

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7033452号
(P7033452)

(45)発行日 令和4年3月10日(2022.3.10)

(24)登録日 令和4年3月2日(2022.3.2)

(51)国際特許分類

C 1 2 N 15/11 (2006.01)
C 1 2 N 15/113 (2010.01)

F I

C 1 2 N 15/11
C 1 2 N 15/113

15/11
15/113

Z Z N A
Z

請求項の数 49 (全138頁)

(21)出願番号 特願2017-565893(P2017-565893)
(86)(22)出願日 平成28年6月15日(2016.6.15)
(65)公表番号 特表2018-518186(P2018-518186)
A)
(43)公表日 平成30年7月12日(2018.7.12)
(86)国際出願番号 PCT/US2016/037685
(87)国際公開番号 WO2016/205410
(87)国際公開日 平成28年12月22日(2016.12.22)
審査請求日 令和1年6月12日(2019.6.12)
(31)優先権主張番号 62/216,317
(32)優先日 平成27年9月9日(2015.9.9)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 62/216,314
(32)優先日 平成27年9月9日(2015.9.9)

最終頁に続く

(73)特許権者 517437807
エムベグ エルエイ リミテッド ライア
ビリティ カンパニー
アメリカ合衆国 20815 メリーラン
ド州 チェビー チェイス ウィスコンシン
アベニュー 5425 スイート 801
(74)代理人 100102978
弁理士 清水 初志
(74)代理人 100102118
弁理士 春名 雅夫
(74)代理人 100160923
弁理士 山口 裕孝
(74)代理人 100119507
弁理士 刑部 俊
(74)代理人 100142929

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 定義されたマルチコンジュゲートオリゴヌクレオチド

(57)【特許請求の範囲】**【請求項1】**

少なくとも75%の純度で、構造1の化合物を含む、組成物：

X-R1-R2-A-R3-B (構造1)

構造中、

Xは、その3'または5'末端を通してR1に結合した核酸であり；

R1は、ホスホジエステル、チオホスホジエステル、スルファート、アミド、グリコールであるか、または欠如しており；

R2は、C2-C10アルキル、アルコキシ、もしくはアリール基であるか、または欠如しており；

Aは、第1の求核試薬と第1の求電子試薬との反応産物であり；

R3は、C2-C10アルキル、アルコキシ、アリール、アルキルジチオ、エーテル、チオエーテル、エステル、チオプロピオナート、またはジスルフィドであり；かつ

Bは、第2の求核試薬または第2の求電子試薬であって、該第2の求核試薬が第1の求核試薬と同じであり、かつ該第2の求電子試薬が第1の求電子試薬と同じである。

【請求項2】

R1が、ホスホジエステルまたはチオホスホジエステルであり；

R2が、C2-C10アルキル、C3-C6アルキル、またはC6アルキルであり；

Aが、チオールとマレイミドとの反応産物であり；

R3が、アルキルジチオ、またはジスルフィドであり；かつ

Bが、チオールまたはマレイミドである、
請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

少なくとも75%の純度で、単離された構造5の化合物を含む、組成物：
 (構造5)

構造中、

は、第1の一本鎖オリゴヌクレオチドであり、


10

は、第1の一本鎖オリゴヌクレオチドとは異なる配列を有する第2の一本鎖オリゴヌクレオチドであり、かつ

は、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖をそれらの3'または5'末端で連結し、
かつ構造-R1-R2-A-R3-A-R2-R1-を有する共有結合性リンカーであり、
構造中、

各々のR1は、独立してホスファート、スルファート、アミド、グリコールであるか、または欠如しており；

各々のR2は、独立してC2-C10アルキル、アルコキシ、もしくはアリール基であるか、または欠如しており；

Aは、チオールとマレイミド、チオールとビニルスルホン、チオールとピリジルジスルフィド、チオールとヨードアセトアミド、チオールとアクリラート、アジドとアルキン、またはアミンとカルボキシル基との反応産物であり、かつ

R3は、C2-C10アルキル、アルコキシ、アリール、アルキルジチオ基、エーテル、チオエーテル、エステル、チオプロピオナート、またはジスルフィドである。

【請求項4】

少なくとも75%の純度で、単離された構造6の化合物を含む、組成物：

 (構造6)

20

30

構造中、

は、第1の二本鎖オリゴヌクレオチドであり、


は、第1の二本鎖オリゴヌクレオチドとは異なる配列を有する第2の二本鎖オリゴヌクレオチドであり、かつ

は、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖をそれらの3'または5'末端で連結し、
かつ構造-R1-R2-A-R3-A-R2-R1-を有する共有結合性リンカーであり、
構造中、

各々のR1は、独立してホスファート、スルファート、アミド、グリコールであるか、または欠如しており；

各々のR2は、独立してC2-C10アルキル、アルコキシ、もしくはアリール基であるか、または欠如しており；

Aは、チオールとマレイミドと、チオールとビニルスルホン、チオールとピリジルジスルフィド、チオールとヨードアセトアミド、チオールとアクリラート、アジドとアルキン、またはアミンとカルボキシル基との反応産物であり、かつ

R3は、C2-C10アルキル、アルコキシ、アリール、アルキルジチオ基、エーテル、チオエ

40

50

ーテル、エステル、チオプロピオナート、またはジスルフィドである。

【請求項 5】

Aの求核試薬と求電子試薬が、チオールとマレイミド、チオールとビニルスルホン、チオールとピリジルジスルフィド、チオールとヨードアセトアミド、チオールとアクリラート、アジドとアルキン、またはアミンとカルボキシル基を含む、
請求項1に記載の組成物。

【請求項 6】

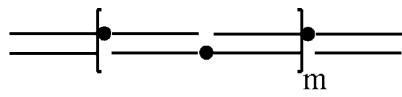
R3におけるエステルが、酸で切断可能なエステルである、請求項1、3、4または5に記載の組成物。

【請求項 7】

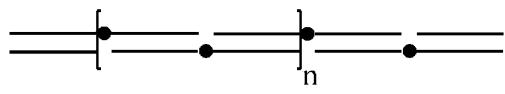
チオールとマレイミドとの反応産物が、マレイミドまたはスクシンアミド酸誘導体である
、請求項2、3、4または5に記載の組成物。

【請求項 8】

構造7または8の化合物：



(構造 7)



(構造 8)

10

20

構造中、

各々の

は、二本鎖オリゴヌクレオチドであり、

各々の は、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖を連結する共有結合性リンカー
であり、かつ

mは、1以上の整数であり、かつnは、0以上の整数である。

【請求項 9】

30

構造11の化合物：



(構造 11)

構造中、

は、二本鎖オリゴヌクレオチドであり、

は、一本鎖オリゴヌクレオチドであり、かつ

40

は、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖を連結する共有結合性リンカーである。

【請求項 10】

各々の共有結合性リンカー が同じである、請求項8に記載の化合物。

【請求項 11】

2種類以上の異なる共有結合性リンカー を含む、請求項8に記載の化合物。

【請求項 12】

各々の二本鎖オリゴヌクレオチド

が同じである、請求項8、10または11に記載の化合物。

50

【請求項 13】

2種類以上の異なる二本鎖オリゴヌクレオチド

を含む、請求項8、10または11に記載の化合物。

【請求項 14】

共有結合性リンカー の少なくとも1個が、チオールとマレイミド、チオールとビニルスルホン、チオールとピリジルジスルフィド、チオールとヨードアセトアミド、チオールとアクリラート、アジドとアルキン、またはアミンとカルボキシル基との反応産物を含む、請求項8～13のいずれか一項に記載の化合物。

10

【請求項 15】

共有結合性リンカー の少なくとも1個が、チオールと、DTME (ジチオビスマレイミドエタン)、BM(PEG)2 (1,8-ビス(マレイミド)ジエチレングリコール)、BM(PEG)3 (1,11-ビスマレイミド-トリエチレングリコール)、BMOE (ビスマレイミドエタン)、BMH (ビスマレイミドヘキサン) またはBMB (1,4-ビスマレイミドブタン)との反応産物を含む、請求項8～13のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 16】

少なくとも1個の共有結合性リンカー が、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの3'を3'に、または5'を5'に連結する、請求項8～15のいずれか一項に記載の化合物。

20

【請求項 17】

の1種類または複数種類が、切斷可能な共有結合性リンカーを含む、請求項8～16のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 18】

切斷可能な共有結合性リンカーが、酸で切斷可能なエステル結合、ヒドラジン結合、またはアセタール結合を含む、請求項17記載の化合物。

【請求項 19】

切斷可能な共有結合性リンカーが、還元剤で切斷可能な結合を含む、請求項17記載の化合物。

【請求項 20】

切斷可能な共有結合性リンカーが、細胞内条件下で切斷可能である、請求項17記載の化合物。

30

【請求項 21】

切斷可能な共有結合性リンカーが、生物切斷性 (biocleavable) 結合を含む、請求項17記載の化合物。

【請求項 22】

切斷可能な共有結合性リンカーが、酵素で切斷可能な結合を含む、請求項17記載の化合物

—

【請求項 23】

の1種類または複数種類が、切斷不可能な共有結合性リンカーを含む、請求項8～16のいずれか一項に記載の化合物。

40

【請求項 24】

切斷不可能な共有結合性リンカーが、アミド結合またはウレタン結合を含む、請求項23に記載の化合物。

【請求項 25】

の全てが、切斷可能である、請求項17に記載の化合物。

【請求項 26】

ターゲティングリガンドをさらに含む、請求項8～25のいずれか一項に記載の化合物。

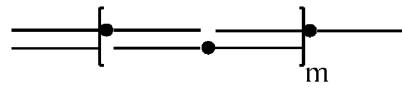
【請求項 27】

請求項8～26のいずれか一項に記載の化合物を含む、組成物。

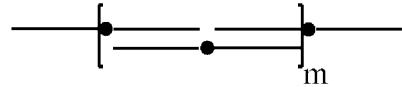
【請求項 28】

50

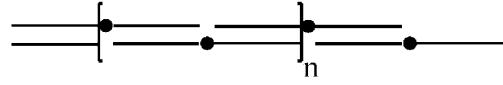
少なくとも75%の純度で、構造12、13、14、または15の化合物を含む、組成物：



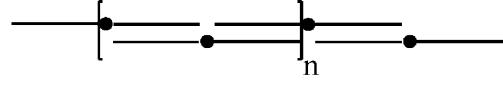
(構造 12)



(構造 13)



(構造 14)



(構造 15)

10

構造中、
各々の

は、二本鎖オリゴヌクレオチドであり、
各々の

20

は、一本鎖オリゴヌクレオチドであり、
各々の は、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖を連結する共有結合性リンカー
であり、かつ
mは、1以上の整数であり、nは、0以上の整数である。

【請求項 29】

化合物中の各々の共有結合性リンカー が同じである、請求項28に記載の組成物。

【請求項 30】

化合物が、2種類以上の異なる共有結合性リンカー を含む、請求項28に記載の組成物。

30

【請求項 31】

化合物中の各々の二本鎖オリゴヌクレオチド

が同じである、請求項28～30のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 32】

化合物が、2種類以上の異なる二本鎖オリゴヌクレオチド

を含む、請求項28～30のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項 33】

化合物中の共有結合性リンカー の少なくとも1個が、チオールとマレイミド、チオール
とビニルスルホン、チオールとピリジルジスルフィド、チオールとヨードアセトアミド、
チオールとアクリラート、アジドとアルキン、またはアミンとカルボキシル基との反応產
物を含む、請求項28～32のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 34】

化合物中の共有結合性リンカー の少なくとも1個が、チオールと、DTME (ジチオビスマ
レイミドエタン)、BM(PEG)2 (1,8-ビス(マレイミド)ジエチレングリコール)、BM(PE
G)3 (1,11-ビスマレイミド-トリエチレングリコール)、BMOE (ビスマレイミドエтан
)、BMH (ビスマレイミドヘキサン) またはBMB (1,4-ビスマレイミドブタン) との反

50

応産物を含む、請求項28～32のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項35】

化合物中の少なくとも1個の共有結合性リンカーが、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの3'を3'に、または5'を5'に連結する、請求項28～34のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項36】

化合物中の1種類または複数種類が、切断可能な共有結合性リンカーを含む、請求項28～35のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項37】

切断可能な共有結合性リンカーが、酸で切断可能なエステル結合、ヒドラジン結合、またはアセタール結合を含む、請求項36記載の組成物。

10

【請求項38】

切断可能な共有結合性リンカーが、還元剤で切断可能な結合を含む、請求項36記載の組成物。

【請求項39】

切断可能な共有結合性リンカーが、細胞内条件下で切断可能である、請求項36記載の組成物。

【請求項40】

切断可能な共有結合性リンカーが、生物切斷性(biocleavable)結合を含む、請求項36記載の組成物。

【請求項41】

切断可能な共有結合性リンカーが、酵素で切断可能な結合を含む、請求項36記載の組成物。

20

【請求項42】

化合物中の1種類または複数種類が、切断不可能な共有結合性リンカーを含む、請求項28～35のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項43】

切断不可能な共有結合性リンカーが、アミド結合またはウレタン結合を含む、請求項42に記載の組成物。

【請求項44】

の全てが、切断可能である、請求項36に記載の組成物。

30

【請求項45】

化合物がターゲティングリガンドをさらに含む、請求項28～44のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項46】

少なくとも80%の純度で化合物を含む、請求項1～7および27～45のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項47】

少なくとも85%の純度で化合物を含む、請求項46記載の組成物。

【請求項48】

少なくとも90%の純度で化合物を含む、請求項47に記載の組成物。

40

【請求項49】

少なくとも95%の純度で化合物を含む、請求項48に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、あらかじめ決定されたサイズおよび組成を有する、定義されたマルチコンジュゲートオリゴヌクレオチドに関する。種々の態様において、本発明は、有利な特性を有する、定義されたマルチコンジュゲートオリゴヌクレオチドに関する。例えば、定義されたマルチコンジュゲートsiRNA(すなわち、2種類、3種類、またはそれより多いsiRNAを含

50

む)は、増強された細胞内送達および/または複数遺伝子サイレンシング効果を有し得る。種々の態様において、本発明はまた、新たな合成中間体および定義されたマルチコンジュゲートオリゴヌクレオチドを合成する方法にも関する。本発明はまた、例えば、遺伝子発現の低減において、生物学的研究において、医学的状態の処置もしくは予防において、または、細胞もしくは生物体において新たなもしくは変更された表現型を生じるために、定義されたマルチコンジュゲートオリゴヌクレオチドを使用する方法にも関する。

【背景技術】

【0002】

背景

現在、少し例を挙げると低分子干渉RNA (siRNA) およびマイクロRNA (miRNA) などの生物学的活性分子の、細胞内で生物学的效果を生じるため、例えば、siRNAおよびmiRNAの場合にはタンパク質産生を抑制するための、細胞膜および細胞壁を横切る送達を含む、数多くの新たな治療様式および生物工学様式がある。細胞中に送達される他の技法および/または生物学的活性分子は、遺伝子発現およびタンパク質産生を増強する効果を有する。

10

【0003】

しかし、RNAおよび他のオリゴヌクレオチドは、その天然の状態ではインビボで不安定であり、短い時間内に容易に分解される。さらに、それらの多くは、RNAのように、細胞膜透過を困難にするアニオン性であり、低い細胞内送達効率を結果として生じる。

20

【0004】

siRNAを例にとると、その送達効率を増大させる取り組みは、siRNAと、カチオン性ポリマー、脂質、またはペプチドなどの多様なカチオン性担体材料とのイオン結合を通したナノサイズのイオン性複合体の調製を含む。Jeong et al., Bioconjugate Chem, 20(1): 5-14 (2009) (非特許文献1)。しかし、安定なsiRNA/カチオン性担体複合体の調製と関連する課題がある。

【0005】

siRNAなどのオリゴヌクレオチドの送達効率を増大させる他の取り組みは、特定の細胞ターゲティング部分へのオリゴヌクレオチドのコンジュゲーションを含む。例えば、Nair et al., "Multivalent N-Acetylgalactosamine-Conjugated siRNA Localizes in Hepatocytes and Elicits Robust RNAi-Mediated Gene Silencing," J Am Chem Soc, 136 (49): 16958-16961 (2014) (非特許文献2)。

30

【0006】

しかし、これらのアプローチおよび他の先行技術アプローチは、オリゴヌクレオチド送達の問題を解決していない。したがって、オリゴヌクレオチド組成物の改善の必要性が残っている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【文献】Jeong et al., Bioconjugate Chem, 20(1): 5-14 (2009)

Nair et al., "Mulivalent N-Acetylgalactosamine-Conjugated siRNA Localizes in Hepatocytes and Elicits Robust RNAi-Mediated Gene Silencing," J Am Chem Soc, 136 (49): 16958-16961 (2014)

40

【発明の概要】

【0008】

本発明は、あらかじめ決定されたサイズおよび組成を有する、定義されたマルチコンジュゲートオリゴヌクレオチドに関する。本発明はまた、定義されたマルチコンジュゲートオリゴヌクレオチドを使用する方法にも関する。本発明はまた、定義されたマルチコンジュゲートオリゴヌクレオチドを合成する方法、および、定義されたマルチコンジュゲートオリゴヌクレオチドの合成において使用される新たな中間化合物にも関する。

【0009】

50

したがって、本発明は、あらかじめ決定されたサイズおよび組成物、改善された電荷密度、改善された送達、および/または改善された有効性（例えば、コンジュゲートされていない状態における同じ部分と比較した際に）を有する、RNAおよび/またはDNAマルチコンジュゲートを提供する。マルチコンジュゲートが、適当な担体と複合体形成されるか、および/または細胞ターゲティングリガンドなどの別の化学的または生物学的部分にコンジュゲートされた場合に、それらは、生物学的または治療的効果の増強のために、細胞膜または細胞壁を横切って、より高い効率および安全性を伴って送達されうる。

【0010】

したがって、本発明の定義されたマルチコンジュゲートオリゴヌクレオチドの利点は、以下を含むことができる：細胞へのオリゴヌクレオチド送達の増大（例えば、細胞ターゲティングリガンド結合イベントあたり、より多くのオリゴヌクレオチドを送達する）、あらかじめ決定された化学量論比の異なるオリゴヌクレオチドを細胞に送達する能力（例えば、3種類の異なるオリゴヌクレオチドを含む三量体マルチコンジュゲートの場合に1:1:1）、および/または、治療用オリゴヌクレオチドの組み合わせを単一の化学実体として送達し（例えば、3種類の異なるオリゴヌクレオチドを含む三量体マルチコンジュゲートは1つの分子である）、それによりそれらの使用および規制上の審査を単純化する能力。

10

【0011】

本発明はまた、少なくとも部分的に、あらかじめ決定されたサイズおよび組成を有する、定義されたマルチコンジュゲートオリゴヌクレオチドの調製を可能にする、新たな合成方法論および中間体の開発に基づく。

20

【0012】

種々の局面において、本発明は、例えば、あらかじめ決定されたサイズおよび組成を有する、定義されたマルチコンジュゲートオリゴヌクレオチドの合成において使用することができる、共有結合性リンカーにカップリングされたオリゴヌクレオチドを提供する。

【0013】

1つの局面において、本発明は、以下の構造1の化合物を提供する：

X-R₁-R₂-A-R₃-B（構造1）

構造中、

Xは、その3'または5'末端を通してR₁に結合した核酸であり；

R₁は、ホスホジエステル、チオホスホジエステル、スルファート、アミド、グリコールであるか、または欠如しており；

30

R₂は、C₂-C₁₀アルキル、アルコキシ、もしくはアリール基であるか、または欠如しており；

Aは、求核試薬と求電子試薬との反応産物であり；

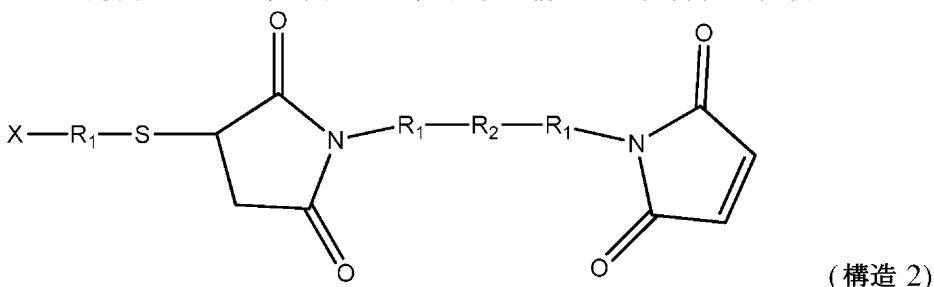
R₃は、C₂-C₁₀アルキル、アルコキシ、アリール、アルキルジチオ基、エーテル、チオエーテル、チオプロピオナート、またはジスルフィドであり；かつ

Bは、求核試薬または求電子試薬である。

40

【0014】

1つの局面において、本発明は、以下の構造2の化合物を提供する：



構造中、

Xは、その3'または5'末端でホスファートまたはチオホスファートを介してR₁に結合した

50

核酸であり；

各々のR1は、独立してC2-C10アルキル、アルコキシ、またはアリール基であり；かつR2は、チオプロピオナートまたはジスルフィド基である。

【0015】

1つの局面において、本発明は、以下の構造3の化合物を提供する：

X-R1-R2-A-R3-B (構造3)

構造中、

Xは、その3'または5'末端を通してR1に結合した核酸であり；

R1は、ホスファート、チオホスファート、スルファート、アミド、グリコールであるか、または欠如しており；

R2は、C2-C10アルキル、アルコキシ、もしくはアリール基であるか、または欠如しており；

Aは、第1の反応部分と第2の反応部分との反応産物であり；

R3は、C2-C10アルキル、アルコキシ、アリール、アルキルジチオ基、エーテル、チオエーテル、チオプロピオナート、またはジスルフィドであり；かつ

Bは、第3の反応部分である。

【0016】

種々の局面において、本発明は、共有結合性リンカーにカップリングされたオリゴヌクレオチドを合成するための方法を提供する。

【0017】

1つの局面において、本発明は、以下の工程を含む、構造1の化合物を合成するための（または、構造2もしくは3の化合物を合成するのに適合した）方法を提供する：

A'およびA''が求核試薬および求電子試薬を含む、官能基を有する核酸X-R1-R2-A'と共に共有結合性リンカーA''-R3-Bとを、X-R1-R2-A'の希釈溶液において化学量論的過剰量のA''-R3-Bで反応させる工程であって、それにより、

Xが、その3'または5'末端を通してR1に結合した核酸であり；

R1が、ホスホジエステル、チオホスホジエステル、スルファート、アミド、グリコールであるか、または欠如しており；

R2が、C2-C10アルキル、アルコキシ、もしくはアリール基であるか、または欠如しており；

Aが、求核試薬と求電子試薬との反応産物であり；

R3が、C2-C10アルキル、アルコキシ、アリール、アルキルジチオ基、エーテル、チオエーテル、チオプロピオナート、またはジスルフィドであり；かつ

Bが、求核試薬または求電子試薬である、化合物X-R1-R2-A-R3-B (構造1) を形成する、工程。

【0018】

方法は、(i) ホスホラミダイトオリゴマー化化学を用いた核酸の固相合成の最中のチオールの導入、または(ii) 固相合成の最中に導入されたジスルフィドの還元による、A'がチオール(-SH)を含む、官能基を有する核酸X-R1-R2-A'を合成する工程をさらに含むことができる。

【0019】

種々の局面において、本発明は、二量体の定義されたマルチコンジュゲートオリゴヌクレオチドを提供する。

【0020】

1つの局面において、本発明は、以下の構造4の単離された化合物を提供する：

 ●

(構造4)

構造中、

各々の

10

20

30

40

50

は、インビボで同じ分子標的と反応するように設計された二本鎖オリゴヌクレオチドであり、かつ

は、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖をそれらの3'または5'末端で連結し、かつ構造-R1-R2-A-R3-A-R2-R1-を有する共有結合性リンカーであり、構造中、

各々のR1は、独立してホスホジエステル、チオホスホジエステル、スルファート、アミド、グリコールであるか、または欠如しており；

各々のR2は、独立してC2-C10アルキル、アルコキシ、もしくはアリール基であるか、または欠如しており；

各々のAは、独立して求核試薬と求電子試薬との反応産物であり、かつ

R3は、C2-C10アルキル、アルコキシ、アリール、アルキルジチオ基、エーテル、チオエーテル、チオプロピオナート、またはジスルフィドである。

【 0 0 2 1 】

1つの局面において、本発明は、以下の構造5の単離された化合物を提供する：



構造中、

は、第1の一本鎖オリゴヌクレオチドであり、



は、第1の一本鎖オリゴヌクレオチドとは異なる配列を有する第2の一本鎖オリゴヌクレオチドであり、かつ

は、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖をそれらの3'または5'末端で連結し、かつ構造-R1-R2-A-R3-A-R2-R1-を有する共有結合性リンカーであり、構造中、

各々のR1は、独立してホスファート、スルファート、アミド、グリコールであるか、または欠如しており；

各々のR2は、独立してC2-C10アルキル、アルコキシ、もしくはアリール基であるか、または欠如しており；

各々のAは、独立してチオールとマレイミド、チオールとビニルスルホン、チオールとピリジルジスルフィド、チオールとヨードアセトアミド、チオールとアクリラート、アジドとアルキン、またはアミンとカルボキシリル基との反応産物であり、かつ

R3は、C2-C10アルキル、アルコキシ、アリール、アルキルジチオ基、エーテル、チオエーテル、チオプロピオナート、またはジスルフィドである。

【 0 0 2 2 】

1つの局面において、本発明は、以下の構造6の単離された化合物を提供する：



構造中、

は、第1の二本鎖オリゴヌクレオチドであり、



は、第1の二本鎖オリゴヌクレオチドとは異なる配列を有する第2の二本鎖オリゴヌクレオチドであり、かつ

は、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖をそれらの3'または5'末端で連結し、

10

20

30

40

50

かつ構造-R1-R2-A-R3-A-R2-R1-を有する共有結合性リンカーであり、
構造中、
各々のR1は、独立してホスファート、スルファート、アミド、グリコールであるか、または欠如しており；
各々のR2は、独立してC2-C10アルキル、アルコキシ、もしくはアリール基であるか、または欠如しており；
各々のAは、独立してチオールとマレイミド、チオールとビニルスルホン、チオールとピリジルジスルフィド、チオールとヨードアセトアミド、チオールとアクリラート、アジドとアルキン、またはアミンとカルボキシル基との反応産物であり、かつ
R3は、C2-C10アルキル、アルコキシ、アリール、アルキルジチオ基、エーテル、チオエーテル、チオプロピオナート、またはジスルフィドである。
10

【0023】

1つの局面において、本発明は、以下の構造11の単離された化合物を提供する：



構造中、

は、二本鎖オリゴヌクレオチドであり、

20

は、一本鎖オリゴヌクレオチドであり、かつ
は、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖を連結する共有結合性リンカーである。
【0024】
種々の局面において、本発明は、二量体の定義されたマルチコンジュゲートオリゴヌクレオチドを合成するための方法を提供する。
【0025】
1つの局面において、本発明は、構造5の化合物を合成するための方法を提供し、
—●~~~ (構造 5)

30

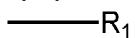
構造中、

は、第1の一本鎖オリゴヌクレオチドであり、
~~~

は、第1の一本鎖オリゴヌクレオチドとは異なる配列を有する第2の一本鎖オリゴヌクレオチドであり、かつ は、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖をそれらの3'または5'末端で連結する共有結合性リンカーであり、前記方法は以下の工程を含む：

## (i) 第1の一本鎖オリゴヌクレオチド

40

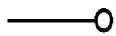


を二官能性連結部分 と反応させる工程であって、構造中、R1は、一置換産物



を生じる条件下で と反応することができる化学基である、工程；

## (ii)

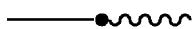


を第2の一本鎖オリゴヌクレオチド

50

$\text{~~~~~R}_2$

と反応させる工程であって、構造中、 $R_2$ は、 と反応することができる化学基であり、それにより



を形成する、工程。

【 0 0 2 6 】

方法は、相補的な

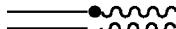


10

と



とをアニーリングさせて、構造6



(構造6)

を産する工程をさらに含むことができる。

【 0 0 2 7 】

1つの局面において、本発明は、構造4の単離された化合物を合成するための方法を提供し

20

、



(構造4)

構造中、各々の



は、二本鎖オリゴヌクレオチドであり、かつ は、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖をそれらの3'または5'末端で連結する共有結合性リンカーであり、前記方法は以下の工程を含む：

( i ) 第1の一本鎖オリゴヌクレオチド

30



を二官能性連結部分 と反応させる工程であって、構造中、 $R_1$ は、 と反応することができる化学基であり、それにより一置換産物



を形成する、工程；

( ii )



40

を第2の一本鎖オリゴヌクレオチド



と反応させる工程であって、構造中、 $R_2$ は、 と反応することができる化学基であり、それにより一本鎖二量体



を形成する、工程；

( iii ) 一本鎖オリゴヌクレオチドを、同時にまたは逐次的にアニーリングさせる工程であって、それにより

50



を形成する、工程。

【 0 0 2 8 】

1つの局面において、本発明は、構造4の単離された化合物を合成するための方法を提供し

、



(構造4)

構造中、各々の



10

は、二本鎖オリゴヌクレオチドであり、かつ は、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖をそれらの3'または5'末端で連結する共有結合性リンカーであり、前記方法は以下の工程を含む：

(i) 以下の段階により



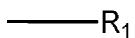
を形成する工程：

(a) 第1の一本鎖オリゴヌクレオチド

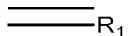


20

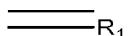
と第2の一本鎖オリゴヌクレオチド



とをアニーリングさせる段階であって、それにより

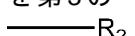


を形成する、段階、および

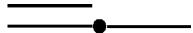


30

を第3の一本鎖オリゴヌクレオチド

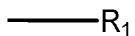


と反応させる段階であって、構造中、R1およびR2は、直接的にまたは間接的に反応して共有結合性リンカー を形成することができる化学的部分であり、それにより



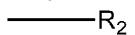
を形成する、段階；または

(b) 第2の一本鎖オリゴヌクレオチド



40

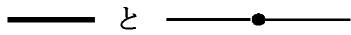
と第3の一本鎖オリゴヌクレオチド



とを反応させる段階であって、それにより



を形成する、段階、および、第1の一本鎖オリゴヌクレオチド



50

とをアニーリングさせる段階であって、それにより



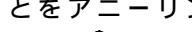
を形成する、段階；

(ii)



と第4の一本鎖オリゴヌクレオチド

とをアニーリングさせる工程であって、それにより



を形成する、工程。

【0029】

1つの局面において、本発明は、構造4の単離された化合物を合成するための方法を提供し

、



(構造4)

構造中、各々の

は、二本鎖オリゴヌクレオチドであり、かつ は、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖をそれらの3'または5'末端で連結する共有結合性リンカーであり、前記方法は以下の工程を含む：

(a) 第1の一本鎖オリゴヌクレオチド

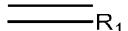
と第2の一本鎖オリゴヌクレオチド



20

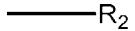
30

とをアニーリングさせる工程であって、それにより



を形成する、工程；

(b) 第3の一本鎖オリゴヌクレオチド

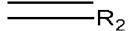


と第4の一本鎖オリゴヌクレオチド



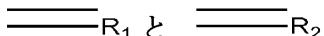
40

とをアニーリングさせる工程であって、それにより



を形成する、工程；

(b)



とを反応させる工程であって、構造中、R1およびR2は、直接的にまたは間接的に反応して共有結合性リンカー を形成することができる化学的部分であり、それにより

50



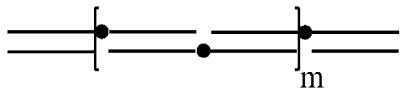
を形成する、工程。

**【 0 0 3 0 】**

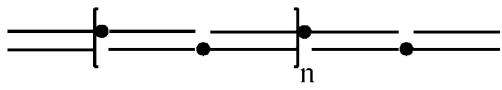
種々の局面において、本発明は、定義されたトリコンジュゲートおよび定義されたテトラコンジュゲートを含む、多量体 ( $n > 2$ ) の定義されたマルチコンジュゲートオリゴヌクレオチドを提供する。

**【 0 0 3 1 】**

1つの局面において、本発明は、以下の構造7または8の化合物を提供する：



(構造 7)



(構造 8)

10

構造中、

各々の



20

は、二本鎖オリゴヌクレオチドであり、

各々の は、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖を連結する共有結合性リンカーであり、かつ

$m$ は、1以上の整数であり、 $n$ は、0以上の整数である。

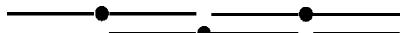
**【 0 0 3 2 】**

1つの局面において、本発明は、以下の構造9の、 $n = 0$ である化合物を提供する。



(構造 9)

1つの局面において、本発明は、以下の構造10の、 $m = 1$ である化合物を提供する。



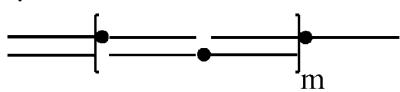
(構造 10)

30

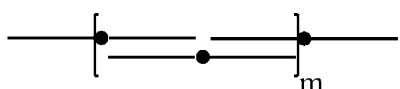
**【 0 0 3 3 】**

1つの局面において、本発明は、以下の構造12、13、14、または15の化合物を提供する

：

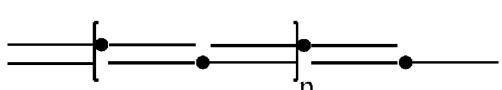


(構造 12)

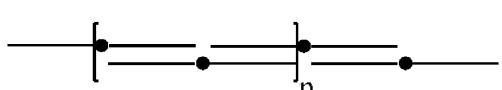


(構造 13)

40



(構造 14)



(構造 15)

構造中、

各々の

50

は、二本鎖オリゴヌクレオチドであり、  
各々の

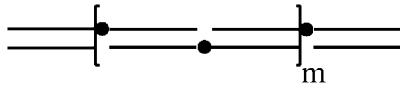
は、一本鎖オリゴヌクレオチドであり、  
各々の は、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖を連結する共有結合性リンカー  
であり、かつ  
mは、1以上の整数であり、nは、0以上の整数である。

## 【0034】

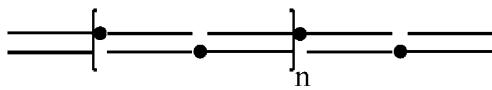
種々の局面において、本発明は、定義されたトリコンジュゲートおよび定義されたテトラ  
コンジュゲートを含む、多量体 ( $n > 2$ ) の定義されたマルチコンジュゲートオリゴヌクレ  
オチドを合成するための方法を提供する。

## 【0035】

1つの局面において、本発明は、構造7または8の化合物を合成するための方法を提供し、



(構造 7)

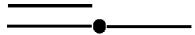


(構造 8)

構造中、各々の

は、二本鎖オリゴヌクレオチドであり、各々の は、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチド  
の一本鎖を連結する共有結合性リンカーであり、かつ、mは、1以上の整数であり、nは、  
0以上の整数であり、前記方法は以下の工程を含む：

## (i) 以下の段階により



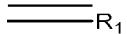
を形成する工程：

## (a) 第1の一本鎖オリゴヌクレオチド

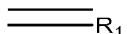
と第2の一本鎖オリゴヌクレオチド



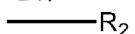
とをアニーリングさせる段階であって、それにより



を形成する、段階、および



を第3の一本鎖オリゴヌクレオチド



と反応させる段階であって、構造中、R1およびR2は、直接的にまたは間接的に反応して  
共有結合性リンカー を形成することができる化学的部分であり、それにより

10

20

30

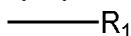
40

50



を形成する、段階；または

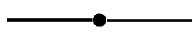
( b ) 第2の一本鎖オリゴヌクレオチド



と第3の一本鎖オリゴヌクレオチド



とを反応させる段階であって、それにより



10

を形成する、段階、および、第1の一本鎖オリゴヌクレオチド

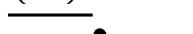


とをアニーリングさせる段階であって、それにより



を形成する、段階；

( ii )

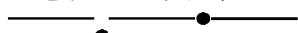


と第2の一本鎖二量体

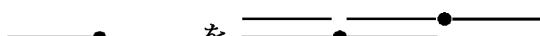


20

とをアニーリングさせる工程であって、それにより



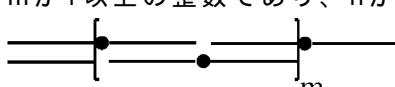
を形成する、工程、および、任意で、1種類または複数種類の追加の一本鎖二量体



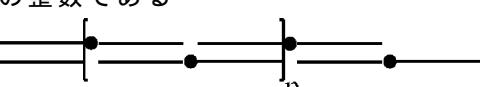
30

に対してアニーリングさせる工程であって、それにより、

mが1以上の整数であり、nが0以上の整数である



m



n

または

を形成する、工程；ならびに

( iii ) 第4の一本鎖オリゴヌクレオチド

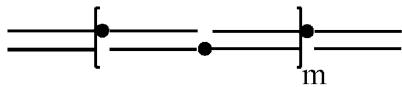
40

を工程 ( ii ) の産物に対してアニーリングさせる工程であって、それにより構造7または8を形成する、工程。

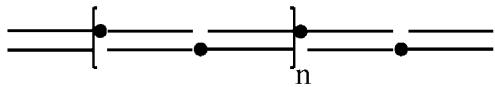
【 0 0 3 6 】

1つの局面において、本発明は、構造7または8の化合物を合成するための方法を提供し、

50



(構造 7)



(構造 8)

構造中、各々の

10

は、二本鎖オリゴヌクレオチドであり、各々の一本鎖を連結する共有結合性リンカーであり、かつ、 $m$ は、1以上の整数であり、 $n$ は、0以上の整数であり、前記方法は以下の工程を含む：

(i) 第1の一本鎖オリゴヌクレオチド

と第1の一本鎖二量体



とをアニーリングさせる工程であって、それにより

20



を形成する、工程；

(ii)

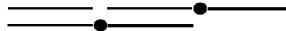


と第2の一本鎖二量体



とをアニーリングさせる工程であって、それにより

30

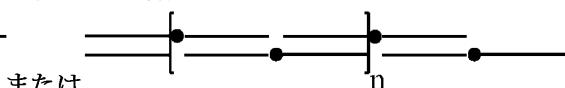
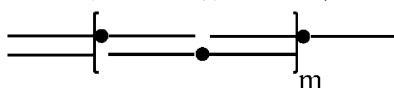


を形成する、工程、および、任意で、1種類または複数種類の追加の一本鎖二量体



に対してアニーリングさせる工程であって、それにより、

$m$ が1以上の整数であり、 $n$ が0以上の整数である



40

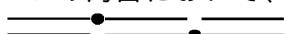
を形成する、工程；ならびに

(iii) 第2の一本鎖オリゴヌクレオチド

を工程(ii)の産物に対してアニーリングさせる工程であって、それにより構造7または8を形成する、工程。

【0037】

1つの局面において、本発明は、構造9の化合物を合成するための方法を提供し、



(構造 9)

50

構造中、各々の

は、二本鎖オリゴヌクレオチドであり、各々の は、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖を連結する共有結合性リンカーであり、前記方法は以下の工程を含む：

( i ) 以下の段階により



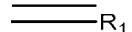
を形成する工程：

( a ) 第1の一本鎖オリゴヌクレオチド

と第2の一本鎖オリゴヌクレオチド



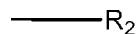
とをアニーリングさせる段階であって、それにより



を形成する、段階、および



を第3の一本鎖オリゴヌクレオチド



と反応させる段階であって、構造中、R1およびR2は、直接的にまたは間接的に反応して共有結合性リンカー を形成することができる化学的部分であり、それにより



を形成する、段階；または

( b ) 第2の一本鎖オリゴヌクレオチド



と第3の一本鎖オリゴヌクレオチド



とを反応させる段階であって、それにより



を形成する、段階、および、第1の一本鎖オリゴヌクレオチド



とをアニーリングさせる段階であって、それにより



を形成する、段階；

( ii )



と一本鎖二量体



10

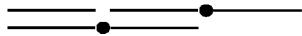
20

30

40

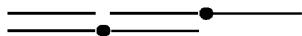
50

とをアニーリングさせる工程であって、それにより



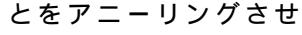
を形成する、工程；ならびに

(iii)



と第4の一本鎖オリゴヌクレオチド

とをアニーリングさせる工程であって、それにより



を形成する、工程。

【0038】

1つの局面において、本発明は、構造10の化合物を合成するための方法を提供し、



(構造10)

構造中、各々の



10

20

は、二本鎖オリゴヌクレオチドであり、各々のは、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖を連結する共有結合性リンカーであり、前記方法は以下の工程を含む：

(i) 以下の段階により



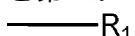
を形成する工程：

(a) 第1の一本鎖オリゴヌクレオチド

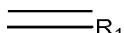


30

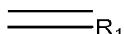
と第2の一本鎖オリゴヌクレオチド



とをアニーリングさせる段階であって、それにより



を形成する、段階、および

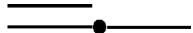


を第3の一本鎖オリゴヌクレオチド



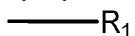
40

と反応させる段階であって、構造中、R1およびR2は、直接的にまたは間接的に反応して共有結合性リンカーを形成することができる化学的部分であり、それにより



を形成する、段階；または

(b) 第2の一本鎖オリゴヌクレオチド



50

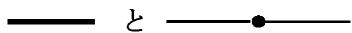
と第3の一本鎖オリゴヌクレオチド



とを反応させる段階であって、それにより



を形成する、段階、および、第1の一本鎖オリゴヌクレオチド



とをアニーリングさせる段階であって、それにより



を形成する、段階；

(ii)



と一本鎖二量体



とをアニーリングさせる工程であって、それにより

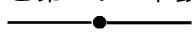


を形成する、工程；

(iii)



と第2の一本鎖二量体



とをアニーリングさせる工程であって、それにより



を形成する、工程；ならびに

(iv)



と第4の一本鎖オリゴヌクレオチド



とをアニーリングさせる工程であって、それにより



を形成する、工程。

【0039】

種々の局面において、本発明は、センス-アンチセンスマルチコンジュゲートオリゴヌクレオチド、およびそれらの合成のための方法を提供する。

【0040】

1つの局面において、本発明は、多数の分子を含む組成物を提供し、各々の分子は構造16を有する：

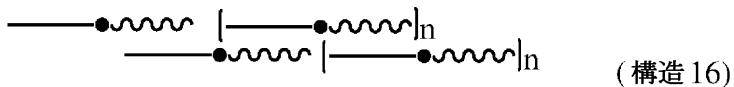
10

20

30

40

50



構造中、  
nは、1以上 の整数であり；  
各々の

は、一本鎖オリゴヌクレオチドであり；  
各々の

は、

とハイブリダイズする一本鎖オリゴヌクレオチドであり；

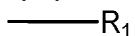
は、二本鎖オリゴヌクレオチドであり；かつ

各々の は、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖を連結する共有結合性リンカーである。

**【0041】**

1つの局面において、本発明は、以下の工程を含む、各々の分子が構造16を有する、多数の分子を含む組成物を合成するための方法を提供する：

(i) 第1の一本鎖オリゴヌクレオチド



を二官能性連結部分 と反応させる工程であって、構造中、R1は、一置換産物



を生じる条件下で と反応することができる化学基である、工程；

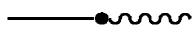
(ii)



を第2の一本鎖オリゴヌクレオチド



と反応させる工程であって、構造中、R2は、 と反応することができる化学基であり、それにより



を形成する、工程；

(iii) 多数の



をアニーリングさせる工程であって、それにより、各々の分子が構造16を有する、多数の分子を含む組成物を形成する、工程。

**【0042】**

種々の局面において、本発明は、マルチコンジュゲートオリゴヌクレオチドを合成するた

10

20

30

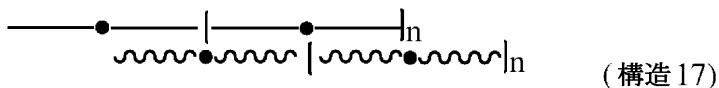
40

50

めの方法を提供する。

【0043】

1つの局面において、本発明は、構造17を含む多数の分子を含む組成物を合成するための方法を提供し、



構造中、nは、1以上の整数であり；各々の

10

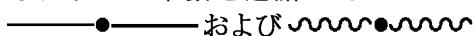
は、一本鎖オリゴヌクレオチドであり；各々の  
wave

は、

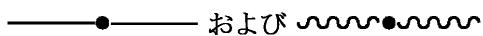
とハイブリダイズする一本鎖オリゴヌクレオチドであり；  
wave

20

は、二本鎖オリゴヌクレオチドであり；かつ、各々の  
は、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖を連結して

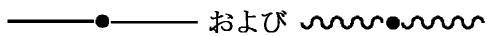


を形成する共有結合性リンカーであり、前記方法は以下の工程を含む：  
多数の



を、

(i)



30

について約200～300 μMの総オリゴヌクレオチド濃度、

(ii) 約0.1～0.3×リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、および

(iii) 約1.5～2.5時間にわたる、約70～80℃から約20～30℃への温度でアニーリングさせる工程。

【0044】

種々の局面において、本発明は、マルチコンジュゲートオリゴヌクレオチドを含む薬学的組成物を提供する。

【0045】

1つの局面において、本発明は、(i)本発明による化合物または組成物、および(ii)薬学的に許容される賦形剤、を含む組成物(例えば、薬学的組成物)を提供する。

40

【0046】

1つの局面において、本発明は、薬剤としての使用のため、または薬剤の製造における使用のための、本発明による化合物または組成物を提供する。薬剤は、少なくとも1種類の過剰発現している遺伝子の発現をサイレンシングまたは低減させるため、例えば、2種類、3種類、4種類、またはそれより多い、過剰発現している遺伝子の発現をサイレンシングまたは低減させるためであることができる。

【0047】

1つの局面において、本発明は、液体ナノ粒子(LNP)、エキソソーム、微小胞、または

50

ウイルスベクター中に製剤化された、本発明による化合物または組成物を含む組成物（例えば、薬学的組成物）を提供する。

【 0 0 4 8 】

種々の局面において、本発明は、マルチコンジュゲートオリゴヌクレオチドを使用するための方法を提供する。

【 0 0 4 9 】

1つの局面において、本発明は、本発明による化合物または組成物の有効量を、その必要がある対象に投与する工程を含む、遺伝子発現を低減させるための方法を提供する。

【 0 0 5 0 】

1つの局面において、本発明は、本発明による化合物または組成物の有効量を、その必要がある対象に投与する工程を含む、対象を処置するための方法を提供する。

10

【 0 0 5 1 】

1つの局面において、本発明は、2種類以上の遺伝子をターゲティングするオリゴヌクレオチドを含む、本発明による化合物または組成物の有効量を、その必要がある対象に投与する工程を含む、2種類以上の遺伝子をサイレンシングさせるための方法を提供する。化合物または組成物は、2種類、3種類、4種類、またはそれより多い遺伝子をターゲティングするオリゴヌクレオチドを含むことができる。

【 0 0 5 2 】

1つの局面において、本発明は、ターゲティングリガンドを含む、本発明による化合物または組成物の有効量を、その必要がある対象に投与する工程を含む、ターゲティングリガンド結合イベントあたり2種類以上のオリゴヌクレオチドを細胞に送達するための方法を提供する。

20

【 0 0 5 3 】

1つの局面において、本発明は、あらかじめ決定された化学量論比の2種類以上のオリゴヌクレオチドを含む、本発明による化合物または組成物の有効量を、その必要がある対象に投与する工程を含む、あらかじめ決定された化学量論比の2種類以上のオリゴヌクレオチドを細胞に送達するための方法を提供する。

【 0 0 5 4 】

種々の局面において、本発明は、特定の配列を有するオリゴヌクレオチドを提供する。

30

【 0 0 5 5 】

1つの局面において、本発明は、SEQ ID NO:104および105を有するsiRNAを提供する。

【 0 0 5 6 】

1つの局面において、本発明は、SEQ ID NO:113および114を有するsiRNAを提供する。

【 0 0 5 7 】

当業者は、上記の局面が、以下に記載される1つまたは複数の適当な特徴と組み合わされうることを認識するであろう。

【 0 0 5 8 】

種々の態様において、共有結合性リンカー（例えば、の1つまたはすべて）は、求核試薬と求電子試薬との反応産物を含むことができる。例えば、共有結合性リンカー（例えば、の1つまたはすべて）は、チオールとマレイミド、チオールとビニルスルホン、チオールとピリジルジスルフィド、チオールとヨードアセトアミド、チオールとアクリラート、アジドとアルキン、またはアミンとカルボキシル基との反応産物を含むことができる。

種々の態様において、共有結合性リンカーは、オリゴヌクレオチドではない。

40

【 0 0 5 9 】

種々の態様において、（例えば、構造1または4～6中のAの）求核試薬と求電子試薬は、チオールとマレイミド、チオールとビニルスルホン、チオールとピリジルジスルフィド、チオールとヨードアセトアミド、チオールとアクリラート、アジドとアルキン、またはアミンとカルボキシル基を含むことができる。同様に、構造3中の反応部分は、求核試薬と求電子試薬、例えば、チオールとマレイミド、チオールとビニルスルホン、チオールとピリジルジスルフィド、チオールとヨードアセトアミド、チオールとアクリラート、アジド

50

とアルキン、またはアミンとカルボキシル基を含むことができる。

**【 0 0 6 0 】**

種々の態様において、(例えば、構造1中のBの)求核試薬または求電子試薬は、チオール、マレイミド、ビニルスルホン、ピリジルジスルフィド、ヨードアセトアミド、アクリラート、アジド、アルキン、アミン、またはカルボキシル基を含むことができる。

**【 0 0 6 1 】**

種々の態様において、リンカー(例えば、または構造1~3に示されるリンカー)は、DTME(ジチオビスマレイミドエタン)、BM(PEG)2(1,8-ビス(マレイミド)ジエチレングリコール)、BM(PEG)3(1,11-ビスマレイミド-トリエチレングリコール)、BMOE(ビスマレイミドエタン)、BMH(ビスマレイミドヘキサン)、またはBMB(1,4-ビスマレイミドブタン)の反応産物を含むことができる。例えば、リンカーは、チオールとDTME(ジチオビスマレイミドエタン)、BM(PEG)2(1,8-ビス(マレイミド)ジエチレングリコール)、BM(PEG)3(1,11-ビスマレイミド-トリエチレングリコール)、BMOE(ビスマレイミドエタン)、BMH(ビスマレイミドヘキサン)、またはBMB(1,4-ビスマレイミドブタン)との反応産物を含むことができる。

10

**【 0 0 6 2 】**

2種類以上の共有結合性リンカーを含む種々の態様において(例えば、構造7~16中)、リンカーはすべて同じである。あるいは、化合物または組成物は、2種類以上の異なる共有結合性リンカーを含むことができる。

**【 0 0 6 3 】**

20

種々の態様において、構造1中、

R1は、ホスホジエステルまたはチオホスホジエステルであり；

R2は、C2-C10アルキルであり；

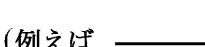
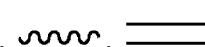
Aは、チオールとマレイミドとの反応産物であり；

R3は、ジスルフィドであり；かつ

Bは、チオールまたはマレイミドである。

**【 0 0 6 4 】**

種々の態様において、核酸(例えば、X)またはオリゴヌクレオチド

(例えば、, , または)

30

は、RNA、DNAであるか、または人工もしくは非天然の核酸類似体を含む。

**【 0 0 6 5 】**

種々の態様において、核酸またはオリゴヌクレオチドは、DNA、例えば、アンチセンスDNA(aDNA)またはアンチセンスギャップマーである。

**【 0 0 6 6 】**

種々の態様において、核酸またはオリゴヌクレオチドは、RNA、例えば、アンチセンスRNA(aRNA)、CRISPR RNA(crRNA)、長鎖ノンコーディングRNA(lncRNA)、マイクロRNA(miRNA)、piwi相互作用RNA(piRNA)、低分子干渉RNA(siRNA)、メッセンジャーRNA(mRNA)、短鎖ヘアピンRNA(shRNA)、低分子活性化(saRNA)、アンタゴミル、またはリボザイムである。1つの態様において、RNAはsiRNAである。

40

**【 0 0 6 7 】**

種々の態様において、核酸またはオリゴヌクレオチドは、アプタマーである。

**【 0 0 6 8 】**

種々の態様において、核酸またはオリゴヌクレオチドは、化学修飾をさらに含む。化学修飾は、修飾されたヌクレオシド、修飾された骨格、修飾された糖、または修飾された末端を含むことができる。

**【 0 0 6 9 】**

種々の態様において、核酸またはオリゴヌクレオチドは、ターゲティングリガンドをさらに含む。ターゲティングリガンドは、例えばその3'または5'末端を通して、(例えば、直

50

接的に)核酸に結合させることができる。1つの態様において、ターゲティングリガンドは、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)、コレステロール、トコフェロール、フォレート、2-[3-(1,3-ジカルボキシプロピル)-ウレイド]ペンタン二酸(DUPA)、またはアニスアミドを含む。

**【0070】**

種々の態様において、方法は、ターゲティングリガンドを分子にカップリングする工程を含むことができる。

**【0071】**

種々の態様において、核酸またはオリゴヌクレオチドは、一本鎖である。

**【0072】**

種々の態様において、核酸またはオリゴヌクレオチドは、二本鎖である。

**【0073】**

種々の態様において、核酸またはオリゴヌクレオチドは、15~30、17~27、19~26、20~25、40~50、40~150、100~300、1000~2000、または最大10000までのヌクレオチド長である。

**【0074】**

種々の態様において、核酸またはオリゴヌクレオチドは、ホスホジエステルまたはチオホスホジエステルを介してリンカーに接続される(例えば、構造1中のR1は、ホスホジエステルまたはチオホスホジエステルである)。

**【0075】**

種々の態様において、核酸またはオリゴヌクレオチドは、C2-C10、C3-C6、またはC6アルキルを介してリンカーに接続される(例えば、構造1中のR2は、C2-C10、C3-C6、またはC6アルキルである)。

**【0076】**

種々の態様において、核酸またはオリゴヌクレオチドは、チオールとマレイミド基との反応産物を介してリンカーに接続される(例えば、構造1中のAは、チオールとマレイミド基との反応産物である)。

**【0077】**

種々の態様において、リンカー(例えば、構造1中のR3、構造2中のR1-R2-R1、または構造3中のA-R3-B)は、切断可能である。1つの態様において、切断可能な共有結合性リンカーは、酸で切断可能なエステル結合、ヒドラジン結合、またはアセタール結合を含む。1つの態様において、切断可能な共有結合性リンカーは、還元剤で切断可能な結合を含む。1つの態様において、還元剤で切断可能な結合は、ジスルフィド結合である。1つの態様において、切断可能な共有結合性リンカーは、細胞内条件下で切断可能である。1つの態様において、切断可能な共有結合性リンカーは、生物切斷性(biocleavable)結合を含む。1つの態様において、切断可能な共有結合性リンカーは、酵素で切断可能な結合を含む。

**【0078】**

種々の態様において、リンカーは切断可能ではない。1つの態様において、の1種類または複数種類は、切断不可能な共有結合性リンカーを含む。1つの態様において、切断不可能な共有結合性リンカーは、アミド結合またはウレタン結合を含む。切断不可能な共有結合性リンカーは、アルキル、アリール、または類似した炭化水素基であることができる。

**【0079】**

種々の態様において、リンカーは、チオプロピオナートまたはジスルフィドを含む(例えば、R3は、チオプロピオナートまたはジスルフィドである)。

**【0080】**

種々の態様において、構造2中の部分

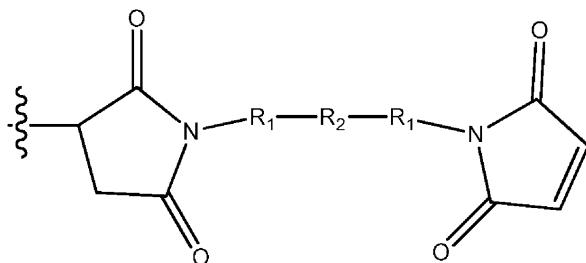
10

20

30

40

50



は、DTME（ジチオビスマレイミドエタン）、BM(PEG)2（1,8-ビス(マレイミド)ジエチレングリコール）、BM(PEG)3（1,11-ビスマレイミド-トリエチレングリコール）、BMOE（ビスマレイミドエタン）、BMH（ビスマレイミドヘキサン）、またはBMB（1,4-ビスマレイミドブタン）の反応産物を含む。

**【0081】**

種々の態様において、リンカーは、ホモ二官能性リンカーである。例えば、1つの態様において、Bは、構造1または構造3中のAと同じ基のうちの1つを含む。

**【0082】**

種々の態様において、リンカーは、ヘテロ二官能性リンカーである。例えば、1つの態様において、Bは、構造1または構造3中のAとは異なる基を含む。

**【0083】**

種々の態様において、化合物は、単離されているか、または実質的に純粋である。例えば、化合物は、少なくとも75、80、85、90、95、96、97、98、99、または100%純粋であることができる。1つの態様において、化合物は、約85～95%純粋である。同様に、本発明による化合物および組成物を合成するための方法は、少なくとも75、80、85、90、95、96、97、98、99、または100%純粋である産物を結果としてもたらすことができる。1つの態様において、産物は、約85～95%純粋である。

**【0084】**

種々の態様において、各々の二本鎖オリゴヌクレオチドは、siRNAであり、おかつ/または、15～30塩基対の長さを有する。

**【0085】**

種々の態様において、各々の

は、独立して2種類のセンスオリゴヌクレオチドまたは2種類のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含んでもよい。

**【0086】**

種々の態様において、各々の

は、独立して1種類のセンスオリゴヌクレオチドおよび1種類のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含んでもよい。

**【0087】**

種々の態様において、化合物または組成物は、実質的に同一の二本鎖オリゴヌクレオチドのホモ多量体を含む。実質的に同一の二本鎖オリゴヌクレオチドは、インピボで同じ分子標的をターゲティングするsiRNAを各々含むことができる。

**【0088】**

種々の態様において、化合物または組成物は、2種類以上の実質的に異なる二本鎖オリゴヌクレオチドのヘテロ多量体を含む。実質的に異なる二本鎖オリゴヌクレオチドは、異なる遺伝子をターゲティングするsiRNAを各々含むことができる。

**【0089】**

種々の態様において、化合物は、 $n = 0$ である、以下の構造9を含む。

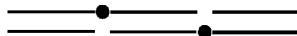
10

20

30

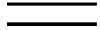
40

50



(構造 9)

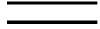
化合物は、ターゲティングリガンドをさらに含むことができる。化合物は、インビボで異なる分子標的をターゲティングするsiRNAを各々含む、2種類または3種類の実質的に異なる二本鎖オリゴヌクレオチド



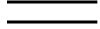
10  
をさらに含むことができる。化合物は、ターゲティングリガンド、第VII因子をターゲティングする第1のsiRNAガイド鎖およびガイド鎖にハイブリダイズした第1のパッセンジャー鎖を含む、1種類の



、アポリポタンパク質Bをターゲティングする第2のsiRNAガイド鎖および第2のガイド鎖にハイブリダイズした第2のパッセンジャー鎖を含む、1種類の



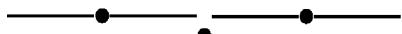
、ならびに、TTRをターゲティングする第3のsiRNAガイド鎖および第3のガイド鎖にハイブリダイズした第3のパッセンジャー鎖を含む、1種類の



をさらに含むことができる。ターゲティングリガンドは、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)を含むことができる。

**【0090】**

種々の態様において、化合物は、 $m = 1$ である、以下の構造10を含む。

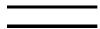


(構造 10)

化合物は、ターゲティングリガンドをさらに含むことができる。化合物は、インビボで異なる分子標的をターゲティングするsiRNAを各々含む、2種類、3種類、または4種類の実質的に異なる二本鎖オリゴヌクレオチド



をさらに含むことができる。化合物は、ターゲティングリガンド、第VII因子をターゲティングする第1のsiRNAガイド鎖およびガイド鎖にハイブリダイズした第1のパッセンジャー鎖を含む、1種類の



、アポリポタンパク質Bをターゲティングする第2のsiRNAガイド鎖および第2のガイド鎖にハイブリダイズした第2のパッセンジャー鎖を含む、1種類の



、ならびに、TTRをターゲティングする第3のsiRNAガイド鎖および第3のガイド鎖にハイブリダイズした第3のパッセンジャー鎖を含む、1種類の



をさらに含むことができる。ターゲティングリガンドは、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)を含むことができる。

**【0091】**

構造16に関する種々の態様において、各々の

10

20

30

40

50

~~~~~

は、15～30塩基対の長さを有し；各々の

~~~~~

は、siRNAであり；かつ/または、nは、1～100の整数である。

【0092】

種々の態様において、各々の二本鎖オリゴヌクレオチド（例えば構造4中の

)は、第VII因子をターゲティングするsiRNAガイド鎖およびガイド鎖にハイブリダイズしたパッセンジャー鎖を含む。

【0093】

種々の態様において（例えば、構造4中）、化合物は、ターゲティングリガンドをさらに含み、各々の二本鎖オリゴヌクレオチド（例えば、

)は、siRNAガイド鎖およびガイド鎖にハイブリダイズしたパッセンジャー鎖を含み、かつ化合物は、少なくとも75、80、85、90、95、96、97、98、99、または100%純粋である。

【0094】

種々の態様において、少なくとも1種類の二本鎖オリゴヌクレオチド（例えば構造6中の、例えば、

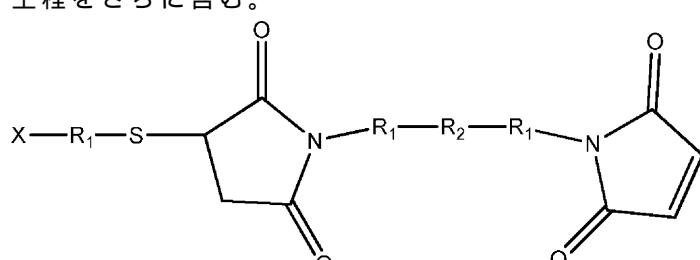
)は、第VII因子をターゲティングする第1のsiRNAガイド鎖およびガイド鎖にハイブリダイズした第1のパッセンジャー鎖を含み、かつ、少なくとも1種類の二本鎖オリゴヌクレオチド（例えば構造6中の、例えば、

~~~~~

)は、アポリポタンパク質Bをターゲティングする第2のsiRNAガイド鎖および第2のガイド鎖にハイブリダイズした第2のパッセンジャー鎖を含む。

【0095】

種々の態様において、構造1の化合物を合成するための方法は、構造2の化合物を合成する工程をさらに含む。



(構造 2)

【0096】

種々の態様において、構造1または2の化合物を合成するための方法は、構造1または2の形成に実質的に好都合であり、Xの二量体化を実質的に阻止する条件下で行われる。条件は、反応の収率を改善する（例えば、産物の純度を改善する）ことができる。

【0097】

10

20

30

40

50

種々の態様において、構造1または2の化合物を合成するための方法、官能基を有する核酸X-R1-R2-A'と共に結合性リンカーA''-R3-Bとを反応させる工程は、約1 mM、500 μM、250 μM、100 μM、または50 μMより下のX-R1-R2-A'濃度で行われる。あるいは、X-R1-R2-A'濃度は、約1 mM、500 μM、250 μM、100 μM、または50 μMであることができる。

【 0 0 9 8 】

種々の態様において、構造1または2の化合物を合成するための方法、官能基を有する核酸X-R1-R2-A'と共に結合性リンカーA''-R3-Bとを反応させる工程は、少なくとも約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、または100のモル過剰量のA''-R3-Bで行われる。あるいは、A''-R3-Bのモル過剰量は、約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、または100であることができる。10

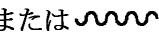
【 0 0 9 9 】

種々の態様において、構造1または2の化合物を合成するための方法、官能基を有する核酸X-R1-R2-A'と共に結合性リンカーA''-R3-Bとを反応させる工程は、約7、6、5、または4より下のpHで行われる。あるいは、pHは、約7、6、5、または4であることができる。

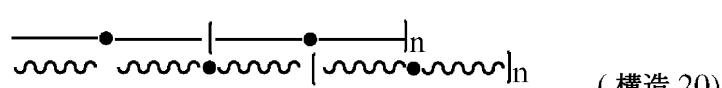
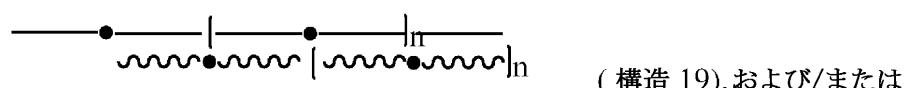
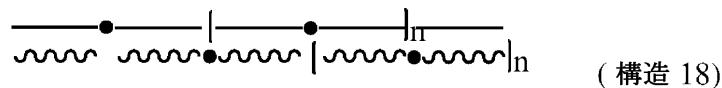
【 0 1 0 0 】

種々の態様において、構造1または2の化合物を合成するための方法、官能基を有する核酸X-R1-R2-A'と共に結合性リンカーA''-R3-Bとを反応させる工程は、水および水混和性有機共溶媒を含む溶液において行われる。水混和性有機共溶媒は、DMF、NMP、DMSO、またはアセトニトリルを含むことができる。水混和性有機共溶媒は、約10、15、20、25、30、40、または50%V (v/v) の溶液を含むことができる。20

【 0 1 0 1 】

(例えれば、構造17を合成するための) 種々の態様において、方法は、多数の
_____ および/または 

をアニーリングさせる工程であって、それにより

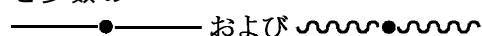


を含む多数の分子を形成する、工程をさらに含む。

【 0 1 0 2 】

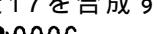
(例えれば、構造17を合成するための) 種々の態様において、方法は、

を多数の



とアニーリングさせる工程をさらに含む。

【 0 1 0 3 】

(例えれば、構造17を合成するための) 種々の態様において、
_____ 対 

のモル比は、約5:100、10:100、20:100、30:100、40:100、または50:100である。

【 0 1 0 4 】

50

30

40

50

(例えば、構造17を合成するための) 種々の態様において、方法は、
 ~~~~~

を多数の

——●—— および ~~~~~●~~~~~

とアニーリングさせる工程をさらに含む。

【 0 1 0 5 】

( 例えば、構造17を合成するための ) 種々の態様において、

~~~~~ 对 —————●————

10

のモル比は、約5:100、10:100、20:100、30:100、40:100、または50:100である。

【 0 1 0 6 】

(例えば、構造17を合成するための) 種々の態様において、

——●—— と ~~~~~●~~~~~

のモル比は、約1:1である。

【 0 1 0 7 】

(例えば、構造17を合成するための) 種々の態様において、

——●—— 对 ~~~~~●~~~~~

20

のモル比または

~~~~~●~~~~~ 对 —————●————

のモル比は、約100:90、100:80、100:75、100:70、または100:60である。

【 0 1 0 8 】

( 例えば、構造17を合成するための ) 種々の態様において、各々の

~~~~~

は、15～30塩基対の長さを有する。

30

【 0 1 0 9 】

(例えば、構造17を合成するための) 種々の態様において、各々の

~~~~~

は、siRNAである。

【 0 1 1 0 】

( 例えば、構造17を合成するための ) 種々の態様において、各々の

~~~~~

は、第VII因子をターゲティングするsiRNAガイド鎖およびガイド鎖にハイブリダイズした
 パッセンジャー鎖を含む。

40

【 0 1 1 1 】

(例えば、構造17を合成するための) 種々の態様において、nは、1～100の整数である。

【 0 1 1 2 】

(例えば、構造17を合成するための) 種々の態様において、nは、切断可能なまたは切断
 不可能なリンカーである。

【 0 1 1 3 】

種々の態様において、方法は、化合物または組成物のいずれかをナノ粒子中に製剤化する
 工程をさらに含む。

【 0 1 1 4 】

50

種々の態様において、オリゴヌクレオチドは、特定の配列、例えば、本明細書において開示される配列のいずれか1つを有する。1つの態様において、オリゴヌクレオチドは、SEQ ID NO:104および105を有するsiRNAである。1つの態様において、オリゴヌクレオチドは、SEQ ID NO:113および114を有するsiRNAである。

【0115】

種々の態様において、対象は、細胞、哺乳動物、またはヒトである。

【0116】

[本発明1001]

構造1の化合物：

X-R1-R2-A-R3-B (構造1)

10

構造中、

Xは、その3'または5'末端を通してR1に結合した核酸であり；

R1は、ホスホジエステル、チオホスホジエステル、スルファート、アミド、グリコールであるか、または欠如してあり；

R2は、C2-C10アルキル、アルコキシ、もしくはアリール基であるか、または欠如してあり；

Aは、求核試薬と求電子試薬との反応産物であり；

R3は、C2-C10アルキル、アルコキシ、アリール、アルキルジチオ基、エーテル、チオエーテル、チオプロピオナート、またはジスルフィドであり；かつ

Bは、求核試薬または求電子試薬である。

20

[本発明1002]

Aの求核試薬と求電子試薬が、チオールとマレイミド、チオールとビニルスルホン、チオールとピリジルジスルフィド、チオールとヨードアセトアミド、チオールとアクリラート、アジドとアルキン、またはアミンとカルボキシル基を含む、本発明1001の化合物。

[本発明1003]

Bの求核試薬または求電子試薬が、チオール、マレイミド、ビニルスルホン、ピリジルジスルフィド、ヨードアセトアミド、アクリラート、アジド、アルキン、アミン、またはカルボキシル基を含む、本発明1001～1002のいずれかの化合物。

[本発明1004]

R1が、ホスホジエステルまたはチオホスホジエステルであり；

30

R2が、C2-C10アルキルであり；

Aが、チオールとマレイミドとの反応産物であり；

R3が、ジスルフィドであり；かつ

Bが、チオールまたはマレイミドである、

本発明1001の化合物。

[本発明1005]

XがsiRNAである、本発明1001～1004のいずれかの化合物。

[本発明1006]

核酸が、RNA、DNAであるか、または人工もしくは非天然の核酸類似体を含む、本発明1001～1005のいずれかの化合物。

40

[本発明1007]

核酸がDNAである、本発明1006の化合物。

[本発明1008]

DNAが、アンチセンスDNA (aDNA) またはアンチセンスギャップマーである、本発明1007の化合物。

[本発明1009]

核酸がRNAである、本発明1006の化合物。

[本発明1010]

RNAが、アンチセンスRNA (aRNA)、CRISPR RNA (crRNA)、長鎖ノンコーディングRNA (lncRNA)、マイクロRNA (miRNA)、piwi相互作用RNA (piRNA)、低分子

50

干渉RNA (siRNA) 、メッセンジャーRNA (mRNA) 、短鎖ヘアピンRNA (shRNA) 、低分子活性化 (saRNA) 、アンタゴミル、またはリボザイムである、本発明1009の化合物。

[本発明1011]

核酸がアプタマーである、本発明1001～1010のいずれかの化合物。

[本発明1012]

核酸が、化学修飾をさらに含む、本発明1001～1011のいずれかの化合物。

[本発明1013]

化学修飾が、修飾されたヌクレオシド、修飾された骨格、修飾された糖、または修飾された末端を含む、本発明1012の化合物。

10

[本発明1014]

ターゲティングリガンドをさらに含む、本発明1001～1013のいずれかの化合物。

[本発明1015]

ターゲティングリガンドが、核酸に結合している、本発明1014の化合物。

[本発明1016]

ターゲティングリガンドが、その3'または5'末端を通して核酸に結合している、本発明1015の化合物。

20

[本発明1017]

ターゲティングリガンドが、N-アセチルガラクトサミン (GaINAc) 、コレステロール、トコフェロール、フォレート、2-[3-(1,3-ジカルボキシプロピル)-ウレイド]ペンタン二酸 (DUPA) 、またはアニスアミドを含む、本発明1014～1016のいずれかの化合物。

[本発明1018]

核酸が一本鎖である、本発明1001～1017のいずれかの化合物。

[本発明1019]

核酸が二本鎖である、本発明1001～1017のいずれかの化合物。

[本発明1020]

核酸が、15～30、17～27、19～26、20～25、40～50、40～150、100～300、100～2000、または最大10000までのヌクレオチド長である、本発明1001～1019のいずれかの化合物。

30

[本発明1021]

R1が、ホスホジエステルまたはチオホスホジエステルである、本発明1001～1020のいずれかの化合物。

[本発明1022]

R2が、C2-C10、C3-C6、またはC6アルキルである、本発明1001～1021のいずれかの化合物。

[本発明1023]

Aが、チオールとマレイミド基との反応産物である、本発明1001～1022のいずれかの化合物。

[本発明1024]

R3が、チオプロピオナートまたはジスルフィドである、本発明1001～1023のいずれかの化合物。

40

[本発明1025]

R3が、細胞内条件下で切断可能なリンカーを含む、本発明1001～1024のいずれかの化合物。

[本発明1026]

Bが、Aと同じ基のうちの1つを含む、本発明1001～1025のいずれかの化合物。

[本発明1027]

Bが、Aとは異なる基を含む、本発明1001～1026のいずれかの化合物。

[本発明1028]

少なくとも75、80、85、90、95、96、97、98、99、または100%純粋である、本

50

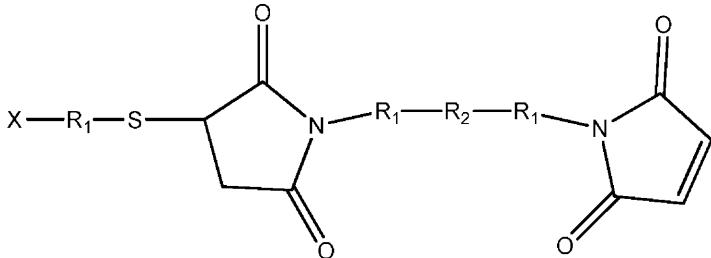
発明1001～1027のいずれかの化合物。

[本発明1029]

約85～95%純粋である、本発明1001～1027のいずれかの化合物。

[本発明1030]

構造2の化合物：



(構造 2)

10

構造中、

Xは、その3'または5'末端でホスファートまたはチオホスファートを介してR1に結合した核酸であり；

各々のR1は、独立してC2-C10アルキル、アルコキシ、またはアリール基であり；かつR2は、チオプロピオナートまたはジスルフィド基である。

[本発明1031]

R1-R2-R1が、細胞内条件下で切断可能である、本発明1030の化合物。

20

[本発明1032]

XがsiRNAを含む、本発明1030の化合物。

[本発明1033]

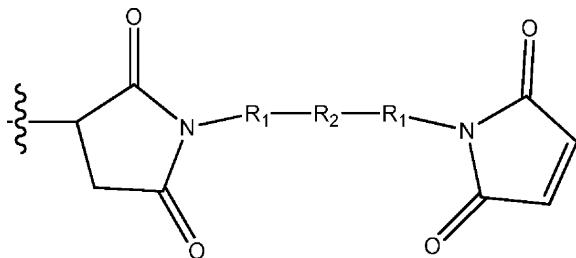
少なくとも75、80、85、90、95、96、97、98、99、または100%純粋である、本発明1030の化合物。

[本発明1034]

約85～95%純粋である、本発明1030の化合物。

[本発明1035]

部分



30

が、DTME(ジチオビスマレイミドエタン)、BM(PEG)2(1,8-ビス(マレイミド)ジエチレングリコール)、BM(PEG)3(1,11-ビスマレイミド-トリエチレングリコール)、BMOE(ビスマレイミドエタン)、BMH(ビスマレイミドヘキサン)、またはBMB(1,4-ビスマレイミドブタン)の反応産物を含む、本発明1030～1034のいずれかの化合物。

40

[本発明1036]

構造3の化合物：

X-R1-R2-A-R3-B(構造3)

構造中、

Xは、その3'または5'末端を通してR1に結合した核酸であり；

R1は、ホスファート、チオホスファート、スルファート、アミド、グリコールであるか、または欠如しており；

R2は、C2-C10アルキル、アルコキシ、もしくはアリール基であるか、または欠如しており；

50

Aは、第1の反応部分と第2の反応部分との反応産物であり；

R3は、C2-C10アルキル、アルコキシ、アリール、アルコキシ、アルキルジチオ基、エーテル、チオエーテル、チオプロピオナート、またはジスルフィドであり；かつBは、第3の反応部分である。

[本発明1037]

A-R3-Bが、細胞内条件下で切断可能である、本発明1036の化合物。

[本発明1038]

XがsiRNAを含む、本発明1036の化合物。

[本発明1039]

少なくとも75、80、85、90、95、96、97、98、99、または100%純粋である、本発明1036の化合物。

10

[本発明1040]

約85～95%純粋である、本発明1036の化合物。

[本発明1041]

以下の工程を含む、本発明1001～1040のいずれかの化合物を合成するための方法：

A'およびA''が求核試薬および求電子試薬を含む、官能基を有する核酸X-R1-R2-A'と共に有結合性リンカーア''-R3-Bとを、X-R1-R2-A'の希釈溶液において化学量論的過剰量のA''-R3-Bで反応させる工程であって、それにより、

Xが、その3'または5'末端を通してR1に結合した核酸であり；

R1が、ホスホジエステル、チオホスホジエステル、スルファート、アミド、グリコールであるか、または欠如しており；

20

R2が、C2-C10アルキル、アルコキシ、もしくはアリール基であるか、または欠如しており；

Aが、求核試薬と求電子試薬との反応産物であり；

R3が、C2-C10アルキル、アルコキシ、アリール、アルキルジチオ基、エーテル、チオエーテル、チオプロピオナート、またはジスルフィドであり；かつ

Bが、求核試薬または求電子試薬である、化合物X-R1-R2-A-R3-B（構造1）を形成する、工程。

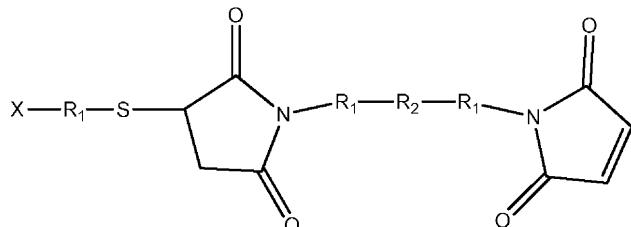
[本発明1042]

(i) ホスホラミダイトオリゴマー化化学を用いた核酸の固相合成の最中のチオールの導入、または(ii) 固相合成の最中に導入されたジスルフィドの還元により、A'がチオール(-SH)を含む、官能基を有する核酸X-R1-R2-A'を合成する工程をさらに含む、本発明1041の方法。

30

[本発明1043]

本発明1030の化合物



40

を合成する工程を含む、本発明1041～1042のいずれかの方法。

[本発明1044]

反応が、構造1または2の形成に実質的に好都合であり、かつXの二量体化を実質的に阻止する条件下で行われる、本発明1041～1043のいずれかの方法。

[本発明1045]

官能基を有する核酸X-R1-R2-A'と共に有結合性リンカーア''-R3-Bとを反応させる工程が、約1 mM、500 μM、250 μM、100 μM、または50 μMより下のX-R1-R2-A'濃度で行わ

50

れる、本発明1041～1044のいずれかの方法。

[本発明1046]

官能基を有する核酸X-R1-R2-A'と共に結合性リンカーA''-R3-Bとを反応させる工程が、約1 mM、500 μM、250 μM、100 μM、または50 μMのX-R1-R2-A'濃度で行われる、本発明1041～1044のいずれかの方法。

[本発明1047]

官能基を有する核酸X-R1-R2-A'と共に結合性リンカーA''-R3-Bとを反応させる工程が、少なくとも約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、または100のモル過剰量のA''-R3-Bで行われる、本発明1041～1046のいずれかの方法。

[本発明1048]

官能基を有する核酸X-R1-R2-A'と共に結合性リンカーA''-R3-Bとを反応させる工程が、約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、または100のモル過剰量のA''-R3-Bで行われる、本発明1041～1046のいずれかの方法。

10

[本発明1049]

官能基を有する核酸X-R1-R2-A'と共に結合性リンカーA''-R3-Bとを反応させる工程が、約7、6、5、または4より下のpHで行われる、本発明1041～1048のいずれかの方法。

[本発明1050]

官能基を有する核酸X-R1-R2-A'と共に結合性リンカーA''-R3-Bとを反応させる工程が、約7、6、5、または4のpHで行われる、本発明1041～1048のいずれかの方法。

[本発明1051]

官能基を有する核酸X-R1-R2-A'と共に結合性リンカーA''-R3-Bとを反応させる工程が、水および水混和性有機共溶媒を含む溶液において行われる、本発明1041～1050のいずれかの方法。

20

[本発明1052]

水混和性有機共溶媒が、DMF、NMP、DMSO、またはアセトニトリルを含む、本発明1051の方法。

[本発明1053]

水混和性有機共溶媒が、約10、15、20、25、30、40、または50% (v/v) の溶液を含む、本発明1051または1052のいずれかの方法。

[本発明1054]

30

構造4の単離された化合物：



(構造 4)

構造中、

各々の

は、インビオで同じ分子標的と反応するように設計された二本鎖オリゴヌクレオチドであり、かつ

は、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖をそれらの3'または5'末端で連結し、かつ構造-R1-R2-A-R3-A-R2-R1-を有する共有結合性リンカーであり、

構造中、

各々のR1は、独立してホスホジエステル、チオホスホジエステル、スルファート、アミドグリコールであるか、または欠如しており；

各々のR2は、独立してC2-C10アルキル、アルコキシ、もしくはアリール基であるか、または欠如しており；

各々のAは、独立して求核試薬と求電子試薬との反応産物であり、かつ

R3は、C2-C10アルキル、アルコキシ、アリール、アルコキシ、アルキルジチオ基、エーテル、チオエーテル、チオプロピオナート、またはジスルフィドである。

[本発明1055]

40

50

各々の

が、第VII因子をターゲティングするsiRNAガイド鎖および該ガイド鎖にハイブリダイズしたパッセンジャー鎖を含む、本発明1054の単離された化合物。

[本発明1056]

ターゲティングリガンドをさらに含み、各々の

が、siRNAガイド鎖および該ガイド鎖にハイブリダイズしたパッセンジャー鎖を含む、少なくとも75、80、85、90、95、96、97、98、99、または100%純粋である、本発明1054～1055のいずれかの単離された化合物。

10

[本発明1057]

構造5の単離された化合物：

—•~~~ (構造5)

構造中、

は、第1の一本鎖オリゴヌクレオチドであり、
~~~

20

は、第1の一本鎖オリゴヌクレオチドとは異なる配列を有する第2の一本鎖オリゴヌクレオチドであり、かつ

は、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖をそれらの3'または5'末端で連結し、かつ構造-R1-R2-A-R3-A-R2-R1-を有する共有結合性リンカーであり、  
構造中、

各々のR1は、独立してホスファート、スルファート、アミド、グリコールであるか、または欠如しており；

各々のR2は、独立してC2-C10アルキル、アルコキシ、もしくはアリール基であるか、または欠如しており；

30

各々のAは、独立してチオールとマレイミド、チオールとビニルスルホン、チオールとピリジルジスルフィド、チオールとヨードアセトアミド、チオールとアクリラート、アジドとアルキン、またはアミンとカルボキシリル基との反応産物であり、かつ

R3は、C2-C10アルキル、アルコキシ、アリール、アルコキシ、アルキルジチオ基、エーテル、チオエーテル、チオプロピオナート、またはジスルフィドである。

[本発明1058]

構造6の単離された化合物：

—•~~~ (構造6)

40

構造中、

---

は、第1の二本鎖オリゴヌクレオチドであり、  
~~~

は、第1の二本鎖オリゴヌクレオチドとは異なる配列を有する第2の二本鎖オリゴヌクレオチドであり、かつ

は、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖をそれらの3'または5'末端で連結し、

50

かつ構造-R1-R2-A-R3-A-R2-R1-を有する共有結合性リンカーであり、構造中、

各々のR1は、独立してホスファート、スルファート、アミド、グリコールであるか、または欠如しており；

各々のR2は、独立してC2-C10アルキル、アルコキシ、もしくはアリール基であるか、または欠如しており；

各々のAは、独立してチオールとマレイミド、チオールとビニルスルホン、チオールとピリジルジスルフィド、チオールとヨードアセトアミド、チオールとアクリラート、アジドとアルキン、またはアミンとカルボキシル基との反応産物であり、かつ

R3は、C2-C10アルキル、アルコキシ、アリール、アルコキシ、アルキルジチオ基、エーテル、チオエーテル、チオプロピオナート、またはジスルフィドである。

[本発明1059]

10

が、第VII因子をターゲティングする第1のsiRNAガイド鎖および該ガイド鎖にハイブリダイズした第1のパッセンジャー鎖を含み、かつ



が、アポリポタンパク質Bをターゲティングする第2のsiRNAガイド鎖および該第2のガイド鎖にハイブリダイズした第2のパッセンジャー鎖を含む、

本発明1058の単離された化合物。

20

[本発明1060]

Aの求核試薬と求電子試薬が、チオールとマレイミド、チオールとビニルスルホン、チオールとピリジルジスルフィド、チオールとヨードアセトアミド、チオールとアクリラート、アジドとアルキン、またはアミンとカルボキシル基を含む、本発明1054～1059のいずれかの単離された化合物。

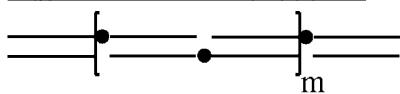
[本発明1061]

共有結合性リンカーが、DTME(ジチオビスマレイミドエタン)、BM(PEG)2(1,8-ビス(マレイミド)ジエチレングリコール)、BM(PEG)3(1,11-ビスマレイミド-トリエチレングリコール)、BMOE(ビスマレイミドエタン)、BMH(ビスマレイミドヘキサン)、またはBMB(1,4-ビスマレイミドブタン)の反応産物を含む、本発明1054～1060のいずれかの単離された化合物。

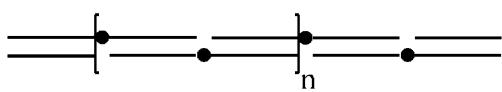
30

[本発明1062]

構造7または8の化合物：



(構造 7)



(構造 8)

40

構造中、

各々の

は、二本鎖オリゴヌクレオチドであり、

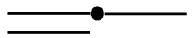
各々の は、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖を連結する共有結合性リンカーであり、かつ

mは、1以上の整数であり、nは、0以上の整数である。

[本発明1063]

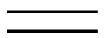
50

構造 11 の化合物：



(構造 11)

構造中、



は、二本鎖オリゴヌクレオチドであり、

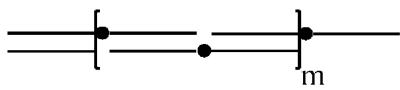


は、一本鎖オリゴヌクレオチドであり、かつ

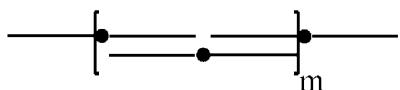
は、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖を連結する共有結合性リンカーである。

[本発明 1064]

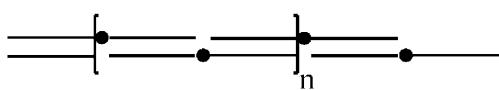
構造 12、13、14、または 15 の化合物：



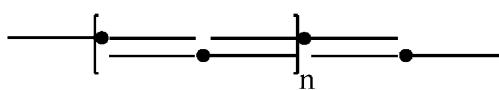
(構造 12)



(構造 13)



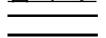
(構造 14)



(構造 15)

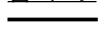
構造中、

各々の



は、二本鎖オリゴヌクレオチドであり、

各々の



は、一本鎖オリゴヌクレオチドであり、

各々の は、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖を連結する共有結合性リンカー
で、かつ

m は、1 以上の整数であり、n は、0 以上の整数である。

[本発明 1065]

各々の



が、独立して2種類のセンスオリゴヌクレオチドまたは2種類のアンチセンスオリゴヌクレ
オチドを含みうる、本発明 1062～1064 のいずれかの化合物。

[本発明 1066]

各々の



が、独立して1種類のセンスオリゴヌクレオチドおよび1種類のアンチセンスオリゴヌクレ
オチドを含みうる、本発明 1062～1064 のいずれかの化合物。

10

20

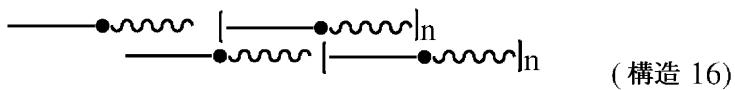
30

40

50

[本発明1067]

多数の分子を含む組成物であって、各々の分子が構造16を有する、組成物：



構造中、

nは、1以上の整数であり；

各々の

は、一本鎖オリゴヌクレオチドであり；

各々の

wave

は、

とハイブリダイズする一本鎖オリゴヌクレオチドであり；

wave

10

20

は、二本鎖オリゴヌクレオチドであり；かつ

各々の　は、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖を連結する共有結合性リンカーである。

[本発明1068]

各々の

wave

が、15～30塩基対の長さを有する、本発明1067の組成物。

[本発明1069]

各々の

wave

30

がsiRNAである、本発明1067～1068のいずれかの組成物。

[本発明1070]

nが、1～100の整数である、本発明1067～1069のいずれかの組成物。

[本発明1071]

各々の共有結合性リンカー　が同じである、本発明1062～1070のいずれかの化合物。

[本発明1072]

2種類以上の異なる共有結合性リンカー　を含む、本発明1062～1070のいずれかの化合物。

40

[本発明1073]

実質的に同一の二本鎖オリゴヌクレオチドのホモ多量体を含む、本発明1062～1072のいずれかの化合物。

[本発明1074]

実質的に同一の二本鎖オリゴヌクレオチドが、インビボで同じ分子標的をターゲティングするsiRNAを各々含む、本発明1073の化合物。

[本発明1075]

2種類以上の実質的に異なる二本鎖オリゴヌクレオチド

50

のヘテロ多量体を含む、本発明1062～1066のいずれかの化合物。

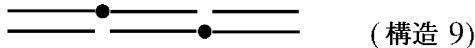
[本発明1076]

実質的に異なる二本鎖オリゴヌクレオチド

が、異なる遺伝子をターゲティングするsiRNAを各々含む、本発明1075の化合物。

[本発明1077]

構造9



10

を含み、n = 0である、本発明1062の化合物。

[本発明1078]

ターゲティングリガンドをさらに含む、本発明1077の化合物。

[本発明1079]

インビボで異なる分子標的をターゲティングするsiRNAを各々含む、2種類または3種類の実質的に異なる二本鎖オリゴヌクレオチド

をさらに含む、本発明1077～1078のいずれかの化合物。

20

[本発明1080]

ターゲティングリガンドをさらに含み、1種類の

が、第VII因子をターゲティングする第1のsiRNAガイド鎖および該ガイド鎖にハイブリダイズした第1のパッセンジャー鎖を含み、1種類の

が、アポリポタンパク質Bをターゲティングする第2のsiRNAガイド鎖および該第2のガイド鎖にハイブリダイズした第2のパッセンジャー鎖を含み、かつ1種類の

30

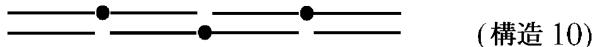
が、TTRをターゲティングする第3のsiRNAガイド鎖および該第3のガイド鎖にハイブリダイズした第3のパッセンジャー鎖を含む、本発明1077～1079のいずれかの化合物。

[本発明1081]

ターゲティングリガンドが、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)を含む、本発明1077～1080のいずれかの化合物。

[本発明1082]

構造10



40

を含み、m = 1である、本発明1062の化合物。

[本発明1083]

ターゲティングリガンドをさらに含む、本発明1082の化合物。

[本発明1084]

インビボで異なる分子標的をターゲティングするsiRNAを各々含む、2、3、または4種類の実質的に異なる二本鎖オリゴヌクレオチド

50

をさらに含む、本発明1082～1083のいずれかの化合物。

[本発明1085]

ターゲティングリガンドをさらに含み、1種類の

が、第VII因子をターゲティングする第1のsiRNAガイド鎖および該ガイド鎖にハイブリダイズした第1のパッセンジャー鎖を含み、1種類の

が、アポリポタンパク質Bをターゲティングする第2のsiRNAガイド鎖および該第2のガイド鎖にハイブリダイズした第2のパッセンジャー鎖を含み、かつ1種類の

10

が、TTRをターゲティングする第3のsiRNAガイド鎖および該第3のガイド鎖にハイブリダイズした第3のパッセンジャー鎖を含む、本発明1082～1084のいずれかの化合物。

[本発明1086]

ターゲティングリガンドが、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)を含む、本発明1082～1085のいずれかの化合物。

[本発明1087]

共有結合性リンカーが、求核試薬と求電子試薬との反応産物を含む、本発明1062～1086のいずれかの化合物。

20

[本発明1088]

共有結合性リンカーが、チオールとマレイミド、チオールとビニルスルホン、チオールとピリジルジスルフィド、チオールとヨードアセトアミド、チオールとアクリラート、アジドとアルキン、またはアミンとカルボキシル基との反応産物を含む、本発明1087の化合物。

[本発明1089]

共有結合性リンカーが、チオールとDTME(ジチオビスマレイミドエタン)、BM(PEG)2(1,8-ビス(マレイミド)ジエチレングリコール)、BM(PEG)3(1,11-ビスマレイミドトリエチレングリコール)、BMOE(ビスマレイミドエタン)、BMH(ビスマレイミドヘキサン)、またはBMB(1,4-ビスマレイミドブタン)との反応産物を含む、本発明1087の化合物。

30

[本発明1090]

1種類または複数種類の二本鎖オリゴヌクレオチドが、平滑末端を含む、本発明1054～1089のいずれかの化合物。

[本発明1091]

1種類または複数種類の二本鎖オリゴヌクレオチドが、突出を含む、本発明1054～1090のいずれかの化合物。

[本発明1092]

各々の共有結合性リンカーが、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの3'を3'に、5'を5'に、または3'を5'に独立して連結する、本発明1054～1091のいずれかの化合物。

40

[本発明1093]

少なくとも1種類のオリゴヌクレオチドが、化学修飾をさらに含む、本発明1054～1092のいずれかの化合物。

[本発明1094]

化学修飾が、修飾されたヌクレオシド、修飾された骨格、修飾された糖、または修飾された末端を含む、本発明1093の化合物。

[本発明1095]

少なくとも75、80、85、90、95、96、97、98、99、または100%純粋である、本発明1054～1094のいずれかの化合物。

50

[本発明1096]

約85～95%純粋である、本発明1054～1095のいずれかの化合物。

[本発明1097]

オリゴスクレオチドの少なくとも1種類がsiRNAである、本発明1054～1078、1081～1083、または1086～1096のいずれかの化合物。

[本発明1098]

核酸が、RNA、DNAであるか、または人工もしくは非天然の核酸類似体を含む、本発明1054～1077、1082、または1087～1096のいずれかの化合物。

[本発明1099]

核酸がDNAである、本発明1098の化合物。

10

[本発明1100]

DNAが、アンチセンスDNA(aDNA)またはアンチセンスギャップマーである、本発明1099の化合物。

[本発明1101]

核酸がRNAである、本発明1098の化合物。

[本発明1102]

RNAが、アンチセンスRNA(aRNA)、CRISPR RNA(crRNA)、長鎖ノンコーディングRNA(lncRNA)、マイクロRNA(miRNA)、piwi相互作用RNA(piRNA)、低分子干渉RNA(siRNA)、メッセンジャーRNA(mRNA)、短鎖ヘアピンRNA(shRNA)、低分子活性化(saRNA)、アンタゴニル、またはリボザイムである、本発明1101の化合物。

20

[本発明1103]

核酸がアプタマーである、本発明1054～1077、1082、または1087～1096のいずれかの化合物。

[本発明1104]

核酸が、15～30、17～27、19～26、20～25、40～50、40～150、100～300、1000～2000、または最大10000までのヌクレオチド長である、本発明1054～1077、1082、または1087～1096のいずれかの化合物。

[本発明1105]

ターゲティングリガンドをさらに含む、本発明1054～1077、1082、または1087～1096のいずれかの化合物。

30

[本発明1106]

ターゲティングリガンドが、核酸に結合している、本発明1105の化合物。

[本発明1107]

ターゲティングリガンドが、その3'または5'末端を通して核酸に結合している、本発明1106の化合物。

[本発明1108]

ターゲティングリガンドが、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)、コレステロール、トコフェロール、フォレート、2-[3-(1,3-ジカルボキシプロピル)-ウレイド]ペンタン二酸(DUPA)、またはアニスアミドを含む、本発明1105～1107のいずれかの化合物。

40

[本発明1109]

の1種類または複数種類が、切断可能な共有結合性リンカーを含む、本発明1054～1108のいずれかの化合物。

[本発明1110]

切断可能な共有結合性リンカーが、酸で切断可能なエステル結合、ヒドラジン結合、またはアセタール結合を含む、本発明1109の組成物。

[本発明1111]

切断可能な共有結合性リンカーが、還元剤で切断可能な結合を含む、本発明1109の組成物。

[本発明1112]

50

還元剤で切断可能な結合がジスルフィド結合である、本発明1111の組成物。

[本発明1113]

切断可能な共有結合性リンカーが、細胞内条件下で切断可能である、本発明1109の組成物。

[本発明1114]

切断可能な共有結合性リンカーが、生物切断性 (biocleavable) 結合を含む、本発明1109の組成物。

[本発明1115]

切断可能な共有結合性リンカーが、酵素で切断可能な結合を含む、本発明1109の組成物。

[本発明1116]

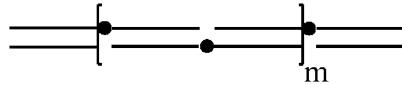
の1種類または複数種類が、切断不可能な共有結合性リンカーを含む、本発明1054～1108のいずれかの化合物。

[本発明1117]

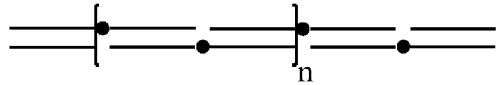
切断不可能な共有結合性リンカーが、アミド結合またはウレタン結合を含む、本発明1116の組成物。

[本発明1118]

構造7または8の化合物を合成するための方法であって、



(構造 7)



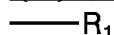
(構造 8)

構造中、各々の

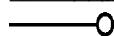
が、二本鎖オリゴヌクレオチドであり、各々の が、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖を連結する共有結合性リンカーであり、かつ、mが、1以上の整数であり、nが、0以上の整数であり、

前記方法が以下の工程を含む、前記方法：

(i) 第1の一本鎖オリゴヌクレオチド

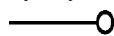


を二官能性連結部分 と反応させる工程であって、構造中、R1は、一置換産物



を生じる条件下で と反応することができる化学基である、工程；

(ii)



を第2の一本鎖オリゴヌクレオチド



と反応させる工程であって、構造中、R2は、 と反応することができる化学基であり、それにより一本鎖二量体



を形成する、工程；

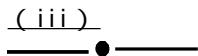
10

20

30

40

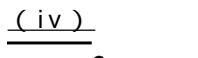
50



を第3の一本鎖オリゴスクレオチド

とアニーリングさせる工程であって、それにより

を形成する、工程：



と一本鎖二量体

とをアニーリングさせる工程であって、それにより

を形成する、工程：

(v) 任意で、1種類または複数種類の追加の一本鎖二量体

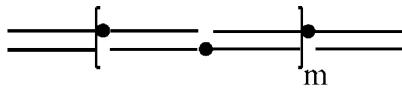
をアニーリングさせる工程、

(vi) 工程 (iv) または工程 (v) の産物と第4の一本鎖オリゴスクレオチド

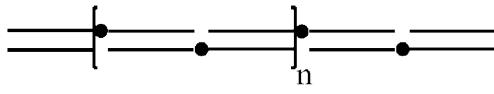
とをアニーリングさせる工程であって、それにより構造7または8を形成する、工程。

[本発明1119]

構造7または8の化合物を合成するための方法であって、



(構造 7)



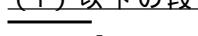
(構造 8)

構造中、各々の

が、二本鎖オリゴスクレオチドであり、各々の が、隣接する一本鎖オリゴスクレオチドの一本鎖を連結する共有結合性リンカーであり、かつ、mが、1以上の整数であり、nが、0以上の整数であり、

前記方法が以下の工程を含む、前記方法：

(i) 以下の段階により



を形成する工程：

(a) 第1の一本鎖オリゴスクレオチド

10

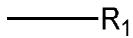
20

30

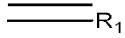
40

50

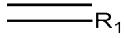
と第2の一本鎖オリゴヌクレオチド



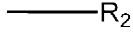
とをアニーリングさせる段階であって、それにより



を形成する、段階、および



を第3の一本鎖オリゴヌクレオチド



10

と反応させる段階であって、構造中、R1およびR2は、直接的にまたは間接的に反応して
共有結合性リンカー を形成することができる化学的部分であり、それにより



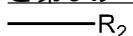
を形成する、段階；または

(b) 第2の一本鎖オリゴヌクレオチド

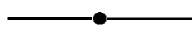


20

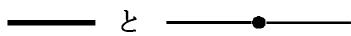
と第3の一本鎖オリゴヌクレオチド



とを反応させる段階であって、それにより



を形成する、段階、および、第1の一本鎖オリゴヌクレオチド



とをアニーリングさせる段階であって、それにより



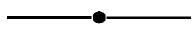
30

を形成する、段階；

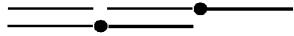
(ii)



と第2の一本鎖二量体

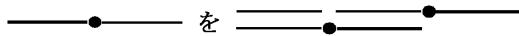


とをアニーリングさせる工程であって、それにより



40

を形成する、工程、および、任意で、1種類または複数種類の追加の一本鎖二量体

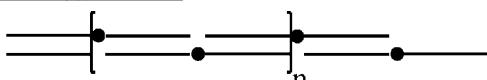


に対してアニーリングさせる工程であって、それにより、

mが1以上の整数であり、nが0以上の整数である



または



または

50

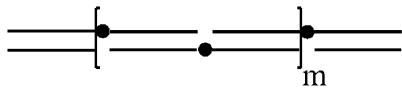
を形成する、工程；ならびに

(iii) 第4の一本鎖オリゴヌクレオチド

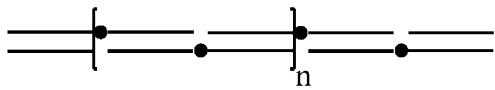
を工程 (ii) の産物に対してアニーリングさせる工程であって、それにより構造7または8を形成する、工程。

[本発明1120]

構造7または8の化合物を合成するための方法であって、



(構造 7)



(構造 8)

10

構造中、各々の

が、二本鎖オリゴヌクレオチドであり、各々のが、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖を連結する共有結合性リンカーであり、かつ、mが、1以上の整数であり、nが、0以上の整数であり、

20

前記方法が以下の工程を含む、前記方法：

(i) 第1の一本鎖オリゴヌクレオチド

と第1の一本鎖二量体



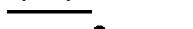
とをアニーリングさせる工程であって、それにより



30

を形成する、工程；

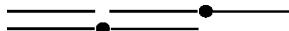
(ii)



と第2の一本鎖二量体



とをアニーリングさせる工程であって、それにより



40

を形成する、工程、および、任意で、1種類または複数種類の追加の一本鎖二量体



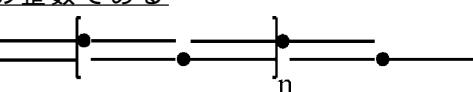
を

に対してアニーリングさせる工程であって、それにより、

mが1以上の整数であり、nが0以上の整数である



または



50

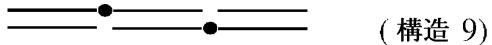
を形成する、工程；ならびに

(iii) 第2の一本鎖オリゴヌクレオチド

を工程 (ii) の産物に対してアニーリングさせる工程であって、それにより構造7または8を形成する、工程。

[本発明1121]

構造9の化合物を合成するための方法であって、

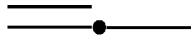


構造中、各々の

が、二本鎖オリゴヌクレオチドであり、各々の が、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖を連結する共有結合性リンカーであり、

前記方法が以下の工程を含む、前記方法：

(i) 以下の段階により



10

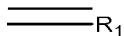
を形成する工程：

(a) 第1の一本鎖オリゴヌクレオチド

と第2の一本鎖オリゴヌクレオチド

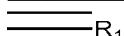


とをアニーリングさせる段階であって、それにより



20

を形成する、段階、および



を第3の一本鎖オリゴヌクレオチド



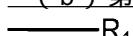
と反応させる段階であって、構造中、R1およびR2は、直接的にまたは間接的に反応して共有結合性リンカー を形成することができる化学的部分であり、それにより



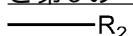
30

を形成する、段階；または

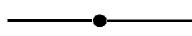
(b) 第2の一本鎖オリゴヌクレオチド



と第3の一本鎖オリゴヌクレオチド



とを反応させる段階であって、それにより



40

JP 7033452 B2 2022.3.10

を形成する、段階、および、第1の一本鎖オリゴヌクレオチド
と

とをアニーリングさせる段階であって、それにより
と

を形成する、段階；
(ii)
と

一本鎖二量体

とをアニーリングさせる工程であって、それにより
と

を形成する、工程；ならびに
(iii)
と

第4の一本鎖オリゴヌクレオチド

とをアニーリングさせる工程であって、それにより
と

を形成する、工程。

[本発明1122]

構造10の化合物を合成するための方法であって、
（構造10）

構造中、各々の

が、二本鎖オリゴヌクレオチドであり、各々の が、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチド
の一本鎖を連結する共有結合性リンカーであり、
前記方法が以下の工程を含む、前記方法：

(i) 以下の段階により

と

を形成する工程：

(a) 第1の一本鎖オリゴヌクレオチド

と第2の一本鎖オリゴヌクレオチド
R₁

とをアニーリングさせる段階であって、それにより
と

10

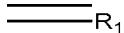
20

30

40

50

を形成する、段階、および



を第3の一本鎖オリゴヌクレオチド



と反応させる段階であって、構造中、R1およびR2は、直接的にまたは間接的に反応して共有結合性リンカーを形成することができる化学的部分であり、それにより



10

を形成する、段階；または

(b) 第2の一本鎖オリゴヌクレオチド



と第3の一本鎖オリゴヌクレオチド

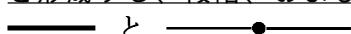


とを反応させる段階であって、それにより



20

を形成する、段階、および、第1の一本鎖オリゴヌクレオチド

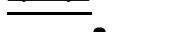


とをアニーリングさせる段階であって、それにより



を形成する、段階；

(ii)



30

と一本鎖二量体



とをアニーリングさせる工程であって、それにより



を形成する、工程；

(iii)



40

と第2の一本鎖二量体



とをアニーリングさせる工程であって、それにより

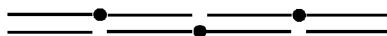


を形成する、工程；ならびに

(iv)



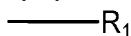
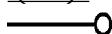
50

と第4の一本鎖オリゴヌクレオチドとをアニーリングさせる工程であって、それによりを形成する、工程。[本発明1123]構造5の化合物を合成するための方法であって、

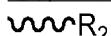
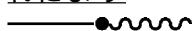
10

構造中、が、第1の一本鎖オリゴヌクレオチドであり、が、第1の一本鎖オリゴヌクレオチドとは異なる配列を有する第2の一本鎖オリゴヌクレオチドであり、かつ が、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖をそれらの3'または5'末端で連結する共有結合性リンカーであり、

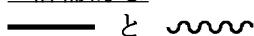
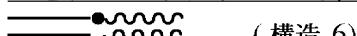
20

前記方法が以下の工程を含む、前記方法：(i) 第1の一本鎖オリゴヌクレオチドを二官能性連結部分 と反応させる工程であって、構造中、R1は、一置換産物を生じる条件下で と反応することができる化学基である、工程；(ii)

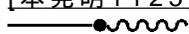
30

を第2の一本鎖オリゴヌクレオチドと反応させる工程であって、構造中、R2は、 と反応することができる化学基であり、それによりを形成する、工程。[本発明1124]

40

相補的なとをアニーリングさせて、構造6

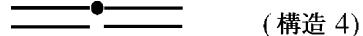
50

を産する工程をさらに含む、本発明1123の方法。[本発明1125]

の収率が、少なくとも75、80、85、90、95、96、97、98、99、または100%純粋である、本発明1124の方法。

[本発明1126]

構造4の単離された化合物を合成するための方法であって、



構造中、各々の

が、二本鎖オリゴヌクレオチドであり、かつ が、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖をそれらの3'または5'末端で連結する共有結合性リンカーであり、前記方法が以下の工程を含む、前記方法：

(i) 第1の一本鎖オリゴヌクレオチド



を二官能性連結部分 と反応させる工程であって、構造中、R1は、 と反応することができる化学基であり、それにより一置換産物



を形成する、工程；

(ii)



を第2の一本鎖オリゴヌクレオチド



と反応させる工程であって、構造中、R2は、 と反応することができる化学基であり、それにより一本鎖二量体



を形成する、工程；

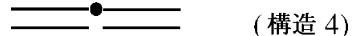
(iii) 一本鎖オリゴヌクレオチドを、同時にまたは逐次的にアニーリングさせる工程であって、それにより



を形成する、工程。

[本発明1127]

構造4の単離された化合物を合成するための方法であって、



構造中、各々の

が、二本鎖オリゴヌクレオチドであり、かつ が、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖をそれらの3'または5'末端で連結する共有結合性リンカーであり、前記方法が以下の工程を含む、前記方法：

(i) 以下の段階により



を形成する工程：

10

20

30

40

50

(a) 第1の一本鎖オリゴヌクレオチド

と第2の一本鎖オリゴヌクレオチド

——R₁

とをアニーリングさせる段階であって、それにより

——R₁

を形成する、段階、および

——R₁

10

を第3の一本鎖オリゴヌクレオチド

——R₂

と反応させる段階であって、構造中、R₁およびR₂は、直接的にまたは間接的に反応して
共有結合性リンカーを形成することができる化学的部分であり、それにより

——●——

を形成する、段階；または

(b) 第2の一本鎖オリゴヌクレオチド

——R₁

20

と第3の一本鎖オリゴヌクレオチド

——R₂

と反応させる段階であって、それにより

——●——

を形成する、段階、および、第1の一本鎖オリゴヌクレオチド

——と——●——

30

とをアニーリングさせる段階であって、それにより

——●——

を形成する、段階；

(ii)

——●——

と第4の一本鎖オリゴヌクレオチド

40

とをアニーリングさせる工程であって、それにより

——●——

を形成する、工程。

[本発明 1128]

構造4の単離された化合物を合成するための方法であって、

——●—— (構造4)

50

構造中、各々の

が、二本鎖オリゴヌクレオチドであり、かつ が、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖をそれらの3'または5'末端で連結する共有結合性リンカーであり、

前記方法が以下の工程を含む、前記方法：

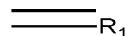
(a) 第1の一本鎖オリゴヌクレオチド

と第2の一本鎖オリゴヌクレオチド



10

とをアニーリングさせる工程であって、それにより



を形成する、工程；

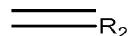
(b) 第3の一本鎖オリゴヌクレオチド



と第4の一本鎖オリゴヌクレオチド

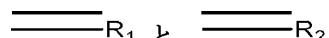
20

とをアニーリングさせる工程であって、それにより

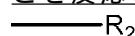


を形成する、工程；

(b)

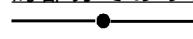


とを反応させる工程であって、構造中、R1およびR2



30

は、直接的にまたは間接的に反応して共有結合性リンカー を形成することができる化学的部分であり、それにより

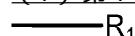


を形成する、工程。

[本発明1129]

以下の工程を含む、本発明1067の組成物を合成するための方法：

(i) 第1の一本鎖オリゴヌクレオチド



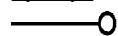
40

を二官能性連結部分 と反応させる工程であって、構造中、R1は、一置換産物



を生じる条件下で と反応することができる化学基である、工程；

(ii)

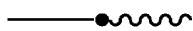


を第2の一本鎖オリゴヌクレオチド

50

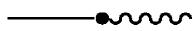
~~~~R<sub>2</sub>

と反応させる工程であって、構造中、R<sub>2</sub>は、と反応することができる化学基であり、それにより



を形成する、工程；

(iii) 多数の

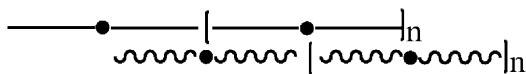


10

をアニーリングさせる工程であって、それにより本発明1067の組成物を形成する、工程。

[本発明1130]

構造17を含む多数の分子を含む組成物を合成するための方法であって、



(構造17)

構造中、nが、1以上の整数であり；各々の

20

が、一本鎖オリゴヌクレオチドであり；各々の



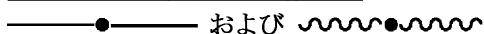
が、

とハイブリダイズする一本鎖オリゴヌクレオチドであり；



が、二本鎖オリゴヌクレオチドであり；かつ、各々のが、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖を連結して

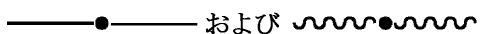
30



を形成する共有結合性リンカーであり、

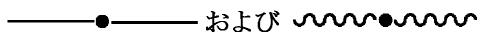
前記方法が以下の工程を含む、前記方法：

多数の



を、

(i)



40

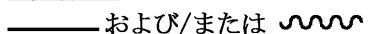
について約200～300 μMの総オリゴヌクレオチド濃度、

(ii) 約0.1～0.3 × リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、および

(iii) 約1.5～2.5時間にわたる、約70～80 ℃から約20～30 ℃への温度でアニーリングさせる工程。

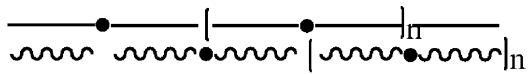
[本発明1131]

多数の

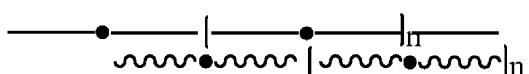


50

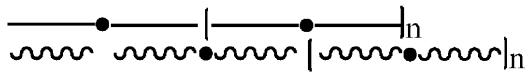
をアニーリングさせる工程であって、それにより構造18



(構造 18)



(構造 19), および/または



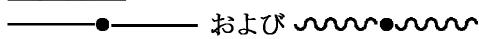
(構造 20)

10

を含む多数の分子を形成する、工程をさらに含む、本発明1130の方法。

[本発明1132]

を多数の



とアニーリングさせる工程をさらに含む、本発明1130または1131の方法。

[本発明1133]



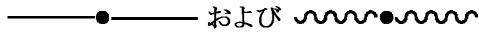
20

のモル比が、約5:100、10:100、20:100、30:100、40:100、または50:100である、本発明1131または1132の方法。

[本発明1134]



を多数の



とアニーリングさせる工程をさらに含む、本発明1130または1131の方法。

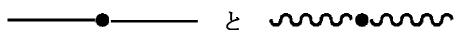
30

[本発明1135]



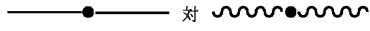
のモル比が、約5:100、10:100、20:100、30:100、40:100、または50:100である、本発明1131または1132の方法。

[本発明1136]



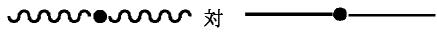
のモル比が、約1:1である、本発明1130～1135のいずれかの方法。

[本発明1137]



40

のモル比または



のモル比が、約100:90、100:80、100:75、100:70、または100:60である、本発明1130～1135のいずれかの方法。

[本発明1138]

各々の



50

が、15～30塩基対の長さを有する、本発明1130～1137のいずれかの方法。

[本発明1139]

各々の

~~~~~

がsiRNAである、本発明1130～1138のいずれかの方法。

[本発明1140]

各々の

~~~~~

が、第VII因子をターゲティングするsiRNAガイド鎖および該ガイド鎖にハイブリダイズしたパッセンジャー鎖を含む、本発明1130～1139のいずれかの方法。

[本発明1141]

nが、1～100の整数である、本発明1130～1140のいずれかの方法。

[本発明1142]

が、切断可能なまたは切断不可能なリンカーである、本発明1130～1141のいずれかの方法。

[本発明1143]

構造17、18、19、および/または20を含む多数の分子をナノ粒子中に製剤化する工程をさらに含む、本発明1130～1142のいずれかの方法。

[本発明1144]

各々の共有結合性リンカーが同じである、本発明1118～1122または1129～1143のいずれかの方法。

[本発明1145]

2種類以上の異なる共有結合性リンカーを含む、本発明1118～1122または1129～1143のいずれかの方法。

[本発明1146]

実質的に同一の二本鎖オリゴヌクレオチドのホモ多量体を含む、本発明1118～1122または1129～1143のいずれかの方法。

[本発明1147]

実質的に同一の二本鎖オリゴヌクレオチドが、インビボで同じ分子標的をターゲティングするsiRNAを各々含む、本発明1146の方法。

[本発明1148]

2種類以上の実質的に異なる二本鎖オリゴヌクレオチド

のヘテロ多量体を含む、本発明1118～1122のいずれかの方法。

[本発明1149]

実質的に異なる二本鎖オリゴヌクレオチド

が、異なる遺伝子をターゲティングするsiRNAを各々含む、本発明1148の方法。

[本発明1150]

共有結合性リンカーが、求核試薬と求電子試薬との反応産物を含む、本発明1118～1149のいずれかの方法。

[本発明1151]

共有結合性リンカーが、チオールとマレイミド、チオールとビニルスルホン、チオールとピリジルジスルフィド、チオールとヨードアセトアミド、チオールとアクリラート、アジドとアルキン、またはアミンとカルボキシル基との反応産物を含む、本発明1150の方法。

[本発明1152]

共有結合性リンカー が、チオールとDTME(ジチオビスマレイミドエタン)、BM(PEG)2(1,8-ビス(マレイミド)ジエチレングリコール)、BM(PEG)3(1,11-ビスマレイミド-トリエチレングリコール)、BMOE(ビスマレイミドエタン)、BMH(ビスマレイミドヘキサン)、またはBMB(1,4-ビスマレイミドブタン)との反応産物を含む、本発明1150の化合物。

[本発明1153]

1種類または複数種類の二本鎖オリゴヌクレオチドが、平滑末端を含む、本発明1118～1152のいずれかの方法。

[本発明1154]

1種類または複数種類の二本鎖オリゴヌクレオチドが、突出を含む、本発明1118～1153のいずれかの方法。

[本発明1155]

各々の共有結合性リンカー が、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの3'を3'に、5'を5'に、または3'を5'に独立して連結する、本発明1118～1154のいずれかの方法。

[本発明1156]

少なくとも1種類のオリゴヌクレオチドが、化学修飾をさらに含む、本発明1118～1155のいずれかの方法。

[本発明1157]

化学修飾が、修飾されたヌクレオシド、修飾された骨格、修飾された糖、または修飾された末端を含む、本発明1156の方法。

10

[本発明1158]

産物が、少なくとも75、80、85、90、95、96、97、98、99、または100%純粋である、本発明1118～1157のいずれかの方法。

20

[本発明1159]

産物が、約85～95%純粋である、本発明1118～1157のいずれかの方法。

[本発明1160]

オリゴヌクレオチドの少なくとも1種類がsiRNAである、本発明1118～1159のいずれかの方法。

30

[本発明1161]

核酸が、RNA、DNAであるか、または人工もしくは非天然の核酸類似体を含む、本発明1118～1159のいずれかの方法。

[本発明1162]

核酸がDNAである、本発明1161の方法。

[本発明1163]

DNAが、アンチセンスDNA(aDNA)またはアンチセンスギャップマーである、本発明1162の方法。

[本発明1164]

核酸がRNAである、本発明1161の方法。

[本発明1165]

RNAが、アンチセンスRNA(aRNA)、CRISPR RNA(crRNA)、長鎖ノンコーディングRNA(lncRNA)、マイクロRNA(miRNA)、piwi相互作用RNA(piRNA)、低分子干渉RNA(siRNA)、メッセンジャーRNA(mRNA)、短鎖ヘアピンRNA(shRNA)、低分子活性化(saRNA)、アンタゴミル、またはリボザイムである、本発明1164の方法。

40

[本発明1166]

核酸がアプタマーである、本発明1118～1159のいずれかの方法。

[本発明1167]

核酸が、15～30、17～27、19～26、20～25、40～50、40～150、100～300、1000～2000、または最大10000までのヌクレオチド長である、本発明1118～1166のいずれかの方法。

50

[本発明1168]

ターゲティングリガンドをさらに含む、本発明1118～1167のいずれかの方法。

[本発明1169]

ターゲティングリガンドが、核酸に結合している、本発明1168の方法。

[本発明1170]

ターゲティングリガンドが、その3'または5'末端を通して核酸に結合している、本発明1168の方法。

[本発明1171]

ターゲティングリガンドが、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)、コレステロール、トコフェロール、フォレート、2-[3-(1,3-ジカルボキシプロピル)-ウレイド]ペンタン二酸(DUPA)、またはアニスアミドを含む、本発明1168～1170のいずれかの方法。

10

[本発明1172]

の1種類または複数種類が、切断可能な共有結合性リンカーを含む、本発明1118～1171のいずれかの方法。

[本発明1173]

切断可能な共有結合性リンカーが、酸で切断可能なエステル結合、ヒドラジン結合、またはアセタール結合を含む、本発明1172の方法。

[本発明1174]

切断可能な共有結合性リンカーが、還元剤で切断可能な結合を含む、本発明1172の方法

20

[本発明1175]

還元剤で切断可能な結合がジスルフィド結合である、本発明1174の方法。

[本発明1176]

切断可能な共有結合性リンカーが、細胞内条件下で切断可能である、本発明1172の方法

—

[本発明1177]

切断可能な共有結合性リンカーが、生物切断性結合を含む、本発明1172の方法。

[本発明1178]

切断可能な共有結合性リンカーが、酵素で切断可能な結合を含む、本発明1172の方法。

[本発明1179]

の1種類または複数種類が、切断不可能な共有結合性リンカーを含む、本発明1118～1171のいずれかの方法。

30

[本発明1180]

切断不可能な共有結合性リンカーが、アミド結合またはウレタン結合を含む、本発明1179の方法。

[本発明1181]

本発明1054～1117のいずれかの化合物と、薬学的に許容される賦形剤とを含む、組成物。

[本発明1182]

薬剤としての使用のための、本発明1054～1117のいずれかの化合物を含む組成物。

40

[本発明1183]

薬剤の製造における使用のための、本発明1054～1117のいずれかの化合物を含む組成物。

[本発明1184]

薬剤が、少なくとも1種類の過剰発現している遺伝子の発現をサイレンシングまたは低減させるためである、本発明1182または1183の組成物。

[本発明1185]

2種類、3種類、4種類、またはそれより多い、過剰発現している遺伝子の発現をサイレンシングまたは低減させるための、本発明1184の組成物。

[本発明1186]

50

液体ナノ粒子（LNP）、エキソソーム、微小胞、またはウイルスベクター中に製剤化された、本発明1054～1117のいずれかの化合物を含む組成物。

[本発明1187]

本発明1054～1117または1181～1186のいずれかの化合物または組成物の有効量を、その必要がある対象に投与する工程を含む、遺伝子発現を低減させるための方法。

[本発明1188]

本発明1054～1117または1181～1186のいずれかの化合物または組成物の有効量を、その必要がある対象に投与する工程を含む、対象を処置するための方法。

[本発明1189]

2種類以上の遺伝子をターゲティングするオリゴヌクレオチドを含む、前記本発明のいずれかの化合物または組成物の有効量を、その必要がある対象に投与する工程を含む、2種類以上の遺伝子をサイレンシングさせるための方法。

[本発明1190]

前記化合物または組成物が、2種類、3種類、4種類、またはそれより多い遺伝子をターゲティングするオリゴヌクレオチドを含む、本発明1189の方法。

[本発明1191]

ターゲティングリガンドを含む、前記本発明のいずれかの化合物または組成物の有効量を、その必要がある対象に投与する工程を含む、ターゲティングリガンド結合イベントあたり2種類以上のオリゴヌクレオチドを細胞に送達するための方法。

[本発明1192]

あらかじめ決定された化学量論比の2種類以上のオリゴヌクレオチドを含む、前記本発明のいずれかの化合物または組成物の有効量を、その必要がある対象に投与する工程を含む、あらかじめ決定された化学量論比の2種類以上のオリゴヌクレオチドを細胞に送達するための方法。

[本発明1193]

対象が、細胞、哺乳動物、またはヒトである、本発明1187～1192のいずれかの方法。

[本発明1194]

SEQ ID NO:106を有する、siRNA。

[本発明1195]

SEQ ID NO:115を有する、siRNA。

本技術のこれらのおよび他の利点は、添付の図面および以下の説明が参照されると明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【0117】

【図1】三本のアンテナを有する（tri-antennary）N-アセチルガラクトサミンリガンドの化学構造を提示する。

【図2】実施例9と関連して議論される、FVII-ApoBヘテロ二量体（XD-05311）の合成の概略図を提示する。

【図3】実施例10と関連して議論される、インビボのマウス血清由来のFVII活性を示すデータを提示する。

【図4】実施例10と関連して議論される、動物実験MausRNAi-TV30における肝臓組織由来のFVIIおよびApoBのmRNAレベルを示すデータを提示する。

【図5】実施例11と関連して議論される、5'-GAIINAc-FVII基準対照を提示する。

【図6】実施例12と関連して議論される、GAIINAc-ホモ二量体コンジュゲート（XD-06330）を提示する。

【図7】実施例13と関連して議論される、GAIINAc-ホモ二量体コンジュゲート（XD-06360）の合成の概略図を提示する。

【図8】実施例14と関連して議論される、GAIINAc-ホモ二量体コンジュゲート（XD-06329）の合成の概略図を提示する。

【図9】実施例15と関連して議論される、マウス血清（FVIIホモ二量体GAIINAcコンジュ

10

20

30

40

50

ゲートによるノックダウン)におけるFVII活性を示すデータを提示する。

【図10】図10Aおよび10Bおよび10Cは、実施例15と関連して議論される、マウス血清(GaINAc含量について正規化されたFVIIホモ二量体GaINAcコンジュゲートによるノックダウン)におけるFVII活性を示すデータを提示する。

【図11】実施例16と関連して議論される、FVII、ApoB、およびTTRを独立してターゲティングする基準GaINAc-siRNAを提示する。

【図12】実施例17と関連して議論される、GaINAC-ヘテロ三量体コンジュゲート(XD06726)を提示する。キー：本実施例において、「遺伝子A」はsiFVIIであり；「遺伝子B」はsiApoBであり；かつ「遺伝子C」はsiTTRである。

【図13】実施例17と関連して議論される、GaINAcコンジュゲートされたヘテロ三量体(XD06726)についての合成戦略の概略図を提示する。キー：本実施例において、「遺伝子A」はsiFVIIであり；「遺伝子B」はsiApoBであり；かつ「遺伝子C」はsiTTRである。

【図14】実施例18と関連して議論される、GaINAc-ヘテロ三量体コンジュゲート(XD06727)を提示する。キー：本実施例において、「遺伝子A」はsiFVIIであり；「遺伝子B」はsiApoBであり；かつ「遺伝子C」はsiTTRである。

【図15】実施例18と関連して議論される、GaINAcコンジュゲートされたヘテロ三量体(XD06727)についての合成戦略の概略図を提示する。キー：本実施例において、「遺伝子A」はsiFVIIであり；「遺伝子B」はsiApoBであり；かつ「遺伝子C」はsiTTRである。

【図16】実施例18と関連して議論される、X20366へのX20336の添加のHPLC分析についてのデータを提示する。

【図17】実施例18と関連して議論される、X20336およびX20366の反応産物へのX19580のさらなる添加のHPLC分析についてのデータを提示する。

【図18】実施例18と関連して議論される、XD-06727を産する、X20336、X20366およびX19580の反応産物へのX18795(5'-siFVIIアンチセンス-3')のさらなる添加のHPLC分析についてのデータを提示する。

【図19】図19Aおよび19Bは、実施例20と関連して議論される、(ELISAにより測定された)血清試料中のTTRタンパク質レベルについてのデータを提示する。

【図20】図20Aおよび20Bは、実施例20と関連して議論される、血清試料中のFVII酵素活性についてのデータを提示する。

【図21】図21Aおよび21Bは、実施例20と関連して議論される、(ELISAにより測定された)血清試料中のApoBタンパク質レベルについてのデータを提示する。

【図22】図22Aおよび22Bは、実施例20と関連して議論される、肝臓データにおける標的ノックダウンを提示する。

【図23】実施例21と関連して議論される、GaINAc-ヘテロ四量体コンジュゲート(XD-07140)を提示する。キー：本実施例において、「遺伝子A」はsiFVIIであり；「遺伝子B」はsiApoBであり；かつ「遺伝子C」はsiTTRである。

【図24】実施例21と関連して議論される、GaINAc-ヘテロ四量体コンジュゲート(XD-07140)の合成の概略図を提示する。キー：本実施例において、「遺伝子A」はsiFVIIであり；「遺伝子B」はsiApoBであり；かつ「遺伝子C」はsiTTRである。

【図25】実施例21と関連して議論される、GaINAc-siFVII-siApoB-siTTR-siFVII四量体(XD-07140)のHPLC分析を提示する。

【図26】実施例22と関連して議論される、ホモ二量体の合成を提示する。

【図27】実施例22と関連して議論される、XD-05305のSEC HPLC分析を提示する。

【図28】実施例22と関連して議論される、XD-05305のSEC HPLC分析を提示する。

【図29】実施例22と関連して議論される、XD-05305のIEX HPLC分析を提示する。

【図30】実施例22と関連して議論される、XD-05305のSEC HPLC分析を提示する。多量体siRNAは、左側のピークであり；二量体siRNAは、中央のピークであり；かつ基準siRNAは、右側のピークである。

10

20

30

40

50

【図31】実施例22と関連して議論される、多量体siRNA混合物に対する塩濃度および反応温度の効果を提示する。

【図32】終端鎖（この場合、アンチセンス鎖を終結物質として使用した）の濃度が高ければ高いほど、多量体化されたsiRNA画分は小さいことを示すデータを提示する。データは、実施例22と関連して議論される。

【図33】センスホモ二量体の濃度が小さければ小さいほど、多量体化されたsiRNA画分は小さいことを示すデータを提示する。データは、実施例22と関連して議論される。

【図34】図34Aは、実施例22と関連して議論される、試料番号1～15についてのゲルを提示する。図34Bは、実施例22と関連して議論される、試料番号1'～10'についてのゲルを提示する。

【図35】実施例23と関連して議論される、動物実験MausRNAi-TV29においてマウス血清から決定されたFVII活性を示すデータを提示する。

【図36】実施例23と関連して議論される、動物実験MausRNAi-TV30においてマウス血清から決定されたFVII活性を示すデータを提示する。

【図37】実施例24と関連して議論される、FVIIIs-FVIIasヘテロ二量体（X12714）を提示する。

【図38】実施例24と関連して議論される、ヘテロ二量体X12714（レーン12）のゲル分析を提示する。

【図39】実施例26と関連して議論される、NMuLi細胞でのApobスクリーニングについての用量応答データを提示する。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0118】

本発明は、多くの異なる形態における態様を含むが、図面に示されるものがあり、かつ、本開示は、技術の原理の例証として考えられるべきであること、および例証されている態様に本発明を限定するようには意図されないことの理解と共に、詳細ないくつかの具体的な形態において、本明細書に説明されるであろうものがある。

##### 【0119】

#### 詳細な説明

本発明の種々の局面は、オリゴヌクレオチドを含有するマルチコンジュゲートの製造および使用を共通に有する。マルチコンジュゲートは、RNAおよび/またはDNAを含有してもよい。RNAは、siRNA、miRNA、および低分子活性化RNA（saRNA）などの、本明細書において提供されるマルチコンジュゲーション反応条件に適用できる生理活性RNAの任意の形態であってもよい。

##### 【0120】

本発明の種々の局面において使用されるオリゴヌクレオチドは、関心対象であるか、または（A）例えば、対象における標的遺伝子もしくはタンパク質の発現を抑制もしくは増強するための医術において、および、標的遺伝子もしくはタンパク質の発現の抑制もしくは増強から恩恵を受けると考えられる任意の疾患の処置もしくは予防において；（B）生物学的研究の実施において；ならびに（C）動物および植物において新たなもしくは変更された表現型を生じるために使用される、任意であってもよい。非限定的な例として、オリゴヌクレオチドは、c-myc、c-myb、c-fos、c-jun、bcl-2、またはVEGF、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、またはPIGFと関連して活性を有するように設計されたRNAなどの、RNA干渉、RNA活性化、もしくは遺伝子治療のために使用されているか、または、近い将来使用されることが期待される任意のRNAであってもよい。

##### 【0121】

本明細書に記載される製造法は、当技術分野において以前に記載されているものよりも高いレベルの純度で種々のマルチコンジュゲートを生じる。本発明のこの特徴は、マルチコンジュゲートの治療的適用にとって特に有利であり、かつ、研究などの他の適用におけるマルチコンジュゲートの製造および使用にとって利点を生じる可能性が高い。

##### 【0122】

10

20

30

40

50

本発明の1つの局面は、あらかじめ決定されたサイズおよび組成を有する、オリゴヌクレオチドを含有するマルチコンジュゲート、ならびにそのようなマルチコンジュゲートを作製するための方法である。方法は、当技術分野において以前に記載されているものよりも高いレベルの純度でマルチコンジュゲートを生じる。

【 0 1 2 3 】

本発明の種々の特徴を、次に、下記で議論する。

【 0 1 2 4 】

核酸

種々の態様において、核酸またはオリゴヌクレオチドは、RNA、DNAであるか、または人工もしくは非天然の核酸類似体を含む。種々の態様において、核酸またはオリゴヌクレオチドは、一本鎖である。種々の態様において、核酸またはオリゴヌクレオチドは、二本鎖（例えば、逆平行二本鎖）である。

【 0 1 2 5 】

種々の態様において、核酸またはオリゴヌクレオチドは、RNA、例えば、アンチセンスRNA (aRNA)、CRISPR RNA (crRNA)、長鎖ノンコーディングRNA (lncRNA)、マイクロRNA (miRNA)、piwi相互作用RNA (piRNA)、低分子干渉RNA(siRNA)、メッセンジャーRNA (mRNA)、短鎖ヘアピンRNA (shRNA)、低分子活性化 (saRNA)、またはリボザイムである。

【 0 1 2 6 】

1つの態様において、RNAはsiRNAである。例えば、各々の二本鎖オリゴヌクレオチドは、siRNAであり、かつ/または、15～30塩基対の長さを有する。

【 0 1 2 7 】

種々の態様において、核酸またはオリゴヌクレオチドは、アブタマーである。

【 0 1 2 8 】

siRNA（低分子干渉RNA）は、標的遺伝子を分解することにより遺伝子の発現を抑制するための、ヌクレオチド配列がそのセンス鎖と同一である遺伝子のmRNA（メッセンジャーRNA）を標的とする、19～22個の核酸から構成される短い二本鎖RNAである (Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494-8)。

【 0 1 2 9 】

本発明の方法において有用な別のクラスの核酸は、miRNAである。miRNAは、転写後遺伝子調節において鍵となる役割を果たすノンコーディングRNAである。miRNAは、すべての哺乳動物タンパク質をコードする遺伝子の30%の発現を調節することができる。二本鎖RNAによる特異的かつ強力な遺伝子サイレンシング (RNAi) が、追加の低分子ノンコーディングRNAを加えて発見された (Canver, M.C. et al., *Nature* (2015))。pre-miRNAは、2ヌクレオチドの3'突出を有する約70ヌクレオチド長の短いステムループであり、排出されて、成熟した19～25ヌクレオチドの二重鎖になる。塩基対形成の安定性がより低いmiRNA鎖（ガイド鎖）が、RNA誘導サイレンシング複合体 (RISC) 上にロードされる。パッセンジャーガイド鎖は、機能的でありうるが、通常分解される。成熟miRNAは、RISCを、3'非翻訳領域 (UTR) 内に主に見出される標的mRNA中の部分的に相補的な配列モチーフに結び付け、転写後遺伝子サイレンシングを誘導する (Bartel, D.P. *Cell*, 136: 215-233 (2009); Saj, A. & Lai, E.C. *Curr Opin Genet Dev*, 21: 504-510 (2011))。miRNA模倣物は、例えば、米国特許第8,765,709号に記載されている。

【 0 1 3 0 】

いくつかの態様において、RNAは、例えば、米国特許第8,202,846号および第8,383,599号に記載されているような、短鎖ヘアピンRNA (shRNA) であることができる。

【 0 1 3 1 】

いくつかの態様において、RNAは、CRISPR RNA (crRNA) であることができ、例えば、タイプVのCRISPRアレイは、42～44ヌクレオチド長の短い成熟crRNAにプロセシングさ

10

20

30

40

50

れることができ、各々の成熟crRNAは、19ヌクレオチドの直列反復配列で始まり、その後23～25ヌクレオチドのスペーサー配列が続く。あるいは、タイプIIシステム中の成熟crRNAは、20～24ヌクレオチドのスペーサー配列で開始し、その後約22ヌクレオチドの直列反復配列が続くことができる。CRISPRシステムは、例えば、米国特許第8,771,945号、Jinek et al., *Science*, 337(6096): 816-821 (2012)、および国際特許出願公開第WO 2013/176772号に記載されている。

#### 【0132】

種々の態様において、核酸またはオリゴヌクレオチドは、15～30、17～27、19～26、20～25、40～50、40～150、100～300、1000～2000、または最大10000までのヌクレオチド長である。10

#### 【0133】

種々の態様において、オリゴヌクレオチドは、二本鎖であり、かつ相補的である。相補性は、100%相補的であるか、または、オリゴヌクレオチドがそれにもかかわらず、妥当な条件（例えば、生理学的に妥当な条件）下でハイブリダイズし、二本鎖のままである場合には、100%未満が相補的であることができる。例えば、二本鎖オリゴヌクレオチドは、少なくとも約80、85、90、または95%相補的であることができる。

#### 【0134】

いくつかの態様において、RNAは、長鎖ノンコーディングRNA (lncRNA) である。lncRNAは、タンパク質をコードしない（または100アミノ酸よりも大きいオープンリードィングフレームを欠如する）200ヌクレオチドよりも長い長さを有する、転写されたRNA分子の大きなかつ多様なクラスである。lncRNA転写物は、ノンコーディングトランスク립トームの大部分を占めるため、lncRNAは、ヒトにおいてほぼ30,000種類の異なる転写物を包含すると考えられる（例えば、Derrien et al., *The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression*. *Genome Res.*, 22(9): 1775-89 (2012)を参照されたい）。20

#### 【0135】

さらに他の態様において、RNAは、メッセンジャーRNA (mRNA) である。mRNA、およびタンパク質のインビオ産生のための送達法としてのその適用は、例えば、国際特許出願公開第WO 2013/151736号に記載されている。

#### 【0136】

他の態様において、RNAは、低分子活性化 (saRNA)（例えば、Chappell et al., *Nature Chemical Biology*, 11: 214-220 (2015)に記載されているような）、またはリボザイム（Doherty et al., *Ann Rev Biophys Biomol Struct*, 30: 457-475 (2001)）であることができる。30

#### 【0137】

いくつかの態様において、核酸またはオリゴヌクレオチドは、DNA、例えば、アンチセンスDNA (adNA)（例えば、アンタゴミル）またはアンチセンスギャップマーである。ギャップマーおよび多量体を含むadNAの例は、例えば、Subramanian et al., *Nucleic Acids Res.*, 43(19): 9123-9132 (2015)および国際特許出願公開第WO 2013/040429号に記載されている。アンタゴミルの例は、例えば、米国特許第7,232,806号に記載されている。40

#### 【0138】

種々の態様において、オリゴヌクレオチドは、特定の配列、例えば、本明細書において開示される配列のいずれか1つを有する。1つの態様において、オリゴヌクレオチドは、SEQ ID NO:104および105を有するsiRNAである。1つの態様において、オリゴヌクレオチドは、SEQ ID NO:113および114を有するsiRNAである。

#### 【0139】

オリゴヌクレオチド合成のための一般的手順を、下記の実施例において提供する。本発明での使用に適合されうる他の方法は、当技術分野において公知である。

#### 【0140】

10

20

30

40

50

### 核酸に対する修飾

種々の態様において、核酸またはオリゴヌクレオチドは、化学修飾をさらに含む。化学修飾は、修飾されたヌクレオシド、修飾された骨格、修飾された糖、または修飾された末端を含むことができる。

#### 【0141】

リン含有結合は、ホスホロチオアート、キラルホスホロチオアート、ホスホロジチオアート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、3'アルキレンホスホナートおよびキラルホスホナートを含むメチルおよび他のアルキルホスホナート、ホスフィナート、3'-アミノホスホルアミダートおよびアミノアルキルホスホルアミダートを含むホスホルアミダート、チオノホスホルアミダート、チオノアルキルホスホナート、チオノアルキルホスホトリエステル、および通常の3'-5'結合を有するボラノホスファート、これらの2'-5'結合した類似体、ならびに、ヌクレオシド単位の隣接する対が3'-5'から5'-3'へまたは2'-5'から5'-2'へ結合している、逆の極性を有するものを含むが、これらに限定されない。10

#### 【0142】

本発明のマルチコンジュゲートに含有されるオリゴヌクレオチドは、例えば、インビトロおよびインビボでの改善された効力および安定性を含む、様々な効果を生じるために、当技術分野において公知の種々の戦略を用いて修飾されてもよい。これらの戦略の中には、人工核酸、例えば、2'-O-メチル置換RNA；2'-フルオロ-2'デオキシRNA、ペプチド核酸(PNA)；モルホリノ；ロックド核酸(LNA)；アンロックド核酸(UNA)；架橋核酸(BNA)；グリコール核酸(GNA)；およびトレオース核酸(TNA)；またはより一般的には、天然に存在するRNAおよびDNAに構造上類似しているが、天然に存在する分子のホスファート骨格、糖、または核酸塩基部分の1つまたは複数において変更を有する、核酸類似体、例えば、二環式および三環式ヌクレオシド類似体がある。典型的に、類似体核酸塩基は、中でも、異なる塩基対形成および塩基スタッキング特性を付与する。例は、4種類の正規の塩基すべてと対形成することができる万能塩基を含む。ホスファート-糖骨格類似体の例は、PNAを含む。モルホリノベースのオリゴマー化合物は、Braasch et al., Bioc hemistry, 41(14): 4503-4510 (2002)、ならびに米国特許第5,539,082号；第5,714,331号；第5,719,262号；および第5,034,506号に記載されている。20

#### 【0143】

本明細書に記載される製造法において、オリゴヌクレオチドのいくつかは、化学官能基での置換により、末端が修飾される。置換は、オリゴヌクレオチドの3'または5'端で行われることができ、好ましくは、单量体のセンス鎖およびアンチセンス鎖の両方の3'端で行われるが、常にそれに限定されるわけではない。化学官能基は、例えば、スルフヒドリル基(-SH)、カルボキシル基(-COOH)、アミン基(-NH<sub>2</sub>)、水酸基(-OH)、ホルミル基(-CHO)、カルボニル基(-CO-)、エーテル基(-O-)、エステル基(-COO-)、ニトロ基(-NO<sub>2</sub>)、アジド基(-N<sub>3</sub>)、またはスルホン酸基(-SO<sub>3</sub>H)を含んでもよい。30

#### 【0144】

本発明のマルチコンジュゲートに含有されるオリゴヌクレオチドは、修飾されてもよく、追加的にまたは代替的に、核酸塩基(当技術分野において単純に「塩基」としばしば呼ばれる)修飾または置換も含むことができる。修飾された核酸塩基は、天然の核酸においてはまれにまたは一過性にのみ見出される核酸塩基、例えば、ヒポキサンチン、6-メチルアデニン、5-Meピリミジン類、特に5-メチルシトシン(5-メチル-2'デオキシシトシンとも呼ばれ、当技術分野において5-Me-Cとしばしば呼ばれる)、5-ヒドロキシメチルシトシン(HMC)、グリコシリHMCおよびゲントビオシリHMC、ならびに合成核酸塩基、例えば、2-アミノアデニン、2-(メチルアミノ)アデニン、2-(イミダゾリルアルキル)アデニン、2-(アミノアルキルアミノ)アデニン、または他のヘテロ置換アルキルアデニン類、2-チオウラシル、2-チオチミン、5-プロモウラシル、5-ヒドロキシメチルウラシル、8-アザグアニン、7-デアザグアニン、N6(6-アミノヘキシル)アデニン、および2,6-ジアミノプリンを含む。Kornberg, A., DNA Replication, W. H. Freeman & Co., San Francisco, p40

p 75-77 (1980); Gebeyehu et al., Nucl. Acids Res, 15: 4513 (1997)。当技術分野において公知の「万能」塩基、例えばイノシンもまた、含まれうる。5-Me-C置換は、0.6~1.2で、核酸二重鎖安定性を増大させることができることが示されており (Sanghvi, Y. S., in C rooke, S. T. and Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, pp 276-278 (1993))、塩基置換の局面である。修飾された核酸塩基は、5-メチルシトシン (5-me-C)、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの6-メチルおよび他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの2-プロピルおよび他のアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミン、および2-チオシトシン、5-ハロウラシルおよびシトシン、5-プロピニルウラシルおよびシトシン、6-アゾウラシル、シトシンおよびチミン、5-ウラシル (シュード-ウラシル)、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシル、および他の8-置換アデニン類およびグアニン類、5-ハロ、特に5-ブロモ、5-トリフルオロメチル、および他の5-置換ウラシル類およびシトシン類、7-メチルグアニンおよび7-メチルアデニン、8-アザグアニンおよび8-アザアデニン、7-デアザグアニンおよび7-デアザアデニン、ならびに3-デアザグアニンおよび3-デアザアデニンなどの、他の合成核酸塩基および天然核酸塩基を含むことができる。核酸の末端の水酸基 (-OH) は、スルフヒドリル基 (-SH)、カルボキシル基 (-COOH)、またはアミン基 (-NH<sub>2</sub>) などの官能基で置換することができる。置換は、3'端または5'端で行うことができる。  
10

#### 【0145】

##### リンカー

本発明の種々の局面および態様において、オリゴヌクレオチドは共有結合性に連結されている。リンカーは、切断可能であってもよく (例えば、オリゴヌクレオチドの送達および/または作用を促進するために、細胞内条件下で)、または切断不可能であってもよい。求核試薬-求電子試薬化学を用いるリンカーの文脈において下記および実施例において一般的に記載されるが、他の化学および配置が可能である。かつ、当業者により理解されるであろうように、種々のリンカーが、それらの組成、合成、および用途を含み、当技術分野において公知であり、本発明での使用に適合しうる。

#### 【0146】

種々の態様において、共有結合性リンカーは、求核基と求電子基との反応産物を含むことができる。例えば、共有結合性リンカーは、チオールとマレイミド、チオールとビニルスルホン、チオールとピリジルジスルフィド、チオールとヨードアセトアミド、チオールとアクリラート、アジドとアルキン、またはアミンとカルボキシル基との反応産物を含むことができる。本明細書に記載されるように、これらの基の1つは、オリゴヌクレオチドに接続され (例えば、3'または5'端でのチオール(-SH)官能化)、もう1つの基は、2種類のオリゴヌクレオチドを最終的に連結する第2の分子 (例えば、連結剤) により包含される (例えば、DTME中のマレイミド)。  
30

#### 【0147】

種々の態様において、核酸またはオリゴヌクレオチドは、ホスホジエステルまたはチオホスホジエステルを介してリンカーに接続される (例えば、構造1中のR1は、ホスホジエステルまたはチオホスホジエステルである)。種々の態様において、核酸またはオリゴヌクレオチドは、C2-C10、C3-C6、またはC6アルキルを介してリンカーに接続される (例えば、構造1中のR2は、C2-C10、C3-C6、またはC6アルキルである)。あるいは、これらの部分 (例えば、構造1中のR1および/またはR2) は任意であり、直接連結が可能である。  
40

#### 【0148】

種々の態様において、核酸またはオリゴヌクレオチドは、チオールとマレイミド基との反応産物を介してリンカーに接続される (例えば、構造1中のAは、チオールとマレイミド基との反応産物である)。そのような化学を利用する好ましい連結剤は、DTME (ジチオビスマレイミドエタン)、BM(PEG)2 (1,8-ビス(マレイミド)ジエチレンギリコール)、BM(PEG)3 (1,11-ビスマレイミド-トリエチレンギリコール)、BMOE (ビスマレイミドエタン)、BMH (ビスマレイミドヘキサン)、またはBMB (1,4-ビスマレイミドブタン) を  
50

含む。

#### 【 0 1 4 9 】

再び、例は、例証となるものであり、限定するものではない。種々の態様において、オリゴヌクレオチドを、官能端置換を介して直接的に、または連結剤により間接的に、互いに連結させることができる。種々の態様において、オリゴヌクレオチドを、リンカーに直接結合させることができる（例えば、構造1のR1およびR2が欠如する）。そのような結合は、例えば、当技術分野における通常の技能にしたがって調製することができる3'-チオヌクレオシドの使用を通して、達成することができる。例えば、Sun et al. "Synthesis of 3'-thioribonucleosides and their incorporation into oligoribonucleotides via phosphoramidite chemistry" RNA. 1997 Nov;3(11):1352-63を参照されたい。種々の態様において、連結剤は、ポリエチレン glycole (PEG)、ポリビニルピロリドン、およびポリオキサゾリンなどの非イオン性親水性ポリマー、または、PLGAおよびPLAなどの疎水性ポリマーであってもよい。

#### 【 0 1 5 0 】

共有結合性結合のための媒介物質として使用されるポリマー連結剤は、PEG、Pluronic、ポリビニルピロリドン、ポリオキサゾリン、もしくはそれらのコポリマーを含む非イオン性親水性ポリマー；または、ポリ-L-乳酸、ポリ-D-乳酸、ポリ-D,L-乳酸、ポリ-グリコール酸、ポリ-D-乳酸グリコール酸共重合体、ポリ-L-乳酸グリコール酸共重合体、ポリ-D,L-乳酸グリコール酸共重合体、ポリカプロラクトン、ポリバレロラクトン、ポリヒドロキシブチラート、ポリヒドロキシバレラート、もしくはそれらのコポリマーを含む1種類または複数種類の生物切断性ポリエステルポリマーであってもよいが、常にそれに限定されるわけではない。

#### 【 0 1 5 1 】

連結剤は、100～10,000ダルトンの分子量を有しうる。そのような連結剤の例は、ジチオ-ビス-マレイミドエタン (DTME)、1,8-ビス-マレイミドジエチレン glycole (BM(PEG)2)、トリ-(2-マレイミドエチル)-アミン (TMEA)、トリ-スクシンイミジルアミノトリアセタート (TSAT)、3-アーム-ポリ(エチレン glycole) (3-アームPEG)、マレイミド、N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS)、ビニルスルホン、ヨードアセチル、ニトロフェニルアジド、イソシアナート、ピリジルジスルフィド、ヒドラジド、およびヒドロキシフェニルアジドを含む。

#### 【 0 1 5 2 】

切断可能な結合（サイトゾルの化学的環境により切断される還元剤結合など）を有する連結剤、または切断不可能な結合を有する連結剤を、本明細書において使用することができる。例えば、本発明の前述の局面の連結剤は、アミド結合またはウレタン結合などの切断不可能な結合を有することができる。あるいは、本発明の前述の局面の連結剤は、酸で切断可能な結合（例えば、エステル、ヒドラゾン、またはアセタールの共有結合性結合）、還元剤で切断可能な結合（例えば、ジスルフィド結合）、生物切断性結合、または酵素で切断可能な結合などの切断可能な結合を有することができる。1つの態様において、切断可能な共有結合性リンカーは、細胞内条件下で切断可能である。追加的に、薬物修飾に利用可能な任意の連結剤を、非限定的に、本発明の前述の局面において使用することができる。

#### 【 0 1 5 3 】

さらに、官能基および連結剤の組み合わせは、以下を含みうる：(a) 官能基がアミノおよびチオールである場合、連結剤は、スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート、またはスクシンイミジル6-([3(2-ピリジルジチオ)プロピオアミド]ヘキサノアートであってもよい；(b) 官能基がアミノである場合、連結剤は、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ-(N-スクシンイミジルエステル)、ジチオ-ビス(エチル1H-イミダゾール-1-カルボキシラート)、またはジチオ-ビス(エチル1H-イミダゾール-1-カルボキシラート)であってもよい；(c) 官能基がアミノおよびアルキンである場合、連結剤は、スルホ-N-スクシンイミジル3-[[2-(p-アジドサリチルアミド)エチル]-1,3'-ジチオ]プロピオナートであってもよい；

10

20

30

40

50

および(d)官能基yがチオールである場合、連結剤は、ジチオ-ビス-マレイミドエタン(DTME)；1,8-ビス-マレイミドジエチレングリコール(BM(PEG)2)；またはジチオビス(スルホスクシンイミジルプロピオナート)(DTSSP)である。

【0154】

化合物を調製する前述の方法において、官能基を活性化する追加の工程を含めることができる。官能基の活性化において使用することができる化合物は、1-エチル-3,3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド、イミダゾール、N-ヒドロキシスクシンイミド、ジクロロヘキシリカルボジイミド、N-マレイミドプロピオン酸、N-マレイミドプロピルスクシンイミドエステル、またはN-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナートを含むが、これらに限定されない。

10

【0155】

単量体中間化合物

種々の局面において、本発明は、例えば、あらかじめ決定されたサイズおよび組成を有する、定義されたマルチコンジュゲートオリゴヌクレオチドの合成において使用することができる、共有結合性リンカーにカップリングされたオリゴヌクレオチドを提供する。

【0156】

1つの局面において、本発明は、以下の構造1の化合物を提供する：

X-R<sub>1</sub>-R<sub>2</sub>-A-R<sub>3</sub>-B (構造1)

構造中、

Xは、その3'または5'末端を通してR<sub>1</sub>に結合した核酸であり；

20

R<sub>1</sub>は、ホスホジエステル、チオホスホジエステル、スルファート、アミド、グリコールであるか、または欠如しており；

R<sub>2</sub>は、C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>アルキル、アルコキシ、もしくはアリール基であるか、または欠如しており；

Aは、求核試薬と求電子試薬との反応産物であり；

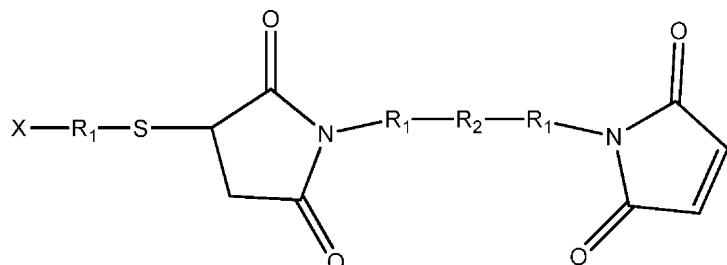
R<sub>3</sub>は、C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>アルキル、アルコキシ、アリール、アルキルジチオ基、エーテル、チオエーテル、チオプロピオナート、またはジスルフィドであり；かつ

Bは、求核試薬または求電子試薬(例えば、チオール、マレイミド、ビニルスルホン、ピリジルジスルフィド、ヨードアセトアミド、アクリラート、アジド、アルキン、アミン、またはカルボキシル基)である。

30

【0157】

1つの局面において、本発明は、以下の構造2の化合物を提供する：



(構造2)

40

構造中、

Xは、その3'または5'末端でホスファートまたはチオホスファートを介してR<sub>1</sub>に結合した核酸であり；

各々のR<sub>1</sub>は、独立してC<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>アルキル、アルコキシ、またはアリール基であり；かつR<sub>2</sub>は、チオプロピオナートまたはジスルフィド基である。

【0158】

1つの局面において、本発明は、以下の構造3の化合物を提供する：

X-R<sub>1</sub>-R<sub>2</sub>-A-R<sub>3</sub>-B (構造3)

50

構造中、

Xは、その3'または5'末端を通してR1に結合した核酸であり；

R1は、ホスファート、チオホスファート、スルファート、アミド、グリコールであるか、または欠如しており；

R2は、C2-C10アルキル、アルコキシ、もしくはアリール基であるか、または欠如しており；

Aは、第1の反応部分と第2の反応部分との反応産物であり；

R3は、C2-C10アルキル、アルコキシ、アリール、アルキルジチオ基、エーテル、チオエーテル、チオプロピオナート、またはジスルフィドであり；かつ

Bは、第3の反応部分である。

10

【0159】

種々の局面において、本発明はまた、共有結合性リンカーにカップリングされたオリゴヌクレオチドを合成するための方法も提供する。

【0160】

1つの局面において、本発明は、以下の工程を含む、構造1の化合物を合成するための（または、構造2もしくは3の化合物を合成するのに適合した）方法を提供する：

A'およびA''が求核試薬および求電子試薬を含む、官能基を有する核酸X-R1-R2-A'と共有結合性リンカーA''-R3-Bとを、X-R1-R2-A'の希釈溶液において化学量論的過剰量のA''-R3-Bで反応させる工程であって、それにより、

Xが、その3'または5'末端を通してR1に結合した核酸であり；

20

R1が、ホスホジエステル、チオホスホジエステル、スルファート、アミド、グリコールであるか、または欠如しており；

R2が、C2-C10アルキル、アルコキシ、もしくはアリール基であるか、または欠如しており；

Aが、求核試薬と求電子試薬との反応産物であり；

R3が、C2-C10アルキル、アルコキシ、アリール、アルキルジチオ基、エーテル、チオエーテル、チオプロピオナート、またはジスルフィドであり；かつ

Bが、求核試薬または求電子試薬（例えば、チオール、マレイミド、ビニルスルホン、ピリジルジスルフィド、ヨードアセトアミド、アクリラート、アジド、アルキン、アミン、またはカルボキシル基）である、化合物X-R1-R2-A-R3-B（構造1）

30

を形成する、工程。

【0161】

方法は、(i) ホスホラミダイトオリゴマー化化学を用いた核酸の固相合成の最中のチオールの導入、または(ii) 固相合成の最中に導入されたジスルフィドの還元による、A'がチオール(-SH)を含む、官能基を有する核酸X-R1-R2-A'を合成する工程をさらに含むことができる。

【0162】

種々の態様において、構造1の化合物を合成するための方法は、構造2の化合物を合成する工程をさらに含む。

【0163】

共有結合性リンカーにカップリングされたオリゴヌクレオチドは、実施例中を含む、本明細書に記載される特徴のいずれか1つまたは複数を含むことができる。例えば、化合物は、上記の核酸（修飾を伴うかもしくは伴わない）、ターゲティングリガンド、および/もしくはリンカーのいずれか1つもしくは複数、または、概要もしくは実施例において示される特定の構造もしくは化学のいずれかを含むことができる。実施例1は、チオール末端オリゴヌクレオチドを生成するための例示的な方法論を提供する。実施例2は、リンカーにカップリングされたオリゴヌクレオチドを調製するための例示的な方法論を提供する。

40

【0164】

種々の態様において、構造1または2の化合物を合成するための方法は、構造1または2の形成に実質的に好都合であり、Xの二量体化を実質的に阻止する条件下で行われる。条件

50

は、反応の収率を改善する（例えば、産物の純度を改善する）ことができる。

**【0165】**

種々の態様において、構造1または2の化合物を合成するための方法、官能基を有する核酸X-R1-R2-A'と共に結合性リンカーA''-R3-Bとを反応させる工程は、約1 mM、500 μM、250 μM、100 μM、または50 μMより下のX-R1-R2-A'濃度で行われる。あるいは、X-R1-R2-A'濃度は、約1 mM、500 μM、250 μM、100 μM、または50 μMであることができる。

**【0166】**

種々の態様において、構造1または2の化合物を合成するための方法、官能基を有する核酸X-R1-R2-A'と共に結合性リンカーA''-R3-Bとを反応させる工程は、少なくとも約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、または100のモル過剰量のA''-R3-Bで行われる。あるいは、A''-R3-Bのモル過剰量は、約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、または100であることができる。

10

**【0167】**

種々の態様において、構造1または2の化合物を合成するための方法、官能基を有する核酸X-R1-R2-A'と共に結合性リンカーA''-R3-Bとを反応させる工程は、約7、6、5、または4より下のpHで行われる。あるいは、pHは、約7、6、5、または4であることができる。

**【0168】**

種々の態様において、構造1または2の化合物を合成するための方法、官能基を有する核酸X-R1-R2-A'と共に結合性リンカーA''-R3-Bとを反応させる工程は、水および水混和性有機共溶媒を含む溶液において行われる。水混和性有機共溶媒は、DMF（ジメチルホルムアミド）、NMP（N-メチル-2-ピロリドン）、DMSO（ジメチルスルホキシド）、またはアセトニトリルを含むことができる。水混和性有機共溶媒は、約10、15、20、25、30、40、または50% V (v/v) の溶液を含むことができる。

20

**【0169】**

種々の態様において、化合物は、単離されているか、または実質的に純粋である。例えば、化合物は、少なくとも75、80、85、90、95、96、97、98、99、または100% 純粋であることができる。1つの態様において、化合物は、約85～95% 純粋である。同様に、本発明による化合物および組成物を合成するための方法は、少なくとも75、80、85、90、95、96、97、98、99、または100% 純粋である産物を結果としてもたらすことができる。1つの態様において、産物は、約85～95% 純粋である。調製物は、50% 純粋よりも高いかまたは同等；好ましくは、75% 純粋よりも高いかまたは同等；より好ましくは、85% 純粋よりも高いかまたは同等；およびさらにより好ましくは、95% 純粋よりも高いかまたは同等であることができる。

30

**【0170】**

本明細書において使用される際、約という用語は、およそのその簡単なかつ通常の意味にしたがって使用される。例えば、「約X」は、Xの値について測定誤差内である類似した量、または、Xとほぼ同じであり、Xと同じ特性を本質的に有する量を含み、述べられるような値Xをほぼ包含する。

30

**【0171】**

本明細書において使用される際、単離されたとは、他の望ましくない物質から分離されている化合物を含む。単離された化合物は、実質的に純粋な状態で合成されることが可能か、または、粗反応混合物の他の成分の残留量を含み、いくらかの量の不純物が残る可能性があることを除いて、粗反応混合物の他の成分から分離されることがある。同様に、純粋または実質的に純粋とは、その意図された用途（例えば、薬学的製剤において、またはその後の化学反応のための材料として）を可能にするのに十分、不純物を含まないことを意味する。X% 純粋とは、例えばHPLCなどの分析法によることができる、関連する測定により、化合物が、組成物全体のうちのX%であることを意味する。

40

**【0172】**

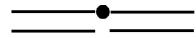
二量体化合物および中間体

50

種々の局面において、本発明は、二量体の定義されたマルチコンジュゲートオリゴヌクレオチドを提供する。これらの化合物は、ホモ二量体（例えば、実質的に同じである、例えば、インビボで同じ遺伝子をターゲティングする2種類のオリゴヌクレオチド）およびヘテロ二量体（例えば、実質的に異なる、例えば、異なる配列であるかまたはインビボで異なる遺伝子をターゲティングする2種類のオリゴヌクレオチド）を含む。

## 【0173】

1つの局面において、本発明は、以下の構造4の単離された化合物を提供する：



(構造4)

構造中、  
各々の

10

は、インビボで同じ分子標的と反応するように設計された二本鎖オリゴヌクレオチドであり、かつ

は、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖をそれらの3'または5'末端で連結し、かつ構造-R1-R2-A-R3-A-R2-R1-を有する共有結合性リンカーであり、  
構造中、

各々のR1は、独立してホスホジエステル、チオホスホジエステル、スルファート、アミド、グリコールであるか、または欠如しており；

20

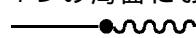
各々のR2は、独立してC2-C10アルキル、アルコキシ、もしくはアリール基であるか、または欠如しております；

各々のAは、独立して求核試薬と求電子試薬との反応産物であり、かつ

R3は、C2-C10アルキル、アルコキシ、アリール、アルキルジチオ基、エーテル、チオエーテル、チオプロピオナート、またはジスルフィドである。

## 【0174】

1つの局面において、本発明は、以下の構造5の単離された化合物を提供する：



(構造5)

構造中、

30

は、第1の一本鎖オリゴヌクレオチドであり、  
~~~~~

は、第1の一本鎖オリゴヌクレオチドとは異なる配列を有する第2の一本鎖オリゴヌクレオチドであり、かつ

は、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖をそれらの3'または5'末端で連結し、かつ構造-R1-R2-A-R3-A-R2-R1-を有する共有結合性リンカーであり、
構造中、

各々のR1は、独立してホスファート、スルファート、アミド、グリコールであるか、または欠如しております；

40

各々のR2は、独立してC2-C10アルキル、アルコキシ、もしくはアリール基であるか、または欠如しております；

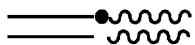
各々のAは、独立してチオールとマレイミド、チオールとビニルスルホン、チオールとピリジルジスルフィド、チオールとヨードアセトアミド、チオールとアクリラート、アジドとアルキン、またはアミンとカルボキシル基との反応産物であり、かつ

R3は、C2-C10アルキル、アルコキシ、アリール、アルキルジチオ基、エーテル、チオエーテル、チオプロピオナート、またはジスルフィドである。

【0175】

50

1つの局面において、本発明は、以下の構造6の単離された化合物を提供する：



(構造 6)

構造中、

は、第1の二本鎖オリゴヌクレオチドであり、



10

は、第1の二本鎖オリゴヌクレオチドとは異なる配列を有する第2の二本鎖オリゴヌクレオチドであり、かつ

は、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖をそれらの3'または5'末端で連結し、かつ構造-R1-R2-A-R3-A-R2-R1-を有する共有結合性リンカーであり、

構造中、

各々のR1は、独立してホスファート、スルファート、アミド、グリコールであるか、または欠如しており；

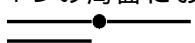
各々のR2は、独立してC2-C10アルキル、アルコキシ、もしくはアリール基であるか、または欠如しており；

各々のAは、独立してチオールとマレイミド、チオールとビニルスルホン、チオールとピリジルジスルフィド、チオールとヨードアセトアミド、チオールとアクリラート、アジドとアルキン、またはアミンとカルボキシル基との反応産物であり、かつ

R3は、C2-C10アルキル、アルコキシ、アリール、アルキルジチオ基、エーテル、チオエーテル、チオプロピオナート、またはジスルフィドである。

【0176】

1つの局面において、本発明は、以下の構造11の単離された化合物を提供する：



(構造 11)

20

構造中、

30

は、二本鎖オリゴヌクレオチドであり、

は、一本鎖オリゴヌクレオチドであり、かつ

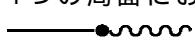
は、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖を連結する共有結合性リンカーである。

【0177】

種々の局面において、本発明は、二量体の定義されたマルチコンジュゲートオリゴヌクレオチドを合成するための方法を提供する。

【0178】

1つの局面において、本発明は、構造5の化合物を合成するための方法を提供し、



(構造 5)

40

構造中、

は、第1の一本鎖オリゴヌクレオチドであり、



は、第1の一本鎖オリゴヌクレオチドとは異なる配列を有する第2の一本鎖オリゴヌクレオ

50

チドであり、かつ は、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖をそれらの3'または5'末端で連結する共有結合性リンカーであり、前記方法は以下の工程を含む：

(i) 第1の一本鎖オリゴヌクレオチド



を二官能性連結部分 と反応させる工程であって、構造中、R1は、一置換産物



を生じる条件下で と反応することができる化学基である、工程；

(ii)



を第2の一本鎖オリゴヌクレオチド



と反応させる工程であって、構造中、R2は、 と反応することができる化学基であり、それにより



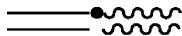
を形成する、工程。

【 0 1 7 9 】

方法は、相補的な



とをアニーリングさせて、構造6



(構造 6)

を産する工程をさらに含むことができる。

【 0 1 8 0 】

1つの局面において、本発明は、構造4の単離された化合物を合成するための方法を提供し

、

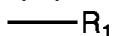


(構造 4)

構造中、各々の

は、二本鎖オリゴヌクレオチドであり、かつ は、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖をそれらの3'または5'末端で連結する共有結合性リンカーであり、前記方法は以下の工程を含む：

(i) 第1の一本鎖オリゴヌクレオチド

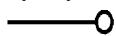


を二官能性連結部分 と反応させる工程であって、構造中、R1は、 と反応することができる化学基であり、それにより一置換産物



を形成する、工程；

(ii)



10

20

30

40

50

と反応させる工程であって、構造中、R2は、

R₂

と反応させる工程であって、構造中、R2は、と反応することができる化学基であり、それにより一本鎖二量体

_____ • _____

を形成する、工程；

(iii) 一本鎖オリゴヌクレオチドを、同時にまたは逐次的にアニーリングさせる工程であって、それにより

10

を形成する、工程。

【0181】

1つの局面において、本発明は、構造4の単離された化合物を合成するための方法を提供し

、

_____ • _____

(構造4)

構造中、各々の

20

は、二本鎖オリゴヌクレオチドであり、かつ は、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖をそれらの3'または5'末端で連結する共有結合性リンカーであり、前記方法は以下の工程を含む：

(i) 以下の段階により

_____ • _____

を形成する工程：

(a) 第1の一本鎖オリゴヌクレオチド

30

と第2の一本鎖オリゴヌクレオチド

R₁

とをアニーリングさせる段階であって、それにより

_____ R₁

を形成する、段階、および

_____ R₁

40

を第3の一本鎖オリゴヌクレオチド

R₂

と反応させる段階であって、構造中、R1およびR2は、直接的にまたは間接的に反応して
共有結合性リンカー を形成することができる化学的部分であり、それにより

_____ • _____

を形成する、段階；または

(b) 第2の一本鎖オリゴヌクレオチド

_____ R₁

50

と第3の一本鎖オリゴヌクレオチド



とを反応させる段階であって、それにより



を形成する、段階、および、第1の一本鎖オリゴヌクレオチド



とをアニーリングさせる段階であって、それにより



を形成する、段階；

(ii)



と第4の一本鎖オリゴヌクレオチド



とをアニーリングさせる工程であって、それにより



を形成する、工程。

【0182】

この方法論は、例えば工程(ii)を省略することにより、



(構造 11)

の単離された化合物を合成するのに適合させることができる。

【0183】

1つの局面において、本発明は、構造4の単離された化合物を合成するための方法を提供し

、



(構造 4)

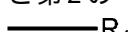
構造中、各々の



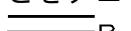
は、二本鎖オリゴヌクレオチドであり、かつ は、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖をそれらの3'または5'末端で連結する共有結合性リンカーであり、前記方法は以下の工程を含む：

(a) 第1の一本鎖オリゴヌクレオチド

と第2の一本鎖オリゴヌクレオチド



とをアニーリングさせる工程であって、それにより



を形成する、工程；

(b) 第3の一本鎖オリゴヌクレオチド

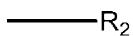
10

20

30

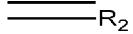
40

50



と第4の一本鎖オリゴヌクレオチド

とをアニーリングさせる工程であって、それにより



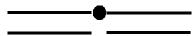
を形成する、工程；

(c)



10

とを反応させる工程であって、構造中、R1およびR2は、直接的にまたは間接的に反応して共有結合性リンカーを形成することができる化学的部分であり、それにより



を形成する、工程。

【0184】

本発明による他の化合物および組成物のように、二量体化合物および中間体は、実施例中を含む、本明細書に記載される特徴のいずれか1つまたは複数を含むことができる。例えば、化合物は、上記の核酸（修飾を伴うかもしくは伴わない）、ターゲティングリガンド、および/もしくはリンカーのいずれか1つもしくは複数、または、概要もしくは実施例において示される特定の構造もしくは化学のいずれかを含むことができる。

20

【0185】

実施例3は、二量体化されたオリゴヌクレオチドを調製するための例示的な方法論を提供し、実施例4は、一本鎖オリゴヌクレオチドをアニーリングさせて、二本鎖オリゴヌクレオチドを形成するための例示的な方法論を提供する。実施例7は、上記の合成において有用である、種々のオリゴヌクレオチド前駆体を調製するための例示的な方法論を提供する。実施例8は、上記の合成においてまた有用である、種々のオリゴヌクレオチド多量体を調製するための例示的な方法論を提供する。

30

【0186】

ヘテロ二量体の例は、実施例9および10において提供される。

【0187】

ホモ二量体の例は、実施例12～15において提供される。

【0188】

種々の態様において、R1、R2、および二官能性連結部分は、本明細書に記載され、示されるような共有結合性リンカーを形成することができる。例えば、種々の態様において、R1およびR2は、各々独立して、反応部分、例えば、求電子試薬または求核試薬を含むことができる。1つの態様において、R1およびR2は、各々独立して、チオール、マレイミド、ビニルスルホン、ピリジルジスルフィド、ヨードアセトアミド、アクリラート、アジド、アルキン、アミン、およびカルボキシル基からなる群より選択されることがある。種々の態様において、二官能性連結部分は、上記の工程(i)および(ii)にしたがつて逐次的に反応させることができる2種類の反応部分、例えば、R1およびR2中の求電子試薬/求核試薬と反応させることができる第2の求電子試薬/求核試薬を含む。二官能性連結部分の例は、DTME、BM(PEG)2、BM(PEG)3、BMOE、BMH、またはBMBを含むが、これらに限定されない。

40

【0189】

これらの、および本発明のすべての他の合成法は、ターゲティングリガンドを分子に付加する工程をさらに含むことができる。実施例6は、ターゲティングリガンド（例えば、GalNAc）を付加するための例示的な方法論を提供する。ターゲティングリガンドを付加する

50

ための追加の方法は、当技術分野において公知であり、当業者が本発明に適合させることができる。

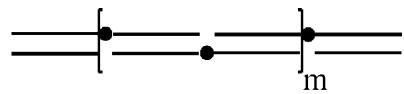
【 0 1 9 0 】

多量体 ($n > 2$) 化合物および中間体

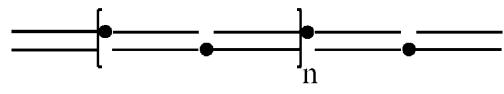
種々の局面において、本発明は、定義されたトリコンジュゲートおよび定義されたテトラコンジュゲートを含む、多量体 ($n > 2$) の定義されたマルチコンジュゲートオリゴヌクレオチドを提供する。

【 0 1 9 1 】

1つの局面において、本発明は、以下の構造7または8の化合物を提供する：



(構造 7)



(構造 8)

10

構造中、
各々の

20

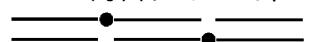
は、二本鎖オリゴヌクレオチドであり、

各々の は、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖を連結する共有結合性リンカーであり、かつ

m は、1以上の整数であり、 n は、0以上の整数である。

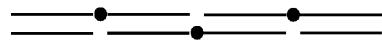
【 0 1 9 2 】

1つの局面において、本発明は、以下の構造9の、 $n = 0$ である化合物を提供する。



(構造 9)

1つの局面において、本発明は、以下の構造10の、 $m = 1$ である化合物を提供する。

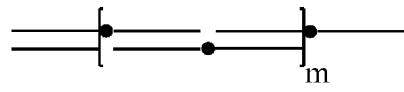


(構造 10)

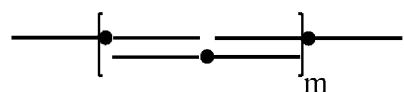
30

【 0 1 9 3 】

1つの局面において、本発明は、以下の構造12、13、14、または15の化合物を提供する：

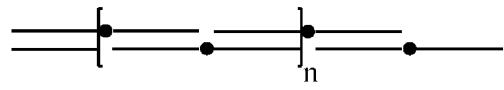


(構造 12)

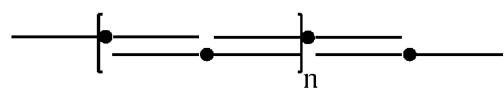


(構造 13)

40



(構造 14)



(構造 15)

構造中、
各々の

50

は、二本鎖オリゴヌクレオチドであり、
各々の

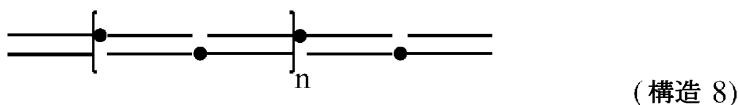
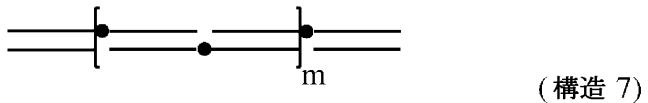
は、一本鎖オリゴヌクレオチドであり、
各々の は、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖を連結する共有結合性リンカー
であり、かつ
mは、1以上の整数であり、nは、0以上の整数である。

【0194】

種々の局面において、本発明は、定義されたトリコンジュゲートおよび定義されたテトラ
コンジュゲートを含む、多量体 ($n > 2$) の定義されたマルチコンジュゲートオリゴヌクレ
オチドを合成するための方法を提供する。

【0195】

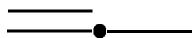
1つの局面において、本発明は、構造7または8の化合物を合成するための方法を提供し、



構造中、各々の

は、二本鎖オリゴヌクレオチドであり、各々の は、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチド
の一本鎖を連結する共有結合性リンカーであり、かつ、mは、1以上の整数であり、nは、
0以上の整数であり、前記方法は以下の工程を含む：

(i) 以下の段階により



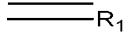
を形成する工程：

(a) 第1の一本鎖オリゴヌクレオチド

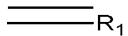
と第2の一本鎖オリゴヌクレオチド



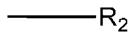
とをアニーリングさせる段階であって、それにより



を形成する、段階、および



を第3の一本鎖オリゴヌクレオチド



と反応させる段階であって、構造中、R1およびR2は、直接的にまたは間接的に反応して
共有結合性リンカー を形成することができる化学的部分であり、それにより

10

20

30

40

50

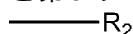


を形成する、段階；または

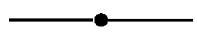
(b) 第2の一本鎖オリゴヌクレオチド



と第3の一本鎖オリゴヌクレオチド



とを反応させる段階であって、それにより



を形成する、段階、および、第1の一本鎖オリゴヌクレオチド



とをアニーリングさせる段階であって、それにより

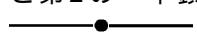


を形成する、段階；

(ii)



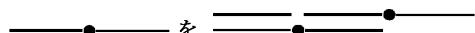
と第2の一本鎖二量体



とをアニーリングさせる工程であって、それにより



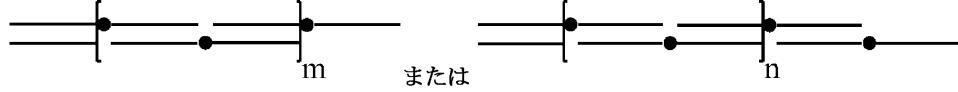
を形成する、工程、および、任意で、1種類または複数種類の追加の一本鎖二量体



を

に対してアニーリングさせる工程であって、それにより、

mが1以上の整数であり、nが0以上の整数である



または

を形成する、工程；ならびに

(iii) 第4の一本鎖オリゴヌクレオチド



30

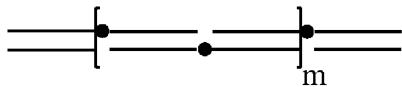
40

を工程 (ii) の産物に対してアニーリングさせる工程であって、それにより構造7または8を形成する、工程。

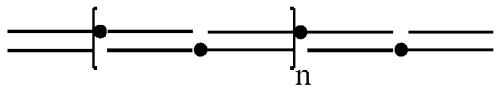
【 0 1 9 6 】

1つの局面において、本発明は、構造7または8の化合物を合成するための方法を提供し、

50



(構造 7)



(構造 8)

構造中、各々の

10

は、二本鎖オリゴヌクレオチドであり、各々の一本鎖を連結する共有結合性リンカーであり、かつ、 m は、1以上の整数であり、 n は、0以上の整数であり、前記方法は以下の工程を含む：

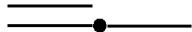
(i) 第1の一本鎖オリゴヌクレオチド

と第1の一本鎖二量体



とをアニーリングさせる工程であって、それにより

20



を形成する、工程；

(ii)

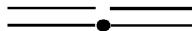


と第2の一本鎖二量体

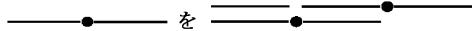


とをアニーリングさせる工程であって、それにより

30



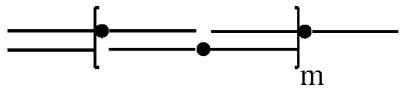
を形成する、工程、および、任意で、1種類または複数種類の追加の一本鎖二量体



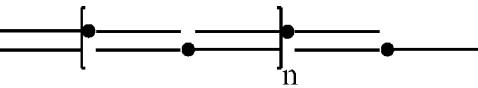
を

に対してアニーリングさせる工程であって、それにより、

m が1以上の整数であり、 n が0以上の整数である



または



40

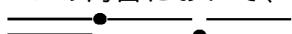
を形成する、工程；ならびに

(iii) 第2の一本鎖オリゴヌクレオチド

を工程(ii)の産物に対してアニーリングさせる工程であって、それにより構造7または8を形成する、工程。

【0197】

1つの局面において、本発明は、構造9の化合物を合成するための方法を提供し、



(構造 9)

50

構造中、各々の

は、二本鎖オリゴヌクレオチドであり、各々の一本鎖を連結する共有結合性リンカーであり、前記方法は以下の工程を含む：

(i) 以下の段階により



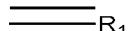
を形成する工程：

(a) 第1の一本鎖オリゴヌクレオチド

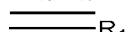
と第2の一本鎖オリゴヌクレオチド



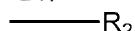
とをアニーリングさせる段階であって、それにより



を形成する、段階、および



を第3の一本鎖オリゴヌクレオチド

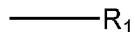


と反応させる段階であって、構造中、R1およびR2は、直接的にまたは間接的に反応して共有結合性リンカーを形成することができる化学的部分であり、それにより

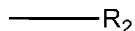


を形成する、段階；または

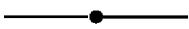
(b) 第2の一本鎖オリゴヌクレオチド



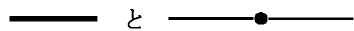
と第3の一本鎖オリゴヌクレオチド



とを反応させる段階であって、それにより



を形成する、段階、および、第1の一本鎖オリゴヌクレオチド



とをアニーリングさせる段階であって、それにより

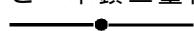


を形成する、段階；

(ii)



と一本鎖二量体



10

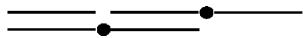
20

30

40

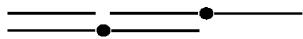
50

とをアニーリングさせる工程であって、それにより



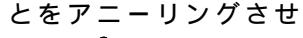
を形成する、工程；ならびに

(iii)



と第4の一本鎖オリゴヌクレオチド

とをアニーリングさせる工程であって、それにより



を形成する、工程。

【0198】

1つの局面において、本発明は、構造10の化合物を合成するための方法を提供し、



(構造10)

構造中、各々の



10

は、二本鎖オリゴヌクレオチドであり、各々のは、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖を連結する共有結合性リンカーであり、前記方法は以下の工程を含む：

(i) 以下の段階により



を形成する工程：

(a) 第1の一本鎖オリゴヌクレオチド

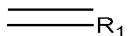


20

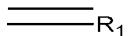
と第2の一本鎖オリゴヌクレオチド



とをアニーリングさせる段階であって、それにより



を形成する、段階、および、

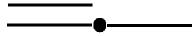


を第3の一本鎖オリゴヌクレオチド



30

と反応させる段階であって、構造中、R1およびR2は、直接的にまたは間接的に反応して共有結合性リンカーを形成することができる化学的部分であり、それにより



を形成する、段階；または

(b) 第2の一本鎖オリゴヌクレオチド

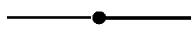


40

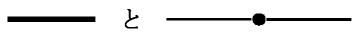
と第3の一本鎖オリゴヌクレオチド



とを反応させる段階であって、それにより



を形成する、段階、および、第1の一本鎖オリゴヌクレオチド

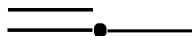


とをアニーリングさせる段階であって、それにより

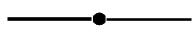


を形成する、段階；

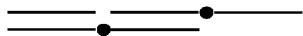
(ii)



と一本鎖二量体

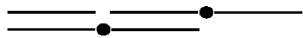


とをアニーリングさせる工程であって、それにより

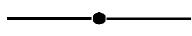


を形成する、工程；

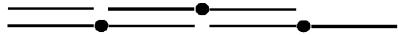
(iii)



と第2の一本鎖二量体

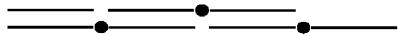


とをアニーリングさせる工程であって、それにより



を形成する、工程；ならびに

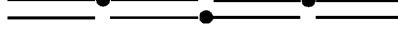
(iv)



と第4の一本鎖オリゴヌクレオチド



とをアニーリングさせる工程であって、それにより



を形成する、工程。

【0199】

本発明による他の化合物および組成物のように、二量体化合物および中間体は、実施例中を含む、本明細書に記載される特徴のいずれか1つまたは複数を含むことができる。例えば、化合物は、上記の核酸（修飾を伴うかもしくは伴わない）、ターゲティングリガンド、および/もしくはリンカーのいずれか1つもしくは複数、または、概要もしくは実施例において示される特定の構造もしくは化学のいずれかを含むことができる。

【0200】

10

20

30

40

50

実施例7は、上記の合成において有用である、種々のオリゴヌクレオチド前駆体を調製するための例示的な方法論を提供する。実施例8は、上記の合成においてまた有用である、種々のオリゴヌクレオチド多量体を調製するための例示的な方法論を提供する。

【0201】

種々の態様において、R1、R2、および二官能性連結部分 は、本明細書に記載され、示されるような共有結合性リンカー を形成することができる。例えば、種々の態様において、R1およびR2は、各々独立して、反応部分、例えば、求電子試薬または求核試薬を含むことができる。1つの態様において、R1およびR2は、各々独立して、チオール、マレイミド、ビニルスルホン、ピリジルジスルフィド、ヨードアセトアミド、アクリラート、アジド、アルキン、アミン、およびカルボキシル基からなる群より選択されることがある。種々の態様において、二官能性連結部分 は、上記の工程(i)および(ii)にしたがつて逐次的に反応させることができる2種類の反応部分、例えば、R1およびR2中の求電子試薬/求核試薬と反応させることができる第2の求電子試薬/求核試薬を含む。二官能性連結部分 の例は、DTME、BM(PEG)2、BM(PEG)3、BMOE、BMH、またはBMBを含むが、これらに限定されない。

【0202】

2種類以上の共有結合性リンカー を含む種々の態様において（例えば、構造7～16中）、リンカーはすべて同じである。あるいは、化合物または組成物は、2種類以上の異なる共有結合性リンカー を含むことができる。

【0203】

種々の態様において、各々の

は、独立して2種類のセンスオリゴヌクレオチドまたは2種類のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含んでもよい。例えば、siRNAの場合、

は、2種類の活性鎖または2種類のパッセンジャー鎖を含んでもよい。

【0204】

種々の態様において、各々の

は、独立して1種類のセンスオリゴヌクレオチドおよび1種類のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含んでもよい。例えば、siRNAの場合、

は、1種類の活性鎖および1種類のパッセンジャー鎖を含んでもよい。

【0205】

種々の態様において、化合物または組成物は、実質的に同一の二本鎖オリゴヌクレオチドのホモ多量体を含む。実質的に同一の二本鎖オリゴヌクレオチドは、インビオで同じ分子標的をターゲティングするsiRNAを各々含むことができる。

【0206】

種々の態様において、化合物または組成物は、2種類以上の実質的に異なる二本鎖オリゴヌクレオチドのヘテロ多量体を含む。実質的に異なる二本鎖オリゴヌクレオチドは、異なる遺伝子をターゲティングするsiRNAを各々含むことができる。

【0207】

種々の態様において、化合物は、n = 0である、以下の構造9を含む。

(構造9)

10

20

30

40

50

化合物は、ターゲティングリガンドをさらに含むことができる。化合物は、インビポで異なる分子標的をターゲティングするsiRNAを各々含む、2種類または3種類の実質的に異なる二本鎖オリゴヌクレオチド

をさらに含むことができる。化合物は、ターゲティングリガンド、第VII因子をターゲティングする第1のsiRNAガイド鎖およびガイド鎖にハイブリダイズした第1のパッセンジャー鎖を含む、1種類の

10
、アポリポタンパク質Bをターゲティングする第2のsiRNAガイド鎖および第2のガイド鎖にハイブリダイズした第2のパッセンジャー鎖を含む、1種類の

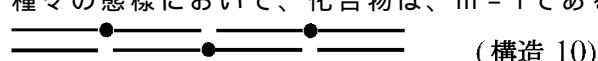
、ならびに、TTRをターゲティングする第3のsiRNAガイド鎖および第3のガイド鎖にハイブリダイズした第3のパッセンジャー鎖を含む、1種類の

をさらに含むことができる。ターゲティングリガンドは、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)を含むことができる。

20

【0208】
三量体の例は、実施例17、18、および20において提供される。

【0209】
種々の態様において、化合物は、 $m = 1$ である、以下の構造10を含む。



化合物は、ターゲティングリガンドをさらに含むことができる。化合物は、インビポで異なる分子標的をターゲティングするsiRNAを各々含む、2種類、3種類、または4種類の実質的に異なる二本鎖オリゴヌクレオチド

30

をさらに含むことができる。化合物は、ターゲティングリガンド、第VII因子をターゲティングする第1のsiRNAガイド鎖およびガイド鎖にハイブリダイズした第1のパッセンジャー鎖を含む、1種類の

、アポリポタンパク質Bをターゲティングする第2のsiRNAガイド鎖および第2のガイド鎖にハイブリダイズした第2のパッセンジャー鎖を含む、1種類の

40

、ならびに、TTRをターゲティングする第3のsiRNAガイド鎖および第3のガイド鎖にハイブリダイズした第3のパッセンジャー鎖を含む、1種類の

をさらに含むことができる。ターゲティングリガンドは、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)を含むことができる。

【0210】
四量体の例は、実施例21において提供される。

【0211】

50

種々の態様において、各々の二本鎖オリゴヌクレオチド（例えば構造4中の、例えば、

)は、第VII因子をターゲティングするsiRNAガイド鎖およびガイド鎖にハイブリダイズしたパッセンジャー鎖を含む。

【0212】

種々の態様において（例えば、構造4中）、化合物は、ターゲティングリガンドをさらに含み、各々の二本鎖オリゴヌクレオチド（例えば、

)は、siRNAガイド鎖およびガイド鎖にハイブリダイズしたパッセンジャー鎖を含み、かつ化合物は、少なくとも75、80、85、90、95、96、97、98、99、または100%純粋である。

【0213】

種々の態様において、少なくとも1種類の二本鎖オリゴヌクレオチド（例えば構造6中の、例えば、

)は、第VII因子をターゲティングする第1のsiRNAガイド鎖およびガイド鎖にハイブリダイズした第1のパッセンジャー鎖を含み、かつ、少なくとも1種類の二本鎖オリゴヌクレオチド（例えば構造6中の、例えば、



)は、アポリポタンパク質Bをターゲティングする第2のsiRNAガイド鎖および第2のガイド鎖にハイブリダイズした第2のパッセンジャー鎖を含む。

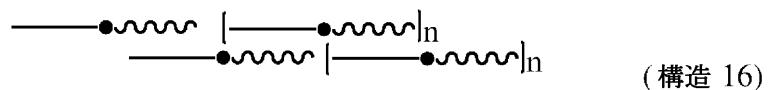
【0214】

センス-アンチセンス多量体化合物

種々の局面において、本発明は、センス-アンチセンスマルチコンジュゲートオリゴヌクレオチド、およびそれらの合成のための方法を提供する。

【0215】

1つの局面において、本発明は、多数の分子を含む組成物を提供し、各々の分子は構造16を有する：



構造中、

nは、1以上の整数であり；

各々の

は、一本鎖オリゴヌクレオチドであり；

各々の



は、

とハイブリダイズする一本鎖オリゴヌクレオチドであり；



10

20

30

40

50

は、二本鎖オリゴヌクレオチドであり；かつ

各々の は、隣接する一本鎖オリゴヌクレオチドの一本鎖を連結する共有結合性リンカーである。

【 0 2 1 6 】

同様に、本発明は、以下の工程を含む、各々の分子が構造16を有する、多数の分子を含む組成物を合成するための方法を提供する：

(i) 第1の一本鎖オリゴヌクレオチド

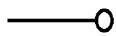


を二官能性連結部分 と反応させる工程であって、構造中、R1は、一置換産物



を生じる条件下で と反応することができる化学基である、工程；

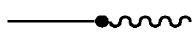
(ii)



を第2の一本鎖オリゴヌクレオチド

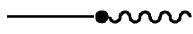


と反応させる工程であって、構造中、R2は、 と反応することができる化学基であり、それにより



を形成する、工程；および

(iii) 多数の



をアニーリングさせる工程であって、それにより、各々の分子が構造16を有する、多数の分子を含む組成物を形成する、工程。

【 0 2 1 7 】

本発明による他の化合物および組成物のように、構造16の分子は、実施例中を含む、本明細書に記載される特徴のいずれか1つまたは複数を含むことができる。例えば、化合物は、上記の核酸（修飾を伴うかもしくは伴わない）、ターゲティングリガンド、および/もしくはリンカーのいずれか1つもしくは複数、または、概要もしくは実施例において示される特定の構造もしくは化学のいずれかを含むことができる。

【 0 2 1 8 】

例えば、種々の態様において、各々の



は、15～30塩基対の長さを有し；各々の



は、siRNAであり；かつ/または、nは、1～100の整数である。構造16の具体例は、siRNAとして示されるが、構造は、必ずしもsiRNAに限定されない。

【 0 2 1 9 】

種々の態様において、R1、R2、および二官能性連結部分 は、本明細書に記載され、示されるような共有結合性リンカー を形成することができる。例えば、種々の態様において、R1およびR2は、各々独立して、反応部分、例えば、求電子試薬または求核試薬を含むことができる。1つの態様において、R1およびR2は、各々独立して、チオール、マレイミド、ビニルスルホン、ピリジルジスルフィド、ヨードアセトアミド、アクリラート、ア

10

20

30

40

50

ジド、アルキン、アミン、およびカルボキシル基からなる群より選択されることができる。種々の態様において、二官能性連結部分は、上記の工程(i)および(ii)にしたがつて逐次的に反応させることができる2種類の反応部分、例えば、R1およびR2中の求電子試薬/求核試薬と反応させることができる第2の求電子試薬/求核試薬を含む。二官能性連結部分の例は、DTME、BM(PEG)2、BM(PEG)3、BMOE、BMH、またはBMBを含むが、これらに限定されない。

【0220】

1つの態様において、各々の二本鎖オリゴヌクレオチドは、本質的に同じ配列を有する。他の態様において、二本鎖オリゴヌクレオチドは変動してもよい。例えば、各々の

10

は、同じ標的を有するsiRNA活性鎖であることができ、かつ各々の


は、

に少なくとも約80、85、90、または95%相補的であるsiRNAパッセンジャー鎖であるこ
とができる（例えば、

20

の配列は、それが

とハイブリダイズする限り、変動することができる）。

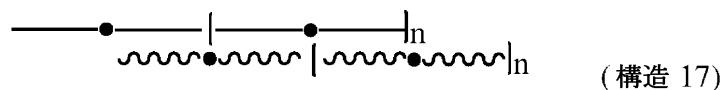
【0221】

多量体化合物のためのアニーリング条件

種々の局面において、本発明は、マルチコンジュゲートオリゴヌクレオチドを合成するための方法を提供する。

【0222】

1つの局面において、本発明は、構造17を含む多数の分子を含む組成物を合成するための方法を提供し、



30

構造中、nは、1以上の整数であり；各々の

は、一本鎖オリゴヌクレオチドであり；各々の


40

は、

とハイブリダイズする一本鎖オリゴヌクレオチドであり；


は、二本鎖オリゴヌクレオチドであり；かつ、各々の は、隣接する一本鎖オリゴヌクレ
 オチドの一本鎖を連結して

50

—●— および

を形成する共有結合性リンカーであり、前記方法は以下の工程を含む：
多数の

—●— および

を、

(i)

—●— および

10

について約200～300 μMの総オリゴヌクレオチド濃度、

(ii) 約0.1～0.3×リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、および

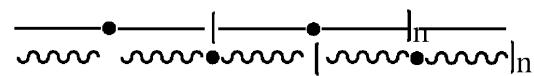
(iii) 約1.5～2.5時間にわたる、約70～80℃から約20～30℃への温度でアニーリングさせる工程。

【0223】

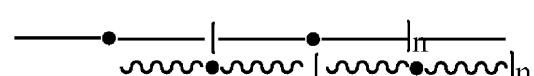
種々の態様において、方法は、多数の

— および/または

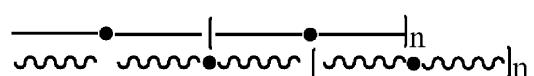
をアニーリングさせる工程であって、それにより



(構造 18)



(構造 19), および/または



(構造 20)

20

を含む多数の分子を形成する、工程をさらに含む。

【0224】

種々の態様において、方法は、

を多数の

—●— および

とアニーリングさせる工程をさらに含む。

【0225】

種々の態様において、

— 对

30

のモル比は、約5:100、10:100、20:100、30:100、40:100、または50:100である。

【0226】

種々の態様において、方法は、

を多数の

—●— および

とアニーリングさせる工程をさらに含む。

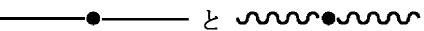
40

【 0 2 2 7 】

種々の態様において、


のモル比は、約5:100、10:100、20:100、30:100、40:100、または50:100である。

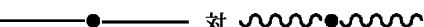
【 0 2 2 8 】

種々の態様において、


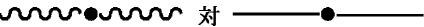
のモル比は、約1:1である。

10

【 0 2 2 9 】

種々の態様において、


のモル比または



のモル比は、約100:90、100:80、100:75、100:70、または100:60である。

【 0 2 3 0 】

種々の態様において、各々の


20

は、15～30塩基対の長さを有する。

【 0 2 3 1 】

種々の態様において、各々の


は、siRNAである。

【 0 2 3 2 】

種々の態様において、各々の


30

は、第VII因子をターゲティングするsiRNAガイド鎖および該ガイド鎖にハイブリダイズしたパッセンジャー鎖を含む。

【 0 2 3 3 】

種々の態様において、nは、1～100の整数である。

【 0 2 3 4 】

種々の態様において、　は、切断可能なまたは切断不可能なリンカーである。

【 0 2 3 5 】

種々の態様において、方法は、構造17、18、19、および/または20を含む多数の分子をナノ粒子中に製剤化する工程をさらに含む。

40

【 0 2 3 6 】

本発明による他の化合物および組成物のように、多量体化合物および中間体は、本明細書に記載される特徴（方法工程を含み、かつ実施例中を含む）のいずれか1つまたは複数を含むことができる。例えば、化合物は、上記の核酸（修飾を伴うかもしくは伴わない）、ターゲティングリガンド、および/もしくはリンカーのいずれか1つもしくは複数、または、概要もしくは実施例において示される特定の構造もしくは化学のいずれかを含むことができる。実施例22～24は、多量体オリゴヌクレオチドの例示的な態様を例証する。

【 0 2 3 7 】

薬学的組成物

50

種々の局面において、本発明は、上記の化合物または組成物のいずれか1つまたは複数を含む薬学的組成物を提供する。本明細書において使用される際、薬学的組成物は、疾患を予防、診断、緩和、処置、または治癒するために使用することができる、食物以外の物体の組成物を含む。同様に、本発明による種々の化合物または組成物は、薬剤としての使用のため、および/または薬剤の製造における使用のための態様を含むように理解されるべきである。

【 0 2 3 8 】

薬学的組成物は、本発明による化合物または組成物、および薬学的に許容される賦形剤を含むことができる。本明細書において使用される際、賦形剤は、活性成分と並んで製剤化される天然または合成の物質であることができる。賦形剤は、長期安定化、体積の増大（例えば、增量剤、充填剤、または希釈剤）の目的で、または、薬物吸収の促進、粘性の低減、もしくは溶解性の增强など、最終剤形において活性成分に対して治療上の增强を付与するために含めることができる。賦形剤はまた、例えば、活性成分の取り扱いを助長するため、および/またはインビトロ安定性を助長するために（例えば、変性または凝集を阻止することにより）、製造および分布において有用であることもできる。当業者により理解されるであろうように、適切な賦形剤の選択は、投与の経路、剤形、および活性成分を含む、種々の要因に依存することができる。

10

【 0 2 3 9 】

オリゴヌクレオチドは、局所的にまたは全身的に送達することができ、本発明の薬学的組成物は、それに応じて変動することができる。例えば、投与は、いずれかの特定の送達システムに必ずしも限定されず、非限定的に、非経口（皮下、静脈内、髄内、関節内、筋肉内、または腹腔内注射を含む）、直腸、局所、経皮、または経口を含んでもよい。個体への投与は、単一用量においてもしくは反復投与において、ならびに様々な生理学的に許容される塩形態のいずれかにおいて、ならびに/または、薬学的組成物の一部としての許容される薬学的担体および/もしくは添加物と共に用いられてもよい。生理学的に許容される製剤、ならびに標準的な薬学的製剤の技法、投薬量、および賦形剤は、当業者に周知である（例えば、Physicians' Desk Reference (PDR(登録商標)) 2005, 59th ed., Medical Economics Company, 2004；およびRemington: The Science and Practice of Pharmacy, eds. Gennaro et al. 21th ed., Lippincott, Williams & Wilkins, 2005 を参照されたい）。

20

【 0 2 4 0 】

薬学的組成物は、本発明による化合物または組成物の有効量を含むことができる。本明細書において使用される際、有効量とは、特定の述べられた目的を達成することを結果としてもたらす濃度もしくは量であることができ、またはより多い量は、例えば、プラセボとの比較において変化を引き起こすのに妥当な量を意味する。有効量が治療的有効量である場合、それは、例えば、治療的使用に妥当な量、および、疾患を予防、診断、緩和、処置、または治癒するのに十分な量であることができる。有効量は、当技術分野において公知である方法によって決定することができる。有効量は、例えば、ヒト臨床治験によって経験的に決定することができる。有効量はまた、当技術分野において公知である換算係数を用いて、1つの動物（例えば、マウス、ラット、サル、ブタ、イヌ）から別の動物（例えば、ヒト）における使用のために外挿することもできる。例えば、Freireich et al., Cancer Chemother Reports 50(4):219-244 (1966)を参照されたい。

30

【 0 2 4 1 】

送達ビヒクルおよびターゲティングリガンド

種々の局面において、本発明は、送達ビヒクル中に製剤化された、上記の化合物または組成物のいずれか1つまたは複数を提供する。例えば、送達ビヒクルは、脂質ナノ粒子（LN P）、エキソソーム、微小胞、またはウイルスベクターであることができる。同様に、種々の局面において、本発明は、上記の、かつターゲティングリガンドをさらに含む、化合物または組成物のいずれか1つまたは複数を提供する。例えば、ターゲティングリガンドは、N-アセチルガラクトサミン (GalNAc)、コレステロール、トコフェロール、フォレ

40

50

ート、2-[3-(1,3-ジカルボキシプロピル)-ウレイド]ペンタン二酸(DUPA)、またはアニスアミドを含む。ターゲティングリガンドは、例えば、その3'または5'末端を通して、核酸に(例えば、直接的に)結合させることができる。本発明での使用に適合しうる追加の例は、下記で議論される。

【0242】

当業者により理解されるであろうように、生物学的標的または作用の機構にかかわらず、治療用オリゴヌクレオチドは、生物体(例えば、治療の必要がある、ヒトなどの動物)における標的細胞に接近するために、一連の生理学的ハードルを克服しなければならない。例えば、治療用オリゴヌクレオチドは、一般に、すべてが望ましくない免疫応答を誘発することなく、血流におけるクリアランスを回避し、標的細胞タイプに入り、次いで細胞質に入らなければならない。このプロセスは、一般に、非効率的と考えられており、例えば、インビボでエンドソームに入るsiRNAの95%以上が、リソソームにおいて分解されるか、またはいずれの遺伝子サイレンシングにも影響を及ぼすことなく細胞から外へ押し出される可能性がある。

10

【0243】

これらの障害を克服するために、科学者は、数多くの薬物送達ビヒクルを設計してきた。これらのビヒクルは、低分子薬物、タンパク質薬物、および他の治療用分子に加えて、治療用RNAを送達するために使用されている。薬物送達ビヒクルは、糖、脂質、脂質様材料、タンパク質、ポリマー、ペプチド、金属、ヒドロゲル、コンジュゲート、およびペプチドのような多様な材料から作製されている。多くの薬物送達ビヒクルは、これらの群の組み合わせから局面を組み入れ、例えば、いくつかの薬物送達ビヒクルは、糖と脂質とを組み合わせることができる。いくつかの他の例において、薬物を、細胞を模倣することになる「細胞様」材料中に直接隠すことができ、他の場合には、薬物を、細胞自体の中に、または細胞自体の上に置くことができる。薬物送達ビヒクルは、pH変化、生体分子濃度、磁界、および熱などの刺激に応答して薬物を放出するように設計することができる。

20

【0244】

多くの研究が、siRNAなどのオリゴヌクレオチドを肝臓に送達することに焦点を合わせている。インビボでの肝細胞への有効なsiRNA送達に必要とされる用量は、過去10年間に10,000倍より多く減少しており、2006年に報告された送達ビヒクルは、標的タンパク質産生のために10 mg/kg siRNAよりも多くを必要とする場合があったが、標的タンパク質産生のための新たな送達ビヒクルは、現在、0.001 mg/kg siRNAの全身注射に低減することができる。オリゴヌクレオチド送達効率の増大は、少なくとも部分的に、送達ビヒクルの開発に帰することができる。

30

【0245】

別の重要な進歩は、ヘルパー成分が送達に影響を及ぼす様式の理解の増大である。ヘルパー成分は、根本の薬物送達システムに添加される化学構造を含むことができる。しばしば、ヘルパー成分は、粒子の安定性または特定の器官への送達を改善することができる。例えば、ナノ粒子は、脂質で作製することができるが、これらの脂質ナノ粒子により媒介される送達は、親水性ポリマーおよび/または疎水性分子の存在により影響を受ける場合がある。ナノ粒子送達に影響を及ぼす1つの重要な親水性ポリマーは、ポリ(エチレングリコール)である。他の親水性ポリマーは、非イオン性界面活性剤を含む。ナノ粒子送達に影響を及ぼす疎水性分子は、コレステロール、1-2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC)、1-2-ジ-0-オクタデセニル-3-トリメチルアンモニウムプロパン(DOTMA)、1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパン(DOTAP)、および他のものを含む。

40

【0246】

薬物送達システムはまた、ターゲティングリガンドまたはコンジュゲートシステムを用いて設計されている。例えば、オリゴヌクレオチドは、肝細胞および/または他の細胞タイプ中への送達を促進するために、コレステロール、糖、ペプチド、および他の核酸にコンジュゲートすることができる。

50

【 0 2 4 7 】

当業者は、公知の送達ビヒクルおよびターゲティングリガンドを、一般に、本発明による使用に適合できることを認識するであろう。送達ビヒクルおよびターゲティングリガンド、ならびにそれらの使用の例は、以下において見出すことができる：Sahay, G., et al. Efficiency of siRNA delivery by lipid nanoparticles is limited by endocytic recycling. *Nat Biotechnol*, 31: 653-658 (2013) ; Wittrup, A., et al. Visualizing lipid-formulated siRNA release from endosomes and target gene knockdown. *Nat Biotechnol* (2015) ; Whitehead, K.A., Langer, R. & Anderson, D.G. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nature reviews. Drug Discovery*, 8: 129-138 (2009) ; Kanasty, R., Dorkin, J.R., Vegas, A. & Anderson, D. Delivery materials for siRNA therapeutics. *Nature Materials*, 12: 967-977 (2013) ; Tibbitt, M.W., Dahlman, J.E. & Langer, R. Emerging Frontiers in Drug Delivery. *J Am Chem Soc*, 138: 704-717 (2016) ; Akinc, A., et al. Targeted delivery of RNAi therapeutics with endogenous and exogenous ligand-based mechanisms. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 18, 13 57-1364 (2010) ; Nair, J.K., et al. Multivalent N-acetylgalactosamine-conjugated siRNA localizes in hepatocytes and elicits robust RNAi-mediated gene silencing. *J Am Chem Soc*, 136: 16958-16961 (2014) ; Ostergaard, M.E., et al. Efficient Synthesis and Biological Evaluation of 5'-GalNAc Conjugated Antisense Oligonucleotides. *Bioconjugate chemistry* (2015) ; Sehgal, A., et al. An RNAi therapeutic targeting antithrombin to rebalance the coagulation system and promote hemostasis in hemophilia. *Nature Medicine*, 21: 492-497 (2015) ; Semple, S.C., et al. Rational design of cationic lipids for siRNA delivery. *Nat Biotechnol*, 28: 172-176 (2010) ; Maier, M.A., et al. Biodegradable lipids enabling rapidly eliminated lipid nanoparticles for systemic delivery of RNAi therapeutics. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 21: 1570-1578 (2013) ; Love, K.T., et al. Lipid-like materials for low-dose, in vivo gene silencing. *Proc Nat Acad USA*, 107: 1864-1869 (2010) ; Akinc, A., et al. A combinatorial library of lipid-like materials for delivery of RNAi therapeutics. *Nat Biotechnol*, 26: 561-569 (2008) ; Eguchi, A., et al. Efficient siRNA delivery into primary cells by a peptide transduction domain-dsRNA binding domain fusion protein. *Nat Biotechnol*, 27: 567-571 (2009) ; Zuckerman, J.E., et al. Correlating animal and human phase Ia/Ib clinical data with CALAA-01, a targeted, polymer-based nanoparticle containing siRNA. *Proc Nat Acad USA*, 111: 11449-11454 (2014) ; Zuckerman, J.E. & Davis, M.E. Clinical experiences with systemically administered siRNA-based therapeutics in cancer. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 14: 843-856 (2015) ; Hao, J., et al. Rapid Synthesis of a Lipocationic Polyester Library via Ring-Opening Polymerization of Functional Valerolactones for Efficacious siRNA Delivery. *J Am Chem Soc*, 29: 9206-9209 (2015) ; Siegwart, D.J., et al. Combinatorial synthesis of chemically diverse core-shell nanoparticles for intracellular delivery. *Proc Nat Acad USA*, 108: 12996-13001 (2011) ; Dahlman, J.E., et al. In vivo endothelial siRNA delivery using polymeric nanoparticles with low molecular weight. *Nat Nano* 9, 648-655 (2014) ; Soppimath, K.S., Aminabhavi, T.M., Kulkarni, A.R. & Rudzinski, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society* 70, 1-20 (2001) ; Kim, H.J., et al. Precise engineering of siRNA delivery vehicles to tumors using polyion complexes and gold nanoparticles. *ACS Nano*, 8: 8979-8991 (2014) ; Krebs, M.D., Jeon, O. & Alberg, E. Localized and sustained delivery of silencing RNA from macroscopic biopolymer hydrogels. *J Am Chem*

Soc 131, 9204-9206 (2009) ; Zimmermann, T.S., et al. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature*, 441: 111-114 (2006) ; Dong, Y., et al. Lipopeptide nanoparticles for potent and selective siRNA delivery in rodents and nonhuman primates. *Proc Nat Acad USA*, 111: 3955-3960 (2014) ; Zhang, Y., et al. Lipid-modified aminoglycoside derivatives for in vivo siRNA delivery. *Advanced Materials*, 25: 4641-4645 (2013) ; Molinaro, R., et al. Biomimetic proteolipid vesicles for targeting inflamed tissues. *Nat Mater* (2016) ; Hu, C. M., et al. Nanoparticle biointerfacing by platelet membrane cloaking. *Nature*, 526: 118-121 (2015) ; Cheng, R., Meng, F., Deng, C., Klok, H.-A. & Zhong, Z. Dual and multi-stimuli responsive polymeric nanoparticles for programmed site-specific drug delivery. *Biomaterials*, 34: 3647-3657 (2013) ; Qiu, Y. & Park, K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, Supplement, 49-60 (2012) ; Mui, B.L., et al. Influence of Polyethylene Glycol Lipid Desorption Rates on Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of siRNA Lipid Nanoparticles. *Mol Ther Nucleic Acids* 2, e139 (2013) ; Draz, M.S., et al. Nanoparticle-Mediated Systemic Delivery of siRNA for Treatment of Cancers and Viral Infections. *Theranostics*, 4: 872-892 (2014) ; Otsuka, H., Nagasaki, Y. & Kataoka, K. PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55: 403-419 (2003) ; Kauffman, K.J., et al. Optimization of Lipid Nanoparticle Formulations for mRNA Delivery in vivo with Fractional Factorial and Definitive Screening Designs. *Nano Letters*, 15: 7300-7306 (2015) ; Zhang, S., Zhao, B., Jiang, H., Wang, B. & Ma, B. Cationic lipids and polymers mediated vectors for delivery of siRNA. *Journal of Controlled Release* 123, 1-10 (2007) ; Illum, L. & Davis, S.S. The organ uptake of intravenously administered colloidal particles can be altered using a non-ionic surfactant (Poloxamer 338). *FEBS Letters*, 167: 79-82 (1984) ; Felgner, P.L., et al. Improved Cationic Lipid Formulations for In vivo Gene Therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 772: 126-139 (1995) ; Meade, B.R. & Dowdy, S.F. Exogenous siRNA delivery using peptide transduction domains/cell penetrating peptides. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59: 134-140 (2007) ; Endoh, T. & Ohtsuki, T. Cellular siRNA delivery using cell-penetrating peptides modified for endosomal escape. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61: 704-709 (2009) ; およびLee, H., et al. Molecularly self-assembled nucleic acid nanoparticles for targeted in vivo siRNA delivery. *Nat Nano*, 7: 389-393 (2012).

【 0 2 4 8 】

種々の態様において、本発明の化合物および組成物は、例えば、生物学的に活性を有する部分を含む、他の化学的または生物学的部分にコンジュゲートすることができるか、またはそれらと共に送達することができる。生物学的に活性を有する部分は、生物学的效果、好ましくは測定可能な生物学的效果を有する任意の分子または作用物質である。化学的または生物学的部分は、例えば、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、核酸（例えば、DNA、すべてのタイプのRNA、RNAおよびDNAアブタマー、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ならびにアンチセンスmiRNA阻害物質を含む）、ターゲティングリガンド、炭水化物、多糖、脂質、有機化合物、および無機化学化合物を含む。

【 0 2 4 9 】

本明細書において使用される際、ターゲティングリガンドという用語は、例えば、ナノ粒子または送達コンジュゲートの細胞受容体付着を可能にすることによって、特異的な身体組織または細胞タイプなどの特異的な標的に、ナノ粒子または送達コンジュゲートのペイロードを送達する目的で、ナノ粒子の表面上に接近可能のように、または送達コンジュゲートの一部として作製されうる部分を含むことができる。適しているターゲティングリガ

10

20

30

40

50

ンドの例は、細胞特異的なペプチドまたはタンパク質（例えば、トランスフェリンおよびモノクローナル抗体）、アプタマー、細胞成長因子、ビタミン（例えば、葉酸）、単糖（例えば、ガラクトースおよびマンノース）、多糖、アルギニン-グリシン-アスパラギン酸（RGD）、ならびに、N-アセチルガラクトサミン（GalNac）に由来するアシアロ糖タンパク質受容体リガンドを含む。リガンドは、当技術分野において公知である様々な技法を用いて、例えば、ジスルフィド結合、アミド結合、もしくはエステル結合などの共有結合性結合を介して、または、ビオチン-ストレプトアビシン、もしくは金属-リガンド複合体などの非共有結合性結合を介して、前述の本発明の化合物中に組み入れられてもよい。本発明の範囲内の追加の生物学的に活性を有する部分は、例えば、オリゴヌクレオチド、ポリペプチド、ならびに、CRISPR/Casシステムに関するタンパク質、Tale、Talen、およびジングルフィンガーなどの物質を含む、公知の遺伝子編集物質のいずれかである。

【0250】

種々の態様において、本発明の化合物および組成物を、細胞内送達用のナノ粒子を形成するように、担体材料中にカプセル化することができる。公知の担体材料は、カチオン性ポリマー、脂質もしくはペプチド、またはそれらの化学的類似体を含む。Jeong et al., BIO CONJUGATE CHEM., Vol. 20, No. 1, pp. 5-14 (2009)。

カチオン性脂質の例は、ジオレイルホスファチジルエタノールアミン、コレステロールジオレイルホスファチジルコリン、N-[1-(2,3-ジオレオイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTMA)、1,2-ジオレオイルオキシ-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン(DOTAP)、1,2-ジオレオイル-3-(4'-トリメチル-アンモニオ)ブタノイル-sn-グリセロール(DOTB)、1,2-ジアシル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン(DAP)、1,2-ジアシル-3-トリメチルアンモニウム-プロパン(TAP)、1,2-ジアシル-sn-グリセロール-3-エチルホスホコリン、3-[N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル]コレステロール(DC-コレステロール)、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド(DDAB)、およびそれらのコポリマーを含む。カチオン性ポリマーの例は、ポリエチレンイミン、ポリアミン、ポリビニルアミン、ポリ(アルキルアミンヒドロクロリド)、ポリアミドアミンデンドリマー、ジエチルアミノエチル-デキストラン、ポリビニルピロリドン、キチン、キトサン、およびポリ(2-ジメチルアミノ)エチルメタクリラートを含む。1つの態様において、担体は、1種類または複数種類のアシル化アミンを含有し、それらの特性は、他の公知の担体材料と比較した際にインビボでの使用により適している可能性がある。

【0251】

1つの態様において、担体は、カチオン性ペプチド、例えば、KALA(カチオン性融合性ペプチド)、ポリリジン、ポリグルタミン酸、またはプロタミンである。1つの態様において、担体は、カチオン性脂質、例えば、ジオレイルホスファチジルエタノールアミンまたはコレステロールジオレイルホスファチジルコリンである。1つの態様において、担体は、カチオン性ポリマー、例えば、ポリエチレンイミン、ポリアミン、またはポリビニルアミンである。

【0252】

種々の態様において、本発明の化合物および組成物を、エキソソーム中にカプセル化することができる。エキソソームは、血液、尿、および細胞培養物の培養培地を含む生物学的流体中に存在する、30~100 nmの間の直径を有する細胞由来の小胞である。合成エキソソームおよびエキソソーム模倣物を含むエキソソームは、当技術分野における技能にしたがって薬物送達における使用に適合させることができる。例えば、"A comprehensive overview of exosomes as drug delivery vehicles - endogenous nanocarriers for targeted cancer therapy" Biochim Biophys Acta. 1846(1):75-87 (2014); "Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges" Acta Pharmaceutica Sinica B, 8 March 2016オンラインで入手可能(印刷中); および"Exosome mimetics: a novel class of drug delivery systems" International Journal of Nanomedicine, 7: 1525-1541 (2012)を参照されたい。

10

20

30

40

50

【 0 2 5 3 】

種々の態様において、本発明の化合物および組成物を、微小胞中にカプセル化することができる。微小胞（時には、循環微小胞、またはマイクロパーティクルと呼ばれる）は、ほぼすべての細胞タイプから脱粒した100 nm ~ 1000 nmの範囲の形質膜の断片であり、エキソソームとして公知である、より小さな細胞内で生成された細胞外小胞とは別個である。微小胞は、細胞間コミュニケーションにおいて役割を果たし、細胞間でmRNA、miRNA、およびタンパク質を輸送することができる。合成微小胞および微小胞模倣物を含む微小胞は、当技術分野における技能にしたがって薬物送達における使用に適合させることができる。例えば、"Microvesicle- and exosome-mediated drug delivery enhances the cytotoxicity of Paclitaxel in autologous prostate cancer cells" Journal of Controlled Release, 220: 727-737 (2015) ; "Therapeutic Uses of Exosomes" J Circ Biomark, 1:0 (2013)を参照されたい。

10

【 0 2 5 4 】

種々の態様において、本発明の化合物および組成物を、ウイルスベクターを用いて送達することができる。ウイルスベクターは、細胞中に遺伝物質を送達するために分子生物学者により通例使用されるツールである。このプロセスは、生きている生物体内で（インビオで）または細胞培養において（インビトロで）行うことができる。ウイルスベクターは、当技術分野における技能にしたがって薬物送達における使用に適合させることができる。例えば、"Viruses as nanomaterials for drug delivery" Methods Mol Biol, 26: 207-21 (2011) ; "Viral and nonviral delivery systems for gene delivery" Adv Biomed Res, 1:27 (2012) ; および"Biological Gene Delivery Vehicles: Beyond Viral Vectors" Molecular Therapy, 17(5): 767-777 (2009)を参照されたい。

20

【 0 2 5 5 】

LNP製剤化および特徴決定のための一般的手順は、LNP製剤化ならびに他のインビトロおよびインビオの試験の実施例であるとして、下記の実施例において提供される。他の方法が、当技術分野において公知であり、当業者が本発明での使用に適合させることができる。

【 0 2 5 6 】**遺伝子発現を低減させる処置の方法**

種々の局面において、本発明は、マルチコンジュゲートオリゴヌクレオチドを使用するため、例えば、医学的処置、研究のため、または、動物および植物において新たなもしくは変更された表現型を生じるための方法を提供する。

30

【 0 2 5 7 】

1つの局面において、本発明は、本発明による化合物または組成物の有効量を、その必要がある対象に投与する工程を含む、対象を処置するための方法を提供する。そのような治療的態様において、オリゴヌクレオチドは、治療用オリゴヌクレオチド、例えば、siRNAまたはmiRNAであろう。

【 0 2 5 8 】

このおよび他の態様において、本発明の組成物および化合物を、薬学的組成物の形態において、送達ビヒクリにおいて、またはターゲティングリガンドにカップリングさせて投与することができる。

40

【 0 2 5 9 】

1つの局面において、本発明は、本発明による化合物または組成物の有効量を、その必要がある対象に投与する工程を含む、遺伝子発現をサイレンシングまたは低減させるための方法を提供する。そのような治療的態様において、オリゴヌクレオチドは、遺伝子発現をサイレンシングまたは低減させるオリゴヌクレオチド、例えば、siRNAまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドであろう。

【 0 2 6 0 】

同様に、本発明は、2種類以上の遺伝子をターゲティングするオリゴヌクレオチドを含む、本発明による化合物または組成物の有効量を、その必要がある対象に投与する工程を含む、2種類以上の遺伝子の発現をサイレンシングまたは低減させるための方法を提供する

50

。化合物または組成物は、2種類、3種類、4種類、またはそれより多い遺伝子をターゲティングするオリゴヌクレオチドを含むことができる。

【0261】

1つの局面において、本発明は、ターゲティングリガンドを含む、本発明による化合物または組成物の有効量を、その必要がある対象に投与する工程を含む、ターゲティングリガンド結合イベントあたり2種類以上のオリゴヌクレオチドを細胞に送達するための方法を提供する。

【0262】

1つの局面において、本発明は、あらかじめ決定された化学量論比の2種類以上のオリゴヌクレオチドを含む、本発明による化合物または組成物の有効量を、その必要がある対象に投与する工程を含む、あらかじめ決定された化学量論比の2種類以上のオリゴヌクレオチドを細胞に送達するための方法を提供する。

10

【0263】

本明細書において使用される際、対象は、処置または投与に対する細胞または生物体対象を含む。対象は、動物、例えば、実験動物（マウス、サル）もしくは獣医学的患者、または、ヒトなどの霊長類のような哺乳動物であることができる。非限定的に、処置または投与の必要がある対象は、疾患（例えば、本発明の化合物および組成物を用いて処置される）を有する対象、または状態（例えば、本発明の化合物および組成物を用いて対処される、例えば、サイレンシングされるべき、または低減された発現を有する1種類または複数種類の遺伝子）を有する対象を含むことができる。

20

【0264】

遺伝子ノックダウンの測定および動物実験のための一般的手順は、他のインビトロおよびインビボの試験の実施例であるとして、下記の実施例において提供される。他の方法が、当技術分野において公知であり、当業者が本発明での使用に適合させることができる。

【0265】

以下の実施例は、例証となるものであり、制限となるものではない。技術の多くのバリエーションが、本開示の検討時に当業者に明らかになるであろう。そのため、技術の範囲は、実施例に関してではなく決定されるべきであるが、その代わりに、添付の特許請求の範囲に関して、等価物のそれらの完全な範囲と共に決定されるべきである。

30

【実施例】

【0266】

一般的手順：一本鎖オリゴヌクレオチド合成

オリゴリボヌクレオチドを、ホスホラミダイト化学を用いて、 $10 \mu\text{mol}$ スケールで ABI 394 および 3900 合成機 (Applied Biosystems) 上で、または $28 \mu\text{mol}$ スケールで Oligo pilot 10 合成機上でアセンブルした。固体支持体は、2'-デオキシチミジン (Glen Research, Sterling, Virginia, USA) をロードしたポリスチレン、または制御細孔ガラス (controlled pore glass) (CPG, 520、 $75 \mu\text{mol/g}$ のローディングを有し、Prime Synthesis, Aston, PA, USA から入手) であった。補助的な合成試薬である、DNA-、2'-O-メチルRNA-、および2'-デオキシ-2'-フルオロ-RNAホスホラミダイトを、SAFC ProLigo (Hamburg, Germany) から入手した。具体的には、2'-O-メチル-ウリジン (2'-OMe-U)、4-N-アセチル-2'-O-メチル-シチジン (2'-OMe-CAc)、6-N-ベンゾイル-2'-O-メチル-アデノシン (2'-OMe-Abz)、および2-N-イソブチリルグアノシン (2'-OMe-GiBu) の5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-3'-O-(2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピル)ホスホラミダイト単量体を用いて、オリゴマー配列を作った。2'-OMe RNA 基礎単位と同じ核酸塩基保護基を保有する、対応するホスホラミダイトを使用して、2'-フルオロ修飾を導入した。すべてのホスホラミダイト（アセトニトリル中、 70 mM ）についてのカップリング時間は、活性化物質として5-エチルチオ-1H-テトラゾール (ETT、アセトニトリル中、 0.5 M) を使用して3分であった。ホスホロチオアート連結を、 50 mM 3-((ジメチルアミノ-メチリデン)アミノ)-3H-1,2,4-ジチアゾール-3-チオン (DDTT、AM Chemicals, Oceanside, California, USA) をピリジンとアセトニトリルの1:1 (v/v) 混合物中で用いて導入

40

50

した。公開されている方法にしたがって (Wincott, F. et al: Synthesis, deprotection, analysis and purification of RNA and ribozymes. Nucleic Acids Res, 23: 2677-2684 (1995))、DMT基の除去を含む固相合成（「DMTオフ合成」）の完了時に、オリゴヌクレオチドを、固体支持体から切断し、水性メチルアミン（41%）と濃アンモニア水（32%）からなる1:1混合物を用いて3時間、25°Cで脱保護した。

【0267】

その後、粗オリゴマーを、Source Q15 (GE Healthcare) で充填されたカラムおよびAKTA Explorerシステム (GE Healthcare) を用いて陰イオン交換HPLCにより精製した。緩衝液Aは、20%水性アセトニトリル中、10 mM過塩素酸ナトリウム、20 mMトリス、1 mM EDTA、pH 7.4 (Fluka, Buchs, Switzerland) であり、緩衝液Bは、500 mM過塩素酸ナトリウムを有して緩衝液Aと同じであった。32カラム体積 (CV) 内の22%Bから42%Bへの勾配を使用した。280 nmでのUVトレースを記録した。適切な画分をプールし、3M NaOAc、pH = 5.2および70%エタノールで沈殿させた。沈殿物を、遠心分離により収集した。あるいは、Sephadex HiPrepカラム (GE Healthcare) を用い、製造業者の推奨にしたがって脱塩を行った。

【0268】

オリゴヌクレオチドを、水において再構成し、オリゴヌクレオチドの同一性を、エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) により確認した。純度を、分析用陰イオン交換HPLCにより評価した。

【0269】

一般的手順：脂質ナノ粒子製剤化

1,2-ジステアロイル-3-ホスファチジルコリン (DSPC) を、Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, USA) から購入した。-[3'-(1,2-ジミリストイル-3-プロパノキシ)-カルボキサミド-プロピル]-メトキシ-ポリオキシエチレン (PEG-c-DOMG) を、NOF (Bouwelven, Belgium) から入手した。コレステロールを、Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany) から購入した。

【0270】

独占所有権のあるアミノ脂質KL22およびKL52は、特許文献において開示されている (Constien et al. "Novel Lipids and Compositions for Intracellular Delivery of Biologically Active Compounds" US 2012/0295832 A1)。KL52およびKL22脂質、DSPC、コレステロール、およびPEG-c-DOMGのストック溶液を、エタノール中、50 mMの濃度で調製し、-20°Cで保存した。脂質を、種々のモル比（下記の個々の実施例を参照されたい）を産するように組み合わせ、エタノールで希釈して、25 mMの最終脂質濃度にした。H₂O中、10 mg/mLの濃度のsiRNAストック溶液を、50 mMクエン酸ナトリウム緩衝液、pH 3において希釈した。KL22およびKL52は、以下に続く実施例において、それぞれ、XL 7およびXL 10と時には呼ばれる。

【0271】

脂質ナノ粒子 (LNP) 製剤を、脂質溶液をsiRNA溶液と、7:1の総脂質対siRNA重量比で組み合わせることによって調製した。脂質エタノール性溶液を、水性siRNA溶液中に急速に注入して、33%エタノールを含有する懸濁液をもたらした。溶液は、シリンドリポンプ (Harvard Pump 33 Dual Syringe Pump Harvard Apparatus Holliston, MA) の手助けにより注入した。

【0272】

その後、エタノールを除去して、緩衝液交換を達成するために、製剤を、10 kDのMWCO (RC膜) を有するSlide-A-Lyzerカセット (Thermo Fisher Scientific Inc. Rockford, IL) を用いて初期産物の200倍の体積のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 、pH 7.4に対して2回透析した。最初の透析は、室温で3時間行い、次いで、製剤を、一晩4°Cで透析した。結果として生じたナノ粒子懸濁液を、0.2 μm滅菌フィルター (Sarstedt, Numbrecht, Germany) を通してガラスバイアル中に濾過し、圧着閉鎖具 (crimp closure) でシールした。

10

20

30

40

50

【 0 2 7 3 】**一般的手順：LNPの特徴決定**

製剤の粒子サイズおよびゼータ電位を、それぞれ、 $1 \times$ PBSおよび15 mM PBSにおいてZetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Worcestershire, UK) を用いて決定した。

【 0 2 7 4 】

リポソーム製剤中のsiRNA濃度を、紫外可視により測定した。簡潔に言うと、 $1 \times$ PBS中の希釈された製剤の100 μ Lを、メタノールとクロロホルムの4:1 (v/v) 混合物の900 μ Lに添加した。混合した後、溶液の吸光度スペクトルを、DU 800分光光度計 (Beckman Coulter, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA) 上で230 nm ~ 330 nmの間で記録した。リポソーム製剤中のsiRNA濃度を、製剤中で使用されたsiRNAの吸光係数、および、260 nmの波長での吸光度と330 nmの波長でのベースライン値との間の差に基づいて算出した。

10

【 0 2 7 5 】

ナノ粒子によるsiRNAのカプセル化を、Quant-iT (商標) RiboGreen (登録商標) RNA アッセイ (Invitrogen Corporation Carlsbad, CA) により評定した。簡潔に言うと、試料を、TE緩衝液 (10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、pH 7.5) においておよそ5 μ g/mLの濃度に希釈した。50 μ Lの希釈された試料を、ポリスチレン96ウェルプレートに移し、次いで、50 μ LのTE緩衝液または50 μ Lの2% Triton X-100溶液のいずれかを添加した。プレートを、37 °C の温度で15分間インキュベートした。RiboGreen試薬をTE緩衝液において1:100に希釈し、この溶液の100 μ Lを各ウェルに添加した。蛍光強度を、蛍光プレートリーダー (Wallac Victor 1420 Multilabel Counter; Perkin Elmer, Waltham, MA) を用いて、約480 nmの励起波長および約520 nmの発光波長で測定した。試薬プランクの蛍光値を、試料の各々の蛍光値から差し引き、無傷の試料 (Triton X-100の添加なし) の蛍光強度を、破壊された試料 (Triton X-100の添加により引き起こされた) の蛍光値により割ることによって、遊離siRNAのパーセンテージを決定した。

20

【 0 2 7 6 】**一般的手順：動物実験**

マウス系統C57BL/6Nを、すべてのインビオ実験に使用した。動物は、Charles River (Sulzfeld, Germany) から入手し、実験の時に6 ~ 8週齢の間であった。静脈内投与したLNP製剤は、尾静脈中への200 μ Lの注入により注射した。皮下投与した化合物は、100 ~ 200 μ Lの体積において注射した。血液を、注射の前の日 (「前採血 (prebleed) 」) 、および注射後の実験の最中の示された時間に、頸下静脈の出血により収集した。血清を、血清分離チューブ (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) で単離し、解析まで凍結保存した。化合物投与の7日後に、マウスを、CO₂吸入により麻酔し、頸椎脱臼により殺した。血液を、心穿刺により収集し、上記のように血清を単離した。mRNA定量用の組織を採取し、液体窒素において直ちに急激に凍結した。

30

【 0 2 7 7 】**一般的手順：遺伝子ノックダウンの測定**

血清タンパク質レベルの決定を、以下を用いて達成した：第VII因子を、色素産生酵素活性アッセイ BIOPHEN FVII (#221304, Hyphen BioMed, MariaEnzersdorf, Austria) を用いて、製造業者の推奨にしたがって解析した。マウス血清を、解析前に1:3000に希釈した。405 nmでの比色発色の吸光度を、Victor 3マルチラベルカウンター (Perkin Elmer, Wiesbaden, Germany) を用いて測定した。

40

【 0 2 7 8 】

血清中のApoBタンパク質を、ELISA (CloudClone Corp. / Hoezel Diagnostics, Cologne, Germany, #SEC003Mu) により測定した。マウス血清の1:5000希釈物を、製造業者の説明書にしたがって加工処理し、450 nmでの吸光度を、Victor 3マルチラベルカウンター (Perkin Elmer, Wiesbaden, Germany) を用いて測定した。

【 0 2 7 9 】

50

血清中のトランスサイレチン（TTR、プレアルブミンとしても公知である）タンパク質を、ELISA (#KA2070, Novus Biologicals, / Biotechne, Wiesbaden, Germany)により測定した。マウス血清の1:4000希釈物を、製造業者の説明書にしたがって加工処理し、450 nmでの吸光度を、Victor 3マルチラベルカウンター (Perkin Elmer, Wiesbaden, Germany) を用いて測定した。

【0280】

mRNAレベルの定量のために、凍結組織片 (30~50 mg) を、冷却した1.5 mL反応チューブに移した。3,3 μL/mlのプロテイナーゼK (50 μg/μL) (Epicenter Biotechnologies, Madison, USA) を含有する1 mL Lysis Mixture (Epicenter Biotechnologies, Madison, USA) を添加し、超音波処理器 (HD2070, Bandelin, Berlin, Germany) を用いた数秒間の超音波処理により組織を溶解し、プロテイナーゼKで30分間、65 °Cでthermomixer (Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg, Germany) において消化した。溶解物を、解析まで-80 °Cで保存した。mRNA解析のために、溶解物を融解し、mRNAレベルを、QuantiGene 1.0 (FVII、ApoB、およびGAPDH) またはQuantigene 2.0 (TTR) 分岐DNA (bDNA) アッセイキット (Panomics, Fremont, Calif., USA, カタログ番号 : QG0004) のいずれかを用いて、製造業者の推奨にしたがって定量した。アッセイ読み取り値として、化学発光シグナルを、相対光単位 (RLU) としてVictor 2 Light 発光カウンター (Perkin Elmer, Wiesbaden, Germany) において測定した。対応する mRNAについてのシグナルを、同じ溶解物由来のGAPDH mRNAについてのシグナルによって割った。値を、GAPDHに対して正規化されたmRNA発現として報告する。

10

20

【0281】

実施例1：チオール末端siRNAの生成

必要な場合、3'-または5'-末端チオール基を、1-O-ジメトキシリチル-ヘキシリ-ジスルフィド、1'-(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)-ホスホラミダイトリンカー (Nucl eoSyn, Olivet Cedex, France) を介して導入した。固相合成およびDMT基の最終除去（「DMTオフ合成」）の完了時に、オリゴヌクレオチドを、固体支持体から切断し、水性メチルアミン (41%) と濃アンモニア水 (32%) からなる1:1混合物を用いて6時間、10 °Cで脱保護した。その後、粗オリゴヌクレオチドを、AKTA Explorer System (GE Healthcare, Freiburg, Germany) 上での陰イオン交換高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) により精製した。精製された(C₆SSC₆)-オリゴヌクレオチドを、エタノールの添加およびフリーザー中での一晩保存により沈殿させた。沈殿物を、遠心分離により収集した。オリゴヌクレオチドを、水において再構成し、オリゴヌクレオチドの同一性を、エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) により確認した。純度を、分析用陰イオン交換およびRP HPLCにより評価した。

30

【0282】

各々のジスルフィド含有オリゴマーを、次いで、100 mM DL-ジチオスレイトール (DTT) 溶液を用いて還元した。1.0 M DTTストック溶液 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Munich, Germany, #646563) を、重炭酸トリエチルアンモニウム緩衝液 (TEABc, 1 M, pH 8.5, Sigma, #90360) および水で希釈して、DTTおよびTEABcが各々100 mM の溶液をもたらした。オリゴヌクレオチドを、TEABc緩衝液 (100 mM, pH 8.5) 中に溶解して、1 mM 溶液を生じた。ジスルフィド還元を達成するために、50~100倍モルのDTT過剰量を、オリゴヌクレオチド溶液に添加する。還元の進行を、Thermo Fisherから入手したDionex DNA Pac 200カラム (4 × 250 mm) 上での分析用AEX HPLCによりモニタリングした。還元された物質、すなわち対応するチオール (C₆SH) は、出発物質よりも前に溶出する。反応の完了後に、過剰の試薬を、GE Healthcare由來のHiPrepカラムを用いたサイズ排除クロマトグラフィーにより除去する。その後、オリゴヌクレオチドを、3 M NaOAc (pH 5.2) およびエタノールを用いて沈殿させ、-20 °Cで保存した。

40

【0283】

実施例2：モノ-DTMEオリゴマーの調製のための一般的手順

チオール修飾されたオリゴヌクレオチドを、25%アセトニトリルを含有する300 mM Na

50

OAc (pH 5.2) 中に溶解し、20 OD/mL 溶液をもたらした。40当量のジチオビスマレイミドエタン (DTME, Thermo Fisher, #22335) をアセトニトリル中に溶解し、15.6 mM 溶液を準備した。DTME 溶液を、オリゴヌクレオチド含有溶液に添加し、25 °C で Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Germany) 上で攪拌した。反応の進行を、Dionex DNA Pac200カラム (4 × 250 mm) を用いた分析用AEX HPLCによりモニタリングした。必要とされる純度レベルに応じて、過剰のDTMEを、HiPrepカラム (GE Healthcare) を用いたサイズ排除HPLCにより除去するか、または、粗反応混合物を、GE Healthcare から市販されているSource 15 Q樹脂で充填されたカラムを用いて調製用AEX HPLCにより精製するかのいずれかである。

【0284】

10

実施例3：DTME官能性を介した二量体の調製のための一般的手順

実施例2における手順にしたがって調製した、DTME修飾されたオリゴヌクレオチドを、チオールリンカーを装備した別のオリゴヌクレオチドと反応させた。この反応は、一本鎖配列に対して、または反応パートナーの1つの相補的オリゴヌクレオチドの事前のアニーリング後のいずれかに行うことができた。したがって、望ましい場合、DTME修飾されたオリゴヌクレオチドを、チオール修飾されたオリゴヌクレオチドと直接反応させ、または、その相補鎖とアニーリングさせて、結果として生じた二重鎖を、チオール修飾されたオリゴヌクレオチドと反応させた。あるいは、チオール修飾されたオリゴヌクレオチドを、その相補鎖とアニーリングさせて、この二重鎖を、DTME修飾された一本鎖と反応させた。すべての場合に、反応を、300 mM NaOAc (pH 5.2) の存在下の水溶液中で行った。

【0285】

20

実施例4：二本鎖RNA (dsRNA) を形成するための一本鎖RNA (ssRNA) のアニーリングのための一般的手順

等モル量の相補的なセンス鎖とアンチセンス鎖とを混合して、20 mM NaCl/4 mM リン酸ナトリウムpH 6.8緩衝液中でアニーリングさせることによって、dsRNAをRNA一本鎖から生成した。二重鎖形成の成功を、GE Healthcare由来のSuperdex 75カラム (10 × 300 mm) を用いた未変性サイズ排除HPLCにより確認した。試料は、使用まで凍結保存した。

【0286】

実施例5：3'-または5'-NH₂誘導体化オリゴヌクレオチドの調製のための一般的手順

30

センス鎖の5'-端にC-6-アミノリンカーを装備したRNAを、AKTA Oligopilot 100 (GE Healthcare, Freiburg, Germany) および固体支持体としての制御細孔ガラス (CPG) (Prime Synthesis, Aston, PA, USA) を用いて、140 μmolのスケールで固相上の標準的なホスホラミダイト化学により産出した。2'-O-メチルおよび2'-Fヌクレオチドを含有するオリゴマーを、対応する2'-OMe-ホスホラミダイト、2'-F-メチルホスホラミダイトを使用して生成した。センス鎖の5'-端の5'-アミノヘキシリルリンカーを、TFA保護されたヘキシリアルアミノリンカーホスホラミダイト (Sigma-Aldrich, SAFC, Hamburg, Germany) を使用して導入した。ヘキシリアルアミノ-リンカーが3'-位で必要である場合は、CPG (Prime Synthesis, Aston, PA, USA) 上に固定化されたフタルイミド保護されたヘキシリアルアミノ-リンカーを用いた。切断および脱保護を、水中41%メチルアミンと濃アンモニア水との混合物 (1:1 v/v) を用いて達成した。粗オリゴヌクレオチドを、陰イオン交換HPLC、およびGE Healthcareから入手したSource 15Q樹脂で充填されたカラム (2.5 × 18 cm) を用いて精製した。

【0287】

40

実施例6：GalNAcリガンドコンジュゲーションのための一般的手順

三価のGalNAcリガンドを、Hadwigerらの特許出願第US2012/0157509 A1号において概要が述べられているように、調製した。対応するカルボキシリ酸誘導体を、以下の手順によるNHS化学を用いて活性化させた。

【0288】

3GalNAc-COOH (90 μmol, 206 mg) を、2.06 mL DMF中に溶解した。この溶液に

50

、N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS、14.3 mg (99 μmol、1.1当量)）およびジイソプロピルカルボジイミド（DIC、18.29 μL、1.05当量、94 μmol）を0℃で添加した。この溶液を、一晩、周囲温度で攪拌した。反応の完了を、TLC (DCM:MeOH = 9:1)によりモニタリングした。

【0289】

アミノヘキシリリンカーを装備した前駆体オリゴヌクレオチドを、2:3 v/vの炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.6):DMSO中に溶解して、4.4 mM溶液をもたらした。この溶液に、NHS活性化GalNAc溶液のアリコート (1.25当量、116 μL) を添加した。1時間、25℃で振盪した後、NHS活性化GalNAcの別のアリコート (116 μL) を添加した。ひとたびRP HPLC分析が少なくとも85%より多いコンジュゲートされた物質を示したら、粗コンジュゲートを、エタノールの添加およびフリーザーにおける一晩の保存により沈殿させた。沈殿物を、遠心分離により収集した。O-アセタートをGalNAc糖残基から除去するために、沈殿物を、1 mLの濃アンモニア水中に溶解して、4時間、室温で攪拌した。RP HPLC ESI-MSによるO-アセタートの定量的な除去の確認後に、物質を、100 mMトリエチルアンモニウムアセタート (TEAA) で希釈し、粗反応混合物を、AKTA explorer HPLCシステム上でXBridge Prep C18 (5 μm、10 × 50 mm、Waters) カラムを60℃で用いたRP HPLCにより精製した。溶媒Aは、100 mM水性TEAAであり、溶媒Bは、95% CAN中100 mM TEAAであり、両方とも、緩衝液予熱器によって60℃に加熱した。3.5 mL/分の流速での60分における5%から25%へのBの勾配を使用した。化合物の溶出は、260および280 nmで観察された。1.0 mLの体積を有する画分を収集して、分析用RP HPLC/ESI-MSにより分析した。85%より高い純度を有する標的コンジュゲートを含有する画分を、組み合わせた。正確な分子量を、ESI/MSにより確認した。

【0290】

実施例7：オリゴヌクレオチド前駆体

上記の実施例に記載した方法論を用いて、以下の一本鎖単量体、二量体、ならびに、GalNAcタグ付加された単量体および二量体を調製した。

【0291】

(表1) オリゴヌクレオチド前駆体 一本鎖(「X」)

SEQ ID NO:	ID	FVIII センス鎖 (5'-3')
1	X18791	(C ₆ SSC ₆) gcAfaAf ^g GfcGfuGfcCfaAf ^c UfcAf ^f (invdT) (C ₆ NH ₂)
2	X18792	(C ₆ SSC ₆) gcAfaAf ^g GfcGfuGfcCfaAf ^c UfcAf ^f (invdT) (C ₆ NH) (GalNAc ₃)
3	X18793	(SHC ₆) gcAfaAf ^g GfcGfuGfcCfaAf ^c UfcAf ^f (invdT) (C ₆ NH) (GalNAc ₃)
4	X18794	(C ₆ SSC ₆) gcAfaAf ^g GfcGfuGfcCfaAf ^c UfcAf ^f (invdT)
5	X19569	(SHC ₆) gcAfaAf ^g GfcGfuGfcCfaAf ^c UfcAf ^f (invdT)
6	X19574	(DTME) (SHC ₆) gcAfaAf ^g GfcGfuGfcCfaAf ^c UfcAf ^f (invdT)
ID	FVII antisense strands (5'-3')	
7	X18796	UfsGfaGfuUfgGfcAf ^c GfcCfuUfuGfcusu (C ₆ SSC ₆) dT
8	X18797	UfsGfaGfuUfgGfcAf ^c GfcCfuUfuGfcusu (C ₆ SH)
9	X18798	UfsGfaGfuUfgGfcAf ^c GfcCfuUfuGfcusu (C ₆ SH) (DTME)
ID	ApoB sense strands (5'-3')	
10	X19577	(C ₆ SSC ₆) cuAfuUfuGfgAf ^g AfgAf ^a AfuCfgAf ^f (invdT)
11	X19578	(SHC ₆) cuAfuUfuGfgAf ^g AfgAf ^a AfuCfgAf ^f (invdT)
12	X19579	(DTME) (SHC ₆) cuAfuUfuGfgAf ^g AfgAf ^a AfuCfgAf ^f (invdT)

【0292】

(表2) オリゴヌクレオチド一本鎖センスおよびアンチセンス対；ならびにアニーリング

10

20

30

40

50

後に結果として生じた二重鎖（「XD」）

二重鎖 ID	SEQ ID <u>NO:</u>	一本鎖 ID	配列（5'-3'）	標的/鎖
XD- 00376	13	X01162	GGAUfCfAUfCfUFfCfAAGUfCfUFfUfACfdTsdT	FVIIIs
	14	X00549	GUfAAGACfUFfUfGAGAUfGAUfCfCfdTsdT	FVIIas
XD- 00030	16	X00116	GcAAAGGcGuGccAAcucAdTsdT	FVIIIs
	17	X00117	UGAGUUGGcACGCCUUUGCdTsdT	FVIIas
XD- 01078	19	X02943	GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	ApoBs
	20	X02944	uuGGAUcAAAuAuAAGAuUCcscsU	ApoBas
XD- 00194	22	X00539	cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT	LUCs
	23	X00540	UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT	LUCas

【0293】

(表3) 誘導体化オリゴヌクレオチド一本鎖センスおよびアンチセンス対；ならびにアニーリング後に結果として生じた二重鎖

二重鎖 ID	SEQ ID <u>NO:</u>	一本鎖 ID	配列（5'-3'）	標的
XD- 06328	25	X18790	(GalNAc3) (NHC ₆) gcAfaAf <u>g</u> GfcGfuGfcCfaAf cUfcAf(invdT)	FVII
	26	X18795	UfsGfaGfuUfgGfcAf <u>c</u> GfcCfuUfuGfcusu	
XD- 06728	28	X20124	(GalNAc3) (NHC ₆) cuAfuUfuGfgAf <u>g</u> Af <u>g</u> AfaAf uCfgAf(invdT)	ApoB
	29	X19583	UfsCfgAfuUfuCfuCfuCfcAfaAf <u>a</u> Afgusu	
XD- 06386	31	X20216	(GalNAc3) (NHC ₆) sAfsasCfaGfuGfuUfc <u>C</u> fu GfcUfcUfaUfaAf(invdT)	TTR
	32	X19584	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	
	34	X19571	gcAfaAf <u>g</u> GfcGfuGfcCfaAf <u>c</u> UfcAf(invdT) (C εNH) (GalNAc3)	FVII
XD- 05961	35	X18788	gcAfaAf <u>g</u> GfcGfuGfcCfaAf <u>c</u> UfcAf(invdT)	FVII
	26	X18795	UfsGfaGfuUfgGfcAf <u>c</u> GfcCfuUfuGfcusu	

【0294】

(表4) DTMEにより連結された一本鎖オリゴヌクレオチド二量体

10

20

30

40

50

SEQ ID NO:	ID	配列 (5'-3')	標的/鎖
37 および 125	X150 49	GGAAUCuuAuAuuuGAUCCAsA (SHC ₆) (DTME) GGAUfCfAUfCfUFfCfAAGU fCfUFfUFACfdTsdt (SHC ₆)	ApoBs/F7s
38 および 126	X127 14	GGAUfCfAUfCfUFfCfAAGUfCfUFfUFACfdTsdt (SHC ₆) (DTME) GUfAAGA CfUFfUFGAGAUfGAUfCfCfdTsdt (SHC ₆)	F7s/F7as
39 および 127	X195 75	(SHC ₆) gcAfaAf gGfcGfuGfcCfaAf cUfcAf (invdT) (C ₆ NH) (GalNAc ₃)) (DTME) (SHC ₆) gcAfaAf gGfcGfuGfcCfaAf cUfcAf (invdT)	F7s/F7s
40 および 128	X198 19	UfsGfaGfuUfgGfcAf cGfcCfuUfuGfcusu (C ₆ SH) (DTME) UfsGfaGfu UfgGfcAf cGfcCfuUfuGfcusu (C ₆ SH)	F7as/F7a s
41 および 129	X203 36	(SHC ₆) gcAfaAf gGfcGfuGfcCfaAf cUfcAf (invdT) (C ₆ NH) (GalNAc ₃)) (DTME) (SHC ₆) cuAfuUfuGfgAf gAf gAfaAf uCf gAf (invdT)	F7s/ApoB s

【 0 2 9 5 】

(表5) 一本鎖DTME二量体および対応する単量体；ならびにアニーリング後に結果として生じた二重鎖

二重鎖 ID	SEQ ID NO:	一本鎖 ID	配列 (5'-3')	標的/鎖
XD- 0531 1	37 および 130	X15049	GGAAUCuuAuAuuuGAUCCAsA (SHC ₆) (DTME) GGAUf CfAUfCfUFfCfAAGUfCfUFfUFACfdTsdt (SHC ₆)	ApoBs-- FVIIIs
	14	X00549	5'-GUfAAGACfUFfUFGAGAUfGAUfCfCfdTsdt-3' +	FVIIAs
	20	X02944	5'-uuGGAUcAAuAuAAGAuUCCscsU-3'	ApoBas
XD- 0531 2	38 および 131	X12714	GGAUfCfAUfCfUFfCfAAGUfCfUFfUFACfdTsdt (SHC 6) (DTME) GUfAAGACfUFfUFGAGAUfGAUfCfCfdTsdt (SHC ₆)	FVIIIs-- FVIIAs
	13	X01162	5'-GGAUfCfAUfCfUFfCfAAGUfCfUFfUFACfdTsdt- 3'	FVIIIs
	14	X00549	5'-GUfAAGACfUFfUFGAGAUfGAUfCfCfdTsdt-3'	FVIIAs

【 0 2 9 6 】

(表6) 化学的に合成されたジスルフィド連結二量体および三量体

10

20

30

40

50

SEQ ID NO:	一本鎖 ID	配列 (5'-3')	標的/鎖
44 <u>および</u> <u>132</u>	X20366	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu(C6SSC6)UfsCfgAf uUfuCfuCfuCfcAfaAfuAfgusu	TTRas/ ApoBas
45 <u>および</u> <u>133</u>	X22413	AfsasCfaGfuGfuUfcfUfuGfcUfcUfaAf(invdT) (C6SSC6)gc AfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	FVIIIs/ TTRs
46 <u>および</u> <u>134</u> <u>および</u> <u>135</u>	X20256	(SHC6)gcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT) (C6NH) (GalN Ac3) (SPDP) (NHC6)cuAfuUfuGfgAfgAfgAfaAfuCfgAf(invdT) (C6SSC6)AfsasCfaGfuGfuUfcfUfuGfcUfcUfaAf(invdT)	FVIIIs/A poBs/TT Rs
47 <u>および</u> <u>136</u>	X20366	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu(C6SSC6)UfsCfgAfu UfuCfuCfuCfcAfaAfuAfgusu	TTRas/ ApoBas
48 <u>および</u> <u>137</u>	X22413	AfsasCfaGfuGfuUfcfUfuGfcUfcUfaAf(invdT) (C6SSC6)gcA faAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	FVIIIs/ TTRs

【0297】

キー：上記の表1～6（および以下に続くもの）の配列部分において：大文字の「A」、「C」、「G」、および「U」は、RNAヌクレオチドを表す。小文字の「c」、「g」、「a」、および「u」は、2'-O-メチル修飾されたヌクレオチドを表し；「s」は、ホスホロチオアートを表し；かつ「dT」は、デオキシチミジン残基を表す。「f」が後に続く大文字のA、C、G、Uは、2'-フルオロヌクレオチドを示す。「(SHC6)」は、チオヘキシリリンカーを表す。「(DTME)」は、切断可能なホモ二官能性クロスリンカーであるジチオビスマレイミドエタンを表す。「(BMPEG2)」は、切断不可能なホモ二官能性クロスリンカーである1,8-ビスマレイミド-ジエチレングリコールを表す。「C6NH2」および「C6NH」は、互換的に使用されて、アミノヘキシリリンカーを表す。「C6SSC6」は、ジヘキシリジスルフィドリンカーを表す。「GalNAc3」および「GalNAc」は、互換的に使用されて、三本のアンテナを有するN-アセチルガラクトサミンリガンドを表し、その化学構造を図1に示す。「SPDP」は、スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナートの、アミノリンカーを装備したRNAとの反応の反応産物を表す。「InvdT」は、逆向きチミジンを意味する。

【0298】

図表の標的/鎖部分において：「F7」または「FVII」は、第VII因子転写物（mRNA）をターゲティングするsiRNA配列を指定する。「ApoB」は、アポリポタンパク質B転写物をターゲティングするsiRNA配列を指定する。「TTR」は、トランスサイレチン転写物をターゲティングするsiRNA配列を指定する。センス鎖を「s」と指定し；アンチセンス鎖を「as」と指定する。

【0299】

実施例8：逐次的アニーリングにより二量体、三量体、および四量体のsiRNAを生成するための一般的手順

二量体、三量体、および四量体のsiRNAの調製のために、段階的なアニーリング手順を実施した。アニーリングは、水中で実施し、相補鎖の段階的添加を利用した。溶液の加熱/冷

10

20

30

40

50

却は必要としなかった。各添加の後に、アニーリング溶液のアリコートを取り出し、分析用RP HPLCを用いて未変性条件下(20)で、二重鎖形成についてモニタリングした。等モル量の相補的一本鎖を組み合わせるために必要とされる量を、最近隣法によってコンピュータ計算された個々の一本鎖の吸光係数に基づいて算出した。分析用RP HPLCのトレースが、過剰な一本鎖を示した場合には、追加量の対応する相補鎖を添加して、二重鎖形成させた(「二重鎖滴定」)。

【0300】

20に平衡化した、XBride C18 Oligo BEH(2.5 μm; 2.1 × 50 mm、Waters)カラムを装備したDionex Ultimate 3000 HPLCシステムを用いて、二重鎖滴定をモニタリングした。診断波長は、260 nmであった。緩衝液Aは、1%メタノールを含有する、100 mMヘキサフルオロ-イソプロパノール(HFIP)、16.3 mMトリエチルアミン(TEA)であり、緩衝液Bは、MeOHが95%である以外は同じ組成を有した。30分における5%から70%への緩衝液Bの勾配を、250 μL/分の流速で適用した。保持時間を確立するために、2種類の相補鎖を、独立して流した。次いで、二重鎖溶液を含有するアリコートを分析して、構成要素である一本鎖の保持時間を比較した。二重鎖溶液が有意な量の一本鎖を示した場合には、対応する相補鎖を二重鎖溶液に添加した。

10

【0301】

実施例9：FVII-DTME-ApoBヘテロ二量体(XD-05311)の調製

FVII-ApoBヘテロ二量体(XD-05311)を、実施例8に記載し、図2に示した方法論を用いて、以下の一本鎖の逐次の組み合わせにより、高純度で調製した。

20

【0302】

一本鎖ヘテロ二量体X15049を、GE Healthcareから入手したResourceQカラムを装備したAKTA explorer 100(GE Healthcare)上で精製した。緩衝液Aは、20%水性アセトニトリル中、10 mM過塩素酸ナトリウム、20 mMトリス、1 mM EDTA、pH 7.4(FI uka, Buchs, Switzerland)であり、緩衝液Bは、緩衝液Aと同じであったが、500 mM過塩素酸ナトリウムを含有していた。カラムを、カラムオーブンを用いて60℃に維持した。流速は、4 mL/分であった。機器の試料ポンプを用いて、粗物質をカラム上にロードした。溶出を280 nmで記録し、45分における15%Bから45%Bへの勾配を使用した。適切な画分をプールし、1/32(v/v)の3M酢酸ナトリウム(NaOAc, pH 5.2)/エタノールの添加および-20℃での一晩の保存により沈殿させた。沈殿物を遠心分離により収集し、物質を水において再構成した。物質を、分析用AEX HPLCを用いて純度について分析した。Dionex DNA Pac 200カラム(4 × 250 mm)を用いて、物質は、92.8%面積の純度を有していた。加えて、物質を、Waters由来のXBridge C18 Oligo BEHカラム(2.5 μm; 2.1 × 50 mm)上のRP HPLCにより分析した。この技法を用いて、物質は、96.5%面積を有していた。

30

【0303】

実施例10：LNP製剤化FVII-ApoBヘテロ二量体(XD-05311)のインビオ解析(動物実験MausRNAi-TV30)

第VII因子およびApoBをターゲティングするヘテロ二量体siRNA(XD-05311)を、一般的手順：脂質ナノ粒子製剤化(上記)にしたがって、50:10:38.5/1.5モル%のKL52/DS PC/コレステロール/PEG-c-DMOGからなる標準的なKL52(XL10)製剤を用いて、LNP中に製剤化した。ApoBに対する基準siRNA(XD-01078)およびFVIIに対する基準siRNA(XD-00030)を、同じLNP(XL10)において各自製剤化し、FVIIに対する追加の基準siRNA(XD-00030)を、50:10:38.5/1.5モル%のKL22/DSPC/コレステロール/PEG-c-DMOGからなる標準的なKL22(XL7)製剤中に製剤化した。下記の表7に要約したLNP製剤を、一般的手順：LNPの特徴決定(上記)にしたがって特徴決定し、一般的手順：動物実験(上記)に記載したような動物実験においてインビオ有効性について試験した。

40

群サイズは、処置群についてn=3のマウスであり、食塩水対照についてn=6であった。すべての化合物を、0.35 mg/kgの用量で静脈内注射した。血液を、注射前、ならびに注射後24時間、69時間、および7日目に収集して、一般的手順：遺伝子ノックダウンの測定(

50

上記)にしたがってFVII酵素活性を解析した。結果を、図3に示す。肝臓溶解物におけるFVIIおよびApoBのmRNAレベルを、注射後7日目に測定し、図4に示す。

【0304】

(表7) 動物実験MausRNAi-TV30において使用したLNP製剤

製剤ID	siRNA	脂質
NPA-640-1	ヘテロ二量体 FVII-ApoB (XD-05311)	XL10 Std
NPA-641-1	ApoB (XD-01078)	XL10 Std
NPA-194-3	FVII (XD-00030)	XL10 Std
NPA-624-1	FVII (XD-00030)	XL7 Std

10

【0305】

実施例11: 5'-GalNAc-FVII基準対照(XD-06328)の調製

5'-GalNAc-FVII基準対照(XD-06328)(図5を参照されたい)を、実施例4に記載した方法により、ssRNA鎖X18790とX18795とをアニーリングさせることによって調製した。産物は、HPLC分析により決定した際に、91.6%の純度で取得された。

【0306】

実施例12: 3'アンチセンス鎖を連結する切断可能なリンカー、およびセンス鎖の外部の3'端にコンジュゲートされたGalNAcを有する、3'-GalNAc-FVII-DTME-FVIIホモ二量体(XD-06330)の調製

20

実施例8に記載した二重鎖滴定法にしたがって、一本鎖二量体X19819を段階的にX18788およびX19571と組み合わせることにより、FVIIをターゲティングする、GalNAcコンジュゲートされたホモ二量体siRNA XD-06330(図6)を調製した(10mg、323 nmol)。単離された物質は、HPLC分析により、本質的に純粋であった。

【0307】

(表8) GalNAc-FVII-DTME-FVIIホモ二量体(XD-06330)の合成において使用したオリゴマーの化学量論

SEQ ID NO:	ID	標的	E (L/mol*cm)	Nmol/ OD	MW (遊離酸)	MW Na 塩	Req OD
40	X19819	FVIIas-FVIIas	389000	2.57	14405.6	15372.9	174
36	X18788	FVIIis	193000	5.18	6545.3	6962.9	62.3
34	X19571	FVIIis	193000	5.18	8161.0	8600.6	62.3
49	XD-06330				29111.9	30936.4	

30

40

【0308】

実施例13: 5'センス鎖を連結する切断可能なリンカー、およびセンス鎖の外部の3'端にコンジュゲートされたGalNAcを有する、3'-GalNAc-FVII-DTME-FVIIホモ二量体(XD-06360)の調製

50

図7に示した合成戦略および実施例8に記載した方法論を用いて、一本鎖を段階的に組み合わせることにより、FVIIをターゲティングする、GaINAcコンジュゲートされたホモ二量体siRNA XD-06360を調製した(11 mg、323 nmol)。

【0309】

すべての反応工程は、高品質の物質を生じ、オリゴマーX19575は、それぞれ、イオン交換クロマトグラフィーおよび逆相クロマトグラフィーにより、91.7%および93.4%純粋であると判定され、オリゴマーXD-06360は、非変性逆相HPLCにより判定された際に、86.8%の純度で単離された。合成において使用した種々のオリゴマーの化学量論を、表9に示す。

【0310】

(表9) GaINAc-FVII-FVIIホモ二量体(XD-06360)の合成において使用したオリゴマーの化学量論

SEQ ID NO:	ID	標的	E (L/mol*cm)	Nmol/OD	MW (遊離酸)	MW Na 塩	Req OD
39	X19575	FVII _s -FVII _s	384800	2.60	15413.1	16314.4	137
26	X18795	FVII _{as}	194800	5.13	6849.4 x2	7289.1 x2	139
50	XD06360				29111.9	30892.6	

10

20

【0311】

実施例14: 3'アンチセンス鎖を連結する切断可能なリンカー、およびセンス鎖の内部の5'端にコンジュゲートされたGaINAcを有する、5'-GaINAc-FVII-DTME-FVIIホモ二量体(XD-06329)の調製

図8に示したように、1150 nmolのX18788と1150 nmolのX18798とをアニーリングさせることによって、FVIIをターゲティングする、GaINAcコンジュゲートされたホモ二量体siRNA XD-06329を調製した。個々の鎖のODの合計は、450 ODであり、組み合わされた溶液、すなわち二重鎖は、濃色効果のために394 ODを有していた(394 OD = 1150 nmol二重鎖)。このDTME修飾された二重鎖を、1150 nmolのX18797(3'-SH修飾されたFVIIアンチセンス)(224 OD)と反応させた。HPLC精製の後、364 ODの「半分-二量体」のsiRNAを単離した。「半分-二量体」のFVII siRNA(10 mg、323 nmol、174 OD)を、次いで、5'GaINAc-FVIIセンス(X18790)(323 nmol、62.3 OD)とアニーリングさせて、最終産物XD-06329を産した。

30

【0312】

実施例15: FVIIホモ二量体GaINAcコンジュゲート(XD-06329、XD-06330、およびXD-06360)によるインビボのFVII遺伝子ノックダウンの判定

第VII因子を標的とするホモ二量体のGaINAcコンジュゲートされたsiRNAの3種類の異なるバリエント(XD-06329、XD-06330、およびXD-06360)、ならびに単量体のGaINAcコンジュゲートされたFVII-siRNA(XD-06328)を、上記のような動物実験(一般的手順:動物実験)においてインビボ有効性について試験した。群サイズは、処置群についてn=4のマウスであり、食塩水対照についてn=5であった。すべての化合物を、0.2 mLの体積において異なる用量(25 mg/kgまたは50 mg/kg)で皮下注射した。血液を、処置の1日前、ならびに、処置後の1、3、および7日目に収集し、FVII酵素活性について解析した。結果を、図9に示す。

40

【0313】

ホモ二量体GaINAc-コンジュゲート(XD-06329、XD-06330、およびXD-06360)のサイレンシング活性、作用の開始、および効力は、単位重量ベース当たりのノックダウン

50

について、単量体の基準対照（XD-06328）に匹敵していた。いかなる毒性の徴候も観察されなかつた（例えば、体重減少、異常行動）。

【0314】

しかし、GalNAc含量についてデータを正規化した際には、ホモ二量体GalNAcコンジュゲートはすべて、GalNAc単量体よりもFVIIノックダウンでより有効であり、それにより、リガンド/受容体結合イベントあたりのより効率的なsiRNAの取り込みが実証された。これらの結果を、図10Aおよび10Bおよび10Cに示す。

【0315】

図10A。GalNAcコンジュゲートまたはPBSの皮下投与後の第VII因子血清活性。各時点での第VII因子血清値を、1×PBSを注射した対照マウスに対して正規化する。この場合には、動物に注射したGalNAcの量をほぼ一定に保つ。第VII因子血清活性を、注射の3日前（-3）、または、注射の1、3、もしくは7日後に測定した。データを、平均+/- S.E.M.としてプロットし、N=3のマウス/群である。各データ点（-3、1、3、および7日）でのバーは、左から右へ、それぞれ、食塩水、XD-06328、XD-06329、XD-06330、およびXD-06360に対応する。

10

【0316】

図10B。GalNAcコンジュゲートまたはPBSの皮下投与後の第VII因子血清活性。各時点での第VII因子血清値を、注射の3日前に取った対照第VII因子値に対して正規化する。この場合には、動物に注射したGalNAcの量をほぼ一定に保つ。第VII因子血清活性を、注射の3日前（-3）、または、注射の1、3、もしくは7日後に測定した。データを、平均+/- S.E.M.としてプロットし、N=3のマウス/群である。各データ点（-3、1、3、および7日）でのバーは、左から右へ、それぞれ、食塩水、XD-06328、XD-06329、XD-06330、およびXD-06360に対応する。

20

【0317】

実施例16：FVII（XD-06328）、ApoB（XD-06728）、およびTTR（XD-06386）を独立してターゲティングする基準GalNAc-siRNAの調製

FVII（XD-06328）、ApoB（XD-06728）、およびTTR（XD-06386）を独立してターゲティングする3種類の基準siRNA（図11を参照されたい）を、固相合成により独立して調製した。3種類のセンス鎖（それぞれ、X18790、X20124、X20216）を、5'-ヘキシリアミンリンカーを伴って別々に調製した。オリゴヌクレオチドの切断および脱保護、ならびに粗物質のHPLC精製の後に、各オリゴに対する過アセチル化GalNAcクラスターのコンジュゲーションを、NHS化学を用いて達成した。鹼化によるO-アセタートの除去を、アンモニア水により媒介した。相補的アンチセンス鎖（それぞれ、X18795、X19583、およびX19584）を、上記で提供した標準的な手順により合成し、その後、GalNAcコンジュゲートされた一本鎖に対してアニーリングさせて、FVII（XD-06328）、ApoB（XD-06728）、およびTTR（XD-06386）をターゲティングするsiRNAを、それぞれ、99.7、93.1、および93.8%の純度で産した。

30

【0318】

（表10）GalNAc-siRNAコンジュゲート

40

50

二重鎖 ID	<u>SEQ ID NO:</u>	ssRNA	配列 5'--3'	
XD-06328	<u>138</u>	X18790	(GalNAc3) (NHC ₆) gcAfaAf _g GfcGfuGfcCfaAf _c UfcAf (invdT)	FVII
	<u>139</u>	X18795	UfsGfaGfuUfgGfcAf _c GfcCfuUfuGfcusu	
XD-06728	<u>140</u>	X20124	(GalNAc3) (NHC ₆) cuAfuUfuGfgAf _g Af _g AfuC _f gAf (invdT)	ApoB
	<u>141</u>	X19583	UfsC _f gAf _u UfuCfuCfuCfcAfaAf _u Afgusu	
XD-06386	<u>142</u>	X20216	(GalNAc3) (NHC ₆) sAfsasCfaGfuGfuUfcfUfuGfcUfcUfaUfaAf (invdT)	TTR
	<u>143</u>	X19584	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAf _c UfgUfususu	

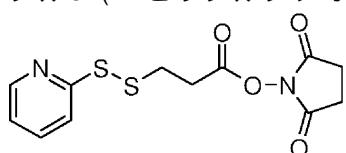
【0319】

実施例17：センス鎖上に切断可能な連結を有するGalNAc-FVII-ApoB-TTR三量体(XD06726)の調製

GalNAcにコンジュゲートされた、FVII、ApoB、およびTTRをターゲティングするヘテロ三量体(図12を参照されたい)を、図13に示したように、固相と液相とのハイブリッド戦略を用いて合成した。

【0320】

二量体X19581を、対応する市販のTFA保護されたホスホラミダイト(SAFC Proligo, Hamburg, Germany)を用い、5'-端上のアミノヘキシリリンカーで固相化学を用いて作製した。上記に要約した条件にしたがって、配列を、固体支持体から切断し、脱保護し、かつ精製した。追加のジスルフィドリンカーを取り付けるために、オリゴヌクレオチドの5'-アミノヘキシリリンカーを、Sigma (#P3415)から入手可能なSPDP(スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート)



と反応させた。928 nmol(400 OD)ヌクレオチドを、20%ジメチルホルムアミド(DMF)を含有する4.7 mLの100 mM TEAB、pH8.5中に溶解した。この溶液に、100 μL DMF中1.4 mg(4.6 μmol、5当量)SPDPの溶液を添加した。ひとたび分析用RP HPLCが出発物質の消費を示したら、粗反応混合物を、Watersから購入したC18 XBridgeカラム(10 × 50 mm)上で精製した。RP精製は、AKTA explorer HPLCシステム上で行った。溶媒Aは、100 mM水性TEAAであり、溶媒Bは、95% ACN中、100 mM TEAAであった。溶媒を、緩衝液予熱器によって60℃に加熱し、カラムを、オープン中で同じ温度に保った。4 mL/分の流速での45分における0%から35%へのBの勾配を使用した。化合物の溶出は、260および280 nmで観察された。1.5 mLの体積を有する画分を収集して、分析用RP HPLC/ESI-MSにより分析した。適している画分を組み合わせて、オリゴヌクレオチドX19582を、エタノールおよび3M NaOAc(pH5.2)の添加後に-20℃で沈殿させた。同一性を、RP-HPLC ESI-MSにより確認した。

【0321】

一本鎖三量体を調製するために、上記のオリゴヌクレオチドX19582(255 nmol)を、1.3 mLの水中に溶解した。この溶液に、306 nmol(1.2当量)のチオール修飾されたオリゴヌクレオチドX18793を添加した。反応混合物は、200 mM TEAAおよび20%アセ

トニトリルを含有していた。反応の進行を、RP HPLCにより追跡した。ひとび出発物質が消費されたら、45分において0%Bから30%Bへの勾配を流したこと以外は、前の段落に記載したのと同じ条件を用いて、反応混合物を精製した。

【0322】

一本鎖ヘテロ三量体X20256 (siFVII、 siApoB、 および siTTR の連結されたセンス鎖を含有する) が、高純度で取得された。 X20256 の配列を、表11に示す。

【0323】

(表 11)

SEQ ID NO:	ID	配列	標的/鎖
52 および 144 および 145	X20256	(SHC ₆)gcAfaAf _g Gf _c GfuGf _c CfaAf _c Uf _c Af(invdT)(C ₆ NH)(Ga1NAC ₃)(SPDP)(NHC ₆)cuAf _c UfuGf _c Af _g Af _g AfaAf _c Cf _c Af(invdT)(C ₆ SSC ₆)Af _s aSCfaGfuGfuUf _c FuFuGf _c UfcUfaUfaAf(invdT)	FVIIIs/A poBs/TT Rs

10

【0324】

注記：原理において、上記の配列は、单一固相合成を通して入手可能である。この場合には、SPDPおよびC₆NH₂が、C₆SSC₆ホスホラミダイトによって置き換えられることになる。しかし、構築物全体の配列の長さのために、そのような合成は困難であろう。

20

【0325】

その後、FVII、ApoB、およびTTRを同時にターゲティングするヘテロ三量体二重鎖構築物 (XD-06726) の 7 mg (150 nmol) を、実施例 8 に記載した二重鎖滴定法にしたがって、アンチセンス一本鎖を段階的にセンス鎖ヘテロ三量体中間体 (X20256) に逐次的に添加することによって調製した。 7 mg の物質が取得され、それは HPLC により、本質的に純粋であった。

【0326】

(表 12) GaINAc-FVII-ApoB-TTR 三量体 (XD-06726) の合成において使用したオリゴマーナーの化学量論

30

SEQ ID NO:	ID	標的	E (L/mol*cm)	Nmol/OD	MW (遊離酸)	MW Na 塩	Req OD
52 および 144 および 145	X20256	FVIIIs- ApoBs- TTRs	623900	1.60	22690.8	24075.7	94
29	X19583	ApoBas	206500	4.84	6762.4	7202.1	31
32	X19584	TTRas	240400	4.16	7596.1	8079.7	36
26	X18795	FVIIas	194800	5.13	6849.4	7289.1	29
53	XD-06726				43898.7	46646.6	

30

40

【0327】

実施例 18 : 交互のセンス鎖およびアンチセンス鎖上に切断可能な連結を有する GaINAc-FVII-ApoB-TTR 三量体 (XD-06727) の調製

FVII、ApoB、およびTTRを同時にターゲティングする三量体 siRNA XD-06727 (図 14 を参照されたい) の 9 mg (192 nmol) を、実施例 8 に記載した方法論を用いて、図 15 に示したように一本鎖を段階的に組み合わせることによって、高純度で調製した。

50

【0328】

(表13) GaINAc-siFVII-siApoB-siTTR三量体(XD-06727)の合成において使用したオリゴマーの化学量論

SEQ ID NO:	ID	標的	E (L/mol*cm)	1 OD nmol	MW (遊離酸)	MW Na 塩	Req OD
42	X20336	FVIIIs-ApoBs	404300	2.47 nmol	15440.1	16341.4	78
49	X20366	ApoBas-TTRas	446700	2.24 nmol	14748.9	15716.1	86
	X19580	TTRs	220300	4.54 nmol	7105.6	7567.2	42
26	X18795	FVIIas	194800	5.13 nmol	6849.4	7289.1	37
54	XD-06727				44144	46913.8	

10

【0329】

ヘテロ三量体(XD-06727)を生じた合成は、非常に効率的である。本実施例において、反応物のほぼ100%の変換が、各工程で達成された。図16、17、および18を参照されたい。

20

【0330】

実施例19：FVII、ApoB、およびTTRを個々にターゲティングする、プールされたsiRNAのLNP製剤の調製

FVII(XD-00030)、ApoB(XD-01078)、およびTTR(XD-06729)をターゲティングする単量体siRNAを、一般的手順：脂質ナノ粒子製剤化、および一般的手順：LNPの特徴決定に記載した方法論を用いて、脂質ナノ粒子中に製剤化し、特徴決定した。脂質組成物は、XL10:DSPC:コレステロール:PEG-DOMG/50:10:38.5:1.5モルパーセントであった。88%のカプセル化が達成され、結果として生じた粒子は、サイズが83 nmで、2.2 mVのゼータ電位および0.04のPDIを有していた。

30

【0331】

実施例20：GaINAcコンジュゲートされたヘテロ三量体SiRNAによるmRNAノックダウンの評価

ヘテロ三量体のGaINAcコンジュゲートされたsiRNA(FVII、ApoB、およびTTRを標的とした)のインビオ有効性を判定するために、処置群についてn=4のマウス、食塩水対照についてn=5の群サイズを用いて、上記(一般的手順：動物実験)のように動物実験を実施した。ヘテロ三量体XD-06726およびXD-06727、ならびに3種類の単量体のGaINAcコンジュゲートされたsiRNA(FVIIをターゲティングするXD-06328；TTRをターゲティングするXD-06386；およびApoBをターゲティングするXD-06728)のプールを、三量体については50 mg/kg総RNA、単量体コンジュゲートの各々については17 mg/kgの濃度で皮下注射(0.1 mL体積)した。比較のために、同じ標的(FVII(XD-00030)、ApoB(XD-01078)、およびTTR(XD-06729))に対するLNP製剤化されたsiRNAのプール(NPA-741-1)を、siRNAあたり0.5 mg/kgで静脈内注射した。血液を、処置の1日前、ならびに、処置後1、3、および7日目に上記(一般的手順：動物実験)のように収集し、FVII、ApoB、およびTTRの血清レベルを、一般的手順：遺伝子ノックダウンの測定にしたがって測定した。結果を、図19Aおよび19B、20Aおよび20B、ならびに、21Aおよび21Bに示す。肝臓溶解物におけるmRNAレベルを、注射後7日目に測定した(図22Aおよび22B)。

40

50

【 0 3 3 2 】

群A (XD-06726) における1匹の動物は、TTR血清レベルに対しても効果も示さなかった。2つのTTRタンパク質のグラフのうちの1番目は、無応答動物について省略された値でのデータを示す。

【 0 3 3 3 】

比較のために、不十分なTTR応答を示す動物由来の値を、2番目のFVIIグラフから省略した。

【 0 3 3 4 】

ApoB血清レベルは、1つの群の動物内、および食塩水対照の異なる時点の間の両方で、高いバリエーションを示す。

【 0 3 3 5 】

すべての3種類の遺伝子のノックダウンもまた、上記の一般的手順：遺伝子ノックダウンの測定にしたがって、肝臓組織由来のmRNAについてのbDNAアッセイを用いて測定した。標的遺伝子レベルを、ハウスキーパーGAPDHに対して正規化した。

【 0 3 3 6 】

実施例21 : GaINAc-FVII-ApoB-TTR-FVII四量体 (XD-07140) の調製

FVII、ApoB、およびTTRを同時にターゲティングする四量体siRNA XD-07140 (図23 を参照されたい) の12.4 nmolを、図24に示したように一本鎖を段階的に組み合わせることによって、および実施例8に記載した二重鎖滴定法にしたがって、調製した。HPLC分析は、産物が高純度で取得されたことを示した。

【 0 3 3 7 】

(表14) GaINAc-FVII-ApoB-TTR-FVII四量体 (XD-07140) の合成において使用したオリゴマーの化学量論

SEQ ID NO:	ID	標的	E (L/mol*cm)	1 OD	MW (遊離酸)	MW Na 塩	Req OD
42	X20336	FVIIIs-ApoBs	404300	2.47 nmol	15440.1	16341.4	5
49	X20366	ApoBas-TTRas	446700	2.24 nmol	14748.9	15716.1	5.5
45	X22413	TTRs-FVIIIs	412100	2.52 nmol	14041.3	14964.5	4.9
26	X18795	FVIIas	194800	5.13 nmol	6849.4 x2	7289.1 x2	4.8
55	XD-07140				57929.1	61600.2	

【 0 3 3 8 】

実施例22 : 多量体siRNAの混合物の生成

動的平衡における多量体siRNAの混合物、およびそれらを製造する方法は、Mok et al., " Multimeric small interfering ribonucleic acid for highly efficient sequence-specific gene silencing," NATURE MATERIALS, Vol. 9, March 2010に記載されている。その中に記載されているように、混合物は、化学的に連結されたsiRNAの直鎖を含み、該鎖は、様々な長さのものである。本実施例においては、Mokらの合成反応の効率および最終産物の特徴に対する異なるアニーリング条件の効果を検討するために実施した一連の実験が後に続く。

【 0 3 3 9 】

(表15) 多量体siRNA混合物のための出発物質

10

20

30

40

50

SEQ ID NO:	説明	Axo ID	配列 (5'---3')
13	F7 センス (s)	X01162	GGAUFCFAUF CfUF CfAAGUFCfUF UfACfdTsdT
56	3'-チオール-F7s	X12006	GGAUFCFAUF CfUF CfAAGUFCfUF UfACfdTsdT (SHC6)
14	F7 アンチセンス (as)	X00549	GUfAAGACfUF UfGAGAUfGAUfCfCfdTsdT
57	3'-チオール-F7as	X12007	GUfAAGACfUF UfGAGAUfGAUfCfCfdTsdT (SHC6)
58 および 146	F7 ホモ二量体 (s-c-s)	X12710	GGAUFCFAUF CfUF CfAAGUFCfUF UfACfdTsdT (SHC6) (DTME) GGAUFCFAUF CfUF CfAAGUFCfUF UfACfdTsdT (SHC6)
59 および 147	F7 ホモ二量体 (as-c-as)	X12711	GUfAAGACfUF UfGAGAUfGAUfCfCfdTsdT (SHC6) (DTME) GUfAAGACfUF UfGAGAUfGAUfCfCfdTsdT (SHC6)
60 および 148	ホモ二量体 (s-nc-s)	X12712	GGAUFCFAUF CfUF CfAAGUFCfUF UfACfdTsdT (SHC6) (BMPEG2) GGAUFCFAUF CfUF CfAAGUFCfUF UfACfdTsdT (SHC6)
61 および 149	ホモ二量体 (as-nc-as)	X12713	GUfAAGACfUF UfGAGAUfGAUfCfCfdTsdT (SHC6) (BMPEG2) GUfAAGACfUF UfGAGAUfGAUfCfCfdTsdT (SHC6)

【0340】

キー：図表の説明部分において：「F7」は、第VII因子遺伝子（第VII因子としても公知である）をターゲティングするsiRNA配列を意味する。センス鎖を「s」と指定し；アンチセンス鎖を「as」と指定する。鎖を連結する化学リンカーを、切断可能なものについて「c」、および切断不可能なものについて「nc」と指定する。

【0341】

この図表（および以下に続くもの）の配列部分において：大文字の「A」、「C」、「G」、および「U」は、RNAヌクレオチドを表す。小文字の「s」は、ホスホロチオアートを表し、かつ「dT」は、デオキシチミジン残基を表す。「f」が後に続く大文字のA、C、G、Uは、2'-フルオロヌクレオチドを示す。「(SHC6)」は、チオヘキシリルリンカーを表す。「(DTME)」は、切断可能なホモ二官能性クロスリンカーであるジチオビスマレイミドエタンを表す。「(BMPEG2)」は、切断不可能なホモ二官能性クロスリンカーである1,8-ビスマレイミド-ジエチレングリコールを表す。一般に、配列は、5'-末端から3'-末端へ書く；しかし、DTMEまたはBMPEG2クロスリンカーを含む配列は、3'-端を介して連結され、これらの配列において、後半を右から左へ、すなわち3'から5'へ読む必要がある。

【0342】

表15に示す配列は、一般的手順：一本鎖オリゴヌクレオチド合成における上記の合成方法論にしたがって作製した。

【0343】

配列の固相アセンブリ、センスおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドの脱保護および調製用AEX HPLC精製の後、3'-チオール修飾された一本鎖オリゴヌクレオチドとそれぞれのホモ二官能性クロスリンカー（DTMEまたはBMPEG2、両方ともPierceから購入）とを組み合わせることによって、一本鎖ホモ二量体を形成させた。この目的に向けて、オリゴヌクレオチドを、100 mMトリエチルアンモニウムアセタート、pH 7中に溶解して、1.4 mM溶液をもたらした。アセトニトリル中のホモ二官能性クロスリンカー（5 mg/mL）の新しく調製した溶液を、オリゴヌクレオチドを含有する溶液に添加した。反応混合物を、サーモシェーカー上、25℃で攪拌した。反応を、Dionex DNA Pac 200カラム（4×250

10

20

30

40

50

mm)を用いて分析用AEX HPLCによってモニタリングした。ひとたび出発物質が消費されたら、反応を、1:32(v/v)の酢酸ナトリウム(3M、pH 5.2)とエタノールの混合物の添加により終息させた。粗物質を、一晩フリーザー中で沈殿させた。沈殿物を、水中に溶解し、source 15 Q樹脂(GE Healthcare)で充填されたカラムを用いてAEX HPLCにより精製した。適切な純度の画分を組み合わせて、再び沈殿させた。沈殿物を水中に溶解し、260 nmでの吸収を測定することによって定量した。リンカーとしてBMPEG2を用いたホモ二量体の合成の包括的な描写を、図26に示す。

【0344】

上記の表15に示した配列についての分析データを、以下のように表16に列挙する。

【0345】

(表16)出発物質の分析データ

説明	ID	純度 (IEC HPLC, %)	(算出された)分子量	(測定された)分子量
F7 センス (s)	X01162	93.5	6629.1	6629.4
3'-チオール-s	X12006	93.4	6826.4	6825.3
F7 アンチセンス (as)	X00549	94.2	6726.2	6726.0
3'-チオール-as	X12007	94.2	6923.4	6922.1
ホモ二量体 (s-c-s)	X12710	84.9	13967.2	13969.3
ホモ二量体 (as-c-as)	X12711	87.2	14159.2	14157.7
ホモ二量体 (s-nc-s)	X12712	89.9	13961.1	13959.7
ホモ二量体 (as-nc-as)	X12713	87.2	14155.1	14153.1

【0346】

表17は、アニーリングさせて、二重鎖多量体siRNA混合物、XD-05305(切断不可能な連結を有する)およびXD-05306(切断可能な連結を有する)を生じた、一本鎖ホモ二量体を示す。最初に、包括的なアニーリング条件を使用した:相補的一本鎖を、1×PBS中で組み合わせて、70℃で保たれた水浴中に10分間置いた。次いで、水浴を、3時間にわたって25℃に冷却した。

【0347】

(表17)二重鎖多量体siRNA混合物の産出において使用した配列

10

20

30

40

50

二重鎖 - ID	説明	Axo ssRNA ID	SEQ ID NO:	配列 (5'--3')
XD-05305	(s-nc-s)	X12712	<u>150</u> および <u>151</u>	GGAUFCfAUFCfUFCAAGUFCfUFUFACfdTsdT (SHC6) (BM PEG2) GGAUFCfAUFCfUFCAAGUFCfUFUFACfdTsdT (SHC6)
	(as-nc-as)	X12713	<u>152</u> および <u>153</u>	GUfAAGACfUFUfUGAGAUfGAUfCfCfFdTsdT (SHC6) (BMPEG2) GUfAAGACfUFUfUGAGAUfGAUfCfCfFdTsdT (SHC6)
XD-05306	(s-c-s)	X12710	<u>154</u> および <u>155</u>	GGAUFCfAUFCfUFCAAGUFCfUFUFACfdTsdT (SHC6) (DT ME) GGAUFCfAUFCfUFCAAGUFCfUFUFACfdTsdT (SHC6)
	(as-c-as)	X12711	<u>156</u> および <u>157</u>	GUfAAGACfUFUfUGAGAUfGAUfCfCfFdTsdT (SHC6) (DTME) GUfAAGACfUFUfUGAGAUfGAUfCfCfFdTsdT (SHC6)

【0348】

先行技術において示されているもの (Mok et al, NATURE MATERIALS, Vol. 9, March 2010) を上回る、潜在的に改善されたアニーリング条件についてのベースラインを確立するために、切断不可能なホモ二量体X12712およびX12713を使用した。Mokらにより公開されたアニーリング条件（以下「Park」）と、標準的なアニーリング条件の独占所有権のあるセット（以下「Axolabs」条件）との比較を実施した。Park条件は、以下であった：1×PBS、1時間、37℃。Axolabs条件は、以下であった：1×PBS、70℃で10分、3時間にわたって25℃に冷却。図27により、SEC HPLCは、一本鎖二量体を多量体siRNAから分離することが実証される。NC-センス-二量体は、中央のピークに対応し、NC-アンチセンス-二量体は、右のピークに対応し、かつ多量体siRNAは、左のピークに対応する。

【0349】

さらに、図28により、多量体siRNAの全体は、アニーリング条件とは独立しているように見えるが；短鎖dsRNAの画分は、そうではないことが実証される。t = 15.0分辺りの丸で囲んだ領域中のより高いピークは、「Parkの条件」に対応し、かつ、丸で囲んだ領域中のより低いピークは、「Axolabsの条件」に対応する。

【0350】

Axolabsアニーリング条件は、より多くの物質を多量体siRNA画分中に移動させる。

【0351】

図29において実証されるように、一連の様々な未変性HPLC条件（緩衝液、温度、アセトニトリルの含量）の探索は、多量体siRNAを部分的に分離する能力を結果としてもたらした。最も高いピークは、NC-センス-二量体に対応し、最も左のピークは、NC-アンチセンス二量体に対応し、t = 9～11分辺りの「多量体siRNA」領域中の最も高いピークは、「Axolabsのアニーリング条件」に対応し、かつ、「多量体siRNA」領域中の2番目に高いピークは、「Parkのアニーリング条件」に対応する。

【0352】

さらに、この分析によって、より高い温度でのアニーリングは、より短い多量体を最小化し、より長いものに好都合であることが確認された。さらに、本発明者らは、SECおよびEX HPLC分析を用いて、分析した混合物中のX-mer siRNAの分布を割り当てるのは可能ではなかったことを見出した。

【0353】

多量体siRNA混合物の種々のsiRNA構成要素のベースラインの分離を、図30に示すように、SEC HPLC分析によって達成した。多量体siRNAは、左側のピークであり；二量体siRNAは、中央のピークであり；かつ基準siRNAは、右側のピークである。

【0354】

HPLCベースの方法およびSuperdex 200 10/300 GLカラムを用いて、めったにオリゴ

10

20

30

40

50

マー化しない物質の画分を最小化することを目標に、追加のアニーリング条件を検討した。具体的に、表18は、分析したパラメータ、および切断不可能なF7ホモ二量体を用いて得られた結果を示す。

【0355】

(表18) アニーリング条件および結果

アニーリング条件	結果
温度対冷却速度 : 1×PBS、250 μM、70°C、80°C、および90°C（各時点10分間）、その後の、室温への緩徐な冷却（2時間） 対、試料を氷水浴に置くことによる急速冷却	有意な変化は観察されない。 急激な冷却は、いかなる利点も提供しない。 温度の増大からの有意な恩恵はない。
温度対高塩濃度 : 10×PBS、250 μM、70°C、80°C、および90°C（各時点10分間）、その後の、室温への緩徐な冷却（2時間）	より高い塩濃度は、より小さい多量体siRNA種の部分を増大させる。
温度対低塩濃度 : 0.2×PBS、250 μM、70°C、80°C、および90°C（各時点10分間）、その後の、室温への緩徐な冷却（2時間）	より低い塩濃度は、多量体siRNAの形成に最適であるように見える。 再び、温度はそれほど影響を有さない。
温度、希釀されたアニーリング、ベースラインの塩 : 1×PBS、25 μM (1:10)、70°C、80°C、および90°C（各時点10分間）、その後の、室温への緩徐な冷却（2時間）	より高い温度は、多量体siRNAの形成を破壊した。
温度、希釀されたアニーリング、より高い塩 : 10×PBS、25 μM (1:10)、70°C、80°C、および90°C（各時点10分間）、その後の、室温への緩徐な冷却（2時間）	塩濃度の増大は、80°Cで、多量体siRNAの形成を少なくとも部分的に回復したが、90°Cではしなかった。
温度、希釀されたアニーリング、より低い塩 : 0.2×PBS、25 μM (1:10)、70°C、80°C、および90°C（各時点10分間）、その後の、室温への緩徐な冷却（2時間）	250 μMでのアニーリングで観察されたものと一致した。

10

20

30

40

【0356】

これらの結果に基づいて、最適化されたアニーリング条件は、高いRNA濃度（250 μM以上）、低い塩濃度（約0.2×PBS）、70～80くらいの反応温度（約10分間）、および室温への緩徐な冷却（2時間）を含むことが決定された。

50

【 0 3 5 7 】

図31は、多量体siRNA混合物に対する塩濃度および反応温度の効果を実証する。

【 0 3 5 8 】

次に、最適化されたアニーリング条件を選択して、最終混合物における極度に高い分子量の多量体種の量を最小化するように反応を制御することが可能かどうかを判定するために、2種類の追加の実験を（より低い分子量種は、インビボでより活性であり、LNPを送達ビヒクルとして使用する場合、潜在的に容易にLNP中に製剤化されるであろうという理論上で）行った。

【 0 3 5 9 】

これらの第1において、最適化されたアニーリング条件を、終端鎖として作用する一本鎖单量体（いかなるリンカーも欠如する）の0.1、0.3、および0.9当量の存在下で反復した。図32に示す結果により、終端鎖（この場合には、アンチセンス鎖を終結物質として使用した）の濃度が高ければ高いほど、多量体化されるsiRNA画分は小さいことが示される。

10

【 0 3 6 0 】

第2の実験において、最適化されたアニーリング条件を、切断不可能なセンスホモ二量体X12712の準化学量論的な量で実施した；具体的には、90 mol%、75 mol%、および60 mol%のセンスホモ二量体対100 mol%のアンチセンスホモ二量体X12711を、アニーリング反応において使用した。図33に示す結果により、センスホモ二量体の濃度が小さければ小さいほど、多量体化されるsiRNA画分は小さいことが示される。

【 0 3 6 1 】

20

アニーリング後に、種々の「終結物質」試料および「準化学量論的な」試料を、140 mAを2時間使用するTAE緩衝液における2%アガロースゲル上で分析した。バンドを、GelRed染色を用いて可視化した。図34Aは、試料番号1～15についてのゲルを表す。図34Bは、試料番号1'～10'についてのゲルを表す。

【 0 3 6 2 】

（表19）ゲル中に存在する試料およびそれらの特徴の列挙

30

40

50

モル比	反応条件	試料番号 #
+0.5x_unlinkered_as	70C_250μM_0.2xPBS	1
+1.5x_unlinkered_as	70C_250μM_0.2xPBS	2
+4.5x_unlinkered_as	70C_250μM_0.2xPBS	3
4.5_s + 5_as	70C_250μM_0.2xPBS	4
3.75_s + 5_as	70C_250μM_0.2xPBS	5
3.0_s + 5_as	70C_250μM_0.2xPBS	6
5_s + 5_as	70C_250μM_1xPBS	7
5_s + 5_as	80C_250μM_1xPBS	8
5_s + 5_as	90C_250μM_1xPBS	9
5_s + 5_as	70C_250μM_10xPBS	10
5_s + 5_as	80C_250μM_10xPBS	11
5_s + 5_as	90C_250μM_10xPBS	12
5_s + 5_as	70C_250μM_0.2xPBS	13
5_s + 5_as	80C_250μM_0.2xPBS	14
5_s + 5_as	90C_250μM_0.2xPBS	15
5_s + 5_as	70C_25μM_1xPBS	1'
5_s + 5_as	80C_25μM_1xPBS	2'
5_s + 5_as	90C_25μM_1xPBS	3'
5_s + 5_as	70C_25μM_10xPBS	4'
5_s + 5_as	80C_25μM_10xPBS	5'
5_s + 5_as	90C_25μM_10xPBS	6'
5_s + 5_as	70C_25μM_0.2xPBS	7'
5_s + 5_as	80C_25μM_0.2xPBS	8'
5_s + 5_as	90C_25μM_0.2xPBS	9'
5_s + 5_as	37C_250μM_1xPBS	10'

【0363】

キー：左側の縦列："+0.5x_unlinkered_as"は、試料（番号1）が、（終結物質として）10%過剰量の連結されていないアンチセンス鎖X00549で調製されたことを意味し；"+1.5x_unlinkered_as"は、試料（番号2）が、（終結物質として）30%過剰量の連結されていないアンチセンス鎖X00549で調製されたことを意味し；"+4.5x_unlinkered_as"は、試料（番号3）が、（終結物質として）90%過剰量の連結されていないアンチセンス鎖X00549で調製されたことを意味し；残りの試料番号4～10'について、X_s + Y_asは、試料がX nmolの連結されたセンスホモ二量体およびY nmolの連結されたアンチセンスホモ二量体で調製された（例えば、試料番号4は、4.5 nmolの連結されたセンスホモ二量体および5 nmolの連結されたアンチセンスホモ二量体で調製された）ことを意味する。配列X00549：

5'-GUfAAGACfUfUfGAGAUfGAUfCfCfdTsdT-3' (SEQ ID NO:158)

中央の縦列：反応条件を、温度（）、RNA濃度（μM）、および塩濃度（PBSとして）に関して提供する。

10

20

30

40

50

【 0 3 6 4 】

要約すると、これらの実験により、多量体siRNA混合物の分析は、混合物内の多量体化されたsiRNA単位の大きなサイズのために困難であることが実証される。SEC HPLC分析は、多量体化された（最大5merまたは6merまで）siRNA単位対二量体化されたsiRNA単位の比を確立するのに十分適していたが、所定の試料における多量体化の程度に関する洞察を提供することはできなかった。未変性アガロースゲルは、多量体化の程度を可視化する手助けをする。さらに、アニーリング条件は、最終混合物における多量体化の程度に対して深い影響を及ぼす。例えば、等モルのアニーリングを実施する際、非常に高い分子量の多量体siRNAの形成を観察することができる（例えば、6000 bpよりも大きい等価物）。一般に、アニーリングは、高いRNA濃度（250 μM以上）、低い塩濃度（例えば、約0.2 × PBS）、および70～80 °Cくらいの反応温度で実施されるべきである。多量体化の程度は、等モルでないアニーリングを実施することによって低減させることができる。200～500 DNA bpの等価物の範囲に濃縮された多量体化（例えば、図34A中のゲルレーン3および6）は、終結物質の一本鎖の添加によるか、または1種類の鎖の量を有意に低減させることによるかのいずれかで、行うことができる。

【 0 3 6 5 】

図34A中のゲルレーン6および図34B中のゲルレーン10'由来の試料を、LNP中への製剤化後にマウスにおいて試験するために選択した。試料番号10'は、同等の割合のセンスホモ二量体とアンチセンスホモ二量体からなる250 μMのRNA濃度を有し、1 × PBSにおいて37 °Cで1時間、アニーリングさせた。試料番号6は、3（センスホモ二量体）対5（アンチセンスホモ二量体）のモル比からなる250 μMのRNA濃度および0.2 × PBSで、70 °Cの水浴中に置き、3時間にわたって冷却した。結果として生じた多量体siRNA混合物を、一般的な手順：脂質ナノ粒子製剤化にしたがってLNP中に製剤化し、一般的な手順：LNPの特徴決定にしたがって分析した。LNP実験についての組成物および分析データを、表20、21、および22に提示する。

【 0 3 6 6 】

（表20）

製剤-ID	siRNA	製剤組成, モル%	サイズ(nm)	PDI	ビーダム濃度[mg/ml]	封入%	
NPA-624-1	FVII (XD-0030)	KL22/DSPC/コレステロール/PEG-c-DOMG 50:10:38.5:1.5	69,73	0,05	-0,4	0,71	63%
NPA-194-3	FVII (XD-0030)	KL52/DSPC/コレステロール/PEG-c-DOMG 50:10:38.5:1.5	91,02	0,07	-2,6	0,51	83%
NPA-625-1	多量体、レーン6 (XD-05305) (X12712K1 + X12713K1)	KL52/DOPE/コレステロール/PEG-c-DOMG 40:10:48.5:1.5	113,2	0,10	-4,4	0,11	76%
NPA-626-1	多量体、レーン6 (XD-05305) (X12712K1 + X12713K1)	KL52/DOPE/コレステロール/PEG-c-DOMG 40:30:28.5:1.5	106,2	0,05	-4,6	0,14	75%
NPA-627-1	多量体、切断可能 (XD-05306) (X12710K1 + X12711K1)	KL52/DOPE/コレステロール/PEG-c-DOMG 40:10:48.5:1.5	129,6	0,10	0,0	0,13	92%
NPA-628-1	多量体、切断可能 (XD-05306) (X12710K1 + X12711K1)	KL52/DOPE/コレステロール/PEG-c-DOMG 40:15:43.5:1.5	116,4	0,07	-5,3	0,14	89%
NPA-629-2	多量体、切断可能 (XD-05306) (X12710K1 + X12711K1)	KL52/DOPE/コレステロール/PEG-c-DOMG 40:20:38.5:1.5	142,2	0,09	-6,7	0,15	99%
NPA-630-1	多量体、切断可能 (XD-05306) (X12710K1 + X12711K1)	KL52/DOPE/コレステロール/PEG-c-DOMG 40:25:33.5:1.5	118,9	0,04	-5,6	0,15	86%
NPA-631-1	多量体、切断可能 (XD-05306) (X12710K1 + X12711K1)	KL52/DOPE/コレステロール/PEG-c-DOMG 40:30:28.5:1.5	102,8	0,03	-3,7	0,16	90%
NPA-632-1	多量体、切断可能 (XD-05306) (X12710K1 + X12711K1)	KL52/DOPE/コレステロール/PEG-c-DOMG 40:40:18.5:1.5	90,88	0,06	-1,8	0,16	83%
NPA-623-2	多量体、レーン6 (XD-05305) (X12712K1 + X12713K1)	KL52/DOPE/コレステロール/PEG-c-DOMG 40:20:38.5:1.5	129,1	0,06	-4,9	0,15	95%

【 0 3 6 7 】

（表21）

製剤-ID	siRNA	製剤組成, モル%	サイズ(nm)	PDI	ビーダム濃度[mg/ml]	封入%	
NPA-642-1	多量体、切断可能、レーン6 (XD-05306) (X12710K1 + X12711K1)	KL22/DOPE/コレステロール/PEG-c-DOMG 40:20:38.5:1.5	62,45	0,07	-2,4	0,19	93%
NPA-643-1	多量体、切断可能、レーン10' (XD-05306) (X12710K1 + X12711K1)	KL22/DOPE/コレステロール/PEG-c-DOMG 40:20:38.5:1.5	61,67	0,08	-2,5	0,19	92%
NPA-644-1	多量体、切断可能、レーン6 (XD-05306) (X12710K1 + X12711K1)	Invivofectamine 2.0	69,52	0,02	1,2	0,42	97%
NPA-645-1	多量体、切断可能、レーン10' (XD-05306) (X12710K1 + X12711K1)	Invivofectamine 2.0	87,71	0,11	1,2	0,44	100%
NPA-646-1	FVII (XD-00376)	Invivofectamine 2.0	67,04	0,07	2,2	0,46	100%

【 0 3 6 8 】

（表22）定義された長さの二量体（2mer）siRNA二重鎖。定義された二量体siRNA：

10

20

30

40

50

二重鎖 - ID	説明	ssRNA ID	SEQ ID NO:	配列 (5'---3')
XD-04600	F (s-c-s)	X12710	<u>159</u> および <u>160</u>	GGAUFCFAUFCFUFCFAAGUFCFUUFACFdTsdT (SHC6) (DTME) GGAUFCFAUFCFUFCFAAGUFCFUUFACFdTsdT (SHC6)
		X00549	<u>161</u>	GU <u>GAAGACFU</u> FUFGAGAU <u>GAUFC</u> CfdTsdT
XD-04601	H (s-nc-s)	X12712	<u>162</u> および <u>163</u>	GGAUFCFAUFCFUFCFAAGUFCFUUFACFdTsdT (SHC6) (BMPEG 2) GGAUFCFAUFCFUFCFAAGUFCFUUFACFdTsdT (SHC6)
		X00549	<u>164</u>	GU <u>GAAGACFU</u> FUFGAGAU <u>GAUFC</u> CfdTsdT

10

【 0 3 6 9 】

実施例23：FVII多量体siRNAのLNP製剤化された混合物の解析（動物実験MausRNAi-TV 29/30）

様々な脂質組成のLNP中に製剤化された（FVIIを標的とする）多量体siRNAの混合物（表23に列挙）のインビボ有効性を判定するために、動物実験を、上記（一般的手順：動物実験）のように実施した。化合物を、0.35 mg/kg siRNAの用量で静脈内注射した。Invivofectamine 2.0で製剤化された多量体siRNAを、1 mg/kgおよび3 mg/kgの用量で注射した。LNP製剤化された基準FVII siRNA (XD-00030)を、陽性対照として含めた。群サイズは、処置群についてn = 3のマウスであり、食塩水対照についてn = 6であった。血液を、図35において言及した時点で収集し、FVII酵素活性について解析した。結果を、図35に示す。

20

【 0 3 7 0 】

（表23）動物実験MausRNAi-TV 29に使用したLNP製剤

製剤-ID	脂質	siRNA
NPA-625-1	XL10 DOPE 10	多量体、レーン 6 (XD-05305) (X12712K1 +X12713K1)
NPA-626-1	XL10 DOPE 30	多量体、レーン 6 (XD-05305) (X12712K1 +X12713K1)
NPA-627-1	XL10 DOPE 10	多量体、切断可能 (XD-05306) (X12710K1 +X12711K1)
NPA-628-1	XL10 DOPE 15	多量体、切断可能 (XD-05306) (X12710K1 +X12711K1)
NPA-630-1	XL10 DOPE 25	多量体、切断可能 (XD-05306) (X12710K1 +X12711K1)
NPA-631-1	XL10 DOPE 30	多量体、切断可能 (XD-05306) (X12710K1 +X12711K1)
NPA-632-1	XL10 DOPE 40	多量体、切断可能 (XD-05306) (X12710K1 +X12711K1)
NPA-623-2	XL10 DOPE 20	多量体、レーン 6 (XD-05305) (X12712K1 +X12713K1)
NPA-629-2	XL10 DOPE 20	多量体、切断可能 (XD-05306) (X12710K1 +X12711K1)
NPA-194-3	XL10 std	XD-00030 (FVII単量体)
NPA-624-1	XL7 std	XD-00030 (FVII単量体)

30

【 0 3 7 1 】

同じ製剤において異なるペイロード（切断可能なリンカーを有するペイロード対切断不可能なリンカーを有するペイロード）を比較した場合、切断可能なペイロードは、切断不可能なペイロードよりも良好に機能したことが観察される（例えば、NPA-625-1対NPA-627-1；NPA-626-1対NPA-631-1；およびNPA-629-1対NPA-623）。

40

【 0 3 7 2 】

（表24）動物実験MausRNAi-TV 30において使用したLNP製剤

製剤-ID	siRNA	脂質
NPA-642-1	多量体、切断可能、レーン6 (XD-05306) (X12710K1 +X12711K1)	XL7 DOPE 20
NPA-643-1	多量体、切断可能、レーン10' (XD-05306) (X12710K1 +X12711K1)	XL7 DOPE 20
NPA-644-1	多量体、切断可能、レーン6 (XD-05306) (X12710K1 +X12711K1)	Invivofectamine 2.0
NPA-645-1	多量体、切断可能、レーン10' (XD-05306) (X12710K1 +X12711K1)	Invivofectamine 2.0
NPA-646-1	FVII(XD-00376)	Invivofectamine 2.0

50

【0373】

実施例24：FVIIセンス：FVIIアンチセンスのFVIIヘテロ二量体（X12714）の製造および結果として生じた多量体の混合物

実施例9のF7-ApoBヘテロ二量体についてのバリエーションを、図37に示したように、si F7センス鎖をsiF7アンチセンス鎖に化学的に連結して、F7をターゲティングする一本鎖ヘテロ二量体を形成することで作製した。

【0374】

ヘテロ二量体X12714は、図38に示したゲル中のレーン12に見られる。ゲル分析条件は、以下であった：1.5 μg/レーン；1×TAEにおける2%アガロースゲル；140mA；130分；Gel red染色（1:10000）。

10

【0375】

実施例25：ApoBスクリーニングのための配列選択

マウスApoBに対する適当なsiRNAは、本発明の前に知られていなかった。したがって、マウスApoBをターゲティングする特異的なdsRNAを特定するために、dsRNA設計を行った。最初に、マウス（ハツカネズミ（Mus musculus））ApoBの公知のmRNA配列（NM_009693.2およびXM_006515078.1）を、NCBI Reference Sequenceデータベース、リリース73からダウンロードした。

【0376】

この最初の配列のセットから、NCBI dbSNP（ビルト146）により示されるような、マウスApoB mRNAにおけるそれらの対応する標的部位配列（19merの位置2～18）においてSNP（一塩基多型）を保有するものを排除した。

20

【0377】

RNAi作用物質の特定において、選択は、包括的なマウストランスクリプトームを表すと本発明者らが仮定した、マウスNCBI Ref Seqデータベース（リリース73）における任意の他の配列に対して、それぞれ、少なくとも1個または2個のミスマッチを有する、19merのセンスおよびアンチセンス配列に限定した。

【0378】

候補の選択は、miRBase（University of Manchester、リリース21）において列挙されているような公知のマウスmiRNAシード配列（5'末端のヌクレオチド2～7）と同一のシード配列（5'末端のヌクレオチド2～7）を保有する19merのセンスおよびアンチセンス鎖の除去により、さらに限定した。

30

【0379】

加えて、5個以上の連続したG（ポリG配列）を含有するすべてのセンスおよびアンチセンス配列を、選択から排除した。特定された配列を、表25に提示する。

【0380】

（表25）マウスApoB mRNAをターゲティングする二本鎖RNA（dsRNA）のコア配列

40

50

SEQ ID NO:	センス鎖コア配列 (5'-3')	SEQ ID NO:	アンチセンス鎖コア配列 (5'-3')
65	CAACCAGUGUACCCUUAAA	77	UUUAAGGGUACACUGGUUG
66	CUGUGUACGAAGUACAAAA	78	UUUUGUACUUCGUACACAG
67	CAACCUAUGAACCUUAAA	79	UUUAGGAGUUCAUAGGUUG
68	GCUUACGGCUACAACAUUU	80	AAAUUGUUGAGCCGUAGC
69	GCACGUGAUGGACUAUCAA	81	UUGAUAGUCCAUCACGUGC
70	CUAUUUGGAGAGAAAUCGA	82	UCGAUUUCUCUCCAAAUAG
71	GAGAUUAUUGAUCGAAUCA	83	UGAUUCGAUCAAAUACUC
72	CCGUGUAAAUCUAGAAAA	84	UUUUGCUGAUUACACGG
73	GCAUUUAGAUCAAUUGAGA	85	UCUCAAUUGAUCUAAAUGC
74	GGUUUUAAUGGAUAAAUC	86	UGAUUUAUCCAUAAAACC
75	GACUUUCCAGAGCAAUUU	87	AAUAUUGCUCUGCAAAGUC
76	CUUACGGGUCAUCCAAAAA	88	UUUUGGAUGACCCGUAG

【0381】

10

表25から選択された配列を、表26Aおよび26Bに提示したような化学修飾で合成した。

【0382】

20

(表26A)

二重鎖-ID	SEQ ID NO:	ss-ID	配列 (5'--3')
XD-05962	89	X18815	caAf <u>c</u> CfaGfuGfuAf <u>c</u> CfcUfuAf <u>a</u> AfdTsdt
XD-05963	92	X18817	cuGfuGfuAf <u>c</u> GfaAf <u>g</u> UfuCfaAf <u>a</u> AfdTsdt
XD-05964	95	X18819	caAf <u>c</u> CfuAf <u>f</u> GfaAf <u>c</u> UfcCfuAf <u>a</u> AfdTsdt
XD-05965	98	X18821	gcUfuAf <u>c</u> GfgCfuCfaAf <u>c</u> AfaUfuUfdTsdt
XD-05966	101	X18823	gcAf <u>c</u> GfuGfaUfgGfaCfuAf <u>c</u> AfdTsdt
XD-05967	104	X18825	cuAf <u>f</u> UfuGfgAf <u>g</u> AfgAf <u>a</u> AfuCfgAf <u>d</u> Tsdt
XD-05968	107	X18827	gaGfaUfuAf <u>f</u> UfgAf <u>c</u> FfgAf <u>a</u> UfcAf <u>d</u> Tsdt
XD-05969	110	X18829	ccGfuGfuAf <u>a</u> AfuCfuAf <u>g</u> CfaAf <u>a</u> AfdTsdt
XD-05970	113	X18831	gcAf <u>f</u> UfuAf <u>g</u> AfuCfaAf <u>u</u> UfgAf <u>g</u> AfdTsdt
XD-05971	116	X18833	ggUfuUfuAf <u>a</u> UfgGfaAf <u>a</u> AfaUfcAf <u>d</u> Tsdt
XD-05972	119	X18835	gaCfuUfuGfcAf <u>g</u> AfgCfaAf <u>a</u> AfuUfdTsdt
XD-05973	122	X18837	cuUfaC <u>E</u> gGfgUfcAf <u>a</u> CfcAf <u>a</u> AfaAf <u>d</u> Tsdt

30

【0383】

40

(表26B)

50

二重鎖 -ID	SEQ ID NO:	as-ID	配列 (5'--3')
XD-05962	90	X18816	UfUFuAfaGfgGfuAfcAfcUfgGfuUfgdTsdT
XD-05963	93	X18818	UfUFuUfgUfaCfuUfcGfuAfcAfcAfgdTsdT
XD-05964	96	X18820	UfUFuAfgGfaGfuUfcAfuAfgGfuUfgdTsdT
XD-05965	99	X18822	AfAfaUfuGfuUfgAfgCfcGfuAfaGfcdTsdT
XD-05966	102	X18824	UfUfgAfuAfgUfcCfaUfcAfcGfuGfcdTsdT
XD-05967	105	X18826	UfCfgAfuUfuCfuCfuCfcAfaAfuAfgdTsdT
XD-05968	108	X18828	UfGfaUfuCfgAfuCfaAfaAfuUfcUfcdTsdT
XD-05969	111	X18830	UfUFuUfgCfuAfgAfuUfuAfcAfcGfgdTsdT
XD-05970	114	X18832	UfCfuCfaAfuUfgAfuCfuAfaAfuGfcdTsdT
XD-05971	117	X18834	UfGfaUfuUfaUfcCfaUfuAfaAfaCfcdTsdT
XD-05972	120	X18836	AfAfuAfuUfgCfuCfuGfcAfaAfgUfcdTsdT
XD-05973	123	X18838	UfUFuUfuGfgAfuGfaCfcCfgUfaAfgdTsdT

【0384】

表中、小文字の「c」、「g」、「a」、および「u」は、2'-O-メチル修飾されたヌクレオチドを表し、「s」は、ホスホロチオアートを表し、かつ「dT」は、デオキシチミジン残基を表す。「f」が後に続く大文字のA、C、G、Uは、2'-フルオロヌクレオチドを示す。表26Aおよび26Bに提示した、修飾されたdsRNAは、表25に提示した、修飾されていないdsRNAに対応する。

【0385】

実施例26：ApoBをターゲティングするsiRNAのインピトロ評定

マウスApoB mRNAに対する表27中のsiRNAの活性を、マウス肝臓細胞株NMuLiにおいて試験した。

【0386】

ApoB mRNA含量を、ApoB特異的siRNAとインキュベートした細胞から単離した全mRNAにおける分岐DNAによって定量した。細胞を、American Type Culture Collection (Rockville, Md., カタログ番号CCL-1638) から入手した。NMuLi細胞を、10%胎児ウシ血清 (FCS, Biochrom AG, Berlin, Germany, カタログ番号S0115) およびペニシリン100 U/mL、ストレプトマイシン100 mg/mL (Biochrom AG, Berlin, Germany, カタログ番号A2213) を補給したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM, Biochrom #F0435) において培養した。

【0387】

siRNAのトランスフェクションを、96ウェルプレート上に15,000個のNMuLi細胞/ウェルを播種した後に直接実施し、トランスフェクション試薬RNAiMax (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany, カタログ番号13778-150) で、製造業者により記載されたように行なった。四連で実施した用量応答実験において、siRNA濃度を、50 nMで開始し、5倍希釈工程において16 pMまで減少させた。トランスフェクション後、細胞を、加湿したインキュベーター (Heraeus GmbH, Hanau, Germany) において24時間、37 °C および5 %CO₂でインキュベートした。トランスフェクション試薬のみ（「モック」）で処置された細胞が、陰性対照となった。ApoB mRNAレベルを、Quantigene Explore Kit QG1.0 (Panomics, Fremont, Calif., USA, カタログ番号QG0004) を用いて定量した。製造業者により推奨された手順にしたがって、細胞を採取し、53 °C で溶解した。インキュベーションおよび溶解の後、細胞溶解物を、マウスApoBおよびマウスGAPDH (正規化のためのハウスキーパーとして) に特異的なプローブセットと共にインキュベートした。アッセイを、製造業者のプロトコルにしたがって処理した。化学発光を、Victor2-Light (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA, カタログ番号V2030) で測定した。

in Elmer, Wiesbaden, Germany)においてRLU(相対光単位)として測定し、ApoBプローブセットで得られた値を、各ウェルのそれぞれのGAPDH値に対して正規化した。グラフ表示のために、10 nMおよび0.4 nMでのApoB mRNAレベルを、1として設定した、モックで処置された細胞のレベルに対して示す(図39)。IC₅₀(標的mRNAが50%低減された)およびIC₈₀(標的mRNAが80%低減された)の値を、XLfitソフトウェア(IDBS, Guildford, UK)を用いて決定し、表27に示す。siRNA XD-05967を、それが最低のIC₈₀値を有したために多量体実験についての最良の候補として選択し、XD-05970を、最良のIC₅₀値のためにバックアップ候補として選択した。

【0388】

(表27) ApoBを標的としたsiRNAのIC₅₀およびIC₈₀値

siRNA	IC ₅₀ (nM)	IC ₈₀ (nM)
XD-05962	1.77	n.a.
XD-05963	n.a.	n.a.
XD-05964	n.a.	n.a.
XD-05965	1.34	n.a.
XD-05966	1.84	n.a.
XD-05967	0.29	9.12
XD-05968	n.a.	n.a.
XD-05969	0.54	n.a.
XD-05970	0.17	44.63
XD-05971	n.a.	n.a.
XD-05972	n.a.	n.a.
XD-05973	n.a.	n.a.

10

20

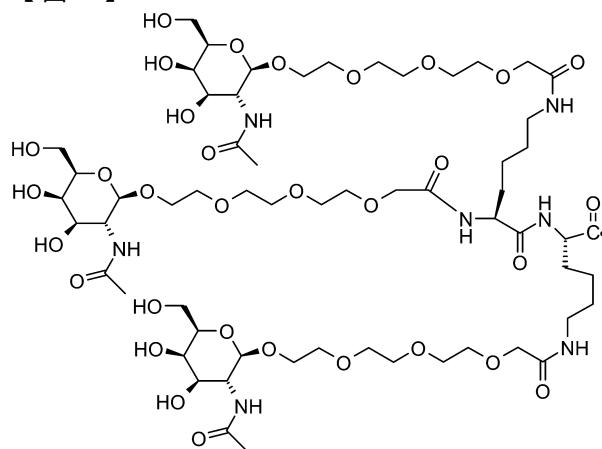
30

40

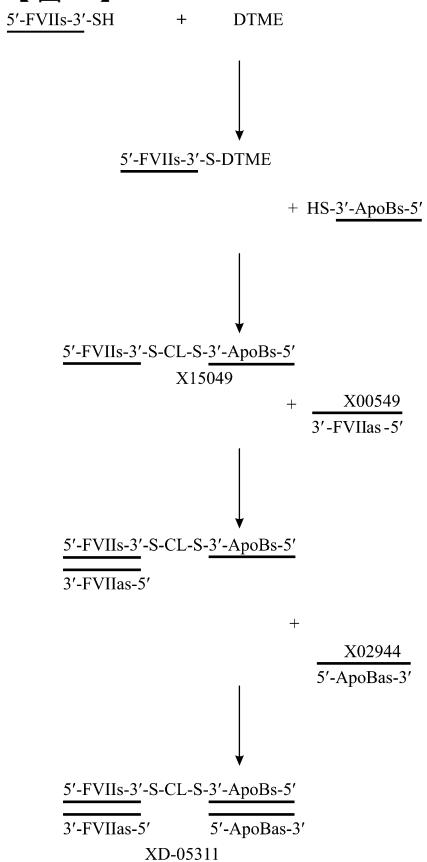
50

【図面】

【図 1】

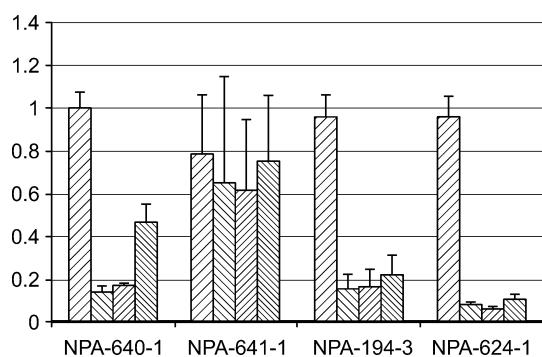


【図 2】



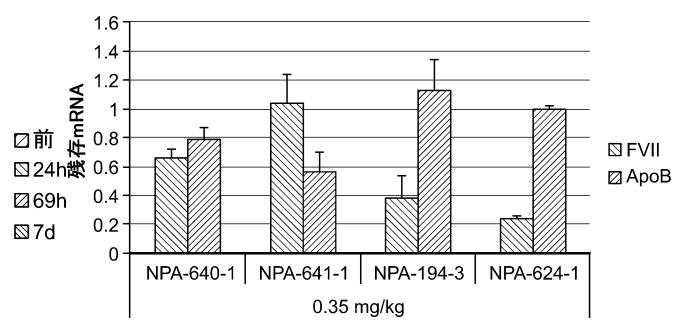
【図 3】

MausRNAi_TV30-血清中のFVII活性
0.35 mg/kg、食塩水で処置された動物 = 1



【図 4】

MausRNAi_TV30-肝臓組織中のFVII
およびApoBのmRNA



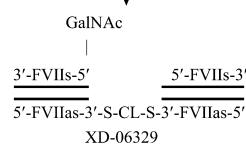
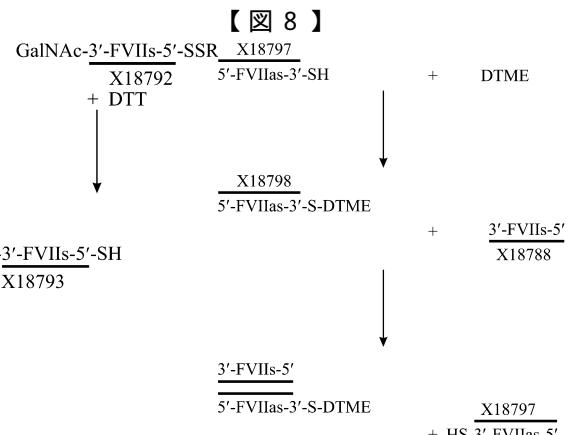
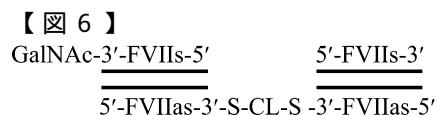
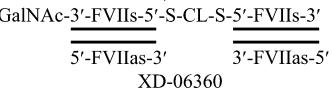
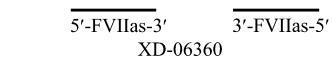
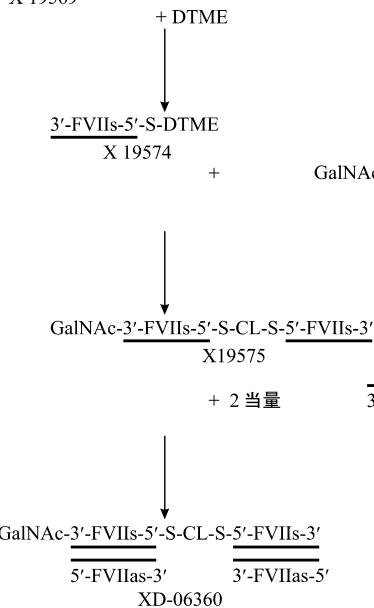
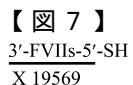
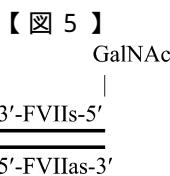
10

20

30

40

50



10

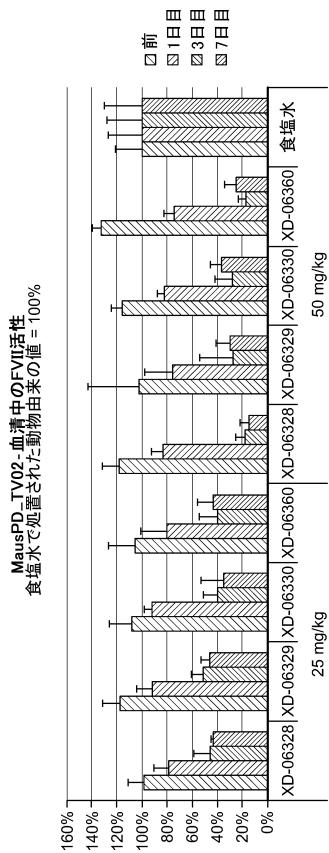
20

30

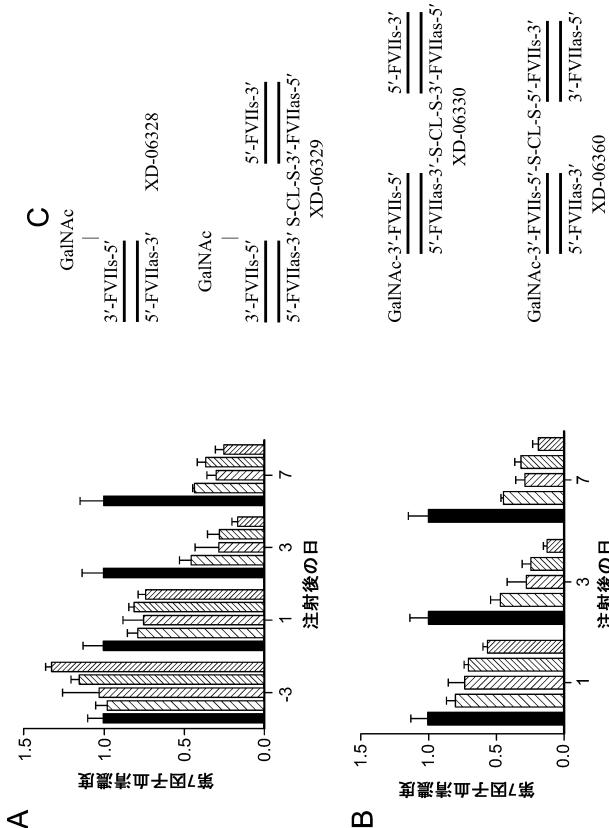
40

50

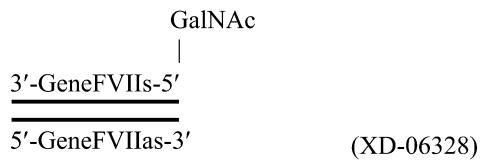
【図9】



【図10】



【図11】

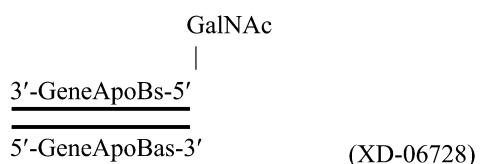
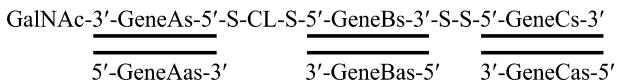


10

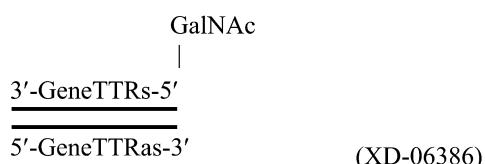
20

30

【図12】

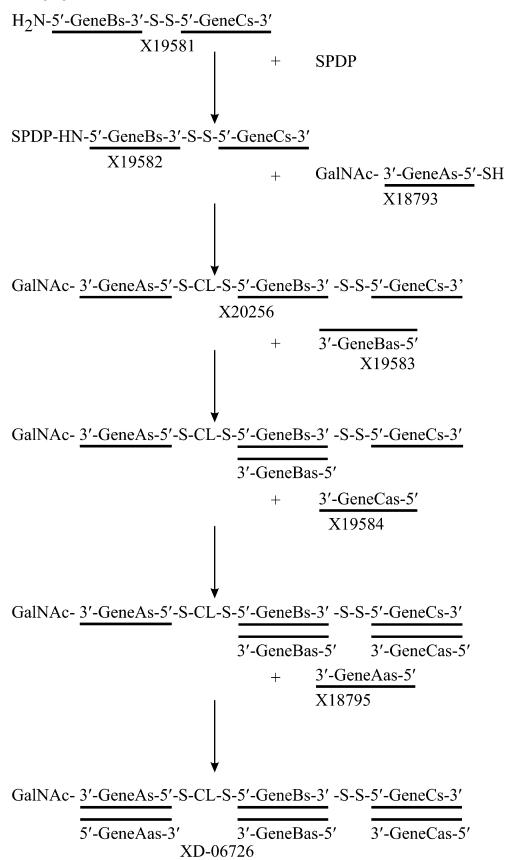


40

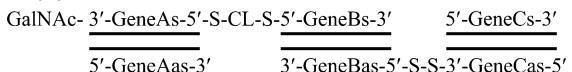


50

【図 1 3】



【図 1 4】

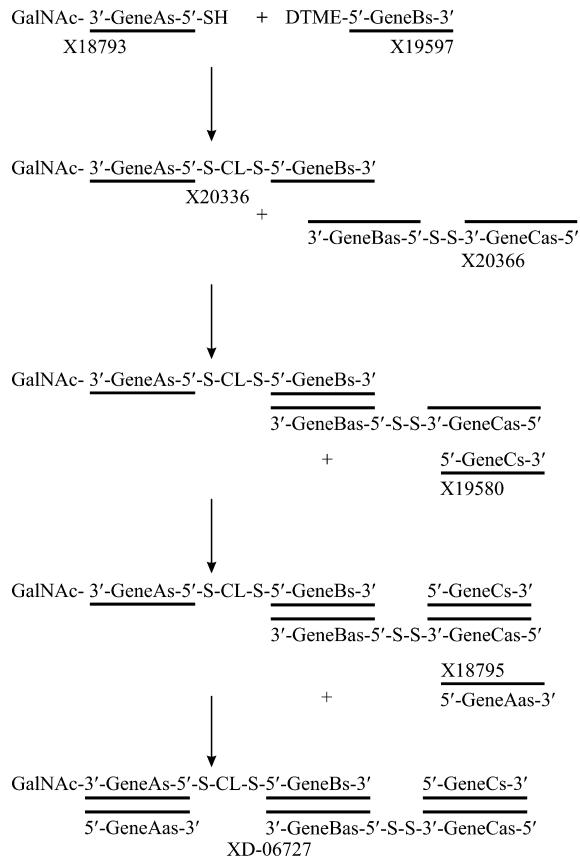


10

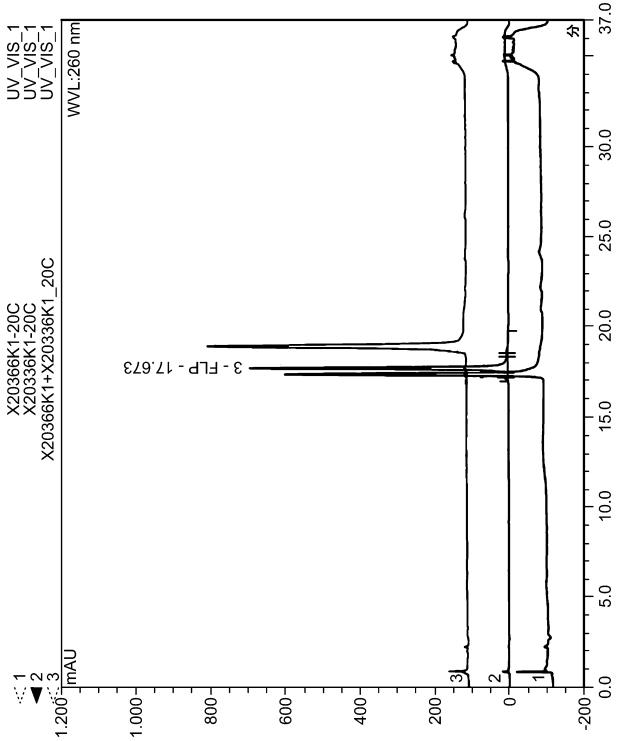
20

40

【図 1 5】

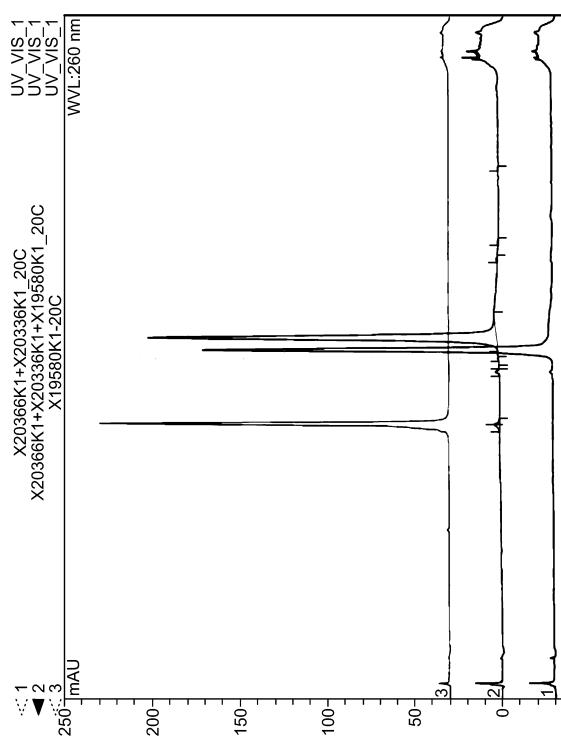


【図 1 6】

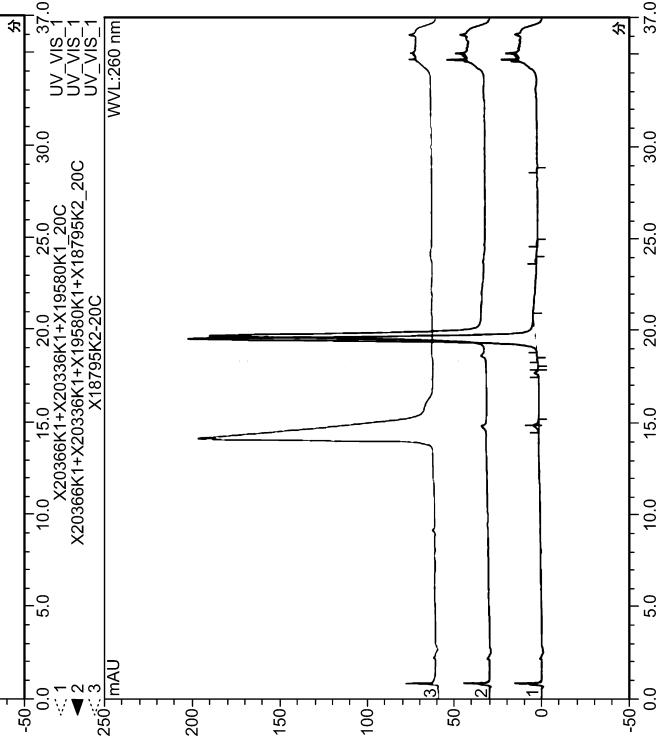


50

【図 17】



【図 18】



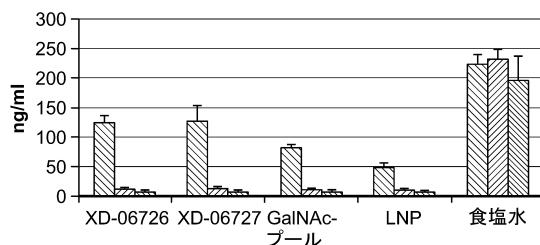
10

20

30

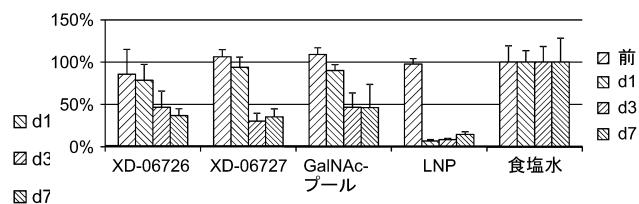
【図 19】

A 血清中のTTRタンパク質レベル
動物A3を省略



【図 20】

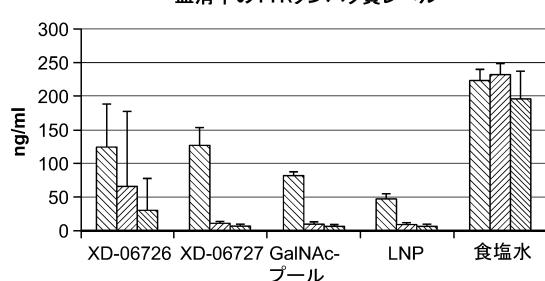
A 血清中のFVII活性
食塩水で処置された動物由来の値=100%



30

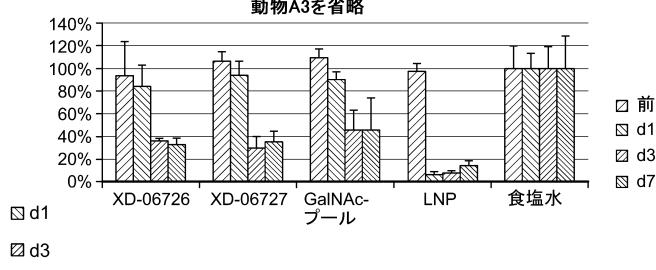
B

血清中のTTRタンパク質レベル



B

血清中のFVII活性
食塩水で処置された動物由来の値=100%
動物A3を省略

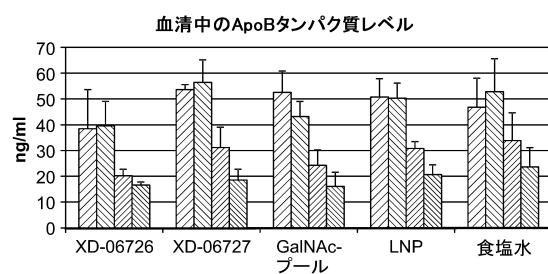


40

50

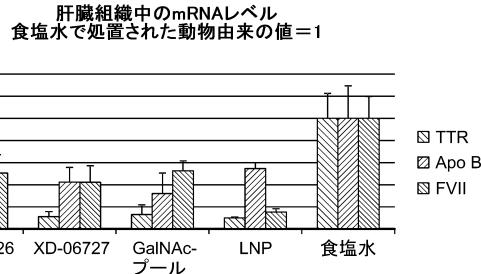
【図 2 1】

A



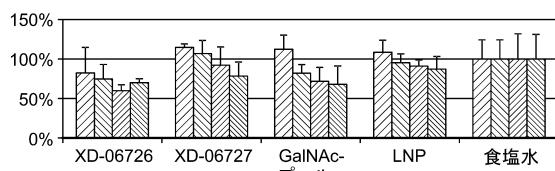
【図 2 2】

A

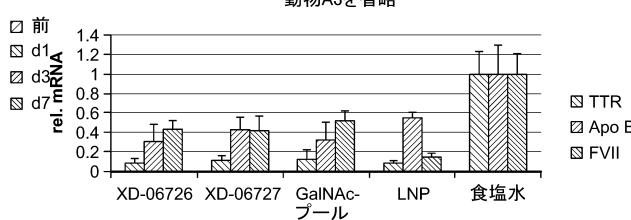


10

B

血清中のApoBタンパク質レベル
食塩水で処置された動物由来の値=100%

B

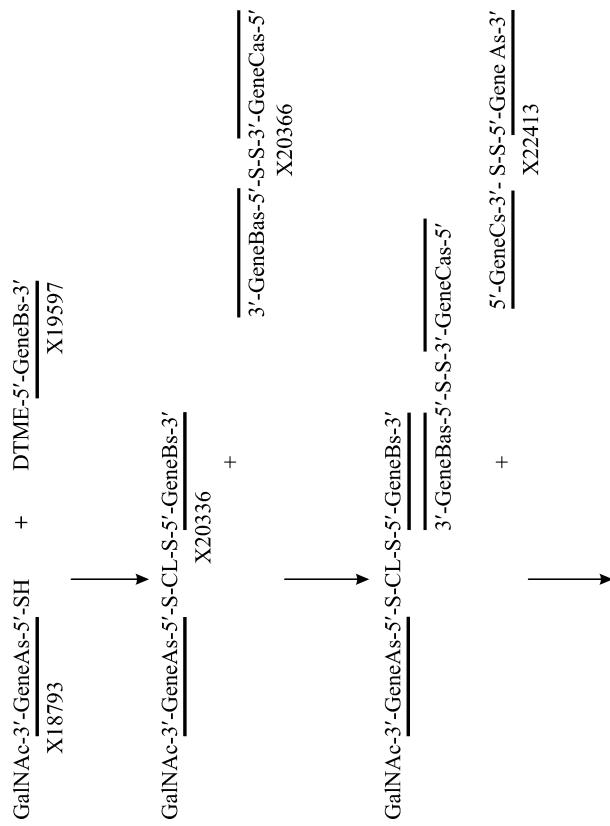
肝臓組織中のmRNAレベル
食塩水で処置された動物由来の値=1
動物A3を省略

20

【図 2 3】



【図 2 4 - 1】

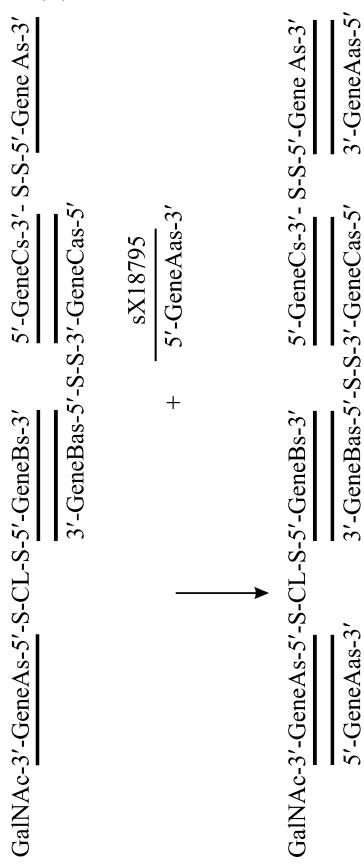


30

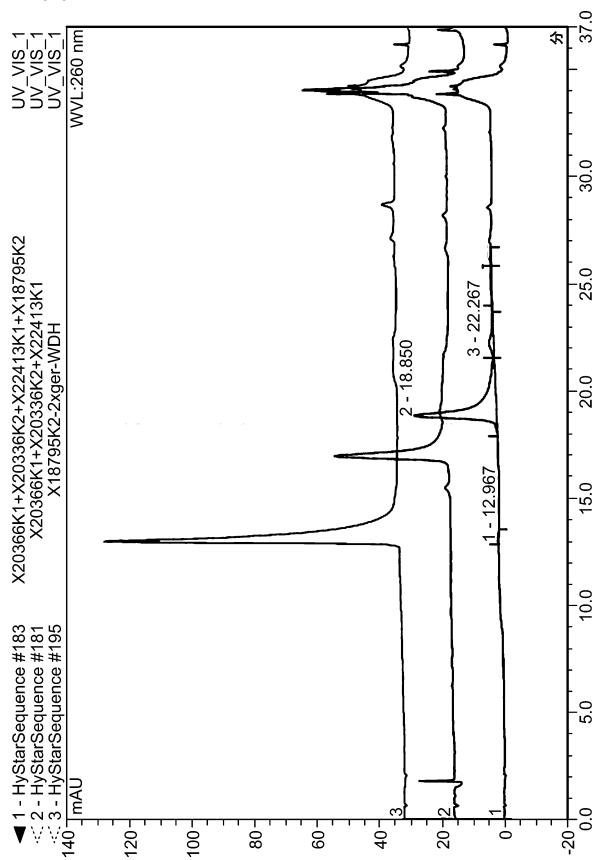
40

50

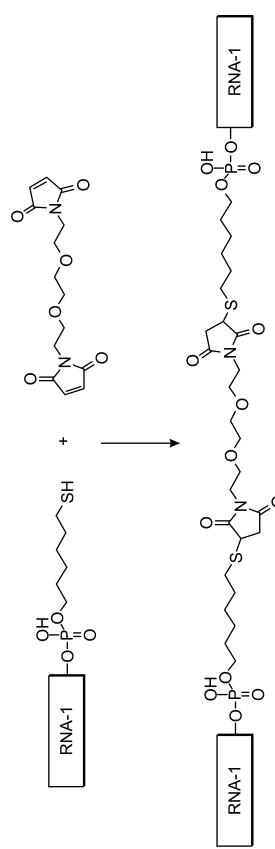
【図 24 - 2】



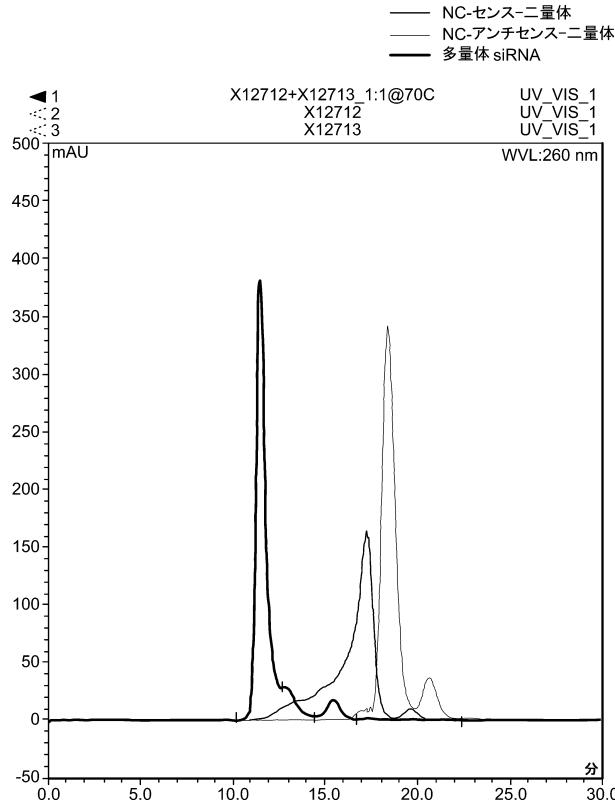
【図 25】



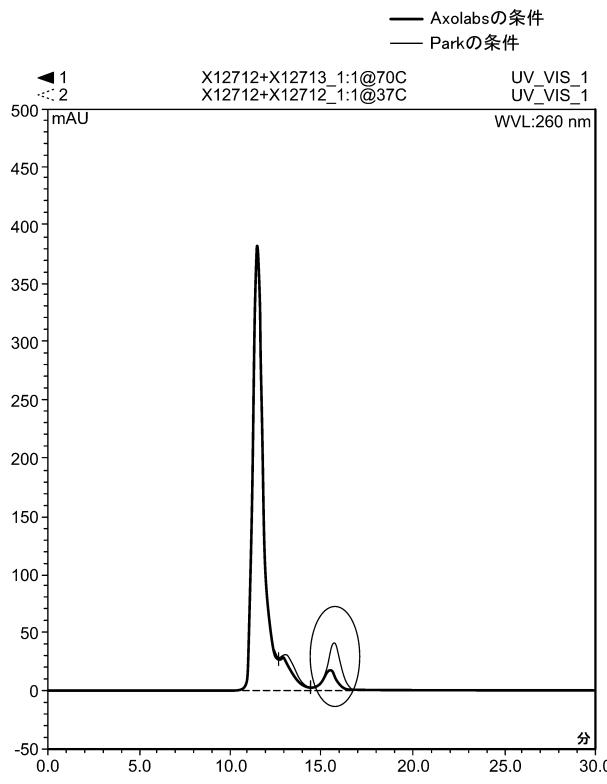
【図 26】



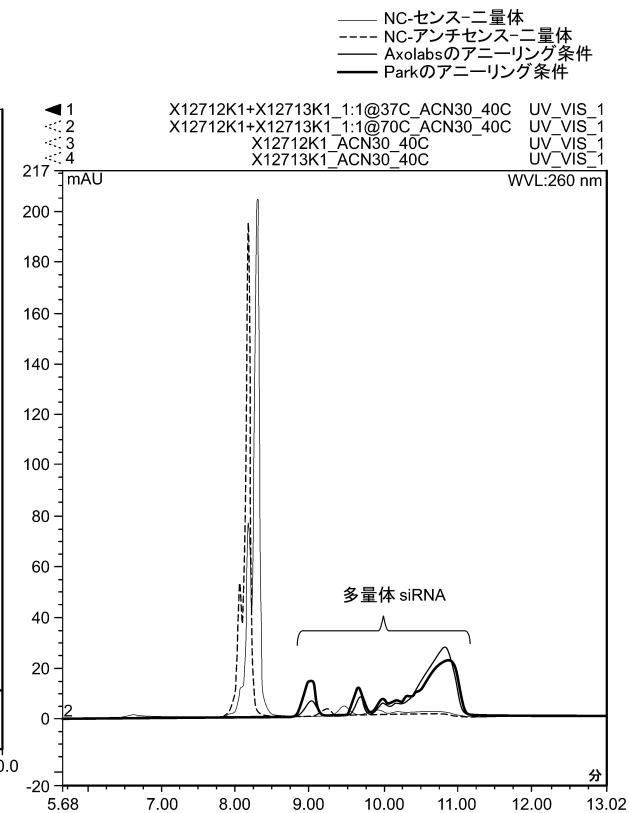
【図 27】



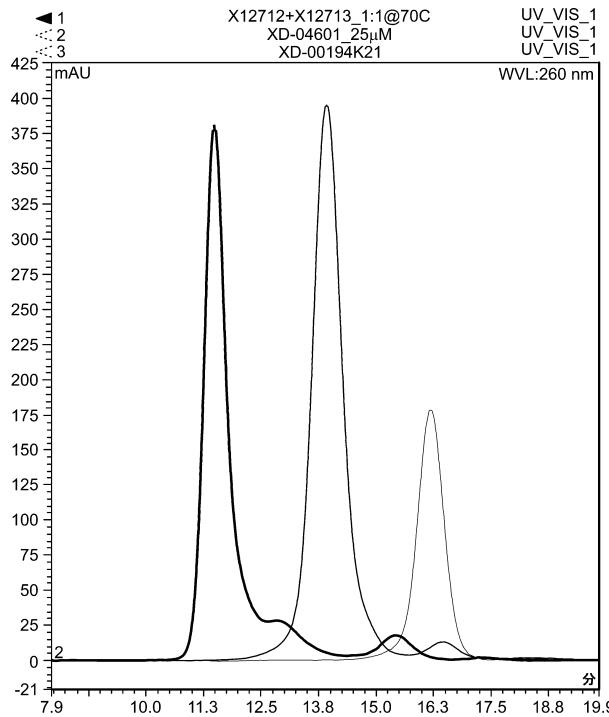
【図 2 8】



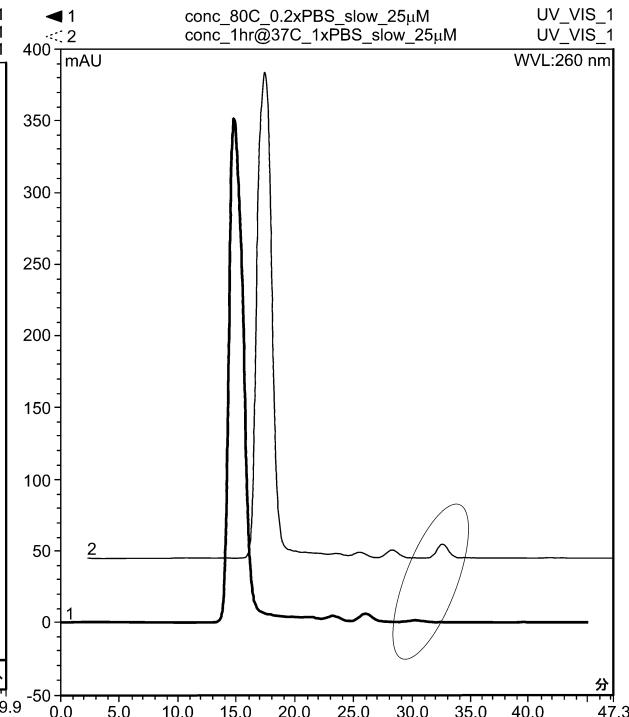
【図 2 9】



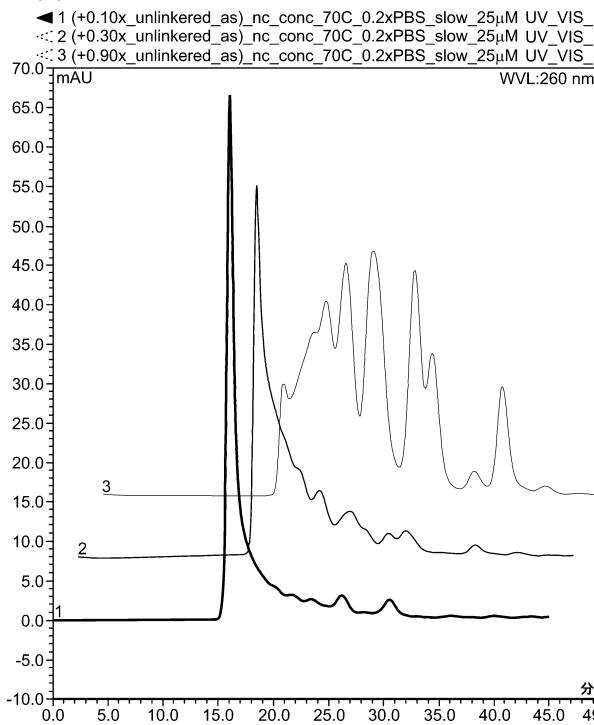
【図 3 0】



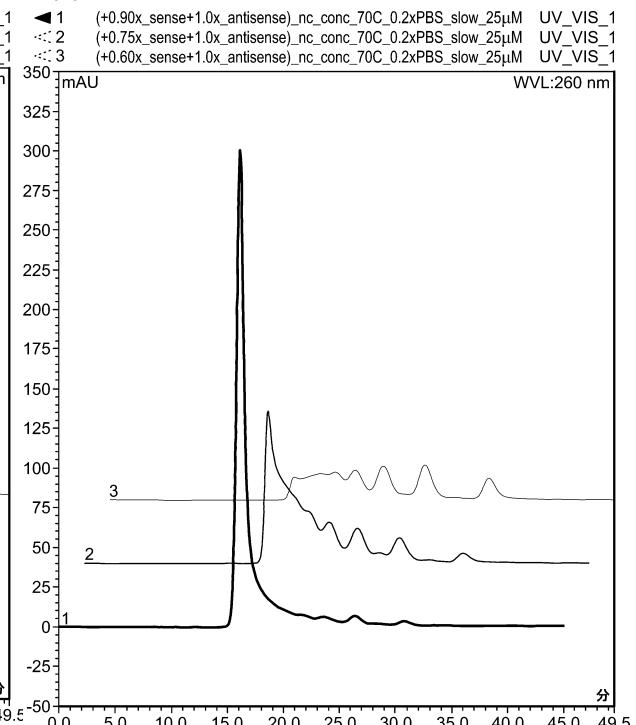
【図 3 1】



【図 3 2】



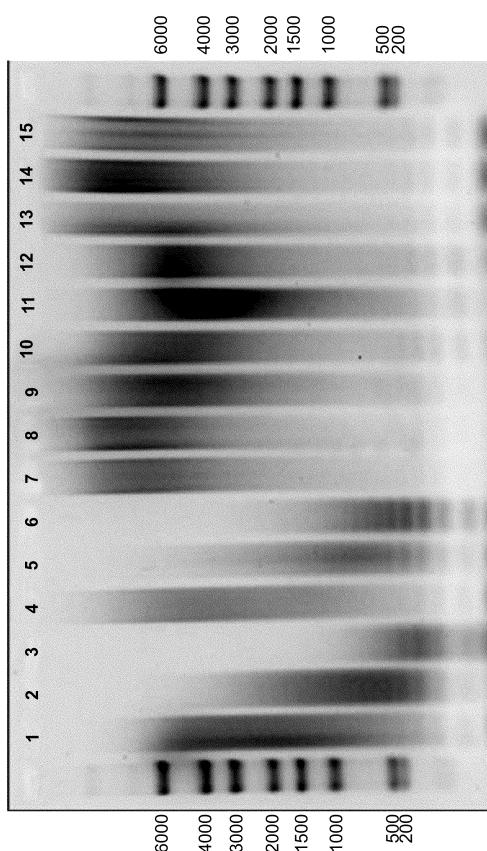
【図 3 3】



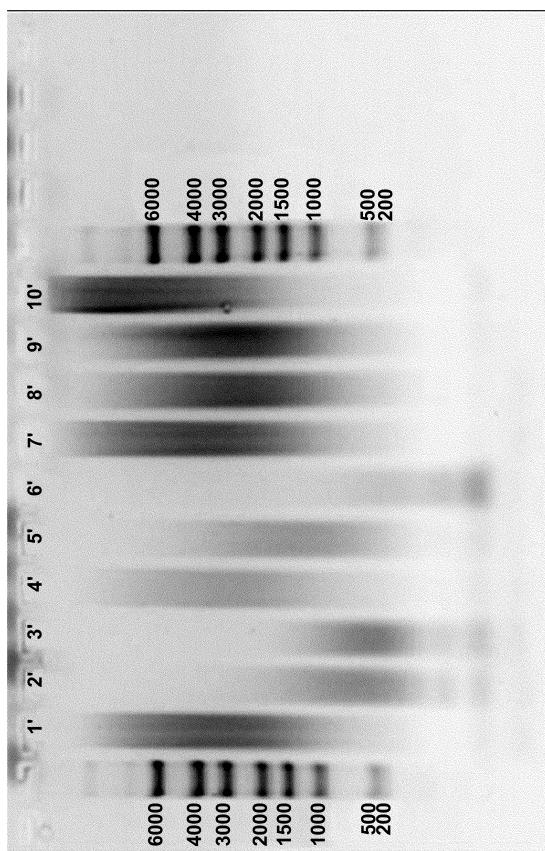
10

20

【図 3 4 A】



【図 3 4 B】

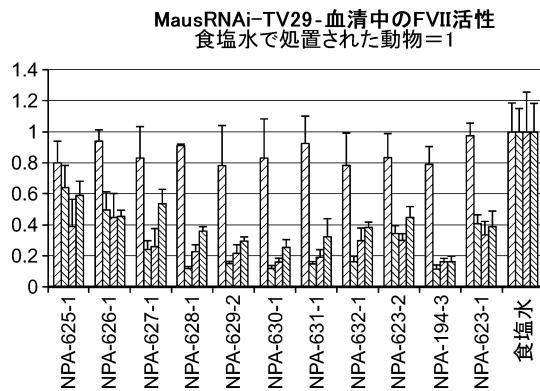


30

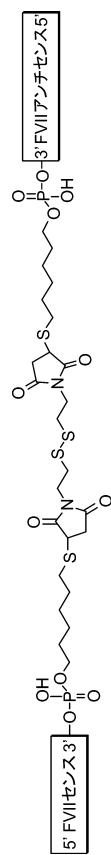
40

50

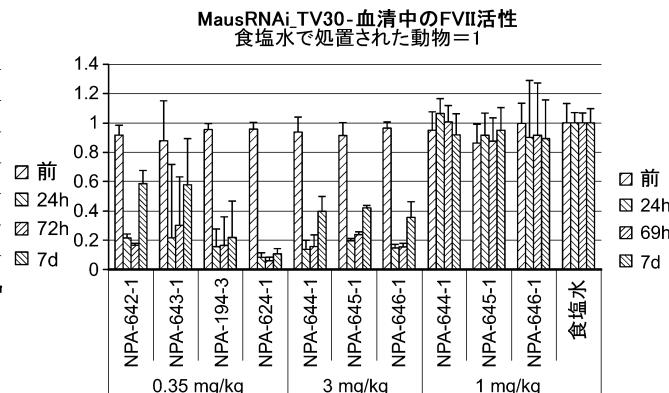
【図35】



【図37】



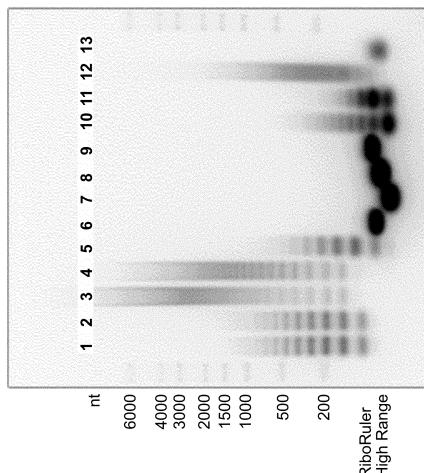
【図36】



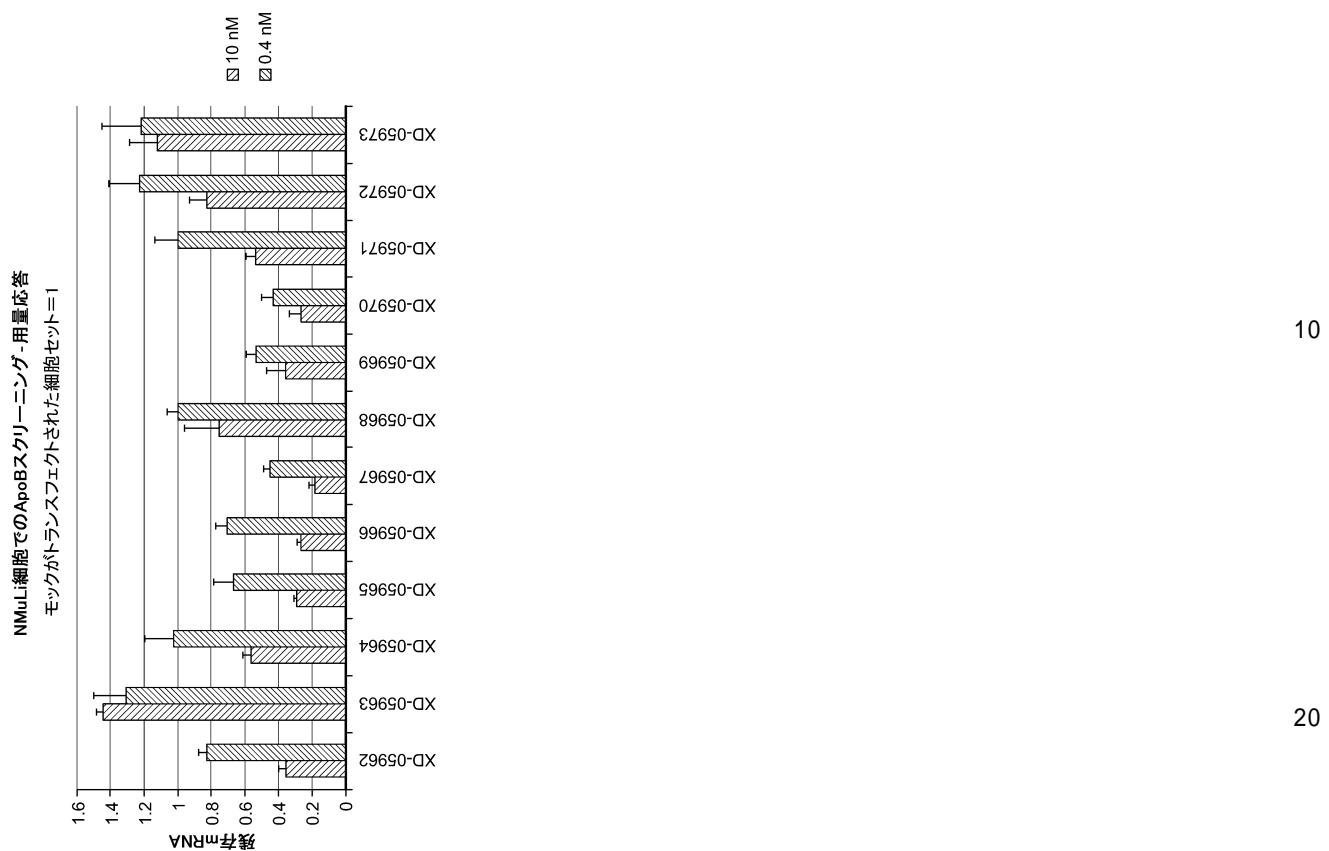
【図38】

1. XD-05305 K1: [レーン-1] 順序不可能
2. XD-05306 K1: [レーン-1] 順序不可能
3. XD-05307 K1: s-c-s → s-c-s
4. XD-05308 K1: s-ncs → s-cas
5. XD-05309 K1: (5) 二進制 SIRNA
6. XD-05310 K1: (6) 二進制 SIRNA
7. XD-05316 K3: FVII 基盤 SIRNA
8. XD-05319 K24: FVII 基盤 SIRNA
9. XD-05331 K1: FVII-ランゲン-c-ApoB-センスと
FVII-アンチセンス および ApoB-アンチセンス
10. XD-05332 K1: FVII-ランゲン-c-ApoB-センスと
FVII-アンチセンス (ニーアール@70°C)
11. XD-05333 K1: FVII-ランゲン-c-ApoB-センスと
FVII-アンチセンス (ニーアール@90°C)
12. XD-12174 K1: FVII ヘテロ二量体
13. X.M15049 K1: FVII/ApoB ヘテロ二量体

1. 5.1μg/レーン
1×TAE中 2% アガロースゲル
140mA 100000
Gel readout (1:10000)



【図 3 9】



【配列表】

0 0 0 7 0 3 3 4 5 2 0 0 0 0 0 1 . a p p

30

40

50

フロントページの続き

(33) 優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31) 優先権主張番号 62/175,709

(32) 優先日 平成27年6月15日(2015.6.15)

(33) 優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31) 優先権主張番号 62/175,714

(32) 優先日 平成27年6月15日(2015.6.15)

(33) 優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31) 優先権主張番号 62/203,243

(32) 優先日 平成27年8月10日(2015.8.10)

(33) 優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31) 優先権主張番号 62/216,318

(32) 優先日 平成27年9月9日(2015.9.9)

(33) 優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31) 優先権主張番号 62/175,718

(32) 優先日 平成27年6月15日(2015.6.15)

(33) 優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

弁理士 井上 隆一

(74) 代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74) 代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74) 代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74) 代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74) 代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74) 代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72) 発明者 ハドヴィガー フィリップ

ドイツ連邦共和国 ディー 9 5 3 2 6 クルムバッハ フリット ホルンシュフ シュトラーセ 9

アクソラバス ゲーエムベーハー

(72) 発明者 ヴォルンロシェル ハンス ピーター

ドイツ連邦共和国 ディー 9 5 3 2 6 クルムバッハ フリット ホルンシュフ シュトラーセ 9

アクソラバス ゲーエムベーハー

(72) 発明者 ブラウン ジョナサン マイルズ

アメリカ合衆国 2 0 8 1 5 メリーランド州 チェバー チェイス ウィスコンシン アベニュー 5

4 2 5 スイート 8 0 1 エムペグ エルエイ リミテッド ライアビリティ カンパニー

(72) 発明者 ダールマン ジェームズ エベレット

アメリカ合衆国 3 0 3 0 6 ジョージア州 アトランタ イースト ロック スプリングス ロード

ノースイースト 1 2 9 5 アパートメント 4 0 3

(72) 発明者 ニューマン クリストイン ケイ . エイチ .

アメリカ合衆国 1 0 5 3 8 ニューヨーク州 ラーチモント サケット ドライブ 1 0

審査官 小林 薫

- (56)参考文献 国際公開第2008/109105(WO,A2)
特表2011-518784(JP,A)
特表2014-527819(JP,A)
米国特許出願公開第2013/0064786(US,A1)
米国特許出願公開第2014/0309281(US,A1)
韓国公開特許第10-2011-0083919(KR,A)
Nature Materials, 2010, Vol.9, pp.272-278
Journal of Controlled Release, 2006, Vol.116, pp.123-129
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C12N 15/00 - 15/90
Caplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS / WPI/DS (STN)