でHBsAgに対して、いずれも優れた抑制効果を示した。高投与量群については、単回投与後13日で、HBsAgに対する最大抑制率は99.8%に達し、投与後84日間の長期間にわたって、HBsAg抑制率は依然として90%以上に維持され、観察終了時点でも、HBsAg抑制効率は、77.0%と依然として高かった。低投与量群については、投与後13日でHBsAgに対する最大抑制率が99.0%に達し、154日間の観察が終了した時点でも、HBsAg抑制効率は依然と

10

20

30

40

50

して79.4%のレベルに達していた。

【0539】

図4から分かるように、複合体1は、同様にHB e A gの発現を抑制することができ、高投与量群については、投与後70日で、血清HB e A gに対する発現抑制が50%程度であり、154日間の観察が終了するまで、HB e A gに対する抑制効率は、投与前のレベルに戻らなかった。

【0540】

図5から分かるように、複合体1は、さらにHBV DNAの発現を効率よく抑制し、154日間の長い観察期間にわたって常に高い抑制率を維持することができた。高投与量群については、単回投与後13日でHBV DNAに対する最大抑制率が99.2%に達し、投与後84日間の長期間にわたって、HBV DNAに対する抑制率は依然として90%以上に維持され、観察終了時点でも、HBV DNAに対する抑制効率は80.1%と依然として高かった。低投与量群については、投与後13日でHBV DNAに対する最大抑制率は95.4%に達し、154日間の観察が終了した時点でも、HBV DNAに対する抑制効率は依然として60.8%のレベルに達していた。

10

【0541】

上記結果から、本開示の複合体は、HBV遺伝子の発現を長期間安定的で効率的に抑制することができ、特に表面抗原に対する長期間の持続的な抑制については、優れた効果を示すことが明らかになった。

【0542】

20

(実験例5) siRNAの体外psiCHECK系における抑制活性

本実験例では、調製例12における各siRNAの体外psiCHECK系における抑制活性を調べた。

【0543】

実験例1における検出プラスミドGSCMを用いて被評価siRNA (siRNA1~4及びNC)とともにHEK239A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の抑制活性を反映した。具体的な工程は以下のとおりである。

【0544】

96ウェルプレートに、LipofectamineTM 2000 (Invitrogen社)の使用説明書により、それぞれsiRNAとGSCM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LipofectamineTM 2000を用いた。siRNAの最終濃度は、順に0.1nM、0.01nM及び0.001nMであった。各群では、siRNA処理なしを対照とした。1群あたり3個の複製ウェルがあった。

30

【0545】

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、使用明細書によりHEK293A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6に示す。

40

【0546】

結果から、siRNA1~4は、いずれも良好な体外抑制活性を有し、濃度0.1nMで、各siRNAの抑制率はいずれも80%以上であることを示した。

【0547】

(実験例6) siRNAの体外でのヒト血漿における安定性

調製例12で得られたsiRNA1-4 (20μM、12μl)をそれぞれ108μLの90%ヒト血漿 (Human plasma、PBSで希釈)と均一に混合した。37で恒温培養した。それぞれ0、2、4、6、24、48、72時間で10μLの試料を

50

取り出し、直ちに液体窒素により急速冷凍し、 -80 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、 $1 \times \text{PBS}$ ($\text{pH} 7.4$) で5倍希釈した後、各サンプルを $10 \mu\text{L}$ ずつとった。同時に、等モル量の siRNA ($20 \mu\text{M}$ 、 $1 \mu\text{l}$) を $49 \mu\text{l}$ の $1 \times \text{PBS}$ ($\text{pH} 7.4$) と均一に混合し、 $10 \mu\text{L}$ をヒト血漿処理されていない参照サンプルとし、それぞれ「M11~M14」と記した。16重量%の非変性ポリアクリルアミドゲルを配合し、上記サンプルと $4 \mu\text{L}$ の試料負荷緩衝液 (20mM の EDTA 、36重量%グリセリン、0.06重量%ブロムフェノールブルー) を混合した後、ゲルに負荷し、 20mA の定電流条件で20分間電気泳動した後、 40mA の定電流条件で60分間程度電気泳動し続けた。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15分間染色した。ゲルイメージングを行い観察して撮影し、その結果を図7に示す。

10

【0548】

結果から明らかにわかるとおり、本開示の siRNA は、参照サンプルと比較して異なる時点でバンドの輝度にいずれも有意差がなく、バンドは鮮明でテーリングがなかった。各 siRNA は、いずれも分解されておらず、安定性が良好であった。

【0549】

以上に本開示の好ましい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なく、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種々の簡単な変形が可能であり、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。

20

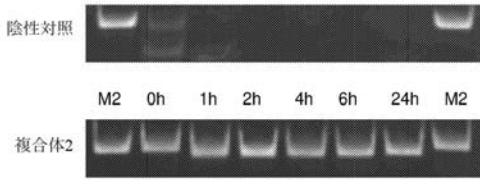
【0550】

このほかに説明すべきこととして、上記実施形態に記載された各技術的特徴は、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。

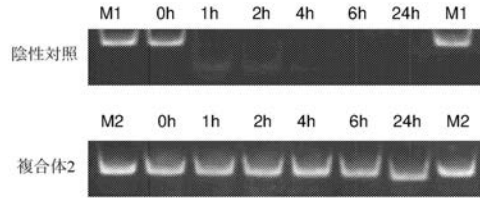
【0551】

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。

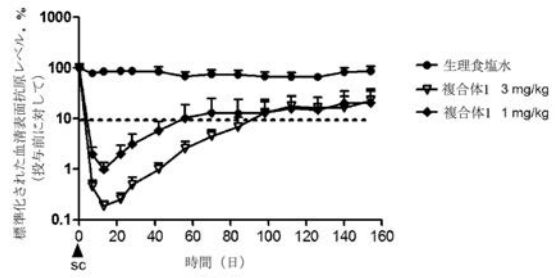
【 図 1 】



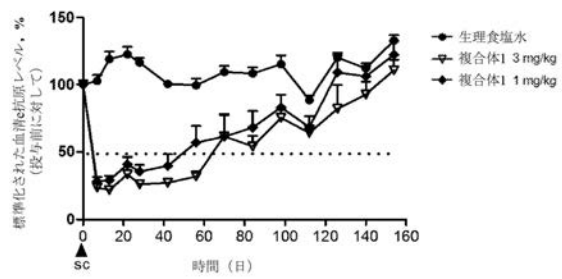
【 図 2 】



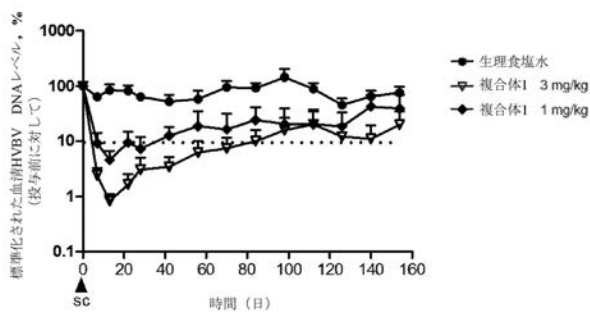
【 図 3 】



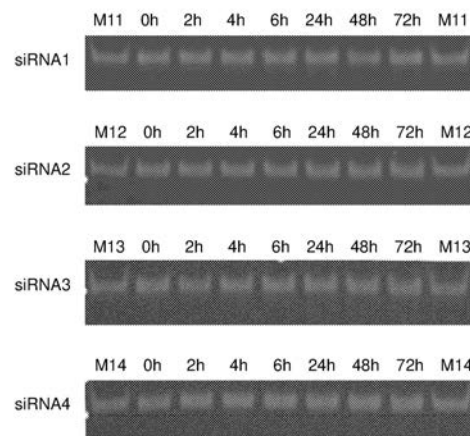
【 図 4 】



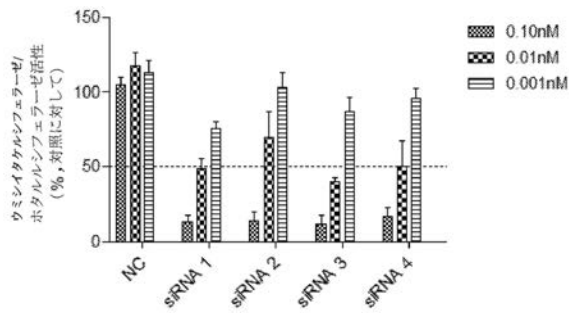
【 図 5 】



【 図 7 】



【 図 6 】



【配列表】

2021533800000001.app

【手続補正書】

【提出日】令和3年2月25日(2021.2.25)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

B型肝炎ウイルス遺伝子の発現を抑制できる s i R N A であって、前記 s i R N A はセンス鎖とアンチセンス鎖を含み、前記センス鎖とアンチセンス鎖の各ヌクレオチドはいずれも修飾ヌクレオチドであり、前記センス鎖とアンチセンス鎖はいずれもフルオロ修飾ヌクレオチド及び非フルオロ修飾ヌクレオチドを含み、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し、前記センス鎖は、ヌクレオチド配列 1 を含み、前記アンチセンス鎖は、ヌクレオチド配列 2 を含み、前記ヌクレオチド配列 1 と前記ヌクレオチド配列 2 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 1 と配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列とは、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 2 と配列番号 2 に示されるヌクレオチド配列とは、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' - G A A A G U A U G U C A A C G A A U Z - 3' (配列番号 1)、

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

ただし、Z は U であり、Z' は A であり、

前記ヌクレオチド配列 1 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 2 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 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り、

前記フルオロ修飾ヌクレオチドは、ヌクレオチド配列 1 とヌクレオチド配列 2 に位置し、前記ヌクレオチド配列 1 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 1 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 2 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 2 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】

前記センス鎖は、ヌクレオチド配列 3 をさらに含み、前記アンチセンス鎖は、ヌクレオチド配列 4 をさらに含み、前記ヌクレオチド配列 3 と前記ヌクレオチド配列 4 は、長さがそれぞれ 1 ~ 4 ヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列 3 は、前記ヌクレオチド配列 1 の 5' 末端に結合され、前記ヌクレオチド配列 4 は、前記ヌクレオチド配列 2 の 3' 末端に結合され、前記ヌクレオチド配列 3 と前記ヌクレオチド配列 4 は、長さが等しく、基本的に完全に逆相補的又は完全に逆相補的であり、前記基本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、請求項 1 に記載の s i R N A。

【請求項3】

前記ヌクレオチド配列 3 と前記ヌクレオチド配列 4 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 3 の塩基が G である、或いは、

前記ヌクレオチド配列 3 と前記ヌクレオチド配列 4 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3の塩基が順にU及びGである、或いは、

前記ヌクレオチド配列3と前記ヌクレオチド配列4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、前記ヌクレオチド配列3の塩基が順にU、U及びGである、或いは、

前記ヌクレオチド配列3と前記ヌクレオチド配列4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、前記ヌクレオチド配列3の塩基が順にA、U、U及びGである、請求項2に記載の*s i R N A*。

【請求項4】

前記*s i R N A*は、ヌクレオチド配列5をさらに含み、前記ヌクレオチド配列5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、前記アンチセンス鎖の3'オーバーハング端を構成する、請求項1~3のいずれか一項に記載の*s i R N A*。

【請求項5】

前記ヌクレオチド配列5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、前記ヌクレオチド配列5は、連続した2個のチミンデオキシリボヌクレオチド、連続した2個のウラシルリボヌクレオチド、又は標的*m R N A*と相補的な2つのヌクレオチドである、請求項4に記載の*s i R N A*。

【請求項6】

前記ヌクレオチド配列1は、配列番号3又は配列番号4に示されるヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチド配列2は、配列番号5、配列番号6、配列番号7及び配列番号8に示されるヌクレオチド配列からなる群より選ばれるいずれか1つのヌクレオチド配列を含む、請求項5に記載の*s i R N A*。

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

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

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

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

5' - U A U U C G U U G A C A U A C U U U C U U - 3' (配列番号7)

5' - U A U U C G U U G A C A U A C U U U C C A - 3' (配列番号8)

【請求項7】

以下の*s i P 1*~*s i P 4*のいずれか1つである、請求項6に記載の*s i R N A*。

s i P 1

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

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

s i P 2

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

アンチセンス鎖：5' - A A U U C G U U G A C A U A C U U U C C A - 3' (配列番号6)

s i P 3

センス鎖：5' - G A A A G U A U G U C A A C G A A U A - 3' (配列番号4)

アンチセンス鎖：5' - U A U U C G U U G A C A U A C U U U C U U - 3' (配列番号7)

s i P 4

センス鎖：5' - G A A A G U A U G U C A A C G A A U A - 3' (配列番号4)

アンチセンス鎖：5' - U A U U C G U U G A C A U A C U U U C C A - 3' (配列番号8)

【請求項8】

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から独立して選択さ

れる1つである、請求項1に記載の*s i R N A*。

【請求項9】

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、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、請求項8に記載の*s i R N A*。

【請求項10】

前記*s i R N A*は、表1A内のいずれか1つに示される*s i R N A*である、請求項9に記載の*s i R N A*。

【請求項11】

前記*s i R N A*において、前記センス鎖と前記アンチセンス鎖のうちの少なくとも1本のリン酸-糖骨格中のリン酸エステル基の少なくとも1個がチオリン酸エステル基であり、以下のヌクレオチド間の結合からなる群より選ばれる少なくとも1つが、該チオリン酸エステル基による結合である、請求項1に記載の*s i R N A*：

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の結合、

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の結合、

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の結合、

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の結合、

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の結合、

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の結合、

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の結合、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の結合。

【請求項12】

前記*s i R N A*は、表1B内のいずれか1つに示される*s i R N A*である、請求項11に記載の*s i R N A*。

【請求項13】

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る、請求項1に記載の*s i R N A*。

【請求項14】

前記*s i R N A*は、表1C又は表1D内のいずれか1つに示される*s i R N A*である、請求項13に記載の*s i R N A*。

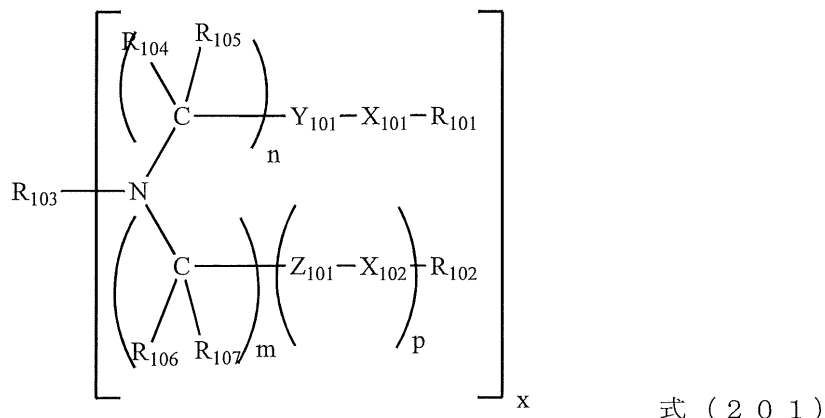
【請求項15】

請求項1に記載の*s i R N A*及び薬学的に許容可能な担体を含み、該*s i R N A*と該薬学的に許容可能な担体との重量比が1：(1~500)である、薬物組成物。

【請求項16】

前記薬学的に許容可能な担体が、有機アミン、補助脂質及びPEG化脂質を含み、前記有機アミンが、式(201)に示される化合物及び/又はその薬学的に許容できる塩である、請求項15に記載の薬物組成物：

【化 1】



式 (201)

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_{101} 及び Z_{101} はそれぞれ独立して C = O、C = S、S = O、CH - OH 又は SO_2 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、

水素と、

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と、

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と、

置換又は無置換の、分岐鎖又は直鎖アシル基と、

置換又は無置換の、分岐鎖又は直鎖アリール基と、

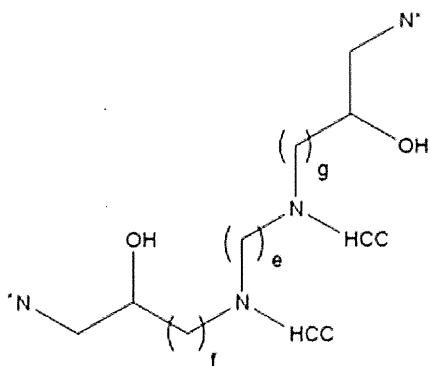
置換又は無置換の、分岐鎖又は直鎖ヘテロアリール基と、から選択され、

x は 1 ~ 10 の整数であり、

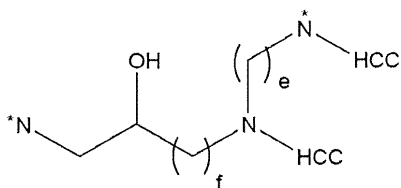
n は 1 ~ 3 の整数であり、m は 0 ~ 20 の整数であり、p は 0 又は 1 であり、m 及び p がいずれも 0 である場合、 R_{102} は水素であり、

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し、

【化 2】



式 (202)、



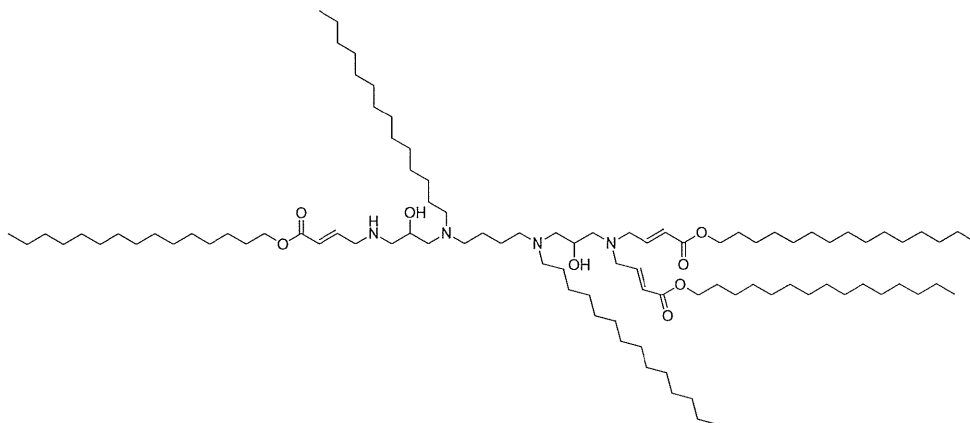
式 (203)

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) に示される窒素原子を表す。

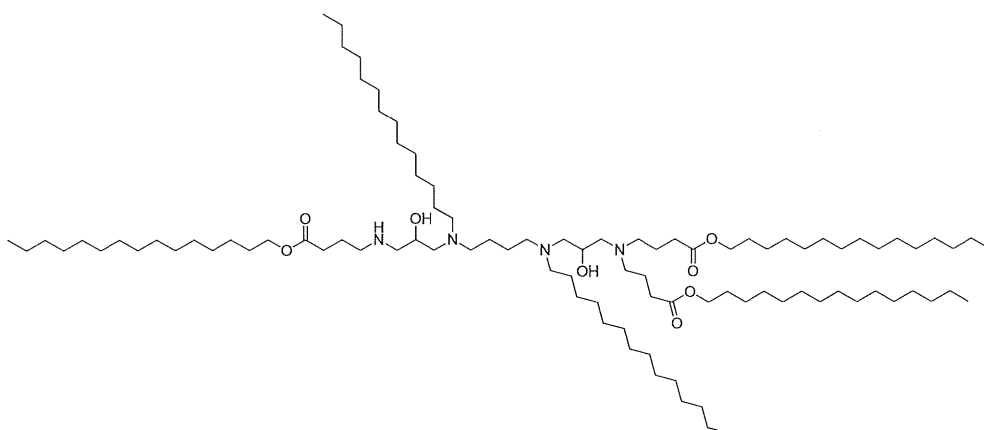
【請求項 17】

前記有機アミンが、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り、

【化3】



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、かつ、

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である、請求項16に記載の薬物組成物。

【請求項 18】

前記有機アミン、前記補助脂質及び前記PEG化脂質のモル比が(19.7~80):(19.7~80):(0.3~50)である、請求項16に記載の薬物組成物。

【請求項 19】

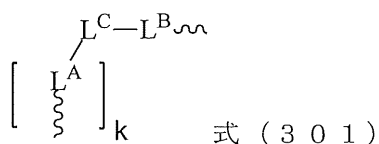
請求項1に記載のsiRNA及び当該siRNAに複合して結合されるリガンドを含むsiRNA複合体。

【請求項 20】

前記リガンドが薬学的に許容できる複合基であり、前記複合基が薬学的に許容できる標的基とリンカーを含み、前記siRNA、前記リンカー及び前記標的基が順に共有結合的に結合されており；かつ

前記リンカーが式(301)に示される構造を有する

【化4】

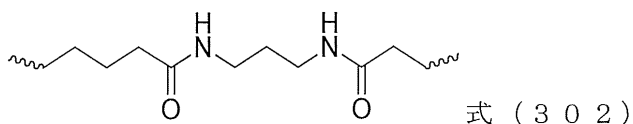


(式中、kは1~3の整数であり、

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

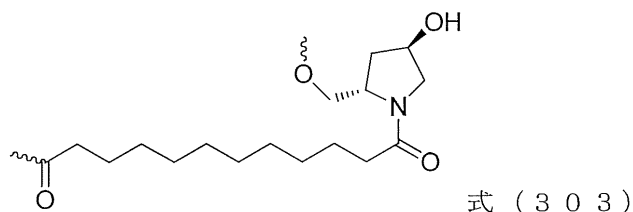
L^A は、その両端でそれぞれ 1 つの前記標的基及び前記 L^C 部にエーテル結合により結合され、

【化 5】



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、他端に酸素原子を有し、前記 siRNA にリン酸エステル結合により結合され、

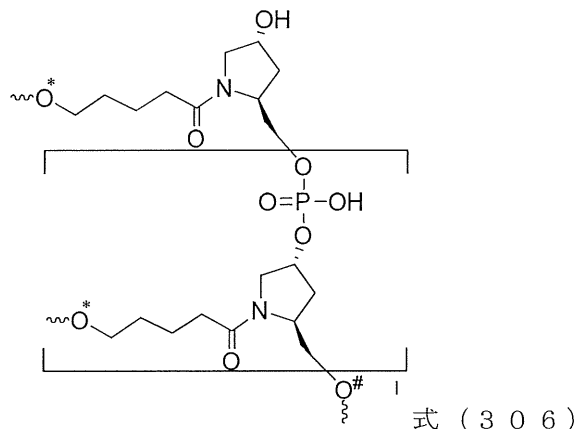
【化 6】



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 価のリンカー基であり、前記 L^C は、酸素原子を介して各前記 L^A 部にエーテル結合により結合され、窒素原子を介して前記 L^B 部にアミド結合により結合される) ; 又は、

前記リンカーが式 (306) に示される構造を有する

【化 7】



(式中、1 は 0 ~ 3 の整数であり、

* は、前記リンカーにおける、エーテル結合により前記標的基に結合される部位を表し

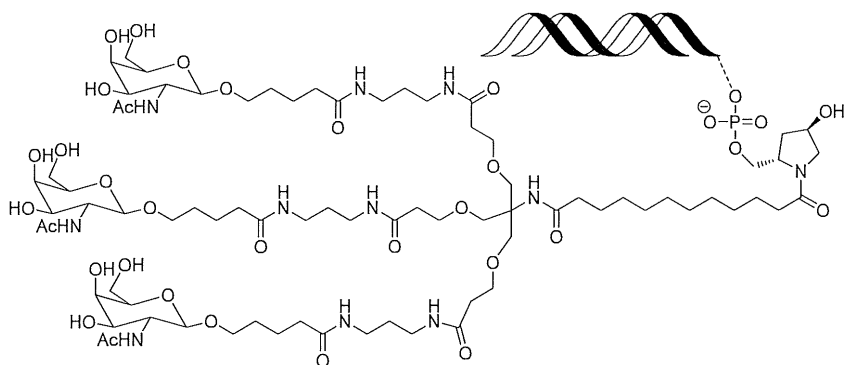
は、前記リンカーにおける、リン酸エステル結合により前記 siRNA に結合される部位を表す)、

請求項 19 に記載の siRNA 複合体。

【請求項 21】

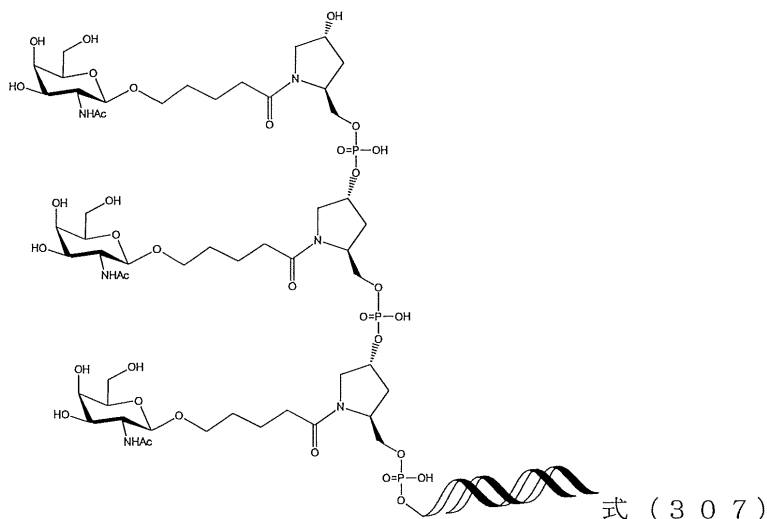
式 (305) 又は式 (307) に示される構造を有し、

【化 8】



式 (3 0 5)

【化 9】



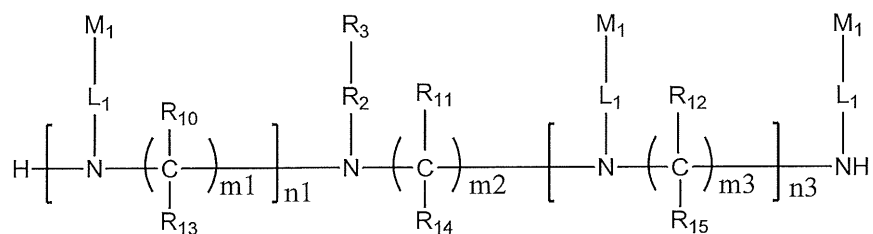
式 (3 0 7)

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、請求項 20 に記載の *siRNA* 複合体。

【請求項 22】

式 (4 0 1) に示される構造を有する *siRNA* 複合体：

【化 10】



式 (4 0 1)

式中、

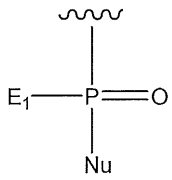
n_1 は、1 ~ 3 から選択される整数であり、 n_3 は、0 ~ 4 から選択される整数であり、

m_1 、 m_2 及び m_3 は独立して、2 ~ 10 から選択される整数であり、

R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 及び R_{15} はそれぞれ独立して、H、メチル基又はエチル基の 1 つであり、

R_3 は式 A 59 に示される構造の基であり、

【化 1 1】



(A 5 9)

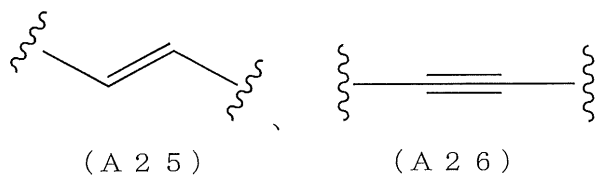
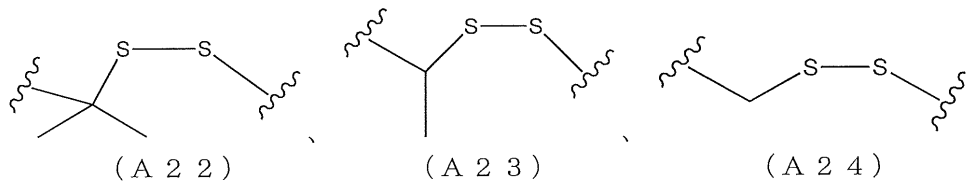
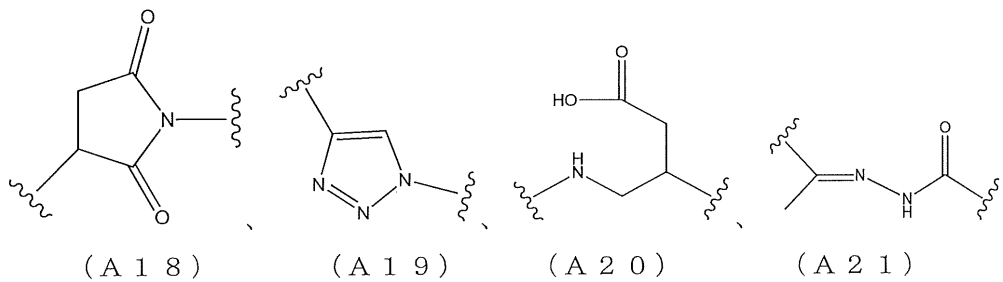
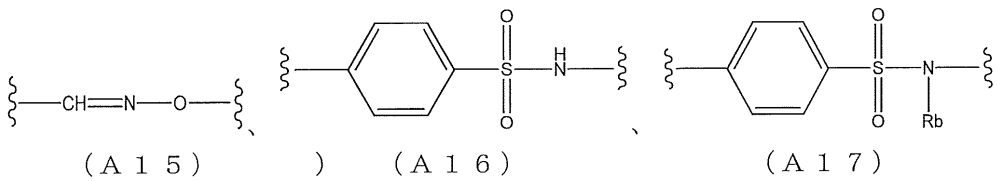
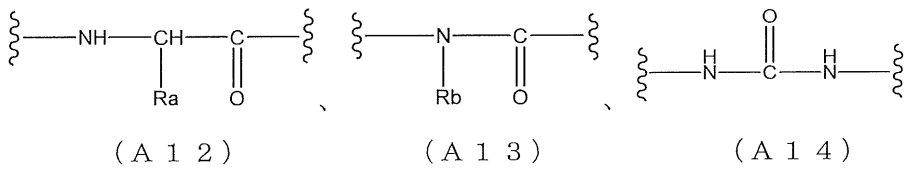
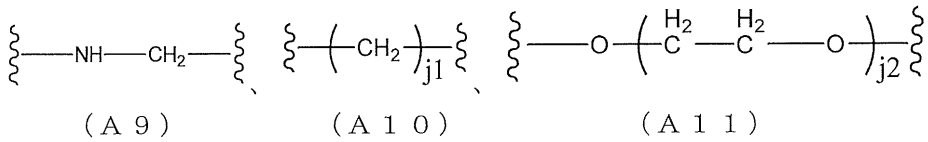
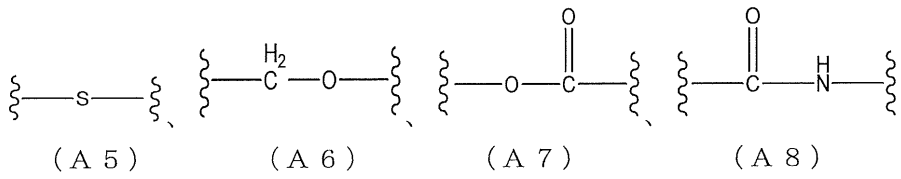
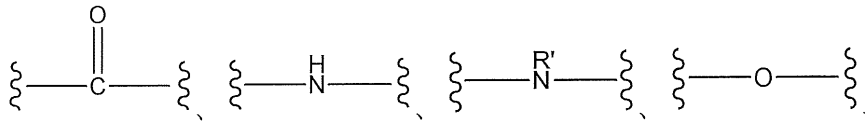
式中、 E_1 は OH 、 SH 又は BH_2 であり、 Nu は請求項 1 に記載の siRNA であり、

、

R_2 は、窒素含有骨格上の N と A 5 9 との結合を実現できる任意の基であり、

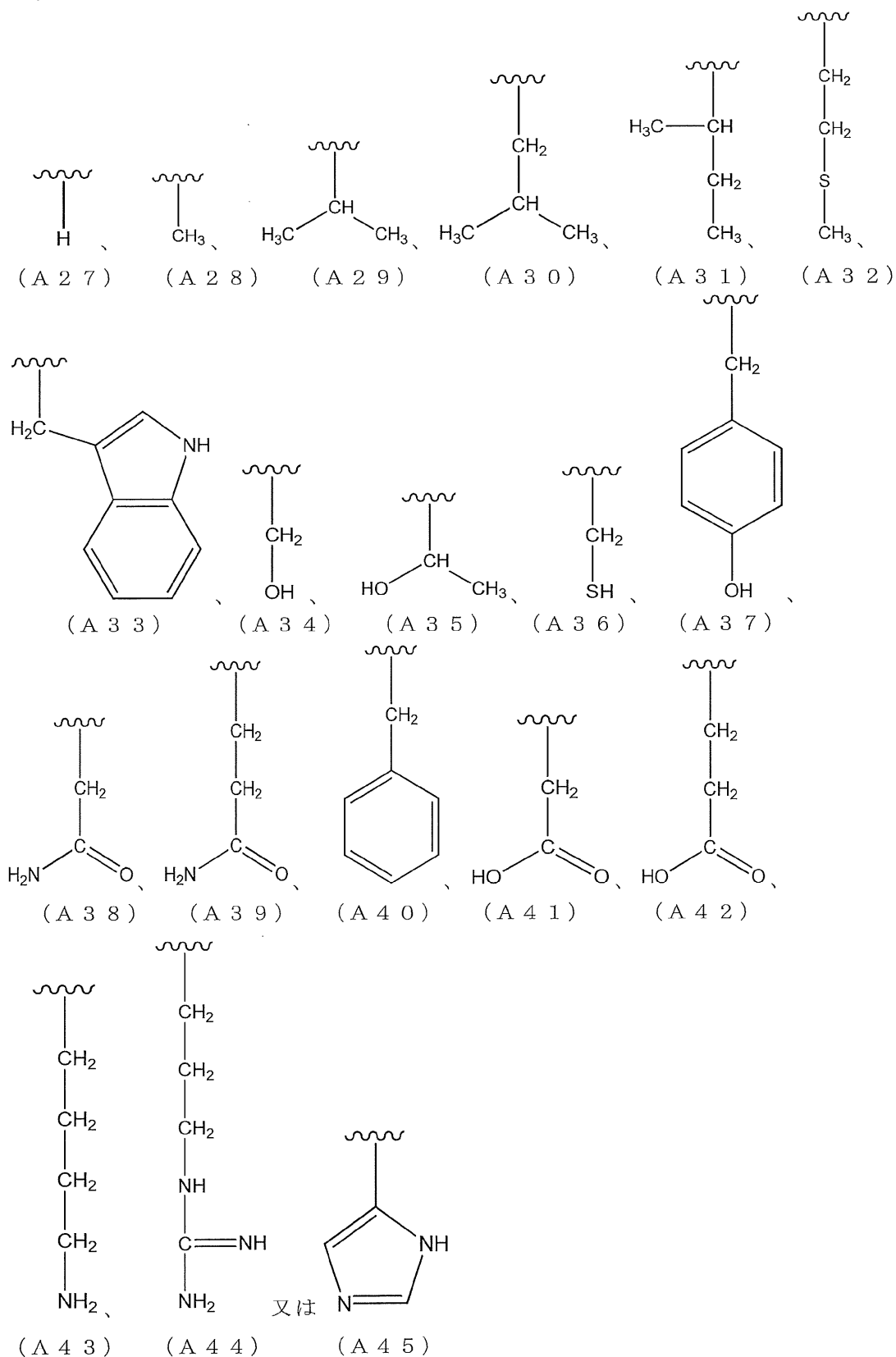
各 L_1 は、式 $\text{A 1} \sim \text{A 2 6}$ の基から独立して選択される 1 又は複数の結合の組合せであり、

【化 1 2】



式中、j 1 は 1 ~ 20 の整数であり、j 2 は 1 ~ 20 の整数であり、
 R ' は C₁ - C₁₀ のアルキル基であり、
 R a は式 A 27 ~ A 45 の基から選択される 1 つであり、

【化 1 3】



R b は C₁ - C₁₀ のアルキル基であり、
 wavy line

は、基が共有結合的に結合する部位を表し、

各 M₁ 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。

【請求項 2 3】

L_1 が、A 1、A 4、A 5、A 6、A 8、A 10、A 11、A 13 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 2 2 に記載の s i R N A 複合体。

【請求項 2 4】

L_1 の長さが 3 ~ 25 個の原子である、又は、 L_1 の長さが 4 ~ 15 個の原子である、請求項 2 2 に記載の s i R N A 複合体。

【請求項 2 5】

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 2 2 に記載の s i R N A 複合体。

【請求項 2 6】

各 M_1 が、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、 α - D - マンノフラノース、 β - D - マンノフラノース、 α - D - マンノピラノース、 β - D - マンノピラノース、 α - D - グルコピラノース、 β - D - グルコピラノース、 α - D - グルコフラノース、 β - D - グルコフラノース、 α - D - フルクトフラノース、 β - D - フルクトピラノース、 α - D - ガラクトピラノース、 β - D - ガラクトピラノース、 α - D - ガラクトフラノース、 β - 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 - プロピオニルガラクトサミン、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 - α - 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 - β - ノイラミン酸、5 - チオ - α - 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 - α - D - グルコピラノシド、4 - チオ - α - 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 - α - 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、L - 4 - チオリボースから独立して選択される 1 つである、請求項 2 2 に記載の s i R N A 複合体。

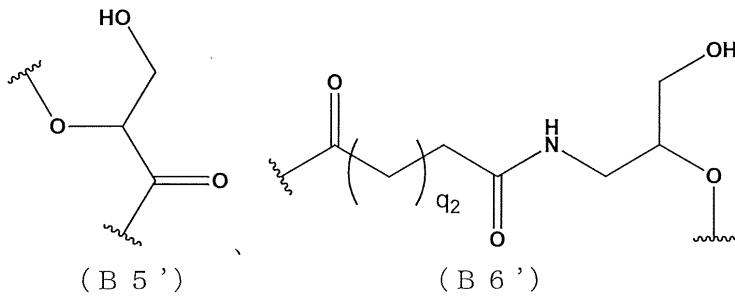
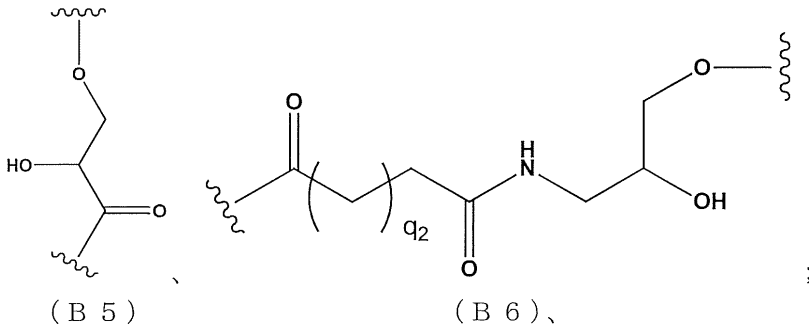
【請求項 2 7】

R_2 には、窒素含有骨格中の 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、かつ

前記 R_2 における窒素含有骨格上の N 原子に結合される部位が該 N 原子とアミド結合を形成し、前記 R_3 における P 原子に結合される部位が該 P 原子とリン酸エステル結合を形成する、又は

R_2 が B 5、B 6、B 5' 又は B 6' から選択される、

【化 1 4】



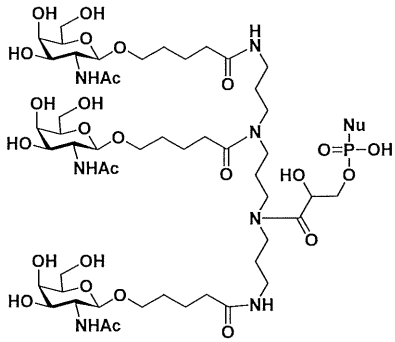
(式中、

~~~~~  
 は、基が共有結合的に結合する部位を表し、 $q_2$  は 1 ~ 10 の整数である、  
 請求項 2 2 に記載の siRNA 複合体。

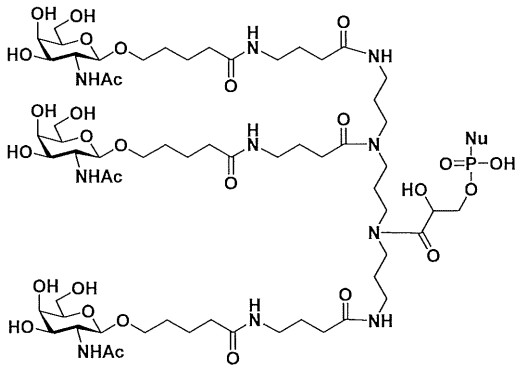
【請求項 2 8】

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 2 2 に記載の siRNA 複合体。

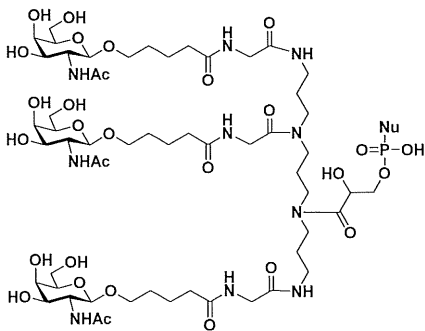
## 【化 1 5】



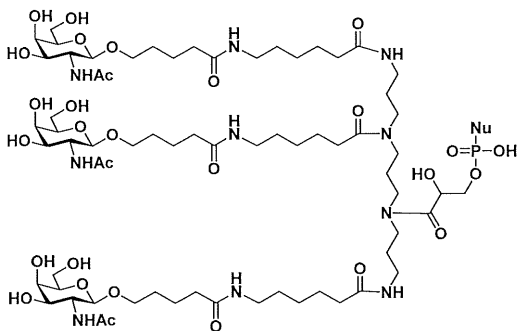
式 (403)



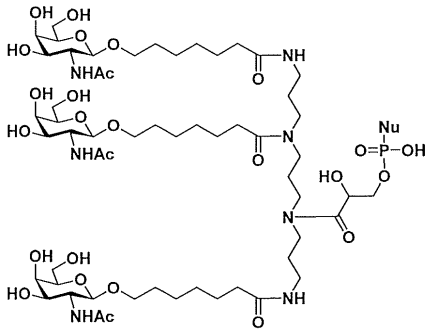
式 (404)



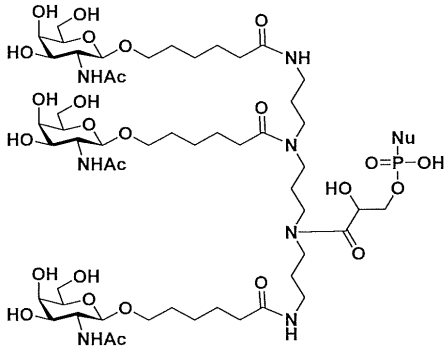
式 (405)



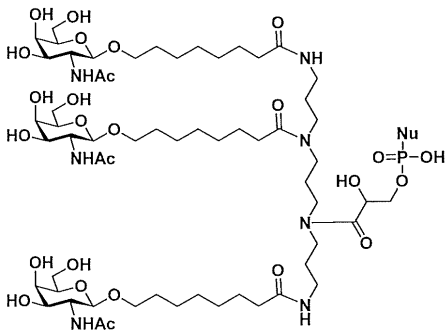
式 (406)



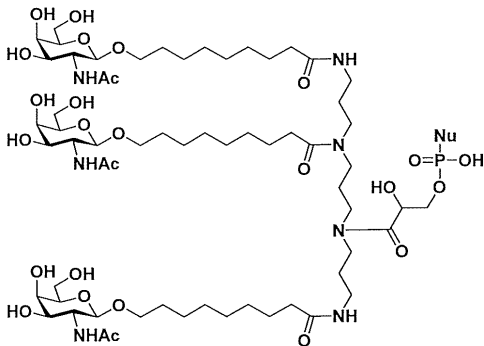
式 (407)



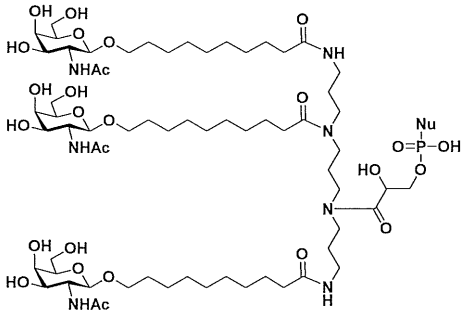
式 (408)



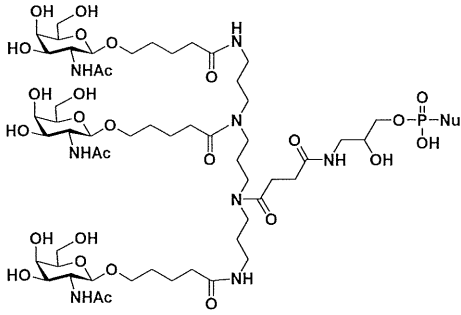
式 (409)



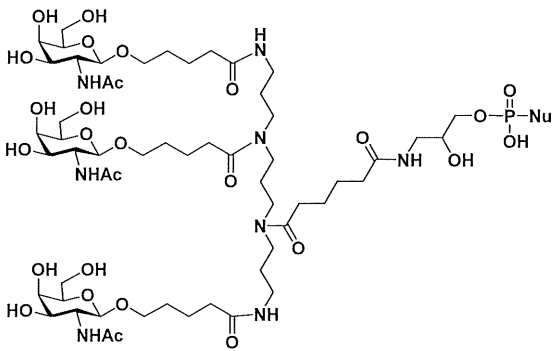
式 (410)



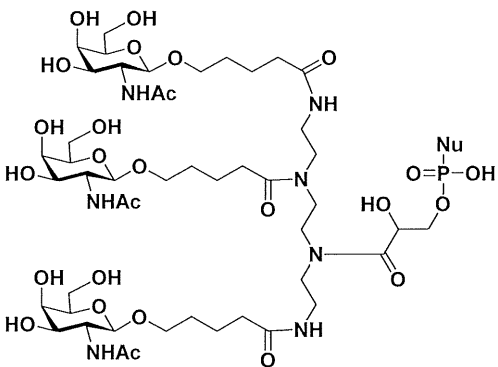
式 (411)



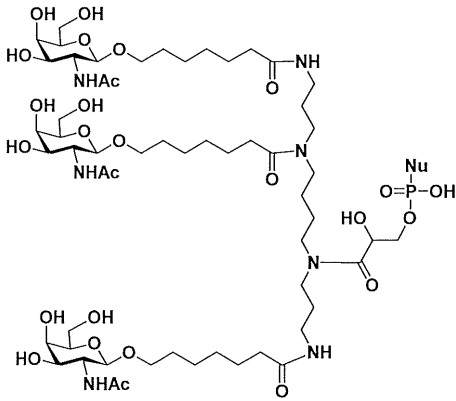
式 (412)



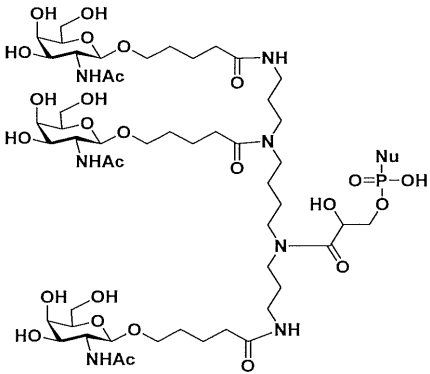
式 (413)



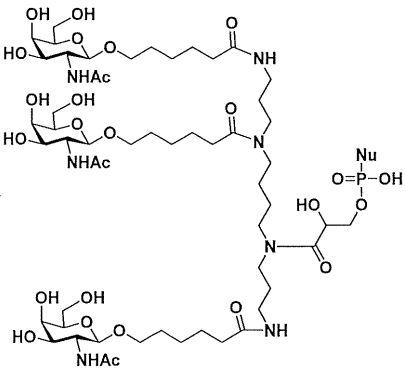
式 (414)



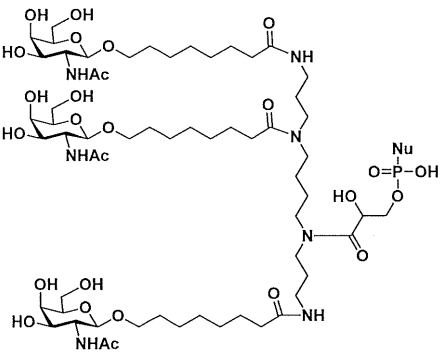
式 ( 4 1 5 )



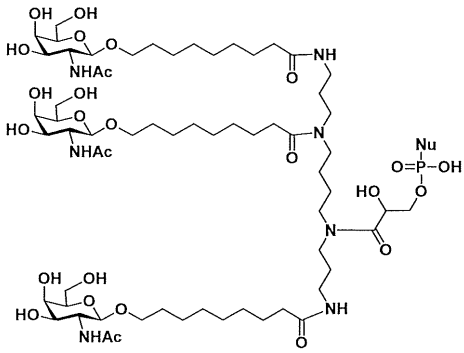
式 ( 4 1 6 )



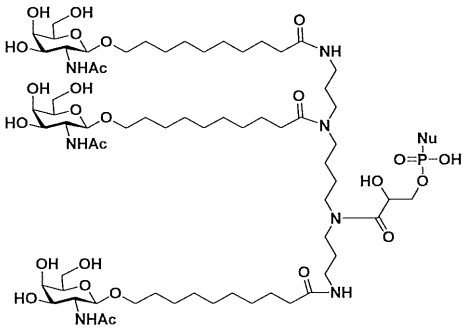
式 ( 4 1 7 )



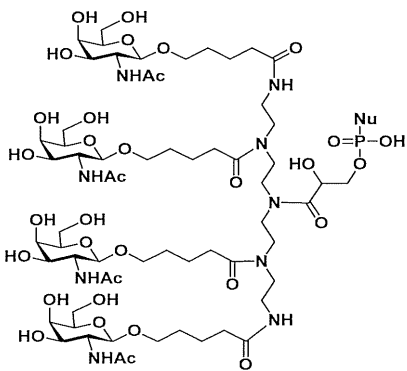
式 ( 4 1 8 )



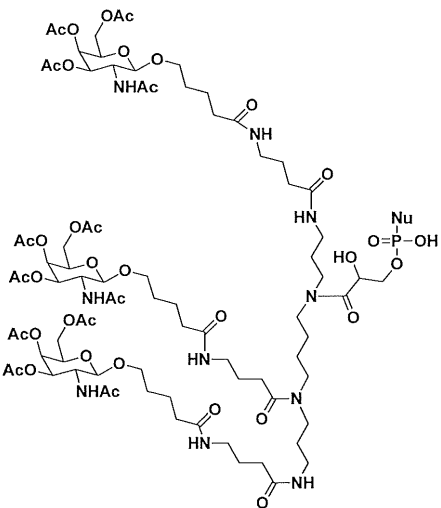
式 (419)



式 (420)



式 (421)



式 (422)

## 【請求項 29】

式 A 59 における P が、前記センス鎖の 3' 末端に結合される、請求項 28 に記載の siRNA 複合体。

## 【請求項 30】

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 / 又は予防のために用

いられる、請求項 1 に記載の s i R N A、請求項 1 5 に記載の薬物組成物及び / 又は請求項 1 9 に記載の s i R N A 複合体。

【請求項 3 1】

B 型肝炎ウイルス遺伝子の発現の抑制のために用いられる、請求項 1 に記載の s i R N A、請求項 1 5 に記載の薬物組成物及び / 又は請求項 1 9 に記載の s i R N A 複合体。

【請求項 3 2】

前記 H B V 感染による病理学的状態又は疾患が、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、請求項 3 0 に記載の s i R N A、薬物組成物及び / 又は s i R N A 複合体。

## 【 国际调查报告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                            | International application No.<br><b>PCT/CN2019/101656</b>                     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>C12N 15/11(2006.01)i; C12N 15/51(2006.01)i; C12N 15/10(2006.01)i; A61K 31/7088(2006.01)i; A61P 1/16(2006.01)i<br>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                            |                                                                               |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>C12N; A61K; A61P<br>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>CNABS, CPRSABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, WOTXT, EPTXT, USTXT, CNKI, 百度搜索, Baidu XUESHU search, WEB OF SCIENCE, PubMed: 小干扰RNA, small interfering RNA, siRNA, RNA干扰, RNA interference, RNAi, HBV, 乙肝, 乙型肝炎; Genbank, EMBL: 基于SEQ ID NOs: 1-8的检索, search based on SEQ ID NOs: 1-8                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                            |                                                                               |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                            |                                                                               |
| Category*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                         | Relevant to claim No.                                                         |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | WO 2017019891 A2 (PROTIVA BIOTHERAPEUTICS, INC.) 02 February 2017 (2017-02-02)<br>see entire document      | 1-68, 71                                                                      |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | WO 2017015175 A1 (ARCTURUS THERAPEUTICS, INC.) 26 January 2017 (2017-01-26)<br>see entire document         | 1-68, 71                                                                      |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | WO 2010012244 A1 (SUZHOU RIBO LIFE SCIENCE CO., LTD.) 04 February 2010 (2010-02-04)<br>see entire document | 1-68, 71                                                                      |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | WO 2006096018 A1 (PARK, MAHNHOON et al.) 14 September 2006 (2006-09-14)<br>see entire document             | 1-68, 71                                                                      |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | WO 2012024170 A2 (MERCK SHARP & DOHME et al.) 23 February 2012 (2012-02-23)<br>see entire document         | 1-68, 71                                                                      |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                            |                                                                               |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"D" document cited by the applicant in the international application<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br>"&" document member of the same patent family |                                                                                                            |                                                                               |
| Date of the actual completion of the international search<br><b>14 November 2019</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                            | Date of mailing of the international search report<br><b>28 November 2019</b> |
| Name and mailing address of the ISA/CN<br><b>China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)<br/>No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing<br/>100088<br/>China</b><br>Facsimile No. (86-10)62019451                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                            | Authorized officer<br><br><br>Telephone No.                                   |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/101656

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: **69,70**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
[1] Claims 69 and 70 relate to a treatment method of the human or animal body (PCT Rule 39.1(iv)).
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/CN2019/101656**

| Patent document cited in search report |            |    | Publication date (day/month/year) | Patent family member(s) |             |    | Publication date (day/month/year) |
|----------------------------------------|------------|----|-----------------------------------|-------------------------|-------------|----|-----------------------------------|
| WO                                     | 2017019891 | A3 | 09 March 2017                     | TW                      | 201718856   | A  | 01 June 2017                      |
|                                        |            |    |                                   | WO                      | 2017019891  | A2 | 02 February 2017                  |
|                                        |            |    |                                   | US                      | 2018208932  | A1 | 26 July 2018                      |
|                                        |            |    |                                   | EP                      | 3329003     | A2 | 06 June 2018                      |
|                                        |            |    |                                   | CN                      | 108350455   | A  | 31 July 2018                      |
| WO                                     | 2017015175 | A1 | 26 January 2017                   | EP                      | 3325097     | A1 | 30 May 2018                       |
|                                        |            |    |                                   | US                      | 2017016000  | A1 | 19 January 2017                   |
|                                        |            |    |                                   | EP                      | 3325097     | A4 | 10 July 2019                      |
|                                        |            |    |                                   | CA                      | 2996722     | A1 | 26 January 2017                   |
|                                        |            |    |                                   | AU                      | 2016296592  | A1 | 08 March 2018                     |
|                                        |            |    |                                   | CN                      | 108136206   | A  | 08 June 2018                      |
|                                        |            |    |                                   | US                      | 2018371463  | A1 | 27 December 2018                  |
|                                        |            |    |                                   | JP                      | 2018520685  | A  | 02 August 2018                    |
|                                        |            |    |                                   | TW                      | 201803989   | A  | 01 February 2018                  |
|                                        |            |    |                                   | WO                      | 2010012244  | A1 | 04 February 2010                  |
| CN                                     | 102083983  | A  | 01 June 2011                      |                         |             |    |                                   |
| WO                                     | 2006096018 | A1 | 14 September 2006                 | KR                      | 20070110135 | A  | 15 November 2007                  |
|                                        |            |    |                                   | US                      | 2010063132  | A1 | 11 March 2010                     |
|                                        |            |    |                                   | KR                      | 20100060018 | A  | 04 June 2010                      |
|                                        |            |    |                                   | CN                      | 101142316   | A  | 12 March 2008                     |
|                                        |            |    |                                   | US                      | 2008096839  | A1 | 24 April 2008                     |
| WO                                     | 2012024170 | A2 | 23 February 2012                  | US                      | 2018195071  | A1 | 12 July 2018                      |
|                                        |            |    |                                   | LT                      | 2606134     | T  | 25 July 2019                      |
|                                        |            |    |                                   | CN                      | 108676800   | A  | 19 October 2018                   |
|                                        |            |    |                                   | DK                      | 2606134     | T3 | 22 July 2019                      |
|                                        |            |    |                                   | AU                      | 2011292261  | B2 | 14 May 2015                       |
|                                        |            |    |                                   | JP                      | 2019141101  | A  | 29 August 2019                    |
|                                        |            |    |                                   | US                      | 9464290     | B2 | 11 October 2016                   |
|                                        |            |    |                                   | JP                      | 2017079759  | A  | 18 May 2017                       |
|                                        |            |    |                                   | US                      | 9879262     | B2 | 30 January 2018                   |
|                                        |            |    |                                   | US                      | 2016369279  | A1 | 22 December 2016                  |
|                                        |            |    |                                   | RU                      | 2624045     | C2 | 30 June 2017                      |
|                                        |            |    |                                   | RU                      | 2013111850  | A  | 27 September 2014                 |
|                                        |            |    |                                   | EP                      | 2606134     | B1 | 10 April 2019                     |
|                                        |            |    |                                   | US                      | 10407682    | B2 | 10 September 2019                 |
|                                        |            |    |                                   | CN                      | 103282497   | A  | 04 September 2013                 |
|                                        |            |    |                                   | KR                      | 20130137156 | A  | 16 December 2013                  |
|                                        |            |    |                                   | CN                      | 103282497   | B  | 10 July 2018                      |
|                                        |            |    |                                   | JP                      | 6529481     | B2 | 12 June 2019                      |
|                                        |            |    |                                   | RU                      | 2017121299  | A  | 29 January 2019                   |
|                                        |            |    |                                   | US                      | 9029341     | B2 | 12 May 2015                       |
|                                        |            |    |                                   | EP                      | 2606134     | A4 | 22 April 2015                     |
|                                        |            |    |                                   | AU                      | 2011292261  | A1 | 07 February 2013                  |
|                                        |            |    |                                   | US                      | 2016076034  | A1 | 17 March 2016                     |
|                                        |            |    |                                   | JP                      | 2013537423  | A  | 03 October 2013                   |
|                                        |            |    |                                   | CA                      | 2807307     | A1 | 23 February 2012                  |
|                                        |            |    |                                   | US                      | 2013150433  | A1 | 13 June 2013                      |
|                                        |            |    |                                   | EP                      | 2606134     | A2 | 26 June 2013                      |
|                                        |            |    |                                   | SI                      | 2606134     | T1 | 30 August 2019                    |

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
**PCT/CN2019/101656**

| Patent document cited in search report | Publication date (day/month/year) | Patent family member(s) | Publication date (day/month/year) |
|----------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|
| WO 2012024170 A3 18 May 2012           |                                   |                         |                                   |
|                                        |                                   |                         |                                   |

| 国际检索报告                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                     | 国际申请号<br>PCT/CN2019/101656   |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| <b>A. 主题的分类</b><br>C12N 15/11(2006.01)i; C12N 15/51(2006.01)i; C12N 15/10(2006.01)i; A61K 31/7088(2006.01)i; A61P 1/16(2006.01)i<br>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                     |                              |
| <b>B. 检索领域</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                     |                              |
| 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)<br>C12N; A61K; A61P                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                     |                              |
| 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                     |                              |
| 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))<br>CNABS, CPRSABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, WOTXT, EPTXT, USTXT, CNKI, 百度学术搜索, WEB OF SCIENCE, PubMed, 小干扰 RNA, small interfering RNA, siRNA, RNA干扰, RNA interference, RNAi, HBV, 乙肝, 乙型肝炎 Genbank, EMBL: 基于SEQ ID N0s:1-8的检索                                                                                                                                  |                                                                                     |                              |
| <b>C. 相关文件</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                     |                              |
| 类型*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 引用文件, 必要时, 指明相关段落                                                                   | 相关的权利要求                      |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | WO 2017019891 A2 (PROTIVA BIOTHERAPEUTICS INC) 2017年 2月 2日 (2017-02-02)<br>参见全文     | 1-68, 71                     |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | WO 2017015175 A1 (ARCTURUS THERAPEUTICS INC) 2017年 1月 26日 (2017-01-26)<br>参见全文      | 1-68, 71                     |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | WO 2010012244 A1 (SUZHOU RIBO LIFE SCIENCE CO LT等) 2010年 2月 4日 (2010-02-04)<br>参见全文 | 1-68, 71                     |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | WO 2006096018 A1 (PARK MAHNHOON等) 2006年 9月 14日 (2006-09-14)<br>参见全文                 | 1-68, 71                     |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | WO 2012024170 A2 (MERCK SHARP & DOHME等) 2012年 2月 23日 (2012-02-23)<br>参见全文           | 1-68, 71                     |
| <input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                     |                              |
| * 引用文件的具体类型:<br>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件<br>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利<br>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)<br>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件<br>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件<br>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件<br>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性<br>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性<br>“&” 同族专利的文件 |                                                                                     |                              |
| 国际检索实际完成的日期<br>2019年 11月 14日                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                     | 国际检索报告邮寄日期<br>2019年 11月 28日  |
| ISA/CN的名称和邮寄地址<br>中国国家知识产权局(ISA/CN)<br>中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088<br>传真号 (86-10)62019451                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                     | 受权官员<br>赵彦豪<br>电话号码 62411043 |

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2015年1月)

## 国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/101656

## 第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1.  权利要求： 69, 70  
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：  
[1] 权利要求69, 70涉及人体或动物体的治疗方法（PCT实施细则39.1 (iv)）。
2.  权利要求：  
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3.  权利要求：  
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/101656

| 检索报告引用的专利文件 |            |    | 公布日<br>(年/月/日) | 同族专利 |             |    | 公布日<br>(年/月/日) |
|-------------|------------|----|----------------|------|-------------|----|----------------|
| WO          | 2017019891 | A3 | 2017年 3月 9日    | TW   | 201718856   | A  | 2017年 6月 1日    |
|             |            |    |                | WO   | 2017019891  | A2 | 2017年 2月 2日    |
|             |            |    |                | US   | 2018208932  | A1 | 2018年 7月 26日   |
|             |            |    |                | EP   | 3329003     | A2 | 2018年 6月 6日    |
|             |            |    |                | CN   | 108350455   | A  | 2018年 7月 31日   |
| WO          | 2017015175 | A1 | 2017年 1月 26日   | EP   | 3325097     | A1 | 2018年 5月 30日   |
|             |            |    |                | US   | 2017016000  | A1 | 2017年 1月 19日   |
|             |            |    |                | EP   | 3325097     | A4 | 2019年 7月 10日   |
|             |            |    |                | CA   | 2996722     | A1 | 2017年 1月 26日   |
|             |            |    |                | AU   | 2016296592  | A1 | 2018年 3月 8日    |
|             |            |    |                | CN   | 108136206   | A  | 2018年 6月 8日    |
|             |            |    |                | US   | 2018371463  | A1 | 2018年 12月 27日  |
|             |            |    |                | JP   | 2018520685  | A  | 2018年 8月 2日    |
|             |            |    |                | TW   | 201803989   | A  | 2018年 2月 1日    |
| WO          | 2010012244 | A1 | 2010年 2月 4日    | CN   | 102083983   | B  | 2014年 4月 16日   |
|             |            |    |                | CN   | 102083983   | A  | 2011年 6月 1日    |
| WO          | 2006096018 | A1 | 2006年 9月 14日   | KR   | 20070110135 | A  | 2007年 11月 15日  |
|             |            |    |                | US   | 2010063132  | A1 | 2010年 3月 11日   |
|             |            |    |                | KR   | 20100060018 | A  | 2010年 6月 4日    |
|             |            |    |                | CN   | 101142316   | A  | 2008年 3月 12日   |
|             |            |    |                | US   | 2008096839  | A1 | 2008年 4月 24日   |
|             |            |    |                | KR   | 101012595   | B1 | 2011年 2月 7日    |
| WO          | 2012024170 | A2 | 2012年 2月 23日   | US   | 2018195071  | A1 | 2018年 7月 12日   |
|             |            |    |                | LT   | 2606134     | T  | 2019年 7月 25日   |
|             |            |    |                | CN   | 108676800   | A  | 2018年 10月 19日  |
|             |            |    |                | DK   | 2606134     | T3 | 2019年 7月 22日   |
|             |            |    |                | AU   | 2011292261  | B2 | 2015年 5月 14日   |
|             |            |    |                | JP   | 2019141101  | A  | 2019年 8月 29日   |
|             |            |    |                | US   | 9464290     | B2 | 2016年 10月 11日  |
|             |            |    |                | JP   | 2017079759  | A  | 2017年 5月 18日   |
|             |            |    |                | US   | 9879262     | B2 | 2018年 1月 30日   |
|             |            |    |                | US   | 2016369279  | A1 | 2016年 12月 22日  |
|             |            |    |                | RU   | 2624045     | C2 | 2017年 6月 30日   |
|             |            |    |                | RU   | 2013111850  | A  | 2014年 9月 27日   |
|             |            |    |                | EP   | 2606134     | B1 | 2019年 4月 10日   |
|             |            |    |                | US   | 10407682    | B2 | 2019年 9月 10日   |
|             |            |    |                | CN   | 103282497   | A  | 2013年 9月 4日    |
|             |            |    |                | KR   | 20130137156 | A  | 2013年 12月 16日  |
|             |            |    |                | CN   | 103282497   | B  | 2018年 7月 10日   |
|             |            |    |                | JP   | 6529481     | B2 | 2019年 6月 12日   |
|             |            |    |                | RU   | 2017121299  | A  | 2019年 1月 29日   |
|             |            |    |                | US   | 9029341     | B2 | 2015年 5月 12日   |
|             |            |    |                | EP   | 2606134     | A4 | 2015年 4月 22日   |
|             |            |    |                | AU   | 2011292261  | A1 | 2013年 2月 7日    |
|             |            |    |                | US   | 2016076034  | A1 | 2016年 3月 17日   |
|             |            |    |                | JP   | 2013537423  | A  | 2013年 10月 3日   |
|             |            |    |                | CA   | 2807307     | A1 | 2012年 2月 23日   |
|             |            |    |                | US   | 2013150433  | A1 | 2013年 6月 13日   |
|             |            |    |                | EP   | 2606134     | A2 | 2013年 6月 26日   |

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号  
PCT/CN2019/101656

| 检索报告引用的专利文件 | 公布日<br>(年/月/日) | 同族专利             | 公布日<br>(年/月/日) |
|-------------|----------------|------------------|----------------|
|             |                | SI 2606134 T1    | 2019年 8月 30日   |
|             |                | WO 2012024170 A3 | 2012年 5月 18日   |
| <hr/>       |                |                  |                |

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)

## フロントページの続き

| (51) Int.Cl.             | F I            | テーマコード (参考) |
|--------------------------|----------------|-------------|
| A 6 1 K 48/00 (2006.01)  | A 6 1 P 31/20  |             |
| A 6 1 K 31/713 (2006.01) | A 6 1 K 48/00  |             |
| A 6 1 K 47/18 (2006.01)  | A 6 1 K 31/713 |             |
| A 6 1 K 47/28 (2006.01)  | A 6 1 K 47/18  |             |
| A 6 1 K 47/24 (2006.01)  | A 6 1 K 47/28  |             |
| A 6 1 K 47/54 (2017.01)  | A 6 1 K 47/24  |             |
| C 0 7 H 21/02 (2006.01)  | A 6 1 K 47/54  |             |
| C 0 7 K 4/00 (2006.01)   | C 0 7 H 21/02  |             |
|                          | C 0 7 K 4/00   | Z N A       |

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

- (72) 発明者 チャン、ホンイェン  
中華人民共和国 チアンスー 2 1 5 3 0 0、クンシャン シティー、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 シティー、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 シティー、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 チェン、コンロン  
中華人民共和国 チアンスー 2 1 5 3 0 0、クンシャン シティー、ユイシャン タウン、ユアンフォン ロード ナンバー 1 6 8

F ターム (参考) 4C057 BB02 CC02 DD03 MM01 MM02 MM05  
4C076 AA12 AA95 CC16 CC35 CC41 DD23 DD23D DD49 DD63 DD66  
DD70 EE23 EE59  
4C084 AA13 MA05 NA05 NA13 NA14 ZA751 ZA752 ZB111 ZB112 ZB211  
ZB212 ZB331 ZB332 ZC411 ZC412  
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 NA05  
NA13 NA14 ZA75 ZB11 ZB21 ZB33 ZC41  
4H045 AA10 AA30 BA13 BA14 BA15 BA53 BA54 BA57 EA29 FA10  
GA45