

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6313768号

(P6313768)

(45) 発行日 平成30年4月18日 (2018. 4. 18)

(24) 登録日 平成30年3月30日 (2018. 3. 30)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
A 6 1 P 37/04 (2006. 01)	A 6 1 P 37/04
A 6 1 K 31/712 (2006. 01)	A 6 1 K 31/712
C O 7 H 21/02 (2006. 01)	C O 7 H 21/02

請求項の数 8 (全 35 頁)

(21) 出願番号	特願2015-533587 (P2015-533587)	(73) 特許権者	506266528
(86) (22) 出願日	平成25年9月26日 (2013. 9. 26)		ライニッシェ フリードリッヒ ヴィルヘルムス ユニヴェルジテート ボン
(65) 公表番号	特表2015-532270 (P2015-532270A)		ドイツ連邦共和国 5 3 1 1 3 ボン レ
(43) 公表日	平成27年11月9日 (2015. 11. 9)		ギーナ パツィス ヴェーク 3
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/070117	(74) 代理人	100113376
(87) 国際公開番号	W02014/049079		弁理士 南条 雅裕
(87) 国際公開日	平成26年4月3日 (2014. 4. 3)	(74) 代理人	100179394
審査請求日	平成28年8月23日 (2016. 8. 23)		弁理士 瀬田 あや子
(31) 優先権主張番号	12186444. 1	(74) 代理人	100185384
(32) 優先日	平成24年9月27日 (2012. 9. 27)		弁理士 伊波 興一朗
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100137811
			弁理士 原 秀貢人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規の R I G－I リガンドおよびそれらの生産方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

センス鎖およびアンチセンス鎖を含む二本鎖オリゴヌクレオチドであって、

前記センス鎖は、

5' G A C G C U G A C C C U G A A G U U C A U C U U 3' のヌクレオチド配列を含み；

前記アンチセンス鎖は、

3' C U G C G A C U G G G A C U U C A A G U A G A A 5' のヌクレオチド配列を含み；

前記オリゴヌクレオチドは、以下の群から選択される 2'－O－メチル修飾を含む；

ヌクレオチド配列 5' G A C G C U G A C C C U G A A _m G U U C A U C U U 3' を含むセンス鎖；およびヌクレオチド配列 3' C U G _m C G A C U G G G A C U U C A A G U A G A A 5' を含むアンチセンス鎖；[ここで、インデックス m が付いたヌクレオチドは 2'－O－メチル化されている]
を含む、オリゴヌクレオチド s 1 5 / a s 3 ；ヌクレオチド配列 5' G A C G C U G A C C C U G A A G U U C A _m U C U U 3' を含むセンス鎖；およびヌクレオチド配列 3' C U G _m C G A C U G G G A C U U C A A G U A G A A 5' を含むアンチセンス鎖；

10

20

〔ここで、インデックスmが付いたヌクレオチドは2'－O－メチル化されている〕
 を含む、オリゴヌクレオチドs 20/a s 3；および
 ヌクレオチド配列 5' GAC_mGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU 3'
 'を含むセンス鎖；および
 ヌクレオチド配列 3' CUGCGACUGGGACUUCAAG_mUAGAA 5'
 'を含むアンチセンス鎖；

〔ここで、インデックスmが付いたヌクレオチドは2'－O－メチル化されている〕
 を含む、オリゴヌクレオチドs 3/a s 19；
 ここで、前記オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの1つの5'末端に少なくとも1つの三リン酸をさらに含み、および、2'－フルオロおよびホスホチオエート結合からなる群から選択される少なくとも1つの修飾をさらに含む、オリゴヌクレオチド。

【請求項2】

請求項1のオリゴヌクレオチドであって、
 前記オリゴヌクレオチドは、センス鎖の5'末端に少なくとも1つの三リン酸を含む、オリゴヌクレオチド。

【請求項3】

請求項1または2に記載のオリゴヌクレオチドであって、
前記オリゴヌクレオチドはホスホチオエート結合修飾をさらに含み、
 ヌクレオチド配列 5' GACGCUGACCCUGAA_mGUUCAUC_{P TO}U_{P TO} 3'を含むセンス鎖；および
 ヌクレオチド配列 3' CUG_mCGACUGGGACUUCAAGUAG_{P TO}A_{P TO}A 5'を含むアンチセンス鎖；
〔ここで、インデックスmが付いたヌクレオチドは2'－O－メチル化されており；
 2つのヌクレオチドの間のインデックスP TOは、前記の2つのヌクレオチドがホスホチオエート結合によって連結されていることを示し；および、
 前記センス鎖は、5'末端に三リン酸を含む〕
 を含む、オリゴヌクレオチド。

【請求項4】

請求項1～3のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチドであって、
前記オリゴヌクレオチドはホスホチオエート結合修飾、および、2'－フルオロ修飾をさらに含み、
 ヌクレオチド配列 5' GACGCUG_fACCCUGAA_mGUUCAUC_{P TO}U_{f P TO}U 3'を含むセンス鎖；および
 ヌクレオチド配列 3' CUG_mCGACUGGGAC_fUUCAAGUAG_{P TO}A_{P TO}A 5'を含むアンチセンス鎖；
〔ここで、インデックスmが付いたヌクレオチドは2'－O－メチル化されており；
 インデックスfが付いたヌクレオチドは2'－フルオロであり；
 2つのヌクレオチドの間のインデックスP TOは、前記の2つのヌクレオチドがホスホチオエート結合によって連結されていることを示し；および、
 前記センス鎖は、5'末端に三リン酸を含む〕、
 を含む、オリゴヌクレオチド。

【請求項5】

請求項1から4のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドを含む、医薬組成物。

【請求項6】

請求項5に記載の医薬組成物であって、
前記医薬組成物は、腹腔内、筋肉内、静脈内、鼻腔内、皮下、皮内または髄腔内に投与される、
医薬組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 7】

請求項 6 の医薬組成物であって、
前記医薬組成物は、皮内に投与される、
医薬組成物。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の医薬組成物であって、
前記医薬組成物は、タトゥーイング、マイクロニードルおよび／またはマイクロニードルパッチによって、皮内に投与される、
医薬組成物。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、RIG-I リガンドとして作用し得る新規の三リン酸修飾オリゴヌクレオチド、ならびに、医薬用途に適切な高い収率および純度での合成および精製が可能な新規の方法に関する。

【背景技術】

【0002】

Schlee ら (Immunity, 2009, 31, 25-34) は、一方の鎖に、
RIG-I ヘリカーゼを結合することによって免疫系の強力な刺激因子として作用する 5
'-O-三リン酸部分を有する平滑末端二本鎖 RNA を開示している。このように、医薬
用途に適切な三リン酸修飾オリゴヌクレオチドを高純度で調製するための単純かつ効率的
な方法の提供が必要とされている。

20

【0003】

ヌクレオシド化合物の 5'-OH 基への、三リン酸基またはそのアナログのカップリン
グは、当技術分野でよく知られている。Ludwig J. ら (J. Org. Chem.
, 1989, 54, 631-635) は、2-クロロ-4H-1, 3, 2-ベンゾジオキサ
ホスホリン-4-オンをホスファイト化剤 (phosphitylating age
nt) として用いた、ヌクレオシドの 5'-O-三リン酸およびアナログを調製するた
めの溶液三リン酸化の方法 (solution triphosphorylation
method) を開示している。Gaur R. K. ら (1992, Tetrahedr
on Letters, 33, 3301-3304) は、2'-O-メチルリボヌクレオ
シド 5'-O-三リン酸およびその P_α-チオアナログの合成のための、固相上での前記
方法の使用を開示している。米国特許第 6, 900, 308 号 B2 には、潜在的な抗ウイル
ス化合物としての修飾ヌクレオシド 5'-O-三リン酸の固相合成が開示され、米国特
許第 7, 285, 658 号、第 7, 598, 230 号および第 7, 807, 653 号には
、糖中、核酸塩基中、および三リン酸物質 (triphosphate entity)
中に、修飾を有するヌクレオシドの三リン酸アナログが開示されている。

30

【0004】

WO 96/40159 は、キャップ化 RNA または RNA アナログ分子を生産する方法
を開示し、ここで、RNA または RNA アナログオリゴヌクレオチドは、ホスファイト化
剤、例えば 2-クロロ-4H-1, 3, 2-ベンゾジオキサホスホリン-4-オンまたは
その環置換誘導体と反応する。生じる中間体は、リン酸またはピロリン酸またはそれらの
塩と反応し、酸化され、または加水分解される。二リン酸化または三リン酸化 RNA また
は RNA アナログは、活性化された m⁷G 三リン酸、二リン酸または一リン酸またはアナ
ログとの反応によりキャップ化される。

40

【0005】

WO 2009/060281 には、修飾オリゴリン酸部分を含む免疫刺激オリゴリボ
ヌクレオチドアナログ、およびそのような化合物の調製方法が開示されている。この方法は
、固体支持体上でのオリゴヌクレオチドの合成を含み、ヌクレオチドを、オリゴヌクレオ

50

チドの5'末端で、2-クロロ-4H-1,3,2-ベンゾジオキサホスホリン-4-オンなどのホスファイト化剤と適切な溶媒中かつ塩基存在下で反応させ、ホスファイト化オリゴヌクレオチドをピロリン酸またはピロリン酸アナログと反応させ、酸化剤を用いてオリゴヌクレオチドを酸化し、そして、オリゴヌクレオチドを脱保護して三リン酸または三リン酸アナログ-修飾オリゴヌクレオチドを得る。

【0006】

WO96/40159で用いられるポリアクリルアミドゲル電気泳動は、小スケールの分離にのみ適用できる。より長いオリゴリボヌクレオチドの5'-一リン酸化、二リン酸化、三リン酸化産物に関するイオン交換クロマトグラフィーの分離能は制限される。要求される変性条件は、分離を煩わしい作業にし (Sprout, 1999; Zlatev, 2010; WO2009/060281)、さらに、産物は通常、n-1、n-2 配列が混入しており、そして、それらの一リン酸および二リン酸は、不十分な純度をもたらす。RIG-I リガンドの正確な末端構造に対する感受性があるとすれば、これらの精製方法は、薬理学的適用に最適以下であろう。

10

【発明の概要】

【0007】

したがって、新規の三リン酸化オリゴヌクレオチドおよびそのアナログ (特にRIG-I 選択性を有する)、ならびに、そのような化合物を調製する方法に対する高い必要性がある。

【0008】

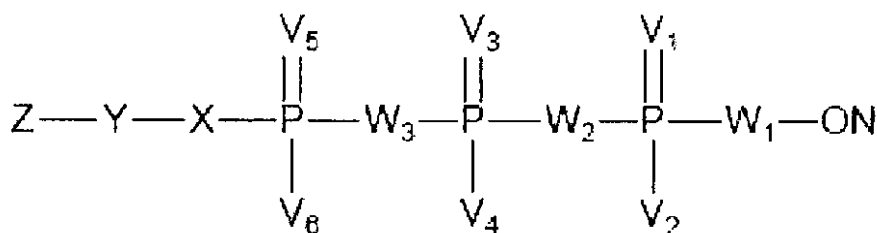
20

したがって、本発明は、潜在的な臨床用途のために大スケールで生産することのできる、新規の5'-三リン酸化オリゴヌクレオチドおよびそのアナログ、ならびに、そのようなオリゴヌクレオチドの便利な調製方法に関する。さらに、オリゴヌクレオチドのRIG-I 選択性を確立、維持および/または改善する、またはそれらの化学的安定性を高める、オリゴヌクレオチドの修飾を開示する。

【0009】

したがって、本発明の第1の態様は、式(I)

【化1】



30

の修飾オリゴヌクレオチドに関し、

ここで、 V_1 、 V_3 および V_5 は、それぞれ独立にO、SおよびSeから選択され；

V_2 、 V_4 および V_6 はそれぞれ独立に、OH、OR¹、SH、SR¹、F、NH₂、NHR¹、N(R¹)₂ および BH₃⁻M⁺から選択され、

W_1 はOまたはSであり、

40

W_2 はO、S、NHまたはNR²であり、

W_3 はO、S、NH、NR²、CH₂、CHHalまたはC(Hal)₂であって、

R¹、R² および R³ は、C₁₋₆ アルキル、C₂₋₆ アルケニル、C₂₋₆ アルキニル、C₂₋₆ アシルまたは環状基から選択され、それぞれ場合により置換され、

または、ここで、2つのR¹は、それに結合したN原子と共に環を形成していてもよく、

M⁺はカチオンであり、

XはNH、NR³、OまたはSであり、

ZはキャプチャータグまたはHを表し、

Yは、前記キャプチャータグをXに連結する結合またはリンカーを表し、および

50

ONは、少なくとも4つのヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログビルディングブロックを含むオリゴヌクレオチドを表す。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】オリゴヌクレオチド三リン酸エステル誘導体に関する合成方法の概略概要を示す。

【図2】デシルーO-pppRNAの24mer合成（RNA配列：5'-GACGCGUGACCCUGAAGUUCAUCUU）のRP-HPLCおよびESI-LC/MS分析を示す。（A）RP-HPLCプロファイル：a）48%デシルーO-pppRNAを含む未精製の反応混合物（RT=14分）b）純粋デシルーO-pppRNA
カラム：Hamilton PRP-1 4.1×250、10μm グラジエント：0～100% B, 18分中、A=100mM TEAB; B=80%メタノール、100mM TEAB （B）RP-LC/MSを用いて記録した純粋デシルーO-pppRNAのESI-MSプロファイル（分子量計算値：7987、計測値：7968）

10

【図3】デシルーO-pppRNAの1μmolスケール反応のセミ分取スケールのRP-HPLC精製を示す：デシルタグ化は、合成失敗配列、全長の非リン酸化OH-RNAおよび非誘導体化pppRNAを含む、タグ化されていない副産物から、目的産物（画分3）を効率的に分離することを可能にする。カラム：Hamilton PRP-1 7×250mm、10μm グラジエント：0～80% B 50分中、A=100mM TEAB; B=80%メタノール、100mM TEAB。

20

【図4】Yの特に好ましい実施態様である。

【図5】2'-O-メチル化のスクリーニングは、RIG-I選択性を導入する位置を決定する。

【図6】メチル化は、デュプレックスを、RIG-I特異性および高活性にさせる。

【図7】末端ホスホロチオエートは、選択的なデュプレックスの免疫原性を増大させる。

【図8】選択した2'-フルオロ置換は、デュプレックスのRIG-I活性化能力を増大させる。

【図9】OH ds-RNA OH-GFP2の多重修飾パターンは、RIG-I活性化能力の強力な亢進を導く。

30

【図10】骨格修飾による免疫原性の亢進は、三リン酸化デュプレックスに移行可能である。

【図11】求核開環試薬としてのアルキルポリエチレングリコール類の例としてジエチレングリコールモノブチルエーテルを用いた、本発明の方法の概略概要を示す。

【図12】45% C4-DEG-pppRNA（88.4mlのグラジエント容量でピーク）および50% pppRNA（77.5mlでピーク）を含むC4-DEG-pppRNA未精製反応混合物のRP-HPLC精製。カラム：Hamilton PRP-1 7×250mm、10μm 流速3ml/分。グラジエント：1～80% B 50分中、A=0.1M TEAB; B=80%メタノール0.1M TEAB

【図13】HPLC精製後のC4-DEG-pppRNAに対応するMALDI-TOFスペクトル。正確な質量ピークはm/z 7972.6（A）に見られる。

40

【図14】脂溶性ポリエーテル複合タグを用いた、pppRNAの合成スキームを示す。

【図15】図14に関するHPLC精製およびMALDIのデータを示す。（RNA配列：5'-GACGCGUGACCCUGAAGUUCAUCUU）（A）RP-HPLC精製：C11-CONH-CH₂CH₂CH₂-(O-CH₂CH₂)₂-O-CH₂CH₂CH₂-NHpppRNA カラム：Hamilton PRP-1 4.1×250mm、10μmグラジエント：0～80%B 50分中、; A=100mM TEAB、B=80%メタノール、100mM TEAB （B）脱塩後に未精製反応混合物から記録したMALDIスペクトルは、C11-CONH-CH₂CH₂CH₂-(O-CH₂CH₂)₂-O-CH₂CH₂CH₂NHpppRNAの存在を示す（Mw8214

50

、8)。 (C) 精製 $C_{11}-CONH-CH_2CH_2CH_2-(O-CH_2CH_2)_2-O-CH_2CH_2CH_2NHpppRNA$ の $pH=3.8$ 加水分解産物のMALDIスペクトル ($M_w 7832.6$)

【図16】コレステリルタグ化 $pppRNA$ の合成スキームを、対応する $pppRNA$ への随意的な切断とともに示す。

【図17】コレステリルタグ化 $pppRNA$ (RNA配列: $5'-GACGCUGACCUGAAGUUCUUCUU$) の精製および分析を示す: (A) コレステリル- $CONH-CH_2CH_2-(O-CH_2CH_2)_2-NH-ppp-RNA$ のRP-HPLC精製。カラム: Hamilton PRP-1 $4.1 \times 250mm$ 、 $10\mu m$ グラジエント: $0 \sim 10\% B$ 5分中、 $10\% B$ 9分間、 $10 \sim 100\% B$ 33分中; $A=50mM TEAB$ 、 $B=95\% \text{メタノール}$ 、 $50mM TEAB$ (B) 純粋コレステリル- $CONH-CH_2CH_2-(O-CH_2CH_2)_2-NH-ppp-RNA$ のRP-HPLC分析。カラム: Hamilton PRP-1 $4.1 \times 250mm$ 、 $10\mu m$ グラジエント: $0 \sim 100\% B$ 18分中、 $100\% B$ 4分間; $A=50mM TEAB$ 、 $B=95\% \text{メタノール}$ 、 $50mM TEAB$ (C) 純粋コレステリル- $CONH-CH_2CH_2-(O-CH_2CH_2)_2-NH-ppp-RNA$ のMALDIスペクトル。 $pppRNA$ ピーク ($7827.3 Da$) は、イオン化過程中的PN-切断に起因する。

【発明を実施するための形態】

【0011】

用語「オリゴヌクレオチド」は、本出願の文脈において、複数の、例えば少なくとも4つの、ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログビルディングブロックを含む、化合物を含む。好ましくは、オリゴヌクレオチドは、 $6 \sim 100$ 個、例えば $20 \sim 40$ 個のビルディングブロックを含む。ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログビルディングブロックは、サブユニット間結合により連結されたヌクレオシドまたはヌクレオシドアナログサブユニットを含んでよい。ヌクレオシドサブユニットは、デオキシリボヌクレオシドサブユニット、リボヌクレオシドサブユニットおよび／またはそれらのアナログ、特に糖-および／または核酸塩基-修飾のヌクレオシドアナログを含む。さらに、オリゴヌクレオチドは、非ヌクレオチドのビルディングブロック、および／または、さらなる末端および／または側鎖の修飾を含んでよい。

【0012】

好ましい糖修飾サブユニットでは、リボヌクレオシドサブユニットの $2'-OH$ が、O、R、R、ハロゲン、SH、SR、 NH_2 、NHR、 NR_2 またはCNから選択される基で置換されていて、ここで、Rは C_{1-6} アルキル、 C_{2-6} アルケニルまたは C_{2-6} アルキニルであり、ハロゲンはF、Cl、BrまたはIである。さらに好ましい糖修飾サブユニットでは、リボースが、例えば別の糖により、例えばアラビノースなどのペントースにより、置換されてよい。この糖修飾は、例えば $2'$ -フルオロアラビノヌクレオシドサブユニットでの上述の $2'-OH$ 修飾と組み合わせてよい。さらに好ましい糖修飾サブユニットは、ロック化ヌクレオシド(LNA)または $2'$ 、 $3'$ -セコヌクレオシド(UNA)を含む。好ましい核酸塩基修飾ヌクレオシドビルディングブロックでは、非標準的な、例えば天然起源でない核酸塩基が、標準的な核酸塩基の代わりに用いられる。非標準的な核酸塩基の例は、5位が修飾されたウラシル類またはシトシン類、例えば $5-(2-アミノ)$ プロピルウラシルまたは 5 -ブロモウラシル; ヒポキサンチン; $2,6$ -ジアミノプリン; 8位が修飾されたアデニン類またはグアニン類、例えば 8 -ブロモグアニン; デアザヌクレオシド類、例えば 7 -デアザグアニンまたは 7 -デアザアデニン; またはO-およびN-アルキル化核酸塩基、例えば N^6 -メチルアデニン、または N^6 、 N^6 -ジメチルアデニンである。さらに適切な核酸塩基アナログは、 5 -ニトロインドールなどのユニバーサルな核酸塩基アナログから選択してよい。

【0013】

サブユニットの間の、サブユニット間結合は、ホスホジエステル結合または修飾結合、

例えばホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、ホスホロアミデート、ボラノホスフェート、または当業者に公知の他の修飾結合であってよい。

【0014】

オリゴヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドアナログから選択してよい。デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチドおよび／またはオリゴヌクレオチドアナログは、前記のアナログ、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチドおよび／またはオリゴヌクレオチドの、ヌクレオシドおよび／またはリボースサブユニットで、化学修飾されてよい。デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドのアナログは、少なくとも1つのデオキシリボヌクレオシドまたはリボヌクレオシドサブユニットおよび少なくとも1つの修飾ヌクレオシドサブユニット、および／または、例えば上述の少なくとも1つの修飾サブユニット間結合を含んでよい。オリゴヌクレオチドアナログは、その全体が修飾ヌクレオシドサブユニットから構成されてもよい。

10

【0015】

オリゴヌクレオチドは、一本鎖分子または二本鎖分子であってよい。二本鎖オリゴヌクレオチドは、完全または部分的な相補鎖を含んでよい。二本鎖分子は、平滑末端であってよく、または、少なくとも1つの突出、例えば5' - または 3' - 突出を含んでよい。突出は、存在する場合は、好ましくは、分子の遠位端（三リン酸／三リン酸アナログ基に関して）に位置する。また、二本鎖オリゴヌクレオチドはヘアピン構造を含んでもよく、その場合、デュプレックスは、その遠位端（三リン酸／三リン酸アナログ基に関して）でループにより閉じている。ループは、ヌクレオチドおよび／または非ヌクレオチドビルディングブロック、例えばジオールに基づくビルディングブロック、例えばトリ（エチレン）グリコールまたはヘキサ（エチレン）グリコールなどのエチレングリコール部分；プロパン-1, 3-ジオール；ドデカン-1, 12-ジオール；または3, 12-ジオキサー-7, 8-ジチアテトラデカン-1, 14-ジオールを含んでよい。

20

【0016】

好ましい実施態様では、二本鎖分子は、特にその近位端（三リン酸／三リン酸アナログ基に関して）が平滑末端である。

【0017】

特に好ましい実施態様によれば、オリゴヌクレオチドは二本鎖であり、二本鎖の各鎖は、少なくとも19ヌクレオチドの長さを有する。そのような長さの、平滑末端の二本鎖オリゴヌクレオチドが、特に好ましい。さらに好ましい実施態様によれば、オリゴヌクレオチドの各鎖は、少なくとも19～50個のヌクレオチド、19～30個のヌクレオチド、20～30個のヌクレオチド、22～28個のヌクレオチド、特に好ましくは22～26個のヌクレオチドの長さを有する。

30

【0018】

オリゴヌクレオチドは、さらに末端および／または側鎖の修飾、例えば、それに共有結合している細胞特異的な標的物質を含んでよい。これらの物質は、細胞の、または細胞特異的な、取り込みを促進し得て、例えば、脂質、ビタミン、ホルモン、ペプチド、オリゴ糖およびそれらのアナログを含んでよい。例えば、標的物質は、当業者に公知の方法により、修飾核酸塩基または非ヌクレオチドビルディングブロックに結合してよい。

40

【0019】

好ましい実施態様によれば、修飾は、所定の標的に対するオリゴヌクレオチドの選択性を確立および／または亢進させる。特に好ましい実施態様では、オリゴヌクレオチドのRIG-I選択性が確立され、または亢進される。所定のオリゴヌクレオチドのRIG-I選択性を決定する方法は、本明細書中に詳細に記載され（実施例参照）、および／または、当業者に知られている。

【0020】

別の好ましい実施態様によれば、化学修飾は、オリゴヌクレオチドの化学的安定性を維持または亢進する。当業者は、所定のオリゴヌクレオチドの化学的安定性を決定する方法

50

を知っている。そのような方法は、例えば実施例にも記載される。

【0021】

好ましい実施態様によれば、オリゴヌクレオチドの化学修飾は、ハロゲン化、特にF-ハロゲン化、2'-O-アルキル化、特に2'-O-メチル化、および／または、ヌクレオチド間結合のホスホロチオエート修飾を含む群から独立に選択される。特に、F-ハロゲン化およびホスホロチオエート修飾はオリゴヌクレオチドの安定性を増大させ、一方で、2'-O-メチル化はオリゴヌクレオチドのR I G-I選択性を確立または増大させる。2'-O-メチル化は、RNAの免疫原性を変更することも可能である。好ましい実施態様では、オリゴヌクレオチドは、鎖あたり1つまたは2つの2'-O-メチル化、より好ましくは、鎖あたり1つの2'-O-メチル化のみ含む。

10

【0022】

2'-F置換が特に好ましい。リボースの2'位において、ヒドロキシル基がフルオロに置換されている。RNAでの2'-F置換は、特に、ヌクレアーゼ消化に対する安定性を亢進させる。さらなる実施態様では、2'-フルオロ置換は、特にR I G-I依存性の免疫刺激を増大させ得る。

【0023】

本明細書では、ホスホロチオエート化合物は、一般に、ヌクレオチド間結合のホスホロチオエート修飾に関する。

【0024】

オリゴヌクレオチドの末端に修飾を有するホスホロチオエート修飾化合物が、特に好ましい。ホスホロチオエート修飾では、核酸骨格において、架橋リン酸の非結合酸素原子は、硫黄原子に置換される。この置換は、この位置でのヌクレアーゼによる切断性を著しく低減させ、核酸鎖のより高い安定性をもたらす。

20

【0025】

特に好ましい実施態様では、本発明に係るオリゴヌクレオチドは、F-ハロゲン化、メチル化、特に2'-O-メチル化、および、特にオリゴヌクレオチドの末端でのホスホロチオエート修飾を示す。

【0026】

所定のオリゴヌクレオチドの同定パターンは、オリゴヌクレオチドの配列および長さに依存し、各所定のオリゴヌクレオチドごとに決定することができる。当業者は、この決定をどのようにして行うか十分に知っている。

30

【0027】

既に上述のとおり、所定のオリゴヌクレオチドのR I G-I選択性および／または安定性を決定するための、そのような方法は、本出願に詳細に記載されている。

【0028】

式(I)または(IV)のオリゴヌクレオチドは、三リン酸／三リン酸アナログ基を含む。この基において、 V_1 、 V_3 および V_5 は独立に、O、SおよびSeから選択される。好ましくは、 V_1 、 V_3 および V_5 は、Oである。 V_2 、 V_4 および V_6 は、それぞれ独立に、OH、OR¹、SH、SR¹、F、NH₂、NHR¹、N(R¹)₂およびBH₃⁻M⁺から選択される。好ましくは、 V_2 、 V_4 および V_6 は、OHである。R¹は、C₁₋₆アルキル、C₂₋₆アルケニル、C₂₋₆アルキニル、C₂₋₆アシル、または、C₃₋₈シクロ(ヘテロ)アルキル基、C₃₋₈シクロ(ヘテロ)アルケニル基、フェニルまたはC₅₋₆ヘテロアリール基などの環状基であってよく、ここでヘテロ原子は、N、OおよびSから選択される。さらに、2つのR¹は、それに結合したN原子と共に5員環または6員環などの環を形成してよい。R¹は、ハロゲンなどの置換基、例えば、F、Cl、BrまたはI、O(ハロ)C₁₋₂アルキルおよび、環状基の場合は、(ハロ)C₁₋₂アルキルを含んでもよい。M⁺は、無機または有機カチオン、例えばアルカリ金属カチオンまたはアンモニウムまたはアミンカチオンであってよい。

40

【0029】

W₁はOまたはSであってよい。好ましくは、W₁はOである。W₂はO、S、NHま

50

たは NR^2 であってよい。好ましくは、 W_2 は O である。 W_3 は O 、 S 、 NH 、 NR^2 、 CH_2 、 CHHal または $\text{C}(\text{Hal})_2$ であってよい。好ましくは、 W_3 は O 、 CH_2 または CF_2 である。 R^2 は、 R^1 に関して上記に記載した群から選択してよい。 Hal は F 、 Cl 、 Br または I であってよい。

【0030】

特に好ましい実施態様によれば、 V_1 、 V_2 、 V_3 、 V_4 、 V_5 、 V_6 、 W_1 、 W_2 および W_3 は O である。

【0031】

三リン酸／三リン酸アナログ基は、好ましくはオリゴヌクレオチドの末端に結合している。好ましくは、その基は、オリゴヌクレオチドの 5' 末端、特にその 5' 末端糖の 5' - OH 基に結合している。

10

【0032】

本明細書で定義されるように、 Z はキャプチャータグまたは H を表す。キャプチャータグ Z は、以下に示す一連の妥当な例により、機能的に定義することができる。一般的な規則は以下であってよい： Z は便利な精製を可能にしなければならず、 pppRNA 安定性の要件と適合する条件下で除去可能でなければならない。当業者は、過度の負荷なく、所定のタグが機能的な定義を満たすか否かを判断することができる。したがって当業者は、特に本出願で提供される詳細例に関する、そのようなキャプチャータグを知っている。

【0033】

好ましい実施態様によれば、キャプチャータグ Z は、長鎖脂肪族残基、非共有結合の高親和性結合ペアのパートナー、反応性の化学物質 (chemical entity)、 Q または $\text{NHC}_2\text{---C}_{24}$ アルキルから選択され、 Q は、好ましくは、 H 、アミノ酸、アミノ酸アナログ、 $\text{C}_1\text{---C}_{24}$ アルキル、好ましくは $\text{C}_{12}\text{---C}_{24}$ アルキル、ペプチドおよび脂質から選択される。しかしながら、特に好ましい実施態様によれば、 Z はデシル、すなわち C_{10} アルキルである。

20

【0034】

本発明に係るキャプチャータグ Z は、キャプチャータグを含まない他の種から、キャプチャータグを含む化合物、例えばオリゴヌクレオチド (I) を分離することが可能な条件下で、キャプチャー試薬と非共有結合的または共有結合的に相互作用が可能な部分である。好ましくは、キャプチャー試薬は固定化された試薬であり、または固定化が可能な試薬である。

30

【0035】

適切なキャプチャータグは、例えば、長鎖の、例えば $\text{C}_8\text{---C}_{24}$ 、好ましくは $\text{C}_{13}\text{---C}_{24}$ 、より好ましくは $\text{C}_{13}\text{---C}_{14}$ の脂肪族アルキル残基、例えばオクタデシルまたは他の脂質／脂溶性残基、例えばコレステリル、トコフェリルまたはトリチルおよびそれらの誘導体である。しかしながら、特に好ましい実施態様によれば、 Z はデシル残基である。この場合、タグ化三リン酸物質は、標準的な逆相クロマトグラフィー、例えば RP-HPLC によって、または疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) によって、固相上でキャプチャーおよび精製することができる。キャプチャータグは、例えば、Fluorous Technologies 社から市販されるようなフルオラスアフィニティ支持体上で修飾オリゴ三リン酸を特異的にキャプチャーするための、4-(1H, 1H, 2H, 2H-ペルフルオロデシル)ベンジルまたは3-(ペルフルオロオクチル)プロピル残基などのペルフルオロアルキル物質であってもよい。

40

【0036】

別の実施態様では、キャプチャータグは、非共有結合の高親和性結合ペアの第一のパートナー、例えばビオチン、またはデスチオビオチンなどのビオチンアナログ、ハプテンまたは抗原であってよく、それは、高親和性結合ペアの第二の相補パートナーであるキャプチャー試薬 (例えばストレプトアビジン、アビジンまたは抗体) と高親和力 (例えば結合定数 $10\sim 6\text{---}1/\text{mol}$ 以下) を有する。

【0037】

50

さらに別の実施態様では、キャプチャータグは共有結合性ペアの第一のパートナーであってよく、それは、共有結合性ペアの第二の相補パートナーであるキャプチャー試薬と共有結合を形成してよく、ここで共有結合は、可逆または不可逆の結合であってよい。この実施態様では、Husigenの3+2環化付加反応(Cu(I)により触媒されるいわゆる「クリック反応」、または、例えばシクロオクチン誘導体での重度の環ひずみのリリースを介してCu(I)イオン無しで進行するその変異型)の場合、キャプチャータグの構成要素Zはアジド基またはアルキニル基などの反応性の化学物質であってよく、それぞれ、アルキニルまたはアジド部分などの相補反応基を含むキャプチャー試薬と共有結合反応が可能である。そのような場合のZ-Y-Xの具体例は、プロパルギルアミノである。

【0038】

10

別の実施態様では、キャプチャータグ構成要素は、さらなる求核基、例えば、NH₂-Y-XHタイプの試薬中の第二のアミノ基(second amino group)を含む化学物質であってよい。オリゴヌクレオチドを固相に結合させながら、様々の適切な求電子Z試薬、例えばコレステロール、クロロフォルミエート(chloroformate)またはビオチンN-ヒドロキシスクシンイミド活性エステルを用いてタグ基を導入してよく、したがって、タグ化反応の範囲は著しく拡大される。

【0039】

好ましい実施態様では、キャプチャータグは、長鎖アルキル残基、ペルフルオロアルキル物質、アジドまたはアルキニル基である。

【0040】

20

本発明のさらなる実施態様では、オリゴヌクレオチドは、第二のキャプチャータグを、異なる位置(例えば3'末端)に有してよい。第一および第二のキャプチャータグは、好ましくは、2つの直交法による精製を可能にするように選択され、純度が非常に高い物質を回収することが可能である。例えば、第一のキャプチャータグは親油基であってよく、それは適切なクロマトグラフィー支持体と相互作用し、第二のキャプチャータグはビオチンであってよく、それはストレプトアビジンと相互作用する。

【0041】

第二のキャプチャータグは、オリゴリボヌクレオチド合成用の修飾CPG(controlled glass support)を用いた合成を行なうことにより、好適に導入され得る。

30

【0042】

Yは、化学結合またはリンカー、例えばアルキレン、好ましくはC₁-6-アルキレンリンカー、より好ましくはC₂-5-アルキレンリンカー、またはアラルキレンリンカーを表し、場合によりヘテロ原子またはヘテロ原子含有基、例えばO、S、NH、C=OまたはC=Sを含み、および/または、場合によりC=CまたはC≡C結合を含む。特に好ましい実施態様によれば、Yは結合である。

【0043】

別の好ましい実施態様では、リンカーは、ポリアルキレンオキシド、好ましくはポリ-C₂-C₆-アルキレンオキシド、より好ましくはポリ-C₂-C₃-アルキレンオキシドである。リンカーの数平均分子量は、30~800 g/molの範囲内、好ましくは40~450 g/mol、より好ましくは40~250 g/molであってよい。リンカーは[-CH₂CHR₄-O-]_nであってよく、n=1~10、好ましくはn=1~7、より好ましくはn=2~5、およびさらにより好ましくはn=3である。R₄はHまたはC₁-6-アルキルであってよい。Yのさらに好ましい実施態様を図4に示す。好ましい実施態様では、R₄はHである。

40

【0044】

特に好ましい実施態様によれば、

XはNHまたはOであり、

Yは-K-((CHR₁)_m-CH₂-O)_n-R-、または、

(O-(CHR₃)_m-CH₂)_n-1-(O-(CHR₂)_m-CH₂)_n-2-(

50

$O-(CHR_1)_{m_1}-CH_2)_{n_3}-$ であり、および、

KはOまたはNHであり、

m 、 m_1 、 m_2 および m_3 は独立に、1～12、好ましくは1～8、より好ましくは1～5、およびさらに好ましくは1～3であり、

n 、 n_1 、 n_2 および n_3 は独立に、0～20、好ましくは0～10、より好ましくは0～5、およびさらに好ましくは0～3であり、および、

R_1 、 R_2 および R_3 は独立に、H、 C_{1-6} アルキル、 C_{2-6} アルケニル、 C_{2-6} アルキニル、 C_2-C_6 アシルまたは環状基であり、それぞれ場合により置換され、および、

Rは、 C_{1-6} アルキル、 C_{2-6} アルケニル、 C_{2-6} アルキニル、 C_2-C_6 アシルまたは環状基であり、それぞれ場合により置換される。好ましくは、Rは CH_2CH_2 である。

【0045】

Yが上記の定義のとおりである特に好ましい実施態様によれば、 R_1 および R_2 はHであり、 n_1 はOであり、 n_2 および n_3 は1である。さらに好ましい実施態様は、図4から得ることができる。

【0046】

Yは上記の定義のとおりである別の好ましい実施態様では、 R_1 、 R_2 および R_3 はHであり、 n_1 、 n_2 および n_3 は1である。

【0047】

好ましい実施態様によれば、XはNHであり、KはNHであり、Yは $(CH_2CH_2O)_n$ であって、 n は上記の定義のとおりであり、ここでKは、コレステロール- $C(O)-$ 、トリチルまたはそれらの誘導体でさらに置換される。

【0048】

式(I)によるオリゴヌクレオチドの特に好ましい実施態様では、XはNHまたはOであり、Yは結合であり、Zは C_{1-12} アルキルまたはH、好ましくは C_{1-10} 、Qまたは NHC_2-C_{2-4} アルキルであり、ここでQは、H、アミノ酸、アミノ酸アナログ、 C_{1-12} アルキル、好ましくは $C_{1-12}-C_{2-4}$ アルキル、ペプチドおよび脂質から選択され、 V_1 、 V_2 、 V_3 、 V_4 、 V_5 、 V_6 、 W_1 、 W_2 および W_3 は、Oである。

【0049】

式(I)のオリゴヌクレオチドのさらに好ましい実施態様によれば、XはNHまたはOであり、Yは結合であり、ZはデシルまたはHであり、 V_1 、 V_2 、 V_3 、 V_4 、 V_5 、 V_6 、 W_1 、 W_2 および W_3 は好ましくはOである。

【0050】

本発明のさらなる態様は、本明細書に定義される修飾オリゴヌクレオチドを含む医薬組成物に関する。

【0051】

本発明に係る医薬組成物は、薬学的に許容できる担体、希釈剤、および／またはアジュバントをさらに含んでよい。用語「担体」は、本明細書中で用いられる場合、担体、賦形剤および／または安定剤を含み、それは、用いられる用量および濃度で、それに曝される細胞または哺乳類に非毒性である。多くの場合、生理的に許容できる担体は、pH緩衝水溶液またはリポソームである。生理的に許容できる担体の例は、リン酸、クエン酸および他の有機酸などのバッファー（しかしながら、本発明の製剤に関しては、リン酸バッファーが好ましい）；アスコルビン酸を含む抗酸化剤、低分子量（約10残基未満）のポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリジン；単糖類、二糖類、および、グルコース、マンノースまたはデキストリンを含む他の糖類、ゲル化剤、例えばEDTA、糖、アルコール類、例えばマンニトールまたはソルビトール；塩形成対イオン、例えばナトリウム；および／または、非イオン性界面活性剤、例えばTWEEN、ポリエチレンまたはポリエチレングリコ

10

20

30

40

50

ールを含む。特に好ましい実施態様によれば、本発明の化合物は、滅菌脱イオン水に溶解される。

【0052】

本発明に係る、そのような組成物および／または製剤は、それらを必要とする対象、特にヒト患者に対して、適切な方法により特定の状態を治療するのに十分な量で投与することができる。例えば、本発明に係る組成物および／または製剤は、薬学的に許容できる担体、希釈剤および／またはアジュバントとともに、医薬組成物として処方してよい。治療効率および毒性は、標準的なプロトコルによって決定してよい。医薬組成物は、全身性に、例えば腹腔内、筋肉内、または静脈内に、または、局所的に、例えば鼻腔内、皮下、皮内または髄腔内に、投与してよい。投与される組成物および／または製剤の投与量は、もちろん、治療すべき対象、および対象の状態、例えば対象の体重、対象の年齢および治療すべき疾患または損傷の種類および重症度、投与様式および処方医師の判断に依存する。

10

【0053】

好ましい実施態様では、医薬組成物は皮内に投与される。タトゥーイング、マイクロニードルおよび／またはマイクロニードルパッチを介して、組成物を皮内に投与するのが特に好ましい。

【0054】

本発明に係る化合物は、好ましくは、滅菌した脱イオン水（精製水）に所望の濃度で溶解および希釈され、それから、毛剃りしてエタノール消毒した皮膚上に、ピペッティング器具を用いて塗布し、そして続けて皮膚内にタトゥーイングする。

20

【0055】

タトゥーイングについては、例えば、本発明に係る水ベースの医薬組成物は、マルチニードル（使い捨て）ニードルチップ（例えば9ニードル、使い捨てチップ）を装着した（医療用）タトゥー器具を用いて、皮膚へ皮内注入される。

【0056】

典型的なタトゥーイングの手順は以下である：毛剃りしてエタノール洗浄した皮膚上に水ベースの医薬組成物をピペット後、稼働ニードルチップ（例えば、100～120Hz、特に100Hzのスピードで稼働）を、水ベースの医薬組成物の液滴上部に穏やかに置くことにより、水ベースの医薬組成物をタトゥー装置のマルチニードルチップ内に導入する。水ベースの医薬組成物の液滴が、稼働ニードルチップ内に完全に吸着され、それゆえに稼働ニードルの間に存在した時点で、この充填されたニードルチップを、皮膚に対して正確に90度の角度で保持しながら、稼働チップを穏やかに皮膚の上で前後に動かす。この方法を用いることにより、水ベースの医薬組成物が皮膚中に完全にタトゥーイングされる。50～100μlの水ベースの医薬組成物については、これは典型的に、2～4平方センチメートルの皮膚領域一面に10～15秒を要する。この処置が標準的な単回の皮内ボラス注射に勝る利点は、水ベースの医薬組成物が、より広い領域の皮膚一面に均一に注入され、標的組織一面に、より均一かつより正確に分けられることである：9ニードルチップを100Hzで10秒間用いることにより、この方法は、処置される皮膚において9000の均一分散した皮内注射を確実にする。

30

【0057】

もちろん、当業者は、治療すべき患者または体の部分に応じて、手順を逸脱および調整してよい。マイクロニードルの手順は、タトゥーイングの手順とほぼ同様の手順で行なうてよい。しかしながら、マイクロニードルでは、タトゥーニードルチップはマイクロニードルチップに置き換え、それはより表面の皮内投与を確実にする。水ベースの医薬組成物は、原理的には、毛剃りされエタノール洗浄された皮膚上にピペットされ、それからマイクロニードルチップを用いて、タトゥーの手順と同様に皮内に投与される。マイクロニードルは、マイクロニードルのニードル間に医薬組成物を事前に吸着させる必要はない。

40

【0058】

加えて、医薬組成物でコーティングされた、またはそれ以外の方法で医薬組成物を含むマイクロニードルパッチを、経皮／皮内の送達に用いることができることが想定される。

50

これは、病院訪問の必要および／または専門医のタトゥーイング／マイクロニードルの介在無しで、医薬組成物の皮内送達をレシipient自身によって安全に行なうことができるという、特有の利点がある。これは、治療スキームに柔軟性を大いに与えることができ、非常にパーソナライズされた治療レジメンを可能にし、治療に関係する苦痛を軽減し、治療費を削減する。これらのパッチは、制限されないが、時間－制御－、持続－またはボラスで医薬組成物を経皮送達するための、溶解性または非溶解性のマイクロニードルパッチを構成することができる。

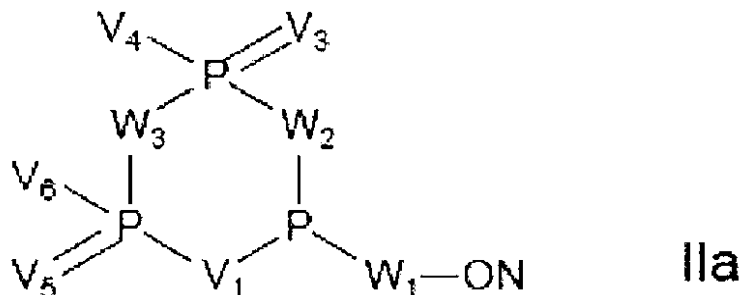
【0059】

本発明の別態様は、請求項1から15のいずれかのオリゴヌクレオチドを調製する方法に関し、以下のステップを含む。

10

(a) 式(I I a)の化合物を、酸化剤と反応させて、式(I I b)の化合物を得るステップ、

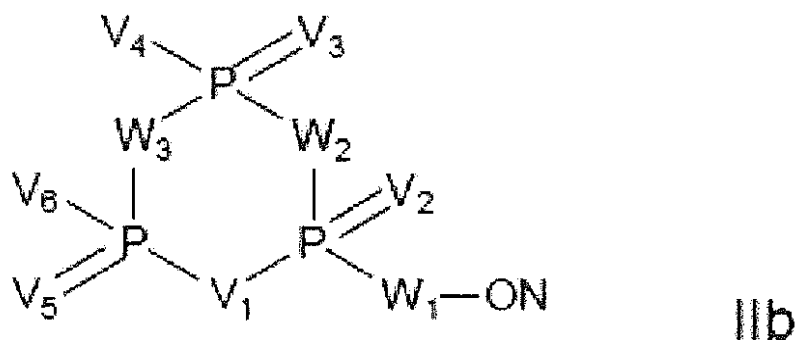
【化2】



20

[ここでV1、V3、V5、V4、V6、W1、W2、W3、およびONは上記で定義されたとおりであり、ONは少なくとも1つの保護基により保護されている。]

【化3】

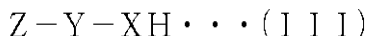


30

[ここでV1、V3、V5、V2、V4、V6、W1、W2、W3およびONは上記で定義されたとおりであり、ONは、少なくとも1つの保護基により保護されている。]

(b) 式(I I b)の化合物を、式(I I I)のキャプチャータグ剤と反応させ、式(I)のオリゴヌクレオチドを含む反応産物を得るステップ、

【化4】



[ここでX、Z、およびYは上記で定義されたとおりであり、Xは好ましくはOである。]

40

および、

(c) 前記の少なくとも1つのON保護基を脱保護するステップ、および

(d) ステップ(c)の反応産物を、キャプチャータグと相互作用可能なキャプチャー試薬と接触させるステップ、

ここで、前記の接触させるステップは、前記の反応産物中に含まれる他の種からオリゴヌクレオチド(I)を分離するのを可能にする条件下で行なわれる。

【0060】

XがOである態様が特に好ましい。

【0061】

50

本発明の方法において、ONオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの保護基を含む。本発明による保護基の使用は、特に、用いられるオリゴヌクレオチドの2'-OH基リボースサブユニットを保護することを目的とする。当業者、特にヌクレオチド合成の分野に従事する者は、どの保護基が合成に適切であるか知っている。保護基は、オリゴヌクレオチドのリボースサブユニットの2'-OH位が好ましい。本発明の好ましい実施態様では、フッ化物に不安定な保護基がリボースユニットの2'-位に用いられる。

【0062】

特に好ましいのは、2'-O-TBDMSまたは2'-O-TOM保護基である。特に好ましい実施態様では、TBDMS保護基が用いられる。

【0063】

特に、Z-Y-X-PPP結合安定性が高い、X=Oである化合物の合成においては、広範囲の脱保護条件が、2'-OH保護基の切断を導き得る。

【0064】

全ての公知の脱保護試薬が、TBDMS保護基を切断するのに適切である。特に、以下の試薬を用いてよい：

(a) トリエチルアミン-トリハイドロフルオリド（場合により極性溶媒と組み合わせる）、

(b) トリアルキルアミン、トリエチルアミン-トリハイドロフルオリドおよび極性溶媒、

(c) ピリジン-HFおよび他の付加物（有機窒素塩基のハイドロフルオリド）、

(d) アンモニウムフルオリド、

(e) テトラ-n-ブチルアンモニウムフルオリド、

(f) テトラメチルアンモニウムフルオリド、および他のテトラアルキルアンモニウムフルオリドおよびそれらの組み合わせ。

【0065】

ステップ(c)は、好ましくは、例えば以下に詳述のような、三リン酸部分の分解を生じない条件下で行なわれる。

【0066】

本発明の方法のステップ(a)は、式(IIa)の環状P(V)-P(V)-P(III)種と酸化剤との反応を含む。式(IIa)の化合物は、上記のLudwigら(1989)およびGaurら(1992)により記載の標準的な方法により、すなわち、オリゴヌクレオチドの5'末端-OH基を、2-クロロ-4H-1,3,2-ベンゾジオキサホスホリン-4-オンのような三官能性ホスファイト化剤と、適切な条件下で、例えばジオキサンまたはジクロロメタンなどの適切な溶媒中、塩基（ピリジンまたはジイソプロピルメチルアミン）存在下で反応させて、その後、ピロリン酸(W₃=O)または修飾ピロリン酸(W₃がOではなく、例えばCH₂、CCl₂、NHまたはCF₂である)と反応させることにより、得てよい。好ましくは、DMF中で、ピロリン酸または修飾ピロリン酸のトリ-n-ブチルアンモニウム塩を用いる。生じる環状P(III)-P(V)中間体(IIa)を、それから、無水条件下で、例えば、t-ブチルヒドロペルオキシド、クメンヒドロペルオキシド、(10-カンファースルホニル)オキサジリジンなどの過酸化物を用いて、酸化させる。あるいは、フェニルアセチルジスルフィド(V₂=S)、またはボラン-ジイソプロピルエチルアミン複合体(V₂=BH₃)を用いて、それぞれ対応する式(IIb)の環状5'-三リン酸/三リン酸アナログを得ることもできる。本文脈での参照は、WO96/40159またはWO2009/060281にもなされ、その内容は参照により本明細書中に援用される。

【0067】

反応ステップ(a)は、溶液中のオリゴヌクレオチドを用いて、または、固相（例えば有機樹脂またはガラス、CPGなど）に結合したオリゴヌクレオチドを用いて、行なう。オリゴヌクレオチドは、保護基、例えば当業者に良く知られた糖または核酸塩基の保護基を、さらに含んでよい。保護基の好ましい例は、ヌクレオシド間ホスホジエステル

10

20

30

40

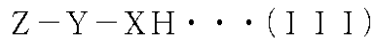
50

またはホスホロチオエートについては2-シアノエチルであり、リボース2'-ヒドロキシル基については、tert-ブチルジメチルシリル、トリイソプロピルシリルオキシメチルまたはビス(アセトキシエトキシ)メチルであり、核酸塩基の環外アミノ基については、4-tert-ブチルフェノキシアセチルまたはフェノキシアセチル、アセチル、イソブチリル、ベンゾイルである。より好ましくは、ステップ(a)は、固相結合オリゴヌクレオチドを用いて行なわれる。

【0068】

本発明の方法のステップ(b)によれば、化合物(IIb)は、式(III)のキャプチャータグ剤と反応する。

【化5】



【0069】

ここでXは、NH、NR³、OまたはおよびXから選択される基であり、Yは、上記で定義されたとおりである。R³は、R¹について上述したとおりに定義される。

【0070】

特に、XがOである場合は、デカノールのような求核性が制限された試薬を開環に用いることができる(図1、ステップ4を参照)。そのようなステップは、室温で例えば48時間行なうことができ、そして、シクロ三リン酸を所望の三リン酸γ-エステルに変換させる。

【0071】

ステップ(c)によってON保護基が切断される。

【0072】

ステップ(c)の間、例えば、上記で規定の脱保護試薬(a)および(b)の後に、X=Oの場合は、20分~180分、より好ましくは60分~約150分、特に約120分の時間にわたって、60~70℃、特に約65℃で、脱保護条件を続けてよい。X=NHの場合は、結合安定性が異なるためにそのような反応は行なわないか、または、著しくより悪い反応パラメータの下でのみ、例えば室温で40時間にわたって、行なうことができる。

【0073】

本発明の方法のステップ(d)は、反応産物中に含まれる他の種から、キャプチャータグ含有オリゴヌクレオチド(I)を分離することを可能にする条件下で、ステップ(b)の反応産物を、キャプチャータグZと相互作用することが可能なキャプチャー試薬と接触させるステップを含む。ステップ(d)の前に、固相結合オリゴヌクレオチド(I)は、固相から切断されて脱保護され、すなわち、保護基が部分的または完全に除去される。キャプチャー試薬は、好ましくは、クロマトグラフィー支持体などの適切な支持体上に固定化される。キャプチャータグ含有オリゴヌクレオチド(I)を、キャプチャータグを含まない種から分離するために、必要であれば、ステップ(b)による反応産物を固相から切断して脱保護し、分離手段(好ましくはキャプチャータグZとキャプチャー試薬との相互作用に基づくクロマトグラフィー分離手段)に供する。分離ステップの間、オリゴヌクレオチド(I)の純度は、一般に未精製の材料では配列の長さおよび複雑さに応じて25~

【0074】

ステップ(d)では、キャプチャータグおよびそれと相互作用可能なキャプチャー試薬は、好ましくは以下から選択される。(i)疎水基またはフッ素化基、および、疎水基またはフッ素化基に関して親和性を有するクロマトグラフィー材料、例えば逆相材料またはフルオラスアフィニティ支持体；(ii)非共有結合の高親和性結合ペアの第一のパート

10

20

30

40

50

ナー、および、非共有結合の高親和性結合ペアの第二の相補パートナー、(i i i) 共有結合ペアの第一のパートナー、および、共有結合ペアの第二の相補パートナー（その際、第一および第二のパートナーは、共有結合を形成する）。

【0075】

キャプチャータグは、一連の妥当な実施例により以下に機能的に定義される。一般的な規則は以下であってよい：

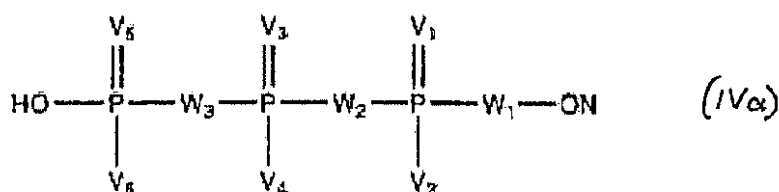
【0076】

Zは便利な精製を可能にしなければならず、p p p RNA 安定性の要件と適合する条件下で除去可能でなければならない。

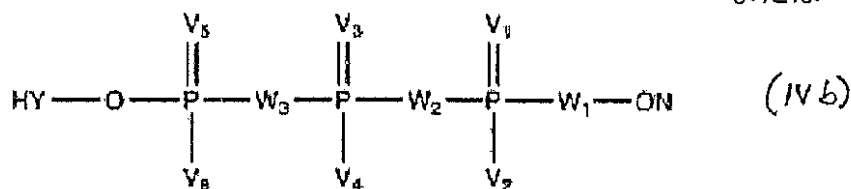
【0077】

加えて、その方法は、キャプチャータグを除去して式 (IV) のオリゴヌクレオチドを得るステップ (e) をさらに含んでよい。好ましい実施態様によれば、X = O については、式 (IV) a または (IV) b の化合物

【化6】

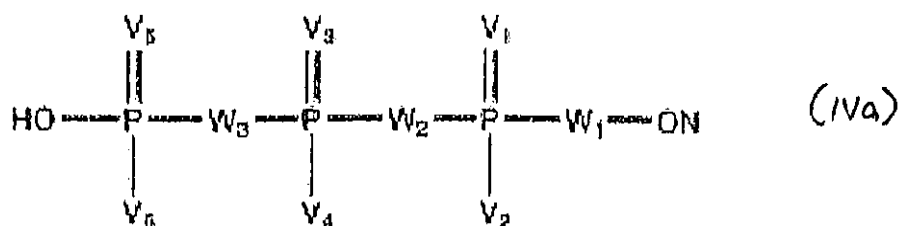


または



および、X = NH については、式 (IV) a の化合物

【化7】



が得られる。

【0078】

ステップ (e) は、三リン酸最終産物の安定性要件およびリボヌクレオチド間結合の安定性要件と適合しなければならない。XがNHである場合は弱酸性条件での切断を含んでよく、XがSの場合は銀イオンを用いた切断を含んでよく、Y-X-Pが-S-S-CH₂-CH₂-O-Pを含む場合は、チランの除去を導くジチオスレイトールなどのチオールによる切断を含んでよい。

【0079】

さらなる実施態様では、キャプチャータグZは除去されないか、または完全には除去されない。これらの実施態様では、そのようなタグ化オリゴヌクレオチドは、医薬品としての有用性などの、有用性を有し得る。

【0080】

これらの実施態様では、試薬Z-Y-XHは、RIG-Iセンサーの構造上の要件と機能的に適合するZ-残基のサブグループから選択しなければならない。例えば、Z = デシ

10

20

30

40

50

ルーオクタデシル、Y=リンク、X=NHまたはOの組み合わせが、これらの要件を満たすことが知られている。

【0081】

本発明により生産される三リン酸／三リン酸アナログ修飾オリゴヌクレオチドは、その高い純度のため、医薬用途に特に適切である。特に好ましい実施態様では、オリゴヌクレオチド(I)または(IV)は、RIG-Iヘリカーゼのアクチベーターである。適切なRIG-Iアクチベーターの具体例は、上記のSchleeら(2009)に記載されており、その内容は参照により本明細書中に援用される。

【実施例】

【0082】

実施例1：5'-デシル-O-三リン酸RNAの調製

概略(図1)に概説するように、デシル-O-三リン酸RNA合成工程は、以下の合成ステップを含む：

【0083】

1-4) 5'-デシル-O-三リン酸RNA

支持体に結合し、完全に保護された5'-OH-RNA(1 μmol)を、合成カラム内で、真空下で3時間乾燥させ、続いて、無水ピリジン／ジオキサン(1:3, v/v, 4 ml)を用いて洗浄した。アルゴン下で、調製したばかりの、乾燥ジオキサン(100 μl, 100 μmol)中、1Mの2-クロロ-4H-1,3,2-ベンゾジオキサホスホリン-4-オン溶液を、2 mlの無水ピリジン／ジオキサン(1:3, v/v)を含むフラスコ内に注入した。生じた50 mMのホスファイト化溶液を合成カラム内に吸引し、30分の反応時間の間、ゆっくり前後に動かした。次に、DMF(1 ml, 0, 5 mmol)およびトリ-n-ブチルアミン(238 μl, 1 mmol)中、ビス(トリ-n-ブチルアンモニウム)ピロリン酸の0,5M溶液を混合することにより、テトラ(トリ-n-ブチルアンモニウム)ピロリン酸溶液を調製した。ピロリン酸溶液を押してカラムを通過させ、そして、過剰のホスファイト化試薬をカラムから排出および除去した後、2本のシリンジを用いて残存するピロリン酸溶液を前後に押した。10分後、無水アセトニトリル(3 ml)を用いてカラムを洗浄した。デカン(300 μl)中、5,5Mのtert-ブチルヒドロペルオキシド溶液を、無水アセトニトリル(2 ml)中に溶解させ、そして、合成支持体と接触させた。15分後、無水アセトニトリル(6 ml)を用いてカラムを洗浄した。続けて、N-メチルイミダゾール(240 μl, 3 mmol)、トリ-n-ブチルアミン(250 μl, 1, 1 mmol)およびn-デシルアルコール(2 ml, 10, 5 mmol)の均質溶液を、繰り返し前後に押してカラムを通し、放置して、シクロ三リン酸をデシル-O-三リン酸に変換するために48時間反応させた。無水アセトニトリル(6 ml)を用いてカラムを洗浄し、未反応のシクロ三リン酸の加水分解のために、0,1Mのトリエチルアンモニウムバイカーボネート(TEAB, 2 ml)を用いて20分間処理して、この後の脱保護工程中の非特異的な誘導体化を避けた。無水アセトニトリル(9 ml)を用いたさらなる洗浄ステップに続いて、合成支持体をアルゴン蒸気中で乾燥させた。

【0084】

5-6) 脱保護および精製

2本のシリンジを用いて、5'-デシル-O-三リン酸オリゴヌクレオチドを、40%メチルアミン水および濃縮アンモニア水の、調製したばかりの溶液(AMA, 1:1, v/v, 2 ml)と接触させた。30分の切断時間後、清潔なスクリュキャップのバイアルに溶液を移し、AMA(1 ml)を用いて支持体をリンスした。合わせた溶液および洗浄液を、65℃で10分間加熱した。氷上で冷却後、溶液を蒸発乾固させ、残渣を無水エタノールとの共蒸発により乾燥させた。2'-O-TBDMS保護基を除去するために、修飾三リン酸部分を大きく失うことなく、トリエチルアミントリハイドロフルオリド(TEA, 3HF)による処理を用いることができるリン酸。デシル-O-三リン酸オリゴヌクレオチドを、調製されたばかりのN-メチルピロリドン／トリエチルアミン／T

10

20

30

40

50

EA・3HF (NMP/TEA/TEA・3HF, 6:4:3, v/v, 325 μ l) 溶液中に再溶解させて、その溶液を65℃で2時間加熱した。あるいは、DMSO中、TEA・3HFの脱保護溶液(1:1, v/v, 600 μ l)を用いてよい。完全に脱保護したデシルーOー三リン酸オリゴヌクレオチドを、n-ブタノールを用いて脱保護溶液から析出させて、HPLCにより精製した。脂溶性のデシルタグは、逆相クロマトグラフィーを使用することによって、タグを含まない不純物からデシルーOー三リン酸を分離することを可能にする。反応産物を、7×250mmのPRP-1カラムにアプライして、3ml/分の流速で、50分中、0~100%バッファーBの直線グラジエントで分離した。バッファーAは100mM TEABであり、バッファーBは80%メタノール中100mM TEABであった。産物画分を集めて、メタノールとの共蒸発を繰り返して蒸発および脱塩させた。残渣を水に溶解させ、0, 3M塩化ナトリウム存在下で、エタノール沈殿によりナトリウム形態に変えた。

10

【0085】

実施例2：5'-pppRNAγ2-(2-ブトキシエトキシ)エチルーエステルの調製 (C4-DEG-pppRNA)

実施例2に記載の反応スキームの概略を図11に示す。

【0086】

ステップ1：203mg (1mmol)の2-クロロ-4H-1, 3, 2-ベンゾジオキサホスホリン-4-オンを、アルゴン下で、10mLのセプタムバイアル中の乾燥ジオキサン1mL中に溶解させる。

20

【0087】

ステップ2：脱トリチル化され(detritylated)、アセトニトリルを用いて十分に洗浄された、完全に保護されたRNAを含む合成カラムを、12時間、真空中で乾燥させる。アルゴン雰囲気中で、2mLの無水ジオキサン/ピリジン溶液(3:1 (v/v))を繰り返し吸引および排出させることにより、カラム内容物を十分に洗浄する。

【0088】

ステップ3：最初に、2mLのピリジン/ジオキサン(3:1 v/v)をバイアル中に加え、続いて、乾燥ジオキサン中、1Mの2-クロロ-4H-1, 3, 2-ベンゾジオキサホスホリン-4-オン溶液100 μ Lを加えて、ジオキサン/ピリジン(3:1 (v/v))中、2-クロロ-4H-1, 3, 2-ベンゾジオキサホスホリン-2-オンなどの、ホスファイト化試薬の、50mM溶液を得る。穏やかに振とうして、溶液をホモジナイズする。2-クロロ-4H-1, 3, 2-ベンゾジオキサホスホリン-4-オン溶液を、バイアルから合成カラムを通して吸引することにより、反応を開始させる。

30

【0089】

固相に支持されたRNAとの完全な接触および良好な混合を可能にするために、反応の間、合成カラムから、2-クロロ-4H-1, 3, 2-ベンゾジオキサホスホリン-4-オン含有溶液を、繰り返し吸引および排出させる。30分の反応時間は、通常、20~40ntの範囲で、支持体に結合したオリゴマーの遊離5'-OH基のほぼ定量的な反応を与える。

【0090】

ステップ4：30分の反応時間後、過剰のホスファイト化剤を含むジオキサン/ピリジン溶液を廃棄容器中に排出させて、乾燥DMF中、1mLの0.5M (Bu₃NH)₂ピロリン酸と238 μ L (1mmol)の乾燥Bu₃Nとのボルティックス混合物で新しいシリンジを満たし、0.5M (Bu₃N)₄ピロリン酸溶液を得る。この溶液を、カラムを押し通し、それによりジオキサン/ピリジン溶液を置き換える。非常に過剰のピロリン酸が、中間体の、P(III)-P(V)環状無水物IIaへの定量的変換を確実にする。

40

【0091】

ステップ5：3mLのCH₃CNを用いてカラムを洗浄して、DMFおよび過剰のPPiを除去し、そして、カラムリアクターを乾燥CH₃CNで満たす。

50

【0092】

ステップ6：300 μ Lのt-BuOOH（デカン中5.5 M溶液、Sigma-Aldrich）を、2 mLの無水CH₃CNに溶解して、およそ0.7 Mの均質溶液を得る。酸化P（V）環状無水物I Ibを得るために、合成支持体をこの溶液と15分間接触させる。

【0093】

ステップ7：3 mLの乾燥CH₃CNを用いてカラムを洗浄して、過剰の過酸化物を除去し、乾燥CH₃CNでカラムを満たす。

【0094】

ステップ8：0.1 M N-メチルイミダゾールおよび0.1 M トリーn-ブチルアミンを含む2 mLの乾燥2-（2-ブトキシエトキシ）エタノール（ジエチレングリコールモノブチルエーテル）を、カラム中の支持体と接触させる。CPGとアルコールとの接触時間は、室温で少なくとも48時間であるべきである。

【0095】

ステップ9：9 mLのアセトニトリルを用いてカラムを完全に洗浄し、それから、未反応のシクロトリリン酸を加水分解するために、0.1 M TEAB（トリエチルアンモニウムバイカーボネート）水溶液2 mLとカラムを1時間接触させる。

【0096】

ステップ10-脱保護の第一段階：1 mLの脱保護溶液（40%メチルアミン水溶液／濃縮アンモニア水溶液 1：1 v/v、AMA試薬）を、2～3回支持体に通す。30分の接触後、溶液を新しいバイアル中に移す。同量のAMA脱保護溶液を用いて支持体を洗浄し、洗浄液と合わせる。合わせた溶液および洗浄液を、65℃で10分間加熱する。氷上で冷却後、その溶液を300～500 μ Lの容量に濃縮し、それから蒸発乾固させる。

【0097】

ステップ11-2'-O-TBDMS保護基の除去：300 μ Lの乾燥EtOHを添加し共蒸発により残渣を乾燥させ、THF中、1 mLの乾燥1 M TBAF（テトラn-ブチルアンモニウムフルオリド）を添加し、きつく密閉して、16時間、シェイカー上に置く。1 mLの滅菌1 M TEAB（トリエチルアンモニウムバイカーボネート）水を用いて反応を止めて、滅菌水を溶離液として用いて、NAPT-25（Nucleic Acid Purification）カラム上でそれを脱塩する。滅菌2 μ mフィルターを通した濾過が、このステップで必要であり得る。UV吸収画分を合わせて、150 μ Lの容量に蒸発させて、100 mLの1 M TEAB pH8を添加して、HPLC精製を行なうことができるまで、その溶液を-20℃で冷凍保存する。

【0098】

ステップ12-HPLC精製：ステップ11による1 μ molスケールの反応混合物からの反応産物を、7×25 mmのPRP-1カラム（Hamilton）中にロードした。精製は、流速3 mL／分で、50分中、直線グラジエントバッファーB 0～80%を用いて行なった。バッファーAは100 mM TEABであり、バッファーBはメタノール／水 8：2 v/v中の100 mM TEABである。24-merの精製の典型的な例を図3に示す。4原子アルキルタグとジエチレングリコール残渣との組み合わせは、pppRNAからベスライン付近を分離するのに十分である。88.4 mLのピークに対応する画分を合わせて、ロータリーエバポレーター上で蒸発させ、乾燥メタノールを用いた数回の共蒸発により脱塩した。

【0099】

実施例3：予め形成した脂溶性ポリエーテルアミンを用いた、脂溶性ポリエーテル複合タグを使用したpppRNAの誘導体化

実施例3は、ZY-H構造の脂溶性ポリエーテルアミンを用いて、ZYNHpppRNAを生産する。

【0100】

10

20

30

40

50

パートA：脂溶性ポリエーテルアミンの、経済的な大スケール調製

この工程は、フラッシュカラムクロマトグラフィーを用いずに行なうことができ、一般的に、水溶性ジアミンと脂溶性カルボン酸メチルエステルからの、モノアミド合成に適用できる。

【0101】

N-ラウリル-4, 7, 10-トリオキサー-1, 13-トリデカンジアミン（化合物3, 図14）の合成：4, 7, 10-トリオキサー-1, 13-トリデカンジアミン（43, 8ml, 200mmol）を、32.5mlのメタノール中に溶解させた。ラウリン酸メチルエステル（4.92ml, 20mmol）を、攪拌しながらゆっくり添加して、密閉フラスコを室温で5日間維持した。ロータリーエバポレーター上で反応混合物からメタノールを除去し、残渣を100ml酢酸エチル中に溶解させた。

10

【0102】

水（2*120ml）に続いて濃縮塩化ナトリウム（2*100ml）を用いた抽出により、過剰のジアミンを除去した。酢酸エチル相を蒸発させて、-20℃で静置して残渣を結晶化し、6.8g（17mmol）の純粋N-ラウリル4, 7, 10-トリオキサー-1, 13-トリデカンジアミンを得た。

【0103】

パートB：N-ラウリル-4, 7, 10-トリオキサー-1, 13-トリデカンジアミンを用いたCPG結合RNAシクロ三リン酸の開環反応

【0104】

CPG結合RNAシクロ三リン酸（化合物4、図14）を、上記実施例2のステップ1～7に従って合成した。固相固定化RNAシクロ三リン酸の開環反応は、アセトニトリル中のN-ラウリル-4, 7, 10-トリオキサー-1, 13-トリデカンジアミンの0, 08M溶液を用いて行なった。室温で3時間、アセトニトリル溶液をCPGと接触させ、それから、10mlの乾燥アセトニトリルを用いて支持体を洗浄し、アルゴンを流して乾燥させた。支持体からの切断、脱保護およびさらなるHPLC処理は、実施例2のステップ10～12のとおりに行なった。産物5を75%メタノール濃度（図15A）で溶出した。反応混合物のMALDIスペクトル分析は、化合物5の構造を確認する（Mw 8214.8Da, 図15B）。

20

【0105】

場合により、精製タグを除去して対応する三リン酸オリゴヌクレオチドを得てよい：100nmolのn-ラウリル置換γアミド（化合物5、図14）を、2mlエッペンドルフチューブ中のpH3.8脱保護バッファー400μl中に溶解させ、密封チューブを60℃で70分間加熱した。これらの条件は、三リン酸部分を分解せずに、化合物5のホスホロアミデート結合の定量的切断を生じさせる。反応混合物を氷上で冷却し、14μLの滅菌5M NaCl溶液および1.2mLの無水エタノールを添加した。沈殿物を遠心分離により集めて、冷エタノールを用いて洗浄し、Speed Vac上で乾燥させ、滅菌水中に溶解させて、-20℃で冷凍保存した。

30

【0106】

MALDIスペクトル分析は、pppRNA産物の期待分子量を確認する（Mw 7832 Da, 図15C）。

40

【0107】

実施例4：脂溶性ポリエーテル複合タグを使用したpppRNAの誘導化のための、オンカラムアプローチ

実施例4は、ZYNHpppRNAを生産するための、固定化HYNHpppRNAオリゴヌクレオチドのオンカラム誘導体化を用いた2ステップ工程である。

【0108】

コレステリルタグ化三リン酸RNAの調製

(Chl-CONH-CH₂CH₂-(O-CH₂CH₂)₂-NH-ppp-RNA、化合物4、図16)

50

脂溶性コレステリルータグの、三リン酸RNAへのコンジュゲーションは、R P-H P L Cによる、非タグ化不純物からのタグ-p p p RNA産物の効率的な分離を可能にする。コレステリルータグ化三リン酸RNAの調製に関する反応スキームの概略を図16に示す。最初のステップにおいて、実施例2のステップ1～7に記載のように、支持体に結合し完全に保護された5'OH-RNAを、シクロ三リン酸中間体に変換した(化合物2、図16)。

【0109】

続いて、無水アセトニトリル(3ml)を用いてカラムを洗浄した。176μlの2, 2'-(エチレンジオキシ)ジエチルアミン(化合物1、図16; 1, 2mmol)を、無水アセトニトリル(1ml)中に溶解させ、その溶液を、カラム中の支持体と接触させた。3分後に、無水アセトニトリル(3ml)および無水ジクロロメタン(6ml)を用いてカラムを洗浄した。

【0110】

次に、アミノ修飾三リン酸(すなわち化合物3、図16)を、無水ジクロロメタン(5ml)中、4-ジメチルアミノピリジン(4, 9mg、40μmol)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(13, 9μl、40μmol)およびコレステリルクロホルメート(36mg、80μmol)の予混合溶液を用いて、15分間処理した。無水ジクロロメタン(3ml)および無水アセトニトリル(6ml)を用いてカラムを洗浄し、アルゴン流中で乾燥させた。支持体からの切断および脱保護のために、2本のシリンジを用いて、誘導体化オリゴヌクレオチドを、40%メチルアミン水および濃縮アンモニア水の、調製したばかりの溶液(AMA, 1:1, v/v, 2ml)と接触させた。30分の切断時間後、その溶液をスクリュウキャップのバイアルに移し、65℃で10分間加熱し、蒸発乾固させた。無水エタノールとの共蒸発により残渣を乾燥させ、THF中、1Mのテトラ-n-ブチルアンモニウムフルオリド(1ml, 1mmol)を用いて、振とうしながら16時間処理した。NAP-25カラムでの脱塩後、完全に脱保護されたコレステリルータグ化三リン酸オリゴヌクレオチドを、逆相カラムを用いてHPLCにより精製した(Hamilton PRP-1, 4, 1×250mm、図17A)。化合物4を95%メタノール濃度で溶出し、予測構造をMALDI分析により確認した(Mw 8370, 6Da、図17C)。

【0111】

場合により、60℃でpH3.8での酸加水分解によりコレステリルータグを除去し、対応する三リン酸オリゴヌクレオチド(化合物5、図16)を得て、実施例3に記載したのと同様の工程を続ける。

【0112】

実施例5: 2'-O-メチル化の体系的な導入は、RIG-I選択性のRNAデュプレックスをもたらす

略称のリストおよびそれらの意味は、本出願書類の最後に見ることができる。

【0113】

身体自体の(body's own)RNAは、RNA機能(tRNAおよびrRNA)に影響を及ぼし得る複数の修飾により特徴付けられる。2'-O-メチル化は、したがって、RNAの免疫原性を変更することができる。選択性RIG-Iリガンドは、したがって、鎖あたり1つを超える2'-O-メチル化は含むべきでない。これらの特性は、適切にメチル化されたセンス鎖およびアンチセンス鎖の組み合わせにより、RNAデュプレックスに含まれる。

【0114】

2'-O-メチル化のスクリーニングにより、RIG-I選択性を導入する部位を決定した(図5)。OH-GFP2のセンス鎖(A)およびアンチセンス鎖(B)に関して、全体的な2'-O-メチル化スクリーニングを行なった。それぞれの位置を2'-O-メチル化によってそれぞれ修飾し、RIG-I、TLR7またはTLR8の刺激に用いた。RIG-Iの刺激に関しては、末梢血単核細胞(PBMC)を、クロロキンにより阻害し

、デュプレックスのリポフェクションにより刺激した。IFNaは、ELISAによって、刺激の20時間後に測定した。TLR7およびTLR8に関しては、関連のある一本鎖のみ刺激能をスクリーニングし、阻害していないPBMCを調べた。ポリ-L-アルギニンとの複合体形成により一本鎖をトランスフェクトし、そして、トランスフェクションの20時間後に、TLR7活性化についてはIFNaを、TLR8活性化についてはIL12p70を、ELISAによって測定した。センス鎖についてGFP2を用いた100%誘導は、RIG-Iについては3085 pg/mlのIFNaに相当し、TLR7については2758 pg/mlのIFNaに相当し、そして、TLR8については1206 pg/mlのIL12p70に相当した。GFP2のアンチセンス100%に関しては、RIG-Iについては2342 pg/mlのIFNaに相当し、TLR7については1831 pg/mlのIFNaに相当し、そして、TLR8については3018 pg/mlのIL12p70に相当した。2'-O-メチル化の位置依存的な導入の影響の概略を、表形式で示す(図5)。効果は、参照として非修飾鎖に対してノーマライズされる。白＝変化無し、黄＝免疫刺激の減少、赤＝免疫刺激無し、緑＝免疫刺激の増大。

【0115】

さらに、特定のメチル化が、デュプレックスRIG-Iを特異的かつ高活性にさせることを示し得る。

【0116】

図6：(A) RIG-I活性化に不活性のメチル化をアンチセンス鎖に組み合わせて、生じたデュプレックスを、クロロキンでブロックしたPBMCの刺激のために0, 8 μg/mlの濃度で用いた。刺激の20時間後に、ELISAによってIFNaを測定した。OH-GFP2の100%は、2729 pg/mlのIFNaと類似する。(B) センス鎖およびアンチセンス鎖で異なる組み合わせの2'-O-メチル化をハイブリダイズし、PBMCの刺激に用いた。RIG-Iの刺激については、PBMCをクロロキンにより阻害し、リポフェクタミンを用いてトランスフェクトし、TLR7およびTLR8については、非阻害のPBMCを用い、ポリ-L-アルギニンと複合体化したデュプレックスでトランスフェクトした。IVT-2に関する100%は、RIG-Iについては4861 pg/mlのIFNaに相当し、9.2 Sでの100%は、TLR7については1975 pg/mlのIFNaに相当し、TLR8については771 pg/mlのIL12p70に相当する。(A) および (B) は、3ドナーの平均±SEMを示す。

【0117】

実施例6：RNAを安定化する修飾の挿入によるRIG-I活性化の増大

siRNA療法の間、短いdsRNAフラグメントが体内に入れられ、体内でそれらは、標的細胞での特定のタンパク質の形成を阻害する。この形態の治療における問題は、siRNAデュプレックスが非常に不安定であることである。RNAは、標的細胞への輸送中に、血清中のエキソヌクレアーゼおよびエンドヌクレアーゼによって簡単に分解され得る。

【0118】

治療目的で用いられる外来性RNAのかなりの部分が、それが投与される対象の血清および細胞基質内で変性しているようである。

【0119】

それぞれの5'-PTO修飾が、デュプレックス免疫活性に対して好ましい効果を有すること、および、センス鎖およびアンチセンス鎖での5'-PTOの組み合わせが、活性を最大限に増加させることが、示され得る(s15 PTO/as3 PTOに対してs15/as3; 図7B)。したがって、RIG-I選択性リガンドにおけるRNA骨格のそのような修飾の使用は、有益であると考えられることができる。

【0120】

特に、5'-ホスホロチオエートが選択性デュプレックスの免疫原性を増大させることが、示され得る。

【0121】

図7：(A) PBMCをクロロキンでブロックし、 $0, 8 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でデュプレックスにより刺激した。刺激の20時間後、IFNaをELISAにより測定した。100%のIVT2は、 $6138 \text{ pg}/\text{ml}$ のIFNaに相当する。(B)示されたデュプレックスを滴定し、RIG-Iの刺激に用いた。PBMCをクロロキンでブロックし、リポフェクタミンを用いてデュプレックスをトランスフェクトした。刺激の20時間後に、上清中のIFNaをELISAによって決定した。100%の50nM 3P-GFP2は $16044 \text{ pg}/\text{ml}$ のIFNaに相当する。結果は4ドナーの平均±SEMを示す。

【0122】

治療用siRNAの開発において、血清安定性の問題は、別の種類の修飾により解決された：2'-フルオロ置換がRNAに組み込まれた場合、生じるRNAはヌクレアーゼ消化に関してより安定であった。しかしながら、RIG-I依存的な免疫刺激の場合は、2'-フルオロ置換は免疫刺激を活性化することができることが分かった。

【0123】

特に、5'-ホスホロチオエートは、選択性デュプレックスの免疫原性を増大させることが、示され得た。

【0124】

しかしながら、本発明によれば、選択された2'-フルオロ置換は、デュプレックスのRIG-I活性化能を増大させることが分かった。

【0125】

デュプレックスのセンス鎖(A)およびアンチセンス鎖(B)に関して、それぞれの位置を、2'-フルオロ置換により個々に修飾した(図8)。生じたデュプレックスを、 $0, 8 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で、PBMCの刺激に用いた。RIG-I活性化の評価については、PBMCをブロックしリポフェクタミンによりトランスフェクトして、TLR7およびTLR8の刺激については、PBMCをブロックせずに用いポリ-L-アルギニンと複合体化したデュプレックスでトランスフェクトした。刺激の20時間後に、ELISAによりサイトカインを測定した。センス鎖では、GFP2に関する100%は、RIG-Iについては $2407 \text{ pg}/\text{ml}$ のIFNa、TLR7については $3281 \text{ pg}/\text{ml}$ 、そして、TLR8については $1990 \text{ pg}/\text{ml}$ と、同様である。アンチセンス鎖に関しては、100%のGFP2は、RIG-Iについては $4512 \text{ pg}/\text{ml}$ のIFNaに相当し、TLR7については $4691 \text{ pg}/\text{ml}$ のIFNaに相当し、そして、TLR8については $1997 \text{ pg}/\text{ml}$ のIL-12p70に相当する。4ドナーの平均±SEMを示す。

【0126】

したがって、デュプレックスを、出来る限り活性で、その強い活性によってRNAの損失を補うことができるように確立することが、非常に重要であった。前節では、RNA修飾がどのように特定され得るかを、選択性PTO結合および2'-フルオロ置換によって示し、それらはデュプレックスの活性の増加をもたらした。

【0127】

実施例7：全ての修飾の組み合わせは、免疫原性の強いRIG-Iリガンドをもたらす

PTO結合または2'-フルオロ置換を、2'-O-メチル化と組み合わせて、選択性を増大することができるかどうか試すために、段階的にそれらをデュプレックスで組み合わせた。

【0128】

PBMCをクロロキンでブロックし、RIG-Iの刺激のために用いた。OH-GFP2に基づいて示差的に修飾したデュプレックスを用い、IFNaについて、ELISAによって、刺激の20時間後にRIG-I活性化を測定した(図9)。多重に修飾したデュプレックスを、OH-GFP2(A)または三リン酸化3P-GFP2(B)のいずれかと比較した。100%のIVT4は、 $21305 \text{ pg}/\text{ml}$ のIFNaに相当する。2ドナーの平均±SEMを示す。

【0129】

最初に、2'-Oメチル化 s15/as3 を、開始の RNA OH-GFP2 に加え (OH-GFP2 oMet15s/oMet3as、図9A)、そしてそれから、センスおよびアンチセンスでの5'-PTO修飾と比較した (OH-GFP2 PTO 5'、図9A)。次に、両方の型の修飾を、デュプレックス (OH-GFP2 oMet15/oMet3 PTO、図9A) と組み合わせた。最後に、センスの7位および23位およびアンチセンスの13位に3つの2'-フルオロ置換をさらに含むデュプレックスを生産した (OH-GFP2 oMet15/3-F23/13-PTO、図9A)。これらのRNA二本鎖の比較滴定は、多重修飾したオリゴOH-GFP2 oMet15/3-F23/13-PTOは、他のデュプレックスよりも活性はるかに勝ることを示した。その活性をさらに評価するために、デュプレックスを滴定し、その非修飾三リン酸デュプレックスと比較した (図9B)。修飾の挿入は、オリゴヌクレオチドの免疫活性がその三リン酸の免疫活性と比べて同等になるように、オリゴヌクレオチドを変えることを可能にすることが分かった (3P-GFP2、図9B)。

10

【0130】

実施例8：要素 (elements) は、3P-dsRNA系に移行可能である

RIG-I 選択性リガンドの開発全体は、配列 GFP2 の OH レベルで行なった。適切な修飾により、活性を著しく増大することができたが、リガンドの三リン酸化は、その活性をさらに増大させる。

【0131】

これまで、修飾およびそれぞれの位置を、3P-GFP2系にそのまま移行することが

20

【0132】

この疑問に対する答えを見つけるために、デュプレックス (全て、活性を増大する修飾を有する) を生産した：センス鎖の塩基15での2'-Oメチル化、塩基7および23での2'-フルオロ置換、および、5'末端および3'末端での2つのPTO結合 (2S2F、図10)。アンチセンス鎖では、塩基3での2'-Oメチル化、塩基13での2'-フルオロ置換、および、2つの5'-PTO結合を組み合わせた。センス鎖での2つの5'-PTOの結合が、三リン酸にそれらが近接することにより中断するのを避けるために、5'-PTOの無い多重修飾センス鎖をさらに生産した (1S2F、図10)。

【0133】

三リン酸化による活性増加の評価を可能にするために、5'-ヒドロキシルおよび5'-三リン酸 (OH vs 3P、図10) を用いてデュプレックスをそれぞれ生産し、PBMCに対する刺激滴定により互いに比較した。

30

【0134】

図10：(A) 三リン酸有りおよび無しで、多重修飾デュプレックスを合成した。用量滴定を、クロロキンでブロックしたPBMCに対して行なった。刺激の20時間後、IFN α について、免疫活性化をELISAにより測定した。4ドナーの平均土SEMを示す。(B) 滴定曲線に基づき、生物学的EC50値を計算した。

【0135】

多重修飾OHデュプレックスは、1つまたは2つのPTO末端の存在に関係なく、無修飾形態のOH-GFP2の活性限界に到達することができることが分かった (OH Multi 1S2F, OH Multi 2S2F, OH-GFP2, 図10)。センス鎖への5'-三リン酸のさらなる付加は、ヒドロキシル複合体と比較して活性をさらに5倍増加させた (3P-Multi 1S2F, 3P-Multi 2S2F, 図10)。

40

【0136】

結果として、様々な修飾により活性を増加させる効果は、オリゴヌクレオチドの三リン酸化と組み合わせることができると確認され、そして、これらはそこで好ましい影響を示すことも確認された。

【0137】

オリジナルのデュプレックスOH-GFP2の選択性レベルの漸進的増加 (2'-Oメ

50

チル化)、安定化する修飾による活性増加 (PTO 結合および 2'-フルオロ置換)、および、結合ポケットに対する親和力 (三リン酸)、により、強力な選択性 RIG-I リガンド (3P-Multi-1S2F) を定義することが可能となった。

【0138】

最後に、3P-dsRNA は、特定の修飾を挿入することにより、免疫を刺激する活性を最大限まで増加させて開発することができた。この免疫原性の増大は、薬剤の用量を低レベルに維持することを可能にし、および、薬剤の適用から細胞内に入るまでの期間に生じる RNA の損失を補うことを可能にする。

【0139】

【表 1】

RNAオリゴヌクレオチド

GFP2s oMet1	G _m ACGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU C UGCGACUGGGACUUCAAGUAGAA	
GFP2s oMet2	GA _m CGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU CU GCGACUGGGACUUCAAGUAGAA	
GFP2s oMet23	GACGCUGACCCUGAAGUUCAUCU _m U CUGCGACUGGGACUUCAAGUAGA A	N _m = 2'-OCH ₃
GFP2s oMet24	GACGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU _m CUGCGACUGGGACUUCAAGUAGAA	
GFP2as oMet1	G ACGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU C _m UGCGACUGGGACUUCAAGUAGAA	N _m = 2'-OCH ₃

10

20

GFP2as oMet2	GA CGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU CU _m CGACUGGGACUUCAAGUAGAA	
GFP2as oMet23	GACGCUGACCCUGAAGUUCAUCU U CUGCGACUGGGACUUCAAGUAGA _m A	
GFP2as oMet24	GACGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU CUGCGACUGGGACUUCAAGUAGAA _m	
OH-GFP2 multi oMet	G AC G CUGAC C C U GAAGUUCA UCUU C _m UG _m C _m GACUG _m G _m A _m CUUCAAGU _m AGAA _m	N _m = 2'-OCH ₃
s20/as12	GACGCUGACCCU GAAGUUCA _m UCUU CUGCGACUGGGA _m CUUCAAGU AGAA	N _m = 2'-OCH ₃
s20/as19	GACGCUGACCCUGAAGUUC A _m UCUU CUGCGACUGGGACUUCAAG _m U AGAA	N _m = 2'-OCH ₃
s15/as12	GACGCUGACCCU GAA _m GUUCAUCUU CUGCGACUGGGA _m CUU CAAGUAGAA	N _m = 2'-OCH ₃
s15/as19	GACGCUGACCCUGAA _m GUUC AUCUU CUGCGACUGGGACUU CAAG _m UAGAA	N _m = 2'-OCH ₃
s20/as3	GAC GCUGACCCUGAAGUUCA _m UCUU CUG _m CGACUGGGACUUCAAGU AGAA	N _m = 2'-OCH ₃
s15/as3	GAC GCUGACCCUGAA _m GUUCAUCUU CUG _m CGACUGGGACUU CAAGUAGAA	N _m = 2'-OCH ₃
s3/as12	GAC _m GCUGACCCU GAAGUUCAUCUU CUG CGACUGGGA _m CUUCAAGUAGAA	N _m = 2'-OCH ₃
s3/as19	GAC _m GCUGACCCUGAAGUUC AUCUU CUG CGACUGGGACUUCAAG _m UAGAA	N _m = 2'-OCH ₃
Fs1	G _F ACGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU C UGCGACUGGGACUUCAAGUAGAA	
Fs2	GA _F CGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU CU GCGACUGGGACUUCAAGUAGAA	
Fs23	GACGCUGACCCUGAAGUUCAUCU _F U CUGCGACUGGGACUUCAAGUAGA A	N _F = 2'-F
Fs24	GACGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU _F CUGCGACUGGGACUUCAAGUAGAA	
Fas1	G ACGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU C _F UGCGACUGGGACUUCAAGUAGAA	
Fas2	GA CGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU CU _F GCGACUGGGACUUCAAGUAGAA	
Fas23	GACGCUGACCCUGAAGUUCAUCU U CUGCGACUGGGACUUCAAGUAGA _F A	N _F = 2'-F
Fas24	GACGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU CUGCGACUGGGACUUCAAGUAGAA _F	

10

20

30

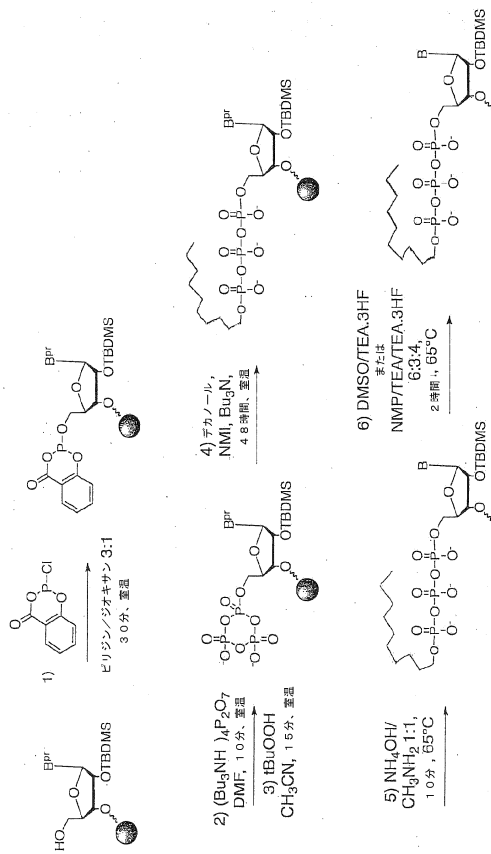
40

3P-GFP2	ppp-GACGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU CUGCGACUGGGACUUCAAGUAGAA	
s15/as3 PTO	GAC GCUGACCCUGAA _m GUUCAUC U U CUG _m CGACUGGGACUU CAAGUAG*A*A	* = PTO N _m = 2'-OCH ₃
s15 PTO/as3	G*A*C GCUGACCCUGAA _m GUUCAUCUU C U G _m CGACUGGGACUU CAAGUAGAA	* = PTO N _m = 2'-OCH ₃
s15 PTO/as3 PTO	G*A*C GCUGACCCUGAA _m GUUCAUC U U C U G _m CGACUGGGACUU CAAGUAG*A*A	* = PTO N _m = 2'-OCH ₃
OH-GFP2 PTO 5'	G*A*CGCUGACCCUGAAGUUCAUC U U C U GCGACUGGGACUUCAAGUAG*A*A	* = PTO
OH-GFP2 oMet15/oMet3 PTO	G*A*C GCUGACCCUGAA _m GUUCAUC U U C U G _m CGACUGGGACUU CAAGUAG*A*A	* = PTO N _m = 2'-OCH ₃
OH-GFP2 F23s/13as	GACGCUGACCCUG AAGUUCAUC _F U CUGCGACUGGGAC _F UUCAAGUAGA A	N _F = 2'-F
OH-GFP2oMet15/3 F23/13 PTO	G*A*C GCUG _F ACCCUG AA _m GUUCAUC U _F U C U G _m CGAC UGGGAC _F UU CAAGUAG*A *A	N _F = 2'-F * = PTO N _m = 2'-OCH ₃
3P-GFP2 1S2F	ppp-GAC GCUG _F ACCCUG AA _m GUUCAUC*U _F *U CUG _m CGAC UGGGAC _F UU CAAGUAG*A *A	N _F = 2'-F * = PTO N _m = 2'-OCH ₃
OH-GFP2 1S2F	GAC GCUG _F ACCCUG AA _m GUUCAUC*U _F *U CUG _m CGAC UGGGAC _F UU CAAGUAG*A *A	N _F = 2'-F * = PTO N _m = 2'-OCH ₃
3P-GFP2 2S2F	ppp-G*A*C GCUG _F ACCCUG AA _m GUUCAUC*U _F *U C U G _m CGAC UGGGAC _F UU CAAGUAG*A *A	N _F = 2'-F * = PTO N _m = 2'-OCH ₃
OH-GFP2 2S2F	G*A*C GCUG _F ACCCUG AA _m GUUCAUC*U _F *U C U G _m CGAC UGGGAC _F UU CAAGUAG*A *A	N _F = 2'-F * = PTO N _m = 2'-OCH ₃

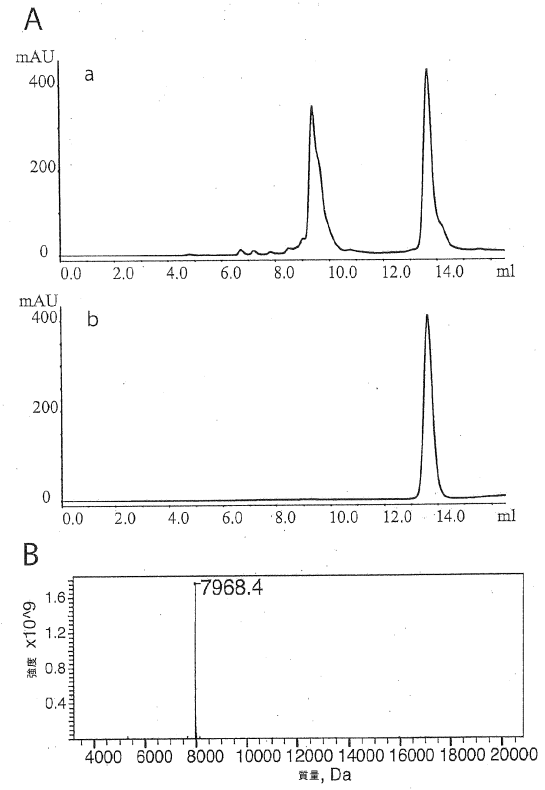
10

20

【図 1】



【図 2】



【図 3】

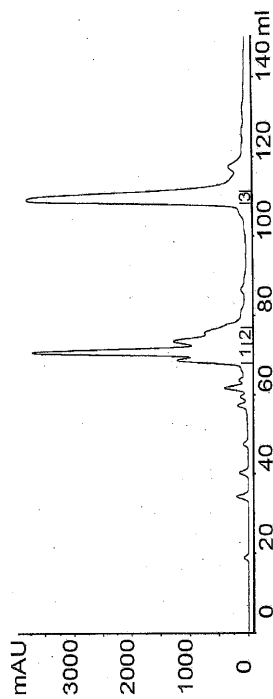
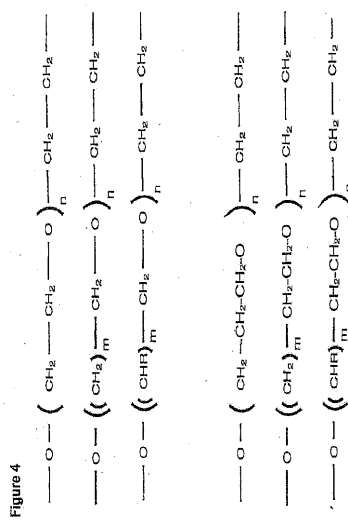
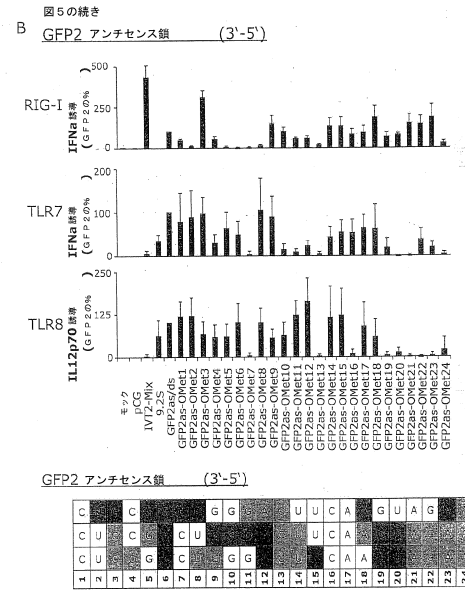


Figure 3

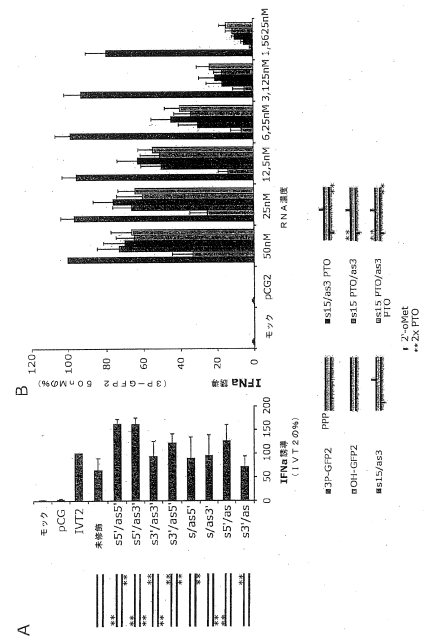
【図 4】



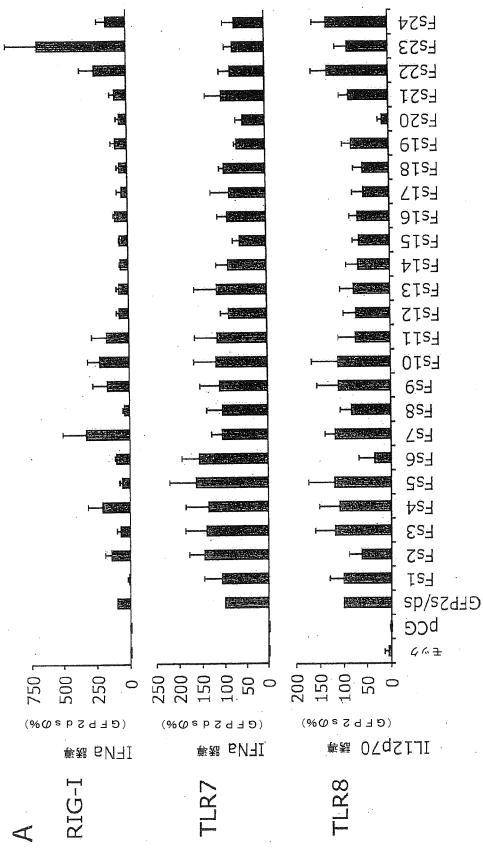
【图 5-2】



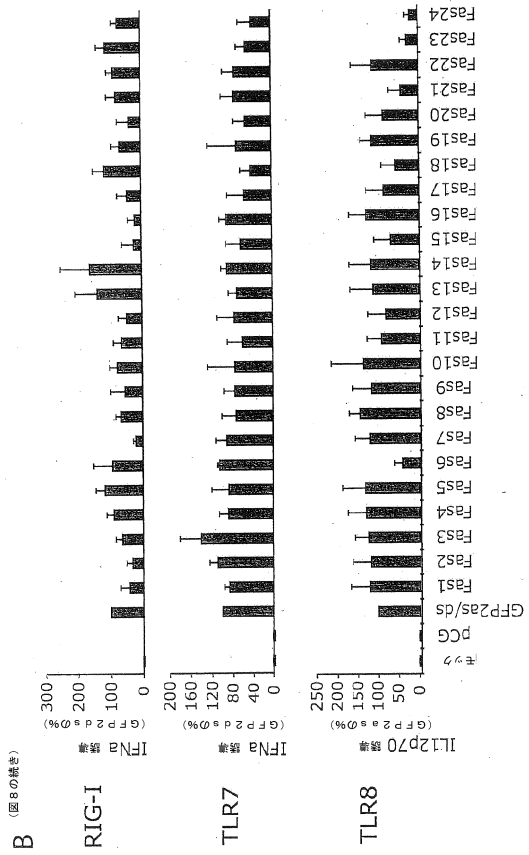
【图 7】



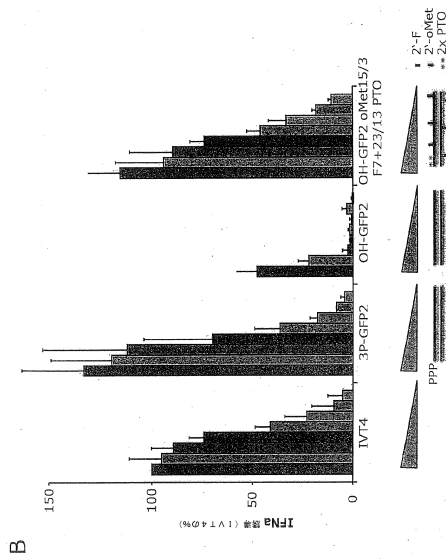
【図 8 - 1】



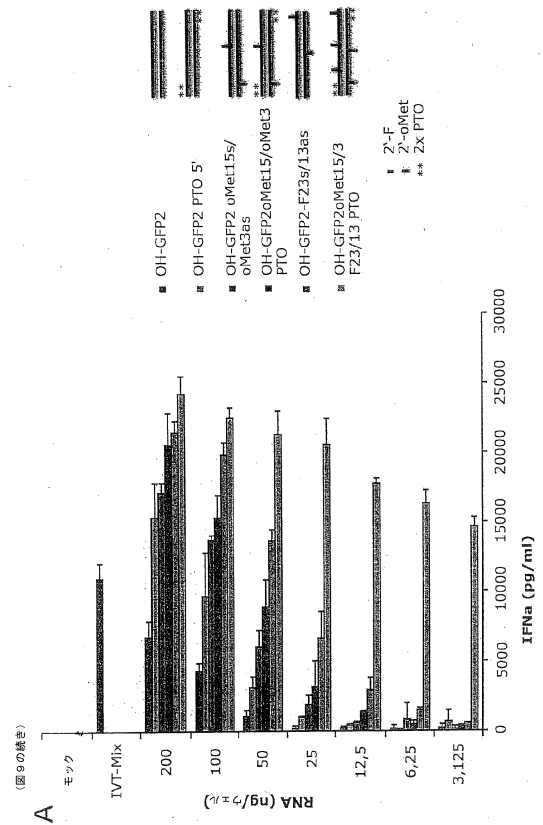
【図 8 - 2 1】



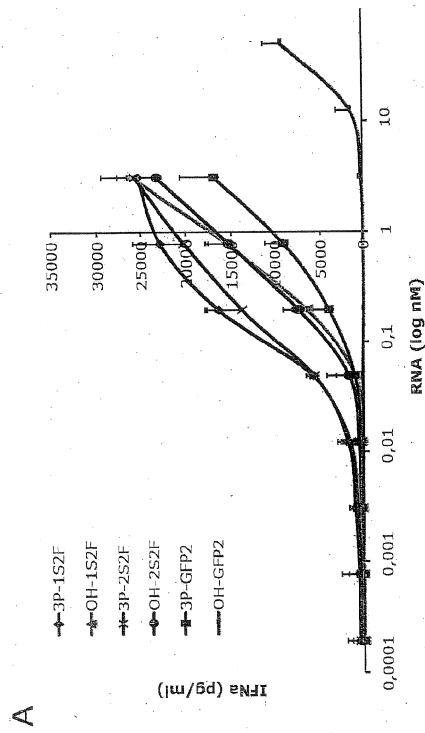
【図 6 - 1】



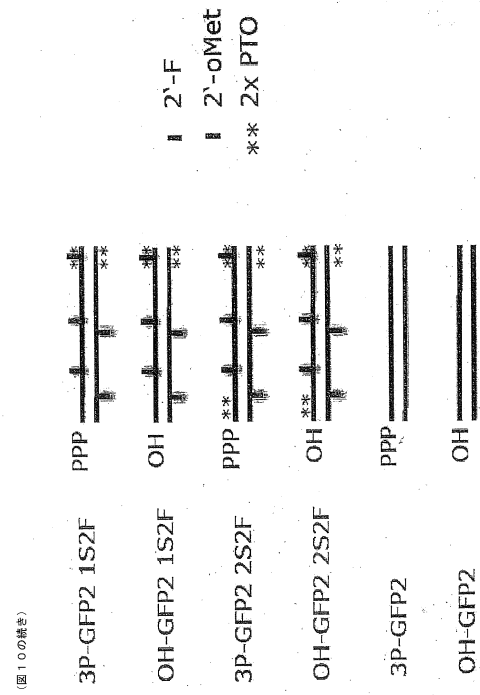
【図 6 - 2】



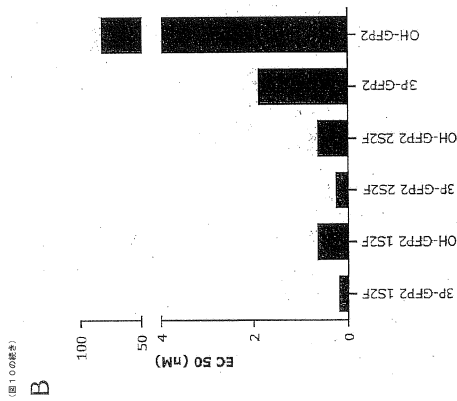
【図10-1】



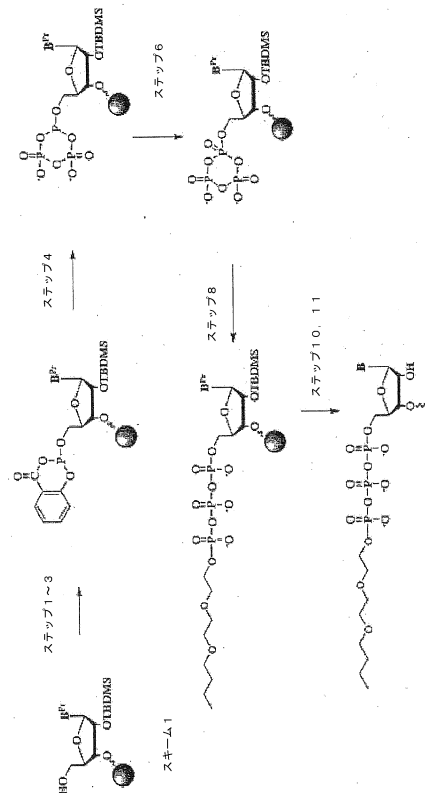
【図10-2】



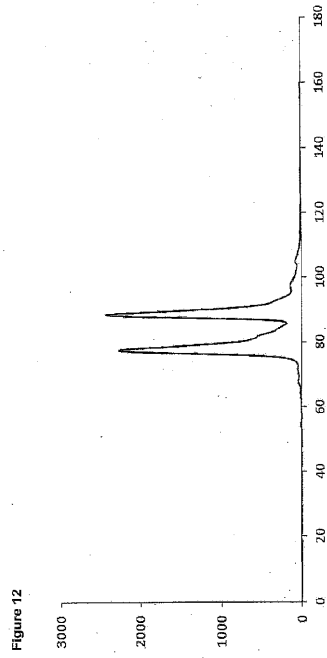
【図10-3】



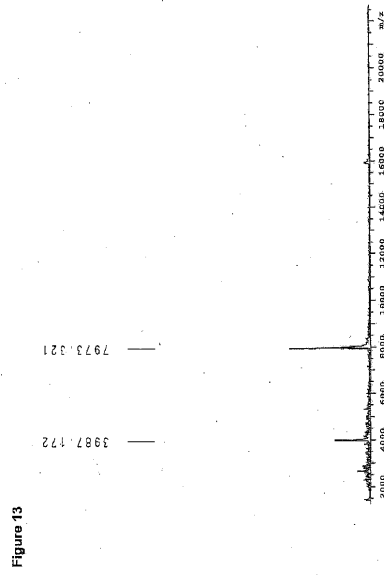
【図11】



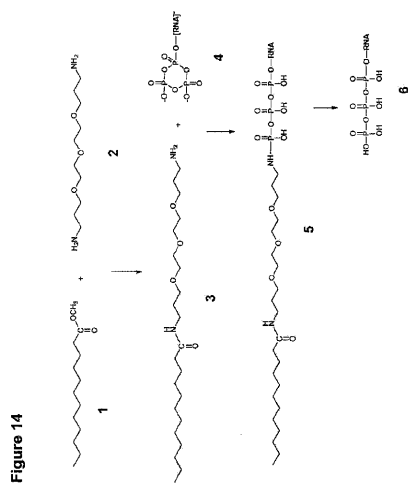
【図 1 2】



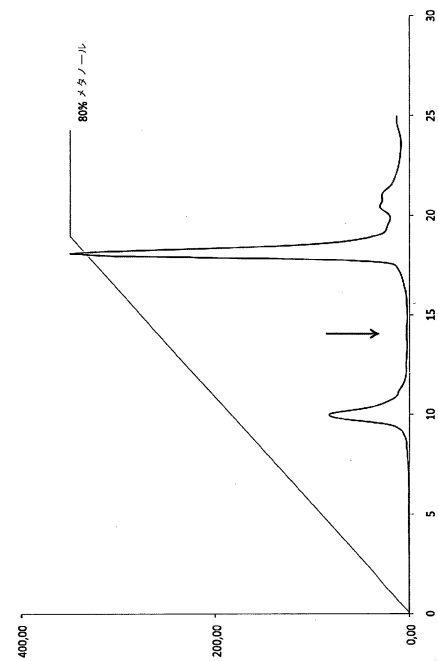
【図 1 3】



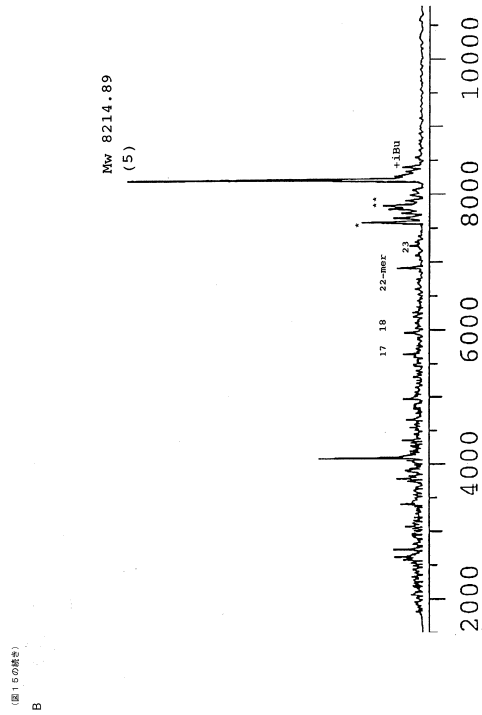
【図 1 4】



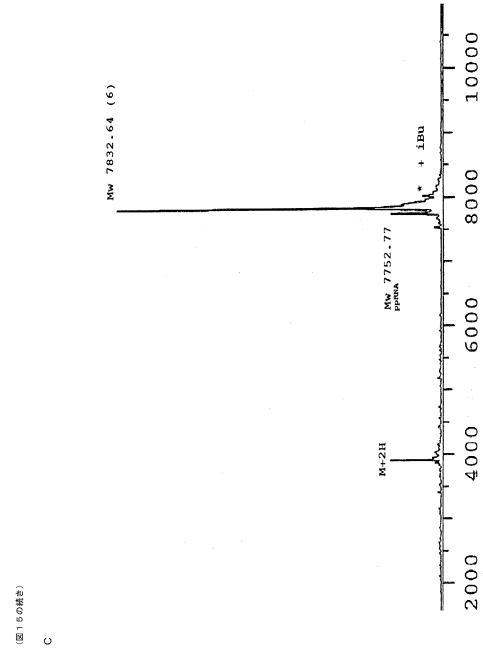
【図 1 5 - 1】



【図 15-2】



【図 15-31】



【図 16】

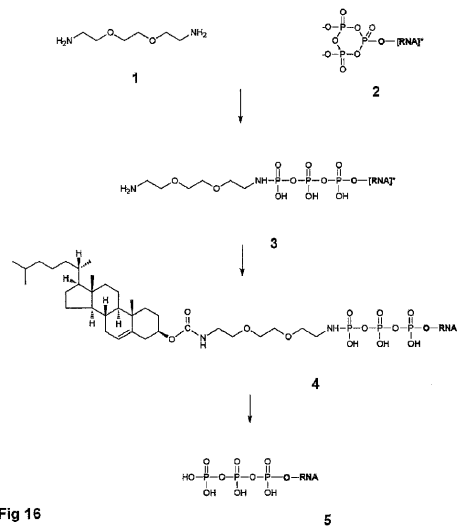
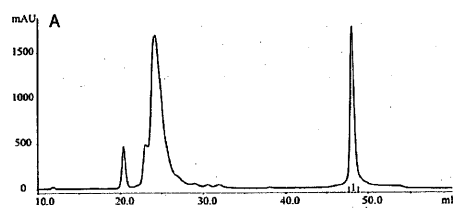
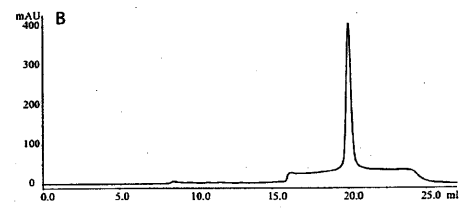


Fig 16

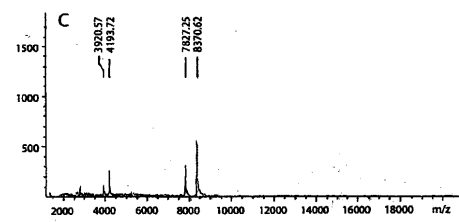
【図 17 A】



【図 17 B】



【図 17 C】



【配列表】

0006313768000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 ゴールデック マリオン
ドイツ連邦共和国 53111 ボン ヴェンツェルガッセ 44
- (72)発明者 ファン デン ブーン ジャスパー
ドイツ連邦共和国 53177 ボン ワースシュトラッセ 64
- (72)発明者 ルートヴィヒ ヤノシュ
ドイツ連邦共和国 37085 ゲッティンゲン トゥッカーマンヴェーク 6
- (72)発明者 シューベルト-ワグナー クリスティン
ドイツ連邦共和国 53721 ジークブルク ジャン-ドール-シュトラッセ 13

審査官 坂崎 恵美子

- (56)参考文献 特表2011-522526 (JP, A)
特表2010-500011 (JP, A)
特表2011-502979 (JP, A)
特表2012-502040 (JP, A)
特表2014-514920 (JP, A)
Immunity, 2009年, Vol.31, p.25-34
Organic Letters, 2010年, Vol.12, No.10, p.2190-2193
Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids, 2001年, Vol.20, No.4-7, p.1403-1409

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/09
C07H 21/02
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
Caplus/REGISTRY/MEDLINE/WPIDS/EMBASE/BIOSIS
(STN)