

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2006 年 3 月 9 日 (09.03.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/025154 A1(51) 国際特許分類⁷: C07H 19/073, 19/173, 21/00, A61K
31/7125, 31/713, 48/00, A61P 43/00, C12N 15/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/012579

(22) 国際出願日: 2005 年 7 月 7 日 (07.07.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2004-250866 2004 年 8 月 30 日 (30.08.2004) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人岐阜大学 (GIFU UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5011193 岐阜県岐阜市柳戸 1 番 1 Gifu (JP). 国立大学法人岡山大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION OKAYAMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7008530 岡山県岡山市津島中 1 丁目 1 番 1 号 Okayama (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 北出幸夫 (KITADE, Yukio). 上野義仁 (UENO, Yoshihito). 綿矢有佑 (WATAYA, Yusuke).

(74) 代理人: 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ (IKEUCHI SATO & PARTNER PATENT ATTORNEYS); 〒5306026 大阪府大阪市北区天満橋 1 丁目 8 番 30 号 OAP タワー 26 階 Osaka (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

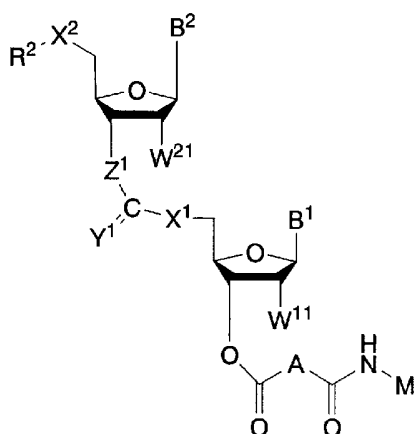
添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: MODIFIED OLIGONUCLEOTIDES

(54) 発明の名称: 修飾オリゴヌクレオチド



(X-1)

(57) Abstract: The invention aims at providing oligonucleotides modified at the 3' end which are excellent in penetration through cell membrane, resistance to nuclease, and the ability to form double strands and whose production was difficult in the prior art. The aim is attained by a modified oligonucleotide wherein the 5',3'-phosphoric diester linkage between the first and second nucleosides from the 3' end is replaced by a linkage represented by the general formula (I-1): $-X^1-C(=Y^1)-Z^1-$ (I) [wherein X^1 is O, NH, or S; Y^1 is O or S; and Z^1 is O, NH, or S]. Such modified oligonucleotides can be produced through solid phase synthesis by using unit compounds for solid phase synthesis as represented by the general formula (X-1) as the starting raw material: (X-1) wherein R^2 , W^{11} , W^{21} , B^1 , B^2 , A , X^2 , X^1 , Y^1 , Z^1 and M are each as

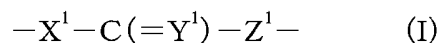
defined in the description.

/ 続葉有 /



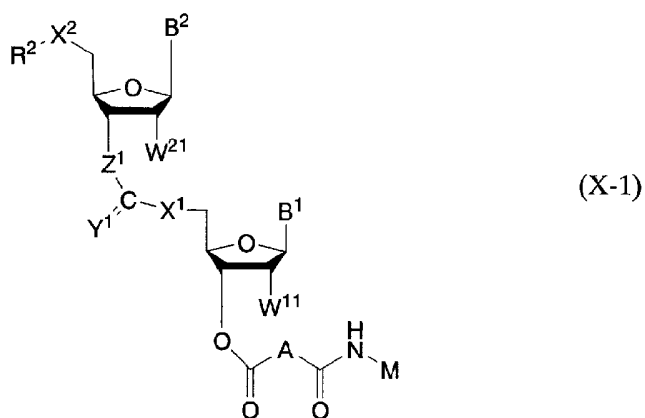
(57) 要約:

細胞膜に対する透過性、ヌクレアーゼ耐性および二本鎖形成能という3つの特性が優れた3'末端が修飾されたオリゴヌクレオチドであって、その製造が困難であった修飾オリゴヌクレオチドの提供を可能とする。オリゴヌクレオチドの3'末端から1番目と2番目のヌクレオチド間の、5', 3'-リン酸ジエステル結合が、式(I-1)の結合に置き換えられた修飾オリゴヌクレオチドにより、解決される。



前記式中、 X^1 はO、NH又はS、 Y^1 はO又はS、 Z^1 はO、NH又はSである。この修飾オリゴヌクレオチドは、式(X-1)で表される固相合成用ユニット化合物を出発原料として、固相合成により製造することができる。

【化1】



前記式(X-1)中、 R^2 、 W^{11} 、 W^{21} 、 B^1 、 B^2 、 A 、 X^2 、 X^1 、 Y^1 、 Z^1 およびMは、明細書中に定義のとおり。

明 細 書

修飾オリゴヌクレオチド

技術分野

[0001] 本発明は、修飾オリゴヌクレオチドに関するものである。

背景技術

[0002] 近年、遺伝情報そのものを治療の対象としてとらえるという方法論が普及しつつある。この方法論の一つに、オリゴヌクレオチドを用いたアンチセンス法がある。アンチセンス法とは、化学合成したオリゴヌクレオチド(例えば、15～20の塩基対から成る一本鎖DNA)を細胞に加え、標的メッセンジャーRNA(mRNA)とDNA等/mRNA二本鎖核酸を形成させることにより、標的遺伝子の発現を塩基配列特異的に抑制し、mRNAからタンパク質への翻訳過程を阻害する方法である。アンチセンス法では、病因となるウイルスまたは遺伝子の塩基配列が既知の場合、アンチセンス分子を理論的に設計し、それを合成するのが可能であることから、これまで治癒が困難と考えられてきた様々なウイルスを原因とする疾患および遺伝子疾患に対する有効な治療方法の一つとして期待されている。

[0003] また、ごく最近、オリゴヌクレオチドを用いた遺伝子発現抑制法として、RNAi(RNA interference、RNA干渉)を利用した方法に、注目が集まっている。このRNAiとは、二本鎖RNAを細胞に導入することにより、同じ塩基配列を有する細胞の染色体由来のRNAが分解され、切断される現象を指す。このRNAiの機構は、現在のところ、次のように考えられている。まず、長鎖二本鎖RNAが、酵素(Dicerと呼ばれる)により3'-UU型のダングリリングエンド構造を持つ21塩基程度の長さの二本鎖RNA(siRNA(short interfering RNA)と呼ばれる)に加水分解される。そのsiRNAが、標的mRNAとRNA/mRNA二本鎖核酸を形成し、この二本鎖核酸を認識する細胞内タンパク質(RISC(RNA-induced Silencing Complex)と呼ばれる)と、この二本鎖核酸とが結合し、この結合体により、標的mRNAが切断されるというものである。このRNAiを利用する方法によると、多くの場合、アンチセンス法と比較して1/100程度の濃度のRNAを用いて同等の効果が得られている。従って、RNAiを利用する方法

も、これまで治癒が困難と考えられてきた様々なウイルスを原因とする疾患および遺伝子疾患に対する有効な治療方法の一つとして期待が高まっている。

- [0004] アンチセンス法、RNAiを利用する方法等、オリゴヌクレオチドを用いる方法では、細胞内にそのオリゴヌクレオチドを導入させる必要がある。また、一旦細胞内に導入されたオリゴヌクレオチドを、安定に存在させる必要もあるが、細胞内外には核酸加水分解酵素(ヌクレアーゼ)が存在し、導入されたオリゴヌクレオチド、特に天然型のオリゴヌクレオチドは容易に分解されてしまうという問題があった。
- [0005] 細胞膜に対する透過性向上と、ヌクレアーゼ耐性の向上を目的として、種々の修飾オリゴヌクレオチドが開発されてきた。例えば、チミジン-チミジンのダイマー間の5', 3'-リン酸ジエステル結合を、カルバメート結合に置き換えた修飾TTダイマーを導入した、DNAオリゴヌクレオチドが知られている(例えば、非特許文献1参照)。このような修飾TTダイマーを含むDNAオリゴヌクレオチドは、わずかにヌクレアーゼ耐性が向上していることが確認されている。しかし、この修飾TTダイマーは、その製造方法の性質上、DNAオリゴヌクレオチドの3'末端以外の部位に導入することは可能であるが、3'末端部位に導入することは実現されていなかった。
- [0006] また、ヌクレアーゼは、オリゴヌクレオチドをその3'末端から分解していくことが知られている。例えば、前記のような修飾TTダイマーを含むDNAオリゴヌクレオチドは、DNAオリゴヌクレオチドの3'末端から修飾TTダイマーまでの間は、ヌクレアーゼにより通常分解されていると考えられる。すなわち、若干のヌクレアーゼ耐性を示すものの、前記修飾TTダイマーを含むDNAオリゴヌクレオチドの塩基配列は部分的に分解されており、その配列が保存されているわけではなく、DNAオリゴヌクレオチドの作用が低下する恐れがあった。前記のようなヌクレアーゼの反応特性を考えると、オリゴヌクレオチドの3'末端から1番目と2番目のヌクレオシド間の5', 3'-リン酸ジエステル結合を修飾すれば、ヌクレアーゼ対し耐性を示す修飾オリゴヌクレオチドが期待できる。しかし、固相合成技術を利用したオリゴヌクレオチド合成においては、その部位の修飾は困難であり、そのような修飾オリゴヌクレオチドは実現されていなかった。
- [0007] さらに、アンチセンス法、RNAiを利用する方法等、オリゴヌクレオチドを用いる方法では、そのオリゴヌクレオチドに天然のオリゴヌクレオチドとの二本鎖形成能力および

、その形成した二本鎖の安定性が要求されるが、化学構造が修飾された非天然型オリゴヌクレオチドには、通常、その二本鎖形成能力は低下するという問題があった。

非特許文献1: Adrian Waldner, Alain De Mesmaeker and Jacques Lebreton, 「Synthesis of Oligodeoxyribonucleotides containing Dimers with Carbamate Moieties as Replacement of the Natural Phosphodiester linkage」, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1994年, 第4巻, p.405

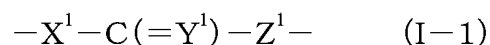
発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0008] そこで、本発明は、細胞膜に対する透過性、ヌクレアーゼ耐性および二本鎖形成能という3つの特性が優れた3'末端が修飾されたオリゴヌクレオチドの提供を目的とする。

課題を解決するための手段

- [0009] 本発明は、オリゴヌクレオチドの3'末端から1番目と2番目のヌクレオチド間の5', 3'-リン酸ジエステル結合が、下記式(I-1)で表される結合に置き換えられた修飾オリゴヌクレオチドである。



前記式(I-1)中、 X^1 はO、NHまたはS、 Y^1 はOまたはS、 Z^1 はO、NHまたはSである。

発明の効果

- [0010] 本発明は、従来製造が困難であった、3'末端から1番目と2番目のヌクレオチド間の5', 3'-リン酸ジエステル結合が修飾されたオリゴヌクレオチドの製造に成功したことに基づき、完成したものである。本発明では、その修飾として、前記式(I-1)で示す結合での置き換えを選択し、その修飾オリゴヌクレオチドのヌクレアーゼ耐性向上、細胞膜に対する透過性向上および二本鎖形成能の向上を実現した。さらに、本発明の修飾オリゴヌクレオチドのヌクレアーゼ耐性向上は、3'末端が修飾されたことから予想されるものをはるかに超える、優れたものである。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図1は、修飾二本鎖オリゴヌクレオチドの例を示す図である。

[図2]図2は、修飾二本鎖オリゴヌクレオチドの例および非修飾二本鎖オリゴヌクレオチドの一例のRNaseL発現濃度を示すグラフである。

[図3]図3は、修飾二本鎖オリゴヌクレオチドの例および非修飾二本鎖オリゴヌクレオチドの一例のRNaseL発現濃度を示すグラフである。

[図4]図4は、修飾二本鎖オリゴヌクレオチドの一例および非修飾二本鎖オリゴヌクレオチドの一例の細胞膜透過性を示す図である。

[図5]図5は、修飾二本鎖オリゴヌクレオチドの一例および非修飾二本鎖オリゴヌクレオチドの一例の細胞内RNaseL発現濃度を示す図である。

[図6]図6は、修飾二本鎖オリゴヌクレオチドの一例および非修飾二本鎖オリゴヌクレオチドの一例のエキソヌクレアーゼ耐性を示すグラフである。

[図7]図7は、修飾二本鎖オリゴヌクレオチドの例を示す図である。

[図8]図8は、修飾二本鎖オリゴヌクレオチドの一例のエンドヌクレアーゼ耐性を示すグラフである。

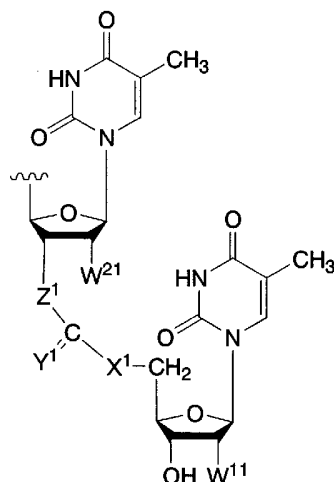
発明を実施するための最良の形態

[0012] 本発明において、「オリゴヌクレオチド」は、例えばヌクレオシドサブユニットのポリマーをいい、そのサブユニット数は特に限定されないが、例えば、4から100個である。中でも、本発明の修飾オリゴヌクレオチドがDNAである場合には、それらのサブユニット数は、4～100個が好ましく、4～30個がより好ましく、RNAである場合には、4～50個が好ましく、4～30個がより好ましい。なお、本発明における「オリゴヌクレオチド」は、3'末端から1番目と2番目のヌクレオシド間の5', 3'-リン酸ジエステル結合が修飾されていること以外は、特に限定されない。例えば、オリゴヌクレオチドのサブユニットであるヌクレオシドについては、糖部(例えば、2'置換体)および塩基は、当業者に公知な修飾体であってもよい。

[0013] 本発明の修飾オリゴヌクレオチド中の式(I-1)で表される結合 $-X^1-C(=Y^1)-Z^1$ は、便宜的に、ヌクレオシドの糖部分の5'位炭素原子に結合する結合手を左に、3'位炭素原子に結合する結合手を右に記載する。例えば、修飾オリゴヌクレオチドの3'末端がTTで、そのTT間の5', 3'-リン酸ジエステル結合が式(I-1)で表され

る結合に置き換えられている場合、以下のように表される。

[0014] [化36]



[0015] 前記式中、 W^{11} は、Hまたは式 OR^{11} で表される基であり、

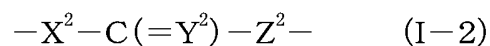
W^{21} は、Hまたは式 OR^{21} で表される基であり、

ここで、前記 R^{11} および R^{21} は、互いに独立して、保護基である。

[0016] 前記式(I-1)で表される結合は、例えば、 $-O-C(=O)-NH-$ 、 $-NH-C(=O)-O-$ 、 $-NH-C(=O)-NH-$ 、 $-NH-C(=O)-S-$ 、 $-S-C(=O)-NH-$ 、 $-O-C(=S)-NH-$ 、 $-NH-C(=S)-O-$ 、 $-NH-C(=S)-NH-$ 、 $-NH-C(=S)-S-$ 、 $-S-C(=S)-NH-$ 等が挙げられる。その中でも、前記式(I-1)で表される結合は、 $-O-C(=O)-NH-$ 、 $-NH-C(=O)-O-$ または $-NH-C(=O)-NH-$ が好ましい。

[0017] 本発明の修飾オリゴヌクレオチド中、下記(i)および(ii)の少なくとも一方を満たすのが好ましい。なお、下記式(I-2)および下記式(I-3)で表される結合についても、同様に、便宜的に、ヌクレオチドの糖部分の5'位炭素原子に結合する結合手を左に、3'位炭素原子に結合する結合手を右に記載する。

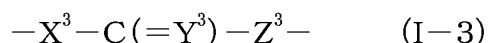
(i) 前記オリゴヌクレオチドの3'末端から2番目と3番目のヌクレオチド間の5', 3'-リン酸ジエステル結合が、下記式(I-2)で表される結合に置き換えられている。



前記式(I-2)中、 X^2 はO、NHまたはS、 Y^2 はOまたはS、 Z^2 はO、NHまたはSである

。

(ii) 前記オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目と4番目のヌクレオシド間の5', 3'リン酸ジエステル結合が、下記式(I-3)で表される結合に置き換えられている。



前記式(I-3)中、 X^3 はO、NHまたはS、 Y^3 はOまたはS、 Z^3 はO、NHまたはSである。

。

[0018] 前記式(I-2)で表される結合および前記式(I-3)で表される結合は、互いに独立して、例えば、 $-O-C(=O)-NH-$ 、 $-NH-C(=O)-O-$ 、 $-NH-C(=O)-NH-$ 、 $-NH-C(=O)-S-$ 、 $-S-C(=O)-NH-$ 、 $-O-C(=S)-NH-$ 、 $-NH-C(=S)-O-$ 、 $-NH-C(=S)-NH-$ 、 $-NH-C(=S)-S-$ 、 $-S-C(=S)-NH-$ 等から選択されるのが好ましい。中でも、前記式(I-2)で表される結合は、 $-O-C(=O)-NH-$ 、 $-NH-C(=O)-O-$ または $-NH-C(=O)-NH-$ がより好ましい。また、中でも、前記式(I-3)で表される結合は、 $-O-C(=O)-NH-$ 、 $-NH-C(=O)-O-$ または $-NH-C(=O)-NH-$ がより好ましい。

[0019] 前記(i)を満たす場合、式(I-1)で表される結合と式(I-2)で表される結合の組み合わせは、特に限定されないが、例えば、 $-O-C(=O)-NH-$ と $-O-C(=O)-NH-$ 、 $-NH-C(=O)-O-$ と $-NH-C(=O)-O-$ 、 $-NH-C(=O)-NH-$ と $-NH-C(=O)-NH-$ 等である。式(I-1)で表される結合と式(I-2)で表される結合とは、同一であっても、異なってもよい。また、前記(ii)を満たす場合、式(I-1)で表される結合と式(I-3)で表される結合の組み合わせは、特に限定されないが、例えば、 $-O-C(=O)-NH-$ と $-O-C(=O)-NH-$ 、 $-NH-C(=O)-O-$ と $-NH-C(=O)-O-$ 、 $-NH-C(=O)-NH-$ と $-NH-C(=O)-NH-$ 等である。式(I-1)で表される結合と式(I-3)で表される結合とは、同一であっても、異なってもよい。さらに、前記(i)と(ii)の両方を満たす場合、式(I-1)で表される結合と式(I-2)で表される結合と式(I-3)で表される結合の組み合わせは、特に限定されないが、例えば、 $-O-C(=O)-NH-$ と $-NH-C(=O)-O-$ と $-O-C(=O)-NH-$ 、 $-NH-C(=O)-O-$ と $-O-C(=O)-NH-$

—と—NH—C(=O)—O—等である。式(I-1)で表される結合と式(I-2)で表される結合と式(I-3)で表される結合は、同一であっても、異なってもよい。

[0020] 本発明の修飾オリゴヌクレオチドは、一本鎖オリゴヌクレオチド、二本鎖オリゴヌクレオチド等であってもよい。本発明の修飾オリゴヌクレオチドは、二本鎖形成能に優れるので、アンチセンス、siRNA等として用いるのに好ましい。修飾オリゴヌクレオチドが、二本鎖である場合、前記二本鎖オリゴヌクレオチドの一方または両方の一本鎖オリゴヌクレオチドの3'末端から1番目と2番目のヌクレオチド間の5', 3'-リン酸ジエステル結合が、前記式(I-1)で表される結合に置き換えられているのが好ましい。前記二本鎖オリゴヌクレオチドの両方の一本鎖オリゴヌクレオチドの3'末端から1番目と2番目のヌクレオチド間の5', 3'-リン酸ジエステル結合が、前記式(I-1)で表される結合に置き換えられている場合、双方の式(I-1)で表される結合は、同一であっても、相違してもよい。

[0021] 前記修飾オリゴヌクレオチドが二本鎖である場合、RNAi(RNA interference)を引き起こすオリゴヌクレオチドであり、前記修飾オリゴヌクレオチドが、エンドヌクレアーゼ等をコードするmRNAの一部と同じ塩基配列を有する修飾オリゴヌクレオチドが好ましい。このような修飾オリゴヌクレオチドは、RNAi研究等に有用だからである。前記エンドヌクレアーゼとしては、例えば、RNaseL等が挙げられる。

[0022] 前記修飾オリゴヌクレオチドが二本鎖である場合、前記修飾オリゴヌクレオチドが、siRNA(short interfering RNA)であり、前記mRNAの一部が、スタートコドンから75塩基以上上流の、最初のAA配列に続く19塩基配列であって、前記mRNAの一部が、前記mRNAに対して特異的であり、前記修飾オリゴヌクレオチドが、前記19塩基配列のセンス鎖とアンチセンス鎖との組み合わせであるのが好ましい。このようなセンス鎖は、例えば、以下のようにして得ることができる。まず、NCBI(National Center for Biotechnology Information)、EMBL-EBI(European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute)等の公知遺伝子データベースを用いて、例えばエキソヌクレアーゼのmRNA配列を取得する。その遺伝子配列中、スタートコドンから75塩基以上下流の、最初のAA配列を見つける。そのAA配列に続く19塩基配列、合計21塩基配列が、再度、公知の遺伝子データベースを用いて、目

的とする遺伝子に対して特異的であることを確認する。なお、この19塩基配列は、GC含有量が50%前後であることも確認する。この2つを確認して、得られた19塩基配列が、前記のようなセンス鎖である。

- [0023] 前述のように修飾オリゴヌクレオチドがsiRNAである場合、前記センス鎖およびアンチセンス鎖の一方またはその両方は、その3'末端にさらに2つのチミジンを含むヌクレオチドを有するのが好ましい。3'末端にこのような配列を有すると、RNAiが引き起こされやすくなるからである。また、この修飾オリゴヌクレオチドは、3'末端から1番目と2番目のヌクレオチドである、チミジン-チミジン配列が、前記式(I-1)で表される結合に置き換えられているので、二本鎖形成能に優れ、siRNA機能発揮の点から好ましい。
- [0024] また、前記修飾オリゴヌクレオチドが一本鎖である場合、前記修飾オリゴヌクレオチドは、アンチセンスDNAまたはアンチセンスRNAであり、前記修飾オリゴヌクレオチドが、エンドヌクレアーゼ等をコードするmRNAの一部または全部と相補的な配列を有するのが好ましい。修飾オリゴヌクレオチドが、このようなmRNAと二本鎖を形成し、エンドヌクレアーゼ等の発現を抑制可能だからである。
- [0025] 本発明の修飾オリゴヌクレオチドは、ヌクレアーゼ耐性であるのが好ましい。本発明の修飾オリゴヌクレオチドが、細胞内に取り込まれた際、ヌクレアーゼで分解されるのを防ぐことができ、その結果、修飾オリゴヌクレオチドの細胞内での活性を、持続させることが可能だからである。
- [0026] 本発明の遺伝子発現抑制剤は、本発明の修飾オリゴヌクレオチドを含む。このような遺伝子発現抑制剤は、修飾オリゴヌクレオチドが、例えば、標的遺伝子のmRNAを切断したり、標的遺伝子のmRNAと二本鎖を形成等して、その結果、遺伝子発現を抑制することができる。
- [0027] 本発明の医薬組成物は、遺伝子発現に伴う疾患を治療するためであり、前記遺伝子発現抑制剤を含むものである。遺伝子発現に伴う疾患、例えば、あるタンパク質が発現されることにより疾患が引き起こされる場合、この医薬組成物により、その遺伝子発現を抑制し、その遺伝子発現に伴う疾患を治療するのに用いることが可能である。
- [0028] このような医薬組成物は、さらに細胞導入用賦形剤を含むのが好ましい。遺伝子発

現に伴う疾患を治療する際、細胞内への導入を容易にすることが可能になるからである。前記細胞導入用賦形剤としては、例えば、トランスフェクション試薬等が挙げられる。前記トランスフェクション試薬とは、例えば、DNA分子(前記医薬組成物)を、リン脂質を用いて構成された人工脂質小胞(リポソーム)で包み込み、この人工脂質小胞を細胞懸濁液に加え、細胞表面に付着させ、細胞膜と融合させて、人工脂質小胞中のDNA分子を細胞内に取り込ませるリポフェクション方法において、用いられる、人工脂質小胞を形成する試薬である。前記トランスフェクション試薬としては、例えば、リポフェクタミン(インビトロジェン(Invitrogen)社製)、リポフェクタミン2000(インビトロジェン社製)、オリゴフェクタミン(Oligofectamin(インビトロジェン社製))、トランスメッセンジャー(TransMessenger(キーゲン(QIAGEN)社製))、siRNAトランスフェクション・キット・ジェットSI(アンビオン(Ambion)社製)、ジーンスライサーSiRNAトランスフェクション試薬(ジーン・セラピー・システムズ(Gene Therapy Systems)社製)等が、挙げられる。

[0029] 前述のように細胞導入用賦形剤を含むことによる他、本発明の医薬組成物は、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法等を用いて、細胞内に導入することもできる。前記エレクトロポレーション法は、例えば、細胞に電気パルスをかけてその細胞壁に穴をあけ、その穴から本発明の医薬組成物を細胞内へ導入する方法である。前記パーティクルガン法は、金微粒子にDNA分子(前記医薬組成物)などの分子を付着させ、パーティクルガン(粒子銃)を用いて、圧縮ヘリウムガスを利用し、銃弾を撃ち込むように金微粒子を細胞膜に透過させて、DNA分子(前記医薬組成物)を細胞内に導入する方法である。

[0030] 本発明のRNAiキットは、siRNAである修飾オリゴヌクレオチドを含む。このようなキットは、他に、ウェルと修飾オリゴヌクレオチド等とが固定されたプレート、ファイバー、バイオチップ等の固定化担体等が挙げられる。このようなキットには、前記修飾オリゴヌクレオチド等のほかに、例えば、薬物、反応して発色する発色試薬、検出を容易にする検出試薬等を含んでもよい。

[0031] 本発明のRNAi研究用試薬は、siRNAである修飾オリゴヌクレオチドを含む。RNAi研究の際、30bp以上のdsRNAを細胞へ導入すると、細胞固有の防御反応が活性

化され、mRNAをランダムに分解する反応が生じたりして、細胞内でRNAiが生じているかどうか、判断できない場合がある。このmRNAのランダム分解は、以下のメカニズムで生じると考えられている。まず、dsRNAにより2-5オリゴアデニル酸合成酵素(2-5AS)が活性化され、それにより生じた2-5Aが、RNAaseLを活性化する。そのRNAaseLが、mRNAをランダムに分解するというものである。siRNAである修飾オリゴヌクレオチドは、このRNAaseLの発現を抑制可能であるので、mRNAのランダム分解を抑制でき、その結果、例えばRNAiが細胞内で生じているか否かが判断しやすくなる。

[0032] 本発明の遺伝子発現抑制方法は、修飾オリゴヌクレオチドを用いて、遺伝子の発現を抑制する方法である。この方法では、修飾オリゴヌクレオチドが、例えば、標的遺伝子のmRNAを切断したり、標的遺伝子のmRNAと二本鎖を形成等して、その結果、遺伝子発現を抑制することができる。

[0033] 本発明のRNAiを引き起こす方法は、siRNAである修飾オリゴヌクレオチドを用いて、RNAiを引き起こす方法である。この方法では、修飾オリゴヌクレオチドがsiRNAであるので、RNAiを引き起こすことができる。

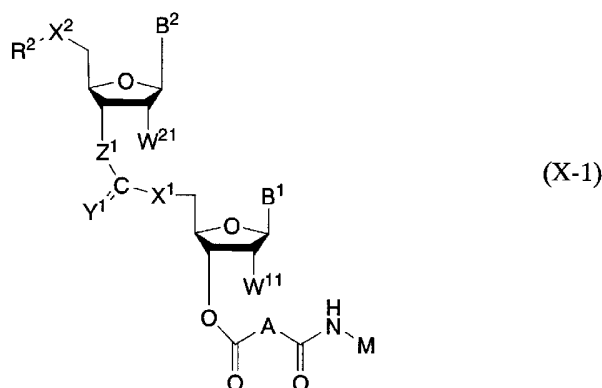
[0034] 次に、本発明の修飾オリゴヌクレオチドを製造するための製造方法について、例を挙げて説明する。このような製造方法により、従来製造することができなかった本発明の修飾オリゴヌクレオチドの製造が可能になった。

[0035] まず、オリゴヌクレオチドの3'末端から1番目と2番目のヌクレオチド間の3', 5'-リン酸ジエステル結合が、下記式(I-1)(下記式中、 X^1 はO、NHまたはS、 Y^1 はOまたはS、 Z^1 はO、NHまたはS)で表される結合に置き換えられた修飾オリゴヌクレオチドの製造例を説明する。

[0036] $-X^1-C(=Y^1)-Z^1-$ (I-1)

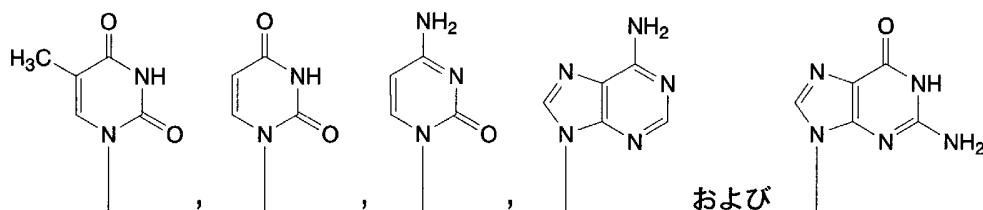
例えば、下記式(X-1)で表される固相合成用ユニット化合物を出発原料とし、式(X-1)で表される固相合成用ユニット化合物の R^2 を除去し、次いで、式(X-1)で表される固相合成用ユニット化合物の5'末端にヌクレオチドを伸長させ、その後、固相担体から切り出して前記修飾オリゴヌクレオチドを得ることができる。

[0037] [化37]



[0038] 前記式(X-1)中、 R^2 は、保護基であり、
 B^1 および B^2 は、互いに独立して、以下の式で示す基およびその官能基が保護基で保護された基から選択される基であり、

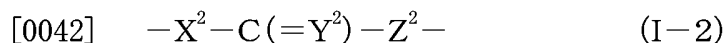
[0039] [化38]



[0040] Aは、式 $-(CH_2)_n-$ で表される基であり、前記式においてnは1～6の整数であり、
 W^{11} は、Hまたは式 OR^{11} で表される基であり、
 W^{21} は、Hまたは式 OR^{21} で表される基であり、
 ここで、前記 R^{11} および R^{21} は、互いに独立して、保護基であり、
 X^1 および X^2 は、互いに独立して、O、NHまたはSであり、
 Y^1 は、OまたはSであり、
 Z^1 は、O、NHまたはSであり、
 Mは、固相担体である。

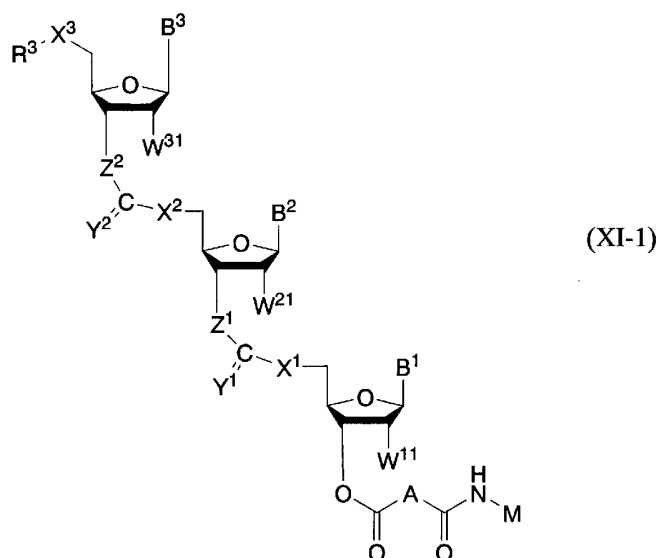
[0041] また、オリゴヌクレオチドの3'末端から1番目と2番目のヌクレオチド間の3', 5'-リン酸ジエステル結合が、前記式(I-1) (前記式中、 X^1 はO、NHまたはS、 Y^1 はOまたはS、 Z^1 はO、NHまたはS)で、かつ、オリゴヌクレオチドの3'末端から2番目と3番

目のヌクレオシド間の5', 3'-リン酸ジエステル結合が、下記式(I-2) (下記式中、 X^2 はO、NHまたはS、 Y^2 はOまたはS、 Z^2 はO、NHまたはS)表される結合に置き換えられた修飾オリゴヌクレオチドの製造例を説明する。



例えば、下記式(XI-1)で表される固相合成用ユニット化合物を出発原料とし、式(XI-1)で表される固相合成用ユニット化合物の R^3 を除去し、次いで式(XI-1)で表される固相合成用ユニット化合物の5'末端にヌクレオチドを伸長させ、その後、固相担体から切り出して前記修飾オリゴヌクレオチドを得ることができる。

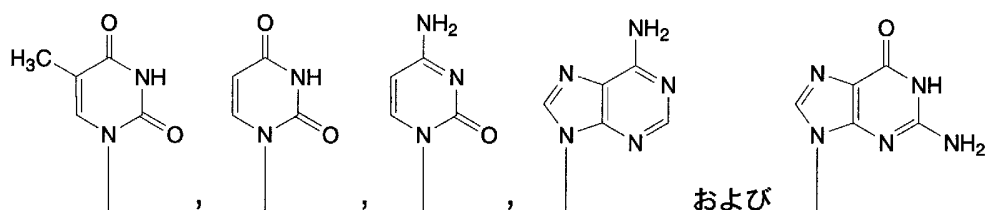
[0043] [化39]



[0044] 前記式中、 R^3 は、保護基であり、

B^1 、 B^2 および B^3 は、互いに独立して、以下の式で示す基およびその官能基が保護基で保護された基から選択される基であり、

[0045] [化40]



[0046] Aは、式 $-(CH_2)_n-$ で表される基であり、前記式においてnは1～6の整数であり、
 W^{11} は、Hまたは式 OR^{11} で表される基であり、
 W^{21} は、Hまたは式 OR^{21} で表される基であり、
 W^{31} は、Hまたは式 OR^{31} で表される基であり、
 ここで、前記 R^{11} 、 R^{21} および R^{31} は、互いに独立して、保護基であり、
 X^1 、 X^2 および X^3 は、互いに独立して、O、NHまたはSであり、
 Y^1 および Y^2 は、互いに独立して、OまたはSであり、
 Z^1 および Z^2 は、互いに独立して、O、NHまたはSであり、
 Mは、固相担体である。

[0047] また、オリゴヌクレオチドの3'末端から1番目と2番目のヌクレオチド間の3', 5'-リン酸ジエステル結合が、前記式(I-1)(前記式中、 X^1 はO、NHまたはS、 Y^1 はOまたはS、 Z^1 はO、NHまたはS)で、かつ、オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目と4番目のヌクレオチド間の5', 3'-リン酸ジエステル結合が、下記式(I-3)(下記式中、 X^3 はO、NHまたはS、 Y^3 はOまたはS、 Z^3 はO、NHまたはS)表される結合に置き換えられた修飾オリゴヌクレオチドの製造例を説明する。

[0048] $-X^3-C(=Y^3)-Z^3-$ (I-3)

例えば、下記式(XII-1)で表される固相合成用ユニット化合物を出発原料とし、式(XII-1)で表される固相合成用ユニット化合物の R^4 を除去し、次いで式(XII-1)で表される固相合成用ユニット化合物の5'末端にヌクレオチドを伸長させ、その後、固相担体から切り出して前記修飾オリゴヌクレオチドを得ることができる。

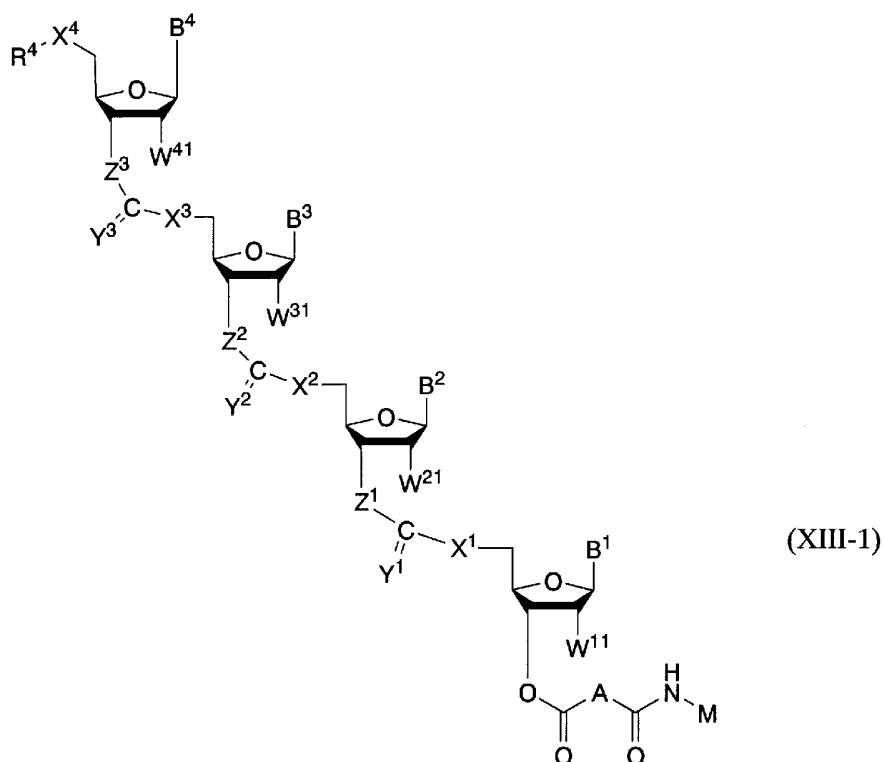
[0049] [化41]

ここで、前記 R^{11} 、 R^{21} 、 R^{31} および R^{41} は、互いに独立して、保護基であり、
 X^1 、 X^3 および X^4 は、互いに独立して、O、NHまたはSであり、
 Y^1 および Y^3 は、互いに独立して、OまたはSであり、
 Z^1 および Z^3 は、互いに独立して、O、NHまたはSであり、
Mは、固相担体である。

[0053] また、オリゴヌクレオチドの3'末端から1番目と2番目のヌクレオシド間の3', 5'-リン酸ジエステル結合が、前記式(I-1) (前記式中、 X^1 はO、NHまたはS、 Y^1 はOまたはS、 Z^1 はO、NHまたはS)で、かつ、オリゴヌクレオチドの3'末端から2番目と3番目のヌクレオシド間の5', 3'-リン酸ジエステル結合が、前記式(I-2) (前記式中、 X^2 はO、NHまたはS、 Y^2 はOまたはS、 Z^2 はO、NHまたはS)表される結合で、かつオリゴヌクレオチドの3'末端から3番目と4番目のヌクレオシド間の5', 3'-リン酸ジエステル結合が、前記式(I-3) (前記式中、 X^3 はO、NHまたはS、 Y^3 はOまたはS、 Z^3 はO、NHまたはS)表される結合に置き換えられた修飾オリゴヌクレオチドの製造例を説明する。

[0054] 例えば、下記式(XIII-1)で表される固相合成用ユニット化合物を出発原料とし、式(XIII-1)で表される固相合成用ユニット化合物の R^4 を除去し、次いで式(XIII-1)で表される固相合成用ユニット化合物の5'末端にヌクレオチドを伸長させ、その後、固相担体から切り出して前記修飾オリゴヌクレオチドを得ることができる。

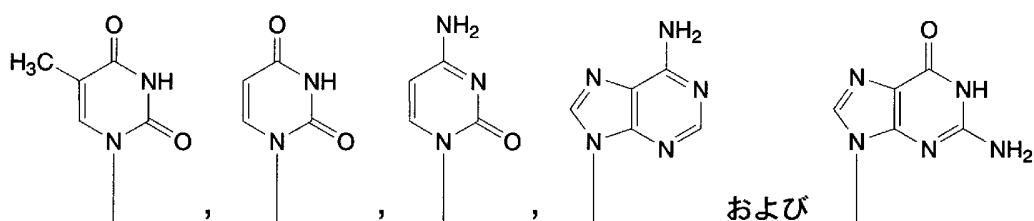
[0055] [化43]



[0056] 前記式中、 R^4 は、互いに独立して、保護基であり、

B^1 、 B^2 、 B^3 および B^4 は、互いに独立して、以下の式で示す基およびその官能基が保護基で保護された基から選択される基であり、

[0057] [化44]



[0058] A は、式 $-(CH_2)_n-$ で表される基であり、前記式において n は1～6の整数であり、

W^{11} は、 H または式 OR^{11} で表される基であり、

W^{21} は、 H または式 OR^{21} で表される基であり、

W^{31} は、 H または式 OR^{31} で表される基であり、

W^{41} は、 H または式 OR^{41} で表される基であり、

ここで、前記 R^{11} 、 R^{21} 、 R^{31} および R^{41} は、互いに独立して、保護基であり、 X^1 、 X^2 、 X^3 および X^4 は、互いに独立して、O、NHまたはSであり、 Y^1 、 Y^2 および Y^3 は、互いに独立して、OまたはSであり、 Z^1 、 Z^2 および Z^3 は、互いに独立して、O、NHまたはSであり、Mは、固相担体である。

- [0059] 前記固相担体とは、固相担体でDNA、RNA等を合成するのに適した固相担体であれば限定されず、例えば、CPG (コントロール細孔ガラス)、HCP (highly cross-linked polystyrene)等である。
- [0060] R^2 、 R^3 および R^4 について前記保護基とは、 $-X^2-H$ 、 $-X^3-H$ および $-X^4-H$ の反応性に応じて、従来公知の保護基から選択される。例えば、 X^2 、 X^3 または X^4 がOであるとき、従来公知の1級アルコールの保護基、例えば、ヌクレオシド化学の分野で公知の、4, 4'-ジメトキシトリチル(DMTTr)、4-モノメトキシトリチル(MMTTr)、(9-フェニル)キサンテン-9-イル[ピキシル(pixyl)]等が、その保護基として用いられうる。
- [0061] また、 R^{11} 、 R^{21} 、 R^{31} および R^{41} について前記保護基とは、2'位水酸基の反応性に応じて、従来公知の保護基から選択される。例えば、tert-ブチルジメチルシリル(TBDMS)、[(トリイソプロピルシリル)オキシ]メチル(Tom)、テトラヒドロピラニル(THP)等が、その保護基として用いられうる。
- [0062] また、Rについて前記保護基とは、リン酸の反応性に応じて、従来公知の保護基から選択される。例えば、シアノエチル(CE)、アリル(Allyl)、トリメチルシリルエチル(TMSE)、p-ニトロフェネチル(NPE)等が、その保護基として用いられうる。
- [0063] また、 B^1 、 B^2 、 B^3 および B^4 について、官能基が保護されている保護基とは、核酸化学において公知な保護基から選択される。例えば、ベンゾイル(Bz)、イソブチリル(iBu)、フェノキシアセチル(Pac)、アリルオキシカルボニル(AOC)等が、その保護基として用いられうる。
- [0064] 前記固相合成用ユニット化合物の5'末端にヌクレオチドを伸長させるには、オリゴヌクレオチド合成分野で従来公知の技術を用いて、修飾オリゴヌクレオチドの配列に従い、ヌクレオシドを順次カップリングさせて行うことができる。

なお、ヌクレオシド、カップリング試薬、脱保護試薬、洗浄試薬等は、通常核酸固相合成に用いられるものを用いる。得られた固相担体上の修飾オリゴヌクレオチドは、必要であればオリゴヌクレオチド側鎖の脱保護を行った後、固相担体から切り出して、粗修飾オリゴヌクレオチドを得る。切り出しに用いる試薬は、固相担体およびリンカー(固相担体と修飾オリゴヌクレオチドを接続する部分)構造等に応じて、従来公知の試薬から、適宜選択することができる。この粗修飾オリゴヌクレオチドは、必要であれば、HPLC等で精製してもよい。

[0065] 次に、修飾オリゴヌクレオチドが二本鎖である場合の製造について例を挙げて説明する。例えば前記のような方法に従い、一本鎖の修飾オリゴヌクレオチドをまず製造する。その修飾オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有する、一本鎖の天然オリゴヌクレオチドも別途、従来公知の方法に従い、製造する。次いで、得られた一本鎖の修飾オリゴヌクレオチドをアニーリング用緩衝液(例えば、100mMのKOAc水溶液、2 mMのMgOAc溶液、および30mMのHEPES-KOH(pH7.4)を含む緩衝液)中に溶解させたものと、一本鎖の天然オリゴヌクレオチドをアニーリング用緩衝液中に溶解させたものとを、例えば混合し、95℃で5分間処理し、その後、徐々に25℃まで冷却させて、二本鎖の修飾オリゴヌクレオチドを得ることができる。この二本鎖の修飾オリゴヌクレオチドは、必要に応じて、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿等をさらに行って、単離精製することができる。

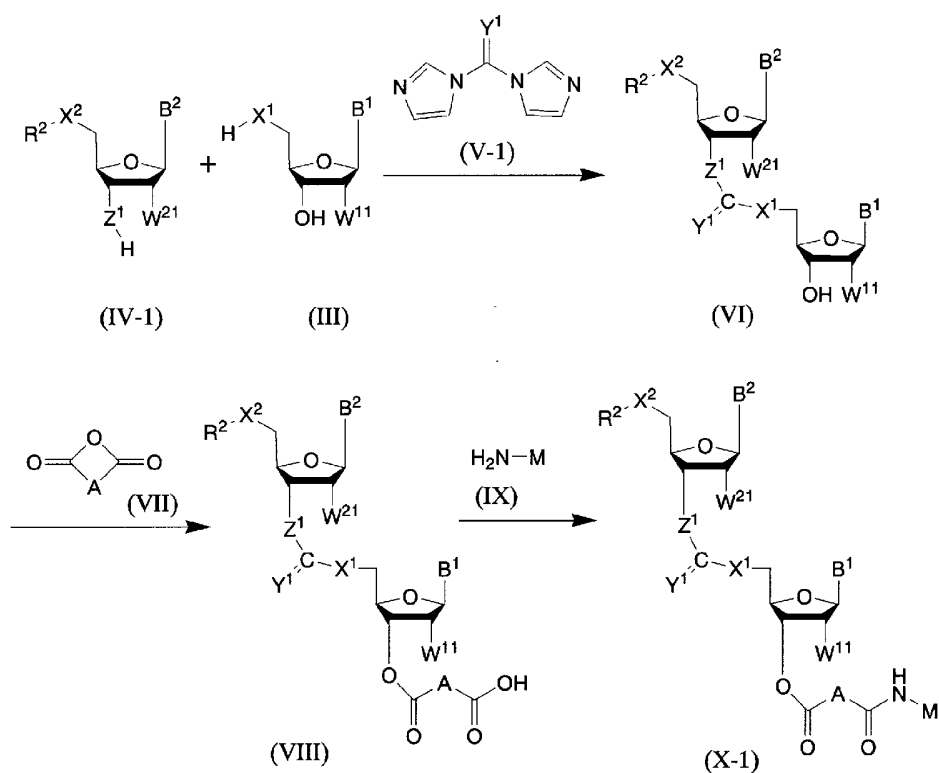
[0066] 前記製造方法で用いる式(X-1)の固相合成用ユニット化合物、式(XI-1)の固相合成用ユニット化合物、式(XII-1)の固相合成用ユニット化合物および式(XIII-1)の固相合成用ユニット化合物は、例えば、以下のような方法で製造することができる。

[0067] まず、ユニット化合物(X-1)の製造について、スキーム1を参照しながら説明する。式(IV-1)のヌクレオシド誘導体と、式(III)のヌクレオシド誘導体とを、式(V-1)のジイミダゾール誘導体ならびに任意に、塩基(例えば、ピリジン等)、触媒(例えば4-ジメチルアミノピリジン(DMAP)等)等の存在下に反応させ、二量体(VI)を得る。式(IV-1)および式(III)のヌクレオシドは、市販で入手してもよいし、公知文献を利用して自家製造してもよい。

[0068] 次に、得られた二量体(VI)に、無水物(VII)を、任意に、塩基(例えば、ピリジン、トリエチルアミン等)、触媒(例えば4-ジメチルアミノピリジン(DMAP)等)等の存在下に反応させ、二量体(VIII)を得る。

[0069] 次に、得られた二量体(VIII)と、アミノ基を有する固相担体(IX)とをカップリング試薬(例えば、WSC(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))存在下に縮合させ、ユニット化合物(X-1)を得る。

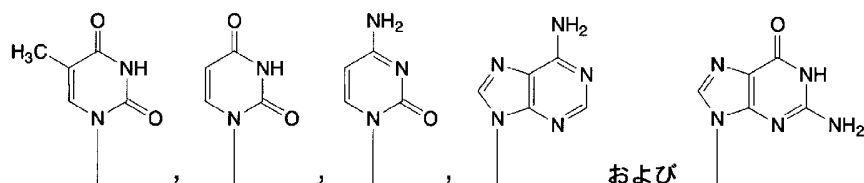
[0070] [化45]



スキーム 1

[0071] 前記式中、
 R^2 は、保護基であり、
 B^1 および B^2 は、互いに独立して、以下の式で示す基およびその官能基が保護基で保護された基から選択される基であり、

[0072] [化46]



[0073] Aは、式 $-(CH_2)_n-$ で表される基であり、前記式においてnは1～6の整数であり、

W^{11} は、Hまたは式 OR^{11} で表される基であり、

W^{21} は、Hまたは式 OR^{21} で表される基であり、

ここで、前記 R^{11} および R^{21} は、互いに独立して、保護基であり

X^1 および X^2 は、互いに独立して、O、NHまたはSであり、

Y^1 は、OまたはSであり、

Z^1 は、O、NHまたはSであり、

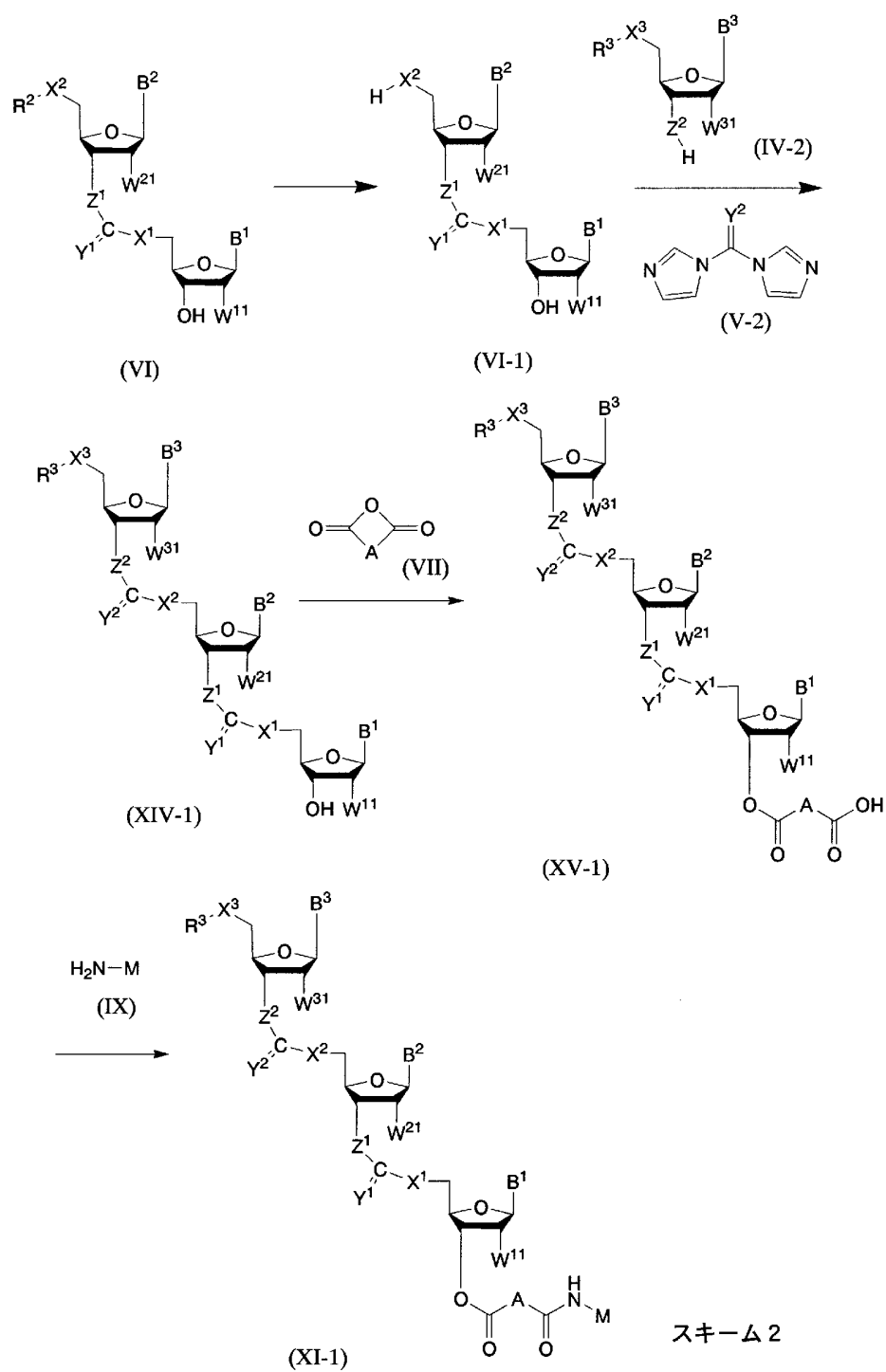
Mは、固相担体である。

[0074] つぎに、ユニット化合物(XI-1)の製造例について、スキーム2を参照しながら説明する。例えば、式(VI)の二量体の R^2 を R^2 の性質に応じた方法により、Hに置き換え、5'位が遊離型の式(VI-1)の二量体を得る。次いで、式(VI-1)の二量体と、式(IV-2)のヌクレオシド誘導体とを、式(V-2)のジミダゾール誘導体ならびに任意に、塩基(例えば、ピリジン等)、触媒(例えば4-ジメチルアミノピリジン(DMAP)等)等の存在下に反応させ、三量体(XIV-1)を得る。式(IV-2)のヌクレオシドは、市販で入手してもよいし、公知文献を利用して自家製造してもよい。

[0075] 次に、得られた三量体(XIV-1)に、無水物(VII)を、任意に、塩基(例えば、ピリジン、トリエチルアミン等)、触媒(例えば4-ジメチルアミノピリジン(DMAP)等)等の存在下に反応させ、三量体(XV-1)を得る。

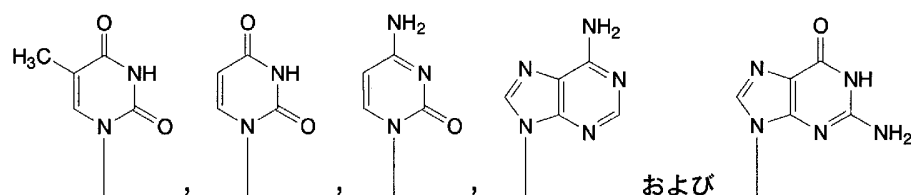
[0076] 次に、得られた三量体(XV-1)と、アミノ基を有する固相担体(IX)とをカップリング試薬(例えば、WSC(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド・塩酸塩))存在下に縮合させ、ユニット化合物(XI-1)を得る。

[0077] [化47]



[0078] 前記式中、R²およびR³は、互いに独立して、保護基であり、
 B¹、B²およびB³は、互いに独立して、以下の式で示す基およびその官能基が保護基
 で保護された基から選択される基であり、

[0079] [化48]



[0080] Aは、式 $-(CH_2)_n-$ で表される基であり、前記式においてnは1～6の整数であり、

W^{11} は、Hまたは式 OR^{11} で表される基であり、

W^{21} は、Hまたは式 OR^{21} で表される基であり、

W^{31} は、Hまたは式 OR^{31} で表される基であり、

ここで、前記 R^{11} 、 R^{21} および R^{31} は、互いに独立して、保護基であり

X^1 、 X^2 および X^3 は、互いに独立して、O、NHまたはSであり、

Y^1 および Y^2 は、互いに独立して、OまたはSであり、

Z^1 および Z^2 は、互いに独立して、O、NHまたはSであり、

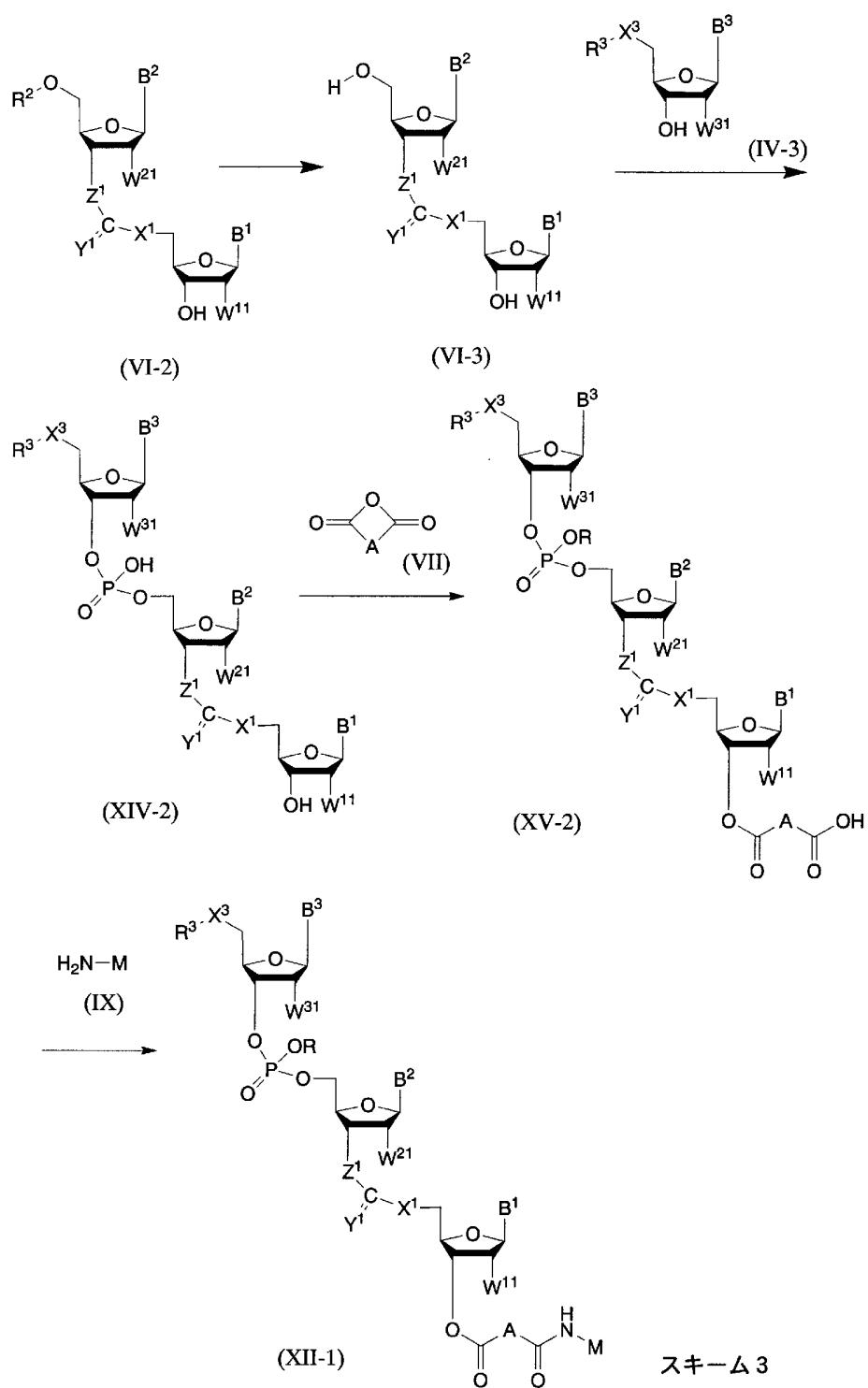
Mは、固相担体である。

[0081] つぎに、ユニット化合物(XII-1)の製造例について、スキーム3を参照しながら説明する。例えば、式(VI-2)の二量体の R^2 を R^2 の性質に応じた方法により、Hに置き換え、5'位が遊離型の式(VI-3)の二量体を得る。次いで、式(VI-3)の二量体と、式(IV-3)のヌクレオシド誘導体とを、リン酸結合試薬(例えば、2-シアノエチルN,N-ジイソプロピルクロロホスホロアミダイト等)の存在下縮合させ、式(XIV-2)の三量体を得る。式(IV-3)のヌクレオシドは、市販で入手してもよいし、公知文献を利用して自家製造してもよい。

[0082] 次に、得られた三量体(XIV-2)に、無水物(VII)を、任意に、塩基(例えば、ピリジン、トリエチルアミン等)、触媒(例えば4-ジメチルアミノピリジン(DMAP)等)等の存在下に反応させ、三量体(XV-2)を得る。

[0083] 次に、得られた三量体(XV-2)と、アミノ基を有する固相担体(IX)とをカップリング試薬(例えば、WSC(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))存在下に縮合させ、ユニット化合物(XII-1)を得る。

[0084] [化49]

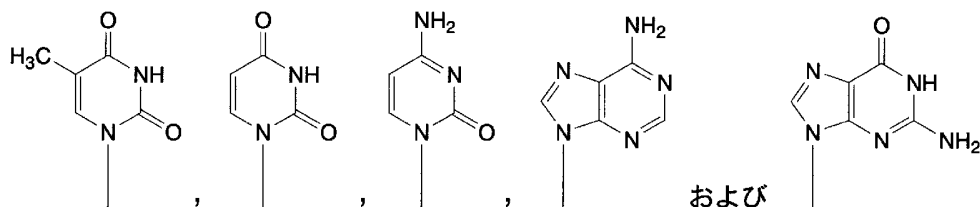


[0085] 前記式中、 R^2 、 R^3 および R は、互いに独立して、保護基であり、

B^1 、 B^2 および B^3 は、互いに独立して、以下の式で示す基およびその官能基が保護基

で保護された基から選択される基であり、

[0086] [化50]



[0087] Aは、式 $-(CH_2)_n-$ で表される基であり、前記式においてnは1～6の整数であり、

W^{11} は、Hまたは式 OR^{11} で表される基であり、

W^{21} は、Hまたは式 OR^{21} で表される基であり、

W^{31} は、Hまたは式 OR^{31} で表される基であり、

ここで、前記 R^{11} 、 R^{21} および R^{31} は、互いに独立して、保護基であり

X^1 および X^3 は、互いに独立して、O、NHまたはSであり、

Y^1 は、互いに独立して、OまたはSであり、

Z^1 は、互いに独立して、O、NHまたはSであり、

Mは、固相担体である。

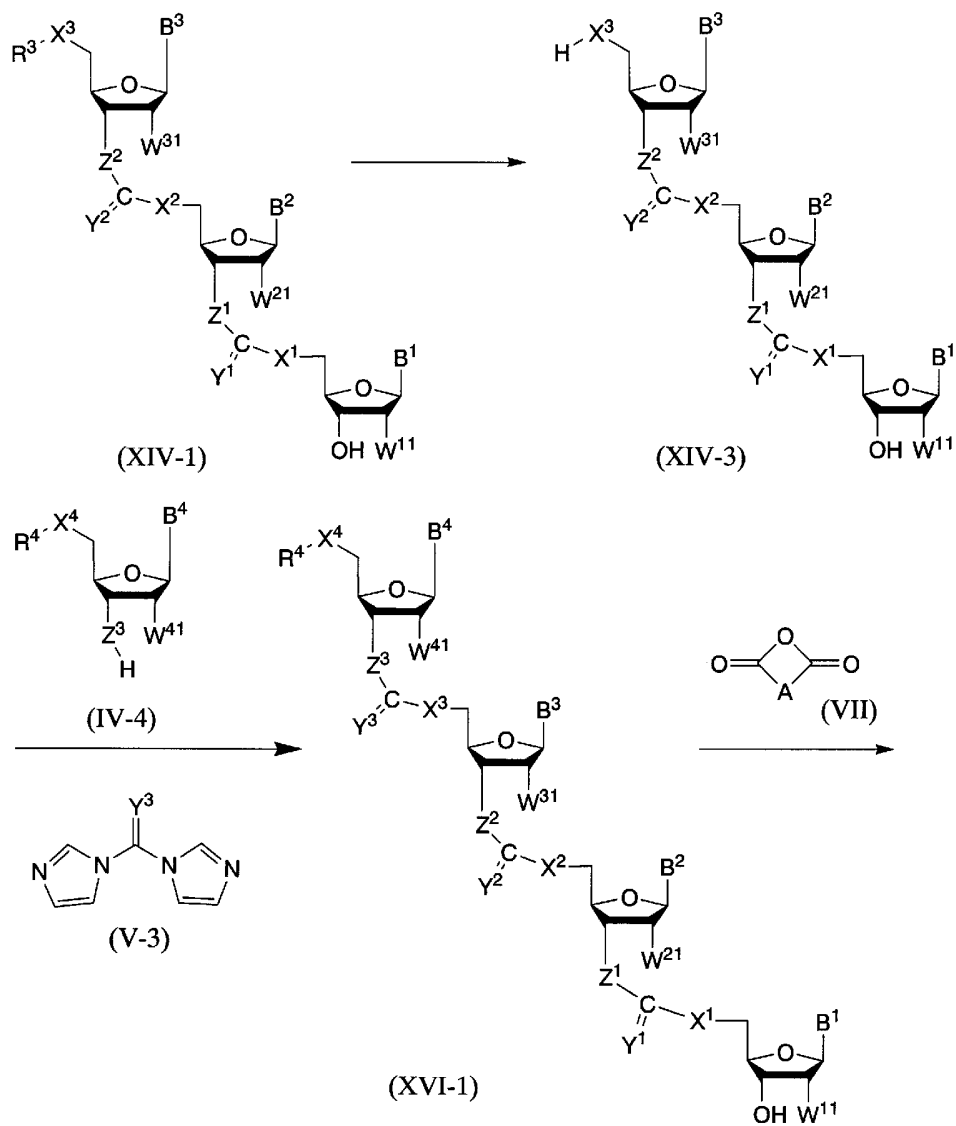
[0088] つぎに、ユニット化合物(XIII-1)の製造例について、スキーム4を参照しながら説明する。例えば、式(XIV-1)の三量体の R^3 を R^3 の性質に応じた方法により、Hに置き換え、5'位が遊離型の式(XIV-3)の三量体を得る。次いで、式(XIV-3)の三量体と、式(IV-4)のヌクレオシド誘導体とを、式(V-3)のジミダゾール誘導体ならびに任意に、塩基(例えば、ピリジン等)、触媒(例えば4-ジメチルアミノピリジン(DMAP)等)等の存在下に反応させ、四量体(XVI-1)を得る。式(IV-4)のヌクレオシドは、市販で入手してもよいし、公知文献を利用して自家製造してもよい。

[0089] 次に、得られた四量体(XVI-1)に、無水物(VII)を、任意に、塩基(例えば、ピリジン、トリエチルアミン等)、触媒(例えば4-ジメチルアミノピリジン(DMAP)等)等の存在下に反応させ、四量体(XVII-1)を得る。

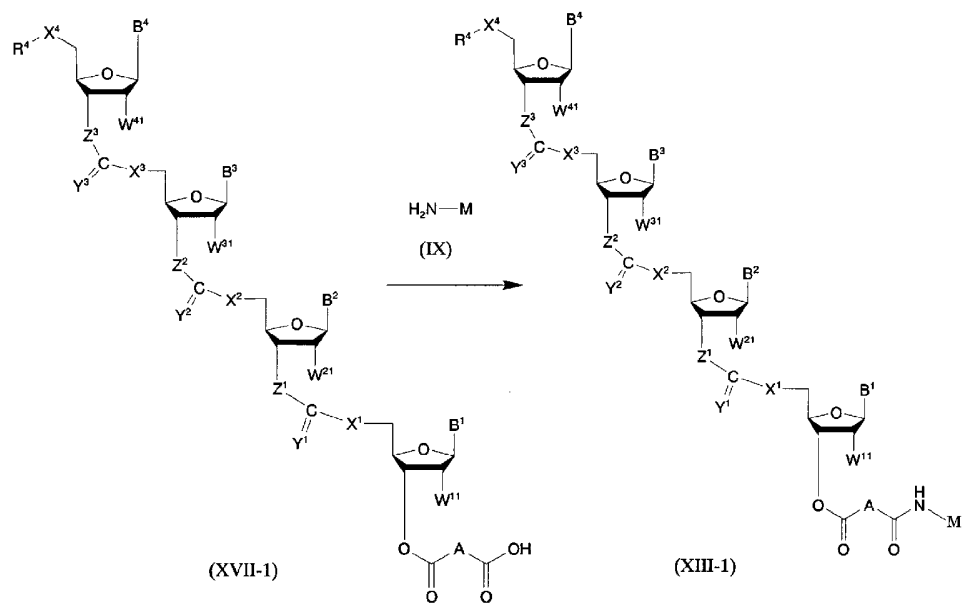
[0090] 次に、得られた四量体(XVII-1)と、アミノ基を有する固相担体(IX)とをカップリング試薬(例えば、WSC(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミ

ド・塩酸塩))存在下に縮合させ、ユニット化合物(XIII-1)を得る。

[0091] [化51]



[0092] [化52]



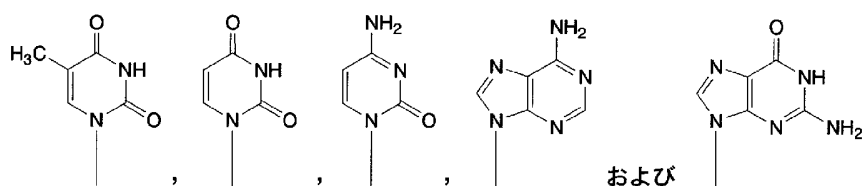
スキーム 4

[0093] 前記式において、

R^3 および R^4 は、保護基であり、

B^1 、 B^2 、 B^3 および B^4 は、互いに独立して、以下の式で示す基およびその官能基が保護基で保護された基から選択される基であり、

[0094] [化53]



[0095] Aは、式 $-(\text{CH}_2)_n-$ で表される基であり、前記式においてnは1～6の整数であり、

W^{11} は、Hまたは式 OR^{11} で表される基であり、

W^{21} は、Hまたは式 OR^{21} で表される基であり、

W^{31} は、Hまたは式 OR^{31} で表される基であり、

W^{41} は、Hまたは式 OR^{41} で表される基であり、

ここで、前記 R^{11} 、 R^{21} 、 R^{31} および R^{41} は、互いに独立して、保護基であり、

X^1 、 X^2 、 X^3 および X^4 は、互いに独立して、O、NHまたはSであり、

Y^1 、 Y^2 および Y^3 は、互いに独立して、OまたはSであり、

Z^1 、 Z^2 および Z^3 は、互いに独立して、O、NHまたはSであり、

Mは、固相担体である。

- [0096] なお、スキーム1～4の各工程において、必要であれば、各官能基に保護基を導入したり、保護基を脱保護したり、保護基を変更してもよい。なお、官能基の種類に応じた保護基の選択、保護基の導入および保護基の除去は、当該分野で公知の方法に従い、行うことができ、例えば、「有機合成における保護基(Protective Groups in Organic Synthesis)」、T. Greeneら著、John Wiley & Sons, Inc.出版」等を参照することができる。

実施例

- [0097] 本明細書の記載において、以下の略語を使用する。

Ar: アルゴン

APS: アンモニウム ペルオキシジサルフェート(ammonium peroxodisulfate)

CPG: コントロール細孔ガラス (controlled pore glass)

DIAD: ジイソプロピルアゾカルボキシレート(diisopropylazocarboxyrate)

DMAP: 4-ジメチルアミノピリジン (4-dimethylaminopyridine)

DMTrCl: 4,4'-ジメトキシトリチルクロライド(4,4'-dimethoxytritylchloride)

DMF: ジメチルホルムアミド (dimethylformamide)

EDTA: エチレンジアミン-N, N, N', N' -テトラ酢酸・ジナトリウム塩・dehydrate(ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid, disodium salt, dehydrate)

FAB: 高速原子衝撃(fast atom bombardment)

HRMS: 高分解能質量分析(high-resolution mass spectrometry)

Im₂CO: 1-1'-カルボニルビス-1H-イミダゾール(1-1'-Carbonylbis-1H-imidazole)

mRNA: メッセンジャー リボ核酸 (messenger ribonucleic acid)

NBA: 3-ニトロベンジルアルコール (3-nitrobenzylalcohol)

PAGE: ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (polyacrylamide gel electrophoresis)

TBAF: トリブチルアンモニウムフルオライド (tributylammoniumfluoride)

TBE: Tris-ホウ酸-EDTA (Tris-boric acid-EDTA)

TEAA: トリエチルアミン-酢酸 (triethylamine-acetic acid)

TBDMSCl: tert-ブチルジメチルシリルクロライド (tert-butyldimethylsilylchloride)

TEMED: N, N, N', N' - テトラメチル-エチレンジアミン (N,N,N',N'-tetramethyl-ethylenediamine)

THF: テトラヒドロフラン (tetrahydrofuran)

TRIS: トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン (tris(hydroxymethyl)aminomethane)

WSC: 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 (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide, hydrochloride)

CPG上の化合物の活性は、以下のようにして算出した。

[0098] 乾燥させたCPG 6mgをガラスフィルターにのせ、そこへHClO₄およびエタノールの混合物 (HClO₄:EtOH=3:2)を流し込んだ。得られたろ液の吸光度(波長498nm (DMTr基の吸収波長))を測定し、その値を以下の式に代入して算出した。

[0099] [数1]

$$\frac{Abs.(498nm) \times Vol.(solution)(mL) \times 14.3}{Weight(support)(mg)} = \text{活性} \quad (\mu \text{ mol/g})$$

[0100] 前記式中、Abs.は、波長498nmにおけるCPGの吸光度であり、

Vol.は、測定したろ液の容量であり、

weightは、測定したCPGの重量である。

[0101] 1. 修飾1本鎖オリゴヌクレオチドまたは修飾2本鎖オリゴヌクレオチド製造のための、モノマー製造

[0102] (1) 5'-O-(4, 4'-ジメトキシトリチル)チミジン (IV-11) (5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)thymidine)の製造 (S. Agrawalら, Methods in Molecular Biology vol.20, 360-366に従い製造。)

チミジン (2.03g, 8.43mmol) のピリジン (16mL) 溶液を、Ar雰囲気下、室温で

攪拌した。そこへDMTrCl(3.08g, 9.11mmol, 1.1当量)を加えて、さらに室温で攪拌した。12時間後、その反応混合物へ、さらにDMTrClを1当量(0.28g, 0.83mmol)加えて、さらにその反応混合物を攪拌した。TLC分析により、チミジンがこれ以上消費されないことを確認した後、その反応混合物に、氷冷下でメタノールを加えた。その反応混合物から溶媒を減圧下に留去した後、得られた残渣をクロロホルムで希釈した。そのクロロホルム溶液を、飽和 NaHCO_3 水溶液(2回)および飽和 NaCl 水溶液(1回)で順次洗浄し、その後、硫酸ナトリウムで乾燥させた。前記クロロホルム溶液から溶媒を減圧下に留去し、得られた残渣をトルエンで共沸した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー($\text{MeOH}:\text{CHCl}_3=0\sim 4\%$)で精製して、白色の泡状結晶の標題化合物を得た(3.55g, 6.51mmol, 収率77%)。

[0103] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ : 1.47 (3H, s, 5-CH_3), 2.32-2.41 (2H, m, $2'\text{-H}$), 3.35-3.49 (2H, m, $5'\text{-H}$), 3.79 (6H, s, $-\text{OCH}_3$), 4.06 (1H, m, $4'\text{-H}$), 4.54 (1H, m, $3'\text{-H}$), 6.44 (1H, t, $J=6.8$ Hz, $1'\text{-H}$), 6.83-7.40 (13H, m, DMTr), 7.59 (1H, s, 6-H), 8.66 (1H, s, 1-NH).

[0104] (2) $3'\text{-O-tert-ブチルジメチルシリルチミジン}$ (III-12) の製造 (S. Agrawalら, *Methods in Molecular Biology* vol.20, 360-366に従い製造。)

[0105] (i) $3'\text{-O-tert-ブチルジメチルシリル-5'-O-(4,4'\text{-ジメトキシトリチル})$ チミジン ($3'\text{-O-tert-butyl dimethylsilyl-5'-O-(4,4'\text{-dimethoxytrityl})thymidine$) の製造

$5'\text{-O-(4,4'\text{-ジメトキシトリチル})チミジン}$ (1.04g, 1.91mmol) およびイミダゾール (0.32g, 4.74mmol, 2.5当量) を、 Ar 雰囲気下で DMF (8.0mL) に溶解させ、得られた溶液を Ar 雰囲気下で攪拌した。TBDMSCl (0.36g, 2.37mmol, 1.当量) を前記溶液に加えた後、その反応混合物を Ar 雰囲気下で12時間攪拌した。TLC分析により、 $5'\text{-O-(4,4'\text{-ジメトキシトリチル})チミジン}$ がこれ以上消費されないことを確認した後、その反応混合物に氷冷下でメタノール (4mL) を加えた。その反応混合物から溶媒を減圧下に留去した後、得られた残渣を酢酸エチル希釈した。その酢酸エチル溶液を、飽和 NaHCO_3 水溶液(2回)および飽和 NaCl 水溶液(1回)で順次洗浄し、その後、硫酸ナトリウムで乾燥させた。前記酢酸エチル溶液から溶媒を

減圧下に留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (MeOH:CHCl₃=0~5%) で精製して、白色の泡状結晶の標題化合物を得た (1.18g, 1.79mmol, 収率94%)。

[0106] ¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ:0.09 (6H, s, TBDMS-CH₃), 0.81 (9H, s, t-ブチル), 1.47 (3H, s, 5-CH₃), 2.16-2.33 (2H, m, 2'-H), 3.23-3.46 (2H, m, 5'-H), 3.77 (6H, s, OCH₃), 3.94-3.95 (1H, m, 4'-H), 4.49-4.50 (1H, m, 3'-H), 6.32 (1H, t, J=6.6 Hz, 1'-H), 6.80-7.39 (13H, m, DMTr), 7.63 (1H, s, 6-H), 8.15 (1H, s, NH).

[0107] (ii) 3'-O-tert-ブチルジメチルシリルチミジン(III-12) (3'-O-tert-butyl dimethylsilylthymidine) の製造

3'-O-tert-ブチルジメチルシリル-5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)チミジン (1.18g, 1.79mmol) に80%酢酸水溶液 (26mL) を加え、その反応混合物を攪拌した。1時間後、TLC分析により3'-O-tert-ブチルジメチルシリル-5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)チミジンの消失を確認した後、前記反応混合物から溶媒を減圧下に留去した。得られた残渣を酢酸エチルで希釈した。その酢酸エチル溶液を、飽和NaHCO₃水溶液 (2回) および飽和NaCl水溶液 (1回) で順次洗浄し、その後硫酸ナトリウムで乾燥させた。前記酢酸エチル溶液から溶媒を減圧下に留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (MeOH:CHCl₃=0~3%) で精製して、白色結晶の標題化合物を得た (0.60g, 1.68mmol, 収率94%)。

[0108] ¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ:0.03 (6H, s, TBDMS-CH₃), 0.81 (9H, s, t-ブチル), 1.83 (3H, s, 5-CH₃), 2.10-2.41 (2H, m, 2'-H), 3.64-3.69 (1H, m, 4'-H), 3.81-3.86 (2H, m, 5'-H), 4.39-4.42 (1H, m, 3'-H), 6.02-6.05 (1H, t, J=6.8 Hz, 1'-H), 7.26 (1H, s, 6-H), 8.34 (1H, s, NH).

(3) 5'-アミノチミジン(III-11)の製造 (T. Hataら, J. Chem. Soc., Perkin trans. I, 1980, 306-310に従い製造。)

[0109] (i) 5'-アジドチミジン (5'-azidothymidine) の製造

チミジン (2.00g, 8.26mmol)、Ph P (2.00g, 8.26mmol, 1.0当量) および NaN₃ (2.60g, 41.3mmol, 5.0当量) をDMF (40mL) に溶解させ、その溶液にCB

r_4 (2.80g, 8.40mmol, 1.0当量)を加えた。得られた反応混合物を、Ar雰囲気下に85°Cで攪拌した。25時間後、TLC分析によりチミジンの消失を確認した後、前記反応混合物を酢酸エチルで希釈し、水(3回)、飽和 NaHCO_3 水溶液(1回)、飽和 NaCl 水溶液(1回)で順次洗浄し、その後硫酸ナトリウムで乾燥させた。その酢酸エチル溶液から溶媒を減圧下に留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー($\text{MeOH}:\text{CHCl}_3=1:49\sim7:93$)で精製して、白色結晶の標題化合物を得た(収量2.01g, 7.52mmol, 収率91%)。

[0110] ^1H NMR(400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 1.78 (3H, s, 5-CH_3), 2.06–2.28 (2H, m, $2'\text{-H}$), 3.55 (2H, d, $J=4.8\text{Hz}$, $5'\text{-H}$), 3.83 (1H, m, $4'\text{-H}$), 4.08 (1H, m, $3'\text{-H}$), 3.40 (1H, d, $J=3.6\text{Hz}$, 3-OH), 6.19 (1H, t, $J=6.8\text{Hz}$, $1'\text{-H}$), 7.55 (1H, s, 6-H), 11.32 (1H, s, NH).

[0111] (ii) 5'-アミノチミジン(III-11)(5'-aminothymidine)の製造

5'-アジドチミジン(0.23g, 0.94mmol)および5%Pd触媒(0.065g)を、エタノールと塩化メチレンの混合溶媒($\text{EtOH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2=1:1$) (3.1mL)中、水素雰囲気下で24時間攪拌した。TLC分析により5'-アジドチミジンの消失を確認した後、反応混合物をセライト濾過した。得られたろ液から溶媒を減圧下に留去して、白色結晶の標題化合物を得た(収量0.22g, 0.89mmol, 収率95%)。

[0112] ^1H NMR(400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 1.74 (3H, s, 5-CH_3), 2.00–2.16 (2H, m, $2'\text{-H}$), 2.49–2.77 (2H, m, $5'\text{-H}$), 3.20–3.45 (1H, br, $3'\text{-OH}$), 3.63–3.66 (1H, m, $4'\text{-H}$), 4.16–4.20 (1H, m, $3'\text{-H}$), 6.13 (1H, t, $J=6.8\text{Hz}$, $1'\text{-H}$), 7.63 (1H, s, 6-H).

[0113] (4) 3'-アミノ-5'-O-tert-ブチルジメチルシリルチミジン(IV-12)の製造 (E. W. Harkinsら, Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, 4. 7. 15–4. 7.17に従い製造。)

[0114] (i) 5'-O-tert-ブチルジメチルシリルチミジン(5'-O-tert-butyl dimethylsilylthymidine)の製造

チミジン(2.00g, 8.26mmol)をDMFで共沸し、DMF(16.5mL)に溶かした。その溶液に、 Et_3N (1.36mL, 9.91mmol, 1.2当量)、DMAP(0.05g, 0.41mmol)を加えた。

mol, 0.05当量)およびTBDMSCl(1.36g, 9.02mmol, 1.1当量)を順次加え、得られた反応混合物をAr雰囲気下に室温で2時間半撹拌した。さらにTBDMSCl(0.25g, 1.66mmol, 0.2当量)を前記反応混合物に加え、さらに30分間撹拌した。TLC分析でチミジンの消失を確認した後、その反応混合物を酢酸エチルで希釈した。得られた酢酸エチル溶液を、水(3回)、飽和NaHCO₃水溶液(1回)、飽和NaCl水溶液(1回)で順次洗浄し、その後硫酸ナトリウムで乾燥させた。その酢酸エチル溶液から溶媒を減圧下に留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(MeOH:CHCl₃=0:1~1:20)で精製して、白色結晶の標題化合物を得た(収量2.44g, 6.84mmol, 収率83%)。

[0115] ¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ:0.12 (6H, m, TBDMS-CH₃), 0.92 (9H, s, t-ブチル), 1.89 (3H, s, 5-CH₃), 2.08-2.39 (3H, m, 2'-H and 3'-OH), 3.82-3.92 (2H, m, 5'-H), 4.03 (1H, m, 4'-H), 4.47 (1H, m, 3'-H), 6.37 (1H, m, 1'-H), 7.50 (1H, s, 6-H), 8.44 (1H, br, NH).

[0116] (ii) 2, 3'-アンハイドロ-5'-O-tert-ブチルジメチルシリルチミジン(2,3'-anhydro-5'-O-tert-butyltrimethylsilylthymidine)の製造

5'-O-tert-ブチルジメチルシリルチミジン(2.19g, 6.14mmol)およびPh₃P(2.60g, 9.91mmol, 1.6当量)のDMF(7.0mL)溶液に、DIAD(3.2mL, 9.00mmol, 1.6当量, 40%トルエン溶液)のDMF(3.1mL)溶液を加え、得られた反応混合物をAr雰囲気下に室温で撹拌した。3時間半後、TLC分析により5'-O-tert-ブチルジメチルシリルチミジンの消失を確認した。この反応混合物を酢酸エチルで希釈し、水(3回)、飽和NaHCO₃水溶液(1回)、飽和NaCl水溶液(1回)で順次洗浄し、その後硫酸ナトリウムで乾燥させた。得られた酢酸エチル溶液から溶媒を減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(n-ヘキサン:EtOAc:MeOH=1:1:0~0:10:1)で精製して、白色結晶の標題化合物を得た(収量1.63g, 4.82mmol, 収率79%)。

[0117] ¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ:0.07 (6H, s, TBDMS-CH₃), 0.88 (9H, s, t-ブチル), 1.95 (3H, s, 5-CH₃), 2.43-2.67 (2H, m, 2'-H), 3.73-3.83 (2H, m, 5'-H), 4.28 (1H, t, J=5.6Hz, 4'-H), 5.19 (1H, s, 3'-H), 5.47 (1H, s, 1'

-H), 6.95 (1H, s, 6-H).

- [0118] (iii) 3'-アジド-5'-O-tert-ブチルジメチルシリルチミジン (3'-azido-5'-O-tert-butyl dimethylsilylthymidine) の製造

2, 3'-アンハイドロ-5'-O-tert-ブチルジメチルシリルチミジン (0.48g, 1.41mmol) の DMF (4.2mL) 溶液に、 NaN_3 (0.14g, 2.21mmol, 1.5当量) を加え、その反応混合物を Ar 雰囲気下に 120°C で攪拌した。48時間後、TLC 分析により、2, 3'-アンハイドロ-5'-O-tert-ブチルジメチルシリルチミジンの消失を確認した。この反応混合物を酢酸エチルで希釈し、水 (3回)、飽和 NaHCO_3 水溶液 (1回)、飽和 NaCl 水溶液 (1回) で順次洗浄し、その後硫酸ナトリウムで乾燥させた。得られた酢酸エチル溶液から溶媒を減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン:EtOAc=0:1) で精製して、油状の標題化合物を得た (収量 0.48g, 1.25mmol, 収率 88%)。

- [0119] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ : 0.01 (6H, m, TBDMS- CH_3), 0.80 (9H, m, t-ブチル), 1.80 (3H, s, 5'- CH_3), 2.07-2.34 (2H, m, 2'-H), 3.66-3.70 (1H, m, 4'-H), 3.81-3.86 (2H, m, 5'-H), 4.12 (1H, m, 3'-H), 6.12 (1H, s, 1'-H), 7.32 (1H, s, 6-H), 10.00 (1H, br, NH).

- [0120] (iv) 3'-アミノ-5'-O-tert-ブチルジメチルシリルチミジン (IV-12) (3'-amino-5'-O-tert-butyl dimethylsilylthymidine) の製造

3'-アジド-5'-O-tert-ブチルジメチルシリルチミジン (1.15g, 3.02mmol) および 5% Pd 触媒 (0.15g) をメタノール (10mL) 中、Ar 雰囲気下に室温で 19 時間攪拌した。TLC 分析により 3'-アジド-5'-O-tert-ブチルジメチルシリルチミジンが消失したことを確認した後、反応混合物をセライト濾過した。得られたろ液から溶媒を減圧留去して、白色結晶の標題化合物を得た (収量 1.03g, 2.89mmol, 収率 95%)。

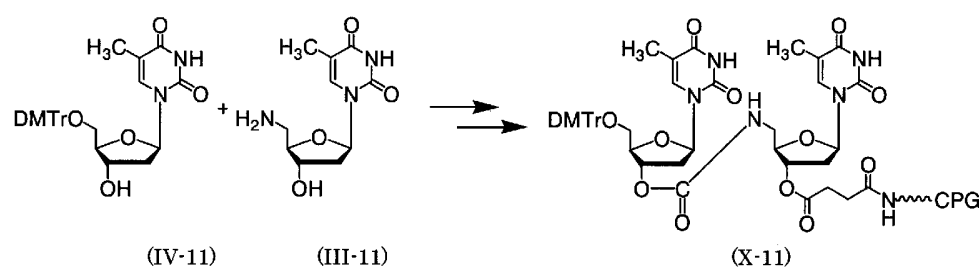
- [0121] ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 0.05 (6H, m, TBDMS- CH_3), 0.86 (9H, s, t-ブチル), 1.75 (3H, s, 5'- CH_3), 2.01-2.09 (2H, m, 2'-H), 3.30 (2H, s, NH_2), 3.41-3.46 (1H, m, 4'-H), 3.64-3.77 (2H, m, 5'-H), 3.80-3.84 (1H, m, 3'-H), 6.11-6.16 (1H, t, 9.4 Hz, 1'-H), 7.45 (1H, s, 6-H).

[0122] 2. 修飾1本鎖オリゴヌクレオチドまたは修飾2本鎖オリゴヌクレオチド製造のための、固相担体に結合したユニット化合物の製造

[0123] (実施例1-01)

(1) (X-11)で表されるユニット化合物の製造

[0124] [化54]



[0125] (i) 5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-3'-(5''-アミノチミジリル)カルバモイルチミジン(5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-(5''-aminothymidilyl)carbamoylthymidine)の製造

5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)チミジン(IV-11) (0.76g, 1.4mmol)のピリジン(8.0mL)溶液に、DMAP(少量)および Im_2CO (0.23g, 1.4mmol, 1.0当量)を加え、その反応混合物をAr雰囲気下に室温で撹拌した。24時間後、5'-アミノチミジン(III-11) (0.50g, 2.07mmol, 1.5当量)のピリジン(6.0mL)溶液を、前記反応混合物に滴下して加えた。48時間後、前記反応混合物を酢酸エチルで希釈した。得られた酢酸エチル溶液を、水(1回)、飽和 NaHCO_3 水溶液(1回)、飽和 NaCl 水溶液(1回)で順次洗浄し、その後、硫酸ナトリウムで乾燥させた。前記酢酸エチル溶液から溶媒を減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー($\text{MeOH}:\text{CHCl}_3 = 1:20 \sim 1:10$)で精製して、白色結晶の標題化合物を得た(収量0.71g, 0.87mmol, 収率62%)。

[0126] ^1H NMR(400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 1.38 (3H, s, 5- CH_3 5'T), 1.75 (3H, s, 5- CH_3 3'T), 1.98-2.48 (4H, m, 2'-H), 3.14-3.33 (4H, m, 5'-H), 3.73 (6H, s, OCH_3), 3.99-4.04 (2H, m, 4'-H), 4.12 (1H, s, 3'-H 5'T), 5.22 (1H, br, OH), 5.28-5.29 (1H, m, 3'-H 3'T), 6.10-6.14 (1H, m, 1'-H 5'T), 6.20-6

.24 (1H, m, 1'-H 3'T), 6.28-7.38 (13H, m, DMTr), 7.48 (1H, s, 6-H 5'T),
 , 7.51 (1H, s, 6-H 3'T), 7.60 (1H, t, J=6.0 Hz, NH), 11.28 (1H, s, NH
 5'T), 11.37 (1H, s, NH 3'T).

^{13}C -NMR (100MHz, CDCl_3) δ : 11.44, 12.34, 37.97, 38.90, 55.22, 63.94, 71.
 23, 76.33, 76.68, 77.32, 84.00, 84.36, 84.87, 87.19, 110.75, 111.96, 113.
 28, 127.19, 128.01, 128.11, 130.11, 135.04, 135.21, 135.56, 144.16, 151.14
 , 156.38, 158.70, 164.07, 164.41.

FAB-MS(NBA) calcd for $\text{C}_{42}\text{H}_{45}\text{N}_2\text{O}_{12}$ (MH^-), 810.29867; found, 810.29930.

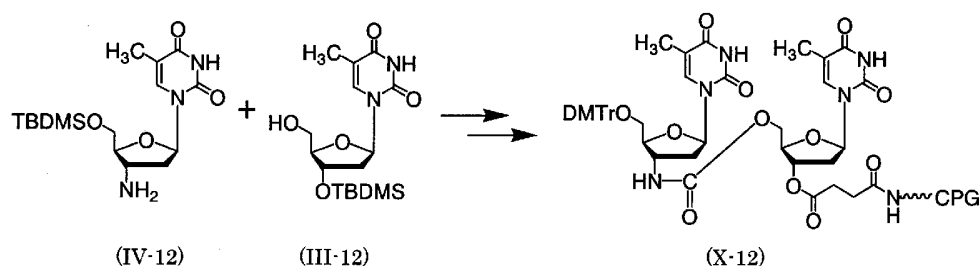
[0127] ユニット化合物(X-11)の製造

5'-O-(4, 4'-ジメトキシトリチル)-3'-(5''-アミノチミジリル)カルバモイル
 チミジン(0. 71g, 0. 87mmol)のピリジン(8. 7mL)溶液に、DMAP(少量)および
 無水コハク酸(0. 29g, 2. 87mmol, 3. 3当量)を加え、その反応混合物をAr雰囲気
 下で室温で16時間攪拌した。TLC分析により5'-O-(4, 4'-ジメトキシトリチ
 ル)-3'-(5''-アミノチミジリル)カルバモイルチミジンの消失を確認した後、前記
 反応混合物をクロロホルムで希釈した。そのクロロホルム溶液を、水(1回)および飽
 和NaCl水溶液(1回)で順次洗浄し、その後硫酸ナトリウムで乾燥させた。前記クロ
 ホルム溶液から溶媒を減圧留去した。得られた残渣の一部(0. 80g, 0. 87mmol, 4
 当量)をDMF(22mL)に溶解させた。その溶液にCPG($136\mu\text{mol/g}$, 1. 61g, 0
 . 22mol)を加えてCPGを膨潤させた後、WSC(0. 17g, 0. 87mmol, 4当量)をそ
 の反応混合物に加えた。前記反応混合物を室温で2日間、振とうした。その反応混
 合物を減圧ろ過した後、得られたろ取物をピリジンで洗浄し、その後乾燥させた。前
 記ろ取物に、DMAPの0. 1Mピリジンおよび無水酢酸混合物溶液(ピリジン:無水酢
 酸=9:1)(15mL)を加え、室温で15時間振とうさせた。その反応混合物を減圧ろ過
 した後、得られたろ取物をメタノールおよびアセトンで順次洗浄し、その後乾燥させて
 標題のユニット化合物(CPGの化合物の活性= $26. 7\mu\text{mol/g}$)を得た(収量1. 53
 g)。

[0128] (実施例1-02)

(2)(X-12)で表されるユニット化合物の製造

[0129] [化55]



[0130] (i) 5'-O-tert-ブチルジメチルシリル-3'-アミノ-(3''-O-tert-ブチルジメチルシリルチミジリル)カルバモイルチミジン(5'-O-tert-butyl dimethylsilyl -3'-amino-(3''-O-tert-butyl dimethylsilylthymidyl)carbamoylthymidine)の製造

3'-O-tert-ブチルジメチルシリルチミジン(III-12)(2.27g, 6.37mmol)のピリジン(35mL)溶液に、DMAP(少量)および Im_2CO (0.76g, 4.70mmol, 1当量)を加え、その反応混合物を1日間攪拌した。3'-アミノ-5'-O-tert-ブチルジメチルシリルチミジン(IV-12)(1.70g, 4.79mmol, 1当量)のピリジン(12mL)溶液を滴下して加えた後、その反応混合物を1日間攪拌した。その反応混合物を酢酸エチルで希釈した。その酢酸エチル溶液を、水(1回)、飽和 NaHCO_3 水溶液(1回)および飽和 NaCl 水溶液(1回)で順次洗浄し、その後硫酸ナトリウムで乾燥させた。その酢酸エチル溶液から溶媒を減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー($\text{MeOH}:\text{CHCl}_3=0:1\sim 1:10$)で精製して、白色結晶の標題化合物を得た(収量2.46g, 3.33mmol, 収率70%)。

[0131] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ : 0.08-0.13 (12H, m, TBDMS- CH_3), 0.89 and 0.93 (18H, s, t-ブチル), 1.90 (3H, s, 5- CH_3 5'T), 1.93 (3H, s, 5- CH_3 3'T), 2.15-2.35 (4H, m, 2'-H), 3.85-3.94 (2H, m, 5'-H 5'T), 4.01-4.03 (2H, m, 5'-H 3'T), 4.24-4.34 (2H, m, 4'-H), 6.04-6.08 (1H, m, 3'-H 5'T), 6.30-6.37 (1H, m, 3'-H 3'T), 7.17 (1H, s, 6-H 5'T), 7.56 (1H, s, 6-H 3'T), 8.83 (1H, s, NH 5'T), 8.95 (1H, s, NH 3'T).

^{13}C -NMR (100MHz, CDCl_3) δ : -5.98, -4.91, 12.42, 18.30, 25.88, 40.46, 52.51, 55.21, 61.70, 63.97, 66.45, 71.52, 83.67, 84.82, 86.96, 87.56, 110.83,

110.91, 111.42, 130.02, 130.69, 135.05, 137.03, 150.23, 155.72, 163.80.

FAB-HRMS(NBA) calcd for $C_{33}H_{55}N_5O_{10}Si_2$ (MH^+), 738.3566; found, 738.3579.

[0132] (ii) 3'-アミノチミジリルカルバモイルチミジン(3'-amino-thymidylcarbamoylthymidine)の製造

5'-O-tert-ブチルジメチルシリル-3'-アミノ-(3''-O-tert-ブチルジメチルシリルチミジリル)カルバモイルチミジン(0.90g, 1.44mmol)のTHF(14mL)溶液に、TBAF(2mL, 2mmol, 2当量)を加え、その反応混合物を1日間攪拌した。その反応混合物から溶媒を減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(MeOH:CHCl₃=1:20~1:5)で精製して、白色結晶の標題化合物を得た(収量0.72g, 1.43mmol, 収率99%)。

[0133] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ: 1.77 (6H, s, 5-CH₃), 2.00-2.24 (4H, m, 2'-H), 3.44-3.64 (2H, m, 5'-H 5'T), 3.76-3.91 (2H, m, 5'-H 3'T), 4.01-4.21 (2H, m, 4'-H), 5.00-5.22 (1H, m, 3'-H 5'T), 5.37-5.43 (1H, m, 3'-H 3'T), 6.13-6.21 (2H, m, 1'-H), 7.44-7.9 (2H, m, 6-H), 11.28 (1H, s, NH 5'T), 11.31 (1H, s, NH 3'T).

¹³C-NMR (100MHz, DMSO-d₆) δ: 12.23, 12.29, 37.17, 50.80, 61.24, 64.53, 70.74, 83.46, 83.86, 84.11, 84.83, 109.40, 109.72, 135.00, 136.12, 150.41, 150.50, 155.58, 163.71, 163.76.

FAB-HRMS(NBA) calcd for $C_{21}H_{27}N_5O_{10}$ (MH^+), 510.18406; found, 510.18357.

[0134] (iii) 5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-3'-アミノチミジリルカルバモイルチミジン(5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-aminothymidylcarbamoylthymidine)の製造

3'-アミノチミジリルカルバモイルチミジン(0.21g, 0.41mmol)のピリジン(1.4mL)溶液に、DMAP(少量)およびDMTrCl(0.21g, 0.62mmol, 1.5当量)を加え、その反応混合物を1日間攪拌した。その反応混合物を酢酸エチルで希釈した。その酢酸エチル溶液を、水(1回)、飽和NaHCO₃水溶液(1回)および飽和NaCl水溶液(1回)で順次洗浄し、その後硫酸ナトリウムで乾燥させた。得られた酢酸エチル溶液から溶媒を減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(n-ヘキサン:AcOEt:MeOH=9:1:0~0:1:20)で精製して、白色結晶の標題化

合物を得た(収量0.19g, 0.22mmol, 54%)。

[0135] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d_6) δ : 1.46 (3H, s, 5-CH_3 5'T), 1.68 (3H, s, 5-CH_3 3'T), 1.90–2.36 (4H, m, 2'-H), 3.05–3.32 (4H, m, 5'-H), 3.71 (6H, s, OCH_3), 3.89–3.92 (2H, m, 4'-H), 4.02–4.31 (4H, m, 3'-H), 5.38 (1H, d, $J=4.4$ Hz, OH), 6.15 (1H, t, $J=8.0$ Hz, 1'-H 5'T), 6.21 (1H, t, $J=8.0$ Hz, 1'-H 3'T), 6.84–7.42 (13H, m, DMTr), 7.55 (1H, s, 6-H 5'T), 7.75–7.55 (1H, m, 6-H 3'T), 7.76 (1H, d, $J=7.6$ Hz, NH), 11.30 (1H, s, NH 5'T), 11.33 (1H, s, NH 3'T).

^{13}C -NMR (100MHz, DMSO-d_6) δ : 11.78, 12.14, 37.01, 38.60, 50.65, 54.98, 55.00, 63.11, 64.63, 70.68, 82.68, 83.56, 83.77, 84.06, 85.76, 109.50, 109.67, 113.17, 126.73, 127.65, 127.84, 129.67, 129.71, 135.24, 135.31, 135.78, 135.91, 144.68, 150.28, 150.47, 155.49, 158.09, 158.12, 163.63, 163.68.

FAB-HRMS(NBA) calcd for $\text{C}_{42}\text{H}_{45}\text{N}_5\text{O}_{12}$ (MH^+), 812.3143; found, 812.3137.

[0136] (iv) ユニット化合物(X-12)の製造

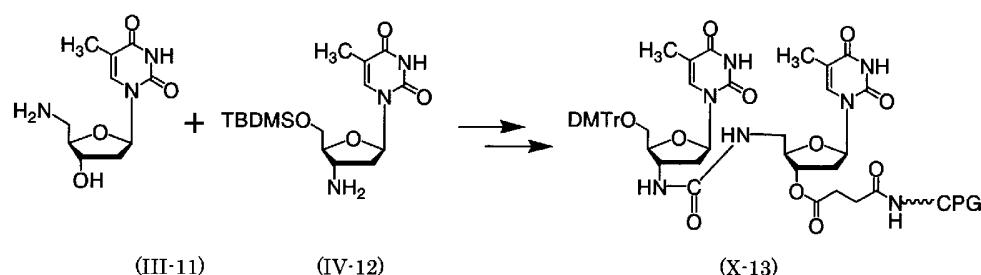
5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-3'-アミノチミジリルカルバモイルチミジン(0.50g, 0.61mmol)のピリジン(6.1mL)溶液に、DMAP(少量)および無水コハク酸(0.18g, 1.83mmol, 3.0当量)を加え、その反応混合物を2日攪拌した。その反応混合物をクロロホルムで希釈した。そのクロロホルム溶液を、水(3回)で洗浄し、その後硫酸ナトリウムで乾燥させた。そのクロロホルム溶液から溶媒を減圧留去した。得られた残渣の一部(0.55g, 0.61mmol, 4.0当量)を一晩、真空乾燥させた。その残渣のDMF(15mL)溶液に、CPG(1.65g, 0.15mmol, $90.4\mu\text{mol/g}$)を加え、CPGを膨潤させた。30分間後、その反応混合物に、さらにWSC(0.12g, 0.60mmol, 1.0当量)を加え、3日間振とうした。その反応混合物を減圧ろ過した後、得られたろ取物をピリジンで洗浄し、その後乾燥させた。前記ろ取物に、DMAPの0.1Mピリジンおよび無水酢酸の混合物(ピリジン:無水酢酸=9:1)溶液(20mL)を加え、室温で1日間振とうさせた。その反応混合物を減圧ろ過した後、得られたろ取物をメタノールおよびアセトンで順次洗浄し、その後乾燥させて、標題のユニット化

化合物を得た(CPGの化合物の活性=44.4 μ mol/g)(収量0.93g)。

[0137] (実施例1-03)

(3) (X-13) で表されるユニット化合物の製造

[0138] [化56]



[0139] (i) 5'-O-tert-ブチルジメチルシリル-3'-アミノ-(5''-アミノチミジリル)ウレアチミジン(5'-O-tert-butyldimethylsilyl-3'-amino-(5''-aminothymidyl)ureathy midine)の製造

3'-アミノ-5'-O-tert-ブチルジメチルシリルチミジン(IV-12)(0.26g, 0.74mmol)のピリジン(5mL)溶液に、DMAP(0.018g, 0.15mmol, 0.2当量)およびIm₂CO(0.12g, 0.74mmol, 1当量)を加え、その反応混合物を3.5時間攪拌した。5'-アミノチミジン(III-11)(0.22g, 0.89mmol, 1.2当量)のピリジン(2mL)溶液を、その反応混合物に滴下して加えた後、その反応混合物を12時間攪拌した。前記反応混合物を酢酸エチルで抽出した後、その酢酸エチル溶液から溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHCl₃:CH₃OH=100:3~10:1)で精製して、白色結晶の標題化合物を得た(収量0.26g, 0.42mmol, 収率57%)。

[0140] ¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ: 0.06 (6H, s, TBDMS-CH₃), 0.87 (9H, s, t-ブチル), 1.77 (3H, s, 5-CH₃ 5'T), 1.79 (3H, s, 5-CH₃ 3'T), 2.05-2.17 (4H, m, 2'-H), 3.13-3.16 (4H, m, 5'-H), 3.70-3.84 (2H, m, 4'-H), 4.10-4.12 (1H, m, 3'-H 5'T), 5.26-5.27 (1H, m, -OH), 5.98 (1H, t, 1'-H 5'T), 6.12-6.13 (1H, m, 3'-H 3'T), 6.45-6.47 (1H, m, 1'-H 3'T), 7.48-7.50 (2H, s, 6-H), 11.29-11.32 (2H, s, NH).

^{13}C -NMR (100MHz, DMSO-d_6) δ : -5.47, -5.43, 12.10, 12.26, 18.08, 25.81, 37.67, 38.45, 41.78, 49.99, 63.46, 71.13, 79.19, 83.58, 83.76, 85.24, 85.51, 109.41, 109.74, 135.49, 136.10, 150.34, 150.47, 157.53, 163.69, 163.74

FAB-HRMS(NBA) calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{43}\text{N}_6\text{O}_9\text{Si}$ (MH^+), 623.28707; found, 623.28606

- [0141] (ii) 3'-アミノ-(5''-アミノチミジリル)ウレアチミジン(3'-amino-(5''-aminothymidyl)ureathymidine)の製造

5'-O-tert-ブチルジメチルシリル-3'-アミノ-(5''-アミノチミジリル)ウレアチミジン(0.90g, 1.44mmol)のTHF(14mL)溶液に、TBAF(2mL, 2mmol, 1.4当量)を加え、その反応混合物を10時間攪拌した。その反応混合物から溶媒を減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}=20:1\sim 5:1$)で精製して、白色結晶の標題化合物を得た(収量0.72g, 1.43mmol, 収率99%)。

- [0142] ^1H NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ : 1.76 (3H, s, 5- CH_3 5'T), 1.78 (3H, s, 5- CH_3 3'T), 1.94-2.20 (4H, m, 2'-H), 3.42-3.69 (4H, m, 5'-H), 4.10-4.24 (2H, m, 4'-H), 5.04-5.07 (1H, m, OH 5'T), 5.27-5.28 (1H, m, OH 3'T), 6.02 (1H, m, 3'-H 5'T), 6.09-6.15 (2H, m, 1'-H 5'T and 3'-H 3'T), 6.43-6.45 (1H, m, 1'-H 3'T), 7.48 (1H, s, 6H 5'T), 7.73 (1H, s, 6H 3'T), 11.28 (2H, s, NH).

^{13}C -NMR (100MHz, DMSO-d_6) δ : 12.07, 12.25, 37.66, 38.35, 49.78, 61.23, 71.08, 83.33, 83.69, 85.43, 109.27, 109.74, 136.05, 150.39, 150.45, 157.63, 163.71, 163.73.

FAB-HRMS(NBA) calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_9$ (MH^+), 509.1996; found, 509.1996.

- [0143] (iii) 5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-3'-アミノ-(5''-アミノチミジリル)ウレアチミジン(5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-amino-(5''-aminothymidyl)ureathymidine)の製造

3'-アミノ-(5''-アミノチミジリル)ウレアチミジン(0.80g, 1.57mmol)のピリジ

ン(15.7mL)溶液に、DMAP(少量)およびDMTrCl(0.64g, 1.90mmol, 1.2当量)を加え、その反応混合物を1日間攪拌した。その反応混合物を酢酸エチルで希釈した。その酢酸エチル溶液を、水(1回)、飽和 NaHCO_3 水溶液(1回)および飽和 NaCl 水溶液(1回)で順次洗浄し、その後硫酸ナトリウムで乾燥させた。その酢酸エチル溶液から溶媒を減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(n -ヘキサン: AcOEt : MeOH =9:1:0~0:1:20)で精製して、白色結晶の標題化合物を得た(収量0.30g, 0.37mmol, 収率24%)。

[0144] ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 1.43 (3H, s, 5- CH_3 5'T), 1.73 (3H, s, 5- CH_3 3'T), 1.98-2.32 (4H, m, 2'-H), 3.14-3.28 (4H, m, 5'-H), 3.72 (6H, s, OCH_3), 3.86-4.04 (2H, m, 4'-H), 4.07-4.36 (1H, m, 3'-H 5'T), 5.27 (1H, m, OH), 6.03 (1H, t, $J=6$ Hz, 1'-H 5'T), 6.03-6.16 (1H, m, 3'-H 3'T), 6.38-6.40 (1H, m, 1'-H 3'T), 6.80-7.30 (13H, m, DMTr), 7.49 (1H, s, 6-H 5'T), 7.53 (1H, s, 6-H 3'T), 11.29 (1H, s, NH 5'T), 11.34 (1H, s, NH 3'T).

^{13}C -NMR (100MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 11.77, 12.08, 14.10, 20.78, 39.92, 40.13, 41.83, 49.75, 55.03, 59.77, 63.31, 71.13, 83.30, 83.56, 83.75, 85.51, 85.78, 109.46, 109.76, 113.22, 123.93, 126.76, 127.72, 127.89, 129.77, 135.29, 135.45, 135.71, 136.08, 144.77, 149.63, 150.34, 150.48, 157.44, 158.13, 163.72.

FAB-MS(NBA) calcd for $\text{C}_{42}\text{H}_{46}\text{N}_6\text{O}_{11}$ (MH^+), 809.31468; found, 809.31376.

[0145] (iv) ユニット化合物(X-13)の製造

5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-3'-アミノ-(5''-アミノチミジリル)ウレアチミジン(0.72g, 0.88mmol)のピリジン(8.8mL)溶液に、DMAP(少量)および無水コハク酸(0.29g, 2.87mmol, 3.0当量)を加え、その反応混合物を2日攪拌した。前記反応混合物をクロロホルムで希釈した。そのクロロホルム溶液を、水(3回)で洗浄し、その後硫酸ナトリウムで乾燥させた。前記クロロホルム溶液から溶媒を減圧留去した。得られた残渣の一部(0.55g, 0.61mmol, 4.0当量)を一晩、真空乾燥させた。その残渣のDMF(15mL)にCPG(1.10g, 0.15mmol, 136 $\mu\text{mol/g}$)

を加えて膨潤させた。30分後、その反応混合物に、さらにWSC (0.12g, 0.60mmol, 1.0当量)を加え、3日間振とうした。その反応混合物を減圧ろ過した後、得られたろ取物をピリジンで洗浄し、その後乾燥させた。前記ろ取物に、DMAPの0.1Mピリジンおよび無水酢酸混合物(ピリジン:無水酢酸=9:1)溶液(20mL)を加え、室温で1日間振とうさせた。その反応混合物を減圧ろ過した後、得られたろ取物をメタノールおよびアセトンで順次洗浄し、その後乾燥させて、標題のユニット化合物を得た(CPGの化合物の活性=38.4 μ mol/g)(収量1.09g)。

- [0146] 一本鎖オリゴヌクレオチドの3'末端から1番目と2番目のヌクレオチド間の、3', 5'-リン酸ジエステル結合が、 $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ 、 $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$ または $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ で置き換えられた修飾一本鎖オリゴヌクレオチドの製造標的タンパクはホモサピエンス・リボヌクレアーゼL(Homo sapiens ribonuclease L)(2',5'-oligoadenylate synthetase-dependent, RNase L) [gi:30795246]とし、標的配列は開始コドンから92番目から114番目にあたる配列番号1からなる塩基配列とした。修飾一本鎖オリゴヌクレオチドとして、この配列番号1からなる塩基配列に対し、設計されたsiRNA配列の修飾RNAセンス鎖(配列番号2、3および4)と、修飾RNAアンチセンス鎖(配列番号5、6および7)とを製造した。比較として、配列番号1からなる塩基配列に対し、設計されたsiRNA配列のRNAセンス鎖(配列番号8)およびRNAアンチセンス鎖(配列番号9)を製造した。

- [0147] (参考例1-1s)

なお、配列番号8からなるRNAセンス鎖は、3'末端のTT二量体配列を合成するために、市販のdT樹脂(CPG樹脂に結合)(グレンリサーチ社製)を使用した。それ以外は、配列番号8に従い、核酸自動合成機によるホスホロアミダイト法により、CPG樹脂に結合した配列番号8のオリゴヌクレオチドを製造した。1 μ molの前記dT樹脂を使用し、各縮合時間は15分とした。

- [0148] 前記CPG樹脂に結合した配列番号8のオリゴヌクレオチドは、DMTr基を除去した状態で核酸自動合成機による合成を終了した。

- [0149] 前記CPG樹脂に結合したオリゴヌクレオチドは、それぞれ、エタノールおよびアンモニア混合($\text{EtOH}:\text{NH}_3=1:3$)溶液(2mL)中で55°Cで12時間反応させた。反応

混合物を減圧ろ過し、得られたろ液をエッペンドルフチューブにそれぞれ移し、その後、減圧下で濃縮した。得られた濃縮物に、1MのTBAFのTHF溶液(1mL)をそれぞれ加え、12時間の間、振とうさせた。この反応溶液を、それぞれ0.1MのTEAA緩衝液で30mLに希釈した。この希釈溶液を、C-18逆相カラム(Sep-Pak)(CH₃CN(10mL)および0.1MのTEAA緩衝液(10mL)を予め順次流して、平衡化した)にそれぞれ通し、カラムに吸着させた。このカラムを滅菌水で洗浄して塩を除去し、その後、アセトニトリルと水の混合物(50%CH₃CN水(3mL))でそれぞれ溶出した。得られた溶出液を減圧下にそれぞれ濃縮した。得られた濃縮物を、充填溶液(90%ホルムアミド中の1×TBE溶液)(100 μL)にそれぞれ溶解させた。その溶液を、20%PAGE(20A, 6時間)(泳動用緩衝液は、1×TBE緩衝液を用いた)を用いてそれぞれ分離し、目的とするオリゴヌクレオチドのバンドを切り出した。切り出したバンドに、0.1MのEDTA水溶液(20mL)をそれぞれ加え、一晩放置した。このEDTA水溶液の液体部分を、C-18逆相カラムクロマトグラフィー(Sep-Pak)(溶離液:水中、50%CH₃CN(3mL))によりそれぞれ精製して、目的とするオリゴヌクレオチドを得た。

[0150] 前記参考例において用いた、以下の溶液の調製方法について説明する。

[0151] 0.1MのTEAA緩衝液は、以下のようにして調製した。まず、2Nの酢酸(114.38 mL)およびトリエチルアミン(277.6mL)の混合物に、水を加えて1Lにした。その溶液に酢酸を加えて、pHを7.0に調整し、次いでその溶液を20倍に希釈することにより調製した。

[0152] 20%PAGEは、以下のようにして調製した。まず、40%アクリルアミド(アクリルアミド:N,N'-メチレンビスアクリルアミド=19:1)溶液(45mL)、尿素(37.8g)および10×TBE緩衝液(9mL)を混合して溶解させ、その後水を加えて90mLとした。その溶液に、APS(62mg)を加えて溶解させた後、TEMED(45 μL)を加えて振り混ぜた。その溶液を、1.5mmスペーサーを挟んで固定した2枚ガラス板の間に流し込み、1時間以上静置して固化させて、20%PAGEを得た。

[0153] 0.1MのEDTA水溶液は、EDTA・4Na(1.80g)を水(40mL)に溶解させることにより調製した。

- [0154] 40%アクリルアミド(アクリルアミド:N, N'-メチレンビスアクリルアミド=19:1)溶液は、アクリルアミド(190g)およびN, N'-ビスアクリルアミド(10g)を水に溶解させて、500mLにすることで調製した。
- [0155] 10×TBE緩衝液は、Tris(109g)、ホウ酸(55g)およびEDTA・2Na(7.43g)を水に溶解させて1Lにすることで調製した。
- [0156] 得られたオリゴヌクレオチドを、水(1mL)に溶解させ、水で100倍に希釈して希釈液を調製した。その希釈液の吸光度(260nm)を測定し、収量を算出した。その吸光度の ϵ 値、260nmにおける吸光度および収量を、表1に示す。また、得られたオリゴヌクレオチドの分子量は、MALDI-TOF/MSにより確認した。その結果も、表1に示す。
- [0157] (参考例1-1a)
配列番号8の代わりに配列番号9を用いた以外は、参考例1-1sと同様にして、配列番号9からなるRNAアンチセンス鎖を製造した。
- [0158] (参考例1-2)
配列番号9からなる修飾一本鎖オリゴヌクレオチドの5'末端に³²Pラベルを施した以外は、参考例1-1aと同様にして、配列番号9からなる一本鎖オリゴヌクレオチドをそれぞれ製造した。
- [0159] (参考例1-3a)
同様に、フルオレセインで5'末端が修飾された、配列番号9からなる修飾一本鎖オリゴヌクレオチドは、5'末端として、フルオレセインホスホロアミダイト(Fluorescein Phosphoramidite)(グレン・リサーチ(Glen Research)社製)を追加する以外は、参考例1-1sと同様にして、フルオレセインで5'末端が修飾された、配列番号9からなる一本鎖オリゴヌクレオチドを、製造した。
- [0160] (参考例1-4)
配列番号8の代わりに配列番号12を用いた以外は、参考例1-1sと同様にして、配列番号12からなるRNA一本鎖を製造した。
- [0161] (実施例1-1s)
また、配列番号2からなる修飾一本鎖オリゴヌクレオチドは、前記dT樹脂の代わりに

、前記(X-11)で表されるユニット化合物を用いた以外は、参考例1-1sと同様に
して、配列番号2からなる修飾一本鎖オリゴヌクレオチドを、製造した。

[0162] (実施例1-1a)

また、配列番号5からなる修飾一本鎖オリゴヌクレオチドは、前記dT樹脂の代わりに
、前記(X-11)で表されるユニット化合物を用いた以外は、参考例1-1sと同様にし
て、配列番号5からなる修飾一本鎖オリゴヌクレオチドを、製造した。

[0163] (実施例1-2s)

また、配列番号3からなる修飾一本鎖オリゴヌクレオチドは、前記dT樹脂の代わりに
、前記(X-12)で表されるユニット化合物を用いた以外は、参考例1-1sと同様にし
て、配列番号3からなる修飾一本鎖オリゴヌクレオチドを、製造した。

[0164] (実施例1-2a)

また、配列番号6からなる修飾一本鎖オリゴヌクレオチドは、前記dT樹脂の代わりに
、前記(X-12)で表されるユニット化合物を用いた以外は、参考例1-1sと同様にし
て、配列番号6からなる修飾一本鎖オリゴヌクレオチドを、製造した。

[0165] (実施例1-3s)

また、配列番号4からなる修飾一本鎖オリゴヌクレオチドは、前記dT樹脂の代わりに
、前記(X-13)で表されるユニット化合物を用いた以外は、参考例1-1sと同様にし
て、配列番号4からなる修飾一本鎖オリゴヌクレオチドを、製造した。

[0166] (実施例1-3a)

また、配列番号7からなる修飾一本鎖オリゴヌクレオチドは、前記dT樹脂の代わりに
、前記(X-13)で表されるユニット化合物を用いた以外は、参考例1-1sと同様にし
て、配列番号7からなる修飾一本鎖オリゴヌクレオチドを、製造した。

[0167] (実施例1-4a)

同様に、フルオレセインで5'末端が修飾された、配列番号6からなる修飾一本鎖オリ
ゴヌクレオチドは、5'末端として、フルオレセインホスホロアミダイト(Fluorescein Pho
phoramidite) (グレン・リサーチ (Glen Research) 社製) を追加する以外は、実施例1
-2aと同様に、フルオレセインで5'末端が修飾された、配列番号6からなる修飾
一本鎖オリゴヌクレオチドを、製造した。

[0168] (実施例1-5a)

配列番号6からなる修飾一本鎖オリゴヌクレオチドの5'末端に³²Pラベルを施した以外は、実施例1-2aと同様にして、配列番号6からなる5'末端に³²Pラベル修飾一本鎖オリゴヌクレオチドを製造した。

[0169] (実施例1-6)

また、配列番号10からなる修飾一本鎖オリゴヌクレオチドは、前記dT樹脂の代わりに、前記(X-12)で表されるユニット化合物を用いた以外は、参考例1-1sと同様にして、配列番号10からなる修飾一本鎖オリゴヌクレオチドを、製造した。

[0170] (実施例1-7)

また、配列番号11からなる修飾一本鎖オリゴヌクレオチドは、前記dT樹脂の代わりに、前記(X-13)で表されるユニット化合物を用いた以外は、参考例1-1sと同様にして、配列番号11からなる修飾一本鎖オリゴヌクレオチドを、製造した。

[0171] なお、参照例1-1sおよび1-1aで得られた配列番号8および9のオリゴヌクレオチドは、以下、それぞれ(dT-s)および(dT-a)と表記する。参考例1-2で得られた配列番号9からなるオリゴヌクレオチドは、以下、(PdT-a)と表記する。参考例1-3aで得られた、フルオレセインで5'末端が修飾された配列番号9からなるオリゴヌクレオチドは、以下、(FdT-a)と表記する。参考例1-4で得られた配列番号12のオリゴヌクレオチドは、以下、(d-sa)と表記する。

[0172] 実施例1-1sおよび1-1aで得られた配列番号2および5からなる修飾一本鎖オリゴヌクレオチドは、以下、それぞれ(11-s)および(11-a)と表記する。実施例1-2sおよび1-2aで得られた配列番号3および6からなる修飾一本鎖オリゴヌクレオチドは、以下、それぞれ(12-s)および(12-a)と表記する。実施例1-3sおよび1-3aで得られた配列番号4および7からなる修飾一本鎖オリゴヌクレオチドは、以下、それぞれ(13-s)および(13-a)と表記する。実施例1-4aで得られた、フルオレセインで5'末端が修飾された、配列番号6からなる修飾一本鎖オリゴヌクレオチドは、以下、(F12-a)と表記する。実施例1-5aで得られた配列番号6からなる修飾一本鎖オリゴヌクレオチドは、以下、(P12-a)と表記する。実施例1-6および1-7で得られた配列番号10および11からなる修飾一本鎖オリゴヌクレオチドは、以下、それぞれ(

16-sa)および(17-sa)と表記する。

[0173] [表1]

実施例または参考 例	配列番号	サンプル名	ϵ 値 ($\times$ 1000)	吸光度 (OD260)	収量 nmol	Calcd M.W.	MALDI-TOF/MS observed
参考例 1-1 s	8	(dT-s)	216.3	15.2	70.3	6717.10	6717.52
参考例 1-1 a	9	(dT-a)	202.3	10.4	51.4	6567.93	6568.58
参考例 1-4	12	(d-s a)	97.8	25.0	255.62	3117.94	—
実施例 1-1 s	2	(11-s)	216.3	10.0	46.2	6680.15	6680.53
実施例 1-1 a	5	(11-a)	202.3	13.9	68.7	6530.98	6532.32
実施例 1-2 s	3	(12-s)	216.3	14.5	67.0	6680.15	6683.54
実施例 1-2 a	6	(12-a)	202.3	19.8	97.9	6530.98	6531.28
実施例 1-3 s	4	(13-s)	216.3	8.3	38.4	6679.16	6679.16
実施例 1-3 a	7	(13-a)	202.3	10.1	49.9	6529.99	6538.39
実施例 1-4 a	6	(F12-a)	216.3	14.5	67.4	7129.54	7127.63
実施例 1-5 a	6	(P12-a)	202.3	12.5	57.8	7223.71	7220.40
実施例 1-6	10	(16-s a)	97.8	32.7	334.36	3080.99	3082.30
実施例 1-7	11	(17-s a)	97.8	20.8	212.68	3080.00	3081.60

[0174] 前記オリゴヌクレオチドの吸光度および収量は、以下のようにして測定した。

[0175] 前記オリゴヌクレオチドを水に溶解させて、水溶液を調製し、その水溶液を、波長260nmでの吸光度(Abs_{260})が、吸光度計の有効範囲になるように希釈した。光路長(1)1cmの吸光度測定用石英セルを用い、室温にて Abs_{260} を測定した。 OD_{260} 値の計算には以下の式(1)を用いて算出した。

$$OD_{260} (\epsilon \cdot M \cdot mL^{-1}) = Abs_{260} (\epsilon \cdot cm \cdot M) \times V^{-1} (mL) \times l^{-1} (cm) \quad (1)$$

前記式(1)中、 Abs_{260} は、前記オリゴヌクレオチド溶液の波長260nmにおける吸光度を示し、Vは溶液の全量を示し、lは光路長を示し、Mはモル濃度を示す。

[0176] 前記式(1)中、前記オリゴヌクレオチドのモル吸光係数 ϵ_{260} は、以下の式(2)を用いて算出した。

$$\epsilon = 2\{ \epsilon (N_{1p} N_2) + \epsilon (N_{2p} N_3) + \cdots + \epsilon (N_{n-1p} N_n) \} - \{ \epsilon (N_2) + \epsilon (N_3) + \cdots + \epsilon (N_{n-1}) \} \quad (2)$$

前記式(2)中、 $\epsilon (N_n)$ はある核酸 N_n の ϵ_{260} を示し、 $\epsilon (N_{n-1p} N_n)$ はある核酸二量体 $N_{n-1p} N_n$ の ϵ_{260} を示す。なお、(11-s)、(11-a)、(12-s)、(12-a)、(13-s)、(13-a)、(F12-s)、(F12-a)、(P-12-a)および(P13-a)については、修飾された3'末端部分のTT配列をUU配列として ϵ_{260} を計算した。

[0177] 濃度C(mol/L)は、以下の式(3)を用いて算出した。

$$C = Abs_{260} \times \epsilon_{260}^{-1} \times l^{-1} \quad (3)$$

[0178] 前記式(3)中、 Abs_{260} 、 ϵ_{260} 、およびlは、前記のとおりである。

修飾二本鎖オリゴヌクレオチドの製造

[0179] (実施例2-1)

実施例1-1sで製造した、(11-s)(35nmol)と実施例1-1aで製造した(11-a)(35nmol)を、アニーリングバッファー(10mMのTris-HCl(pH7.5)および100mMのNaCl)中に溶解させた。その溶液を90℃で1分間、次いで37℃で1時間の間、インキュベートして、図1に示すような、配列番号2および配列番号5からなる修飾二本鎖オリゴヌクレオチドを得た。

[0180] (実施例2-2)

(11-s)および(11-a)の代わりに、(12-s)および(12-a)を用いた以外は、実

実施例2-1と同様にして、図1に示すような、配列番号3および配列番号6からなる修飾二本鎖オリゴヌクレオチドを得た。

[0181] (実施例2-3)

(11-s)および(11-a)の代わりに、(13-s)および(13-a)を用いた以外は、実施例2-1と同様にして、図1に示すような、配列番号4および配列番号7からなる修飾二本鎖オリゴヌクレオチドを得た。

[0182] (実施例2-4)

(11-s)および(11-a)の代わりに、(12-s)および(F12-a)を用いた以外は、実施例2-1と同様にして、図1に示すような、配列番号3と、配列番号6にさらに5'末端がフルオレセインで修飾された配列とからなる修飾二本鎖オリゴヌクレオチドを得た。

[0183] (実施例2-5)

実施例1-2sで製造した、(12-s) (80pmmol)と実施例1-5aで製造した(P12-a) (80pmmol)を、アニーリングバッファー(10mMのTris-HCl(pH7.5)および100mMのNaCl)中に溶解させた。その溶液を95°Cで3分間加熱し、次いで室温で1時間の間、インキュベートして、図1に示すような、配列番号3および5'末端に³²Pラベルを有する配列番号6からなる修飾二本鎖オリゴヌクレオチドを得た。

[0184] (実施例2-6)

(11-s)および(11-a)の代わりに、(16-sa)および(16-sa)を用いた以外は、実施例2-1と同様にして、図7に示すような、配列番号10および配列番号10からなる修飾二本鎖オリゴヌクレオチドを得た。

[0185] (実施例2-7)

(11-s)および(11-a)の代わりに、(17-sa)および(17-sa)を用いた以外は、実施例2-1と同様にして、図7に示すような、配列番号11および配列番号11からなる修飾二本鎖オリゴヌクレオチドを得た。

[0186] (参考例2-1)

(11-s)および(11-a)の代わりに、(dT-s)および(dT-a)を用いた以外は、実施例2-1と同様にして、図1に示すような、配列番号8および配列番号9からなる二

本鎖オリゴヌクレオチドを得た。

[0187] (参考例2-2)

(11-s)および(11-a)の代わりに、(dT-s)および(PdT-a)を用いた以外は、実施例2-1と同様にして、図1に示すような、配列番号8および配列番号9からなる二本鎖オリゴヌクレオチドを得た。

[0188] (参考例2-3)

(11-s)および(11-a)の代わりに、(d-sa)および(d-sa)を用いた以外は、実施例2-1と同様にして、図7に示すような、配列番号12および配列番号12からなる二本鎖オリゴヌクレオチドを得た。

[0189] (修飾二本鎖オリゴヌクレオチドの評価)

1. 細胞内でのRNaseL発現の評価

(1) 細胞培養

細胞培養10%FBS、ペニシリン(100ユニット/ml)およびストレプトマイシン(0.1 mg/ml)を補充したRPMI1640培地中で、37°CでHT1080細胞を増殖させた。指数増殖を維持するため、細胞を定期的に継代した。約25%コンフルエンスでのトランスフェクションの24時間前に、HT1080細胞をトリプシン処理し、抗生物質を含まない新しい培地を用いて希釈し、35ミリディッシュに移した(2ml/ディッシュ)。

[0190] (2) 修飾二本鎖オリゴヌクレオチドの細胞へのトランスフェクション

リポフェクタミン2000試薬(インビトロジェン(Invitrogen)社製)を用いて、接着細胞株に対して以下に記載する方法で修飾二本鎖オリゴヌクレオチドのトランスフェクションを行った。まず、RPMI1640培地(抗生物質およびFBSを含まない)に、二本鎖オリゴヌクレオチド(前記培地250 μ l当たり50、100nMまたは200nM)(実施例2-2得られた二本鎖オリゴヌクレオチド)を溶解させ、5分間室温でインキュベートした。その溶液に、50倍希釈した等量のリポフェクタミン2000試薬を添加し、その後20分間室温でインキュベートした。得られた溶液のうち、500 μ lを採取して、前記(1)で調製した35ミリディッシュへ移してトランスフェクションを行った。トランスフェクションから24時間インキュベーション後および48時間インキュベーション後に、その35ミリディッシュ中の細胞をインキュベートした。なお、その後、実施例2-3または参考例2-1で

得られた二本鎖オリゴヌクレオチドのいずれについても、トランスフェクションされた細胞に対する毒性は確認されなかった。

[0191] (3) ウェスタンブロット法によるRNaseL発現のモニター

トランスフェクションから24時間インキュベーション後および48時間インキュベーション後に得られたHT1080細胞をトリプシン処理し、冷PBS(－)で2回洗浄した。その後、得られた細胞ペレットを2倍量の低浸透圧緩衝液A(0.5%(v/v)のノニデット(Nonidet)P-40、20mMのHepes(pH7.5)、10mMの $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$ 、15mMの $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ Mg、1mMのジチオトレイトール、1mMのフェニルメチルスルホニルフルオリド、10 $\mu\text{g/ml}$ のアプロチニン)に懸濁させた。

[0192] 得られた細胞懸濁液を10分間氷上でインキュベートした後、タイト・フィッティング・ガラス・ドゥース・ホモジナイザー(Tight-fitting glass dounce homogenizer)を用いて氷上で30回上下ヘストロックしてホモゲナイズした。得られたホモジナイズ液を、超遠心機(10000 $\times g$)を用いて4℃で10分間遠心した。その後、遠心分離された上清液を回収し、その上清液に等量の2 $\times$ サンプル緩衝液(0.14MのTris-HCl pH6.8、0.2%(v/v)のグリセロール、2.8%(v/v)のSDS、適量のブロモフェノール・ブルー)を加え、沸騰水中で5分間インキュベートした。インキュベートされた上清液を7.5%のポリアクリルアミドゲル(ATTO)を用いて20mA、70分間、電気泳動により分離し、その後、PVDFメンブレン(ミリポア社(Millipore)製)へタンパクを転写した。

[0193] 前記PVDFメンブレンを、5%の牛血清アルブミンで25℃で1時間の間インキュベートした。その後、前記PVDFメンブレンをTBST(200mMのTris pH7.6、1.37Mの塩化ナトリウム、0.1%のTween-20)で2回リンスした。そのPVDFメンブレンを、0.5 $\mu\text{g/ml}$ の抗RNaseLモノクローナル抗体で4℃、16時間インキュベートした。その後、前記PVDFメンブレンをTBSTで15分間1回、次いで5分間3回、順次洗浄した。そのPVDFメンブレンを、次いでセイヨウワザビ・ペルオキシダーゼ(Horse radish peroxidase)で標識された抗マウスIgG(500 $\mu\text{g/mL}$ を、100000倍希釈した)で25℃で1時間インキュベートした。その後、前記PVDFメンブレンをTBSTで15分間1回、次いで5分間3回、順次洗浄した。

- [0194] 前記PVDFメンブラン上のセイヨウワザビ・ペルオキシダーゼ標識の検出には、ECLプラス・ウェスタン・ブロットイング検出キット(prus western blotting detection kit)(アマシヤム(Amersham)社製)を用いて行った。前記PVDFメンブラン上のセイヨウワザビ・ペルオキシダーゼ標識の定量は、デンスitometer(Kodak Digital Science DC290 Zoom Digital Camera)を用いて行った。二本鎖オリゴヌクレオチドでの処理を行っていない細胞におけるRNaseL強度を1として、二本鎖オリゴヌクレオチドでの処理細胞のRNaseL強度の相対比を求めた。なお、求めた数値はGAPDH強度を1とし標準化した。得られた結果を図2(a)に示す。
- [0195] (4) 実施例2-2で得られた二本鎖オリゴヌクレオチドの代わりに、実施例2-3および参考例2-1でそれぞれ得られた二本鎖オリゴヌクレオチドを用いる以外は、(1)~(3)と同様にして、二本鎖オリゴヌクレオチドでの処理細胞のRNaseL強度の相対比を求めた。その結果は、図2(b)および(c)にそれぞれ示す。
- [0196] 前記図2(a)~(c)に示すように、本発明の修飾二本鎖オリゴヌクレオチドは、非修飾二本鎖オリゴヌクレオチドと比較して、RNaseLの発現を抑制する効果が著しく向上していることが確認できた。このことは、本発明の修飾二本鎖オリゴヌクレオチドが、細胞膜の透過性に優れ、かつ細胞内での安定性または滞留性が向上したためと考えられる。
- [0197] 2. 細胞毒性の評価
- (1) 1. (2)に記載のようにして実施例2-2で得られた修飾二本鎖オリゴヌクレオチドをトランスフェクションした細胞について、その数を血球計数板を用いて位相差顕微鏡下で計数した。そのトランスフェクションされた細胞の生存率は、トリパンブルー色素排除試験法によって判定した。その際、細胞膜機能の低下により色素排除ができず、その結果トリパンブルーによって染色される細胞を死細胞とした。なお、生細胞数の総細胞数に対する百分率(%)を生存率とした。その結果、前記修飾二本鎖オリゴヌクレオチドのいずれの濃度(50nM、100nM、および200nM)においても、細胞毒性は観察されなかった。
- [0198] (2) 実施例2-2で得られた二本鎖オリゴヌクレオチドの代わりに、実施例2-1、2-3および参考例2-1でそれぞれ得られた二本鎖オリゴヌクレオチドを用いる以外

は、2. (1)と同様にして、細胞毒性を評価した。その結果、前記二本鎖オリゴヌクレオチドのいずれの濃度(50nM、100nM、および200nM)においても、細胞毒性は観察されなかった。

[0199] 3. 細胞内でのRNaseLに対するIC₅₀の測定

(1) 1. (2)において用いる二本鎖オリゴヌクレオチドの濃度を、前記培地250 μ l当たり50、100nMまたは200nMの代わりに1nM、5nMまたは10nMを用いる以外は、前記1. (1)～(4)と同様にして二本鎖オリゴヌクレオチドでの処理細胞のRNaseL強度の相対比を求めた。その結果を図3に示す。

[0200] (2) また、実施例2-2で得られた二本鎖オリゴヌクレオチドの代わりに、実施例2-3および参考例2-1でそれぞれ得られた二本鎖オリゴヌクレオチドを用いる以外は、3. (1)と同様にして、二本鎖オリゴヌクレオチドでの処理細胞のRNaseL強度の相対比を求めた。その結果を図3に示す。

[0201] (3) 図3のグラフから、IC₅₀を求め、表2に示す。

[0202] [表2]

二本鎖オリゴヌクレオチド	IC ₅₀ (nM)	相対強度
実施例 2-2	1. 8	77. 8
実施例 2-3	6. 0	23. 3
参考例 2-1	140	1

[0203] 前記表2に示すように、本発明の修飾二本鎖オリゴヌクレオチドは、非修飾二本鎖オリゴヌクレオチドと比較して、RNaseLの発現を抑制する効果が著しく向上していることが確認できた。この著しい向上は、本発明の修飾二本鎖オリゴヌクレオチドが、細胞膜の透過性に優れ、ヌクレアーゼ耐性が向上したことから予想される以上の優れた効果である。

[0204] 4. 細胞内への修飾二本鎖オリゴヌクレオチドの導入効果の評価

(1) 免疫染色法による細胞内RNaseLの観察

トランスフェクションを行う24時間前に、ポリ-L-リジン(シグマ(Sigma)社製)によりコートしたカバーガラスを35ミリディッシュへ入れた。その35ミリディッシュ内のカバーガラス上へ、容量2mLのHT1080細胞溶液を添加し、その後培養することにより、

HT1080細胞をカバーガラス上へ予め固定した。

- [0205] 抗生物質およびFBSを含まないRPMI1640培地(GIBCO社製)で、実施例2-2で得られた二本鎖オリゴヌクレオチドを希釈し、その後5分間室温でインキュベートした(希釈濃度=培地250 μ lあたり二本鎖オリゴヌクレオチド10nMまたは50nM)。別途、抗生物質およびFBSを含まないRPMI1640培地(GIBCO社製)(250 μ l)で、リポフェクタミン2000試薬(インビトロジェン社製)(5 μ g)を希釈し、その後5分間室温でインキュベートした。インキュベート後の二本鎖オリゴヌクレオチド希釈溶液250 μ lと、インキュベート後のリポフェクタミン2000試薬溶液250 μ lとを混合した後、その混合液を20分間室温でインキュベートした。その混合液500 μ lを、先に調製したHT1080細胞を予め固定したカバーガラスへ加え、トランスフェクションを行った。
- [0206] トランスフェクションから24時間の間インキュベートした後、前記カバーガラス上のHT1080細胞をPBS(-)で2回洗浄した。その後、前記カバーガラス上の細胞を4%のパラホルムアルデヒドで4℃で15分間インキュベートした。PBS(-)で3回洗浄後、前記カバーガラス上の細胞を0.2%のTriton-X 100溶液で室温で5分間インキュベートした。PBS(-)で3回洗浄後、前記カバーガラス上の細胞を、0.5%の牛血清アルブミンで室温で30分間インキュベートした。前記カバーガラス上の細胞をPBS(-)で3回洗浄後、1 μ g/mlの抗RNaseLモノクローナル抗体で室温で60分間インキュベートした。そのカバーガラス上の細胞を、PBS(-)で3回洗浄した。10 μ g/mlの蛍光(Alexa 488)標識マウスIgGを前記カバーガラス上の細胞に添加し、室温で30分間インキュベートした。その後、PBS(-)で3回洗浄後、前記カバーガラス上の細胞を直ちに蛍光顕微鏡にて観察を行った。その結果を、図5に示す。対照として、実施例2-2で得られた二本鎖オリゴヌクレオチドの代わりに参考例2-1で得られた二本鎖オリゴヌクレオチドを用いた以外は、前記と同様として得られた結果も示す。
- [0207] 前記図5に示すように、本発明の修飾二本鎖オリゴヌクレオチドは、非修飾二本鎖オリゴヌクレオチドと比較して、顕著なRNaseL蛍光強度の減少、すなわちRNaseLの発現に対する強い抑制効果を示していることが確認できた。
- [0208] (2) 蛍光顕微鏡による修飾二本鎖オリゴヌクレオチドの細胞内導入効果の算出法

実施例2-2で得られた二本鎖オリゴヌクレオチド(10nMまたは50nM)の濃度を、10nMの代わりに50nMまたは25nMにすること、および実施例2-2で得られた二本鎖オリゴヌクレオチドの代わりに実施例2-4で得られたフルオロセイン標識された二本鎖オリゴヌクレオチドを用いた以外は、4(1)に記載のようにして、二本鎖オリゴヌクレオチドをカバーガラス上のHT1080細胞へトランスフェクションした。

- [0209] トランスフェクションから24時間の間インキュベートした後、前記カバーガラス上のHT1080細胞をPBS(－)で2回洗浄した。その後、前記カバーガラス上の細胞を4%のパラホルムアルデヒドで4℃で15分間インキュベートした。PBS(－)で3回洗浄後、前記カバーガラス上の細胞を直ちに蛍光顕微鏡にて観察を行った。その結果を、図4に示す。得られた結果から、総細胞数当たりのフルオレセイン標識二本鎖オリゴヌクレオチドポジティブな細胞数の割合を算出した。その結果を表3に示す。また、コントロールとしては、前記混合液の代わりに、インキュベート後のリポフェクタミン2000試薬溶液500 μ lのみを先に調製したHT1080細胞を予め固定したカバーガラスへ加え、トランスフェクションを行ったHT1080細胞で得られた結果も図4に示す。

- [0210] [表3]

二本鎖オリゴヌクレオチド	二本鎖オリゴヌクレオチドの濃度が25nMにおけるヌクレオチドポジティブな細胞数の割合(%)
実施例2-4	73.5
参考例2-1	23.3

- [0211] 前記図4および前記表3に示すように、本発明の修飾二本鎖オリゴヌクレオチドは、顕著なRNAseL蛍光強度の減少、すなわち、RNAseLの抑制が確認された。

- [0212] 5. 修飾一本鎖および二本鎖オリゴヌクレオチドのエキソヌクレアーゼ耐性の評価
 実施例1-5aで得られた配列番号6からなる修飾一本鎖オリゴヌクレオチド(5'末端を³²Pでラベルしたもの)、参考例1-2で得られた配列番号9からなる非修飾一本鎖オリゴヌクレオチド(5'末端を³²Pでラベルしたもの)、実施例2-5で得られた修飾二本鎖オリゴヌクレオチド(5'末端を³²Pでラベルしたもの)および参考例2-2で得ら

れた非修飾二本鎖オリゴヌクレオチド(5'末端を ^{32}P でラベルしたもの)の、エキソヌクレアーゼ耐性を評価した。エキソヌクレアーゼとしては、ヘビ毒ホスホロジエステラーゼ(SVP)を使用した。SVPは、リン酸ジエステル結合を選択的に切断しオリゴヌクレオチドを5'-モノリン酸ヌクレオチドに分解する。

[0213] 以下に示す組成の反応溶液から、1、3、5、10、30、60分後に各エッペンドルフチューブに分注しておいた充填溶液(7M尿素 XC BPB) ($5\mu\text{l}$) 中に、反応液($5\mu\text{l}$)をサンプリングして反応を停止させた。得られた各時間におけるサンプルを、20%ポリアクリルアミドゲル(7M尿素含有)を用いて20mA、180分間、電気泳動により分離して、修飾オリゴヌクレオチドの完全鎖の残存率(%)を $\log_{10}$ 表示したものを縦軸に、反応時間を横軸にとって図6(a)および(b)を作成した。そして、図6(a)および(b)のグラフより、完全鎖の残存率が50%になる時間(t_{50})を算出した。その結果を表4に示す。

[0214] [表4]

オリゴヌクレオチド	t_{50} (分)	エキソヌクレアーゼ耐性の向上 (非修飾二本鎖を1とする)
実施例1-5a	17.5	7.6
参考例1-2	2.3	1
実施例2-5	100.3	3.7
参考例2-2	2.7	1

[0215] 修飾一本鎖オリゴヌクレオチド(実施例1-5a)の反応溶液の組成

20 μM 修飾一本鎖オリゴヌクレオチド水溶液	4 μL
緩衝液(250mM Tris-HCl, 50mM MgCl_2 (pH7.0))	6 μL
2u/mL SVP水溶液	4 μL
水	26 μL
計	40 μL

[0216] 非修飾一本鎖オリゴヌクレオチド(参考例1-2)の反応溶液の組成

20 μM 非修飾一本鎖オリゴヌクレオチド水溶液	4 μL
緩衝液(250mM Tris-HCl, 50mM MgCl_2 (pH7.0))	6 μL

2u/mL SVP水溶液	4 μ L
水	26 μ L
計	40 μ L

[0217] 修飾二本鎖オリゴヌクレオチド(実施例2-5)の反応溶液の組成

20 μ M 修飾二本鎖オリゴヌクレオチド水溶液	4 μ L
緩衝液(250mM Tris-HCl, 50mM MgCl ₂ (pH7.0))	6 μ L
2u/mL SVP水溶液	4 μ L
水	26 μ L
計	40 μ L

[0218] 非修飾二本鎖オリゴヌクレオチド(参考例2-2)の反応溶液の組成

20 μ M 非修飾二本鎖オリゴヌクレオチド水溶液	4 μ L
緩衝液(250mM Tris-HCl, 50mM MgCl ₂ (pH7.0))	6 μ L
2u/mL SVP水溶液	4 μ L
水	26 μ L
計	40 μ L

[0219] 図6および表4から、修飾一本鎖オリゴヌクレオチドは、非修飾一本鎖オリゴヌクレオチドと比較して、エキソヌクレアーゼ耐性が向上していることが確認された。また、修飾二本鎖オリゴヌクレオチドは、非修飾二本鎖オリゴヌクレオチドと比較して、エキソヌクレアーゼ耐性が著しく向上していることが確認された。特に二本鎖の修飾オリゴヌクレオチドは、一本鎖の修飾オリゴヌクレオチドの結果と比較しても、著しいヌクレアーゼ耐性の向上が確認され、この結果は、予想の範囲を超えるものである。

[0220] 6. 修飾二本鎖オリゴヌクレオチドの熱力学的安定性の評価

実施例2-6で得られた配列番号10からなる修飾二本鎖オリゴヌクレオチド、実施例2-7で得られた配列番号11からなる修飾二本鎖オリゴヌクレオチド、および参考例2-3で得られた配列番号12からなる二本鎖オリゴヌクレオチドについて、熱力学的安定性を評価した。

[0221] 前記オリゴヌクレオチド類について、MarkyとBleslaurの手法に従い、van't Hoff トランジションエンタルピー(ΔH°)、エントロピー(ΔS°)、298Kにおける自由エネ

ルギー (ΔG°) を算出した。 ΔG° は標準状態において1molの一本鎖が1molの二本鎖になる場合、ある温度における反応の平衡状態から熱力学的エネルギーとしてどの程度傾いているかを示すもので、この値から二本鎖の熱力学的安定性を評価できる。この値の－符号は一本鎖状態より二本鎖状態が安定であることを表しており、この絶対値が大きいほど二本鎖の状態が安定であることを示している。 ΔH° は標準状態において1molの一本鎖が1molの二本鎖になるときの熱エネルギー収支の変化を表しており、－の符号は発熱反応を表し、この絶対値が大きいほど二本鎖が熱エネルギー的に安定であることを示している。 ΔS° は標準状態において1molの一本鎖が1molの二本鎖になるときの乱雑さの変化を表しており、－符号はより秩序ない状態に向かうことを示すものであり、この絶対値が小さいほど二本鎖形成に有利であることを示す。そして ΔG° と ΔH° および ΔS° との関係は、下記式(4)で表される。

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad \dots (4)$$

すなわち、二本鎖の熱力学的安定性は反応の熱エネルギー収支と乱雑さの変化との差によって決まる。

[0222] オリゴヌクレオチド類の濃度を数段階に分けて T_m を測定した。この T_m 値は、Beckman Coulter DU 640 spectrophotometerで測定した。測定に当たっては、bufferとして10 mM NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , 1 M NaCl (pH 7.0)を用いた。得られた T_m 値を用い、式(5)に基いて $1/T_m$ 対 $\ln Ct/4$ (Ct はオリゴヌクレオチド総濃度)のグラフを描き、その傾きと切片から ΔH° と ΔS° を算出した。そして式(4)から ΔG° を求めた。得られた結果を表5に示す。

$$1/T_m = (R/\Delta H^\circ) \ln Ct/4 + (\Delta S^\circ / \Delta H^\circ) \quad \dots (5)$$

[0223] [表5]

	T_m (°C)	$-\Delta G^\circ_{298}$ (kcal/mol)	$-\Delta H$ (kcal/mol)	$-\Delta S$ (cal/Kmol)
実施例 2-6	56.9	15.4	77.9	210
実施例 2-7	54.5	14.8	74.1	199
参考例 2-3	55.7	13.6	62.7	165

[0224] 前記表5に示すように、本発明の修飾二本鎖オリゴヌクレオチドは、非修飾のオリゴヌクレオチドと比較して、 $-\Delta G_{298}^0$ の絶対値の増加および ΔH の絶対値の増加が確認され、二本鎖としての安定性が向上していることが確認された。また、本発明の修飾二本鎖オリゴヌクレオチドは、非修飾のオリゴヌクレオチドと比較して、 ΔS の絶対値が増加していることから、より秩序ある二本鎖を形成することが確認された。

[0225] 7. 修飾二本鎖オリゴヌクレオチドのエンドヌクレアーゼ耐性の評価

実施例1－5aで得られた配列番号5からなる修飾一本鎖オリゴヌクレオチド(5'末端を ^{32}P でラベルしたもの)、参考例1－2で得られた配列番号9からなる非修飾一本鎖オリゴヌクレオチド(5'末端を ^{32}P でラベルしたもの)、実施例2－5で得られた修飾二本鎖オリゴヌクレオチド(5'末端を ^{32}P でラベルしたもの)および参考例2－2で得られた非修飾二本鎖オリゴヌクレオチド(5'末端を ^{32}P でラベルしたもの)の、エンドヌクレアーゼ耐性を評価した。エンドヌクレアーゼとしては、RNaseAを使用した。

[0226] 以下に示す組成の反応溶液から、30分後に各エッペンドルフチューブに分注しておいた充填溶液(8M尿素 XC BPB)(10 μl)中に、反応液(10 μl)をサンプリングして反応を停止させた。得られた各時間におけるサンプルを、20%ポリアクリルアミドゲル(7M尿素含有)を用いて20mA、180分間、電気泳動により分離して、修飾または非修飾一本鎖オリゴヌクレオチドの完全鎖の残存率(%)を測定した。その結果を表6に示す。

[0227] [表6]

	30分後の残存率 (%)
実施例 1－8 a	67
参考例 1－2	32

[0228] 修飾一本鎖オリゴヌクレオチド(実施例1－5a)の反応溶液の組成

20 μM 修飾一本鎖オリゴヌクレオチド水溶液	2 μL
緩衝液(250mM Tris-HCl, 50mM MgCl_2 (pH7.0))	1.5 μL
10 $\mu\text{g/mL}$ RNase水溶液	0.5 μL

水	6 μ L
計	10 μ L

[0229] 非修飾一本鎖オリゴヌクレオチド(参考例1-2)の反応溶液の組成

20 μ M 非修飾一本鎖オリゴヌクレオチド水溶液	2 μ L
緩衝液(250mM Tris-HCl, 50mM MgCl ₂ (pH7.0))	1. 5 μ L
10 μ g/mL RNase水溶液	0. 5 μ L
水	6 μ L
計	10 μ L

[0230] また、以下に示す組成の反応溶液から、5、10、20、30、60、90分後に各エッペンドルフチューブに分注しておいた充填溶液(8M尿素 XC BPB)(10 μ l)中に、反応液(10 μ l)をサンプリングして反応を停止させた。得られた各時間におけるサンプルを、20%ポリアクリルアミドゲル(7M尿素含有)を用いて20mA、180分間、電気泳動により分離して、修飾または非修飾二本鎖オリゴヌクレオチドの完全鎖の残存率(%)を縦軸に、反応時間を横軸にとって図8を作成した。

[0231] 修飾二本鎖オリゴヌクレオチド(実施例2-5)の反応溶液の組成

20 μ M 修飾二本鎖オリゴヌクレオチド水溶液	2 μ L
緩衝液(250mM Tris-HCl, 50mM MgCl ₂ (pH7.0))	1. 5 μ L
10 μ g/mL RNase水溶液	0. 5 μ L
水	6 μ L
計	10 μ L

[0232] 非修飾二本鎖オリゴヌクレオチド(参考例2-2)の反応溶液の組成

20 μ M 非修飾二本鎖オリゴヌクレオチド水溶液	2 μ L
緩衝液(250mM Tris-HCl, 50mM MgCl ₂ (pH7.0))	1. 5 μ L
10 μ g/mL RNase水溶液	0. 5 μ L
水	6 μ L
計	10 μ L

[0233] 表6から、修飾二本鎖オリゴヌクレオチドは、非修飾二本鎖オリゴヌクレオチドと比較して、エンドヌクレアーゼ耐性が著しく向上していることが確認された。また、図8から

、修飾二本鎖オリゴヌクレオチドは、非修飾二本鎖オリゴヌクレオチドと比較して、エンドヌクレアーゼ耐性が著しく向上していることが確認された。

産業上の利用可能性

[0234] 本発明の修飾オリゴヌクレオチドは、例えば、疾患治療剤として有用である。

配列表フリーテキスト

[0235] 配列番号1 RNaseLの標的配列

配列番号2 配列番号1の標的配列に対するsiRNA配列の修飾センス鎖

配列番号3 配列番号1の標的配列に対するsiRNA配列の修飾センス鎖

配列番号4 配列番号1の標的配列に対するsiRNA配列の修飾センス鎖

配列番号5 配列番号1の標的配列に対するsiRNA配列の修飾アンチセンス鎖

配列番号6 配列番号1の標的配列に対するsiRNA配列の修飾アンチセンス鎖

配列番号7 配列番号1の標的配列に対するsiRNA配列の修飾アンチセンス鎖

配列番号8 配列番号1の標的配列に対するsiRNA配列のセンス鎖

配列番号9 配列番号1の標的配列に対するsiRNA配列のアンチセンス鎖

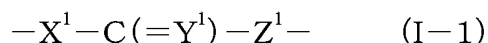
配列番号10 配列番号12の標的配列に対するsiRNA配列の修飾鎖

配列番号11 配列番号12の標的配列に対するsiRNA配列の別の修飾鎖

配列番号12 標的配列

請求の範囲

- [1] オリゴヌクレオチドの3'末端から1番目と2番目のヌクレオシド間の5', 3'-リン酸ジエステル結合が、下記式(I-1)で表される結合に置き換えられた修飾オリゴヌクレオチド。



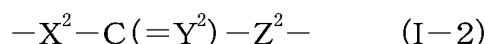
前記式(I-1)中、 X^1 はO、NHまたはS、 Y^1 はOまたはS、 Z^1 はO、NHまたはSである。

- [2] 前記式(I-1)で表される結合が、 $-O-C(=O)-NH-$ 、 $-NH-C(=O)-O-$ 、 $-NH-C(=O)-NH-$ 、 $-NH-C(=O)-S-$ 、 $-S-C(=O)-NH-$ 、 $-O-C(=S)-NH-$ 、 $-NH-C(=S)-O-$ 、 $-NH-C(=S)-NH-$ 、 $-NH-C(=S)-S-$ および $-S-C(=S)-NH-$ からなる群から選択される請求項1に記載の修飾オリゴヌクレオチド。

- [3] 前記式(I-1)で表される結合が、 $-O-C(=O)-NH-$ 、 $-NH-C(=O)-O-$ および $-NH-C(=O)-NH-$ からなる群から選択される請求項2に記載の修飾オリゴヌクレオチド。

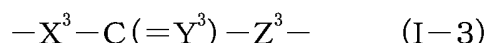
- [4] 下記(i)および(ii)の少なくとも一方を満たす請求項1に記載の修飾オリゴヌクレオチド。

(i) 前記オリゴヌクレオチドの3'末端から2番目と3番目のヌクレオシド間の5', 3'-リン酸ジエステル結合が、下記式(I-2)で表される結合に置き換えられている。



前記式(I-2)中、 X^2 はO、NHまたはS、 Y^2 はOまたはS、 Z^2 はO、NHまたはSである。

(ii) 前記オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目と4番目のヌクレオシド間の5', 3'-リン酸ジエステル結合が、下記式(I-3)で表される結合に置き換えられている。



前記式(I-3)中、 X^3 はO、NHまたはS、 Y^3 はOまたはS、 Z^3 はO、NHまたはSである。

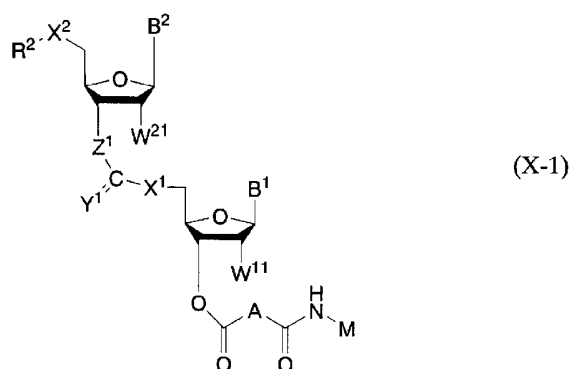
- [5] 前記式(I-2)で表される結合および前記式(I-3)で表される結合が、互いに独立

して、 $-O-C(=O)-NH-$ 、 $-NH-C(=O)-O-$ 、 $-NH-C(=O)-NH-$ 、 $-NH-C(=O)-S-$ 、 $-S-C(=O)-NH-$ 、 $-O-C(=S)-NH-$ 、 $-NH-C(=S)-O-$ 、 $-NH-C(=S)-NH-$ 、 $-NH-C(=S)-S-$ および $-S-C(=S)-NH-$ からなる群から選択される請求項4に記載の修飾オリゴヌクレオチド。

- [6] 前記修飾オリゴヌクレオチドが、二本鎖オリゴヌクレオチドである請求項1に記載の修飾オリゴヌクレオチド。
- [7] 前記二本鎖オリゴヌクレオチドの少なくとも一方の一本鎖オリゴヌクレオチドの3'末端から1番目と2番目のヌクレオチド間の5', 3'-リン酸ジエステル結合が、前記式(I-1)で表される結合に置き換えられている請求項6に記載の修飾オリゴヌクレオチド。
- [8] 前記修飾オリゴヌクレオチドが、RNAi (RNA interference) を引き起こすオリゴヌクレオチドであり、前記修飾オリゴヌクレオチドが、エンドヌクレアーゼをコードするmRNAの一部と同じ塩基配列を有する請求項6に記載の修飾オリゴヌクレオチド。
- [9] 前記修飾オリゴヌクレオチドが、siRNA (short interfering RNA) であり、
前記mRNAの一部が、
スタートコドンから75塩基以上上流の、最初のAA配列に続く19塩基配列であって、
前記mRNAの一部が、前記mRNAに対して特異的であり、
前記修飾オリゴヌクレオチドが、前記19塩基配列のセンス鎖とアンチセンス鎖との組み合わせである請求項8に記載の修飾オリゴヌクレオチド。
- [10] 前記センス鎖およびアンチセンス鎖の少なくとも一方が、その3'末端にさらに2つのチミジンを含むヌクレオチドを有する請求項9に記載の修飾オリゴヌクレオチド。
- [11] 前記修飾オリゴヌクレオチドが、一本鎖オリゴヌクレオチドである請求項1に記載の修飾オリゴヌクレオチド。
- [12] 前記修飾オリゴヌクレオチドが、アンチセンスDNAまたはアンチセンスRNAであり、
前記修飾オリゴヌクレオチドが、エンドヌクレアーゼをコードするmRNAの少なくとも一部と相補的な配列を有する請求項11に記載の修飾オリゴヌクレオチド。
- [13] 前記オリゴヌクレオチドが、ヌクレアーゼ耐性である請求項1に記載の修飾オリゴヌ

クレオチド。

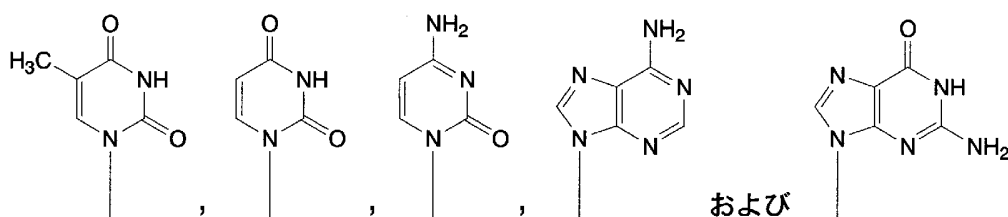
- [14] オリゴヌクレオチドを含む遺伝子発現抑制剤であって、前記オリゴヌクレオチドが、請求項1に記載の修飾オリゴヌクレオチドである遺伝子発現抑制剤。
- [15] 遺伝子発現に伴う疾患を治療するための医薬組成物であって、前記医薬組成物が、請求項14に記載の遺伝子発現抑制剤を含む医薬組成物。
- [16] さらに細胞導入用賦形剤を含む請求項15に記載の医薬組成物。
- [17] 前記細胞導入用賦形剤が、トランスフェクション試薬である請求項16に記載の医薬組成物。
- [18] RNAiキットであって、前記キットが、請求項8に記載の修飾オリゴヌクレオチドを含むキット。
- [19] RNAi研究用試薬であって、前記試薬が、請求項8に記載の修飾オリゴヌクレオチドを含む試薬。
- [20] オリゴヌクレオチドを用いて遺伝子発現を抑制する方法であって、前記オリゴヌクレオチドが、請求項1に記載の修飾オリゴヌクレオチドである方法。
- [21] オリゴヌクレオチドを用いてRNAiを引き起こす方法であって、前記オリゴヌクレオチドが、請求項8に記載の修飾オリゴヌクレオチドである方法。
- [22] 下記式(X-1)で表される固相合成用ユニット化合物を出発原料として、請求項1に記載の修飾オリゴヌクレオチドを製造する方法であって、
式(X-1)で表される固相合成用ユニット化合物のR²を除去し、
式(X-1)で表される固相合成用ユニット化合物の5'末端にヌクレオチドを伸長させ、その後、固相担体から切り出して前記修飾オリゴヌクレオチドを得る製造方法。
[化1]



前記式(X-1)中、 R^2 は、保護基であり、

B^1 および B^2 は、互いに独立して、以下の式で示す基およびその官能基が保護基で保護された基から選択される基であり、

[化2]



Aは、式 $-(CH_2)_n-$ で表される基であり、前記式においてnは1～6の整数であり、

W^{11} は、Hまたは式 OR^{11} で表される基であり、

W^{21} は、Hまたは式 OR^{21} で表される基であり、

ここで、前記 R^{11} および R^{21} は、互いに独立して、保護基であり、

X^1 および X^2 は、互いに独立して、O、NHまたはSであり、

Y^1 は、OまたはSであり、

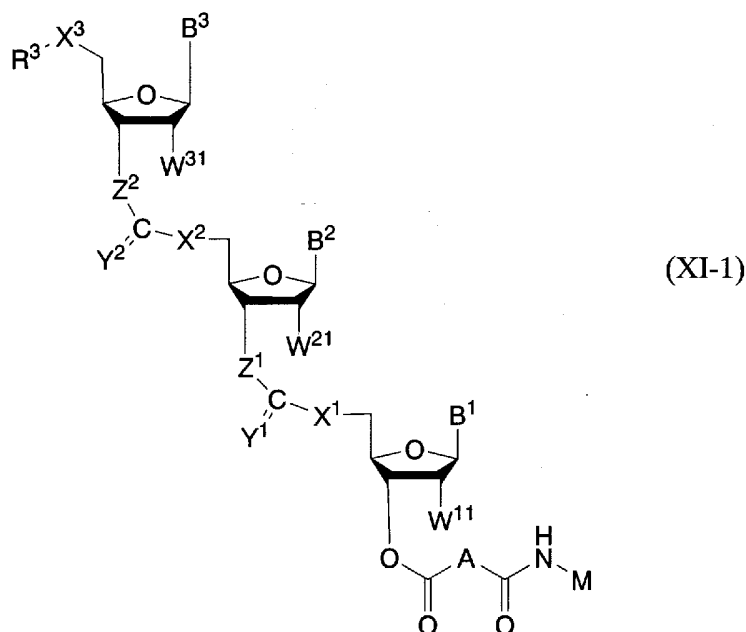
Z^1 は、O、NHまたはSであり、

Mは、固相担体である。

- [23] 下記式(XI-1)で表される固相合成用ユニット化合物を出発原料として、(i)を満たす請求項4に記載の修飾オリゴヌクレオチドを製造する方法であって、式(XI-1)で表される固相合成用ユニット化合物の R^3 を除去し、

式(XI-1)で表される固相合成用ユニット化合物の5'末端にヌクレオチドを伸長させ、その後、固相担体から切り出して前記修飾オリゴヌクレオチドを得る製造方法。

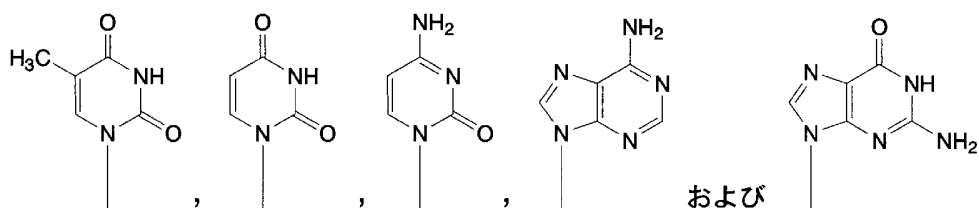
[化3]



前記式中、 R^3 は、保護基であり、

B^1 、 B^2 および B^3 は、互いに独立して、以下の式で示す基およびその官能基が保護基で保護された基から選択される基であり、

[化4]



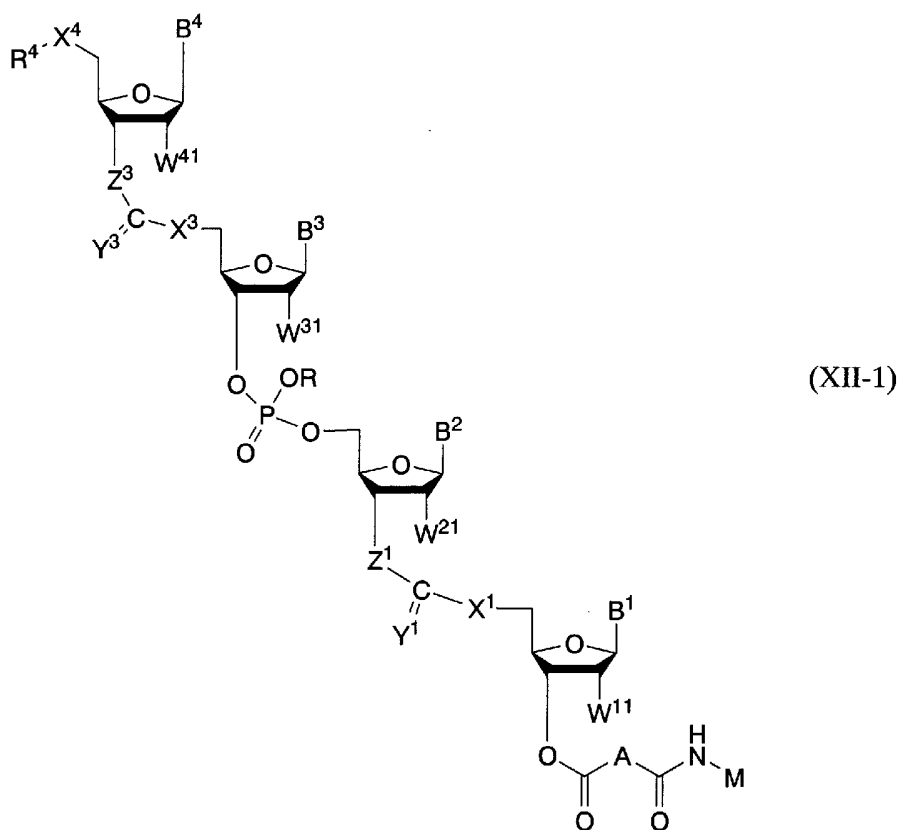
Aは、式 $-(CH_2)_n-$ で表される基であり、前記式においてnは1~6の整数であり、

W^{11} は、Hまたは式 OR^{11} で表される基であり、

W^{21} は、Hまたは式 OR^{21} で表される基であり、

W^{31} は、Hまたは式 OR^{31} で表される基であり、
 ここで、前記 R^{11} 、 R^{21} および R^{31} は、互いに独立して、保護基であり、
 X^1 、 X^2 および X^3 は、互いに独立して、O、NHまたはSであり、
 Y^1 および Y^2 は、互いに独立して、OまたはSであり、
 Z^1 および Z^2 は、互いに独立して、O、NHまたはSであり、
 M は、固相担体である。

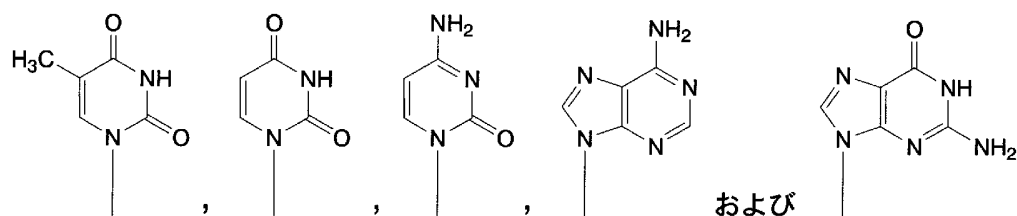
- [24] 下記式(XII-1)で表される固相合成用ユニット化合物を出発原料として、(ii)を満たす請求項4に記載の修飾オリゴヌクレオチドを製造する方法であって、
 式(XII-1)で表される固相合成用ユニット化合物の R^4 を除去し、
 式(XII-1)で表される固相合成用ユニット化合物の5'末端にヌクレオチドを伸長させ、その後、固相担体から切り出して前記修飾オリゴヌクレオチドを得る製造方法。
 [化5]



前記式中、 R^4 および R は、互いに独立して、保護基であり、

B^1 、 B^2 、 B^3 および B^4 は、互いに独立して、以下の式で示す基およびその官能基が保護基で保護された基から選択される基であり、

[化6]



A は、式 $-(CH_2)_n-$ で表される基であり、前記式において n は1～6の整数であり、

W^{11} は、 H または式 OR^{11} で表される基であり、

W^{21} は、 H または式 OR^{21} で表される基であり、

W^{31} は、 H または式 OR^{31} で表される基であり、

W^{41} は、 H または式 OR^{41} で表される基であり、

ここで、前記 R^{11} 、 R^{21} 、 R^{31} および R^{41} は、互いに独立して、保護基であり、

X^1 、 X^3 および X^4 は、互いに独立して、 O 、 NH または S であり、

Y^1 および Y^3 は、互いに独立して、 O または S であり、

Z^1 および Z^3 は、互いに独立して、 O 、 NH または S であり、

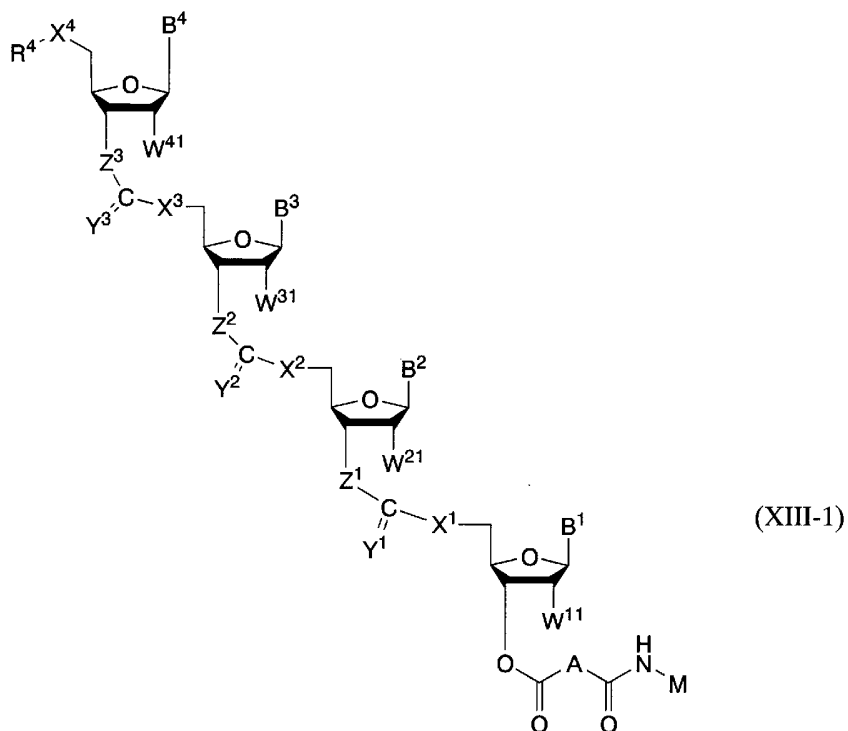
M は、固相担体である。

- [25] 下記式(XIII-1)で表される固相合成用ユニット化合物を出発原料として、(i)および(ii)の両方を満たす請求項4に記載の修飾オリゴヌクレオチドを製造する方法であって、

式(XIII-1)で表される固相合成用ユニット化合物の R^4 を除去し、

式(XIII-1)で表される固相合成用ユニット化合物の5'末端にヌクレオチドを伸長させ、その後、固相担体から切り出して前記修飾オリゴヌクレオチドを得る製造方法。

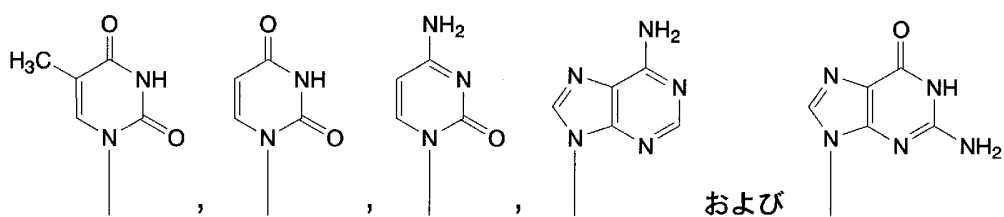
[化7]



前記式中、 R^4 は、保護基であり、

B¹、B²、B³およびB⁴は、互いに独立して、以下の式で示す基およびその官能基が保護基で保護された基から選択される基であり、

[化8]



Aは、式－(CH₂)_n－で表される基であり、前記式においてnは1～6の整数であり、

W¹¹は、Hまたは式OR¹¹で表される基であり、

W²¹は、Hまたは式OR²¹で表される基であり、

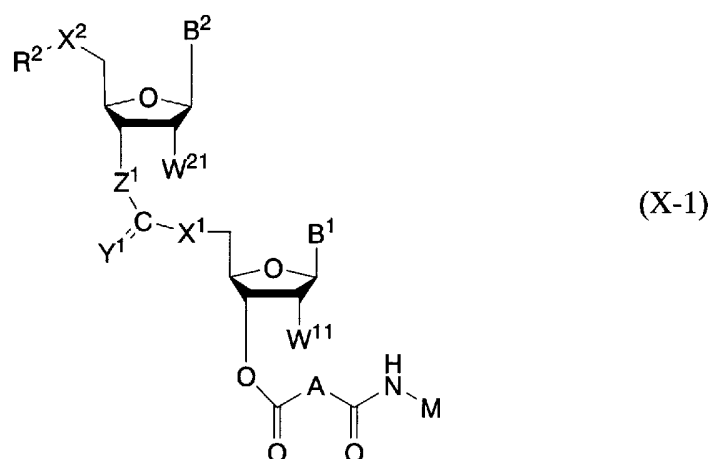
W^{31} は、Hまたは式OR³¹で表される基であり、

W⁴¹は、Hまたは式OR⁴¹で表される基であり、

ここで、前記 R^{11} 、 R^{21} 、 R^{31} および R^{41} は、互いに独立して、保護基であり、
 X^1 、 X^2 、 X^3 および X^4 は、互いに独立して、O、NHまたはSであり、
 Y^1 、 Y^2 および Y^3 は、互いに独立して、OまたはSであり、
 Z^1 、 Z^2 および Z^3 は、互いに独立して、O、NHまたはSであり、
Mは、固相担体である。

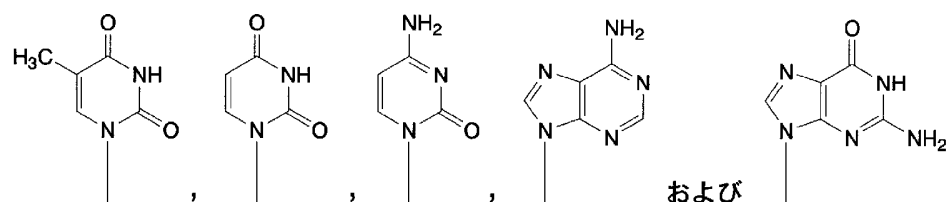
[26] 請求項1に記載の修飾オリゴヌクレオチド製造のための、下記式(X-1)で表される固相合成用ユニット化合物。

[化9]



前記式(X-1)中、 R^2 は、保護基であり、
 B^1 および B^2 は、互いに独立して、以下の式で示す基およびその官能基が保護基で保護された基から選択される基であり、

[化10]



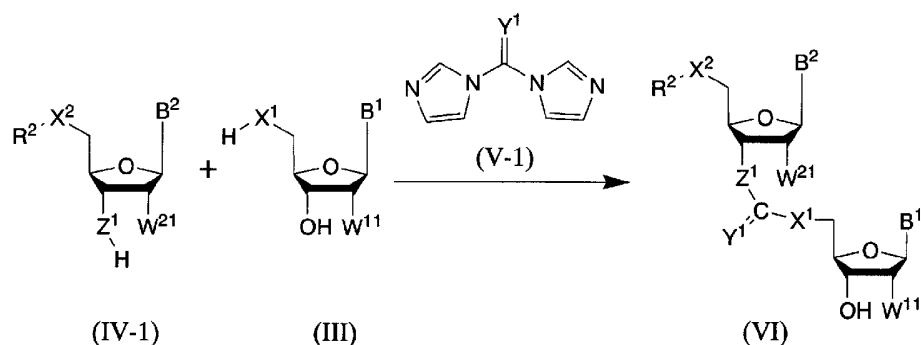
Aは、式 $-(CH_2)_n-$ で表される基であり、前記式においてnは1～6の整数であり、
 W^{11} は、Hまたは式 OR^{11} で表される基であり、

W^{21} は、Hまたは式 OR^{21} で表される基であり、
 ここで、前記 R^{11} および R^{21} は、互いに独立して、保護基であり、
 X^1 および X^2 は、互いに独立して、O、NHまたはSであり、
 Y^1 は、OまたはSであり、
 Z^1 は、O、NHまたはSであり、
 M は、固相担体である。

[27] 請求項26に記載の式(X-1)で表される固相合成用ユニット化合物の製造方法であって、

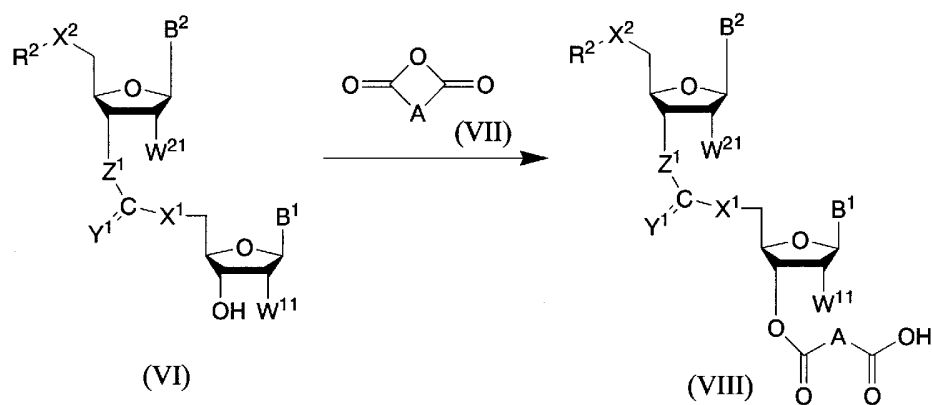
下記式(IV-1)で表されるヌクレオシド誘導体と、下記式(III)で表されるヌクレオシド誘導体とを、下記式(V-1)で表されるジイミダゾール誘導体と縮合させ、下記式(VI)で表される二量体(VI)を得、

[化11]



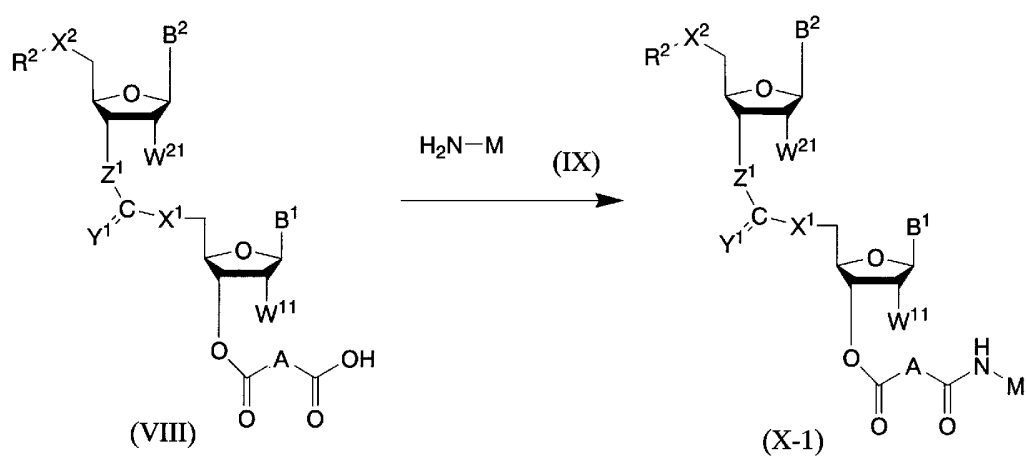
前記式(VI)で表される二量体と下記式(VII)で表される無水物とを縮合させ、下記式(VIII)で表される二量体を得、

[化12]



前記式(VIII)で表される二量体と下記式(IX)で表されるアミノ基を有する固相担体とを縮合させ、式(X-1)で表される固相合成用ユニット化合物を得る製造方法。

[化13]

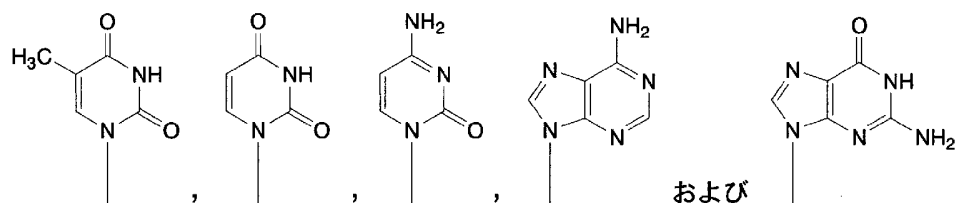


前記式中、

R^2 は、保護基であり、

B^1 および B^2 は、互いに独立して、以下の式で示す基およびその官能基が保護基で保護された基から選択される基であり、

[化14]



Aは、式 $-(CH_2)_n-$ で表される基であり、前記式においてnは1～6の整数であり、

W^{11} は、Hまたは式 OR^{11} で表される基であり、

W^{21} は、Hまたは式 OR^{21} で表される基であり、

ここで、前記 R^{11} および R^{21} は、互いに独立して、保護基であり、

X^1 および X^2 は、互いに独立して、O、NHまたはSであり、

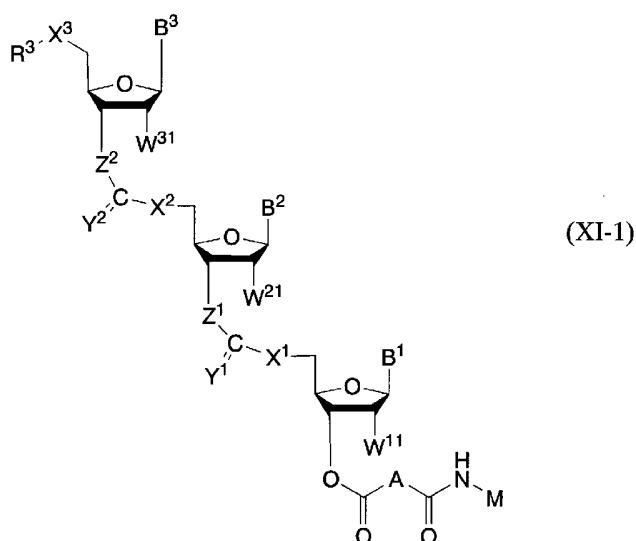
Y^1 は、OまたはSであり、

Z^1 は、O、NHまたはSであり、

Mは、固相担体である。

- [28] 請求項4に記載の修飾オリゴヌクレオチド製造のための、下記式(XI-1)で表される固相合成用ユニット化合物。

[化15]

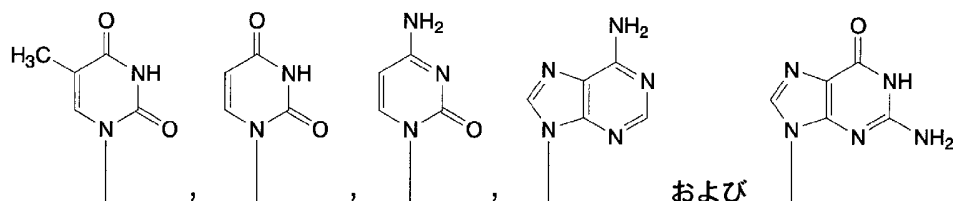


前記式中、 R^3 は、保護基であり、

B^1 、 B^2 および B^3 は、互いに独立して、以下の式で示す基およびその官能基が保護基

で保護された基から選択される基であり、

[化16]



Aは、式 $-(CH_2)_n-$ で表される基であり、前記式においてnは1～6の整数であり、

W^{11} は、Hまたは式 OR^{11} で表される基であり、

W^{21} は、Hまたは式 OR^{21} で表される基であり、

W^{31} は、Hまたは式 OR^{31} で表される基であり、

ここで、前記 R^{11} 、 R^{21} および R^{31} は、互いに独立して、保護基であり、

X^1 、 X^2 および X^3 は、互いに独立して、O、NHまたはSであり、

Y^1 および Y^2 は、互いに独立して、OまたはSであり、

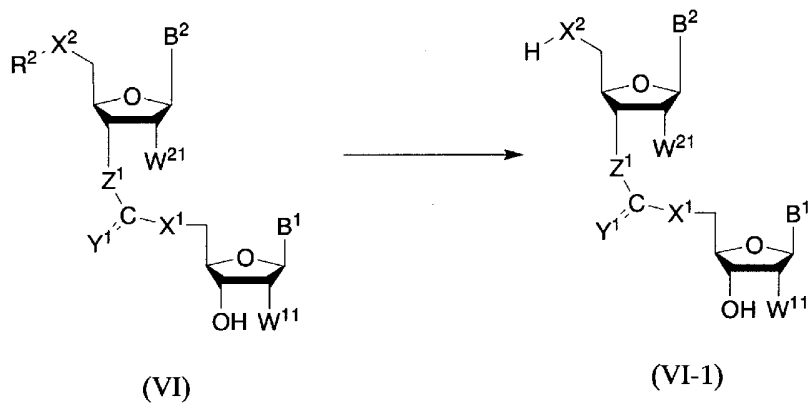
Z^1 および Z^2 は、互いに独立して、O、NHまたはSであり、

Mは、固相担体である。

[29] 請求項28に記載の前記式(XI-1)で表される固相合成用ユニット化合物の製造方法であって、

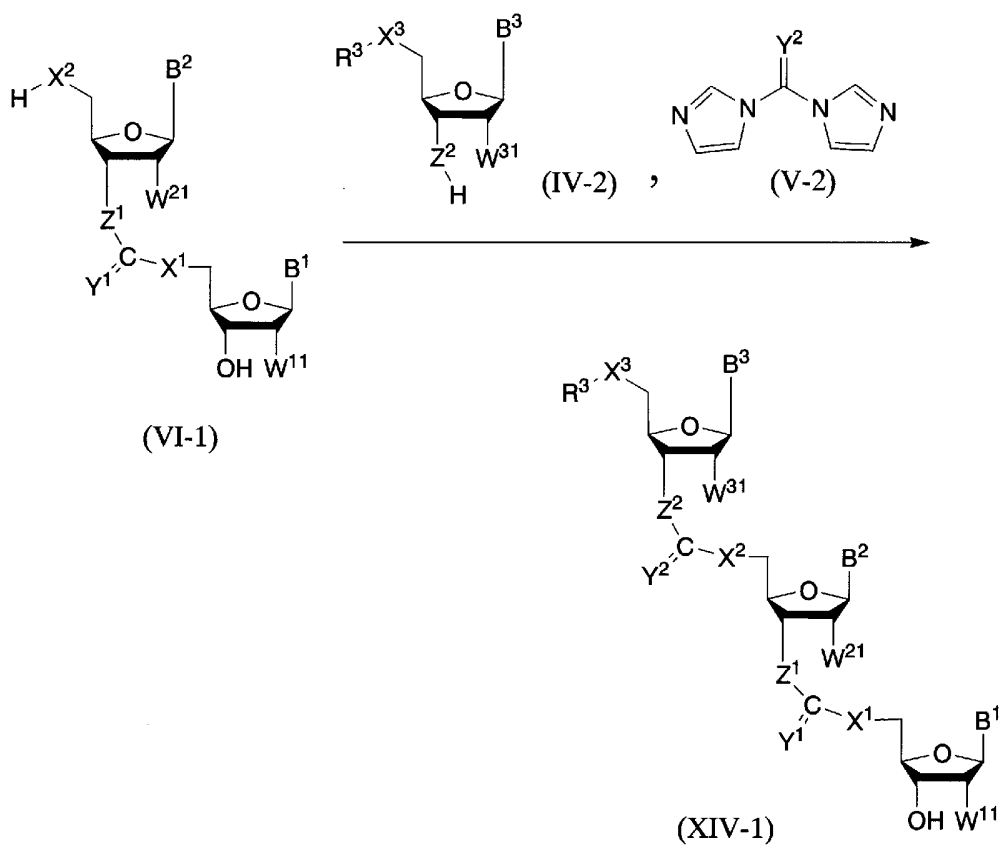
前記式(VI)で表される二量体の R^2 をHに置き換え、式(VI-1)で表される二量体を得、

[化17]

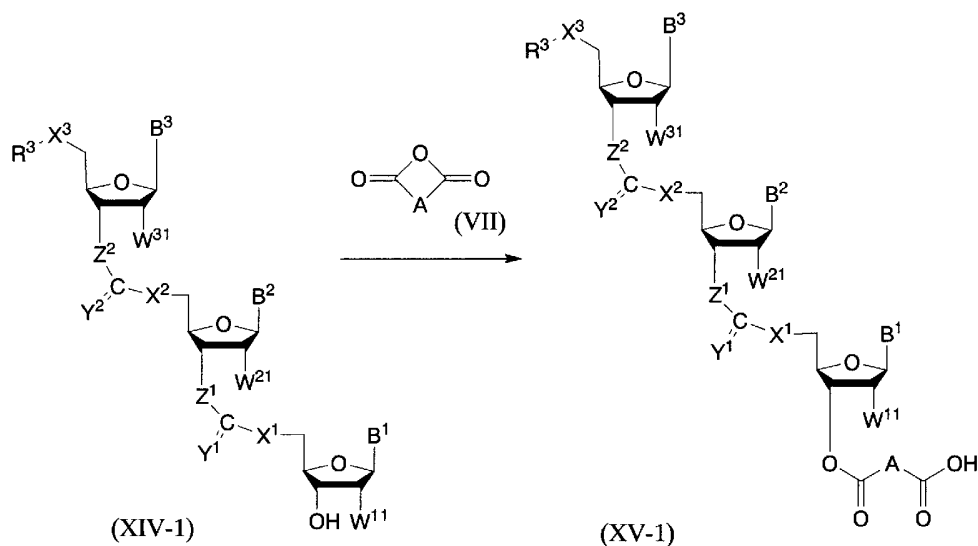


前記式(VI-1)で表される二量体と、下記式(IV-2)で表されるヌクレオシド誘導体とを、下記式(V-2)で表されるジイミダゾール誘導体と縮合させ、式(XIV-1)で表される三量体を得、

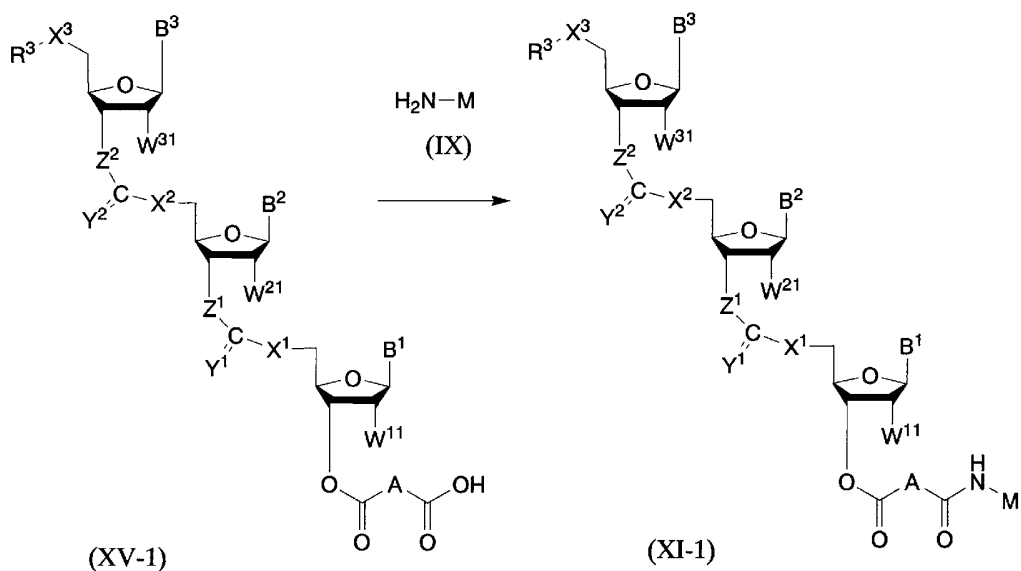
[化18]



前記式(XIV-1)で表される三量体と、下式(VII)で表される無水物とを縮合させ、
下記式(XV-1)で表される三量体を得、
[化19]



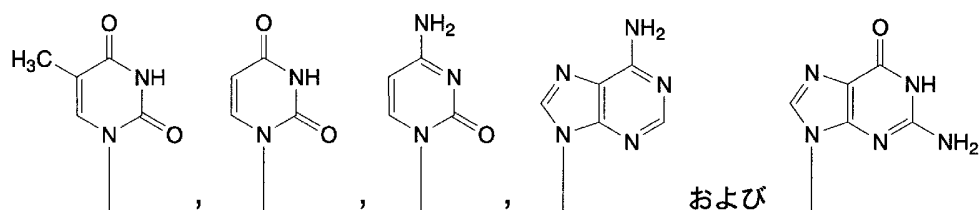
前記式(XV-1)で表される三量体と下記式(IX)で表されるアミノ基を有する固相担体とを縮合させ、式(XI-1)で表される固相合成用ユニット化合物を得る製造方法。
[化20]



前記式中、R²およびR³は、互いに独立して、保護基であり、

B¹、B²およびB³は、互いに独立して、以下の式で示す基およびその官能基が保護基で保護された基から選択される基であり、

[化21]



Aは、式 $-(CH_2)_n-$ で表される基であり、前記式においてnは1～6の整数であり、

W¹¹は、Hまたは式OR¹¹で表される基であり、

W²¹は、Hまたは式OR²¹で表される基であり、

W³¹は、Hまたは式OR³¹で表される基であり、

ここで、前記R¹¹、R²¹およびR³¹は、互いに独立して、保護基であり、

X¹、X²およびX³は、互いに独立して、O、NHまたはSであり、

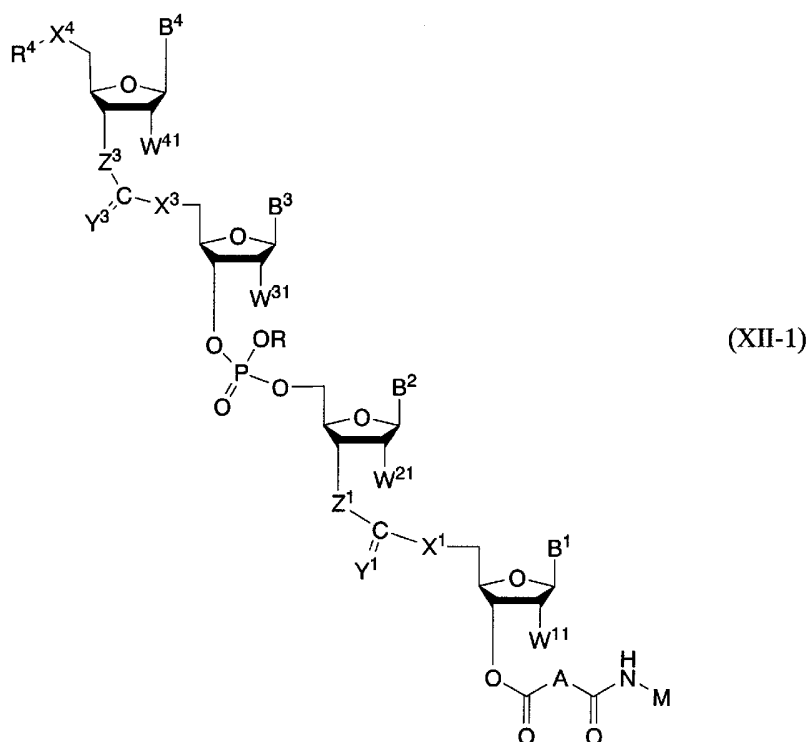
Y¹およびY²は、互いに独立して、OまたはSであり、

Z¹およびZ²は、互いに独立して、O、NHまたはSであり、

Mは、固相担体である。

[30] 請求項4に記載の修飾オリゴヌクレオチド製造のための、下記式(XII-1)で表される固相合成用ユニット化合物。

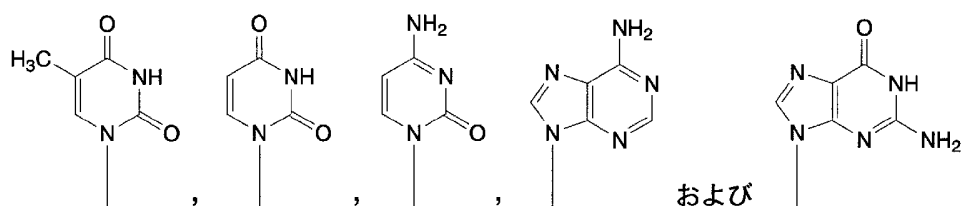
[化22]



前記式中、 R^4 および R は、保護基であり、

B^1 、 B^2 、 B^3 および B^4 は、互いに独立して、以下の式で示す基およびその官能基が保護基で保護された基から選択される基であり、

[化23]



A は、式 $-(CH_2)_n-$ で表される基であり、前記式において n は1～6の整数であり、

W^{11} は、 H または式 OR^{11} で表される基であり、

W^{21} は、 H または式 OR^{21} で表される基であり、

W^{31} は、 H または式 OR^{31} で表される基であり、

W^{41} は、 H または式 OR^{41} で表される基であり、

ここで、前記 R^{11} 、 R^{21} 、 R^{31} および R^{41} は、互いに独立して、保護基であり、

X^1 、 X^3 および X^4 は、互いに独立して、O、NHまたはSであり、

Y^1 および Y^3 は、互いに独立して、OまたはSであり、

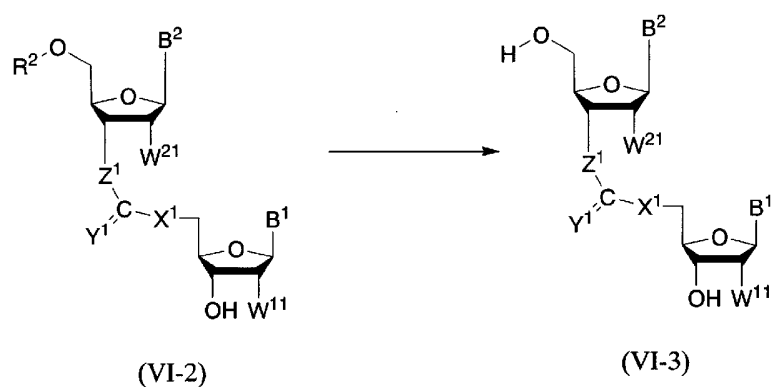
Z^1 および Z^3 は、互いに独立して、O、NHまたはSであり、

Mは、固相担体である。

[31] 請求項30に記載の式(XII-1)で表される固相合成用ユニット化合物の製造方法であって、

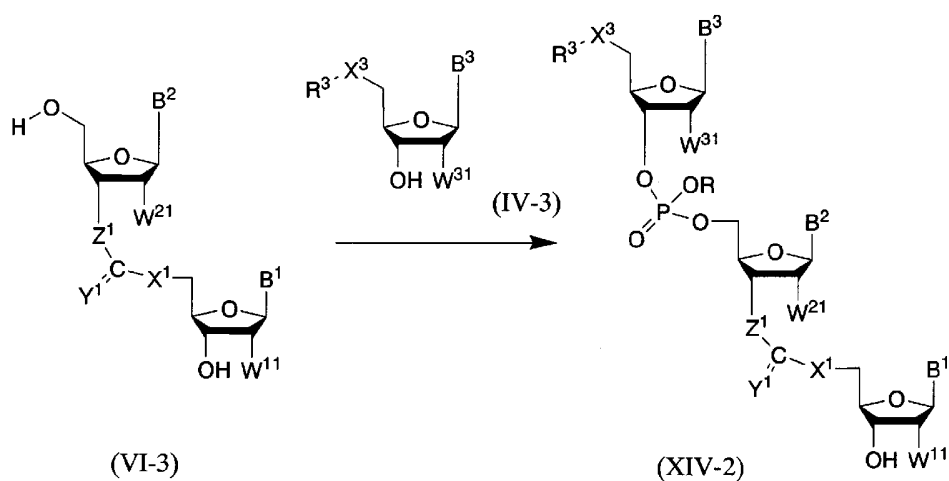
下記式(VI-2)で表される二量体の R^2 をHに置き換え、下記式(VI-3)で表される二量体を得、

[化24]



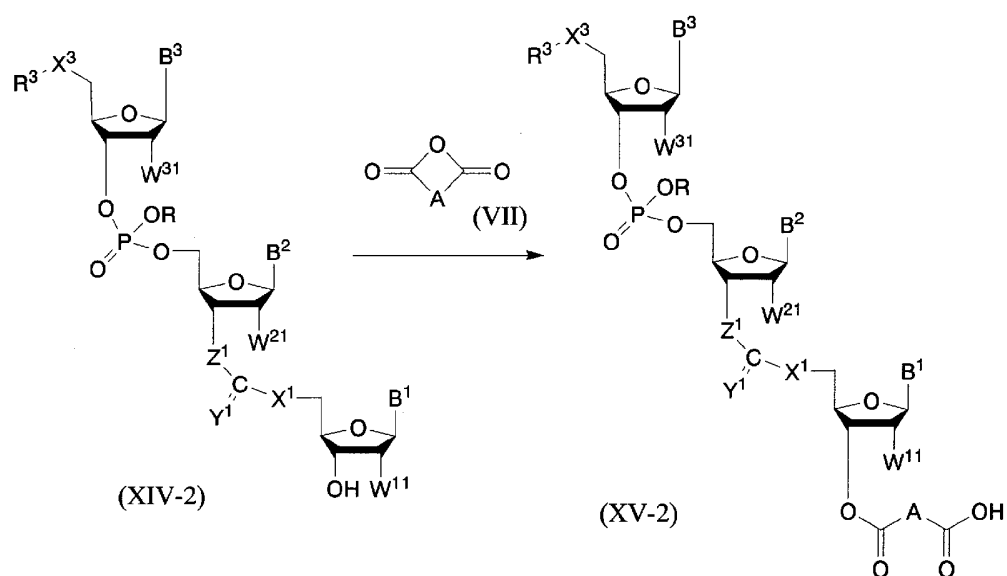
前記式(VI-3)で表される2量体と、下記式(IV-3)で表されるヌクレオシド誘導体とを、リン酸結合試薬と縮合させ、下記式(XIV-2)で表される三量体を得、

[化25]



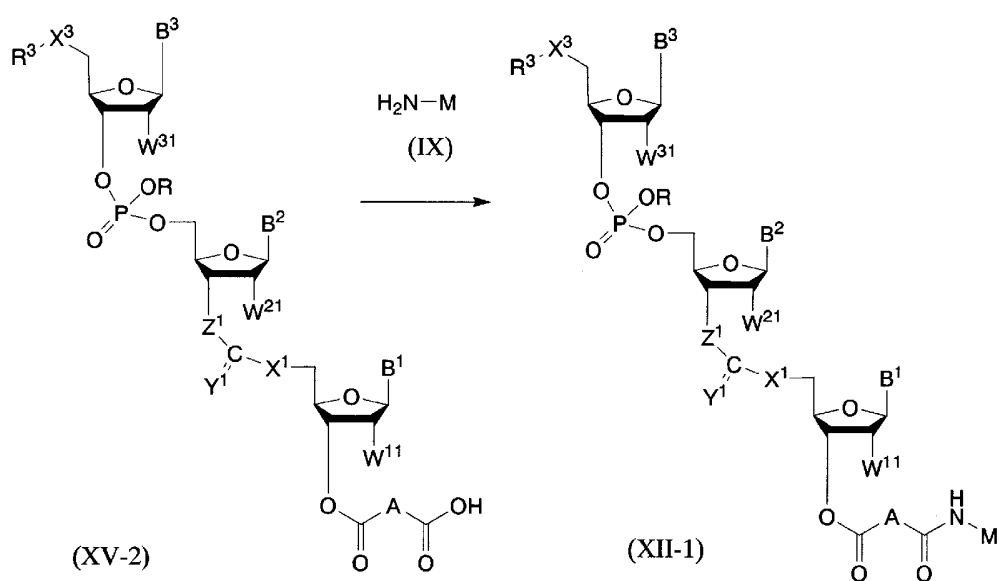
前記式(XIV-2)で表される三量体と、下記式(VII)で表される無水物とを縮合させ、下記式(XV-2)で表される三量体を得、

[化26]



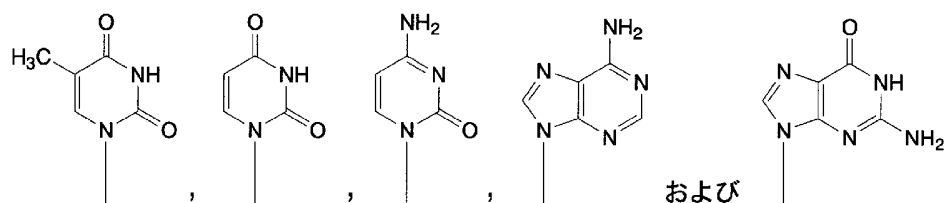
前記式(XV-2)で表される三量体と下記式(IX)で表されるアミノ基を有する固相担体とを縮合させ、下記式(XII-1)で表される固相合成用ユニット化合物を得る製造方法。

[化27]



前記式中、 R^2 、 R^3 およびRは、互いに独立して、保護基であり、
 B^1 、 B^2 および B^3 は、互いに独立して、以下の式で示す基およびその官能基が保護基
 で保護された基から選択される基であり、

[化28]



Aは、式 $-(CH_2)_n-$ で表される基であり、前記式においてnは1～6の整数であり、

W^{11} は、Hまたは式 OR^{11} で表される基であり、

W^{21} は、Hまたは式 OR^{21} で表される基であり、

W^{31} は、Hまたは式 OR^{31} で表される基であり、

ここで、前記 R^{11} 、 R^{21} および R^{31} は、互いに独立して、保護基であり、

X^1 および X^3 は、互いに独立して、O、NHまたはSであり、

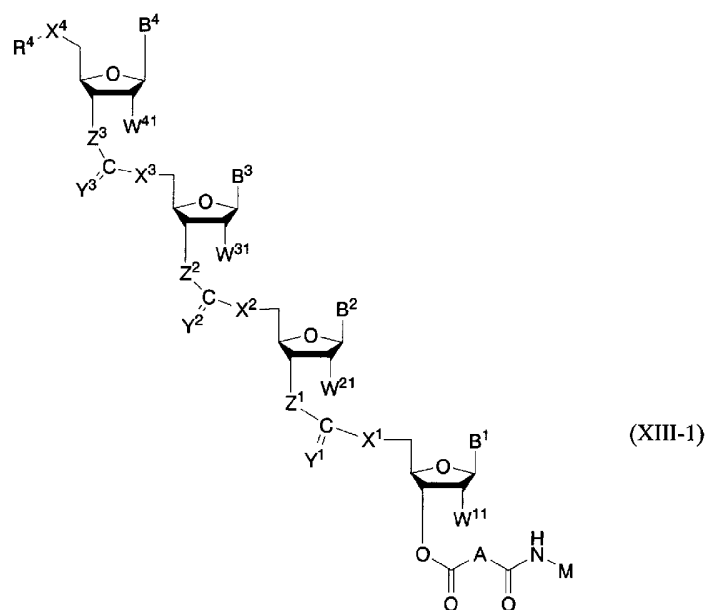
Y^1 は、互いに独立して、OまたはSであり、

Z^1 は、互いに独立して、O、NHまたはSであり、

Mは、固相担体である。

[32] 請求項4に記載の修飾オリゴヌクレオチド製造のための、下記式(XIII-1)で表される固相合成用ユニット化合物。

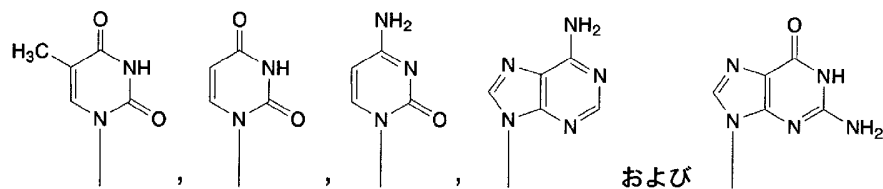
[化29]



前記式中、 R^4 は、保護基であり、

B^1 、 B^2 、 B^3 および B^4 は、互いに独立して、以下の式で示す基およびその官能基が保護基で保護された基から選択される基であり、

[化30]



Aは、式 $-(CH_2)_n-$ で表される基であり、前記式においてnは1～6の整数であり、

W^{11} は、Hまたは式 OR^{11} で表される基であり、

W^{21} は、Hまたは式 OR^{21} で表される基であり、

W^{31} は、Hまたは式 OR^{31} で表される基であり、

W^{41} は、Hまたは式 OR^{41} で表される基であり、

ここで、前記 R^{11} 、 R^{21} 、 R^{31} および R^{41} は、互いに独立して、保護基であり、

X^1 、 X^2 、 X^3 および X^4 は、互いに独立して、O、NHまたはSであり、

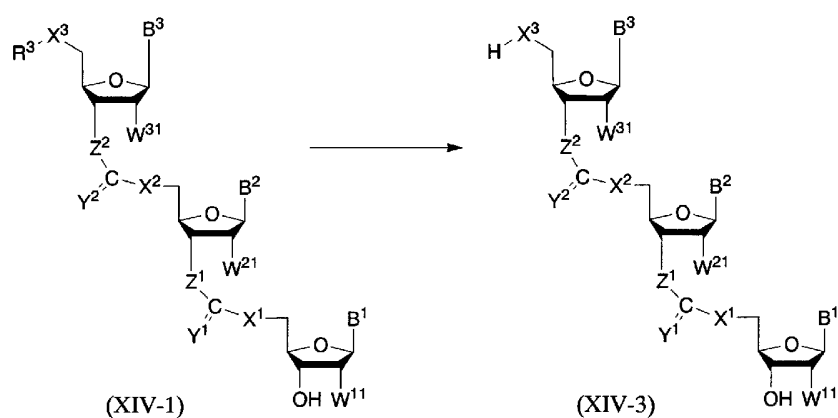
Y^1 、 Y^2 および Y^3 は、互いに独立して、OまたはSであり、

Z^1 、 Z^2 および Z^3 は、互いに独立して、O、NHまたはSであり、
Mは、固相担体である。

[33] 請求項32に記載の式(XIII-1)で表される固相合成用ユニット化合物の製造方法であって、

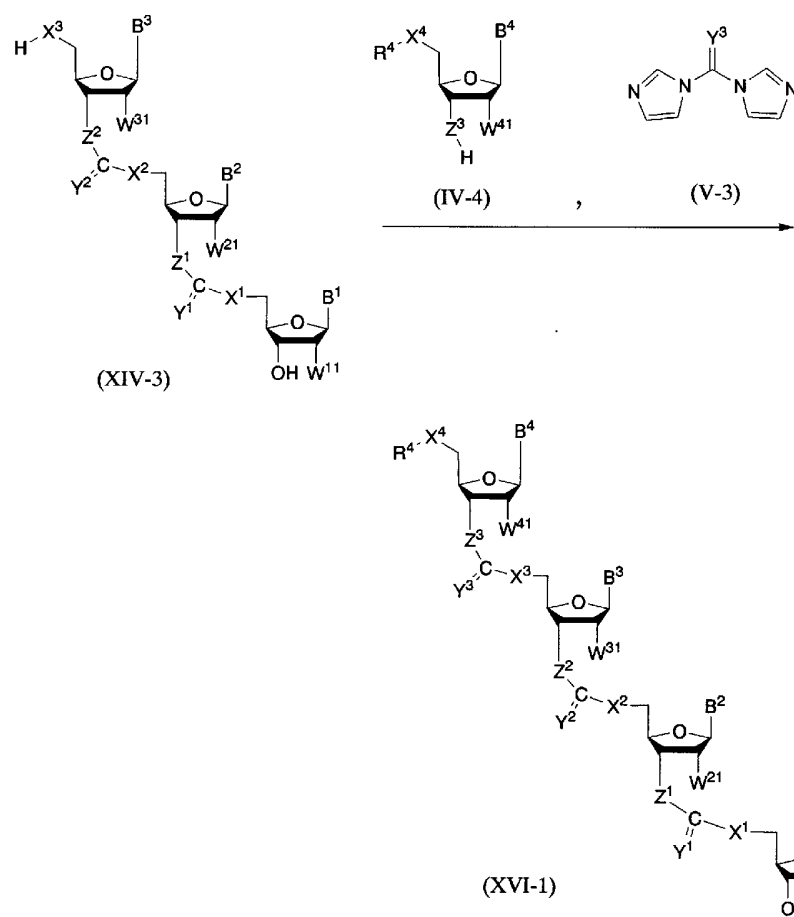
下記式(XIV-1)で表される三量体の R^3 をHに置き換え、式(XIV-3)で表される三量体を得、

[化31]



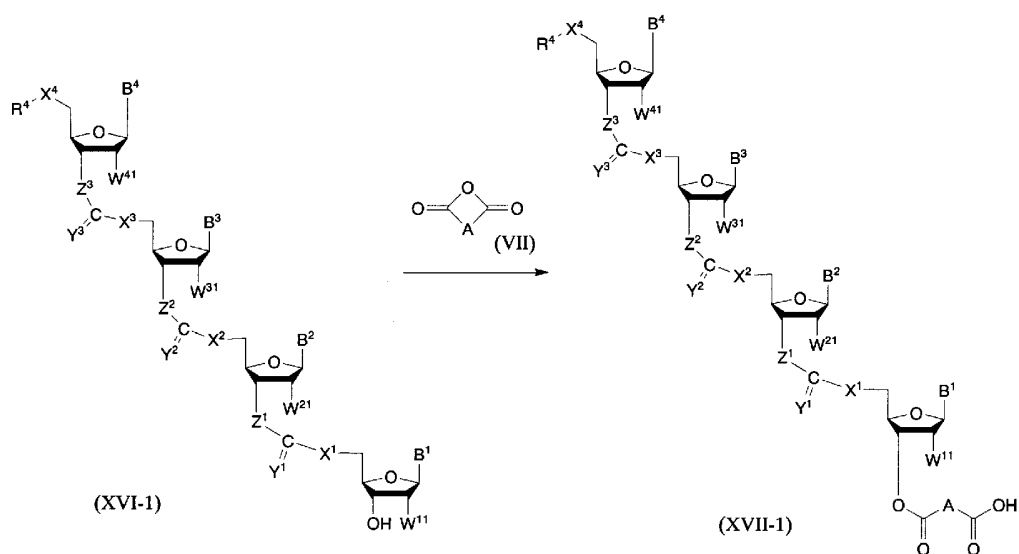
前記式(XIV-3)で表される三量体と、下記式(IV-4)で表されるヌクレオシド誘導体とを、下記式(V-3)で表されるジイミダゾール誘導体と縮合させ、下記式(XVI-1)で表される四量体を得、

[化32]



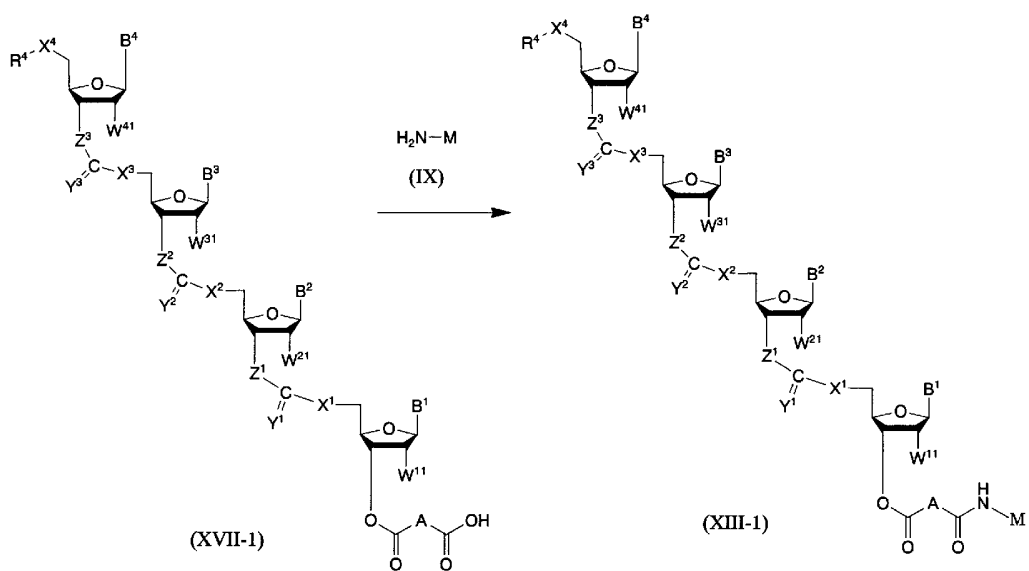
前記式(XVI-1)で表される四量体と、下記式(VII)で表される無水物とを縮合させ、下記式(XVII-1)で表される四量体を得、

[化33]



前記式(XVII-1)で表される四量体と、下記式(IX)で表されるアミノ基を有する固相担体とを縮合させ、式(XIII-1)で表される固相合成用ユニット化合物を得る製造方法。

[化34]

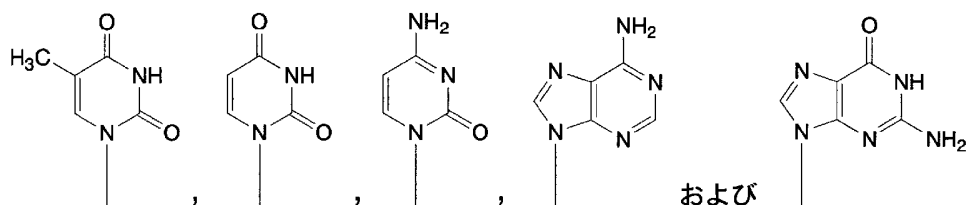


前記式において、

R³およびR⁴は、保護基であり、

B^1 、 B^2 、 B^3 および B^4 は、互いに独立して、以下の式で示す基およびその官能基が保護基で保護された基から選択される基であり、

[化35]



Aは、式 $-(CH_2)_n-$ で表される基であり、前記式においてnは1～6の整数であり、

W^{11} は、Hまたは式 OR^{11} で表される基であり、

W^{21} は、Hまたは式 OR^{21} で表される基であり、

W^{31} は、Hまたは式 OR^{31} で表される基であり、

W^{41} は、Hまたは式 OR^{41} で表される基であり、

ここで、前記 R^{11} 、 R^{21} 、 R^{31} および R^{41} は、互いに独立して、保護基であり、

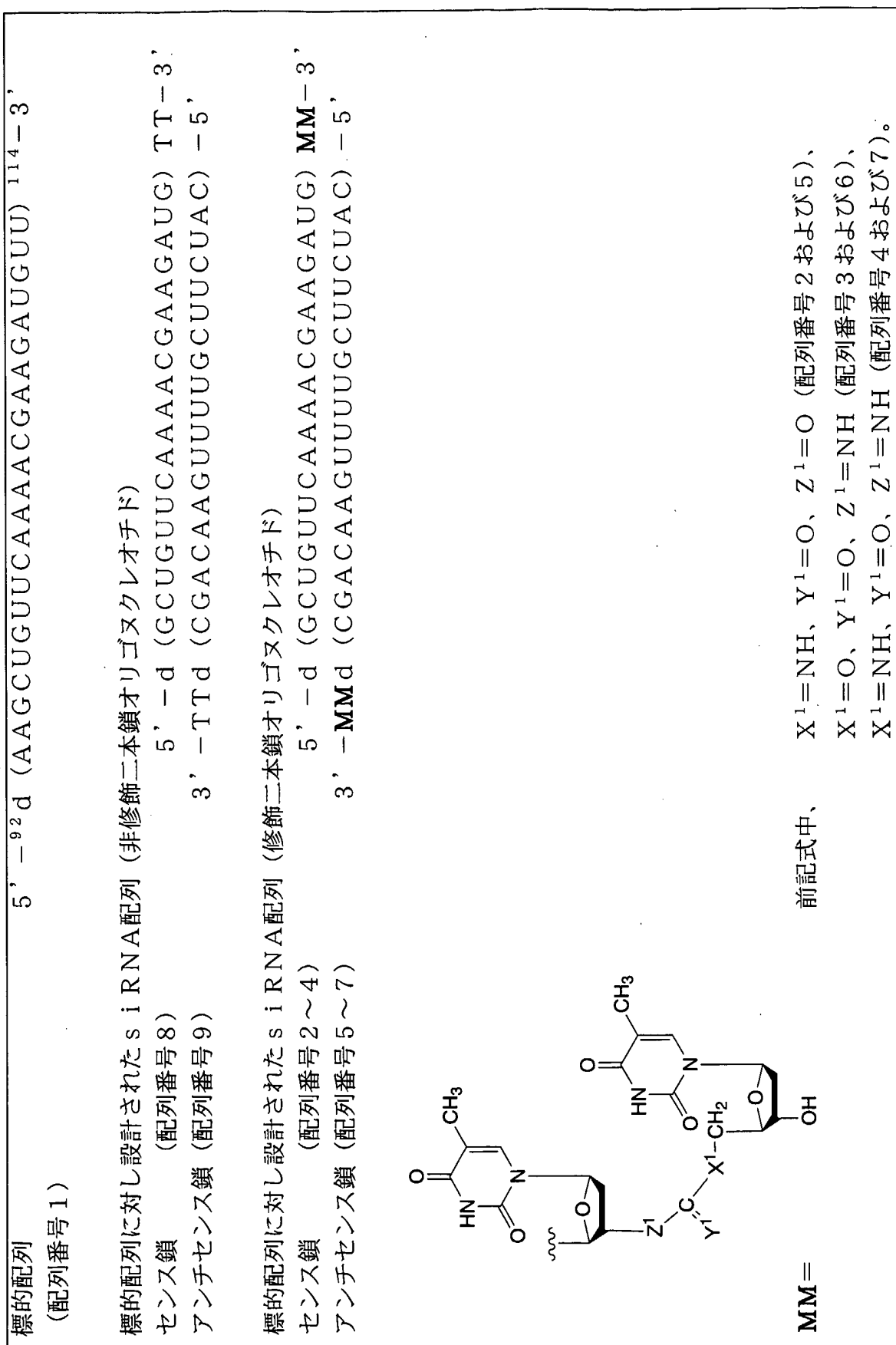
X^1 、 X^2 、 X^3 および X^4 は、互いに独立して、O、NHまたはSであり、

Y^1 、 Y^2 および Y^3 は、互いに独立して、OまたはSであり、

Z^1 、 Z^2 および Z^3 は、互いに独立して、O、NHまたはSであり、

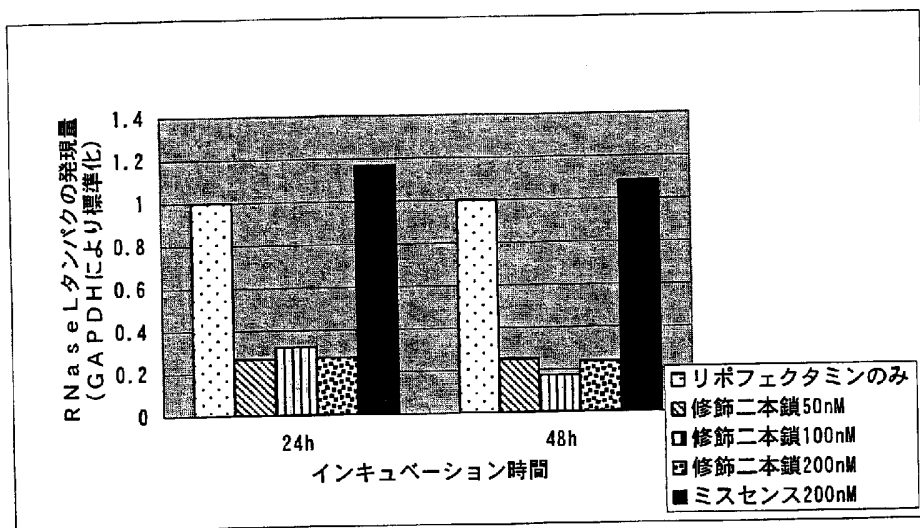
Mは、固相担体である。

[図 1]

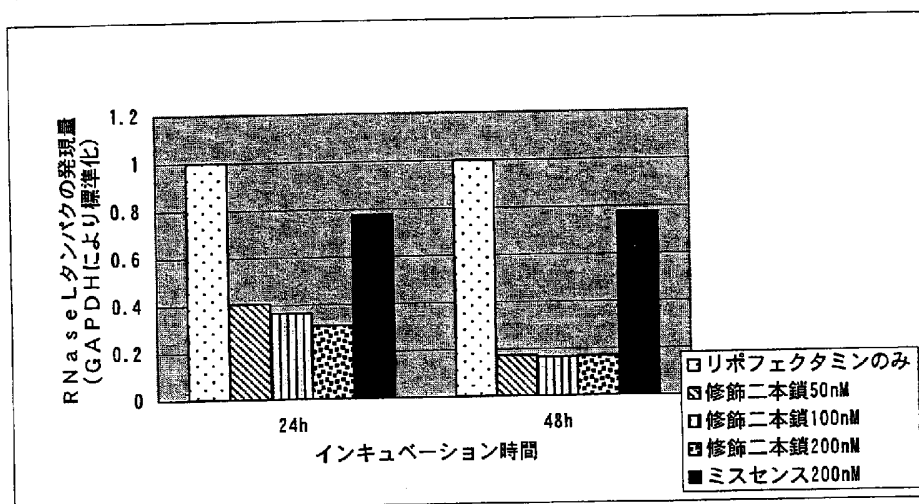


[図2]

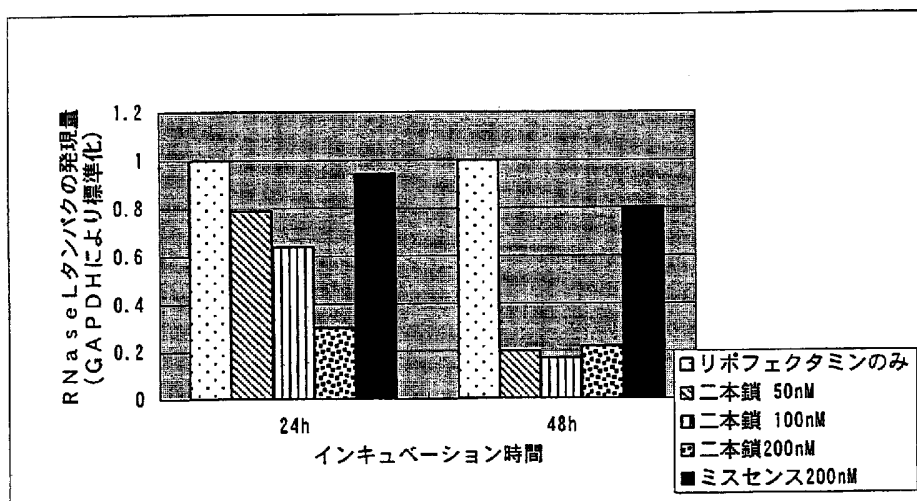
(a)



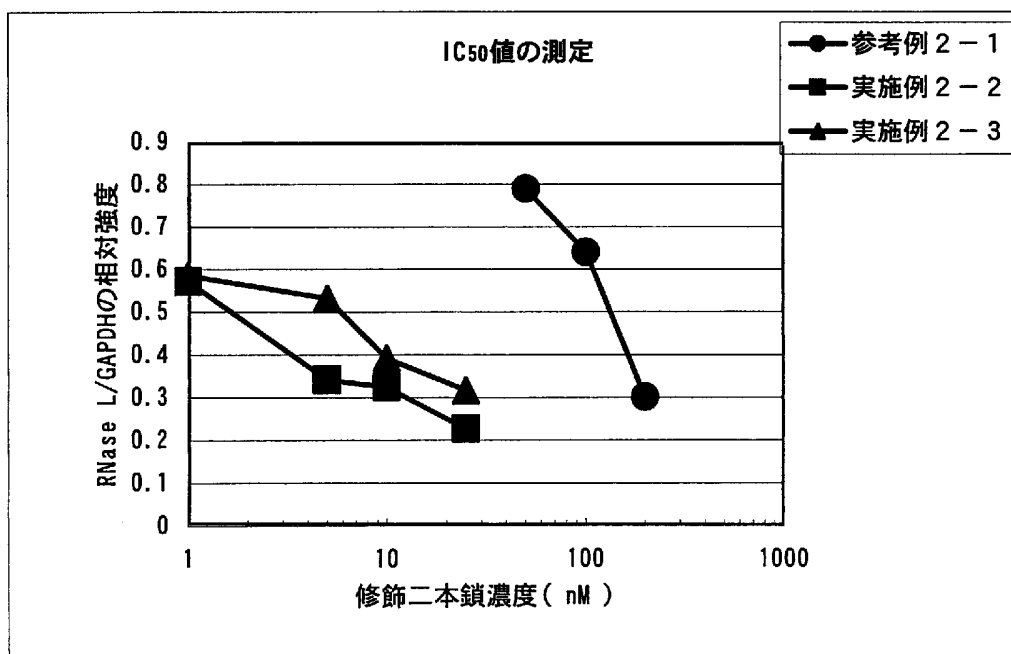
(b)



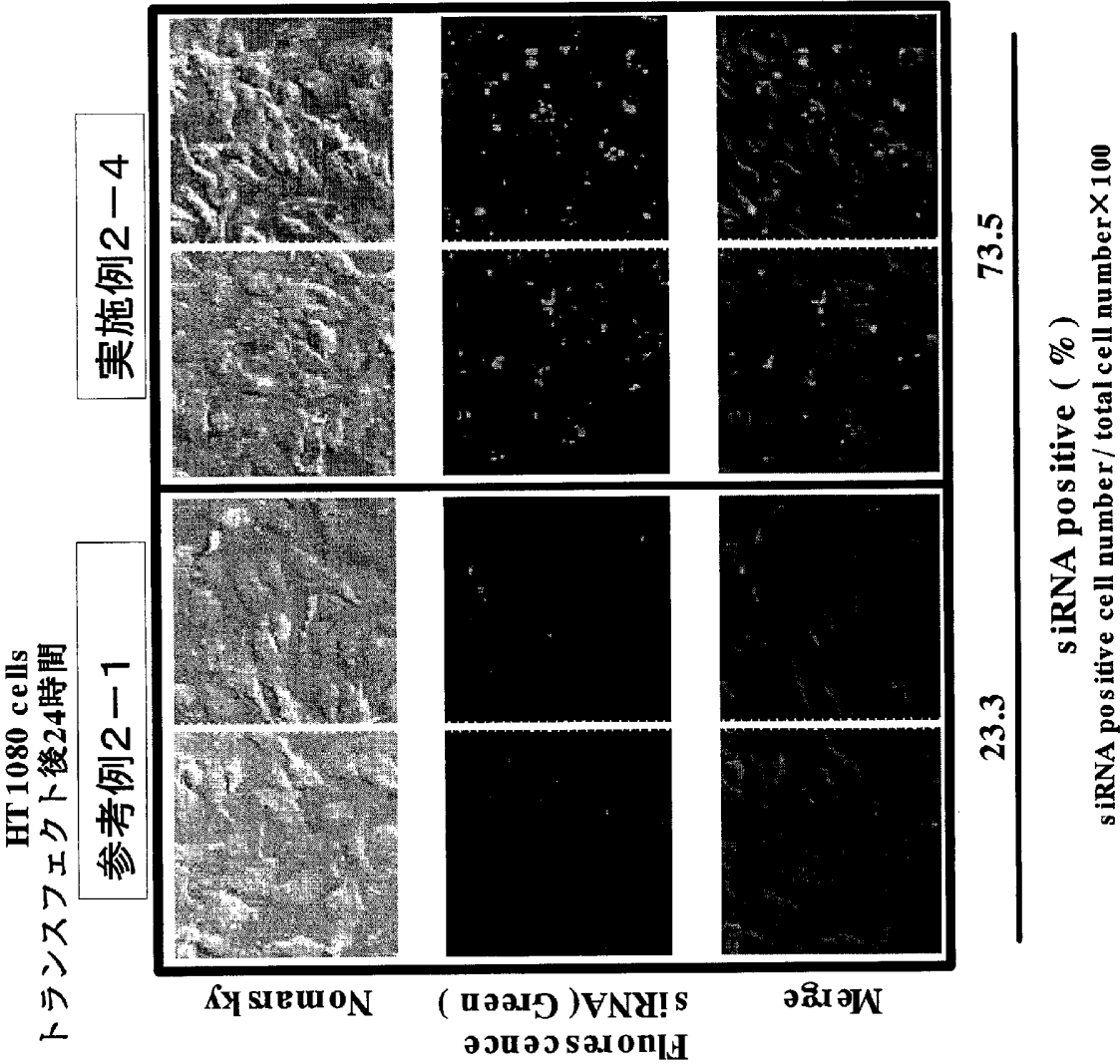
(c)



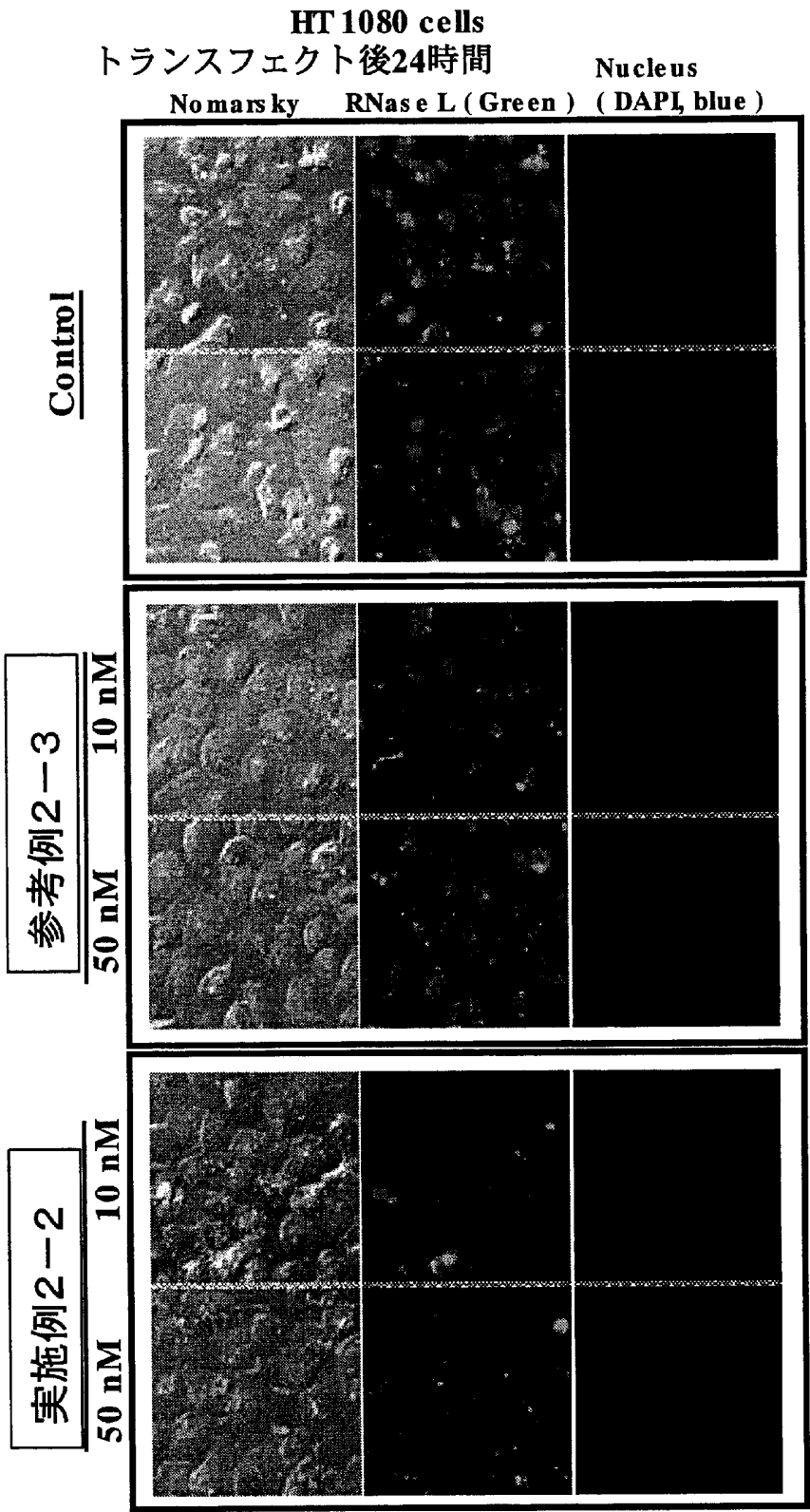
[図3]



[図4]

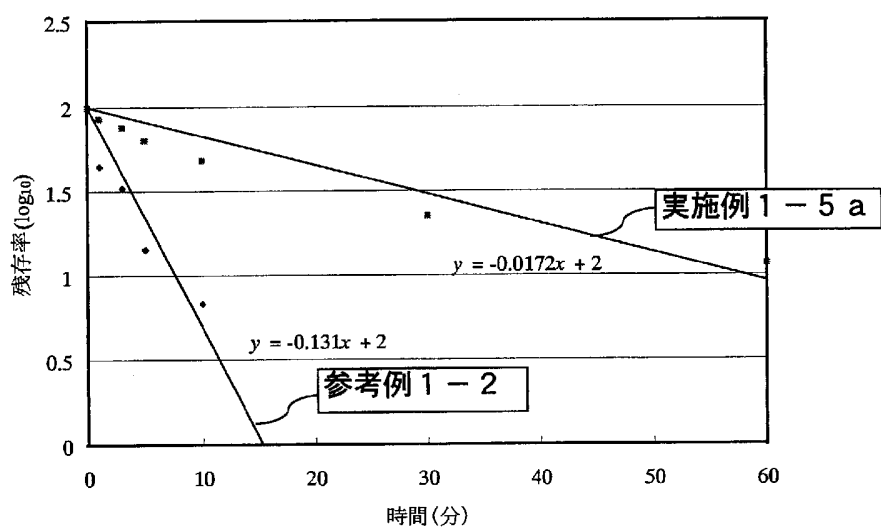


[図5]

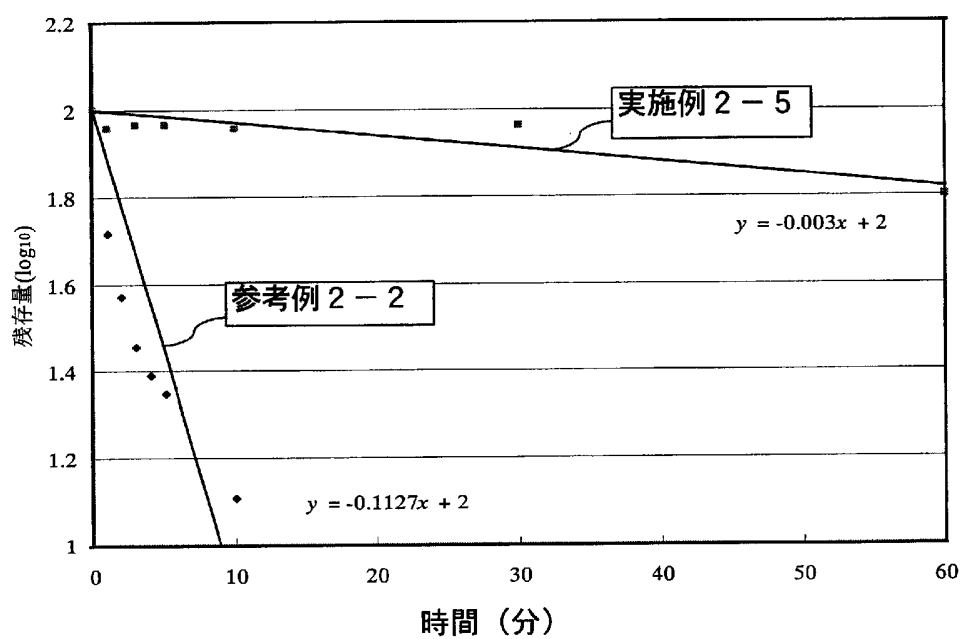


[図6]

(a)



(b)

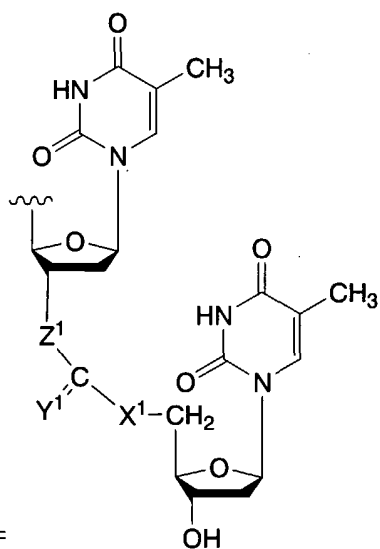


[図 7]

配列番号 10 5' - GCAUAUGC MM - 3'
 3' - MMCGUAUACG - 5'

配列番号 11 5' - GCAUAUGC MM - 3'
 3' - MMCGUAUACG - 5'

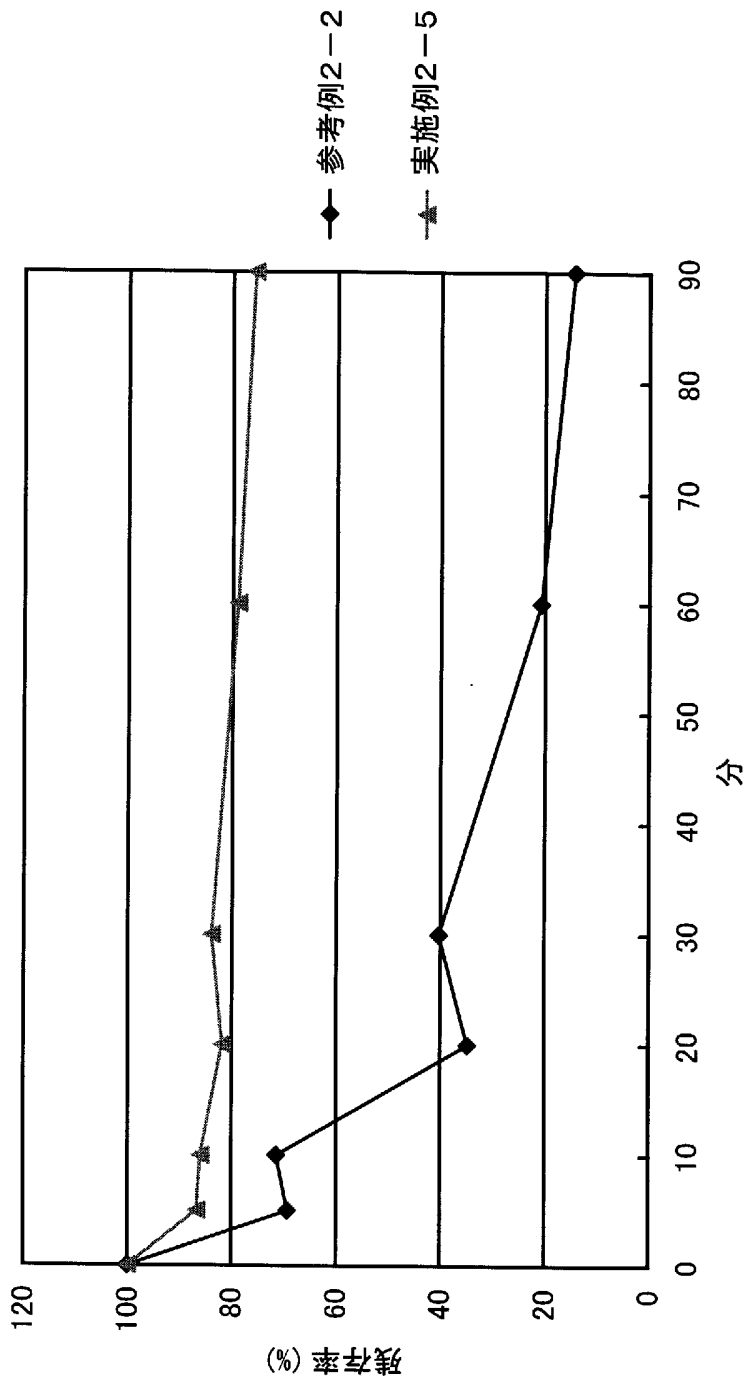
配列番号 12 5' - GCAUAUGCTT - 3'
 3' - TTCGUAUACG - 5'



MM=

前記式中、 $X^1=O$ 、 $Y^1=O$ 、 $Z^1=NH$ (配列番号 10)、
 $X^1=NH$ 、 $Y^1=O$ 、 $Z^1=NH$ (配列番号 11)

[図8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/012579

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C07H19/073, 19/173, 21/00, A61K31/7125, 31/713, 48/00,
A61P43/00, C12N15/00

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)

Int.Cl.⁷ C07H19/073, 19/173, 21/00, A61K31/7125, 31/713, 48/00,
A61P43/00, C12N15/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

REGISTRY (STN), CAPLUS (STN), CAOLD (STN), JSTPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 9-503494 A (Hybridon, Inc.), 08 April, 1997 (08.04.97), & WO 95/04066 A1 & US 6605708 B1 & CA 2167679 A & AU 9475528 A1 & EP 711302 A1 & CN 1131951 A & NO 9600304 A & FI 9600375 A	1-7, 11-17 8-10, 18, 19, 22-33
X Y	STIRCHAK, Eugene P. et al., Uncharged stereoregular nucleic acid analogs. 1. Synthesis of a cytosine-containing oligomer with carbamate internucleoside linkages, Journal of Organic Chemistry, 1987, Vol.52, No.19, p.4202-4206	1-7, 11-17 8-10, 18, 19, 22-33

☒ 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 another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
14 September, 2005 (14.09.05)

Date of mailing of the international search report
04 October, 2005 (04.10.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/012579

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 62-502338 A (James E. Summerton), 10 September 1987 (10.09.87), & WO 86/05518 A1 & AU 8656613 A1 & EP 215942 A1 & CA 1268404 A1 & US 5378841 A	1-19, 22-33
Y	WALDNER, Adrian et al., Synthesis of oligodeoxyribonucleotides containing dimers with carbamate moieties as replacement of the natural phosphodiester linkage, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1994, Vol.4, No.3, pages 405-408	1-19, 22-33
Y	JP 2004-519458 A (RIBOPHARMA. AG.), 02 July, 2004 (02.07.04), & WO 02/055693 A2 & US 2004/0001811 A1 & EP 1349927 A2 & DE 10160151 A & CA 2432350 A	8-10, 18, 19
Y	WO 2003/070918 A1 (SIRNA THERAPEUTICS, INC.) 28 March, 2003 (28.08.03), & JP 2005-517438 A & EP 1458741 A2 & US 2004/110296 A1 & GB 2397818 A1 & AU 9851819 A1 & CA 2459532 A	8-10, 18, 19
Y	JP 10-72486 A (Hoechst AG.), 17 March 1998 (17.03.98), & DE 19627898 A1 & EP 818460 A2 & AU 9728552 A1 & CA 2210031 A & NO 9703217 A & US 5936077 A	22-33
Y	JP 3-68594 A (Shiratori Pharmaceutical Co., Ltd.), 25 March 1991 (25.03.91), (Family: none)	22-33

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/012579

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.: 20, 21
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The invention as set forth in claims 20 and 21 involve methods for treatment of the human body by therapy.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C07H19/073, 19/173, 21/00, A61K31/7125, 31/713, 48/00, A61P43/00, C12N15/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C07H19/073, 19/173, 21/00, A61K31/7125, 31/713, 48/00, A61P43/00, C12N15/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY(STN), CAplus(STN), CAOLD(STN), JSTplus(JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	JP 9-503494 A (ハイブライドソ インコーポレイテッド) 1997. 04. 08 & WO 95/04066 A1 & US 6605708 B1 & CA 2167679 A & AU 9475528 A1 & EP 711302 A1 & CN 1131951 A & NO 9600304 A & FI 9600375 A	1-7, 11-17 8-10, 18, 19, 22-33
X Y	STIRCHAK, Eugene P. et al., Uncharged stereoregular nucleic acid analogs. 1. Synthesis of a cytosine-containing oligomer with carbamate internucleoside linkages, Journal of Organic Chemistry, 1987, Vol. 52, No. 19, p. 4202-4206	1-7, 11-17 8-10, 18, 19, 22-33

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14. 09. 2005

国際調査報告の発送日

04.10.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

中木 亜希

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

4P

9282

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 62-502338 A (サートン, ジェームス) 1987. 09. 10 & WO 86/05518 A1 & AU 8656613 A1 & EP 215942 A1 & CA 1268404 A1 & US 5378841 A	1-19, 22-33
Y	WALDNER, Adrian et al., Synthesis of oligodeoxyribonucleotides containing dimers with carbamate moieties as replacement of the natural phosphodiester linkage, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1994, Vol.4, No.3, p.405-408	1-19, 22-33
Y	JP 2004-519458 A (リボファルマ アーゲー) 2004. 07. 02 & WO 02/055693 A2 & US 2004/0001811 A1 & EP 1349927 A2 & DE 10160151 A & CA 2432350 A	8-10, 18, 19
Y	WO 2003/070918 A1 (SIRNA THERAPEUTICS, INC.) 2003. 08. 28 & JP 2005-517438 A & EP 1458741 A2 & US 2004/110296 A1 & GB 2397818 A1 & AU 9851819 A1 & CA 2459532 A	8-10, 18, 19
Y	JP 10-72486 A (ヘキスト・アクチエンゲゼルシャフト) 1998. 03. 17 & DE 19627898 A1 & EP 818460 A2 & AU 9728552 A1 & CA 2210031 A & NO 9703217 A & US 5936077 A	22-33
Y	JP 3-68594 A (白鳥製薬株式会社) 1991. 03. 25 (ファミリーなし)	22-33

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 20, 21 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲 20 及び 21 は、治療による人体の処置方法に関する発明を包含している。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって P C T 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 「追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。」
「追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。」