

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-503394

(P2016-503394A)

(43) 公表日 平成28年2月4日 (2016. 2. 4)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 B O 2 4
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02 Z N A	4 C O 7 6
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 4
A 6 1 K 9/127 (2006.01)	A 6 1 K 9/127	4 C O 8 6
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 99 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-538468 (P2015-538468)	(71) 出願人	512269834
(86) (22) 出願日	平成25年10月25日 (2013.10.25)		エヌライフ、セラピューティックス、ソシ
(85) 翻訳文提出日	平成27年6月26日 (2015.6.26)		エダッド、リミターダ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/072411		N L I F E T H E R A P E U T I C S ,
(87) 国際公開番号	W02014/064258		S . L .
(87) 国際公開日	平成26年5月1日 (2014.5.1)		スペイン国グラナダ、アルミージャ、パル
(31) 優先権主張番号	12382413.8		ケ、テクノロジー、デ、ラ、サルー、アベ
(32) 優先日	平成24年10月26日 (2012.10.26)		ニダ、デ、ラ、インノバシオン、ヌメロ、
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		1、ナベ、5、エディフィシオ、ペイセ
(31) 優先権主張番号	61/719,297	(74) 代理人	100117787
(32) 優先日	平成24年10月26日 (2012.10.26)		弁理士 勝沼 宏仁
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100091487
			弁理士 中村 行孝
		(74) 代理人	100120617
			弁理士 浅野 真理
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 細胞型へのオリゴヌクレオチド分子の選択的送達のための組成物および方法

(57) 【要約】

本発明は、(i) 標的核酸配列と相補的であり、その発現が前記標的核酸の発現を抑制または低減する核酸と、(i i) 受容体と高い親和性で結合することができる選択性薬剤であって、前記選択性薬剤の結合に応答して前記受容体が細胞によって内部移行され得る、選択性薬剤とを含んでなるコンジュゲートを提供する。本発明のコンジュゲートは、対象とする細胞への核酸の送達に、従って、前記標的核酸によりコードされるタンパク質のダウンレギュレーションを必要とする疾患の治療のための送達に、ならびに診断目的での前記細胞への造影剤の送達に有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

i) 受容体に特異的に結合する選択性薬剤であって、前記選択性薬剤の結合時に前記受容体が細胞によって内部移行され得る、少なくとも 1 種の選択性薬剤と、

ii) 前記受容体と同じ細胞で発現される標的分子を特異的に阻害することができる少なくとも 1 種の核酸

とを含んでなるコンジュゲート。

【請求項 2】

前記標的分子がポリペプチドまたは mRNA である、請求項 1 に記載のコンジュゲート。

10

【請求項 3】

前記標的分子の阻害が、標的ポリペプチドがポリペプチドである場合には、ポリペプチドの活性の阻害であり、または標的ポリペプチドが mRNA である場合には、mRNA のサイレンシングである、請求項 2 に記載のコンジュゲート。

【請求項 4】

前記受容体が表 1 の左の列に示される受容体ファミリーの 1 つに属す、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 5】

前記受容体が表 1 の右の列に示される受容体からなる群から選択される、請求項 4 に記載のコンジュゲート。

20

【請求項 6】

前記受容体が G タンパク質共役受容体である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 7】

前記受容体が中枢神経系の 1 以上の場所で発現される、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 8】

前記中枢神経系の場所が、視床下部、脳幹、皮質、小脳、線条体、中脳、海馬、グリアおよび髄質からなる群から選択される、請求項 7 に記載のコンジュゲート。

30

【請求項 9】

視床下部で発現される受容体が、成長ホルモン分泌促進因子受容体、ガラニン GAL 1 受容体、カルシトニン受容体様受容体、ニューロペプチド FF / B NPBW 2 受容体、ニューロペプチド FF / B NPFF 2 受容体、ニューロペプチド Y Y 2 受容体、ボンベシン BB 2 受容体、ボンベシン BB 3 受容体、カルシトニン AM 1 受容体、カルシトニン AMY 1 受容体、カルシトニン CGRP 受容体、カルシトニン受容体、フリッツルド FZD 2 受容体、フリッツルド FZD 5 受容体、メラノコルチン MC 2 受容体、メラノコルチン MC 3 受容体、メラノコルチン MC 4 受容体、ニューロペプチド S 受容体、ニューロペプチド FF / B NPFF 1 受容体、ニューロペプチド Y Y 4 受容体、ニューロテンシン NTSR 1 受容体、オレキシン OX 1 受容体、オレキシン OX 2 受容体、ソマトスタチン sst 1 受容体、ソマトスタチン sst 5 受容体、オキシトシン受容体、バソプレシン V 1 A 受容体、バソプレシン V 1 B 受容体、バソプレシン V 2 受容体、キスペプチン受容体、ニューロペプチド FF / B NPBW 1 受容体、ペプチド P 5 1 8 受容体、タキキニン NK 1 受容体、タキキニン NK 2 受容体およびタキキニン NK 3 受容体からなる群から選択される、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

40

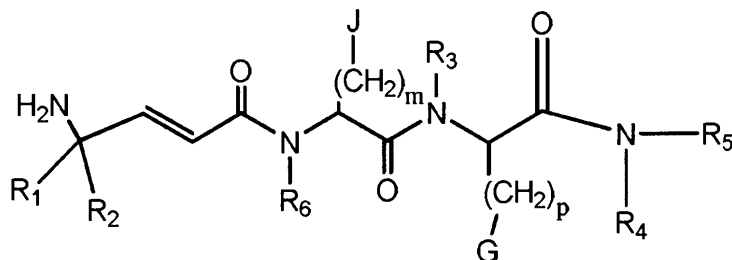
【請求項 10】

前記標的分子が、表 3 の左の列に定義されるポリペプチドからなる群から選択されるポリペプチド、またはその対応する mRNA である、請求項 9 に記載のコンジュゲート。

【請求項 11】

前記標的分子が SOCS 3 または PTP 1 B であり、かつ、前記選択性薬剤が構造

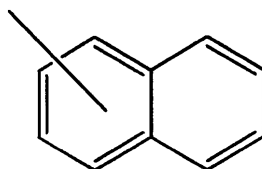
【化 1】



〔式中、 R_1 および R_2 は互いに独立に、水素もしくは $C_1 - C_6$ アルキルであるか、または R_1 および R_2 は一緒に $C_2 - C_5$ アルキレン基を形成し、

J は、1 以上の $C_1 - C_6$ アルキルまたはハロゲンで置換されていてもよい基

【化 2】



であり、

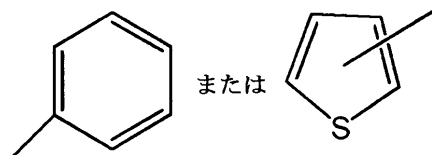
m は、1、2 または 3 であり、

R_3 は、 $C_1 - C_6$ アルキルであり、

p は、1、2 または 3 であり、

G は、1 以上の $C_1 - C_6$ アルキルまたはハロゲンで置換されていてもよい基

【化 3】



であり、

R_4 および R_5 は互いに独立に、水素または $C_1 - C_6$ アルキルであり、かつ、

R_6 は、水素または $C_1 - C_6$ アルキル、好ましくは、水素である]

を有する化合物またはその薬学上許容される塩である、請求項 10 に記載のコンジュゲート。

【請求項 12】

表 3 の右の列に示される疾患からなる群から選択される疾患であって、各疾患は表 3 において前記疾患と同じ行の左の列に示される標的ポリペプチドに指向されたコンジュゲートで治療される疾患の治療において使用するための、請求項 10 または 11 に記載のコンジュゲート。

【請求項 13】

中脳で発現される受容体が、成長ホルモン分泌促進因子受容体、ボンベシン BB1 受容体、ブラジキニン B2 受容体、ガラニン GAL2 受容体、ニューロペプチド FF/B NPBW2 受容体、ニューロペプチド FF/B NPPFF2 受容体、ニューロペプチド Y Y1 受容体、ニューロテンシン NTSR1 受容体、ニューロテンシン NTSR2 受容体、ニューロペプチド S 受容体、オレキシン OX2 受容体、5-HT1D 受容体、アンジオテンシン AT2a 受容体、アンジオテンシン AT2b 受容体、カルシトニン AM2 受容体、カルシトニン AMY3 受容体、フリッツル FZD6 受容体、キスペプチン受容体、メラトニン MT1 受容体、ニューロペプチド FF/B NPBW1 受容体およびオピオイド μ

受容体からなる群から選択される、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 1 4】

前記標的分子が、表 4 の左の列に定義されるポリペプチドからなる群から選択されるポリペプチド、またはその対応する mRNA である、請求項 1 3 に記載のコンジュゲート。

【請求項 1 5】

表 4 の右の列に示される疾患からなる群から選択される疾患であって、各疾患は表 4 において前記疾患と同じ行の左の列に示される標的ポリペプチドに指向されたコンジュゲートで治療される疾患の治療において使用するための、請求項 1 4 に記載のコンジュゲート。

10

【請求項 1 6】

脳幹で発現される受容体が、5 - HT₃ 受容体、ガラニン受容体 1、メラノコルチン MC 1 受容体、メラノコルチン MC 2 受容体、メラノコルチン MC 3 受容体、メラノコルチン MC 4 受容体、カルシトニン受容体様、CRF 2 受容体、ニューロペプチド FF / BNPBW 2 受容体、5 - HT_{1A} 受容体、ニューロペプチド Y₁ 受容体、ニューロテンシン NTSR 1 受容体、オピオイド μ 受容体、オレキシン OX 1 受容体、オレキシン OX 2 受容体およびドーパミン D 2 受容体からなる群から選択される、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 1 7】

前記標的分子が、表 5 の左の列に定義されるポリペプチドからなる群から選択されるポリペプチド、またはその対応する mRNA である、請求項 1 6 に記載のコンジュゲート。

20

【請求項 1 8】

前記標的分子が 5 - HT_{1A} であり、かつ、前記選択性薬剤がレリセトロンである、請求項 1 7 に記載のコンジュゲート。

【請求項 1 9】

表 5 の右の列に示される疾患からなる群から選択される疾患であって、各疾患は表 5 において前記疾患と同じ行の左の列に示される標的ポリペプチドに指向されたコンジュゲートで治療される疾患の治療において使用するための、請求項 1 7 または 1 8 に記載のコンジュゲート。

【請求項 2 0】

皮質で発現される受容体が、5 - HT₃ 受容体、メラノコルチン MC 1 受容体、CRF 1 受容体、5 - HT_{2A} 受容体、 α 1 アドレナリン受容体、ボンベシン BB 1 受容体、フリッツルド FZD 3 受容体、ボンベシン BB 3 受容体、ブラジキニン B 2 受容体、カルシトニン受容体様受容体、コレシストキニン CCK 2 受容体、CRF 1 受容体、CRF 2 受容体、ガラニン GAL 2 受容体、ガラニン GAL 3 受容体、ニューロペプチド FF / BNPBW 2 受容体、ニューロペプチド FF / BNPFF 2 受容体、ニューロペプチド Y₁ 受容体、ニューロペプチド Y₅ 受容体、ニューロペプチド Y₂ 受容体、ニューロテンシン NTSR 2 受容体、オピオイド δ 受容体、オピオイド κ 受容体、ソマトスタチン sst 2 受容体、ソマトスタチン sst 3 受容体、ソマトスタチン sst 4 受容体、5 - HT_{1A} 受容体、エンドセリン ETa 受容体、エンドセリン ETb 受容体、メラノコルチン MC 3 受容体、ニューロペプチド S NPS 受容体、ニューロテンシン NTSR 1 受容体、オレキシン OX 1 受容体、オレキシン OX 2 受容体、バソプレシン V 1 B 受容体、キスペプチン受容体、メラトニン MT 1 受容体、タキキニン NK 1 受容体、タキキニン NK 2 受容体およびタキキニン NK 3 受容体からなる群から選択される、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

30

40

【請求項 2 1】

前記標的分子が、表 6 の左の列に定義されるポリペプチドからなる群から選択されるポリペプチド、またはその対応する mRNA である、請求項 2 0 に記載のコンジュゲート。

【請求項 2 2】

表 6 の右の列に示される疾患からなる群から選択される疾患であって、各疾患は表 6 に

50

において前記疾患と同じ行の左の列に示される標的ポリペプチドに指向されたコンジュゲートで治療される疾患の治療において使用するための、請求項 2 1 に記載のコンジュゲート。

【請求項 2 3】

小脳で発現される受容体が、CRF 1 受容体、5-HT_{1B} 受容体、フリッツルド FZD 4 受容体、フリッツルド FZD 10 受容体、フリッツルド FZD 7 受容体、ブラジキニン B 2 受容体、ガラニン G A L 3 受容体、ニューロテンシン N T S R 2 受容体、エンドセリン E T b 受容体、ホルミルペプチド F P R 1 受容体、ホルミルペプチド F P R 2 受容体、メラトニン M T 2 受容体、バソプレシン V 1 A 受容体、アンジオテンシン A T 2 a 受容体、アンジオテンシン A T 2 b 受容体、キスペプチン受容体およびメラトニン M T 1 受容体からなる群から選択される、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

10

【請求項 2 4】

前記標的分子が、表 7 の左の列に定義されるポリペプチドからなる群から選択されるポリペプチド、またはその対応する m R N A である、請求項 2 3 に記載のコンジュゲート。

【請求項 2 5】

前記標的分子がアタキシン I であり、かつ、前記選択性薬剤が 5 - ノニルオキシトリプタミンオキサレートである、請求項 2 4 に記載のコンジュゲート。

【請求項 2 6】

表 7 の右の列に示される疾患からなる群から選択される疾患であって、各疾患は表 7 において前記疾患と同じ行の左の列に示される標的ポリペプチドに指向されたコンジュゲートで治療される疾患の治療において使用するための、請求項 2 4 または 2 5 に記載のコンジュゲート。

20

【請求項 2 7】

線条体で発現される受容体が、5-HT_{2A} 受容体、コレシストキニン C C K 2 受容体、CRF 1 受容体、ニューロペプチド F F / B N P B W 2 受容体、ニューロペプチド F F / B N P F F 2 受容体、ソマトスタチン s s t 5 受容体、バソプレシン V 1 B 受容体、5-HT₆ 受容体、アデノシン A 2 受容体、アデノシン A 2 A 受容体、ドーパミン D 1 受容体、ドーパミン D 2 受容体、ペプチド P 5 1 8 受容体、タキキニン N K 1 受容体、タキキニン N K 2 受容体およびタキキニン N K 3 受容体からなる群から選択される、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

30

【請求項 2 8】

前記標的分子が、表 8 の左の列に定義されるポリペプチドからなる群から選択されるポリペプチド、またはその対応する m R N A である、請求項 2 7 に記載のコンジュゲート。

【請求項 2 9】

前記標的分子がグリコーゲンシンターゼキナーゼ 3 であり、かつ、前記選択性薬剤が L Y - 1 6 5 , 1 6 3 である、請求項 2 8 に記載のコンジュゲート。

【請求項 3 0】

表 8 の右の列に示される疾患からなる群から選択される疾患であって、各疾患は表 8 において前記疾患と同じ行の左の列に示される標的ポリペプチドに指向されたコンジュゲートで治療される疾患の治療において使用するための、請求項 2 8 または 2 9 に記載のコンジュゲート。

40

【請求項 3 1】

海馬で発現される受容体が、5-HT₃ 受容体、ブラジキニン B 2 受容体、CRF 2 受容体、フリッツルド FZD 3 受容体、ガラニン G A L 3 受容体、ニューロペプチド F F / B N P B W 2 受容体、ニューロペプチド Y Y 1 受容体、ニューロペプチド Y Y 5 受容体、ニューロテンシン N T S R 2 受容体、オピオイド 受容体、ソマトスタチン s s t 3 受容体、ソマトスタチン s s t 5 受容体、5-HT_{1A} 受容体、アデノシン A 1 受容体、エンドセリン E T a 受容体、エンドセリン E T b 受容体、ホルミルペプチド F P R 1 受容体、ホルミルペプチド F P R 3 受容体、フリッツルド FZD 8 受容体、フリッツルド FZD 9 受容体、メラトニン M T 2 受容体、ニューロペプチド F F / B N P B W 2 受容体

50

、ニューロペプチド Y₁ 受容体、ニューロペプチド F F / B N P F F 1 受容体、ニューロペプチド Y₄ 受容体、ニューロテンシン N T S R 1 受容体、オレキシン O X 1 受容体、オレキシン O X 2 受容体、ソマトスタチン s s t 1 受容体、ソマトスタチン s s t 5 受容体、バソプレシン V 1 A 受容体およびバソプレシン V 1 B 受容体からなる群から選択される、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 3 2】

前記標的分子が、表 9 の左の列に定義されるポリペプチドからなる群から選択されるポリペプチド、またはその対応する m R N A である、請求項 3 1 に記載のコンジュゲート。

【請求項 3 3】

表 9 の右の列に示される疾患からなる群から選択される疾患であって、各疾患は表 9 において前記疾患と同じ行の左の列に示される標的ポリペプチドに指向されたコンジュゲートで治療される疾患の治療において使用するための、請求項 3 2 に記載のコンジュゲート。

10

【請求項 3 4】

グリアで発現される受容体が、ホルミルペプチド F P R 1 受容体、ホルミルペプチド F P R 2 受容体、ホルミルペプチド F P R 3 受容体および T L R 7 からなる群から選択される、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 3 5】

髄質で発現される受容体が、E p h A 1、E p h A 2、E p h A 3、E p h A 4、E p h B 1、E p h B 2、E p h B 3、オピオイド μ 受容体、G l y T 1 輸送体、ニューロキニン N K 1 受容体、ニューロキニン N K 2 受容体、ニューロキニン N K 3 受容体、C X C R 4 ケモカイン受容体、V E G F R 1、V E G F R 2 および V E G F R 3 からなる群から選択される、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

20

【請求項 3 6】

前記標的分子が、表 1 0 の左の列に定義されるポリペプチドからなる群から選択されるポリペプチド、またはその対応する m R N A である、請求項 3 5 に記載のコンジュゲート。

【請求項 3 7】

表 1 0 の右の列に示される疾患からなる群から選択される疾患であって、各疾患は表 1 0 において前記疾患と同じ行の左の列に示される標的ポリペプチドに指向されたコンジュゲートで治療される疾患の治療において使用するための、請求項 3 6 に記載のコンジュゲート。

30

【請求項 3 8】

少なくとも 1 種の付加的選択性薬剤をさらに含んでなる、請求項 1 ~ 3 7 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 3 9】

第 1 の選択性薬と前記少なくとも 1 種の付加的選択性薬剤が同じまたは異なる、請求項 3 8 に記載のコンジュゲート。

【請求項 4 0】

前記少なくとも 1 種の付加的選択性薬剤と第 1 の選択性薬剤とが異なる場合に、両選択性薬剤が中枢神経系の同じ場所で発現される受容体に特異的であるか、または中枢神経系の異なる場所で発現される受容体に特異的である、請求項 3 9 に記載のコンジュゲート。

40

【請求項 4 1】

前記第 1 の選択性薬剤と少なくとも 1 種の付加的選択性薬剤とが結合する中枢神経系の場所が、

- (i) 中脳と線条体、
- (i i) 皮質と海馬、
- (i i i) 脳幹と海馬、
- (i v) 皮質と海馬と線条体、
- (v) 皮質とグリアと海馬、

50

- (v i) 海馬と線条体、
- (v i i) 脳幹と視床下部、
- (v i i i) 皮質と線条体、
- (i x) グリアと髄質、
- (x) 脳幹と皮質と中脳、
- (x i) 脳幹と中脳と線条体、
- (x i i) 脳幹と皮質と海馬、および
- (x i i i) 皮質と中脳と線条体

からなる群から選択される、請求項 40 に記載のコンジュゲート。

【請求項 42】

標的分子と同じ細胞で発現され、標的分子に特異的に結合することができる核酸が、ギャップマー、二本鎖 RNA 干渉オリゴヌクレオチド、マイクロ RNA 活性を有する二本鎖 RNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アンチマイクロ RNA オリゴヌクレオチド、miRNA 前駆体、マイクロ RNA または shRNA をコードする mRNA、PNA、LNA、リボザイムおよびアプタマーからなる群から選択される、請求項 1 ~ 41 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

10

【請求項 43】

前記選択性薬剤が核酸の 5' 末端または核酸の 3' 末端に結合されている、請求項 1 ~ 42 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 44】

第 1 の核酸と相補的な核酸をさらに含んでなる、請求項 1 ~ 43 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

20

【請求項 45】

前記核酸が干渉 RNA である、請求項 44 に記載のコンジュゲート。

【請求項 46】

コンジュゲートが第 2 の選択性薬剤を含んでなる場合に、

(i) 前記核酸が一本鎖ポリヌクレオチドであれば、第 2 の選択性薬剤は、第 1 の選択性薬剤が結合されている核酸の反対の末端に結合されるか、または第 1 の選択性薬剤が結合されている同じ末端に二官能性リンカーによって結合され、あるいは

(i i) 前記核酸が二本鎖ポリヌクレオチドであれば、第 2 の選択性薬剤は、第 1 の選択性薬剤が結合されている鎖の反対の末端に、または第 1 の選択性薬剤が結合されている鎖と相補的な鎖のいずれかの末端に、または第 1 の選択性薬剤が結合されていない末端と同じ末端に二官能性リンカーを介して結合される、
請求項 1 ~ 42 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

30

【請求項 47】

少なくとも 1 種の選択性薬剤が架橋基により核酸に連結されている、請求項 1 ~ 46 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 48】

前記架橋基が構造

- L_{1d} - [(A - L₂)_a - (B - L₃)_b]_c -
を有し、式中、

40

A および B は、単糖、C₁ - C₅₀ アルキル鎖および (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単位を表し；

a および b は、0 ~ 50 の範囲の整数であり；

c は、0 ~ 30 の範囲の整数であり；

L₁、L₂ および L₃ は、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、カルバメート、メチルスルホネート、カルボニル、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、アミドおよびそれらの混合物からなる群から独立に選択される架橋化合物であり；

d は、0 または 1 である、

50

請求項 47 に記載のコンジュゲート。

【請求項 49】

b および d が 0 であり、c が 1 であり、A がアルキル鎖であり、かつ、L2 がホスホジエステル結合である、請求項 48 に記載のコンジュゲート。

【請求項 50】

選択性薬剤と結合されていないポリヌクレオチドの一末端または両末端に結合された保護基をさらに含んでなる、請求項 1 ~ 49 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 51】

生体膜を経る輸送を助長する基をさらに含んでなる、請求項 1 ~ 50 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

10

【請求項 52】

エンドソーム溶解性ペプチドをさらに含んでなる、請求項 1 ~ 51 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 53】

(i) 受容体に特異的に結合する選択性薬剤であって、前記選択性薬剤の結合時に前記受容体が細胞によって内部移行され得る、少なくとも 1 種の選択性薬剤と、

(ii) 神経伝達物質輸送体と同じ細胞で発現される標的分子に特異的に結合することができる核酸を含んでなる、リポソームまたはデンドリマーであるナノ輸送体とを含んでなる、コンジュゲート。

20

【請求項 54】

前記標的分子がポリペプチドまたは mRNA である、請求項 53 に記載のコンジュゲート。

【請求項 55】

前記標的分子の阻害が、標的ポリペプチドがポリペプチドである場合には、ポリペプチドの活性の阻害であり、または標的ポリペプチドが mRNA である場合には、mRNA のサイレンシングである、請求項 54 に記載のコンジュゲート。

【請求項 56】

前記受容体が表 1 の左の列に示される受容体ファミリーの 1 つに属する、請求項 53 ~ 55 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 57】

前記受容体が表 1 の右の列に示される受容体からなる群から選択される、請求項 56 に記載のコンジュゲート。

30

【請求項 58】

前記受容体が G タンパク質共役受容体である、請求項 53 ~ 57 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 59】

前記受容体が中枢神経系の 1 以上の場所で発現される、請求項 53 ~ 58 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 60】

前記中枢神経系の場所が、視床下部、脳幹、皮質、小脳、線条体、中脳、海馬、グリアおよび髄質からなる群から選択される、請求項 59 に記載のコンジュゲート。

40

【請求項 61】

視床下部で発現される受容体が、成長ホルモン分泌促進因子受容体、ガラニン GAL1 受容体、カルシトニン受容体様受容体、ニューロペプチド FF/B NPBW2 受容体、ニューロペプチド FF/B NPF2 受容体、ニューロペプチド Y Y2 受容体、ボンベシン BB2 受容体、ボンベシン BB3 受容体、カルシトニン AM1 受容体、カルシトニン AMY1 受容体、カルシトニン CGRP 受容体、カルシトニン受容体、フリッツル FZD2 受容体、フリッツル FZD5 受容体、メラノコルチン MC2 受容体、メラノコルチン MC3 受容体、メラノコルチン MC4 受容体、ニューロペプチド S 受容体、ニューロペプチド FF/B NPF1 受容体、ニューロペプチド Y Y4 受容体、ニューロテン

50

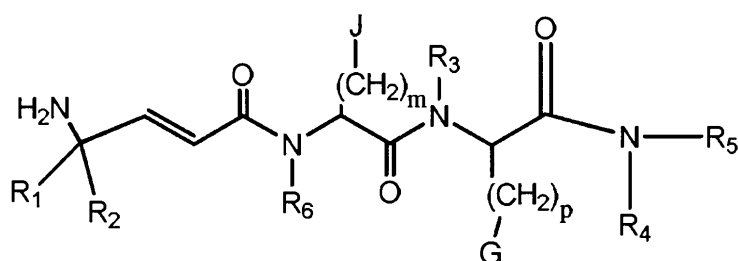
シンNTSR1受容体、オレキシンOX1受容体、オレキシンOX2受容体、ソマトスタチンsst1受容体、ソマトスタチンsst5受容体、オキシトシン受容体、バソプレシンV1A受容体、バソプレシンV1B受容体、バソプレシンV2受容体、キスペプチン受容体、ニューロペプチドFF/BNPBW1受容体、ペプチドP518受容体、タキキニンNK1受容体、タキキニンNK2受容体およびタキキニンNK3受容体からなる群から選択される、請求項53～60のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項62】

前記標的分子が、表3の左の列に定義されるポリペプチドからなる群から選択されるポリペプチド、またはその対応するmRNAである、請求項61に記載のコンジュゲート。

【請求項63】

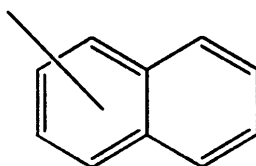
前記標的分子がSOC3またはPTP1Bであり、かつ、前記選択性薬剤が構造【化4】



【式中、 R_1 および R_2 は互いに独立に、水素もしくは $C1 - C6$ アルキルであるか、または R_1 および R_2 は一緒に $C2 - C5$ アルキレン基を形成し、

J は、1以上の $C1 - C6$ アルキルまたはハロゲンで置換されていてもよい基

【化5】



であり、

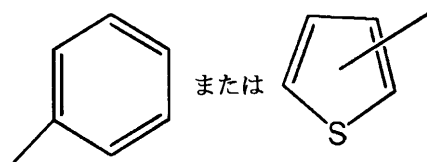
m は、1、2または3であり、

R_3 は、 $C1 - C6$ アルキルであり、

p は、1、2または3であり、

G は、1以上の $C1 - C6$ アルキルまたはハロゲンで置換されていてもよい基

【化6】



であり、

R_4 および R_5 は互いに独立に、水素または $C1 - C6$ アルキルであり、かつ、

R_6 は、水素または $C1 - C6$ アルキル、好ましくは、水素である]

を有する化合物またはその薬学上許容される塩である、請求項62に記載のコンジュゲート。

【請求項64】

中脳で発現される受容体が、成長ホルモン分泌促進因子受容体、ポンベシンBB1受容

10

20

30

40

50

体、ブラジキニン B 2 受容体、ガラニン G A L 2 受容体、ニューロペプチド F F / B N P B W 2 受容体、ニューロペプチド F F / B N P F F 2 受容体、ニューロペプチド Y Y 1 受容体、ニューロテンシン N T S R 1 受容体、ニューロテンシン N T S R 2 受容体、ニューロペプチド S 受容体、オレキシン O X 2 受容体、5 - H T 1 D 受容体、アンジオテンシン A T 2 a 受容体、アンジオテンシン A T 2 b 受容体、カルシトニン A M 2 受容体、カルシトニン A M Y 3 受容体、フリッツルド F Z D 6 受容体、キスペプチン受容体、メラトニン M T 1 受容体、ニューロペプチド F F / B N P B W 1 受容体およびオピオイド μ 受容体からなる群から選択される、請求項 5 3 ~ 6 0 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 6 5】

10

前記標的分子が、表 4 の左の列に定義されるポリペプチドからなる群から選択されるポリペプチド、またはその対応する m R N A である、請求項 6 4 に記載のコンジュゲート。

【請求項 6 6】

脳幹で発現される受容体が、5 - H T ₃ 受容体、ガラニン受容体 1、メラノコルチン M C 1 受容体、メラノコルチン M C 2 受容体、メラノコルチン M C 3 受容体、メラノコルチン M C 4 受容体、カルシトニン受容体様、C R F 2 受容体、ニューロペプチド F F / B N P B W 2 受容体、5 - H T 1 _A 受容体、ニューロペプチド Y Y 2 受容体、ニューロテンシン N T S R 1 受容体、オピオイド μ 受容体、オレキシン O X 1 受容体、オレキシン O X 2 受容体およびドーパミン D 2 受容体からなる群から選択される、請求項 5 3 ~ 6 0 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

20

【請求項 6 7】

前記標的分子が、表 5 の左の列に定義されるポリペプチドからなる群から選択されるポリペプチド、またはその対応する m R N A である、請求項 6 6 に記載のコンジュゲート。

【請求項 6 8】

前記標的分子が 5 - H T 1 A であり、かつ、前記選択性薬剤がレリセトロンである、請求項 6 7 に記載のコンジュゲート。

【請求項 6 9】

皮質で発現される受容体が、5 - H T ₃ 受容体、メラノコルチン M C 1 受容体、C R F 1 受容体、5 - H T 2 _A 受容体、1 アドレナリン受容体、ボンベシン B B 1 受容体、フリッツルド F Z D 3 受容体、ボンベシン B B 3 受容体、ブラジキニン B 2 受容体、カルシトニン受容体様受容体、コレシストキニン C C K 2 受容体、C R F 1 受容体、C R F 2 受容体、ガラニン G A L 2 受容体、ガラニン G A L 3 受容体、ニューロペプチド F F / B N P B W 2 受容体、ニューロペプチド F F / B N P F F 2 受容体、ニューロペプチド Y Y 1 受容体、ニューロペプチド Y Y 5 受容体、ニューロペプチド Y Y 2 受容体、ニューロテンシン N T S R 2 受容体、オピオイド 受容体、オピオイド 受容体、ソマトスタチン s s t 2 受容体、ソマトスタチン s s t 3 受容体、ソマトスタチン s s t 4 受容体、5 - H T 1 A 受容体、エンドセリン E T a 受容体、エンドセリン E T b 受容体、メラノコルチン M C 3 受容体、ニューロペプチド S N P S 受容体、ニューロテンシン N T S R 1 受容体、オレキシン O X 1 受容体、オレキシン O X 2 受容体、バソプレシン V 1 B 受容体、キスペプチン受容体、メラトニン M T 1 受容体、タキキニン N K 1 受容体、タキキニン N K 2 受容体およびタキキニン N K 3 受容体からなる群から選択される、請求項 5 3 ~ 6 0 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

30

40

【請求項 7 0】

前記標的分子が、表 6 の左の列に定義されるポリペプチドからなる群から選択されるポリペプチド、またはその対応する m R N A である、請求項 6 9 に記載のコンジュゲート。

【請求項 7 1】

小脳で発現される受容体が、C R F 1 受容体、5 - H T _{1 B} 受容体、フリッツルド F Z D 4 受容体、フリッツルド F Z D 1 0 受容体、フリッツルド F Z D 7 受容体、ブラジキニン B 2 受容体、ガラニン G A L 3 受容体、ニューロテンシン N T S R 2 受容体、エンドセリン E T b 受容体、ホルミルペプチド F P R 1 受容体、ホルミルペプチド F P R 2 受容体

50

、メラトニン M T 2 受容体、バソプレシン V 1 A 受容体、アンジオテンシン A T 2 a 受容体、アンジオテンシン A T 2 b 受容体、キスペプチン受容体およびメラトニン M T 1 受容体からなる群から選択される、請求項 5 3 ~ 6 0 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 7 2】

前記標的分子が、表 7 の左の列に定義されるポリペプチドからなる群から選択されるポリペプチド、またはその対応する m R N A である、請求項 7 1 に記載のコンジュゲート。

【請求項 7 3】

前記標的分子がアタキシン I であり、かつ、前記選択性薬剤が 5 - ノニルオキシトリプタミンオキサレートである、請求項 7 2 に記載のコンジュゲート。

10

【請求項 7 4】

線条体で発現される受容体が、5 - H T 2 A 受容体、コレシストキニン C C K 2 受容体、C R F 1 受容体、ニューロペプチド F F / B N P B W 2 受容体、ニューロペプチド F F / B N P F F 2 受容体、ソマトスタチン s s t 5 受容体、バソプレシン V 1 B 受容体、5 - H T 6 受容体、アデノシン A 2 受容体、アデノシン A 2 A 受容体、ドーパミン D 1 受容体、ドーパミン D 2 受容体、ペプチド P 5 1 8 受容体、タキキニン N K 1 受容体、タキキニン N K 2 受容体およびタキキニン N K 3 受容体からなる群から選択される、請求項 5 3 ~ 6 0 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 7 5】

前記標的分子が、表 8 の左の列に定義されるポリペプチドからなる群から選択されるポリペプチド、またはその対応する m R N A である、請求項 7 4 に記載のコンジュゲート。

20

【請求項 7 6】

海馬で発現される受容体が、5 - H T ₃ 受容体、ブラジキニン B 2 受容体、C R F 2 受容体、フリッツルド F Z D 3 受容体、ガラニン G A L 3 受容体、ニューロペプチド F F / B N P B W 2 受容体、ニューロペプチド Y Y 1 受容体、ニューロペプチド Y Y 5 受容体、ニューロテンシン N T S R 2 受容体、オピオイド 受容体、ソマトスタチン s s t 3 受容体、ソマトスタチン s s t 5 受容体、5 - H T 1 A 受容体、アデノシン A 1 受容体、エンドセリン E T a 受容体、エンドセリン E T b 受容体、ホルミルペプチド F P R 1 受容体、ホルミルペプチド F P R 3 受容体、フリッツルド F Z D 8 受容体、フリッツルド F Z D 9 受容体、メラトニン M T 2 受容体、ニューロペプチド F F / B N P B W 2 受容体、ニューロペプチド Y Y 2 受容体、ニューロペプチド F F / B N P F F 1 受容体、ニューロペプチド Y Y 4 受容体、ニューロテンシン N T S R 1 受容体、オレキシン O X 1 受容体、オレキシン O X 2 受容体、ソマトスタチン s s t 1 受容体、ソマトスタチン s s t 5 受容体、バソプレシン V 1 A 受容体およびバソプレシン V 1 B 受容体からなる群から選択される、請求項 5 3 ~ 6 0 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

30

【請求項 7 7】

前記標的分子が、表 9 の左の列に定義されるポリペプチドからなる群から選択されるポリペプチド、またはその対応する m R N A である、請求項 7 6 に記載のコンジュゲート。

【請求項 7 8】

前記標的分子がグリコーゲンシンターゼキナーゼ 3 であり、かつ、前記選択性薬剤が L Y - 1 6 5 , 1 6 3 である、請求項 7 7 に記載のコンジュゲート。

40

【請求項 7 9】

グリアで発現される受容体が、ホルミルペプチド F P R 1 受容体、ホルミルペプチド F P R 2 受容体、ホルミルペプチド F P R 3 受容体および T L R 7 からなる群から選択される、請求項 5 3 ~ 6 0 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 8 0】

髄質で発現される受容体が、E p h A 1、E p h A 2、E p h A 3、E p h A 4、E p h A B 1、E p h A B 2、E p h A B 3、オピオイド μ 受容体、G l y T 1 輸送体、D P 1 受容体、ニューロキニン N K 1 受容体、ニューロキニン N K 2 受容体、ニューロキニン N K 3 受容体、および C X C R 4 ケモカイン受容体、V E G F R 1、V E G F R 2 および

50

VEGFR3 からなる群から選択される、請求項 53 ~ 60 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 81】

前記標的分子が、表 10 の左の列に定義されるポリペプチドからなる群から選択されるポリペプチド、またはその対応する mRNA である、請求項 80 に記載のコンジュゲート。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、対象とする標的に特異的な核酸と、特定の細胞への前記核酸の送達を前記細胞の表面の G タンパク質共役受容体に対する親和性によって可能とする基とを含んでなるコンジュゲートに関する。

【背景技術】

【0002】

核酸の使用は、細胞の状態を変化させ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) またはリボ核酸 (RNA) の細胞への導入は、細胞中の特定の遺伝子の発現をアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションし、それにより、1 以上の生化学的経路に影響を与え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術のうち、RNA 干渉 (RNAi) は、多様な生物体において遺伝子の発現を転写後レベルで調節することに関して与えられた総称である。RNAi 遺伝子サイレンシングは、低分子干渉または「siRNA」として知られている相同な短い (21 ~ 23 bp) dsRNA 断片を使用して達成され得る。長い dsRNA が細胞系に導入されると、細胞酵素のダイサーがそれを切断して低分子干渉 RNA (siRNA) 分子とする。この低分子干渉 RNA 分子は、現在ガイド RNA と呼ばれている。ガイド RNA は RNA 誘導サイレンシング複合体 (RNA-Induced-Silencing-Complex) (RISC) を相同な標的 mRNA に誘導する。ひと度、それが相同な mRNA 配列とハイブリッド構造を形成すれば、RISC は mRNA を切断する。結果として、該 mRNA にコードされているタンパク質はもはや産生されず、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、低分子干渉 RNA (siRNA) により媒介される動物における配列特異的転写後遺伝子サイレンシングのプロセスを意味する。

【発明の概要】

【0003】

本発明者らは、所与の標的分子に特異的な核酸と、選択的リガンドの結合に応答してエンドサイトーシスを受け得る受容体の選択的リガンドとを含有する核酸構築物を開発した。これらの構築物は、対象とする核酸をその受容体を発現する細胞の内部へ送達するために特に有用であることが示されている。いずれの理論にも拘束されることを望むものではないが、リガンドは、その受容体が発現される細胞の表面の対応する受容体に結合すると考えられる。そしてこれは、受容体媒介エンドサイトーシスによる細胞の内部への核酸 - 阻害剤複合体の輸送をもたらす。

【0004】

当業者ならば、本発明が GSH-R を発現する細胞への送達のためのコンジュゲートに限定されないことを認識するであろう。対照的に、本発明において提供される結果は、表面受容体を介してシグナルを伝達するために細胞が用いている機構が、前記受容体に親和性を示す分子に結合された小分子の細胞への送達を促すための十分な手段であることを示す。

【図面の簡単な説明】

【0005】

【図 1】タビモレリン構造。強力な経口活性グレリン受容体 (GHS-R1a) アゴニスト (ヒト組換え GHS-R1a で $K_i = 50 \text{ nM}$)。ラット下垂体細胞からの GH 放出を EC_{50} 値 2.7 nM で刺激する。

10

20

30

40

50

【図2】種々の分子で12日間処置した後の肥満動物の累積体重(BW)増。A) ビヒクル(VH)、TAB-NS-ASO4(NS)、TAB-SOCS3-ASO4(SOCS3)またはTAB-PTP1B-ASO4(PTP1B)で12日間処置した動物の累積体重増(g)。VHに対して $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$; $****p < 0.0001$ 。NSに対して $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$; $****p < 0.0001$ 。B) 分析の統計学的有意性を示すANOVA表、TTは処置を意味する。データは平均+ESDを表す。

【図3】種々の分子で12日間処置した後の肥満動物の累積食物摂取(FI)。A) ビヒクル(VH)、TAB-NS-ASO4(NS)、TAB-SOCS3-ASO4(SOCS3)またはTAB-PTP1B-ASO4(PTP1B)で12日間処置した動物の累積FI増(g)。VHに対して $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$; $****p < 0.0001$ 。NSに対して $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$; $****p < 0.0001$ 。B) 分析の統計学的有意性を示すANOVA表、TTは処置を意味する。データは平均+ESDを表す。

【図4】肥満の1日体重(BW)増および食物摂取(FI)。A) 1日BW増は、1日体重変化の平均とした。群間で有意差は無かったが、TAB-SOCS3-ASO4(SOCS3)およびTAB-PTP1B-ASO4(PTP1B)で処置した動物では減少傾向が見られた。B) 1日の食物摂取の平均として測定した1日FIは、TAB-SOCS3-ASO4(SOCS3)およびTAB-PTP1B-ASO4(PTP1B)で処理した動物で低下していた。一元配置ANOVAは、処置間の有意差を示した($p < 0.0001$)。VHに対して $**p < 0.01$; $***p < 0.001$ 。NSに対して $*p < 0.01$; $***p < 0.001$ 。データは平均+ESDを表す。

【図5】アタキシン-1に対するプローブで標識した小脳矢状切片の顕微鏡写真。A) およびB) 矢印はプルキンエ細胞層、ML:分子層、GL:顆粒層を示す。A:PBSで処置した動物の例、B:アタキシン-IのmRNAに対するsiRNAにコンジュゲートした5-ノニルオキシトリプタミンオキサレート(NP-1297)で処置した動物の例。C:プルキンエ細胞層における光学密度(ImageJ)の任意単位(O.D.(a.u.))での定量値をPBSに対して正規化したもの、NP-1297で処理した動物において有意な低下($48\% \pm 5\text{ s.e.m.}$)(t検定、 $*p < 0.02$)を示す。

【図6】1319の5HT3への結合。3H-GR65630(0.5nM)の排除。データは、1回の実験からの $n = 4$ の平均 \pm SDとして表す。GR65630のKdは飽和アッセイから決定した。

【図7】1301の5HT1Aへの結合。3H-8-OH-DPAT(0.6nM)の排除。データは、1回の実験からの $n = 4$ の平均 \pm SDとして表す。

【発明の具体的説明】

【0006】

本発明者らは、予期しないことに、受容体に特異的に結合することができる分子に核酸を共有結合させることにより、その受容体を発現する対象細胞に前記核酸を特異的に標的化できることを見出した。さらに、本発明者らはまた、前記核酸が細胞によって内部移行され、それによりその効果を発揮し得ることも見出した。いずれの理論にも拘束されることを望むものではないが、これらのコンジュゲートは、受容体が選択性薬剤の結合に応答して内部移行される際にその受容体によって内部移行されると考えられる。例えば、本発明の実施例に示されるように、成長ホルモン分泌促進因子受容体のリガンド(タビモレリン)とSOCS4またはPTP1Bのいずれかを特異的にサイレンシングすることができる核酸とを含有するコンジュゲートで処置した動物は、対照動物(VHおよびNS)よりも体重増加が有意に低く、食物摂取の低下を示し、それにより、これらの核酸が標的とされる視床下部領域に達するのに効果的であったことを示す。

【0007】

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、

10

20

30

40

50

i) 受容体に特異的に結合する選択性薬剤であって、前記選択性薬剤の結合時に前記受容体がエンドサイトーシスを受ける、少なくとも1種の選択性薬剤と、

ii) 前記受容体と同じ細胞で発現される標的分子を特異的に阻害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に関する。

【0008】

用語「コンジュゲート」は、本明細書で使用する場合、2つ以上の個々の化合物の共有結合から得られるいずれの化合物も意味する。本発明では、コンジュゲートは、共有結合されている核酸と選択性薬剤を含んでなる分子を意味し、前記の結合は直接的または架橋化合物を介したものである。

【0009】

用語「共有結合(covalent coupling)」または「共有結合(covalent attachment)」は、核酸と選択性薬剤が相互に直接共有結合的に連結されているか、またはリンカー、もしくは架橋、もしくは1もしくは複数のスペーサー部分などの1または複数の介在部分によって相互に間接的に共有結合的に連結されていることを意味する。

【0010】

A. 1. 選択性薬剤

「1以上の受容体に特異的に結合する選択性薬剤」という用語は、本明細書で使用する場合、受容体に結合するいずれの物質も意味し、ここで、この受容体は前記選択性薬剤の結合に応答してエンドサイトーシスを受ける。この結合特異性が、前記選択性薬剤に結合された分子の、前記受容体を発現する細胞、組織または器官への送達を可能とする。このように、前記選択性薬剤を担持するコンジュゲートは、動物に投与した場合または*in vitro*で種々のタイプの細胞の集団と接触させた場合に、前記細胞に特異的に指向される。

【0011】

用語「受容体」は、リガンドと呼ばれる生物活性分子と結合する細胞会合型のタンパク質を表す。

【0012】

本明細書で使用する場合、第1の分子と第2の分子の特異的結合は、第1の分子の、非特異的相互作用とは測定可能に異なる様式で前記第2の分子と結合する能力を意味する。本発明による選択性薬剤は、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またはそれを超える標的(受容体)に対する K_d を示し得る。

【0013】

本発明の選択性薬剤により標的化され得る受容体としてはまた、限定されるものではないが、5-ヒドロキシトリプタミン受容体、アデノシン受容体、アドレノセプター受容体、アンジオテンシン受容体、ボンベシン受容体、ブラジキニン受容体、カルシトニン受容体、ケモカイン受容体、コレシストキニン受容体、コルチコトロピン放出因子受容体、ドーパミン受容体、エンドセリン受容体、エフリン受容体、ホルミルペプチド受容体、フリッツルド受容体、ガラニン受容体、成長ホルモン分泌促進因子受容体(グレリン)受容体、キスペプチン受容体、メラノコルチン受容体、メラトニン受容体、ニューロペプチドF/F/ニューロペプチドA/F受容体、ニューロペプチドS受容体、ニューロペプチドW/ニューロペプチドB受容体、ニューロペプチドY受容体、ニューロテンシン受容体、オピオイド(opioid)受容体、オレキシン受容体、ペプチドP518受容体、プロスタノイド受容体、SLC6神経伝達物質輸送体ファミリー、ソマトスタチン受容体、タキキニン受容体、Toll様受容体、バソプレシンおよびオキシトシン受容体、ならびにVEGF受容体が挙げられる。

【0014】

別の好ましい実施形態では、本発明によるコンジュゲートの選択性薬剤により標的化され得る受容体は表 1 に定義される。

【 0 0 1 5 】

【 表 1 】

ファミリー名, IUPHAR データベース	公式 IUPHAR サブタイプ名
5-ヒドロキシトリプタミン受容体	5-HT1A
	5-HT1B
	5-HT2A
	5-HT3
	5-HT1D
	5-HT6
アデノシン受容体	A1
	A2
	A2A
アドレノセプター受容体	α 1A-アドレノセプター
	α 1B-アドレノセプター
	α 1D-アドレノセプター
アンジオテンシン受容体	AT2
ボンベシン受容体	BB1
	BB2
	BB3
ブラジキニン受容体	B1
	B2
カルシトニン受容体	CT 受容体様 CRL
	AM1
	AMY1
	CGRP
	CT-R
	AM2
	AMY3
ケモカイン (Chemokien) 受容体	CXCR4
コレシストキニン受容体	CCK2
コルチコトロピン放出因子受容体	CRF1
	CRF2
ドーパミン受容体	D1
	D2
エフリン受容体	EphA1
	EphA2
	EphA3
	EphA4

10

20

30

40

ファミリー名, IUPHAR データベース	公式 IUPHAR サブタイプ名
	EphB1
	EphB2
	EphB3
エンドセリン受容体	ETa
	ETb
ホルミルペプチド受容体	FPR1
	FPR2/ALX
	FPR3
フリッツルド受容体	FZD2
	FZD3
	FZD4
	FZD5
	FZD6
	FZD7
	FZD8
	FZD9
	FZD10
ガラニン受容体	GAL1
	GAL2
	GAL3
グレリン受容体	グレリン受容体
キスペプチン受容体	キスペプチン受容体
メラノコルチン受容体	MC1
	MC2
	MC3
	MC4
メラトニン受容体	MT2
	MT1
ニューロペプチド FF/ニューロペプチド AF 受容体	NPFF2
	NPFF1
ニューロペプチド S 受容体	NPS 受容体
ニューロペプチド W/ニューロペプチド B 受容体	NPBW2
ニューロペプチド Y 受容体	Y1
	Y2
	Y5
	Y4
ニューロテンシン受容体	NTS2

10

20

30

40

ファミリー名, IUPHAR データベース	公式 IUPHAR サブタイプ名
	NTS1
オピオイド (Opiod) 受容体	δ
	κ
	μ
オレキシン受容体	OX1
	OX2
ペプチド P518 受容体	QRFP
SLC6 神経伝達物質輸送体ファミリー	DAT
	NET
	SERT
	GlyT1
ソマトスタチン受容体	sst2
	sst3
	sst4
	sst1
	sst5
タキキニン受容体	NK1
	NK2
	NK3
Toll 様受容体	TLR7
バソプレシンおよびオキシトシン受容体	OT
	V1A
	V1B
	V2
VEGF 受容体	VEGFR1
	VEGFR2
	VEGFR3

表 1 : 受容体ファミリーおよび具体的受容体

【 0 0 1 6 】

好ましい実施形態では、受容体は G タンパク質共役受容体である。

【 0 0 1 7 】

本明細書で使用する場合、用語「G タンパク質共役受容体」(または「GPCR」)は、細胞により発現された際に G タンパク質 (例えば、GTP を加水分解するタンパク質) と会合する標的受容体を意味する。好ましくは、GPCR は、構造上 7 つの疎水性の膜貫通領域を含んでなるタンパク質を意味する、「7 回膜貫通セグメント受容体」(または「7 TMS 受容体」) である。

【 0 0 1 8 】

別の実施形態では、受容体は、中枢神経系の 1 以上の場所で発現される。さらに別の実施形態では、中枢神経系の前記の場所は、視床下部、脳幹、皮質、小脳、線条体、中脳、海馬、グリアおよび脊髄からなる群から選択される。

【 0 0 1 9 】

好ましい実施形態では、コンジュゲート内の選択的リガンドは、視床下部で発現される

受容体に結合する。なおさらに好ましい実施形態では、視床下部で発現される受容体は、成長ホルモン分泌促進因子受容体、ガラニン G A L 1 受容体、カルシトニン受容体様、ニューロペプチド F F / B N P B W 2 受容体、ニューロペプチド F F / B N P F F 2 受容体、ニューロペプチド Y Y 2 受容体、ボンベシン B B 2 受容体、ボンベシン B B 3 受容体、カルシトニン A M 1 受容体、カルシトニン A M Y 1 受容体、カルシトニン C G R P 受容体、カルシトニン受容体、フリッツル D F Z D 2 受容体、フリッツル D F Z D 5 受容体、メラノコルチン M C 2 受容体、メラノコルチン M C 3 受容体、メラノコルチン M C 4 受容体、ニューロペプチド S 受容体、ニューロペプチド F F / B N P F F 1 受容体、ニューロペプチド Y Y 4 受容体、ニューロテンシン N T S R 1 受容体、オレキシン O X 1 受容体、オレキシン O X 2 受容体、ソマトスタチン s s t 1 受容体、ソマトスタチン s s t 5 受容体、オキシトシン受容体、バソプレシン V 1 A 受容体、バソプレシン V 1 B 受容体、バソプレシン V 2 受容体、キスペプチン受容体、ニューロペプチド F F / B N P B W 1 受容体、ペプチド P 5 1 8 受容体、タキキニン N K 1 受容体、タキキニン N K 2 受容体およびタキキニン N K 3 受容体からなる群から選択される。

10

【 0 0 2 0 】

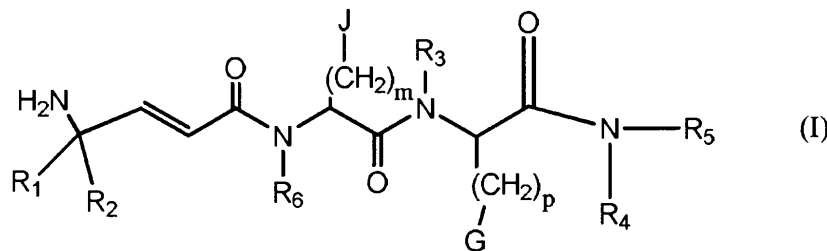
好ましい実施形態では、受容体に結合するリガンドは、表 2 に示されるリガンドの群から選択される。別の好ましい実施形態では、選択性薬剤は G H S - R アゴニストである。

【 0 0 2 1 】

なおさらに好ましい実施形態では、G H S - R アゴニストは、タビモレリン、または構造 (I) :

20

【 化 1 】

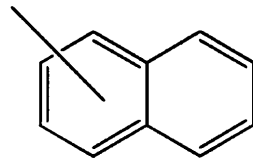


30

[式中、R₁ および R₂ は互いに独立に、水素もしくは C 1 - C 6 アルキルであるか、または R₁ および R₂ は一緒に C 2 - C 5 アルキレン基を形成し、

J は、1 以上の C 1 - C 6 アルキルまたはハロゲンで置換されていてもよい基

【 化 2 】



であり、

40

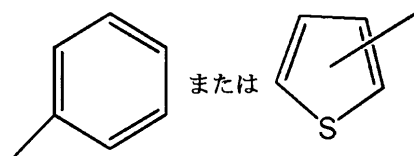
m は、1、2 または 3 であり、

R₃ は、C 1 - C 6 アルキルであり、

p は、1、2 または 3 であり、

G は、1 以上の C 1 - C 6 アルキルまたはハロゲンで置換されていてもよい基

【化 3】



であり、

R_4 および R_5 は互いに独立に、水素または C 1 - C 6 アルキルであり、かつ、
 R_6 は、水素または C 1 - C 6 アルキル、好ましくは、水素である]
 を有するその構造類似体である。

10

【0022】

式 I の化合物は 1 以上の不斉中心を有することができ、分割された、純粋なまたは部分的に精製されたその光学異性体またはラセミ混合物の形態のあらゆる光学異性体が式 I の範囲内に含まれる。E および Z 幾何異性体（上記に示す式 I の構造の左側へのオレフィン二重結合に関する）も同様に式 I の範囲内に含まれる。

【0023】

一態様において、本発明は、 R_1 および R_2 が両方ともアルキル、好ましくは、メチルである式 I の化合物を含んでなるコンジュゲートを提供する。一態様において、本発明は、それに加えてまたはその代わりに J が 2 - ナフチルである式 I の化合物を含んでなるコンジュゲートを提供する。一態様において、それに加えてまたはその代わりに m は 1 である。一態様において、 R_3 はメチルである。別の態様では、p は 1 である。別の態様では、G はフェニルである。

20

【0024】

別の態様では、 R_4 はメチルである。別の態様では、 R_5 は水素またはメチルである。さらに別の態様では、 R_6 は水素またはメチルである。

【0025】

用語「C 1 - 6 アルキル」は、本発明で使用する場合、炭素原子 1 ~ 6 個の直鎖（線状）、分岐型および環式アルキル基を含むものとする。適切な線状 C 1 - 6 アルキル基は、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチルおよびヘキシルである。分岐型 C 1 - 6 アルキル基の例は、イソプロピル、sec - ブチル、tert - ブチル、イソペンチルおよびイソヘキシルである。環式基（C 3 - 6 シクロアルキル基）の例は、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチルおよびシクロヘキシルである。用語「C 1 - 6 アルキル」は、本文脈において同様に、例えば、1 ~ 6 個の炭素原子を有するシクロアルキル置換アルキル基を含み、その例としては、（シクロプロピル）メチル、（シクロプロピル）エチル、（シクロプロピル）プロピル、（シクロブチル）メチル、（シクロブチル）エチルおよび（シクロペンチル）メチルなどの基が挙げられる。特に好適な C 1 - 6 アルキル基は、多くの場合、C 1 - 3 アルキル基、すなわち、メチル、エチル、プロピル、イソプロピルおよびシクロプロピルの中から選択される。

30

40

【0026】

用語「C 2 - 5 アルキレン基」（すなわち、C 2 - 5 アルカンジイル基）は、本発明で使用する場合、炭素原子 2 ~ 5 個の直鎖（線状）および分岐型の両方のアルカンジイル基を含むものとする。適切な線状基は、 $-CH_2-CH_2-$ ； $-CH_2-CH_2-CH_2-$ ； $-CH_2-(CH_2)_2-CH_2-$ ；および $-CH_2-(CH_2)_3-CH_2-$ である。好適な分岐型基の例としては、 $-CH_2-CH(CH_3)-$ ； $-CH_2-CH(CH_3)-CH_2-$ ； $-CH_2-CH_2-CH(CH_3)-$ ； $-CH_2-(CH_2)_2-CH(CH_3)-$ ；および $-CH_2-CH_2-CH(CH_3)-CH_2-$ が挙げられる。

【0027】

用語「ハロゲン」は、C 1、F、Br および I を含む。式 I に関して特に好適なハロゲ

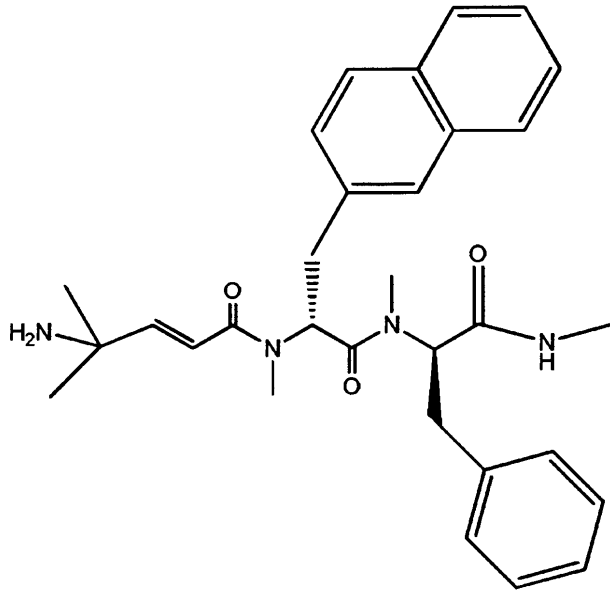
50

ンは、C 1 および F である。

【 0 0 2 8 】

好ましい実施形態では、G S H - R アゴニストは、N - [(2 E) - 5 - アミノ - 5 - メチルヘクス - エノイル] - N - メチル - 3 - (2 - ナフチル) アラニル - N , N - ジメチル - D - フェニルアラニンアミド (タビモレリン) である。

【 化 4 】



10

20

【 0 0 2 9 】

別の実施形態では、選択性薬剤は、中脳で発現される受容体に特異的に結合する。好ましい実施形態では、中脳で発現される受容体は、成長ホルモン分泌促進因子受容体、ポンペシン B B 1 受容体、ブラジキニン B 2 受容体、ガラニン G A L 2 受容体、ニューロペプチド F F / B N P B W 2 受容体、ニューロペプチド F F / B N P F F 2 受容体、ニューロペプチド Y Y 1 受容体、ニューロテンシン N T S R 1 受容体、ニューロテンシン N T S R 2 受容体、ニューロペプチド S 受容体、オレキシン O X 2 受容体、5 - H T 1 D 受容体、アンジオテンシン A T 2 a 受容体、アンジオテンシン A T 2 b 受容体、カルシトニン A M 2 受容体、カルシトニン A M Y 3 受容体、フリッツル D F Z D 6 受容体、キスペプチン受容体、メラトニン M T 1 受容体、ニューロペプチド F F / B N P B W 1 受容体およびオピオイド μ 受容体からなる群から選択される。

30

【 0 0 3 0 】

別の実施形態では、選択性薬剤は、脳幹で発現される受容体に特異的に結合する。好ましい実施形態では、脳幹で発現される受容体は、5 - H T ₃ 受容体、ガラニン受容体 1、メラノコルチン M C 1 受容体、メラノコルチン M C 2 受容体、メラノコルチン M C 3 受容体、メラノコルチン M C 4 受容体、カルシトニン受容体様、C R F 2 受容体、ニューロペプチド F F / B N P B W 2 受容体、5 - H T 1 _A 受容体、ニューロペプチド Y Y 2 受容体、ニューロテンシン N T S R 1 受容体、オピオイド μ 受容体、オレキシン O X 1 受容体、オレキシン O X 2 受容体およびドーパミン D 2 受容体からなる群から選択される。より好ましい実施形態では、脳幹で発現される受容体は、5 - H T ₃ 受容体である。

40

【 0 0 3 1 】

好ましい実施形態では、5 - H T ₃ 受容体に結合するリガンドは、表 2 に示されるリガンドの群から選択される。別の好ましい実施形態では、選択性薬剤は、レリセトロン (1 - ベンジル - 2 - ピペラジン - 1 - イル - 1 H - ベンズイミダゾール) またはレリセトロン - C 6 - アシルである。別の実施形態では、選択性薬剤は、皮質で発現される受容体に特異的に結合する。好ましい実施形態では、皮質で発現される受容体は、5 - H T ₃ 受容

50

体、メラノコルチンMC 1受容体、CRF 1受容体、5-HT_{2A}受容体、 α_1 アドレナリン受容体、ボンベシンBB 1受容体、フリッツルドFZD 3受容体、ボンベシンBB 3受容体、ブラジキニンB 2受容体、カルシトニン受容体様受容体、コレシストキニンCKK 2受容体、CRF 1受容体、CRF 2受容体、ガラニンGAL 2受容体、ガラニンGAL 3受容体、ニューロペプチドFF/B NPBW 2受容体、ニューロペプチドFF/B NPFF 2受容体、ニューロペプチドY Y 1受容体、ニューロペプチドY Y 5受容体、ニューロペプチドY Y 2受容体、ニューロテンシンNTSR 2受容体、オピオイド受容体、オピオイド受容体、ソマトスタチンsst 2受容体、ソマトスタチンsst 3受容体、ソマトスタチンsst 4受容体、5-HT_{1A}受容体、エンドセリンETa受容体、エンドセリンETb受容体、メラノコルチンMC 3受容体、ニューロペプチドSNPS受容体、ニューロテンシンNTSR 1受容体、オレキシンOX 1受容体、オレキシンOX 2受容体、バソプレシンV 1B受容体、キスペプチン受容体、メラトニンMT 1受容体、タキキニンNK 1受容体、タキキニンNK 2受容体およびタキキニンNK 3受容体からなる群から選択される。

10

20

30

40

50

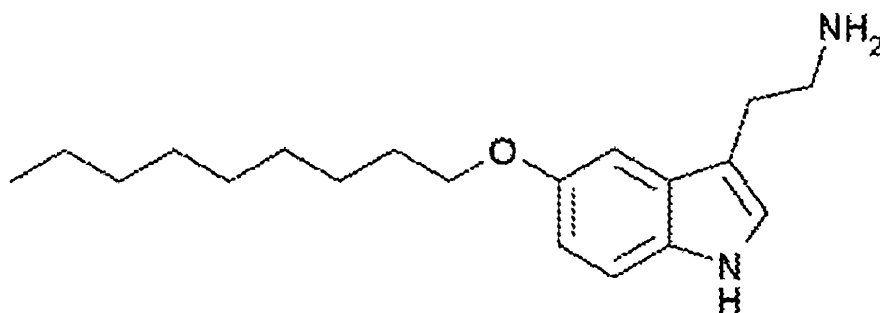
【0032】

別の実施形態では、選択性薬剤は、小脳で発現される受容体に特異的に結合する。好ましい実施形態では、小脳で発現される受容体は、CRF 1受容体、5-HT_{1B}受容体、フリッツルドFZD 4受容体、フリッツルドFZD 10受容体、フリッツルドFZD 7受容体、ブラジキニンB 2受容体、ガラニンGAL 3受容体、ニューロテンシンNTSR 2受容体、エンドセリンETb受容体、ホルミルペプチドFPR 1受容体、ホルミルペプチドFPR 2受容体、メラトニンMT 2受容体、バソプレシンV 1A受容体、アンジオテンシンAT 2a受容体、アンジオテンシンAT 2b受容体、キスペプチン受容体およびメラトニンMT 1受容体からなる群から選択される。好ましい実施形態では、小脳で発現される受容体は、5-HT_{1B}受容体である。

【0033】

好ましい実施形態では、5-HT_{1B}受容体に結合するリガンドは、表2に示されるリガンドの群から選択される。別の好ましい実施形態では、選択性薬剤は、5-ノニルオキシトリプタミンオキサレートまたは構造

【化5】



を有するその構造類似体である。

【0034】

別の実施形態では、選択性薬剤は、線条体で発現される受容体に特異的に結合する。好ましい実施形態では、線条体で発現される受容体は、5-HT_{2A}受容体、コレシストキニンCKK 2受容体、CRF 1受容体、ニューロペプチドFF/B NPBW 2受容体、ニューロペプチドFF/B NPFF 2受容体、ソマトスタチンsst 5受容体、バソプレシンV 1B受容体、5-HT₆受容体、アデノシンA₂受容体、アデノシンA_{2A}受容体、ドーパミンD₁受容体、ドーパミンD₂受容体、ペプチドP₅₁₈受容体、タキキニンNK 1受容体、タキキニンNK 2受容体およびタキキニンNK 3受容体からなる群から選択される。

【0035】

別の実施形態では、選択性薬剤は、海馬で発現される受容体に特異的に結合する。好ましい実施形態では、海馬で発現される受容体は、5-HT₃受容体、ブラジキニンB₂受容体、CRF₂受容体、フリッツルドFZD₃受容体、ガラニンGAL₃受容体、ニューロペプチドFF/B NPBW₂受容体、ニューロペプチドY₁受容体、ニューロペプチドY₅受容体、ニューロテンシンNTSR₂受容体、オピオイド受容体、ソマトスタチンsst₃受容体、ソマトスタチンsst₅受容体、5-HT_{1A}受容体、アデノシンA₁受容体、エンドセリンETa受容体、エンドセリンETb受容体、ホルミルペプチドFPR₁受容体、ホルミルペプチドFPR₃受容体、フリッツルドFZD₈受容体、フリッツルドFZD₉受容体、メラトニンMT₂受容体、ニューロペプチドFF/B NPBW₂受容体、ニューロペプチドY₂受容体、ニューロペプチドFF/B NPF₁受容体、ニューロペプチドY₄受容体、ニューロテンシンNTSR₁受容体、オレキシンOX₁受容体、オレキシンOX₂受容体、ソマトスタチンsst₁受容体、ソマトスタチンsst₅受容体、バソプレシンV_{1A}受容体およびバソプレシンV_{1B}受容体からなる群から選択される。好ましい実施形態では、海馬で発現される受容体は、5-HT_{1A}受容体である。

10

【0036】

好ましい実施形態では、5-HT_{1A}受容体に結合するリガンドは、表2に示されるリガンドの群から選択される。別の好ましい実施形態では、選択性薬剤は、LY-165、LY-165, 163 C6-アシル、または8-OH-DPATである。

20

【0037】

別の実施形態では、選択性薬剤は、髄質で発現される受容体に特異的に結合する。好ましい実施形態では、髄質で発現される受容体は、EphA₁受容体、EphA₂受容体、EphA₃受容体、EphA₄受容体、EphB₁受容体、EphB₂受容体、EphB₃受容体、オピオイド(opioid)μ(ミュー)受容体、GlyT₁輸送体、DP1プロスタノイド受容体、タキキニンNK₁、NK₂またはNK₃受容体、CXCR₄ケモカイン受容体およびVEGFR₁、VEGFR₂またはVEGFR₃受容体からなる群から選択される。

【0038】

別の実施形態では、選択性薬剤は、グリアで発現される受容体に特異的に結合する。好ましい実施形態では、グリアで発現される受容体は、ホルミルペプチドFPR₁受容体、ホルミルペプチドFPR₂受容体、ホルミルペプチドFPR₃受容体およびTLR₇からなる群から選択される。

30

【0039】

好ましい実施形態では、受容体に結合する選択性薬剤は、表2に示される通りである。

【0040】

【表 2】

標的受容体	選択性薬剤
5-HT1A	5-カルボキサミドトリプタミンマレアート, インドレナート塩酸塩, ピンドロール, Ro 60-0175 フマレート, S-(-)-ピンドロール, F-15,599, フレシノキサン, ヨヒンビン, 1-(メチルフェニル)-3-(1,2,3,4-テトラヒドロカルバゾール-9-イル)プロパン-2-オール, 4-[ビス(4-エトキシフェニル)メチル]ピペリジン, 6-tert-ブチル-2-(ピペラジン-1-イル)-1,3-ベンゾジアゾール, 1-[2-(2-エトキシフェニル)シクロプロピル]エチルアミン, N-[[2-(2-フルオロフェニル)メトキシ]フェニル]メチルシクロプロパンアミン, (5,6-ジメトキシ-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-イル)メタンアミン, 4-(4-クロロナフタレン-1-イル)オキシピペリジン, 2-メトキシ-N-メチル-2-[3-(トリフルオロメチル)フェニル]エタンアミン, 1-(3,6-ジクロカルバゾール-9-イル)-3-(プロパン-2-イルアミノ)プロパン-2-オール, N',N'-ジメチル-N-(2-メチルキノリン-4-イル)エタン-1,2-ジアミン, 2-(2-メチルフェニル)-4-ピペラジン-1-イルピラゾロ[1,5-a]ピラジン, 4-(1,4-ジアゼパン-1-イル)-7-メチルピロロ[1,2-a]キノキサリン, N-[2-(2-(4-プロモフェニル)イミダゾ[1,2-a]ベンズイミダゾール-3-イル)エチル]-2-メチルプロパン-2-アミン, N-[3-(2-メトキシ-4-メチルフェノキシ)プロピル]ブタン-2-アミン, 4-(2,4-ジメトキシフェニル)-N-(1-メチルピペリジン-4-イル)-1,3-チアゾール-2-アミン, 2-(1-エチル-5-メチルインドル-3-イル)エタンアミン, [2-(3-フルオロフェノキシ)フェニル]メタンアミン, 3-(4-フルオロフェニル)-3-(4-メトキシフェニル)プロパン-1-アミン, アニロパム塩酸塩, LY-165,163 ((1-[2-(4-アミノフェニル)エチル]-4-(3-トリフルオロメチルフェニル)-ピペラジン)) LY-165,163 C6-アシル, 8-OH-DPAT (8-ヒドロキシ-2-(ジ-n-プロピルアミノ)テトラリン)
5-HT1B	5-カルボキサミドトリプタミンマレアート, 5-ノニルオキシトリプタミンオキサレート, ドニトリプタミン塩酸塩, インドレナート塩酸塩, ピンドロール, S-(-)-ピンドロール, トリプタン, 好ましくは, ズルミチリプタン, エレトリプタン, スマトリプタン, CP-93,129, CP-94,253, ジヒドロエルゴタミン, エルトプララジン, エルゴタミン, メチセルジド, RU 24969, ズルミチリプタン, エレトリプタン, スマトリプタン, 2-ピペラジン-1-イルキノリン, 1-(メチルアミノ)-3-(1,2,3,4-テトラヒドロカルバゾール-9-イル)プロパン-2-オール, N',N'-ジメチル-N-(2-メチルキノリン-4-イル)エタン-1,2-ジアミン, 4-(1,4-ジアゼパン-1-イル)-7-メチルピロロ[1,2-a]キノキサリン, 4-(2,4-ジメトキシフェニル)-N-(1-メチルピペリジン-4-イル)-1,3-チアゾール-2-アミン
5-HT1D	5-カルボキサミドトリプタミンマレアート, CP-135,807, ジヒドロエルゴタミン, エルゴタミン, メチセルジド, ヨヒンビン, ドニトリプタン塩酸塩, トリプタン, 好ましくは, アルモトリプタン, エレトリプタン, フラバトリプタン, ナラトリプタン, リザトリプタン, スマトリプタンまたはズルミトリプタン
5-HT1E	BRL-54443
5-HT1F	BRL-54443, ラスミジタン, LY-334,370, ナラトリプタン
5-HT2A	DOI 塩酸塩, Ro 60-0175 フマレート, TCB-2, α-メチル-5-ヒドロキシトリプタミンマレアート, リスリド, ヨ

10

20

30

40

標的受容体	選択性薬剤
	ヒンビン, 2-ピペラジン-1-イルキノリン, [2-(4-クロロフロフェニル)エチル][(1-メチル-1H-インドル-3-イル)メチル]アミン, N-[2-[(2-フルオロフロフェニル)メトキシ]フェニル]メチル]シクロプロパンアミン, (5,6-ジメトキシ-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-イル)メタンアミン, 4-(4-クロロナフタレン-1-イル)オキシピペリジン, 1'-エチル-6-メトキシスピロ[2,3,4,9-テトラヒドロピリド[3,4-b]インドル-1,4'-ピペリジン], 4-(1,4-ジアゼパン-1-イル)-7-メチルピロロ[1,2-a]キノキサリン, N-[(2,5-ジフルオロフェニル)メチル]-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-(3,4-ジメトキシフェニル)エタンアミン, N-[(2,3-ジメトキシフェニル)メチル]-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-2-アミン, 1-(シクロペンチルアミノ)-3-(3-メチルフェノキシ)プロパン-2-オール, 2-(1-エチル-5-メチルインドル-3-イル)エタンアミン, [2-(3-フルオロフェノキシ)フェニル]メタンアミン, 3-(1,3-ベンゾジオキソール-5-イルオキシメチル)-4-(4-フルオロフェニル)ピペリジン, 3-(4-フルオロフェニル)-3-(4-メトキシフェニル)プロパン-1-アミン
5-HT2B	BW-723C86, フェンフルラミン, Ro60-0175 フマレート
5-HT2C	A-372,159, AL-38022A, アリピプラゾール, ロルカセリン, Ro60-0175 フマレートおよびYM-348
5-HT3	1-フェニルビグアナイド塩酸塩, B-HT 920, m-クロロフェニルビグアナイド, SR 57227 塩酸塩, 2-メチル-5-ヒドロキシトリプタミン, キバジン, RS-56812, レリセトロン(F-0930-RS), レリセトロン-C6-アシル,
5-HT4	5-メトキシトリプタミン, BIMU-8, シニタプリド, シサプリド, ダゾプリド, メトクロプラミド, モサプリド, プロカロプリド, RS-67333, レンザプリド, テガセロッドおよびザコプリド
5-HT5a	5-カルボキサミドトリプタミンマレアート, エルゴタミン
5-HT6	Ro 60-0175 フマレート, EMD-386,088, 4-(1,4-ジアゼパン-1-イル)-7-メチルピロロ[1,2-a]キノキサリン, 3-(4-フルオロフェニル)-3-(4-メトキシフェニル)プロパン-1-アミン
5-HT7	5-カルボキサミドトリプタミンマレアート, AS-19, E-55888 およびRA-7
GAL1	ガラニン, ガラニン様ペプチドおよびM617
GAL2	AR-M 1896, ガラニン, ガラニン様ペプチド, M1145 およびM617
GAL3	ガラニンおよびガラニン様ペプチド
MC1	副腎皮質刺激ホルモン(ACTH), α-メラノサイト刺激ホルモン, β-メラノサイト刺激ホルモン, γ-メラノサイト刺激ホルモン, メラノタン-II およびMS05
MC2	副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)
MC3	副腎皮質刺激ホルモン(ACTH), α-メラノサイト刺激ホルモン(α-MSH), α-NDP-MSH, β-メラノサイト刺激ホルモン(β-MSH), γ-メラノサイト刺激ホルモン(γ-MSH)およびメラノタン-II
MC4	副腎皮質刺激ホルモン(ACTH), α-メラノサイト刺激ホルモン(α-MSH), α-NDP-MSH, β-メラノサイト刺激ホルモン

標的受容体	選択性薬剤
CRF1	ン(β-MSH), γ-メラノサイト刺激ホルモン(γ-MSH)およびメラノタン-II コルチコトロピン放出因子(CRF), サウバギン, ストレシンI, ウロコルチン1, , N-シクロヘキシル-7-(4-メ チルフェニル)-5-フェニルピロロ[2,3-d]ピリミジン-4-アミン
CRF2	コルチコトロピン放出因子(CRF), サウバギン, ウロコルチン1, ウロコルチン2およびウロコルチン3
FZD2	Wnt-5a およびWnt
FZD3	Wnt-3 およびWnt-5a
FZD4	Wnt およびノリン
FZD6	Wnt-3a, wnt-4 およびWnt-5a
FZD8	Wnt
FZD9	Wnt
FZD10	Wnt
α1A-アドレノセ プター	フェニエフリン, , 2,3,3a,4,5,6-ヘキサヒドロ-1H-ピラジノ[3,2,1-jk]カルバゾール, 2-ピペラジン-1-イ ルキノリン, 6-tert-ブチル-2-(ピペラジン-1-イル)-1,3-ベンゾチアゾール, 2-(2-メチルフェニル)-4-ピペ ラジン-1-イルピラゾロ[1,5-a]ピラジン, 4-(1,4-ジアゼパン-1-イル)-7-メチルピロロ[1,2-a]キノキサリ ン, N-(1,2-ジフェニルエチル)-4-メチル-4-(5-メチルフラン-2-イル)ペンタン-2-アミン, 3-(1,3-ベンゾジ オキソール-5-イルオキシメチル)-4-(4-フルオロフェニル)ピペリジン, 3-(4-フルオロフェニル)-3-(4-メトキ シフェニル)プロパン-1-アミン
α2-アドレノセ プター	B-HT 933 二塩酸塩, グアニファアシン塩酸塩
BB1	ガストリン放出ペプチド, GRP-27, GRP-14, GRP-10 およびニューロメジンB
BB2	ガストリン放出ペプチド, GRP-27, GRP-14, GRP-10, ニューロメジンB およびボンベシン
BB3	ボンベシン
B2	ブラジキニン, Phe ⁸ ψ(CH-NH)-Arg ⁹]-ブラジキニン, カリジンおよびキニン
CT 受容体様 CRL	アドレノメジュリンおよびCGRP
CCK2	CCK-33, CCK-4, CCK-8, ガストリン17 およびガストリンI
Y1	BWX-46, ニューロペプチドY, 膵臓ポリペプチドおよびペプチドYY, 1,4-ジメチル-7,8,9,10-デトラヒドロ- 6H-シクロヘプタ[b]キノリン-11-アミン, 3-(4-フルオロフェニル)-3-(4-メトキシフェニル)プロパン-1-アミ ン
Y2	ニューロペプチドY, 膵臓ポリペプチドおよびペプチドYY(3-36)およびペプチドYY(PYY), 1,4-ジメチル-

標的受容体	選択性薬剤
	7,8,9,10-デトラヒドロ-6H-シクロヘプタ[b]キノリン-11-アミン
Y4	ニューロペプチドY, 膵臓ポリペプチドおよびペプチドYY
Y5	BWX-46, ニューロペプチドY, 膵臓ポリペプチドおよびペプチドYY
NPFF1	ニューロペプチドB-23, ニューロペプチドB-29, ニューロペプチドW-23 およびニューロペプチドW-30
NPFF2	ニューロペプチドSF, ニューロペプチドB-23, ニューロペプチドB-29, ニューロペプチドW-23 およびニューロペプチドW-30
NPFF1	ニューロペプチドAF, ニューロペプチドFF, ニューロペプチドRFRP-1, ニューロペプチドRFRP-3 およびニューロペプチドSF
NPFF2	ニューロペプチドAF, ニューロペプチドFF, ニューロペプチドRFRP-1 およびニューロペプチドRFRP-3
ニューロテニン ンNTSR1 受容体	ABS-201, コンツラキニン-G, EISAI-2, JMV431, KH28, 大ニューロメジンN, 大ニューロテニンシ, ニューロメジンN およびニューロテニンシ
NTS2	コンツラキニン-G, JMV458, ニューロメジンN, ニューロテニンシ, キセニン
オピオイドδ	β-エンドルフィン, デルトルフィンI, ダイノルフィン1-13, ダイノルフィンA, ダイノルフィンB, エンドルフィン-1, Leu-エンケファリンおよびMet-エンケファリン, 4-[3-(2-(4-メトキシフェニル)エチルアミノ)ブチル]フェノール
オピオイドκ	α-ネオエンドルフィン, β-エンドルフィン, ビッグダイノルフィン, ダイノルフィン1-13, ダイノルフィンA, ダイノルフィンB, Leu-エンケファリンおよびMet-エンケファリン, 1,2,3,4,7,8,9,10-オクタヒドロ-[1]ベンゾチオロ[2,3-b]キノリン-11-アミン, 4-[3-(2-(4-メトキシフェニル)エチルアミノ)ブチル]フェノール
オピオイドμ	β-エンドルフィン, ダイノルフィン1-13, ダイノルフィンA, ダイノルフィンB, エンドモルフィン-1, エンドモルフィン-2, Leu-エンケファリン, Met-エンケファリンおよびPL-017
sst1	BIM 23053, CST-14, CST-17, L871,881, ソマトスタチン-14 およびSS-28
sst2	(1R,1'S,3'R/1R,1'R,3'S)-L-054,264, BIM 23053, CST-14, CST-17, L871,881, SRIF-14 およびSRIF-28.
sst3	CST-14, CST-17, L871881, SRIF-14 およびSRIF-28
sst4	BIM 23053, CST-14, CST-17, L803,087 トリフルオロアセテート, L871,881, SRIF-14 およびSRIF-28
sst5	BIM 23053, CST-14, CST-17, L871,881, SRIF-14 およびSRIF-28
FPR1	カテプシンG, fMet-Ile-Phe-Leu, fMet-Leu-Phe, fMet-Met-Tyr-Ala-Leu-Phe, WKYMVm およびアネキシンI
FPR2	アミロイド形成ペプチド, アネキシンI, 宿主由来ペプチド, 微生物由来ペプチド, ミトコンドリア由来ホルミル-

標的受容体	選択性薬剤
	ペプチド, MMK1 および WKYMVm
FPR3	アミロイド形成ペプチド, アネキシン I, 宿主由来ペプチド, 微生物由来ペプチド, ミトコンドリア由来ホルミルペプチド, および WKYMVm
TLR7	イミキモド
A1	PD81723, 3-(4-フルオロフェニル)-3-(4-メトキシフェニル)プロパン-1-アミン
A2	CV1808
A2A	CGS21680, 3-(4-フルオロフェニル)-3-(4-メトキシフェニル)プロパン-1-アミン
ETA	エンドセリン-1, エンドセリン-2 および エンドセリン-3
ETb	[Ala ^{1,3,11,15}]-エンドセリン, BQ-3020, エンドセリン-1, エンドセリン-2, エンドセリン-3 および IRL-1620
MT1	アゴメラチンおよびメラトニン
MT2	アゴメラチンおよびメラトニン
AM1	アドレノメジュリン, アドレノメジュリン 2/インテルメジン, α -CGRP, AM (11-50) および β -CGRP
AM2	アドレノメジュリン, アドレノメジュリン 2/インテルメジン, α -CGRP および β -CGRP
AMY1	アドレノメジュリン, アドレノメジュリン 2/インテルメジン, α -CGRP, アミリン, β -CGRP およびカルシトニン
AMY3	アドレノメジュリン, アドレノメジュリン 2/インテルメジン, α -CGRP, アミリン およびカルシトニン
CGRP	アドレノメジュリン, アドレノメジュリン 2/インテルメジン, α -CGRP および β -CGRP
CT-R	アドレノメジュリン, アドレノメジュリン 2/インテルメジン, α -CGRP, アミリン, β -CGRP およびカルシトニン
グレリン受容体	タビモレリンヘミフマレート, グレリン, アシルグレリン, カプロモレリン, GHRP-2, GHRP-6, ヘキサレリン, イパモレリン, MK-677, SM-130, 686.
NPS 受容体	ニューロペプチド S
OX1	オレキシン A および オレキシン B
OX2	オレキシン A および オレキシン B
OT	オキシトシン および バソプレシン
V1A	オキシトシン および バソプレシン
V1B	d[Cha ⁴]-AVP, デスモプレシン, オキシトシン および バソプレシン
V2	デスモプレシン, オキシトシン および バソプレシン
AT2	アンジオテンシン I, アンジオテンシン (angiotensin) II, アンジオテンシン III, CGP42112 および ノボキ
キスペプチン受容体	キスペプチン, キスペプチン-10, キスペプチン-13, キスペプチン-14, キスペプチン-15, キスペプチン-52, キスペプチン-54 および キスペプチン-9

標的受容体	選択性薬剤
D1	6, 7-ADTN, A68930 塩酸塩およびブアラミペキソール二塩酸塩
D2	A68930 塩酸塩, B-HT 920, 4-[ビス(4-エトキシフェニル)メチル]ピペリジン, N-[[2-[(2-フルオロフェニル)メトキシ]フェニル]メチル]シクロプロパンアミン, (5,6-ジメトキシ-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-イル)メタンアミン, 4-(4-クロロナフタレン-1-イル)オキシピペリジン, 4-[[[3-(4-メトキシフェニル)イミダゾ[1,2-a]ベンズイミダゾール-3-イル]エチル]-N,N-ジメチルプロパン-2-アミン, N-[2-(4-ブロモフェニル)イミダゾ[1,2-a]ベンズイミダゾール-3-イル]エチル]-2-メチルプロパン-2-アミン, 4-[3-(2-(4-メトキシフェニル)メチル)プロパン-2-アミン], {[1-(3,4-ジフルオロフェニル)ピロリジン-3-イル]メチル}[(2-メチル-1-フェニル-1H-イミダゾール-5-イル)メチル]アミン, 2-(1-エチル-5-メチルインドール-3-イル)エタンアミン, [2-(3-フルオロフェノキシ)フェニル]メタンアミン, 3-(4-フルオロフェニル)-3-(4-メトキシフェニル)プロパン-1-アミン
QRFP	26RGa および QRFP (P518)
NK1	C14TKL-1, GR73632, ヘモキニン1, エレドイシン, カツシニン, ニューロキニン(nurokinin)A, ニューロキニンB, ニューロペプチドK, ニューロペプチド-α, フィロメズシン, セプチド, スパンチドI, スパンチド(sepantide)II およびサブスタンスP, 3-(4-フルオロフェニル)-3-(4-メトキシフェニル)プロパン-1-アミン, サブスタンスP スルホン, フィサレミン, サブスタンスP 4-11, カツシニン, サブスタンス(substante)P 6-11
NK2	[Lys ⁵ , MeLeu ⁹ , Nle ¹⁰]-NKA(4-10), GR64349, エレドイシン, カツシニン, ニューロキニン(nurokinin)A, ニューロキニンB, ニューロペプチドK, ニューロペプチド-α, フィロメズシン, セプチド, スパンチドI, スパンチド(sepantide)II およびサブスタンスP, 3-(4-フルオロフェニル)-3-(4-メトキシフェニル)プロパン-1-アミン, ヘモキニン1
NK3	セククチド, エレドイシン, カツシニン, ニューロキニン(nurokinin)A, ニューロキニンB, ニューロペプチドK, ニューロペプチド-α, フィロメズシン, セプチド, スパンチドI, スパンチド(sepantide)II およびサブスタンスP, 3-(4-フルオロフェニル)-3-(4-メトキシフェニル)プロパン-1-アミン, ヘモキニン1
EphA1	Pro7 ニューロキニンB
EphA2	エフリン-A1 (EFNA1)
EphA3	エフリン-A2 (EFNA2)
EphA4	エフリン-A3 (EFNA3)
EphB1	エフリン-A4 (EFNA4)
EphB2	エフリン-B1 (EFNB1)
	エフリン-B2 (EFNB2)

標的受容体	選択性薬剤
EphB3	エフリン-A1 (EFNB3)
GlyT1	サルコシン, Org 24598, NFPS, SSR-103800, N-メチル-SSR504734, GSK931145, NPTS
CXCR4	SDF-1 α , SDF-1 β , CXCL12 1-17, CXCL 1-9, イソチオ尿素-1t, AMD3100, ALX40-4C, T140
VEGFR1	VRGFRA, VGFRB, SU 4312, アキシチニブ, スニチニブマレート
VEGFR2	VRGFRA, VGFRB, SU 4312, アキシチニブ, スニチニブマレート
VEGFR3	VRGFRA, VGFRB, SU 4312, アキシチニブ, スニチニブマレート
VEGFR3	VRGFRA, VGFRB, SU 4312, アキシチニブ, スニチニブマレート

表 2：受容体と、各受容体に特異的な選択的リガンド

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、前記受容体と同じ細胞で発現され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。一般に、本発明の核酸は、前記標的分子の機能を阻害することができる。従って、標的分子がmRNAである場合、前記核酸（一般には、siRNA、shRNAまたはアンチセンス核酸）は、そのmRNAの翻訳を阻害して、そのmRNAによりコードされているタンパク質のレベルの低下をもたらすことにより機能する。標的核酸がタンパク質である場合、前記核酸（一般には、アプタマー）は、そのタンパク質の活性を阻害することにより機能する。

【0042】

用語「核酸」は、本明細書で使用する場合、2以上のデオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体分子ならびに天然核酸に構造上類似するが、天然の核酸とは（例えば、化学修飾によって）1以上の核酸骨格（例えば、天然核酸のリン酸）、核酸の糖（例えば、天然DNAではデオキシリボース、天然RNAではリボース）、および核酸の塩基（例えば、天然核酸のアデノシン、シトシン、グアニン、チミジン、またはプリン）が異なる分子を有するポリマーを意味する。

【0043】

オリゴヌクレオチドは、二本鎖または一本鎖オリゴヌクレオチドであってよく、限定されるものではないが、低分子干渉RNA（siRNA）、低分子ヘアピン型RNA（shRNA）、マイクロRNA（miRNA）、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムを含む。二本鎖核酸が使用される場合、これらは標的核酸と相補的な第1のセンス鎖と、そのセンス鎖と相補的な第2のアンチセンス鎖を含んでなり、これにより、第1鎖と第2鎖の間での塩基対形成により二本鎖DNAの形成が可能である。

【0044】

用語「アンチセンス鎖」は、標的配列と実質的に相補的な領域を含む二本鎖核酸の鎖を意味する。相補性領域が標的配列と完全に相補的でない場合、アンチセンス鎖の5'末端のヌクレオチド2～7個外側にミスマッチが最も許容される。

【0045】

用語「センス鎖」は、本明細書で使用する場合、アンチセンス鎖の領域と実質的に相補的な領域を含むdsRNA鎖を意味する。

【0046】

用語低分子干渉RNA（「siRNA」）は、RNA干渉経路を誘導する低分子の阻害性RNA二重鎖を意味する。これらの分子は様々な長さであってよく（一般に18～30塩基対）、アンチセンス鎖にそれらの標的mRNAとの様々な程度の相補性を含む。総てではないが一部のsiRNAは、センス鎖および/またはアンチセンス鎖の5'または3'末端に対合しないオーバーハング塩基を有する。用語「siRNA」は、2本の分離した鎖の二重鎖を含む。本明細書で使用する場合、siRNA分子はRNA分子に限定されず、モルホリノなどの、1以上の化学的に修飾されたヌクレオチドを有する核酸をさらに包含する。

【0047】

用語「shRNA」または「短鎖ヘアピンRNA」は、本明細書で使用する場合、2本の鎖が、一方の鎖の3'末端と対応する他方の鎖の5'末端との間で中断されないヌクレオチド鎖により連結されて二重鎖構造を形成しているdsRNAを意味する。

【0048】

用語「マイクロRNA」または「miRNA」は、遺伝子発現を調節することができる、一般に約21～23ヌクレオチド長の短い一本鎖RNA分子を意味する。miRNAは、合成物（すなわち、組換え型）であっても天然物であってもよい。天然miRNAは遺伝子によりコードされ、DNAから転写され、一次転写産物（「pri-miRNA」）からプロセシングされて短いステム-ループ構造（「pre-miRNA」）となり、最終的に成熟miRNAとなる。成熟miRNA分子は、1以上のmRNA分子と部分的に相補的であり、RNA干渉に類似したプロセスを介して、またはmRNAの翻訳を阻害す

10

20

30

40

50

ることにより、遺伝子発現のダウンレギュレーションを行う。

【0049】

「アンチセンス配列」は、本明細書で使用する場合、標的mRNA（センス）またはDNA（アンチセンス）配列と結合することができる一本鎖核酸配列（RNAまたはDNAのいずれか）を含んでなるアンチセンスまた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cDNA配列に基づき、アンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドを送達する能力は、例えば、Stein and Cohen, Cancer Res. 48:2659, (1988)およびvan der Krol et al., BioTechniques 6:958, (1988)に記載されている。

【0050】

本明細書で使用する場合、用語「リボザイム」または「RNA酵素」または「触媒RNA」は、化学反応を触媒するRNA分子を意味する。多くの天然リボザイムが、それらの固有のホスホジエステル結合の1つの加水分解、または他のRNA内の結合の加水分解を触媒するが、それらはリボソームのアミノトランスフェラーゼ活性、DNAリガーゼのリガーゼ活性、および従来のタンパク質酵素により遂行される他のいくつかの化学反応を触媒することも分かっている。

【0051】

「アプタマー」は、本明細書で使用する場合、結合が「相補的」でない、すなわち、核酸リガンドと標的核酸配列の間の塩基対形成によらない、標的分子上の2以上の部位と結合する核酸リガンドを意味する。アプタマーは、ポリペプチドを含め、想定できるいずれの標的にも結合するものを設計することができる。アプタマーは、慣用の生体分子である抗体のものと競合する分子認識特性を付与するので、生物学適用および治療適用に有用性を与える。それらの選択的認識に加え、アプタマーは、試験管内で完全に操作することができ、化学合成により容易に生産され、望ましい保存特性を備え、かつ、治療適用において免疫原性をほとんどまたは全く惹起しないことから、抗体に優る利点を提供する。アプタマーは、「SELEX」(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) (Shamah et al, Acc. Chem. Res. 2008, 41 pp. 130-8)として当技術分野の現状で知られている方法論で、in vitroパーティション、選択および増幅を何回か繰り返すことによって合成することができる。あるいは、アプタマーは、例えば、段階的固相により合成することができる。

【0052】

本発明の核酸は、核酸塩基、糖および/またはヌクレオチド間結合に1以上の修飾を含んでもよい。

【0053】

核酸の1以上の骨格残基に対する修飾は、下記のうちの1以上を含んでなり得る：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'-AIlyl、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'糖修飾；4'-チオ、4'-CH₂-O-2'-架橋、4-(CH₂)₂-O-2'-架橋を含む4'糖修飾；ロックド核酸(Locked Nucleic Acid)(LNA)；ペプチド核酸(Peptide Nucleic Acid)(PNA)；インターカレーティング核酸(Intercalating nucleic acid)(INA)；ツイストインターカレーティング核酸(Twisted intercalating nucleic acid)(TINA)；ヘキサトール核酸(Hexitol nucleic acids)(HNA)；アラビノ核酸(arabinonucleic acid)(ANA)；シクロヘキサン核酸(cyclohexane nucleic acids)(CNA)；シクロヘキセニル核酸(cyclohexenyl nucleic acid)(CeNA)；トレオシル核酸(threosyl nucleic acid)(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；インコーポレーションアルギニンリッチペプチド；合成RNAへの5'-リン酸の付加；RNAアプタマー((Que-Gewirth NS, Gene Ther. 2007 Feb;14(4):283-91.)；特定のRNAアプタマーの対象に対する解毒薬で調節したRNAアプタマー(Oney S, Oligonucleotides. 2007 Fall;17(3):265-74参照)またはそれらの任意の組合せ。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 4 】

核酸の1以上のヌクレオシド間結合に対する修飾は、下記のうちの1以上を含んでなり得る：ホスホロチオエート、ホスホルアミデート、ホスホロジアミデート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノアート、ホスホロジセレノアート、ホスホロアニロチオエートおよびホスホルアニリダート、またはそれらの任意の組合せ。

【 0 0 5 5 】

ロックド核酸 (LNA) は、よく接近不能RNAとも呼ばれる、修飾された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'炭素を連結する付加的な架橋 (O2', C4' - メチレンブリッジ) で修飾される。この架橋は、A型のDNAまたはRNAによく見られる、3'エンド構造立体配座でリボースを「ロック」する。LNAヌクレオチドは、所望により、核酸においてDNAまたはRNA塩基と混合することができる。このようなオリゴマーは市販されている。ロックされたりボース立体配座は、塩基のスタッキングおよび骨格の予備構成を増進する。これは、改善されたミスマッチ識別能を備えるだけでなく、熱安定性 (融解温度) およびLNA修飾核酸のハイブリダイゼーション親和性を著しく高める。これらの特性は、それらをアンチセンスに基づく技術に極めて有用とする。さらに、LNA抗miRオリゴヌクレオチドは霊長類で試験されており、有望な結果と毒性の低さが示されている。

10

【 0 0 5 6 】

ペプチド核酸 (PNA) は、DNAまたはRNAに類似する人工的に合成されたポリマーであり、生物学的研究および医学的処置に使用される。PNAは、自然界に存在することは知られていない。DNAおよびRNAはそれぞれデオキシリボースおよびリボースの糖骨格を有するが、PNAの骨格は、ペプチド結合により連結されたN - (2 - アミノエチル) - グリシン単位の繰り返しから構成される。この骨格に、メチレンカルボニル結合により様々なプリンおよびピリミジン塩基が結合される。PNAは、ペプチドと同様に、最初の (左側) の位置にN末端、右側にC末端がくるように描かれる。PNAの骨格は電荷の無いリン酸基を含むので、PNA / DNA鎖間の結合は、静電反発が無いためにDNA / DNA鎖間よりも強い。混合塩基PNA分子は、塩基対認識に関してまさにDNA分子を模倣するものである。PNA / PNA結合は、PNA / DNA結合よりも強い。

20

【 0 0 5 7 】

インターカレーティング核酸 (INA) は、疎水性の挿入物に共有結合により連結された通常のデオキシリボヌクレオチドからなる、修飾された核酸類似体である。INAは、各修飾に関して最大11度の安定化で、相補的DNAに高い親和性を有する。INAは、通常のDNAよりも、ミスマッチ標的に対する完全マッチ標的への特異性が高い。INAがDNAにより高い親和性を持つことを利用すれば、より短いプローブを使用すること、またそれにより特異性をなおさらに増強することが可能となる。さらに、INAは、DNAおよびRNA間のユニークな識別能を備えたDNA選択的オリゴヌクレオチド類似体である。INAが相補的DNAに高い親和性を持つとしても、相補的INAの相補配列に対する親和性は低い。ツイストインターカレーティング核酸は、TINAで表す。

30

【 0 0 5 8 】

ヘキシトール核酸 (HNA) は、天然の核酸塩基とリン酸化された1, 5 - アンヒドロヘキシトール骨格から構成されるオリゴヌクレオチドである。HNAとRNA間の分子会合は、HNAとDNA間および天然核酸間 (dsDNA、dsRNA、DNA / RNA) よりも安定である。他の合成修飾オリゴヌクレオチドは、ANA (アラビノ核酸)、CNA (シクロヘキサン核酸)、CeNA (シクロヘキセニル核酸) およびTNA (トレオシル (threosyl) 核酸) を含んでなる。

40

【 0 0 5 9 】

モルホリノは、天然の核酸構造の再設計産物である合成分子である。モルホリノとDNAまたはRNAの間の構造上の違いは、モルホリノも標準的な核酸塩基を有するが、それらの塩基がデオキシリボース / リボース環ではなく6員モルホリン環に結合され、かつ、非イオン性ホスホロジアミデートサブユニット間結合が陰イオン性ホスホジエステル結合

50

に置き換わっていることである。モルホリノは、PMO（ホスホロジアミデートモルホリノオリゴヌクレオチド）とも呼ばれることがある。6員モルホリン間は、化学式 $O - (CH_2 - CH_2)_2 - NH$ を有する。

【0060】

ギャップマーは、DNA窓または「ギャップ」が、それ以外の点では通常の、または修飾されたRNAオリゴヌクレオチドに挿入されたRNA-DNA-RNAキメラオリゴヌクレオチドプローブである。この修飾はオリゴヌクレオチドの *in vivo* 安定性およびプローブと標的の相互作用のアビディティを高め、その結果、より短いプローブが効果的に使用できる。

【0061】

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で発現される標的分子に特異的に結合することができる。核酸と標的分子の結合は、標的分子が、核酸の配列と相補的な配列を含む核酸である場合に、ワトソン-クリック相互作用を介して起こり得る。あるいは、標的分子がポリペプチドである場合には、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、この場合、核酸はアプタマーとして働く。

【0062】

本発明のコンジュゲートの一部を形成する核酸が、標的mRNAの核酸配列に相補的な場合、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siRNAである場合、これは、AAジヌクレオチドに対する標的のmRNA配列をスキャンして、AAのすぐ下流の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。一例では、siRNA標的配列の選択は、標的配列がGGで始まり、BLAST検索により解析した際に他の遺伝子と有意な配列相同性を持たない限り、純粋に経験的に決定される（例えば、Sui *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:5515-20 (2002) 参照）。他の例では、siRNA標的配列を選択するためにより精巧な方法が使用される。この手順は、内在mRNA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/RNAアーゼH法による分解の標的となり得る（例えば、Lee *et al.*, *Nature Biotechnol.* 20:500-05 (2002) 参照）という所見を利用する。

【0063】

あるいは、ヘアピンsiRNA発現カセットは、標的のセンス鎖と、その後に短いスーパー、標的のアンチセンス鎖、およ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発現構築物内のセンス鎖およ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影響を及ぼさずに変更することができる。場合によっては、順序の逆転が遺伝子サイレンシング活性の部分的低下をもたらすこともある。

【0064】

siRNA発現カセットのステムとして使用されるヌクレオチド配列の長さは、例えば、19～29の範囲であり得る。ループサイズは3～23ヌクレオチドの範囲であり得る。他の長さおよび/またはループサイズも使用可能である。

【0065】

さらに別の実施形態では、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'オーバーハングを使用することができる。ある特定の例において、5'オーバーハングは約6ヌクレオチド残基を含む。

【0066】

さらに別の実施形態では、RNAiに対する標的配列は21merの配列断片である。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。残りの19merの配列は35%～55%の間のGC含有率を有する。加えて、残りの19merの配列には、4つ連続するAまたはT（すなわち、AAAAまたはTTTT）も、3つ連続するGまたはC（すなわち、GGGまたはCCC）も、あるいは7回の「GC」列もない。

10

20

30

40

50

【0067】

RNAiの標的配列を選択するために付加的な基準も使用することができる。例えば、残りの19merの配列のGC含有率は45%~55%の間に制限することができる。さらに、3つ連続する同一塩基(すなわち、GGG、CCC、TTT、もしくはAAA)または5個以上の塩基の回文配列を有するいずれの19mer配列も排除される。さらに、残りの19mer配列は、他の遺伝子に対して相同性の低い配列を持つように選択することもできる。ある特定の例では、可能性のある標的配列をNCBIのヒトUniGeneクラスター配列データベースに対してBLASTNにより検索する。ヒトUniGeneデータベースには、遺伝子指向クラスターの非冗長セットが含まれる。各UniGeneクラスターには、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19merの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。

10

【0068】

siRNA配列、ならびに本発明に従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、当技術分野で公知の種々の方法を使用して評価することができる。

【0069】

用語「サイレンス」および「の発現を阻害する」、「の発現をダウンレギュレートする」、「の発現を抑制する」などは、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の細胞または細胞群から単離することができる標的mRNAの量が、第1の細胞また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の細胞または細胞群(対照細胞)と比較して減少することにより示されるような、標的遺伝子の発現の少なくとも部分的抑制を意味する。阻害の程度は通常以下のように表される:

20

$$\left(\frac{\text{対照細胞中のmRNA} - \text{処理細胞中のmRNA}}{\text{対照細胞中のmRNA}} \right) * 100 \text{ パーセント}$$

【0070】

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またはある表現型を示す細胞の数の減少に関し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、構成的にまたはゲノム操作により標的を発現する任意の細胞において、いずれの適当なアッセイによって測定してもよい。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どうか、従って、本発明に含まれるかどうかを決定するために参照が必要とされる場合に、下記の実施例で提供されるアッセイおよび当技術分野で公知の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、二本鎖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、または50パーセント抑制される。いくつかの実施形態では、二本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、または80パーセント抑制される。いくつかの実施形態では、二本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85パーセント、90パーセント、または95パーセント抑制される。

30

40

【0071】

例えば、本発明による核酸配列は、標的遺伝子を発現する細胞中に導入することができる。細胞中の標的遺伝子のmRNAレベルは、RT-PCR、ノーザンブロットまた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によりコードされているポリペプチドのレベルは、ウェスタンブロット、ELISAまたは任意の他の免疫学的また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、標的遺伝子によりコードされているmRNAまたはそのタンパク質の発現レベルの実質的变化は、標的遺伝子の発現の抑制におけるsiRNA配列の有効性

50

を示す。ある特定の例では、他の遺伝子の発現レベルも s i R N A 配列の導入前後にモニタリングされる。標的遺伝子発現に対して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 s i R N A 配列を選択することができる。他の特定の例では、複数の s i R N A または他の R N A i 配列を同じ標的細胞に導入することができる。これらの s i R N A または R N A i 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。さらに別の特定の例では、標的遺伝子および他の 1 または複数の遺伝子の発現を阻害する s i R N A または他の R N A i 配列を使用することができる。

【 0 0 7 2 】

当業者ならば、本発明のコンジュゲートに組み込まれる核酸分子の特定の選択がそのコンジュゲートに存在する選択性薬剤のタイプに依存することを認識するであろう。従って、本核酸は、選択性薬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で発現される標的分子に特異的である。このような場合、核酸がアンチセンス、s i R N A、s h R N A、m i R N A またはリボザイムであれば、その核酸は標的分子と塩基対を形成することにより働き、この場合、標的分子は m R N A である。核酸がアプタマーであれば、標的分子は前記 m R N A によりコードされているポリペプチドである。

10

【 0 0 7 3 】

当業者ならば、標的 m R N A に対して特異的な本発明の核酸が、上述の方法のいずれかを用いて選択され、相当する m R N A のレベルに実質的な低下を誘導するその能力に関して試験可能であることを認識するであろう。これらの領域は、異種間で保存性の高い領域またはコード領域内で翻訳複合体との潜在的干渉を避けるための一次転写産物の非コード領域に相当する領域に相当する。

20

【 0 0 7 4 】

2 つの所与の核酸配列を対となるようにアライメント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 [BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)] により、デフォルトパラメーターを使用して実施することができる。複数の核酸配列のアライメントの方法は、C L U S T A L W タイプの標準的アルゴリズム (Thompson JD et al, Nucleic Acids Res, 1994, 22:4673-4680) を使用し、デフォルトパラメーターを使用して実施することができる。

30

【 0 0 7 5 】

好ましい実施形態では、選択性薬剤が視床下部で発現される受容体に特異的に結合する場合、核酸はサイトカインシグナル伝達 3 (S O C S 3)、タンパク質チロシンホスファターゼ 1 B (P T P 1 B)、C B 1、インターロイキン 1 (I L 1 B)、ニューロペプチド Y (N P Y)、ニューロペプチド Y 1、ニューロペプチド Y 5 およびグレリン受容体サブレッサーの m R N A に特異的である。

40

【 0 0 7 6 】

用語「S O C S 3」は、リン酸化されたレプチン受容体にその S H 2 ドメインを介して結合することによるレプチンによるシグナルの伝達と、偽基質として働くその N 末端キナーゼ阻害領域を介した J a k チロシンキナーゼ活性の阻害とに關与する、天然型または組換え型のポリペプチド「サイトカインシグナル伝達 - 3 のサブレッサー」を意味する。S O C S 3 ポリペプチドの種々のオーソログは、N C B I データベースにおいて、ヒト、マウスおよびラットタンパク質配列に関してそれぞれ受託番号 N P _ 0 0 3 9 4 6、N P _ 0 0 3 1 7 3 3、および N P _ 4 4 6 0 1 7 と示されている (2 0 1 3 年 1 0 月 2 1 日)。S O C S 3 ポリペプチドの種々のオーソログは、N C B I データベースにおいて、ヒト、マウス、およびラットポリヌクレオチド配列に関してそれぞれ受託番号 N M _ 0 0 3 9 5 5 . 2、N M _ 0 0 7 7 0 7 . 2、および N M _ 0 5 3 5 6 5 . 1 と示されている (2 0 1 3 年 1 0 月 2 1 日)。

40

【 0 0 7 7 】

本発明で 사용할 ことができる好適な S O C S 3 特異的 s i R N A は、例えば、W O 2 0 1 2 0 8 2 7 6 5 に示されているものである。本発明で 사용할 ことができる好適な S

50

OC S 3 特異的アンチセンス核酸は、例えば、US 2 0 1 0 1 3 5 9 5 2、US 2 0 0 4 0 8 7 5 3 0、Raghavendra Rao et al., (J Neurochem., 2002, 83, 1072-1086)、Fox et al., (J. Immunol., 2003, 170, 3679-3687)に示されているものである。

【0078】

別の好ましい実施形態では、SOC S 3 に特異的な核酸は、配列 G U G G C G C T G G T C C G A G C T G T (配列番号1) を有するギャップマーであり、ここで、下線のブロックは2' - O - メチル修飾ヌクレオチドに相当する。

【0079】

別の好ましい実施形態では、SOC S 3 に特異的な核酸は、配列 c u u u u c g c u g c a g a g u g a c T T (配列番号2) のセンス鎖とおよび配列 g u c a c u c u g c a g c g a a a a g T T (配列番号3) のアンチセンス鎖を有する siRNA である。

10

【0080】

用語 PTP 1 B は、本明細書で使用する場合、インスリン応答の負のレギュレーターとして同定されているタンパク質チロシンホスファターゼ 1 B を意味する。単離された PTP - 1 B は、in vitro でインスリン受容体を脱リン酸化する (Tonks, N. K., 1988, J. Biol. Chem., 263: 6731-6737)。インスリン受容体の複数のホスホチロシン残基の PTP - 1 B 脱リン酸化は順次、受容体自己活性化化合物に重要な3つのチロシン残基に特異性を持って進行する (Ramachandran, C. 1992, Biochemistry, 31: 4232-4238)。インスリン受容体の脱リン酸化に加え、PTP - 1 B はまた、インスリン受容体の主要基質であるインスリン関連基質 1 (insulin related substrate 1) (IRS - 1) も脱リン酸化する (Lammers, R., 1993, J. Biol. Chem. 268: 22456-22462)。PTP - 1 B ポリペプチドのヒトオーソログは、NCBI データベースに Genbank 受託番号 NM_002827 として示されている (2013 年 10 月 21 日)。

20

【0081】

本発明による核酸により標的化され得る好適な PTP - 1 B 配列は、WO 2 0 0 3 0 7 0 8 8 の表 2 に示されている。好適な PTP - 1 B 特異的 siRNA は、WO 2 0 0 3 0 7 0 8 8 の表 2 に示されている。

【0082】

別の好ましい実施形態では、PTP - 1 B に特異的な核酸は、配列 G C U C C T T C C A C T G A T C C U G C (配列番号4) を有するギャップマーであり、ここで、下線のブロックは2' - O - メチル修飾ヌクレオチドに相当し、太字のブロックはホスホチオエートにより連結されたヌクレオチドに相当する。

30

【0083】

別の好ましい実施形態では、PTP - 1 B に特異的な核酸は、配列 c c g c a u c a u g g a g a a a g g c T T (配列番号5) のセンス鎖と配列 g c c u u u c u c c a u g a u g c g g T T (配列番号6) のアンチセンス鎖を有する siRNA であり、大文字の配列は二重鎖 siRNA のオーバーハングに相当する。

【0084】

別の好ましい実施形態では、選択性薬剤が中脳で発現される受容体に特異的に結合する場合、核酸は、ドーパミン D 1、D 2 もしくは D 3 受容体、ドーパミン輸送体または - シヌクレインに特異的である。

40

【0085】

別の好ましい実施形態では、選択性薬剤が脳幹で発現される受容体に特異的に結合する場合、核酸は、セロトニン 5 - HT 1 A 受容体、セロトニン 5 - HT 2 C 受容体、SERT (セロトニン輸送体)、1 A - アドレノセプター、アンジオテンシン変換酵素、Gタンパク質 3、5 - HT 2 C 受容体、インターロイキン 1、モノアミノオキシダーゼ A、カンナビノイド CB 1 受容体および - シヌクレインからなる群から選択される mRNA に特異的である。

【0086】

より好ましい実施形態では、選択性薬剤が脳幹で発現される受容体に特異的に結合する

50

場合、核酸はセロトニン 5 - H T 1 A 受容体の m R N A に特異的である。

【 0 0 8 7 】

用語「セロトニン 5 - H T 1 A 受容体」は、内在性の神経伝達物質セロトニンと結合する 5 - H T 受容体のサブタイプを意味する。セロトニン 5 - H T 1 A 受容体のヒト配列は、UniProt データベースに受託番号 P 0 8 9 0 8 で示されている (2 0 1 3 年 1 0 月 2 1 日) 。

【 0 0 8 8 】

好ましい実施形態では、セロトニン 5 - H T 1 A 受容体に特異的な核酸は s i R N A である。別の好ましい実施形態では、セロトニン 5 - H T 1 A 受容体に特異的な核酸は、配列 g g u g c u c a a c a a g u g g a c u T T (配列番号 1 1) のセンス鎖と配列 a g u c c a c u u g u u g a g c a c c T T (配列番号 1 2) のアンチセンス鎖を有する s i R N A である。

10

【 0 0 8 9 】

別の好ましい実施形態では、選択性薬剤が皮質で発現される受容体に特異的に結合する場合、核酸は、アミロイド前駆体タンパク質として 2 1 番染色体にコードされている遺伝子産物、プレセニリン 1、プレセニリン 2、アポリポタンパク質 E、サイクリン依存性キナーゼ 5、グリコーゲンシンターゼキナーゼ 3、微小管親和性調節キナーゼ A 2、ドーパミン D 4 受容体、アセチルコリンエステラーゼ、アデノシン A 2 受容体、C B 1、カテコール - O - メチルトランスフェラーゼ、ヒスタミン N - メチルトランスフェラーゼ、H 3、5 - H T 6、ホスホジエステラーゼ 1 0 A、ホスホジエステラーゼ 1 B、ホスホジエステラーゼ 1 C、ホスホジエステラーゼ 2 A、ホスホジエステラーゼ 4 A、ホスホジエステラーゼ 4 B、ホスホジエステラーゼ 4 D、ホスホジエステラーゼ 7 A、ホスホジエステラーゼ 7 B、ホスホジエステラーゼ 8 B、ホスホジエステラーゼ 9 B、ドーパミン受容体 D 1、D 2 または D 3、未同定タンパク質 C 9 o r f 7 2、プログラニユリン、タウ、ハンチニン、 - シヌクレイン、キヌレニンアミノトランスフェラーゼおよび m i R - 1 3 7 からなる群から選択される m R N A に特異的である。

20

【 0 0 9 0 】

別の好ましい実施形態では、選択性薬剤が小脳で発現される受容体に特異的に結合する場合、核酸は、アトロフィン - 1、脆弱 X 精神遅滞 1、G タンパク質共役受容体 5 5、1 p 3 6、アタキシン 1、アタキシン 1 0、チューブリンキナーゼ 2、P P P 2 R 2 B、K v 3 . 3 チャネル、プロテインキナーゼ C、イノシトール受容体、アタキシン 1 7、インターフェロン関連発生調節遺伝子 1、アタキシン 1 9、アタキシン 2、アタキシン 2 0、アタキシン 2 1、アタキシン 2 2、ダイノルフィン、アタキシン 2 5、アタキシン 2 6、線維芽細胞増殖因子 1 4、ミトコンドリアメタロプロテアーゼ複合体、アタキシン 2 9、アタキシン 3、アタキシン 3 0、チミジンキナーゼ 2 および N E D D 4 関連脳発現、アタキシン 3 2、アタキシン 3 3、1 6 p 1 2 . 3 - q 1 6 . 2 によりコードされている遺伝子産物、トランスグルタミナーゼ、核タンパク質 5 6、アタキシン 4、アタキシン 5、P / Q カルシウムチャネルの 1 A サブユニット、アタキシン 7 および K e l c h 様タンパク質 1 からなる群から選択される m R N A に特異的である。

30

【 0 0 9 1 】

より好ましい実施形態では、選択性薬剤が小脳で発現される受容体に特異的に結合する場合、核酸はアタキシン 1 の m R N A に特異的である。

40

【 0 0 9 2 】

用語「アタキシン 1」は、C B F 1 コリプレッサーとして働くことにより N o t c h 細胞内ドメインの不在下で N o t c h シグナル伝達を抑制するクロマチン結合因子である脊髄小脳運動失調タイプ 1 タンパク質を意味する。アタキシン 1 ポリペプチドの種々のオーソログが、N C B I データベースにヒトおよびマウスに関してそれぞれ受託番号 N P _ 0 0 0 3 2 3 および N P _ 0 0 1 1 8 6 2 3 3 として示されている (2 0 1 3 年 1 0 月 2 1 日) 。

【 0 0 9 3 】

50

好ましい実施形態では、アタキシン 1 に特異的な核酸は s i R N A である。別の好ましい実施形態では、アタキシン 1 に特異的な核酸は、配列 g a u c u a a c g u g g c a a g u a T T (配列番号 9) のセンス鎖と配列 u a c u u g c c c a c g u u a g a u c T T (配列番号 10) のアンチセンス鎖を有する s i R N A である。

【 0 0 9 4 】

別の好ましい実施形態では、選択性薬剤が線条体で発現される受容体に特異的に結合する場合、核酸は、ドーパミン D 1、D 2 または D 3 受容体、セロトニン 5 - H T 2 C 受容体、アデノシン A 2 A 受容体、ハンチンチン、およびドーパミン輸送体からなる群から選択される m R N A に特異的である。

【 0 0 9 5 】

別の好ましい実施形態では、選択性薬剤が海馬で発現される受容体に特異的に結合する場合、核酸は、21番染色体にコードされている遺伝子産物、アミロイド前駆体タンパク質、プレセニン 1、プレセニン 2、アポリポタンパク質 E、サイクリン依存性キナーゼ 5、グリコーゲンシンターゼキナーゼ 3、微小管親和性調節キナーゼ、セロトニン 5 - H T 1 A 受容体、アデノシン A 1 受容体、アセチルコリンエステラーゼ、カンナビノイド C B 1 受容体、カテコール - O - メチルトランスフェラーゼ、ヒスタミン N - メチルトランスフェラーゼ、H 3、5 - H T 6、酸化窒素シンターゼ、ホスホジエステラーゼ 10 A、ホスホジエステラーゼ 1 B、ホスホジエステラーゼ 1 C、ホスホジエステラーゼ 2 A、ホスホジエステラーゼ 4 A、ホスホジエステラーゼ 4 B、ホスホジエステラーゼ 4 D、ホスホジエステラーゼ 7 A、ホスホジエステラーゼ 7 B、ホスホジエステラーゼ 8 B およびホスホジエステラーゼ 9 A からなる群から選択される m R N A に特異的である。

【 0 0 9 6 】

より好ましい実施形態では、選択性薬剤が小脳で発現される受容体に特異的に結合する場合、核酸は、グリコーゲンシンターゼキナーゼ 3 の m R N A に特異的である。

【 0 0 9 7 】

用語「グリコーゲンシンターゼキナーゼ 3」は、セリンおよびトレオニンアミノ酸残基へのリン酸分子の付加を媒介するセリン/トレオニンタンパク質キナーゼを意味する。グリコーゲンシンターゼキナーゼ 3 のヒト配列は、Un i p r o t データベースに受託番号 P 4 9 8 4 1 で示されている (2 0 1 3 年 1 0 月 2 1 日)。

【 0 0 9 8 】

好ましい実施形態では、グリコーゲンシンターゼキナーゼ 3 に特異的な核酸は s i R N A である。別の好ましい実施形態では、グリコーゲンシンターゼキナーゼ 3 に特異的な核酸は、配列 g g c a c c a g a g u u g a u c u u u g T T (配列番号 13) のセンス鎖と配列 c a a a g a u c a a c u c u g g u g c c T T (配列番号 14) のアンチセンス鎖を有する s i R N A である。

【 0 0 9 9 】

別の好ましい実施形態では、選択性薬剤が脊髄で発現される受容体に特異的に結合する場合、核酸は、スーパーオキシドジスムターゼ 1、アルシン、推定ヘリカーゼセナタキシン、R N A 結合タンパク質 F U S、セシクル結合膜タンパク質 (c e s i c l e - a s s o c i a t e d m e m b r a n e p r o t e i n) 結合タンパク質 B / C、アンジオゲニン、T A R D N A 結合タンパク質 4 3、ポリホスホイノシチドホスファターゼ、オブチニューリン、アタキシン - 2、パロシン含有タンパク質、レチキュロン 4、N a v 1 . 7、N a v 1 . 8、C a v 2 . 2、C O X - 2、および生存運動ニューロンタンパク質からなる群から選択される m R N A に特異的である。

【 0 1 0 0 】

A . 3 . 本発明のコンジュゲートのリンカー領域

核酸および選択性薬剤は、直接結合させてもよい。しかしながら、両部分が連結基によって連結されていることが好ましい。

【 0 1 0 1 】

用語「連結基」、「リンカー」、「架橋基」およびそれらの文法上同等な語は、化合物

10

20

30

40

50

の 2 つの部分を選択する有機部分を意味して本明細書で使用される。選択性薬剤は核酸内のいずれのセンスまたはアンチセンスヌクレオチドにも結合させることができるが、好ましくは、3'末端ヌクレオチドおよび/または5'末端ヌクレオチドを介して結合させることができる。内部コンジュゲートは直接結合させてもよいし、またはリボース基の2'位のヌクレオチドにもしくは別の好適な位置にリンカーを介して間接的に結合させてもよい。

【0102】

核酸が二本鎖核酸である場合、コンジュゲートは、センス3'末端ヌクレオチド、センス5'末端ヌクレオチド、アンチセンス3'末端ヌクレオチド、および/またはアンチセンス5'末端ヌクレオチドに結合させることができる。

10

【0103】

定義または慣例によって制限されることを望むものではないが、本出願では、リンカーの長さは、コンジュゲート部分とリンカーを連結する原子と、それを介してリンカーがオリゴヌクレオチドに結合されているオリゴヌクレオチドと会合している末端リン酸部分の酸素原子との間の最短距離に当たる原子数を数えることによって表される。リンカーが1以上の環構造を含んでなる場合、最短経路に当たる環前後の原子を数えることが好ましい。

【0104】

本発明において使用するための好適なリンカー基としては、限定されるものではないが、修飾または非修飾ヌクレオチド、ヌクレオシド、ポリマー、糖、炭水化物、ポリエチレングリコールおよびポリプロピレングリコールなどのポリアルキレン、ポリアルコール、ポリプロピレン、エチレンとプロピレングリコールの混合物、ポリアルキルアミン、ポリリジンおよびスぺルミジンなどのポリアミン、ポリ(アクリル酸エチル)などのポリエステル、ポリホスホジエステル、脂肪族、およびアルキレンが挙げられる。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-アルコール、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-アルコール、-チオ-アルコール、-カルボキシ-アルコール、官能基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、およびその他に基づくリンカー/リンカー化学も、適当な長さのリンカーを作製するために本文脈で適用可能である。

20

30

【0105】

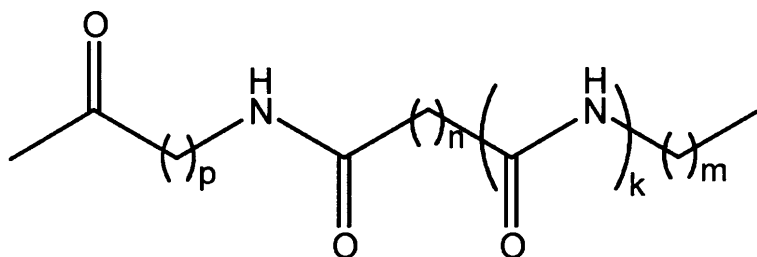
リンカーはまた、オリゴヌクレオチドコンジュゲートに他の所望の特性、すなわち、高い水溶性、コンジュゲート部分とオリゴヌクレオチド間の分離の最適な距離、柔軟性(またはその欠如)、特定の配向、分岐その他を付与し得る。

【0106】

好ましくは、前記連結基は下記の構造

【化6】

40



を有し、ここで、

m、nおよびpは0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12および

50

13 から選択され、

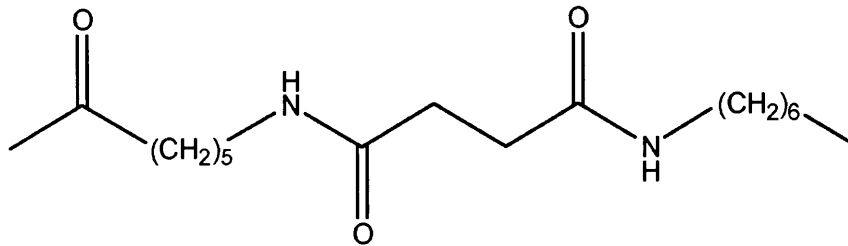
$m + n + p$ の和は、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17 および 18 から選択される整数であり、かつ、

k は、0 または 1 である。

【0107】

好ましい実施形態では、 p は 5 であり、 n は 2 であり、 k は 1 であり、かつ、 m は 6 であって、リンカーは構造：

【化 7】



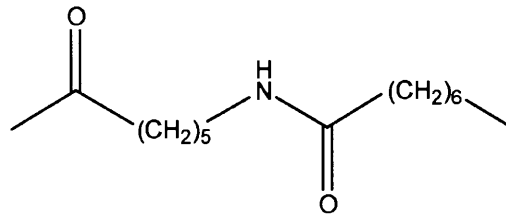
10

となる。

【0108】

別の好ましい実施形態では、 p は 5 であり、 n および k は 0 であり、かつ、 m は 6 であって、リンカーは構造：

【化 8】



20

となる。

【0109】

特定の実施形態では、リンカーは、選択性薬剤に対して 2 以上のカップリングを含んでなる。好ましい実施形態では、リンカーは二価または三価のリンカーであり、すなわち、それぞれ 2 または 3 分子の選択性薬剤がカップリングすることができる。

【0110】

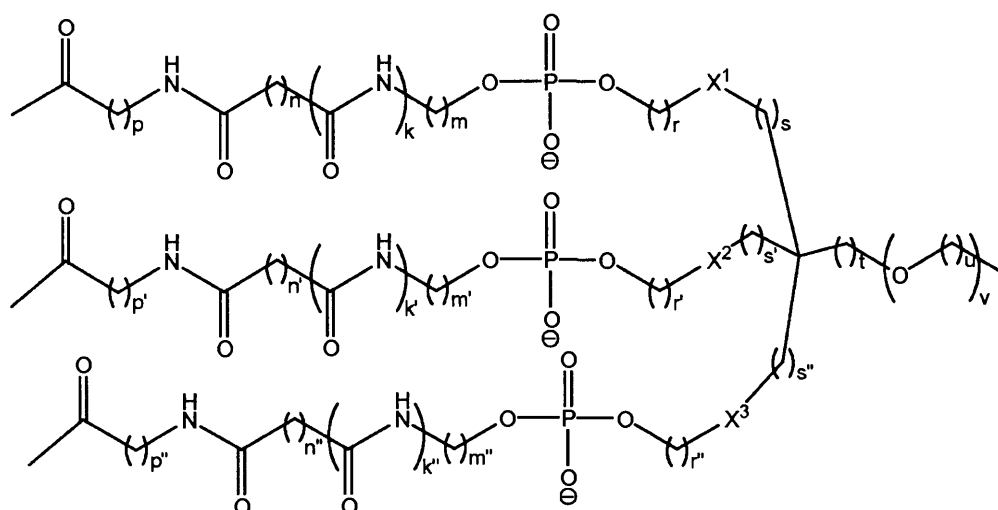
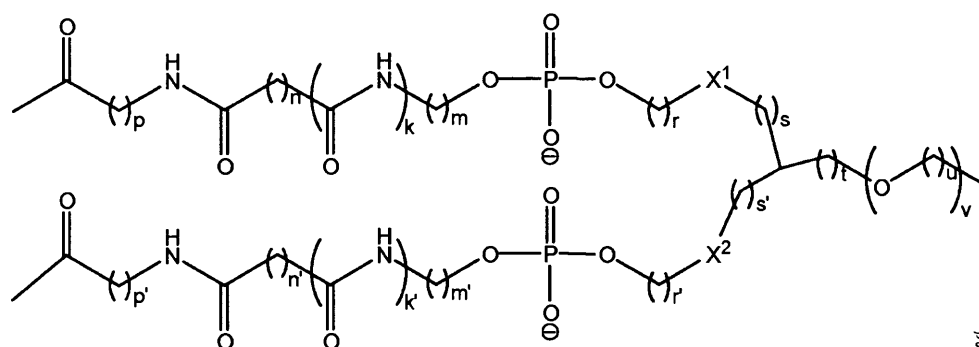
2 分子以上の選択性薬剤がリンカーを介して核酸とカップリングしている場合、前記分子は同じ選択性薬剤でも異なる選択性薬剤でもよい。

【0111】

特定の実施形態では、二価または三価のリンカーは下式：

30

【化 9】



を有し、式中、

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

$k, k', k'',$ および v は、0 および 1 から独立に選択され；かつ

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

【0112】

上記の基の価数に依存して、分岐リンカーは対称的であっても非対称的であってもよい。

【0113】

特定の実施形態では、リンカーは、 p および p' が 5 であり、 n および n' が 2 であり、 k および k' が 1 であり、かつ、 m および m' が 6 である上記に示される二価のリンカーである。特定の実施形態では、リンカーは、 p および p' が 5 であり、 n, n', k および k' が 0 であり、かつ、 m および m' が 6 である上記に示される二価のリンカーである。

【0114】

特定の実施形態では、リンカーは、 r および r' が 4 であり、 s および s' が 1 であり、 t および v が 0 であり、かつ、 X^1 および X^2 が $C(O)NH$ を表す上記に示される二価のリンカーである。別の実施形態では、リンカーは、 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 および v が 0 であり、かつ、 X^1 および X^2 が CH_2 を表す上記に示される二価のリンカーである。

10

20

30

40

50

【0115】

特定の実施形態では、リンカーは、 p および p' が 5 であり、 n および n' が 2 であり、 k および k' が 1 であり、 m および m' が 6 であり、 r および r' が 4 であり、 s および s' が 1 であり、 t および v が 0 であり、かつ、 X^1 および X^2 が $C(O)NH$ を表す上記に示される二価のリンカーである。

【0116】

別の実施形態では、リンカーは、 p および p' が 5 であり、 n および n' が 2 であり、 k および k' が 1 であり、 m および 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 および v が 0 であり、かつ、 X^1 および X^2 が CH_2 を表す上記に示される二価のリンカーである。

10

【0117】

別の実施形態では、リンカーは、 p および p' が 5 であり、 n 、 n' 、 k および k' が 0 であり、 m および m' が 6 であり、 r および r' が 4 であり、 s および s' が 1 であり、 t および v が 0 であり、かつ、 X^1 および X^2 が $C(O)NH$ を表す上記に示される二価のリンカーである。

【0118】

別の実施形態では、リンカーは、 p および p' が 5 であり、 n 、 n' 、 k および k' が 0 であり、 m および 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 および v が 0 であり、かつ、 X^1 および X^2 が CH_2 を表す上記に示される二価のリンカーである。

20

【0119】

特定の実施形態では、リンカーは、 p 、 p' および p'' が 5 であり、 n 、 n' および n'' が 2 であり、 k 、 k' および k'' が 1 であり、 m 、 m' および m'' が 6 である上記に示される三価のリンカーである。特定の実施形態では、リンカーは、 p 、 p' および p'' が 5 であり、 n 、 n' 、 n'' 、 k 、 k' および k'' が 0 であり、かつ、 m 、 m' および m'' が 6 である上記に示される三価のリンカーである。

【0120】

特定の実施形態では、リンカーは、 r 、 r' および r'' が 3 であり、 s 、 s' および s'' が 1 であり、 t が 1 であり、 v が 0 であり、かつ、 X^1 、 X^2 および X^3 が O を表す上記に示される三価のリンカーである。

30

【0121】

別の実施形態では、リンカーは、 r 、 r' および r'' が 3 であり、 s 、 s' および s'' が 1 であり、 t が 1 であり、 u が 3 であり、 v が 1 であり、かつ、 X^1 、 X^2 および X^3 が O を表す上記で示される三価のリンカーである。

【0122】

特定の実施形態では、リンカーは、 p 、 p' および p'' が 5 であり、 n 、 n' および n'' が 2 であり、 k 、 k' および k'' が 1 であり、 m 、 m' および m'' が 6 であり、 r 、 r' および r'' が 3 であり、 s 、 s' および s'' が 1 であり、 t が 1 であり、 v が 0 であり、かつ、 X^1 、 X^2 および X^3 が O を表す上記に示される三価のリンカーである。

40

【0123】

別の実施形態では、リンカーは、 p 、 p' および p'' が 5 であり、 n 、 n' および n'' が 2 であり、 k 、 k' および k'' が 1 であり、 m 、 m' および m'' が 6 であり、 r 、 r' および r'' が 3 であり、 s 、 s' および s'' が 1 であり、 t が 1 であり、 u が 3 であり、 v が 1 であり、かつ、 X^1 、 X^2 および X^3 が O を表す上記に示される三価のリンカーである。

【0124】

別の実施形態では、リンカーは、 p 、 p' および p'' が 5 であり、 n 、 n' 、 n'' 、 k 、 k' および k'' が 0 であり、 m 、 m' および m'' が 6 であり、 r 、 r' および r'' が 3 であり、 s 、 s' および s'' が 1 であり、 t が 1 であり、 v が 0 であり、か

50

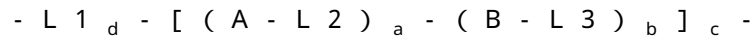
つ、 X^1 、 X^2 および X^3 が 0 を表す上記に示される三価のリンカーである。

【0125】

別の実施形態では、リンカーは、 p 、 p' および p'' が 5 であり、 n 、 n' 、 n'' 、 k 、 k' および k'' が 0 であり、 m 、 m' および m'' が 6 であり、 r 、 r' および r'' が 3 であり、 s 、 s' および s'' が 1 であり、 t が 1 であり、 u が 3 であり、 v が 1 であり、かつ、 X^1 、 X^2 および X^3 が 0 を表す上記に示される三価のリンカーである。

【0126】

本発明による特に好ましい架橋基は下記の構造：



を有し、ここで、

A および B は、単糖、アルキル鎖および ($C_2 - C_{20}$) 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単位を表し；

a および b は、0 ~ 50 の範囲の整数であり；

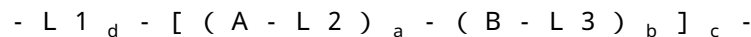
c は、0 ~ 30 の範囲の整数であり；

L_1 、 L_2 および L_3 は、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、カルバメート、メチルスルホネート、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、アミドおよびそれらの混合物からなる群から独立に選択される架橋化合物であり；かつ

d は、0 または 1 である。

【0127】

特定の実施形態では、架橋基は、構造：



を有し、ここで、 b および d は 0 であり、 c は 1 であり、 A はアルキル鎖であり、かつ、 L_2 はホスホジエステル結合である。

【0128】

A. 4. 本発明のコンジュゲートのさらなる修飾

本発明のコンジュゲートの別の修飾として、核酸の活性、細胞分布または細胞取り込みを増強する 1 以上の部分またはコンジュゲートを、核酸または保護基に化学的に連結することを含む。このような部分としては、限定されるものではないが、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., 1992, 20, 533-538)、脂肪族鎖、例えば、ドデカンジオールもしくはウンデシル残基 (Saison-Behmoaras et al, E MBO J, 1991, 10, 1111-1118; Kabanov et al, FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svina rchuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49-54)、リン脂質、例えば、ジ - ヘキサデシル - r a c - グリセロールもしくはトリエチル - アンモニウム 1, 2 - ジ - O - ヘキサデシル - r a c - グリセロ - 3 - H ホスホネート (Manoharan et al, Tetrahedron Lett., 199 5, 36, 3651-3654; Shea et al, Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783)、ポリアミンもしくはポリエチレングリコール鎖 (Manoharan et al., Nucleosides and Nucleotides, 1995, 14, 969-973)、また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)、またはオクタデシルアミンもしくはヘキシルアミノ - 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) が挙げられる。

【0129】

あるいは、細胞分布を増大させることができる部分は、生物障壁中に存在する特定の輸送体を用い、受容体を介するエンドサイトーシスの使用により生物障壁を経て特異的に輸

10

20

30

40

50

送され得る低分子量化合物またはポリペプチドであってもよい。取り込み受容体および担体の広いアレイは、さらに多数の受容体特異的リガンドとともに、当技術分野で公知である。本発明による使用のための、エンドサイトーシスおよび/また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は、例えば、チアミン輸送体、葉酸受容体、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ラマ単一ドメイン抗体(sdAb)からなるFC5およびFC44ナノボディを伴う。)、トランスフェリン-1および-2受容体、スカベンジャー受容体(クラスAもしくはB、タイプI、IIもしくはIII、またはCD36もしくは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(メガリンまたは糖タンパク質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増殖因子様増殖因子(HB-EGF)の膜結合前駆体である)、インスリン受容体、インスリン様増殖因子(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、グルタミン酸受容体およびマンノース6リン酸受容体に対する、またはそれらに特異的に結合するリガンドが挙げられる。

【0130】

本発明による使用のための、これらの受容体と結合する好ましいリガンドとしては、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、デスモテブラーゼ、組織型およびウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクチベーター(tPA/uPA)、プラスミノーゲンアクチベーター阻害剤(PAI-I)、tPA/uPA:PAI-1複合体、メラノトランスフェリン(またはP97)、トロンボスポンジン1および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-ITaタンパク質、ライノウイルス、マトリックスメタロプロテイナーゼ9(MMP-9)、MMP-13(コラゲナーゼ-3)、スフィンゴ脂質活性化タンパク質(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)、血小板由来増殖因子(PDGF)、アポリポタンパク質J(apoJ、またはクラスチリン)、apoJおよびapoEに結合したABETA、アプロチニン、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、インスリン様増殖因子、上皮増殖因子、レクチン、ペプチド模倣および/またはヒト化モノクローナル抗体また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に結合する配列HAIFYPRH(配列番号7)およびTHRPMPWSPVWP(配列番号8)、また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非毒性部分、ジフテリア毒素B鎖の全体または一部(DTB-Hisを含む(Spilsberg et al., 2005, Toxicon., 46(8):900-6により記載))、ジフテリア毒素CRM197の非毒性変異体の全体または一部、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/コバラミン血漿担体タンパク質、グルタチオンおよびトランスコバラミン-B12からなる群から選択されるリガンドが挙げられる。

【0131】

特定の実施形態では、本発明のコンジュゲートは、コンジュゲートの生体膜を経た輸送を促進する基をさらに含んでなる。好ましくは、この基は両親媒性である。例示的薬剤としては、限定されるものではないが、ペネトラチン、アミノ酸48~60を含んでなるTatタンパク質の断片、シグナル配列に基づくペプチド、PVEC、トランスポータン、両親媒性モデルペプチド、Arg9、細菌細胞壁透過ペプチド、LL-37、セクロピンP1、-デフェンシン、-デフェンシン、バクテネクチン、PR-39およびイン

10

20

30

40

50

ドリシジンが挙げられる。薬剤がペプチドである場合、ペプチジル模倣物、逆転異性体、非ペプチドまたは偽ペプチド結合、およびD - アミノ酸の使用を含め、それは修飾が可能である。ヘリックス剤は、好ましくは - ヘリックス剤であり、好ましくは、親油相および脂質親和相を持つ。

【0132】

リガンドは、ペプチドまたはペプチド模倣物であり得る。ペプチド模倣物（本明細書ではオリゴペプチド模倣物とも呼ばれる）は、天然ペプチドに類似する定義された三次元構造に折り畳むことができる分子である。ペプチドまたはペプチド模倣物部分は、約5～50アミノ酸長、例えば、約5、10、15、20、25、30、35、40、45、または50アミノ酸長であり得る（例えば、表4参照）。

10

【0133】

本発明の別の特定の実施形態では、本発明のコンジュゲートは、エンドソーム溶解性リガンドをさらに含んでなる。エンドソーム溶解性リガンドは、エンドソームの溶解および/または本発明の組成物もしくはその成分の、エンドソームからその細胞の細胞質への輸送を促進する。エンドソーム溶解性リガンドは、pH依存的膜活性および膜融合性を示すポリ陰イオン性のペプチドまたはペプチド模倣物であり得る。特定の実施形態では、エンドソーム溶解性リガンドは、エンドソームpHにおいてその活性立体配座を想定する。「活性立体配座」は、エンドソーム溶解性リガンドがエンドソームの溶解および/または本発明の組成物もしくはその成分の、エンドソームからその細胞の細胞質への輸送を促進する立体配座である。例示的エンドソーム溶解性リガンドとしては、GAL4ペプチド(Subbarao et al., Biochemistry, 1987, 26: 2964-2972)、EALAペプチド(Vogel et al., J. Am. Chem. Soc., 1996, 118: 1581-1586)、およびそれらの誘導体(Turk et al., Biochem. Biophys. Acta, 2002, 1559: 56-68)、INF-7ペプチド、InfHA-2ペプチド、diINF-7ペプチド、diINF3ペプチド、GLFペプチド、GALA-INF3ペプチドおよびINF-5ペプチドが挙げられる。特定の実施形態では、エンドソーム溶解性成分は、pHの変化にตอบสนองして電荷の変化またはプロトン化を受ける化学基（例えば、アミノ酸）を含み得る。エンドソーム溶解性成分は、直鎖であっても分岐型であってもよい。

20

【0134】

A.5. 保護基

30

本発明のコンジュゲートの核酸形成部分は、生体の種々の体液およびコンパートメントを経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、酵素的消化に耐性を持ち、オリゴヌクレオチドのin vivo安定性およ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ぐ基の存在により化学的に修飾されることが好ましい。

【0135】

本発明の目的では、「キャップ構造」または「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修飾を意味すると理解すべきである。5'キャップの限定されない例として、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、炭素環式ヌクレオチド；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架橋基；トレオ-ペントフラノシルヌクレオチド；非環式3', 4'-セコヌクレオチド；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；または架橋もしくは非架橋メチルホスホネート部分が挙げられる。詳細は引用することにより本明細書の一部

40

50

とされる WO 97 / 2 6 2 7 0 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、炭素環式ヌクレオチド ; 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 ; 修飾塩基ヌクレオチド ; ホスホロジチオエート ; トレオ - ペントフラノシルヌクレオチド ; 非環式 3' , 4' - セコヌクレオチド ; 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' - ホスホロチオエート ; 1 , 4 - ブタンジオールホスフェート ; 5' - アミノ ; 架橋および / または非架橋 5' - ホスホロアミデート、ホスホロチオエートおよび / またはホスホロジチオエート、架橋または非架橋メチルホスホネートおよび 5' - メルカプト部分が挙げられる。Beaucage and Iyer, 1993, Tetrahedron 49, 1925 もまた参照 (この内容は引用することにより本明細書の一部とされる) 。

10

【 0 1 3 6 】

好ましい実施形態では、本発明のコンジュゲートの核酸配列に結合されたキャップ構造は、以下の一般的構造

$$M - L_1 - [(A - L_2)_a - (B - L_3)_b]_c -$$

を有し、

20

ここで、

M は、H、脂質部分または上記で定義されたターゲティング基であり ;

A および B は、単糖および (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単位を表し ;

L₁、L₂ および L₃ は、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、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、アミドおよびそれらの混合物からなる群から独立に選択される架橋化合物であり ;

a および b は 0 ~ 50 の範囲の整数であり ;

c は 0 ~ 30 の範囲の整数であり ;

30

d は少なくとも 1 の整数である。

【 0 1 3 7 】

脂質部分は、本明細書中で使用する場合、限定されるものではないが、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)、および脂肪酸を含む、親油性または両親媒性の性質を有する有機化合物を意味する。用語「脂質」は、天然脂質および合成生産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、in vivo 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。使用され得る好適な脂質として、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 および K などの脂溶性ビタミン ; モノグリセリド ; ジグリセリド、ならびに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)、およ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などを考慮に入れることによって状況に応じて当業者が選択できる。

40

【 0 1 3 8 】

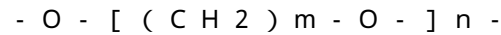
用語「単糖」は、本明細書中使用する場合、当技術分野において周知であり、ブロックまたは部分を構成するより小さい糖にさらに分解することのできない単一の糖単位からなる糖の単純形態を意味する。このコンジュゲーション基として好ましい糖部分は、フラノ

50

ース、フルクトース、グルコース、ガラクトース、マンノース、修飾単糖、シアル酸およびエリトロースおよびそれらの混合物からなる群から選択される。単糖は、その線状または環状形態（ヘミアセタール環状異性体）にあり得る。フラノースは、D-リボースまた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。フルクトオリゴ糖（FOS）およびガラクトオリゴ糖（GOS）は、二糖類のサッカロースもしくはラクトース、または多糖類のイヌリン、デキストリン、デンプンもしくはグリコーゲンと同様に特に着目される組合せである。

【0139】

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、本明細書で使用する場合、一般式



を共有するポリエチレンポリマー系列を包含し、式中、

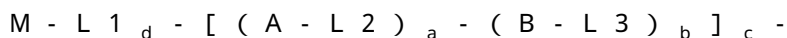
mは各アルキレングリコール単位中に存在するメチレン基の数を表し、nは反復単位の数を表し、従って、ポリマーのサイズまたは長さを表す。この用語は、限定されるものではないが、エチレングリコール、プロピレングリコール、ジアルキレングリコール（例えば、ジエチレングリコール）、トリアルキレングリコール（例えば、トリエチレングリコール）、および上記のグリコールの対応するモノアルキルエーテルおよびジアルキルエーテルなどのグリコールが挙げられ、ここで、アルキルエーテルは1～6個の炭素原子を有する低級アルキルエーテル（例えば、メチル、エチル、プロピルエーテルなど）である。

【0140】

他の実施形態では、式（I）の基は、炭素原子が2～20個の任意の線状または分岐型分子であってよい（ C_2-C_{20} ）アルキレングリコールモノマー単位、またはaおよびbの値に応じて、数個の（ C_2-C_{20} ）アルキレングリコールモノマー単位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

【0141】

本発明のコンジュゲートに適切な保護基として、限定されるものではないが、



・MがHであり、dが0であり、AがPEGであり、Bが糖であり、aおよびbがそれぞれ1であり、かつ、L1およびL2がホスホジエステル結合である上式に相当するPEG+糖；

・AがPEGであり、Bが糖であり、aが1であり、bが2であり、MがHであり、dが0であり、かつ、L1およびL2がホスホジエステル結合である上式に相当するPEG+（糖）2；

・AがPEGであり、Bが糖であり、aが2であり、bが1であり、MがHであり、dが0であり、かつ、L1およびL2がホスホジエステル結合である上式に相当する（PEG）2+糖；

・AがPEGであり、Bが糖であり、aが3であり、bが1であり、MがHであり、dが0であり、かつ、L1およびL2がホスホジエステル結合である上式に相当する（PEG）3+糖；

・AがPEGであり、Bが糖であり、aが5であり、bが1であり、MがHであり、dが0であり、かつ、L1およびL2がホスホジエステル結合である上式に相当する（PEG）5+糖

が挙げられる。

【0142】

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

【0143】

本発明はまた、コンジュゲートが選択性薬剤と結合されてないポリヌクレオチドの一末端または両末端に結合された保護基をさらに含んでなることを企図する。

【0144】

B. 本発明のコンジュゲートの構造

本発明によるコンジュゲートの種々の要素は種々の様式で配列することができ、本発明の一部を成す(form)。従って、選択性薬剤は核酸の5'末端および/または3'末端にカップリングさせることができる。好ましくは、選択性薬剤は核酸の5'末端にカップリングさせる。さらに、核酸と選択性薬剤とは、直接連結してもよいし、またはリンカーにより接続してもよい。同様に、リンカーも核酸の5'末端および/または3'末端にカップリングさせることができる。好ましくは、リンカーは核酸の5'末端にカップリングさせる。従って、本発明の核酸が単一の核酸鎖を含有する場合、可能な配置は、

- ・ 5'末端に結合された選択性薬剤を含んでなる核酸、
 - ・ 3'末端に結合された選択性薬剤を含んでなる核酸、
 - ・ 5'末端に結合された選択性薬剤と3'末端に結合された保護基を含んでなる核酸、
 - ・ 5'末端に結合された保護基と3'末端に結合された選択性薬剤を含んでなる核酸、
 - ・ 第1および第2の選択性薬剤を含んでなる修飾された核酸であって、前記第1および第2の選択性薬剤は同じであるかまたは異なり、これらの選択性薬剤が、核酸の5'末端および3'末端に接続されている核酸、
 - ・ 第1および第2の選択性薬剤を含んでなる修飾された核酸であって、前記第1および第2の選択性薬剤は同じであるかまたは異なり、両選択性薬剤が、核酸の5'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、
 - ・ 第1および第2の選択性薬剤を含んでなる修飾された核酸であって、前記第1および第2の選択性薬剤は同じであるかまたは異なり、両選択性薬剤が、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つの選択性薬剤を含んでなる修飾された核酸であって、前記選択性薬剤は同じであるかまたは異なり、選択性薬剤の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、選択性薬剤の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、
 - ・ 3つの選択性薬剤を含んでなる修飾された核酸であって、前記選択性薬剤は同じであるかまたは異なり、前記3つの選択性薬剤が三官能性リンカーによって核酸の一末端に接続されている核酸
- である。

【0145】

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み得る。例えば、本発明の構築物は、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結合を介して直列に連結された5個までの異なる核酸を含むことができる。

【0146】

さらに、核酸が二本鎖核酸であるこれらの場合には、選択性薬剤はセンス鎖および/またはアンチセンス鎖にカップリングさせてもよく、直接カップリングしてもよいし、またはリンカー基によりカップリングしてもよい。従って、本発明の核酸が単一の核酸鎖を含有する場合、可能な配置は、

- ・ センス鎖またはアンチセンス鎖の5'末端に結合された単一の選択性薬剤を含んでなる核酸、
- ・ センス鎖またはアンチセンス鎖の3'末端に結合された単一の選択性薬剤を含んでなる核酸、
- ・ センス鎖またはアンチセンス鎖の5'に結合された単一の選択性薬剤と反対鎖の5'末端に結合された保護基を含んでなる核酸、
- ・ 第1および第2の選択性薬剤を含んでなる修飾された核酸であって、前記第1および第

2の選択性薬剤は同じであるかまたは異なり、前記選択性薬剤が核酸のセンス鎖またはアンチセンス鎖の5'および3'末端に接続されている核酸、

・第1および第2の選択性薬剤を含んでなる修飾された核酸であって、前記第1および第2の選択性薬剤は同じであるかまたは異なり、第1の選択性薬剤がセンス鎖の5'末端に接続され、第2の選択性薬剤がアンチセンス鎖の5'末端に接続されている核酸、

・第1および第2の選択性薬剤を含んでなる修飾された核酸であって、前記第1および第2の選択性薬剤は同じであるかまたは異なり、両選択性薬剤がセンス鎖の5'末端またはアンチセンス鎖の5'末端に、核酸の一方の鎖の5'末端に接続されている二官能性リンカーによって接続されている核酸、

・第1および第2の選択性薬剤を含んでなる修飾された核酸であって、前記第1および第2の選択性薬剤は同じであるかまたは異なり、両選択性薬剤がセンス鎖の3'末端またはアンチセンス鎖の3'末端に、核酸の一方の鎖の3'末端に接続されている二官能性リンカーにより接続されている核酸、

・4つの選択性薬剤を含んでなる修飾された核酸であって、前記選択性薬剤は同じであるかまたは異なり、選択性薬剤の2つがセンス鎖の5'末端に、センス鎖の5'に接続されている第1の二官能性リンカーによって接続され、かつ、選択性薬剤の2つがアンチセンス鎖の5'末端に、アンチセンス鎖の5'に接続されている第2の二官能性リンカーによって接続されている核酸、

・3つの選択性薬剤を含んでなる修飾された核酸であって、前記選択性薬剤は同じであるかまたは異なり、3つの選択性薬剤がセンス鎖の5'末端またはアンチセンス鎖の5'末端に、三官能性リンカーによって接続されている核酸

・6つの選択性薬剤を含んでなる修飾された核酸であって、前記選択性薬剤は同じであるかまたは異なり、3つの選択性薬剤が三官能性リンカーによってセンス鎖の5'末端に接続され、かつ、3つの選択性薬剤が三官能性リンカーによってアンチセンス鎖の5'末端に接続され、両三官能性リンカーは同じであっても異なってもよい、核酸である。

【0147】

コンジュゲートが2以上の選択性薬剤を含有する好ましい実施形態では、種々の選択性薬剤は同じであっても異なってもよい。選択性薬剤が異なる場合、それらは同じ受容体に結合しても異なる受容体に結合してもよい。異なる選択性薬剤が異なる受容体に結合する場合、これらの受容体は同じ細胞種または異なる細胞種のいずれで発現されてもよい。受容体が異なる細胞種で発現される場合、これらの受容体は中枢神経系の同じ場所に位置しても異なる場所に位置してもよい。好ましい実施形態では、単一のコンジュゲート内に見られる選択性薬剤は、下記の場所：

- (i) 中脳および線条体、
 - (ii) 皮質および海馬、
 - (iii) 脳幹および海馬、
 - (iv) 皮質、海馬および線条体、
 - (v) 皮質、グリアおよび海馬、
 - (vi) 海馬および線条体、
 - (vii) 脳幹および視床下部、
 - (viii) 皮質および線条体、
 - (ix) グリアおよび髄質、
 - (x) 脳幹、皮質および中脳、
 - (xi) 脳幹、中脳および線条体、
 - (xii) 脳幹、皮質および海馬、ならびに
 - (xiii) 皮質、中脳および線条体
- に結合可能である。

【0148】

好ましい実施形態では、本発明によるコンジュゲートの選択性薬剤は成長ホルモン分泌

10

20

30

40

50

促進因子受容体のリガンドであり、核酸は、SOCSS3もしくはPTP-1B mRNAに、またはその対応するポリペプチドに特異的である。好ましい実施形態では、選択性薬剤はタビモレリンである。別の実施形態では、核酸は一本鎖核酸であり、コンジュゲートは、二官能性リンカーの使用により核酸の5'末端に結合された2つのタビモレリン基を含有する。別の実施形態では、核酸は一本鎖核酸であり、コンジュゲートは、核酸の3'末端に結合された二官能性リンカーの使用により核酸の3'末端に結合された2つのタビモレリン基を含有する。別の実施形態では、核酸は一本鎖核酸であり、コンジュゲートは、核酸の5'末端および3'末端にそれぞれ結合された2つのタビモレリン基を含有する。

【0149】

10

別の実施形態では、核酸は二本鎖核酸であり、コンジュゲートは、二官能性リンカーの使用によりセンス鎖の5'末端またはアンチセンス鎖の5'末端に結合された2つのタビモレリン基を含有する。別の実施形態では、核酸は二本鎖核酸であり、コンジュゲートは、2つのタビモレリン基を含有し、第1の基がセンス鎖の5'末端に結合され、第2の基がアンチセンス鎖の5'末端に結合されている。

【0150】

別の実施形態では、本発明によるコンジュゲートは、中枢神経系の同じ領域で発現される異なる受容体に標的化された異なる選択性薬剤を含有する。SOCSS3またはPTP-1Bに特異的な核酸を含んでなるコンジュゲートの場合、選択性リガンドは、視床下部で発現される異なる受容体に標的化され得る。従って、別の実施形態では、第1および第2の選択性薬剤は、視床下部で発現される、成長ホルモン分泌促進因子受容体、ガラニンGAL1受容体、カルシトニン受容体様、ニューロペプチドFF/B-NPBW2受容体、ニューロペプチドFF/B-NPFF2受容体、ニューロペプチドY-Y2受容体、ボンベシンBB2受容体、ボンベシンBB3受容体、カルシトニンAM1受容体、カルシトニンAMY1受容体、カルシトニンCGRP受容体、カルシトニン受容体、フリッツルドFZD2受容体、フリッツルドFZD5受容体、メラノコルチンMC2受容体、メラノコルチンMC3受容体、メラノコルチンMC4受容体、ニューロペプチドS受容体、ニューロペプチドFF/B-NPFF1受容体、ニューロペプチドY-Y4受容体、ニューロテンシンNTSR1受容体、オレキシンOX1受容体、オレキシンOX2受容体、ソマトスタチンsst1受容体、ソマトスタチンsst5受容体、オキシトシン受容体、バソプレシンV1A受容体、バソプレシンV1B受容体、バソプレシンV2受容体、キスペプチン受容体、ニューロペプチドFF/B-NPBW1受容体、ペプチドP518受容体、タキキニンNK1受容体、タキキニンNK2受容体およびタキキニンNK3受容体からなる群から選択される受容体の組合せ対のいずれかに指向される。

20

30

【0151】

本発明のコンジュゲートの核酸形成部分は、生体の種々の体液およびコンパートメントを経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、酵素的消化に耐性を持ち、オリゴヌクレオチドのin vivo安定性およ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。細胞エキソヌクレアーゼは、標的として遊離型の5'末端を用いる。従って、一本鎖核酸の場合、選択性薬剤は核酸の5'側にカップリングされると安定化部分として働き得る。しかしながら、選択性薬剤が3'末端に連結された二本鎖核酸または一本鎖核酸を含んでなるコンジュゲートの場合、コンジュゲートは、通常はエキソヌクレアーゼの活性による核酸の分解を防ぐ基である安定化部分またはキャップ構造をさらに含み得る。二本鎖核酸の場合、下記の可能な配置が存在する。

40

【0152】

好ましい実施形態では、核酸は、選択性薬剤がアンチセンス鎖の5'末端に連結され、保護基がセンス鎖の5'末端に連結された二本鎖RNAである。なおさらに好ましい実施形態では、保護基は、構造

$$M-L1_d - [(A-L2)_a - (B-L3)_b]_c -$$

50

を有し、ここで、MはHであり、dは0であり、AはポリエチレングリコールのC18スパーサーであり、Bはフラノースであり、aは2であり、bおよびcは1であり、かつ、L2およびL3はホスホジエステル結合である。

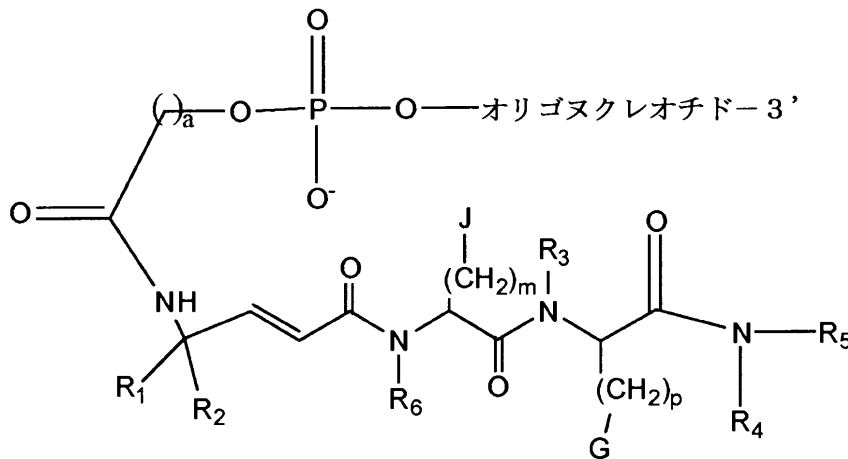
【0153】

本発明のコンジュゲートの核酸形成部分は、生体の種々の体液およびコンパートメントを経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、酵素的消化に耐性を持ち、オリゴヌクレオチドの *in vivo* 安定性およ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。細胞エキソヌクレアーゼは、標的として遊離型の5'末端を用いる。従って、一本鎖核酸の場合、選択性薬剤は核酸の5'側にカップリングされると安定化部分として働き得る。しかしながら、選択性薬剤が3'末端に連結された二本鎖核酸または一本鎖核酸を含んでなるコンジュゲートの場合、コンジュゲートは、通常はエキソヌクレアーゼの活性による核酸の分解を防ぐ基である安定化部分またはキャップ構造をさらに含み得る。二本鎖核酸の場合、下記の可能な配置が存在する。

【0154】

なおさらに好ましい実施形態では、本発明のコンジュゲートは、構造(I)

【化10】

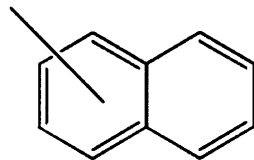


(I)

を有し、ここで、R₁およびR₂は互いに独立に水素またはC1-C6アルキルであるか、またはR₁およびR₂は一緒にC2-C5アルキレン基を形成し、

Jは、1以上のC1-C6アルキルまたはハロゲンで置換されていてもよい基

【化11】



であり、

mは、1、2または3であり、

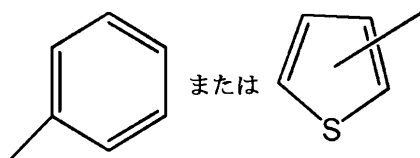
R₃は、C1-C6アルキルであり、

pは、1、2または3であり、

aは、1～10であり、

Gは、1以上のC1-C6アルキルまたはハロゲンで置換されていてもよい基

【化 1 2】



であり、

R_4 および R_5 は、互いに独立に水素または C 1 - C 6 アルキルであり、かつ

R_6 は、水素または C 1 - C 6 アルキル、好ましくは、水素であり、

10

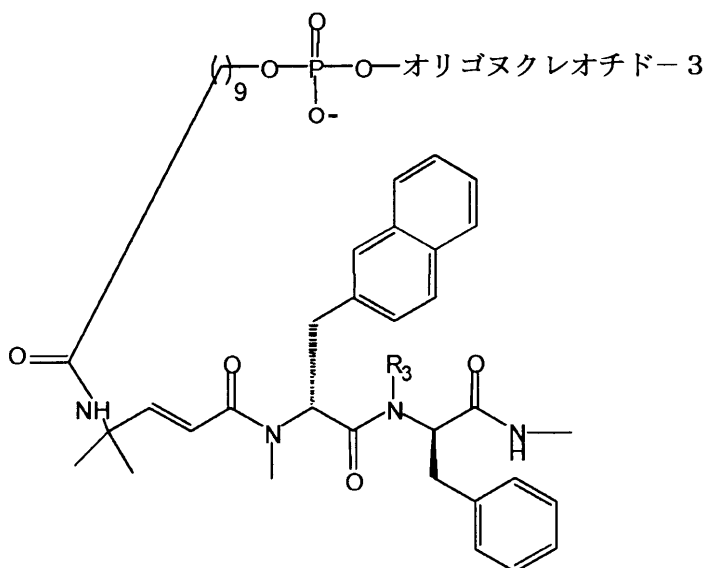
かつ、

オリゴヌクレオチドは、S O C S 3 mRNA または P T P - 1 B mRNA に特異的な配列を含んでなる。

【0 1 5 5】

別の実施形態では、コンジュゲートは構造：

【化 1 3】



20

30

を有する。

【0 1 5 6】

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る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、S O C S 3 または P T P 1 B に特異的な核酸と成長ホルモン分泌促進因子受容体に対するリガンドを含んでなるコンジュゲートの場合、その構築物が対象者に投与されると、それは対象者の中脳縫線核内の 5 S O C S 3 および P T P 1 B の特異的ノックダウンを効果的に誘導することができる。

40

【0 1 5 7】

従って、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認識するであろう。よって、別の態様において、本発明は医薬に使用するための本発明によるコンジュゲートに関する。加えて、本発明はまた、本発明によるコンジュゲートと薬学上許容される賦形剤とを含んでなる医薬組成物にも関する。

【0 1 5 8】

適当な量の本発明のオリゴヌクレオチド構築物は、薬学上許容される賦形剤および / ま

50

たは担体とともに処方して医薬組成物とすることができる。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。例示的経路としては、線条体内、脳室内、髄腔内、実質内（例えば、線条体内）、鼻内、および眼内送達挙げられる。組成物は、例えば、静脈内、皮下または筋肉注射により全身送達することもでき、それはコンジュゲートの末梢ニューロンへの送達に特に有用である。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投与が可能になる。心室内投与も適切な場合がある。好ましい送達経路は脳へ直接、例えば、脳室もしくは脳の視床下部へ、または脳の側方もしくは背側領域への送達である。

【0159】

当業者は、Remington's Pharmaceutical Science（第17版，Mack Publishing Co.，Easton, Pa.，1985）およびGoodman and Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics（第8版，Pergamon Press，Elmsford, N.Y.，1990）（いずれも引用することにより本明細書の一部とされる）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および手順に精通している。

【0160】

本発明の好ましい実施形態において、コンジュゲートは、標準的手順に従ってヒトおよび他の哺乳動物への送達投与に適合した医薬組成物として処方される。通常、静脈内または心室内投与用の組成物は無菌等張緩衝水溶液である。

【0161】

必要な場合、組成物は、注射部位における疼痛を緩和するために可溶化剤および局所麻酔薬も含み得る。一般に、成分は、アンプルまたは有効剤の量を示すサシェなどの気密容器中で、例えば、凍結乾燥粉末または無水濃縮物として、個別にまたは単位投与形中に一緒に混合して供給される。組成物を点滴注入により投与すべき場合、製薬等級の無菌水または生理食塩水を含む点滴瓶を用いて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、成分を投与前に混合できるように、無菌注射水または生理食塩水のアンプルを提供することができる。

【0162】

静脈内投与以外の場合、組成物は少量の加湿剤または乳化剤、またはpH緩衝剤を含有することができる。組成物は、溶液、懸濁液、エマルション、ゲル、ポリマー、または徐放性処方物とすることができる。組成物は、当技術分野において公知の従来の結合剤および担体を用いて処方することができる。処方物は、製薬等級のマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、ナトリウムサッカライド、セルロース、炭酸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、マイクロカプセルなどへのカプセル化を含む種々の送達系が知られており、本発明の治療薬を投与するために使用することができる。

【0163】

さらに別の好ましい実施形態では、本発明のコンジュゲートを含有する治療薬は、中性または塩形態として処方することができる。薬学上許容される塩としては、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の遊離アミノ基を伴って形成されたもの、および水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、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、プロカインなどから誘導されたものなどの遊離カルボキシル基を伴って形成されたものが挙げられる。

【0164】

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病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と理解される。従って、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内の対象とす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。当業者ならば、コン

ジュゲートが、細胞中のタンパク質の異常な発現を特徴とする疾患、また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低下させることにより改善され得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。よって、別の実施形態では、本発明は、本発明によるコンジュゲートを対象者に投与することを含んでなる、それを必要とする対象者における疾患の治療方法に関し、前記コンジュゲートは、前記疾患に関与する標的遺伝子の発現をサイレンシングすることができる核酸と、前記標的遺伝子が発現される細胞で発現される受容体に特異的なリガンドを含有する。

【0165】

選択性薬剤が視床下部で発現される受容体に特異的である一実施形態では、本発明は、表3（右の列）に示される疾患の治療のためのコンジュゲートの使用に関し、その場合、核酸は表3（左の列）に示される標的ポリペプチドに特異的である。

10

【0166】

【表3】

標的ポリペプチド	疾患
サイトカインシグナル伝達 3(SOCS3), タンパク質チロシンホ スファターゼ 1B(PTP1B), CB1, イ ンターロイキン β 1(IL1B), ニュー ロペプチド Y(NPY), グレリン受容 体, Y1, Y5 のサブレッサー	摂食障害, 肥満

20

表3：視床下部で発現される標的ポリペプチドおよび前記ポリペプチドをサイレンシングすることにより治療可能な疾患

【0167】

選択性薬剤が中脳で発現される受容体に特異的である一実施形態では、本発明は、表4（右の列）に示される疾患の治療のためのコンジュゲートの使用に関し、その場合、核酸は表4（左の列）に示される標的ポリペプチドに特異的である。

【0168】

30

【表4】

標的ポリペプチド	疾患
D1, D2, D3, DAT	嗜癖
α -シヌクレイン	シヌクレイン病
D1, D2, D3, DAT	統合失調症
D2, DAT	心的外傷後ストレス障害

表4：中脳で発現される標的ポリペプチドおよび前記ポリペプチドをサイレンシングすることにより治療可能な疾患

40

【0169】

選択性薬剤が脳幹で発現される受容体に特異的である一実施形態では、本発明は、表5（右の列）に示される疾患の治療のためのコンジュゲートの使用に関し、その場合、核酸は表5（左の列）に示される標的ポリペプチドに特異的である。

【0170】

【表 5】

標的ポリペプチド	疾患
5-HT1A, 5-HT2C, SERT	不安症
α 1A-アドレノセプター, アンジオテンシン変換酵素, G タンパク質 β 3, 5-HT2C, インターロイキン 1β , モノアミンオキシダーゼ A, SERT	鬱病
CB1	摂食障害
5-HT1A	片頭痛
α -シヌクレイン	シヌクレイン病
SERT	恐怖症, 心的外傷後ストレス障害
5-HT1A, 5-HT1A2C	精神障害
5-HT1A	睡眠障害

10

表 5：脳幹で発現される標的ポリペプチドおよび前記ポリペプチドをサイレンシングすることにより治療可能な疾患

【0171】

選択性薬剤が皮質で発現される受容体に特異的である一実施形態では、本発明は、表 6（右の列）に示される疾患の治療のためのコンジュゲートの使用に関し、その場合、核酸は表 6（左の列）に示される標的ポリペプチドに特異的である。

20

【0172】

【表 6】

標的ポリペプチド	疾患
21 番染色体にコードされている遺伝子産物	ダウン症候群関連アルツハイマー病
アミロイド前駆体タンパク質, プレセニリン 1, プレセニリン 2	早期発症型アルツハイマー病
アポリポタンパク質 E, サイクリン依存性キナーゼ 5, グリコーゲンシンターゼキナーゼ 3, 微小管親和性調節キナーゼ	遅発型, 早期発症型または散発型アルツハイマー病
A2, D4	注意欠陥多動性障害
アセチルコリンエステラーゼ, A2, CB1, カテコール-O-メチルトランスフェラーゼ, ヒスタミン N-メチルトランスフェラーゼ, H3, 5-HT6, ホスホジエステラーゼ 10A, ホスホジエステラーゼ 1B, ホスホジエステラーゼ 1C, ホスホジエステラーゼ 2A, ホスホジエステラーゼ 4A, ホスホジエステラーゼ 4B, ホスホジエステラーゼ 4D, ホスホジエステラーゼ 7A, ホスホジエステラーゼ 7B, ホスホジエステラーゼ 8B, ホスホジエステラーゼ 9B	認知障害
D1, D2, D3	脱抑制
未同定タンパク質 C9orf72, プログラニューリン, タウ	前頭側頭型認知症
ハンチンチン	ハンチントン病
α -シヌクレイン	シヌクレイン病
D1, D2, D3	パーキンソン病
D1, D2, D3, キヌレニンアミノトランスフェラーゼ	統合失調症
5-HT2C, キヌレニンアミノトランスフェラーゼ, miR-137	精神障害

表 6：皮質で発現される標的ポリペプチドおよび前記ポリペプチドをサイレンシングすることにより治療可能な疾患

【0173】

選択性薬剤が小脳で発現される受容体に特異的である一実施形態では、本発明は、表 7（右の列）に示される疾患の治療のためのコンジュゲートの使用に関し、その場合、核酸は表 7（左の列）に示される標的ポリペプチドに特異的である。

【0174】

10

20

30

40

【表 7】

標的ポリペプチド	疾患
アトロフィン-1	歯状核赤核萎縮
脆弱 X 精神遅滞 1	脆弱 X 関連振戦/失調症候群 (FXTAS)
G タンパク質共役受容体 55	運動障害
1p36	常染色体劣性 (Autosomal Recessive) 脊髄小脳失調症 4 型, SCAR4 (Old SCA24) またはサッカーディックイントルージョン (Saccadic Intrusions) を伴う脊髄小脳失調症
アタキシン 1	脊髄小脳失調症 1 型
アタキシン 10	脊髄小脳失調症 10 型
チューブリンキナーゼ 2	脊髄小脳失調症 11 型
PPP2R2B	脊髄小脳失調症 12 型
Kv3.3 チャネル	脊髄小脳失調症 13 型
プロテインキナーゼ Cγ	脊髄小脳失調症 14 型
イノシトール受容体	脊髄小脳失調症 15/16 型
アタキシン 17	脊髄小脳失調症 17 型
インターフェロン関連発生調節遺伝子 1	脊髄小脳失調症 18 型
アタキシン 19	脊髄小脳失調症 19 型
アタキシン 2	脊髄小脳失調症 2 型
アタキシン 20	脊髄小脳失調症 20 型
アタキシン 21	脊髄小脳失調症 21 型
アタキシン 22	脊髄小脳失調症 22 型
ダイノルフィン	脊髄小脳失調症 23 型
アタキシン 25	脊髄小脳失調症 25 型
アタキシン 26	脊髄小脳失調症 26 型
線維芽細胞増殖因子 14	脊髄小脳失調症 27 型
ミトコンドリアメタロプロテアーゼ複合体	脊髄小脳失調症 28 型
アタキシン 29	脊髄小脳失調症 29 型
アタキシン 3	脊髄小脳失調症 3 型
アタキシン 30	脊髄小脳失調症 30 型
チミジンキナーゼ 2 および NEDD4 関連脳発現	脊髄小脳失調症 31 型
アタキシン 32	脊髄小脳失調症 32 型
アタキシン 33	脊髄小脳失調症 33 型
16p12.3-q16.2 によりコードされている遺伝子産物	脊髄小脳失調症 34 型

10

20

30

40

トランスグルタミナーゼ	脊髄小脳失調症 35 型
核タンパク質 56	脊髄小脳失調症 36 型
アタキシン 4	脊髄小脳失調症 4 型
アタキシン 5	脊髄小脳失調症 5 型
P/Q カルシウムチャネルの $\alpha 1A$ サブユニット	脊髄小脳失調症 6 型
アタキシン 7	脊髄小脳失調症 7 型
Kelch 様タンパク質 1	脊髄小脳失調症 8 型

10

表 7：小脳で発現される標的ポリペプチドおよび前記ポリペプチドをサイレンシングすることにより治療可能な疾患

【 0 1 7 5 】

選択性薬剤が線条体で発現される受容体に特異的である一実施形態では、本発明は、表 8（右の列）に示される疾患の治療のためのコンジュゲートの使用に関し、その場合、核酸は表 8（左の列）に示される標的ポリペプチドに特異的である。

【 0 1 7 6 】

【表 8】

20

標的ポリペプチド	疾患
D1, D2, D3, 5-HT _{2C}	嗜癖
A2A	注意欠陥多動性障害 (ADHD)
A2A	認知障害
D2	脱抑制
ハンチンチン	ハンチントン病
D2, DAT	心的外傷後ストレス障害
D1, D2, D3	統合失調症

表 8：線条体で発現される標的ポリペプチドおよび前記ポリペプチドをサイレンシングすることにより治療可能な疾患

30

【 0 1 7 7 】

選択性薬剤が海馬で発現される受容体に特異的である一実施形態では、本発明は、表 9（右の列）に示される疾患の治療のためのコンジュゲートの使用に関し、その場合、核酸は表 9（左の列）に示される標的ポリペプチドに特異的である。

【 0 1 7 8 】

【表 9】

標的ポリペプチド	疾患
21 番染色体にコードされている遺伝子産物	ダウン症候群関連アルツハイマー病
アミロイド前駆体タンパク質, プレセニリン 1, プレセニリン 2	早期発症型アルツハイマー病
アポリポタンパク質 E, サイク リン依存性キナーゼ 5, グリコ ーゲンシンターゼキナーゼ 3, 微小管親和性調節キナーゼ	遅発型, 早期発症型または散発型アルツ ハイマー病
5-HT1A	不安症
A1	注意欠陥多動性障害 (ADHD)
5-HT1A	双極性障害
アセチルコリンエステラーゼ, A1, CB1, カテコール-O-メチ ルトランスフェラーゼ, ヒスタ ミン N-メチルトランスフェラ ーゼ, H3, 5-HT6, 酸化窒素 シンターゼ, ホスホジエステラ ーゼ 10A, ホスホジエステラー ゼ 1B, ホスホジエステラーゼ 1C, ホスホジエステラーゼ 2A, ホスホジエステラーゼ 4A, ホスホジエステラーゼ 4B, ホスホジエステラーゼ 4D, ホスホジエステラーゼ 7A, ホスホジエステラーゼ 7B, ホスホジエステラーゼ 8B, ホスホジエステラーゼ 9A	認知障害
5-HT1A	片頭痛, 精神障害または睡眠障害

表 9：海馬で発現される標的ポリペプチドおよび前記ポリペプチドをサイレンシングすることにより治療可能な疾患

【0179】

選択性薬剤が脊髄で発現される受容体に特異的である一実施形態では、本発明は、表 10 (右の列) に示される疾患の治療のためのコンジュゲートの使用に関し、その場合、核酸は表 10 (左の列) に示される標的ポリペプチドに特異的である。

【0180】

10

20

30

40

【表 10】

標的ポリペプチド	疾患
スーパーオキシドジスムターゼ 1, アルシン, 推定ヘリカーゼセナタキシン, RNA 結合タンパク質 FUS, 小胞関連膜タンパク質関連タンパク質 B/C, アンギオゲニン, TAR DNA 結合タンパク質 43, ポリホスホイノシチドホスファターゼ, オプチニューリン, アタキシン-2, バロシン含有タンパク質	筋萎縮性側索硬化症 (ALS) / ルー・ゲーリック病
レチキュロン 4	運動失調, ブラウン・セカール症候群および神経障害, 疼痛, 麻痺, 脊髄損傷
Nav1.7, Nav1.8, Cav2.2, COX-2, κ	神経障害, 疼痛
生存運動ニューロンタンパク質	脊髄損傷, 脊髄萎縮 (SMA)

表 10 : 脊髄で発現される標的ポリペプチドおよび前記ポリペプチドをサイレンシングすることにより治療可能な疾患

【0181】

特定の障害または病態の治療において有効な本発明のコンジュゲートの量は、その障害または病態の性質によって異なり、治療薬の投与が十分確立された標準的臨床技術により決定することができる。調剤に使用される厳密な用量は、投与経路、および疾患または障害の重症度にもより、医師の判断および患者の必要性に応じて決定されるべきである。脳内投与のための好適な用量範囲は一般に、 $1 \sim 3000 \mu\text{l}$ の 1 回注射容量で送達される μl 当たり約 $10^3 \sim 10^{15}$ 感染単位のウイルスベクターである。 μl 当たりのベクターの感染単位の添加量は一般に、約 10、50、100、200、500、1000、または $2000 \mu\text{l}$ で送達される約 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 感染単位のウイルスベクターを含む。効果的な用量は、*in vitro* または *in vivo* 試験系から導かれる用量反応曲線から外挿することができる。

【0182】

完治療法のため、本発明のコンジュゲートの脳室内投与の目的で、アクセスポート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。好ましい実施形態では、脳または脳半球当たり 1 つのポートとカテーテル系が、おそらく複数ある。神経外科医により埋め込みが実施されれば、患者の神経内科医は、数週間または数ヶ月の期間で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リングしながら行うことができる。フルコースの療法のためには、デバイスを数ヶ月または数年間埋め込んだままにしておくことができる。治療有効性の確認後、アクセスポートを場合により取り出してもよく、またカテーテルを密封して放棄するか、または同様に取出すこともできる。デバイス材料は、磁気共鳴撮像に干渉してはならず、また、当然のことながら、低分子干渉 RNA 製剤は、アクセスポートおよびカテーテル材料ならびに任意の表面コーティングと適合しなければならない。

【0183】

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、一般に、有機合成における標準的手順を用いて合成される。当業者ならば、合成の厳密なステップは、合成すべきコンジュゲートの厳密な構造によって異なること認識するであろう。例えば、コンジュゲートが選択性薬剤にその 5' 末端

を介してコンジュゲートされた単一の核酸鎖を含んでなる場合、合成は、通常、以下に説明するように活性化オリゴヌクレオチドと反応性の活性化選択性試薬とを接触させることにより実施される。

【0184】

コンジュゲートが二本鎖核酸を含んでなる場合には、センス鎖およびアンチセンス鎖は標準的な分子生物学の手順を用いて *in vitro* で別々に合成され、アニーリングされる。典型的なコンジュゲートでは、第1の核酸鎖が選択性薬剤を担持し、第2の核酸鎖が保護基を担持する。さらにより好ましい実施形態では、選択性薬剤は第1の核酸鎖の5'末端とカップリングされ、かつ/または保護基は第2の核酸鎖の5'末端に結合されるが、選択性薬剤または保護基の付加は核酸鎖の3'末端に行うこともできる。

10

【0185】

コンジュゲートの合成は、以下のように行うことができる。

【0186】

[1] 構造:

選択性薬剤 - [オリゴヌクレオチド] - 3'

を有するコンジュゲートは、一般に下記の工程を用いて合成される。

(i) 選択性薬剤を活性化する。好ましくは、選択性薬剤の活性基はスクシンイミド基である。選択性薬剤が第一または第二アミノ基を担持した場合、この基は活性化オリゴヌクレオチドと直接反応し得るので、この工程は必要でない場合がある、

(ii) オリゴヌクレオチドをその5'末端で活性化する。好ましくは、オリゴヌクレオチドの活性基はアミノ基またはカルボキシル基である、および

20

(iii) 活性化された選択性薬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。

【0187】

[2] 構造:

保護基 - [センス鎖] - 3'

3' - [アンチセンス鎖] - 選択性薬剤

を有するコンジュゲートは、一般に下記の工程を用いて合成される。

(i) 選択性薬剤を活性化する。好ましくは、選択性薬剤の活性基はスクシンイミドである。選択性薬剤が第一または第二アミノ基を担持した場合、この基は活性化オリゴヌクレオチドと直接反応し得るので、この工程は必要ない場合がある、

30

(ii) センス鎖をその5'末端で活性化する。好ましくは、オリゴヌクレオチドの活性化基はアミノ基である、

(iii) 活性化された選択性薬剤と活性化されたセンス鎖を、2つの活性基間の反応に適した条件下で接触させる、

(iv) 固定化したアンチセンス鎖に保護基を付加する。この工程は、好ましくは反応性基がアセチル化またはベンジル化(フラノース基)、2-シアノエチル化(ホスホジエステル結合)および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用いて行われる、

(v) センス鎖およびアンチセンス鎖をアニーリングする。

40

【0188】

E. 1. 核酸と5'末端結合された成長ホルモン分泌促進因子に対するリガンドを含んでなる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術を用い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および脱保護を含み得る。好適な保護基は当業者に周知である。例えば、有機化学における保護基の総説は、Wuts, P.G.M. and Greene T.W. *Protecting Groups in Organic Synthesis* (第4版 Wiley-Interscience)、およびKocienski P.J. *Protecting Groups* (第3版 Georg Thieme Verlag)で提供されている。

【0189】

50

本発明に関して、以下の用語は下記で詳細に示す意味を有する。

【0190】

用語「 $C_1 - C_6$ アルキル」は、不飽和を含まず、単結合により分子の残りの部分に連結している1～6個の、好ましくは1～3個の($C_1 - C_3$ アルキル)炭素原子を有する炭素原子と水素原子からなる線状または分岐型の炭化水素基を意味する。アルキル基の例としては、限定されるものではないが、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、ペンチルおよびヘキシルなどのアルキル基が挙げられる。好ましくは、アルキルはメチルを意味する。

【0191】

用語「ハロゲン」は、フロモ、クロロ、ヨードまたはフルオロを意味する。

10

【0192】

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記で定義されるアルキル基を意味する。ハロアルキル基の例としては、限定されるものではないが、 CF_3 、 CCl_3 、 CHF_2 、 CF_2CF_3 が挙げられる。好ましくは、ハロアルキルは CF_3 を意味する。

【0193】

用語「 $C_6 - C_{10}$ アリール」は、例えばフェニル、ナフチルおよびジフェニルを含む、炭素-炭素結合により結合したまたは縮合した1または2個の芳香族核を含んでなる、6～10個の間の炭素原子を有する芳香族基を意味する。好ましくは、「アリール」はフェニルを意味する。

20

【0194】

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応じて立体異性体を含み得る。単一の異性体、鏡像異性体またはジアステレオ異性体およびそれらの混合物は本発明の範囲内にある。

【0195】

特に断りのない限り、本発明において使用する化合物は、1以上の同位体が富化された原子が存在することのみが異なる化合物を含むことが意図される。例えば、水素の重水素もしくはトリチウムによる置換、または炭素の ^{13}C もしくは ^{14}C が富化された炭素による置換、または ^{15}N が富化された窒素による置換を除き、本発明の構造を有する化合物は、本発明の範囲内にある。

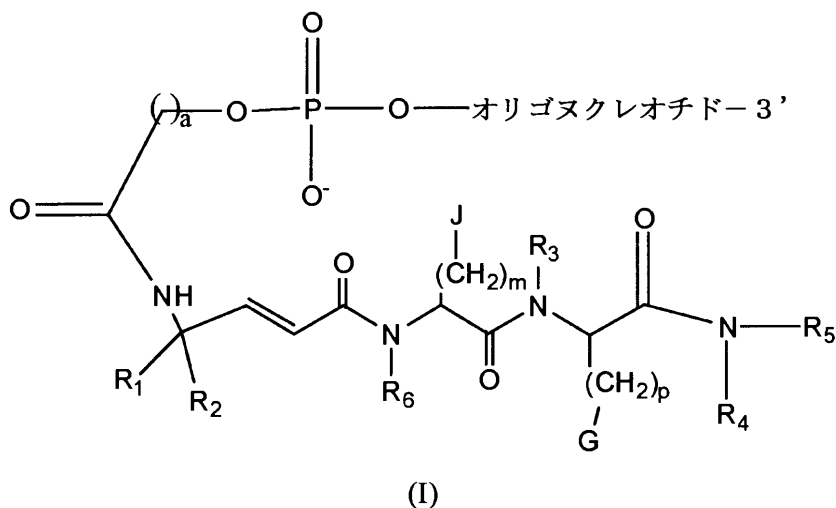
30

【0196】

カルボキシ誘導体化核酸および活性化三重取り込み阻害剤を用いた合成

一実施形態において、本発明のコンジュゲートは、アミノ誘導体化選択性薬剤とカルボキシル誘導体化オリゴヌクレオチドのコンジュゲーションにより得られる。特に、本発明のコンジュゲートは構造(I)：

【化 1 4】



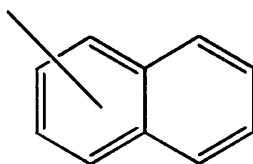
10

を有し、ここで、 R_1 および R_2 は互いに独立に、水素もしくは $C1 - C6$ アルキルであるか、または R_1 および R_2 は一緒に $C2 - C5$ アルキレン基を形成し、

J は、1 以上の $C1 - C6$ アルキルまたはハロゲンで置換されていてもよい基

【化 1 5】

20



であり、

m は、1、2 または 3 であり、

R_3 は、 $C1 - C6$ アルキルであり、

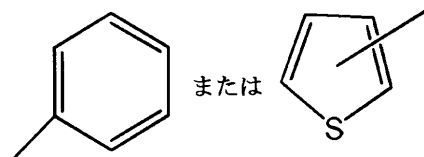
p は、1、2 または 3 であり、

a は、1 ~ 10 であり、

G は、1 以上の $C1 - C6$ アルキルまたはハロゲンで置換されていてもよい基

30

【化 1 6】



40

であり、

R_4 および R_5 は互いに独立に、水素または $C1 - C6$ アルキルであり、かつ

R_6 は、水素または $C1 - C6$ アルキル、好ましくは、水素であり、

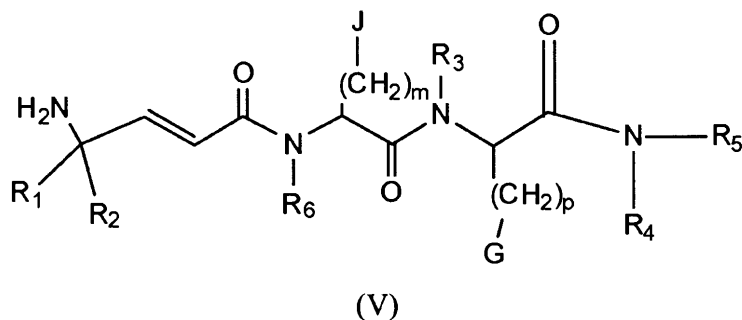
かつ、

オリゴヌクレオチドは、標的分子に特異的に結合することができる核酸であり、前記標的分子は表 3 (左の列) に定義されるポリペプチドの mRNA である。

【0197】

(III) の構造を有するコンジュゲートの合成方法は、(V) :

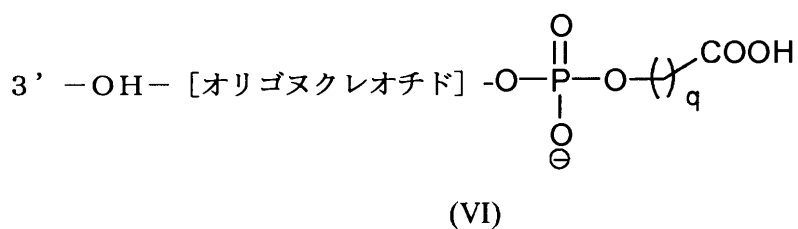
【化 1 7】



10

の構造を有する化合物を式 (V I) :

【化 1 8】



20

を有するカルボキシ修飾オリゴヌクレオチドと反応させることを含んでなる。

【 0 1 9 8】

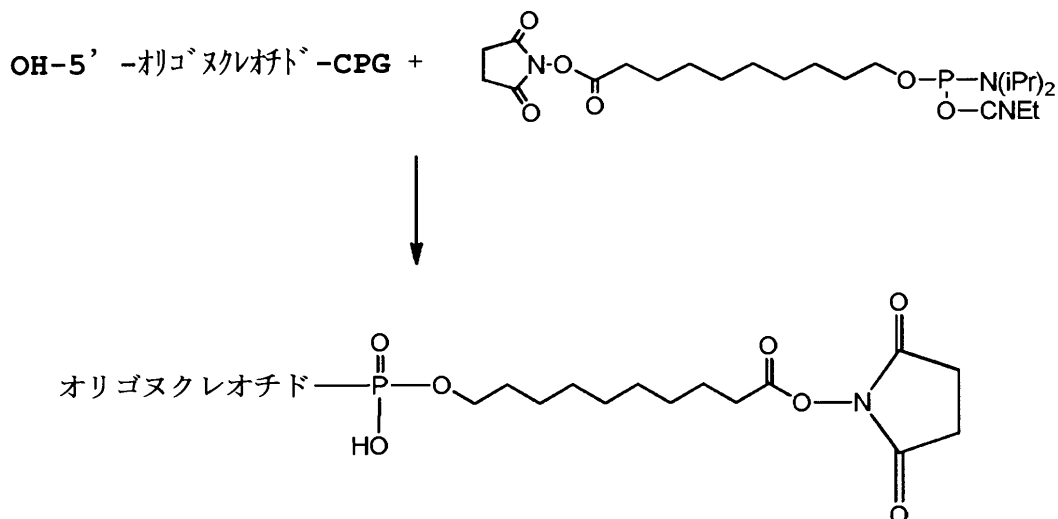
よって、本発明はまた、オリゴヌクレオチドが標的分子に特異的に結合することができる核酸であり、前記標的分子が表 3 (左の列) に定義されるポリペプチドの mRNA である、構造 (V I) を有する化合物に関する。特定の実施形態では、構造 (V I) を有する化合物中のオリゴヌクレオチドは、アンチセンスギャップマーである。特に、前記ギャップマーは、5 個の 2' - O メチル修飾リボヌクレオチドのブロックに挟まれた 10 個のデオキシヌクレオチドの中央ブロックを含んでなる。別の実施形態では、核酸は si RNA のセンス鎖またはアンチセンス鎖である。

30

【 0 1 9 9】

カルボキシルリンカー修飾因子を用いてオリゴヌクレオチドを活性化するための一般手法は一般に、以下のスキームに従う。

【化 1 9】



40

【 0 2 0 0】

50

カルボキシ修飾オリゴヌクレオチドの一般合成法

(i) 無水アセトニトリル中に修飾因子分子の溶液を作製し、それを合成装置(Y)の外部リザーバーに入れる、

(ii) 必要なオリゴヌクレオチド配列の合成の開始時に、Y塩基を5'末端に付加する。これによりYリザーバーからのリンカー/修飾因子分子の、オリゴヌクレオチド配列の末端へのカップリングが可能となる、

(iii) 適当なカップリングサイクルを用いて合成を開始する。同じカップリングサイクルを用いて、リンカー/修飾因子分子のカップリングも行う、

(iv) オリゴヌクレオチド合成の終了時に、支持体を洗浄し、最後に支持体をガスで乾燥させる、

(v) 固相支持体をカラムから取り出し、それをねじ口バイアルに移し、2段階の脱保護を完了させる。

【0201】

カルボキシ修飾オリゴヌクレオチドは、選択性薬剤とのさらなるコンジュゲーションのために脱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中の残存する保護基を総て次のように除去する。20% v/vのメチルアミン(水溶液40% w/v)および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管に加えた。この管を密閉して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またはベンゾイル化およびホスホジエステル結合の2-シアノエチル化)および環外アミノ基の保護基(Bz、Ac、IBu)が排除される。次に、この混合物を冷却し、濾過し、上清を乾燥させた。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、得られた溶液をセファデックスカラムで脱塩すると、カルボキシ修飾5'-オリゴヌクレオチドが残った。

【0202】

特定の実施形態では、本発明の方法により合成されたコンジュゲートにより含まれるオリゴヌクレオチドは、アンチセンスギャップマーである。特に、ギャップマーは、5個の2'-Oメチル修飾リボヌクレオチドのブロックに挟まれた10個のデオキシヌクレオチドの中央ブロックを含んでなる。

【0203】

次に、カルボキシル活性化オリゴヌクレオチドを、上記で定義される式(V)の選択性薬剤の活性化誘導体と反応させる。上記に示される一般式(I)を有する化合物が得られる。

【0204】

特に、この化合物(I)は、標的分子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドを含んでなり、前記標的分子は表3に定義されるポリペプチドまたは前記ポリペプチドをコードするmRNAである。特定の実施形態では、構造(III)を有する化合物中のオリゴヌクレオチドは、アンチセンスギャップマーである。特に、ギャップマーは、5個の2'-Oメチル修飾リボヌクレオチドのブロックに挟まれた10個のデオキシヌクレオチドの中央ブロックを含んでなる。別の実施形態では、核酸はsiRNAのセンス鎖またはアンチセンス鎖である。

【0205】

F. 診断用のコンジュゲートおよびそれらの使用

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性薬剤を使用することにより治療用化合物の標的細胞特異的様式での送達を達成し得るということは、診断目的に使用できる化合物の送達にも応用できる。従って、別の実施形態において、本発明は、

(i) 受容体に特異的に結合する選択性薬剤であって、前記選択性薬剤の結合時に前記受容体が細胞によって内部移行され得る、少なくとも1種の選択性薬剤と、

10

20

30

40

50

(i i) 撮像剤

を含んでなるコンジュゲートを提供する。

【 0 2 0 6 】

用語「選択性薬剤」および「受容体」は上記で詳細に説明されており、本発明の診断用コンジュゲートについても同様に理解することができる。上記の選択性薬剤はいずれも、本発明による撮像法のためのコンジュゲートにおいて使用可能である。

【 0 2 0 7 】

用語「撮像剤」および「造影剤」は、本明細書において互換的に使用され、その使用により、その像の異なる領域間の「コントラスト」を増強することにより像の異なる部分の区別が容易になる生体適合性化合物を意味する。従って、用語「造影剤」は、そのような薬剤の不在下でも生成可能な像（例えば、MRIの場合）の品質を向上させるために使用される薬剤、ならびに像の生成に欠くことのできない薬剤（例えば、核撮像の場合）を包含する。好適な造影剤としては、限定されるものではないが、放射性核種撮像用、コンピューター断層撮影用、ラマン分光法用、磁気共鳴撮像（MRI）用および光学的撮像用の造影剤が挙げられる。

【 0 2 0 8 】

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 および ^{68}Ga などの陽電子放射体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、 ^{94m}Tc 、 ^{201}Tl および ^{67}Ga などの陽電子放射体で標識される。放射性核種撮像様式（陽電子放射断層撮影（PET）；単光子放射コンピューター断層撮影法（SPECT））は、放射性核種で標識された放射性トレーサーの位置および濃度をマッピングする診断用断面撮像技術である。PETおよびSPECTは、代謝活性を測定することにより放射性核種の位置決定および同定を行うために使用することができる。PETおよびSPECTは、細胞生存率などの細胞レベルでの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または注射され、この物質は身体中を移動するのでモニタリングすることができる。一つの一般的な適用では、例えば、患者は陽電子放射体が結合されたグルコースを与えられ、患者が種々の課題を遂行する際の脳がモニタリングされる。脳はそれが働く際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では、細胞をin vivoのPETまたはSPECT撮像のためにex vivoで標識する。PETと密接に関係するのは単光子放射コンピューター断層撮影法、またはSPECTである。この二者の間の主な違いは、SPECTが、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。

【 0 2 0 9 】

CT撮像用の造影剤は、例えば、ヨウ素化または臭素化造影媒体を含む。これらの薬剤の例としては、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、エチオドールおよ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で論述）。コンピューター断層撮影（CT）が本発明に関して撮像様式として企図される種々の角度から時には千本を超える一連のX線を用い、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。コンピューターは任意の角度からおおよび任意の深さで2次元断面を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のなどの放射線不透過造影剤の静注が、軟組織体の同定および描写の助けとなり得る。

【 0 2 1 0 】

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の誘導体、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、ダボキシル色素および本明細書に開示されている種々の他の蛍光化合物が挙げられる。

【0211】

好ましい実施形態では、造影剤は、磁気共鳴撮像装置により撮像可能な化合物である。磁気共鳴撮像装置により撮像可能な造影剤は、他の撮像技術で利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を有する組織コンパートメント間を識別するのに役立つこと、および緩和時間を短縮すること（T1強調スピンエコーMRI像により強いシグナルを、そしてT2強調像に低強度のシグナルを生ずることになる）である。MRI造影剤の例としては、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、および鉄粒子が挙げられる。特定の実施形態では、MRI造影剤は ^{19}F である。CTおよびMRIは両方とも組織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の欠点として、患者の忍容性が低いこと、ペースメーカーおよびある種の他の金属インプラントデバイスの禁忌、ならびに複数の原因（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(Alberico et al., 2004)。他方、CTは迅速で、十分な忍容性があり、かつ容易に利用できるが、MRIよりコントラスト解像度が低く、ヨウ素化造影剤およびイオン化性放射線が必要になる(Alberico et al., 2004)。CTおよびMRIの両方の欠点は、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、高強度磁石およびラジオ波周波数シグナルを使用して像を生成する撮像様式である。生物組織中に最も豊富な分子種は水である。撮像検査で最終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中に正味の磁化を生じさせる。次に、種々の磁場勾配および他のRFパルスがスピンの作用して、記録されるシグナル中に空間的情報をコードする。これらのシグナルを収集して解析することにより、CT像同様に、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。

【0212】

MRI造影剤としては、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(III)、テルビウム(III)、ジスプロシウム(III)、ホルミウム(III)およびエルビウム(III)からなる群から選択される金属の錯体が挙げられる。好ましい実施形態では、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。

【0213】

用語「ガドリニウム系化合物」は、本明細書で使用する場合、脳撮像に関して使用される場合には、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ものとする。別の実施形態では、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、およびガドジアミドからなる群から選択される。

【0214】

ガドリニウム含有造影剤の投与量は、体重1kg当たり約10mgの量で可変である。別の実施形態では、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。本発明はまた、工程(c)または工程(d)のいずれかに続いて対象者に生理食塩水（例えば、リンゲル溶液）を腹腔内投与する工程をさらに含んでなる上記の方法も提供する。

【0215】

本発明はまた、診断剤として上記に定義されたコンジュゲートの使用およ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。

【0216】

本発明はまた、多モードの撮像法も提供する。本発明のある特定の実施形態は、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または対象者内の部位を撮像する方法に関する。ある特定の実施形態では、細胞上または細胞中の単一の標識から複数のシグナルが生ずる。上記で示されるように、当業者に知られたいずれの撮像様式も、本発明の撮像法のこれらの実施形態で適用可能である。

【0217】

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または投与後の任意の時点で実施される。例えば、撮像試験は、本発明の標識された細胞の投与中に、すなわち、特定の位置へ送達を導く補助とするために、またはその後の任意の時点で実施することができる。

10

【0218】

第1の撮像様式と同時に、または第1の撮像様式後の任意の時点で、付加的撮像様式を実施することができる。例えば、付加的撮像様式は、第1の撮像様式の完了の約1秒、約1時間、約1日、もしくはそれより長い任意の時間の後に、またはこれらの示した時間の間の任意の時点で実施することができる。本発明のある特定の実施形態では、複数の撮像様式が並行して実施され、従って、それらは標識された細胞または薬剤の投与に続いて同時に開始される。当業者ならば、本発明によって企図される種々の撮像様式の実行に精通しているであろう。

【0219】

本撮像方法のいくつかの実施形態では、同じ撮像デバイスが第1の撮像様式および第2の撮像様式を実施するために使用される。他の実施形態では、異なる撮像デバイスが異なる撮像様式を実施するために使用される。当業者ならば、本明細書に記載の撮像様式を実行するために利用可能な撮像デバイスに精通しているであろう。

20

【0220】

本発明は、1以上の撮像様式を用いて細胞を撮像するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、細胞は複数種の撮像剤で標識され、他の態様では、細胞は単一の標識剤で標識される。ある特定の実施形態では、単一の標識剤は多モード検出可能な薬剤である。

【0221】

G. リポソームおよびデンドリマーを含んでなるコンジュゲート

30

別の実施形態では、本発明は、リポソームと、受容体に特異的に結合する選択性薬剤であって、前記選択性薬剤の結合時に前記受容体が細胞によって内部移行されうる選択性薬剤とを含んでなるコンジュゲートを提供する。

【0222】

別の実施形態では、本発明は、デンドリマーと、受容体に特異的に結合する選択性薬剤であって、前記選択性薬剤の結合時に前記受容体が細胞によって内部移行され得る選択性薬剤とを含んでなるコンジュゲートを提供する。

【0223】

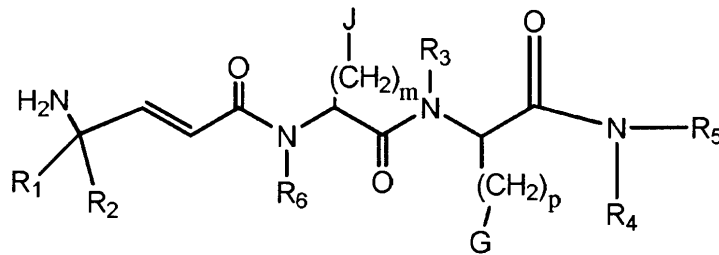
デンドリマーまたはリポソーム内に治療化合物をカプセル化することにより、コンジュゲートは、前記神経伝達物質輸送体を発現する細胞に対する前記化合物の選択的送達が可能となる。

40

【0224】

好ましい実施形態では、選択性薬剤は、表1（左の列）に定義される受容体に特異的である。別の実施形態では、選択性薬剤は、表1（右の列）に定義される受容体に特異的である。別の実施形態では、選択性薬剤は、表2に定義される任意の薬剤である。より好ましい実施形態では、選択性薬剤は、成長ホルモン分泌促進因子受容体である。なおさらに好ましい実施形態では、選択性薬剤は構造：

【化 2 0】



10

を有し、ここで、 m 、 p 、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 および R_6 は上記で定義される通りである。

【0225】

リポソームおよびナノ粒子は、薬物のカプセル化に慣用されるナノコンテナの例示的形態である。リポソームは好ましくは、200ナノメートル未満の直径を有する。50～150ナノメートルの間の直径を有するリポソームが好ましい。特に好ましいのは、約80ナノメートルの外径を有するリポソームまたは他ナノコンテナである。好適なタイプのリポソームは、1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロール-3-ホスホコリン(POPC)、ジホス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(DSPE)、またはコレステロールなどの天然リン脂質を、リポソーム内のDNAを安定化させるための少量(1パーセント)のジドデシルジメチル臭化アンモニウム(DDAB)などの陽イオン脂質とともに用いて製造される。

20

【0226】

リポソームは、DNAを封入し、かつ、処方物が血液中に留まっているかまたは血液から標的細胞の細胞内コンパートメントに移行中に核酸をヌクレアーゼから保護することができる、直径200nm未満のナノ粒子または任意の他の分子ナノコンテナで置き換えることができる。また、PEG鎖などのコンジュゲーション剤を使用する代わりに、スフィンゴミエリンなどの1以上の他のポリマー物質をリポソームまたはナノコンテナの表面に結合させて、「輸送可能ペプチド」のコンジュゲーションのため、および処方物の血液からの除去を遅延させて血漿薬物動態を最適化するための足場を提供するという二重の目的を果たすこともできる。さらに、本発明は、特定の標的受容体を有する任意の細胞群または臓器群へのDNAの送達を企図する。リポソームは、肝臓、肺および脾臓などの臓器へDNAを送達するために使用可能である。

30

【0227】

本発明のコンジュゲートの送達のために好適な他のコンテナとして、デンドリマーが含まれる。用語「デンドリマー」は、コアとそのコアから発散する分岐構造の複数のシェルを有する高分子を意味する。樹枝状担体の形状およびサイズは様々であり得る。場合によっては、樹枝状担体はほぼ球状または球形の形状であってもよい。さらに、樹枝状担体は、例えば、約500ダルトン～約200万ダルトンの分子量範囲に相当する、約15オングストローム(A)～約250Aの範囲の直径を有し得る。デンドリマーは、種々の供給先(例えば、Dendritech、ミッドランド、ミシガン)から商業的に入手可能であり、または当業者に公知の方法により合成することもできる。樹枝状分子は、低分子量種と高分子量種に大別できる。第1のカテゴリーにはデンドリマーおよびデンドロンが含まれ、第2のカテゴリーはデンドロナイズドポリマー、高分岐ポリマー、およびブラシポリマー(ボトルブラシとも呼ばれる)を包含する。デンドリマーおよびデンドロンは、繰り返し分岐した、単分散、かつ、通常は高対称性の化合物である。デンドリマーおよびデンドロンの定義に明白な違いはない。デンドロンは通常、フォーカルポイントと呼ばれる、単一の化学介入可能な基を含む。モル質量分布の欠如のために、高分子質量デンドリマーおよびデンドロンは高分子ではあるがポリマーではない。デンドリマーの特性は、分子表面上の官能基により支配される。樹枝状足場は内部機能と外部機能を分離することから

40

50

、機能性分子のデンドリマー封入により、生体材料中の活性部位の構造を模倣する構造である活性部位の孤立化が可能となる。例えば、デンドリマーは、その末端基がカルボキシル基などの親水基である場合には水溶性となり得る。

【0228】

デンドリマーは一般に下記の特徴によって特性決定が可能である：(i) 1以上の反応性部位を有することができ、デンドリマーの最終トポロジーを左右するような点様または有意なサイズであり得る開始コア(I)；(ii) 開始コアに結合した分岐状の繰り返し単位の1以上の層；(iii) デンドリマーの表面に、場合により架橋基を介して結合された陰イオン基または陽イオン基などの官能性末端基。

【0229】

本明細書において企図されるデンドリマーは、リジン、またはリジン類似体構成単位を含んでなり得る。用語「リジン類似体」は、構成単位の前層に結合するための単一の頂点カルボキシル基と、さらなる構成単位、遮断基、リンカーまたはアリアル酸基と結合することができる2個または3個の第一アミン基を有する分子を意味する。本明細書において企図される「リジン類似体」の例はPCT/AU2007/000352に記載され、例えば、グリシル-Lysである。いくつかの特定の例では、デンドリマーは、構成単位としてリジンのみかまたはリジン類似体の一タイプを含んでなる。

【0230】

本明細書において企図される他のデンドリマーには、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)またはポリプロピレンイミン構成単位を含んでなるものが含まれる。その特定の例では、デンドリマーは、構成単位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)またはポリプロピレンイミンのみを有する。

【0231】

コア部分は、一構成単位に対して結合点を1つだけ含んでもよいし、または2、3もしくはそれを超える結合点を含んでいてもよく、これらは構成単位の結合のためにさらに使用されてもされなくてもよい。一般に、結合点は遊離アミノ基である。コア部分は、構成単位からなり得るか、構成単位を含んでなり得るか、構成単位から誘導され得るか、または構成単位とは異なる分子であり得る。例示的なコア部分は本発明に示され、PCT/AU2007/000352に記載されている。

【0232】

リポソームおよびデンドリマーは、静脈内投与に好適な任意の医薬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、最小の侵襲性であるので好ましい経路である。必要であれば、他の投与経路も可能である。好適な薬学上許容される担体としては、生理食塩水、Trisバッファー、リン酸バッファー、または任意の他の水溶液が含まれる。適当な用量は、当業者に周知の手順によって確定することができる。

【0233】

本発明を、本明細書において以下の例により説明するが、これらの例は例示に過ぎず、本発明の範囲を限定するものではない。

【実施例】

【0234】

以下の分子を、成長ホルモン分泌促進因子受容体を発現する脳領域(視床下部)において標的遺伝子をサイレンシングするそれらの能力に関して調べた。

・TAB-NS-Cy3: 3'オーバーハングTTを有し、センス鎖が5'末端でC16リンカーを介してタビモレリンとコンジュゲートされ、アンチセンス鎖がCy3で3'標識されている、二重鎖21mers iRNA、

・2'-o-メチルヌクレオチドの各末端に10個のDNAヌクレオチドと5個のヌクレオチドのコアを有する(非センス用とSOC3用) 20merのアンチセンス配列、

・2'-o-メトキシエチルntの各末端に10個のホスホロチオエートntと5ntのコアを有し(PTP1B用)、その5'末端でC10リンカーによってタビモレリンとコ

10

20

30

40

50

ンジュゲートされている、20merのアンチセンス配列。

【0235】

実施例 1

Cy3で標識されタビモレリンで視床下部中心に指向されたsiRNAのin vivo 標的化のバリデーション

タビモレリンにコンジュゲートし、Cy3（長鎖リンカー）で標識した単回用量30μgの非コードsiRNA配列（TAB-NS-Cy3）で動物を処置した。非コンジュゲート分子を対照として用いた（NS-Cy3）。分子を片側の心室に投与した。1時間後に動物を屠殺し、脳を摘出し、蛍光顕微鏡下での可視化のために処理した。

【0236】

非コンジュゲート対照（NS-Cy3）に比べてコンジュゲート分子（TAB-NS-Cy3）で処置したマウスにのみ特定の脳領域、すなわち、視床下部領域にCy3標識が検出されたが、このことは、タビモレリンが核酸分子を特定の脳領域に指向され得ることを示している。

【0237】

実施例 2

高脂肪食肥満モデルにおいてSOC3 mRNAまたはPTP1B mRNAに指向されたタビモレリンコンジュゲートアンチセンスオリゴヌクレオチドの生理学的効果を評価することによるin vivo 標的化バリデーション

動物に高脂肪食（HFD）（TD、06414、60%脂肪、Harlan）または標準食（対照食：2014、Harlan）を12週間与えた。非肥満動物の平均体重に非肥満標準偏差の2倍を加えたものより重い体重の肥満動物を選択した：

肥満BW > 非肥満BW平均 + 2 × 非肥満SD

ここで、

- ・BW = 体重
- ・SD = 標準偏差

【0238】

投与当日に動物を8時間絶食させた。イソフルオラン麻酔下、下記の分子30μgを12日で10用量鼻腔内投与した（5μl/鼻孔）：

- ・ビヒクル（VH）（1×PBS）
- ・TAB-NS-ASO4（NS）（タビモレリンで指向された非センス配列）
- ・TAB-SOC3-ASO4（SOC3）（タビモレリンで指向されたsoc3 mRNAに対するアンチセンス配列）
- ・TAB-PTP1B-ASO4（PTP1B）（タビモレリンで指向されたptp1b mRNAに対するアンチセンス配列）。

【0239】

体重および食物摂取を毎日モニタリングした。最後の投与の48時間後に動物を屠殺し、さらなる分析のために組織を回収した。

【0240】

図2は、処置中の累積体重増を示す。示されているように、TAB-SOC3-ASO4またはTAB-PTP1B-ASO4のいずれかで処置された動物は、対照動物（VHおよびNS）よりも有意に体重増加が小さかった。

【0241】

累積食物摂取（FI）もまた、TAB-SOC3-ASO4またはTAB-PTP1B-ASO4で処置した動物において有意に低下した（図3）。これらの結果は、両分子とも標的化された視床下部領域に到達してBWおよびFIの低下をもたらすのに効果的であったことを示唆した。

【0242】

経日変化を分析したところ（図4）、1日当たりのFIだけが有意に低下していた。経日BW変化は統計的に有意ではなかったにもかかわらず、全処置期間でBWをモニタリン

10

20

30

40

50

グしたときには小さな経日変化が表れた（図 2 の累積 B W 増）。

【 0 2 4 3 】

実施例 3

小脳のプルキンエ細胞におけるアタキシン I の標的化（細胞特異性）およびノックダウンの *in vivo* パリテーション

コンジュゲートされたオリゴヌクレオチドの、標的領域に到達して特定の遺伝子をノックダウンする能力を証明するために、本発明者らは、5 - H T 1 B 受容体に対するリガンドを選択し、この分子をアタキシン - I mRNA に対応する *siRNA* にコンジュゲートした。5 - H T 1 B 受容体は小脳のプルキンエ細胞で発現されるが、本発明者らは、これらの受容体のアゴニストである 5 - ノニルオキシトリプタミンオキサレートのアタキシン - I の mRNA に対する *siRNA* にコンジュゲートして用い、プルキンエ細胞でのみこのタンパク質をノックダウンする。

【 0 2 4 4 】

アタキシン - 1 - *siRNA* 配列 (Lee et al., Nat Neurosci 11, 1137-1139 (2008))

【表 1 1】

センス鎖	gaucuaacgugggcaaguaTT	(配列番号 9)
アンチセンス鎖	uacuugcccacguuagaucTT	(配列番号 10)

【 0 2 4 5 】

このため、5 個体の C 5 7 / B 1 6 野生型マウスの鼻腔内に、コンジュゲート分子を連続 4 日間、4 m g / k g / 日濃度で投与し、対照として、同系統の 5 個体の動物を P B S で処置し、最終投与の 2 4 時間後に動物を屠殺し、比色定量検出による *in situ* ハイブリダイゼーションのために脳を処理した。両末端（5' および 3'）をジゴキシゲニンで標識した 4 5 ヌクレオチド長のマウスアタキシン - I mRNA 相補的プローブを使用した。脳の矢状凍結切片をこのプローブとともにインキュベートし、ビヒクルで処置した動物に比べて mRNA レベルが低下したかどうか検出した。アルカリ性ホスファターゼにコンジュゲートされた抗ゴキシゲニン抗体および基質 B C I P / N B T（図 5）とともにインキュベートしたところ、比色定量シグナルが得られた。

【 0 2 4 6 】

実施例 4

リガンド、誘導体化リガンドおよびオリゴヌクレオチドを伴った誘導体化リガンドの 5 - H T 3 および 5 - H T 1 A に対する結合アッセイ

候補コンジュゲート 1 3 1 9 を合成した。コンジュゲート 1 3 1 9 は、以下の配列を有し、5 - H T 1 A に特異的な *siRNA* にコンジュゲートされたレリセトロン（セロトニン 5 - H T 3 受容体のリガンド）に相当する (Lee et al., Nat Neurosci 11, 1137-1139 (2008))。

【 0 2 4 7 】

【表 1 2】

センス鎖	ggugcucaacaaguggacuTT	(配列番号 11)
アンチセンス鎖	aguccacuuguugagcaccTT	(配列番号 12)

【 0 2 4 8 】

H E K - 5 H T 3 において 3 H - G R 6 5 6 3 0（0.5 n M）を漸増濃度の 1 3 1 9（0.1 n M ~ 1 0 μ M）、レリセトロン - C 6 - アシルおよび非誘導体化レリセトロン（0.1 n M ~ 3 0 μ M）に置き換えた：1 ウェル当たり 3 μ g のタンパク質を表 1 1 に示す。

【 0 2 4 9 】

【 表 1 3 】

	IC50 (nM)
レリセトロン	7.0
レリセトロン-C6-アシル	8.500
1319	14.900

表 1 1. 1 3 1 9 の 5 H T 3 への結合

10

【 0 2 5 0 】

候補コンジュゲート 1 3 0 1 を合成した。コンジュゲート 1 3 0 1 は、グリコーゲンシンターゼキナーゼ 3 siRNA 配列にコンジュゲートされた LY - 1 6 5 , 1 6 3 (セロトニン 5 H T 1 A 受容体のリガンド) に相当する (Wang J. et al., J Biol Chem 281, 33842-33848 (2006))。

【 0 2 5 1 】

【 表 1 4 】

センス鎖	ggcaccagaguugaucuuugTT	(配列番号 13))
アンチセンス鎖	caaagaucaacucuggugccTT	(配列番号 14))

20

【 0 2 5 2 】

ヒト 5 H T 1 A 受容体を過剰発現する CHO 細胞において、3 H - 8 - O H - D P A T (0 . 6 n M) を、漸増濃度の 1 3 0 1 (0 . 1 n M ~ 1 0 μ M)、LY - 1 6 5 , 1 6 3 - C 6 - アシルおよび非誘導体化 LY - 1 6 5 , 1 6 3 および対照としての 8 - O H - D P A T (0 . 1 n M ~ 3 0 μ M) に置き換えた：(表 1 2)。1 ウェル当たり 1 0 μ g のタンパク質を室温で、1 5 分間ブレインキュベートし、6 0 分間インキュベートした。

30

【 0 2 5 3 】

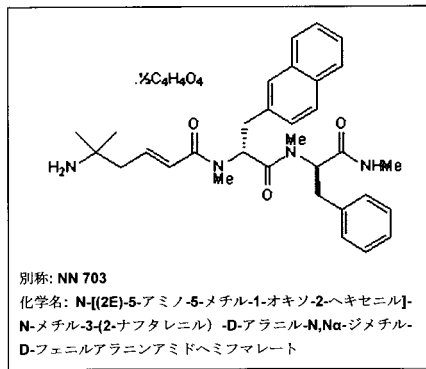
【 表 1 5 】

	IC50 (nM)
8-OH-DPAT	1,1
LY-165,163	1,1
LY-165,163-C6-アシル	5,5
1301	5.500

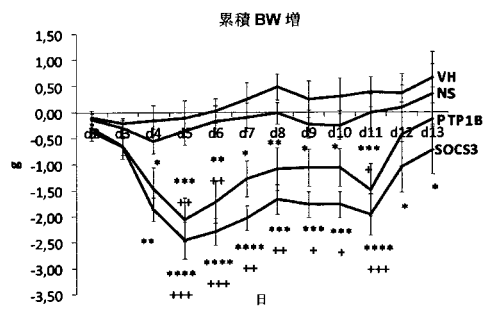
表 1 2. 1 3 0 1 の 5 H T 1 A への結合

40

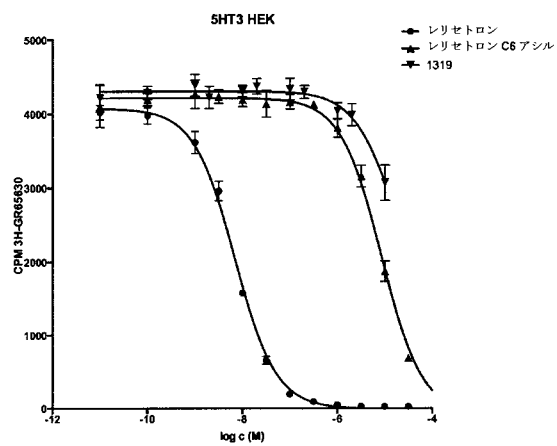
【 図 1 】



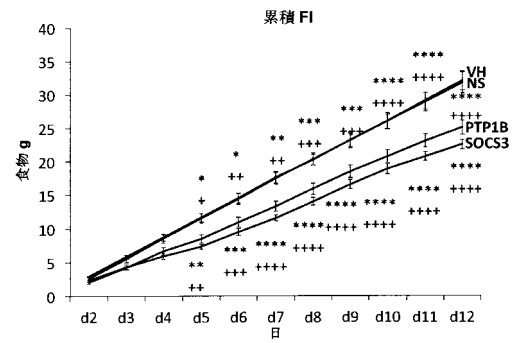
【 図 2 】



【 図 6 】



【 図 3 】



【 図 7 】

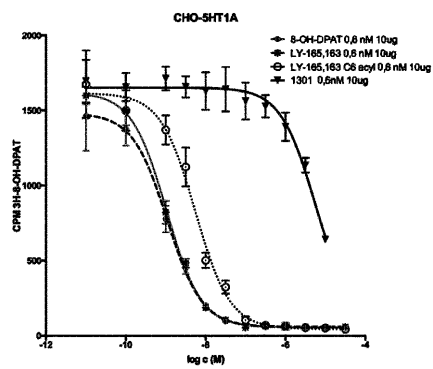
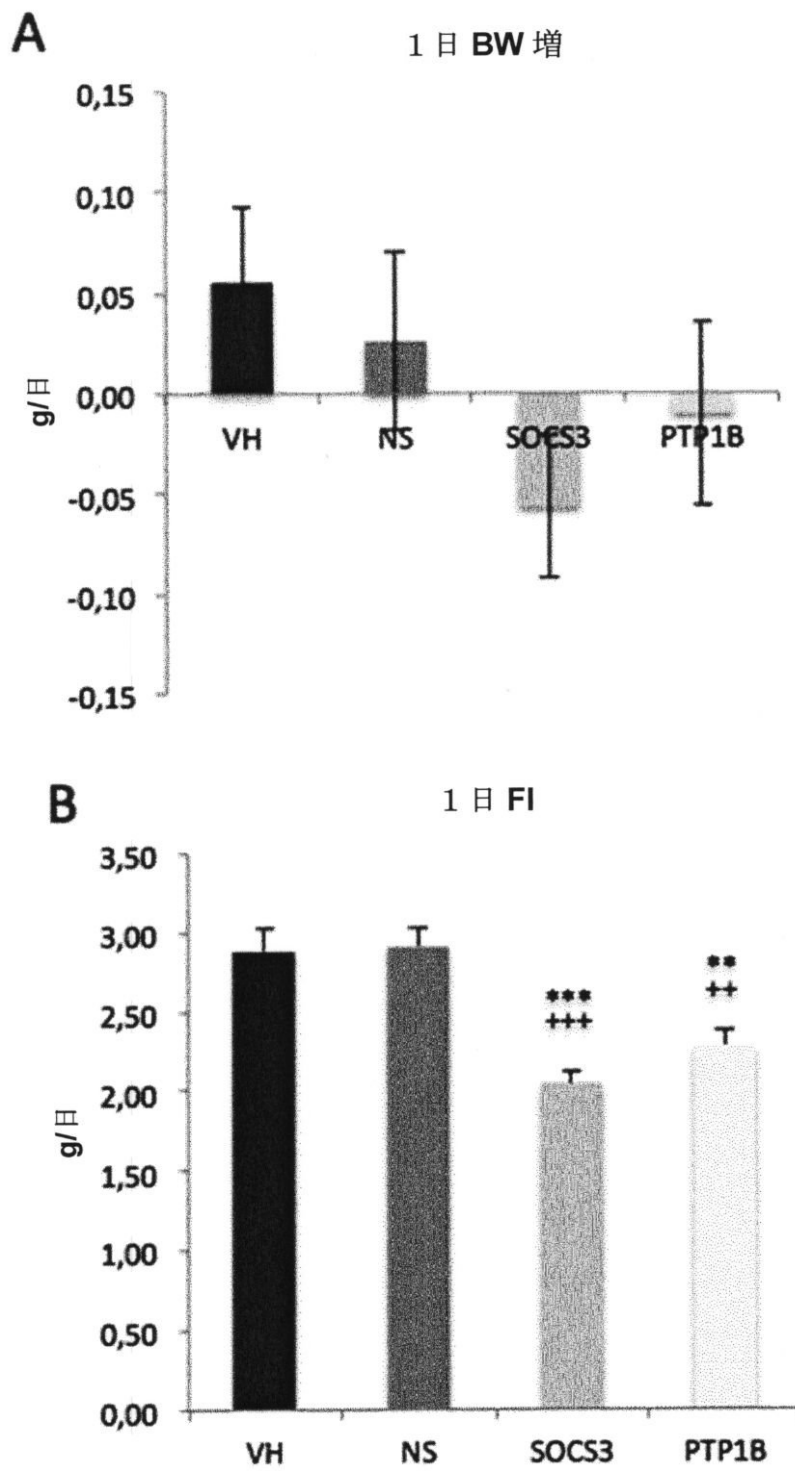
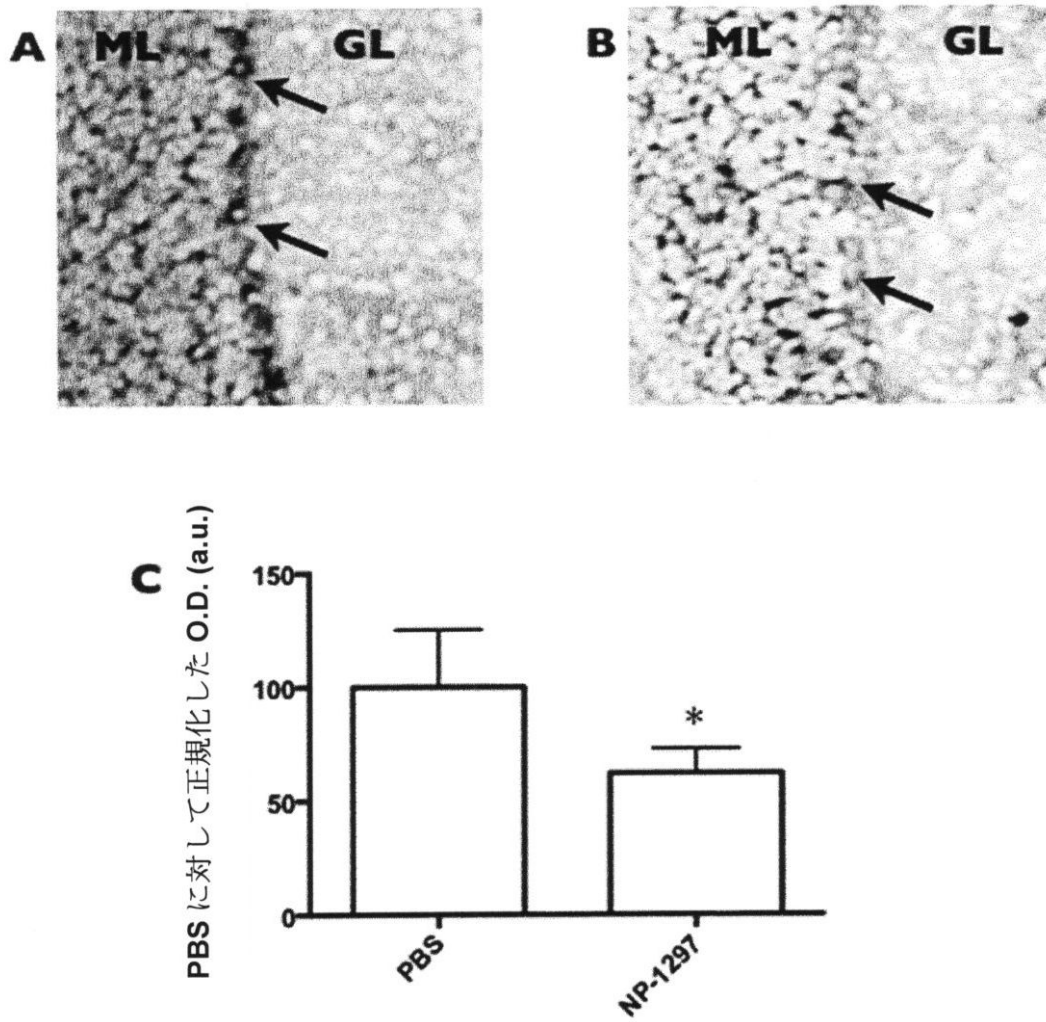


Fig. 7

【 図 4 】



【 図 5 】



【 配 列 表 】

2016503394000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2013/072411

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K47/48 A61K31/165 A61K31/711 A61P3/04 A61P25/00
A61K9/127

ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K A61P

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2011/131693 A2 (NLIFE THERAPEUTICS S L [ES]; MONTEFELTRO ANDRES PABLO [ES]; ALVARADO U) 27 October 2011 (2011-10-27) page 1, line 8 page 9, lines 19-24 page 24, lines 9-11 page 40, line 5 - page 49, line 1 page 56, line 5 - page 57, line 15 page 66, line 1 - page 71, line 28 page 77, line 23 - page 79, line 32 page 89, line 19 - page 92, line 6 page 92, lines 10-18 page 95, line 20 - page 96, line 4 ----- -/--	1-8, 38-60 13-15, 64,65

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 January 2014

Date of mailing of the international search report

07/03/2014

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Villard, Anne-Laure

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/072411

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LOGAN J ET AL: "Imaging the norepinephrine transporter in humans with (S,S)-[<11>C]0-methyl reboxetine and PET: problems and progress", NUCLEAR MEDICINE AND BIOLOGY 200708 US, vol. 34, no. 6, August 2007 (2007-08), pages 667-679, XP002718955, ISSN: 0969-8051 abstract page 668, left-hand column, paragraph 2 -----	1-15, 38-65
A	BORRONI E ET AL: "Pre-clinical characterization of [<11>C]R05013853 as a novel radiotracer for imaging of the glycine transporter type 1 by positron emission tomography", NEUROIMAGE 20130715 ACADEMIC PRESS INC. USA, vol. 75, 10 December 2011 (2011-12-10), pages 291-300, XP002718956, ISSN: 1053-8119 published online on 10-12-2011 and on paper on 15-07-2013 figure 3 -----	1-15, 38-65
A	VARRONE A ET AL: "Molecular imaging of the dopamine transporter", JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE 2010 SOCIETY OF NUCLEAR MEDICINE INC. USA, vol. 51, no. 9, September 2010 (2010-09), pages 1331-1334, XP002718957, ISSN: 0161-5505 page 1331, left-hand column, paragraph 1 figure 2 -----	1-15, 38-65
A	HOULE S ET AL: "Imaging the serotonin transporter with positron emission tomography: Initial human studies with [<11>C]DAPP and [<11>C]DASB", EUROPEAN JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE 2000 DE, vol. 27, no. 11, 2000, pages 1719-1722, XP002718958, ISSN: 0340-6997 page 1720, right-hand column, paragraph 1 -----	1-15, 38-65
Y	STOICA GEORGE ET AL: "Potential role of [alpha]-synuclein in neurodegeneration: studies in a rat animal model.", JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY AUG 2012, vol. 122, no. 4, August 2012 (2012-08), pages 812-822, XP002718959, ISSN: 1471-4159 abstract -----	13-15, 64,65
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/072411

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KROEMER N B ET AL: "Fasting levels of ghrelin covary with the brain response to food pictures", ADDICTION BIOLOGY 2013 BLACKWELL PUBLISHING LTD GBR, vol. 18, no. 5, September 2013 (2013-09), pages 855-862, XP002718960, ISSN: 1355-6215 Article first published online: 13 SEP 2012 abstract	13-15, 64,65
X	----- UENO S ET AL: "In vitro selection of a peptide antagonist of growth hormone secretagogue receptor using cDNA display", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 20120710 NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES USA, vol. 109, no. 28, 10 July 2012 (2012-07-10), pages 11121-11126, XP002718961, ISSN: 0027-8424 page 1122 Supplementary information pages 1-2 and figure S4	1-9,13, 38,39, 42-44, 47-51
X	----- SEIM INGE ET AL: "Ghrelin and the Brain-gut Axis as a Pharmacological Target for Appetite Control", CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, NL, vol. 18, no. 6, 1 February 2012 (2012-02-01), pages 768-775, XP008166723, ISSN: 1381-6128, DOI: 10.2174/138161212799277806	9,12,13, 61
Y	page 770, left-hand column, last paragraph page 771, left-hand column, last paragraph - page 772, left-hand column	10,62
X	----- ZHAO H ET AL: "Growth hormone secretagogue receptor antagonists as anti-obesity therapies? Still an open question", CURRENT OPINION IN DRUG DISCOVERY AND DEVELOPMENT, CURRENT DRUGS, LONDON, GB, vol. 9, no. 4, 1 July 2006 (2006-07-01), pages 509-515, XP008110770, ISSN: 1367-6733	9,12,13, 61
Y	the whole document ----- -/--	10,62

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/072411

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CARPINO PHILIP A ET AL: "Modulators of the ghrelin system as potential treatments for obesity and diabetes", EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC PATENTS, INFORMA HEALTHCARE, GB, vol. 18, no. 11, 1 November 2008 (2008-11-01), pages 1253-1263, XP002638556, ISSN: 1354-3776, DOI: 10.1517/13543776.18.11.1253	9,12,13, 61
Y	the whole document -----	10,62
Y	US 2004/087530 A1 (FLIER JEFFREY S [US] ET AL) 6 May 2004 (2004-05-06) paragraphs [0005], [0064] claim 19 -----	10,62
Y	LIU G: "Protein tyrosine phosphatase 1B inhibition: Opportunities and challenges", CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, vol. 10, no. 15, 1 August 2003 (2003-08-01), pages 1407-1421, XP009115436, ISSN: 0929-8673, DOI: 10.2174/0929867033457296 page 1409, right-hand column, section 4. -----	10,62

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2013/072411**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

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

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

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
11, 63(completely); 1-10, 12-15, 38-62, 64, 65(partially)

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/ EP2013/ 072411

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 11, 63(completely); 1-10, 12-15, 38-62, 64, 65(partially)

A conjugate comprising:

- i) at least one selectivity agent, which binds specifically to the growth hormone secretagogue receptor (or ghrelin receptor) which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
- ii) at least one nucleic acid which is capable of specifically inhibiting a target molecule which is expressed in the same cell as the receptor.

A conjugate comprising:

- (i) at least one selectivity agent which binds specifically to the growth hormone secretagogue receptor which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
- (ii) a nanotransporter comprising a nucleic acid which is capable of specifically binding to a target molecule which is expressed in the same cell as the neurotransmitter transporter, wherein said nanotransporter is a liposome or a dendrimer.

2. claims: 1-10, 12-17, 19-24, 26, 31-33, 38-62, 64-67, 69-72, 76, 77(all partially)

A conjugate comprising:

- i) at least one selectivity agent, which binds specifically to a galanin receptor being in particular the galanin GAL1, GAL2 or GAL3 receptor which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
- ii) at least one nucleic acid which is capable of specifically inhibiting a target molecule which is expressed in the same cell as the receptor.

A conjugate comprising:

- (i) at least one selectivity agent which binds specifically to a galanin receptor being in particular the galanin GAL1, GAL2 or GAL3 receptor which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
- (ii) a nanotransporter comprising a nucleic acid which is capable of specifically binding to a target molecule which is expressed in the same cell as the neurotransmitter transporter, wherein said nanotransporter is a liposome or a dendrimer.

3. claims: 1-10, 12-17, 19-22, 38-62, 64-67, 69, 70(all partially)

A conjugate comprising:

- i) at least one selectivity agent, which binds specifically to a calcitonin receptor selected in particular from the calcitonin receptor-like, calcitonin AM1, calcitonin AMY1,

International Application No. PCT/ EP2013/ 072411

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

calcitonin GGRP, calcitonin AM2, calcitonin AMY3 receptors which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and

ii) at least one nucleic acid which is capable of specifically inhibiting a target molecule which is expressed in the same cell as the receptor.

A conjugate comprising:

(i) at least one selectivity agent which binds specifically to a calcitonin receptor selected in particular from the calcitonin receptor-like, calcitonin AM1, calcitonin AMY1, calcitonin GGRP, calcitonin AM2, calcitonin AMY3 receptors which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and

(ii) a nanotransporter comprising a nucleic acid which is capable of specifically binding to a target molecule which is expressed in the same cell as the neurotransmitter transporter, wherein said nanotransporter is a liposome or a dendrimer.

4. claims: 1-10, 12-17, 19-22, 27, 28, 30-33, 38-62, 64-67, 69, 70, 74-77(all partially)

A conjugate comprising:

i) at least one selectivity agent, which binds specifically to a neuropeptide W/ neuropeptide B receptor being in particular the neuropeptide FF/B NPBW1 or NBPW2 receptor which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and

ii) at least one nucleic acid which is capable of specifically inhibiting a target molecule which is expressed in the same cell as the receptor.

A conjugate comprising:

(i) at least one selectivity agent which binds specifically to a neuropeptide W/ neuropeptide B receptor being in particular the neuropeptide NPBW1 or NBPW2 receptor which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and

(ii) a nanotransporter comprising a nucleic acid which is capable of specifically binding to a target molecule which is expressed in the same cell as the neurotransmitter transporter, wherein said nanotransporter is a liposome or a dendrimer.

5. claims: 1-10, 12-15, 20-22, 27, 28, 30-33, 38-62, 64, 65, 69, 70, 74-77(all partially)

A conjugate comprising:

i) at least one selectivity agent, which binds specifically to a neuropeptide FF/ neuropeptide AF receptor being in particular the neuropeptide FF/B NPFF1 or NPFF2 receptor which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and

ii) at least one nucleic acid which is capable of

International Application No. PCT/ EP2013/ 072411

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

specifically inhibiting a target molecule which is expressed in the same cell as the receptor.

A conjugate comprising:

- (i) at least one selectivity agent which binds specifically to a neuropeptide FF/ neuropeptide AF receptor being in particular the neuropeptide FF/B NPFF1 or NPFF2 receptor which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
- (ii) a nanotransporter comprising a nucleic acid which is capable of specifically binding to a target molecule which is expressed in the same cell as the neurotransmitter transporter, wherein said nanotransporter is a liposome or a dendrimer.

6. claims: 1-10, 12-17, 19-22, 31-33, 38-62, 64-67, 69, 70, 76, 77(all partially)

A conjugate comprising:

- i) at least one selectivity agent, which binds specifically to a receptor being a neuropeptide Y receptor selected in particular from neuropeptide Y1, Y2, Y4 or Y5 receptors which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
- ii) at least one nucleic acid which is capable of specifically inhibiting a target molecule which is expressed in the same cell as the receptor.

A conjugate comprising:

- (i) at least one selectivity agent which binds specifically to a neuropeptide Y receptor selected in particular from neuropeptide Y1, Y2, Y4 or Y5 receptors which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
- (ii) a nanotransporter comprising a nucleic acid which is capable of specifically binding to a target molecule which is expressed in the same cell as the neurotransmitter transporter, wherein said nanotransporter is a liposome or a dendrimer.

7. claims: 1-10, 12-15, 20-22, 38-62, 64, 65, 69, 70(all partially)

A conjugate comprising:

- i) at least one selectivity agent, which binds specifically to a bombesin receptor selected in particular from bombesin BB1, BB2, BB3 receptors which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
- ii) at least one nucleic acid which is capable of specifically inhibiting a target molecule which is expressed in the same cell as the receptor.

A conjugate comprising:

- (i) at least one selectivity agent which binds specifically to a bombesin receptor selected in particular from bombesin BB1, BB2, BB3 receptors which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and

International Application No. PCT/ EP2013/ 072411

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

(ii) a nanotransporter comprising a nucleic acid which is capable of specifically binding to a target molecule which is expressed in the same cell as the neurotransmitter transporter, wherein said nanotransporter is a liposome or a dendrimer.

8. claims: 1-10, 12-15, 20-24, 26, 31-33, 38-62, 64, 65, 69-72, 76, 77(all partially)

A conjugate comprising:

i) at least one selectivity agent, which binds specifically to a frizzled receptor selected in particular from the FDZ2, FZD3, FZD4, FDZ5, FDZ6, FDZ7, FDZ8, FDZ9, FDZ10 receptors which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and

ii) at least one nucleic acid which is capable of specifically inhibiting a target molecule which is expressed in the same cell as the receptor.

A conjugate comprising:

(i) at least one selectivity agent which binds specifically to a frizzled receptor selected in particular from the FDZ2, FZD3, FZD4, FDZ5, FDZ6, FDZ7, FDZ8, FDZ9, FDZ10 receptors which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and

(ii) a nanotransporter comprising a nucleic acid which is capable of specifically binding to a target molecule which is expressed in the same cell as the neurotransmitter transporter, wherein said nanotransporter is a liposome or a dendrimer.

9. claims: 1-10, 12, 16, 17, 19-22, 38-62, 66, 67, 69, 70(all partially)

A conjugate comprising:

i) at least one selectivity agent, which binds specifically to a melanocortin receptor selected in particular from the MC1, MC2, MC4 receptors which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and

ii) at least one nucleic acid which is capable of specifically inhibiting a target molecule which is expressed in the same cell as the receptor.

A conjugate comprising:

(i) at least one selectivity agent which binds specifically to a melanocortin receptor selected in particular from the MC1, MC2, MC4 receptors which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and

(ii) a nanotransporter comprising a nucleic acid which is capable of specifically binding to a target molecule which is expressed in the same cell as the neurotransmitter transporter, wherein said nanotransporter is a liposome or a dendrimer.

International Application No. PCT/ EP2013/ 072411

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

10. claims: 1-10, 12-15, 20-22, 38-62, 64, 65, 69, 70(all partially)

A conjugate comprising:

- i) at least one selectivity agent, which binds specifically to a neuropeptide S receptor which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
- ii) at least one nucleic acid which is capable of specifically inhibiting a target molecule which is expressed in the same cell as the receptor.

A conjugate comprising:

- (i) at least one selectivity agent which binds specifically to a neuropeptide S receptor which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
- (ii) a nanotransporter comprising a nucleic acid which is capable of specifically binding to a target molecule which is expressed in the same cell as the neurotransmitter transporter, wherein said nanotransporter is a liposome or a dendrimer.

11. claims: 1-10, 12-17, 19-24, 26, 31-33, 38-62, 64-67, 69-72, 76, 77(all partially)

A conjugate comprising:

- i) at least one selectivity agent, which binds specifically to a neurotensin receptor selected in particular from the NTS1 or NTS2 receptors which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
- ii) at least one nucleic acid which is capable of specifically inhibiting a target molecule which is expressed in the same cell as the receptor.

A conjugate comprising:

- (i) at least one selectivity agent which binds specifically to a neurotensin receptor selected in particular from the NTS1 or NTS2 receptors which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
- (ii) a nanotransporter comprising a nucleic acid which is capable of specifically binding to a target molecule which is expressed in the same cell as the neurotransmitter transporter, wherein said nanotransporter is a liposome or a dendrimer.

12. claims: 1-10, 12-17, 19-22, 31-33, 38-62, 64-67, 69, 70, 76, 77(all partially)

A conjugate comprising:

- i) at least one selectivity agent, which binds specifically to an orexin receptor selected from in particular the OX1 or OX2 receptors which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
- ii) at least one nucleic acid which is capable of specifically inhibiting a target molecule which is expressed in the same cell as the receptor.

International Application No. PCT/ EP2013/ 072411

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

A conjugate comprising:

- (i) at least one selectivity agent which binds specifically to an orexin receptor selected in particular from the OX1 or OX2 receptors which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
- (ii) a nanotransporter comprising a nucleic acid which is capable of specifically binding to a target molecule which is expressed in the same cell as the neurotransmitter transporter, wherein said nanotransporter is a liposome or a dendrimer.

13. claims: 1-10, 12, 20-22, 27, 28, 30-33, 38-62, 69, 70, 74-76(all partially)

A conjugate comprising:

- i) at least one selectivity agent, which binds specifically to a somatostatin receptor selected in particular from sst1, sst2, sst3, sst4 or sst5 which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
- ii) at least one nucleic acid which is capable of specifically inhibiting a target molecule which is expressed in the same cell as the receptor.

A conjugate comprising:

- (i) at least one selectivity agent which binds specifically to a somatostatin receptor selected in particular from sst1, sst2, sst3, sst4 or sst5 which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
- (ii) a nanotransporter comprising a nucleic acid which is capable of specifically binding to a target molecule which is expressed in the same cell as the neurotransmitter transporter, wherein said nanotransporter is a liposome or a dendrimer.

14. claims: 1-10, 12, 38-62(all partially)

A conjugate comprising:

- i) at least one selectivity agent, which binds specifically to the oxytocin receptor which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
- ii) at least one nucleic acid which is capable of specifically inhibiting a target molecule which is expressed in the same cell as the receptor.

A conjugate comprising:

- (i) at least one selectivity agent which binds specifically to the oxytocin receptor which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
- (ii) a nanotransporter comprising a nucleic acid which is capable of specifically binding to a target molecule which is expressed in the same cell as the neurotransmitter transporter, wherein said nanotransporter is a liposome or a dendrimer.

International Application No. PCT/ EP2013/ 072411

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

15. claims: 1-10, 12, 20-24, 26-28, 30-33, 38-62, 69-72, 74-77(all partially)

A conjugate comprising:

- i) at least one selectivity agent, which binds specifically to a vasopressin receptor selected in particular from the V1A, V1B or V2 receptors which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
- ii) at least one nucleic acid which is capable of specifically inhibiting a target molecule which is expressed in the same cell as the receptor.

A conjugate comprising:

- (i) at least one selectivity agent which binds specifically to a vasopressin receptor selected in particular from the V1A, V1B or V2 receptors which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
- (ii) a nanotransporter comprising a nucleic acid which is capable of specifically binding to a target molecule which is expressed in the same cell as the neurotransmitter transporter, wherein said nanotransporter is a liposome or a dendrimer.

16. claims: 1-10, 12-15, 20-24, 26, 38-62, 64, 65, 69-72(all partially)

A conjugate comprising:

- i) at least one selectivity agent, which binds specifically to the kisspeptin receptor which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
- ii) at least one nucleic acid which is capable of specifically inhibiting a target molecule which is expressed in the same cell as the receptor.

A conjugate comprising:

- (i) at least one selectivity agent which binds specifically to the kisspeptin receptor which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
- (ii) a nanotransporter comprising a nucleic acid which is capable of specifically binding to a target molecule which is expressed in the same cell as the neurotransmitter transporter, wherein said nanotransporter is a liposome or a dendrimer.

17. claims: 1-10, 12, 27, 28, 30, 38-62, 74, 75(all partially)

A conjugate comprising:

- i) at least one selectivity agent, which binds specifically to the Peptide P518 receptor which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
- ii) at least one nucleic acid which is capable of specifically inhibiting a target molecule which is expressed in the same cell as the receptor.

A conjugate comprising:

- (i) at least one selectivity agent which binds specifically

International Application No. PCT/ EP2013/ 072411

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

to the Peptide P518 receptor which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
 (ii) a nanotransporter comprising a nucleic acid which is capable of specifically binding to a target molecule which is expressed in the same cell as the neurotransmitter transporter, wherein said nanotransporter is a liposome or a dendrimer.

18. claims: 1-10, 12, 20-22, 27, 28, 30, 35-62, 74, 75, 80, 81(all partially)

A conjugate comprising:

i) at least one selectivity agent, which binds specifically to a tachykinin/neurokinin receptor selected in particular from the NK1, NK2 or NK3 receptors which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
 ii) at least one nucleic acid which is capable of specifically inhibiting a target molecule which is expressed in the same cell as the receptor.

A conjugate comprising:

(i) at least one selectivity agent which binds specifically to a tachykinin/neurokinin receptor selected in particular from the NK1, NK2 or NK3 receptors which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
 (ii) a nanotransporter comprising a nucleic acid which is capable of specifically binding to a target molecule which is expressed in the same cell as the neurotransmitter transporter, wherein said nanotransporter is a liposome or a dendrimer.

19. claims: 1-8, 13-15, 20-22, 27, 28, 30-33, 38-60, 64, 65, 69-72, 76, 77(all partially)

A conjugate comprising:

i) at least one selectivity agent, which binds specifically to a bradykinin receptor selected in particular from the B1 or B2 bradykinin receptors which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
 ii) at least one nucleic acid which is capable of specifically inhibiting a target molecule which is expressed in the same cell as the receptor.

A conjugate comprising:

(i) at least one selectivity agent which binds specifically to a bradykinin receptor selected in particular from the B1 or B2 bradykinin receptors which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
 (ii) a nanotransporter comprising a nucleic acid which is capable of specifically binding to a target molecule which is expressed in the same cell as the neurotransmitter transporter, wherein said nanotransporter is a liposome or a dendrimer.

International Application No. PCT/ EP2013/ 072411

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

20. claims: 18, 25, 29, 68, 73, 78(completely); 1-8, 13-17, 19-22, 27, 28, 30-33, 38-60, 64-67, 69, 70, 74-77(partially)

A conjugate comprising:

- i) at least one selectivity agent, which binds specifically to a 5-Hydroxytryptamine receptor selected in particular from the 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT2A, 5-HT3, 5-HT1D or 5-HT6 receptors which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
- ii) at least one nucleic acid which is capable of specifically inhibiting a target molecule which is expressed in the same cell as the receptor.

A conjugate comprising:

- (i) at least one selectivity agent which binds specifically to a 5-Hydroxytryptamine receptor selected in particular from the 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT2A, 5-HT3, 5-HT1D or 5-HT6 receptors which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
- (ii) a nanotransporter comprising a nucleic acid which is capable of specifically binding to a target molecule which is expressed in the same cell as the neurotransmitter transporter, wherein said nanotransporter is a liposome or a dendrimer.

21. claims: 1-8, 13-15, 23, 24, 26, 38-60, 64, 65, 71, 72(all partially)

A conjugate comprising:

- i) at least one selectivity agent, which binds specifically to an angiotensin receptor selected in particular from the angiotensin AT2 or AT2b receptors which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
- ii) at least one nucleic acid which is capable of specifically inhibiting a target molecule which is expressed in the same cell as the receptor.

A conjugate comprising:

- (i) at least one selectivity agent which binds specifically to an angiotensin receptor selected in particular from the angiotensin AT2 or AT2b receptors which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
- (ii) a nanotransporter comprising a nucleic acid which is capable of specifically binding to a target molecule which is expressed in the same cell as the neurotransmitter transporter, wherein said nanotransporter is a liposome or a dendrimer.

22. claims: 1-8, 13-15, 20-24, 26, 31-33, 38-60, 64, 65, 69-72, 76, 77(all partially)

A conjugate comprising:

- i) at least one selectivity agent, which binds specifically to a melatonin receptor selected in particular from the MT1 or MT2 receptors which can be internalized by the cell upon

International Application No. PCT/ EP2013/ 072411

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

binding of said selectivity agent, and
 ii) at least one nucleic acid which is capable of specifically inhibiting a target molecule which is expressed in the same cell as the receptor.

A conjugate comprising:

(i) at least one selectivity agent which binds specifically to a melatonin receptor selected in particular from the MT1 or MT2 receptors which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and

(ii) a nanotransporter comprising a nucleic acid which is capable of specifically binding to a target molecule which is expressed in the same cell as the neurotransmitter transporter, wherein said nanotransporter is a liposome or a dendrimer.

23. claims: 1-8, 13-17, 19-22, 31-33, 35-60, 64-67, 69, 70, 76, 77, 80, 81(all partially)

A conjugate comprising:

i) at least one selectivity agent, which binds specifically to an opioid receptor selected in particular from the delta, kappa or mu opioid receptors which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and

ii) at least one nucleic acid which is capable of specifically inhibiting a target molecule which is expressed in the same cell as the receptor.

A conjugate comprising:

(i) at least one selectivity agent which binds specifically to an opioid receptor selected in particular from the delta, kappa or mu opioid receptor which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and

(ii) a nanotransporter comprising a nucleic acid which is capable of specifically binding to a target molecule which is expressed in the same cell as the neurotransmitter transporter, wherein said nanotransporter is a liposome or a dendrimer.

24. claims: 1-8, 16, 17, 19-24, 26-28, 30-33, 38-60, 66, 67, 69-72, 74-77(all partially)

A conjugate comprising:

i) at least one selectivity agent, which binds specifically to a corticotropin-releasing factor receptor selected in particular from the CRF1 or CRF2 receptors which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and

ii) at least one nucleic acid which is capable of specifically inhibiting a target molecule which is expressed in the same cell as the receptor.

A conjugate comprising:

(i) at least one selectivity agent which binds specifically to a corticotropin-releasing factor receptor selected in particular from the CRF1 or CRF2 receptors which can be

International Application No. PCT/ EP2013/ 072411

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
 (ii) a nanotransporter comprising a nucleic acid which is capable of specifically binding to a target molecule which is expressed in the same cell as the neurotransmitter transporter, wherein said nanotransporter is a liposome or a dendrimer.

25. claims: 1-8, 16, 17, 19, 27, 28, 30, 38-60, 66, 67, 74, 75(all partially)

A conjugate comprising:

i) at least one selectivity agent, which binds specifically to a dopamine receptor selected in particular from the D1 or D2 receptors which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
 ii) at least one nucleic acid which is capable of specifically inhibiting a target molecule which is expressed in the same cell as the receptor.

A conjugate comprising:

(i) at least one selectivity agent which binds specifically to a dopamine receptor selected in particular from the D1 or D2 receptors which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
 (ii) a nanotransporter comprising a nucleic acid which is capable of specifically binding to a target molecule which is expressed in the same cell as the neurotransmitter transporter, wherein said nanotransporter is a liposome or a dendrimer.

26. claims: 1-8, 20-22, 38-60, 69, 70(all partially)

A conjugate comprising:

i) at least one selectivity agent, which binds specifically to an adrenoceptor receptor selected in particular from the alpha 1A, alpha1B or alpha 1D adrenoceptor receptors which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
 ii) at least one nucleic acid which is capable of specifically inhibiting a target molecule which is expressed in the same cell as the receptor.

A conjugate comprising:

(i) at least one selectivity agent which binds specifically to an adrenoceptor receptor selected in particular from the alpha 1A, alpha1B or alpha 1D adrenoceptor receptors which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
 (ii) a nanotransporter comprising a nucleic acid which is capable of specifically binding to a target molecule which is expressed in the same cell as the neurotransmitter transporter, wherein said nanotransporter is a liposome or a dendrimer.

International Application No. PCT/ EP2013/ 072411

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

27. claims: 1-8, 20-22, 38-60, 69, 70, 74, 75(all partially)

A conjugate comprising:

- i) at least one selectivity agent, which binds specifically to an endothelin receptor selected in particular from the ETa and ETb receptors which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
- ii) at least one nucleic acid which is capable of specifically inhibiting a target molecule which is expressed in the same cell as the receptor.

A conjugate comprising:

- (i) at least one selectivity agent which binds specifically to an endothelin receptor selected in particular from the ETa and ETb receptors which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
- (ii) a nanotransporter comprising a nucleic acid which is capable of specifically binding to a target molecule which is expressed in the same cell as the neurotransmitter transporter, wherein said nanotransporter is a liposome or a dendrimer.

28. claims: 1-8, 20-24, 26, 31-33, 38-60, 69-72(all partially)

A conjugate comprising:

- i) at least one selectivity agent, which binds specifically to the cholecystkinin receptor CCK2 which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
- ii) at least one nucleic acid which is capable of specifically inhibiting a target molecule which is expressed in the same cell as the receptor.

A conjugate comprising:

- (i) at least one selectivity agent which binds specifically to the cholecystkinin receptor CCK2 which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
- (ii) a nanotransporter comprising a nucleic acid which is capable of specifically binding to a target molecule which is expressed in the same cell as the neurotransmitter transporter, wherein said nanotransporter is a liposome or a dendrimer.

29. claims: 1-8, 23, 24, 26, 31-34, 38-60, 71, 72, 76, 77, 79(all partially)

A conjugate comprising:

- i) at least one selectivity agent, which binds specifically to a formylpeptide receptor selected in particular from FPR1, FPR2/ALX and FPR3 which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
- ii) at least one nucleic acid which is capable of specifically inhibiting a target molecule which is expressed

International Application No. PCT/ EP2013/ 072411

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

in the same cell as the receptor.

A conjugate comprising:

- (i) at least one selectivity agent which binds specifically to a formylpeptide receptor selected in particular from FPR1, FPR2/ALX and FPR3 which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
- (ii) a nanotransporter comprising a nucleic acid which is capable of specifically binding to a target molecule which is expressed in the same cell as the neurotransmitter transporter, wherein said nanotransporter is a liposome or a dendrimer.

30. claims: 1-8, 27, 28, 30-33, 38-60, 74-77(all partially)

A conjugate comprising:

- i) at least one selectivity agent, which binds specifically to an adenosine receptor selected in particular from the A1, A2 or A2A receptors which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
- ii) at least one nucleic acid which is capable of specifically inhibiting a target molecule which is expressed in the same cell as the receptor.

A conjugate comprising:

- (i) at least one selectivity agent which binds specifically to an adenosine receptor selected in particular from the A1, A2 or A2A receptors which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
- (ii) a nanotransporter comprising a nucleic acid which is capable of specifically binding to a target molecule which is expressed in the same cell as the neurotransmitter transporter, wherein said nanotransporter is a liposome or a dendrimer.

31. claims: 1-8, 34, 38-60, 79(all partially)

A conjugate comprising:

- i) at least one selectivity agent, which binds specifically to the TLR7 receptor which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
- ii) at least one nucleic acid which is capable of specifically inhibiting a target molecule which is expressed in the same cell as the receptor.

A conjugate comprising:

- (i) at least one selectivity agent which binds specifically to the TLR7 receptor which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and
- (ii) a nanotransporter comprising a nucleic acid which is capable of specifically binding to a target molecule which is expressed in the same cell as the neurotransmitter transporter, wherein said nanotransporter is a liposome or a dendrimer.

International Application No. PCT/ EP2013/ 072411

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

32. claims: 1-8, 35-60, 80, 81(all partially)

A conjugate comprising:

i) at least one selectivity agent, which binds specifically to an Ephrin receptor selected in particular from EphA1, EphA2, EphA3, EphA3, EphA4, EphB1, EphB2, EphB3 which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and

ii) at least one nucleic acid which is capable of specifically inhibiting a target molecule which is expressed in the same cell as the receptor.

A conjugate comprising:

(i) at least one selectivity agent which binds specifically to an Ephrin receptor selected in particular from EphA1, EphA2, EphA3, EphA3, EphA4, EphB1, EphB2, EphB3 which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and

(ii) a nanotransporter comprising a nucleic acid which is capable of specifically binding to a target molecule which is expressed in the same cell as the neurotransmitter transporter, wherein said nanotransporter is a liposome or a dendrimer.

33. claims: 1-8, 35-60, 80, 81(all partially)

A conjugate comprising:

i) at least one selectivity agent, which binds specifically to a SLC6 neurotransmitter transporter family receptor selected in particular from the DAT, NET, SERT, GlyT1 receptors which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and

ii) at least one nucleic acid which is capable of specifically inhibiting a target molecule which is expressed in the same cell as the receptor.

A conjugate comprising:

(i) at least one selectivity agent which binds specifically to a SLC6 neurotransmitter transporter family receptor selected in particular from the DAT, NET, SERT, GlyT1 receptors which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and

(ii) a nanotransporter comprising a nucleic acid which is capable of specifically binding to a target molecule which is expressed in the same cell as the neurotransmitter transporter, wherein said nanotransporter is a liposome or a dendrimer.

34. claims: 1-8, 35-60, 80, 81(all partially)

A conjugate comprising:

i) at least one selectivity agent, which binds specifically to a VEGF receptor selected in particular from VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3 which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and

International Application No. PCT/ EP2013/ 072411

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

ii) at least one nucleic acid which is capable of specifically inhibiting a target molecule which is expressed in the same cell as the receptor.

A conjugate comprising:

(i) at least one selectivity agent which binds specifically to a VEGF receptor selected in particular from VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3 which can be internalized by the cell upon binding of said selectivity agent, and

(ii) a nanotransporter comprising a nucleic acid which is capable of specifically binding to a target molecule which is expressed in the same cell as the neurotransmitter transporter, wherein said nanotransporter is a liposome or a dendrimer.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/072411

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011131693 A2	27-10-2011	AR 083715 A1	20-03-2013
		AU 2011244321 A1	15-11-2012
		CA 2796722 A1	27-10-2011
		CN 103025357 A	03-04-2013
		EP 2560687 A2	27-02-2013
		JP 2013525330 A	20-06-2013
		KR 20130103662 A	24-09-2013
		US 2012322991 A1	20-12-2012
		WO 2011131693 A2	27-10-2011

US 2004087530 A1	06-05-2004	NONE	

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 3/04 (2006.01)	A 6 1 P 3/04	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/18 (2006.01)	A 6 1 P 25/18	
A 6 1 P 25/24 (2006.01)	A 6 1 P 25/24	
A 6 1 P 25/06 (2006.01)	A 6 1 P 25/06	
A 6 1 P 25/20 (2006.01)	A 6 1 P 25/20	
A 6 1 P 25/22 (2006.01)	A 6 1 P 25/22	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 25/14 (2006.01)	A 6 1 P 25/14	
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	
A 6 1 K 31/496 (2006.01)	A 6 1 K 31/496	
A 6 1 K 31/4045 (2006.01)	A 6 1 K 31/4045	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/00	G

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

(74)代理人 100126099

弁理士 反町 洋

(74)代理人 100176083

弁理士 松山 祐子

(72)発明者 マリア、デル、カルメン、カルモナ、オロスコ

スペイン国テラサ、パセッジ、リュイス、ムンクニイ、44、6-4

(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、ジー・アルバラド

カナダ国オンタリオ州、ネピーアン、バターマン、ドライブ、8

(72)発明者 アナリア、ボルトロッシ

スペイン国バルセロナ、ルセリョ、161-シックスス、フロアー、インスティトゥト、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、イディバアペエセ、デパー
トメント、ニューロケミストリー、アンド、ニューロファーマコロジー

(72)発明者 ラケル、レビリャ・サンチェス

スペイン国グラナダ、アベニダ、イラストラシオン、85、7ベ

Fターム(参考) 4B024 AA01 CA01 CA09 CA11 CA20 DA02 HA12

4C076 AA19 AA95 BB13 BB15 BB16 BB25 CC01 EE59

4C084 AA01 AA02 AA13 AA20 AA25 BA01 BA23 BA35 MA24 MA59

MA66 NA13 ZA011 ZA021 ZA051 ZA081 ZA111 ZA121 ZA151 ZA161

ZA181 ZA701 ZC412 ZC751

4C086	AA01	AA02	BC13	BC50	EA16	GA07	GA12	MA02	MA04	MA24
	MA59	MA66	NA13	ZA01	ZA02	ZA05	ZA08	ZA11	ZA12	ZA15
	ZA16	ZA18	ZA70	ZC01	ZC75					