

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-67889

(P2006-67889A)

(43) 公開日 平成18年3月16日(2006.3.16)

(51) Int.Cl.

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

F I

C 1 2 N 15/00 Z N A A

テーマコード (参考)

4 B O 2 4

審査請求 未請求 請求項の数 14 O L (全 14 頁)

(21) 出願番号 特願2004-254824 (P2004-254824)

(22) 出願日 平成16年9月1日(2004.9.1)

(71) 出願人 503360115

独立行政法人科学技術振興機構
埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(74) 代理人 100060782

弁理士 小田島 平吉

(74) 代理人 100094293

弁理士 藤井 幸喜

(72) 発明者 長崎 幸夫

茨城県守谷市けやき台3-5-17

(72) 発明者 片岡 一則

東京都中野区上鷺宮5-17-22

(72) 発明者 大石 基

千葉県流山市西深井848-1 グランデ
ュール昼間A-201

Fターム(参考) 4B024 AA20 CA01 CA11 CA20 HA11

(54) 【発明の名称】 PEOと二本鎖核酸のコンジュゲート

(57) 【要約】

【課題】 効果的な遺伝子の標的細胞へのデリバリー手段の提供

【解決手段】

ポリ(エチレンオキシド)修飾オリゴもしくはポリヌクレオチドを含む二本鎖核酸とポリカチオン化合物を含んでなるポリイオンコンプレックス。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(A) 相補性を有する 2 種のオリゴ - もしくはポリヌクレオチドからなる二本鎖核酸であって、少なくとも 1 種のオリゴ - もしくはポリヌクレオチドの末端にポリ(エチレンオキシド)鎖を有するセグメントが共有結合している二本鎖核酸、および

(B) ポリアミンを含んでなるポリカチオン化合物

を含んでなるポリイオンコンプレックス。

【請求項 2】

ポリアミンを含んでなるポリカチオン化合物が、分子間で少なくとも 1 個のジスルフィド結合により架橋している請求項 1 記載のポリイオンコンプレックス。

10

【請求項 3】

二本鎖核酸におけるホスフェートに由来するアニオンとポリアミンを含んでなるポリカチオン化合物におけるアミン残基に由来するカオチンの比が $0.5/1 \sim 1/10$ である請求項 1 記載のポリイオンコンプレックス。

【請求項 4】

ポリイオンコンプレックスが水性媒体中でミセルの形態で存在する請求項 1 記載のポリイオンコンプレックス。

【請求項 5】

二本鎖核酸が、RNA/RNA、DNA/RNA および DNA/DNA からなる群より選ばれる対合物である請求項 1 記載のポリイオンコンプレックス。

20

【請求項 6】

二本鎖核酸が siRNA である請求項 5 記載のポリイオンコンプレックス。

【請求項 7】

オリゴ - もしくはポリヌクレオチドの末端にポリ(エチレンオキシド)鎖を有するセグメントが共有結合した化合物が、一般式(1)：



(式中、NT はリボースの 3' もしくは 5' 末端においてリン酸エステル結合を介して $L_1 - L_2 - PEO$ に結合したオリゴ - もしくはポリヌクレオチド残基を表し、

L_1 は NH、酸素原子もしくは硫黄原子により 1 もしくは 2 以上の箇所中断されていてもよい総原子数 3 ~ 30 のアルキレン基を表し、

30

L_2 は生理学的条件下で開裂しうる結合を有する連結基を表し、

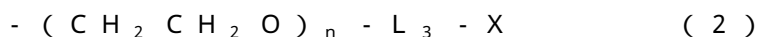
PEO は L_2 の未結合末端に連結基を場合により介して、水素原子、アルキル基、アラ

ルキル基、官能基もしくはリガンド残基を担持するポリ(エチレンオキシド)基を表す。

)
で表される請求項 1 記載のポリイオンコンプレックス。

【請求項 8】

- PEO が式(2)



(式中、 L_3 は単結合、カルボニルもしくは L_1 について定義したのと同義の連結基を表し、

40

X は水素原子、 $C_1 - C_6$ アルキル、ヒドロキシ - $C_1 - C_6$ アルキル、カルボキシ - $C_1 - C_6$ アルキル、アセタールもしくはケタール化ホルミル - $C_1 - C_6$ アルキル、アミノ - $C_1 - C_6$ アルキル、マレイミド - $C_1 - C_6$ アルキル、カルボニルイミノフェニル、アリルおよびこれらの官能基を介してリガンドが結合した部分からなる群より選ばれ、そして

n が 5 ~ 500 の整数である)

で表される請求項 7 記載のポリイオンコンプレックス。

【請求項 9】

オリゴ - もしくはポリヌクレオチド残基が 10 ~ 50 のヌクレオチドからなる RNA または DNA に由来する請求項 7 記載のポリイオンコンプレックス。

50

【請求項 10】

ポリアミンを含んでなるポリカチオン化合物が、1または複数のSH基が側鎖に導入されたポリリジン、ポリリジン、ポリエチレンジイミン、ポリメタクリル酸ジメチルアミノエチル、オリゴアルギニン、t a tおよびK A L Aからなる群より選ばれる請求項1記載のポリイオンコンプレックス。

【請求項 11】

一般式(1)



(式中、NTはリボースの3'もしくは5'末端においてリン酸エステル結合を介して $L_1 - L_2 - P E O$ に結合したオリゴ-もしくはポリヌクレオチド残基を表し、

L_1 は酸素原子もしくは硫黄原子により1もしくは2以上の箇所中断されていてもよい総原子数3~30のアルキレン基を表し、

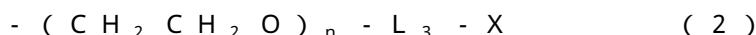
L_2 は生理学的条件下で開裂しうる結合を有する連結基を表し、

PEOは L_2 の未結合末端に連結基を場合により介して、水素原子、アルキル基、アラキル基、官能基もしくはリガンド残基を担持するポリ(エチレンオキシド)基を表す。)

で表される化合物のNT部に相補性のオリゴ-もしくはポリヌクレオチドがハイブリダイズして二本鎖核酸部を形成している核酸コンジュゲート。

【請求項 12】

-PEOが式(2)



(式中、 L_3 は単結合、カルボニルもしくは L_1 について定義したのと同義の連結基を表し、

Xは水素原子、 $C_1 - C_6$ アルキル、ヒドロキシ- $C_1 - C_6$ アルキル、カルボキシ- $C_1 - C_6$ アルキル、アセタールもしくはケタール化ホルミル- $C_1 - C_6$ アルキル、アミノ- $C_1 - C_6$ アルキル、マレイミド- $C_1 - C_6$ アルキル、およびカルボニルイミノフェニル基ならびにこれらの基における官能基を介してリガンドが結合した部分からなる群より選ばれ、

nが5~500の整数である)

で表される請求項11記載の核酸コンジュゲート。

【請求項 13】

NTが15~30のリボヌクレオチドもしくはデオキシリボヌクレオチドからなる核酸からなる群より選ばれ、該NT部に相補性のオリゴヌクレオチドが15~30のリボヌクレオチドであり、そして L_2 が $-O(CH_2)_a - OCO(CH_2)_b S(CH_2)_c -$ または $-O(CH_2)_a - S - S(CH_2)_c -$ の連結基であって、a、bおよびcは、相互に独立して2~8の整数である請求項11記載の核酸コンジュゲート。

【請求項 14】

NTとそれに相補性のオリゴヌクレオチドからなる二本鎖核酸部分がsiRNAに相当する請求項11記載の核酸コンジュゲート。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ポリ(エチレンオキシド)で修飾された二本鎖核酸のコンジュゲートおよび該コンジュゲートとポリアミンを含んでなるポリカチオン化合物のポリイオンコンプレックス(PICともいう)に関する。かかるコンジュゲートおよびPICは生化学、化学療法、特に、多種多様な動物細胞において標的とする遺伝子の発現を抑制する方法において有利に使用される。

10

20

30

40

50

【背景技術】

【0002】

遺伝子特異的治療法に使用される遺伝子や標的mRNAに使用できるオリゴデオキシリボヌクレオチドは、治療剤として注目を集めてきた。しかし、該遺伝子やオリゴデオキシリボヌクレオチド(ODN)は、それらを標的部位にデリバリーする際の、例えばODNと血漿タンパク質との非特異的相互作用、ODNの優先的な肝および腎への取り込みに伴う標的細胞への取り込みの効率の低さ、遺伝子およびODNのヌクレアーゼによる分解に対する安定性の低さ、等の各種障害のために、治療において、必ずしも期待した効果をもたらさなかった。

【0003】

このような障害を成功裏に除去できる手段として、アンチセンスDNAとチオラート化(thiolated)ポリ(エチレングリコール)-block-ポリ(L-リシン)から形成されたブロックコポリマーミセルまたはポリイオンコンプレックス(PIC)ミセルが提案された(例えば、特許文献1、非特許文献1または非特許文献2、参照。)。また、酸分解性-プロピオネート結合を介して形成されODN-ポリ(エチレングリコール)コンジュゲート、該コンジュゲートと線状ポリ(エチレンイミン)のPICミセルも、上記の障害を除去できる有力な候補である(例えば、非特許文献3、参照。)。上記のブロックコポリマーを用いるPICミセルは、主としてプラスミドDNAまたはアンチセンスDNA(一本鎖)の安定化またはデリバリー用のキャリアーとして、また、非特許文献3では、主としてアンチセンスDNAの安定化がはかられている。

【0004】

他方、細胞のインターフェロン誘導を起こさないとされるSmall interference RNA(siRNA)と称される二本鎖のRNA分子は、培養細胞において効率的にRNAi(配列特異的RNA干渉または配列特異的遺伝子発現阻害)を引き起こし、RNAi活性がアンチセンスDNAより有意に高いことから治療薬の候補物質として注目されている(例えば、非特許文献4および非特許文献5、参照。)。また、siRNAのセンス鎖をDNAに置き換えた二本鎖DNA/RNAにおいてもRNAiが引き起こされることも報告されている(例えば、非特許文献6、参照。)。しかし、これらの二本鎖核酸もアンチセンスDNAと同様に血中での分解や腎への吸収、排泄が起こることが報告されている(例えば、非特許文献7、参照。)。

【特許文献1】特開2001-146556号公報

【非特許文献1】Biomacromolecules 2001, 2, 491~497

【非特許文献2】J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 2355-2361

【非特許文献3】Biomacromolecules 2003, 4, 1426-1432

【非特許文献4】Nature 2001, 411, 494-498

【非特許文献5】Biochemical and Biophysical Research Communications 2002, 296(2002), 1000-1004

【非特許文献6】FEBS Letters 2002, 521, 195-199

【非特許文献7】Bioorganic and Medicinal Chemistry Letter 2004, 14, 1139-1143

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明の目的は、特に上記二本鎖核酸の生物学的環境下での不安定性を改善し、さらに動物細胞への効率的な取り組みを可能にする手段を提供することにある。二本鎖核酸のいずれか一方のオリゴ-もしくはポリヌクレオチドの末端にポリ(エチレンオキシド)鎖を有するセグメントを共有結合するように修飾し、こうして修飾した二本鎖核酸のコンジュ

10

20

30

40

50

ゲートとポリカオチン化合物を水性媒体中で混合すると、自動的に会合してポリイオンコンプレックス（PIC）ミセルを形成し、こうして得られたPICによって二本鎖核酸が生物学的環境下で安定化され、しかも動物細胞への取り込みも効率が高まることが見出された。

【0006】

したがって本発明によれば、

（A） 相補性を有する2種のオリゴ - もしくはポリヌクレオチドからなる二本鎖核酸であって、少なくとも1種のオリゴ - もしくはポリヌクレオチドの末端にポリ（エチレンオキシド）鎖を有するセグメントが共有結合している二本鎖核酸（以下、成分Aともいう。）

）、

（B） ポリアミンを含んでなるポリカオチン化合物（以下、成分Bともいう。）を含んでなるポリイオンコンプレックスが提供される。

【0007】

さらに、本発明のポリイオンコンプレックス（PIC）は、水性媒体中でミセルの形態で存在しうが、該PICを形成するポリカオチン化合物として少なくとも1個以上のメルカプト基（-SH）を側鎖に有する化合物を使用して形成したPICでは、これらの化合物間で少なくとも1個のジスルフィド結合（-SS-）で架橋したPICミセルを提供できる。かようなPICミセルは構造上の安定性が向上した態様のものとして提供される。

【0008】

本発明のPICは水性媒体（例えば、生理食塩液、リン酸緩衝化生理食塩水（PBS）中でミセルを形成しうるものであれば、成分Aと成分Bの含有率は限定されるものでないが、成分Aの二本鎖核酸におけるホスフェートに由来するアニオンと成分Bのポリカオチン化合物におけるアミン残基に由来するカオチンの比が0.5/1～1/10であるPICが好ましい態様のものとして提供される。PICミセル全体が少しポジティブに荷電していると、該ミセルの動物細胞への取り込みの効率が高まることがよくある。

【0009】

二本鎖核酸は、それぞれ、相補性を有する2種のオリゴ - もしくはポリリボヌクレオチドとオリゴ - もしくはポリリボヌクレオチドとの対合物（RNA/RNA）、オリゴ - もしくはポリデオキシリボヌクレオチドとオリゴ - もしくはポリリボヌクレオチドとの対合物（DNA/RNA）、ならびにオリゴ - もしくはポリデオキシリボヌクレオチドとオリゴ - もしくはポリデオキシリボヌクレオチドとの対合物（DNA/DNA）から選ばれる。

【0010】

本発明に関して使用する核酸、ヌクレオチド、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、RNAおよびDNAの語は、当該技術分野で通常用いられている意味を有する。本明細書では、オリゴ - もしくはポリリボヌクレオチドの語はRNAと互換可能に使用されており、そしてオリゴ - もしくはポリデオキシリボヌクレオチドの語はDNAと互換可能に使用されている。

【0011】

成分Aのオリゴ - もしくはポリヌクレオチド末端にポリ（エチレンオキシド）鎖を有するセグメントが共有結合した化合物は、より具体的には下記の一般式（1）で表すことができる。

【0012】



式中、NTはリボースの3'もしくは5'末端においてリン酸エステル結合を介して $L_1 - L_2 - PEO$ に結合したオリゴ - もしくはポリヌクレオチド残基を表し、

L_1 は酸素原子もしくは硫黄原子により1もしくは2以上の箇所中断されていてもよい総原子数3～30のアルキレン基を表し、

10

20

30

40

50

L_2 は生理学的条件下で開裂しうる結合を有する連結基を表し、

PEOは L_2 の未結合末端に連結基を場合により介して、水素原子、アルキル基、アラルキル基、官能基もしくはリガンド残基を担持するポリ(エチレンオキシド)基を表す。

【0013】

より具体的な態様の成分Aとしては、上記の一般式(1)における-PEOが式(2)：



で表され、ここで、 L_3 は単結合、カルボニルもしくは L_1 について定義したのと同様の連結基を表し、

Xは C_1-C_6 アルキル、ヒドロキシ- C_1-C_6 アルキル、カルボキシ- C_1-C_6 アルキル、アセタールもしくはケタール化ホルミル- C_1-C_6 アルキル、アミノ- C_1-C_6 アルキル、マレイミド- C_1-C_6 アルキル、カルボニルイミノフェニル、アリルおよびこれらの官能基を介してリガントが結合した部分からなる群より選ばれ、そしてnが5～500の整数である、化合物を挙げることができる。

【0014】

他方、成分Bのポリアミンを含んでなるポリカチオン化合物は、限定されるものでないが、1または複数のSH基が導入されたポリリジン、ポリリジン、ポリエチレンジイミン、ポリメタクリル酸ジメチルアミノエチル、オリゴアルギニン、tatおよびKALAからなる群より選ばれる。これらのポリアミンを含んでなるポリカチオン化合物の分子量は、成分Aと一体となって、PICミセルを形成するものであれば、制限されることなく使用できる。しかしながら、ポリリジンを例にとれば、一般的に、500～100000、好ましくは1000～50000、より好ましくは、5000～25000であることができる。他のポリアミンを含んでなるポリカチオンについて好ましい分子量は、上記のポリリジンの例を参考に、必要により、小実験を行うことにより決定できる。1または複数のSH基が側鎖に導入されたポリリジンでは、リジン単位10、好ましくは5個当たりSH基が1個となるように選定されたものを挙げることができる。

【0015】

また、別の態様の本発明としては、

一般式(1)：



(式中、NTはリボースの3'もしくは5'末端においてリン酸エステル結合を介して L_1-L_2-PEO に結合したオリゴ-もしくはポリヌクレオチド残基を表し、

L_1 は酸素原子もしくは硫黄原子により1もしくは2以上の箇所中断されていてもよい総原子数3～30のアルキレン基を表し、

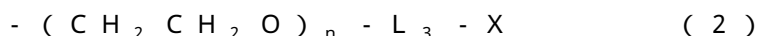
L_2 は生理学的条件下で開裂しうる結合を有する連結基を表し、

PEOは L_2 の未結合末端に連結基を場合により介して、水素原子、アルキル基、アラルキル基、官能基もしくはリガンド残基を担持するポリ(エチレンオキシド)基を表す。)

で表される化合物のNT部に相補性のオリゴ-もしくはポリヌクレオチドがハイブリダイズして二本鎖核酸部を形成している核酸コンジュゲートも提供される。

【0016】

好ましい態様のコンジュゲートは、上記式中の-PEOが、上述したPICについて説明した式(2)



で表されるものを挙げることができる。

<発明のさらなる説明>

オリゴ-もしくはポリヌクレオチドにおける「オリゴマー(もしくはオリゴ)もしくはポリ」の語は、PICを形成し、そして水性媒体中でPICミセルを形成する鎖長を有するものをすべて包含する目的で使用している。したがって、限定されるものでないが、具体的には、ヌクレオチド単位が、10～5000、好ましくは、18～50、特に好まし

10

20

30

40

50

くは、*siRNA* のヌクレオチド単位に近似するように 21 ~ 22 であり、これらの 2 種の鎖が形成する二本鎖においては、3' 末端及び 5' 末端に 1 ~ 2 個のヌクレオチドがオーバーハングされているような形態にあることが好ましい。

【0017】

本発明にいう「相補性を有する」とは、二本鎖の全体にわたって、厳密に全てが相補性であること、具体的には、塩基対で表すと、アデニン (A) とウラシル (U) もしくはグアニン (G) とシトシン (C) またはアデニン (A) とチミン (T) およびグアニン (G) とシトシン (C) のいずれかの対合を形成していることまで必要とするものでなく、高ストリンジント条件下で二本鎖核酸がハイブリダイズするものも包含する概念で使

10

【0018】

このようなオリゴ - もしくはポリヌクレオチドの末端に共有結合するポリ (エチレンオキシド) 鎖を有するセグメントは、上記の一般式 (1) における $-L_1-L_2-PEO$ で表される部分が具体的なものである。ここで、 L_1 、 L_2 および PEO は、既に、一般式 (1) について定義したとおりであり、また、 $-PEO$ の好ましい態様は、式 (2) で表されるものである。これらの定義における「酸素原子もしくは硫黄原子により 1 もしくは 2 以上の箇所

で中断されていてもよい総原子数 3 ~ 30 のアルキレン基」には、例えば、 $-CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2-(O-CH_2CH_2)_2-$ 、 $-CH_2CH_2-S-CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2-S-(CH_2)_6-$ 、等が挙げられる。また、「生理的条件下で開裂しうる結合を有する連結基」における該結合は、例えば、エンドソームにおける低 pH (6.0 ~ 5.0) において開裂しうるいずれかのエステル結合または還元条件下もしくは還元性物質の存在下で開裂しうるジスルフィド結合を挙げることができる。このような結合を有する連結基は、連結基中のどの位置に該結合を有していてもよいが、例えば、 $-OCH_2CH_2OCO-CH_2-$ 、 $-OCH_2CH_2SSCH_2-$ 、 $-OCH_2CH_2CH_2OCO-CH_2-$ 、 $-SCH_2CH_2COO-CH_2-$ 、 $-OCH_2CH_2NHCH_2COO-CH_2-$ 等を挙げることができる。

20

【0019】

$-PEO$ が式 (2) : $-(CH_2CH_2O)_n-L_3-X$ で表す場合の定義における C_1-C_6 アルキル、ヒドロキシ- C_1-C_6 アルキル等というアルキルまたはアルキル部分は、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、*n*-ヘキシル等および、これらに由来する部分を意味する。 L_3 は上記の L_1 について定義する連結基を包含し、それら以外としては、 $-O-Ph-NHCO-$ (Ph はフェニルを表す。)、 $-OCH_2CH_2NHCO-$ 、 $-NHCOCH_2CH_2-$ 等であることもできる。 X にいう、「アセタールもしくはケタール化ホルミル」は、ホルミルもしくはアルデヒドの保護された形態をも意味し、また、「カルボキシ」、「アミノ」は、ペプチド合成等で慣用されるような保護基で保護されていてもよい。また、これら官能基を介して (アミド、エステル、エーテル結合を形成して) 結合したりガンドとしては、ある一定の細胞表面に結合しうる糖もしくはペプチドであることができ、さらには抗体、抗原、ハプテン、ホルモン等であることもできる。

30

【0020】

以上によって特定される PIC もしくは PIC ミセルは、水性媒体中で成分 A と成分 B を単に混合するだけで形成できる。また、成分 A ともなり得る本発明のコンジュゲートは、例えば、本発明者の一部が著者に含まれる非特許文献 3 記載の方法でポリ (エチレンオキシド) 鎖含有セグメントで修飾した一本鎖核酸を調製した後、該核酸部に対する相補性鎖をハイブリダイズすることにより調製できる。

40

【0021】

他方、成分 B のポリカチオンのうちポリアミンの側鎖に SH 基を導入するには、やはり、本発明者の一部が著者に含まれる非特許文献 1 および 2 に記載する方法に準じてポリアミンを処理することにより実施できる。

【0022】

50

二本鎖核酸を形成するオリゴ - もしくはポリヌクレオチドは、動物、殊に哺乳動物のいずれかの遺伝子のセンス鎖およびアンチセンス鎖のいずれかあることができる。かかる遺伝子としては、既に各種疾患の治療目的で提供されてきたアンチセンスDNAが対象としてきた遺伝子であることができる。かかる遺伝子としては、限定されるものでないが、非小細胞肺癌などに関係のあるPKC、悪性黒色腫などに関係のあるBCL-2、クローン病に関係のあるICAM-1、C型肝炎に関係のあるHCV、関節リウマチ、乾癬に関係のあるTNF、喘息に関係のあるアデノシンA1受容体、卵巣癌などに関係のあるc-raf kinase、膵臓癌などに関係のあるH-ras、冠動脈疾患癌に関係のあるc-myc、大腸癌に関係のあるPKAR1、エイズに関係のあるHIV、固形癌に関係のあるDNAメチル - トランスフェラーゼ、癌に関係のあるVEGF受容体、腎臓癌に関係のあるリボヌクレオチド還元酵素、CMV性網膜炎に関係のあるCMV IE2、前立腺癌に関係のあるMMP-9、悪性グリオーマに関係のあるTGF-2、多発性硬化症に関係のあるCD49d、糖尿病に関係のあるPTP-1B、癌に関係のあるc-myb、乳癌などに関係のあるEGFR、癌に関係のあるmdr1、autotaxinおよびGLUT-1の遺伝子を挙げることができる。

10

【0023】

例えば、本発明のPICにおける二本鎖核酸の一方が、上記遺伝子のセンス鎖もしくはアンチセンス鎖の一部である場合には、本発明のPICを用いてかかる遺伝子の発現を効果的に抑制することができる。したがって本発明は、上記の遺伝子の発現に随伴する疾患の治療に有用である。

20

【0024】

以下、具体的を挙げて、本発明をさらに説明する。

【実施例1】

【0025】

アリル - PEO - OHの製造

アルゴン下、ナスフラスコ中、室温において、開始剤アリルアルコール1.0mmol(0.07ml)を溶媒テトラヒドロフラン(THF)25mlにマイクロシリンジで加え、K-ナフタレン1.0mmol(0.325mol/l-THF溶液、3.1ml)を加えて10分間メタル化を施した。次いで、エチレンオキシド(EO)110mmol(5.5ml)を加えて水冷下で2日間攪拌し、アニオン開環重合を行った。ジエチルエーテル沈澱(2l)、吸引濾過、ベンゼン凍結乾燥により精製を行った。この生成物の収量は4.4g(98%)であった。

30

【実施例2】

【0026】

カルボン酸 - PEO - OHの製造

アリル - PEO - OH 1.0mmol(4.3g, $M_n = 4340$)、3-メルカプトプロパン酸15mmol(1.6g、15倍モル量)およびアゾビスイソブチロニトリル(AIBN)0.75mol(0.12g、0.75倍モル量)をTHF30ml中に溶解させ、凍結脱気を3回行った。次に、アルゴン下70において2日間反応を行った。その後、2-プロパノール沈澱(2l)、遠心分離(5000×g、45分間)、純水に対する透析(区画分子量3500, 1, 2, 4, 6, 8, 12時間後に水を交換)、水凍結乾燥により精製を行った。この生成物の収量は3.6g(82%)であった。

40

【実施例3】

【0027】

カルボン酸 - PEO - アクリレートの製造

アルゴン下、ナスフラスコ中、室温において、アクリロイルクロライド4.5mmol(0.36ml, 10倍モル量)をTHF5mlに溶解させた。次に、その溶液にカルボン酸 - PEO - OH 0.45mmol(2.0g, $M_n = 4380$)およびトリエチルアミン9.0mmol(1.3ml, 20倍モル量)をTHF15mlに溶かした溶液を0にて1時間かけて滴下した。その後、遮光下0にて1日反応を行った後、2-プロ

50

パノール沈殿 (1 1)、遠心分離 (5 0 0 0 × g、4 5 分間)、純水に対する透析 (区画分子量 3 5 0 0、1、2、4、6、8、1 2 時間後に水を交換)、水凍結乾燥により精製を行った。この生成物の収量は 1 . 6 g (7 2 %) であった。

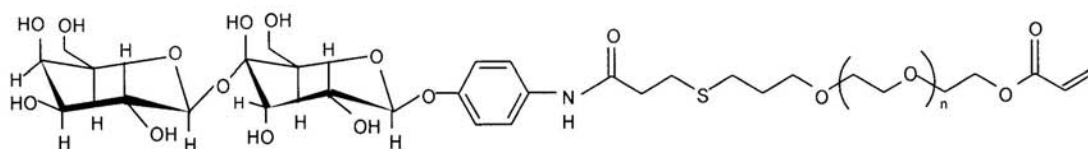
【実施例 4】

【 0 0 2 8 】

ラクトース - P E O - アクリレートの製造

【 0 0 2 9 】

【化 1】



10

【 0 0 3 0 】

ナスフラスコ中、室温において、カルボン酸 - P E O - アクリレート 2 2 μ m o l (0 . 1 g , M_n = 4 4 5 0)、4 - アミノフェニル - D - ラクトピラノサイド 1 1 1 μ m o l (4 8 m g , 5 倍モル量)、1 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - 3 - エチルカルボジイミド塩酸塩 (E D C) 2 . 8 m m o l (0 . 5 3 g , 1 2 5 倍モル量)および N - ヒドロキシスクシンイミド (N H S) 0 . 5 5 m m o l (6 4 m g , 2 5 倍モル量)を溶媒 2 5 m M 4 - モルフォリノエタン硫酸緩衝溶液 5 m l (p H 6 . 6) に溶解させ、室温において 1 日反応を行った。その後、2 - プロパノール沈澱 (2 0 0 m l)、遠心分離 (5 0 0 0 × g、4 5 分間)、純水に対する透析 (区画分子量 3 5 0 0、1、2、4、6、8、1 2 時間後に水を交換)、水凍結乾燥により精製を行った。この生成物の収量は 6 9 m g (6 7 %) であった。

20

【 0 0 3 1 】

ゲルパーミエーションクロマトグラフィーの測定により、得られたポリマーは単峰性であり、その数平均分子量は 4 6 3 0 であり、理論分子量 5 4 9 0 とほぼ一致していた。

【 0 0 3 2 】

さらに、得られたポリマーの重水 (D₂O) 中での ¹H - N M R (プロトン核磁気共鳴) スペクトルより、このポリマーの平均分子量は 5 5 3 0 と計算された。またこのポリマーはエチレンオキシド骨格を主鎖に有し、 - 末端にラクトース基、 - 末端にアクリレート基を有するヘテロテレケリックポリエチレンオキシドであることが確認された (図 2 参照)。

30

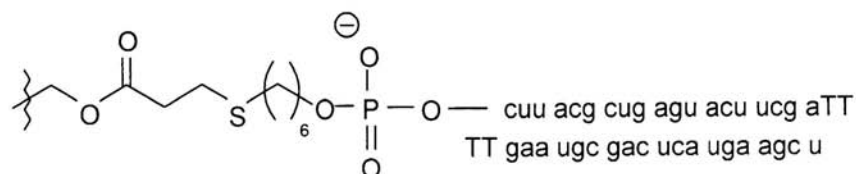
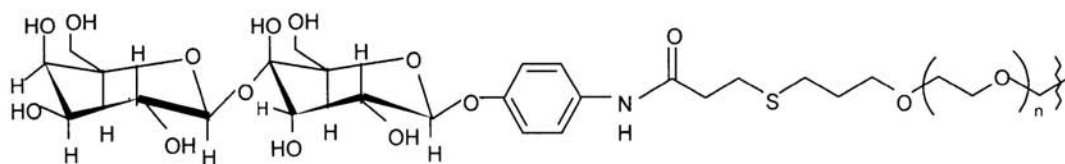
【実施例 5】

【 0 0 3 3 】

ラクトース - P E O - s i R N A コンジュゲートの製造

【 0 0 3 4 】

【化 2】



10

【0035】

5'末端SH修飾センス鎖RNA 30 nmol (193 μ g, グライナー・ジャパンより購入)とラクトース-PEO-アクリレート 0.3 μ mol (1.6 mg, 10倍モル量)を試験管に加え、アルゴン置換を行った。次いで、10 nM トリス-塩酸緩衝溶液 (pH 8) 300 μ l および 1 mM のトリフェニルフォスフィン-N, N-ジメチルホルムアミド (DMF) 溶液 60 μ l (2倍モル量)をマイクロシリンジで加え、室温にて2日間マイケル付加反応を行った。また、陰イオン交換クロマトグラフィーにより、RNAの消費とRNA-PEOコンジュゲートの生成を確認した。その後、陰イオン交換カラムクロマトグラフィー (Mono Q HR 10/10) による分取、純水に対する透析 (区画分子量 3500、1, 2, 4, 6, 8, 12時間後に水を交換)を1日行うことで精製を行った。このUV測定による生成物の収量は89%であった。さらに、得られたRNA-PEOコンジュゲート 27 nmolとアンチセンス鎖RNA 27 nmol (グライナー・ジャパンより購入)を10 mM リン酸緩衝溶液 (pH 7.4, アニールング buffer) 270 μ lに溶解させ、95℃において3分間アニールングさせることで、ラクトース-PEO-siRNAコンジュゲートを定量的に得た。

20

30

【実施例 6】

【0036】

SH化ポリリジンの製造。

平均重合度 40 の L-ポリリン臭酸塩 5.1 μ mol (42 mg)、トラウト試薬 51 μ mol (7.0 mg, ポリリンのアミノ基に対して 0.25倍モル量)およびトリエチルアミン 4.5 mmol (0.65 ml)を純水 4 mlに溶解させ、室温にて2日間反応を行った。次に、純水に対する透析 (区画分子量 3500、1, 2, 4, 6, 8, 12時間後に水を交換)、水凍結乾燥により精製を行った。この生成物の収量は40 mg (82%)であった。

【0037】

40

さらに、得られたポリマーの重水 (D_2O) 中での 1H -NMR (プロトン核磁気共鳴) スペクトルより、このポリマーへのSH基 (トラウト試薬) の修飾数は、平均重合度 40 当りに9つのSH基が導入されていることが確認された。

【実施例 7】

【0038】

ラクトース-PEO-siRNAコンジュゲートとポリリジンからなるポリイオンコンプレックス (PIC) ミセルの製造。

【0039】

ラクトース-PEO-siRNAコンジュゲート 10 nmol およびポリリジン (平均重合度 = 40) 12 nmol を、それぞれ 10 mM トリス-塩酸緩衝溶液 (pH 7.4

50

に溶解させた後、 $0.1 \mu\text{m}$ のフィルターで濾過しゴミを取り除いた。次に、これらの溶液をポリリジンの正電荷とラクトース-PEO-siRNAコンジュゲートの負電荷の比が1 ($N/P = 1$)となるように混合した。さらに、 10 mM トリス-塩酸緩衝溶液 ($\text{pH } 7.4$, 0.3 M NaCl)を混合液と同量加え、 12 時間静置しPICミセルを形成させた。

【実施例8】

【0040】

ラクトース-PEO-siRNAコンジュゲートとSH化ポリリジンからなるS-S架橋ポリイオンコンプレックス(PIC)ミセルの製造。

【0041】

ラクトース-PEO-siRNAコンジュゲート 10 nmol およびSH化ポリリジン(平均重合度 $=40$) 12 nmol を、それぞれ 10 mM トリス-塩酸緩衝溶液 ($\text{pH } 7.4$)に溶解させた後、 $0.1 \mu\text{m}$ のフィルターで濾過しゴミを取り除いた。このSH化ポリリジン溶液に、 $0.1 \mu\text{M}$ のジチオスレイトール(DTT)の 10 mM トリス-塩酸緩衝溶液 ($\text{pH } 7.4$) $12.5 \mu\text{l}$ (SH基の3倍モル当量)を加え、室温にて30分間還元反応を行った。次に、ポリリジンの正電荷とラクトース-PEO-SiRNAコンジュゲートの負電荷の比が1 ($N/P = 1$)となるように混合し、 0.5% ジメチルスルフォキシド(DMSO)を含んでいる 10 mM トリス-塩酸緩衝溶液 ($\text{pH } 7.4$)に対して透析(区画分子量 3500)を2日間行った。さらに、 0.15 M NaCl を含んでいる 10 mM トリス-塩酸緩衝溶液 ($\text{pH } 7.4$)に対して透析(区画分子量 3500)1日間行うことにより、S-S架橋PICミセルを形成させた。

【0042】

ラクトース-PEO-RNAコンジュゲート、ラクトース-PEO-siRNAコンジュゲート、PICミセルおよびS-S架橋PICミセルの調製の確認は 12% アクリルアミド電気泳動により行った(図3参照)。その結果、ラクトース-PEO-RNAコンジュゲートおよびラクトース-PEO-siRNAコンジュゲートの電気泳動バンドは、対応する1本鎖RNAおよび2本鎖RNA(sRNA)のバンドよりも遅れていることから、コンジュゲートの調製が確認された(レーン1と3、レーン2と4の比較)。また、PICミセルおよびS-S架橋PICミセルの電気泳動バンドは、原点付近に確認されたことから、PICミセルおよびS-S架橋PICミセルの調製が確認された(レーン4と5、レーン4と6の比較)。

【実施例9】

【0043】

ラクトース-PEO-siRNAコンジュゲートおよびラクトース-PEO-DNA/RNAコンジュゲートPICミセルのRNAi効果。

【0044】

24 穴ポリスチレン製細胞培養プレート(ファルコン社製)に、人肝癌細胞(Huh7 cell)を 5×10^4 cell/well 播種し、 24 時間培養した後、市販の遺伝子導入試薬であるLipofect AMINE($1.22 \mu\text{L/well}$, インビトロジェン社製)を用い、ホタルルシフェラーゼプラスミドDNA(pGL3, $0.084 \mu\text{g/well}$, プロメガ社製)とウミシイタケルシフェラーゼプラスミドDNA(pRL-TK, $0.75 \mu\text{g/well}$, プロメガ社製)のレポーター遺伝子を細胞にトランスフェクションした。次に、ホタルルシフェラーゼ遺伝子に対する配列を有するPICミセル溶液(実施例7で調製した)、S-S架橋PICミセル溶液(実施例8で調製した)およびコンジュゲート単独の溶液を所定量加え(培地濃度換算 100 nM)、 24 時間細胞と接触させた。培地交換後、さらに 24 時間培養した後、細胞を回収し両レポーター遺伝子の発現量をDual Luciferase Reporter Assay System(プロメガ社製)により測定しアンチセンス効果を評価した($n=3$)。

【0045】

以上の結果を図4に示した。DNA/RNA単独、siRNA単独およびラクトース-

【 0 0 4 6 】

【図面の簡単な説明】

【 0 0 4 7 】

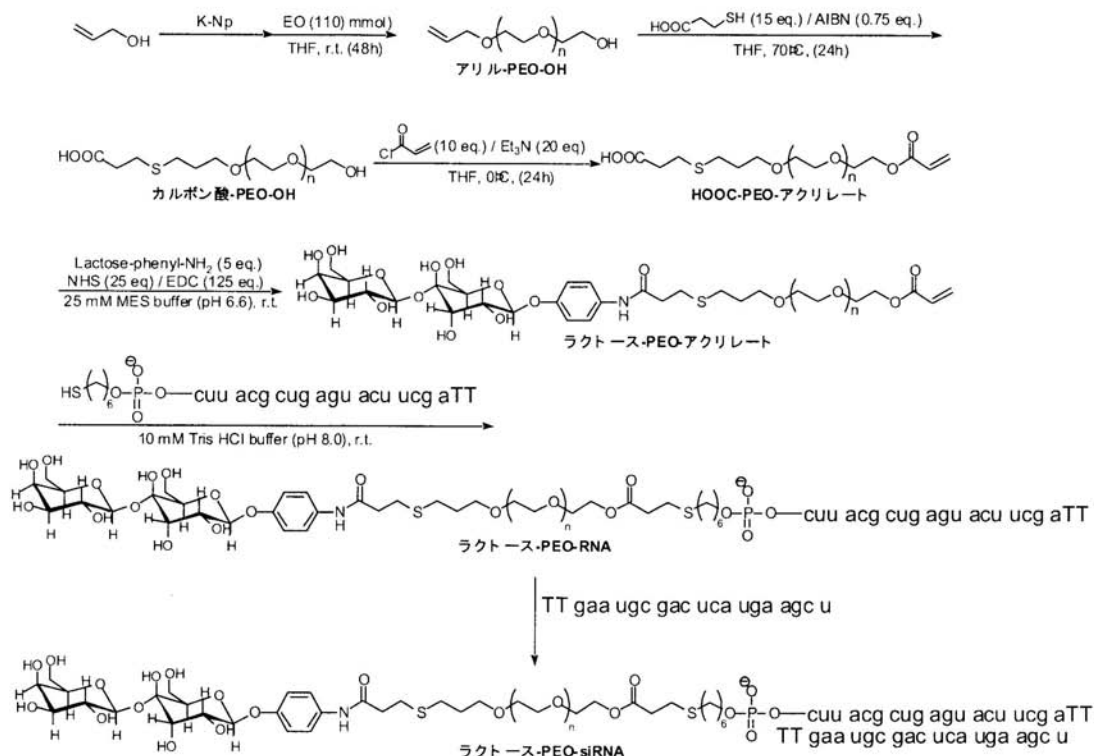
【図 1】図 1 はラクトース - P E G - s i R N A コンジュゲートの合成スキームである。

【図 2】図 2 はラクトース - P E G - アクリレートの H - N M R による測定結果である。

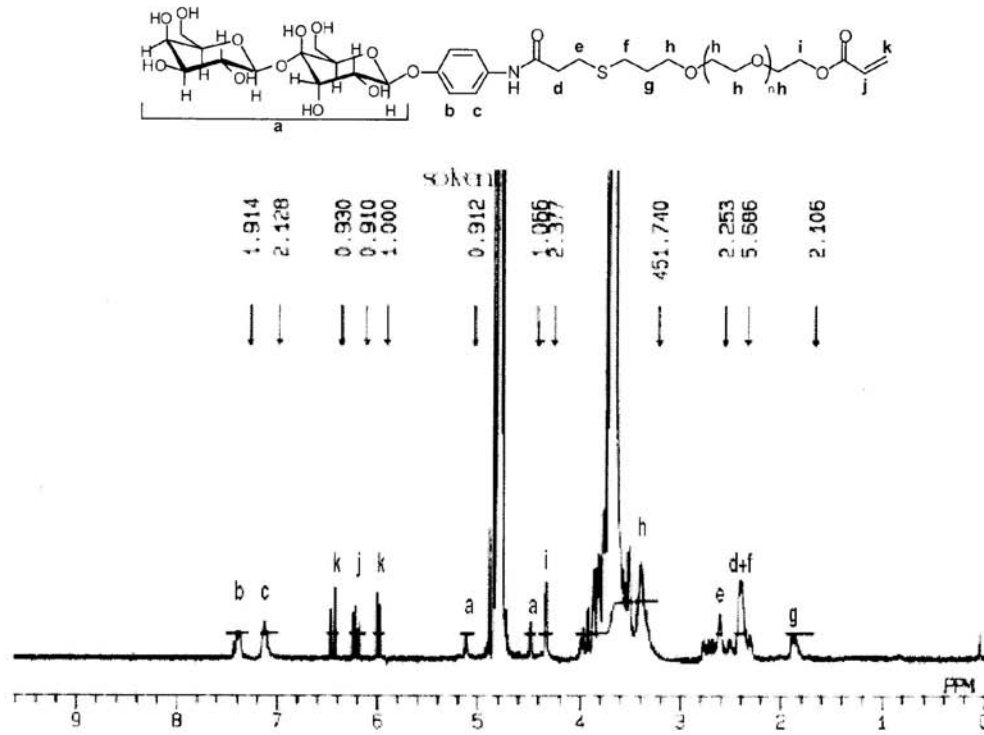
【図 3】図 3 はラクトース - P E G - R N A コンジュゲート、ラクトース - P E G - s i R N A コンジュゲート、P I C ミセルおよび S - S 架橋 P I C ミセルの 1 2 % アクリルアミドゲル電気泳動の結果を表す図に代わる写真である。

【図 4】図 4 は 1 0 0 n M におけるラクトース - P E G - D N A / R N A コンジュゲート、ラクトース - P E G - s i R N A コンジュゲート、P I C ミセルおよび S - S 架橋 P I C ミセルの R N A i 効果の結果である。

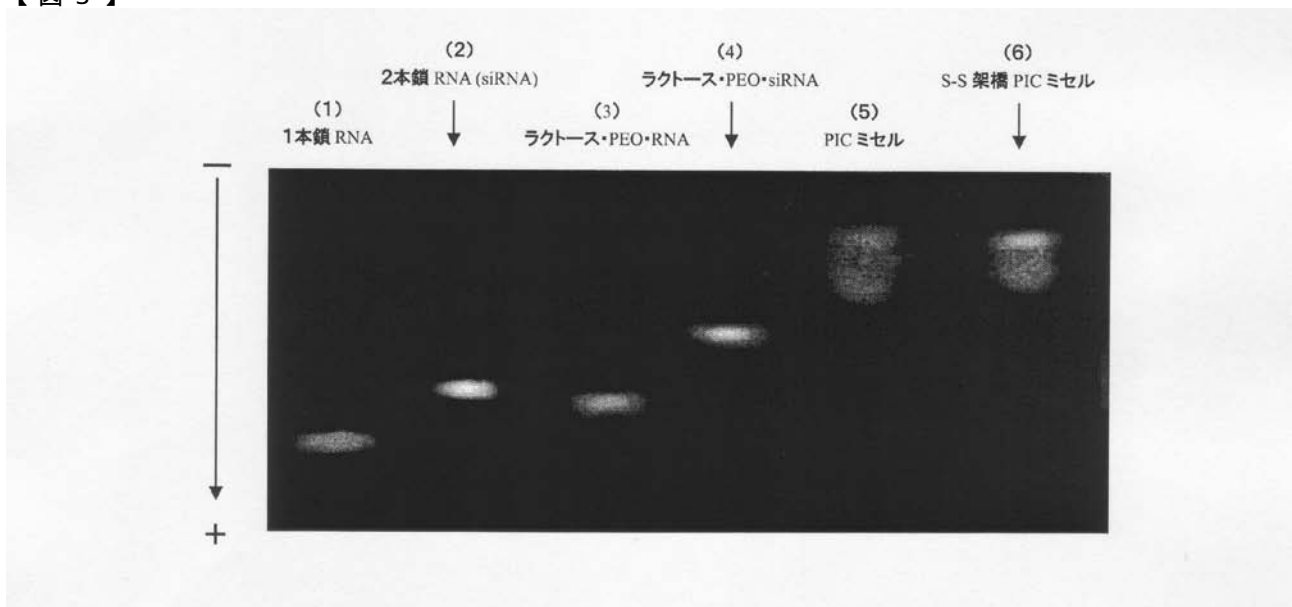
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】

