

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2025-500860

(P2025-500860A)

(43)公表日 令和7年1月15日(2025.1.15)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113	Z Z N A 4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 5 7
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 7 6
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 C 0 8 6

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全169頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2024-535520(P2024-535520)	(71)出願人	521218294
(86)(22)出願日	令和4年12月16日(2022.12.16)		上海拓界生物医薬科技有限公司
(85)翻訳文提出日	令和6年6月13日(2024.6.13)		TUOJIE BIOTECH(SHANGHAI) CO., LTD.
(86)国際出願番号	PCT/CN2022/139488		中華人民共和國201203上海市浦東
(87)国際公開番号	WO2023/109938		新区自由貿易試驗区金科路3728号1
(87)国際公開日	令和5年6月22日(2023.6.22)		4幢103室
(31)優先権主張番号	202111542797.4		Room 103, No.14 Building, No.3728 Jink
(32)優先日	令和3年12月16日(2021.12.16)		e Road, Free Trade P
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)		ilot Zone, Pudong N
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,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)	(74)代理人	100108453
	最終頁に続く		弁理士 村山 靖彦
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 dsRNA、その調製方法及び使用

(57)【要約】

dsRNA、その調製方法及び使用。当該dsRNAを含む医薬組成物、細胞又は試薬キットである。当該dsRNAは、HBV遺伝子の発現を妨害し、関連疾患を予防及び/又は治療することができる。

【特許請求の範囲】

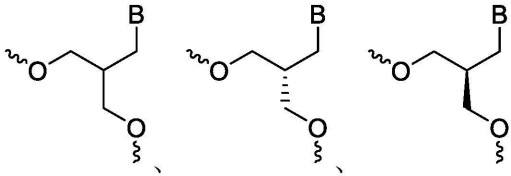
【請求項 1】

dsRNAであって、
siRNA及び
それに複合する1つ又は複数のリガンドを含み、
前記siRNAはセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、
前記アンチセンス鎖は、その5'末端から2位～8位の少なくとも1つのヌクレオチド位置で式(I)に示される化学修飾、その互変異性体又はその薬学的に許容される塩を含み、

前記式(I)に示される化学修飾は、

10

【化 1】

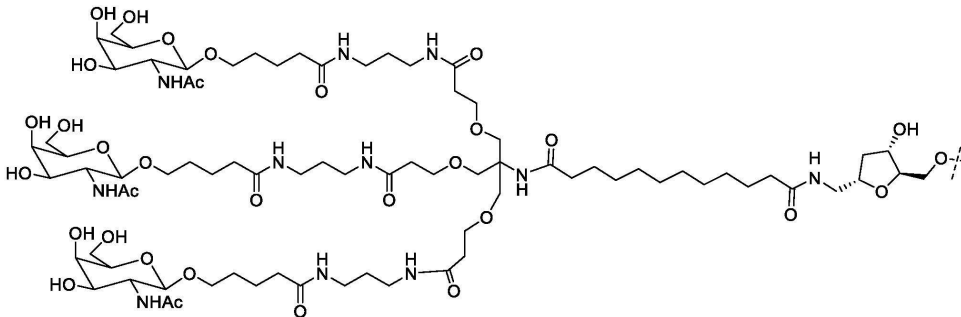


の何れか1つの構造から選ばれ、Bは塩基であり、

前記リガンドは、以下の構造式に示されるリガンド又はその薬学的に許容される塩であり、

20

【化 2】



30

前記siRNAは、B型肝炎ウイルスを標的とする、
dsRNA。

【請求項 2】

前記センス鎖は、配列番号1～配列番号4の何れか1つのヌクレオチド配列と3個以下のヌクレオチドの違いがある配列を含み、それは少なくとも15個の連続ヌクレオチドを含み、及び/又は、

アンチセンス鎖は、配列番号5～配列番号8の何れか1つのヌクレオチド配列と3個以下のヌクレオチドの違いがある配列を含み、それは少なくとも19個の連続ヌクレオチドを含み、

40

好ましくは、前記センス鎖は、配列番号1～配列番号4の何れか1つに示されるヌクレオチド配列を含み、及び/又は、

アンチセンス鎖は、配列番号5～配列番号8の何れか1つに示されるヌクレオチド配列を含み、

より好ましくは、前記センス鎖及びアンチセンス鎖は、

センス鎖は配列番号1に示されるヌクレオチド配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号5に示されるヌクレオチド配列を含み、

センス鎖は配列番号1に示されるヌクレオチド配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号8に示されるヌクレオチド配列を含み、

センス鎖は配列番号2に示されるヌクレオチド配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号

50

6 に示されるヌクレオチド配列を含み、

センス鎖は配列番号 3 に示されるヌクレオチド配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 7 に示されるヌクレオチド配列を含み、

センス鎖は配列番号 4 に示されるヌクレオチド配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 5 に示されるヌクレオチド配列を含む、という群の何れか 1 つから選ばれる、請求項 1 に記載の dsRNA。

【請求項 3】

前記センス鎖の 3' 末端が、前記リガンドに複合される、請求項 1 又は 2 に記載の dsRNA。

【請求項 4】

前記リガンドは、ホスフェート基又はチオホスフェート基を介して前記 siRNA 末端に連結し、好ましくは、ホスホジエステル基又はチオホスホジエステル基を介して連結し、より好ましくは、ホスホジエステル基を介して連結する、請求項 1 ~ 3 の何れか一項に記載の dsRNA。

【請求項 5】

前記アンチセンス鎖は、その 5' 末端から 5、6 又は 7 位で式 (I) に示される化学修飾、その互変異性体又はその薬学的に許容される塩を含み、好ましくは、7 位に位置する、請求項 1 ~ 4 の何れか一項に記載の dsRNA。

【請求項 6】

式 (I) に示される化学修飾を含む残りの位置において、前記センス鎖及び / 又はアンチセンス鎖における少なくとも 1 つの別のヌクレオチドが修飾されたヌクレオチドである、請求項 1 ~ 5 の何れか一項に記載の dsRNA。

【請求項 7】

前記センス鎖が、下記式に示されるヌクレオチド配列を含み、

5' - N_a N_a N_a N_a N_a N_a N_b N_b N_b N_a N_a N_a N_a N_a N_a N_a N_a N_a N_a - 3'、又は、

5' - N_b N_a N_a N_a N_b N_a N_b N_b N_b N_a N_a N_a N_a N_a N_a N_a N_a N_a N_a - 3'、

そのうち、N_a は 2' - メトキシ基で修飾されたヌクレオチドで、N_b は 2' - フルオロ口で修飾されたヌクレオチドである、

請求項 1 ~ 6 の何れか一項に記載の dsRNA。

【請求項 8】

前記アンチセンス鎖は、

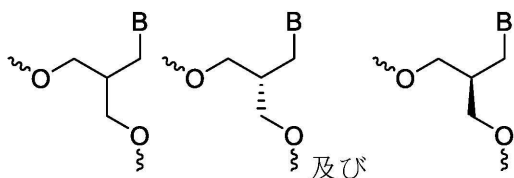
5' - N_b' N_b' N_b' N_b' N_b' N_b' W' dN' N_b' N_b' N_b' N_b' N_b' N_b' N_b' N_b' N_a' N_b' N_b' N_b' N_b' - 3'、

そのうち、それぞれの X' は、独立的に N_b' 又は N_b' であり、Y' は dN' 又は N_b' であり、

N_a' は 2' - メトキシ基で修飾されたヌクレオチドで、dN' は 2' - フルオロ口で修飾されたヌクレオチドであり、

W' は、式 (I) に示される化学修飾、その互変異性体又はその薬学的に許容される塩を含むヌクレオチドを示し、前記式 (I) は、

【化 3】



10

20

30

40

50

から選ばれ、そのうち、Bは、前記アンチセンス鎖の5'末端から7位のヌクレオチドが修飾されていない場合の塩基と同じである、
請求項1～7の何れか一項に記載のdsRNA。

【請求項9】

前記センス鎖及び/又はアンチセンス鎖の少なくとも1つのホスフェート基は、修飾基を有するホスフェート基であり、好ましくは、前記修飾基を有するホスフェート基は、チオホスホジエステル基である、

請求項1～8の何れか一項に記載のdsRNA。

【請求項10】

前記チオホスホジエステル基は、

前記センス鎖の5'末端の1番目のヌクレオチドと2番目のヌクレオチドとの間、

前記センス鎖の5'末端の2番目のヌクレオチドと3番目のヌクレオチドとの間、

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

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

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

、及び

前記アンチセンス鎖の3'末端の2番目のヌクレオチドと3番目のヌクレオチドとの間、
という位置から選ばれる少なくとも1つに存在し、

好ましくは、

前記センス鎖及び/又はアンチセンス鎖は複数のチオホスホジエステル基を含み、前記チオホスホジエステル基は、

前記センス鎖の5'末端の1番目のヌクレオチドと2番目のヌクレオチドとの間、

前記センス鎖の5'末端の2番目のヌクレオチドと3番目のヌクレオチドとの間、

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

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

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

、及び

前記アンチセンス鎖の3'末端の2番目のヌクレオチドと3番目のヌクレオチドとの間、
という位置から選ばれる少なくとも1つに存在する、

請求項9に記載のdsRNA。

【請求項11】

dsRNAであって、そのうち、

前記dsRNAは、

配列番号9に示されるセンス鎖及び配列番号17に示されるアンチセンス鎖を含むdsRNA、

配列番号9に示されるセンス鎖及び配列番号20に示されるアンチセンス鎖を含むdsRNA、

配列番号11に示されるセンス鎖及び配列番号18に示されるアンチセンス鎖を含むdsRNA、

配列番号13に示されるセンス鎖及び配列番号19に示されるアンチセンス鎖を含むdsRNA、

配列番号10に示されるセンス鎖及び配列番号17に示されるアンチセンス鎖を含むdsRNA、

配列番号12に示されるセンス鎖及び配列番号18に示されるアンチセンス鎖を含むdsRNA、

配列番号14に示されるセンス鎖及び配列番号19に示されるアンチセンス鎖を含むdsRNA、

配列番号15に示されるセンス鎖及び配列番号17に示されるアンチセンス鎖を含むdsRNA、という群の何れか1つから選ばれる、

dsRNA。

10

20

30

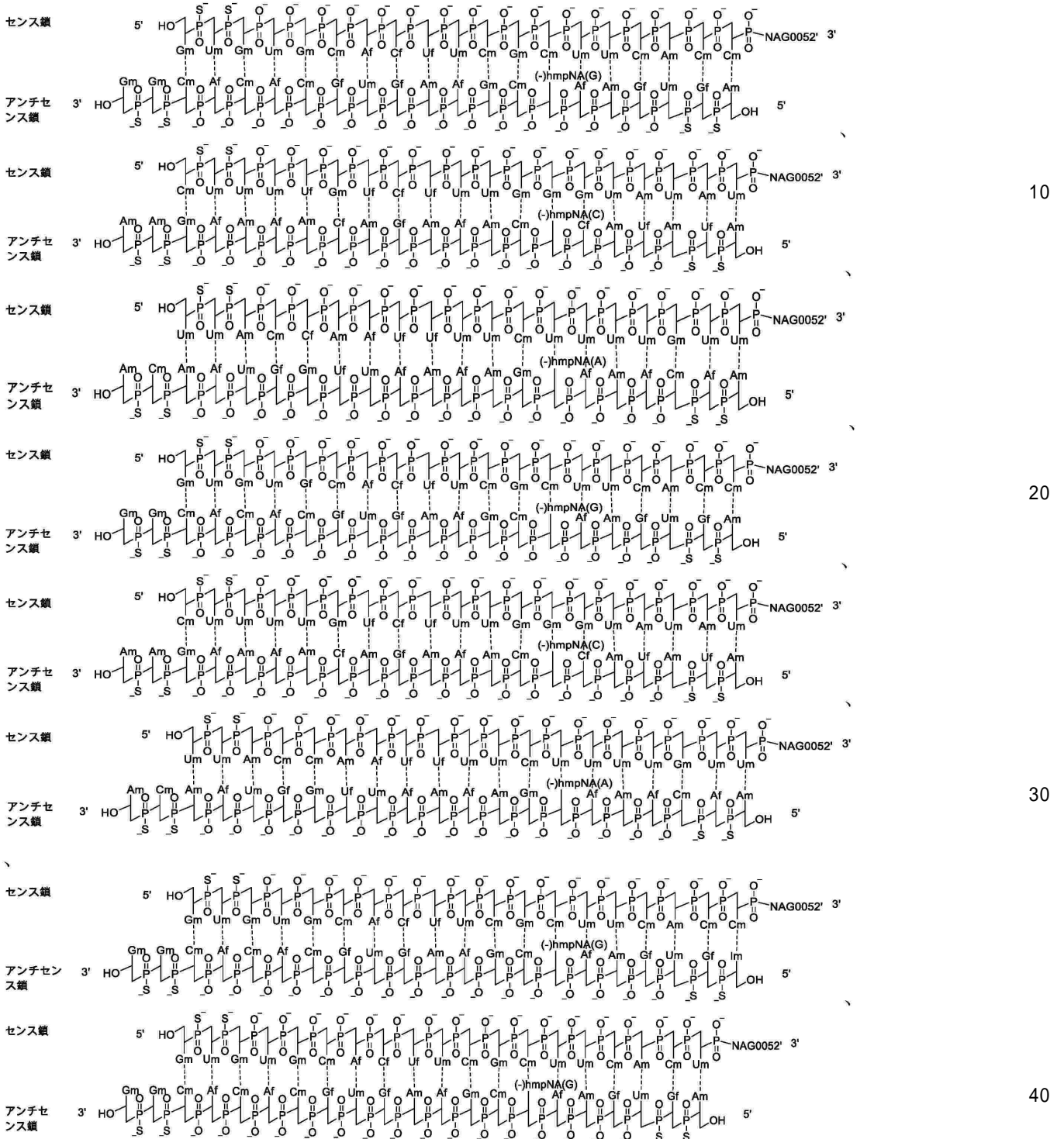
40

50

【請求項 1 2】

前記 dsRNA は、以下の構造又はその薬学的に許容される塩から選ばれ、

【化 4】



そのうち、

A f = アデニン 2' - F リボヌクレオシド、C f = シトシン 2' - F リボヌクレオシド、
G f = グアニン 2' - F リボヌクレオシド、U f = ウラシル 2' - F リボヌクレオシド、

A m = アデニン 2' - O M e リボヌクレオシド、C m = シトシン 2' - O M e リボヌクレオシド、
G m = グアニン 2' - O M e リボヌクレオシド、U m = ウラシル 2' - O M e リボヌクレオシド、
I m = ヒポキサンチン 2' - O M e リボヌクレオシド、

【化5】



はチオホスホジエステル基を表し、

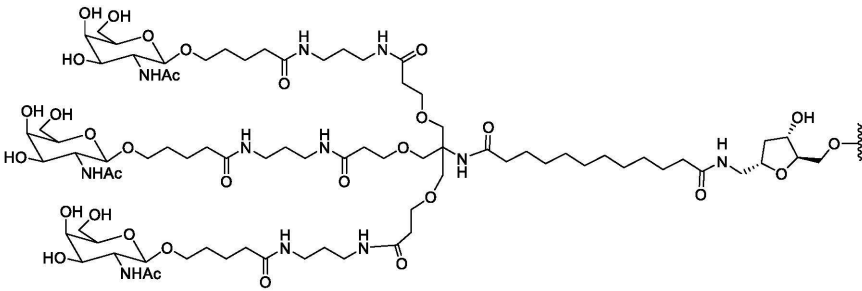
【化6】



はホスホジエステル基を表し、

NA G 0 0 5 2 ' は

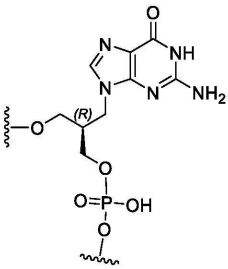
【化7】



を表し、

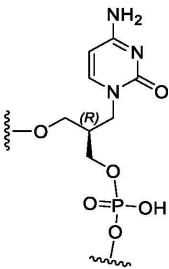
(-) h m p N A (G) は

【化8】



を表し、(-) h m p N A (C) は

【化9】



を表し、

(-) h m p N A (A) は

10

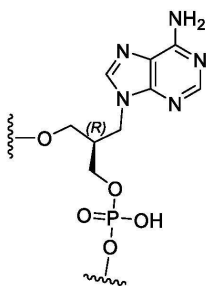
20

30

40

50

【化 1 0】



を表す、

10

請求項 1 ~ 1 1 の何れか一項に記載の d s R N A。

【請求項 1 3】

二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含む s i R N A であって、前記センス鎖及びアンチセンス鎖は、

センス鎖は配列番号 1 を含み、アンチセンス鎖は配列番号 8 を含み、

センス鎖は配列番号 4 を含み、アンチセンス鎖は配列番号 5 を含む、という群の何れか 1 つから選ばれる、

s i R N A。

【請求項 1 4】

前記 d s R N A 又は s i R N A は合成由来又はインビトロで調製されるものから選ばれる、

20

ことを特徴とする請求項 1 ~ 1 2 の何れか一項に記載の d s R N A 又は請求項 1 3 に記載の s i R N A。

【請求項 1 5】

医薬組成物であって、

請求項 1 ~ 1 2、1 4 の何れか一項に記載の d s R N A 又は請求項 1 3 ~ 1 4 の何れか一項に記載の s i R N A、及び

任意選択的に、1 つ又は複数の薬学的に許容される賦形剤を含む、
医薬組成物。

【請求項 1 6】

30

他の治療剤を更に含む、

請求項 1 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 7】

薬剤の調製における、請求項 1 ~ 1 2、1 4 の何れか一項に記載の d s R N A、又は請求項 1 5 若しくは 1 6 に記載の医薬組成物の使用であって、

前記薬剤は B 型肝炎ウイルス感染症又は B 型肝炎ウイルス関連疾患の予防及び / 又は治療するために用いられ、

好ましくは、前記 B 型肝炎ウイルス関連疾患は、慢性肝炎、急性 B 型肝炎、慢性 B 型肝炎、D 型肝炎ウイルス感染症、D 型肝炎、肝線維症、進行性肝疾患、肝細胞癌から選ばれ

40

、
前記 B 型肝炎ウイルス感染症の対象又は B 型肝炎ウイルス関連疾患の対象が H B e A g 陽性又は H B e A g 陰性である、

使用。

【請求項 1 8】

H B V 標的遺伝子又はその m R N A の発現を阻害する方法であって、

請求項 1 ~ 1 2、1 4 の何れか一項に記載の d s R N A、又は請求項 1 5 若しくは 1 6 に記載の医薬組成物の有効量又は有効用量を対象に投与することを含み、

方法。

【請求項 1 9】

前記 d s R N A 又は医薬組成物は、別の治療剤と組み合わせて投与される、

50

請求項 18 記載の方法。

【請求項 20】

肝臓にオリゴヌクレオチドを送達する方法であって、

請求項 1 ~ 12、14 の何れか一項に記載の dsRNA、又は請求項 15 若しくは 16 に記載の医薬組成物の有効量又は有効用量を対象に投与することを含む、方法。

【請求項 21】

請求項 13 に記載の siRNA を含む、細胞。

【請求項 22】

請求項 1 ~ 12、14 の何れか一項に記載の dsRNA 又は請求項 13 ~ 14 の何れか一項に記載の siRNA を含む、ベクター。

【請求項 23】

請求項 1 ~ 12、14 の何れか一項に記載の dsRNA 又は請求項 15 若しくは 16 の何れか一項に記載の医薬組成物を独立的に含む 1 つ又は複数の容器を含む、試薬キット又はキット。

【請求項 24】

請求項 1 ~ 12、14 の何れか一項に記載の dsRNA を合成することを含む、dsRNA を調製する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、出願日が 2021 年 12 月 16 日である中国特許出願 202111542797.4 の優先権を主張し、本開示には、上記中国特許出願の全文が引用されている。

【0002】

本開示は、RNA 干渉の役割を果たすための、細胞内への標的化された送達を可能にする dsRNA に関する。本開示はまた、dsRNA の調製方法及び使用に関する。

【背景技術】

【0003】

RNA 干渉 (RNAi) は、遺伝子の発現をサイレンシングする効率的な方式である。統計によると、人体内の疾患関連タンパク質のうち、約 80% 以上のタンパク質は、現在通常の小分子薬物及び生物大分子製剤により標的とされることができず、創薬不可能なタンパク質に属する。RNA 干渉技術によれば、これらのタンパク質をコードする mRNA によって、適当な siRNA を設計し、特異的に目標 mRNA を標的として目標 mRNA を分解することで、関連するタンパク質の産生の抑制を達成することができる。従って、siRNA は、非常に重要な医薬品開発の可能性を持っている。しかしながら、体内での治療的な RNA 干渉効果を達成するためには、体内での特定の細胞への siRNA 分子の送達が必要である。

【0004】

標的リガンド複合 siRNA を採用し、標的リガンドを利用して細胞膜表面の受容体分子を結合し、エンドサイトーシスすることが、効果的な薬物送達方式である。例えば、アシアロ糖タンパク受容体 (ASGPR) は、肝細胞表面において高い存在度を有し、細胞内外での転換が迅速である特徴を有する、肝細胞特異的に発現される受容体である。ガラクトース、ガラクトサミン、N-アセチルガラクトサミンなどの単糖や多糖分子は、ASGPR に対して高い親和性を有する。文献によると (10.16476/j.pibb.2015.0028)、肝細胞に siRNA を効率的に送達するためにアミノガラクトース分子クラスター (GalNAc) を使用することができ、GalNAc 分子が 3 価又は 4 価の分子クラスターとして設計されることは、肝細胞を標的とする 1 価又は 2 価 GalNAc 分子の能力を顕著に増加させることができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 5 】

異なる分子クラスター構造、及びRNAへの異なる連結方式は、体内でのsiRNAの活性に明らかに影響を及ぼし、より高い活性は、よりよい治療効果、又はより低い投与量を意味する。同等の薬効において、投与量が少ないほど毒性応答が低いことを意味する。

【 発明の概要 】

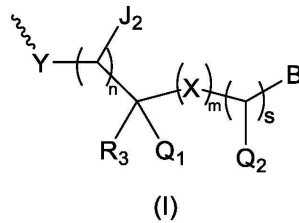
【 0 0 0 6 】

dsRNA

第1の態様において、本開示は、siRNA及びそれに複合する1つ又は複数のリガンドを含むdsRNAを提供し、上記siRNAはセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、上記アンチセンス鎖は、その5'末端から2位~8位の少なくとも1つのヌクレオチド位置で式(I)に示される化学修飾、その互変異性体修飾又はその薬学的に許容される塩を含み、

10

【 化 1 】



20

そのうち、YはO、NH及びSから選ばれ、

各Xは、独立的にCR₄(R₄')、S、NR₅及びNH-COから選ばれ、そのうち、R₄、R₄'、R₅はそれぞれ独立的にH又はC₁-C₆アルキル基であり、

J₂はH又はC₁-C₆アルキル基であり、

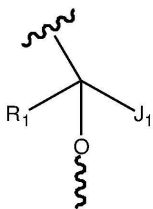
n = 0、1又は2、m = 0、1又は2、s = 0又は1であり、

R₃はH、OH、ハロゲン、NH₂、C₁-C₆アルキル基、C₁-C₆アルコキシ基、C₂-C₆アルケニル基、C₂-C₆アルキニル基、S-CH₃、NCH₃(CH₃)、OCH₂CH₂OCH₃、-O-アルキルアミノ基及び(CH₂)_pR₆から選ばれ、そのうち、R₆は、OH、ハロゲン、メトキシ基、エトキシ基、N₃、C₂-C₆アルケニル基及びC₂-C₆アルキニル基から選ばれ、p = 1、2又は3であり、

30

Q₁は

【 化 2 】

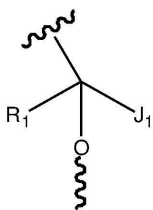


、Q₂はR₂であり、又は

Q₁はR₂、Q₂は

40

【 化 3 】



であり、

そのうち、

R₁はH、C₁-C₆アルキル基、C₁-C₆アルコキシ基、C₂-C₆アルケニル基

50

、C₂ - C₆アルキニル基及び(C₂H₂)_qR₇から選ばれ、そのうち、R₇はOH、ハロゲン、メトキシ基、エトキシ基、N₃、C₂ - C₆アルケニル基及びC₂ - C₆アルキニル基から選ばれ、q = 1、2又は3であり、

J₁はH又はC₁ - C₆アルキル基であり、

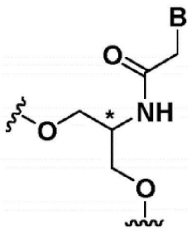
R₂はH、OH、ハロゲン、NH₂、C₁ - C₆アルキル基、C₁ - C₆アルコキシ基、C₂ - C₆アルケニル基、C₂ - C₆アルキニル基、S - CH₃、NCH₃(CH₃)、OCH₂CH₂OCH₃、-O-アルキルアミノ基及び(C₂H₂)_rR₈から選ばれ、そのうち、R₈はOH、ハロゲン、メトキシ基、エトキシ基、N₃、C₂ - C₆アルケニル基及びC₂ - C₆アルキニル基から選ばれ、r = 1、2又は3であり、

任意選択的に、R₁とR₂は環になるように直接連結しており、

Bは塩基であり、

上記式(I)に示される化学修飾、その互変異性体又はその薬学的に許容される塩修飾は、

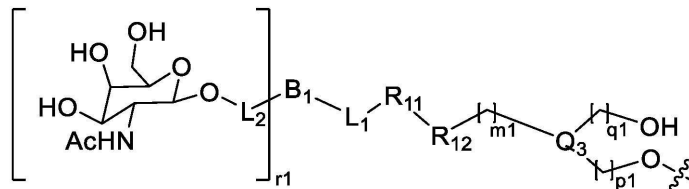
【化4】



ではなく、

上記リガンドは、式(II)に示される化合物又はその薬学的に許容される塩であり、

【化5】



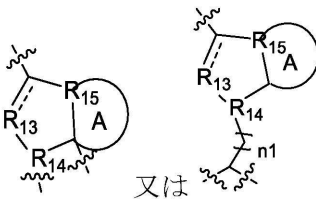
(II)

そのうち、L₁は、C₁ - C₃₀アルキル鎖であるか、或いは1つ又は複数の酸素、硫黄、窒素原子又はC=Oにより中断されるC₁ - C₃₀アルキル鎖を含み、

R₁₁及びR₁₂は、独立的に化学結合、NR₁₆、C=O又は-O-C(=O)-であり、

Q₃は、

【化6】



であり、

【化7】

は、単結合又は二重結合であり、且つ

10

20

30

40

50

【化 8】

が単結合である場合、 R_{13} は、独立的に $CR_{17}R_{18}$ 、 NR_{16} 、 O 又は S であり、

【化 9】

が二重結合である場合、 R_{13} は、独立的に CR_{19} 又は N であり、

R_{14} は、独立的に CR_{19} 又は N であり、

環 A は、存在するか、又は存在しないシクロアルキル基、ヘテロシクロアルキル基、アリール基又はヘテロアリール基であり、且つ環 A が存在する場合、 R_{15} は、独立的に CR_{19} 又は N であり、環 A が存在しない場合、 R_{15} は、独立的に $CR_{17}R_{18}$ 、 NR_{16} 又は O であり、

R_{16} 及び R_{19} は、独立的に水素、重水素、アルキル基、アルコキシ基、シクロアルキル基、ヘテロシクロアルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、 SR' 、 $S(=O)R'$ 、 $S(=O)_2R'$ 、 $S(=O)_2NR'(R'')$ 、 $NR'(R'')$ 、 $C(=O)R'$ 、 $C(=O)OR'$ 又は $C(=O)NR'(R'')$ であり、上記アルキル基、アルコキシ基、シクロアルキル基、ヘテロシクロアルキル基、アリール基又はヘテロアリール基は、任意選択的にハロゲン、ヒドロキシ基、オキソ、ニトロ基、シアノ基、 C_{1-6} アルキル基、 C_{1-6} アルコキシ基、 C_{3-7} シクロアルキル基、 $3 \sim 12$ 員ヘテロシクロアルキル基、 $6 \sim 12$ 員アリール基、 $5 \sim 12$ 員ヘテロアリール基、 SR' 、 $S(=O)R'$ 、 $S(=O)_2R'$ 、 $S(=O)_2NR'(R'')$ 、 $NR'(R'')$ 、 $C(=O)R'$ 、 $C(=O)OR'$ 及び $C(=O)NR'(R'')$ から選ばれる1つ又は複数の基で置換され、

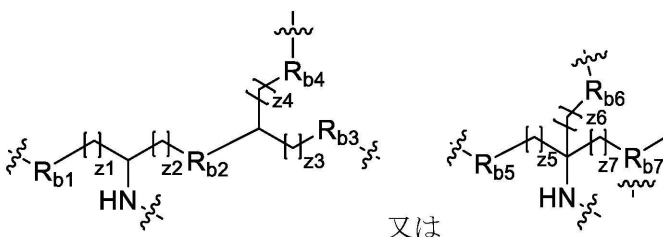
R_{17} 及び R_{18} は、独立的に水素、重水素、アルキル基、アルコキシ基、シクロアルキル基、ヘテロシクロアルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、 SR' 、 $S(=O)R'$ 、 $S(=O)_2R'$ 、 $S(=O)_2NR'(R'')$ 、 $NR'(R'')$ 、 $C(=O)R'$ 、 $C(=O)OR'$ 又は $C(=O)NR'(R'')$ であり、上記アルキル基、アルコキシ基、シクロアルキル基、ヘテロシクロアルキル基、アリール基又はヘテロアリール基は、任意選択的にハロゲン、ヒドロキシ基、オキソ、ニトロ基、シアノ基、 C_{1-6} アルキル基、 C_{1-6} アルコキシ基、 C_{3-7} シクロアルキル基、 $3 \sim 12$ 員ヘテロシクロアルキル基、 $6 \sim 12$ 員アリール基、 $5 \sim 12$ 員ヘテロアリール基、 SR' 、 $S(=O)R'$ 、 $S(=O)_2R'$ 、 $S(=O)_2NR'(R'')$ 、 $NR'(R'')$ 、 $C(=O)R'$ 、 $C(=O)OR'$ 及び $C(=O)NR'(R'')$ から選ばれる1つ又は複数の基で置換され、

R' 及び R'' は、独立的に水素、重水素、ヒドロキシ基、アルキル基、アルコキシ基、シクロアルキル基、ヘテロシクロアルキル基、アリール基又はヘテロアリール基であり、上記アルキル基、アルコキシ基、シクロアルキル基、ヘテロシクロアルキル基、アリール基又はヘテロアリール基は、任意選択的にハロゲン、ヒドロキシ基、オキソ、ニトロ基及びシアノ基から選ばれる1つ又は複数の置換基で置換され、

m_1 、 n_1 、 p_1 及び q_1 は、独立的に0、1、2、3又は4であり、

B_1 は、

【化 10】



であり、

R_{b1} 、 R_{b2} 、 R_{b3} 、 R_{b4} 、 R_{b5} 、 R_{b6} 及び R_{b7} は、独立的に $-C(=O)$

-、-NHC(=O)-、-C(=O)O-、-C(=O)-(CH₂)_{z8}-O-又は
-NHC(=O)-(CH₂)_{z9}-O-であり、

z₁、z₂、z₃、z₄、z₅、z₆、z₇、z₈及びz₉は、独立的に0~10の整数であり、

L₂は、C₁-C₃₀アルキル鎖であるか、或いは1つ又は複数の酸素、硫黄、窒素原子又はC=Oにより中断されるC₁-C₃₀アルキル鎖を含み、

r₁は、1~10の整数である。

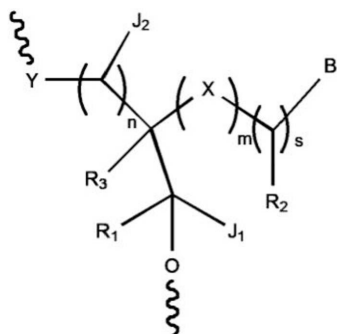
【0007】

幾つかの実施形態において、XがNH-COである場合、R₁はHではない。

【0008】

幾つかの実施形態において、式(I)に示される化学修飾は、式(I-1)に示される化学修飾であり、

【化11】



(I-1)

そのうち、YはO、NH及びSから選ばれ、

各Xは、独立的にCR₄(R₄')、S、NR₅及びNH-COから選ばれ、そのうち、R₄、R₄'、R₅はそれぞれ独立的にH又はC₁-C₆アルキル基であり、

各J₁、J₂は、それぞれ独立的にH又はC₁-C₆アルキル基であり、

n=0、1又は2、m=0、1又は2、s=0又は1であり、

R₃はH、OH、ハロゲン、NH₂、C₁-C₆アルキル基、C₁-C₆アルコキシ基、C₂-C₆アルケニル基、C₂-C₆アルキニル基、S-CH₃、NCH₃(CH₃)、OCH₂CH₂OCH₃、-O-アルキルアミノ基及び(CH₂)_pR₆から選ばれ、そのうち、R₆は、OH、ハロゲン、メトキシ基、エトキシ基、N₃、C₂-C₆アルケニル基及びC₂-C₆アルキニル基から選ばれ、p=1、2又は3であり、

R₁はH、C₁-C₆アルキル基、C₁-C₆アルコキシ基、C₂-C₆アルケニル基、C₂-C₆アルキニル基及び(CH₂)_qR₇から選ばれ、そのうち、R₇はOH、ハロゲン、メトキシ基、エトキシ基、N₃、C₂-C₆アルケニル基及びC₂-C₆アルキニル基から選ばれ、q=1、2又は3であり、

R₂はH、OH、ハロゲン、NH₂、C₁-C₆アルキル基、C₁-C₆アルコキシ基、C₂-C₆アルケニル基、C₂-C₆アルキニル基、S-CH₃、NCH₃(CH₃)、OCH₂CH₂OCH₃、-O-アルキルアミノ基及び(CH₂)_rR₈から選ばれ、そのうち、R₈はOH、ハロゲン、メトキシ基、エトキシ基、N₃、C₂-C₆アルケニル基及びC₂-C₆アルキニル基から選ばれ、r=1、2又は3であり、

任意選択的に、R₁とR₂は環になるように直接連結しており、

Bは、式(I)に定義される通りである。

【0009】

式(I-1)の幾つかの実施形態において、Bは、プリン塩基、ピリミジン塩基、インドール、5-ニトロインドール及び3-ニトロピロールから選ばれる。

【0010】

式(I-1)の幾つかの実施形態において、Bは、アデニン、グアニン、イソグアニン

、ヒポキサンチン、キサンチン、C 2 で修飾されたプリン、N 8 で修飾されたプリン、2, 6 - ジアミノプリン、6 - ジメチルアミノプリン、2 - アミノプリン、N 6 - アルキルアデニン、O 6 - アルキルグアニン、7 - デアザプリン、シトシン、5 - メチルシトシン、イソシトシン、プソイドシトシン、ウラシル、プソイドウラシル、2 - チオウリジン、4 - チオウリジン、C 5 で修飾されたピリミジン、チミン、インドール、5 - ニトロインドール及び 3 - ニトロピロールから選ばれる。

【0011】

式 (I - 1) の幾つかの実施形態において、B は、アデニン、グアニン、2, 6 - ジアミノプリン、6 - ジメチルアミノプリン、2 - アミノプリン、シトシン、ウラシル、チミン、インドール、5 - ニトロインドール及び 3 - ニトロピロールから選ばれる。

10

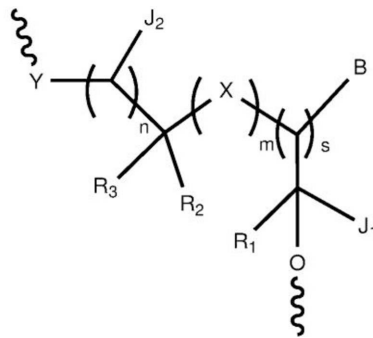
【0012】

式 (I - 1) の幾つかの実施形態において、B は、アンチセンス鎖の当該位置におけるヌクレオチドが修飾されていない場合の塩基と同じである。

【0013】

幾つかの実施形態において、式 (I) に示される化学修飾は、式 (I - 2) に示される化学修飾であり、

【化 1 2】



(I - 2)

20

そのうち、Y は O、NH 及び S から選ばれ、

各 X は、独立的に CR₄ (R₄'), S、NR₅ 及び NH - CO から選ばれ、そのうち

30

、R₄、R₄'、R₅ はそれぞれ独立的に H 又は C₁ - C₆ アルキル基であり、

n = 0、1 又は 2、m = 0、1 又は 2、s = 0 又は 1 であり、

各 J₁、J₂ は、それぞれ独立的に H 又は C₁ - C₆ アルキル基であり、

R₃ は H、OH、ハロゲン、NH₂、C₁ - C₆ アルキル基、C₁ - C₆ アルコキシ基、C₂ - C₆ アルケニル基、C₂ - C₆ アルキニル基、S - CH₃、NCH₃ (CH₃)、OCH₂CH₂OCH₃、- O - アルキルアミノ基及び (CH₂)_pR₆ から選ばれ、そのうち、R₆ は、OH、ハロゲン、メトキシ基、エトキシ基、N₃、C₂ - C₆ アルケニル基及び C₂ - C₆ アルキニル基から選ばれ、p = 1、2 又は 3 であり、

R₁ は H、C₁ - C₆ アルキル基、C₁ - C₆ アルコキシ基、C₂ - C₆ アルケニル基、C₂ - C₆ アルキニル基及び (CH₂)_qR₇ から選ばれ、そのうち、R₇ は OH、ハロゲン、メトキシ基、エトキシ基、N₃、C₂ - C₆ アルケニル基及び C₂ - C₆ アルキニル基から選ばれ、q = 1、2 又は 3 であり、

40

R₂ は H、C₁ - C₆ アルキル基、C₁ - C₆ アルコキシ基、S - CH₃、NCH₃ (CH₃)、OCH₂CH₂OCH₃、- O - アルキルアミノ基及び (CH₂)_rR₈ から選ばれ、そのうち、R₈ は OH、ハロゲン、メトキシ基、エトキシ基、N₃、C₂ - C₆ アルケニル基及び C₂ - C₆ アルキニル基から選ばれ、r = 1、2 又は 3 であり、

任意選択的に、R₁ と R₂ は環になるように直接連結しており、

B は、式 (I) に定義される通りである。

【0014】

式 (I - 2) の幾つかの実施形態において、B は、プリン塩基、ピリミジン塩基、イン

50

ドール、5 - ニトロインドール及び3 - ニトロピロールから選ばれる。

【0015】

式(I-2)の幾つかの実施形態において、Bは、アデニン、グアニン、イソグアニン、ヒポキサンチン、キサンチン、C2で修飾されたプリン、N8で修飾されたプリン、2,6 - ジアミノプリン、6 - ジメチルアミノプリン、2 - アミノプリン、N6 - アルキルアデニン、O6 - アルキルグアニン、7 - デアザプリン、シトシン、5 - メチルシトシン、イソシトシン、プソイドシトシン、ウラシル、プソイドウラシル、2 - チオウリジン、4 - チオウリジン、C5で修飾されたピリミジン、チミン、インドール、5 - ニトロインドール及び3 - ニトロピロールから選ばれる。

【0016】

式(I-2)の幾つかの実施形態において、Bは、アデニン、グアニン、2,6 - ジアミノプリン、6 - ジメチルアミノプリン、2 - アミノプリン、シトシン、ウラシル、チミン、インドール、5 - ニトロインドール及び3 - ニトロピロールから選ばれる。

【0017】

式(I-2)の幾つかの実施形態において、Bは、アンチセンス鎖の当該位置におけるヌクレオチドが修飾されていない場合の塩基と同じである。

【0018】

幾つかの実施形態において、各Xは、独立的に $CR_4(R_4')$ 、S、 NR_5 及び $NH-CO$ から選ばれ、そのうち、 R_4 、 R_4' 、 R_5 はそれぞれ独立的にH又は C_1-C_3 アルキル基であり、

$n = 0, 1$ 又は 2 、 $m = 0, 1$ 又は 2 、 $s = 0$ 又は 1 であり、

各 J_1 、 J_2 は、それぞれ独立的にH又は C_1-C_3 アルキル基であり、

R_3 はH、OH、ハロゲン、 NH_2 、 C_1-C_3 アルキル基、 C_1-C_3 アルコキシ基、 C_2-C_4 アルケニル基、 C_2-C_4 アルキニル基、 $S-CH_3$ 、 $NCH_3(CH_3)$ 、 $OCH_2CH_2OCH_3$ 、 $-O-$ アルキルアミノ基及び $(CH_2)_pR_6$ から選ばれ、そのうち、 R_6 は、OH、ハロゲン、メトキシ基、エトキシ基、 N_3 、 C_2-C_6 アルケニル基及び C_2-C_6 アルキニル基から選ばれ、 $p = 1, 2$ 又は 3 であり、

R_1 はH、 C_1-C_3 アルキル基、 C_1-C_3 アルコキシ基、 C_2-C_4 アルケニル基、 C_2-C_4 アルキニル基及び $(CH_2)_qR_7$ から選ばれ、そのうち、 R_7 は、OH、ハロゲン、メトキシ基、エトキシ基、 N_3 、 C_2-C_4 アルケニル基及び C_2-C_4 アルキニル基から選ばれ、 $q = 1, 2$ 又は 3 であり、

R_2 はH、OH、ハロゲン、 NH_2 、 C_1-C_3 アルキル基、 C_1-C_3 アルコキシ基、 C_2-C_4 アルケニル基、 C_2-C_4 アルキニル基、 $S-CH_3$ 、 $NCH_3(CH_3)$ 、 $OCH_2CH_2OCH_3$ 、 $-O-$ アルキルアミノ基及び $(CH_2)_rR_8$ から選ばれ、そのうち、 R_8 は、OH、ハロゲン、メトキシ基、エトキシ基、 N_3 、 C_2-C_4 アルケニル基及び C_2-C_4 アルキニル基から選ばれ、 $r = 1, 2$ 又は 3 であり、

任意選択的に、 R_1 と R_2 は環になるように直接連結しており、

Bは、式(I)に定義される通りである。

【0019】

幾つかの実施形態において、Bは、プリン塩基、ピリミジン塩基、インドール、5 - ニトロインドール及び3 - ニトロピロールから選ばれる。

【0020】

幾つかの実施形態において、Bは、アデニン、グアニン、イソグアニン、ヒポキサンチン、キサンチン、C2で修飾されたプリン、N8で修飾されたプリン、2,6 - ジアミノプリン、6 - ジメチルアミノプリン、2 - アミノプリン、N6 - アルキルアデニン、O6 - アルキルグアニン、7 - デアザプリン、シトシン、5 - メチルシトシン、イソシトシン、プソイドシトシン、ウラシル、プソイドウラシル、2 - チオウリジン、4 - チオウリジン、C5で修飾されたピリミジン、チミン、インドール、5 - ニトロインドール及び3 - ニトロピロールから選ばれる。

【0021】

10

20

30

40

50

幾つかの実施形態において、Bは、アデニン、グアニン、2,6-ジアミノプリン、6-ジメチルアミノプリン、2-アミノプリン、シトシン、ウラシル、チミン、インドール、5-ニトロインドール及び3-ニトロピロールから選ばれる。

【0022】

幾つかの実施形態において、Bは、アンチセンス鎖の当該位置におけるヌクレオチドが修飾されていない場合の塩基と同じである。

【0023】

幾つかの実施形態において、各Xは、独立的に $CR_4(R_4')$ 、S、 NR_5 及び $NH-CO$ から選ばれ、そのうち、 R_4 、 R_4' 、 R_5 は、それぞれ独立的にH、メチル基、エチル基、n-プロピル基又はイソプロピル基であり、

n = 0、1又は2、m = 0、1又は2、s = 0又は1であり、

各 J_1 、 J_2 は、それぞれ独立的にH又はメチル基であり、

R_3 はH、OH、F、Cl、 NH_2 、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、メトキシ基、エトキシ基、n-プロポキシ基、イソプロポキシ基、ビニル基、アリル基、エチニル基、プロパルギル基、 $S-CH_3$ 、 $NCH_3(CH_3)$ 、 $OCH_2CH_2OCH_3$ 、-O-メチルアミノ基、-O-エチルアミノ基及び $(CH_2)_pR_6$ から選ばれ、そのうち、 R_6 はOH、F、Cl、メトキシ基、エトキシ基、 N_3 、ビニル基、アリル基、エチニル基及びプロパルギル基から選ばれ、p = 1又は2であり、

R_1 はH、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、メトキシ基、エトキシ基、n-プロポキシ基、イソプロポキシ基、ビニル基、アリル基、エチニル基、プロパルギル基及び $(CH_2)_qR_7$ から選ばれ、そのうち、 R_7 はOH、F、Cl、メトキシ基、エトキシ基、 N_3 、ビニル基、アリル基、エチニル基及びプロパルギル基から選ばれ、q = 1又は2であり、

R_2 はH、OH、F、Cl、 NH_2 、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、メトキシ基、エトキシ基、n-プロポキシ基、イソプロポキシ基、ビニル基、アリル基、エチニル基、プロパルギル基、 $S-CH_3$ 、 $NCH_3(CH_3)$ 、 $OCH_2CH_2OCH_3$ 、-O-メチルアミノ基、-O-エチルアミノ基及び $(CH_2)_rR_8$ から選ばれ、そのうち、 R_8 は、OH、F、Cl、メトキシ基、エトキシ基、 N_3 、ビニル基、アリル基、エチニル基及びプロパルギル基から選ばれ、r = 1又は2であり、

任意選択的に、 R_1 と R_2 は環になるように直接連結しており、

Bは、式(I)に定義される通りである。

【0024】

幾つかの実施形態において、Bは、プリン塩基、ピリミジン塩基、インドール、5-ニトロインドール及び3-ニトロピロールから選ばれる。

【0025】

幾つかの実施形態において、Bは、アデニン、グアニン、イソグアニン、ヒポキサンチン、キサンチン、C2で修飾されたプリン、N8で修飾されたプリン、2,6-ジアミノプリン、6-ジメチルアミノプリン、2-アミノプリン、N6-アルキルアデニン、O6-アルキルグアニン、7-デアザプリン、シトシン、5-メチルシトシン、イソシトシン、プソイドシトシン、ウラシル、プソイドウラシル、2-チオウリジン、4-チオウリジン、C5で修飾されたピリミジン、チミン、インドール、5-ニトロインドール及び3-ニトロピロールから選ばれる。

【0026】

幾つかの実施形態において、Bは、アデニン、グアニン、2,6-ジアミノプリン、6-ジメチルアミノプリン、2-アミノプリン、シトシン、ウラシル、チミン、インドール、5-ニトロインドール及び3-ニトロピロールから選ばれる。

【0027】

幾つかの実施形態において、Bは、アンチセンス鎖の当該位置におけるヌクレオチドが修飾されていない場合の塩基と同じである。

【0028】

10

20

30

40

50

幾つかの実施形態において、YはO又はNHであり、各Xは、独立的にNH-CO、CH₂及びNHから選ばれ、

n = 0又は1、m = 0又は1、s = 0又は1であり、

各J₁、J₂は、それぞれ独立的にHであり、

R₁はH、メチル基及びCH₂OHから選ばれ、

R₂はH、OH、NH₂、メチル基及びCH₂OHから選ばれ、

R₃はH、OH、NH₂、メチル基及びCH₂OHから選ばれ、

任意選択的に、R₁とR₂は環になるように直接連結しており、

Bは、式(I)に定義される通りである。

【0029】

10

幾つかの実施形態において、Bは、プリン塩基、ピリミジン塩基、インドール、5-ニトロインドール及び3-ニトロピロールから選ばれる。

【0030】

幾つかの実施形態において、Bは、アデニン、グアニン、イソグアニン、ヒポキサンチン、キサンチン、C2で修飾されたプリン、N8で修飾されたプリン、2,6-ジアミノプリン、6-ジメチルアミノプリン、2-アミノプリン、N6-アルキルアデニン、O6-アルキルグアニン、7-デアザプリン、シトシン、5-メチルシトシン、イソシトシン、プソイドシトシン、ウラシル、プソイドウラシル、2-チオウリジン、4-チオウリジン、C5で修飾されたピリミジン、チミン、インドール、5-ニトロインドール及び3-ニトロピロールから選ばれる。

20

【0031】

幾つかの実施形態において、Bは、アデニン、グアニン、2,6-ジアミノプリン、6-ジメチルアミノプリン、2-アミノプリン、シトシン、ウラシル、チミン、インドール、5-ニトロインドール及び3-ニトロピロールから選ばれる。

【0032】

幾つかの実施形態において、Bは、アンチセンス鎖の当該位置におけるヌクレオチドが修飾されていない場合の塩基と同じである。

【0033】

幾つかの実施形態において、YはO又はNHであり、各Xは、独立的にNH-CO、CH₂及びNHから選ばれ、

30

n = 0又は1、m = 0又は1、s = 0又は1であり、

各J₁、J₂は、それぞれ独立的にHであり、

R₁はH、メチル基及びCH₂OHから選ばれ、

R₂はH、メチル基及びCH₂OHから選ばれ、

R₃はH、OH、NH₂、メチル基及びCH₂OHから選ばれ、

任意選択的に、R₁とR₂は環になるように直接連結しており、

Bは、式(I)に定義される通りである。

【0034】

幾つかの実施形態において、Bは、プリン塩基、ピリミジン塩基、インドール、5-ニトロインドール及び3-ニトロピロールから選ばれる。

40

【0035】

幾つかの実施形態において、Bは、アデニン、グアニン、イソグアニン、ヒポキサンチン、キサンチン、C2で修飾されたプリン、N8で修飾されたプリン、2,6-ジアミノプリン、6-ジメチルアミノプリン、2-アミノプリン、N6-アルキルアデニン、O6-アルキルグアニン、7-デアザプリン、シトシン、5-メチルシトシン、イソシトシン、プソイドシトシン、ウラシル、プソイドウラシル、2-チオウリジン、4-チオウリジン、C5で修飾されたピリミジン、チミン、インドール、5-ニトロインドール及び3-ニトロピロールから選ばれる。

【0036】

幾つかの実施形態において、Bは、アデニン、グアニン、2,6-ジアミノプリン、6

50

- ジメチルアミノプリン、2 - アミノプリン、シトシン、ウラシル、チミン、インドール、5 - ニトロインドール及び3 - ニトロピロールから選ばれる。

【0037】

幾つかの実施形態において、Bは、アンチセンス鎖の当該位置におけるヌクレオチドが修飾されていない場合の塩基と同じである。

【0038】

幾つかの実施形態において、YはO又はNHであり、

各Xは、独立的に CR_4 (R_4')、 NR_5 及び $NH-CO$ から選ばれ、 R_4 、 R_4' 、 R_5 はそれぞれ独立的にH又は C_1-C_6 アルキル基であり、

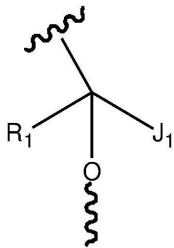
J_2 はH又は C_1-C_6 アルキル基であり、

$n=0$ 又は1、 $m=0$ 又は1、 $s=0$ 又は1であり、

R_3 はH、OH、 NH_2 、 C_1-C_6 アルキル基、 C_1-C_6 アルコキシ基及び $(CH_2)_p R_6$ から選ばれ、 R_6 はOH、メトキシ基及びエトキシ基から選ばれ、 $p=1, 2$ 又は3であり、

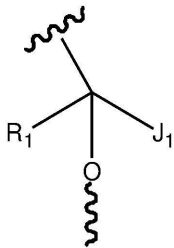
Q_1 は

【化13】



、 Q_2 は R_2 であり、又は Q_1 は R_2 、 Q_2 は

【化14】



であり、

R_1 はH、OH、 C_1-C_6 アルキル基、 C_1-C_6 アルコキシ基及び $(CH_2)_q R_7$ から選ばれ、 R_7 はOH、メトキシ基及びエトキシ基から選ばれ、 $q=1, 2$ 又は3であり、

J_1 はH又は C_1-C_6 アルキル基であり、

R_2 はH、OH、 C_1-C_6 アルキル基、 C_1-C_6 アルコキシ基及び $(CH_2)_r R_8$ から選ばれ、 R_8 はOH、メトキシ基及びエトキシ基から選ばれ、 $r=1, 2$ 又は3であり、

任意選択的に、 R_1 と R_2 は3~6員環になるように直接連結しており、

Bは塩基であり、

上記式(I)に示される化学修飾、その互変異性体又はその薬学的に許容される塩修飾は、

10

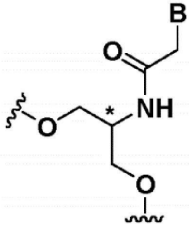
20

30

40

50

【化 1 5】



ではない。

【0039】

10

幾つかの実施形態において、Xは独立的に CR_4 (R_4')及びNH-COから選ばれる。

【0040】

幾つかの実施形態において、Xは独立的に CR_4 (R_4')から選ばれる。

【0041】

幾つかの実施形態において、 R_3 はH、 $C_1 - C_6$ アルキル基及び $(CH_2)_p R_6$ から選ばれる。

【0042】

幾つかの実施形態において、 R_3 はH及び $C_1 - C_6$ アルキル基から選ばれる。

【0043】

20

幾つかの実施形態において、 R_1 はH、 $C_1 - C_6$ アルキル基及び $(CH_2)_q R_7$ から選ばれる。

【0044】

幾つかの実施形態において、 R_1 はH及び $C_1 - C_6$ アルキル基から選ばれる。

【0045】

幾つかの実施形態において、 R_2 はH、OH、 $C_1 - C_6$ アルキル基及び $(CH_2)_r R_8$ から選ばれる。

【0046】

幾つかの実施形態において、 R_2 はH、 $C_1 - C_6$ アルキル基及び $(CH_2)_r R_8$ から選ばれる。

30

【0047】

幾つかの実施形態において、YはOであり、

各Xは、独立的に CR_4 (R_4')及びNH-COから選ばれ、 R_4 及び R_4' は、それぞれ独立的にH又は $C_1 - C_6$ アルキル基であり、

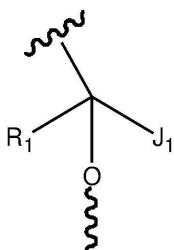
J_2 はH又は $C_1 - C_6$ アルキル基であり、

R_3 はH、 $C_1 - C_6$ アルキル基及び $(CH_2)_p R_6$ から選ばれ、 R_6 はOHから選ばれ、 $p = 1, 2$ 又は3であり、

Q_1 は

【化 1 6】

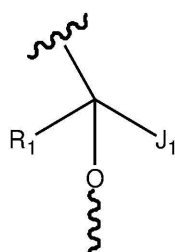
40



、 Q_2 は R_2 であり、又は Q_1 は R_2 、 Q_2 は

50

【化 1 7】



であり、

R_1 は H、 $C_1 - C_6$ アルキル基及び $(CH_2)_q R_7$ から選ばれ、 R_7 は OH から選ばれ、 $q = 1, 2$ 又は 3 であり、

J_1 は H 又は $C_1 - C_6$ アルキル基であり、

R_2 は H、OH、 $C_1 - C_6$ アルキル基及び $(CH_2)_r R_8$ から選ばれ、 R_8 は OH から選ばれ、 $r = 1, 2$ 又は 3 であり、

任意選択的に、 R_1 と R_2 は 5 ~ 6 員環になるように直接連結しており、

B は塩基である。

10

【0048】

幾つかの実施形態において、B は、プリン塩基、ピリミジン塩基、インドール、5 - ニトロインドール及び 3 - ニトロピロールから選ばれる。

20

【0049】

幾つかの実施形態において、B は、アデニン、グアニン、イソグアニン、ヒポキサンチン、キサンチン、C2 で修飾されたプリン、N8 で修飾されたプリン、2, 6 - ジアミノプリン、6 - ジメチルアミノプリン、2 - アミノプリン、N6 - アルキルアデニン、O6 - アルキルグアニン、7 - デアザプリン、シトシン、5 - メチルシトシン、イソシトシン、プソイドシトシン、ウラシル、プソイドウラシル、2 - チオウリジン、4 - チオウリジン、C5 で修飾されたピリミジン、チミン、インドール、5 - ニトロインドール及び 3 - ニトロピロールから選ばれる。

【0050】

幾つかの実施形態において、B は、アデニン、グアニン、2, 6 - ジアミノプリン、6 - ジメチルアミノプリン、2 - アミノプリン、シトシン、ウラシル、チミン、インドール、5 - ニトロインドール及び 3 - ニトロピロールから選ばれる。

30

【0051】

幾つかの実施形態において、B は、アンチセンス鎖の当該位置におけるヌクレオチドが修飾されていない場合の塩基と同じである。

【0052】

幾つかの実施形態において、Y は O であり、

各 X は、 $CR_4 (R_4')$ から独立的に選ばれ、 R_4 及び R_4' は、それぞれ独立的に、H 又は $C_1 - C_6$ アルキル基であり、

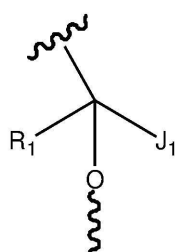
J_2 は H であり、

R_3 は H 及び $C_1 - C_6$ アルキル基から選ばれ、

Q_1 は

40

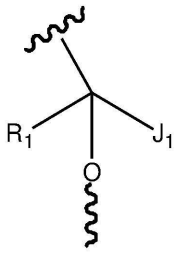
【化 1 8】



50

、 Q_2 は R_2 であり、又は Q_1 は R_2 、 Q_2 は

【化 19】



10

であり、

R_1 は H 及び $C_1 - C_6$ アルキル基から選ばれ、

J_1 は H 又は $C_1 - C_6$ アルキル基であり、

R_2 は H、 $C_1 - C_6$ アルキル基及び $(CH_2)_r R_8$ から選ばれ、 R_8 は OH から選ばれ、 $r = 1, 2$ 又は 3 であり、

任意選択的に、 R_1 と R_2 は 5 ~ 6 員環になるように直接連結しており、

B は塩基である。

【0053】

幾つかの実施形態において、B は、プリン塩基、ピリミジン塩基、インドール、5 - ニトロインドール及び 3 - ニトロピロールから選ばれる。

20

【0054】

幾つかの実施形態において、B は、アデニン、グアニン、イソグアニン、ヒポキサンチン、キサンチン、C2 で修飾されたプリン、N8 で修飾されたプリン、2, 6 - ジアミノプリン、6 - ジメチルアミノプリン、2 - アミノプリン、N6 - アルキルアデニン、O6 - アルキルグアニン、7 - デアザプリン、シトシン、5 - メチルシトシン、イソシトシン、プソイドシトシン、ウラシル、プソイドウラシル、2 - チオウリジン、4 - チオウリジン、C5 で修飾されたピリミジン、チミン、インドール、5 - ニトロインドール及び 3 - ニトロピロールから選ばれる。

【0055】

幾つかの実施形態において、B は、アデニン、グアニン、2, 6 - ジアミノプリン、6 - ジメチルアミノプリン、2 - アミノプリン、シトシン、ウラシル、チミン、インドール、5 - ニトロインドール及び 3 - ニトロピロールから選ばれる。

30

【0056】

幾つかの実施形態において、B は、アンチセンス鎖の当該位置におけるヌクレオチドが修飾されていない場合の塩基と同じである。

【0057】

幾つかの実施形態において、Y は O である。

【0058】

幾つかの実施形態において、X は独立的に $CR_4 (R_4')$ 、 NR_5 及び $NH - CO$ から選ばれ、 R_4 、 R_4' 、 R_5 は、それぞれ独立的に H、メチル基、エチル基、 n - プロピル基又はイソプロピル基である。幾つかの実施形態において、X は独立的に $NH - CO$ 、 CH_2 及び NH から選ばれる。幾つかの実施形態において、X は独立的に $NH - CO$ 及び CH_2 から選ばれる。幾つかの実施形態において、X は CH_2 である。

40

【0059】

幾つかの実施形態において、 J_2 は H 又はメチル基である。幾つかの実施形態において、 J_2 は H である。

【0060】

幾つかの実施形態において、 R_3 は H、OH、 NH_2 、メチル基、エチル基、 n - プロピル基、イソプロピル基、メトキシ基、エトキシ基、 n - プロポキシ基、イソプロポキシ基及び $(CH_2)_p R_6$ から選ばれ、 R_6 は OH、メトキシ基及びエトキシ基から選ばれ

50

、 $p = 1$ 又は 2 である。幾つかの実施形態において、 R_3 は H、メチル基、エチル基、 n -プロピル基、イソプロピル基及び $(CH_2)_p R_6$ から選ばれ、 R_6 は OH から選ばれ、 $p = 1$ 又は 2 である。幾つかの実施形態において、 R_3 は H 及びメチル基から選ばれる。

【0061】

幾つかの実施形態において、 R_1 は H、OH、メチル基、エチル基、 n -プロピル基、イソプロピル基、メトキシ基、エトキシ基、 n -プロポキシ基、イソプロポキシ基及び $(CH_2)_q R_7$ から選ばれ、 R_7 は OH から選ばれ、 $q = 1$ 又は 2 である。幾つかの実施形態において、 R_1 は H、メチル基、エチル基、 n -プロピル基、イソプロピル基及び $(CH_2)_q R_7$ から選ばれ、 R_7 は OH から選ばれ、 $q = 1$ 又は 2 である。幾つかの実施形態において、 R_1 は H 及びメチル基から選ばれる。

10

【0062】

幾つかの実施形態において、 R_2 は H、OH、メチル基、エチル基、 n -プロピル基、イソプロピル基、メトキシ基、エトキシ基、 n -プロポキシ基、イソプロポキシ基及び $(CH_2)_r R_8$ から選ばれ、 R_8 は OH から選ばれ、 $r = 1$ 又は 2 である。幾つかの実施形態において、 R_2 は H、OH、メチル基、エチル基、 n -プロピル基、イソプロピル基及び $(CH_2)_r R_8$ から選ばれ、 R_8 は OH から選ばれ、 $r = 1$ 又は 2 である。幾つかの実施形態において、 R_2 は H、メチル基及び CH_2OH から選ばれる。

【0063】

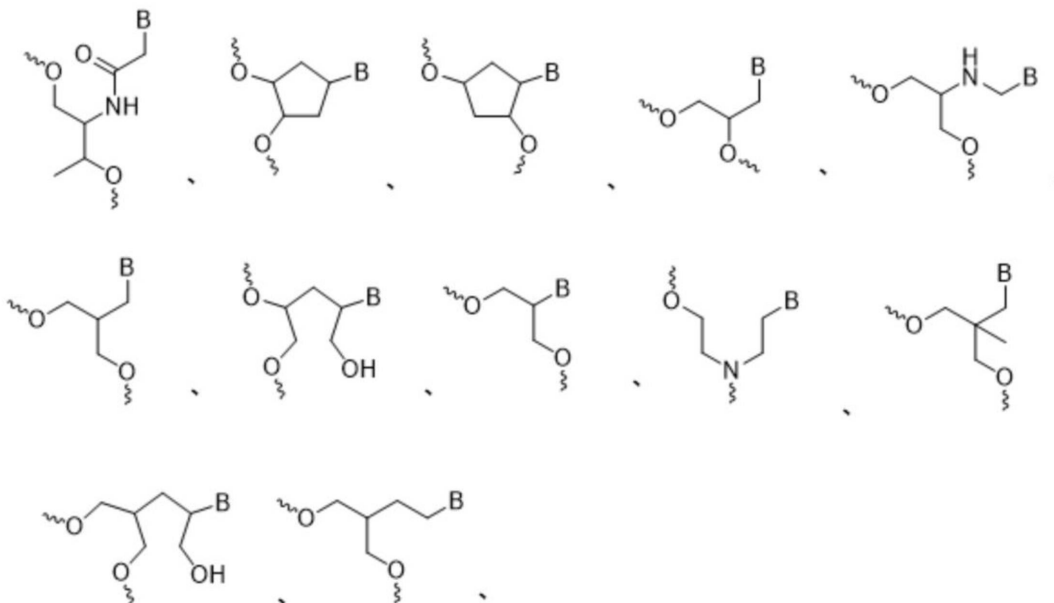
幾つかの実施形態において、 R_1 及び R_2 は 5 ~ 6 員環になるように直接連結している。幾つかの実施形態において、 R_1 及び R_2 は 3 ~ 6 員シクロアルキル基になるように直接連結している。幾つかの実施形態において、 R_1 及び R_2 はシクロペンチル基又はシクロヘキシル基になるように直接連結している。

20

【0064】

幾つかの実施形態において、上記式 (I) に示される化学修飾は、

【化20】

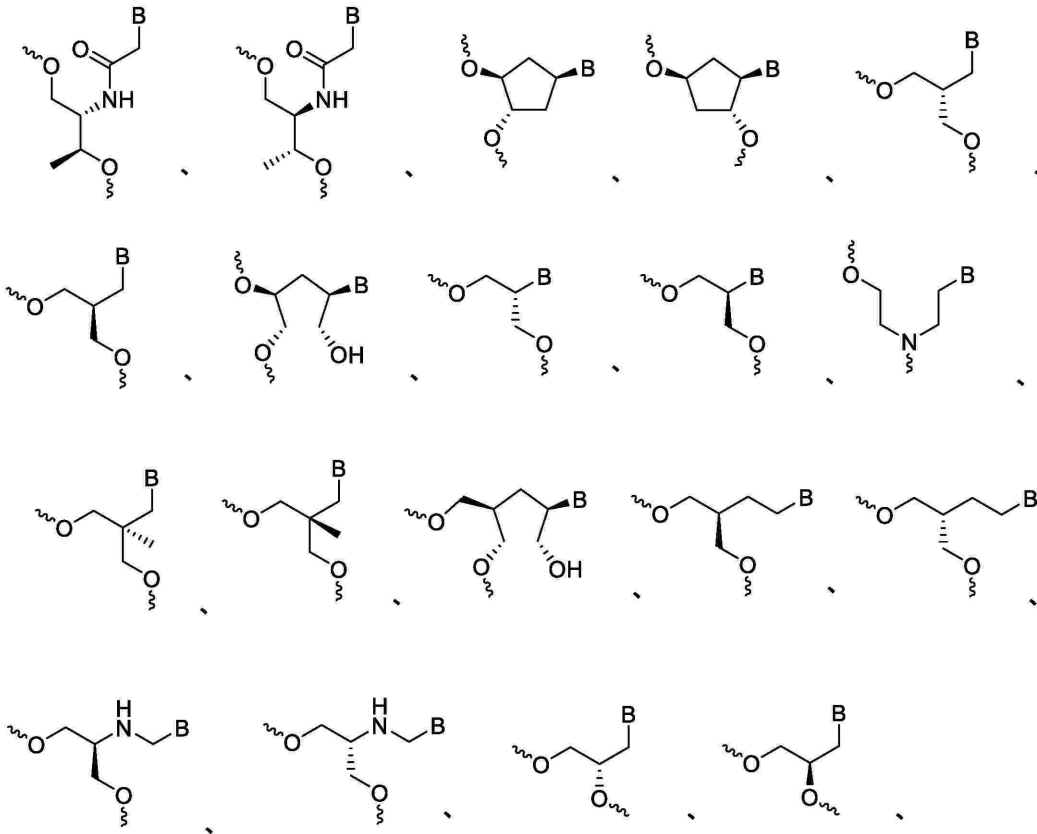


30

40

50

【化 2 1】



10

20

という何れかの構造から選ばれ、

そのうち、Bは、プリン塩基、ピリミジン塩基、インドール、5 - ニトロインドール及び3 - ニトロピロールから選ばれる。

【0065】

幾つかの実施形態において、Bは、アデニン、グアニン、イソグアニン、ヒポキサンチン、キサンチン、C2で修飾されたプリン、N8で修飾されたプリン、2,6 - ジアミノプリン、6 - ジメチルアミノプリン、2 - アミノプリン、N6 - アルキルアデニン、O6 - アルキルグアニン、7 - デアザプリン、シトシン、5 - メチルシトシン、イソシトシン、プソイドシトシン、ウラシル、プソイドウラシル、2 - チオウリジン、4 - チオウリジン、C5で修飾されたピリミジン、チミン、インドール、5 - ニトロインドール及び3 - ニトロピロールから選ばれる。

30

【0066】

幾つかの実施形態において、Bは、アデニン、グアニン、2,6 - ジアミノプリン、6 - ジメチルアミノプリン、2 - アミノプリン、シトシン、ウラシル、チミン、インドール、5 - ニトロインドール及び3 - ニトロピロールから選ばれる。

【0067】

幾つかの実施形態において、Bは、アンチセンス鎖の当該位置におけるヌクレオチドが修飾されていない場合の塩基と同じである。

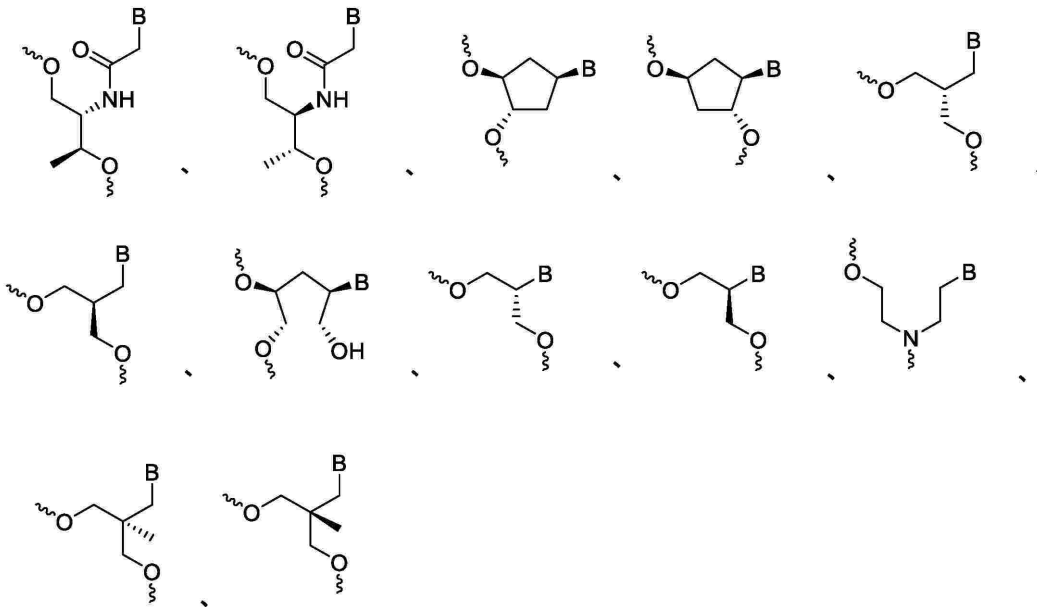
40

【0068】

幾つかの実施形態において、上記式(I)に示される化学修飾は、

50

【化 2 2】



10

という何れかの構造から選ばれ、

そのうち、Bは、プリン塩基、ピリミジン塩基、インドール、5 - ニトロインドール及び3 - ニトロピロールから選ばれる。

20

【0069】

幾つかの実施形態において、Bは、アデニン、グアニン、イソグアニン、ヒポキサンチン、キサンチン、C2で修飾されたプリン、N8で修飾されたプリン、2,6 - ジアミノプリン、6 - ジメチルアミノプリン、2 - アミノプリン、N6 - アルキルアデニン、O6 - アルキルグアニン、7 - デアザプリン、シトシン、5 - メチルシトシン、イソシトシン、プソイドシトシン、ウラシル、プソイドウラシル、2 - チオウリジン、4 - チオウリジン、C5で修飾されたピリミジン、チミン、インドール、5 - ニトロインドール及び3 - ニトロピロールから選ばれる。

【0070】

幾つかの実施形態において、Bは、アデニン、グアニン、2,6 - ジアミノプリン、6 - ジメチルアミノプリン、2 - アミノプリン、シトシン、ウラシル、チミン、インドール、5 - ニトロインドール及び3 - ニトロピロールから選ばれる。

30

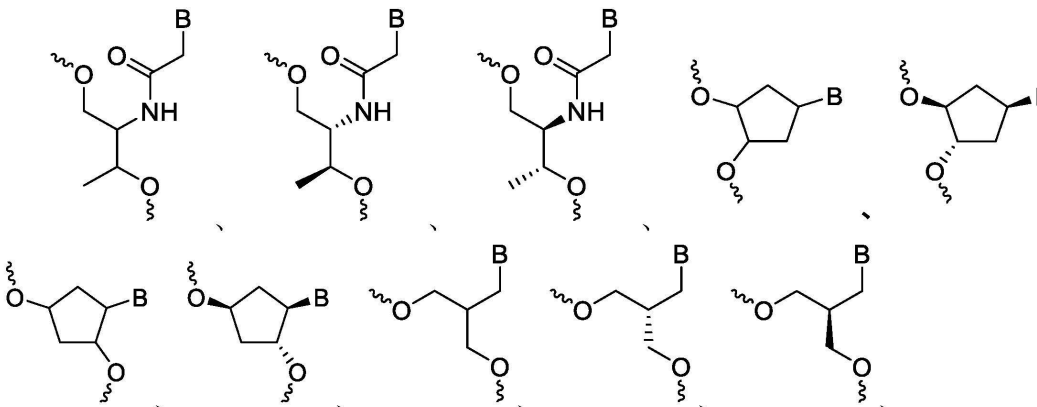
【0071】

幾つかの実施形態において、Bは、アンチセンス鎖の当該位置におけるヌクレオチドが修飾されていない場合の塩基と同じである。

【0072】

幾つかの実施形態において、上記式(I)に示される化学修飾は、

【化 2 3】



40

50

という何れかの構造から選ばれ、

そのうち、Bは、プリン塩基、ピリミジン塩基、インドール、5 - ニトロインドール及び3 - ニトロピロールから選ばれる。

【0073】

幾つかの実施形態において、Bは、アデニン、グアニン、イソグアニン、ヒポキサンチン、キサンチン、C2で修飾されたプリン、N8で修飾されたプリン、2,6 - ジアミノプリン、6 - ジメチルアミノプリン、2 - アミノプリン、N6 - アルキルアデニン、O6 - アルキルグアニン、7 - デアザプリン、シトシン、5 - メチルシトシン、イソシトシン、プソイドシトシン、ウラシル、プソイドウラシル、2 - チオウリジン、4 - チオウリジン、C5で修飾されたピリミジン、チミン、インドール、5 - ニトロインドール及び3 - ニトロピロールから選ばれる。

10

【0074】

幾つかの実施形態において、Bは、アデニン、グアニン、2,6 - ジアミノプリン、6 - ジメチルアミノプリン、2 - アミノプリン、シトシン、ウラシル、チミン、インドール、5 - ニトロインドール及び3 - ニトロピロールから選ばれる。

【0075】

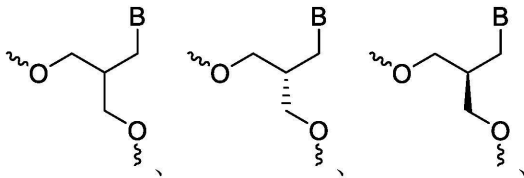
幾つかの実施形態において、Bは、アンチセンス鎖の当該位置におけるヌクレオチドが修飾されていない場合の塩基と同じである。

【0076】

幾つかの実施形態において、上記式(I)に示される化学修飾は、

20

【化24】



という何れかの構造から選ばれ、

そのうち、Bは、プリン塩基、ピリミジン塩基、インドール、5 - ニトロインドール及び3 - ニトロピロールから選ばれる。

30

【0077】

幾つかの実施形態において、Bは、アデニン、グアニン、イソグアニン、ヒポキサンチン、キサンチン、C2で修飾されたプリン、N8で修飾されたプリン、2,6 - ジアミノプリン、6 - ジメチルアミノプリン、2 - アミノプリン、N6 - アルキルアデニン、O6 - アルキルグアニン、7 - デアザプリン、シトシン、5 - メチルシトシン、イソシトシン、プソイドシトシン、ウラシル、プソイドウラシル、2 - チオウリジン、4 - チオウリジン、C5で修飾されたピリミジン、チミン、インドール、5 - ニトロインドール及び3 - ニトロピロールから選ばれる。

【0078】

幾つかの実施形態において、Bは、アデニン、グアニン、2,6 - ジアミノプリン、6 - ジメチルアミノプリン、2 - アミノプリン、シトシン、ウラシル、チミン、インドール、5 - ニトロインドール及び3 - ニトロピロールから選ばれる。

40

【0079】

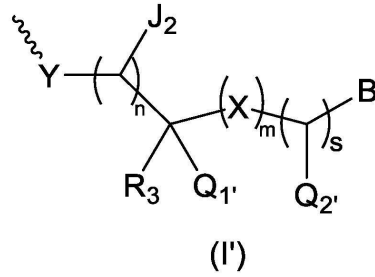
幾つかの実施形態において、Bは、アンチセンス鎖の当該位置におけるヌクレオチドが修飾されていない場合の塩基と同じである。

【0080】

幾つかの実施形態において、式(I)に示される化学修飾、その互変異性体又はその薬学的に許容される塩を含むヌクレオチドは、式(I')に示される化学修飾、その互変異性体又はその薬学的に許容される塩を含むヌクレオチドであり、

50

【化 2 5】



そのうち、YはO、NH及びSから選ばれ、

10

各Xは、独立的に CR_4 (R_4')、S、 NR_5 及びNH-COから選ばれ、そのうち、 R_4 、 R_4' 、 R_5 はそれぞれ独立的にH又は $C_1 - C_6$ アルキル基であり、

J_2 はH又は $C_1 - C_6$ アルキル基であり、

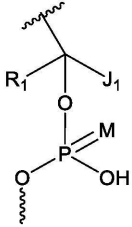
$n = 0$ 、 1 又は 2 、 $m = 0$ 、 1 又は 2 、 $s = 0$ 又は 1 であり、

R_3 はH、OH、ハロゲン、 NH_2 、 $C_1 - C_6$ アルキル基、 $C_1 - C_6$ アルコキシ基、 $C_2 - C_6$ アルケニル基、 $C_2 - C_6$ アルキニル基、 $S - CH_3$ 、 NCH_3 (CH_3)、 $OCH_2CH_2OCH_3$ 、 $-O-$ アルキルアミノ基及び $(CH_2)_p R_6$ から選ばれ、そのうち、 R_6 は、OH、ハロゲン、メトキシ基、エトキシ基、 N_3 、 $C_2 - C_6$ アルケニル基及び $C_2 - C_6$ アルキニル基から選ばれ、 $p = 1$ 、 2 又は 3 であり、

Q_1 は

20

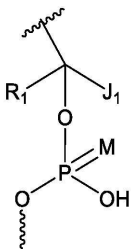
【化 2 6】



、 Q_2 は R_2 であり、又は Q_1 は R_2 、 Q_2 は

30

【化 2 7】



であり、

そのうち、

40

R_1 はH、 $C_1 - C_6$ アルキル基、 $C_1 - C_6$ アルコキシ基、 $C_2 - C_6$ アルケニル基、 $C_2 - C_6$ アルキニル基及び $(CH_2)_q R_7$ から選ばれ、そのうち、 R_7 はOH、ハロゲン、メトキシ基、エトキシ基、 N_3 、 $C_2 - C_6$ アルケニル基及び $C_2 - C_6$ アルキニル基から選ばれ、 $q = 1$ 、 2 又は 3 であり、

J_1 はH又は $C_1 - C_6$ アルキル基であり、

R_2 はH、OH、ハロゲン、 NH_2 、 $C_1 - C_6$ アルキル基、 $C_1 - C_6$ アルコキシ基、 $C_2 - C_6$ アルケニル基、 $C_2 - C_6$ アルキニル基、 $S - CH_3$ 、 NCH_3 (CH_3)、 $OCH_2CH_2OCH_3$ 、 $-O-$ アルキルアミノ基及び $(CH_2)_r R_8$ から選ばれ、そのうち、 R_8 はOH、ハロゲン、メトキシ基、エトキシ基、 N_3 、 $C_2 - C_6$ アルケニル基及び $C_2 - C_6$ アルキニル基から選ばれ、 $r = 1$ 、 2 又は 3 であり、

50

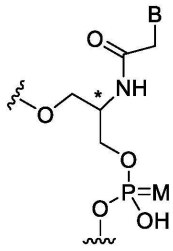
任意選択的に、 R_1 と R_2 は環になるように直接連結しており、

B は塩基であり、

M は O 又は S であり、

上記式(I')に示される化学修飾、その互変異性体又はその薬学的に許容される塩は、

【化28】



10

ではない。

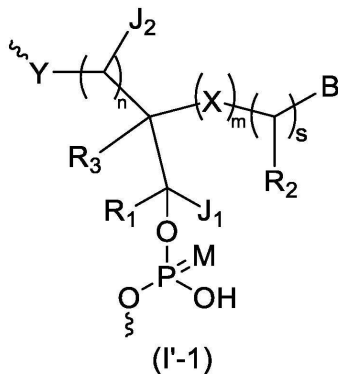
【0081】

幾つかの実施形態において、 X が $NH-CO$ である場合、 R_1 は H ではない。

【0082】

幾つかの実施形態において、式(I')に示される化学修飾は、式(I'-1)に示される化学修飾であり、

【化29】



20

そのうち、 Y は O 、 NH 及び S から選ばれ、

各 X は、独立的に CR_4 (R_4')、 S 、 NR_5 及び $NH-CO$ から選ばれ、そのうち、 R_4 、 R_4' 、 R_5 はそれぞれ独立的に H 又は C_1-C_6 アルキル基であり、

各 J_1 、 J_2 は、それぞれ独立的に H 又は C_1-C_6 アルキル基であり、

$n = 0$ 、 1 又は 2 、 $m = 0$ 、 1 又は 2 、 $s = 0$ 又は 1 であり、

R_3 は H 、 OH 、ハロゲン、 NH_2 、 C_1-C_6 アルキル基、 C_1-C_6 アルコキシ基、 C_2-C_6 アルケニル基、 C_2-C_6 アルキニル基、 $S-CH_3$ 、 NCH_3 (CH_3)

、 $OCH_2CH_2OCH_3$ 、 $-O-$ アルキルアミノ基及び $(CH_2)_pR_6$ から選ばれ、

そのうち、 R_6 は、 OH 、ハロゲン、メトキシ基、エトキシ基、 N_3 、 C_2-C_6 アルケニル基及び C_2-C_6 アルキニル基から選ばれ、 $p = 1$ 、 2 又は 3 であり、

40

R_1 は H 、 C_1-C_6 アルキル基、 C_1-C_6 アルコキシ基、 C_2-C_6 アルケニル基、 C_2-C_6 アルキニル基及び $(CH_2)_qR_7$ から選ばれ、そのうち、 R_7 は OH 、ハロゲン、メトキシ基、エトキシ基、 N_3 、 C_2-C_6 アルケニル基及び C_2-C_6 アルキニル基から選ばれ、 $q = 1$ 、 2 又は 3 であり、

R_2 は H 、 OH 、ハロゲン、 NH_2 、 C_1-C_6 アルキル基、 C_1-C_6 アルコキシ基、 C_2-C_6 アルケニル基、 C_2-C_6 アルキニル基、 $S-CH_3$ 、 NCH_3 (CH_3)

、 $OCH_2CH_2OCH_3$ 、 $-O-$ アルキルアミノ基及び $(CH_2)_rR_8$ から選ばれ、

そのうち、 R_8 は OH 、ハロゲン、メトキシ基、エトキシ基、 N_3 、 C_2-C_6 アルケニル基及び C_2-C_6 アルキニル基から選ばれ、 $r = 1$ 、 2 又は 3 であり、

M は O 又は S であり、

50

任意選択的に、 R_1 と R_2 は環になるように直接連結しており、
 B は、式(I')に定義される通りである。

【0083】

式(I'-1)の幾つかの実施形態において、 B は、プリン塩基、ピリミジン塩基、インドール、5-ニトロインドール及び3-ニトロピロールから選ばれる。

【0084】

式(I'-1)の幾つかの実施形態において、 B は、アデニン、グアニン、イソグアニン、ヒポキサンチン、キサンチン、 C_2 で修飾されたプリン、 N_8 で修飾されたプリン、2,6-ジアミノプリン、6-ジメチルアミノプリン、2-アミノプリン、 N_6 -アルキルアデニン、 O_6 -アルキルグアニン、7-デアザプリン、シトシン、5-メチルシトシン、イソシトシン、プソイドシトシン、ウラシル、プソイドウラシル、2-チオウリジン、4-チオウリジン、 C_5 で修飾されたピリミジン、チミン、インドール、5-ニトロインドール及び3-ニトロピロールから選ばれる。

10

【0085】

式(I'-1)の幾つかの実施形態において、 B は、アデニン、グアニン、2,6-ジアミノプリン、6-ジメチルアミノプリン、2-アミノプリン、シトシン、ウラシル、チミン、インドール、5-ニトロインドール及び3-ニトロピロールから選ばれる。

【0086】

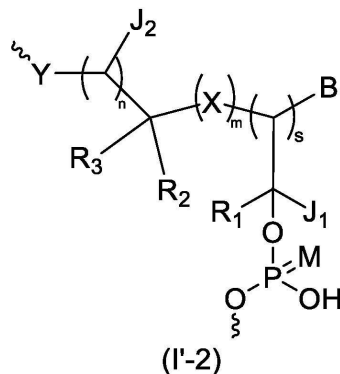
式(I'-1)の幾つかの実施形態において、 B は、アンチセンス鎖の当該位置におけるヌクレオチドが修飾されていない場合の塩基と同じである。

20

【0087】

幾つかの実施形態において、式(I')に示される化学修飾は、式(I'-2)に示される化学修飾であり、

【化30】



30

そのうち、 Y は O 、 NH 及び S から選ばれ、

各 X は、独立的に CR_4 (R_4')、 S 、 NR_5 及び $NH-CO$ から選ばれ、そのうち、 R_4 、 R_4' 、 R_5 はそれぞれ独立的に H 又は C_1-C_6 アルキル基であり、

$n = 0, 1$ 又は 2 、 $m = 0, 1$ 又は 2 、 $s = 0$ 又は 1 であり、

各 J_1 、 J_2 は、それぞれ独立的に H 又は C_1-C_6 アルキル基であり、

40

R_3 は H 、 OH 、ハロゲン、 NH_2 、 C_1-C_6 アルキル基、 C_1-C_6 アルコキシ基、 C_2-C_6 アルケニル基、 C_2-C_6 アルキニル基、 $S-CH_3$ 、 NCH_3 (CH_3)、 $OCH_2CH_2OCH_3$ 、 $-O-$ アルキルアミノ基及び $(CH_2)_pR_6$ から選ばれ、そのうち、 R_6 は、 OH 、ハロゲン、メトキシ基、エトキシ基、 N_3 、 C_2-C_6 アルケニル基及び C_2-C_6 アルキニル基から選ばれ、 $p = 1, 2$ 又は 3 であり、

R_1 は H 、 C_1-C_6 アルキル基、 C_1-C_6 アルコキシ基、 C_2-C_6 アルケニル基、 C_2-C_6 アルキニル基及び $(CH_2)_qR_7$ から選ばれ、そのうち、 R_7 は OH 、ハロゲン、メトキシ基、エトキシ基、 N_3 、 C_2-C_6 アルケニル基及び C_2-C_6 アルキニル基から選ばれ、 $q = 1, 2$ 又は 3 であり、

R_2 は H 、 C_1-C_6 アルキル基、 C_1-C_6 アルコキシ基、 $S-CH_3$ 、 NCH_3 (

50

CH₃)、OCH₂CH₂OCH₃、-O-アルキルアミノ基及び(CH₂)_rR₈から選ばれ、そのうち、R₈はOH、ハロゲン、メトキシ基、エトキシ基、N₃、C₂-C₆アルケニル基及びC₂-C₆アルキニル基から選ばれ、r = 1、2又は3であり、

任意選択的に、R₁とR₂は環になるように直接連結しており、

MはO又はSであり、

Bは、式(I')に定義される通りである。

【0088】

式(I'-2)の幾つかの実施形態において、Bは、プリン塩基、ピリミジン塩基、インドール、5-ニトロインドール及び3-ニトロピロールから選ばれる。

【0089】

式(I'-2)の幾つかの実施形態において、Bは、アデニン、グアニン、イソグアニン、ヒポキサンチン、キサンチン、C₂で修飾されたプリン、N₈で修飾されたプリン、2,6-ジアミノプリン、6-ジメチルアミノプリン、2-アミノプリン、N₆-アルキルアデニン、O₆-アルキルグアニン、7-デアザプリン、シトシン、5-メチルシトシン、イソシトシン、プソイドシトシン、ウラシル、プソイドウラシル、2-チオウリジン、4-チオウリジン、C₅で修飾されたピリミジン、チミン、インドール、5-ニトロインドール及び3-ニトロピロールから選ばれる。

【0090】

式(I'-2)の幾つかの実施形態において、Bは、アデニン、グアニン、2,6-ジアミノプリン、6-ジメチルアミノプリン、2-アミノプリン、シトシン、ウラシル、チミン、インドール、5-ニトロインドール及び3-ニトロピロールから選ばれる。

【0091】

式(I'-2)の幾つかの実施形態において、Bは、アンチセンス鎖の当該位置におけるヌクレオチドが修飾されていない場合の塩基と同じである。

【0092】

幾つかの実施形態において、各Xは、独立的にCR₄(R₄')、S、NR₅及びNH-COから選ばれ、そのうち、R₄、R₄'、R₅はそれぞれ独立的にH又はC₁-C₃アルキル基であり、

n = 0、1又は2、m = 0、1又は2、s = 0又は1であり、

各J₁、J₂は、それぞれ独立的にH又はC₁-C₃アルキル基であり、

R₃はH、OH、ハロゲン、NH₂、C₁-C₃アルキル基、C₁-C₃アルコキシ基、C₂-C₄アルケニル基、C₂-C₄アルキニル基、S-CH₃、NCH₃(CH₃)、OCH₂CH₂OCH₃、-O-アルキルアミノ基及び(CH₂)_pR₆から選ばれ、そのうち、R₆は、OH、ハロゲン、メトキシ基、エトキシ基、N₃、C₂-C₆アルケニル基及びC₂-C₆アルキニル基から選ばれ、p = 1、2又は3であり、

R₁はH、C₁-C₃アルキル基、C₁-C₃アルコキシ基、C₂-C₄アルケニル基、C₂-C₄アルキニル基及び(CH₂)_qR₇から選ばれ、そのうち、R₇は、OH、ハロゲン、メトキシ基、エトキシ基、N₃、C₂-C₄アルケニル基及びC₂-C₄アルキニル基から選ばれ、q = 1、2又は3であり、

R₂はH、OH、ハロゲン、NH₂、C₁-C₃アルキル基、C₁-C₃アルコキシ基、C₂-C₄アルケニル基、C₂-C₄アルキニル基、S-CH₃、NCH₃(CH₃)、OCH₂CH₂OCH₃、-O-アルキルアミノ基及び(CH₂)_rR₈から選ばれ、そのうち、R₈は、OH、ハロゲン、メトキシ基、エトキシ基、N₃、C₂-C₄アルケニル基及びC₂-C₄アルキニル基から選ばれ、r = 1、2又は3であり、

任意選択的に、R₁とR₂は環になるように直接連結しており、

Bは、式(I')に定義される通りである。

【0093】

幾つかの実施形態において、Bは、プリン塩基、ピリミジン塩基、インドール、5-ニトロインドール及び3-ニトロピロールから選ばれる。

【0094】

10

20

30

40

50

幾つかの実施形態において、Bは、アデニン、グアニン、イソグアニン、ヒポキサンチン、キサンチン、C2で修飾されたプリン、N8で修飾されたプリン、2,6-ジアミノプリン、6-ジメチルアミノプリン、2-アミノプリン、N6-アルキルアデニン、O6-アルキルグアニン、7-デアザプリン、シトシン、5-メチルシトシン、イソシトシン、プソイドシトシン、ウラシル、プソイドウラシル、2-チオウリジン、4-チオウリジン、C5で修飾されたピリミジン、チミン、インドール、5-ニトロインドール及び3-ニトロピロールから選ばれる。

【0095】

幾つかの実施形態において、Bは、アデニン、グアニン、2,6-ジアミノプリン、6-ジメチルアミノプリン、2-アミノプリン、シトシン、ウラシル、チミン、インドール、5-ニトロインドール及び3-ニトロピロールから選ばれる。

10

【0096】

幾つかの実施形態において、Bは、アンチセンス鎖の当該位置におけるヌクレオチドが修飾されていない場合の塩基と同じである。

【0097】

幾つかの実施形態において、各Xは、独立的にCR₄(R₄'), S、NR₅及びNH-COから選ばれ、そのうち、R₄、R₄'、R₅は、それぞれ独立的にH、メチル基、エチル基、n-プロピル基又はイソプロピル基であり、

n = 0、1又は2、m = 0、1又は2、s = 0又は1であり、

各J₁、J₂は、それぞれ独立的にH又はメチル基であり、

20

R₃はH、OH、F、Cl、NH₂、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、メトキシ基、エトキシ基、n-プロポキシ基、イソプロポキシ基、ビニル基、アリル基、エチニル基、プロパルギル基、S-CH₃、NCH₃(CH₃)、OCH₂CH₂OCH₃、-O-メチルアミノ基、-O-エチルアミノ基及び(CH₂)_pR₆から選ばれ、そのうち、R₆はOH、F、Cl、メトキシ基、エトキシ基、N₃、ビニル基、アリル基、エチニル基及びプロパルギル基から選ばれ、p = 1又は2であり、

R₁はH、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、メトキシ基、エトキシ基、n-プロポキシ基、イソプロポキシ基、ビニル基、アリル基、エチニル基、プロパルギル基及び(CH₂)_qR₇から選ばれ、そのうち、R₇はOH、F、Cl、メトキシ基、エトキシ基、N₃、ビニル基、アリル基、エチニル基及びプロパルギル基から選ばれ、q = 1又は2であり、

30

R₂はH、OH、F、Cl、NH₂、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、メトキシ基、エトキシ基、n-プロポキシ基、イソプロポキシ基、ビニル基、アリル基、エチニル基、プロパルギル基、S-CH₃、NCH₃(CH₃)、OCH₂CH₂OCH₃、-O-メチルアミノ基、-O-エチルアミノ基及び(CH₂)_rR₈から選ばれ、そのうち、R₈は、OH、F、Cl、メトキシ基、エトキシ基、N₃、ビニル基、アリル基、エチニル基及びプロパルギル基から選ばれ、r = 1又は2であり、

任意選択的に、R₁とR₂は環になるように直接連結しており、

Bは、式(I')に定義される通りである。

【0098】

幾つかの実施形態において、Bは、プリン塩基、ピリミジン塩基、インドール、5-ニトロインドール及び3-ニトロピロールから選ばれる。

40

【0099】

幾つかの実施形態において、Bは、アデニン、グアニン、イソグアニン、ヒポキサンチン、キサンチン、C2で修飾されたプリン、N8で修飾されたプリン、2,6-ジアミノプリン、6-ジメチルアミノプリン、2-アミノプリン、N6-アルキルアデニン、O6-アルキルグアニン、7-デアザプリン、シトシン、5-メチルシトシン、イソシトシン、プソイドシトシン、ウラシル、プソイドウラシル、2-チオウリジン、4-チオウリジン、C5で修飾されたピリミジン、チミン、インドール、5-ニトロインドール及び3-ニトロピロールから選ばれる。

50

【0100】

幾つかの実施形態において、Bは、アデニン、グアニン、2,6-ジアミノプリン、6-ジメチルアミノプリン、2-アミノプリン、シトシン、ウラシル、チミン、インドール、5-ニトロインドール及び3-ニトロピロールから選ばれる。

【0101】

幾つかの実施形態において、Bは、アンチセンス鎖の当該位置におけるヌクレオチドが修飾されていない場合の塩基と同じである。

【0102】

幾つかの実施形態において、YはO又はNHであり、各Xは、独立的にNH-CO、CH₂及びNHから選ばれ、

n = 0又は1、m = 0又は1、s = 0又は1であり、

各J₁、J₂は、それぞれ独立的にHであり、

R₁はH、メチル基及びCH₂OHから選ばれ、

R₂はH、OH、NH₂、メチル基及びCH₂OHから選ばれ、

R₃はH、OH、NH₂、メチル基及びCH₂OHから選ばれ、

任意選択的に、R₁とR₂は環になるように直接連結しており、

Bは、式(I')に定義される通りである。

【0103】

幾つかの実施形態において、Bは、プリン塩基、ピリミジン塩基、インドール、5-ニトロインドール及び3-ニトロピロールから選ばれる。

【0104】

幾つかの実施形態において、Bは、アデニン、グアニン、イソグアニン、ヒポキサンチン、キサンチン、C2で修飾されたプリン、N8で修飾されたプリン、2,6-ジアミノプリン、6-ジメチルアミノプリン、2-アミノプリン、N6-アルキルアデニン、O6-アルキルグアニン、7-デアザプリン、シトシン、5-メチルシトシン、イソシトシン、プソイドシトシン、ウラシル、プソイドウラシル、2-チオウリジン、4-チオウリジン、C5で修飾されたピリミジン、チミン、インドール、5-ニトロインドール及び3-ニトロピロールから選ばれる。

【0105】

幾つかの実施形態において、Bは、アデニン、グアニン、2,6-ジアミノプリン、6-ジメチルアミノプリン、2-アミノプリン、シトシン、ウラシル、チミン、インドール、5-ニトロインドール及び3-ニトロピロールから選ばれる。

【0106】

幾つかの実施形態において、Bは、アンチセンス鎖の当該位置におけるヌクレオチドが修飾されていない場合の塩基と同じである。

【0107】

幾つかの実施形態において、YはO又はNHであり、各Xは、独立的にNH-CO、CH₂及びNHから選ばれ、

n = 0又は1、m = 0又は1、s = 0又は1であり、

各J₁、J₂は、それぞれ独立的にHであり、

R₁はH、メチル基及びCH₂OHから選ばれ、

R₂はH、メチル基及びCH₂OHから選ばれ、

R₃はH、OH、NH₂、メチル基及びCH₂OHから選ばれ、

任意選択的に、R₁とR₂は環になるように直接連結しており、

Bは、式(I')に定義される通りである。

【0108】

幾つかの実施形態において、Bは、プリン塩基、ピリミジン塩基、インドール、5-ニトロインドール及び3-ニトロピロールから選ばれる。

【0109】

幾つかの実施形態において、Bは、アデニン、グアニン、イソグアニン、ヒポキサンチン

10

20

30

40

50

ン、キサンチン、C 2 で修飾されたプリン、N 8 で修飾されたプリン、2, 6 - ジアミノプリン、6 - ジメチルアミノプリン、2 - アミノプリン、N 6 - アルキルアデニン、O 6 - アルキルグアニン、7 - デアザプリン、シトシン、5 - メチルシトシン、イソシトシン、プソイドシトシン、ウラシル、プソイドウラシル、2 - チオウリジン、4 - チオウリジン、C 5 で修飾されたピリミジン、チミン、インドール、5 - ニトロインドール及び 3 - ニトロピロールから選ばれる。

【0 1 1 0】

幾つかの実施形態において、B は、アデニン、グアニン、2, 6 - ジアミノプリン、6 - ジメチルアミノプリン、2 - アミノプリン、シトシン、ウラシル、チミン、インドール、5 - ニトロインドール及び 3 - ニトロピロールから選ばれる。

10

【0 1 1 1】

幾つかの実施形態において、B は、アンチセンス鎖の当該位置におけるヌクレオチドが修飾されていない場合の塩基と同じである。

【0 1 1 2】

幾つかの実施形態において、Y は O 又は NH であり、

各 X は、独立的に CR_4 (R_4')、 NR_5 及び $NH-CO$ から選ばれ、 R_4 、 R_4' 、 R_5 はそれぞれ独立的に H 又は $C_1 - C_6$ アルキル基であり、

J_2 は H 又は $C_1 - C_6$ アルキル基であり、

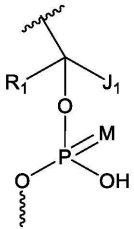
$n = 0$ 又は 1、 $m = 0$ 又は 1、 $s = 0$ 又は 1 であり、

R_3 は H、OH、 NH_2 、 $C_1 - C_6$ アルキル基、 $C_1 - C_6$ アルコキシ基及び $(CH_2)_p R_6$ から選ばれ、 R_6 は OH、メトキシ基及びエトキシ基から選ばれ、 $p = 1, 2$ 又は 3 であり、

20

Q_1 は

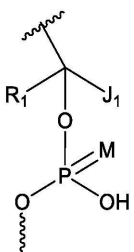
【化 3 1】



30

、 Q_2 は R_2 であり、又は Q_1 は R_2 、 Q_2 は

【化 3 2】



40

であり、

R_1 は H、OH、 $C_1 - C_6$ アルキル基、 $C_1 - C_6$ アルコキシ基及び $(CH_2)_q R_7$ から選ばれ、 R_7 は OH、メトキシ基及びエトキシ基から選ばれ、 $q = 1, 2$ 又は 3 であり、

J_1 は H 又は $C_1 - C_6$ アルキル基であり、

R_2 は H、OH、 $C_1 - C_6$ アルキル基、 $C_1 - C_6$ アルコキシ基及び $(CH_2)_r R_8$ から選ばれ、 R_8 は OH、メトキシ基及びエトキシ基から選ばれ、 $r = 1, 2$ 又は 3 であり、

任意選択的に、 R_1 と R_2 は 3 ~ 6 員環になるように直接連結しており、

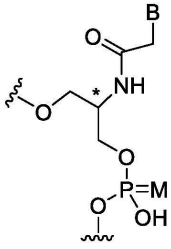
50

MはO又はSであり、

Bは塩基であり、

上記式(I')に示される化学修飾、その互変異性体又はその薬学的に許容される塩は、

【化33】



10

ではない。

【0113】

幾つかの実施形態において、Xは独立的に CR_4 (R_4')及びNH-COから選ばれる。

【0114】

幾つかの実施形態において、Xは独立的に CR_4 (R_4')から選ばれる。

【0115】

幾つかの実施形態において、 R_3 はH、 $C_1 - C_6$ アルキル基及び $(CH_2)_p R_6$ から選ばれる。

20

【0116】

幾つかの実施形態において、 R_3 はH及び $C_1 - C_6$ アルキル基から選ばれる。

【0117】

幾つかの実施形態において、 R_1 はH、 $C_1 - C_6$ アルキル基及び $(CH_2)_q R_7$ から選ばれる。

【0118】

幾つかの実施形態において、 R_1 はH及び $C_1 - C_6$ アルキル基から選ばれる。

【0119】

幾つかの実施形態において、 R_2 はH、OH、 $C_1 - C_6$ アルキル基及び $(CH_2)_r R_8$ から選ばれる。

30

【0120】

幾つかの実施形態において、 R_2 はH、 $C_1 - C_6$ アルキル基及び $(CH_2)_r R_8$ から選ばれる。

【0121】

幾つかの実施形態において、YはOであり、

各Xは、独立的に CR_4 (R_4')及びNH-COから選ばれ、 R_4 及び R_4' は、それぞれ独立的にH又は $C_1 - C_6$ アルキル基であり、

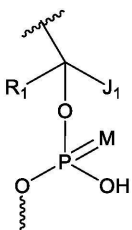
J_2 はH又は $C_1 - C_6$ アルキル基であり、

R_3 はH、 $C_1 - C_6$ アルキル基及び $(CH_2)_p R_6$ から選ばれ、 R_6 はOHから選ばれ、 $p = 1, 2$ 又は3であり、

40

Q_1 は

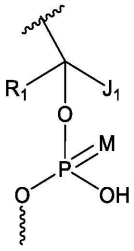
【化34】



、 Q_2 は R_2 であり、又は Q_1 は R_2 、 Q_2 は

50

【化 3 5】



であり、

R_1 は H、 $C_1 - C_6$ アルキル基及び $(CH_2)_q R_7$ から選ばれ、 R_7 は OH から選ばれ、 $q = 1, 2$ 又は 3 であり、

J_1 は H 又は $C_1 - C_6$ アルキル基であり、

R_2 は H、OH、 $C_1 - C_6$ アルキル基及び $(CH_2)_r R_8$ から選ばれ、 R_8 は OH から選ばれ、 $r = 1, 2$ 又は 3 であり、

任意選択的に、 R_1 と R_2 は 5 ~ 6 員環になるように直接連結しており、

M は O 又は S であり、

B は塩基である。

【0 1 2 2】

幾つかの実施形態において、B は、プリン塩基、ピリミジン塩基、インドール、5 - ニトロインドール及び 3 - ニトロピロールから選ばれる。

【0 1 2 3】

幾つかの実施形態において、B は、アデニン、グアニン、イソグアニン、ヒポキサンチン、キサンチン、C 2 で修飾されたプリン、N 8 で修飾されたプリン、2, 6 - ジアミノプリン、6 - ジメチルアミノプリン、2 - アミノプリン、N 6 - アルキルアデニン、O 6 - アルキルグアニン、7 - デアザプリン、シトシン、5 - メチルシトシン、イソシトシン、プソイドシトシン、ウラシル、プソイドウラシル、2 - チオウリジン、4 - チオウリジン、C 5 で修飾されたピリミジン、チミン、インドール、5 - ニトロインドール及び 3 - ニトロピロールから選ばれる。

【0 1 2 4】

幾つかの実施形態において、B は、アデニン、グアニン、2, 6 - ジアミノプリン、6 - ジメチルアミノプリン、2 - アミノプリン、シトシン、ウラシル、チミン、インドール、5 - ニトロインドール及び 3 - ニトロピロールから選ばれる。

【0 1 2 5】

幾つかの実施形態において、B は、アンチセンス鎖の当該位置におけるヌクレオチドが修飾されていない場合の塩基と同じである。

【0 1 2 6】

幾つかの実施形態において、Y は O であり、

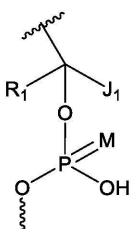
各 X は、 $CR_4 (R_4')$ から独立的に選ばれ、 R_4 及び R_4' は、それぞれ独立的に、H 又は $C_1 - C_6$ アルキル基であり、

J_2 は H であり、

R_3 は H 及び $C_1 - C_6$ アルキル基から選ばれ、

Q_1 は

【化 3 6】



10

20

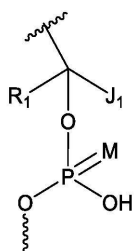
30

40

50

、 Q_2 は R_2 であり、又は Q_1 は R_2 、 Q_2 は

【化 3 7】



10

であり、

R_1 は H 及び $C_1 - C_6$ アルキル基から選ばれ、

J_1 は H 又は $C_1 - C_6$ アルキル基であり、

R_2 は H、 $C_1 - C_6$ アルキル基及び $(CH_2)_r R_8$ から選ばれ、 R_8 は OH から選ばれ、 $r = 1, 2$ 又は 3 であり、

任意選択的に、 R_1 と R_2 は $5 \sim 6$ 員環になるように直接連結しており、

M は O 又は S であり、

B は塩基である。

【0 1 2 7】

幾つかの実施形態において、B は、プリン塩基、ピリミジン塩基、インドール、5 - ニトロインドール及び 3 - ニトロピロールから選ばれる。

20

【0 1 2 8】

幾つかの実施形態において、B は、アデニン、グアニン、イソグアニン、ヒポキサンチン、キサンチン、 C_2 で修飾されたプリン、 N_8 で修飾されたプリン、2, 6 - ジアミノプリン、6 - ジメチルアミノプリン、2 - アミノプリン、 N_6 - アルキルアデニン、 O_6 - アルキルグアニン、7 - デアザプリン、シトシン、5 - メチルシトシン、イソシトシン、プソイドシトシン、ウラシル、プソイドウラシル、2 - チオウリジン、4 - チオウリジン、 C_5 で修飾されたピリミジン、チミン、インドール、5 - ニトロインドール及び 3 - ニトロピロールから選ばれる。

【0 1 2 9】

幾つかの実施形態において、B は、アデニン、グアニン、2, 6 - ジアミノプリン、6 - ジメチルアミノプリン、2 - アミノプリン、シトシン、ウラシル、チミン、インドール、5 - ニトロインドール及び 3 - ニトロピロールから選ばれる。

30

【0 1 3 0】

幾つかの実施形態において、B は、アンチセンス鎖の当該位置におけるヌクレオチドが修飾されていない場合の塩基と同じである。

【0 1 3 1】

幾つかの実施形態において、Y は O である。

【0 1 3 2】

幾つかの実施形態において、X は独立的に CR_4 (R_4')、 NR_5 及び $NH - CO$ から選ばれ、 R_4 、 R_4' 、 R_5 は、それぞれ独立的に H、メチル基、エチル基、 n - プロピル基又はイソプロピル基である。幾つかの実施形態において、X は独立的に $NH - CO$ 、 CH_2 及び NH から選ばれる。幾つかの実施形態において、X は独立的に $NH - CO$ 及び CH_2 から選ばれる。幾つかの実施形態において、X は CH_2 である。

40

【0 1 3 3】

幾つかの実施形態において、 J_2 は H 又はメチル基である。幾つかの実施形態において、 J_2 は H である。

【0 1 3 4】

幾つかの実施形態において、 R_3 は H、OH、 NH_2 、メチル基、エチル基、 n - プロピル基、イソプロピル基、メトキシ基、エトキシ基、 n - プロポキシ基、イソプロポキシ

50

基及び $(CH_2)_p R_6$ から選ばれ、 R_6 は OH、メトキシ基及びエトキシ基から選ばれ、 $p = 1$ 又は 2 である。幾つかの実施形態において、 R_3 は H、メチル基、エチル基、 n -プロピル基、イソプロピル基及び $(CH_2)_p R_6$ から選ばれ、 R_6 は OH から選ばれ、 $p = 1$ 又は 2 である。幾つかの実施形態において、 R_3 は H 及びメチル基から選ばれる。

【0135】

幾つかの実施形態において、 R_1 は H、OH、メチル基、エチル基、 n -プロピル基、イソプロピル基、メトキシ基、エトキシ基、 n -プロポキシ基、イソプロポキシ基及び $(CH_2)_q R_7$ から選ばれ、 R_7 は OH から選ばれ、 $q = 1$ 又は 2 である。幾つかの実施形態において、 R_1 は H、メチル基、エチル基、 n -プロピル基、イソプロピル基及び $(CH_2)_q R_7$ から選ばれ、 R_7 は OH から選ばれ、 $q = 1$ 又は 2 である。幾つかの実施形態において、 R_1 は H 及びメチル基から選ばれる。

10

【0136】

幾つかの実施形態において、 R_2 は H、OH、メチル基、エチル基、 n -プロピル基、イソプロピル基、メトキシ基、エトキシ基、 n -プロポキシ基、イソプロポキシ基及び $(CH_2)_r R_8$ から選ばれ、 R_8 は OH から選ばれ、 $r = 1$ 又は 2 である。幾つかの実施形態において、 R_2 は H、OH、メチル基、エチル基、 n -プロピル基、イソプロピル基及び $(CH_2)_r R_8$ から選ばれ、 R_8 は OH から選ばれ、 $r = 1$ 又は 2 である。幾つかの実施形態において、 R_2 は H、メチル基及び CH_2OH から選ばれる。

【0137】

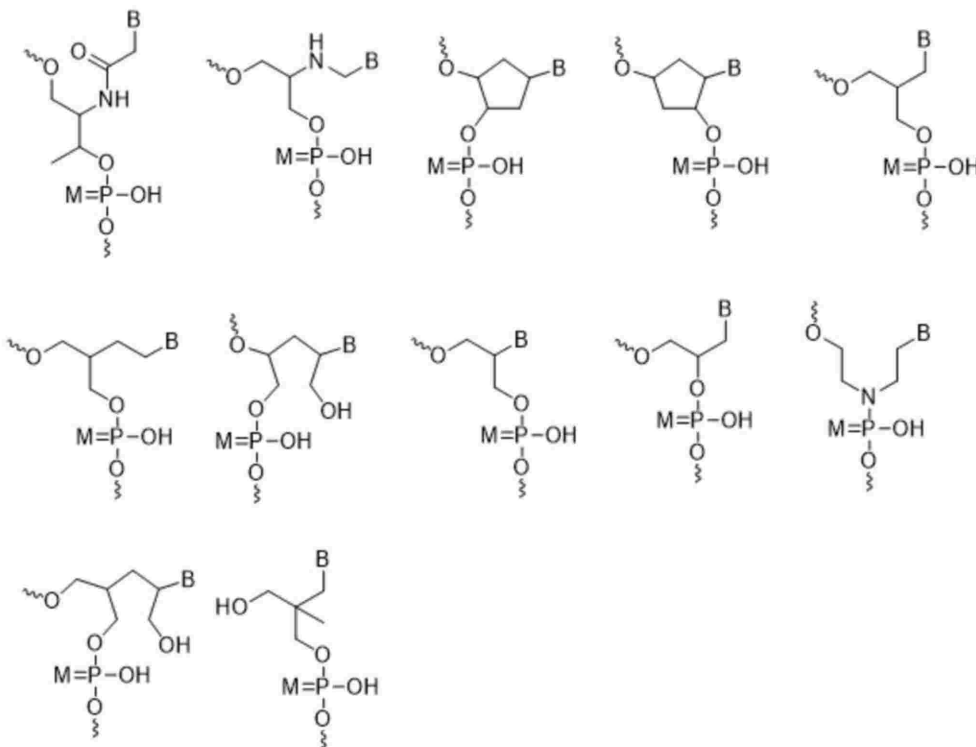
幾つかの実施形態において、 R_1 及び R_2 は 5 ~ 6 員環になるように直接連結している。幾つかの実施形態において、 R_1 及び R_2 は 3 ~ 6 員シクロアルキル基になるように直接連結している。幾つかの実施形態において、 R_1 及び R_2 はシクロペンチル基又はシクロヘキシル基になるように直接連結している。

20

【0138】

幾つかの実施形態において、上記式 (I') に示される化学修飾は、

【化38】

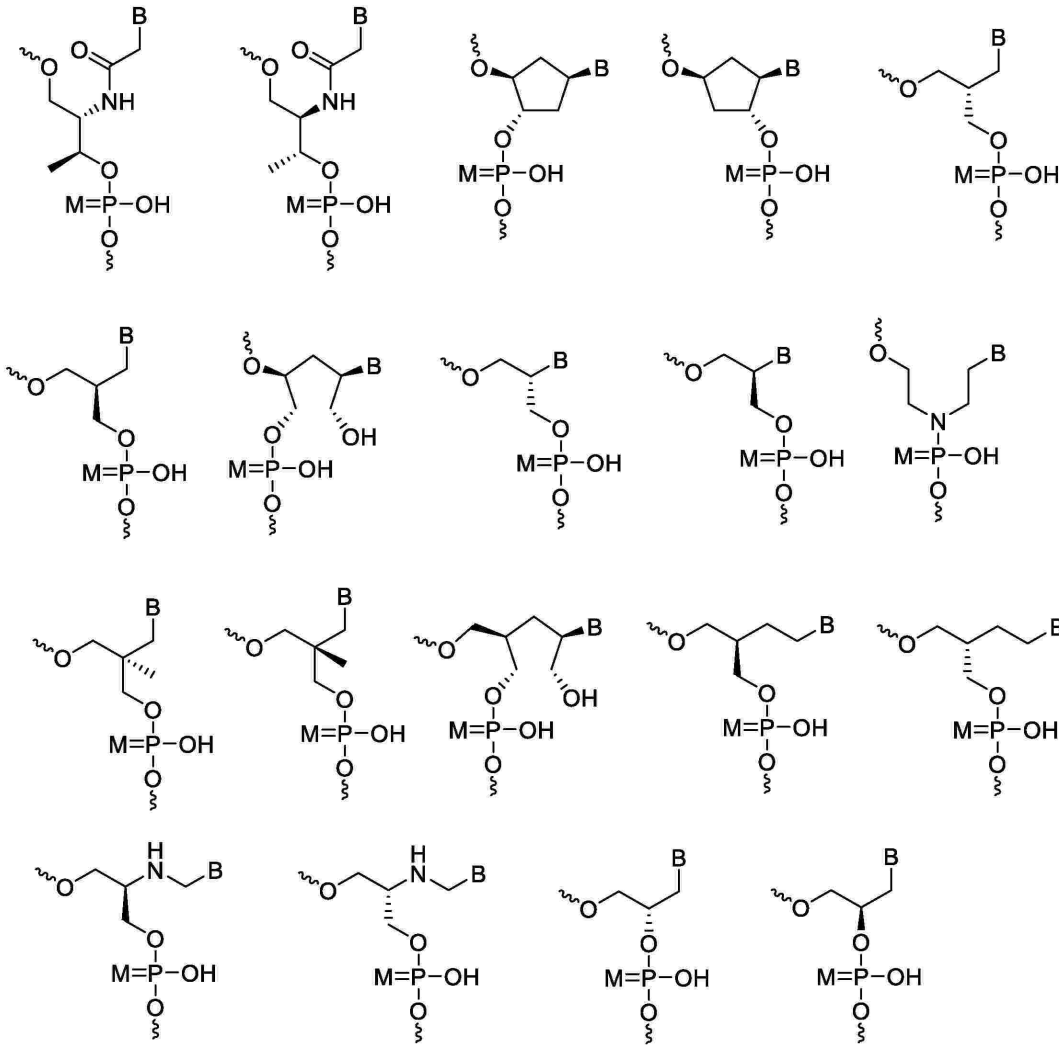


30

40

50

【化 3 9】



10

20

30

という何れかの構造から選ばれ、

そのうち、MはO又はSであり、

Bは、プリン塩基、ピリミジン塩基、インドール、5 - ニトロインドール及び3 - ニトロピロールから選ばれる。

【0139】

幾つかの実施形態において、Bは、アデニン、グアニン、イソグアニン、ヒポキサンチン、キサンチン、C2で修飾されたプリン、N8で修飾されたプリン、2,6 - ジアミノプリン、6 - ジメチルアミノプリン、2 - アミノプリン、N6 - アルキルアデニン、O6 - アルキルグアニン、7 - デアザプリン、シトシン、5 - メチルシトシン、イソシトシン、プソイドシトシン、ウラシル、プソイドウラシル、2 - チオウリジン、4 - チオウリジン、C5で修飾されたピリミジン、チミン、インドール、5 - ニトロインドール及び3 - ニトロピロールから選ばれる。

40

【0140】

幾つかの実施形態において、Bは、アデニン、グアニン、2,6 - ジアミノプリン、6 - ジメチルアミノプリン、2 - アミノプリン、シトシン、ウラシル、チミン、インドール、5 - ニトロインドール及び3 - ニトロピロールから選ばれる。

【0141】

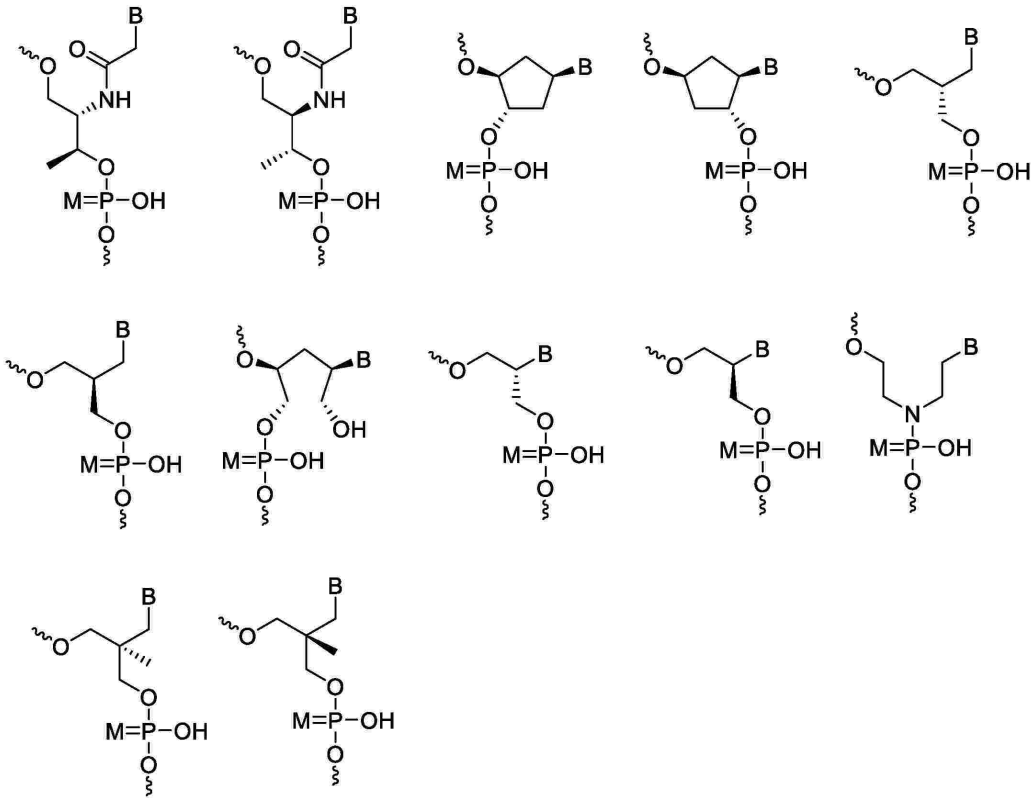
幾つかの実施形態において、Bは、アンチセンス鎖の当該位置におけるヌクレオチドが修飾されていない場合の塩基と同じである。

【0142】

幾つかの実施形態において、上記式(I')に示される化学修飾は、

50

【化 4 0】



10

20

という何れかの構造から選ばれ、

そのうち、MはO又はSであり、

Bは、プリン塩基、ピリミジン塩基、インドール、5 - ニトロインドール及び3 - ニトロピロールから選ばれる。

【0 1 4 3】

幾つかの実施形態において、Bは、アデニン、グアニン、イソグアニン、ヒポキサンチン、キサンチン、C 2で修飾されたプリン、N 8で修飾されたプリン、2, 6 - ジアミノプリン、6 - ジメチルアミノプリン、2 - アミノプリン、N 6 - アルキルアデニン、O 6 - アルキルグアニン、7 - デアザプリン、シトシン、5 - メチルシトシン、イソシトシン、プソイドシトシン、ウラシル、プソイドウラシル、2 - チオウリジン、4 - チオウリジン、C 5で修飾されたピリミジン、チミン、インドール、5 - ニトロインドール及び3 - ニトロピロールから選ばれる。

30

【0 1 4 4】

幾つかの実施形態において、Bは、アデニン、グアニン、2, 6 - ジアミノプリン、6 - ジメチルアミノプリン、2 - アミノプリン、シトシン、ウラシル、チミン、インドール、5 - ニトロインドール及び3 - ニトロピロールから選ばれる。

【0 1 4 5】

幾つかの実施形態において、Bは、アンチセンス鎖の当該位置におけるヌクレオチドが修飾されていない場合の塩基と同じである。

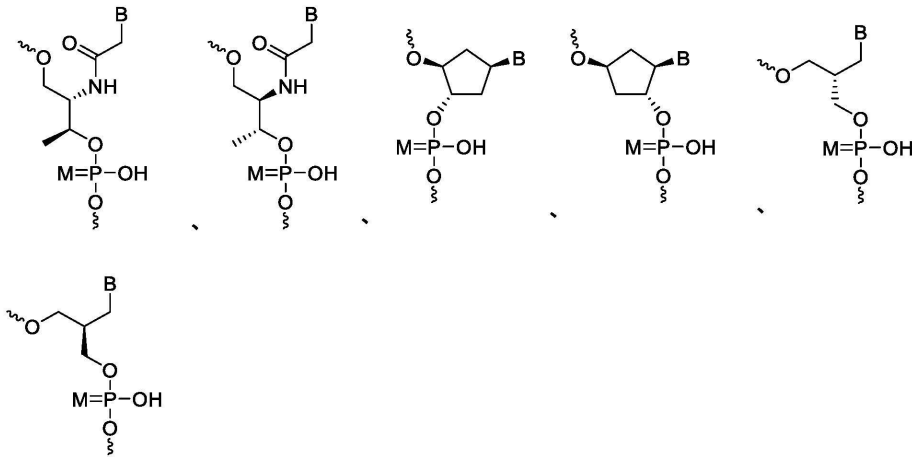
40

【0 1 4 6】

幾つかの実施形態において、上記式 (I ') に示される化学修飾は、

50

【化 4 1】



10

という何れかの構造から選ばれ、

そのうち、MはO又はSであり、

Bは、プリン塩基、ピリミジン塩基、インドール、5 - ニトロインドール及び3 - ニトロピロールから選ばれる。

【0147】

幾つかの実施形態において、Bは、アデニン、グアニン、イソグアニン、ヒポキサンチン、キサンチン、C2で修飾されたプリン、N8で修飾されたプリン、2,6 - ジアミノプリン、6 - ジメチルアミノプリン、2 - アミノプリン、N6 - アルキルアデニン、O6 - アルキルグアニン、7 - デアザプリン、シトシン、5 - メチルシトシン、イソシトシン、プソイドシトシン、ウラシル、プソイドウラシル、2 - チオウリジン、4 - チオウリジン、C5で修飾されたピリミジン、チミン、インドール、5 - ニトロインドール及び3 - ニトロピロールから選ばれる。

20

【0148】

幾つかの実施形態において、Bは、アデニン、グアニン、2,6 - ジアミノプリン、6 - ジメチルアミノプリン、2 - アミノプリン、シトシン、ウラシル、チミン、インドール、5 - ニトロインドール及び3 - ニトロピロールから選ばれる。

30

【0149】

幾つかの実施形態において、Bは、アンチセンス鎖の当該位置におけるヌクレオチドが修飾されていない場合の塩基と同じである。

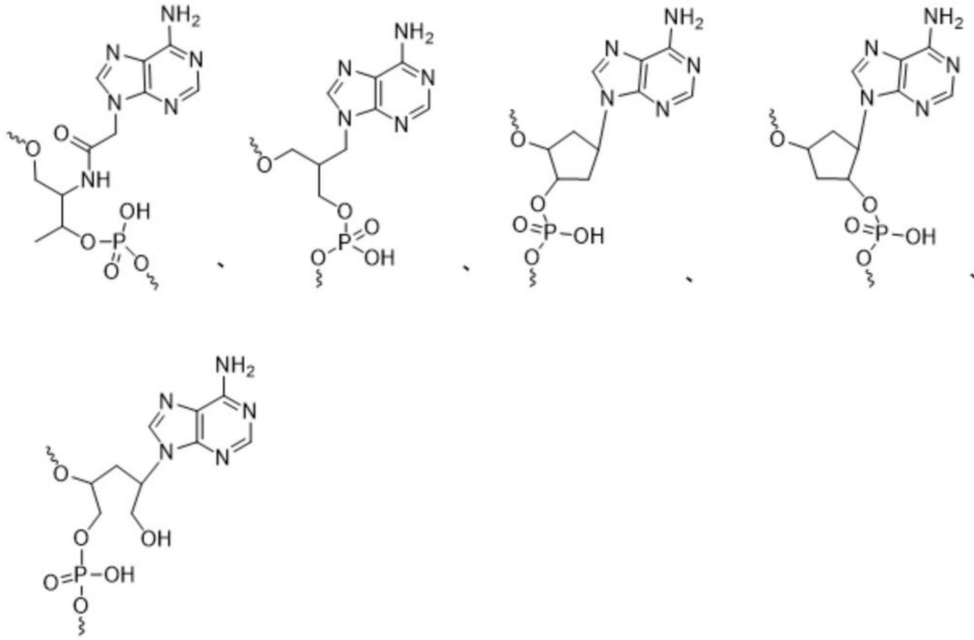
【0150】

幾つかの実施形態において、上記式(I')に示される化学修飾は、

40

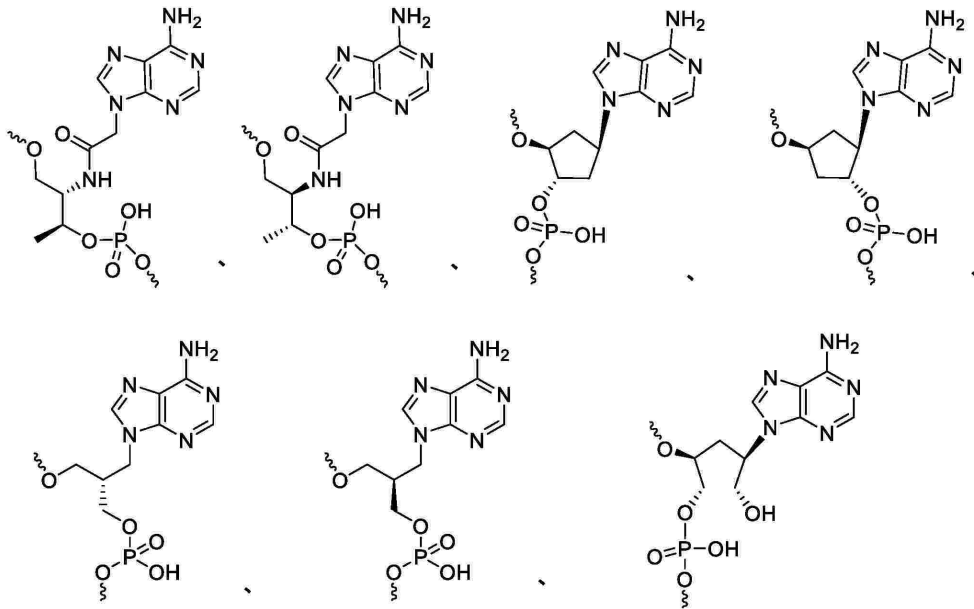
50

【化 4 2】



10

【化 4 3】



20

30

、及びそれらの構造におけるアデニンがグアニン、シトシン、ウラシル又はチミンで置換されたもの、という何れかの構造から選ばれる。

【0151】

40

幾つかの実施形態において、Bは、プリン塩基、ピリミジン塩基、インドール、5 - ニトロインドール及び3 - ニトロピロールから選ばれる。

【0152】

幾つかの実施形態において、Bは、アデニン、グアニン、イソグアニン、ヒポキサンチン、キサンチン、C2で修飾されたプリン、N8で修飾されたプリン、2,6 - ジアミノプリン、6 - ジメチルアミノプリン、2 - アミノプリン、N6 - アルキルアデニン、O6 - アルキルグアニン、7 - デアザプリン、シトシン、5 - メチルシトシン、イソシトシン、プソイドシトシン、ウラシル、プソイドウラシル、2 - チオウリジン、4 - チオウリジン、C5で修飾されたピリミジン、チミン、インドール、5 - ニトロインドール及び3 - ニトロピロールから選ばれる。

50

【 0 1 5 3 】

幾つかの実施形態において、Bは、アデニン、グアニン、2,6-ジアミノプリン、6-ジメチルアミノプリン、2-アミノプリン、シトシン、ウラシル、チミン、インドール、5-ニトロインドール及び3-ニトロピロールから選ばれる。

【 0 1 5 4 】

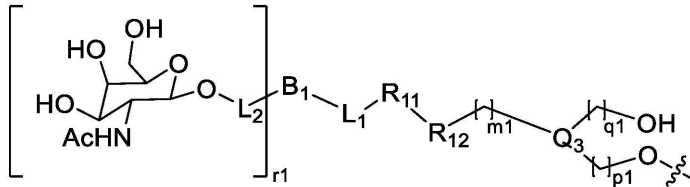
幾つかの実施形態において、Bは、上記アンチセンス鎖の当該位置におけるヌクレオチドが修飾されていない場合の塩基と同じである。

【 0 1 5 5 】

幾つかの実施形態において、上記リガンドは、式(II)に示される化合物又はその薬学的に許容される塩であり、

10

【化44】



(II)

そのうち、

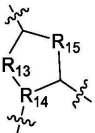
20

L₁は、C₁-C₃₀アルキル鎖であるか、或いは1つ又は複数の酸素、硫黄、窒素原子又はC=Oにより中断されるC₁-C₃₀アルキル鎖を含み、

R₁₁及びR₁₂は、独立的に化学結合、NR₁₆又はC=Oであり、

Q₃は

【化45】



30

であり、

R₁₃はCR₁₇R₁₈、NR₁₆、O又はSであり、

R₁₄はCR₁₉であり、

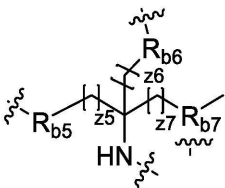
R₁₅は、独立的にCR₁₇R₁₈、NR₁₆又はOであり、

R₁₆~R₁₉は、独立的に水素、重水素又はアルキル基であり、

m₁、p₁及びq₁は独立的に0、1、2、3又は4であり、

B₁は

【化46】



40

であり、

R_{b5}、R_{b6}及びR_{b7}は、独立的に-C(=O)-、-NHC(=O)-、-C(=O)O-、-C(=O)-(CH₂)_{z8}-O-又は-NHC(=O)-(CH₂)_{z9}-O-であり、

z₅、z₆、z₇、z₈及びz₉は、独立的に0~10の整数であり、

L₂は、C₁-C₃₀アルキル鎖であるか、或いは1つ又は複数の酸素、硫黄、窒素原

50

子又は $C=O$ により中断される $C_1 - C_{30}$ アルキル鎖を含み、

r_1 は、 $1 \sim 10$ の整数である。

【0156】

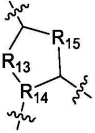
幾つかの実施形態において、 L_1 は、 $-(CH_2)_{j_{11}}-C(=O)-(CH_2)_{j_{12}}-$ であり、

R_{11} 及び R_{12} は、独立的に化学結合、 NR_{16} 又は $C=O$ であり、

R_{16} は、水素又は C_{1-6} アルキル基であり、

Q_3 は

【化47】



10

であり、

R_{13} は $CR_{17}R_{18}$ 又は O であり、

R_{14} は CR_{19} であり、

R_{15} は、独立的に $CR_{17}R_{18}$ 又は O であり、

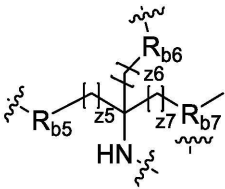
$R_{16} \sim R_{19}$ は、独立的に水素又はアルキル基であり、

m_1 、 p_1 及び q_1 は、独立的に 0 又は 1 であり、

B_1 は

20

【化48】



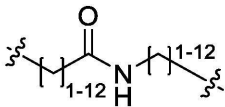
であり、

R_{b5} 、 R_{b6} 及び R_{b7} は、独立的に $-C(=O)-(CH_2)_{z_8}-O-$ 又は $-NH$ 30
 $C(=O)-(CH_2)_{z_9}-O-$ であり、

z_8 及び z_9 は、独立的に $0 \sim 10$ の整数であり、

L_2 は、 $-(CH_2)_{j_{15}}-(OCH_2CH_2)_{1-4}-(CH_2)_{j_{16}}-$ 又は

【化49】



であり、

j_{15} 及び j_{16} は、独立的に $0 \sim 4$ の整数であり、

40

r_1 は、 3 、 4 、 5 又は 6 である。

【0157】

幾つかの実施形態において、 L_1 は、 L_3 又は $L_3-R_{110}-R_{111}-L_3$ であつてもよく、そのうち、 L_3 は、独立的に $C_1 - C_{12}$ アルキル鎖、 $-(CH_2)_{j_{11}}-C(=O)-(CH_2)_{j_{12}}$ 又は $-(CH_2)_{j_{13}}-(CH_2CH_2O)_{1-4}-(CH_2)_{j_{14}}$ であり、 R_{110} 及び R_{111} は、独立的に化学結合、 $-NR_{112}$ 、 $-C(=O)-$ 又は $-OC(=O)-$ であり、 R_{112} は、水素又は $C_1 - C_{12}$ アルキル基であり、 j_{11} 、 j_{12} 、 j_{13} 及び j_{14} は、独立的に $0 \sim 10$ の整数である。幾つかの実施形態において、 j_{11} 、 j_{12} 、 j_{13} 及び j_{14} は、独立的に $0 \sim 2$ 又は $4 \sim 10$ の整数である。幾つかの実施形態において、 j_{11} 、 j_{12} 、 j_{13} 及び j_{14} は、独

50

立的に 0、1、2、6、7、8、9 又は 10 である。

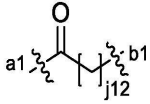
【0158】

幾つかの実施形態において、 L_1 は、 $-(CH_2)_{j11}-C(=O)-(CH_2)_{j12}-$ であってもよく、 $j11$ 及び $j12$ の定義は、上記の何れか 1 つの形態に記載される通りである。

【0159】

幾つかの実施形態において、 L_1 は、

【化50】



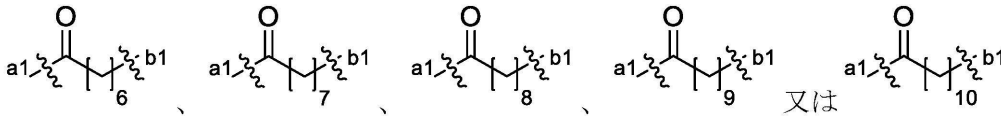
10

であってもよく、 $j12$ の定義は、上記の何れか 1 つの形態に記載される通りであり、そのうち、 $a1$ 末端は B_1 に連結し、 $b1$ 末端は R_{11} に連結する。

【0160】

幾つかの実施形態において、 L_1 は、

【化51】



20

であってもよく、そのうち、 $a1$ 末端は B_1 に連結し、 $b1$ 末端は R_{11} に連結する。

【0161】

幾つかの実施形態において、 R_{11} は、化学結合であってもよく、且つ R_{12} は、 $C=O$ であってもよい。

【0162】

幾つかの実施形態において、 R_{11} は、化学結合であってもよく、且つ R_{12} は、 NR_{16} であってもよく、 R_{16} の定義は、上記の何れか 1 つの形態に記載される通りである。

【0163】

幾つかの実施形態において、 R_{11} は、化学結合であってもよく、且つ R_{12} は、 $-OC(=O)-$ であってもよい。

30

【0164】

幾つかの実施形態において、 R_{11} は、 NR_{16} であってもよく、且つ R_{12} は、 $C=O$ であってもよく、 R_{16} の定義は、上記の何れか 1 つの形態に記載される通りである。

【0165】

幾つかの実施形態において、 R_{11} は、 NR_{16} であってもよく、且つ R_{12} は、 $-OC(=O)-$ であってもよく、 R_{16} の定義は、上記の何れか 1 つの形態に記載される通りである。

【0166】

幾つかの実施形態において、 R_{12} は、 NR_{16} であってもよく、且つ R_{11} は、 $C=O$ であってもよく、 R_{16} の定義は、上記の何れか 1 つの形態に記載される通りである。

40

【0167】

幾つかの実施形態において、 R_{12} は、 NR_{16} であってもよく、且つ R_{11} は、 $-OC(=O)-$ であってもよく、 R_{16} の定義は、上記の何れか 1 つの形態に記載される通りである。

【0168】

幾つかの実施形態において、 R_{11} は、 NH であってもよく、且つ R_{12} は、 $C=O$ であってもよい。

【0169】

50

幾つかの実施形態において、 R_{12} は、 NH であってもよく、且つ R_{11} は、 $C=O$ であってもよい。

【0170】

幾つかの実施形態において、 R_{16} は、水素又は C_{1-6} アルキル基であってもよい。

【0171】

幾つかの実施形態において、 R_{16} は、水素、メチル基、エチル基、プロピル基又はイソプロピル基であってもよい。

【0172】

幾つかの実施形態において、 R_{16} は、水素であってもよい。

【0173】

幾つかの実施形態において、 R_{17} 及び R_{18} は、水素であってもよい。

【0174】

幾つかの実施形態において、 R_{19} は、水素であってもよい。

【0175】

幾つかの実施形態において、環Aが存在する場合、環Aは、 C_{6-12} アリール基であってもよい。

【0176】

幾つかの実施形態において、環Aは、フェニル基であってもよい。

【0177】

幾つかの実施形態において、 m_1 は、0又は1であってもよい。

【0178】

幾つかの実施形態において、 m_1 は、3であってもよい。

【0179】

幾つかの実施形態において、 n_1 は、0又は1であってもよい。

【0180】

幾つかの実施形態において、 p_1 及び q_1 は、独立的に0又は1である。

【0181】

幾つかの実施形態において、 $p_1 = 1$ 且つ $q_1 = 1$ である。

【0182】

幾つかの実施形態において、 $p_1 = 1$ 且つ $q_1 = 0$ である。

【0183】

幾つかの実施形態において、 $p_1 = 0$ 且つ $q_1 = 1$ である。

【0184】

幾つかの実施形態において、 $p_1 = 0$ 且つ $q_1 = 0$ である。

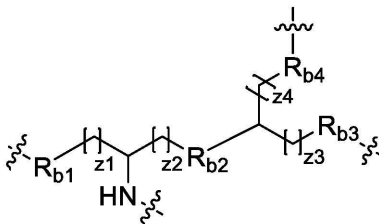
【0185】

幾つかの実施形態において、 z_1 、 z_2 、 z_3 、 z_4 、 z_5 、 z_6 、 z_7 、 z_8 及び z_9 は、独立的に0~4の整数であってもよい。幾つかの実施形態において、 z_1 、 z_2 、 z_3 、 z_4 、 z_5 、 z_6 、 z_7 、 z_8 及び z_9 は、独立的に0、1又は2であってもよい。

【0186】

幾つかの実施形態において、 B_1 は、

【化52】



であってもよく、 R_{b1} 、 R_{b2} 、 R_{b3} 及び R_{b4} は、独立的に $-C(=O)-$ 又は $-N$

10

20

30

40

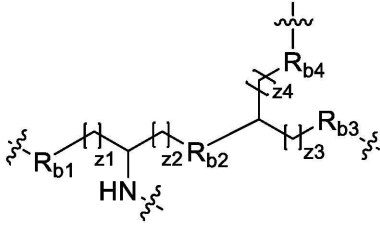
50

H C (= O) - であり、N 原子は L₁ に連結し、z₁、z₂、z₃ 及び z₄ の定義は、上記の何れか 1 つの形態に記載される通りである。

【 0 1 8 7 】

幾つかの実施形態において、B₁ は、

【 化 5 3 】



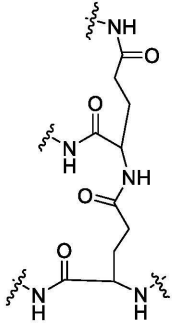
10

であってもよく、R_{b1}、R_{b2}、R_{b3} 及び R_{b4} は、独立的に - C (= O) - 又は - N H C (= O) - であり、N 原子は L₁ に連結し、R_{b1}、R_{b3} 及び R_{b4} は同じであり、z₁、z₂、z₃ 及び z₄ の定義は、上記の何れか 1 つの形態に記載される通りである。

【 0 1 8 8 】

幾つかの実施形態において、B₁ は

【 化 5 4 】



20

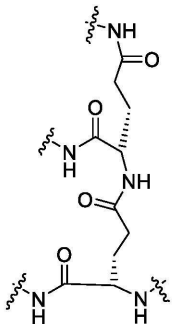
であってもよい。

30

【 0 1 8 9 】

幾つかの実施形態において、B₁ は

【 化 5 5 】



40

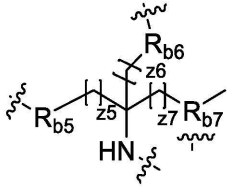
であってもよい。

【 0 1 9 0 】

幾つかの実施形態において、B₁ は、

50

【化56】

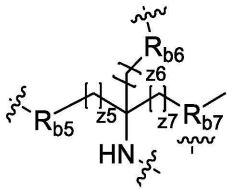


であってもよく、 R_{b5} 、 R_{b6} 及び R_{b7} は、独立的に $-C(=O)-(CH_2)_{z8}-O-$ 又は $-NHC(=O)-(CH_2)_{z9}-O-$ であり、N原子は L_1 に連結し、 $z5$ 、 $z6$ 、 $z7$ 、 $z8$ 及び $z9$ の定義は、上記の何れか1つの形態に記載される通りである。

【0191】

幾つかの実施形態において、 B_1 は、

【化57】

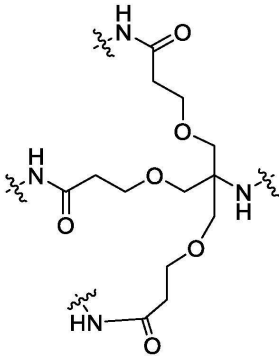


であってもよく、 R_{b5} 、 R_{b6} 及び R_{b7} は、独立的に $-C(=O)-(CH_2)_{z8}-O-$ 又は $-NHC(=O)-(CH_2)_{z9}-O-$ であり、N原子は L_1 に連結し、 R_{b5} 、 R_{b6} 及び R_{b7} は同じであり、 $z5$ 、 $z6$ 、 $z7$ 、 $z8$ 及び $z9$ の定義は、上記の何れか1つの形態に記載される通りである。

【0192】

幾つかの実施形態において、 B_1 は

【化58】



であってもよい。

【0193】

幾つかの実施形態において、 L_2 は、 L_4 又は $L_4-R_{13}-R_{14}-L_4$ であってもよく、そのうち、 L_4 は、独立的に C_1-C_{12} アルキル鎖又は $-(CH_2)_{j15}-(OCH_2CH_2)_{1-4}-(CH_2)_{j16}-$ であり、 R_{13} 及び R_{14} は、独立的に化学結合、 $-NR_{115}$ 、 $-C(=O)-$ 又は $-OC(=O)-$ であり、 R_{115} は、独立的に水素又は C_1-C_{12} アルキル基であり、 $j15$ 及び $j16$ は、独立的に $0 \sim 10$ の整数である。幾つかの実施形態において、 $j15$ 及び $j16$ は、独立的に $0 \sim 6$ の整数である。幾つかの実施形態において、 $j15$ 及び $j16$ は、独立的に 0 、 1 、 2 、 3 又は 4 である。

【0194】

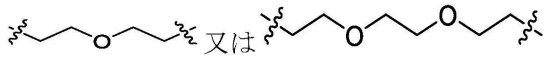
幾つかの実施形態において、 L_2 は、 $-(CH_2)_{j15}-(OCH_2CH_2)_{1-4}-(CH_2)_{j16}-$ であってもよく、 $j15$ 及び $j16$ の定義は、上記の何れか1つの形

態に記載される通りである。

【0195】

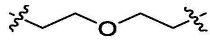
幾つかの実施形態において、L₂は、

【化59】



であってもよい。幾つかの実施形態において、L₂は、

【化60】



10

であってもよく、そのうち、一側はO原子に連結し、他側はB₁に連結する。

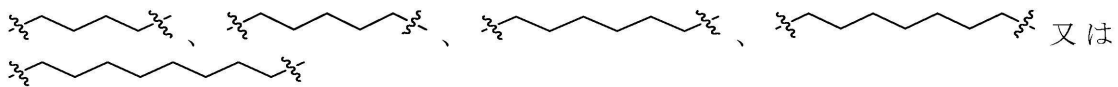
【0196】

幾つかの実施形態において、L₂は、C₁-C₁₂アルキル鎖であってもよい。

【0197】

幾つかの実施形態において、L₂は、

【化61】



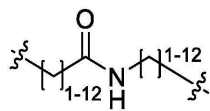
20

であってもよい。

【0198】

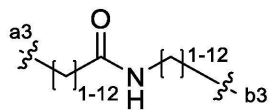
幾つかの実施形態において、L₂は、

【化62】



であってもよい。幾つかの実施形態において、L₂は、

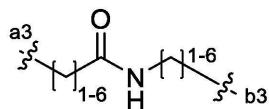
【化63】



30

であってもよい。幾つかの実施形態において、L₂は、

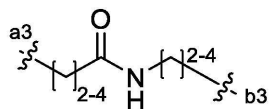
【化64】



40

であってもよい。幾つかの実施形態において、L₂は、

【化65】



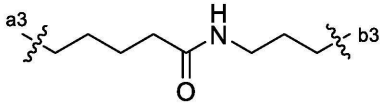
であってもよい。そのうち、a₃末端はO原子に連結し、b₃末端はB₁に連結する。

【0199】

幾つかの実施形態において、L₂は、

50

【化66】



であってもよく、そのうち、a3末端はO原子に連結し、b3末端はB₁に連結する。

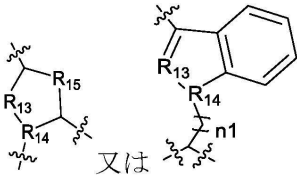
【0200】

幾つかの実施形態において、r₁は、3、4、5又は6であってもよい。幾つかの実施形態において、r₁は、3であってもよい。

【0201】

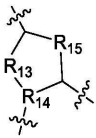
幾つかの実施形態において、Q₃は、

【化67】



であってもよい。幾つかの実施形態において、Q₃は、

【化68】

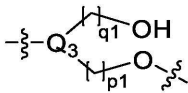


であってもよい。そのうち、R₁₃、R₁₄、R₁₅及びn₁の定義は、上記の何れか1つの形態に記載される通りである。

【0202】

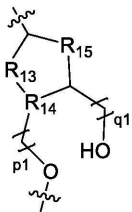
幾つかの実施形態において、

【化69】



は、

【化70】

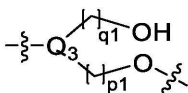


であってもよく、そのうち、R₁₃、R₁₄、R₁₅、p₁及びq₁の定義は、上記の何れか1つの形態に記載される通りである。

【0203】

幾つかの実施形態において、

【化71】



10

20

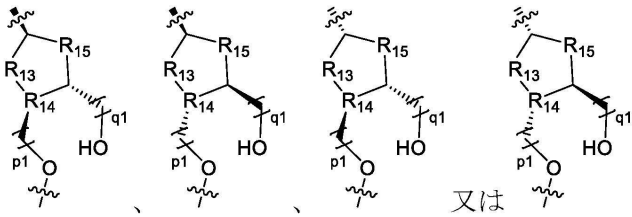
30

40

50

は、

【化72】



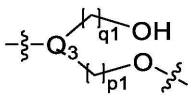
であってもよく、そのうち、R₁₃、R₁₄、R₁₅、p₁及びq₁の定義は、上記の何れか1つの形態に記載される通りである。

10

【0204】

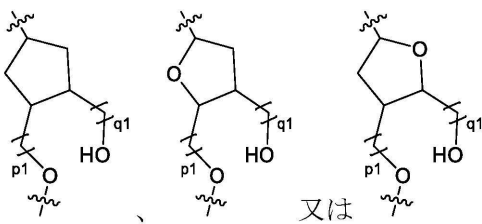
幾つかの実施形態において、

【化73】



は、

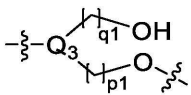
【化74】



20

であってもよい。幾つかの実施形態において、

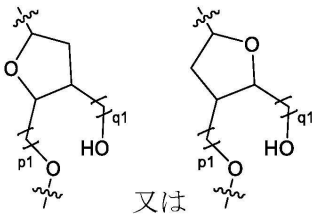
【化75】



30

は、

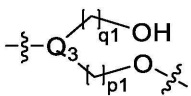
【化76】



40

であってもよい。幾つかの実施形態において、

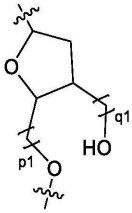
【化77】



は、

50

【化78】



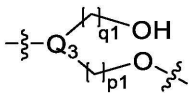
であってもよい。p1及びq1の定義は、上記の何れか1つの形態に記載される通りである。

10

【0205】

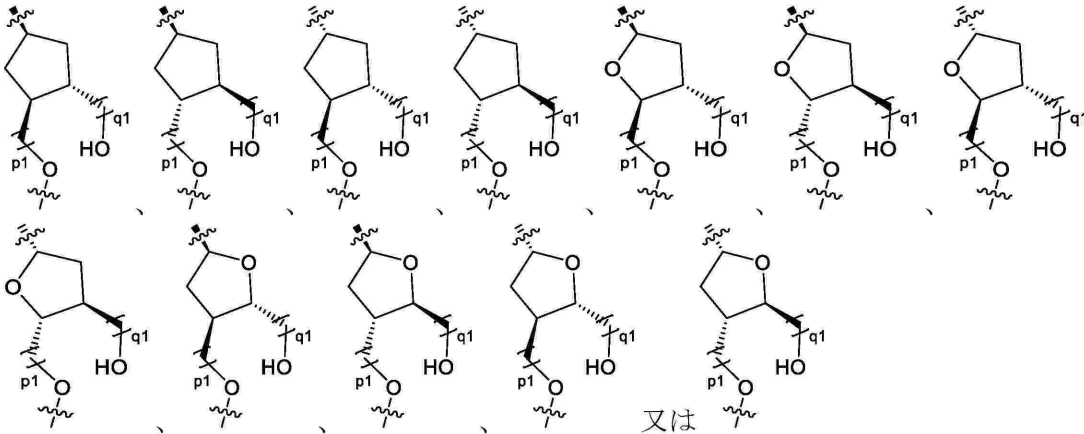
幾つかの実施形態において、

【化79】



は、

【化80】



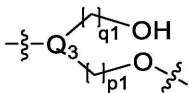
又は

20

30

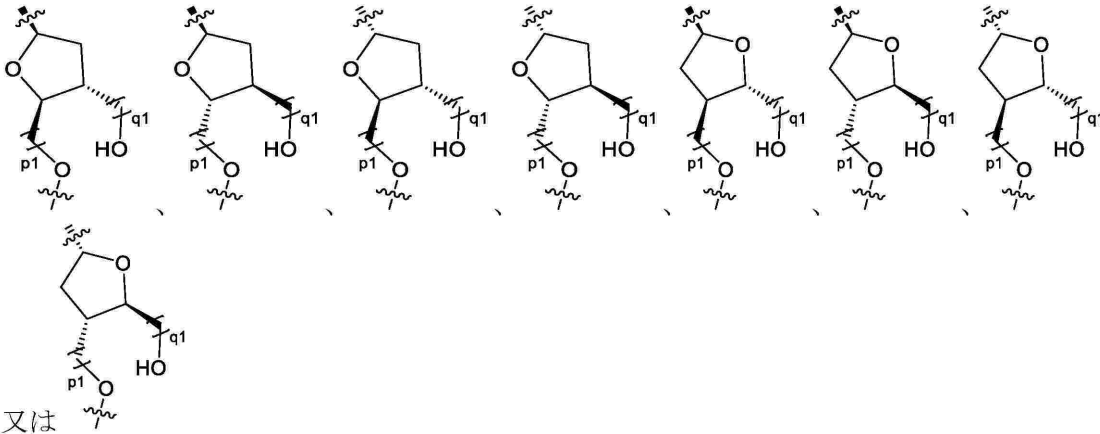
であってもよい。幾つかの実施形態において、

【化81】



は、

【化82】



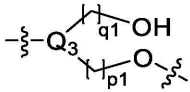
又は

40

であってもよい。幾つかの実施形態において、

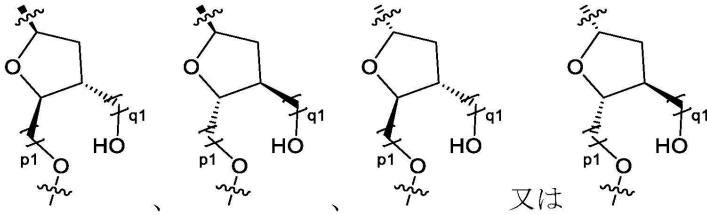
50

【化 8 3】



は、

【化 8 4】



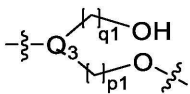
10

であってもよい。p 1 及び q 1 の定義は、上記の何れか 1 つの形態に記載される通りである。

【 0 2 0 6 】

幾つかの実施形態において、

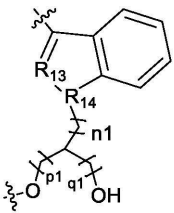
【化 8 5】



20

は、

【化 8 6】



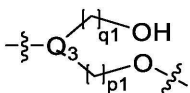
30

であってもよく、そのうち、R 1 3、R 1 4、n 1、p 1 及び q 1 の定義は、上記の何れか 1 つの形態に記載される通りである。

【 0 2 0 7 】

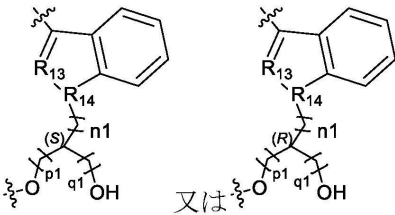
幾つかの実施形態において、

【化 8 7】



は、

【化 8 8】



40

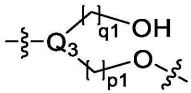
であってもよく、そのうち、R 1 3、R 1 4、n 1、p 1 及び q 1 の定義は、上記の何れか 1 つの形態に記載される通りである。

【 0 2 0 8 】

50

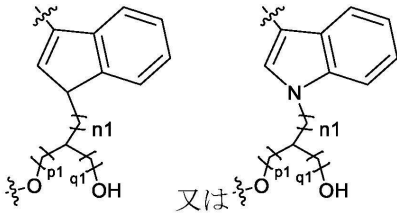
幾つかの実施形態において、

【化 8 9】



は、

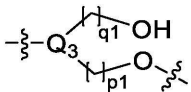
【化 9 0】



10

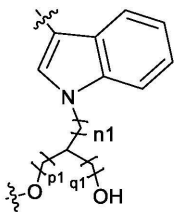
であってもよく、幾つかの実施形態において、

【化 9 1】



は、

【化 9 2】



20

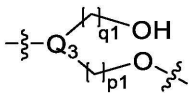
であってもよい。n 1、p 1 及び q 1 の定義は、上記の何れか 1 つの形態に記載される通りである。

30

【0 2 0 9】

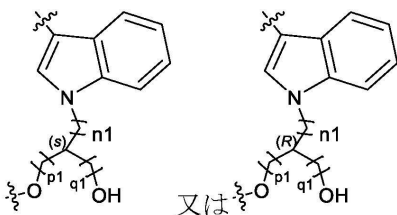
幾つかの実施形態において、

【化 9 3】



は、

【化 9 4】



40

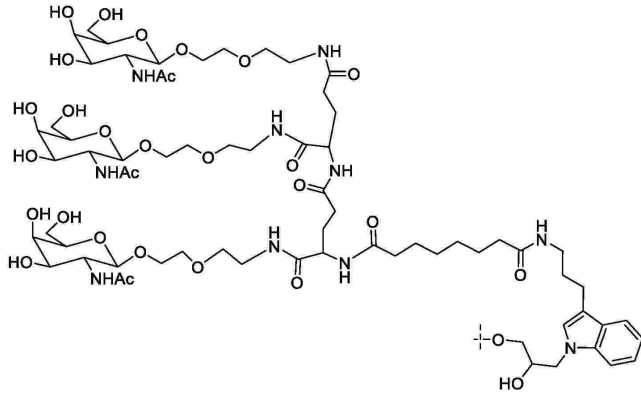
であってもよく、n 1、p 1 及び q 1 の定義は、上記の何れか 1 つの形態に記載される通りである。

【0 2 1 0】

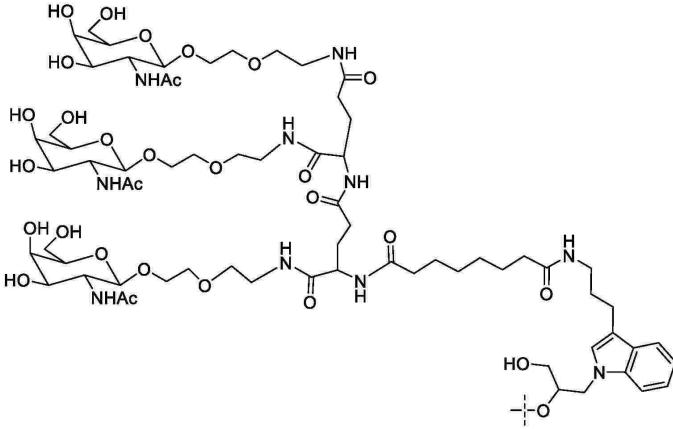
幾つかの実施形態において、上記リガンドは、

50

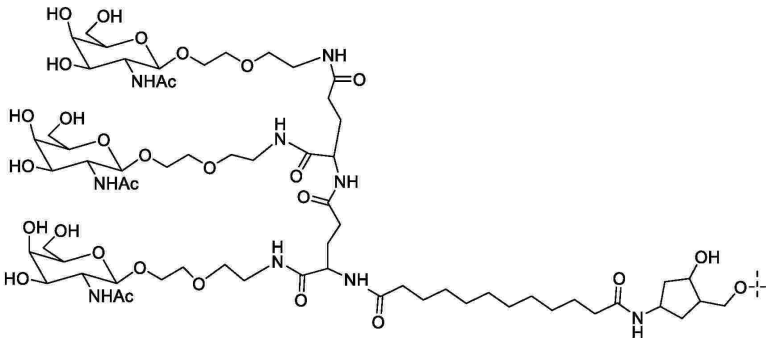
【化 9 5】



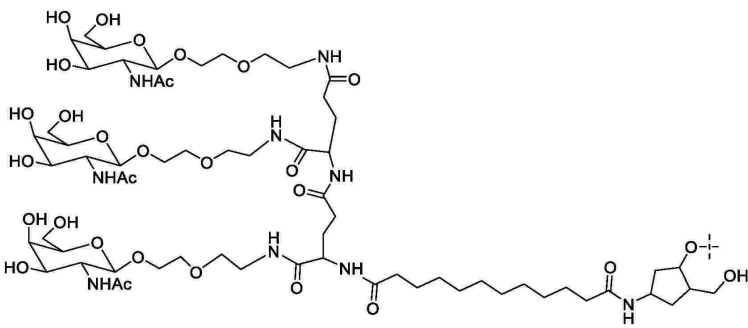
10



20



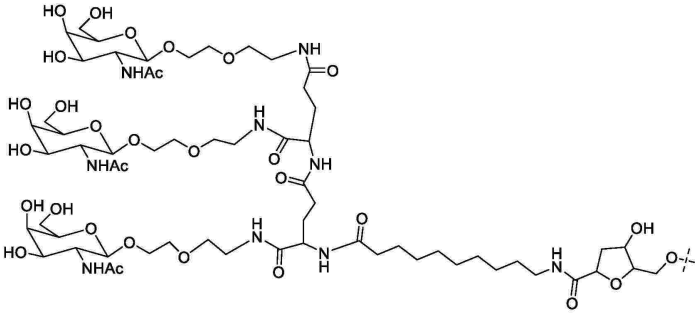
30



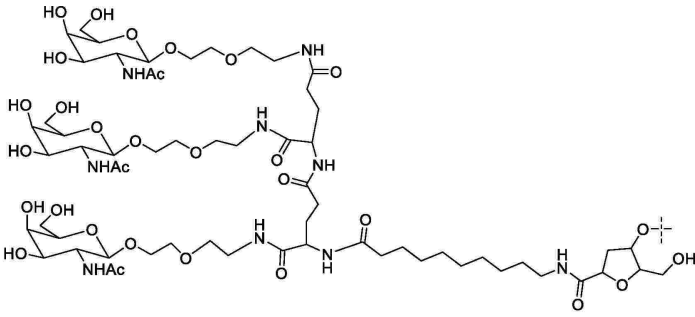
40

50

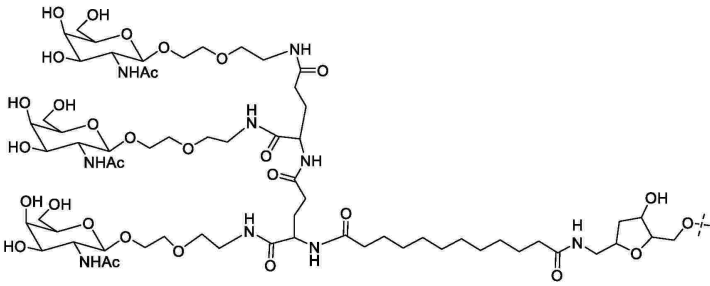
【化 9 6】



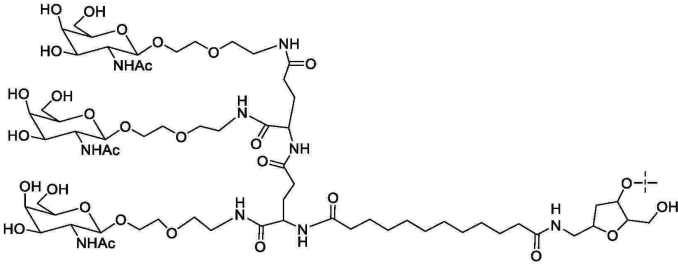
10



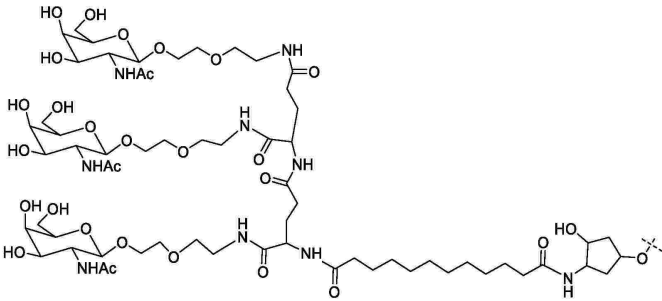
20



30

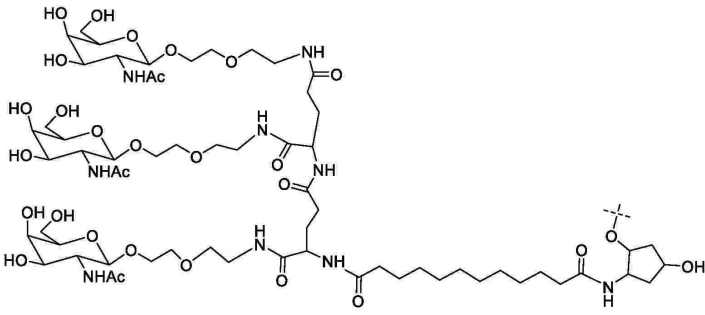


40

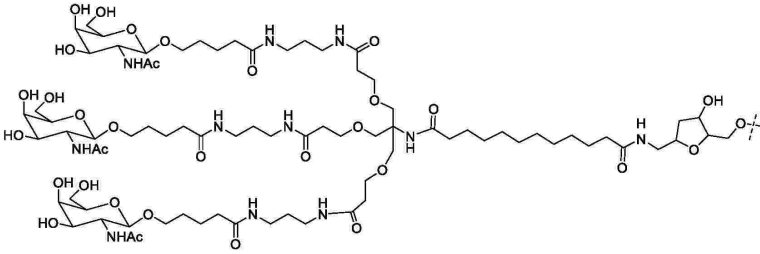


50

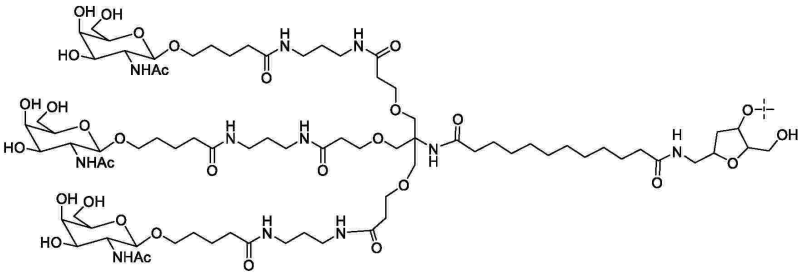
【化 9 7】



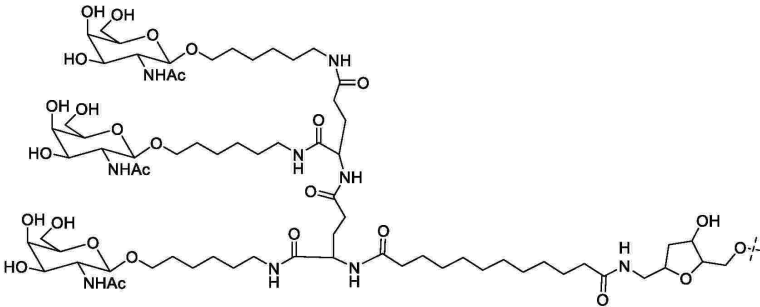
10



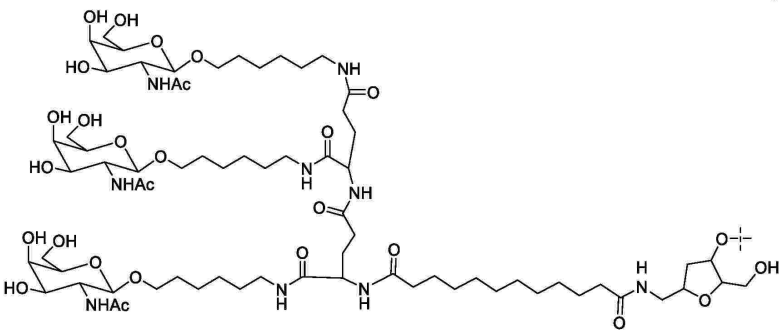
19



20



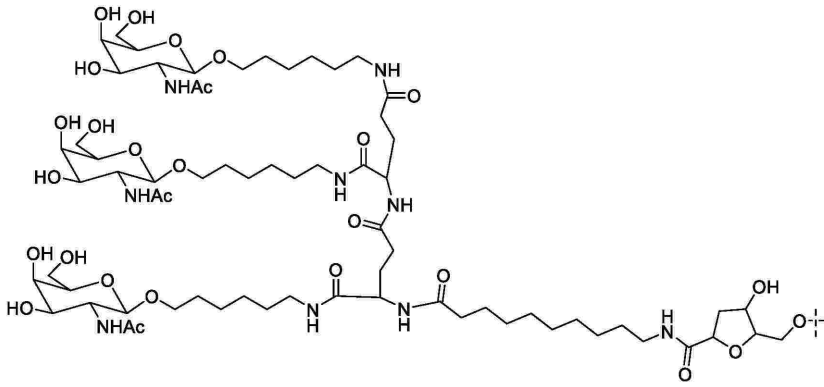
29



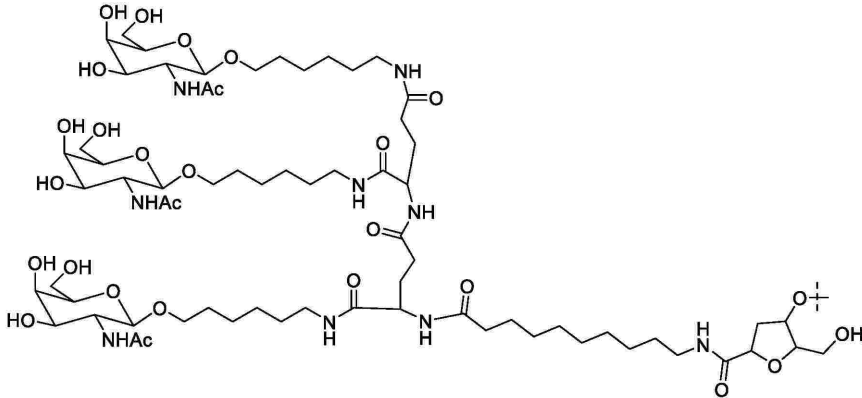
40

50

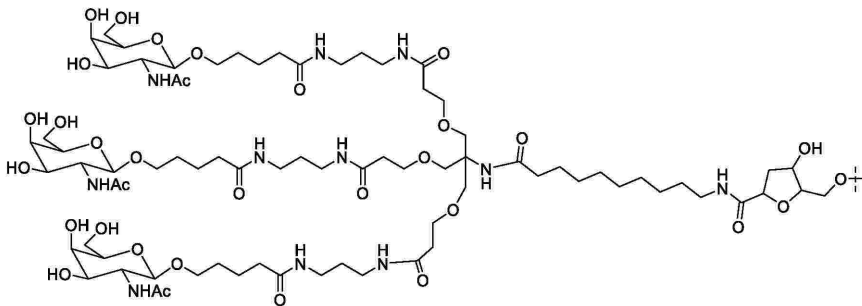
【化 9 8】



10

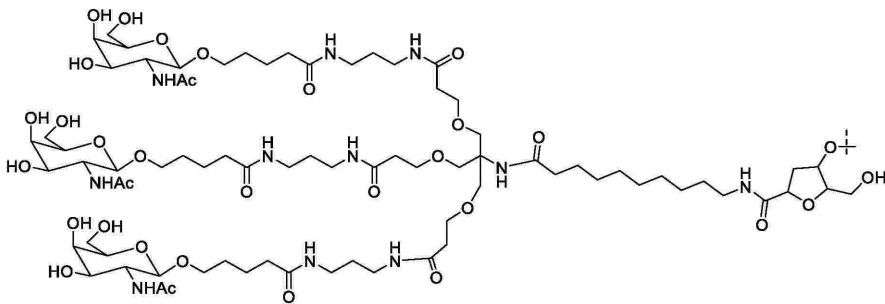


20



又は

30



という何れか 1 つの構造又はその薬学的に許容される塩であってもよい。

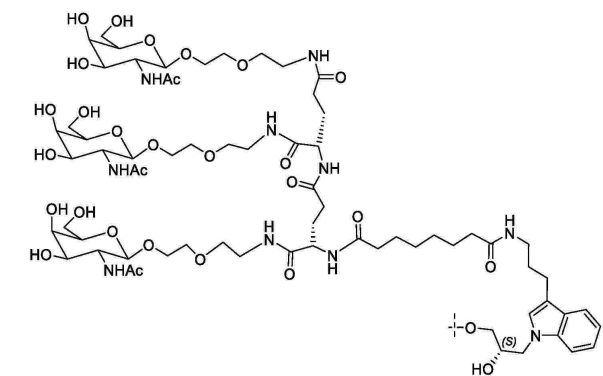
40

【 0 2 1 1】

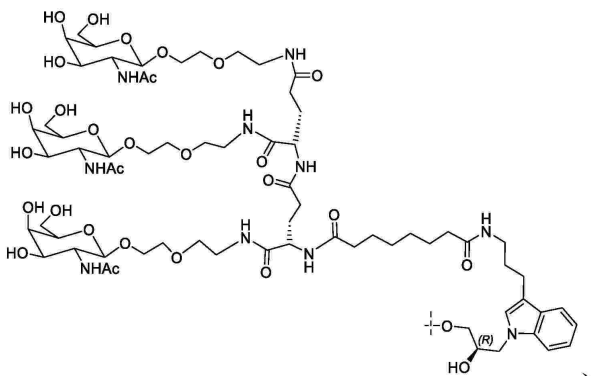
幾つかの実施形態において、上記リガンドは、

50

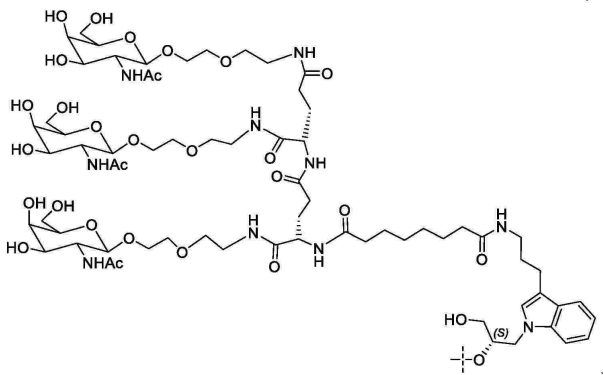
【化 9 9】



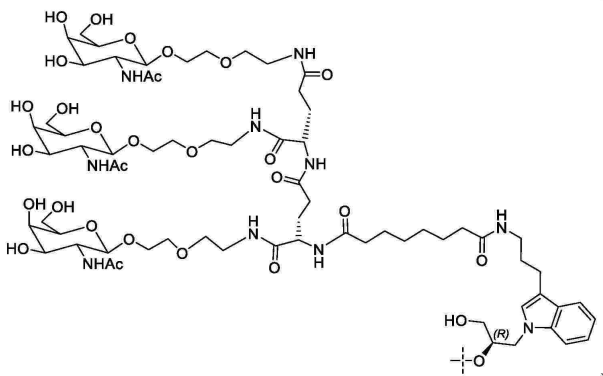
10



20



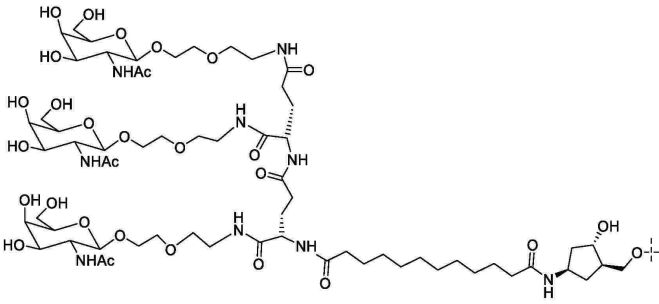
30



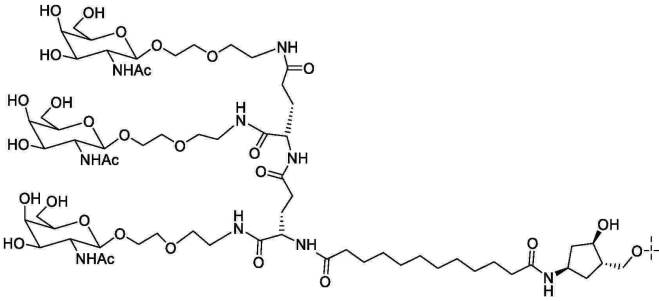
40

50

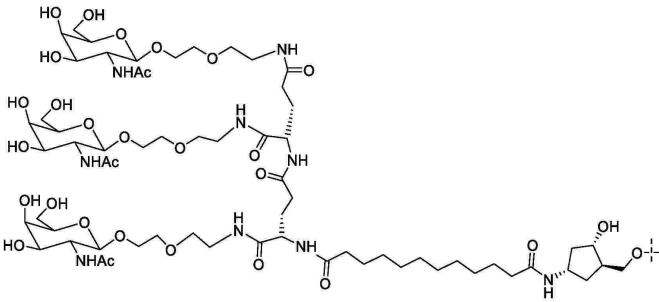
【化100】



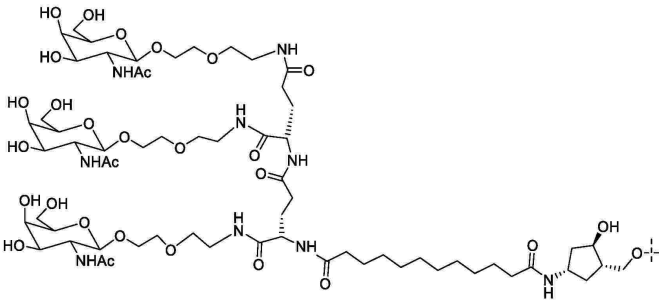
10



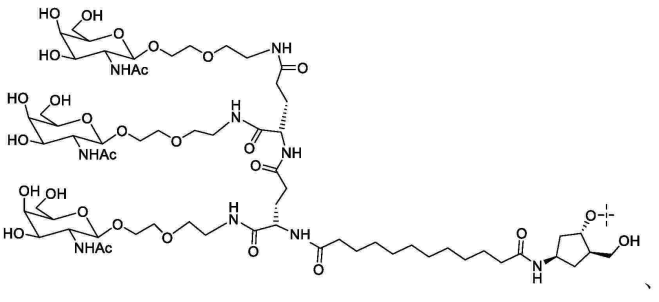
20



30

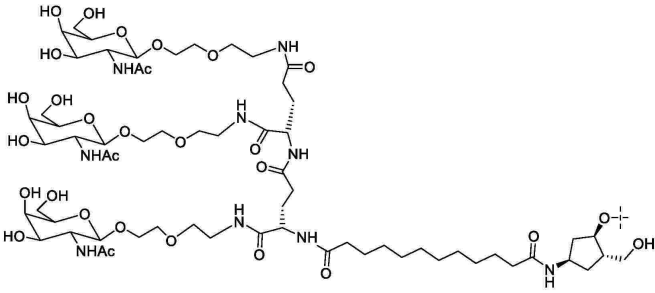


40

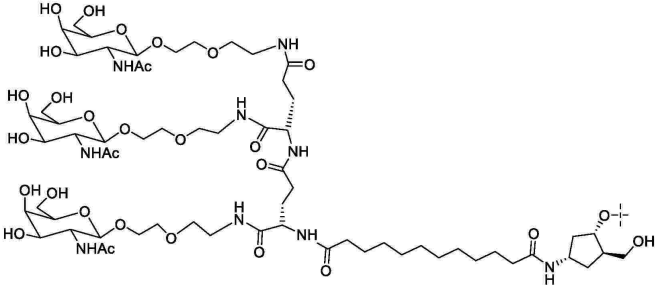


50

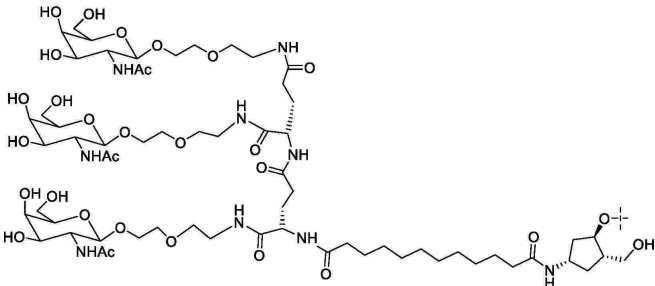
【化 1 0 1】



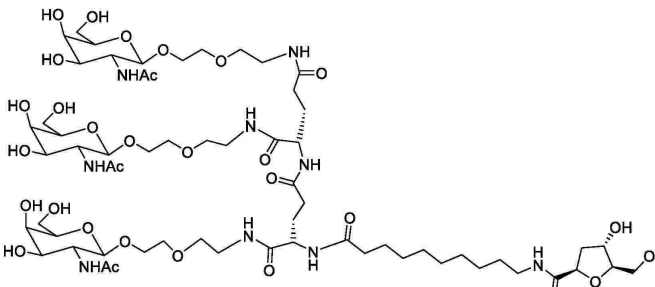
10



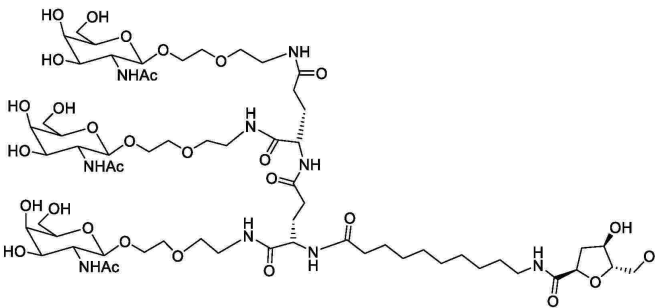
20



30

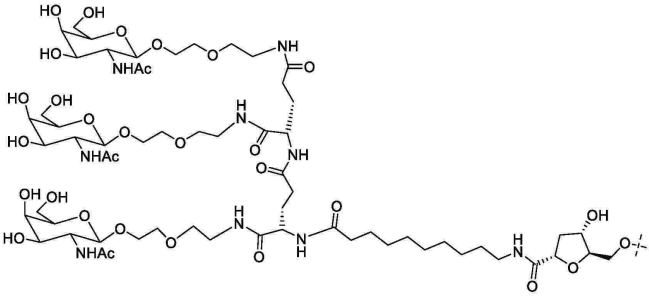


40

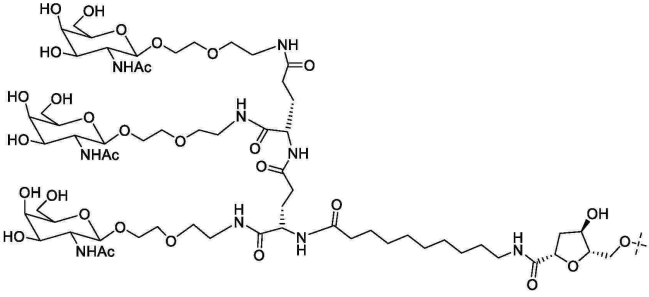


50

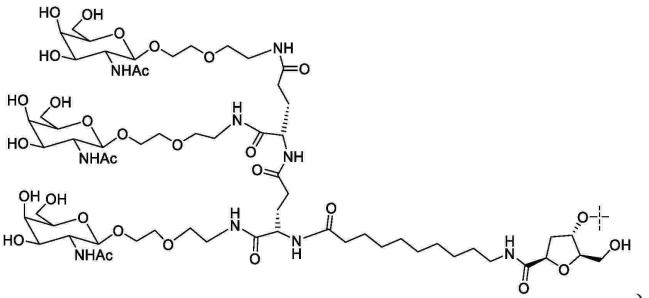
【化 1 0 2】



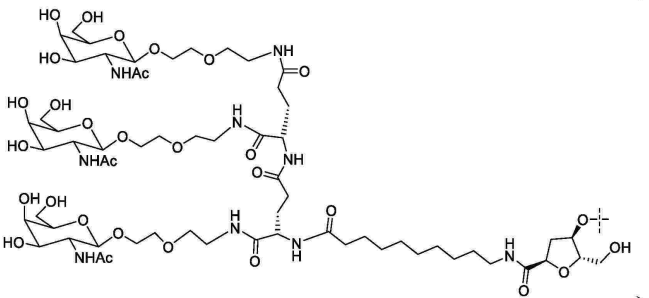
10



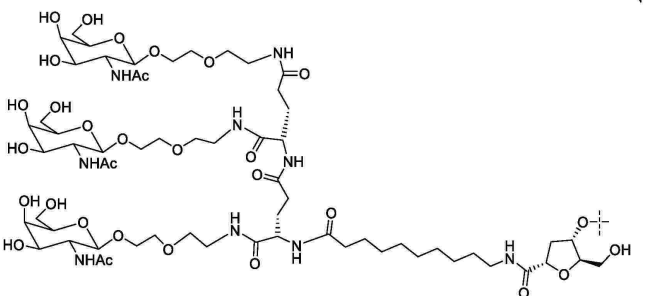
20



30

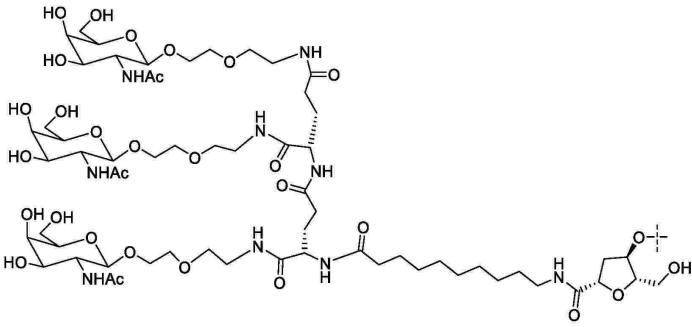


40

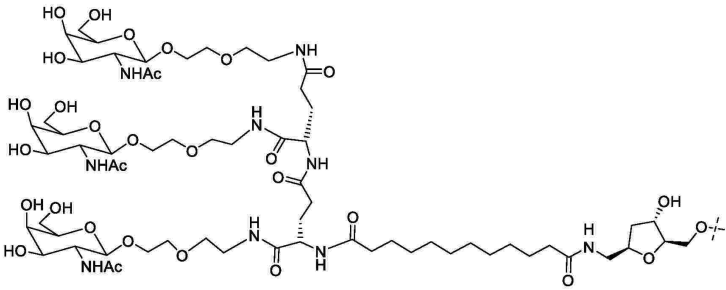


50

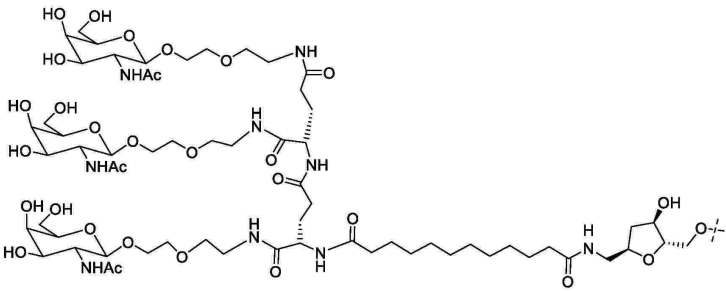
【化 1 0 3】



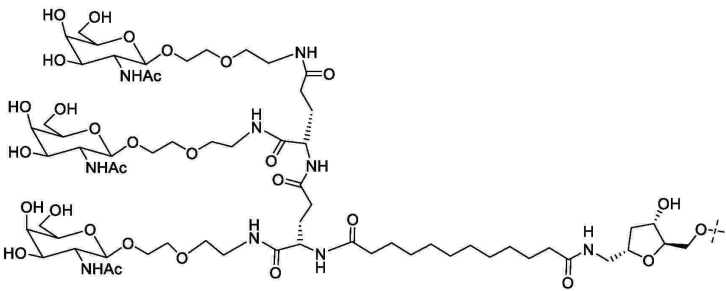
10



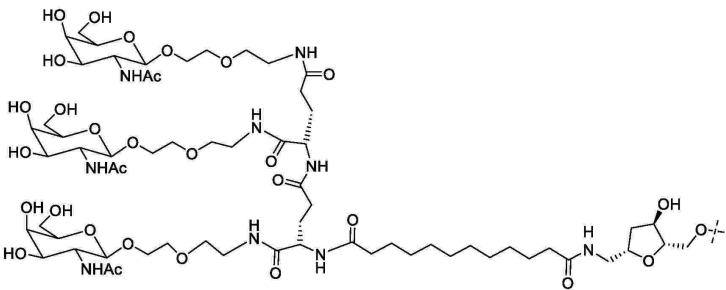
20



30

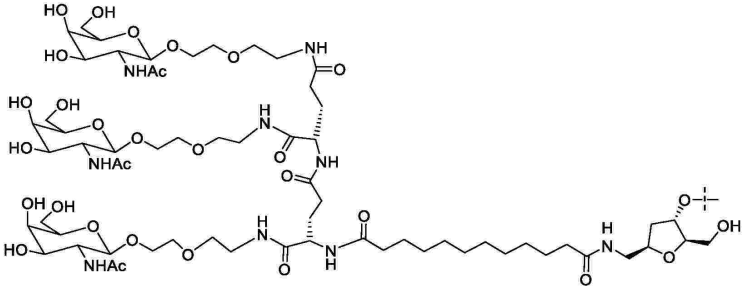


40

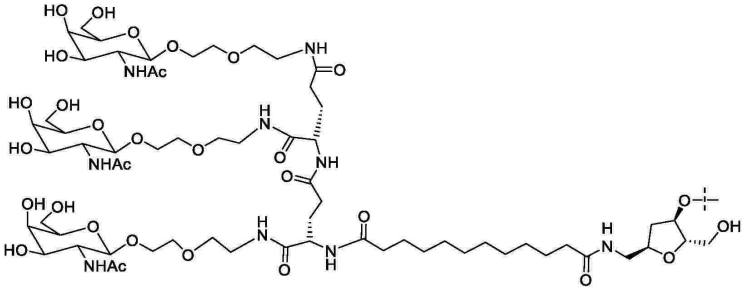


50

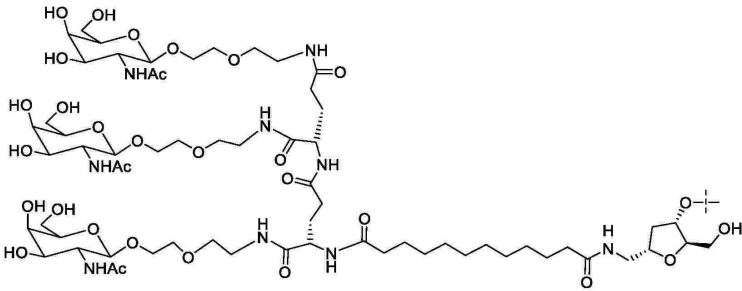
【化 1 0 4】



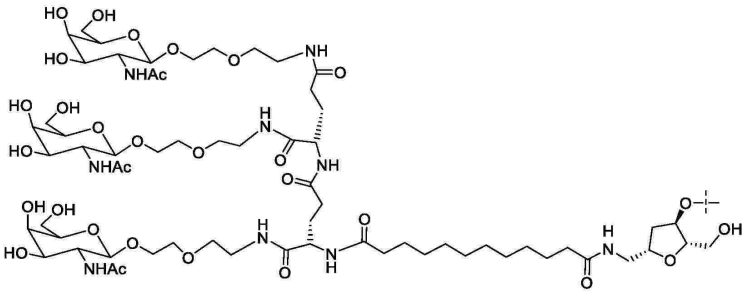
10



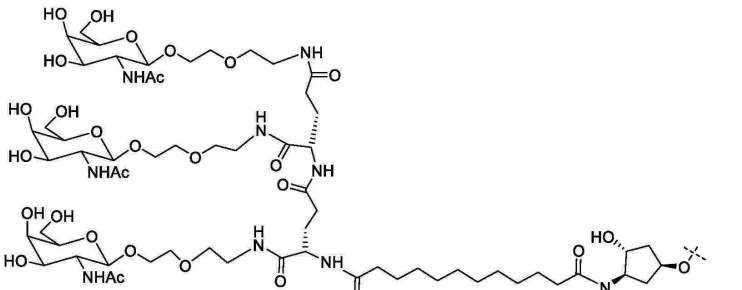
20



30

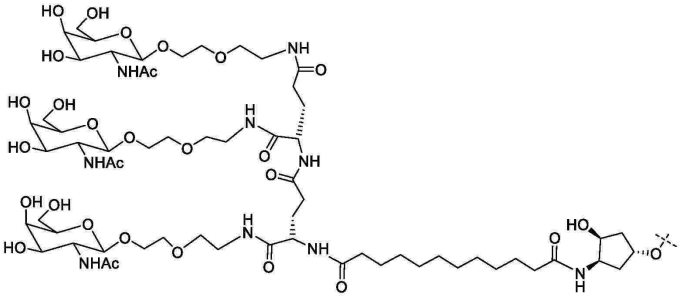


40

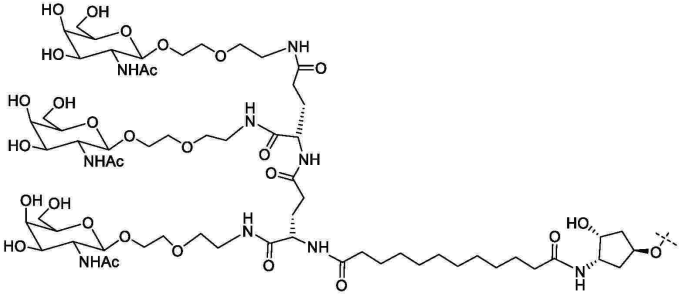


50

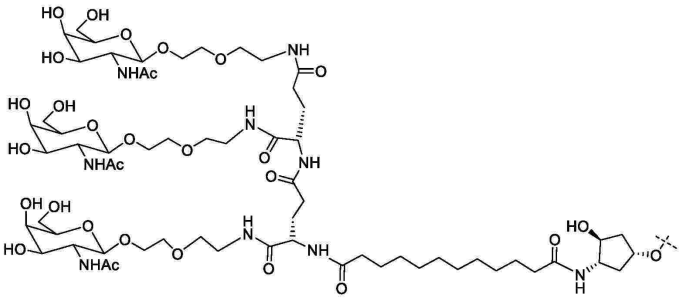
【化 1 0 5】



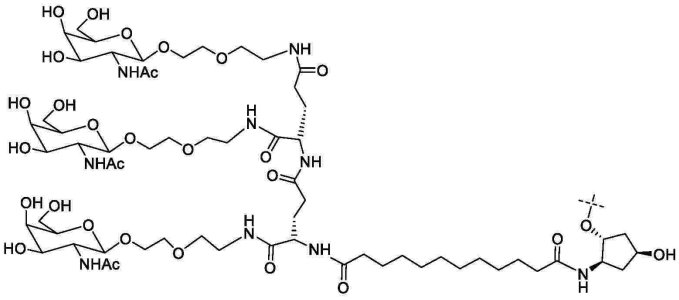
10



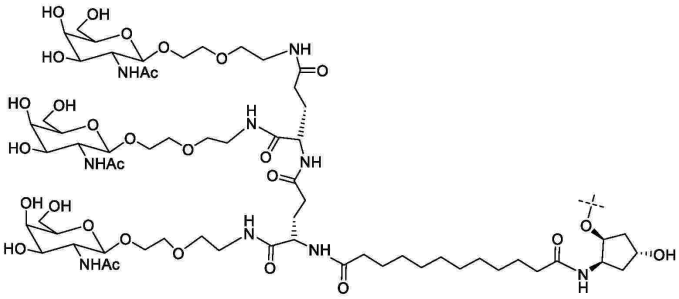
20



30

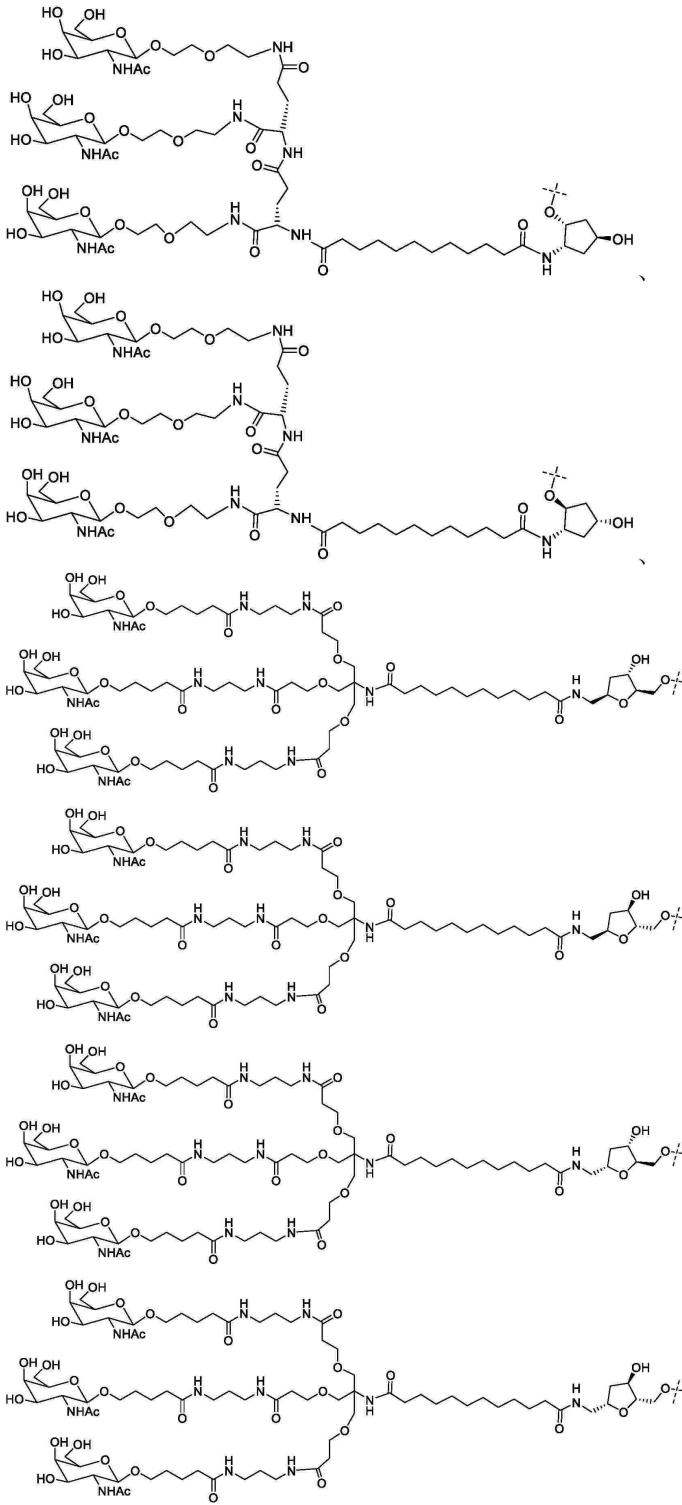


40



50

【化106】



10

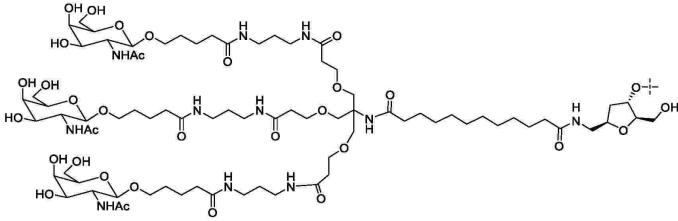
20

30

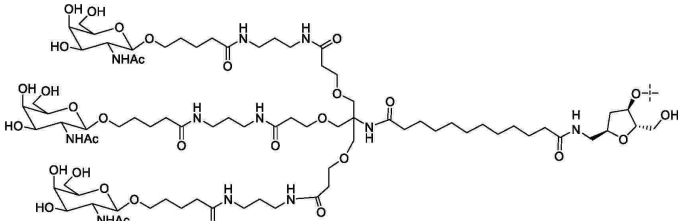
40

50

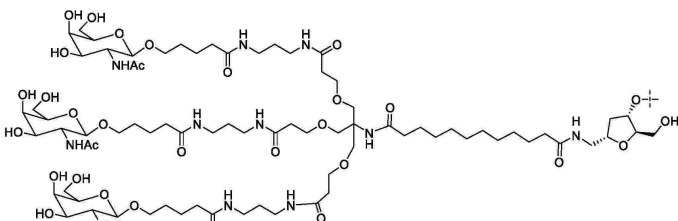
【化 1 0 7】



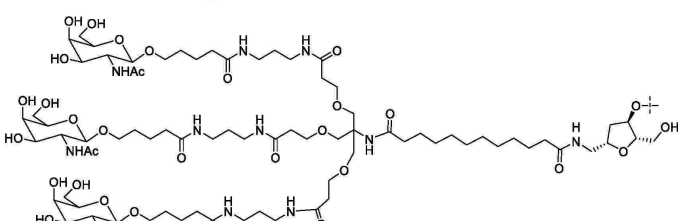
10



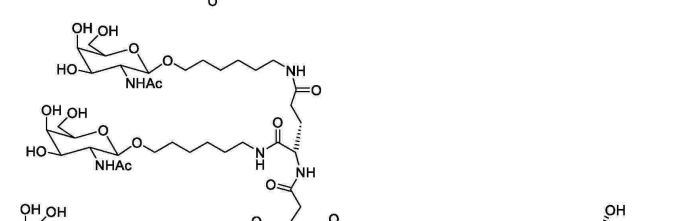
20



30

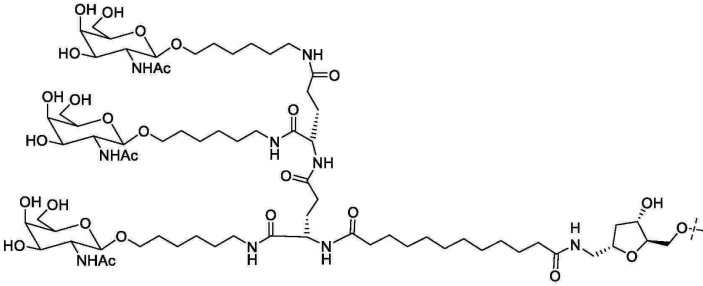


40

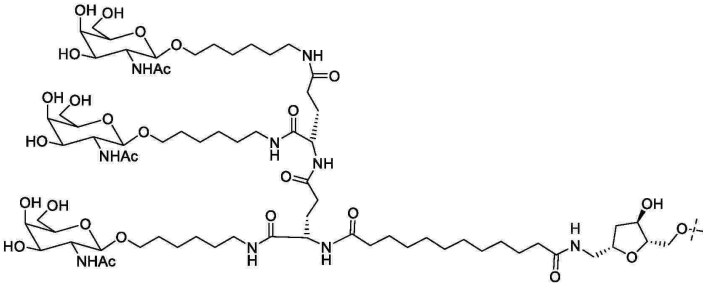


50

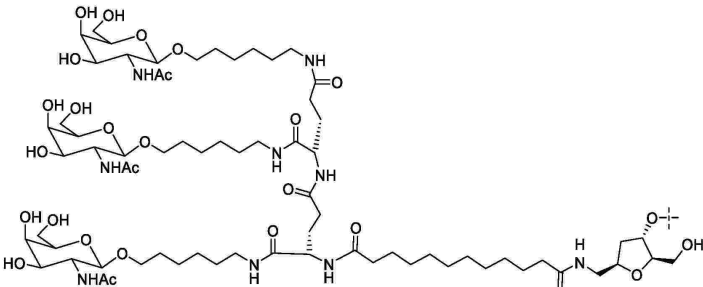
【化 1 0 8】



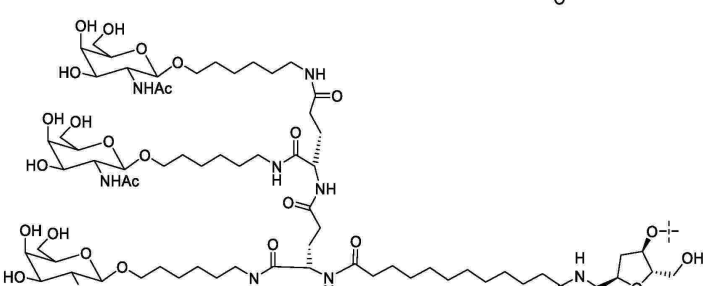
10



20



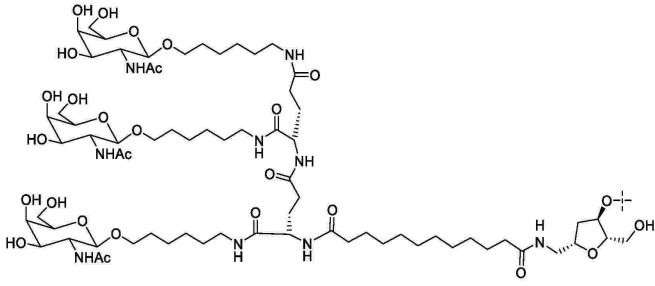
30



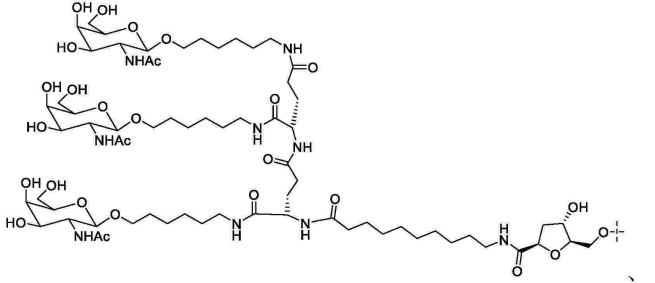
40

50

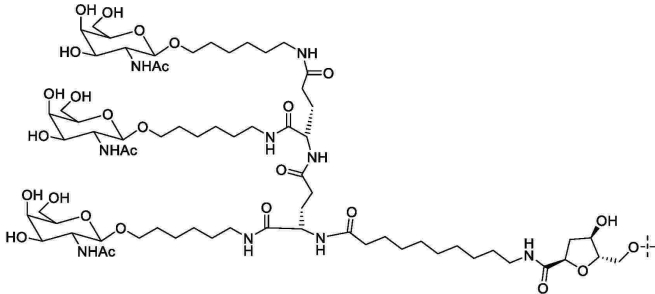
【化 1 0 9】



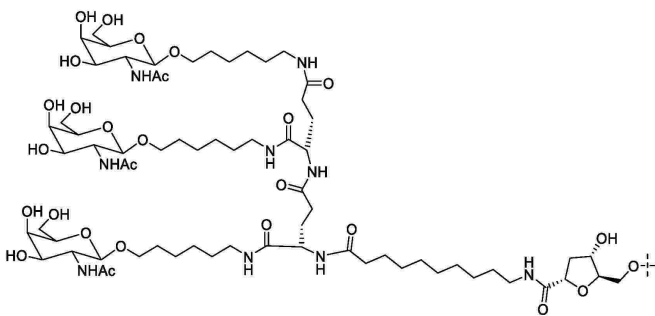
10



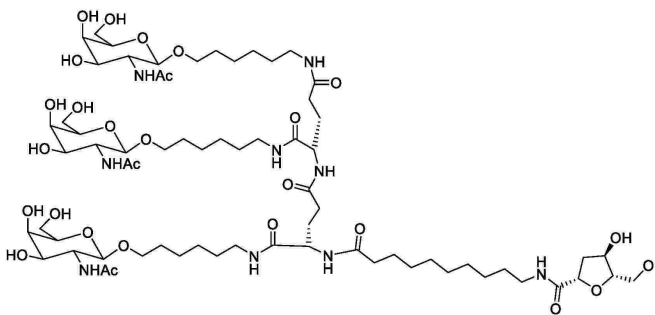
20



30

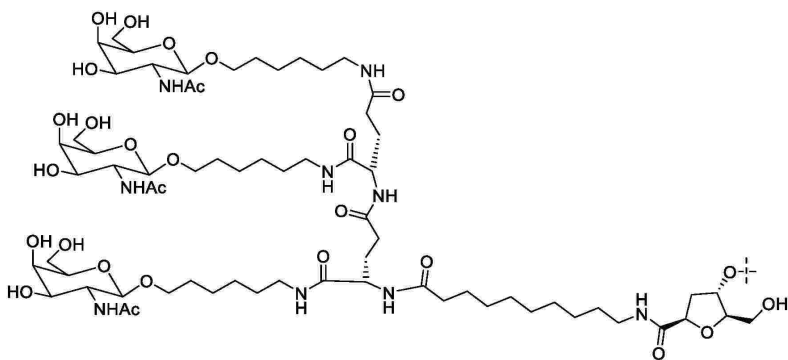


40

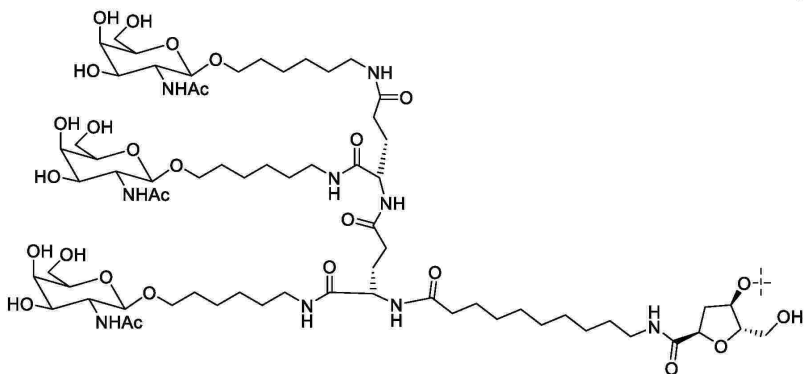


50

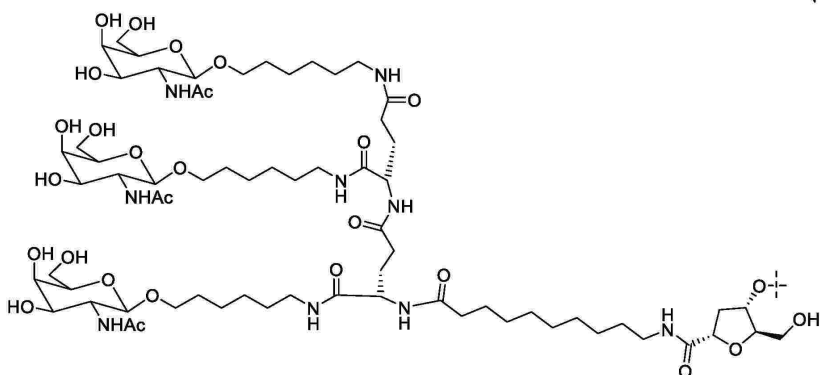
【化 1 1 0】



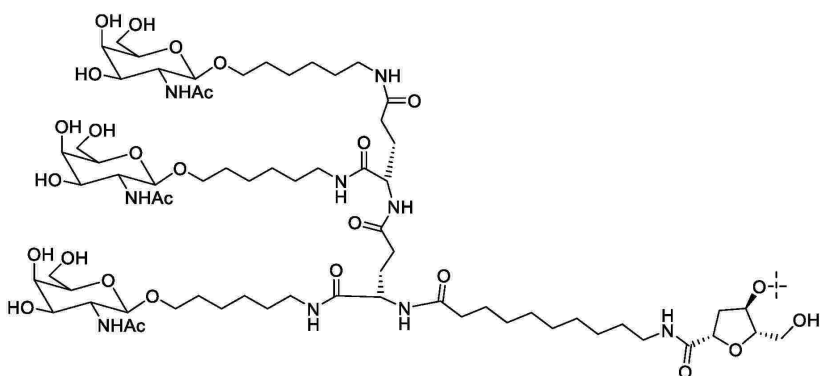
10



20



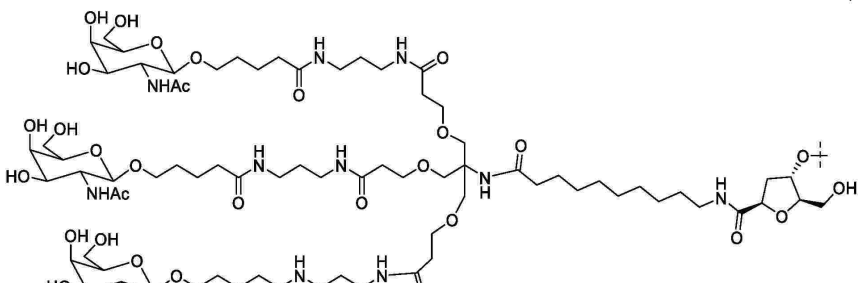
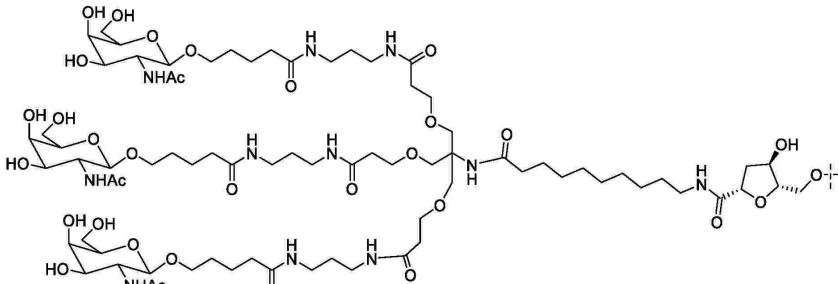
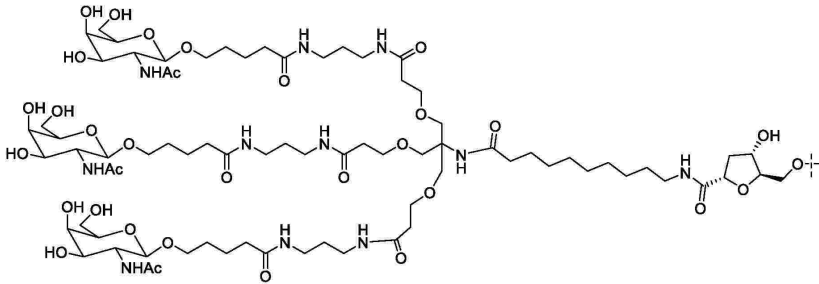
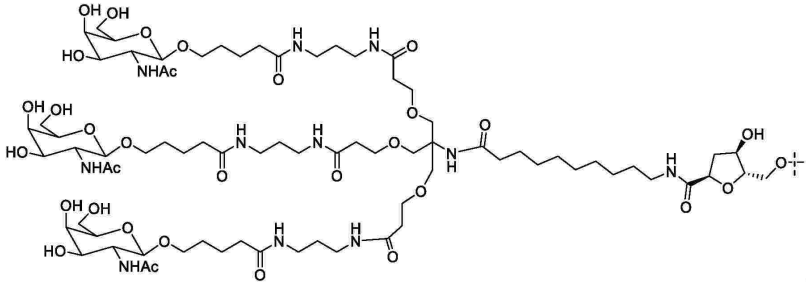
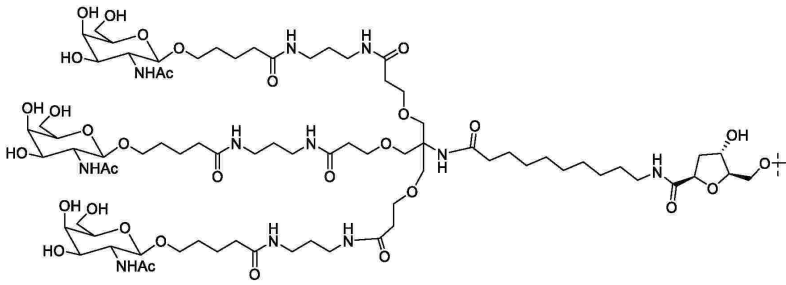
30



40

50

【化 1 1 1】



10

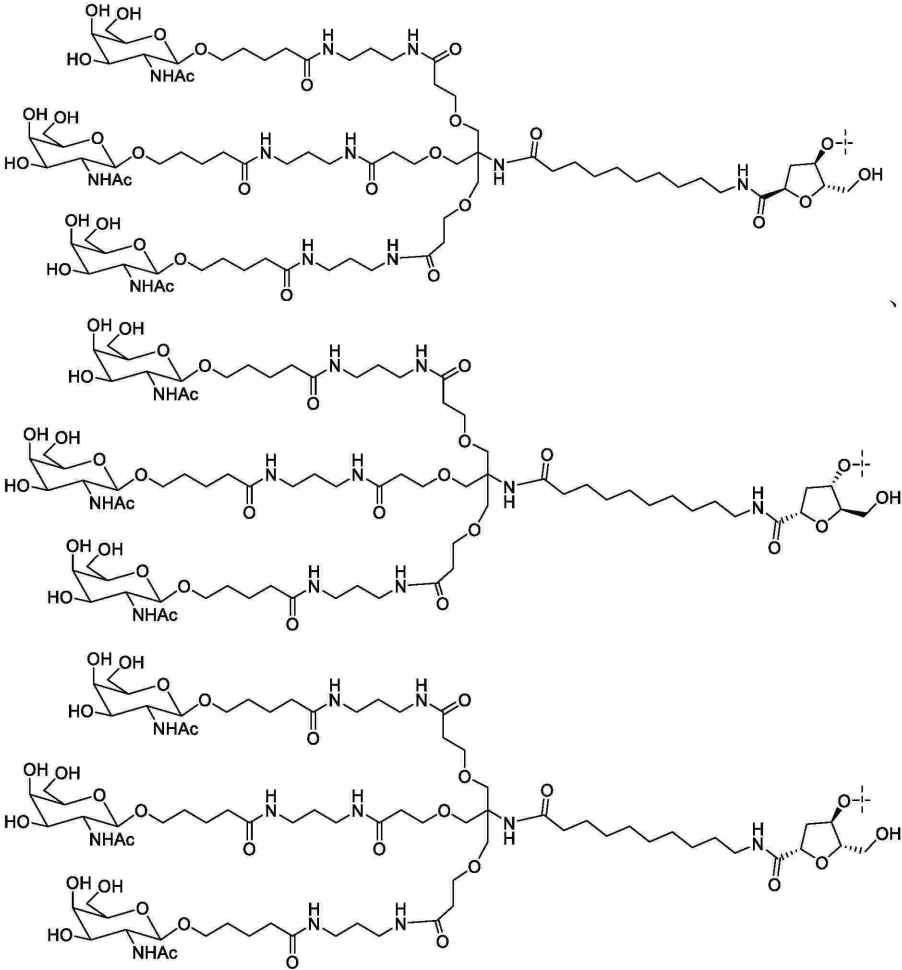
20

30

40

50

【化 1 1 2】



10

20

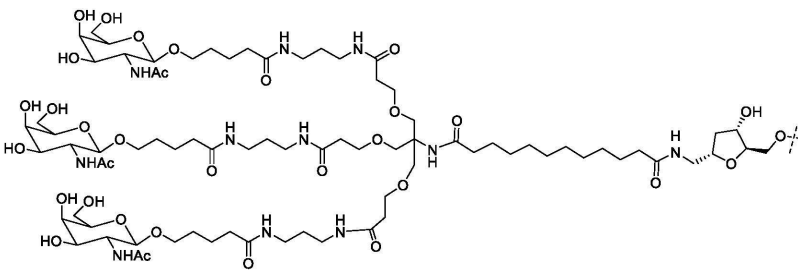
という何れか 1 つの構造又はその薬学的に許容される塩であってもよい。

【 0 2 1 2】

幾つかの実施形態において、上記リガンドは、

30

【化 1 1 3】



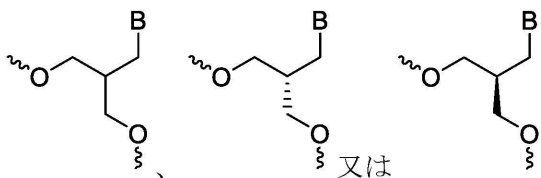
40

という何れか 1 つの構造又はその薬学的に許容される塩から選ばれる。。

【 0 2 1 3】

幾つかの実施形態において、上記式 (I) に示される化学修飾は

【化 1 1 4】

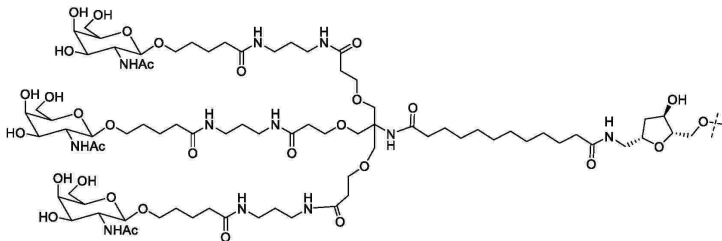
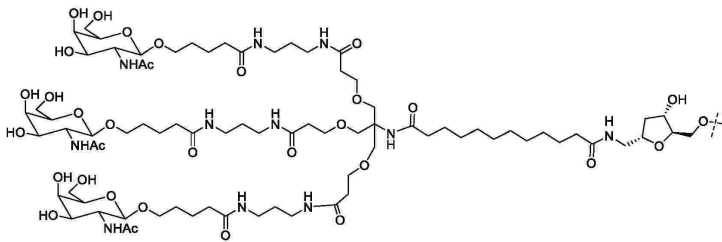
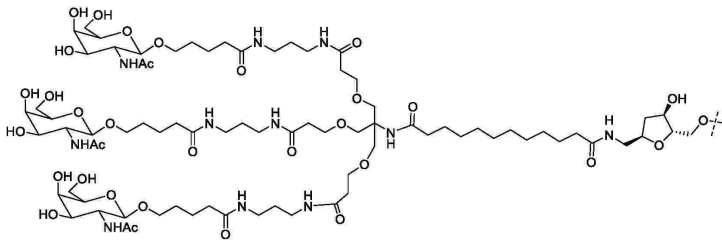
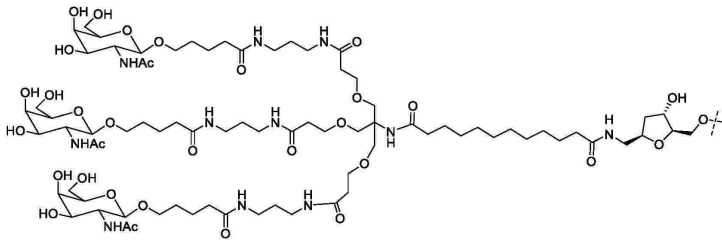
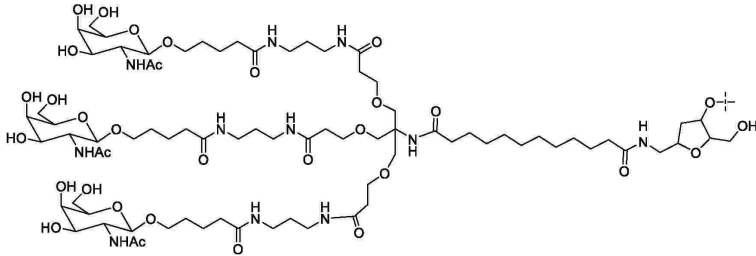
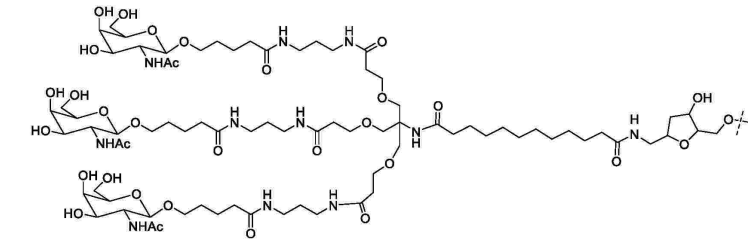


であり、B はグアニン、アデニン、シトシン及びウラシルから選ばれ、且つ上記リガンド

50

は、

【化 1 1 5】



10

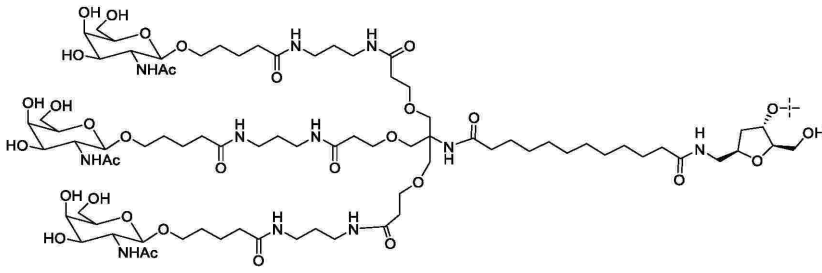
20

30

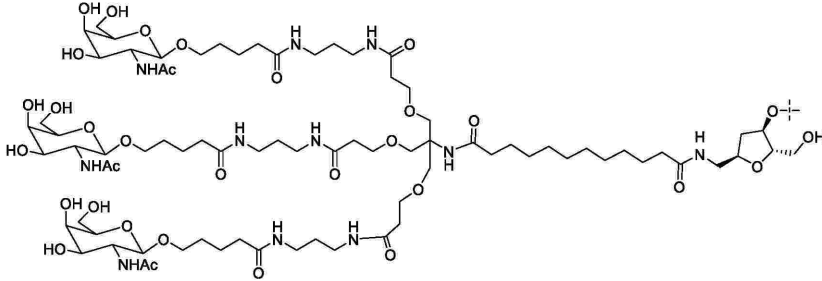
40

50

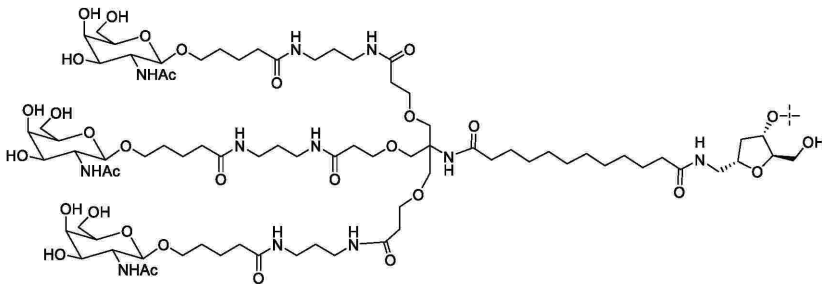
【化 1 1 6】



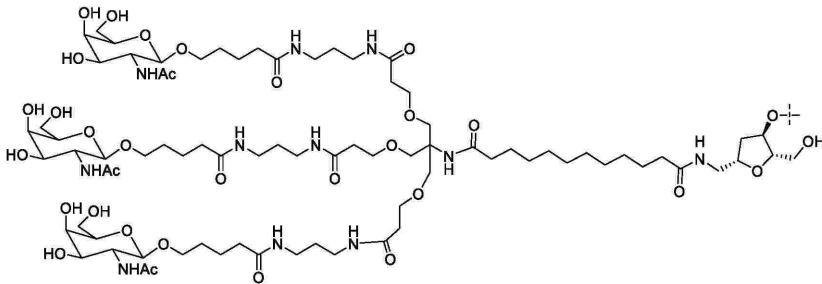
10



20



又は



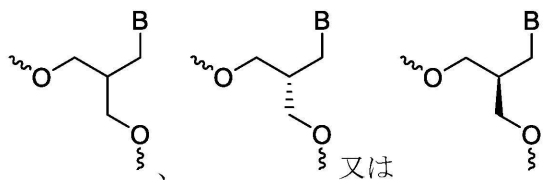
30

という何れか 1 つの構造又はその薬学的に許容される塩である。

【 0 2 1 4】

幾つかの実施形態において、上記式 (I) に示される化学修飾は、

【化 1 1 7】

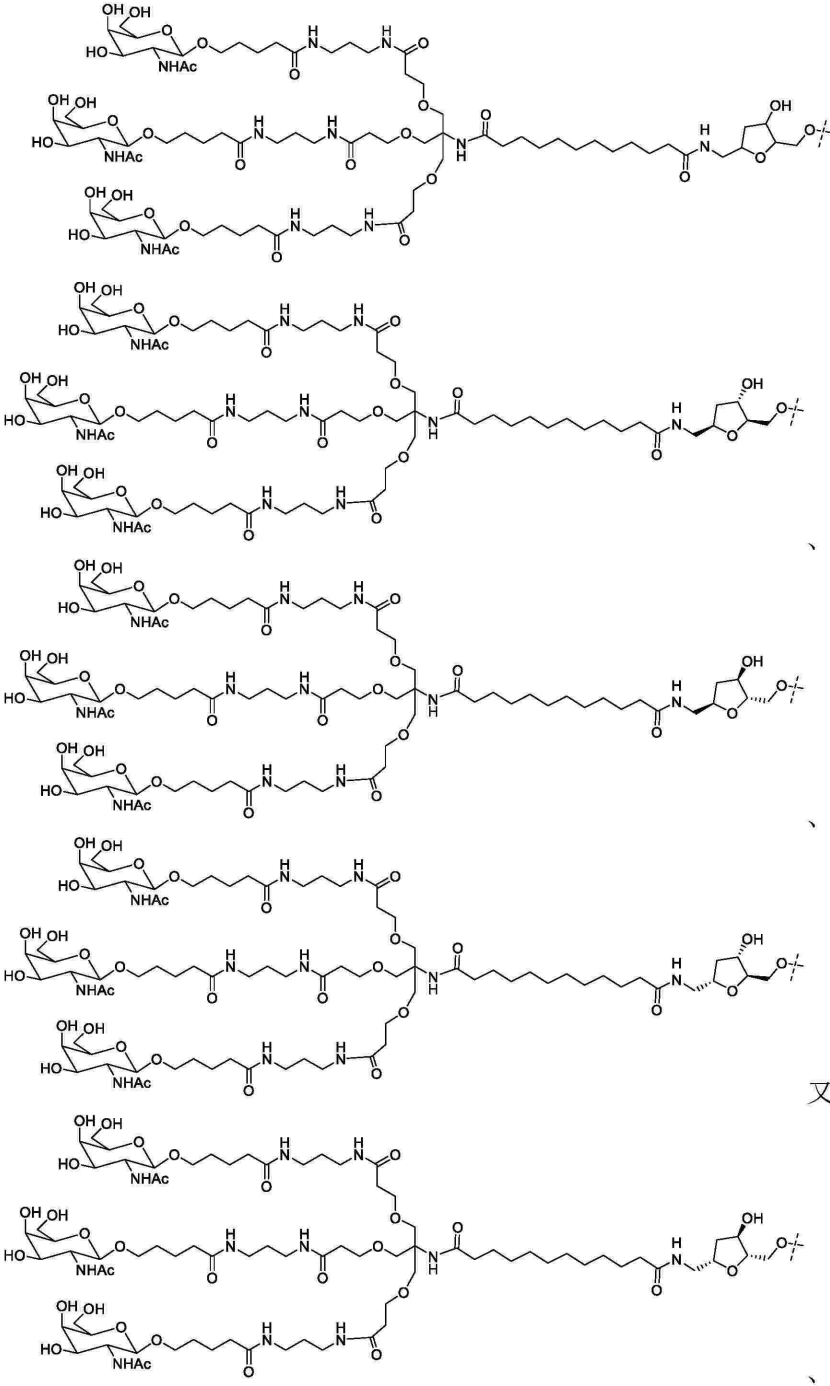


40

であり、B はグアニン、アデニン、シトシン及びウラシルから選ばれ、且つ、上記リガンドは、

50

【化 1 1 8】



10

20

30

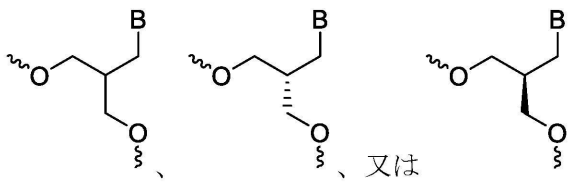
という何れか 1 つの構造又はその薬学的に許容される塩である。

【 0 2 1 5】

40

幾つかの実施形態において、上記式 (I) に示される化学修飾は、

【化 1 1 9】

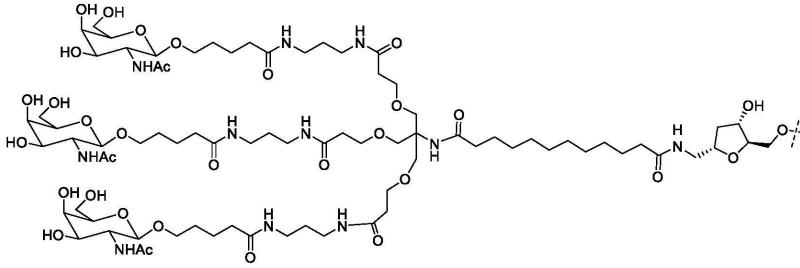


、又は

であり、 B はグアニン、アデニン、シトシン及びウラシルから選ばれ、且つ、上記リガンドは、

50

【化 1 2 0】



という何れか 1 つの構造又はその薬学的に許容される塩である。。

10

【 0 2 1 6】

幾つかの実施形態において、N - トリフルオロアセチルガラクトサミン、N - プロピオンルガラクトサミン、N - ブチリルガラクトサミン又は N - イソブチリルガラクトサミンで上記リガンドにおける N - アセチル - ガラクトサミン部分を置換することができる。

【 0 2 1 7】

幾つかの実施形態において、上記 s i R N A は上記リガンドと共有又は非共有結合している。

【 0 2 1 8】

幾つかの実施形態において、上記センス鎖の 3 ' 末端及び / 又は 5 ' 末端は、上記リガンドに複合される。

20

【 0 2 1 9】

幾つかの実施形態において、上記センス鎖の 3 ' 末端は、上記リガンドに複合される。

【 0 2 2 0】

幾つかの実施形態において、上記リガンドは、ホスフェート基又はチオホスフェート基を介して上記 s i R N A 末端に連結される。

【 0 2 2 1】

幾つかの実施形態において、上記リガンドは、ホスホジエステル基又はチオホスホジエステル基を介して上記 s i R N A 末端に連結される。

【 0 2 2 2】

幾つかの実施形態において、上記リガンドは、ホスホジエステル基を介して上記 s i R N A 末端に連結される。

30

【 0 2 2 3】

幾つかの実施形態において、上記リガンドは、ホスフェート基又はチオホスフェート基を介して上記 s i R N A 末端に間接的に連結される。

【 0 2 2 4】

幾つかの実施形態において、上記リガンドは、ホスフェート基又はチオホスフェート基を介して上記 s i R N A 末端に直接的に連結される。

【 0 2 2 5】

幾つかの実施形態において、上記リガンドは、ホスフェート基又はチオホスフェート基を介して上記 s i R N A のセンス鎖 3 ' 末端に直接的に連結される。

40

【 0 2 2 6】

幾つかの実施形態において、上記ホスフェート基は、ホスホモノエステル基又はホスホジエステル基である。幾つかの実施形態において、上記ホスフェート基は、ホスホジエステル基である。

【 0 2 2 7】

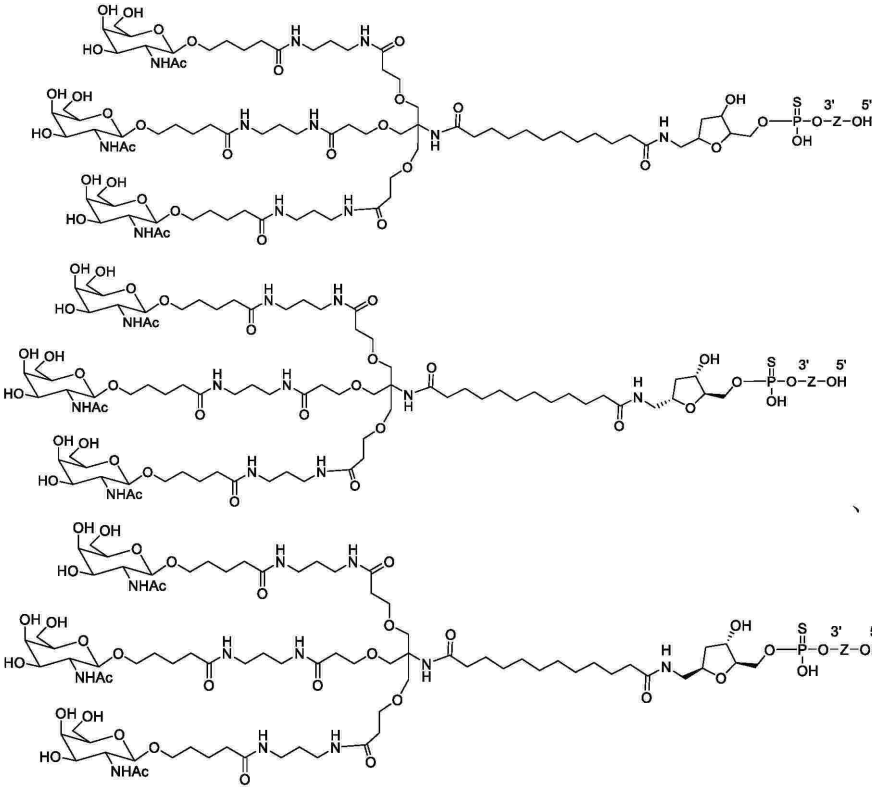
幾つかの実施形態において、上記ホスホチオエート基は、チオホスホモノエステル基又はチオホスホジエステル基である。幾つかの実施形態において、上記ホスホチオエート基は、チオホスホジエステル基である。

【 0 2 2 8】

幾つかの実施形態において、上記 d s R N A は、

50

【化 1 2 1】



10

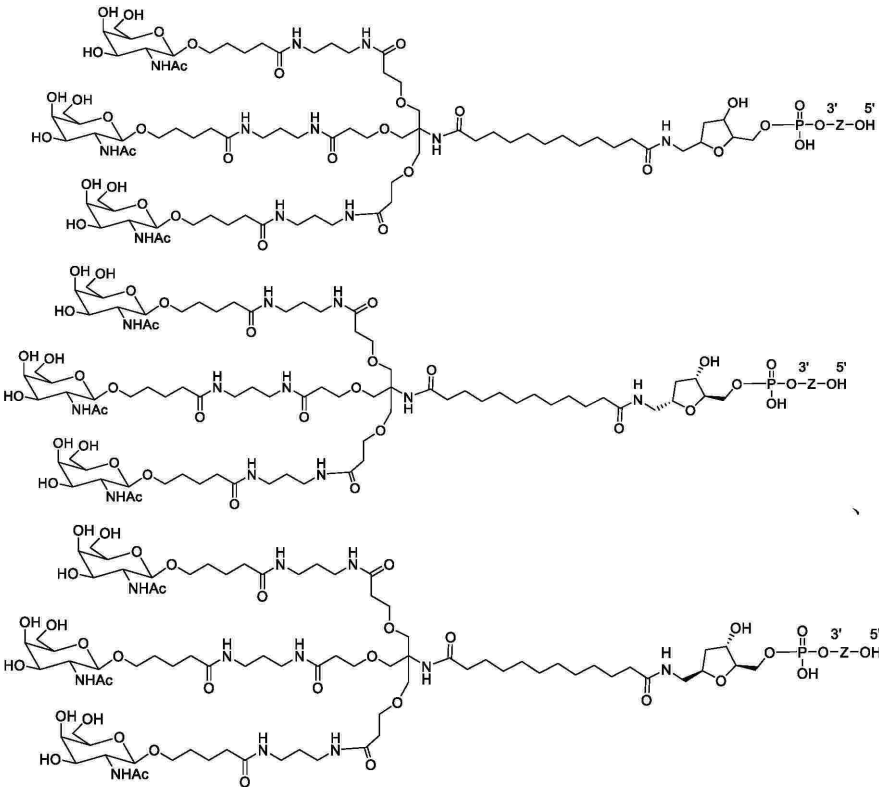
20

という何れか 1 つの構造又はその薬学的に許容される塩であり、そのうち、Z は s i R N A であり、上記 s i R N A のセンス鎖の 3 ' 末端はチオホスホジエステル基を介してリガンドに直接的に連結し、上記 s i R N A は本開示で定義される通りである。

【 0 2 2 9】

幾つかの実施形態において、上記 d s R N A は、

【化 1 2 2】



30

40

50

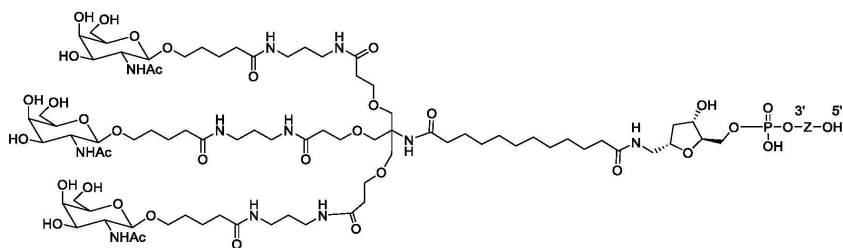
という何れか 1 つの構造又はその薬学的に許容される塩であり、

そのうち、Z は s i R N A であり、上記 s i R N A のセンス鎖の 3' 末端はホスホジエステル基を介してリガンドに直接的に連結し、上記 s i R N A は本開示で定義される通りである。

【0230】

幾つかの実施形態において、上記 d s R N A は、

【化123】



10

、という構造又はその薬学的に許容される塩であり、

そのうち、Z は s i R N A であり、上記 s i R N A のセンス鎖の 3' 末端はホスホジエステル基を介してリガンドに直接的に連結し、上記 s i R N A は本開示で定義される通りである。

【0231】

幾つかの実施形態において、s i R N A の細胞への進入を促進するために、s i R N A センス鎖の末端にコレステロールなどの親油性の基を導入することができ、親油性の基は共有結合で s i R N A と結合し、例えば、末端にコレステロール、リポタンパク質、ビタミン E などを導入することで、脂質二重層からなる細胞膜を介して細胞内の m R N A と作用することに寄与する。また、s i R N A は非共有結合で修飾してもよく、例えば、疎水結合又はイオン結合によりリン脂質分子、ポリペプチド、カチオン性ポリマーなどに結合することで安定性と生物学的活性を向上させる。

20

【0232】

幾つかの実施形態において、式 (I) に示される化学修飾、その互変異性体又はその薬学的に許容される塩を含むヌクレオチドは、アンチセンス鎖の 5' 末端から 5 位、6 位又は 7 位に位置する。

30

【0233】

幾つかの実施形態において、式 (I) に示される化学修飾、その互変異性体又は薬学的に許容されるその塩を含むヌクレオチドは、アンチセンス鎖の 5' 末端の 7 位に位置する。

【0234】

幾つかの実施形態において、式 (I) に示される化学修飾、又はその互変異性体又は薬学的に許容されるその塩修飾が 5' 末端からの 5 位にある場合、B は、アデニン、グアニン、2, 6 - ジアミノプリン、6 - ジメチルアミノプリン、2 - アミノプリン、シトシン、ウラシル、チミン、インドール、5 - ニトロインドール及び 3 - ニトロピロールから選ばれる。

【0235】

幾つかの実施形態において、式 (I) に示される化学修飾、又はその互変異性体又は薬学的に許容されるその塩修飾が 5' 末端からの 6 位にある場合、B は、アデニン、グアニン、2, 6 - ジアミノプリン、6 - ジメチルアミノプリン、2 - アミノプリン、シトシン、ウラシル、チミン、インドール、5 - ニトロインドール及び 3 - ニトロピロールから選ばれる。

40

【0236】

幾つかの実施形態において、式 (I) に示される化学修飾、又はその互変異性体又は薬学的に許容されるその塩修飾が 5' 末端からの 7 位にある場合、B は、アデニン、グアニン、2, 6 - ジアミノプリン、6 - ジメチルアミノプリン、2 - アミノプリン、シトシン、ウラシル、チミン、インドール、5 - ニトロインドール及び 3 - ニトロピロールから選

50

ばれる。

【0237】

幾つかの実施形態において、式(I)に示される化学修飾、又はその互変異性体又は薬学的に許容されるその塩修飾が5'末端からの8位にある場合、Bは、アデニン、グアニン、2,6-ジアミノプリン、6-ジメチルアミノプリン、2-アミノプリン、シトシン、ウラシル、チミン、インドール、5-ニトロインドール及び3-ニトロピロールから選ばれる。

【0238】

幾つかの実施形態において、Bは、上記アンチセンス鎖のその5'末端から5位のヌクレオチドが修飾されていない場合の塩基と同じである。

10

【0239】

幾つかの実施形態において、Bは、上記アンチセンス鎖のその5'末端から6位のヌクレオチドが修飾されていない場合の塩基と同じである。

【0240】

幾つかの実施形態において、Bは、上記アンチセンス鎖のその5'末端から7位のヌクレオチドが修飾されていない場合の塩基と同じである。

【0241】

幾つかの実施形態において、Bは、上記アンチセンス鎖のその5'末端から8位のヌクレオチドが修飾されていない場合の塩基と同じである。

【0242】

幾つかの実施形態において、式(I)に示される化学修飾を含む残りの位置において、上記センス鎖及び/又はアンチセンス鎖における少なくとも1つの別のヌクレオチドが修飾されたヌクレオチドである。

20

【0243】

幾つかの実施形態において、上記修飾されたヌクレオチドは、2'-メトキシ基で修飾されたヌクレオチド、2'-置換アルコキシ基で修飾されたヌクレオチド、2'-アルキル基で修飾されたヌクレオチド、2'-置換アルキル基で修飾されたヌクレオチド、2'-アミノ基で修飾されたヌクレオチド、2'-置換アミノ基で修飾されたヌクレオチド、2'-フルオロで修飾されたヌクレオチド、2'-デオキシヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロで修飾されたヌクレオチド、3'-デオキシ-チミンヌクレオチド、イソヌクレオチド、LNA、ENA、cET、UNA及びGNAから選ばれる。幾つかの実施形態において、修飾されたヌクレオチドは、互いに独立的に2'-メトキシ基で修飾されたヌクレオチド又は2'-フルオロで修飾されたヌクレオチドから選ばれる。

30

【0244】

幾つかの実施形態において、上記センス鎖は、同一の修飾を有する3つの連続するヌクレオチドを含む。

【0245】

幾つかの実施形態において、上記同じ修飾を有する3つのヌクレオチドは、2'-フルオロ修飾されたヌクレオチドである。

【0246】

幾つかの実施形態において、5'末端から3'末端へ方向に、アンチセンス鎖の2位、4位、6位、10位、12位、14位、16位及び18位のヌクレオチドは、それぞれ独立的に2'-フルオロで修飾されたヌクレオチドである。

40

【0247】

幾つかの実施形態において、上記アンチセンス鎖は標的配列に少なくとも部分的に逆相補的である。幾つかの実施形態において、上記アンチセンス鎖と標的配列との間に5個以下、4個以下、3個以下、2個以下、1個以下のミスマッチが存在する。幾つかの実施形態において、上記アンチセンス鎖は、標的配列と完全に逆相補的である。

【0248】

幾つかの実施形態において、上記センス鎖は、二本鎖領域を形成するためにアンチセン

50

ス鎖と少なくとも部分的に逆相補的である。幾つかの実施形態において、上記センス鎖とアンチセンス鎖との間に5個以下、4個以下、3個以下、2個以下、1個以下のミスマッチが存在する。幾つかの実施形態において、上記センス鎖は、アンチセンス鎖と完全に逆相補的である。

【0249】

幾つかの実施形態において、上記センス鎖とアンチセンス鎖は、それぞれ独立的に16個～35個、16個～34個、17個～34個、17個～33個、18個～33個、18個～32個、18個～31個、18個～30個、18個～29個、18個～28個、18個～27個、18個～26個、18個～25個、18個～24個、18個～23個、19個～25個、19個～24個、又は19個～23個のヌクレオチド（例えば19個、20個、21個、22個、23個のヌクレオチド）を有する。

【0250】

幾つかの実施形態において、上記センス鎖とアンチセンス鎖の長さは同一又は異なり、上記センス鎖の長さは19個～23個のヌクレオチド（例えば19個、20個、21個、22個、23個のヌクレオチド）であり、上記アンチセンス鎖の長さは19個～26個のヌクレオチドである。本開示により提供されるdsRNAのセンス鎖とアンチセンス鎖との長さ比は、 $19/19$ 、 $19/20$ 、 $19/21$ 、 $19/22$ 、 $19/23$ 、 $19/24$ 、 $19/25$ 、 $19/26$ 、 $20/19$ 、 $20/20$ 、 $20/21$ 、 $20/22$ 、 $20/23$ 、 $20/24$ 、 $20/25$ 、 $20/26$ 、 $21/20$ 、 $21/21$ 、 $21/22$ 、 $21/23$ 、 $21/24$ 、 $21/25$ 、 $21/26$ 、 $22/20$ 、 $22/21$ 、 $22/22$ 、 $22/23$ 、 $22/24$ 、 $22/25$ 、 $22/26$ 、 $23/20$ 、 $23/21$ 、 $23/22$ 、 $23/23$ 、 $23/24$ 、 $23/25$ 又は $23/26$ であってもよい。幾つかの実施形態において、上記センス鎖とアンチセンス鎖との長さ比は、 $19/21$ 、 $21/23$ 又は $23/25$ である。幾つかの実施形態において、上記センス鎖とアンチセンス鎖との長さ比は $19/21$ である。

【0251】

幾つかの実施形態において、上記siRNAは、1個又は2個の平滑末端を含む。

【0252】

幾つかの具体的な実施形態において、siRNAの各鎖は、それぞれ独立的に1個～2個の不對ヌクレオチドを含み、突出末端を形成する。

【0253】

幾つかの実施形態において、上記siRNAは、上記アンチセンス鎖3'末端に位置する突出末端を含む。

【0254】

幾つかの実施形態において、siRNAのセンス鎖において、5'末端の7位～9位に位置する3個の連続的なヌクレオチドは、2'-フルオロで修飾されたヌクレオチドである。

【0255】

幾つかの実施形態において、上記センス鎖は、下記の式に示されるヌクレオチド配列（5'-3'）を含む。

【0256】

$N_a N_a N_a N_a X N_a N_b N_b N_b N_a N_a N_a N_a N_a N_a N_a N_a N_a N_a$

そのうち、各Xは独立的に N_a 又は N_b であり、 N_a は2'-メトキシ基で修飾されたヌクレオチドであり、 N_b は2'-フルオロで修飾されたヌクレオチドである。

【0257】

幾つかの実施形態において、上記センス鎖は、下記の式に示されるヌクレオチドを含む。

【0258】

5'- $N_b N_a N_a N_a N_a N_a N_b N_b N_b N_a N_a N_a N_a N_a N_a N_a N_a N_a N_a$ -3'、又は、

10

20

30

40

50

5' - N_b N_a N_a N_a N_b N_a N_b N_b N_b N_a N_a N_a N_a N_a N_a N_a N_a N_a N_a -
3'、

そのうち、N_aは2'-メトキシ基で修飾されたヌクレオチドで、N_bは2'-フルオロ
で修飾されたヌクレオチドである。

【0259】

幾つかの実施形態において、上記アンチセンス鎖は、下記の式に示されるヌクレオチド
を含む。

【0260】

5' - N_b' N_b' N_b' N_b' N_b' N_b' W' N' N_b' N_b' N_b' N_b' N_b' N_b' N_b' N_b' N_a'
N_b' N_b' N_b' N_b' - 3'、

そのうち、N_a'は2'-メトキシ基で修飾されたヌクレオチドで、N'は2'-フルオロ
で修飾されたヌクレオチドであり、W'は、2'-メトキシ基で修飾されたヌクレオチド
或いは式(I)に示される化学修飾、又はその互変異性体又はその薬学的に許容される塩
修飾を含むヌクレオチドを表す。

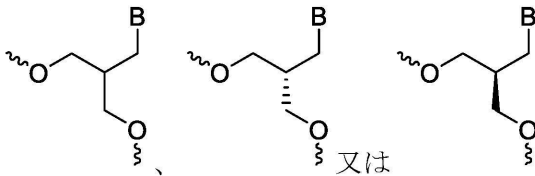
【0261】

幾つかの具体的な実施形態において、W'は、式(I)に示される化学修飾、その互変
異性体又はその薬学的に許容される塩を含むヌクレオチドを表す。

【0262】

幾つかの具体的な実施形態において、式(I)に示される化学修飾は、

【化124】

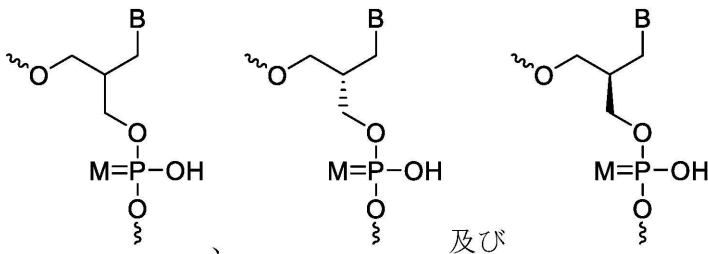


から選ばれ、そのうち、Bは、グアニン、アデニン、シトシン又はウラシルから選ばれる。
幾つかの具体的な実施形態において、Bは、上記アンチセンス鎖のその5'末端から7
位のヌクレオチドが修飾されていない場合の塩基と同じである。

【0263】

幾つかの具体的な実施形態において、式(I)に示される化学修飾は、

【化125】



から選ばれ、そのうち、MはO又はSであり、そのうち、Bは、グアニン、アデニン、シ
トシン又はウラシルから選ばれる。幾つかの具体的な実施形態において、Bは、上記アン
チセンス鎖のその5'末端から7位のヌクレオチドが修飾されていない場合の塩基と同じ
である。

【0264】

幾つかの具体的な実施形態において、MはSである。幾つかの具体的な実施形態におい
て、MはOである。

【0265】

幾つかの実施形態において、上記センス鎖及び/又はアンチセンス鎖における少なくと
も1つのホスフェート基は、修飾基を有するホスフェート基である。上記修飾基により、

10

20

30

40

50

上記 s i R N A は、生体試料又は環境において向上した安定性を有する。幾つかの実施形態において、上記修飾基を有するホスフェート基は、チオホスフェート基である。幾つかの実施形態において、上記修飾基を有するホスフェート基は、チオホスホジエステル基である。

【0266】

幾つかの実施形態において、上記チオホスホジエステル基は、
 上記センス鎖の 5' 末端の 1 番目のヌクレオチドと 2 番目のヌクレオチドとの間、
 上記センス鎖の 5' 末端の 2 番目のヌクレオチドと 3 番目のヌクレオチドとの間、
 上記アンチセンス鎖の 5' 末端の 1 番目のヌクレオチドと 2 番目のヌクレオチドとの間、
 上記アンチセンス鎖の 5' 末端の 2 番目のヌクレオチドと 3 番目のヌクレオチドとの間、
 上記アンチセンス鎖の 3' 末端の 1 番目のヌクレオチドと 2 番目のヌクレオチドとの間、
 及び
 上記アンチセンス鎖の 3' 末端の 2 番目のヌクレオチドと 3 番目のヌクレオチドとの間、
 という位置から選ばれる少なくとも 1 つに存在する。

【0267】

幾つかの実施形態において、上記センス鎖及び / 又はアンチセンス鎖は複数のチオホスホジエステル基を含み、上記チオホスホジエステル基は、
 上記センス鎖の 5' 末端の 1 番目のヌクレオチドと 2 番目のヌクレオチドとの間、
 上記センス鎖の 5' 末端の 2 番目のヌクレオチドと 3 番目のヌクレオチドとの間、
 上記アンチセンス鎖の 5' 末端の 1 番目のヌクレオチドと 2 番目のヌクレオチドとの間、
 上記アンチセンス鎖の 5' 末端の 2 番目のヌクレオチドと 3 番目のヌクレオチドとの間、
 上記アンチセンス鎖の 3' 末端の 1 番目のヌクレオチドと 2 番目のヌクレオチドとの間、
 及び
 上記アンチセンス鎖の 3' 末端の 2 番目のヌクレオチドと 3 番目のヌクレオチドとの間、
 という位置から選ばれる少なくとも 1 つに存在する。

【0268】

幾つかの実施形態において、上記センス鎖は、下記の式に示されるヌクレオチド配列を含み、
 $5' - N m s N m s N m N m N f N m N f N f N f N m N m N m N m N m N m N m N m N m N m - 3'$ 、又は、
 $5' - N m s N m s N m N m N m N m N f N f N f N m N m N m N m N m N m N m N m N m N m - 3'$ 、
 そのうち、Nm は 2' - メトキシ基で修飾された任意のヌクレオチドを示し、例えば、
 2' - メトキシ基で修飾された C、G、U、A であり、Nf は 2' - フルオロで修飾された
 任意のヌクレオチドを示し、例えば、2' - フルオロで修飾された C、G、U、A であり、
 小文字 s は、当該文字 s の左右に隣接する 2 つのヌクレオチド同士がチオホスフェート
 基で連結されていることを示し、小文字 s が 3' 末端の 1 番目にある場合は、当該文字 s
 の上流 (5' 方向) に隣接する 1 つのヌクレオチド末端がチオホスホジエステル基である
 ことを示す。

【0269】

幾つかの実施形態において、上記アンチセンス鎖は、下記の式に示されるヌクレオチド
 配列を含み、
 $5' - N m ' s N f ' s N m ' N f ' N m ' N f ' W ' N m ' N m ' N f ' N m ' N f ' N m ' N$
 $' N f ' N m ' N f ' N m ' s N m ' s N m ' - 3'$ 、
 そのうち、Nm' は 2' - メトキシ基で修飾された任意のヌクレオチドを示し、例えば、
 2' - メトキシ基で修飾された C、G、U、A であり、Nf' は 2' - フルオロで修飾され
 た任意のヌクレオチドを示し、例えば、2' - フルオロで修飾された C、G、U、A であ
 り、
 小文字 s は、当該文字 s の左右に隣接する 2 つのヌクレオチド同士がチオホスホジエ
 ステル基で連結されていることを示し、小文字 s が 3' 末端の 1 番目にある場合は、当該文

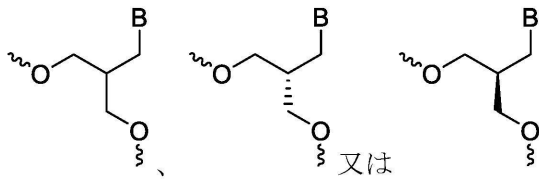
字 s の上流に隣接する 1 つのヌクレオチド末端がチオホスホジエステル基であることを示し、

W' は 2' - メトキシ基で修飾されたヌクレオチド或いは式 (I) に示される化学修飾、又はその互変異性体又はその薬学的に許容される塩修飾を含むヌクレオチドを示す。

【 0 2 7 0 】

幾つかの実施形態において、式 (I) に示される化学修飾は、

【 化 1 2 6 】



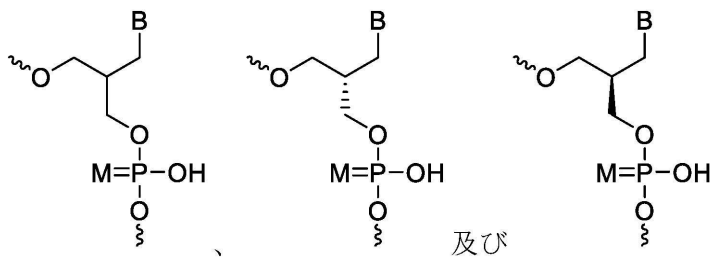
10

から選ばれ、そのうち、B は、グアニン、アデニン、シトシン又はウラシルから選ばれる。幾つかの実施形態において、B は、上記アンチセンス鎖のその 5' 末端から 7 位のヌクレオチドが修飾されていない場合の塩基と同じである。

【 0 2 7 1 】

幾つかの実施形態において、式 (I) に示される化学修飾は、

【 化 1 2 7 】



20

から選ばれ、そのうち、M は O 又は S であり、そのうち、B は、グアニン、アデニン、シトシン又はウラシルから選ばれる。幾つかの具体的な実施形態において、B は、上記アンチセンス鎖のその 5' 末端から 7 位のヌクレオチドが修飾されていない場合の塩基と同じである。

30

【 0 2 7 2 】

幾つかの実施形態において、M は S である。幾つかの具体的な実施形態において、M は O である。

【 0 2 7 3 】

HBV を標的とする dsRNA

幾つかの実施形態において、上記 siRNA は、B 型肝炎ウイルス (HBV) 遺伝子を標的とする siRNA である。

【 0 2 7 4 】

幾つかの実施形態において、上記 siRNA は、HBV-S を標的とする siRNA である。

40

【 0 2 7 5 】

幾つかの具体的な実施形態において、HBV-S を標的とする siRNA のセンス鎖及びアンチセンス鎖は、

センス鎖のヌクレオチド配列は、配列番号 2 を含み、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列は、配列番号 6 を含む、という群の何れか 1 つから選ばれる。

【 0 2 7 6 】

幾つかの実施形態において、上記 siRNA は、HBV-X を標的とする siRNA である。

【 0 2 7 7 】

50

幾つかの具体的な実施形態において、HBV-Xを標的とする*s i R N A*のセンス鎖及びアンチセンス鎖は、

センス鎖のヌクレオチド配列は配列番号1を含み、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列は配列番号5を含み、

センス鎖のヌクレオチド配列は配列番号4を含み、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列は配列番号5を含み、

センス鎖のヌクレオチド配列は配列番号1を含み、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列は配列番号8を含む、という群の何れか1つから選ばれる。

【0278】

幾つかの実施形態において、上記*s i R N A*のセンス鎖は、配列番号1～配列番号4の何れかのヌクレオチド配列と3個以下のヌクレオチドの違いがある配列を含み、それは少なくとも15個（幾つかの実施形態において、少なくとも19個から選ばれる）の連続ヌクレオチドを含み、及び/又は、

アンチセンス鎖は、配列番号5～配列番号8の何れかのヌクレオチド配列と3個以下のヌクレオチドの違いがある配列を含み、それは少なくとも19個（幾つかの実施形態において、少なくとも21個）の連続ヌクレオチドを含む。

【0279】

幾つかの実施形態において、上記*s i R N A*のセンス鎖のヌクレオチド配列は、配列番号1～配列番号4の何れか1つを含み、及び/又は、上記アンチセンス鎖のヌクレオチド配列は、配列番号5～配列番号8の何れか1つを含み、

幾つかの実施形態において、上記*s i R N A*のセンス鎖及びアンチセンス鎖は、

センス鎖のヌクレオチド配列は配列番号1を含み、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列は配列番号5を含み、

センス鎖のヌクレオチド配列は配列番号2を含み、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列は配列番号6を含み、

センス鎖のヌクレオチド配列は配列番号3を含み、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列は配列番号7を含み、

センス鎖のヌクレオチド配列は配列番号4を含み、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列は配列番号5を含み、

センス鎖のヌクレオチド配列は配列番号1を含み、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列は配列番号8を含む、という群の何れか1つから選ばれる。

【0280】

幾つかの実施形態において、上記*s i R N A*のセンス鎖及びアンチセンス鎖は、

センス鎖のヌクレオチド配列は配列番号1であり、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列は配列番号5であり、

センス鎖のヌクレオチド配列は配列番号2であり、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列は配列番号6であり、

センス鎖のヌクレオチド配列は配列番号3であり、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列は配列番号7であり、

センス鎖のヌクレオチド配列は配列番号4であり、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列は配列番号5であり、

センス鎖のヌクレオチド配列は配列番号1であり、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列は配列番号8である、という群の何れか1つから選ばれる。

【0281】

本開示において、5' - 3'方向に従って、

配列番号1はGUGUGCACUUCGCUUCACCCであり、

配列番号2はCUUUUGUCUUUGGGUAUAUであり、

配列番号3はUUAACA AUUUUCUUUUGUUであり、

配列番号4はGUGUGCACUUCGCUUCACUであり、

配列番号5はAGUGAAGCGAAGUGCACACGGであり、

10

20

30

40

50

配列番号 6 は A U A U A C C C A A A G A C A A A A G A A であり、
 配列番号 7 は A A C A A A A G A A A A U U G G U A A C A であり、
 配列番号 8 は I G U G A A G C G A A G U G C A C A C G G である。

【 0 2 8 2 】

幾つかの実施形態において、上記 s i R N A は T J R 1 0 0 3 8 1 及び T J R 1 0 0 3 8 2 である。

【 0 2 8 3 】

幾つかの実施形態において、本開示に記載の d s R N A のセンス鎖は、配列番号 9 ~ 配列番号 1 5 の何れか 1 つを含み、及び / 又は、

アンチセンス鎖のヌクレオチド配列は、配列番号 1 7 ~ 配列番号 2 0 の何れか 1 つを含む。 10

【 0 2 8 4 】

幾つかの実施形態において、上記 d s R N A は、

センス鎖は配列番号 9 を含み、アンチセンス鎖は配列番号 1 7 を含む d s R N A 、

センス鎖は配列番号 1 1 を含み、アンチセンス鎖は配列番号 1 8 を含む d s R N A 、

センス鎖は配列番号 1 3 を含み、アンチセンス鎖は配列番号 1 9 を含む d s R N A 、

センス鎖は配列番号 1 0 を含み、アンチセンス鎖は配列番号 1 7 を含む d s R N A 、

センス鎖は配列番号 1 2 を含み、アンチセンス鎖は配列番号 1 8 を含む d s R N A 、

センス鎖は配列番号 1 4 を含み、アンチセンス鎖は配列番号 1 9 を含む d s R N A 、

センス鎖は配列番号 9 を含み、アンチセンス鎖は配列番号 2 0 を含む d s R N A 、 20

センス鎖は配列番号 1 5 を含み、アンチセンス鎖は配列番号 1 7 を含む d s R N A 、 と

という群の何れか 1 つから選ばれる。

【 0 2 8 5 】

幾つかの実施形態において、上記 d s R N A は、

センス鎖は配列番号 9 であり、アンチセンス鎖は配列番号 1 7 である d s R N A 、

センス鎖は配列番号 1 1 であり、アンチセンス鎖は配列番号 1 8 である d s R N A 、

センス鎖は配列番号 1 3 であり、アンチセンス鎖は配列番号 1 9 である d s R N A 、

センス鎖は配列番号 1 0 であり、アンチセンス鎖は配列番号 1 7 である d s R N A 、

センス鎖は配列番号 1 2 であり、アンチセンス鎖は配列番号 1 8 である d s R N A 、

センス鎖は配列番号 1 4 であり、アンチセンス鎖は配列番号 1 9 である d s R N A 、 30

センス鎖は配列番号 9 であり、アンチセンス鎖は配列番号 2 0 である d s R N A 、

センス鎖は配列番号 1 5 であり、アンチセンス鎖は配列番号 1 7 である d s R N A 、 と

という態様の何れか 1 つである。

【 0 2 8 6 】

幾つかの実施形態において、上記 d s R N A は、

配列番号 9 及び配列番号 1 7 を含む d s R N A 、

配列番号 1 1 及び配列番号 1 8 を含む d s R N A 、

配列番号 1 3 及び配列番号 1 9 を含む d s R N A 、

配列番号 1 0 及び配列番号 1 7 を含む d s R N A 、

配列番号 1 2 及び配列番号 1 8 を含む d s R N A 、 40

配列番号 1 4 及び配列番号 1 9 を含む d s R N A 、

配列番号 9 及び配列番号 2 0 を含む d s R N A 、

配列番号 1 5 及び配列番号 1 7 を含む d s R N A 、 という群の何れか 1 つから選ばれる

。

【 0 2 8 7 】

幾つかの実施形態において、上記 d s R N A は、

配列番号 9 及び配列番号 1 7 である d s R N A 、

配列番号 1 1 及び配列番号 1 8 である d s R N A 、

配列番号 1 3 及び配列番号 1 9 である d s R N A 、

配列番号 1 0 及び配列番号 1 7 である d s R N A 、 50

配列番号 12 及び配列番号 18 である dsRNA、
 配列番号 14 及び配列番号 19 である dsRNA、
 配列番号 9 及び配列番号 20 である dsRNA、
 配列番号 15 及び配列番号 17 である dsRNA、 という態様の何れか 1 つである。

【0288】

幾つかの実施形態において、上記 dsRNA は、
 配列番号 9 に示されるセンス鎖及び配列番号 17 に示されるアンチセンス鎖を含むか又は
 はから選ばれる dsRNA、
 配列番号 9 に示されるセンス鎖及び配列番号 20 に示されるアンチセンス鎖を含むか又は
 はから選ばれる dsRNA、
 配列番号 11 に示されるセンス鎖及び配列番号 18 に示されるアンチセンス鎖を含むか
 又はから選ばれる dsRNA、
 配列番号 13 に示されるセンス鎖及び配列番号 19 に示されるアンチセンス鎖を含むか
 又はから選ばれる dsRNA、
 配列番号 10 に示されるセンス鎖及び配列番号 17 に示されるアンチセンス鎖を含むか
 又はから選ばれる dsRNA、
 配列番号 12 に示されるセンス鎖及び配列番号 18 に示されるアンチセンス鎖を含むか
 又はから選ばれる dsRNA、
 配列番号 14 に示されるセンス鎖及び配列番号 19 に示されるアンチセンス鎖を含むか
 又はから選ばれる dsRNA、
 配列番号 15 に示されるセンス鎖及び配列番号 17 に示されるアンチセンス鎖を含むか
 又はから選ばれる dsRNA、 という群の何れか 1 つから選ばれる。

10

20

【0289】

幾つかの具体的な実施形態において、HBV-X を標的とする dsRNA は、
 配列番号 9 及び配列番号 17 である dsRNA、
 配列番号 10 及び配列番号 17 である dsRNA、
 配列番号 9 及び配列番号 20 である dsRNA、
 配列番号 15 及び配列番号 17 である dsRNA、 という態様の何れか 1 つである。

【0290】

幾つかの具体的実施形態において、HBV-S を標的とする dsRNA は、
 配列番号 11 及び配列番号 18 である dsRNA、
 配列番号 13 及び配列番号 19 である dsRNA、
 配列番号 12 及び配列番号 18 である dsRNA、
 配列番号 14 及び配列番号 19 である dsRNA、 という態様の何れか 1 つである。

30

【0291】

本開示において、5' - 3' 方向に従って、

配列番号 9 は

GmsUm sGmUmGmCmAfCfUfUmCmGmCmUmUmCmA mCmC
 m - NAG0052' であり、

配列番号 10 は

GmsUm sGmUmGfCmAfCfUfUmCmGmCmUmUmCmA mCmC
 m - NAG0052' であり、

配列番号 11 は

CmsUm sUmUmUfGmUfCfUfUmUmGmGmGmUmAmUmAmU
 m - NAG0052' であり、

配列番号 12 は

CmsUm sUmUmUmGmUfCfUfUmUmGmGmGmUmAmUmAmU
 m - NAG0052' であり、

配列番号 13 は

UmsUm sAmCmCfAmAfUfUfUmUmCmUmUmUmUmGmUmU

40

50

m - N A G 0 0 5 2 ' であり、

配列番号 1 4 は

U m s U m s A m C m C m A m A f U f U f U m U m C m U m U m U m U m G m U m U

m - N A G 0 0 5 2 ' であり、

配列番号 1 5 は

G m s U m s G m U m G m C m A f C f U f U m C m G m C m U m U m C m A m C m U

m - N A G 0 0 5 2 ' であり、

配列番号 1 7 は

A m s G f s U m G f A m A f (-) h m p N A (G) C m G m A f A m G f U m G f
C m A f C m A f C m s G m s G m であり、

10

配列番号 1 8 は

A m s U f s A m U f A m C f (-) h m p N A (C) C m A m A f A m G f A m C f
A m A f A m A f G m s A m s A m であり、

配列番号 1 9 は

A m s A f s C m A f A m A f (-) h m p N A (A) G m A m A f A m A f U m U f
G m G f U m A f A m s C m s A m であり、

配列番号 2 0 は

I m s G f s U m G f A m A f (-) h m p N A (G) C m G m A f A m G f U m G f
C m A f C m A f C m s G m s G m であり、

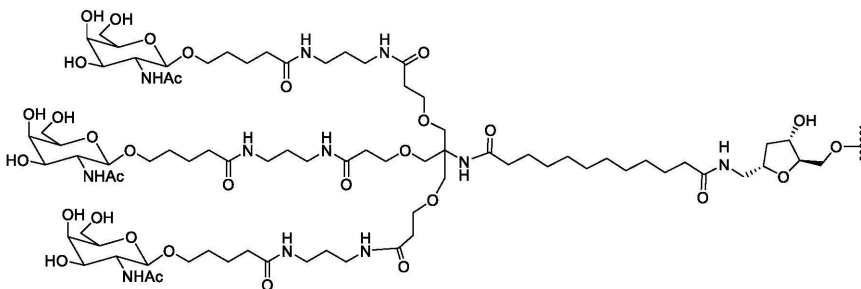
そのうち、A f = アデニン 2' - F リボヌクレオシド (adenine 2' - F r i 20
bonucleoside)、C f = シトシン 2' - F リボヌクレオシド (c y t o s i
ne 2' - F r i b o n u c l e o s i d e)、U f = ウラシル 2' - F リボヌクレオ
シド (u r a c i l 2' - F r i b o n u c l e o s i d e)、G f = グアニン 2' -
F リボヌクレオシド (g u a n i n e 2' - F r i b o n u c l e o s i d e)、A
m = アデニン 2' - O M e リボヌクレオシド (adenine 2' - O M e r i b o n
u c l e o s i d e)、C m = シトシン 2' - O M e リボヌクレオシド (c y t o s i
n e 2' - O M e r i b o n u c l e o s i d e)、G m = グアニン 2' - O M e リボヌ
クレオシド (g u a n i n e 2' - O M e r i b o n u c l e o s i d e)、U m =
ウラシル 2' - O M e リボヌクレオシド (u r a c i l 2' - O M e r i b o n u c l
e o s i d e)、I m = ヒポキサンチン 2' - O M e リボヌクレオシド (h y p o x a n
t h i n e 2' - O M e r i b o n u c l e o s i d e)、

30

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、チオホスホジエステル基
による連結であることを表し、

N A G 0 0 5 2 ' は

【化 1 2 8】



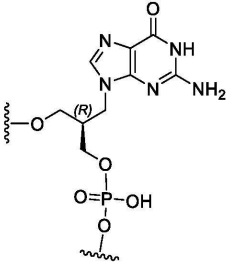
40

を表し、

(-) h m p N A (G) は

50

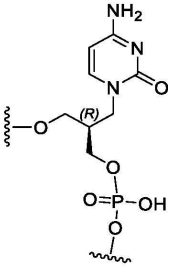
【化 1 2 9】



を表し、(-) h m p N A (C) は

10

【化 1 3 0】

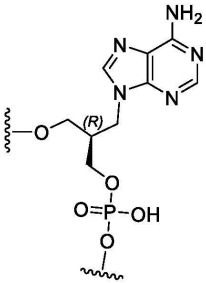


を表し、

20

(-) h m p N A (A) は

【化 1 3 1】



30

を表す。

【 0 2 9 2】

幾つかの実施形態において、上記 d s R N A は、

40

50

Cf = シトシン 2' - F リボヌクレオシド (cytosine 2' - F ribonucleoside)、

Gf = グアニン 2' - F リボヌクレオシド (guanine 2' - F ribonucleoside)、

Uf = ウラシル 2' - F リボヌクレオシド (uracil 2' - F ribonucleoside)、

Am = アデニン 2' - OMe リボヌクレオシド (adenine 2' - OMe ribonucleoside)、

Cm = シトシン 2' - OMe リボヌクレオシド (cytosine 2' - OMe ribonucleoside)、

Gm = グアニン 2' - OMe リボヌクレオシド (guanine 2' - OMe ribonucleoside)、

Um = ウラシル 2' - OMe リボヌクレオシド (uracil 2' - OMe ribonucleoside)、

Im = ヒポキサンチン 2' - OMe リボヌクレオシド (Inosine 2' - OMe ribonucleoside)、

【化 134】



20

はチオホスホジエステル基を表し、

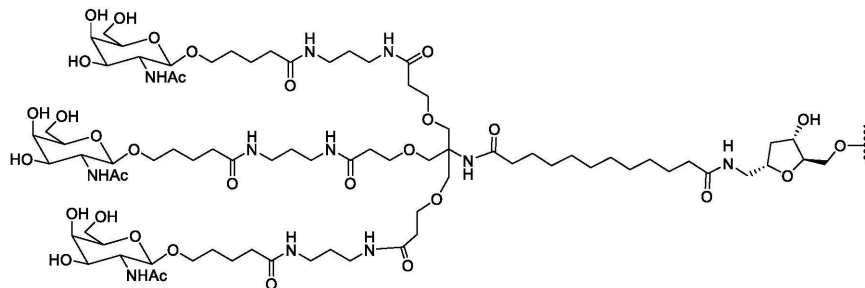
【化 135】



はホスホジエステル基を表し、

NAG0052' は

【化 136】



30

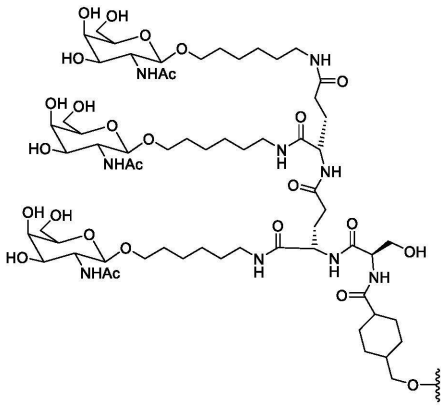
を表し、

NAG1 は

40

50

【化 1 3 7】

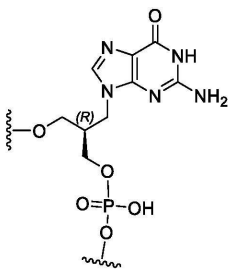


10

を表し、

(-) h m p N A (G) は

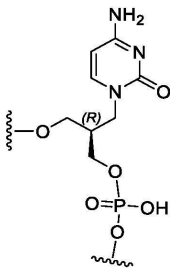
【化 1 3 8】



20

を表し、(-) h m p N A (C) は

【化 1 3 9】

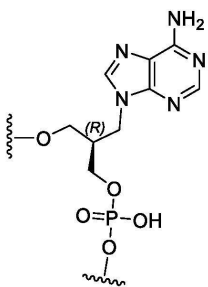


30

を表し、

(-) h m p N A (A) は

【化 1 4 0】



40

を表す。

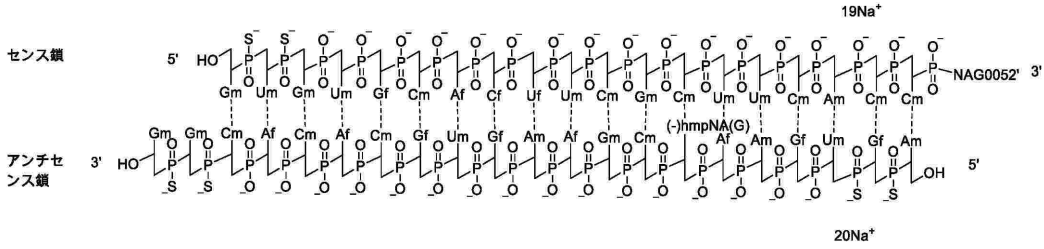
【 0 2 9 3】

幾つかの実施形態において、上記薬学的に許容される塩は、ナトリウム塩、カリウム塩、アンモニウム塩、アミン塩などを含むが、これらに限定されない、本分野における従来の塩であってもよい。

【 0 2 9 4】

50

【化144】

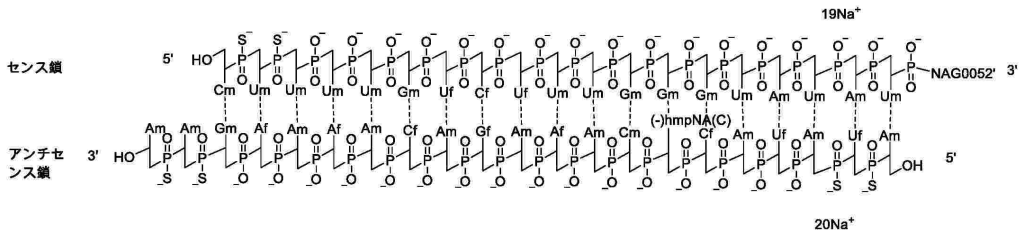


【0303】

幾つかの実施形態において、上記 dsRNA は TRD007994 - 1 であり、その構造は以下の通りである。

【0304】

【化145】

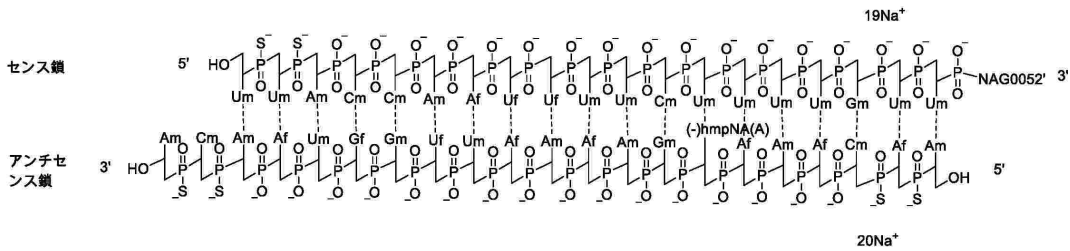


【0305】

幾つかの実施形態において、上記 dsRNA は TRD007995 - 1 であり、その構造は以下の通りである。

【0306】

【化146】

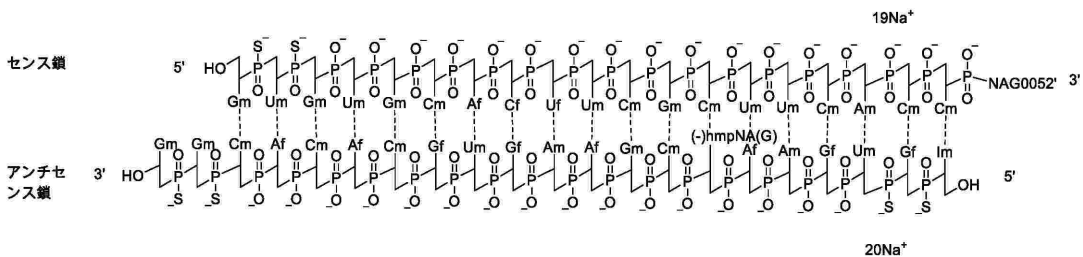


【0307】

幾つかの実施形態において、上記 dsRNA は TJR100259 であり、その構造は以下の通りである。

【0308】

【化147】



【0309】

10

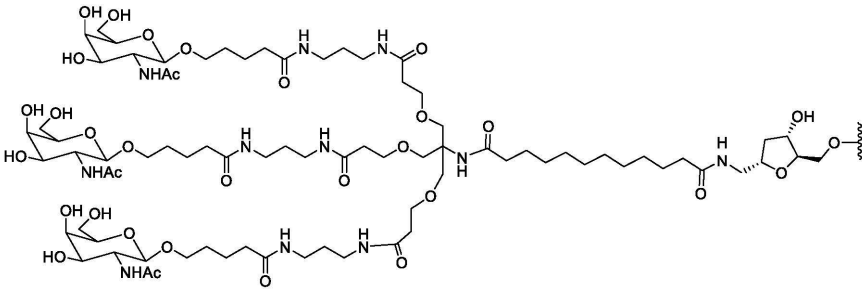
20

30

40

50

【化 1 5 2】

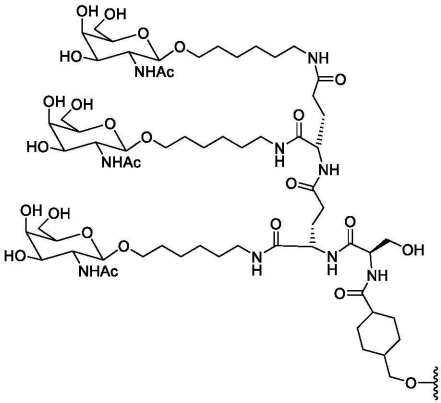


10

を表し、

N A G 1 は

【化 1 5 3】

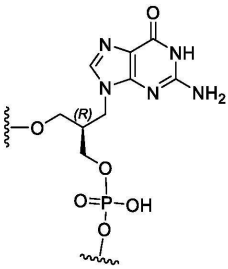


20

を表し、

(-) h m p N A (G) は

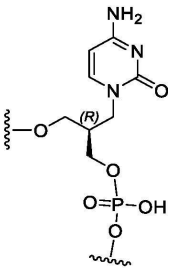
【化 1 5 4】



30

を表し、(-) h m p N A (C) は

【化 1 5 5】



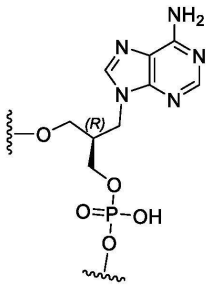
40

を表し、

(-) h m p N A (A) は

50

【化 1 5 6】



を表す。

10

【0 3 1 4】

幾つかの実施形態において、上記薬学的に許容される塩は、ナトリウム塩、カリウム塩、アンモニウム塩、アミン塩などを含むが、これらに限定されない、本分野における従来の塩であってもよい。

【0 3 1 5】

別の態様において、本開示は、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含む dsRNA を提供し、上記センス鎖及びアンチセンス鎖は、

センス鎖のヌクレオチド配列は配列番号 1 を含み、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列は配列番号 5 を含み、

センス鎖のヌクレオチド配列は配列番号 2 を含み、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列は配列番号 6 を含み、

センス鎖のヌクレオチド配列は配列番号 3 を含み、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列は配列番号 7 を含み、

センス鎖のヌクレオチド配列は配列番号 4 を含み、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列は配列番号 5 を含み、

センス鎖のヌクレオチド配列は配列番号 1 を含み、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列は配列番号 8 を含む、という群の何れか 1 つから選ばれる。

20

【0 3 1 6】

幾つかの実施形態において、上記 dsRNA のセンス鎖及びアンチセンス鎖は、

センス鎖のヌクレオチド配列は配列番号 1 であり、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列は配列番号 5 であり、

センス鎖のヌクレオチド配列は配列番号 2 であり、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列は配列番号 6 であり、

センス鎖のヌクレオチド配列は配列番号 3 であり、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列は配列番号 7 であり、

センス鎖のヌクレオチド配列は配列番号 4 であり、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列は配列番号 5 であり、

センス鎖のヌクレオチド配列は配列番号 1 であり、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列は配列番号 8 である、という群の何れか 1 つから選ばれる。

30

【0 3 1 7】

本開示に記載の siRNA、dsRNA は、合成由来又はインビトロで調製されるものから選ばれる。

40

【0 3 1 8】

医薬組成物

別の態様において、本開示は、本開示に記載の dsRNA から選ばれる合成由来の化合物又はインビトロで調製される化合物を提供する。

【0 3 1 9】

別の態様において、本開示は、上記 dsRNA を含む医薬組成物を提供する。

【0 3 2 0】

幾つかの実施形態において、上記医薬組成物は、1 つ又は複数の薬学的に許容される賦

50

形剤を更に含む。

【0321】

幾つかの実施形態において、上記医薬組成物は、1つ又は複数の他の治療剤を更に含む。

【0322】

幾つかの実施形態において、上記医薬組成物は、本開示に記載の dsRNA 及び1つ又は複数の他の治療剤を活性成分として含む。

【0323】

幾つかの実施形態において、上記医薬組成物の dsRNA は、1つ又は複数の他の治療剤と組み合わせて使用される。

【0324】

幾つかの具体的な実施形態において、上記他の治療剤は、抗ウイルス剤、逆転写酵素阻害剤、免疫刺激剤、治療用ワクチン、ウイルス侵入阻害剤、HbsAg の分泌又は放出を阻害するオリゴヌクレオチド、キャプシド阻害剤、共有結合性閉鎖環状 (ccc) HBV DNA 阻害剤から選ばれる。

【0325】

種々の薬物送達システムは既知のもので、本開示に係る dsRNA 又は医薬組成物に適用可能であり、例えば、リポソーム中へのパッケージ、微小粒子、マイクロカプセル、当該化合物を発現可能な組換え細胞、受容体媒介性の細胞エンドサイトーシス、逆転写ウイルス又は他のベクターの一部となる核酸の構築である。

【0326】

幾つかの実施形態において、本開示に記載の dsRNA 又は医薬組成物は、従来通りに投与され、局所（例えば、直接注射若しくは移植）又は全身投与によって、又は経口、直腸若しくは非経口経路によって投与され、上記非経口経路は皮下注射、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、経皮投与、吸入投与（例えば、エアロゾル）、粘膜投与（例えば、舌下、鼻腔内投与）、頭蓋内投与などを含むが、これらに限定されない。

【0327】

幾つかの実施形態において、本開示により提供される dsRNA 又は医薬組成物は、注射、例えば、静脈内、筋肉内、皮内、皮下、十二指腸内又は腹腔内注射により投与されてもよい。

【0328】

幾つかの実施形態において、本開示によって提供される dsRNA 又は医薬組成物は、試薬キットにパッケージされ得る。

【0329】

使用及び治療方法

別の態様において、本開示は、薬剤の調製における本開示に記載の dsRNA 又は医薬組成物の使用を提供する。

【0330】

幾つかの実施形態において、上記薬剤は、対象における B 型肝炎ウイルス (HBV) 感染の予防及び / 又は治療に用いられる。

【0331】

幾つかの実施形態において、上記薬剤は、B 型肝炎ウイルス関連疾患の予防及び / 又は治療に用いられる。幾つかの実施形態において、上記 B 型肝炎ウイルス関連疾患は慢性肝炎であり、上記対象は HBeAg 陽性又は HBeAg 陰性である。

【0332】

幾つかの実施形態において、上記 B 型肝炎ウイルス関連疾患は、急性 B 型肝炎、慢性 B 型肝炎、D 型肝炎ウイルス感染症、D 型肝炎、肝線維症、進行性肝疾患及び肝細胞癌である。

【0333】

幾つかの実施形態において、上記 dsRNA 又は医薬組成物の有効量又は有効用量は、

10

20

30

40

50

約 0.001 mg/kg 体重 ~ 約 200 mg/kg 体重、約 0.01 mg/kg 体重 ~ 約 100 mg/kg 体重又は約 0.5 mg/kg 体重 ~ 約 50 mg/kg 体重である。

【0334】

別の態様において、本開示は、本開示に記載の dsRNA 又は医薬組成物の有効量又は有効用量を対象に投与することを含む、疾患を予防及び/又は治療する方法を提供する。

【0335】

幾つかの実施形態において、上記疾患は、B型肝炎ウイルス(HBV)感染症から選ばれる。幾つかの実施形態において、上記疾患は、B型肝炎ウイルス関連疾患から選ばれる。幾つかの実施形態において、上記B型肝炎ウイルス関連疾患は慢性肝炎であり、上記対象はHBeAg陽性又はHBeAg陰性である。

10

【0336】

幾つかの実施形態において、上記B型肝炎ウイルス関連疾患は、急性B型肝炎、慢性B型肝炎、D型肝炎ウイルス感染症、D型肝炎、肝線維症、進行性肝疾患及び肝細胞癌である。幾つかの実施形態において、本開示の方法は、別の治療剤を対象に投与することを更に含む。

【0337】

幾つかの実施形態において、上記別の治療剤は、抗ウイルス剤、逆転写酵素阻害剤、免疫刺激剤、治療用ワクチン、ウイルス侵入阻害剤、HbsAgの分泌又は放出を阻害するオリゴヌクレオチド、キャプシド阻害剤、cccDNA阻害剤、及び前述のものの何れかの組み合わせから選ばれる。

20

【0338】

幾つかの実施形態において、上記 dsRNA 又は医薬組成物の有効量又は有効用量は、約 0.001 mg/kg 体重 ~ 約 200 mg/kg 体重、約 0.01 mg/kg 体重 ~ 約 100 mg/kg 体重又は約 0.5 mg/kg 体重 ~ 約 50 mg/kg 体重である。別の態様において、本開示は、体内又は体外で細胞における標的遺伝子又はその mRNA をサイレンシングするための方法であって、上記 dsRNA 又は上記医薬組成物を当該細胞に導入するステップを含む方法を提供する。

【0339】

幾つかの実施形態において、上記標的遺伝子は、HBV(例えば、HBV-S、HBV-X)を標的とする遺伝子を含むが、これに限定されない。

30

【0340】

標的遺伝子の抑制方法

別の態様において、本開示は、対象に有効量又は有効用量の本開示に記載の dsRNA 又は本開示に記載の医薬組成物を投与することを含む、標的遺伝子又はその mRNA の発現を阻害する方法を提供する。

【0341】

幾つかの実施形態において、上記標的遺伝子は、HBV(例えば、HBV-S、HBV-X)を含むが、これに限定されない。

【0342】

幾つかの実施形態において、上記対象は、既にこの前に、標的とされた細胞、細胞集団、組織又は対象において標的遺伝子又はその mRNA の病理学的アップレギュレーションを有すると同定された。

40

【0343】

本開示は、細胞を本開示の dsRNA 及び/又は医薬組成物と接触させることによって、細胞における HBV の複製を阻害するステップを含む、細胞における B型肝炎ウイルス(HBV)の複製を阻害する方法を更に提供する。幾つかの実施形態において、細胞は対象の体内にある。幾つかの実施形態において、細胞はインビトロである。

【0344】

本開示は、HBVに感染した対象におけるB型肝炎ウイルス(HBV)抗原のレベルを低下させる方法であって、本開示の dsRNA 及び/又は医薬組成物の治療有効量を対象

50

に投与し、それによって対象におけるHBV抗原のレベルを低下させることを含む、方法を更に提供する。幾つかの実施形態において、HBV抗原はHBsAgである。幾つかの実施形態において、HBV抗原はHBeAgである。幾つかの実施形態において、上記対象はHBeAg陽性である。幾つかの実施形態において、上記対象はHBeAg陰性である。

【0345】

送達方法

別の態様において、本開示は、肝臓にオリゴヌクレオチドを送達する方法であって、上記dsRNA又は上記医薬組成物の有効量又は有効量を対象に投与することを含む方法を提供する。

【0346】

幾つかの実施形態において、上記dsRNA又は医薬組成物の有効量又は有効用量は、約0.001mg/kg体重～約200mg/kg体重、約0.01mg/kg体重～約100mg/kg体重又は約0.5mg/kg体重～約50mg/kg体重である。

【0347】

別の態様において、本開示は、上記dsRNA又は上記医薬組成物を含むRNAi(RNA干渉)剤を提供する。

【0348】

幾つかの実施形態において、上記dsRNA又は医薬組成物の有効量又は有効用量は、約0.001mg/kg体重～約200mg/kg体重、約0.01mg/kg体重～約100mg/kg体重又は約0.5mg/kg体重～約50mg/kg体重である。

【0349】

別の態様において、本開示は、上記dsRNA又は上記医薬組成物を含む細胞を更に提供する。

【0350】

別の態様において、本開示は、上記dsRNA又は上記医薬組成物を含む試薬キット又はキットを更に提供する。

【0351】

本開示において、上記dsRNA又は医薬組成物は標的遺伝子を発現した細胞に接触する場合、測定されるように(例えば、psiCHECK活性スクリーニング、ルシフェラーゼレポーター遺伝子検出法、PCR又は分岐DNA(bDNA)に基づく方法、又はタンパク質に基づく方法、例えば、免疫蛍光分析法、Western Blot、又はフローサイトメトリーなどにより)、上記dsRNA又は医薬組成物は、標的遺伝子の発現を少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%阻害することになる。

【0352】

本開示において、上記dsRNA又は医薬組成物は標的遺伝子を発現した細胞に接触する場合、測定されるように(例えば、psiCHECK活性スクリーニング、ルシフェラーゼレポーター遺伝子検出法、PCR又は分岐DNA(bDNA)に基づく方法、又はタンパク質に基づく方法、例えば、免疫蛍光分析法、Western Blot、又はフローサイトメトリーなどにより)、上記dsRNA又は医薬組成物による標的遺伝子mRNAの余剰発現百分率は99%以下、95%以下、90%以下、85%以下、80%以下、75%以下、70%以下、65%以下、60%以下、55%以下、50%以下、45%以下、40%以下、35%以下、30%以下、25%以下、20%以下、15%以下、又は10%以下である。

10

20

30

40

50

【0353】

本開示において、上記 dsRNA 又は医薬組成物は標的遺伝子を発現した細胞に接触する場合、測定されるように（例えば、psiCHECK 活性スクリーニング、ルシフェラーゼレポーター遺伝子検出法、PCR 又は分岐 DNA (bDNA) に基づく方法、又はタンパク質に基づく方法、例えば、免疫蛍光分析法、Western Blot、又はフローサイトメトリーなどにより）、dsRNA はオンターゲット活性を維持しながら、オフターゲット活性を少なくとも 20%、少なくとも 25%、少なくとも 30%、少なくとも 35%、少なくとも 40%、少なくとも 45%、少なくとも 50%、少なくとも 55%、少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70% 又は少なくとも 75% 低減させる。

10

【0354】

本開示において、上記 dsRNA 又は医薬組成物は標的遺伝子を発現した細胞に接触する場合、測定されるように（例えば、psiCHECK 活性スクリーニング、ルシフェラーゼレポーター遺伝子検出法、PCR 又は分岐 DNA (bDNA) に基づく方法、又はタンパク質に基づく方法、例えば、免疫蛍光分析法、Western Blot、又はフローサイトメトリーなどにより）、dsRNA はオンターゲット活性を多くとも 20%、多くとも 19%、多くとも 15%、多くとも 10%、多くとも 5% 又は多くとも 1% 低下させると共に、オフターゲット活性を少なくとも 20%、少なくとも 25%、少なくとも 30%、少なくとも 35%、少なくとも 40%、少なくとも 45%、少なくとも 50%、少なくとも 55%、少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70% 又は少なくとも 75% 低減させる。

20

【0355】

本開示において、上記 dsRNA 又は医薬組成物は標的遺伝子を発現した細胞に接触する場合、測定されるように（例えば、psiCHECK 活性スクリーニング及びルシフェラーゼレポーター遺伝子検出法、PCR 又は分岐 DNA (bDNA) に基づく方法、又はタンパク質に基づく方法、例えば、免疫蛍光分析法、Western Blot、又はフローサイトメトリーなどにより）、dsRNA 又は医薬組成物は、オンターゲット活性を少なくとも 1%、少なくとも 5%、少なくとも 10%、少なくとも 15%、少なくとも 20%、少なくとも 25%、少なくとも 30%、少なくとも 35%、少なくとも 40%、少なくとも 45%、少なくとも 50%、少なくとも 55%、少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75% 又は少なくとも 80% を向上させると共に、オフターゲット活性を少なくとも 20%、少なくとも 25%、少なくとも 30%、少なくとも 35%、少なくとも 40%、少なくとも 45%、少なくとも 50%、少なくとも 55%、少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70% 又は少なくとも 75% 低減させる。

30

【0356】

本開示は、本開示に記載のリガンド、siRNA、dsRNA 又は医薬組成物を合成することを含む、dsRNA 又は医薬組成物を調製する方法を更に提供する。

【0357】

用語の説明

本開示が更に容易に理解されるように、以下、幾つかの技術・科学用語を具体的に定義する。本願で別途明確に定義しない限り、本願に使用される他の技術・科学用語の全ては、当業者に通常理解されている意味を持っている。

40

【0358】

本開示に係る化合物は、特定の幾何又は立体異性体の形態があってもよい。本開示は、シス・トランス異性体、(-) - と (+) - エナンチオマー、(R) - と (S) - エナンチオマー、ジアステレオマー、(D) - 異性体、(L) - 異性体、及びそのラセミ混合物と他の混合物、例えば、エナンチオマーやジアステレオマーに富む混合物のような混合物の全てを含め、このような化合物の全ては本開示の範囲に含まれることを意図する。アルキル基などの置換基には、他の不斉炭素原子があってもよい。このような異性体及びそれ

50

らの混合物の全ては、本開示の範囲に含まれる。本開示に係る不斉炭素原子を含む化合物は、光学活性純品の形態又はラセミ形態で単離されることができ、光学活性純品の形態は、ラセミ混合物から分割され、或いはキラル原料又はキラル試薬を使用することにより合成されてもよい。

【0359】

キラル合成又はキラル試薬又は他の通常の技術により、光学活性の(R)-と(S)-異性体及びDとL異性体を調製することができる。本開示のある化合物の1つのエナンチオマーを得るには、不斉合成又はキラル助剤を有する誘導作用により調製することができ、ここで、得られたジアステレオマー混合物を単離し、且つ基の分裂を補助することにより、必要なエナンチオマーの純品を提供する。或いは、分子に塩基性官能基(例えば、アミノ基)又は酸性官能基(例えば、カルボキシ基)が含まれる場合、適当な光学活性の酸又は塩基と共にジアステレオマーの塩を形成し、そしてこの分野でよく知られている通常の方法によりジアステレオマー分割を行い、その後、回収してエナンチオマーの純品を得る。なお、エナンチオマーとジアステレオマーの単離は、一般的にクロマトグラフィーを使用することにより完成され、上記クロマトグラフィーはキラル固定相を採用し、且つ任意選択的に化学誘導法と組み合わせる(例えば、アミンからカルバメートを生成する)。

10

【0360】

本開示に記載される化合物の化学構造において、「

【化157】

／

20

」という結合は配置が指定されていないことを示し、即ち、化学構造にキラル異性体が存在する場合、「

【化158】

／

」という結合は「

【化159】

.....

30

」又は「

【化160】

／

」であってもよく、或いは「

【化161】

.....

」及び「

【化162】

／

40

」という2つの配置を同時に含んでもよい。本開示に記載される化合物の化学構造において、「

【化163】

／

」という結合は、配置が指定されておらず、即ち、「

【化164】

／

50

」という結合の配置はE配置又はZ配置であってもよく、或いはEとZという2つの配置を同時に含んでもよい。

【0361】

本開示の化学構造式において、「

【化165】



」、

【化166】



10

」又は「

【化167】



」は、本明細書に記載される発明の範囲に従って、1つ又は複数の任意の基に結合することができ、アスタリスク「*」はキラル中心を表す。

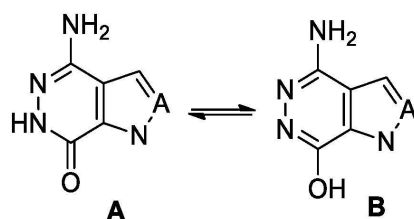
【0362】

配置が明示されていない場合、本開示の化合物と中間体は、異なる互変異性体形態で存在してもよく、且つ、このような形態の全ては本開示の範囲内に含まれる。「互変異性体」又は「互変異性体形態」という用語は、低いエネルギー障壁により相互変換可能な異なるエネルギーの構造異性体を指す。例えば、プロトン互変異性体（プロトン移動互変異性体ともいう）は、例えば、ケト-エノール及びイミン-エナミン、ラクタム-ラクチム異性化などのプロトリスによる相互変換を含む。ラクタム-ラクチム平衡の実例は、以下に示すようなAとBの間である。

20

【0363】

【化168】



30

本開示における化合物の全ては、A型又はB型に描かれることができる。全ての互変異性形態は、本発明の範囲にある。化合物の命名は、何れの互変異性体も排除しない。

【0364】

本開示は、本願に記載されるものと同じであるが、1つ又は複数の原子が、自然界で通常見られる原子量又は質量数と異なる原子量又は質量数を有する原子で置換された同位体標識の幾つかの本開示の化合物を更に含む。本開示の化合物に結合可能な同位体の実例は、水素、炭素、窒素、酸素、リン、硫黄、フッ素、ヨウ素及び塩素の同位体を含み、例えば、それぞれ²H、³H、¹¹C、¹³C、¹⁴C、¹³N、¹⁵N、¹⁵O、¹⁷O、¹⁸O、³¹P、³²P、³⁵S、¹⁸F、¹²³I、¹²⁵I及び³⁶Clなどである。

40

【0365】

特に説明のない限り、1つの位置が特に重水素(D)と指定される場合、当該位置は、重水素の天然存在度(0.015%である)よりも少なくとも1000倍高い存在度を有する重水素(即ち、少なくとも10%の重水素が組み込まれた)であると理解すべきである。例における化合物の、重水素の天然存在度よりも高い存在度を有することは、少なくとも1000倍の存在度の重水素、少なくとも2000倍の存在度の重水素、少なくとも3000倍の存在度の重水素、少なくとも4000倍の存在度の重水素、少なくとも50

50

00倍の存在度の重水素、少なくとも6000倍の存在度の重水素又はそれ以上の存在度の重水素であってもよい。本開示は、種々の重水素化形態の式(I)、式(I')、式(II)の化合物を更に含む。炭素原子に連結されるそれぞれの利用可能な水素原子は、独立的に重水素原子で置換されてもよい。当業者は、関連文献を参照して重水素化形態の式(I)、式(I')、式(II)の化合物を合成することができる。重水素化形態の式(I)、式(I')、式(II)の化合物は、調製する場合、市販の重水素化出発物質を使用してもよく、或いは、通常の技術により重水素化試薬で合成されてもよく、重水素化試薬は、重水素化ボラン、三重水素化ボラントラヒドロフラン溶液、重水素化水素化アルミニウムリチウム、重水素化ヨードエタン及び重水素化ヨードメタンなどを含むが、これらに限定されない。

10

【0366】

特に説明のない限り、「任意選択的に」、「任意選択的」、「選択可能的に」又は「選択可能的」は、その後に説明される事象又は状況が生じてもよいが、生じなくてもよいことを意味し、この説明は、当該事象又は状況が生じる場合と生じない場合を含む。例えば、「任意選択的に、 R_1 と R_2 は環になるように直接連結している」とは、 R_1 と R_2 は環になるように直接連結してもよいが、存在する必要はないことを意味し、当該説明には、 R_1 と R_2 が環になるように直接連結する場合と、 R_1 と R_2 が環を形成しない場合とが含まれる。

【0367】

「約」又は「ほぼ」という用語は、数値が当業者により測定される具体値の許容可能な誤差範囲にあることを意味し、上記数値部分が如何に計測又は測定するか(即ち、計測システムの限度)によって決められる。例えば、「約」は、標準偏差の範囲内であることを意味してもよい。或いは、「約」又は「基本的に含む」は、多くとも20%の範囲、例えば、1%~15%の間、1%~10%の間、1%~5%の間、0.5%~5%の間、0.5%~1%の間に変化することを意味してもよく、本開示では、数字又は数値範囲の前に「約」という用語がある何れの場合も、所定の数の実施形態を含む。特に説明のない限り、具体値が本願及び特許請求の範囲に現れる場合、「約」又は「基本的に含む」の意味は、当該具体値の許容可能な誤差範囲内にあると仮定すべきである。

20

【0368】

本開示において、「含む」という用語は、「...からなる」と置き換えることができる。

30

【0369】

特に明記しない限り、本開示の「化合物」、「化合修飾」、「リガンド」、「dsRNA」、「核酸」及び「RNAi」は何れも、独立的に、塩、混合塩又は非塩(例えば、遊離酸又は遊離塩基)の形態で存在することができる。塩又は混合塩の形態で存在する場合、それは薬学的に許容される塩であってもよい。

【0370】

「薬学的に許容される塩」は、無機塩又は有機塩から選ばれてもよく、薬学的に許容される酸付加塩及び薬学的に許容される塩基付加塩も含んでもよい。

【0371】

「薬学的に許容される酸付加塩」は、他の副作用無しに遊離塩基の生物学的利用率を保持することができる、無機酸又は有機酸と形成された塩を指す。無機酸塩は塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩などを含むが、これらに限定されず、有機酸塩はギ酸塩、酢酸塩、2,2-ジクロロ酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、プロピオン酸塩、カプロン酸塩、オクタン酸塩、デカン酸塩、ウンデシレン酸塩、グリコール酸塩、グルコン酸塩、乳酸塩、セバシン酸塩、アジピン酸塩、グルタル酸塩、マロン酸塩、シュウ酸塩、マレイン酸塩、コハク酸塩、フマル酸塩、酒石酸塩、クエン酸塩、パルミチン酸塩、ステアリン酸塩、オレイン酸塩、桂皮酸塩、ラウリン酸塩、リンゴ酸塩、グルタミン酸塩、ピログルタミン酸塩、アスパラギン酸塩、安息香酸塩、メシル酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、アルギン酸塩、アスコルビン酸塩、サリチル酸塩、4-アミノ

40

50

サリチル酸塩、ナフタレンジスルホン酸塩などを含むが、これらに限定されない。これらの塩は、本分野で知られている方法で調製することができる。

【0372】

「薬学的に許容される塩基付加塩」は、他の副作用無しに遊離酸の生物学的利用率を保持することができる、無機塩基又は有機塩基と形成された塩を指す。無機塩基から誘導された塩は、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩、アンモニウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、鉄塩、亜鉛塩、銅塩、マンガン塩、アルミニウム塩などを含むが、これらに限定されない。好ましい無機塩は、アンモニウム塩、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩及びマグネシウム塩であり、ナトリウム塩が好ましい。有機塩基から誘導された塩は、以下の塩、即ち、第1級アミン類、第2級アミン類及び第3級アミン類、天然の置換されたアミン類を含む置換されたアミン類、環状アミン類及び塩基性イオン交換樹脂、例えば、アンモニア、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、ジエチルアミン、トリエチルアミン、トリプロピルアミン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、ジメチルエタノールアミン、2-ジメチルアミノエタノール、2-ジエチルアミノエタノール、ジシクロヘキシルアミン、リジン、アルギニン、ヒスチジン、カフェイン、プロカイン、コリン、グリシンベタイン、エチレンジアミン、グルコサミン、メチルグルコサミン、テオプロミン、プリン、ピペラジン、ピペリジン、N-エチルピペリジン、ポリアミド樹脂などを含むが、これらに限定されない。好ましい有機塩基は、イソプロピルアミン、ジエチルアミン、エタノールアミン、トリメチルアミン、ジシクロヘキシルアミン、コリン及びカフェインを含む。これらの塩は、本分野で知られている方法で調製することができる。

10

20

【0373】

「アルキル基」は、例えば、1個～30個の炭素原子を含む直鎖及び分岐鎖基(C₁-C₃₀アルキル基)、又は例えば、1個～6個の炭素原子を含むアルキル(C₁-C₆アルキル基)、又は例えば、1個～3個の炭素原子を含むアルキル(C₁-C₃アルキル基)である、飽和脂肪族炭化水素基を意味する。非限定的な実施例は、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、tert-ブチル基、sec-ブチル基、n-ペンチル基、1,1-ジメチルプロピル基、1,2-ジメチルプロピル基、2,2-ジメチルプロピル基、及びその様々な分岐鎖異性体などを含む。

【0374】

「アルケニル基」という用語は、少なくとも1つの二重結合を含む炭化水素基を指す。アルケニル基の非限定的な実例は、ビニル基、1-プロペニル基、2-プロペニル基、1-ブテニル基又は2-ブテニル基及びその種々の分岐鎖異性体を含むが、これらに限定されない。

30

【0375】

「アルキニル基」という用語は、少なくとも1つの三重結合を含む炭化水素基を指す。アルキニル基の非限定的な実例は、エチニル基、1-プロピニル基、2-プロピニル基、1-ブチニル基又は2-ブチニル基及びその種々の分岐鎖異性体を含むが、これらに限定されない。

【0376】

「アルコキシ基」という用語は、-O-(アルキル基)を指し、そのうち、アルキル基の定義は上記の通りである。アルコキシ基の非限定的な実例は、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、ブトキシ基を含む。

40

【0377】

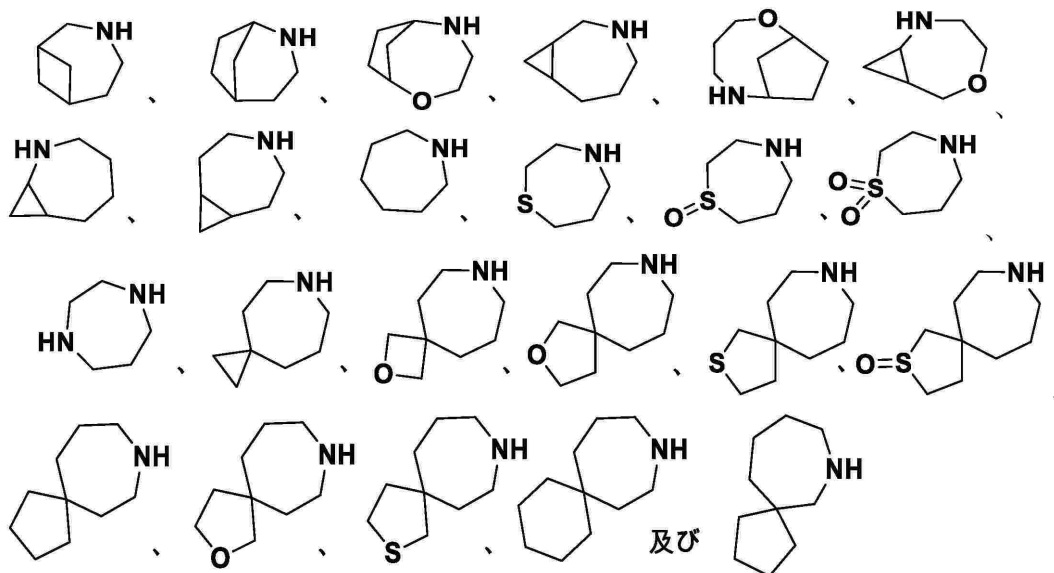
「シクロアルキル基」は、飽和又は部分不飽和の単環式又は多環式環状炭化水素置換基を指し、シクロアルキル環は3個～20個の炭素原子を含み、好ましくは3個～6個の炭素原子を含み、より好ましくは5個～6個の炭素原子を含む。単環式シクロアルキル基の非限定的な実例は、シクロプロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基、シクロペンテニル基、シクロヘキシル基、シクロヘキセニル基、シクロヘキサジエニル基などを含み、多環式シクロアルキル基は、スピロ環、縮合環及び架橋環のシクロアルキル基を含む。

50

【0378】

「ヘテロシクロアルキル基」は、飽和又は部分的に不飽和の単環又は多環式の環状炭化水素置換基であり、3個～20個の環原子を含み、そのうち、1つ又は複数の環原子は、窒素、酸素又は $S(O)_m$ （そのうち、 m は0～2の整数である）から選ばれるヘテロ原子であるが、 $-O-O-$ 、 $-O-S-$ 又は $-S-S-$ の環部分を含まず、残りの環原子は炭素である。好ましくは3個～12個の環原子を含み、そのうち、1個～4個はヘテロ原子であり、より好ましくは3個～7個の環原子を含む。「ヘテロシクロアルキル基」の非限定的な実例は、

【化169】



10

20

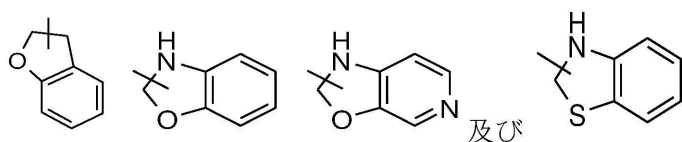
などを含む。

【0379】

上記ヘテロシクロアルキル環は、アリール基又はヘテロアリール基に縮合されてもよく、そのうち、母体構造に連結された環はヘテロシクロアルキル基であり、その非限定的な実例は、

30

【化170】



などを含む。

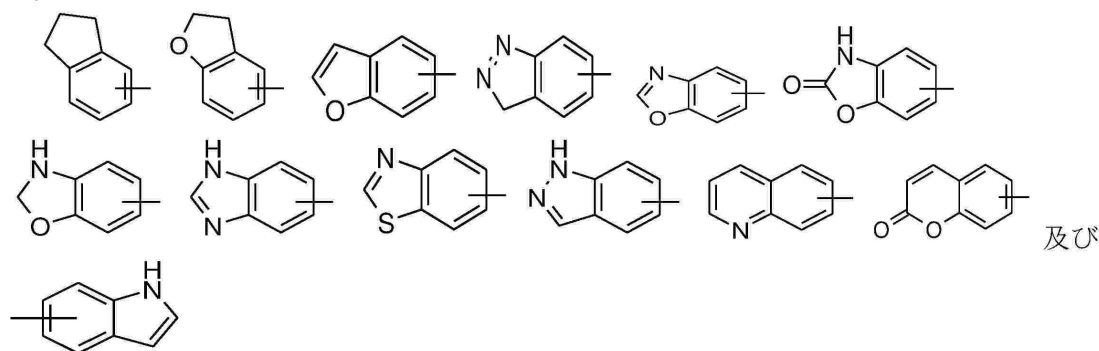
【0380】

「アリール基」は、共役した電子系を有する6～14員の全炭素単環式又は縮合多環式（即ち、隣接する炭素原子対を共有する環）の基を指し、好ましくは6～12員であり、例えば、フェニル基とナフチル基である。上記アリール基環は、ヘテロアリール基、ヘテロシクロアルキル基又はシクロアルキル基環に縮合してもよく、そのうち、母体構造に連結された環はアリール基環であり、その非限定的な実例は、

40

50

【化 1 7 1】



10

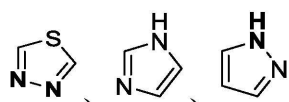
を含む。

【0 3 8 1】

「ヘテロアリアル基」は、1個～4個のヘテロ原子、5個～14個の環原子を含む複素芳香族系を指し、そのうち、ヘテロ原子は酸素、硫黄及び窒素から選ばれる。ヘテロアリアル基は、6～12員が好ましく、5員又は6員がより好ましい。例えば、その非限定的な実例は、イミダゾリル基、フリル基、チエニル基、チアゾリル基、ピラゾリル基、オキサゾリル基(oxazolyl)、イソオキサゾリル基(isoxazolyl)、ピロリル基、テトラゾリル基、ピリジル基、ピリミジニル基、チアジアゾリル基、ピラジニル基、トリアゾリル基、インダゾリル基、ベンゾイミダゾリル基、

20

【化 1 7 2】



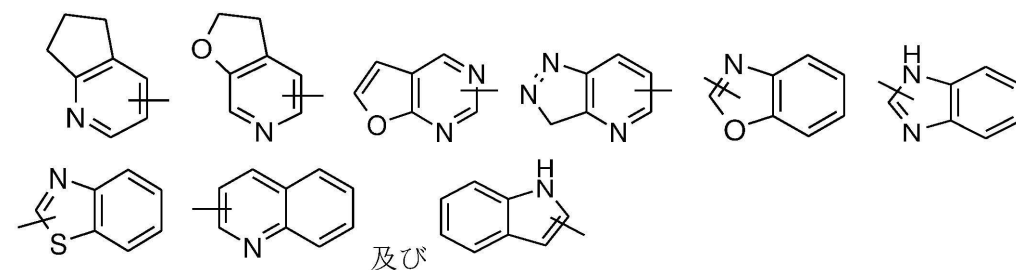
などを含む。

【0 3 8 2】

上記ヘテロアリアル基環は、アリアル基、ヘテロシクロアルキル基又はシクロアルキル基環に縮合してもよく、そのうち、母体構造に連結された環はヘテロアリアル基環であり、その非限定的な実例は、

30

【化 1 7 3】



を含む。

40

【0 3 8 3】

「ヒドロキシ基」という用語は、-OH基を指す。

【0 3 8 4】

「ハロゲン」という用語は、フッ素、塩素、臭素又はヨウ素を指す。

【0 3 8 5】

「シアノ基」という用語は、-CNを指す。

【0 3 8 6】

「アミノ基」という用語は、-NH₂を指す。

【0 3 8 7】

「ニトロ基」という用語は、-NO₂を指す。

50

【0388】

「オキソ」という用語は、=O置換基を指す。

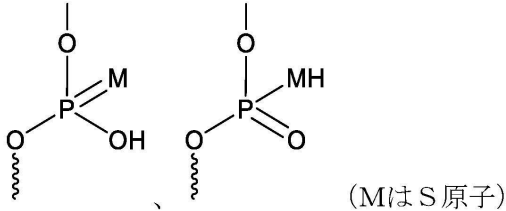
【0389】

本開示において、「ホスフェート基」は、ホスホモノエステル基、ホスホジエステル基又はホスホトリエステル基であってよく、好ましくはホスホジエステル基である。

【0390】

本開示において、チオホスホジエステル基は、非架橋酸素原子の1つを硫黄原子に置換して修飾したホスホジエステル基を指し、

【化174】



10

と互換的に使用される。

【0391】

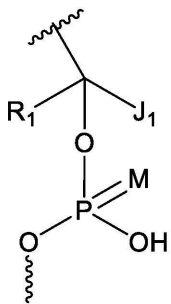
「置換される」とは、基の中の1つ又は複数の水素原子、好ましくは5個以下、より好ましくは1個～3個の水素原子が互いに独立的に対応する数の置換基で置換されることを指す。置換基がケトン又はオキソ（即ち、=O）である場合、原子上の2つ（2個）の水素が置換される。

20

【0392】

本開示の文脈において、

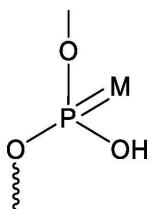
【化175】



30

という基における

【化176】



40

は、隣接するヌクレオチドと連結可能な任意の基で置換されることができる。

【0393】

「連結」という用語は、2つの分子間の繋がりを示す場合、2つの分子が共有結合で連結し、又は2つの分子が非共有結合（例えば、水素結合又はイオン結合）で繋がることを指し、直接的連結と間接的連結を含む。

【0394】

「直接的連結」という用語は、第1の化合物又は基と第2の化合物又は基が、何らの原子や原子団も介在することなく連結していることを指す。

50

【0395】

「間接的連結」という用語は、第1の化合物又は基と第2の化合物又は基が、中間基、化合物又は分子（例えば、連結基）を介して連結していることを指す。

【0396】

「医薬組成物」は、1種又は複数種の本明細書に記載の化合物又はその生理学的に薬用可能な塩又はプロドラッグと他の化学成分の混合物と、生理学的に薬用可能なベクター及び賦形剤などの他の成分とを含むことを意味する。医薬組成物は、生体への投与を促進し、活性成分の吸収に寄与して更に生物活性を発揮するためのものである。

【0397】

「薬学的に許容される賦形剤」は、承認された、ヒト又は家畜動物への使用が許容される任意の助剤、ベクター、流動促進剤、甘味料、希釈剤、防腐剤、染料/着色剤、着香剤、界面活性剤、湿潤剤、分散剤、懸濁化剤、安定剤、等張化剤、緩衝剤、溶媒又は乳化剤を含むが、これらに限定されない。

【0398】

本明細書に使用されるように、「阻害」という用語は、「低減」、「サイレンシング」、「ダウンレギュレーション」、「抑制」及び他の類似の用語と交換して使用可能であり、且つ、任意のレベルの阻害も含む。阻害は、これらの変数のうちの1つ又は複数の、対照レベルと比べる場合の絶対的又は相対的なレベルの低減によって評価可能である。この対照レベルは、この分野で使用されている何れの種類の対照レベルであってもよく、例えば、投与前基線レベル、又は類似の未処理の、若しくは対照（例えば、緩衝液対照又は不活性剤対照だけ）処理された対象、細胞や試料から決定されたレベルである。例えば、mRNA余剰発現量によって、siRNA（又はdsRNA）による標的遺伝子発現への阻害程度を表すことができ、例えば、mRNA余剰発現量は、99%以下、95%以下、90%以下、85%以下、80%以下、75%以下、70%以下、65%以下、60%以下、55%以下、50%以下、45%以下、40%以下、35%以下、30%以下、25%以下、20%以下、15%以下、又は10%以下である。標的遺伝子発現の抑制率は、Dual-Glo（登録商標）Luciferase Assay Systemにより検出し、それぞれホタル（Firefly）化学発光値とウミシイタケ（Renilla）化学発光値を読み取り、相対値Ratio = Ren / Fir、抑制率(%) = 1 - (Ratio + siRNA / レポーター遺伝子のみ) × 100%を算出することができ、本開示では、余剰mRNA発現量比率（又は余剰活性%）= 100% - 抑制率(%)である。

【0399】

「有効量」又は「有効用量」という用語は、医学病状の症状又は病状の改善や予防に十分な量を含む。有効量は、更に、診断の許容又は促進に十分な量を指す。特定の患者又は獣医学対象に用いられる有効量は、例えば、治療すべき病状、患者の全体的な健康状況、投与の方法経路と用量及び副作用の重症度などの要因によって変化することができる。有効量は、顕著な副作用又は毒性作用が回避される最大用量又は投与計画であってもよい。

【0400】

本明細書に使用されるように、「対象」、「患者」、「対象」又は「個体」は互い交換して使用可能であり、ヒト又は哺乳類などの非ヒト動物を含み、例えば、ヒトやサルである。

【0401】

本明細書で使用する場合、センス鎖（SS、SS鎖、又はセンス鎖とも呼ばれる）は、標的mRNA配列と同一又は実質的に同一の配列を含む鎖を指し、アンチセンス鎖（AS又はAS鎖とも呼ばれる）は、標的mRNA配列に相補的な配列を有する鎖を指す。

【0402】

本開示において、センス鎖又はアンチセンス鎖の「5'領域」即ち「5'端」、「5'末端」は互換的に使用される。例えば、アンチセンス鎖5'領域の2位から8位のヌクレオチドに代えて、アンチセンス鎖5'端の2位から8位のヌクレオチドに置換してもよい。

同様に、センス鎖又はアンチセンス鎖の「3'領域」、「3'末端」及び「3'端」も同様

10

20

30

40

50

に互換的に使用される。

【0403】

本明細書に記載の s i R N A センス鎖を説明する文脈において、「配列番号 1 ~ 配列番号 4 の何れか 1 つのヌクレオチド配列と 3 個以下のヌクレオチドの違いがある配列、且つ少なくとも 15 個の連続的なヌクレオチドを含む」という用語は、本明細書に記載の s i R N A センス鎖が、配列番号 1 ~ 配列番号 4 の何れか 1 つのセンス鎖の少なくとも 15 個の連続的なヌクレオチド、或いは配列番号 1 ~ 配列番号 4 の何れか 1 つのセンス鎖の少なくとも 15 個の連続的なヌクレオチドと 3 個以下のヌクレオチドの違いがある配列（任意選択的に、2 個以下のヌクレオチドの違いがある配列、任意選択的に、1 個以下のヌクレオチドの違いがある配列）を含むことを示すことを意図する。任意選択的に、本明細書に記載の s i R N A センス鎖は、配列番号 1 ~ 配列番号 4 の何れか 1 つのセンス鎖の少なくとも 16 個の連続的なヌクレオチド、或いは配列番号 1 ~ 配列番号 4 の何れか 1 つのセンス鎖の少なくとも 16 個の連続的なヌクレオチドと 3 個以下のヌクレオチドの違いがある配列（任意選択的に、2 個以下のヌクレオチドの違いがある配列、任意選択的に、1 個以下のヌクレオチドの違いがある配列）を含む。

10

【0404】

本明細書に記載の s i R N A アンチセンス鎖を説明する文脈において、「配列番号 5 ~ 配列番号 8 の何れか 1 つのアンチセンス鎖と 3 個以下のヌクレオチドの違いがある配列、且つ少なくとも 15 個の連続的なヌクレオチドを含む」という用語は、本明細書に記載の s i R N A アンチセンス鎖が、配列番号 5 ~ 配列番号 8 の何れか 1 つのアンチセンス鎖の少なくとも 15 個の連続的なヌクレオチド、或いは配列番号 5 ~ 配列番号 8 の何れか 1 つのアンチセンス鎖の少なくとも 15 個の連続的なヌクレオチドと 3 個以下のヌクレオチドの違いがある配列（任意選択的に、2 個以下のヌクレオチドの違いがある配列、任意選択的に、1 個以下のヌクレオチドの違いがある配列）を含むことを示すことを意図する。

20

【0405】

特に明記しない限り、本開示の文脈において、「G」、「C」、「A」、「T」及び「U」は、それぞれグアニン、シトシン、アデニン、チミジン及びウラシルの塩基を含むヌクレオチドをそれぞれ表す。本開示の文脈において、I は、核酸塩基ヒポキサンチン (n u c l e o b a s e h y p o x a n t h i n e) を含むヌクレオチドに相当する。幾つかの実施形態において、本開示で使用されるイノシンという用語は、ヒポキサンチン及び糖又は修飾糖を含むヌクレオチド (n u c l e o s i d e c o m p r i s i n g h y p o x a n t h i n e a n d a s u g a r o r m o d i f i e d s u g a r) に相当する。

30

【0406】

特に説明のない限り、本開示の文脈において、小文字 d は、当該文字 d の下流に隣接する 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示し、小文字 m は、当該文字 m の上流に隣接する 1 つのヌクレオチドが 2' - メトキシ基で修飾されたヌクレオチドであることを示し、小文字 f は、当該文字 f の上流に隣接する 1 つのヌクレオチドが 2' - フルオロで修飾されたヌクレオチドであることを示し、小文字 s は、当該文字 s の左右に隣接する 2 つのヌクレオチド同士がチオホスホジエステル基で連結されていることを示す。

40

【0407】

本明細書に使用されるように、「2' - フルオロ (2' - F) で修飾されたヌクレオチド」という用語は、ヌクレオチドのリボシル基 2' 位のヒドロキシ基がフルオロで置換されて形成されたヌクレオチドを指し、「非フルオロで修飾されたヌクレオチド」は、ヌクレオチドのリボシル基 2' 位のヒドロキシ基が非フルオロ基で置換されて形成されたヌクレオチド又はヌクレオチド類似体を指す。

【0408】

本開示に使用されるように、「2' - メトキシ基 (2' - O M e) で修飾されたヌクレオチド」という用語は、リボシル基の 2' - ヒドロキシ基がメトキシ基で置換されて形成さ

50

れたヌクレオチドを指す。

【0409】

本開示の文脈において、1つのヌクレオチド配列と別のヌクレオチド配列との間に「ヌクレオチドの差異」があるとは、前者が後者と比較して、同じ位置のヌクレオチドの塩基の種類が変化していることを意味し、例えば、後者において、1つのヌクレオチド塩基がAである場合、前者の同じ位置における対応するヌクレオチド塩基がU、C、G又はTである場合、2つのヌクレオチド配列間に、その位置でヌクレオチドの差異があると考えられる。幾つかの実施形態において、元の位置のヌクレオチドを無塩基ヌクレオチド又はその等価物に置き換える場合、その位置でヌクレオチドの差異が生じると考えられる。

【0410】

本明細書に使用されるように、「相補的」又は「逆相補的」という用語は、互いに置き換えて使用することができ、且つ、二本鎖核酸分子において、1つの鎖の塩基がもう1つの鎖における塩基と相補的にペアリングするという当業者に知られている意味を有する。DNAにおいて、プリン塩基アデニンは、常にピリミジン塩基チミン（又は、RNAではウラシル）とペアリングし、プリン塩基グアニンは、常にピリミジン塩基シトシンとペアリングする。各塩基ペアは、何れも1つのプリンと1つのピリミジンを含む。1つの鎖におけるアデニンが常にもう1つの鎖におけるチミン（又はウラシル）とペアリングし、且つグアニンが常にシトシンとペアリングする場合、2つの鎖は互いに相補的であるとされ、また、その相補的な鎖の配列から当該鎖の配列を推定することができる。それに応じて、「ミスマッチ」は、本分野で、二本鎖核酸において、対応する位置での塩基が相補的な形態でペアリングして存在するものではないことを意味する。

【0411】

「化学修飾」又は「修飾」という用語は、ヌクレオチドの化学的手段による変化の全てを含み、例えば、化学部分の追加又は除去、或いは1つの化学部分による別の化学部分の置換である。

【0412】

「dsRNA」という用語は、RNA干渉が可能なセンス鎖及びアンチセンス鎖を含む二本鎖RNA分子を指す。

【0413】

「塩基」という用語は、何れの既知のDNAとRNA塩基、塩基類似体を含み、例えば、プリンやピリミジンであり、更に、天然化合物であるアデニン、チミン、グアニン、シトシン、ウラシル、イノシン及び天然類似体を含む。塩基類似体は、ユニバーサル塩基であってもよい。

【0414】

「平坦末端」又は「平滑末端」という用語は、siRNAの所定の末端におけるペアリングしなかったヌクレオチド又はヌクレオチド類似体がないこと、即ちヌクレオチド突出がないことを意味するために互換的に使用される。ほとんどの場合、2つの末端が平滑末端であるsiRNAは、その全長にわたって二本鎖である。

【0415】

本開示により提供されるsiRNAは、この分野での通常の調製方法（例えば、固相合成と液相合成の方法）により得ることができる。そのうち、固相合成は、既に商用カスタマイズサービスが出た。対応する修飾を持つヌクレオシド単量体により、修飾されたヌクレオチド基を本開示に記載されるsiRNAに導入することができ、対応する修飾を持つヌクレオシド単量体を調製する方法、及び修飾されたヌクレオチド基をsiRNAに導入する方法も、当業者によく知られているものである。

【0416】

本開示に記載の「併用」、「組み合わせて使用する」とは、一定の期間内に少なくとも1つの用量のdsRNA、及び少なくとも1つの用量の他の治療剤を投与する投与方法であり、そのうち、投与される薬剤は、何れも薬理学的作用を示す。dsRNAは、別の治療剤と同時に又は順次に投与することができる。このような期間は、同じ投与経路又は異

10

20

30

40

50

なる投与経路で dsRNA 及び別の治療剤を投与する治療を含む。本開示に記載の併用投与方法は、同時に投与すること、個別に調製して共投与すること、又は個別に調製して相次いで投与することから選ばれる。

【図面の簡単な説明】

【0417】

【図1】TRD002218、及びTRD007205の投与後の7日目のTTRにおけるmRNAの余剰発現量である。

【図2】TRD002218、及びTRD007205の投与後の28日目のTTRにおけるmRNAの余剰発現量である。

【図3】エキソヌクラーゼ安定性のゲル電気泳動実験の結果である。

10

【図4】5'エキソヌクラーゼ安定性の実験的定量結果である。

【図5】3'エキソヌクラーゼ安定性の実験的定量結果である。

【発明を実施するための形態】

【0418】

以下、実施例と合わせて本開示を更に説明するが、これらの実施例は本開示の範囲を限定するものではない。本開示の実施例において具体的な条件が明記されていない実験方法は、一般的に、通常の状態に従い、又は原料や商品のメーカーにより勧められた条件に従う。具体的な供給源が明記されていない試薬である場合、当該試薬は、何れかの分子生物学的試薬の供給元から、分子生物学的使用のための品質/純度で得ることができる。

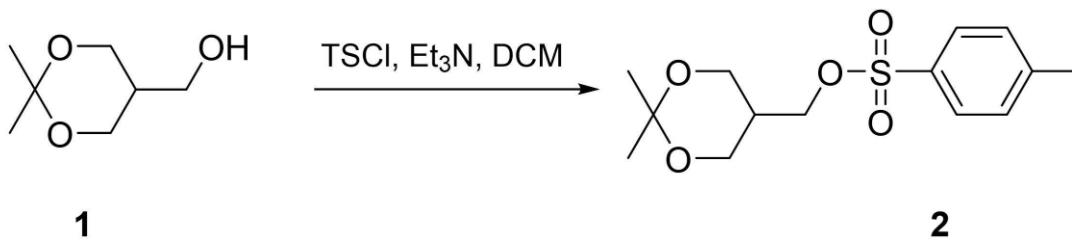
【0419】

20

実施例1：化学修飾の調製

1.1 化合物1-1a及び化合物1-1bの合成

【化177】



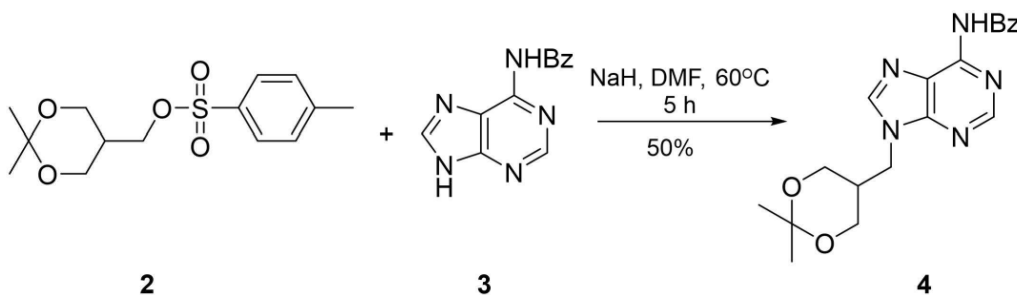
30

化合物1 (500 mg、3.42 mmol) 及びトリエチルアミン (Et₃N、692 mg、6.84 mmol、0.95 mL) をジクロロメタン (DCM、10 mL) に溶け、氷浴下で4-トルエンシルホニルクロリド (TsCl、717 mg、3.76 mmol) のジクロロメタン (10 mL) 溶液を滴下し、滴下完了後に室温で一晩攪拌しながら反応させ、反応が完了した後、水でクエンチし、水相をジクロロメタン (15 mL) で3回抽出し、合わせた有機相をまず飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (10 mL) で洗浄し、更に飽和食塩水 (20 mL) で洗浄してから、減圧下で溶剤を蒸発乾燥させて粗製品2 (820 mg、80%) を得て、そのまま次の反応に用いた。MS m/z: C₁₄H₂₁O₅S、[M+H]⁺ 理論: 301.10、実測: 301.2。

40

【0420】

【化178】



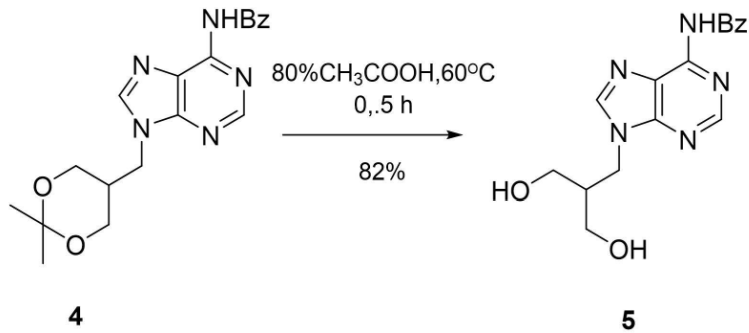
50

化合物 3 (239 mg、1.22 mmol) をジメチルホルムアミド (DMF、10 mL) に溶解、氷浴下で NaH (ミネラルオイルに 60% 溶けた、93 mg、2.33 mmol) 溶液を加え、30 分間攪拌しながら当該反応を行い、その後化合物 2 (350 mg、1.16 mmol) を滴下し、滴下完了後に 60 で 5 時間攪拌しながら反応させ、反応が完了した後、水を加えてクエンチし、水相を酢酸エチル (15 mL) で 3 回抽出し、合わせた有機相をまず水 (10 mL) で 3 回洗浄し、そして飽和食塩水 (10 mL) で洗浄してから、減圧下で溶剤を蒸発乾燥させ、逆相分取 HPLC (C¹⁸、条件: 5% ~ 50% (A: H₂O、B: CH₃CN)、流速: 70 mL/min) を経て、凍結乾燥した後に 220 mg の化合物 4 を得た。MS m/z: C₁₉H₂₁N₅O₃Na、[M+Na]⁺ 理論: 390.16、実測: 390.3。

10

【0421】

【化179】

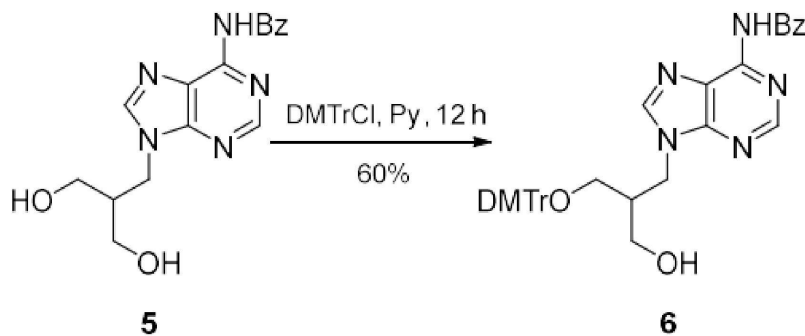


20

室温下で化合物 4 (1.50 g、4.08 mmol) を 20 mL の酢酸と水 (4:1) の混合溶液に溶解、60 で 30 分間攪拌し、反応が完了した後に減圧下で溶剤を蒸発乾燥させ、逆相分取 HPLC (C¹⁸、条件: 5% ~ 25% (A: H₂O、B: CH₃CN)、流速: 70 mL/min) を経て、凍結乾燥した後に 1.10 g の化合物 5 を得た。MS m/z: C₁₆H₁₈N₅O₃、[M+H]⁺ 理論: 328.13、実測: 328.4。

【0422】

【化180】



30

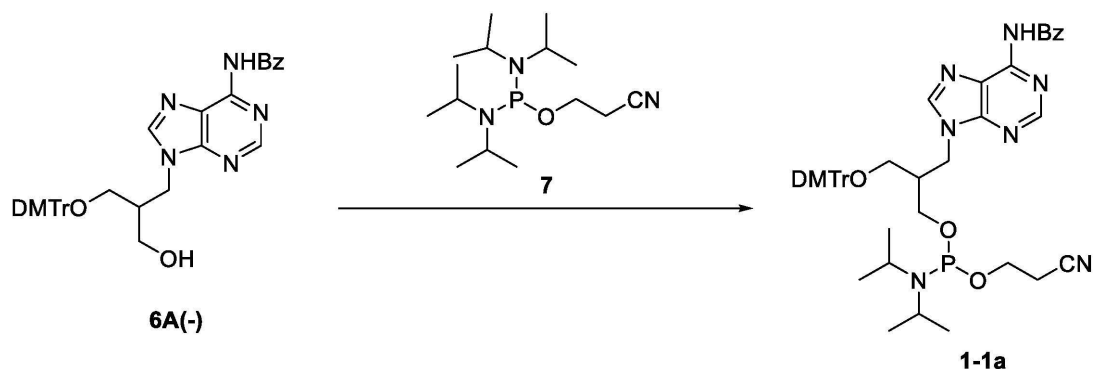
40

化合物 5 (1.00 g、3.05 mmol) をピリジン (Py、10 mL) に溶解、氷浴下で 4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (DMTrCl、1.50 g、4.58 mmol) のピリジン (5 mL) 溶液を滴下し、滴下完了後に室温で一晩攪拌しながら反応させ、反応が完了した後、水でクエンチし、減圧下で溶剤を蒸発乾燥させ、逆相分取 HPLC (C¹⁸、条件: 5% ~ 80% (A: H₂O、B: CH₃CN)、流速: 70 mL/min) を経て、凍結乾燥した後に 1.00 g の化合物 6 を得た。MS m/z: C₃₇H₃₆N₅O₅、[M-H]⁺ 理論: 630.26、実測: 630.5。ラセミ体化合物 6 をキラルカラム (Daicel CHIRALPAK (登録商標) IE 250 mm * 4.6 mm、5 μm、A: n-ヘキサン、B: エタノール) により分割して 410 mg の 6A (-) と 435 mg の 6B (+) を得た。

50

【 0 4 2 3 】

【 化 1 8 1 】



10

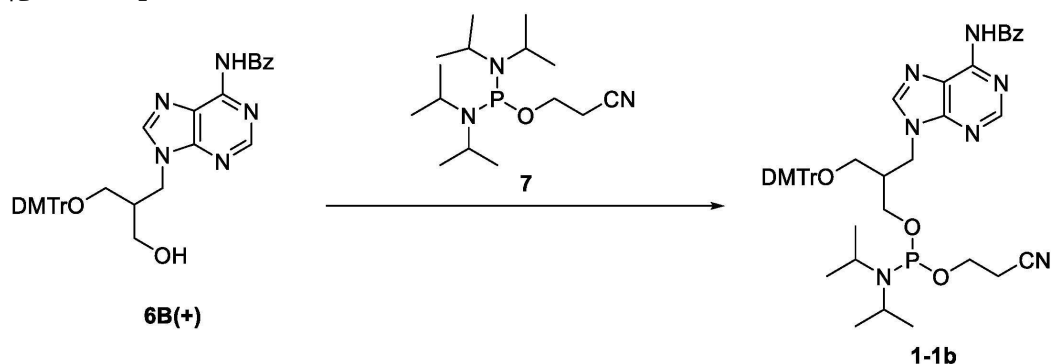
化合物 6 A (-) (2 0 0 m g 、 0 . 3 2 m m o l) 、 テトラゾリウム (1 1 m g 、 0 . 1 6 m m o l) 、 N - メチルイミダゾール (5 m g 、 0 . 0 6 m m o l) 、 3 A 分子ふるい (5 0 0 m g) を 1 0 m L の アセトニトリル に 溶 け 、 室 温 下 で 化 合 物 7 (1 4 4 m g 、 0 . 4 8 m m o l) を 加 え 、 室 温 下 で 一 晩 攪 拌 し た 。 反 応 が 完 了 し た 後 、 分 子 ふ り い を る 過 除 去 し 、 ジ ク ロ ロ メ タ ン (3 0 m L) を 加 え 、 飽 和 炭 酸 水 素 ナ ト リ ウ ム 水 溶 液 (1 0 m L) で 3 回 洗 浄 し 、 更 に 飽 和 食 塩 水 (2 0 m L) で 洗 浄 し 、 る 液 を 回 転 乾 燥 さ せ 、 そ し て 逆 相 分 取 H P L C (C ¹⁸ 、 条 件 : 5 % ~ 1 0 0 % (A : 水 、 B : C H ₃ C N) 、 流 速 : 7 0 m L / m i n) を 経 て 、 凍 結 乾 燥 し た 後 に 2 0 0 m g の 化 合 物 1 - 1 a を 得 た 。 M S m / z : C ₄₀ H ₃₉ N ₆ O ₇ P 、 [M - ジ イ ソ プ ロ ピ ル + O H] ⁺ 理 論 : 7 4 7 . 2 6 、 実 測 : 7 4 7 . 6 。 ¹ H N M R (4 0 0 M H z , ア セ ト ニ ト リ ル - d ₃)

20

7 . 5 6 , 7 . 5 4 (2 s , 1 H) , 7 . 3 6 - 7 . 2 7 (m , 2 H) , 7 . 2 4 - 7 . 2 1 (m , 7 H) , 6 . 8 3 - 6 . 8 0 (m , 4 H) , 4 . 1 2 - 4 . 1 0 (m , 2 H) , 3 . 7 5 - 3 . 6 8 (m , 1 0 H) , 3 . 2 0 - 2 . 8 0 (m , 2 H) , 2 . 6 8 - 2 . 5 4 (m , 4 H) , 1 . 2 2 - 1 . 0 4 (m , 1 8 H) 。

【 0 4 2 4 】

【 化 1 8 2 】



30

化 合 物 6 B (+) (2 0 0 m g 、 0 . 3 2 m m o l) 、 テトラゾリウム (1 1 m g 、 0 . 1 6 m m o l) 、 N - メチルイミダゾール (5 m g 、 0 . 0 6 m m o l) 、 3 A 分子ふるい (5 0 0 m g) を 1 0 m L の アセトニトリル に 溶 け 、 室 温 下 で 化 合 物 7 (1 4 4 m g 、 0 . 4 8 m m o l) を 加 え 、 室 温 下 で 一 晩 攪 拌 し た 。 反 応 が 完 了 し た 後 、 分 子 ふ り い を る 過 除 去 し 、 ジ ク ロ ロ メ タ ン (3 0 m L) を 加 え 、 飽 和 炭 酸 水 素 ナ ト リ ウ ム 水 溶 液 (1 0 m L) で 3 回 洗 浄 し 、 更 に 飽 和 食 塩 水 (2 0 m L) で 洗 浄 し 、 る 液 を 回 転 乾 燥 さ せ 、 そ し て 逆 相 分 取 H P L C (C ¹⁸ 、 条 件 : 5 % ~ 1 0 0 % (A : 水 、 B : C H ₃ C N) 、 流 速 : 7 0 m L / m i n) を 経 て 、 凍 結 乾 燥 し た 後 に 2 0 0 m g の 化 合 物 1 - 1 b を 得 た 。 M S m / z : C ₄₀ H ₃₉ N ₆ O ₇ P 、 [M - ジ イ ソ プ ロ ピ ル + O H] ⁺ 理 論 : 7 4 7 . 2 6 、 実 測 : 7 4 7 . 5 。

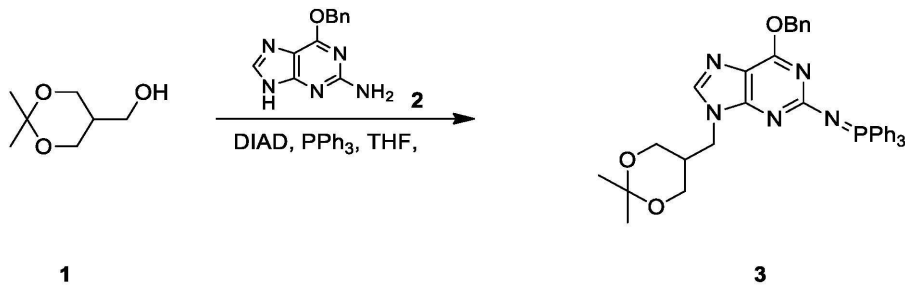
40

【 0 4 2 5 】

50

1.2 化合物 1 - 6 a の合成

【化 1 8 3】

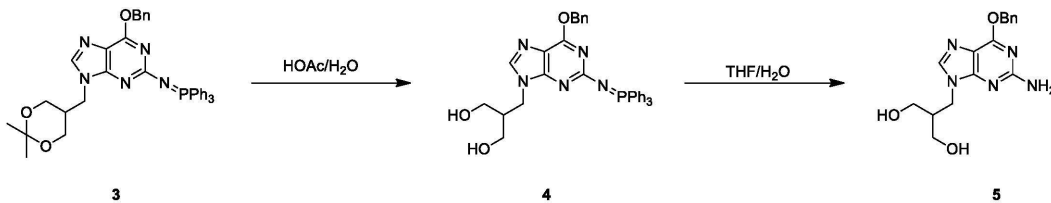


10

化合物 1 (10 g、68.404 mmol)、化合物 2 (15 g、62.186 mmol) 及びトリフェニルホスフィン (32.62 g、124.371 mmol) を無水 THF (30 mL) に溶解、0 で DIAD (24.656 mL、124.371 mmol) を徐々に滴下した。当該反応液を 25 で 12 h 反応させ、LCMS で反応が完了したことを示した。当該反応液を酢酸エチル (200 mL) と水 (200 mL) で抽出し、有機相を乾燥してろ液を濃縮し、得られた残留物を順相カラムで精製 (DCM / MeOH = 10 / 1) して目標生成物 3 (20 g) を得た。

【0 4 2 6】

【化 1 8 4】



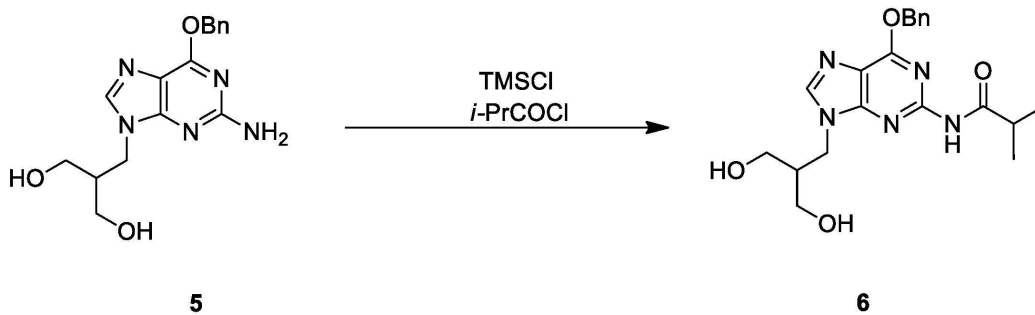
20

化合物 3 (20 g、28.585 mmol) を酢酸 (24 mL、426.016 mmol) と H₂O (12 mL) に溶解、60 で 1 h 撹拌した。その後、反応液を回転乾燥させて THF (12 mL) と H₂O (12 mL) を加え、80 で 7 h 撹拌した。LCMS で反応が完了したことを示した。反応液に酢酸エチル (200 mL) と水 (100 mL) を加えて抽出し、水相に大量の固体が析出するまで、水相に炭酸ナトリウム固体を加えた。固体をろ過し、水で洗浄し、ろ過ケーキを油ポンプにより吸引乾燥させ、目標化合物 5 (9 g) を得た。

30

【0 4 2 7】

【化 1 8 5】



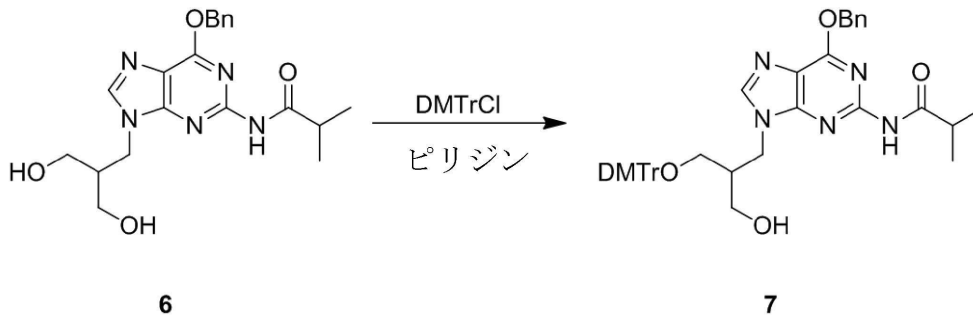
40

窒素ガス保護で、化合物 5 (6.8 g、18.581 mmol) をピリジン (80 mL) に溶解、0 で TMSCl (14.250 mL、111.489 mmol) を徐々に加え、2 h 撹拌した。その後、0 で イソブチリルクロライド (2.044 mL、19.511 mmol) を加え、25 で 1 h 撹拌し、LCMS で反応が完了したことを示した。ジクロロメタン (200 mL) と水 (200 mL) で抽出し、有機相を回転乾燥させた後、試料を混合し、順相カラムで精製 (DCM : MeOH = 10 : 1) してカラムにかけ、4.8% でピークが出た)、黄色油状化合物 6 (12 g) を得た。

50

【 0 4 2 8 】

【 化 1 8 6 】



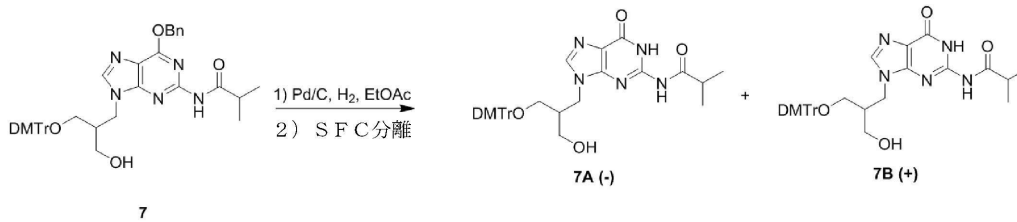
10

窒素ガス保護下で、化合物 6 (5 . 5 g 、 1 2 . 3 9 2 m m o l) をピリジン (3 0 m L) に溶解、MOLECULAR SIEVE 4 A 1 / 1 6 (7 g 、 1 2 . 3 9 2 m m o l) を加え、その後、0 で数回に分けてDMTrCl (5 . 0 4 g 、 1 4 . 8 7 0 m m o l) 固体を加え、25 で 2 h 反応させ、TLC (PE : EtOAc = 1 : 1 、 R f = 0 . 6 9) で反応が既に完了したことを示した。当該反応液とTJN200879-040-P1を合わせて処理した。反応液を酢酸エチル (2 0 0 m L) と水 (2 0 0 m L) で抽出し、有機相を回転乾燥させた後、試料を混合し、順相カラムで精製し (PE : EtOAc でカラムにかけ、84%でピークが出た)、黄色油状化合物 7 (1 2 g) を得た。

20

【 0 4 2 9 】

【 化 1 8 7 】

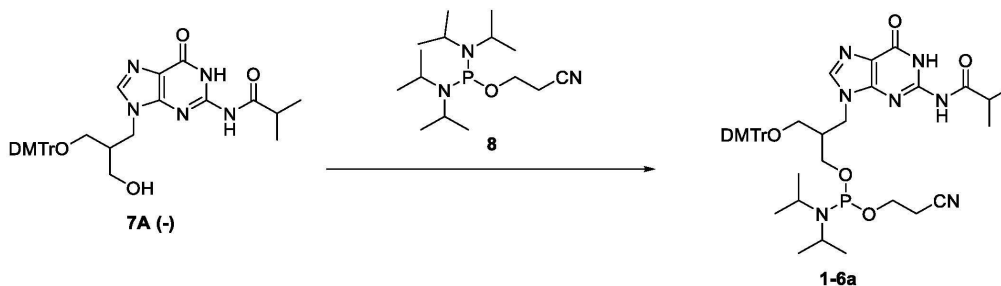


化合物 7 (1 2 g 、 1 5 . 3 8 9 m m o l) を EtOAc (1 4 0 m L) に溶解、湿式パラジウム炭素 Pd / C (7 g 、 1 5 . 3 8 9 m m o l) を加えて当該反応液を 2 5 、水素ガス (1 5 P s i) で 2 h 反応させた。TLC (PE : EtOAc = 0 : 1 、 R f = 0 . 0 9) で反応が既に完了したことを示した。反応液をろ過し、ろ過ケーキを酢酸エチル (3 0 m L) で 3 回洗った後、ろ液を収集した。ろ液を回転乾燥させた後、50 mL のジクロロメタン及び 2 mL のトリエチルアミンを加えて試料を混合し、順相カラムで精製し (DCM : MeOH = 1 0 : 1 でカラムにかけ、0.5%でピークが出た)、9 g (黄色泡状固体) を得て、得られたラセミ化合物を SFC により分割し、製品である目標化合物 7 A (-) (3 . 9 g) 及び目標化合物 7 B (+) (3 . 8 g) を得た。

30

【 0 4 3 0 】

【 化 1 8 8 】



40

化合物 7 A (-) (3 . 3 0 g 、 5 . 4 0 m m o l) 、テトラゾリウム (1 9 0 m g 、 2 . 7 0 m m o l) 、1-メチルイミダゾール (9 0 m g 、 1 . 1 0 m m o l) 、3 A 分

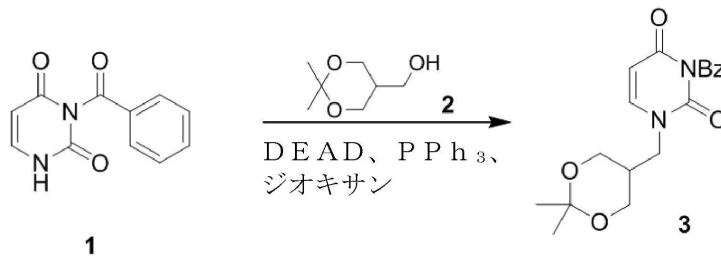
50

子ふるい (500 mg) を 30 mL のアセトニトリルに溶け、室温下で化合物 8 (2.50 g、8.10 mmol) を加え、室温下で 2 h 攪拌した。反応が完了した後、分子ふるいをろ過除去し、DCM (150 mL)、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて洗浄し (30 mL × 3)、更に飽和食塩水 (30 mL) で洗浄し、ろ液を回転乾燥させ、そして逆相分取 HPLC (C18、条件: 5% ~ 100% (A: 水、B: CH₃CN)、流速: 70 mL/min) を経て、凍結乾燥した後に 1-6a (2.9 g、66%) を得た。MS m/z: C₄₃H₅₅N₇O₇P [M+H]⁺、理論: 812.38、実測: 812.5。¹H NMR (400 MHz, アセトニトリル-d₃) 7.56, 7.54 (2s, 1H), 7.36-7.27 (m, 2H), 7.24-7.21 (m, 7H), 6.83-6.80 (m, 4H), 4.12-4.10 (m, 2H), 3.75-3.68 (m, 10H), 3.20-2.80 (m, 2H), 2.68-2.54 (m, 4H), 1.22-1.04 (m, 18H)。

【0431】

1.3 化合物 1-7a の合成

【化189】



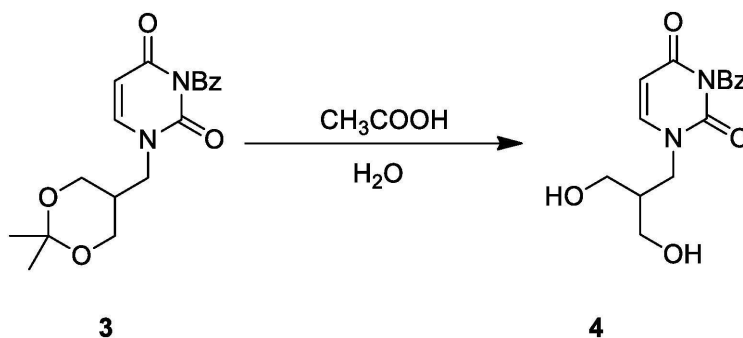
20

窒素ガス保護下で、化合物 1 (5 g、23.1272 mmol)、化合物 2 (6.76 g、46.254 mmol) 及びトリフェニルホスフィン (7.28 g、27.753 mmol) を 30 mL のジオキサンに溶け、0 で DEAD (5.502 mL、27.753 mmol) を徐々に滴下した。滴下完了後に、反応を 25 に徐々に昇温し、そして 1 h 反応させ続けた。反応物に 100 mL の H₂O 及び 100 mL の EtOAc を加えて抽出し、有機相を合わせ、乾燥してろ過し、そして濃縮した後、試料を混合してカラムにかけ、順相カラムで精製し (PE: EtOAc = 1:1 でカラムにかけた)、目標生成物 (4 g) を得た。

30

【0432】

【化190】



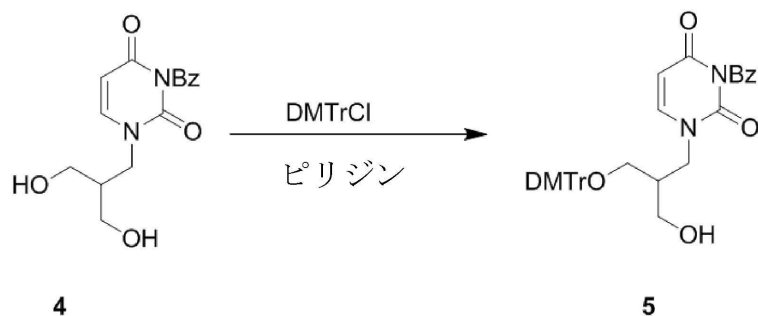
40

化合物 3 (3.3 g) を HOAc (16 mL) と H₂O (4 mL) に溶け、油浴に 60 で 0.5 h 加熱し、反応液を回転乾燥させ、得られた残留物を順相カラムで精製し (PE: EtOAc = 0:1 でカラムにかけた)、目標生成物 4 (3 g) を得た。

【0433】

50

【化191】

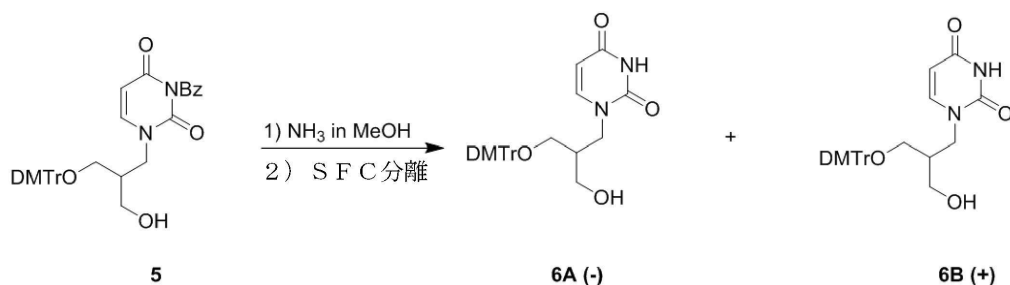


10

化合物4 (3 g、8.873 mmol) を5 mLのピリジンに溶解、窒素ガス保護で0℃でDMTrCl (3.91 g、11.535 mmol) のピリジン溶液10 mLを徐々に滴下した。滴下完了後に反応を25℃に昇温し、そして1 h 反応させ続けた。反応液に50 mLの水と100 mLの酢酸エチルを加えて抽出した。水相を更に100 mLの酢酸エチルで3回抽出し、有機相を合わせて乾燥しろ過し濃縮して順相カラムで精製 (PE : EtOAc = 2 : 1で) した。目標生成物5 (4 g) を得た。

【0434】

【化192】



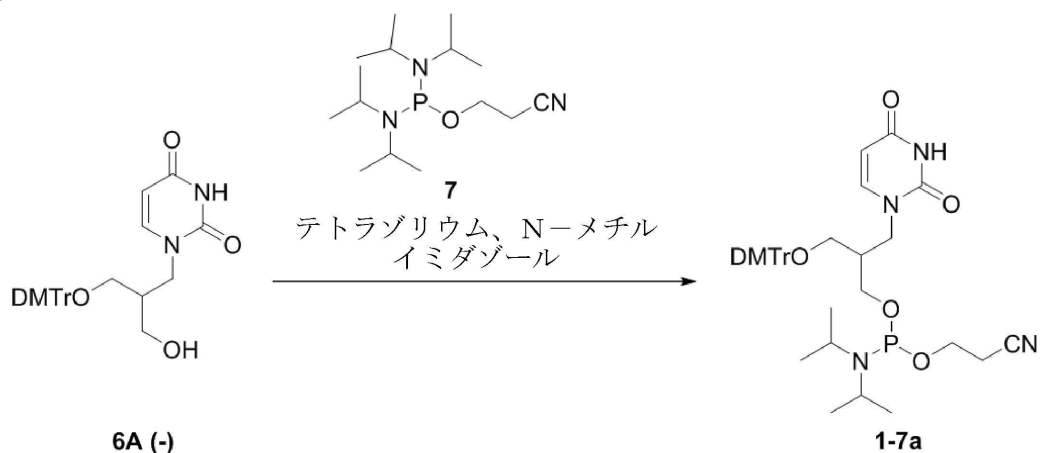
20

化合物5 (4 g、5.769 mmol) をメタノール (10 mL) に溶解、飽和のNH₃メタノール溶液 (40 mL) を加え、0℃で6 h 反応させ、反応液を回転乾燥させて順相カラムで精製 (PE : EtOAc = 0 : 1で) してラセミ化合物2.4 gを得てSFCにより分割し、目標生成物6A (750 mg、100%の純度) と目標生成物6B (400 mg、99.16%の純度) を得た。

30

【0435】

【化193】



40

化合物6A (-) (700 mg、1.40 mmol)、テトラブチリウム (50 mg、0.70 mmol)、1-メチルイミダゾール (23 mg、0.28 mmol)、3 Å分子ふるい (500 mg) を10 mLのアセトニトリルに溶解、室温下で化合物7 (630 mg、2.10 mmol) を加え、室温下で2 h 攪拌した。反応が完了した後、分子ふるい

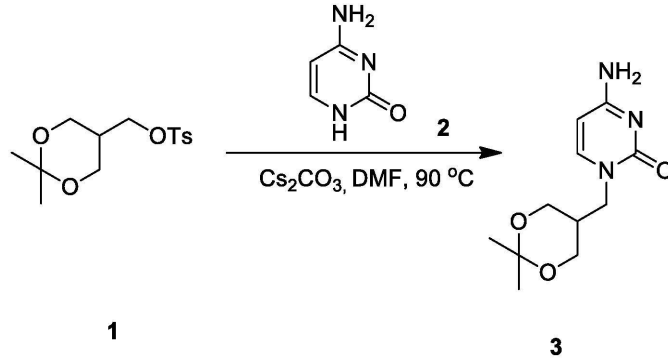
50

をろ過除去し、DCM (50 mL)、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて洗浄し(10 mL × 3)、更に飽和食塩水(20 mL)で洗浄し、ろ液を回転乾燥させて逆相分取HPLC(C18、条件: 5% ~ 100% (A: 水、B: CH₃CN)、流速: 70 mL/min)を経て、凍結乾燥した後に1-7a (700 mg、72%)を得た。MS m/z: C₃₈H₄₇N₄O₇PNa [M+Na]⁺、理論: 725.32、実測: 725.5。

【0436】

1.4 化合物1-8aの合成

【化194】



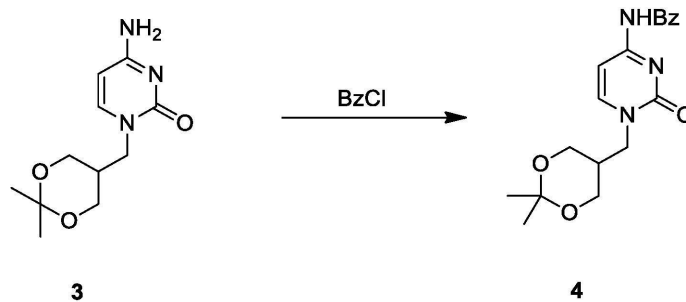
10

化合物1 (8.5 g、76.508 mmol)、化合物2 (30.64 g、91.809 mmol)をDMF (150 mL)に溶解、Cs₂CO₃ (29.91 g、91.809 mmol)を加え、反応を窒素ガス保護下で、90 °Cで12 h反応させた。LCMSで反応が完了したことを検出した。反応液をろ過し、油ポンプで回転乾燥させ、順相カラムで分離して精製(80 g、DCM/MeOH = 10/1 ~ 5/1)して目標生成物3 (13.5 g、80%の純度)を得た。

20

【0437】

【化195】



30

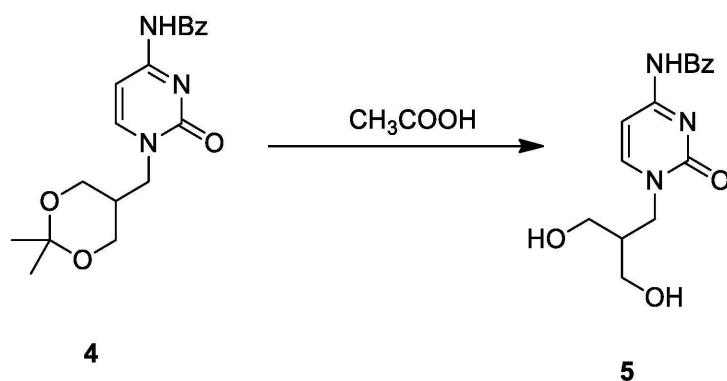
化合物3 (10.5 g、35.105 mmol)をピリジン(65 mL)とCH₃CN (65 mL)に溶解、溶液にBzCl (4.894 mL、42.126 mmol)を滴下し、25 °Cで2 h反応させた。LCMSでほとんどの原料の反応が完了したことを検出し、H₂O (100 mL)を加えてクエンチし、EtOAc (100 mL × 3)で抽出し、回転乾燥させ、カラムで分離(TJN200872-101と合わせ)して精製(80 g、PE/EtOAc = 10/1 ~ 0/1、DCM/MeOH = 10/1)して目標生成物4 (14 g、90%の純度)を得た。

40

【0438】

50

【化196】

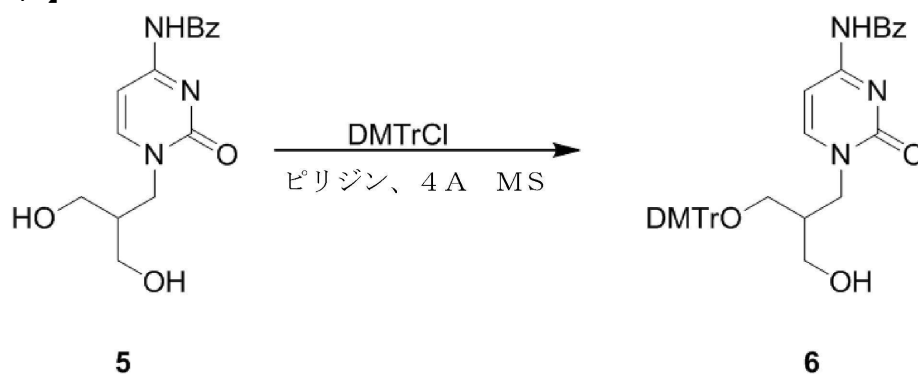


10

化合物4 (14 g、36.694 mmol) をHOAc (56 mL、314.796 mmol) とH₂O (14 mL) に溶解、60 °C で2 h 反応させ、LCMSで反応が完了したことを示した。油ポンプで濃縮させ、順相カラムで分離 (40 g、DCM/MeOH = 1/0 ~ 5/1) して目標生成物5 (8.4 g、90%の純度 & 2.4 g、80%の純度) を得た。

【0439】

【化197】



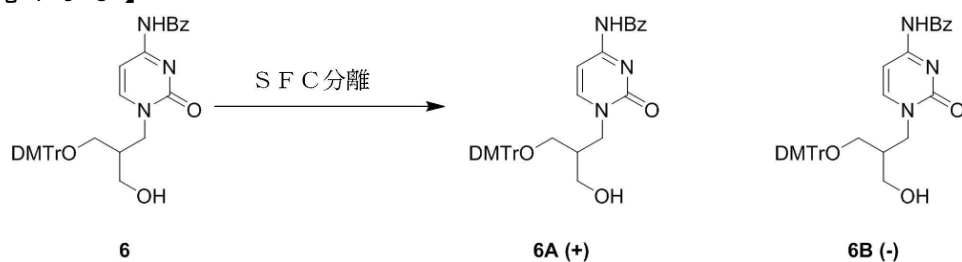
20

化合物5 (7.4 g、21.957 mmol)、DMAP (0.54 g、4.391 mmol)、MOLECULAR SIEVE 4A (11.1 g、2.967 mmol) をピリジン (60 mL) に溶解、氷浴下で10 min 攪拌し、その後DMTrCl (8.93 g、26.348 mmol) を加え、1.8 h 攪拌しながら反応させ、LCMSで約19%の原料が残り、約60%の目標がMSであることが検出された。(TJN200872-105 & 106) と合わせて精製した。反応液にH₂O (50 mL) を加え、DCM (50 mL x 3) で抽出し、乾燥し、回転乾燥させ、カラムで分離 (120 g、PE/(EA:DCM:TEA = 1:1:0.05) = 1/0 ~ 0/1 からDCM/MeOH = 10/1) して目標化合物6 (11 g、89%の純度、TJN200872-105 & 106 & 107) を得て、原料 (3.0 g、70%の純度) を回収した。

30

【0440】

【化198】



40

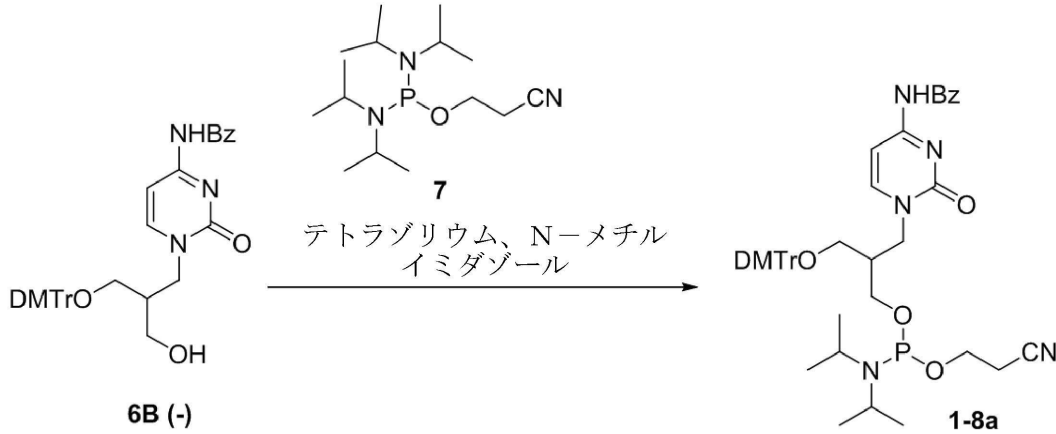
化合物6 (15 g、22.041 mmol) をSFC (DAICEL CHIRALP

50

A K A D (2 5 0 m m × 5 0 m m 、 1 0 μ m) 、 0 . 1 % の N H ₃ H ₂ O E t O H 、 B : 4 5 % ~ 4 5 % 、 2 0 0 m L / m i n) により分離して目標生成物 6 A (5 . 3 3 g 、 9 4 . 2 9 % の純度) 、 目標生成物 6 B (6 . 1 4 g 、 9 7 . 9 1 % の純度) を得て、化合物 6 を 1 . 0 g 回収した。

【 0 4 4 1 】

【 化 1 9 9 】



10

化合物 6 B (-) (5 . 4 g 、 8 . 9 2 m m o l) 、 テトラゾリウム (3 1 2 m g 、 4 . 4 6 m m o l) 、 1 - メチルイミダゾール (1 4 6 m g 、 1 . 7 8 m m o l) 、 3 A 分子ふるい (5 0 0 m g) を 4 0 m L のアセトニトリルに溶解、室温下で化合物 7 (4 g 、 1 3 . 4 m m o l) を加え、室温下で 2 h 攪拌した。反応が完了した後、分子ふるいをろ過除去し、DCM (2 0 0 m L) 、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて洗浄し (3 0 m L × 3) 、更に飽和食塩水 (5 0 m L) で洗浄し、ろ液を回転乾燥させて逆相分取 H P L C (C 1 8 、条件 : 5 % ~ 1 0 0 % (A : 水、B : C H ₃ C N) 、流速 : 7 0 m L / m i n) を経て、凍結乾燥した後に 1 - 8 a (5 . 8 g 、 8 0 %) を得た。MS m / z : C 4 5 H 5 1 N 5 O 7 P 、 [M + H] ⁺ 、理論 : 8 0 4 . 3 6 、実測 : 8 0 4 . 4 。

20

【 0 4 4 2 】

実施例 2 . s i R N A の合成

d s R N A の合成は、通常のスホロアミダイト固相合成法と変わりがなく、AS 鎖 5 ' の 7 位修飾されたヌクレオチドを合成する時に、上記合成されたスホロアミダイト単量体で親配列元ヌクレオチドを置換した。以下、合成プロセスを簡単に説明する。Dr . O l i g o 4 8 シンセサイザー (B i o l y t i c) において、U n i v e r s a l C P G ベクターを始めとして、合成プログラムによってヌクレオシドスホロアミダイト単量体を 1 つずつ連結した。以上記載された AS 鎖 5 ' の 7 位のヌクレオシドスホロアミダイト単量体を除き、他のヌクレオシド単量体原料である 2 ' - F R N A 、 2 ' - O - メチル R N A などのヌクレオシドスホロアミダイト単量体は、上海兆維又は蘇州吉瑪から購入された。5 - エチルチオ - 1 H - テトラゾール (E T T) を活性化剤 (0 . 6 M のアセトニトリル溶液) として採用し、0 . 2 2 M の P A D S を 1 : 1 の体積比であるアセトニトリルとトリメチルピリジン (蘇州柯楽瑪) に溶けた溶液を加硫試薬として使用し、ヨードピリジン / 水溶液 (柯楽瑪) を酸化剤として使用した。

30

40

【 0 4 4 3 】

固相合成が完了した後、オリゴリボヌクレオチドは当該固体支持体から溶解され、3 : 1 の 2 8 % アンモニア水とエタノール溶液により 5 0 の条件で 1 6 h 浸漬された。その後遠心分離し、上清液を別の遠心分離管に移動し、濃縮して蒸発乾燥させた後、C 1 8 逆相クロマトグラフィーにより精製し、移動相が 0 . 1 M の T E A A とアセトニトリルで、そして、3 % のトリフルオロ酢酸溶液により D M T r を除去した。目標オリゴヌクレオチドを収集してから凍結乾燥させ、そして LC - M S で目標生成物であると同一し、更に U V (2 6 0 n m) で定量した。

【 0 4 4 4 】

50

得られた一本鎖オリゴヌクレオチドを、等モル比によって、相補的にペアリングし、アニールし、最後に得られた二本鎖 dsRNA を 1 × PBS に溶解、そして実験に必要な濃度に調整して使用に備えた。

【0445】

実施例 3 . p s i C H E C K 活性スクリーニング実験

dsRNA サンプルの合成は上記の通りであり、プラスミドは、生工生物工程（上海）股フン有限公司に由来した。p s i C H E C K 実験消耗品は表 1 に示される。

【0446】

【表 1】

表 1. p s i C H E C K 実験消耗品と試薬

試薬・消耗品				
名称	会社	製品番号/型番	ロット番号	有効期限
Hu h 7 細胞	南京科佰	ATCC-Cob i oer/CBP60 202	/	/
Dual-Glo® Luciferase Assay S ystem	Prome ga	E2940	00003 63099	2020/ 5/13
Lipofecta mine® 20 00	Invit rogen	11668-019	/	2021/ 6/14

10

20

【0447】

実験手順：細胞をプレートに播種し、細胞をトランスフェクションし、そのうち、トランスフェクション複合物の具体的な調製量は表 2 に示す通りである。

【0448】

【表 2】

表 2. 96 ウェルプレートの各ウェルに必要なトランスフェクション複合物の使用量

	使用量/ウェル	Opt i -MEM
プラスミド Mix	0.05 μL	10 μL
Lipofectamine 2000	0.2 μL	10 μL

30

注記：Lipo：0.2 μL / ウェル、プラスミド：0.05 μL / ウェル、Opt i -MEM：10 μL / ウェル。

【0449】

表 3 によれば、異なる実験の需要に応じて異なる濃度に希釈し、作動液として使用に備え、使用する直前に調製した。24 h トランスフェクションした後、Dual-Glo（登録商標）Luciferase Assay System 検出試薬キットの実験操作案によって検出した。相対値 Ratio = Ren / Fir（ウミシイタケ / ホタルの比）を算出し、阻害率 $1 - (Ratio + dsRNA / レポーター遺伝子のみ) \times 100\%$ = 阻害率（%）を計算し、本開示において、余剰活性 %（mRNA 余剰発現量 % 又は mRNA 余剰発現割合ともいう）= $100\% - 阻害率（\%）$ である。

40

【0450】

50

【表 3】

表 3 複数濃度点の dsRNA 希釈スキーム

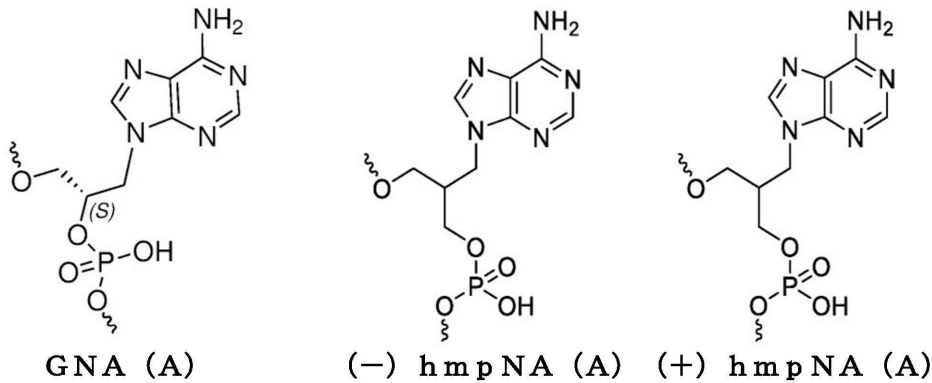
最終濃度 (nM)	水と dsRNA の添加
40	4 μ L dsRNA (20 μ M) + 96 μ L H ₂ O
13.33333333	30 μ L dsRNA + 60 μ L H ₂ O
4.44444444	30 μ L dsRNA + 60 μ L H ₂ O
1.481481481	30 μ L dsRNA + 60 μ L H ₂ O
0.49382716	30 μ L dsRNA + 60 μ L H ₂ O
0.164609053	30 μ L dsRNA + 60 μ L H ₂ O
0.054869684	30 μ L dsRNA + 60 μ L H ₂ O
0.018289895	30 μ L dsRNA + 60 μ L H ₂ O
0.006096632	30 μ L dsRNA + 60 μ L H ₂ O
0.002032211	30 μ L dsRNA + 60 μ L H ₂ O
0.000677404	30 μ L dsRNA + 60 μ L H ₂ O

10

【0451】

実施例 4：異なる化学修飾の特性評価

【化 200】



20

そのうち、2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオールを出発原料として合成されたヌクレオチドを hmpNA と定義し、

30

(+) hmpNA (A) は、実施例 1.1 におけるヌクレオシドホスホロアミダイト単量体 1-1b から固相合成により得られ、絶対配置が (S) - hmpNA (A) であり、

(-) hmpNA (A) は、実施例 1.1 におけるヌクレオシドホスホロアミダイト単量体 1-1a から固相合成により得られ、絶対配置が (R) - hmpNA (A) であり、

同様に、hmpNA の塩基の種類を置換し、固相合成により以下の構造を得て、そして絶対配置を確認した：

(+) hmpNA (G) は、絶対配置が (S) - hmpNA (G) であり、

(-) hmpNA (G) は、絶対配置が (R) - hmpNA (G) であり、

(+) hmpNA (C) は、絶対配置が (S) - hmpNA (C) であり、

(-) hmpNA (C) は、絶対配置が (R) - hmpNA (C) であり、

(+) hmpNA (U) は、絶対配置が (R) - hmpNA (U) であり、

(-) hmpNA (U) は、絶対配置が (S) - hmpNA (U) であり、

(S) - hmpNA (G)、(R) - hmpNA (G)、(S) - hmpNA (C)、

(R) - hmpNA (C)、(S) - hmpNA (U) 及び (R) - hmpNA (U) の絶対配置は、その中間体又は誘導体から X-Ray 回折により確認された。

40

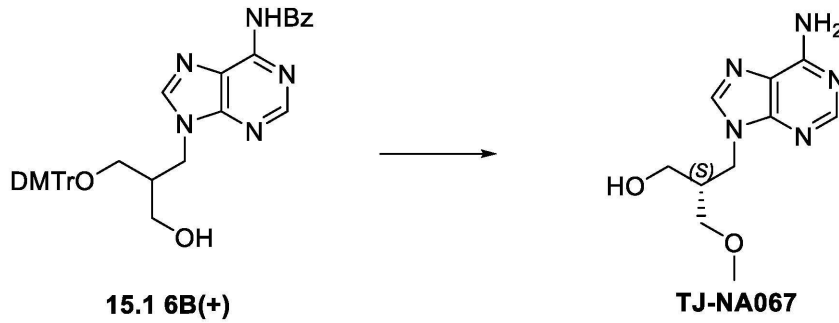
【0452】

中間体又は誘導体の構造は、以下の通りである。

【0453】

50

【化201】

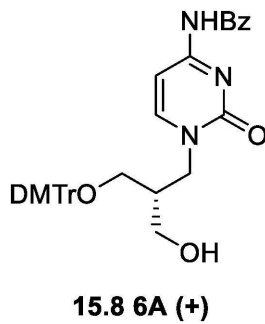


10

TJ-NA067: 検出結晶は無色のブロック状 ($0.30\text{ mm}^3 \times 0.10\text{ mm}^3 \times 0.04\text{ mm}^3$) で、単斜晶系 $P2_1$ 空間群に属する。セルパラメータ $a = 16.0496(5)$ 、 $b = 4.86260(10)$ 、 $c = 16.4686(5)$ 、 $\alpha = 90^\circ$ 、 $\beta = 118.015(4)^\circ$ 、 $\gamma = 90^\circ$ 、 $V = 1134.65(7)\text{ \AA}^3$ 、 $Z = 4$ 。計算密度 $D_c = 1.389\text{ g/cm}^3$ 、単位セルにおける電子数 $F(000) = 504.0$ 、単位セルの線形吸収係数 $\mu(\text{Cu K}\alpha) = 0.840\text{ mm}^{-1}$ 、回折実験温度 $T = 150.00(11)\text{ K}$ 。

【0454】

【化202】



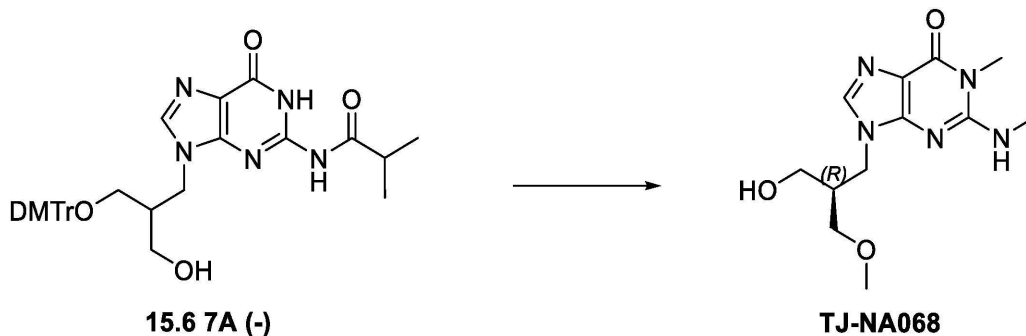
20

6A(+): 検出結晶は無色のブロック状 ($0.30\text{ mm}^3 \times 0.20\text{ mm}^3 \times 0.10\text{ mm}^3$) で、単斜晶系 $P2_1$ 空間群に属する。セルパラメータ $a = 22.6688(7)$ 、 $b = 8.5595(2)$ 、 $c = 23.3578(5)$ 、 $\alpha = 90^\circ$ 、 $\beta = 113.876(3)^\circ$ 、 $\gamma = 90^\circ$ 、 $V = 4144.3(2)\text{ \AA}^3$ 、 $Z = 2$ 。計算密度 $D_c = 0.999\text{ g/cm}^3$ 、単位セルにおける電子数 $F(000) = 1318.0$ 、単位セルの線形吸収係数 $\mu(\text{Cu K}\alpha) = 0.570\text{ mm}^{-1}$ 、回折実験温度 $T = 100.01(18)\text{ K}$ 。

30

【0455】

【化203】



40

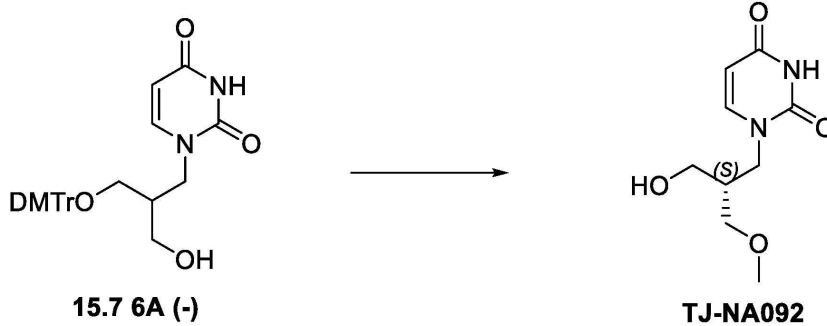
TJ-NA048: 検出結晶は無色の針状 ($0.30\text{ mm}^3 \times 0.04\text{ mm}^3 \times 0.04\text{ mm}^3$) で、単斜晶系 $P1$ 空間群に属する。セルパラメータ $a = 7.6165(4)$ 、 $b = 11.3423(5)$ 、 $c = 17.3991(8)$ 、 $\alpha = 85.007(4)^\circ$ 、 $\beta = 90^\circ$ 、 $\gamma = 90^\circ$ 、 $V = 1134.65(7)\text{ \AA}^3$ 、 $Z = 4$ 。計算密度 $D_c = 1.389\text{ g/cm}^3$ 、単位セルにおける電子数 $F(000) = 504.0$ 、単位セルの線形吸収係数 $\mu(\text{Cu K}\alpha) = 0.840\text{ mm}^{-1}$ 、回折実験温度 $T = 150.00(11)\text{ K}$ 。

50

$\alpha = 88.052(4)^\circ$ 、 $\beta = 70.532(4)^\circ$ 、 $V = 1411.75(12)$ \AA^3 、 $Z = 2$ 。計算密度 $D_c = 1.366 \text{ g/cm}^3$ 、単位セルにおける電子数 $F(000) = 620.0$ 、単位セルの線形吸収係数 $\mu(\text{Cu K}\alpha) = 0.856 \text{ mm}^{-1}$ 、回折実験温度 $T = 150.00(13) \text{ K}$ 。

【0456】

【化204】



10

TJ-NA092: 検出結晶は無色の角柱状 ($0.30 \text{ mm}^3 \times 0.10 \text{ mm}^3 \times 0.10 \text{ mm}^3$) で、単斜晶系 $P1$ 空間群に属する。セルパラメータ $a = 5.17960(10)$ 、 $b = 8.0667(2)$ 、 $c = 12.4077(2)$ 、 $\alpha = 93.146(2)^\circ$ 、 $\beta = 101.266(2)^\circ$ 、 $\gamma = 96.134(2)^\circ$ 、 $V = 503.993(18)$ \AA^3 、 $Z = 2$ 。計算密度 $D_c = 1.412 \text{ g/cm}^3$ 、単位セルにおける電子数 $F(000) = 228.0$ 、単位セルの線形吸収係数 $\mu(\text{Cu K}\alpha) = 0.945 \text{ mm}^{-1}$ 、回折実験温度 $T = 100.00(10) \text{ K}$ 。

20

【0457】

実施例 5: 異なる化学修飾を含む siRNA の配列依存性実験

Abasic 修飾は dsRNA 配列依存性を有することが知られており、従って、本発明者らは、複数の異なる配列における本開示の化学修飾を試験した。異なる 3 つの遺伝子 (ANGPTL3、HBV-S、HBV-X) mRNA を標的とする siRNA (配列は表 4 に示す通りである) を使用し、実施例 1 の化合物 (+) hmpNA(A)、(-) hmpNA(A) 及び対照としての GNA(A)、化合物により AS 鎖 5' 末端 7 位 (配列は表 5 に示す通りである) を修飾し、更に親配列とオンターゲット活性及びオフターゲット活性を比較した。

30

【0458】

【表 4】

表 4. 異なる遺伝子を標的とする siRNA 配列

dsRNA 標的遺伝子	配列番号	SS 鎖 5' - 3'
ANGPTL3	21	GmsAm sAmCmUfAmC fUfCfCmCmUmUmUm CmUmUmCmAm
HBV-S	22	Cm sCm sAmUmUfUmG fUfUfCmAmGmUmGm GmUmUmCm sGm
HBV-X	23	Cm sAm sCmCmUfCmU fGfCfAmCmGmUmCm GmCmAmUm sGm

40

上記表において、大文字 G、A、C、U は、それぞれ、グアニン、アデニン、シトシン及びウラシルを含むヌクレオチドを表し、小文字 m は、2'-メトキシ修飾を表し、小文字 f は、2'-フルオロ修飾を表し、小文字 s は、当該文字 s の左右に隣接する 2 つのヌ

50

クレオチド同士がチオホスホジエステル基で連結されていることを示し、以下同様である。

【 0 4 5 9 】

【 表 5 】

表 5. 異なる遺伝子を標的とする化学修飾を含む修飾 s i R N A 配列

標的 m R N A	d s R N A	配列番号	A S 鎖修飾
A N G P T L 3	TRD 5 8 4 0	2 4	U m s G f s A m A f G m A f A m A m G f G m G m A f G m U f A m G f U m U f C m s U m s U m
	TRD 5 8 4 1	2 5	U m s G f s A m A f G m A f <u>G N A (A)</u> A m G f G m G m A f G m U f A m G f U m U f C m s U m s U m
	TRD 5 8 4 5	2 6	U m s G f s A m A f G m A f (+) h m p N A (A) A m G f G m G m A f G m U f A m G f U m U f C m s U m s U m
	TRD 5 8 4 6	2 7	U m s G f s A m A f G m A f (-) h m p N A (A) A m G f G m G m A f G m U f A m G f U m U f C m s U m s U m
H B V - S	TRD 5 8 4 7	2 8	U m s G f s A m A m C m C f A m C m U m G m A m A m C m A f A m A f U m G m G m s C m s A m
	TRD 5 8 4 8	2 9	U m s G f s A m A m C m C f <u>G N A (A)</u> C m U m G m A m A m C m A f A m A f U m G m G m s C m s A m
	TRD 5 8 5 2	3 0	U m s G f s A m A m C m C f (+) h m p N A (A) C m U m G m A m A m C m A f A m A f U m G m G m s C m s A m
	TRD 5 8 5 3	3 1	U m s G f s A m A m C m C f (-) h m p N A (A) C m U m G m A m A m C m A f A m A f U m G m G m s C m s A m
H B V - X	TRD 5 8 5 4	3 2	U m s A f s U m G f C m G f A m C m G f U m G m C f A m G f A m G f G m U f G m s A m s A m
	TRD 5 8 5 5	3 3	U m s A f s U m G f C m G f <u>G N A (A)</u> C m G f U m G m C f A m G f A m G f G m U f G m s A m s A m
	TRD 5 8 5 9	3 4	U m s A f s U m G f C m G f (+) h m p N A (A) C m G f U m G m C f A m G f A m G f G m U f G m s A m s A m
	TRD 5 8 6 0	3 5	U m s A f s U m G f C m G f (-) h m p N A (A) C m G f U m G m C f A m G f A m G f G m U f G m s A m s A m

10

20

30

40

【 0 4 6 0 】

オンターゲット活性実験の結果は表 6 に示されており、G N A (A) は顕著な配列依存性を示し、異なる配列のオンターゲット活性は明らかに相違している。本開示に係る実験化合物は、明らかな配列依存性を示しておらず、一般的な適用性がより強い。

【 0 4 6 1 】

オフターゲット活性の実験結果は表 7 を参照することができ、本開示の実験化合物は、親配列に比べて s i R N A のオフターゲット活性を明らかに低下させることが分かる。

【 0 4 6 2 】

50

【表 6】

表 6. 異なる標的配列に対する siRNA のオンターゲット活性の結果

二本鎖 コード	標的遺伝子mRNA (オンターゲット活性) 発現余剰百分率 (平均値)											
	40 nM	13.3 nM	4.44 nM	1.48 nM	0.493 nM	0.164 nM	0.054 nM	0.0182 nM	0.006 0.9 nM	0.002 0.3 nM	0.000 67 nM	IC ₅₀ 値 (nM)
TRD 5840	28.0%	24.2%	30.9%	52.8%	48.9%	86.7%	92.7%	89.8%	92.4%	95.8%	102.4%	0.8710
TRD 5841	57.5%	51.1%	55.5%	68.3%	76.5%	85.9%	82.9%	87.8%	81.5%	64.0%	97.8%	>40
TRD 5845	28.2%	30.5%	41.7%	55.0%	63.9%	78.0%	77.1%	84.1%	95.8%	83.2%	91.9%	1.9953
TRD 5846	31.6%	26.8%	34.1%	59.1%	84.8%	102.1%	97.2%	108.9%	95.6%	107.2%	102.1%	1.9055
TRD 5847	9.3%	7.2%	6.3%	8.5%	17.9%	47.2%	80.6%	94.7%	100.5%	106.1%	110.6%	0.1380
TRD 5848	46.5%	35.1%	26.6%	36.0%	67.3%	76.3%	88.4%	104.1%	91.6%	95.1%	98.1%	0.7943
TRD 5852	24.7%	17.5%	13.1%	21.1%	40.5%	64.1%	84.3%	94.5%	88.4%	100.2%	95.1%	0.2951
TRD 5853	17.5%	11.5%	9.9%	13.5%	30.3%	54.5%	74.6%	86.3%	90.3%	91.0%	84.1%	0.1905
TRD 5854	37.9%	32.4%	35.3%	50.3%	70.6%	89.7%	98.8%	101.1%	106.1%	99.6%	114.7%	1.3804
TRD 5855	41.3%	40.7%	36.9%	73.6%	71.7%	87.0%	89.0%	85.8%	94.9%	104.4%	101.6%	4.2658
TRD 5860	43.5%	37.1%	34.1%	50.8%	77.6%	88.5%	86.6%	100.0%	95.1%	97.8%	110.8%	1.5488

10

【表 7】

表 7. 異なる標的配列に対する siRNA のオフターゲット活性の結果

二本鎖 コード	標的遺伝子mRNA (オフターゲット活性) 発現余剰百分率 (平均値)										
	40 nM	13.3 nM	4.44 nM	1.48 nM	0.493 nM	0.164 nM	0.054 nM	0.0182 nM	0.006 0.9 nM	0.002 0.3 nM	0.000 67 nM
TRD 5854	36.9%	32.7%	36.1%	39.8%	62.9%	81.3%	87.6%	87.0%	95.8%	93.6%	99.8%
TRD 5855	71.1%	78.2%	81.6%	92.0%	91.0%	94.1%	87.3%	93.6%	99.4%	119.9%	96.6%
TRD 5859	79.8%	81.0%	86.0%	96.4%	101.9%	98.8%	99.8%	118.4%	101.3%	93.3%	103.2%
TRD 5860	78.4%	75.6%	80.6%	86.1%	83.2%	95.9%	91.6%	91.5%	95.6%	97.3%	98.6%

20

30

【0463】

実施例 6 : リガンドの調製 (NAG0052、L96)

化合物 NAG0024、NAG0026 は、天津薬明康德新薬開発有限公司から購入した。特に説明のない限り、以下の実施例で使用される試薬は何れも市販品である。

【0464】

化合物 NAG0052 の合成

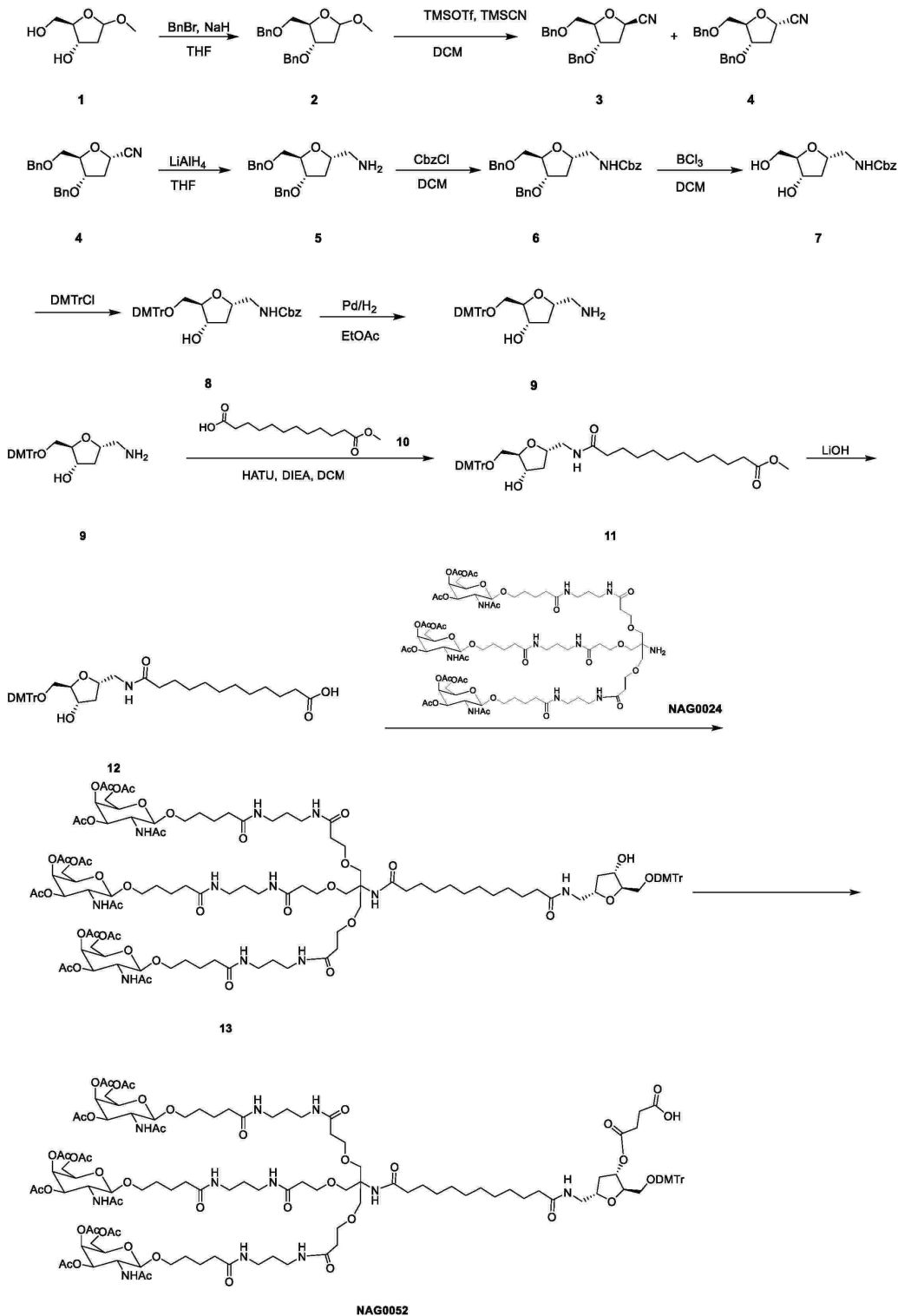
出発原料である化合物 1 は、江蘇倍達医薬科技有限公司から購入した。

【0465】

40

50

【化205】



10

20

30

40

【0466】

化合物 2

0 及び窒素ガス保護で、化合物 1 (12.3 mL、101 mmol) の THF (300 mL) 溶液に NaH (12.2 g、304 mmol、60% の純度) を数回に分けて加えた。当該混合物を 20 で 1 h 攪拌した後、0 に再度冷却し、次に系に臭化ベンジル (36.3 mL、304 mmol) を 1 滴ずつ滴下し、そして 20 で 12 h 攪拌した。当該反応液を H₂O (100 mL) でクエンチした後、EtOAc (200 mL × 2) で抽出した。合わせた有機相を飽和食塩水 (100 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥し、ろ過し、濃縮させて得た残留物はシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分離した

50

後、目標化合物 2 (20.0 g、51.8 mmol、収率 51%) を得た。

LCMS: $t_R = 2.615$ and 2.820 min in 30-90 A B_7 min_220&254 Shimadzu.lcm (Xtimate C18, 3 μ m, 2.1*30mm), MS (ESI) $m/z = 351.2$ [M+Na]⁺.

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) ppm 7.35 - 7.12 (m, 10H), 5.06 - 4.95 (m, 1H), 4.51 - 4.39 (m, 4H), 4.24 - 3.87 (m, 2H), 3.50 - 3.40 (m, 2H), 3.38 - 3.20 (m, 3H), 2.20 - 1.91 (m, 2H).

【0467】

化合物 3 及び化合物 4

20 及び窒素ガス保護で、化合物 2 (13.0 g、33.6 mmol) の DCM (300 mL) 溶液に TMSCN (13.5 mL、101 mmol) を一度に加え、次に TMSOTf (9.14 mL、50.5 mmol) の DCM (30 mL) 溶液を 1 滴ずつ加えた。当該反応液を 20 で 15 h 撹拌した。反応終了後に飽和 NaHCO₃ 水溶液 (80 mL) で当該系をクエンチし、そして DCM (150 mL x 2) で抽出し、合わせた有機相を飽和食塩水 (80 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥し、ろ過及び濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分離した後、目標化合物 3 (3.30 g、9.18 mmol、収率 27%) 及び淡黄色油状液体化合物 4 (8.50 g、9.18 mmol、収率 70%) を得た。

【0468】

化合物 3

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) ppm 7.42 - 7.29 (m, 10H), 4.81 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 4.65 - 4.49 (m, 4H), 4.30 - 4.21 (m, 2H), 3.65 - 3.57 (m, 1H), 3.57 - 3.49 (m, 1H), 2.49 - 2.40 (m, 2H).

【0469】

化合物 4

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) ppm 7.42 - 7.26 (m, 10H), 4.93 - 4.87 (m, 1H), 4.65 - 4.48 (m, 4H), 4.43 - 4.38 (m, 1H), 4.21 - 4.17 (m, 1H), 3.79 - 3.70 (m, 1H), 3.54 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 2.45 - 2.37 (m, 2H).

【0470】

化合物 5

0 及び窒素ガス保護で、化合物 4 (3.00 g、9.28 mmol) の THF (15 mL) 溶液を、LiAlH₄ (0.79 g、20.9 mmol) の THF (15 mL) 溶液に滴下し、滴下完了後に系を 0 で 1 h 反応させた。TLC (PE:EtOAc = 3:1) で原料が完全に消失したことをモニタリングした。発泡がなくなるまで、反応液に硫酸ナトリウム十水和物を徐々に加えた。その後、反応液をろ過し、ろ過ケーキをジクロロメタン (60 mL) で 3 回洗浄した後、ろ液を収集して回転乾燥させ、目標化合物 5 (3.00 g、収率 90%) を得た。

¹H NMR: (400 MHz, DMSO-d₆) ppm 7.40 - 7.14 (m, 10H), 4.54 - 4.38 (m, 4H), 4.06 - 3.99 (m, 2H), 3.91 (q, J = 6.4 Hz, 1H), 3.48 - 3.37 (m, 2H), 2.67 - 2.52 (m, 2H), 2.21 - 2.18 (m, 1H), 1.77 - 1.73 (m, 1H).

【0471】

化合物 6

10

20

30

40

50

窒素ガス保護で、化合物 5 (3.00 g、8.25 mmol) を DCM (30 mL) に溶解、TEA (3.44 mL、24.7 mmol) 及び CbzCl (1.76 mL、12.4 mmol) を加え、20 で 2 h 反応させた。LCMS で反応が完了したことを示した。反応液にジクロロメタン (30 mL) 及び水 (60 mL) を加えて抽出した。有機相を水 (60 mL × 3) で 3 回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濃縮させて順相カラムで精製し (PE : EtOAc = 1 : 1)、目標化合物 6 (2.5 g、収率 90%) を得た。

LCMS: $t_R = 0.810 \text{ min in } 5-95 \text{ AB}_1 \text{ min}$, MS (ESI) $m/z = 462.2 [M+H]^+$.

$^1\text{H NMR}$: (400 MHz, CDCl_3) ppm 7.39 - 7.29 (m, 15H), 5.35 (s, 1H), 5.15 - 5.01 (m, 2H), 4.72 (d, $J = 6.0 \text{ Hz}$, 1H), 4.54 - 4.40 (m, 3H), 4.26 (s, 1H), 4.23 - 4.18 (m, 1H), 4.11 - 4.04 (m, 1H), 3.54 - 3.41 (m, 3H), 3.37 - 3.25 (m, 1H), 2.34 - 2.23 (m, 1H), 1.85 - 1.79 (m, 1H).

【0472】

化合物 7

窒素ガス保護で、化合物 6 (2.00 g、3.90 mmol) を DCM (5 mL) に溶解、-78 で BCl_3 の THF 溶液 (1M、27.3 mL) を加え、1 h 反応させた。TLC (DCM : MeOH = 10 : 1) で原料が完全に消失したことをモニタリングした。-78 でメタノール (20 mL) を加えて反応液をクエンチし、濃縮させ、順相カラムで精製し (DCM : MeOH = 10 : 1)、目標化合物 7 (2.00 g、収率 60%) を得た。

$^1\text{H NMR}$: (400 MHz, CD_3OD) ppm 7.41 - 7.23 (m, 5H), 5.08 (s, 2H), 4.25 - 4.07 (m, 2H), 3.85 - 3.75 (m, 1H), 3.63 - 3.56 (m, 1H), 3.54 - 3.48 (m, 1H), 3.30 - 3.27 (m, 2H), 2.34 - 2.21 (m, 1H), 1.71 - 1.64 (m, 1H).

【0473】

化合物 8

窒素ガス保護で、化合物 7 (0.50 g、1.78 mmol) をピリジン (5 mL) に溶解、0 で 4A 分子ふるい (500 mg) 及び DMTrCl (0.66 mL、2.13 mmol) を加え、その後、20 に昇温して 1.5 h 反応させた。TLC (PE : EtOAc = 2 : 1) で原料が完全に消失したことをモニタリングした。反応液を酢酸エチル (60 mL) 及び水 (60 mL) に加えて抽出し、有機相を水 (60 mL × 3) で 3 回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濃縮させ、順相カラムで精製し (PE : EtOAc = 1 : 1)、目標化合物 8 (800 mg、収率 90%) を得た。

$^1\text{H NMR}$: (400 MHz, CDCl_3) ppm 7.44 (d, $J = 7.6 \text{ Hz}$, 2H), 7.37 - 7.23 (m, 11H), 7.22 - 7.15 (m, 1H), 6.84 (d, $J = 8.8 \text{ Hz}$, 4H), 5.09 (s, 2H), 4.31 - 4.17 (m, 2H), 4.02 - 3.91 (m, 1H), 3.84 - 3.73 (m, 6H), 3.33 (s, 1H), 3.28 (s, 1H), 3.19 - 3.01 (m, 2H), 2.34 - 2.25 (m, 1H), 1.70 - 1.62 (m, 1H).

【0474】

化合物 9

化合物 8 (800 mg、1.234 mmol) を EtOAc (5 mL) に溶解、Pd/C 10% (800 mg、7.517 mmol) を加え、反応を H_2 条件 (15 Psi)、20 で 1 h 反応させた。LCMS で反応が既に完了したことを示した。反応液をろ過

し、ろ過ケーキをジクロロメタン(100 mL)及びメタノール(100 mL)で3回洗淨し、濃縮させ、逆相カラムを経て分離して化合物9(300 mg、54%)を得た。

LCMS: $t_R = 2.586 \text{ min in } 10-80 \text{ CD}_3\text{OD}_3 \text{ min MS}$
(ESI) $m/z = 450.2 [M+H]^+$ 。

【0475】

化合物11

化合物10(435 mg、1.780 mmol)をDCM(10 mL)に溶解、DIEA(0.441 mL、2.67 mmol)及びHATU(677 mg、1.78 mmol)を加えた後、化合物9(400 mg、0.890 mmol)を更に加え、20℃で1h反応させた。TLC(DCM:MeOH=10:1)で反応が完成したことをモニタリングした。反応液にジクロロメタン(60 mL)及び水(60 mL)を加えて抽出し、有機相を水(60 mL×3)で3回洗淨し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濃縮させ、順相カラムで精製し(PE:EtOAc=0:1でカラムにかけ、100%で製品ピークが出た)、目標化合物11(600 mg、収率90%)を得た。

10

LCMS: $t_R = 2.745 \text{ min in } 30-90 \text{ CD}_3\text{OD}_3 \text{ min, MS}$
(ESI) $m/z = 698.4 [M+Na]^+$ 。

$^1\text{H NMR}$: (400 MHz, CD_3OD) ppm 7.46 - 7.38 (m, 2H), 7.35 - 7.24 (m, 6H), 7.22 - 7.16 (m, 1H), 6.90 - 6.78 (m, 4H), 4.29 - 4.21 (m, 2H), 4.02 - 3.95 (m, 1H), 3.77 (s, 6H), 3.66 - 3.62 (m, 3H), 3.41 (s, 1H), 3.18 - 3.04 (m, 2H), 2.36 - 2.17 (m, 5H), 1.71 - 1.50 (m, 5H), 1.39 - 1.25 (m, 14H)。

20

【0476】

化合物12

化合物11(600 mg、0.799 mmol)をTHF(3 mL)及び H_2O (1 mL)に溶解、LiOH· H_2O (134 mg、3.20 mmol)を加え、20℃で12h反応させた。TLC(DCM:MeOH=10:1)で反応が完了したことを示した。反応液を回転乾燥させ、水(5 mL)及びメタノール(5 mL)で溶解し、逆相カラムで精製し($\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}=1:1$ 、約35%でピークが出た)、目標化合物12(460 mg、収率100%、リチウム塩)を得た。

30

LCMS: $t_R = 1.346 \text{ min in } 10-80 \text{ CD}_3\text{OD}_3 \text{ min, MS}$
(ESI) $m/z = 684.3 [M+Na]^+$ 。

HPLC: $t_R = 1.879 \text{ min in } 10-80 \text{ CD}_3\text{OD}_6 \text{ min}$ 。

$^1\text{H NMR}$: (400 MHz, CD_3OD) ppm 7.47 - 7.39 (m, 2H), 7.35 - 7.24 (m, 6H), 7.22 - 7.15 (m, 1H), 6.91 - 6.79 (m, 4H), 4.31 - 4.18 (m, 2H), 4.02 - 3.95 (m, 1H), 3.78 (s, 6H), 3.44 - 3.33 (m, 2H), 3.18 - 3.04 (m, 2H), 2.35 - 2.27 (m, 1H), 2.24 - 2.10 (m, 4H), 1.70 - 1.51 (m, 5H), 1.31 - 1.23 (m, 12H)。

40

【0477】

化合物13

室温環境、及び窒素ガス保護で、化合物NAG0024(271 mg、0.151 mmol)を無水THF(2 mL)及び無水DMF(4 mL)に溶解、3A分子ふるいを加え、更に化合物12(100 mg、0.151 mmol)、HOBt(25 mg、0.181 mmol)、DCC(38 mg、0.181 mmol)及びDIEA(39 mg、0.302 mmol)を順に加えた。反応液を45℃で16h反応させ、LC-MSで反応が完了したことを示した後、水を加えてクエンチし、ろ過した。ろ液を濃縮させた後、C18逆相カラムを経て精製し($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$)、化合物13(210 mg、収率57%)を得た。

50

)を得た。

【0478】

化合物NAG0052

室温環境で、化合物13 (230 mg、0.094 mmol) をピリジン (5 mL) に溶解、分子ふるいを加え、DMA P (12 mg、0.283 mmol)、コハク酸無水物 (28 mg、0.283 mmol) を加えた。窒素ガス保護で、50 で16 h 攪拌した。LCMSで反応完了を検出し、ろ過して回転乾燥させた。C18 逆相カラムにかけて精製した後、分取HPLCで二次精製し、目標化合物NAG0052 (123 mg、0.048 mmol、収率51%) を得た。

MS (ESI) $m/z = 2535.3 [M - 1]^-$. 理論: 2536.2.

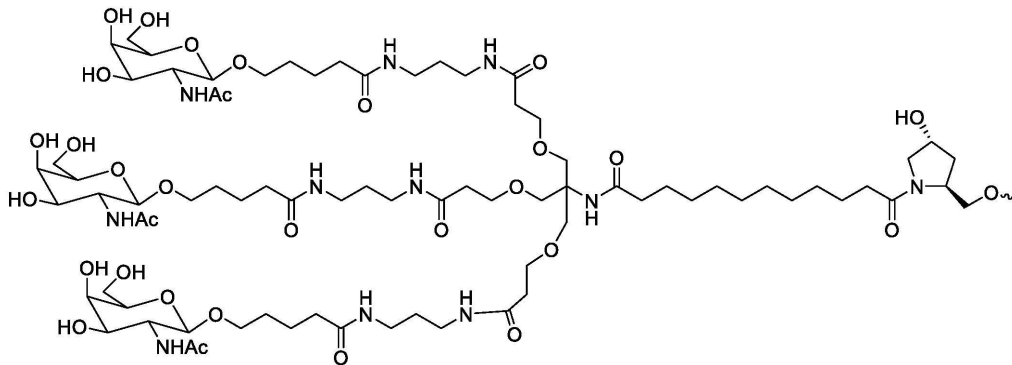
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, アセトニトリル- d_3) 7.48 - 7.43 (m, 2H)、7.37 - 7.12 (m, 11H)、7.00 - 6.85 (m, 10H)、6.66 (s, 1H)、5.31 (dd, $J = 3.4, 1.1$ Hz, 3H)、5.20 - 5.13 (m, 1H)、5.05 (dd, $J = 11.3, 3.4$ Hz, 3H)、4.56 (d, $J = 8.5$ Hz, 3H)、4.30 (dd, $J = 7.7, 5.3$ Hz, 1H)、4.18 - 3.93 (m, 14H)、3.79 (s, 10H)、3.65 (q, $J = 4.7, 3.6$ Hz, 13H)、3.56 - 3.07 (m, 24H)、2.56 (s, 6H)、2.37 (t, $J = 5.8$ Hz, 10H)、2.17 (t, $J = 7.5$ Hz, 9H)、2.02 - 1.96 (m, 20H)、1.88 (s, 8H)、1.82 - 1.73 (m, 2H)、1.60 (dt, $J = 15.0, 7.3$ Hz, 16H)、1.27 (s, 13H) s.

化合物NAG0052は、固相合成により配列に連結され、更にアミン分解された後、NAG0052の構造から一部の官能基が除去されてNAG0052'となった。

【0479】

L96の合成

【化206】



特許出願WO2014025805A1に記載の方法に従って調製し得た。

【0480】

実施例7: dsRNAの合成

1. ベクター付き樹脂の自製

カルボン酸基を含有する化合物NAG0052 (157 mg、0.062 mmol) を無水DMF (3 mL) に溶解、基質が完全に溶解した後、無水アセトニトリル (4 mL)、DIEA (0.03 mL、0.154 mmol、2.5 eq) 及びHBTU (35 mg、0.093 mmol、1.5 eq) を順に加えた。反応液を均一に混合した後、大孔質アミノメチル樹脂 (476 mg、空白担持量0.41 mmol/g、目標担持量0.1 mmol/g) を更に加えた。反応液をシェーカー (温度: 25、回転速度: 200 rpm) に入れて一晩振とうした。反応液をろ過し、ろ過ケーキをDCM、無水アセトニトリルでそれぞれ順に洗浄し、固体を収集し、真空で一晩乾燥した。

【0481】

前のステップの固体を無水アセトニトリル (5 mL) に分散し、ピリジン (0.18 m

L)、DMAP(3mg)、NMI(0.12mL)及びCapB1(2.68mL)を順に加えた。反応液をシェーカー(温度:25、回転速度:200rpm)に入れて2h振とうした。反応液をろ過し、ろ過ケーキを無水アセトニトリルで洗浄し、固体を収集し、真空で一晩乾燥し、ベクター付き樹脂を得た。測定によって担持量が0.1mmol/gであった。

【0482】

2.既に樹脂に連結されたNAG0052は、当該樹脂を開始として、ヌクレオチド配列順番に従って3'-5'の方向からヌクレオシド単量体に1個ずつ連結された。1つのヌクレオシド単量体との連結には、脱保護、カップリング、キャッピング、酸化又は硫化という4ステップ反応が含まれている。操作は、当該技術分野において一般的であった。

10

調製されたdsRNAは、表8及び表9-1に示されるセンス鎖及びアンチセンス鎖を有した。

【0483】

【表8】

表8. dsRNAリスト

dsRNA番号	センス鎖番号	アンチセンス鎖番号
TRD002218	TJR4373-SS	TJR0414-AS
TRD007205	TJR013485S	TJR0414-AS

【0484】

20

【表9】

表9-1. dsRNAセンス鎖及びアンチセンス鎖の核酸配列

		配列番号	配列方向5' - 3'
センス鎖	TJR4373-SS	36	CmsAmsGm UmGfUm UfCf Uf UmGmCm UmCmUm AmU mAm Am- L96
	TJR013485S	37	CmsAmsGm UmGfUm UfCf Uf UmGmCm UmCmUm AmU mAms Ams- NAG0052'
アンチセンス鎖	TJR0414-AS	38	UmsUfsAm UmAmGf AmGm Cm AmAmGm AmAfCm AfC mUm GmsUmsUm

30

上記dsRNAの構造は、以下の通りである：

40

50

【表 10】

表 9-2. dsRNAの構造

dsRNAセ ンス鎖番号	構造
TJR437 3-SS	
TJR013 485S	

10

20

【0485】

そのうち、TRD002218は参照陽性化合物とした。

【0486】

実施例 8 : dsRNAの、体内での標的遺伝子 mRNA の発現量への阻害

本実験は、異なる構造と複合した本開示の dsRNA の、体内での標的遺伝子 mRNA 発現量への阻害効率を調べた。

【0487】

雄 6 週齢 ~ 8 週齢 C57BL/6 マウスを、各群に合計 6 匹ずつ、各時点で 3 匹ずつ無作為に群分けし、各群のマウスに TRD007205、参照陽性 TRD002218 及び PBS をそれぞれ投与した。

30

【0488】

全ての動物は、体重によって投与量が算出され、皮下注射で単回投与され、dsRNA の投与用量 (リガンドを含まない siRNA の量で) は 1 mg / kg、投与体積は 5 mL / kg であった。投与の 7 日、28 日後に、マウスを殺し、肝臓を収集し、RNA lator (Sigma Aldrich 社) で保存し、その後、組織ホモジナイザーにより肝臓をホモジネートし、更に組織 RNA 抽出試薬キット (凡知医療科技、FG0412) により取扱説明書に記載された操作ステップに従って肝臓全 RNA を抽出して得た。全 RNA を cDNA に逆転写し、そしてリアルタイム蛍光定量 PCR 方法により肝臓中の TTR mRNA の発現量を検出した。当該蛍光定量 PCR 法において、グリセルアルデヒド 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) 遺伝子を内部基準遺伝子として、TTR と GAPDH に対する Taqman プローブプライマーにより TTR と GAPDH の mRNA 発現量をそれぞれ検出した。

40

【0489】

【表 11】

表 10. マウス体内の実験化合物の群分け情報

化合物の番号	用量	mRNA 定量	動物数	備考
PBS	—	D 7, 28	6	各時点で 3 匹ずつ
TRD002218	1 mpk s. c.	D 7, 28	6	各時点で 3 匹ずつ
TRD007205	1 mpk s. c.	D 7, 28	6	各時点で 3 匹ずつ

50

検出プライマーの配列を表 1 1 に示される：

【表 1 2】

表 1 1. プライマー配列

プライマーの名称	プライマー配列情報
mTTR-F	GGGAAGACCGCGGAGTCT (配列番号39)
mTTR-R	CAGTTCTACTCTGTACACTCCTTCTACAAA (配列番号40)
mTTR-P	CTGCACGGGCTCACACAGATGA (配列番号41)
mGAPDH-F	CGGCAAATTCAACGGCACAG (配列番号42)
mGAPDH-R	CCACGACATACTCAGCACCG (配列番号43)
mGAPDH-P	ACCATCTTCCAGGAGCGAGACCCCACT (配列番号44)

10

【0490】

TTR mRNA 発現量は、下記の等式によって算出した。

$$\text{TTR mRNA 発現量} = \left[\left(\frac{\text{試験群 TTR mRNA 発現量}}{\text{試験群 GAPDH mRNA 発現量}} \right) / \left(\frac{\text{対照群 TTR mRNA 発現量}}{\text{対照群 GAPDH mRNA 発現量}} \right) \right] \times 100\%$$

20

【0491】

投与の7日、28日後に、異なる構造と複合した dsRNA の、体内での標的遺伝子 mRNA 発現量への阻害効率はそれぞれ、図 1 及び図 2 に示された。図 1 の結果から分かるように、TRD007205 は、投与7日後の TTR mRNA 発現への阻害は、何れも良好な効果を有することを示した。図 2 から分かるように、投与の28日後、TRD007205 による標的遺伝子 mRNA 発現量への阻害作用は、TRD002218 より優れた。

【0492】

実施例 9 : dsRNA の合成

1 . ベクター付き樹脂の自製

具体的な操作は実施例 7 と同様であった。

30

【0493】

2 . NAG0052 付き樹脂を開始として、ヌクレオチド配列順番に従って 3' - 5' の方向からヌクレオシド単量体に 1 個ずつ連結された。1 つのヌクレオシド単量体との連結には、脱保護、カップリング、キャッピング、酸化又は硫化という 4 ステップ反応が含まれている。具体的には、実施例 2 の合成方法を参照した。

【0494】

調製された dsRNA は、表 1 2 及び表 1 4 に示されるセンス鎖及びアンチセンス鎖を有した。

40

【0495】

50

【表 1 3】

表 1 2. dsRNAリスト

標的	dsRNA番号	センス鎖番号	アンチセンス鎖番号
HBV	TRD007970	TJR014881S	TJR013124A
	TRD007994	TJR014931S	TJR013130A
	TRD007995	TJR014932S	TJR013131A
	TRD007970-1	TJR014881S-1	TJR013124A
	TRD007994-1	TJR014931S-1	TJR013130A
	TRD007995-1	TJR014932S-1	TJR013131A
	TJR100259	TJR014881S	A0166
	TJR100260	S0186	TJR013124A

10

注：TRD007970、TRD007970-1、TJR100259、TJR100260はHBV-Xを標的とし、

TRD007994、TRD007995、TRD007994-1、TRD007995-1は、HBV-Sを標的とする。

【0496】

【表 1 4】

表 1 3. dsRNAのセンス鎖及びアンチセンス鎖の、対応する原配列

	対応するセンス鎖番号	原配列の配列番号	原配列、方向5'-3'	対応するセンス鎖番号	原配列の配列番号	原配列、配列方向5'-3'
センス鎖	TJR014881S	1	GUGUGCACUUCGCUUCACC	TJR014881S-1	1	GUGUGCACUUCGCUUCACC
	TJR014931S	2	CUUUUGUCUUUGGGUAUAU	TJR014931S-1	2	CUUUUGUCUUUGGGUAUAU
	TJR014932S	3	UUACCAAUUUCUUUUGUU	TJR014932S-1	3	UUACCAAUUUCUUUUGUU
	S0186	4	GUGUGCACUUCGCUUCACU	S0186-1	4	GUGUGCACUUCGCUUCACU
	対応するアンチセンス鎖番号	原配列の配列番号	原配列、方向5'-3'			
アンチセンス鎖	TJR013124A	5	AGUGAAGCGAAGUGCACACGG			
	TJR013130A	6	AUAUACCCAAAGACAAAAGAA			
	TJR013131A	7	AACAAAAGAAAAUUGGUAACA			
	A0166	8	IGUGAAGCGAAGUGCACACGG			

20

30

40

50

【表 15】

表 14. dsRNA のセンス鎖及びアンチセンス鎖

	センス鎖番号	配列番号	配列方向 5' - 3'	センス鎖番号	配列番号	配列方向 5' - 3'
センス鎖	TJR014881S	9	GmsUmsGmUm GmCmAfCfUf UmCmGmCmUm UmCmAmCmCm -NAG0052'	TJR014881S-1	10	GmsUmsGmUmGf CmAfCfUfUmCm GmCmUmUmCmAm CmCm-NAG0052'
	TJR014931S	11	CmsUmsUmUm UfGmUfCfUf UmUmGmGmGm UmAmUmAmUm -NAG0052'	TJR014931S-1	12	CmsUmsUmUmUm GmUfCfUfUmUm GmGmGmUmAmUm AmUm-NAG0052'
	TJR014932S	13	UmsUmsAmCm CfAmAfUfUf UmUmCmUmUm UmUmGmUmUm -NAG0052'	TJR014932S-1	14	UmsUmsAmCmCm AmAfUfUfUmUm CmUmUmUmUmGm UmUm-NAG0052'
	S0186	15	GmsUmsGmUm GmCmAfCfUf UmCmGmCmUm UmCmAmCmUm -NAG0052'	S0186-1	16	GmsUmsGmUmGf CmAfCfUfUmCm GmCmUmUmCmAm CmUm-NAG0052'
アンチセンス鎖	TJR013124A	17	Am s G f s Um G f Am A f (-) h m p N A (G) Cm G m A f Am G f Um G f Cm A f Cm A f Cm s G m s G m			
	TJR013130A	18	Am s U f s Am U f Am C f (-) h m p N A (C) Cm Am A f Am G f Am C f Am A f Am A f G m s Am s Am			
	TJR013131A	19	Am s A f s Cm A f Am A f (-) h m p N A (A) G m Am A f Am A f Um U f G m G f Um A f Am s Cm s Am			
	A0166	20	Im s G f s Um G f Am A f (-) h m p N A (G) Cm G m A f Am G f Um G f Cm A f Cm A f Cm s G m s G m			

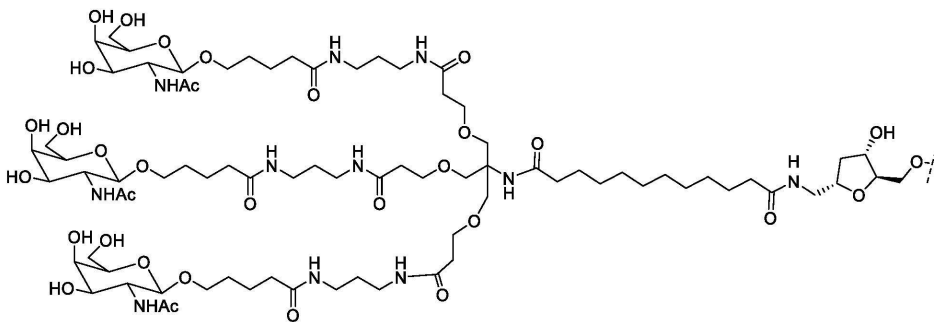
【0497】

そのうち、(-)hmpNA(A)、(-)hmpNA(G)、(-)hmpNA(C)、(-)hmpNA(U)の構造は、実施例4を参照した。

【0498】

NAG0052'の構造は、

【化207】



である。

【0499】

実施例10: HBVに対するdsRNAのオンターゲット活性陽性対照化合物を表15に示される。

【0500】

10

20

30

40

50

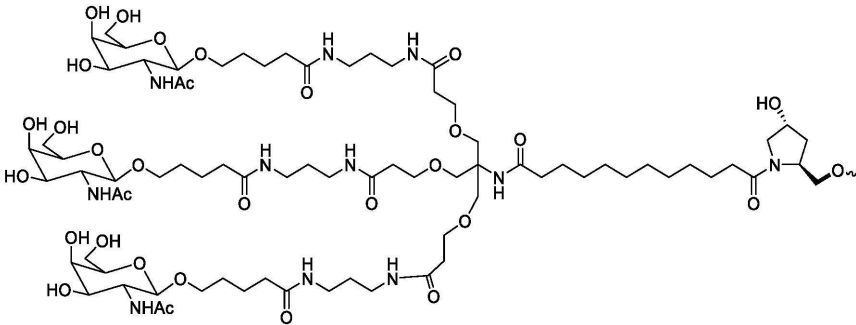
【表 1 6】

表 1 5. 陽性対照化合物配列情報

陽性対照化合物番号	配列番号	センス鎖 (5' - 3')	配列番号	アンチセンス鎖 (5' - 3')
AD81890	45	GmsUmsGmUmGf CmAfCfUfUmCm GmCmUmUmCmA CmA-L96	46	UmsGfsUmGmA NA(A)GmCfGfAmA mGmUmGfCmAfCm AmCmsUmsUm

そのうち、AD81890はCN201980053789.8を参照して調製され、L96構造は

【化 2 0 8】



である。

【0501】

HEK293A細胞では、11個の濃度勾配を使用し、表14及び15のdsRNA配列に対して体外分子レベルのシミュレーションとオンターゲット活性スクリーニングを行った。

【0502】

HBV遺伝子でdsRNAに対応するオンターゲット配列を構築し、psiCHECK-2プラスミドに挿入した。当該プラスミドには、ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子及びホタルルシフェラーゼ遺伝子が含まれていた。二重レポーター遺伝子システムとして、dsRNAの標的配列はウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子の3'UTR領域に挿入され、dsRNAの標的配列に対する活性は、ホタルルシフェラーゼでキャリブレーションされたウミシイタケルシフェラーゼの発現状況の検出によって反映可能であり、検出にはDual-Luciferase Reporter Assay System (promega, E2940)が使用された。

【0503】

HEK293A細胞を10%のウシ胎児血清を含むDMEM高グルコース培地に培養し、37℃、5%のCO₂の条件で培養した。トランスフェクション24h前、HEK293A細胞を96ウェルプレートに接種し、各ウェルに8×10³個の細胞、各ウェルに100μL培地の密度で接種した。

【0504】

取扱説明書に従って、Lipofectamine 2000 (ThermoFisher, 11668019)により細胞にdsRNA及び対応するプラスミドを共トランスフェクションし、各ウェルに0.2μLのLipofectamine 2000を使用した。プラスミドのトランスフェクション量は、各ウェルに20ngであった。オンターゲット配列プラスミドについて、dsRNAは、最高濃度点の最終濃度を20nMとし、3倍勾配希釈で、20nM、6.6667nM、2.2222nM、0.7407nM、0.2469nM、0.0823nM、0.0274nM、0.0091nM、0.0030nM、0.0010nM及び0.0003nM、合計11個の濃度点を設定した。トランスフェクションの24h後に、Dual-Luciferase Reporter A

10

20

30

40

50

ssay System (promega、E2940)によりオンターゲットレベルを検出した。

【0505】

psiCHECK活性スクリーニング実験手順は、具体的には以下の通りである：

HEK293A細胞系において、psi-CHECKを行うことにより、dsRNA配列のオンターゲット活性をスクリーニングした。実験材料及び機器は、表16及び17に詳細に示された。

【0506】

Psi-CHECKプラスミドは、生工生物工程（上海）股フン有限公司から購入した。

【0507】

【表17】

表16. psi-CHECK実験消耗品及び試薬

試薬・消耗品				
名称	会社	製品番号/型番	ロット番号	有効期限
HEK293A細胞	南京科佰	ATCC-Cobioer/CBP60202	/	/
OPTI-MEM	GIBCO	31985-070	2085556	2022/1/30
DMEM	GIBCO	11965-092	2061113	2022/2/28
FBS	GIBCO	10091-148	1989478	May-23
パンクレアチン	GIBCO	25200-056	/	/
Dual-Glo® Luciferase Assay System	Promega	E2940	0000363099	2022/5/13
Lipofectamine® 2000	Invitrogen	11668-019	/	2022/6/14
PBS (1X)	Corning	21-040-CVR	26318001	Sep-20

【表18】

表17. psi-CHECK実験機器

実験用機器		
名称	会社	製品番号/型番
Nanodrop	Thermo	Nanodrop One
プレートリーダー	Perkin Elmer	EnVision2105
シングルチャンネルピペット	Rainin	SL-2XLS+/10XLS+/20XLS+/200XLS+/1000XLSC+

10

20

30

40

50

【表 19】

8チャンネル／12チャンネルピ ペット	R a i n i n	E 8 - 2 0 0 X L S + / E 1 2 - 2 0 0 X L S +
CO ₂ インキュベーター	T h e r m o	F o r m a TM S t e r i - C y c l e TM i 1 6 0
生物学的安全キャビネット	E s c o	A C 2 - 4 S 1
遠心分離機	T h e r m o	F r e s c o 2 1
作図ソフトウェア	/	G r a p h P r i s m 5

10

【0508】

p s i C H E C K 実験手順：

(一) 細胞の播種

1. 実験の準備：

1.1 HEK293A細胞の準備：

南京科佰から購入し、足場依存性細胞消化が完了した後に計数する必要があるあり、細胞活性率が95%以上であれば使用可能である。

【0509】

1.2 DMEM完全培地(DMEM+10% FBS)を4 で保存し、実験前に平衡を室温に取り出した。

20

【0510】

1.3 96ウェル細胞プレート。

【0511】

2. 細胞の播種

トランスフェクション18h前、HEK293A細胞を96ウェルプレートに接種し、各ウェルに 8×10^3 個の細胞、各ウェルに100 μ L培地の密度で接種し、

2.1 培地を37 の水浴ポットに入れて20minインキュベートして使用に備え、

2.2 均一な細胞懸濁液100 μ Lを吸引し、細胞計数染料5 μ Lと混合し、1min静止染色し、懸濁液15 μ Lを吸引して細胞計数プレートに注入し、生細胞量(緑色)を計算し、細胞生存率は98.7%であり、

30

2.3 細胞計数結果に応じて、適当な体積の培地を加え、細胞量が 8×10^3 細胞/ウェルとなるように、100 μ Lを96ウェルプレートに分取し、37、5%のCO₂インキュベーターに入れて培養した。

【0512】

(二) 細胞トランスフェクション実験

1. 実験の準備：

1.1 dsRNA試料及びプラスミドの調製：dsRNA試料を20 μ Mに定量し、psi-CHECKプラスミドをその濃度を測定し、-20 で保存して使用に備え、使用前に短時間の遠心分離を必要とし、

1.2 トランスフェクション試薬Lipofectamine2000を4 で保存し、

40

1.3 PCR96ウェルプレートチューブ及び8連PCRチューブ、

1.4 Opti-MEM培地。

【0513】

2. 細胞トランスフェクション実験

2.1 トランスフェクション前に、Opti-MEM培地を予熱し、Opti-MEM培地と細胞プレートで交換し、80 μ Lの培地/ウェルとした。

【0514】

2.2 トランスフェクション複合体を調製する：各濃度につき2つの平行ウェルを設け、トランスフェクション複合体の具体的な調製量は表18に示され、

50

トランスフェクション複合体成分：

【表 20】

表 18. ウェルプレート内の各ウェルに必要なトランスフェクション複合物の使用量

名称	使用量/ウェル	Opti-MEM
プラスミド	20 ng	10 μ L
Lipofectamine 2000	0.2 μ L	10 μ L

【0515】

調製したプラスミドを対応する 8 連チューブに 22 μ L / チューブを分注し、Tube A と命名し、

2.3 液置換：ウェル中の 10% FBS 含有の H-DMEM 完全培地を吸引除去し、80 μ L の Opti-MEM に交換し、飢餓処理を 1.5 h 行った。

【0516】

2.4 希釈 dsRNA：dsRNA を -20 から出して解凍し、均一に混合し、表 19 に従って異なる実験の必要に応じて異なる濃度に希釈し、作動液として使用に備え、使用する直前に調製した。

【0517】

【表 21】

表 19. dsRNA 試料の多濃度希釈案

dsRNA 最終濃度 (nM)	水と dsRNA の添加
20	4 μ L dsRNA (保存液) + 36 μ L の H ₂ O
6.6667	10 μ L dsRNA + 20 μ L H ₂ O
2.2222	10 μ L dsRNA + 20 μ L H ₂ O
0.7407	10 μ L dsRNA + 20 μ L H ₂ O
0.2469	10 μ L dsRNA + 20 μ L H ₂ O
0.0823	10 μ L dsRNA + 20 μ L H ₂ O
0.0274	10 μ L dsRNA + 20 μ L H ₂ O
0.0091	10 μ L dsRNA + 20 μ L H ₂ O
0.0030	10 μ L dsRNA + 20 μ L H ₂ O
0.0010	10 μ L dsRNA + 20 μ L H ₂ O
0.0003	10 μ L dsRNA + 20 μ L H ₂ O

2.5 希釈された dsRNA を、対応する Tube A の 8 連チューブに 2.2 μ L / チューブで添加し、使用する直前に調製し、

2.6 Lipofectamine 2000 Mix の製剤：Lipofectamine 2000 を Opti-MEM で希釈し、5 min 静置し、Lipo Mix の具体的な調製量は表 19 に示され、

2.7 続いて調製された Lipo Mix を Tube A に対応する 8 連チューブに分注し、22 μ L / チューブでピペティングして均一に混合した後（気泡を発生させず

)、室温で20minインキュベートした。

【0518】

2.8 上記Tube A混合物を、20 μ L/ウェルで、各ウェルの細胞に入れ、元の80 μ LのOpti-MEMを加えて最終容積が100 μ Lであった。4hインキュベーターで培養した後、各ウェルに20% FBS含有のH-DMEM培地100 μ Lを追加した。

【0519】

2.9 37 $^{\circ}$ C、CO₂インキュベーターで24h培養した。

【0520】

(三) Dual-Glo (登録商標) Luciferase Assay System 検出 10

1. 実験の準備:

1.1 Dual luciferase reporter gene assay kit (promega, cat. E2940) 成分及び調製方法: Dual-Glo (登録商標) Luciferase Buffer及びvial Dual-Glo (登録商標) Luciferase Substrate (lyophilized) を予備混合し、次いで、15mLの遠心分離管に、各管に7.5mLで分取した。Dual-Glo (登録商標) Stop&Glo (登録商標) Bufferは、各管に12mLに事前に分注を行った。試験前に事前に混合したDual-Glo (登録商標) Luciferaseを再溶解し、室温に平衡化した後、DMEM 7.5mLを各管に添加して調製し、使用する直前に調製した。Dual-Glo (登録商標) Stop&Glo (登録商標) Bufferを再溶解し、室温に平衡化した後、Dual-Glo (登録商標) Stop&Glo (登録商標) Substrate 100:1で配合し、使用する直前に調製した。 20

【0521】

2. シグナル採取

2.1 吸引: 96ウェル培養プレートから元の培地を吸引し、

2.2 基質添加 (Dual-Glo (登録商標) Luciferase): 各ウェルに150 μ LのLARI I基質を添加し、シェーカーで10min振とうし、

2.3 ピペティング: 基質 (Dual-Glo (登録商標) Luciferase Mix) 120 μ Lを取り、96ウェルプレートに移し、Firefly化学発光値を読み取り、 30

2.4 基質添加 (Dual-Glo (登録商標) Stop&Glo): 各ウェルに60 μ LのDual-Glo (登録商標) Stop&Glo基質を更に添加し、シェーカーで10min振とうして、Renilla化学発光値を読み取り、

2.5 相対値Ratio = Ren / Fir (ウミシイタケ/ホタルの比)を計算し、

2.6 阻害率 $1 - (\text{Ratio} + \text{dsRNA} / \text{レポーター遺伝子のみ}) \times 100\% =$ 阻害率 (%) を計算し、

本開示において、余剰活性% (mRNA余剰発現量%又はmRNA余剰発現割合ともいう) = $100\% - \text{阻害率}(\%)$ である。 40

【0522】

2.7 Graphpad prism 5を用いてをプロットした。

【0523】

結果は表20に示される通りであった。

【0524】

【表 2 2】

表 20. dsRNA の p s i - C H E C K オンターゲット活性スクリーニング結果

標的遺伝子mRNA発現余剰百分率 (平均値)						
二本鎖コード	20 nM	6. 666 7 nM	2. 222 2 nM	0. 740 7 nM	0. 246 9 nM	0. 0823 nM
TRD00 7970	24. 3 6%	19. 1 4%	17. 4 8%	15. 7 4%	26. 8 5%	46. 52%

【表 2 3】

TRD00 7994	4. 48%	3. 56%	3. 49%	2. 58%	8. 30%	9. 56%
TRD00 7995	2. 40%	2. 39%	3. 12%	3. 96%	9. 01%	22. 05%
AD818 90	13. 5 5%	11. 1 8%	22. 1 1%	35. 6 4%	77. 9 8%	117. 71%
二本鎖コード	0. 027 4 nM	0. 009 1 nM	0. 003 0 nM	0. 001 0 nM	0. 000 3 nM	オンターゲット活性 (GSC M) IC ₅₀ (nM)
TRD00 7970	79. 9 1%	91. 3 7%	96. 5 9%	103. 8 9%	100. 3 0%	0. 0719
TRD00 7994	21. 6 4%	49. 5 7%	84. 8 4%	101. 3 8%	91. 4 5%	0. 0098
TRD00 7995	52. 2 3%	87. 2 9%	100. 4 3%	105. 8 2%	91. 0 1%	0. 0309
AD818 90	119. 7 6%	118. 3 3%	114. 4 4%	119. 6 4%	104. 4 2%	0. 4677

10

20

【0525】

以上の結果は、対照化合物AD81890を参照して、TRD007970、TRD007994、TRD007995がp s i C H E C KシステムにおいてHBV遺伝子に対して高レベルのオンターゲット阻害活性を有することを示した。

【0526】

別のバッチの結果は表21に示される。

【0527】

【表 2 4】

表 21. dsRNA の p s i - C H E C K オンターゲット活性スクリーニング結果

標的遺伝子mRNA発現余剰百分率 (平均値)						
二本鎖コード	20 nM	6. 666 7 nM	2. 222 2 nM	0. 740 7 nM	0. 246 9 nM	0. 0823 nM
TRD00 7970	33. 1%	19. 4%	17. 6%	18. 1%	28. 7%	53. 1%
TJR10 0259	28. 1%	16. 8%	16. 8%	24. 2%	40. 9%	68. 6%
TJR10 0260	37. 0%	20. 8%	18. 8%	26. 9%	48. 4%	69. 9%
AD818 90	11. 6%	13. 2%	28. 3%	54. 4%	82. 3%	99. 8%
二本鎖コード	0. 027 4 nM	0. 009 1 nM	0. 003 0 nM	0. 001 0 nM	0. 000 nM	オンターゲット活性 (GSC M) IC ₅₀ (nM)
TRD00 7970	76. 9%	93. 3%	99. 3%	10 1. 2%	96. 5%	0. 0819
TJR10 0259	85. 7%	98. 3%	98. 3%	10 4. 1%	93. 9%	0. 1457
TJR10 0260	89. 2%	10 4. 4%	10 4. 8%	11 1. 1%	96. 9%	0. 1765
AD818 90	10 8. 0%	11 5. 5%	10 8. 6%	10 5. 0%	12 1. 7%	0. 8191

30

40

【0528】

以上の結果は、対照AD81890を参照して、本開示のTRD007970、TJR100259、TJR100260がp s i C H E C K系においてHBV遺伝子に対して

50

より高レベルのオンターゲット阻害活性を有することを示した。

【0529】

実施例11：HepG2.2.15細胞を用いたdsRNAの体外抗HBV活性を評価する

HepG2.2.15細胞では、8個の濃度勾配を使用し、dsRNAに対して体外抗HBV活性評価を行った。

【0530】

1日目にHepG2.2.15細胞を96ウェルプレートに接種し、各ウェルに2万個の細胞であった。細胞を接種すると共に、RNAiMaxにより異なる濃度のdsRNAをHepG2.2.15細胞に移転し、4日目に細胞培養上清を収集し、ELISAによりHBsAgを検出した（残りの上清は凍結保存して使用に備えた）。最後に細胞を収集し、細胞内RNAを抽出し、RT-PCRにより全HBV RNA（3.5 kb + 2.4 kb + 2.1 kb + 0.7 kbのRNAを含む）及び3.5 kbのHBV RNA（pgRNA + preCore RNAを含む）をそれぞれ検出すると共に、GAPDH遺伝子RNAを内部基準として検出した。測定待ちの化合物は8個の濃度点であり、平行して2つの平行ウェルを測定した。培養液においてDMSOの最終濃度は0.5%であった。

【0531】

抑制百分率の計算式は以下の通りである。

【0532】

% HBsAg 抑制率 = (1 - 試料中のHBsAg含有量 / DMSO対照群中のHBsAg含有量) × 100

% HBV RNA 抑制率 = (1 - 試料中のHBVのRNA含有量 / DMSO対照群中のHBVのRNA含有量) × 100

%細胞生存性 = (試料吸光値 - 培養液対照の吸光値) / (DMSO対照の吸光値 - 培養液対照の吸光値) × 100。

【0533】

Graphpad Prismソフトウェア(four parameter logistic equations)を使用してEC50値を計算した。

【0534】

結果は表22に示され、対照AD81890を参照し、総合抗ウイルス活性検出指標、試験TRD007970、TRD007994及びTRD007995はHepG2.2.15細胞において優れた抗ウイルス活性を示した。

【0535】

【表25】

表22. HepG2.2.15におけるdsRNAの抗ウイルス活性

化合物の番号	HBsAg EC ₅₀ (nM)	pgRNA IC ₅₀ (nM)	全RNA IC ₅₀ (nM)
TRD007970	0.0027	0.0097	0.0792
TRD007994	0.0083	0.0398	0.1204
TRD007995	0.0012	0.0073	0.0134
AD81890	0.0212	0.0449	0.1428

【0536】

実施例12：AS鎖9位と10位の異なる修飾の評価

1. 固相ベクターに連結されたアミノガラクトース化合物1-tの合成：

10

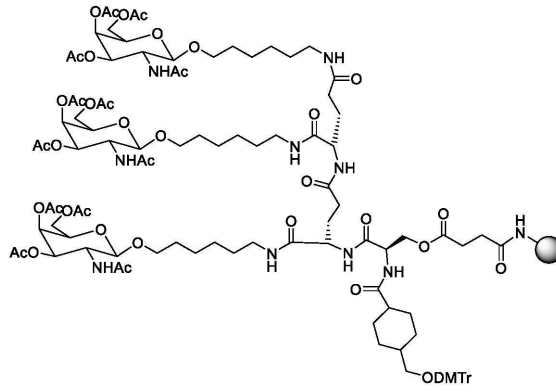
20

30

40

50

【化209】



10

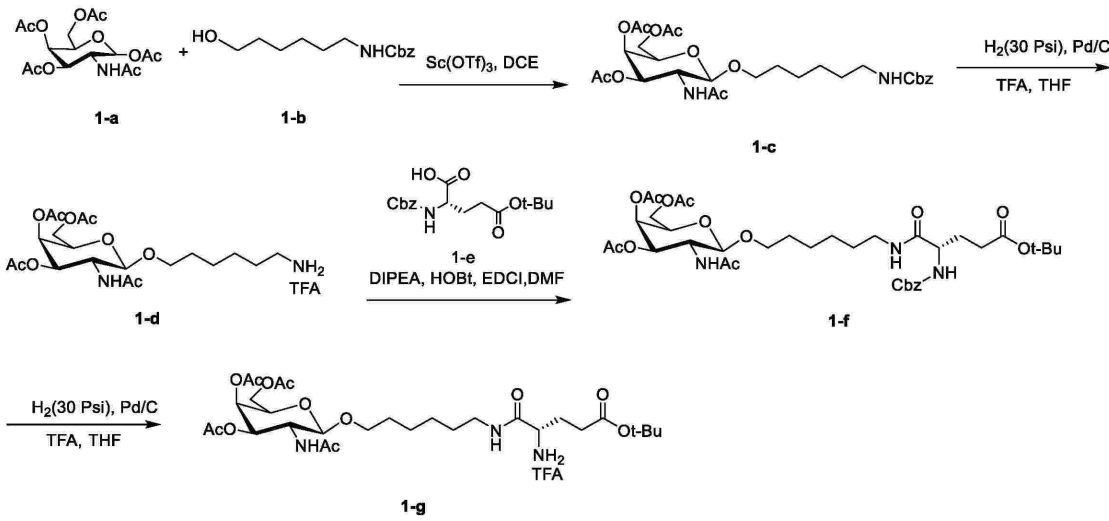
【0537】

合成経路は下記の通りである。

【0538】

1) 化合物 1 - g の合成経路

【化210】

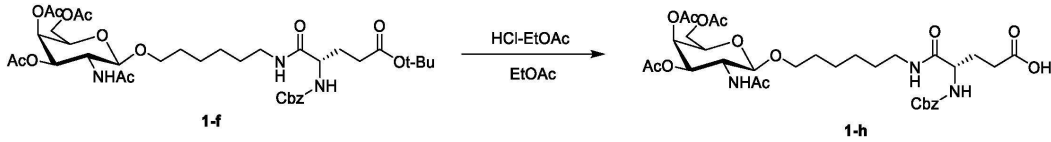


20

30

2) 化合物 1 - h の合成経路

【化211】

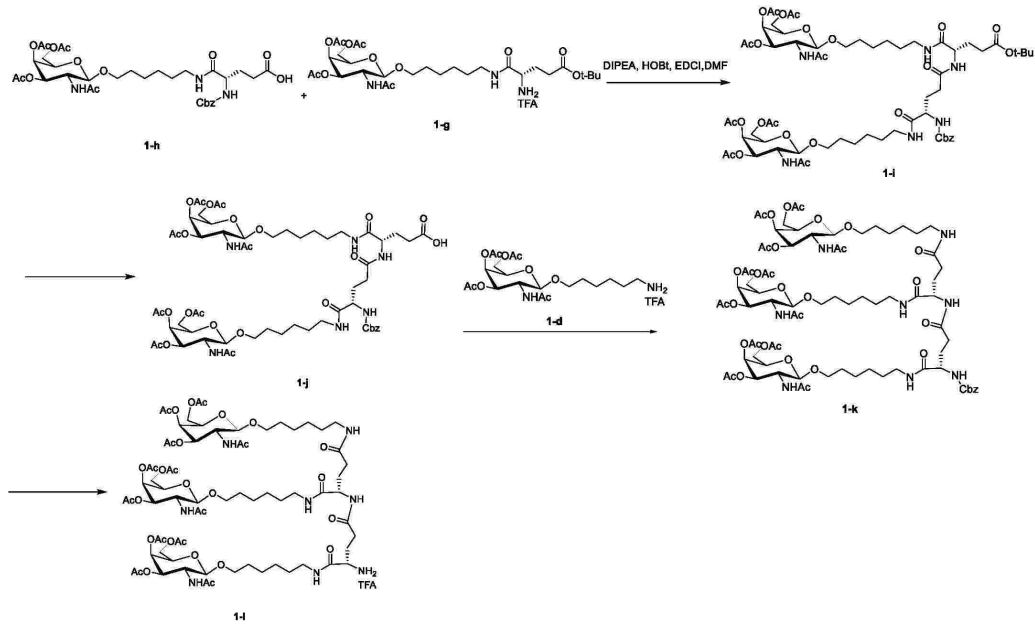


40

3) 化合物 1 - l の合成経路

50

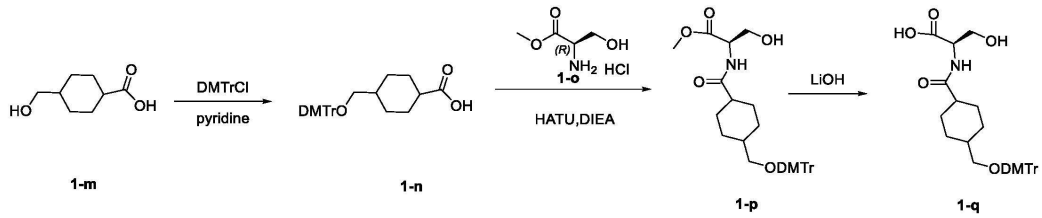
【化 2 1 2】



10

4) 化合物 1 - q の合成

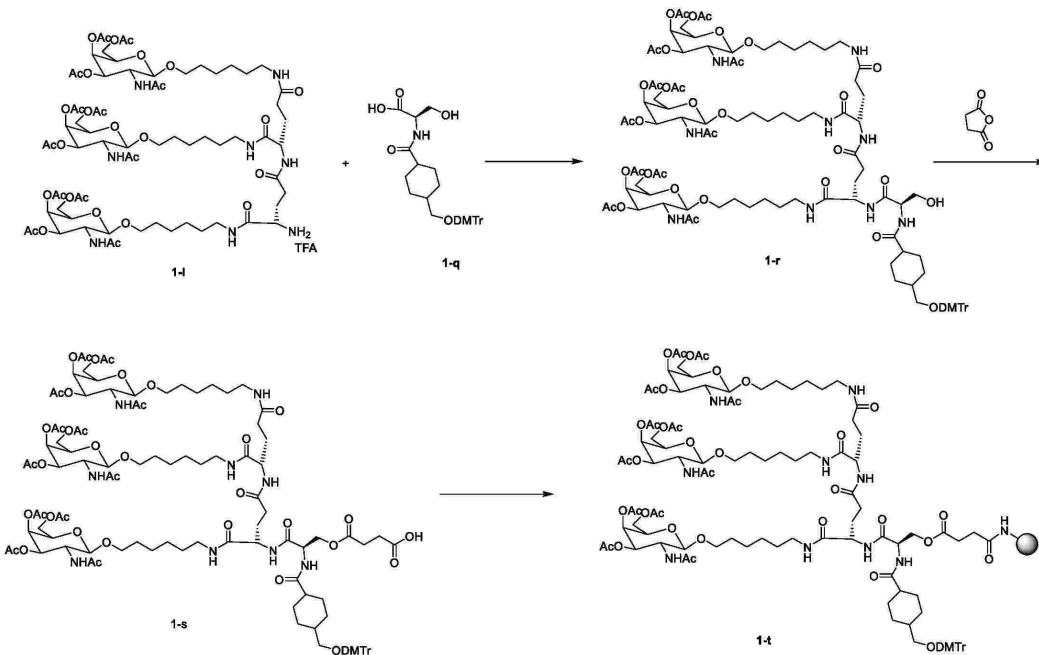
【化 2 1 3】



20

5) 固相ベクターに連結されたアミノガラクトース化合物 1 - t の合成

【化 2 1 4】



30

40

【0 5 3 9】

ステップ 1

50

原料 1 - a (2 9 7 g、7 6 3 m m o l) と原料 1 - b (1 6 0 g、6 3 6 m m o l) を 9 6 0 m L の D C E に溶け、1 5 の条件下で、S c (O T f) ₃ (1 5 . 6 g、3 1 . 8 m m o l) を加え、その後反応温度を 8 5 に昇温し、2 h 攪拌しながら反応させ、反応終了後に 1 . 5 L の飽和 N a H C O ₃ を加えて反応を中止し、有機相を分離し、更に 1 . 5 L の飽和食塩水で洗浄し、有機相を無水 N a ₂ S O ₄ で乾燥し、ろ過した溶液を減圧下で蒸留した後にシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し (石油エーテル : 酢酸エチル 5 : 1 ~ 0 : 1)、標的生成物 1 - c (3 2 8 g、5 4 4 m m o l、収率が 8 5 . 5 %、純度が 9 6 . 4 %) を得た。

¹ H N M R (4 0 0 M H z , C D C l ₃) 7 . 4 4 - 7 . 2 9 (m , 5 H) , 5 . 8 3 (d , J = 8 . 8 H z , 1 H) , 5 . 4 0 - 5 . 2 3 (m , 2 H) , 5 . 1 8 - 5 . 0 6 (m , 2 H) , 4 . 8 6 (s , 1 H) , 4 . 6 6 (d , J = 8 . 4 H z , 1 H) , 4 . 2 1 - 4 . 0 7 (m , 2 H) , 4 . 0 4 - 3 . 7 7 (m , 3 H) , 3 . 5 1 - 3 . 4 5 (m , 1 H) , 3 . 3 1 - 3 . 1 1 (m , 2 H) , 2 . 1 8 (d , J = 2 . 0 H z , 1 H) , 2 . 1 4 (s , 3 H) , 2 . 0 6 (s , 3 H) , 2 . 0 3 - 1 . 9 9 (m , 3 H) , 1 . 9 5 (s , 3 H) , 1 . 6 4 - 1 . 4 6 (m , 4 H) , 1 . 4 3 - 1 . 2 9 (m , 4 H) 。

M S、C ₂₈ H ₄₀ N ₂ O ¹¹、実測 M ⁺ 5 8 1 . 3。

【 0 5 4 0 】

ステップ 2

ステップ 1 で得られた化合物を平行して 2 部に分けて行った：それぞれの反応には、化合物 1 - c (7 2 . 0 g、1 2 4 m m o l) を 4 3 2 m L の T H F に加え、アルゴンガス保護下で P d / C (2 0 . 0 g、1 0 % の純度) を加え、更に T F A (1 4 . 1 g、1 2 4 m m o l、9 . 1 8 m L) を加え、反応溶液に水素ガスを通し、ガス圧を 3 0 P s i のままにして、3 0 に加熱して 1 6 h 攪拌しながら反応させることが含まれた。反応が完了した後、平行して行った 2 つの反応を合わせ、ろ過し、減圧下でろ液を濃縮した。残留物をジクロロメタンで希釈して繰り返し減圧下で濃縮し、3 回繰り返した。減圧下で吸引乾燥させた後、目標化合物 1 - d (1 3 9 g) を得た。

¹ H N M R (4 0 0 M H z , D M S O - d ₆) 7 . 8 5 (d , J = 9 . 2 H z , 1 H) , 7 . 7 4 (s , 3 H) , 5 . 2 1 (d , J = 3 . 6 H z , 1 H) , 4 . 9 7 (d d , J = 2 . 8 , 1 0 . 8 H z , 1 H) , 4 . 4 8 (d , J = 8 . 8 H z , 1 H) , 4 . 0 6 - 3 . 9 8 (m , 3 H) , 3 . 9 3 - 3 . 8 2 (m , 1 H) , 3 . 7 3 - 3 . 6 8 (m , 1 H) , 3 . 6 3 - 3 . 5 6 (m , 1 H) , 3 . 4 3 - 3 . 3 8 (m , 1 H) , 2 . 8 2 - 2 . 7 1 (m , 2 H) , 2 . 1 3 - 2 . 0 9 (m , 3 H) , 2 . 0 1 - 1 . 9 7 (m , 3 H) , 1 . 9 1 - 1 . 8 7 (m , 3 H) , 1 . 7 7 (s , 3 H) , 1 . 7 6 - 1 . 7 3 (m , 1 H) , 1 . 5 2 - 1 . 4 4 (m , 4 H) , 1 . 2 8 (s , 4 H) 。

【 0 5 4 1 】

ステップ 3

化合物 1 - d (1 3 9 g、2 4 7 m m o l) と化合物 1 - e (7 5 . 3 g、2 2 3 m m o l) を D M F 溶液 (8 3 4 m L) に加え、0 で更に D I P E A (4 1 . 6 g、3 2 2 m m o l、5 6 . 1 m L)、H O B t (3 6 . 8 g、2 7 2 m m o l) と E D C I (5 2 . 2 g、2 7 2 m m o l) を加え、1 5 のままにして 1 6 h 攪拌しながら反応させ、反応が完了した後、反応液をジクロロメタン (4 0 0 m L) で希釈し、その後飽和塩化アンモニウム溶液 (1 L)、飽和 N a H C O ₃ (1 . 0 0 L)、飽和食塩水で順に洗浄し、有機相を分離して無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過した後に減圧下で溶剤を蒸留して除去し、残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し (石油エーテル : 酢酸エチル = 5 : 1 ~ 0 : 1)、目標化合物 1 - f (1 0 8 g、収率が 5 6 . 8 %) を得た。

¹ H N M R (4 0 (4 0 0 M H z , D M S O - d ₆) 7 . 8 9 - 7 . 7 8 (

m, 2 H), 7.41 - 7.27 (m, 6 H), 5.21 (d, J = 3.2 Hz, 1 H), 5.08 - 4.92 (m, 3 H), 4.48 (d, J = 8.4 Hz, 1 H), 4.07 - 3.99 (m, 3 H), 3.97 - 3.81 (m, 2 H), 3.75 - 3.64 (m, 1 H), 3.42 - 3.37 (m, 1 H), 3.13 - 2.93 (m, 2 H), 2.20 (t, J = 8.0 Hz, 2 H), 2.10 (s, 3 H), 1.99 (s, 3 H), 1.89 (s, 3 H), 1.87 - 1.79 (m, 1 H), 1.76 (s, 3 H), 1.74 - 1.64 (m, 1 H), 1.48 - 1.41 (m, 2 H), 1.38 (s, 12 H), 1.29 - 1.20 (m, 4 H), 1.19 - 1.14 (m, 1 H).

10

MS、C₃₇H₅₅N₃O₁₄、実測値 M⁺ 766.4。

【0542】

ステップ4

上記得られた化合物 1 - f を平行して2部に分けて行った：それぞれの反応には、化合物 6 (47.0 g、61.3 mmol) を 280 mL の THF に加え、アルゴンガス保護下で Pd/C (15.0 g、10% の純度) を加え、更に TFA (7.00 g、61.3 mmol、4.54 mL) を加え、反応溶液に水素ガスを通し、ガス圧を 30 Psi のままにして、30 に加熱して 16 h 攪拌しながら反応させることが含まれた。反応が完了した後、平行して行った2つの反応を合わせ、ろ過し、減圧下で液を濃縮した。残留物をジクロロメタンで希釈して繰り返して減圧下で濃縮し、3回繰り返した。減圧下で吸引乾燥させた後、目標化合物 1 - g (94.0 g、粗製品) を得た。

20

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) 8.38 (s, 1 H), 8.10 (s, 3 H), 7.83 (d, J = 9.2 Hz, 1 H), 5.21 (d, J = 3.2 Hz, 1 H), 4.96 (dd, J = 3.6, 11.2 Hz, 1 H), 4.47 (d, J = 8.4 Hz, 1 H), 4.06 - 3.98 (m, 3 H), 3.92 - 3.82 (m, 1 H), 3.75 - 3.67 (m, 2 H), 3.60 (s, 1 H), 3.43 - 3.37 (m, 1 H), 3.18 - 3.04 (m, 2 H), 2.30 - 2.24 (m, 2 H), 2.10 (s, 3 H), 2.00 (s, 3 H), 1.95 - 1.90 (m, 2 H), 1.89 (s, 3 H), 1.78 - 1.75 (m, 3 H), 1.49 - 1.41 (m, 3 H), 1.40 (s, 9 H), 1.26 (s, 4 H)。

30

【0543】

ステップ5

上記得られた化合物 1 - f を平行して2部に分けて行った：それぞれの反応には、化合物 1 - f (46.0 g、60 mmol) を HCl - EtOAc (2.00 M、276 mL) に加え、15 の条件下で 16 h 攪拌しながら反応させることが含まれた。反応完了後に2つの反応溶液を合わせ、減圧下で蒸留して濃縮し、残留物をジクロロメタンで希釈して繰り返して減圧下で濃縮し、3回繰り返した。減圧下で吸引乾燥させた後、目標化合物 1 - h (91.0 g、粗製品) を得た。

40

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) 7.91 - 7.80 (m, 2 H), 7.42 - 7.26 (m, 6 H), 5.21 (d, J = 3.2 Hz, 1 H), 5.07 - 4.92 (m, 4 H), 4.48 (d, J = 8.4 Hz, 1 H), 4.06 - 3.98 (m, 3 H), 3.98 - 3.82 (m, 3 H), 3.73 - 3.65 (m, 1 H), 3.44 - 3.35 (m, 1 H), 3.12 - 2.94 (m, 2 H), 2.22 (t, J = 8.0 Hz, 2 H), 2.10 (s, 3 H), 2.01 - 1.97 (m, 4 H), 1.94 - 1.90 (m, 1 H), 1.89 (s, 3 H), 1.87 - 1.79 (m, 2 H), 1.76 (s, 3 H), 1.74 - 1.67 (m, 1 H), 1.49 - 1.40 (m, 2 H), 1.40 - 1.32 (m, 2 H),

50

1.24 (d, J = 4.0 Hz, 4H), 1.19 - 1.13 (m, 1H)。
MS、C₃₃H₄₇N₃O₁₄、実測M⁺710.3。

【0544】

ステップ6

平行して2つの反応を行った：それぞれの反応には、化合物1-g (45.0 g、60.3 mmol)と化合物1-h (38.5 g、54.3 mmol)を270 mLのDMFに加え、0 で更にDIPEA (10.1 g、78.4 mmol、13.6 mL)を加え、更にHOBT (8.97 g、66.3 mmol)とEDCI (12.7 g、66.3 mmol)を加えたことが含まれた。15 の条件下で16 h 攪拌しながら反応させた。反応完了後に2つの反応溶液を合わせ、300 mLのDCMを加えて希釈し、順に飽和塩化アンモニウム (800 mL)、飽和NaHCO₃ (800 mL)と飽和食塩水 (800 mL)で洗浄し、有機相を無水Na₂SO₄で乾燥した。ろ過した後、加圧下で蒸発して濃縮し、残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し (石油エーテル：酢酸エチル = 5 : 1 ~ 0 : 1)、目標化合物1-i (66.0 g、47.4 mmol、収率が39.3%、純度が95.1%)を得た。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) 7.96 - 7.78 (m, 5H), 7.41 - 7.25 (m, 6H), 5.21 (d, J = 3.6 Hz, 2H), 5.05 - 4.92 (m, 4H), 4.48 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 4.22 - 4.12 (m, 1H), 4.02 (s, 6H), 3.94 - 3.80 (m, 3H), 3.74 - 3.64 (m, 2H), 3.45 - 3.35 (m, 2H), 3.11 - 2.92 (m, 4H), 2.20 - 2.12 (m, 4H), 2.10 (s, 6H), 1.99 (s, 6H), 1.89 (s, 6H), 1.82 - 1.79 (m, 2H), 1.76 (s, 6H), 1.74 - 1.63 (m, 2H), 1.44 (d, J = 6.0 Hz, 4H), 1.37 (s, 12H), 1.24 (s, 9H)。

MS：C₆₂H₉₄N₆O₂₅、実測値m/z 1323.8。

【0545】

ステップ7

11個の反応に分けて行った：それぞれの反応に化合物1-i (5.00 g、3.78 mmol)とトルエン (300 mL)を加え、シリカゲル (45.0 g)を加えた。100 で40 h 攪拌しながら反応させ、反応完了後に11個の反応混合物を合わせた。減圧下で溶剤を蒸留して除去した後、残留物にイソプロパノール及びジクロロメタンを加え、20 min 攪拌した。ろ過して不溶物を除去し、生成物が溶出されないまでイソプロパノールでろ過ケーキを洗浄し、得られた溶液から溶剤を除去して吸引乾燥した後に目標化合物1-j (43.2 g、34.0 mmol、収率が82.0%)を得た。

¹H NMR： (400 MHz, DMSO-d₆) 8.01 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.93 - 7.79 (m, 2H), 7.39 - 7.27 (m, 3H), 5.21 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 5.06 - 4.91 (m, 2H), 4.48 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.07 - 3.97 (m, 3H), 3.94 - 3.82 (m, 2H), 3.73 - 3.65 (m, 1H), 3.45 - 3.36 (m, 2H), 3.10 - 2.94 (m, 2H), 2.15 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 2.10 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.89 (s, 3H), 1.86 - 1.79 (m, 1H), 1.77 (s, 3H), 1.74 - 1.65 (m, 1H), 1.44 (s, 2H), 1.37 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 1.24 (s, 4H)。

MS：C₅₈H₈₆N₆O₂₅、実測m/z = 1267.8。

【0546】

ステップ8

このステップは平行して2つの反応に分けて行った：それぞれの反応には、化合物1-

d (11.8 g、21.0 mmol) と化合物 1-j (21.3 g、16.8 mmol) を 70 mL の DMF に加え、0 で更に DIPEA (3.54 g、27.3 mmol、4.77 mL) を加え、更に HOBt (3.13 g、23.1 mmol) と EDCI (4.44 g、23.1 mmol) を加えたことが含まれた。15 の条件下で 16 h 撪拌しながら反応させた。反応完了後に 2 つの反応溶液を合わせ、500 mL の DCM を加えて希釈し、順に飽和塩化アンモニウム (1.5 L)、飽和 NaHCO₃ (1.5 mL) と飽和食塩水 (1.5 mL) で洗浄し、有機相を無水 Na₂SO₄ で乾燥した。ろ過した後、加圧下で蒸発して濃縮し、残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し (ジクロロメタン : メタノール = 50 : 1 ~ 10 : 1)、目標化合物 1-k (54.0 g、31.8 mmol、収率が 75.6%) を得た。

10

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) 7.91 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.87 - 7.78 (m, 5H), 7.73 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 7.42 - 7.24 (m, 6H), 5.21 (d, J = 3.6 Hz, 3H), 5.06 - 4.92 (m, 5H), 4.48 (d, J = 8.4 Hz, 3H), 4.19 - 4.09 (m, 2H), 4.07 - 3.97 (m, 10H), 3.94 - 3.80 (m, 4H), 3.76 - 3.64 (m, 3H), 3.42 - 3.37 (m, 4H), 3.08 - 2.94 (m, 6H), 2.20 - 2.12 (m, 2H), 2.10 (s, 9H), 2.08 - 2.01 (m, 2H), 1.99 (s, 9H), 1.89 (s, 9H), 1.87 - 1.79 (m, 2H), 1.77 (s, 9H), 1.74 - 1.63 (m, 2H), 1.44 (d, J = 5.6 Hz, 6H), 1.40 - 1.31 (m, 6H), 1.24 (s, 13H)。

20

MS : C₇₈H₁₁₈N₈O₃₃、実測値 m/z = 1696.1。

【0547】

ステップ 9

このステップは平行して 3 個の反応に分けて行った : それぞれの反応には、化合物 1-k (17.0 g、10.0 mmol) と THF (100 mL) を加え、アルゴンガス保護下で Pd/C (5.0 g、10% の純度) を加え、更に TFA (1.14 g、10.0 mmol、742 μL) を加え、反応溶液に水素ガスを通し、ガス圧を 15 Psi のままにして、30 に加熱して 4 h 撪拌しながら反応させた。反応が完了した後、平行して行った 3 つの反応を合わせ、ろ過し、減圧下で液を濃縮した。残留物をジクロロメタンで希釈して繰り返して減圧下で濃縮し、3 回繰り返した。残留物を分取液体クロマトグラフィー (C18、移動相 A : 0.1% TFA - 水、移動相 B : 10% ~ 40% の CAN、20 min) により精製して目標化合物 1-l (17.3 g、10.2 mmol、収率が 34.0%) を得た。

30

¹H NMR : (400 MHz, DMSO-d₆) 8.45 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 8.14 (d, J = 5.2 Hz, 3H), 7.97 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 7.90 - 7.77 (m, 4H), 5.21 (d, J = 2.8 Hz, 3H), 4.96 (dd, J = 3.2, 11.6 Hz, 3H), 4.47 (d, J = 8.4 Hz, 3H), 4.20 - 4.10 (m, 1H), 4.02 (s, 8H), 3.87 (q, J = 9.6 Hz, 3H), 3.75 - 3.61 (m, 4H), 3.46 - 3.34 (m, 3H), 3.21 - 2.93 (m, 6H), 2.21 (s, 2H), 2.14 - 2.02 (m, 11H), 1.99 (s, 9H), 1.96 - 1.82 (m, 12H), 1.80 - 1.65 (m, 10H), 1.44 (d, J = 5.6 Hz, 8H), 1.36 (d, J = 6.4 Hz, 4H), 1.30 - 1.17 (m, 12H)。

40

MS : C₇₀H₁₁₂N₈O₃₁、実測値 m/z = 781.8。

【0548】

ステップ 10

50

化合物 1 - m (2 g、12.64 mmol) をピリジン (10 mL) に溶解、室温下で DMTrCl (4.71 g、13.90 mmol) のピリジン (10 mL) 溶液を滴下し、室温下で 5 時間攪拌しながら反応させ、反応が完了した後、メタノールでクエンチし、減圧下で濃縮して粗製品を得て、シリカゲルにより精製し (石油エーテル : 酢酸エチル = 10 : 1 で溶離した)、生成物溶離液を収集し、減圧下で溶剤を蒸発乾燥させて 4 g の化合物 1 - n を得た。

MS m/z : C₂₉H₃₂O₅、[M+H]⁺ 実測 : 461.3。

【0549】

ステップ 11

化合物 1 - n (2 g、4.34 mmol)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (DIEA、1.43 mL、8.68 mmol) と HATU (2.47 g、6.51 mmol) を DMF (10 mL) に溶解、室温下で化合物 1 - o の DMF (5 mL) 溶液を加え、室温下で 8 時間攪拌しながら当該反応を行った。反応が完了した後、水を加えてクエンチし、水相を酢酸エチルで抽出し、合わせた有機相をまず水で洗浄し、更に飽和食塩水 (20 mL) で洗浄してから、減圧下で溶剤を蒸発乾燥させ、逆相分取 HPLC (Column : Boston Green ODS 150 mm * 30 mm * 5 μm、条件 : 25% ~ 80% (A : 水 0.075% の NH₃ · H₂O、B : CH₃CN)、流速 : 55 mL / min) を経て、凍結乾燥した後に 2.4 g の化合物 1 - p を得た。

MS m/z : C₃₃H₃₉NO₇、[M+H]⁺ 実測 : 562.4。

【0550】

ステップ 12

化合物 1 - p (2.4 g、4.27 mmol) を 15 mL のメタノールと水 (2 : 1) の混合溶液に溶解、室温下で LiOH (0.36 g、8.54 mmol) を加えて一晩攪拌した。反応が完了した後に減圧下で溶剤を蒸発乾燥させ、逆相分取 HPLC (Column : Boston Green ODS 150 mm * 30 mm * 5 μm、条件 : 25% ~ 75% (A : 水 0.075% の NH₃ · H₂O、B : CH₃CN)、流速 : 55 mL / min) を経て、凍結乾燥した後に 2 g の化合物 1 - q を得た。

MS m/z : C₃₂H₃₇NO₇、[M+H]⁺ 実測 : 548.6。

【0551】

ステップ 13

化合物 1 - q (0.37 g、0.69 mmol)、DIEA (0.19 mL、1.15 mmol) と HATU (0.32 g、0.86 mmol) を 2 mL の DMF に溶解、室温下で化合物 1 - l (0.9 g、0.69 mmol) の DMF (2 mL) 溶液を加え、室温下で一晩攪拌した。反応が完了した後、ジクロロメタン (10 mL) で反応液を希釈し、そして順に飽和 NaHCO₃ (20 mL) と飽和食塩水 (20 mL) で洗浄し、有機相を無水 Na₂SO₄ で乾燥し、ろ過した後に減圧下で濃縮した。逆相分取 HPLC (Column : Boston Green ODS 150 mm * 30 mm * 5 μm、条件 : 25% ~ 65% (A : 水 0.075% の NH₃ · H₂O、B : CH₃CN)、流速 : 45 mL / min) により精製し、凍結乾燥した後に 0.5 g の化合物 1 - r を得た。

MS m/z : C₁₀₂H₁₄₇N₉O₃₇、[M-H]⁺ 実測 : 2088.5。

【0552】

ステップ 14

化合物 1 - r (300 mg、0.14 mmol) とコハク酸無水物 (28.70 mg、0.28 mmol) をテトラヒドロフランに溶解、反応液に DMAP (3.50 mg、0.028 mmol) を加えて 40 °C で一晩攪拌した。反応が完了した後、反応が完了した後、メタノール (18.8 mg) を加え、10 min 攪拌しながら反応させ、その後、反応液はジクロロメタン (3 mL) で反応液を希釈し、且つ飽和 NaHCO₃ (5 mL) で 2 回洗浄した。有機相を減圧下で乾燥になるまで濃縮し、逆相分取 HPLC (Column : Boston Green ODS 150 mm * 30 mm * 5 μm、条件 : 25% ~ 65% (A : 水 0.075% の NH₃ · H₂O、B : CH₃CN)、流速 : 35 mL

10

20

30

40

50

/min)により精製し、凍結乾燥した後に140mgの化合物1-sを得た。

MS m/z: C₁₀₆H₁₅₁N₉O₄₀、[M-H]⁺実測: 2189.4。

【0553】

ステップ15

前のステップで得られた化合物1-r (140mg、64μmol)をアセトニトリル(5mL)に加え、更にHBTU(48.7mg、128μmol)を加え、表面がアミノ基で修飾された固相支持体(CPG-NH₂、2.3g)を加え、DIEA(41.5mg、320μmol、55μL)を加え、30 のままにして16h振とうしながら反応させた。反応が完了した後、ろ過し、また順にメタノール(8mL×4)、ジクロロメタン(8mL×4)で洗浄した。固体をピリジン:酢酸無水物(v:v=4:1、10 10 .0mL)に加え続け、引き続き30 のままにして16h振とうしながら反応させた。反応が完了した後、ろ過し、また順にメタノール(8mL×4)、ジクロロメタン(8mL×4)で洗浄した。固相ベクターに連結された化合物1-tを2.1g得た。

【0554】

2. dsRNAの合成

表23におけるdsRNAはホスホロアミダイト固相合成法により合成した。

【0555】

3. 試験

この実験は、本開示の異なる部位2'-フルオロで修飾されたdsRNAの体内での標的遺伝子mRNA発現量への阻害効率を調べた。雄の6週齢~8週齢のC57BL/6マウスを無作為に群分け、1群あたり合計6匹で、各時点で3匹ずつであり、各群のマウスにそれぞれ試験試料(2個、TRD007047とTRD006870)、比較試料(TRD002218)及びPBSを投与した。全ての動物は、体重によって投与量が算出され、皮下注射で単回投与され、dsRNAの投与用量(リガンドを含まないsiRNAの量で)は1mg/kg、投与体積は5mL/kgであった。投与の7日後に、マウスを殺し、肝臓を収集し、RNA later (Sigma Aldrich社)で保存し、その後、組織ホモジナイザーにより肝組織をホモジネートし、更に組織RNA抽出試薬キット(凡知医療科技、FG0412)により取扱説明書に記載された操作ステップに従って肝組織全RNAを抽出して得た。全RNAをcDNAに逆転写し、そしてリアルタイム蛍光定量PCR方法により肝組織中のTTR mRNAの発現量を検出した。当該蛍光定量PCR法において、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)遺伝子を内部基準遺伝子として、TTRとGAPDHに対するTaqmanプローブプライマーによりTTRとGAPDHのmRNA発現量をそれぞれ検出した。化合物情報は表23に、マウス体内の実験化合物の群分け情報は表24を参照し、プライマーは表11と同じであった。

【0556】

10

20

30

40

50

【表 2 6】

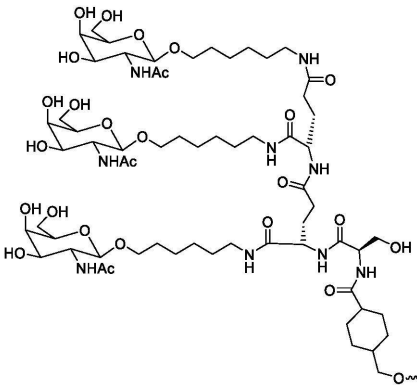
表 2 3. AS鎖9位と10位の修飾化合物

	配列番号	SS鎖	配列番号	AS鎖
TRD002218	47	CmsAmsGmUmGf UmUfCfUfUmGm CmUmCmUmAmUm AmAm-L96	48	UmsUfsAmUmAm GfAmGmCmAmAm GmAmAfCmAfCm UmGmsUmsUm
TRD007047	49	CmsAmsGmUmGf UmUfCfUfUmGm CmUmCmUmAmUm AmsAms-NAG1	50	UmsUfsAmUfAm Gf(-)hmpNA(A) GmCfAmAmGfAm AfcmAfCmUfGm sUmsUm
TRD006870	51	CmsAmsGmUmGf UmUfCfUfUmGm CmUmCmUmAmUm AmsAms-NAG1	52	UmsUfsAmUfAm Gf(-)hmpNA(A) GmCmAfAmGfAm AfcmAfCmUfGm sUmsUm

10

ここで、NAG1の構造は

【化 2 1 5】



20

である。

30

【0557】

【表 2 7】

表 2 4 マウス体内の実験化合物の群分け情報：

化合物の番号	用量	mRNA定量	動物数	備考
PBS	—	D7, 28	6	各時点で3匹ずつ
TRD002218	1mpk s.c.	D7, 28	6	各時点で3匹ずつ
TRD007047	1mpk s.c.	D7, 28	6	各時点で3匹ずつ
TRD006870	1mpk s.c.	D7, 28	6	各時点で3匹ずつ

40

【0558】

投与の28日後に、本開示の異なる部位の2'-フルオロで修飾されたdsRNAの体内での標的遺伝子mRNA発現量への阻害効率は、表25に示された。陽性対照TRD002218を参照し、異なる部位の2'-フルオロで修飾されたdsRNAは、投与の28日後にTTR mRNA発現への阻害が参照陽性化合物より高く、2種類の修飾方法は、高い阻害効率を示すと共に、有意差がなく、2種類の修飾方法は、より効率的な阻害効率を媒介できることを示唆した。

【0559】

50

【表 2 8】

表 2 5. 7日と28日の検出結果

9/10F	化合物の番号	7日		28日	
		mRNA余剰	SD	mRNA余剰	SD

【表 2 9】

	PBS	100%	11%	100%	9%
PC	TRD002218	31%	7%	49%	5%
mTTR 9F	TRD007047	15%	5%	39%	10%
mTTR 10F	TRD006870	13%	4%	36%	3%

10

【0560】

TTR mRNA発現量は、下記の等式によって算出した。

【0561】

TTR mRNA発現量 = [(試験群 TTR mRNA発現量 / 試験群 GAPDH mRNA発現量) / (対照群 TTR mRNA発現量 / 対照群 GAPDH mRNA発現量)] × 100%。

【0562】

実施例 1 3 : PHH細胞を用いた dsRNAの体外抗HBV活性(自由摂取)を評価した

20

体外抗HBV活性評価を、それぞれ TRD007970、TJR100259及びAD81890に対して行った。

【0563】

0日目に、まずは dsRNAをPBSで7個の濃度(100、25、6.25、1.563、0.391、0.098、0.024 nM)に勾配希釈し、48ウェルプレートに加えた。冷凍保存のPHHを蘇生し、続いてPHHを48ウェルプレートに播種し、播種する同時に試験化合物を細胞に自由摂取(free uptake)させた。

【0564】

1日目に、dsRNAを含まない培地を交換し、HBV感染PHHを添加した。

【0565】

2日目、4日目及び6日目に、dsRNAを含まない新鮮な培地を交換した。

30

【0566】

8日目に上清を収集し、収集した細胞上清をELISA法によりHBsAg及びHBeAgを検出し、qPCR法によりHBV DNAレベルを検出した。実験の結果は、表26に示される。

【0567】

【表 3 0】

表 2 6 PHHにおける dsRNAの抗ウイルス活性

化合物の番号	HBsAg EC ₅₀ (nM)	HBeAg EC ₅₀ (nM)	HBV DNA EC ₅₀ (nM)
TRD007970	0.90	2.02	1.30
TJR100259	1.29	2.78	1.43
AD81890	2.09	4.84	3.34

40

結果は、対照AD81890に比較し、TRD007970及びTJR100259のPHHにおける抗ウイルス活性がより良好であることを示した。

【0568】

実施例 1 4 : エクソヌクレアーゼ安定性実験による dsRNAの安定性評価

TRD007970及びTJR100259の siRNA原配列 TJR100381及

50

びTJR100382(表27を参照)についてエキソヌクラーゼ安定性評価を行い、実験の反応系に従って対応する反応溶液を調製して実験を行った(表28を参照)。

【0569】

【表31】

表27:原配列TJR100381及びTJR100382

二本鎖番号	センス鎖5' - 3'	アンチセンス鎖5' - 3'
TJR100381	GUGUGCACUUCGCUUC ACC (配列番号1)	AGUGAAGCGAAGUG CACACGG (配列番号5)
TJR100382	GUGUGCACUUCGCUUC ACC (配列番号1)	IGUGAAGCGAAGUG CACACGG (配列番号8)

10

【表32】

表28. 5'エキソヌクラーゼ(PDII)安定性反応系(100μL)

試薬	体積(μL)
50mMの酢酸ナトリウム	77
100mM MgCl ₂	10
siRNA	5
PDII	8

【表33】

表29. 3'エキソヌクラーゼ(SVPD)安定化反応系(100μL)

試薬	体積(μL)
50mM Tris·HCl	85
100mM MgCl ₂	10
siRNA	5
SVPD	1

20

【0570】

5'エキソヌクラーゼ(PDII、Worthington、cat#LS003602)の最終濃度は500U/mLであり、3'エキソヌクラーゼ(SVPD、Worthington、cat#LS003926)の最終濃度は0.5U/mLであった。調製完了後、0h、1.5h、2h、3h、4hの5つの時点で異なる8連チューブに分注し(各ウェルに16μL)、37でインキュベートし、時点に達した直後に反応液を取り出し、9Mの尿素を含むローディング緩衝液(各ウェルに32μL)を加え、-80で冷蔵庫に保存して使用に備えた。その後、20%(7Mの尿素)PAGEゲルによって電気泳動を行った。電気泳動終了後、ゲルをgel red色素に浸し、シェーカー染色を10min行い、ゲルイメージング(312nmのUV)観察及び写真撮影を行った。実験結果を図3(ゲル電気泳動結果)、図4(5'エキソヌクラーゼ定量結果)及び図5(3'エキソヌクラーゼ定量結果)に示され、結果はTJR100382の安定性がTJR100381よりも顕著に優れていることを示した。

30

40

【0571】

実施例15:肝臓S9代謝安定性分析

カニクイザルの肝臓S9(カニクイザル肝臓S9、雄、供給元Xenotech、ロット番号1510192)を、それぞれTRD007970、TJR100259及びAD81890に対して行い、dsRNAの代謝安定性分析を、以下のように実施した:

1、T0、T60、T120、T240、T360、T1440、T2880、ブランクと命名した8個の96ウェル試料プレートを調製した。

【0572】

2、190μL/ウェルS9懸濁液(又はブランク緩衝液)を各プレートに添加し、次いで、37で約10分間インキュベートした。

50

【0573】

3、基質細孔に加えて、各プレート（T0、T60、T120、T240、T360、T1440、T2880）に、各ウェルに10μLの試料又はブランク緩衝液を加えた。

【0574】

4、T0に加えて、各時点（60、120、240、360、1440、2880分）のTRD007970、TJR100259及びAD81890試料は、何れも37の水浴においてインキュベートした。

【0575】

5、各時点の終了時に、200μL（100mMのNH4Ac pH10.0、1mMのEDTA及び750ng/mLを水中に内部標準）を添加し、60秒間ボルテックスミキサー上で振とうさせた。 10

【0576】

6、PCI（フェノール/クロロホルム/イソペンタノール（25：24：1））試薬200μL及びジクロロメタン400μLを各ウェルに添加し、ボルテックスミキサーで10min振とうした後、遠心分離し（4、3220g、20min）、上清液を得た。

【0577】

7、上清液を新しいプレートに移し、LC-MS分析を行う前に4で保存した。

【0578】

8、AS鎖及びSS鎖の一本鎖の余剰百分率をそれぞれ検出し、それによりTRD007970、TJR100259及びAD81890の余剰量の特徴付けた。 20

【0579】

9、以下の式を用いて計算した：

余剰% = 各時点での分析物対内部標準のピーク面積比 / T0分析物対内部標準のピーク面積比 × 100%

$$C_t = C_0 * e^{-k_e * t}$$

$T_{1/2} = \ln 2 / k_e = 0.693 / k_e C_{liver}(S9) = 0.693 / \text{体外 } T_{1/2} * 1 / (\text{mg/mL 反応系における } S9 \text{ タンパク質})$

$C_{liver}(liver) = C_{liver}(S9) * (\text{mg } S9) / g \text{ 肝臓} * g \text{ 肝臓} / (\text{kg 体重})$ 。 30

【0580】

実験結果を表30に示され、結果はカニクイザル肝臓S9を48hインキュベートし、TJR100259アンチセンス鎖が93.8%残り、AD81890アンチセンス鎖が70.2%残り、TRD007970アンチセンス鎖が61.0%残りことを示した。データは、カニクイザル肝臓S9を48hインキュベートし、TJR100259におけるアンチセンス鎖が、AD81890におけるアンチセンス鎖及びTRD007970におけるアンチセンス鎖に比べてより安定であることを示した。

【0581】

カニクイザル肝臓S9を48hインキュベートし、TJR100259センス鎖が21.0%残り、AD81890センス鎖が12.2%残り、TRD007970センス鎖が8.9%残った。データは、カニクイザル肝臓S9を48hインキュベートし、TJR100259におけるセンス鎖がAD81890におけるセンス鎖及びTRD007970におけるセンス鎖に比べてより安定であることを示した。 40

【0582】

一本鎖の余剰率は、dsRNAの安定性を反映することができ、余剰率が高いほど安定性が良好である。従って、TJR100259は、カニクイザル肝臓S9代謝安定性実験条件下でAD81890及びTRD007970よりも安定性が高い。

【0583】

【表 3 4】

表 3 0. カニクイザル肝臓の S 9 代謝安定性分析

検出結果	カニクイザル肝臓 S 9			
	T 1 / 2 (min)	CLint (S9) ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ タンパク質)	CLint (肝臓) ($\text{mL}/\text{min}/\text{kg}$)	余剰 (T = 2880 min)

【表 3 5】

TJR100259におけるアンチセンス鎖	>8944	<0.015	<0.05	93.8%
TJR100259におけるセンス鎖	1285.8	0.108	0.39	21.0%
AD81890におけるアンチセンス鎖	6423.8	0.022	0.08	70.2%
AD81890におけるセンス鎖	952.5	0.146	0.53	12.2%
TRD007970におけるアンチセンス鎖	3853.0	0.036	0.13	61.0%
TRD007970におけるセンス鎖	838.4	0.165	0.60	8.9%

【0584】

実施例 16 : 組織分布実験

TRD007970、TJR100410及びTJR100259を用いて、以下のよう
に組織分布実験を行った：

雄性C56BL/6Jマウス(7-8w、北京京維通利華実験動物技術有限公司)72匹を約1週間馴化し、24匹ずつの3群に分けた。TRD007970、TJR100259及びTJR100410の用量は、何れも10mg/kgであり、投与後0.5h、1h、2h、4h、8h、24h、72h、168h(n=3)に試料を採取した。安楽死後に心臓を採血し、左腎臓と肝臓左側の最大葉を採取し、採取した臓器を生理食塩水で洗浄した。肝臓腎臓試料の前処理後に、高分解能質量分析法を用いて肝臓及び腎臓のAS鎖濃度を分析し、TRD007970、TJR100259及びTJR100410の濃度を特徴付けた。

【0585】

実験の結果は、表31に示されている。その結果、C56BL/6Jマウス組織分布実験におけるTRD007970、TJR100259及びTJR100410アンチセンス鎖肝臓と腎臓の暴露量比は、それぞれ9.44、29.38及び3.49であった。肝臓と腎臓の暴露量比が大きいということは、標的臓器(肝臓)の濃度が高く、非標的臓器(腎臓)の濃度が低いことを示している。従って、同等用量では、TJR100259はTRD007970よりも高い肝腎臓比を示し、TRD007970はTJR100410よりも高い肝腎臓比を示し、TJR100259はTRD007970よりも低い腎臓毒性のリスクを示し、TRD007970はTJR100410よりも低い腎臓毒性のリスクを示す。

【0586】

【表 3 6】

表 3 1. 組織分布結果

アンチセンス鎖の暴露量比	TRD007970 10mg/kg	TJR100259 10mg/kg	TJR100410 10mg/kg
AUC _{肝臓} /AUC _{腎臓}	9.44	29.38	3.49

【0587】

実施例 17 : 肝臓ホモジネート安定性

10

20

30

40

50

TJR100410及びTJR100259を、以下のように肝臓ホモジネート安定性分析を行った：

1. カニクイザル肝臓ホモジネート（実験単位薬明康德により提供される）をApricotを用いて190µL/ウェルに添加し、プレートを37で約30分間インキュベートした。

【0588】

2. 基質細孔を除いて、各プレートは、10µLのdsRNA又は対照緩衝液を、各ウェル（T0、T1、T2、T4、T6、T24、T48、表32）に添加し、時間を計り始めた。

【0589】

【表37】

10

表32. 各時点表

時点	開始時刻	終了時刻
ブランク	48 h	0 h
T48	48 h	0 h
T24	24 h	0 h
T6	6 h	0 h
T4	4 h	0 h
T2	2 h	0 h
T1	1 h	0 h
T0	透明OTX溶解緩衝液を先に加え、次に化合物溶液を加えた	

20

【0590】

2. 1、試料の準備

(1) 200µLのdsRNAを、指定されたウェルに加えた。

(2) Clarify OTX溶解緩衝液1000µLを加えた。

(3) 800rpmの速度で5分間振とうした。

【0591】

2. 2、SPE

30

(1) 条件：フェノメネクス Clarity OTX SPEプレート（8e-s103-cga）により、600µLのMeOHで洗浄した。

(2) 平衡：SPEプレートにより、平衡緩衝液600µL（pH5.5の50mM NH4Ac、0.0025%のTriton X-100及び0.01mg/mLシステインを含む）で洗浄した。

(3) ローディング：2.1の試料をSPEプレートで洗浄した。

(4) 洗浄1：600µLの洗浄緩衝液1（25mM NH4Ac pH5.5）を固相抽出プレートで洗浄した後、再び上記ステップを再び繰り返した。

(5) 洗浄2：600µLの洗浄緩衝液2（25mM NH4Ac pH5.5、50% CAN）を固相抽出プレートで洗浄した後、上記ステップを再び繰り返した。

40

(6) 溶離：試料を150µLの溶出緩衝液（100mM NH4HCO3、40% ACN及び10% THFを含む1mM TCEP pH9.5）で溶離し、このステップを繰り返した。

(7) 試料をN2蒸発器を用いて45で（約2時間）乾燥させた。

(8) 試料を70µLの移動相Aと組み換える。51

(9) LC-MS/MS分析前に、800rpmの速度で0.5時間軽く振とうした。

(10) 以下の式を用いて算出した。

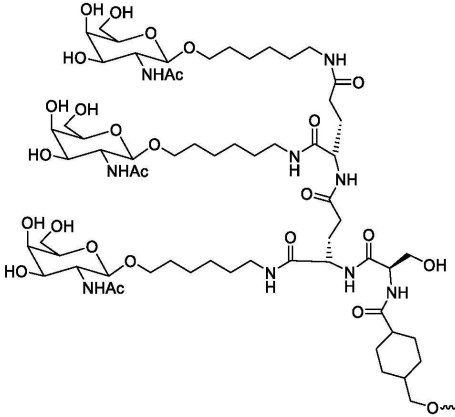
$C_t = C_0 * e^{-k_e * t}$ $C_t = 1 / 2 C_0$ $T_{1/2} = \ln 2 / (-k_e) = 0.693 / (-k_e)$ 。

【0592】

50

そのうち、T J R 1 0 0 4 1 0 は対照 d s R N A であり、そのセンス鎖は、
 G m s U m s G m U m G m C m A f C f U f U m C m G m C m U m U m C m A m C m C
 m - N A G 1 (配列番号 5 3) であり、
 アンチセンス鎖は、
 A m s G f s U m G f A m A f (-) h m p N A (G) C m G m A f A m G f U m G f
 C m A f C m A f C m s G m s G m (配列番号 5 4) であり、
 N A G 1 の構造は

【化 2 1 6】



10

20

であった。

【 0 5 9 3】

実験の結果は、表 3 3 に示される。

【 0 5 9 4】

結果は、カニクイザル肝臓ホモジネートを 4 8 h インキュベートし、T J R 1 0 0 2 5 9
 におけるアンチセンス鎖が 9 4 . 6 % 残り、T J R 1 0 0 4 1 0 におけるアンチセンス
 鎖が 4 2 . 7 % 残り、T J R 1 0 0 2 5 9 におけるセンス鎖が 1 8 . 3 % 残り、T J R 1
 0 0 4 1 0 におけるセンス鎖が 4 . 3 % 残ることを示した。データは、カニクイザル肝臓
 ホモジネートを 4 8 h インキュベートし、T J R 1 0 0 2 5 9 におけるアンチセンス鎖が
 T J R 1 0 0 4 1 0 におけるアンチセンス鎖よりも安定であり、T J R 1 0 0 2 5 9 にお
 けるセンス鎖は T J R 1 0 0 4 1 0 におけるセンス鎖よりも安定であることを示した。

30

【 0 5 9 5】

一本鎖の余剰率は、d s R N A の安定性を反映することができ、余剰率が高いほど安定
 性が良好である。従って、T J R 1 0 0 2 5 9 は、カニクイザル肝臓ホモジネート安定性
 実験条件下で T J R 1 0 0 4 1 0 よりも安定性が高い。

【 0 5 9 6】

【表 3 8】

表 3 3 . カニクイザル肝臓ホモジネート安定性分析

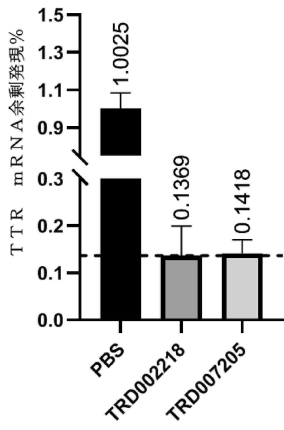
検出結果	カニクイザル肝臓ホモジネート	
	T _{1/2} (m i n)	余剰 (T=48時間)
T J R 1 0 0 4 1 0 におけるアンチセンス鎖	3 5 . 9	4 2 . 7 %
T J R 1 0 0 4 1 0 におけるセンス鎖	1 1 . 7	4 . 3 %
T J R 1 0 0 2 5 9 におけるアンチセンス鎖	2 2 9 . 9	9 4 . 6 %
T J R 1 0 0 2 5 9 におけるセンス鎖	2 0 . 4	1 8 . 3 %

40

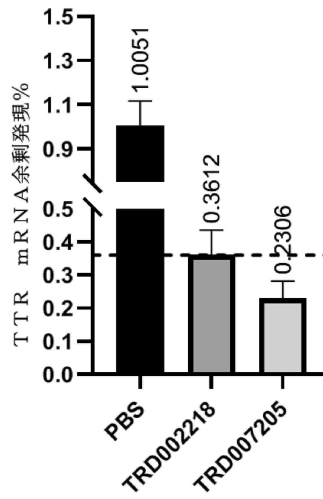
50

【 図面 】

【 図 1 】

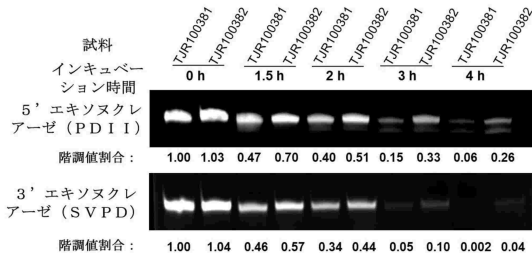


【 図 2 】

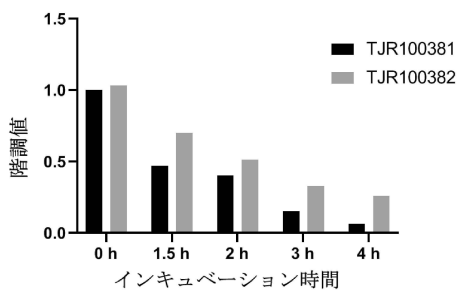


10

【 図 3 】

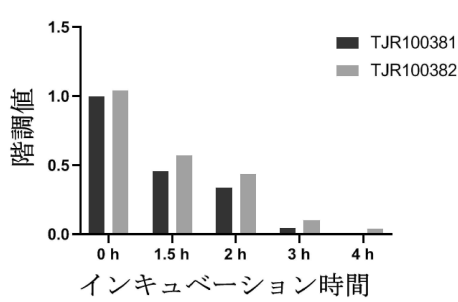


【 図 4 】



20

【 図 5 】



30

【 配列表 】

2025500860000001.xml

40

50

【 国际调查报告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2022/139488
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/113(2010.01)i;A61K48/00(2006.01)i;A61K31/713(2006.01)i;A61P7/00(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: C12N,A61K,A61P Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, CNTXT, DWPI, ENTXT, CJFD, CNKI, 百度学术, BAIDU SCHOLA R, PubMed, STN, NCBI, EBI, 中国专利生物序列检索系统, China Patent Biological Sequence Search System: 上海拓界生物医药, 乙肝病毒, 乙型肝炎病毒, dsRNA, HBV, siRNA, HBV-X, HBV-S, 有义链, 反义链, 第2位, 第8位, 第7位, 式(1)结构, structure of formula (1), SEQ ID NOs: 1-20		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2020233650 A1 (SUZHOU RIBO LIFE SCIENCE CO., LTD.) 26 November 2020 (2020-11-26) claims 1-71, description, page 3, paragraph 6, page 26, tables 1a-1i, tables 3-4, preparation examples, and experimental examples	1-24
A	CN 102245186 A (ISIS PHARMACEUTICALS INC.) 16 November 2011 (2011-11-16) entire document	1-24
A	CN 111378655 A (SUZHOU RIBO LIFE SCIENCE CO., LTD.) 07 July 2020 (2020-07-07) entire document	1-24
A	CN 103635576 A (ARROWHEAD RES CORP.) 12 March 2014 (2014-03-12) entire document	1-24
A	US 2020360522 A1 (SUZHOU RIBO LIFE SCIENCE CO., LTD.) 19 November 2020 (2020-11-19) entire document	1-24
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 02 March 2023		Date of mailing of the international search report 08 March 2023
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088 Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/139488

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.: **18-20**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 18-20 relate to a method for treating diseases, and therefore do not comply with PCT Rule 39.1(iv).
The present report is provided on the basis that claims 18-20 are amended to pharmaceutical use claims.

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).

10

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/139488

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2020233650	A1	26 November 2020	EP	3974532	A1	30 March 2022
				AU	2020280438	A1	16 December 2021
				JP	2022533722	A	25 July 2022
				TW	202111120	A	16 March 2021
				KR	20220011689	A	28 January 2022
				CA	3139195	A1	26 November 2020
				CN	102245186	A	16 November 2011
				MX	2011004097	A	28 July 2011
				US	2021169921	A1	10 June 2021
				US	11376273	B2	05 July 2022
				US	2017035798	A1	09 February 2017
				US	2013274308	A1	17 October 2013
				US	8735370	B2	27 May 2014
				EP	3335715	A2	20 June 2018
				EP	3335715	A3	08 August 2018
				JP	2018199700	A	20 December 2018
				JP	6633155	B2	22 January 2020
				NZ	603603	A	27 June 2014
				NO	2379084	T3	21 April 2018
				AU	2017202862	A1	18 May 2017
				AU	2017202862	B2	20 September 2018
				BRPI	0920263	A2	12 July 2016
				CY	1119909	T1	27 June 2018
				JP	2015211685	A	26 November 2015
				JP	6084255	B2	22 February 2017
				NZ	592203	A	25 January 2013
				EP	2379084	A2	26 October 2011
				EP	2379084	A4	06 June 2012
				EP	2379084	B1	22 November 2017
				PT	2379084	T	19 February 2018
				ES	2657679	T3	06 March 2018
				KR	20110081294	A	13 July 2011
				KR	101773551	B1	31 August 2017
				US	2020000839	A1	02 January 2020
				US	10772906	B2	15 September 2020
				RU	2011119479	A	27 November 2012
				RU	2535964	C2	20 December 2014
				AU	2009305636	A1	22 April 2010
				CA	2966011	A1	22 April 2010
				CA	2966011	C	19 October 2021
				HUE	035888	T2	28 May 2018
				IL	244116	A0	21 April 2016
				IL	244116	B	31 March 2019
				JP	2012505660	A	08 March 2012
				JP	5809058	B2	10 November 2015
				RU	2014134408	A	20 March 2016
				RU	2739594	C2	28 December 2020
				WO	2010045509	A2	22 April 2010
				WO	2010045509	A3	15 July 2010
				US	2013190384	A1	25 July 2013

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2022)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/139488

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		JP 2017099395 A	08 June 2017
		JP 6397517 B2	26 September 2018
		LT 2379084 T	26 March 2018
		KR 20170101324 A	05 September 2017
		KR 101979134 B1	15 May 2019
		HRP 20171969 T1	06 April 2018
		DK 2379084 T3	22 January 2018
		PL 2379084 T3	30 April 2018
		US 2010137414 A1	03 June 2010
		US 8334372 B2	18 December 2012
		CA 2740785 A1	22 April 2010
		CA 2740785 C	20 June 2017
		IL 212267 A0	30 June 2011
		IL 212267 A	29 February 2016
CN 111378655 A	07 July 2020	None	
CN 103635576 A	12 March 2014	AU 2022202365 A1	28 April 2022
		WO 2013003520 A1	03 January 2013
		USRE 48345 E	08 December 2020
		ES 2690538 T3	21 November 2018
		IL 230226 B	31 December 2019
		IL 284578 A	31 August 2021
		ZA 201307914 B	28 January 2015
		KR 20190111147 A	01 October 2019
		KR 102167524 B1	20 October 2020
		HK 1193633 A1	26 September 2014
		EP 3901263 A1	27 October 2021
		TW 201311716 A	16 March 2013
		TWI 659040 B	11 May 2019
		PT 2726613 T	26 October 2018
		AU 2017210563 A1	24 August 2017
		AU 2017210563 B2	10 October 2019
		AU 2012275355 A1	31 October 2013
		AU 2012275355 A2	13 February 2014
		AU 2012275355 B2	11 May 2017
		IL 270877 A	30 January 2020
		IL 270877 B	31 October 2021
		MX 2013013556 A	27 February 2014
		MX 342731 B	11 October 2016
		PL 2726613 T3	28 February 2019
		DK 2726613 T3	03 December 2018
		NZ 617756 A	24 April 2015
		JP 2021191274 A	16 December 2021
		KR 20140028021 A	07 March 2014
		KR 102025295 B1	26 September 2019
		EA 201391394 A1	30 May 2014
		EA 024762 B1	31 October 2016
		EA 024762 B9	28 April 2017
		TW 201827594 A	01 August 2018
		TWI 695066 B	01 June 2020
		KR 20200122397 A	27 October 2020

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2022)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/139488

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		KR 102434346 B1	18 August 2022
		CA 2833778 A1	03 January 2013
		CA 2833778 C	28 September 2021
		SI 2726613 T1	30 October 2018
		KR 20210110900 A	09 September 2021
		KR 102434357 B1	18 August 2022
		EP 3418386 A2	26 December 2018
		EP 3418386 A3	24 April 2019
		EP 3418386 B1	07 April 2021
		TW 202102673 A	16 January 2021
		KR 20220119522 A	29 August 2022
		EA 201690497 A2	31 August 2016
		EA 201690497 A3	30 December 2016
		EA 035756 B1	05 August 2020
		SG 194751 A1	30 December 2013
		US 2013005793 A1	03 January 2013
		US 8809293 B2	19 August 2014
		HRP 20181564 T1	30 November 2018
		EA 202090994 A1	31 August 2020
		EA 202191537 A1	31 January 2022
		JP 2019141077 A	29 August 2019
		JP 6959293 B2	02 November 2021
		AU 2022206748 A1	18 August 2022
		EP 2726613 A1	07 May 2014
		EP 2726613 A4	10 December 2014
		EP 2726613 B1	08 August 2018
		BR 112013031021 A2	09 October 2018
		MX 2020011807 A	07 December 2020
		AU 2019240625 A1	17 October 2019
		AU 2019240625 B2	21 April 2022
		CA 3064103 A1	03 January 2013
		JP 2017169568 A	28 September 2017
		JP 2014527401 A	16 October 2014
		JP 6165723 B2	19 July 2017
US 2020360522 A1	19 November 2020	TW 201925471 A	01 July 2019
		EP 3719127 A1	07 October 2020
		EP 3719127 A4	20 October 2021
		WO 2019105419 A1	06 June 2019
		JP 2021503929 A	15 February 2021
WO 2020233655 A1	26 November 2020	CA 3141372 A1	26 November 2020
		TW 202111118 A	16 March 2021
		AU 2020280439 A1	06 January 2022
		JP 2022533841 A	26 July 2022
		EP 3974530 A1	30 March 2022
		KR 20220011656 A	28 January 2022

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2022)

10

20

30

40

50

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/139488

A. 主题的分类		
C12N15/113(2010.01)i;A61K48/00(2006.01)i;A61K31/713(2006.01)i;A61P7/00(2006.01)i		
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. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
IPC: 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))		
CNABS, CNTXT, DWPI, ENTXT, CJFD, CNKI, 百度学术, PubMed, STN, NCBI, EBI, 中国专利生物序列检索系统:上海拓界生物医药, 乙肝病毒, 乙型肝炎病毒, dsRNA, HBV, siRNA, HBV-X, HBV-S, 有义链, 反义链, 第2位, 第8位, 第7位, 式(1)结构, SEQ ID NOs: 1-20		
C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	WO 2020233650 A1 (SUZHOU RIBO LIFE SCIENCE CO., LTD.) 2020年11月26日 (2020-11-26) 权利要求1-71, 说明书第3页第6段、第26页, 表1a-1i、表3-4, 制备例以及实验例	1-24
A	CN 102245186 A (ISIS制药公司) 2011年11月16日 (2011-11-16) 全文	1-24
A	CN 111378655 A (苏州瑞博生物技术有限公司) 2020年7月7日 (2020-07-07) 全文	1-24
A	CN 103635576 A (箭头研究公司) 2014年3月12日 (2014-03-12) 全文	1-24
A	US 2020360522 A1 (SUZHOU RIBO LIFE SCIENCE CO., LTD.) 2020年11月19日 (2020-11-19) 全文	1-24
A	WO 2020233655 A1 (SUZHOU RIBO LIFE SCIENCE CO., LTD.) 2020年11月26日 (2020-11-26) 全文	1-24
<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: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “D” 申请人在国际申请中引证的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “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特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “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 “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 “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 “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 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期
2023年3月2日		2023年3月8日
ISA/CN的名称和邮寄地址		受权官员
中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088		张艳青
传真号 (86-10)62019451		电话号码 (+86) 010-53962112

PCT/ISA/210 表(第2页) (2022年7月)

10

20

30

40

50

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/139488

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: 18-20
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题,即:
权利要求18-20涉及疾病的治疗方法,因此不符合PCT细则第39.1(iv)的规定。本报告基于权利要求18-20修改为制药用途权利要求而作出。
- 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。

10

20

30

40

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2022/139488

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2020233650	A1	2020年11月26日	EP	3974532	A1	2022年3月30日
				AU	2020280438	A1	2021年12月16日
				JP	2022533722	A	2022年7月25日
				TW	202111120	A	2021年3月16日
				KR	20220011689	A	2022年1月28日
				CA	3139195	A1	2020年11月26日
				CN	102245186	A	2011年11月16日
				MX	2011004097	A	2011年7月28日
				US	2021169921	A1	2021年6月10日
				US	11376273	B2	2022年7月5日
				US	2017035798	A1	2017年2月9日
				US	2013274308	A1	2013年10月17日
				US	8735370	B2	2014年5月27日
				EP	3335715	A2	2018年6月20日
				EP	3335715	A3	2018年8月8日
				JP	2018199700	A	2018年12月20日
				JP	6633155	B2	2020年1月22日
				NZ	603603	A	2014年6月27日
				NO	2379084	T3	2018年4月21日
				AU	2017202862	A1	2017年5月18日
				AU	2017202862	B2	2018年9月20日
				BR-	0920263	A2	2016年7月12日
				PI			
				CY	1119909	T1	2018年6月27日
				JP	2015211685	A	2015年11月26日
				JP	6084255	B2	2017年2月22日
				NZ	592203	A	2013年1月25日
				EP	2379084	A2	2011年10月26日
				EP	2379084	A4	2012年6月6日
				EP	2379084	B1	2017年11月22日
				PT	2379084	T	2018年2月19日
				ES	2657679	T3	2018年3月6日
				KR	20110081294	A	2011年7月13日
				KR	101773551	B1	2017年8月31日
				US	2020000839	A1	2020年1月2日
				US	10772906	B2	2020年9月15日
				RU	2011119479	A	2012年11月27日
				RU	2535964	C2	2014年12月20日
				AU	2009305636	A1	2010年4月22日
				CA	2966011	A1	2010年4月22日
				CA	2966011	C	2021年10月19日
				HUE	035888	T2	2018年5月28日
				IL	244116	AO	2016年4月21日
				IL	244116	B	2019年3月31日
				JP	2012505660	A	2012年3月8日
				JP	5809058	B2	2015年11月10日
				RU	2014134408	A	2016年3月20日
				RU	2739594	C2	2020年12月28日
				WO	2010045509	A2	2010年4月22日
				WO	2010045509	A3	2010年7月15日

10

20

30

40

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2022年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/139488

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		US 2013190384 A1	2013年7月25日
		JP 2017099395 A	2017年6月8日
		JP 6397517 B2	2018年9月26日
		LT 2379084 T	2018年3月26日
		KR 20170101324 A	2017年9月5日
		KR 101979134 B1	2019年5月15日
		HRP 20171969 T1	2018年4月6日
		DK 2379084 T3	2018年1月22日
		PL 2379084 T3	2018年4月30日
		US 2010137414 A1	2010年6月3日
		US 8334372 B2	2012年12月18日
		CA 2740785 A1	2010年4月22日
		CA 2740785 C	2017年6月20日
		IL 212267 A0	2011年6月30日
		IL 212267 A	2016年2月29日
CN 111378655 A	2020年7月7日	无	
CN 103635576 A	2014年3月12日	AU 2022202365 A1	2022年4月28日
		WO 2013003520 A1	2013年1月3日
		US-RE 48345 E	2020年12月8日
		ES 2690538 T3	2018年11月21日
		IL 230226 B	2019年12月31日
		IL 284578 A	2021年8月31日
		ZA 201307914 B	2015年1月28日
		KR 20190111147 A	2019年10月1日
		KR 102167524 B1	2020年10月20日
		HK 1193633 A1	2014年9月26日
		EP 3901263 A1	2021年10月27日
		TW 201311716 A	2013年3月16日
		TWI 659040 B	2019年5月11日
		PT 2726613 T	2018年10月26日
		AU 2017210563 A1	2017年8月24日
		AU 2017210563 B2	2019年10月10日
		AU 2012275355 A1	2013年10月31日
		AU 2012275355 A2	2014年2月13日
		AU 2012275355 B2	2017年5月11日
		IL 270877 A	2020年1月30日
		IL 270877 B	2021年10月31日
		MX 2013013556 A	2014年2月27日
		MX 342731 B	2016年10月11日
		PL 2726613 T3	2019年2月28日
		DK 2726613 T3	2018年12月3日
		NZ 617756 A	2015年4月24日
		JP 2021191274 A	2021年12月16日
		KR 20140028021 A	2014年3月7日
		KR 102025295 B1	2019年9月26日
		EA 201391394 A1	2014年5月30日
		EA 024762 B1	2016年10月31日
		EA 024762 B9	2017年4月28日
		TW 201827594 A	2018年8月1日

10

20

30

40

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2022年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2022/139488

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		TWI 695066 B	2020年6月1日
		KR 20200122397 A	2020年10月27日
		KR 102434346 B1	2022年8月18日
		CA 2833778 A1	2013年1月3日
		CA 2833778 C	2021年9月28日
		SI 2726613 T1	2018年10月30日
		KR 20210110900 A	2021年9月9日
		KR 102434357 B1	2022年8月18日
		EP 3418386 A2	2018年12月26日
		EP 3418386 A3	2019年4月24日
		EP 3418386 B1	2021年4月7日
		TW 202102673 A	2021年1月16日
		KR 20220119522 A	2022年8月29日
		EA 201690497 A2	2016年8月31日
		EA 201690497 A3	2016年12月30日
		EA 035756 B1	2020年8月5日
		SG 194751 A1	2013年12月30日
		US 2013005793 A1	2013年1月3日
		US 8809293 B2	2014年8月19日
		HRP 20181564 T1	2018年11月30日
		EA 202090994 A1	2020年8月31日
		EA 202191537 A1	2022年1月31日
		JP 2019141077 A	2019年8月29日
		JP 6959293 B2	2021年11月2日
		AU 2022206748 A1	2022年8月18日
		EP 2726613 A1	2014年5月7日
		EP 2726613 A4	2014年12月10日
		EP 2726613 B1	2018年8月8日
		BR 112013031021 A2	2018年10月9日
		MX 2020011807 A	2020年12月7日
		AU 2019240625 A1	2019年10月17日
		AU 2019240625 B2	2022年4月21日
		CA 3064103 A1	2013年1月3日
		JP 2017169568 A	2017年9月28日
		JP 2014527401 A	2014年10月16日
		JP 6165723 B2	2017年7月19日
US 2020360522 A1	2020年11月19日	TW 201925471 A	2019年7月1日
		EP 3719127 A1	2020年10月7日
		EP 3719127 A4	2021年10月20日
		WO 2019105419 A1	2019年6月6日
		JP 2021503929 A	2021年2月15日
WO 2020233655 A1	2020年11月26日	CA 3141372 A1	2020年11月26日
		TW 202111118 A	2021年3月16日
		AU 2020280439 A1	2022年1月6日
		JP 2022533841 A	2022年7月26日
		EP 3974530 A1	2022年3月30日
		KR 20220011656 A	2022年1月28日

10

20

30

40

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2022年7月)

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N	15/63	(2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	C 1 2 N	15/113	1 0 0 Z
A 6 1 P	31/20	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 P	31/14	(2006.01)	A 6 1 P	31/20	
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	31/14	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 K	31/713	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	31/713	
A 6 1 K	47/54	(2017.01)	A 6 1 K	45/00	
C 0 7 H	21/02	(2006.01)	A 6 1 K	47/54	
C 0 7 H	1/00	(2006.01)	C 0 7 H	21/02	C S P
			C 0 7 H	1/00	

,MC,ME,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,C O,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,I R,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX ,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV, SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T R I T O N

(74)代理人 100110364

弁理士 実広 信哉

(74)代理人 100133400

弁理士 阿部 達彦

(72)発明者 李 云 飛

中華人民共和国 2 0 1 2 0 3 上 海 市 浦 東 新 区 自 由 貿 易 試 験 区 金 科 路 3 7 2 8 号 1 4 幢 1 0 3 室

(72)発明者 張 ジェン

中華人民共和国 2 0 1 2 0 3 上 海 市 浦 東 新 区 自 由 貿 易 試 験 区 金 科 路 3 7 2 8 号 1 4 幢 1 0 3 室

(72)発明者 侯 哲

中華人民共和国 2 0 1 2 0 3 上 海 市 浦 東 新 区 自 由 貿 易 試 験 区 金 科 路 3 7 2 8 号 1 4 幢 1 0 3 室

(72)発明者 耿 俊

中華人民共和国 2 0 1 2 0 3 上 海 市 浦 東 新 区 自 由 貿 易 試 験 区 金 科 路 3 7 2 8 号 1 4 幢 1 0 3 室

(72)発明者 張 建羽

中華人民共和国 2 0 1 2 0 3 上 海 市 浦 東 新 区 自 由 貿 易 試 験 区 金 科 路 3 7 2 8 号 1 4 幢 1 0 3 室

(72)発明者 周 雅琴

中華人民共和国 2 0 1 2 0 3 上 海 市 浦 東 新 区 自 由 貿 易 試 験 区 金 科 路 3 7 2 8 号 1 4 幢 1 0 3 室

(72)発明者 黄 龍 飛

中華人民共和国 2 0 1 2 0 3 上 海 市 浦 東 新 区 自 由 貿 易 試 験 区 金 科 路 3 7 2 8 号 1 4 幢 1 0 3 室

F ターム (参考) 4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AA96Y AB01 AC14 BA02 BC01 CA23

CA44

4C057 AA17 AA18 BB02 DD03 MM01 MM02 MM05

