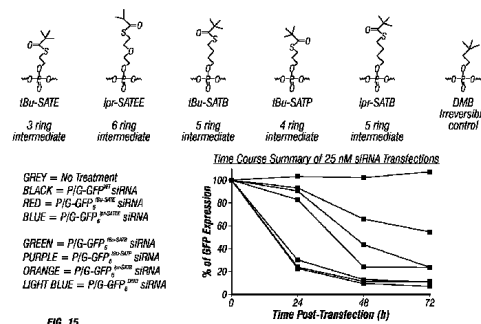




【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、及びこれらの任意の組合せからなる群から選択される成分(i)を含むポリヌクレオチド構築物であって、成分(i)が、ヌクレオチド間架橋基に結合された生物可逆性基を介してポリヌクレオチド構築物に連結されている、ポリヌクレオチド構築物。

【請求項 2】

親水性官能基を含む生物可逆性基、コンジュゲート部分を含む生物可逆性基、並びにコンジュゲート部分及び親水性基を含む生物可逆性基からなる群から選択される少なくとも1種の第2成分(ii)をさらに含み、コンジュゲート部分が保護基をさらに含んでもよい、請求項1に記載のポリヌクレオチド構築物。

10

【請求項 3】

生物可逆性基が、チオエステルを含む、請求項1又は2に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 4】

成分(i)が、ポリヌクレオチド構築物が細胞内輸送されることを可能にし、その結果、生物可逆性基が開裂される、請求項1から3のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 5】

小分子、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、又はこれらの任意の組合せからなる群から選択される少なくとも1種の第3成分(iii)をさらに含み、成分(iii)が、ヌクレオチド間架橋基又は末端ヌクレオチド基の細胞内生物可逆性基にコンジュゲートされている、請求項1から4のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

20

【請求項 6】

成分(iii)が、小分子である、請求項5に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 7】

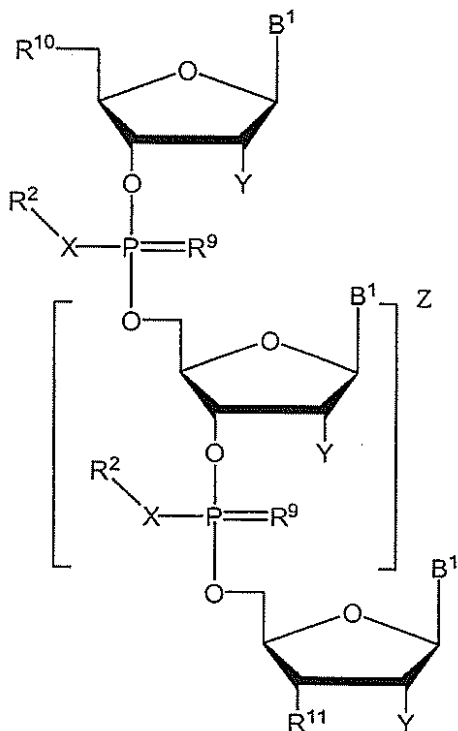
小分子が、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルキルである、請求項6に記載のポリヌクレオチド構築物。

30

【請求項 8】

式II:

【化 1】



式 II,

(式中、

1つの R^2 は、成分(i)を含み、

Zは、0～150の数字であり、

各 B^1 は、個別に核酸塩基であり、各Xは、個別に、O、S及び NR^5 からなる群から選択され、

各Yは、個別に、水素、ヒドロキシル、ハロ、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルコキシ、又は保護されたヒドロキシル基からなる群から選択され、

各 R^2 は、個別に、存在しないか、水素、又は親水性官能基を含む第1生物可逆性基、コンジュゲート部分を含む第2生物可逆性基、或いは小分子、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、又はこれらの組合せからなる群から選択される補助部分を含む第3生物可逆性基であり、ここで、コンジュゲート部分又は親水性官能基は、保護基で保護されていてもよく、

各 R^5 は、個別に、H、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルキル、S-ビバロイルチオエタノール、ヒドロキシル、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルコキシ、置換されていてもよい $C_3 \sim 8$ シクロアルキル、置換されていてもよい $C_6 \sim 12$ アリール、及び置換されていてもよい $C_2 \sim 9$ ヘテロシクリルからなる群から選択され、

各 R^9 は、個別に、O又はSであり、

R^{10} は、H、ヒドロキシル、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルコキシ、保護されたヒドロキシル基、ーリン酸、ニリン酸、三リン酸、四リン酸、五リン酸、5'キャップ、ホスホチオール、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルキル、アミノ含有基、ビオチン含有基、ジゴキシゲニン含有基、コレステロール含有基、色素含有基、クエンチャー含有基、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、及びこれらの任意の組合せからなる群から選択され、

R^{11} は、H、ヒドロキシル、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルコキシ、保護されたヒドロキシル基、ーリン酸、ニリン酸、三リン酸、四リン酸、五リン酸、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルキル、アミノ含有基、ビオチン含有基、ジゴキシゲニン含有基、コレステロール含有基、色素含有基、クエンチャー含有基、ホスホチオール、ペプチド、ポリペプチド

10

20

30

40

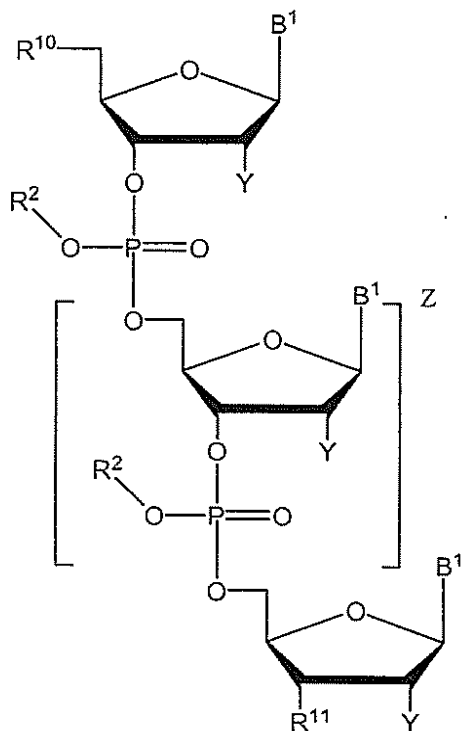
50

、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、及びこれらの任意の組合せからなる群から選択される)の構造を有する、請求項1に記載のポリヌクレオチド構築物又はその塩。

【請求項9】

式II(a):

【化2】



式II(a).

の構造を有するヌクレオチドの1つ以上の鎖を含む、請求項8に記載のポリヌクレオチド構築物。

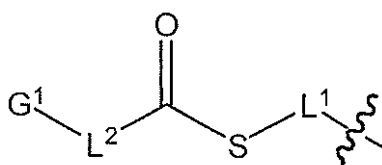
【請求項10】

R²が第1、第2、又は第3生物可逆性基であるヌクレオチドに関して、Yが、F又はOMeである、請求項8又は9に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項11】

生物可逆性基に結合された成分(i)が、構造式V:

【化3】



式V

(式中、

G¹は、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、又はこれらの組合せであり、

L¹は、置換されていてもよいC₂ - ₁₀アルキレン、置換されていてもよいC₂ - ₁₀アルケニレン、又は置換されていてもよいC₂ - ₁₀アルキニレンであり、ここで、アルキレン、アルケニレン、又はアルキニレンのそれぞれは、O、N及びSから選択される1~10個のヘテロ原子で割り込まれていてもよく、

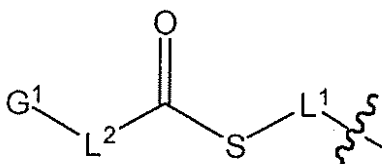
L²は、共有結合であるか、或いは置換されていてもよいC₁ - ₁₀アルキレン、置換されて

いてもよい $C_2 \sim 10$ アルケニレン、置換されていてもよい $C_2 \sim 10$ アルキニレン、及び置換されていてもよい $C_6 \sim 12$ アリーレンから選択され、ここで、アルキレン、アルケニレン、又はアルキニレンのそれぞれは、O、N及びSから選択される1～10個のヘテロ原子で割り込まれていてもよい)

を有する、請求項1に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 1 2】

生物可逆性基に結合された成分(ii)が、構造式V:



式V

10

(式中、

G^1 は、コンジュゲート部分又は親水性官能基であり、

L^1 は、置換されていてもよい $C_2 \sim 10$ アルキレン、置換されていてもよい $C_2 \sim 10$ アルケニレン、又は置換されていてもよい $C_2 \sim 10$ アルキニレンであり、ここで、アルキレン、アルケニレン、又はアルキニレンのそれぞれは、O、N及びSから選択される1～10個のヘテロ原子で割り込まれていてもよく、

20

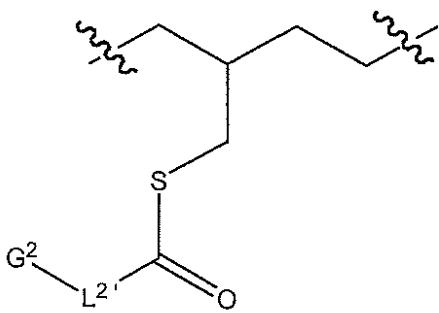
L^2 は、共有結合であるか、或いは置換されていてもよい $C_1 \sim 10$ アルキレン、置換されていてもよい $C_2 \sim 10$ アルケニレン、置換されていてもよい $C_2 \sim 10$ アルキニレン、及び置換されていてもよい $C_6 \sim 12$ アリーレンから選択され、ここで、アルキレン、アルケニレン、又はアルキニレンのそれぞれは、O、N及びSから選択される1～10個のヘテロ原子で割り込まれていてもよい)

を有する、請求項2に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 1 3】

L^1 が、

【化 5】



30

(式中、

$L^{2'}$ は、共有結合であるか、或いは置換されていてもよい $C_1 \sim 10$ アルキレン、置換されていてもよい $C_2 \sim 10$ アルケニレン、置換されていてもよい $C_2 \sim 10$ アルキニレン、及び置換されていてもよい $C_6 \sim 12$ アリーレンから選択され、ここで、アルキレン、アルケニレン、又はアルキニレンのそれぞれは、O、N及びSから選択される1～10個のヘテロ原子で割り込まれていてもよく、

40

G^2 は、コンジュゲート部分、親水性官能基、小分子、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、又はこれらの組合せである)

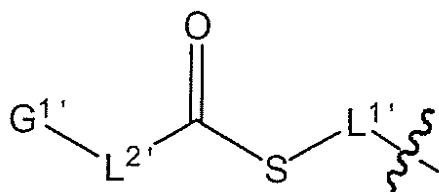
である、請求項11又は12に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 1 4】

式V':

50

【化 6】



式 V'

(式中、

$\text{G}^{1'}$ は、コンジュゲート部分、親水性官能基、小分子、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、又はこれらの組合せであり、

$\text{L}^{1'}$ は、置換されていてもよい $\text{C}_2 \sim 10$ アルキレン、置換されていてもよい $\text{C}_2 \sim 10$ アルケニレン、又は置換されていてもよい $\text{C}_2 \sim 10$ アルキニレンであり、ここで、アルキレン、アルケニレン、又はアルキニレンのそれぞれは、O、N及びSから選択される1～10個のヘテロ原子で割り込まれていてもよく、

$\text{L}^{2'}$ は、共有結合であるか、或いは置換されていてもよい $\text{C}_1 \sim 10$ アルキレン、置換されていてもよい $\text{C}_2 \sim 10$ アルケニレン、置換されていてもよい $\text{C}_2 \sim 10$ アルキニレン、及び置換されていてもよい $\text{C}_6 \sim 12$ アリーレンから選択され、ここで、アルキレン、アルケニレン、又はアルキニレンのそれぞれは、O、N及びSから選択される1～10個のヘテロ原子で割り込まれていてもよい)

の構造をさらに含む、請求項11又は12に記載のポリヌクレオチド構築物。

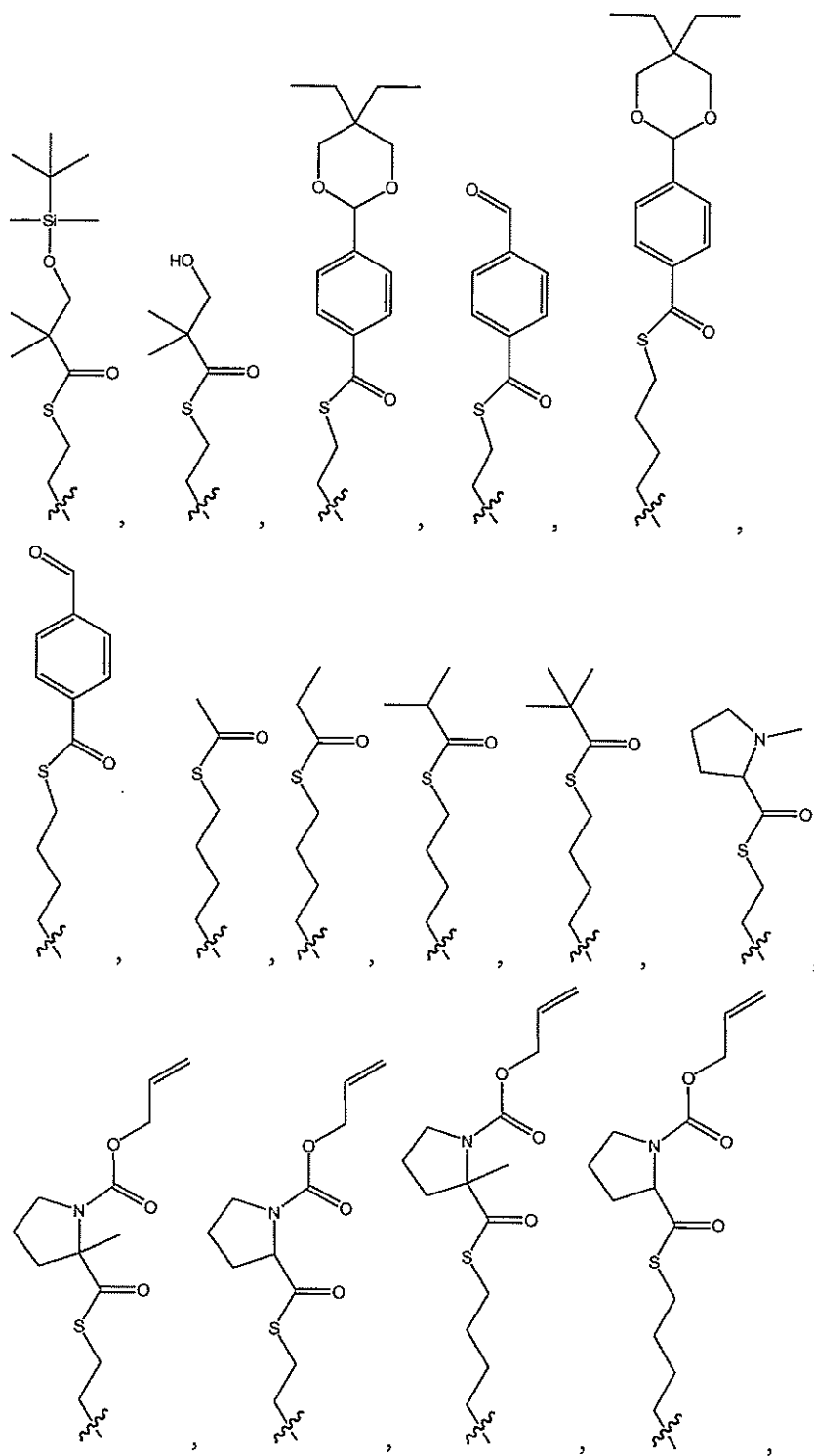
【請求項 15】

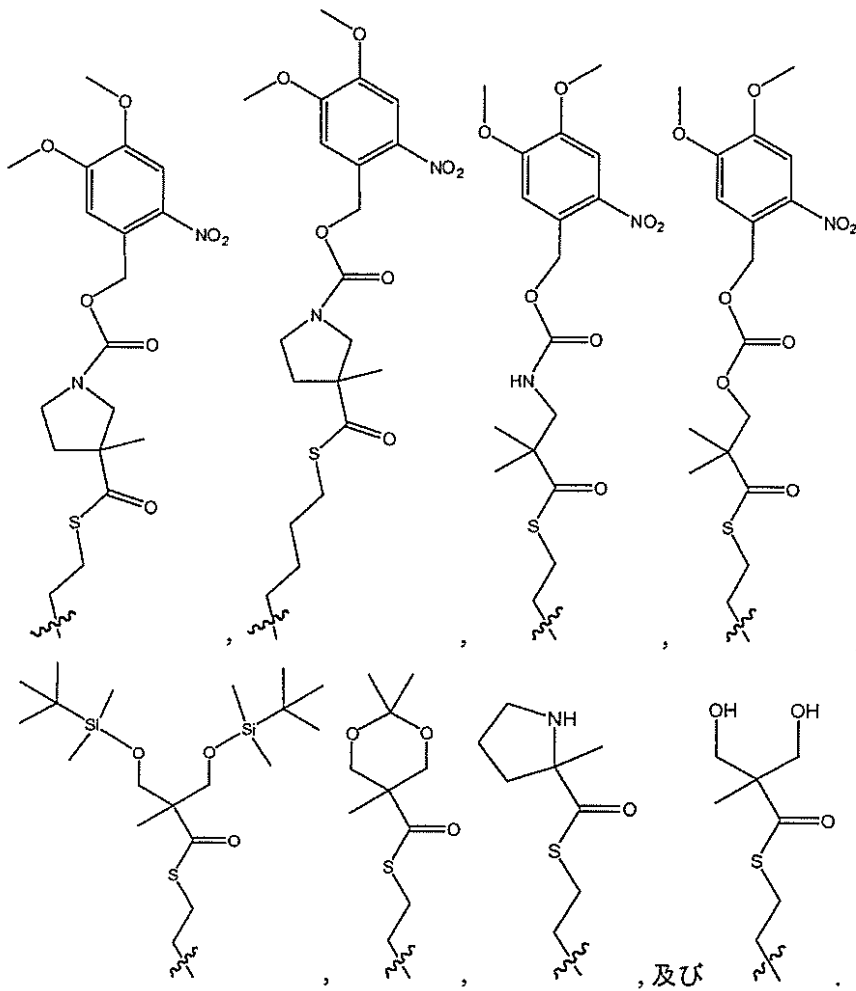
構造式V又はV'が、

10

20

【化 7】





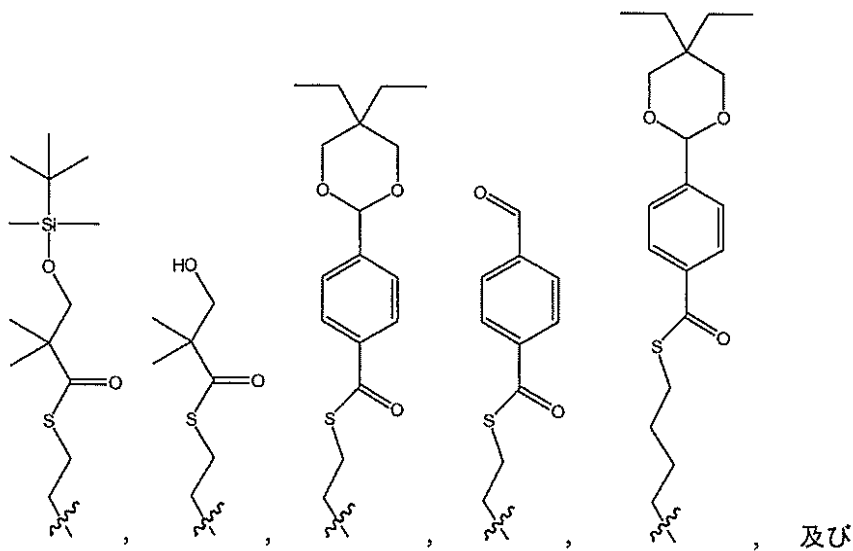
からなる群から選択される、請求項11から14に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項16】

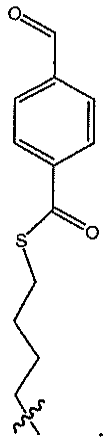
構造式V又はV'が、

【化8】

30



40



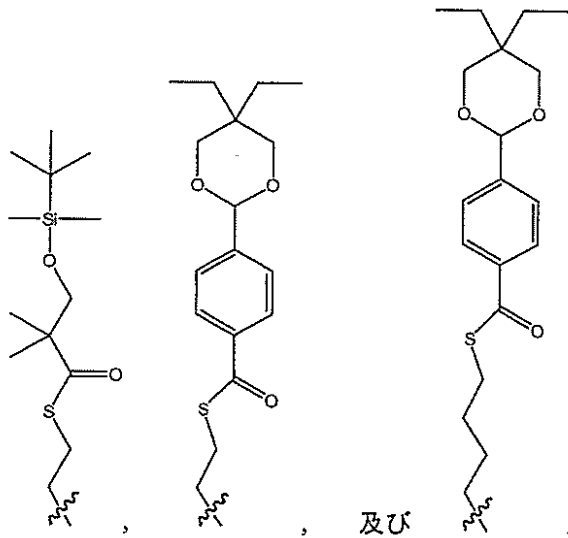
10

からなる群から選択される、請求項15に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項17】

構造式V又はV'が、

【化9】



20

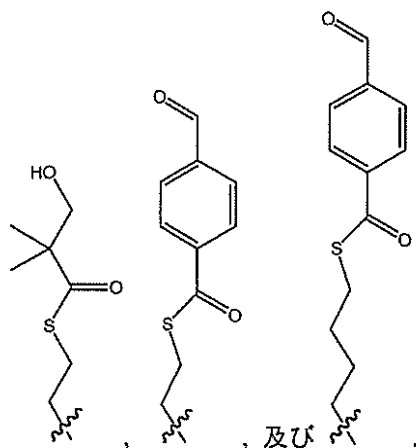
30

からなる群から選択される、請求項15に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項18】

構造式V又はV'が、

【化10】



40

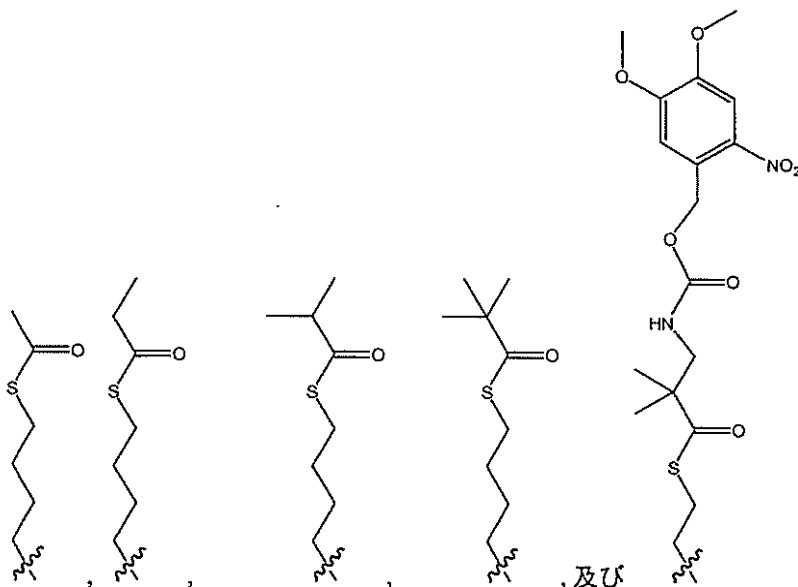
からなる群から選択される、請求項15に記載のポリヌクレオチド構築物。

50

【請求項 19】

構造式V'が、

【化 11】



10

からなる群から選択される、請求項15に記載のポリヌクレオチド構築物。

20

【請求項 20】

L^1 が、置換されていてもよい $C_2 \sim 10$ アルキレンである、請求項11から19のいずれかに記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 21】

L^1 が、非置換又は置換された C_2 、 C_4 又は C_5 アルキレンである、請求項20に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 22】

L^2 が、共有結合である、請求項11から21のいずれかに記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 23】

L^2 が、置換されていてもよい $C_1 \sim 10$ アルキレン又は置換されていてもよい $C_6 \sim 12$ アリーレンである、請求項11から21のいずれかに記載のポリヌクレオチド構築物。

30

【請求項 24】

G^1 が、ヒドロキシルである、請求項12から18及び20から23のいずれかに記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 25】

G^1 が、コンジュゲート部分である、請求項12から18及び20から23のいずれかに記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 26】

コンジュゲート部分が、 $-CHO$ 、チオール、又は $-N_3$ である、請求項25に記載のポリヌクレオチド構築物。

40

【請求項 27】

G^1 が、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、又はこれらの任意の組合せを含む、請求項11、13から18、及び20から24のいずれかに記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 28】

L^2 が結合ではなく、且つ G^1 が、ペリ環状反応；ヒドロキシル、チオール、又はアミノ部分のアルキル化若しくはアリール化；及びヒドロキシル、チオール又はアミノ求核基の電子求引基との反応からなる群から選択される反応によって形成された結合を介して L^2 に結合されている、請求項27に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 29】

50

L^2 が結合ではなく、且つ G^1 が、アミド結合、スルホンアミド結合、カルボン酸エステル、チオエステル、置換されていてもよい $C_6 \sim 12$ アリール若しくは $C_2 \sim 9$ ヘテロアリール、イミン、ヒドラゾン、オキシム、又はスクシンイミドを介して L^2 に結合されている、請求項27に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項30】

R^2 の1つ以上の親水性官能基及び/又はコンジュゲート部分が、保護基で保護されている、請求項12から29のいずれかに記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項31】

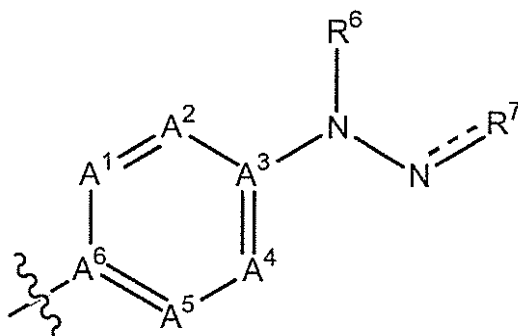
ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、又はこれらの組合せが、アルデヒドコンジュゲート部分との縮合反応を介して生物可逆性基に連結されて、イミン、エナミン又はヒドラゾン結合を形成している、請求項1から30のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

10

【請求項32】

ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、又はこれらの組合せが、式III:

【化12】



(式III)

20

(式中、

A^1 、 A^2 、 A^4 及び A^5 は、それぞれ個別に、N又は CR^8 であり、

30

A^3 及び A^6 は、Cであり、

$R^6 \sim R^7$ は、それぞれ個別に、H、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルキル、置換されていてもよい $C_2 \sim 6$ アルケニル、置換されていてもよいイミン、及び置換されていてもよいエナミンであり、

各 R^8 は、個別に、H、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルキル、置換されていてもよい $C_2 \sim 6$ アルケニル、置換されていてもよい $C_2 \sim 6$ アルキニル、ハロ、ヒドロキシル、-CHO、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アシル、カルボキシル、シアノ、ニトロ、置換されていてもよいアミノ、チオール、置換されていてもよい $C_2 \sim 9$ ヘテロシクリル、置換されていてもよい $C_6 \sim 12$ アリール、置換されていてもよい $C_3 \sim 8$ シクロアルキル、及び置換されていてもよい $C_4 \sim 8$ シクロアルケニルである)

40

の構造を有する1つ以上の窒素含有コンジュゲート部分によって生物可逆性基に連結されている、請求項1から31のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項33】

生物可逆性基の多くても25%が、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、又はこれらの組合せに連結されている、請求項1から32のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項34】

生物可逆性基の多くても50%が、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、又はこれらの組

50

合せに連結されている、請求項1から33のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項35】

生物可逆性基の多くても75%が、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、又はこれらの組合せに連結されている、請求項1から34のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項36】

生物可逆性基の多くても90%が、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、又はこれらの組合せに連結されている、請求項1から35のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

10

【請求項37】

成分(i)が、送達ドメインを含む、請求項1から36のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項38】

送達ドメインが、1つ以上のペプチド導入ドメイン(PTD)を含む、請求項37に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項39】

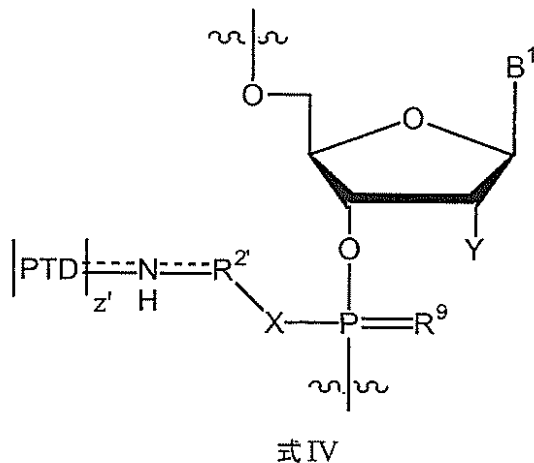
1つ以上のPTDが、イミン、エナミン、又はヒドラゾン結合を介して生物可逆性基に連結されている、請求項37に記載のポリヌクレオチド構築物。

20

【請求項40】

1つ以上のPTDが、生物可逆性基に連結されて構造式IV:

【化13】



30

(式中、

$R^{2'}$ は、PTDに結合された生物可逆性基の残余部であり、

z' は、1~10の数字であり、ここで、 z' が1を超える場合、PTDは、1~10個の繰り返し単位を有するポリ($C_1 \sim 4$ アルキレンオキシド)基を介して一緒に連結されていてもよい)を形成している、請求項37に記載のポリヌクレオチド構築物。

40

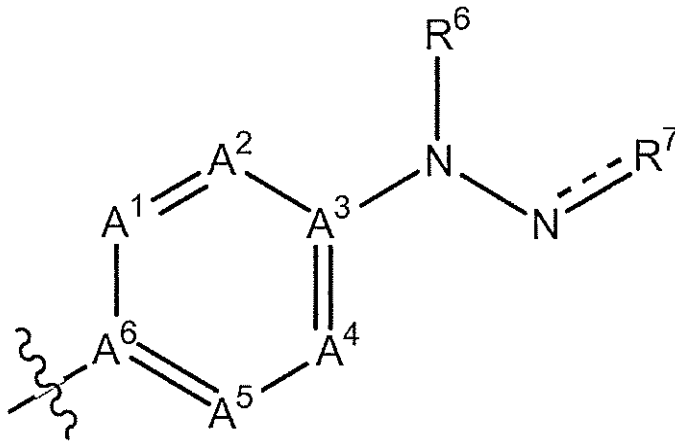
【請求項41】

1つ以上のPTDが、トランス活性化転写活性化因子(TAT)ペプチドである、請求項37から40のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項42】

PTDが、式III:

【化 1 4】



(式III)

(式中、

 A^1 、 A^2 、 A^4 及び A^5 は、それぞれ個別に、N又は CR^8 であり、 A^3 及び A^6 は、Cであり、

$R^6 \sim R^7$ は、それぞれ個別に、H、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルキル、置換されていてもよい $C_2 \sim 6$ アルケニル、置換されていてもよいイミン、及び置換されていてもよいエナミンであり、

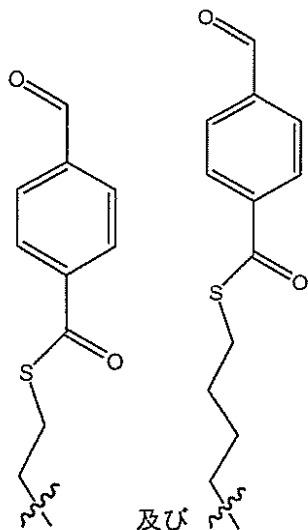
各 R^8 は、個別に、H、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルキル、置換されていてもよい $C_2 \sim 6$ アルケニル、置換されていてもよい $C_2 \sim 6$ アルキニル、ハロ、ヒドロキシル、-CHO、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アシル、カルボキシル、シアノ、ニトロ、置換されていてもよいアミノ、チオール、置換されていてもよい $C_2 \sim 9$ ヘテロシクリル、置換されていてもよい $C_6 \sim 12$ アリール、置換されていてもよい $C_3 \sim 8$ シクロアルキル、及び置換されていてもよい $C_4 \sim 8$ シクロアルケニルである)

の構造を含む相補性コンジュゲート部分を介して生物可逆性基に連結されている、請求項37から41のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 4 3】

コンジュゲーション前の生物可逆性基が、

【化 1 5】



からなる群から選択される、請求項42に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 4 4】

PTDが、5～15個のアミノ酸にわたって5～10個のアルギニン及び/又はリシン残基を有す

るカチオン性ペプチド配列を含む、請求項37から43のいずれかに記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 4 5】

PTDが、配列RKKRRQRRR(配列番号1)を含む、請求項37から44に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 4 6】

成分(i)が、1～10個の繰り返し単位を有するポリ(エチレングリコール)(PEG)にコンジュゲートされたPTDを含む、請求項37から44に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 4 7】

成分(i)が、10
PEG-(PTD)、
GG-(PTD)-PEG-(PTD)、
PEG-(PTD)-PEG-(PTD)、
GG-(PTD)-PEG-PEG-PEG-(PTD)、
PEG-(PTD)-PEG-PEG-PEG-(PTD)、
GG-(PTD)-PEG-(PTD)-PEG-(PTD)、及び
GG-(PTD)-PEG-PEG-PEG-(PTD)-PEG-PEG-PEG-(PTD)
(ここで、PEGは1～10個の繰り返し単位を有するポリ(エチレングリコール)リンカーである)

からなる群から選択される配列を含む、請求項46に記載のポリヌクレオチド構築物。20

【請求項 4 8】

成分(i)が、標的指向性部分を含む、請求項1から36のいずれかに記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 4 9】

標的指向性部分が、リガンド、炭水化物、抗体、FAb、ScFv、又は単一ドメイン抗体である、請求項48に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 5 0】

非天然核酸塩基を含む、請求項1から49のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 5 1】30

天然に存在する核酸塩基のみを含む、請求項1から50のいずれかに記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 5 2】

核酸塩基が、シトシン、グアニン、アデニン、ウラシル、及びチミジンから選択される、請求項51に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 5 3】

ポリヌクレオチド構築物中のヌクレオチドの75%以下が、生物可逆性基を有する、請求項1から52のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 5 4】

ポリヌクレオチド構築物中のヌクレオチドの65%以下が、生物可逆性基を有する、請求項1から53のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。40

【請求項 5 5】

ポリヌクレオチド構築物が、2～40個の生物可逆性基を含む、請求項1から54のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 5 6】

ポリヌクレオチド構築物が、5～10個の生物可逆性基を含む、請求項1から55のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 5 7】

ポリヌクレオチド構築物が、10～32個のヌクレオチドを有する、請求項1から56のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。50

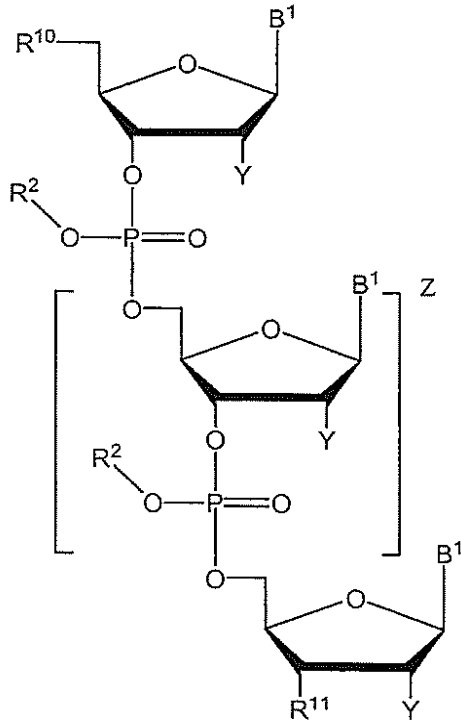
【請求項 58】

ポリヌクレオチド構築物が、17～30個のヌクレオチドを有する、請求項57に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 59】

式II(a):

【化 16】



式II(a),

[式中、

1つの R^2 は、成分(i)を含み、

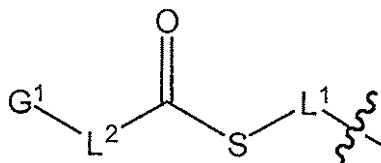
Zは、0～30の数字であり、

各 B^1 は個別に核酸塩基であり、

各Yは、個別に、ヒドロキシル、ハロ、又は $C_1 \sim 6$ アルコキシからなる群から選択され、

各 R^2 は、個別に、存在しないか、水素、式Vの基:

【化 17】



式V

(式中、

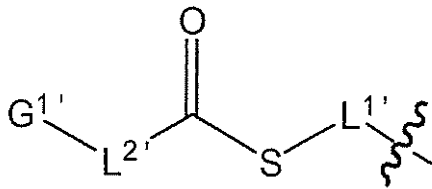
G^1 は、ペプチド、ポリペプチド、中性有機ポリマー、又はこれらの任意の組合せであり、

L^1 は、置換されていてもよい $C_2 \sim 6$ アルキレン、置換されていてもよい $C_2 \sim 6$ アルケニレン、又は置換されていてもよい $C_2 \sim 6$ アルキニレンであり、ここで、アルキレン、アルケニレン、又はアルキニレンのそれぞれは、1又は2つの酸素原子で割り込まれていてもよく、

L^2 は、共有結合であるか、或いは置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルキレン、置換されていてもよい $C_2 \sim 6$ アルケニレン、置換されていてもよい $C_2 \sim 6$ アルキニレン、及び置換さ

れていてもよい $C_6 \sim 10$ アリーレンから選択される)、又は式V'の基:

【化 1 8】



式V'

(式中、

$G^{1'}$ は、水素、アルデヒド、若しくは保護されたアルデヒド、ヒドロキシル、保護されたヒドロキシル、アミン、保護されたアミン、又は保護基若しくは $C_1 \sim 6$ アルキルで置換されていてもよい5又は6員の複素環式アミンであり、

$L^{1'}$ は、置換されていてもよい $C_2 \sim 6$ アルキレンであり、ここで、各アルキレンは、1又は2つの酸素原子で割り込まれていてもよく、

$L^{2'}$ は、共有結合であるか、或いは置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルキレン及び置換されていてもよい $C_6 \sim 10$ アリーレンから選択される)であり、

R^{10} は、H、ヒドロキシル、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルコキシ、保護されたヒドロキシル基、ーリン酸、二リン酸、三リン酸、5'キャップ、ホスホチオール、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルキル、アミノ含有基、ペプチド、ポリペプチド、中性有機ポリマー、並びにペプチド、ポリペプチド及び中性有機ポリマーの任意の組合せからなる群から選択され、

R^{11} は、H、ヒドロキシル、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルコキシ、保護されたヒドロキシル基、ーリン酸、二リン酸、三リン酸、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルキル、ペプチド、ポリペプチド、中性有機ポリマー、並びにペプチド、ポリペプチド及び中性有機ポリマーの任意の組合せからなる群から選択される]

の構造を有する、請求項1に記載のポリヌクレオチド構築物又はその塩。

【請求項 6 0】

R^2 が式V又はV'の基であるヌクレオチドに関して、Yが、F又はOMeである、請求項59に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 6 1】

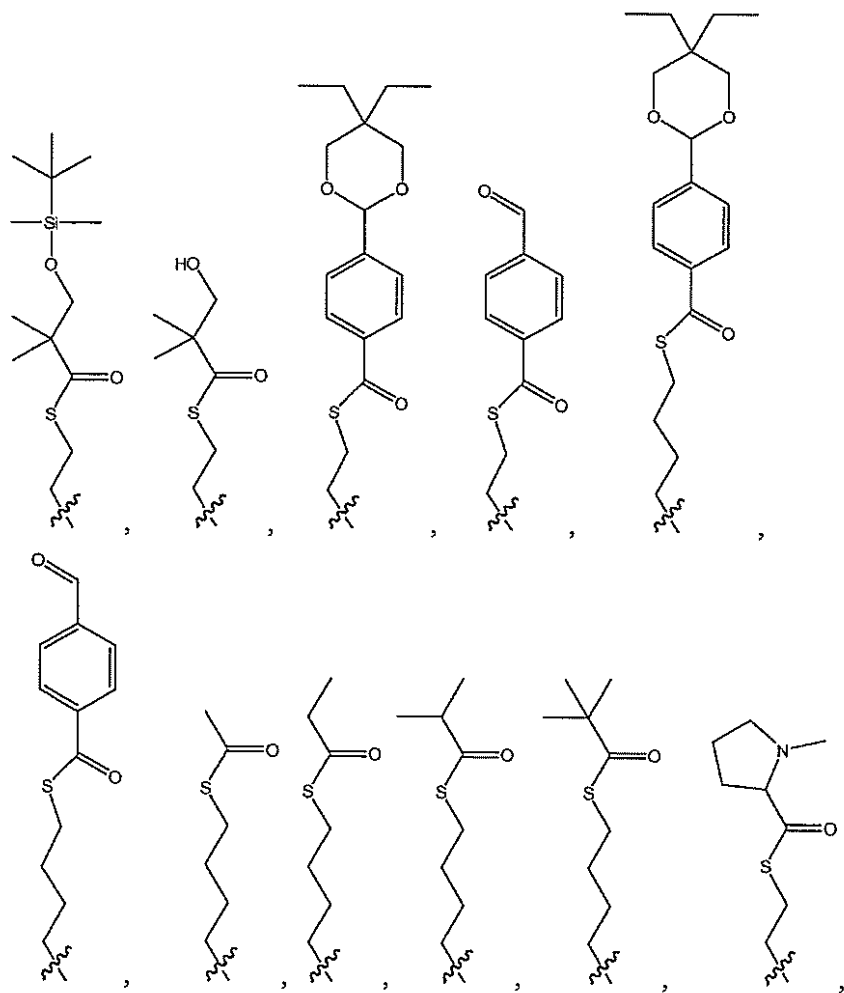
構造式V'が、

10

20

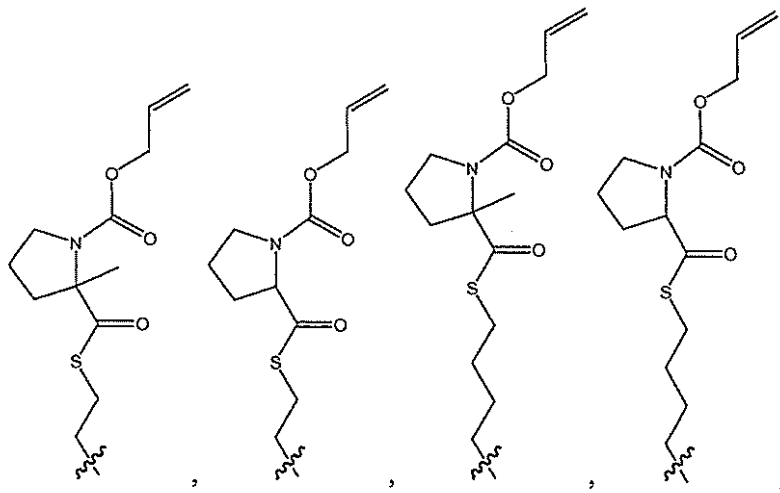
30

【化 1 9】

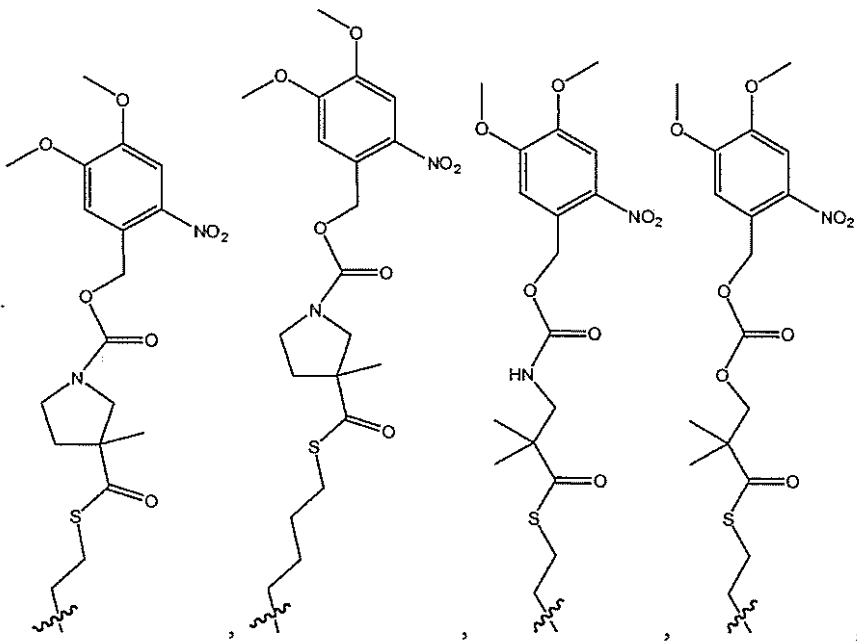


10

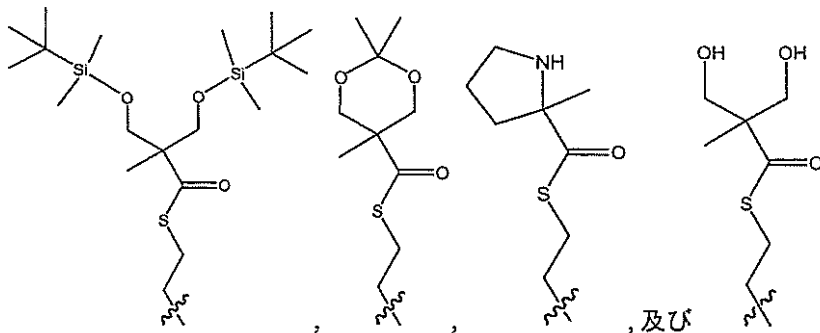
20



10



20



30

からなる群から選択される、請求項59又は60に記載のポリヌクレオチド構築物。

40

【請求項 6 2】

G^1 が、送達ドメインを含む、請求項59から61のいずれかに記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 6 3】

送達ドメインが、1つ以上のペプチド導入ドメイン(PTD)を含む、請求項62に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 6 4】

G^1 、 R^{10} 又は R^{11} の中性有機ポリマーが、ポリ(エチレングリコール)である、請求項59から63のいずれかに記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 6 5】

50

各 R^5 は、個別に、H、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルキル、S-ピバロイルチオエタノール、ヒドロキシル、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルコキシ、置換されていてもよい $C_3 \sim 8$ シクロアルキル、置換されていてもよい $C_6 \sim 12$ アリール、及び置換されていてもよい $C_2 \sim 9$ ヘテロシクリルからなる群から選択され、

各 R^9 は、個別にO又はSであり、

R^{10} は、H、ヒドロキシル、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルコキシ、保護されたヒドロキシル基、ーリン酸、ニリン酸、三リン酸、四リン酸、五リン酸、5'キャップ、ホスホチオール、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルキル、アミノ含有基、ビオチン含有基、ジゴキシゲニン含有基、コレステロール含有基、色素含有基、クエンチャー含有基、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、

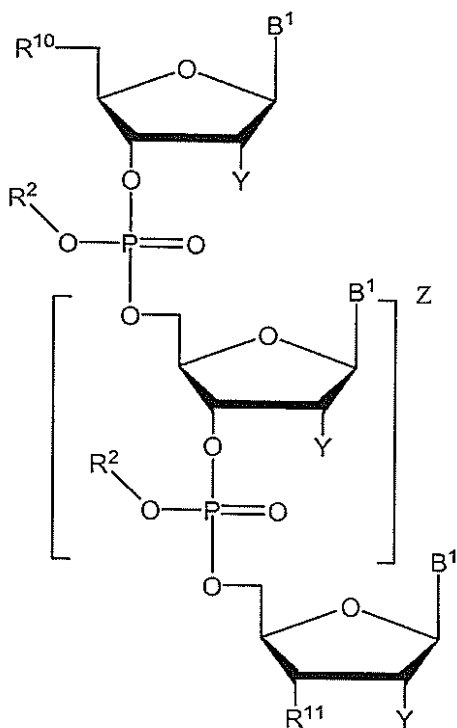
R^{11} は、H、ヒドロキシル、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルコキシ、保護されたヒドロキシル基、ーリン酸、ニリン酸、三リン酸、四リン酸、五リン酸、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルキル、アミノ含有基、ビオチン含有基、ジゴキシゲニン含有基、コレステロール含有基、色素含有基、クエンチャー含有基、ホスホチオール、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、及びこれらの任意の組合せからなる群から選択される)

の構造を有する、請求項65に記載のポリヌクレオチド構築物又はその塩。

【請求項 6 7】

式II(a):

【化 2 2】



式II(a).

の構造を有するヌクレオチドの1つ以上の鎖を含む、請求項66に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 6 8】

R^2 が生物可逆性基(i)、(ii)又は(iii)であるヌクレオチドに関して、Yが、F又はOMeである、請求項66又は67に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 6 9】

ポリヌクレオチド構築物が、 R^2 基の混合物を含み、ここで、

1つ以上の R^2 基は、存在しないか、Hであり、

1つ以上の R^2 基は、生物可逆性基(i)であり、且つ

1つ以上の R^2 基は、生物可逆性基(ii)又は(iii)である、請求項66から68のいずれかに記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 7 0】

存在しないかHである R^2 基の、生物可逆性基(i)、(ii)又は(iii)である R^2 基に対する比率が、1:10~10:1である、請求項69に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 7 1】

存在しないかHである R^2 基の、生物可逆性基(i)、(ii)又は(iii)である R^2 基に対する比率が、1:5~5:1である、請求項69に記載のポリヌクレオチド構築物。

10

【請求項 7 2】

存在しないかHである R^2 基の、生物可逆性基(i)、(ii)又は(iii)である R^2 基に対する比率が、1:4~4:1である、請求項69に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 7 3】

存在しないかHである R^2 基の、生物可逆性基(i)、(ii)又は(iii)である R^2 基に対する比率が、1:3~3:1である、請求項69に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 7 4】

存在しないかHである R^2 基の、生物可逆性基(i)、(ii)又は(iii)である R^2 基に対する比率が、1:2~2:1である、請求項69に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 7 5】

存在しないかHである R^2 基の、生物可逆性基(i)、(ii)又は(iii)である R^2 基に対する比率が、1:1である、請求項69に記載のポリヌクレオチド構築物。

20

【請求項 7 6】

生物可逆性基(i)である R^2 基の、生物可逆性基(ii)又は(iii)である R^2 基に対する比率が、1:10~10:1である、請求項69に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 7 7】

生物可逆性基(i)である R^2 基の、生物可逆性基(ii)又は(iii)である R^2 基に対する比率が、1:5~5:1である、請求項69に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 7 8】

生物可逆性基(i)である R^2 基の、生物可逆性基(ii)又は(iii)である R^2 基に対する比率が、1:4~4:1である、請求項69に記載のポリヌクレオチド構築物。

30

【請求項 7 9】

生物可逆性基(i)である R^2 基の、生物可逆性基(ii)又は(iii)である R^2 基に対する比率が、1:3~3:1である、請求項69に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 8 0】

生物可逆性基(i)である R^2 基の、生物可逆性基(ii)又は(iii)である R^2 基に対する比率が、1:2~2:1である、請求項69に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 8 1】

生物可逆性基(i)である R^2 基の、生物可逆性基(ii)又は(iii)である R^2 基に対する比率が、1:1である、請求項69に記載のポリヌクレオチド構築物。

40

【請求項 8 2】

相補性ポリヌクレオチドにハイブリッド化された請求項1から81のいずれかに記載のポリヌクレオチド構築物を含む、ハイブリッド化ポリヌクレオチド。

【請求項 8 3】

相補性ポリヌクレオチドが、ヌクレオチド間架橋基又は末端ヌクレオチド基にコンジュゲートされた細胞内生物可逆性基を含む、請求項82に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 8 4】

請求項1から75に記載のポリヌクレオチド構築物、及び相補性ポリヌクレオチドが、それぞれ9つ以下の生物可逆性基を含む、請求項82又は83に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 8 5】

50

ヌクレオチドの総数の75%以下が、生物可逆性基を有する、請求項82から84のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

【請求項 8 6】

請求項1から75に記載のポリヌクレオチド構築物、及び相補性ヌクレオチドが、それぞれ10～32個のヌクレオチドを有する、請求項82から85のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

【請求項 8 7】

請求項1から75に記載のポリヌクレオチド構築物、及び相補性ヌクレオチドが、それぞれ19～25個のヌクレオチドを有する、請求項86に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 8 8】

ハイブリッド化ポリヌクレオチドが、siRNAである、請求項82から87のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

【請求項 8 9】

請求項1から75に記載のポリヌクレオチド構築物がガイド鎖であり、相補性ポリヌクレオチドがパッセンジャー鎖である、請求項88に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 9 0】

パッセンジャー鎖が、細胞内酵素によって開裂できない部分を有するリン酸トリエステルを含む、請求項89に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 9 1】

細胞内酵素によって開裂できない部分が、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルキルである、請求項90に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 9 2】

請求項1から91のいずれかに記載のポリヌクレオチド構築物又はポリヌクレオチド、及び薬学上許容される賦形剤を含む医薬組成物。

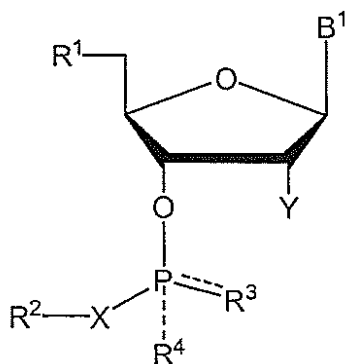
【請求項 9 3】

請求項1から91のいずれかに記載の構築物又はハイブリッド化ポリヌクレオチドを細胞に、遺伝子発現のアンチセンス又はRNAi介在性低減を誘導するのに十分な量で投与することを含む、タンパク質の発現を低減する方法。

【請求項 9 4】

式(I):

【化 2 3】



式(I),

(式中、

B^1 は、核酸塩基であり、

Xは、O、S又は NR^5 であり、

Yは、ハロ、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルコキシ、又は保護されたヒドロキシル基であり、

R^1 は、ヒドロキシル、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルコキシ、保護されたヒドロキシル基、一リン酸、二リン酸、三リン酸、四リン酸、又は五リン酸であり、

R^2 は、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、及びこれらの任意の組合せからなる群から選択される補助部分を含む生物可逆性基であり、ここで、補助部分は、1つ以上の共有結合で生物可逆性基に連結されており、

R^3 は、O、S、又は置換されていてもよいアミノであり、

R^4 は、H、ヒドロキシル、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルコキシ、保護されたヒドロキシル基、ーリン酸、二リン酸、三リン酸、四リン酸、五リン酸であるか、 R^3 が置換されていてもよいアミノである場合は存在せず、

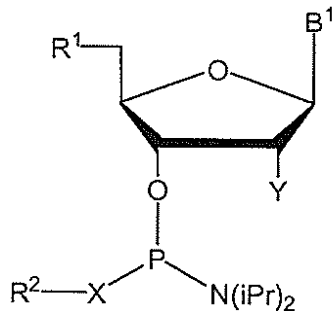
R^5 は、H、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルキル、S-ピバロイルチオエタノール、ヒドロキシル、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルコキシ、置換されていてもよい $C_3 \sim 8$ シクロアルキル、置換されていてもよい $C_6 \sim 12$ アリール、又は置換されていてもよい $C_2 \sim 9$ ヘテロシクリルである)

の構造を含むヌクレオチド構築物又はその塩。

【請求項 9 5】

式 I(a)：

【化 2 4】



式 (I)a.

の構造を含む、請求項94に記載のヌクレオチド構築物。

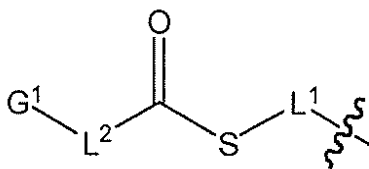
【請求項 9 6】

R^1 が、4,4'-ジメトキシトリチル基(DMT)で保護されたヒドロキシル基である、請求項95に記載のヌクレオチド構築物。

【請求項 9 7】

R^2 が、構造式V：

【化 2 5】



式 V

(式中、

G^1 は、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、又はこれら任意の組合せであり、

L^1 は、置換されていてもよい $C_2 \sim 10$ アルキレン、置換されていてもよい $C_2 \sim 10$ アルケニレン、又は置換されていてもよい $C_2 \sim 10$ アルキニレンであり、ここで、アルキレン、アルケニレン、又はアルキニレンのそれぞれは、O、N及びSから選択される1~10個のヘテロ原子で割り込まれていてもよく、

L^2 は、共有結合であるか、或いは置換されていてもよい $C_1 \sim 10$ アルキレン、置換されていてもよい $C_2 \sim 10$ アルケニレン、置換されていてもよい $C_2 \sim 10$ アルキニレン、及び置換されていてもよい $C_6 \sim 12$ アリーレンから選択され、ここで、アルキレン、アルケニレン、又

10

20

30

40

50

はアルキニレンのそれぞれは、O、N及びSから選択される1~10個のヘテロ原子で割り込まれていてもよい)

を含む、請求項94から96のいずれかに記載のヌクレオチド構築物。

【請求項98】

L^1 が、置換されていてもよい $C_2 \sim 10$ アルキレンである、請求項97に記載のヌクレオチド構築物。

【請求項99】

L^1 が、非置換又は置換された C_2 、 C_4 又は C_5 アルキレンである、請求項98に記載のヌクレオチド構築物。

【請求項100】

L^2 が、共有結合である、請求項97から99のいずれかに記載のヌクレオチド構築物。

【請求項101】

L^2 が、置換されていてもよい $C_1 \sim 10$ アルキレン、又は置換されていてもよい $C_6 \sim 12$ アリーレンである、請求項97から99のいずれかに記載のヌクレオチド構築物。

【請求項102】

L^2 が、結合ではなく、且つ G^1 が、ペリ環状反応；ヒドロキシル、チオール、又はアミノ部分のアルキル化若しくはアリール化；及びヒドロキシル、チオール、又はアミノ求核基の電子求引基との反応からなる群から選択される反応によって形成される結合を介して L^2 に結合されている、請求項97から101のいずれかに記載のヌクレオチド構築物。

【請求項103】

L^2 が、結合ではなく、且つ G^1 が、アミド結合、スルホンアミド結合、カルボン酸エステル、チオエステル、置換されていてもよい $C_6 \sim 12$ アリール若しくは $C_2 \sim 9$ ヘテロアリール、イミン、ヒドラゾン、オキシム、又はスクシニミドを介して L^2 に結合されている、請求項97から101のいずれかに記載のヌクレオチド構築物。

【請求項104】

G^1 が、ペプチド、ポリペプチド、中性有機ポリマー、又はこれらの任意の組合せであり、

L^1 が、置換されていてもよい $C_2 \sim 6$ アルキレン、置換されていてもよい $C_2 \sim 6$ アルケニレン、又は置換されていてもよい $C_2 \sim 6$ アルキニレンであり、ここで、アルキレン、アルケニレン、又はアルキニレンのそれぞれは、1又は2つの酸素原子で割り込まれていてもよく、

L^2 は、共有結合であるか、或いは置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルキレン、置換されていてもよい $C_2 \sim 6$ アルケニレン、置換されていてもよい $C_2 \sim 6$ アルキニレン、及び置換されていてもよい $C_6 \sim 10$ アリーレンから選択される、請求項97に記載のヌクレオチド構築物。

【請求項105】

G^1 が、送達ドメインを含む、請求項104に記載のヌクレオチド構築物。

【請求項106】

送達ドメインが、1つ以上のペプチド導入ドメイン(PTD)を含む、請求項105に記載のヌクレオチド構築物。

【請求項107】

G^1 の中性有機ポリマーが、ポリ(エチレングリコール)である、請求項104から106のいずれかに記載のヌクレオチド構築物。

【請求項108】

L^1 が、

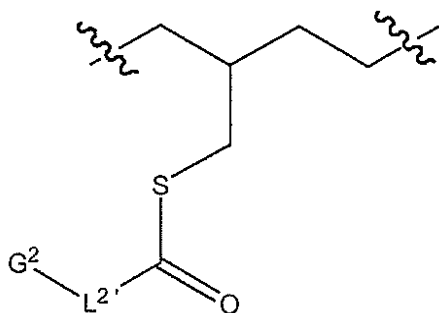
10

20

30

40

【化 2 6】



10

(式中、

$L^{2'}$ は、共有結合であるか、或いは置換されていてもよい $C_1 \sim 10$ アルキレン、置換されていてもよい $C_2 \sim 10$ アルケニレン、置換されていてもよい $C_2 \sim 10$ アルキニレン、及び置換されていてもよい $C_6 \sim 12$ アリーレンから選択され、ここで、アルキレン、アルケニレン、又はアルキニレンのそれぞれは、O、N及びSから選択される1~10個のヘテロ原子で割り込まれていてもよく、

G^2 は、コンジュゲート部分、親水性官能基、小分子、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、又はこれらの組合せである)

である、請求項97から103のいずれかに記載のヌクレオチド構築物。

20

【請求項 1 0 9】

XがOである、請求項94から104のいずれかに記載のヌクレオチド構築物。

【請求項 1 1 0】

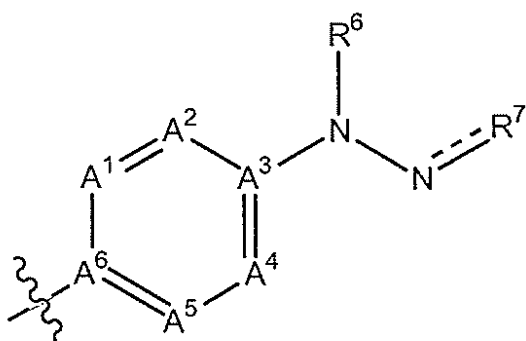
ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、又はこれらの組合せが、アルデヒド基との縮合反応を介して生物可逆性基に連結されて、イミン、エナミン、又はヒドラゾン結合を形成している、請求項94から105のいずれかに記載のヌクレオチド構築物。

【請求項 1 1 1】

ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、又はこれらの組合せが、式III:

30

【化 2 7】



40

(式III)

(式中、

A^1 、 A^2 、 A^4 及び A^5 は、それぞれ個別に、N又は CR^8 であり、

A^3 及び A^6 は、Cであり、

$R^6 \sim R^7$ は、それぞれ個別に、H、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルキル、置換されていてもよい $C_2 \sim 6$ アルケニル、置換されていてもよいイミン、及び置換されていてもよいエナミンであり、

各 R^8 は、個別に、H、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルキル、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルケニル、置換されていてもよい $C_2 \sim 6$ アルキニル、ハロゲン化物、ヒドロキシル、-C

50

HO、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アシル、カルボン酸、シアノ、ニトロ、置換されていてもよいアミノ、チオール、置換されていてもよい $C_2 \sim 9$ ヘテロシクリル、置換されていてもよい $C_6 \sim 12$ アリール、置換されていてもよい $C_3 \sim 8$ シクロアルキル、及び置換されていてもよい $C_4 \sim 8$ シクロアルケニルである)

の構造を有する1つ以上の窒素含有相補性コンジュゲート部分によって生物可逆性基に連結されている、請求項94から105のいずれかに記載のヌクレオチド構築物。

【請求項 1 1 2】

R^2 が、送達ドメインを含む、請求項94から107のいずれかに記載のヌクレオチド構築物。

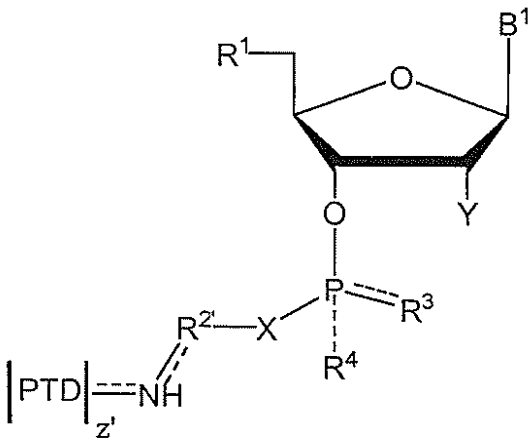
【請求項 1 1 3】

送達ドメインが、1つ以上のペプチド導入ドメイン(PTD)を含む、請求項105に記載のヌクレオチド構築物。

【請求項 1 1 4】

式I(c):

【化 2 8】



式I(c)

(式中、

$R^{2'}$ は、PTDに結合された生物可逆性基の残余部であり、

z' は、1~10の数字であり、ここで、 z' が1を超える場合、PTDは、1~10個の繰り返し単位を有するポリ($C_1 \sim 4$ アルキレンオキシド)基を介して一緒に連結されている)の構造を含む、請求項113に記載のヌクレオチド構築物。

【請求項 1 1 5】

PTDが、5~15個のアミノ酸にわたって5~10個のアルギニン及び/又はリシン残基を有するカチオン性ペプチド配列である、請求項113又は114に記載のヌクレオチド構築物。

【請求項 1 1 6】

PTDが、配列RKKRRQRRR(配列番号1)を含む、請求項113から115のいずれかに記載のヌクレオチド構築物。

【請求項 1 1 7】

送達ドメインが、1~10個の繰り返し単位を有するポリ(エチレングリコール)にコンジュゲートされたPTDを含む、請求項113から116のいずれかに記載のヌクレオチド構築物。

【請求項 1 1 8】

送達ドメインが、

PEG-(PTD)、

GG-(PTD)-PEG-(PTD)、

PEG-(PTD)-PEG-(PTD)、

GG-(PTD)-PEG-PEG-PEG-(PTD)、

PEG-(PTD)-PEG-PEG-PEG-(PTD)、

GG-(PTD)-PEG-(PTD)-PEG-(PTD)、及び

GG-(PTD)-PEG-PEG-PEG-(PTD)-PEG-PEG-PEG-(PTD)

(ここで、PEGは、1～10個の繰り返し単位を有するポリ(エチレングリコール)リンカーである)

からなる群から選択される配列を含む、請求項117に記載のヌクレオチド構築物。

【請求項 1 1 9】

R^2 が、標的指向性部分を含む、請求項94から116に記載のヌクレオチド構築物。

【請求項 1 2 0】

標的指向性部分が、リガンド、炭水化物、抗体、FAb、ScFv、又は単ドメイン抗体である、請求項119に記載のヌクレオチド構築物。

10

【請求項 1 2 1】

B^1 が、非天然核酸塩基である、請求項94から120のいずれかに記載のヌクレオチド構築物。

【請求項 1 2 2】

B^1 が、天然に存在する核酸塩基である、請求項94から120のいずれかに記載のヌクレオチド構築物。

【請求項 1 2 3】

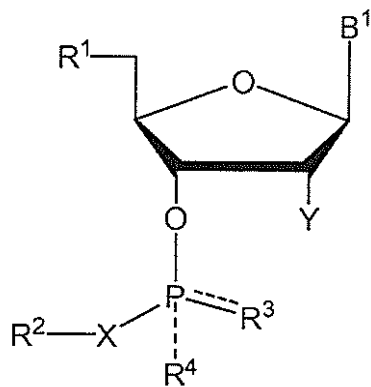
B^1 が、シトシン、グアニン、アデニン、ウラシル、又はチミジンである、請求項122に記載のヌクレオチド構築物。

【請求項 1 2 4】

20

式(I):

【化 2 9】



30

式(I),

(式中、

B^1 は、核酸塩基であり、

Xは、O、S又は NR^5 であり、

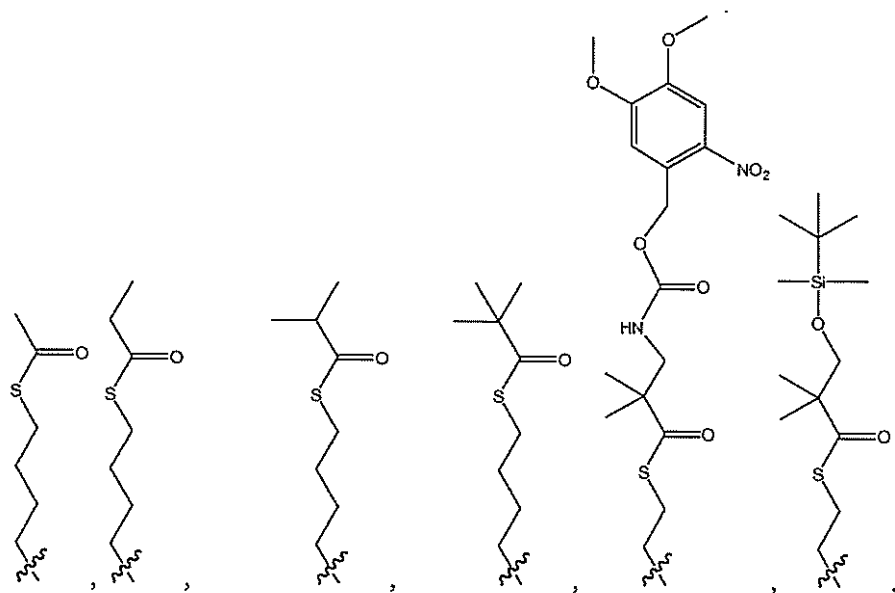
Yはハロ、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルコキシ、又は保護されたヒドロキシル基であり、

40

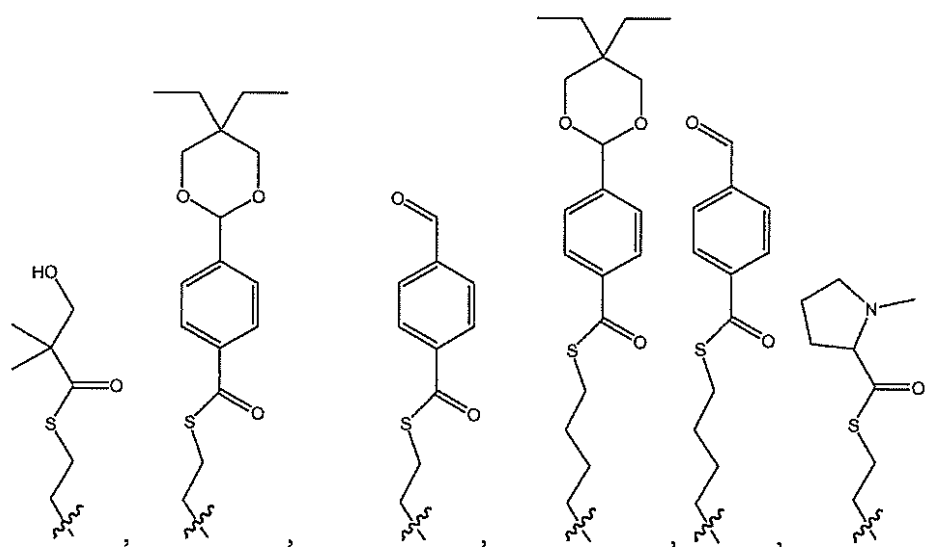
R^1 は、ヒドロキシル、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルコキシ、保護されたヒドロキシル基、一リン酸、二リン酸、三リン酸、四リン酸、又は五リン酸であり、

R^2 は、

【化 3 0】

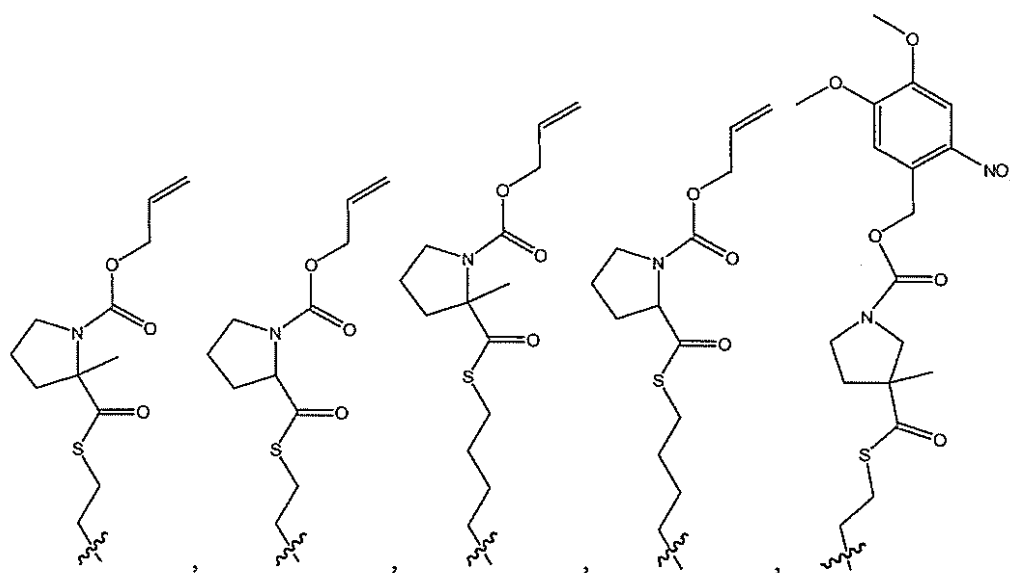


10

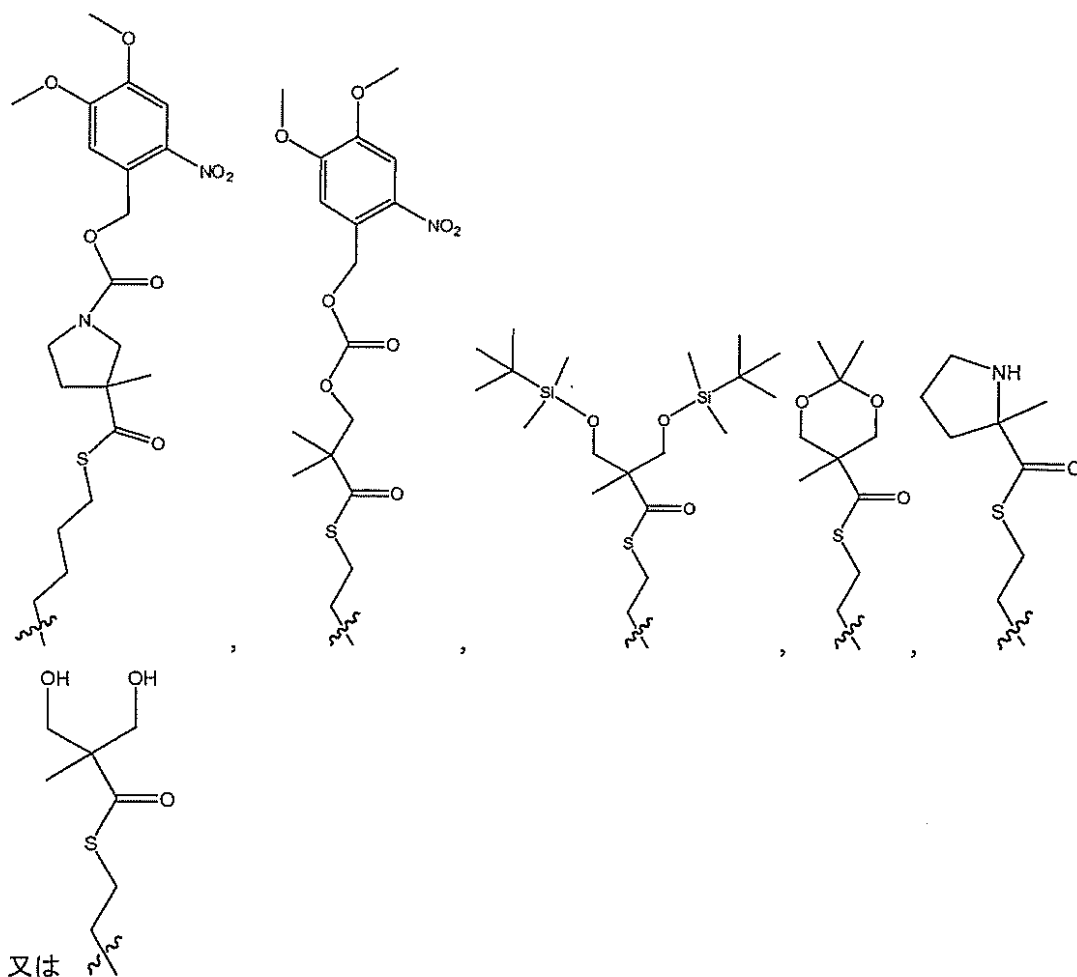


20

30



40



であり、

R^3 は、O、S、又は置換されていてもよいアミノであり、

R^4 は、H、ヒドロキシル、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルコキシ、保護されたヒドロキシル基、ーリン酸、二リン酸、三リン酸、四リン酸、五リン酸であるか、 R^3 が置換されていてもよいアミノである場合は存在せず、

R^5 は、H、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルキル、S-ピバロイルチオエタノール、ヒドロキシル、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルコキシ、置換されていてもよい $C_3 \sim 8$ シクロアルキル、置換されていてもよい $C_6 \sim 12$ アリール、又は置換されていてもよい $C_2 \sim 9$ ヘテロシクリルである)

の構造を含むヌクレオチド構築物又はその塩。

【請求項 125】

(1)5' 位にDMT保護基を含む第1ヌクレオシド又はヌクレオチドを、非プロトン性溶媒系中で酸性条件下にDMT基を除去することによって脱ブロックするステップであって、第1ヌクレオシド又はヌクレオチドが、3' 位で固体支持体に固定されていてもよく、或いは代わりに3' 位が、酸に不安定ではないヒドロキシル保護基で保護されており、第1ヌクレオシド又はヌクレオチドが溶解している、ステップ、

(2)脱ブロックされた第1ヌクレオシド又はヌクレオチドを、請求項88から114に記載の活性化されたヌクレオチド又は3' 位にホスホルアミダイトを含む活性化されたヌクレオチドと、酸性アゾール触媒の存在下にカップリングするステップ、

(3)カップリングされたヌクレオチドを、プロトン性溶媒及び弱塩基を含む溶媒系中、酸化剤で酸化するステップ、及び

(4)カップリングされたヌクレオチドを、カップリングされたヌクレオチドの5' 位のDMT基を非プロトン性溶媒系中、酸性条件下に除去することによって脱ブロックするステップ

、

10

20

30

40

50

を含み、

ステップ(2)~(4)が、1~149回繰り返され、且つポリヌクレオチド構築物が、請求項94から124のいずれか一項に記載の少なくとも1つのヌクレオチド構築物を含む、ポリヌクレオチド構築物を製造する方法。

【請求項126】

ステップ(1)の第1ヌクレオシド又はヌクレオチドが、固体支持体に結合され、生じたポリヌクレオチド構築物が、最後の脱ブロックステップの後に、固体支持体から開裂される、請求項125に記載の製造方法。

【請求項127】

各ステップが、コンピュータで制御される装置を使用して実施される、請求項125に記載の製造方法。

【請求項128】

ポリヌクレオチド構築物の合成後に、核酸塩基が1つ以上の保護基を含む場合、次いで該保護基を除去し、且つ/又は保護基で保護された親水性官能基又はコンジュゲート部分を含む任意の生物可逆性基について、次いで保護基を除去する、請求項125に記載の製造方法。

【請求項129】

ポリヌクレオチド構築物の合成後に、小分子、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、及び/又はエンドソーム脱出部分が、1つ以上の生物可逆性基の1つ以上のコンジュゲート部分に連結される、請求項125又は128に記載の製造方法。

【請求項130】

アルデヒド基と縮合して1つ以上の共有結合及び請求項1から81のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物を形成できる1つ以上のコンジュゲート部分を有する、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、又はこれらの任意の組合せを含む容器又は容器群を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、その開示が参照により本明細書に組み込まれる、2012年8月20日に出願の米国仮出願第61/691,175号に基づく優先権を主張する。

【0002】

本発明は、細胞にトランスフェクトするための組成物、及び方法に関する

【背景技術】

【0003】

細胞へのインビトロ及びインビボでの核酸送達は、双方とも、種々の組換えウイルスベクター、脂質送達系、及び電気穿孔を使用して実施されてきた。このような技術は、遺伝子発現を欠損させること、遺伝子療法のための遺伝子構築物を提供することによって種々の疾患及び障害を治療しようと、又は種々の生物学的系を研究しようと努めてきた。

【0004】

ポリヌクレオチドなどのポリアニオン性ポリマーは、細胞膜を横切って拡散するのが容易でない。培養細胞に関するこの問題を克服するために、典型的には、カチオン性脂質をアニオン性ポリヌクレオチドと組み合わせ、取り込みを助ける。残念ながら、この複合体は、細胞に対して一般には毒性があり、このことは、生存細胞へのトランスフェクションを確実にするために、カチオン性脂質の曝露時間及び濃度の両方を注意深く制御しなければならないことを意味する。

【0005】

mRNAを選択的に分解する細胞機構としてのRNA干渉(RNAi)の発見は、細胞培養における

10

20

30

40

50

細胞表現型の標的化された操作、及び指向性治療剤を開発する潜在能力の双方を可能にする(Behlke, Mol. Ther., 13, 644 ~ 670, 2006、Xie et al., Drug Discov. Today 11, 67 ~ 73, 2006)。しかし、それらの大きさ及び負帯電性(アニオン性)のため、siRNAは、細胞に侵入する能力のない巨大分子である。実際、siRNAは、一般には大きさを500Da未満に限定する、膜拡散性分子の細胞内送達に関するリビンスキーの「5の法則」を25倍超過する。その結果、送達ビヒクル又はトランスフェクション剤の不在下で、裸のsiRNAは、ミリモルの濃度でさえも細胞に侵入しない(Barquinero et al., Gene Ther. 11 Suppl 1, S3 ~ 9, 2004)。siRNAの送達の問題を解決するために、かなりの注目が、siRNAを濃縮し、且つ細胞膜に穴をあけるカチオン性脂質の使用に集中されてきた。広範に使用されるが、トランスフェクション試薬は、多くの細胞型、特に初代細胞及び造血細胞系統(T及びB細胞、マクロファージ)中への効率的な送達を達成することができない。さらに、リポフェクション試薬は、しばしば、腫瘍細胞での軽度から初代細胞での高度に及ぶ様々な度合の細胞毒性をもたらす。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本開示は、ポリヌクレオチドを細胞中に送達するための方法及び組成物を提供する。本開示は、アニオン電荷を中和する部分/基を含み、また、本明細書に記載のようなさらなる機能を付与することもできる、一時的に保護されたポリヌクレオチドを提供する。これらの化合物は、エンドサイトーシス又はマクロピノサイトーシスの機構によって細胞のサイトゾルに侵入することができる。一実施形態において、一時的な保護基は、生物可逆性(bioreversible)であり、すなわちいったん細胞内部に入ると、該保護基は、酵素活性によって、又は受動的な細胞内の方法(例えば、pH又は還元環境の変化)によって、除去されるように設計されている。したがって、本開示は、治療剤、診断剤、及び研究用ツールとして有用なポリヌクレオチドを提供する。

20

【課題を解決するための手段】

【0007】

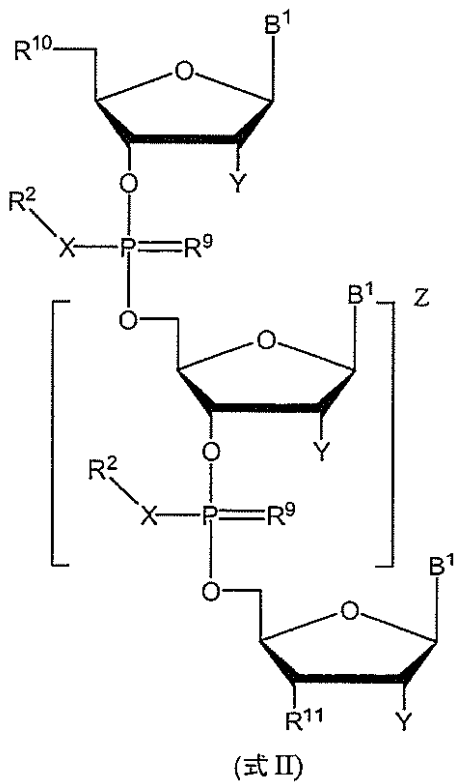
本開示は、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、及びこれらの任意の組合せからなる群から選択される成分(i)を含むポリヌクレオチド構築物であって、成分(i)が、ヌクレオチド間架橋基に結合された生物可逆性基を介してポリヌクレオチド構築物に連結されている、ポリヌクレオチド構築物を提供する。ポリヌクレオチド構築物は、さらに、親水性官能基を含む生物可逆性基、コンジュゲート部分を含む生物可逆性基、並びにコンジュゲート部分及び親水性基を含む生物可逆性基からなる群から選択される少なくとも1種の第2成分(ii)を含むことができ、ここで、コンジュゲート部分は、さらに保護基を含むことができる。一実施形態において、生物可逆性基はチオエステルを含む。前記実施形態のいずれかのさらに別の実施形態において、成分(i)は、ポリヌクレオチド構築物が細胞内輸送されることを可能にし、その結果、生物可逆性基は開裂される。前記実施形態のいずれかのさらに別の実施形態において、構築物は、さらに、小分子、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、又はこれらの任意の組合せからなる群から選択される少なくとも1種の第3成分(iii)を含むことができ、ここで、成分(iii)は、ヌクレオチド間架橋基又は末端ヌクレオチド基の細胞内生物可逆性基にコンジュゲートされる。さらなる実施形態において、成分(iii)は小分子である。よりさらなる実施形態において、小分子は、置換されていてもよいC₁ - C₆アルキルである。一実施形態において、ポリヌクレオチド構築物は、式II:

30

40

【0008】

【化 1】



10

20

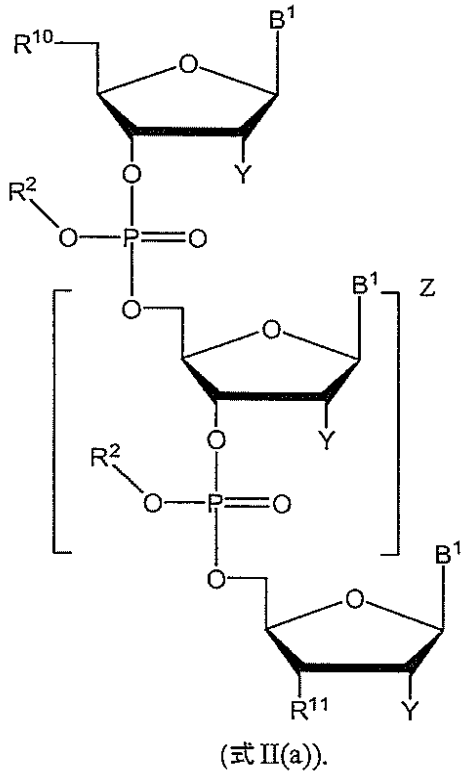
又はその塩の構造を有し、式中、1つの R^2 は成分(i)を含み、Zは、0~150の数字であり、各 B^1 は、個別に核酸塩基であり、各Xは、個別に、O、S及び NR^5 からなる群から選択され、各Yは、個別に、水素、ヒドロキシル、ハロ、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルコキシ、又は保護されたヒドロキシル基からなる群から選択され、各 R^2 は、個別に、存在しないか、水素、又は親水性官能基を含む第1生物可逆性基、コンジュゲート部分を含む第2生物可逆性基、或いは小分子、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、又はこれらの組合せからなる群から選択される補助部分を含む第3生物可逆性基であり、ここで、コンジュゲート部分又は親水性官能基は、保護基で保護されていてもよく、各 R^5 は、個別に、H、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルキル、S-ピパロイルチオエタノール、ヒドロキシル、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルコキシ、置換されていてもよい $C_3 \sim 8$ シクロアルキル、置換されていてもよい $C_6 \sim 12$ アリール、及び置換されていてもよい $C_2 \sim 9$ ヘテロシクリルからなる群から選択され、各 R^9 は、個別に、O又はSであり、 R^{10} は、H、ヒドロキシル、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルコキシ、保護されたヒドロキシル基、一リン酸、二リン酸、三リン酸、四リン酸、五リン酸、5'キャップ、ホスホチオール、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルキル、アミノ含有基、ビオチン含有基、ジゴキシゲニン含有基、コレステロール含有基、色素含有基、クエンチャー含有基、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、及びこれらの任意の組合せからなる群から選択され、 R^{11} は、H、ヒドロキシル、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルコキシ、保護されたヒドロキシル基、一リン酸、二リン酸、三リン酸、四リン酸、五リン酸、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルキル、アミノ含有基、ビオチン含有基、ジゴキシゲニン含有基、コレステロール含有基、色素含有基、クエンチャー含有基、ホスホチオール、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、及びこれらの任意の組合せからなる群から選択される。特定の実施形態において、各XはO又はSである。さらに別の実施形態において、構築物は、式II(a):

30

40

【0009】

【化 2】



10

20

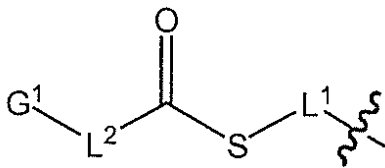
の構造を含む1つ以上のヌクレオチド鎖を有する。

【 0 0 1 0】

さらなる実施形態において、上記のポリヌクレオチド構築物中、 R^2 が第1、第2、又は第3生物可逆性基である場合、 Y は、ヒドロキシル以外、例えば、 F 又は OMe である。前記実施形態のいずれかのさらに別の実施形態において、生物可逆性基に結合された成分(i)は、構造式V:

【 0 0 1 1】

【化 3】



(式 V)

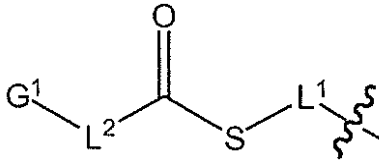
を有し、式中、 G^1 は、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、又はこれらの組合せであり、 L^1 は、置換されていてもよい $C_2 \sim 10$ アルキレン、置換されていてもよい $C_2 \sim 10$ アルケニレン、又は置換されていてもよい $C_2 \sim 10$ アルキニレンであり、ここで、アルキレン、アルケニレン、又はアルキニレンのそれぞれは、 O 、 N 及び S から選択される1~10個のヘテロ原子で割り込まれていてもよく、 L^2 は、共有結合であるか、或いは置換されていてもよい $C_1 \sim 10$ アルキレン、置換されていてもよい $C_2 \sim 10$ アルケニレン、置換されていてもよい $C_2 \sim 10$ アルキニレン、及び置換されていてもよい $C_6 \sim 12$ アリーレンから選択され、ここで、アルキレン、アルケニレン、又はアルキニレンのそれぞれは、 O 、 N 及び S から選択される1~10個のヘテロ原子で割り込まれていてもよい。前記実施形態のいずれかのさらに別の実施形態において、生物可逆性基に結合された成分(ii)は、構造式V:

【 0 0 1 2】

30

40

【化 4】



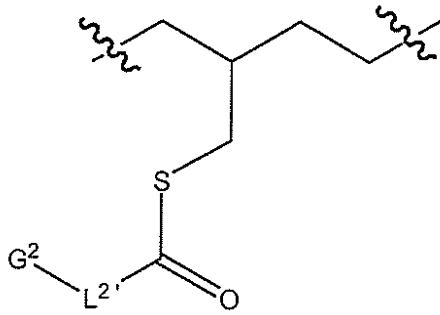
(式 V)

を有し、式中、 G^1 は、コンジュゲート部分又は親水性官能基であり、 L^1 は、置換されていてもよい C_{2-10} アルキレン、置換されていてもよい C_{2-10} アルケニレン、又は置換されていてもよい C_{2-10} アルキニレンであり、ここで、アルキレン、アルケニレン、又はアルキニレンのそれぞれは、O、N及びSから選択される1~10個のヘテロ原子で割り込まれていてもよく、 L^2 は、共有結合であるか、或いは置換されていてもよい C_{1-10} アルキレン、置換されていてもよい C_{2-10} アルケニレン、置換されていてもよい C_{2-10} アルキニレン、及び置換されていてもよい C_{6-12} アリーレンから選択され、ここで、アルキレン、アルケニレン、又はアルキニレンのそれぞれは、O、N及びSから選択される1~10個のヘテロ原子で割り込まれていてもよい。前記実施形態のいずれかのさらに別の実施形態において、 L^1 は、

10

【 0 0 1 3 】

【化 5】



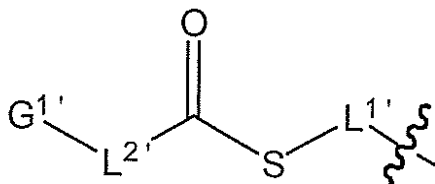
20

であり、式中、 $L^{2'}$ は、共有結合であるか、或いは置換されていてもよい C_{1-10} アルキレン、置換されていてもよい C_{2-10} アルケニレン、置換されていてもよい C_{2-10} アルキニレン、及び置換されていてもよい C_{6-12} アリーレンから選択され、ここで、アルキレン、アルケニレン、又はアルキニレンのそれぞれは、O、N及びSから選択される1~10個のヘテロ原子で割り込まれていてもよく、 G^2 は、コンジュゲート部分、親水性官能基、小分子、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、又はこれらの組合せである。前記実施形態のいずれかのさらに別の実施形態において、構築物は、さらに、式V'：

30

【 0 0 1 4 】

【化 6】



(式 V'')

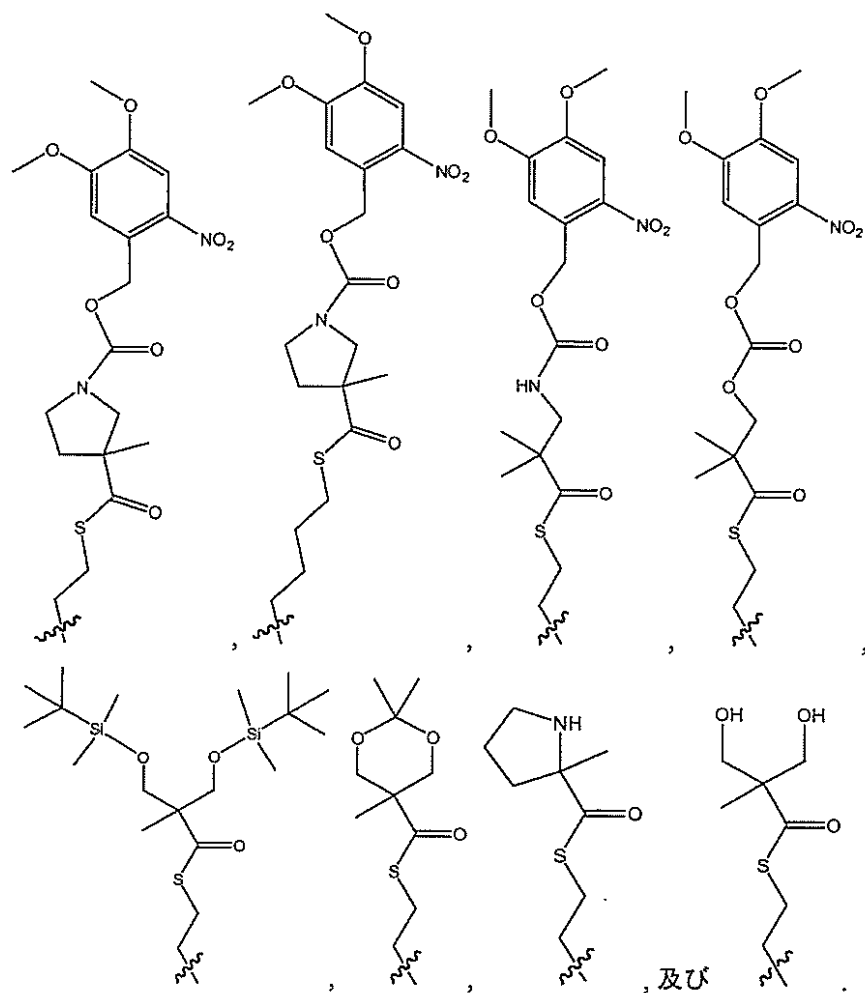
40

の構造を含むことができ、式中、 $G^{1'}$ は、コンジュゲート部分、親水性官能基、小分子、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、又はこれらの組合せであり、 $L^{1'}$ は、置換されていてもよい C_{2-10} アルキレン、置換されていてもよい C_{2-10} アルケニレン、又は置換されていてもよい C_{2-10} アルキニレンであり、ここで、アルキレン、アルケニレン、又はアルキニレンのそれぞれは、O、N及びSから選択される1~10個のヘテロ原子で割り込まれていて

50

【化 7】





からなる群から選択される。

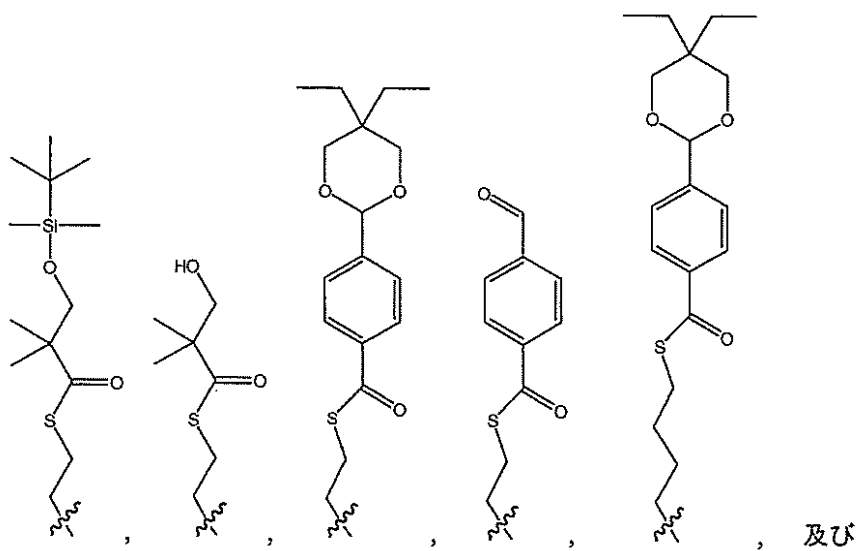
【0016】

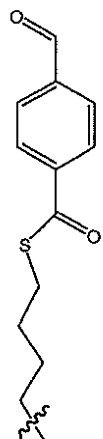
よりさらなる実施形態において、構造式V又はV'は、

【0017】

30

【化8】





10

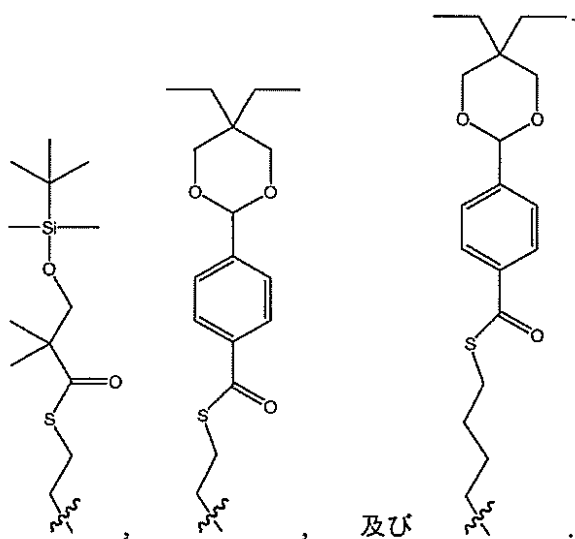
からなる群から選択される。

【0018】

よりさらなる実施形態において、構造式V又はV'は、

【0019】

【化9】



20

30

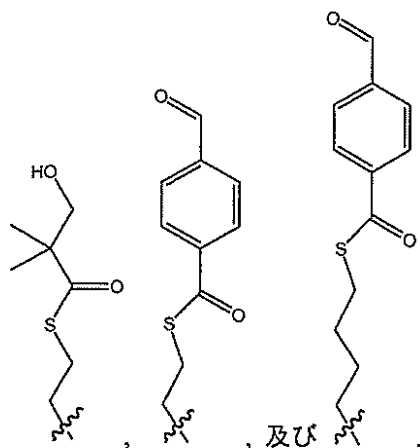
からなる群から選択される。

【0020】

さらに別の実施形態において、構造式V又はV'は、

【0021】

【化 1 0】



10

からなる群から選択される。

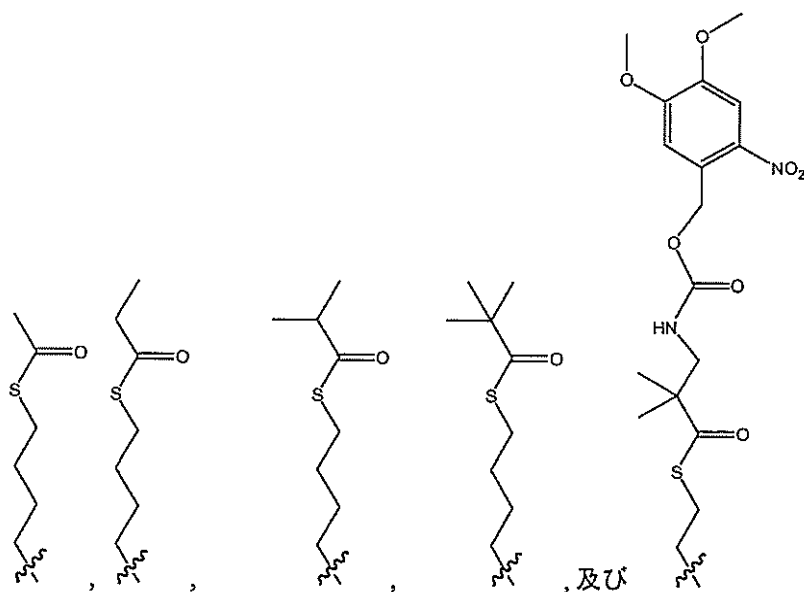
【 0 0 2 2】

さらなる実施形態において、構造式V'は、

【 0 0 2 3】

【化 1 1】

20



30

からなる群から選択される。

【 0 0 2 4】

任意数の上記の種々の実施形態において、 L^1 は、置換されていてもよい $C_2 \sim 10$ アルキレンである。別の実施形態において、 L^1 は、非置換又は置換された C_2 、 C_4 又は C_5 アルキレンである。さらに別の実施形態において、 L^2 は、共有結合である。さらなる実施形態において、 L^2 は、置換されていてもよい $C_1 \sim 10$ アルキレン又は置換されていてもよい $C_6 \sim 12$ アリーレンである。さらに他の実施形態において、 G^1 は、ヒドロキシルであるか、又は G^1 は、コンジュゲート部分である。さらに別の実施形態において、コンジュゲート部分は、 $-CHO$ 、チオール、又は $-N_3$ である。前記のいずれかのさらなる実施形態において、 G^1 は、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、又はこれらの任意の組合せを含む。別の実施形態において、 G^1 は、ペリ環状反応、ヒドロキシル、チオール、又はアミノ部分のアルキル化若しくはアリール化、及びヒドロキシル、チオール又はアミノ求核基の電子求引基との反応からなる群から選択される反応によって形成された結合を介して L^2 に結合されている。一実施形態において、 L^2 は結合ではなく、且つ G^1 は、アミド結合、スルホンアミド結合、カルボ

40

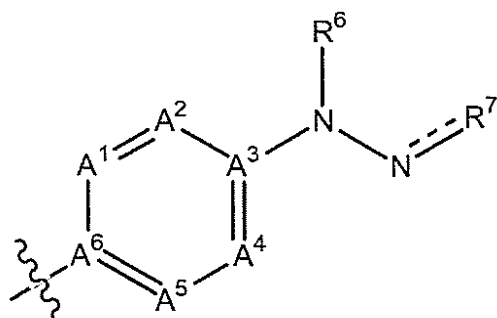
50

ン酸エステル、チオエステル、置換されていてもよい $C_6 \sim 12$ アリール又は $C_2 \sim 9$ ヘテロアリール、イミン、ヒドラゾン、オキシム、又はスクシンイミドを介して L^2 に結合されている。任意数の前記実施形態のさらなる実施形態において、 R^2 の1種以上の親水性官能基及び/又はコンジュゲート部分は、保護基で保護されている。前記実施形態のいずれかのさらに別の実施形態において、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、又はこれらの組合せは、アルデヒドコンジュゲート部分との縮合反応を介して生物可逆性基に連結されて、イミン、エナミン又はヒドラゾン結合を形成している。前述の実施形態のいずれかのさらに別の実施形態において、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、又はこれらの組合せは、式III:

10

【0025】

【化12】



20

(式III)

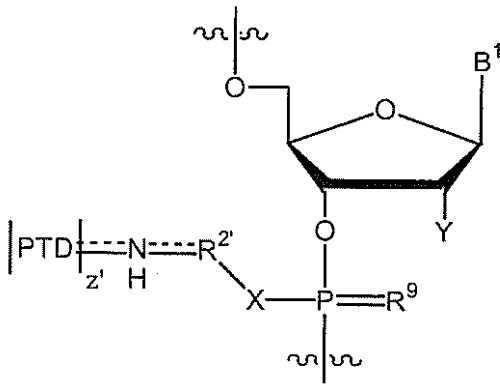
の構造を有する1つ以上の窒素含有コンジュゲート部分によって生物可逆性基に連結されており、式中、 A^1 、 A^2 、 A^4 及び A^5 は、それぞれ個別に、N又は CR^8 であり、 A^3 及び A^6 は、Cであり、 $R^6 \sim R^7$ は、それぞれ個別に、H、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルキル、置換されていてもよい $C_2 \sim 6$ アルケニル、置換されていてもよいイミン、及び置換されていてもよいエナミンであり、各 R^8 は、個別に、H、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルキル、置換されていてもよい $C_2 \sim 6$ アルケニル、置換されていてもよい $C_2 \sim 6$ アルキニル、ハロ、ヒドロキシル、 $-CHO$ 、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アシル、カルボキシル、シアノ、ニトロ、置換されていてもよいアミノ、チオール、置換されていてもよい $C_2 \sim 9$ ヘテロシクリル、置換されていてもよい $C_6 \sim 12$ アリール、置換されていてもよい $C_3 \sim 8$ シクロアルキル、及び置換されていてもよい $C_4 \sim 8$ シクロアルケニルである。前記実施形態のいずれかのさらに別の実施形態において、生物可逆性基の多くても25%、50%、75%又は90%は、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、又はこれらの組合せに連結されている。前記のいずれかの特定の実施形態において、成分(i)は、送達ドメインを含む。さらなる実施形態において、送達ドメインは、1つ以上のペプチド導入ドメイン(PTD)を含む、一実施形態において、1つ以上のPTDが、イミン、エナミン、又はヒドラゾン結合を介して生物可逆性基に連結されている。例えば、1つ以上のPTDが、生物可逆性基に連結されて、構造式IV:

30

40

【0026】

【化 1 3】

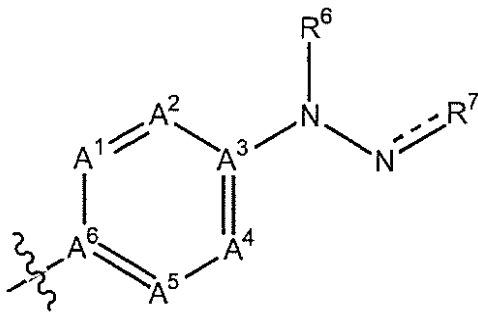


(式IV)

を形成し、式中、 $R^{2'}$ は、PTDに結合された生物可逆性基の残余部であり、 z' は、1~10の数字であり、ここで、 z' が1を超える場合、PTDは、1~10個の繰り返し単位を有するポリ($C_1 \sim 4$ アルキレンオキシド)基を介して一緒に連結されていてもよい。特定の実施形態において、1つ以上のPTDは、トランス活性化転写活性化因子(TAT)ペプチドである。前記の種々の実施形態において、PTDは、式III:

【0027】

【化 1 4】



(式III)

の構造を含む相補性コンジュゲート部分を介して生物可逆性基に連結されており、式中、 A^1 、 A^2 、 A^4 及び A^5 は、それぞれ個別に、N又は CR^8 であり、 A^3 及び A^6 は、Cであり、 $R^6 \sim R^7$ は、それぞれ個別に、H、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルキル、置換されていてもよい $C_2 \sim 6$ アルケニル、置換されていてもよいイミン、及び置換されていてもよいエナミンであり、各 R^8 は、個別に、H、置換されていてもよい、 $C_1 \sim 6$ アルキル、置換されていてもよい $C_2 \sim 6$ アルケニル、置換されていてもよい $C_2 \sim 6$ アルキニル、ハロ、ヒドロキシル、-CHO、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アシル、カルボキシル、シアノ、ニトロ、置換されていてもよいアミノ、チオール、置換されていてもよい $C_2 \sim 9$ ヘテロシクリル、置換されていてもよい $C_6 \sim 12$ アリール、置換されていてもよい $C_3 \sim 8$ シクロアルキル、及び置換されていてもよい $C_4 \sim 8$ シクロアルケニルである。一実施形態において、コンジュゲーション前の生物可逆性基は、

【0028】

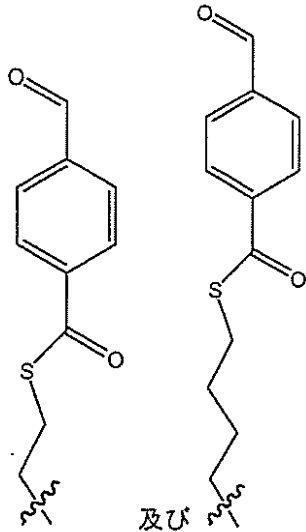
10

20

30

40

【化 1 5】



10

からなる群から選択される。

【0029】

別の実施形態において、PTDは、5～15個のアミノ酸にわたって5～10個のアルギニン及び/又はリシン残基を有するカチオン性ペプチド配列を含む。例えば、PTDは、配列RKKRRQRRR(配列番号1)を含むことができる。さらなる実施形態において、成分(i)は、1～10個の繰り返し単位を有するポリ(エチレングリコール)(PEG)にコンジュゲートされたPTDを含む。一部の特定の実施形態において、成分(i)は、PEG-(PTD)、GG-(PTD)-PEG-(PTD)、PEG-(PTD)-PEG-(PTD)、GG-(PTD)-PEG-PEG-PEG-(PTD)、PEG-(PTD)-PEG-PEG-PEG-(PTD)、GG-(PTD)-PEG-(PTD)-PEG-(PTD)、及びGG-(PTD)-PEG-PEG-PEG-(PTD)-PEG-PEG-PEG-(PTD)からなる群から選択される配列を含み、ここで、PEGは、1～10個の繰り返し単位を有するポリ(エチレングリコール)リンカーである。別の実施形態において、成分(i)は、標的指向性部分を含む。一部の実施形態において、標的指向性部分は、リガンド、炭水化物、抗体、FAb、ScFv、又は単ドメイン抗体である。前記実施形態のいずれかのさらに別の実施形態において、ポリヌクレオチド構築物は、非天然核酸塩基を含む。さらに別の実施形態において、構築物は、天然に存在する核酸塩基をのみ含む。前記実施形態のいずれかにおいて、核酸塩基は、シトシン、グアニン、アデニン、ウラシル、及びチミジンから選択される。別の実施形態において、ポリヌクレオチド構築物中のヌクレオチドの75%又は65%以下は、生物可逆性基を有する。前記実施形態のいずれかにおいて、ポリヌクレオチド構築物は、2～40又は5～10個の生物可逆性基を有する。前記実施形態のいずれかのさらに別の実施形態において、ポリヌクレオチド構築物は、10～32個のヌクレオチド(例えば、17～30個のヌクレオチド)を有する。構築物中に1つを超える生物可逆性基が存在する場合、このような基は、同一であるか、異なってもよい。とりわけ、構築物は、生物可逆性基とペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、又はこれらの組合せとの混合物、及び C_{1-6} アルキル又はヒドロキシル-置換された C_{1-6} アルキル小分子基を有する生物可逆性基を含むことができる。

20

30

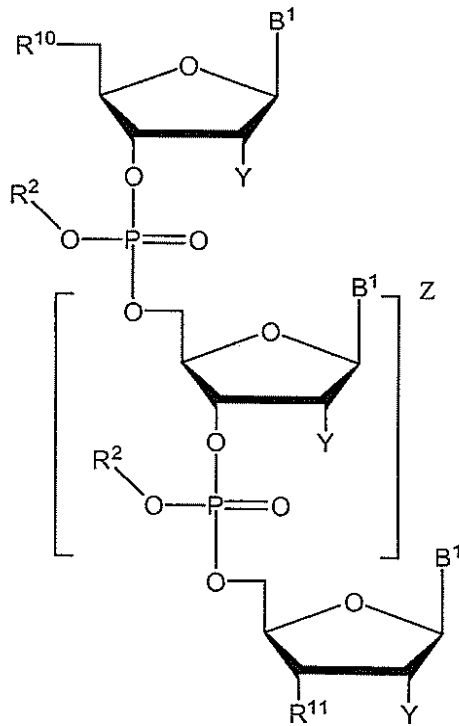
40

【0030】

他の実施形態において、ポリヌクレオチド構築物は、式II(a)：

【0031】

【化 1 6】

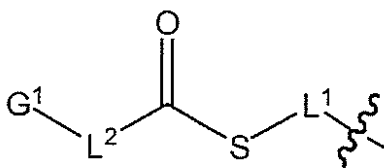


(式 II(a))

又はその塩の構造を有し、式中、1つの R^2 は、成分(i)を含み、Zは、0~30の数字であり、各 B^1 は個別に核酸塩基であり、各Yは、個別に、ヒドロキシル、ハロ、又は $C_1 \sim 6$ アルコキシからなる群から選択され、各 R^2 は、個別に、存在しないか、水素、式Vの基：

【 0 0 3 2 】

【化 1 7】



(式 V)

(式中、 G^1 は、ペプチド、ポリペプチド、中性有機ポリマー、又はこれらの任意の組合せであり、 L^1 は、置換されていてもよい $C_2 \sim 6$ アルキレン、置換されていてもよい $C_2 \sim 6$ アルケニレン、又は置換されていてもよい $C_2 \sim 6$ アルキニレンであり、ここで、アルキレン、アルケニレン、又はアルキニレンのそれぞれは、1又は2つの酸素原子で割り込まれていてもよく、 L^2 は、共有結合であるか、或いは置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルキレン、置換されていてもよい $C_2 \sim 6$ アルケニレン、置換されていてもよい $C_2 \sim 6$ アルキニレン、及び置換されていてもよい $C_6 \sim 10$ アリーレンから選択される)、又は式V'の基：

【 0 0 3 3 】

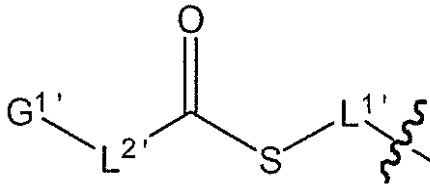
10

20

30

40

【化 1 8】



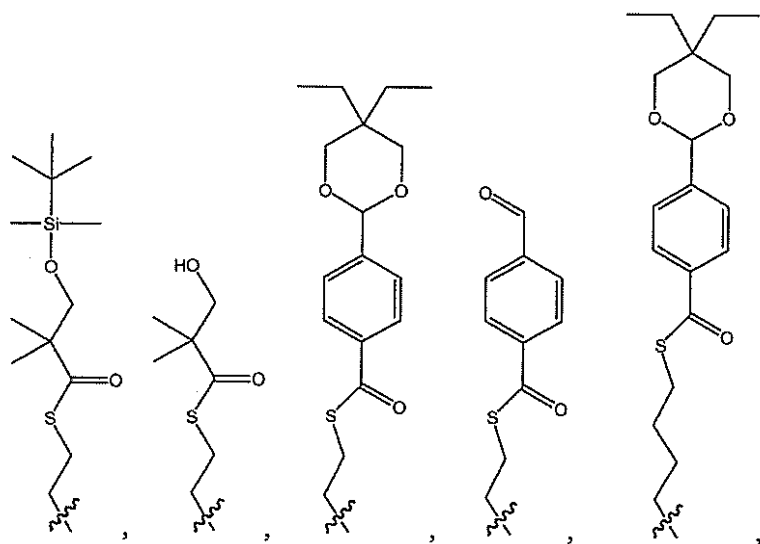
(式 V')

(式中、 $G^{1'}$ は、水素、アルデヒド、若しくは保護されたアルデヒド、ヒドロキシル、保護されたヒドロキシル、アミン、保護されたアミン、又は保護基若しくは $C_1 \sim 6$ アルキルで置換されていてもよい5又は6員の複素環式アミンであり、 $L^{1'}$ は、置換されていてもよい $C_2 \sim 6$ アルキレンであり、ここで、各アルキレンは、1又は2つの酸素原子で割り込まれていてもよく、 $L^{2'}$ は、共有結合であるか、或いは置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルキレン、及び置換されていてもよい $C_6 \sim 10$ アリーレンから選択される)であり、

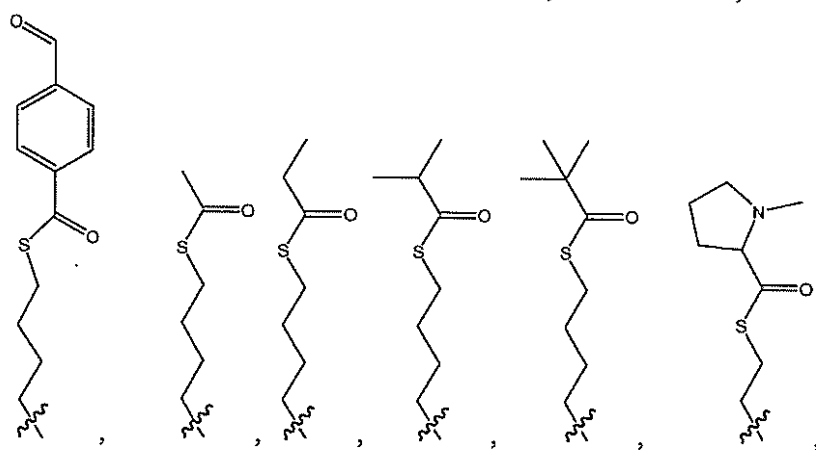
R^{10} は、H、ヒドロキシル、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルコキシ、保護されたヒドロキシル基、ーリン酸、二リン酸、三リン酸、5'キャップ、ホスホチオール、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルキル、アミノ含有基、ペプチド、ポリペプチド、中性有機ポリマー、並びにペプチド、ポリペプチド及び中性有機ポリマーの任意の組合せからなる群から選択され、 R^{11} は、H、ヒドロキシル、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルコキシ、保護されたヒドロキシル基、ーリン酸、二リン酸、三リン酸、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルキル、ペプチド、ポリペプチド、中性有機ポリマー、並びにペプチド、ポリペプチド及び中性有機ポリマーの任意の組合せからなる群から選択される。さらなる実施形態において、 R^2 が式V又はV'の基であるヌクレオチドの場合、YはF又はOMeである。構造式V'は、

【 0 0 3 4】

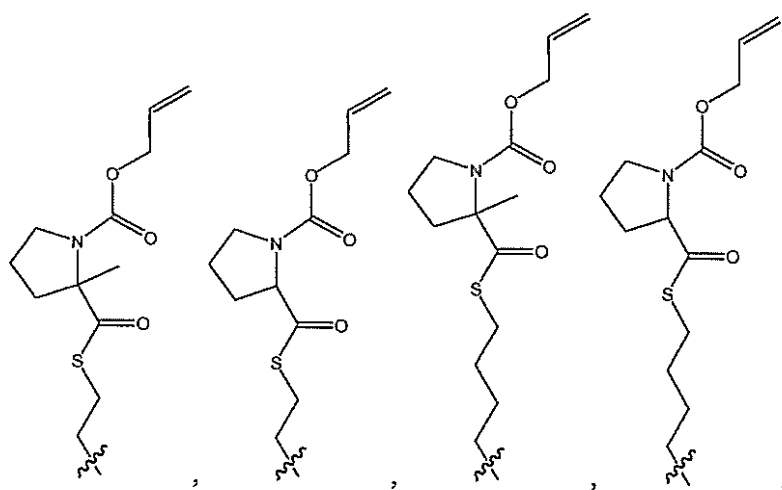
【化 19】



10

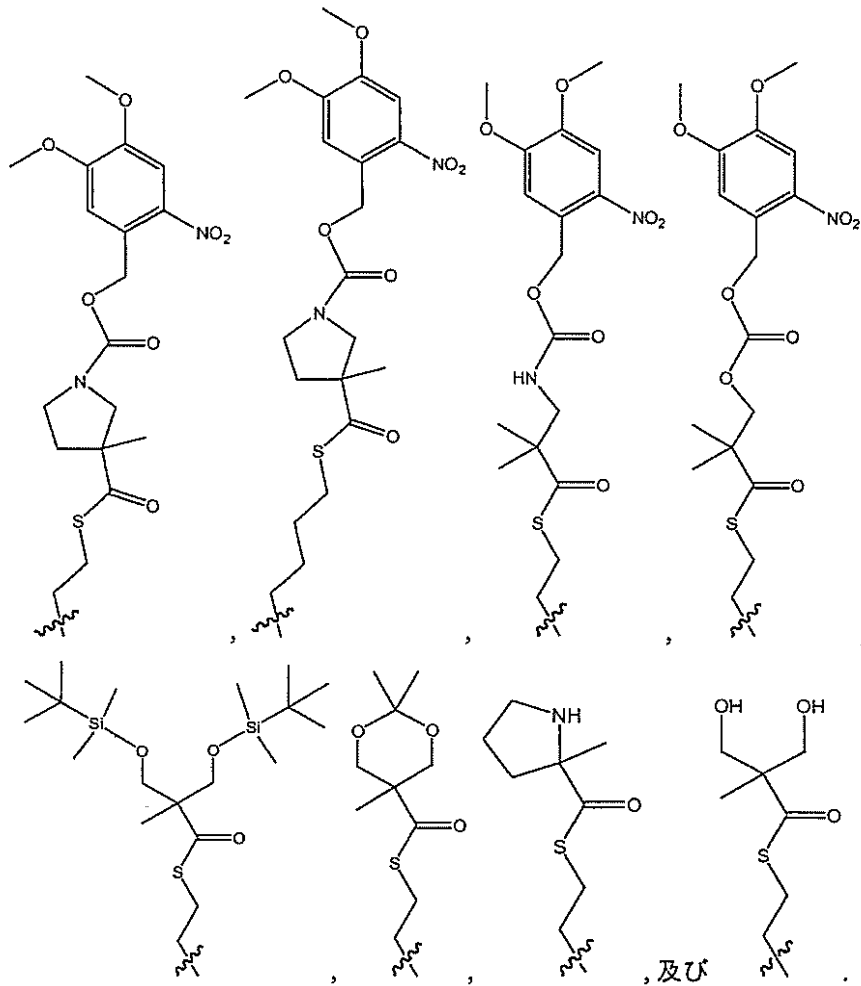


20



30

40



10

20

からなる群から任意に選択される。他の実施形態において、 G^1 は、本明細書に記載のような1つ以上のペプチド導入ドメイン(PTD)を含む送達ドメインを含む。

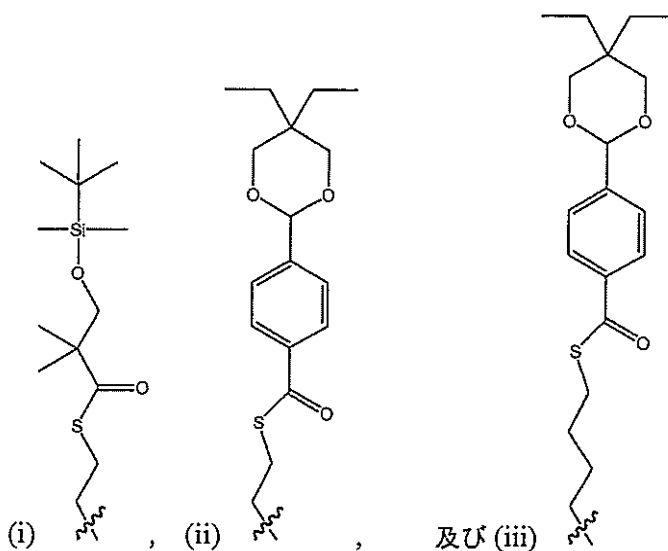
【0035】

本開示は、また、ヌクレオチド間架橋基に結合されたヒドロキシル置換 C_{1-6} アルキル基を含む、或いはヌクレオチド間架橋基又は末端ヌクレオチド基に結合された-CHO、 N_3 、又はチオールなどのコンジュゲート部分を含む、1つ以上の生物可逆性基を含むポリヌクレオチド構築物を提供する。本開示は、また、

30

【0036】

【化20】



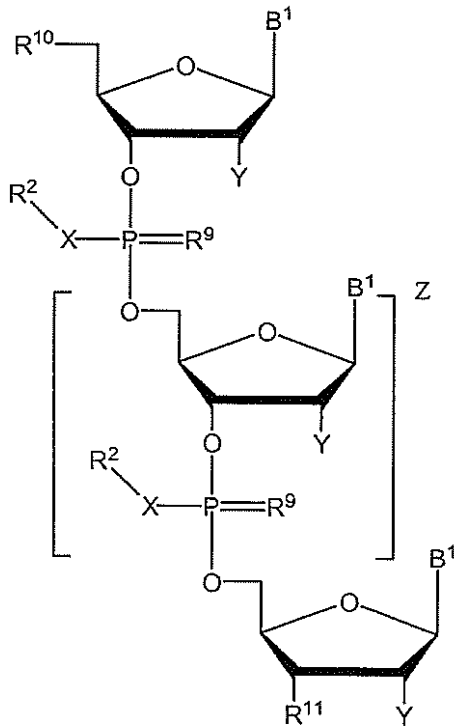
40

50

からなる群から選択され、ヌクレオチド間架橋基又は末端ヌクレオチド基に結合された1つ以上の生物可逆性基を含むポリヌクレオチド構築物を提供する。一実施形態において、ポリヌクレオチド構築物は、式II:

【0037】

【化21】

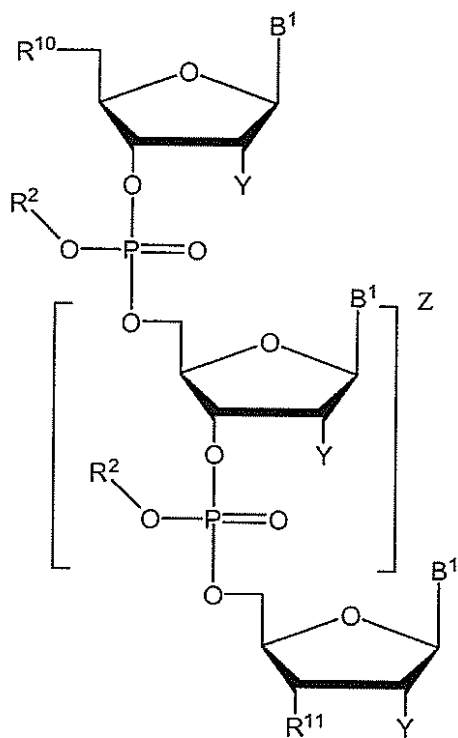


(式II)

又はその塩の構造を有し、式中、Zは、0~150の数字であり、各 B^1 は、個別に、核酸塩基であり、各Xは、個別に、O、S及び NR^5 からなる群から選択され、各Yは、個別に、水素、ヒドロキシル、ハロ、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルコキシ、又は保護されたヒドロキシル基からなる群から選択され、各 R^2 は、個別に、存在しないか、水素、生物可逆性基(i)、生物可逆性基(ii)、又は生物可逆性基(iii)であり、各 R^5 は、個別に、H、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルキル、S-ピバロイルチオエタノール、ヒドロキシル、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルコキシ、置換されていてもよい $C_3 \sim 8$ シクロアルキル、置換されていてもよい $C_6 \sim 12$ アリール、及び置換されていてもよい $C_2 \sim 9$ ヘテロシクリルからなる群から選択され、各 R^9 は、個別にO又はSであり、 R^{10} は、H、ヒドロキシル、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルコキシ、保護されたヒドロキシル基、一リン酸、二リン酸、三リン酸、四リン酸、五リン酸、5'キャップ、ホスホチオール、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルキル、アミノ含有基、ピオチン含有基、ジゴキシゲニン含有基、コレステロール含有基、色素含有基、クエンチャー含有基、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、及びこれらの任意の組合せからなる群から選択され、 R^{11} は、H、ヒドロキシル、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルコキシ、保護されたヒドロキシル基、一リン酸、二リン酸、三リン酸、四リン酸、五リン酸、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルキル、アミノ含有基、ピオチン含有基、ジゴキシゲニン含有基、コレステロール含有基、色素含有基、クエンチャー含有基、ホスホチオール、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、及びこれらの任意の組合せからなる群から選択される。但し、少なくとも1つの R^2 は、生物可逆性基(i)、(ii)又は(iii)である。特定の実施形態において、XはO又はSである。さらに別の実施形態において、ポリヌクレオチド構築物は、式II(a):

【0038】

【化 2 2】



(式 II(a)).

10

20

の構造を有する1つ以上のヌクレオチド鎖を含む。

【0039】

一実施形態において、 R^2 が生物可逆性基(i)、(ii)又は(iii)であるヌクレオチドの場合、 Y は、ヒドロキシル以外、例えば、 F 又は OMe である。さらに別の実施形態において、ポリヌクレオチド構築物は、 R^2 基の混合物を含み、ここで、1つ以上の R^2 基は、存在しないか H であり、1つ以上の R^2 基は生物可逆性基(i)であり、且つ1つ以上の R^2 基は、生物可逆性基(ii)又は(iii)である。さらに別の実施形態において、存在しないか H である R^2 基の生物可逆性基(i)、(ii)又は(iii)である R^2 基に対する比率は、1:10~10:1である。さらに別の実施形態において、存在しないか H である R^2 基の生物可逆性基(i)、(ii)又は(iii)である R^2 基に対する比率は、1:5~5:1である。よりさらなる実施形態において、存在しないか H である R^2 基の生物可逆性基(i)、(ii)又は(iii)である R^2 基に対する比率は、1:4~4:1である。さらに別の実施形態において、存在しないか H である R^2 基の生物可逆性基(i)、(ii)又は(iii)である R^2 基に対する比率は、1:2~2:1である。特定の実施形態において、存在しないか H である R^2 基の生物可逆性基(i)、(ii)又は(iii)である R^2 基に対する比率は、1:1である。別の実施形態において、生物可逆性基(i)である R^2 基の生物可逆性基(ii)又は(iii)である R^2 基に対する比率は、1:10~10:1である。さらに別の実施形態において、生物可逆性基(i)である R^2 基の生物可逆性基(ii)又は(iii)である R^2 基に対する比率は、1:5~5:1である。さらに別の実施形態において、生物可逆性基(i)である R^2 基の生物可逆性基(ii)又は(iii)である R^2 基に対する比率は、1:4~4:1である。さらに別の実施形態において、生物可逆性基(i)である R^2 基の生物可逆性基(ii)又は(iii)である R^2 基に対する比率は、1:3~3:1である。さらに別の実施形態において、生物可逆性基(i)である R^2 基の生物可逆性基(ii)又は(iii)である R^2 基に対する比率は、1:2~2:1である。特定の実施形態において、生物可逆性基(i)である R^2 基の生物可逆性基(ii)又は(iii)である R^2 基に対する比率は、1:1である。

30

40

【0040】

本開示は、また、相補性ポリヌクレオチドにハイブリッド化された、前記実施形態のいずれかのポリヌクレオチド構築物を含むハイブリッド化ポリヌクレオチドを提供する。一

50

実施形態において、相補的ポリヌクレオチドは、ヌクレオチド間架橋基又は末端ヌクレオチド基にコンジュゲートされた細胞内生物可逆性基を含む。さらに別の実施形態において、ポリヌクレオチド構築物及び相補的ポリヌクレオチドは、それぞれ、9つ以下の生物可逆性基を含む。一実施形態において、ヌクレオチドの総数の75%以下が、生物可逆性基を有する。別の実施形態において、相補鎖及びポリヌクレオチド構築物は、それぞれ、10～32(例えば、19～25)個のヌクレオチドを有する。一実施形態において、ハイブリッド化ポリヌクレオチドは、siRNAである。別の実施形態において、ポリヌクレオチド構築物は、ガイド鎖であり、相補的ポリヌクレオチドは、パッセンジャー鎖である。別の実施形態において、パッセンジャー鎖は、細胞内酵素によって開裂できない部分を有するリン酸トリエステルを含む。さらなる実施形態において、細胞内酵素によって開裂できない部分は、置換されていてもよい $C_1 - 6$ アルキルである。

10

【0041】

本開示は、また、前記実施形態のいずれかのポリヌクレオチド構築物又はポリヌクレオチド、及び薬学上許容される賦形剤を含む医薬組成物を提供する。

【0042】

本開示は、また、上記の構築物又はハイブリッド化ポリヌクレオチドを遺伝子発現のアンチセンス又はRNAi介在性低下を誘導するのに十分な量で細胞に投与することを含む、タンパク質の発現を低下させる方法を提供する。

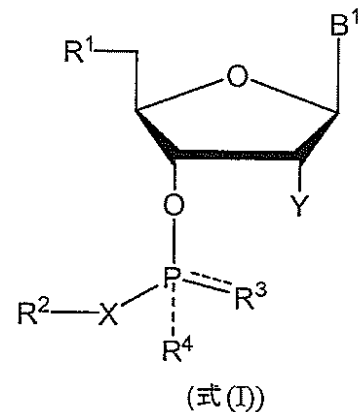
【0043】

本開示は、また、式(I)：

20

【0044】

【化23】



30

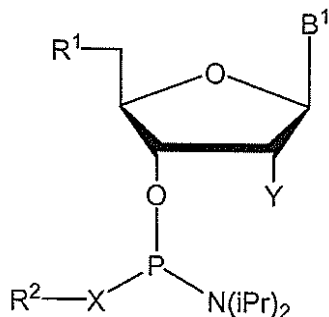
又はその塩の構造を含むヌクレオチド構築物を提供し、式中、 B^1 は、核酸塩基であり、Xは、O、S又は NR^5 であり、Yは、ハロ、置換されていてもよい $C_1 - 6$ アルコキシ、又は保護されたヒドロキシル基であり、 R^1 は、ヒドロキシル、置換されていてもよい $C_1 - 6$ アルコキシ、保護されたヒドロキシル基、一リン酸、二リン酸、三リン酸、四リン酸、又は五リン酸であり、 R^2 は、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、及びこれらの任意の組合せからなる群から選択される補助部分を含む生物可逆性基であり、ここで、補助部分は、1つ以上の共有結合で生物可逆性基に連結されており、 R^3 は、O、S、又は置換されていてもよいアミノであり、 R^4 は、H、ヒドロキシル、置換されていてもよい $C_1 - 6$ アルコキシ、保護されたヒドロキシル基、一リン酸、二リン酸、三リン酸、四リン酸、五リン酸であるか、 R^3 が置換されていてもよいアミノである場合は存在せず、 R^5 は、H、置換されていてもよい $C_1 - 6$ アルキル、S-ピバロイルチオエタノール、ヒドロキシル、置換されていてもよい $C_1 - 6$ アルコキシ、置換されていてもよい $C_3 - 8$ シクロアルキル、置換されていてもよい $C_6 - 12$ アリール、又は置換されていてもよい $C_2 - 9$ ヘテロシクリルである。特定の実施形態において、XはO又はSである。一実施形態において、ヌクレオチド構築物は、式I(a)：

40

【0045】

50

【化 2 4】



(式 I)a.

10

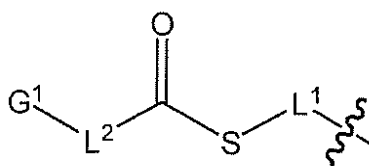
の構造を含む。

【 0 0 4 6】

一実施形態において、 R^1 は、4,4'-ジメトキシトリチル基(DMT)で保護されたヒドロキシル基である。別の実施形態において、 R^2 は、構造式V:

【 0 0 4 7】

【化 2 5】



(式 V)

20

を含み、式中、 G^1 は、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、又はこれら任意の組合せであり、 L^1 は、置換されていてもよい $C_2 \sim 10$ アルキレン、置換されていてもよい $C_2 \sim 10$ アルケニレン、又は置換されていてもよい $C_2 \sim 10$ アルキニレンであり、ここで、アルキレン、アルケニレン、又はアルキニレンのそれぞれは、O、N及びSから選択される1~10個のヘテロ原子で割り込まれていてもよく、 L^2 は、共有結合であるか、或いは置換されていてもよい $C_1 \sim 10$ アルキレン、置換されていてもよい $C_2 \sim 10$ アルケニレン、置換されていてもよい $C_2 \sim 10$ アルキニレン、及び置換されていてもよい $C_6 \sim 12$ アリーレンから選択され、ここで、アルキレン、アルケニレン、又はアルキニレンのそれぞれは、O、N及びSから選択される1~10個のヘテロ原子で割り込まれていてもよい。さらに別の実施形態において、 L^1 は、置換されていてもよい $C_2 \sim 10$ アルキレンである。よりさらなる実施形態において、 L^1 は、非置換又は置換された C_2 、 C_4 又は C_5 アルキレンである。さらに別の実施形態において、 L^2 は、共有結合である。別の実施形態において、 L^2 は、置換されていてもよい $C_1 \sim 10$ アルキレン、又は置換されていてもよい $C_6 \sim 12$ アリーレンである。さらに別の実施形態において、 L^2 は、結合ではなく、且つ G^1 は、ペリ環状反応、ヒドロキシル、チオール、又はアミノ部分のアルキル化若しくはアリール化、及びヒドロキシル、チオール、又はアミノ求核基の電子求引基との反応からなる群から選択される反応によって形成される結合を介して L^2 に結合されている。一実施形態において、 L^2 は、結合ではなく、且つ G^1 は、アミド結合、スルホンアミド結合、カルボン酸エステル、チオエステル、置換されていてもよいアリール若しくはヘテロアリール、イミン、ヒドラゾン、オキシム、又はスクシンイミドを介して L^2 に結合されている。とりわけ、 G^1 は、ペプチド、ポリペプチド、中性有機ポリマー、又はこれらの任意の組合せであり、 L^1 は、置換されていてもよい $C_2 \sim 6$ アルキレン、置換されていてもよい $C_2 \sim 6$ アルケニレン、又は置換されていてもよい $C_2 \sim 6$ アルキニレンであり、ここで、アルキレン、アルケニレン、又はアルキニレンのそれぞれは、1又は2つの酸素原子で割り込まれていてもよく、 L^2 は、共有結合であるか、或いは置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルキレン、置換されていてもよい $C_2 \sim 6$ アルケニレン、置換されていてもよい $C_2 \sim$

30

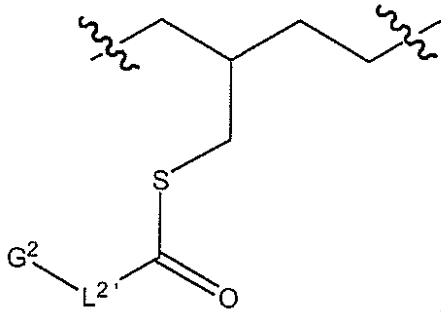
40

50

₆アルキニレン、及び置換されていてもよいC₆~₁₀アリーレンから選択される。これらの実施形態において、G¹は、例えば、1つ以上のペプチド導入ドメイン(PTD)を含む送達ドメインを含むことができる。G¹の中性有機ポリマーは、ポリ(エチレングリコール)であってもよい。さらに別の実施形態において、L¹は、

【0048】

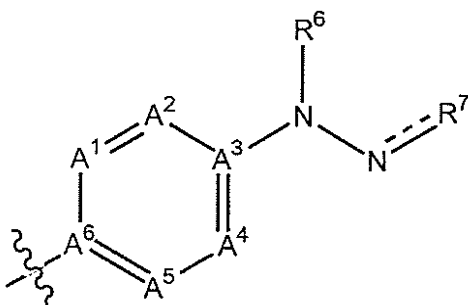
【化26】



であり、式中、L^{2'}は、共有結合であるか、或いは置換されていてもよいC₁~₁₀アルキレン、置換されていてもよいC₂~₁₀アルケニレン、置換されていてもよいC₂~₁₀アルキニレン、及び置換されていてもよいC₆~₁₂アリーレンから選択され、ここで、アルキレン、アルケニレン、又はアルキニレンのそれぞれは、O、N及びSから選択される1~10個のヘテロ原子で割り込まれていてもよく、G²は、コンジュゲート部分、親水性官能基、小分子、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、又はこれらの組合せである。一実施形態において、XはOである。別の実施形態において、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、又はこれらの組合せは、アルデヒド基との縮合反応を介して生物可逆性基に連結されて、イミン、エナミン、又はヒドラゾン結合を形成している。さらに別の実施形態において、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、又はこれらの組合せは、式III:

【0049】

【化27】



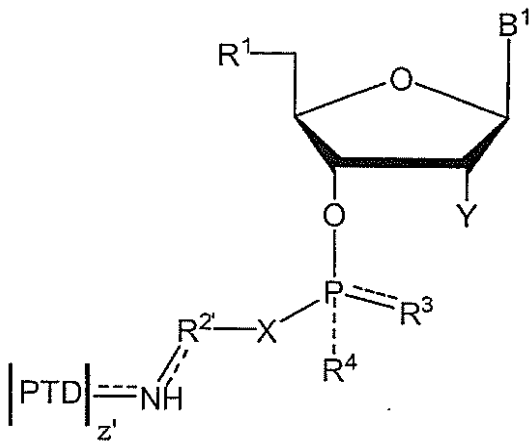
(式 III)

の構造を有する1つ以上の窒素含有相補性コンジュゲート部分によって生物可逆性基に連結されており、式中、A¹、A²、A⁴及びA⁵は、それぞれ個別に、N又はCR⁸であり、A³及びA⁶は、Cであり、R⁶~R⁷は、それぞれ個別に、H、置換されていてもよいC₁~₆アルキル、置換されていてもよいC₂~₆アルケニル、置換されていてもよいイミン、及び置換されていてもよいエナミンであり、各R⁸は、個別に、H、置換されていてもよいC₁~₆アルキル、置換されていてもよいC₁~₆アルケニル、置換されていてもよいC₂~₆アルキニル、ハロゲン化物、ヒドロキシル、-CHO、置換されていてもよいC₁~₆アシル、カルボン酸、シアノ、ニトロ、置換されていてもよいアミノ、チオール、置換されていてもよいC₂~₉ヘテロシクリル、置換されていてもよいC₆~₁₂アリール、置換されていてもよいC₃~₈シクロアルキル、及び置換されていてもよいC₄~₈シクロアルケニルである。一実施形態において、R

²は、送達ドメインを含む。さらなる実施形態において、送達ドメインは、1つ以上のペプチド導入ドメイン(PTD)を含む。よりさらなる実施形態において、ヌクレオチド構築物は、式I(c):

【0050】

【化28】



(式I(c))

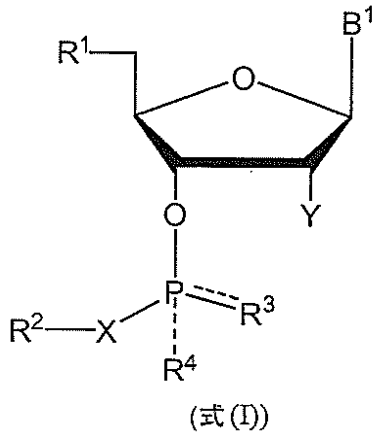
の構造を含み、式中、 $R^{2'}$ は、PTDに結合された生物可逆性基の残余部であり、 z' は1~10の数字であり、 z' が1を超える場合、PTDは、1~10個の繰り返し単位を有するポリ($C_1 \sim 4$ アルキレンオキシド)基を介して一緒に連結されている。別の実施形態において、PTDは、5~15個のアミノ酸にわたって5~10個のアルギニン及び/又はリシン残基を有するカチオン性ペプチド配列である。特定の実施形態において、PTDは、配列RKKRRQRRR(配列番号1)を含む。さらに別の実施形態において、送達ドメインは、1~10個の繰り返し単位を有するポリ(エチレングリコール)にコンジュゲートされたPTDを含む。例えば、送達ドメインは、PEG-(PTD)、GG-(PTD)-PEG-(PTD)、PEG-(PTD)-PEG-(PTD)、GG-(PTD)-PEG-PEG-PEG-(PTD)、PEG-(PTD)-PEG-PEG-PEG-(PTD)、GG-(PTD)-PEG-(PTD)-PEG-(PTD)、及びGG-(PTD)-PEG-PEG-PEG-(PTD)-PEG-PEG-PEG-(PTD)からなる群から選択される構造を含み、ここで、PEGは、1~10個の繰り返し単位を有するポリ(エチレングリコール)リンカーである。さらに別の実施形態において、 R^2 は、標的指向性部分を含む。例えば、標的指向性部分は、リガンド、炭水化物、抗体、FAb、ScFv、又は単一ドメイン抗体を含むことができる。前記のいずれかのさらに別の実施形態において、 B^1 は、非天然ヌクレオチド塩基である。さらなる実施形態において、 B^1 は、天然に存在するヌクレオチド塩基である。例えば、 B^1 は、シトシン、グアニン、アデニン、ウラシル、又はチミジンでよい。

【0051】

本開示は、また、式(I):

【0052】

【化 2 9】



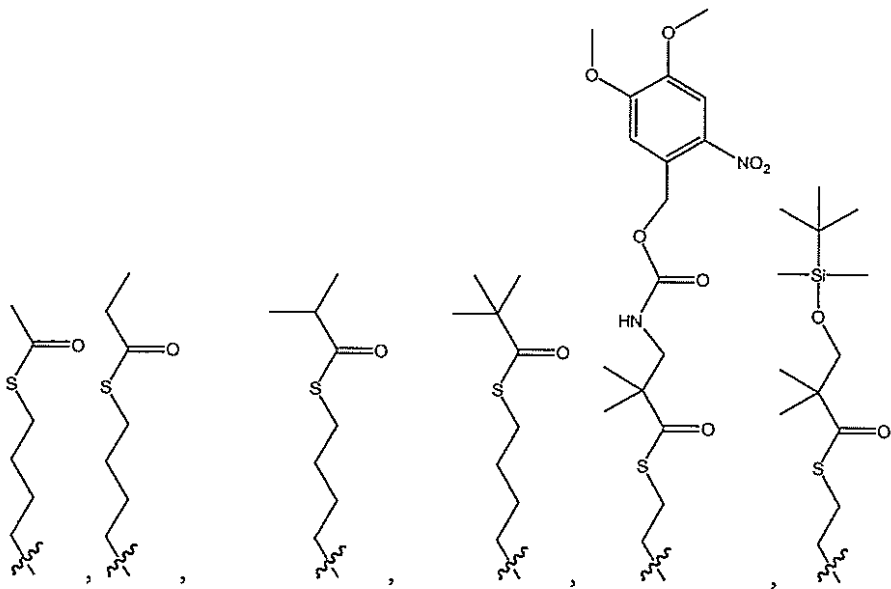
10

又はその塩の構造を含むヌクレオチド構築物を提供し、式中、 B^1 は、核酸塩基であり、 X は、 O 、 S 又は NR^5 であり、 Y はハロ、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルコキシ、又は保護されたヒドロキシル基であり、 R^1 は、ヒドロキシル、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルコキシ、保護されたヒドロキシル基、一リン酸、二リン酸、三リン酸、四リン酸、又は五リン酸であり、 R^2 は、

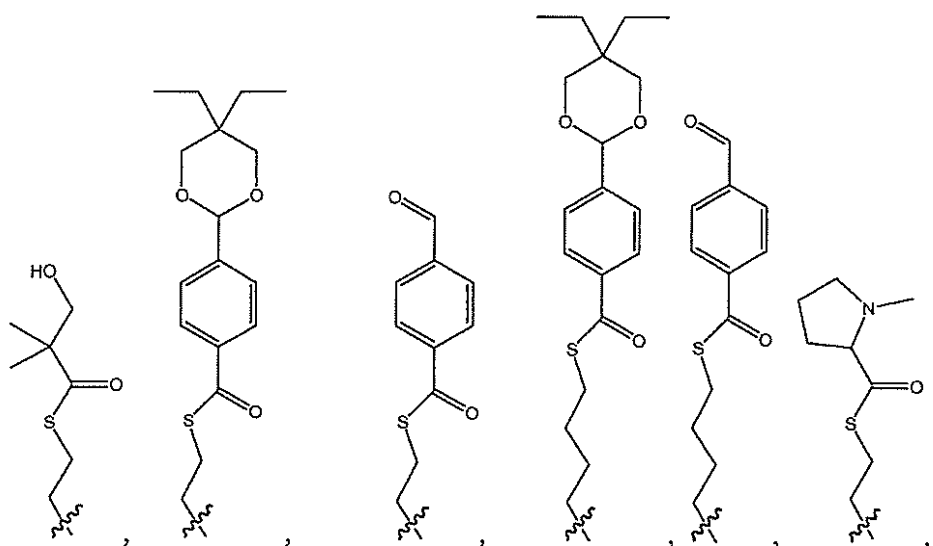
【 0 0 5 3】

【化 3 0】

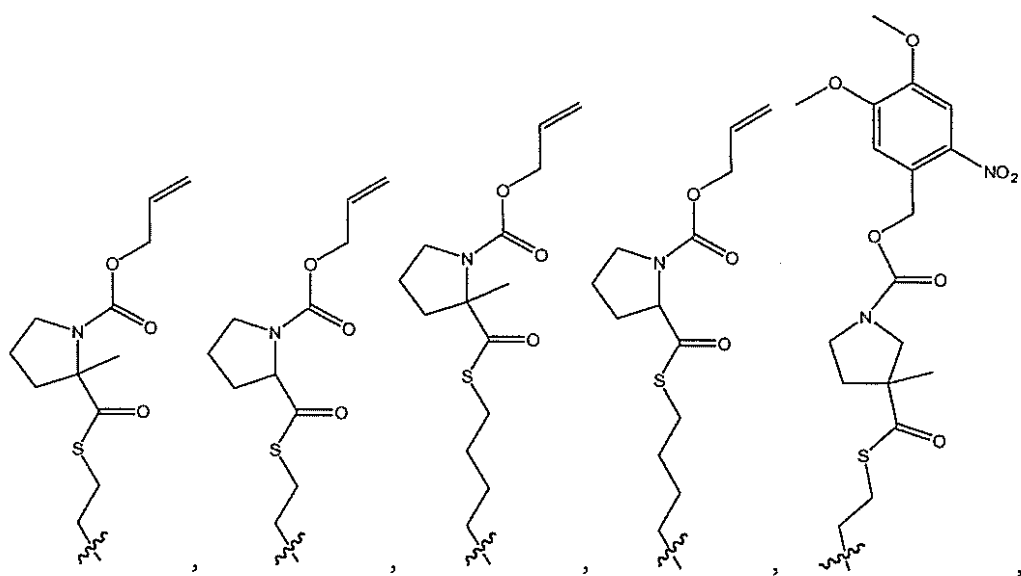
20



30

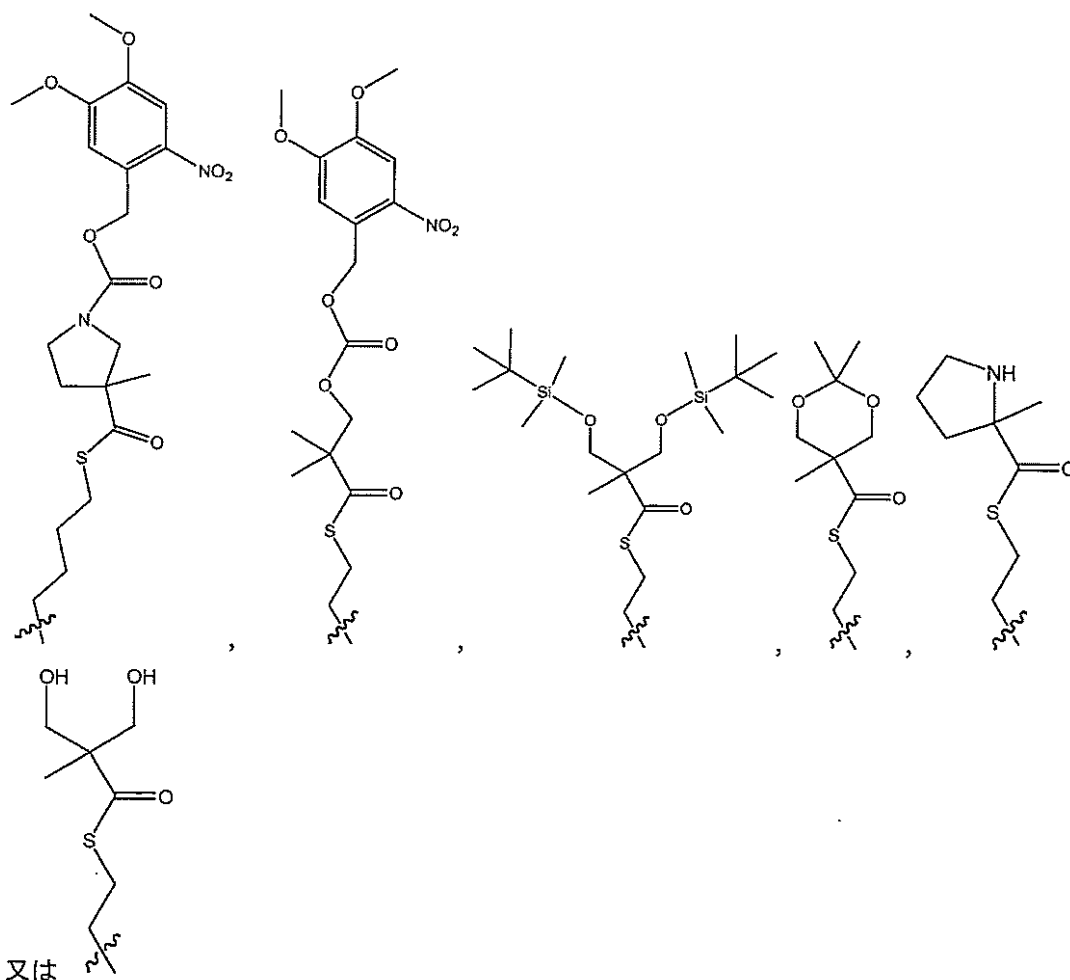


10



20

30



10

20

30

40

50

であり、 R^3 は、O、S、又は置換されていてもよいアミノであり、 R^4 は、H、ヒドロキシル、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルコキシ、保護されたヒドロキシル基、ーリン酸、ニリン酸、三リン酸、四リン酸、五リン酸であるか、或いは R^3 が置換されていてもよいアミノである場合は存在せず、 R^5 は、H、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルキル、S-ビバロイルチオエタノール、ヒドロキシル、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルコキシ、置換されていてもよい $C_3 \sim 8$ シクロアルキル、置換されていてもよい $C_6 \sim 12$ アリール、又は置換されていてもよい $C_2 \sim 9$ ヘテロシクリルである。特定の実施形態において、XはO又はSである。

【0054】

本開示は、また、(1)5'位にDMT保護基を含む第1ヌクレオシド又はヌクレオチドを、非プロトン性溶媒系中で酸性条件下にDMT基を除去することによって脱ブロックするステップであって、第1ヌクレオシド又はヌクレオチドが、3'位で固体支持体に固定されていてもよく、或いは代わりに3'位が酸に不安定ではないヒドロキシル保護基で保護され、第1ヌクレオシド又はヌクレオチドが溶解している、ステップ、(2)脱ブロックされた第1ヌクレオシド又はヌクレオチドを、前に示したような活性化されたヌクレオチド又は3'位にホスホルアミダイトを含む活性化されたヌクレオチドと、酸性アゾール触媒の存在下にカップリングするステップ、(3)カップリングされたヌクレオチドを、プロトン性溶媒及び弱塩基を含む溶媒系中、酸化剤で酸化するステップ、(4)カップリングされたヌクレオチドを、カップリングされたヌクレオチドの5'位のDMT基を非プロトン性溶媒系中、酸性条件下に除去することによって脱ブロックするステップを含み、ステップ(2)～(4)が、1～149回繰り返され、ポリヌクレオチド構築物が、少なくとも1つの上記のようなヌクレオチド構築物を含む、ポリヌクレオチド構築物を製造する方法を提供する。一実施形態において、ステップ(1)の第1ヌクレオシド又はヌクレオチドは固体支持体に結合されており、生じるポリヌクレオチド構築物は、最後の脱ブロックステップの後に、固体支持体から開裂される。別の実施形態において、ステップは、コンピュータで制御された装置を使用して実

施される。さらに別の実施形態において、ポリヌクレオチド構築物の合成後に、核酸塩基が1つ以上の保護基を含む場合、次いで保護基を除去し、且つ/又は保護基で保護されている親水性官能基又はコンジュゲート部分を含む任意の生物可逆性基について、次いで、保護基を除去する。さらに別の実施形態において、ポリヌクレオチド構築物を合成した後に、小分子、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、及び/又はエンドソーム脱出部分が、1つ以上の生物可逆性基の1つ以上のコンジュゲート部分に連結される。

【0055】

本開示は、また、アルデヒド基と縮合して1つ以上の共有結合及び上記のようなポリヌクレオチド構築物を形成できる、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、又はこれらの任意の組合せを含む容器又は容器群を含むキットを提供する。

10

【0056】

本開示は、化合物のすべての異性形態(エナンチオマー、ジアステレオマー、及び幾何異性体(又は配座異性体))、例えばsyn及びanti異性体、各不斉中心に関してR及びS配置、Z及びE二重結合異性体、並びにZ及びE配座異性体を包含する。したがって、本開示の化合物の単一の立体化学的異性体並びにエナンチオマー、ジアステレオマー、及び幾何(又は配座)異性体混合物が本明細書中で想定される。とりわけ、特定のヌクレオチド間架橋基又は末端ヌクレオチド基上に生物可逆性基が存在することは、種々のジアステレオマー及びそれらの混合物をもたらす可能性がある。特記しない限り、本開示の化合物のすべての互変異性形が、本明細書中で想定される。本開示は、本開示のすべての薬学上許容される同位体標識化合物(1つ以上の原子が、同一の原子番号を有するが、天然に通常に見出される原子質量又は質量数と異なる原子質量又は質量数を有する原子で置き換えられている)を包含する。本開示の化合物中に含めるのに適した同位体の例は、水素の同位体、例えば²H及び³H、炭素の同位体、例えば¹¹C、¹³C及び¹⁴C、塩素の同位体、例えば³⁶Cl、フッ素の同位体、例えば¹⁸F、ヨウ素の同位体、例えば¹²³I及び¹²⁵I、窒素の同位体、例えば¹³N及び¹⁵N、酸素の同位体、例えば¹⁵O、¹⁷O及び¹⁸O、リンの同位体、例えば³²P、硫黄の同位体、例えば³⁵Sを含む。

20

【0057】

適切な塩基から誘導される塩としては、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩、及びアンモニウム塩が挙げられる。代表的なアルカリ又はアルカリ土類金属塩としては、ナトリウム塩、リチウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などが挙げられる。塩の1つの部類には、薬学上許容される塩が包含される。用語「薬学上許容される塩」は、本明細書中で使用する場合、健全な医学的判断の範囲内で、過度の毒性、刺激、アレルギー反応などを伴わずにヒト及び動物の組織と接触させて使用するのに適しており、且つ合理的な利益/リスク比と釣り合っている塩を意味する。薬学上許容される塩は、当技術分野で周知である。例えば、薬学上許容される塩は、Berge et al., J. Pharmaceutical Sciences 66:1~19, 1977及びPharmaceutical Salts: Properties, Selections, and Use (Eds. P.H. Stahl and C.G. Wermuth), Wiley-VCH, 2008中に記載されている。塩は、本明細書に記載の化合物の最終的な単離及び精製中にインサイチュで、又は別個に、遊離の塩基性基を適切な有機酸と反応させることによって調製することができる。代表的な酸付加塩としては、酢酸塩、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスコルビン酸塩、アスパラギン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、安息香酸塩、重硫酸塩、ホウ酸塩、酪酸塩、樟脳酸塩、樟脳スルホン酸塩、クエン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、フマル酸塩、グルコヘプトン酸塩、グリセロリン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプトン酸塩、ヘキサノ酸塩、臭化水素酸塩、塩酸塩、ヨウ化水素酸塩、2-ヒドロキシ-エタンスルホン酸塩、ラクチン酸塩、乳酸塩、ラウリン酸塩、ラウリル硫酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、メタンスルホン酸塩、2-ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、オレイン酸塩、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、パモ酸塩、ペクチン酸塩、過硫酸塩、3-フェニルプロピオン酸塩、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、ブ

30

40

50

ロピオン酸塩、ステアリン酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、チオシアン酸塩、トルエンスルホン酸塩、ウンデカン酸塩、吉草酸塩などが挙げられる。代表的なアルカリ又はアルカリ土類金属塩としては、ナトリウム塩、リチウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩など、並びに非毒性のアンモニウム塩、第四級アンモニウム塩、及びアミンカチオン塩、例えば、限定はされないが、アンモニウム塩、テトラメチルアンモニウム塩、テトラエチルアンモニウム塩、メチルアミン塩、ジメチルアミン塩、トリメチルアミン塩、トリエチルアミン塩、エチルアミン塩などが挙げられる。

【0058】

用語「活性化されたカルボニル」は、本明細書中で使用する場合、 R^A が $C_1 \sim 6$ アルコキシ基、OH、又はハロゲン化物である式- $C(O)R^A$ を有する官能基を意味する。

10

【0059】

用語「活性化されたリン中心」は、本明細書中で使用する場合、その置換基の少なくとも1つが $C_1 \sim 6$ アルコキシ基である三価のリン(III)又は五価のリン(V)中心を意味する。望ましくは、アルコキシ基は、 $-OCH_3$ 又は $-OCH_2CH_3$ である。

【0060】

用語「活性化されたケイ素中心」は、本明細書中で使用する場合、その置換基の少なくとも1つが $C_1 \sim 6$ アルコキシ基である四置換されたケイ素中心を意味する。望ましくは、アルコキシ基は、 $-OCH_3$ 又は $-OCH_2CH_3$ である。

【0061】

用語「活性化された硫黄中心」は、本明細書中で使用する場合、その置換基の少なくとも1つが $C_1 \sim 6$ アルコキシ基である四価の硫黄中心を意味する。望ましくは、アルコキシ基は、 $-OCH_3$ 又は $-OCH_2CH_3$ である。

20

【0062】

用語「アシル」は、本明細書中で使用する場合、カルボニル基を介して親分子基に結合されている水素又はアルキル基(例えば、ハロアルキル基)を意味し、ホルミル(すなわち、カルボキシアルデヒド基)、アセチル、プロピオニル、ブタノイルなどで例示される。例示的な非置換アシル基は、1~7個の炭素を含む。一部の実施形態において、アルキル基は、本明細書に記載のような1、2、3又は4個の置換基でさらに置換されている。

【0063】

用語「アルカリアル」は、本明細書中で使用する場合、アルキレン基を介して親分子基に結合されているアリール基を意味する。例示的な非置換アルカリアル基は、7~16個の炭素からなる。一部の実施形態において、アルキレン及びアリールは、それぞれ、それぞれの基について本明細書中で定義したような1、2、3又は4個の置換基でさらに置換される。接頭辞「アルキ-(alk-)」が前置されたその他の基は、同様の方式で定義され、ここで、「アルキ(alk)」は、特記しない限り $C_1 \sim 6$ アルキレンを指し、結合される化学構造は、本明細書で定義される通りである。

30

【0064】

用語「アルケニル」は、本明細書中で使用する場合、1つ以上の炭素-炭素二重結合を含み、特記しない限り2~6個の炭素からなる一価の直鎖又は分枝鎖の炭化水素基、及び4~8個の炭素からなるシクロアルケニル基を意味し、エテニル、1-プロペニル、2-プロペニル、2-メチル-1-プロペニル、1-ブテニル、2-ブテニルなどで例示される。アルケニル基は、アリール、シクロアルキル、又はヘテロシクリル(例えば、ヘテロアリール)から独立に選択される1、2、3又は4個の置換基で、或いは本明細書に記載の例示的なアルキル置換基のいずれかで置換されていてもよい。さらに、アルケニル基が本開示の生物可逆性基中に存在する場合、それは、本明細書中で定義されるようなコンジュゲート部分、親水性官能基、又は補助部分に結合されているチオエステル又はジスルフィド基で置換されていてもよい。

40

【0065】

用語「アルコキシ」は、本明細書中で使用する場合、 R が特記しない限り $C_1 \sim 6$ アルキル基である、式-ORの化学置換基を意味する。一部の実施形態において、アルキル基は、本

50

明細書中で定義されるような1、2、3又は4個の置換基でさらに置換され得る。

【0066】

用語「アルキル」は、本明細書中で使用する場合、特記しない限り炭素数が1から6の直鎖、分枝鎖の双方、及びシクロアルキルの飽和炭化水素基を包含する。アルキル基は、メチル、エチル、*n*-及び*iso*-プロピル、*n*-、*sec*-、*iso*-及び*tert*-ブチル、ネオペンチルなどで例示され、(1)アルコキシ、(2)アルキルスルフィニル、(3)アミノ、(4)アリーラルコキシ、(5)アジド、(6)ハロ、(7)(ヘテロシクリル)オキシ、(8)ヒドロキシ、(9)ニトロ、(10)オキソ(例えば、カルボキシアルデヒド又はアシル)、(11)スピロシクリル、(12)チオアルコキシ、(13)チオール、(14)-CO₂R^A(ここで、R^Aは(a)アルキル、(b)アリール、(c)水素、及び(d)アルカリールからなる群から選択される)、(15)-C(O)NR^BR^C(ここで、R^B及びR^Cのそれぞれは、独立に、(a)水素、(b)アルキル、(c)アリール、及び(d)アルカリールからなる群から選択される)、(16)-SO₂R^D(ここで、R^Dは、(a)アルキル、(b)アリール、及び(c)アルカリールからなる群から選択される)、(17)-SO₂NR^ER^F(ここで、R^E及びR^Fのそれぞれは、独立に、(a)水素、(b)アルキル、(c)アリール、及び(d)アルカリールからなる群から選択される)、(18)シリル、(19)シアノ、及び(20)-S(O)R^H(ここで、R^Hは、(a)水素、(b)アルキル、(c)アリール、及び(d)アルカリールからなる群から選択される)からなる群から独立に選択される、1、2、3個、又は2個以上の炭素からなるアルキル基の場合には4つの置換基で置換されていてもよい。一部の実施形態において、これらの基のそれぞれは、本明細書に記載のようにさらに置換され得る。例えば、C₁-アルカリールのアルキレン基は、オキソ基でさらに置換されて、それぞれのアリーロイル置換基を提供することができる。

10

20

【0067】

用語「アルキレン」及び接頭辞「アルキ-」は、本明細書中で使用する場合、直鎖又は分枝鎖の飽和炭化水素から少なくとも2つの水素原子を除去することによって誘導される二価の飽和炭化水素基を意味し、メチレン、エチレン、イソプロピレンなどにより例示される。用語「C_x-yアルキレン」及び接頭辞「C_x-yアルキ-」は、x~y個の炭素を有するアルキレン基を意味する。xの例示的な値は、1、2、3、4、5及び6であり、yの例示的な値は、2、3、4、5、6、7、8、9又は10である。一部の実施形態において、アルキレンは、アルキル基に関して本明細書中で定義した通りの1、2、3又は4個の置換基でさらに置換され得る。同様に、接尾辞「エン」は、本明細書中で定義されるような一価の基に対応する二価の基を意味する。例えば、アリーレン、ヘテロシクリレン、アルケニレン、及びアルキニレンは、アリール、ヘテロシクリル、アルケニル、及びアルキニルの二価形態である。さらに、アルキル又はアルキレン、アルケニル又はアルケニレン、或いはアルキニル又はアルキニル基が、本開示の生物可逆性基中に存在する場合、それは、本明細書中で定義されるようなコンジュゲート部分、親水性官能基、又は補助部分に結合されているエステル、チオエステル、又はジスルフィド基で置換されていてもよい。

30

【0068】

用語「アルキニル」は、本明細書中で使用する場合、少なくとも1つの炭素-炭素三重結合を含み、2~6個の炭素原子からなる直鎖又は分枝鎖の一価炭化水素基を意味し、エチニル、1-プロピニルなどによって例示される。アルキニル基は、本明細書中で定義されるようなアリール、シクロアルキル又はヘテロシクリル(例えば、ヘテロアリール)から、又は本明細書に記載の例示的なアルキル置換基のいずれかから独立に選択される1、2、3又は4つの置換基で置換されていてもよい。

40

【0069】

用語「アミノ」は、本明細書中で使用する場合、-N(R^{N1})₂又は-N(=NR^{N1})(NR^{N1})₂を意味し、ここで、各R^{N1}は、独立に、H、OH、NO₂、N(R^{N2})₂、SO₂OR^{N2}、SO₂R^{N2}、SOR^{N2}、N-保護基、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アリール、アルカリール、シクロアルキル、アルキシクロアルキル、ヘテロシクリル(例えば、ヘテロリール)、アルキヘテロシクリル(例えば、アルキヘテロアリール)であるか、又は2つのR^{N1}が、合わさって、ヘテロシクリルを形成し、各R^{N2}は、独立に、H、アルキル、又はアリールである。一実施形

50

態において、アミノは、 $-NH_2$ 又は $-NHR^{N1}$ であり、ここで、 R^{N1} は、独立に、 OH 、 NO_2 、 NH_2 、 NR^{N2}_2 、 SO_2OR^{N2} 、 SO_2R^{N2} 、 SOR^{N2} 、アルキル、又はアリールであり、各 R^{N2} は、 H 、アルキル、又はアリールでよい。 R^{N1} 基は、それら自体、非置換であるか、又は本明細書に記載のように置換されていてよい。さらに、本開示の生物可逆性基中にアルキニル基が存在する場合、それは、本明細書中で定義されるようなコンジュゲート部分、親水性官能基、又は補助部分に結合されているエステル、チオエステル、又はジスルフィド基で置換されていてよい。

【0070】

用語「抗体」は、本明細書中で使用する場合、最も広い意味で使用され、具体的には、例えば、単一モノクローナル抗体、ポリエピトープ特異性を伴う抗体組成物、単鎖抗体、及び抗体のフラグメント(例えば、抗原結合性フラグメント又はFc領域)を包含する。「抗体」は、本明細書中で使用する場合、それらが、抗原を認識し、且つ/又は本明細書に記載の所望される作動又は拮抗特性のいずれかを呈示する限り、無傷の免疫グロブリン又は抗体分子、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体(すなわち、少なくとも2種の無傷の抗体から形成される二重特異性抗体)、及び免疫グロブリンフラグメント(Fab 、 $F(ab')_2$ 又は Fv など)を包含する。抗体又はフラグメントは、ヒト化、ヒト、又はキメラ性でよい。

10

【0071】

用語「アリール」は、本明細書中で使用する場合、1つ又は2つの芳香族環を有する単環式、二環式又は多環式の炭素環式環系を意味し、フェニル、ナフチル、1,2-ジヒドロナフチル、1,2,3,4-テトラヒドロナフチル、フルオレニル、インダニル、インデニルなどによって例示され、(1)アシル(例えば、カルボキシアルデヒド)、(2)アルキル(例えば、アルコキシアルキル、アルキルスルフィニルアルキル、アミノアルキル、アジドアルキル、(カルボキシアルデヒド)アルキル、ハロアルキル(例えば、ペルフルオロアルキル)、ヒドロキシアルキル、ニトロアルキル、又はチオアルコキシアルキル)、(3)アルコキシ(例えば、ペルフルオロアルコキシ)、(4)アルキルスルフィニル、(5)アリール、(6)アミノ、(7)アルカリール、(8)アジド、(9)シクロアルキル、(10)アルキシクロアルキル、(11)ハロ、(12)ヘテロシクリル(例えば、ヘテロアリール)、(13)(ヘテロシクリル)オキシ、(14)ヒドロキシ、(15)ニトロ、(16)チオアルコキシ、(17) $-(CH_2)_qCO_2R^A$ (ここで、 q は0~4の整数であり、 R^A は、(a)アルキル、(b)アリール、(c)水素、及び(d)アルカリールからなる群から選択される)、(18) $-(CH_2)_qCONR^BR^C$ (ここで、 q は0~4の整数であり、 R^B 及び R^C は、独立に、(a)水素、(b)アルキル、(c)アリール、及び(d)アルカリールからなる群から選択される)、(19) $-(CH_2)_qSO_2R^D$ (ここで、 q は0~4の整数であり、 R^D は、(a)アルキル、(b)アリール、及び(c)アルカリールからなる群から選択される)、(20) $-(CH_2)_qSO_2NR^ER^F$ (ここで、 q は0~4の整数であり、 R^E 及び R^F のそれぞれは、独立に、(a)水素、(b)アルキル、(c)アリール、及び(d)アルカリールからなる群から選択される)、(21)チオール、(22)アリールオキシ、(23)シクロアルコキシ、(24)アリールアルコキシ、(25)アルキヘテロシクリル(例えばアルキヘテロアリール)、(26)シリル、(27)シアノ、及び(28) $-S(O)R^H$ (ここで、 R^H は、(a)水素、(b)アルキル、(c)アリール、及び(d)アルカリールからなる群から選択される)からなる群から独立に選択される1つ、2つ、3つ、4つ、又は5つの置換基で置換されていてよい。一部の実施形態において、これらの基のそれぞれは、本明細書に記載のようにさらに置換され得る。例えば、 C_1 -アルカリール又は C_1 -アルキヘテロシクリルのアルキレン基は、オキシ基でさらに置換されて、それぞれアリーロイル及び(ヘテロシクリル)オイル置換基を提供することができる。さらに、本開示の生物可逆性基中にアリール基が存在する場合、それは、本明細書中で定義されるようなコンジュゲート部分、親水性官能基、又は補助部分に結合されたエステル、チオエステル、又はジスルフィド基で置換されていてよい。

20

30

40

【0072】

用語「補助部分」は、限定はされないが、本明細書中で開示される核酸構築物にコンジュゲートさせることのできる、小分子、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、及びこれら

50

の任意の組合せをはじめとする任意の部分を目指す。常にではないが、一般に、「補助部分」は、本明細書に開示の核酸構築物に、生物可逆性基上に存在する1つ以上のコンジュゲート基に対して1つ以上の共有結合を形成することによって連結又は結合される。しかし、代替の実施形態において、「補助部分」は、本明細書に開示の核酸構築物に、生物可逆性基上に存在するコンジュゲート基に加えて、核酸構築物の任意の部分、例えば、ヌクレオチド糖分子の2'、3'又は5'位に、或いは核酸塩基の任意の部分に対して1つ以上の共有結合を形成することによって連結又は結合され得る。個々の補助部分に関する名称は、遊離分子を意味するが、このような遊離分子は、核酸構築物に結合されていると理解される。当業者は、核酸構築物に対する個々の補助部分の適切な結合箇所を容易に理解するであろう。

10

【0073】

用語「アジド」は、本明細書中で使用する場合、 N_3 基を意味する。

【0074】

用語「生物可逆性基」は、本明細書中で使用する場合、例えば、1種以上の細胞内酵素(例えば、細胞内チオエステラーゼ又は細胞内レダクターゼ)の作用により細胞内で能動的に開裂され得る、又はその基を細胞内環境又は細胞中に存在する条件(例えば、pH、還元若しくは酸化環境、又はグルタチオンなどの細胞内の種との反応)に曝露することなどによって細胞内で受動的に開裂され得る官能基を含む部分を意味する。例示的な生物可逆性基は、チオエステル又はジスルフィドを含む。

20

【0075】

用語「カルベン」は、本明細書中で使用する場合、6個の価電子及び構造 $=C:$ 又は $-CR^B:$ を有する二価の炭素種である官能基を意味し、ここで、 R^B は、H、置換されていてもよい C_{1-12} アルキル、置換されていてもよい C_{6-12} アリール、置換されていてもよい C_{1-12} アルキ C_{6-12} アリール、又は置換されていてもよいカルボニルから選択され、Cは、共有結合の一部ではない2つの電子を有する炭素である。2つの電子は、対をなしていても(例えば、一重項カルベン)、対をなしていなくても(例えば、三重項カルベン)よい。

【0076】

用語「炭素環式」は、本明細書中で使用する場合、その環が炭素原子により形成されており、芳香族又は非芳香族でよい、置換されていてもよい $C_3 \sim C_{12}$ の単環式、二環式又は三環式構造を意味する。炭素環式構造は、シクロアルキル、シクロアルケニル、及びアリール基を包含する。

30

【0077】

用語「炭水化物」は、本明細書中で使用する場合、各炭素原子に結合された酸素、窒素又は硫黄原子と共に少なくとも5つの炭素原子を有する1つ以上の単糖単位(直鎖状、分枝状若しくは環状であってよい)を含む化合物を意味する。用語「炭水化物」は、したがって、単糖、二糖、三糖、四糖、オリゴ糖、及び多糖を包含する。代表的な炭水化物としては、糖(単糖、二糖、三糖、及び約4~9個の単糖単位を含むオリゴ糖)、並びにデンプン、グリコーゲン、セルロース及び多糖ガムなどの多糖が挙げられる。具体的な単糖としては、 $C_5 \sim 6$ 糖が挙げられ、二糖及び三糖としては、2つ又は3つの単糖単位(例えば、 $C_5 \sim 6$ 糖)を有する糖が挙げられる。

40

【0078】

用語「カルボニル」は、本明細書中で使用する場合、 $C(=O)$ 基を意味する。「カルボニル」を含む官能基の例としては、エステル、ケトン、アルデヒド、無水物、アシルクロリド、アミド、カルボン酸、及びカルボキシレートが挙げられる。

【0079】

用語「カップリング反応の成分」は、本明細書中で使用する場合、カップリング反応に参加する能力のある分子種を意味する。カップリング反応の成分としては、ヒドリドシラン、アルケン、及びアルキンが挙げられる。

【0080】

用語「付加環化反応の成分」は、本明細書中で使用する場合、付加環化反応に参加する

50

能力のある分子種を意味する。結合形成が $[4n+2]$ (ここで、 n は1である)個の π 電子を必要とする付加環化反応において、一方の成分は2個の π 電子を提供し、他方の成分は4個の π 電子を提供する。2個の π 電子を提供する付加環化反応の代表的な成分としては、アルケン及びアルキンが挙げられる。4個の π 電子を提供する付加環化反応の代表的な成分としては、1,3-ジエン、 α, β -不飽和カルボニル、及びアジドが挙げられる。

【0081】

用語「コンジュゲート部分」は、本明細書中で使用する場合、適切な条件下で別の補助部分(例えば、求核基、電子求引基、付加環化反応の成分、又はカップリング反応の成分)に対して1つ以上の共有結合を形成する能力のある官能基を意味する。このような基の例は、本明細書中で示される。

10

【0082】

用語「カップリング反応」は、本明細書中で使用する場合、一方の成分が、Si-H又はC-Hなどの非極性 σ 結合を含み、第2の成分が、C-H、Si-C、又はC-C結合を形成するための π 結合に対する σ 結合の正味の付加、或いは2種の成分間に単一の共有結合の形成をもたらすアルケン又はアルキンなどの π 結合を含む、2種の成分の反応を意味する。1つのカップリング反応は、アルケンに対するSi-Hの付加(ヒドロシリル化としても知られる)である。その他のカップリング反応としては、Stilleカップリング、鈴木カップリング、園頭カップリング、檜山カップリング、及びHeck反応が挙げられる。触媒を使用してカップリング反応を促進することができる。典型的な触媒は、Pt(0)、Pt(II)又はPt(IV)を含む触媒である。

20

【0083】

用語「付加環化反応」は、本明細書中で使用する場合、 $[4n+2]$ 個の π 電子が、活性化、化学触媒による活性化、又は熱エネルギーを使用する活性化のいずれもがない場合結合形成に関与し、 n は1、2又は3である、2種の成分の反応を意味する。付加環化反応は、また、 $[4n]$ (n は1、2又は3である)個の π 電子が関与し、光化学的活性化を伴う、2種の成分の反応である。望ましくは、 $[4n+2]$ 個の π 電子が結合形成に関与し、且つ $n=1$ である。代表的な付加環化反応としては、アルケンの1,3-ジエンとの反応(ディールス-アルダー反応)、アルケンの α, β -不飽和カルボニルとの反応(ヘテロディールス-アルダー反応)、及びアルキンのアジドとの反応(Huisgen付加環化)が挙げられる。

【0084】

用語「シクロアルキル」は、本明細書中で使用する場合、特記しない限り3~8つの炭素からなる飽和又は不飽和の一価の非芳香族環式炭化水素基を意味し、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、ビシクロ[2.2.1]ヘプチルなどによって例示される。シクロアルキル基が1つの炭素-炭素二重結合を含む場合、該シクロアルキル基を、「シクロアルケニル」基と呼ぶことができる。例示的なシクロアルケニル基としては、シクロペンテニル、シクロヘキセニルなどが挙げられる。本開示のシクロアルキル基は、(1)アシル(例えば、カルボキシアルデヒド)、(2)アルキル(例えば、アルコキシアルキル、アルキルスルフィニルアルキル、アミノアルキル、アジドアルキル、(カルボキシアルデヒド)アルキル、ハロアルキル(例えば、ペルフルオロアルキル)、ヒドロキシアルキル、ニトロアルキル、又はチオアルコキシアルキル)、(3)アルコキシ(例えば、ペルフルオロアルコキシ)、(4)アルキルスルフィニル、(5)アリール、(6)アミノ、(7)アルカリール、(8)アジド、(9)シクロアルキル、(10)アルキシクロアルキル、(11)ハロ、(12)ヘテロシクリル(例えば、ヘテロアリール)、(13)(ヘテロシクリル)オキシ、(14)ヒドロキシ、(15)ニトロ、(16)チオアルコキシ、(17) $-(CH_2)_qCO_2R^A$ (ここで、 q は0~4の整数であり、 R^A は、(a)アルキル、(b)アリール、(c)水素、及び(d)アルカリールからなる群から選択される)、(18) $-(CH_2)_qCONR^BR^C$ (ここで、 q は0~4の整数であり、 R^B 及び R^C は、独立に、(a)水素、(b)アルキル、(c)アリール、及び(d)アルカリールからなる群から選択される)、(19) $-(CH_2)_qSO_2R^D$ (ここで、 q は0~4の整数であり、 R^D は、(a)アルキル、(b)アリール、及び(c)アルカリールからなる群から選択される)、(20) $-(CH_2)_qSO_2NR^ER^F$ (ここで、 q は0~4の整数であり、 R^E 及び R^F のそれぞれは、独立に、(a)水素、(b)アルキル、(c)

30

40

50

アリール、及び(d)アルカリールからなる群から選択される)、(21)チオール、(22)アリールオキシ、(23)シクロアルコキシ、(24)アリールアルコキシ、(25)アルキヘテロシクリル(例えばアルキヘテロアリール)、(26)オキソ、(27)シリル、(28)シアノ、(29)-S(O) R^H (ここで、 R^H は、(a)水素、(b)アルキル、(c)アリール、及び(d)アルカリールからなる群から選択される)で置換されていてもよい。一部の実施形態において、これらの基のそれぞれは、本明細書に記載のようにさらに置換され得る。例えば、 C_1 -アルカリール又は C_1 -アルキヘテロシクリルのアルキレン基は、オキソ基でさらに置換されて、それぞれアリーロイル及び(ヘテロシクリル)オイル置換基を提供することができる。

【0085】

用語「電子求引基」又は「電子求引性基」は、本明細書中で使用する場合、電子に富む中心に引き付けられ、且つ1つ以上の求核基からの電子対を受け入れて1つ以上の共有結合を形成する能力のある官能基を意味する。電子求引基としては、限定はされないが、カチオン、分極した中性分子、ナイトレン(nitrene)、アジドなどのナイトレン前駆体、カルベン、カルベン前駆体、活性化されたケイ素中心、活性化されたカルボニル、ハロゲン化アルキル、擬ハロゲン化アルキル、エポキシド、電子不足アリール、活性化されたリン中心、及び活性化された硫黄中心が挙げられる。典型的に遭遇する電子求引基としては、 H^+ 及び NO^+ などのカチオン、HClなどの分極した中性分子、ハロゲン化アルキル、ハロゲン化アシル、アルデヒドなどのカルボニル含有化合物、及びメシレート、トリフレート及びトシレートなどの良好な脱離基に連結された原子が挙げられる。

10

【0086】

用語「エンドソーム脱出部分」は、本明細書中で使用する場合、エンドソーム内容物の放出を高める、又はエンドソームなどの細胞内コンパートメントからの分子の脱出を可能にする部分を意味する。

20

【0087】

用語「ハロ」は、本明細書中で使用する場合、臭素、塩素、ヨウ素及びフッ素から選択されるハロゲンを意味する。

【0088】

用語「ハロアルキル」は、本明細書中で使用する場合、ハロゲン基(すなわち、F、Cl、Br又はI)で置換された本明細書中で定義されるようなアルキル基を意味する。ハロアルキルは、1つ、2つ、3つ、又は2つ以上の炭素からなるアルキル基の場合には4つのハロゲンで置換されていてもよい。ハロアルキル基は、ペルフルオロアルキルを含む。一部の実施形態において、ハロアルキル基は、アルキル基に関して本明細書に記載のような1、2、3又は4つの置換基でさらに置換され得る。

30

【0089】

用語「ヘテロアリール」は、本明細書中で使用する場合、本明細書中で定義されるようなヘテロシクリルの中の、芳香族(すなわち、単環式又は多環式環系内に $4n+2$ 個の π 電子を含む)である下位集合を意味する。一実施形態において、ヘテロアリールは、ヘテロシクリル基に関して定義されるような1、2、3又は4つの置換基で置換されている。

【0090】

用語「ヘテロシクリル」は、本明細書中で使用する場合、特記しない限り、窒素、酸素及び硫黄を含む群から独立に選択される1、2、3又は4つのヘテロ原子を含む、5、6又は7員環を意味する。5員環は、0~2つの二重結合を有し、6及び7員環は、0~3つの二重結合を有する。特定のヘテロシクリル基は、2~9つの炭素原子を含む。その他のこのような基は、12個までの炭素原子を含むことができる。用語「ヘテロシクリル」は、また、1つ以上の炭素及び/又はヘテロ原子が、単環式環、例えばキヌクリジニル基の2つの非隣接メンバーを架橋している架橋された多環式構造を有する複素環式化合物を意味する。用語「ヘテロシクリル」は、上記複素環式環のいずれかが、1、2又は3つの炭素環式環、例えば、アリール環、シクロヘキサン環、シクロヘキセン環、シクロペンタン環、シクロペンテン環、又は別の単環式複素環式環、例えば、インドリル、キノリル、イソキノリル、テトラヒドロキノリル、ベンゾフリル、ベンゾチエニルなどに縮合されている、二環式、三環式

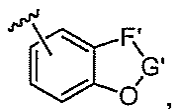
40

50

、及び四環式基を包含する。縮合ヘテロシクリルの例には、トロパン及び1,2,3,5,8,8a-ヘキサヒドロインドリジンが含まれる。ヘテロ環としては、ピロリル、ピロリニル、ピロリジニル、ピラゾリル、ピラゾリニル、ピラゾリジニル、イミダゾリル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、ピリジル、ピペリジニル、ホモピペリジニル、ピラジニル、ピペラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、オキサゾリル、オキサゾリジニル、イソオキサゾリル、イソオキサゾリジニル、モルホリニル、チオモルホリニル、チアゾリル、チアゾリジニル、イソチアゾリル、イソチアゾリジニル、インドリル、キノリニル、イソキノリニル、ベンゾイミダゾリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾオキサゾリル、フリル、チエニル、チアゾリジニル、イソチアゾリル、イソインダゾイル、トリアゾリル、テトラゾリル、オキサジアゾリル、プリニル、チアジアゾリル(例えば、1,3,4-チアジアゾール)、テトラヒドロフラニル、ジヒドロフラニル、テトラヒドロチエニル、ジヒドロチエニル、ジヒドロインドリル、テトラヒドロキノリル、テトラヒドロイソキノリル、ピラニル、ジヒドロピラニル、ジチアゾリル、ベンゾフラニル、ベンゾチエニルなどが挙げられる。さらなるその他の例示的なヘテロシクリルとしては、2,3,4,5-テトラヒドロ-2-オキソ-オキサゾリル、2,3-ジヒドロ-2-オキソ-1H-イミダゾリル、2,3,4,5-テトラヒドロ-5-オキソ-1H-ピラゾリル(例えば、2,3,4,5-テトラヒドロ-2-フェニル-5-オキソ-1H-ピラゾリル)、2,3,4,5-テトラヒドロ-2,4-ジオキソ-1H-イミダゾリル(例えば、2,3,4,5-テトラヒドロ-2,4-ジオキソ-5-メチル-5-フェニル-1H-イミダゾリル)、2,3-ジヒドロ-2-チオキソ-1,3,4-オキサジアゾリル(例えば、2,3-ジヒドロ-2-チオキソ-5-フェニル-1,3,4-オキサジアゾリル)、4,5-ジヒドロ-5-オキソ-1H-トリアゾリル(例えば、4,5-ジヒドロ-3-メチル-4-アミノ5-オキソ-1H-トリアゾリル)、1,2,3,4-テトラヒドロ-2,4-ジオキソピリジニル(例えば、1,2,3,4-テトラヒドロ-2,4-ジオキソ-3,3'-ジエチルピリジニル)、2,6-ジオキソ-ピペリジニル(例えば、2,6-ジオキソ-3-エチル-3-フェニルピペリジニル)、1,6-ジヒドロ-6-オキソピリジミニル、1,6-ジヒドロ-4-オキソピリミジニル(例えば、2-(メチルチオ)-1,6-ジヒドロ-4-オキソ-5-メチルピリミジン-1-イル)、1,2,3,4-テトラヒドロ-2,4-ジオキソピリミジニル(例えば、1,2,3,4-テトラヒドロ-2,4-ジオキソ-3-エチルピリミジニル)、1,6-ジヒドロ-6-オキソ-ピリダジニル(例えば、1,6-ジヒドロ-6-オキソ-3-エチルピリダジニル)、1,6-ジヒドロ-6-オキソ-1,2,4-トリアジニル(例えば、1,6-ジヒドロ-5-イソプロピル-6-オキソ-1,2,4-トリアジニル)、2,3-ジヒドロ-2-オキソ-1H-インドリル(例えば、3,3'-ジメチル-2,3-ジヒドロ-2-オキソ-1H-インドリル及び2,3-ジヒドロ-2-オキソ-3,3'-スピロプロパン-1H-インドール-1-イル)、1,3-ジヒドロ-1-オキソ-2H-イソ-インドリル、1,3-ジヒドロ-1,3-ジオキソ-2H-イソ-インドリル、1H-ベンゾピラゾリル(例えば、1-(エトキシカルボニル)-1H-ベンゾピラゾリル)、2,3-ジヒドロ-2-オキソ-1H-ベンゾイミダゾリル(例えば、3-エチル-2,3-ジヒドロ-2-オキソ-1H-ベンゾイミダゾリル)、2,3-ジヒドロ-2-オキソ-ベンゾオキサゾリル(例えば、5-クロロ-2,3-ジヒドロ-2-オキソ-ベンゾオキサゾリル)、2,3-ジヒドロ-2-オキソ-ベンゾオキサゾリル、2-オキソ-2H-ベンゾピラニル、1,4-ベンゾジオキサニル、1,3-ベンゾジオキサニル、2,3-ジヒドロ-3-オキソ-4H-1,3-ベンゾチアジニル、3,4-ジヒドロ-4-オキソ-3H-キナゾリニル(例えば、2-メチル-3,4-ジヒドロ-4-オキソ-3H-キナゾリニル)、1,2,3,4-テトラヒドロ-2,4-ジオキソ-3H-キナゾリル(例えば、1-エチル-1,2,3,4-テトラヒドロ-2,4-ジオキソ-3H-キナゾリル)、1,2,3,6-テトラヒドロ-2,6-ジオキソ-7H-プリニル(例えば、1,2,3,6-テトラヒドロ-1,3-ジメチル-2,6-ジオキソ-7H-プリニル)、1,2,3,6-テトラヒドロ-2,6-ジオキソ-1H-プリニル(例えば、1,2,3,6-テトラヒドロ-3,7-ジメチル-2,6-ジオキソ-1H-プリニル)、2-オキソベンゾ[c,d]インドリル、1,1-ジオキソ-2H-ナフト[1,8-c,d]イソチアゾリル、及び1,8-ナフチレンジカルボキサミドが挙げられる。複素環式基には、また、式：

【 0 0 9 1 】

【化 3 1】



の基が含まれ、式中、

F' は、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{O}-$ 及び $-\text{O}-$ からなる群から選択され、G' は、 $-\text{C}(\text{O})-$ 及び $-(\text{C}(\text{R}')(\text{R}''))_\nu$ 、 $-(\text{ここで、R' 及び R'' のそれぞれは、独立に、水素、又は 1 \sim 4 つの炭素原子からなるアルキルからなる群から選択され、\nu は 1 \sim 3 である})$ からなる群から選択され、1,3-ベンゾジオキソリル、1,4-ベンゾジオキサニルなどの基が含まれる。本明細書中で言及されるヘテロシクリル基のいずれも、(1)アシル(例えば、カルボキシアリド)、(2)アルキル(例えば、アルコキシアリル、アルキルスルフィニルアルキル、アミノアルキル、アジドアルキル、(カルボキシアリド)アルキル、ハロアルキル(例えば、ペルフルオロアルキル)、ヒドロキシアリル、ニトロアルキル、又はチオアルコキシアリル)、(3)アルコキシ(例えば、ペルフルオロアルコキシ)、(4)アルキルスルフィニル、(5)アリール、(6)アミノ、(7)アルカリール、(8)アジド、(9)シクロアルキル、(10)アルキシクロアルキル、(11)ハロ、(12)ヘテロシクリル(例えば、ヘテロアリール)、(13)(ヘテロシクリル)オキシ、(14)ヒドロキシ、(15)ニトロ、(16)チオアルコキシ、(17) $-(\text{CH}_2)_q\text{CO}_2\text{R}^A$ (ここで、q は 0 \sim 4 の整数であり、R^A は、(a)アルキル、(b)アリール、(c)水素、及び(d)アルカリールからなる群から選択される)、(18) $-(\text{CH}_2)_q\text{CONR}^B\text{R}^C$ (ここで、q は 0 \sim 4 の整数であり、R^B 及び R^C は、独立に、(a)水素、(b)アルキル、(c)アリール、及び(d)アルカリールからなる群から選択される)、(19) $-(\text{CH}_2)_q\text{SO}_2\text{R}^D$ (ここで、q は 0 \sim 4 の整数であり、R^D は、(a)アルキル、(b)アリール、及び(c)アルカリールからなる群から選択される)、(20) $-(\text{CH}_2)_q\text{SO}_2\text{NR}^E\text{R}^F$ (ここで、q は 0 \sim 4 の整数であり、R^E 及び R^F のそれぞれは、独立に、(a)水素、(b)アルキル、(c)アリール、及び(d)アルカリールからなる群から選択される)、(21)チオール、(22)アリールオキシ、(23)シクロアルコキシ、(24)アリールアルコキシ、(25)アルキヘテロシクリル(例えばアルキヘテロアリール)、(26)オキソ、及び(27)(ヘテロシクリル)イミノ、(28)シリル、(29)シアノ、及び(30) $-\text{S}(\text{O})\text{R}^H$ (ここで、R^H は、(a)水素、(b)アルキル、(c)アリール、及び(d)アルカリールからなる群から選択される)からなる群から独立に選択される 1、2、3、4 又は 5 つの置換基で置換されていてもよい。一部の実施形態において、これらの基のそれぞれは、本明細書中に記載のようにさらに置換され得る。例えば、C₁-アルカリール又は C₁-アルキヘテロシクリルのアルキレン基は、オキソ基でさらに置換されて、それぞれアリーロイル及び(ヘテロシクリル)オイル置換基を提供することができる。さらに、本開示の生物可逆性基中にヘテロシクリル基が存在する場合、それは、本明細書中で定義されるようなコンジュゲート部分、親水性官能基、又は補助部分に結合されたエステル、チオエステル又はジスルフィド基で置換されていてもよい。

【0092】

用語「親水性官能基」は、本明細書中で使用する場合、水に対する親和性を付与し、アルキル部分の水への溶解性を増加させる部分を意味する。親水性官能基は、イオン性又は非イオン性でよく、正に帯電、負に帯電している部分を含み、且つ/又は水素結合性相互作用に参加することができる。例示的な親水性官能基としては、ヒドロキシ、アミノ、カルボキシル、カルボニル、チオール、ホスフェート(例えば、一、二、又は三リン酸)、ポリアルキレンオキシド(例えば、ポリエチレングリコール)、及びヘテロシクリルが挙げられる。

【0093】

用語「ヒドロキシル」は、本明細書中で使用する場合、 $-\text{OH}$ 基を意味する。

【0094】

用語「ヒドロキシ」は、本明細書中で使用する場合、ヒドロキシル基の存在を示す。

【0095】

用語「イミン」は、本明細書中で使用する場合、「 $\text{C}=\text{N}$ 」と表すことのできる、炭素と

窒素の間の二重結合を有する基を意味する。プロトンがイミン官能基に対して α である特定の実施形態において、イミンは、互変異性体であるエナミンの形態で存在することもできる。イミン結合の1つの種類は、イミン結合の窒素が共有結合で三価の窒素に結合されているヒドラゾン結合(例えば、 $C=N-N(R)_2$)である。一部の実施形態において、各Rは、独立に、H、OH、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルコキシ、又は置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルキルでよい。

【0096】

用語「ナイトレン」は、本明細書中で使用する場合、6つの価電子及び構造 $=N:$ 又は $-NR^A$:を有する一価の窒素種を意味し、ここで、 R^A は、置換されていてもよい $C_1 \sim 12$ アルキル、置換されていてもよい $C_6 \sim 12$ アリール、置換されていてもよい $C_1 \sim 12$ アルキ $C_6 \sim 12$ アリール、又は置換されていてもよいカルボニルから選択され、Nは、4つの価電子を有し、その少なくとも2つが対を形成している窒素である。2つの残存電子は、対を形成して(すなわち、一重項ナイトレン)も、対を形成していなくても(すなわち、三重項ナイトレン)よい。

10

【0097】

用語「ニトロ」は、本明細書中で使用する場合、 $-NO_2$ 基を意味する。

【0098】

「天然に存在しないアミノ酸」は、哺乳動物において自然には産生されない又は見出されないアミノ酸である。

20

【0099】

「非極性 σ 結合」とは、ポーリング尺度により測定した場合に、1.0単位以下で相違する電気陰性度の値を有する2つの元素の間の共有結合を意味する。非極性 σ 結合の非限定的例には、C-C、C-H、Si-H、Si-C、C-Cl、C-Br、C-I、C-B及びC-Sn結合が含まれる。

【0100】

用語「核酸塩基」は、本明細書中で使用する場合、ヌクレオチド又はヌクレオシドの糖部分の1'位に見出される窒素含有複素環式環を意味する。核酸塩基は、非修飾型又は修飾型でよい。本明細書中で使用する場合、「非修飾型」又は「天然」核酸塩基としては、プリン塩基であるアデニン(A)及びグアニン(G)、並びにピリミジン塩基であるチミン(T)、シトシン(C)及びウラシル(U)が挙げられる。修飾型核酸塩基としては、その他の合成及び天然核酸塩基、例えば、5-メチルシトシン(5-me-C又はm5c)、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、アデニン及びグアニンの6-メチル及びその他のアルキル誘導体、アデニン及びグアニンの2-プロピル及びその他のアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミン及び2-チオシトシン、5-ハロウラシル及びシトシン、5-プロピニルウラシル及びシトシン、6-アゾウラシル、シトシン及びチミン、5-ウラシル(プソイドウラシル)、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-ヒドロキシル及びその他の8-置換アデニン及びグアニン、5-ハロ、とりわけ5-プロモ、5-トリフルオロメチル及びその他の5-置換ウラシル及びシトシン、7-メチルグアニン及び7-メチルアデニン、8-アザグアニン及び8-アザアデニン、7-デアザグアニン及び7-デアザアデニン、並びに3-デアザグアニン及び3-デアザアデニンが挙げられる。さらなる核酸塩基としては、米国特許第3,687,808号中に開示の核酸塩基、The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858 ~ 859、Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990中に開示の核酸塩基、English et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613中に開示の核酸塩基、及びSanghvi, Y. S., Chapter 15, Antisense Research and Applications, pages 289 ~ 302 (Crooke et al., ed., CRC Press, 1993)に開示の核酸塩基が挙げられる。特定の核酸塩基は、5-置換ピリミジン、6-アザピリミジン、及び2-アミノプロピルアデニンをはじめとするN-2、N-6及びO-6置換プリン、5-プロピニルウラシル及び5-プロピニルシトシンを含む本開示のポリマー性化合物の結合親和性を増加させるのにとりわけ有用である。5-メチルシトシン置換は、核酸二本鎖の安定性を0.6 ~ 1.2 増加させることが示された(Sanghvi et al. eds., Antisense Research and Applications 1993, CRC Press, Boca Raton, pages 276 ~ 278)。特定の実施形態において、これらを

30

40

50

、2'-O-メトキシエチル糖修飾と組み合わせることができる。これらの修飾型核酸塩基のいくつか及びその他の修飾型核酸塩基の調製を教示している米国特許としては、限定はされないが、上記の米国特許第3,687,808号、4,845,205号、5,130,302号、5,134,066号、5,175,273号、5,367,066号、5,432,272号、5,457,187号、5,459,255号、5,484,908号、5,502,177号、5,525,711号、5,552,540号、5,587,469号、5,594,121号、5,596,091号、5,614,617号、及び5,681,941号が挙げられる。この開示の目的に関し、「修飾型核酸塩基」は、本明細書中で使用する場合、さらに、本明細書に記載のような1つ以上の保護基を含む、天然又は非天然の核酸塩基を意味する。

【0101】

用語「求核基」又は「求核性官能基」は、本明細書中で使用する場合、電子対又は π 結合から電子を供与することによる共有結合の形成に参加する置換されていてもよい官能基を意味する。求核基は、アルケン、アルキン、アリール、ヘテロアリール、ヒドラジン基、ヒドロキシ基、フェノキシ基、アミノ基、アルキルアミノ基、アニリド基、チオ基、及びチオフェノキシ基から選択することができる。

【0102】

用語「ヌクレオシド」は、本明細書中で使用する場合、核酸塩基-糖の組合せを意味する。ヌクレオシドの核酸塩基部分は、通常、複素環式塩基である。用語「ヌクレオチド」は、本明細書中で使用する場合、ヌクレオシドの糖部分に共有結合で連結されたリン酸基などのヌクレオチド間架橋基又は末端ヌクレオチド基をさらに含むヌクレオシドを指す。ペントフラノシル糖を含むそれらのヌクレオシドの場合、ヌクレオチド間架橋基又は末端基、例えば、リン酸基を、糖の2'、3'又は5'ヒドロキシル部分に連結することができる。糖は、天然に存在する糖、例えば、リボース又はデオキシリボースであってもなくてもよく、それは、天然に存在する糖の修飾された形態、例えば、2'修飾型リボースでよい。例示的な修飾型糖は、2-OHが、H、OR、R、ハロ(例えば、F)、SH、SR、NH₂、NHR、NR₂、又はCN(ここで、Rはアルキル部分である)などの基で置き換えられている、2'-位での糖の修飾を含む。修飾型糖としては、また、例えば、マンノース、アラビノース、グルコピラノース、ガラクトピラノース、4-チオリボース、及びその他の糖などの非リボース糖、複素環、又は炭素環が挙げられる。ヌクレオチドとしては、また、ロックされた核酸(LNA)、ペプチド核酸、グリセロール核酸、モルホリノ核酸、及びトレオース核酸が挙げられる。

【0103】

他の実施形態では、天然糖のホスホロジエステル骨格を、ペプチド結合によって連結された繰り返し単位N-(2-アミノエチル)-グリシンを有するタンパク質ヌクレオチド(PNA)骨格で置き換えることができる。ヌクレアーゼ分解に対してより抵抗性であるように設計されたポリヌクレオチドのためのその他の種類の修飾は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第6,900,540号及び6,900,301号に記載されている。

【0104】

用語「ポリヌクレオチド」は、本明細書中で使用する場合、ヌクレオチド間架橋基によって一緒に共有結合で結合された2つ以上のヌクレオチド及び/又はヌクレオシドを意味する。ポリヌクレオチドは、直鎖又は環状でよい。さらに、本開示の目的に関して、用語「ポリヌクレオチド」は、オリゴヌクレオチド及びより長い配列の双方、並びにヌクレオチドの混合物、例えば、DNAとRNAとの混合物、又はRNAと2'修飾型RNAとの混合物に関する。用語「ポリヌクレオチド」は、特記しない限り、1つ以上の鎖からなるポリヌクレオチドを包含する。

【0105】

用語「ヌクレオチド間架橋基」は、本明細書中で使用する場合、ヌクレオチド及び/又はヌクレオシドを共有結合で一緒に連結する基を意味する。「末端ヌクレオチド」基は、ヌクレオチドの5'、3'又は2'端に配置される。末端ヌクレオチド基は、他のヌクレオシド又はヌクレオチドに連結される能力があってもなくてもよい。例示的なヌクレオチド間架橋基及び末端ヌクレオチド基としては、リン酸基、チオリン酸基、ホスホン酸基(例えば、メチルホスホン酸基)、ホスホルアミデート、ボラノホスフェート、アミド、メチレン

メチルイミノ、ホルムアセタール、チオホルムアセタール、スルホニル、グアニジン、及びメチルチオウレアが挙げられる。その他の基も当技術分野で公知であり、例えば、Current Medicinal Chemistry, 2001, Vol. 8, No. 10, 1157を参照されたい。ヌクレオチド間架橋基は、2つのヌクレオチドに結合されており、末端ヌクレオチド基は、単一のヌクレオチドに、例えば、3'又は5'端で結合されていることが理解されるであろう。

【0106】

用語「オキソ」は、本明細書中で使用する場合、=Oを意味する。

【0107】

用語「ペプチド」は、本明細書中で使用する場合、ペプチド結合で連結された2～約50個のアミノ酸残基を意味する。用語「ポリペプチド」は、本明細書中で使用する場合、ペプチド結合で連結された50個以上のアミノ酸からなる鎖を意味する。さらに、本開示の目的に関し、用語「ポリペプチド」及び用語「タンパク質」は、そうでないこと、例えば、天然に存在する又は操作されたタンパク質と示されていない限り、本明細書中のすべての文脈中で互換的に使用される。種々のポリペプチドを、本明細書中で提供される方法及び組成物の範囲内で使用することができる。特定の実施形態において、ポリペプチドは、抗体、又は抗体の抗原結合部位を含むフラグメントを包含する。合成的に作製されたポリペプチドは、DNAによって天然にはコードされないアミノ酸(例えば、天然に存在しない又は非天然のアミノ酸)の置換を含むことができる。天然に存在しないアミノ酸の例には、D-アミノ酸、システインの硫黄原子に結合されたアセチルアミノメチル基を有するアミノ酸、PEG化アミノ酸、式 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ (ここで、 n は2～6である)の ω -アミノ酸、サルコシンなどの中性非極性アミノ酸、*t*-ブチルアラニン、*t*-ブチルグリシン、*N*-メチルイソロイシン、及びノルロイシンが含まれる。

【0108】

用語「Ph」は、本明細書中で使用する場合、フェニルを意味する。

【0109】

用語「光分解活性化」又は「光分解」は、本明細書中で使用する場合、反応物に光を照射することによる、化学反応の促進又は開始を意味する。光分解活性化に適した光の波長は、200～500nmに及び、200～260nm及び300～460nmに及び波長を含む。その他の有用な範囲としては、200～230nm、200～250nm、200～275nm、200～300nm、200～330nm、200～350nm、200～375nm、200～400nm、200～430nm、200～450nm、200～475nm、300～330nm、300～350nm、300～375nm、300～400nm、300～430nm、300～450nm、300～475nm、及び300～500nmが挙げられる。

【0110】

用語「保護基」は、本明細書中で使用する場合、官能基(例えば、ヒドロキシル、アミノ、又はカルボニル)を、化学合成(例えば、ポリヌクレオチド合成)中に1種以上の望ましくない反応に参加することから保護することを意図した基を意味する。用語「O-保護基」は、本明細書中で使用する場合、酸素含有(例えば、フェノール、ヒドロキシル、又はカルボニル)基を、化学合成中に1種以上の望ましくない反応に参加することから保護することを意図した基を意味する。用語「N-保護基」は、本明細書中で使用する場合、窒素含有(例えば、アミノ又はヒドラジン)基を、化学合成中に1種以上の望ましくない反応に参加することから保護することを意図した基を意味する。一般的に使用されるO-及びN-保護基は、参照により本明細書に組み込まれるGreene, 「Protective Groups in Organic Synthesis」3rd Edition(John Wiley & Sons, New York, 1999)中に開示されている。例示的なO-及びN-保護基としては、アシル、アリーロイル、又はカルバミル基、例えば、ホルミル、アセチル、プロピオニル、ピバロイル、*t*-ブチルアセチル、2-クロロアセチル、2-ブロモアセチル、トリフルオロアセチル、トリクロロアセチル、フタリル、*o*-ニトロフェノキシアセチル、 α -クロロブチリル、ベンゾイル、4-クロロベンゾイル、4-ブロモベンゾイル、*t*-ブチルジメチルシリル、トリ-イソ-プロピルシリルオキシメチル、4,4'-ジメトキシトリチル、イソブチリル、フェノキシアセチル、4-イソプロピルペヘノキシアセチル、ジメチルホルムアミジノ、及び4-ニトロベンゾイルが挙げられる。

【0111】

カルボニル含有基を保護するための例示的なO-保護基としては、限定はされないが、アセタール、アシラール、1,3-ジチアン、1,3-ジオキサン、1,3-ジオキサラン、及び1,3-ジチオランが挙げられる。

【0112】

その他のO-保護基としては、限定はされないが、置換されたアルキル、アリアル、及びアルカリールエーテル(例えば、トリチル、メチルチオメチル、メトキシメチル、ベンジロキシメチル、シロキシメチル、2,2,2-トリクロロエトキシメチル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロフラニル、エトキシエチル、1-[2-(トリメチルシリル)エトキシ]エチル、2-トリメチルシリルエチル、t-ブチルエーテル、p-クロロフェニル、p-メトキシフェニル、p-ニトロフェニル、ベンジル、p-メトキシベンジル、及びニトロベンジル)、シリルエーテル(例えば、トリメチルシリル、トリエチルシリル、トリイソプロピルシリル、ジメチルイソプロピルシリル、t-ブチルジメチルシリル、t-ブチルジフェニルシリル、トリベンジルシリル、トリフェニルシリル、及びジフェニルメチルシリル)、カーボネート(例えば、メチル、メトキシメチル、9-フルオレニルメチル、エチル、2,2,2-トリクロロエチル、2-(トリメチルシリル)エチル、ビニル、アリル、ニトロフェニル、ベンジル、メトキシベンジル、3,4-ジメトキシベンジル、及びニトロベンジル)が挙げられる。

10

【0113】

その他のN-保護基としては、限定はされないが、保護又は非保護のD、L、又はD,L-アミノ酸などのキラルな補助基、例えば、アラニン、ロイシン、フェニルアラニンなど、スルホニル含有基、例えば、ベンゼンスルホニル、p-トルエンスルホニルなど、カルバメート形成基、例えば、ベンジロキシカルボニル、p-クロロベンジロキシカルボニル、p-メトキシベンジロキシカルボニル、p-ニトロベンジロキシカルボニル、2-ニトロベンジロキシカルボニル、p-ブロモベンジロキシカルボニル、3,4-ジメトキシベンジロキシカルボニル、3,5-ジメトキシベンジロキシカルボニル、2,4-ジメトキシベンジロキシカルボニル、4-メトキシベンジロキシカルボニル、2-ニトロ-4,5-ジメトキシベンジロキシカルボニル、3,4,5-トリメトキシベンジロキシカルボニル、1-(p-ビフェニリル)-1-メチルエトキシカルボニル、 α , α -ジメチル-3,5-ジメトキシベンジロキシカルボニル、ベンズヒドリロキシカルボニル、t-ブチロキシカルボニル、ジイソプロピルメトキシカルボニル、イソプロピロキシカルボニル、エトキシカルボニル、メトキシカルボニル、アリロキシカルボニル、2,2,2-トリクロロエトキシカルボニル、フェノキシカルボニル、4-ニトロフェノキシカルボニル、フルオレニル-9-メトキシカルボニル、シクロペンチロキシカルボニル、アダマンチロキシカルボニル、シクロヘキシルオキシカルボニル、フェニルチオカルボニルなど、アルカリール基、例えば、ベンジル、トリフェニルメチル、ベンジロキシメチルなど、及びシリル基、例えば、トリメチルシリルなどが挙げられる。有用なN-保護基は、ホルミル、アセチル、ベンゾイル、ピバロイル、t-ブチルアセチル、アラニル、フェニルスルホニル、ベンジル、t-ブチロキシカルボニル(Boc)、及びベンジロキシカルボニル(Cbz)である。

20

30

【0114】

用語「対象」は、本明細書中で使用する場合、ヒト又は非ヒト動物(例えば、哺乳動物)を意味する。

40

【0115】

用語「標的指向性部分」は、本明細書中で使用する場合、所与の標的細胞集団に付随する受容体又はその他の受容性部分と特異的に結合する、又は反応的に会合する、又は複合化する任意の部分の意味する。

【0116】

用語「治療有効用量」は、本明細書中で使用する場合、疾患又は障害の症状を改善、治療、又は少なくとも部分的に止めるのに(例えば、細胞増殖を阻害するのに)必要な、本開示によるsiRNA又はポリヌクレオチドの量を意味する。この使用に関して有効な量は、もちろん、疾患の重症度、並びに対象の体重及び一般的状態に依存する。典型的には、イン

50

ピトロで使用される投与量は、医薬組成物のインビボでの投与に有用な量に関する有用な指針を提供し、動物モデルを使用して、特定の障害を治療するのに有効な投与量を決めることができる。

【0117】

用語「チオール」は、本明細書中で使用する場合、-SH基を意味する。

【0118】

用語「障害」は、本明細書中で使用する場合、一般には、用語「疾患」、「症候群」及び「状態」(医学的状态としての)と同義であり、互換的に使用されることが意図される。なぜなら、これらのすべてが、正常な機能を損ね、典型的には徴候及び症状を識別することによって明らかにされる、対象又はその部分の1つによって呈示される異常な状態を反映するからである。

10

【0119】

用語「治療する」は、対象における障害に関して使用する場合、対象に治療剤(例えば、本開示の核酸構築物)を投与することによって、障害の少なくとも1つの症状を軽減することを指すと解釈される。

【0120】

本明細書及び添付の特許請求の範囲中で使用する場合、単数形「a」、「and」及び「the」は、文脈が明確にそうでないことを示さない限り、複数の指示物を包含する。したがって、例えば、「PTD」への言及は、複数のこのようなPTDを包含し、「細胞」への言及は、当業者に公知の1つ以上の細胞への言及を包含する、等々。

20

【0121】

別途定義しない限り、本明細書中で使用されるすべての技術及び科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者が一般的に理解しているのと同様の意味を有する。本明細書に記載のものと類似又は等価な方法及び材料を、開示される方法及び組成物を実施する際に使用することができるが、例示的な方法、デバイス及び材料を本明細書中で説明する。

【0122】

また、「又は」の使用は、特記しない限り、「及び/又は」を意味する。同様に、「含む(comprise)」、「含む(comprises)」、「含んでいる(comprising)」、「含む(include)」、「含む(includes)」及び「含んでいる(including)」は、互換可能であり、限定することを意図したものではない。

30

【0123】

さらに、種々の実施形態の説明が、用語「含んでいる(comprising)」を使用している場合、当業者は、一部の具体例において、実施形態を、言語「本質的には～からなる」又は「～からなる」を使用して代わりに説明できることを理解することを理解されたい。

【0124】

前に及び本文中で考察された刊行物は、本出願の出願日以前のそれらの開示に関してのみ提供される。本明細書中のなにもものも、本発明者らが、以前の開示によってこのような開示を実際の日付より早める資格を与えられないことの容認と解釈してはならない。本開示内で引用される刊行物は、それらが開示しているすべてに関してすべて組み込まれる。しかし、本開示の目的に関して、刊行物又は当技術分野中で呈示され、本開示中で明確に定義された任意の用語と同一である任意の用語、本開示中で呈示される用語の定義は、すべての点で、コントロールする。

40

【図面の簡単な説明】

【0125】

【図1-1】本開示の核酸構築物の調製に関する合成スキーム及び精製を示す図である。

【図1-2】図1-1のつづきである。

【図2A-1】本開示のポリヌクレオチド構築物の製造で採用できる、化学的に合成される中間体及びヌクレオチド構築物に関する構造及び分析データを示す図である。

【図2A-2】図2A-1のつづきである。

【図2B-1】本開示のポリヌクレオチド構築物の製造で採用できる、化学的に合成され

50

る中間体及びヌクレオチド構築物に関する構造及び分析データを示す図である。

【図2B-2】図2B-1のつづきである。

【図2C-1】本開示のポリヌクレオチド構築物の製造で採用できる、化学的に合成される中間体及びヌクレオチド構築物に関する構造及び分析データを示す図である。

【図2C-2】図2C-1のつづきである。

【図2D-1】本開示のポリヌクレオチド構築物の製造で採用できる、化学的に合成される中間体及びヌクレオチド構築物に関する構造及び分析データを示す図である。

【図2D-2】図2D-1のつづきである。

【図2E-1】本開示のポリヌクレオチド構築物の製造で採用できる、化学的に合成される中間体及びヌクレオチド構築物に関する構造及び分析データを示す図である。

10

【図2E-2】図2E-1のつづきである。

【図2F-1】本開示のポリヌクレオチド構築物の製造で採用できる、化学的に合成される中間体及びヌクレオチド構築物に関する構造及び分析データを示す図である。

【図2F-2】図2F-1のつづきである。

【図2G-1】本開示のポリヌクレオチド構築物の製造で採用できる、化学的に合成される中間体及びヌクレオチド構築物に関する構造及び分析データを示す図である。

【図2G-2】図2G-1のつづきである。

【図2H-1】本開示のポリヌクレオチド構築物の製造で採用できる、化学的に合成される中間体及びヌクレオチド構築物に関する構造及び分析データを示す図である。

20

【図2H-2】図2H-1のつづきである。

【図2I-1】本開示のポリヌクレオチド構築物の製造で採用できる、化学的に合成される中間体及びヌクレオチド構築物に関する構造及び分析データを示す図である。

【図2I-2】図2I-1のつづきである。

【図2J-1】本開示のポリヌクレオチド構築物の製造で採用できる、化学的に合成される中間体及びヌクレオチド構築物に関する構造及び分析データを示す図である。

【図2J-2】図2J-1のつづきである。

【図2K-1】本開示のポリヌクレオチド構築物の製造で採用できる、化学的に合成される中間体及びヌクレオチド構築物に関する構造及び分析データを示す図である。

【図2K-2】図2K-1のつづきである。

【図2L-1】本開示のポリヌクレオチド構築物の製造で採用できる、化学的に合成される中間体及びヌクレオチド構築物に関する構造及び分析データを示す図である。

30

【図2L-2】図2L-1のつづきである。

【図3】tBu-SATE型生物可逆性基を含むポリヌクレオチド構築物の野生型siRNAへの定量的変換を示す図である。変換は、開裂性官能基を含まないリン酸トリエステルを含む構築物と対比される。

【図4-1】本開示のポリヌクレオチド構築物を使用することによってGFP発現を抑制できること、及び結果が野生型siRNAと同等であることを示す図である。

【図4-2】図4-1のつづきである。

【図5-1】本開示のポリヌクレオチド構築物を使用することによって、インビトロ(図5)でルシフェラーゼ発現を抑制できることを示す図である。

40

【図5-2】図5-1のつづきである。

【図6-1】本開示のポリヌクレオチド構築物を使用することによって、インビボ(図6)でルシフェラーゼ発現を抑制できることを示す図である。

【図6-2】図6-1のつづきである。

【図7-1】6つのペプチド導入ドメイン(PTD)を含む本開示の例示的なポリヌクレオチド構築物を示し、且つこれらのポリヌクレオチド構築物が細胞中でのGFP発現の低下をもたらすことができることを示す図である。

【図7-2】図7-1のつづきである。

【図8】本開示の二本鎖ポリヌクレオチド構築物を、10%非変性ゲル中での銀染色(上部パネル)を使用して、又はSDS-PAGEゲル及び臭化エチジウム染色(下段パネル)を使用するこ

50

とによって定量的に測定できることを示す図である。

【図 9 - 1】パッセンジャー及びガイド鎖上の様々な部位に配置された様々な数の生物可逆性基を有する本開示のポリヌクレオチド構築物を使用するハイブリッド化研究の要約を示す図である。

【図 9 - 2】図 9 - 1 のつづきである。

【図 10 - 1】パッセンジャー及びガイド鎖上の様々な部位に配置された様々な数の生物可逆性基を有する本開示のポリヌクレオチド構築物を使用するハイブリッド化研究の要約を示す図である。

【図 10 - 2】図 10 - 1 のつづきである。

【図 11】本開示のポリヌクレオチド構築物を精製するための方法を示す図である。

10

【図 12】複数のPTD補助部分を本開示の核酸構築物に効果的にコンジュゲートさせることができることを示す図である。

【図 13】生物可逆性基にコンジュゲートされたPTD補助部分を有する本開示のポリヌクレオチド構築物が、ポリヌクレオチドのH1299細胞中への効果的な細胞内送達を可能にすることを示す図である。これらのポリヌクレオチド構築物は、200nM ~ 500nMの範囲の濃度で、インビトロでのGFPの発現を低減することが示されている。

【図 14】生物可逆性基にコンジュゲートされたPTD補助部分を有する本開示のポリヌクレオチド構築物が、ポリヌクレオチドのH1299細胞中への効果的な細胞内送達を可能にすることを示す図である。これらのポリヌクレオチド構築物は、200nM ~ 500nMの範囲の濃度で、インビトロでのGFPの発現を低減することが示されている。

20

【図 15】異なる生物可逆性基を有する6種の異なるポリヌクレオチド構築物に関するRNA i 応答に対するリンカー長の効果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0126】

特定の生物活性薬剤を細胞内部に送達する能力は、細胞原形質膜の選択的透過性のため、問題となる。細胞の原形質膜は、十分に非極性で且つ大きさがほぼ500ダルトンより小さい分子に、分子の細胞内取り込みを制限する障壁を形成する。タンパク質の細胞内移行を高めるための以前の努力は、タンパク質を受容体リガンドと融合させること(Ng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:10706 ~ 11, 2002)、或いはそれらをかご型リボソーム担体中に包装すること(Abu-Amer et al., J. Biol. Chem. 276:30499 ~ 503, 2001)に焦点を合わせてきた。しかし、これらの技術は、貧弱な細胞内取り込み及びエンドサイトーシス経路中への細胞内追放をもたらすことがある。それらのアニオン性電荷及び約14,000ダルトンの大きなサイズのため、siRNAの送達は、ヒトを含む哺乳動物において、手ごわい難題である。しかし、カチオン帯電したペプチド及びタンパク質は、ポリヌクレオチド送達の増進をもたらした。例えば、ペプチド導入ドメイン(PTD)を核酸に連結することは、ポリヌクレオチド送達の若干の増進を提供した。しかし、これらの事例においてすら、siRNA及びPTDのそれぞれのアニオン電荷及びカチオン電荷は、しばしば、互いに中和し、それによって、これらの核酸構築物の取り込みを有意に低減する。

30

【0127】

本開示は、1つ以上の生物可逆性基を含む核酸構築物を提供する。本開示は、比較的大きな部分、例えば、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、又はこれらの組合せを、細胞内で開裂される予定の生物可逆性基の能力に影響を及ぼすことなしに、ヌクレオチド間架橋基に連結する生物可逆性基に連結することができることを立証する。本開示は、また、疎水性又は親水性官能基、及び/又はコンジュゲート部分を有する生物可逆性基を含む核酸構築物を提供し、ここで、これらのコンジュゲート部分は、ペプチド、ポリペプチド、小分子、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、又はこれらの任意の組合せのヌクレオチド間架橋基又は末端ヌクレオチド基への結合を可能にする。本開示は、さらに、1つ以上の疎水性又は親水性官能基、及び/又は1つ以上のコンジュゲート部分を含む1つ以上の生物可逆性基を含む、ヌクレオチ

40

50

ドをベースにした核酸構築物を提供し、ここで、該コンジュゲート部分は、補助部分、例えば、ペプチド、ポリペプチド、小分子、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、又はこれらの任意の組合せのヌクレオチドへの結合を可能にする。特定の実施形態において、本明細書に開示の核酸構築物は、構築物の全体的負電荷を低減し、細胞による構築物の取り込みを可能にする又は促進するように、特定数の生物可逆性基を含む。本明細書に記載の核酸構築物は、ポリヌクレオチド自体、又は結合された補助部分、例えば、小分子、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、又はこれらの組合せに連結されたポリヌクレオチドの細胞内輸送を可能にするか、促進することができる。細胞内酵素(例えば、細胞内チオエステラーゼ)の作用、又は細胞内環境への曝露は、ポリヌクレオチドからの補助部分の開裂をもたらし、したがって補助部分の放出及びポリヌクレオチドの非マスク化を可能にすることができる。非マスク化されたポリヌクレオチドは、次いで、例えば、アンチセンス又はRNAi介在性応答を開始することができる。さらに、本開示の核酸構築物は、また、ポリヌクレオチド、又は結合された補助部分、例えば、小分子、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、又はこれらの組合せに連結されたポリヌクレオチドの細胞内送達を、リボソーム又はカチオン性脂質などの担体を必要とすることなく、可能にするか、促進する。それぞれの特徴を、本明細書中でさらに説明する。

10

20

【0128】

本開示は、アニオン帯電したポリヌクレオチドに付随する電荷を保護/中和すること、及び任意選択で分子、例えば、カチオン性ペプチド、標的指向性部分、及び/又はエンドソーム脱出部分にさらなる官能性を付加することによって、核酸分子の細胞内取り込みを促進及び改善するための方法及び組成物を提供する。特定の実施形態において、本開示の組成物は、カチオン電荷を有する核酸構築物を作り出すことによって、核酸の取り込みを促進する。

【0129】

本開示は、ヒトの障害を選択的に治療するのに、及び研究を促進するのに有用な配列特異的ポリヌクレオチドを送達するための組成物及び方法を提供する。本開示の組成物及び方法は、現行の核酸送達法の欠点を伴うことなしに、siRNA、RNA及びDNAをはじめとするポリヌクレオチドを対象及び細胞に効果的に送達する。本開示は、RNAi構築物の細胞中への送達を困難にするか、構築物を送達不能にする、大きさ及び電荷の制約を克服する組成物及び方法を提供する。核酸(例えば、dsRNA)のアニオン電荷を可逆的に中和することによって、本開示によるリン酸トリエステル及び/又はホスホチオエート型生物可逆性保護基を含む核酸構築物は、核酸をインピトロ及びインピボで細胞中に送達することができる。

30

【0130】

本開示は、電荷中和部分(例えば、リン酸トリエステル及び/又はホスホチオエート保護基)を含む核酸構築物を提供する。該構築物は、さらに、細胞内トランスフェクション及び細胞内調節で有用な補助部分を含むことができる。このような補助部分としては、小分子、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、又はこれらの任意の組合せを挙げることができる。

40

【0131】

本明細書中で立証されるように、核酸への1つ以上の除去可能な(例えば、可逆的に結合された)電荷中和部分の付加は、細胞内トランスフェクションを効果的に促進することができる。任意の核酸を、配列組成に関係なく、修飾することができる。したがって、本開示は、任意の特定の配列(すなわち、任意の特定のsiRNA、dsRNA、DNAなど)に限定されない。

【0132】

50

本開示は、一部の実施形態において、細胞膜透過並びにエキソ及びエンドヌクレアーゼの分解に対する抵抗性を高める化学的及び生物物理学的特性に寄与する1つ以上の生物可逆性部分を有する核酸構築物を提供する。本開示は、さらに、本明細書に開示の核酸構築物を合成するための試薬、例えば、ホスホルアミダイト試薬を提供する。さらに、これらの生物可逆性基は、合成工程で安定である。

【0133】

細胞中では、生物可逆性部分を、酵素(例えば、内因性カルボキシエステラーゼ及びチオ-エステラーゼ)の作用によって、或いは細胞内条件(例えば、pH及び酸化又は還元性環境)又は反応体(例えば、グルタチオン又はその他の遊離チオール)への曝露によって除去して、特定の内因性核酸にハイブリッド化する及び/又は親和性を有する能力のある生物学的に活性なポリヌクレオチド化合物をもたらすことができる。

10

【0134】

生物可逆性部分は、合成のDNA又はRNAのアンチセンスポリヌクレオチド、或いはその発現を遮断又は下向き調節するように特別に設計された遺伝子又はmRNAに属する標的配列に対する相補的配列の混合分子と共に使用することができる。これらの阻害性ポリヌクレオチドは、標的mRNA配列、又は代わりに標的DNA配列に向けられ、それらが相補的であり、それによって転写又は翻訳を阻害する核酸へハイブリッド化することができる。したがって、本明細書に開示の核酸構築物は、遺伝子発現を効果的に遮断又は下向き調節することができる。

20

【0135】

本開示の核酸構築物は、また、特定の二分岐DNA領域(ホモプリン/ホモピリミジン配列又はプリン/ピリミジンに富む配列)に向けられ、したがって三重らせんを形成することができる。三重らせんの形成は、特定の配列で、遺伝子発現を調節するか、そうでなければ制御する、且つ/又は生じるポリヌクレオチドが反応性官能基を所持するように作られるなら、特定の核酸部位に導入される予定の非可逆的損傷を促進することのできるタンパク質因子の相互作用を遮断することができる。

【0136】

本開示は、ヌクレオチド間架橋基又は末端ヌクレオチド基に結合された1つ以上の補助部分を有するポリヌクレオチドから構成される核酸構築物(「ポリヌクレオチド構築物」)を提供する。このような補助部分の例には、小分子、コンジュゲート部分、親水性官能基、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、及びこれらの任意の組合せが含まれる。補助部分が細胞によって取り込まれた場合に、補助部分がポリヌクレオチドから放出されるように、このような補助部分を生物可逆性基によってポリヌクレオチドに結合することができる。生物可逆性基は、また、別個の反応を、例えば分子内で受けて、非修飾のヌクレオチド間架橋基又は末端ヌクレオチド基を残すことができる。種々の糖及び骨格を本明細書で提供されるヌクレオチドの定義中に記載のように採用できるが、ポリヌクレオチドは、典型的には、リボース、デオキシリボース、又はLNA糖及びリン酸又はチオリン酸ヌクレオチド間架橋基を採用する。単一ポリヌクレオチド中でのこれらの糖及び架橋基の混交も想定される。

30

40

【0137】

本明細書に記載のポリヌクレオチド構築物は、細胞内で選択的に開裂され(例えば、受動環境への曝露、酵素の作用、又はその他の反応体により)、それによってポリヌクレオチドの細胞への細胞内送達を促進することのできる生物可逆性基を特徴とする。例示的な生物可逆性基としては、ジスルフィド結合、エステル及びチオエステルが挙げられる。

【0138】

例えば、本明細書に記載のポリヌクレオチド構築物は、細胞内チオエステラーゼによって開裂され得る部分(例えば、チオエステル官能基)を含むことができる。細胞中に侵入すると、これらの酵素は、核酸を非マスク化するためにチオエステル基(本明細書に記載の式(1)などの部分を含む)を選択的に開裂することができる。式(1)などのチオエステル基

50

は、また、PTD及びその他のコンジュゲートなどの基で、又は核酸の物理化学的特性を修飾する基(例えば、ヒドロキシ(-OH)基などの親水性基)で、核酸を官能化するための有用なハンドルを提供することができる。該戦略は、別個の送達剤を使用することなしに、標的指向化された細胞内送達を可能にするために、いくつかの構造的及び機能的に多様な核酸に容易に一般化することができる。

【0139】

本明細書に記載のポリヌクレオチド構築物は、例えば1~40個の独立した生物可逆性基を含むことができる。例えば、本明細書に開示のポリヌクレオチド構築物は、2~30、2~25、2~20、5~15、5~10、又は2~5個の独立した生物可逆性基を含むことができる。特定の実施形態において、構成ヌクレオチドの75%以下が、生物可逆性基を含む(例えば、50%、55%、60%、65%、70%又は75%以下が生物可逆性基を含む)。別の実施形態において、最大で90%までが、生物可逆性基を有することができる。さらに別の実施形態において、生物可逆性基の半分以下が、疎水性末端、例えば、アルキル基を含む。本明細書に開示のポリヌクレオチド構築物は、例えば、コンジュゲート部分、親水性官能基、ペプチド、ポリペプチド、小分子、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、又はこれらの任意の組合せを含む生物可逆性基の任意の組合せを特徴とすることができる。ポリヌクレオチド構築物は、一般に、150個までのヌクレオチド長である。例示的な大きさは、10~100、10~75、10~50、又は10~25個のヌクレオチド長である。

【0140】

特定の実施形態において、ポリヌクレオチド構築物は、

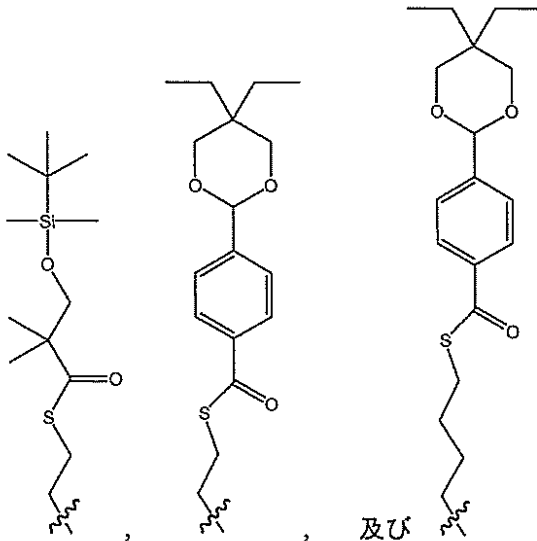
(a)ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、及びこれらの任意の組合せから選択される成分(i)を含むポリヌクレオチド(ここで、成分(i)は、ヌクレオチド間架橋基に結合された生物可逆性基を介してポリヌクレオチドに連結されている)、

(b)ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、及びこれらの任意の組合せから選択される少なくとも1種の成分(i)、並びに親水性官能基を含む生物可逆性基、コンジュゲート部分を含む生物可逆性基、又はコンジュゲート部分及び親水性基を含む生物可逆性基から選択される少なくとも1種の第2成分(ii)を含むポリヌクレオチド(ここで、成分(i)は、ヌクレオチド間架橋基に結合された生物可逆性基を介してポリヌクレオチドに連結され、コンジュゲート部分は、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、及びこれらの任意の組合せに対して1つ以上の共有結合を形成できる官能基であり、コンジュゲート部分又は親水性官能基は、さらに、保護基を含むことができる)、及び

(c)ヌクレオチド間架橋基又は末端ヌクレオチド基に結合され、

【0141】

【化 3 2】



10

からなる群から選択される1つ以上の生物可逆性基を含むポリヌクレオチド、を含む群から選択される。

【0142】

特定の実施形態において、ポリヌクレオチド構築物内の生物可逆性基の位置は、生じる構築物の安定性を改善するように(例えば、立体的及び/又は電子的反発を最小化するように)選択される。とりわけ、二重鎖ポリヌクレオチドの場合、生物可逆性基の位置は、安定な二重鎖分子が形成されるように配置される。

20

【0143】

別の実施形態において、各生物可逆性基の性質は、好ましい溶解性及び送達特性を生じるように選択することができる。このような変形形態は、例えばヌクレオチド間架橋基又は末端ヌクレオチド基と開裂可能部分との間の、及び/又は開裂可能部分と任意のコンジュゲート部分、親水性官能基、又は補助部分との間のリンカーの長さを調節することを含むことができる。疎水性生物可逆性基によってもたらされる溶解性の低下は、ポリヌクレオチドのどこかでの1つ以上の親水性生物可逆性基の使用によって部分的には相殺することができる。特定の実施形態において、生物可逆性基を有するヌクレオチド間架橋基の3'端上の糖は、2'にOH基を含まず、例えば、代わりに2'にF又はOMe基を含む。

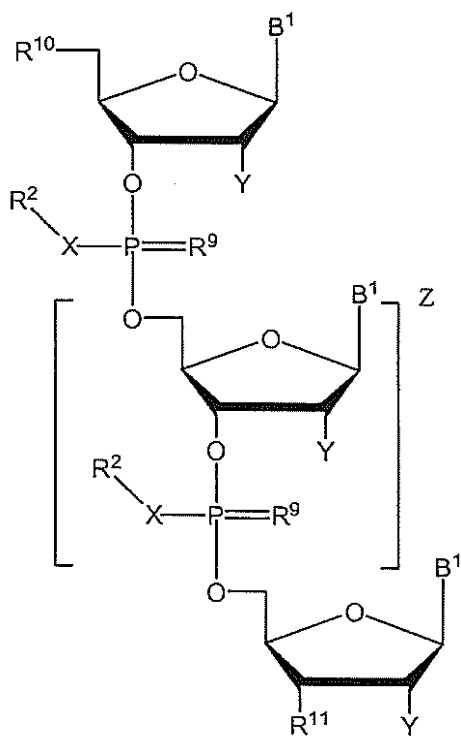
30

【0144】

例えば、本明細書に記載の一部のポリヌクレオチド構築物は、式Iに記載の構造:

【0145】

【化 3 3】



(式 I)

10

20

を有することができ、式中、

Zは0～150の数字であり、

各B¹は、個別に、核酸塩基であり、

各Xは、個別に、O、S及びNR⁵から選択され、

各Yは、個別に、ハロ、置換されていてもよいC₁～₆アルコキシ、又は保護されたヒドロキシル基から選択され、

各R²は、個別に、存在しないか、水素、或いは1つ以上の共有結合によって生物可逆性基に連結された親水性官能基、コンジュゲート部分、小分子、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、又はこれらの組合せを含む生物可逆性基であり、ここで、コンジュゲート部分又は親水性官能基は、保護基で保護されていてもよく、

30

各R⁵は、個別に、H、置換されていてもよいC₁～₆アルキル、S-ピバロイルチオエタノール、ヒドロキシル、置換されていてもよいC₁～₆アルコキシ、置換されていてもよいC₃～₈シクロアルキル、置換されていてもよいC₆～₁₂アリール、及び置換されていてもよいC₂～₉ヘテロシクリルから選択され、

各R⁹は、個別に、O又はSであり、

R¹⁰は、H、ヒドロキシル、置換されていてもよいC₁～₆アルコキシ、保護されたヒドロキシル基、ーリン酸、二リン酸、三リン酸、四リン酸、五リン酸、5'キャップ、ホスホチオール、置換されていてもよいC₁～₆アルキル、アミノ含有基、ピオチン含有基、ジゴキシゲニン含有基、コレステロール含有基、色素含有基、クエンチャー含有基、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、及びこれらの任意の組合せから選択され、

40

R¹¹は、H、ヒドロキシル、置換されていてもよいC₁～₆アルコキシ、保護されたヒドロキシル基、ーリン酸、二リン酸、三リン酸、四リン酸、五リン酸、置換されていてもよいC₁～₆アルキル、アミノ含有基、ピオチン含有基、ジゴキシゲニン含有基、コレステロール含有基、色素含有基、クエンチャー含有基、ホスホチオール、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、及びこれらの任意の組合せから選択される。

50

【 0 1 4 6 】

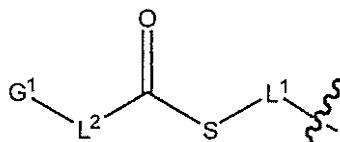
式(1)の例示的な実施形態は、X及びR⁹が双方ともOである実施形態を含む。代わりの実施形態において、本明細書に開示のポリヌクレオチド構築物は、主として、式(1)の構造を含むが、描かれた式(1)のヌクレオチド間架橋基は、本明細書に記載の別のヌクレオチド間架橋基(例えば、修飾型ポリヌクレオチド骨格)で置き換えられる。代わりの実施形態において、本明細書に開示のポリヌクレオチド構築物は、主として、式(1)の構造を含むが、描かれた式(1)の基R¹⁰及び/又はR¹¹は、生物可逆性基R²を有する末端ヌクレオチド基で置き換えられる。本明細書に開示のポリヌクレオチド構築物は、修飾型ポリヌクレオチド骨格を有することができる。修飾型ポリヌクレオチド骨格の例には、例えば、ホスホロチオエート、キラルなホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、アミノアルキルリン酸トリエステル、メチル及びその他のアルキルホスホネート(例えば、3'-アルキレンホスホネート及びキラルなホスホネート)、ホスフィネート、ホスホルアミデート(例えば、3'-アミノホスホルアミデート及びアミノアルキルホスホルアミデート)、チオノホスホルアミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルリン酸トリエステル及び正常な3'-5'結合、これらの2'-5'連結類似体を有するボラノホスフェート、及び逆転した極性を有するものが含まれ、ここで、ヌクレオシド単位の隣接対は、3'-5'~5'-3'、又は2'-5'~5'-2'で連結される。上記のリン含有結合体の調製を教示している代表的な米国特許としては、米国特許第3,687,808号、4,469,863号、4,476,301号、5,023,243号、5,177,196号、5,188,897号、5,264,423号、5,276,019号、5,278,302号、5,286,717号、5,321,131号、5,399,676号、5,405,939号、5,453,496号、5,455,233号、5,466,677号、5,476,925号、5,519,126号、5,536,821号、5,541,306号、5,550,111号、5,563,253号、5,571,799号、5,587,361号、及び5,625,050号が挙げられ、これらのそれぞれは、参照により本明細書に組み込まれる。その中にリン原子を含まない修飾型ポリヌクレオチド骨格を有する本明細書に開示の核酸構築物は、短鎖アルキル又はシクロアルキルヌクレオチド間架橋基、混合ヘテロ原子及びアルキル又はシクロアルキルヌクレオチド間架橋基、又は1つ以上の短鎖ヘテロ原子又は複素環式ヌクレオチド間架橋基によって形成された骨格を有することができる。これらの骨格としては、モルホリノ結合(ヌクレオシドの糖部分から部分的には形成される)、シロキサン骨格、スルフィド、スルホキシド及びスルホン骨格、ホルムアセチル及びチオホルムアセチル骨格、メチレンホルムアセチル及びチオホルムアセチル骨格、アルケン含有骨格、スルファメート骨格、メチレンイミノ及びメチレンヒドラジノ骨格、スルホネート及びスルホンアミド骨格、アミド骨格、及び混合N、O、S及びCH₂構成部分を有するその他のものを有するものが挙げられる。上記ポリヌクレオチドの調製を教示している代表的な米国特許としては、米国特許第5,034,506号、5,166,315号、5,185,444号、5,214,134号、5,216,141号、5,235,033号、5,264,562号、5,264,564号、5,405,938号、5,434,257号、5,466,677号、5,470,967号、5,489,677号、5,541,307号、5,561,225号、5,596,086号、5,602,240号、5,610,289号、5,602,240号、5,608,046号、5,610,289号、5,618,704号、5,623,070号、5,663,312号、5,633,360号、5,677,437号、及び5,677,439号が挙げられ、これらのそれぞれは、参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 1 4 7 】

本明細書に記載の式のいずれかにおいて、R²は、次式V:

【 0 1 4 8 】

【 化 3 4 】



(式 V)

で記述することができ、式中、

G¹は、コンジュゲート部分、親水性官能基、小分子、ペプチド、ポリペプチド、炭水化

物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、又はこれらの組合せであり、

L^1 は、置換されていてもよい $C_{2 \sim 10}$ アルキレン、置換されていてもよい $C_{2 \sim 10}$ アルケニレン、又は置換されていてもよい $C_{2 \sim 10}$ アルキニレンであり、ここで、アルキレン、アルケニレン、又はアルキニレンのそれぞれは、O、N及びSから選択される1~10個のヘテロ原子で割り込まれていてもよく、

L^2 は、共有結合であるか、或いは置換されていてもよい $C_{1 \sim 10}$ アルキレン、置換されていてもよい $C_{2 \sim 10}$ アルケニレン、置換されていてもよい $C_{2 \sim 10}$ アルキニレン、及び置換されていてもよい $C_{6 \sim 12}$ アリーレンから選択され、ここで、アルキレン、アルケニレン、又はアルキニレンのそれぞれは、O、N及びSから選択される1~10個のヘテロ原子で割り込まれていてもよい。本明細書で提供される式Vの基のいずれかに関して、チオエステル(-C(O)S-)を、エステル(-C(O)O-)又はジスルフィド(-S-S-)に置き換えることができる。

10

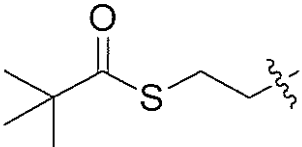
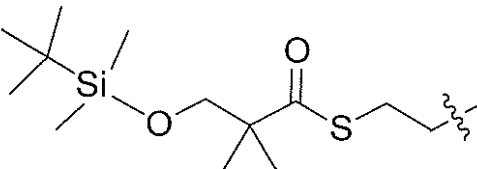
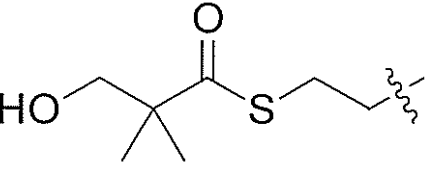
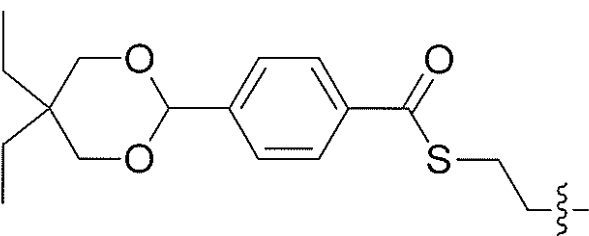
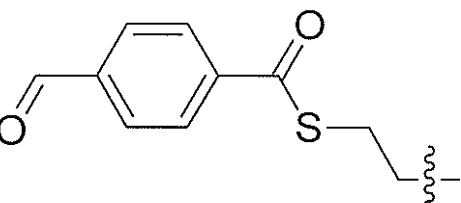
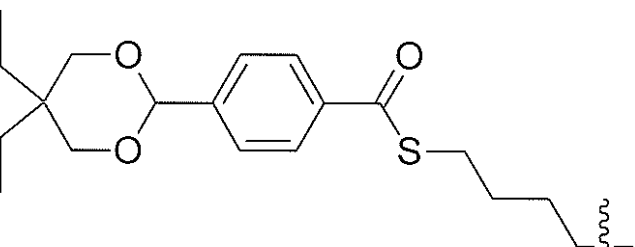
【 0 1 4 9 】

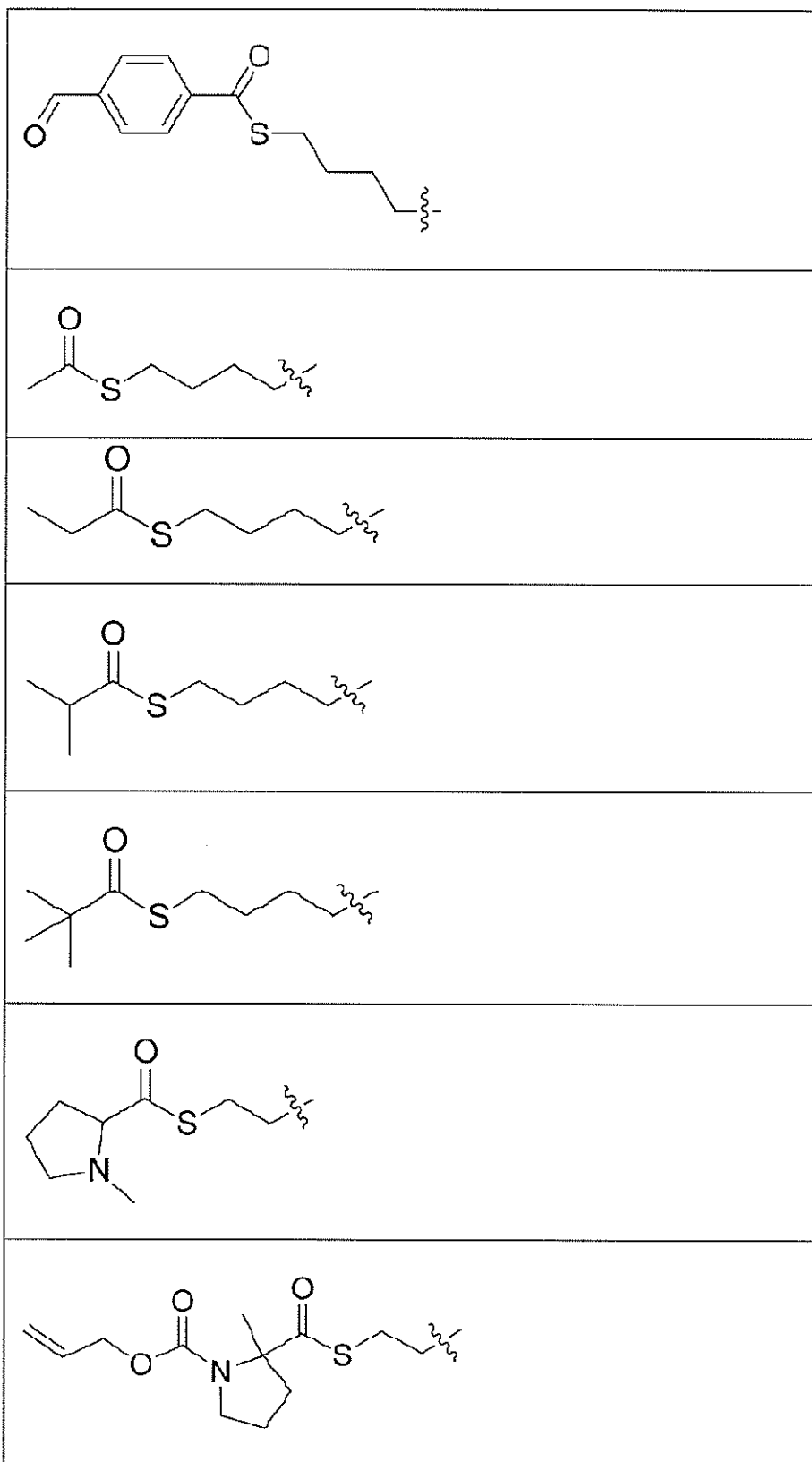
例示的な R^2 基を表1に示す。

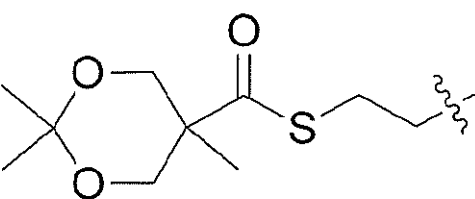
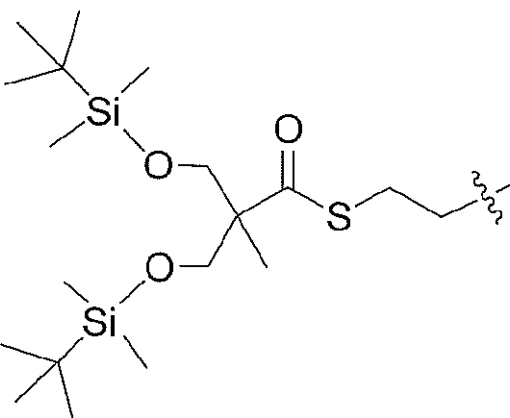
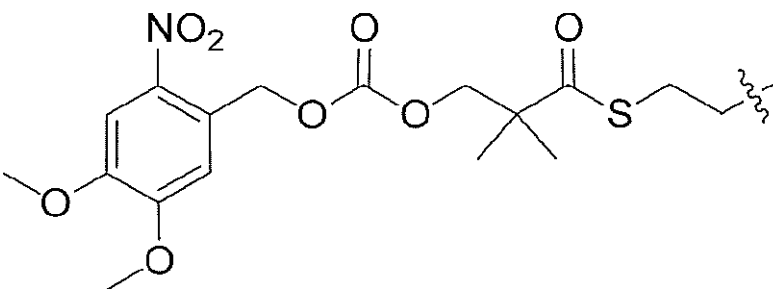
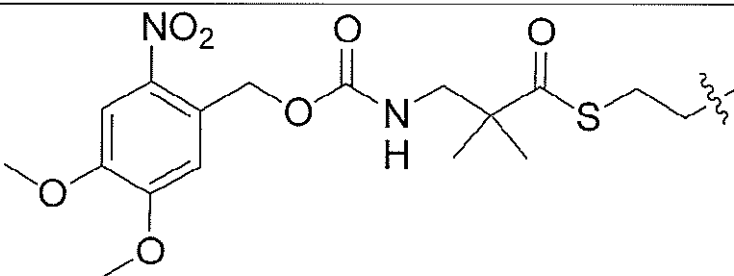
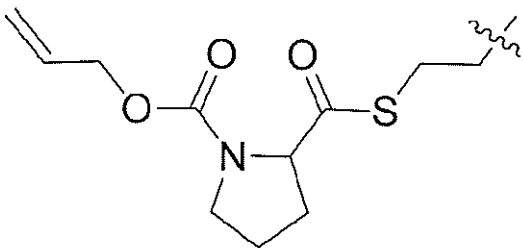
【 0 1 5 0 】

【表 1】

表1

	
	10
	
	20
	30
	40



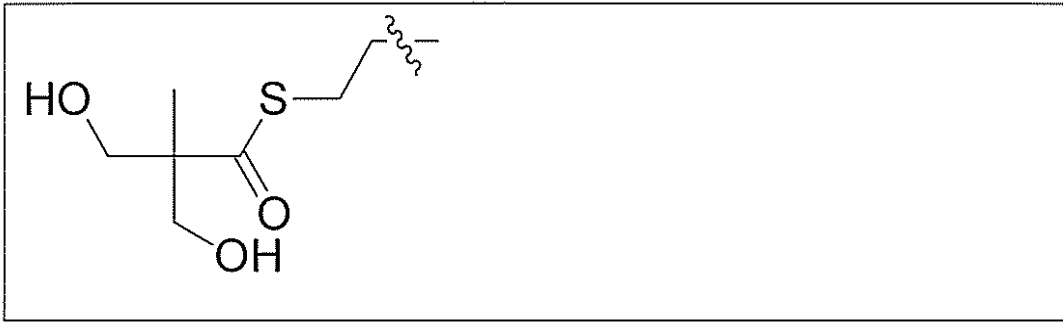


10

20

30

40



10

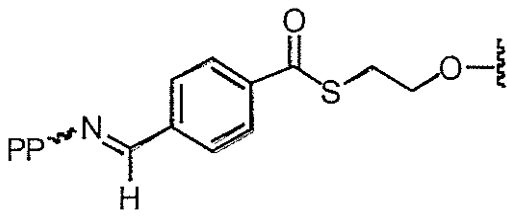
認識されるように、表1の生物可逆性基のいくつかは、保護されたアミン基、ヒドロキシル、ヘテロシクリル、又はアルデヒド基を含む。例示された保護基は、本明細書に記載のようなその他の保護基に置き換えることができる。

【0151】

別の生物可逆性基は、形態：

【0152】

【化35】



20

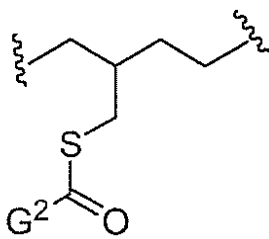
を有し、式中、PPは、小分子、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、又はこれらの任意の組合せである。

【0153】

他の実施形態において、L¹は、

【0154】

【化36】



30

であり、式中、G²は、G¹と同じ置換基から選択される。

【0155】

さらなる実施形態において、本開示の核酸構築物は、例えば、国際公開第W098/07734号、96/07392号、2008/008476号、2010/036905号、2011/005761号、及び2010/039546号、並びに米国特許第6,399,589号、及び6,124,445号に記載のような、当技術分野で公知の1つ以上の生物可逆性基を含む。

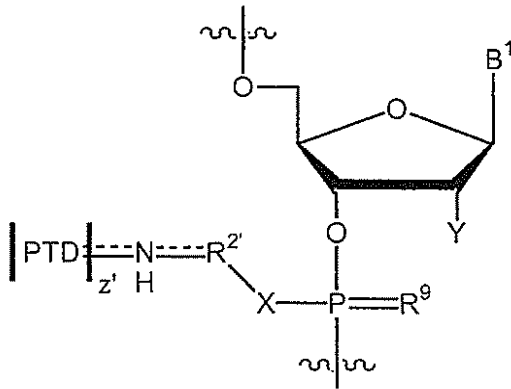
40

【0156】

特定の実施形態において、本開示のポリヌクレオチド構築物は、式IV：

【0157】

【化 3 7】



(式IV)

に記載の構造を含み、式中、

PTDは、ペプチド導入ドメインであり、

$R^{2'}$ は、PTDに結合された生物可逆性基の残余部であり、

z' は、1～10の数字であり、ここで、 z' が1を超える場合、PTDは、1～10個の繰り返し単位を有するポリ($C_1 \sim 4$ アルキレンオキシド)基などのリンカー基を介して一緒に連結されている。

【0158】

本開示のポリヌクレオチド構築物は、単鎖又は二重鎖でよい。二重鎖の場合、一方又は双方の鎖が、1つ以上の生物可逆性基を含むことができる。ポリヌクレオチドがsiRNAとして作用する場合、パッセンジャー鎖は、ヌクレオチド間架橋基に非可逆的に結合された基、例えばアルキルリン酸トリエステルを含むことができる。典型的には、このような基は、3'端から最初又は次のヌクレオチドの後に配置される。非可逆性基は、パッセンジャー鎖がガイド鎖として作用することを防止し、それによってあり得るオフターゲット効果(off-target effect)を防止又は低減する。

【0159】

本開示は、さらに、本開示のポリヌクレオチド構築物を製造する方法を提供する。ヌクレオチド及びポリヌクレオチドの調製方法は、当技術分野で公知である。例えば、ポリヌクレオチドを調製するためのホスホルアミダイト化学の実施は、Caruthers及びBeaucageらの発表済の研究から公知である。例えば、そのそれぞれが参照により本明細書に組み込まれ、ポリヌクレオチドの合成方法を記載している、米国特許第4,458,066号、4,500,707号、5,132,418号、4,415,732号、4,668,777号、4,973,679号、5,278,302号、5,153,319号、5,218,103号、5,268,464号、5,000,307号、5,319,079号、4,659,774号、4,672,110号、4,517,338号、4,725,677号、及びRE34,069を参照されたい。さらに、ホスホルアミダイト化学の実施は、そのすべてが参照により本明細書に組み込まれる、Beaucage et al., Tetrahedron, 48:2223～2311, 1992及びBeaucage et al., Tetrahedron 49:6123～6194, 1993、並びにこれらの中で言及されている参考文献で系統的に概説されている。

【0160】

核酸合成装置が市販されており、それらの使用は、一般に、望ましい可能性のある妥当な長さのほぼ任意のポリヌクレオチドを作り出すのに有効であると当業者によって理解されている。

【0161】

ホスホルアミダイト化学の実施において、有用な糖の5'位OHを封鎖する基は、トリチル、モノメトキシトリチル、ジメトキシトリチル及びトリメトキシトリチル、特にジメトキシトリチル(DMTri)である。ホスホルアミダイト化学の実施において、有用な亜リン酸活性化基は、ジアルキル置換窒素基及び窒素複素環である。1つの手法は、ジ-イソプロピルアミノ活性化基の使用を含む。

【0162】

50

ポリヌクレオチドは、Mermade-6固相自動化ポリヌクレオチド合成装置又は任意の一般に入手可能な自動ポリヌクレオチド合成装置によって合成することができる。トリエステル、ホスホルアミダイト、又はホスホン酸水素カップリングの化学(例えば、M.Caruthers, Oligonucleotides: Antisense Inhibitors of Gene Expression, pp.7~24, J.S.Cohen, ed. (CRC Press, Inc. Boca Raton, フロリダ州, 1989)、Oligonucleotide synthesis, a practical approach, Ed. M.J.Gait, IRL Press, 1984及びOligonucleotides and Analogues, A Practical Approach, Ed. F.Eckstein, IRL Press, 1991中に記載されている)が、所望のポリヌクレオチドを提供するために、これらの合成装置によって採用される。例えば、Journal of American Chemical Society, 112:1253~1255, 1990中に記載のようなBeaucage試薬、又はBeaucage et al., Tetrahedron Letters 22:1859~1862, 1981中に記載のような元素硫黄が、置換ホスホロチオエートポリヌクレオチドを提供するために、ホスホルアミダイト又はホスホン酸水素の化学と共に使用される。

10

【0163】

例えば、本明細書中に挙げた保護基を含む試薬を、保護が望ましい多くの応用で使うことができる。このような応用には、限定はされないが、固相及び溶液相の双方でのポリヌクレオチド合成などが含まれる。

【0164】

例えば、構造基が、任意選択で、ポリヌクレオチド中に組み込むためのヌクレオシドのリボース又は塩基に、例えば、リボースの2'-O位にメチル、プロピル若しくはアリル基が、又は2'-O基に代わってフルオロ基が、又はリボヌクレオチド塩基にプロモ基が付加される。ホスホルアミダイト化学で使用するために、種々のホスホルアミダイト試薬、例えば、2'-デオキシホスホルアミダイト、2'-O-メチルホスホルアミダイト、及び2'-O-ヒドロキシルホスホルアミダイトが、市販されている。このような合成のために任意のその他の手段も採用することができる。ポリヌクレオチドの実際の合成は、十分に当業者の手腕の範囲内にある。その他のポリヌクレオチドを調製するために、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、及びアルキル化誘導体などの類似の技術を使用することも周知である。蛍光標識化、ビオチン化又はその他の共役ポリヌクレオチドを合成するために、ビオチン、Cy3、フルオレセイン、アクリジン又はプソラレン修飾ホスホルアミダイト及び/又はCPG(Glen Research、Sterlingヴァージニア州から入手可能)など、類似の技術及び市販の修飾型ホスホルアミダイト及び調節された細孔ガラス(CPG)製品を使用することも周知である。

20

30

【0165】

特定の実施形態において、本開示のポリヌクレオチド構築物を製造する方法は、

(1)5'位に(4,4'-ジメトキシトリチル)基(DMT)などのO-保護基を含む最初のヌクレオシド又はヌクレオチドを、非プロトン性溶媒系中、酸性条件下でO-保護基を除去することによって脱ブロックして、遊離ヒドロキシルを得るステップであって、最初のヌクレオシド又はヌクレオチドが、3'位で固体支持体に固定されていてもよく、又は代わりに3'位が、酸に抵抗性のあるO-保護基で保護され、最初のヌクレオシド又はヌクレオチドが溶解している、ステップ、

(2)脱ブロックされた最初のヌクレオシド又はヌクレオチドを、本明細書に開示の活性化されたヌクレオチド構築物、又は3'位にホスホルアミダイトを含む当技術分野で公知の活性化されたヌクレオチドと、溶媒系中、酸性アゾールなどの触媒の存在下でカップリングさせるステップ、

(3)カップリングされたヌクレオチドを、プロトン性溶媒及び弱塩基を含む溶媒系中、酸化剤で酸化するステップ、

(4)カップリングされたヌクレオチドを、5'位のDMT基などのO-保護基を非プロトン性溶媒系中、酸性条件下で除去することによって、脱ブロックするステップ、並びに、

ステップ(2)~(4)を1~149回繰り返すステップを含み、生じるポリヌクレオチド構築物は、本開示の1つ以上のヌクレオチド構築物を含む。

【0166】

40

50

さらなる実施形態において、ステップ(1)の最初のヌクレオシド又はヌクレオチドは、固体支持体に結合される。よりさらなる実施形態において、ステップ(1)の最初のヌクレオシド又はヌクレオチドが固体支持体に結合される場合、生じる合成されたポリヌクレオチド構築物は、最後の脱ブロックステップの後に固体支持体から開裂される。代替の実施形態において、ステップ(1)の最初のヌクレオシド又はヌクレオチドは、固体支持体に結合されない。

【0167】

別の実施形態において、本明細書中のポリヌクレオチド構築物を製造する方法は、コンピュータで制御される装置を使用して実施することができる。代替の実施形態において、本明細書中のポリヌクレオチド構築物を製造する方法は、コンピュータで制御される装置を使用することなしに実施することができる。

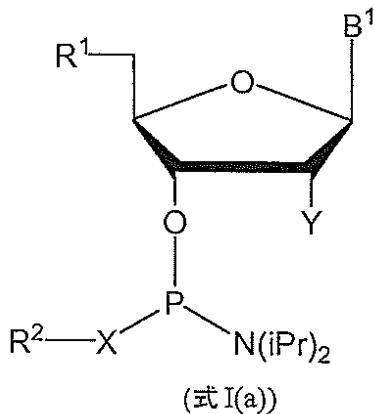
10

【0168】

さらに別の実施形態において、ポリヌクレオチド構築物を製造する方法は、式I(a)：

【0169】

【化38】



20

[式中、

B¹は、核酸塩基であり、

Xは、O又はSであり、

Yは、ハロ、置換されていてもよいC₁ - 6アルコキシ、又は保護されたヒドロキシル基であり、

R¹は、4,4'-ジメトキシトリチル基(DMT)で保護されたヒドロキシル基であり、

R²は、本明細書に記載のような、又は表1に例示したような生物可逆性基である]

を有する1つ以上のヌクレオチド構築物の使用を含む。

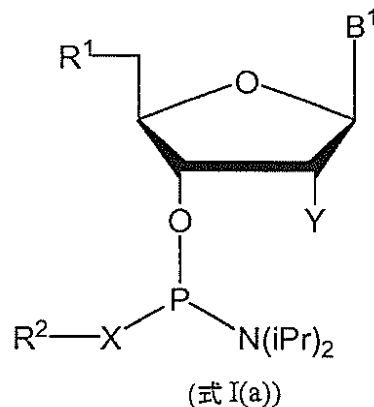
30

【0170】

さらなる実施形態において、ポリヌクレオチド構築物を製造する方法は、式I(a)：

【0171】

【化39】



40

50

[式中、

B^1 は、核酸塩基であり、

Xは、Oであり、

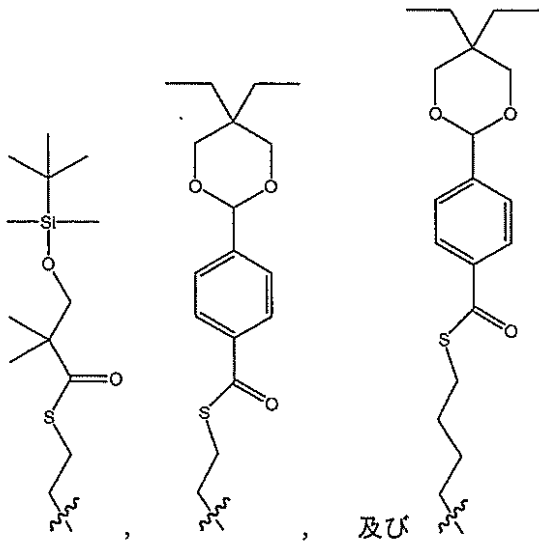
Yは、ハロ、置換されていてもよい C_{1-6} アルコキシ、又は保護されたヒドロキシル基であり、

R^1 は、4,4'-ジメトキシトリチル基(DMT)で保護されたヒドロキシル基であり、

R^2 は、

【0172】

【化40】



10

20

から選択される生物可逆性基である]

を有する1つ以上のヌクレオチド構築物の使用を含む。

【0173】

本開示は、さらに、本明細書に開示の製造方法を使用して合成されたポリヌクレオチド構築物を処理する方法を提供する。例えば、ポリヌクレオチド構築物の合成後に、核酸塩基が1つ以上の保護基を含む場合、次いで保護基を除去し、且つ/又は保護基で保護された親水性官能基又はコンジュゲート部分を含む任意の生物可逆性基について、次いで保護基を除去する。

30

【0174】

さらに、ポリヌクレオチド構築物を合成した後に、小分子、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、及び/又はエンドソーム脱出部分を、1つ以上の生物可逆性基の1つ以上のコンジュゲート部分に連結することができる。

【0175】

本開示は、さらに、単一ヌクレオチドからなる核酸構築物(「ヌクレオチド構築物」)を提供する。

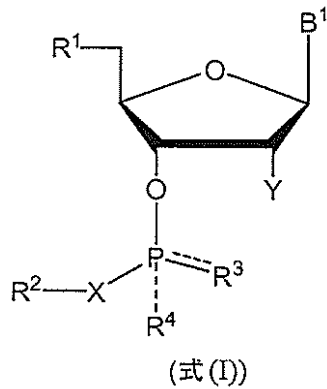
40

【0176】

本開示は、式(I):

【0177】

【化 4 1】



10

[式中、

B¹は、核酸塩基であり、Xは、O、S又はNR⁵であり、

Yは、ハロ、置換されていてもよいC₁ - 6アルコキシ、又は保護されたヒドロキシル基であり、

R¹は、ヒドロキシル、置換されていてもよいC₁ - 6アルコキシ、保護されたヒドロキシル基、一リン酸、二リン酸、三リン酸、四リン酸、又は五リン酸であり、

R²は、親水性官能基、コンジュゲート部分、又は親水性官能基及びコンジュゲート部分を含む生物可逆性基であり(ここで、コンジュゲート部分及び/又は親水性官能基は保護基で保護されていてもよい)、

R³は、O、S、又は置換されていてもよいアミノであり、

R⁴は、H、ヒドロキシル、置換されていてもよいC₁ - 6アルコキシ、保護されたヒドロキシル基、一リン酸、二リン酸、三リン酸、四リン酸、五リン酸であるか、R³が置換されていてもよいアミノである場合は存在せず、

R⁵は、H、置換されていてもよいC₁ - 6アルキル、S-ピバロイルチオエタノール、ヒドロキシル、置換されていてもよいC₁ - 6アルコキシ、置換されていてもよいC₃ - 8シクロアルキル、置換されていてもよいC₆ - 12アリール、又は置換されていてもよいC₂ - 9ヘテロシクリルである]

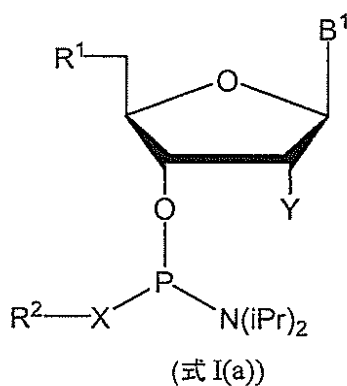
に記載の構造を有するヌクレオチド構築物を特徴とする。

【 0 1 7 8】

別の実施形態において、ヌクレオチド構築物は、式I(a)：

【 0 1 7 9】

【化 4 2】



40

[式中、

B¹は、核酸塩基であり、

Xは、Oであり、

Yは、ハロ、置換されていてもよいC₁ - 6アルコキシ、又は保護されたヒドロキシル基で

50

あり、

R^1 は、4,4'-ジメトキシトリチル基(DMT)で保護されたヒドロキシル基であり、

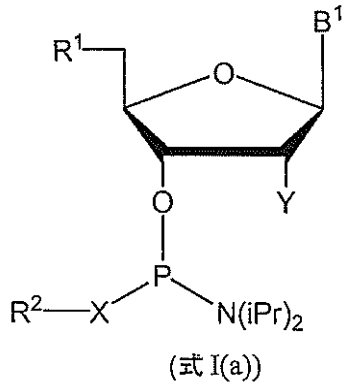
R^2 は、本明細書に記載のような、例えば表1に例示したような生物可逆性基である]
に記載の構造を有する。

【0180】

さらに別の実施形態において、ヌクレオチド構築物は、式I(a)：

【0181】

【化43】



10

[式中、

B^1 は、核酸塩基であり、

X は、 O であり、

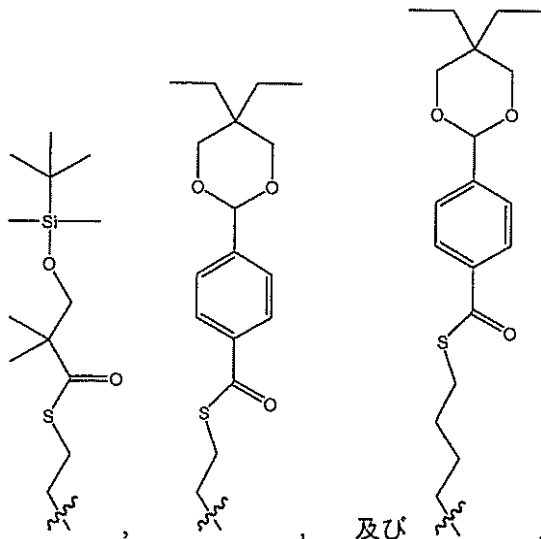
Y は、ハロ、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルコキシ、又は保護されたヒドロキシル基であり、

R^1 は、4,4'-ジメトキシトリチル基(DMT)で保護されたヒドロキシル基であり、

R^2 は、

【0182】

【化44】



30

40

から選択される生物可逆性基である]

に記載の構造を有する。認識されるように、これらの生物可逆性基は、保護されたヒドロキシル基又は保護されたアルデヒド基を含む。例示された保護基は、本明細書に記載のようなその他のヒドロキシル又はカルボニル保護基で置き換えることができる。

【0183】

本開示は、さらに、保護されたコンジュゲート部分を含むヌクレオチド構築物などの核酸構築物のコンジュゲート部分を脱保護することを提供する。例えば、シリルエーテルと

50

して保護されたヒドロキシをベースにしたコンジュゲート部分は、酸又はフッ化物を添加することによって脱保護してヒドロキシル基にすることができ、1,3-ジオキサン又は1,3-ジオキソランとして保護されたカルボニルをベースにしたコンジュゲート部分は、触媒量の酸、例えば触媒量のトルエンスルホン酸を添加することによって、脱保護してアルデヒド又はケトンを形成することができる。

【0184】

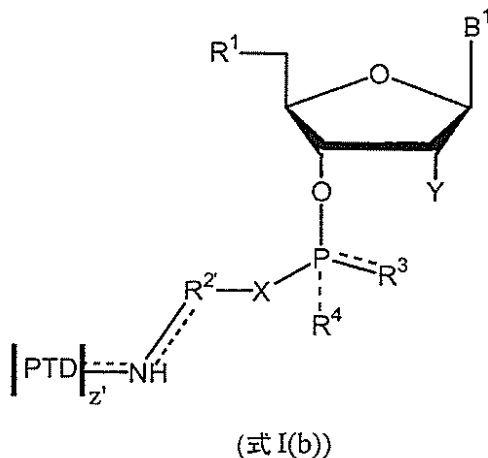
本開示は、さらに、小分子、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、又はこれらの任意の組合せから選択される補助部分を含むヌクレオチド構築物を提供し、ここで、該補助部分は、1つ以上の共有結合によって生物可逆性基に連結されている。特定の実施形態では、補助部分を、生物可逆性基上に見出されるコンジュゲート部分に1つ以上の共有結合を形成することを介して生物可逆性基に結合することができる。

【0185】

特定の実施形態において、ヌクレオチド構築物は、式I(b)：

【0186】

【化45】



[式中、

PTDは、ペプチド導入ドメインであり、

z' は、1～10の数字であり(ここで、 z' が1を超える場合、PTDは、1～10個の繰り返し単位を有するポリ($C_1 \sim 4$ アルキレンオキシド)基などの連結基を介して一緒に連結され得る)

B^1 は、核酸塩基であり、

Xは、O、S又は NR^5 であり、

Yは、ハロ、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルコキシ、又は保護されたヒドロキシル基であり、

R^1 は、ヒドロキシル、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルコキシ、保護されたヒドロキシル基、一リン酸、二リン酸、三リン酸、四リン酸、又は五リン酸であり、

$R^{2'}$ は、補助部分 $|PTD|_{z'}$ へ1つ以上の共有結合を形成している生物可逆性基の残余部であり、

R^3 は、O、S、又は置換されていてもよいアミノであり、

R^4 は、H、ヒドロキシル、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルコキシ、保護されたヒドロキシル基、一リン酸、二リン酸、三リン酸、四リン酸、五リン酸であるか、 R^3 が置換されていてもよいアミノである場合は存在せず、

R^5 は、H、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルキル、S-ピバロイルチオエタノール、ヒドロキシル、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルコキシ、置換されていてもよい $C_3 \sim 8$ シクロアルキル、置換されていてもよい $C_6 \sim 12$ アリール、又は置換されていてもよい $C_2 \sim 9$ ヘテロシクリルである]

に記載の構造を含む。

【0187】

本開示の核酸構築物は、種々のコンジュゲート部分を含むことができる。次いで、コンジュゲート部分を、種々のその他の補助部分、例えば、小分子、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正帯電ポリマー、治療剤、標的指向性部分、エンドソーム脱出部分、又はこれらの組合せを核酸構築物に結合するのに使用することができる。特定の実施形態において、1種を超えるコンジュゲート部分が、核酸構築物中に存在し、それによって、補助部分の核酸構築物への選択的及び/又は逐次的カップリングを可能にする。ポリヌクレオチド構築物中での結合位置は、ポリマーの合成中での適切なヌクレオチド構築物の使用によって決定される。1つ以上のコンジュゲート部分を含む核酸構築物は、適切な条件下で、補助部分上の1つ以上の対応するコンジュゲート部分と反応する。補助部分は、コンジュゲート部分、例えば、ペプチド又はポリペプチド中の末端又はリシンアミン基、及びチオール基を本来的に所持することができるか、コンジュゲート部分を導入するために、補助部分を小さな連結基を含むように修飾することができる。このような連結基の導入は、当技術分野で周知である。本開示の核酸構築物に結合される補助部分は、任意の必要な連結基を含むことが理解されるであろう。

10

【0188】

多様な結合形成法を使用して、補助部分を本明細書に記載の核酸構築物にコンジュゲートさせることができる。例示的な反応としては、アジドとアルキンとの間のトリアゾールを形成するためのHuisgen付加環化、ジエノフィルとジエン/ヘテロ-ジエンとの間のディールス-アルダー反応、エン反応などのその他のペリ環状反応を介する結合形成、アミド又はチオアミド結合の形成、スルホンアミド結合の形成、アルコール又はフェノールのアルキル化(例えば、ジアゾ化合物との)、オキシム又はヒドラゾン結合を形成するための縮合反応、求核基(例えば、アミン及びチオール)による共役付加反応、ジスルフィド結合の形成、及びカルボキシル官能基での求核性置換(アミン、チオール、又はヒドロキシル求核基による)が挙げられる。その他の例示的な結合形成方法は、本明細書中に記載され、当技術分野で公知である。

20

【0189】

求核基及び電子求引基は、限定はされないが、電子求引基によるC-H結合中への挿入、電子求引基によるO-H結合中への挿入、電子求引基によるN-H結合中への挿入、電子求引基のアルケンに対する付加、電子求引基のアルキンに対する付加、電子求引性カルボニル中心への付加、電子求引性カルボニル中心での置換、ケテンへの付加、イソシアネートへの求核性付加、イソチオシアネートへの求核性付加、活性化されたケイ素中心での求核性置換、ハロゲン化アルキルの求核性置換、擬ハロゲン化アルキルでの求核性置換、活性化されたカルボニルでの求核性付加/脱離、求核基の α , β -不飽和カルボニルへの1,4-共役付加、エポキシドの求核性開環、電子不足芳香族化合物の求核性芳香族置換、活性化されたリン中心への求核性付加、活性化されたリン中心での求核性置換、活性化された硫黄中心への求核性付加、及び活性化された硫黄中心での求核性置換から選択される結合形成反応に参加することができる。

30

【0190】

求核性のコンジュゲート部分は、置換されていてもよいアルケン、置換されていてもよいアルキン、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよいヘテロシクリル、ヒドロキシル基、アミノ基、アルキルアミノ基、アニリド基、及びチオ基から選択することができる。

40

【0191】

電子求引性のコンジュゲート部分は、ナイトレン、アジドなどのナイトレン前駆体、カルベン、カルベン前駆体、活性化されたケイ素中心、活性化されたカルボニル、無水物、イソシアネート、チオイソシアネート、スクシンイミジルエステル、スルホスクシンイミジルエステル、マレイミド、ハロゲン化アルキル、擬ハロゲン化アルキル、エポキシド、エビスルフィド、アジリジン、電子不足アリール、活性化されたリン中心、及び活性化さ

50

れた硫黄中心から選択することができる。

【0192】

例えば、コンジュゲーションは、ヒドラゾン結合である連結を形成するための縮合反応を介して起こり得る。

【0193】

アミド結合の形成を介するコンジュゲーションは、カルボキシルをベースにしたコンジュゲート部分の活性化、及び後に続く第一級アミンをベースにしたコンジュゲート部分との反応によって仲介される。活性化剤は、EDC(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩)、EDAC(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩)、DCC(ジシクロヘキシルカルボジイミド)、CMC(1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリノエチル)カルボジイミド)、DIC(ジイソプロピルカルボジイミド)、又はウッドワード試薬K(N-エチル-3-フェニルイソキサゾリウム-3'-スルホネート)のような、種々のカルボジイミドでよい。活性化されたNHS-エステルをベースにしたコンジュゲート部分の第一級アミンをベースにしたコンジュゲート部分との反応も、アミド結合の形成をもたらす。

10

【0194】

核酸構築物は、カルボニルをベースにしたコンジュゲート部分を含むことができる。第二級アミンの形成を介するコンジュゲーションは、アミンをベースにしたコンジュゲート部分をアルデヒドをベースにしたコンジュゲート部分と反応させること、続いてシアノ水素化ホウ素ナトリウムのようなヒドリド供与体で還元することによって達成することができる。アルデヒドをベースにしたコンジュゲート部分は、例えば、糖部分の酸化によって、又はSFB(スクシンイミジル-p-ホルミルベンゾエート)又はSFPA(スクシンイミジル-p-ホルミルフェノキシアセテート)との反応によって導入することができる。

20

【0195】

また、エーテル形成を利用して、補助部分を本開示の核酸構築物にコンジュゲートさせることができる。エーテル結合を介するコンジュゲーションは、エポキシドをベースにしたコンジュゲート部分のヒドロキシをベースにしたコンジュゲート部分との反応によって仲介することができる。

【0196】

チオールをコンジュゲート部分として使用することもできる。例えば、ジスルフィド結合の形成を介するコンジュゲーションは、ピリジルジスルフィドが介在するチオール-ジスルフィド交換によって完遂することができる。スルフヒドリルをベースにしたコンジュゲート部分の導入は、例えば、Traut試薬(2-イミノチオラン)、SATA(N-スクシンイミジル-S-アセチルチオアセテート)、SATP(スクシンイミジルアセチルチオプロピオネート)、SPDP(N-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート)、SMPT(スクシンイミジルオキシカルボニル- α -メチル- α -(2-ピリジルジチオ)トルエン)、N-アセチルホモシステインチオラクトン、SAMSA(S-アセチルメルカプトコハク酸無水物)、AMBH(2-アセタミド-4-メルカプト酪酸ヒドラジド)、及びシスタミン(2,2'-ジチオビス(エチルアミン))によって仲介される。

30

【0197】

チオエーテル結合の形成を介するコンジュゲーションは、スルフヒドリルをベースにしたコンジュゲート部分をマレイミド又はヨードアセチルをベースにしたコンジュゲート部分と反応させることによって、又はエポキシドをベースにしたコンジュゲート部分と反応させることによって実施することができる。マレイミドをベースにしたコンジュゲート部分は、SMCC(スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート)、スルホ-SMCC(スルホスクシンイミジル4-(N-マレイドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシレート)、MBS(m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル)、スルホ-MBS(m-マレイミドベンゾイル-N-スルホヒドロキシスクシンイミドエステル)、SMPB(スクシンイミジル-4-(p-マレイドフェニル)ブチレート)、スルホ-SMPB(スルホスクシンイミジル4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート)、GMBS(N- α -マレイミドブツリル-オキシスクシンイミドエステル)、スルホGMBS(N- α -マレイミドブツリル-オキシスルホスク

40

50

シンイミドエステル)によって導入することができる。

【0198】

チオールをベースにしたコンジュゲート部分を、ヨードアセチルをベースにしたコンジュゲート部分と反応させることもできる。ヨードアセチルをベースにしたコンジュゲート部分は、SIAB(N-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート)、スルホSIAB(スルホ-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)-アミノベンゾエート)、SIAX(スクシンイミジル6-[(ヨードアセチル-アミノ)ヘキサノエート)、SIAXX(スクシンイミジル6-[6-(((ヨードアセチル)アミノ)-ヘキサノイル)アミノ]ヘキサノエート)、SIAC(スクシンイミジル4-(((ヨードアセチル)アミノ)メチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシレート)、SIACX(スクシンイミジル6-(((4-(ヨードアセチル)アミノ)メチル)-シクロヘキサン-1-カルボニル)アミノ)ヘキサノエート)、及びNP1A(p-ニトロフェニルヨードアセテート)を用いて挿入することができる。

10

【0199】

カルバメート結合の形成を介するコンジュゲーションは、ヒドロキシをベースにしたコンジュゲート部分とCDI(N,N'-カルボニルジイミダゾール)又はDSC(N,N'-ジスクシンイミジルカルボネート)、又はN-ヒドロキシスクシンイミジルククロホーメートとの反応、及び後に続くアミンをベースにしたコンジュゲート部分との反応によって、実施することができる。

【0200】

別法として、コンジュゲート部分は、所望の共有結合を形成するために、光分解性又は熱分解性の活性化を採用することができる。アジド官能基を含むコンジュゲート部分が1つの例である。したがって、コンジュゲーションは、光反応性のコンジュゲート部分の導入によって達成することもできる。光反応性のコンジュゲート部分は、アリアルアジド、ハロゲン化アリアルアジド、ベンゾフェノン、特定のジアゾ化合物、及びジアジリン誘導体である。それらは、アミノをベースにしたコンジュゲート部分と又は活性化された水素結合を有するコンジュゲート部分と反応する。

20

【0201】

アジドをベースにしたコンジュゲート部分は、UVに不安定であり、光分解により、アリアルをベースにしたコンジュゲート部分又はアルケニルをベースにしたコンジュゲート部分などの求核性のコンジュゲート部分と反応することのできるナイトレン求核基の形成をもたらすことができる。別法として、これらのアジド化合物を加熱すると、やはり、ナイトレンが形成される。

30

【0202】

付加環化反応を利用して、所望の共有結合を形成することができる。代表的は付加環化反応としては、限定はされないが、アルケンをベースにしたコンジュゲート部分の1,3-ジエンをベースにしたコンジュゲート部分との反応(ディールス-アルダー反応)、アルケンをベースにしたコンジュゲート部分の α 、 β -不飽和カルボニルをベースにしたコンジュゲート部分との反応(ヘテロ・ディールス-アルダー反応)、及びアルキンをベースにしたコンジュゲート部分のアジドをベースにしたコンジュゲート部分との反応(Huisgen付加環化)が挙げられる。付加環化反応のための反応体を含むコンジュゲート部分の選択された非限定的例は、アルケン、アルキン、1,3-ジエン、 α 、 β -不飽和カルボニル、及びアジドである。例えば、アジドとアルキンとの間のHuisgen付加環化は、多様な生物学的実在物の官能化に使用されてきた。

40

【0203】

コンジュゲート部分は、また、限定はされないが、ヒドロシリル化、Stilleカップリング、鈴木カップリング、園頭カップリング、檜山カップリング、及びHeck反応のための反応体を含む。これらの反応のためのコンジュゲート部分としては、ヒドリドシラン、アルケン、及びアルキンが挙げられる。

【0204】

種々の補助部分を本開示の核酸構築物(例えば、siRNA)にコンジュゲートさせることが

50

でき、補助部分は、任意の数の生物学的又は化学的效果を有することができる。生物学的効果としては、限定はされないが、細胞内移行の誘導、細胞表面への結合、特定の細胞型への標的指向化、エンドソーム脱出の許容、ポリヌクレオチドのインビボでの半減期の変更、及び治療効果の提供が挙げられる。化学的效果としては、限定はされないが、溶解性、電荷、大きさ、及び反応性の変化が挙げられる。

【0205】

小分子をベースにした補助部分(例えば、約1000Da以下の分子量を有する有機化合物)は、本開示の核酸構築物にコンジュゲートすることができる。このような小分子の例には、限定はされないが、置換又は非置換のアルカン、アルケン、又はアルキン、例えば、ヒドロキシ置換、NH₂置換、モノ、ジ又はトリアルキルアミノ置換、グアニジノ置換、ヘテロシクリル置換、及びこれらの保護された変形体が含まれる。その他の小分子としては、ステロイド(例えば、コレステロール)、その他の脂質、胆汁、及びアミノ酸が挙げられる。小分子をポリヌクレオチドに付加して、中性又は正電荷を提供するか、ポリヌクレオチドの親水性又は疎水性を変更することができる。

10

【0206】

ペプチド又はポリペプチド(融合ポリペプチドを含む)は、そのモノマーが、アミド結合を介して一緒に連結されるアミノ酸残基であるポリマーを指す。アミノ酸が α -アミノ酸である場合、L-光学異性体又はD-光学異性体を使用できる。ペプチド又はポリペプチドは、アミノ酸配列を包含し、且つ糖タンパク質、レトロ-インベルソ(retro-inverso)なポリペプチド、D-アミノ酸などの修飾された配列を含む。ペプチド又はポリペプチドとしては、天然に存在するタンパク質、及び組換え又は合成的に作られたものが挙げられる。ポリペプチド(及びより一般的ではないがペプチド)は、ポリペプチドの特定のフラグメント又は部分に帰すことのできる機能を有する1つを超えるドメインを含むことができる。ドメインは、例えば、少なくとも1つの有用なエピトープ又は機能性ドメインを呈示するペプチド又はポリペプチドの部分を含む。2つ以上のドメインは、各ドメインが、その機能を保持し、しかも単一のペプチド又はポリペプチドを含む(例えば融合ポリペプチド)ように機能的に連結されることができる。例えば、PTDの機能性フラグメントは、導入活性を保持するフラグメントを含む。生物学的機能性フラグメントは、例えば、抗体分子に結合する能力のあるエピトープのよう小さなフラグメントから、細胞内での表現型変化の特徴的な誘導又はプログラミングに参加する能力のある大きなポリペプチドまでその大きさが異なり得る。

20

30

【0207】

一部の実施形態では、レトロ-インベルソなペプチド又はポリペプチドが使用される。「レトロ-インベルソ」は、1つ以上のアミノ酸におけるアミノ-カルボキシの反転及びエナンチオマー変化(すなわち、左旋性(L)から右旋性(D)への)を意味する。本開示のペプチド又はポリペプチドは、例えば、アミノ酸配列のアミノ-カルボキシ反転、1つ以上のD-アミノ酸を含むアミノ-カルボキシ反転、及び1つ以上のD-アミノ酸を含む非反転配列を包含する。安定であり且つ生物活性を保持しているレトロ-インベルソなペプチド模擬体を、B rugidou et al.(Biochem.Biophys.Res.Comm.214(2):685~693,1995)、及びChorevra et al.(Trends Biotechnol.13(10):438~445,1995)によって記載されているように考案することができる。レトロ-インベルソなペプチド又はポリペプチドの全体的な構造の特徴は、親のL-ポリペプチドのものに類似している。しかし、この2つの分子は、本来的にキラルな第2の構造要素を共有しているので、大まかには鏡像体である。ペプチド結合のキラリティの逆転及び反転をベースにした主鎖ペプチド模擬体は、ペプチド及びタンパク質に関する重要な構造改変を意味し、バイオテクノロジーにとって高度に重要である。抗原性及び免疫原性は、天然の抗原性ペプチド及びポリペプチドの全D-及びレトロ-インベルソな異性体などの代謝的に安定な抗原によって達成され得る。いくつかのPTD由来ペプチド模擬体が、本明細書中で提供される。

40

【0208】

ポリペプチド及びフラグメントは、天然由来のポリペプチド又はドメインと同一又は実

50

質上同一のアミノ酸配列を有することができる。「実質上同一」とは、アミノ酸配列が、完全ではないが大部分が同一であり、それが関係する配列の機能活性を保持していることを意味する。機能活性の例は、フラグメントが、導入する能力があるか、RNAに結合する能力があることである。例えば、導入活性を有する完全長TATのフラグメントが、本明細書中に記載される。一般に、2つのペプチド、ポリペプチド又はドメインは、それらの配列が少なくとも85%、90%、95%、98%又は99%同一である場合、又は配列中に保存的変動が存在する場合、「実質上同一」である。BLASTプログラム(Altschulら、1990)などのコンピュータプログラムを使用して配列の同一性を比較することができる。

【0209】

本開示のペプチド又はポリペプチドは、ペプチド結合又は修飾ペプチド結合、すなわちペプチド同配体(isostere)によって互いに連結されたアミノ酸からなることができ、且つ遺伝子でコードされた20種のアミノ酸以外のアミノ酸を含むことができる。ペプチド又はポリペプチドを、翻訳後処理などの自然な処理によって、又は当技術分野で周知の化学的修飾技術によって修飾することができる。このような修飾は、基礎的教科書及びより詳細なモノグラフ、並びに多くの研究文献中に詳しく記載されている。修飾は、骨格、アミノ酸側鎖、及びアミノ又はカルボキシル末端を含む、ペプチド又はポリペプチド中のいずれの場所でも起こり得る。同じ種類の修飾が、所与のペプチド又はポリペプチド中のいくつかの部位で同一又は異なる程度で存在できることが認識されるであろう。また、所与のペプチド又はポリペプチドは、多くの種類の修飾を含むことができる。ペプチド又はポリペプチドは、例えば、ユビキチン化の結果として分枝されていてもよく、且つそれらは、分枝を伴う又は伴わない環状でよい。環状、分枝状、及び分枝で環状のペプチド及びポリペプチドは、翻訳後の自然な処理に由来することができ、或いは合成的方法によって作製することもできる。修飾としては、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質又は脂質誘導体の共有結合、ホスホチジルイノシトールの共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合の形成、脱メチル化、共有架橋の形成、システインの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、 γ -カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリスチル化、酸化、PEG化、タンパク質分解処理、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、タンパク質へのアミノ酸の転移RNA介在性付加(アルギニン化など)、及びユビキチン化が挙げられる。(例えば、Proteins-Structure And Molecular Properties, 2nd Ed., T.E.Creighton, W.H.Freeman and Company, New York(1993)、Posttranslational Covalent Modification of Proteins, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pgs.1~12(1983)、Seifter et al., Meth Enzymol 182:626~646(1990)、Rattan et al., Ann N.Y.Acad Sci 663:48~62(1992)を参照されたい。)

【0210】

本開示のペプチド又はポリペプチドドメイン又は融合ポリペプチドは、 α -アミノ基のt-BOC又はFMOC保護を含むものなど、一般的に使用される方法により合成することができる。双方の方法は、ペプチド又はポリペプチドのC-末端から出発して各段階で1つのアミノ酸を付加する段階的合成を含む(Coligan, et al., Current Protocols in Immunology, Wiley Interscience, 1991, Unit 9を参照されたい)。本開示のポリペプチド及びペプチドは、また、Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149, 1962及びStewart and Young, Solid Phase Peptides Synthesis, Freeman, San Francisco, 1969, pp.27~62に記載のものなどの周知の固相ペプチド合成法により、0.1~1.0mMアミン/ポリマー(g)を含むコポリ(スチレン-ジビニルベンゼン)を使用して合成することができる。化学合成が完結したら、ペプチド又はポリペプチドを、脱保護し、液状HF-10%アニソールを用いて約15分~1時間処理することによってポリマーから開裂させることができる。試薬を蒸発させた後、ペプチド又はポリペプチドを、1%酢酸溶液でポリマーから抽出し、次いで、凍結乾燥して、粗材料を得る。ペプチド又はポリペプチドを、溶媒として5%酢酸を使用するSephadex G-15でのゲル濾過のような技術によって精製することができる。カラム溶離液の適切な画分を凍結乾燥して、

均一なペプチド又はポリペプチドを得て、次いで、それを、アミノ酸分析、薄層クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、紫外吸収分光法、モル回転、又は溶解度測定などの標準的技術により特徴付けることができる。所望なら、ペプチド又はポリペプチドを、固相エドマン分解によって定量することができる。

【0211】

本開示の核酸構築物に結合することのできる、炭水化物をベースにした補助部分としては、単糖、二糖、及び多糖を挙げることができる。例には、アロース、アルトロース、アラビノース、クラジノース、エリスロース、エリスルロース、フルクトース、D-フシトール、L-フシトール、フコサミン、フコース、フクロース、ガラクトサミン、D-ガラクトサミニトール、N-アセチル-ガラクトサミン、ガラクトース、グルコサミン、N-アセチル-グルコサミン、グルコサミニトール、グルコース、グルコース-6-リン酸、グルコースグリセルアルデヒド、L-グリセロ-D-マンノース-ヘブロース、グリセロール、グリセロン、グロースイドース、リキソース、マンノサミン、マンノース、マンノース-6-リン酸、プシコース、キノボース、キノボサミン、ラムニトール、ラムノサミン、ラムノース、リボース、リブロース、セドヘブツロース、ソルボース、タガトース、タロース、酒石酸、トレオース、キシロース、及びキシルロースが含まれる。単糖はD-又はL-配置でよい。単糖は、さらに、デオキシ糖(アルコール性ヒドロキシ基が水素で置き換えられた)、アミノ糖(アルコール性ヒドロキシ基がアミノ基で置き換えられた)、チオ糖(アルコール性ヒドロキシ基がチオールで置き換えられた又はC=OがC=Sで置き換えられた、又は環状形態の環酸素が硫黄で置き換えられた)、セレノ糖、テルロ糖、アザ糖(環炭素が窒素で置き換えられた)、イミノ糖(環酸素が窒素で置き換えられた)、ホスファノ糖(環酸素がリンで置き換えられた)、ホスファ糖(環炭素がリンで置き換えられた)、C-置換単糖(非末端炭素原子の水素が炭素で置き換えられた)、不飽和単糖、アルジトール(カルボニル基がCHOH基で置き換えられた)、アルドン酸(アルデヒド性基がカルボキシ基で置き換えられた)、ケトアルドン酸、ウロン酸、アルダル酸、等々でよい。アミノ糖としては、アミノ単糖、例えば、ガラクトサミン、グルコサミン、マンノサミン、フコサミン、キナボサミン、ノイラミン酸、ムラミン酸、ラクトセジアミン、アコサミン、バシロサミン、ダウノサミン、デソサミン、フォロサミン、ガロサミン、カノサミン、カノサミン、ミカミノース、ミオサミン、ペルソサミン、プノイモサミン、ブルプロサミン、ロドスミンが挙げられる。単糖などはさらに置換され得ることが理解される。二糖及び多糖としては、アベコース、アクラボース、アミセトース、アミロペクチン、アミロース、アピオース、アルカノース、アスカリロース、アスコルビン酸、ボイビノース、セロビオース、セロトリオース、セルロース、カコトリオース、カルコース、キチン、コリトース、シクロデキストリン、シマロース、デキストリン、2-デオキシリボース、2-デオキシグルコースジギノース、ジギタロース、ジギトキソース、エバロース、エベミトロース、フルクトオリゴ糖、ガルト-オリゴ糖、ゲンチアノース、ゲニチオビオース、グルカン、グリコゲン、グリコーゲン、ハمامエロース、ヘパリン、イヌリン、イソレボグルコセノン、イソマルトース、イソマルトリオース、イソパノース、コージビオース、ラクトース、ラクトサミン、ラクトセジアミン、ラミナラビオース、レボグルコサン、レボグルコセノン、 β -マルトース、マルトリオース、マンナン-オリゴ糖、マンニノトリオース、メレジトース、メリビオース、ムラミン酸、ミカロース、ミシノース、ノイラミン酸、ミゲロース、ノジリミコン、ノビオース、オレアンドロース、パノース、パラトース、プランテオース、プリメベロース、ラフィノース、ロドン、ルチノース、オレアンドロース、パノース、パラトース、プランテオース、プリメベロース、ラフィノース、ロジノース、ルチノース、サルメントース、セドヘブツロース、セドヘブツロサン、ソラトリオース、ソホロース、スタキオース、ストレプトース、スクロース、 α , α -トレハロース、トラハロサミン、ツラノース、チベロース、キシロビオース、ウンベリフェロースなどが挙げられる。

【0212】

本明細書に記載の核酸構築物は、また、共有結合で結合された中性又は帯電(例えば、カチオン帯電)したポリマーをベースにした補助部分を含むことができる。正に帯電した

ポリマーの例には、ポリ(エチレンジイミン)(PEI)、スぺルミン、スぺルミジン、及びポリ(アミドアミン)(PAMAM)が含まれる。中性ポリマーとしては、ポリ(C_{1-4} アルキレンオキシド)、例えば、ポリ(エチレングリコール)及びポリ(プロピレングリコール)並びにこれらのコポリマー、例えば、ジ及びトリブロックコポリマーが挙げられる。ポリマーのその他の例には、エステル化されたポリ(アクリル酸)、エステル化されたポリ(グルタミン酸)、エステル化されたポリ(アスパラギン酸)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリ(エチレン-co-ビニルアルコール)、ポリ(N-ビニルピロリドン)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(エチルオキサゾリン)、ポリ(アルキルアクリレート)、ポリ(アクリルアミド)、ポリ(N-アルキルアクリルアミド)、ポリ(N-アクリロイルモルホリン)、ポリ(乳酸)、ポリ(グリコール酸)、ポリ(ジオキサノン)、ポリ(カプロラクトン)、スチレン-マレイン酸無水物コポリマー、ポリ(L-ラクチド-co-グリコリド)コポリマー、ジビニルエーテル-マレイン酸無水物コポリマー、N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミドコポリマー(HMPA)、ポリウレタン、ポリ(2-エチルアクリル酸)、N-イソプロピルアクリルアミドポリマー、ポリホスファジン、及びポリ(N,N-ジアルキルアクリルアミド)が挙げられる。例示的なポリマー補助部分は、100、300、500、1000又は5000未満の分子量を有することができる。その他のポリマーも当該技術分野で公知である。

【0213】

治療剤は、診断/造影剤を含め、補助部分として、本開示の核酸構築物に共有結合で結合させることができるか、或いは本明細書に記載の併用療法として投与することができる。それらは、天然に存在する化合物、合成有機化合物、又は無機化合物でよい。例示的な治療剤としては、限定はされないが、抗生物質、抗増殖剤、ラバマイシン系マクロライド、鎮痛薬、麻酔薬、血管新生阻害剤、血管作動剤、抗凝固薬、免疫調節薬、細胞傷害剤、抗ウイルス剤、抗血栓薬、抗体、神経伝達物質、向精神薬、及びこれらの組合せが挙げられる。治療剤のさらなる例には、限定はされないが、細胞周期調節剤、サイクリンタンパク質の産生を阻害する薬剤、限定はされないがインターロイキン1~13及び腫瘍壊死因子をはじめとするサイトカイン、抗凝固薬、抗血小板剤、TNF受容体ドメインなどが含まれる。典型的には、治療剤は中性であるか、正に帯電している。治療剤が負に帯電している特定の例では、さらなる電荷中和部分(例えば、カチオン性ペプチド)を使用することができる。

【0214】

治療部分は、本明細書に開示の核酸構築物に補助部分として連結されて、診断アッセイ/造影を可能にすることができる。このような部分の例には、限定はされないが、同位体などの検出可能な標識、放射線造影剤、マーカー、トレーサー、蛍光標識(例えば、ローダミン)、及びレポーター分子(例えば、ビオチン)が含まれる。

【0215】

例示的な診断剤としては、限定はされないが、陽電子放射断層撮影法(PET)、コンピュータ支援断層撮影法(CAD)、単一光子放射コンピュータ化断層撮影法、X線、蛍光分光法、及び磁器共鳴造影(MRI)で使用されるような造影剤が挙げられる。MRIで造影剤として使用するのに適した材料としては、限定はされないが、ガドリニウムキレート化合物、並びに鉄、マグネシウム、マンガン、銅、及びクロムのキレート化合物が挙げられる。CAT及びX線で有用な材料の例には、限定はされないが、ヨウ素をベースにした材料が含まれる。

【0216】

適切である可能性のある放射線を放射する放射線造影剤(検出可能な放射線標識)の例は、インジウム-111、テクネチウム-99、又は低線量ヨウ素-131によって例示される。本開示の核酸構築物と一緒に又は本開示の核酸構築物に補助部分として結合させて使用するための検出可能な標識又はマーカーは、放射性標識、蛍光標識、核磁気共鳴活性標識、発光性標識、発光団標識、PET走査装置のための陽電子放射同位体、化学発光標識、又は酵素標識でよい。蛍光標識としては、限定はされないが、緑色蛍光タンパク質(GFP)、フルオレセイン、及びローダミンが挙げられる。標識は、例えば、医療用同位体、例えば、限定はされないが、テクネチウム-99、ヨウ素-123及び-131、タリウム-201、ガリウム-67、フ

ッ素-18、インジウム-111などでよい。

【0217】

当技術分野で公知のその他の治療剤を、本開示の核酸構築物と一緒に、又は本開示の核酸構築物に補助部分として結合させて同様に使用することができる。

【0218】

本開示は、本明細書に開示の核酸構築物に補助部分として、例えば標的指向性補助部分として結合させることのできる1つ以上の標的指向性部分を提供する。標的指向性部分は、本開示の構築物を、選択された標的指向性部分に対応する結合パートナー(例えば、対応する受容体又はリガンド)を発現する所望の又は選択された細胞集団に向けるその能力に基づいて選択される。例えば、本開示の構築物を、標的指向性部分として選択された表皮増殖因子(EGF)によって、表皮増殖因子受容体(EGFR)を発現する細胞に向けることができる可能性がある。

10

【0219】

一実施形態において、標的指向性部分は、受容体結合ドメインである。別の実施形態において、標的指向性部分は、インスリン、インスリン様増殖因子受容体1(IGF1R)、IGF2R、インスリン様増殖因子(IGF、例えば、IGF1又は2)、間葉上皮転移因子受容体(c-met、肝細胞増殖因子受容体(HGFR)としても知られる)、肝細胞増殖因子(HGF)、表皮増殖因子受容体(EGFR)、表皮増殖因子(EGF)、ヘレグリン、線維芽細胞増殖因子受容体(FGFR)、血小板由来増殖因子受容体(PDGFR)、血小板由来増殖因子(PDGF)、血管内皮増殖因子受容体(VEGFR)、血管内皮増殖因子(VEGF)、腫瘍壊死因子受容体(TNFR)、腫瘍壊死因子 α (TNF- α)、TNF- β 、葉酸受容体(FOLR)、葉酸、転移、トランスフェリン受容体(TfR)、メソテリン、Fc受容体、c-kit受容体、c-kit、インテグリン(例えば、 α 4インテグリン又は β -1インテグリン)、P-セレクチン、スフィンゴシン-1-リン酸受容体-1(S1PR)、ヒアルロン酸受容体、白血球機能抗原-1(LFA-1)、CD4、CD11、CD18、CD20、CD25、CD27、CD52、CD70、CD80、CD85、CD95(Fas受容体)、CD106(血管細胞接着分子1(VCAM1)、CD166(活性化白血球細胞接着分子(ALCAM))、CD178(Fasリガンド)、CD253(TNF-関連アポトーシス誘導リガンド(TRAIL))、ICOSリガンド、CCR2、CXCR3、CCR5、CXCL12(間質細胞由来因子1(SDF-1))、インターロイキン1(IL-1)、IL-1ra、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-7、IL-8、CTLA-4、MART-1、gp100、MAGE-1、エフリン(Eph)受容体、粘膜アドレシン細胞接着分子1(MAdCAM-1)、癌胎児性抗原(CEA)、Lewis^Y、MUC-1、上皮細胞接着分子(EpCAM)、がん抗原125(CA125)、前立腺特異的膜抗原(PSMA)、TAG-72抗原、及びこれらのフラグメントを含む群から選択されるタンパク質であるか、それらに特異的に結合する。さらなる実施形態において、標的指向性部分は、赤芽球性白血病ウイルス性発癌遺伝子相同体(ErbB)受容体(例えば、ErbB1受容体、ErbB2受容体、ErbB3受容体、及びErbB4受容体)である。

20

30

【0220】

標的指向性部分は、また、ボンベシン、ガストリン、ガストリン放出ペプチド、TGF- α 及びTGF- β などの腫瘍増殖因子(TGF)、並びに牛痘ウイルス増殖因子(VVGF)から選択することができる。非ペプチジルリガンドを、標的指向性部分として使用することもでき、該リガンドとしては、例えば、ステロイド、炭水化物、ビタミン、及びレクチンを挙げることができる。標的指向性部分は、また、ペプチド又はポリペプチド、例えばソマトスタチン(例えば、コア配列、シクロ[Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys]を有し、且つ例えば、ソマトスタチン類似体のC-末端がThr-NH₂であるソマトスタチン)、ソマトスタチン類似体(例えば、オクトレオチド及びランレオチド)、ボンベシン、ボンベシン類似体、又はモノクローナル抗体などの抗体から選択することができる。

40

【0221】

本開示の核酸構築物中の標的指向性補助部分として使用するためのその他のペプチド又はポリペプチドは、KiSSペプチド及び類似体、ウロテンシンIIペプチド及び類似体、GnRH I及びIIペプチド及び類似体、デプレオチド、バプレオチド、血管作用性腸ペプチド(VIP)、コレシストキニン(CCK)、RGD-含有ペプチド、メラニン細胞刺激ホルモン(MSH)ペプチド、ニューロテンシン、カルシトニン、抗腫瘍抗体の相補性決定領域からのペプチド、グル

50

タチオン、YIGSR(白血球avidペプチド、例えば、血小板因子-4(PF-4)のヘパリン結合領域及びリシンに富む配列を含むP483H)、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)、 β -アミロイドペプチド、 δ -オピオイド拮抗薬(ITIPP(psi)など)、アネキシン-V、エンドセリン、ロイコトリエンB₄(LTB₄)、走化性ペプチド(例えば、N-ホルミル-メチオニル-ロイシル-フェニルアラニン-リシン(fMLFK))、GPIIb/IIIa受容体拮抗薬(例えば、DMP444)、ヒト好中球エラスターゼ阻害薬(EPI-HNE-2及びEPI-HNE-4)、プラスミン阻害薬、抗微生物性ペプチド、アプチシド(apticide)(P280及びP274)、トロンボスポンジン受容体(TP-1300などの類似体を含む)、ピチスタチン(bitistatin)、下垂体アデニルシクラーゼI型受容体(PAC1)、フィブリン α -鎖、ファージディスプレイライブラリ由来ペプチド、及びこれらの保存的置換体から選択することができる。

10

【0222】

本開示の核酸構築物中の標的指向性部分として使用するための免疫活性リガンドとしては、抗原を認識する免疫グロブリン(「抗体」とも呼ばれる)、又は抗原を認識するそのフラグメントが挙げられる。本明細書中で使用する場合、「免疫グロブリン」は、IgG、IgA、IgM、IgD又はIgEなどの、免疫グロブリンの任意の認識されている部類又は下位部類を指す。典型的なのは、免疫グロブリンの部類IgGに属する免疫グロブリンである。免疫グロブリンは、任意の種に由来することができる。しかし、典型的には、免疫グロブリンは、ヒト、ネズミ、又はウサギ起源である。さらに、免疫グロブリンは、ポリクローナル又はモノクローナルでよいが、典型的にはモノクローナルである。

20

【0223】

本開示の標的指向性部分は、抗原を認識する免疫グロブリンフラグメントを含むことができる。このような免疫グロブリンフラグメントとしては、例えば、Fab'、F(ab')₂、F_v、又はFabフラグメント、単ドメイン抗体、ScFv、又は抗原を認識するその他の免疫グロブリンフラグメントを挙げることができる。Fcフラグメントを、標的指向性部分として採用することもできる。このような免疫グロブリンフラグメントは、例えば、タンパク質分解酵素での消化によって、例えば、ペプシン又はパバインでの消化、還元アルキル化、又は組換え技術によって調製することができる。このような免疫グロブリンフラグメントを調製するための材料及び方法は、当業者にとって周知である。Parham, J. Immunology, 131, 2895, 1983; Lamoyi et al., J. Immunological Methods, 56, 235, 1983を参照されたい。

30

【0224】

本開示の標的指向性部分は、当技術分野で公知ではあるが、本開示中の特定の例として提供されなかった標的指向性部分を含む。

【0225】

本開示は、本明細書に開示の核酸構築物に、補助部分として、例えばエンドソーム脱出補助部分として結合することのできる1つ以上のエンドソーム脱出部分を提供する。例示的なエンドソーム脱出部分としては、化学療法薬(例えば、クロロキンなどのキノロン類)、膜融合性脂質(例えば、ジオレオイルホスファチジル-エタノールアミン(DOPE))、及びポリエチレンイミン(PEI)などのポリマー、ポリ(β -アミノエステル)、ポリアルギニン(例えば、オクタアルギニン)及びポリリシン(例えば、オクタリシン)などのペプチド又はポリペプチド、プロトスポンジ、ウイルスキャプシド、及び本明細書に記載のようなペプチド導入ドメインが挙げられる。例えば、膜融合性ペプチドは、インフルエンザA型ウイルスのM2タンパク質、インフルエンザウイルス赤血球凝集素のペプチド類似体、インフルエンザC型ウイルスのHEFタンパク質、フィロウイルスの膜貫通糖タンパク質、狂犬病ウイルスの膜貫通糖タンパク質、水泡性口内炎ウイルスの膜貫通糖タンパク質(G)、センダイウイルスの融合タンパク質、セムリキ森林ウイルスの膜貫通糖タンパク質、ヒト呼吸器合胞体ウイルス(RSV)の融合タンパク質、麻疹ウイルスの融合タンパク質、ニューカッスル病ウイルスの融合タンパク質、ヴィスナウイルスの融合タンパク質、マウス白血病ウイルスの融合タンパク質、HTLVウイルスの融合タンパク質、及びサル免疫不全ウイルス(SIV)の融合タンパク質から誘導できる。エンドソーム脱出を促進するために採用できるその他の部分は、Dominska et al., Journal of Cell Science, 123(8):1183~1189, 2010中に記載

40

50

されている。

【0226】

本開示は、本明細書に開示の核酸構築物に、補助部分として、例えば送達ドメイン補助部分として結合することのできる1つ以上の送達ドメイン部分を提供する。送達ドメインは、本開示のポリヌクレオチドの細胞中への、任意の機構による輸送を誘導する部分である。典型的には、本開示の核酸構築物は、マクロピノサイトーシス、ファゴサイトーシス、又はエンドサイトーシス(例えば、クラスリン介在性エンドサイトーシス、小胞介在性エンドサイトーシス、及び脂質筏依存性エンドサイトーシス)によって内部移行される(例えば、Chem.Soc.Rev.2011,40,233~245を参照されたい)。送達ドメインは、本明細書に記載のようなペプチド又はポリペプチド(例えば、ペプチド導入ドメイン)、炭水化物(ヒアルロン酸)、及び正帯電ポリマー(ポリ(エチレンイミン))を含むことができる。

10

【0227】

細胞内送達は、「荷物」である生物学的薬剤(この場合はポリヌクレオチド)の、TAT又は(Arg₈)などのカチオン性ペプチド導入ドメイン(PTD、細胞浸透性ペプチド(CPP)とも称される)への巨大分子融合によって完遂することができる(Snyder and Dowdy,2005,Expert Opin.Drug Deliv.2,43~51)。PTDを利用して、本明細書に記載のポリヌクレオチドをはじめとする広範な種類の巨大分子の荷物を送達することができる(Schwarze et al.,1999,Science 285,1569~1572、Eguchi et al.,2001,J.Biol.Chem.276,26204~26210、及びKoppelhus et al.,2002,Antisense Nucleic Acid Drug Dev.12,51~63)。カチオン性PTDは、すべての細胞が実行する流体相取り込みの特別な形態であるマクロピノサイトーシスによって細胞に侵入する。

20

【0228】

モデル小胞に関する生物物理学的研究は、荷物が、マクロピノソーム小胞から細胞質中に脱出し、したがって、pH低下を必要とすることを示唆している(Magzoub et al.,2005,Biochemistry 44,14890~14897)。PTDのカチオン電荷は、分子が細胞膜を通り抜けるのに必須である。驚くべきことではないが、カチオン性PTD(6~8の正電荷)のアニオン性siRNA(約40の負電荷)へのコンジュゲーションは、電荷の中和、及びsiRNAが細胞内に侵入しないPTDの不活性化をもたらす(Turner et al.,Blood Cells Mol.Dis.,38(1):1~7,2007)。しかし、カチオン性PTDの本明細書に記載の核酸構築物(例えば、アニオン性RNA又はDNA)への化学的コンジュゲーションは、なお、細胞によって取り込まれることのできる核酸構築物をもたらし、したがって、本明細書に開示の新規で自明でない核酸構築物は、その他の類似の方法で観察される任意の電荷中和の有害な人為的構造体の欠点を有さない。さらに、これらのPTDの細胞内での開裂は、ポリヌクレオチドを標的細胞に非可逆的に送達することを可能にする。

30

【0229】

真核細胞の原形質膜を効率的に通過できるいくつかのタンパク質の発見は、ペプチド導入ドメインが誘導されるタンパク質の部類の識別をもたらした。これらのタンパク質の中で最もよく特徴付けられたものは、ショウジョウバエのホメオタンパク質アンテナペディア転写タンパク質(AntHD)(Juliot et al.,New Biol.3:1121~34,1991、Joliot et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,88:1864~8,1991、Le Roux et al.,Proc. Natl.Acad.Sci.USA,90:9120~4,1993)、単純ヘルペスウイルス構造タンパク質VP22(Elliot and O'Hare,Cell 88:223~33,1997)、HIV-1転写活性化因子TATタンパク質(Green and Loewenstein,Cell 55:1179~1188,1988、Frankel and Pabo,Cell 55:1189~1193,1988)、及びより最近ではブリオンタンパク質のカチオン性N-末端ドメインである。例示的なPTD配列を表2に示す。本開示は、さらに、本明細書に開示の核酸構築物に補助部分としてコンジュゲートさせるための、表2に挙げるPTD、又は当技術分野で公知のその他のPTD(例えば、Joliot et al.,Nature Cell Biology,6(3):189~196,2004参照)の1種以上を提供する。コンジュゲーションのための戦略は、細胞内酵素の作用によって開裂することのできる官能基を含む、二官能性リンカーの使用を含む。

40

【0230】

50

【表 2】

表2

PDP	配列	配列番号
TAT	RKKRRQRRR	配列番号1
ペネトラチン	RQIKIWFQNRRMKWKK	配列番号2
ブフォリンII	TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK	配列番号3
トランスポルタン	GWTLNSAGYLLGKINKALAALAKKIL	配列番号4
MAP(両親媒性モデルペプチド)	KLALKLALKALKAALKLA	配列番号5
K-FGF	AAVALLPAVLLALLAP	配列番号6
Ku70	VPMLK - PMLKE	配列番号7
Prion	MANLGYWLLALFVTMWTDVGLCKKRPKP	配列番号8
pVEC	LLIILRRRIRKQAHASK	配列番号9
プリオン	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV	配列番号10
SynBl	RGGRLSYSRRRFSTSTGR	配列番号11
Pep-7 (ファージディスプレイ)	SDLWEMMMVSLACQY	配列番号12
HN-1 (ファージディスプレイ)	TSPLNIHNGQKL	配列番号13

10

20

【0231】

本明細書に記載の核酸構築物のいずれかにコンジュゲートすることのできるTATペプチドを含む例示的な補助部分を表3に示す。

【0232】

【表 3】

表3

配列(N'からC'へ)
PEG-(PTD)
GG-(PTD)-PEG-(PTD)
PEG-(PTD)-PEG-(PTD)
GG-(PTD)-PEG-PEG-PEG-(PTD)
PEG-(PTD)-PEG-PEG-PEG-(PTD)
GG-(PTD)-PEG-(PTD)-PEG-(PTD)
GG-(PTD)-PEG-PEG-PEG-(PTD)-PEG-PEG-PEG-(PTD)
PEG=6つの繰り返し単位を有するポリ(エチレングリコール)リンカー

30

【0233】

特定の実施形態において、表3に記載の補助部分は、N'末端にZ'への共有結合を含み、ここで、Z'は、ポリペプチドR²の6-ヒドラジノニコチン酸又はアミノ基のアルデヒドへのコンジュゲーションの残余部である。

【0234】

40

したがって、本開示の核酸構築物にコンジュゲートすることのできるPTDとしては、限定はされないが、AntHD、TAT、VP22、カチオン性プリオンタンパク質ドメイン、及びこれらの官能性フラグメントが挙げられる。これらのペプチドは、原形質膜を通過できるのみならず、β-ガラクトシダーゼ酵素などのその他のペプチド又はポリペプチドの結合は、これらの複合体の細胞取り込みを刺激するのに十分である。このようなキメラタンパク質は、細胞質及び核内に生物学的に活性な形態で存在する。この過程の特徴付けは、これらの融合ポリペプチドの取り込みが、迅速であり、しばしば、数分以内に受容体に独立な方式で行われることを示す。さらに、これらのタンパク質の導入は、細胞型によって影響されるとは思われず、これらのタンパク質は、明白な毒性なしに、培養中の細胞のほぼ100%に効率的に導入することができる(Nagahara et al. Nat. Med. 4:1449 ~ 52, 1998)。完全長タ

50

ンパク質に加えて、ペプチド導入ドメインを使用して、DNA(Abu-Amer、同上)、アンチセンスポリヌクレオチド(Astriab-Fisher et al., Pharm. Res. 19:744 ~ 54, 2002)、小分子(Polyakov et al., Bioconjug. Chem. 11:762 ~ 71, 2000)、及びさらには40nmの無機鉄粒子(Dodd et al., J. Immunol. Methods 256:89 ~ 105, 2001、Wunderbaldinger et al., Bioconjug. Chem. 13:264 ~ 8, 2002、Lewin et al., Nat. Biotechnol. 18:410 ~ 4, 2000、Josephson et al., Bioconjug. Chem. 10:186 ~ 91, 1999)の細胞内取り込みを成功裡に誘導し、この過程において粒径にかなりの柔軟性が存在することを示唆した。

【0235】

特定の実施形態において、本開示は、したがって、TAT及びポリ-ArgなどのPTDの使用を本明細書に開示の核酸構築物と組み合わせて、構築物の標的細胞中への標的化された取り込み、及び/又は標的細胞中への放出を促進するための方法及び組成物を提供する。本明細書に開示の核酸構築物は、したがって、補助部分として連結される治療剤又は診断剤を、補助部分として連結された1種以上のPTDをさらに含む核酸構築物によって特定の細胞中に送達されるように標的指向化することができる方法を提供する。

10

【0236】

本開示の核酸構築物は、それ自体で治療又は診断上の利益を提供するsiRNA又はその他の阻害性核酸配列でよい。しかし、一部の例で、さらなる補助部分を治療剤として結合すること、又は取り込みを促進することが望ましいことがある。PTDの場合、PTDは、核酸構築物上の電荷を中和することによって、又は典型的には核酸構築物に正味のわずかなカチオン電荷を供給することによって核酸構築物の取り込みを促進するためのさらなる電荷修正部分として役立つ。核酸構築物は、限定はされないが、標的指向性部分、生物学的活性分子、治療剤、小分子(例えば、細胞障害剤)などのその他の補助部分を含むことができる。このように理解される。このような例において、このような補助部分を有する核酸構築物は、補助部分の大きさ及び電荷に応じて、中性に帯電又はカチオン帯電してよい。補助部分がアニオン帯電している例では、カチオン帯電したペプチド(例えばPTD)の付加は、さらに帯電を中和できるか、或いは構築物の正味正電荷を増進することができる。

20

【0237】

一般に、本明細書に開示の核酸構築物に連結される送達ドメインは、本明細書に開示の核酸構築物の標的細胞中への細胞内送達を助ける、ほぼ任意の合成又は天然に存在するアミノ酸配列でよい。例えば、トランスフェクションは、本開示により、本開示の核酸構築物のコンジュゲート部分に共有結合で連結される、HIV TATタンパク質又はそのフラグメントなどのペプチド導入ドメインを使用することによって達成することができる。別法として、ペプチド導入ドメインは、アンテナペディアホメオドメイン又はHSV VP22配列、プリオンタンパク質のN-末端フラグメント、又は当技術分野で公知であるようなこれらの適切な導入フラグメントを含むことができる。

30

【0238】

PTDの種類及び大きさは、所望されるトランスフェクションの割合をはじめとするいくつかのパラメーターによって左右される。典型的には、PTDは、細胞の少なくとも約20%、25%、50%、75%、80%又は90%、95%、98%、及び最大で約100%にトランスフェクトする能力がある。トランスフェクション効率は、典型的にはトランスフェクトされた細胞の割合として表現され、いくつかの従来からの方法で測定することができる。

40

【0239】

PTDは、本明細書に開示の核酸構築物の少なくともピコモル量を標的細胞中に送る細胞侵入及び脱出速度(時には、それぞれ k_1 及び k_2 と呼ばれる)を示す。PTD及び任意の荷物の侵入及び脱出速度は、検出可能であるように標識された融合分子を使用する標準的な動力学的分析によって、容易に測定、又は少なくとも近似することができる。典型的には、侵入速度の脱出速度に対する比率は、約5 ~ 約100の範囲、最大で約1000である。

【0240】

一実施形態において、本開示の方法及び組成物で有用なPTDは、実質上 α -らせん性を特徴とするペプチド又はポリペプチドを含む。トランスフェクションは、PTDがかなりの α -

50

らせん性を示す場合に最適化されることが発見された。別の実施形態において、PTDは、ペプチド又はポリペプチドの少なくとも1つの面に沿って実質上整列されている塩基性アミノ酸残基を含む配列を備える。本開示で有用なPTDドメインは、天然に存在するペプチド又はポリペプチド、或いは合成のペプチド又はポリペプチドでよい。

【0241】

別の実施形態において、PTDは、らせん筒の下方にアルギニン(Arg)残基を伴う強い α -らせん構造を含むアミノ酸配列を備える。

【0242】

さらに別の実施形態において、PTDドメインは、次の一般式: $B_{P1}-X_{P1}-X_{P2}-X_{P3}-B_{P2}-X_{P4}-X_{P5}-B_{P3}$ (配列番号14)で表されるペプチドを含み、式中、 B_{P1} 、 B_{P2} 及び B_{P3} は、それぞれ独立に、同一又は異なる塩基性アミノ酸であり、 X_{P1} 、 X_{P2} 、 X_{P3} 、 X_{P4} 及び X_{P5} は、それぞれ独立に、同一又は異なる α -らせんが増強されたアミノ酸である。

10

【0243】

別の実施形態において、PTDドメインは、次の一般式: $B_{P1}-X_{P1}-X_{P2}-B_{P2}-B_{P3}-X_{P3}-X_{P4}-B_{P4}$ (配列番号15)で表され、式中、 B_{P1} 、 B_{P2} 、 B_{P3} 及び B_{P4} は、それぞれ独立に、同一又は異なる塩基性アミノ酸であり、 X_{P1} 、 X_{P2} 、 X_{P3} 及び X_{P4} は、それぞれ独立に、同一又は異なる α -らせんが増強されたアミノ酸である。

【0244】

さらに、PTDドメインは、塩基性残基、例えば、リシン(Lys)又はアルギニン(Arg)を含み、さらに、ドメイン中に「よじれ(kink)」を導入するのに十分な少なくとも1つのプロリン(Pro)残基を含むことができる。このようなドメインの例には、プリオンの導入ドメインが含まれる。例えば、このようなペプチドは、KKRPKPG(配列番号16)を含む。

20

【0245】

一実施形態において、ドメインは、次の配列: $X_P-X_P-R-X_P-(P/X_P)-(B_P/X_P)-B_P-(P/X_P)-X_P-B_P-(B_P/X_P)$ (配列番号17)で表されるペプチドであり、ここで、 X は、 α -らせんを促進する任意の残基、例えばアラニンであり、 P/X_P は、プロリン又は前に定義した通りの X_P であり、 B_P は、塩基性アミノ酸残基、例えば、アルギニン(Arg)又はリシン(Lys)であり、 R はアルギニン(Arg)であり、 B_P/X_P は、上で定義した通りの B_P 又は X_P である。

【0246】

別の実施形態において、PTDは、カチオン性であり、7~10個のアミノ酸からなり、式 $KX_{P1}RX_{P2}X_{P1}$ (配列番号18)を有し、式中、 X_{P1} はR又はKであり、 X_{P2} は任意のアミノ酸である。このようなペプチドの例は、RKKRRQRRR(配列番号1)を含む。別の例で、PTDは、5~15個のアミノ酸にわたって5~10個のアルギニン(及び/又はリシン)残基を有するカチオン性ペプチド配列である。

30

【0247】

本開示によるさらなる送達ドメインは、ほとんど完全長TAT配列(例えば、配列番号1参照)までのTATの少なくともアミノ酸49~56を含むTATフラグメントを含む。TATフラグメントは、フラグメントの α -らせん性を高めるのに十分な1つ以上のアミノ酸の交換を含むことができる。一部の例で、導入されるアミノ酸の交換は、認識されている α -らせんを増すアミノ酸を付加することを含む。別法として、アミノ酸の交換は、TATフラグメントから α -らせんの形成又は安定性を妨げる1つ以上のアミノ酸を除去することを含む。より具体的な実施形態において、TATフラグメントは、少なくとも1つのアミノ酸の α -らせんを増すアミノ酸での置換を含む。典型的には、TATフラグメントは、標準的なペプチド合成技術により作製されるが、一部の事例では、組換えDNAの手法を利用することができる。一実施形態において、置換は、TATフラグメント中の少なくとも2つの塩基性アミノ酸残基が、そのTATフラグメントの少なくとも1つの面に沿って実質上整列されるように選択される。より具体的な実施形態において、置換は、TAT49~56配列中の少なくとも2つの塩基性アミノ酸残基が、その配列の少なくとも1つの面に沿って実質上整列されるように選択される。

40

【0248】

50

本開示の組成物及び方法中で使用できるさらなる導入タンパク質(PTD)は、TATの49～56の配列が、該配列中の少なくとも2つの塩基性アミノ酸がTATフラグメントの少なくとも1つの面に沿って実質上整列されるように修飾されたTATフラグメントを含む。例示的TATフラグメントは、置換が、49～56の配列の塩基性アミノ酸残基を部分及び典型的にはTAT49～56の配列の少なくとも1つの面に沿って整列させる、TATの少なくともアミノ酸49～56における少なくとも1つの指定されたアミノ酸の置換を含む。

【0249】

キメラ性PTDドメインも含まれる。このようなキメラ性PTDは、少なくとも2つの異なる導入タンパク質の部分を含む。例えば、キメラ性PTDは、2つの異なるTATフラグメント、例えば、HIV-1からの1つ及びHIV-2からのもう1つ、又はプリオンタンパク質からの1つ及びHIVからの1つを融合することによって形成することができる。

10

【0250】

PTDを補助部分として、本開示の核酸構築物にヌクレオチド間架橋基、又は3'若しくは5'端で、ホスホルアミデート又はリン酸トリエステルリンカーを使用して連結することができる。例えば、siRNA構築物をPTDに連結するのに、3'-アミノ基を3-炭素リンカーと共に含むsiRNA構築物を利用することができる。siRNA構築物を、ヘテロ二官能性架橋リンカーを介してPTDにコンジュゲートすることができる。

【0251】

PTDを補助部分として、生物可逆性基を介して核酸構築物に結合することができ、それによって、生物可逆性基を、細胞内で、例えば、細胞内酵素(例えば、チオエステラーゼ)によって開裂し、それによってポリヌクレオチドを放出することができる。

20

【0252】

例えば、5'と3'端との間にコンジュゲートされているPTDに加えて、PTDは、本明細書に開示の核酸構築物を含むポリヌクレオチド(例えば、RNA又はDNA)に5'及び/又は3'端で遊離チオール基を介して直接コンジュゲートすることができる。例えば、PTDをポリヌクレオチドに、細胞内酵素(例えば、チオエステル)の作用により開裂させることのできるジスルフィド結合又は官能基などの生物学的に敏感で且つ可逆的な方式によって連結することができる。この手法は、任意の長さのポリヌクレオチドに適用することができ、ポリヌクレオチド(例えば、siRNA)の細胞中への送達を可能にする。ポリヌクレオチドは、また、例えば、1つ以上の送達ドメイン及び/又は塩基性基を含む保護基を含むことができる。いったん細胞内部に入ると、ポリヌクレオチドは、加水分解又はその他の酵素活性(例えば、チオエステラーゼ活性)によって、細胞内条件、例えば、還元性環境に基づいて非保護ポリヌクレオチドに戻る。

30

【0253】

本開示の構築物及び方法中で使用できるペプチドリinkerは、典型的には、約20又は30個までのアミノ酸、一般には約10又は15個までのアミノ酸、さらによりしばしば約1～5個のアミノ酸を含む。リンカー配列は、一般に、単一の固定した立体配置中に融合分子を保持しないような可撓性がある。リンカー配列を使用して、例えばPTDドメインを核酸から間隔をあけることができる。例えば、ペプチドリinker配列を、ペプチド導入ドメインと核酸ドメインとの間に配置して、例えば、分子の可撓性を提供することができる。リンカー部分の長さは、例えば、PTDドメイン融合構築物を含むペプチド又はポリペプチドの生物学的活性を最適化するように選択され、過度な実験なしに経験的に決定することができる。リンカー部分の例は、-Gly-Gly-、GGGS(配列番号19)、(GGGS)_N(配列番号20)、GKSSGSGSESKS(配列番号21)、GSTSGSGKSSEGGK(配列番号22)、GSTSGSGKSSEGGSGSTKG(配列番号23)、GSTSGSGKPGSGEGSTKG(配列番号24)、又はEGKSSGSGSESKEF(配列番号25)である。ペプチド又はポリペプチド連結部分は、例えば、Huston et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. 85:5879, 1988、Whitlow et al., Protein Engineering 6:989, 1993、及びNewton et al., Biochemistry 35:545, 1996中に記載されている。その他の適切なペプチド又はポリペプチドリinkerは、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第4,751,180号及び4,935,233号中に記載されているものである。

40

50

【 0 2 5 4 】

本開示の核酸構築物の送達は、当業者に公知の種々の方法を使用して、細胞を構築物と接触させることによって達成できる。特定の実施形態において、本開示の核酸構築物は、種々の担体、分散剤などと共に、本明細書中の別の場所でより完全に説明されるように製剤化される。

【 0 2 5 5 】

本開示による医薬組成物は、対象に投与するのに適した形態中に本明細書に開示の核酸構築物を含むように、担体、賦形剤、及び添加物又は補助物を使用して調製することができる。頻繁に使用される担体又は補助物としては、炭酸マグネシウム、二酸化チタン、ラクトース、マンニトール及びその他の糖、タルク、乳タンパク質、ゼラチン、デンプン、ビタミン、セルロース及びその誘導体、動植物油、ポリエチレングリコール、並びに滅菌水、アルコール、グリセロール及び多価アルコールなどの溶媒が挙げられる。静脈内ピヒクルは、流体及び栄養補給剤を含む。保存剤としては、抗微生物剤、酸化防止剤、キレート化剤、及び不活性気体が挙げられる。その他の薬学上許容される担体としては、水溶液、その記載内容が参照により本明細書に組み込まれる例えばRemington'Pharmaceutical Sciences及びThe National Formulary、第30版中に記載のような食塩、保存剤、緩衝剤などをはじめとする非毒性賦形剤が挙げられる。医薬組成物の種々の成分のpH及び正確な濃度は、当技術分野の定型的技術により調整される。Goodman and Gilman's, The Pharmacological Basis for Therapeuticsを参照されたい。

【 0 2 5 6 】

本開示による医薬組成物は、局所又は全身で投与することができる。治療有効量は、対象における感染の度合、個体の年齢、性別、及び体重などの因子により変化する。投与レジームは、最良の治療応答を提供するように調整することができる。例えば、いくつかに分割された投与量を毎日投与することができ、或いは、投与量を、治療状況の緊急性によって指示されたように比例的に減らすことができる。

【 0 2 5 7 】

医薬組成物は、注射(例えば、皮下、静脈内、眼窩内など)、経口投与、眼適用、吸入、経皮適用、局所適用、又は直腸投与などにより、簡便な方式で投与することができる。投与経路に応じて、医薬組成物を、医薬組成物を不活化し得る酵素、酸、及びその他の自然条件から医薬組成物を保護するための材料で被覆することができる。医薬組成物は、また、非経口で又は腹腔内で投与することができる。分散剤を、グリセロール、液状ポリエチレングリコール、及びこれらの混合物中で、及び油中で調製することもできる。通常的な貯蔵及び使用条件下で、これらの調合物は、微生物の増殖を防止するための保存剤を含むことができる。

【 0 2 5 8 】

注射可能な用途に適した医薬組成物としては、滅菌水性溶液(水溶性の場合)又は分散液、及び注射可能な滅菌溶液又は分散液の即時調製のための滅菌粉末が挙げられる。該組成物は、典型的には、無菌であり、且つ容易に注射が可能である程度まで流動性である。典型的には、組成物は、製造及び貯蔵の条件下で安定であり、細菌及び真菌などの微生物の汚染作用に対抗して保存される。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液状ポリエチレングリコールなど)、これらの適切な混合物、及び植物油を含む溶媒又は分散媒体でよい。適切な流動性は、例えば、レシチンなどの被覆を使用することによって、分散液の場合には必要な粒径を維持することによって、及び界面活性剤を使用することによって、維持することができる。微生物の作用の防止は、種々の抗菌剤及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどによって達成することができる。多くの場合、等張剤、例えば、糖、マンニトール、ソルビトールなどのポリアルコール、又は塩化ナトリウムが、組成物中で使用される。注射可能な組成物の長期吸収は、組成物中に吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを含めることによって成し遂げることができる。

【0259】

注射可能な滅菌溶液は、所要量の医薬組成物を上で列挙した成分の1種又は組合せと共に適切な溶媒中に組み込み、必要なら、続いて濾過滅菌して、調製することができる。一般に、分散液は、医薬組成物を、基礎的な分散媒体及び上で列挙したもののからの必要とされるその他の成分を含む滅菌ビヒクル中に組み込むことによって調製される。

【0260】

医薬組成物は、例えば、不活性希釈剤又は同化性可食性担体と共に経口で投与することができる。医薬組成物及びその他の成分を、硬質又は軟質の殻型ゼラチンカプセル中に封入し、錠剤に圧縮し、又は対象の食物中に直接組み込むことができる。経口での治療剤投与の場合、医薬組成物を賦形剤と組み合わせ、摂取可能な錠剤、口腔錠、トローチ剤、カプセル剤、エレキシル剤、懸濁剤、シロップ剤、オブラート剤などの形態で 사용할ことができる。このような組成物及び調合物は、少なくとも1重量%の活性化化合物を含むべきである。組成物及び調合物の割合は、もちろん、様々であり、好都合には単位重量の約5%～約80%でよい。錠剤、トローチ剤、丸剤、カプセル剤などは、また、次のもの：トラガカントガム、アラビアガム、コーンスターチ、又はゼラチンなどの結合剤、リン酸二カルシウムなどの賦形剤、トウモロコシデンプン、パレイショデンプン、アルギン酸などの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤、及びスクロース、ラクトース又はサッカリンなどの甘味剤、又はペパーミント、冬緑油、又はチェリー風味料などの香味剤を含むことができる。投与単位形態がカプセル剤である場合、それは、上記の種類の材料に加えて、液状担体を含むことができる。種々のその他の材料が、被覆として、又はそうでなければ投与単位の物理的形態を修正するために存在することができる。例えば、錠剤、丸剤又はカプセル剤を、セラック、糖、又はその双方で被覆することができる。シロップ剤又はエレキシル剤は、薬剤、甘味剤としてのスクロース、保存剤としてのメチル及びプロピルパラベン、色素、及びチェリー又はオレンジ風味などの風味料を含むことができる。もちろん、任意の投与単位形態を調製する際に使用されるいずれの材料も、薬学的に純粋で、且つ採用される量で実質上非毒性であるべきである。さらに、医薬組成物を、徐放性の調合物及び製剤中に組み込むことができる。

【0261】

したがって、薬学上許容される担体とは、溶媒、分散媒体、被覆、抗菌及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤などを包含すると解釈される。薬学上活性のある物質に対するこのような媒体及び薬剤の使用は、当技術分野で周知である。任意の通常的な媒体又は薬剤が該医薬組成物と配合禁忌である範囲を除いて、治療用組成物及び治療方法におけるこれらの使用が想定される。補足的活性化化合物も、組成物中に組み込むことができる。

【0262】

投与の容易性及び投与量の均一性のため、非経口組成物を投与単位形態で製剤化することが、特に有利である。投与単位形態とは、本明細書中で使用する場合、治療予定の対象のための単位投与量として適した物理的に独立した単位を指し、前以て決められた量の医薬組成物を含む各単位は、必要とされる医薬担体と共同して所望の治療効果をもたらすように計算される。本開示の投与単位形態に関する仕様は、該医薬組成物の特徴、及び達成すべき個々の治療効果に関係する。便利で効果的な投与のために、主たる医薬組成物は、有効量で、適切な薬学上許容される担体と共に許容される投与単位中に配合される。補足的活性成分を含む組成物の場合、投与量は、前記成分の通常的な用量及び投与方式を参照して決められる。

【0263】

局所用製剤の場合、基本組成物は、米国食品医薬品局(FDA)によって一般に安全と見なされる(GRAS)ものなどの任意の溶媒系を用いて調製することができる。GRAS溶媒系は、FDAが局所用途に承認している送達ビヒクルとして、ブタン、プロパン、n-ブタン、又はこれらの混合物などの多くの短鎖炭化水素を含む。局所用組成物は、任意の皮膚科学的に許容される担体を使用して製剤化することができる。例示的な担体としては、アルミナ、粘土、微結晶セルロース、シリカ又はタルクなどの固体担体、並びに/或いはアルコール、

グリコール、又は水-アルコール/グリコールのブレンド物などの液状担体が挙げられる。化合物は、また、化合物が皮膚に侵入するのを可能にするリポソーム製剤で投与することができる。このようなリポソーム製剤は、米国特許第5,169,637号、5,000,958号、5,049,388号、4,975,282号、5,194,266号、5,023,087号、5,688,525号、5,874,104号、5,409,704号、5,552,155号、5,356,633号、5,032,582号、4,994,213号、及びPCT公開第W096/40061号中に記載されている。その他の適切なビヒクルの例は、米国特許第4,877,805号、米国特許第4,980,378号、米国特許第5,082,866号、米国特許第6,118,020号、及び欧州特許公開第0586106A1号中に記載されている。本開示の適切なビヒクルとしては、また、ミネラルオイル、ペトロラタム、ポリデセン、ステアリン酸、ミリスチン酸イソプロピル、ステアリン酸ポリオキシル40、ステアリルアルコール、又は植物油を挙げることができる。

10

【0264】

局所用組成物は、任意の有用な形態で提供され得る。例えば、本開示の組成物は、溶液剤、乳剤(ミクロ乳剤を含めて)、懸濁剤、クリーム剤、発泡剤、ローション剤、ゲル剤、散剤、パルム剤、或いは該組成物を使用できる皮膚又はその他の組織へ適用するのに使用されるその他の典型的な固形、半固形、又は液状組成物として製剤化することができる。このような組成物は、このような製品中で典型的に使用されるその他の成分、例えば、着色剤、香料、増粘剤、抗微生物剤、溶媒、界面活性剤、洗浄剤、ゲル化剤、酸化防止剤、充填剤、色素、粘度調節剤、保存剤、湿潤剤、皮膚軟化剤(例えば、天然若しくは合成油、炭化水素油、ワックス、又はシリコーン)、水和剤、キレート化剤、緩和剤、可溶化用賦形剤、アジュバント、分散剤、皮膚浸透増強剤、可塑化剤、保存剤、安定剤、解乳化剤、湿潤化剤、日焼け止め剤、乳化剤、保湿剤、収斂剤、脱臭剤を含むことができ、且つ任意選択で、麻酔薬、抗痒み剤、植物エキス、コンディショニング剤、暗色化又は明色化剤、光輝剤、湿潤剤、マイカ、鉱物、ポリフェノール、シリコーン又はその誘導体、日光遮断剤、ビタミン、及び植物薬剤を含むことができる。

20

【0265】

一部の製剤において、組成物は、眼への適用のために製剤化される。例えば、眼適用のための医薬製剤は、本明細書に記載のようなポリヌクレオチド構築物を、例えば、最大で99重量%までの量で、水、緩衝液、生理食塩水、グリシン、ヒアルロン酸、マンニトールなどの生理学的に許容される眼用担体媒体と混合されて含むことができる。眼への送達の場合、本明細書に記載のようなポリヌクレオチド構築物を、眼科学上許容される保存剤、共溶媒、界面活性剤、粘度増強剤、浸透増強剤、緩衝剤、塩化ナトリウム、又は眼用の水性滅菌懸濁液若しくは溶液を形成するための水と組み合わせることができる。眼用の溶液製剤は、ポリヌクレオチド構築物を生理学上許容される等張性水性緩衝液中に溶解することによって調製することができる。さらに、眼用溶液は、阻害薬を溶解するのを助けるために、眼科学上許容される界面活性剤を含むことができる。ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、メチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどの粘度構築剤を本開示の組成物に添加して、化合物の滞留を改善することができる。

30

【0266】

局所用組成物は、熟練した臨床医の定型的な裁量により、例えば1日に1~4回で、或いは毎日1回、毎週1回、2週に1回、毎月1回、又はより長いなどの長期送達スケジュールに基づき、眼の表面に送達することができる。製剤のpHは、約pH4~9、又は約pH4.5~pH7.4の範囲でよい。

40

【0267】

本開示の核酸構築物の場合、適切な薬学上許容される塩としては、(i)ナトリウム、カリウム、アンモニウム、マグネシウム、カルシウムなどのカチオン、スペルミン及びスペルミジンなどのポリアミンなどで形成される塩、(ii)無機酸、例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、硝酸などで形成される酸付加塩、(iii)例えば、酢酸、シュウ酸、酒石酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、グルコン酸、クエン酸、リンゴ酸、アスコルビン酸、安息香酸、タンニン酸、パルミチン酸、アルギン酸、ポリグルタミン酸、ナフタレンスルホン酸、メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、ナフタレンジスルホン酸、ポリ

50

ガラクトロン酸などの有機酸で形成される塩、及び(iv)塩素、臭素、及びヨウ素などの元素アニオンから形成される塩が挙げられる。

【0268】

本明細書に記載の核酸構築物は、標的細胞に送達するために担体の使用を必要としないこともあるが、担体の使用は、一部の実施形態で有利である可能性がある。したがって、標的細胞に送達するために、本開示の核酸構築物を担体に非共有結合で結合して、複合体を形成することができる。担体を使用して、送達後の体内分布を変え、取り込みを増強し、ポリヌクレオチドの半減期又は安定性を増加させ(例えば、ヌクレアーゼ抵抗性を改善し)、且つ/又は特定の細胞若しくは組織型への標的指向性を増加することができる。

【0269】

例示的な担体としては、縮合剤(例えば、イオン性又は静電相互作用を介して核酸を誘引する又は核酸に結合する能力のある薬剤)、膜融合剤(例えば、細胞膜に融合する及び/又は細胞膜を通して輸送される能力のある薬剤)、特定の細胞又は組織型を標的にするタンパク質(例えば、甲状腺刺激ホルモン、メラニン刺激ホルモン、レクチン、糖タンパク質、界面活性タンパク質A、又は任意のその他のタンパク質)、脂質、リポ多糖、脂質ミセル又はリポソーム(例えば、ホスホチジルコリンなどのリン脂質、脂肪酸、糖脂質、セラミド、グリセリド、コレステロール、又はこれらの任意の組合せから形成される)、ナノ粒子(例えば、シリカ、脂質、炭水化物、又はその他の薬学上許容されるポリマー性ナノ粒子)、カチオン性ポリマー及びアニオン性薬剤(例えば、CRO)から形成されるポリプレックス(polyplex)(ここで、例示的なカチオン性ポリマーとしては、ポリアミン(例えば、ポリリシン、ポリアルギニン、ポリアミドアミン、及びポリエチレンジアミン)が挙げられる)、コレステロール、デンドリマー(例えば、ポリアミドアミン(PAMAM)デンドリマー)、血清タンパク質(例えば、ヒト血清アルブミン(HSA)又は低密度リポタンパク質(LDL))、炭水化物(例えば、デキストラン、プルラン、キチン、キトサン、イヌリン、シクロデキストリン、又はヒアルロン酸)、脂質、合成ポリマー(例えば、ポリリシン(PLL)、ポリエチレンジアミン、ポリ-L-アスパラギン酸、ポリ-L-グルタミン酸、スチレン-無水マレイン酸コポリマー、ポリ(L-ラクチド-co-グリコール酸)コポリマー、ジビニルエーテル-無水マレイン酸コポリマー、N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミドコポリマー(HMPA)、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリビニルアルコール(PVA)、ポリウレタン、ポリ(2-エチルアクリル酸)、N-イソプロピルアクリルアミドポリマー、プソイドペプチド-ポリアミン、ペプチド模擬ポリアミン、又はポリアミン)、カチオン性部分(例えば、カチオン性脂質、カチオン性ポルフィリン、ポリアミンの第四級塩、又は α -らせんペプチド)、多価糖(例えば、多価ラクトース、多価ガラクトース、N-アセチル-ガラクトサミン、N-アセチル-グルコサミン、多価マンノース、又は多価フコース)、ビタミン(例えば、ビタミンA、ビタミンE、ビタミンK、ビタミンB、葉酸、ビタミンB12、リボフラビン、ビオチン、又はピリドキサル)、補因子、又は細胞骨格を崩壊させて取り込みを増加させるための薬物(例えば、タキソール、ビンクリスチン、ビンブラスチン、シトカラシン、ノコダゾール、ジャブラキノリド、ラトルンクリンA、ファロイジン、スウィンホリドA、インダノシン、又はミオセルペン)が挙げられる。

【0270】

本明細書に記載のようなその他の治療剤を、本開示の医薬組成物中に、本開示の核酸構築物と組み合わせて含めることができる。

【0271】

本開示は、本明細書に開示の核酸構築物(例えば、RNA、DNA、修飾された塩基を含む核酸、その他のアニオン性核酸など)を送達するための組成物及び方法を提供する。本開示は、したがって、遺伝子又はタンパク質の発現に対して調節効果を発揮する非コード核酸構築物を送達するのに有用な方法及び組成物を提供する。

【0272】

RNA干渉(RNAi)は、それによってメッセンジャーRNA(mRNA)が、発現を抑制されるべき標的遺伝子の配列と同一又は極めて類似のヌクレオチド配列を含む二重鎖RNA(dsRNA)に由来

10

20

30

40

50

する小さな干渉性RNA(siRNA)によって分解される過程である。この過程は、標的遺伝子によってコードされたタンパク質の産生を、転写後で翻訳前の操作を介して妨害する。したがって、優性疾患遺伝子又はその他の標的遺伝子の発現抑制を完遂することができる。

【0273】

インビボでのRNAiは、dsRNAが、ダイサー、dsRNAエンドリボヌクレアーゼと呼ばれる酵素によって短い干渉性RNA(siRNA)に開裂される過程によって進行し(Bernstein et al., 2001, Hamilton & Baulcombe, 1999, Science 286:950, Meister and Tuschl, 2004, Nature 431, 343~9)、かくして、当初の1つのdsRNAから多数の分子が生じる。siRNAは、触媒的活性化及びmRNA標的特異性の双方をもたらす多量体RNAiサイレンシング複合体(RISC)中に装填される(Hannon and Rossi, Nature 431, 371~378, 2004, Novina and Sharp, Nature 430, 161~164, 2004)。RISC中へのsiRNAの装填中に、アンチセンス又はガイド鎖は、siRNAから分離され、アルゴノート-2(Ago2)、RISC触媒サブユニット中に合体して留まる(Leuschner et al., EMBO Rep. 7, 314~320, 2006)。核から細胞質中に転送されたmRNAは、リボソームに到着する前に活性化されたRISCを通過し、それによって転写後で翻訳前の遺伝子発現の指向性調節を可能にすると考えられる。理論上、それぞれ及びあらゆる細胞内mRNAを、選択的RNAi応答の誘導によって調節することができる。

【0274】

21~23塩基対のsiRNAが哺乳動物細胞中でRNAi応答を効率的に誘導する能力は、現在、決まっている(Sontheimer, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 6, 127~138, 2005)。siRNAに関する IC_{50} は、10~100pMの範囲にあり、1~10nM範囲の IC_{50} 値を有する最良の薬物より有意に小さい。したがって、その鋭敏な選択性のため、RNAiは、細胞表現型の指向性操作、遺伝経路のマッピング、治療標的の発見及び検証のための礎石になり、重要な治療的潜在能力を有する。

【0275】

RNAiの態様は、(1)単鎖アンチセンスRNAではなく、dsRNAが干渉性薬剤であること、(2)過程が、高度に特異的であり、且つ著しく強力である(効果的な干渉に要求される、細胞当たりのdsRNA分子はほんの少数である)こと、(3)干渉活性(及び多分dsRNA)が、導入部位から遠く移された細胞及び組織中で干渉を引き起こすことができることを含む。しかし、dsRNAの効果的な送達には困難である。例えば、13,860ダルトンの分子量を有する21塩基対のdsRNAは、(1)大きさ及び(2)RNAの極度に負の(酸性)電荷のため、細胞膜を通り抜けて細胞質に侵入することができない。本開示により提供される方法及び組成物は、dsRNAなどの核酸構築物の細胞中への送達を、電荷中和及び取込みの改善を介して可能にする。

【0276】

標的遺伝子のヌクレオチド配列に対して相補的であるsiRNA配列を含むdsRNAは、任意の数の方法で調製することができる。siRNA配列を確認するための方法及び技術は当技術分野で公知である。siRNAヌクレオチド配列は、National Center for Biotechnology Informationウェブサイトからの受託番号又はGI番号(World Wide Web上でncbi.nlm.nih.govで入手可能)を提供した後に、siRNA選別プログラム、Whitehead Institute for Biomedical Research, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge、マサチューセッツ州(現在、<http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/>で利用可能、括弧はハイパーリンクを解除するために付加されていることに注意)から得ることができる。別法として、適切なsiRNA配列を含むdsRNAは、宮岸及び多比良(2003)の戦略を使用して確かめることができる。市販のRNAi設計者アルゴリズムも存在する(<http://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaipress/>)。RNAを調製して配列することは、商業的に利用可能である。

【0277】

本開示の核酸構築物は、また、mRNAの開裂を誘導するためのmiRNAとして作用することができる。別法として、本開示の核酸構築物は、RNアーゼによる開裂を誘導するための、又は翻訳を立体的に遮断するための、mRNAに結合するアンチセンス剤として作用することができる。

【0278】

10

20

30

40

50

本開示の核酸構築物を細胞中に輸送することのできる例示的な方法を、本明細書中で説明する。

【0279】

種々の疾患及び障害を、本開示の核酸構築物を使用して治療することができる。例えば、腫瘍細胞の増殖を、抗腫瘍性siRNAの送達により阻害、抑制、又は撲滅することができる。例えば、抗腫瘍性siRNAは、血管新生を促進するポリペプチドをコードする遺伝子を標的としたsiRNAでよい。腫瘍増殖に関連した種々の血管新生タンパク質が当技術分野で公知である。したがって、本明細書に記載の核酸構築物を、抗増殖性障害(例えば、がん)、ウイルス感染症、及び遺伝性疾患などの疾患の治療で使用する事ができる。本開示に基づくポリヌクレオチドを使用して治療することのできるその他の疾患は、加齢性黄斑変性などの眼障害(例えば、米国特許第7,879,813号及び米国特許出願公開第2009/0012030号に記載のような)及び乾癬などの局所障害である。

10

【0280】

有効量を含む組成物を、予防又は治療処置のために投与することができる。予防的適用では、組成物を、がん又は本明細書に記載の任意の疾患に対する臨床的に判定された素因、又は感受性の増加を伴う対象に投与することができる。本開示の組成物は、対象(例えば、ヒト)に、臨床的疾患の開始を遅延、減弱、又は予防するのに十分な量で投与することができる。治療的適用において、組成物は、疾患(例えば、白血病又は骨髓異形成症候群などのがん)を既に患っている対象(例えば、ヒト)に、状態の症状及びその合併症を治癒、又は少なくとも部分的に停止させるのに十分な量で投与される。

20

【0281】

この用途に有効な量は、疾患又は状態の重症度、並びに対象の体重及び一般的状態に依存する可能性があるが、一般には、対象当たり1回の投与につき約0.05 µg ~ 約1000 µg(例えば、0.5 ~ 100 µg)の等価薬剤量の範囲である。初期投与及び追加投与に適したレジームは、初回投与、それに続く後続投与と1時間、1日、1週間、又は1か月の1つ又は複数の間隔での反復投与で代表される。本開示の組成物中に存在する薬剤の全有効量を、ボラスとしての、又は比較的短時間にわたる点滴による単回投与として、哺乳動物に投与することができ、或いは多回用量をより長時間にわたって(例えば、4 ~ 6時間毎、8 ~ 12時間毎、14 ~ 16時間毎、18 ~ 24時間毎、2 ~ 4日毎、1 ~ 2週間毎、及び月1回の用量)投与する細分化された治療プロトコルを使用して投与することができる。別法として、治療有効血中濃度を維持するのに十分な連続静脈内点滴が想定される。

30

【0282】

本開示の組成物内に存在し、本開示の方法中で使用され、哺乳動物(例えば、ヒト)に適用される1種以上の薬剤の治療有効量は、当業者が、哺乳動物の年齢、体重及び状態の個体差を考慮して決定することができる。有効量を含む本開示の組成物の単回又は多回投与は、治療する医師によって選択される用量レベル及びパターンで実施することができる。用量及び投与スケジュールは、臨床医によって一般的に実施される方法又は本明細書に記載の方法による治療過程中に観察できる、対象における疾患又は状態の重症度に基づいて決定及び調整することができる。

40

【0283】

本開示の1種以上の核酸構築物を、通常的な治療方法又は療法と組み合わせて使用することができ、或いは通常的な治療方法又は療法とは別個に使用することができる。

【0284】

本開示の1種以上の核酸構築物を他の薬剤との併用療法で投与する場合、それらは、逐次的又は同時に個体に投与され得る。別法として、本開示による医薬組成物は、本開示の核酸構築物の、本明細書に記載のような薬学上許容される賦形剤、及び当技術分野で公知の別の治療又は予防薬剤と一緒に組合せからなることができる。

【0285】

[実施例]

RNNオリゴヌクレオチドの一般的な合成及び精製

50

以下の実施例において、本開示の核酸構築物は、RNN、又はリボ核酸中性体(ribonucleic neutral)と呼ばれる。本開示のポリヌクレオチド構築物は、本明細書に記載の一般化された具体的な方法及びスキームにより調製することができる。例えば、カルボン酸を含む出発原料を、チオールアルコールと縮合させ(例えば、図1、上段パネル左参照)、次いで、ヌクレオシドホスホルジアミダイトと反応させてRNNヌクレオチド構築物を生じさせた(例えば、図1、上段パネル中央参照)。次いで、これらのRNNヌクレオチド構築物を標準的なオリゴヌクレオチド合成プロトコールで使用して、RNNポリヌクレオチド構築物を形成した。次いで、これらのRNNポリヌクレオチド構築物を脱保護し、HPLCで精製し(例えば、図1、下段パネル左参照)、MALDI-TOF質量分光法により分析した(例えば、図1、下段パネル中央を参照)。20個のリン酸基を含む21merのポリヌクレオチドの15%変性PAGEゲル(メチレンブルーで染色)を通る移動速度は、アニオン性リン酸基がリン酸トリエステル基として中和されるにつれて、ますます累進的に遅くなった(例えば、図1、下段パネル右参照)。RNNポリヌクレオチド構築物上の中性リン酸トリエステル基の数の増加は、主として電荷の喪失により、より遅い移動をもたらし、16個のリン酸トリエステル基の付加後に至って、RNNポリヌクレオチドは、ゲルに侵入するのに十分な残存ホスホジエステルの負電荷を有さなかった(例えば、図1、下段パネル右参照)。

10

【0286】

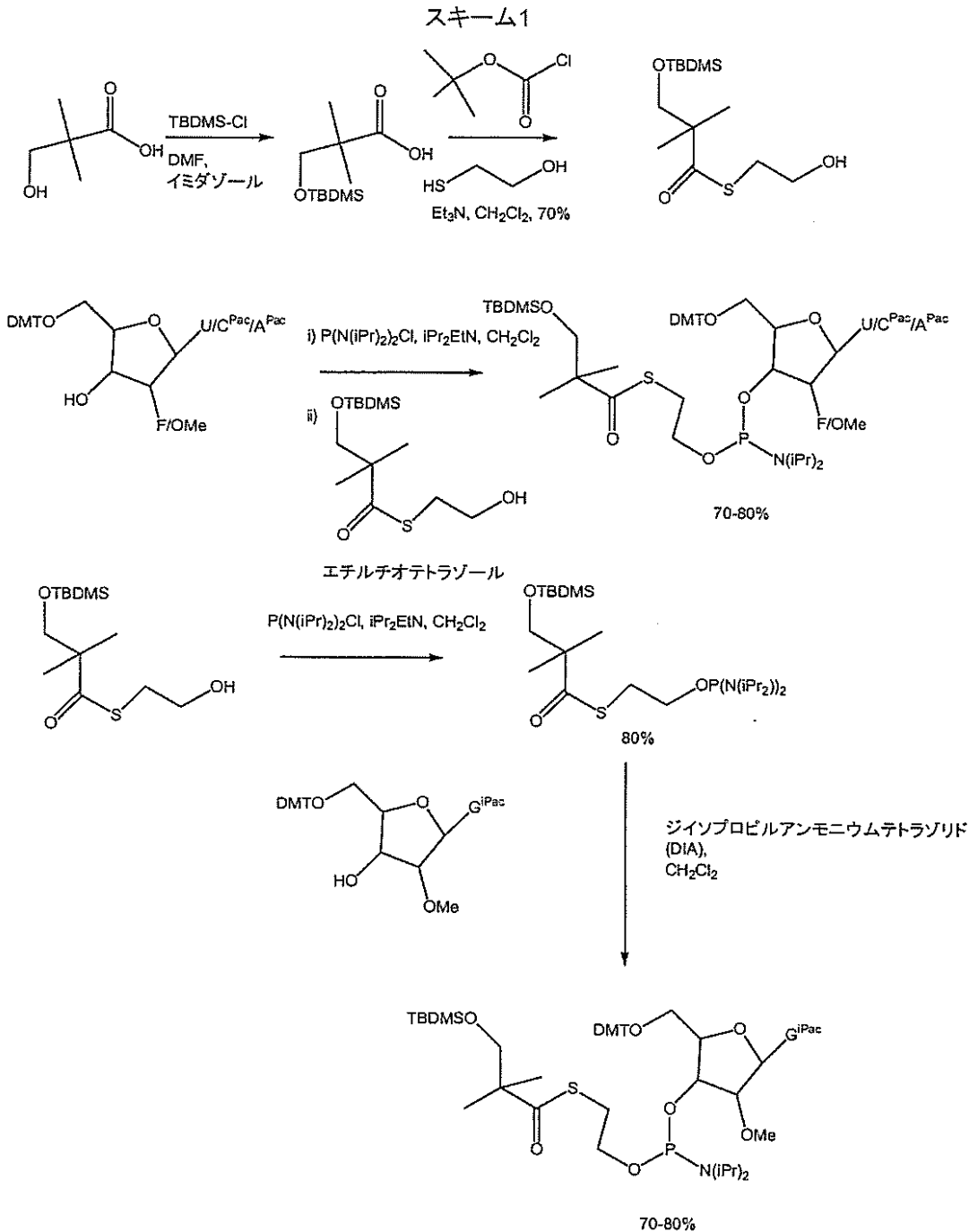
RNN核酸構築物の具体的な合成及び精製

本明細書に記載の方法中で使用できるヌクレオチド構築物の例示的な合成を、スキーム1に示す。

20

【0287】

【化 4 6】



【0288】

スキーム1は、本明細書に記載のポリヌクレオチド構築物を調製するのに使用できる、ヌクレオチド構築物を調製するための2つの代替経路を示す。1つの経路は、保護されたヌクレオシドの、 $P(N(iPr)_2)_2Cl$ 、それに続くS-アシルチオエタノール(SATE)試薬での逐次的処理を採用する。別法として、保護されたヌクレオシドを、前以て形成されたチオホスホルアミダイト試薬で処理することができる。

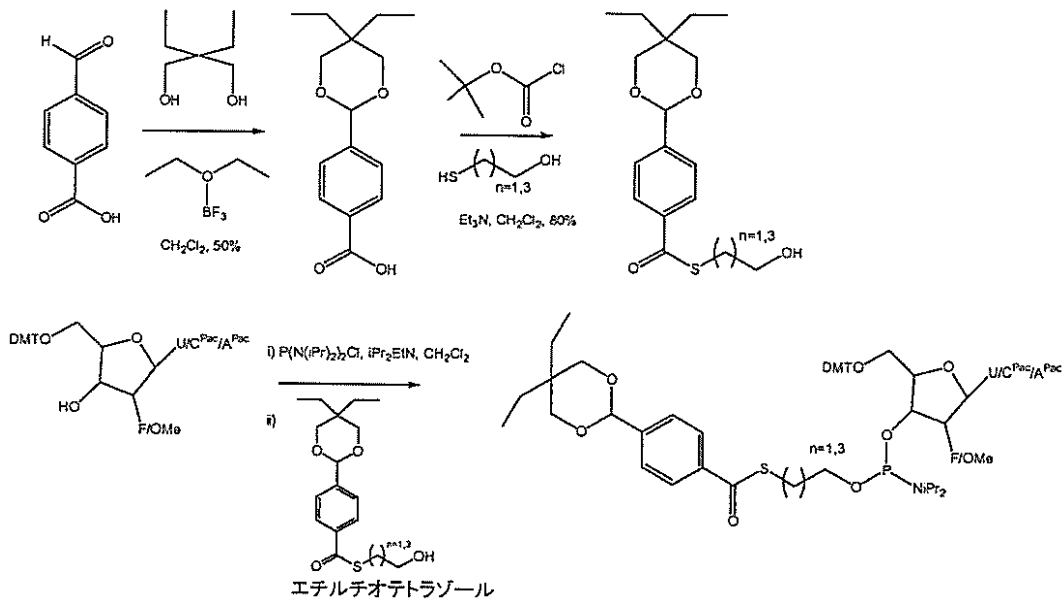
【0289】

アルデヒドSATE、並びに類似のプロピル及びブチル(SATB)ホスホルアミダイトの合成は、スキーム2に概略的に示すように同様に進めることができる。

【0290】

【化 4 7】

スキーム2



10

【 0 2 9 1】

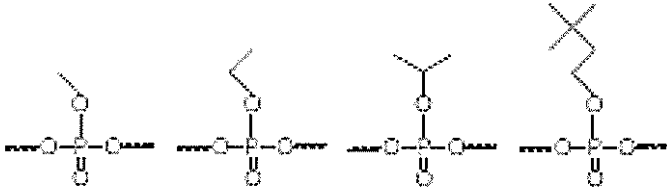
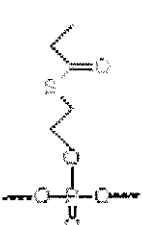
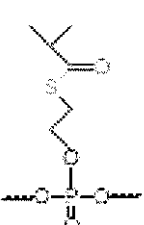
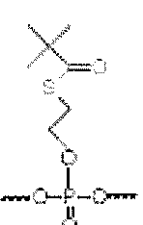
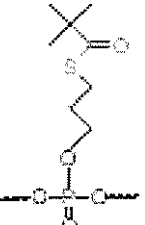
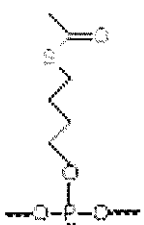
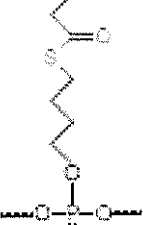
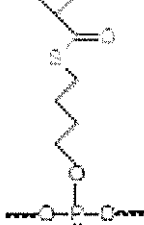
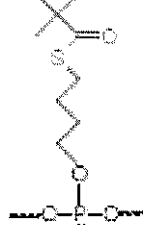
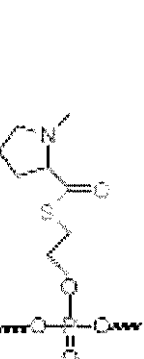
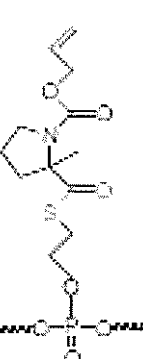
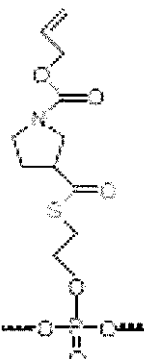
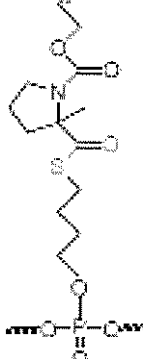
次いで、ホスホルアミダイトを使用して、生物可逆性であってもなくてもよい、対応するトリエステル基を調製することができる。調製され研究された例示的なトリエステル基を表4に示すが、特記しない限り、表4に例示されるトリエステル基のすべては、生物可逆性である。

20

【 0 2 9 2】

【表 4】

表4

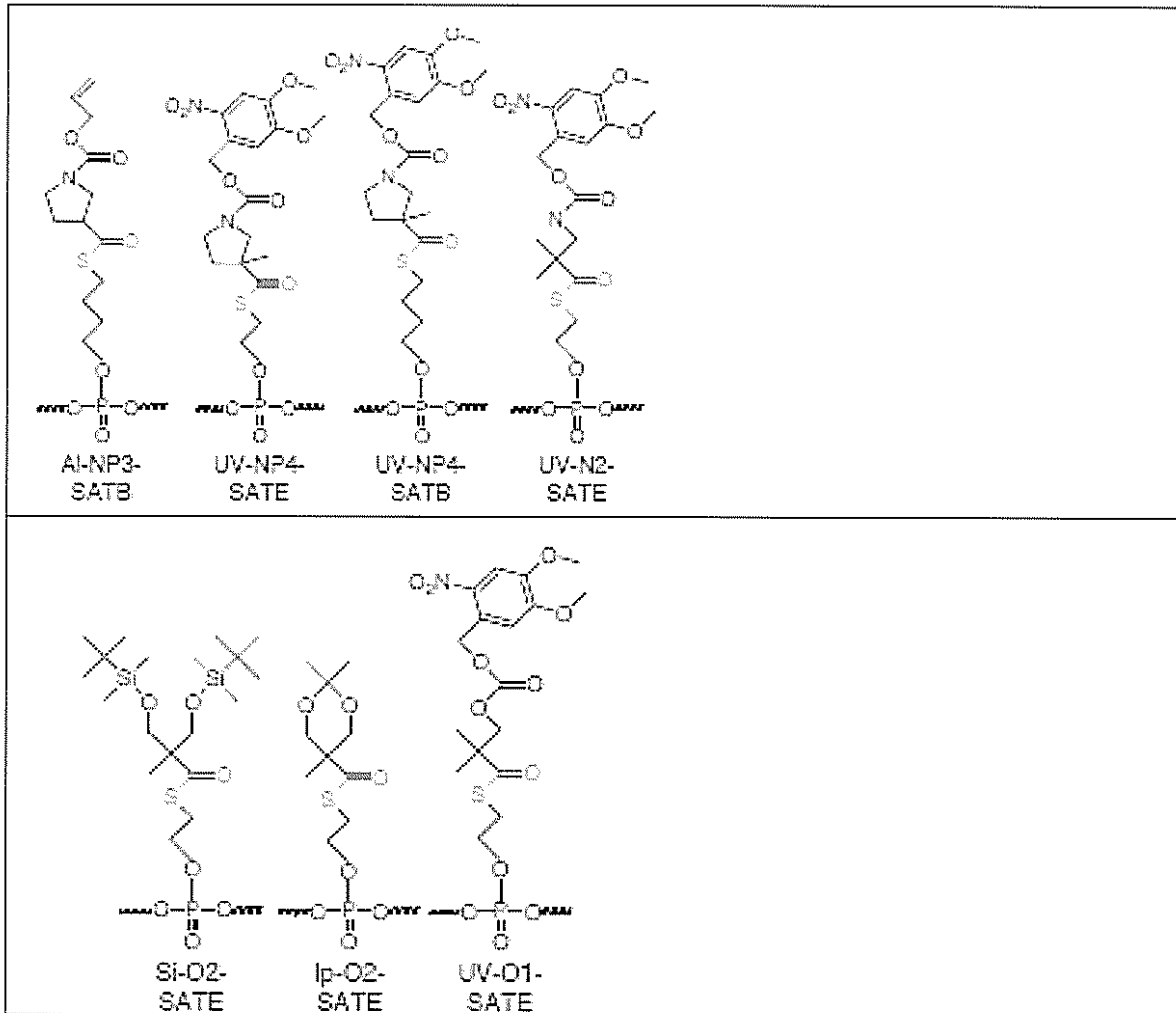
 メチル エチル イソプロピル DMB 非可逆性トリエステル				
 Me-SATE	 Et-SATE	 Isp-SATE	 tBu-SATE	 tBu-SATP
 Me-SATB	 Et-SATB	 Isp-SATB	 tBu-SATB	
 NP1-SATE	 Al-NP2-SATE	 Al-NP3-SATE	 Al-NP2-SATB	

10

20

30

40



10

20

30

40

50

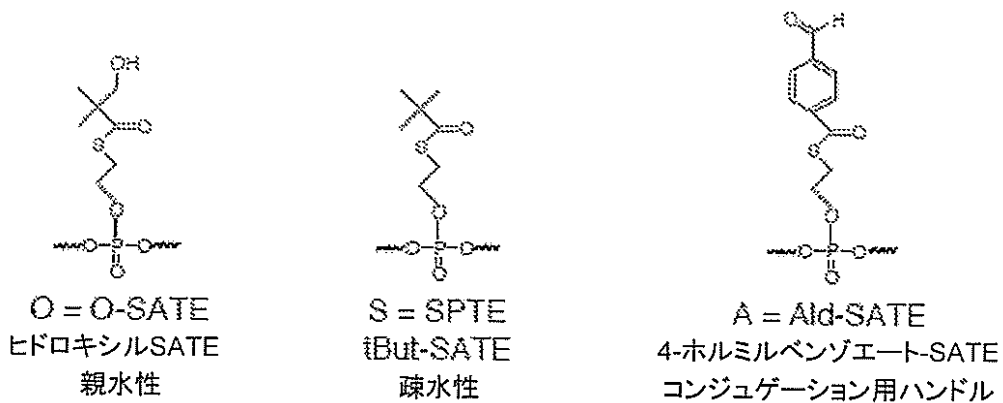
【 0 2 9 3 】

さらに、1つ以上の保護基を含む表4中の任意の生物可逆性トリエステル基、例えば、Si-O2-SATEの場合、本開示は、また、それらの脱保護形態で存在するこれらの生物可逆性トリエステル基を提供する。例えば、本明細書に開示のホスホルアミダイト法を使用して、保護されたヌクレオチド構築物を調製することができ、該構築物は、オリゴ合成及び脱保護の後に、所望のポリヌクレオチド構築物を提供することができる。スキーム3に示す生物可逆性チオエステルを含む例示的な核酸構築物が調製された。

【 0 2 9 4 】

【 化 4 8 】

スキーム3



【 0 2 9 5 】

この方法で調製された核酸構築物は、種々の分析方法、例えば、HPLC、質量分光法、NMR、及びゲル分析によって特徴付けることができる。

【0296】

本開示のさらなる他の例示的な核酸構築物が、本明細書に記載の方法により調製され、図2A~2Lに、これらの合成を裏付ける分析データと共に示される。

【0297】

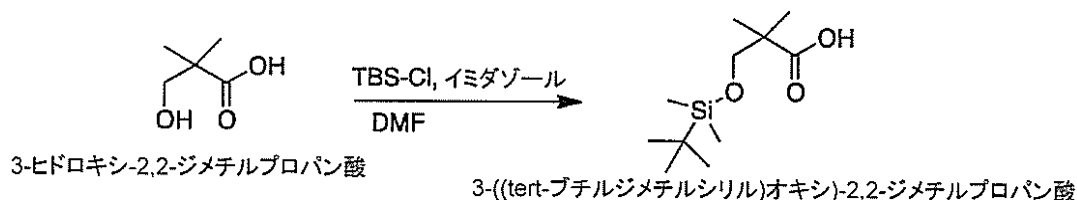
TBSOSATEの合成

反応1:

【0298】

【化49】

10



3-ヒドロキシ-2,2-ジメチルプロパン酸(5g、42.4ミリモル)及びイミダゾール(7.2g、106ミリモル)をジメチルホルムアミド(DMF)(10ml)に溶解した。次いで、溶液に、DMF(8ml)中tert-ブチルジメチルシリルクロリド(TBS-Cl)(7.6g、51ミリモル)を15分にわたって徐々に添加した。生じた混合物を12時間撹拌し、水(10ml)を添加して反応を止めた。生じた生成物を、EtOAc/水(250ml:250ml)での抽出によって単離した。酢酸エチル層を水(3×250ml)で洗浄し、次いでEtOAcを真空下で蒸発させて、粗混合物を得た。粗混合物を、1M NaOH(10ml)及び水(40ml)中に溶解した。不溶性不純物をEtOAcでの抽出によって除去した後、水層を1M HCl(40ml)で中和した。生じた生成物を、EtOAc(250ml)で抽出し、ブライン(2×200ml)で洗浄し、無水Na₂SO₄上で乾燥した。溶媒を真空下で蒸発させて、3-((tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)-2,2-ジメチルプロパン酸を得た(収率82%、8g)。これを、さらなる精製なしで次の反応に使用した。

20

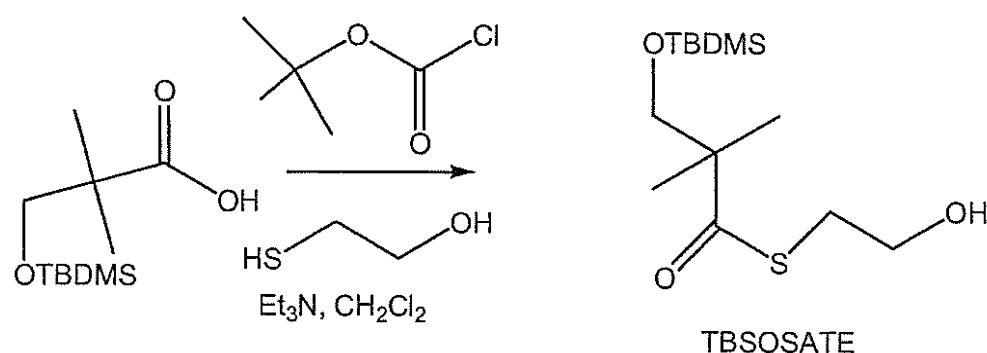
【0299】

反応2:

【0300】

【化50】

30



40

ジクロロメタン(CH₂Cl₂)(120ml)中3-((tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)-2,2-ジメチルプロパン酸(4.2g、18ミリモル)をドライアイス中で冷却する際に、クロロギ酸イソブチル(2.36ml、18ミリモル)及びトリエチルアミン(Et₃N)(2.5ml、18モル)を10分間にわたって滴加した。生じた混合物をドライアイス浴中で10分間撹拌し、次いで外界温度で30分間撹拌した。その後、Et₃N(2.5ml)及びβ-メルカプトエタノール(36ミリモル、2.5ml)を添加した。混合物を外界温度で2.5時間撹拌した。NaHCO₃飽和溶液(30ml)で反応を止めた後、有機層を単離し、無水Na₂SO₄上で乾燥した。溶媒を真空下で蒸発させ、次いで、生じた粗混合物を、Combi Flash Rf装置での0~30%ヘキサン:酢酸エチルをグラジエントで使用するシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製して、TBSOSATEを得た(収率78%、4g)

50

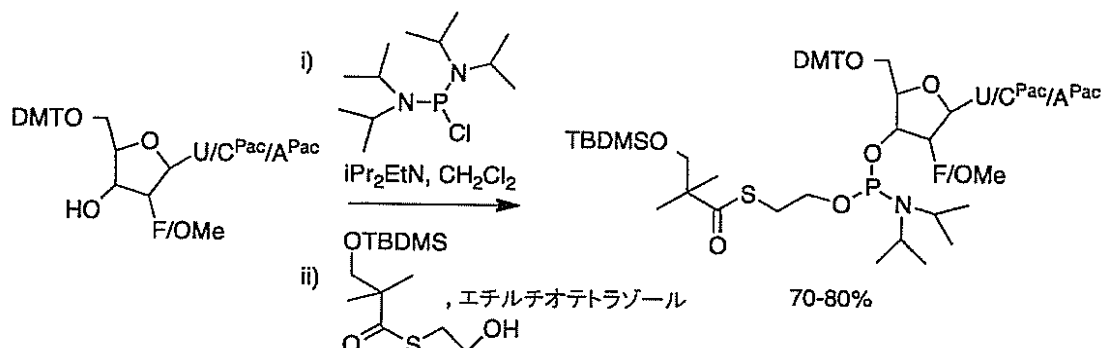
^1H NMR (400 MHz) δ 0.01(s, 6H), 0.8(s, 9H), 1.2 (s, 6H), 1.9 (s, 1H), 3.0 (t, 2H), 3.6(s, 2H), 3.7 (m, 2H). ESI MS: $\text{C}_{13}\text{H}_{28}\text{O}_3\text{SSi}$ 計算値292.15 実測値 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 293.17, $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 310.16, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 315.17. TBSOSATEに関する代表的なスペクトルを図2Aに示す。

【0301】

TBSOSATEホスホルアミダイトの合成

【0302】

【化51】



10

ビス-(N,N-ジイソプロピルアミノ)-クロロホスフィン(1g、4ミリモル)の乾燥 CH_2Cl_2 (5ml)中溶液を、5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-F-ウリジン(2g、3.64ミリモル)とN,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.71ml、0.4ミリモル)との、磁気攪拌され、冷却された乾燥 CH_2Cl_2 (24ml)中溶液(-78℃)に滴加した。攪拌を1~1.5時間継続しながら、反応混合物を外気温度に温めた。乾燥 CH_2Cl_2 (5ml)中TBSOSATE(1g、4ミリモル)を分割添加した後、反応混合物を10分間攪拌した。次いで、反応混合物にエチルチオテトラゾール(7.3ml、アセトニトリル中0.25M溶液、1.82ミリモル)を添加した。反応混合物を4~6時間攪拌し、次いで CH_2Cl_2 (60ml)を添加した。反応混合物を、炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(20ml)及びブライン(2×20ml)で洗浄し、次いで無水硫酸ナトリウム上で乾燥した。溶媒を真空下で蒸発させ、生じた粗残留物を、combiflash Rf装置で溶媒としてヘキサン:酢酸エチル(0.5%TEA)を使用するシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーで精製した。生成物を含む画分を集め、一緒にして、次いで蒸発乾固した。生じた発泡性残留物をベンゼンに再溶解し、凍結し、凍結乾燥し、無色粉末としてTBSOSATE_Uを得た(ジアステレオマー混合物として収率80%、2.8g)。ESI MS: $\text{C}_{49}\text{H}_{69}\text{FN}_3\text{O}_{10}\text{PSSi}$ 計算値969.42, 実測値 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 969.89, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 992.29. ^{31}P NMR (121 MHz, CDCl_3) δ 150.21 (d, $J_{\text{P-F}} = 7.9$ Hz), 150.53 (d, $J_{\text{P-F}} = 8.5$ Hz). TBSOSATE_Uに関する代表的なスペクトルを図2B及び図2Dに示す。

20

30

【0303】

TBSOSATE_{C^{Pac}}ホスホルアミダイトの合成

TBSOSATE_{C^{Pac}}ホスホルアミダイトは、5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-F-ウリジンを5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-F-C^{Pac}に代えたこと以外は、本明細書に開示のTBSOSATE_Uホスホルアミダイトのためのプロトコールに従って合成した。TBSOSATE_{C^{Pac}}は、70%の収率で単離された。ESI MS: $\text{C}_{57}\text{H}_{76}\text{FN}_4\text{O}_{11}\text{PSSi}$ 計算値1102.47, 実測値 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1125.9, $[\text{M}+\text{K}]^+$ 1141.62. ^{31}P NMR (121 MHz, CDCl_3) δ 150.18 (d, $J_{\text{P-F}} = 8.4$ Hz), 150.43 (d, $J_{\text{P-F}} = 8.7$ Hz). TBSOSATE_{C^{Pac}}に関する代表的なスペクトルを図2C及び図2Dに示す。

40

【0304】

TBSOSATE_{A^{Pac}}ホスホルアミダイトの合成

TBSOSATE_{A^{Pac}}ホスホルアミダイトは、5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-F-ウリジンを5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-F-A^{Pac}に代えたこと以外は、本明細書に開示のTBSOSATE_Uホスホルアミダイトのためのプロトコールに従って合成した。TBSOSATE_{A^{Pac}}は、70%の収率で単離された。ESI MS: $\text{C}_{59}\text{H}_{79}\text{N}_6\text{O}_{11}\text{PSSi}$ 計算値1138.503, 実測値 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1139.6, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1161.65. ^{31}P NMR (121 MHz, CDCl_3) δ 149.88及び150.53. TBSOSATE_{A^P}

50

^acに関する代表的なスペクトルを図2C及び図2Eに示す。

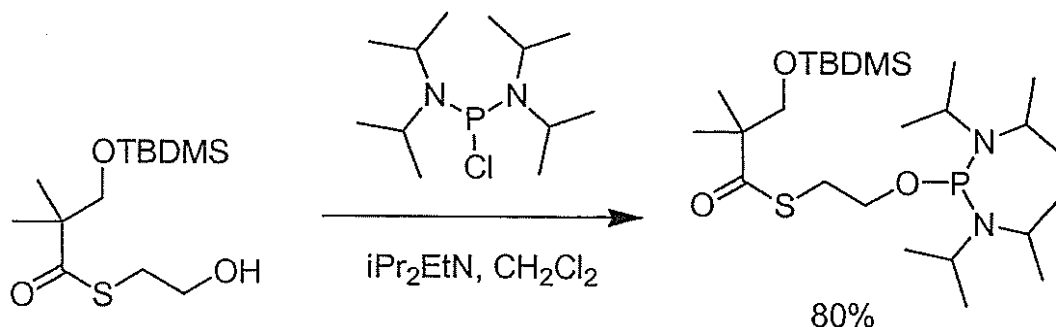
【0305】

TBSOSATE_GⁱPacの合成

反応1:

【0306】

【化52】



10

ビス-(N,N-ジイソプロピルアミノ)-クロロホスフィン(1.75g、6.6ミリモル)の乾燥CH₂Cl₂(5ml)中溶液を、TBSOSATE(1.6g、5.5ミリモル)とN,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.71ml、6.6ミリモル)との、磁気攪拌され、冷却された乾燥CH₂Cl₂(15ml)中溶液(-78℃)に滴加した。攪拌を-78℃で1時間継続した。溶媒を真空下で蒸発させた。次いでヘキサン(50ml)を添加すると、副生物ジイソプロピルエチル塩酸塩の白色沈殿物が生じた。沈殿物をアルゴン雰囲気下で濾過した。濾液を真空下で蒸発させて、約3gの粗TBSOSATEテトライソプロピルホスホルアミダイトを得た。これを、さらなる精製なしで次の反応に使用した。³¹P NMR (121 MHz, CDCl₃) δ 125 ppm.

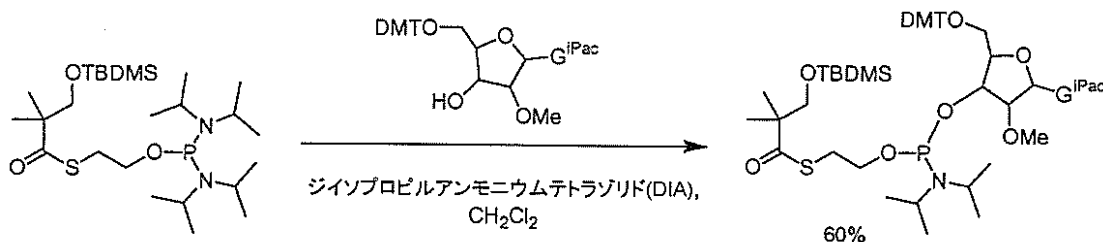
20

【0307】

反応2:

【0308】

【化53】



30

ジメトキシトリチル-2'-OMe-イソプロピルフェノキシアセチル-グアノシン(1g、1.3ミリモル)とジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド(0.22g、1.3ミリモル)との乾燥CH₂Cl₂(15ml)中溶液に、TBSOSATEテトライソプロピルホスホルアミダイト(1.4g、2.6ミリモル)を添加した。混合物を16時間攪拌し、次いで、DCM(50ml)及びNaHCO₃飽和溶液(20ml)を添加した。有機層を分離し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥した。溶媒を真空下で蒸発させ、生じた粗残留物を、combiflash Rf装置での溶媒として0~100%ヘキサン:酢酸エチル(0.5% TEA)を使用するシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーで精製した。生成物を含む画分を単離し、一緒にし、蒸発乾固した。生じた発泡性残留物をベンゼンに再溶解し、凍結し、凍結乾燥して、無色の粉末を得た(ジアステレオマー混合物として収率60%、0.75g)ESI MS: C₆₂H₈₅N₆O₁₂PSSi計算値1196.54, 実測値[M+H]⁺ 1197.33, [M+Na]⁺ 1219.5. ³¹P NMR (121 MHz, CDCl₃) δ 150.23及び150.74.TBSOSATE_GⁱPacに関する代表的なスペクトルを図2B及び図2Eに示す。

40

【0309】

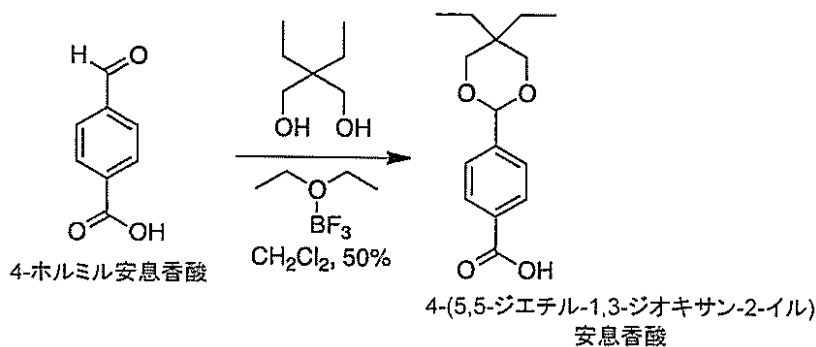
Acetal AldSATEの合成

反応1:

【0310】

50

【化 5 4】



10

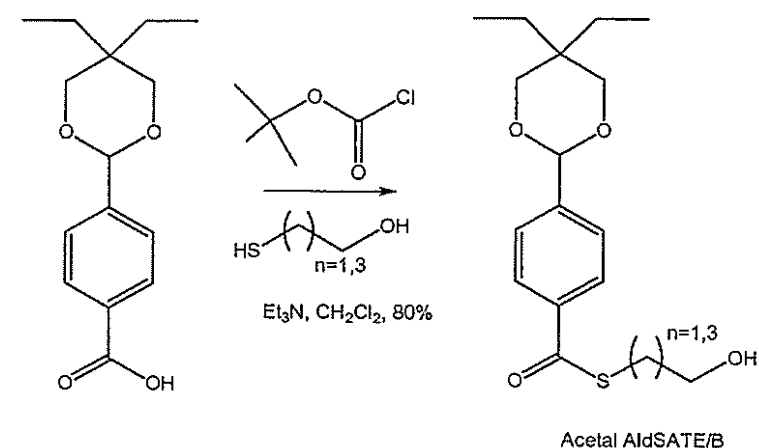
CH_2Cl_2 (30ml) 中 4-ホルミル安息香酸 (3g、20ミリモル)、2,2-ジエチル-1,3-プロパンジオール (3.25g、26ミリモル) に、 $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (2.5ml、20ミリモル) を添加した。反応混合物を外界温度で2時間撹拌した。トリエチルアミン (2.8ml) を添加して反応を止め、次いで溶媒を真空下で蒸発させた。生じた残留物を DCM (100ml) に再溶解し、水 (2 × 100ml) で洗浄し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥した。溶媒を真空下で蒸発させ、4-(5,5-ジエチル-1,3-ジオキサン-2-イル)安息香酸を得た (3.5g)。生成物を、さらなる精製なしで次の反応に使用した。ESI MS: $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4$ 計算値 264.136, 実測値 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 265.1, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 287.1.

【 0 3 1 1】

反応2:

【 0 3 1 2】

【化 5 5】



30

ジクロロメタン (CH_2Cl_2) (120ml) 中 4-(5,5-ジエチル-1,3-ジオキサン-2-イル)安息香酸 (3.4g、13.3ミリモル) をドライアイス浴中で冷却する際に、クロロギ酸イソブチル (1.8ml、13.3ミリモル) 及びトリエチルアミン (Et_3N) (1.85ml、13.3モル) を10分間にわたって滴加した。混合物をドライアイス浴中で10分間撹拌し、次いで外界温度で30分間撹拌した。次いで、 Et_3N (1.85ml) 及び β -メルカプトエタノール (26.6ミリモル) (1.9ml) を添加した。反応混合物を外界温度で2.5時間撹拌した。生成物の形成を薄層クロマトグラフィーで確認した。 NaHCO_3 飽和溶液 (30ml) を添加して反応を止めた後、有機層を分離し、無水 Na_2SO_4 上で乾燥した。溶媒を真空下で蒸発させ、粗混合物を、Combi Flash Rf 装置で0~30%ヘキサン:酢酸エチルをグラジエントで使用するシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製して、Acetal AldSATEを得た (収率80%、3.4g)。 ^1H NMR (400 MHz) δ 0.79-0.88 (m, 6H), 1.13(m, 2H), 1.8(t, 2H), 3.25 (t, 2H), 3.6(t, 2H), 3.8 (m, 2H), 3.85(m, 2H), 5.42 (s, 1H), 7.6 (d, 2H). ESI MS: $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_4\text{S}$ 計算値 324.14 実測値 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 325.2, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 347.2. Acetal AldSATEの代表的なスペクトルを図2Fに示す。

40

【 0 3 1 3】

Acetal AldSATBの合成

Acetal AldSATBは、 β -メルカプトエタノールを4-メルカプト-ブタン-1-オールに代え

50

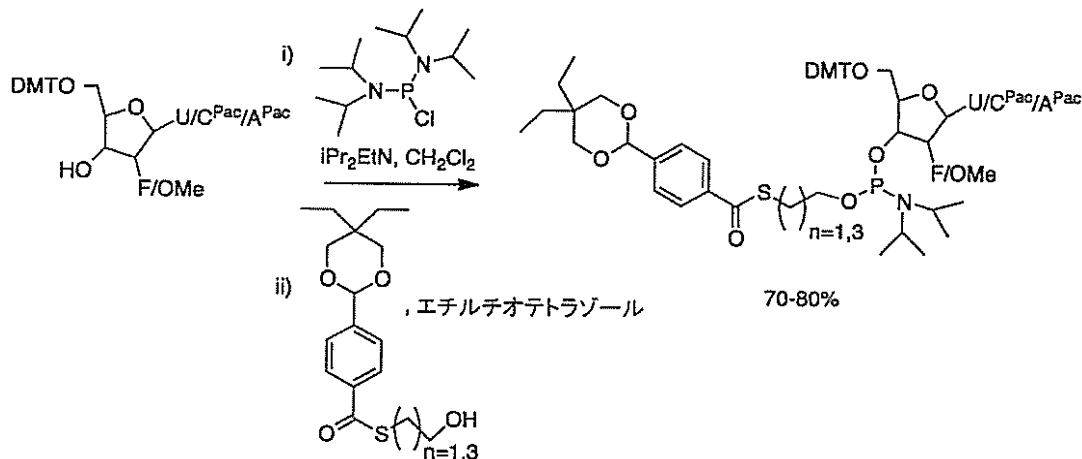
たこと以外は、本明細書に開示のAcetal AldSATEのためのプロトコールに従って合成した。AldSATBは、80%の収率で単離された。 ^1H NMR (400 MHz) δ 0.8-1.0 (m, 6H), 1.1(t, 2H), 1.7-1.8 (m, 10H), 3.1(t, 2H), 3.6-3.7 (m, 5H), 3.9(t, 2H), 5.4 (s, 1H), 7.6 (d, 2H), 7.9 (d, 2H). ESI MS: $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_4\text{S}$ 計算値352.17 実測値 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 353.3, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 375.3. AldSATBの代表的なスペクトルを図2Iに示す。

【0314】

Acetal AldSATEホスホルアミダイトの合成

【0315】

【化56】



10

20

ビス-(N,N-ジイソプロピルアミノ)-クロロホスフィン(1g、4ミリモル)の乾燥 CH_2Cl_2 (5ml)中溶液を、5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-F-ウリジン(2g、3.64ミリモル)とN,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.71ml、4ミリモル)の磁気攪拌され、冷却された乾燥 CH_2Cl_2 (24ml)中溶液(-78℃)に滴加した。攪拌を1~1.5時間継続しながら、反応混合物を外界温度に温めた。反応混合物に乾燥 CH_2Cl_2 (5ml)中acetalAldSATE(1g、3.3ミリモル)を分割添加した後、混合物を10分間攪拌し、次いで、エチルチオテトラゾール(7.3ml、アセトニトリル中0.25M溶液、1.82ミリモル)を添加した。反応混合物を4~6時間攪拌し、次いで CH_2Cl_2 (60ml)を添加した。反応混合物を、炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(20ml)及びブライン(2×20ml)で洗浄し、次いで無水硫酸ナトリウム上で乾燥した。溶媒を真空下で蒸発させ、生じた粗残留物を、combiflash Rf装置での溶媒としてヘキサン:酢酸エチル(0.5%TEA)を使用するシリカゲルフラッシュクロマトグラフィーで精製した。生成物を含む画分を単離し、一緒にし、蒸発乾固した。生じた発泡性残留物をベンゼンに再溶解し、凍結し、凍結乾燥して、無色の粉末としてacetal AldSATE_Uホスホルアミダイトを得た(ジアステレオマー混合物の収率80%、2.9g)。ESI MS: $\text{C}_{53}\text{H}_{65}\text{FN}_3\text{O}_{11}\text{PS}$ 計算値1001.4, 実測値 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1002.07, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1024.41. ^{31}P NMR (121 MHz, CDCl_3) δ 150.27 (d, $J_{\text{P-F}} = 8.0$ Hz), 150.63 (d, $J_{\text{P-F}} = 7.8$ Hz). Acetal AldSATE_Uの代表的なスペクトルを図2Hに示す。

30

【0316】

Acetal AldSATB_Uホスホルアミダイトの合成

40

AcetalAldSATB_Uホスホルアミダイトは、acetalAldSATEをacetalAldSATBに代えたこと以外は、本明細書に開示のAcetal AldSATE_Uホスホルアミダイトのためのプロトコールに従って合成した。AldSATB_Uは、70%の収率で単離された。ESI MS: $\text{C}_{55}\text{H}_{69}\text{FN}_3\text{O}_{11}\text{PS}$ 計算値1029.43, 実測値 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1030.12, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1052.35. ^{31}P NMR (121 MHz, CDCl_3) δ 150.27 (d, $J_{\text{P-F}} = 8.0$ Hz), 150.63 (d, $J_{\text{P-F}} = 7.8$ Hz). AcetalAldSATB_Uの代表的なスペクトルを図2J及び図2Kに示す。

【0317】

Acetal AldSATE_C^{Pac}ホスホルアミダイトの合成

Acetal AldSATE_C^{Pac}ホスホルアミダイトは、5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-F-ウリジンを5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-F-C^{Pac}に代えたこと以外は本明細書に開

50

示のAcetal AldSATE_Uホスホルアミダイトのためのプロトコールに従って合成した。Acetal AldSATE_C^{Pac}ホスホルアミダイトは、70%の収率で単離された。ESI MS: C₆₁H₇₂FN₄O₁₂ PS計算値1132.46, 実測値[M+Na]⁺ 1157.44.

³¹P NMR (121 MHz, CDCl₃) δ 150.44 (d, J_{P-F} = 8.1 Hz), 150.74 (d, J_{P-F} = 8.5 Hz)

Acetal AldSATE_C^{Pac}ホスホルアミダイトの代表的なスペクトルを図2G及び図2Lに示す。

【0318】

Acetal AldSATB_C^{Pac}ホスホルアミダイトの合成

Acetal AldSATB_C^{Pac}ホスホルアミダイトは、acetalAldSATEをacetalAldSATBに代えたこと以外は本明細書中に開示のAcetal AldSATE_C^{Pac}のためのプロトコールに従って合成した。Acetal AldSATB_C^{Pac}ホスホルアミダイトは、70%の収率で単離された。ESI MS: C₆₃H₇₆FN₄O₁₂ PS計算値1162.49, 実測値[M+Na]⁺ 1185.45. ³¹P NMR (121 MHz, CDCl₃) δ 149.9 (d, J_{P-F} = 8.2 Hz), 150.4 (d, J_{P-F} = 8.3 Hz). AldSATB_C^{Pac}ホスホルアミダイトの代表的なスペクトルを図2Jに示す。

10

【0319】

Acetal AldSATE_A^{Pac}ホスホルアミダイトの合成

Acetal AldSATE_A^{Pac}ホスホルアミダイトは、5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-F-ウリジンを5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-F-A^{Pac}に代えたこと以外は本明細書中に開示のAcetal AldSATE_Uホスホルアミダイトのためのプロトコールに従って合成した。Acetal AldSATE_A^{Pac}ホスホルアミダイトは、70%の収率で単離された。ESI MS: C₆₃H₇₅N₆O₁₂P S計算値1170.49, 実測値[M+Na]⁺ 1193.43. ³¹P NMR (121 MHz, CDCl₃) δ 149.9及び150.8. Acetal AldSATE_A^{Pac}ホスホルアミダイトの代表的なスペクトルを図2Hに示す。

20

【0320】

Acetal AldSATB_A^{Pac}ホスホルアミダイトの合成

Acetal AldSATB_A^{Pac}ホスホルアミダイトは、acetalAldSATEをacetalAldSATBに代えたこと以外は本明細書中に開示のAcetal AldSATE_A^{Pac}ホスホルアミダイトのためのプロトコールに従って合成された。Acetal AldSATB_A^{Pac}ホスホルアミダイトは、70%の収率で単離された。ESI MS: C₆₅H₇₉N₆O₁₂ PS計算値1198.52, 実測値[M+Na]⁺ 1221.43. ³¹P NMR (121 MHz, CDCl₃) δ 149.3及び150.3. Acetal AldSATB_A^{Pac}ホスホルアミダイトの代表的なスペクトルを図2K及び図2Lに示す。

30

【0321】

生物可逆性中性リン酸トリエステルの負帯電ホスホジエステルへの定量的細胞内変換

例示的なポリヌクレオチド及び例示的なリポフェクションデータを図3に示す。図3に示すように、加水分解可能なtBu-SATE生物可逆性部分を含む修飾型ポリヌクレオチド(配列番号26)は、定量的に開裂されて、siRNAを提供した(2'修飾を伴う)。対照的に、非可逆性ジメチルブチルリン酸トリエステル(DMB)基を含む官能化ポリヌクレオチドは、細胞内でsiRNAに開裂されなかった。

【0322】

リン酸トリエステルを含むオリゴヌクレオチドによるRNAi応答の誘導は、Ago2/RISC中へのTRBP介在性装填のために、リン酸トリエステルのホスホジエステル結合への開裂、分解及び分割を必要とする。GFPのmRNAを標的とする二重鎖siRNN(リン酸トリエステル基を気泡として表示する)を合成した(図3、上段パネル参照)。生物可逆性tBut-SATE又は対照の非可逆性ジメチルブチル(DMB)若しくは対照の野生型ホスホジエステルを含むガイド(アンチセンス)鎖(図3、下段パネル参照)の5'端を、³²Pで標識化した。siRNNを細胞中にトランスフェクトした。抗-Ago2を使用する共免疫沈降の後に、細胞溶解液を装填し、15%変性PAGEゲル上で30時間展開した。示したように、チオエステラーゼによるtBut-SATE RNNオリゴヌクレオチドの定量的細胞内変換、及び野生型ホスホジエステルオリゴヌクレオチドとの共移動が存在した(図3、中段パネル参照)。対照的に、Ago2と会合した対照³²P標識化非可逆性DMB RNNではバックグラウンドレベルでのみ検出され、これらの構築物は、細胞内開裂を受けなかったことを示している。データは、SATEリン酸トリエステルを含むsiRN

40

50

Nが、生物学的に活性なsiRNAへ細胞内で変換され、Ago2中に装填されたことを示している。

【0323】

siRNNはインビトロでGFP及びルシフェラーゼのRNAi応答を誘導する

siRNNは、H1299細胞中でGFPに対するRNAi応答を誘導し、GFPの発現を抑制した(図4参照)。GFPのmRNAを標的とする二重鎖siRNN(リン酸トリエステル基を青色気泡として表示する)を合成した(図4、上段パネル参照)。GFPの野生型ホスホジエステル型siRNA又は非標的指向性の対照siRNA、及びGFPのSATEリン酸トリエステルsiRNN又は非標的指向性の対照siRNNを、構成的にGFPを発現するH1299細胞にトランスフェクトした。GFP発現のRNAiによる阻害に関する用量-キネティック曲線を、GFP発現の2日目にフローサイトメトリーにより作成した(図4、中段左及び右パネル参照)。トランスフェクトされた細胞からのGFP発現に関する5'RACE研究を、GFPのmRNAのPCR増幅によって実施した。正確な189塩基対のフラグメントがSATEリン酸トリエステル型siRNN及びGFPを標的とするsiRNAでトランスフェクトされた細胞から見出されたが、このフラグメントは、非標的指向性の対照siRNAでは見出されなかった(図4、下段左パネル参照)。下段左パネルからの5'RACE cDNAフラグメントのcDNA配列解析は、Ago2介在性RNAi応答のための正確なGFP mRNAの開裂を示す(図4、下段右パネル参照)。

10

【0324】

同様のサイレンシング実験を、ルシフェラーゼを構成的に発現するH1299細胞を用いて実施した(図5参照)。構成的GFP発現を伴う結果と同様に、RNAi応答の誘導が、細胞にsiRNNをトランスフェクトすることによって対照ベクターに対照して観察された(図5参照)。

20

【0325】

siRNNは肝ルシフェラーゼを発現するマウスモデルにおいてインビボでルシフェラーゼに対してRNAi応答を誘導する

ルシフェラーゼのmRNAを標的とする二重鎖siRNN(リン酸トリエステル基を青色気泡で表示する)を合成した(図7、上段パネル参照)。肝(肝臓)ルシフェラーゼを選択的に発現するマウスを無作為に群分けした(図7、上段左パネル参照)。Mock(PBS)、ルシフェラーゼsiRNA又はtBut-SATE及びO-SATEリン酸トリエステル型ルシフェラーゼsiRNN、又は対照の非可逆性DMBルシフェラーゼsiRNNを肝臓中に流体力学的に送達した。尾部静脈での流体力学的送達は、肝臓に一時的(2~5分)に、siRNA/siRNNがその孔を通して細胞質中に拡散することを可能にする孔を作り出した。次いで、マウスを、30日の過程にわたって画像化するインビボでのIVISによってルシフェラーゼ発現について分析した。ルシフェラーゼを標的とする野生型siRNA、tBut-SATE siRNN又はO-SATE型siRNNで処置されたマウスは、大きさ及び継続期間の双方で等価なルシフェラーゼRNAi応答を誘導したが、対照の非可逆性DMB型のルシフェラーゼsiRNNは、RNAi応答を誘導できなかった(図7、右パネル参照)。これらの結果は、生物可逆性リン酸トリエステル型siRNNが、インビボで、細胞内チオエステラーゼによって、活性なRNAi分子に効率的に変換されることを立証している。

30

【0326】

TAT PTD-siRNNの自己送達

TAT PTD送達ペプチドとコンジュゲートされたsiRNNによる自己送達に関する実験を実施した(図8、上段パネル参照)。GFPレポーター遺伝子を標的とする可溶性モノマー性自己送達性siRNN、GFPレポーター遺伝子を標的とする対照の非可逆性siRNN、及びmockで処理されたGFP細胞の用量曲線を作成した。曲線を、0.22ナノモルを使用するFACSヒストグラム分析によって比較、解析し(図8、下段左パネル参照)、次いで、mockで処理されたGFP細胞に対して正規化した(図8、下段右パネル参照)。図8で、P6(A6)は、6つのAld-SATEを備えたパッセンジャー鎖を意味し、G6(A6)は、6つのAld-SATEを備えたガイド鎖を意味する。結果は、GFP発現細胞の生物可逆性TAT PTD-siRNNコンジュゲートでの処理が、自己送達及びRNAi応答の誘導をもたらし、一方、対照の非可逆性TAT PTD-siRNNコンジュゲートでの処理はRNAi応答を誘導できなかったことを立証している。これらの結果は、siRNNが可溶性のモノマー性コンジュゲート(ナノ粒子ではない)として細胞中に自己送達され、活性な

40

50

帯電ホスホジエステル型RNAi分子に変換され、RNAi応答を誘導する能力を立証している。

【0327】

SDS-PAGE分析を用いるdsRNN形成の判定

siRNNの二本鎖化に耐性があるリン酸トリエステルの最大挿入数を決めるために、様々な数のリン酸トリエステルを含むパッセンジャー及びガイド鎖ssRNN分子をアニールし、SDS-PAGEで分析した。アニーリングは、パッセンジャー及びガイド鎖の混合物を65℃に5分間加熱し、続いて外界温度まで15分間冷却することによって完遂された。アニールされたdsRNN二本鎖を、非変性SDS-PAGEゲル上で展開させ、続いて臭化エチジウム染色(図8、下段パネル参照)又は銀染色(図8、上段パネル参照)によって分析した。パーセントdsRNN形成を、各dsRNNの組合せについて、銀染色されたSDS-PAGEゲルのデンストメトリーで測定した。図8で、13×リン酸トリエステル型ガイド鎖(G13b)は、異なる位置(P13a、P13b、P13c)に配置されたリン酸トリエステル挿入片を含む13×リン酸トリエステル型パッセンジャー鎖にアニールされることが示される。アニーリング効率(%二重鎖化)の不一致は、dsRNN骨格上のリン酸トリエステル挿入部位の相違と相互に関連していることに留意されたい。

10

【0328】

種々のO-SATE型ssRNNの組合せを用いたdsRNN形成効率の要約

図9及び図10は、本開示のポリヌクレオチド構築物のハイブリッド化が、生物可逆性基の種類及び間隔に依存することを立証している。これらの図で、パッセンジャー鎖(P)は、5'-CCACUACCUGAGCACCCAGUU-3'(配列番号27)であり、ガイド鎖(G)は、5'-CUGGGUGCUCAGGUAGUGGUU-3'(配列番号28)である。数字は、生物可逆性基の位置を示す(5'端から数えて)。デフォルトの生物可逆性基はO-SATEであり、さらなる生物可逆性基は、4-ホルミルベンゾエート-SATE(A)である。

20

【0329】

図8に記載のプロトコールに従って、O-SATE型ssRNN分子の種々の組合せを、アニールし、銀染色されたSDS-PAGEゲルのデンストメトリーで分析して、dsRNN形成の効率を求めた(図9参照)。図9で、異なる数及び位置のO-SATE型リン酸トリエステルを含むパッセンジャー鎖(P)及びガイド鎖(G)を試験した(命名については図9の下段パネル参照)。dsRNN形成の効率は、5つの範疇(>90%、>75%、約50%、<10%、又は0%)に群分けされた。野生型のパッセンジャー鎖(P^{WT})及びガイド鎖(G^{WT})の双方が大きな数のO-SATE挿入片を含むssRNN分子(それぞれ、G16a及びP15a)に効率的にアニールする能力について留意されたい(図9、上段パネル参照)。しかし、一部の組合せは、大きな量のハイブリッド化をもたらさない(例えば、<50%のハイブリッド化)。一部の研究で、ハイブリッド化は測定されなかった。dsRNNの形成は、双方の鎖が特定のリン酸トリエステル数及び位置に達する場合(すなわち、P15a/G16a dsRNN=0%)に損われる(図9、上段パネル参照)。>90%の効率でアニールされたdsRNN分子のみ、その後の研究に使用された。

30

【0330】

Ald-SATE型ssRNNオリゴヌクレオチドに関するdsRNN形成の要約

図8に記載のプロトコールに従って、Ald-SATE又はSPTE型ssRNN分子の種々の組合せを、アニールし、銀染色されたSDS-PAGEゲルのデンストメトリーで分析して、dsRNN形成の効率を求めた(図10参照)。図10で、異なる数及び位置のAld-SATE又はSPTE型リン酸トリエステルを含むパッセンジャー鎖(P)及びガイド鎖(G)を試験した(命名については図10の下段パネル参照)。図9で検討された核酸とは対照的に、図10に呈示されたパッセンジャー及びガイド鎖は、より少ない官能化ポリヌクレオチド(例えば、鎖当たり3~6個のリン酸トリエステル)を含んでいた。dsRNN形成の効率は、5つの範疇(>90%、>75%、約50%、<10%、又は0%)に群分けされた。Ald-SATEを含むdsRNNの組合せのすべてが、銀染色されたSDS-PAGEゲルのデンストメトリー分析で測定した場合に>90%のdsRNN形成効率を示したことに留意されたい。すべてのAld-SATE型dsRNNの組合せを、その後のコンジュゲーション及び細胞内送達研究に使用した。

40

【0331】

50

ssRNNオリゴヌクレオチドに関する逆相HPLCでの精製例

オリゴヌクレオチドの合成及び脱保護に続いて、ssRNNオリゴヌクレオチドを、逆相HPLC(RP-HPLC)で単離した(図11参照)。カラムとの疎水性相互作用によって、所望のオリゴ生成物を、酢酸トリエチルアンモニウム(TEAA)の存在下に、アセトニトリルが増加するグラジエントで、汚染物から単離した(図11、上段パネル参照)。主要生成物ピークの幅での分別は、所望の合成オリゴ生成物の精製をもたらした(図11、下段パネル参照)。RP-HPLCの画分6~8は、最終オリゴ生成物を、>95%の純度で含んでいることに留意されたい。

【0332】

Ald-SATEを含むdsRNNオリゴヌクレオチドのペプチドコンジュゲーション

RP-HPLC精製に続いて、最終ssRNNオリゴヌクレオチド生成物を分析するために、尿素変性ゲルを使用した(図12参照)。Ald-SATEを含むssRNNオリゴヌクレオチド(P5(A5)a及びP6(A6)a)を、>95%の純度で単離した(図12、左パネル参照)。種々のAld-SATE型パッセンジャー鎖の6×SPTeを含むガイド鎖(G6(S6)a)への二本鎖化に続いて、dsRNN分子を、Ald-SATE型末端上の遊離アルデヒドを介してペプチド導入ドメイン3T3Sにコンジュゲートした。ペプチドのコンジュゲーションに続いて、コンジュゲーション効率を、銀染色されたSDS-PAGEゲルで評価した(図12、中段パネル参照)。図12で、siRNNオリゴヌクレオチドが、存在するAld-SATE挿入片の数に基づいて、増加する数のペプチドにコンジュゲートする能力が示される(図12、右パネル参照)。Ald-SATE挿入片の3T3Sペプチドへのほぼ定量的なコンジュゲーションが存在することに留意されたい。

【0333】

TAT PTD-siRNNの自己送達の比較

図9及び図10からのsiRNN命名省略形を使用して、Ald-SATE及びtBut-SATE型リン酸トリエステルをsiRNN上の異なる指定位置に配置し、TAT送達ペプチドにコンジュゲートさせ、精製し、自己送達について分析した(図13参照)。GFP細胞を構成的に発現するH1299におけるGFPに対するRNAi応答の誘導を、自己送達の48時間後の時点で、フローサイトメトリーで測定し、非標的指向性の対照ルシフェラーゼsiRNNと比較した。FACSヒストグラム(図13、上段右パネル参照)、及びmockで処理されたGFP細胞に対して正規化された用量曲線(図13、下段パネル参照)を示す。

【0334】

Ald-SATE型リン酸トリエステル数を制限することによるTAT PTD-siRNNの自己送達の比較

上の図13と同様、図14は、自己送達性siRNN、及びH1299細胞中で構成的に発現されるGFPを標的とする対照による、RNAi応答の誘導を示す。パッセンジャー鎖上のAld-SATE型リン酸トリエステル基の数及び位置を変えることによって(図14、上段パネル参照)(具体的位置については図9及び図10からの命名を参照)、RNAi応答の相違を、非標的指向性の対照ルシフェラーゼsiRNNと比較して検出することができた。FACSヒストグラム(図14、上段右パネル参照)及びmockで処理されたGFP細胞に正規化された用量曲線(図14、下段パネル参照)が示される。

【0335】

リン酸トリエステルリンカー-1の長さの比較

チオエステル結合のチオエステラーゼでの開裂(第1ステップ)後のリン酸トリエステルのキックアウトの第2ステップを完結するためのリンカー-1(L¹)の長さの寄与を調べるために、GFPを標的としたガイド鎖RNNを合成した。ここで、RNNは、6つのウリジンヌクレオチド間架橋基(図4からの配列参照)のすべてで、示されたようなリン酸トリエステル基(図15、上段の図参照)及び野生型ホスホジエステルパッセンジャー鎖を含んでいた。25nMのsiRNNを、GFPを構成的に発現するH1299細胞中にトランスフェクトし、FACSにより時間と共にGFPに対するRNAi応答について分析し、mockで処理されたGFP細胞に対して正規化した(図15、下段パネル参照)。tBut-SATE(L¹=エチル)、lpr-SATB(L¹=ブチル)は、野生型ホスホジエステルsiRNAに類似したGFP RNAi応答を誘導し、一方、対照の非可逆性DMBリン酸トリエステルsiRNNは、RNAi応答を誘導せず、tBut-SATP(L¹=プロピル)は、72時間の時点でわずかに約50%の応答を与えた(図15、下段左パネル参照)。tBut-SATB(L¹=ブチル)は、lpr-S

10

20

30

40

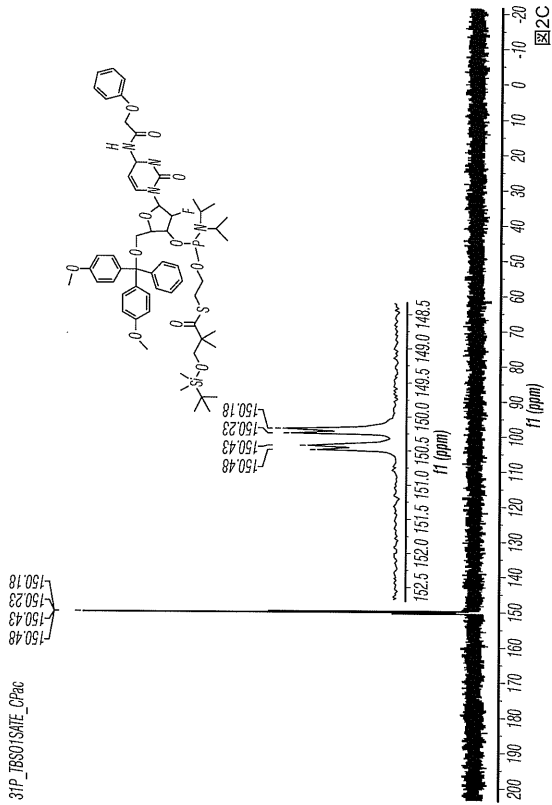
50

10

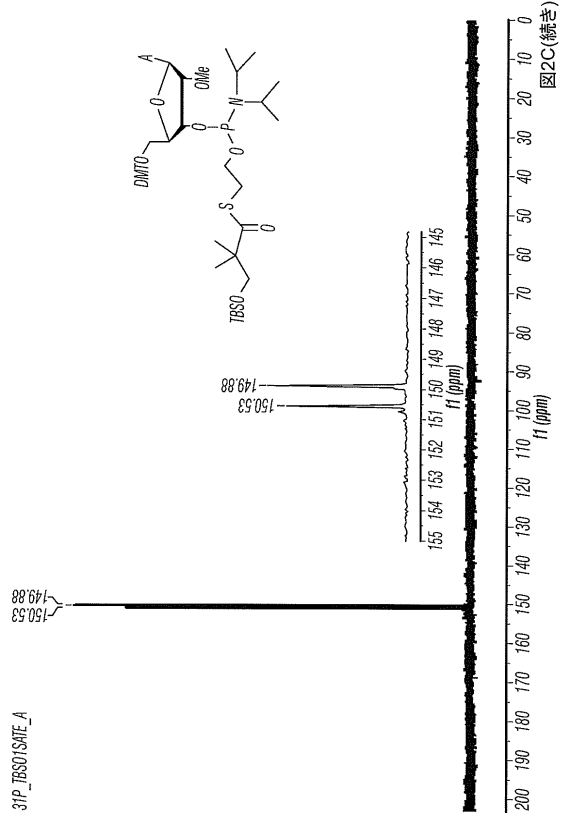
記載の方法及び本開示のシステムの、本開示の範囲及び精神から逸脱しない種々の修正形態及び変形形態は、当業者にとって明らかであろう。本開示を特定の所望の実施形態と関連させて説明してきたが、その開示は、特許を請求する場合、このような特定の実施形態に不相応に限定されるものではないことを理解されたい。実際、医学、薬学、又は関連する分野の当業者にとって明らかである、開示を実施するために記載された方式の種々の修正形態は、本開示の範囲に包含されると解釈される。

圖1 (續七)

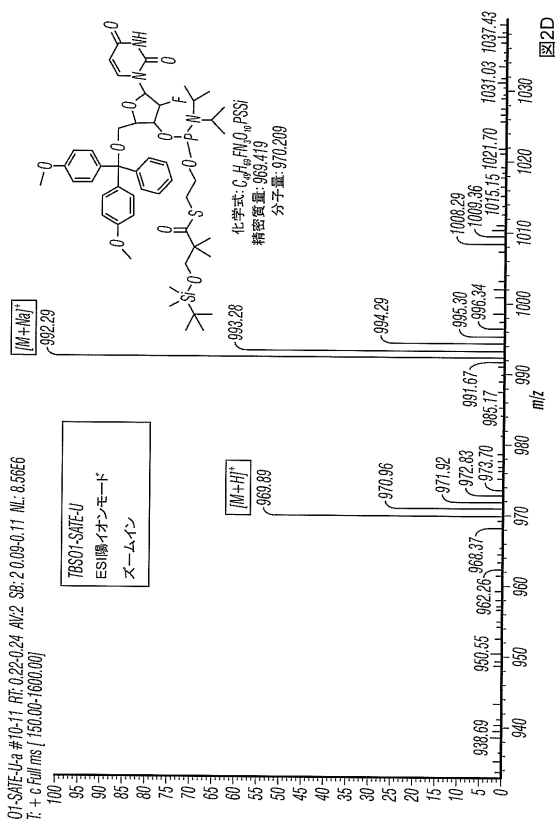
【 図 2 C - 1 】



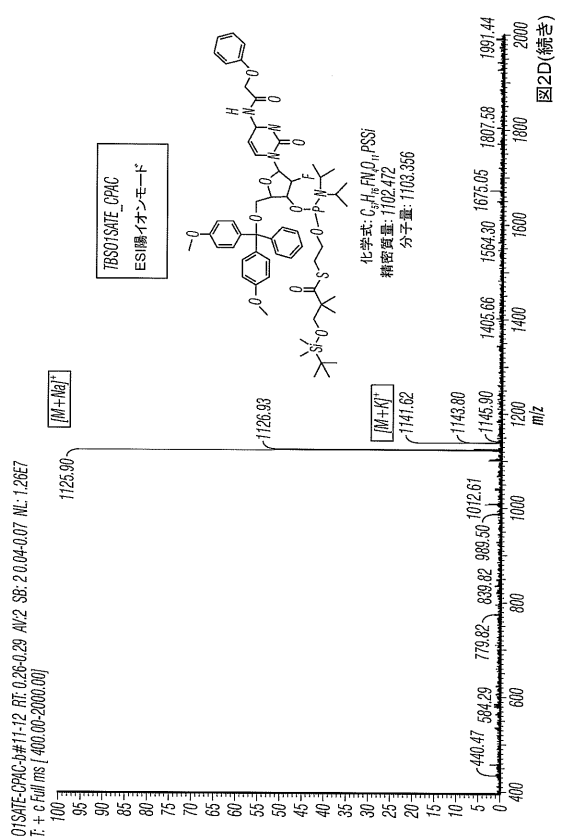
【 図 2 C - 2 】



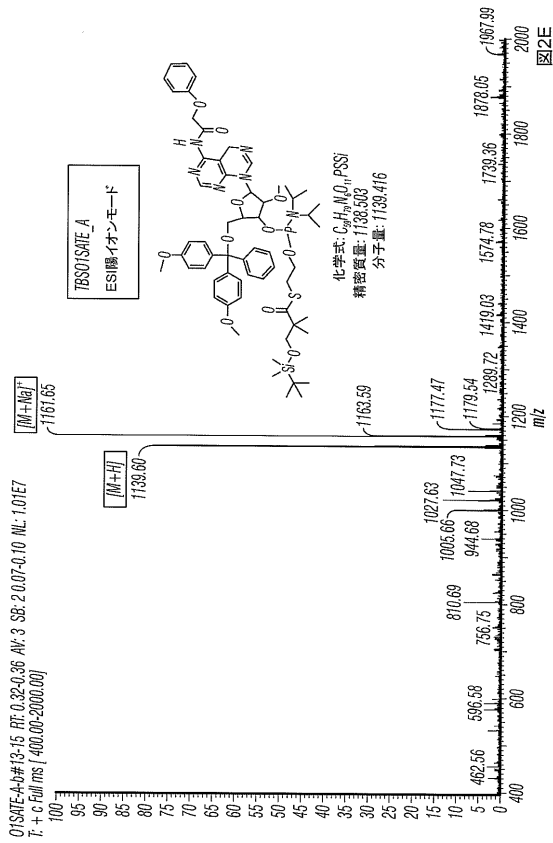
【 図 2 D - 1 】



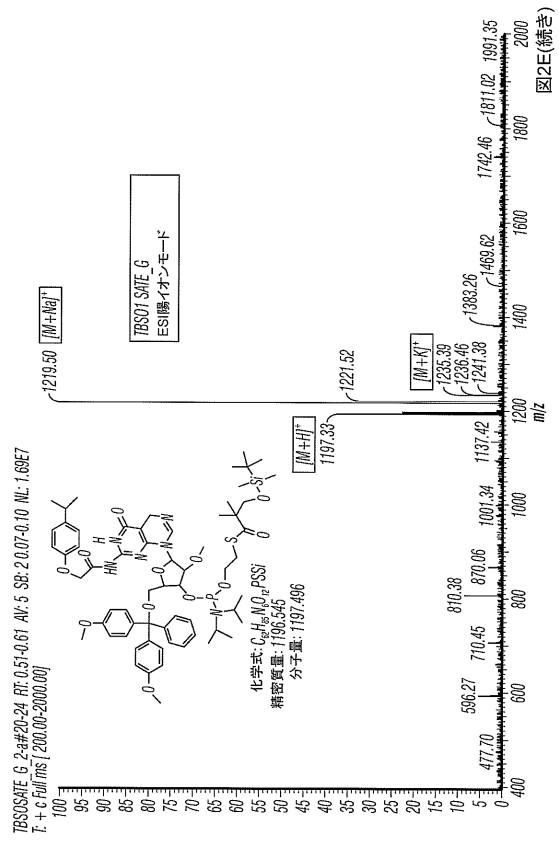
【 図 2 D - 2 】



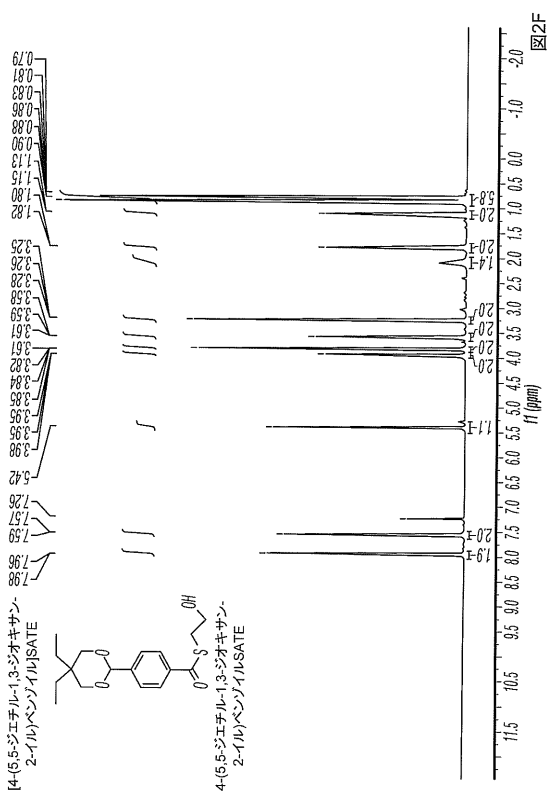
【 図 2 E - 1 】



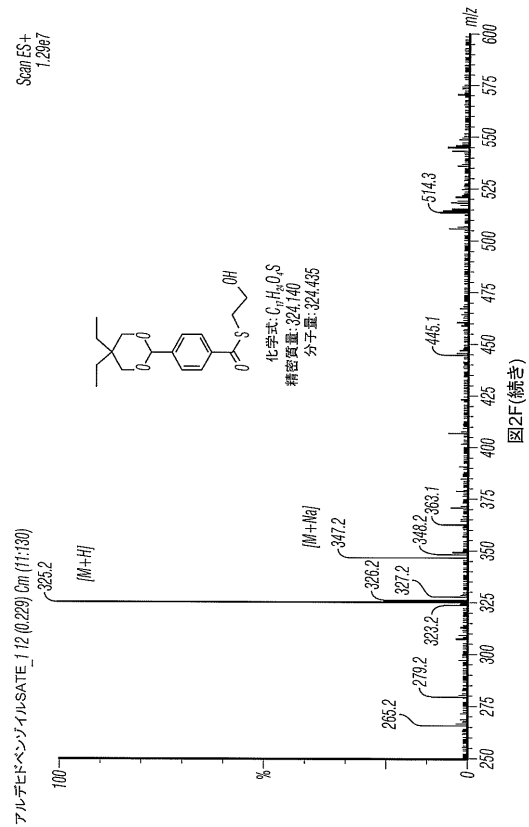
【 図 2 E - 2 】



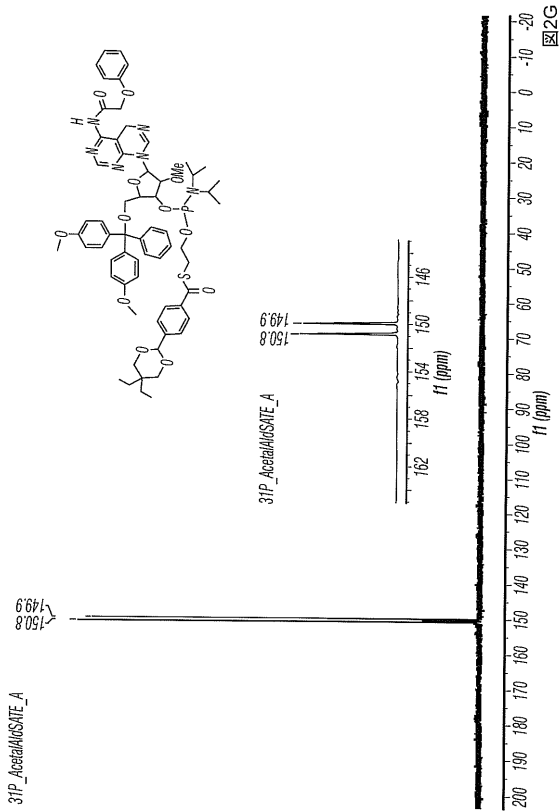
【 図 2 F - 1 】



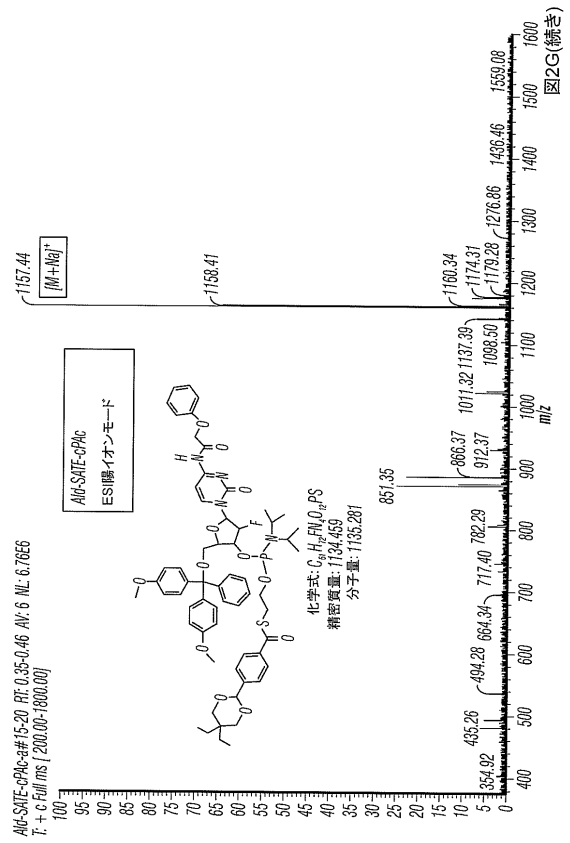
【 図 2 F - 2 】



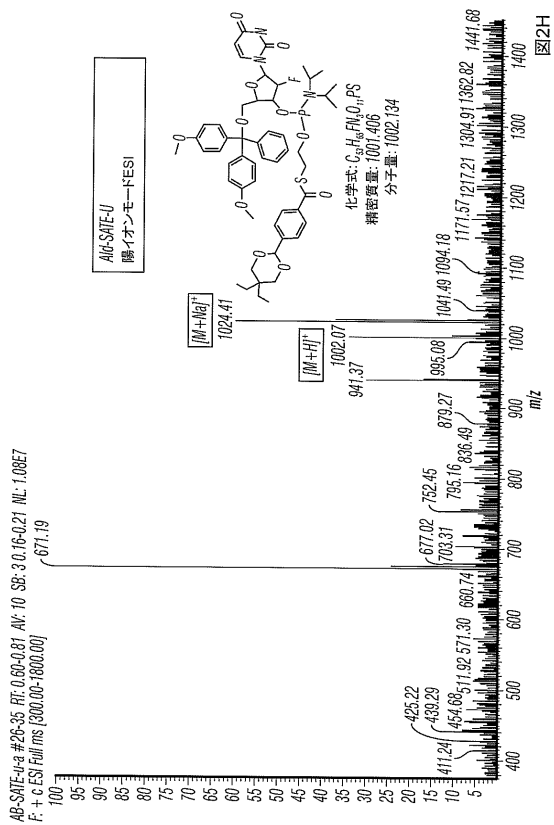
【図 2 G - 1】



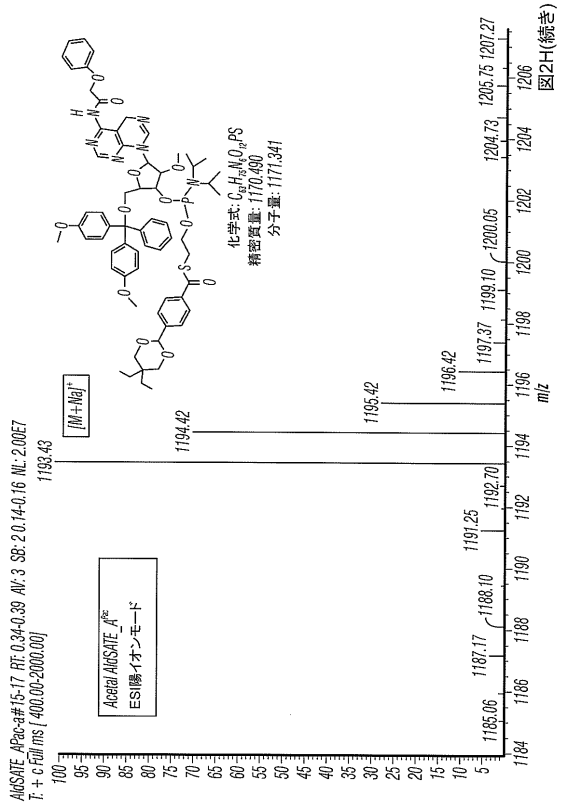
【図 2 G - 2】



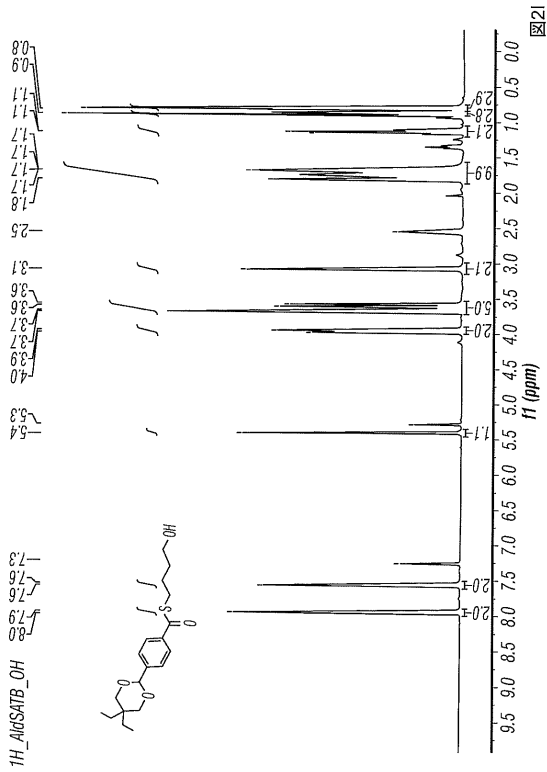
【図 2 H - 1】



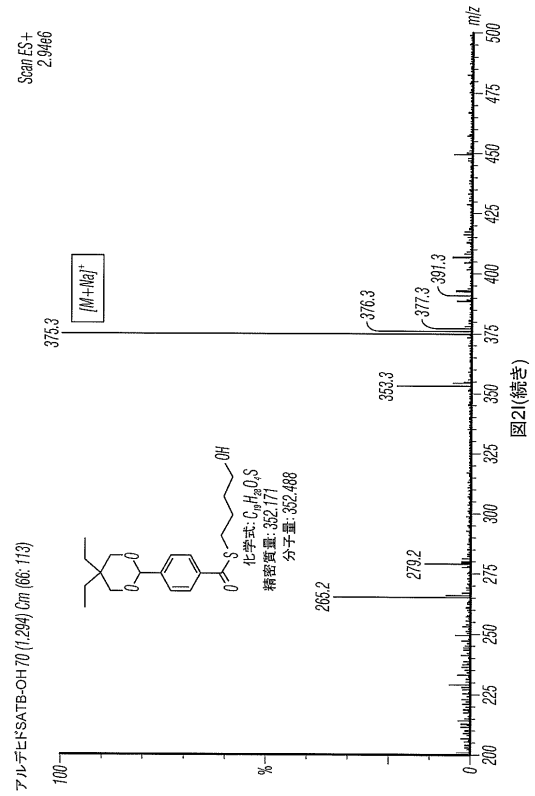
【図 2 H - 2】



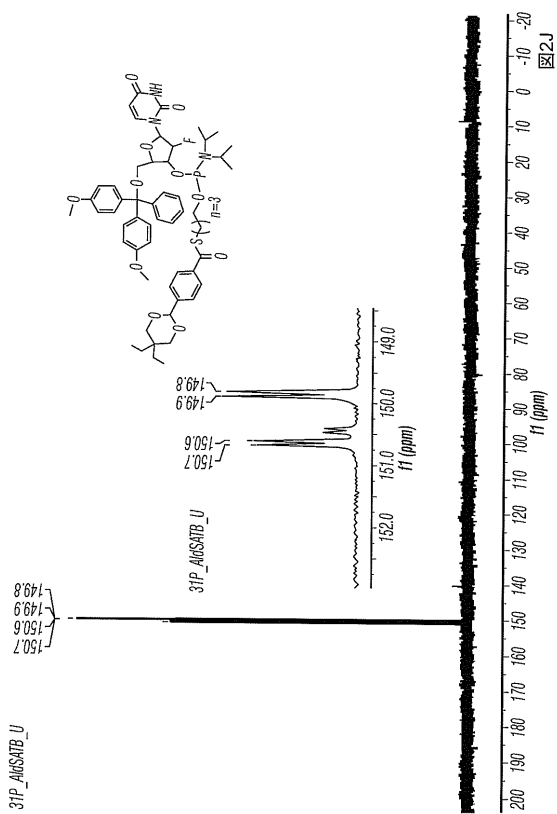
【図 2 I - 1】



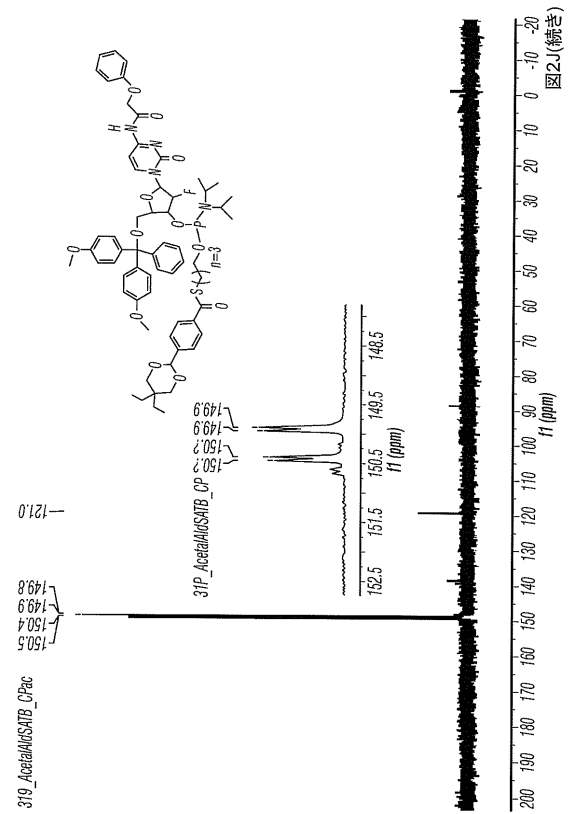
【図 2 I - 2】



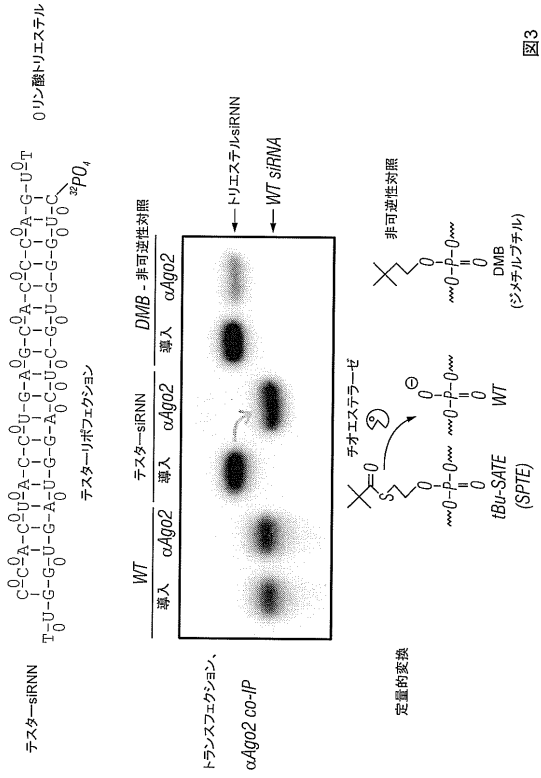
【図 2 J - 1】



【図 2 J - 2】

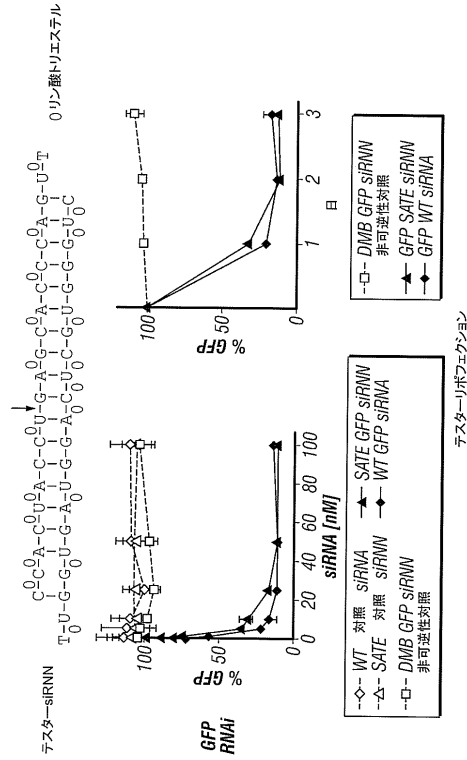


【 図 3 】



3

【 図 4 - 1 】



デスターリポフエクション

4.

【 図 4 - 2 】

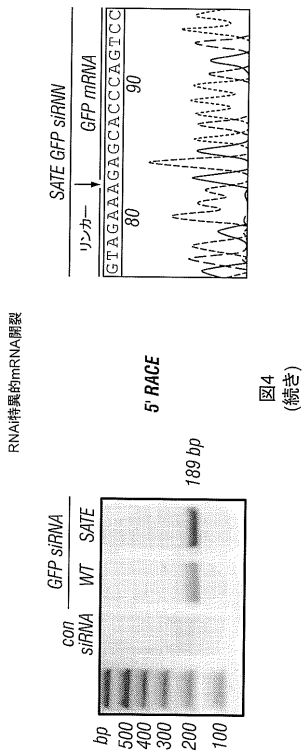
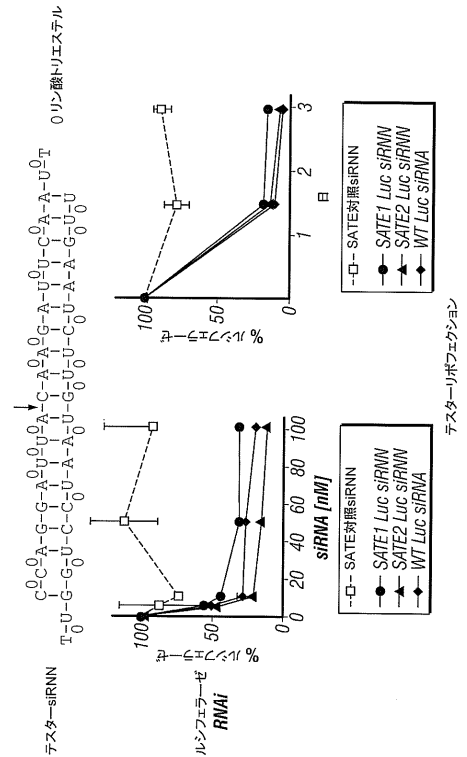


図4 (続き)

【 図 5 - 1 】



テストリポジション

5

【 図 7 - 2 】

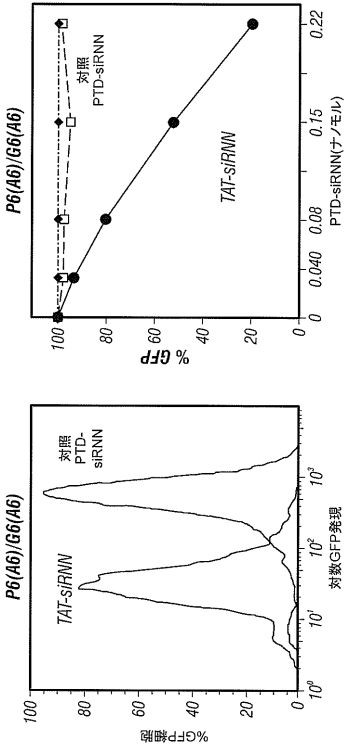


図7 (続き)

【 図 8 】

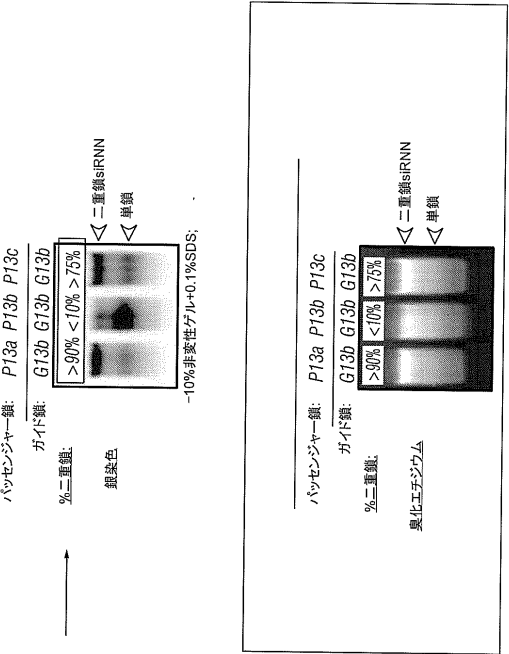


図8

【 図 9 - 1 】

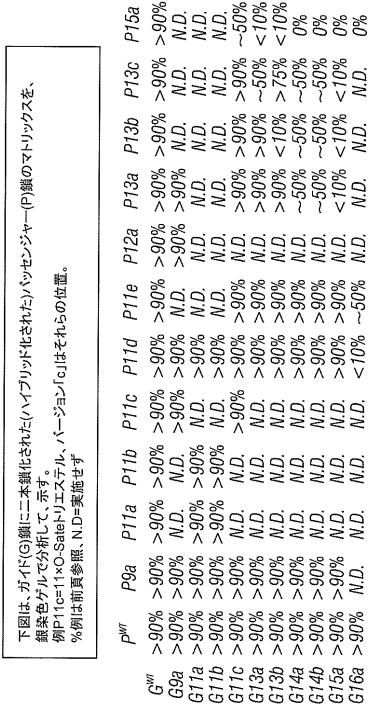


図9

【 図 9 - 2 】

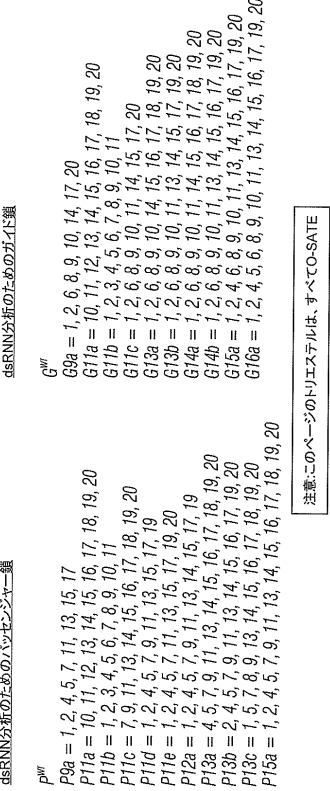


図9 (続き)

【図 1 0 - 1】

	P ^{WT}	P3(A3)a	P3(A3)b	P4(A4)a	P4(A4)b	P4(A4)c	P4(A4)d	P4(A4)e
G ^{WT}	>90%	>90%	>90%	>90%	>90%	>90%	>90%	>90%
G6(S6)a	>90%	>90%	>90%	>90%	>90%	>90%	>90%	>90%
G6a	>90%	>90%	>90%	>90%	>90%	>90%	>90%	>90%
G3(A3)a	>90%	>90%	>90%	>90%	>90%	>90%	>90%	>90%
G4(A4)a	>90%	>90%	>90%	>90%	>90%	>90%	>90%	>90%
G6(A6)a	>90%	>90%	>90%	>90%	>90%	>90%	>90%	>90%

	P5(A5)a	P6(A6)a	P6(A4S2)a	P6(S6)a
G ^{WT}	>90%	>90%	>90%	>90%
G6(S6)a	>90%	>90%	>90%	>90%
G6a	>90%	>90%	>90%	>90%
G3(A3)a	>90%	>90%	>90%	>90%
G4(A4)a	>90%	>90%	>90%	>90%
G6(A6)a	>90%	>90%	>90%	>90%

図 10

【図 1 0 - 2】

	Ald-SATEオリゴ体に対する相補鎖
G ^{WT}	G3(A3)a = 1-A, 14-A, 20-A
G4(A4)a	G4(A4)a = 1-A, 6-A, 14-A, 20-A
G6(A6)a	G6(A6)a = 2-A, 6-A, 10-A, 14-A, 17-A, 20-A

	Ald-SATEオリゴ体に対する相補鎖
P6(S6)a	P6(S6)a = 1-S, 5-S, 9-S, 13-S, 16-S, 20-S
G6a	G6a = 2, 6, 10, 14, 17, 20
G6(S6)a	G6(S6)a = 2-S, 6-S, 10-S, 14-S, 17-S, 20-S

(これは、変異ALL O-SATEによることに留意のこと)

A = Ald-SATE リン酸トリエステル
S = SPTE リン酸トリエステル

図 10
(続き)

【図 1 1】

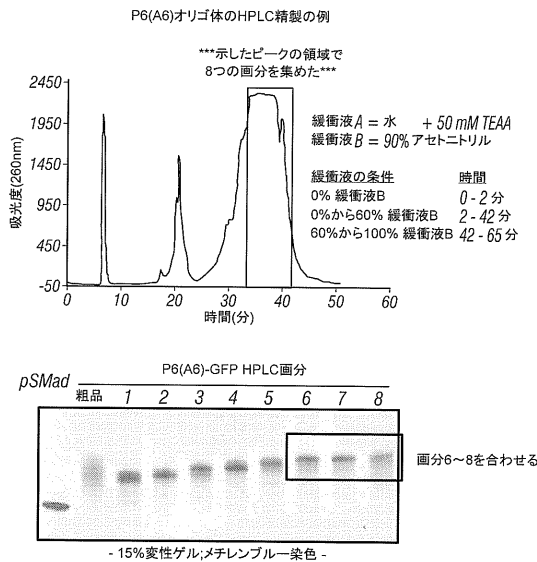


図 11

【図 1 2】

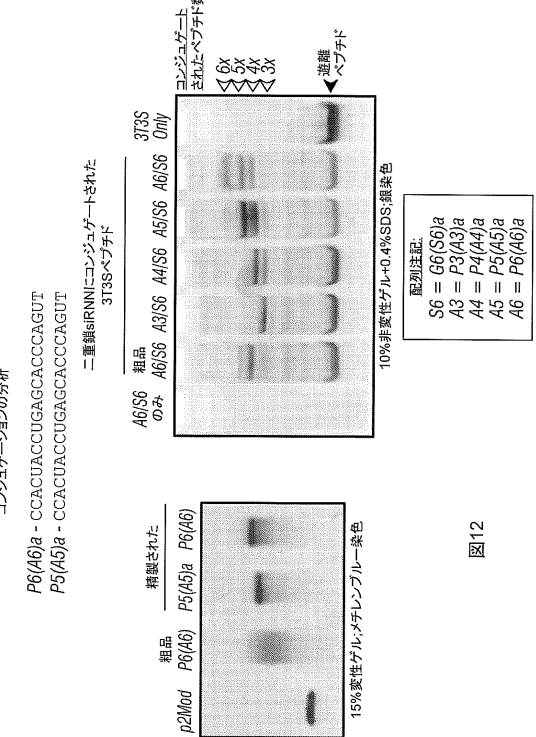
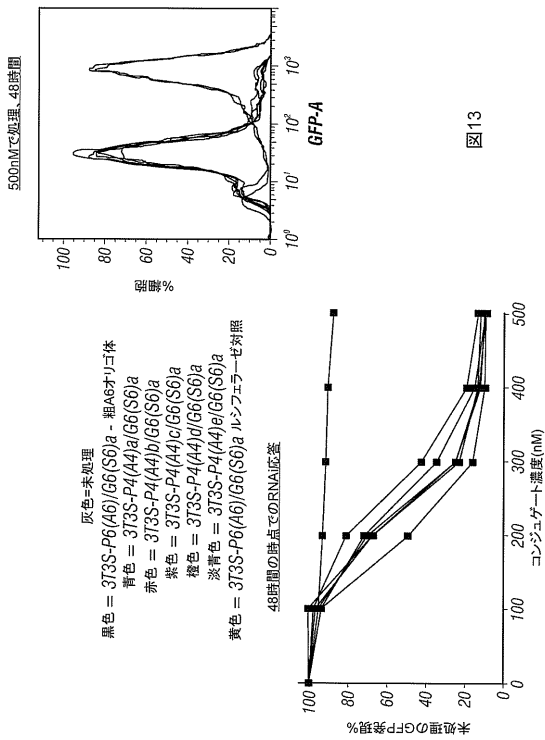
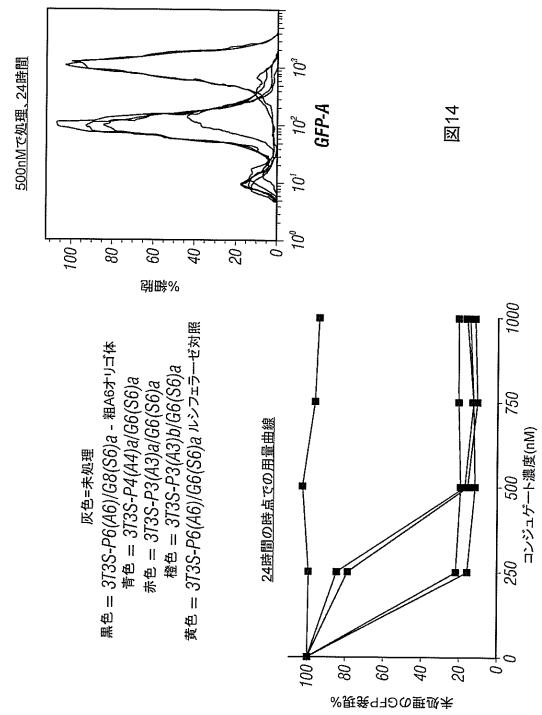


図 12

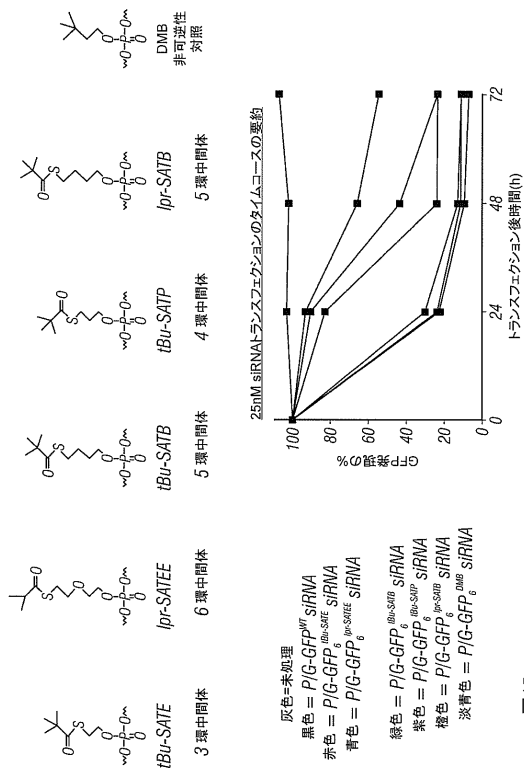
【図 13】



【図 14】



【図 15】



【配列表】

2015529073000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2013/055675
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07H 21/00(2006.01)i, C12N 15/11(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07H 21/00; C07H 19/067; A61K 31/7125; C07H 21/02; C12P 19/34; C07H 19/00; A61K 48/00; C07H 1/06; C12N 15/11		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eCOMPASS(KIPO internal) & Keywords: pronucleotide, polynucleotide, bioreversible, thioether, internucleotide		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2012-0142763 A1 (DOWDY, S. F. et al.) 07 June 2012 See abstract, paragraphs [0067], [0071]-[0073], claim 18.	1-3, 8-14, 59-61 , 65-68, 94-99 , 104-106, 113, 114 , 124
A	US 6610841 B1 (WARREN, S.) 26 August 2003 See abstract, claim 1.	1-3, 8-14, 59-61 , 65-68, 94-99 , 104-106, 113, 114 , 124
A	WO 2008-008476 A2 (THE REAGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 17 January 2008 See abstract, paragraph [0041], claims 1-3, 5.	1-3, 8-14, 59-61 , 65-68, 94-99 , 104-106, 113, 114 , 124
A	WAGNER, C. R. et al. 'Pronucleotides: toward the in vivo delivery of antiviral and anticancer nucleotides.', Medicinal Research Reviews, 31 November 2000, Vol. 20, No. 6, pp. 417-51 See abstract, pages 419, 424, figure 2.	1-3, 8-14, 59-61 , 65-68, 94-99 , 104-106, 113, 114 , 124
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 21 November 2013 (21.11.2013)		Date of mailing of the international search report 22 November 2013 (22.11.2013)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-472-7140		Authorized officer HEO, Joo Hyung Telephone No. +82-42-481-8150 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US2013/055675

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2003-0153743 A1 (MANOHARAN, M. et al.) 14 August 2003 See abstract, paragraphs [0018], [0019], claim 1.	1-3, 8-14, 59-61 , 65-68, 94-99 , 104-106, 113, 114 , 124

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2013/055675

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2012-0142763 A1	07/06/2012	AU 2010-256836 A1	19/01/2012
		CA 2801178 A1	09/12/2010
		CN 102459302 A	16/05/2012
		EP 2438079 A2	11/04/2012
		EP 2438079 A4	22/05/2013
		KR 10-2012-0052909 A	24/05/2012
		WO 2010-141471 A2	09/12/2010
		WO 2010-141471 A3	21/04/2011
US 6610841 B1	26/08/2003	AU 1623299 A	05/07/1999
		AU 1995-36795 B2	06/01/2000
		AU 1996-54197 B2	22/03/2001
		AU 1996-56707 B2	03/05/2001
		AU 1996-57200 B2	14/12/2000
		AU 1996-57231 B2	04/01/2001
		AU 1996-58839 B2	03/05/2001
		AU 1996-61598 B2	23/11/2000
		AU 1996-61611 B2	14/06/2001
		AU 1996-64507 B2	12/10/2000
		AU 1997-26016 B2	09/11/2000
		AU 1997-26016 C	29/10/1997
		AU 1997-49904 B2	24/05/2001
		AU 1998-72823 A1	05/07/1999
		AU 1998-72823 B2	20/06/2002
		AU 1999-16004 A1	15/06/1999
		AU 1999-16004 B2	25/07/2002
		AU 1999-16232 A1	05/07/1999
		AU 1999-30106 A1	18/10/1999
		AU 1999-47287 A1	07/02/2000
		AU 1999-60392 A1	10/04/2000
		AU 1999-60392 B2	11/12/2003
		AU 2000-32092 A1	07/08/2000
		AU 2000-32092 B2	04/11/2004
		AU 2000-33519 A1	19/02/2001
		AU 2000-33519 B2	13/11/2003
		AU 2000-33519 C	19/02/2001
		AU 2000-36047 A1	21/09/2000
		AU 2000-36047 B2	02/06/2005
		AU 2000-40184 A1	09/10/2000
		AU 2000-62349 A1	19/02/2001
		AU 2000-62349 B2	20/10/2005
		AU 2000-67487 A1	19/02/2001
		AU 2000-67487 B2	12/05/2005
		AU 2001-73370 A1	30/01/2002
		AU 2001-73548 A1	30/01/2002
		AU 2002-254321 A8	08/10/2002
		AU 767501 C	17/06/2004
		CA 2084987 A1	12/12/1991
		CA 2084987 C	13/02/2007

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2013/055675

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		CA 2145761 A1	14/04/1994
		CA 2145761 C	22/12/2009
		CA 2196286 A1	28/03/1996
		CA 2196286 C	02/02/2010
		CA 2219106 A1	07/11/1996
		CA 2219106 C	23/09/2008
		CA 2219119 A1	07/11/1996
		CA 2219119 C	23/10/2012
		CA 2219807 A1	07/11/1996
		CA 2219807 C	30/12/2008
		CA 2221318 A1	05/12/1996
		CA 2221318 C	24/01/2012
		CA 2223078 A1	19/12/1996
		CA 2223078 C	25/11/2008
		CA 2269072 A1	07/05/1998
		CA 2269072 C	14/02/2006
		CA 2311164 A1	03/06/1999
		CA 2315271 A1	24/06/1999
		CA 2315271 C	23/11/2010
		CA 2344288 A1	30/03/2000
		CA 2360748 A1	27/07/2000
		CA 2362526 A1	08/09/2000
		CA 2380473 A1	08/02/2001
		CA 2380837 A1	08/02/2001
		CA 2381004 A1	08/02/2001
		CA 2535449 A1	07/05/1998
		CA 2574895 A1	26/12/1991
		CN 0558411 C	11/11/2009
		CN 1156583 C	07/07/2004
		CN 1164760 C	01/09/2004
		CN 1365395 A	21/08/2002
		CN 1367845 A	04/09/2002
		CN 1589908 A	09/03/2005
		EP 0533838 A1	09/04/1997
		EP 0533838 B1	03/12/1997
		EP 0668931 A1	14/09/2005
		EP 0668931 B1	04/01/2006
		EP 0672188 A1	14/05/2003
		EP 0672188 B1	10/12/2003
		EP 0724647 A1	03/03/2004
		EP 0736105 A1	25/02/2004
		EP 0736105 B1	21/11/2007
		EP 0782580 A1	20/04/2005
		EP 0782580 B1	10/01/2007
		EP 0786469 A3	06/08/1997
		EP 0786469 B1	01/03/2006
		EP 0805870 A1	07/09/2005
		EP 0823914 A1	28/07/2004
		EP 0824540 A1	01/09/2004
		EP 0824540 B1	15/09/2004

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2013/055675

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		EP 0824541 A1	12/05/2004
		EP 0824541 B1	16/12/2009
		EP 0828849 A1	04/05/2005
		EP 0828849 B1	25/10/2006
		EP 0830367 A1	19/11/2003
		EP 0832291 A1	03/11/2004
		EP 0832291 B1	21/08/2013
		EP 0832299 A1	06/10/2004
		EP 0832299 B1	05/05/2010
		EP 0833944 A1	28/07/2004
		EP 0833944 B1	07/01/2009
		EP 0840739 A1	28/07/2004
		EP 0840742 A1	15/12/2004
		EP 0957929 A1	10/11/2004
		EP 0957929 B1	22/02/2006
		EP 1015627 A1	05/07/2000
		EP 1032708 A1	06/09/2000
		EP 1042348 A1	11/10/2000
		EP 1042348 B1	03/07/2013
		EP 1100960 A1	23/05/2001
		EP 1115887 A1	18/07/2001
		EP 1144669 A1	17/10/2001
		EP 1144669 A4	05/01/2005
		EP 1171632 A1	16/01/2002
		EP 1171632 B1	18/08/2010
		EP 1198589 A1	24/04/2002
		EP 1198589 B1	20/08/2008
		EP 1198589 B9	12/08/2009
		EP 1203004 A1	08/05/2002
		EP 1203007 A1	08/05/2002
		EP 1203007 B1	15/04/2009
		EP 1493825 A2	05/01/2005
		EP 1493825 A3	09/02/2005
		EP 1564290 A2	17/08/2005
		EP 1564290 A3	01/02/2006
		EP 1564290 B1	16/07/2008
		EP 1683871 A2	26/07/2006
		EP 1683871 A3	31/10/2007
		EP 1683871 B1	03/08/2011
		EP 1685842 A2	02/08/2006
		EP 1685842 A3	29/11/2006
		EP 1695978 A1	30/08/2006
		EP 1741780 A2	10/01/2007
		EP 1741780 A3	28/03/2007
		EP 1793006 A2	06/06/2007
		EP 1793006 A3	22/08/2007
		EP 1889910 A2	20/02/2008
		EP 1889910 A3	02/09/2009
		EP 1975172 A2	01/10/2008
		EP 1975172 A3	14/01/2009

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2013/055675

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		EP 2000534 A2	10/12/2008
		EP 2000534 A3	02/09/2009
		EP 2011503 A2	07/01/2009
		EP 2011503 A3	08/07/2009
		EP 2080813 A1	22/07/2009
		EP 2080813 B1	05/01/2011
		EP 2168973 A1	31/03/2010
		EP 2241635 A1	20/10/2010
		JP 08-252100 A	01/10/1996
		JP 08-501943 A	05/03/1996
		JP 09-502354 A	11/03/1997
		JP 09-502616 A	18/03/1997
		JP 10-508465 A	25/08/1998
		JP 10-512751 A	08/12/1998
		JP 11-502105 A	23/02/1999
		JP 11-504812 A	11/05/1999
		JP 11-504926 A	11/05/1999
		JP 11-505106 A	18/05/1999
		JP 11-507223 A	29/06/1999
		JP 11-507526 A	06/07/1999
		JP 11-507529 A	06/07/1999
		JP 2000-508169 A	04/07/2000
		JP 2001-500362 A	16/01/2001
		JP 2001-505191 A	17/04/2001
		JP 2001-524320 A	04/12/2001
		JP 2002-508387 A	19/03/2002
		JP 2002-526511 A	20/08/2002
		JP 2002-534985 A	22/10/2002
		JP 2002-537825 A	12/11/2002
		JP 2003-505111 A	12/02/2003
		JP 2003-506024 A	18/02/2003
		JP 2003-517295 A	27/05/2003
		JP 2004-097232 A	02/04/2004
		JP 2005-046160 A	24/02/2005
		JP 2005-065701 A	17/03/2005
		JP 2006-129870 A	25/05/2006
		JP 2007-049997 A	01/03/2007
		JP 2007-195559 A	09/08/2007
		JP 2007-195560 A	09/08/2007
		JP 2008-206524 A	11/09/2008
		JP 2009-039126 A	26/02/2009
		JP 2009-106277 A	21/05/2009
		JP 2009-254380 A	05/11/2009
		JP 2010-265300 A	25/11/2010
		JP 2011-103890 A	02/06/2011
		JP 2763958 B2	11/06/1998
		JP 3626503 B2	09/03/2005
		JP 3966478 B2	29/08/2007
		JP 4153030 B2	17/09/2008
		JP 4160038 B2	01/10/2008

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2013/055675

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		JP 4276272 B2	10/06/2009
		JP 4335975 B2	30/09/2009
		JP 4413428 B2	10/02/2010
		JP 4531132 B2	25/08/2010
		JP 4738599 B2	03/08/2011
		KR 10-0457015 B1	17/05/2005
		KR 10-0514929 B1	15/09/2005
		KR 10-0605072 B1	26/07/2006
		KR 10-2001-0089276 A	29/09/2001
		KR 10-2001-0101573 A	14/11/2001
		US 05270163 A	14/12/1993
		US 05459015 A	17/10/1995
		US 05472841 A	05/12/1995
		US 05475096 A	12/12/1995
		US 05476766 A	19/12/1995
		US 05496938 A	05/03/1996
		US 05503978 A	02/04/1996
		US 05527894 A	18/06/1996
		US 05543293 A	06/08/1996
WO 2008-008476 A2	17/01/2008	AU 2007-272906 A1	17/01/2008
		AU 2007-272906 B2	31/01/2013
		CA 2659103 A1	17/01/2008
		CN 1506368 A	12/08/2009
		EP 2046964 A2	15/04/2009
		JP 2009-543783 A	10/12/2009
		US 2009-093425 A1	09/04/2009
		WO 2008-008476 A3	24/07/2008
US 2003-0153743 A1	14/08/2003	AU 1999-36627 A1	16/11/1999
		AU 1999-37577 A1	16/11/1999
		AU 1999-37578 A1	16/11/1999
		AU 1999-37578 B2	16/01/2003
		AU 2003-248689 A1	22/12/2003
		AU 3662799 A	16/11/1999
		CA 2162893 C	05/03/2002
		CA 2272919 A1	04/06/1998
		CA 2272919 C	17/10/2006
		CA 2297663 A1	04/11/1999
		CA 2297663 C	04/11/1999
		CA 2297663 C	02/04/2002
		CA 2330321 A1	04/11/1999
		CA 2489152 A1	18/12/2003
		CN 0397406 C	25/06/2008
		CN 1307713 A	08/08/2001
		CN 1701337 A	23/11/2005
		CN 1701337 C	25/06/2008
		EP 0626085 A1	30/11/1994
		EP 0626085 B1	27/05/1998
		EP 0698258 A1	04/06/1997

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2013/055675

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

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

a. a sequence listing filed or furnished

☐

on paper

☒

in electronic form

b. time of filing or furnishing

☒

contained in the international application as filed

☐

filed together with the international application in electronic form

☐

furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

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

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US2013/055675

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: See below
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 6, 7, 16-19, 21, 26, 28, 29, 38-40, 43, 47, 52, 58, 63, 70-81, 83, 90, 91, 118, 120, 123 and 126-128 are unclear since they refer to claims which are not searchable due to not being drafted in accordance with the second and third sentence of Rule 6.4(a).
3. ☒ Claims Nos.: See Extra Sheet
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2013/055675

(Continuation of Box No. II)

Claim Nos.: 4, 5, 15, 20, 22-25, 27, 30-37, 41, 42, 44-46, 48, 50, 51, 53-57, 62, 64, 69, 82, 84-89, 92, 93, 100-103, 107-112, 115-117, 119, 121, 122, 125, 129, 130.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2013/055675

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		EP 0698258 A1	28/02/1996
		EP 0960385 A1	08/12/2004
		EP 1073994 A1	07/02/2001
		EP 1075385 A1	14/02/2001
		EP 1075385 B1	12/03/2003
		EP 1514220 A1	16/03/2005
		JP 2002-512905 A	08/05/2002
		JP 2002-513174 A	08/05/2002
		JP 2005-530228 A	06/10/2005
		JP 2738980 B2	08/04/1998
		KR 10-0297612 B1	24/10/2001
		KR 10-2001-0042971 A	25/05/2001
		KR 10-2006-0021797 A	08/03/2006
		US 05412199 A	02/05/1995
		US 05434405 A	18/07/1995
		US 05608203 A	04/03/1997
		US 05856661 A	05/01/1999
		US 06086811 A	11/07/2000
		US 2003-0226899 A1	11/12/2003
		US 2003-201331 A1	30/10/2003
		US 6176430 B1	23/01/2001
		US 6531590 B1	11/03/2003
		US 6769618 B1	03/08/2004
		US 6817532 B2	16/11/2004
		US 6902116 B2	07/06/2005
		WO 03-105065 A1	18/12/2003
		WO 93-16445 A1	19/08/1993
		WO 95-22805 A1	24/08/1995
		WO 98-24054 A1	04/06/1998
		WO 99-55523 A1	04/11/1999
		WO 99-55717 A1	04/11/1999
		WO 99-56240 A1	04/11/1999

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
A 6 1 P 43/00 (2006.01) A 6 1 P 43/00 1 0 5

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

(74)代理人 100169971

弁理士 菊田 尚子

(74)代理人 100168893

弁理士 岩崎 正路

(72)発明者 ダウディー, スティーヴン エフ.

アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州, ラホヤ, ウェイバリー アベニュー 5 7 6 1

(72)発明者 ミード, ブライアン アール.

アメリカ合衆国 9 2 1 0 9 カリフォルニア州, サンディエゴ, ベリル ストリート 9 6 7

(72)発明者 ゴゴイ, ヒラド

アメリカ合衆国 9 2 1 2 2 カリフォルニア州, サンディエゴ, アpartment 3 1 0 7, コスタ ヴェルデ ブルバード 8 5 2 0

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA20 CA01 CA11 GA11 GA30 HA17 HA20

4C057 AA03 BB04 CC02 DD01 MM01 MM02 MM04 MM05

4C084 AA13 NA14 ZC411

4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA05 NA14 ZB21