

(19)日本国特許庁(JP)

**(12)特許公報(B2)**

(11)特許番号  
**特許第7348064号**  
**(P7348064)**

(45)発行日 令和5年9月20日(2023.9.20)

(24)登録日 令和5年9月11日(2023.9.11)

(51)国際特許分類

A 6 1 K	47/54 (2017.01)	A 6 1 K	47/54
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/04
A 6 1 P	17/02 (2006.01)	A 6 1 P	17/02
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	37/02

請求項の数 2 (全37頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-536976(P2019-536976)  
 (86)(22)出願日 平成30年1月9日(2018.1.9)  
 (65)公表番号 特表2020-514299(P2020-514299)  
 A)  
 (43)公表日 令和2年5月21日(2020.5.21)  
 (86)国際出願番号 PCT/IL2018/050031  
 (87)国際公開番号 WO2018/127927  
 (87)国際公開日 平成30年7月12日(2018.7.12)  
 審査請求日 令和3年1月6日(2021.1.6)  
 (31)優先権主張番号 62/443,822  
 (32)優先日 平成29年1月9日(2017.1.9)  
 (33)優先権主張国・地域又は機関  
 米国(US)  
 前置審査

(73)特許権者 505467867  
 アポセンス リミテッド  
 A P O S E N S E L T D .  
 イスラエル国 4 9 1 7 0 ペタ - ティク  
 ヴァ , キルヤット・マタロン , オデム ·  
 ストリート 5 - 7  
 110001379  
 弁理士法人大島特許事務所  
 ジヴ、イーラン  
 イスラエル国・ケフェア サバ 4 4 4 1  
 8 0 5 · シエザフ ストリート 5  
 デュプロヴスキー、ヨセフ  
 イスラエル国テル アヴィヴ 6 9 1 0 2  
 0 1 · アインシュタイン ストリート 3 6  
 グリムベルグ、ハギット

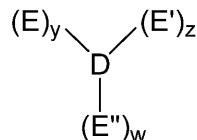
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 分子を経膜送達するための化合物及び方法

**(57)【特許請求の範囲】****【請求項1】**

コンジュゲートであって、

下記の化学式(I)に示す構造で表される化合物の薬学的に許容される塩、水和物、溶媒和物、金属キレート、または前記塩の溶媒和物若しくは水和物を含む、下記の化学式(I)に示す構造を有するコンジュゲート。

**【化1】**

10

化学式(I)

式中、

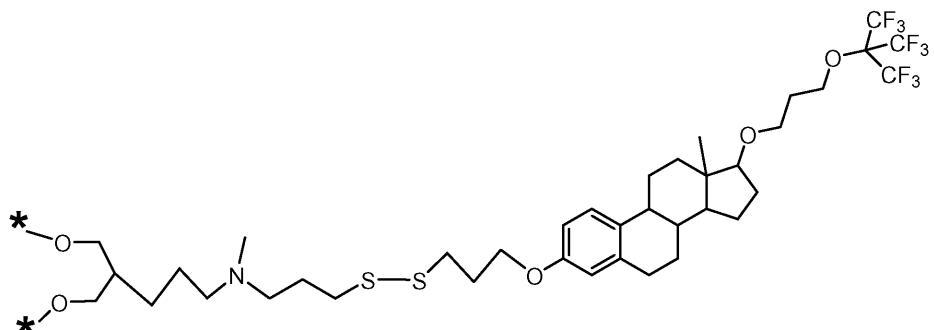
Dは、生体膜を横断して送達される薬物であり、低分子薬物、ペプチド、タンパク質、及び、天然の若しくは修飾された、一本鎖若しくは二本鎖のDNA若しくはRNA、siRNA、またはASOからなる群より選択され；

20

$y$ 、 $z$ 、及び $w$ は、互いに独立して、0、1、2、3、4、5または6から選択される整数であり、整数が0である場合はそのE部分がヌルであることを意味し； $y$ 、 $z$ 、及び $w$ の少なくとも1つは0ではなく；

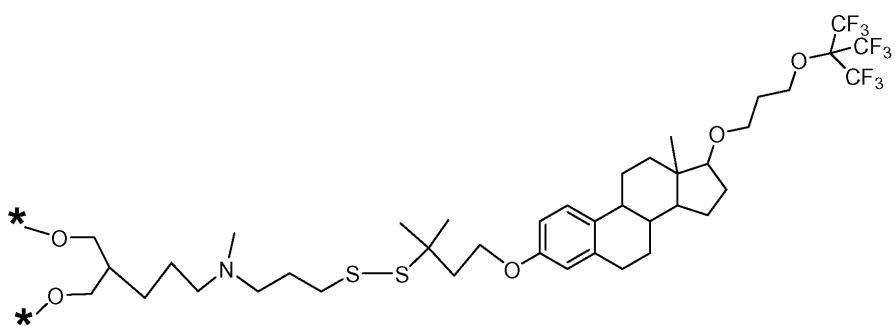
E、E'、及びE''は、互いに同一であっても異なっていてもよく、互いに独立して、下記の化学式(IV)、(IVa)、(V)または(Va)に示す構造で表される化合物の薬学的に許容される塩、水和物、溶媒和物、金属キレート、または前記塩の溶媒和物若しくは水和物を含む。

【化 2】



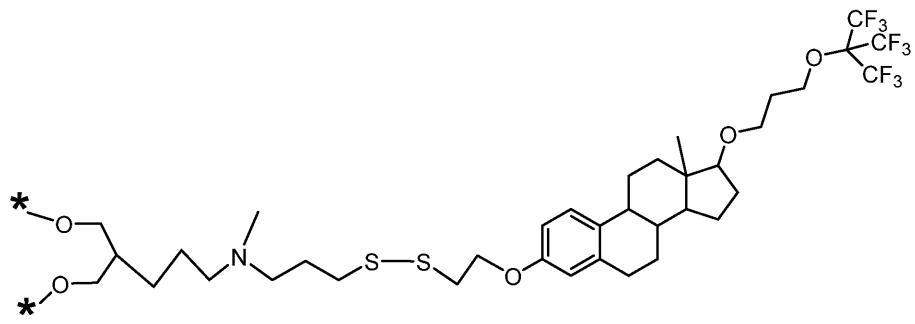
#### 化学式(IV)

【化3】



### 化学式(IVa)

【化 4】



## 化学式(V)

10

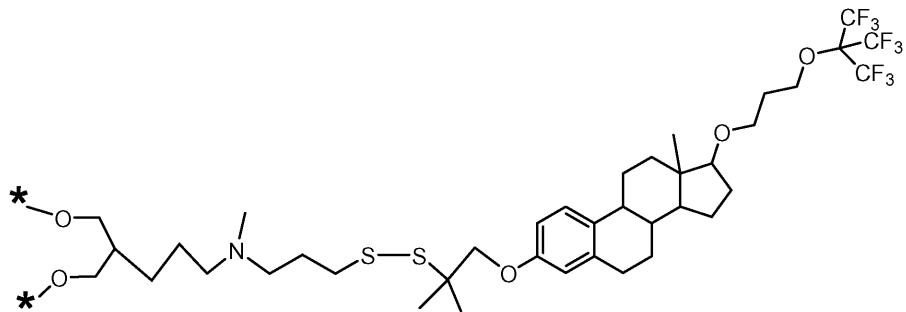
20

30

40

50

## 【化 5】



10

化学式(Va)

## 【請求項 2】

薬学的組成物であって、

請求項 1 に記載のコンジュゲートと、

薬学的に許容される塩または担体とを含む、薬学的組成物。

## 【発明の詳細な説明】

20

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、分子及び高分子を、臨床現場においてインピトロ及びインピボで使用される細胞内に、生体膜を横断して送達するための化合物、送達システム及び方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

近年の主要な科学進歩の 1 つは、ヒトゲノムのマッピングが完成したことであり、これにより、薬物療法のための多数の新規標的がもたらされた。このような標的の多くは細胞内に存在し、遺伝物質やタンパク質などの高分子薬物によって対処する必要がある。この分野において特に興味深いのは、低分子干渉 RNA ( siRNA ) を使用した RNA 干渉によって特定の遺伝子の発現をサイレンシング ( 抑制 ) するという最近発見された機能である。RNA 干渉は、短い ( 約 19 ~ 27 塩基対 ) 二本鎖 RNA 配列 ( 指定 siRNA ) の利用に基づいており、細胞生物学的システム ( とりわけ、長い二本鎖 RNA を切断して siRNA を提供するダイサー・タンパク質コンジュゲート、及び RNA 誘導性サイレンシングコンジュゲート ( RISC ) ) と協働して、特異的 mRNA 配列分解のための翻訳及びマーキングを阻害し、それにより、翻訳段階での遺伝子発現を阻害するように作用することができる。また、特異的メッセンジャー RNA ( mRNA ) に相補的な、未修飾または化学的に修飾された DNA 分子の短い配列 ( 通常 13 ~ 25 ヌクレオチド ) であるアンチセンスオリゴヌクレオチド ( ASO ) も、特異的疾患関連標的タンパク質の発現及び産生を阻害するために使用されている。新規な細胞内標的を標的とする他の高分子薬物は、タンパク質薬物である。しかしながら、医療のためのこのようなアプローチの途方もない潜在的利益にもかかわらず、オリゴヌクレオチドの比較的大きいかつ高電荷の構造に起因して、このような高分子の細胞内への送達は、依然として大きな課題である。例えば、 siRNA は、 13 kDa の平均分子量を有し、 40 ~ 50 個の負に荷電したリン酸基を運ぶ。実際、オリゴヌクレオチドの経膜送達は、非常に大きなエネルギー障壁を克服する必要がある。したがって、インピトロ及びインピボの両方において、生体膜を通過させて高分子薬物を送達するための新規なツールが求められている。

30

## 【発明の概要】

## 【課題を解決するための手段】

## 【0003】

40

50

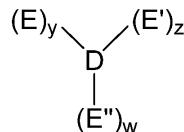
本発明は、新規な分子送達システムに結合された siRNAなどの高分子薬物を含むコンジュゲート及びその前駆体に焦点を合わせている。この新規な送達システムは、siRNAまたはアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)などの遺伝薬物を、リン脂質細胞膜などの生物学的障壁を横断して送達するのに特に有利である。この新規な分子送達システムは、膜内部電界によってエネルギーを与えられる経膜送達部分と、細胞質で還元されるように設計された酸化還元感受性ジスルフィド部分とを含み、カーゴ薬物を放出して標的部位でその薬理効果を発揮する。この新規な分子送達システムは、血漿タンパク質の有無にかかわらず作動する。

## 【0004】

本発明の一実施形態では、下記の化学式(I)に示す構造を有するコンジュゲートが提供される。このコンジュゲートは、下記の化学式(I)に示す構造で表される化合物の薬学的に許容される塩、水和物、溶媒和物、金属キレート、または塩の溶媒和物若しくは水和物を含む。

## 【0005】

## 【化1】



10

20

化学式(I)

## 【0006】

式中、

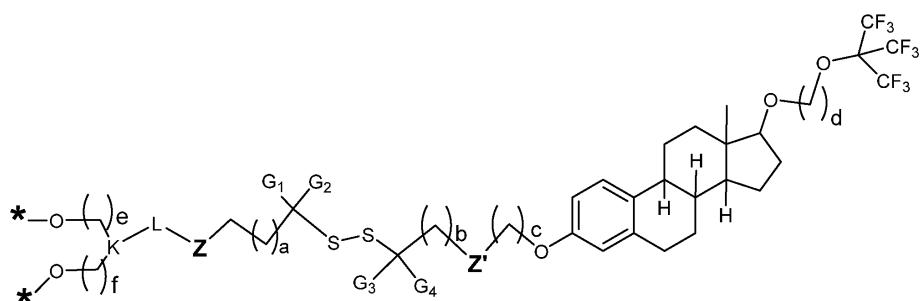
Dは、生体膜を横断して送達される薬物であり、低分子薬物、ペプチド、タンパク質、及び、天然の若しくは修飾された、一本鎖若しくは二本鎖のDNA若しくはRNA、siRNA、またはASOからなる群より選択され；

y、z、及びwは、互いに独立して、0、1、2、3、4、5または6から選択される整数であり、整数が0である場合はそのE部分がヌルであることを意味し；y、z、及びwの少なくとも1つは0ではなく；

E、E'、及びE''は、互いに同一であっても異なっていてもよく、互いに独立して、下記の化学式(II)に示す構造で表される化合物の薬学的に許容される塩、水和物、溶媒和物、金属キレート、または塩の溶媒和物若しくは水和物を含む、下記の化学式(II)に示す構造を有する。

## 【0007】

## 【化2】



30

40

化学式(II)

## 【0008】

50

式中、

$G_1$ 、 $G_2$ 、 $G_3$ 、及び $G_4$ は、互いに独立して、水素、メチル、及びエチルからなる群より選択され；少なくとも2つの $G$ 基は水素であり；

$Z$ 及び $Z'$ は、互いに独立して、ヌル、 $-CH_2-$ 、 $-NH-$ 、 $-N(R')$ 、 $-C(H)(CH_2)_n[N(R'')](R''')$ 、及び $-N(R')-C(O)-C(H)(CH_2)_n[N(R'')](R''')$ からなる群より選択され； $R'$ 、 $R''$ 、及び $R'''$ は、互いに独立して、水素、 $C_1$ 、 $C_2$ 、 $C_3$ 、 $C_4$ アルキル、及び、 $C_1$ 、 $C_2$ 、 $C_3$ 、 $C_4$ アルキルアミンからなる群より独立して選択され；アミンは、第一級、第二級、または第三級アミンであり； $n$ は、0、1、2、3、または4から選択される整数であり； $n=0$ はヌルを意味し； $Z$ 及び $Z'$ の少なくとも1つはアミンであり；

$L$ はリンカーであり、ヌル、エーテル、アミド、エステル、炭酸塩、カルバメート基、1~4個の炭素原子を各々含みかつ任意選択でヒドロキシルまたはアミン基によって置換される1個または2個の炭化水素鎖、または、これらの任意の組み合わせから選択され；

$K$ は、ヌル、 $-CH-$ 、及び $-N-$ から選択され；

$a$ は、0、1、2、3、及び4からなる群より選択された整数であり；

$b$ は、0、1、2、3、及び4からなる群より選択された整数であり；

$c$ は、1、2、3、及び4からなる群より選択された整数であり；

$d$ は、2、3、及び4からなる群より選択された整数であり；

$e$ 及び $f$ は、互いに独立して、0、1、2、及び3からなる群より選択された整数であり；

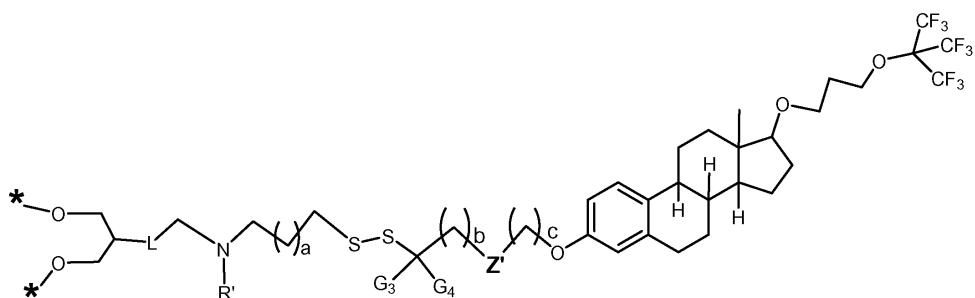
\*は、水素、Dへの結合点、アルコールの保護基への結合点、リン酸、硫酸またはカルボキシル基への結合点、及び、固体支持体への結合点からなる群より選択される。

#### 【0009】

別の実施形態では、化学式(I)に係るコンジュゲートであって、 $E$ 、 $E'$ 、及び $E''$ の少なくとも1つが、下記の化学式(III)に示す構造で表される化合物の薬学的に許容される塩、水和物、溶媒和物、金属キレート、または塩の溶媒和物若しくは水和物を含む、コンジュゲートが提供される。

#### 【0010】

#### 【化3】



化学式(III)

#### 【0011】

式中、 $Z'$ 、 $R'$ 、 $L$ 、 $G_3$ 、 $G_4$ 、 $a$ 、 $b$ 、 $c$ 、及び\*はそれぞれ、化学式(II)で定義したとおりである。

#### 【0012】

別の実施形態では、化学式(III)に係るコンジュゲートであって、

#### 【0013】

10

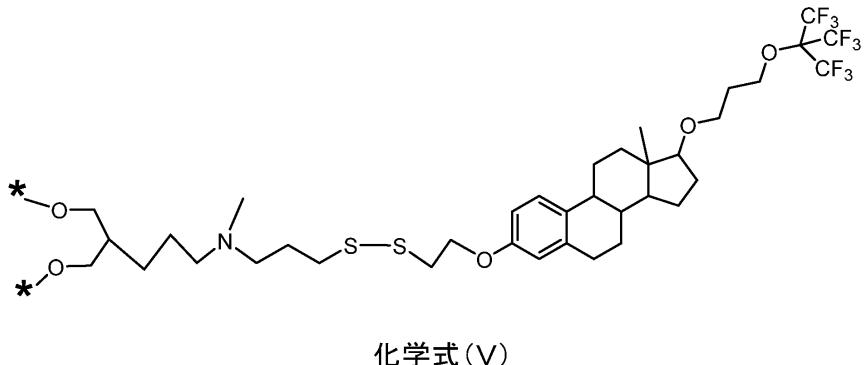
20

30

40

50

## 【化4】



10

化学式(V)

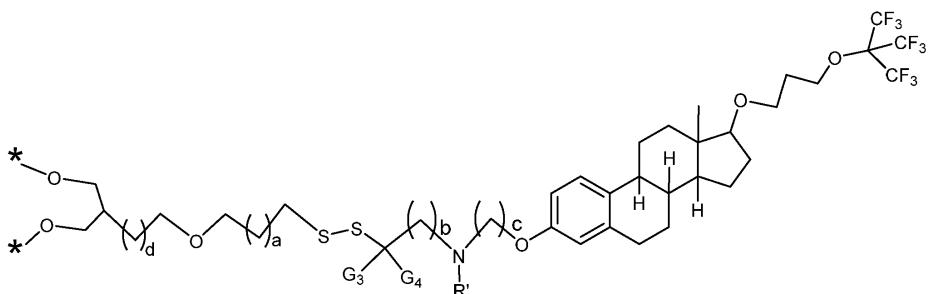
## 【0014】

さらに別の実施形態では、本発明は、化学式(I)に係るコンジュゲートであって、E、E'、及びE''の少なくとも1つが、下記の化学式(VI)に示す構造で表される化合物の薬学的に許容される塩、水和物、溶媒和物、金属キレート、または塩の溶媒和物若しくは水和物を含む、下記の化学式(VI)に示す構造を有する、コンジュゲートを提供する。

## 【0015】

20

## 【化5】



30

化学式(VI)

## 【0016】

式中、R'、G<sub>3</sub>、G<sub>4</sub>、a、b、c、及び\*は、それぞれ、化学式(II)で定義したとおりである。

## 【0017】

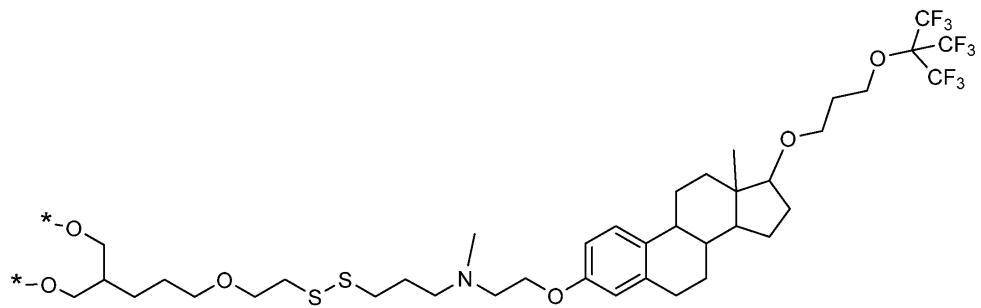
より具体的な実施形態では、化学式(VI)に係るコンジュゲートであって、E、E'、及びE''の少なくとも1つが、下記の化学式(VII)または(VIIa)に示す構造で表される化合物の薬学的に許容される塩、水和物、溶媒和物、金属キレート、または塩の溶媒和物若しくは水和物を含む、下記の化学式(VII)または(VIIa)に示す構造を有する、コンジュゲートが提供される。化学式(VII)に係るE部分は、アポ-Si-K-93-Aとして設計される。

40

## 【0018】

50

【化6】

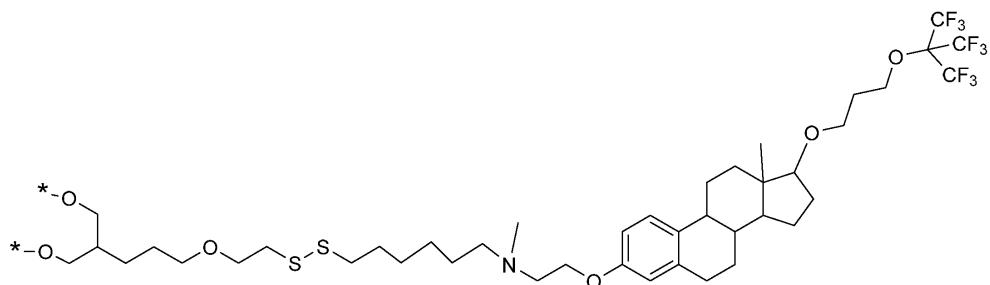


10

### 化学式(VII)

【 0 0 1 9 】

【化 7】



20

### 化学式(VIIa)

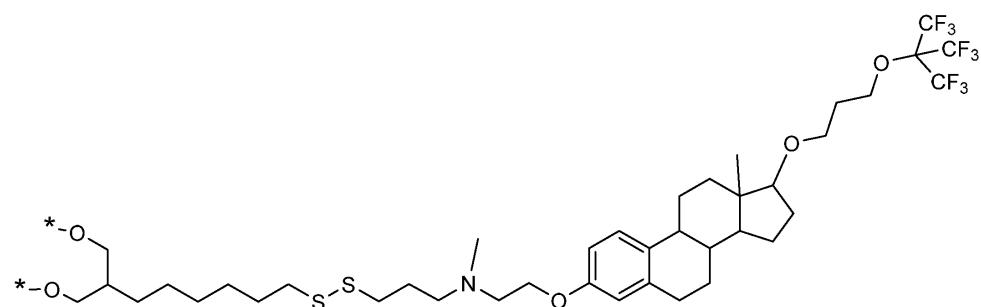
〔 0 0 2 0 〕

別の実施形態では、本発明は、化学式(Ⅱ)に係るコンジュゲートであって、E、E'、及びE''の少なくとも1つが、下記の化学式(ⅧⅠⅠ)または(ⅧⅠⅠa)に示す構造で表される化合物の薬学的に許容される塩、水和物、溶媒和物、金属キレート、または塩の溶媒和物若しくは水和物を含む、下記の化学式(ⅧⅠⅠ)または(ⅧⅠⅠa)に示す構造を有する、コンジュゲートを提供する。化学式(ⅧⅠⅠa)に係るE部分は、アポ-Si-K-63-Aとして設計される。

30

[ 0 0 2 1 ]

【化 8】



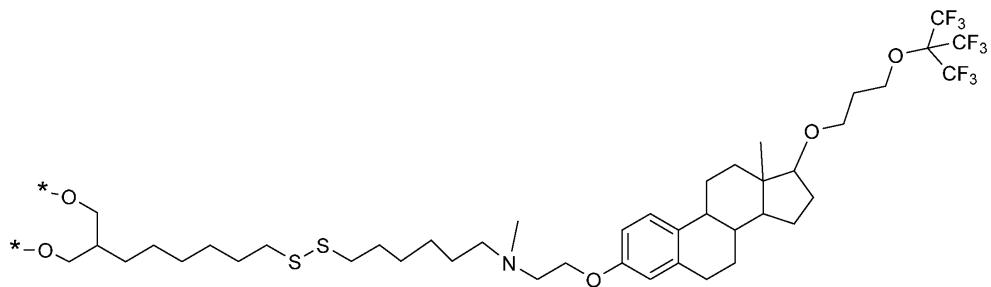
40

### 化学式(VIII)

[ 0 0 2 2 ]

50

## 【化9】



10

化学式(VIIIa)

## 【0023】

本発明のいくつかの実施形態は、薬物を、インピトロまたはインピボで、培養物中または生きている動物若しくはヒト対象中の生体細胞に送達するための方法であって、生体細胞を、上記のコンジュゲートと接触させるステップを含む、方法に関する。

## 【0024】

別の実施形態は、医学的疾患を治療する方法であって、対象に対して、上記のコンジュゲートを含有する薬学的組成物を治療有効量で投与するステップを含む、方法に関する。

20

## 【0025】

本発明の別の実施形態は、例えば人間医学また獣医学における医療行為に使用するための上記のコンジュゲートに関する。

## 【0026】

本発明の別の実施形態は、対象の医学的疾患を治療するための上記のコンジュゲートを作製するための、化学式(I I)、(I I I)、(I V)、(I V a)、(V)、(V a)、(V I)、(V I I)、(V I I a)、(V I I I)、または(V I I I a)に記載した構造を有するE、E'、またはE''部分の1以上の使用に関する。本発明の別の実施形態は、対象の医学的疾患を治療するための薬剤の作製におけるコンジュゲートの使用に関する。いくつかの実施形態では、医学的疾患は癌である。別の実施形態では、コンジュゲートは抗感染性を有し得、そのため、例えば細菌感染症またはウイルス感染症などの感染症の治療に有用である。

30

## 【図面の簡単な説明】

## 【0027】

【図1A】2つのE部分を含み、E部分の各々がsiRNA二本鎖の5'末端に位置する、本発明のコンジュゲートを示す。

【図1B】コンジュゲートが膜と相互作用するときに、siRNAが膜の表面に対して平行であり、外膜リーフレットの歪み及び構造的摂動を誘導する位置にある状態を示す。

【図1C】歪み及び構造的摂動の結果として、コンジュゲートによって誘導されるエンドサイトーシスを示す。図中の矢印は、エンドサイトーシス小胞の例である。

【図2A】3つのE部分を含む本発明のsiRNAコンジュゲートの構造の例であり、細胞外空間に存在する無傷のコンジュゲートを示す。

40

【図2B】細胞質内の還元条件下でのE部分の切断を示す。

【図2C】RNA二本鎖の切断を示し、それにより21/23ヌクレオチド二本鎖が生成され、また、ガイド鎖の残基部分も除去される。

【図2D】ヘリカーゼによるパッセンジャー鎖の除去を示し、E部分の残りの2つの断端が、ガイド鎖を残し、RIC複合体に無傷で送達される準備ができている。

【図3】本発明のコンジュゲートを10%BSAとインキュベートしたときの、タンパク質結合画分及びタンパク質非結合画分(矢印)を示す。プロテイナーゼK(PK)処理によって、全てのタンパク質結合コンジュゲートがリカバーされた。

50

【図4】還元グルタチオンとインキュベートしたときの(1 mM、2時間)、本発明のコンジュゲートの還元切断(矢印)を示す。

【発明を実施するための形態】

【0028】

本発明は、高分子薬物を含むコンジュゲート(conjugate)及びその前駆体に焦点を合わせている。高分子薬物は、これに限定されないが、例えばオリゴヌクレオチド、いくつかの実施形態では、生体膜及び生物学的障壁を横断して薬物を送達するように設計された分子送達システムに結合された siRNA、であり得る。この新規な分子送達システムは、膜内部電界によってエネルギーを与えられる経膜送達部分と、細胞質で還元されるように設計された酸化還元感受性ジスルフィド部分とを含み、カーゴ薬物を放出して標的部位でその薬理効果を発揮する。この新規な分子送達システムは、血漿タンパク質の有無にかかわらず作動する。

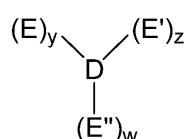
10

【0029】

本発明の一実施形態では、下記の化学式(I)に示す構造を有するコンジュゲートが提供される。このコンジュゲートは、下記の化学式(I)に示す構造で表される化合物の薬学的に許容される塩、水和物、溶媒和物、金属キレート、または塩の溶媒和物若しくは水和物を含む。

【0030】

【化1】



20

化学式(I)

【0031】

式中、

Dは、生体膜を横断して送達される薬物であり、低分子薬物、ペプチド、タンパク質、及び、天然の若しくは修飾された、一本鎖若しくは二本鎖のDNA若しくはRNA、siRNA、またはASOからなる群より選択され；

30

y、z、及びwは、互いに独立して、0、1、2、3、4、5または6から選択される整数であり、整数が0である場合はそのE部分がヌルであることを意味し；y、z、及びwの少なくとも1つは0ではなく；

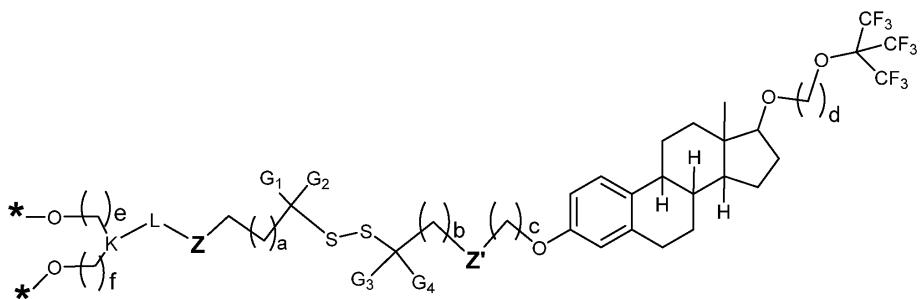
E、E'、及びE''は、互いに同一であっても異なっていてもよく、互いに独立して、下記の化学式(II)に示す構造で表される化合物の薬学的に許容される塩、水和物、溶媒和物、金属キレート、または塩の溶媒和物若しくは水和物を含む、下記の化学式(II)に示す構造を有する。

【0032】

40

50

## 【化2】



10

化学式(II)

## 【0033】

式中、

G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>、G<sub>3</sub>、及びG<sub>4</sub>は、互いに独立して、水素、メチル、及びエチルからなる群より選択され；少なくとも2つのG基は水素であり；

Z及びZ'は、互いに独立して、ヌル、-CH<sub>2</sub>、-NH-、-N(R')-、-C(H)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>[N(R'')(R''')]--及び、-N(R')-C(O)-C(H)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>[N(R'')(R''')]--からなる群より選択され；R'、R''、及びR'''は、互いに独立して、水素、C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub>アルキル、及び、C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub>アルキルアミンからなる群より独立して選択され；アミンは、第一級、第二級、または第三級アミンであり；nは、0、1、2、3、または4から選択される整数であり；n=0はヌルを意味し；Z及びZ'の少なくとも1つはアミンであり；

Lはリンカーであり、ヌル、エーテル、アミド、エステル、炭酸塩、カルバメート基、1~4個の炭素原子を各々含みかつ任意選択でヒドロキシルまたはアミン基によって置換される1個または2個の炭化水素鎖、または、これらの任意の組み合わせから選択され；

Kは、ヌル、-CH-、及び-N-から選択され；

aは、0、1、2、3、及び4からなる群より選択された整数であり；

bは、0、1、2、3、及び4からなる群より選択された整数であり；

cは、1、2、3、及び4からなる群より選択された整数であり；

dは、2、3、及び4からなる群より選択された整数であり；

e及びfは、互いに独立して、0、1、2、及び3からなる群より選択された整数であり；

\*は、水素、Dへの結合点、アルコールの保護基への結合点、リン酸、硫酸またはカルボキシル基への結合点、及び、固体支持体への結合点からなる群より選択される。

## 【0034】

別の実施形態では、化学式(I)に係るコンジュゲートであって、E、E'、及びE'の少なくとも1つが、下記の化学式(III)に示す構造で表される化合物の薬学的に許容される塩、水和物、溶媒和物、金属キレート、または塩の溶媒和物若しくは水和物を含む、コンジュゲートが提供される。

## 【0035】

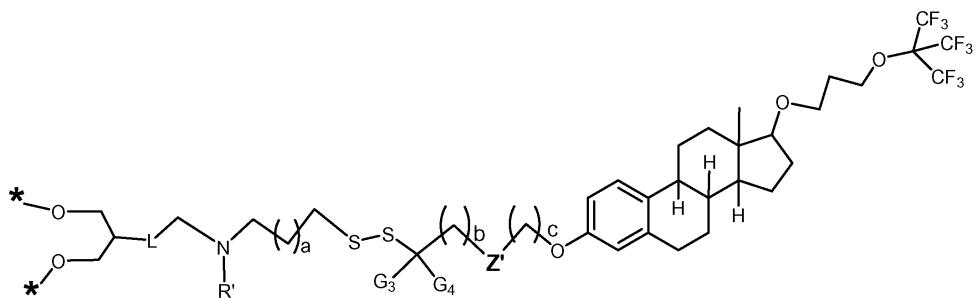
20

30

40

50

【化 3】



10

化学式(III)

【0036】

式中、 $Z'$ 、 $R'$ 、 $L$ 、 $G_3$ 、 $G_4$ 、 $a$ 、 $b$ 、 $c$ 、及び\*はそれぞれ、化学式(I I)で定義したとおりである。

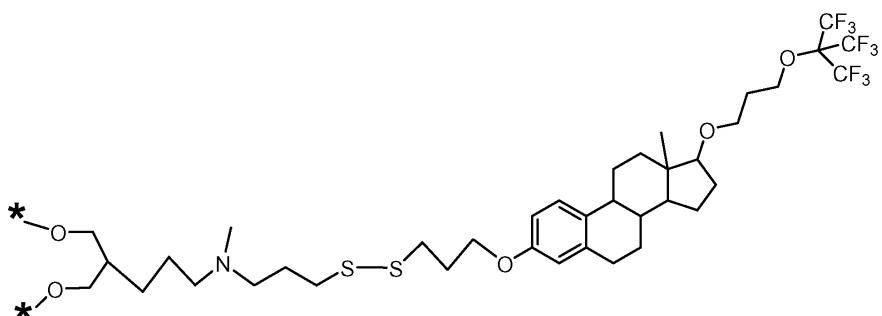
【0037】

別の実施形態では、化学式(I I I)に係るコンジュゲートであって、 $E$ 、 $E'$ 、及び $E''$ の少なくとも1つが、下記の化学式(I V)または(I V a)に示す構造で表される化合物の薬学的に許容される塩、水和物、溶媒和物、金属キレート、または塩の溶媒和物若しくは水和物を含む、下記の化学式(I V)または(I V a)に示す構造を有するコンジュゲートが提供される。

20

【0038】

【化10】

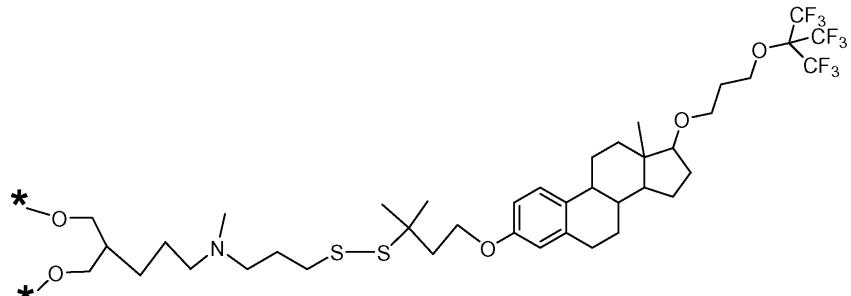


30

化学式(IV)

【0039】

【化11】



40

化学式(IVa)

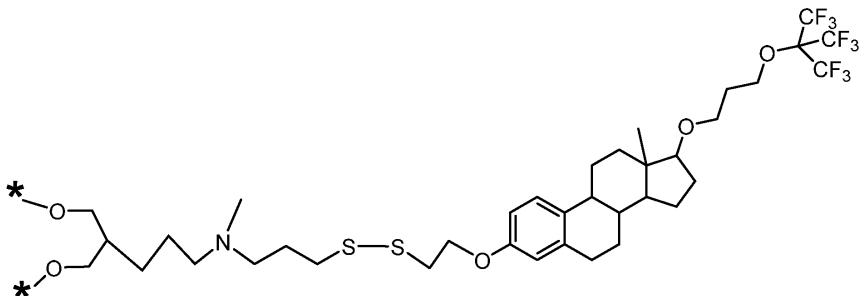
50

## 【0040】

別の実施形態では、化学式(I II)に係るコンジュゲートであって、E、E'、及びE''の少なくとも1つが、下記の化学式(V)または(Va)に示す構造で表される化合物の薬学的に許容される塩、水和物、溶媒和物、金属キレート、または塩の溶媒和物若しくは水和物を含む、下記の化学式(V)または(Va)に示す構造を有するコンジュゲートが提供される。

## 【0041】

## 【化4】

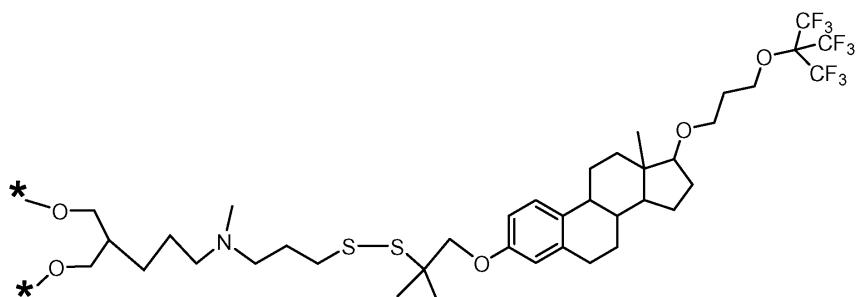


化学式(V)

10

## 【0042】

## 【化12】



20

30

化学式(Va)

## 【0043】

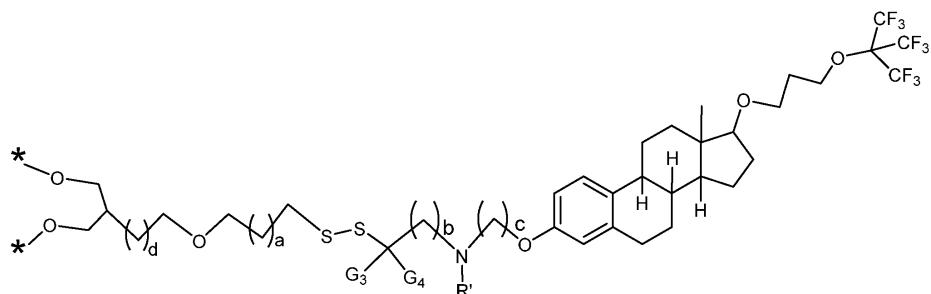
さらに別の実施形態では、本発明は、化学式(I)に係るコンジュゲートであって、E、E'、及びE''の少なくとも1つが、下記の化学式(VI)に示す構造で表される化合物の薬学的に許容される塩、水和物、溶媒和物、金属キレート、または塩の溶媒和物若しくは水和物を含む、下記の化学式(VI)に示す構造を有する、コンジュゲートを提供する。

## 【0044】

40

50

## 【化5】



10

化学式(VI)

## 【0045】

式中、 $R'$ 、 $G_3$ 、 $G_4$ 、 $a$ 、 $b$ 、 $c$ 、及び\*は、それぞれ、化学式(I I)で定義したとおりである。

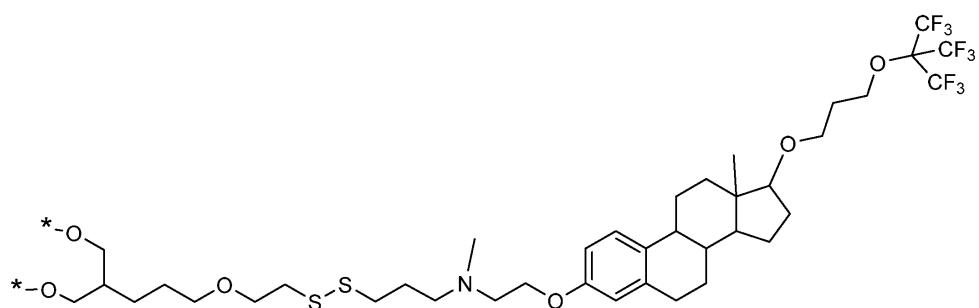
## 【0046】

より具体的な実施形態では、化学式(V I)に係るコンジュゲートであって、 $E$ 、 $E'$ 、及び $E''$ の少なくとも1つが、下記の化学式(V I I)または(V I I a)に示す構造で表される化合物の薬学的に許容される塩、水和物、溶媒和物、金属キレート、または塩の溶媒和物若しくは水和物を含む、下記の化学式(V I I)または(V I I a)に示す構造を有する、コンジュゲートが提供される。化学式(V I I)に係る $E$ 部分は、アポ-S i - K - 9 3 - Aとして設計される。

20

## 【0047】

## 【化6】

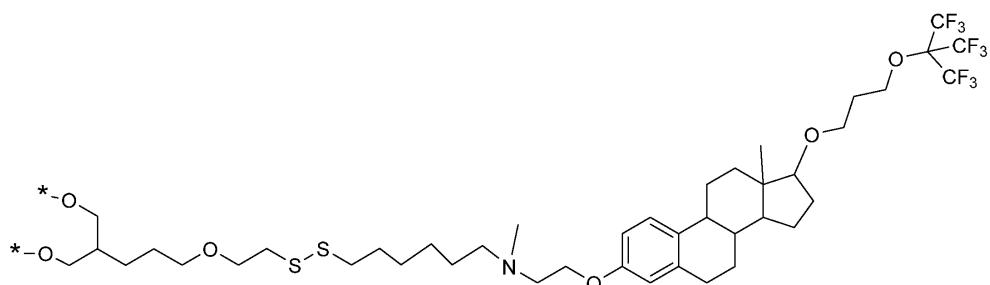


30

化学式(VII)

## 【0048】

## 【化7】



40

化学式(VIIa)

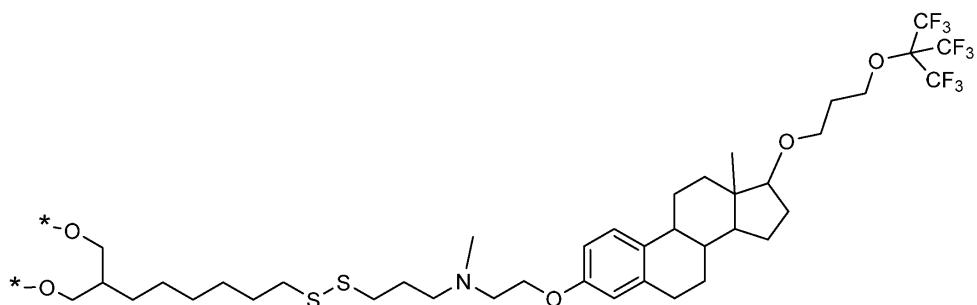
50

## 【0049】

別の実施形態では、本発明は、化学式(I I)に係るコンジュゲートであって、E、E'、及びE''の少なくとも1つが、下記の化学式(V I I I)または(V I I I a)に示す構造で表される化合物の薬学的に許容される塩、水和物、溶媒和物、金属キレート、または塩の溶媒和物若しくは水和物を含む、下記の化学式(V I I I)または(V I I I a)に示す構造を有する、コンジュゲートを提供する。化学式(V I I I a)に係るE部分は、アポ-S i - K - 6 3 - Aとして設計される。

## 【0050】

## 【化8】



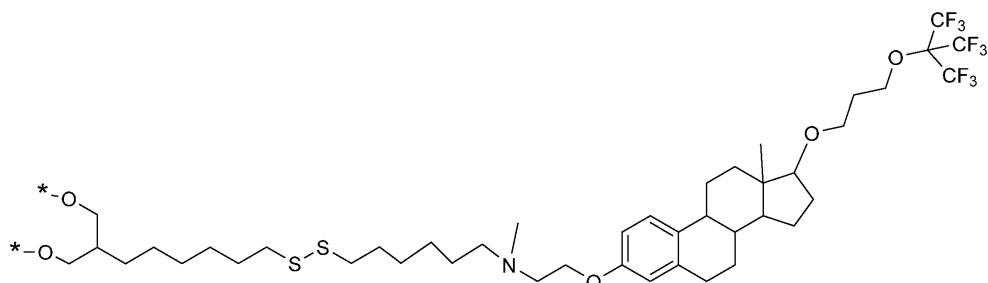
化学式(VIII)

10

20

## 【0051】

## 【化9】



30

化学式(VIIIa)

## 【0052】

本発明のコンジュゲートによって送達される薬物（すなわち、D部分）は、低分子薬物であってもよいし、高分子薬物、例えばペプチド、タンパク質またはオリゴヌクレオチド（例えば、一本鎖または二本鎖のRNAまたはDNA）など、であってもよい。本発明の一実施形態では、送達される高分子としては、遺伝子抑制（サイレンシング）のためのRNA鎖、すなわちsiRNA（低分子干渉RNA）、マイクロRNA（miRNA）、またはアンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）としての役割を果たすように設計されたDNA配列が挙げられる。

40

## 【0053】

本発明の実施形態は、生体膜を横断して、または、血液脳関門（BBB）、血液眼関門（BOB）、血液胎児関門（胎盤血液関門）などの生物学的障壁を通過して、薬物を細胞質内に送達するシステムを含む、新規なコンジュゲートに関する。

## 【0054】

本発明の文脈における「アルコールの保護基」という用語は、当分野で既知のように、特定の化学反応中にヒドロキシリル基を「マスク」するためにヒドロキシリル基に結合され、

50

かつその後に除去可能な化学基を指す。このような保護基の例は、アセチル( A c )、ベンゾイル( B z )、ベンジル( B n )、<sup>10</sup> -メトキシエトキシメチルエーテル( M E M )、ジメトキシトリチル[ビス(4-メトキシフェニル)フェニルメチル]( D M T )、メトキシメチルエーテル( M O M )、メトキシトリチル[ ( 4 - メトキシフェニル ) ジフェニルメチル ] ( M M T )、p - メトキシ - ベンジルエーテル( P M B )、ピバロイル( P i v )、テトラヒドロピラニル( T H P )、テトラヒドロフラン( T H F )、トリチル( トリフェニルメチル、 T r )、シリルエーテル[ 例えば、トリメチルシリル( T M S )、 t e r t - ブチルジメチルシリル( T B D M S )、トリ - イソ - プロピルシリルオキシメチル( T O M )、及びトリイソプロピルシリル( T I P S )エーテル ]、エトキシエチルエーテル( E E )、ホスホロアミダイト、 N - ヒドロキシスクシンイミド( N H S )である。

#### 【 0 0 5 5 】

本発明の文脈における「前駆体」という用語は、コンジュゲートの合成中に除去または修飾される化学基に結合される本発明の E 、 E ' 、または E '' 部分に関する。このような除去または修飾は、合成の様々な段階、例えば、これに限定しないが、オリゴヌクレオチド薬物などの高分子薬物への E 、 E ' 、または E '' 部分の結合中に生じ得る。

#### 【 0 0 5 6 】

本発明の実施形態はまた、治療を必要とする対象における医学的疾患を治療するための、タンパク質またはオリゴヌクレオチド( 例えば、 s i R N A または A S O )などの治療上有用な薬物を含む、本発明によるコンジュゲートの使用に関する。医学的疾患は、これに限定しないが、特定のタンパク質が疾患の原因または発症のいずれかに関与し、 s i R N A またはアンチセンス機構を介した各遺伝子の発現の調節、あるいは治療用タンパク質による( 例えば、抗体による、またはタンパク質置換療法による ) 各タンパク質の活性の調節によって、疾患関連プロセスの阻害または疾患の根底原因の治療において有益な効果を有し得る、変性疾患、癌、外傷性傷害、毒性傷害、虚血性傷害、感染症疾患、または免疫媒介性疾患であり得る。

#### 【 0 0 5 7 】

例えば、本発明の実施形態によるコンジュゲートは、特定のタンパク質をコードする D N A 配列に対して、またはタンパク質への翻訳が行われる各メッセンジャー R N A ( m R N A )に対して結合する一本鎖または二本鎖核酸鎖( D N A 、 R N A または化学的類似体 )の投与を含む医療形態である、アンチセンスまたは s i R N A 療法として使用することができる。この療法は、各遺伝子の発現を阻害するように作用し、それによって、疾患の原因または発症に関与し得る各疾患関連タンパク質の產生を防止する。あるいは、本発明のコンジュゲートは、治療用タンパク質、または、例えば C a s 9 タンパク質などのタンパク質 / 核酸複合体を含み得る。

#### 【 0 0 5 8 】

本発明の文脈における「薬物」または「薬剤」という用語は、疾患を患っている対象に投与されたときに、対象に有益な効果をもたらすことができる化学物質に関する。有益な効果は、症状の改善、または、疾患プロセスに関与する因子または物質の拮抗作用であり得る。薬物は、遺伝子発現を阻害するために投与される、タンパク質、または一本鎖若しくは二本鎖の R N A 若しくは D N A などの低分子または高分子を含み得る。とりわけ、薬物は、 s i R N A または A S O を含み得る。いくつかの実施形態では、薬物は、変性疾患、癌、虚血性傷害、感染性傷害、毒性傷害、または免疫介在性疾患の治療を目的とする。

#### 【 0 0 5 9 】

本発明による用語「生体膜」は、生物学的システムに関連する任意のリン脂質膜を指す。このようなリン脂質膜の例は、細胞の形質膜、細胞内膜、または、例えば血液脳関門( B B B )、血液眼関門( B O B )、血液胎盤関門などの生物学的障壁である。

#### 【 0 0 6 0 】

本発明の実施形態は、本明細書に記載されたコンジュゲートと、薬学的に許容される担体または塩とを含む薬学的組成物を提供する。いくつかの実施形態では、本発明のコンジ

10

20

30

40

50

ユゲート及び薬学的組成物は、臨床現場においてインピボで使用され得る。

**【 0 0 6 1 】**

本発明の別の実施形態では、医学的疾患の治療を必要とする対象における医学的疾患の治療に使用するための、本発明のコンジュゲート、または本発明のコンジュゲートを含む薬学的組成物を含む。本発明のさらなる実施形態は、医学的疾患の治療を必要とする対象における医学的疾患を治療するための医薬組成物を調製するための本発明のコンジュゲートの使用を含む。いくつかの実施形態では、医学的疾患は癌である。

**【 0 0 6 2 】**

本発明の実施形態によるコンジュゲートは、細胞膜または生物学的障壁（例えば、血液脳関門（B B B）など）を介した、s i R N A、A S O、または治療用タンパク質（例えば抗体など）の送達を改善するのに有利であり得る。これにより、例えば、効能、毒性、または薬物動態などの1以上の側面における高分子薬物の性能が改善される。

10

**【 0 0 6 3 】**

本発明のコンジュゲートが他の薬物送達システムに対して有利になるように設計される重要な側面は、アルブミンに対する最適化された好ましい結合親和力に関し得る。これは、一方では、体内での長い滞留時間を可能にすると共に、全身への広い分配、及び血漿溶解酵素による分解からの保護を与える。そして、他方では、コンジュゲートをリン脂質細胞膜に優先的に結合させ、リン脂質細胞膜を横断して細胞内に輸送するために、コンジュゲートをアルブミンから効果的に離脱させることを可能にする。

20

**【 0 0 6 4 】**

本発明のコンジュゲートが他の薬物送達システムに対して有利になるように設計される別の重要な側面は、高分子薬物を放出して標的部位でその薬理効果を発揮し、細胞質中の構築物の選択的切断を提供する、酸化還元反応感受性部分、すなわちジスルフィド基を含むことに関し得る。

**【 0 0 6 5 】**

本発明の一実施形態では、薬物は、s i R N A、A S O、及び治療用タンパク質からなる群より選択される高分子である。

**【 0 0 6 6 】**

本発明の一実施形態では、化学式(I I)、(I I I)、(I V)、(I V a)、(V)、(V a)、(V I)、(V I I)、(V I I a)、(V I I I)または(V I I I a)のいずれかに示す構造を有する本発明のコンジュゲートと、薬学的に許容される塩または担体とを含む薬学的組成物が提供される。

30

**【 0 0 6 7 】**

本発明の一実施形態では、薬物を、培養物中または生きている動物若しくはヒト対象中の生体細胞に送達する方法であって、生体細胞を本発明のコンジュゲートと接触させるステップを含む方法を提供する。

**【 0 0 6 8 】**

本発明の一実施形態では、生体膜が、細胞膜及び生物学的障壁からなる群より選択される方法が提供され、生物学的障壁は、血液脳関門、血液眼関門または血液胎児関門から選択される。

40

**【 0 0 6 9 】**

本発明の一実施形態では、E、E'、またはE''部分の各々が互いに独立して、薬物に結合された、化学式(I I)、(I I I)、(I V)、(I V a)、(V)、(V a)、(V I)、(V I I)、(V I I a)、(V I I I)または(V I I I a)のいずれかに示す構造を有するコンジュゲートを提供する。

**【 0 0 7 0 】**

上述したように、本発明の範囲はまた、「前駆物質」と称される分子を含む。本発明の文脈において「前駆体」は、化学基に結合された、化学式(I I)、(I I I)、(I V)、(I V a)、(V)、(V a)、(V I)、(V I I)、(V I I a)、(V I I I)または(V I I I a)のいずれかに示す構造を有するE、E'、またはE''部分のい

50

すれかを含む分子であって、コンジュゲートの合成中に除去または修飾される、すなわち、D部分をE、E'、またはE''部分に結合させる段階で除去または修飾される分子である。このような化学基の例は、ホスホロアミダイト、アジド、アセチレン、ジメトキシリチル[ビス(4-メトキシフェニル)フェニルメチル](DMT)、またはN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)基である。

#### 【0071】

Dがオリゴヌクレオチド薬物(例えばsiRNA)である本発明のより具体的な実施形態では、本発明は、前駆体であって、E、E'、またはE''部分のDへの結合中に除去または修飾される化学部分がホスホロアミダイト及び/またはDMTを含む前駆体を提供する。

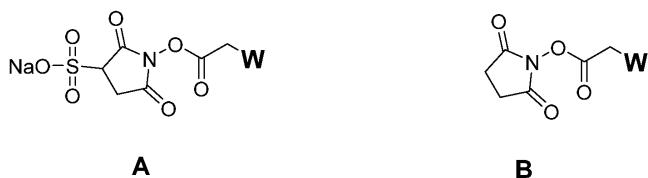
10

#### 【0072】

さらに別の前駆体は、E、E'、またはE''部分をタンパク質薬物であるDに結合させる役割を果たす。この前駆体では、E、E'、またはE''部分は、下記の構造のうちの1つに結合される。

#### 【0073】

#### 【化13】



20

#### 【0074】

式中、Wは、化学式(I I)、(I I I)、(I V)、(I V a)、(V)、(V a)、(V I)、(V I I)、(V I I a)、(V I I I)または(V I I I a)のいずれかに示す構造を有するE、E'またはE''部分から選択される。この前駆体は、そのN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)部分を介してタンパク質のリジン側鎖のアミン基に結合することを目的としている。

#### 【0075】

本発明の実施形態は、化学式(I)、(I I)、(I I I)、(I V)、(I V a)、(V)、(V a)、(V I)、(V I I)、(V I I a)、(V I I I)または(V I I I a)のいずれかに示す構造を有するコンジュゲートと、薬学的に許容される塩または担体とを含む薬学的組成物をさらに含み得る。

30

#### 【0076】

本発明はまた、インピトロまたはインピボで、遺伝子発現を特異的に阻害するための方法を含む。一実施形態では、本方法は、Dが特定の遺伝子の発現を抑制するように設計されたsiRNAまたはASOである、化学式(I)、(I I)、(I I I)、(I V)、(I V a)、(V)、(V a)、(V I)、(V I I)、(V I I a)、(V I I I)、(V I I I a)のいずれかに示す構造を有するコンジュゲート、またはその薬学的組成物の利用を含み得る。いくつかの実施形態では、遺伝子は、疾患の病因または発症に関与する病原性タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、Dは、治療用タンパク質である。

40

#### 【0077】

本発明の一実施形態では、siRNAを含むコンジュゲートであって、siRNAの各末端が、化学式(I I)、(I I I)、(I V)、(I V a)、(V)、(V a)、(V I)、(V I I)、(V I I a)、(V I I I)または(V I I I a)のいずれかに示す構造を有するE、E'、またはE''部分に結合された、コンジュゲートが提供される。本発明の別の実施形態では、siRNAを含むコンジュゲートであって、siRNAの各末端、及びsiRNA二本鎖内の内部位置が、化学式(I I)、(I I I)、(I V)、

50

(IVa)、(V)、(Va)、(VI)、(VII)、(VIIa)、(VIII)または(VIIIa)のいずれかに示す構造を有するE、E'、またはE''部分に結合された、コンジュゲートが提供される。

#### 【0078】

本発明のさらに別の実施形態では、リン脂質膜の外部リーフレットにおける歪み(strain)及び焦点構造擾動(focal structural perturbation)を誘導する方法が提供される。本方法は、本発明のコンジュゲートをリン脂質膜と相互作用させるステップを含む。本発明のコンジュゲートは、siRNA二本鎖を含み、siRNAの各末端、及びsiRNA二本鎖内の内部位置が、化学式(I I)、(I I I)、(I V)、(IVa)、(V)、(Va)、(VI)、(VII)、(VIIa)、(VIII)または(VIIIa)のいずれかに示す構造を有するE、E'、またはE''部分(すなわち、全部で2~3個の部分)に結合されている。10

#### 【0079】

本発明のコンジュゲートのこの構造に起因して、siRNAは、膜の表面に平行に接近し、E、E'、またはE''部分は、膜の表面に垂直な膜コアに向かって配向される(図1A、図1B及び図1Cに示す)。この結果、高度に負に荷電したsiRNAが膜表面に接近し、これにより、リン脂質膜の外部リーフレットの歪み及び焦点構造擾動が誘導される。このような外膜の歪み及び焦点構造擾動は、とりわけ、エンドサイトーシスの開始、または、siRNAを有するコンジュゲートの、膜リーフレットの一方から他方への通過(その反対も可)の誘導に有用であり得る。両方のプロセスは、siRNAの経膜送達の開始及び/または進展に非常に有用である可能性がある。上記のリン脂質膜は、インビトロまたはインビボのいずれかにおける、これに限定しないが、リポソームまたは細胞膜を含む任意のリン脂質膜であり得る。20

#### 【0080】

本発明の実施形態によるコンジュゲートは、医学的疾患の治療のために使用され得る。本発明の実施形態は、医療方法であって、化学式(I)、(I I)、(I I I)、(I V)、(IVa)、(V)、(Va)、(VI)、(VII)、(VIIa)、(VIII)または(VIIIa)のいずれかに示す構造を有するコンジュゲート(式中、Dは、医学的疾患の治療に有用な薬物である)を含む治療有効量の薬学的組成物を、治療を必要とする対象に投与するステップを含む医療方法を提供する。30

#### 【0081】

一実施形態では、本方法は、siRNAまたはASOによる遺伝子治療のためのものであり、化学式(I)、(I I)、(I I I)、(I V)、(IVa)、(V)、(Va)、(VI)、(VII)、(VIIa)または(VIII)のいずれかに示す構造を有するコンジュゲート(式中、Dは、特定の対象(患者)の疾患に関する遺伝子の発現を阻害するのに有用なsiRNA、ASOまたは治療用タンパク質である)を含む治療有効量の薬学的組成物を、治療を必要とする対象に投与するステップを含む。

#### 【0082】

本発明の別の態様では、本発明は、疾患を治療タンパク質によって医学的に治療するための方法であって、Dが、リン脂質生体膜を横断して、または血液脳関門などの生物学的障壁を通過して細胞に送達されるタンパク質である方法を含む。Dが送達される細胞は、インビトロでの細胞培養物、またはインビボでの生きている動物若しくはヒト対象のいずれかである。いくつかの実施形態では、Dが送達される細胞は、新生物細胞である。いくつかの実施形態では、新生物細胞は、腫瘍細胞である。いくつかの実施形態では、新生物細胞は、転移内の細胞である。Dが送達される細胞は、真核細胞、発癌性因子によってトランスフェクトされた真核細胞、ヒト細胞、前癌細胞である細胞、またはそれらの任意の組み合わせであり得る。Dが送達される細胞は、インビトロ、すなわち細胞培養物内、エクスピボ、またはインビボ、すなわち、生きている動物またはヒト対象の体内に存在し得る。

#### 【0083】

10

20

30

40

50

本発明のさらに別の実施形態では、Dは、置換療法として、例えば、変異した機能不全タンパク質を置換して生理学的必要性に対処するために投与されるタンパク質である。別の実施形態では、Dは、遺伝子調節に関与するタンパク質であり、とりわけ、DNAまたはRNA編集（特定の遺伝子の配列の追加、分断または変更）に関与するタンパク質を含む。一実施形態では、上記のタンパク質は、CRISPR（clustered regularly interspaced short palindromic repeat）関連タンパク質のメンバーであり得る。具体的には、上記のタンパク質は、Cas9タンパク質（CRISPR関連タンパク質9）、RNA誘導DNAスクレアーゼ酵素、またはその類似体であってもよく、またはそれらを含んでもよい、そのガイドオリゴヌクロエチド配列をコード可能である。

## 【0084】

10

本発明の一実施形態では、医学的疾患の遺伝子治療のための方法であって、化学式(I)、(II)、(III)、(IV)、(IVa)、(V)、(Va)、(VI)、(VII)、(VIIa)、(VIII)または(VIIIa)のいずれかにのコンジュゲートを含む、治療有効量の医薬組成物を、治療を必要とする対象に投与するステップを含む方法が提供される。Dは、例えばCas9などのCRISPRタンパク質であり、適切なガイドオリゴヌクレオチドと共に投与され、これにより、ガイドオリゴヌクレオチドがコードされたタンパク質の細胞内への送達が達成され、CRISPRタンパク質がそのゲノム編集活性を発揮することができる。この場合のガイドオリゴヌクレオチドは、Cas9タンパク質をDNA上の特定の遺伝子座（部位）に誘導し、その部位での二本鎖DNA切断を誘導して遺伝物質の局所的欠陥の修復を可能にするRNAまたはDNAの配列である。Cas9の場合、ガイドオリゴヌクレオチドはRNAの短いセグメントであり、その配列は標的DNA遺伝子座の配列に対して相補的である。

## 【0085】

20

したがって、本発明の実施形態によるコンジュゲート、医薬組成物、及び方法は、癌、毒性傷害、虚血性疾患、感染症、タンパク質蓄積症、外傷、免疫介在性疾患、または変性疾患から特に選択される医学的疾患の治療においてとりわけ有益であり得る。

## 【0086】

30

したがって、本発明の一実施形態は、医学的疾患を治療する方法であって、治療を必要としている対象に対して、化学式(I)、(II)、(III)、(IV)、(IVa)、(V)、(Va)、(VI)、(VII)、(VIII)または(VIIIa)のいずれかに示す構造を有し、かつDが医学的疾患の治療に有用な薬物であるコンジュゲートを含む、治療有効量の薬学的組成物を投与するステップを含む、方法である。

## 【0087】

いくつかの実施形態では、医学的疾患は癌である。本明細書で使用されるとき、「癌」という用語は、癌を引き起こす細胞の典型的な特徴、例えば、制御されていない増殖、特殊機能の喪失、不死性、有意な転移能、抗アポトーシス活性の有意な増加、急速な増殖及び増殖速度、または特定の特徴的な形態及び細胞マーカーなどを示す細胞の存在を指す。一般的に、癌細胞は腫瘍の形態であり、動物の体内に局所的に存在するか、または、例えば白血病細胞などの独立細胞として血流中を循環する。

## 【0088】

40

神経学的疾患の分野において、本発明の実施形態によるコンジュゲートは、とりわけ、アルツハイマー病、運動ニューロン病、パーキンソン病、ハンチントン病、多発性硬化症、及びクロイツフェルト・ヤコブ病などの神経変性疾患の治療に有用であり得る。

## 【0089】

感染症の分野において、本発明の実施形態によるコンジュゲートは、とりわけ、抗生素または抗ウイルス剤を細菌またはウイルス病原体に送達するのに有用であり得る。したがって、本発明のコンジュゲートは、抗感染性を有し得、そのため、例えば細菌感染症またはウイルス感染症などの感染症の治療に有用である。

## 【0090】

別の実施形態では、本発明は、リン脂質膜を横断した化合物の細胞内への送達を強化す

50

るための、本発明の化合物の使用に関する。結合された化合物及び所望の兆候に応じて、このような送達は、様々な有用な用途を有し得る。例えば、植物においては、このような送達は、とりわけ、植物の遺伝子を改良したり、様々な昆虫、細菌、菌類を根絶したりすることにより、作物の品質と量の向上を助けることができる。

#### 【0091】

このような送達はまた、細菌またはウイルス病原体への抗生物質または抗ウイルス剤の送達にも有用であり得る。したがって、本発明のコンジュゲートは、抗感染性を有し得、そのため、細菌感染症またはウイルス感染症などの感染症の治療に有用である。したがって、本発明の一実施形態は、抗ウイルス剤または抗菌剤に結合されたE、E'、またはE''部分である。このような薬物は、とりわけ、感染性因子の遺伝物質と相互作用することを目的とした遺伝子配列であり得、このため、感染性因子の遺伝物質の複製または代謝を阻害してその生存に影響を及ぼす。

#### 【0092】

本発明のコンジュゲートは、生体膜を横断した送達における該コンジュゲートの性質によって、虚血性傷害、毒性傷害、外傷性傷害、または遺伝的病因の医学的疾患などの様々な医学的疾患の治療にも有用であり得る。

#### 【0093】

実施例

#### 【0094】

本発明をさらに説明するため、及び本発明の実施形態が実際にどのように実施され得るかを示すために、以下にいくつかの例を説明する。

#### 【0095】

実施例1：D部分がオリゴヌクレオチドである、本発明の実施形態によるコンジュゲートを合成するための一般的方法

#### 【0096】

まず、疾患の原因または発症における役割に基づいて、サイレンシング（抑制）される遺伝子を選択した。次いで、当分野で既知のバイオ情報科学方法論に基づき、コンジュゲートに組み込まれるヌクレオチド配列を設計及び決定した（一般的に、R I S C 基質の場合は19～21塩基対の二本鎖RNA、ダイサー基質の場合は25～29塩基対の二本鎖RNA）。

#### 【0097】

合成は、3'から5'の方向に行った。固相合成を、保護された2'-デオキシヌクレオシド（dA、dC、dG、及びT）、リボヌクレオシド（A、C、G、U）、または化学的に修飾されたヌクレオシド、例えばLNA（ロックされた核酸）またはBNA（架橋された核酸）、から誘導されたホスホロアミダイト構築ブロックを用いて適用した。構築ブロックは、所望のsiRNAの配列によって決定された順序で、成長オリゴヌクレオチド鎖に順次結合された。

#### 【0098】

オリゴヌクレオチドの構築の後に、本発明の1以上のE部分を、オリゴヌクレオチドの構築ブロックの一部として加えた。まず、上述したように、E部分をその前駆体形態で加えた。本発明の化合物の主な利点は、E、E'、またはE''部分をオリゴヌクレオチドの5'末端、オリゴヌクレオチドの3'末端、またはオリゴヌクレオチドに沿った内部位置のいずれかに結合させるための、化学式（II）、（III）、（IV）、（IVa）、（V）、（Va）、（VI）、（VII）、（VIIa）、（VIIId）または（VIIIda）に示すような均一な結合部分を提供することである。とりわけ、そのような前駆体部分は、当分野で既知のヒドロキシルのための任意の保護基、ホスホロアミダイト、アジド、アセチレン、ジメトキシリチル[ビス(4-メトキシフェニル)フェニルメチル]（DMT）、N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）基を含み得る。鎖の組み立てが完了すると、生成物が、固体支持体から溶液中に放出され、脱保護され、集められた。次に、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）によって所望のコンジュゲートを単離する

10

20

30

40

50

ことによって、所望の共役オリゴヌクレオチドが高純度で得られた。s i R N A の場合、相補的な R N A 鎖の各々は別々に合成され、その後、2つの鎖のアニーリングを当分野で既知の標準的な条件下で行うことによって、所望の二本鎖 s i R N A が得られた。

### 【0099】

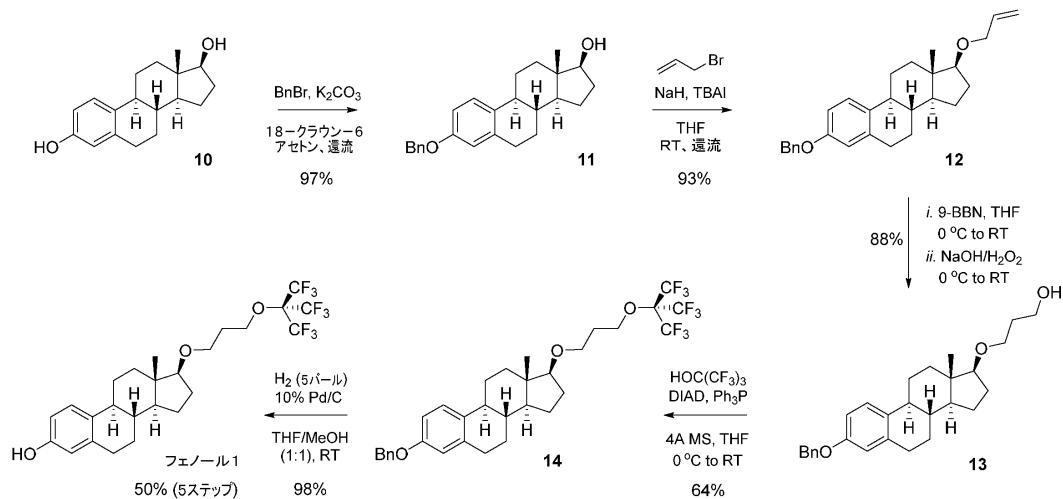
実施例 2：ステロール 1 の合成方法；本発明の E 部分の共通構築ブロック

### 【0100】

開始物質であるペルフルオロ - t e r t - プタノールは、市販されている。合成は、エストラジオールから開始し、下記のスキーム 1 に従って行った。

### 【0101】

### 【化14】



スキーム1:

### 【0102】

エストラジオールをベンジル基で保護することによって化合物 11 を得た。アルコール 11 (25.6 グラム) を、最適化された反応条件下（臭化アリル、NaH触媒）でアリル化した。臭化テトラ - n - ブチルアンモニウム (TBAI)、テトラヒドロフラン (THF) の 16 時間の還流によって、アリルエーテル 12 (21.85 g、77%) が、白色固体（ヘプタン及び MeOH 中での連続的な粉碎によって精製された）として得られた。標準的な酸化的後処理 (NaOH / H2O2) をしたときの、末端アルケン (21.8 グラム) の 9 - ボラビシクロ [3.3.1] ノナン (9-BBN) による部位選択的ヒドロホウ素化によって、アルコール 13 を得た。アルコール 13 (13.6 グラム) と過剰のペルフルオロ - t e r t - プタノールとを、最適反応条件下 [アゾジカルボン酸ジイソプロピル (DIAD)、PPh3、4A モレキュラーシーブ (MS)、THF、室温、16 時間] で光延反応させることにより、所望のエーテル 14 を得た。化合物 14 を、THF と 2、2、2 - トリフルオロエタノールとの混合物 (1:1) を溶媒 (5 バール、パール反応器) として使用して接触水素化させることによって (10% Pd/C、室温)、フェノール 1 を灰白色固体として得た (~18 時間後)。

### 【0103】

実施例 3：アポ - S i - K - 93 - A 前駆体の合成方法

### 【0104】

10

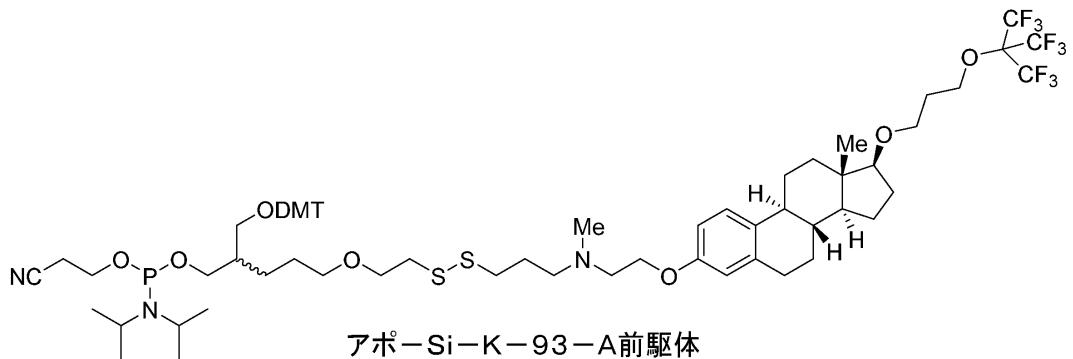
20

30

40

50

【化 1 5】



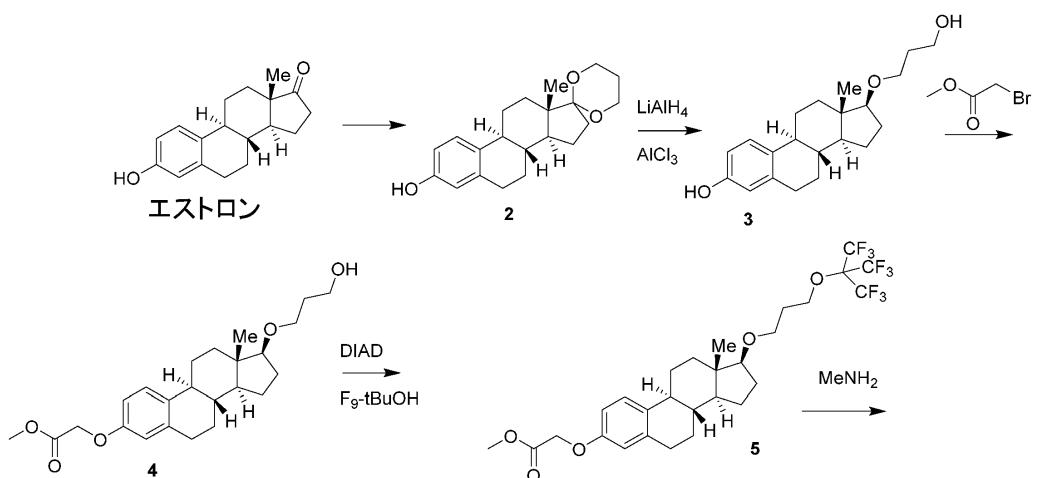
10

〔 0 1 0 5 〕

## アミン 7 の合成：

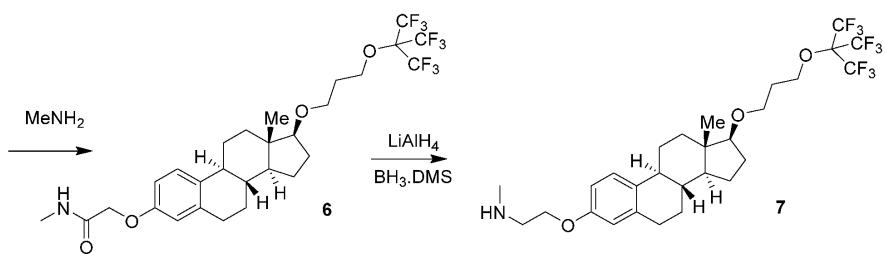
〔 0 1 0 6 〕

【化 1 6】



20

30



### スキーム1. アミン7の合成

40

【 0 1 0 7 】

エストロンをプロパンジオール及びオルトギ酸トリメチルで処理して化合物2を得た。化合物2をLiAlH<sub>4</sub>及びAlCl<sub>3</sub>で処理して開環生成物3を得た。このフェノールをプロモ酢酸メチルでアルキル化して化合物4を得た。光延条件を用いて、ペルフルオロ-tert-ブタノール部分に誘導した(化合物5)。化合物5をメチルアミンで処理してアミド6を得た。BH<sub>3</sub>·DMSを用いてアミドを還元してアミン7を得た。

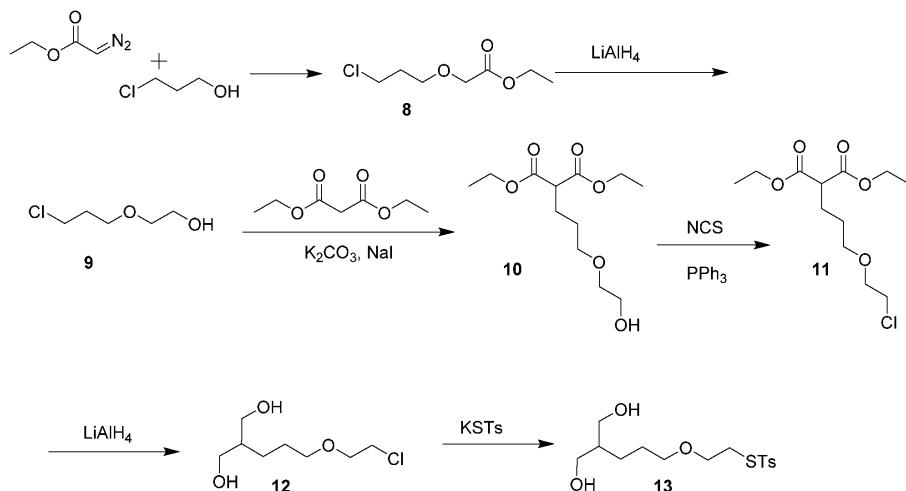
[ 0 1 0 8 ]

## チオトシラート14の合成：

[ 0 1 0 9 ]

50

## 【化17】



スキーム2. チオトシラート14の合成

## 【0110】

チオトシラート13の合成は、ジアゾ酢酸エチルと3-クロロプロパン-1-オールとの結合によって開始され、これにより、エーテル8を得た。次いで、エステルを還元してアルコール9を得た。マロン酸ジエチルを塩化物9でアルキル化して化合物10を得た。次に、このアルコールを、NCS及びPPh<sub>3</sub>を用いて塩素化して塩化物11を得た。このエステルを、LiAlH<sub>4</sub>を用いて還元してジオール12を得た。最後に、この塩化物をチオトシラートカリウムで置換して所望の構築ブロックチオトシラート13を得た。

## 【0111】

アボ-Si-K-93-Aの合成：

## 【0112】

合成は、下記の合成スキーム3に従って行った。

## 【0113】

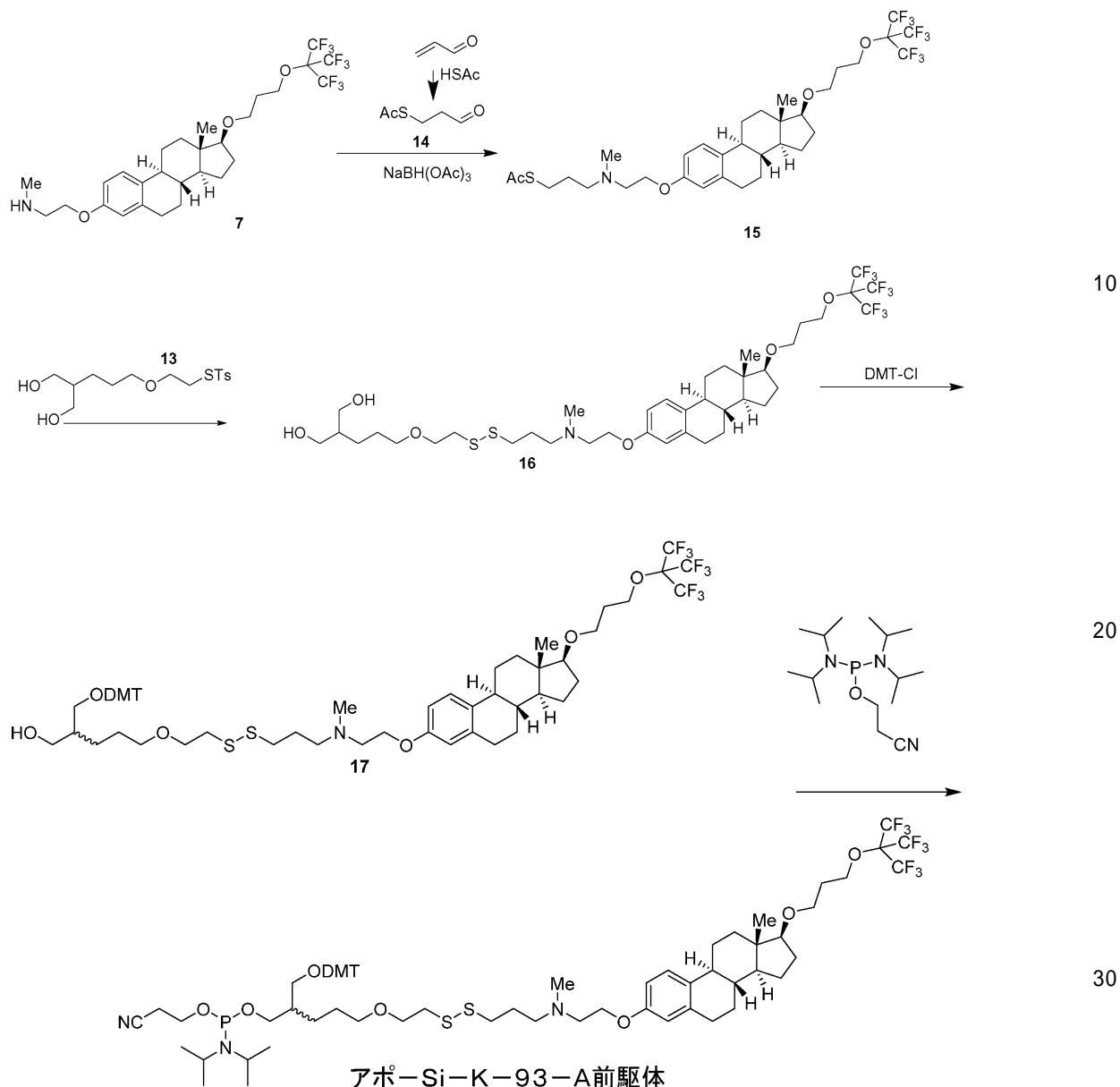
20

30

40

50

## 【化18】



スキーム3. アポー- Si-K-93-Aの合成

## 【0114】

アミン7を1-ブロモ-3-クロロプロパンでアルキル化したが、この条件では収率がかなり低いことが分かった。しかし、アクロレイン由来のチオアルデヒド14を用いて還元的アミノ化を行うと、はるかに良い収率が得られ、全合成体からチオアセテート交換の必要性が除去された。アクロレインを、塩基存在下でチオ酢酸により処理することによって、良好な転化率が得られた。所望の物質を、フラッシュクロマトグラフィーを用いて55%の収率で単離した。その後、アルデヒド14による還元アミノ化によって、化合物15を59%の収率で得た。

## 【0115】

メタノール中のナトリウムメトキシドをチオアセテート15及びチオトシラート13の溶液に添加して、チオアセテート15からアセテートを除去した。そして、その結果得られたチオールをチオトシラート13と反応させて、所望の非対称ジスルフィド(16)を形成した。化合物16をDMT-Clと反応させてモノ-保護ジオール17を得た。適切

なホスホロアミダイト剤と反応させることによって、アポ - S i - K - 9 3 - Aを得た。酸不安定ホスホロアミダイト生成物の精製は、E t 3 Nで前処理したシリカを使用するフラッシュクロマトグラフィーを用いて行った。最終的に、4 × 2 2 0 m gが得られた。

#### 【0116】

##### 実験セクション

#### 【0117】

( 8 R、9 S、13 S、14 S ) - 1 3 - メチル - 6、7、8、9、11、12、13  
、14、15、16 - デカヒドロスピロ [ シクロペンタ [ a ] フェナントレン - 1 7、2  
' - [ 1、3 ] ジオキサン ] - 3 - オール ( 2 )

#### 【0118】

トルエン ( 3 0 0 m L ) 中のエストロンの懸濁液 ( 6 7 . 9 g、0 . 2 5 1 m m o l ) に  
、1、3 - プロパンジオール ( 7 0 m L ) 及びオルトギ酸トリメチル ( 1 0 0 m L ) を加  
えた。懸濁液を p T s O H ( 1 g、5 m m o l ) で処理し、6 0 ° C に 1 6 時間加温した  
。室温に冷却後、トリエチルアミン ( 1 0 m L ) 及び水 ( 1 0 0 m L ) を加え、攪拌を 3  
0 分間続けた。相は分離され、有機相を水 ( 2 × 1 0 0 m L ) 及びブライン ( 塩水 ) で洗  
浄し、N a 2 S O 4 上で乾燥させ、濃縮した。この粗物質をトルエン ( 1 5 0 m L ) に溶  
解させ、さらにヘプタン ( 7 5 0 m L ) をゆっくり添加して希釈し、白色沈殿を形成させ  
た。この固体を濾取し、真空で乾燥させた。化合物 2 ( 7 1 . 1 g、2 1 7 m m o l )  
が、白色固体として 8 6 % の収率で単離された。

#### 【0119】

( 8 R、9 S、13 S、14 S、17 S ) - 1 7 - ( 3 - ヒドロキシプロポキシ ) - 1  
3 - メチル - 7、8、9、11、12、13、14、15、16、17 - デカヒドロ - 6  
H - シクロペンタ [ a ] フェナントレン - 3 - オール ( 3 )

#### 【0120】

0 ° C の T H F ( 1 . 5 L ) 中の化合物 2 ( 7 1 . 4 g、2 1 7 m m o l ) の溶液に、  
L i A 1 H 4 ( 1 0 g、2 6 3 m m o l ) 及び A 1 C l 3 ( 1 1 6 g、8 7 2 m m o l )  
を注意深く添加した。発熱反応物をさらに 3 0 分間 0 ° C で攪拌し、その後、この固体を  
5 0 ° C に加温しながら、機械的攪拌 ( r o t a v a p を使用 ) を 3 時間行った。この混  
合物を 0 ° C に冷却し、水性飽和塩化アンモニウム ( 1 5 0 m L ) を滴下した。この混  
合物をさらに 3 0 分間攪拌し、その後、シリカのショートパスで濾過し、固体を酢酸エチル  
で洗浄した。有機層を回収し、ブラインで洗浄し、N a 2 S O 4 上で乾燥し、濃縮した。  
この粗物質 ( 8 9 . 2 ) は主に化合物 3 であったが、精製は次の工程の後に行つた。

#### 【0121】

2 - ( ( ( 8 R、9 S、13 S、14 S、17 S ) - 1 7 - ( 3 - ヒドロキシプロポキ  
シ ) - 1 3 - メチル - 7、8、9、11、12、13、14、15、16、17 - デカヒ  
ドロ - 6 H - シクロペンタ [ a ] フェナントレン - 3 - イル ) オキシ ) 酢酸メチル ( 4 )

#### 【0122】

粗物質 3 ( 8 9 . 4 g ) をアセトン ( 1 . 2 5 L ) 及び M e O H ( 0 . 2 L ) に溶解さ  
せ、炭酸カリウム ( 6 0 g、4 3 5 m m o l ) 及びプロモ酢酸メチル ( 5 0 m L、4 3 5  
m m o l ) で処理した。懸濁液を 6 0 ° C に温め、攪拌を 1 6 時間続けた。T L C に基づ  
き、すべてのフェノール部分をアルキル化した。混合物を室温に冷却し、濾過した。濾液  
を濃縮し、フラッシュクロマトグラフィーを用いてさらに精製した ( ヘプタン中の 2 0 %  
ないし 3 0 % E t O A c での溶出により、全ての不純物、1 0 0 % E t O A c を除去して  
所望の材料を得る )。化合物 4 ( 5 6 . 7 g、1 4 0 . 3 m m o l ) が、黄色油として 6  
5 % の収率で単離された。

#### 【0123】

酢酸メチル 2 - ( ( ( 8 R、9 S、13 S、14 S、17 S ) - 1 7 - ( 3 - ( ( 1、  
1、1、3、3 - ヘキサフルオロ - 2 - ( トリフルオロメチル ) プロパン - 2 - イル  
) オキシ ) プロポキシ ) - 1 3 - メチル - 7、8、9、11、12、13、14、15、  
1 6、1 7 - デカヒドロ - 6 H - シクロペンタ [ a ] フェナントレン - 3 - イル ) オキシ

10

20

30

40

50

) ( 5 )

【 0 1 2 4 】

T H F ( 1 L ) 中の化合物 4 ( 5 6 . 7 g、 1 4 0 . 3 m m o l ) の溶液に、 トリフェニルホスフィン ( 5 5 . 4 g、 2 1 1 m m o l ) 、 ノナフルオロ - t e r t - ブチルアルコール ( 3 0 m L ) 及びジ - t e r t - ブチルアゾジカルボキシレート ( 3 8 . 5 g、 1 6 7 m m o l ) を加えた。 T L C が完全に転化したとき、 混合物を 3 0 分間攪拌した。 ヘプタン ( 5 0 0 m L ) を加え、 混合物を約 5 0 0 m L まで部分的に濃縮した。 さらに、 ヘプタン ( 1 L ) を加え、 その混合物を室温で一晩攪拌した。 沈殿が形成され、 その沈殿を濾取し、 濾液を濃縮し、 微量の D B A D 及びトリフェニルホスフィンが混入していたが、 化合物 5 を黄色シロップとして得た。

10

【 0 1 2 5 】

2 - ( ( ( 8 R 、 9 S 、 1 3 S 、 1 4 S 、 1 7 S ) - 1 7 - ( 3 - ( ( 1 、 1 、 1 、 3 、 3 、 3 - ヘキサフルオロ - 2 - ( トリフルオロメチル ) プロパン - 2 - イル ) オキシ ) プロポキシ ) - 1 3 - メチル - 7 、 8 、 9 、 1 1 、 1 2 、 1 3 、 1 4 、 1 5 、 1 6 、 1 7 - デカヒドロ - 6 H - シクロペンタ [ a ] フェナントレン - 3 - イル ) オキシ ) - N - メチルアセトアミド ( 6 )

【 0 1 2 6 】

化合物 5 の粗シロップを M e O H ( 2 5 0 m L ) で希釈し、 4 0 % 水性メチルアミン ( 3 5 0 m L ) を加えた。 T L C が完全な転化を示したとき、 白色沈殿物を 1 時間攪拌した。 水 ( 1 L ) を加え、 固形物を濾取した。 残渣を水で洗浄し、 ジクロロメタン ( 1 L ) に溶解させた。 有機層をブラインで洗浄し、 N a 2 S O 4 上で乾燥させ、 濃縮した。 さらに、 約 7 c m のシリカ及びヘプタン中の 1 5 % E t O A c での初期溶出を用いて精製を行った。 カラムからすべての不純物を除去した後、 化合物 6 を 1 0 0 % E t O A c で溶出させた。 微量のトリフェニルホスホキシドが残存していたが、 化合物 6 ( 8 2 . 0 g、 1 3 2 m m o l ) が白色固体として 9 4 % の収率で単離された。

20

【 0 1 2 7 】

2 - ( ( ( 8 R 、 9 S 、 1 3 S 、 1 4 S 、 1 7 S ) - 1 7 - ( 3 - ( ( 1 、 1 、 1 、 3 、 3 、 3 - ヘキサフルオロ - 2 - ( トリフルオロメチル ) プロパン - 2 - イル ) オキシ ) プロポキシ ) - 1 3 - メチル - 7 、 8 、 9 、 1 1 、 1 2 、 1 3 、 1 4 、 1 5 、 1 6 、 1 7 - デカヒドロ - 6 H - シクロペンタ [ a ] フェナントレン - 3 - イル ) オキシ ) - N - メチルエタン - 1 - アミン ( 7 )

30

【 0 1 2 8 】

T H F ( 5 0 0 m L ) 中の化合物 6 ( 5 6 . 0 g、 9 0 . 5 m m o l ) の 6 5 ° C の溶液に、 B H 3 . D M S ( 5 6 m L 、 5 9 0 m m o l ) を滴下した。 還流をさらに 5 時間継続し、 その後、 混合物を室温に冷却した。 混合物を M e O H ( 3 0 0 m L ) に注意深く溶解させ、 H C l ( 5 0 m L ) 中の 4 M ジオキサンを加えた。 溶液を 3 0 分間還流し、 その後、 室温に冷却し、 濃縮した。 混合物を M e O H ( 3 0 0 m L ) 中に溶解させ、 3 0 分間還流した。 冷却及び濃縮後、 シロップを C H 2 C l 2 ( 1 L ) 中に溶解させ、 水性飽和重炭酸ナトリウム ( 2 倍 ) で洗浄した。 有機層を N a 2 S O 4 上で乾燥させ、 濃縮した。 化合物 7 ( 5 0 . 0 g、 8 2 . 6 m m o l ) が、 9 1 % の収率でゆっくりと固化した透明油状物として単離された。 微量のトリフェニルホスホキシドが残存する不純物プロファイルは化合物 6 と同様であった。

40

【 0 1 2 9 】

チオトシラート 1 3 の合成 :

【 0 1 3 0 】

2 - ( 3 クロロプロポキシ ) 酢酸エチル ( 8 )

【 0 1 3 1 】

C H 2 C l 2 ( 2 5 0 m L ) 中の 3 - クロロプロパン - 1 - オール ( 2 0 m L 、 2 3 9 m m o l ) の溶液に、 ジアゾ酢酸エチル ( 2 5 m L 、 2 3 9 m m o l ) を 0 ° C で添加した。 その後、 B F 3 . O E t 2 ( 0 . 3 m L 、 2 . 3 9 m m o l 、 0 . 0 1 当量 ) を加え

50

た後、氷浴を除去し、混合物を 37 °C に温め、ガスの発生が止まるまで（2時間）その温度で攪拌した。混合物を H<sub>2</sub>O (250 mL) 及びブライン (250 mL) で洗浄し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 上で乾燥させ、濃縮し、エーテル 8 (44 g, 240 mmol, quant.) を黄色油状物として得た。

## 【0132】

2 - (3クロロプロポキシ)エタン-1-オール (9)

## 【0133】

Et<sub>2</sub>O (750 mL) 中の LiAlH<sub>4</sub> (12 g, 316 mmol) の氷冷懸濁液に、エステル 8 (57 g, 316 mmol) の溶液をゆっくり添加し、その結果得られた混合物を室温で一晩攪拌した。KOH (aq. 20% 51 mL) を 0 °C でゆっくり添加することによって反応をクエンチした。混合物を室温で 30 分間攪拌した後、セライト上で濾過した。濾液を Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 上で乾燥させ、濃縮し、アルコール 9 (33 g, 240 mmol, 76%) を透明油状物として得た。

10

## 【0134】

2 - (3 - (2 - ヒドロキシエトキシ)プロピル)マロン酸ジエチル (10)

## 【0135】

DMF (500 mL) 中のマロン酸ジエチル (25 mL, 166 mmol) 及びアルコール 9 (23 g, 166 mL) の溶液に、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (34 g, 249 mmol) 及び NaI (25 g, 166 mmol) を加え、その結果得られた混合物を 90 °C で 64 時間攪拌した。H<sub>2</sub>O (1.5 L) を加え、EtOAc (3 × 500 mL) によって混合物を抽出した。組み合わせた有機層をブラインで洗浄し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 上に乾燥させ、濃縮した。この粗物質をカラムクロマトグラフィー (EtOAc : ヘプタンが 1 : 1) を用いて精製し、生成物 10 (17 g, 65 mmol, 39%) を透明な黄色がかかった油として得た。

20

## 【0136】

2 - (3 - (2クロロエトキシ)プロピル)マロン酸ジエチル (11)

## 【0137】

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (500 mL) 中のアルコール 10 (17 g, 65 mmol) の溶液に PPh<sub>3</sub> (26 g, 98 mmol) 及び N - クロロコハク酸イミド (11 g, 78 mmol) を加え、その結果得られた混合物を室温で一晩攪拌した。ヘプタン (300 mL) を添加し、混合物を部分的に濃縮した。形成された固体を濾取し、濾液を濃縮した。この粗物質をカラムクロマトグラフィー (ヘプタン中の 20% EtOAc) を用いて精製し、塩化物 11 (14 g, 49 mmol, 75%) を透明油状物として得た。

30

## 【0138】

2 - (3 - (2クロロエトキシ)プロピル)プロパン-1、3 - ジオール (12)

## 【0139】

Et<sub>2</sub>O (500 mL) 中の LiAlH<sub>4</sub> (7.3 g, 192 mmol) の氷冷懸濁液に、ジエチルエステル 11 (27 g, 96 mmol) の溶液をゆっくり添加し、その結果得られた混合物を室温で一晩攪拌した。KOH (aq. 20% 31 mL) を 0 °C でゆっくり添加することによって反応をクエンチした。混合物を室温で 30 分間攪拌した後、セライト上で濾過した。濾液を Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 上で乾燥させ、濃縮し、ジオール 12 (14 g, 73 mmol, 76%) を透明油状物として得た。

40

## 【0140】

S - (2 - ((5 - ヒドロキシ - 4 - (ヒドロキシメチル)ペンチル)オキシ)エチル)4 - メチルベンゼン - スルホンチオエート (13)

## 【0141】

ジオール 12 (14 g, 73 mmol) の溶液に、チオトリル酸カリウム (25 g, 110 mmol) 及び TBAI (2.7 g, 7.3 mmol) を加え、その結果得られた混合物を 80 °C で 64 時間攪拌した。混合物を濃縮し、この粗物質をカラムクロマトグラフィー (ヘプタン中に 40% アセトン) を用いて精製し、チオトリル酸カリウム (5.0 g) を得た。

50

、 $14\text{ mmol}$ 、20%を黄色油状物として得た。

**【0142】**

アポ-Si-K-93-Aの合成

**【0143】**

S-(3-オキソプロピル)エタンチオエート(14)

**【0144】**

アクロレイン( $11\text{ g}$ 、 $196\text{ mmol}$ )のジクロロメタン( $250\text{ mL}$ )溶液に、トリエチルアミン( $6.9\text{ mL}$ 、 $49\text{ mmol}$ )及びチオ酢酸( $13.8\text{ mL}$ 、 $195\text{ mmol}$ )を加えた。混合物を室温で一晩攪拌し、その後、濃縮した。フラッシュクロマトグラフィー(ヘプタン中に15%EtOAc)を用いてさらに精製することによって、化合物14( $14.4\text{ g}$ 、 $109\text{ mmol}$ )を褐色油状物として55%の収率で得た。  
10

**【0145】**

S-(6-(((2-(((8R,9S,13S,14S,17S)-17-((1,1,1,3,3-ヘキサフルオロ-2-(トリフルオロメチル)プロパン-2-イル)オキシ)プロポキシ)-13-メチル-7、8、9、11、12、13、14、15、16、17-デカヒドロ-6H-シクロペンタ[a]フェナントレン-3-イル)オキシ)エチル)(メチル)アミノ)ヘキシリ)エタンチオエート(15)

**【0146】**

1、2-ジクロロエタン( $500\text{ mL}$ )中の7( $20.6\text{ g}$ 、 $34\text{ mmol}$ )溶液に、酢酸( $8.2\text{ mL}$ 、 $136\text{ mmol}$ )及びアルデヒド14( $5.4\text{ g}$ 、 $41\text{ mmol}$ )を添加し、その1分後にトリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム( $30\text{ g}$ 、 $141\text{ mmol}$ )を添加した。混合物を室温で2時間攪拌し、その後ジクロロメタンを加え、混合物を $1\text{ M NaOH}$ 、水及びブラインで洗浄した。有機層を $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 上で乾燥させ、濃縮した。フラッシュクロマトグラフィー(ヘプタン中に15%~25%勾配のアセトン、及び0.1%Et<sub>3</sub>N)を用いてさらに精製することによって、化合物15( $14.4\text{ g}$ 、 $20\text{ mmol}$ )が透明油状物として59%の収率で単離された。  
20

**【0147】**

2-((3-((2-((3-((2-(((8R,9S,13S,14S,17S)-17-((1,1,1,3,3-ヘキサフルオロ-2-(トリフルオロメチル)プロパン-2-イル)オキシ)プロポキシ)-13-メチル-7、8、9、11、12、13、14、15、16、17-デカヒドロ-6H-シクロペンタ[a]フェナントレン-3-イル)オキシ)エチル)(メチル)アミノ)プロピル)ジスルファネイル)エトキシ)プロピル)プロパン-1、3-ジオール(16)  
30

**【0148】**

$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ( $200\text{ mL}$ )及びメタノール( $20\text{ mL}$ )中のチオアセテート15( $1.9\text{ g}$ 、 $2.6\text{ mmol}$ )及びチオトシラート13( $1.8\text{ g}$ 、 $5.1\text{ mmol}$ 、2当量)の溶液を、 $\text{MeOH}$ ( $1.42\text{ mL}$ 、 $7.7\text{ mmol}$ 、3当量)中の $5.4\text{ M NaOMe}$ で処理した。混合物を室温で一晩攪拌した。混合物を $\text{NaHCO}_3$ ( $200\text{ mL}$ )及びブライン( $200\text{ mL}$ )で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濃縮した。フラッシュクロマトグラフィー(ヘプタン中に30%アセトン+1%Et<sub>3</sub>N)を用いてさらに精製することによって、化合物16( $1.2\text{ g}$ 、 $1.4\text{ mmol}$ 、53%)を黄色がかった油状物として得た。  
40

**【0149】**

2-((ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)メチル)-5-((2-((3-((2-(((8R,9S,13S,14S,17S)-17-((1,1,1,3,3-ヘキサフルオロ-2-(トリフルオロメチル)プロパン-2-イル)オキシ)プロポキシ)-13-メチル-7、8、9、11、12、13、14、15、16、17-デカヒドロ-6H-シクロペンタ[a]フェナントレン-3-イル)オキシ)エチル)(メチル)アミノ)プロピル)ジスルファネイル)エトキシ)ペンタン-1-オール(17)  
50

## 【0150】

16(1.2g、1.4mmol)の溶液に、Et<sub>3</sub>N(0.14mL、1.4mmol、1当量)及びDMAP(16mg、0.14mmol、0.1当量)を添加した。その結果得られた混合物にDMT-C1(0.47g、1.4mmol、1当量)を添加した。その結果得られた黄色混合物を室温で一晩攪拌し、その後、濃縮した。カラムクロマトグラフィー(ヘプタン中に20%アセトン及び1%Et<sub>3</sub>N)による精製によって、モノ保護アルコール17(1.0g、0.87mmol、63%)を透明の黄色がかった油状物として得た。

## 【0151】

2-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)メチル)-5-(2-((3-((2-(((8R,9S,13S,14S,17S)-17-(3-((1,1,3,3,3ヘキサフルオロ-2-(トリフルオロメチル)プロパン-2-イル)オキシ)プロポキシ)-13-メチル-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-デカヒドロ-6H-シクロヘンタ[а]フェナントレン-3-イル)オキシ)エチル)(メチル)アミノ)プロピル)ジスルファネイル)エトキシ)ペンチル(2-シアノエチル)ジイソプロピルホスホロアミダイト(アポSi-K-93-A)。

10

## 【0152】

ジクロロメタン(40mL)中のモノ保護ジオール17(1.0g、0.87mmol)溶液に、2-シアノエチルN、N、N'、N'-テトライソプロピルホスホジアミダイト(0.4mL、1.25mmol、1.3当量)、並びに、ジクロロメタン(2.5mL、ホスホロアミダイト剤に対してN-メチルモルホリンの1当量)中の0.5MのN-メチルモルホリン溶液及び0.25Mトリフルオロ酢酸を加えた。黄色がかった溶液を室温で2時間攪拌した。TLCは不完全な転化を示したので、さらに、0.2mLの2-シアノエチルN、N、N'、N'-テトライソプロピルホスホジアミダイトを加えた。1時間後、混合物を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液でクエンチし、さらに10分間攪拌した。有機層を分離し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濃縮した。フラッシュクロマトグラフィー(ヘプタン中に15%アセトン及び1%Et<sub>3</sub>N)を用いてさらに精製することにより、化合物アポ-Si-K-93-A(880mg、0.64mmol、74%)を無色油状物として得た。

20

## 【0153】

30

実施例4：オリゴヌクレオチド鎖内の内部位置での本発明のE部分の結合モード

## 【0154】

まず、E部分は、その前駆体形態にあり、その2つのヒドロキシル基は、ジメトキシリチル[ビス(4-メトキシフェニル)フェニルメチル](DMT)及びホスホロアミダイトの各々によって保護されている。通常、オリゴヌクレオチドの合成は、保護されたヌクレオチドの3'から5'方向への連続的な付加によって行われる。ホスホロアミダイトは、オリゴヌクレオチド鎖の5'末端のヒドロキシル基との結合に用いられる。その後、DMTが除去され、各ヒドロキシル基は、鎖に取り込まれる次のヌクレオチドの3'-ヒドロキシルに結合されたホスホロアミダイト部分に結合される。siRNAのセンス鎖(パッセンジャー鎖)及びガイド鎖(アンチセンス鎖)の両方の合成の完了後、当分野で既知のように、アニーリング手順が行われ、これにより、本発明の最終的なRNA二本鎖コンジュゲートが得られる。siRNAの性能を最適化するために、内部位置のE部分はセンス鎖(パッセンジャー鎖)に結合される。これは、センス鎖(パッセンジャー鎖)がRISC複合体内で除去され、これにより、ガイド鎖(アンチセンス鎖)がRISC遺伝子サイレンシング装置において間断なく作用することが可能になるためである。

40

## 【0155】

実施例5：カーゴ薬物(例えばsiRNA)を放出するための、細胞質内のE部分の酸化還元媒介の脱離及び除去

## 【0156】

本発明のE、E'またはE''部分は、siRNAコンジュゲートの経膜送達に必須で

50

あるが、これらの部分は、コンジュゲートが細胞質に到達した後に除去し、体内から排出することが望ましい。カーゴ薬物が si RNA である場合は、si RNA と遺伝子サイレンシングタンパク質複合体（ダイサー及び RISC ）との相互作用における立体干渉の回避に有益であり得る。加えて、このようなカーゴ薬物の E 部分からの脱離は、細胞リン脂質膜上のコンジュゲートの負荷を最小化するので、安全性の観点から有利であり得る。この目的のために、本発明の全ての E 部分はジスルフィド部分を含む。細胞外環境で主流であるような酸化的条件下では、ジスルフィド部分は安定性を示す。そのため、コンジュゲートをインピボで全身投与すると、コンジュゲートが体内に広がって、細胞リン脂質膜を通過して細胞内に入ることを可能にする。対照的に、細胞質は、主にグルタチオンの高濃度に起因する高度に還元的な環境であり、約 4 衍の大きさの細胞質 / 細胞外空間濃度勾配を示す。細胞質内のこのような顕著な還元条件に起因して、E 部分のジスルフィド基は細胞質環境で還元される。その結果、カーゴ薬物（例えば si RNA ）が放出され、その薬理活性を細胞質の標的部位（例えば、遺伝子サイレンシングのためのダイサーまたは RISC タンパク質複合体）で発揮する。同時に、ステロール骨格を有する本発明の E 部分は、他のステロール系分子（例えばエストロゲン）と同様に、直接にまたは代謝後（例えば、肝臓におけるシトクロム P - 450 媒介代謝）に、胆汁及び / または尿によって体内から排泄される。

#### 【 0157 】

実施例 6：化学式（ IVa ）に示す構造を各々有する 3 つの E 部分を含む本発明の si RNA コンジュゲートの例示的構造及びその作用モード

#### 【 0158 】

コンジュゲートは、図 2 A 、 2 B 、 2 C 及び 2 D に示されている。最初、コンジュゲートは酸化状態にあり、したがって、ジスルフィド部分を含む。例示されているのはダイサー基質であり、 RNA 鎮は 25 及び 27 ヌクレオチドの長さを有する。長い方の鎮（ガイド鎖、アンチセンス鎖）は、その 3' 末端に、酵素との結合に必要な 2 ヌクレオチドのオーバーハングを有する。加えて、センス鎖（パッセンジャー鎖）は、正に荷電したアミノ酸によって覆われた酵素の各結合ポケットを占めるために、その 5' 末端に遊離リン酸を有する。E 部分のうちの 2 つはパッセンジャー鎖に結合される。第 1 の E 部分はパッセンジャー鎖の 5' 末端に結合され、第 2 の E 部分はパッセンジャー鎖のほぼ中央に結合される。そして、第 3 の E 部分は、ガイド鎖の 5' 末端に結合される。初めは、コンジュゲートは細胞外空間に特徴的な酸化状態にあり、このため、E 部分のジスルフィド基は保存される。細胞質に入ると、周囲の還元状態に起因してジスルフィド結合は還元され、E 部分は RNA から切断されて体内から排泄され、それぞれが小さな残基断端（図 2 B ）を残す。次いで、ダイサー酵素により RNA 二本鎖が切断され、 21 / 23 のヌクレオチド長さの二本鎖が形成され、これにより、ガイド鎖の断端も除去される（図 2 C ）。次に、 RNA 二本鎖は、細胞質 RNA 誘導サイレンシングタンパク質複合体（ RISC ）に入る準備ができている。まず、酵素ヘリカーゼを作用させて、パッセンジャー鎖の除去を行う。これには、パッセンジャー鎖に結合している 2 つの残基断端も含まれる。その結果（図 2 D ）、ガイド鎖は無傷で RISC 複合体に送達され、標的タンパク質をコードする mRNA と相互作用してその分解を引き起こし、これにより、所望の遺伝子サイレンシングを誘導する。

#### 【 0159 】

実施例 7：アポ - Si - K - 93 - A の生物学的性能

#### 【 0160 】

アポ - Si - K - 93 - A の生物学的性能を以下の側面で評価した。これらは全て、臨床現場においてインピボでの、この E 部分を含むコンジュゲートの用途を予測するのに重要である。これらの実験のために、ダイサー基質であり、 EGFP 遺伝子をサイレンシングするようにそれぞれ設計された 2 つの si RNA 二本鎖を使用した。第 1 の二本鎖では、アポ - Si - K - 93 - A 部分は、各 RNA 鎮の 5' 末端に結合されている（この第 1 の二本鎖は K - 93 - A と命名した）。第 2 の二本鎖では、アポ - Si - K - 93 - A 部

分は、各RNA鎖の5' - 末端に結合されているが、第3のアポ - Si - K - 93 - A部分は、パッセンジャー（ガイド）鎖に沿った内部位置の14番目のヌクレオチドの部位に結合している。したがって、この第2の二本鎖はK - 93 - A - d e l - 14と命名した。これらの各構築物のヌクレオチド配列は下記の通りである（rはリボースを意味し、mはメチル化を意味する）。

#### 【0161】

1. K - 93 - A 構築物：

センス：5' - phos / iアポ - Si - K 93 - A / mAmCrCmCrUmGrA  
rArGrUrUmCrAmUrCmUrGmCrArCrCrArCmCGrUrCrA  
アンチセンス：5' - phos / iアポ - Si K - 93 - A / rCrGmGrUrGr  
GrUrGmCrAmGrAmUrGrArArCrUrGmGrGmUmCmA

#### 【0162】

2. K - 93 - A - d e l - 14 構築物：

センス：5' phos / iアポ - Si - K - 93 - A / mAmCrCmCrUmGrA  
rArGrUrUmCrA / iアポ - Si K 93 - A / rCmUrGmCrArCrCr  
ArCmCG

アンチセンス：5' phos / iアポ - Si - K - 93 - A / rCrGmGrUrGr  
GrUrGmCrAmGrAmUrGrArArCrUrCrArGmGrGmUm  
CmA

#### 【0163】

次いで、両方のコンジュゲートを以下の評価に供した。

#### 【0164】

1. アルブミンとのインキュベート時のタンパク質非含有画分：

#### 【0165】

血液への投与時に実施するために、薬物が、血液タンパク質に結合する画分と、細胞外空間を自由に通過して細胞内へ移動する自由画分との両方を有することが有益である。アポ - Si - K - 93 - Aについてこの側面を調べるために、ゲル電気泳動を用いた。20 pmoleのRNA試料をTris緩衝液（pH = 7.4）で希釈し、ウシ血清アルブミン（BSA）を加えて2mg/mlの最終濃度にした。全試料を25℃で一晩インキュベートした。その後、これらのRNA試料を12%天然ポリアクリルアミドゲル上にロードし、電場上で5V/cm（バイオラッドミニプロテアン）で1時間移動させた。対照サンプルには、BSAではなく水で希釈したRNAサンプルと、アルブミンのタンパク質分解によってタンパク質結合コンジュゲートを放出することを目的としてプロテイナーゼK（シグマ）で37°Cで2時間処理した反応混合物とが含まれる。アルブミンに強力に結合するアポ - Siコンジュゲートであるアポ - Si - S1を陽性対照として用いた。

#### 【0166】

2. 還元型グルタチオンとのインキュベート時のアポ - Si - K - 93 のジスルフィド部分の切断：

#### 【0167】

アポ - Si - K - 93 - Aのデザインの特質の1つは、細胞質内で主流の還元条件下で選択的に切断され、細胞質遺伝子サイレンシング複合体（ダイサー及びRISC）と相互作用するカーゴ遺伝薬物を放出することを目的として、アポ - Si - K - 93 - A部分内にジスルフィド基を取り込むことである。アポ - Si - K - 93 - Aのこの特徴を実証するために、20pmoleのRNA試料を1mMのグルタチオン（シグマ）を補充した30mMのTris緩衝液（pH = 7.4）で希釈した。全ての試料を37°Cで2時間インキュベートした。対照試料は水で希釈した。その後、RNA試料を12%天然ポリアクリルアミドゲル上にロードし、電場上で5V/cm（バイオラッドミニプロテアン）で1時間移動させた。

#### 【0168】

3. インビトロでの細胞への導入及び遺伝子サイレンシング：

10

20

30

40

50

## 【0169】

セルバイオラボ社 (Cell Biolabs) から入手した HeLa - E G F P 細胞株を、10% FBS (ギブコ)、100 U / ml ペニシリン 100 mg / ml ストレプトマイシン (バイオロジカルインダストリーズ、イスラエル) 及びプラスチシジン 10 µg / ml が補充されたダルベッコ改变イーグル培地 (ギブコ) 中で培養した。細胞は、5% の CO<sub>2</sub> 加湿空気を含む 37° のインキュベーター中で維持した。トランスフェクションの前日に、細胞を、抗生物質が補充されていない完全培地を使用して 24 ウェルの黒色プレートのガラス底部にブレーティングした (4 万細胞 / ウェル)。翌日、細胞を、MNM コンジュゲートに暴露させた。MNM コンジュゲートは、10% BSA と 72 時間インキュベートした 600 nM のコンジュゲート、または、無血清条件下で 24 時間インキュベートした後に完全血清を添加してさらに 24 時間インキュベートした、10、40 若しくは 150 nM のコンジュゲートのいずれかである。トランスフェクションの 72 時間後に、タンパク質のダウンレギュレーションを測定した。この目的のために、培地を吸引し、細胞を HBS で洗浄した。無限 M200 - PRO マルチモードリーダー (テカン) を用いて、励起波長 488 nm、発光波長 535 nm で、E G F P 蛍光強度を定量した。

10

## 【0170】

結果：

## 【0171】

図 3 は、BSA とインキュベートしたときのタンパク質フリー画分を示す。これは、アポ - Si - S1 とは対照的に、BSA、K - 93 - A、及び K - 93 - A - del - 14 と完全に相互作用し、BSA とはわずかな相互作用しか示さず、興味深いことに、K - 93 - A - del - 14 (アポ 93 - del - 14) において、追加的な K - 93 - A 部分の存在によって有意に除去されない主要な遊離画分が明らかになった (矢印)。プロテイナーゼ K (PK) の処理は全てのタンパク質結合アポ - Si - S1 をリカバーし、また、K - 93 - A コンジュゲート及び K - 93 - A - del - 14 コンジュゲートの両方において BSA に結合した K - 93 - A の小画分を放出した。

20

## 【0172】

図 4 は、K - 93 - A コンジュゲート及び K - 93 - A - del - 14 コンジュゲートの両方を還元グルタチオンでインキュベートすると (1 mM で 2 時間)、K - 93 - A コンジュゲート及び K - 93 - A - del - 14 コンジュゲートの両方がロバストに切断されることを示す (矢印)。重要なことに、第 3 の E 部分の結合は、還元反応を減速させなかった。反応は、還元剤 (1 mM、2 時間) への比較的穏やかな曝露条件で行った。これらの陽性結果は、遺伝子サイレンシングに対する観察された効果と一致した。同一の E G F P siRNA 配列に結合した K - 93 - A 及び K - 93 - A - del - 14 は、無血清条件及び血清添加条件の両方で、用量依存的に E G F P 発現の顕著なノックダウンを誘導した。血清 (10% BSA) では、600 nM の K - 93 - A は、E G F P 遺伝子の 24.1 ± 5.0% のダウンレギュレーションを誘導したが、内部の第 3 の E 部分の追加は、観察された遺伝子サイレンシングの 50.3% ± 5.0% への顕著な強化に関連した。有効な遺伝子サイレンシングは、無血清条件下でも観察され、K - 93 - A によって、10 nM、40 nM、及び 150 nM のコンジュゲートとインキュベートした場合、それぞれ、63.5%、79.3%、及び 86.3% の遺伝子サイレンシングが誘導された。K - 93 - A - del - 14 は、10 nM、40 nM 及び 150 nM で処理した場合に、それぞれ、50.3%、76.6% 及び 84.7% の遺伝子サイレンシングが誘導された。

30

## 【0173】

結論：

## 【0174】

インビトロで HeLa 細胞によって評価したように、アポ - Si - K - 93 - A は好ましい性能プロファイルを示し、これは、生体膜を横断しての細胞内への siRNA の送達ツールとしての継続的開発に値する。この E 部分は、アルブミンとインキュベートした場合に、大きな遊離画分、生きている細胞の細胞質内の生理学的レベルに相当するグルタチ

40

50

オンレベルでのジスルフィド部分の強力な還元及び切断を示し、血漿タンパク質の存在下及び非存在下で効果的な遺伝子サイレンシングを達成する。重要なことに、アポ - S i - K - 9 3 - A は、遺伝子サイレンシングの望ましい誘導において、2つの部分の結合よりも明らかに優れていることが見出された3つの部分の結合によって反映されるように、その活性において協働性を示した。

## 【0175】

実施例8：アポ - S i - K - 6 3 - A の生物学的性能

## 【0176】

E G F P 遺伝子をサイレンシングするように設計された2つのs i R N A二本鎖（各々、ダイサー基質である）を使用した。第1の二本鎖では、アポ - S i - K - 6 3 - A部分が、各R N A鎖の5'末端に結合されている。この第1の二本鎖は、K - 6 3 - Aと命名した。第2の二本鎖では、アポ - S i - K - 6 3 - A部分が、各R N A鎖の5' - 末端に結合されているが、第3のアポ - S i - K - 6 3 - A部分は、パッセンジャー（ガイド）鎖に沿った内部位置の14番目のヌクレオチドの部位に結合されている。したがって、この第2の二本鎖は、K - 6 3 - A - d e l - 1 4と命名した。これらの各構築物のヌクレオチド配列は下記の通りである。

10

## 【0177】

1 . K - 6 3 - A 構築物：

センス：5' - p h o s / i アポ - S i - K 6 3 - A / m A m C r C m C r U m G r A  
r A r G r U r U m C r A m U r C m U r G m C r A r C r C r A r C m C G r U r C r A  
アンチセンス：5' - p h o s / i アポ - S i K - 6 3 - A / r C r G m G r U r G r  
G r U r G m C r A m G r A m U r G r A r A r C r U r G m G r G m U m C m A

20

## 【0178】

2 . K - 6 3 - A - d e l - 1 4 構築物：

センス：/ 5 p h o s / i アポ - S i - K - 6 3 - A / m A m C r C m C r U m G r A  
r A r G r U r U m C r A / i アポ - S i K 6 3 - A / r C m U r G m C r A r C r A r  
C m C G

アンチセンス：/ 5 p h o s / i アポ - S i - K - 6 3 - A / r C r G m G r U r G r  
U r G m C r m C r A m G r A m U r G r A r A r C r U r U r C r A r G m G r G m U  
m C m A

30

## 【0179】

試験目的：

## 【0180】

E G F P 遺伝子の発現のサイレンシングにおける両構築物の性能の評価：

## 【0181】

方法：

## 【0182】

H e L a - G F P 細胞株は、セルバイオラボ社（Cell Biolabs）から入手した。この細胞を、10% F B S（ギブコ）、100 U / m l ペニシリソ 100 mg / m l ストレプトマイシン（バイオロジカルインダストリーズ）及びプラスチシジン 10 μ g / m l が補充されたダルベッコ変形イーグル培地（ギブコ）中で培養した。細胞は、5%のC O<sub>2</sub>加湿空気と37°のインキュベーター中で維持した。トランスフェクションの前日に、細胞を、24ウェルの黒色プレートのガラス底部にプレーティングした（4万細胞/ウェル）。翌日、細胞を、10%血清存在下で、K - 6 3 - AまたはK - 6 3 - A - d e l - 1 4に曝露させた。無血清トランスフェクションのために、培地を吸引し、細胞をハンクス平衡塩溶液（H B S S）で洗浄し、次いで、培地を無血清O p t i - M E M（サーモフィッシュ・サイエンティフィック）と24時間交換し、その後、血清を添加してさらに48時間インキュベートした。トランスフェクションの72時間後に、タンパク質発現のダウンリギュレーションを測定した。この目的のために、培地を吸引し、細胞をH B S Sで洗浄した。無限M 2 0 0 - P r o マルチモードリーダー（テカン）を用いて、励起波長488 n

40

50

m、発光波長535nmで、EGFP蛍光強度を定量した。

【0183】

結果：

【0184】

2つのE部分を有するK-63-A、及び3つのE部分を有するK-63-A-del-14は、RGFPの発現の有効なノックダウンを誘導した。

【0185】

血清存在下で、600nMのK-63-Aは、EGFP発現を77.6%±1.3(平均±SD)減少させた。強力な効果がK-63-A-del-14で観察され、600nMはEGFP発現を60.2%±1.0減少させた。

10

【0186】

無血清条件下では、本発明のコンジュゲートによって、強力なGFPノックダウンが誘導された。K-63-Aは、細胞を10nM、40nM及び150nMにそれぞれ曝露した場合、EGFP発現をそれぞれ75.6%±2.6%、44.1%±0.05%及び23.7%±0.62%減少させた。K-63-A-del-14は、細胞を10nM、40nM及び150nMにそれぞれ曝露した場合、GFP発現をそれぞれ83.2%±4.0%、51.4%±0.07%及び18.9%±1.3%減少させた。

【0187】

結論：

【0188】

K-63-Aは、リン脂質膜を通過させて高分子siRNAを送達するための強力な部分である。追加的なK-63-A部分の付加は、経膜送達プロセスにおける協働性及び相乗性を示す。

20

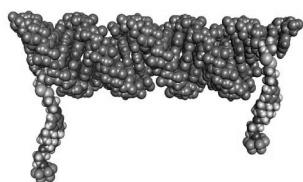
30

40

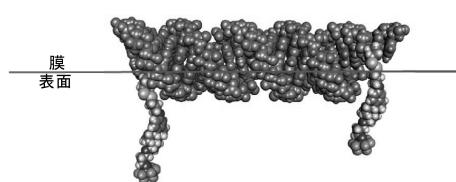
50

【図面】

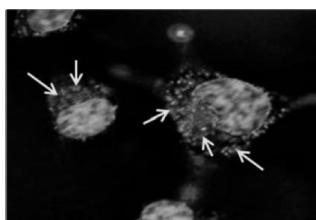
【図 1 A】



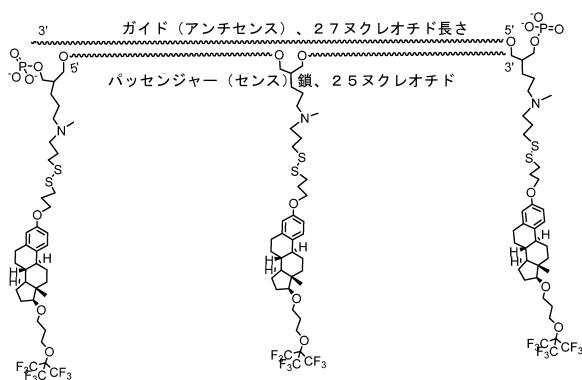
【図 1 B】



【図 1 C】

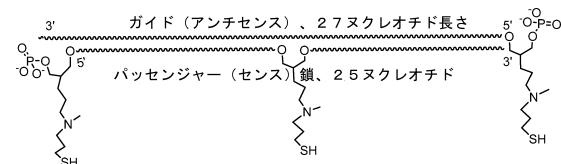


【図 2 A】

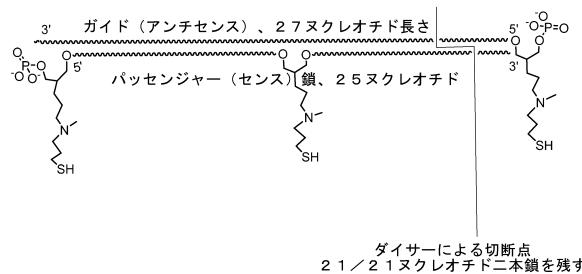


10

【図 2 B】



【図 2 C】



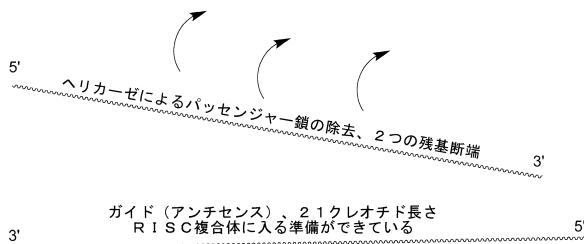
20

30

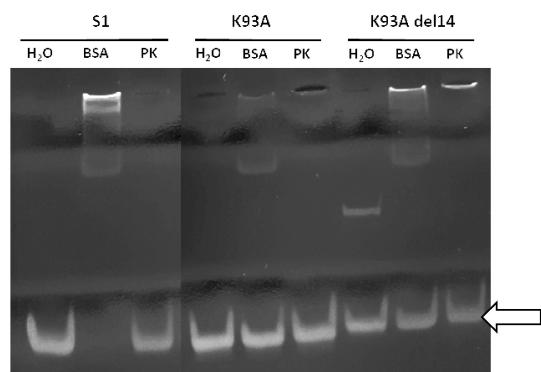
40

50

【図 2 D】

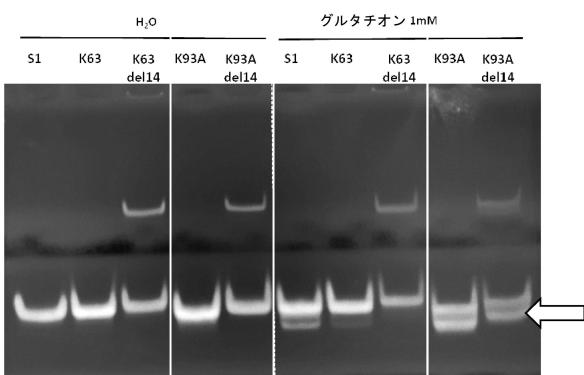


【図 3】



10

【図 4】



20

30

40

50

---

フロントページの続き

## (51)国際特許分類

A 6 1 K    38/02 (2006.01)	F I	A 6 1 K    38/02
A 6 1 K    31/7088(2006.01)		A 6 1 K    31/7088
A 6 1 K    31/713(2006.01)		A 6 1 K    31/713
A 6 1 P    9/00 (2006.01)		A 6 1 P    9/00

イスラエル国ヘルツリーヤ 4 6 3 6 7 2 2 · デイビッド シモニ ストリート 2 2

審査官 辰己 雅夫

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 6 / 0 1 0 6 8 5 5 ( U S , A 1 )

(58)調査した分野 (Int.Cl. , DB名)

A 6 1 K 9 / 0 0 - 9 / 7 2  
A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 6 9  
C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T  
N )