

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5819401号
(P5819401)

(45) 発行日 平成27年11月24日 (2015.11.24)

(24) 登録日 平成27年10月9日 (2015.10.9)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 47/48 (2006.01)

A 6 1 K 47/48

A 6 1 K 31/138 (2006.01)

A 6 1 K 31/138

A 6 1 K 31/15 (2006.01)

A 6 1 K 31/15

A 6 1 K 31/4525 (2006.01)

A 6 1 K 31/4525

A 6 1 K 31/4462 (2006.01)

A 6 1 K 31/4462

請求項の数 17 (全 162 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-505466 (P2013-505466)
 (86) (22) 出願日 平成23年4月19日 (2011.4.19)
 (65) 公表番号 特表2013-525330 (P2013-525330A)
 (43) 公表日 平成25年6月20日 (2013.6.20)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2011/056270
 (87) 国際公開番号 W02011/131693
 (87) 国際公開日 平成23年10月27日 (2011.10.27)
 審査請求日 平成26年4月21日 (2014.4.21)
 (31) 優先権主張番号 11382031.0
 (32) 優先日 平成23年2月9日 (2011.2.9)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 61/325,515
 (32) 優先日 平成22年4月19日 (2010.4.19)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 512269834
 エヌライフ、セラピューティックス、ソシ
 エダッド、リミターダ
 N L I F E T H E R A P E U T I C S ,
 S . L .
 スペイン国グラナダ、アルミージャ、パル
 ケ、テクノロヒコ、デ、ラ、サルー、アベ
 ニダ、デ、ラ、インノバシオン、ヌメロ、
 1、ナベ、5、エディフィシオ、ペイセ
 (74) 代理人 100117787
 弁理士 勝沼 宏仁
 (74) 代理人 100091487
 弁理士 中村 行孝
 (74) 代理人 100107342
 弁理士 横田 修孝

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組成物及びオリゴヌクレオチド分子を特異的なニューロンのタイプに選択的に送達する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

i) 1種又は複数種の神経伝達物質輸送体に特異的に結合する少なくとも1種の選択的作用剤であって、選択的セロトニン再取り込み阻害剤 (SSRI)、ノルアドレナリン再取り込み阻害剤 (NRI)、ノルエピネフリン-ドーパミン再取り込み阻害剤 (NDR I) およびセロトニン-ノルエピネフリン-ドーパミン再取り込み阻害剤 (SNDRI) からなる群から選択される、選択的作用剤、及び

ii) 神経伝達物質輸送体と同じ細胞で発現している標的分子に特異的に結合することができる少なくとも1種の核酸であって、標的分子に対する核酸の結合が標的分子の活性の阻害を生ずる核酸

を含んでなる、コンジュゲート。

【請求項 2】

神経伝達物質輸送体と同じ細胞で発現している標的分子に特異的に結合することができる核酸配列が、2本鎖RNA干渉オリゴヌクレオチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ギャップマー、ペプチド核酸、ロックド核酸、リボザイム及びアプタマーからなる群から選択される、請求項1に記載のコンジュゲート。

【請求項 3】

選択的作用剤がオリゴヌクレオチドの5'末端にコンジュゲーションしている、請求項1又は2に記載のコンジュゲート。

【請求項 4】

選択的作用剤とオリゴヌクレオチドとが連結基により接続している、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のコンジュゲート。

【請求項 5】

第 1 のオリゴヌクレオチド配列に相補的な第 2 のオリゴヌクレオチド配列をさらに含んでなる、請求項 4 に記載のコンジュゲート。

【請求項 6】

干渉性 RNA が siRNA である、請求項 5 に記載のコンジュゲート。

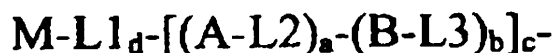
【請求項 7】

第 2 のオリゴヌクレオチドの 5' 末端に付いた保護基をさらに含んでなる、請求項 6 に記載のコンジュゲート。

【請求項 8】

第 2 のオリゴヌクレオチドの 5' 末端に付いた保護基が、下記の構造物：

【化 1】



(式中、

M が H 又は脂質部分であり、

A 及び B は、単糖及び ($C_2 \sim C_{20}$) アルキレングリコールからなる群から独立に選択されるモノマーユニットを表し；

a 及び b は 0 から 50 の範囲の整数であり；

c は 0 から 30 の範囲の整数であり；

L1、L2 及び L3 は、ホスホジエステル、ホスホロチオネート、カルバメート、メチルホスホネート、グアニジニウム、スルファメート、スルファミド、ホルムアセタール、チオホルムアセタール、スルホン、アミド及びそれらの混合物からなる群から独立に選択される連結化合物であり；

d は 0 又は 1 である)

を有する、請求項 7 に記載のコンジュゲート。

【請求項 9】

単糖が、フラノース、フルクトース、ガラクトース、マンノース、改変された単糖、シアル酸及びエリトロースからなる群から選択される、請求項 8 に記載のコンジュゲート。

【請求項 10】

($C_2 \sim C_{20}$) アルキレングリコールがエチレングリコール、プロピレングリコール、及びそれらの混合物からなる群から選択される、請求項 8 又は 9 に記載のコンジュゲート。

【請求項 11】

M が H であり、A がフラノースであり；B が C_{18} エチレングリコールであり；a、b 及び c が 1 であり、d が 0 であり、L2 及び L3 がホスホジエステル結合である、請求項 10 に記載のコンジュゲート。

【請求項 12】

(I) 又は (II) からなる群から選択される構造を有する、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載のコンジュゲート；

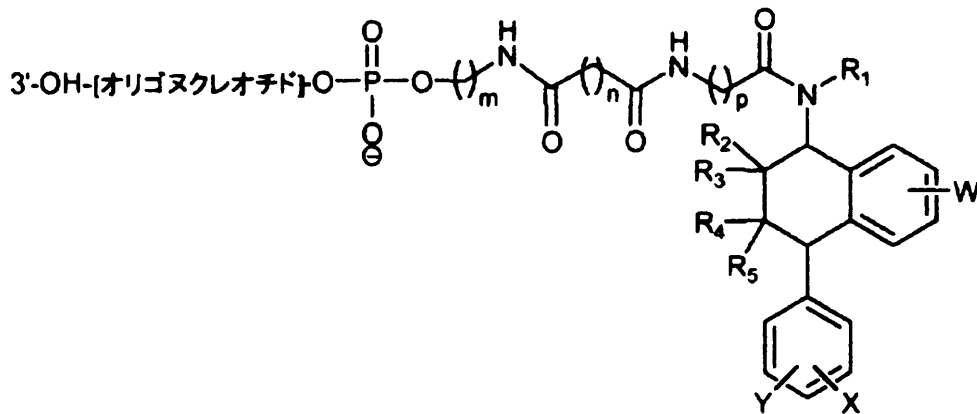
10

20

30

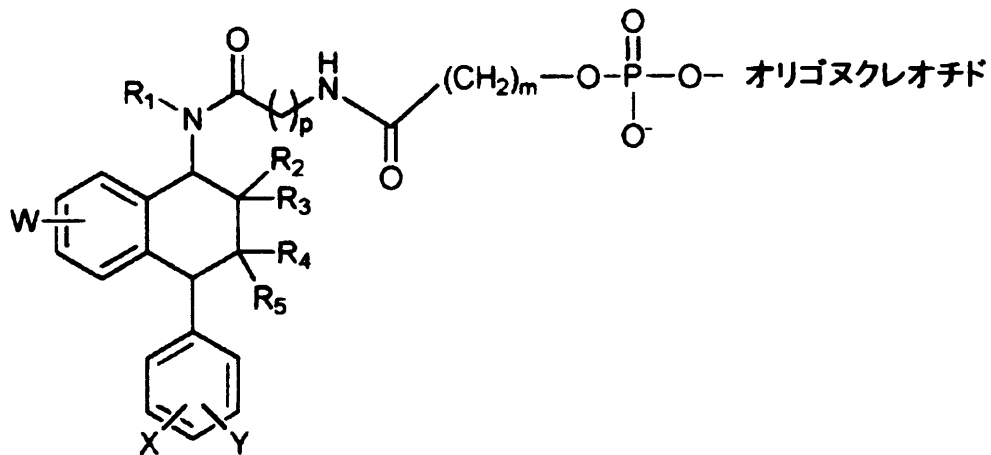
40

【化 2】



10

【化 3】



20

(II)

(式中、

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 及び R^5 は、水素及び $C_1 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され；
 X 及び Y は、水素、ハロゲン、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $C_1 \sim C_3$ ハロアルキル、 OR^a 及び SR^b から独立に選択され、ここで R^a 及び R^b は $C_1 \sim C_3$ アルキル及び $C_6 \sim C_{10}$ アリールから独立に選択され；

30

W は、水素、ハロゲン、 CN 、 NO_2 、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $C_1 \sim C_3$ ハロアルキル、 NR^cR^d 、 $SO_2NR^eR^f$ 、 $NR^gSO_2R^h$ 、 CO_2R^i から選択され、ここで R^c 、 R^d 、 R^e 、 R^f 、 R^g 、 R^h 及び R^i は水素及び $C_1 \sim C_3$ アルキルから独立に選択され；

m 、 n 及び p は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 及び 13 から選択され、ここで $m+n+p$ の和は、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17 及び 18 から選択される整数である）。

【請求項 13】

40

請求項 1 ～ 12 のいずれか一項に記載のコンジュゲートであって、かつ、以下の群から選択されるコンジュゲート：

(i) 選択的作用剤が選択的セロトニン再取り込み阻害剤 (SSRI) であり、かつ、標的分子がセロトニン受容体 1A 型 (5-HT_{1A})、セロトニン受容体 1A 型 (5-HT_{1A}) をコードする mRNA、セロトニン輸送体、及びセロトニン輸送体をコードする mRNA の群から選択される、コンジュゲート；

(ii) 選択的作用剤がノルエピネフリン - ドーパミン再取り込み阻害剤 (NDRI) 及びセロトニン - ノルエピネフリン - ドーパミン再取り込み阻害剤 (SNDRI) からなる群から選択され、かつ、標的分子が - シヌクレイン又は - シヌクレインをコードする mRNA である、コンジュゲート；

50

(i i i) 選択的作用剤がノルエピネフリン再取り込み阻害剤 (N R I) であり、かつ、標的分子がドーパミン - - ヒドロキシラーゼ又はドーパミン - - ヒドロキシラーゼをコードする m R N A である、コンジュゲート；

(i v) 選択的作用剤がノルエピネフリン - ドーパミン再取り込み阻害剤 (N D R I) 及びセロトニン - ノルエピネフリン - ドーパミン再取り込み阻害剤 (S N D R I) からなる群から選択され、かつ、標的分子は B A X 又は B A X をコードする m R N A である、コンジュゲート；

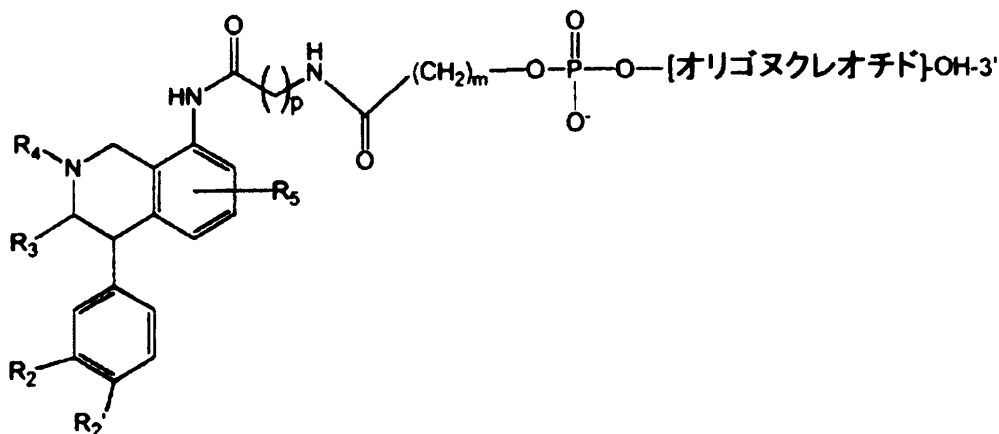
(v) 選択的作用剤がノルエピネフリン - ドーパミン再取り込み阻害剤 (N D R I) 及びセロトニン - ノルエピネフリン - ドーパミン再取り込み阻害剤 (S N D R I) からなる群から選択され、かつ、標的分子はタウ (T a u) 又はタウをコードする m R N A である、コンジュゲート；および

(v i) 選択的作用剤がノルエピネフリン - ドーパミン再取り込み阻害剤 (N D R I) 及びセロトニン - ノルエピネフリン - ドーパミン再取り込み阻害剤 (S N D R I) からなる群から選択され、かつ、標的分子がハンチンチン又はハンチンチンをコードする m R N A である、コンジュゲート。

【請求項 1 4】

構造：

【化 4】



を有する、請求項 1 3 に記載のコンジュゲート。

【請求項 1 5】

請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載のコンジュゲートを含んでなる、鬱病関連障害の治療又は予防に使用するための医薬組成物であって、

(i) 選択的作用剤が、選択的セロトニン再取り込み阻害剤 (S S R I) であり、及び (i i) オリゴヌクレオチドが、セロトニン受容体 1 A 型 (5 - H T 1 A) をコードする m R N A、セロトニン輸送体をコードする m R N A、セロトニン受容体 1 A 型 (5 - H T 1 A) 及びセロトニン輸送体の群から選択される標的分子に特異的に結合することができる、

医薬組成物。

【請求項 1 6】

(i) 選択的作用剤がノルエピネフリン - ドーパミン再取り込み阻害剤 (N D R I) 及びセロトニン - ノルエピネフリン - ドーパミン再取り込み阻害剤 (S N D R I) の群から選択され、及び

(i i) オリゴヌクレオチドが - シヌクレインをコードする m R N A 又は - シヌクレインポリペプチドである標的分子に特異的に結合することができる、

レヴィー小体の堆積と関連する疾患の治療又は予防に使用するための、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載のコンジュゲートを含んでなる医薬組成物。

【請求項 1 7】

請求項 1 5 または 1 6 に記載の、処置又は予防のための医薬組成物であって、脳室内に又は鼻内に投与される、医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、関心のある標的に特異的な核酸と、該核酸を中枢神経系内の特異的細胞に送達することを、前記細胞の表面上の神経伝達物質輸送体分子に対する親和性により可能にする基を含むコンジュゲートに関する。

【背景技術】

【0002】

核酸の使用は、細胞の状態を変更するために効果的であることが証明されている。デオキシリボ核酸 (DNA) 又はリボ核酸 (RNA) の細胞への導入は、細胞中の特定の遺伝子の発現を上方制御又は下方制御して、それにより、1つ又は複数の生化学的経路に強く影響するために使用することができる。細胞生理を変化させるために使用される核酸に基づく技法のなかで、RNA 干渉 (RNAi) は、種々の生物体において転写後のレベルで遺伝子の発現を調節することに与えられた総称である。RNAi 遺伝子サイレンシングは、短い干渉性又は「siRNA」として知られている相同性の短い (21 ~ 23 bp) dsRNA 断片を使用して達成することができる。長い dsRNA が細胞ラインに導入されると、それを細胞酵素のダイサーが短い干渉性 RNA (siRNA) 分子に切断するであろう。この短い干渉性 RNA 分子は、現在ガイド RNA と呼ばれている。ガイド RNA は RNA 誘発サイレンシング - コンプレックス (RISC) を相同性の標的 mRNA に誘導するであろう。ひとたびそれが相同性 mRNA 配列とハイブリッド構造物を形成すれば、RISC は mRNA を切断するであろう。結果として、該 mRNA にコードされたタンパク質は、最早産生されず、それにより遺伝子のサイレンシングが起こる。RNA 干渉とは、短い干渉性 RNA (siRNA) により媒介される動物における配列特異的転写後の遺伝子サイレンシングの過程を指す。

【0003】

しかしながら、脳病理のための RNAi に基づく治療手法の開発に対する主要な障害物は血液脳関門 (BBB) である。脳は、2つのバリアシステム：血液脳関門 (BBB) 及び血液脳脊髄液関門 (BCSFB) の存在により毒性の可能性のある物質に対して遮蔽されている。BBB は、その表面積が BCSFB より約 5000 倍大きいので、血清リガンドの取り込みのための主要な経路であると考えられる。BBB を構成する脳内皮細胞は、CNS の多くの障害に対する可能性のある薬剤の使用に対する主要な障害物の代表である。一般原則として、小さい親油性分子のみが BBB を越えて、即ち、全身を循環する血液から脳へ通過することができる。より大きいサイズ又はより高い疎水性を有する多くの薬剤が、CNS 障害を治療するための動物での研究で有望な結果を示す。

【0004】

全身投与される RNA 干渉分子により CNS において遺伝子サイレンシングを達成するために、直接脳内投与の他に色々な戦略が記載されている。例えば、Kumar et al. (Nature, 2007, 448: 39 - 44) には、siRNA とアルギニン九量体を含む狂犬病ウイルスの糖タンパク質から誘導されたペプチドとのコンジュゲート及び静脈注射後の脳中において遺伝子発現を抑制するそれらの能力が記載されている。Xia et al. (Pharmaceutical Research, 2007, 24: 2309 - 2316) には、ビオチン化 siRNA を含むコンジュゲート及び全身送達後に中枢神経系における遺伝子発現を抑制することができるアビジン - 抗トランスフェリン受容体抗体を含むコンジュゲートが記載されている。国際公開第 200979790 号には、siRNA を含むコンジュゲート及び低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質 - 1 (LRP - 1) を使用して受容体に媒介されるトランスサイトーシスにより血液脳関門を越えることができ、前記ペプチドを含む全身投与されたコンジュゲートの CNS への送達を可能にする Angiopeps として一まとめにして知られる一連のペプチド

10

20

30

40

50

が記載されている。国際公開第2007107789号には、鼻内投与の使用により、CNS中に存在する標的に特異的なRNA干渉及びCNSへの送達を起こすことができる化合物の使用が記載されている。

【0005】

しかしながら、これら全てのシステムは全身投与されたsiRNAのCNSへの送達を可能にするが、一方それらは脳内の特定のタイプの細胞への送達は可能でない。事実として、CNS内の特異的タイプの細胞に対する治療剤の送達を可能にする送達システムは記載されたことがない。中枢神経系に特異性の知られたsiRNAを送達する可能性は、所与の遺伝子の望ましくない活性/発現により引き起こされる、鬱病、認識障害、パーキンソン病、アルツハイマー病等を含む疾患の治療のために有用であろう。

10

【0006】

鬱病は、中枢神経系の疾患と認識されている。鬱病は、心理学的、行動的及び生理学的レベルで顕在化した症状を伴う生物学的にも遺伝的にも多様な障害である。さらに、鬱病は、不安障害及び不安自体（典型的には予期不安）の高度の併発を示し、抑鬱性の患者に最も頻繁な症状の1つである。実際、大部分の不安障害も、抗鬱剤で治療される。

【0007】

大鬱病の治療において最初に使用される薬剤は、イミプラミン型の三環式抗鬱剤(TCA)及びモノアミンオキシダーゼ阻害剤(MAOI)であった。これらの薬剤は、1950年代後期に発見されて有効なことが証明されたが、しかしそれらは多くの重篤な副作用を示し、それが、選択的セロトニン再取り込み阻害剤(SSRI)又は選択的セロトニン再取り込み阻害剤及びノルアドレナリン再取り込み阻害剤(SNRI)などの新薬の開発をもたらした。

20

【0008】

TCA(及びその後、SSRI及びSNRI)が、モノアミンセロトニン(5-HT)及びノルアドレナリン(NA)のシナプス前部の細胞への再取り込みを阻害し、シナプス間隙内における5-HTのレベルを増大させて、それによりシナプス後部の受容体におけるそれらの活性を増強するという発見は、鬱病の病因の最初の仮説、即ち、鬱病は脳中におけるこれらのモノアミン作動性神経伝達物質システムの活性の不足により引き起こされるという仮説をもたらした。それ以来今まで、全ての市販された抗鬱薬剤は、セロトニン作動性及び/又はノルアドレナリン作動性輸送体又は受容体を標的としてきた。

30

【0009】

5-HT受容体は、動物における神経細胞及び他のタイプの細胞の細胞膜上に位置する。5-HT₃受容体を例外として、全ての他の5-HT受容体は、細胞内の第2のメッセンジャーカスケードを活性化する、Gタンパク質が結合した7つの膜貫通型(又はヘプタヘリカル)受容体である。同定された5-HT受容体の幾つかには、セロトニンニューロンのシナプス前部で発現した5-HT_{1A}(自己受容体)及びシナプス後部の5-HT神経末端にかけて位置するニューロン上で発現した5-HT_{1B/1D}受容体(自己受容体)が含まれる。SSRIの抗鬱効果と直接の関連がより大きい5-HT受容体は5-HT_{1A}受容体であった。

【0010】

40

現在、新しい抗鬱薬剤が、比較的選択的なノルエピネフリン再取り込み阻害(NARI)に基づく作用機構により登録されつつあり、例えばレボキセチン、又は二重遮断(SNRI)では、ベンラファキシン又はデュロキセチンなどである。ネファゾドン、トラゾドン又はミルタザピンなどの他の薬剤は、それらよりもモノアミン輸送体及びブロックモノアミン作動性受容体で弱い作用を有する。

【0011】

しかしながら、SSRIの商業的成功にも拘わらず、これらの化合物には2つの主要な限界がある：1)患者の60%が治療に応答するのみである(ベースライン重症度の半分に軽減)、及び2)応答は、数週間の継続した治療の後にようやく現れる。これはシナプス前部のニューロンで起こる負のフィードバック機構に基づく。簡単に述べると、セロト

50

ニン再取り込みの遮断により誘発される高いセロトニンレベルは後部シナプスセロトニン受容体を活性化するだけでなく、シナプス前部の自己受容体も活性化して、それが細胞のためのフィードバックセンサとして役立つのであろう。5-HT又は選択的アゴニストによる5-HT_{1A}自己受容体(シナプス前部の5-HT_{1A}受容体又はシナプス前部の5-HT_{1A}Rとも呼ばれる)の活性化は、細胞発火及びインパルス依存性5-HT放出を抑制するのに対して、5-HT_{1B}受容体は末端レベルで5-HT合成及び放出を制御する。5-HT_{1A}及び5-HT_{1B}受容体は両方とも、ニューロンシナプス後部から5-HT神経末端にも、主として皮質辺縁系領域に局在化している。セルトラリン(SERT、SSRIの1つ)の再取り込み遮断により産生された細胞外5-HTの増加は、中脳縫線核中のシナプス前部の5-HT_{1A}受容体を活性化して、細胞発火及び末端放出を抑制し、再取り込み遮断により生じた細胞外5-HT増大を和らげる効果がある。5-HT_{1B}自己受容体は局所レベルで同様な負のフィードバックを発揮する。SSRIの反復投与に続いて、5-HT_{1A}自己受容体は脱感作して、それがセロトニン作動性ニューロンが細胞発火を回復し、細胞外5-HTの増加を、単独治療後に見られるレベルより高いレベルにもたらず。脳組織のこれらの(ゆっくり進行する)神経生理学的適応は、通常数週間の連続したSSRIの使用が抗鬱効果が十分顕在化するのに必要である理由であるだけでなく、増大する不安が最初の2~3日又は2~3週間の使用における普通の副作用である理由である。5-HT_{1A}及び/又は5-HT_{1B}受容体のアンタゴニストによるこれらの負のフィードバック機構の遮断は、SSRIにより生ずる5-HT増加を強化して、それ故、SSRIの臨床的效果を助長するために役立つ可能性があることが知られている。

【0012】

SSRI投与中にシナプス前部の5-HT_{1A}受容体の作用を遮断することにより抗鬱応答を助長する薬理学的戦略が(±)ピンドロールを使用して試験された。この化合物は、5-HT_{1A}受容体に対する拮抗作用を推定される₁₋₂アドレナリン作用性の受容体アンタゴニストである。(±)ピンドロールは、中枢の5-HT_{1A}受容体の活性化により媒介される数種類の作用、例えば低体温又はホルモンの分泌などを弱めた。一般的に、ピンドロールのSSRIへの添加は抗鬱応答を助長する。しかしながら、ピンドロールは幾つかの研究で、臨床的用量でヒト脳中において5-HT_{1A}受容体の一部を占めることが示されているが、他の研究では低い占拠率が見出されている。それに加えて、5-HT_{1A}受容体はセロトニン作動性のニューロン上だけでなくシナプス後部ニューロンからセロトニン作動性のニューロンにかけても局在化していることを忘れるべきでない。実際、重要な懸念は、シナプス前部とシナプス後部の5-HT_{1A}受容体に対するこれらの作用剤の選択性の欠如である。即ち、シナプス後部の受容体の完全遮断は抗鬱剤により生じた前脳部5-HT_{1A}受容体を通る伝達の増大を打ち消す可能性がある。

【0013】

したがって、抗鬱剤の開発においてなされた進歩にも拘わらず、シナプス前部の5-HT_{1A}受容体に特異的に作用する代替的化合物の必要性が未だに存在する。

【0014】

パーキンソン病(PD)は、患者の運動機能、言語、及び他の機能を傷害することが多い中枢神経系の変性性障害である(Olanow)。パーキンソン病の症状は、黒質の緻密部領域(SNpc)中のドーパミン作動性細胞の活性が大きく低下した結果による(Olanow、Dawson)。これらのニューロンは、線条体に突き出しており、それらが減少すると、運動を調節する基底神経節内の神経回路の活性における変化、本質的には直接経路の阻害及び間接経路の励起が生ずる。直接経路は、運動を容易にし、間接経路は運動を阻害し、したがって、これらの細胞が減少すると運動低下症の運動障害が生ずる。ドーパミンの不足は視床の前方前核の阻害が増大する結果となり、それは運動野に興奮性突起を送り、その結果運動低下症が生ずる。

【0015】

PDは、SNpcにおけるドーパミン作動性ニューロンの進行性喪失及びレヴィー小体(LB)と称する細胞内封入体の存在により特徴づけられる。神経化学的に、PDはミト

10

20

30

40

50

コンドリアのコンプレックスⅠの機能不全及び酸化ストレス指数の増大により特色づけられる。PDについて、酸化ストレス及びニトロソ化ストレス、ミトコンドリアの機能不全、タンパク質の折り畳み異常及び凝集、及びアポトーシスを含む数通りの病理機構が提案されている。PDは、大部分が散发性であるが、PDの幾つかの症例は家族性であることが示されている。同定された最初の家族性PD遺伝子は、 α -シヌクレイン(α -syn)であり、それは実際に全てのPD患者におけるLBの主要な成分である。 α -シヌクレインの正常機能は十分にわかっていない。 α -シヌクレインは、脂質に結合することができて、ニューロン中で、シナプス前部の小胞及びプラズマ膜と、おそらく脂質ラフトを通して結合している。 α -シヌクレインの堆積した病理学的形態は凝集しており、正常タンパク質より低い溶解性を示す。3点変異が家族性PDを引き起こすと記載されているが、SNCA遺伝子の重複及び三重複もPD及びレヴィー小体病の原因であると報告されている。それ故、配列の変形がなくてさえ、 α -シヌクレイン投与はレヴィー小体病の原因となり得る。

10

【0016】

α -シヌクレインはミトコンドリアに影響して、おそらくアポトーシスを誘発する。事実として、 α -シヌクレインと酸化的損傷との間の密接な関係に対する蓄積する証拠があり、即ち、変異体 α -シヌクレインの過剰発現がニューロンを酸化ストレス及びドーパミン及びコンプレックスⅠ阻害剤による損傷に敏感にして、その結果インビトロ及びインビボでタンパク質のカルボニル化及び脂質過酸化が増大する。逆に、ミトコンドリアのコンプレックスⅠの機能不全がPDの散发性形態と関連していた。コンプレックスⅠに依存する酸化的損傷及び欠陥のあるミトコンドリアの機能がPDにおけるニューロンの変性及び細胞死の主原因である。したがって損なわれたミトコンドリアの機能及びROS産生によりミトコンドリアの膜間隙中のチトクロームcの貯留レベルが増加して、その急速な放出が、細胞死アゴニストのBAXタンパク質が活性化されたときに可能になる。

20

【0017】

まとめると、PDにおけるシナリオは、一方で α -シヌクレイン蓄積を増加させて他方ではBAXに媒介される細胞死を活性化するROS産生増加を伴うニューロンのミトコンドリアの機能不全の状況であろう。さらに、 α -シヌクレイン蓄積は、順送りで、細胞のROS産生及びニューロンの変性の誘発を増強するであろう。

【0018】

PDのために最も広く使用される治療は、種々の形態のL-ドーパである。しかしながら、1~5%のL-ドーパがドーパミン作動性ニューロンに入るにすぎない。残余のL-ドーパはしばしば他の箇所で代謝されてドーパミンになり、広範囲の副作用を惹起する。ドーパデカルボキシラーゼ阻害剤様のカルビドパ及びベンセラジドも、L-ドーパの代謝を、それがドーパミン作動性ニューロンに到達する前に防止するのでPDの治療のために使用されて、一般にカルビドパ/レボドパ及びベンセラジド/レボドパの配合製剤として与えられる。さらに、ドーパミンアゴニストは中程度に有効であり、ドーパミン受容体の一部を刺激することにより作用する。しかしながら、それらはドーパミン受容体が次第に感じにくくなり、それにより最終的に症状が進む原因になる。

30

【0019】

アンチセンスの手法も役に立つ可能性があり、ラット及びマウスの脳で作用すると報告されている。この手法は、 α -シヌクレインは本当はヒトにおけるCNS機能にとってなくても済むという発想に基づいており、それはマウスにおいてそのように思われるからであるが、多分タンパク質レベルにおける控えめな減少でさえPD進行を遅らせるのに十分である。

40

【0020】

しかしながら、PD療法の開発においてなされた進歩にも拘わらず、黒質の緻密部領域中のドーパミン作動性細胞の活性低下を特異的に防止することができる代替的化合物の必要性が未だ存在する。

【0021】

50

中脳皮質及び中脳辺縁系のドーパミン（D A）系は統合失調症を含む多くの精神医学的障害において決定的な役割を演じる。統合失調症における脳のドーパミン作動性神経伝達の一般的な増強は薬理学的証拠により示唆された（Seeman and Lee, 1975; Creese et al, 1976）。しかしながら、最新の見解は、低活動中脳皮質と一緒に皮質下のD A伝達が機能亢進することを示す。陽性（精神病性）症状を治療する古典的（D A D 2 受容体アンタゴニスト）及び非定型抗精神病薬（A P D、D A D 2 受容体アンタゴニストに対する優先的 5 - H T _{2 A / 2 C}）の全体的有効性は同様である。対照的に、後者の群の幾つかの作用剤、特にクロザピンは、陰性症状及び認識障害を治療するために古典的抗精神病薬に勝る。この臨床的特徴は、少なくとも一部は、中脳皮質経路におけるD A放出を増加させる能力、非定型の古典的でない抗精神病薬により誘発される効果と関連していた。実際、最適の前頭前野のD A機能は作業記憶及び実行機能にとって決定的である。

10

【0022】

中脳皮質におけるD A放出及び中脳辺縁系のD A経路は、数種の要因により制御される。第一に、それはV T A D Aニューロンの発火様式（持続性／一過性）に依存する。第2に、それは細胞発火及びD A放出を制御する細胞体樹状突起の及び末端D _{2 / 3} 自己受容体の活性化によりしっかり調節される。最後に、D A輸送体（D A T）に媒介される再取り込みは、細胞外D A濃度の減衰動力学を決定する決めた機構の1つである。以前の研究でP F C及び線条体中におけるD A Tの異なった密度が示されている。

【0023】

20

さらに、ノルアドレナリン（N A）軸索は、N A輸送体（N A T）がN A及びD Aに対する同様な親和性を示すので、細胞外脳空間からD Aを除去することに役立ち得る。したがって、N A T阻害剤は、尾状核及び核側坐核（N A c）よりも内側のP F C（m P F C）における細胞外D A濃度を優先的に上昇させる。したがって、青斑核（L C）ニューロンからのN A軸索はP F C中の細胞外D A濃度を、D Aを取り込むか又は共放出することにより調節することに役立ち得る。幾人かの研究者は、N Aを標的として中脳皮質D A伝達を選択的に増強する薬剤（N A T阻害剤に加えて ₂ - アドレナリン作用性のアンタゴニスト）に基づく新しい組合せ治療の効果を示している。

【0024】

しかしながら、中脳皮質のD A伝達を増強することができる化合物に対する必要性が未だ存在する。

30

【発明の概要】

【0025】

本発明者らは、所与の標的遺伝子に特異的な核酸及び神経伝達物質輸送体の選択的阻害剤を含有する核酸構築物を開発した。これらの構築物は、関心のある核酸を神経伝達物質輸送体を発現する細胞の内部に送達するために特に有用であることが示されている。如何なる理論にも拘束されることは望まず、神経伝達物質輸送体の阻害剤が、輸送体が発現している細胞の表面における対応する神経伝達物質輸送体に結合して、それが順送りで核酸阻害剤のコンプレックスを細胞内部に移動させるであろうと考えられる。したがって、本発明の実施例3に例示したように、セロトニン5 - H T _{1 A} 受容体に特異的なs i R N A及び特異的セロトニン輸送体阻害剤（セルトラリン）を含む構造物の投与は、8 - O H - D P A T（セロトニン作動性のシグナル伝達の尺度）に対する応答において5 - H T _{1 A} 受容体のm R N Aの減少及び非コンジュゲートのs i R N Aで得られるよりもはるかに高度の低体温応答欠如を生ずる。

40

【0026】

当業者は、本発明はセロトニン作動性のニューロンに送達するためのコンジュゲートに限定されないことを理解するであろう。反対に、本発明において提供される結果は、ニューロンにより神経伝達物質を輸送するのに使用される機構が、前記神経伝達物質輸送体に対する親和性を示す分子に結合した低分子の細胞への送達を促進する適切な手段であることを例示する。

50

【0027】

したがって、第1の態様において、本発明は

(i) 1種又は複数種の神経伝達物質輸送体に特異的に結合する少なくとも1種の選択的作用剤、及び

(ii) 神経伝達物質輸送体と同じ細胞で発現する標的分子に特異的に結合することができる少なくとも1種の核酸を含むコンジュゲートに関する。

【0028】

第2の態様において、本発明は、医薬で使用するための本発明のコンジュゲートに関する。

10

【0029】

さらなる態様において、本発明は、

(i) 選択的作用剤が選択的セロトニン再取り込み阻害剤(SSRI)の群から選択され、且つ

(ii) オリゴヌクレオチドが、セロトニン受容体の1A型(5-HT_{1A})をコードするmRNA又はセロトニン輸送体(5-HT輸送体又はSERT)をコードするmRNA又はセロトニン受容体の1B型(5-HT_{1B})をコードするmRNA又はTREK-1カリウムチャンネル若しくはGir-KカリウムチャンネルをコードするmRNAの群から選択される標的分子に特異的に結合することができる、
鬱病関連障害の治療又は予防に使用するため本発明のコンジュゲートに関する。

20

【0030】

さらなる態様において、本発明は、

(i) 選択的作用剤が、ドーパミン再取り込み阻害剤(DRI)又はノルエピネフリン-ドーパミン再取り込み阻害剤(NDRI)又はセロトニン-ノルエピネフリン-ドーパミン再取り込み阻害剤(SNDRI又はトリプルブロッカー)の群から選択され、且つ

(ii) オリゴヌクレオチドが、 α -シヌクレインをコードするmRNAである標的分子に特異的に結合することができる、
神経伝達物質小胞の機能障害及びレヴィー小体の堆積と関連する疾患の治療又は予防に使用するための本発明のコンジュゲートに関する。

30

【0031】

さらなる態様において、本発明は、

(i) 選択的作用剤がドーパミン再取り込み阻害剤(DRI)又はノルエピネフリン-ドーパミン再取り込み阻害剤(NDRI)又はセロトニン-ノルエピネフリン-ドーパミン再取り込み阻害剤(SNDRI又はトリプルブロッカー)の群から選択され、且つ

(ii) オリゴヌクレオチドが、BAXをコードするmRNAである標的分子に特異的に結合することができる、
ニューロンのアポトーシス及び細胞死に関連する疾患(即ちパーキンソン及びアルツハイマー)の治療又は予防において使用するための本発明のコンジュゲートに関する。

【0032】

さらなる態様において、本発明は、

(i) 選択的作用剤がノルエピネフリン再取り込み阻害剤(NRI)の群から選択され、且つ

(ii) オリゴヌクレオチドが、ドーパミンヒドロキシラーゼをコードするmRNA又はノルエピネフリン輸送体(NET)又はドーパミンヒドロキシラーゼポリペプチドをコードするmRNAである標的分子に特異的に結合することができる、
認知症、鬱病及び神経変性性疾患と関連する記憶及び認識過程のようなノルアドレナリン作動性突起様中におけるドーパミン欠乏と関連する疾患の治療又は予防に使用するための本発明のコンジュゲートに関する。

40

【0033】

さらなる態様において、本発明は、

50

(i) 選択的作用剤がノルエピネフリン再取り込み阻害剤 (N R I) の群から選択され、且つ

(i i) オリゴヌクレオチドが、ノルエピネフリン輸送体 (N E T) 又はノルエピネフリン輸送体 (N E T) ポリペプチドをコードする m R N A である標的分子に特異的に結合することができる、

認知症、鬱病及び神経変性性疾患と関連する記憶及び認識過程のようなノルアドレナリン作動性突起中におけるドーパミン欠乏と関連する疾患の治療又は予防に使用するための本発明のコンジュゲートに関する。

【 0 0 3 4 】

さらなる態様において、本発明は、

(i) 選択的作用剤が、ドーパミン再取り込み阻害剤 (D R I) 又はノルエピネフリン - ドーパミン再取り込み阻害剤 (N D R I) 又はセロトニン - ノルエピネフリン - ドーパミン再取り込み阻害剤 (S N D R I 又はトリプルブロッカー) の群から選択され、且つ

(i i) オリゴヌクレオチドが、タウ (T a u) をコードする m R N A である標的分子に特異的に結合することができる、

アルツハイマーのようにタウタンパク質における変異による神経変性と関連する疾患の治療又は予防に使用するための本発明のコンジュゲートに関する。

【 0 0 3 5 】

さらなる態様において、本発明は、

(i) 選択的作用剤が、ドーパミン再取り込み阻害剤 (D R I) 又はノルエピネフリン - ドーパミン再取り込み阻害剤 (N D R I) 又はセロトニン - ノルエピネフリン - ドーパミン再取り込み阻害剤 (S N D R I 又はトリプルブロッカー) の群から選択され、且つ

(i i) オリゴヌクレオチドが、ハンチンチンをコードする m R N A である標的分子に特異的に結合することができる、

ハンチンチンの変化した (遺伝子内重複) 発現の蓄積により生じた神経変性性疾患の治療又は予防に使用するための本発明のコンジュゲートに関する。

【 0 0 3 6 】

さらなる態様において、本発明は、

(i) 選択的作用剤が、ノルエピネフリン再取り込み阻害剤 (N R I) の群から選択され、且つ

(i i) オリゴヌクレオチドが、ドーパミン ヒドロキシラーゼをコードする m R N A 又はノルエピネフリン輸送体 (N E T) をコードする m R N A である標的分子に特異的に結合することができる、

認知症、鬱病及び神経変性性疾患と関連する記憶及び認識過程のようにノルアドレナリン作動性突起中のドーパミン欠乏と関連する疾患の治療又は予防に使用するための本発明のコンジュゲートに関する。

【 0 0 3 7 】

他の態様において、本発明は、

(i) 1 種又は複数種の神経伝達物質輸送体に特異的に結合する少なくとも 1 種の選択的作用剤、及び

(i i) 造影剤又は標識剤を含むコンジュゲートに関する。

【 0 0 3 8 】

さらに他の態様において、本発明は、診断剤として使用するための標識剤の造影剤を含むコンジュゲートに関する。

【 0 0 3 9 】

本発明のこれらの及び他の目的を、以下の詳細な説明の節においてさらに詳述するが、それらにより本発明を限定することは意図しない。特に断らない限り、本明細書で使用する全ての技術的及び科学的用語は、本発明が属する分野の当業者により共通的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載したものと同様な又は等価な方法及び材料は

10

20

30

40

50

、本発明の実施に使用することができる。説明及び請求項を通じて、用語「含む」及びその変形は、他の技術的特徴、添加剤、成分、又はステップを排除することを意図しない。

【図面の簡単な説明】

【0040】

【図1】シナプス前部の5-HT_{1A}R活性の機能測定の例として、5-HT_{1A}Rを標的とするsiRNA（裸出又はコンジュゲート）を背側の縫線核（DRN）に局所的に入れられたマウスにおける、（R）-（+）-8-ヒドロキシ-2-（ジ-n-プロピルアミノ）テトラリン臭化水素酸塩（8-OH-DPAT、選択的5-HT_{1A}Rアゴニスト）により誘発される低体温応答の不在を示す。マウスに：i）ビヒクル、ii）ナンセンス裸出（naked）siRNA（ns裸出siRNA）、iii）ナンセンスNLF-siRNA（nsNLF-siRNA）、iv）裸出5-HT_{1A}R-siRNA、又はv）5-HT_{1A}R-NLF-siRNA（DRN中に0.3μg/1μl/2日）を与えた。5-HT_{1A}Rノックアウト（5-HT_{1A}R-KO）マウスの追加群も評価した。体温を8-OH-DPAT投与（1mg/kg i.p.）の5分前並びに15、30、60及び120分後に測定した。値は群当たり5～7匹のマウスから体温における変化の平均±SEMとして示す。要因と時間との間で対象者内変量として処理して、反復測定分散分析を使用し、続いて多重比較Newman-Keuls検定を行い、**p<0.01でビヒクル、ns裸出siRNA、nsNLF-siRNAとそれぞれ有意の差があった。

10

【図2】5-HT_{1A}Rを標的とする-siRNA（裸出又はコンジュゲート）の背側の縫線核（DRN）への局所注射が5-HT_{1A}Rタンパク質レベルの特異的ノックダウンを誘発したことを示す。マウスには：（i）ビヒクル、ii）ナンセンス裸出siRNA（ns裸出siRNA）、iii）ナンセンスNLF-siRNA（nsNLF-siRNA）、iv）裸出5-HT_{1A}R-siRNA、又はv）5-HT_{1A}R-NLF-siRNA（DRN中に0.3μg/1μl/2日）の注射した。棒はマウスのDRN中の5-HT_{1A}Rに結合している[³H]-8-OH-DPATのデンストメトリーによる定量を示し、5-HT_{1A}R（fmol/mg組織タンパク質）の平均±SEMとして表した（1群当たり4ないし5匹の動物で1匹の動物当たりの背側縫線核の3APレベルで2回観察）。一元配置分散分析を使用し次にNewman-Keuls事後検定を行い、*p<0.05、**p<0.01で、ビヒクル、ns裸出siRNA及びnsNLF-siRNAと有意の差があった。

20

30

【図3】5-HT_{1A}R-NLF-siRNAコンジュゲートの脳室内（i.c.v）投与による選択的5-HT_{1A}自己受容体サイレンシングを示す。A）縫線核における5-HT_{1A}R発現をin situハイブリッド形成により観察評価した。マウスは背側第三脳室（D3V）中に以下の単回投与を受けた：i）ビヒクル、ii）ナンセンス裸出siRNA（ns裸出siRNA）、iii）ナンセンスNLF-siRNA（nsNLF-siRNA）、iv）裸出5-HT_{1A}R-siRNA又はv）5-HT_{1A}R-NLF-siRNA（30μg/2.5μl/1日）。a1～a555は³³P標識オリゴヌクレオチドの結合したマウスの縫線核の冠状切片を3つの異なる前後方向（AP）座標で示す（mm）：十字縫合から-4.84/-4.96、-4.36/-4.60及び-4.24/-4.36（左から右へ尾から頭へ）。尺度のバー：2mm。B）a111～a555に示した切片の高倍率拡大。尺度のバー：500μm。C）5-HT_{1A}R-NLF-siRNAが背側の縫線核において5-HT_{1A}R mRNAレベルの低下を誘発したことを示す棒グラフ。フィルムで測定した5-HT_{1A}R mRNA陽性のグレインのデンストメトリーによる定量を平均光学密度（OD）（%）±SEMとして示す（群当たりn=4～5匹のマウス及び背側の縫線核の3APレベルで2ないし4回観察）。一元配置分散分析を使用し次にNewman-Keuls事後検定を行い、**p<0.01でビヒクル、nsNLF-siRNA及び裸出5-HT_{1A}R-siRNAと有意の差があった。

40

【図4】5-HT_{1A}R-NLF-siRNAは、シナプス前部の部位で5-HT_{1A}R

50

の特異的ノックダウンを誘発したが、シナプス後部の部位では誘発しなかったことを示す。背側の縫線核 (A)、前頭前野の皮質 (B) 及び海馬 (C) における 5-HT_{1A}R タンパク質レベルを ³[H]-8-OH-DPAT を使用してオートラジオグラフィー結合により観察評価した。マウスは背側の 3 脳室 (D3V) 中に以下の単回投与を受けた: i) ビヒクル、ii) ナンセンス裸出 siRNA (ns 裸出 siRNA)、iii) ナンセンス NLF-siRNA (ns NLF-siRNA)、iv) 裸出 5-HT_{1A}R-siRNA 又は v) 5-HT_{1A}R-NLF-siRNA (30 µg / 2.5 µl / 1 日)。棒は 5-HT_{1A}R の平均 (fmol / mg 組織タンパク質) ± SEM を示す (群当たり n = 4 ~ 5 匹のマウス及び背側の縫線核の 3 AP レベルで 2 回観察及び前頭前野の皮質及び海馬の左及び右の部位で 2 回観察)。一元配置分散分析を使用し次に Newman-K

10

【図 5】背側の縫線核におけるセロトニン-5-HT 輸送体 (5-HTT) 及び 5-HT_{1B} 受容体 (5-HT_{1B}R) 結合レベルは 5-HT_{1A}R-siRNA 治療により変化しなかったことを示す。A) 背側の縫線核における 5-HTT タンパク質レベルを、³[H]-シタロプラムを使用してオートラジオグラフィー結合により観察評価した。B) 背側の縫線核における 5-HT_{1B}R タンパク質レベルを、-アドレナリン作用部位を遮断するイソブレナリンの存在下で ¹²⁵[I] シアノピンドロールを使用してオートグラフィー結合により評価した。マウスは背側の 3 脳室 (D3V) 中に以下の単回投与を受けた: i) ビヒクル、ii) ナンセンス裸出 siRNA (ns 裸出 siRNA)、iii) ナンセンス NLF-siRNA (ns NLF-siRNA)、iv) 裸出 5-HT_{1A}R-siRNA 又は v) 5-HT_{1A}R-NLF-siRNA (30 µg / 2.5 µl / 1 日)。棒グラフは: A) 平均 5-HTT fmol / mg 組織タンパク質 ± SEM 及び、B) 平均光学密度 (OD) (%) ± SEM (群当たり n = 4 匹のマウス及び背側の縫線核の 3 AP レベルで 2 回観察) を示す。

20

【図 6】シナプス前部の 5-HT_{1A}R 活性の機能測定として、(R)-(+)-8-ヒドロキシ-2-(ジ-n-プロピルアミノ)テトラリン臭化水素酸塩 (8-OH-DPAT、選択的 5-HT_{1A}R アゴニスト) により誘発された低体温応答を示す。マウスは、背側の 3 脳室 (D3V) 中に以下の単回投与を受けた: i) ビヒクル、ii) ナンセンス裸出 siRNA (ns 裸出 siRNA)、iii) ナンセンス NLF-siRNA (ns NLF-siRNA)、iv) 裸出 5-HT_{1A}R-siRNA 又は v) 5-HT_{1A}R-NLF-siRNA (30 µg / 2.5 µl / 1 日)。5-HT_{1A}R ノックアウト (5-HT_{1A}R-KO) マウスの追加群も評価した。体温を 8-OH-DPAT 投与 (1 mg / kg i.p.) の 5 分前及び 15、30、60 及び 120 分後に測定評価した。5-HT_{1A}R-NLF-siRNA コンジュゲート及び 5-HT_{1A}R-KO マウスにおける体温に対して 8-OH-DPAT は効果がないことに注目されたい。表示値は群当たり 7 ~ 10 匹のマウスから体温の変化の平均 ± SEM として示す。要因と時間との間で対象者内変量として処理して、反復測定分散分析を使用し、続いて多重比較 Newman-K

30

【図 7】マウスの内側前頭前野の皮質 (mPFC) における透析液の 5-HT レベルに対する (R)-(+)-8-ヒドロキシ-2-(ジ-n-プロピルアミノ)テトラリン臭化水素酸塩の全身投与 (8-OH-DPAT、0.5 mg / kg i.p.) の効果を示す。マウスの群は以下の通りであった: i) ビヒクル、ii) ナンセンス NLF-siRNA (ns NLF-siRNA)、iii) 5-HT_{1A}R を標的とする NLF-siRNA (5-HT_{1A}R-NLF-siRNA) 及び iv) 5-HT_{1A}R ノックアウトマウス (5-HT_{1A}R-KO)。マウスにビヒクル又は siRNA を 30 µg / 2.5 µl / 1 日、i.c.v で注入し、微小透析実験を注入の 24 ~ 48 時間後に実施した。5-HT_{1A} 自己受容体 ノックダウン及び 5-HT_{1A}R ノックアウトマウスの mPFC における 5-HT レベル低下に対して 8-OH-DPAT 効果のないことに注目されたい。データはベースラインのパーセンテージで表し、平均 ± SEM (n = 5 ~ 9 匹のマウス / 群

40

50

）で示す。要因と時間との間で対象者内変量として処理して、反復測定分散分析を使用し、続いて多重比較Newman-Keuls検定を行い、 $^{**} p < 0.01$ でビヒクル及びnsNLF-siRNA群で有意の差があった。

【図8】5-HT_{1A}R-NLF-siRNAコンジュゲートの5-HTニューロンへの送達に対するセルトラリン（セロトニン輸送体-5-HTTの選択的阻害剤）の効果を示す。A）セルトラリンの急性注射（20 mg/kg i.p.）は5-HT_{1A}R-NLF-siRNAコンジュゲートによる5-HT_{1A}自己受容体のサイレンシングを防止し、8-OHDPATの急性投与（選択的5-HT_{1A}Rアゴニスト、0.5 mg/kg i.p.）は内側前頭前野の皮質における5-HTレベルを低下させた。マウスの群は以下の通りであった：i）ビヒクル、ii）ナンセンスNLF-siRNA（nsNLF-siRNA）、iii）5-HT_{1A}Rを標的とするNLF-siRNA（5-HT_{1A}R-NLF-siRNA）及びiv）5-HT_{1A}Rノックアウト（5-HT_{1A}R-KO）。マウスは、5-HTT阻害剤、セルトラリン（20 mg/kg i.p.）の急性注射をsiRNAのD3Vへの注入（30 µg/2.5 µl/1日、i.c.v.）の3時間前に受けた。それに加えて、マウスの1群にはビヒクルi.p及びD3V中へのビヒクルを与えた。微小透析実験はi.c.v.でビヒクル又はsiRNA投与の24時間後に実施した。データはベースラインのパーセンテージで表し、平均±SEMを示す（n = 5~8マウス/群）。一元配置分散分析を使用し、次に多重比較Newman-Keuls検定を行って、 $^{***} p < 0.001$ で対照と5-HT_{1A}R-NLF-siRNA群とで有意の差があった。B）選択的5-HTT阻害剤セルトラリン（20 mg/kg i.p.）で予め処置したNLF-siRNAマウスにおける体温に対する8-OH-DPAT投与（1 mg/kg i.p.）の効果を示す。マウス群はパネルAと同様であった。5-HT_{1A}R-NLF-siRNA群とは異なり、8-OH-DPAT投与は、セルトラリンで前処置した5-HT_{1A}R-NLF-siRNAマウスにおいて低体温応答を生じた。表示値は群当たり6~10匹のマウスから体温変化の平均±SEMで示す。2元配置分散分析を使用して次に多重比較Newman-Keuls検定を行い、 $^{***} p < 0.001$ である。

【図9】フルオキシセチンの急性投与（セロトニン輸送体-5-HTTの選択的阻害剤、20 mg/kg i.p.）のマウスの内側前頭前野の皮質（mPFC）における透析液5-HTレベルに対する効果を示す。マウスの群は以下の通りであった：i）ビヒクル、ii）ナンセンスNLF-siRNA（nsNLF-siRNA）、iii）5-HT_{1A}Rを標的とするNLF-siRNA（5-HT_{1A}R-NLF-siRNA）及びiv）5-HT_{1A}Rノックアウト（5-HT_{1A}R-KO）。マウスにビヒクル又はsiRNAを30 µg/2.5 µl/1日、i.c.v.を注入して、微小透析実験を注入の24~48時間後に実施した。5-HT_{1A}R-KOマウスにおける場合と同様な、フルオキシセチンの、5-HT_{1A}自己受容体ノックダウンマウスのmPFCにおける5-HTレベルに対する増大した効果に注目されたい。データは、ベースラインのパーセンテージで表し、平均±SEM（n = 4~6マウス/群）で示す。要因と時間との間で対象者内変量として処理して、反復測定分散分析を使用し、続いて多重比較Newman-Keuls検定を行い、 $^{**} p < 0.01$ で、ビヒクル及びnsNLF-siRNA群と有意の差があった。

【図10】5-HT_{1A}自己受容体ノックダウンマウスにおいて、不安様の挙動に変化はないが、ストレス/鬱病関連検査で変化した応答があったことを示す。マウス群は以下の通りであった：i）ビヒクル、ii）5-HT_{1A}Rを標的とするNLF-siRNA（5-HT_{1A}R-NLF-siRNA）及びiii）5-HT_{1A}Rノックアウト（5-HT_{1A}R-KO）。マウスは、D3V中にビヒクル又はsiRNAを30 µg/2.5 µl/1日、i.c.v.で注入した。A）不安様挙動を高架式十字迷路法を使用してビヒクル又はsiRNA投与の24時間後に評価した。5-HT_{1A}Rノックアウトマウス（5-HT_{1A}R-KO）と異なって、5-HT_{1A}自己受容体ノックダウンマウス（5-HT_{1A}R-NLF-siRNA）は、高架式十字迷路の開放枝道に入る回数及びそこで

10

20

30

40

50

過ごす時間に差を示さなかった。B) 尾懸垂試験法は急性ストレス/鬱病状態における応答を評価するために選んだ典型であった。この試験をビヒクル又は 5-HT_{1A} 自己受容体ノックダウン及び 5-HT_{1A} R-KO マウスは、ストレスに満ちた状態にあるビヒクル群と比較して増加した運動を示した。表示値は平均 \pm SEM である ($n = 12 \sim 18$ 匹のマウス/群)。一元配置分散分析を使用し次に Newman-Keuls 事後検定を行って、 $* p < 0.05$ 、 $** p < 0.01$ 、 $*** p < 0.001$ で、ビヒクルと有意の差があった。

【図11】 5-HT_{1A} R-NLF-siRNA コンジュゲートの鼻内投与による選択的 5-HT_{1A} 自己受容体サイレンシングを示す。マウスは以下の単回鼻内投与を受けた：i) ビヒクル、ii) ナンセンス NLF-siRNA (nsNLF-siRNA) 及び iii) 5-HT_{1A} R-NLF-siRNA (各鼻孔中に $15 \mu\text{g} / 5 \mu\text{l}$)。A) 背側の縫線核 (DRN) における 5-HT_{1A} R 発現を *in situ* ハイブリッド形成により観察評価した。棒グラフは 5-HT_{1A} R-NLF-siRNA が DRN における 5-HT_{1A} R mRNA レベルの低下を誘発したことを示す。フィルムで測定した 5-HT_{1A} R mRNA 陽性グレインのデンストメトリーによる定量を平均光学密度 (OD) (%) \pm SEM で示す (群当たり $n = 4$ 匹のマウス及び DRN の 3 AP レベルで 2 回観察)。B ~ D) 5-HT_{1A} R-NLF-siRNA はシナプス前部における 5-HT_{1A} R の特異的ノックダウンを誘発したが、シナプス後部の部位では誘発しなかった。背側の縫線核 (B)、前頭前野の皮質 (C) 及び海馬 (D) における 5-HT_{1A} R タンパク質レベルは $^3[\text{H}]-8\text{-OH-DPAT}$ を使用してオートラジオグラフィー結合により観察評価した。棒は 5-HT_{1A} R (fmol/mg 組織タンパク質) の平均 \pm SEM を表す (群当たり $n = 4$ 匹のマウス、及び DRN の 3 AP レベルで 2 回観察及び前頭前野皮質及び海馬の左及び右の部位で 2 回観察)。一元配置分散分析を使用し次に Newman-Keuls 事後検定を行い、 $* p < 0.05$ 、 $** p < 0.01$ で、ビヒクル及び nsNLF-siRNA と有意の差があった。

【図12】 5-HT_{1A} 自己受容体ノックダウンマウスにおける生理学的及び神経化学的パラメーターに対する 8-OH-DPAT (選択的 5-HT_{1A} R アゴニスト) の効果はないことを示す。マウスの群は以下の単回鼻内投与を受けた：i) ビヒクル、ii) ナンセンス NLF-siRNA (nsNLF-siRNA) 及び iii) 5-HT_{1A} R-NLF-siRNA (各鼻孔中に $15 \mu\text{g} / 5 \mu\text{l}$)。A) ビヒクル及び nsNLF-siRNA 処置マウスと異なって、 $1 \text{mg} / \text{kg}$ i.p. 用量の 8-OH-DPAT は、 5-HT_{1A} R-NLF-siRNA マウスにおいて体温にいかなる変化も生じなかった。表示値は体温変化の平均 \pm SEM で示す (群当たり $n = 4 \sim 7$ 匹のマウス)。B) 8-OH-DPAT の全身投与 ($0.5 \text{mg} / \text{kg}$ i.p.) 後に、ビヒクル、nsNLF-siRNA 及び 5-HT_{1A} R-NLF-siRNA マウスの mPFC におけるインビオ微小透析により測定した細胞外 5-HT レベルを示す。 5-HT レベルは mPFC においてビヒクル及び nsNLF-siRNA の両方で低下した。しかしながら、 5-HT_{1A} R-NLF-siRNA マウスは、mPFC における 5-HT レベルに対して 8-OH-DPAT の効果がないことを示した。データはベースラインのパーセンテージで表し、平均 \pm SEM で示す ($n = 4 \sim 9$ 匹のマウス/群)。それぞれ 1 元又は 2 元配置の分散分析を使用し次に多重比較 Newman-Keuls 検定を行って、 $** p < 0.01$ 、 $*** p < 0.001$ で、ビヒクル及び nsNLF-siRNA と有意の差があった。

【図13】鼻内 5-HT_{1A} R-NLF-siRNA は、 5-HT_{1A} 自己受容体遺伝子の発現を抑制し、抗鬱様応答を誘起する。マウスは以下の単回鼻内投与を受けた：i) ビヒクル、ii) 5-HT_{1A} R-NLF-siRNA (各鼻孔中に $15 \mu\text{g} / 5 \mu\text{l}$) 及び iii) 5-HT_{1A} R-NLF-siRNA (各鼻孔中に $50 \mu\text{g} / 5 \mu\text{l}$)。A) いかなる用量の 5-HT_{1A} R-NLF-siRNA も高架式十字迷路法における不安様応答に影響しなかった ($n = 6$)。表示値は平均 \pm SEM である。B) 5-HT_{1A} R-NLF-siRNA の単回鼻内投与 (30 又は $100 \mu\text{g}$) は尾懸垂試験法における用量依存性の無動状態減少を誘起した ($n = 10 \sim 15$)。表示値は平均 \pm SEM である。

一元配置分散分析は群の有意の効果を示した、 $F_{2,34} = 8.70$ 、 $p < 0.001$ 。ビヒクルに対して $* p < 0.05$ 、 $*** p < 0.001$ 。C) 5-HT_{1A}R-NLF-siRNAの単回鼻内投与(100 µg)は、強制水泳試験において無動状態の減少を誘起した($n = 13 \sim 16$)。表示値は平均 ± SEMである。一元配置分散分析は、ビヒクルに対して $* p < 0.05$ 、 $** p < 0.01$ で群の有意の効果を示した。

【図14】5-HTT-NLF-siRNAコンジュゲートの鼻内投与による特異的5-HT輸送体(5-HTT)のサイレンシングを示す。A) 背側の縫線核(DR)における5-HTT発現をin situハイブリッド形成により観察評価した。マウスは以下の単回投与を受けた：i) ビヒクル、ii) 各鼻孔中に5-HTT-NLF-siRNAを5 µg/5 µl(5-HTT-NLF-siRNA 10)及び、iii) 各鼻孔中に5-HTT-NLF-siRNAを15 µg/5 µl(5-HTT-NLF-siRNA 30)。a1-a333は、マウスの縫線核の³³P標識5-HTT特異的オリゴヌクレオチドが結合した冠状切片を異なる前後3方向(AP)の座標で示す(mm)：十字縫合から4.24/-4.36、-4.36/-4.60及び-4.72/-4.84(左から右へ頭部から尾側)。尺度のバー：500 µm。B) 棒グラフは5-HTT-NLF-siRNAが背側の縫線核において5-HTT mRNAレベルの低下を誘発したことを示す。フィルムで測定した5-HTT mRNA陽性グレインのデンシトメトリーによる定量を光学密度(OD)の平均値(%) ± SEMで示す(群当たり $n = 4$ 匹のマウス及び背側の縫線核の3 APレベルで2ないし4回観察)。一元配置分散分析を使用し次にNewman-Keuls事後検定を行って、 $* p < 0.05$ 、 $** p < 0.01$ でビヒクルと有意の差がある。

【図15】in situハイブリッド形成及びオートグラフィー結合により評価した、5-HTT-NLF-siRNAに誘発されたセロトニン輸送体の特異的ノックダウンを示す。マウスは、以下の単回投与を受けた：i) ビヒクル、ii) 各鼻孔中にナンセンス-NLF-siRNAを15 µg/5 µl、iii) 各鼻孔中に5-HTT-NLF-siRNAを5 µg/5 µl(各鼻孔中に5-HTT-NLF-siRNA 10)及び、iv) 各鼻孔中に5-HTT-NLF-siRNAを15 µg/5 µl(5-HTT-NLF-siRNA 30)。A) 棒グラフは、5-HTT-NLF-siRNAが、背側(DR)及び中位の(MnR)縫線核において5-HTT mRNAレベルの低下を誘発したことを示す。フィルムで測定した5-HTT mRNA陽性グレインのデンシトメトリーによる定量を平均光学密度(OD)の値(%) ± SEMで示す(群当たり $n = 7 \sim 10$ 匹のマウス)。一元配置分散分析を使用し次にNewman-Keuls事後検定を行って、 $* p < 0.05$ 、 $*** p < 0.001$ で、同じ領域においてビヒクル及びナンセンス-NLF-siRNAと有意の差がある。B~C) 各領域においてNLF-siRNAにより誘発された5-HTT下方制御の程度を例示するために、特異的5-HTT結合のデンシトメトリーによる分析を、ビヒクル注入マウスの対応する領域における結合率(%)で示す。棒は6~9匹のマウス/群の平均 ± SEMを表す)。一元配置分散分析を使用し次にNewman-Keuls事後検定を行って、 $* p < 0.05$ 、 $** p < 0.01$ で、同じ領域においてビヒクル及びナンセンス-NLF-siRNAと有意の差がある。

【図16】A) フルオキセチン(5-HT輸送体の選択的阻害剤、20 mg/kg i.p.)の急性投与のマウスの背側の線条体における透析液5-HTレベルに対する効果を示す。マウスは、以下の単回投与を受けた：i) ビヒクル、ii) 各鼻孔中に5-HTT-NLF-siRNAを5 µg/5 µl(5-HTT-NLF-siRNA 10)及び、iii) 各鼻孔中に5-HTT-NLF-siRNAを15 µg/5 µl(5-HTT-NLF-siRNA 30)。微小透析実験は、適用の24~48時間後に実施した。フルオキセチンはビヒクル群の背側の線条体における上昇した5-HTレベルを生じたが、5-HTT-NLF-siRNA群では生じなかった。B) 選択的5-HT輸送体阻害剤、シタロプラム(Cit)の、ビヒクル及び5-HTT-NLF-siRNAマウスの背側の線条体における5-HTレベルに対する局所効果を示す。シタロプラムの局所投与は、ビヒクル群の背側の線条体において5-HTレベルを濃度依存性様式で上昇させ

た。しかしながら、僅か $50 \mu\text{M}$ のシタロプラムは、 5-HTT-NLF-siRNA 群の線条体における 5-HT レベルの僅かな上昇を生じただけであった。データはベースラインのパーセンテージで表し、平均 $\pm \text{SEM}$ で示す ($n = 7 \sim 8$ 匹のマウス/群)。要因と時間との間で対象者内変量として処理して、反復測定分散分析を使用し、続いて多重比較 Newman-Keuls 検定を行い、 $** p < 0.01$ でビヒクルと有意の差があった。

【図 17】黒質緻密部のドーパミン作動性ニューロンの NLF-NS-siRNA-Cy3 による選択的ターゲティングを示す。A 及び C は、マウスの腹側中脳における siRNA の ICV 投与後それぞれ 1 時間及び 3 時間の NLF-NS-siRNA-Cy3 の赤色標識を示す。B 及び D は、チロシンヒドロキシラーゼ (TH) 染色と併せた同じ標識を示す。10 NLF-NS-siRNA-Cy3 ICV 投与の 1 時間後 (A 及び B)、赤色標識 (Cy3) は、TH 陽性黒質ニューロン (青色) 内で検出することができるが、黒質細網の GABA 作動性ニューロン (*) では検出できない。赤色標識は斑点状の紋様をたどる (挿入写真)。注射の 3 時間後には、いかなる赤色細胞内標識も検出することができない (C 及び D)。

【図 18】遺伝子座位青斑核のノルアドレナリン作動性ニューロンの NLF-NS-siRNA-Cy3 による選択的ターゲティング。A 及び C は、 siRNA の ICV 投与後それぞれ 1 時間及び 3 時間の NLF-NS-siRNA-Cy3 の赤色標識を示す。B 及び D は、チロシンヒドロキシラーゼ (TH) 染色と併せた同じ標識を示す。20 NLF-NS-siRNA-Cy3 の ICV 投与の 1 時間後 (A 及び B) には、赤色標識 (Cy3) を主として TH 陽性ノルアドレナリン作動性ニューロン (青色) 内で検出することができる。赤色標識は斑点状の紋様 (挿入写真) をたどる。注射の 3 時間後にはいかなる赤色細胞内標識も検出することができない (C 及び D)。

【図 19】セルトラリン-コンジュゲート 2-O'-メチル (TOM) で改変したナンセンスオリゴヌクレオチド (C-ns-TOM) の縫線核セロトニンニューロンにおける選択的蓄積を示す。マウスは、Cy3 標識 C-ns-TOM ($30 \mu\text{g}$) の単回脳室内注入を背側の第 3 脳室中に受けて注入後 24 時間で殺害した ($n = 2$ 匹のマウス)。YOYO 1 免疫反応性細胞核 (緑色) のレーザ共焦点像が免疫局在化 Cy3 標識 C-ns-TOM (赤色) を示す。尺度のバーは $40 \mu\text{m}$ である。

【発明を実施するための形態】

【0041】

本発明者らは、予想外に、神経伝達物質輸送体を発現している関心のある細胞を特定して核酸の標的とすることが、前記神経伝達物質輸送体に、さらに特定すれば、前記輸送体の阻害剤に特異的に結合することができる分子に前記核酸を共有結合でカップリングすることにより、可能であることに気づいた。

【0042】

A. 本発明のコンジュゲート

第 1 の態様において、本発明は、

i) 1 種又は複数種の神経伝達物質輸送体に特異的に結合する少なくとも 1 種の選択的作用剤、

ii) 神経伝達物質輸送体と同じ細胞中に発現している標的分子に特異的に結合することができる少なくとも 1 種のオリゴヌクレオチドを含むコンジュゲートに関する。

【0043】

本明細書中で使用する「コンジュゲート」という用語は、2 種以上の個々の化合物の共有結合から生ずる任意の化合物を指す。本発明において、コンジュゲートは共有結合でカップリングした核酸と選択的作用剤とを含む分子を指し、前記カップリングは直接又は結合剤化合物を通して行われる。

【0044】

「共有結合カップリング」又は「共有結合」という用語は、核酸と選択的作用剤とが、

直接共有結合で互いに連結するか、又はそうではなくて間接的に共有結合で、リンカー、又は架橋、又はスペーサーの部分（単数又は複数）などの介在する構造部分（単数又は複数）を通して互いに連結するかのいずれかであることを意味する。

【0045】

A. 1. 選択的作用剤

本明細書中で使用する「1種又は複数種の神経伝達物質輸送体に特異的に結合する選択的作用剤」という表現は、神経伝達物質輸送体に結合する任意の物質を指す。この結合特異性は、前記選択的作用剤に結合した分子を前記神経伝達物質輸送体を含む細胞、組織又は器官に送達することを可能にする。このようにして、前記選択的作用剤を担持するコンジュゲートは、動物に投与されたときに又はインビトロで異なったタイプの細胞の集団と接触したときに、前記細胞に特異的に向かうであろう。

10

【0046】

本明細書中で使用する、第1の分子の第2の分子への特異的結合は、第1の分子が前記第2の分子に非特異的相互作用とはっきり異なる方式で結合する能力を指す。本発明による選択的作用剤は、標的（神経伝達物質輸送体）に対して少なくとも約 10^{-4} M、あるいは少なくとも約 10^{-5} M、あるいは少なくとも約 10^{-6} M、あるいは少なくとも約 10^{-7} M、あるいは少なくとも約 10^{-8} M、あるいは少なくとも約 10^{-9} M、あるいは少なくとも約 10^{-10} M、あるいは少なくとも約 10^{-11} M、あるいは少なくとも約 10^{-12} M以上のKdを示すことができる。

【0047】

20

本明細書中で使用する用語「神経伝達物質輸送体」は、ニューロンの細胞膜の両側にまたがり、その主な機能はこれらの膜を越えて神経伝達物質を運び、それらの特定の細胞内の位置へのさらなる輸送を指示する膜輸送タンパク質のクラスに属するタンパク質を指す。本発明の選択的作用剤により標的とされ得る神経伝達物質輸送体として、ニューロンのプラズマ膜中に存在する取り込み担体及び神経伝達物質を細胞外空間から細胞中に送り込むグリア細胞が挙げられるが、これらに限定されない。この過程は、プラズマ膜を通してのNa⁺勾配、特にNa⁺の共輸送に依存する。タンパク質の2つのファミリーが同定されている。1つのファミリーは、GABA、ノルアドレナリン、ドーパミン、セロトニンなどのモノアミン、及びグリシン及びプロリンなどのアミノ酸のための輸送体を含む。共通の構造成分としては、12個の推定されている膜貫通型 - ヘリカルドメイン、細胞質のN-及びC-末端、及び膜貫通ドメインを3と4に分離する大きいグリコシル化された細胞外ループが含まれる。相同性タンパク質のこのファミリーは、Na⁺及びCl⁻イオンと神経伝達物質の細胞中への共輸送からそれらのエネルギーを引き出す（Na⁺/Cl⁻神経伝達物質輸送体）。第2のファミリーとしては、グルタメートなどの興奮性アミノ酸のための輸送体が含まれる。共通構造成分としては、推定されている6～10個の膜貫通型ドメイン、細胞質のN-及びC-末端、及び細胞外ループ中のグリコシル化物が含まれる。興奮性アミノ酸輸送体は、Cl⁻に依存せず、及び且つ細胞内K⁺イオンを必要とし得る（Na⁺/K⁺-神経伝達物質輸送体）（Liu, Y. et al. (1999) Trends Cell Biol. 9:356-363）。

30

【0048】

40

本発明の選択的作用剤の標的とされ得る神経伝達物質輸送体として、細胞内小胞膜中に存在する神経伝達物質輸送体、典型的には、主要な機能が、シナプス伝達中に小胞内容物のエキソサイトシス前に神経伝達物質を細胞質から小胞中に濃縮することであるシナプス小胞も挙げられる。小胞の輸送には、H⁺-ATPアーゼにより生ずる小胞の膜の両側間の電気化学的勾配が使用される。神経伝達物質の小胞への輸送にはタンパク質の2つのファミリーが関与する。1つのファミリーは、主としてプロトン交換を使用して分泌性小胞中への輸送を推進するもので、モノアミン及びアセチルコリンの輸送体が含まれる。例えば、モノアミン輸送体は細胞質伝達物質の各分子のために2つの管腔プロトンを交換する。第2のファミリーには、シナプス小胞内の正電荷に依存するGABA輸送体が含まれる。小胞の輸送体の2つのクラスは、互いに配列類似性を示さず、プラズマ膜担体の小胞

50

とは異なった構造を有する (Schloss, P. et al. (1994) Curr. Opin. Cell Biol. 6: 595 - 599; Liu, Y. et al. (1999) Trends Cell Biol. 9: 356 - 363)。

【0049】

本発明の選択的作用剤の標的にすることができる神経伝達物質輸送体の特定のタイプには、興奮性アミノ酸輸送体1 (EAAT1)、興奮性アミノ酸輸送体2 (EAAT2)、興奮性アミノ酸輸送体3 (EAAT3)、興奮性アミノ酸輸送体4 (EAAT4)、興奮性アミノ酸輸送体5 (EAAT5)、小胞のグルタメート輸送体1 (VGUT1)、小胞のグルタメート輸送体2 (VGUT2) 及び小胞のグルタメート輸送体3 (VGUT3) を含むグルタメート/アスパラテート輸送体; 1型GABA輸送体 (GAT1)、2型GABA輸送体 (GAT2)、3型GABA輸送体 (GAT3)、ベタイン輸送体 (BGT1) 及び小胞のGABA輸送体 (VGAT) を含むGABA輸送体; 1型グリシン輸送体 (GlyT1)、2型グリシン輸送体 (GlyT2) を含むグリシン輸送体; ドーパミン輸送体 (DAT)、ノルエピネフリン輸送体 (NET)、セロトニン輸送体 (SERT)、小胞のモノアミン輸送体1 (VMAT1)、小胞のモノアミン輸送体2 (VMAT2) を含むモノアミン輸送体; 受動拡散型ヌクレオシド輸送体1 (ENT1)、受動拡散型ヌクレオシド輸送体2 (ENT2)、受動拡散型ヌクレオシド輸送体3 (ENT3) 及び受動拡散型ヌクレオシド輸送体4 (ENT4) 及び小胞のアセチルコリン輸送体 (VAChT) を含むアデノシン輸送体が含まれる。

【0050】

好ましい実施形態において、選択的作用剤はペプチドではない。

【0051】

好ましい実施形態において、選択的作用剤は、セロトニン再取り込み阻害剤 (SRI)、選択的セロトニン再取り込み阻害剤 (SSRI)、セロトニン - ノルエピネフリン再取り込み阻害剤 (SNRI)、ノルアドレナリン作動性及び特異的セロトニン作動性の抗鬱剤 (NASSA)、ノルアドレナリン再取り込み阻害剤 (NRI)、ドーパミン再取り込み阻害剤 (DRI)、内在性カンナビノイド再取り込み阻害剤 (eCBRI)、アデノシン再取り込み阻害剤 (AdoRI)、興奮性アミノ酸再取り込み阻害剤 (EAARI)、グルタメート再取り込み阻害剤 (GluRI)、GABA再取り込み阻害剤 (GRI)、グリシン再取り込み阻害剤 (GlyRI) 及びノルエピネフリン - ドーパミン再取り込み阻害剤 (NDR I) の群から選択される。

【0052】

用語「セロトニン再取り込み阻害剤」又は「SRI」は、セロトニン取り込みを阻止することができて、選択的セロトニン再取り込み阻害剤 (SSRI) (他の神経伝達物質に実質的に影響せずに特異的にセロトニン取り込みを阻止する) に加えて非選択的セロトニン再取り込み阻害剤、例えば、セロトニン - ノルエピネフリン再取り込み阻害剤 (SNRI) 及びセロトニン - ノルエピネフリン - ドーパミン再取り込み阻害剤 (SNDRI) も含む分子を指す。

【0053】

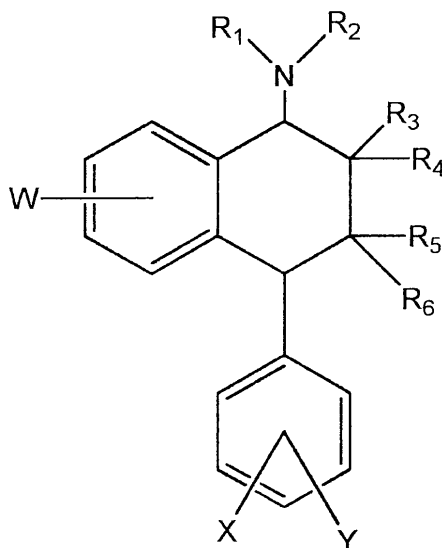
用語「セロトニン選択的再取り込み阻害剤」又は「SSRI」は、他の神経伝達物質再取り込み又は輸送体系に実質的に影響しないセロトニン再取り込みの選択的阻害剤を指す。これらの化合物は、主としてシナプス前部のセロトニン作動性の細胞に作用して神経伝達物質セロトニンの細胞外レベルの上昇をもたらし、それによりシナプス後部の受容体に結合し得るセロトニンのレベルを上昇させて脳中のこのモノアミン作動性神経伝達物質系の活性の欠乏を回復させる。SSRIの例示となる例として、セルトラリン (CAS 79617-96-2)、セルトラリンの構造的アナログ、フルオキセチン (CAS 54910-89-3)、フルボキサミン (CAS 54739-18-3)、パロキセチン (CAS 61869-08-7)、インダブリン (CAS 63758-79-2)、ジメルジン (CAS 56775-88-3)、シタロプラム (CAS 59729-33-8) 及びエスシタロプラム (CAS 219861-08-2) が挙げられるが、これらに限定されな

い。所与の化合物がSSRIとして作用しているかどうかを決定するためのアッセイは、例えば、体外でセロトニンの取り込みを減少させて、Koe et al. (J. Pharmacol. Exp. Ther., 1983, 226: 686-700) に本質的に記載されたように静脈内 [^3H] ノルエピネフリンのラット心臓取り込みに影響せずにセロトニンを消耗させる p - クロロアンフェタミンの作用に拮抗する能力である。

【0054】

好ましい実施形態において、SSRIはセルトラリン又は構造(I)

【化1】



(I)

(式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、及び R^6 は、独立に、水素又は場合により置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキルであり；X及びYは水素、フルオロ、クロロ、ブromo、トリフルオロメチル、 $C_1 \sim C_3$ アルコキシ、及びシアノからなる群から各々選択され；及びWは水素、フルオロ、クロロ、ブromo、トリフルオロメチル、ニトロ及び $C_1 \sim C_3$ アルコキシからなる群から選択される)

を有するそれらの構造的アナログである。幾つかの実施形態において、セルトラリンアナログはシス異性体配置である。用語「シス異性体の」は、シクロヘキセン環上の NR^1R^2 とフェニル部分との相対的配向を指す(即ちそれらは両方とも環の同じに側にある)。1 - 及び4 - 炭素は両方とも非対称的に置換されているので、各シス化合物は、(1 - 炭素に関して)シス(1R)及びシス(1S)エナンチオマーと表示される2つの光学活性鏡像異性形を有する。

【0055】

ある有用なセルトラリンアナログは、(1S) - 鏡像異性又は(1S)(1R)ラセミ体、及びそれらの薬学的に許容される塩のいずれかである以下の化合物である：

cis - N - メチル - 4 - (3, 4 - ジクロロフェニル) - 1, 2, 3, 4 - テトラヒドロ - 1ナフタレンアミン；

cis - N - メチル - 4 - (4 - ブロモフェニル) - 1, 2, 3, 4 - テトラヒドロ - 1ナフタレンアミン；

cis - N - メチル - 4 - (4 - クロロフェニル) - 1, 2, 3, 4 - テトラヒドロ - 1ナフタレンアミン；

cis - N - メチル - 4 - (3 - トリフルオロメチル - フェニル) - 1, 2, 3, 4 - テトラヒドロ - 1 - ナフタレンアミン；

cis - N - メチル - 4 - (3 - トリフルオロメチル - 4 - クロロフェニル) - 1, 2

10

20

30

40

50

, 3, 4 - テトラヒドロ - 1 - ナフタレンアミン ;

c i s - N , N - ジメチル - 4 - (4 - クロロフェニル) - 1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロ - 1 - ナフタレンアミン ;

c i s - N , N - ジメチル - 4 - (3 - トリフルオロメチル - フェニル) - 1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロ - 1 - ナフタレンアミン及び

c i s - N - メチル - 4 - (4 - クロロフェニル) - 7 - クロロ - 1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロ - 1 - ナフタレンアミン。

c i s - N - メチル - 4 - (3 , 4 - ジクロロフェニル) - 1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロ - 1 - ナフタレンアミンの (1 R) - エナンチオマーも興味がある。

【 0 0 5 6 】

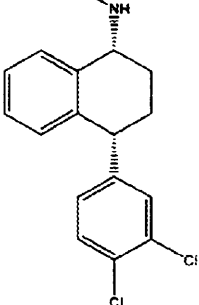
10

セルトラリンアナログは、米国特許第 4 , 5 3 6 , 5 1 8 号にも記載されている。他の関係ある化合物として、(S , S) - N - デスメチルセルトラリン、r a c - c i s - N - デスメチルセルトラリン、(1 S , 4 S) - デスメチルセルトラリン、1 - デス(メチルアミン) - 1 - オキソ - 2 - (R , S) - ヒドロキシセルトラリン、(1 R , 4 R) - デスメチルセルトラリン、セルトラリン、スルホンアミド、セルトラリン(反転)メタンスルホンアミド、1 R , 4 R セルトラリン、エナンチオマー、N , N - ジメチルセルトラリン、ニトロセルトラリン、セルトラリンアニリン、セルトラリンヨウ化物、セルトラリンスルホンアミド N H 2、セルトラリンスルホンアミドエタノール、セルトラリンニトリル、セルトラリン - C M E、ジメチルセルトラリン反転スルホンアミド、セルトラリン反転スルホンアミド(C H 2 リンカー)、セルトラリン B - 環オルトメトキシ、セルトラリン A - 環メチルエステル、セルトラリン A - 環エタノール、セルトラリン N , N - ジメチルスルホンアミド、セルトラリン A 環カルボン酸、セルトラリン B - 環パラフェノキシ、セルトラリン B - 環パラ - トリフルオロメタン、N , N - ジメチルセルトラリン B - 環及びパラ - トリフルオロメタン、及び U K - 4 1 6 2 4 4 が含まれる。これらのアナログの構造を下に示す。

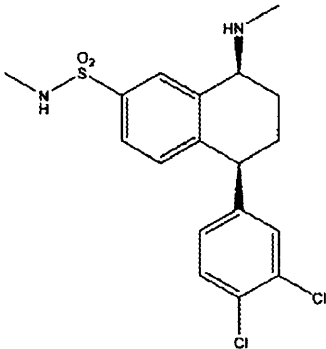
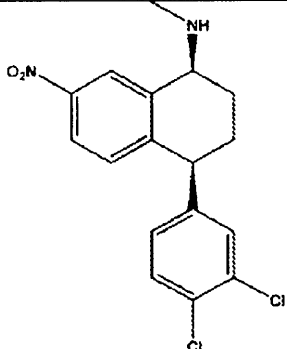
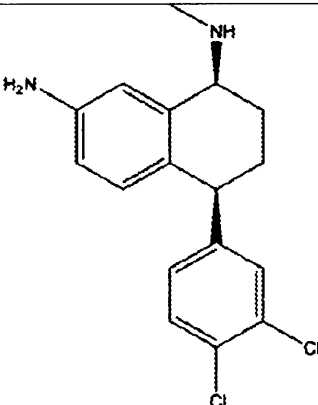
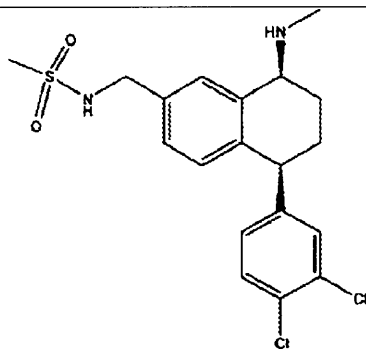
20

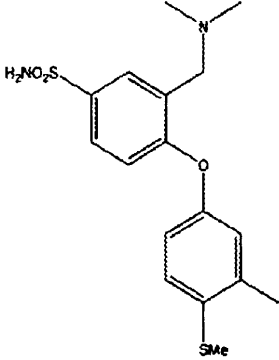
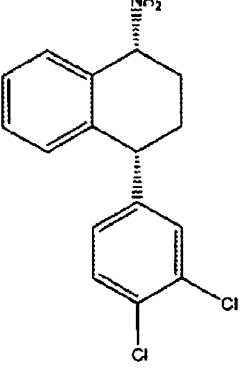
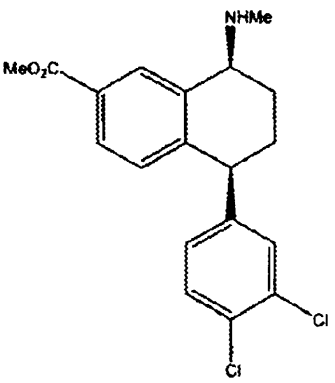
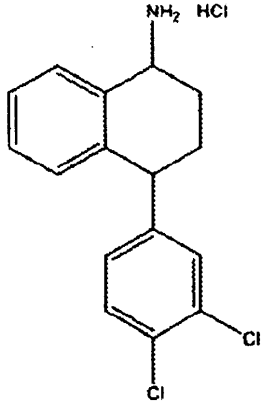
【 0 0 5 7 】

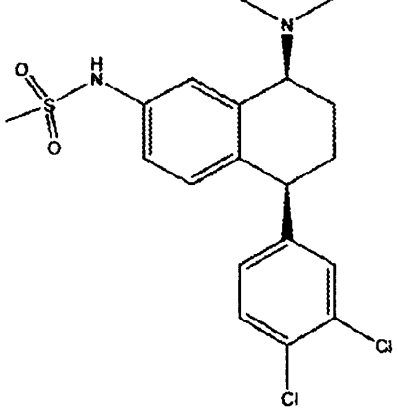
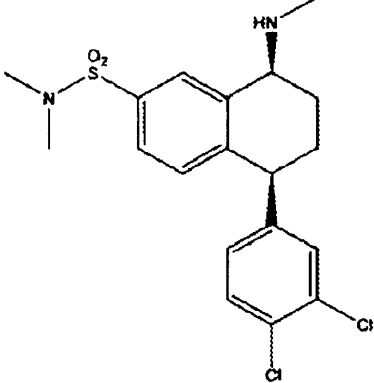
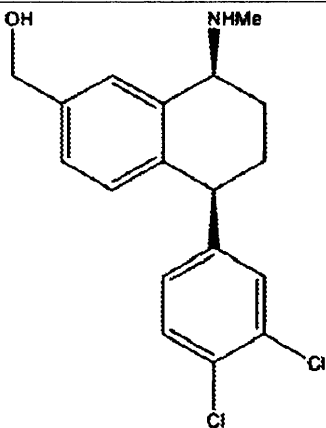
【表 1】

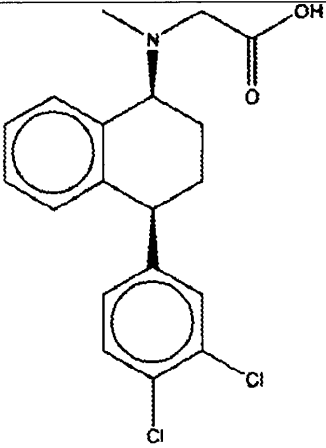
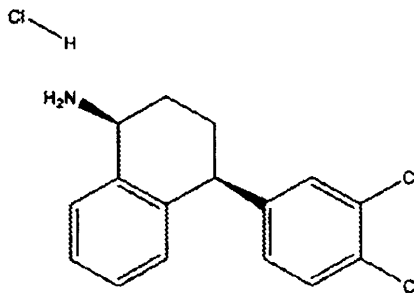
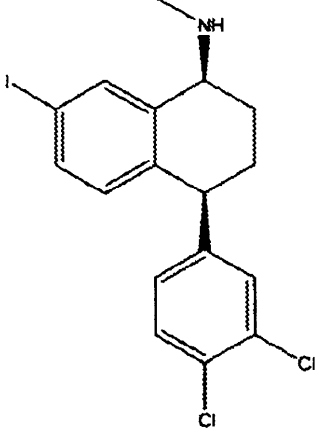
	<p>1R, 4Rセルトラリンエナンチオマー</p>
---	----------------------------

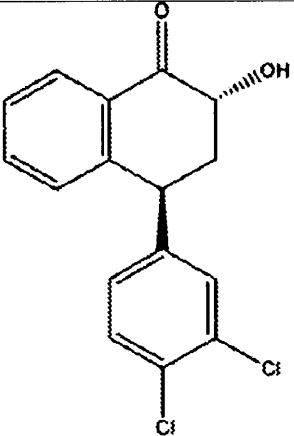
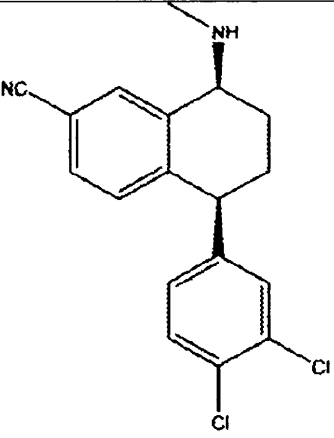
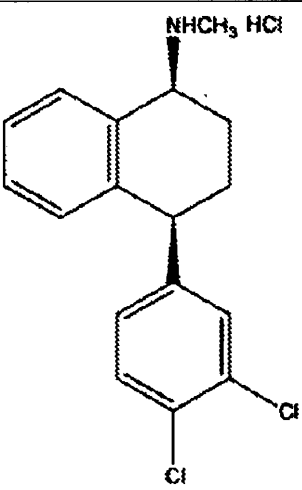
30

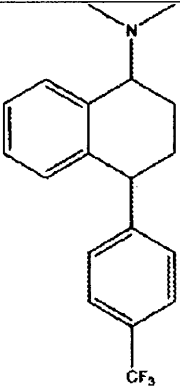
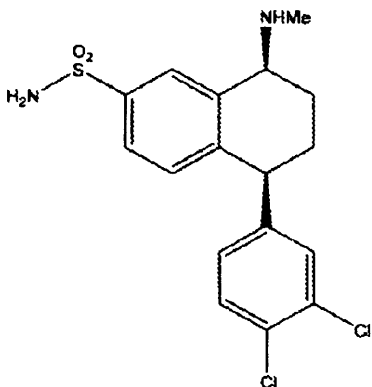
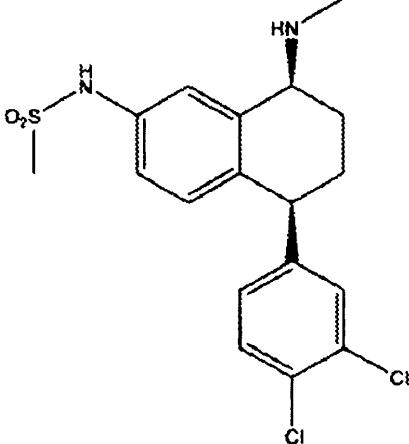
	セルトラリンスルホンアミド	10
	ニトロセルトラリン	20
	セルトラリンアニリン	30
	セルトラリン反転スルホアミド (CH ₂ リンカー)	40

	UK-416244	10
	(1R, 4R)ーデスメチルセルトラリン	20
	セルトラリンAー環メチルエステル	30
	rac-cis-Nーデメチルセルトラリン 塩酸塩	40

	ジメチルセルトラリン反転スルホン アミド	10
	セルトラリンN, N-ジメチルスル ホンアミド	20
	セルトラリンA-環エタノール	30

	<p>セルトラリンーCME</p>	10
	<p>(1S, 4S)ーデスメチルセルトラリン 塩酸塩</p>	20
	<p>セルトラリンヨウ化物</p>	30

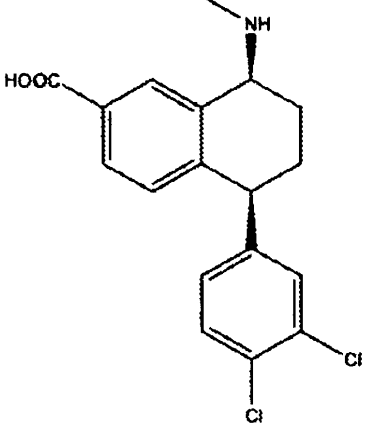
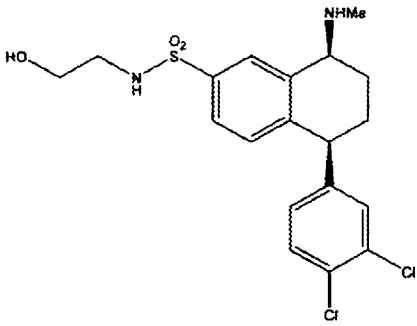
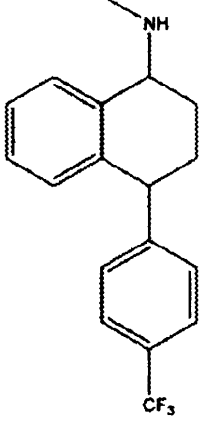
 <p>Chemical structure of 1-(2-(3,4-dichlorophenyl)-2-hydroxy-1-phenylpropan-1-yl)pyrrolidine. It features a phenyl ring attached to a 1-hydroxy-2-(3,4-dichlorophenyl)ethyl group, which is further attached to a pyrrolidine ring.</p>	<p>1-デス(メチルアミン)-1- オキソ-2-(R, S)ヒドロキシル セルトラリン</p>	10
 <p>Chemical structure of 1-(2-(3,4-dichlorophenyl)-2-nitro-1-phenylpropan-1-yl)pyrrolidine. It features a phenyl ring attached to a 2-nitro-1-(3,4-dichlorophenyl)ethyl group, which is further attached to a pyrrolidine ring.</p>	<p>セルトラリンニトリル</p>	20
 <p>Chemical structure of 1-(2-(3,4-dichlorophenyl)-2-(methylammonio)ethyl)pyrrolidine hydrochloride. It features a phenyl ring attached to a 2-(methylammonio)-1-(3,4-dichlorophenyl)ethyl group, which is further attached to a pyrrolidine ring.</p>	<p>セルトラリン塩酸塩</p>	30

 <chem>CN(C)C1CCC2=CC=CC=C2C1C3=CC=C(C=C3)C(F)(F)F</chem>	<p>N, N-ジメチルセルトラリン B. 環パタトリフルオロメタン</p>
 <chem>CNC1CCC2=CC=C(C=C2C1C3=CC(=CC=C3)ClCl)S(=O)(=O)N</chem>	<p>セルトラリンスルホンアミドNH₂</p>
 <chem>CNC1CCC2=CC=C(C=C2C1C3=CC(=CC=C3)ClCl)S(=O)(=O)NC</chem>	<p>セルトラリン(反転)メタンスルホン アミド</p>

10

20

30

	セルトラリンA-環カルボン酸
	セルトラリンスルホンアミド エタノール
	セルトラリンB-環パトリフルオロ メタン

10

20

30

用語「セロトニン - ノルエピネフリン再取り込み阻害剤」又は「SNRI」は、セロトニン輸送体を遮断することによりセロトニンの再取り込み、及びノルエピネフリン輸送体を遮断することによりノルエピネフリンの再取り込みを阻害することができる化合物のファミリーを指す。このファミリーには、ベンラファキシン (CAS 93413-69-5)、デスベンラファキシン (CAS 93413-62-8)、デュロキセチン (CAS 116539-59-4)、ミルナシプラン (CAS 92623-85-3)、シブトラミン (106650-56-0)、トラマドール (CAS 27203-92-5) 及びビシファジン (CAS 71195-57-8) などの化合物が含まれる。所与の化合物が、SNRIとして作用するかどうかを決定するためのアッセイは、例えば、Bolden-Watson C, Richelson E. (Life Sci. 1993; 52(12): 1023-9) に本質的に記載された脳シナプトソームによるセロトニン及びノルエピネフリンの取り込みを減少させる能力である。SNRIの特定のタイプは3環を含む一般的分子構造を有するSNRIである三環式抗鬱剤である。抗鬱剤の中でも突出しているのは、線状三環式、例えば、イミプラミン、デシプラミン、アミトリプチリン、ノルトリプチリン、プロトプチリン、ドキセピン、ケチプラミン、ミアンセリン、ドチエピン、アモ

40

50

キサピン、ジベンゼピン、メリトラセン、マプロチリン、フルペンチキソール、アザフェン、チアネピン及び同様な活性を示す関連化合物である。角形三環式には、インドリリン、クロダゾン、ノミフェンシン、及び関連化合物が含まれる。種々の他の構造的に多様な抗鬱剤、例えば、イプリンドール、ウェルバトリン、ニアラミド、ミルナシプラン、フェネルジン及びトラニルシブロミンが同様な活性を生ずることが示されている。それらは機能的に三環式抗鬱剤と同等であり、それ故本発明の範囲内に含まれる。したがって、三環式抗鬱剤という用語は、上記の広範なクラスの抗鬱剤を、アミトリプチリン、アミトリプチリンオキシド、カルバマゼピン、ブトリプチリン、クロミプラミン、デメキシプチリン、デシプラミン、ジベンゼピン、ジメタクリン、ドスレピン/ドチエピン、ドキシセピン、イミプラミン、イミプラミンオキシド、イプリンドール、ロフェプラミン、メリトラセン、メタプラミン、ニトロキサゼピン、ノルトリプチリン、ノキシプチリン、プレガバリン、プロピゼピン、プロトリプチリン、キヌプラミン及びトリミプラミンなどの化合物を含むがこれらに限定されない全て抗鬱剤活性を有し共通の性質を有する関連化合物と一緒に包含することが本発明者により意図される。

【0058】

用語「ノルアドレナリン再取り込み阻害剤」、「NRI」、「NERI」、アドレナリン作用性の再取り込み阻害剤又は「ARI」は、ノルエピネフリン輸送体(NET)の作用を阻害することによりノルアドレナリン及びアドレナリンの再取り込みを阻止することができる化合物のファミリーを指す。このファミリーの化合物には、他のモノアミン輸送体に影響せずにもっぱらNETを遮断する選択的NRI並びにノルエピネフリン輸送体及びセロトニン輸送体(上を参照されたい)を遮断するSNRI、ノルエピネフリン及びドーパミン輸送体(下を参照されたい)を遮断するノルエピネフリン-ドーパミン再取り込み阻害剤(NDRI)、三環式抗鬱剤及び四環式抗鬱剤(上を参照されたい)などの非選択的NRIが含まれる。本発明に適した選択的NRIとして、アトモキセチン/トモキセチン(ストラッテラ又はCAS 83015-26-3)、マジンドール(マザノール、サノレックス又はCAS 22232-71-9)、レボキセチン(エドロナックス、ベストラ又はCAS 98819-76-2)及びビロキサジン(ビバラン又はCAS 46817-91-8)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0059】

用語「ドーパミン再取り込み阻害剤」又は「DRI」は、ドーパミン輸送体(DAT)の作用を遮断することにより神経伝達物質ドーパミンの再取り込み阻害剤として作用する。これは、順送りで、ドーパミンの上昇した細胞外濃度を、それ故ドーパミン作動性神経伝達の増強をもたらす。適当なDRIには、アミネプチン、ベンザトロピン/ベンズトロピン、ブプロピオン、デクスメチルフェニデート、エスケタミン、エチベンザトロピン/エチベ(Ethylbe)、ポナリド、フェンカムファミン、フェンカミン、ケタミン、レフェタミン、メジホキサミン、メソカルブ、メチルフェニデート、ネホパム、ノミフェンシン、ピブラドロール、プロリントアン、ピロバレロン、チレタミン及びトリペレンアミンなどの医薬;アルトロパン、アンホネリン酸、ベノシクリジン、ブラソフェンシン、プロマンタン、DBL-583、ジクロロパン、ジクロフェンシン、ジエチシクリジン、ジフルオロピン、ガシクリジン、GBR-12,935、インダトラリン、イオフルパン、イオメトパン、マニファクシン、ラダファクシン、タメトラリン、テソフェンシン、トロパリル及びパノキセリンなどの研究用化学物質が含まれるが、これらに限定されない。適当なDRIは、Kulala(Life Sciences 34:2567-2575, 1984)により発表された方法を使用して記載されたように実施して、ラット死体の線条体から調製されたシナプトソーム製剤によるドーパミンの高親和性取り込みを阻害する、推定されているDRIの能力の定量などの当業者に知られたアッセイを使用して同定することができる。

【0060】

本明細書中で使用する用語「内在性カンナビノイド再取り込み阻害剤」又は「eCBRI」は、内在性カンナビノイド輸送体の作用を遮断することにより内在性カンナビノイド

10

20

30

40

50

の再取り込み阻害剤として作用する任意の化合物を指す。この活性を有する化合物は、Beltramio, M. et al. (Science, 1997, 277: 1094 - 1097)に記載された方法を使用して、ラットのニューロン及び星状細胞によるアナンダミドの取り込みを阻止する推定されている内在性カンナビノイド再取り込み阻害剤の能力に基づいて同定することができ、AM404、アルバニル及びオルバニルを含むが、これらに限定されない。

【0061】

用語「アデノシン再取り込み阻害剤」又は「AdoRI」は、1種又は複数種の受動拡散型ヌクレオシド輸送体(ENT)の作用を遮断することにより、プリンヌクレオシド及び神経伝達物質アデノシンの再取り込み阻害剤として作用する化合物を指す。これは、順送りで、アデノシンの増大した細胞外濃度、それ故アデノシン作動性神経伝達の増強をもたらす。AdoRI活性を有する化合物は、赤血球によるアデノシン取り込みの阻害における推定されているAdoRIの能力に基づくインビトロアッセイ並びにアデノシンの血管拡張剤効果を阻害する推定されているAdoRIの能力並びにアデノシンに媒介される側副血管の成長の促進を妨げる能力に基づくインビボアッセイを使用して同定することができ、それらの全ては米国特許第6984642号に本質的に記載されたようにして実施することができる。適当なAdoRIとして、アカデシン、アセテート、バルビツール酸、ベンゾジアゼピン、カルシウムチャンネル遮断剤、カルバマゼピン、カリソプロドール、シロスタゾール、シクロベンザブリン、ジラゼブ、ジピリダモル、エストラジオール、エタノール(アルコール)、フルマゼニル、ヘキサベンジン、ヒドロキシジン、インドメタシン、イノシン、KF24345、メプロバメート、ニトロベンジルチオグアノシン、ニトロベンジルチオイノシン、パパベリン、ペントキシフィリン、フェノチアジン、フェニトイン、プロゲステロン、プロペントフィリン、プロポフォル、ピューロマイシン、R75231、RE102BS、ソフルフラジン、トヨカマイシン、トラカゾレート、三環式抗鬱剤が挙げられるが、これらに限定されない。

【0062】

用語「興奮性アミノ酸再取り込み阻害剤」又は「EAARI」は、興奮性アミノ酸輸送体又はEETを遮断することにより興奮性アミノ酸の再取り込みを阻害する化合物を指す。多くの化合物が、EETに結合すること及び輸送体機能を阻害することが知られている。EETの阻害剤は、それらの作用様式が異なる2つの主要なクラス：即ち非輸送性遮断剤及び競合性基質に入る。適当なEAARIとして、DL-トレオ-ベンジルオキシアスパラテート、カイナイト、ジヒドロカイネート、2S4R4MG、トレオ-ヒドロキシアスパラテート、L-トランス-ピロリジン-2,4-ジカルボン酸(t-2,4-PDC)が挙げられるがこれらに限定されない。適当なEAARIは、例えば、Shimamoto et al. (Molecular Pharmacology, 1998, 53: 195 - 201)により記載されたアッセイを使用して、ヒト興奮性アミノ酸輸送体-1(EAT1)又はヒト興奮性アミノ酸輸送体-2(EAT2)が発現しているCos-1細胞による放射性標識グルタメートの取り込みを阻害する推定されているEAARIの能力に基づいて同定することができる。

【0063】

用語「グルタメート再取り込み阻害剤」又は「GluRI」は、1種又は複数種のグルタメート輸送体の作用を遮断することによりグルタメートの再取り込み阻害剤として作用する化合物を指す。グルタメート再取り込みの適当な阻害剤は、実例として、トレオ-3ヒドロキシ-DL-アスパラギン酸(THA)、(2S)-トランス-ピロリジン-2,4-ジカルボン酸(PDC)、アミノカプロン酸、及び(2S,3S)-3-{3-[4-(トリフルオロメチル)ベンゾイルアミノ]ベンジルオキシ}アスパラテートを含む当技術分野において既知の阻害剤の任意のものを包含する。GluRI活性を有する化合物は、例えばShimamoto et al. (Molecular Pharmacology, 1998, 53: 195 - 201)により記載されたアッセイを使用して、放射性標識グルタメートのヒト興奮性アミノ酸輸送体-1(EAT1)又はヒト興奮性

アミノ酸輸送体 - 2 (E E A T 2) を発現している C o s - 1 細胞中への取り込みを阻害する推定されている G l u R I の能力に基づいて同定することができる。

【 0 0 6 4 】

用語「 G A B A 再取り込み阻害剤」又は「 G R I 」は、 - アミノ酪酸輸送体 (G A T) の作用を遮断することにより神経伝達物質 - アミノ酪酸 (G A B A) の再取り込み阻害剤として作用する化合物を指す。これは、順送りで G A B A の上昇した細胞外濃度及びそれ故 G A B A 作動性神経伝達の増強をもたらす。 G A B A 再取り込みの適当な阻害剤として、アドハイパフォリン (H y p e r i c u m p e r f o r a t u m (セイヨウトギリソウ)) に見出される)、 C I - 9 6 6 、デラムシ克蘭 (E G I S - 3 8 8 6) 、 G u v a c i n e (C 1 0 1 4 9) 、ハイパフォリン (H y p e r i c u m p e r f o r a t u m (セイヨウトギリソウ)) に見出される)、ニベコチン酸、 N N C 0 5 - 2 0 9 0 、 N N C - 7 1 1 、 S K F - 8 9 9 7 6 A 、 S N A P - 5 1 1 4 、スチリベントール及び B o R d e n L A e t a l . (E u r J P h a r m a c o l . 1 9 9 4 , 2 6 9 : 2 1 9 - 2 2 4) に記載されたチアガピン (ガピトリル) が含まれるがこれらに限定されない。所与の化合物が G A B A 再取り込み阻害剤であるかどうかを検知する方法は、当技術分野において知られており、例えば、米国特許第 6 9 0 6 1 7 7 号 ; 米国特許第 6 2 2 5 1 1 5 号 ; 米国特許第 4 3 8 3 9 9 9 号及び A I i , F . E . , e t a l . (J . M e d . C h e m . 1 9 8 5 , 2 8 , 6 5 3 - 6 6 0) に記載されている。これらの方法は、通常細胞を放射性標識 G A B A と接触させること及び候補化合物の存在及び不在下において G A B A の取り込みを検出することを含む。

【 0 0 6 5 】

用語「グリシン再取り込み阻害剤」又は「 G l y R I 」は、シナプス間隙からグリシンを除去することに関与するグリシン輸送体 (1 型) G l y T 1 並びにグリシンのシナプス小胞への再取り込み及び再装入に必要とされる G l y T 2 を遮断する化合物を含むグリシン輸送体 (G l y T) の作用を遮断することにより、神経伝達物質グリシンの再取り込み阻害剤として作用する化合物を指す (G o m e z a e t a l . , 2 0 0 3 ; C u r r O p i n D r u g D i s c o v D e v e l 6 (5) : 6 7 5 - 8 2) 。本発明において使用する適当なグリシン再取り込み阻害剤として、 N - メチル - N - [[(1 R , 2 S) - 1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロ - 6 - メトキシ - 1 - フェニル - 2 - ナフタレニル] メチルグリシン (M T H M P N M グリシンの遊離塩基) 、国際公開第 0 0 0 7 9 7 8 号及び国際公開第 0 1 3 6 4 2 3 号に記載されている 4 - [3 - フルオロ - 4 - プロボキシフェニル] - スピロ [2 H - 1 - ベンゾピラン - 2 , 4 ' - ピペリジン] - 1 ' - 酢酸 (F P P S B P A A の遊離塩基) 、 A L X 5 4 0 7 、ザルコシン、 5 , 5 - ジアリール - 2 - アミノ - 4 - ペンタノエート又は国際公開第 0 2 0 8 2 1 6 号に記載された化合物などの G l y T 1 特異的阻害剤並びにその内容をそれら全体で引用により組み込む国際公開第 0 5 0 4 4 8 1 0 号 A に記載されたものなどの G l y T 2 特異的阻害剤が含まれる。 G l y T 1 特異的又は G l y T 2 特異的再取り込み阻害剤を検出する方法は当技術分野において知られており、例えば、関連のある受容体 (G l y T 1 又は G l y T 2) を発現している細胞と放射性標識グリシンとを再取り込み阻害活性を試験すべき化合物及び細胞内に見出されるグリシンの量の存在下に接触させ、所与の時間後に測定する、国際公開第 0 5 0 1 8 6 7 6 号 A 又は国際公開第 0 5 0 4 4 8 1 0 号に記載された方法が挙げられる。

【 0 0 6 6 】

本明細書中で使用する用語「ノルエピネフリン - ドーパミン再取り込み阻害剤」又は「 N D R I 」は、ノルエピネフリン輸送体 (N E T) 及びドーパミン輸送体 (D A T) の作用を遮断することにより、それぞれ神経伝達物質ノルエピネフリン及びドーパミンの再取り込み阻害剤として作用する化合物を指す。これは順送りで、ノルエピネフリン及びドーパミン両方の増大した細胞外濃度及びそれ故アドレナリン作用性の及びドーパミン作動性神経伝達の増強をもたらす。本発明のコンジュゲートに使用するために適当な N D R I として、アミネプチン (サーベクター、マレオン、ジレクチン) 、ブプロピオン (ウェルプトリン、ザイバン) 、デクスメチルフェニデート (フォカリン) 、フェンカムファミン (

グルコエネルガン、レアクチバン)、フェンカミン(アルチミナ、シコクロール)、レフェタミン(サンテノール)、メチルフェニデート(リタリン、コンサータ)、ノミフェンシン(メリタール)、ピプラドロール(メレトラン)、プロリント(プロモチル、コトビット)、ピロバレロン(セントロトン、チメルギックス)、ネホパム(アキュパン)、アドハイパフォリン(Hypericum perforatum(セイヨウオトギリソウ)に見出される)、ハイパフォリン(Hypericum perforatum(セイヨウオトギリソウ)に見出される)、コカイン、デソキシピプラドロール(2-DPM P)、ジフェニルプロリノール(D2PM)、メチレンジオキシピロバレロン(MDPV)、シロバミン、マニファクシン(GW-320,659)、ラダファクシン(GW-353,162)、タメトラリン(CP-24,441)が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0067】

好ましい実施形態において、本発明のコンジュゲートは、選択的セロトニン再取り込み阻害剤(SSRI)である選択的作用剤を含有する。さらにより好ましい実施形態において、SSRIはセルトラリン又は上で定義したそれらの構造的アナログである。

【0068】

A.2. 本発明のコンジュゲートの核酸

本発明によるコンジュゲートの第2の成分は、神経伝達物質輸送体と同じ細胞で発現している標的分子に特異的に結合することができる核酸である。典型的には、本発明の核酸は、標的分子の機能を阻害することができる。したがって、標的分子がmRNAであれば、その場合該核酸(典型的にはsiRNA、shRNA又はアンチセンス核酸)はmRNAの翻訳を阻害することにより作用し、mRNAによりコードされたタンパク質のレベルの低下をもたらす。標的分子がタンパク質であれば、その場合核酸(典型的にはアプタマー)はタンパク質の活性を阻害することにより作用する。

20

【0069】

本明細書中で使用する用語「核酸」は、2つ以上デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド又はヌクレオチドアナログ分子並びに天然核酸と構造的に類似であるが、核酸骨格(例えば、天然核酸中のリン酸エステル)、核酸の糖(例えば、天然DNAのデオキシリボース及び天然RNA中のリボース)、及び核酸塩基(例えば、天然核酸中のアデノシン、シトシン、グアニン又はチミジン)の1箇所又は複数の箇所で天然核酸とは異なる分子(例えば、化学的改変により)を有するポリマーを指す。

30

【0070】

オリゴヌクレオチドは、小さい干渉RNA(siRNA)、小さいヘアピンRNA(shRNA)、マイクロRNA(miRNA)、アンチセンスオリゴヌクレオチド又はリボザイムを含む2本鎖又は一本鎖オリゴヌクレオチドであってよいが、これらに限定されない。2本鎖核酸が使用される場合、これらは標的核酸に対して相補的な第1のセンス鎖と該センス鎖に対して相補的な第2のアンチセンス鎖とを含み、それが第1鎖と第2鎖との間における塩基対形成による2本鎖DNAの形成を可能にする。

【0071】

用語「アンチセンス鎖」は、2本鎖核酸のうち標的配列に実質的に相補的な領域を含む鎖のことである。相補的な領域が標的配列に完全に相補的でない場合、ミスマッチはアンチセンス鎖の5'末端のヌクレオチド2~7の外側なら大抵許容される。

40

【0072】

本明細書中で使用する用語「センス鎖」は、dsRNAのうちアンチセンス鎖の領域に実質的に相補的な領域を含む鎖を指す。

【0073】

低分子干渉RNA(「siRNA」という用語は、RNA干渉経路を誘発する小さい阻害RNA二重鎖のことである。これらの分子は、長さが変化してもよく(一般的に18~30塩基対)、アンチセンス鎖中のそれらの標的mRNAに対する相補性の程度はさまざまである。全てではないが幾つかのsiRNAは、センス鎖及び/又はアンチセンス鎖

50

の5'又は3'末端に不對の塩基が突出している。用語「s i R N A」は、2本の別の鎖の二重鎖を含む。本明細書中で使用するs i R N A分子はR N A分子に限定されず、さらにモルホリノなど1つ又は複数の化学的に改変されたヌクレオチドを含む核酸を含む。

【0074】

本明細書中で使用する用語「s h R N A」又は「ショートヘアピンR N A」は、2つの鎖が一方の鎖の3'末端とそれぞれの他方の鎖の5'末端との連続したヌクレオチドの鎖により接続されて二重構造物を形成しているd s R N Aのことである。

【0075】

用語「マイクロR N A」又は「m i R N A」は、典型的には、遺伝子発現を調節することができる長さ約21~23ヌクレオチドの短い一本鎖のR N A分子を指す。m i R N Aは合成(即ち、組み替え)でも天然でもよい。天然m i R N AはD N Aから転写された遺伝子によりコードされ、最初の転写物(「p r i - m i R N A」)から短い幹ループ構造物(「p r e - m i R N A」)に加工されて、最後に成熟m i R N Aになる。成熟m i R N A分子は1つ又は複数のm R N A分子に部分的に相補的であり、R N A干渉と同様な過程により、又はm R N Aの翻訳を阻害することにより遺伝子発現を下方制御する。

【0076】

本明細書中で使用する「アンチセンス配列」は、標的m R N A(センス)又はD N A(アンチセンス)の配列に結合することができる一本鎖の核酸配列(R N A又はD N Aのいずれか)を含むアンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドを含む。所与のタンパク質をコードするc D N A配列に基づいてアンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドを誘導できることが、例えば、Stein and Cohen, Cancer Res. 48: 2659, (1988)及びvan der Krol et al., BioTechniques 6: 958, (1988)に記載されている。

【0077】

本明細書中で使用する、用語「リボザイム」又は「R N A酵素」又は「触媒的R N A」は、化学的反應の触媒になるR N A分子を指す。多くの天然リボザイムは、それら自体のホスホジエステル結合の1つの加水分解、又は他のR N Aの結合の加水分解のいずれかを触媒するが、それらは、リボソームのアミノトランスフェラーゼ活性、D N Aリガーゼのリガーゼ活性、及び従来のタンパク質酵素により実施される多数の他の化学的反應を触媒することも見出されている。

【0078】

本明細書中で使用する「アプタマー」は、結合が「相補的」でなくて即ち、核酸リガンドと標的核酸配列との間の塩基対形成に基づかずに、標的分子の2つ以上の部位に結合する核酸リガンドを指す。ポリペプチドを含む任意の構想し得る標的に結合するアプタマーを設計することができる。アプタマーはそれらが一般的に使用される生体分子、抗体に匹敵する分子認識の性質を提供するので、バイオテクノロジー及び治療用途のための効用を提供する。それらの選択的認識に加えて、アプタマーは、それらは完全に試験管中で操作することができて、化学的合成により容易に製造され、望ましい貯蔵性を有し、治療に應用して免疫原性をほとんど又は全く誘発しないので、抗体に勝る利点を提供する。アプタマーはインビトロで分配、選択及び増幅の繰り返しという、「S E L E X」(S y s t e m a t i c E v o l u t i o n o f L i g a n d s b y E x p o n e n t i a l E n r i c h m e n t)(Shamah et al, Acc. Chem. Res. 2008, 41 pp. 130-8)として当技術の段階で知られている方法により合成することができる。あるいは、それらは、例えば、逐次固相法により合成することができる。

【0079】

本発明の核酸は、核酸塩基、糖類及び/又はヌクレオチド間の連結中に1つ又は複数の改変を含むことができる。

【0080】

核酸の1つ又は複数の骨格残基に対する改変は、以下の1つ又は複数を含むことができ

10

20

30

40

50

る：2'-O-メチル(2'-OMe)、2'-O-メトキシエチル(2'-MOE)、2'-O-メトキシエトキシ、2'-フルオロ(2'-F)、2'-アリル、2'-O-[2-(メチルアミノ)-2-オキソエチル]、2'-O-(N-メチルカルバメート)などの2'糖改変；4'-チオ、4'-CH₂-O-2'-架橋、4-(CH₂)₂-O-2'-架橋を含む4'糖改変；ロックド核酸(LNA)；ペプチド核酸(PNA)；インターカレーティング核酸(INA)；捻りインターカレーティング核酸(TINA)；ヘキシトール核酸(HNA)；アラビノ核酸(ANA)；シクロヘキサン核酸(CNA)；シクロヘキセニル核酸(CeNA)；トレオシル核酸(TNA)；モルホリノオリゴヌクレオチド；ギャップマー；ミックスマー；組み込みアルギニンリッチペプチド；合成RNAに5'-ホスフェートの付加；RNAアプタマー(Que-Gewirth NS, Gene Ther. 2007 Feb; 14(4): 283-91.)；特異的RNAアプタマーを対象に対する解毒剤で調節したRNAアプタマー(Oney S, Oligonucleotides. 2007 Fall; 17(3): 265-74.を参照されたい)又は任意のそれらの組合せである。

【0081】

核酸の1つ又は複数ヌクレオシド間連結に対する改変は、以下の1つ又は複数を含むことができる：ホスホロチオネート、ホスホロアミデート、ホスホロジアミデート、ホスホロジチオネート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオネート及びホスホロアニリデート、又は任意のそれらの組合せである。

【0082】

しばしば隔離RNAと称されるロックド核酸(LNA)は、改変されたRNAヌクレオチドである。LNAヌクレオチドのリボース部分は2'炭素と4'炭素とを接続するエキストラ架橋(O2', C4'-メチレン架橋)で改変されている。架橋はDNA又はRNAでしばしば見出される3'エンド構造配座でリボースを「ロック」する。LNAヌクレオチドは、望めばいつでも核酸中のDNA又はRNA塩基と混合することができる。そのようなオリゴマーは市販されている。ロックドリボースの配座は塩基のスタッキング及び骨格の前組織化を強化する。これは、LNA-改変核酸の熱的安定性(溶融温度)及びハイブリッド形成親和性だけでなく改善されたミスマッチ識別能力を大きく向上させる。これらの性質によりそれらはアンチセンスに基づく技法にとって非常に有用になる。さらに、LNA抗miRオリゴヌクレオチドは、霊長類で試験して有望な結果及び低毒性が得られている。

【0083】

ペプチド核酸(PNA)はDNA又はRNAと同様な人工的に合成されたポリマーであり、生物学の研究及び医学的治療において使用される。PNAが天然に生ずることは知られていない。DNA及びRNAはそれぞれデオキシリボース及びリボース糖骨格を有するのに対して、PNAの骨格はペプチド結合によって連結した反復するN-(2-アミノエチル)-グリシンユニットで構成されている。種々のプリン及びピリミジン塩基は、メチレンカルボニル結合により骨格に連結している。PNAは、N末端が第1の(左)位置にあり、C末端が右にあるペプチドのように描かれる。PNAの骨格は無荷電のホスフェート基を含有するので、PNA/DNA鎖間の結合は静電的反発の欠如によりDNA/DNA鎖より強い。混合塩基PNA分子は塩基対認識に関してDNA分子の真の模倣体である。PNA/PNA結合はPNA/DNA結合より強い。

【0084】

インターカレーティング核酸(INA)は、疎水性挿入部に共有結合で連結した正常デオキシリボヌクレオチドを含む改変された核酸類似体である。INAは、各改変について相補的DNAに対する11度まで安定化した高い親和性を有する。INAは、ミスマッチした標的を超えて完全に合致した標的に対して正常DNAより高い特異性を有する。INAがDNAに対して高い親和性を有することを利用してより短いプローブを使用することが可能となり、それによりさらになお特異性が増強される。さらに、INAはDNAとRNAとの間を識別する独特の能力を有するDNA選択的オリゴヌクレオチド類似体である

。I N Aは相補的D N Aに対して高い親和性を有するのに、相補的I N Aの相補的配列に対する親和性はより低い。捻りインターカレーティング核酸はT I N Aと表示される。

【 0 0 8 5 】

ヘキシトール核酸 (H N A) は、天然核酸塩基及びリン酸化された 1 , 5 - アンヒドロヘキシトール骨格から構築されたオリゴヌクレオチドである。H N A と R N A の間の分子の会合はH N A とD N A との間及び天然核酸間 (d s D N A 、 d s R N A 、 D N A / R N A) より安定である。他の合成的に改変されたオリゴヌクレオチドは、A N A (アラビノ核酸) 、C N A (シクロヘキサヌ核酸) 、C e N A (シクロヘキセニル核酸) 及びT N A (トレオシル核酸) を含む。

【 0 0 8 6 】

モルホリノは、天然核酸構造物の再設計の産物である合成分子である。構造的に、モルホリノとD N A 又はR N A との相違は、モルホリノは標準的核酸塩基を有するが、これらの塩基がデオキシリボース/リボース環ではなくて6員モルホリン環に結合しており且つ非イオン性ホスホロジアミデートのサブユニット間連結がアニオン性ホスホジエステル連結を置き換えていることである。モルホリノはP M O (ホスホロジアミデートモルホリノオリゴヌクレオチド) と称される場合もある。6員モルホリン環の化学式はO - (C H ₂ - C H ₂) ₂ - N H である。

【 0 0 8 7 】

ギャップマー又は「ギャップ付きオリゴマー化合物」は、D N A の窓又は「ギャップ」がさもなければ正常な又は「ウィング (W i n g) 」として知られる改変されたR N A オリゴヌクレオチド中に挿入されたR N A - D N A - R N A キメラオリゴヌクレオチドプローブである。この改変は、インピボにおけるオリゴヌクレオチド安定性及びプローブと標的との相互作用の結合力を向上させ、その結果、より短いプローブを効果的に使用することができる。好ましくは、ウィングは、ヌクレアーゼ分解から内部の単位を保護する、2' - O - メチル (O M e) 又は2' - O - メトキシエチル (M O E) で改変されたりボヌクレオチドである。さらに、ギャップ又はウィングを形成するヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により又はホスホロチオネート結合により接続することができ、したがってR N アーゼ分解に抵抗性になる。それに加えて、ウィングを形成するヌクレオチドは3'メチルホスホネート連結により接続された塩基を組み込むことにより改変することもできる。

【 0 0 8 8 】

本発明のコンジュゲートの核酸は、神経伝達物質輸送体と同じ細胞中で発現している標的分子に特異的に結合することができる。核酸の標的分子への結合は、標的分子が核酸の配列に相補的である配列を含有する核酸である場合に、ワトソン - クリック相互作用により起こり得る。あるいは、標的分子がポリペプチドである場合に、本発明のコンジュゲートの核酸は、前記分子と相互作用することもでき、その場合核酸はアプタマーとして作用する。

【 0 0 8 9 】

本発明のコンジュゲートの一部を形成する核酸が、標的m R N A の核酸配列に相補的である場合、最も適切な核酸を選択するために異なった基準が当業者に利用可能である。例として、コンジュゲートの一部を形成する核酸がs i R N A である場合、これは、A A ジヌクレオチドに対する標的のm R N A 配列を走査して、A A の直ぐ下流の19個のヌクレオチドを記録することにより選択することができる。他の方法も核酸標的を選択するために使用することができる。1例において、s i R N A 標的配列の選択は、標的配列がG G で開始して、B L A S Tサーチにより解析された他の遺伝子と有意の配列相同性を共有しない限り、純粋に経験的に決定される (例えば、S u i G e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 99 : 5515 - 20 (2002) を参照されたい) 。他の例において、より精巧な方法がs i R N A 標的配列を選択するために使用される。この手順は、内在m R N A 中の接近可能な任意の部位が合成オリゴデオキシリボヌクレオチド / R N アーゼH法により分解するために標的となり得る (例えば、L e e N S

10

20

30

40

50

et al., Nature Biotechnol. 20:500-05 (2002)を参照されたい)という観察を活用する。

【0090】

あるいは、ヘアピン*siRNA*発現カセットは、標的のセンス鎖に続いて短いスパーサー、標的のアンチセンス鎖、及び転写ターミネーターとして5～6個のTを含むように構築される。*siRNA*発現構築物中におけるセンス鎖及びアンチセンス鎖の順は、ヘアピン*siRNA*の遺伝子サイレンシング活性に悪影響を及ぼさずに変更することができる。ある場合には、順序の逆転は遺伝子サイレンシング活性の部分的低下の原因となり得る。

【0091】

*siRNA*発現カセットの幹として使用されるヌクレオチド配列の長さは、例えば、19から29の範囲にすることができる。ループサイズは3から23ヌクレオチドの範囲にすることができる。他の長さ及び/又はループサイズも使用することができる。

【0092】

さらに他の実施形態において、ヘアピン*siRNA*が遺伝子サイレンシングにおいて機能する限り、ヘアピン*siRNA*構築物中の5'突出を使用することができる。特定の1例において、5'突出は約6ヌクレオチド残基を含む。

【0093】

さらなる他の実施形態において、RNAiに対する標的配列は21塩基長の配列フラグメントである。標的配列の5'末端はジヌクレオチド「NA」を有し、「N」は任意の塩基であってよく「A」はアデニンを表す。残余の19塩基長の配列は35%と55%の間のGC含有率を有する。それに加えて、残余の19塩基長配列には、いかなる4つ連続したA又はT(即ち、AAAA又はTTTT)も、3つ連続したG又はC(即ち、GGG又はCCC)も、又は連続して7つの「GC」もない。

【0094】

追加の基準もRNAiの標的配列を選択するために使用することができる。例えば、残余の19塩基長配列のGC含有率は45%と55%の間に制限することができる。さらに、3つ連続した同一の塩基(即ち、GGG、CCC、TTT、又はAAA)又は5個以上の塩基の回文配列を有するいかなる19塩基長配列も排除される。さらに、残余の19塩基長配列は、他の遺伝子に対する相同性の低い配列でも選択することができる。1つの特定の例において、可能性がある標的配列をNCBIのヒトUniGene cluster 配列データベースに対するBLASTNにより検索することができる。ヒトUniGene データベースには遺伝子指向の集団の余剰のないセットが含まれる。各UniGene cluster には一意的な遺伝子を表す配列が含まれる。BLASTN検索で他のヒト遺伝子にヒットしない19塩基長配列を選択することができる。検索中に、e-値を厳密な値(「1」など)に設定することができる。

【0095】

*siRNA*配列、並びに本発明にしたがって誘導された任意の他のRNAi配列の、標的遺伝子のサイレンシング発現における有効性は、当技術分野において知られている種々の方法を使用して評価することができる。

【0096】

用語「サイレンス」及び「の発現を阻害する」「の発現の下方制御」「の発現を抑制する」等は、それらが標的遺伝子を指す限りにおいて、本明細書においては、標的遺伝子が転写されて標的遺伝子の発現が阻害されるように処理された第1の細胞又は細胞群から単離することができる標的mRNAの量が、第1の細胞又は細胞群と実質的に同一であるがそのように処理されていない第2の細胞又は細胞群(対照細胞)と比較して減少することにより証明されるような、標的遺伝子の発現の少なくとも部分的抑制を指す。阻害の程度は通常以下のことにに関して表す：

(対照細胞中のmRNA) - (処理された細胞中のmRNA) * 100パーセント
(対照細胞中のmRNA)

【0097】

あるいは、阻害の程度は、標的遺伝子発現に機能的に関連するパラメーター、例えば、標的遺伝子によりコードされるタンパク質の量又はある表現型を示す細胞の数の減少によって示すこともできる。原則として、標的ゲノムサイレンシングは、標的を発現する任意の細胞において、構成要素により又はゲノムの操作により、及び任意の適当なアッセイによりのいずれかで測定することができる。しかしながら、所与の核酸がある程度標的遺伝子の発現を阻害するか、それ故本発明に含まれるかを決定するために参照が必要な場合に、下の例で提供するアッセイ及び当技術分野において知られているアッセイがそのような参照として役立つであろう。例えば、ある例では、二重螺旋オリゴヌクレオチドの投与により、標的遺伝子の発現は、少なくとも約 5 パーセント、10 パーセント、15 パーセント、20 パーセント、25 パーセント、30 パーセント、35 パーセント、40 パーセント、45 パーセント、又は 50 パーセント抑制される。幾つかの実施形態において、二重鎖オリゴヌクレオチドの投与により、標的遺伝子は、少なくとも約 60 パーセント、70 パーセント、又は 80 パーセント抑制される。幾つかの実施形態において、二重螺旋オリゴヌクレオチドの投与により、標的遺伝子は、少なくとも約 85 パーセント、90 パーセント、又は 95 パーセント抑制される。

10

【0098】

例えば、本発明による核酸配列は、標的遺伝子を発現している細胞中に導入することができる。細胞中における標的遺伝子の mRNA レベルは、RT-PCR、ノーザンブロット又は任意の他の標準的方法を使用することにより検出することができる。あるいは、標的 mRNA によりコードされたポリペプチドのレベルを、ウェスタンブロット、ELISA 又は任意の他の免疫学的又は非免疫学的方法を使用して測定することができる。siRNA 配列の導入後の、遺伝子によりコードされた mRNA 又は標的タンパク質の発現レベルにおける実質的变化は、標的遺伝子の発現の抑制における siRNA 配列の有効性を示す。1つの特定の例においては、他の遺伝子の発現レベルも siRNA 配列導入の前及び後にモニターする。標的遺伝子発現の対する阻害効果を有するが他の遺伝子の発現には有意に影響しない siRNA 配列を選択することができる。他の特異的例において、複数の siRNA 又は他の RNAi 配列を同じ標的細胞中に導入することができる。これらの siRNA 又は RNAi 配列は、標的遺伝子発現を特異的に阻害するが、他の遺伝子の発現は阻害しない。さらに他の特定の例においては、標的遺伝子及び他の遺伝子（単数又は複数）の発現を阻害することができる siRNA 又は他の RNAi 配列を使用することができる。

20

30

【0099】

当業者は、本発明のコンジュゲート中に組み込まれる核酸分子の特異的選択がコンジュゲートに存在する選択的作用剤のタイプに依存するであろうということを理解するであろう。したがって、核酸は、選択的作用剤が特異的に結合する神経伝達物質輸送体を発現する細胞中で発現している標的分子に対して特異的であろう。

【0100】

好ましい実施形態において、核酸は、セロトニン受容体 1A 型（5-HT_{1A}）に対して特異的である。核酸がアンチセンス、siRNA、shRNA 又はリボザイムである場合で、標的分子がセロトニン受容体 1A 型（5-HT_{1A}）をコードする mRNA である場合には、核酸は標的分子と塩基対を形成することにより作用する。核酸がアプタマーであれば、標的分子はセロトニン受容体 1A 型（5-HT_{1A}）ポリペプチドである。

40

【0101】

本明細書中で使用する用語「1A 型セロトニン受容体」又は「5-HT_{1A}R」は、セロトニン作動性のニューロンのシナプス前部で主に見出されるセロトニン受容体のタイプを指す。これらの受容体は、細胞外セロトニンにより活性化して細胞発火活性を減少させ、順送り、主要な前脳領域におけるセロトニン放出を減少させる。この負のフィードバックによって、抗鬱剤により急性の誘発を起こすことができるシナプスセロトニンの増加は制限される。時が経つにつれて、細胞体樹状突起の自己受容体は感度が下がり、SSRI の最大限の効果が前脳部で発揮されることが可能になる。この期間が抗鬱活性の発症ま

50

での潜伏期に相当することが見出されている [P e r e z , V . , e t a l . , T h e L a n c e t , 1 9 9 7 , 3 4 9 : 1 5 9 4 - 1 5 9 7]。したがって、セロトニン 1 A 型受容体が不活性化された細胞においては、セロトニン輸送体における遮断の結果として細胞外セロトニンの増加は細胞発火活性の減少に結びつかず、したがって、セロトニン再取り込みの阻害剤による処理と関連する負のフィードバックを防止する。

【 0 1 0 2 】

本発明のコンジュゲートの核酸により標的とされ得る 1 A 型セロトニン受容体は、配列が S w i s s P r o t データベースにおいて受入番号 P 0 8 9 0 8 を与えられているヒト 5 - H T _{1 A} R、配列が S w i s s P r o t データベースにおいて受入番号 Q 6 4 2 6 4 を与えられているマウス 5 - H T _{1 A} R、配列が S w i s s P r o t データベースにおいて受入番号 P 1 9 3 2 7 を与えられているラット 5 - H T _{1 A} R、配列が S w i s s P r o t データベースにおいて受入番号 Q 6 X X X 9 を与えられているイヌ 5 - H T _{1 A} R を含むが、これらに限定されない任意の 1 A 型セロトニン受容体であってよい。

10

【 0 1 0 3 】

当業者は、5 - H T _{1 A} R をコードする m R N A に対して特異的な本発明の核酸は、上記の方法のいずれかを使用して選択することができ、且つ対応する m R N A のレベルの実質的低下を誘発する能力を試験することができることを理解するであろう。本発明者らは、本発明の核酸により優先的に標的とされ得る 5 - H T _{1 A} R m R N A の配列内の領域を同定した。これらの領域は、コード領域内の翻訳コンプレックスとの可能な干渉を避けるための、異なった種の間で高度に保存されている領域又は最初の転写物の非コード領域

20

【 0 1 0 4 】

したがって、好ましい実施形態において、核酸配列は、マウス 5 - H T _{1 A} R m R N A (N C B I データベースにおける受入番号 N M _ 0 0 8 3 0 8 の配列) 内のヌクレオチドの 6 2 1 から 1 6 4 0 に又はヌクレオチドの 1 8 8 0 から 2 4 0 0 に又は他の種の 5 - H T _{1 A} R の c D N A における対応する領域に対応する領域に相補的である。前記の対応する領域は、前記 c D N A のマウス 5 - H T _{1 A} R の c D N A との対における配列比較により又は異なった 5 - H T _{1 A} R の c D N A の複数の配列比較及びマウス 5 - H T _{1 A} R の c D N A 中の選択された領域と重なる前記の他の c D N A 中の領域の同定により決定することができる。

30

【 0 1 0 5 】

2 つの所与の核酸配列を対で配列比較する方法は、当業者に広く知られており、B L A S T N タイプの標準的アルゴリズム [B L A S T M a n u a l , A l t s c h u l , S . , e t a l . , N C B I N L M N I H B e t h e s d a , M d . 2 0 8 9 4 , A l t s c h u l , S . , e t a l . , J . M o l . B i o l . 2 1 5 : 4 0 3 - 4 1 0 (1 9 9 0)] により初期パラメーターを使用して実施することができる。複数の核酸配列を配列比較する方法は、C L U S T A L W タイプの標準的アルゴリズム (T h o m p s o n J D e t a l , N u c l e i c A c i d s R e s , 1 9 9 4 , 2 2 : 4 6 7 3 - 4 6 8 0) を使用し、初期パラメーターを使用して実施することができる。異なった種における 5 - H T _{1 A} R の c D N A の領域が同定されたら、本発明のコンジュゲート

コンジュゲートの核酸中に組み込むことができる適当な核酸配列を同定することが可能である。好ましい実施形態において、本発明のコンジュゲートは、5 - H T _{1 A} R m R N A 中の配列番号：1 (マウス 5 - H T _{1 A} R m R N A のヌクレオチド 1 8 4 1 から 1 9 1 0)、配列番号：2 (マウス 5 - H T _{1 A} R m R N A のヌクレオチド 5 9 1 から 7 0 0)、配列番号：3 (マウス 5 - H T _{1 A} R m R N A のヌクレオチド 8 3 1 から 9 4 0) 及び配列番号：4 (マウス 5 - H T _{1 A} R m R N A のヌクレオチド 2 1 2 0 から 4 4 4 1) の群から選択された領域を標的とする配列を含む核酸配列を含む。

40

【 0 1 0 6 】

さらにより好ましい実施形態において、本発明のコンジュゲートの核酸は、配列番号 5、配列番号 7、配列番号：9、及び配列番号：11 (表 2 参照) の群から選択される配列

50

を含む。

【0107】

核酸が二重螺旋核酸として（例えば *siRNA* として）提供される場合には、オリゴヌクレオチドを、配列番号6、配列番号8、配列番号：10、及び配列番号：12（表2参照）で提供される対応するアンチセンス鎖と一致させる。

【0108】

他の実施形態において、本発明の核酸は、セロトニン輸送体をコードする *mRNA*（この場合、核酸は標的と塩基対形成により作用する）を、又はセロトニン輸送体自体（この場合、直接結合してポリペプチド活性を阻害することによりアプタマーとして作用する）を指向する。

【0109】

本明細書中で使用する用語「セロトニン輸送体」又は「*SERT*」は、神経伝達物質セロトニンをシナプス空間からシナプス前部のニューロン中に輸送する内在性膜タンパク質であるポリペプチドを指す。ヒト、ラット、マウス及びウシの配列 *SERT* は、*SwissProt* データベースにおいてそれぞれ受入番号 P31645、P31652、Q60857 及び Q9XT49 で提供される。5-HT_{1A}R の *cDNA* を標的とする核酸によるのと同様に、*SERT* の *cDNA* 中の任意の領域は、それが対応する *mRNA* 又は前記 *mRNA* によりコードされるタンパク質のレベルで実質的阻害を生ずる限り、標的とすることができる。したがって、適当な *SERT* 特異的核酸は、上記のように試験すべき核酸と接触した後 *SERT* を発現している細胞中の *SERT mRNA* 又は *SERT* タンパク質のレベルを測定することにより同定することができる。

【0110】

例として、*Mol. Psychiatry*, 2005 Aug; 10(8): 782-9, 714 及び *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 2006; 26: 527-47 に記載された *SERT* 特異的 *siRNA* を使用することができる。さらにより好ましい実施形態において、*SERT* 特異的 *siRNA* は、配列

【化2】

5' CUCCUGGAACACUGGCAACdTdT 3' (SEQ ID NO:13) (配列番号13)

を含有する。

【0111】

さらに他の実施形態において、*SERT* 特異的 *siRNA* は、表X中に記載した配列を含む。

【表2】

RNAオリゴヌクレオチド同定	配列(5' - 3' 方向)	配列番号
siRNA-A-s (sense)	GCUAGCUACAACAAGUUCATT	14
siRNA-A-a (antisense)	UGAACUUGUUGUAGCUAGCTT	15 15

【0112】

シナプス前部の 5-HT_{1A} の他に、*TREK-1* 又は *GIRK* など 5-HT_{1A} 作用の下流の幾つかのイオンチャンネルを調節することにより、5-HT_{1A} 作用を調節することも可能である。これらのチャンネルはカリウムの大きい内向き流速を生じさせることによって膜を過分極させることによりニューロン活性を調節する。膜電位におけるこの変化は、ニューロン発火を阻害する。*TREK-1* 又は *GIRK* の受容体活性化作用はニューロン活性を増強することが提案されている。これは末端において高レベルのセロトニンの存在でシナプス前部の 5-HT_{1A} 阻害効果を乱すであろう。

【0113】

他の実施形態において、本発明の核酸は、5-HT_{1A}作用の下流で作用するイオンチャンネルをコードするmRNA（この場合核酸は標的と塩基対を形成することにより作用する）又は5-HT_{1A}自体の下流で作用するイオンチャンネル（この場合核酸は、直接結合してポリペプチドの活性を阻害することによりアプタマーとして作用する）を指向する。これらのチャンネルは、カリウムの大きい内向き流速を生じさせることによって膜を過分極させることによりニューロン活性を調節する。膜電位における変化はニューロン発火を阻害する。これは末端において高レベルのセロトニンの存在でシナプス前部の5-HT_{1A}の阻害効果を乱すであろう。好ましい実施形態において、5-HT_{1A}の下流で作用するイオンチャンネルはTREK-1又はGIRKである。

10

【0114】

本明細書中で使用する用語「TREK-1」は、KCNK2、TREK、TPKC1、K2p2.1、TREK1、hTREK-1c、hTREK-1e、MGC126742、MGC126744及びKCNK2としても知られるポリペプチドを指し、2孔ドメインであるKCNK2は、細胞からカリウムを漏らして静止膜電位を制御するチャンネルを創り出す2つのホモダイマーにより形成されるカリウムチャンネルの背景となる。しかしながら該チャンネルは、ある種の麻酔剤、膜の伸張、細胞内アシドーシス、及び熱により開くことができる。ヒトにおいては、TREK遺伝子の代替的スプライシングから生ずるもので、NCBIデータベースにおいて受入番号NP_001017424.1、NP_001017425.2及びNP_055032.1で提供される3種のイソ型がある。TREK-1のイヌ(*Canis familiaris*)、チンパンジー(*Pan troglodytes*)、ウシ(*Bos taurus*)、ラット(*Rattus norvegicus*)及びマウス(*Mus musculus*)オルソログが、NCBIタンパク質データベースにおいて、それぞれ受入番号XP_849278、XP_001171677、NP_777111、NP_742038及びNP_034737で提供される。5-HT_{1A}RのcDNAを標的とする核酸についてと同様に、TREK-1のcDNA中の任意の領域は、対応するmRNA又は前記mRNAによりコードされるタンパク質のレベルにおいて実質的阻害を生ずる限り、標的とすることができる。したがって、適当なTREK-1特異的核酸は、上記のように前記細胞を試験すべき核酸と接触させた後にTREK-1を発現している細胞中のTREK-1 mRNA又はTREK-1タンパク質のレベルを測定することにより同定することができる。

20

30

【0115】

本発明のコンジュゲートにおいて使用することができるTREK-1特異的siRNAとして、Santa Cruz Biotechnologyにより提供されるsc-37180 siRNA、及び米国特許出願第2009317811号に記載されたアンチセンス分子が含まれるが、これらに限定されない。

【0116】

本明細書中で使用するGタンパク質のカップリングした内向き整流カリウムチャンネル、GIRK又はKir3.xという用語は、リガンドで刺激されたGタンパク質結合受容体(GPCR)で開始するシグナル伝達カスケードにより活性化される（開口する）内向き整流カリウムイオンチャンネルのファミリーの任意のメンバーを指す。GPCRは、順送りで不活性なヘテロトリマーのGタンパク質コンプレックス(G)から活性化したG-タンパク質 サブユニット(G)を放出する。最後にG ダイマーのタンパク質はGIRKチャンネルと相互作用してそれらを開口させ、その結果それらはカリウムイオンに透過性となり、細胞の過分極を生ずる。Gタンパク質のサブユニットによりGIRKチャンネルがこのように直接活性化されるので、Gタンパク質がカップリングした内向き整流カリウムチャンネルは、1種のGタンパク質ゲート制御イオンチャンネルである。

40

【0117】

適当なGIRKとして、例えば、NCBI遺伝子データベースにおいて受入番号U39196で同定されている核酸に対応するヒトGIRK1又はGIRKdとして知られるそ

50

これらの脳変種などのメンバー3 (GIRK1又はKir3.1としても知られる)、例えば、NCBI遺伝子データベースにおいて受入番号U24660で同定されている核酸に対応するヒトGIRK2などのメンバー6 (GIRK2又はKir3.2としても知られる)、例えば、NCBI遺伝子データベースにおいて受入番号U52152で同定される核酸に対応するヒトGIRK3などのメンバー9 (GIRK3又はKir3.3としても知られる)、例えばNCBI遺伝子データベースにおいて受入番号U39195で同定される核酸に対応するヒトGIRK4などのメンバー5 (GIRK4又はKir3.4としても知られる)、例えばNCBI遺伝子データベースにおいて受入番号U24055で同定される核酸に対応するヒトIRK1などのメンバー2 (IRK1又はKir2.1としても知られる)及び例えばNCBI遺伝子データベースにおいて受入番号U07364で同定される核酸に対応するヒトIRK3などのメンバー4 (IRK3又はKir2.3としても知られる)を含むJサブファミリーの全てのメンバーが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0118】

GIRKを標的とすることができる適当な核酸として、例えば、国際公開第2005054848号に記載されたりボザイム、アンチセンス分子が挙げられる。

【0119】

5-HT_{1A}R mRNA若しくは5-HT_{1A}Rタンパク質、SERT mRNA若しくはタンパク質、TREK-1 mRNA若しくはタンパク質又はGIRK mRNA若しくはタンパク質を標的とするこれらの核酸は、5-HT_{1A}R、SERT、TREK-1又はGIRKが発現している細胞、即ち、ドーパミン作動性ニューロン中に存在する神経伝達物質輸送体と結合することができる選択的作用剤とカップリングすることが好ましい。したがって、本発明のコンジュゲートとして、非選択的セロトニン輸送体(SRI又はSNRIなど)又は、より好ましくは選択的セロトニン再取り込み阻害剤(SSRI)であってよいセロトニン輸送体と結合することができる選択的作用剤とカップリングした5-HT_{1A}R特異的核酸、SERT特異的核酸、TREK-1特異的核酸又はGIRK特異的核酸が挙げられる。

20

【0120】

他の実施形態において、本発明のコンジュゲートの一部を形成する核酸はシヌクレインを指向する。

30

【0121】

本明細書中で使用する用語「シヌクレイン」は、ある種の神経疾患、例えばパーキンソン病、アルツハイマー病及びレヴィー小体病などで現れるレヴィー小体として知られる細胞内凝集物を形成し得る交換可能なアポリポタンパク質のクラスA2脂質に結合したドメインと類似性のある高度に保存された -ヘリカル脂質結合モチーフを含むシヌクレインメンバーファミリーのポリペプチドを指す。用語「シヌクレイン」は、 -シヌクレイン、 -シヌクレイン又は -シヌクレインを指す。好ましい実施形態において、本発明のコンジュゲートの一部を形成する核酸は -シヌクレインに特異的である。

【0122】

ヒト、ラット、マウス及びウシの -シヌクレインの配列は、SwissProtデータベースにおいてそれぞれ受入番号P37840、P37377、O55042及びQ3T0G8で提供される。5-HT_{1A}RのcDNAを標的とする核酸でと同様に、 -シヌクレイン特異的核酸は、上記の任意の方法を使用して、同定し又は選択することができ、対応するmRNA又は前記mRNAによりコードされるタンパク質のレベルで実質的阻害を誘発するそれらの能力について試験することができる。したがって、適当な -シヌクレイン特異的核酸は、上記のように、前記細胞を試験すべき核酸と接触させた後で -シヌクレインを発現している細胞中の -シヌクレイン mRNA又は -シヌクレインタンパク質のレベルを測定することにより同定することができる。

40

【0123】

好ましい実施形態において、 -シヌクレイン特異的核酸はヒト -シヌクレインのc

50

D N A の領域に対して指向する。他の実施形態において、本発明の核酸は、5 - H T ₁ A 作用の下流で作用するイオンチャンネルをコードする m R N A を指向するか（この場合核酸は標的と塩基対形成することにより作用する）又は 5 - H T ₁ A 自体の下流で作用するイオンチャンネルを指向する（この場合、核酸は、直接結合してポリペプチドの活性を阻害することによりアプタマーとして作用する）。これらのチャンネルは、カリウムの大きい内向き流速を生ずることにより膜を過分極することによってニューロン活性を調節する。膜電位におけるこの変化はニューロン発火を阻害する。これは、高レベルのセロトニンの存在において末端でシナプス前部の 5 - H T ₁ A 阻害効果を乱すであろう。好ましい実施形態において、5 - H T ₁ A の下流で作用するイオンチャンネルは T R E K - 1 である。

10

【 0 1 2 4 】

- シヌクレイン m R N A 内の適当な標的領域として、国際公開第 0 7 1 3 5 4 2 6 号に記載されたもの（例えば核酸、及び特に、国際公開第 2 0 0 6 0 3 9 2 5 3 号に記載された s i R N A の群から選択された配列、例えば、

【 化 3 】

5'-GGAAAGACAAAAGAGGUGdTdT-3'	SEQ ID NO:16 （配列番号16）
5'-GGAAAGACAAAAGAGGUGdTdT-3'	SEQ ID NO:17 （配列番号17）
5'-GGAGGAUUUUAGAAGAGGdTdT-3'	SEQ ID NO:18 （配列番号18）
5'-UGUUGGAGGAGCAGUGGUGdTdT-3'	SEQ ID NO:19 （配列番号19）
5'-GGACCAGUUGGGCAAGAAUdTdT-3'	SEQ ID NO:20 （配列番号20）

20

などを含む s i R N A 又は配列番号：2 1 及び 2 2 にそれぞれ対応する配列

【 化 4 】

5'-GATCCCCGGACCAGTTGGGCAAGAATT**TCAAGAGA**ATTCTTGCCAACTGGTCCTTTTGGAAA-3'

および

5'-CTAGTTTCCAAAAAGGACCAGTTGGGCAAGAATT**CTCTTGAA**ATTCTTGCCCAACTGGTCCGGG-3'

30

を有するヘアピンオリゴヌクレオチド）が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 1 2 5 】

他のシヌクレイン特異的 s i R N A 配列は、米国特許出願第 2 0 0 8 1 3 9 7 9 9 号に記載されたもの（内容を引用により本明細書に組み込む実施例 X V I I に描かれた配列）及び国際公開第 2 0 0 9 0 7 9 3 9 9 号に記載され、

【化 5】

5'-GGUGUGGCAACAGUGGCUGAG-3'	SEQ ID NO:23 (配列番号23)	
5'-AACAGUGGCUGAGAAGACCAA-3'	SEQ ID NO:24 (配列番号24)	
5'-AUUGCAGCAGCCACUGGCUUU-3'	SEQ ID NO:25 (配列番号25)	
5'-AAGUGACAAUGUUGGAGGAG-3'	SEQ ID NO:26 (配列番号26)	
5'-GAAGAAGGAGCCCCACAGGAA-3'	SEQ ID NO:27 (配列番号27)	
5'-CGGGUGUGACAGCAGUAGCdTdT-3'	SEQ ID NO:28 (配列番号28)	
5'-UCCUGACAAUGAGGCUUAUdTdT-3'	SEQ ID NO:29 (配列番号29)	10
5'-U*CCUGACAAUGAGGCUUAUdT*dT-3'	SEQ ID NO:30 (配列番号30)	
5'-CUACGAACCUGAAGCCUAAdTdT-3'	SEQ ID NO:31 (配列番号31)	
5'-C*UACGAACCUGAAGCCUAAdT*dT-3'	SEQ ID NO:32 (配列番号32)	
5'-C*UACGAACCUGAAGCCUAAdT*dT-3'	SEQ ID NO:33 (配列番号33)	
5'-CUAUUGUAGAGUGGUCUAUdTdT-3'	SEQ ID NO:34 (配列番号34)	
5'-C*UAUGAGCCUGAAGC*UAAT*T-3'	SEQ ID NO:35 (配列番号35)	
5'-C*UAUGAGCCUGAAGCCUAAT*T-3'	SEQ ID NO:36 (配列番号36)	20

(表中 * はホスホロチオエート連結基を示し、下線を引いたヌクレオチドは 2' - O - M e 改変を示す)

の群から選択された s i R N A 配列である。

【 0 1 2 6 】

これらは、シヌクレインが発現している細胞中に存在する神経伝達物質輸送体に結合する選択的作用剤とカップリングしていることが好ましい。したがって、本発明のコンジュゲートは、モノアミン作動性ニューロン中への内部移行を媒介することができる選択的作用剤とカップリングしているシヌクレイン特異的核酸を含む。したがって、シヌクレイン m R N A 又はタンパク質を標的とする核酸は、前記核酸のセロトニン作動性でノルアドレナリン作動性で且つノルアドレナリン作動性のニューロン中への内部移行を促進することができる作用剤とカップリングされる。したがって、好ましい実施形態において、シヌクレイン特異的核酸は、ドーパミン再取り込み阻害剤 (D R I)、ノルエピネフリン - ドーパミン再取り込み阻害剤 (N D R I) (S N D R I 又はトリプルブロッカー) の群から選択される、セロトニン作動性でノルアドレナリン作動性で且つドーパミン作動性のニューロンに対する選択的作用剤とカップリングされる。

【 0 1 2 7 】

他の実施形態において、本発明のコンジュゲートの一部を形成する核酸は一酸化窒素合成酵素 (N O S) を指向する。

【 0 1 2 8 】

本明細書中で使用する「一酸化窒素合成酵素」又は「 N O S 」は、インビボで一酸化窒素の合成を触媒する天然に生ずる酵素を意味する。一酸化窒素 (N O) は、一酸化窒素合成酵素 (N O S) と称する酵素のファミリーにより L - アルギニンのグアニジノ基から合成される。該用語は生体系に見出される一酸化窒素合成酵素 (N O S) の全てのイソ型に適用され、 N O S の常在型、内皮の一酸化窒素合成酵素 (e N O S)、ニューロンの一酸化窒素合成酵素 (n N O S)、及び誘導性一酸化窒素合成酵素 (i N O S) を含むが、これらに限定されない。

【 0 1 2 9 】

ヒト、ラット、マウス、イヌ及びウシの i N O S の配列は、 S w i s s P r o t データベースにおいてそれぞれ受入番号 P 3 5 2 2 8、Q 0 6 5 1 8、P 2 9 4 7 7、O 6 2 6

10

30

40

50

99及びQ27995で提供される。ヒト、ラット、マウス及びウシのeNOSの配列は、SwissProtデータベースにおいてそれぞれ受入番号P29474、Q62600、P70313及びP29473で提供される。ヒト、ラット、マウス及びウシのnNOSの配列は、SwissProtデータベースにおいてそれぞれ受入番号P29475、P29476、Q9Z0J4及びP29473で提供される。

【0130】

NOSのcDNA中の任意の領域は、それが対応するmRNA又は前記mRNAによりコードされるタンパク質のレベルで実質的障害を生ずる限り標的とすることができる。したがって、適当なNOS特異的核酸は、上記のように、NOSを発現している細胞中のNOS mRNA又はタンパク質のレベルを、前記細胞を試験すべき核酸と接触させた後で測定することにより、又は処理された細胞中のNOSの活性を定量することにより同定することができる。NOS活性は、場合によっては、iNOS、eNOS及びnNOS活性を定量するために当技術分野において知られた任意の方法により測定することができる。例えば、NOS活性は、[³H]-アルギニンの[³H]L-シトルリンへの変換を放射測定法により又はGriessアッセイを使用して一酸化窒素の形成で測定することにより定量することができる。

【0131】

適当なNOS特異的サイレンシング作用剤として、国際公開第08100591号に記載され、以下のポリヌクレオチド対により得られるnNOS特異的siRNAが挙げられるが、これらに限定されない：

【化6】

- CAAAGAGATCGACACCATC (SEQ ID NO: 58) (配列番号58)(センス)、
GATGGTGTGATCTCTTTGTT (SEQ ID NO:59) (配列番号59)(アンチセンス)；
- CACGCATGTCTGGAAAGGC (SEQ ID NO:60) (配列番号60)(センス)、および
GCCTTTCCAGACATGCGTGTT (SEQ ID NO:61) (配列番号61)(アンチセンス)；
- GGTCTATCCAATGTCCACA (SEQ ID NO:62) (配列番号62)(センス)、および
TGTGGACATTGGATAGACCTT (SEQ ID NO:63) (配列番号63)(アンチセンス)；

【化7】

CCACCAGTATGCAATGAAT-3' (SEQ ID NO:64) (配列番号64)

の配列を有するiNOS特異的siRNA；

・オリゴ同定番号HSS107326、HSS107327及びHSS107328を有するInvitrogen(Carlsbad, CA)から入手可能なeNOS特異的siRNA；

・Fang et al. (RNA、2010、16:1429-1435)の表2に記載されたiNOS特異的siRNA；

【化8】

- 5'-ACAACAGGAACCUACCAGCTT-3' (SEQ ID NO:65) (配列番号65)(センス)および
- 5'-GCUGGUAGGUUCCUGUUGUTT-3' (SEQ ID NO:66) (配列番号66)(アンチセンス)；

の配列を有するiNOS特異的siRNA。

【0132】

本発明における使用に適した実例になるNOS特異的アンチセンスとして：

・Grasso et al. (Exp. Biol. Med., 2003, 228:491-8)に記載された

10

20

30

40

【化 9】

5'- ACAGCTCAGTCCCTTCACCAA -3' (SEQ ID NO:67) (配列番号67)

の配列を有する i N O S 特異的アンチセンスオリゴヌクレオチド。

・ Hemm Rⁱ c h e t a l . (A m . J . P h y s i o l . C e l l P h y s i o l . , 2 0 0 3 , 2 8 5 : C 4 8 9 - C 4 9 8) により記載された

【化 10】

5'- TTTGCCTTATACTGTTCC-3' (SEQ ID NO:68) (配列番号68)

の配列を有する i N O S 特異的アンチセンスオリゴヌクレオチド。

・ 国際公開第 0 1 5 2 9 0 2 号中の表 1 及び 2 に記載された i N O S 特異的アンチセンスオリゴヌクレオチド。

・ Fang e t a l . (R N A , 2 0 1 0 , 1 6 : 1 4 2 9 - 1 4 3 5) の表 1 中に記載された i N O S 特異的アンチセンス分子が挙げられるが、これらに限定されない。

【0133】

N O S 特異的サイレンシング作用剤は、N O S が発現している細胞中に存在する神経伝達物質輸送体と結合することができる選択的作用剤とカップリングしていることが好ましい。したがって、本発明のコンジュゲートは、モノアミン作動性ニューロン中への内部移行を媒介することができる選択的作用剤とカップリングしている N O S 特異的核酸を含む。したがって、シヌクレイン m R N A 又はタンパク質を標的とする核酸は、セロトニン作動性でノルアドレナリン作動性及びノルアドレナリン作動性のニューロン中への前記核酸の内部移行を促進することができる作用剤とカップリングされる。したがって、好ましい実施形態において、シヌクレイン特異的核酸は、ドーパミン再取り込み阻害剤 (D R I) 、ノルエピネフリン - ドーパミン再取り込み阻害剤 (N D R I) (S N D R I 又はトリプルブロッカー) の群から選択されるセロトニン作動性でノルアドレナリン作動性で且つドーパミン作動性のニューロンに対する選択的作用剤とカップリングされる。

【0134】

他の実施形態において、本発明のコンジュゲートの一部を形成する核酸はノルアドレナリン輸送体を指向する。

【0135】

用語「ノルアドレナリン輸送体」、「N A T」、「ノルエピネフリン輸送体」又は「N E T」は、本明細書においては、神経伝達物質ノルエピネフリン (ノルアドレナリン) 及びドーパミンをシナプスからその小胞に後で使用するまで貯蔵するために輸送して戻すモノアミン輸送体を区別せずに指して使用される。N E T は長さが 6 1 7 アミノ酸であり、S L C 6 A 2 遺伝子によりコードされる 1 2 の膜貫通型ドメインを含む。

【0136】

ヒト、イヌ (*Canis familiaris*)、チンパンジー (*Pan troglodytes*)、ウシ (*Bos taurus*)、ラット (*Rattus norvegicus*) 及びマウス (*Mus musculus*) のノルエピネフリン輸送体の配列は、N C B I データベースにおいてそれぞれ受入番号 P 2 3 9 7 5、X M__5 4 4 3 9 8 . 2、X M__0 0 1 1 6 7 6 8 0 . 1、N M__1 7 4 6 0 8 . 2、N M__0 3 1 3 4 3 . 1 及び N M__0 0 9 2 0 9 . 2 で提供される。N E T c D N A 中の任意の領域は、それが前記 m R N A によりコードされる対応する m R N A 又はタンパク質のレベルで実質的阻害を生ずる限り標的とすることができる。したがって、適当な N E T 特異的核酸は、上記のように、N E T を発現している細胞中の N E T m R N A 又はタンパク質のレベルを、前記細胞を試験すべき核酸と接触させた後で測定することにより同定することができる。

【0137】

適当な N E T 特異的核酸として、インビトロジェンから受入番号 H S S 1 0 9 8 5 2、H S S 1 0 9 8 5 3 及び H S S 1 8 5 8 5 8 で入手できる R N A など任意の S L C 6 A 2

10

20

30

40

50

特異的RNAiが挙げられるが、これらに限定されない。

【0138】

他の実施形態において、本発明のコンジュゲートの一部を形成する核酸はドーパミン - ヒドロキシラーゼを指向する。

【0139】

本明細書中で使用する用語「ドーパミン - ヒドロキシラーゼ」は、ドーパミンをノルエピネフリンに変換することができるポリペプチドを指す。

【0140】

ヒト、ラット、マウス及びウシのドーパミン - ヒドロキシラーゼの配列は、NCBIタンパク質データベースにおいてそれぞれ受入番号NP_000778、NP_037290、NP_620392及びNP_851338で提供される。本発明による他の核酸を標的とする核酸についてと同様に、ドーパミン - ヒドロキシラーゼのcDNA中の任意の領域は、それが対応するmRNA又は前記mRNAによりコードされるタンパク質のレベルで実質的障害を生ずる限り標的とすることができる。したがって、適当なドーパミン - ヒドロキシラーゼ特異的核酸は、上記のようにドーパミン - ヒドロキシラーゼを発現している細胞中のドーパミン - ヒドロキシラーゼmRNA又はタンパク質のレベルを、前記細胞を試験すべき核酸と接触させた後で測定することにより同定することができる。

【0141】

適当なドーパミン - ヒドロキシラーゼ特異的核酸として、

【化11】

5'-GACCACGUACUGGUGCUACAUTA-3' (SEQ ID NO:37) (配列番号37)

の配列を有する国際公開第2008019159号に記載された核酸並びにサンタクルーズバイオテクノロジーから(カタログ番号sc-35180)、インビトロジェンから(カタログ番号HSS175953、HSS175954及びHSS175955)、アブノバから(カタログ番号H00001621-R01)、アプライドバイオシステムズから(sRNA ids s3946、s3947及びs3945)入手できる市販のドーパミン - ヒドロキシラーゼ特異的sRNAなどのドーパミン - ヒドロキシラーゼ特異的核酸が挙げられるが、これに限定されない。

【0142】

ドーパミン - ヒドロキシラーゼmRNA又はタンパク質を標的とするこれらの核酸は、ドーパミン - ヒドロキシラーゼが発現しており、所与の病態を引き起こしている神経伝達物質不足を補うためにドーパミン - ヒドロキシラーゼの減少が必要な細胞中に存在する神経伝達物質輸送体と結合することができる選択的作用剤とカップリングされることが好ましい。したがって、本発明のコンジュゲートは、ノルエピネフリン再取り込み阻害剤(NRI)と結合することができる選択的作用剤とカップリングしているドーパミン - ヒドロキシラーゼ特異的核酸を含む。

【0143】

他の実施形態において、本発明のコンジュゲートの一部を形成する核酸はBAXに特異的である。本明細書中で使用する用語「BAX」又は「BCL2会合Xタンパク質」は、その活性化が細胞レベル下の転座及び2量化に關与するプロアポトーシスのBCL-2ファミリーメンバーを指す。生存可能な細胞において、BCL2会合Xタンパク質の実質的部分はモノマー状であり、細胞基質中か又は膜と緩く会合しているかのいずれかで見出される。死の刺激に続いて、細胞質のモノマー状BCL2会合Xタンパク質はミトコンドリアに転座して、そこで架橋可能な内在性膜タンパク質になる。BCL2会合Xタンパク質に特徴的なイオン伝導性膜の孔を形成する能力は、細胞死に至るミトコンドリアの機能不全の原因の一部であり得る(Korsmeyer et al., Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 1999, 64, 343-350; Korsmeyer et al., Cell Death Differ. 2000,

10

20

30

40

50

7, 1166 - 1173)。用語「BAX」は、BAX - (GenBank受入番号L22473)、BAX - (GenBank受入番号NM004324)、BAX - (Oltvai et al., Cell, 1993, 74, 609 - 619)、BAX - (GenBank受入番号AI382305) (Apte et al., Genomics, 1995, 26, 592 - 594)、BAX - (GenBank受入番号AF008196) (Zhou et al., J. Biol. Chem., 1998, 273, 11930 - 11936) 及びBAX - (GenBank受入番号AF007826) (Shi et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1999, 254, 779 - 785) を含むそれらのスプライス変種のいずれかを指す。BAX - 、BAX - 及びBAX - をコードするヌクレオチド配列は、米国特許第5,691,179及び第5,955,595号で開示及び特許請求されている。BAX - をコードするヌクレオチド配列は米国特許第6,140,484号及び対応するPCT国際公開第97/01635号で開示及び特許請求されている。ヒトBAX - のエクソン5/イントロン5接合部に対して指向する22塩基長アンチセンスオリゴヌクレオチドも米国特許第6,140,484号で開示されている。

10

【0144】

本発明によるコンジュゲートにおいて使用する適当なBAX特異的核酸として、

【化12】

5'-UCGAUCCUGGAUGAAACCctg-3' (SEQ ID NO: 38) (配列番号38)

20

の配列(中国特許第101255422号に記載)、

・(Manfredini et al., Antisense Nucleic Acid Drug Dev., 1998, 8, 341 - 350)に記載されたヒトBAXの塩基83~102及び103~122並びに好中球(Dibbert et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1999, 96, 13330 - 13335)を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチド、

・内容を引用により本明細書に組み込む米国特許出願第20040077583号(表1及び3)に開示された任意の配列が挙げられる。

【0145】

30

BAXのmRNA又はタンパク質を標的とするこれらの核酸は、BAXが発現している細胞中に存在する神経伝達物質輸送体と結合することができる選択的作用剤とカップリングしていることが好ましい。したがって、本発明のコンジュゲートは、セロトニン作動性でノルアドレナリン作動性且つドーパミン作動性のニューロン中への内部移行を媒介することができる選択的作用剤とカップリングされているBAX特異的核酸を含む。したがって、好ましい実施形態において、選択的作用剤は、ドーパミン再取り込み阻害剤(DRI)又はノルエピネフリン - ドーパミン再取り込み阻害剤(NDRI)又はセロトニン - ノルエピネフリン - ドーパミン再取り込み阻害剤(SNDRI又はトリプルブロッカー)の群から選択される。

【0146】

40

他の実施形態において、本発明のコンジュゲートの核酸は、微小管会合タンパク質タウのmRNA又はタンパク質を標的とする。用語「タウ」は、天然タウタンパク質モノマー、前駆体タウタンパク質、タウペプチド、タウ中間体、代謝物及びヒト(P10636)、イヌ(XM_844939)、チンパンジー(NM_001009068.1)、マウス(Z12133)、ゼブラフィッシュ(BI981282.1)及び線虫(C. elegans)(NM_001027407.2)を含む任意の起源のタウ誘導体を含むタウタンパク質ファミリーの任意のタンパク質を指すが、これらに限定されず、それらは過リン酸化を受けてアルツハイマー病及び他のタウ病理の病原性に関与する対を形成するヘリカルフィラメント及び直線状フィラメントの纏れの自己集合体を生じ得る。

【0147】

50

適当なタウト異的核酸として、
国際公開第2005118858号に記載された下記配列を有するs i R N A
【化13】

5'-AATCACACCCAACGTGCAGAA-3' (SEQ ID NO:39) (配列番号39)
および

5'-AACTGGCAGTTCTGGAGCAAA-3' (SEQ ID NO:40) (配列番号40)

米国特許第2004241854号に記載された下記配列を有するs i R N A
【表3】

10

センス鎖	配列番号	アンチセンス鎖	配列番号
TCGAAGTGATGGAAGATCACGC	41	CTTCACTACCTTCTAGTGCGAC	42
CAGCCGGGAGTCGGCAAGGTGC	43	CGGCCCTCAGCCCTTCCACGTC	44
ACGTCTTCGGCGGCGGCAGTGTGC	45	CAGGCGCCTGCGGCGTCACACGTT	46
ACGTCTCCATGGCATCTCAGC	47	TTGCTGAGATGCCATGGAGAC	48
GTGGCCAGATGGAAGTAAAATC	49	CCGGTCTACCTTCATTTTAGAC	50
GTGGCCAGATGCAAGTAAAATC	51	CCGGTCTACGTTTCATTTTAGAC	52

【0148】

Caceres et al. (J. Neuroscience, 1991, 11: 1515-1523)により記載された下記配列を有するタウト異的アンチセンス核酸：

20

【化14】

GGTTCAGCCATGCTGCTTCAAAGCC SEQ ID NO:53 (配列番号53)

および

TGATAATCGACAGGAGGCGAGGACA SEQ ID NO:54 (配列番号54)

が挙げられるが、これらに限定されない。

【0149】

30

これらのタウのmRNA又はタンパク質を標的とする核酸は、好ましくは、タウが発現している細胞中に存在する神経伝達物質輸送体と結合することができる選択的作用剤とカップリングされている。したがって、本発明のコンジュゲートは、モノアミン作動性ニューロン、特に、セロトニン作動性でノルアドレナリン作動性且つドーパミン作動性のニューロン中への内部移行を媒介することができる選択的作用剤とカップリングされたタウト異的核酸を含む。したがって、好ましい実施形態において、選択的作用剤は、ドーパミン再取り込み阻害剤(DRI)又はノルエピネフリン-ドーパミン再取り込み阻害剤(NDRI)又はセロトニン-ノルエピネフリン-ドーパミン再取り込み阻害剤(SNDRI又はトリプルブロッカー)の群から選択される。

【0150】

40

他の実施形態において、本発明のコンジュゲートの核酸は、ハンチンチンmRNA又はタンパク質を標的とする。用語「ハンチンチン」は、UniPortKBデータバンク受入番号P42858の機能未知の350kDaタンパク質並びに受入番号L12392で預託された核酸配列によりコードされるタンパク質及びイヌ(NCBI受入番号XP_536221.2)、チンパンジー(NCBI受入番号XP_517080.2)、ウシ(NCBI受入番号XP_871851.2)、ラット(NCBI受入番号XP_573634.1)又はマウス(NCBI受入番号NP_034544.11)に見出されるそれらのオルソログ並びにCAG反復の拡大から生ずるそれらの変種(野生型タンパク質中のCAG6-37から変異体タンパク質中のCAG35-121反復へ)を指す。CAG拡大はハンチンチンタンパク質中のポリグルタミン束の拡大を含む変異体タンパク質の産生

50

を生ずる。

【0151】

適当なハンチンチン特異的核酸として、米国特許出願第2008039418号A中の表4及び5並びに米国特許第7320965号中の表1、2、7、8、9及び10に記載されたアンチセンスオリゴヌクレオチド、米国特許出願第2005042646号Aに記載された。

【化15】

5'-AAGAGGAGGAGGCCGACGCCC-3' (SEQ ID NO:55) (配列番号55)

10

の配列を有するsiRNAが挙げられるが、これらに限定されない。ハンチンチンmRNA又はタンパク質を標的とするこれらの核酸は、ハンチンチンが発現している細胞中に存在する神経伝達物質輸送体と結合することができる選択的作用剤とカップリングしていることが好ましい。したがって、本発明のコンジュゲートは、モノアミン作動性ニューロン、特にセロトニン作動性でノルアドレナリン作動性且つドーパミン作動性のニューロン中への内部移行を媒介することができる選択的作用剤とカップリングしているハンチンチン特異的核酸を含む。したがって、好ましい実施形態において、選択的作用剤は、ドーパミン再取り込み阻害剤(DRI)又はノルエピネフリン-ドーパミン再取り込み阻害剤(NDRI)又はセロトニン-ノルエピネフリン-ドーパミン再取り込み阻害剤(SNDRI)又はトリプルブロッカー)の群から選択される。

20

【0152】

本発明による選択的作用剤及び核酸の適当な組合せを表Iにまとめる。

【0153】

【表 4】

神経伝達物質輸送体	選択的作用剤	オリゴヌクレオチドの標的核酸
SERT	SSRI (セルトラリン)	5-HT _{1A}
SERT	SSRI (セルトラリン)	SERT
SERT	SSRI (セルトラリン)	5-HT _{1B}
SERT	SSRI (セルトラリン)	TREK-1
DAT、SERT又はNET	SDNRI (トリプルブロッカー) 又はDNR I (ノミフェンシン)	α -シヌクレイン
DAT、SERT又はNET	DAT、SERT又はNET SDNRI (トリプルブロッカー) 又はDNR I (ノミフェンシン)	NOS (iNOS、eNOS又はnNOS)
DAT、SERT又はNET	SDNRI (トリプルブロッカー) 又はDNR I (ノミフェンシン)	BAX
NET	NR I (レボキセチン)	ドーパミン- β -ヒドロキシラーゼ
NET	NR I (レボキセチン)、SDNRI、DNR I	NET
DAT、SERT又はNET	SDNRI (トリプルブロッカー) 又はDNR I (ノミフェンシン)	タウ
DAT、SERT又はNET	SDNRI (トリプルブロッカー) 又はDNR I (ノミフェンシン)	ハンチンチン

【0154】

A3. 本発明のコンジュゲートのリンカー領域

核酸と選択的作用剤とは直接カップリングすることができる。しかしながら、両部分を接続基により連結することが好ましい。

【0155】

本明細書において使用する用語「接続基」及び「リンカー」及びそれらと等価の用語は化合物の2つの部分を接続する有機部分を指して使用される。選択的作用剤は、核酸内の任意のセンス又はアンチセンスヌクレオチドに付くことができるが、3'末端ヌクレオチ

10

20

30

40

50

ド及び/又は5'末端ヌクレオチドを通してカップリングできることが好ましい。内部コンジュゲートでは、リンカーを通してヌクレオチドにリボース基の2'位で、又は他の適当な位置に直接又は間接的に付けることができる。

【0156】

核酸が二重螺旋核酸である場合には、コンジュゲートはセンスの3'末端ヌクレオチド、センスの5'末端ヌクレオチド、アンチセンスの3'末端ヌクレオチド、及び/又はアンチセンスの5'末端ヌクレオチドに付いていてよい。

【0157】

定義又は慣例に制限されることは望まないが、本出願においてリンカーの長さは、コンジュゲート部分をリンカーに結びつける原子とオリゴヌクレオチドに結合してそれを通してリンカーがオリゴヌクレオチドに付く末端ホスフェート部分の酸素原子との間の最短距離を表す原子数を数えることにより記述する。リンカーが1つ又は複数の環構造物を含む場合には、最短経路で環を通る原子を数えることが好ましい。

【0158】

本発明において使用する適当なリンカー基として、改変された又は改変されていないヌクレオチド、ヌクレオシド、ポリマー、糖類、炭水化物、ポリアルキレン、例えばポリエチレングリコール及びポリプロピレングリコールなど、ポリアルコール、ポリプロピレン、エチレングリコールとプロピレングリコールの混合物、ポリアルキルアミン、ポリアミン、例えばポリリシン及びスペルミジンなど、ポリエステル、例えばポリ(エチルアクリレート)、ポリホスホジエステルなど、脂肪族化合物、及びアルキレンが挙げられるがこれらに限定されない。さらに、
- アミノ - 1, 3 - ジオール、
- アミノ - 1, 2 - ジオール、
ヒドロキシプロピノール、
- アミノ - アルカノール、ジエタノールアミン、
- ヒドロキシ - 1, 3 - ジオール、
- ヒドロキシ - 1, 2 - ジオール、
- チオ - 1, 3 - ジオール、
- チオ - 1, 2 - ジオール、
- カルボキシ - 1, 3 - ジオール、
- カルボキシ - 1, 2 - ジオール、
コヒドロキシ - アルカノール、
- チオ - アルカノール、
- カルボキシ - アルカノール、
官能化オリゴエチレングリコール、
アリルアミン、
アクリル酸、
アリルアルコール、
プロパルギルアミン、
プロパルギルアルコール等に基づくリンカー/リンカー化合物は、適当な長さのリンカーを生成するこの関係で適用することができる。

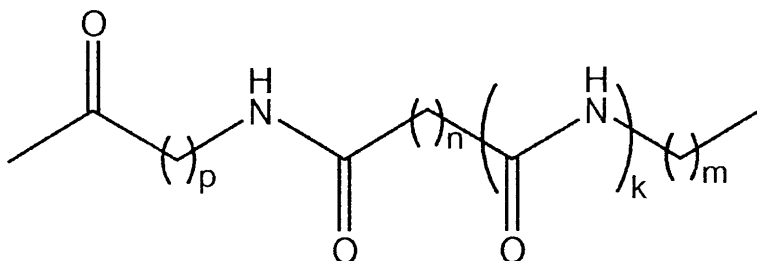
【0159】

リンカーは、改善された水溶性、コンジュゲート部分とオリゴヌクレオチドとの間の最適の分離距離、柔軟性(又はその欠如)、特定の配向、分岐など他の望ましい性質をオリゴヌクレオチドコンジュゲートに付与することもできる。

【0160】

好ましくは、前記接続基は以下の構造を有する：

【化16】



(式中、

m、n及びpは0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12及び13から選択され、

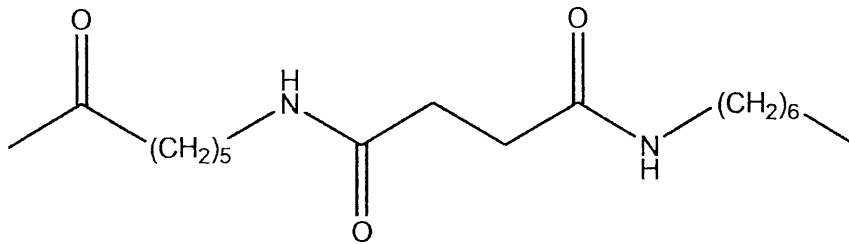
その際m + n + pの和は、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17及び18から選択される整数であり、及び

kは0又は1である)。

【0161】

好ましい実施形態において、 p が5であり、 n が2であり、 k が1であり、及び m が6であり、構造：

【化17】

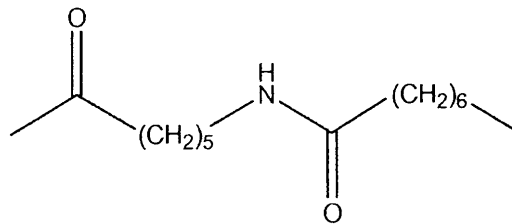


10

を有するリンカーを与える。

他の好ましい実施形態において、 p が5であり、 n 及び k が0であり、及び m が6であり、構造：

【化18】



20

を有するリンカーを与える。

【0162】

特定の実施形態において、リンカーは、選択的作用剤のために2つ以上のカップリングを含む。好ましい実施形態において、リンカーは2価又は3価のリンカーであり、即ち選択的作用剤の2又は3個の分子がそれぞれカップリングすることができる。

【0163】

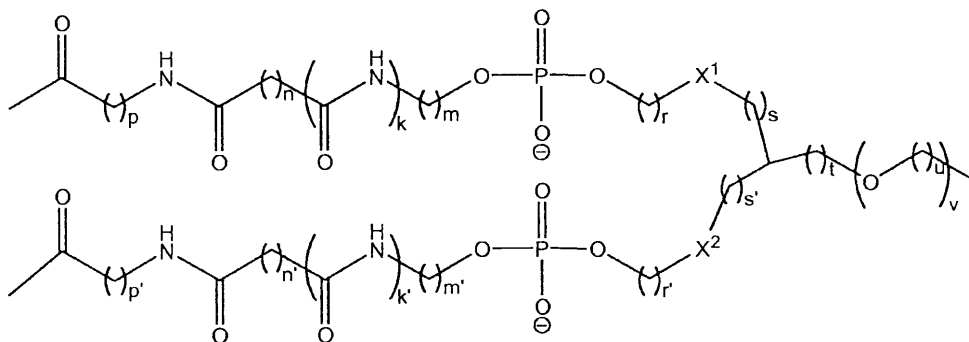
選択的作用剤の2つ以上の分子がリンカーを通して核酸にカップリングしている場合、前記分子は同じ選択的作用剤でも異なった選択的作用剤でもよい。

30

【0164】

特定の実施形態において、2価又は3価のリンカーは以下の式を有する：

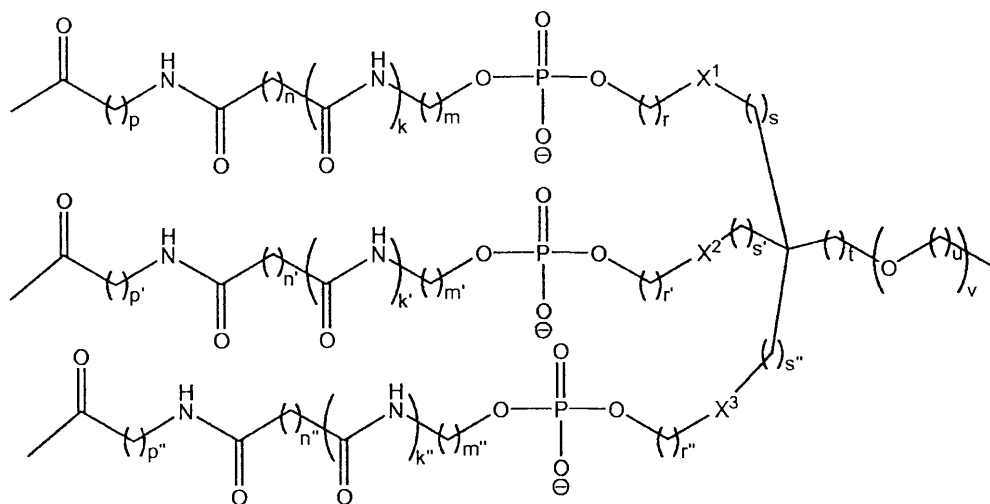
【化19】



40

又は

【化 20】



10

(式中、

$m, m', m'', n, n', n'', p, p', p'', r, r', r'', s, s', s'', t$ 及び u は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 及び 13 から独立に選択され；

20

k, k', k'' 及び v は、0 及び 1 から独立に選択され；及び

X^1, X^2 及び X^3 は、 CH_2 、O、S、NH、CO、 $C(O)O$ 及び $C(O)NH$ から独立に選択される。

【0165】

上記の基の価数に依存して、分岐リンカーは対称的であることも非対称的であることもある。

【0166】

特定の実施形態において、 p 及び p' が 5 であり、 n 及び n' が 2 であり、 k 及び k' が 1 であり、並びに m 及び m' が 6 であるリンカーは、上に示した 2 価のリンカーである。特定の実施形態において、 p 及び p' が 5 であり、 n, n', k 及び k' が 0 であり、並びに m 及び m' が 6 であるリンカーは 2 価のリンカーである。

30

【0167】

特定の実施形態において、 r 及び r' が 4 であり、 s 及び s' が 1 であり、 t 及び v が 0 であり、並びに X^1 及び X^2 が $C(O)NH$ を表すリンカーは上に示した 2 価リンカーである。他の実施形態において、 r が 2 であり、 r' が 0 であり、 s が 1 であり、 s' が 0 であり、 t 及び v が 0 であり、並びに X^1 及び X^2 が CH_2 を表すリンカーは 2 価リンカーである。

【0168】

特定の実施形態において、 p 及び p' が 5 であり、 n 及び n' が 2 であり、 k 及び k' が 1 であり、 m 及び m' が 6 であり、 r 及び r' が 4 であり、 s 及び s' が 1 であり、 t 及び v が 0 であり、並びに X^1 及び X^2 が $C(O)NH$ を表すリンカーは 2 価のリンカーである。

40

【0169】

他の実施形態において、 p 及び p' が 5 であり、 n 及び n' が 2 であり、 k 及び k' が 1 であり、 m 及び m' が 6 であり、 r が 2 であり、 r' が 0 であり、 s が 1 であり、 s' が 0 であり、 t 及び v が 0 であり、並びに X^1 及び X^2 が CH_2 を表すリンカーは 2 価のリンカーである。

【0170】

他の実施形態において、 p 及び p' が 5 であり、 n, n', k 及び k' が 0 であり、 m 及び m' が 6 であり、 r 及び r' が 4 であり、 s 及び s' が 1 であり、 t 及び v が 0 であ

50

り、並びに X^1 及び X^2 がC(O)NHを表すリンカーは2価のリンカーである。

【0171】

他の実施形態において、p及びp'が5であり、n、n'、k及びk'が0であり及びm及びm'が6であり、rが2であり、r'が0であり、sが1であり、s'が0であり、t及びvが0であり、並びに X^1 及び X^2 が CH_2 を表すリンカーは2価のリンカーである。

【0172】

特定の実施形態において、p、p'及びp''が5であり、n、n'及びn''が2であり、k、k'及びk''が1であり、m、m'及びm''が6であるリンカーは、上で示したように3価リンカーである。特定の実施形態において、p、p'及びp''が5であり、n、n'、n''、k、k'及びk''が0であり及びm、m'及びm''が6であるリンカーは3価リンカーである。

10

【0173】

特定の実施形態において、r、r'及びr''が3であり、s、s'及びs''が1であり、tが1であり、vが0であり、並びに X^1 、 X^2 及び X^3 がOを表すリンカーは上で示したように3価リンカーである。他の実施形態において、r、r'及びr''が3であり、s、s'及びs''が1であり、tが1であり、uが3であり、vが1であり、並びに X^1 、 X^2 及び X^3 がOを表すリンカーは3価リンカーである。

【0174】

特定の実施形態において、p、p'及びp''が5であり、n、n'及びn''が2であり、k、k'及びk''が1であり、m、m'及びm''が6であり、r、r'及びr''が3であり、s、s'及びs''が1であり、tが1であり、vが0であり並びに X^1 、 X^2 及び X^3 がOを表すリンカーは3価リンカーである。

20

【0175】

他の実施形態において、p、p'及びp''が5であり、n、n'及びn''が2であり、k、k'及びk''が1であり、m、m'及びm''が6であり、r、r'及びr''が3であり、s、s'及びs''が1であり、tが1であり、uが3であり、vが1であり並びに X^1 、 X^2 及び X^3 がOを表すリンカーは3価リンカーである。

【0176】

他の実施形態において、p、p'及びp''が5であり、n、n'、n''、k、k'及びk''が0であり、m、m'及びm''が6であり、r、r'及びr''が3であり、s、s'及びs''が1であり、tが1であり、vが0であり、並びに X^1 、 X^2 及び X^3 がOを表すリンカーは3価リンカーである。

30

【0177】

他の実施形態において、p、p'及びp''が5であり、n、n'、n''、k、k'及びk''が0であり、m、m'及びm''が6であり、r、r'及びr''が3であり、s、s'及びs''が1であり、tが1であり、uが3であり、vが1であり、並びに X^1 、 X^2 及び X^3 がOを表すリンカーは3価リンカーである。

【0178】

A4. 本発明のコンジュゲートのターゲティング部分

40

本発明のコンジュゲートの他の改変は、核酸の活性、細胞分配又は細胞取り込みを増強する1つ又は複数の部分又はコンジュゲートを、核酸又は保護基に化学的に連結することを含む。そのような部分は、コレステロール部分(Letsinger et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 199, 86, 6553-6556)、コール酸(Manoharan et al, Biorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053-1060)などの脂質部分、チオエーテル、例えば、ベリル-S-トリチルチオール(Manoharan et al, Ann. N. Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309; Manoharan et al, Biorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765-2770)、チオコレステロール(Oberhauser et al, Nucl. Acids Res.,

50

1992, 20, 533-538)、脂肪族鎖、例えば、ドデカンジオール又はウンデシル残基 (Saison-Behmoaras et al, EMBO J, 1991, 10, 1111-1118; Kabanov et al, FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49-54)、リン脂質、例えば、ジ-ヘキサデシル-rac-グリセリン又はトリエチル-アンモニウム 1, 2-ジ-O-ヘキサデシル-rac-グリセロ-3-Hホスホネート (Manoharan et al, Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea et al, Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783)、ポリアミン又はポリエチレングリコール鎖 (Manoharan et al., Nucleosides and Nucleotides, 1995, 14, 969-973)、又はアダマンタン酢酸 (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654)、パルミチル部分 (Mishra et al, Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237)、又はオクタデシルアミン又はヘキシルアミノ-カルボニルオキシコレステロール部分 (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923-937)を含むが、これらに限定されない。

【0179】

あるいは、細胞分配を増大させ得る部分は、前記生物学的障壁中に存在する特異的輸送体を使用して受容体に媒介されるエンドサイトーシスの使用により生物学的障壁を越えて特異的に移動することができる低分子量化合物又はポリペプチドであり得る。取り込み受容体及び担体の広いアレイとそれに伴うさらに多数の受容体特異的リガンドは、当技術分野において知られている。本発明により使用する、エンドサイトーシス及び/又はトランスサイトーシスを媒介する受容体に対する好ましいリガンドとして、例えば、チアミン輸送体、フォレート受容体、ビタミンB12受容体、アシアロ糖タンパク質受容体、(2, 3)-シアロ糖タンパク質受容体(例えば、受容体特異的リガンドとしてのラマ単一メイン抗体(sdAb)からなるFC5及びFC44ナノボディを伴う)、トランスフェリン-1及び-2受容体、捕捉剤受容体(クラスA又はB、タイプI、II又はIII、又はCD36又はCD163)、低密度リポタンパク質(LDL)受容体、LDL関連タンパク質1受容体(LRP1、タイプB)、LRP2受容体(メガリン又は糖タンパク質330としても知られる)、ジフテリア毒素受容体(DTR、これはヘパリン-結合上皮性成長因子様成長因子(HB-EGF)の膜結合前駆体である)、インスリン受容体、インスリン様成長因子(IGF)受容体、レプチン受容体、サブスタンスP受容体、グルタチオン受容体、グルタメート受容体及びマンノース6-ホスフェート受容体に対する、又はそれらに特異的に結合するリガンドが挙げられる。

【0180】

本発明にしたがって使用するこれらの受容体と結合する好ましいリガンドとして、例えば、リポタンパク質リパーゼ(LPL)、-2-マクログロブリン(2M)、受容体関連タンパク質(RAP)、ラクトフェリン、デスモテプラーゼ、組織-及びウロキナーゼ-型プラスミノゲンアクチベーター(tPA/uPA)、プラスミノゲンアクチベーター阻害剤(PAI-I)、tPA/uPA:PAI-I複合体、メラノトランスフェリン(又はP97)、トロンボスポンジン1及び2、肝リパーゼ、第V11a因子/組織因子経路阻害剤(TFPI)、第VIIa因子、第IXa因子、アベタール-40、アミロイド-前駆体タンパク質(APP)、C1阻害剤、補体C3、アポリポタンパク質E(apoE)、シュードモナス外毒素A、CRM66、HIV-I Tatタンパク質、ライノウイルス、マトリックスメタロプロテアーゼ9(MMP-9)、MMP-13(コラゲナーゼ-3)、スピンゴリピド活性化タンパク質(SAP)、妊娠帯タンパク質、アンチトロンピンIII、ヘパリン補助因子II、1-アンチトリプシン、熱ショックタンパク質96(HSP-96)、血小板由来成長因子(PDGF)、アポリポタンパク質J(apoJ、又はクラスτεリン)、apoJ及びapoEに結合したABETA、ア

10

20

30

40

50

プロチニン、angio-pep1、超低密度リポタンパク質(VLDL)、トランスフェリン、インスリン、レプチン、インスリン様成長因子、上皮性成長因子、レクチン、ペプチド模倣体及び/又はヒトモノクローナル抗体又は前記受容体に特異的なペプチド(例えば、ヒトトランスフェリン受容体と結合する配列HAIYPRH及びTHRPMPWSPVWP、又は抗ヒトトランスフェリン受容体(TfR)モノクローナル抗体A24)、ヘモグロビン、ジフテリア毒素ポリペプチド鎖の無毒性部分、ジフテリア毒素B鎖の全体又は一部(DTB-Hisを含む(Spilsberg et al., 2005, Toxicon., 46(8):900-6により記載されたもの))、ジフテリア毒素CRM197の無毒性変異体の全体又は一部、アポリポタンパク質B、アポリポタンパク質E(例えば、ナノ粒子上のポリソープ-80コーティングに結合後)、ビタミンD-結合タンパク質、ビタミンA/レチノール結合タンパク質、ビタミンB12/コバラミンプラズマ担体タンパク質、グルタチオン及びトランスコバラミン-B12からなる群から選択されたりガンドが挙げられる。

10

【0181】

A.5 保護基

本発明のコンジュゲートの核酸形成部分は、生体の異なった体液及び区画を通じたそれらの輸送中に、ヌクレアーゼ(エンド/エキソヌクレアーゼ)などの分解因子から保護されなければならない。この目的で、オリゴヌクレオチドは、酵素的消化に抵抗して、オリゴヌクレオチドのインピボ安定性及びバイオアベイラビリティを改善するように設計される。核酸は、ヌクレアーゼに媒介される分解を防止する基の存在により化学的に改変されることが好ましい。

20

【0182】

本発明の目的のために、「キャップ構造」又は「保護基」は、オリゴヌクレオチドのいずれかの末端に組み込まれた化学的改変を意味すると理解すべきである。5'-キャップの例として、反転した塩基脱落残基(部分)、4', 5'-メチレンヌクレオチド; 1-(D-エリスロフラノシル)ヌクレオチド、4'-チオヌクレオチド、炭素環状ヌクレオチド; 1, 5-アンヒドロヘキシトールヌクレオチド; L-ヌクレオチド; -ヌクレオチド; 改変塩基ヌクレオチド; ホスホロジチオネート連結基; トレオ-ペントフラノシルヌクレオチド; 非環式3', 4'-secoヌクレオチド; 非環式3, 4-ジヒドロキシブチルヌクレオチド; 非環式3, 5-ジヒドロキシペンチルヌクレオチド、3'-3'-反転ヌクレオチド部分; 3'-3'-反転塩基脱落部分; 3'-2'-反転ヌクレオチド部分; 3'-2'-反転塩基脱落部分; 1, 4-ブタンジオールホスフェート; 3'-ホスホロアミデート; ヘキシルホスフェート; アミノヘキシルホスフェート; 3'-ホスフェート; 3'-ホスホロチオネート; ホスホロジチオネート; 又は架橋又は非架橋メチルホスホネート部分が挙げられるが、これらに限定されない。詳細は引用により本明細書に組み込まれる国際公開第97/26270号に記載されている。3'-キャップとしては、例えば、4', 5'-メチレンヌクレオチド; 1-(D-エリスロフラノシル)ヌクレオチド; 4'-チオヌクレオチド、炭素環ヌクレオチド; 5'-アミノ-アルキルホスフェート; 1, 3-ジアミノ-2-プロピルホスフェート、3-アミノプロピルホスフェート; 6-アミノヘキシルホスフェート; 1, 2-アミノドデシルホスフェート; ヒドロキシプロピルホスフェート; 1, 5-アンヒドロヘキシトールヌクレオチド; L-ヌクレオチド; -ヌクレオチド; 改変塩基ヌクレオチド; ホスホロジチオネート; トレオ-ペントフラノシルヌクレオチド; 非環式3', 4'-secoヌクレオチド; 3, 4-ジヒドロキシブチルヌクレオチド; 3, 5-ジヒドロキシペンチルヌクレオチド、5'-5'-反転ヌクレオチド部分; 5'-5'-反転塩基脱落部分; 5'-ホスホロアミデート; 5'-ホスホロチオネート; 1, 4-ブタンジオールホスフェート; 5'-アミノ; 架橋及び/又は非架橋5'-ホスホロアミデート、ホスホロチオネート及び/又はホスホロジチオネート、架橋又は非架橋メチルホスホネート及び5'-メルカプト部分が挙げられる。引用により内容を本明細書組み込まれるBeaucage and Iyer, 1993, Tetrahedron 49, 1925を参照されたい。

30

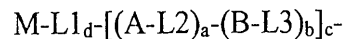
40

50

【 0 1 8 3 】

好ましい実施形態において、本発明のコンジュゲートの核酸配列に付けられたキャップ構造は、以下の一般的構造を有する：

【 化 2 1 】



(式中、

Mは、H、脂質部分又は上で定義したターゲティング基であり；

A及びBは、単糖及び(C₂ - C₂₀) アルキレングリコールからなる群から独立に選択されるモノマーユニットを表し；

L1、L2及びL3は、ホスホジエステル、ホスホロチオネート、カルバメート、メチルホスホネート、グアニジニウム、スルファメート、スルファミド、ホルムアセタール、チオホルムアセタール、スルホン、アミド及びそれらの混合物からなる群から独立に選択される連結化合物であり；

a及びbは0から50の範囲の整数であり；

cは0及び30の範囲の整数であり；

dは少なくとも1の整数である)。

【 0 1 8 4 】

本明細書中で使用する脂質部分は、脂肪、油脂、精油、ワックス、ステロイド、ステロール、リン脂質、糖脂質、スルホリピド、アミノリピド、クロモリピド(リポクローム)、及び脂肪酸を含むが、これらに限定されない親油性又は両親媒性の性質を有する有機化合物を指す。用語「脂質」は、天然の脂質及び合成で生成した脂質の両方を包含する。脂質部分は、通常、オリゴヌクレオチドの親油性を増大させてインビボにおけるオリゴヌクレオチド構造の細胞内取り込みを助長する。使用され得る適当な脂質として、脂肪酸；脂肪；油；ワックス；コレステロール；ステロール；ビタミンA、D、E及びKなどの脂溶性ビタミン；モノグリセリド；ジグリセリド、及びリン脂質が挙げられる。好ましい脂肪酸は、ラウリン酸(C₁₂)、ミリスチン酸(C₁₄)、パルミチン酸(C₁₆)、ステアリン酸(C₁₈)、ドコサン酸(C₂₂)、及びリトコール酸とオレイルアミンとのハイブリッド(リトコール-オレイルアミン、C₄₃)からなる群から選択されるものである。脂質は、標的組織、標的細胞、投与経路、オリゴヌクレオチドがたどると予想される経路等を考慮に入れることによって状況により当業者が選択できる。

【 0 1 8 5 】

本明細書中で使用する用語「単糖」は、当技術分野において周知であり、ブロック又は部分を構成するより小さい糖にさらに分解することのできない単糖ユニットからなる糖の単純形態を指す。この接合基として好ましい糖部分は、フラノース、フルクトース、グルコース、ガラクトース、マンノース、改変された単糖、シアル酸及びエリトロース及びそれらの混合物からなる群から選択される。単糖は、その線状又は環状形態(ヘミアセタール環状異性体)にあることができる。フラノースは、D-リボース又はフルクトース残基(D-(-)-フルクトフラノース)などの5員フラン系環を含む任意の単糖である。単糖の組合せで、複数の糖構造物を得ることができる。フルクトオリゴサッカライド(FOS)及びガラクトオリゴサッカライド(GOS)は、二糖類のサッカロース又はラクトース、又は多糖類のイヌリン、デキストリン、デンプン若しくはグリコーゲンと同様に特に興味ある組合せである。

【 0 1 8 6 】

本明細書中で使用する用語「アルキレングリコール」、「ポリ(アルキレングリコール)」、「アルキレンオキシド」は、一般式 - O - [(CH₂)_m - O -]_n - (式中、mは各アルキレングリコールユニット中に存在するメチレン基の数を表し、及びnは反復ユニットの数を表し、それ故ポリマーのサイズ又は長さを表す)を共有するポリエーテルポリマーのファミリーを包含する。該用語は、エチレングリコール、プロピレングリコール、ジアルキレングリコール(例えば、ジエチレングリコール)、トリアルキレングリコール

10

20

30

40

50

(例えば、トリエチレングリコール)、及び上記のグリコールの対応するモノ及びジ-アルキルエーテルなどのグリコール、(アルキルエーテルは1から6個の炭素原子(例えば、メチル、エチル、プロピルエーテル等)を有する低級アルキルエーテルである)を含むが、これらに限定されない。

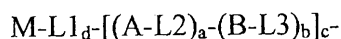
【0187】

他の実施形態において、式(I)の基は、炭素原子が2から20個の任意の線状又は分岐分子であってよい($C_2 - C_{20}$)アルキレングリコールモノマーユニット、又はa及びbの値に依存して、数個の($C_2 - C_{20}$)アルキレングリコールモノマーユニットを有するポリアルキレングリコールポリマーを有する。好ましくは、アルキレングリコール基は、 $C_{16} - C_{20}$ アルキレングリコールから選択される。さらにより好ましくは、アルキレングリコール基は C_{18} アルキレングリコールである。

【0188】

本発明のコンジュゲートに適切な保護基として、

【化22】



において、

・上の式(式中、MはHであり、dが0であり、AはPEGであり、Bは糖であり、a及びbは各々1でありL1及びL2はホスホジエステル結合である)に対応するPEG+糖；

・上の式(式中、AはPEGであり、Bは糖であり、aが1であり、bが2であり、MはHであり及びdが0であり及びL1及びL2はホスホジエステル結合である)に対応するPEG+(糖)2；

・上の式(式中、AはPEGであり、Bは糖であり、aが2であり、bが1であり、MはHであり及びdが0であり及びL1及びL2はホスホジエステル結合である)に対応する(PEG)2+糖；

・上の式(式中、AはPEGであり、Bは糖であり、aが3であり、bが1であり、MはHであり及びdが0であり及びL1及びL2はホスホジエステル結合である)に対応する(PEG)3+糖；

・上の式(式中、AはPEGであり、Bは糖であり、aが5であり、bが1であり、MはHであり及びdが0であり及びL1及びL2はホスホジエステル結合である)に対応する(PEG)5+糖

が挙げられるが、これらに限定されない。

【0189】

用語「PEG」及び「糖」は、本質的に上記のように使用され、糖としてフラノース及びC3、C9及びC18のスペーサーの群から選択されたPEGを含む。

【0190】

B. 本発明のコンジュゲートの構造物

本発明によるコンジュゲートの異なった要素は異なった様式で配列することができる。したがって、選択的作用剤は核酸の5'末端及び/又は3'末端にカップリングすることができる。さらに、核酸と選択的作用剤とは、直接連結することができ又はリンカーにより接続することができる。同様に、リンカーを核酸の5'末端及び/又は3'末端にカップリングすることができる。したがって、本発明の核酸が単一の核酸鎖を含有する場合、可能な配列は：

- ・5'末端に付けた選択的作用剤を含む核酸、
- ・3'末端に付けた選択的作用剤を含む核酸、
- ・5'末端に付けた選択的作用剤を含む核酸及び3'末端に付けた保護基、及び
- ・5'末端に付けた保護基及び3'末端に付けた選択的作用剤を含む核酸、
- ・第1の及び第2の選択的作用剤を含む改変された核酸であって、前記第1の及び第2の選択的作用剤は同じであるか又は異なり、両方の選択的作用剤が、核酸の5'末端に接

10

20

30

40

50

続されている二官能性リンカーの２つの末端に接続されている核酸、

・第１の及び第２の選択的作用剤を含む改変された核酸であって、前記第１の及び第２の選択的作用剤は同じである又は異なり、両方の選択的作用剤が、核酸の３'末端に接続されている二官能性リンカーの２つの末端に接続されている核酸、

・４つの選択的作用剤を含む改変された核酸であって、前記選択的作用剤は同じである又は異なり、選択的作用剤の２つは核酸の５'末端に接続されている第１の二官能性リンカーの両末端に接続され、選択的作用剤の２つは核酸の３'末端に接続されている第２の二官能性リンカーの両末端に接続されている核酸である。

【０１９１】

10

それに加えて、本発明のコンジュゲートは、標的分子の発現を調節する２つ以上の核酸鎖を含むことができる。例えば、本発明の構造物は、所与の標的分子の異なった領域を標的としたホスホジエステルを通して直列に結びつけた５個までの異なった核酸を含むことができる。

【０１９２】

さらに、核酸が２本鎖核酸であるこれらの場合には、選択的作用剤はセンス鎖及び／又はアンチセンス鎖とカップリングすることができ、直接カップリングするか又はリンカー基により接続することができる。

【０１９３】

本発明のコンジュゲートの一部を形成する核酸は、それらが生体の種々の体液及び区画を通る輸送中にヌクレアーゼ（エンド／エキソヌクレアーゼ）などの分解因子から保護されなければならない。この目的で、オリゴヌクレオチドは、酵素による消化に抵抗し、且つオリゴヌクレオチドのインビボ安定性及びバイオアベイラビリティを改善するように設計しなければならない。細胞のエキソヌクレアーゼは遊離の５'末端を標的として使用する。したがって、一本鎖核酸の場合には、選択的作用剤は、核酸の５'にカップリングしたときに安定化部分として作用することができる。しかしながら、２本鎖核酸を含むコンジュゲート又は選択的作用剤が３'末端に連結している一本鎖核酸の場合に、コンジュゲートは、通常エキソヌクレアーゼの活性による核酸の分解を防止する基である安定化部分又はキャップ構造をさらに含むことができる。２本鎖核酸の場合、以下の可能な配列が存在する：

20

[１] 選択的作用剤が鎖の一方の５'末端に付き、その場合キャップ構造を反対の鎖の５'末端に付けることが有用である。それに加えて、キャップ構造は１つ又は２つの３'末端に存在することもできる。

[２] 選択的作用剤が鎖の一方の３'末端に付き、その場合キャップ構造をセンス鎖及びアンチセンス鎖の５'末端に付けることが有用である。それに加えて、キャップ構造は遊離３'末端に存在することもできる。

[３] 同じであっても異なってもよい２つ以上の選択的作用剤を含むコンジュゲートであって、その場合、選択的作用剤はセンス鎖及びアンチセンス鎖の５'末端にカップリングしている。場合により、キャップ構造が１つ又は２つの遊離３'末端にカップリングしていてもよい。

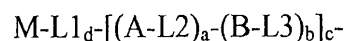
30

40

【０１９４】

好ましい実施形態において、核酸は、選択的作用剤がアンチセンス鎖の５'末端に連結し、且つ保護基がセンス鎖の５'末端に連結している２本鎖RNAである。さらにより好ましい実施形態において、保護基は、構造

【化２３】



（式中、MはHであり、dが0であり、AはポリエチレングリコールのC18スペーサーであり、Bはフラノースであり、aが2であり、b及びcが1であり並びにL2及びL3

50

はホスホジエステル結合である)
を有する。

【0195】

好ましい実施形態において、本発明のコンジュゲートは、

(i) 1種又は複数種の神経伝達物質輸送体に特異的に結合する少なくとも1種の選択的作用剤であって、セロトニン再取り込み阻害剤(SRI)、選択的セロトニン再取り込み阻害剤(SSRI)、セロトニン-ノルエピネフリン再取り込み阻害剤(SNRI)からなる群から選択される選択的作用剤、及び

(ii) 標的分子に特異的に結合することができる核酸であって、標的分子が、セロトニン受容体1A型(5-HT_{1A})、セロトニン受容体1A型(5-HT_{1A})をコードするmRNA、セロトニン輸送体タンパク質及びセロトニン輸送体をコードするmRNAからなる群から選択される核酸を含む。

10

【0196】

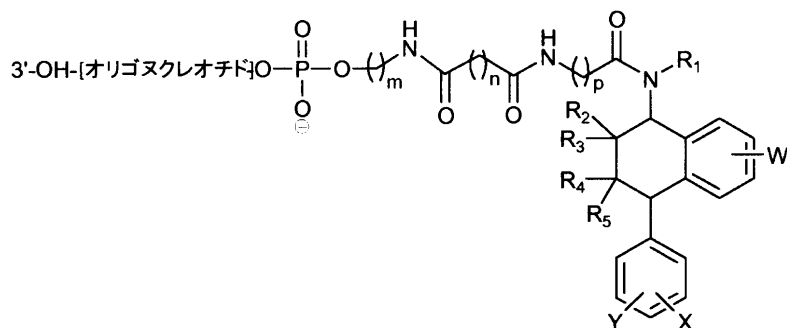
より好ましい実施形態において、セロトニン受容体1A型(5-HT_{1A})をコードするmRNAと特異的に結合することができる核酸は、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3及び配列番号：4の群からなる配列を含む。

【0197】

さらにより好ましい実施形態において、本発明のコンジュゲートは、構造(I)

【化24】

20



(I)

30

(式中、

R¹、R²、R³、R⁴及びR⁵は水素及びC₁～C₆アルキルから独立に選択され；
X及びYは、水素、ハロゲン、C₁～C₃アルキル、C₁～C₃ハロアルキル、OR^a及びSR^bから独立に選択され、ここでR^a及びR^bはC₁～C₃アルキル及びC₆～C₁₀アリールから独立に選択され；

Wは、水素、ハロゲン、CN、NO₂、C₁～C₃アルキル、C₁～C₃ハロアルキル、NR^cR^d、SO₂NR^eR^f、NR^gSO₂R^h、CO₂Rⁱから選択され、ここでR^c、R^d、R^e、R^f、R^g、R^h及びRⁱは、水素及びC₁～C₃アルキルから独立に選択され；

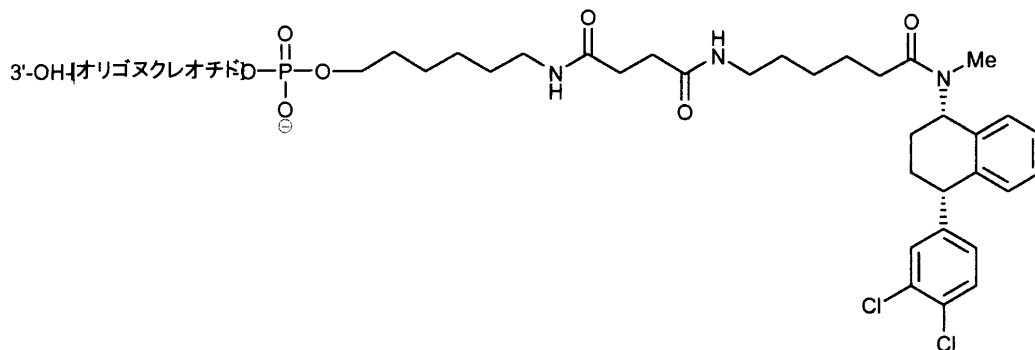
40

m、n及びpは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12及び13から選択され、ここでm+n+pの和は、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17及び18から選択される整数であり、並びに
オリゴヌクレオチドは、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3及び配列番号：4の群から選択された配列を含む)
を有する。

【0198】

他の実施形態において、本発明のコンジュゲートは、構造：

【化 2 5】



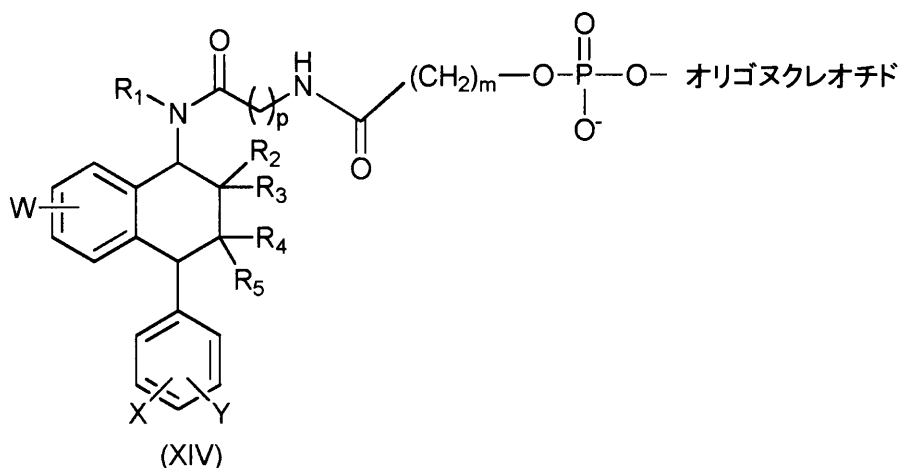
10

(式中、オリゴヌクレオチドは、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3及び配列番号：4の群から選択された配列を含む)
を有する。

【0199】

さらにより好ましい実施形態において、本発明のコンジュゲートは、構造(XIV)

【化 2 6】



20

30

(式中、

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 及び R^5 は、水素及び $C_1 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され；
X及びYは、水素、ハロゲン、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $C_1 \sim C_3$ ハロアルキル、 OR^a 及び SR^b から独立に選択され、ここで R^a 及び R^b は $C_1 \sim C_3$ アルキル及び $C_6 \sim C_{10}$ アリールから独立に選択され；

Wは、水素、ハロゲン、CN、 NO_2 、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $C_1 \sim C_3$ ハロアルキル、 NR^cR^d 、 $SO_2NR^eR^f$ 、 $NR^gSO_2R^h$ 、 CO_2R^i から選択され、ここで R^c 、 R^d 、 R^e 、 R^f 、 R^g 、 R^h 及び R^i は、水素及び $C_1 \sim C_3$ アルキルから独立に選択され；

m及びpは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12及び13から選択され、ここでm+pの和は、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17及び18から選択される整数であり、並びに

オリゴヌクレオチドは、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3及び配列番号：4の群から選択された配列を含む)

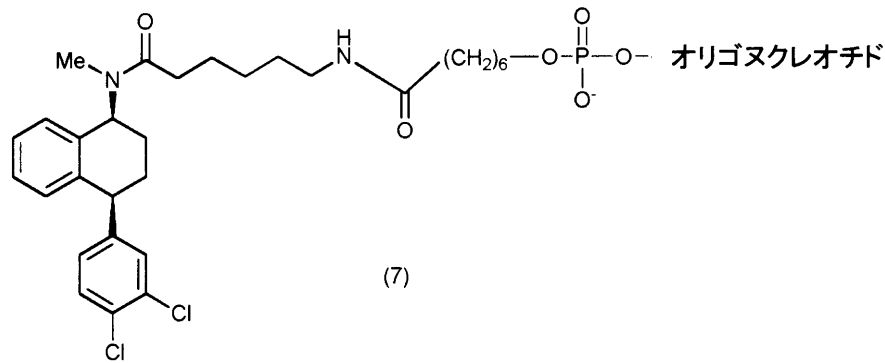
を有する。

【0200】

特定の実施形態において、コンジュゲートは、構造

40

【化 2 7】



10

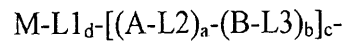
(式中、オリゴヌクレオチドは、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3 及び配列番号：4 の群から選択された配列を含む) を有する。

【0201】

さらに他の好ましい実施形態において、本発明のコンジュゲートは、センス鎖の 5' 末端が保護基とカップリングし、アンチセンス鎖の 5' 末端が選択的作用剤とカップリングしている 2 本鎖核酸を含む。保護基が、構造：

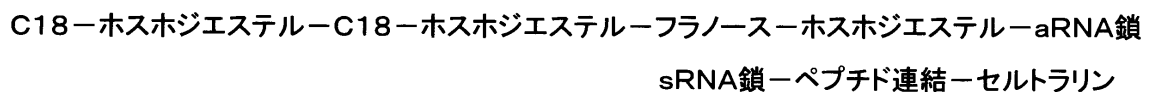
【化 2 8】

20



(式中、M は H であり、d が 0 であり、A はポリエチレングリコールの C 18 スペーサーであり、B はフラノースであり、a が 2 であり、b 及び c が 1 であり並びに L 2 及び L 3 はホスホジエステル結合である) を有する場合及び保護基がセルトラリンである場合、本発明の化合物は、構造：

【化 2 9】



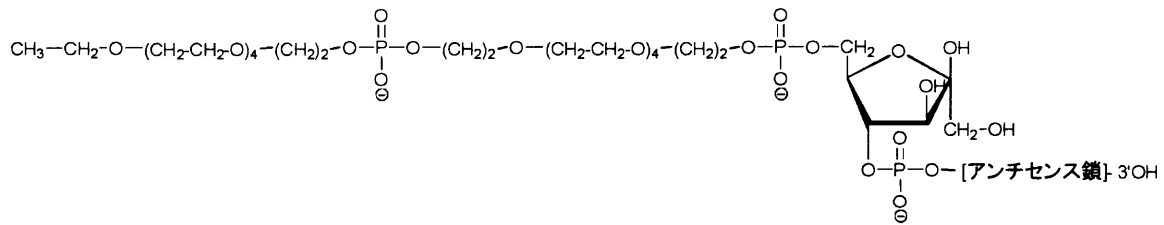
30

を有する。

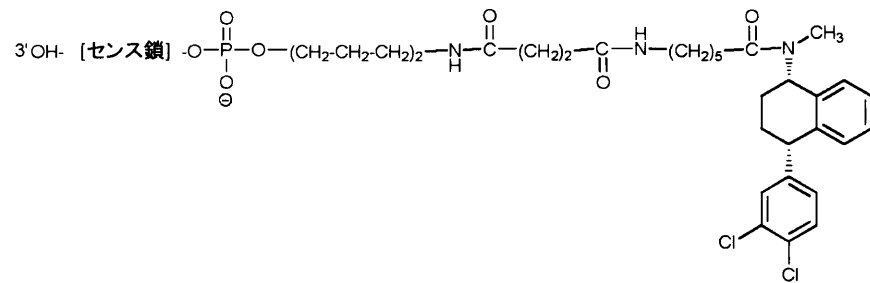
【0202】

さらにより好ましい実施形態において、本発明の化合物は、構造：

【化 3 0】



10



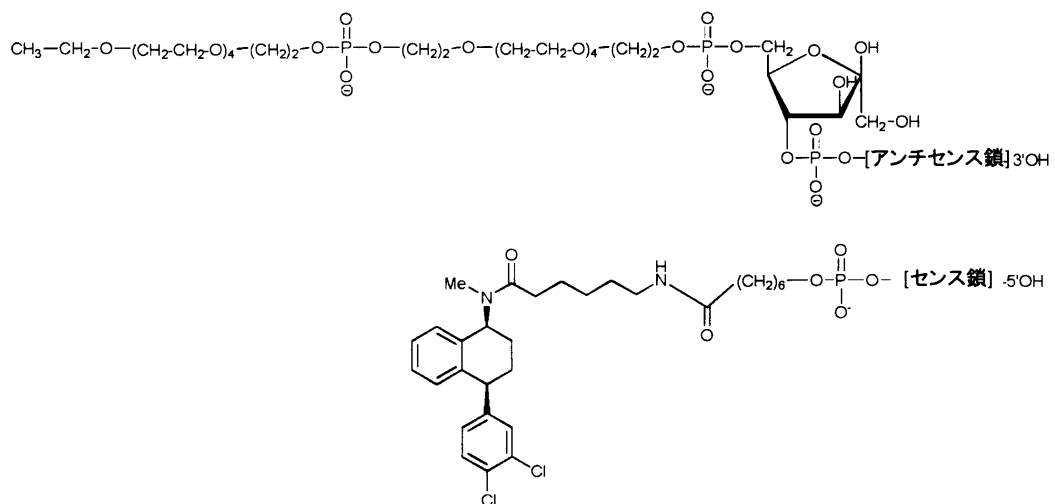
を有する。

20

【 0 2 0 3】

さらにより好ましい実施形態において、本発明の化合物は、構造：

【化 3 1】



30

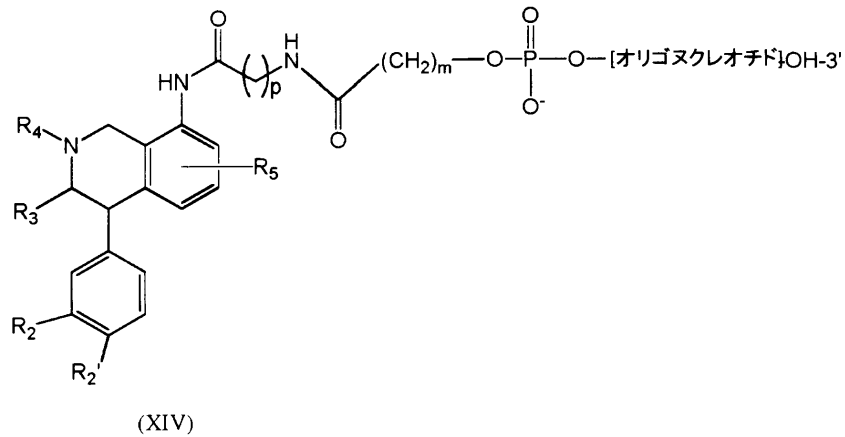
を有する。

【 0 2 0 4】

40

他の実施形態において、コンジュゲートは、以下の構造：

【化 3 2】



10

(式中、

R¹ は水素、低級アルキル基又はベンジル基を表し、R² は水素、メチル、塩素又はフッ素基を表し、R^{2'} は水素、メチル、メトキシ、ヒドロキシル又はハロゲン原子を表し、R³ 及び R⁴ は水素、低級アルキル基を表し、R⁵ は 5 - 又は 6 - 位における水素、塩素又はメトキシ基を表し、且つ

20

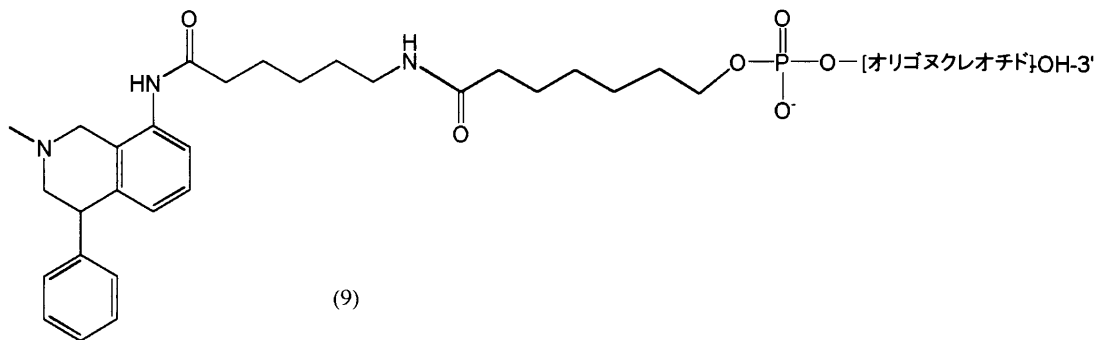
p は 2 ~ 6 である)

を有する。

【 0 2 0 5 】

さらにより好ましい実施形態において、コンジュゲートは、以下の構造

【化 3 3】



30

を有する。

【 0 2 0 6 】

さらにより好ましい実施形態において、上で定義したコンジュゲートの一部を形成するオリゴヌクレオチドは：

40

- ・ドーパミン - ヒドロキシラーゼ、
- ・ドーパミン - ヒドロキシラーゼをコードする mRNA、
- ・BAX、
- ・BAX をコードする mRNA、
- ・タウ、
- ・タウをコードする mRNA、
- ・ハンチンチン及び
- ・ハンチンチンをコードする mRNA

からなる群から選択された標的分子に特異的に結合することができる。

【 0 2 0 7 】

50

本発明の趣旨において、式の保護基は、連結化合物（式（Ⅰ）の基中でL''として参照される）によりオリゴヌクレオチドの5'-OH又は3'-OH基に連結することができ、したがってコンジュゲート-オリゴヌクレオチドを得ることができる。オリゴヌクレオチド及び式（Ⅰ）の基の化学的性質により、数通りの実施形態が可能になる。

【0208】

例えば、単一のオリゴヌクレオチド分子中に、該オリゴヌクレオチドが二重螺旋か又は一本鎖かに依存して可変の、典型的には2から4個の式（Ⅰ）の基を連結することが可能であるが、ただし、連結は5'-OH及び/又は3'-OHを通して行われる。数個の式（Ⅰ）の基の鎖をオリゴヌクレオチドに連結することも可能であり、前記式（Ⅰ）の基は、分子及び/又はオリゴヌクレオチドの間にホスホジエステル結合を生成させるホスホル

10

【0209】

本発明のヌクレオチド構造は、オリゴヌクレオチドの2つの鎖の5'-OH及び3'-OH末端の中で可能な全ての組合せで分布した又は式（Ⅰ）の基に結びついた2つ以上のターゲティング作用剤を含むことができる。さらに、2種以上ターゲティング作用剤があれば、これらを、式（Ⅰ）の基及び/又はオリゴヌクレオチドに直列に連結することができる。

【0210】

20

オリゴヌクレオチド構造が2種以上ターゲティング作用剤を含めば、異なった組合せが可能である。例えば、保護基を、オリゴヌクレオチド鎖の1つの5'-OH又は3'-OH末端基に連結することができる。他の可能な組合せは、1方のオリゴヌクレオチド鎖の5'-OH基に連結した薬剤化合物及び他方のオリゴヌクレオチド鎖に結合した式（Ⅰ）の基の末端ユニットに結びついたひと続きのアプタマーを含む。

【0211】

C. 本発明の医薬組成物

本発明者らは、本発明のコンジュゲートがコンジュゲートの核酸配列により標的とされた核酸の発現を調節する能力を有することを見出した。例えば、シナプス前部の5-HT_{1A}Rに特異的な核酸を含むコンジュゲートの場合、該構造物が対象者に投与されると、それは対象者の中脳縫線核（即ちセロトニン作動性ニューロンの集まりが位置する脳中の領域）中の5-HT_{1A}Rの特異的ノックダウンを効果的に誘発することができる。

30

【0212】

したがって、当業者は、本発明のコンジュゲートが、本発明のコンジュゲート中に存在する核酸により標的とされる遺伝子の発現レベルの低下から利益を得る疾患の治療のために適していることを理解するであろう。したがって、他の態様において本発明は医薬で使用する本発明によるコンジュゲートに関する。それに加えて、本発明は、本発明によるコンジュゲート及び薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物にも関する。

【0213】

適当な量の本発明のオリゴヌクレオチド構造物は、薬学的に許容される賦形剤及び/又は担体とともに剤形化して医薬組成物にすることができる。本発明によるコンジュゲートを含む組成物は、種々の経路により対象者に送達することができる。典型的経路は、線条体内、脳室内、髄腔内、実質内（例えば、線条体内）、鼻内、及び眼内送達を含む。組成物は、全身的に、例えば、静脈内、皮下又は筋肉注射により送達することもでき、それはコンジュゲートを末梢ニューロンに送達するために特に有用である。それに加えて、本発明のコンジュゲートを鼻内に投与することも可能で、それにより非侵襲的投与様式による全身性投与が可能になる。心室内投与も適切なことがある。好ましい送達経路は脳へ直接、例えば、脳室又は脳の視床下部中へ、又は脳の側方又は背側の領域中へである。

40

【0214】

本発明の医薬組成物は、複数の異なったコンジュゲートを含むことができ、その場合

50

、異なったコンジュゲートは、同じ標的分子の異なった領域を標的とする核酸を含む。したがって、医薬組成物は、各々異なった核酸を含む少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6種以上の異なったコンジュゲートを含むことができる。

【0215】

当業者は、いずれも参照により本明細書に組み込まれる Remington's Pharmaceutical Science (17th Ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985) 並びに Goodman 及び Gilman の The Pharmaceutical Basis of Therapeutics (8th Ed., Pergamon Press, Elmsford, N. Y., 1990) などの広く知られ利用可能な資料で論じられている原理及び手順を熟知している。

10

【0216】

好ましい実施形態において、コンジュゲートは、標準的手順にしたがってヒト及び他の哺乳動物に送達される投与に適合した医薬組成物として剤形化される。通常、静脈内又は心室内投与用の組成物は滅菌等張緩衝水溶液である。

【0217】

必要な場合、組成物は、注射部位における何らかの疼痛を緩和するために可溶化作用剤及び局所麻酔薬も含むことができる。一般的に、含有成分は、アンプル又は活性作用剤の量を示す薬袋などの気密の密封容器中で、例えば、凍結乾燥粉末又は無水濃縮物として、別々に又は単位剤形中に一緒に混合してのいずれかで供給される。組成物を点滴により投与すべき場合、薬学的規格の滅菌水又は食塩水を含む点滴瓶で投薬することができる。組成物が注射により投与される場合、含有成分を投与前に混合することができるように、注射用滅菌水又は食塩水のアンプルを提供することができる。

20

【0218】

静脈内投与以外の場合、組成物は少量の加湿剤又は乳化剤、又はpH緩衝剤を含有することができる。組成物は、溶液、懸濁液、エマルジョン、ゲル、ポリマー、又は徐放化剤形にすることができる。組成物は、当技術分野において知られている伝統的結合剤及び担体を用いて剤形化することができる。剤形は、薬学グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、糖ナトリウム、セルロース、酸化マグネシウムなどの標準的担体、医薬の製造における機能性が十分確立されている不活性担体を含むことができる。リポソーム、微粒子、マイクロカプセル等中へのカプセル化を含む種々の送達システムが知られており、本発明の治療剤を投与するために使用することができる。

30

【0219】

さらに他の好ましい実施形態において、本発明のコンジュゲートを含む治療剤は、中性又は塩形として剤形化することができる。薬学的に許容される塩として、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などから誘導されたものなど遊離アミノ基で形成されたもの、及び水酸化ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン等から誘導されたものなど遊離カルボキシル基で形成されたものが挙げられる。

40

【0220】

組成物が血液脳関門を越えて送達される実施形態について、組成物は、例えば、例えば、米国特許第6,372,250 (Pardridge) に記載されたりポソーム、及び薬学的に許容される担体を含む。本明細書中に記載するリポソームは、生物学的に活性な作用剤を血液脳関門を越えて送達することができ、続いて脳中で発現する。リポソーム及びナノ粒子は、薬剤カプセル化のために一般的に使用されるナノ容器の典型的形態である。リポソームの直径は、好ましくは200ナノメートル未満である。リポソームの直径は50ナノメートルと150ナノメートルの間が好ましい。特に好ましいのは、外径が約80ナノメートルのリポソーム又は他のナノ容器である。適当なタイプのリポソームは、リポソーム内のDNAを安定化するために、1-バルミトイル-2-オレオイル-sn-グ

50

リセロール - 3 - ホスホコリン (P O P C)、ジホシファチジルホスホコリン、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン (D S P E) などの中性リン脂質を、又は少量 (1 パーセント) の臭化ジドデシルジメチルアンモニウム (D D A B) などのカチオン性脂質と一緒にコレステロールを用いて作製される。

【 0 2 2 1 】

リポソームは、DNA をカプセル化して、剤形が未だ血液中にある間又は血液から標的細胞の細胞内区画に移るときに核酸をヌクレアーゼから保護することができるナノ粒子又は直径が 2 0 0 n m 未満の任意の他の分子のナノ容器で置き換えることができる。P E G 鎖などの接合剤を使用する代わりに、スフィンゴミエリンなどの 1 種又は複数種の他のポリマー状物質も、リポソーム又はナノ容器の表面に付けて、「輸送可能なペプチド」をコンジュゲーションするための足場を提供すること及び剤形の血液からの除去を遅らせて血漿薬物動態を最適化することの二重の目的に役立てることができる。さらに、本発明は、特異的標的受容体を有する細胞又は器官の任意の群に DNA を送達することを意図する。リポソームは DNA を肝臓、肺及び脾臓などの器官に送達するために使用することができる。

10

【 0 2 2 2 】

本発明のコンジュゲートを送達するための他の適当な容器として、デンドリマーが挙げられる。用語「デンドリマー」は、コア及びコアから放射状に出る分岐構造の複数の骨組みを有する巨大分子を指す。デンドリマー担体の形状及びサイズは様々であり得る。幾つかの例において、デンドリマー担体は、形状がおよそ球形又は球状であり得る。さらに、デンドリマー担体は、対応する分子量範囲、例えば、約 5 0 0 ダルトンから約 2 百万ダルトンで、約 1 5 オングストローム (Å) から約 2 5 0 Å の範囲内の直径を有することができる。デンドリマーは、種々の供給源 (例えば、D e n d r i t e c h、M i d l a n d、M i c h i g a n) から市販品として得るか又は当業者に知られた方法により合成することができる。デンドリマー分子は、低分子量種と高分子量種とに大まかに分けることができる。第 1 のカテゴリーは、デンドリマー及びデンドロンを含むが、それに対して第 2 のカテゴリーはデンドロン化したポリマー、超分岐ポリマー、及びブラッシポリマー (ボトルブラッシとも呼ばれる) を包含する。デンドリマー及びデンドロンは、繰り返し分岐し、単分散で、及び通常高度に対称性の化合物である。デンドリマーとデンドロンの定義で明確な相違はない。デンドロンは、通常焦点があると言われる単一の化学的に指定可能な基を含む。モル質量分布がないので、高いモル質量のデンドリマー及びデンドロンは巨大分子であるがポリマーではない。デンドリマーの性質は、分子の表面の官能基により支配される。機能的分子のデンドリマーカプセル化は、デンドリマーの足場が内部的機能と外部的機能とを分離するので、活性な部位、生体材料中の活性な部位の構造を模倣する構造物の単離を可能にする。例えば、デンドリマーは、その末端基がカルボキシル基のような親水性基である場合、水溶性であることができる。

20

30

【 0 2 2 3 】

デンドリマーは、以下の特徴により一般的に特徴づけることができる：(i) 1 つ又は複数の反応部位を有し、点様であるか又は有意のサイズがあり、デンドリマーの最終的立体配置に影響する開始剤コア (I) ；(i i) 開始剤コアに付いた分岐した反復ユニットの 1 つ又は複数の層；(i i i) 場合により連結基を通してデンドリマー表面に付いたアニオン性又はカチオン性基などの機能的末端基。

40

【 0 2 2 4 】

本明細書において考慮するデンドリマーは、ユニットを構築するリシン、又はリシン類似体を含むことができる。用語「リシン類似体」は、構築ユニットの前の層に付くための単一の尖端カルボキシル基、及び構築ユニット、遮断基、リンカー又はアリアル酸基がさらに付くことができる 2 つ又は 3 つの第一級アミン基を有する分子を指す。本明細書において考慮する「リシン類似体」の例は、P C T / A U 2 0 0 7 / 0 0 0 3 5 2 に記載され、例えばグリシル - リシンである。幾つかの特定の例において、デンドリマーは、構築ユニットとしてリシンのみ又はリシン類似体の 1 つのタイプを含む。

50

【0225】

本明細書において考慮する他のデンドリマーとして、ポリアミドアミン（PAMAM）、ポリ（エーテルヒドロキシルアミン）（PEHAM）又はポリプロピレンイミン構築ユニットを含むものが挙げられる。特定のそれらの例においては、デンドリマーは、構築ユニットとして、ポリアミドアミン（PAMAM）、ポリ（エーテルヒドロキシルアミン）（PEHAM）又はポリプロピレンイミンのみを有する。

【0226】

コア部分は、構築ユニットへの付加点を1つのみを含むことができるか又は構築ユニットが付くためにさらに利用できるか又はできない2若しくは3個以上の点を含むことができる。典型的には、付加点は遊離アミノ基である。コア部分は、構築ユニットからなるか、それを含むか又はそれから誘導することができ、構築ユニットと異なった分子であってよい。典型的コア部分は、本明細書中で例示し、及びPCT/AU2007/000352に記載されている。

【0227】

リポソーム及びデンドリマーは、静脈内投与のために、任意の適当な薬学的担体と組み合わせることができる。組成物の静脈内投与は、その侵襲性が最小なので好ましい経路である。他の投与経路は、所望であれば可能である。適当な薬学的に許容される担体として、食塩水、トリス緩衝液、リン酸緩衝液、又は任意の他の水溶液が挙げられる。適当な用量は、当業者に周知の手順により確立することができる。

【0228】

D. 本発明のコンジュゲートの治療的使用

本発明のコンジュゲートで治療することができる臨床状態はコンジュゲートの一部を形成する核酸の特異性に依存するであろうということは理解されるであろう。したがって、本発明のコンジュゲートは、神経伝達物質輸送体を発現する細胞中の関心のある遺伝子をノックダウンすることにより改善することができる任意の疾患の治療のために使用することができる。当業者は、コンジュゲートが、細胞中におけるタンパク質の異常な発現（例えば、レヴィー小体中における α -シヌクレインの蓄積）により特徴づけられる疾患又は標的タンパク質が正常レベルで発現しているが前記標的タンパク質の発現を減少させることにより改善することができる疾患の治療のために有用であることを理解するであろう。

【0229】

D. 1. セロトニン作動性ニューロン中に位置する5-HT_{1A}受容体、セロトニン輸送体又はイオンチャンネルを標的とする核酸を含むコンジュゲート

上記のように、SSRIがそれを必要とする対象者に投与される場合、セロトニン作動性ニューロン中に位置する5-HT_{1A}受容体（シナプス前部の5-HT_{1A}R）の活性化の結果として生ずる負のフィードバック機構がある。SSRIの作用は、セロトニン作動性ニューロン中に位置するセロトニン再取り込み輸送体（SERT）により媒介されるセロトニン再取り込みの遮断により誘発される高いセロトニンレベルをもたらす。このことはシナプス後部のセロトニン受容体だけでなく、細胞のためのフィードバックセンサとして役立つシナプス前部の5-HT_{1A}Rも活性化するであろう。これらの5-HT_{1A}Rの活性化は、細胞発火の抑制及びインパルス依存性セロトニン放出の故にセロトニンレベルの低下を引き起こし、それ故投与されたSSRIの効果を制限する。

【0230】

この効果は、例えば本発明の実施例2及び3に示し、そこで、セルトラリン及び5-HT_{1A}R特異的siRNAを含むコンジュゲートの注入が、選択的5-HT_{1A}Rアゴニストにより誘発される体温低下応答を防止することができることが示される。この効果により、コンジュゲートの一部を形成する核酸に相補的な遺伝子の発現をノックダウンするところが望ましい場合に、これら全ての臨床状態における本発明のコンジュゲートの使用を可能になる。

【0231】

これは、本発明のオリゴヌクレオチドが市販のSSRIの上記の好ましくない作用、即

10

20

30

40

50

ち、作用の遅い発現及び有効性の限定を打ち消すために役立ち得るので、抗鬱療法分野における重要な発見である。それに加えて、本発明の高度に選択的なオリゴヌクレオチド構造を使用することにより、低用量の治療用オリゴヌクレオチドが、所望の効果をj得るために投与される必要があるにすぎない。結果として、本発明の構造物は、シナプス領域に存在する異常な濃度のセロトニンと関連する疾患、特にセロトニンの不十分な伝達（即ちシナプスにおけるセロトニン濃度の低下したレベル）と関連する疾患、例えば鬱病関連障害などの治療に有用である。

【0232】

したがって、核酸がシナプス前部のセロトニン作動性のニューロンの成分を標的としていれば、コンジュゲートは、シナプス前部のセロトニン作動性のニューロンの活性低下が必要な疾患の治療に適するであろう。したがって、他の態様において、本発明は、

(i) 選択的作用剤が、選択的セロトニン再取り込み阻害剤(SSRI)、セロトニン-ノルエピネフリン再取り込み阻害剤(SNRI)又はノルアドレナリン作動性及び特異的セロトニン作動性の抗鬱剤(NASSA)の群から選択され、及び

(ii) オリゴヌクレオチドが、セロトニン受容体1A型(5-HT_{1A}) mRNA、セロトニン輸送体mRNA、TREK-1 mRNA、セロトニン受容体1A型(5-HT_{1A})ポリペプチド、セロトニン輸送体ポリペプチド及びTREK-1ポリペプチドの群から選択される標的分子に特異的に結合することができる、鬱病関連障害の治療又は予防において使用するための本発明のコンジュゲートに関する。

【0233】

あるいは、本発明は、本発明のコンジュゲートをそれを必要とする対象者に投与することを含む鬱病関連障害の治療又は予防のための方法であって、

(i) 選択的作用剤が、選択的セロトニン再取り込み阻害剤(SSRI)、セロトニン-ノルエピネフリン再取り込み阻害剤(SNRI)又はノルアドレナリン作動性及び特異的セロトニン作動性の抗鬱剤(NASSA)の群から選択され、及び

(ii) オリゴヌクレオチドが、セロトニン受容体1A型(5-HT_{1A})をコードするmRNA、セロトニン輸送体mRNA、TREK-1 mRNA、セロトニン受容体1A型(5-HT_{1A})ポリペプチド、セロトニン輸送体ポリペプチド及びTREK-1ポリペプチドの群から選択される標的分子に特異的に結合することができる

方法に関する。

【0234】

本明細書中で使用する発現「鬱病関連障害」とは、シナプス中の異常に低レベルのセロトニンを特徴として、American Psychiatric Association, Washington DCにより出版されたDiagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - 第4版(DSM-IV)において定義された状態のことであり、限定されないが、大鬱病、長期の鬱病、難治性鬱病、気分変調症；絶望、落胆、「ブルー」、憂鬱症、自尊心喪失、罪悪感及び自責の念、対人接触からの逃避、及び食事及び睡眠の乱れなどの肉体症状により特徴づけられる抑鬱した気分の精神状態を含むが、これらに限定されない。好ましくは、鬱病関連障害は、：大鬱病、妄想-強迫性障害(OCD)、広汎性発達障害(PDD)、心的外傷後ストレス障害(PTSD)、不安障害、双極性障害、食餌障害及び慢性疼痛を含む群から選択される。

【0235】

それに加えて、作動性ニューロンに特異的な選択性試薬及び5-HT_{1A}受容体を下方制御するオリゴヌクレオチドを含む本発明のコンジュゲートにより、前頭前野の皮質におけるセロトニン放出が、抗鬱剤単独により生じた50%増加と比較してベースライン値の約150~200%増加した(図8参照)。前に言及したように、伝統的抗鬱剤はセロトニンの伝達を改善するように設計されているが、シナプス前部の5-HT_{1A}受容体の活性化に基づく効果は限られている。したがって、本発明の構造のオリゴヌクレオチドを用いれば、前記抗鬱剤の主な限界(作用の遅い発現及び限られた有効性)が克服される。そ

の結果、抗鬱治療に対する正の応答を短期間内に得ることができ、市販の抗鬱剤（即ちSSRI）のみ用いる治療と比較して治療に応答する患者の数を改善することができる。したがって、他の態様において、本発明は、本発明によるコンジュゲートと抗鬱剤との投与を含む鬱病関連障害の治療方法に関する。

【0236】

本発明のオリゴヌクレオチド構造物は、現行の抗鬱剤（SSRI、NARIs、MAOI、TCA等）とともに同時に投与することができる。5-HT_{1A}自己受容体の発現を遮断するオリゴヌクレオチド配列の投与は、再取り込み遮断により生じた細胞外5-HTの増加の減弱を阻止することにより、これらの抗鬱剤の効果を改善することを可能にする。

10

【0237】

D. 2. シヌクレインを標的とする核酸を含むコンジュゲート

他の態様において本発明は、

(i) 選択的作用剤が、ドーパミン再取り込み阻害剤（DRI）及びノルエピネフリン - ドーパミン再取り込み阻害剤（NDRI）の群から選択され、及び

(ii) オリゴヌクレオチドが、 α -シヌクレインをコードするmRNA又は α -シヌクレインポリペプチドである標的分子に特異的に結合することができる、レヴィー小体の堆積と関連する疾患の治療又は予防のための本発明のコンジュゲートに関する。

【0238】

用語「レヴィー小体の堆積と関連する疾患」は、異常なニューロンの α -シヌクレイン封入体の形成を生じさせる α -シヌクレイン代謝の障害により特徴づけられる状態を指す。より特定のレヴィー小体障害には、パーキンソン病（PD）、レヴィー小体（DLB）型認知症、認知症を伴うPD（PDD）及び多系統萎縮症が含まれる。

20

【0239】

好ましくは、本発明のコンジュゲートは、鬱病及び/又は鬱病関連障害の治療のためにSSRIなどの市販の抗鬱剤と一緒に投与することができる。

【0240】

D. 3. ノルエピネフリン輸送体を標的とする核酸を含むコンジュゲート

背景技術の節で説明したように、中脳皮質DA伝達の増大は統合失調症の治療に有用である。NA輸送体（NAT）は、NA及びDAに対して同様な親和性を示すので、NAT阻害剤は内側PFC（mPFC）の細胞外DA濃度を、尾状核及び核側坐核（NAC）と比較して優先的に増大させる。それ故、遺伝子座位青斑核（LC）ニューロンからのNA軸索は、PFC中の細胞外DA濃度を、DAを取り込むか又は共放出するかのいずれかにより調節することに寄与し得る。

30

【0241】

他の態様において本発明は、

(i) 選択的作用剤が、ドーパミン再取り込み阻害剤、ノルアドレナリン再取り込み阻害剤、セロトニン - ノルアドレナリン再取り込み阻害剤及びノルエピネフリン - ドーパミン再取り込み阻害剤（NDRI）の群から選択され、及び

40

(ii) オリゴヌクレオチドがノルエピネフリン輸送体又はノルエピネフリンポリペプチドをコードするmRNAである標的分子に特異的に結合することができる、ノルエピネフリン再取り込み阻害により媒介されるか又はそれに応答する疾患の治療又は予防のための本発明のコンジュゲートに関する。

【0242】

そのような病態の例として、神経障害性疼痛及び慢性疼痛などの疼痛障害、大鬱病などの抑鬱性障害、不安障害などの情緒障害、注意欠陥機能亢進障害、認知症などの認識障害、及びストレス尿失禁が挙げられる。

【0243】

D. 4. ドーパミン - α -ヒドロキシラーゼを標的とする核酸を含むコンジュゲート

50

背景技術の節で説明したように、中脳皮質 D A 伝達の増強は、統合失調症の治療に有用であり得る。この増強はノルアドレナリン輸送体の阻害剤の使用により又は、別法として、ドーパミン - ヒドロキシラーゼを阻害することにより達成することができる。この酵素は、ドーパミンからノルアドレナリンへの変換の原因となり、したがって、ノックダウンされると、その結果として、N A ニューロン中のドーパミンレベルが増大するであろう。これは順送りで N A を含むノルアドレナリン作動性小胞を生じさせ、且つ D A レベルが高くなるであろう。これは、脳中の認識及び記憶に関する機能を改善する N A 保護帯における D A レベルを増大させる。

【 0 2 4 4 】

したがって、他の態様において本発明は、ノルアドレナリン作動性突起中におけるドーパミン欠乏と関連する疾患の治療又は予防のための、

(i) 選択的作用剤が、ノルエピネフリン輸送体阻害剤 (S D N R I) 及びノルエピネフリン - ドーパミン再取り込み阻害剤 (N D R I) の群から選択され、及び

(i i) オリゴヌクレオチドが、ドーパミン - ヒドロキシラーゼをコードする m R N A 又はドーパミン - ヒドロキシラーゼポリペプチドである標的分子に特異的に結合することができる、

本発明のコンジュゲートに関する。

【 0 2 4 5 】

本明細書中で使用する「ノルアドレナリン作動性突起中におけるドーパミン欠乏と関連する疾患」という表現は、認知症、鬱病及び神経変性性疾患と関連する記憶及び認識過程と関連する。

【 0 2 4 6 】

D . 5 . B A X を標的とする核酸を含むコンジュゲート

他の態様において本発明は、ニューロンのアポトーシス及び細胞死と関連する疾患の治療又は予防のための、

(i) 選択的作用剤が、セロトニン - ドーパミン - ノルエピネフリン再取り込み阻害剤 (S D N R I) 及びノルエピネフリン - ドーパミン再取り込み阻害剤 (N D R I) の群から選択され、及び

(i i) オリゴヌクレオチドが、B A X をコードする m R N A 又は B A X ポリペプチドである標的分子に特異的に結合することができる、

本発明のコンジュゲートに関する。

【 0 2 4 7 】

本明細書中で使用する用語「ニューロンのアポトーシス及び細胞死と関連する疾患」は、多くのヒトの神経障害の「エンドポイント」を指し、アルツハイマー病、パーキンソン病及びハンチントン病、脳卒中 / 外傷、多発性及び筋萎縮性側索硬化症を含むが、これらに限定されない。海馬及び皮質のニューロンのアポトーシス性の死はアルツハイマー病の症状の原因であり；神経伝達物質ドーパミンを使用する中脳ニューロンの死はパーキンソン病の根元であり；ハンチントン病は身体の運動を制御する線条体中のニューロンの死を伴い；及び下位運動ニューロンの死は筋萎縮性側索硬化症として顕在化する。それに加えて、脳虚血及び外傷は脳の小領域の壊死を誘発し、それは次に、壊死細胞によって放出された神経毒物質によるアポトーシスにより、ニューロンの細胞の損耗を脳のより広い領域に伝播する。アポトーシス性のニューロン細胞の損耗は、生理学的過程として加齢する脳においても観察される。

【 0 2 4 8 】

D . 6 . タウを標的とする核酸を含むコンジュゲート

他の態様において、本発明は、タウ関連疾患の治療又は予防における使用のための、

(i) 選択的作用剤が、セロトニン - ドーパミン - ノルエピネフリン再取り込み阻害剤 (S D N R I) 及びノルエピネフリン - ドーパミン再取り込み阻害剤 (N D R I) の群から選択され、及び

(i i) オリゴヌクレオチドが、タウをコードする m R N A 又はタウポリペプチドであ

10

20

30

40

50

る標的分子に特異的に結合することができる、
本発明のコンジュゲートに関する。

【0249】

本明細書中で使用する用語「タウ関連疾患」は、タウにおける異常と関連する疾患並びに「タウ障害」である疾患を指す。タウ関連疾患として、第17染色体遺伝子に連鎖しパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症（FTDP-17）、進行性核上麻痺、大脳皮質基底核変性症、ピック病、嗜銀性顆粒性疾患、並びにパーキンソン病、ダウン症候群、脳炎後パーキンソン症候群、筋緊張性ジストロフィー、ニーマンピックC病、ボクサー認知症、プリント（Blint）病、プリオン疾患、筋萎縮性側索硬化症、グアムのパーキンソン症候群認知症複合、多発性硬化症、緑内障、糖尿病性網膜症、及び外傷性脳損傷；並びにハンチントン病、レヴィー小体型認知症、シャルコー・マリー・トゥース病、遺伝性痙攣性対麻痺、及び多系統萎縮症が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書において定義する「タウ障害」は、脳におけるタウタンパク質の繊維形態（縋れ）と関連する神経変性性疾患を意味する。これらの疾患はADを含むが、しかしながら、他のタウ障害として、第17染色体遺伝子に連鎖しパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症（FTDP-17）、進行性核上麻痺、大脳皮質基底核変性症、ピック病、及び嗜銀性顆粒性疾患が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0250】

D. 7. ハンチンチンを標的とする核酸を含むコンジュゲート

他の態様において本発明は、ハンチンチン関連疾患の治療又は予防のための、

20

(i) 選択的作用剤が、セロトニン・ドーパミン・ノルエピネフリン再取り込み阻害剤（SDNRI）及びノルエピネフリン・ドーパミン再取り込み阻害剤（NDR I）の群から選択され、及び

(ii) オリゴヌクレオチドが、ハンチンチンをコードするmRNA又はハンチンチンポリペプチドである標的分子に特異的に結合することができる、
本発明のコンジュゲートに関する。

【0251】

本明細書中で使用する用語「ハンチンチン関連疾患」は、変異ハンチンチンタンパク質により惹起された異常な配座又は凝集又は発現を指し、ハンチントン疾患及びそれらの変種を含む疾患を含むが、これらに限定されない。

30

【0252】

特定の障害又は状態の治療に有効と思われる本発明の治療剤の量は、障害又は状態の性質に依存するであろうが、治療剤の投与が十分確立された標準的臨床技法により決定することができる。剤形に使用すべき厳密な用量は、投与経路、及び疾患又は障害の重症度にも依存依存すると思われる、医師の判断及び患者の必要性により決定すべきである。脳内投与のための適当な用量範囲は、一般的に1から3000マイクロリットルの1回の注射容量で送達されるマイクロリットル当たり約 10^3 から 10^{15} 感染性ユニットのウイルスベクターである。マイクロリットル当たりのベクター感染ユニットの添加量は、一般的に約10、50、100、200、500、1000、又は2000マイクロリットルで送達されるウイルスベクターの約 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 感染性ユニットを含む。効果的な用量は、インビトロ又はインビボ試験システムから導かれる用量-応答曲線から外挿することができる。

40

【0253】

根治療法のために本発明のコンジュゲートを脳室内に投与する目的で、接続口を有する複数のカテーテルを所与の患者に埋め込むことができる。好ましい実施形態においては、脳又は脳半球当たり1つの入り口と多分数本のカテーテルのシステムがある。神経外科医により埋め込みが実施されたら、患者の神経内科医は、数週間又は数ヶ月にわたって繰り返されるコンジュゲートのボラス注射からなる療法コースを、経時的治療効果をモニターしながら実施することができる。フルコースの療法のためには、デバイスを数ヶ月又は

50

数年間埋め込んだままにしておくことができる。治療の有効性の確認後、接続口を場合により取り出してもよく、またカテーテルを封じて廃棄することができ、又は同様に取り出すこともできる。デバイス材料は、磁気共鳴撮像に干渉するべきでなく、また、いうまでもなく、低分子干渉RNA製剤は、接続口及びカテーテル材料及び任意の表面コーティングと適合性でなければならない。

【0254】

E. 本発明のコンジュゲートの合成

本発明のコンジュゲートは、典型的には有機合成における標準的手順を使用して合成される。当業者は、合成の厳密なステップは、合成しなければならないコンジュゲートの厳密な構造物に依存することを理解するであろう。例えば、コンジュゲートが選択的作用剤にその5'末端を通してコンジュゲート化された単一の核酸鎖を含むならば、その場合、合成は、通常下で説明するようにアミノ活性化オリゴヌクレオチドと反応性の活性化された選択性試薬とを接触させることにより実施される。

10

【0255】

コンジュゲートが2本鎖核酸を含むと、その場合、センス鎖及びアンチセンス鎖は標準的分子の生物学の手順を使用してインピット口で別々に合成され、アニールされる。典型的なコンジュゲートにおいては、第1の核酸鎖が選択的作用剤を担持して第2の核酸鎖は保護基を担持する。さらにより好ましい実施形態においては、選択的作用剤は第1の核酸鎖の5'末端とカップリングし及び/又は保護基は第2の核酸鎖の5'末端に付くが、選択的作用剤又は保護基の付加は核酸鎖の3'末端で実施することもできる。

20

【0256】

コンジュゲートの合成は、以下のように実施することができる：

[1]

選択的作用剤 - [オリゴヌクレオチド] - 3'
という構造を有するコンジュゲートが、
典型的には以下のステップを使用して合成される：

(i) 選択的作用剤を活性化するステップ。好ましくは、選択的作用剤中の活性基はスクシンイミド基又はアミノ基である；

(ii) オリゴヌクレオチドをその5'末端で活性化するステップ。好ましくは、オリゴヌクレオチド中の活性基はアミノ基（この場合、選択的作用剤はスクシンイミド基により活性化されている）又はカルボキシル基（この場合、選択的作用剤はアミン基により活性化されている）である、及び

30

(iii) 活性化された選択的作用剤と活性化されたオリゴヌクレオチドとを2つの活性基間の反応に適した条件下で接触させるステップ。

【0257】

[2]

保護基 - [センス鎖] - 3'

3' - [アンチセンス鎖] - 選択的作用剤

という構造を有するコンジュゲートは、典型的には、以下のステップを使用して合成される：

40

(i) 選択的作用剤を活性化するステップ。好ましくは、選択的作用剤中の活性基はスクシンイミド又はアミノ基である；

(ii) オリゴヌクレオチドをその5'末端で活性化するステップ。好ましくは、オリゴヌクレオチド中の活性基はアミノ基（この場合、選択的作用剤はスクシンイミド基により活性化されている）又はカルボキシル基（この場合、選択的作用剤はアミン基により活性化されている）；

(iii) 活性化された選択的作用剤と活性化されたオリゴヌクレオチドとを2つの活性基間の反応に適した条件下で接触させるステップ；

(iv) 固定化したアンチセンス鎖に保護基を付加するステップ。このステップは好ましくは反応性基がアセチル化又はベンジル化（フラノース基）、2-シアノエチル化（ホ

50

スホジエステル連結)及びFMOC(環外アミノ基)により封鎖されているオリゴヌクレオチドを使用して実施される。

(v) センス鎖及びアンチセンス鎖をアニーリングするステップ。

【0258】

E. 1. 核酸と5'末端に付けたSSRIとを含むコンジュゲートの合成

本発明のコンジュゲートは、当業者により知られた技法を使用して調製することができる。コンジュゲートの合成は、官能基の選択的保護及び脱保護を含むことがある。適当な保護基は当業者にとって周知のことである。例えば、有機化学における保護基の総説は、Wuts, P. G. M. 及び Greene, T. W. により *Protecting Groups in Organic Synthesis* (4th Ed. Wiley-Interscience) で、及び Kocienski, P. J. により *Protecting Groups* (3rd Ed. Georg Thieme Verlag) で提供されている。

10

【0259】

本発明の関係においては、以下の用語は下で詳細に説明する意味を有する：

・用語「C₁ ~ C₆ アルキル」は、不飽和を含まず、単結合により該分子の他の部分に結びついた1から6個の、好ましくは1から3個の(C₁ ~ C₃ アルキル)炭素原子を有する炭素原子と水素原子とからなる線状又は分岐炭化水素基を指す。アルキル基の例として、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、t-ブチル、ペンチル及びヘキシルなどのアルキル基が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくはアルキルはメチルを指す。

20

・用語「ハロゲン」は、フロモ、クロロ、ヨード又はフルオロを指す。

・用語「ハロアルキル」は、少なくとも1個の水素原子がハロゲンにより置き換えられた上で定義したアルキル基を指す。ハロアルキル基の例として、CF₃、CCl₃、CHF₂、CF₂CF₃が挙げられるがこれらに限定されない。好ましくはハロアルキルはCF₃を指す。

・用語「C₆ ~ C₁₀ アリール」は、例えばフェニル、ナフチル及びジフェニルを含む炭素-炭素結合により結合したか又は融合した1個又は2個の芳香族核を含む6から10個の間の炭素原子を有する芳香族基を指す。好ましくは「アリール」はフェニルを指す。

・用語「ヘテロシクリル」は、炭素原子と窒素、酸素、及びイオウからなる群から選択される1から5個のヘテロ原子とからなり、部分的に又は完全に飽和していても芳香族(「ヘテロアリール」)であってもよい安定な3員~10員の環基、好ましくは5又は6員環を指す。本発明の目的に対して、複素環は、縮合環系を含んでもよい単環式、二環式又は三環式環系であることができる。特定の実施形態において、ヘテロシクリル基はスクシンイミドである。

30

【0260】

上記の式(I)により表される本発明の化合物は、キラル中心の存在に依存する立体異性体を含むことができる。単一異性体、エナンチオマー又はジアステレオ異性体及びそれらの混合物は本発明の範囲内に入る。

【0261】

特に断らない限り、本発明において使用する化合物は、1つ又は複数の同位体に富む原子存在のみが異なる化合物を含むことを意図される。例えば、水素の重水素又はトリチウムによる置換、又は炭素の¹³C又は¹⁴Cに富む炭素による置換又は¹⁵Nに富む窒素による置換を除く本発明の構造を有する化合物は、本発明の範囲内である。

40

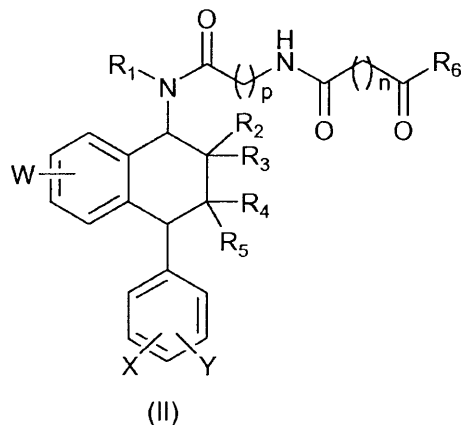
【0262】

i. アミノ誘導体化された核酸及び活性化されたセルトラリン誘導体を使用する合成

第1の実施形態において、本発明によるコンジュゲートは、アミノ誘導体化された核酸を活性化されたセルトラリンの誘導体形又はそれらのアナログにカップリングすることにより得ることができ、その場合、選択的作用剤の活性化された該誘導体は、式(II)の化合物である：

50

【化 3 4】



10

(式中、

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 及び R^5 は、水素及び $C_1 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され；
 X 及び Y は、水素、ハロゲン、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $C_1 \sim C_3$ ハロアルキル、 OR^a 及び SR^b から独立に選択され、ここで R^a 及び R^b は、 $C_1 \sim C_3$ アルキル及び $C_6 \sim C_{10}$ アリールから独立に選択され；

R^6 はカルボニル活性化基であり；

W は、水素、ハロゲン、 CN 、 NO_2 、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $C_1 \sim C_3$ ハロアルキル、 NR^cR^d 、 $SO_2NR^eR^f$ 、 $NR^gSO_2R^h$ 、 CO_2R^i から選択され、 R^c 、 R^d 、 R^e 、 R^f 、 R^g 、 R^h 及び R^i は、水素及び $C_1 \sim C_3$ アルキルから独立に選択され；

20

n 及び p は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 及び 13 から選択される。

【0263】

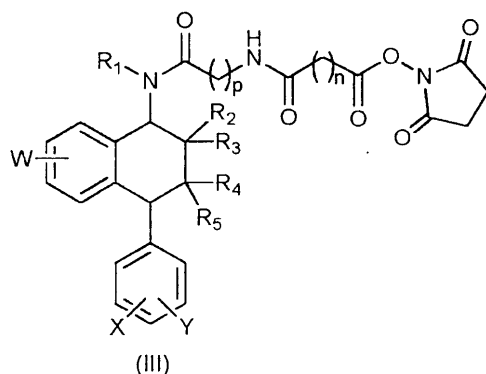
用語「カルボニル活性化基」は、カルボニルを求核付加し易くするカルボニルの置換基を指す。特定の実施形態において、それは、カルボニル基と一緒にあって、酸無水物、酸ハロゲン化物又はエステル基を形成する。好ましい実施形態において、カルボニル活性化基は、ハロゲン、 $-OC(O)R$ 、 $-OR'$ 、 $-SR''$ から選択され； R 、 R' 及び R'' は $C_1 \sim C_6$ アルキル、ハロアルキル、ヘテロシクリル、アリール及びヘテロアリールから独立に選択される。

30

【0264】

特定の実施形態において、 R^6 はスクシンイミドオキシ基である。それ故、他の実施形態において、本発明によるコンジュゲートは、アミノ誘導体化された核酸をセルトラリンの活性化された誘導体形又はそれらのアナログにカップリングすることにより得ることができ、該選択的作用剤の活性化された誘導体は、式 (III) の化合物である：

【化 3 5】



40

(式中、

50

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 及び R^5 は、水素及び $C_1 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され；
 X 及び Y は、水素、ハロゲン、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $C_1 \sim C_3$ ハロアルキル、 OR^a 及び SR^b から独立に選択され、ここで R^a 及び R^b は、 $C_1 \sim C_3$ アルキル及び $C_6 \sim C_{10}$ アリールから独立に選択され；

W は、水素、ハロゲン、 CN 、 NO_2 、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $C_1 \sim C_3$ ハロアルキル、 NR^cR^d 、 $SO_2NR^eR^f$ 、 $NR^gSO_2R^h$ 、 CO_2R^i から選択され、ここで R^c 、 R^d 、 R^e 、 R^f 、 R^g 、 R^h 及び R^i は、水素及び $C_1 \sim C_3$ アルキルから独立に選択され；

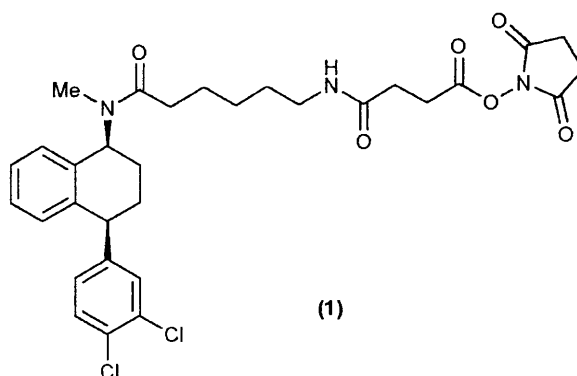
n 及び p は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 及び 13 から選択される）。

10

【0265】

特定の実施形態によれば、式 (III) の活性化された化合物は化合物 (1) である：

【化36】



20

【0266】

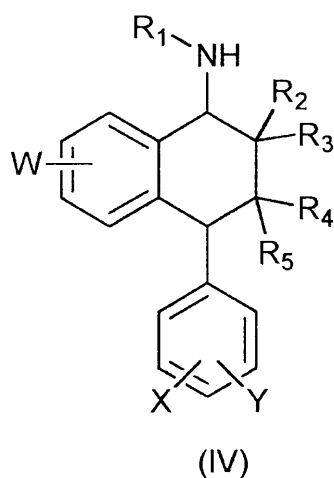
一実施形態によれば、式 (I) の化合物は、a) ないし d) を含む一連のステップにより調製することができる：

a)

式 (IV) の化合物

【化37】

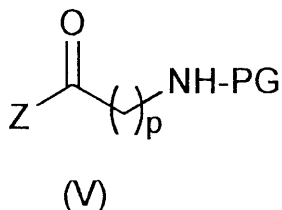
30



40

と式 (V) のアシル化剤

【化 3 8】

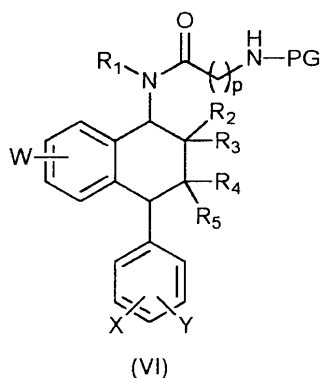


(式中、p は上で定義した通りであり、Z はハロゲン又は O H であり、及び P G はアミン保護基である)

10

とを反応させて、式 (V I) の化合物

【化 3 9】



20

を得るステップ；

【 0 2 6 7】

(アミンのために一般的に使用される保護基として、tert - ブチル、ベンジル、2, 2 - トリクロロエチル、2 - トリメチルシリルエチル、9 H - フルオレニルメチル (Fmoc)、アリル又はニトロフェニルカルバメートなどのカルバメート；ホルムアミド、アセトアミド、トリフルオロアセトアミド、スルホンアミド、トリフルオロメタンスルホニルアミド又は tert - ブチルスルホニルアミドなどのアミド；及び p - メトキシフェニル、ベンジル、p - メトキシベンジル、3, 4 - ジメトキシベンジル、ジメトキシトリチル又はモノメトキシトリチルアミンなどのアリール又はアリールアルキルアミンが挙げられる。特定の実施形態において、式 (V) のアシル化剤は 9 H - フルオレニルメトキシカルボニル - 6 - アミノヘキサン酸である。

30

【 0 2 6 8】

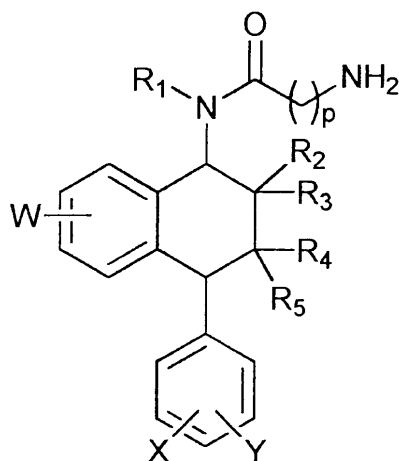
順送りで式 (I V) の化合物は、例えば米国特許第 6 4 5 5 7 3 6 号に記載されたようにして調製することができる。特に、式 (I V) の化合物がセルトラリンであれば、それは、対応するクロロハイドレート (市販で入手可能) から、アルカリ又はアルカリ土類炭酸塩又は水酸化物、アンモニア又はアミン、例えばトリメチルアミン、トリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、ピリジン、ピペリジン、モルホリンなどの有機又は無機塩基を含む適当な塩基で処理することにより得ることができる)

40

【 0 2 6 9】

b) 式 (I V) の化合物中のアミノ保護基を脱保護して式 (V I I) の化合物を得るステップ；

【化 4 0】



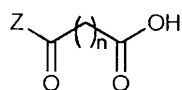
(VII)

(適 当 な 脱 保 護 条 件 は 、 例 え ば 、 P r o t e c t i n g G r o u p s i n O r g a n i c S y n t h e s i s (W u t s , P . G . M . a n d G r e e n e T . W . , 4 ^{t h} E d . W i l e y - I n t e r s c i e n c e) 及 び P r o t e c t i n g G r o u p s (K o c i e n s k i P . J . , 3 ^{r d} E d . G e o r g T h i e m e V e r l a g) で 当 業 者 に 知 ら れ て い る 。 特 定 の 実 施 形 態 に お い て 、 保 護 基 は 、 ピ ペ リ ジ ン 、 モ ル ホ リ ン 、 ジ シ ク ロ ヘ キ シ ル ア ミ ン 、 ジ イ ソ プ ロ ピ ル エ チ ル ア ミ ン 又 は ジ メ チ ル ア ミ ノ ピ リ ジ ン な ど の ア ミ ン の 存 在 下 で 、 好 ま し く は ピ ペ リ ジ ン の 存 在 下 で 除 去 さ れ る)

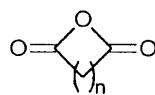
【 0 2 7 0】

c) 式 (V I I) の 化 合 物 を 式 (V I I I) 又 は (I X) の ア シ ル 化 剤 と 反 応 さ せ て 、

【化 4 1】



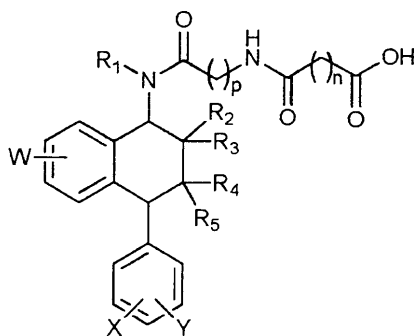
(VIII)



(IX)

(式 中 、 n は 上 で 定 義 し た 通 り で あり 、 Z は ハ ロ ゲ ン 又 は O H で あ る) 、 式 (X) の 化 合 物 を 得 る ス テ ッ プ :

【化 4 2】



(X)

(特 定 の 実 施 形 態 に お い て 、 式 (V I I) の ア シ ル 化 剤 は コ ハ ク 酸 酸 無 水 物 で あ る)

【 0 2 7 1】

d) 式 (X) の 化 合 物 を カ ル ボ ニ ル 活 性 化 基 で 処 理 す る ス テ ッ プ。

用語「カルボニル活性化基」は、カルボン酸基のカルボニルを例えば酸無水物、カルボン酸ハロゲン化物、カルボジイミド、ハロゲン化剤、ジスルフィドなど求核付加をより受け易いものに変換する化合物を指す。特定の実施形態において、カルボニル活性化基は、ハロゲン化剤、 $R(O)COC(O)R$ 、 $RC(O)$ ハロゲン、 $R'OH$ 、 $R'SH$ 、 $R'SSR'$ から選択され； R 、 R' 及び R'' は $C_1 \sim C_6$ アルキル、ハロアルキル、ヘテロシクリル、アリール及びヘテロアリールから独立に選択される。

【0272】

特定の実施形態において、カルボニル活性化基はN-ヒドロキシ-スクシンイミドである。この場合、反応は、好ましくはさらなるカルボニル活性化基の存在下で実施される。

【0273】

それ故、特定の実施形態において、ステップd)は、さらなるカルボニル活性化基の存在下で式(X)の化合物をN-ヒドロキシスクシンイミドで処理することを含む。

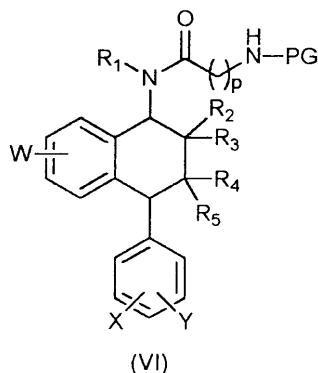
【0274】

この過程に適したカルボニル活性化基として、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)及びジイソプロピルカルボジイミド(DIC)などのカルボジイミド、並びに1-ヒドロキシ-ベンゾトリアゾール(HOBt)及び1-ヒドロキシ-7-アザ-ベンゾトリアゾール(HOAt)などのトリアゾールが挙げられる。好ましい実施形態において、式(VI)の化合物は、ジイソプロピルカルボジイミドの存在下でN-ヒドロキシスクシンイミドと反応して式(II)の活性化された誘導体を生ずる。

【0275】

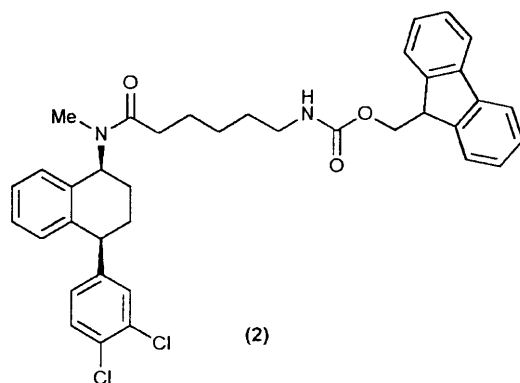
他の態様によれば、本発明は、式(VI)の中間体を指向する：

【化43】



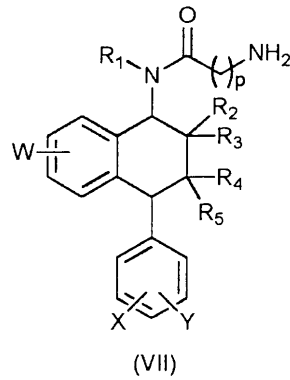
(式中、 $R^1 \sim R^5$ 、 X 、 Y 、 W 、 p 及び PG は上で定義した通りである。好ましい実施形態において、 R^1 はメチルであり、 $R^2 \sim R^5$ は水素であり、 X 及び Y は塩化物であり、 W は水素であり、 p が5であり、及び PG は9H-フルオレニルメトキシカルボニルである)。より好ましくは、式(VI)の化合物は化合物(2)である。

【化44】



他の態様によれば、本発明は、式(VII)の中間体を指向する。

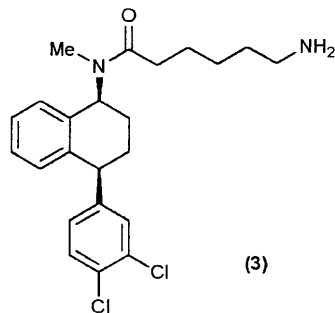
【化 4 5】



10

(式中、 $R^1 \sim R^5$ 、 X 、 Y 、 W 及び p は上で定義した通りである。好ましい実施形態において、 R^1 はメチルであり、 $R^2 \sim R^5$ は水素であり、 X 及び Y は塩化物であり、 W は水素であり及び p は5である。より好ましくは、式(V)の化合物は化合物(3)である。

【化 4 6】

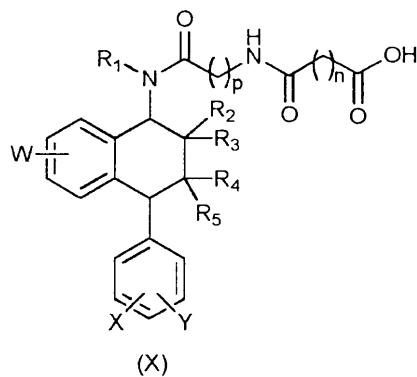


20

【 0 2 7 6】

他の態様によれば、本発明は式(X)の中間体を指向する。

【化 4 7】

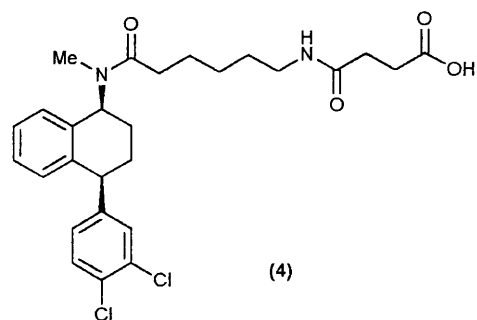


30

(式中、 $R^1 \sim R^5$ 、 X 、 Y 、 W 、 p 及び n は、上で定義した通りである)。好ましい実施形態において、 R^1 はメチルであり、 $R^2 \sim R^5$ 水素であり、 X 及び Y は塩化物であり、 W は水素であり、 p が5であり及び n は2である)。より好ましくは、式(VIII)の化合物は化合物(4)である。

40

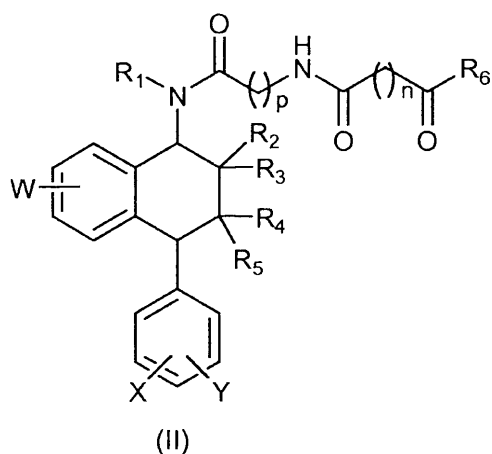
【化 4 8】



10

他の態様によれば、本発明は式 (I I) の中間体を指向する。

【化 4 9】



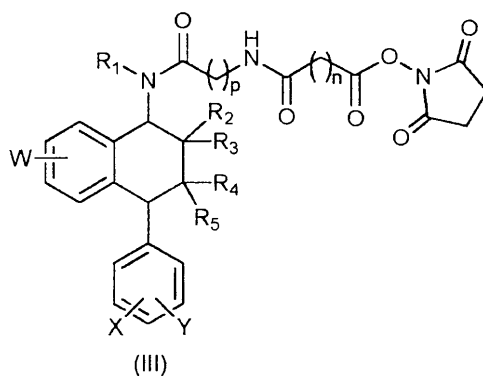
20

(式中、 $R^1 \sim R^6$ 、 X 、 Y 、 W 、 p 及び n は上で定義した通りである)。

【 0 2 7 7 】

他の態様によれば、本発明は式 (I I I) の中間体を指向する。

【化 5 0】

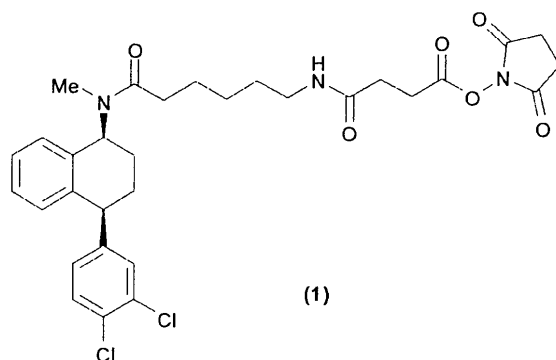


30

40

(式中、 $R^1 \sim R^5$ 、 X 、 Y 、 W 、 p 及び n は上で定義した通りである)。好ましい実施形態において、 R^1 はメチルであり、 $R^2 \sim R^5$ は水素であり、 X 及び Y は塩化物であり、 W は水素であり、 p が 5 であり及び n は 2 である。より好ましくは、式 (I I) の化合物は化合物 (1) である。

【化 5 1】



10

【0278】

選択的作用剤に付けようとする siRNA 鎖は、M. J. Gait 編集の「Oligonucleotide synthesis, a practical approach」(IRL Press 1985)に開示された方法にしたがって、固体支持体上で段階的固相合成により形成することができる。

【0279】

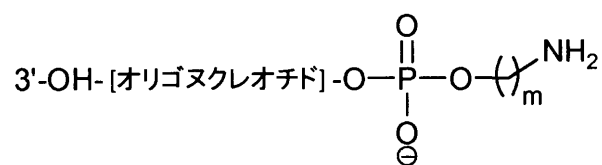
選択性リガンドをコンジュゲート化するためには、オリゴヌクレオチドをアミノ誘導体にする必要がある。これは、5' 又は 3' 末端で行うことができる。好ましい実施形態において、選択性リガンドは 5' 末端に付けられる。

20

【0280】

一実施形態によれば、式 (I) のコンジュゲートは、上記の式 (II) 又は (III) の化合物と式 (XII) のアミノ改変オリゴヌクレオチドとを反応させることにより調製することができる。

【化 5 2】



(XII)

30

【0281】

アミノリンカー改変剤を使用してオリゴヌクレオチドを活性化する一般的手順は下記のスキームによるであろう。

$$\text{OH-5'-オリゴヌクレオチド-CPG} + \text{R}-\underset{\text{N(iPr)}_2}{\text{N}}-(\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{P}-\text{OCN} \rightarrow \text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_n-\text{O}-\underset{\text{O}^-}{\overset{\text{O}}{\text{P}}}-\text{O}-\text{オリゴヌクレオチド}$$
CC(C)N(C(C)C)P(=O)(OCC#N)OCCNPG

(式中、mは上で定義した通りであり、PGはアミン保護基である)。アミンのために普通使用される保護基として、tert-ブチル、ベンジル、2,2,2-トリクロロエチル、2-トリメチルシリルエチル、9H-フルオレニルメチル(Fmoc)；アリル又はニトロフェニルカルバメートなどのカルバメート；ホルムアミド、アセトアミド、トリフルオロアセトアミド、スルホンアミド、トリフルオロメタンスルホニルアミド又はtert-ブチルスルホニルアミドなどのアミド；及びp-メトキシフェニル、ベンジル、p-メトキシベンジル、3,4-ジメトキシベンジル、ジメトキシトリチル又はモノメトキシトリチルアミンなどのアリール又はアリールアルキルアミンが挙げられる。特定の実施形態において、式(XIII)のアミノリンカーは、6-(トリフルオロアセチルアミノ)ヘキシル-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホルアミダイト(5'-TFA-C6-アミノ改変剤-CEP)又は6-(4-モノメトキシトリチルアミノ)ヘキシル-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホルアミダイト(5'-MMT-C₆-アミノ改変剤-CEP)である。

オリゴヌクレオチドの 5' - OH 基をアミノリンカーにカップリング後、アミン保護基が知られた条件下で除去される。例えば、TFA 保護アミノ誘導体は、アンモニア処理により脱保護することができるが、それに対して MMT 保護アミノ誘導体は、酢酸、クロロ酢酸、ジクロロ酢酸又はトリフルオロ酢酸で処理することにより脱保護することができる。

【 0 2 8 4 】

アミノ改変オリゴヌクレオチド合成の一般的方法：

(i) 無水アセトニトリル中のリンカー / 改変剤分子 (真空乾燥) の溶液 (市販のアミダイトの大部分で 0 . 1 M 溶液が使用される) を調製して合成装置中の追加の貯蔵器に入れる (Y) ；

(i i) 必要とされるオリゴヌクレオチド配列の合成開始時に、Y の塩基を 5 ' 末端に付加する。これが Y の貯蔵器からのリンカー / 改変剤分子がオリゴヌクレオチド配列の末端にカップリングすることを可能にするであろう。

(i i i) 適当なカップリングサイクルを使用する合成を開始する。同じカップリングサイクルが、リンカー / 改変剤分子カップリングを実施するために使用されるであろう。

(i v) オリゴヌクレオチド合成終了時に、支持体を洗浄して最後に支持体をガスで乾燥する。

(v) 固体支持体をカラムから取り出してスクリーキャップ付きバイアル中に移し、2 ステップの脱保護を完了する。

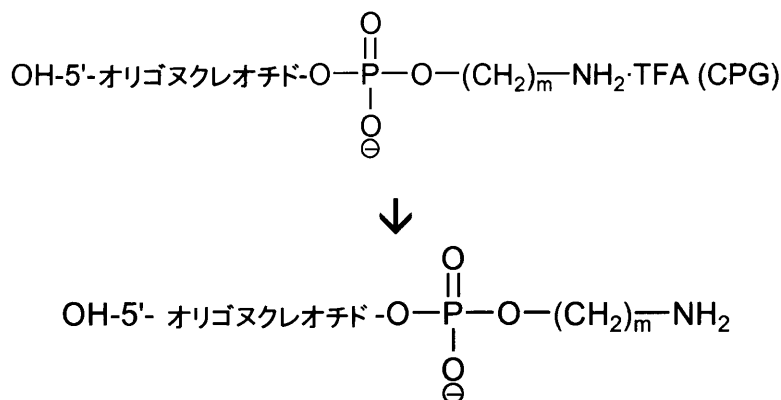
【 0 2 8 5 】

アミノ改変オリゴヌクレオチドは、さらに選択的作用剤と接合するために脱保護しなければならない。この目的のために、オリゴヌクレオチド中の全ての残余の保護基を以下のようにして除去する。20 % v / v のメチルアミン (水溶液 40 % w / v) 及び 80 % v / v の飽和アンモニア溶液 (30 ~ 32 % w / v の NH_3 を含有する) を含有する 500 μl の混合物をオリゴヌクレオチド (200 nmol 規模) の入ったエッペンドルフチューブに加える。該チューブを密閉して 45 分間 65 の温度に加熱した。この手順によりヌクレオチドのリン原子における保護基 (フラノースのアセチル化又はベンゾイル化及びホスホジエステル連結の 2 - シアノエチル化) 及び環外アミノ基の保護基 (Bz、Ac、IBu) が除去される。次に混合物を冷却して濾過し、上清を乾燥した。残留ペレットを 1 M トリエチルアミン - HF と 3 時間 65 で反応させて保護基をヌクレオチド (2 ' - t - ブチルジメチルシリル - TBDMS) の 2 ' で切断した。最後に、生じた溶液をセファデックスカラムで脱塩すると、アミノ改変 - 5 ' - オリゴヌクレオチドが残った。

【 0 2 8 6 】

アミノ改変剤リンカーを 3 ' OH 末端に組み込む場合；対応するポリマー支持体 (CPG ボール) を使用すべきで、合成スキームは以下の流れ図に対応するであろう。

【 化 5 5 】



(加水分解は水酸化アンモニウム又はベックマン試薬を使用することにより行うことができる) (メチルアミン：水酸化アンモニウム) 。

【 0 2 8 7 】

両方の場合とも、脱保護ステップは同一で、そのような場合における接合手法も同じであるが有効性の程度は異なるであろう。大抵の場合、5 ' - アミノ誘導体化を用いる方がよい結果が得られる。

【 0 2 8 8 】

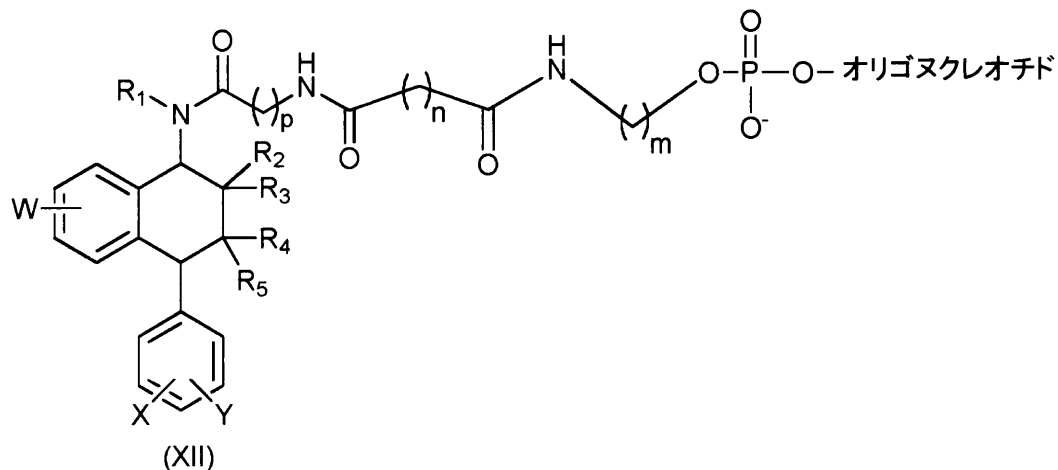
好ましい実施形態において、オリゴヌクレオチドは、配列番号：5 ~ 12 の群から選択

される配列を含むことができる。

【 0 2 8 9 】

アミノ基が活性化されたオリゴヌクレオチドは、次に式 (I I) 又は (I I I) の選択的作用剤の上で定義した活性化された誘導体と反応させられる。構造

【 化 5 6 】



10

(式中、R¹ ~ R⁵、X、Y、W、p 及び n は上で定義した通りであり、m は 2 から 10

20

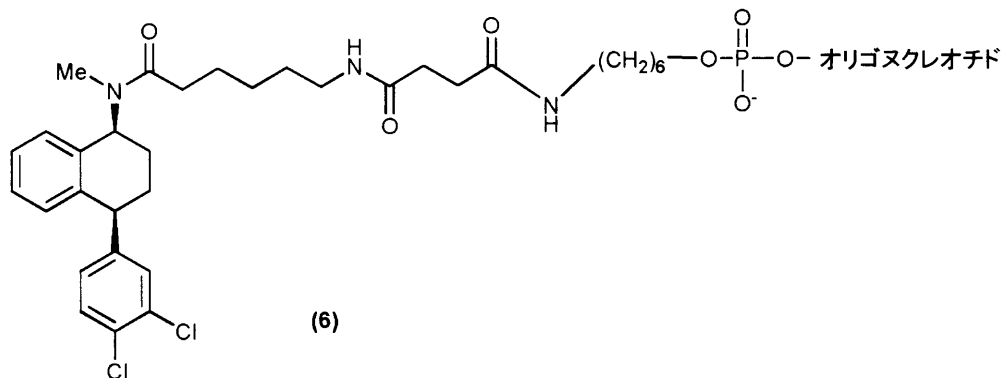
である)

を有するコンジュゲートが得られる。

【 0 2 9 0 】

好ましい実施形態において、コンジュゲートは、構造

【 化 5 7 】



30

を有する。

【 0 2 9 1 】

特定の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、2 価又は 3 価のホスホルアミドと予め反応させてある。このように、2 つ又は 3 つのカップリング位置を有する化合物を得ることができて、その結果、選択的作用剤の 2 つの又は 3 つの分子がオリゴヌクレオチドとカップリングすることができる。選択的作用剤の前記 2 つの又は 3 つの分子は、同じであっても異なってもよい。

40

【 0 2 9 2 】

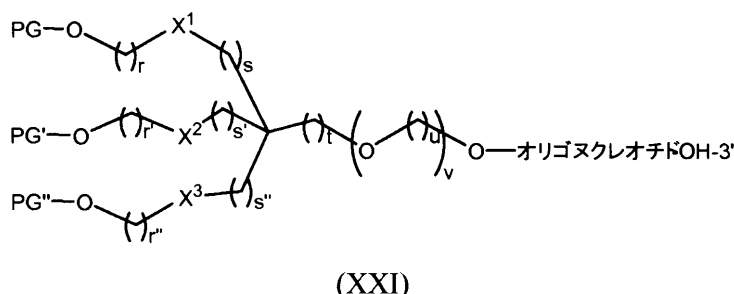
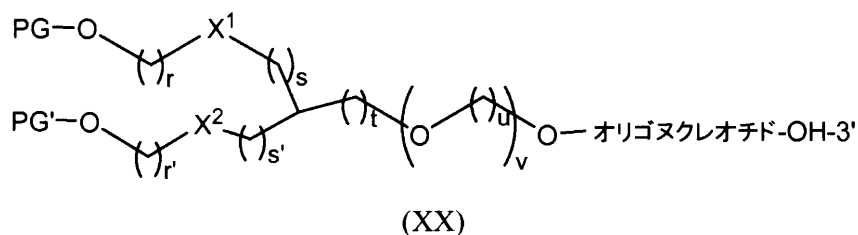
特定の実施形態において、同じ選択的作用剤の 2 つ又は 3 つの分子がオリゴヌクレオチドにカップリングされる。他の実施形態においては、2 つ又は 3 つの異なった選択的作用剤がオリゴヌクレオチドにカップリングされる。

【 0 2 9 3 】

ある実施形態において、オリゴヌクレオチドは 2 価又は 3 価のホスホルアミダイトと反応して式 (X X) 又は (X X I) の化合物を生ずる：

50

【化 5 8】



10

(式中、
 PG、PG'、PG''及びPG'''は、H及びヒドロキシ保護基から独立に選択され；
 r、r'、r''、s、s'、s''、t及びuは、0、1、2、3、4、5、6、7、
 8、9、10、11、12及び13から独立に選択され；
 vは0及び1から独立に選択され；及び
 X¹、X²及びX³は、CH₂、O、S、NH、CO、C(O)O及びC(O)NHから
 独立に選択される)。

20

【0294】

ヒドロキシ保護基、並びに適当な保護及び脱保護条件は、当業者には、例えばProtecting Groups in Organic Synthesis (Wuts, P. G. M. and Greene T. W., 4th Ed. Wiley-Interscience) 及びProtecting Groups (Kocienski P. J., 3rd Ed. Georg Thieme Verlag) で知られている。

30

【0295】

特定の実施形態において、ヒドロキシ保護基は、エーテル、シリルエーテル、エステル、スルホネート、スルフェネート、スルフィネート、カーボネート及びカルバメートから選択される。好ましい実施形態においては、ヒドロキシル保護基は、アセチル、ベンゾイル、ベンジル、メトキシエトキシメチルエーテル(MEM)、ジメトキシトリチル(DMT)、メトキシメチルエーテル(MOM)、メトキシトリチル(MMT)、p-メトキシベンジルエーテル(PMB)、メチルチオメチルエーテル、ピバロイル(Piv)、テトラヒドロピラニル(THP)、トリチル(Tr)、9H-フルオレニルメチル(Fmoc)、トリメチルシリル(TMS)、tert-ブチルジメチルシリル(TBDMS)、tert-ブチルジメチルシリルオキシメチル(TOM)、及びトリイソプロピルシリル(TIPS)エーテルから選択される。好ましくは、PG、PG'及びPG''は、H、DMT及びFmocから独立に選択される。

40

【0296】

特定の実施形態において、式(XX)又は(XXI)の化合物中のヒドロキシル保護基は異なり、その結果それらは、選択的に脱保護されて、所望であれば、異なった分子とカップリングされ得る。

【0297】

特定の実施形態は、r及びr'が4であり、s及びs'が1であり、t及びvが0であり、X¹及びX²がC(O)NHを表し、及びPG¹及びPG²が、H、DMT及びFm

50

o c から独立に選択される式 (X X) の化合物を指向している。他の実施形態においては、r が 2 であり、r ' が 0 であり、s が 1 であり、s ' が 0 であり、t 及び v が 0 であり、X ¹ 及び X ² は C H ₂ を表し、P G ¹ 及び P G ² は H 及び D M T から独立に選択される式 (X X) の化合物に關係する。

【 0 2 9 8 】

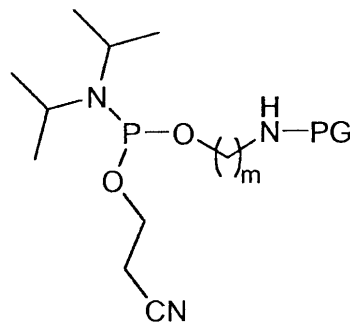
ある実施形態は、r、r ' 及び r ' ' が 3 であり、s、s ' 及び s ' ' が 1 であり、t が 1 であり、v が 0 であり、X ¹、X ² 及び X ³ が O を表し、及び P G ¹、P G ² 及び P G ³ が H 及び D M T から独立に選択される式 (X X I) の化合物を指向する。他の実施形態は、r、r ' 及び r ' ' が 3 であり、s、s ' 及び s ' ' が 1 であり、t が 1 であり、u が 3 であり、v が 1 であり、X ¹、X ² 及び X ³ が O を表し、P G ¹、P G ² 及び P G ³ が H 及び D M T から独立に選択される式 (X X I) の化合物に關係する。

10

【 0 2 9 9 】

式 (X X) 及び (X X I) の化合物は次に脱保護され、必要ならば、式 (X I I I) のアミノ改変剤と反応して：

【 化 5 9 】

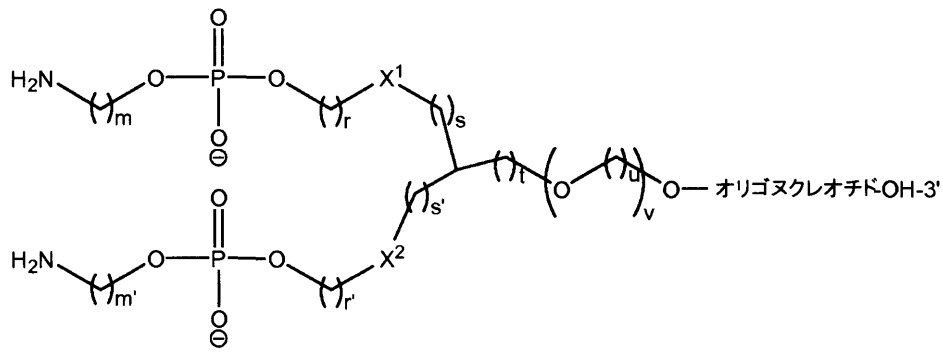


20

(XIII)

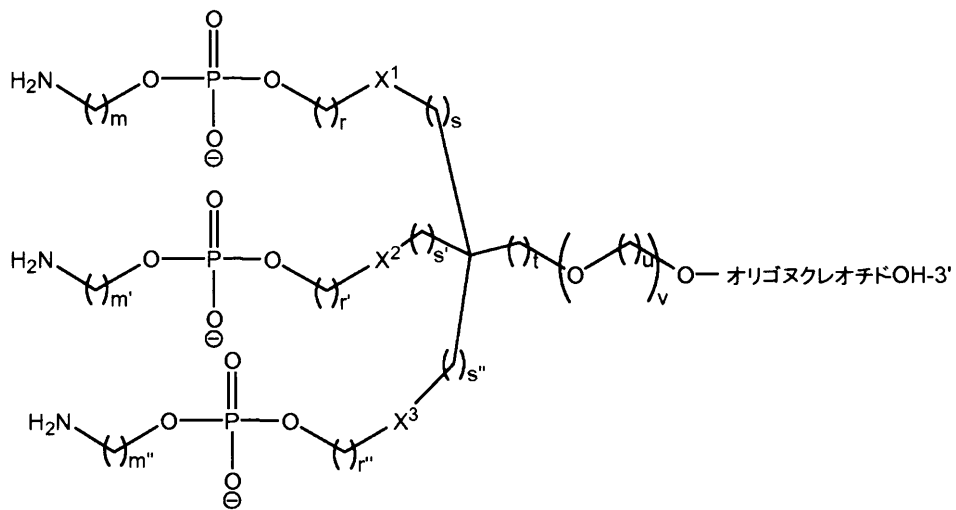
(式中、m 及び P G は上で定義した通りである) それぞれ式 (X X I I) 又は (X X I I I) の化合物を生ずる：

【化 6 0】



(XXII)

10



(XXIII)

20

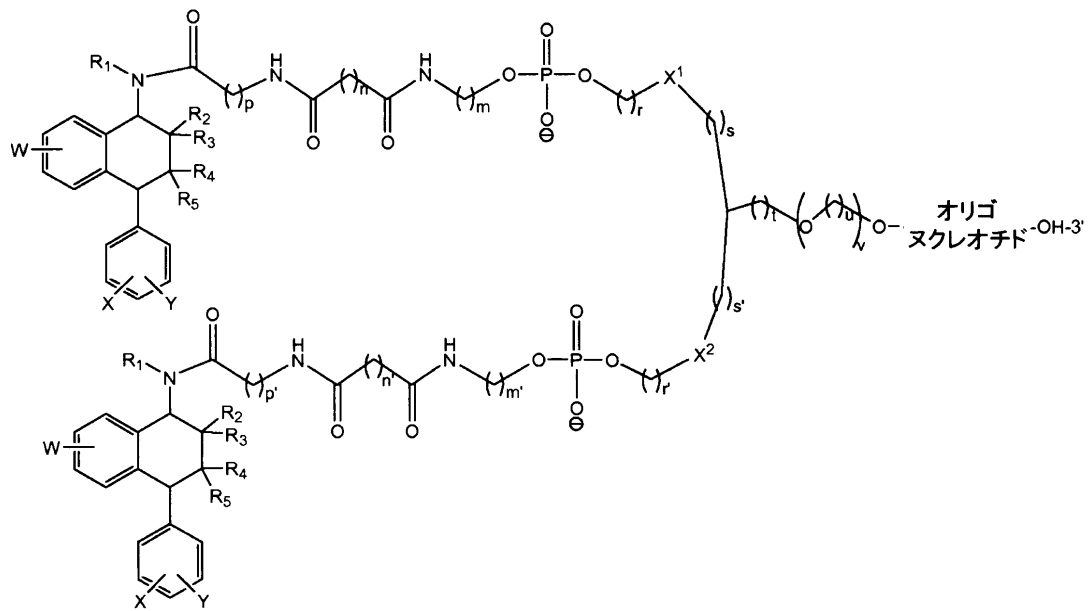
30

(式中、
 m 、 m' 、 m'' 、 r 、 r' 、 r'' 、 s 、 s' 、 s'' 、 t 、 u 、 v 、 X^1 、 X^2 及び
 X^3 は前に定義した通りである)。

【0300】

式(XXII)及び(XXIII)の化合物は、式(II)の化合物と、好ましくは式
 (III)の化合物とさらに反応することができて、それぞれコンジュゲート(XXIV)
)及び(XXV)を生ずる：

【化 6 1】

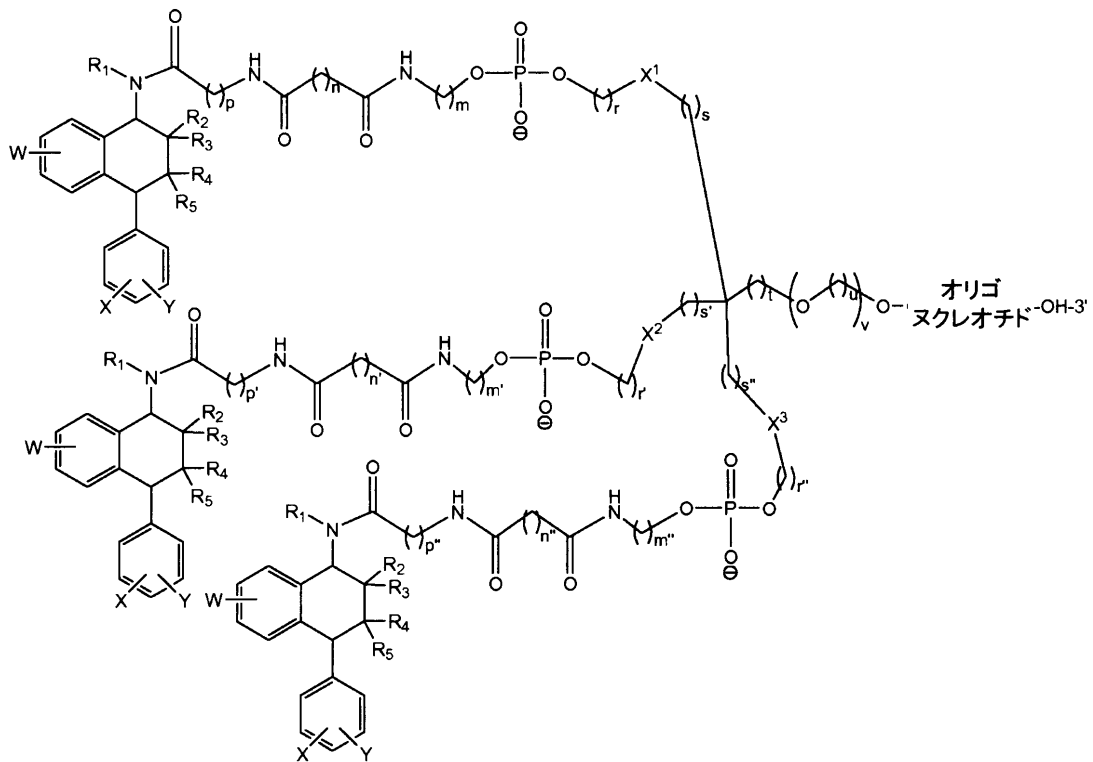


10

(XXIV)

20

【化 6 2】



30

40

(XXV)

(式中、
 m 、 m' 、 m'' 、 n 、 n' 、 n'' 、 p 、 p' 、 p'' 、 r 、 r' 、 r'' 、 s 、 s' 、 s'' 、 t 、 u 、 v 、 X^1 、 X^2 、 X^3 、 $R^1 \sim R^5$ 、 W 、 X 、 Y 及び Z は、前に記載した通りである)。

【0301】

50

ある特定の実施形態は上で定義した式 (X X I V) の化合物を指向する。

【0302】

他の実施形態は、式 (X X I V) の化合物 (式中、選択的作用剤がセルトラリンであり、 p 及び p' が 5 であり、 n 及び n' が 2 であり、 m 及び m' が 6 であり、 r 及び r' が 4 であり、 s 及び s' が 1 であり、 t 及び v が 0 であり並びに X 及び X' が $C(O)NH$ を表す) を指向する。他の実施形態は、式 (X X I V) の化合物 (式中、選択的作用剤がセルトラリンであり、 p 及び p' が 5 であり、 n 及び n' が 2 であり、 m 及び m' が 6 であり、 r が 2 であり、 r' が 0 であり、 s が 1 であり、 s' が 0 であり、 t 及び v が 0 であり、並びに X 及び X' が CH_2 を表す) を指向する。

【0303】

ある特定の実施形態は上で定義した式 (X X V) の化合物を指向する。

【0304】

ある特定の実施形態は、式 (X X V) の化合物 (式中、選択的作用剤がセルトラリンであり、 p 、 p' 及び p'' が 5 であり、 n 、 n' 及び n'' が 2 であり、 m 、 m' 及び m'' が 6 であり、 r 、 r' 及び r'' が 3 であり、 s 、 s' 及び s'' が 1 であり、 t が 1 であり、 v が 0 であり並びに X 、 X' 及び X'' が O を表す) を指向する。他の実施形態は、式 (X X V) の化合物 (式中、選択的作用剤がセルトラリンであり、 p 、 p' 及び p'' が 5 であり、 n 、 n' 及び n'' が 2 であり、 m 、 m' 及び m'' が 6 であり、 r 、 r' 及び r'' が 3 であり、 s 、 s' 及び s'' が 1 であり、 t が 1 であり、 u が 3 であり、 v が 1 であり並びに X 、 X' 及び X'' が O を表す) を指向する。

【0305】

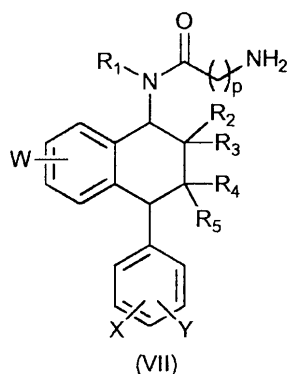
i i . カルボキシル誘導体化された核酸及びアミノ誘導体化されたセルトラリンを使用しする合成

他の実施形態において、本発明のコンジュゲートは、アミノ誘導体化された選択的作用剤とカルボキシル誘導体化されたオリゴヌクレオチドとの接合により得られる。

【0306】

特定の実施形態において、選択的作用剤の活性化された誘導体は式 (V I I) の化合物である：

【化63】



(式中、

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 及び R^5 は、水素及び $C_1 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され； X 及び Y は、水素、ハロゲン、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $C_1 \sim C_3$ ハロアルキル、 OR^a 及び SR^b から独立に選択され、ここで R^a 及び R^b は、 $C_1 \sim C_3$ アルキル及び $C_6 \sim C_{10}$ アリールから独立に選択され；

W は、水素、ハロゲン、 CN 、 NO_2 、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $C_1 \sim C_3$ ハロアルキル、 NR^cR^d 、 $SO_2NR^eR^f$ 、 $NR^gSO_2R^h$ 、 CO_2R^i から選択され、ここで R^c 、 R^d 、 R^e 、 R^f 、 R^g 、 R^h 及び R^i は、水素及び $C_1 \sim C_3$ アルキルから独立に選択され；

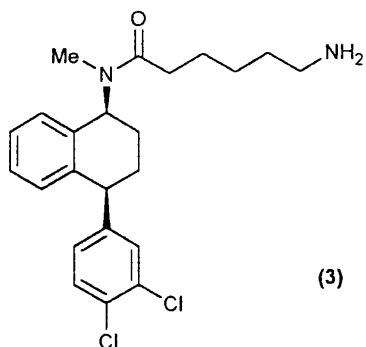
p は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 及び 13 から選択される

）。

【 0 3 0 7 】

ある特定の実施形態によれば、活性化された式（ I I ）の化合物は上記の化合物（ 3 ）である。

【 化 6 4 】

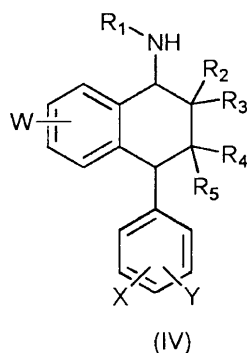


10

【 0 3 0 8 】

式（ V I I ）の化合物は、
（ i ）式（ I V ）の化合物

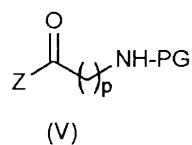
【 化 6 5 】



30

と式（ V ）のアシル化剤：

【 化 6 6 】

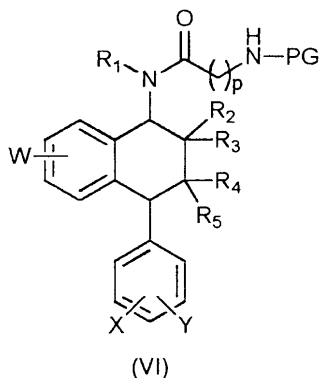


（式中、pは上で定義した通りであり、Zはハロゲン又はOHであり、及びPGはアミン保護基である）

とを反応させて式（ V I ）の化合物

40

【化 6 7】



10

を得るステップ（アミンのために通常使用される保護基として、tert - ブチル、ベンジル、2, 2, 2 - トリクロロエチル、2 - トリメチルシリルエチル、9H - フルオレニルメチル（Fmoc）、アリル又はニトロフェニルカルバメートなどのカルバメート；ホルムアミド、アセトアミド、トリフルオロアセトアミド、スルホンアミド、トリフルオロメタンスルホニルアミド又はtert - ブチルスルホニルアミドなどのアミド；及び、p - メトキシフェニル、ベンジル、p - メトキシベンジル、3, 4 - ジメトキシベンジル、ジメトキシトリチル又はモノメトキシトリチルアミンなどのアリール又はアリールアルキルアミンが挙げられる。特定の実施形態において、式（VII）のアシル化剤は9H - フルオレニルメトキシカルボニル - 6 - アミノヘキサン酸である。

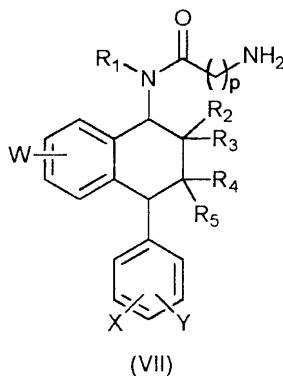
20

順送り式（III）の化合物は例えば上記のようにして調製することができる）と；

【0309】

（ii）式（VI）の化合物中のアミノ保護基を脱保護して式（VII）の化合物

【化 6 8】



30

を得るステップ（適当な脱保護条件は、例えばProtecting Groups in Organic Synthesis (Wuts, P. G. M. and Green T. W., 4th Ed. Wiley - Interscience) 及びProtecting Groups (Kocienski P. J., 3rd Ed. Georg Thieme Verlag) で当業者に知られている。特定の実施形態において、保護基は、ピペリジン、モルホリン、ジシクロヘキシルアミン、ジイソプロピルエチルアミン又はジメチルアミノピリジンなどのアミンの存在下で、好ましくはピペリジンの存在下で除去される）と；

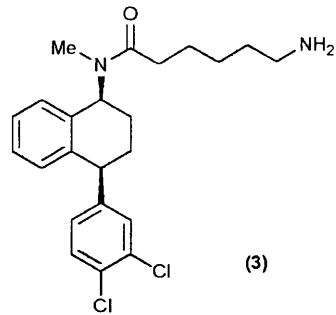
40

を含む一連のステップにより上記のようにして調製することができる。

【0310】

好ましい実施形態において、アミノ改変選択的作用剤は化合物（3）に対応する。

【化 6 9】



10

【0311】

選択的作用剤に付けようとする siRNA 鎖は、M. J. Gait, 編集の「Oligonucleotide synthesis, a practical approach」(IRL Press - 1985) に開示された方法にしたがって固体支持体上の段階的固相合成により形成される。

【0312】

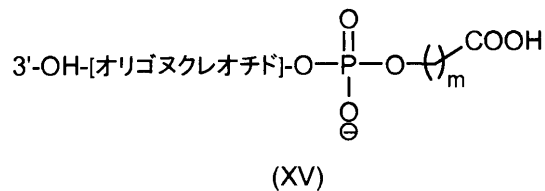
選択性リガンドをコンジュゲート化するために、オリゴヌクレオチドをカルボキシ誘導体にする必要がある。これは 5' 又は 3' 末端で行うことができる。好ましい実施形態において、選択性リガンドは 5' 末端に付けられる。

20

【0313】

一実施形態によれば、式 (XIV) のコンジュゲートは、上記の式 (VII) の化合物と式 (XV) :

【化 7 0】



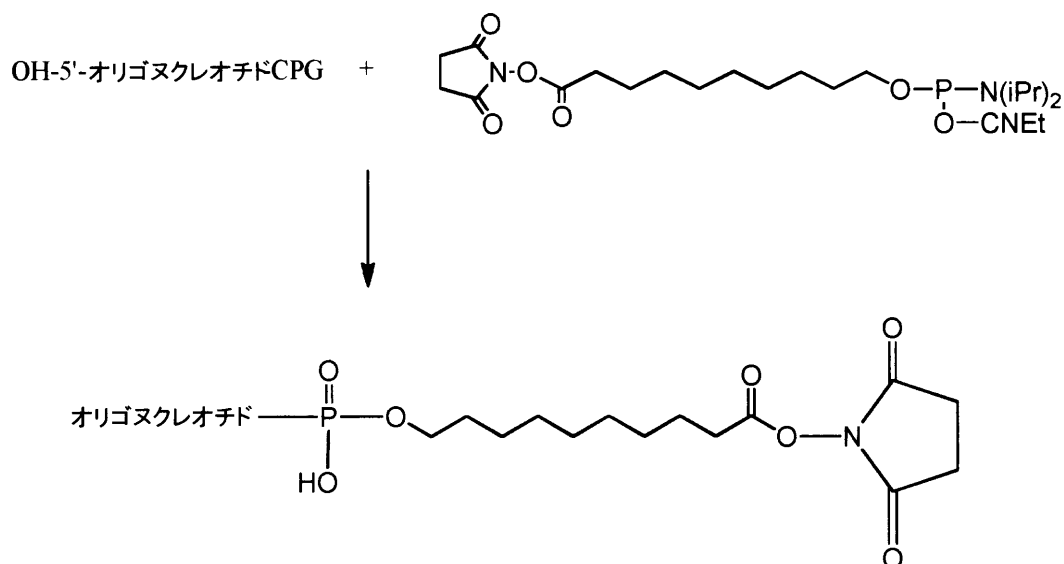
30

のカルボキシ改変オリゴヌクレオチドとを反応させることにより調製することができる。

【0314】

カルボキシリンカー改変剤を使用してオリゴヌクレオチドを活性化する一般的手順は、典型的には下記のスキームにしたがうであろう。

【化 7 1】



10

【0315】

カルボキシ改変オリゴヌクレオチドを合成する一般的方法：

(i) 無水アセトニトリル中で改変剤分子溶液を調製して、それを追加の貯蔵器に入れる (Y)。

20

(ii) 必要とされるオリゴヌクレオチド配列の合成開始時に、Y塩基を5'末端に付加する。これがY貯蔵器からのリンカー/改変剤分子がオリゴヌクレオチド配列の末端にカップリングすることを可能にするであろう。

(iii) 適当なカップリングサイクルを使用する合成を開始する。同じカップリングサイクルが、リンカー/改変剤分子カップリングを実施するために使用されるであろう。

(iv) オリゴヌクレオチド合成終了時に、支持体を洗浄して最後に支持体をガスで乾燥する。

(v) 固体支持体をカラムから取り出してスクリーキャップ付きバイアル中に移し、2ステップの脱保護を完了する。

30

【0316】

カルボキシ改変オリゴヌクレオチドは、選択的作用剤とさらにコンジュゲーションさせるために脱保護すべきである。この目的のために、オリゴヌクレオチド中の全ての残余の保護基を以下のようにして除去する。20% v/vのメチルアミン(水溶液40% w/v)及び80% v/vの飽和アンモニア溶液、(30~32% w/vのNH₃を含有する)を含有する500 µlの混合物をオリゴヌクレオチド(200 nmol規模)の入ったエッペンドルフチューブに加える。該チューブを密閉して45分間65℃の温度に加熱した。この手順によりヌクレオチドのリン原子における保護基(フラノースのアセチル化又はベンゾイル化及びホスホジエステル連結の2-シアノエチル化)及び環外アミノ基の保護基(Bz、Ac、IBu)が排除される。次に混合物を冷却して濾過し、上清を乾燥した。残留ペレットを1Mトリエチルアミン-HFと3時間65℃で反応させて保護基をヌクレオチド(2'-t-ブチルジメチルシリル-TBDMS)の2'で切断した。最後に、生じた溶液をセファデックスカラムで脱塩すると、カルボキシ改変-5'-オリゴヌクレオチドが残った。

40

【0317】

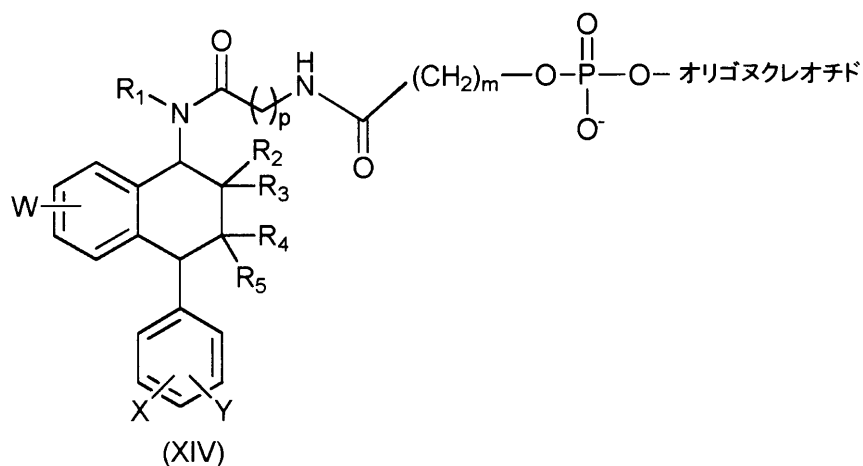
好ましい実施形態において、オリゴヌクレオチドは、配列番号：5~12の群からから選択される配列を含むことができる。

【0318】

次にカルボキシル活性化オリゴヌクレオチドを、上で定義した式(VII)の選択的作用剤の活性化された誘導体と反応させる。一般式：

50

【化 7 2】



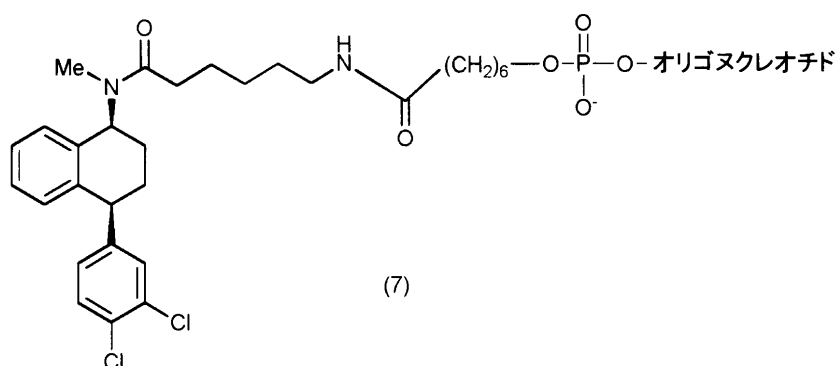
10

を有する化合物が得られる。

【 0 3 1 9 】

特定の実施形態において、該コンジュゲートは、構造

【化 7 3】



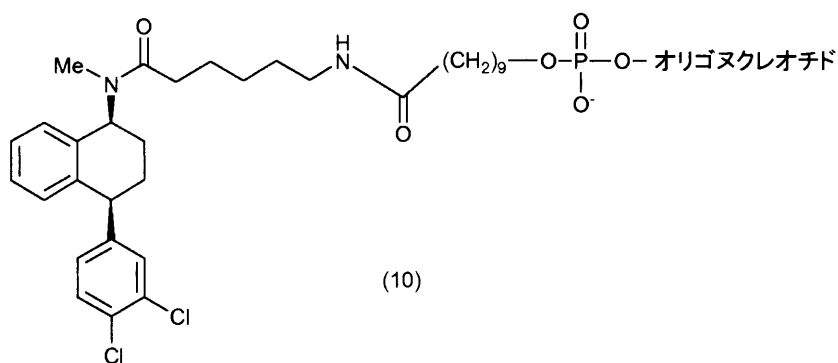
20

を有する。

【 0 3 2 0 】

他の特定の実施形態において、コンジュゲートは構造

【化 7 4】



30

40

を有する。

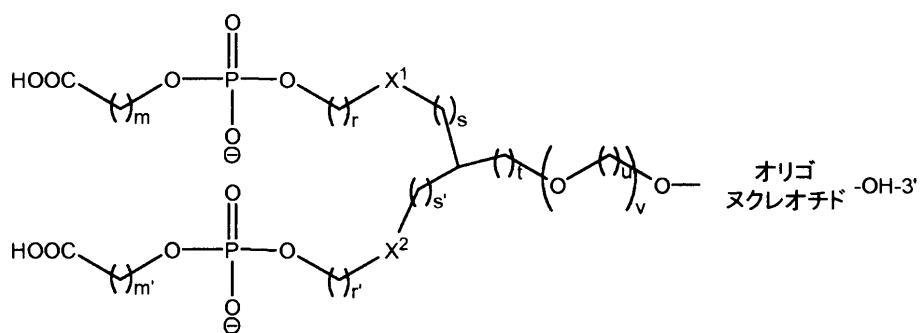
【 0 3 2 1 】

ある実施形態において、オリゴヌクレオチドは最初に 2 価又は 3 価のホスホルアミダイ
トと反応して前に定義した式 (XX) 又は (XXI) の化合物を生ずる。式 (XX) 及び
(XXI) の化合物は、次に必要があれば脱保護し、カルボキシ改変剤と反応させて、そ

50

れぞれ式 (XXVI) 又は (XXVII) の化合物を得る：

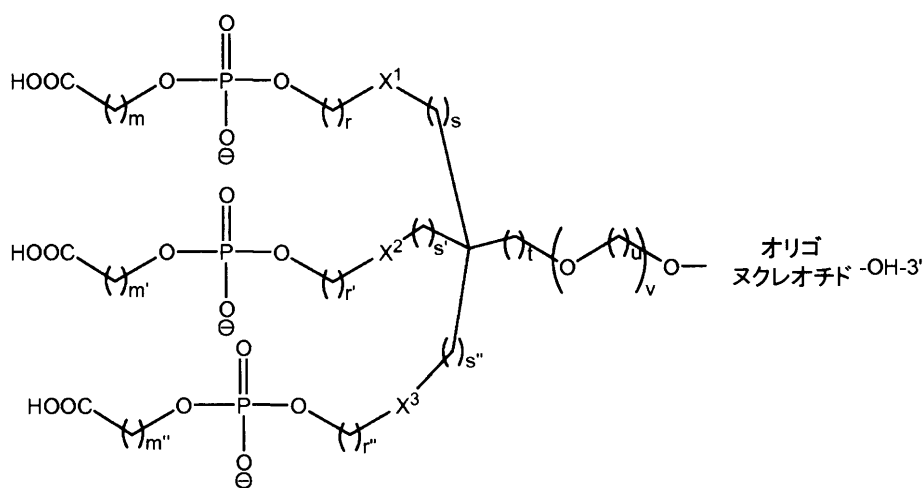
【化 75】



(XXVI)

10

【化 76】



(XXVII)

20

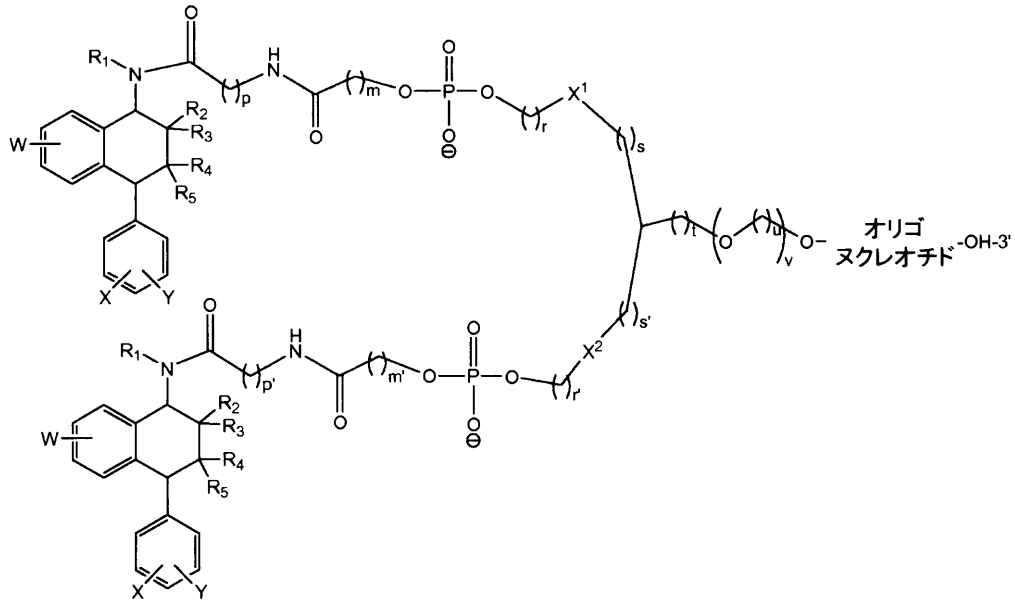
30

(式中、 m 、 m' 、 m'' 、 r 、 r' 、 r'' 、 s 、 s' 、 s'' 、 t 、 u 、 v 、 X^1 、 X^2 及び X^3 は前に定義した通りである)。

【0322】

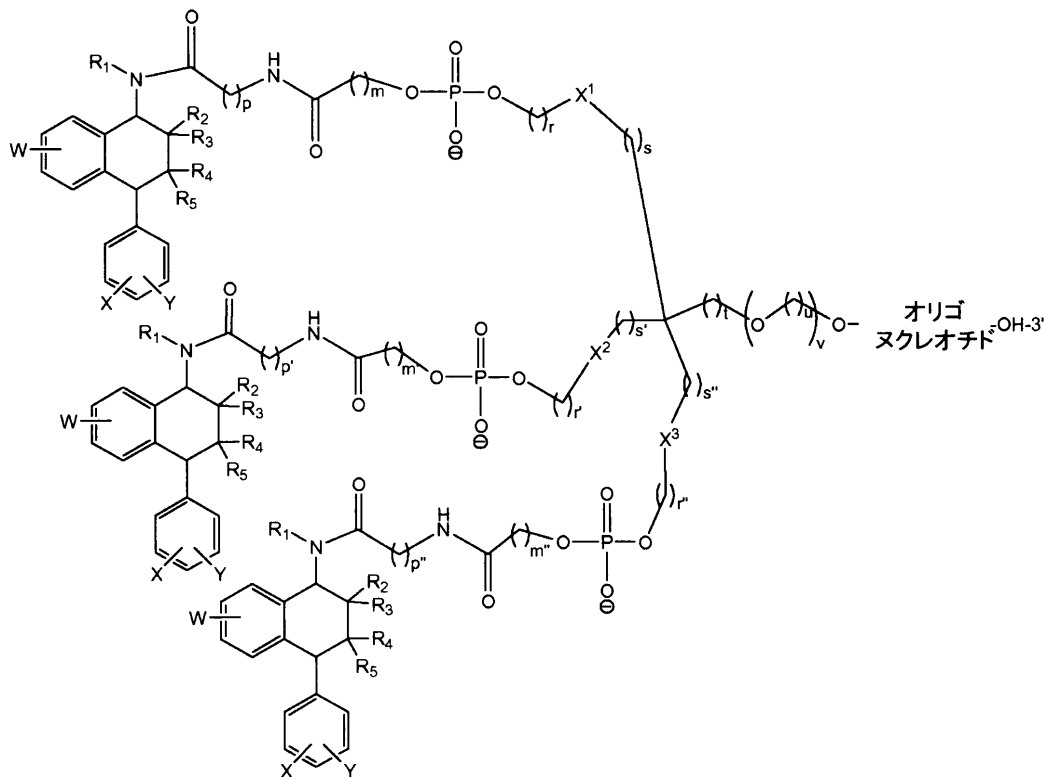
式 (XXVI) 及び (XXVII) の化合物は、式 (VII) の化合物とさらに反応させて、それぞれコンジュゲート (XXVIII) 及び (XXIX) を得ることができる：

【化 7 7】



(XXVIII)

【化 7 8】



(XXIX)

(XXIX)

(式中、

m 、 m' 、 m'' 、 p 、 p' 、 p'' 、 r 、 r' 、 r'' 、 s 、 s' 、 s'' 、 t 、 u 、 v 、 X^1 、 X^2 、 X^3 、 $R^1 \sim R^5$ 、 W 、 X 、 Y 及び Z は前に記載した通りである)。

【0323】

ある特定の実施形態は上で定義した式 (XXVII) の化合物を指向する。

【0324】

10

20

30

40

50

ある特定の実施形態は、式 (X X V I I I) の化合物 (式中、選択的作用剤がセルトラリンであり、p 及び p' が 5 であり、m 及び m' が 6 であり、r 及び r' が 4 であり、s 及び s' が 1 であり、t 及び v が 0 であり、並びに X 及び X' が C (O) N H を表す) を指向する。他の実施形態は、式 (X X V I I I) の化合物 (式中、選択的作用剤がセルトラリンであり、p 及び p' が 5 であり、m 及び m' が 6 であり、r が 2 であり、r' が 0 であり、s が 1 であり、s' が 0 であり、t 及び v が 0 であり並びに X 及び X' が C H₂ を表す) を指向する。

【 0 3 2 5 】

ある特定の実施形態は、式 (X X V I I I) の化合物 (式中、選択的作用剤がセルトラリンであり、p 及び p' が 5 であり、m 及び m' が 9 であり、r 及び r' が 4 であり、s 及び s' が 1 であり、t 及び v が 0 であり並びに X 及び X' が C (O) N H を表す) を指向する。他の実施形態は、式 (X X V I I I) の化合物 (式中、選択的作用剤がセルトラリンであり、p 及び p' が 5 であり、m 及び m' が 9 であり、r が 2 であり、r' が 0 であり、s が 1 であり、s' が 0 であり、t 及び v が 0 であり並びに X 及び X' が C H₂ を表す) を指向する。

10

【 0 3 2 6 】

ある特定の実施形態は、上で定義した式 (X X I X) の化合物を指向する。

【 0 3 2 7 】

ある特定の実施形態は、式 (X X I X) の化合物 (式中、選択的作用剤がセルトラリンであり、p、p' 及び p'' が 5 であり、m、m' 及び m'' が 6 であり、r、r' 及び r'' が 3 であり、s、s' 及び s'' が 1 であり、t が 1 であり、v が 0 であり並びに X、X' 及び X'' が O を表す) を指向する。他の実施形態は、式 (X X I X) の化合物 (式中、選択的作用剤がセルトラリンであり、p、p' 及び p'' が 5 であり、m、m' 及び m'' が 6 であり、r、r' 及び r'' が 3 であり、s、s' 及び s'' が 1 であり、t が 1 であり、u が 3 であり、v が 1 であり、X、X' 及び X'' が O を表す) を指向する。

20

【 0 3 2 8 】

ある特定の実施形態は、式 (X X I X) の化合物 (式中、選択的作用剤がセルトラリンであり、p、p' 及び p'' が 5 であり、m、m' 及び m'' が 9 であり、r、r' 及び r'' が 3 であり、s、s' 及び s'' が 1 であり、t が 1 であり、v が 0 であり並びに X、X' 及び X'' が O を表す) を指向する。他の実施形態は、式 (X X I X) の化合物 (式中、選択的作用剤がセルトラリンであり、p、p' 及び p'' が 5 であり、m、m' 及び m'' が 9 であり、r、r' 及び r'' が 3 であり、s、s' 及び s'' が 1 であり、t が 1 であり、u が 3 であり、v が 1 であり、X、X' 及び X'' が O を表す) を指向する。

30

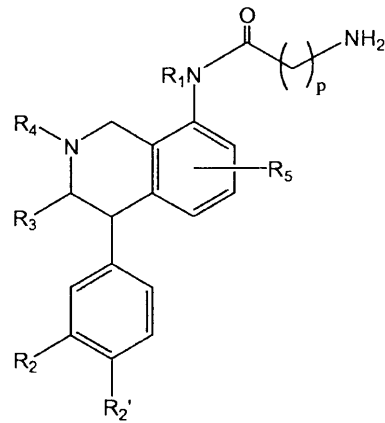
【 0 3 2 9 】

i i i . カルボキシル誘導体化された核酸及びアミノ誘導体化されたノミフェンシンを使用する合成

ノミフェンシン及びそれらのアナログは、カルボキシ改変オリゴヌクレオチドに対するカップリングに原理的に使用され得るアミノ基を含有する。しかしながら、アミノ基が芳香環に直接にカップリングされている結果、反応性が減少して立体障害が生ずる。そのようなわけで、式 (X V I)

40

【化 7 9】



(XVI)

10

(式中、

 R^1 は、水素、アルキル $C_1 \sim C_6$ 基又はベンジル基を表し、 R^2 は、水素、メチル、塩素又はフッ素基を表し、 $R^{2'}$ は、水素、メチル、メトキシ、ヒドロキシル又はハロゲン原子を表し、

20

 R^3 及び R^4 は、水素、アルキル $C_1 \sim C_6$ 基を表し、 R^5 は、5 - 又は 6 - 位における水素、塩素又はメトキシ基を表し、及び

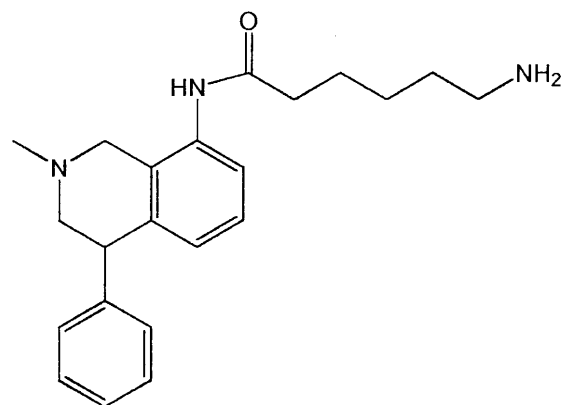
P は 2 ~ 6 である)

を有するアミノ改変ノミフェンシン又はそれらの変種が調製される。

【 0 3 3 0】

特定の実施形態において、選択的作用剤の活性化された誘導体は、 R^1 、 R^2 、 $R^{2'}$ 、 R^3 、及び R^5 が H であり、 R^4 がメチルである化合物 (5) である。

【化 8 0】



(3)

30

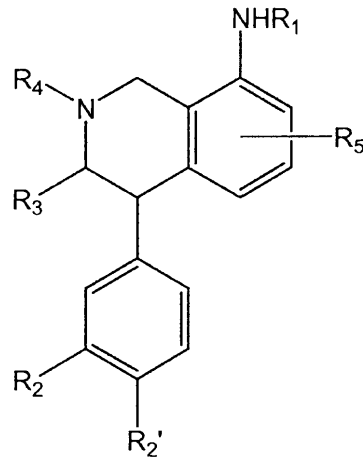
40

【 0 3 3 1】

一実施形態によれば、式 (XVI) の化合物は：

a) 式 (XVII) の化合物

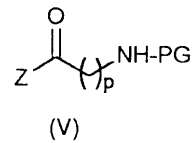
【化 8 1】



(XVII)

と式 (V)

【化 8 2】



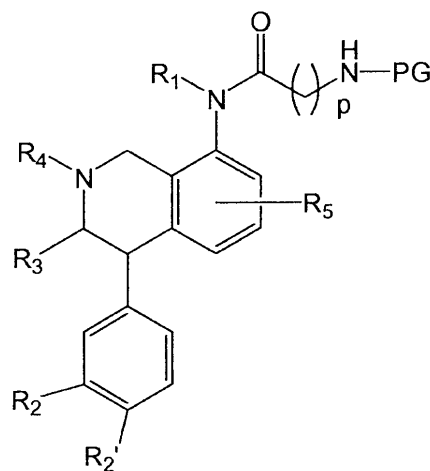
(V)

(式中、p は上で定義した通りであり、Z はハロゲン又は O H であり、及び P G はアミン保護基である)

のアシル化剤とを反応させて、：

式 (X V I I I) の化合物

【化 8 3】



(XVIII)

を得るステップ

(アミンのために通常使用される保護基として、tert-ブチル、ベンジル、2,2,2-トリクロロエチル、2-トリメチルシリルエチル、9H-フルオレニルメチル(Fmoc)、アリル又はニトロフェニルカルバメートなどのカルバメート；ホルムアミド、アセトアミド、トリフルオロアセトアミド、スルホンアミド、トリフルオロメタンスルホンアミド又はtert-ブチルスルホンアミドなどのアミド；及びp-メトキシフェニル、ベンジル、p-メトキシベンジル、3,4-ジメトキシベンジル、ジメトキシトリチ

10

20

30

40

50

ル又はモノメトキシトリチルアミンなどのアリール又はアリールアルキルアミンが挙げられる。特定の実施形態において、式(V)のアシル化剤は9H-フルオレニルメトキシカルボニル-6-アミノヘキサン酸である。

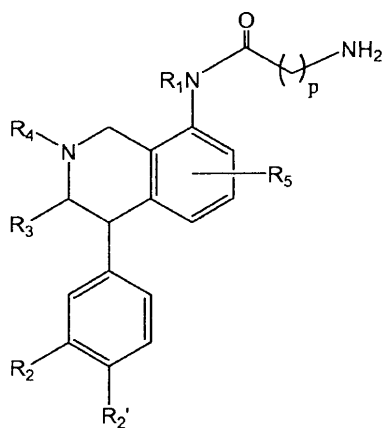
式(XVII)の化合物は、順送りで例えば米国特許第4185105号に記載されたようにして調製することができる。特に、式(III)の化合物がノミフェンシンである場合、それは、対応するクロロハイドレート(市販で入手可能)から、アルカリ又はアルカリ土類の炭酸塩又は水酸化物、アンモニア又は、トリメチルアミン、トリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、ピリジン、ピペリジン、モルホリンなどのアミンなどの有機又は無機塩基を含む適当な塩基で処理することにより得ることができる)と；

【0332】

10

b) 式(XVII)の化合物中のアミノ保護基を脱保護して式(XIX)：

【化84】



(XVI)

20

(適当な脱保護条件は、例えばProtecting Groups in Organic Synthesis (Wuts, P. G. M. and Greene T. W., 4th Ed. Wiley-Interscience)及びProtecting Groups (Kocienski P. J., 第3 Ed. Georg Thieme Verlag)で当業者に知られている。特定の実施形態において、保護基は、ピペリジン、モルホリン、ジシクロヘキシルアミン、ジイソプロピルエチルアミン又はジメチルアミノピリジンなどのアミンの存在下で、好ましくはピペリジンの存在下で除去される)の化合物を得るステップと；

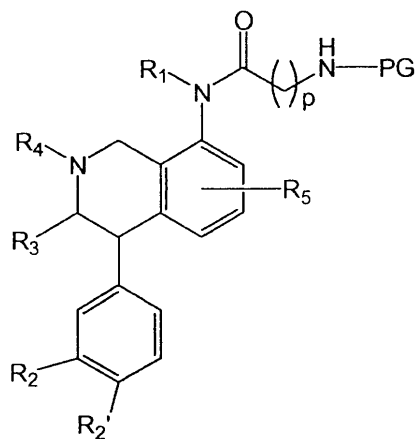
30

を含む一連のステップにより調製することができる。

【0333】

他の態様によれば、本発明は式(XVII)の中間体

【化 8 5】

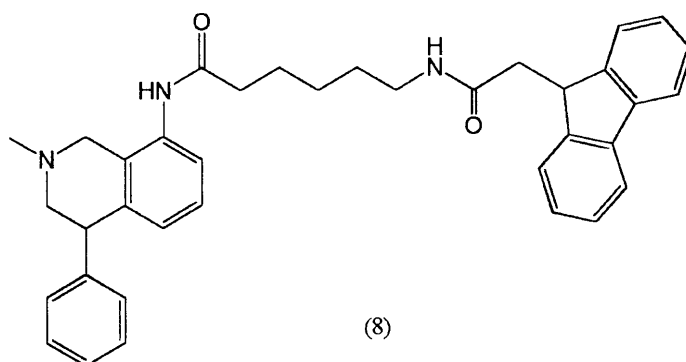


(XVIII)

(式中、 $R^1 \sim R^5$ 、 X 、 Y 、 W 、 p 及び PG は上で定義した通りである。好ましい実施形態において、 R^1 はメチルであり、 $R^2 \sim R^5$ は水素であり、 X 及び Y は塩化物であり、 W は水素であり、 p が5であり、 PG は9H-フルオレニルメトキシカルボニルである)

を指向する。より好ましくは、式(XVII)の化合物は化合物(8)

【化 8 6】



(8)

である。

【0334】

選択的作用剤に結合すべき核酸は、M. J. Gait編集の「Oligonucleotide synthesis, a practical approach.」(IRL Press - 1985)に開示された方法にしたがって固体支持体上で段階的固相合成により形成することができる。

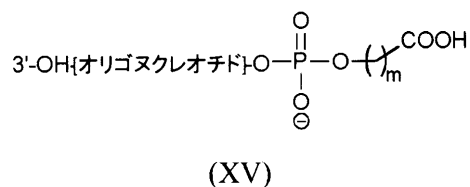
【0335】

選択性リガンドをコンジュゲート化するためには、オリゴヌクレオチドをカルボキシ誘導体にする必要がある。このことは、5'又は3'末端で行うことができる。好ましい実施形態において、選択性リガンドは5'末端に付けられる。

【0336】

一実施形態により、式(XVI)のコンジュゲートは、上記の式(XIX)の化合物と式(XV)のアミノ改変オリゴヌクレオチド：

【化 8 7】



(式中、mは2から6である)

とを反応させることにより調製することができる。カルボキシ基を使用するオリゴヌクレオチドの活性化は、上で説明したようにして行うことができる。

10

【0337】

好ましい実施形態において、ノミフェンシン又はその誘導体にカップリングされたオリゴヌクレオチドは：

(i) - シヌクレインに相補的な核酸、好ましくは、配列番号：16～36のいずれかから選択された配列を含む核酸、

(ii) BAXに相補的な核酸、好ましくは配列番号：38の配列を含む核酸、

(iii) タウに相補的な核酸、

(iv) NETに相補的な核酸、及び

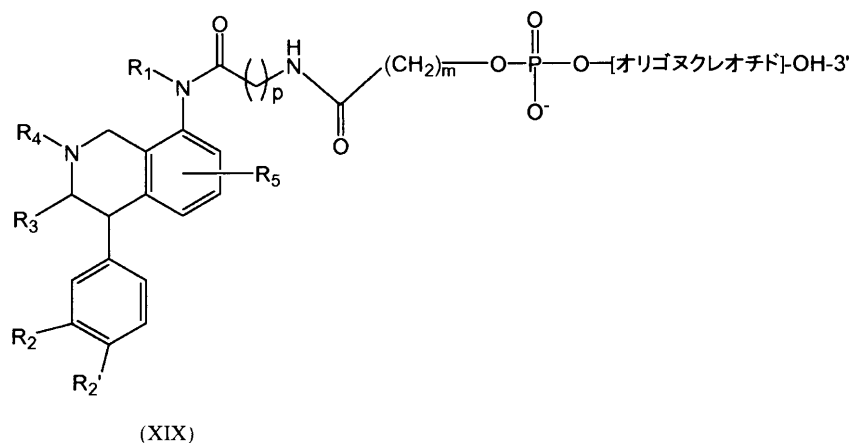
(v) ハンチンチンに相補的な核酸、好ましくは配列番号：39～55のいずれかから選択される配列を含む核酸からなる群から選択される。

20

【0338】

次にカルボキシル活性化オリゴヌクレオチドを上で定義した式(XVI)の選択的作用剤の活性化された誘導体と反応させて、一般的構造：

【化 8 8】



30

の化合物を得る。

好ましい実施形態において、コンジュゲートは、構造

40

CN1CCc2ccccc2C1c3ccc(NC(=O)CCCCCNC(=O)CCCCCCCCOP(=O)([O-])O[O-])cc3

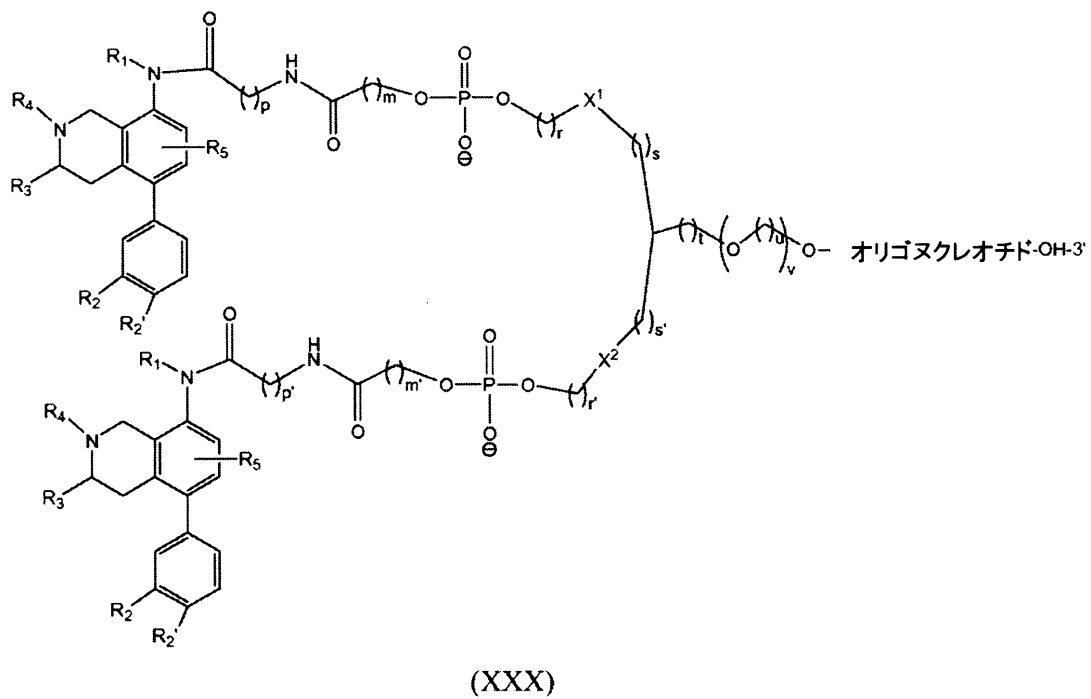
(9)

他の好ましい実施形態において、コンジュゲートは、構造

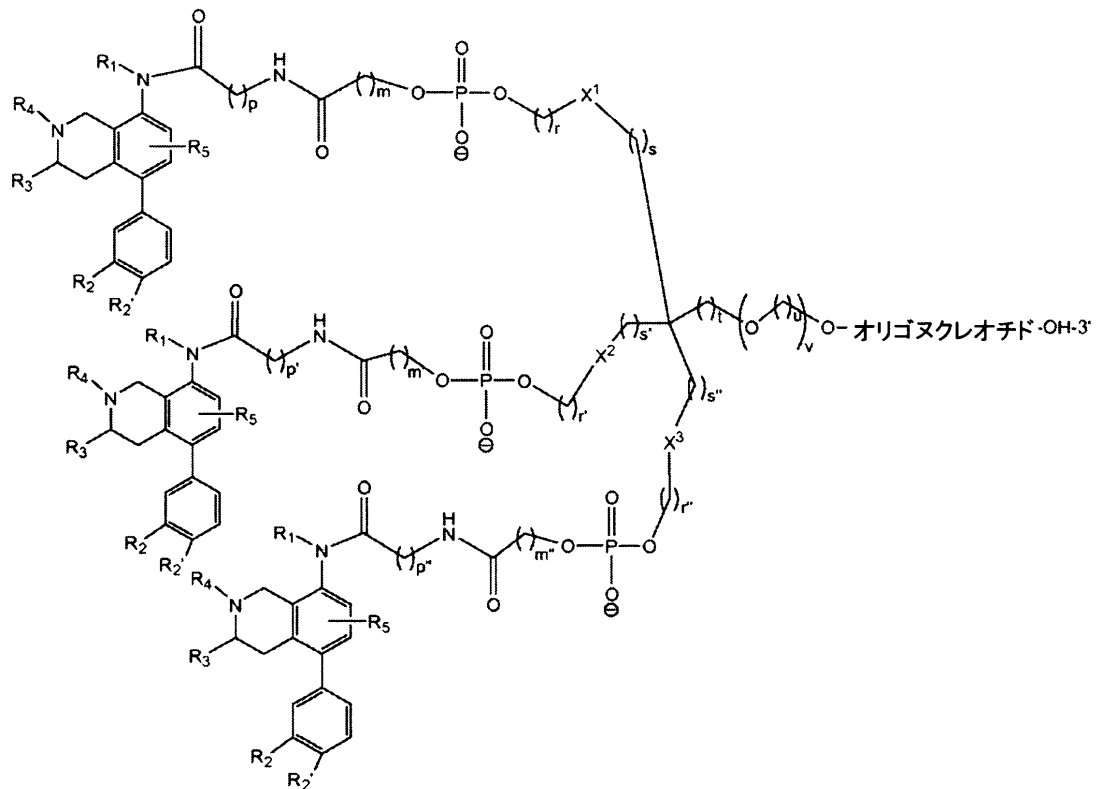
[illegible]

【 0 3 3 9 】

【化 9 1】



【化 9 2】



(XXXI)

(式中、

m、m'、m''、p、p'、p''、r、r'、r''、s、s'、s''、t、u、v、X¹、X²、X³ 及び R¹ ~ R⁵ は前に記載した通りである)。

【0340】

ある特定の実施形態は、上で定義した式 (XXX) の化合物を指向する。

【0341】

ある特定の実施形態は、式 (XXX) の化合物 (式中、選択的作用剤がノミフェンシンであり、p 及び p' が 5 であり、m 及び m' が 6 であり、r 及び r' が 4 であり、s 及び s' が 1 であり、t 及び v が 0 であり並びに X 及び X' が C(O)NH を表す) を指向する。他の実施形態は、式 (XXVIIII) の化合物 (式中、選択的作用剤がノミフェンシンであり、p 及び p' が 5 であり、m 及び m' が 6 であり、r が 2 であり、r' が 0 であり、s が 1 であり、s' が 0 であり、t 及び v が 0 であり並びに X 及び X' が CH₂ を表す) を指向する。

【0342】

ある特定の実施形態は、式 (XXX) の化合物 (式中、選択的作用剤がノミフェンシンであり、p 及び p' が 5 であり、m 及び m' が 9 であり、r 及び r' が 4 であり、s 及び s' が 1 であり、t 及び v が 0 であり、並びに X 及び X' が C(O)NH を表す) を指向する。他の実施形態は、式 (XXVIIII) の化合物 (式中、選択的作用剤がノミフェンシンであり、p 及び p' が 5 であり、m 及び m' が 9 であり、r が 2 であり、r' が 0 であり、s が 1 であり、s' が 0 であり、t 及び v が 0 であり、並びに X 及び X' が CH₂ を表す) を指向する。

【0343】

ある特定の実施形態は、上で定義した式 (XXXI) の化合物を指向する。

【0344】

ある特定の実施形態は、式 (XXXI) の化合物 (式中、選択的作用剤がノミフェンシ

ンであり、 p 、 p' 及び p'' が 5 であり、 m 、 m' 及び m'' が 6 であり、 r 、 r' 及び r'' が 3 であり、 s 、 s' 及び s'' が 1 であり、 t が 1 であり、 v が 0 であり、並びに X 、 X' 及び X'' が 0 を表す) を指向する。他の実施形態は、式 (XXXI) の化合物 (式中、選択的作用剤がノミフェンシンであり、 p 、 p' 及び p'' が 5 であり、 m 、 m' 及び m'' が 6 であり、 r 、 r' 及び r'' が 3 であり、 s 、 s' 及び s'' が 1 であり、 t が 1 であり、 u が 3 であり、 v が 1 であり、並びに X 、 X' 及び X'' が 0 を表す) を指向する。ある特定の実施形態は、式 (XXXI) の化合物 (式中、選択的作用剤がノミフェンシンであり、 p 、 p' 及び p'' が 5 であり、 m 、 m' 及び m'' が 9 であり、 r 、 r' 及び r'' が 3 であり、 s 、 s' 及び s'' が 1 であり、 t が 1 であり、 u が 3 であり、 v が 1 であり、並びに X 、 X' 及び X'' が 0 を表す) を指向する。他の実施形態は、式 (XXXI) の化合物 (式中、選択的作用剤がノミフェンシンであり、 p 、 p' 及び p'' が 5 であり、 m 、 m' 及び m'' が 9 であり、 r 、 r' 及び r'' が 3 であり、 s 、 s' 及び s'' が 1 であり、 t が 1 であり、 u が 3 であり、 v が 1 であり、並びに X 、 X' 及び X'' が 0 を表す) を指向する。

【0345】

iv. カルボキシル誘導体化された核酸、二官能性リンカー、アミノ誘導体化されたノミフェンシン及びアミノ誘導体化されたセルトラリンを使用して二重に誘導体化されたオリゴヌクレオチドの合成

式 (XX) 及び (XXI) の化合物中のヒドロキシ保護基 PG 、 PG' 及び PG'' は、同じであっても異なってもよい。

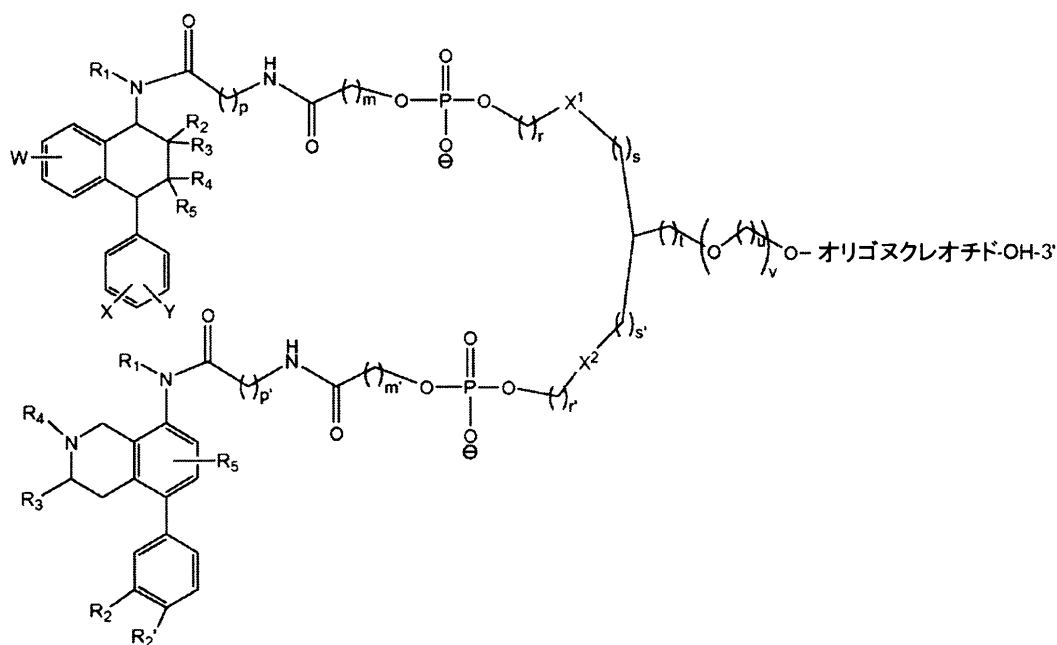
【0346】

特定の実施形態において、式 (XX) の化合物中の PG 及び PG' は異なり、その結果それらは独立に脱保護することができて、式 (XX) の化合物は所望であれば 2 つの異なった活性化選択的作用剤とカップリングすることができる。

【0347】

特定の実施形態において、 PG 及び PG' が異なる式 (XX) の化合物は、カルボキシ改変剤と、次に式 (VII) の化合物と順に反応させ、一方他のカップリング位置はカルボキシ改変剤と、次に式 (XVI) の化合物と反応させて、式 (XXXII) のコンジュゲート：

【化93】

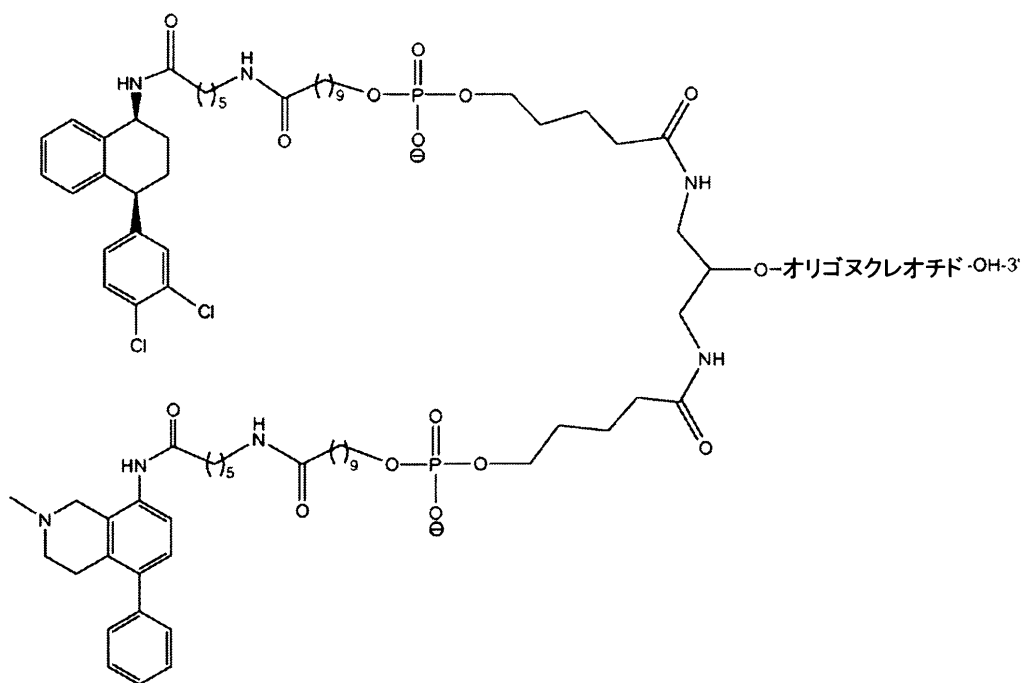


(XXXII)

【 0 3 5 1 】

好ましい実施形態において、式 (X X X I I a) の化合物は下記の式：

【 化 9 6 】



(12)

を有する。

【 0 3 5 2 】

特定の実施形態において、本発明は、式 (X X X I I) 及び (X X X I I a) の化合物 (式中、 m 、 m' 、 p 、 p' 、 r 、 r' 、 s 、 s' 、 t 、 u 、 v 、 X^1 、 X^2 並びに $R^1 \sim R^5$ 、 X 、 Y 及び Z は前に記載した通りである) を指向する。

【 0 3 5 3 】

好ましい実施形態において、本発明は、上で定義した化合物 (1 2) を指向する。

【 0 3 5 4 】

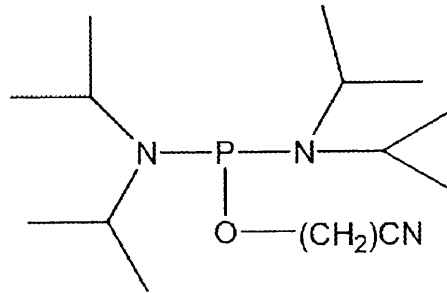
E . 2 . 核酸及び 5 ' 末端に付いた保護基を含むコンジュゲートの合成

合成は第 1 鎖に保護基を付加することにより開始する。保護基が複数の部分により形成される場合、保護基の一部を形成する異なった部分は、ヌクレオチドを既に存在している核酸に付加するとき使用されるものと同様な手法を使用して核酸に付加される。即ち、遊離ヒドロキシ基の反応性を強化するために付加すべき基が最初に活性化される。適当な活性化試薬として、ホスホロチオネート化合物、カルバメート化合物、メチルホスホネート化合物、グアニジニウム化合物、スルファメート化合物、スルファミド化合物、ホルムアセタール化合物、チオホルムアセタール化合物、スルホン化合物、ホスホロアミデート化合物が挙げられるが、これらに限定されない。好ましい実施形態において、保護基の群はホスホルアミダイト化合物及びそれらの混合物で活性化される。

【 0 3 5 5 】

遊離 OH 基を活性化するのに適した典型的なホスホロアミデートは、例えば式：

【化 9 7】

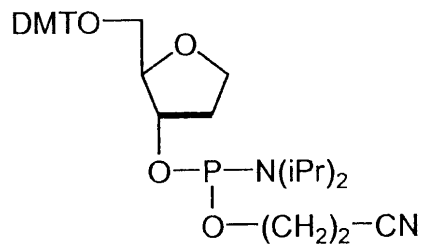


10

の(2-シアノエチル)N,N,N',N'-テトラジイソプロピルホスホロジアミダイト

及び式：

【化 9 8】



20

(式中、nは6から12である)

の(2-シアノエチル)N-ジイソプロピル,N'-アルキルアミンホスホルアミダイトである。

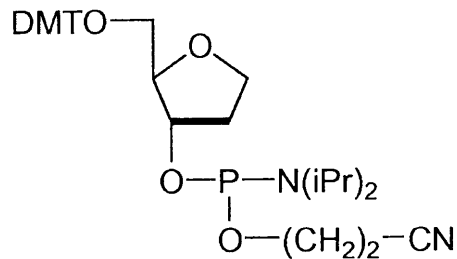
【0356】

典型的な反応は以下のステップを含む：

A) フラノースユニット(適当な化学量論は当業者には明らかであろう)と4,4'-ジメトキシトリチル塩化物(DMT-Cl)とを第一級ヒドロキシル基の位置においてのみ反応が起き易い条件で反応させる。次に、残余のヒドロキシル基をアセチル化又はベンゾイル化保護基と反応させる。活性化されたフラノースは、典型的には、構造：

30

【化 9 9】



40

を有する。

B) 目的の siRNA (センス(s)鎖又はアンチセンス(a)鎖であってよい)の一方の鎖を固体支持体上で段階的固相合成により形成し、そこで、通常はジメトキシトリチル(DMT)により保護されている成長鎖中の末端サブユニットの5'-OH基を、5'-OH DMT保護基を除去するために酸性条件下に置き、一方プリン及びピリミジン塩基は(フルオレン-9-イル)メトキシカルボニル(Fmoc)で保護されたまま残す。他の適当な保護基は、ホスホロアミデート化合物、ホスホロチオネート化合物及びO-メチル(オキシメチル)及びO-エチル(オキシエチル)基に結合した6員モルホリン環を有する化合物である。

【0357】

50

C) siRNA鎖の脱保護された5' - OH基をステップA)の反応性フラノースと反応させ、このようにして1次コンジュゲート化オリゴヌクレオチドを得る。最後に、酸性条件下でフラノースの第一級ヒドロキシルのDMT保護基を除去して5' - OH基は残す。
D) C18員の反応性リンカー(以後C₁₈)である、エチレングリコールの6モノマーを有するアルキレングリコールモノマー(12炭素原子及び6酸素原子)は、ホスフィチル化条件下で、末端OH基に上記の(2 - シアノエチル)N, N' - ジイソプロピルホスホルアミダイトなどのホスホルアミダイト化合物を付加することにより形成する。

【0358】

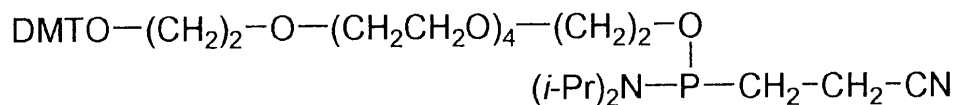
ホスホルアミダイト化合物は、ポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド骨格中に存在するようなホスホジエステル連結の生成に特に有用である。ポリエチレングリコールを反

10

【0359】

典型的には、6モノマーのエチレングリコールを有する反応性(C₁₈)アルキレングリコールモノマーは、構造

【化100】



20

を有する。

E) フラノース - siRNA鎖の脱保護され5' - OH基をステップD)の反応性(C₁₈)アルキレングリコールモノマーと反応させ、このようにして式：

DMT - (C₁₈)アルキレングリコール - ホスホジエステル - フラノース - ホスホジエステル - RNA鎖

を有する2次コンジュゲート化オリゴヌクレオチドを得る。

【0360】

F) (C₁₈)アルキレングリコールの第一級ヒドロキシルのDMT保護基を酸性条件下で除去して5' - OH基を残す。

30

【0361】

G) (C₁₈)アルキレングリコール - ホスホジエステル - フラノース - ホスホジエステル - RNA鎖の脱保護された5' - OH基をステップD)のもののような第2の反応性(C₁₈)アルキレングリコールモノマーと反応させて、式：

DMT - (C₁₈)アルキレングリコール - ホスホジエステル - (C₁₈)アルキレングリコール - ホスホジエステル - フラノース - ホスホジエステル - RNA鎖

を有する3次コンジュゲート化オリゴヌクレオチドを得る。

【0362】

H) (C₁₈)アルキレングリコール末端の第一級ヒドロキシルのDMT保護基を酸性条件下で除去してさらなる操作のために5' - OH基を残す。

40

【0363】

保護基が脂質部分を含む場合、本発明によるオリゴヌクレオチド構造物を得るための方法は、ステップH)と(I)との間に追加されるステップ、好ましくは脂肪酸の活性なエステル、アミン、チオール又は酸の形態にある脂質部分を末端基(場合によりフラノース又はC18アルキレングリコール)に結合するステップを含む。当業者は、前記ステップを実施するのに適当な条件や試薬等を、脂質及び前記基の性質に応じて選択することができる。好ましい条件は、ホスホルアミダイト化学により脂肪酸を誘導体化して、ホスホジエステル連結基を通してオリゴヌクレオチド構造に遊離末端5' - OH又は3' OHで縮合することができる活性化された分子を作ることにある。

50

【0364】

E . 3 . 第1の核酸及び5'末端に付いた保護基を含むコンジュゲートと核酸に相補的な鎖及び5'に付いたSSRIを含むコンジュゲートとをアニーリングすることによるsiRNAの合成

上記のようにE . 1 . で得たSSRIにコンジュゲート化したsiRNAの相補鎖を、E . 2 . で定義し、得られた改変siRNA鎖とアニールする。この目的のために、RNA鎖中の全ての残余の保護基は予め以下のようにして除去する。20% v / vのメチルアミン（水溶液40% w / v）及び80% v / vの飽和したアンモニア溶液30（30～32% v / vのNH₃を含有）を含有する500 µlの混合物をsiRNA（200 nmolスケール）を入れたエッペンドルフチューブに加えた。チューブを密閉して45分間65の温度に加熱した。この手順によりヌクレオチドのリン原子における保護基（フラノースのアセチル化又はベンジル化及びホスホジエステル連結の2-シアノエチル化）、及び環外アミノ基の保護基（FMOC）が除去される。混合物を次に冷却して濾過し、上清を乾燥した。残留したペレットを1 M トリエチルアミン - HFと3時間65で反応させて、保護基をヌクレオチド（2'-t-ブチルジメチルシリル-TBDMS）の2'で切断した。最後に、生じた溶液をセファデックスカラムで脱塩した。

10

【0365】

そのような2本鎖構造物を形成するのに適した核酸アニーリングの条件は、Joseph Sambrook, et al., (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001) 及びHaymes, B.D., et al. (Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press, Washington, D.C., 1985) により開示されている。

20

【0366】

本発明の構造物のオリゴヌクレオチドの有効性の実例を下に示す。実施例2はsiRNAの一方の鎖に連結したフラノース及び2つのC₁₈アルキレングリコール、及び他方の鎖にリンカーを通して連結したセルトラリン分子の付いた本発明のsiRNAオリゴヌクレオチド配列は、裸出形態（naked form）の対応するsiRNAよりも標的シナプス前部の5-HT_{1A}Rの発現をより大きく遮断したことを示す。

30

【0367】

F . 診断用のコンジュゲート及びそれらの使用

神経伝達物質輸送体に高い親和性で結合することができる選択的作用剤を使用することにより治療用の化合物を標的細胞に特異的に送達する可能性は、診断目的に使用することができる化合物の送達に応用することにもできる。したがって、他の実施形態において、本発明は、

(i) 1種又は複数種の神経伝達物質輸送体に特異的に結合する少なくとも1種を選択的作用剤、及び

(ii) 撮像剤

を含むコンジュゲートを提供する。

40

【0368】

用語「選択的作用剤」及び「神経伝達物質輸送体」は、上で詳細に説明してあり、診断用の本発明のコンジュゲートについても同様に理解してよい。

【0369】

用語「撮像剤」及び「造影剤」は、本明細書において互換的に使用され、使用するとこれらの像の異なった領域間の「コントラスト」を強化することにより像の異なった部分の区別が容易になる生体適合性化合物を指す。したがって用語「造影剤」は、そのような作用剤がなくても発生させることができる像（例えば、MRIの場合のように）の品質を向上するために使用される作用剤、並びに像の発生に欠くことのできない作用剤（例えば、核撮像の場合のように）を包含する。適当な造影剤として、放射性核種撮像、コンピュー

50

ター断層撮影、ラマン分光法、磁気共鳴撮像 (MRI) 及び光学的撮像のための造影剤が挙げられるが、これらに限定されない。

【0370】

放射性核種撮像用の造影剤として、通常 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{18}F 、 ^{82}Rb 、 ^{62}Cu 及び ^{68}Ga などの陽電子エミッターで標識された放射性薬剤が挙げられる。SPECT 放射性薬剤は、通常 ^{94}mTc 、 ^{201}Tl 及び ^{67}Ga などの陽電子エミッターで標識される。放射性核種撮像様式 (陽電子断層撮影 (PET); シングルフォトンエミッションCT (SPECT)) は、放射性核種標識の放射性トレーサーの位置及び濃度をマッピングする診断用断面撮像技法である。PET 及び SPECT は、代謝活性を測定することにより放射性核種を局在化させて特徴づけることに使用することができる。PET 及び SPECT は細胞の生存率などの細胞のレベルにおける情報に属する情報を提供する。PET において、患者は、陽電子を放出する微弱な放射性物質を摂取するか又は注射され、該物質は身体中を移動するのでモニターすることができる。1つの一般的な適用では、例えば、患者は陽電子エミッター付きのグルコースを与えられ、種々の課題を遂行させながら彼らの脳がモニターされる。脳はそれがはたらくときにグルコースを使用するので、PET 像はどこで脳活性が高いかを示す。本発明のある実施形態においては、細胞をインビボの PET 又は SPECT 撮像のために体外で標識する。PET と密接に係るものはシングルフォトンエミッションCT、又は SPECT である。2つの間の主要な相違は、SPECT は、陽電子放出物質の代わりに低エネルギー光子を放出する放射性トレーサーを使用することである。

【0371】

CT 撮像用の造影剤は、例えば、ヨウ素化又は臭素化造影媒体を含む。これらの作用剤の例として、イオタラメート、イオヘキシル、ジアトリゾエート、イオパミドール、エチオドール及びイオパノエートが挙げられる。ガドリニウム剤もCT造影剤として使用されることが報告されている (例えば、Henson et al., 2004 参照)。例えば、ガドペンテート剤がCT造影剤として使用されている (Strunk and Schild, 2004 で論じられた)。コンピューター断層撮影 (CT) は本発明の関係では撮像様式として考慮されている。一連のX線を種々の角度から時には千回を超えて取り、次にそれらをコンピューターと組み合わせることにより、CTは身体の任意の部分の3次元像を構築することを可能にする。コンピューターは2次元断面を任意の角度から及び任意の深さで表示するようにプログラムされている。CTにおいて、最初のCTスキャンで診断がつかないときには、本明細書に記載したものなどの放射線不透過性造影剤の静脈注射が、軟組織体の同定及び描写の助けになり得る。

【0372】

光学的撮像用の造影剤としては、例えば、フルオレセイン、フルオレセイン誘導体、インドシアニングリーン、オレゴングリーン、オレゴングリーン誘導体誘導体、ローダミンググリーン、ローダミンググリーン誘導体、エオシン、エリスロシン、テキサスレッド、テキサスレッド誘導体、マラカイトグリーン、ナノゴールドスルホスクシンイミジルエステル、カスケードブルー、クマリン誘導体、ナフタレン、ピリジルオキサゾール誘導体、カスケードイエロー色素、ダポキシル (dapoxy) 色素及び本明細書において開示した種々の他の蛍光性化合物が挙げられる。

【0373】

好ましい実施形態において、造影剤は、磁気共鳴撮像装置により撮像され得る化合物である。磁気共鳴撮像装置により撮像できる造影剤は他の撮像技法で使用されるものと異なる。それらの目的は、同一のシグナル特性が同じ組織成分間を識別するのに役立つこと及び緩和時間を短くすること (T1 強調スピンエコー MR 像により強いシグナル及び T2 強調像に強度のより小さいシグナルを生ずるであろう) である。MRI 造影剤の例として、ガドリニウムキレート、マンガンキレート、クロムキレート、及び鉄粒子が挙げられる。特定の1実施形態において、MRI 造影剤は、 ^{19}F である。CT 及び MRI は両方とも組織の境界を識別するのに役立つ解剖学的情報を提供する。CT に比較した MRI の不

利点として、より低い患者耐性、ペースメーカー及びある種の他の金属のインプラントデバイスにおける禁忌、及び複数の原因（それらの少なからずが運動である）が関係するアーチファクトが挙げられる。他方、CTは迅速で、十分耐えられ、また容易に利用できるが、MRIよりコントラスト解像度が低く、ヨウ素化した造影剤及びイオン化性放射線が必要になる。CT及びMRIの両方の不利点は、いずれの撮像様式も細胞レベルにおける機能的情報を提供しないことである。例えば、いずれの様式も細胞の生存率に関する情報を提供しない。磁気共鳴撮像（MRI）は、CTより新しく、高強度磁石及びラジオ波周波数シグナルを使用して像を生ずる撮像様式である。生物組織中に最も豊富な分子の種は水である。撮像検査で究極的にシグナルを生じさせるのは水のプロトン核の量子力学的「スピン」である。MRIにおいては、撮像されるべき試料が強い静的磁場（1～12テスラ）に置かれ、スピンのラジオ波周波数（Rf）の放射線のパルスで励起されて試料における正味の磁化を生じさせる。次に種々の磁場勾配及び他のRfパルスがスピンの作用して空間的情報を記録されるシグナル中に信号化する。これらのシグナルを集めて解析することにより、CT画像のように、通常2次元断面で表示される3次元画像を計算することが可能である。

10

【0374】

MRI造影剤として、クロム（III）、マンガン（II）、鉄（III）、鉄（II）、コバルト（II）、ニッケル（II）、銅（II）、ネオジム（III）、サマリウム（III）、イッテルビウム（III）、ガドリニウム（III）、バナジウム（II）、テルビウム（III）、ジスプロシウム（III）、ホルミウム（III）及びエルビウム（III）からなる群から選択される金属の錯体が挙げられる。好ましい実施形態において、磁気共鳴撮像装置により撮像することができる化合物は、ガドリニウム系化合物である。

20

【0375】

本明細書中で使用する用語「ガドリニウム系化合物」は、撮像に関して使用される場合、対象者に投与可能で静脈内増強が生ずる任意のガドリニウム含有物質を意味することとする。他の実施形態において、ガドリニウム含有造影剤は、ガドリニウム、ガドリニウムペンテート、及びガドジアミドからなる群から選択される。

【0376】

投与すべきガドリニウム含有造影剤の量は、体重1kg当たり約10mgの量で変化する。他の実施形態においては、第2の磁気共鳴像がガドリニウム含有造影剤を投与した約45分後に取得される。本発明は、ステップ（c）又はステップ（d）のいずれかに続いて対象者の腹腔内に食塩水溶液（例えばリンゲル溶液）を投与するステップをさらに含む上記の方法も提供する。

30

【0377】

本発明は、診断剤として上で定義したコンジュゲートの使用及び神経伝達物質輸送体をそれらの表面上に発現する細胞の検出方法も提供する。

【0378】

撮像されるべき細胞のタイプに応じて、コンジュゲートは1種又は複数種の選択的作用剤を組み込む。以下の表に、撮像しなければならない細胞のタイプに応じて使用することができる選択的作用剤を記載する。

40

【表 5】

発現される神経伝達物質輸送体	選択的作用剤
SERT	SSRI (セルトラリン)
SERT	SSRI (セルトラリン)
SERT	SSRI (セルトラリン)
SERT	SSRI (セルトラリン)
DAT、SERT又はNET	SDNRI (トリプルブロッカー) 又はDNR I (ノミフェンシン)
DAT、SERT又はNET	DAT、SERT又はNET SDNRI (トリプルブロッカー) 又はDNR I (ノミフェンシン)
DAT、SERT又はNET	SDNRI (トリプルブロッカー) 又はDNR I (ノミフェンシン)
NET	NR I (レボキセチン)
NET	NR I (レボキセチン)、SDNRI、DNR I
DAT、SERT又はNET	SDNRI (トリプルブロッカー) 又はDNR I (ノミフェンシン)
DAT、SERT又はNET	SDNRI (トリプルブロッカー) 又はDNR I (ノミフェンシン)

10

20

30

【0379】

本発明は多モードの撮像方法も提供する。本発明のある実施形態は、複数のシグナルを測定することを含む複数の撮像様式を使用して対象者又は対象者内の部位を撮像する方法

40

【0380】

撮像様式は、標識された組成物、例えば、標識された細胞の投与中又は投与の後任意の時間に実施される。例えば、撮像試験は、本発明の標識された細胞の投与中に、又はその後の任意の時間に、即ち、特定の位置への送達を導くのに役立つように実施することができる。

【0381】

第1の撮像様式と同時に、又は第1の撮像様式後の任意の時間に追加の撮像様式を実施

50

することができる。例えば、追加の撮像様式は、第 1 の撮像様式の完了の約 1 秒、約 1 時間、約 1 日、又はそれより長い任意の時間後に、又は任意のこれらの述べた時の間の任意の時に実施することができる。本発明のある実施形態においては、複数の撮像様式が並行して実施され、それらは標識された細胞又は作用剤の投与に続いて同時に開始される。当業者は、本発明により考慮される種々の撮像様式の実行に精通しているであろう。

【 0 3 8 2 】

本発明の撮像方法の幾つかの実施形態においては、同じ撮像デバイスが第 1 の撮像様式及び第 2 の撮像様式を実施するために使用される。他の実施形態においては、異なった撮像デバイスが異なった撮像様式を実施するために使用される。当業者は、本明細書に記載した撮像様式を実行するために利用し得る撮像デバイスに精通しているであろう。

10

【 0 3 8 3 】

本発明は、1 つ又は複数撮像様式を使用して細胞を撮像する方法を提供する。幾つかの実施形態において、細胞が複数種の撮像剤で、及び細胞が単一の標識剤で標識される他の態様で標識される。ある実施形態においては、単一の標識剤が多モード検出可能な作用剤である。

【 0 3 8 4 】

以下の実施例及び図面は例示として提供され、本発明を限定することは意図しない。

【実施例】

【 0 3 8 5 】

実施例 1

20

セルトラリン及びオリゴヌクレオチドを含む本発明のコンジュゲートの合成。

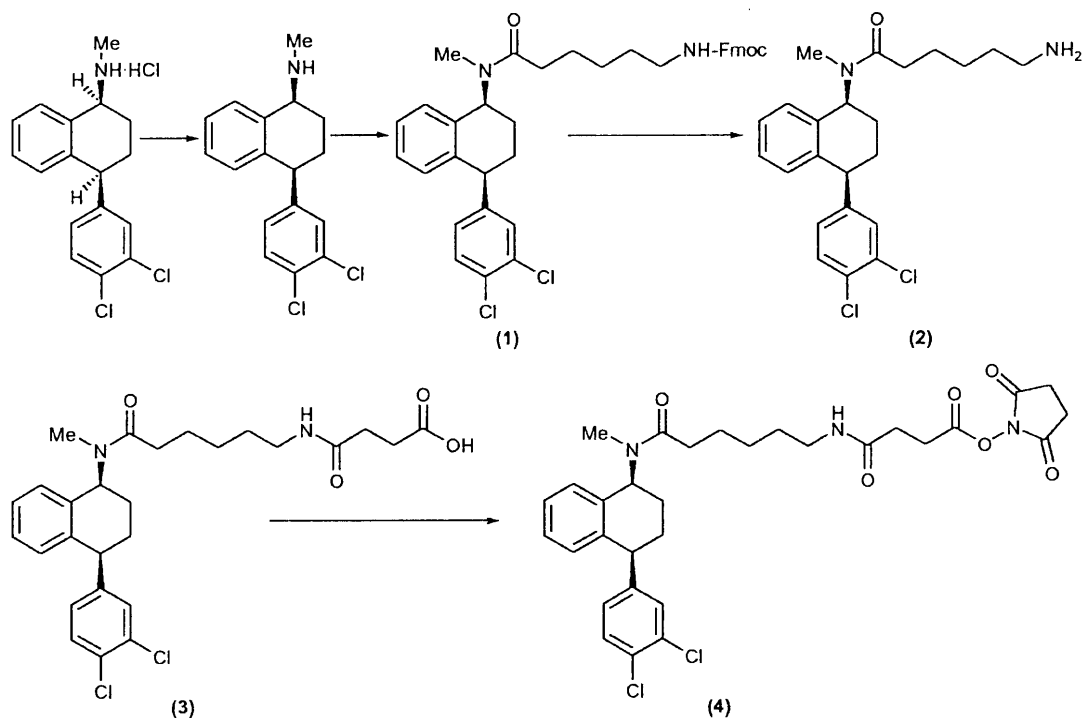
【 0 3 8 6 】

活性化されたセルトラリン (4) の合成

活性化されたセルトラリンを以下のスキームに示したようにして調製した。

【 0 3 8 7 】

【化 1 0 1】



30

40

A . 1 . 化合物 (1) の合成

セルトラリン塩酸塩 (市販で入手可能、34 mg)、9H-フルオレニルメトキシカルボニル-6-アミノヘキサン酸 (Fmoc-ACA、49 mg)、DMF (2 ml)、N-メチル-モルホリン (22 µl) 及びO-(ベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N

50

、 N', N' -テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート (TBTU、68 mg) の混合物を室温で終夜攪拌した。反応に続いて TLC (10% $CH_3OH / CHCl_3$) を行った。混合物を蒸発させると濃い油状物が生じ、それをさらに 3×5 ml の石油エーテルで洗浄した。2 ml の水を油性化合物に加えて、生じた沈殿を 2×10 ml の水で再び洗浄した。沈殿を 20 ml の塩化メチレン (DCM) で溶解して 20 ml の NaCl 溶液で後処理し、次に Na_2SO_4 で乾燥した。溶液を蒸発させて乾燥し、次に機械的ポンプで乾燥すると固体 (129 mg 粗生成物) が生じた。粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、1%、2%、次に 5% メタノール / DCM で溶出した。分画を合わせて蒸発乾固した。生成物を真空で 6 時間乾燥して 90 mg の純粋化合物 (1) を得た。

10

【0388】

A. 2. 化合物 (2) の合成

化合物 (1) (90 mg) を DCM 中 20% ピペリジン 3 ml に 1 時間かけて溶解した。反応に続いて TLC (10% メタノール / $CHCl_3$) を行った。混合物を蒸発させると油状物が生じ、それを 3×10 ml の石油エーテルで洗浄した。生じた粗製化合物 (54 mg) はさらに精製しなくても次の反応に十分な純度であった。

【0389】

A. 3. 化合物 (3) の合成

化合物 (2) (54 mg)、ピリジン (3 ml)、コハク酸無水物 (16 mg) 及び N, N -ジメチルアミノピリジン (DMAP、18 mg) の混合物を室温で終夜攪拌した。反応に続いて TLC (85:10:5 = DCM:メタノール:酢酸) を行った。10 ml の水を反応混合物に加えた。反応混合物を濃縮するとガム状になり、次に 10 ml の DCM 中に懸濁した。有機相を 2×10 ml の 5% $NaHCO_3$ 溶液、10 ml の 5% クエン酸溶液及び 10 ml の塩水溶液で洗浄した。該溶液を硫酸ナトリウムで乾燥して蒸発させ、化合物 (3) を白色発泡体 (46 mg) として得た。

20

【0390】

A. 4. 化合物 (4) の合成

化合物 (3) (46 mg)、ヒドロキシスクシンイミド (13 mg)、 N, N' -ジイソプロピルカルボジイミド (DIC、60 μ l) 及び DCM (4 ml) の混合物を室温で終夜攪拌し、続いて TLC (10% メタノール / $CHCl_3$) を行った。溶液を蒸発乾固すると 150 mg の粗固体が生じた。粗製化合物を分取 TLC (2 mm 厚さ、 20×20 cm) で精製し、TLC を 1% 酢酸を含有する 7% メタノール / $CHCl_3$ により展開した。適当なバンドを切り出してフィルタ - 漏斗中に入れた。15% メタノール / $CHCl_3$ で溶出した後、溶液を蒸発乾固して 35 mg の化合物 (4) (HPLC 純度 98%) を得た。

30

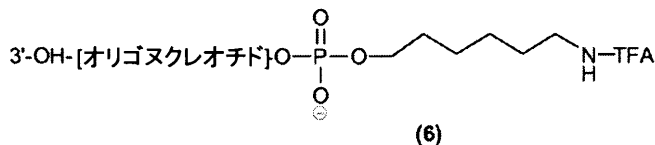
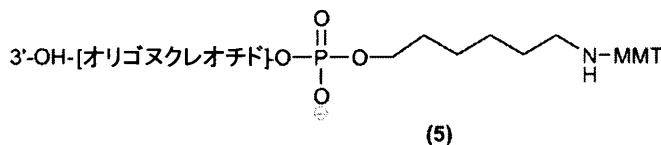
【0391】

B. アミノ改変オリゴヌクレオチド (5) 及び (6) の合成

合成は、自動合成装置で、市販のアミノリンカーである 6 - (4 - モノメトキシトリチルアミノ) ヘキシル - [(2 - シアノエチル) - (N, N -ジイソプロピル)] - ホスホルアミダイト (5' - MMT - C6 - アミノ改変剤 - CEP) 及び 6 - (トリフルオロアセチルアミノ) ヘキシル - [(2 - シアノエチル) - (N, N -ジイソプロピル)] - ホスホルアミダイト (5' - TFA - C6 - アミノ改変剤 - CEP) をそれぞれ使用して実施した。

40

【化 1 0 2】



10

次のステップを続けた。

【 0 3 9 2】

1. アミノ - リンカー - C E P を不活性雰囲気（アルゴン又は窒素）下で無水アセトニトリルに溶解した（1 m l 中に 1 0 0 μ M）。該溶液を清浄な追加の貯蔵器（E x p e d i t e 8 9 0 0 合成装置の位置 5 ~ 9 又は任意の他の合成装置の予備のポート）に入れた。ラインに手作業で 2 ~ 3 秒予備送液するか又はプライミングプログラムを使用して送達チューブをこの試薬で満たした。

2. 所望の配列を書いた；予備の塩基位置（5 ~ 9）を有する 5' 末端、そして改変試薬を機器による合成の最終ステップに組み込んだ。

20

3. オリゴヌクレオチドが H P L C 精製を必要とするので、D M T オプションを有する配列を、合成プログラムについて確認した。

4. 適当なスケール（0.2 ~ 1.0 μ M）のカップリングプログラムを使用して機器で合成を開始した。

5. 合成が終了したら、カラムを機器から取り外し、注射器を使用して支持体をエタノールで洗浄し（3 x 1 m l）、残留する酸（脱トリチル化ステップからの）及びヨウ素（酸化ステップからの）を除去した。

【 0 3 9 3】

C. オリゴヌクレオチドの支持体からの脱保護及び除去

以下のステップを実施した。

30

1. 前のステップで乾燥した支持体をスクリーキャップ付きバイアル（1.5 ~ 2 m l）中に移した。

2. 5 0 0 μ L（0.2 μ M スケール）の濃 N H₄ O H（30 %）溶液を加えた。

3. キャップをきつく締めて懸濁液を 5 5 で少なくとも 8 時間から終夜インキュベートした（G に富む配列のためにはより長い時間が与えられるべきであった）。

4. 上清を 0 に冷却して他の微量遠心管に移した。

5. 支持体を同量の蒸留水ですすぎ、この洗液をアンモニア上清に加えた。その結果アンモニア溶液は、オリゴヌクレオチドに連結した、5' 末端に遊離アミノヘキシル基（N - T F A - アミノヘキシルホスホルアミダイトが組み込まれた場合）又は保護されたアミノヘキシルのいずれかを有する全長オリゴヌクレオチドをヌクレオシドでない物質及び短い配列と一緒に含有した。

40

【 0 3 9 4】

遊離アミノヘキシルリンカーの付いたオリゴヌクレオチドの精製は、アニオン交換 H P L C、エタノール沈殿又はポリアクリルアミドゲル電気泳動（P A G E）により達成することができた。

【 0 3 9 5】

D. 活性化されたセルトラリンの遊離第一級アミンへの結合。

ステップ B 及び C で得られた 5' 末端アミノ連結オリゴヌクレオチドのステップ A で得られた N - ヒドロキシスクシンイミドエステル誘導体による標識を、以下の手順により溶液相で実施した：

50

A. マーカーの結合

1. 前のステップで得た部分的に又は完全に精製されたアミノ連結オリゴヌクレオチド (20 ~ 25 ODU (A260) 約 700 μ g) を 250 μ L の 1.0 M NaHCO_3 / Na_2CO_3 (pH 9.0) 混合物中に溶解した。生じた溶液の pH をチェックして塩基性であることを確認した。

2. ステージ A で得た活性化された誘導体 (5 ~ 6 mg) の溶液 500 μ L を 1.0 M NaHCO_3 / Na_2CO_3 緩衝液 (pH = 9.0) : DMF : 水 (5 : 2 : 3 v / v) の混合物に加えた。

3. 混合物をボルテックスにかけ、露光を防止するためにエッペンドルフチューブをアルミニウム箔で覆った。

4. 室温で 20 時間インキュベーションした後、混合物に 1 M TEAA 溶液を添加して反応を停止させた。

【0396】

B. セファデックス G - 25 カラムを使用する過剰なマーカーの除去

1. 活性化された誘導体試料をカラム上に載せた。

2. カラムを水で溶出して、1.0 ml の分画でエッペンドルフチューブ中に集めた。所望の生成物は溶媒容積の後で溶出を開始し、所望の生成物の大部分は分画 3 ~ 9 に溶出した。

3. 大部分の材料を含有する分画をプールして濃縮した。

4. 通常 12 ~ 15 ODU A260 (70%) が得られ、それは過剰な染料 / マーカー分子を含まない。必要であれば、生成物を逆相 HPLC の電気泳動 (20% PAGE) によりさらに精製することができる。

【0397】

実施例 2

セルトラリンとコンジュゲート化したセンスオリゴヌクレオチド及び式 C18 - L3 - C18 - L2 - フラノース - L1 - [オリゴヌクレオチド] - 3' (L1、L2 及び L3 はホスホジエステル連結である) の保護基を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む siRNA の合成

合成は以下のステップ実施した：

(a) RNA オリゴヌクレオチドは固体支持体上で段階的固相合成により形成し、そこで成長鎖中の末端サブユニットの通常はジメトキシトリチル (DMT) により保護されている 5' - OH 基を酸性条件下に置いて 5' - OH の DMT 保護基を除去するが、一方プリン及びピリミジン塩基は (フルオレン - 9 - イル) メトキシカルボニル (FMOC) で保護されたままで残す。

(b) D - リボース又は D - (-) - フルクトフラノースなどのフラノースユニットを、第一級ヒドロキシル基の位置における反応にだけ有利な条件下に 4, 4' - ジメトキシトリチルクロライド (DMTr - Cl) と反応させる。次に、残余のヒドロキシル基をアセチル化又はベンジル化保護基と反応させる。最後に、酸性条件下で第一級ヒドロキシルの DMT 保護基を除去する。フラノースの前記脱保護されたヒドロキシル基はステップ (a) で得られた siRNA 鎖の脱保護された 5' - OH 基と反応させ、このようにして第 1 のコンジュゲート化オリゴヌクレオチドを得る。

(c) 共有結合結合ユニット (C18 スパース) 18 個のスパースを与えるポリエチレングリコール (PEG) のモノマー 6 個を有する反応性ポリエチレングリコールは、末端 OH 基にホスフィチル化条件下で、式 (II)

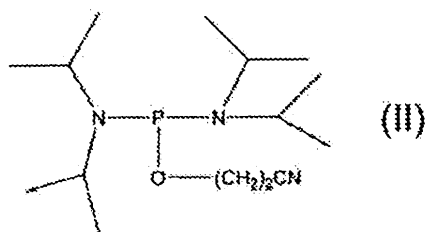
10

20

30

40

【化 1 0 3】



の(2-シアノエチル)N,N'-ジイソプロピルホスホルアミダイトなどのホスホロアミデート化合物を付加することにより形成した。

10

(d)フラノースの脱保護された5'-OH基をステップ(c)の反応性ポリエチレングリコールと反応させ、そのようにして構造:

OH-C18-L2-フラノース-L1-[オリゴヌクレオチド]-3'

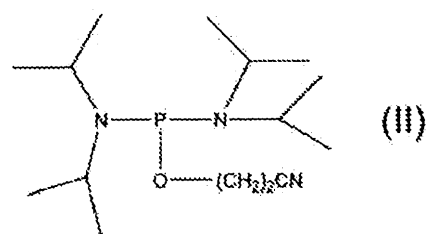
(L1及びL2はホスホジエステル結合である)

を有するsiRNA鎖を得た。

(e)18共有結合ユニットのスペーサー(C18スペーサー)を与えるポリエチレングリコール(PEG)のモノマー6個を有する第2の反応性ポリエチレングリコールは、末端OH基にホスフィチル化条件下で、式(II)

【化 1 0 4】

20



(2-シアノエチル)N,N'-ジイソプロピルホスホルアミダイトなどのホスホロアミデート化合物を付加することにより形成した。

30

(f)C18の脱保護された5'-OH基をステップ(e)からの第2の反応性C18ポリエチレングリコールと反応させ、そのようにして構造:

C18-L3-C18-L2-フラノース-L1-[オリゴヌクレオチド]-3'

(L1、L2及びL3はホスホジエステル結合である)

を有するsiRNA鎖を得た。

【0398】

(g)実施例1に記載したセルトラリンとコンジュゲート化したsiRNAの相補鎖を、ステップf)の改変されたsiRNA鎖とアニールした。この目的でRNA鎖中の全ての残余の保護基は予め以下のようにして除去しておく。20%v/vのメチルアミン(水溶液40%w/v)及び80%v/vの飽和アンモニア溶液30(30~32%v/vのNH3を含む)500μLの混合物を、siRNA(200nmol規模)を入れたエッペンドルフチューブに加えた。チューブを密閉して45分間65の温度に加熱した。この手順で、ヌクレオチドのリン原子における保護基(フラノースのアセチル化又はベンジル化及びホスホジエステル連結の2-シアノエチル化)、及びヌクレオチドの保護基(FMOC)が除去される。該混合物を次に冷却して濾過し、上清を乾燥した。残留ペレットを1Mトリエチルアミン-HFと3時間65で反応させてヌクレオチド(2'-t-ブチルジメチルシリル-TBDMs)の2'の保護基を切断した。最後に、生じた溶液をセファデックスカラムで脱塩した。

40

【0399】

実施例3

50

マウスの背側の縫線核 (DRN) 中にインビボ局所注射することによる、5-HT_{1A}R を標的とする siRNA と式 (I) の基とのコンジュゲート及び 1 種のターゲティング作用剤 (以後 NLF-siRNA) 及び 5-HT_{1A}R を標的とする裸出 siRNA (以後裸出 siRNA) の有効性アッセイ

【0400】

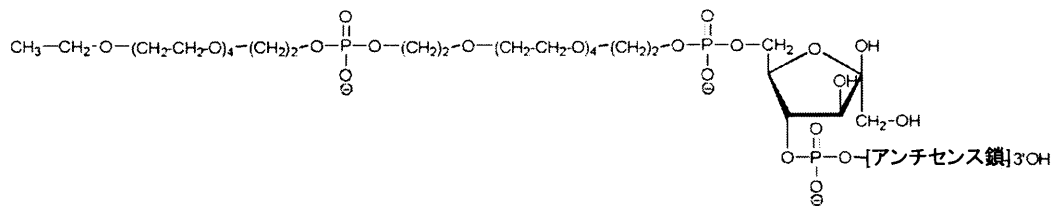
本実施例は NLF-siRNA 及び裸出 siRNA がシナプス前部の 5-HT_{1A}R のノックダウンに対して同様な有効性を呈することを示し、それは、セロトニン作動性ニューロンの本体が位置する背側の縫線核中に局所的に適用されたときに、そのタンパク質レベルの低下及びその機能により測定される。このことは式 (I) の基及び本発明の構造物で使用されるターゲティング作用剤が干渉性オリゴヌクレオチドの有効性に干渉しないことを示す。

10

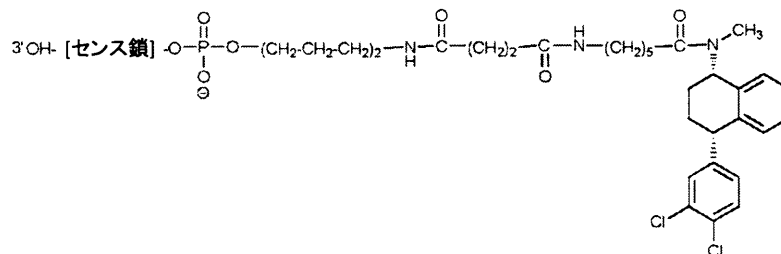
【0401】

実施例 1 及び 2 の構造を有する一組の化合物が上で開示したようにして合成され、以下の構造を有した。

【化105】



20



30

【0402】

siRNA は以下の *Mus musculus* (マウス、GenBank 受入番号: NM_008308) のセロトニン受容体 5-HT_{1A} 型 (5-HT_{1A}R) 配列: 633-651、852-870、1889-1907 及び 2167-2185 の領域を標的とするように設計した。各 siRNA のアンチセンス及びセンス鎖は化学的に合成し (配列番号 5~10、表 1)、等張 RNA アニリング緩衝液 (100 mM 酢酸カリウム、30 mM HEPES-KOH pH: 7.4、2 mM 酢酸マグネシウム) 中で、各鎖の 50 µM 溶液を組み合わせることによりアニールした。該溶液を次に 1 分間 90 ° でインキュベートし、15 秒遠心して次に 37 ° で 1 時間インキュベートした。アニールした溶液は HPLC で精製して siRNA の選択された分画を凍結乾燥した。凍結乾燥した生成物を RNA アーゼを含まない水中に再懸濁することにより siRNA の貯蔵溶液を調製して、使用するまで -20 ° で貯蔵した。使用に先立って全ての siRNA 貯蔵溶液は、脳に適用するために適当なビヒクル (i.c.v. 局所適用) である CSF (125 mM NaCl、2.5 mM KCl、1.26 mM CaCl₂、1.18 mM MgCl₂ 及び 5 % グルコース) 中で最終濃度に希釈した。

40

【表 6】

表2

RNAオリゴヌクレオチド同定(s: センス鎖)、 (a: 抗センス鎖)、(si: 小さい干渉)	配列(5' - 3' 方向)
siRNA-A-s (SEQ ID NO: 5) (配列番号5)	GGAAGAGUGUAGGGCUUAC
siRNA-A-a (SEQ ID NO: 6) (配列番号6)	GUAAGCCCUACACUCUCC
siRNA-B-s (SEQ ID NO: 7) (配列番号7)	CGAUACUGGCCUCUCCAAC
siRNA-B-a (SEQ ID NO: 8) (配列番号8)	GUUGGAGAGGCCAGUAUCG
siRNA-C-s (SEQ ID NO: 9) (配列番号9)	GGUGCUCAACAAGUGGACU
siRNA-C-a (SEQ ID NO: 10) (配列番号10)	AGUCCACUUGUUGAGCACC
siRNA-D-s (SEQ ID NO: 11) (配列番号11)	CGAUGGAAGUUUAAACCUC
siRNA-D-a (SEQ ID NO: 12) (配列番号12)	GAGGUUUAAACUCCAUCG

10

【0403】

全てのこれらの siRNA 配列は HT_{1A} 受容体の mRNA に相補的なアンチセンス配列を含み、したがって前記 mRNA を阻止してその発現を妨げることができる。これらの配列の等モルカクテルを全ての実験に使用した。

20

【0404】

対照として、ナンセンス siRNA 配列 (ns siRNA) を注入した。この ns siRNA は、Blast 配列比較アルゴリズムでマウスの全トランスクリプトームと比較したときに如何なるマウス遺伝子とも相補的でない。該 ns siRNA は以下の配列を有した：

【化106】

ns siRNA-s AGUACUGCUUACGAUACGG SEQ ID NO:56 (配列番号56)
 ns siRNA-a CCGUAUCGUAAGCAGUACU SEQ ID NO:57 (配列番号57)

30

【0405】

全ての配列は、細胞中の正常過程の mRNA を調節するタンパク質との干渉を避けるために、少なくとも1つのチミン (T) を含むヌクレオチド末端 DNA ダイマーを有する (示していない)。この技法は当業者によく知られている。これらの末端ダイマーとともに、該オリゴヌクレオチドは、効率的な RNAi 機構を可能にする 21 ~ 23 塩基対を有する。

【0406】

表1の式 (I) の基とコンジュゲート化した siRNA 配列、及び上記の1種のターゲティング作用剤 (NLF - siRNA)、式 (I) の基とコンジュゲート化したナンセンス siRNA 及び1種のターゲティング作用剤 (ns NLF - siRNA) 及び改変のない裸出オリゴヌクレオチド (表1の裸出 siRNA 又は ns 裸出 siRNA) を実験に使用した。

40

【0407】

siRNA を注入するために、マイクロカニューレシステムを当技術分野において前に記載された標準的定位法を使用して埋め込んだ。25 ゲージ配管により通した流入マイクロカニューレは、110 μm OD 及び 40 μm ID の溶融シリカ毛細管の配管からなる。マイクロカニューレの所定の長さは標的とすべき脳領域の深さ (即ち、背側の縫線核に対して 1 mm) に基づいて決定される。

50

【0408】

雄C57BL/6Jマウス(21~29g、9~12週齢雄)の背側の縫線核(DRN)に1本のマイクロカニューレを埋め込んだ。定位座標(mm)は、Franklin及びPaxinos(1997)にしたがって十字縫合及び頭蓋の頂点から、AP:-4.5、L:-1.0、DV:-4.4であり、横からの角度は20度であった。マイクロカニューレは歯科用セメント及び2本の長さ2mm、直径0.95mmのスクリューで頭蓋に固定した。マイクロ注入実験は、覚醒マウスで手術後20~24時間に実施した。精密ポンプにより0.5µL/分の速度で作動する注射器に注射マイクロカニューレをポリエチレン配管を通して接続した。

【0409】

シナプス前部の5-HT_{1A}R活性の機能測定試験のために、本発明者らは、(R)-(+)-8-ヒドロキシ-2-(ジ-n-プロピルアミノ)テトラリン臭化水素酸塩(8-OH-DPAT、選択的5-HT_{1A}Rアゴニスト)により誘発される低体温応答を、裸出siRNA又はNLF-siRNAのプールを背側の縫線核中に注入(DRN、0.3µg(0.02nmol)/1µl/2日)して24時間後に評価した。対照群には、同じ量のピヒクル(CSF:125mM NaCl、2.5mM KCl, 1.26mM CaCl₂、1.18mM MgCl₂及び5%グルコース)、ns裸出siRNA及びnsNLF-siRNAを注入した。マウスは、実験前の1時間、実験室内の個別のケージに22℃の安定した温度で保管した。全ての実験は10:00a.m.と14:00p.m.の間に実施した。体温は、マウスを自由に運動させながら温度の読み取りの5分前に、潤滑したプローブを直腸中に挿入することにより測定した。表示値はデジタル温度計を使用して得た。基礎値は8-OH-DPAT投与の5分前及び15、30、60及び120分後に測定した。8-OH-DPATは食塩水溶液に溶解して、腹腔内に(i.p.)1mg/kg、体積では5ml/kgで注射した。低体温を誘発するために選択した8-OH-DPATの用量は以前の研究に基づく。マウスの異なった群及びそれらのそれぞれの対照において、5-HT_{1A}Rを標的とするsiRNAをDRN中に最後に適用した24時間後に体温を測定した。体温を直腸で測定する追加の実験を5-HT_{1A}R KOマウス(5-HT_{1A}Rのないマウス)で実施して8-OH-DPAT誘発低体温のないことを評価した。

【0410】

図1で見ることができるよう、siRNAの局所注射による5-HT_{1A}Rのノックダウンは、5-HT_{1A}R KOマウスと同様な8-OH-DPATにより誘発される低体温応答の欠如を示す。

【0411】

このアッセイの後、マウスを斬首により殺害して脳を迅速に取り出し、ドライアイスで凍結して-20℃で貯蔵した。ミクロトームクリオスタットを使用して厚さ14µmの組織切片を切り、APTS(3-アミノプロピルトリエトキシシラン)コートスライド上に解凍固定して、使用するまで-20℃に保った。

【0412】

5-HT_{1A}Rタンパク質の密度を測定する目的で、本発明者らは、5-HT_{1A}受容体部位のオートラジオグラフィーによる可視化のために[³H]8-OH-DPATを使用した。[³H]8-OH-DPATのための実験におけるインキュベーション条件は、当技術の状況において以前に記載されている。簡単に述べれば、凍結した組織切片を解凍して乾燥し、pH7.6の170mM Tris-HCl、4mM CaCl₂及び0.01%アスコルビン酸中で30分間室温で予備インキュベートして、次に1nM[³H]8-OH-DPAT(234.0Ci/mmol)及び10⁻⁵Mパルギリンを含む同じ緩衝液中で60分間室温でインキュベートした。非特異的結合は、10⁻⁵Mの5-HTの存在下で残るものと定義した。インキュベーション及び洗浄後、組織切片を蒸留氷冷水中に浸漬して、冷空気流下で急速に乾燥した。組織をトリチウム感応性フィルムにプラスチックの³H-標準と一緒に60日間4℃で暴露した。

【0413】

マウス中脳縫線核における十字縫合から3つの異なった前後方向（AP）座標（約AP - 4.84、- 4.60及び- 4.24mm）；（Franklin及びPaxinos, 1997）の組織DRN切片を受容体部位の定量のために使用して、それらを同じ実験条件で同時に処理した。オートラジオグラムの定量分析はAIS^Rコンピュータ画像解析システムで行った。

【0414】

図2で見ることができるように、裸出siRNA及びNLF-siRNA群における5-HT_{1A}Rタンパク質密度は、対照群（ビヒクル、ns裸出siRNA及びnsNLF-siRNA）の約40～50％に低下した。この変化は図1に記載した低体温応答の抑制に対応する。

10

【0415】

これらの実験は、両方の鎖におけるNLF-siRNAの化学的改変が、裸出siRNAと比較してsiRNAの標的遺伝子をロックダウンする能力を低下させないことを示す。さらに、5-HT_{1A}受容体特異的siRNAのDRNに対する注入による局所適用は、siRNAが裸出であるか又はターゲティング部分とカップリングしているかに関わらず、標的mRNAをロックダウンした。これは、該投与法が適用中にはたらく物理的圧力によるsiRNAのニューロンの本体への直接移動を生じさせて、その結果、ニューロン膜を越える移動は必要とされないからと説明することができる。

20

【0416】

以下の実施例において、裸出5-HT_{1A}受容体に特異的なsiRNAは脳室内（i.c.v.）又は鼻内いずれの適用によっても標的mRNAをロックダウンできないこと及びsiRNAに付けたターゲティング分子の存在が標的mRNAの有効なロックダウンを可能にすることが示されるであろう。

【0417】

実施例4

中脳縫線核中のセロトニン作動性ニューロンに対する差別的選択性及びマウスの背側の第3脳室（D3V）内へのインピボ脳室内（i.c.v.）注入による裸出siRNAに対する本発明のNLF-siRNA構造物の有効性アッセイ

本実施例は、NLF-siRNA構造物及び裸出siRNAは、それらが背側の第3脳室（D3V）中に適用されて脳脊髄液（CSF）を通して脳全体及びときに、セロトニン作動性ニューロンに対する選択性及び5-HT_{1A}Rをロックダウンする効力が異なることを示すことを示す。このことは、そのmRNA発現レベルの低下、タンパク質レベルの低下、機能的変化及び抗鬱剤薬理学的増強作用の測定により評価した。

30

【0418】

実施例3に記載した一組の分子（ビヒクル、ns裸出siRNA、nsNLF-siRNA、裸出siRNA及びNLF-siRNA群）を、30µg/2.5µl/1日（2.3nmol）で背側の第3脳室（D3V）中に以下の定位座標で（mmで：AP：- 2.0、L：0、DV：- 2.1）同様な系統のマウス及び実施例2の注入システムを使用して注入した。5-HT_{1A}R mRNA発現レベルを決定するために本発明者らは、5-HT_{1A}Rに対する、塩基82～122、123～171、885～933及び1341～1389に相補的な4種のオリゴデオキシリボヌクレオチドプローブを同時に使用して、in situハイブリッド形成アッセイを実施した。各5-HT_{1A}受容体オリゴヌクレオチドは、QIAquickヌクレオチド除去キットを使用して遠心により精製した[³³P]-dATP（>2500Ci/mmol）を用いて末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを使用してその3'末端に個別に標識した（2pmol）。in situハイブリッド形成における単一標識のためのプロトコルは以前に記載された手順に基づく。簡単に述べると、実施例2に記載した凍結組織切片を先ず室温に戻し、リン酸緩衝食塩水（1×PBS：8mM Na₂HPO₄、1.4mM KH₂PO₄、136mM NaCl、2.6mM KCl）中の4％パラホルムアルデヒド中で20分間4

40

50

で固定して、室温で $3 \times \text{PBS}$ で 5 分間、 $1 \times \text{PBS}$ で 2 回各 5 分間洗浄し、 50 mM トリス - HCl ($\text{pH} 7.5$)、 5 mM EDTA 中 24 U/ml の最終濃度で予め消化したプロナーゼの溶液中において 21°C で 2 分間インキュベートする。酵素活性は、 $1 \times \text{PBS}$ 中 2 mg/ml のグリシン中に 30 秒間浸漬することにより停止した。組織は最後に $1 \times \text{PBS}$ 中ですすいで等級づけされたエタノールにより脱水した。ハイブリッド形成のために、放射性標識されたプローブを、 50% ホルムアミド、 $4 \times \text{SSC}$ ($1 \times \text{SSC}$ 、 50 mM NaCl 、 15 mM クエン酸ナトリウム)、 $1 \times$ デンハルト溶液 (0.02% フィコール、 0.02% ポリビニルピロリドン、 0.02% ウシ血清アルブミン)、 10% デキストラン硫酸、 1% サルコシル、 20 mM リン酸緩衝液 ($\text{pH} 7.0$)、 $250 \mu\text{g/ml}$ 酵母 tRNA 及び $500 \mu\text{g/ml}$ サケ精子 DNA を含有する溶液中に希釈した。ハイブリッド形成緩衝液中の放射性プローブの最終濃度は、同じ範囲 (1.5 nM) であった。組織切片を標識されたプローブを含有するハイブリッド形成溶液で覆い、その上に Nescofilm カバーガラスを重ねて加湿箱中 42°C で終夜インキュベートした。次に切片を 60°C で $1 \times \text{SSC}$ により 4 回 (各 15 分) 及び室温で $1 \times \text{SSC}$ で 1 回 30 分間洗浄し、脱水してフィルムに 3 ~ 4 週間触れさせた。フィルムの光学密度を AIS^R コンピューター画像解析システムで半定量した。

【0419】

in situ ハイブリッド形成で使用したのと同じ群のマウスについて、本発明者らは、実施例 2 に記載した 5-HT_{1A} 受容体部位のオートラジオグラフィによる可視化のための [^3H] 8-OH-DPAT を使用して 5-HT_{1A} R タンパク質の密度を測定した。

【0420】

5-HT_{1A} R タンパク質は、シナプス前部でセロトニンニューロン (中脳縫線核) 上で及び 5-HT 神経末端に位置するシナプス後部でニューロン上に、主として皮質辺縁系領域 (即ち海馬) において強く発現する。

【0421】

図 3 A 及び B で見るように、NLF-siRNA 分子だけが、セロトニン作動性ニューロンが位置するマウス中脳縫線核中の 3 つの異なった前後座標で、 5-HT_{1A} R の mRNA レベルの特異的ノックダウンを誘発する。

【0422】

図 3 C で見るように、背側の縫線核における 5-HT_{1A} R mRNA 陽性グレインのフィルムにおける測定のデンシトメトリーによる定量は、NLF-siRNA の群における発現レベルで、他のアッセイされた群と比較して 50% の低下を示した。 5-HT_{1A} R mRNA の発現における相違は、主として DRN 領域において認められる。

【0423】

図 4 で見るように、[^3H] 8-OH-DPAT を使用する 5-HT_{1A} 受容体部位に対する結合アッセイにより定量して、NLF-siRNA 分子だけが 5-HT_{1A} R タンパク質レベルの特異的低下 (約 50%) をシナプス前部の (背側の縫線核) において誘発したが、シナプス後部の (海馬又は前頭前野の皮質) 脳領域では誘発しなかった。 5-HT_{1A} R の mRNA 及びタンパク質発現における相違は、主として DRN 領域において認められる。

【0424】

これらの結果は、NLF-siRNA が、背側の縫線核に局在化している特異的セロトニン作動性ニューロンに対して mRNA の干渉を実行するオリゴヌクレオチドに選択的に向かい、その結果標的とされたニューロンの受容体の発現に対する前記 RNA 干渉の効率を増強することを示した。

【0425】

5-HT_{1A} 受容体の特異的ノックダウンがセロトニン輸送体 (5-HTT 又は SERT) 又は 5-HT_{1B} 受容体のような関係する 5-HT タンパク質の発現に影響し得るか

10

20

30

40

50

否かを調べるために、セロトニン輸送体タンパク質及び5-HT_{1B}受容体の密度をDRNで定量した。

【0426】

セロトニン輸送体タンパク質の密度をアッセイする目的で、本発明者らは、5-HTT部位のオートラジオグラフィーによる可視化のために[³H]シタロプラムを使用した。簡単に述べると、凍結組織切片を解凍して乾燥し、120mM NaCl及び5mM KClを含有する50mM Tris-HCl緩衝液(pH7.4)中室温で15分間ブレインキュベートした。次に1.5nM[³H]シタロプラム(70.0Ci/mmol)を含有する同じ緩衝液中で60分間室温でインキュベートした。非特異的結合は、1μMフルオキセチンの存在下で残留するものと定義した。インキュベーション及び洗浄後、組織切片を蒸留氷冷水中に漬けて冷空気流下で急速乾燥した。組織をトリチウム感応性フィルムに、プラスチックの³H-標準と一緒に4で40日間触れさせた。

【0427】

マウス中脳縫線核中において十字縫合からの3つの異なった前後方向(AP)座標(約AP-4.84/-4.96、-4.60/-4.36及び-4.24mm)(十字縫合;Franklin及びPaxinos, 1997)のDRN組織切片を5-HTT部位の定量に使用して、それらを同じ実験条件で同時に処理した。オートラジオグラムの定量的分析をAIS^Rコンピューター画像解析システムを用いて行った。図5Aで見ることができるように、ビヒクル、裸出siRNA及びNLF-siRNA群は背側の縫線核におけるタンパク質レベルで5-HTT(セロトニン輸送体、SERT)に如何なる低下も変化も示さない。

【0428】

5-HT_{1B}受容体(5-HT_{1BR})タンパク質の密度をアッセイする目的で、本発明者らは5-HT_{1BR}部位をオートラジオグラフィーで可視化するために[¹²⁵I]ヨードシアノピンドロールを使用した。切片を150mM NaClを含有する170mM Tris-HCl緩衝液(pH7.4)中室温で10分間ブレインキュベートし、次に100pM[¹²⁵I]ヨードシアノピンドロール([¹²⁵I]CYP、2000Ci/mmol)及び100nM 8-OH-DPATで補完した同じ緩衝液中で2時間インキュベートして、5-HT_{1AR}部位を遮断し、30μMイソプレナリンでアドレナリン作用性部位を遮断した。非特異的結合は10μM 5-HTの存在以外は同条件下でインキュベートした隣接切片で定量した。切片を同じ緩衝液で2回すすぎ、素早く4で蒸留水に漬け、冷い空気で乾燥し、感光性フィルム(ハイパーフィルム(Hyperfilm)-³H)に4で1日の間暴露した。フィルムの光学密度をAIS^Rコンピューター画像解析システムで半定量した。図5Bで見ることができるように、ビヒクル、裸出siRNA及びNLF-siRNA群は、背側の縫線核における5-HT_{1B}受容体においてタンパク質レベルのいかなる低下も変化も示さない。

【0429】

5-HT_{1AR}の機能的特徴に対するNLF-siRNAの効果を評価するために、本発明者らは8-OH-DPATにより誘発される低体温応答及び内側前頭前皮質(mPFC)における5-HT放出をアッセイした。本発明者らは、裸出siRNA又はNLF-siRNAのプール(実施例2で記載した)を背側の第3脳室中に注入して(D3V、30μg/2.5μl/1日)24時間後に8-OH-DPATにより誘発される低体温応答を評価した。図6で見ることができるように、注入されたNLF-siRNAによる5-HT_{1AR}のノックダウンのみが、5-HT_{1AR}KOマウスと同様に、8-OH-DPATにより誘発される低体温応答のないことを示した。他の裸出siRNA及び対照(ビヒクル、ns裸出siRNA及びnsNLF-siRNA)群は、5-HT_{1AR}に対するノックダウン効果を示さず(図4及び5で見られたように)、8-OH-DPATにより誘発される低体温応答の典型的な曲線と類似であった。

【0430】

上記のように、内在性アゴニスト5-HT(神経伝達物質セロトニン)又は選択的アゴ

10

20

30

40

50

ニスト（即ち 8 - O H - D P A T）によるセロトニン作動性ニューロン中に位置する 5 - H T_{1A} Rの活性化は、内側前頭前野の皮質、海馬などの末端突起脳領域中の中脳縫線核における細胞発火及びインパルス依存性 5 - H T放出を抑制し、5 - H Tレベルを低下させる（8 - O H - D P A T効果）。5 - H T放出を評価するために、当技術の現状で記載されている脳内微小透析手順を使用した。簡単に述べると、プローブのシャフトは長さ 15 mm、25 ゲージ（501 μ m OD、300 μ m ID）のステンレス - 鋼配管で作製した。流入及び流出チューブは、110 μ m OD及び40 μ m IDの溶融シリカ毛细管配管からなる25 ゲージ配管を通った。シリカ配管の上部露出端を長さ7 mm、27 ゲージ（410 μ m OD、220 μ m ID）のステンレス鋼配管中に挿入した。マウスをナトリウムペントバルビタール（40 mg / kg、i.p.）で麻酔して、定位棒で位置決めした。各マウスには、キュプロファン膜を備えた1つの透析プローブ（長さ2 mm；カットオフ分子量5000 Da）を、内側前頭前野の皮質（mPFC）（mmで：Franklin及びPaxinos, 1997の図解により十字縫合からAP + 2.2、L - 0.2、DV - 3.4）に埋め込んだ。

【0431】

微小透析実験は、手術の48～72時間後に自由に運動するマウスで、上から吊した液体回転台に取り付けたWPIモデルsp220i注射器ポンプを用いてaCSF（125 mM NaCl、2.5 mM KCl、1.26 mM CaCl₂、1.18 mM MgCl₂）を2.0 μ l / 分の速度で連続的に灌流するプローブにより実施した。60 μ lの透析液試料を30分毎にマイクロ遠心バイアル中に集めた。

【0432】

初期60分の安定化期の後、4つのベースライン試料を集めてから8 - O H - D P A Tを全身投与して（0.5 mg / kg i.p.）、次に後続の透析液試料を集めた。透析実験終了時に、マウスを犠牲死させて直ちに脳を取り出し - 70℃で凍結した。その後脳の冠状切片（50 μ m）をクリオスタット上で切り、灌流部位を局在化するために標準的手順によりクレジルバイオレットで染色した。組織学的に正しいプローブ配置で動物から得られたデータのみ次の統計分析のために使用した。

【0433】

透析液試料中の5 - H T濃度は、3 μ mオクタデシルシリカ（ODS）カラム（7.5 cm x 0.46 cm）を使用するHPLCにより、検出酸化電位を0.6 Vに設定したヒューレットパッカード1049検出器で電流測定により検出して定量した。移動相は0.15 M NaH₂PO₄・H₂O、1.8 mMオクチル硫酸ナトリウム、0.2 mM EDTA（リン酸でpH 2.8に調節）及び30%メタノールからなり、0.7 ml / 分でポンプ送液した。5 - H Tに対する保持時間は3.5～4分であり、検出限界は2 fmol / 試料であった。

【0434】

図7で見ることができるように、NLF - siRNA処理されたマウス群のマウスでは、nsNLF - siRNA群マウスと比較して前頭前野のセロトニン放出に対する8 - O H - D P A Tの効果がなかった。これは、セロトニン作動性ニューロン中の5 - H T_{1A} Rのノックダウンを、末端脳領域における5 - H T量に対するアゴニストである8 - O H - D P A Tの効果の減少により機能的に評価することができることを証拠づける。

【0435】

実施例 5

リガンドで急激に前処理し、続いてNLF - siRNAをインビボ脳室内（i.c.v.）注入されたマウスにおけるセロトニン作動性ニューロンの機能的パラメーターを測定することによる遊離の選択性リガンド（セルトラリン）と本発明によるNLF - siRNA構造物との競争的アッセイ

【0436】

NLF - siRNA中のsiRNAとコンジュゲート化された選択性リガンドが、背側の縫線核細胞（主としてセロトニン作動性ニューロン）への送達の最重要成分であるかど

10

20

30

40

50

うかを決定するために、幾つかの競争的アッセイを実施した。マウスには、D 3 V (3 0 μ g / 2 . 5 μ l / 1 日、i . c . v .) に s i R N A を注入する 3 時間前に選択的遊離リガンド 5 - H T T 阻害剤であるセルトラリン (2 0 m g / k g i . p .) の急性注射をした。それに加えて、マウスの 1 群ではビヒクルを腹腔内及び D 3 V 内に投与した。

【 0 4 3 7 】

微小透析実験は、i . c . v . ビヒクル又は s i R N A 投与の 2 4 時間後に実施した。図 8 A で見ることができるように、急性セルトラリン注射 (2 0 m g / k g i . p .) によりコンジュゲート化 5 - H T _{1A} R - N L F - s i R N A による 5 - H T _{1A} 自己受容体のサイレンシングが回避され、急性 8 - O H D P A T 投与 (選択的 5 - H T _{1A} R アゴニスト、0 . 5 m g / k g i . p .) により内側前頭前野の皮質中の 5 - H T レベルは対照群のように低下した。

【 0 4 3 8 】

選択的 5 - H T T 阻害剤であるセルトラリンで前に処理された (2 0 m g / k g i . p .) N L F - s i R N A マウスの体温に対する 8 - O H - D P A T 投与 (1 m g / k g i . p .) の効果も、図 8 A で使用したものと同様なマウスで評価した。図 8 B は、セルトラリンが 5 - H T _{1A} R - N L F - s i R N A と有効に競合し、したがって対照群と同様な低体温応答が生じて、5 - H T _{1A} R m R N A のトランスフェクション及びノックダウンのないことを示す。

【 0 4 3 9 】

これらの結果により、遊離の選択性リガンド (セルトラリン) の急性投与は、標的のニューロン (即ち 5 - H T T 、セロトニン輸送体) に同時に与えられて、セルトラリンコンジュゲート化 s i R N A (N L F - s i R N A) を遮断するか又はそれと競合することが示される。第 1 の、セルトラリンは、5 - H T 輸送体による高い特異性及び親和性 (ナノモルの範囲で) を有し、s i R N A とコンジュゲートすることにより N L F - s i R N A となり、この新しいコンジュゲートはこの 5 - H T 輸送体による親和性を維持する。それに対して、5 - H T 輸送体は 5 - H T ニューロン中でのみを発現し、輸送体による高い親和性のこの組合せ及び細胞タイプに特異的な発現が、コンジュゲート化したセルトラリン又は S S R I リガンドを有する N L F - s i R N A の選択性を決定する。

【 0 4 4 0 】

実施例 6

対照群と比較した、マウスの背側第 3 脳室 (D 3 V) 中への N L F - s i R N A のインビボ脳室内 (i . c . v .) 注入における、急性抗鬱剤 (即ちフルオキセチン) 適用後の前頭前野の皮質における 5 - H T レベルの増大の相乗的増強

【 0 4 4 1 】

生理的条件において、S S R I (即ちフルオキセチン) は、中脳縫線核及び前脳部におけるセロトニンの細胞外濃度の顕著な増大を惹起する。セロトニン輸送体 (S E R T) の再取り込み遮断により生ずる細胞外 5 - H T の増大は、中脳縫線核中の 5 - H T _{1A} 自己受容体を活性化して、細胞発火及び末端放出を抑制し、再取り込み遮断により生ずる細胞外 5 - H T の増大を弱める効果がある。その結果として、治療効果に寄与するシナプス後部のセロトニン受容体の活性化が期待より低い。5 - H T _{1A} 受容体アンタゴニスト (即ちピンドロール) によるこれらの負のフィードバック機構の遮断は、S S R I により生ずる 5 - H T の増大を強化して、それ故、S S R I の臨床的效果を助長することに役立つ可能性があることが知られている。

【 0 4 4 2 】

図 9 で見ることができるように、内側前頭前野の皮質における透析物のセロトニン濃度は、5 - H T _{1A} 受容体が前に示したように十分機能的であると期待されたナンセンス N L F - s i R N A (n s N L F - s i R N A) マウス群におけるフルオキセチンの全身投与後にベースラインより約 5 0 % 高かった。N L F - s i R N A マウス群においては、シナプス前部の 5 - H T _{1A} 受容体のノックダウンがフルオキセチンの全身投与の効果を、内側前頭前野の皮質における末端 5 - H T レベルのベースラインの 1 5 0 % にまでを相乗

10

20

30

40

50

的に増強する。

【0443】

これらの結果は、セルトラリン分子にカップリングしたの本発明のオリゴヌクレオチド配列 (NLF - siRNA) が、5-HT_{1A} 受容体の発現を、翻訳されるはずであった対応する mRNA 転写物をノックダウンすることにより遮断したことを明確に示す。本発明のオリゴヌクレオチド配列 (NLF - siRNA) は、前記発現を、裸出形にある対応する siRNA (裸出 siRNA) よりも主要な指数でノックダウンした。それ故、本発明のオリゴヌクレオチドは、改変されていない同じ配列の siRNA (裸出 siRNA) の等量より有効である。

【0444】

これらの観察は、式 (I) の基が受容体の発現のノックダウンに干渉しないと推定することを可能にする。さらに、追加のコンジュゲートの存在は、RNAi 機構により実施される阻害の効力を増強する。

【0445】

実施例 7

NLF - siRNA のインピボ脳室内 (i.c.v.) 注入に対する応答及び 5-HT_{1A} R ノックアウト (KO) マウスとの比較における抗鬱剤及び抗不安薬の作用の検討

シナプス前部の 5-HT_{1A} 受容体のノックダウンの有望な抗抑鬱剤の効果をアッセイするために、9 から 12 週齢の成長したマウスで挙動分析を実施した。それらには試験の間に少なくとも 1 日の間隔をおいて、高架式十字迷路試験及び尾懸垂試験をこの順で実施した。高架式十字迷路試験は、薄暗い照明 (50 ルクス) の室内で地面から 31 cm 上がった長さ 30 cm 及び幅 5 cm の枝道を有する十字迷路を使用して実施した。動物は開放枝道に面した迷路の中央部分に導入して 5 分間自由に探索することを許した。開放及び閉鎖枝道内で費やした時間及び移動した距離をビデオ追跡システムにより測定した。装置を 70 % エタノールで拭いて次のマウスとの間に乾燥した。全ての試験は 11:00 AM と 4:00 PM の間に実施した。試験日に、動物を薄暗い照明の挙動実験室に運び入れて試験前に少なくとも 1 時間邪魔をせずに放置した。尾懸垂試験法においては、マウスを尾で懸垂し、本発明者らはテープを使用して彼らを水平な棒に固定した。動物を 6 分間懸垂して、この期間内の無動状態を自動ビデオ追跡ソフトウェアパッケージを使用して測定した。

【0446】

図 10 で見ることができるよう、不安様挙動に変化は観察されなかったが、5-HT_{1A} 自己受容体 ノックダウンマウスにおいてストレス / 鬱病関連試験に変化した応答があった。NLF - siRNA の有望な抗鬱剤の可能性が KO マウスと野生型の対照マウスとの間にあった。それは、5-HT_{1A} 受容体が鬱病治療のための新しい目標になり得ることを示唆する。抑鬱性患者の約 40 % が従来の SSRI 治療に応答せず、彼らは該疾患に対する新しい治療の取組みにとって第 1 の候補者になり得る。

【0447】

実施例 8

マウスにおけるインピボ鼻内 (i.n) 適用による機能的セロトニン作動性の測定によるナンセンス NLF - siRNA に対する 5-HT_{1A} R NLF - siRNA によるノックダウンの相違した有効性

【0448】

有望な治療剤の投与として鼻内法の適用を検証するために、ビヒクル及び NLF - siRNA を、低体温応答、背側の縫線核における mRNA レベル及び前頭前野の皮質における 5-HT 透析物をチェックするためにアッセイした。

【0449】

マウスをペントバルビタール 40 mg / kg i.p で麻酔して仰向けにした。PBS 又は NLF - siRNA を 5 µl に分けてマイクロピペットの先端で交互に鼻孔内にゆっくりと穏やかに滴下した。

10

20

30

40

50

【0450】

図11で見ることができるよう、NLF-siRNA又はビヒクルの鼻内適用の結果は、*in situ*ハイブリッド形成により測定した5-HT_{1A}受容体のmRNAの減少及びリガンド結合アッセイにより測定した5-HT_{1A}受容体の減少であり、それらは、*i.c.v*適用後に観察された結果と同様である。特に、シナプス前部のノックダウンは、30%であった(NLF-siRNAが脳室内に適用された場合の50%ノックダウンと比較した場合)(図11参照)。さらに、NLF-siRNAの鼻内適用の結果は、8-OH-DPAT投与後の低体温応答の減少(図12A参照)及び、8-OH-DPATの急性適用後の前頭前野皮質の透析物の5-HTレベルの低下における減少であった(図12B)。

10

【0451】

さらに、5-HT_{1A}R-NLF-siRNAの有望な抗鬱効果を実施例7で記載した尾懸垂試験法を使用して評価した。不安様挙動もやはり高架式十字迷路法により評価した。図13で見ることができるよう、実験は、不安様挙動に変化は観察されなかったが(図13A)、無動状態時間の減少が5-HT_{1A}自己受容体ノックダウンマウスにおけるストレス/鬱病関連試験で誘起され(図13B)及び強制水泳試験における無動状態時間の減少(図13C)が観察されたことを示した。

【0452】

実施例9

式(I)の基及び1つのターゲティング作用剤とコンジュゲート化した5-HTTを標的とするsiRNA(セロトニン輸送siRNA)(以後5-HTT-NLF-siRNA)並びに対照群としてのビヒクルの10又は30µg/マウスの用量における、マウスにおけるインピボ鼻内適用による効力のアッセイ

20

【0453】

実施例1及び2の構造物を有する一組の化合物を上記のようにして合成した。siRNAは、*Mus musculus*由来のセロトニン輸送体(5-HTT)配列の以下の領域(マウス、GenBank受入番号:NM_010484):1230-1250を標的とするように設計した。siRNAのアンチセンス及びセンス鎖は化学的に合成して(配列番号1~2、表2)、等張のRNAアニーリング緩衝液(100mM酢酸カリウム、30mM HEPES-KOH pH:7.4、2mM酢酸マグネシウム)中で、各鎖の50µM溶液を組み合わせてることによりアニールした。次に該溶液を90℃で1分インキュベートして、15秒遠心し、次に37℃で1時間インキュベートする。アニールした溶液をHPLCで精製して選択したsiRNA分画を凍結乾燥する。siRNAの貯蔵溶液は、凍結乾燥した生成物をRNAアーゼを含まない水に再懸濁することにより調製して使用するまで-20℃で貯蔵した。使用に先立って、全てのsiRNA貯蔵溶液は、PBS緩衝の適当なビヒクル中で鼻内適用の最終濃度に希釈した。

30

【0454】

【表7】

RNAオリゴヌクレオチド同定	配列(5'-3'方向)	配列番号
siRNA-A-s (sense)	GCUAGCUACAACAAGUUCATT	14
siRNA-A-a (antisense)	UGAACUUGUUGUAGCUAGCTT	15

40

【0455】

該siRNA配列は、5-HT輸送体(5-HTT)のmRNAに相補的なアンチセンス配列を含み、したがって前記mRNAを抑止し、且つその発現を遮断することができる。

【0456】

50

全ての配列は、細胞中で正常過程のmRNAを調節するタンパク質との干渉を避けるために、少なくとも1つチミン(T)を含むヌクレオチドの末端DNAダイマーを有する(示していない)。この技法は当業者に周知である。これらの末端ダイマーでオリゴヌクレオチドは有効なRNAi機構を可能にする21~23塩基対を有する。

【0457】

表2の式(I)の基とコンジュゲート化したsiRNA配列及び上記の1つのターゲティング作用剤(5-HTT-NLF-siRNA)を実験に使用した。

【0458】

実施例10

2通りの用量(10及び30 μ g/マウス)でのマウスにおけるインビボ鼻内(in)適用による5-HTT-NLF-siRNAの機能測定アッセイによる相違したノックダウンの有効性

【0459】

雄C57BL/6Jマウス(21~29g、9~12週齢雄)をペントバルビタール40mg/kg i.pを用いて麻酔し仰向けにした。PBS又は5-HTT-NLF-siRNAをマイクロピペット先端から5 μ lに小分けして交互に鼻孔内にゆっくりと穏やかに滴下した。5-HTT-NLF-siRNAの評価した用量は：各鼻孔に5 μ g/5 μ l及び15 μ g/5 μ l(NLF-siRNAの合計用量：1日当たり10及び30 μ g/マウス)であった。

【0460】

処置の24時間後に、マウスを頭部切断により殺害して脳を迅速に取り出し、ドライアイスで凍結して-20 $^{\circ}$ Cで貯蔵した。ミクロトーム-クリオスタットを使用して厚さ14 μ mの組織切片を切り、APTS(3-アミノプロピルトリエトキシシラン)コートスライド上に解凍して載せ、使用するまで-20 $^{\circ}$ Cに保った。

【0461】

5-HTT mRNAの発現レベルを決定するために、in situハイブリッド形成アッセイを、塩基820~863(マウス、GenBank受入番号：NM_010484)に相補的で5-HTTに特異的なオリゴデオキシリボヌクレオチドプローブを使用して実施した。該5-HTTオリゴヌクレオチドは、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを使用して、その3'末端で[33 P]-dATP(>2500Ci/mmole)により個別に標識し(2pmole)、QIAquickヌクレオチド除去キットを使用して遠心により精製した。単一標識in situハイブリッド形成のためのプロトコルは、前に記載された手順に基づいた。簡単に述べると、実施例2で記載した凍結した組織切片を、最初室温に戻して、リン酸緩衝食塩水(1xPBS:8mM Na₂HPO₄、1.4mM KH₂PO₄、136mM NaCl、2.6mM KCl)中4%のパラホルムアルデヒド中において4 $^{\circ}$ Cで20分間固定し、3xPBS中室温で5分間、1xPBS中で2回各5分間洗浄して、予備消化したプロナーゼの溶液中で2分間21 $^{\circ}$ Cでインキュベートし、最終濃度は50mM Tris-HCl(pH7.5)、5mMEDTA中で24U/mlであった。酵素活性は、1xPBS中2mg/mlのグリシンに30秒間浸漬することにより停止させた。最後に組織を1xPBS中ですすいで、等級付きのエタノールにより脱水した。ハイブリッド形成のために、放射性標識されたプローブを50%ホルムアミド、4xSSC(1xSSC:50mM NaCl、15mMクエン酸ナトリウム)、1xデンハルトの溶液(0.02%フィコール、0.02%ポリビニルピロリドン、0.02%ウシ血清アルブミン)、10%デキストラン硫酸、1%サルコシル、20mMリン酸緩衝液(pH7.0)、250 μ g/ml酵母tRNA及び500 μ g/mlサケ精子DNAを含有する溶液で希釈した。ハイブリッド形成緩衝液中の放射性プローブの最終濃度は、同じ範囲であった(1.5nM)。組織切片を標識されたプローブを含むハイブリッド形成溶液で覆い、ネスコフィルム(Nescofilm)カバーガラスを上重ねて加湿箱中で終夜42 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。次に切片を1xSSC中60 $^{\circ}$ Cで4回(各15分)及び1xSSC中室温で30分間1回洗浄し、脱水してフィルム

10

20

30

40

50

に1～3日間触れさせた。フィルムの光学密度をA I S^R コンピューター画像解析システムで半定量した。

【0462】

図14Aで見ることができるように、5-HTT-NLF-siRNA分子の両方の用量が背側の縫線核中の3つの異なった前後方向座標で5-HTTmRNAの特異的ノックダウンを誘発した。

【0463】

図14Bで見ることができるように、フィルムで測定された中脳縫線核における5-HTTmRNA陽性グレインのデンシトメトリーによる定量は、NLF-siRNAの群における発現レベルがビヒクル群と比較して30%の低下したことを示した。

10

【0464】

これらの結果は、NLF-siRNAが中脳縫線核中に局在化する特異的セロトニン作動性ニューロンに対するmRNAの干渉を実行するオリゴヌクレオチドを選択的に直接指向することを示した。

【0465】

セロトニン輸送体タンパク質の密度を実施例4で記載したように5-HTT部位をオートラジオグラフィーで可視化するために[³H]シタロプラムを使用して測定した。NLF-siRNAの鼻内投与後24～48時間で、マウスを殺害してそれらの脳を取り出し、厚さ14μmのひと続きの冠状切片を十字縫合に対して(Franklin及び Paxinos, 1997)以下のAP座標(mmで)で得た: 2.2(前頭前野の皮質-PFC)、1.1～0.6(尾状核-Cpu、側方及び内側中隔核-Sep、腹側淡蒼球-VP)、-1.5～-1.8(海馬-hippocampus、視床下部-Hip)及び-4.24～-4.96(背側の縫線核-DR及び中央値縫線核-MnR)。簡単に述べると、凍結組織切片を解凍して乾燥し、120mM NaCl及び5mM KClを含有する50mM Tris-HCl緩衝液(25でpH7.4)中で15分間室温でブレインキュベートした。次に1.5nM[³H]シタロプラム(70.0Ci/mmol)を含有する同じ緩衝液中で60分間室温でインキュベートした。非特異的結合は、1μMフルオキセチンの存在下で残留するものと定義した。インキュベーション及び洗浄後、組織切片を蒸留氷冷水中に漬けて、冷空気流下で急速乾燥した。組織をプラスチックの³H-標準と一緒にトリチウム感応性フィルムに40日間4で触れさせた。

20

30

【0466】

オートラジオグラムの定量分析はA I S コンピューター画像解析システムで行った。共暴露した放射性標準による組織-校正データを使用することにより、オートラジオグラムのOD値を組織切片中の特定の脳領域に結合した放射活性(nCi/mg組織タンパク質)のレベルに変換した。

【0467】

図15で見ることができるように、ビヒクル又はNLF-ナンセンス-siRNAの鼻内投与と比較して、5-HTT-NLF-siRNAの鼻内適用は、オートラジオグラフ結合アッセイにより定量して異なった脳領域におけるセロトニン輸送体レベルの低下を誘発した。

40

実施例11

10及び30μg/マウスの用量の5-HTT-NLF-siRNAのインビボ鼻内適用(in.)により処理されたマウスにおける前頭前野の皮質中の5-HTレベルの対照群と比較した増大。

【0468】

5-HTTの機能的性質に対するNLF-siRNAの効果を評価するために、選択的5-HT輸送体阻害剤の5-HTT-NLF-siRNAに応答における背側の線条体中の5-HTレベルに対する神経化学的効果を測定した。この目的で、雄C57BL/6Jマウス(21～29g、9から12週齢雄)をペントバルビタール40mg/kg ipで麻酔して定位枠に固定した。各マウスにキュプロファン膜を備えた1本の透析ブロー

50

ブ（長さ1.5mm；分子量カットオフ5000Da）を背側の線条体（mPFC）（Franklin及びPaxinos, 1997の図解によりmmで：十字縫合からAP+0.5、L-1.7、DV-4.5、）に埋め込んだ。

【0469】

微小透析実験は、手術の24～72時間後に自由に運動するマウスで、上から吊した液体回転台に取り付けたWPIモデルsp220i注射器ポンプを用いてaCSF（125mM NaCl、2.5mM KCl、1.26mM CaCl₂、1.18mM MgCl₂）を2.0μl/分の速度で連続的に灌流するプローブにより実施した。60μlの透析液試料を30分毎にマイクロ遠心バイアル中に集めた。

【0470】

初期60分の安定化期の後、4～6個のベースライン試料を集めてから、シタロプラム（1～10～50μM）を局所投与又はフルオキセチン（20mg/kg i.p.）を全身投与して次に逐次透析液試料を集めた。透析実験終了時に、マウスを犠牲死させて直ちに脳を取り出し-70℃で凍結した。その後脳の冠状切片（50μm）をクリオスタット上で切り、灌流部位を局在化するために標準の手順によりクレジルバイオレットで染色した。組織学的に正しいプローブ配置で動物から得られたデータのみ次の統計分析のために使用した。

【0471】

透析液試料中の5-HT濃度は、3μmオクタデシルシリカ（ODS）カラム（7.5cm×0.46cm）を使用するHPLCにより、検出酸化電位を0.6Vに設定したヒューレットパカード1049検出器により電流測定で検出して定量した。移動相は0.15M NaH₂PO₄・H₂O、1.8mMオクチル硫酸ナトリウム、0.2mM EDTA（リン酸でpH2.8に調節）及び30%メタノールからなり、0.7ml/分でポンプ送液した。5-HTに対する保持時間は3.5～4分であり、検出限界は2fmol/試料であった。

【0472】

図16で見ることができるように、ビヒクル群と比較して、5-HTT-NLF-siRNA処理されたマウス群の背側の線条体において、セロトニンレベルのフルオキセチン及びシタロプラムを含む選択的5-HTT阻害剤に対する5-HTT応答の不在又は減少があった。これは、セロトニン作動性ニューロンにおける5-HTTのノックダウンを、末端脳領域における選択的輸送体阻害剤の5-HT量に対する効果の減少により機能的に評価することができることを証明する。

【0473】

これらの結果は、セルトラリンコンジュゲート化siRNA（NLF-siRNA）の投与が、核酸成分（siRNA）の配列に加えて5-HTTと選択的に相互作用することによりセロトニン作動性ニューロンを標的とすることを示す。

【0474】

実施例3から8は、5-HT_{1A}Rを指向するNLF-siRNAは、背側の縫線核に位置する5-HTニューロン中で標的遺伝子の特異的にノックダウンすることができることを示す。この効果は、脳室内適用後並びに鼻内適用後の両方で観察される。

【0475】

実施例10及び11は、5-HTTに対して特異的なNLF-siRNAも標的遺伝子、この場合5-HTT mRNAをノックダウンすることができることを示す。本発明のNLF-siRNA構造物のターゲティング能力は、0.3から1mg/kg（マウスによるsiRNA分子の10から30μg）の用量で、第3脳室（3DV）内への脳室内適用並びに鼻内適用の両方の後で観察されている。これは、siRNA療法として普通許容される治療の範囲であり、ヒトの治療へグレードアップする可能性がある。非侵襲的な鼻内適用もNLF-siRNA分子が治療剤として発展する可能性を増大させる。

【0476】

実施例12

右側脳室中へのインピボ脳室内注入によるノミフェンシンとコンジュゲート化した siRNA (NLF - NS - siRNA) の標的指向の検証

【0477】

本実施例は、脳室内に注入された NLF - NS - siRNA が黒質及び青斑核に位置する脳内特異的ニューロンに達することができることを示す。これらの細胞は、チロシンヒドロキシラーゼ染色に陽性であり、即ち、それらはドーパミン作動性又はノルアドレナリン作動性ニューロンである。

【0478】

使用される配列は、任意のヒト、マウス又はラット遺伝子のいずれとも相同性のないナンセンス (ns) siRNA である：

【化107】

NS siRNA-s AGUACUGCUUACGAUACGG SEQ ID NO:69 (配列番号69)

NS siRNA-a CCGUAUCGUAAGCAGUACU SEQ ID NO:70 (配列番号70)

配列は、細胞中の正常過程の mRNA を調節するタンパク質との干渉を避けるために、少なくとも1つのチミン (T) を含むヌクレオチドの末端 DNA ダイマーを有する (示していない)。この技法は当業者により周知である。これらの末端ダイマーとともに該オリゴヌクレオチドは、効率のよい RNAi 機構を可能にする 21 塩基対を有する。アンチセンス (a) 配列は Cy 3 分子も有し、共焦点の顕微鏡におけるその目視が可能になる。

【0479】

siRNA を注入するために、C57BL/6Ncr1 雄マウスをイソフルオランで深く麻酔して、デジタル表示読み取りの付いた定位枠に取り付けたマウスアダプター (Stoelting 参照番号: 51625) (David Kopf Instruments、940 型) 中に置いた。21G x 1.5 インチの滅菌針で頭蓋に穴を開けた後、注射器 (10 µl ハミルトン) により、2 µl の siRNA NLF - NS - siRNA - Cy 3 の蒸留水溶液 (合計用量 100 µg) 又はビヒクルを、右側脳室中に (十字縫合から AP + 0.26; L - 0.75; DV - 2.5) 注射器ポンプ (KD Scientific、KDS310) により一定の流速 0.5 µl / 分で (各時点について n = 2) 送達した。siRNA 溶液が上方に流れるのを避けるために3分間その場に残しておいた。

【0480】

マウスは、siRNA の投与後の2つの異なった時点、1及び3時間に4% PFA で灌流した。脳を切開して4% PFA の溶液中で24時間4 で後固定した。次に脳を30% スクロース溶液中に4 で48時間置いた。脳を2-メチルブタン中で-30から-40 で凍結して-80 で貯蔵した。脳をクリオスタット Leica CM3050S (30 mm) で薄片に切った。遊離して浮く切片を洗浄して4 で0.1M PBS 及び0.001% ナトリウムアジド中に貯蔵した。

【0481】

切片を PBS で洗浄し、2% ヤギ血清及び0.1% トリトンで封鎖して、抗 TH 抗体 (1:800 マウス) とともに4 で終夜インキュベートした。洗浄後、切片を Alexa Fluor 647 抗マウス二次抗体 (インビトロジェン) とともに室温で1時間インキュベートした。最後に切片を Dako の蛍光性固定剤で固定して共焦点分光顕微鏡 (FV1000 オリンパス) を使用して分析した。像は FV10-ASW 1.7 Viewer を使用して描いた。

【0482】

図17及び18で見ることができるよう、icv 注入の1時間後、黒質緻密部及び青斑核中の一部の TH 陽性細胞は Cy 3 に対しても陽性であった。全ての TH 陽性細胞が Cy 3 に対しても陽性であったわけではないが、それらの多くの比率が内側に Cy 3 蛍光を有し、NLF - NS - siRNA - Cy 3 分子が一部の TH 陽性ニューロン中に組み込まれ

10

20

30

40

50

たことを示した。

【0483】

実施例13

心室内投与によるセルトラリンとコンジュゲート化したCy3標識ナンセンス2-O'-メチル-改変ギャップマーのセロトニン作動性ニューロンへの標的指向性検証。

2-O'-メチルと10ヌクレオチド長のナンセンスギャップ領域とを非特異的（ナンセンス）配列とともに各々含有する3個のヌクレオチドのRNAウィングを含むギャップマーを含むコンジュゲートを合成した。該ギャップマーは、セルトラリンにその5'末端で及びCy3にその3'末端でコンジュゲート化されている。マウスには、Cy3を脳室内に単回注入し（30μg）、コンジュゲートを背側の第3脳室中に注入して、注入後24時間で殺害した（n=2匹のマウス）。次に標識されたCy3の局在化をレーザ共焦点顕微鏡により決定した。実験は、ギャップマーが特異的にセロトニン作動性のニューロンに局在化したことを示す（図19）。

本発明によれば以下の発明が提供される。

(1)

i) 1種又は複数種の神経伝達物質輸送体に特異的に結合する少なくとも1種の選択的作用剤、及び

ii) 神経伝達物質輸送体と同じ細胞で発現している標的分子に特異的に結合することができる少なくとも1種の核酸を含んでなる、コンジュゲート。

(2) 神経伝達物質輸送体と同じ細胞で発現している標的分子に特異的に結合することができる核酸配列が、2本鎖RNA干渉オリゴヌクレオチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ギャップマー、PNA、LNA、リボザイム及びアプタマーからなる群から選択される、上記(1)に記載のコンジュゲート。

(3) 標的分子に対する核酸の結合が標的分子の活性の阻害を生ずる、上記(1)又は(2)に記載のコンジュゲート。

(4) 選択的作用剤がオリゴヌクレオチドの5'末端にコンジュゲーションしている、上記(1)～(3)のいずれかに記載のコンジュゲート。

(5) 選択的作用剤とオリゴヌクレオチドとが連結基により接続している、請求項1～4のいずれか1項に記載のコンジュゲート。

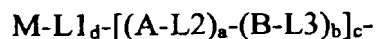
(6) 第1のオリゴヌクレオチド配列に相補的な第2のオリゴヌクレオチド配列をさらに含んでなる、上記(5)に記載のコンジュゲート。

(7) 干渉性RNAがsiRNAである、上記(8)に記載のコンジュゲート。

(8) 第2のオリゴヌクレオチドの5'末端に付いた保護基をさらに含んでなる、上記(7)に記載のコンジュゲート。

(9) 第2のオリゴヌクレオチドの5'末端に付いた保護基が、下記の構造物：

【化108】



(式中、

MがH又は脂質部分であり、

A及びBは、単糖及び(C₂～C₂₀)アルキレングリコールからなる群から独立に選択されるモノマーユニットを表し；

a及びbは0から50の範囲の整数であり；

cは0から30の範囲の整数であり；

L1、L2及びL3は、ホスホジエステル、ホスホロチオネート、カルバメート、メチルホスホネート、グアニジニウム、スルファメート、スルファミド、ホルムアセタール、チオホルムアセタール、スルホン、アミド及びそれらの混合物からなる群から独立に選択される連結化合物であり；

d は 0 又は 1 である)

を有する、上記 (8) に記載のコンジュゲート。

(1 0) 単糖が、フラノース、フルクトース、フラノース、グルコース、ガラクトース、マンノース、改変された単糖、シアル酸及びエリトロースからなる群から選択される、上記 (9) に記載のコンジュゲート。

(1 1) ($C_2 \sim C_{20}$) アルキレングリコールがエチレングリコール、プロピレングリコール、及びそれらの混合物からなる群から選択される、上記 (9) 又は (1 0) に記載のコンジュゲート。

(1 2) M が H であり、A がフラノースであり ; B が C 1 8 エチレングリコールであり ; a、b 及び c が 1 であり、d が 0 であり、L 2 及び L 3 がホスホジエステル結合である、上記 (1 1) に記載のコンジュゲート。

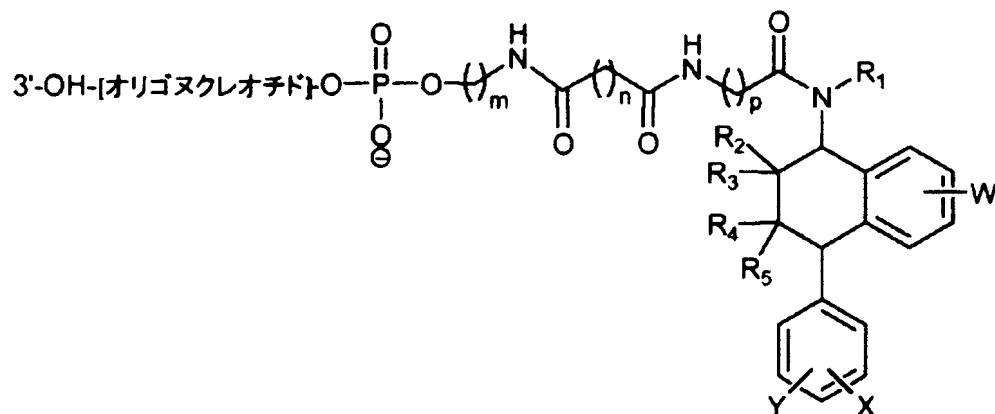
(1 3) 1 種又は複数種の神経伝達物質輸送体に特異的に結合する選択的作用剤が、セロトニン再取り込み阻害剤 (S R I)、選択的セロトニン再取り込み阻害剤 (S S R I)、セロトニン - ノルエピネフリン再取り込み阻害剤 (S N R I)、ノルアドレナリン作動性で且つ特異的セロトニン作動性の抗鬱剤 (N A S S A)、ノルアドレナリン再取り込み阻害剤 (N R I)、ドーパミン再取り込み阻害剤 (D R I)、内在性カンナビノイド再取り込み阻害剤 (e C B R I)、アデノシン再取り込み阻害剤 (A d o R I)、興奮性アミノ酸再取り込み阻害剤 (E A A R I)、グルタメート再取り込み阻害剤 (G l u R I)、G A B A 再取り込み阻害剤 (G R I)、グリシン再取り込み阻害剤 (G l y R I) 及びノルエピネフリン - ドーパミン再取り込み阻害剤 (N D R I) からなる群から選択される、上記 (1) ~ (1 2) のいずれかに記載のコンジュゲート。

(1 4) 選択的作用剤が、セロトニン再取り込み阻害剤 (S R I)、選択的セロトニン再取り込み阻害剤 (S S R I)、セロトニン - ノルエピネフリン再取り込み阻害剤 (S N R I) からなる群から選択される、上記 (1 3) に記載のコンジュゲート。

(1 5) 選択的セロトニン再取り込み阻害剤 (S S R I) が、セルトラリン、セルトラリンの構造的アナログ、フルオキセチン、フルボキサミン、パロキセチン、インダブリン、ジメリジン、シタロプラム、ダボキセチン、エスシタロプラム、及びそれらの混合物からなる群から選択され、且つオリゴヌクレオチドの配列がニューロンのアミノ酸輸送体と同じ細胞で発現している標的核酸に相補的である、上記 (1 4) に記載のコンジュゲート。

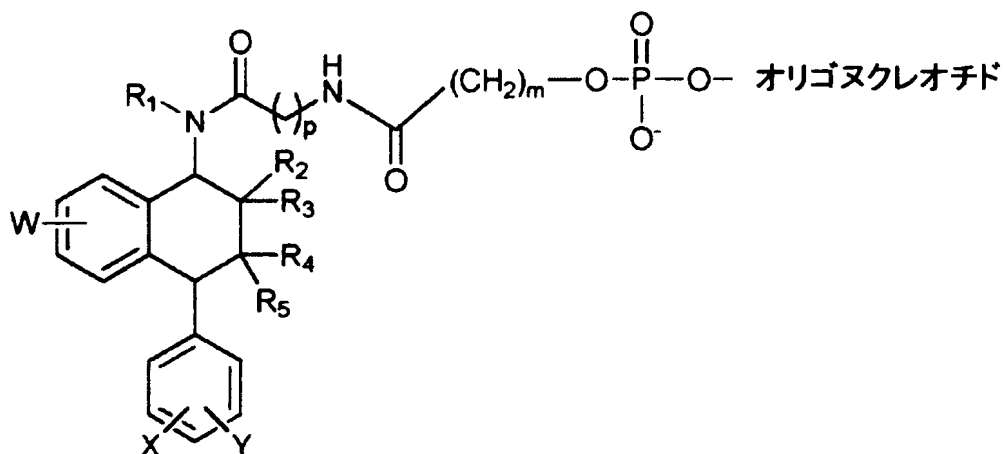
(1 6) (I) 又は (I I) からなる群から選択される構造を有する上記 (1 5) に記載のコンジュゲート :

【化 1 0 9 】



(I)

【化 1 1 0】



10

(II)

(式中、

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 及び R^5 は、水素及び $C_1 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され；
 X 及び Y は、水素、ハロゲン、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $C_1 \sim C_3$ ハロアルキル、 OR^a 及び SR^b から独立に選択され、ここで R^a 及び R^b は $C_1 \sim C_3$ アルキル及び $C_6 \sim C_{10}$ アリールから独立に選択され；

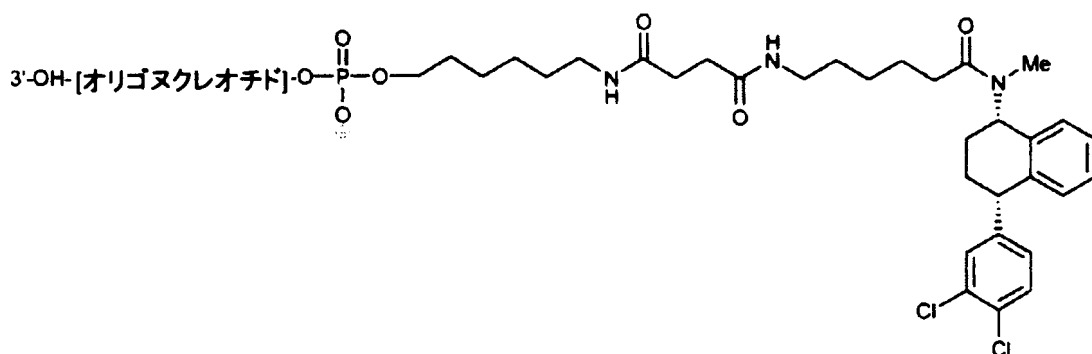
20

W は、水素、ハロゲン、 CN 、 NO_2 、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $C_1 \sim C_3$ ハロアルキル、 NR^cR^d 、 $SO_2NR^eR^f$ 、 $NR^gSO_2R^h$ 、 CO_2R^i から選択され、ここで R^c 、 R^d 、 R^e 、 R^f 、 R^g 、 R^h 及び R^i は水素及び $C_1 \sim C_3$ アルキルから独立に選択され；

m 、 n 及び p は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 及び 13 から選択され、ここで $m+n+p$ の和は、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17 及び 18 から選択される整数である。

(17)

【化 1 1 1】

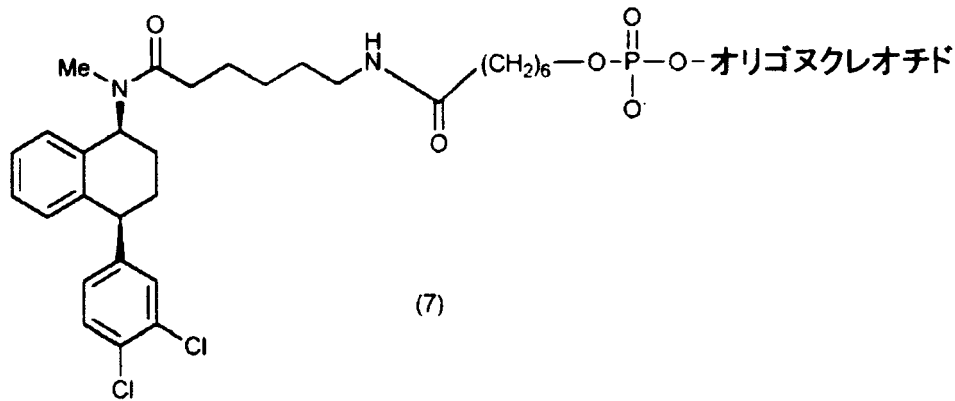


30

及び

40

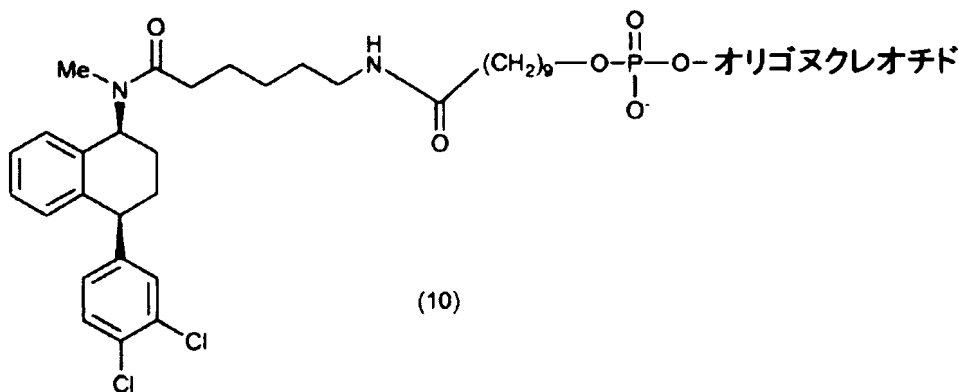
【化 1 1 2】



10

及び

【化 1 1 3】



20

からなる群から選択される構造を有する、上記（１６）に記載のコンジュゲート。

（１８）前記標的分子が、１Ａ型セロトニン受容体（５-HT_{1A}）、１Ａ型セロトニン受容体（５-HT_{1A}）をコードするｍＲＮＡ、セロトニン輸送体タンパク質及びセロトニン輸送体をコードするｍＲＮＡからなる群から選択される、上記（１４）～（１７）のいずれかに記載のコンジュゲート。

30

（１９）核酸が、セロトニン受容体１Ａ型（５-HT_{1A}）をコードするｍＲＮＡに特異的に結合することができ、且つ配列番号：１、配列番号：２、配列番号：３及び配列番号：４の群から選択される配列を含んでなる、上記（１８）に記載のコンジュゲート。

（２０）選択的作用剤が、ドーパミン再取り込み阻害剤（ＤＲＩ）及びノルエピネフリン・ドーパミン再取り込み阻害剤（ＮＤＲＩ）及びセロトニン・ノルエピネフリン・ドーパミン再取り込み阻害剤からなる群から選択され、且つ標的分子が - シヌクレイン又は - シヌクレインをコードするｍＲＮＡである、上記（１）～（１２）のいずれかに記載のコンジュゲート。

（２１）選択的作用剤がノルエピネフリン再取り込み阻害剤（ＮＲＩ）であり、且つ標的分子がドーパミン - - ヒドロキシラーゼ又はドーパミン - - ヒドロキシラーゼをコードするｍＲＮＡである、上記（１）～（１２）のいずれかに記載のコンジュゲート。

40

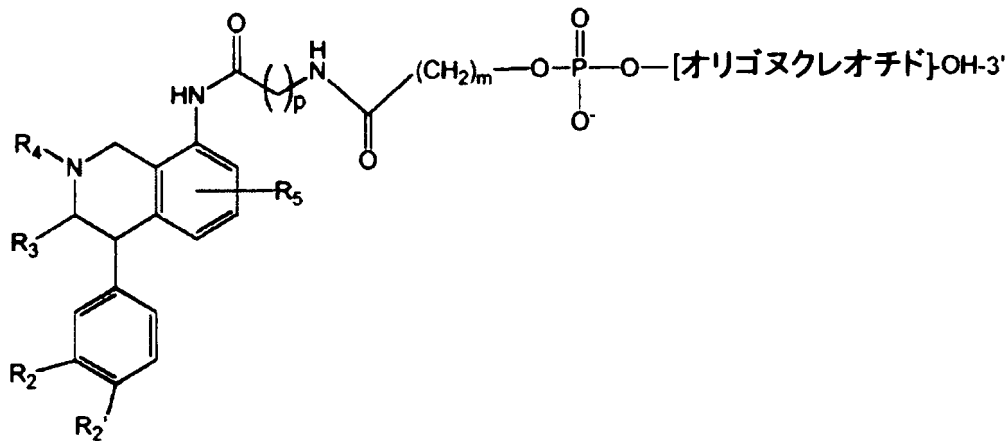
（２２）選択的作用剤が、ドーパミン再取り込み阻害剤（ＤＲＩ）及びノルエピネフリン・ドーパミン再取り込み阻害剤（ＮＤＲＩ）及びセロトニン・ノルエピネフリン・ドーパミン再取り込み阻害剤からなる群から選択され、且つ標的分子はＢＡＸ又はＢＡＸをコードするｍＲＮＡである、上記（１）～（１２）のいずれかに記載のコンジュゲート。

（２３）選択的作用剤が、ドーパミン再取り込み阻害剤（ＤＲＩ）及びノルエピネフリン・ドーパミン再取り込み阻害剤（ＮＤＲＩ）及びセロトニン・ノルエピネフリン・ドーパミン再取り込み阻害剤からなる群から選択され、且つ標的分子はタウ（Ｔau）又はタウをコードするｍＲＮＡである、上記（１）～（１２）のいずれかに記載のコンジュゲート。

50

(2 4) 選択的作用剤が、ドーパミン再取り込み阻害剤 (D R I) 及びノルエピネフリン - ドーパミン再取り込み阻害剤 (N D R I) 及びセロトニン - ノルエピネフリン - ドーパミン再取り込み阻害剤からなる群から選択され、且つ標的分子がハンチンチン又はハンチンチンをコードする m R N A である、上記 (1) ~ (1 2) のいずれかに記載のコンジュゲート。

(2 5) 構造：
【化 1 1 4】

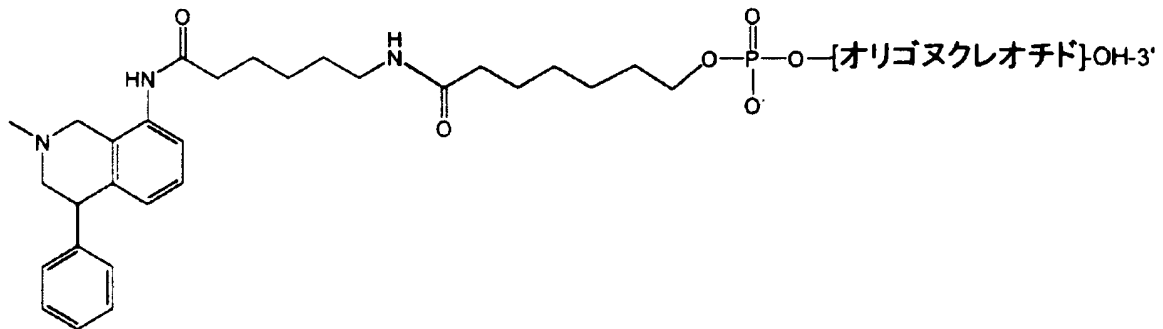


10

を有する、上記 (2 0) ~ (2 4) のいずれかに記載のコンジュゲート。

20

(2 6) 構造：
【化 1 1 5】



30

を有する、上記 (2 5) に記載のコンジュゲート。

(2 7) 医薬に使用するための、上記 (1) ~ (2 6) のいずれかに記載のコンジュゲート。

(2 8)

(i) 選択的作用剤が、選択的セロトニン再取り込み阻害剤 (S S R I)、セロトニン - ノルエピネフリン再取り込み阻害剤 (S N R I) 及びセロトニン - ノルエピネフリン再取り込み阻害剤 (S N R I) の群から選択され、及び

(i i) オリゴヌクレオチドが、セロトニン受容体 1 A 型 (5 - H T 1 A) をコードする m R N A、セロトニン輸送体をコードする m R N A、セロトニン受容体 1 A 型 (5 - H T 1 A) 及びセロトニン輸送体の群から選択される標的分子に特異的に結合することができる、

40

鬱病関連障害の治療又は予防に使用するための、上記 (1) ~ (1 2) のいずれかに記載のコンジュゲート。

(2 9) 鬱病関連障害が、大鬱病、強迫性障害 (O C D)、広汎性発達障害 (P D D)、心的外傷後ストレス障害 (P T S D)、不安障害、双極性障害、摂食障害及び慢性疼痛からなる群から選択される、上記 (2 8) に記載のコンジュゲート。

(3 0)

(i) 選択的作用剤がドーパミン再取り込み阻害剤 (D R I) 及びノルエピネフリン -

50

ドーパミン再取り込み阻害剤 (N D R I) の群から選択され、及び

(i i) オリゴヌクレオチドが - シヌクレインをコードする m R N A 又は - シヌクレインポリペプチドである標的分子に特異的に結合することができる、
レヴィー小体の堆積と関連する疾患の治療又は予防に使用するための、上記 (1) ~ (1 2) のいずれかに記載のコンジュゲート。

(3 1) レヴィー小体の堆積と関連する疾患が、パーキンソン病、レヴィー小体型認知症及び多系統萎縮症の群から選択される、上記 (3 0) に記載のコンジュゲート。

(3 2)

(i) 選択的作用剤がノルエピネフリン再取り込み阻害剤 (N R I) であり、及び

(i i) 標的分子はドーパミン - - ヒドロキシラーゼ又はドーパミン - - ヒドロキシラーゼをコードする m R N A である、

ノルアドレナリン作動性突起中におけるドーパミン欠乏と関連する疾患の治療又は予防に使用するための、上記 (1) ~ (1 2) のいずれかに記載のコンジュゲート。

(3 3)

(i) 選択的作用剤がノルエピネフリン再取り込み阻害剤 (N R I) の群から選択され、及び

(i i) オリゴヌクレオチドが、ノルエピネフリン輸送体 (N E T) をコードする m R N A 又はノルエピネフリン輸送体 (N E T) ポリペプチドである標的分子に特異的に結合することができる、

ノルアドレナリン作動性突起中におけるドーパミン欠乏と関連する疾患の治療又は予防に使用するための、上記 (1) ~ (1 2) のいずれかに記載のコンジュゲート。

(3 4)

ノルアドレナリン作動性突起中におけるドーパミン欠乏と関連する疾患が、認知症、鬱病及び神経変性性疾患と関連する記憶又は認識過程である、上記 (3 3) に記載のコンジュゲート。

(3 5)

(i) 選択的作用剤が、ドーパミン再取り込み阻害剤 (D R I) 及びノルエピネフリン - ドーパミン再取り込み阻害剤 (N D R I) 及びセロトニン - ノルエピネフリン - ドーパミン再取り込み阻害剤からなる群から選択され、及び

(i i) 標的分子が B A X 又は B A X をコードする m R N A である、
ニューロンのアポトーシス及び細胞死と関連する疾患の治療に使用する、上記 (1) ~ (1 2) のいずれかに記載のコンジュゲート。

(3 6) ニューロンのアポトーシス及び細胞死と関連する疾患が、アルツハイマー病、パーキンソン病及びハンチントン病、脳卒中 / 外傷、多発性及び筋萎縮性側索硬化症からなる群から選択される、上記 (3 5) に記載の使用のためのコンジュゲート。

(3 7)

(i) 選択的作用剤が、ドーパミン再取り込み阻害剤 (D R I) 及びノルエピネフリン - ドーパミン再取り込み阻害剤 (N D R I) 及びセロトニン - ノルエピネフリン - ドーパミン再取り込み阻害剤からなる群から選択され、及び

(i i) 標的分子がタウ又はタウをコードする m R N A である、
タウ関連疾患の治療又は予防に使用するための、上記 (1) ~ (1 2) のいずれかに記載のコンジュゲート。

(3 8) タウ関連疾患が、タウにおける異常と関連する疾患及びタウ障害の群から選択される、上記 (3 7) に記載の使用のためのコンジュゲート。

(3 9) タウ関連疾患が、第 1 7 染色体遺伝子に連鎖しパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症 (F T D P - 1 7) を含む前頭側頭型認知症、進行性核上麻痺 (p a l s y) 、大脳皮質基底核変性症、ピック病、嗜銀性顆粒性疾患、並びにパーキンソン病、ダウン症候群、脳炎後パーキンソン症候群、筋緊張性ジストロフィー、ニーマンピック C 病、ボクサー認知症、B l i n t 疾患、プリオン疾患、筋萎縮性側索硬化症、グアムのパーキンソン症候群認知症複合、多発性硬化症、緑内障、糖尿病性網膜症、及び外傷性脳損傷；並び

10

20

30

40

50

にハンチントン病、レヴィー小体型認知症、シャルコー・マリー・トゥース病、遺伝性痙性対麻痺、及び多系統萎縮症からなる群から選択される、上記（３８）に記載のコンジュゲート。

（４０）

（ｉ）選択的作用剤が、ドーパミン再取り込み阻害剤（ＤＲＩ）及びノルエピネフリン - ドーパミン再取り込み阻害剤（ＮＤＲＩ）及びセロトニン - ノルエピネフリン - ドーパミン再取り込み阻害剤からなる群から選択され、及び

（ｉｉ）標的分子がハンチンチン又はハンチンチンをコードするｍＲＮＡである、ハンチントン疾患の治療に使用するための、上記（１）～（１２）のいずれかに記載のコンジュゲート。

10

（４１）脳室内に又は鼻内に投与される、上記（４０）に記載の使用のためのコンジュゲート。

（４２）

（ｉ）１種又は複数種の神経伝達物質輸送体に特異的に結合する少なくとも１種の選択的作用剤、及び

（ｉｉ）撮像剤

を含んでなるコンジュゲート。

（４３）撮像剤が磁気共鳴撮像造影剤である、上記（４２）に記載のコンジュゲート。

（４４）磁気共鳴撮像造影剤がガドリニウム系化合物である、上記（４２）又は（４３）に記載のコンジュゲート。

20

（４５）選択的作用剤が、上記（１３）～（２６）のいずれかに記載のものである、上記（４２）～（４４）のいずれかに記載のコンジュゲート。

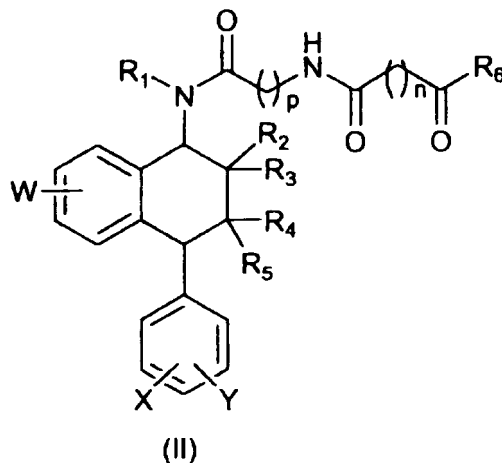
（４６）神経伝達物質輸送体を発現している細胞を撮像する方法であって、前記細胞を上記（４２）～（４５）のいずれかに記載のコンジュゲートと接触させることを含んでなり、コンジュゲートの一部を形成する選択的作用剤が前記細胞により発現される神経伝達物質輸送体に特異的に結合する、方法。

（４７）診断剤として使用するための、上記（４２）～（４５）のいずれかに記載のコンジュゲート。

（４８）式（ＩＩ）の化合物：

【化１１６】

30



40

（式中、

R¹、R²、R³、R⁴及びR⁵は、水素及びC₁～C₆アルキルから独立に選択され；
X及びYは、水素、ハロゲン、C₁～C₃アルキル、C₁～C₃ハロアルキル、OR^a及びSR^bから独立に選択され、ここでR^a及びR^bはC₁～C₃アルキル及びC₆～C₁₀アリールから独立に選択され；

R⁶がカルボニル活性化基であり；

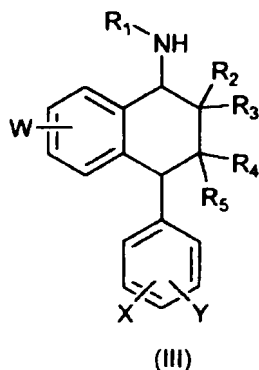
50

Wは、水素、ハロゲン、CN、NO₂、C₁～C₃アルキル、C₁～C₃ハロアルキル、NR^cR^d、SO₂NR^eR^f、NR^gSO₂R^h、CO₂Rⁱから選択され、ここでR^c、R^d、R^e、R^f、R^g、R^h及びRⁱは水素及びC₁～C₃アルキルから独立に選択され；

n及びpが1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12及び13から選択される)を調製する方法であって、

a) 式(III)の化合物：

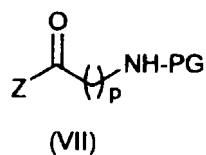
【化117】



10

と式(VII)のアシル化剤：

【化118】

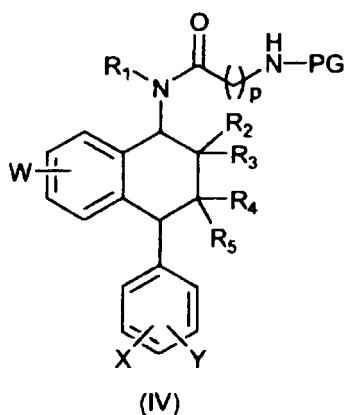


20

(式中、pは上で定義した通りであり、Zはハロゲン又はOHであり、及びPGはアミン保護基である)

とを反応させて式(IV)の化合物：

【化119】



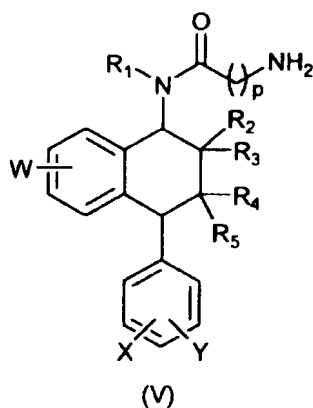
30

40

を得るステップと；

b) 式(IV)の化合物中のアミノ保護基を脱保護して式(V)の化合物：

【化 1 2 0】

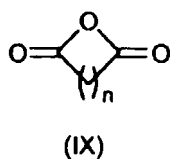
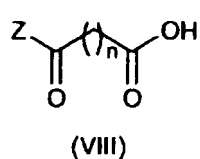


10

を得るステップと；

c) 式 (V) の化合物と式 (VIII) 又は (IX) のアシル化剤とを反応させて

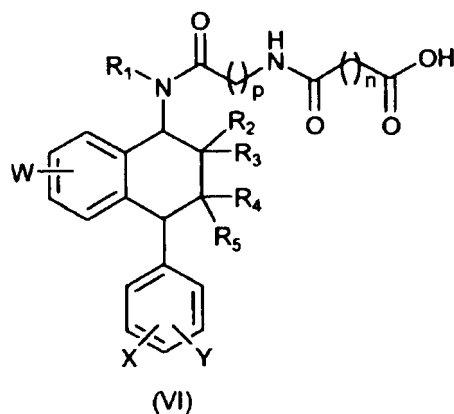
【化 1 2 1】



20

(式中、n は上で定義した通りであり、及び Z はハロゲン又は OH である)、式 (VI) の化合物：

【化 1 2 2】



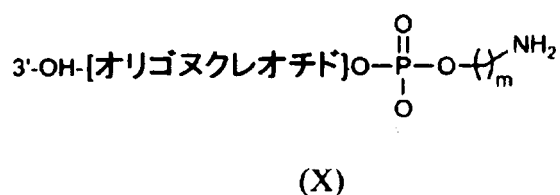
30

を導くステップと；

d) 式 (VI) の化合物をカルボニル活性化基で処理するステップとを含んでなる、方法。

(49) 式 (II) の化合物と式 (X)：

【化 1 2 3】



40

(式中、R¹ ~ R⁵、X、Y、W、m、n 及び p は上記 (48) で定義された通りである) のアミノ改変オリゴヌクレオチドとを反応させて、上記 (25) に記載の式 (I) のコ

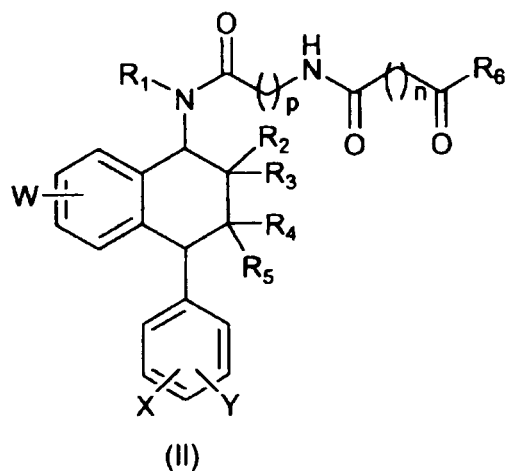
50

ンジュゲートを得ることをさらに含んでなる、上記（４８）に記載の方法。

（５０）オリゴヌクレオチドが配列番号：５および１２の群から選択される配列を含んでなる、上記（４９）に記載の方法。

（５１）（ｉ）式（Ⅱ）を有する化合物：

【化１２４】



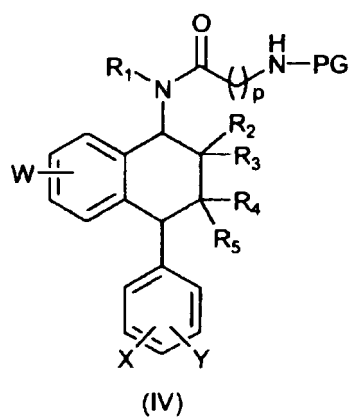
10

（式中、 $R^1 \sim R^6$ 、 X 、 Y 、 W 、 n 及び p は、上記（４８）で定義された通りである）；

20

（ii）式（Ⅳ）を有する化合物：

【化１２５】

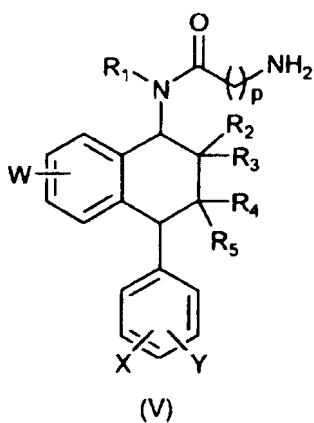


30

（式中、 $R^1 \sim R^5$ 、 X 、 Y 、 W 、 p 及び PG は上記（４８）で定義された通りである）；

（iii）式（Ⅴ）の化合物：

【化１２６】



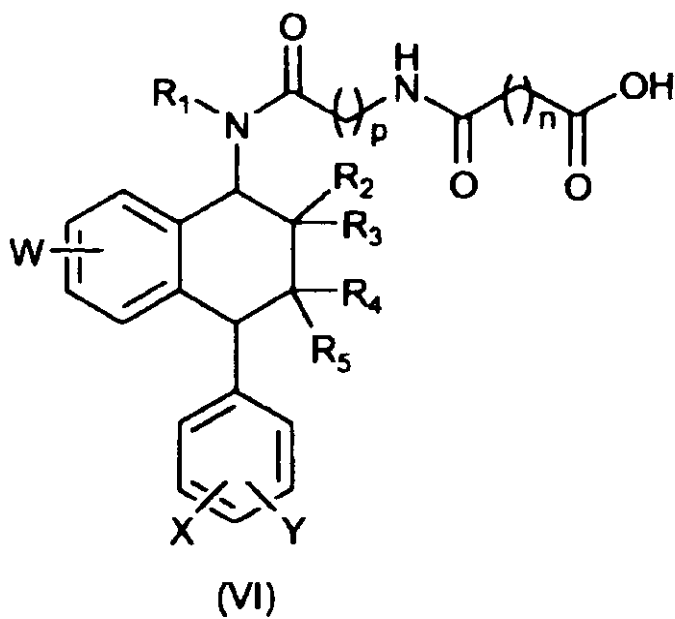
40

50

(式中、 $R^1 \sim R^5$ 、 X 、 Y 、 W 及び p は上記(48)で定義された通りである)；

(iv)式(VI)の化合物：

【化127】



10

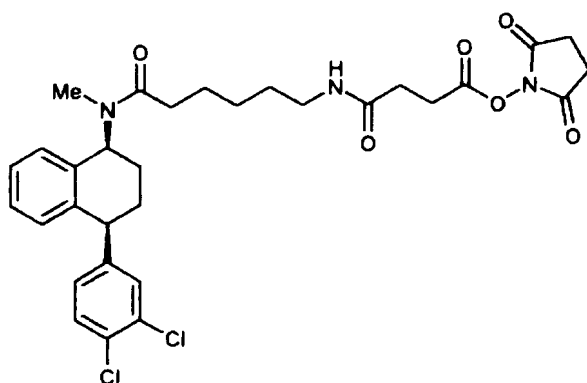
20

($R^1 \sim R^5$ 、 X 、 Y 、 W 、 p 及び n は上記(48)で定義された通りである)からなる群から選択される化合物。

(52)

(i)構造：

【化128】

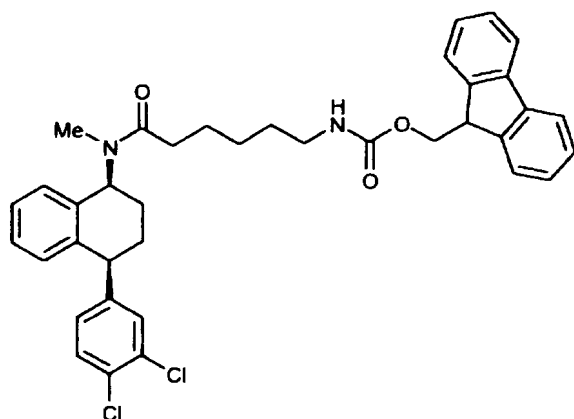


30

を有する化合物、

(ii)構造：

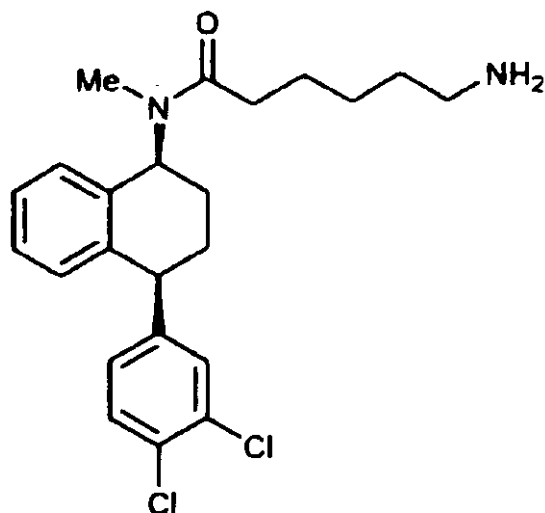
【化 1 2 9】



10

を有する化合物、(i i i) 構造 :

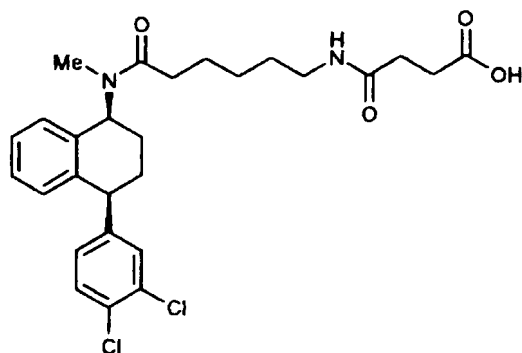
【化 1 3 0】



20

を有する化合物及び(i v) 構造 :

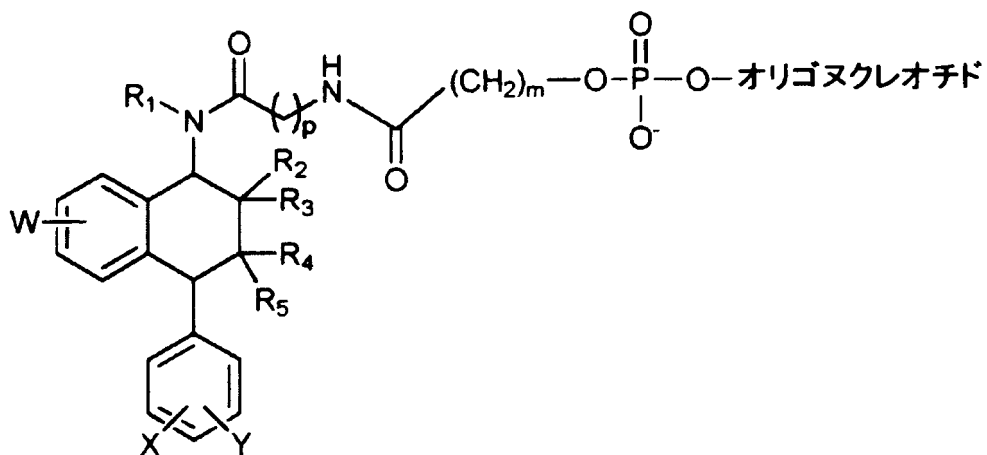
【化 1 3 1】



40

を有する化合物の群から選択される、上記 (5 1) に記載の化合物。(5 3) 構造 :

【化 1 3 2】



10

(式中、

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 及び R^5 が水素及び $C_1 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され；
 X 及び Y は、水素、ハロゲン、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $C_1 \sim C_3$ ハロアルキル、 OR^a 及び SR^b から独立に選択され、ここで R^a 及び R^b は、 $C_1 \sim C_3$ アルキル及び $C_6 \sim C_{10}$ アリールから独立に選択され；

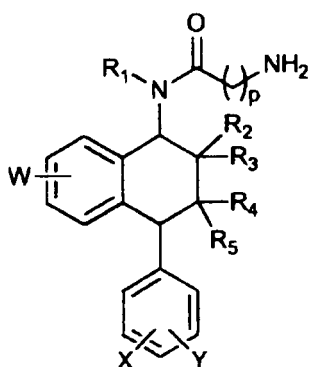
W は、水素、ハロゲン、 CN 、 NO_2 、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $C_1 \sim C_3$ ハロアルキル、 NR^cR^d 、 $SO_2NR^eR^f$ 、 $NR^gSO_2R^h$ 、 CO_2R^i から選択され、ここで R^c 、 R^d 、 R^e 、 R^f 、 R^g 、 R^h 及び R^i は、水素及び $C_1 \sim C_3$ アルキルから独立に選択され；

20

n 及び p は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 及び 13 から選択される) を有するコンジュゲートの合成方法であって、

a) 下式：

【化 1 3 3】



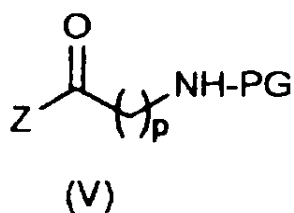
30

の化合物と

式 (V) のアシル化剤：

40

【化 1 3 4】



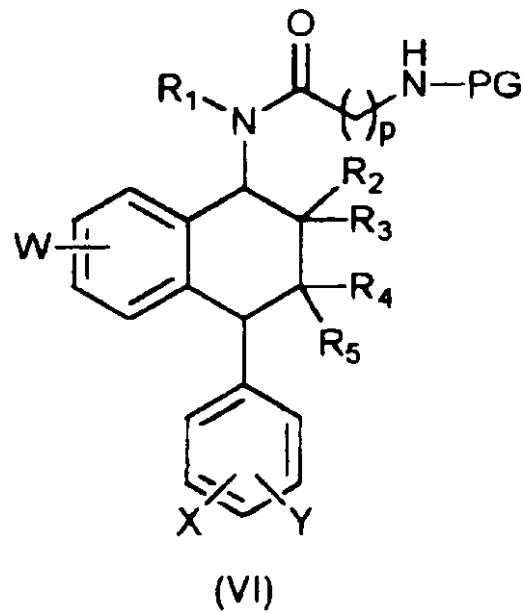
(式中、 p は上で定義した通りであり、 Z はハロゲン又は OH であり、及び PG はアミ

50

ン保護基である)

とを反応させて式(VI)の化合物:

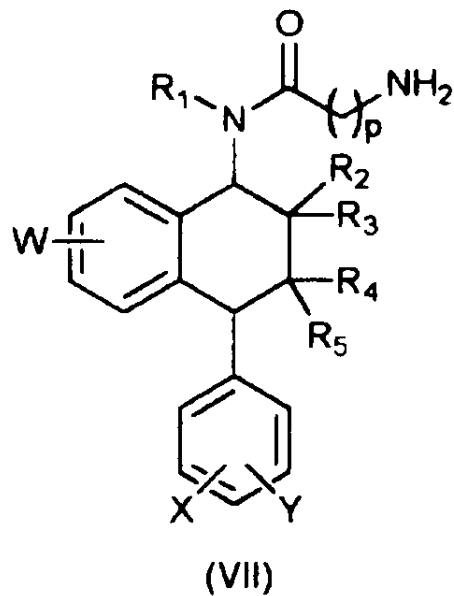
【化135】



を得るステップと;

b) 式(VI)の化合物中のアミノ保護基を脱保護して式(VII)の化合物:

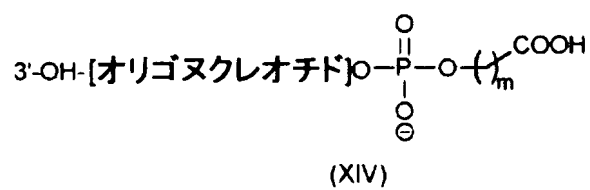
【化136】



を得るステップと; 及び

c) 式(VII)の化合物と式(XIV)のカルボキシ改変オリゴヌクレオチド:

【化137】



10

20

30

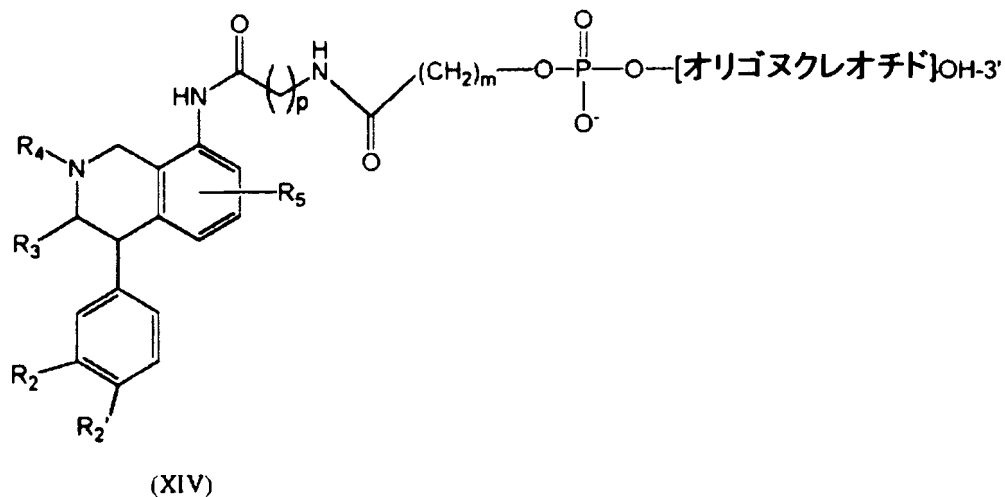
40

50

とを反応させるステップと
を含んでなる、方法。

(54) 式 (XIV) の化合物：

【化 138】



10

(式中、

R¹ は、水素、低級アルキル基又はベンジル基であり；

R² は、水素、メチル、塩素又はフッ素基であり；

R^{2'} は、水素、メチル、メトキシ、ヒドロキシル又はハロゲン原子であり；R³ 及び

R⁴ は、水素、低級アルキル基を表し；

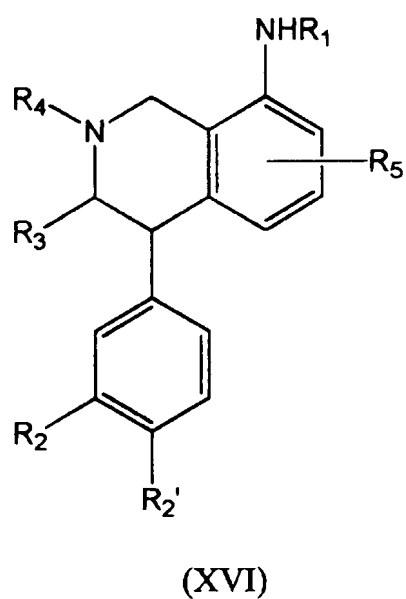
R⁵ は、5 - 又は 6 - 位における水素、塩素又はメトキシ基を表し；及び

p は 2 ~ 6 である）

を調製する方法であって、

a) 式 (XVI) の化合物：

【化 139】

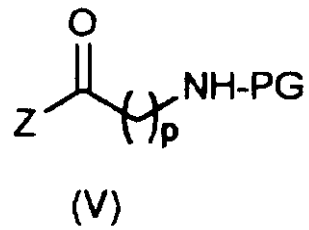


30

40

と式 (V) のアシル化剤：

【化 1 4 0】

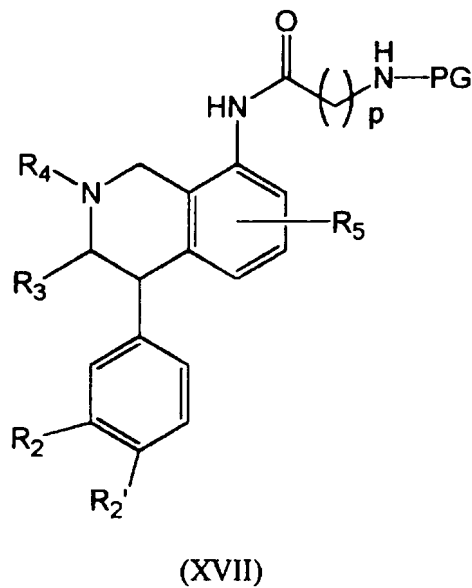


(式中、 R^1 、 R^2 、 $R^{2'}$ 、 R^3 、 R^4 、 R^5 及び p は上で定義した通りであり、
 Z はハロゲン又は OH であり、 PG はアミン保護基である)

10

とを反応させて、式 (XVII) の化合物：

【化 1 4 1】



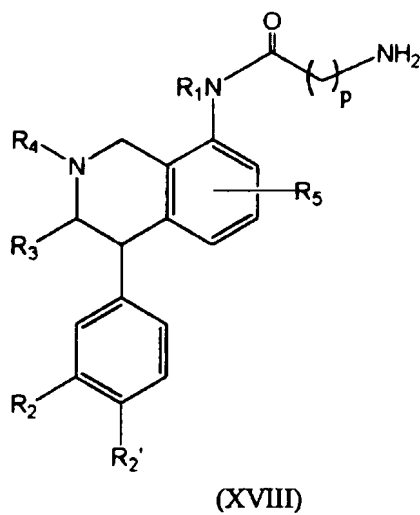
20

を得るステップと；

30

b) 式 (XVII) の化合物中のアミン保護基を脱保護して式 (XVIII) の化合物：

【化 1 4 2】

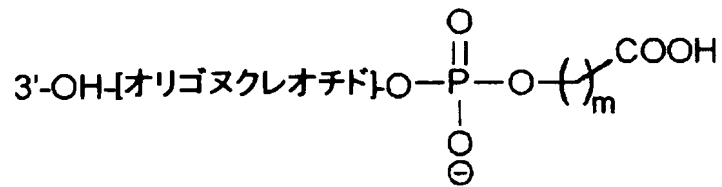


40

を得るステップと；

c) 上記の式 (XVIII) の化合物と式 (X) のアミノ改変オリゴヌクレオチド：

【化 1 4 3】



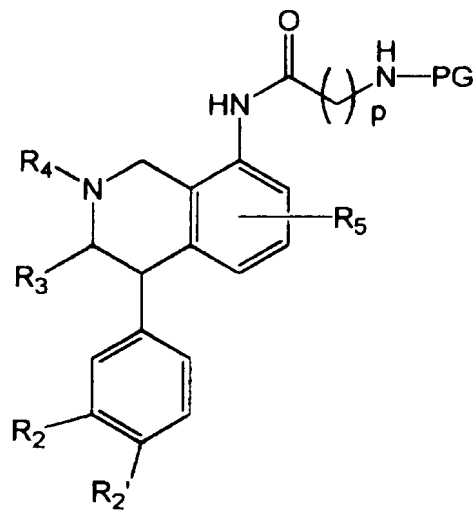
(X)

とを反応させるステップと
を含んでなる、方法。

(5 5)

(i) 式 (X V I I) を有する化合物：

【化 1 4 4】

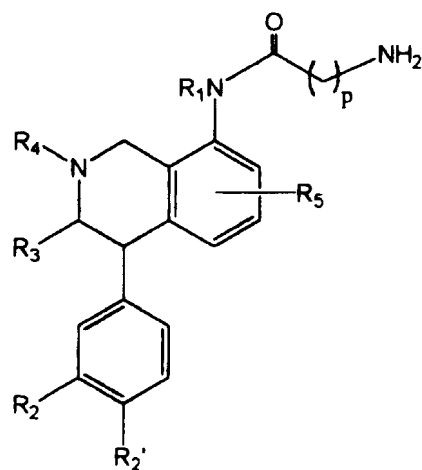


(XVII)

及び

(i i) 式 (X V I I I) を有する化合物：

【化 1 4 5】



(XVIII)

からなる群から選択される化合物。

(5 6)

(i) 構造：

10

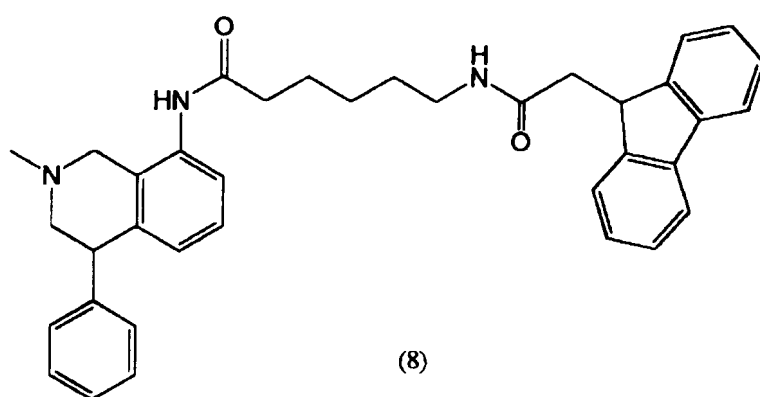
20

30

40

50

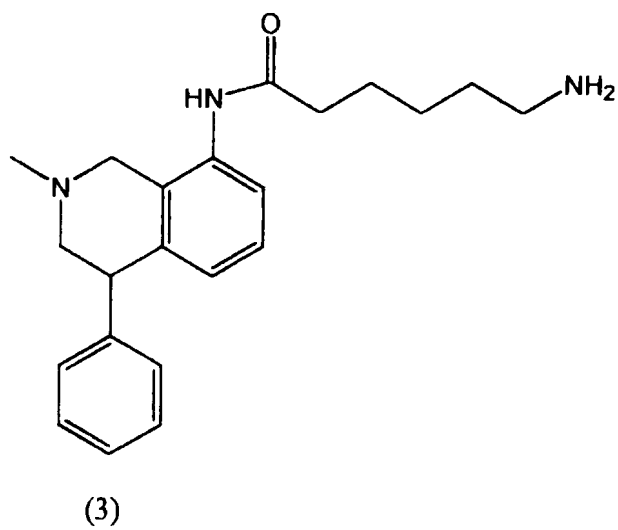
【化 1 4 6】



10

を有する化合物及び(i i) 構造 :

【化 1 4 7】

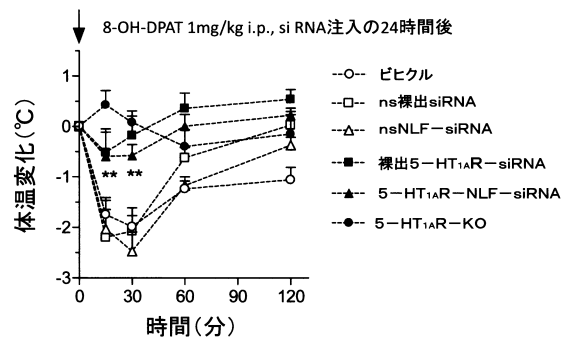


20

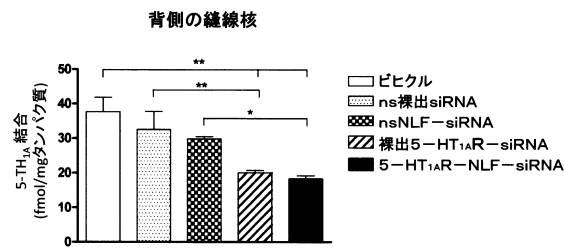
30

を有する化合物の群から選択される、上記 (5 5) に記載の化合物。

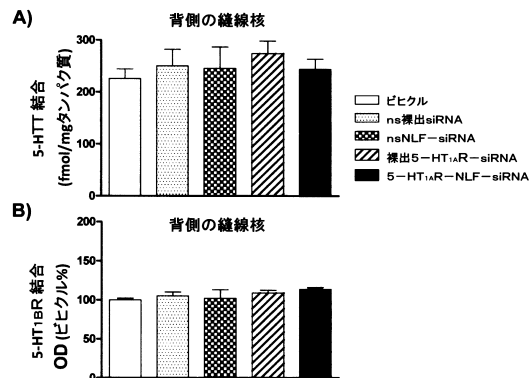
【図 1】



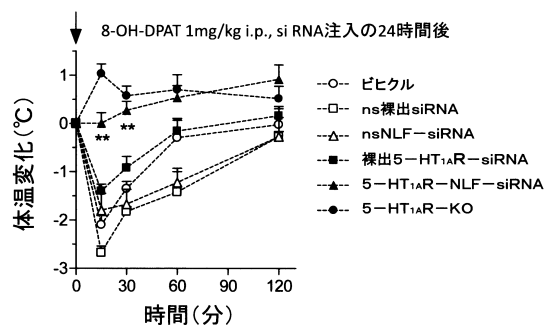
【図 2】



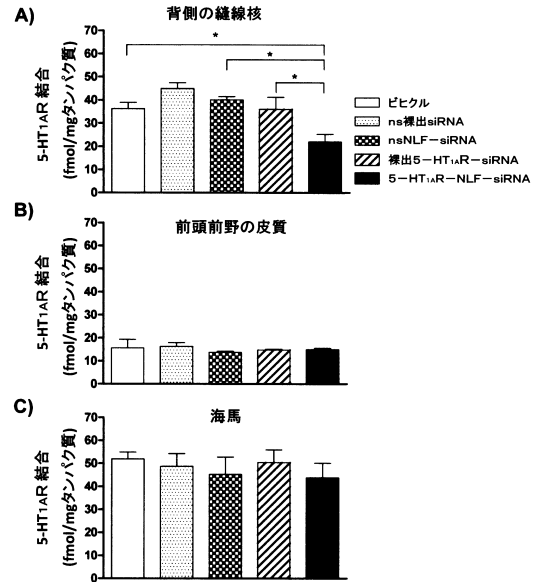
【図 5】



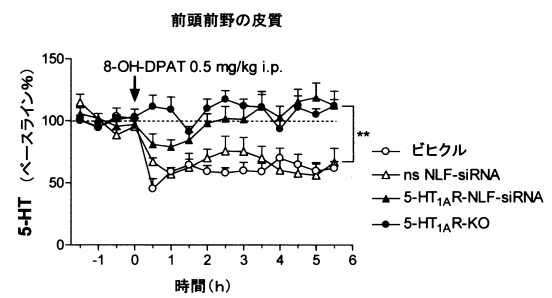
【図 6】



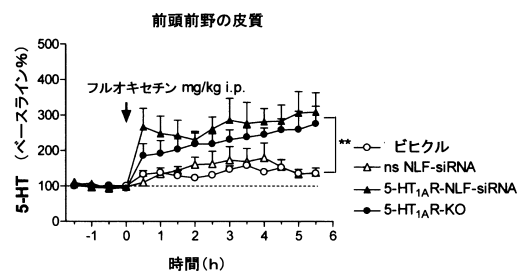
【図 4】



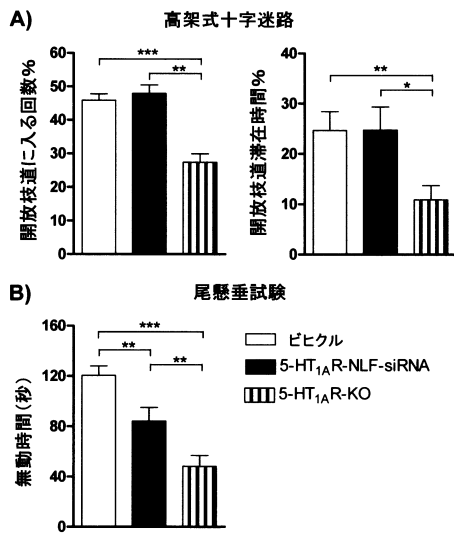
【図 7】



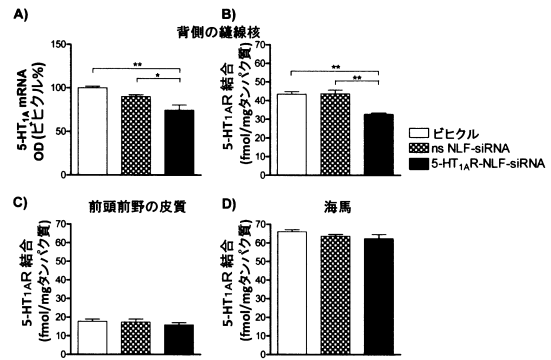
【図 9】



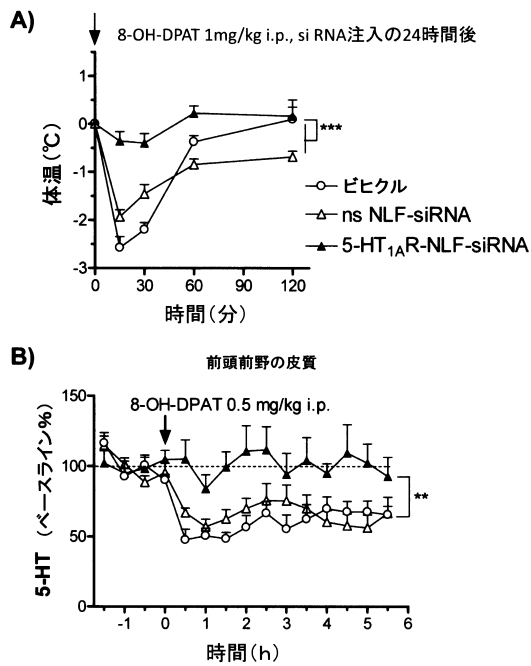
【図 10】



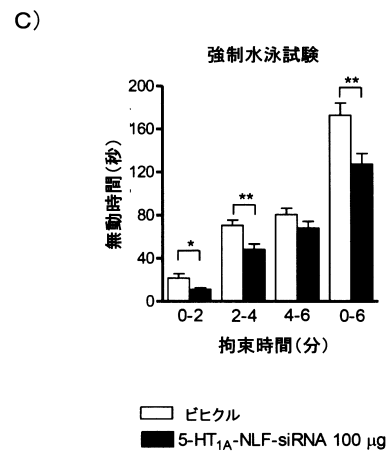
【図 11】



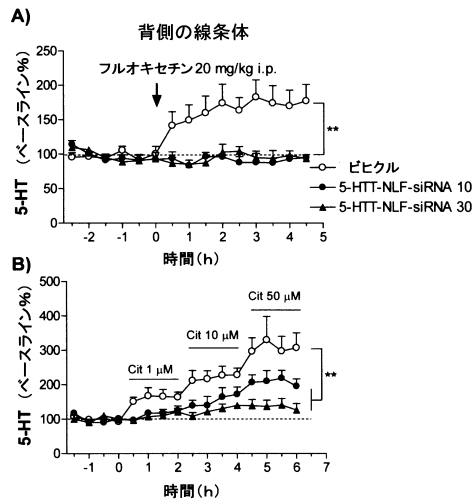
【図 12】



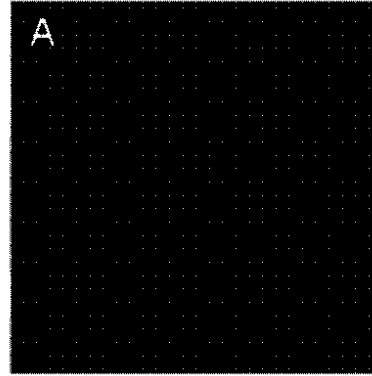
【図 13 - 2】



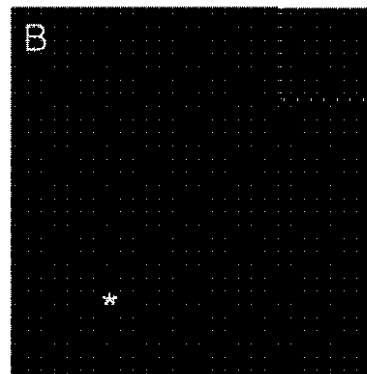
【図 16】



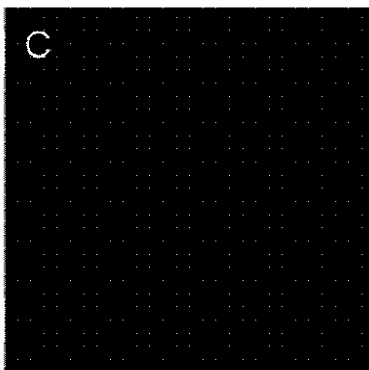
【図 17 A】



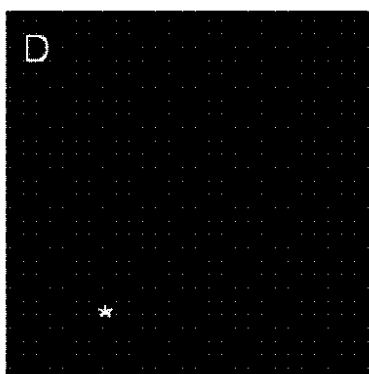
【図 17 B】



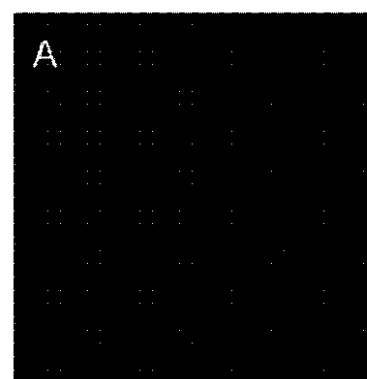
【図 17 C】



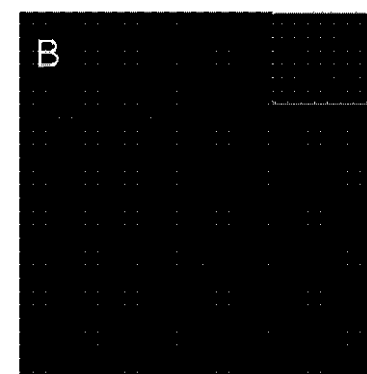
【図 17 D】



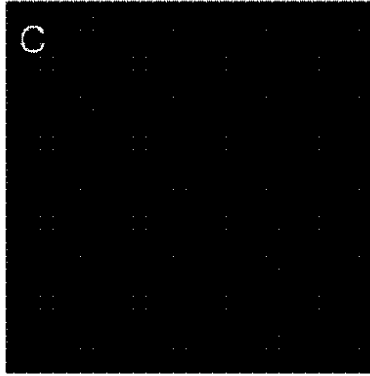
【図 18 A】



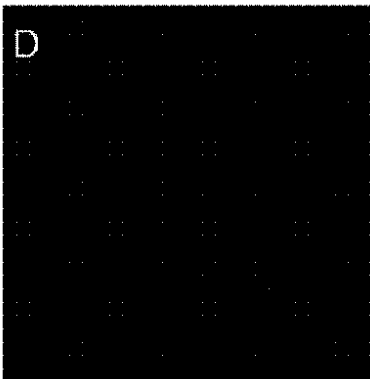
【図 18 B】



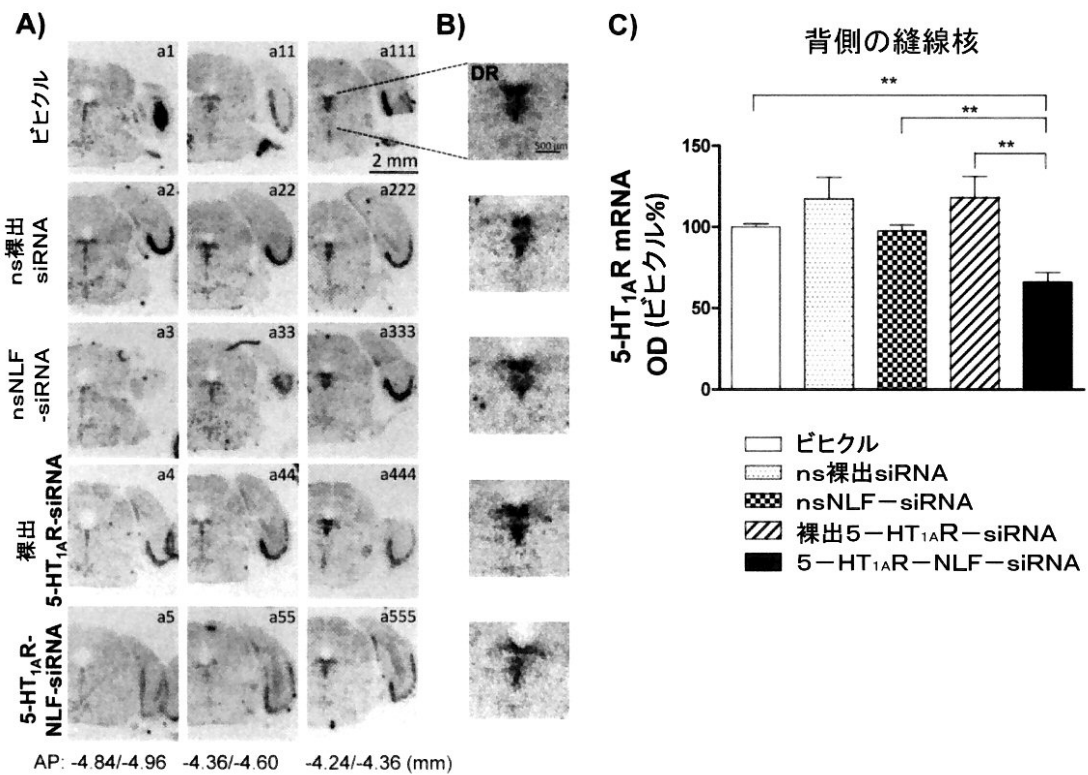
【図 18 C】



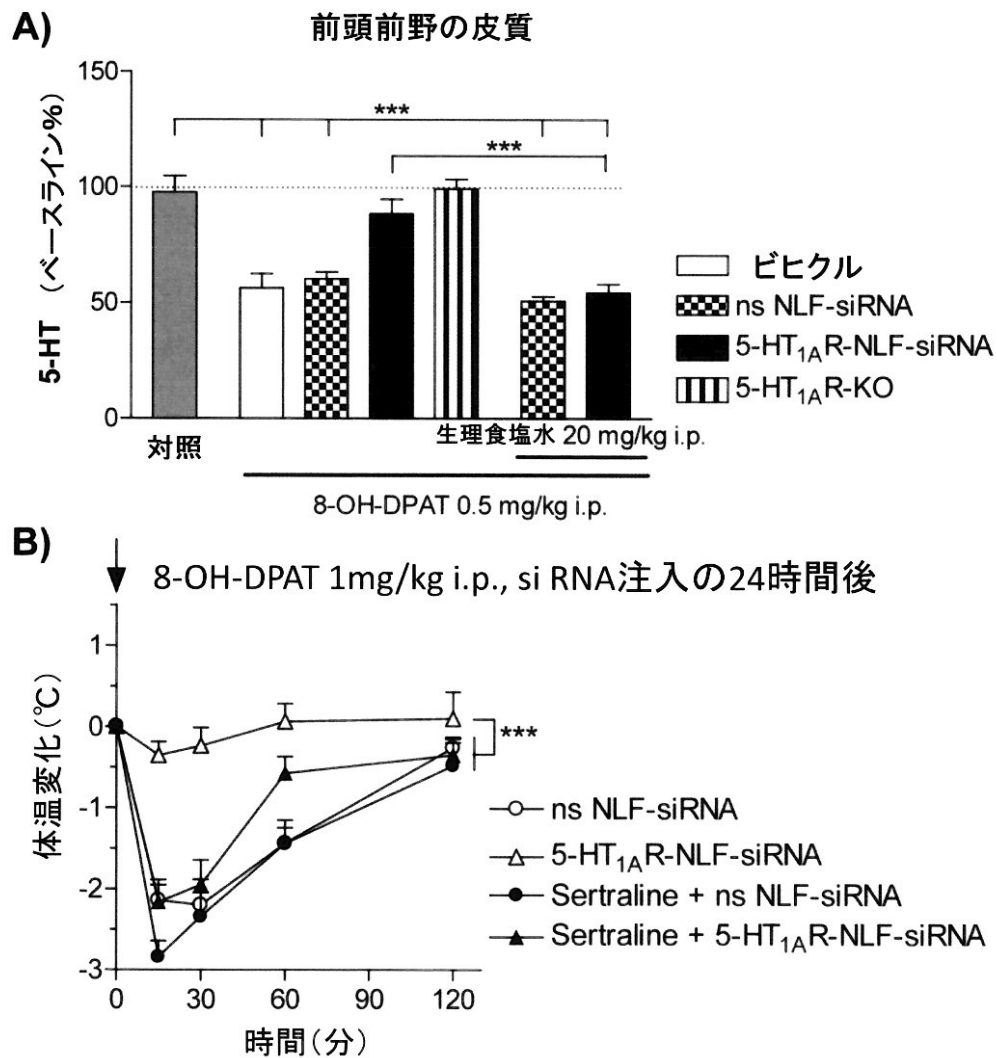
【図 18 D】



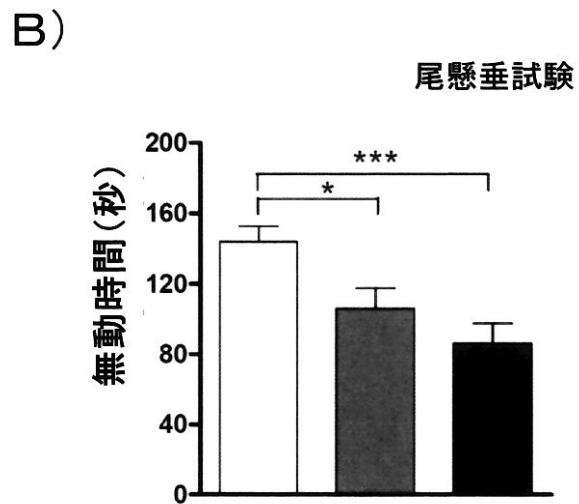
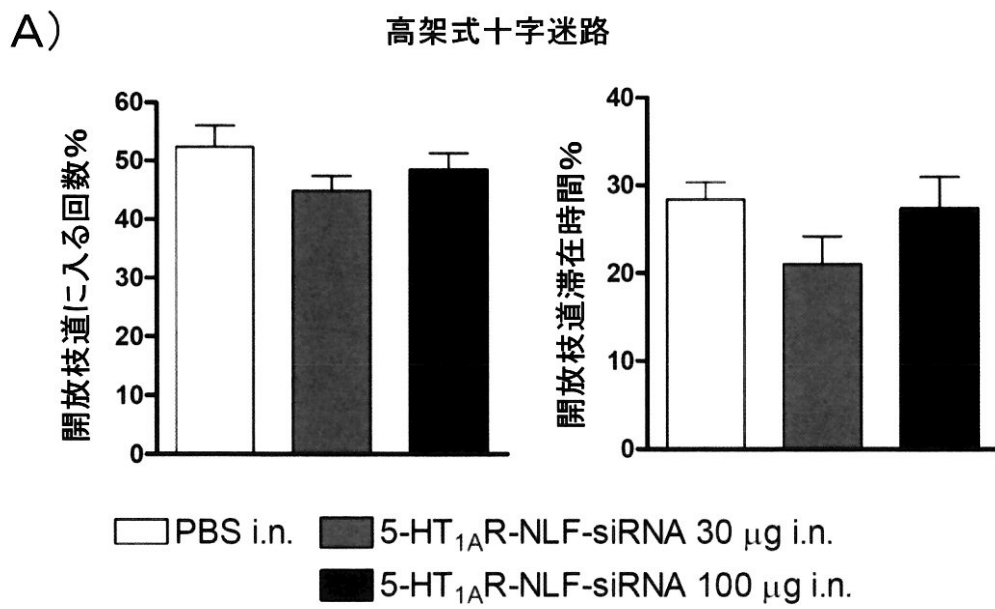
【図 3】



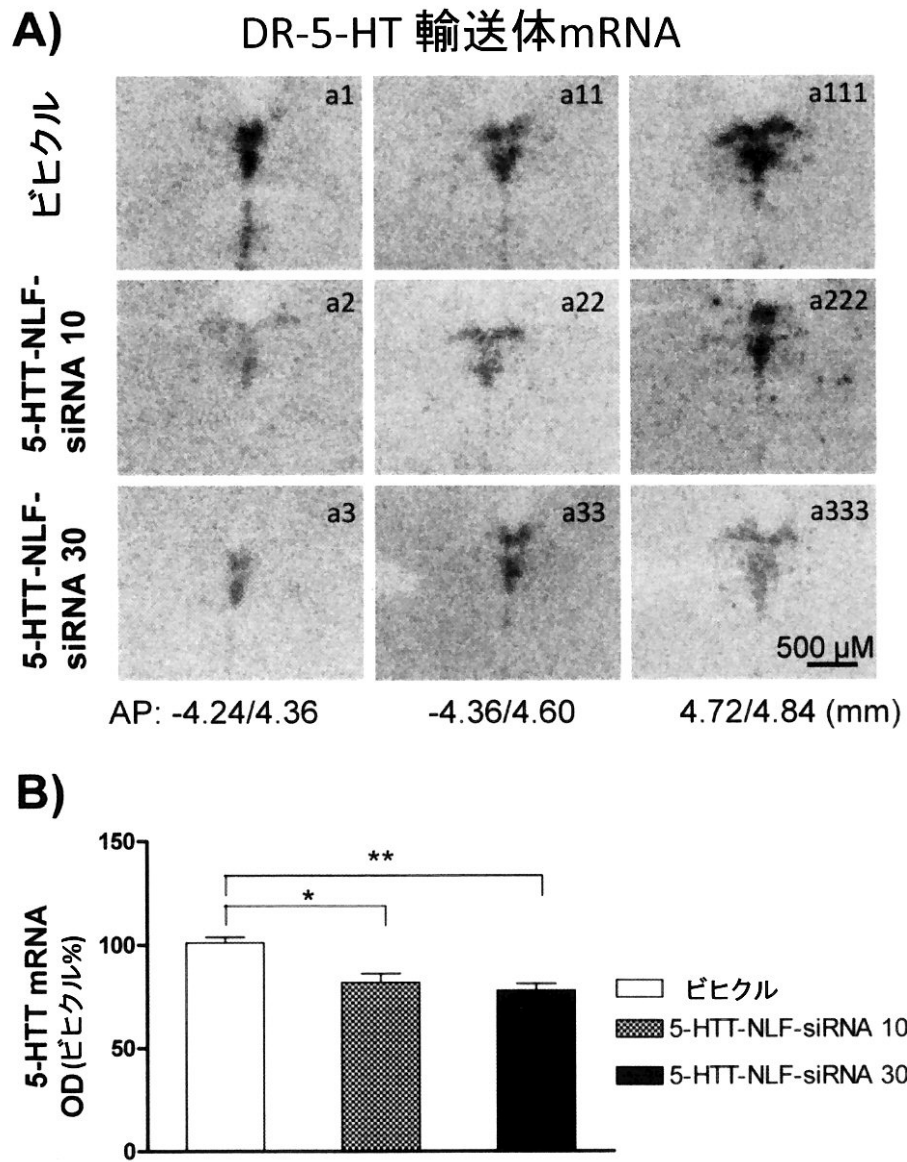
【図 8】



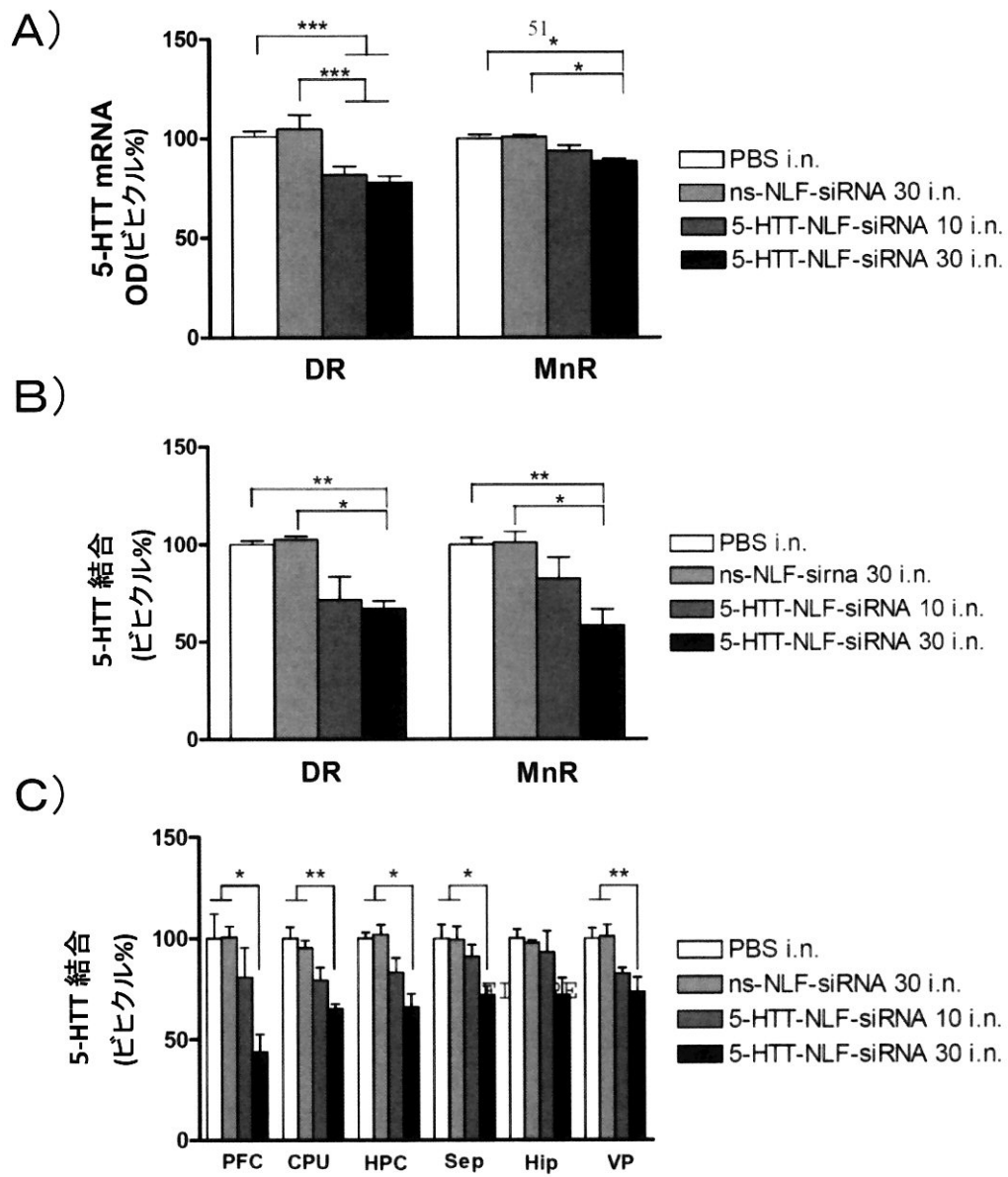
【図 13 - 1】



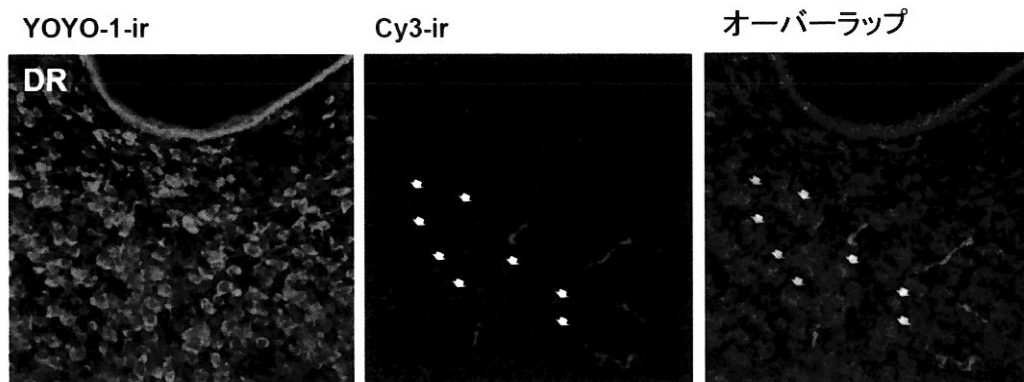
【図 14】



【図 15】



【図 19】



【配列表】

0005819401000001.app

フロントページの続き

(51) Int. Cl.			F I		
A 6 1 K	31/343	(2006.01)	A 6 1 K	31/343	
A 6 1 K	31/135	(2006.01)	A 6 1 K	31/135	
A 6 1 P	25/24	(2006.01)	A 6 1 P	25/24	
A 6 1 P	25/16	(2006.01)	A 6 1 P	25/16	
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	25/14	(2006.01)	A 6 1 P	25/14	
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 K	49/00	(2006.01)	A 6 1 K	49/00	C
C 0 7 D	207/40	(2006.01)	C 0 7 D	207/40	
C 0 7 D	217/04	(2006.01)	C 0 7 D	217/04	
A 6 1 K	31/7088	(2006.01)	A 6 1 K	31/7088	
C 0 7 C	271/22	(2006.01)	C 0 7 C	271/22	
C 0 7 C	237/04	(2006.01)	C 0 7 C	237/04	D
C 1 2 N	15/113	(2010.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A G
C 1 2 N	15/115	(2010.01)	C 1 2 N	15/00	H

(31)優先権主張番号 10382087.4

(32)優先日 平成22年4月19日(2010.4.19)

(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)

(74)代理人 100111730

弁理士 伊藤 武泰

(74)代理人 100173185

弁理士 森田 裕

(72)発明者 アンドレス、パブロ、モンテフェルトロ

スペイン国バルセロナ、ムヤネス、24 アティコ、クアルタ

(72)発明者 ガブリエル、アルバラド、ウルピナ

カナダ国オンタリオ州、ネビーアン、バターマン、ドライブ、8

(72)発明者 アナリア、ボルトロッシ、ピアッソーニ

スペイン国バルセロナ、ルセリョ、161 セスタ、プランタ、インスティトゥット、ディンベステ
ィガシオンズ、ピオメディケス、アウグスト、ピ、イ、スーニア、(イディベアペエセ)

(72)発明者 フランセスク、アルティガス、ペレス

スペイン国バルセロナ、ルセリョ、161 セスタ、プランタ、インスティトゥット、インベステ
ィガシオンズ、ピオメディケス、デ、バルセロナ、(セエセイセ)

(72)発明者 ミケル、ピラ、ボベル

スペイン国バルセロナ、バル、デブロン、119-129、ラボラトリ、106 ペヘ、プリメラ
、プランタ、エディフィシ、レセルカ、バル、デブロン、インスティトゥット、デ、レセルカ、オス
ピタル、ユニベルシタリ

審査官 澤田 浩平

(56)参考文献 国際公開第2008/033285(WO, A1)

国際公開第2009/141625(WO, A1)

国際公開第2009/079790(WO, A1)

Nature, 2007年, 448(7149), p.39-45

TRANSVASCULAR DELIVERY OF SIRTAS INTO THE RAT BRAIN IN AN ANIMAL MODEL OF TEMPORAL LOB
E EPILEPSY., EPILEPSIA, 2009年, Vol.50, p.4, 012

BRAIN RESEARCH, , 2010年, 1338, p.112-121

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K9/00 - 9/72,
A61K31/00 - 31/80,
A61K47/00 - 49/00,
A61P1/00 - 43/00,
C07C237/04,
C07C271/22,
C07D207/40,
C07D217/04,
C12N15/00 - 15/90

C A p l u s (STN),
R E G I S T R Y (STN),
M E D L I N E (STN),
E M B A S E (STN),
B I O S I S (STN)
P u b M e d