

(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2012-513953

(P2012-513953A)

(43) 公表日 平成24年6月21日(2012.6.21)

(51) Int.Cl.

C07H 15/04 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/09 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01)

F 1

C07H 15/04
C12N 15/00
C12N 15/00
A61K 48/00
A61K 31/7105

C SPF

ZNAG
A
A61K
A61K

テーマコード(参考)

4B024
4C057
4C084
4C086

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 178 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-529188 (P2011-529188)
(86) (22) 出願日 平成21年9月23日 (2009.9.23)
(85) 翻訳文提出日 平成23年5月23日 (2011.5.23)
(86) 國際出願番号 PCT/US2009/058084
(87) 國際公開番号 WO2010/039548
(87) 國際公開日 平成22年4月8日 (2010.4.8)
(31) 優先権主張番号 61/099,497
(32) 優先日 平成20年9月23日 (2008.9.23)
(33) 優先権主張国 米国(US)

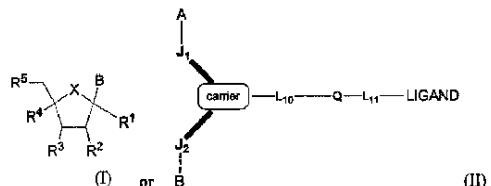
(71) 出願人 506336728
アルニラム ファーマスティカルズ インコーポレイテッド
ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O2142 ケンブリッジ サード ストリート 300
(74) 代理人 100073184
弁理士 柳田 征史
(74) 代理人 100090468
弁理士 佐久間 剛

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】付加環化を用いたモノマーおよびオリゴヌクレオチドの化学修飾

(57) 【要約】

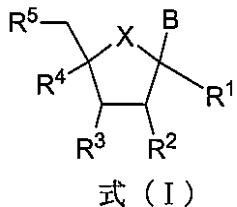
本発明は、式IまたはIIの化合物を特徴とする。一実施形態において、本発明はリガンドとオリゴヌクレオチドとを共役させるための化合物およびプロセスに関する。本発明は、さらに、ウイルス感染、細菌感染、寄生虫感染、癌、アレルギー、自己免疫疾病、免疫不全、および免疫抑制等の様々な疾患および疾病を治療するための方法に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式(I)の化合物、またはその薬学的に許容される塩もしくはプロドラッグであって、
【化1】



10

式中、

Xは、O、S、NR^NまたはCR^P₂であり、

Bは、水素、任意に置換された天然もしくは非天然核酸塩基、任意に置換されたトリアゾール、または任意に置換されたテトラゾール、NH-C(O)-O-C(CH₂B₁)₃、NH-C(O)-NH-C(CH₂B₁)₃であり、B₁は、独立してハロゲン、メシル酸塩、N₃、CN、任意に置換されたトリアゾールもしくは任意に置換されたテトラゾールであり、前記核酸塩基は、-J-リンカー-N₃、-J-リンカー-CN、-J-リンカー-CR⁸、-J-リンカー-シクロアルキン、-J-リンカー-R^L、-リンカー-Q-R^L、または-J-リンカー-Q-リンカー-R^Lによってさらに置換され、

R¹、R²、R³、R⁴、およびR⁵は、それぞれ独立してH、OR⁶、F、N(R^N)₂、N₃、CN、-J-リンカー-N₃、-J-リンカー-CN、-J-リンカー-CR⁸、-J-リンカー-シクロアルキン、-J-リンカー-R^L、-リンカー-Q-R^L、もしくは-J-リンカー-Q-リンカー-R^Lであり、

Jは存在しないか、O、S、NR^N、OC(O)NH、NHC(O)O、C(O)NH、NHC(O)、NHSO、NHSO₂、NHSO₂NH、OC(O)、C(O)O、O C(O)O、NHC(O)NH、NHC(S)NH、OC(S)NH、OP(N(R^P)₂)O、またはOP(N(R^P)₂)であり、

R⁶は、水素、ヒドロキシル保護基、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアリール、任意に置換されたシクロアルキル、任意に置換されたアラルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたヘテロアリール、ポリエチレングリコール(PEG)、リン酸塩、二リン酸塩、三リン酸塩、ホスホン酸塩、ホスホノチオエート、ホスホジチオエート、ホスホロチオエート、ホスホロチオレート、ホスホロジチオエート、ホスホロチオチオネート、リン酸ジエステル、リン酸トリエステル、活性化されたリン酸基、活性化された亜リン酸基、ホスホラミダイト、固体支持体、-P(Z¹)(Z²)-O-ヌクレオシド、-P(Z¹)(Z²)-O-オリゴヌクレオチド、-P(Z¹)(Z²)-式(I)、-P(Z¹)(O-リンカー-Q-リンカー-R^L)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(O-リンカー-R^L)-O-ヌクレオシド、-P(Z¹)(O-リンカー-N₃)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(O-リンカー-CN)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(O-リンカー-CR⁸)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(O-リンカー-Si)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(O-リンカー-CN)-O-オリゴヌクレオチド、P(Z¹)(O-リンカー-N₃)-O-オリゴヌクレオチド、P(Z¹)(O-リンカー-CR⁸)-O-オリゴヌクレオチド、P(Z¹)(O-リンカー-シクロアルキン)-O-オリゴヌクレオチド、-P(Z¹)(-リンカー-Q-リンカー-R^L)-O-ヌクレオシド、-P(Z¹)(-リンカ-N₃)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(-リンカー-CN)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(-リンカー-CR⁸)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(-リンカー-Si)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(-リンカー-CN)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(-リンカ-シ

20

30

40

50

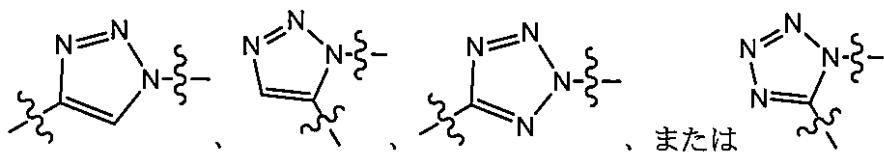
クロアルキン) - O - ヌクレオシド、 - P (Z¹) (- リンカー - Q - リンカー - R^L) - O - オリゴヌクレオチド、 - P (Z¹) (- リンカー - R^L) - O - オリゴヌクレオチド、 P (Z¹) (- リンカー - N₃) - O - オリゴヌクレオチド、 - P (Z¹) (- リンカー - CN) - O - オリゴヌクレオチド、 P (Z¹) (- リンカー - CR⁸) - O - オリゴヌクレオチド、または P (Z¹) (- リンカー - シクロアルキン) - O - オリゴヌクレオチドであり。

R^N は、 H、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたアリール、任意に置換されたシクロアルキル、任意に置換されたアラルキル、任意に置換されたヘテロアリール、またはアミノ保護基であり、

R^P は、独立して H、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたアリール、任意に置換されたシクロアルキル、または任意に置換されたヘテロアリールであり、

Q は、

【化 2】



であり、

R^L は、水素またはリガンドであり、

R⁸ は、N または CR⁹ であり、

R⁹ は、H、任意に置換されたアルキル、またはシリルであり、

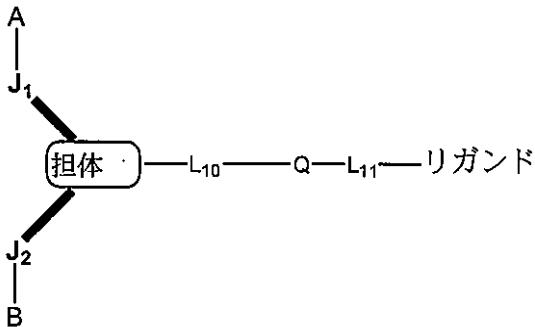
Z¹ および Z² は、それぞれ独立して O、S、または任意に置換されたアルキルであるが、但し、Q、-N₃、-CN、-CR⁸、任意に置換されたトリアゾール、または任意に置換されたテトラゾールが、前記化合物中に少なくとも 1 つ存在する、式(I)の化合物、またはその薬学的に許容される塩もしくはプロドラッグ。

【請求項 2】

式(II)の化合物、またはその薬学的に許容される塩もしくはプロドラッグであって

、

【化 3】



(II)

式中、A および B はそれぞれ独立して水素、保護基、任意に置換された脂肪族、任意に置換されたアリール、任意に置換されたヘテロアリール、ポリエチレンギリコール (PEG)、リン酸塩、ニリン酸塩、ミリン酸塩、ホスホン酸塩、ホスホノチオエート、ホスホノジチオエート、ホスホロチオエート、ホスホロチオレート、ホスホロジチオエート、ホスホロチオエート、リン酸ジエステル、リン酸トリエステル、活性化されたリン酸基、活性化された亜リン酸基、ホスホラミダイト、固体支持体、-P(Z¹)(Z²)-O-ヌクレオシド、または -P(Z¹)(Z²)-O-オリゴヌクレオチドであり、Z¹ および Z² はそれぞれ存在ごとに独立して O、S、または任意に置換されたアルキルであり

10

20

30

40

50

J_1 および J_2 は、それぞれ独立して O、S、NR^N、任意に置換されたアルキル、OC(O)NH、NHC(O)O、C(O)NH、NHC(O)、OC(O)、C(O)O、OC(O)O、NHC(O)NH、NHC(S)NH、OC(S)NH、OP(N(R^P)₂)O、またはOP(N(R^P)₂)であり、

【化4】

担体

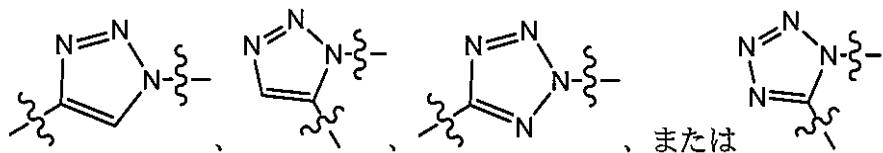
は、環式基または非環式基であり、

R^N は、H、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたアリール、任意に置換されたシクロアルキル、任意に置換されたアラルキル、任意に置換されたヘテロアリール、またはアミノ保護基であり、

R^P は、独立して H、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたアリール、任意に置換されたシクロアルキル、または任意に置換されたヘテロアリールであり、

Q は、

【化5】



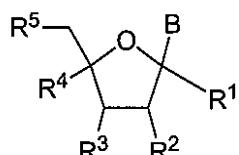
であり、

L₁₀ および L₁₁ は、独立して存在しないかまたはリンカーである、化合物またはその薬学的に許容される塩もしくはプロドラッグ。

【請求項3】

式(I II)で表され、

【化6】



式(III)

式中、R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、およびBは、請求項1すでに定義された通りである、請求項1に記載の化合物、またはその薬学的に許容される塩もしくはプロドラッグ。

【請求項4】

式(IV)で表され、

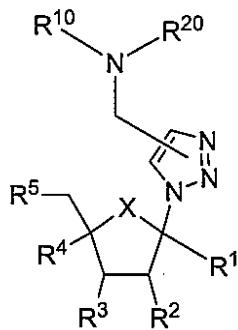
10

20

30

40

【化7】



式 (IV)

10

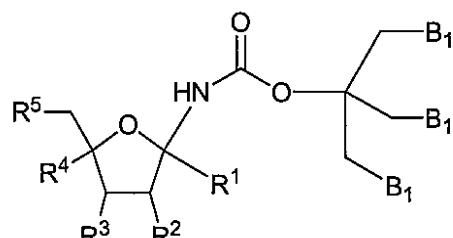
式中、 $R^{1\sim 0}$ および $R^{2\sim 0}$ は、それぞれ独立して水素、任意に置換された脂肪族、任意に置換されたアリール、または任意に置換されたヘテロアリールであり、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、および X は、請求項 1 すでに定義された通りである、請求項 1 に記載の化合物、またはその薬学的に許容される塩もしくはプロドラッグ。

【請求項 5】

式 (V) で表され、

【化8】

20



式 (V)

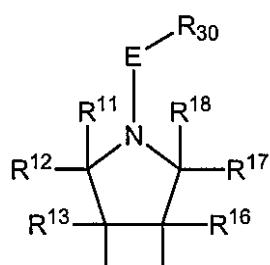
式中、 B_1 は、ハロゲン、 N_3 、 CN 、任意に置換されたトリアゾール、または任意に置換されたテトラゾールであり、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、および R^5 は請求項 1 で定義された通りである、請求項 1 に記載の化合物、またはその薬学的に許容される塩もしくはプロドラッグ。

30

【請求項 6】

式 (VI) の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくはプロドラッグであって、
【化9】

40



式 (VI)

式中、 E は存在しないか、 $C(O)$ 、 $C(O)O$ 、 $C(O)NH$ 、 $C(S)$ 、 $C(S)N$
H、 SO 、 SO_2 、または SO_2NH であり、

$R^{1\sim 1}$ 、 $R^{1\sim 2}$ 、 $R^{1\sim 3}$ 、 $R^{1\sim 4}$ 、 $R^{1\sim 5}$ 、 $R^{1\sim 6}$ 、 $R^{1\sim 7}$ 、および $R^{1\sim 8}$ は、それぞ

50

れ独立して H、 $\text{CH}_2\text{OR}^{\text{a}}$ 、または OR^{b} であり、

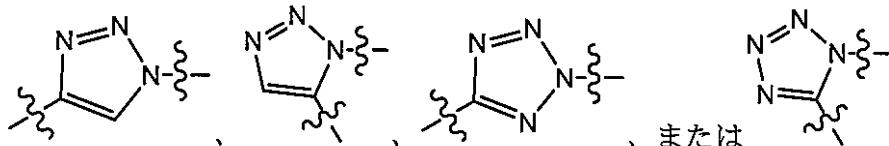
R^{a} および R^{b} は、それぞれ独立して水素、ヒドロキシル保護基、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアリール、任意に置換されたシクロアルキル、任意に置換されたアラルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたヘテロアリール、ポリエチレングリコール (PEG)、リン酸塩、二リン酸塩、三リン酸塩、ホスホン酸塩、ホスホノチオエート、ホスホジチオエート、ホスホロチオエート、ホスホロチオチオネート、リン酸ジエステル、リン酸トリエステル、活性化されたリン酸基、活性化された亜リン酸基、ホスホラミダイト、固体支持体、
 $-\text{P}(\text{Z}^1)(\text{Z}^2)-\text{O}-\text{ヌクレオシド}$ 、 $-\text{P}(\text{Z}^1)(\text{Z}^2)-\text{O}-\text{オリゴヌクレオチド}$ 、 $-\text{P}(\text{Z}^1)(\text{Z}^2)-\text{式(I)}$ 、 $-\text{P}(\text{Z}^1)(\text{O}-\text{リンカ}-\text{Q}-\text{リンカ}-\text{R}^{\text{L}})-\text{O}-\text{ヌクレオシド}$ 、 $-\text{P}(\text{Z}^1)(\text{O}-\text{リンカ}-\text{N}_3)-\text{O}-\text{ヌクレオシド}$ 、 $-\text{P}(\text{Z}^1)(\text{O}-\text{リンカ}-\text{CN})-\text{O}-\text{ヌクレオシド}$ 、 $-\text{P}(\text{Z}^1)(\text{O}-\text{リンカ}-\text{C}\text{R}^8)-\text{O}-\text{ヌクレオシド}$ 、 $-\text{P}(\text{Z}^1)(\text{O}-\text{リンカ}-\text{シクロアルキン})-\text{O}-\text{ヌクレオシド}$ 、 $-\text{P}(\text{Z}^1)(\text{O}-\text{リンカ}-\text{R}^{\text{L}})-\text{O}-\text{オリゴヌクレオチド}$ 、 $-\text{P}(\text{Z}^1)(\text{O}-\text{リンカ}-\text{Q}-\text{リンカ}-\text{R}^{\text{L}})-\text{O}-\text{オリゴヌクレオチド}$ 、 $-\text{P}(\text{Z}^1)(\text{O}-\text{リンカ}-\text{R}^{\text{L}})-\text{O}-\text{オリゴヌクレオチド}$ 、 $-\text{P}(\text{Z}^1)(\text{O}-\text{リンカ}-\text{N}_3)-\text{O}-\text{オリゴヌクレオチド}$ 、 $-\text{P}(\text{Z}^1)(\text{O}-\text{リンカ}-\text{CN})-\text{O}-\text{オリゴヌクレオチド}$ 、 $-\text{P}(\text{Z}^1)(\text{O}-\text{リンカ}-\text{C}\text{R}^8)-\text{O}-\text{オリゴヌクレオチド}$ 、 $-\text{P}(\text{Z}^1)(\text{O}-\text{リンカ}-\text{シクロアルキン})-\text{O}-\text{オリゴヌクレオチド}$ 、 $-\text{P}(\text{Z}^1)(\text{O}-\text{リンカ}-\text{R}^{\text{L}})-\text{O}-\text{ヌクレオシド}$ 、 $-\text{P}(\text{Z}^1)(\text{O}-\text{リンカ}-\text{N}_3)-\text{O}-\text{ヌクレオシド}$ 、 $-\text{P}(\text{Z}^1)(\text{O}-\text{リンカ}-\text{C}\text{R}^8)-\text{O}-\text{ヌクレオシド}$ 、 $-\text{P}(\text{Z}^1)(\text{O}-\text{リンカ}-\text{シクロアルキン})-\text{O}-\text{ヌクレオシド}$ 、 $-\text{P}(\text{Z}^1)(\text{O}-\text{リンカ}-\text{R}^{\text{L}})-\text{O}-\text{オリゴヌクレオチド}$ 、 $(\text{Z}^1)(\text{O}-\text{リンカ}-\text{R}^{\text{L}})-\text{O}-\text{オリゴヌクレオチド}$ 、 $-\text{P}(\text{Z}^1)(\text{O}-\text{リンカ}-\text{N}_3)-\text{O}-\text{オリゴヌクレオチド}$ 、 $-\text{P}(\text{Z}^1)(\text{O}-\text{リンカ}-\text{CN})-\text{O}-\text{オリゴヌクレオチド}$ 、 $-\text{P}(\text{Z}^1)(\text{O}-\text{リンカ}-\text{C}\text{R}^8)-\text{O}-\text{オリゴヌクレオチド}$ 、または $-\text{P}(\text{Z}^1)(\text{O}-\text{リンカ}-\text{シクロアルキン})-\text{O}-\text{オリゴヌクレオチド}$ であり、

$\text{R}^{3\ 0}$ は、 $-\text{リンカ}-\text{Q}-\text{リンカ}-\text{R}^{\text{L}}$ 、 $-\text{リンカ}-\text{R}^{\text{L}}$ 、または $\text{R}^{3\ 1}$ であり

、

Q は、

【化10】



であり、

R^{L} は、リガンド、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{CN}$ 、または $-\text{C}\text{R}^8$ であり、

R^8 は、 N または CR^9 であり、

R^9 は、 H 、任意に置換されたアルキル、またはシリルであり、

$\text{R}^{3\ 1}$ は、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}(\text{N}(\text{R}^{3\ 2}))_2(\text{CH}_2)_h\text{N}(\text{R}^{3\ 2})_2$ であり、

$\text{R}^{3\ 2}$ は、独立して H 、 $-\text{リンカ}-\text{Q}-\text{リンカ}-\text{R}^{\text{L}}$ 、 $-\text{リンカ}-\text{R}^{\text{L}}$ 、または $\text{R}^{3\ 1}$ であり、

h は、1 ~ 20 の整数であり、

Z^1 および Z^2 は、それぞれ独立して O 、 S 、または任意に置換されたアルキルであるが、

但し、 Q 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{CN}$ 、または $-\text{C}\text{R}^8$ が、前記化合物中に少なくとも 1 つ存在する、化合物またはその薬学的に許容される塩もしくはプロドラッグ。

10

20

30

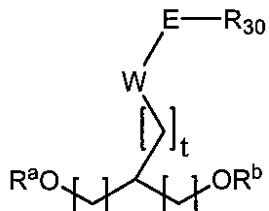
40

50

【請求項 7】

式(VIII)の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくはプロドラッグであって、

【化11】



式(VIII)

10

20

30

40

50

式中、

Wは存在しないか、O、S、およびN(R^N)であり、R^Nは、H、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたアリール、任意に置換されたシクロアルキル、任意に置換されたアラルキル、任意に置換されたヘテロアリール、またはアミノ保護基であり、

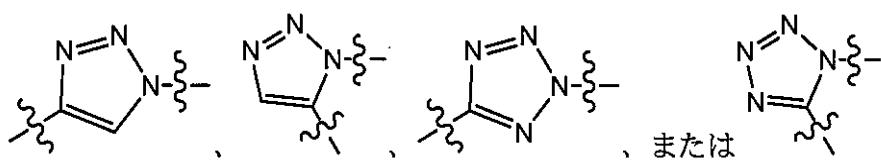
Eは存在しないか、C(O)、C(O)O、C(O)NH、C(S)、C(S)NH、SO、SO₂、またはSO₂NHであり、

R^aおよびR^bは、それぞれ独立して水素、ヒドロキシル保護基、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアリール、任意に置換されたシクロアルキル、任意に置換されたアラルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたヘテロアリール、ポリエチレングリコール(PEG)、リン酸塩、二リン酸塩、三リン酸塩、ホスホン酸塩、ホスホノチオエート、ホスホノジチオエート、ホスホロチオエート、ホスホロチオレート、ホスホジチオエート、ホスホロチオロチオネート、リン酸ジエステル、リン酸トリエ斯特ル、活性化されたリン酸基、活性化された亜リン酸基、ホスホラミダイト、固体支持体、-P(Z¹)(Z²)-O-ヌクレオシド、-P(Z¹)(Z²)-O-オリゴヌクレオチド、-P(Z¹)(Z²)-式(I)、-P(Z¹)(O-リンカー-Q-リンカー-R^L)-O-ヌクレオシド、-P(Z¹)(O-リンカー-N₃)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(O-リンカー-CN)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(O-リンカー-CR⁸)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(O-リンカー-シクロアルキン)-O-ヌクレオシド、-P(Z¹)(O-リンカー-R^L)-O-オリゴヌクレオチド、-P(Z¹)(O-リンカー-Q-リンカー-R^L)-O-オリゴヌクレオチド、-P(Z¹)(O-リンカー-R^L)-O-オリゴヌクレオチド、P(Z¹)(O-リンカー-N₃)-O-オリゴヌクレオチド、-P(Z¹)(O-リンカー-CN)-O-オリゴヌクレオチド、P(Z¹)(O-リンカー-CR⁸)-O-オリゴヌクレオチド、P(Z¹)(O-リンカー-シクロアルキン)-O-オリゴヌクレオチド、-P(Z¹)(-リンカー-Q-リンカー-R^L)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(-リンカー-R^L)-O-ヌクレオシド、-P(Z¹)(-リンカー-N₃)-O-オリゴヌクレオチド、-P(Z¹)(-リンカー-CN)-O-オリゴヌクレオチド、P(Z¹)(-リンcker-CR⁸)-O-オリゴヌクレオチド、またはP(Z¹)(-リンcker-シクロアルキン)-O-オリゴヌクレオチドであり、

R³⁰は、-リンcker-Q-リンcker-R^L、-リンcker-R^L、またはR³¹であり、

Qは、

【化12】



であり、

R^L はリガンドであり、

R⁸ は N または C R⁹ であり、

R⁹ は、H、任意に置換されたアルキル、またはシリルであり、

R^{3 1} は - C (O) CH (N (R^{3 2})₂) (CH₂)_h N (R^{3 2})₂ であり、

R^{3 2} は、独立して H、- リンカーニ - Q - リンカーニ - R^L、または R^{3 1} であり、

h は、1 ~ 20 の整数であり、

Z¹ および Z² は、それぞれ独立して O、S、または任意に置換されたアルキルであり

10

r、s、および t は、それぞれ独立して 0、1、2、または 3 であるが、

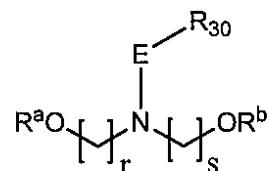
20

但し、Q、- N₃、- CN、または - CR⁸ は、前記化合物中に少なくとも 1 つ存在する、化合物またはその薬学的に許容される塩もしくはプロドラッグ。

【請求項 8】

式(VIII)の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくはプロドラッグであって、

【化13】



30

式 (VIII)

式中、E は存在しないか、C (O)、C (O) O、C (O) NH、C (S)、C (S) NH、SO、SO₂、または SO₂ NH であり、

R^a および R^b は、それぞれ独立して水素、ヒドロキシル保護基、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアリール、任意に置換されたシクロアルキル、任意に置換されたアラルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたヘテロアリール、ポリエチレンギリコール (PEG)、リン酸塩、二リン酸塩、三リン酸塩、ホスホン酸塩、ホスホノチオエート、ホスホジチオエート、ホスホロチオエート、ホスホロチオレート、ホスホロジチオエート、ホスホロチオロチオネート、リン酸ジエステル、リン酸トリエステル、活性化されたリン酸基、活性化された亜リン酸基、ホスホラミダイト、固体支持体、- P (Z¹) (Z²) - O - ヌクレオシド、- P (Z¹) (Z²) - O - オリゴヌクレオチド、- P (Z¹) (Z²) - 式(I)、- P (Z¹) (O - リンカーニ - Q - リンカーニ - R^L) - O - ヌクレオシド、- P (Z¹) (O - リンカーニ - N₃) - O - ヌクレオシド、P (Z¹) (O - リンカーニ - CN) - O - ヌクレオシド、P (Z¹) (O - リンカーニ - CR⁸) - O - ヌクレオシド、P (Z¹) (O - リンカーニ - シクロアルキン) - O - ヌクレオシド、- P (Z¹) (O - リンカーニ - R^L) - O - オリゴヌクレオチド、- P (Z¹) (O - リンカーニ - Q - リンカーニ - R^L) - O - オリゴヌクレオチド、- P (Z¹) (O - リンカーニ - R^L) - O - オリゴヌクレオチド、P (Z¹) (O - リンカーニ - N₃) - O - オリゴヌクレオチド、- P (Z¹) (O - リンカーニ - CN) - O - オリゴヌクレオチド

40

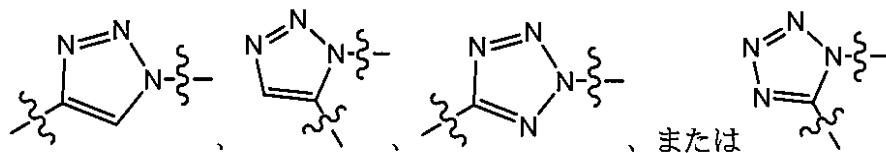
50

、 $P(Z^1)(O\text{-} \text{リンカ}-C R^8) - O\text{-オリゴヌクレオチド}$ 、 $P(Z^1)(O\text{-} \text{リンカ}-\text{シクロアルキン}) - O\text{-オリゴヌクレオチド}$ 、 $-P(Z^1)(-\text{リンカ}-Q\text{-} \text{リンカ}-R^\perp) - O\text{-ヌクレオシド}$ 、 $-P(Z^1)(-\text{リンカ}-N_3) - O\text{-ヌクレオシド}$ 、 $P(Z^1)(-\text{リンカ}-CN) - O\text{-ヌクレオシド}$ 、 $P(Z^1)(-\text{リンカ}-C R^8) - O\text{-ヌクレオシド}$ 、 $P(Z^1)(-\text{リンカ}-\text{シクロアルキン}) - O\text{-ヌクレオシド}$ 、 $-P(Z^1)(-\text{リンカ}-Q\text{-} \text{リンカ}-R^\perp) - O\text{-オリゴヌクレオチド}$ 、 $(Z^1)(-\text{リンカ}-R^\perp) - O\text{-オリゴヌクレオチド}$ 、 $P(Z^1)(-\text{リンカ}-N_3) - O\text{-オリゴヌクレオチド}$ 、 $-P(Z^1)(-\text{リンカ}-CN) - O\text{-オリゴヌクレオチド}$ 、 $P(Z^1)(-\text{リンカ}-C R^8) - O\text{-オリゴヌクレオチド}$ 、 または $P(Z^1)(-\text{リンカ}-\text{シクロアルキン}) - O\text{-オリゴヌクレオチド}$ であり、
10

R^{30} は、 $-\text{リンカ}-Q\text{-} \text{リンカ}-R^\perp$ 、 $-\text{リンカ}-R^\perp$ 、 または R^{31} であり

、 Q は、

【化14】



10

20

30

40

であり、

R^\perp はリガンドであり、

R^8 は N または CR^9 であり、

R^9 は、 H 、 任意に置換されたアルキル、 またはシリルであり、

R^{31} は、 $-C(O)CH(N(R^{32})_2)(CH_2)_hN(R^{32})_2$ であり、

R^{32} は、 H 、 $-\text{リンカ}-Q\text{-} \text{リンカ}-R^\perp$ 、 または R^{31} であり、

h は、 $1 \sim 20$ の整数であり、

Z^1 および Z^2 は、 それぞれ独立して O 、 S 、 または任意に置換されたアルキルであり

、

r および s は、 それぞれ独立して 0 、 1 、 2 、 または 3 であるが、

但し、 Q 、 $-N_3$ 、 $-CN$ 、 または $-CR^8$ は、 前記化合物中に少なくとも 1 つ存在する、 化合物またはその薬学的に許容される塩もしくはプロドラッグ。

【請求項9】

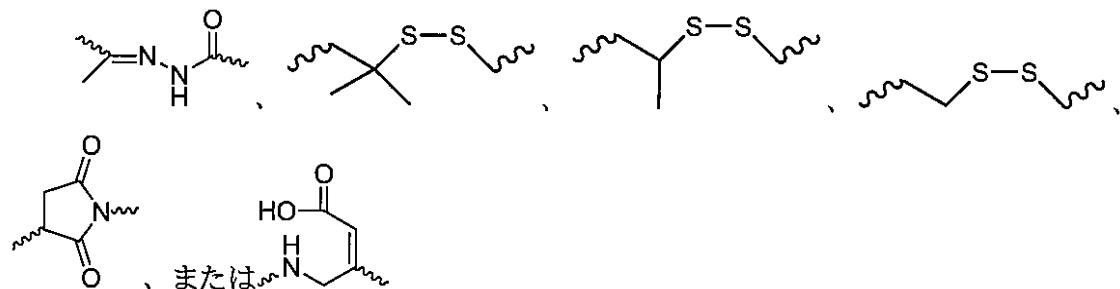
前記リガンドが、 甲状腺刺激ホルモン、 メラニン細胞刺激ホルモン、 レクチン、 糖タンパク質、 サーファクタントタンパク質A、 ムチン糖鎖、 多価ラクトース、 多価ガラクトース、 N -アセチル-ガラクトサミン、 N -アセチル-グルコサミン多価マンノース、 多価フコース、 グリコシル化ポリアミノ酸、 多価ガラクトース、 トランスフェリン、 ビスホスホネート、 ポリグルタミン酸塩、 ポリアスパラギン酸塩、 脂質、 コレスステロール、 ステロイド、 胆汁酸、 葉酸、 ビタミンB12、 ビオチン、 RGDPepチド、 RGDPepチド模倣薬、 およびアプタマーからなる群から選択される、 請求項1または2に記載の化合物。

【請求項10】

前記リンカーが、 構造 $[P-Q_1-R]_q-T$ で表され、 式中、

P 、 R 、 および T は、 それぞれ独立して存在しないか、 CO 、 NH 、 O 、 S 、 $OC(O)$ 、 $NHC(O)$ 、 CH_2 、 CH_2NH 、 CH_2O 、 $NHCH(R^a)C(O)$ 、 $-C(O)-CH(R^a)-NH-$ 、 $-C(O)-($ 任意に置換されたアルキル $) -NH-$ 、 $CH=N-O$ 、

【化15】



であり、

10

Q_1 は存在しないか、 $- (CH_2)_n -$ 、 $- C(R^{1\ 0\ 0})(R^{2\ 0\ 0}) (CH_2)_n$ 、 $- (CH_2)_n C(R^{1\ 0\ 0})(R^{2\ 0\ 0}) -$ 、 $- (CH_2 CH_2 O)_m CH_2 CH_2 NH -$ であり、

R^a は、H またはアミノ酸側鎖であり、

$R^{1\ 0\ 0}$ および $R^{2\ 0\ 0}$ は、それぞれ独立して H、 CH_3 、OH、SH、または $N(R^X)_2$ であり、

R^X は、独立して H、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、またはベンジルであり、

q は 0 ~ 20 の整数であり、

20

n は 1 ~ 20 の整数であり、

m は 0 ~ 50 の整数であるが、

但し、P、R、T、および Q_1 のうちの少なくとも 1 つは、前記リンカー中に存在する、請求項 1 または 2 に記載の化合物。

【請求項 1 1】

前記環式基は、ピロリジニル、ピラゾリニル、ピラゾリジニル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、ピペリジニル、ピペラジニル、[1,3]ジオキソラン、オキサゾリジニル、イソオキサゾリジニル、モルホリニル、チアゾリジニル、イソチアゾリジニル、キノキサリニル、ピリダジノニル、テトラヒドロフリル、およびデカリンからなる群から選択され、前記非環式基は、セリノールまたはジエタノールアミンの誘導体である、請求項 2 に記載の化合物。

30

【請求項 1 2】

請求項 1 ~ 1 1 のうちのいずれか 1 項に記載の化合物から調製される、オリゴヌクレオチド。

【請求項 1 3】

前記オリゴヌクレオチドは一本鎖オリゴヌクレオチドである、請求項 1 2 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 1 4】

前記一本鎖オリゴヌクレオチドは一本鎖 siRNA である、請求項 1 3 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 1 5】

前記一本鎖オリゴヌクレオチドはマイクロ RNA である、請求項 1 3 に記載のオリゴヌクレオチド。

40

【請求項 1 6】

前記オリゴヌクレオチドは二本鎖オリゴヌクレオチドである、請求項 1 2 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 1 7】

前記二本鎖オリゴヌクレオチドは二本鎖 siRNA である、請求項 1 6 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 1 8】

生物における標的特異性 RNA 干渉 (RNAi) を活性化する方法であって、

50

請求項 14 または 17 に記載の siRNA を前記生物に投与することを含み、前記 siRNA は、前記標的 mRNA の分解を発生するために十分な量で投与され、それによって前記生物における標的特異性 RNAi を活性化する、方法。

【請求項 19】

前記標的 mRNA は、ヒト疾患または疾患に関するか、または関与することが予想されるタンパク質の前記アミノ酸配列を特定する、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記疾患または疾患は、ウイルス感染、細菌感染、寄生虫感染、癌、アレルギー、自己免疫疾病、免疫不全、および免疫抑制から選択される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

請求項 1 ~ 11 のうちのいずれか 1 項に記載の化合物、および薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬組成物。

【請求項 22】

請求項 21 に記載される医薬組成物、および使用説明書を含む、薬学的キット。

【請求項 23】

脊椎動物におけるウイルス感染、細菌感染、寄生虫感染、腫瘍、多発性硬化症、アレルギー、自己免疫疾病、免疫抑制、および免疫不全からなる群から選択される疾患および/または疾患を防止および/または治療するための細菌 RNA の調製のための、請求項 12 に記載のオリゴヌクレオチドの使用。

【請求項 24】

標識付パッケージ中に請求項 12 に記載のオリゴヌクレオチドを含み、前記パッケージ上の前記標識が、前記オリゴヌクレオチドが少なくとも 1 つのウイルスに対して使用することができることを示す、キット。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【0001】

本出願は、2008年9月23日に出願された米国仮特許出願第 61/099,497 号の優先権の利益を主張する。

【技術分野】

【0002】

本発明は、「クリック」ケミストリーを用いたリガンドとオリゴヌクレオチドとの共役の分野に関する。

【背景技術】

【0003】

オリゴヌクレオチド化合物は、医学分野において重要な治療用途を有する。オリゴヌクレオチドは、特定の疾患に関する遺伝子をサイレンシングするために使用することができる。遺伝子サイレンシングは、翻訳を抑制することによってタンパク質の形成を防止する。重要なことに、遺伝子サイレンシング剤は、疾患に結び付けられるタンパク質の機能を抑制する、従来の小さな有機化合物に代わる有望なものである。siRNA、アンチセンス RNA、およびマイクロ RNA は、遺伝子サイレンシングによってタンパク質の形成を防止するオリゴヌクレオチドである。

【0004】

RNA 干渉または「RNAi」は、二本鎖 RNA (dsRNA) が遺伝子発現を遮断することができるという知見を説明するために、Fire および共同研究者によって最初に作り出された用語である（非特許文献 1 および 2）。短鎖 dsRNA は、脊椎動物を含む多くの生物における、遺伝子特異的な転写後サイレンシングを誘導し、遺伝子機能を調査するための新しい手段を提供している。RNAi は、サイレンシングトリガーと類似しているメッセンジャー RNA を破壊する RNA 誘導サイレンシング複合体 (RISC)、配列特異的な、多成分性ヌクレアーゼによって媒介される。RISC は、二本鎖 RNA トリガーに由来する短鎖 RNA (約 22 個のヌクレオチド) を含有することで知られているが

10

20

30

40

50

、この活性のタンパク質成分は、依然として不明である。

【0005】

s i R N A 化合物は様々な診断および治療目的に対する有望な薬剤である。s i R N A 化合物を遺伝子の機能を同定するために使用することができる。さらに、s i R N A 化合物は、病原遺伝子をサイレンシングすることによって作用する医薬品の新タイプとして膨大な可能性を提供する。研究は、中枢神経系疾病、炎症性疾患、代謝疾患、腫瘍学、感染症、および眼疾患を含む多くの疾病的治療のための干渉 R N A 治療薬を開発するために現在進行中である。

【0006】

多くの疾病（例えば、癌、造血障害、内分泌疾患、および免疫異常）は、特定の遺伝子もしくは遺伝子群の異常もしくは別の不要発現または活性から起こる。例えば、疾病は不正に制御した遺伝子発現、タンパク質の突然変異体の形の発現、またはウイルス性、細菌性、もしくは他の病原体由来の遺伝子の発現を介して生じることができる。R N A i 経路は、かかる遺伝子の不要発現を抑制するまたは低下するために使用することができる（非特許文献3および4）。

10

【0007】

さらなる態様において、本発明は対象における疾病または疾患を治療するための方法に関する。その方法は、疾病を発症しているまたは発症する危険性のある対象を同定すること、修飾したヌクレオチドまたは上記の結合のうちの1つ以上および薬学的に許容される担体を有する免疫的選択的 i R N A 剤を含有する医薬組成物を投与すること、を含む。対象は、上記のようにサイトカインまたは細胞表面受容体（例えば、T o l l 様受容体）等の成長因子の発現の増加に対して監視することによる等、免疫システム、例えば免疫賦活性または免疫制御反応に対する影響に対して、監視することができる。対象のサイトカインは、対象のT細胞、B細胞、単球、マクロファージ、樹状細胞、または天然キラー細胞から発現されたものであり得る。アッセイは、対象からの血液または血清試料を使用して実施することができる。疾病または疾患は、例えば臓器、組織、または骨髄移植を受けた患者において、免疫システムを刺激することが特に望ましくないものであり得る。別の代替案としては、疾病または疾患は、例えば癌またはウイルス性の疾病を患う患者において、免疫システムを刺激することが特に望ましいものであり得る。一実施形態において、対象は易感染性であり、ヌクレオチド修飾を含む i R N A 剤は、ヌクレオチド修飾を含まない i R N A 剤よりも大きい範囲で、細胞において免疫応答を刺激する。対象はヒト等の哺乳動物であり得る。

20

【0008】

好ましい実施形態では、免疫的選択 i R N A 剤の投与は、対象に存在する疾病または疾患の治療のためである。別の好ましい実施形態では、i R N A 剤の投与は予防的治療のためである。

30

【0009】

したがって、抗ウイルス性反応、特にI型のI F N 反応を刺激することが可能であるポリヌクレオチド／オリゴヌクレオチドを提供することが、本発明の目的である。ウイルス感染等の疾病および疾患の防止および治療のために、患者において抗ウイルス性反応、特にI型のI F N 産生を含むことが可能である医薬組成物を提供することが、本発明の別の目的である。腫瘍を治療するために医薬組成物を提供することが、本発明の目的でもある。

40

【0010】

疾病および／または疾患は、感染、腫瘍、アレルギー、多発性硬化症、および免疫異常を含むがこれらに限定されない。

【0011】

感染は、ウイルス感染、細菌感染、炭疽、寄生虫感染、真菌症、およびプリオン感染を含むがこれらに限定されない。

【0012】

50

ウイルス感染は、C型肝炎、B型肝炎、単純ヘルペスウイルス（HSV）、HIV-AIDS、ポリオウイルス、脳心筋炎ウイルス（EMCV）、および天然痘ウイルスによる感染を含むがこれらに限定されない。抑制するために標的にすることができる（+）鎖RNAウイルスの例は、ピコルナウイルス、カリシウイルス、ノダウイルス、コロナウイルス、アルテリウイルス、ラビウイルス、およびトガウイルスを含むがこれらに限定されない。ピコルナウイルスの例は、エンテロウイルス（ポリオウイルス1）、ライノウイルス（ヒトライノウイルス1A）、ヘパトウイルス（A型肝炎ウイルス）、カルジオウイルス（脳心筋炎ウイルス）、アフトウイルス（口蹄疫疾病ウイルスO）、およびパレコウイルス（ヒトエコーウイルス22）を含む。カリシウイルスの例は、ベジクロウイルス（ブタ水疱疹ウイルスウイルス）、ラゴウイルス（ウサギ出血病ウイルス）、「ノーウォーク様ウイルス」（ノーウォークウイルス）、「サッポロ様ウイルス」（サッポロウイルス）、および「E型肝炎様ウイルス」（E型肝炎ウイルス）を含む。ベータノダウイルス（シマアジ神経壊死症ウイルス）は、代表的なノダウイルスである。コロナウイルスは、コロナウイルス（トリ伝染性気管支炎ウイルス）およびトロウイルス（ベルンウイルス）を含む。アルテリウイルス（ウマ動脈炎ウイルス）は、代表的なアルテリウイルスである。トガウイルスは、アルファウイルス（シンドビスウイルス）およびルビウイルス（風疹ウイルス）を含む。最後に、ラビウイルスは、ラビウイルス（黄熱病ウイルス）、ペストウイルス（ウシウイルス性下痢症ウイルス）、およびヘパシウイルス（C型肝炎ウイルス）を含む。

10

20

30

ある実施形態では、ウイルス感染は、慢性B型肝炎、慢性C型肝炎、HIV感染、RSV感染、HSV感染、VSV感染、CMV感染、およびインフルエンザ感染から選択される。

【0013】

一実施形態において、防止されるおよび／または治療される感染は、ウイルスおよび／または細菌によって起きる上気道感染である。別の実施形態では、防止されるおよび／または治療される感染は鳥類インフルエンザである。

【0014】

細菌感染は、連鎖球菌、ブドウ球菌、大腸菌、ショードモナスを含むがこれらに限定されない。

【0015】

一実施形態において、細菌感染は細胞内細菌感染である。細胞内細菌感染は、マイコバクテリア（結核）、クラミジア、マイコプラズマ、リストリア、および黄色ブドウ球菌等の通性細胞内細菌等の、細胞内細菌による感染を指す。

【0016】

寄生虫感染は、蠕虫感染、特に腸管虫感染を含むがこれに限定されない。

【0017】

腫瘍は良性および悪性腫瘍（すなわち癌）の両方を含む。

【0018】

癌は、胆道癌、脳癌、乳癌、子宮頸癌、緜毛癌、結腸癌、子宮内膜癌、食道癌、胃癌、上皮内新生物、白血病、リンパ腫、肝癌、肺癌、メラノーマ、骨髄腫、神経芽細胞腫、口腔癌、卵巣癌、膵癌、前立腺癌、直腸癌、肉腫、皮膚癌、精巣癌、甲状腺癌、および腎癌を含むがこれらに限定されない。

40

【0019】

癌は、ヘアリー細胞白血病、慢性骨髓性白血病、皮膚T細胞白血病、慢性骨髓性白血病、非ホジキンリンパ腫、多発性骨髓腫、濾胞性リンパ腫、悪性メラノーマ、扁平上皮癌腫、腎細胞癌腫、前立腺癌腫、膀胱細胞癌腫、乳癌腫、卵巣癌腫、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、肝細胞癌腫、基底細胞癌、結腸癌腫、子宮頸部異形成、およびカボジ肉腫（AIDS関連および非AIDS関連）から選択される。

【0020】

50

【0021】

アレルギーは、呼吸アレルギー、接触アレルギー、および食物アレルギーを含むがこれらに限定されない。

【0022】

免疫異常は、自己免疫疾病、免疫不全、および免疫抑制を含むがこれらに限定されない。

【0023】

自己免疫疾病は、糖尿病、関節炎（関節リウマチ、若年性関節リウマチ、変形性関節症、乾癬性関節炎を含む）、多発性硬化症、脳脊髄炎、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス、自己免疫性甲状腺炎、皮膚炎（アトピー性皮膚炎および湿疹性皮膚炎を含む）、乾癬、シェーグレン症候群、クローン病、アフタ性潰瘍、虹彩炎、結膜炎、角結膜炎、潰瘍性大腸炎、喘息、アレルギー性喘息、皮膚エリテマトーデス、強皮症、腎炎、直腸炎、薬疹、ハンセン病逆転反応、らい性結節性紅斑、自己免疫性ブドウ膜炎、アレルギー性脳脊髄炎、急性壊死性出血性脳症、特発性両側進行性感音難聴、再生不良性貧血、赤芽球癆、特発性血小板減少症、多発性軟骨炎、ウェゲナー肉芽腫症、慢性活動性肝炎、スティーブンス・ジョンソン症候、突発性スプラー、扁平苔癬、グレーブス病、サルコイドーシス、原発性胆汁性肝硬、後部ブドウ膜炎、および間質性肺線維症を含むがこれらに限定されない。免疫不全は、自発性免疫不全、後天性免疫不全（AIDSを含む）、薬剤性免疫不全（移植に使用される免疫抑制剤および癌を治療するために使用される化学療法薬によって誘発されるもの等）、慢性血液透析によって引き起こされる免疫抑制、外傷、または外科手術を含むがこれらに限定されない。

10

20

30

【0024】

免疫抑制は、細胞毒性化学療法による骨髄抑制を含むがこれに限定されない。

【0025】

s i R N A は近年出版された発表された多数の例で、抗ウイルス性治療の可能性として非常に効果的であることが示された。ウイルス性ゲノムにおける標的に対して作られる s i R N A 分子は、インフルエンザ（非特許文献 5 ~ 7 ）、呼吸器多核体ウイルス（ R S V ）（非特許文献 8 ）、 B 型肝炎ウイルス（ H B V ）（非特許文献 9 ）、 C 型肝炎ウイルス（非特許文献 10 および 11 ）、および S A R S コロナウイルス（非特許文献 12 ）の動物モデルにおいてオーダー分だけによってウイルス性力価を劇的に削減する。

【0026】

これらのおよび他の核酸ベースのセラピーを使用するための機会は、非常に期待でき、現在の、従来の医療では扱われることができない医学的問題に対する解決法を提供する。疾病関連の遺伝子の数の増加の位置および配列は、同定され、様々な疾患に対する核酸ベースの治療の臨床試験は、現在進行中である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0027】

【非特許文献 1 】 F i r e e t a l . (1 9 9 8) N a t u r e 3 9 1 , 8 0 6 - 8 1 1

【非特許文献 2 】 E l b a s h i r e t a l . (2 0 0 1) G e n e s D e v . 1 5 , 1 8 8 - 2 0 0

40

【非特許文献 3 】 A g r a w a l e t a l . , M i c r o b i o l M o l B i o l R e v . , 2 0 0 3 , 6 7 , 6 5 7 - 6 8 5

【非特許文献 4 】 A l i s k y & D a v i d s o n , A m . J . P h a r m a c o g e n o m i c s , 2 0 0 4 , 4 , 4 5 - 5 1

【非特許文献 5 】 G e e t a l . , (2 0 0 4) P r o c . N a t l . A c d . S c i . U S A , 1 0 1 , 8 6 7 6 - 8 6 8 1

【非特許文献 6 】 T o m p k i n s e t a l . (2 0 0 4) P r o c . N a t l . A c d . S c i . U S A , 1 0 1 , 8 6 8 2 - 8 6 8 6

【非特許文献 7 】 T h o m a s e t a l . (2 0 0 5) E x p e r t O p i n . B i

50

o l . T h e r . 5 , 4 9 5 - 5 0 5

【非特許文献 8】Bitko et al. (2005) Nat. Med. 11, 50 - 55

【非特許文献 9】Morrisssey et al. (2005) Nat. Biotech. 23, 1002 - 1007

【非特許文献 10】Kapadia et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100, 2014 - 2018

【非特許文献 11】Wilson et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100, 2783 - 2788

【非特許文献 12】Li et al. (2005) Nat. Med. 11, 944 - 951

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0028】

様々なリガンドとオリゴヌクレオチドとの結合のために開発された異なる合成戦略にも関わらず、リガンドオリゴヌクレオチド共役体の合成は、決してわずかではなく、有機化学および固相合成における豊富な専門的知識を必要とする。実際の進展は多種多様のリガンドおよびオリゴヌクレオチドに対して利用することができる共役反応を使用することであろう。アルキンおよびアジ化物のHuisgen 1, 3双極性付加環化、「クリック」反応は、軽度の条件下で2つの分子の不可逆的な共役するために特に魅力的である。「クリック」ケミストリーは、オリゴヌクレオチドと炭水化物、ペプチドおよびタンパク質、蛍光標識および脂質とを共役するために効率的な戦略として近年浮上した。したがって、リガンドとオリゴヌクレオチドとの結合のために「クリック」ケミストリーに対して利用することができる新しい試薬の明確な必要性がある。本発明は、この重要な目的に向けられる。

20

【課題を解決するための手段】

【0029】

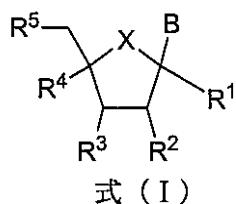
本発明は、「クリック」ケミストリーをとおして、様々なリガンドとオリゴヌクレオチド、例えばiRNA剤とを共役するために、リボース置換として使用できる、またはユニバーサル塩基として使用できる化合物に関する。これらの化合物は、本明細書において「クリック担体」と呼ばれる。

30

【0030】

例えば、本発明は、式(I)に示す構造を有する化合物を特徴とする。

【化1】



40

【0031】

式中、

XはO、S、NR^NまたはCR^P₂であり、

Bはそれぞれ存在ごとに独立して水素、任意に置換された天然または非天然核酸塩基、任意に置換されたトリアゾールまたは任意に置換されたテトラゾール、NH-C(O)-O-C(CH₂B₁)₃、NH-C(O)-NH-C(CH₂B₁)₃であり、B₁はハロゲン、メシリ酸塩、N₃、CN、任意に置換されたトリアゾールまたは任意に置換されたテトラゾールであり、

R¹、R²、R³、R⁴、およびR⁵はそれぞれ存在ごとに独立してH、OR⁶、F、

50

$N(R^N)_2$ 、 N_3 、 CN 、-J-リンカー- N_3 、-J-リンカー-CN、-J-リンカ-CR⁸、-J-リンカー-シクロアルキン、-J-リンカー-R_L、または-J-リンカー-Q-リンカー-R_Lであり、

Jは存在しないか、O、S、NR^N、OC(O)NH、NHC(O)O、C(O)NH、NHC(O)、NHSO、NHSO₂、NHSO₂NH、OC(O)、C(O)O、OC(O)O、NHC(O)NH、NHC(S)NH、OC(S)NH、OP(N(R^P)₂)O、もしくはOP(N(R^P)₂)であり、

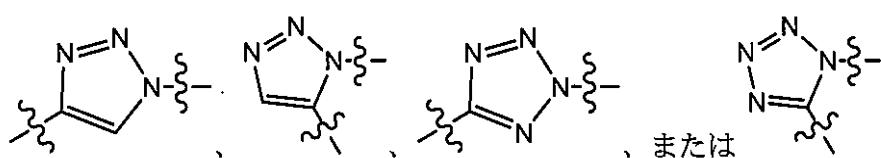
R⁶はそれぞれ存在ごとに独立して水素、ヒドロキシル保護基、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアリール、任意に置換されたシクロアルキル、任意に置換されたアラルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたヘテロアリール、ポリエチレングリコール(PEG)、リン酸塩、二リン酸塩、三リン酸塩、ホスホン酸塩、ホスホノチオエート、ホスホノジチオエート、ホスホロチオエート、ホスホロチオレート、ホスホロジチオエート、ホスホロチオロチオネート、リン酸ジエステル、リン酸トリエステル、活性化されたリン酸基、活性化された亜リン酸基、ホスホラミダイト、固体支持体、-P(Z¹)(Z²)-O-ヌクレオシド、-P(Z¹)(Z²)-O-オリゴヌクレオチド、-P(Z¹)(Z²)-式(I)、-P(Z¹)(O-リンカー-Q-リンカー-R_L)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(O-リンカー-R_L)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(O-リンカー-N₃)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(O-リンカー-CN)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(O-リンカー-CR⁸)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(O-リンカー-シクロアルキン)-O-ヌクレオシド、-P(Z¹)(O-リンカー-Q-リンカー-R_L)-O-オリゴヌクレオチド、P(Z¹)(O-リンカー-R_L)-O-オリゴヌクレオチド、P(Z¹)(O-リンカー-N₃)-O-オリゴヌクレオチド、-P(Z¹)(O-リンカー-CN)-O-オリゴヌクレオチド、P(Z¹)(O-リンカー-CR⁸)-O-オリゴヌクレオチド、P(Z¹)(O-リンカー-シクロアルキン)-O-オリゴヌクレオチド、-P(Z¹)(-リンカー-Q-リンカー-R_L)-O-ヌクレオシド、-P(Z¹)(-リンカー-N₃)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(-リンカー-CN)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(-リンカー-CR⁸)-O-ヌクレオシド、-P(Z¹)(-リンカー-シクロアルキン)-O-ヌクレオシド、-P(Z¹)(-リンカー-Q-リンカー-R_L)-O-オリゴヌクレオチド、-P(Z¹)(-リンカー-R_L)-O-オリゴヌクレオチド、P(Z¹)(-リンcker-N₃)-O-オリゴヌクレオチド、-P(Z¹)(-リンcker-CN)-O-オリゴヌクレオチド、P(Z¹)(-リンcker-CR⁸)-O-オリゴヌクレオチド、またはP(Z¹)(-リンcker-シクロアルキン)-O-オリゴヌクレオチドであり、

R^Nはそれぞれ存在ごとに独立してH、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたアリール、任意に置換されたシクロアルキル、任意に置換されたアラルキル、任意に置換されたヘテロアリール、またはアミノ保護基であり、

R^Pはそれぞれ存在ごとに独立してH、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたアリール、任意に置換されたシクロアルキル、または任意に置換されたヘテロアリールであり、

Qは存在しないか、またはそれ存在ごとに独立して

【化2】



であり、

R^L は水素またはリガンドであり、

R^8 は N または CR^9 であり、

R^9 は H、任意に置換されたアルキル、もしくはシリルであり、

Z^1 および Z^2 はそれぞれ存在ごとに独立して O、S、または任意に置換されたアルキルである。

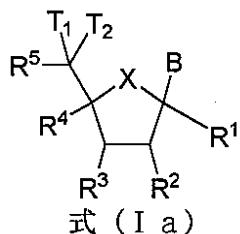
但し、B が未置換の天然塩基である場合、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、および R^5 のうちの少なくとも 1 つは、-J-リンカー-Q-リンカー-R L 、または -リンカー-Q-R L である。

【0033】

10

一態様において、本発明は、式(Ia)に示す構造を有する化合物を特徴とする。

【化3】



20

【0034】

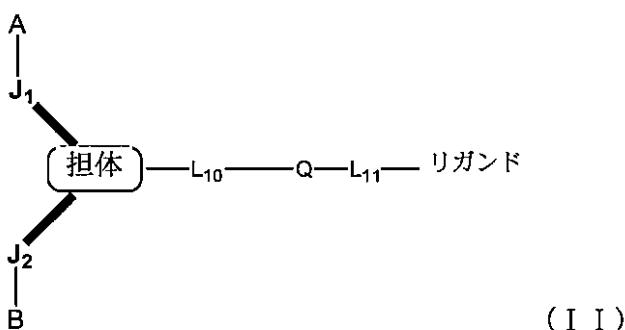
式中、 T_1 および T_2 はそれぞれ独立して H、 C_1-C_9 アルキル、 C_2-C_9 アルケニル、 C_2-C_9 アルキニル、置換した C_1-C_9 アルキル、置換した C_1-C_9 アルケニルおよび置換した C_2-C_9 アルキニルであり、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、X、および B は以前に定義された通りである。

【0035】

30

一実施形態において、本発明は、式(II)に示す構造を有する化合物を特徴とする。

【化4】



【0036】

40

A および B はそれぞれ存在ごとに独立して水素、保護基、任意に置換された脂肪族、任意に置換されたアリール、任意に置換されたヘテロアリール、ポリエチレングリコール (PEG)、リン酸塩、ニリン酸塩、三リン酸塩、ホスホン酸塩、ホスホノチオエート、ホスホジチオエート、ホスホロチオエート、ホスホロチオレート、ホスホロジチオエート、ホスホロチオロチオネート、リン酸ジエステル、リン酸トリエステル、活性化されたリン酸基、活性化された亜リン酸基、ホスホラミダイト、固体支持体、-P(Z¹)(Z²)-O-スクレオシド、または-P(Z¹)(Z²)-O-オリゴスクレオチドであり、 Z^1 および Z^2 はそれぞれ存在ごとに独立して O、S、または任意に置換されたアルキルであり、

J₁ および J₂ は、独立して O、S、NR^N、任意に置換されたアルキル、OC(O)NH、NHC(O)O、C(O)NH、NHC(O)、OC(O)、C(O)O、OC(O)

50

O)O、NHC(O)NH、NHC(S)NH、OC(S)NH、OP(N(R^P)₂)
O、またはOP(N(R^P)₂)であり、

【化5】

担体

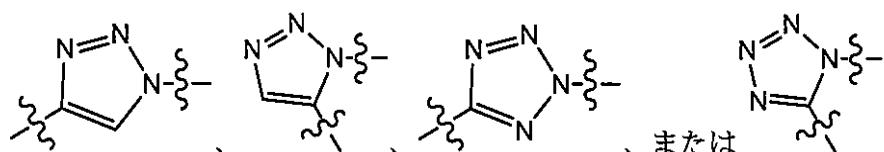
【0037】

は、環式基または非環式基であり、好ましくは、環式基はピロリジニル、ピラゾリニル、ピラゾリジニル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、ピペリジニル、ピペラジニル、[1、3]ジオキソラン、オキサゾリジニル、イソオキサゾリジニル、モルホリニル、チアゾリジニル、イソチアゾリジニル、キノキサリニル、ピリダジノニル、テトラヒドロフリル、およびデカリンから選択され、好ましくは、非環式基はセリノール骨格またはジエタノールアミン骨格から選択され、

10

Qはそれぞれ存在ごとに独立して

【化6】



20

【0038】

であり、

L₁₀およびL₁₁は独立して存在しないかまたはリンカーである。

【0039】

本発明の別の実施形態では、薬学的に許容される担体または賦形剤と組み合わせて、治療上の本発明のiRNA剤の有効量を含む、開示された医薬組成物が存在する。本発明のさらに別の実施形態では、化合物を調製するためのプロセスを記載する。

【図面の簡単な説明】

【0040】

30

【図1】一本鎖オリゴヌクレオチドの代表的なクリック-共役体の概略図。5'末端との複数の共役および複数のものの全ての組み合わせは、リンカー骨格設計で可能であり、したがってリガンドが結合する。化学を選択することおよび共役の順序で、ヘテロ-リガンド（別々のリガンドまたはハイブリッドリガンド）共役が行われる。

【図2】二本鎖オリゴヌクレオチドの代表的なクリック-共役体の概略図。5'末端との複数の共役および複数のものの全ての組み合わせは、リンカー骨格設計で可能であり、したがってリガンドが結合する。化学を選択することおよび共役の順序で、ヘテロ-リガンド（別々のリガンドまたはハイブリッドリガンド）共役が行われる。

【図3】銅を含まないクリックケミストリーに対する環ひずみアルキン。

【図4】クリックケミストリーを使用した、リガンドとアンタゴm i r、アンチセンスオリゴヌクレオチド、およびsiRNAとの3'-の共役。使用されるアルキンは、鎖式または環状制約される。銅がない場合にクリック反応に対して使用された環状制約されたもの。経路1。リガンド-アジ化物と固体支持体の結合後、固相合成、脱保護、およびオリゴヌクレオチドの精製。経路2。リガンド-アジ化物と固体結合のオリゴヌクレオチドとの共役後、脱保護および精製。経路3。合成後のリガンド-アジ化物とオリゴヌクレオチドを有するアルキンとの共役。相補鎖を用いたアニーリングは、siRNAを与える。共役する一本鎖の直接使用は、共役体のアンタゴm i rおよびアンチセンスの適用を可能にする。Lはリンカー骨格であり、XはOまたはSであり、Rはリガンドであり、pは環炭素の置換の有無に関わらずゼロまたは3~8である。環は、N、S、O、SO、SO₂等のヘテロ原子を有することもできる。環炭素上の置換は、QがOH、NH₂、NHE、

40

50

NMe₂、COOMe、NH(アルキル)、パーフルオロ置換である場合、F、OMe、COQとの单一または双生児のジ置換である。環状アルキンのサイトテザリングは、Organic Letters, 2008, 10, 3097-99においてSlettenとBertozziによって説明される窒素原子であり得る。アルキンと固体結合したアジ化物との逆共役は、別のアプローチである、または逆共役はポスト合成を介して達成することができる。いくつかの場合において、他の位置異性体は、入ってくるアジ化物の性質およびアルキンの性質に依存する主要産物または唯一の産物として期待される。別の場合において、産物は同じ反応から形成することができる2つの位置選択的産物の等モル混合物であり得る。銅を含まないクリックケミストリーのための環ひずみ環状アルキンを使用するために関連した参考は、Johnson et al., Copper-free click chemistry for the in situ cross-linking of photodegradable star polymers. Chemical Communications, 2008, (26), 3064-3066; Sletten and Bertozzi in Organic Letters, A hydrophilic azacyclooctyne for Cu-free click chemistry, 2008, 10, 3097-99; Baskin et al., Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2007, 104 (43), 16793; Agard et al., A comparative study of bioorthogonal reactions with azides., ACS Chem. Biol., 2006, 1, 644、およびChen, Fish 'n clicks, Nature Chemical Biology, 2008, 4 (7), 391-92、を含む。

【図5】クリックケミストリーを使用した、リガンドとアンタゴmir、アンチセンスオリゴヌクレオチド、およびsiRNAとの5'-の共役。使用されるアルキンは、環状制約の鎖式である。銅がない場合にクリック反応に対して使用された環状制約されたもの。経路1。リガンド-アジ化物と固体支持体結合のオリゴヌクレオチドとの共役後、脱保護およびオリゴヌクレオチドの精製。経路2。合成後のリガンド-アジ化物とオリゴヌクレオチドを有するアルキンとの共役。相補鎖を含むアニーリングは、siRNAを与える。共役する一本鎖の直接使用は、共役体のアンタゴmirおよびアンチセンスの適用を可能にする。詳細な説明について図4を参照。

【図6】脱塩基リンカーおよびクリックケミストリーを使用してリガンドとアンタゴmir、アンチセンスオリゴヌクレオチド、およびsiRNAとの共役。脱塩基リンカーおよびクリックケミストリーを使用してリガンドとアンタゴmir、アンチセンスオリゴヌクレオチド、およびsiRNAとの共役。Rは、リガンドであり、使用されるアルキンは、環状制約の鎖式である。銅がない場合にクリック反応に対して使用された環状制約されたもの。詳細については、図4のレジェンドを参照。

【図7】siRNAのリガンド結合点を表す概略図。

【図8】オリゴヌクレオチドのリガンド結合点を表す概略図。

【図9】クリックケミストリーによるリガンドとオリゴヌクレオチドの結合のための共役戦略。

【図10】クリックケミストリーに対する脱塩基リンカー。

【図11】クリックケミストリーに対する脱塩基リンカー。

【図12】クリックケミストリーによるリガンド共役のHPLC解析。

【図13】精製したクリックケミストリー共役のHPLC解析

【図14】アジド標識したオリゴヌクレオチドを表す概略図。

【図15】クリックケミストリーによってアジド標識したオリゴヌクレオチドと共に6-カルボキシフルオセイン-プロパルギルアミンを表す概略図。

【図16】6-カルボキシフルオセイン-プロパルギルアミンとアジ化物標識したオリゴヌクレオチドとの間のクリックケミストリー反応の粗産物のLC-MS解析。

10

20

30

30

40

50

【図17】RNAアルキンとの遊離スペルミンアジ化物のクリック反応の逆相HPLC解析。

【図18】アルキンとBoc保護スペルミン・アジ化物との共役の粗い反応混合物の逆相HPLC(a)およびLC-MS解析。

【図19】表6の修飾したRNA配列を作製するために使用する特別なアミダイトおよびCPGを表す概略図。

【図20】RNA-アルキン骨格を作製するために使用する特別なアミダイトおよびCPGを表す概略図。これらのモノマーを組み込んだ配列は、表7に示す。

【図21】図21(a)は表8および9の修飾したRNA配列を作製するためのクリック反応に使用される例示的なアジ化物を表す概略図であり、(b)はクリック反応後のモノマーを表す概略図である。

【図22】オリゴヌクレオチドに組み込まれた後の修飾したモノマーを表す概略図。これらのモノマーを組み込んだ配列は、表10に示す。

【図23a】修飾したRNAを表す概略図。

【図23b】精製されたクリック産物のRP-HPLC解析(表11を参照)(解析条件、¹反応完了は、RP-HPLCによって測定された(DeltaPak C4カラム、150×3.9mm I.D.、5μm、300、緩衝液A:50mM TEAA、pH 7.0、緩衝液B:ACN、勾配:24分で0~70%緩衝液B、30、1mL/分)。

【図23c】精製されたクリック産物のRP-HPLC解析(表11を参照)(解析条件、¹反応完了は、RP-HPLCによって測定された(DeltaPak C4カラム、150×3.9mm I.D.、5μm、300、緩衝液A:50mM TEAA、pH 7.0、緩衝液B:ACN、勾配:24分で0~70%緩衝液B、30、1mL/分))。

【図24】選択した修飾したsiRNAの用量反応曲線。

【発明を実施するための形態】

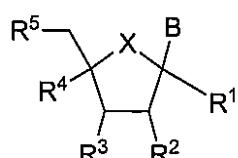
【0041】

一実施形態において、本発明の化合物は上記に図示されるように式IまたはIIによって表される化合物である、またはその薬学的に許容される塩、エステルもしくはプロドラッグである。

【0042】

あるいは、式I、またはその薬学的に許容される塩もしくはプロドラッグは、以下のように表することができる。

【化7】



式(I)

【0043】

一実施形態において、XはO、S、NR^N、またはCR^P₂である。

【0044】

一実施形態において、Bは水素、任意に置換された天然もしくは非天然核酸塩基、任意に置換されたトリアゾール、または任意に置換されたテトラゾール、NH-C(O)-O-C(CH₂B₁)₃、NH-C(O)-NH-C(CH₂B₁)₃であり、式中B₁は独立してハロゲン、メシリ酸塩、N₃、CN、任意に置換されたトリアゾール、または任意に置換されたテトラゾールであり、式中核酸塩基を-J-リンカー-N₃、-J-リンカー-CN、-J-リンカー-CR⁸、-J-リンカー-シクロアルキン、-J-リン

10

20

30

40

50

カ - R^L、 - リンカ - Q - R^L、または - J - リンカ - Q - リンカ - R^Lによってさらに置換することができる。B₁は、水素でもあり得る。

【0045】

一実施形態において、R¹、R²、R³、R⁴、およびR⁵は、それぞれ独立してH、OR⁶、F、N(R^N)₂、N₃、CN、-J-リンカ-N₃、-J-リンカ-CN、-J-リンカ-CR⁸、-J-リンカ-シクロアルキン、-J-リンカ-R^L、-リンカ-Q-R^L、または-J-リンカ-Q-リンカ-R^Lである。R¹、R²、R³、R⁴、およびR⁵はそれぞれ独立してR⁶であることもできる。

【0046】

一実施形態において、Jは存在しないか、O、S、NR^N、OC(O)NH、NHC(O)O、C(O)NH、NHC(O)、NHSO、NHSO₂、NHSO₂NH、OC(O)、C(O)O、OC(O)O、NHC(O)NH、NHC(S)NH、OC(S)NH、OP(N(R^P)₂)O、またはOP(N(R^P)₂)である。

【0047】

一実施形態において、R⁶は水素、ヒドロキシリ保護基、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアリール、任意に置換されたシクロアルキル、任意に置換されたアラルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたヘテロアリール、ポリエチレンリコール(PEG)、リン酸塩、二リン酸塩、三リン酸塩、ホスホン酸塩、ホスホノチオエート、ホスホノジチオエート、ホスホロチオエート、ホスホロチオレート、ホスホロジチオエート、ホスホロチオロチオネット、リン酸ジエステル、リン酸トリエステル、活性化されたリン酸基、活性化された亜リン酸基、ホスホラミダイト、固体支持体、-P(Z¹)(Z²)-O-ヌクレオシド、-P(Z¹)(Z²)-O-オリゴヌクレオチド、-P(Z¹)(Z²)-式(I)、-P(Z¹)(O-リンカ-Q-リンカ-R^L)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(O-リンカ-R^L)-O-ヌクレオシド、-P(Z¹)(O-リンカ-N₃)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(O-リンカ-CN)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(O-リンカ-CR⁸)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(O-リンカ-シクロアルキン)-O-ヌクレオシド、-P(Z¹)(O-リンカ-Q-リンカ-R^L)-O-オリゴヌクレオチド、P(Z¹)(O-リンカ-R^L)-O-オリゴヌクレオチド、P(Z¹)(O-リンカ-N₃)-O-オリゴヌクレオチド、-P(Z¹)(O-リンカ-CN)-O-オリゴヌクレオチド、P(Z¹)(O-リンカ-CR⁸)-O-オリゴヌクレオチド、P(Z¹)(O-リンカ-シクロアルキン)-O-オリゴヌクレオチド、-P(Z¹)(-リンカ-Q-リンカ-R^L)-O-ヌクレオシド、-P(Z¹)(-リンカ-N₃)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(-リンカ-CN)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(-リンカ-CR⁸)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(-リンカ-シクロアルキン)-O-ヌクレオシド、-P(Z¹)(-リンカ-R^L)-O-オリゴヌクレオチド、-P(Z¹)(-リンカ-R^L)-O-オリゴヌクレオチド、P(Z¹)(-リンカ-N₃)-O-オリゴヌクレオチド、-P(Z¹)(-リンカ-CN)-O-オリゴヌクレオチド、P(Z¹)(-リンカ-CR⁸)-O-オリゴヌクレオチド、またはP(Z¹)(-リンカ-シクロアルキン)-O-オリゴヌクレオチドである。

【0048】

一実施形態において、R^NはH、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたアリール、任意に置換されたシクロアルキル、任意に置換されたアラルキル、任意に置換されたヘテロアリール、またはアミノ保護基である。

【0049】

一実施形態において、R^Pは独立してH、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたアリール、任意に置換されたシクロアルキル、または任意に置換されたヘテロアリールである。

10

20

30

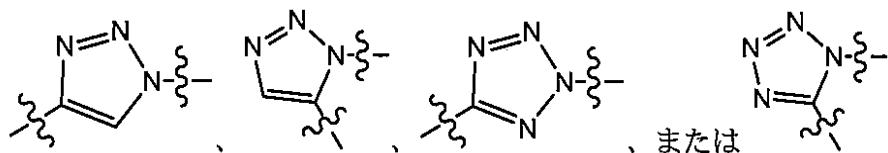
40

50

【0050】

—実施形態において、Qは

【化8】



、または

【0051】

10

である。

【0052】

—実施形態において、R^Lは水素またはリガンドである。

【0053】

—実施形態において、R⁸はNまたはCR⁹である。

【0054】

—実施形態において、R⁹はH、任意に置換されたアルキル、またはシリルである。

【0055】

20

—実施形態において、Z¹およびZ²はそれぞれ独立してO、S、または任意に置換されたアルキルである。

【0056】

30

式Iの本実施形態において、Q、-N₃、-CN、-CR⁸、任意に置換されたトリアゾール、または任意に置換されたテトラゾールは化合物において少なくとも一度は存在しなければならない。例えば、R¹は、少なくとも1つの事例において、N₃、CN、-J-リンカー-N₃、-J-リンカー-CN、-J-リンカー-CR⁸、-リンカー-Q-R^L、または-J-リンカー-Q-リンカー-R^Lであり、R²は、少なくとも1つの事例において、N₃、CN、-J-リンカー-N₃、-J-リンカー-CN、-J-リンカー-CR⁸、-リンカー-Q-R^L、または-J-リンカー-Q-リンカー-R^Lであり、R³は、少なくとも1つの事例において、N₃、CN、-J-リンカー-N₃、-J-リンカー-CR⁸、-リンカー-Q-R^L、または-J-リンカー-Q-リンカー-R^Lであり、R⁴は、少なくとも1つの事例において、N₃、CN、-J-リンカー-N₃、-J-リンカー-CN、-J-リンカー-CR⁸、-リンcker-Q-R^L、または-J-リンcker-Q-リンcker-R^Lであり、R⁵は、少なくとも1つの事例において、N₃、CN、-J-リンcker-N₃、-J-リンcker-CR⁸、-リンcker-Q-R^L、または-J-リンcker-Q-リンcker-R^Lであり、Bは、少なくとも1つの事例において、任意に置換されたトリアゾール、または任意に置換されたテトラゾール、NH-C(O)-O-C(CH₂B₁)₃、NH-C(O)-NH-C(CH₂B₁)₃、式中、B₁はN₃、CN、任意に置換されたトリアゾールまたは任意に置換されたテトラゾールであり、式中核酸塩基は-J-リンcker-N₃、-J-リンcker-CN、-J-リンcker-CR⁸、-リンcker-Q-R^L、または-J-リンcker-Q-リンcker-R^Lによってさらに置換される、またはこれらの組み合わせ。—実施形態において、R¹は-J-リンcker-Q-リンcker-R^Lまたは-リンcker-Q-R^Lである。したがって、—実施形態において、R²は-J-リンcker-Q-リンcker-R^Lまたは-リンcker-Q-R^Lであり、—実施形態において、R³は-J-リンcker-Q-リンcker-R^Lまたは-リンcker-Q-R^Lであり、—実施形態において、R⁴は-J-リンcker-Q-リンcker-R^Lまたは-リンcker-Q-R^Lであり、—実施形態において、R⁵は-J-リンcker-Q-リンcker-R^Lまたは-リンcker-Q-R^Lであり、—実施形態において、Bは-J-リンcker-Q-リンcker-R^Lまたは-リンcker-Q-R^Lを含む。

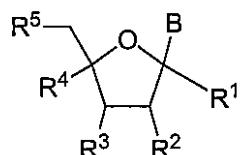
40

【0057】

50

別の実施形態では、担体は式（I I I）に示すようにリボース糖である。本実施形態において、化合物、例えばクリック-担体化合物は、ヌクレオシド／ヌクレオチドまたはヌクレオシド／ヌクレオチド類似体である。

【化9】



式（I I I）

10

【0058】

一実施形態において、同じ化合物のR²およびR⁴はロックされた核酸（LNA）と同様の「ロックされた」化合物を形成するために一緒に結合される。

【0059】

一実施形態において、R¹およびR⁴はHである。

【0060】

一実施形態において、R¹は-O-リンカー-Q-リンカー-R^L、-O C(O)N(R^N)-リンカー-Q-リンカー-R^L、または-リンカー-Q-リンカー-R^Lであり、BはHである。

20

【0061】

一実施形態において、同じ化合物のR²およびR⁴はロックされた核酸（LNA）と同様の「ロックされた」化合物を形成するために一緒に結合される。

【0062】

一実施形態において、Bが水素の場合、R¹は-O-リンカー-Q-リンカー-R^L、-O C(O)N(R⁷)-リンカー-Q-リンカー-R^L、または-リンカー-Q-リンカー-R^Lである。

【0063】

一実施形態において、BはHである。

【0064】

一実施形態において、BはC5の位置においてピリミジン置換される。

30

【0065】

一実施形態において、R²はOR⁶であり、R³は-O-リンカー-Q-リンカー-R^L、-O C(O)N(R^N)-リンカー-Q-リンカー-R^L、または-リンカー-Q-リンカー-R^Lであり、R^Lは存在する。

【0066】

一実施形態において、R³はOR⁶であり、R²は-O-リンカー-Q-リンカー-R^L、-O C(O)N(R^N)-リンカー-Q-リンcker-R^L、または-リンcker-Q-リンcker-R^Lであり、R^Lは存在する。

40

【0067】

一実施形態において、R²はOHである。

【0068】

一実施形態において、R⁹はHである。

【0069】

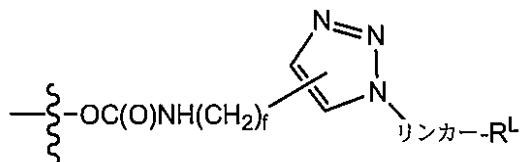
一実施形態において、R⁵は-O-リンcker-Q-リンcker-R^L、-O C(O)N(R^N)-リンcker-Q-リンcker-R^L、または-リンcker-Q-リンcker-R^Lであり、R^Lは存在する。

【0070】

一実施形態において、R⁵は-O C(O)NH(CH₂)_fC-CR⁹であり、fは1～20である。

50

【化13】



【0083】

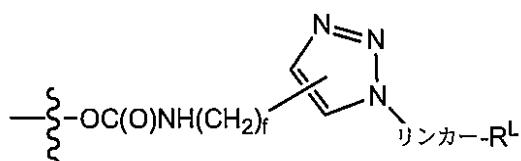
であり、fは1～20である。

【0084】

—実施形態において、R¹は

10

【化14】



【0085】

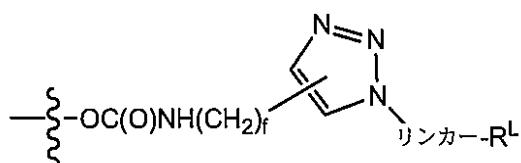
であり、式中fは1～20である。

【0086】

—実施形態において、Bは

20

【化15】



【0087】

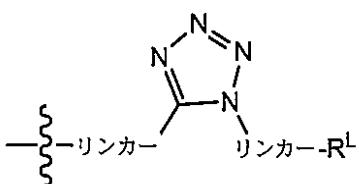
で置換される核酸塩基であり、fは1～20である。

【0088】

—実施形態において、Bは

30

【化16】



【0089】

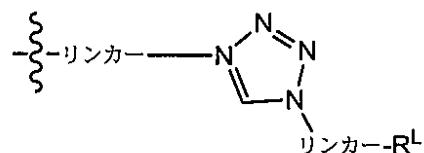
で置換される核酸塩基である。

【0090】

40

—実施形態において、Bは

【化17】



【0091】

で置換される核酸塩基である。

50

【 0 0 9 2 】

—実施形態において、R⁵は-O-(CH₂)_fC-CR⁹であり、式中fは1~20である。

【 0 0 9 3 】

一実施形態において、 R^4 は $-O-(CH_2)_fC-CR^9$ であり、式中 f は 1 ~ 20 である。

[0 0 9 4]

一実施形態において、 R^3 は $-O-(CH_2)_fC-CR^9$ であり、式中 f は 1 ~ 20 である。

〔 0 0 9 5 〕

一実施形態において、 R^2 は - O - (CH₂)_fC-CR⁹であり、式中 f は 1 ~ 20 である。

〔 0 0 9 6 〕

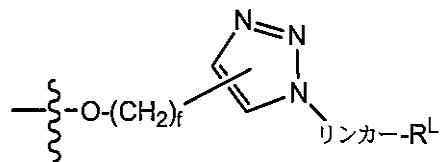
一実施形態において、 R^1 は $-O-(CH_2)_fC-CR^9$ であり、式中 f は 1 ~ 20 である。

【 0 0 9 7 】

一実施形態において、Bは-O-(CH₂)_fC≡CHで置換される核酸塩基であり、式中fは1～20である。

【 0 0 9 8 】

—実施形態において、R⁵は
【化18】



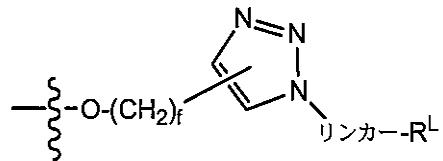
【 0 0 9 9 】

であり、式中 f は 1 ~ 20 である。

【 0 1 0 0 】

—実施形態において、R⁴は

【化 1 9】



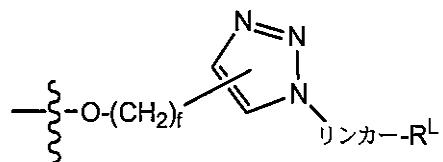
【 0 1 0 1 】

であり、式中 f は 1 ~ 20 である。

【 0 1 0 2 】

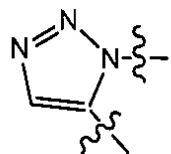
—実施形態において、R³は

【化 2 0】



【 0 1 0 3 】

【化25】



【0114】

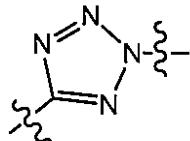
である。

【0115】

—実施形態において、Qは

10

【化26】



【0116】

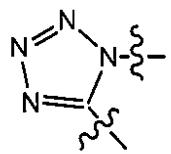
である。

【0117】

—実施形態において、Qは

20

【化27】



【0118】

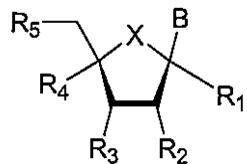
である。

【0119】

—実施形態において、式(I)のリボース糖は式(I')

30

【化28】



【0120】

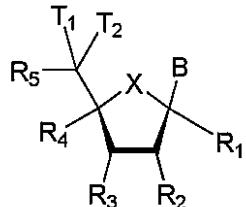
に示す構造を有し、変数は式(I)に対して上記に定義される通りである。

40

【0121】

—実施形態において、式(I)のリボース糖は式(I'a)

【化29】



50

【0122】

に示す構造を有する。

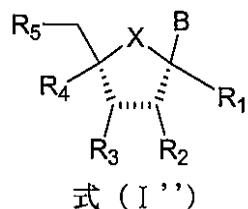
【0123】

式中、 T_1 および T_2 はそれぞれ独立して H、 $C_1 - C_9$ アルキル、 $C_2 - C_9$ アルケニル、 $C_2 - C_9$ アルキニル、置換した $C_1 - C_9$ アルキル、置換した $C_1 - C_9$ アルケニル、および置換した $C_2 - C_9$ アルキニルであり、R1、R2、R3、R4、R5、X、およびBは以前に定義された通りである。

【0124】

一実施形態において、式(I)のリボース糖は、式(I'')

【化30】



10

【0125】

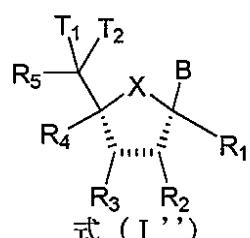
に示す構造を有し、変数は式(I)に対して上記に定義される通りである。

【0126】

20

一実施形態において、式(I)のリボース糖は式(II'a)に示される構造を有し、

【化31】



30

【0127】

式中、 T_1 および T_2 はそれぞれ独立して H、 $C_1 - C_9$ アルキル、 $C_2 - C_9$ アルケニル、 $C_2 - C_9$ アルキニル、置換した $C_1 - C_9$ アルキル、置換した $C_1 - C_9$ アルケニルおよび置換した $C_2 - C_9$ アルキニルであり、R1、R2、R3、R4、R5、X、およびBは以前に定義された通りである。

【0128】

一実施形態において、式(I)のクリック-担体化合物がオリゴヌクレオチドの5'末端にある場合、オリゴヌクレオチドはクリック-担体化合物のR⁵位置において結び付けられる。

【0129】

一実施形態において、式(I)のクリック-担体化合物がオリゴヌクレオチドの3'末端にある場合、オリゴヌクレオチドはクリック-担体化合物のR³またはR²の位置で結び付けられる。

40

【0130】

一実施形態において、式(I)のクリック-担体化合物がオリゴヌクレオチドの末端の位置にない場合、化合物のR⁵の位置は、片方はオリゴヌクレオチドの3' - または2' - の位置に結び付けられ、化合物のR²またはR³の位置はもう一方のオリゴヌクレオチドの5' - 位置に結び付けられる。

【0131】

一実施形態において、2つの異なるクリック-担体化合物は相補官能基を含み、相互に

50

クリックされる。一実施形態において、相補官能基はあるクリック - 化合物の R⁵ 位置および二次化合物の R² または R³ の位置にある。一実施形態において、相補官能基はあるクリック - 化合物の R⁵ の位置および二次化合物の R⁵ の位置にある。一実施形態において、相補官能基はあるクリック - 化合物の R² または R³ の位置、および二次化合物の R² または R³ の位置にある。

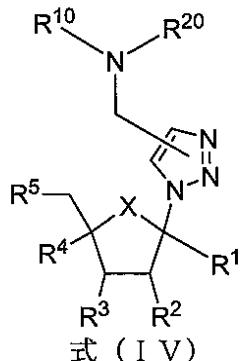
【0132】

いくつかの実施形態において、B はリンカーと担体を結ぶクリック - 担体の一部を形成することができる。例えば、- リンカー - Q - リンカー - R¹ プリン核酸塩基の C₂、C₆、C₇、もしくは C₈ の位置、またはピリミジン核酸塩基の C₂、C₅、または C₆ の位置において存在することができる。リンカーは、核酸塩基に直接、または O、N、S、C(O)、C(O)O、C(O)NH などの 1 つ以上の介在基を介して間接的に、結合することができる。ある実施形態では、上記のクリック - 担体において、B はウラシリル、またはユニバーサル塩基、例えばアリール部分、例えば任意に追加置換基を有するフェニル、例えば 1 つ以上のフルオロ基である。
10

【0133】

一実施形態において、本発明は式(IV)に示す構造を有する化合物を特徴とする。

【化32】



20

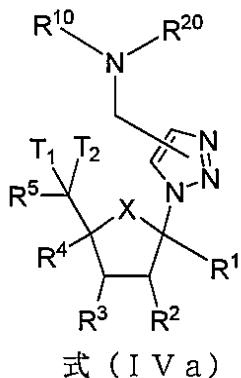
【0134】

式中、R¹ および R² はそれぞれ存在ごとに独立して水素、任意に置換された脂肪族、任意に置換されたアリール、または任意に置換されたヘテロアリールであり、R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、および X は第 1 の実施形態に定義された通りである。
30

【0135】

一実施形態において、本発明は式(IVa)に示す構造を有する化合物を特徴とする。

【化33】



40

【0136】

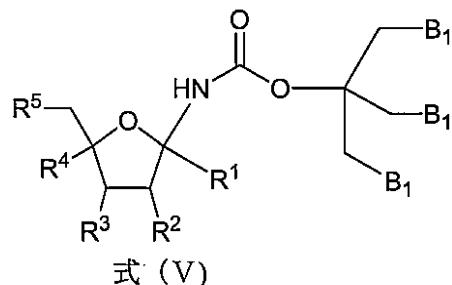
式中、T₁ および T₂ は、それぞれ独立して H、C₁ - C₉ アルキル、C₂ - C₉ アルケニル、C₂ - C₉ アルキニル、置換した C₁ - C₉ アルキル、置換した C₁ - C₉ アルケニル、および置換した C₂ - C₉ アルキニルであり、R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R
50

10、R₂₀、およびXは以前に定義された通りである。

【0137】

一実施形態において、本発明は式(V)に示す構造を有する化合物を特徴とする。

【化34】



10

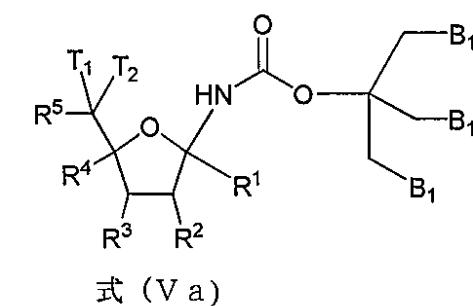
【0138】

式中、B₁はハロゲン、N₃、CN、任意に置換されたトリアゾール、または任意に置換されたテトラゾールである。B₁はメシリ酸塩でもあり得る。R¹、R²、R³、R⁴、およびR⁵が第1の実施形態に定義された通りである。

【0139】

一実施形態において、本発明は式(Va)に示す構造を有する化合物を特徴とする。

【化35】



20

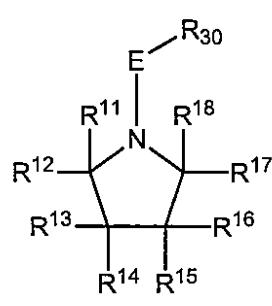
【0140】

式中、B₁はハロゲン、N₃、CN、任意に置換されたトリアゾール、または任意に置換されたテトラゾールであり、T₁およびT₂はそれぞれ独立してH、C₁-C₉アルキル、C₂-C₉アルケニル、C₂-C₉アルキニル、置換したC₁-C₉アルキル、置換したC₁-C₉アルケニル、および置換したC₂-C₉アルキニルであり、R₁、R₂、R₃、R₄、およびR₅は以前に定義した通りである。

【0141】

一実施形態において、担体は式(VI)に示されるピロリン環系を基づくことができる。

【化36】



30

【0142】

40

50

式中、E 存在しないかもしくは C(O)、C(O)O、C(O)NH、C(S)、C(S)NH、SO、SO₂、または SO₂NH であり、

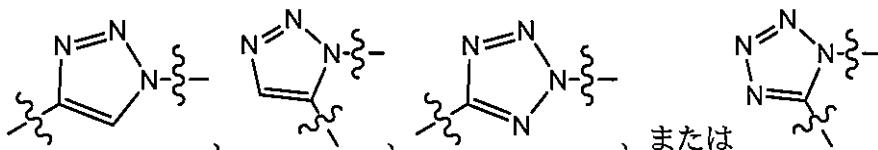
R¹¹、R¹²、R¹³、R¹⁴、R¹⁵、R¹⁶、R¹⁷、および R¹⁸ はそれぞれ存在ごとに独立して H、-CH₂OR^a、または OR^b であることができ、

R^a および R^b はそれぞれ存在ごとに独立して水素、ヒドロキシリ保護基、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアリール、任意に置換されたシクロアルキル、任意に置換されたアラルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたヘテロアリール、ポリエチレングリコール(PEG)、リン酸塩、二リン酸塩、三リン酸塩、ホスホン酸塩、ホスホノチオエート、ホスホジチオエート、ホスホロチオエート、ホスホロチオレート、ホスホジチオエート、ホスホロチオロチオネート、リン酸ジエステル、リン酸トリエステル、活性化されたリン酸基、活性化された亜リン酸基、ホスホラミダイト、固体支持体、-P(Z¹)(Z²)-O-ヌクレオシド、-P(Z¹)(Z²)-O-オリゴヌクレオチド、-P(Z¹)(Z²)-式(I)、-P(Z¹)(O-リンカー-Q-リンカー-R^L)-O-ヌクレオシド、-P(Z¹)(O-リンカー-N₃)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(O-リンカー-CN)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(O-リンカー-CR⁸)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(O-リンカー-シクロアルキン)-O-ヌクレオシド、-P(Z¹)(O-リンカー-R^L)-O-オリゴヌクレオチド、-P(Z¹)(O-リンカー-Q-リンカー-R^L)-O-オリゴヌクレオチド、-P(Z¹)(O-リンカー-R^L)-O-オリゴヌクレオチド、-P(Z¹)(O-リンカー-N₃)-O-オリゴヌクレオチド、-P(Z¹)(O-リンカー-CN)-O-オリゴヌクレオチド、P(Z¹)(O-リンカー-CR⁸)-O-オリゴヌクレオチド、P(Z¹)(O-リンカー-シクロアルキン)-O-オリゴヌクレオチド、-P(Z¹)(-リンカー-Q-リンカー-R^L)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(-リンカー-R^L)-O-ヌクレオシド、-P(Z¹)(-リンカー-N₃)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(-リンカー-CN)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(-リンカー-CR⁸)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(-リンカー-シクロアルキン)-O-ヌクレオシド、-P(Z¹)(-リンカー-Q-リンカー-R^L)-O-オリゴヌクレオチド、(Z¹)(-リンカー-R^L)-O-オリゴヌクレオチド、P(Z¹)(-リンcker-N₃)-O-オリゴヌクレオチド、-P(Z¹)(-リンcker-CN)-O-オリゴヌクレオチド、P(Z¹)(-リンcker-CR⁸)-O-オリゴヌクレオチド、または P(Z¹)(-リンcker-シクロアルキン)-O-オリゴヌクレオチドであり、

R³⁰ はそれぞれに発生に対して独立して -リンカー-Q-リンカー-R^L、-リンカー-R^L、または R³¹ であり、

Q は存在しないか、またはそれ存在ごとに独立して

【化 37】



、または

【0143】

であり、

R^L は水素またはリガンドであり、

R⁸ は N または CR⁹ であり、

R⁹ は H、任意に置換されたアルキル、もしくはシリルであり、

R³¹ は -C(O)CH(N(R³²)₂)(CH₂)_hN(R³²)₂ であり、

R³² はそれ存在ごとに独立して H、-リンcker-Q-リンcker-R^L、-リンcker-R^L、または R³¹ であり、

f および h はそれ存在ごとに独立して 1 ~ 20 であり、

10

20

30

40

50

Z^1 および Z^2 はそれぞれ存在ごとに独立して O、S、または任意に置換されたアルキルである。

[0 1 4 4]

ピロリンベースのクリック - 担体に対して、 R^{1-1} は $-CH_2OR^a$ であり、 R^3 は OR^b である、または R^{1-1} は $-CH_2OR^a$ であり、 R^9 は OR^b である、または R^{1-1} は $-CH_2OR^a$ であり、 R^{1-7} は OR^b である、または R^{1-3} は $-CH_2OR^a$ であり、 R^{1-1} は OR^b である、または R^{1-3} は $-CH_2OR^a$ であり、 R^{1-5} は OR^b である、または R^{1-3} は $-CH_2OR^a$ であり、 R^{1-7} は OR^b である。ある実施形態では、 CH_2OR^a および OR^b をジエミナルに置換することができる。4 - ヒドロキシプロリンベースの担体に対して、 R^{1-1} は $-CH_2OR^a$ であり、 R^{1-7} は OR^b である。ピロリン - および 4 - ヒドロキシプロリンベースの化合物は、したがって結合（例えば、炭素炭素結合）を含むことができ、結合回転は特定の連鎖、例えば環が存在することから生じる制限について限定される。したがって、 CH_2OR^a および OR^b は、上記に描写される対形成のうちのいずれかにおいてお互いに關してシスまたはトランスであり得る。その結果、全てのシス / トランス異性体は特に含まれる。化合物は、1つ以上の不斉中心も含むことができ、したがってラセミ化合物およびラセミ混合物、单一鏡像異性体、個々のジアステレオマーおよびジアステレオマー混合物として発生する。全てのかかる化合物の異性体は、特に含まれる（例えば、 CH_2OR^a および OR^b を有している中心は、両方とも R 配置を有することができる、または両方とも S 配置をふくむことができる、または1つの中心は、R 配置を有することができ、他の中心は S 配置を有することができ、逆もまた同じである）。

[0 1 4 5]

一実施形態において、 R^{1-1} はCH₂OR^aであり、 R^9 はOR^bである。

【 0 1 4 6 】

—実施形態において、 R^b は固形支持体である。

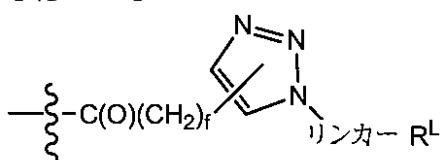
[0 1 4 7]

一実施形態において、 R^3 は $-C(O)(CH_2)_fNH(CO)(CH_2)_gCR^9$ であり、式中 f より g は独立して 1 ~ 20 である。

[0 1 4 8]

一実施形態において、 $R^{3\ 0}$ は

【化 3 8】



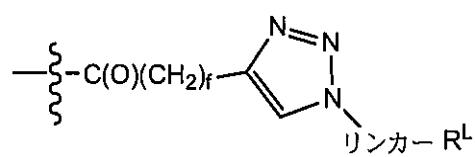
[0 1 4 9]

であり、式中、 f は 1 ~ 20 である。

[0 1 5 0]

一実施形態において、 $R^{3\ 0}$ は

【化 3 9】



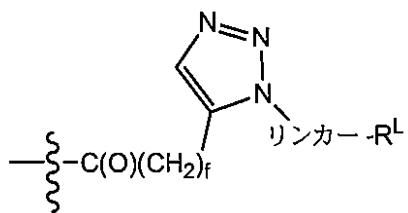
【 0 1 5 1 】

であり、式中、 f は 1 ~ 20 である。

【 0 1 5 2 】

—実施形態において、R³0は

【化40】



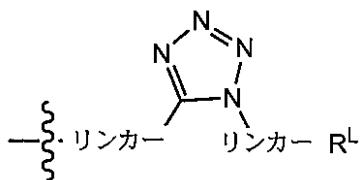
【0153】

であり、式中、fは1～20である。

【0154】

—実施形態において、R^{3 0}は

【化41】



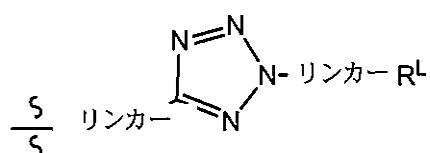
【0155】

である。

【0156】

—実施形態において、R^{3 0}は

【化42】



【0157】

である。

【0158】

ある好ましい実施形態において、R^{3 0}はR^{3 1}である。

【0159】

ある好ましい実施形態において、R^{3 1}は-C(=O)CH(N(R^{3 2})₂)(CH₂)₄N(R^{3 2})₂であり、少なくとも1つのR^{3 2}は-C(=O)(CH₂)_fC-R⁸または-R-リンクー-Q-リンクー-R^Lであり、R^Lは存在する。

【0160】

ある好ましい実施形態において、R^{3 1}は-C(=O)CH(N(R^{3 2})₂)(CH₂)₄NH₂であり、少なくとも1つのR^{3 2}は-C(=O)(CH₂)_fC-R⁸または-R-リンクー-Q-リンクー-R^Lであり、R^Lは存在する。

【0161】

—実施形態において、R^{3 2}は-C(=O)(CH₂)_fC-R⁸である。

【0162】

—実施形態において、R^{3 2}は-C(=O)(CH₂)₃C-Hである。

【0163】

—実施形態において、R^{3 1}は-C(=O)CH(NH₂)(CH₂)₄NH₂である。

【0164】

—実施形態において、特性の非環状糖交換ベースの化合物、例えば糖交換ベースのクリック-担体化合物は、本明細書においてリボース置換化合物サブユニット(R RMS)化

10

20

30

40

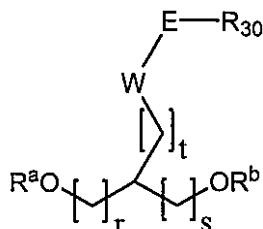
50

合物の化合物としても称される。好みしい非環状担体は、以下の式（I I I）または式（I V）に示す構造を有することができる。

【 0 1 6 5 】

－態様において、本発明は、式(VIII)に示す構造を有する非環状クリック-担体化合物を特徴とする。

【化 4 3】



式(VIII)

[0 1 6 6]

式中、

Wは存在しないか、O、S、およびN（R^N）であり、式中、R^Nはそれぞれ存在ごとに独立してH、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたアリール、任意に置換されたシクロアルキル、任意に置換されたアラルキル、任意に置換されたヘテロアリール、またはアミノ保護基であり

Eは存在しないかもしくはC(0)、C(0)O、C(0)NH、C(S)、C(S)NH、SO、SO₂、またはSO₂NHであり

R^a および R^b は、それぞれ存在ごとに独立して、水素、ヒドロキシル保護基、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアリール、任意に置換されたシクロアルキル、任意に置換されたアラルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたヘテロアリール、ポリエチレングリコール(PEG)、リン酸塩、二リン酸塩、三リン酸塩、ホスホン酸塩、ホスホノチオエート、ホスホジチオエート、ホスホロチオエート、ホスホロチオレート、ホスホロジチオエート、ホスホロチオロチオネート、リン酸ジエステル、リン酸トリエステル、活性化されたリン酸基、活性化された亜リン酸基、ホスホラミダイト、固体支持体、-P(Z¹)(Z²)-O-ヌクレオシド、-P(Z¹)(O-リンカー-Q-リンカー-R^L)-O-ヌクレオシド、-P(Z¹)(O-リンカー-N₃)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(O-リンカー-CN)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(O-リンカー-CR⁸)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(O-リンカー-シクロアルキン)-O-ヌクレオシド、-P(Z¹)(O-リンカー-R^L)-O-オリゴヌクレオチド、-P(Z¹)(O-リンカー-Q-リンカー-R^L)-O-オリゴヌクレオチド、-P(Z¹)(O-リンカー-R^L)-O-オリゴヌクレオチド、P(Z¹)(O-リンカー-N₃)-O-オリゴヌクレオチド、-P(Z¹)(O-リンカー-CN)-O-オリゴヌクレオチド、P(Z¹)(O-リンカー-CR⁸)-O-オリゴヌクレオチド、P(Z¹)(O-リンカー-シクロアルキン)-O-オリゴヌクレオチド、-P(Z¹)(-リンカー-R^L)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(-リンカー-N₃)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(-リンカー-CN)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(-リンカー-CR⁸)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(-リンカー-Q-リンカー-R^L)-O-オリゴヌクレオチド、(Z¹)(-リンカー-R^L)-O-オリゴヌクレオチド、P(Z¹)(-リンカー-N₃)-O-オリゴヌクレオチド、-P(Z¹)(-リンカー-CN)-O-オリゴヌクレオチド、P(Z¹)(-リンカー-CR⁸)-O-オリゴヌクレオチド、またはP(Z¹)(-リンカー-シクロアルキン)-O-オリゴヌクレオチドであり、

10

30

30

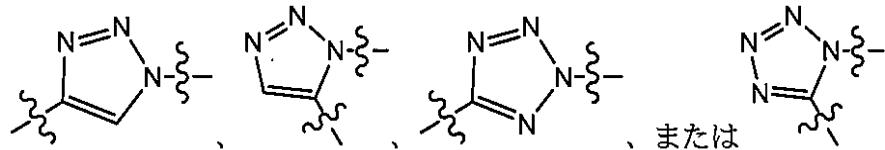
40

50

$R^{3\ 0}$ はそれぞれに発生に対して独立して - リンカ - Q - リンカ - R^L 、 - リンカ - - R^L 、または $R^{3\ 1}$ であり、

Q は存在しないか、またはそれぞれ存在ごとに独立して

【化44】



10

【0167】

であり、

R^L は水素またはリガンドであり、

R^8 は N または CR^9 であり、

R^9 は H、任意に置換されたアルキル、もしくはシリルであり、

$R^{3\ 1}$ は - $C(O)CH(N(R^{3\ 2}))_2(CH_2)_hN(R^{3\ 2})_2$ であり、

$R^{3\ 2}$ はそれぞれ存在ごとに独立して H、 - リンカ - Q - リンカ - R^L 、または $R^{3\ 1}$ であり、

f および h はそれぞれ存在ごとに独立して 1 ~ 20 であり、

Z^1 および Z^2 はそれぞれ存在ごとに独立して O、S、または任意に置換されたアルキルであり、

r、s、および t はそれぞれ存在ごとに独立して 0、1、2、または 3 である。

20

【0168】

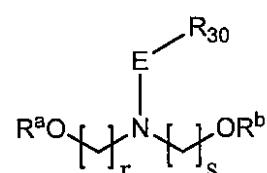
r および s が異なる場合、第三炭素は R または S 配置であり得る。好ましい実施形態において、x および y は 1 であり、z はゼロである（例えば担体はセリノールを基にする）。非環状担体は任意に例えばヒドロキシ、アルコキシ、ペルハロアルキーに置換することができる。

【0169】

別の態様において、本発明は、式(VIII)に示す構造を有する非環状クリック - 担体化合物を特徴とする。

30

【化45】



式(VIII)

30

【0170】

式中、E は存在しないかもしくは C(O)、C(O)O、C(O)NH、C(S)、C(S)NH、SO、SO₂、または SO₂NH であり、

R^a および R^b はそれぞれ存在ごとに独立して水素、ヒドロキシル保護基、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアリール、任意に置換されたシクロアルキル、任意に置換されたアラルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたヘテロアリール、ポリエチレングリコール (PEG)、リン酸塩、二リン酸塩、三リン酸塩、ホスホン酸塩、ホスホノチオエート、ホスホジチオエート、ホスホロチオエート、ホスホロチオレート、ホスホジチオエート、ホスホロチオチオネート、リン酸ジエステル、リン酸トリエステル、活性化されたリン酸基、活性化された亜リン酸基、ホスホラミダイト、固体支持体、-P(Z¹)(Z²)-O-ヌクレオシド、-P(Z¹)(Z²)-O-オリゴ

40

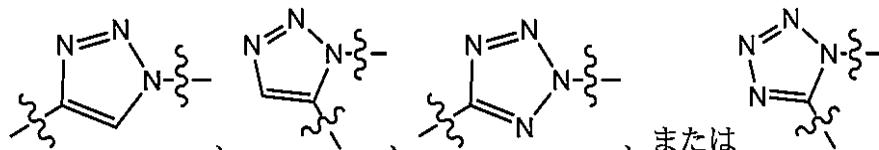
50

ヌクレオチド、-P(Z¹)(Z²)-式(I)、-P(Z¹)(O-リンカー-Q-リンカー-R^L)-O-ヌクレオシド、-P(Z¹)(O-リンカー-N₃)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(O-リンカー-CN)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(O-リンカー-CR⁸)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(O-リンカー-シクロアルキン)-O-ヌクレオシド、-P(Z¹)(O-リンカー-R^L)-O-オリゴヌクレオチド、-P(Z¹)(O-リンカー-Q-リンカー-R^L)-O-オリゴヌクレオチド、-P(Z¹)(O-リンカー-R^L)-O-オリゴヌクレオチド、P(Z¹)(O-リンカー-N₃)-O-オリゴヌクレオチド、-P(Z¹)(O-リンカー-CN)-O-オリゴヌクレオチド、P(Z¹)(O-リンカー-CR⁸)-O-オリゴヌクレオチド、P(Z¹)(O-リンカー-シクロアルキン)-O-オリゴヌクレオチド、-P(Z¹)(-リンカー-Q-リンカー-R^L)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(-リンカー-R^L)-O-ヌクレオシド、-P(Z¹)(-リンカー-N₃)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(-リンカー-CN)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(-リンカー-CR⁸)-O-ヌクレオシド、P(Z¹)(-リンカー-シクロアルキン)-O-ヌクレオシド、-P(Z¹)(-リンカー-Q-リンカー-R^L)-O-オリゴヌクレオチド、(Z¹)(-リンカー-R^L)-O-オリゴヌクレオチド、P(Z¹)(-リンcker-N₃)-O-オリゴヌクレオチド、-P(Z¹)(-リンcker-CN)-O-オリゴヌクレオチド、P(Z¹)(-リンcker-CR⁸)-O-オリゴヌクレオチド、またはP(Z¹)(-リンcker-シクロアルキン)-O-オリゴヌクレオチドであり、

R³⁰はそれぞれに発生に対して独立して-リンカー-Q-リンカー-R^L、-リンカー-R^L、またはR³¹であり、

Qは存在しないか、またはそれぞれ存在ごとに独立して

【化46】



【0171】

であり、

R^Lは水素またはリガンドであり、

R⁸はNまたはCR⁹であり、

R⁹はH、任意に置換されたアルキル、もしくはシリルであり、

R³¹は-C(O)CH(N(R³²)₂)(CH₂)_nN(R³²)₂であり、

R³²はそれぞれ存在ごとに独立してH、-リンカー-Q-リンカー-R^L、またはR³¹であり、

fおよびhはそれぞれ存在ごとに独立して1~20であり、

Z¹およびZ²はそれぞれ存在ごとに独立してO、S、または任意に置換されたアルキルであり、

rおよびsはそれぞれ存在ごとに独立して0、1、2、または3である。

【0172】

好みしくは、Q、-N₃、-CN、または-CR⁸は式(VI)、(VII)、および(VIII)の化合物において少なくとも1回は存在する。

【0173】

本発明に従う他の担体化合物は全ての目的に対して全てが参照により組み込まれる、2004年8月10日に出願された同時係属中の米国特許出願第10/916,185号、2004年9月21日に出願された米国特許出願第10/946,873号、2004年11月9日に出願された米国特許出願第10/985,426号、2007年8月3日に出願された米国特許出願第10/833,934号、2005年4月27日に出願された

10

20

30

40

50

米国特許出願第11/115,989号、2005年4月29日に出願された米国特許出願第11/119,533号の各明細書に記載される。

【 0 1 7 4 】

リンカー

〔 0 1 7 5 〕

—実施形態において、リンカーは構造：

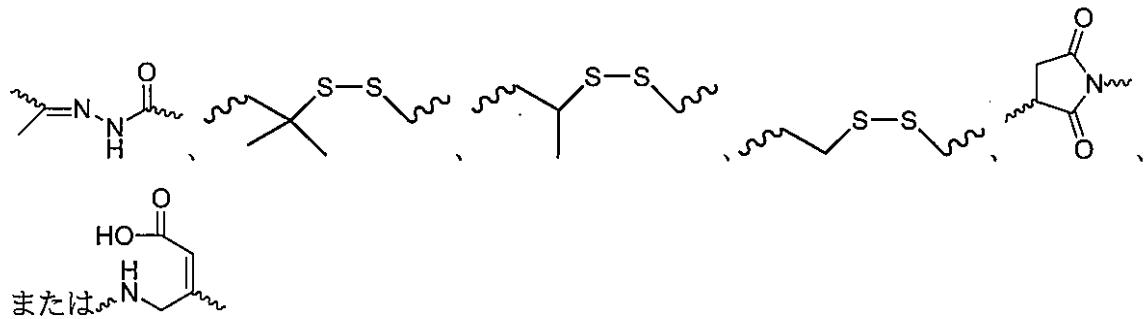
$$- [P - Q_1 - R]_g - T -$$

によって表され、

式中、

P、R、およびTはそれぞれ存在ごとに独立して存在しないか、CO、NH、O、S、OC(O)、NHC(O)、CH₂、CH₂NH、CH₂O；NHCH(R^a)C(O)、-C(O)-CH(R^a)-NH-、-C(O)-(任意に置換されたアルキル)-NH-、CH=N-O、

【化 4 7】



【 0 1 7 6 】

であり、

Q_1 はそれぞれ存在ごとに独立して存在しないか、 $- (C H_2)_n -$ 、 $- C (R^{100}) (R^{200}) (C H_2)_n -$ 、 $- (C H_2)_n C (R^{100}) (R^{200}) -$ 、 $- (C H_2 C H_2 O)_m C H_2 C H_2 -$ 、または $- (C H_2 C H_2 O)_m C H_2 C H_2 N H -$ であり、

R^a は H またはアミノ酸側鎖であり、

R^{100} および R^{200} はそれぞれ存在ごとに独立して H、 $C H_3$ 、 $O H$ 、 $S H$ 、または $N (R^X)_2$ であり、

R^X はそれぞれ存在ごとに独立して H、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、またはベンジルであり、

q はそれぞれ存在ごとに独立して 0 ~ 20 であり、

n はそれぞれ存在ごとに独立して 1 ~ 20 であり、

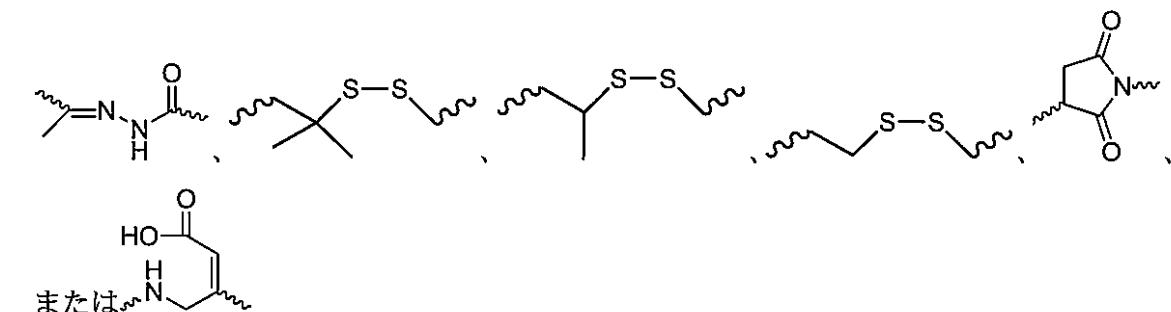
m はそれぞれ存在ごとに独立して 0 ~ 50 である。

【0177】

一実施形態において、リンカーは構造 $[(P - Q_1 - R)_{q'} - X - (P' - Q_1' - R')_{q''}]_{q'''} - T$ を有し、式中、

P 、 R 、 T 、 P' 、 R' 、および T' はそれぞれ存在ごとに独立して存在しないか、 $C O$ 、 $N H$ 、 O 、 S 、 $O C (O)$ 、 $N H C (O)$ 、 $C H_2$ 、 $C H_2 N H$ 、 $C H_2 O$ 、 $N H C H (R^a) C (O)$ 、 $- C (O) - C H (R^a) - N H -$ 、 $- C (O) -$ (任意に置換されたアルキル) $- N H -$ 、 $C H = N - O$ 、

【化48】



【0178】

であり、

Q_1 および Q_1' は、それぞれ存在ごとに独立して存在しないか、 $- (C H_2)_n -$ 、 $- C (R^{100}) (R^{200}) (C H_2)_n -$ 、 $- (C H_2)_n C (R^{100}) (R^{200}) -$ 、 $- (C H_2 C H_2 O)_m C H_2 C H_2 -$ 、または $- (C H_2 C H_2 O)_m C H_2 C H_2 N H -$ であり、

X は切断可能な結合基であり、

R^a は H またはアミノ酸側鎖であり、

R^{100} および R^{200} はそれぞれ存在ごとに独立して H、 $C H_3$ 、 $O H$ 、 $S H$ 、または $N (R^X)_2$ であり、

R^X はそれぞれ存在ごとに独立して H、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、またはベンジルであり、

q 、 q' 、および q'' はそれぞれ存在ごとに独立して 0 ~ 20 であり、

n はそれぞれ存在ごとに独立して 1 ~ 20 であり、

m はそれぞれ存在ごとに独立して 0 ~ 50 である。

【0179】

一実施形態において、リンカーは少なくとも 1 つの切断可能な結合基を含む。

【0180】

切断可能な結合基

切断可能な結合基は、細胞外で十分に安定しているが、標的細胞に侵入する際、リンカーが結合している 2 つの部分を放出するために切断されるものである。好ましい実施形態

では、切断可能な結合基は少なくとも 10 回以上、標的細胞においてまたは（例えば細胞内状態を模倣するまたは表すために選択され得る）第 1 の参照状態の下、対象の血液内、または（例えば血液または血清に見られる状態を模倣するまたは表すために選択され得る）第 2 の参照の状態の下よりも、好ましくは少なくとも 100 回速く切断される。

【0181】

切断可能な結合基は、切断剤、たとえば pH、レドックスの可能性、または分解分子の存在に影響されやすい。一般的に、切断剤はより蔓延する、または高レベルに見られる、または血清または血液内よりも細胞内の活性である。かかる分解剤の例は、還元によってレドックス切断可能な結合基を分解することができる、特定の基質に対して選択される、または細胞に存在する例えば酸化的もしくは還元的酵素またはメルカプタン等の還元剤を含む基質特異性を有さないレドックス剤、エステラーゼ、エンドソームまたは酸性環境、例えば 5 pH 以下を生じるものを作ることができる薬剤、一般酸、（基質特異的であり得る）ペプチダーゼ、およびホスファターゼとして作用することによって、酸性の切断可能な結合基を加水分解または分解することができる酵素を含む。

10

【0182】

ジスルフィド結合等の切断可能な連鎖基は、pH に影響されやすい。ヒト血清の pH は 7.4 であるが、平均細胞内 pH は、約 7.1 ~ 7.3 の範囲で、少し低い。エンドソームは、5.5 ~ 6.0 の範囲のより多くの酸性の pH を有し、リソソームは約 5.0 のさらに酸性の pH を有する。いくつかのスペーサーは、好ましい pH において切断される連鎖基を有し、その結果、細胞内、または細胞の好ましいコンパートメントに担体オリゴマーから iRNA 剤を放出するであろう。

20

【0183】

スペーサーは、特定の酵素によって切断可能な結合基を含むことができる。スペーサーに組み込まれる結合基の種類は、iRNA 剤によって標的にされる細胞に依存することができる。例えば、肝細胞において mRNA を標的とする iRNA 剤は、エステル基を含むスペーサーを介して担体オリゴマーと結び付けられ得る。肝細胞は、エステラーゼに富んでいて、その結果テザーはエステラーゼが豊富でない細胞型においてよりも肝細胞においてより効率的に切断されるであろう。スペーサーの切断は、担体オリゴマーより iRNA 剤を放出する、その結果 iRNA 剤のサイレンシングする活性を強める可能性がある。エステラーゼが豊富な他の細胞型は、肺、腎皮質、および精巣の細胞を含む。

30

【0184】

iRNA 剤が肝細胞および滑膜細胞等のペプチダーゼに富んでいる細胞型を標的としている場合、ペプチド結合を含有するスペーサーを使用することができる。例えば、炎症性疾患（例えば、関節リウマチ）の治療に対する等の滑膜細胞を標的とした iRNA 剤は、ペプチド結合を含むスペーサーを介して担体オリゴマーと結びつけられ得る。

【0185】

一般に、切断可能な結合基候補の適合性は、結合基候補を切断するために分解剤の能力（または状態）を試験することによって評価することができる。血液中で、または他の非標的組織、例えば対象に投与した場合に iRNA 剤に曝される組織と接触したときに、切断に抵抗する能力について、切断可能な結合基候補を試験することも望ましいであろう。したがって、第 1 の条件と第 2 の条件との間で切断に対する相対的感受性を測定することができ、ここで、第 1 の条件は標的細胞における切断を示すために選択され、第 2 の条件は、他の組織または生体液、例えば血液または血清における切断を示すように選択される。評価は、無細胞系、細胞、細胞培養、臓器もしくは組織培養、または動物の全体において実施することができる。無細胞または培養状態における初期評価を実施するため、および動物の全体におけるさらなる評価によって確認するために有用であり得る。好ましい実施形態において、有用な候補化合物は、血液または血清（または細胞外状態を模倣するために選択されたインビトロ状態下で）と比べて、細胞内（細胞内状態を模倣するために選択されたインビトロ状態下で）で少なくとも 2、4、10、または 100 回速く切断される。

40

50

【0186】

レドックス切断可能な結合基

切断可能な結合基の1種類は、還元または酸化の際に切断するレドックスの切断可能な結合基である。還元的に切断可能な結合基の例はジスルフィド結合基(-S-S-)である。切断可能な結合基候補が適切な「還元的に切断可能な結合基」であるか、例えば特定のiRNA部分および特定の標的薬剤とともに使用することに適しているか測定するため、本明細書に記載される方法を試みることができる。例えば、候補を、ジチオスレイトール(DTT)、または細胞、例えば標的細胞に認められる切断率を模倣する、当業者に知られる試薬を使用する他の還元剤とともにインキュベートされることによって評価することができる。候補を、血液または血清状態を模倣するように選択された条件下でも評価することができる。

10

【0187】

好ましい実施形態では、候補化合物は血液中で最大10%で切断される。好ましい実施形態において、有用な候補化合物は、血液(または細胞外条件を模倣するために選択されたインビトロ条件下)と比べて、細胞において(または細胞内条件を模倣するために選択されたインビトロ条件下で)少なくとも2、4、10、または100倍速く分解される。候補化合物の切断率は、細胞外培地を模倣するために選択した状態と比べて、細胞内培地を模倣するために選択した条件下で酵素反応速度アッセイを使用して測定することができる。

20

【0188】

リン酸塩ベースの切断可能な結合基

リン酸塩ベースの結合基はリン酸塩基を分解または加水分解する薬剤によって切断される。細胞においてリン酸塩基を切断する薬剤の例は、細胞におけるホスファターゼ等の酵素である。リン酸塩ベースの結合基の例は、-O-P(O)(ORk)-O-、-O-P(S)(ORK)-O-、-S-P(O)(ORK)-O-、-O-P(O)(ORK)-S-、-S-P(O)(ORK)-S-、-O-P(S)(ORK)-S-、-S-P(S)(ORK)-O-、-O-P(O)(Rk)-O-、-O-P(S)(Rk)-O-、-S-P(O)(Rk)-O-、-O-P(S)(Rk)-S-である。好ましい実施形態は、-O-P(O)(OH)-O-、-O-P(S)(OH)-O-、-O-P(S)(SH)-O-、-S-P(O)(OH)-O-、-O-P(O)(OH)-S-、-S-P(S)(OH)-S-、-O-P(S)(OH)-O-、-O-P(O)(H)-O-、-O-P(S)(H)-O-、-S-P(O)(H)-O-、-S-P(S)(H)-O-、-S-P(O)(H)-S-、-O-P(S)(H)-S-である。好ましい実施形態は、-O-P(O)(OH)-O-である。これらの候補は、上記のものと類似している方法を使用して評価され得る。

30

【0189】

酸性の切断可能な結合基

酸性の切断可能な結合基は酸性の状態下で切断される結合基である。好ましい実施形態において、酸性の切断可能な結合基は、約6.5以下(例えば、約6.0、5.5、5.0以下)のpHである酸性環境において、または一般酸として作用することができる酵素等の薬剤で、切断される。細胞内で、エンドソームおよびリソソーム等の特異的に低いpHの小器官は、酸性の切断可能な結合基に対する切断環境を提供することができる。酸性の切断可能な結合基の例は、ヒドラゾン、エステル、およびアミノ酸のエステルを含むがこれらに限定されない。酸性の切断可能な基は一般式の-C=NN-、C(O)O、または-O-C(O)を有することができる。好ましい実施形態は、エステル(アルコキシ基)の酸素に結合した炭素がアリール基である場合、置換したアルキル基、またはジメチルペニチルもしくはt-ブチル等の第三アルキル基を供する。これらの候補は、上記のものと類似している方法を使用して評価され得る。

40

【0190】

50

エステルベースの結合基

エステルベースの結合基は、細胞におけるエステラーゼおよびアミダーゼ等の酵素によって切斷される。エステルベースの切斷可能な結合基の例は、アルキレン、アルケニレン、およびアルキニレン基のエステルを含むがこれらに限定されない。エステルの切斷可能な結合基は、一般式の - C (O) O - 、または - O C (O) - を有することができる。これらの候補は、上記のものと類似している方法を使用して評価され得る。

【0191】

ペプチドベースの切斷基

ペプチドベースの結合基は細胞におけるペプチダーゼおよびプロテアーゼ等の酵素によって切斷される。ペプチドベースの切斷可能な結合基は、オリゴペプチド（例えば、ジペプチド、トリペプチド等）およびポリペプチドを產生するためにアミノ酸間で形成されるペプチド結合である。ペプチドベースの切斷可能な基は、アミド基 (- C (O) N H -) を含まない。アミド基は、任意のアルキレン、アルケニレン、またはアルキニレン間で形成され得る。ペプチド結合は、ペプチドおよびタンパク質を产生するためにアミノ酸間で形成されるアミド結合の特別な種類である。ペプチドベースの切斷基は、一般的に、ペプチドおよびタンパク質を产生するアミノ酸間で形成されるペプチド結合（すなわち、アミド結合）に限定され、アミド官能基の全体を含まない。R¹ および R² が 2 つの隣接アミノ酸の R 基である場合、ペプチド切斷可能な結合基は、一般式の - N H C H R¹ C (O) N H C H R² C (O) - を有する。これらの候補は、上記のものと類似している方法を使用して評価され得る。

10

20

30

40

50

【0192】

「クリック」反応

本発明の合成方法は、リガンドとクリック - 担体化合物とを共役するためのクリックケミストリーを利用する。クリックケミストリー技術は、例えば、本明細書に全てが参考として組み込まれる以下の参照に記載される：

Kolb, H. C.; Finn, M. G. and Sharpless, K. B. *Angew. Chem., Int. Ed.* (2001) 40: 2004 - 2021.

Kolb, H. C. and Sharpless, K. B. *Drug Disc. Today* (2003) 8: 112 - 1137.

Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V. and Sharpless, K. B. *Angew. Chem., Int. Ed.* (2002) 41: 2596 - 2599.

Tornoe, C. W.; Christensen, C. and Meldal, M. J. *Org. Chem.* (2002) 67: 3057 - 3064.

Wang, Q. et al., *J. Am. Chem. Soc.* (2003) 125: 3192 - 3193.

Lee, L. V. et al., *J. Am. Chem. Soc.* (2003) 125: 9588 - 9589.

Lewis, W. G. et al., *Angew. Chem., Int. Ed.* (2002) 41: 1053 - 1057.

Manetsch, R. et al., *J. Am. Chem. Soc.* (2004) 126: 12809 - 12818.

Mocharla, V. P. et al., *Angew. Chem., Int. Ed.* (2005) 44: 116 - 120.

【0193】

他のクリックケミストリー官能基を、上記の参照で記載されるもの等、利用することができるが、付加環化反応の使用は、特にアルキニル基を含むアジ化物の反応が好まれる。Cu (I) 塩の存在下で、末端アルキンおよびアジ化物は、1, 3 - 双極性付加環化を経て 1, 4 - 二置換 1, 2, 3 - トリアゾールを形成する。Ru (II) 塩（例えば Cu * RuCl (PPh₃)₂ ）の存在下で、末端アルキンおよびアジ化物は、1, 3 - 双極性

付加環化を経て 1,5-二置換 1,2,3-トリアゾールを形成する (Folk i n , V . V . et al . , Org . Lett . (2005) 127 : 15998 - 15999)。あるいは、1,5-二置換 1,2,3-トリアゾールは、アジ化物およびアルキニル試薬を使用して形成され得る (Kran i s k i , A . ; Fok i n , V . V . and Sharpless , K . B . Org . Lett . (2004) 6 : 1237 - 1240)。ヘテロ-ディールス アルダー反応または 1,3-双極性付加環化反応も使用することができる (例えば Padwa , A . 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry : Volume 1 , John Wiley , New York , (1984) 1 - 176 、 Joergensen , K . A . Angew . Chem . , Int . Ed . (2000) 39 : 3558 - 3588 、および Tietze , L . F . and Kettschau , G . Top . Curr . Chem . (1997) 189 : 1 - 120) を参照。
10

【0194】

(銅がない場合) お互いに対して本質的に非反応であり、他の官能基および反応状態に非常に耐えるため、共役パートナーとしてアジ化物およびアルキンの選択は特に有利である。この化学的適合性は、アジ化物およびアルキンの多くの異なる種類が、最低限の副反応で相互に共役することを確認にすることを助ける。

【0195】

必要な銅種 (I) は、安定化リガンドで大抵は第一銅塩、例えば Cu I , Cu OTf . C₆H₆ 、または [Cu(CH₃CN)₄] [PF₆] として直接添加される (例えば Tornoe e , C . W . ; Christensen , C . and Meldal , M . J . Org . Chem . (2002) 67 : 3057 - 3064 、 Chan , T . R . et al . , Org . Lett . (2004) 6 : 2853 - 2855 、 Lewis , W . G . et al . , J . Am . Chem . Soc . (2004) 126 : 9152 - 9153 、 Mantovani , G . et al . , Chem . Comm . (2005) 2089 - 2091 、 Diez - Gonzalez , S . et al . , Chem . Eur . J . (2006) 12 : 7558 - 7564 、および Candelon , N . et al . , Chem . Comm . (2008) 741 - 743 を参照) 、またはより多くの場合、還元剤で銅 (II) 塩から精製される (Rostovtsev , V . V . et al . , Angew . Chem . (2002) 114 : 2708 - 2711 、および Angew . Chem . , Int . Ed . (2002) 41 : 2596 - 2599) 。金属銅 (例えば Himo , F . et al . , J . Am . Chem . Soc . (2005) 127 : 210 - 216 を参照) またはクラスター (例えば Pachon , L . D . et al . , Adv . Synth . Catal . (2005) 347 : 811 - 815 、および Molteni , G . et al . , New J . Chem (2006) 30 : 1137 - 1139 を参照) も利用され得る。Chassaining 等は、近年アジ化物 - アルキン付加環化に対する触媒として銅 (I) ゼオライトを報告した (Chem . Eur . J . (2008) 14 : 6713 - 6721)。銅 (I) 塩はレドックス処理を起こしやすいため、窒素または亜リン酸ベースのリガンドは、付加環化反応の間に活性銅の触媒を保護および安定するために、添加されなければならない。
20
30
40

【0196】

反応は、非常に簡単である。アジ化物およびアルキンは、大抵は同時に水およびtert-ブチルアルコール、THF、DMSO、トルエン、またはDMF等の共溶媒に混合される。水 / 共溶媒は、大抵 1 : 1 ~ 1 : 9 の割合である。軽度の加熱は反応時間を短くするが、反応は、大抵夜通し行われる (Sharpless , W . D . ; Wu , P . ; Hansen , T . V . ; および Li , J . G . J . Chem . Ed . (2005) 82 : 1833)。水溶液系は、還元剤が必要ないように直接銅 (I) 種も使用することができる。反応の状態は、その後大抵、共溶媒としてアセトニトリル (必須ではないが (Chan , T . R . ; Hilgraf , R . ; Sharpless , K . B . および Folk i n , V . V . Org . Lett . (2004) 6 : 2853)) およびトリエチルアミン、2
50

, 6 - ルチジン、ピリジン、およびジイソプロピルアミン等の窒素塩基を必要とする。この場合、銅(I)種は CuI、CuOTf、C₆H₆、または [Cu(CH₃CN)₄] [PF₆] として供給される (Rostoc et al., V.V.; Green L.G.; Fokin, V.V. および Shrapless, K.B. Angew. Chem., Int. Ed. (2002) 41: 2596 - 2599)。

水ベースの方法は、多くの用途に対して魅力的であるが、溶媒系アジ化物 - アルキンの付加環化方法は、溶解度および / または他の問題が生じた場合における有用性を見出した、例えば、以下を参照されたい：

Malkoch, M. et al., Macromolecules (2005) 38: 3663.

Gujadur, R.; Venkataraman, D. and J.T. Kintigh. J.T. Tet. Lett. (2001) 42: 4791.

Laurent, B.A. and Grayson, S.M.J. Am. Chem. Soc. (2006) 128: 4238.

Opsteen, J.A.; van Hest, J.C.M. Chem. Commun. (2005) 57.

Tsarevsky, N.V.; Sumerlin, B.S. and Matyjaszewski, K. Macromolecules (2005) 38: 3558.

Johnson, J.A. et al., J. Am. Chem. Soc. (2006) 128: 6564.

Sumerlin, B.S. et al., Macromolecules (2005) 38: 7540.

Gao, H.F. and Matyjaszewski, K. Macromolecules (2006) 39: 4960.

Gao, H. et al., Macromolecules (2005) 38: 8979.

Vogt, A.P. and Sumerlin, B.S. Macromolecules (2006) 39: 5286.

Lutz, J.F.; Borner, H.G. and Weichenhan, K.M. Macromol. Rapid Comm. (2005) 26: 514.

Mantovani, G.; Admiral, V.; Tao, L. and Haddleton, D.M. Chem. Comm. (2005) 2089.

【0197】

クリック反応は、熱的に実施され得る。一態様において、クリック反応は、25 ~ 100 の微熱で実行される。一態様において、反応は 25 ~ 75 、または 25 ~ 65 、または 25 ~ 50 で実施することができる。一実施形態において、反応は室温で実施される。別の態様において、クリック反応はマイクロ波を使用して実施することができる。マイクロ波補助クリック反応は、銅の有無に関わらず実施することができる。

【0198】

一態様において、本発明は、クリック反応を介してクリック - 担体化合物とリガンドとの共役方法を提供する。好ましい実施形態では、クリック反応はアジ化物とアルキニル基との付加環化反応であり銅によって触媒される。一実施形態において、等モル量のアルキンおよびアジ化物は、DCM / MeOH (10 : 1 ~ 1 : 1 の割合 v / v) で混合され、それぞれ 0.05 ~ 0.5 モル% の [Cu(CH₃CN)₄] [PF₆] および銅が反応に添加される。一実施形態において、DCM / MeOH の割合は、5 : 1 ~ 1 : 1 である。好ましい実施形態では、DCM / MeOH の割合は 4 : 1 である。一実施形態において、等モル量の [Cu(CH₃CN)₄] [PF₆] および銅が添加される。好ましい実施形態では、それぞれ 0.05 ~ 0.25 モル% の [Cu(CH₃CN)₄] [PF₆] および銅が反応に添加される。より好ましい実施形態において、それぞれ 0.05 モル%、0.1 モル%、0.15 モル%、0.2 モル%、または 0.25 モル% の [Cu(CH₃CN)₄] [PF₆] および銅が反応に添加される。

10

20

30

40

50

C N)₄] [P F₆] および銅が反応に添加される。

【 0 1 9 9 】

「プロドラッグ」という用語は、内因性酵素の作用または他の化学物質および／または状態によって、体内またはその細胞内で活性型（すなわち、薬物）に変換される不活性型に調製された治療薬を示す。特に、本発明のオリゴヌクレオチドのプロドラッグバージョンは、Gosselinらに対して1993年12月9日に公開された国際公開第93/24510号または国際公開第94/26764号の各パンフレットおよびImbachらに対する米国特許第5,770,713号明細書に開示される方法によってSATE[（S-アセチル-2-チオエチル）リン酸塩]の誘導体として調製された。

【 0 2 0 0 】

「薬学的に許容される塩」という用語は、本発明のオリゴマー化合物の生理学的および薬学的に許容される塩、すなわち親化合物の好ましい生物学的活性を維持しそれに加えて不要中毒学的影響を与えない塩、を指す。オリゴヌクレオチドについて、薬学的に許容される塩の好ましい例およびそれらの使用は、本明細書にすべてが組み込まれる米国特許第6,287,860号明細書にさらに開示される。

【 0 2 0 1 】

リガンド

様々な実体は「クリック」反応を使用してオリゴヌクレオチド、例えばiRNA剤と共に役することができる。好ましい実体は様々な場所例えば、3'末端、5'末端、および／または内部の位置でオリゴヌクレオチドと共に役することができる。

【 0 2 0 2 】

好ましい実施形態において、リガンドはリンカーを介入してiRNA剤に結合される。化合物が成長している鎖に組み込まれる場合、リガンドは化合物上に存在することができる。いくつかの実施形態において、リガンドを「前駆物質」化合物が成長している鎖に組み込んだ後、「前駆物質」化合物に共役することで組み込むことができる。例えば、アジ化物終結リンカー（すなわち、関連リガンドを有さない）を有する化合物、例えば-LINCA-N₃を、成長しているセンスまたはアンチセンス鎖に組み込むことができる。次の作業において、すなわち鎖に前駆体化合物が組み込まれた後、アルキンを有するリガンド、例えば末端アセチレン、例えばリガンド-C≡C-Hは次に「クリック」反応によって前駆体化合物に結合することができる。あるいは、化合物リンカーはアルキン、例えば末端アセチレンを含み、リガンドは「クリック」反応を起こすためのアジ化物機能を含む。アジ化物またはアルキン機能を、当業者に知られる方法によってリガンドに組み込むことができる。例えば、アジ化物またはアルキン機能を保有する部分をリガンドと結び付けることができるまたはリガンドにおける官能基を、アジ化物またはアルキンに転換することができる。一実施形態において、オリゴヌクレオチドが固体支持体に結合されている間、前駆体化合物とリガンドとの結合は生じる。一実施形態において、オリゴヌクレオチドを保有する前駆物質は、必ず脱保護されるが、リガンド共役が起きる前に精製されない。一実施形態において、オリゴヌクレオチドを保有する前駆体化合物は必ず脱保護され、リガンド共役が起きる前に精製される。ある実施形態では、「クリック」反応はマイクロ波で実施される。

【 0 2 0 3 】

好ましい実施形態において、リガンドは分布、標的または組み込まれるiRNA剤の寿命を変更する。好ましい実施形態において、リガンドは、例えばリガンドなどの不在の種と比較して、選択された標的、例えば分子、細胞もしくは細胞型、コンパートメント、例えば細胞性もしくは臓器コンパートメント、組織、臓器、または体の領域に対して親和性を提供する。好ましいリガンドは二重鎖核酸において二重鎖対形成を起こさないであろう。

【 0 2 0 4 】

好ましいリガンドはエンドソーム溶解の性質を有することができる。エンドソーム溶解リガンドは、エンドソームの溶解および／または本発明の組成物の輸送、またはエンドソ

10

20

30

40

50

ームから細胞の細胞質までのその成分を促進する。エンドソーム溶解リガンドはポリアニオンペプチドまたはpH依存膜活性および膜融合性を示すペプチド模倣であり得る。ある実施形態では、エンドソーム溶解リガンドはエンドソームのpHにおける活性高次構造を想定する。「活性」高次構造は、エンドソーム溶解リガンドにおける高次構造が、エンドソームの溶解および/または本発明の組成物の輸送、エンドソームから細胞の細胞質までのその成分を促進することである。例示的なエンドソーム溶解リガンドは、GALA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)を含む。ある実施形態では、エンドソーム溶解成分は電荷における変化またはpHにおける変更に対する反応におけるプロトン化を起こすであろう化学基(例えばアミノ酸)を含むことができる。エンドソーム溶解成分は直線状であるまたは分岐することができる。例示的なペプチドベースのエンドソーム溶解リガンドの一次配列は表1に示される。

【表1】

表1：エンドソーム溶解活性を含むペプチドの一覧

名前	配列(N~C)	参照
GALA	AALEALAEALEALAEALEAEEAAAAGGC	1
EALA	AALAEALAEALAEALAEALAEAAAAGGC	2
	ALEALAEALEALAEA	3
INF-7	GLFEAIEGFIENGWEGMIWDYG	4
Inf HA-2	GLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYG	5
diINF-7	GLF EAI EGFI ENGW EGMI DGWYGC GLF EAI EGFI ENGW EGMI DGWYGC	5
diINF3	GLF EAI EGFI ENGW EGMI DGGC GLF EAI EGFI ENGW EGMI DGGC	6
GLF	GLFGALAEALAEALAEH LAEALAEALAEALAGGSC	6
GALA-INF3	GLFEAIEGFIENGWEGLAEALAEALAEALAGGSC	6
INF-5	GLF EAI EGFI ENGW EGnI DG K GLF EAI EGFI ENGW EGnI DG	4

n、ノルロイシン

参考文献

- Subbarao, et al. (1987) *Biochemistry* 26:2964–2972.
- Vogel, et al. (1996) *J. Am. Chem. Soc.* 118:1581–1586
- Turk, et al. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* 1559:56–68.
- Plank, et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:12918–12924.
- Mastrobattista, et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277:27135–43.
- Oberhauser, et al. (1995) *Deliv. Strategies Antisense Oligonucleotide Ther.* 2:47–66.

【0205】

好みのリガンドは、輸送、ハイブリダイゼーション、および特異性の性質を改善することができ、結果としての天然もしくは修飾したオリゴリボヌクレオチドのヌクレアーゼ耐性、または本明細書に記載される任意の化合物の組み合わせを含む高分子、および／または天然もしくは修飾したリボヌクレオチドをも改善することができる。

【0206】

一般にリガンドは、例えば吸収を高めるために、治療の修飾因子、例えば分布を監視するために、診断の化合物またはレポーター基、架橋剤、およびヌクレアーゼ耐性授与部分を含むことができる。一般的な例は、脂質、ステロイド、ビタミン、糖、タンパク質、ペプチド、ポリアミン、およびペプチド模倣体を含む。

【0207】

リガンドは、タンパク質（例えば、ヒト血清アルブミン（HSA）、低密度リポタンパク質（LDL）、高密度リポタンパク質（HDL）、またはグロブリン）等の自然発生する物質、炭水化物（例えばデキストラン、フルラン、キチン、キトサン、イヌリン、シク

10

20

30

40

50

ロデキストリン、またはヒアルロン酸)、または脂質を含むことができる。リガンドは、合成ポリマー、例えば合成ポリアミノ酸、オリゴヌクレオチド(例えばアプタマー)等の組換えまたは合成分子でもあり得る。ポリアミノ酸の例は、ポリリジン(PLL)、ポリ-L-アスパラギン酸、ポリ-L-グルタミン酸、スチレン-無水マレイン酸共重合体、ポリ(L-ラクチド-co-グリコリド)共重合体、ジビニルエーテル無水マレイン酸共重合体、N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド共重合体(HMPA)、ポリエチングリコール(PEG)、ポリビニルアルコール(PVA)、ポリウレタン、ポリ(2-エチル酢酸)、N-イソプロピルアクリルアミドポリマー、またはポリホスファジンを含む。ポリアミンの例は、ポリエチレンイミン、ポリリジン(PLL)、スペルミン、スペルミジン、ポリアミン、疑似ペプチドポリアミン、ペプチド模倣物のポリアミン、デンドリマーポリアミン、アルギニン、アミジン、プロタミン、カチオン脂質、カチオンポルフィリン、ポリアミンの四級塩、またはアルファヘリックスのペプチドを含む。

10

【0208】

リガンドは標的基、例えば細胞または組織標的薬剤、例えばレクチン、糖タンパク質、脂質、またはタンパク質、例えば腎細胞等の特定の細胞型と結合する抗体を含むことができる。標的基は、甲状腺刺激ホルモン、メラニン細胞刺激ホルモン、レクチン、糖タンパク質、サーファクタントタンパク質A、ムチン糖鎖、多価ラクトース、多価ガラクトース、N-アセチル-ガラクトサミン、N-アセチル-グルコサミン多価マンノース、多価フコース、グリコシリ化ポリアミノ酸、多価ガラクトース、トランスフェリン、ビスホスホネート、ポリグルタミン酸塩、ポリアスパラギン酸塩、脂質、コレステロール、ステロイド、胆汁酸、葉酸、ビタミンB12、ビオチン、RGDペプチド、RGDペプチド模倣薬、またはアブタマーであることができる。表2はリガンドおよびその関連受容体を標的とした例のいくつかを示す。

20

【0209】

リガンドの他の例は、染色、挿入剤(例えばアクリジン)、架橋剤(例えばソラレン、マイトイシンC)、ポルフィリン(TPPC4、テキサフィリン、サフィリン)、ポリ環状芳香族炭化水素(例えばフェナジン、ジヒドロフェナジン)、人工エンドヌクレアーゼ(例えばEDTA)、親油性分子、例えばコレステロール、コール酸、アダマンタン酢酸、1-ピレン酇酸、ジヒドロテストステロン、1,3-ビス-O(ヘキサデシル)グリセリン、ゲラニルオキシヘキシル基、ヘキサデシルグリセリン、ボルネオール、メントール、1,3-プロパンジオール、ヘプタデシル基、パルミチン酸、ミリスチン酸、O3-(オレオイル)リトコール酸、O3-(オレオイル)コレイン酸、ジメトキシトリチル、またはフェノキサジン)、およびペプチド共役体(例えばアンテナペディアペプチド、Tatペプチド)、アルキル化剤、リン酸塩、アミノ、メルカプト、PEG(例えばPEG-40K)、MPEG、[MPEG]₂、ポリアミノ、アルキル、置換したアルキル、放射性標識マーカー、酵素、ハプテン(例えばビオチン)、輸送/吸収促進薬(例えばアスピリン、ビタミンE、葉酸)、合成リボヌクレアーゼ(例えばイミダゾール、ビスイミダゾール、ヒスタミン、イミダゾールクラスター、アクリジン-イミダゾール共役体、テトラアザ大環状化合物のEu3+複合体)、ジニトロフェニル、HRP、またはAPを含む。

30

【表2】

表2：肝臓標的リガンドおよび関連受容体

<u>肝細胞</u>	<u>リガンド</u>	<u>受容体</u>	
1)実質細胞(PC)(肝細胞)	ガラクトース Gal NAc(n-アセチル-ガラクトサミン) ラクトース アシアロフェツイン	ASGP-R(アシアロ糖タンパク質受容体) ASPG-R(GalNAc受容体) ASPG-r	10
2)類洞内皮細胞(SEC)	ヒアルロナン プロコラーゲン 負荷電分子 マンノース N-アセチルグルコサミン 免疫グロブリン LPS インスリン トランスフェリン アルブミン 糖-アルブミン共役体 マンノース-6-リン酸塩	ヒアルロナン受容体 プロコラーゲン受容体 スカベンジャー受容体 マンノース受容体 スカベンジャー受容体 Fc受容体 CD14受容体 受容体を介した経細胞輸送 受容体を介した経細胞輸送 非特異的 マンノース-6-リン酸塩受容体	20
3)クッパー細胞(KC)	マンノース フコース アルブミン マンノースアルブミン共役体	マンノース受容体 フコース受容体 非特異的	30

【0210】

リガンドは、タンパク質、例えば糖タンパク質、またはペプチド、例えばコリガンドに対する特異的親和性を有する分子、または抗体、例えば癌細胞、内皮細胞、または骨細胞等の特定の細胞型に結合する抗体であることができる。リガンドは、ホルモンおよびホルモン受容体をも含むことができる。それらは、脂質、レクチン、炭水化物、ビタミン、補助因子、多価ラクトース、多価ガラクトース、Nアセチルガラクトサミン、Nアセチルグルコサミン多価マンノース、多価フコース、またはアブタマー等の非ペプチド種を含むことができる。リガンドは例えば、リポ多糖、p38MAPキナーゼの活性化因子、またはNF-Bの活性化因子であることができる。

【0211】

リガンドは、例えば、細胞の細胞骨格を分裂するために、例えば細胞の微小管、微小線維、および/または中間径フィラメントを分裂するために、物質、例えば細胞へiRNA剤の吸収を増加させることができる薬物であることができる。薬物は、例えば分類群、ビンクリスチン、ビンプラスチン、サイトカラシン、ノコダゾール、ジャスプラキノリド、ラトランクリンA、ファロイジン、スワインホリドA、インダノシン、またはミオセルビンであり得る。

【0212】

リガンドは、例えば炎症性反応を活性化することによって細胞へのiRNA剤の吸収を

40

20

30

40

50

増加することができる。かかる影響を有する可能性のある例示的なリガンドは、腫瘍壞死因子アルファ(TNF アルファ)、インターロイキン 1 ベータ、またはガンマインターフェロンを含む。

【 0 2 1 3 】

一態様において、リガンドは脂質または脂質ベースの分子である。かかる脂質または脂質ベースの分子は、好ましくは血清タンパク質、例えばヒト血清アルブミン(H S A)と結合する。リガンドと結合する H S A は、標的組織、例えば体の非腎臓標的組織に対する共役体の分布を可能にさせる。例えば、標的組織は肝臓の実質細胞を含む肝臓であり得る。 H S A と結合する他の分子は、リガンドとして使用されることもできる。例えば、ネプロキシンまたはアスピリンは使用することができる。脂質もしくは脂質ベースのリガンドは、(a) 共役体の分解に対する耐性を増加する、(b) 標的細胞もしくは細胞膜を標的もしくは輸送を増加することができ、および / または(c) 血清タンパク質、例えば H S A との結合を調整するために使用することができる。

10

【 0 2 1 4 】

脂質ベースのリガンドは、調節する、例えば共役体と標的組織との結合を制御するために使用することができる。例えば、 H A S とより強く結合する脂質または脂質ベースリガンドは、腎臓に対して標的とされる可能性が低い、そのため体から取り除かれる可能性は低いであろう。 H S A とあまり強く結合しない脂質または脂質ベースのリガンドは、腎臓に対して共役体を標的とするために使用することができる。

20

【 0 2 1 5 】

好ましい実施形態では、脂質ベースのリガンドは H S A と結合する。好ましくは、共役体が好ましくは非腎臓組織に分布されるように、十分な親和性で H S A と結合される。しかし、 H S A リガンド結合は逆行され得ないほど強い親和性が好ましい。

【 0 2 1 6 】

別の好ましい実施形態では、共役体が腎臓に好ましく分布されるように、脂質ベースのリガンドは H S A と弱く結合するまたは全くしない。腎細胞を標的とする他の部分は、脂質ベースのリガンドの変わりにまたは加えて使用されることもできる。

30

【 0 2 1 7 】

別の態様において、リガンドは、標的細胞、例えば増殖細胞によって取り込まれる部分、例えばビタミンである。これらは、例えば悪性または非悪性型、例えば癌細胞の不必要細胞増殖を特徴とする疾患を治療するために特に有用である。例示的なビタミンはビタミン A 、 E 、および K を含む。他の例示的なビタミンは B ビタミン、例えば葉酸、 B 1 2 、リボフラビン、ビオチン、ピリドキサール、または癌細胞によって吸収されたその他のビタミンもしくは栄養素を含む。また、 H A S 、低密度リポタンパク質(L D L)および高密度リポタンパク質(H D L)も含む。

【 0 2 1 8 】

別の態様において、リガンドは細胞浸透剤、好ましくはらせん細胞浸透剤である。好ましくは、製剤は両親媒性である。例示的な製剤は、 t a t またはアンテナペディア等のペプチドである。製剤がペプチドの場合、修飾され得、ペプチジル模倣、インパートマー、非ペプチド、または疑似ペプチド結合、および D - アミノ酸の使用を含む。らせん製剤は、好ましくは親油性および疎油性相を有するアルファらせん製剤であることが好ましい。

40

【 0 2 1 9 】

リガンドはペプチドまたはペプチド模倣物であることができる。ペプチド模倣物(本明細書でオリゴペプチド模倣物としても引用される)は、天然ペプチドに似た定義された三次元構造に折りたたむことが可能な分子である。ペプチドおよびペプチド模倣物の i R N A 効への結合は、細胞認識および吸収の増強をすることによって等、 i R N A の薬物動態分布に影響することができる。ペプチドまたはペプチド模倣部分は、約 5 ~ 5 0 アミノ酸長、例えば約 5 、 1 0 、 1 5 、 2 0 、 2 5 、 3 0 、 3 5 、 4 0 、 4 5 、または 5 0 アミノ酸長であり得る(例については表 3 を参照)。

【表3】

表3. 例示的な細胞浸透ペプチド

細胞浸透ペプチド	アミノ酸配列	参照
ペネトラチン	RQIKIWFQNRRMKWKK	Derossi et al., J. Biol. Chem. 269:10444, 1994
Tat 断片(48-60)	GRKKRRQRRPPQC	Vives et al., J. Biol. Chem., 272:16010, 1997
シグナル配列ベースのペプチド	GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV	Chaloin et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 243:601, 1998
PVEC	LLIILRRRIRKQAHAAHSK	Elmquist et al., Exp. Cell Res., 269:237, 2001
Transportan	GWTLNSAGYLLKINLKALAALAKKIL	Pooga et al., FASEB J., 12:67, 1998
両親媒性モデルペプチド	KLALKLALKALKALKLA	Oehlke et al., Mol. Ther., 2:339, 2000
Arg ₉	RRRRRRRRR	Mitchell et al., J. Pept. Res., 56:318, 2000
細菌性細胞壁浸透	KFFKFFKFFF	
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES	
セクロピン P1	SWLSKTAKKLENSAKKRISSEGIAIAIQGGPR	
α デフェンシン	ACYCRIPTACIAGERRYGTCIYQGRLWAFCC	
β デフェンシン	DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQGTCYRGK AKCCK)	
バクテネシン	RKCRIVVIRVCR	
PR-39	RRRPRPPYLPRPRPPPFFPPRLPPRIPPGFPPRFP PRFPGKR-NH ₂	
インドリシジン	ILPWKWPWWPWRR-NH ₂	

10

20

30

40

【0220】

ペプチドまたはペプチド模倣物は、例えば細胞浸透ペプチド、カチオンペプチド、両親媒性ペプチド、または疎水性ペプチドであり得る（例えば、第一に T y r 、 T r p 、または P h e からなる）。ペプチド部分はデンドリマーペプチド、制約されたペプチド、または架橋されたペプチドであり得る。別の代替案としては、ペプチド部分は疎水性膜移行配列 (M T S) を含むことができる。例示的な疎水性 M T S を含有するペプチドは、アミノ酸配列 A A V A L L P A V L L A L L A P を有する R F G F である。疎水性 M T S を含む R F G F 類似体（例えば、アミノ酸配列 A A L L P V L L A A P ）は、標的部であるこ

50

ともできる。ペプチド部分は、細胞膜に渡ってペプチド、オリゴヌクレオチド、およびタンパク質を含む大きい極性分子を保有することができる「送達」ペプチドであり得る。例えば、HIV Tat タンパク質 (G R K K R R Q R R R P P Q) およびショウジョウバエアンテナペディアタンパク質 (R Q I K I W F Q N R R M K W K K) からの配列は、送達ペプチドとして機能することが可能であることが分かった。ペプチドまたはペプチド模倣物を、ファージディスプレイライブラリー、または 1 ビーズ 1 化合物 (O B O C) コンビナトリアルライブラリーから同定されたペプチド等の DNA のランダム配列によってコードすることができる (Lam et al., Nature, 354: 82 - 84, 1991)。好ましくは組み込まれた化合物ユニットを通して iRNA 剤につながれたペプチドまたはペプチド模倣物は、アルギニングリシンアスパラギン酸 (RGD) ペプチド、または RGD 模倣物等のペプチドを標的とした細胞である。ペプチド部分は、約 5 個のアミノ酸～約 40 個のアミノ酸の範囲の長さであることができる。ペプチド部分は、安定または直接立体構造性質を増加させる等の構造修飾を有することができる。以下に記載された構造修飾のいずれかを利用することができる。

10

【0221】

RGD ペプチド部分を、内皮腫瘍細胞または乳癌腫瘍細胞等の腫瘍細胞を標的とするために使用することができる (Zittmann et al., Cancer Res., 62: 5139 - 43, 2002)。RGD ペプチドは、肺、腎臓、脾臓、または肝臓を含む様々な他の組織の腫瘍を iRNA 剤の標的にすることを容易にすることができます (Aoki et al., Cancer Gene Therapy 8: 783 - 787, 2001)。好ましくは、RGD ペプチドは、腎臓を iRNA 剤の標的にすることを容易にするであろう。RGD ペプチドは直線状または環状であり得、修飾される、例えば、特異的組織を標的とすることを容易にするためにグリコシル化またはメチル化され得る。例えば、グリコシル化された RGD ペプチドは、 v_3 を発現する腫瘍細胞に iRNA 剤を送達することができる (Haubner et al., Jour. Nuc. Med., 42: 326 - 336, 2001)。

20

【0222】

増殖細胞において濃縮されたマーカーを標的とするペプチドを使用することができる。例えば、ペプチドおよびペプチド模倣物を含む RGD は、癌細胞、特に

30

Iv9₃

【0223】

インテグリンを示す細胞を標的とすることができます。したがって、RGD ペプチド、D-アミノ酸、ならびに合成 RGD 模倣物を含む RGD、RGD ペプチドを含む環状ペプチドを使用することもできる。RGD に加えて、

Iv9₃

【0224】

インテグリンリガンドを標的とする他の部分を使用することができる。一般的に、かかるリガンドを、増殖細胞および血管新生を制御するために使用することができる。PECAM-1、VEGF、または他の癌遺伝子、例えば本明細書に記載される癌遺伝子を標的とするこの種のリガンドの好ましい共役体。

40

【表4】

表4. アジ化物修飾ペプチド。

NB12675	N3-(CH2)5-CO-Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Pro-Pro-Gln-NH2
NB12707	N3-(CH2)15-CO-Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Pro-Pro-Gln-NH2
NB12676	cyclo-[Phe-Arg-Gly-Asp-Lys(N3-(CH2)5-COO H)]
NB12708	cyclo-[Phe-Arg-Gly-Asp-Lys(N3-(CH2)15-COOH)]
NB12709	N3-(CH2)5-CO-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-NH2
NB12710	N3-(CH2)15-CO-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-NH2

10

【0225】

「細胞浸透ペプチド」は、細胞、例えば細菌性もしくは真菌細胞等の微生物細胞、またはヒト細胞等の哺乳動物細胞に浸透することができる。微生物細胞に浸透するペプチドは、例えば、らせん直線状ペプチド（例えばLL-37またはCeropin P1）、ジスルフィド結合を含有するペプチド（例えば、デフェンシン、デフェンシン、またはバクテネシン）、または1つまたは2つのみの支配的なアミノ酸（例えば、PR-39またはインドリシジン）を含有するペプチドであり得る。細胞浸透ペプチドは、核移行シグナル（NLS）も含むことができる。例えば、細胞浸透ペプチドは、HIV-1gp41の融合ペプチドドメインおよびSV40大型T抗原のNLSに由来するMPG等の二分両親媒性ペプチドであることができる（Simeoni et al., Nucleic Acids Res. 31: 2717-2724, 2003）。

20

【0226】

一実施形態において、iRNA剤および/または担体オリゴマーにつながれた標的ペプチドは、両親媒性 - らせんペプチドであり得る。例示的な両親媒性らせんペプチドは、セクロピン、リコトキシン（lycotoxin）、パラダキシン、ブフォリン、CPF、ボンビニン様ペプチド（BLP）、カテリシジン、セラトトキシン（ceratotoxin）、S. clavaペプチド、メクラウナギ腸管抗菌ペプチド（HFIAp）、マガイニン、ブレビニン2、デルマセプチン、メリチン、ブルロシジン（pleurocidin）、H₂Aペプチド、ツメガエルペプチド、エスクレンチニス（esculentin）¹、およびカエリン（caerinin）を含むがこれらに限定されない。要因の多くは、好ましくはらせん安定の完成性を維持すると考えられるであろう。例えば、らせん安定残基の最大数は、利用され（例えば、ロイシン、アラニン、またはリシン）、らせん不安定残基の最小数は、利用されるであろう（例えば、プロリン、または環状化合物ユニット）。キャッピング残基は、検討され（例えばグリシンは例示的なNキャッピング残基であり、および/またはC末端アミド化を、らせんを安定するために必要以上のH結合を提供するために使用することができる。i±3、またはi±4位置によって単離された対立する電荷を含む残基間の塩橋の形成は、安定を提供することができる。例えば、リジン、アルギニン、ホモアルギニン、オルニチン、またはヒスチジン等のカチオン残基は、陰イオン性残基グルタミン酸またはアスパラギン酸を含む塩橋を形成することができる。

30

【0227】

ペプチドおよびペプチド模倣物のリガンドは、天然発生または修飾したペプチド、例えばDもしくはLペプチドを有するもの、、、もしくはペプチド、Nメチルペプチド、アザペプチド、1つ以上のアミド、すなわちペプチドを有するペプチド、1つ以上の尿素、チオ尿素、カルバミン酸、もしくはスルホニル尿素結合と交換される結合、または環状ペプチドを含む。

40

【0228】

標識リガンドは、特異的受容体を標的とすることが可能である任意のリガンドであり得

50

る。例は、葉酸、GalNAc、GalNAc₃、ガラクトース、マンノース、マンノース-6P、GalNAcクラスター、マンノースクラスター、ガラクトースクラスター、またはアプタマー等の糖のクラスター。クラスターは、2つ以上の糖ユニットの組み合わせである。標的リガンドは、インテグリン受容体リガンド、ケモカイン受容体リガンド、トランスフェリン、ビオチン、セロトニン受容体リガンド、PSMA、内皮、GCP II、ソマトスタチン、LDL、およびHDLリガンドも含む。リガンドは、核酸、例えばアプタマーを基にすることもできる。アプタマーは、未修飾であるか、または本明細書に開示される修飾の任意の組み合わせを有することができる。

【0229】

エンドソーム放出剤は、イミダゾール、ポリまたはオリゴイミダゾール、PEI、ペプチド、膜融合ペプチド、ポリカルボキシレート、ポリカチオン、遮蔽されるオリゴまたはポリカチオンもしくはアニオン、アセタール、ポリアセタール、ケタール/ポリケタール、オルトエステル、遮蔽されるまたは曝露されるカチオンまたは陰イオン性電荷を含むポリマー、遮蔽されるまたは曝露されるカチオンまたは陰イオン性電荷を含むデンドリマーを含む。

10

【0230】

PK修飾薬は薬物動態修飾薬を表す。PK修飾薬は、脂肪親和性、胆汁酸、ステロイド、リン脂質類似体、ペプチド、タンパク質結合剤、PEG、ビタミン等を含む。例示的PK修飾薬は、コレステロール、脂肪酸、コール酸、リトコール酸、ジアルキルグリセリド、ジアシルグリセリド、リン脂質、スフィンゴ脂質、ナプロキセン、イブプロフェン、ビタミンE、ビオチン等を含むがこれらに限定されない。多くのホスホロチオエート結合を含むオリゴヌクレオチドは、血清タンパク質と結合することで知られる、したがって主鎖においてホスホロチオエート結合の複数を含む短オリゴヌクレオチド、例えば約5塩基、10塩基、15塩基、または20塩基のオリゴヌクレオチドは、リガンドとして(例えばリガンドを調節するPKとして)本発明も受け入れられる。

20

【0231】

さらに、血清成分(例えば血清タンパク質)と結合するアプタマーは、リガンドを調節するPKとして本発明も受け入れられる。

【0232】

本発明を受け入れられる他のリガンドは、全ての目的に対して全てが参照により組み込まれる2004年8月10日に出願された同時係属中の米国特許出願第10/916,185号、2004年9月21日に出願された同第10/946,873号、2007年8月3日に出願された同第10/833,934号、2005年4月27日に出願された同第11/115,989号、および2007年9月21日に出願された同第11/944,227号の各明細書に記載される。

30

【0233】

2つ以上のリガンドが存在する場合は、全てのリガンドは同じ性質を有すること、異なる性質を有する、またはいくつかのリガンドは同じ性質を有するが他は異なる性質を有することができる。例えば、リガンドは標的性質を有し、エンドソーム溶解活性を有する、または性質を調節するPKを有することができる。好ましい実施形態では、全てのリガンドは異なる性質を有する。

40

【0234】

リガンド、例えばクリック担体化合物を含む化合物は、オリゴヌクレオチド、例えばiRNA剤の任意の位置において存在することができる。いくつかの実施形態において、クリック担体化合物は、iRNA剤の5'または3'末端等の終端において存在することができる。クリック担体化合物はiRNA剤の内部位置において存在することができる。二本鎖iRNA剤に対して、クリック担体化合物を1つのまたは両方の鎖に組み込むことができる。いくつかの実施形態において、二本鎖iRNA剤のセンス鎖はクリック担体化合物を含む。他の実施形態において、二本鎖iRNA剤のアンチセンス鎖は、クリック担体化合物を含む。

50

【0235】

いくつかの実施形態において、リガンドを、核酸塩基、糖部分、または核酸分子のインターヌクレオシド結合と共に役することができる。プリン核酸塩基またはその誘導体との共役は、環内および環外原子を含む任意の位置で発生することができる。いくつかの実施形態において、プリン核酸塩基の2-、6-、7-、または8-の位置は、共役体部分に結合する。ピリミジン核酸塩基またはその誘導体との共役は、任意の位置で発生することができる。いくつかの実施形態において、ピリミジン核酸塩基の2-、5-、および6-の位置を、共役体部分と置換することができる。ヌクレオシドの糖部分との共役は、任意の炭素原子で発生することができる。共役体部分に結合することができる糖部分の炭素原子の例は、2'、3'、および5'の炭素原子を含む。1'の位置は脱塩基残基等の共役体部分に結合することもできる。インターヌクレオシド結合は、共役体部分を有することもできる。リンを含有する結合（例えばリン酸ジエステル、ホスホロチオエート、ホスホジチオエート、ホスホロアミド酸等）に対して、共役体部分はリン原子に直接またはリン原子に結合されたO、N、またはS原子に結合することができる。アミンもしくはアミドを含有するインターヌクレオシド結合（例えばPNA）に対して、共役体部分はアミンもしくはアミドの窒素原子または隣接する炭素原子に結合することができる。

10

【0236】

オリゴマー化合物の共役体を調製するための方法がいくつもある。一般的に、オリゴマー化合物は、共役体部分における反応基でオリゴマー化合物における反応基（例えばOH、SH、アミン、カルボキシル、アルデヒド等）に接触することによって共役体部分に結合する。いくつかの実施形態において、1つの反応基は求電子性であり、他は求核性である。

20

【0237】

例えば、求電子基はカルボニルを含有する機能であり得、求核基アミンまたはチオールであり得る。結合基の有無の関係なしに、核酸と関係オリゴマー化合物との結合の方法は、例えば、本明細書において全体が参照により組み込まれるManoharanのAntisense Research and Applications, Crooke and LeBleu, eds., CRC Press, Boca Raton, Fla., 1993, Chapter 17等の文献によく記載される。

30

【0238】

オリゴヌクレオチドの共役体の調製を教える代表的な米国特許は、それぞれが本明細書に参照により組み込まれる、米国特許第4,828,979号、同第4,948,882号、同第5,218,105号、同第5,525,465号、同第5,541,313号、同第5,545,730号、同第5,552,538号、同第5,578,717号、同第5,580,731号、同第5,580,731号、同第5,591,584号、同第5,109,124号、同第5,118,802号、同第5,138,045号、同第5,414,077号、同第5,486,603号、同第5,512,439号、同第5,578,718号、同第5,608,046号、同第4,587,044号、同第4,605,735号、同第4,667,025号、同第4,762,779号、同第4,789,737号、同第4,824,941号、同第4,835,263号、同第4,876,335号、同第4,904,582号、同第4,958,013号、同第5,082,830号、同第5,112,963号、同第5,214,136号、同第5,082,830号、同第5,112,963号、同第5,149,782号、同第5,214,136号、同第5,245,022号、同第5,254,469号、同第5,258,506号、同第5,262,536号、同第5,272,250号、同第5,292,873号、同第5,317,098号、同第5,371,241号、同第5,391,723号、同第5,416,203号、同第5,451,463号、同第5,510,475号、同第5,512,667号、同第5,514,785号、同第5,565,552号、同第5,567,810号、同第5,574,142号、同第5,585,481号、同第5,587,371号、同第5,595,726号、同第5,597,696号、同第5,

40

50

, 599, 923号、同第5, 599, 928号、同第5, 672, 662号、同第5, 688, 941号、同第5, 714, 166号、同第6, 153, 737号、同第6, 172, 208号、同第6, 300, 319号、同第6, 335, 434号、同第6, 335, 437号、同第6, 395, 437号、同第6, 444, 806号、同第6, 486, 308号、同第6, 525, 031号、同第6, 528, 631号、および同第6, 559, 279号の各明細書を含むがこれらに限定されない。

【0239】

オリゴヌクレオチド

本明細書で使用されるとき、「オリゴヌクレオチド」という用語は、全てが本明細書に定義される未修飾RNA、修飾RNA、またはヌクレオシド代替を指す。修飾はiRNA剤と関連して記載されるが、これらの修飾はアンチセンス、アンタゴm i r、アプタマー、リボザイム、およびデコイオリゴヌクレオチド等の本発明の他のオリゴヌクレオチドに適用されることもできると理解される。多数の修飾RNAおよびヌクレオシド代替は記載されるが、好ましい例はヌクレアーゼ分解に対して未修飾RNAよりも大きい抵抗を有するものを含む。好ましい例は、2'糖修飾を有するもの、一本鎖オーバーハングにおける修飾、好ましくは3'一本鎖オーバーハング、または特に一本鎖の場合、1つ以上のリン酸塩基またはリン酸塩基の1つ以上の類似体を含む5'修飾を含む。

10

【0240】

本明細書で使用されるとき、「iRNA剤」は、標的遺伝子、好ましくは内在性または病原体標的RNAの発現を下方制御することができるRNA剤に切断され得るRNA剤である。理論に縛られることを望まないが、iRNA剤は、当業者にRNAi、または転写前もしくは翻訳前のメカニズムと称されることもある標的mRNAの転写後の切断を含む多くのメカニズムのうちの1つ以上によって作用することができる。iRNA剤は一本鎖を含むことができる、または一つ以上の鎖を含むことができる、例えば二本鎖iRNA剤であることができる。iRNA剤が一本鎖である場合、1つ以上のリン酸塩基または1つ以上のリン酸塩基の類似体を含む5'修飾を含むことが特に好ましい。iRNA剤は二本鎖である場合、二本鎖領域は二本鎖領域における2つ以上の鎖、例えば2つの鎖、例えば3つの鎖を含むことができる。

20

【0241】

iRNA剤は、標的遺伝子に対する十分な相同性の領域を含み、iRNA剤、またはその断片が標的遺伝子の下方制御を媒介することができるよう、ヌクレオチドに関して十分な長さであるべきである。（解説を簡単にするために、ヌクレオチドまたはリボヌクレオチドという用語は、本明細書でRNA剤の1つ以上の化合物サブユニットに関連して使用されることがある。本明細書における「リボヌクレオチド」または「ヌクレオチド」という用語の使用は、修飾RNAまたはヌクレオチド代替の場合、1つ以上の位置における修飾ヌクレオチドまたは代替交換部分も指すことが理解されるであろう。）したがって、iRNA剤は、少なくとも部分的およびいくつかの実施形態において、標的RNAに対して完全に、相補的である領域であるまたは含む。iRNA剤と標的との間に完全相補性があることは必要ではないが、一致は、例えば標的RNA、例えばmRNAのRNAi切断によって直接配列特異的サイレンシングするためにiRNA剤またはその切断製品を可能にするために十分でなければならない。

30

【0242】

iRNA剤は、多くの場合、修飾されるまたはクリック担体化合物に加えてヌクレオシド代替を含むであろう。iRNA剤の一本鎖領域は、多くの場合修飾されるまたはヌクレオシド代替を含む、例えば不对領域またはヘアピン構造の領域、例えば2つの相補的領域に連結する領域は、修飾またはヌクレオシド代替を有することができる。1つ以上のiRNA剤の3'または5'終端、例えばエキソヌクレアーゼに対して安定するため、またはRISCに進入するためにアンチセンスRNA剤を支持するための修飾も支持される。修飾はC3（またはC6、C7、C12）アミノリンカー、チオールリンカー、カルボキシリリンカー、非ヌクレオチドスペーサー（C3、C6、C9、C12、脱塩基、トリエ

40

50

チレングリコール、ヘキサエチレングリコール)、特別なビオチンまたはホスホラミダイトとして生じる、および合成の間複数の共役を可能にする別のDMT保護ヒドロキシル基を有するフルオレセイン試薬を含むことができる。

【0243】

本明細書で使用されるとき、「一本鎖iRNA剤」は、單一分子で構成されているiRNA剤である。iRNA剤は鎖内対形成で形成される二重鎖領域を含む、例えば、ヘアピンまたはパンハンドル構造である、または含むことができる。一本鎖iRNA剤は、標的分子に関して好ましくはアンチセンスである。好ましい実施形態において、一本鎖iRNA剤は5'リン酸化である、または5'終端でホスホリル類似体を含む。5'リン酸塩修飾は、RISC媒介遺伝子サイレンシングに矛盾しないものを含む。適切な修飾は、5'モノリン酸塩((HO)2(O)P-O-5')、5'二リン酸塩((HO)2(O)P-O-P(HO)(O)-O-5')、5'三リン酸塩((HO)2(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5')、5'グアノシンキャップ(7メチル化または非メチル化)(7mG-O-5'-HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5')、5'アデノシンキャップ(Appp)、および任意の修飾または未修飾ヌクレオチドキャップ構造(N-O-5'-HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5')、5'モノチオリン酸塩(ホスホロチオエート、(HO)2(S)P-O-5')、5'モノホスホロジチオエート塩(ホスホロジチオエート、(HO)(HS)(S)P-O-5')、5'ホスホロチオレート((HO)2(O)P-S-5')、任意の酸素/硫黄交換モノリン酸塩の追加組み合わせ、二リン酸塩および三リン酸塩(例えば、5'アルファチオ三リン酸塩、5'ガンマチオ三リン酸等)、5'ホスホロアミド酸((HO)2(O)P-NH-5')、(HO)(NH2)(O)P-O-5')、5'アルキルホスホン酸塩(R=アルキル=メチル、エチル、イソプロピル、プロピル等、例えばRP(OH)(O)-O-5'-(OH)2(O)P-5'-CH2-)、5'アルキルエーテルホスホン酸塩(R=アルキルエーテル=メトキシメチル(MeOCH2-)、エトキシメチル等、例えばRP(OH)(O)-O-5'-(O))を含む。(これらの修飾は、複数鎖iRNA剤のアンチセンス鎖と使用されることもできる。)

本明細書で使用されるとき、「複数鎖iRNA剤」は、2つ以上の鎖、例えば二本鎖iRNA剤を含むiRNA剤である。鎖は、二重鎖領域を形成し、ヘアピン、パンハンドル構造、ループ、またはバルジを含むことができる。iRNA剤の少なくとも1つの鎖は、標的分子に関して、好ましくはアンチセンスである。

【0244】

複数鎖iRNA剤の1つのみ、2つのみ、または全ての鎖を修飾することが望ましいであろう。場合によっては、それらは同じ修飾または同じ種類の修飾を有するであろうが、他の場合は、異なる鎖は異なる修飾を有するであろう、例えば一部の場合、一つの鎖のみを修飾することが望ましい。いくつかの鎖のみを修飾する、例えば不活性化することが望ましいであろう、例えば鎖は不活性化するおよび活性iRNA/タンパク質またはRISCの形成を防止することができるために修飾される。これは、例えば5'-O-メチルリボヌクレオチドで修飾によって、鎖の5'リン酸化を防止する修飾で達成され得る(Nykaenen et al., (2001) ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. Cell 107, 309-321を参照。)。リン酸化を防止する他の修飾は、使用されることもできる、例えば単にO-Meよりも、5'-OHをHで置換する。あるいは、リン酸ジエステラーゼが、連鎖を切断し、機能iRNA5'末端放出することができるため、これは望ましくないかもしれないが、大型の巨大基は、5'リン酸塩に添加され得、リン酸ジエステル連鎖に変化する。アンチセンス鎖修飾は、5'リン酸化ならびに本明細書に論じられる他の5'修飾のいずれか、特定に一本鎖iRNA分子の項に論じられる5'修飾を含む。

【0245】

10

20

30

40

50

場合によっては、異なる鎖は、異なる修飾を含むであろう。複数の異なる修飾を、鎖のそれぞれに含むことができる。ある鎖における修飾は、相互に異なることができ、他の鎖における様々な修飾と異なることもできる。例えば、1つの鎖は修飾、例えば本明細書に記載される修飾を有することができ、異なる鎖は異なる修飾、例えば本明細書に記載される修飾を含むことができる。他の場合、1つの鎖は、2つ以上の異なる修飾を有することができ、別の鎖は、他の鎖における少なくとも2つの修飾と異なる修飾を含むことができる。

【0246】

iRNA剤が分子の一方または両方の末端において一本鎖または不対領域を含むように、鎖が選択されることが好ましい。したがって、iRNA剤は、好ましくはオーバーハング、例えば1つまたは2つの5'または3'のオーバーハング、しかし好ましくは2~3のヌクレオチドの3'のオーバーハングを含有するために対にされた、鎖を2つ以上含有する。ほとんどの実施形態は3'オーバーハングを有するであろう。好ましいiRNA剤は、それぞれの末端に1個または好ましくは2個または3個のヌクレオチド長の、一本鎖のオーバーハング、好ましくは3'のオーバーハングを有するであろう。オーバーハングは、1つの鎖が他よりも長い、または同じ長さの2つの鎖がねじれ型であるため生じることができる。

10

【0247】

鎖間の二重鎖領域の好ましい長さは、6~30個のヌクレオチド長である。好ましい二重鎖領域は、15~30、最も好ましくは18、19、20、21、22、および23個のヌクレオチド長である。他の好ましい二重鎖領域は、6~20個のヌクレオチド、最も好ましくは6、7、8、9、10、11、および12ヌクレオチド長である。複数鎖のiRNA剤では、形成された異なる二重鎖は異なる長さを有することができる、例えば鎖AとBとの間に形成された二重鎖領域は、鎖AとCとの間に形成された二重鎖領域よりも異なる長さを有することができる。

20

【0248】

2つより多くの鎖の二重鎖剤を含むiRNA剤において、同じ長さであり、長いdsRNAの天然ダイサー処理製品を構築することができる。iRNA剤の2つ以上の鎖の実施形態は、連結される、例えば共有結合的な連結も含まれる。必要な二本鎖領域および好ましくは3'のオーバーハングを提供するヘアピンまたは他の一本鎖構造も本発明内である。

30

【0249】

核酸はサブユニットのポリマーまたは化合物であるため、以下に記載される多くの修飾は核酸内で繰り返される位置、例えば塩基の修飾、またはリン酸塩部分、またはリン酸塩部分の非架橋酸素において発生する。場合によっては、修飾は核酸の全ての対象位置において発生されるであろうが、多くの場合および実際はほとんどの事例で発生しないであろう。一例として、修飾は3'または5'末端の位置にのみ発生することができ、内部不対領域にのみ発生することができ、末端領域にのみ、例えば末端ヌクレオチド上の位置において、または鎖の最後の2、3、4、5、または10個のヌクレオチドにおいて発生することができる。修飾は二本鎖領域、一本鎖領域、または両方において発生することができる。修飾はRNA剤の二本鎖領域においてのみ発生することができる、またはRNA剤の一本鎖領域においてのみ発生することができる。例えば、非架橋酸素の位置におけるホスホロチオエート修飾は一方または両方の終端においてのみ発生することができ、末端領域でのみ、例えば末端ヌクレオチド上の位置においてまたは鎖の最後の2、3、4、5、または10個のヌクレオチドにおいて、発生することができ、二本鎖および一本鎖領域、特に終端において発生することができる。5'末端またはその複数を、リン酸化することができる。

40

【0250】

いくつかの実施形態において、例えば安定を増強すること、オーバーハングにおける特定の塩基を含むこと、または一本鎖オーバーハングにおいて、例えば5'または3'オ-

50

バーハング、または両方において、修飾したヌクレオチドまたはヌクレオチド代替を含むことが特に好ましい。例えば、オーバーハングにおいてプリンヌクレオチドを含むことは望ましいことであり得る。いくつかの実施形態において、例えば本明細書に記載される修飾で、3'または5'のオーバーハングにおける全てまたはいくつかの塩基は修飾されるであろう。修飾は例えばリボース糖の2'のOH基における修飾の使用、例えばデオキシリボヌクレオチドの使用、例えばリボヌクレオチドの代わりにチミジン、およびリン酸塩基、例えばホスホチオエート修飾における修飾を含むことができる。オーバーハングは標的配列と相同である必要はない。

【0251】

マイクロRNA

10

マイクロRNA (miRNAまたはmir) は、植物および動物のゲノムにおけるDNAから転写される小さいRNA分子の高度に保存された種類であるが、タンパク質に翻訳されない。プレマイクロRNAは、miRNAに処理される。処理されたマイクロRNAは、RNA誘導サイレンシング複合体 (RISC) に組み込まれる一本鎖～17～25ヌクレオチド(nt) RNA分子であり、発症、細胞増殖、アポトーシス、および分化の主要制御因子として同定された。それらは、特異的mRNAの3'非翻訳領域と結合することによって、遺伝子発現の制御において役割を果たすと考えられている。RISCは翻訳抑制、転写物切断、または両方を通して、遺伝子発現の下方制御を媒介する。RISCは、幅広い範囲の真核生物の核において転写サイレンシングにも結びつけられる。

【0252】

20

マイクロRNAは宿主における病原体の調節にも結びつけられる。例えば、Jopling, C. L.ら、Science (2005) vol. 309, pp 1577-1581を参照。理論に縛られることを望まないが、マイクロRNA、マイクロRNA模倣物、および/または抗マイクロRNAオリゴヌクレオチドの投与は、病原体の生存率、成長、発症、および/または複製の調節を引き起こす。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドはマイクロRNA、マイクロRNA模倣物、および/または抗マイクロRNAであり、マイクロRNAは宿主マイクロRNAである。

【0253】

30

これまでに同定されたmiRNA配列の数は大きく、増加しており、それらの説明に役立つ実例は、例えば、“miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature” Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. NAR, 2006, 34, Database Issue, D140-D144、“The microRNA Registry” Griffiths-Jones S. NAR, 2004, 32, Database Issue, D109-D111、およびワールドワイドウェブhttp://microrna.dot.sanger.dot.ac.dot.uk/sequences/においても見出すことができる。

【0254】

40

リボザイム

リボザイムは、エンドヌクレアーゼ活性を持つ特異的触媒ドメインを有するオリゴヌクレオチドである (Kim and Cech, Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Dec; 84(24): 8788-92; Forster and Symons, Cell. 1987 Apr 24; 49(2): 211-20)。少なくとも6つの基本的な種類の天然発生酵素RNAは現在知られている。一般に、酵素核酸は標的RNAと先ず結合することによって作用する。かかる結合は、標的RNAを切断するために作用する分子の酵素部分の近くに保持される酵素核酸の標的結合部分を通して発生する。したがって、酵素核酸は、先ず認識し、そして標的RNAを、相補的塩基対形成を通じて結合し、正しい部位に結合された時点で、標的RNAを切断するために酵素的に作用する。かかる標的RNAの戦略的な切断は、コードされたタンパク質の直接合成を

50

する能力を破壊するであろう。酵素核酸が結合しそのRNA標的を切斷した後、別の標的を探すためにそのRNAから放出され、繰り返し結合し新しい標的を切斷することができる。

【0255】

任意の標的配列を標的にしたリボザイムの產生の方法は、当該技術分野において既知である。リボザイムは、国際公開第93/23569号および国際公開第94/02595号の各パンフレットに記載されるように設計され得、それぞれ具体的に本明細書に参照により組み込まれ、その中に記載されるようにインピトロおよびインピボで試験されるために合成される。

【0256】

アプタマー

アプタマーは、高い親和性および特異性で、対象の特定の分子に結合する核酸またはペプチド分子である (Tuerk and Gold, Science 249: 505 (1990); Ellington and Szostak, Nature 346: 818 (1990))。DNAまたはRNAアプタマーは、うまく产生され、大きいタンパク質から小さい有機分子までの多くの異なる実体と結合する。Eaton, Curr. Opin. Chem. Biol. 1: 10 - 16 (1997)、Famulok, Curr. Opin. Struct. Biol. 9: 324 - 9 (1999)、およびHermann and Patel, Science 287: 820 - 5 (2000)を参照。アプタマーは、RNAまたはDNAベースであることができる。一般的に、アプタマーは、小分子、タンパク質、核酸、およびさらに細胞、組織、および生物等の様々な分子標的と結合するために、インピトロ選択のラウンドを繰り返してまたは同時に、SELEX(試験管内進化法)で操作された。アプタマーは、合成、組換え、および精製方法を含む、任意の既知の方法で調製され得、単独でまたは同じ標的に対して特異的な他のアプタマーと組み合わせて使用することができる。さらに、本明細書でより詳細に記載される、「アプタマー」という用語は具体的に、ある規定の標的と2つ以上の既知のアプタマーを比べることによって生じる共通配列を含有する「二次アプタマー」を含む。

【0257】

デコイオリゴヌクレオチド

転写因子は、周囲のゲノムDNAがなくても、それらの比較的短い結合配列を認めるため、特定の転写因子の共通結合配列を有する短いオリゴヌクレオチドは、生細胞において遺伝子発現を操縦するための道具として使用され得る。この戦略は、標的因子によって認められて結合されるかかる「デコイオリゴヌクレオチド」の細胞内送達に関与する。デコイによる転写因子のDNA結合部位の占領は、標的遺伝子のプロモーター領域と次に結合することができない転写因子を与える。デコイは、転写因子によって活性化される遺伝子の発現を抑制するため、または転写因子の結合によって抑制される遺伝子を上方制御するため、治療薬として使用され得る。デコイオリゴヌクレオチドの例は、Mann et al., J. Clin. Invest., 2000, 106: 1071 - 1075に見出すことができ、本文献は、参照により本明細書に明確に組み込まれる。

【0258】

miRNA模倣物

miRNA模倣物は、1つ以上のmiRNAの遺伝子調節活性を模倣するために使用され得る分子の種類を表す。したがって、「マイクロRNA模倣物」という用語は、RNAi経路に侵入することができる合成非コードRNA(すなわち、miRNAは、内在性miRNAの源からの精製によって得られない)および制御遺伝子発現を指す。miRNA模倣物は、成熟分子(例えば一本鎖)または模倣前駆物質(例えばpriまたはpre-miRNA)として設計され得る。

【0259】

一設計において、miRNA模倣物は、二本鎖分子であり(例えば、約16~約31個の間のヌクレオチド長の二重鎖領域とともに)、あるmiRNAの成熟鎖と同定される1

10

20

30

40

50

つ以上の配列を含む。二本鎖m i R N A 模倣物は、二本鎖オリゴヌクレオチドに対して上記されるものに似た設計を有する。

【0260】

一実施形態において、m i R N A 模倣物は、16～31個の間のヌクレオチドの二重鎖領域および以下の化学修飾パターンのうちの1つ以上を含む。センス鎖は、(センスオリゴヌクレオチドの5'末端から数えて)ヌクレオチド1および2の2'-O-メチル修飾およびCおよびUの全てを含み、アンチセンス鎖修飾は、CおよびUの全ての2'F修飾、オリゴヌクレオチドの5'末端のリン酸化、および2ヌクレオチド3'オーバーハングと関連する安定したヌクレオチド間結合を含む。

【0261】

スーパー-mir (Supermir)

スーパー-mirは、実質的にm i R N Aと同一であるヌクレオチド配列を有し、その標的に關してアンチセンスであるオリゴヌクレオチド、例えば一本鎖、二本鎖、または部分的に二本鎖を指す。この用語は、同様に機能する少なくとも1つの非天然発生部分を含むオリゴヌクレオチドを含む。好ましい実施形態では、スーパー-mirは、センス鎖を含まない、および別の好ましい実施形態では、スーパー-mirはかなりの範囲で自己ハイブリッド形成しない。本発明に特性付けられたスーパー-mirは二次構造を有すことができるが、生理学的状態下で、実質的に一本鎖である。実質的に一本鎖であるスーパー-mirは、スーパー-mirの約50%未満(例えば、約40%、30%、20%、10%、または5%未満)が、それ自身と二重鎖にすると言う点で一本鎖である。スーパー-mirは、ヘアピンセグメント、例えば配列を含むことができ、好ましくは3'末端で自己ハイブリッド形成でき、二重鎖領域、例えば少なくとも1、2、3、または4の二重鎖領域、および好ましくは8、7、6、または5個のヌクレオチド未満、例えば5個のヌクレオチドを形成する。二重鎖領域は、リンカー、例えばヌクレオチドリンカー、例えば3、4、5、または6dT、例えば修飾dTによって結合され得る。別の実施形態では、スーパー-mirは、例えば3'および5'末端の一方または両方において、または一方の末端および非末端において、またはスーパー-mirの真ん中において、短いオリゴ、例えば5、6、7、8、9、または10個のヌクレオチド長で二重鎖にされる。

【0262】

アンチmir またはm i R N A 抑制剤

「アンチmir」、「マイクロR N A 抑制剤」または「m i R 抑制剤」という用語は、同義語であり、オリゴヌクレオチドまたは特異的m i R N A の活性を妨げる修飾したオリゴヌクレオチドを指す。抑制剤は、一本鎖、二本鎖(R N A / R N A またはR N A / D N A 二重鎖)、およびヘアピン設計を含む、様々な配置を採用することができ、一般に、マイクロR N A 抑制剤は、標的にするために、m i R N A の成熟鎖(または鎖)と相補的である配列または配列部分のうちの1つ以上を含み、さらに、m i R N A 抑制剤は成熟m i R N A の逆相補体である配列と5'および3'に位置する追加配列も含むことができる。追加配列は、成熟m i R N A 由来のp r i - m i R N A において成熟m i R N A に隣接する配列の逆相補体であることができる、または追加配列は、(A、G、C、U、またはdTの混合物を有する)任意の配列であることができる。いくつかの実施形態において、追加配列の一方または両方は、ヘアピンを形成することができる任意の配列である。したがって、いくつかの実施形態において、m i R N A の逆相補体である配列は、ヘアピン構造によって5'側および3'側上で隣接される。マイクロR N A 抑制剤は、二本鎖の場合、反対の鎖においてヌクレオチド間のミスマッチを含むことができる。さらに、マイクロR N A 抑制剤は、細胞の抑制剤の吸収を容易にするために共役体部分と結び付けることができる。

【0263】

ヘアピンm i R N A 抑制剤を含むマイクロR N A 抑制剤は、それぞれが参照により本明細書に全てが組み込まれる、Vermeulenらの“Double-Stranded Regions Are Essential Design Components

10

20

30

40

50

Of Potent Inhibitors of RISC Function" RNA 13:723-730 (2007) および国際公開第2007/095387号、および国際公開第2008/036825号の各パンフレットに詳細が記載される。当業者は、所望のm i RNAに対してデータベースから配列を選択し、本明細書に開示される方法に対して有用な抑制剤を設計することができる。

【0264】

アンタゴmir

アンタゴmirは、強化された組織および細胞吸収等のRNAse保護および薬理的性質に対して様々な修飾を持つRNA様オリゴヌクレオチドである。それらは、例えば、糖の完全2'-O-メチル化、ホスホロチオエート骨格、および例えば、3'末端におけるコレステロール部分に関して、普通のRNAとは異なる。好ましい実施形態では、アンタゴmirは、全てのヌクレオチドにおける2'-O-メチル修飾、3'末端におけるコレステロール部分、5'末端における最初の2つの位置における2つのホスホロチオエート骨格結合、および分子の3'末端における4つのホスホロチオエート結合を含む。アンタゴmirは、アンタゴmirおよび内在性m i RNAを含む、二重鎖を形成することによって、内在性m i RNAを効率的にサイレンシングさせるために使用され得、その結果m i RNA誘発遺伝子サイレンシングを防止する。アンタゴmir媒介m i RNAサイレンシングの例は、全て参照によりその全体が本明細書に明確に組み込まれるKrutzfeldtらのNature, 2005, 438:685-689に記載されるmiR-122のサイレンシングである。

10

20

【0265】

U1アダプター

U1アダプターはポリA部位を抑制し、標的遺伝子の末端エクソンおよびU1snRNPのU1小核RNA成分と結合する「U1ドメイン」における部位と相補的である標的ドメインを含む二機能性オリゴヌクレオチドである（本明細書に参照により全てが明確に組み込まれるGoraczniak, et al., 2008, Nature Biotechnology, 27(3), 257-263）。U1snRNPは、pre-mRNAエクソンイントロン境界に結合することによってスプライソソーム形成における初期段階を方向付けるために主に機能するリボヌクレオタンパク質の複合体である（Brown and Simpson, 1998, Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 49:77-95）。U1snRNA塩基の5'末端のヌクレオチド2~11は、pre-mRNAの一本鎖領域の5'末端と対になる。一実施形態において、本発明のオリゴヌクレオチドはU1アダプターである。一実施形態において、U1アダプターは少なくとも1つの他のRNAi剤と組み合わせて投与され得る。

30

【0266】

免疫賦活性オリゴヌクレオチド

本発明の核酸は、哺乳動物または他の患者であることができる対象に投与された場合、免疫応答を誘発することができる免疫賦活性オリゴヌクレオチド（一本または二本鎖）を含む免疫賦活性であり得る。免疫応答は、自然または適応免疫応答であることができる。免疫システムは、より自然免疫システムに分類され、脊椎動物の適応免疫システムを取得し、後者はさらに体液性細胞成分に分類される。特定の実施形態において、免疫応答は、ムコサールであることができる。

40

【0267】

免疫応答を誘発するために、標的ポリヌクレオチドの発現とそれらが特異的に結合し削減することが必要でない場合、免疫賦活性核酸は、非配列特異的であると考えられる。したがって、ある免疫賦活性核酸は、天然発生遺伝子またはmRNAの領域に相当する配列を含むことができるが、それらはまだ非配列特異的な免疫賦活性核酸であると考えることができる。

【0268】

一実施形態において、免疫賦活性核酸またはオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの

50

CpGジヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチドまたはCpGジヌクレオチドは、非メチル化またはメチル化され得る。別の実施形態では、免疫賦活性核酸は、メチル化したシトシンを有するCpGジヌクレオチドのうちの少なくとも1つを含む。一実施形態において、核酸は、単一CpGジヌクレオチドを含み、CpGジヌクレオチドにおけるシトシンはメチル化される。

【0269】

別の実施形態では、免疫賦活性オリゴヌクレオチドは、5'末端におけるリン酸塩またはリン酸塩修飾を含む。理論に縛られることを望まないが、修飾または未修飾5'リン酸塩を含むオリゴヌクレオチドは、非ウイルス性または非細菌性反応、特に、RIG-Iを調節することによって、I型のIFN、IL-18、および/またはIL-1の誘発を誘発する。10

【0270】

RNA活性化因子

近年の調査で、dsRNAが遺伝子発現、「小RNA誘発遺伝子活性」またはRNAaと称されたメカニズムも活性化することができる事が見出された。例えば、Li, L.C.ら、Proc Natl Acad Sci U S A. (2006), 103(46):17337-42およびLi, L.C. (2008) "Small RNA-Mediated Gene Activation". RNA and the Regulation of Gene Expression: A Hidden Layer of Complexity. Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-25-7を参照。dsRNA標的遺伝子プロモーターは、関連遺伝子の強力な転写活性化を誘発することが示された。RNAaを引き起こす内在性miRNAは、ヒトにおいても認められた。Check E. Nature (2007). 448(7156): 855-858。20

【0271】

別の驚くべき観察は、RNAaによる遺伝子活性化は、長続きすることである。遺伝子発現の誘発は、10日を超えて持続することが分かった。RNAaの持続効果は、dsRNA標的部位における後成的な変化に起因される可能性がある。

【0272】

ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、RNA活性化因子であり、オリゴヌクレオチドは、遺伝子の発現を増加する。一実施形態において、増加した遺伝子発現は、生存率、成長開発、および/または繁殖を抑制する。30

【0273】

三重鎖形成オリゴヌクレオチド

近年の調査で、三重鎖形成オリゴヌクレオチド(TFO)が、配列特異的な方法で二本鎖らせんDNAにおけるポリプリン/ポリピリミジン領域を認め、結合することができる設計をされ得る。これらの認識ルールは、Maher III, L.J., et al., Science (1989) vol. 245, pp 725-730、Moser, H.E., et al., Science (1987) vol. 238, pp 645-630、Beal, P.A., et al., Science (1992) vol. 251, pp 1360-1363、Conney, M., et al., Science (1988) vol. 241, pp 456-459、およびHogan, M.E., et al., EP Publication 375408によって概説される。介入物および骨格置換の導入等のオリゴヌクレオチドの修飾、および結合状況の最適化(pHおよびカチオン濃度)は、電荷反発および不安定等のTFO活性に対する固有の障壁を克服するために助け、合成オリゴヌクレオチドが特異的配列に対して標的とされ得ることが近年しめされた(近年のレビューは、Seidman and Glazer, J Clin Invest 2003; 112: 487-94を参照)。一般に、三重鎖形成オリゴヌクレオチドは、配列一致を有する:

オリゴ 3' - A G G T

10

20

30

40

50

二重鎖 5' - A G C T
 二重鎖 3' - T C G A

【0274】

しかし、A - A T および G - G C の三塩基が最大の三重鎖らせん安定を有することが示された (Reither and Jeltsch, BMC Biochem, 2002, 36: 12, Epub)。同著者は、三重鎖形成は、A - A T および G - G C ルールに従って設計された TFO が非特異的三重鎖を形成しないことが明らかにし、実際に配列特異的であることを示した。

【0275】

したがって、任意のある配列に対して、三重鎖形成配列は、考案され得る。三重鎖形成オリゴヌクレオチドは、好ましくは少なくとも 15 個、より好ましくは 25 個、さらにより好ましくは 30 個以上、最大で 50 個または 100 個のヌクレオチドまでのヌクレオチド長である。

【0276】

標的 DNA を含む三重らせん構造の形成は、立体的なおよび機能的な変化、遮断転写の開始および伸長を誘発し、内在性 DNA において所望の配列変化を導入することを許し、遺伝子発現の特異的な下方制御を生じる。TFO で処理された細胞における遺伝子発現のかかる抑制の例は、哺乳動物細胞におけるエピソーム super FGL の遺伝子欠損および内在性 Hprt 遺伝子 (Vasquez et al., Nucl Acids Res. 1999; 27: 1176-81、および Purini, et al., J Biol Chem, 2001; 276: 28991-98)、ならびに前立腺癌病因学において重要である Ets 2 転写因子の発現の配列および標的特異性の下方制御 (Carbone, et al., Nucl Acid Res. 2003; 31: 833-43)、ならびに炎症誘発性 ICAM-I 遺伝子 (Besch et al., J Biol Chem, 2002; 277: 32473-79) を含む。さらに、Vuyisich と Beal は、近年配列特異的 TFO が dsRNA と結合することができ、RNA 依存性キナーゼ等の dsRNA 依存性酵素の活性を抑制することを示した (Vuyisich and Beal, Nucl. Acids Res. 2000; 28: 2369-74)。

【0277】

さらに、上述の原理に従って設計された TFO は、DNA 修復に作用することができる定方向突然変異誘発を誘発することができる、したがって内在性遺伝子の発現の下方制御および上方制御の両方を提供する (Seidman and Glazer, J Clin Invest 2003; 112: 487-94)。設計、合成、および有効な TFO の投与の詳細は、本明細書に全てが組み込まれる Froehl er らに対する米国特許出願公開第 2003/017068 号、および同第 2003/0096980 号、ならびに Emanuel らに対する第 2002/0128218 号および同第 2002/0123476 号の各明細書、Lawn に対する米国特許第 5,721,138 号明細書において見出すことができる。

【0278】

特定の修飾は、以下により詳細に論じられる。本明細書における修飾は iRNA 剤に関する記載されるが、これらの修飾は本発明の担体オリゴヌクレオチドを修飾するためにも受け入れられる。

【0279】

リン酸塩基

リン酸塩基は負荷電種である。電荷は、2 つの非架橋酸素原子上に均一に分布される。しかし、リン酸塩基は異なる置換基で酸素のうちの 1 つを交換することによって修飾され得る。この RNA リン酸塩骨格への修飾の結果は、核酸分解に対するオリゴリボヌクレオチドの耐性を増加させることであり得る。したがって理論に縛られることを望まないが、いくつかの実施形態において、非対称電荷分布を含む無電荷リンカーまたは電荷リンカーを生じる変化を導入することが望ましくあり得る。

10

20

20

30

40

50

【0280】

修飾したリン酸塩基の例は、ホスホロチオエート、ホスホロセレネート、ボラノリン酸塩、ボラノリン酸塩エステル、水素ホスホン酸塩、ホスホロアミド酸、アルキルまたはアリールホスホン酸塩およびリン酸トリエステルを含む。ホスホロジチオエートは、硫黄によって交換された非架橋酸素の両方を有する。ホスホロジチオエートにおけるリン中心は、オリゴリボヌクレオチドジアステレオマーの形成を防止するアキラルである。ジアステレオマー形成は、個々のジアステレオマーはヌクレアーゼに対する様々な耐性を示す製剤を生じることができる。さらに、キラルリン酸塩基を含有するRNAのハイブリダイゼーション親和性は、対応する未修飾RNA種と比べて低くあり得る。したがって、理論に縛られることを望まないが、キラル中心、例えばホスホロジチオエート形成を除去する、両方の非架橋酸素の修飾は、ジアステレオマー混合物を産生することができないことが望ましくあり得る。したがって、非架橋酸素は、独立してS、Se、B、C、H、N、またはOR(Rはアルキルまたはアリール)のうちのいずれか1つであり得る。硫黄と非架橋酸素との交換は好ましい。

10

【0281】

リン酸塩リンカーは、窒素(架橋ホスホロアミド酸)、硫黄(架橋ホスホロチオエート)および炭素(架橋メチレンホスホン酸塩)と、架橋酸素(すなわち、リン酸塩とヌクレオシドとを結合する酸素)との交換によって修飾されることもできる。交換は、結合酸素のどちらか、または両方の結合酸素において発生することができる。架橋酸素がヌクレオシドの3'酸素である場合、炭素との交換は好ましい。架橋酸素がヌクレオシドの5'酸素である場合、窒素との交換は好ましい。

20

【0282】

リン酸塩基の交換

リン酸塩基は、連結子を含有する非リンによって交換され得る。理論に縛られることを望まないが、電荷リン酸ジエステル基が核酸分解における反応中心であるため、中性構造模倣物との交換は増強したヌクレアーゼ安定性を与えるべきであることが考えられる。また、理論に縛られることを望まないが、いくつかの実施形態において電荷リン酸塩基が中性部分と交換される変化を導入することが望ましくあり得る。

【0283】

リン酸塩基を交換することができる部分の例は、シロキサン、炭酸塩、カルボキシメチル、カルバミン酸、アミド、チオエーテル、エチレンオキシドリンカー、スルホン酸塩、スルホンアミド、チオホルムアセタール、ホルムアセタール、オキシム、メチレンイミノ、メチレンメチルイミノ、メチレンヒドラゾ、メチレンジメチルヒドラゾ、およびメチレンオキシメチルイミノを含む。好ましい交換は、メチレンカルボニルアミノおよびメチレンメチルイミノ基を含む。

30

【0284】

リン酸塩と結び付けられる酸素の少なくとも1つが交換された、またはリン酸塩基が非亜リン酸基と交換された修飾リン酸塩結合は、「非リン酸ジエステル骨格連鎖」としても称される。

40

【0285】

リボリン酸塩骨格の交換

オリゴヌクレオチド模倣骨格は、構築されることもでき、リン酸塩リンカーおよびリボース糖は、ヌクレアーゼ耐性ヌクレオシドまたはヌクレオチド代替と交換される。理論に縛られることを望まないが、繰り返し電荷される骨格の不在は、ポリアニオン(例えばヌクレアーゼ)を認めるタンパク質と結合することを減弱することが考えられる。また、理論に縛られることを望まないが、いくつかの実施形態において、塩基が中性代替骨格によってテザーされる変化を導入する。例は、モフィリノ、シクロブチル、ピロリジン、およびペプチド核酸(PNA)ヌクレオシド代替を含む。好ましい代替は、PNA代替である。

【0286】

50

糖修飾

修飾RNAは、リボ核酸の糖基のうちの全てまたはいくつかの修飾を含むことができる。例えば、2'ヒドロキシル基(OH)は、修飾されるまたは多くの異なる「オキシ」または「デオキシ」置換基と交換され得る。理論に縛られることを望まないが、ヒドロキシルが2'-アルコキシドイオンを形成するために脱プロトンされることがすでにできないため、強化された安定性が、期待される。2'アルコキシドは、リンカーリン原子に対する分子内求核攻撃による分解を触媒することができる。また、理論に縛られることを望まないが、いくつかの実施形態が2'の位置におけるアルコキシド形成が可能ではない変化を導入することが望ましくあり得る。

【0287】

10

「オキシ」2'ヒドロキシル基修飾の例は、アルコキシまたはアリールオキシ(OR、例えばR=H、アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、または糖)、ポリエチレングリコール(PEG)、O(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂O R、例えばメチレンブリッジによって2'ヒドロキシルが同じリボース糖の4'炭素と連結される「ロックされた」核酸(LNA)、Oアミン(アミン=NH₂; アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、ポリアミノ)およびアミノアルコキシ、O(CH₂)_nアミン、(例えばアミン=NH₂; アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、ポリアミノ)を含む。メトキシエチル基(MOE)、(OCH₂CH₂OCH₃、PEG誘導体)のみを含有するオリゴヌクレオチドが頑強なホスホロチオエート修飾で修飾されたものに相当するヌクレアーゼ安定性を示すことは注目に値する。

20

【0288】

「デオキシ」修飾は、水素(すなわち部分的dsRNAのオーバーハング部分と特に関連するデオキシリボース糖)、ハロ(例えばフルオロ)、アミノ(アミン=NH₂; アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、またはアミノ酸)、NH(CH₂CH₂NH)_nCH₂CH₂アミン(アミン=NH₂; アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノ)、-NHC(O)R(R=アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、または糖)、シアノ、メルカプト、アルキルチオアルキル、チオアルコキシ; ならびに例えばアミノ機能と任意に置換され得るアルキル、シクロアルキル、アリール、アルケニル、およびアルキニルを含む。好ましい置換基は、2'メトキシエチル、2' - OCH₃、2' - O - アリル、2' - C - アリル、および2' - フルオロである。

30

【0289】

糖基は、リボースにおける対応する炭素と反対の立体化学的配置を持つ炭素の1つ以上も含有することができる。したがって、修飾RNAは、糖として例えばアラビノースを含有するヌクレオチドを含むことができる。

40

【0290】

修飾RNAは、C-1'において核酸塩基が不在の「脱塩基」糖も含むことができる。これらの脱塩基糖は、1つ以上の構成糖原子において修飾をさらに含有することができる。

【0291】

ヌクレアーゼ耐性を最大限にするために、2'の修飾は1つ以上のリン酸塩リンカーリン修飾(例えばホスホロチオエート)と組み合わせて使用され得る。いわゆる「キメラ」オリゴヌクレオチドは、2つ以上の異なる修飾を含有するものである。

【0292】

修飾は、iRNA剤における1つ以上の部位において別の実体トリボース構造との大量

50

交換を伴うこともできる。

【0293】

末端修飾

オリゴヌクレオチドの3'および5'末端は、修飾され得る。かかる修飾は、3'末端、5'末端または分子の両方の末端において存在することができる。それらは、全ての末端リン酸塩またはリン酸塩基の1つ以上の原子の修飾または交換を含むことができる。例えばオリゴヌクレオチドの3'および5'末端は、標識部分、例えばフルオロフォア（例えばピレン、TAMRA、フルオレセイン、Cy3またはCy5染色）または（例えば硫黄、ケイ素、ホウ素、またはエステルを基にした）保護基等の他の機能的な分子的実体と共に役され得る。機能的な分子的実体は、リン酸塩基および/またはスペーサーを介して糖に結合することができる。スペーサーの末端原子は、リン酸塩基または糖のC-3'もしくはC-5'、O、N、SまたはC基の結合原子と接続または交換することができる。あるいは、スペーサーは、ヌクレオチド代替（例えばRNA）の末端原子と接続または交換することができる。これらのスペーサーまたはリンカーは、例えば-(CH₂)_n-、-(CH₂)_nN-、-(CH₂)_nO-、-(CH₂)_nS-、O(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂OH（例えばn=3または6）、脱塩基糖、アミド、カルボキシ、アミン、オキシアミン、オキシミン、チオエーテル、ジスルフィド、チオ尿素、スルホンアミド、またはモルフォリノ、またはビオチン、およびフルオレセイン試薬を含むことができる。スペーサー/リン酸塩機能的な分子的実体スペーサー/リン酸塩アレイがiRNA剤の2つの鎖の間に挿入された場合、このアレイは、ヘアピンタイプRNA剤においてヘアピンRNAループと置換することができる。3'末端は、-OH基であることができる。理論に縛られることを望まないが、ある部分の結合が輸送、ハイブリダイゼーション、および特異性の性質を改善できると考えられる。また、理論に縛られることを望まないが、ヌクレアーゼ耐性を改善する末端変化を導入することが望ましくあり得る。末端修飾の他の例は、染色、挿入剤（例えばアクリジン）、架橋剤（例えばソラレン、マイトイシンC）、ポルフィリン（TPPC4、テキサフィリン、サフィリン）、ポリ環状芳香族炭化水素（例えばフェナジン、ジヒドロフェナジン）、人工エンドヌクレアーゼ（例えばEDTA）、親油性担体（例えばコレステロール、コール酸、アダマンタン酢酸、1-ピレン酇酸、ジヒドロテストステロン、1,3-ビス-O(ヘキサデシル)グリセリン、ゲラニルオキシヘキシル基、ヘキサデシルグリセリン、ボルネオール、メントール、1,3-プロパンジオール、ヘプタデシル基、パルミチン酸、ミリスチン酸，O3-(オレオイル)リトコール酸、O3-(オレオイル)コレン酸、ジメトキシトリチル、またはフェノキサジン）およびペプチド共役体（例えばアンテナペディアペプチド、Tatペプチド）、アルキル化剤、リン酸塩、アミノ、メルカプト、PEG（例えばPEG-40K）、MPEG、[MPEG]₂、ポリアミノ、アルキル、置換アルキル、放射性標識マーカー、酵素、ハブテン（例えばビオチン）、輸送/吸収促進薬（例えばアスピリン、ビタミンE、葉酸）、合成リボヌクレアーゼ（例えばイミダゾール、ビスイミダゾール、ヒスタミン、イミダゾールクラスター、アクリジンイミダゾール共役体、テトラアザ大環状化合物のEu³⁺複合体）を含む。

【0294】

末端修飾は、本明細書の他の部分で論じられるものを含むいくつかの理由で、活性を調節または分解に対する耐性を調節するために添加され得る。

【0295】

活性を調節するために有用な末端修飾は、リン酸塩またはリン酸塩類似体との5'末端の修飾を含む。例えば好ましい実施形態において、iRNA剤、特にアンチセンス鎖は5'リン酸化または5'プライム終端におけるホスホリル類似体を含む。5'リン酸塩修飾は、RISC媒介遺伝子サイレンシングと矛盾しないものを含む。適切な修飾は、5'モノリン酸塩((HO)₂(O)P-O-5')；5'二リン酸塩((HO)₂(O)P-O-P(HO)(O)-O-5')；5'三リン酸塩((HO)₂(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5')；5'グアノシンキャップ(7メチル化

10

20

30

40

50

または非メチル化した) (7m-G-O-5'--(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5') ; 5'アデノシンキャップ(A p p p)および任意の修飾または未修飾ヌクレオチドキャップ構造(N-O-5'--(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5') ; 5'モノチオリン酸塩(ホスホロジチオエート; (HO)2(S)P-O-5') ; 5'モノホスホロジチオエート塩(ホスホロジチオエート; (HO)(HS)(S)P-O-5')、5'ホスホロジチオレート((HO)2(O)P-S-5') ; 酸素/硫黄交換したモノリン酸塩、二リン酸塩および三リン酸塩(例えば5'アルファチオ三リン酸塩、5'ガンマチオ三リン酸塩等)、5'ホスホロアミド酸((HO)2(O)P-NH-5')、(HO)(NH2)(O)P-O-5') ; 5'アルキルホスホン酸塩(R=アルキル=メチル、エチル、イソプロピル、プロピル等、例えばRP(OH)(O)-O-5' -、(OH)2(O)P-5'-CH2-) ; 5'アルキルエーテルホスホン酸塩(R=アルキルエーテル=メトキシメチル(MeOCH2-))、エトキシメチル等、例えばRP(OH)(O)-O-5' -)の任意の追加組み合わせを含む。

10

【0296】

末端修飾は、分布を監視するために有用でもあり、そのような場合、添加される好ましい基は、フルオロフォア、例えばフルオレセインまたはAllexa染色、例えばAllexa488を含む。末端修飾は、吸収を増強するために有用でもあり、有用な修飾はコレステロールを含む。末端修飾は、RNA剤と別の部分を架橋結合するために有用であり、有用な修飾はマイトイシンCを含む。

20

【0297】

核酸塩基

アデニン、グアニン、シトシン、およびウラシルは、RNAに見られる最も共通の塩基である。これらの塩基は、改善された性質を有するRNAを提供するために、修飾されるまたは交換され得る。例えば、ヌクレアーゼ耐性オリゴリボヌクレオチドは、これらの塩基とともに、または合成および天然核酸塩基(例えばイノシン、チミン、キサンチン、ヒポキサンチン、ヌバラリン、イソグアニン、またはツベルシジン)および上記修飾のうちのいずれか1つとともに調製され得る。あるいは、上記の塩基のうちのいずれかの置換または修飾類似体、例えば本明細書に記載される「特異な塩基」、「修飾塩基」、「非天然塩基」および「ユニバーサル塩基」は採用され得る。例としては、2-アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの6-メチルおよび他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの2-プロピルおよび他のアルキル誘導体、5-ハロウラシルおよびシトシン、5-プロピニルウラシルおよびシトシン、6-アゾウラシル、シトシンおよびチミン、5-ウラシル(ブソイドウラシル)、4-チオウラシル、5-ハロウラシル、5-(2-アミノプロピル)ウラシル、5-アミノアリルウラシル、8-ハロ、アミノ、チオール、チオアルキル、ヒドロキシルおよび他の8-置換アデニンおよびグアニン、5-トリフルオロメチルおよび他の5-置換ウラシルおよびシトシン、7-メチルグアニン、5-置換ピリミジン、6-アザピリミジンおよび2-アミノプロピルアデニンを含むN-2、N-6およびO-6置換プリン、5-プロピニルウラシルおよび5-プロピニルシトシン、ジヒドロウラシル、3-デアザ-5-アザシトシン、2-アミノプリン、5-アルキルウラシル、7-アルキルグアニン、5-アルキルシトシン、7-デアザアデニン、N6、N6-ジメチルアデニン、2,6-ジアミノプリン、5-アミノ-アリル-ウラシル、N3-メチルウラシル、置換1,2,4-トリアゾール、2-ピリジノン、5-ニトロインドール、3-ニトロピロール、5-メトキシウラシル、ウラシル5-オキシ酢酸、5-メトキシカルボニルメチルウラシル、5-メチル-2-チオウラシル、5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウラシル、5-メチルアミノメチル-2-チオウラシル、3-(3-アミノ-3カルボキシプロピル)ウラシル、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N⁴-アセチルシトシン、2-チオシトシン、N6-メチルアデニン、N6-イソペンチルアデニン、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、N-メチルグアニン、またはO-アルキル化した塩基を含むがこれらに限定されない。。さらにプリンおよびピリミジンは

30

40

40

50

、米国特許第3,687,808号明細書に開示されたもの、Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858 - 859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990に開示されたもの、およびEnglisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613に開示されたものを含む。

【0298】

一般的に、塩基変更は、安定性を促進するためにはあまり好ましくないが、他の理由、例えばいくつか、例えば2,6-ジアミノプリンおよび2アミノプリンは蛍光性であるために、有用であることができる。修飾塩基は、標的特異性を削減することができる。これは、iRNA剤の設計において考慮すべきである。

10

【0299】

カチオン基

修飾は、リン酸塩または修飾リン酸塩骨格部分の糖、塩基、および/またはリン原子に対する1つ以上のカチオン基の結合も含むことができる。カチオン基は、天然、特異なまたはユニバーサル塩基上の置換ができる任意の原子に結合することができる。好ましい位置は、ハイブリダイゼーションを妨げない、すなわち、塩基対形成に対して必要な水素結合相互作用を妨げない場所である。カチオン基は、例えば環状または非環状糖代替における糖のC2'位置または類似位置を介して結合することができる。カチオン基は、例えばO-アミン(アミン=NH₂; アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、ポリアミノ)に由来するプロトン化したアミノ基；アミノアルコキシ、例えばO(CH₂)_nアミン、(例えばアミン=NH₂; アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、ポリアミノ)；アミノ(例えばNH₂; アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、またはアミノ酸)；またはNH(CH₂CH₂NH)_nCH₂CH₂-アミン(アミン=NH₂; アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノ)を含むことができる。

20

【0300】

例示的な修飾およびiRNA剤内の配置

いくつかの修飾を、例えば鎖の内部位置、またはiRNA剤の鎖の5'または3'末端における特定の位置において、好ましくはiRNA剤上に含むことができる。iRNA剤上の修飾の好ましい位置は、薬剤上に好ましい性質を与えることができる。例えば、特定の修飾の好ましい位置は、最適な遺伝子サイレンシング性質、または増加したエンドヌクレアーゼもしくはエキソヌクレアーゼ活性に対する耐性を与えることができる。本明細書および以下に記載される修飾は、複数のリボヌクレオチド上に含まれる修飾の唯一の修飾、もしくは単一型であることができる、または修飾は本明細書および以下に記載される1つ以上の他の修飾と結合させることができる。例えば、複数鎖iRNA剤の1つの鎖における修飾は、複数鎖iRNA剤の別の鎖における修飾と異なることができる。同様に、1つの鎖における2つの異なる修飾は、iRNA剤の異なる鎖における修飾と異なることができる。限定なしの他の追加の一意的な修飾を、iRNA剤の鎖に組み込むことができる。

30

【0301】

iRNA剤は、iRNA鎖における任意のヌクレオチドに対して骨格修飾を含むことができる。例えば、iRNA剤は、iRNA剤の1つ以上のヌクレオチド間の結合におけるホスホロチオエート連鎖またはPアルキル修飾を含むことができる。ヌクレオチドは、末端ヌクレオチド、例えばセンスもしくはアンチセンス鎖の最終位置におけるヌクレオチド、または内部ヌクレオチドであり得る。

40

50

【0302】

i RNA 剤は、糖修飾、例えば2'または3'糖修飾を含むことができる。例示的な糖修飾は、例えば、2'-O-メチル化ヌクレオチド、2'デオキシヌクレオチド、(例えば2'デオキシフルオロヌクレオチド)、2'-O-メトキシエチルヌクレオチド、2'-O-NMA、2'-DMAE OE、2'アミノプロピル、2'ヒドロキシ、または2'アラフルオロもしくはロックされた核酸(LNA)、拡張型核酸(ENA)、ヘキソース核酸(HNA)、もしくはシクロヘキセン核酸(CeNA)を含む。2'修飾は、好ましくは2'OMeであり、より好ましくは、2'デオキシフルオロである。修飾が2'OMeの場合、修飾は、好ましくはセンス鎖上に存在する。修飾が2'フルオロである場合、修飾はi RNA 剤の任意の鎖上にあり得る。2'アラフルオロ修飾は、好ましくはi RNA 剤のセンス鎖に存在するであろう。i RNA 剤は、3'糖修飾、例えば3'OMe修飾を含むことができる。好ましくは3'OMe修飾は、i RNA 剤のセンス鎖上に存在する。

10

【0303】

i RNA 剤は、5'メチルピリミジン(例えば5'メチルウリジン修飾または5'メチル-シトジン)修飾を含むことができる。

【0304】

本明細書に記載される修飾は、单一i RNA 剤上で結合され得る。例えば、i RNA 剤は、ホスホロチオエート連鎖および2'糖修飾、例えば2'-OMeまたは2'-F修飾を有することができる。別の例において、i RNA 剤は少なくとも1つの5-Me-ピリミジンおよび2'-糖修飾、例えば2'-Fまたは2'-OMe修飾を含むことができる。

20

【0305】

i RNA 剤は、3'脱塩基カチオン修飾等の、カチオン修飾等の、核酸塩基修飾を含むことができる。カチオン修飾は、i RNA 剤の1つ以上の末端ヌクレオチドにおける、例えばアルキルアミノdT(例えばC6アミノdT)、アリルアミノ共役体、ピロリジン共役体、フタルイミド、ポルフィリン、またはヒドロキシプロリノル共役体であることができる。アルキルアミノdT共役体がi RNA 剤の末端ヌクレオチドに結合する場合、共役体は、好ましくはi RNA 剤のセンスまたはアンチセンス鎖の3'末端に結合する。ピロリジンリンカーがi RNA 剤の末端ヌクレオチドに結合する場合、リンカーは好ましくはセンス鎖の3'もしくは5'末端、またはアンチセンス鎖の3'末端に結合する。ピロリジンリンカーがi RNA 剤の末端ヌクレオチドに結合する場合、リンカーは好ましくはセンス鎖3'または5'末端上に存在し、アンチセンス鎖の5'末端に存在しない。

30

【0306】

i RNA 剤は、脂肪親和性、テルペン、タンパク質結合剤、ビタミン、炭水化物、またはペプチド等の、少なくとも1つの共役体を含むことができる。例えば、共役体は、ナプロキセン、ニトロインドール(またはスタッキング相互作用に寄与する別の共役体)、葉酸、イブプロフェン、またはC5ピリミジンリンカーであり得る。共役体は、グリセリド脂質共役体(例えばジアルキルグリセリド誘導体)、ビタミンE共役体、またはチオコレステロールでもあり得る。一般的に、以下に反対の記述がある場合を除いて、共役体がセンスまたはアンチセンス鎖の末端ヌクレオチド上に存在する場合、共役体は好ましくはセンス鎖の5'もしくは3'末端上またはアンチセンス鎖の5'末端上に存在し、好ましくは、共役体はアンチセンス鎖の3'末端上に存在しない。

40

【0307】

共役体がナプロキセンであり共役体がセンスまたはアンチセンス鎖の末端ヌクレオチド上にある場合、共役体は、好ましくはセンスまたはアンチセンス鎖の5'または3'末端上に存在する。共役体がコレステロールであり、共役体がセンスまたはアンチセンス鎖の末端ヌクレオチド上に存在する場合、コレステロール共役体は、好ましくはセンス鎖の5'または3'末端上に存在し、好ましくはアンチセンス鎖上には存在しない。コレステロールは、ピロリジンリンカー、セリノールリンカー、ヒドロキシプロリノルリンカー、ま

50

たはジスルフィド連鎖によって i R N A 剤に共役され得る。 d U コレステロール共役体は、ジスルフィド連鎖によって i R N A 剤と共に役されることもできる。共役体がコラン酸であり、共役体がセンスまたはアンチセンス鎖の末端ヌクレオチド上に存在する場合、コラン酸は、好ましくはセンス鎖の 5' もしくは 3' 末端、またはアンチセンス鎖の 3' 末端に結合する。一実施形態において、コラン酸は、センス鎖の 3' 末端、およびアンチセンス鎖の 3' 末端に結合する。

【 0 3 0 8 】

i R N A 剤の 1 つ以上のヌクレオチドは、 2' - 5' 連鎖を有することができる。好ましくは、 2' - 5' 連鎖はセンス鎖である。 2' - 5' 連鎖が i R N A 剤の末端ヌクレオチド上に存在する場合、 2' - 5' 連鎖はセンス鎖の 5' 末端上に発生する。

10

【 0 3 0 9 】

i R N A 剤は、好ましくはアンチセンス鎖ではなく、センス鎖上に L 糖を含むことができる。

【 0 3 1 0 】

i R N A 剤は、メチルホスホン酸塩修飾を含むことができる。メチルホスホン酸塩が i R N A 剤の末端ヌクレオチドに存在する場合、メチルホスホン酸塩は i R N A 剤のセンスまたはアンチセンス鎖の 3' 末端に存在する。

【 0 3 1 1 】

i R N A 剤は、デオキシリボヌクレオチドで 1 つ以上のリボヌクレオチドを交換することによって修飾され得る。好ましくは、隣接デオキシリボヌクレオチドはホスホロチオエート結合によって連結され、 i R N A 剤はセンスまたはアンチセンス鎖上の 4 連続以上のデオキシリボヌクレオチドを含まない。

20

【 0 3 1 2 】

i R N A 剤は、イノシン置換に対して、ジフルオロトリル (D F T) 修飾、例えば 2', 4'-ジフルオロトリルウラシル、またはグアニジンを含むことができる。

【 0 3 1 3 】

i R N A 剤は、少なくとも 1 つの 5' - ウリジンアデニン - 3' (5' - U A - 3') デヌクレオチドを含むことができ、ウリジンは 2' 修飾ヌクレオチド、または末端 5' - ウリジン - グアニン - 3' (5' - U G - 3') デヌクレオチドであり、 5' - ウリジンは 2' 修飾したヌクレオチド、または末端 5' - シチジン - アデニン - 3' (5' - C A - 3') デヌクレオチドであり、 5' - シチジンは 2' 修飾ヌクレオチド、または末端 5' - ウリジン - ウリジン - 3' (5' - U U - 3') デヌクレオチドであり、 5' - ウリジンは 2' 修飾ヌクレオチド、または末端 5' - シチジン - シチジン - 3' (5' - C C - 3') デヌクレオチドであり、 5' - シチジンは 2' 修飾ヌクレオチド、または末端 5' - シチジン - ウリジン - 3' (5' - C U - 3') デヌクレオチドであり、 5' - シチジンは 2' 修飾ヌクレオチド、または末端 5' - ウリジン - シチジン - 3' (5' - U C - 3') デヌクレオチドであり、 5' - ウリジンは 2' 修飾ヌクレオチドである。 i R N A 剤において、化学的に修飾したヌクレオチドは、 2' - O - メチル化したヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、修飾したヌクレオチドは、 2' - デオキシヌクレオチド、 2' - デオキシフルオロヌクレオチド、 2' - O - メトキシエチルヌクレオチド、 2' - O - N M A 、 2' - D M A E O E 、 2' - アミノプロピル、 2' - ヒドロキシ、または 2' - アラ - フルオロ、またはロックされた核酸 (L N A) 、拡張された核酸 (E N A) 、ヘキソース核酸 (H N A) 、またはシクロヘキセン核酸 (C e N A) であり得る。修飾したデヌクレオチドが i R N A 剤のセンスまたはアンチセンス鎖の末端上に発生する場合、これらの修飾を含む i R N A 剤は、特にエキソヌクレアーゼ活性に対して安定され、それ以外ではエンドヌクレアーゼ活性に対して特に安定される。

30

【 0 3 1 4 】

i R N A 剤は、例えば i R N A 剤の一方の末端が 3' もしくは 5' オーバーハングを有し、 i R N A 剤のもう一方の末端が平滑末端である、單一オーバーハングを有することができる、または i R N A 剤は、例えば i R N A 剤の両末端は、デヌクレオチドオーバーハ

40

50

ング等の3'もしくは5'オーバーハングを有する、二重オーバーハングを有することができる。別の代替案としては、iRNA剤の両末端は、平滑末端を有することができる。不対ヌクレオチドは、少なくとも1つのホスホロチオエートジヌクレオチド連鎖を有することができ、不対ヌクレオチドのうちの少なくとも1つを、2'-位置において化学的に修飾することができる。iRNA剤の二本鎖領域は、センスおよびアンチセンス鎖のうちの1つまたは両方における、ホスホロチオエートジヌクレオチド結合を含むことができる。複数鎖iRNA剤の様々な鎖を、リンカー、例えばヘキサエチレンギリコールリンカー、ポリ-(オキシホスフィニコ-オキシ-1,3-プロパンジオール)リンカー、アリルリンカー、またはポリエチレンギリコールリンカー等の、化学リンカーで接続することができる。

10

【0315】

ヌクレアーゼ耐性化合物

iRNA剤は、対象の体内に認められる例えばヌクレアーゼ、例えばエンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼによって、分解を抑制するために修飾される化合物を含むことができる。これらの化合物は、本明細書においてNRM、または化合物もしくは修飾を促進するヌクレアーゼ耐性と称される。これらの修飾の多くの場合は、iRNA剤の他の性質、例えばタンパク質、例えば輸送タンパク質、例えば血清アルブミン、もしくはRISCのメンバー(RNA誘導サイレンシング複合体)と相互作用する能力、または相互に二重鎖を形成する、または別の配列、例えば標的分子で二重鎖を形成する第1および第2の配列の能力も調節するであろう。

20

【0316】

理論に縛られることを望まないが、iRNA剤における糖、塩基、および/またはリン酸塩骨格の修飾が、エンドヌクレアーゼおよびエキソヌクレアーゼ耐性を増強することができ、輸送タンパク質およびRISC複合体の機能的な成分のうちの1つ以上の相互作用を増強することができることが考えられる。好ましい修飾は、エキソヌクレアーゼおよびエンドヌクレアーゼ耐性を増加するものであり、したがってRISC複合体との相互作用前に、iRNA剤の半減期を延長するが、同時にRISC複合体においてエンドヌクレアーゼ活性に対してiRNA剤の耐性を与えない。また、理論に縛られることを望まないが、アンチセンス鎖の3'および/または5'末端における、またはそれらの近くの修飾の配置は、上記に描写される好ましいヌクレアーゼ耐性基準を満たすiRNA剤を得ることができると考えられる。また、理論に縛られることを望まないが、例えばセンス鎖の中央における修飾の配置は、オフターゲットを引き起こすことが比較的少ないiRNA剤を得ることができると考えられる。

30

【0317】

本明細書に記載される修飾を、任意のRNAおよび本明細書に記載されるRNA様分子、例えばiRNA剤、担体オリゴヌクレオチドに組み込むことができる。iRNA剤は、アンチセンス鎖および/またはセンス鎖が、本明細書に記載される修飾のうちの1つ以上を含むことができる、ハイブリッド形成されたセンスおよびアンチセンス鎖を含む二重鎖を含むことができる。アンチセンス鎖は、3'末端および/または5'末端における、および/または鎖のどちらかの末端から1~6(例えば1~5、1~4、1~3、1~2)個のヌクレオチドを発生する1つ以上の位置における修飾を含むことができる。センス鎖は、3'末端および/または5'末端における、および/または鎖の2つの末端の間の介在位置のうちのいずれか1つにおける修飾を含むことができる。iRNA剤は、2つのハイブリッド形成されたアンチセンス鎖を含む二重鎖も含むことができる。第1および/または第2のアンチセンス鎖は、本明細書に記載される修飾のうちの1つ以上を含むことができる。したがって、片方および/または両方のアンチセンス鎖は、3'末端および/または5'末端における、および/または鎖のどちらかの末端から1~6(例えば1~5、1~4、1~3、1~2)個のヌクレオチドを発生する1つ以上の位置における修飾を含むことができる。特定の配置は以下に記載される。

40

【0318】

50

上記に描写され好ましいヌクレアーゼ耐性基準を満たすRNA剤を生成するために有用であり得る修飾は、糖、塩基、および／またはリン酸塩骨格の以下の化学および／または立体化学修飾のうちの1つ以上を含む。

【0319】

(i) キラル(S_p)チオエート。したがって、好ましいNRMは、非架橋位置、例えば標準的に酸素によって占められる位置であるS_pまたはR_pにおいてヘテロ原子を含有する修飾したリン酸塩基の特定のキラル形に対して濃縮されたまたは純粋なものを含むヌクレオチド二量体を含む。ヘテロ原子は、S、Se、Nr₂、またはBr₃であり得る。ヘテロ原子がSである場合、濃縮されたまたはキラルに純粋なS_p連鎖が好ましい。濃縮されたとは、好ましい形成の少なくとも70、80、90、95、または99%を意味する。かかるNRMは、以下に詳細が記載される。10

【0320】

(ii) 糖、塩基、および／またはリン酸塩または修飾したリン酸塩骨格部分のリン原子に対する1つ以上のカチオン基の結合。したがって、好ましいNRMは、カチオン基において誘導体化した末端位置における化合物を含む。アンチセンス配列の5'末端が末端-OHまたはリン酸塩基を有すべきであるため、このNRMは好ましくはアンチセンス配列の5'末端において使用されない。基は、例えばピリミジンの5'位置またはプリンの7'位置において、例えば他の鎖上の相補的塩基と相互作用する表面から離れて、H結合形成およびハイブリダイゼーションで干渉を最小限にする塩基上の位置において結合されるべきである。これらは、以下に詳細が記載される。20

【0321】

(iii) 終端における非リン酸塩結合。したがって、好ましいNRMは、非リン酸塩結合、例えばリン酸塩結合よりも大きな切断に対する耐性を与える4原子鎖を含む。例は、3'CH₂-NCH₃-O-CH₂-5'および3'CH₂-NH-(O=)-CH₂-5'を含む。

【0322】

(iv) 3' - 架橋チオリン酸塩および5' - 架橋チオリン酸塩。したがって、好ましいNRMはこれらの構造を含むことができる。

【0323】

(v) L-RNA、2' ~ 5'結合、逆結合、αヌクレオシド。したがって、他の好ましいNRMは、LヌクレオシドおよびL-ヌクレオシドに由来する二量体ヌクレオチド、2' ~ 5'リン酸塩、非リン酸塩および修飾したリン酸塩結合（例えばチオリン酸塩、ホスホロアミド酸、およびリン酸ホウ素）、逆結合、例えば3' ~ 3'または5' ~ 5'結合を有する二量体、糖、例えばアルファ連鎖を有する本明細書に記載の構造上の1'部位においてアルファ連鎖を有する化合物を含む。30

【0324】

(vi) 共役基。したがって、好ましいNRMは、例えば糖、塩基、または骨格を介して化合物で共役される、例えば標的部分または本明細書に記載される共役するリガンドを含むことができる。

【0325】

(vii) 脱塩基結合。したがって、好ましいNRMは、脱塩基化合物、例えば本明細書に記載される脱塩基化合物（例えば核酸塩基不在の化合物）、本明細書に記載される芳香族またはヘテロ環状またはポリヘテロ環状芳香族化合物を含むことができる。40

【0326】

(viii) 5' - ホスホン酸塩および5' - リン酸塩プロドラッグ。したがって、好ましくはリン酸塩基の1つ以上の原子が、保護基または基が対象の体内における成分、例えば対象の体内に存在するカルボキシエステラーゼまたは酵素の作用の結果、削除される保護基で誘導体化された、末端位置、例えば5'位置において、好ましいNRMは化合物を含む。例えば、カルボキシエステラーゼが、リン酸塩のOに隣接する炭素を攻撃するチオエートアニオンの生成が得られ、非保護リン酸塩の生成が得られる保護分子を切断する50

リン酸塩プロドラッグ。

【0327】

1つ以上の異なるNRM修飾を、iRNA剤またはiRNA剤の配列に導入することができる。NRM修飾を配列またはiRNA剤において1回以上使用することができる。いくつかのNRMは、ハイブリダイゼーションと相互作用するため、組み込まれる全数は、iRNA剤の二重鎖形成の受け入れ可能なレベルが維持されるようにあるべきである。

【0328】

いくつかの実施形態において、NRM修飾は、末端、切断部位または対象における所望の配列または遺伝子を標的としない、配列の切断領域（センス鎖または配列）に導入される。これはオフターゲットサイレンシングを削減することができる。

10

【0329】

参考文献

一般的な参考文献

本発明に従って使用されるオリゴリボヌクレオチドおよびオリゴリボヌクレオシドを、固相合成で合成することができる、例えば“Oligonucleotide synthesis, a practical approach”, Ed. M. J. Gait, IRL Press, 1984、“Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach”, Ed. F. Eckstein, IRL Press, 1991(特にChapter 1、Modern machine-aided methods of oligodeoxyribonucleotide synthesis、Chapter 2、Oligoribonucleotide synthesis、Chapter 3、2'-O--Methyloligonucleotides: synthesis and applications、Chapter 4、Phosphorothioate oligonucleotides、Chapter 5、Synthesis of oligonucleotide phosphorodithioates、Chapter 6、Synthesis of oligo-2'-deoxyribonucleoside methylphosphonates、およびChapter 7、Oligodeoxynucleotides containing modified basesを参照。他の特に有用的な合成手順、試薬、遮断基、および反応条件は、Martin, P., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504、Beaucage, S. L. and Iyer, R. P., Tetrahedron, 1992, 48, 2223-2311、およびBeaucage, S. L. and Iyer, R. P., Tetrahedron, 1993, 49, 6123-6194、またはそれらにおいて参考される文献に記載される。

20

30

30

【0330】

国際公開第00/44895号、国際公開第01/75164号、または国際公開第02/44321号の各パンフレットに記載される修飾は、本明細書に使用することができる。

40

【0331】

本明細書に記載される全ての文献、特許、および公開された特許出願の開示は、本明細書に参照により組み込まれる。

【0332】

リン酸塩基の参考文献

ホスフィナートオリゴリボヌクレオチドの調製は、米国特許第5,508,270号明細書に記載される。アルキルホスホン酸塩オリゴリボヌクレオチドの調製は、米国特許第4,469,863号明細書に記載される。ホスホラミダイトオリゴリボヌクレオチドの調製は、米国特許第5,256,775号または米国特許第5,366,878号明細書に記載される。リン酸トリエステルオリゴリボヌクレオチドの調製は、米国特許第5,023,243号明細書に記載される。ボラノリン酸塩オリゴリボヌクレオチドの調製は、

50

米国特許第5,130,302号および同第5,177,198号の各明細書に記載される。3'-デオキシ-3'-アミノホスホロアミド酸オリゴリボヌクレオチドの調製は、米国特許第5,476,925号明細書に記載される。3'-デオキシ-3'-メチレンホスホン酸塩オリゴリボヌクレオチドは、An, H, et al. J. Org. Chem. 2001, 66, 2789-2801に記載される。硫黄架橋ヌクレオチドの調製は、Sproat et al. Nucleosides Nucleotides 1988, 7, 651およびCrossstick et al. Tetrahedron Lett. 1989, 30, 4693に記載される。

【0333】

糖基の参考文献

10

2'修飾に対する修飾を、Verma, S. et al. Annu. Rev. Bioc hem. 1998, 67, 99-134およびその中における全ての文献に見出すことができる。リボースに対する特異的修飾を、以下の参照に見出すことができる。2' - フルオロ(Kawasaki et al., J. Med. Chem., 1993, 36, 831-841), 2' - MOE(Martin, P. Helv. Chim. Acta 1996, 79, 1930-1938)、「LNA」(Wengel, J. Acc. Chem. Res. 1999, 32, 301-310)。

【0334】

リン酸塩基の交換の参考文献

20

本明細書にMMI結合オリゴリボヌクレオシドとしても同定されるメチレンメチルイミノ結合オリゴリボヌクレオシド、本明細書にMDH結合オリゴリボヌクレオシドとしても同定されるメチレンジメチルヒドラゾ結合オリゴリボヌクレオシド、および本明細書にアミド-3結合オリゴリボヌクレオシドとしても同定されるメチレンカルボニルアミノ結合オリゴヌクレオシド、および本明細書にアミド-4結合オリゴリボヌクレオシドとしても同定されるメチレンアミノカルボニル結合オリゴヌクレオシド、ならびに例えばMMIおよびPOまたはPS結合の変化を有する混合された骨格化合物は、米国特許第5,378,825号、第5,386,023号、第5,489,677号の各明細書および公開された国際出願第PCT/US92/04294号、および同第PCT/US92/04305号(国際公開第92/20822号、および92/20823号としてそれぞれ公開された)に記載されるとおり調製することができる。ホルムアセタールおよびチオホルムアセタール結合オリゴリボヌクレオシドは、米国特許第5,264,562号、および同第5,264,564号の各明細書に記載されるとおりに調製することができる。エチレンオキシド結合オリゴリボヌクレオシドは、米国特許第5,223,618号明細書に記載されるとおり調製することができる。シロキサン交換は、Cormier, J. F. et al. Nucleic Acids Res. 1988, 16, 4583に記載される。炭酸塩交換は、Tittensor, J. R. J. Chem. Soc. C 1971, 1933に記載される。カルボキシメチル交換は、Edge, M. D. et al. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 1972, 1991に記載される。カルバミン酸交換は、Stirchak, E. P. Nucleic Acids Res. 1989, 17, 6129に記載される。

30

【0335】

リン酸塩-リボース骨格の交換の参考文献

40

シクロブチル糖代替化合物は、米国特許第5,359,044号明細書に記載されるとおりに調製することができる。ピロリジン糖代替は、米国特許第5,519,134号明細書に記載されるとおりに調製することができる。モルフォリノ糖代替は、米国特許第5,142,047号および同第5,235,033号の各明細書、および他の関係した特許開示に記載されるとおり調製することができる。ペプチド核酸(PNA)は、それ自体は知られており、Peptide Nucleic Acids (PNA): Synthesis, Properties and Potential Applications, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 1996,

50

4, 5 - 23 に言及される様々な手順のうちのいずれかに従って調製することができる。米国特許第5, 539, 083号明細書に従って調製されることもできる。

【0336】

末端修飾の参考文献

末端修飾は、Manoharan, M. et al. Antisense and Nucleic Acid Drug Development 12, 103 - 128 (2002)、およびそれらにおける文献に記載される。

【0337】

塩基の参考文献

N - 2 置換プリンヌクレオシドアミダイトは、米国特許第5, 459, 255号明細書に記載されるとおり調製することができる。3 - デアザプリンヌクレオシドアミダイトは、米国特許第5, 457, 191号明細書に記載されるとおり調製することができる。5, 6 - 置換ピリミジンヌクレオシドアミダイトは、米国特許第5, 614, 617号明細書に記載されるとおり調製することができる。5 - プロピニルピリミジンヌクレオシドアミダイトは、米国特許第5, 484, 908号明細書に記載されるとおり調製することができる。さらなる参考文献は、塩基修飾の上記の項において開示される。

10

【0338】

オリゴヌクレオチド產生

本発明のオリゴヌクレオチド化合物は、液体相または固相の有機合成を使用して調製することができる。有機合成は、非天然または修飾したヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド鎖が容易に調製される利点を提供する。当該技術分野で既知のかかる合成に対する他の意味は、追加でまたは代わりに採用することができる。ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、およびアルキル化した誘導体等の他のオリゴヌクレオチドを調製するために、同様の技術を使用することも知られている。本発明の二本鎖オリゴヌクレオチド化合物は、2段階の手順を使用して調製することができる。先ず、二本鎖分子の個々の鎖は、別々に調製される。次に、成分の鎖がアニーリングされる。

20

【0339】

合成方法に関わらず、オリゴヌクレオチドは、製剤に対して適切である液体（例えば、水溶液および/または有機溶液）において調製することができる。例えば、iRNA調製剤を沈殿し、純粋な再蒸留水において再溶解し、凍結乾燥することができる。乾燥したiRNAを、目的の製剤処理に対して適切な溶液において再懸濁することができる。

30

【0340】

特定の修飾したオリゴヌクレオチドの合成についての教育は、以下の米国特許または特許出願済みのポリアミン共役オリゴヌクレオチドに対して作成された米国特許第5, 138, 045号および同第5, 218, 105号の各明細書、キラルリン結合を有するオリゴヌクレオチドの調製のための化合物に対して作成された米国特許第5, 212, 295号明細書、修飾した骨格を有するオリゴヌクレオチドに対して作成された米国特許第5, 378, 825号明細書および同第5, 541, 307号、還元的共役体を介した骨格-修飾したオリゴヌクレオチドおよびその調整に対して作成された米国特許第5, 386, 023号明細書、3 - デアザプリン環系およびその合成方法を基にした修飾した核酸塩基に対して作成された米国特許第5, 457, 191号明細書、N - 2 置換プリンを基にした修飾した核酸塩基に対して作成された米国特許第5, 459, 255号明細書、キラルリン結合を有するオリゴヌクレオチドを調製するためのプロセスに対して作成される米国特許第5, 521, 302号明細書、ペプチド核酸に対して作成される米国特許第5, 539, 082号明細書、ベータ - ラクタム骨格を有するオリゴヌクレオチドに対して作成される米国特許第5, 554, 746号明細書、オリゴヌクレオチドの合成ための方法および材料に対して作成される米国特許第5, 571, 902号明細書、アルキルチオ基を有するヌクレオシド、かかる基をヌクレオシドの任意の様々な位置に結合された他の部分に対してリンクマーとして使用することに対しても描画される米国特許第5, 578, 718号明細書、高キラル純度のホスホロチオエート結合を有するオリゴヌクレオ

40

50

チドに対して作成される米国特許第5,587,361号および同第5,599,797号の各明細書、2'-O-アルキルグアノシンおよび2',6-ジアミノプリン化合物を含む関係する化合物の調製に対するプロセスに対して作成される米国特許第5,506,351号明細書、N-2置換プリンを有するオリゴヌクレオチドに対して作成される米国特許第5,587,469号明細書、3-デアザプリンを有するオリゴヌクレオチドに対して作成される米国特許第5,587,470号明細書、共役される4'-脱メチルヌクレオシド類似体に対して作成される米国特許第5,223,168号および米国特許第5,608,046号の各明細書、骨格-修飾したオリゴヌクレオチド類似体に対して作成される米国特許第5,602,240号および同第5,610,289号の各明細書、およびとりわけ、2'-フルオロ-オリゴヌクレオチドの合成方法に対して作成される米国特許第6,262,241号および同第5,459,255号の各明細書に見出すことができる。

10

【0341】

ある化合物における全ての位置が均一に修飾される必要はなく、実際は1種類以上の修飾が、單一オリゴヌクレオチド化合物またはその单一ヌクレオチドにでさえも組み込まれ得る。

【0342】

送達の経路

解説を簡略化するために、この項における製剤、組成物、および方法は、未修飾iRNA剤に関して主に論じられる。しかしこれらの製剤、組成物、および方法は、本発明の他のオリゴヌクレオチド、例えば修飾したiRNA剤、アンチセンス、アンタゴmimir、アプタマー、リボザイムで、実行され得、かかる実行は、本発明内であることが理解されるべきである。iRNAを含む組成物を、様々な経路によって対象に送達することができる。例示的な経路は、静脈内、局所的、直腸、肛門、腔、鼻、肺、眼部を含む。

20

【0343】

本発明のiRNA分子は、投与に対して適切な医薬組成物に組み込まれ得る。かかる組成物は、典型的に1種以上のiRNAおよび薬学的に許容される担体を含む。本明細書で使用されるとき、「薬学的に許容される担体」という言葉は、薬学的な投与と矛盾しない任意のおよび全ての溶媒、分散媒、コーティング、非細菌および抗真菌剤、等張性および吸収を遅らせる薬剤等を含むことを目的とする。薬学的活性物質に対するかかる培地および薬剤の使用は、当該技術分野で周知である。任意の従来の培地または薬剤が活性化合物と不適合である場合を除いて、組成物におけるその使用は検討される。補足活性化合物は、組成物に組み込まれることもできる。

30

【0344】

本発明の医薬組成物を、局所的または全身治療が望ましいか否か、および治療される範囲によって様々な方法で投与することができる。投与は、局所的（眼部、腔、直腸、鼻腔内、経皮性を含む）、経口または非経口であり得る。非経口投与は、静脈点滴、皮下、腹腔内もしくは筋肉内注射、またはくも膜下腔内もしくは脳室内投与を含む。

【0345】

投与の経路および部位を、標的を増強するために選択することができる。例えば、筋肉細胞を標的にするためには、対象の筋肉への筋肉内注射は、正しい選択であろう。肺細胞は、エアロゾル形でiRNAを投与することによって標的にされる可能性がある。血管内皮細胞は、iRNAでバルーンカテーテルをコーティングすることによって標的にされ得、DNAを機械的に導入する。

40

【0346】

局所的投与のための製剤は、経皮性パッチ、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、液滴、坐薬、スプレー、液体、および粉末を含むことができる。従来の薬学的担体、水性、粉末、または油性基剤、増粘剤等は、必要または望ましくあり得る。コーティングされたコンドーム、手袋等も有用であり得る。

【0347】

50

経口投与のための組成物は、粉末もしくは顆粒、水における懸濁液もしくは溶液、シロップ、エリキシル剤もしくは非水系培地、錠剤、カプセル剤、ロゼンジ、またはトローチ剤を含む。錠剤の場合、使用することができる担体は、ラクトース、クエン酸ナトリウムおよびリン酸塩を含む。デンブン等の様々な錠剤分解物質、ステアリン酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウム、およびタルク等の平滑剤は、錠剤において一般的に使用される。カプセル剤形の経口投与について、有用的な希釈液はラクトースおよび高分子量ポリエチレングリコールである。水性懸濁液が経口使用に必要な場合、核酸組成物を乳化および懸濁剤と組み合わすことができる。必要な場合、ある甘味料および／または調味料を添加することができる。

【0348】

10

くも膜下腔内または脳室内投与に対する組成物は、緩衝液、希釈液、および他の適切な添加物も含むことができる無菌水溶液を含むことができる。

【0349】

非経口投与に対する製剤は、緩衝液、希釈液、および他の適切な添加物も含むことができる無菌水溶液を含むことができる。脳室内注入を、例えば、リザーバーに取り付けられている脳室内カテーテルによって促進することができる。静脈内使用について、溶質の総濃度は調製等張を与えるために制御されるべきである。

【0350】

20

眼部投与について、軟膏または点眼液を、アプリケーターまたは点眼剤等の当業者に知られる眼部送達システムによって送達することができる。かかる組成物は、ヒアルロン酸等のムコミメティック (mucomimetics)、コンドロイチン硫酸、ヒドロキシプロピルメチルセルロースもしくはポリ(ビニルアルコール)、ソルビン酸等の防腐剤、EDTAもしくは塩化ベンジルクロム、希釈液および／または担体の大抵の量を含むことができる。

【0351】

30

局所的送達

解説を簡略化するために、この項における製剤、組成物、および方法は、未修飾iRNA剤に関して主に論じられる。しかしこれらの製剤、組成物、および方法は、本発明の他のオリゴヌクレオチド、例えば修飾したiRNA剤、アンチセンス、アプタマー、アンタゴミア、リボザイムで、実行され得、かかる実行は、本発明内であることが理解されるべきである。好ましい実施形態では、iRNA剤は、局所的投与を介して対象に送達される。「局所的投与」は、対象の表面に直接製剤を接触することによる対象への送達を指す。最も一般的な局所的送達の形は、皮膚に対してであるが、本明細書に開示される組成物は、体の他の表面、例えば、眼、粘膜、体腔の表面、または内面に、直接塗ることができる。上記の通り、最も一般的な局所的送達は、皮膚に対してである。用語は、局所的および経皮性を含むがこれらに限定されない、投与のいくつかの経路を含む。投与のこれらのモードは、典型的に皮膚の透過障壁の侵入および標的組織または層への効率的な送達を含む。局所的な投与を、表皮および真皮の侵入ならびに組成物の全身送達を、最終的に達成する手段として用いることができる。局所的投与は、選択的に対象の表皮もしくは真皮、またはその特定の層、または下層組織にオリゴヌクレオチドを送達する手段としても使用することができる。

40

【0352】

本明細書で使用されるとき、「皮膚」という用語は、動物の表皮および／または真皮を指す。哺乳動物皮膚は、2つの主な、異なる層からなる。皮膚の外層は、表皮と称される。表皮は、角質層、顆粒膜層、有棘層、基底層からなり、角質層は皮膚の表面にあり基底層は表皮の最深部にある。表皮は、体の位置によって50μm～0.2mmの間の厚さである。

【0353】

50

表皮の下は、表皮よりも非常に厚い真皮である。真皮は、線維束の形のコラーゲンから主になる。コラーゲン束は、取り分け、血管、毛細リンパ管、腺、神経終末、および免疫

学的活性細胞に対する支持を提供する。

【0354】

臓器としての皮膚の主な機能のうちの1つは、体への物質の侵入を制御することである。皮膚の主要な透過性障壁は、分化の様々な状態における細胞の多くの層から形成される角質層によって提供される。角質層における細胞間の空間は、皮膚透過性障壁をさらに増強するために封鎖する格子状の形成に配置される異なる脂質で満たされる。

【0355】

皮膚によって提供される透過性障壁は、約750Daよりも多い分子量を有する分子に対して大いに不透過であるようである。大きな分子が皮膚の透過性障壁を通過するためには、通常の浸透以外のメカニズムを、使用しなければならない。

10

【0356】

いくつかの因子によって、投与された薬剤に対して皮膚の透過性を測定する。これらの因子は、治療された皮膚の特徴、送達剤の特徴、薬物と送達剤との間および薬物と皮膚との間の両方の相互作用、投与された薬物の用量、治療の形式、および治療後の療法を含む。表皮および真皮を選択的に標的にするためには、事前に選択した層に対して薬物の浸透を可能にする1つ以上の浸透エンハンサーを含む組成物を製剤化することが、場合によって可能である。

【0357】

経皮性送達は、脂溶性治療の投与に対して重要な経路である。真皮は、表皮よりも透過性があり、したがって吸収は、擦過した、火傷したまたは剥皮した皮膚を介してより速い。炎症および皮膚に対して血流を増加する他の生理的な状態は、経皮性吸着も増強する。この経路を通した吸収を、油性媒体（塗油）の使用によってまたは1つ以上の浸透エンハンサーの使用を介して増強することができる。経皮性経路を通した本明細書に開示される組成物を送達するための他の効果的な方法は、皮膚の水和および制御された放出局所的パッチの使用を含む。経皮性経路によって、全身および/または局所療法のために、本明細書に開示される組成物を送達する潜在的に有効な手段を提供する。

20

【0358】

さらに、イオン導入（電場の影響を受けて生物学的膜を介してイオン性溶質を伝達する）（Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 163）、フォノフォレシスまたは超音波導入（生物学的膜、特に皮膚および角膜を横断して様々な治療薬の吸収を増強するための超音波の使用）（Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 166）、および投与位置と関連する媒体の特徴の最適化および投与の部位での保持（Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 168）は、皮膚およびムコサール部位を横断して局所的に投与した組成物の輸送を増強するために有用な方法であり得る。

30

【0359】

提供される組成物および方法は、培養または保存された皮膚組織において、および動物においてインビトロで、様々なタンパク質の機能および遺伝子を検査するためにも使用することができる。本発明は、任意の遺伝子の機能を検査するために適用することができる。本発明の方法は、治療的にまたは予防的にも使用することができる。例えば、乾癬、扁平苔癬、毒性の表皮壊死融解症、多形性紅斑、基底細胞癌腫、扁平上皮癌、悪性メラノーマ、パジエット病、カポジ肉腫、肺線維症、ライム病、および皮膚のウイルス性、真菌および細菌感染等の疾病を被ることで知られているまたはその疑いがある動物の治療。

40

【0360】

肺送達

解説を簡略化するために、この項における製剤、組成物、および方法は、未修飾iRN A剤に関して主に論じられる。しかしこれらの製剤、組成物、および方法は、本発明の他

50

のオリゴヌクレオチド、例えば修飾した i R N A 剤、アンチセンス、アプタマー、アンタゴニスト、リボザイムで、実行され得、かかる実行は、本発明内であることが理解されるべきである。 i R N A 剤、例えば二本鎖 i R N A 剤を含む組成物を、肺送達によって対象へ投与することができる。肺送達組成物を、分散内の組成物、好ましくは i R N A が肺胞領域を介して直接血液循環に吸収されることが容易であり得る肺に到達することができるよう、分散の患者によって吸入によって送達することができる。肺送達は、肺の疾病を治療するために、全身送達および局所的送達の両方に対して有効であり得る。

【 0 3 6 1 】

肺送達は、噴霧された、エアロゾル化した、ミセルおよび乾燥粉末ベースの製剤の使用を含む、異なるアプローチによって達成することができる。送達は、液体噴霧器、エアロゾルベースの吸入器、および乾燥粉末分散装置で達成することができる。定量噴霧式装置は、好ましい。アトマイザまたは吸入器を使用する利点のうちの 1 つは、装置が内蔵型であるため、混入の可能性が最小限であることである。乾燥粉末分散装置は、例えば、乾燥粉末として容易に製剤化することができる薬物を送達する。 i R N A 組成物は、それ自身でまたは適切な粉末担体との組み合わせによって、凍結乾燥または吹き付け乾燥させた粉末として安定保存することができる。吸入のための組成物の送達を、装置に組み込まれる場合、投与追跡、順守監視および / またはエアロゾル薬剤の投与中に、患者に対して投与をトリガーすることを可能にするタイマー、投与カウンター、時間測定装置、または時間表示を含むことができる投与時期の要素によって媒介することができる。

【 0 3 6 2 】

「粉末」という用語は、自由流動し、吸入装置において容易に分散され得、次に肺胞への浸透を許すために粒子が肺に到達することができるよう対象によって吸入される細かく分散した固体粒子からなる組成物を意味する。したがって、粉末は「呼吸用」であると考えられている。好ましくは、平均粒子の大きさは、好ましくは比較的均一の橢円体型分布を含む、直径約 1.0 μm 未満である。より好ましくは、直径は約 7.5 μm および最も好ましくは、約 5.0 μm である。大抵は、粒子の大きさ分布は、直径約 0.1 μm ~ 約 5 μm の間、特に約 0.3 μm ~ 約 5 μm である。

【 0 3 6 3 】

「乾燥」という用語は、組成物が重量 (% w) 水で約 10 % 未満、大抵は約 5 % w 未満、および好ましくは約 3 % w 未満の含水量を有することを意味する。乾燥組成物は、粒子がエアロゾルを形成するために、吸入装置に容易に分散するようあり得る。

【 0 3 6 4 】

「治療的に有効な量」という用語は、予想される生理学的反応を与えるために、治療される対象において所望のレベルの薬物を提供するために必要である組成物に存在する量である。

【 0 3 6 5 】

「生理学的に有効な量」という用語は、所望の対症または治療効果を与える対象に送達される量である。

【 0 3 6 6 】

「薬学的に許容される担体」という用語は、担体が肺において著しく有害な毒性効果なしに肺に取り入れられ得ることを意味する。

【 0 3 6 7 】

担体として有用な薬学的な賦形剤の種類は、ヒト血清アルブミン (H S A) 等の安定剤、炭水化物、アミノ酸、およびポリペプチド等の充てん剤、pH 調整剤または緩衝液、塩化ナトリウム等の塩を含む。これらの担体は、結晶の形または無定形であり得る、または 2 つの混合物であり得る。

【 0 3 6 8 】

特に有益な充てん剤は、適合性炭水化物、ポリペプチド、アミノ酸、またはそれらの組み合わせを含む。適切な炭水化物は、ガラクトース、D - マンノース、ソルボース等の单糖；ラクトース、トレハロース等の二糖；2 - ヒドロキシプロピル - ベータ - シクロデキ

10

20

30

40

50

ストリン等のシクロデキストリン；およびラフィノース、マルトデキストリン、デキストラン等の多糖；マンニトール、キシリトール等のアルジトールを含む。炭水化物の好ましい基は、ラクトース、トレハロース、ラフィノスマルトデキストリン、およびマンニトールを含む。適切なポリペプチドは、アスパルテームを含む。アミノ酸は、アラニンおよびグリシンを含むが、グリシンが好ましい。

【0369】

本発明の組成物の少量の成分である添加物は、噴霧乾燥中に、および粉末の分散性を改善するために立体配座安定性に含まれ得る。これらの添加物は、トリプトファン、チロシン、ロイシン、フェニルアラニン等の疎水性アミノ酸を含む。

【0370】

適切なpH調整剤または緩衝液は、クエン酸ナトリウム、アスコルビン酸ナトリウム等の有機酸および塩基から調製される有機塩を含むが、クエン酸ナトリウムが好ましい。

【0371】

ミセルiRNA製剤の肺投与は、テトラフルオロエタン、ヘptaフルオロエタン、ジメチルフルオロプロパン、テトラフルオロプロパン、ブタン、イソブタン、ジメチルエーテル、および他の非CFC等の噴霧剤ならびにCFC噴霧剤を含む定量噴霧式スプレー装置を介して達成することができる。

【0372】

経口または経鼻送達

解説を簡略化するために、この項における製剤、組成物、および方法は、未修飾iRNA剤に関して主に論じられる。しかしこれらの製剤、組成物、および方法は、本発明の他のオリゴヌクレオチド、例えば修飾したiRNA剤、アンチセンス、アプタマー、アンタゴm i r、リボザイムで、実行され得、かかる実行は、本発明内であることが理解されるべきである。経口および鼻粘膜の両方は、他の投与の経路に優る利点を提供する。例えば、これらの膜を通して投与された薬物は、急速に作用の開始を行い、治療の血漿レベルを提供し、肝代謝の初回通過効果を回避し、適さない胃腸(GI)環境に対して薬物の曝露を回避する。追加の利点は、薬物を容易に投与し、局所化し、削除することができるよう、膜部位に容易にアクセスできることを含む。

【0373】

経口送達において、組成物は経口腔、例えば舌の腹側表面の膜および口腔底または頬の裏層を構成する頬粘膜を含む舌下の粘膜の表面を標的にすることができる。舌下の粘膜は、比較的に透過性がある、したがって急速な吸収および多くの薬物の受け入れられる生物学的利用率を与える。さらに、舌下の粘膜は簡便で、受け入れられ、容易にアクセス可能である。

【0374】

経口粘膜を介して透過させる分子の能力は、分子の大きさ、脂溶性、およびペプチドタンパク質のイオン化に関するようである。1000ダルトン未満の小分子は、粘膜を急速に横断するようである。分子の大きさが大きくなるにつれ、透過性は急速に減る。脂溶性の化合物は、非脂溶性分子よりも透過性がある。最大限の吸収は、電荷において分子が非イオン化または中性である場合に発生する。したがって荷電分子は、経口粘膜を介して吸収するために最大の課題を提示する。

【0375】

iRNAの医薬組成物を、定量噴霧式スプレーディスペンサー、上記のとおり混合されたミセルの薬学的な製剤、および噴霧剤から、吸入なしで腔に噴霧することによってヒトの頬側腔にも投与することができる。一実施形態において、ディスペンサーを、先ず薬学的な製剤および噴霧剤を頬側腔に噴霧する前に振とうする。

【0376】

装置

解説を簡略化するために、この項における装置、製剤、組成物、および方法は、未修飾iRNA剤に関して主に論じられる。しかしこれらの製剤、組成物、および方法は、本発

10

20

30

40

50

明の他のオリゴヌクレオチド、例えば修飾した i RNA 剤、アンチセンス、アプタマー、アンタゴミ r 、リボザイムで、実行され得、かかる実行は、本発明内であることが理解されるべきである。 i RNA 剤、例えば二本鎖 i RNA 剤、または s RNA 剤（例えば前駆物質、例えば s RNA 剤または i RNA 剤に加工することができるより大きな i RNA 剤、例えば二本鎖 i RNA 剤、 s RNA 剤、またはその前駆物質をコードする DNA ）を、装置、例えば移植されたまたはそうでなければ対象に置かれた装置において処分することができる。例示的な装置は、脈管構造に導入された装置、例えば血管組織の管腔に挿入された、または装置自身がステント、カテーテル、心臓弁、および他の血管装置を含む脈管構造の一部を形成する装置を含む。これらの装置、例えばカテーテルまたはステントは、肺、心臓、または足の脈管構造に置かれる。

10

【0377】

他の装置は、非血管装置、例えば腹膜に移植される、または臓器または腺性組織、例えば人工臓器における装置を含む。装置は i RNA に加えて治療物質を放出できる、例えば装置はインスリンを放出することができる。

【0378】

他の装置は、人工関節、例えば股関節、および他の整形外科移植片を含む。

【0379】

一実施形態において、 i RNA を含む組成物の単位投与または測定された投与は、移植装置によって分配される。装置は、対象内のパラメータを観察するセンサーを含むことができる。例えば、装置は、ポンプ、例えば任意に関連した電子機器を含むことができる。

20

【0380】

腎臓等の組織、例えば細胞または臓器を、 i RNA 剤でエクスピボ治療することができ、対象に投与または移植することができる。

【0381】

組織は、自己、同種、または異種間の組織であることができる。例えば、組織（例えば腎臓）を、移植片対宿主病を削減するために治療することができる。他の実施形態において、組織は同種であり、組織は腎臓における等、組織における不必要な遺伝子発現によって特徴付けられる疾患を治療するために治療される。別の例において、造血細胞、例えば骨髄造血細胞を含有する組織を、不必要な細胞増殖を抑制するために治療することができる。

30

【0382】

治療された組織の導入、自己または移植に関わらず、他のセラピーと組み合わせられ得る。

【0383】

いくつかの実行において、 i RNA 治療した細胞は、例えば細胞が移植片を離れることを防止する半透明の多孔性隔膜によって、他の細胞から遮断するが、体から分子を細胞に到達し細胞から産生された分子が体に入ることを可能にする。一実施形態において、多孔性隔膜はアルギン酸から形成される。

【0384】

一実施形態において、避妊具は i RNA 剤で覆われているまたはそれを含有する。例示的な装置は、コンドーム、ペッサリー、 IUD (埋め込み型子宮内避妊器具、スポンジ、腔鞘、および避妊具を含む。一実施形態において、 i RNA は精子または卵子を不活性化するために選ばれる。別の実施形態では、 i RNA は、ウイルス性または病原体 RNA 、例えば STD の RNA に対して相補的となるために選ばれる。場合によっては、 i RNA 組成物は殺精子剤を含むことができる。

40

【0385】

製剤

本明細書に記載される i RNA 剤を、対象に投与するために製剤化することができる。解説を簡略化するために、この項における製剤、組成物、および方法は、未修飾 i RNA 剤に関して主に論じられる。しかしこれらの製剤、組成物、および方法は、本発明の他の

50

オリゴヌクレオチド、例えば修飾した i RNA 剤、アンチセンス、アプタマー、アンタゴミ r 、リボザイムで、実行され得、かかる実行は、本発明内であることが理解されるべきである。

【0386】

製剤化した i RNA 組成物によって、様々な状態を想定することができる。いくつかの例において、組成物は、少なくとも部分的に結晶、均一に結晶および / または無水（例えば、水 80 、 50 、 30 、 20 、または 10 % 未満）である。別の例において、 i RNA は水相において、例えば水を含む溶液において、存在する。

【0387】

水相または結晶性の組成物は、例えば送達媒体、例えばリポソーム（特に水相に対して）または粒子（例えば結晶性組成物に対して適切であり得る微小粒子）に組み込まれる。一般的に、 i RNA 組成物は、目的の投与方法に適合する方法で製剤化される。

【0388】

特定の実施形態において、組成物は以下の方法のうちの少なくとも 1 つによって調製される。噴霧乾燥、凍結真空乾燥、真空乾燥、蒸発、流動層乾燥、もしくはこれらの技術の組み合わせ、または脂質での超音波処理、凍結乾燥、凝縮および他の自己組織化。

【0389】

i RNA 調製を、別の薬剤、例えば別の治療薬または i RNA 、例えば i RNP を形成するために i RNA と複合体を形成するタンパク質を安定する薬剤と組み合わせて製剤化することができる。さらに他の薬剤は、キレート剤、例えば EDTA （例えば Mg²⁺ 等の二価カチオンを削除するため）、塩、リボヌクレアーゼ抑制剤（例えば RNAsin 等の広特異性リボヌクレアーゼ抑制剤）等を含む。

【0390】

一実施形態において、 i RNA 調製は別の i RNA 剤、例えば第 2 遺伝子に対して、または同一遺伝子に対して RNAi を媒介することができる第 2 の i RNA を、含む。さらに他の調製は、少なくとも 3 、 5 、 10 、 20 、 50 、または 100 以上の異なる i RNA 種を含むことができる。かかる i RNA は、異なる遺伝子の同様の数に対して RNAi を媒介することができる。

【0391】

一実施形態において、 i RNA 調製は少なくとも第 2 の治療薬（例えば RNA または DNA 以外の薬剤）を含む。例えば、ウイルス性疾病の治療のための i RNA 組成物、例えば HIV は、既知の非ウイルス性薬剤（例えばプロテアーゼ抑制剤または逆転写酵素阻害剤）を含む可能性がある。別の例において、癌の治療のための i RNA 組成物は化学療法薬をさらに含む可能性がある。

【0392】

本発明に適している他の製剤は、 2008 年 1 月 2 日に出願された米国仮特許出願第 61 / 018 , 616 号、 2008 年 1 月 2 日に出願された米国仮特許出願第 61 / 018 , 611 号、 2008 年 3 月 26 日に出願された米国仮特許出願第 61 / 039 , 748 号、 2008 年 4 月 22 日に出願された米国仮特許出願第 61 / 047 , 087 号、および 2008 年 5 月 8 日に出願された米国仮特許出願第 61 / 051 , 528 号の各明細書に記載される。 2007 年 10 月 3 日に出願された国際出願第 PCT / US2007 / 080331 号の明細書も本発明に適している製剤を記載する。

【0393】

医薬組成物

一実施形態において、本発明は前項に記載されるとおり、本発明のオリゴヌクレオチド、例えば i RNA 剤を含有する医薬組成物、および以下に記載される薬学的に許容される担体に関する。修飾した i RNA 剤を含む医薬組成物は、標的遺伝子の発現によって発生した疾患を治療するために有用である。本発明のこの態様において、本発明の i RNA 剤は以下に記載したとおり製剤化される。医薬組成物は、標的遺伝子の発現を抑制するために十分な用量で投与される。

10

20

30

40

50

【0394】

本発明の医薬組成物は、標的遺伝子の発現または活性を抑制するために十分な用量で投与される。本発明のiRNA剤を含有する組成物を、意外にも低容量で投与することができる。1日当たり体重1キログラムにつき最大用量5mgのiRNA剤は、標的遺伝子の発現または活性を十分に抑制する、または完全に抑圧することができる。

【0395】

一般的に、修飾したiRNA剤の適切な用量は、1日当たりレシピエントの体重の1キログラムにつき、0.001～500ミリグラムの範囲（例えば、1キログラムにつき約1マイクログラム～1キログラムにつき約500ミリグラム、1キログラムにつき約100マイクログラム～1キログラムにつき約100ミリグラム、1キログラムにつき約1ミリグラム～1キログラムにつき約75ミリグラム、1キログラムにつき約10マイクログラム～1キログラムにつき約50ミリグラム、または1キログラムにつき約1マイクログラム～1キログラムにつき約50マイクログラム）であろう。医薬組成物を、1日1回投与することができる、またはiRNA剤を、1日を通して2、3、4、5、6以上のサブ用量で、適切な間隔で投与することができる。その場合、それぞれのサブ用量に含有されるiRNA剤は、1日当たりの総量を達成するために同様に少なくなくてはならない。用量単位は、例えばiRNA剤の徐放を数日間提供する従来の徐放性製剤を使用して、数日間の送達のために配合されることもできる。徐放性製剤は、当該技術分野で周知である。本実施形態において、用量単位は、一致する複数の1日量を含有する。

10

【0396】

当業者は、ある因子が、感染または疾病の重症度、以前の治療、全体的な健康および/または対象の年齢、および他の存在する疾病を含むがこれらに限定されない対象を効果的に治療するために必要な用量およびタイミングに影響を与えることを理解するであろう。さらに、組成物の治療に有効な量での対象の治療は、単一治療または一連の治療を含むことができる。本発明によって包含される個々のiRNA剤に対する有効な用量およびインビボ半減期の見積もりは、従来の方法論または本明細書に記載される適切な動物モデルを使用してインビボでの試験に基づいて、作成することができる。

20

【0397】

マウス遺伝学の進展は、様々なヒト疾病の調査のために、多くのマウスマodelを生成した。例えば、マウスリポジトリは、The Jackson Laboratory, Charles River Laboratories, Taconic, Harlan, Mutant Mouse Regional Resource Centers (MMRRC) National Networkおよびthe European Mouse Mutant Archiveにおいて見出すことができる。かかるモデルは、iRNA剤のインビボでの試験に対してならびに治療に有効な量を決定するために使用することができる。

30

【0398】

本発明によって包含される医薬組成物を、静脈内、筋肉内、腹腔内、皮下、経皮性、気道（エアロゾル）、眼部、直腸、腔、および局所的（頬側および舌下を含む）投与を含む、経口または非経口経路を含むがこれに限定されない、当該技術分野で既知の任意の方法で投与することができる。好ましい実施形態において、医薬組成物は静脈内または内部非経口注入または注射によって投与される。医薬組成物は、実質内、くも膜下腔内、および/または定位的注射によって投与されることもできる。

40

【0399】

経口投与について、本発明において有用なiRNA剤は、一般的に、錠剤もしくはカプセル剤の形、粉末もしくは顆粒として、または水溶液もしくは懸濁液として提供される。

【0400】

経口使用のための錠剤は、不活性な希釈液、崩壊剤、結合剤、平滑剤、甘味料、調味料、着色料、および防腐剤等の薬学的に許容される賦形剤と混合した活性成分を、含むことができる。コーンスタークおよびアルギン酸は適切な崩壊剤であるが、適切な不活性希釈

50

液は、炭酸ナトリウムおよびカルシウム、リン酸ナトリウムおよびカルシウム、ならびにラクトースを含む。平滑剤は、存在する場合、一般的に、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、またはタルクであるであろうが、結合剤は、デンプンおよびゼラチンを含むことができる。必要に応じて、錠剤を、消化管における吸収を遅らせるために、モノステアリン酸グリセリンまたはジステアリン酸グリセリル等の物質で覆うことができる。

【0401】

経口使用のためのカプセル剤は、活性成分が固形希釈液および軟ゼラチンカプセル剤と混合される硬ゼラチンカプセル剤を含み、活性成分は水またはピーナッツ油、流動パラフィン、またはオリーブ油等の油と混合される。

【0402】

筋肉内、腹腔内、皮下、および静脈内の使用について、本発明の医薬組成物は、一般的に、適切なpHおよび等張性に緩衝した無菌の水溶液または懸濁液に提供される。適切な水性媒体は、リングル液および等張性塩化ナトリウムを含む。好ましい実施形態では、担体は独占的に水性緩衝液からなる。これに関して、「独占的」とは、標的遺伝子またはウイルスを内部に持つ細胞におけるiRNA剤の吸収に影響するまたはそれを媒介する可能性がある、助剤またはカプセル封じ材料が存在しないことを意味する。かかる物質は、例えば、以下に記載されるリポソームまたはカプシド等のミセル構造を含む。微量注入、リポフェクション、ウイルス、ウイロイド、カプシド、カプシド、または他の助剤がiRNA剤を細胞培養へ導入されることを必要とするが、意外にもこれらの方法および薬剤は、インビボでのiRNA剤の吸収に対して必要ではない。本発明のiRNA剤は、多くは、薬剤が毒性または有害な副作用に関連する細胞にiRNA剤の吸収を媒介するために助剤の使用を必要としないため、特に有利である。本発明による水性懸濁液は、セルロース誘導体、ナトリウムアルギン酸、ポリビニルピロリドおよびトラガカント等の懸濁剤、ならびにレシチン等の湿潤剤を含むことができる。水性懸濁液に対する適切な防腐剤は、エチルおよびn-プロピルp-ヒドロキシベンゾエートを含む。

【0403】

医薬組成物は、移植片およびマイクロカプセル化した送達システムを含む制御された放出製剤等、体からの急速な除去に対してiRNA剤を守るカプセル剤も含むことができる。エチレンビニルアセテート、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸等の、生分解性、生体適合性ポリマーを使用することができる。かかる製剤の調製のための方法は、当業者には明らかであろう。物質は、Alza CorporationおよびNova Pharmaceuticals, Inc.から商業的に得られることもできる。(ウイルス性抗原に対してモノクローナル抗体で感染細胞を標的としたリポソームを含む)リポソーム懸濁液は薬学的に許容される担体として使用されることもできる。これらは、当業者に知られている方法によって、例えば、本明細書において参照により組み込まれる米国特許第4,522,811号明細書、国際公開第91/06309号パンフレット、および欧州特許出願公開第43075号明細書に記載される通りに調製することができる。

【0404】

iRNA剤の毒性および治療の有効性は、例えば、LD50(集団の50%を死に至らしめる用量)およびED50(集団の50%において治療的に効果的な用量)の測定をするために、細胞培養または実験動物において標準的な薬学的手順によって測定することができる。毒性と治療効果との間の用量比は、治療指數であり、LD50/ED50比としても表現することができる。高い治療指數を示すiRNA剤は、好ましい。

【0405】

細胞培養アッセイおよび動物実験から得たデータは、ヒトに使用される用量の範囲を製剤化するために使用することができる。本発明の組成物の用量は、好ましくはほとんどあるいは全く毒性のないED50を含む血中濃度の範囲内である。用量は、採用された剤形および利用される投与の経路によってこの範囲内で変動することができる。本発明の方法で使用される任意のiRNA剤について、治療に有効な量は細胞培養アッセイから最初に

見積もられ得る。用量は、iRNA剤または適切な場合、細胞培養で測定されるIC50（すなわち、症状の最大半量の抑制を達成する試験iRNA剤の濃度）を含む（例えば、減少したポリペプチド濃度を達成する）標的配列のポリペプチド産物の循環する血漿濃度範囲を達成するために動物モデルにおいて製剤化することができる。かかる情報は、ヒトにおける有用な用量を、より正確に測定するために使用することができる。血漿のレベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって測定することができる。

【0406】

それらの個々のまたは複数の投与に加えて、上記に論じた通り、本発明に関係するiRNA剤を、ウイルス感染および疾病を治療するために効果的な他の既知の製剤と組み合わせて投与することができる。いずれにしても、投与する医師は、当該技術分野で既知の、または本明細書に記載される有効性の標準測定値を使用して観察された結果を基に、iRNA剤の投与の量およびタイミングを調整することができる。10

【0407】

併用療法

一態様において、本発明の組成物は、併用療法に使用することができる。「併用療法」という用語は、（限定されないが第2のおよび異なる抗悪性腫瘍薬等の）他の生物学的な活性成分および（限定されないが手術または放射線治療等の）非薬物セラピーと併せて、対象の化合物の投与を含む。例えば、本発明の化合物は、他の薬学的な活性化合物、好ましくは本発明の化合物の効果を増強することができる化合物と併せて使用することができる。本発明の化合物を、同時に（単一調製または別々の調製として）または他の薬物治療に対して連続して投与することができる。一般に、併用療法は、单一サイクルまたは治療過程の間に、2つ以上の薬物の投与に直面する。20

【0408】

本発明の一態様において、対象化合物を、様々な疾病の状態と関与したタンパク質キナーゼを調節する1つ以上の別々の薬剤と併せて投与することができる。かかるキナーゼの例は、セリン／スレオニン特異的キナーゼ、受容体チロシン特異的キナーゼ、および非受容体チロシン特異的キナーゼを含むがこれらに限定されない。セリン／スレオニンキナーゼは、マイトジエン活性化タンパク質キナーゼ(MAPK)、減数分裂特異的キナーゼ(MEK)、RAF、およびオーロラキナーゼを含む。受容体キナーゼファミリーの例は、上皮増殖因子受容体(EGFR)(例えばHER2/neu、HER3、HER4、Erbb、Erbb2、Erbb3、Erbb4、Xmrk、DER、Let23)、線維芽細胞成長因子(FGF)受容体(例えばFGF-R1、GFF-R2/BEK/CEK3、FGF-R3/CEK2、FGF-R4/TKF、KGFR-R)、肝細胞成長/散乱因子受容体(HGFR)(例えばMET、RON、SEA、SEX)、インスリン受容体(例えばIGF1-R)、Eph(例えばCEK5、CEK8、EBK、ECK、EEK、EHK-I、EHK-2、ELK、EPH、ERK、HEK、MDK2、MDK5、SEK)、AXI(例えばMer/Nyk、Rse)、RET；および血小板由来成長因子受容体(PDGFR)(例えばPDGF-R、PDG-R、CSF1-R/FMS、SCF-R/C-KIT、VEGF-R/FLT、NEK/FLK1、FLT3/FLK2/STK-1)を含む。非受容体チロシンキナーゼファミリーは、BCR-ABL(例えばp43^ab¹、ARG)；BTK(例えばITK/EMT、TEC)；CSK、FAK、FPS、JAK、SRC、BMX、FER、CDK、およびSYKを含むがこれらに限定されない。30

【0409】

本発明の別の態様において、対象化合物を、非キナーゼ生物学的標的またはプロセスを調節する1つ以上の薬剤と併せて投与することができる。かかる標的は、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)、DNAメチルトランスフェラーゼ(DNMT)、熱ショックタンパク質(例えばHSP90)、およびプロテアソームを含む。40

【0410】

一実施形態において、対象化合物をZolinda、Tarceva、Iressa、

Tykerb、Gleevec、Sutent、Sprycel、Nexavar、Sorafinib、CNF2024、RG108、BMS387032、Affmitak、Avastin、Herceptin、Erbitux、AG24322、PD325901、ZD6474、PD184322等の1つ以上の生物学的標的を抑制する抗悪性腫瘍薬（例えば小分子、モノクローナル抗体、アンチセンスRNA、および融合タンパク質）と併用することができる。

【0411】

Obatodax、ABT737、およびAEE788。かかる併用は、任意の薬剤1つで達成した有効性を越えて治療の有効性を増強することができ、耐性突然変異体の出現を防止するまたは遅らせることができる。10

【0412】

ある好ましい実施形態において、本発明の化合物は、化学療法薬と併用して投与される。化学療法薬は、腫瘍学の分野における治療の広範囲を包含する。これらの薬剤は、腫瘍を収縮する、手術後に残された残りの癌細胞を破壊する、寛解を誘発する、寛解を維持する、および/または癌またはその治療に関する症状を軽減する目的で、疾病の様々な病期において投与される。かかる薬剤の例は、マスターDガス誘導体（メクロレタミン、シクロホスファミド、クロラムブシリ、メルファラン、イホスファミド）等のアルキル化剤、エチレンイミン（チオテバ、ヘキサメチルメラミン）、アルキルスルホン酸塩（ブルファン）、ヒドラジンおよびトリアジン（アルトレタミン、プロカルバジン、ダカルバジン、およびテモゾロミド）、ニトロソウレア（カルムスチン、ロムスチン、およびストレプトゾシン）、イホスファミドおよび金属塩（カルボプラチン、シスプラチン、およびオキサリプラチン）；ポドフィロトキシン（エトポシドおよびテニポシド）等の植物性アルカロイド、タキサン（パクリタキセルおよびドセタキセル）、ビンカアルカロイド（ビンクリスチン、ビンプラスチン、ビンデシン、およびビノレルビン）、ならびにカンプトテン類似体（イリノテカンおよびトポテカン）；クロモマイシン（ダクチノマイシンおよびプリカマイシン）等の抗腫瘍抗生物質、アントラサイクリン（ドキソルビシン、ダウノルビシン、エピルビシン、ミトキサントロン、バルルビシン、およびイダルビシン）、ならびにマイトマイシン、アクチノマイシン、およびブレオマイシン等の種々の抗生物質；葉酸拮抗薬（メトトレキサート、ペメトレキセド、ラルチトレキセド、アミノブテリン）等の抗代謝剤、ピリミジン拮抗薬（5-フルオロウラシル、フロクスウリジン、シタラビン、カベシタビン、およびゲムシタビン）、プリン拮抗薬（6-メルカプトプリン、および6-チオグアニン）およびアデノシンデアミナーゼ阻害剤（クラドリビン、フルダラビン、メルカプトプリン、クロファラビン、チオグアニン、ネララビン、およびペントスタチン）；トポイソメラーゼI阻害剤（イリノテカン、トポテカン）等のトポイソメラーゼ阻害剤およびトポイソメラーゼII阻害剤（アムサクリン、エトポシド、エトポシドリン酸塩、テニポシド）；モノクローナル抗体（アレムツズマブ、ゲムツズマブオゾガマイシン、リツキシマブ、トラスツズマブ、イブリツモマブチウキセタ、セツキシマブ、パニツムマブ、トシツモマブ、ベバシズマブ）；ならびにリボヌクレオチド還元酵素抑制剤（ヒドロキシ尿素）等の種々の抗悪性腫瘍；副腎皮質ステロイド抑制剤（ミトラン）；酵素（アスパラギナーゼおよびベゲアスパルガーゼ）；微小管阻害剤（エストラムスチン）；ならびにレチノイド（ベキサロテン、イソトレチノイン、トレチノイン（ATRA）を含むがこれらに限定されない。。ある好ましい実施形態において、本発明の化合物は、化学的予防薬と併用して投与される。化学的予防薬は、体を守るために、または化学療法の副作用を最小限にするために、作用する。かかる薬剤の例は、アミホスチン、メスナ、およびデクスラゾキサンを含むがこれらに限定されない。20

【0413】

本発明の一態様において、対象化合物は、放射線治療と併用して投与される。放射線は、光子（X線またはガンマ線）または粒子放射線を採用する機械から一般に内部に（癌部近くの放射性物質の移入）または外部に送達される。併用療法が放射線治療をさらに含む場合には、放射線治療は治療薬および放射線治療の組み合わせの相互作用から有益な効果30

が達成される限り任意の適切な時間において行われ得る。例えば、適切と思われた場合には、場合によって数日間または数週間、放射線治療が時間的に治療薬の投与から削除された場合、有益な効果はさらに達成される。

【0414】

本発明の化合物が免疫療法薬と併用して使用することができることが理解されるであろう。免疫療法の1つの形は、腫瘍から離れた部位におけるワクチン組成物を投与することによる宿主起源の活性前進腫瘍特異的免疫応答の生成である。単離した腫瘍抗原ワクチンおよび抗イディオタイプワクチンを含む、様々な種類のワクチンは、提案されてきた。別のアプローチは、治療される対象からの腫瘍細胞、またはかかる細胞の誘導体を使用することである (reviewed by Schirrmacher et al. (1995) J. Cancer Res. Clin. Oncol. 121: 487)。米国特許第5,484,596号明細書において、Hanna Jr. らは、再発または転移を防止するため、腫瘍を摘出する、コラゲナーゼで細胞を分散する、細胞を照射する、および約 10^7 細胞の少なくとも連続的に3回の投与で患者をワクチン接種することを含む、切除可能な癌腫を治療する方法を主張する。10

【0415】

本発明の化合物が、1つ以上の補助的治療薬とともに有利に使用することができることが理解されるであろう。補助的療法に対して適切な薬剤の例は、副腎皮質ステロイド剤（アムシノニド、ベタメタゾン、ジプロピオン酸ベタメタゾン、吉草酸ベタメタゾン、ブデソニド、クロベタゾール、クロベタゾール酢酸、クロベタゾール酪酸、クロベタゾール17-プロピオン酸、コルチゾン、デフラザコート、デスオキシメタゾン、吉草酸ジフルコルトロン、デキサメタゾン、リン酸デキサメタゾンナトリウム、デソニド、フロ酸、フルオシノニド、フルオシノロンアセトニド、ハルシノニド、ヒドロコルチゾン、酪酸ヒドロコルチゾン、コハク酸ヒドロコルチゾンナトリウム、吉草酸ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、モメタゾン、プレドニカルバート、プレドニゾロン、トリアムシノロン、トリアムシノロンアセトニド、およびプロピオン酸ハロベタゾール）等のステロイド；トリプタン（例えばスマトリプタンまたはナラトリプタン）等の5HT₁刺激薬；アデノシンA₁刺激薬；EPリガンド；グリシン拮抗薬等のNMDA修飾薬；ナトリウムチャンネル遮断薬（例えばラモトリギン）；P物質拮抗薬（例えばNK₁拮抗薬）；カンナビノイド；アセトアミノフェまたはフェナセチン；5-リポキシゲナーゼ抑制剤；ロイコトリエン受容体拮抗薬；DMARD（例えばメトトレキサート）；ガバベンチンおよび関連化合物；三環系抗うつ剤（例えばアミトリプチリン）；神経細胞安定化抗てんかん薬；モノアミン作動性吸収抑制剤（例えばベンラファキシン）；マトリックスマタロプロテアーゼ抑制剤；iNOSまたはnNOS抑制剤等の一酸化窒素合成酵素（NOS）抑制剤；腫瘍壞死因子の放出または作用の抑制剤；モノクローナル抗体療法等の抗体療法；ヌクレオシド抑制剤（例えばラミブジン）または免疫システム修飾薬（例えばインターフェロン）等の非ウイルス剤；オピオイド鎮痛薬；局部麻酔薬；カフェインを含む刺激物質；H₂拮抗薬（例えばラニチジン）；プロトンポンプ抑制剤（例えばオメプラゾール）；制酸薬（例えば水酸化アルミニウムまたはマグネシウム；整腸剤（例えばシメチコン）；うっ血除去薬（例えばフェニレフリン、フェニルプロパノールアミン、ブソイドエフェドリン、オキシメタゾリン、エピネフリン、ナファゾリン、キシロメタゾリン、プロピルヘキセドリン、またはレボ-デゾキシエフェドリン）；鎮咳剤（例えばコデイン、ヒドロコドン、カルミフェン、カルベタペニタン、またはデキストロメトルファン）；利尿剤；または鎮静または非鎮静抗ヒスタミン薬を含む。203040

【0416】

標的遺伝子の発現を抑制する方法

さらに別の態様において、本発明は細胞または生物における標的遺伝子の発現を抑制する方法に関する一実施形態において、方法は、標的遺伝子の発現がサイレンシングされるように、発明オリゴヌクレオチド、例えばアンチセンス、アプタマー、アンタゴmir、もしくはiRNA剤；または哺乳動物等の細胞または生物に対してオリゴヌクレオチドを50

含有する医薬組成物を投与することを含む。発明オリゴヌクレオチド、例えばiRNA剤を使用して標的遺伝子の発現を抑制するための組成物および方法は、前項に記載されたとおり実施することができる。

【0417】

本実施形態において、発明オリゴヌクレオチドを含有する医薬組成物は、静脈内、筋肉内、腹腔内、皮下、経皮性、気道（エアロゾル）、眼部、直腸、腔、および局所的（頬側および舌下を含む）投与を含む経口または非経口経路を含むがそれに限定されない、当該技術分野において既知の任意の方法によって投与することができる。好ましい実施形態において、医薬組成物は静脈内または内部非経口注入または注射によって投与される。医薬組成物は、実質内、くも膜下腔内、および／または定位的注射によって投与されることもできる。

10

【0418】

標的遺伝子の発現を抑制するための方法は、サイレンシングさせることを希望する者の任意の遺伝子に適用することができる、その結果標的遺伝子が発現された細胞または生物がRNA干渉に影響する細胞機構を含む場合は、その発現を特異的に抑制する。サイレンシングするために標的にすることができる遺伝子の例は、接着分子、サイクリンキナーゼ抑制剤、Wntファミリーメンバー、Paxファミリーメンバー、翼状らせんファミリーメンバー、Hoxファミリーメンバー、サイトカイン／リンホカインおよびそれらの受容体、成長／分化因子およびそれらの受容体、ならびに神経伝達物質およびそれらの受容体を含むがこれらに限定されない発生遺伝子；(2)ABL1、BCL1、BCL2、BC
L6、CBFA2、CBL、CSF1R、ERBA、ERBB、EBRB2、ETS1、
ETS1、ETV6、FGR、FOS、FYN、HCR、HRAS、JUN、KRAS、
LCK、LYN、MDM2、MLL、MYB、MYC、MYCL1、MYCN、NRAS、
PIM1、PML、RET、SRC、TAL1、TCL3、およびYESを含むがこれらに限定されない癌遺伝子；(3)APC、BRCA1、BRCA2、MADH4、MC
C、NF1、NF2、RB1、TP53、およびWT1を含むがこれらに限定されない腫瘍抑制遺伝子；ならびに(4)ACP不飽和化酵素およびヒドロキシラーゼ、ADPグルコースピロホスホリラーゼ、ATPアーゼ、アルコール脱水素酵素、アミラーゼ、アミログルコシダーゼ、カタラーゼ、セルラーゼ、シクロオキシゲナーゼ、デカルボキシラーゼ、デキストリナーゼ、DNAおよびRNAポリメラーゼ、ガラクトシダーゼ、グルカナーゼ、グルコース酸化酵素、GTPアーゼ、ヘリカーゼ、ヘミセルラーゼ、インテグラーゼ、インベルターゼ、異性化酵素、キナーゼ、ラクターゼ、リパーゼ、リポキシゲナーゼ、リゾチーム、ペクチンエステラーゼ、ペルオキシダーゼ、ホスファターゼ、ホスホリパーゼ、ホスホリラーゼ、ポリガラクトロナーゼ、プロテイナーゼおよびペプチダーゼ、ブランナーゼ、リコンビナーゼ、逆転写酵素、トポイソメラーゼ、ならびにキシラナーゼを含むがこれらに限定されない酵素を限定なしに含む。

20

30

【0419】

インビボでの遺伝子抑制に加えて、当業者は、発明オリゴヌクレオチド、例えば本発明のiRNA剤は、幅広い種類のインビトロ適用において有用であることを理解するであろう。かかるインビトロ適用は、例えば、科学および商業的な研究（例えば生理学的経路、創薬、および開発の解明）、ならびに医療および獣医診断を含む。一般に、方法は既知の技術（例えば、細胞過程を通して、または電気穿孔およびリポフェクション等の助剤または装置によっての吸収）を使用して細胞にオリゴヌクレオチド、例えばiRNA剤を導入し、標的遺伝子のmRNA転写物の分解を得るために十分な時間の間細胞を維持することを含む。

40

【0420】

定義

本明細書で使用されるとき、「脂肪族」という用語は、最大24個の炭素原子を含有する直鎖状のまたは分岐した炭化水素基を指し、任意の2つの炭素原子間の飽和は、单、二重、または三重結合である。脂肪族基は、好ましくは1～約24個の炭素原子、より典型

50

的に1～約12個の炭素原子を含有する。適切な脂肪族基は、直線状または分岐した、置換した、または非置換のアルキル、アルケニル、アルキニル基、および(シクロアルキル)アルキル、(シクロアルケニル)アルキル、または(シクロアルキル)アルケニル等の、ハイブリッドを含むがこれらに限定されない。脂肪族基の直鎖状または分岐した鎖は、窒素、酸素、硫黄、およびリンを含む1つ以上のヘテロ原子で中断することができる。ヘテロ原子によって中断されるかかる脂肪族基は、例えばポリアルキレングリコール、ポリアミン、およびポリイミン等のポリアルコキシを含むがこれらに限定されない。本明細書に使用される脂肪族基は、さらなる置換基を任意に含むことができる。

【0421】

「アルキル」という用語は、N、O、またはSとともに任意に挿入することができる、炭素原子(これらはプロピル、アリル、またはプロパルギルを含むがこれらに限定されない)の指定された数を含有する直鎖状鎖または分岐した鎖であり得る飽和および不飽和非芳香族炭化水素鎖を指す。例えば、C₁ - C₂₀は、基が1～20個(両端を含む)の炭素原子を有することができることを指示する。「アルコキシ」という用語は、-O-アルキル遊離基を指す。「アルキレン」という用語は、二価アルキル(すなわち-R-)を指す。「アルキレンジオキソ」という用語は、Rがアルキレンを表す構造-O-R-O-の二価種を指す。「アミノアルキル」という用語は、アミノと置換されたアルキルを指す。「メルカブト」という用語は、-SH遊離基を指す。「チオアルコキシ」という用語は、-S-アルキル遊離基を指す。

【0422】

本明細書で使用されるとき、「環状」という用語は、シクロアルキル基およびヘテロ環式基を含む。環式基の任意の適切な環の位置は、定義された化学構造と共有結合的に結び付けられ得る。

【0423】

「非環状」という用語は、分岐したまたは非分岐の任意の担体を説明することができ、閉環を形成しない。

【0424】

「アリール」という用語は、6炭素単環式または10炭素二環式芳香族環系を指し、それぞれの環の0、1、2、3、または4個の原子を置換基によって置換することができる。アリール基の例は、フェニル、ナフチル等を含む。「アリールアルキル」という用語または「アラルキル」という用語は、アリールを用いて置換したアルキルを指す。「アリールアルコキシ」という用語は、アリールを用いて置換したアルコキシを指す。

【0425】

本明細書で採用される「シクロアルキル」は、3～12個の炭素、例えば、3～8個の炭素、および例えば、3～6個の炭素を有する飽和および部分的に不飽和の環状炭化水素基を含み、さらにシクロアルキル基を、任意に置換することができる。シクロアルキル基は、デカリン、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロペンテニル、シクロヘキシリル、シクロヘキセニル、シクロヘプチル、およびシクロオクチルを含むが限定されない。

【0426】

「ヘテロアリール」という用語は、単環式の場合1～3個のヘテロ原子、二環式の場合1～6個のヘテロ原子、または三環式の場合1～9個のヘテロ原子を有する、ヘテロ原子はO、N、またはS(例えば、炭素原子および単環式、二環式、または三環式の場合、それぞれN、O、またはSの1～3個、1～6個、または1～9個のヘテロ原子)から選択した芳香族5～8員単環式、8～12員二環式、または11～14員三環式の環系を指し、それぞれの環の0、1、2、3、または4個の原子を、置換基によって置換することができる。ヘテロアリール基の例は、ピリジル、フリルまたはフラニル、イミダゾリル、ベンゾイミダゾリル、ピリミジニル、チオフェニルまたはチエニル、キノリニル、インドリル、チアゾリル等を含む。「ヘテロアリールアルキル」という用語または「ヘテロアラルキル」という用語は、ヘテロアリールを用いて置換したアルキルを指す。「ヘテロアリー

10

20

30

40

50

「アルコキシ」という用語は、ヘテロアリールを用いて置換したアルコキシを指す。

【0427】

「ヘテロシクロアルキル」という用語と「ヘテロ環状」は、互換的に使用することができ、非芳香族3-、4-、5-、6-、もしくは7-員環、または二もしくは三環式基融合システムを指し、(i)それぞれの環は酸素、硫黄および窒素から独立して選択した1~3個のヘテロ原子を含有し、(ii)それぞれの5-員環は0~1個の二重結合を有し、それぞれの6-員環は0~2個の二重結合を有し、(iii)窒素および硫黄のヘテロ原子を、任意に酸化することができ、(iv)窒素ヘテロ原子を任意に四級化することができ、(v)上記の環のうちのいずれかを、ベンゼン環に融合することができ、(v)残りの環原子は任意にオキソ置換することができる炭素原子である。代表的なヘテロシクロアルキル基は、[1,3]ジオキソラン、ピロリジニル、ピラゾリニル、ピラゾリジニル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、ピペリジニル、ピペラジニル、オキサゾリジニル、イソオキサゾリジニル、モルホリニル、チアゾリジニル、イソチアゾリジニル、キノキサリニル、ピリダジノニル、およびテトラヒドロフリルを含むがこれらに限定されない。かかるヘテロ環式基を、置換したヘテロ環状を投与するためにさらに置換することができる。

10

【0428】

「オキソ」という用語は、炭素に付加した場合にカルボニル、窒素に付加した場合にNオキシド、および硫黄に付加した場合にスルホキシドまたはスルホンを形成する酸素原子を指す。

20

【0429】

「アシル」という用語は、置換基によってさらに置換することができるアルキルカルボニル、シクロアルキルカルボニル、アリールカルボニル、ヘテロシクリルカルボニル、またはヘテロアリールカルボニル置換基を指す。

【0430】

本明細書で使用されるとき、「シリル」という用語は、式-SiA¹A²A³によって表され、A¹、A²、およびA³は、独立して本明細書に記載される水素もしくは置換したもしくは非置換のアルキル、シクロアルキル、アルコキシ、アルケニル、シクロアルケニル、アルキニル、シクロアルケニル、アリール、またはヘテロアリール基である。

30

【0431】

「置換した」という用語は、ある構造における1つ以上の水素遊離基と、ハロ、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロシクリル、チオール、アルキルチオ、アリールチオ、アルキルチオアルキル、アリールチオアルキル、アルキルスルホニル、アルキルスルホニルアルキル、アリールスルホニルアルキル、アルコキシ、アリールオキシ、アラルコキシ、アミノカルボニル、アルキルアミノカルボニル、アリールアミノカルボニル、アルコキシカルボニル、アリールオキシカルボニル、ハロアルキル、アミノ、トリフルオロメチル、シアノ、ニトロ、アルキルアミノ、アリールアミノ、アルキルアミノアルキル、アリールアミノアルキル、アミノアルキルアミノ、ヒドロキシ、アルコキシアルキル、カルボキシアルキル、アルコキシカルボニルアルキル、アミノカルボニルアルキル、アシル、アラルコキシカルボニル、カルボン酸、スルホン酸、スルホニル、ホスホン酸、アリール、ヘテロアリール、ヘテロ環状、および脂肪族を含むがこれらに限定されない特定の置換基の遊離基との交換を指す。置換基をさらに置換することができ理解される。

40

【0432】

塩基

アデニン、グアニン、シトシン、およびウラシルは、RNAにおいて認められる最も一般的な塩基である。これらの塩基は、改善された性質を有するRNAを提供するために、修飾されるまたは交換ができる。例えば、ヌクレアーゼ抵抗性オリゴリボヌクレオチドは、これらの塩基とともに、または合成および天然核酸塩基（例えばイノシン、チミン、キサンチン、ヒポキサンチン、ヌバラリン、イソグアニン、またはツベルシジ

50

ン) および上記修飾のうちのいずれか 1 つとともに調製されることができる。あるいは、上記の塩基のうちのいずれかの置換または修飾類似体、および「ユニバーサル塩基」を採用することができる。例は、2 - アミノアデニン、2 - フルオロアデニン、アデニンおよびグアニンの 6 - メチルおよび他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの 2 - プロピルおよび他のアルキル誘導体、5 - ハロウラシルおよびシトシン、5 - プロピニルウラシルおよびシトシン、6 - アゾウラシル、シトシンおよびチミン、5 - ウラシル(プソイドウラシル)、4 - チオウラシル、5 - ハロウラシル、5 - (2 - アミノプロピル)ウラシル、5 - アミノアリルウラシル、8 - ハロ、アミノ、チオール、チオアルキル、ヒドロキシルおよび他の 8 - 置換アデニンおよびグアニン、5 - トリフルオロメチルおよび他の 5 - 置換ウラシルおよびシトシン、7 - メチルグアニン、5 - 置換ピリミジン、2 - アミノプロピルアデニン、5 - プロピニルウラシルおよび 5 - プロピニルシトシンを含む 6 - アザピリミジンおよび N - 2、N - 6、および O - 6 置換プリン、ジヒドロウラシル、3 - デアザ - 5 - アザシトシン、2 - アミノプリン、5 - アルキルウラシル、7 - アルキルグアニン、5 - アルキルシトシン、7 - デアザアデニン、N 6、N 6 - ジメチルアデニン、2, 6 - ジアミノプリン、5 - アミノ - アリル - ウラシル、N 3 - メチルウラシル、置換 1, 2, 4 - トリアゾール、2 - ピリジノン、5 - ニトロインドール、3 - ニトロピロール、5 - メトキシウラシル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸、5 - メトキシカルボニルメチルウラシル、5 - メチル - 2 - チオウラシル、5 - メトキシカルボニルメチル - 2 - チオウラシル、5 - メチルアミノメチル - 2 - チオウラシル、3 - (3 - アミノ - 3 カルボキシプロピル)ウラシル、3 - メチルシトシン、5 - メチルシトシン、N⁴ - アセチルシトシン、2 - チオシトシン、N 6 - メチルアデニン、N 6 イソペンチルアデニン、2 - メチルチオ - N 6 - イソペンテニルアデニン、N - メチルグアニン、または O - アルキル化塩基を含む。さらに、プリンおよびピリミジンは、米国特許第 3,687,808 号明細書に開示されたもの、Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858 - 859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990 に開示されたもの、および Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613 に開示されたものを含む。

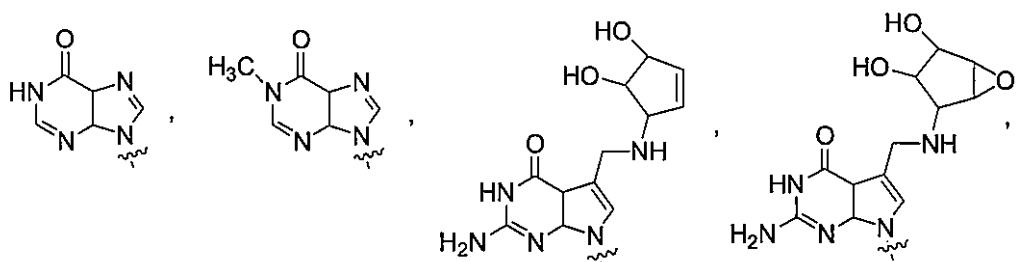
【0433】

「非天然」核酸塩基という用語は、以下のうちのいずれか 1 つを指す：2 - メチルアデニニル、N 6 - メチルアデニニル、2 - メチルチオ - N 6 - メチルアデニニル、N 6 - イソペンテニルアデニニル、2 - メチルチオ - N 6 - イソペンテニルアデニニル、N 6 - (シス - ヒドロキシイソペンテニル)アデニニル、2 - メチルチオ - N 6 - (シス - ヒドロキシイソペンテニル)アデニニル、N 6 - グリシニルカルバモイルアデニニル、N 6 - スレオニルカルバモイルアデニニル、2 - メチルチオ - N 6 - スレオニルカルバモイルアデニニル、N 6 - メチル - N 6 - スレオニルカルバモイルアデニニル、N 6 - ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデニニル、2 - メチルチオ - N 6 - ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデニニル、N 6, N 6 - ジメチルアデニニル、3 - メチルシトニルカルバモイル、5 - メチルシトニルカルバモイル、2 - チオシトニルカルバモイル、5 - ホルミルシトニルカルバモイル、N 4 - メチルシトニルカルバモイル、5 - ヒドロキシメチルシトニルカルバモイル、1 - メチルグアニニル、N 2 - メチルグアニニル、7 - メチルグアニニル、N 2, N 2 - ジメチルグアニニル、N 2, 7 - ジメチルグアニニル、N 2, N 2, 7 - トリメチルグアニニル、1 - メチルグアニニル、7 - シアノ - 7 - デアザグアニニル、7 - アミノメチル - 7 - デアザグアニニル、プソイドウラシリル、ジヒドロウラシリル、5 - メチルウラシリル、1 - メチルプソイドウラシリル、2 - チオウラシリル、4 - チオウラシリル、2 - チオチミニル 5 - メチル - 2 - チオウラシリル、3 - (3 - アミノ - 3 - カルボキシプロピル)ウラシリル、5 - ヒドロキシウラシリル、5 - メトキシウラシリル、ウラシリル 5 - オキシ酢酸、ウラシリル 5 - オキシ酢酸メチルエステル、5 - (カルボキシヒドロキシメチル)ウラシリル、5 - (カルボキシヒドロキシメチル)

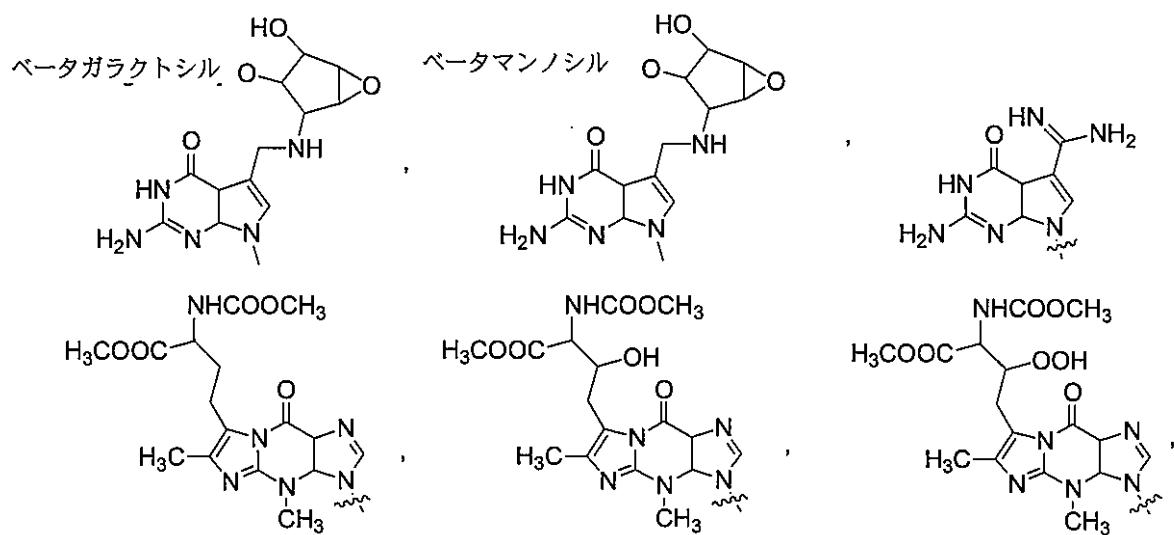
ウラシリルメチルエステル、5 - メトキシカルボニルメチルウラシリル、5 - メトキシカルボニルメチル - 2 - チオウラシリル、5 - アミノメチル - 2 - チオウラシリル、5 - メチルアミノメチルウラシリル、5 - メチルアミノメチル - 2 - チオウラシリル、5 - メチルアミノメチル - 2 - セレノウラシリル、5 - カルバモイルメチルウラシリル、5 - カルボキシメチルアミノメチルウラシリル、5 - カルボキシメチルアミノメチル - 2 - チオウラシリル、3 - メチルウラシリル、1 - メチル - 3 - (3 - アミノ - 3 - カルボキシプロピル) プソイドウラシリル、5 - カルボキシメチルウラシリル、5 - メチルジヒドロウラシリル、3 - メチルブソイドウラシリル、

【化49】

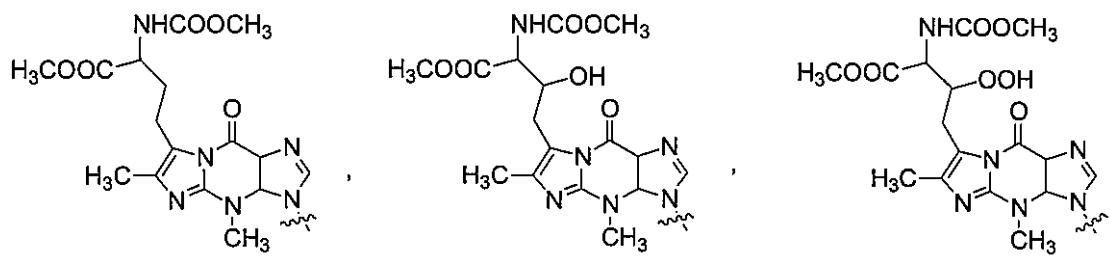
10



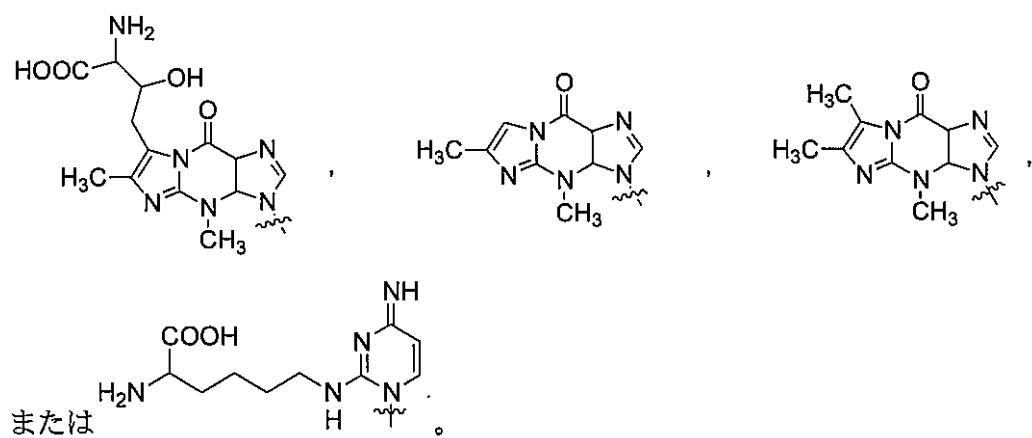
20



30



40



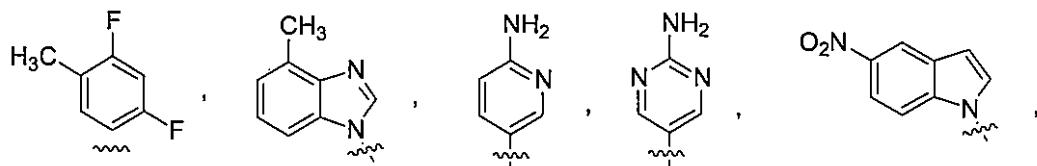
【0434】

ユニバーサル塩基は、天然DNA / RNA塩基のそれぞれと塩基対を形成することができ、それらの間に比較的小さな識別を示す。一般に、ユニバーサル塩基は、相互作用を積み重ねることを通して、例えば二重鎖RNAまたはRNA様分子を安定することができる

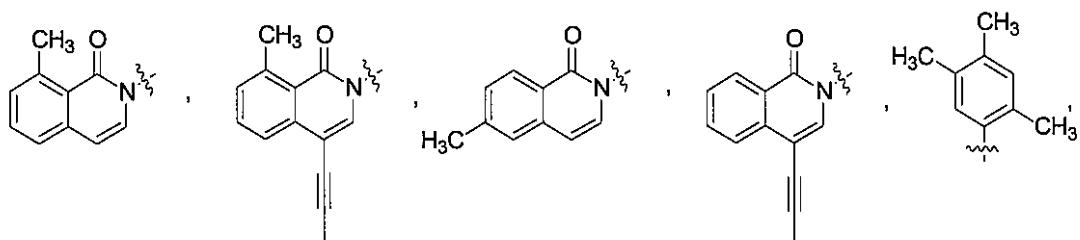
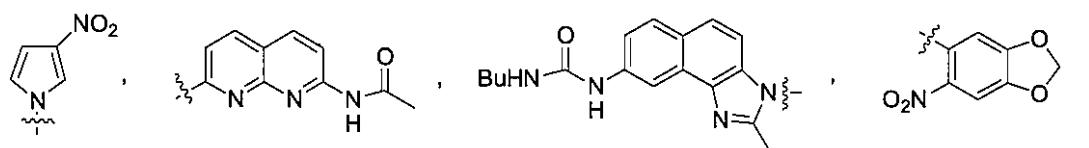
50

非水素結合、疎水性、芳香族部分である。ユニバーサル塩基は、水素結合置換基も含むことができる。本明細書で使用されるとき、「ユニバーサル塩基」は、アントラセン、ピレン、または以下のうちのいずれか1つを含むことができる。

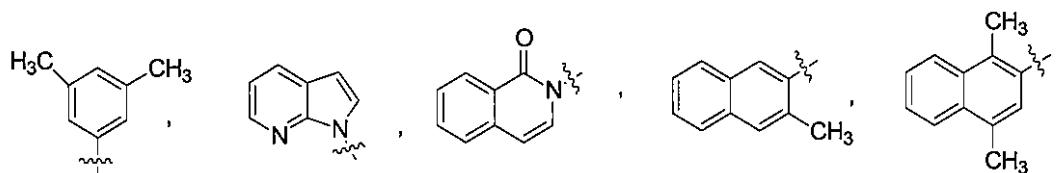
【化50】



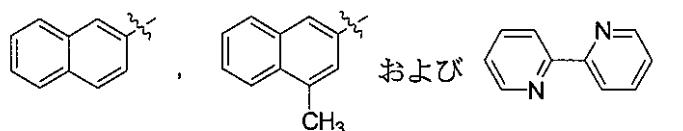
10



20



30



【0435】

アンタゴm i r

アンタゴm i rは、増強した組織および細胞吸収等のリボヌクレアーゼ保護および薬理的性質のための様々な修飾を内部に持つRNA様オリゴヌクレオチドである。それらは、例えば糖の完全2'-O-メチル化、ホスホロチオエート骨格、および例えば3'末端におけるコレステロール部分によって通常のRNAと異なる。アンタゴm i rは、内在性m i RNAを効率的にサイレンシングさせるために使用することができる、その結果m i RNA誘発遺伝子サイレンシングを防止する。アンタゴm i r媒介m i RNAサイレンシングの例は、本明細書に参照により全体が明確に組み込まれるKrutzfeldt et al., Nature, 2005, 438: 685-689に記載されたm i R-122のサイレンシングである。

【0436】

デコイオリゴヌクレオチド

40

50

転写因子がそれらの比較的に短く結合した配列を認めることができるために、周囲のゲノムDNAが不在であっても、特異的な転写因子の共通結合配列を有する短オリゴヌクレオチドを、生細胞における遺伝子発現を操縦するためのツールとして使用することができる。この戦略は、標的因子によって認められ結合されたかかる「デコイオリゴヌクレオチド」の細胞内送達を含む。デコイによる転写因子のDNA結合部位の占領は、標的遺伝子のプロモーター領域と次に結合することができない転写因子を与える。デコイは、転写因子によって活性化される遺伝子の発現を抑制するため、または転写因子の結合によって抑制される遺伝子を上方制御するため、治療薬として使用することができる。デコイオリゴヌクレオチドの例を、本明細書に参照により明確に組み込まれるMann et al., J. Clin. Invest., 2000, 106: 1071-1075に見出すことができる。

10

【0437】

アンチセンスオリゴヌクレオチド

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、DNAまたはRNAの単鎖は選択された配列に対して少なくとも部分的に相補的である。アンチセンスRNAの場合、それらは結合することによって相補的RNA鎖の翻訳を防止する。アンチセンスDNAは、特異的、相補的（コードまたは非コード）RNAを標的にするために使用することができる。結合が起こる場合、DNA/RNAハイブリッドを、酵素リボヌクレアーゼHによって分解することができる。アンチセンスオリゴヌクレオチドの利用の例は、本明細書に参照により全体が明確に組み込まれるDiass et al., Mol. Cancer Ther., 2002, 1: 347-355に見出すことができる。

20

【0438】

アプタマー

アプタマーは、特異的な標的分子を結合する核酸分子である。アプタマーは、RNAまたはDNAベースであることができ、リボスイッチを含むことができる。リボスイッチは、標的小分子を直接結合することができるmRNA分子の一部であり、標的の結合は遺伝子の活性に影響する。したがって、リボスイッチを含有するmRNAは、その標的分子が存在または不在によってそれ自身の活性を制御することに直接関係する。

30

【0439】

参考文献

本明細書に記載する全ての刊行物および特許は、それぞれの個々の刊行物または特許が、参照により組み込まれると具体的かつ個々に示されているかのように、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。矛盾が生じる場合、本明細書におけるいずれの定義も含み、本出願が優先される。

40

【0440】

対応特許

当業者は、日常的実験を超えず、本明細書に記載する本発明の特定の実施形態に対する多くの均等物を認めるか、または解明するであろう。したがって、前述の実施形態は例としてのみ示され、添付の特許請求の範囲およびその均等物の範囲内で、具体的に記載され、特許請求されるものとは別様に、本発明を実践可能であることを理解されたい。

【実施例】

【0441】

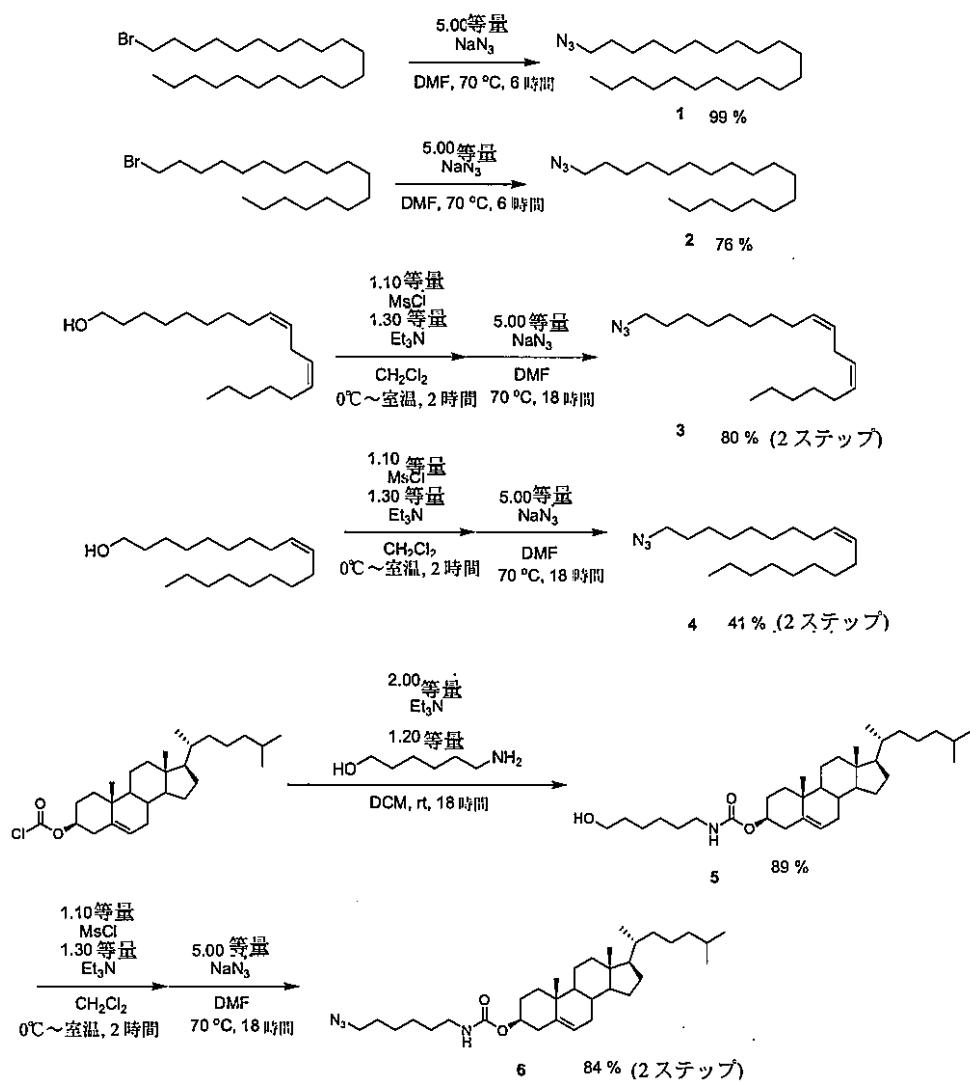
本発明を概して説明したが、本発明のある態様および実施形態の説明を目的として含まれるに過ぎず、本発明を限定することを目的としない、以下の実施例を参照により、より容易に理解されるであろう。したがって、本発明は以下の実施例に限定されると解釈されるべきではなく、本明細書に提供される教示の結果として明らかになる任意および全ての変更を包含すると解釈されるべきである。

【0442】

実施例1. 脂質のアジ化物の合成

【化51】

スキーム4



【0443】

アジ化ドコシル(1)

臭化無水DMF(100mL)におけるドコシル(10.0g、25.67ミリモル)を、60で、2時間アジ化ナトリウム(8.35g、128.37ミリモル)を用いて処理した。そして、氷水(1000mL)を用いた反応溶液の希釈によって、白色結晶を生じた。吸引漏斗および真空でろ過および乾燥し、白色結晶(9.11g、25.90ミリモル、量)として1を生じた。[M+Na]⁺に対するLC-MS計算値：621.2、実測値：621.2。

【0444】

アジ化ステアリル(2)

無水DMF(200mL)におけるプロモオクタデカン(10.0g、30.10ミリモル)を、アジ化ナトリウム(9.78g、150.51ミリモル)を用いて60で2時間処理した。そして、氷水を用いた反応溶液の希釈により、白色結晶を生じた。吸引漏斗および真空でろ過および乾燥し、白色結晶として2を生じた。(6.82g、23.07ミリモル、76%)。

【0445】

アジ化リノレイル(3)

無水DCM(80mL)におけるリノレイルアルコール(10mL、32.3ミリモル)

40

50

)を、メタンスルホニルクロライド(2.75mL、35.5ミリモル)およびトリエチルアミン(5.8mL、42.0ミリモル)を用いて室温において2時間処理した。DCM/水を用いた抽出、硫酸ナトリウムを用いた有機層の乾燥、および蒸発によって、粗メシル酸塩を生じた。この粗製物を、直接次のステップに使用した。

【0446】

無水DMF(300mL)における粗製物を、アジ化ナトリウム(10.5g、161.50ミリモル)を用いて60で18時間処理した。酢酸エチル/水を用いた抽出、硫酸ナトリウムを用いた有機層乾燥、および蒸発によって暗色の油を生じた。油を、シリカゲル上でクロマトグラフした。ヘキサンを含む溶出剤によって、透明な油(7.51g、25.67ミリモル、80%(2ステップ))として3を生じた。

10

【0447】

アジ化オレイル(4)

無水DCM(80mL)におけるオレイルアルコール(10mL、32.30ミリモル)を、メタンスルホニルクロライド(2.75mL、35.5ミリモル)およびトリエチルアミン(5.8mL、42.0ミリモル)を用いて室温において4時間処理した。DCM/水を用いた抽出、硫酸ナトリウムを用いた有機層の乾燥、および蒸発によって粗メシル酸塩を生じた。この粗製物を、直接次のステップに使用した。

【0448】

無水DMF(300mL)における粗製物を、アジ化ナトリウム(10.5g、161.50ミリモル)を用いて60で18時間処理した。酢酸エチル/水を用いた抽出、硫酸ナトリウムを用いた有機層乾燥、および蒸発によって暗色の油を生じた。油を、シリカゲル上でクロマトグラフした。ヘキサンを含む溶出剤によって、透明な油(4.00g、16.38ミリモル、44%(2ステップ))として3を生じた。

20

【0449】

ヒドロキシヘキシカルバモイルコレステロール(5)

無水のジクロロメタンにおける1-アミノ-6-ヘキサノール(5.00g、42.67ミリモル)を、トリエチルアミン(11.9mL、85.33ミリモル)およびコレステロールクロロ酸塩(19.16g、42.67ミリモル)を用いて室温において4時間処理した。DCM/ブラインを用いた抽出、硫酸ナトリウムを用いた乾燥、および蒸発によって黄色いシロップを生じた。そしてDCM/ヘキサンを用いた結晶化によって、白色結晶(20.3g、38.31ミリモル、89%)として5を生じた。[M+Na]⁺ 552.3に対するLC-MS計算値:、実測値: 552.3。

30

【0450】

アジドヘキシカルバモイルコレステロール(6)

5(15.0g、28.31ミリモル)を、トリエチルアミン(7.9mL、56.62ミリモル)およびメタンスルホニルクロライド(2.4mL、31.14ミリモル)を用いて室温において4時間処理した。DCM/ブラインを用いた抽出、乾燥、真空中での濃縮によって、粗メシル酸塩を生じた。この粗製物を、直接次のステップに使用した。

【0451】

無水DMF(300mL)における粗製物を、アジ化ナトリウム(300mL)を用いて60で18時間処理した。酢酸エチル/ブラインを用いた抽出、硫酸ナトリウムを用いた有機層の乾燥、および蒸発によって黄色いシロップを生じた。シロップを18時間静置した後、シロップを結晶化した。結晶を水を用いて洗浄した。ろ過および吸引漏斗における乾燥および真空によって、黄色い結晶(13.24g、23.87ミリモル、84%(2ステップ))として6を生じた。

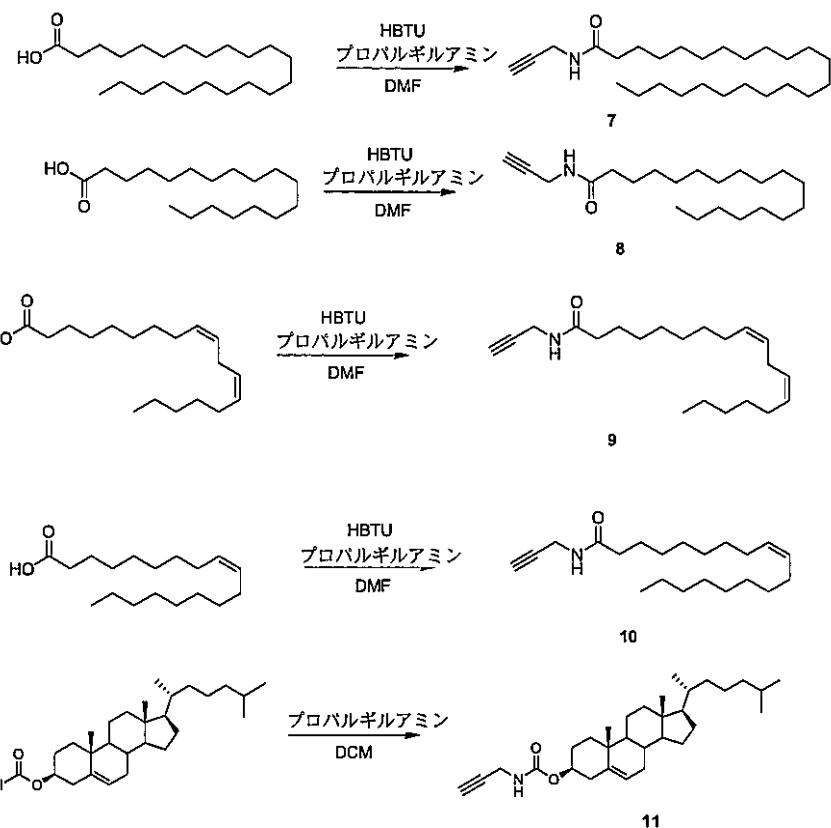
40

【0452】

実施例2. 脂質アルキン共役体

【化52】

スキーム5



【0453】

30

基本手順

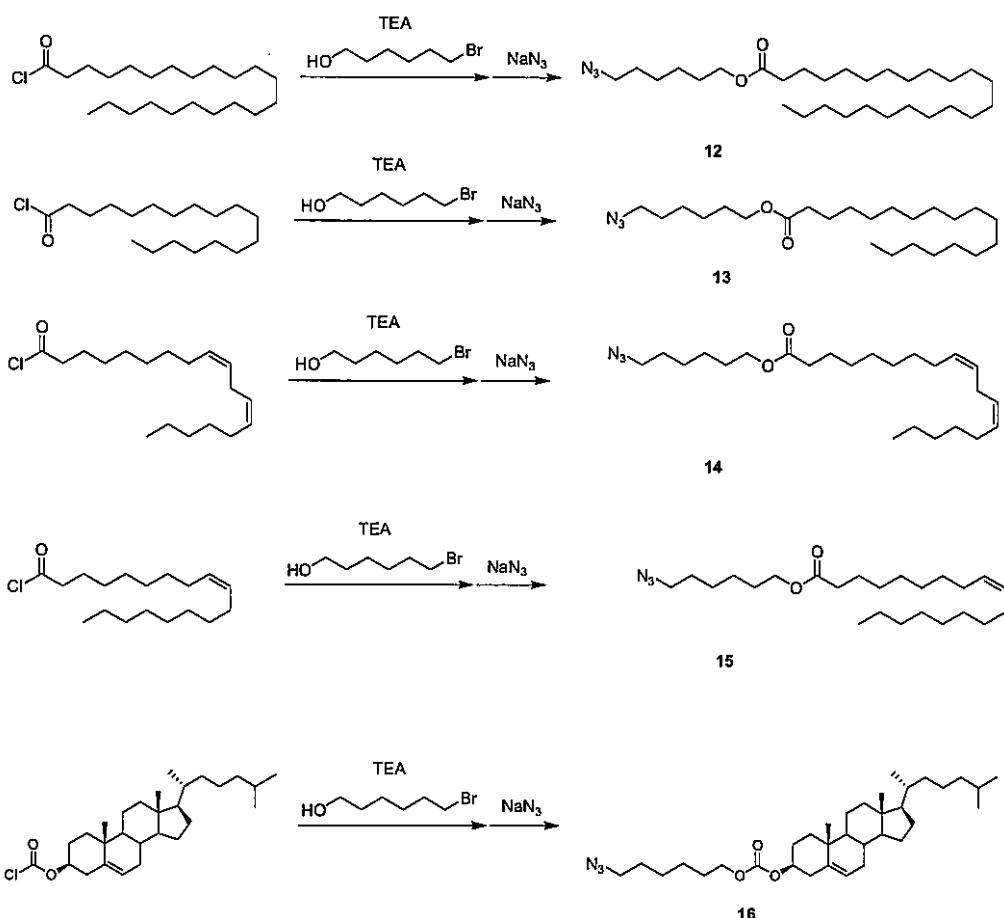
DMFにおけるそれぞれのカルボニル酸またはクロロ口炭酸塩を、HBTUおよびプロパルギルアミンを用いて処理し、対応するアルキンを生じる。

【0454】

実施例3. 脂質アジ化エステル共役体

【化53】

スキーム6



【0455】

これらのアジ化物を、 NH_4OH 処理後に合成後のために使用するであろう。

【0456】

エステルを細胞においてエステラーゼを用いて切断するであろう。

【0457】

基本手順

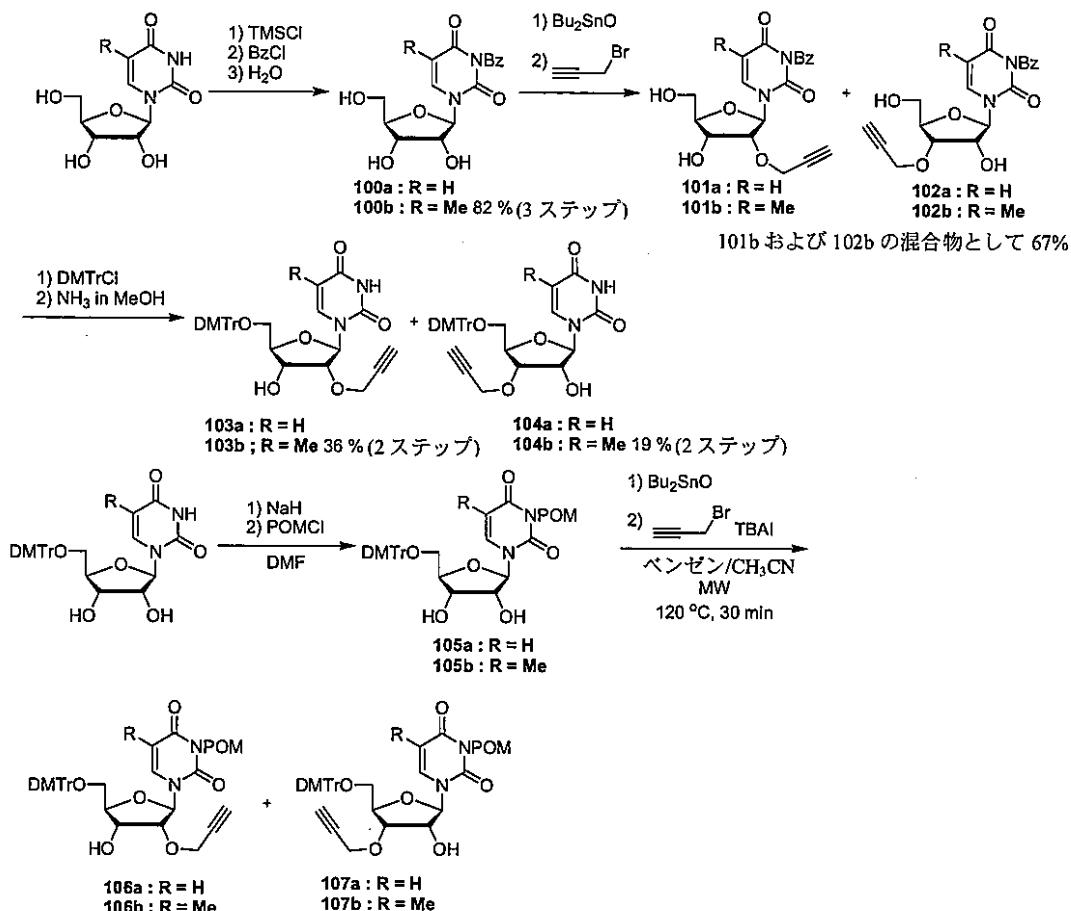
D C M におけるそれぞれの塩化物またはクロロ炭酸塩を、T E A (2等量)および1-ブロモヘキサノール(1.1等量)を用いて室温において処理する。水系後処理および濃縮によって粗臭化物を生じた。D M F における臭化物を、アジ化ナトリウム(5等量)を用いて60°で処理する。再結晶化によって、対応するアジ化物を生じる。

【0458】

実施例 4.2' / 3' - O - プロパルギルヌクレオシド誘導体の合成

【化54】

スキーム7A



10

20

30

40

【0459】

化合物100b

ピリジン (350 mL) における 5-メチルウリジン (20.0 g、77.45 ミリモル) を、クロロトリメチルシラン (49.4 mL、42.07 ミリモル) を用いて 30 分間、室温において処理した。氷浴においてベンゾイル塩化物 (9.90 mL、11.98 ミリモル) を溶液に添加した。18 時間後、TLC モニタリングおよび LC-MS 解析は、反応が完了したことを示した。氷浴において氷水 (100 mL) を溶液に添加した。2 時間後、TLC モニタリングおよび LC-MS 解析は、3 つのトリメチルシリルエーテルの切断を示した。溶液を、酢酸エチルおよびブラインを用いて直接抽出した。有機層を、硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲル上でクロマトグラフした。DCM における 5% MeOH を含む溶出剤によって、白い泡 (23.5 g、64.36 ミリモル、82%) として 100a を生じた。[M + Na]⁺ に対する LC-MS 計算値 : 385.1、実測値 : 385.1。

【0460】

化合物101b および 102b

ジブチルズズオキシド (249 mg、1.00 ミリモル) を、100 で無水 DMF における 100a (330 mg、0.91 ミリモル) の溶液に添加した。18 時間後、水を用いて反応を停止させた。反応溶液を減圧下で濃縮し、水系後処理せずにシリカゲル上でクロマトグラフした。DCM における 10% MeOH を含む溶出剤によって、泡として 101b および 102b (140 mg、0.34 ミリモル、38%) の混合物を生じた。

【0461】

化合物103b

50

4,4'-ジメトキシトリチルクロライド(6.00g、17.71ミリモル)を、無水ピリジン(200mL)における101bおよび102b(5.00g、12.48ミリモル)の溶液に添加した。4時間後、TLCモニタリングは、反応が完了したことを示した。水を用いて反応を停止した後、溶液をEtOAcおよびブラインを用いて抽出した。有機層を、減圧下で濃縮し、黄色い残渣を生じた。残渣をMeOHにおいて7Mアンモニアを用いて18時間室温において処理した。溶液を蒸発し、黄色い残渣を生じた。残渣をシリカゲル上でクロマトグラフした。EtOAc/ヘキサン(1:1~1:2)を含む溶出剤によって、白い泡(3.165g、5.41ミリモル、30%)として103bを生じた。[M+Na]⁺に対するLC-MS計算値: 621.2、実測値: 621.2。

10

【0462】

化合物104b

103bを溶出した後、104bを溶出した。产生量は770mg(1.31ミリモル、8%)であった。[M+Na]⁺に対するLC-MS計算値: 621.2、実測値: 621.2。

【0463】

化合物105a

冰浴において水素化ナトリウム(1.94g、81.08ミリモル)を、無水DMFにおける5'-O-DMTrウリジン(9.00g、36.75ミリモル)の溶液に添加した。1時間活発に攪拌した後、クロロメチルピバレート(11.85mL、81.08ミリモル)を冰浴において溶液に添加した。24時間0~室温において活発に攪拌した後、TLCモニタリングは、反応が完了したことを示した。溶液を、EtOAcおよび水性塩化アンモニウム溶液を用いて分割した。有機層を硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、減圧下で濃縮し、黄色い残渣を生じた。クロマトグラフィーによって105aを生じる。

20

【0464】

化合物105b

105aと同様の手順によって、105bを生じる。

【0465】

化合物106a

ジブチルスズオキシド(1.1等量)を、ベンゼン/ヘキサン(4:1、v/v)における105aの溶液に添加する。混合物を120で20分間マイクロ波によって照射する。反応後、混合物は透明な溶液に変化する。臭化プロパルギル(5等量)およびテトラブチルアンモニウムヨウ化物(5等量)を溶液に添加する。溶液を120で2.5時間マイクロ波によって照射した。水系後処理およびクロマトグラフィーによって106aを生じる。

30

【0466】

化合物106b

106aと同様の手順によって、105bを生じる。

【0467】

化合物107a

106a後、107aを溶出する。

40

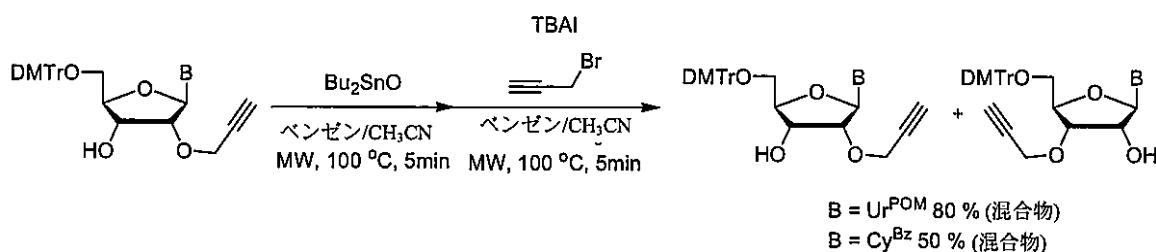
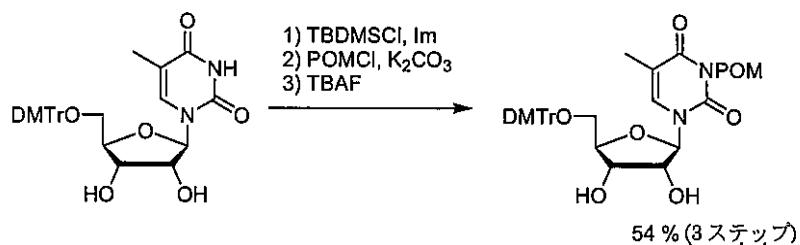
【0468】

化合物107b

107aと同様の手順によって、107bを生じる。

【化55】

スキーム7 b. マイクロ波による2' / 3' -O-プロパルギル-5-メチルウリジン誘導体の調製

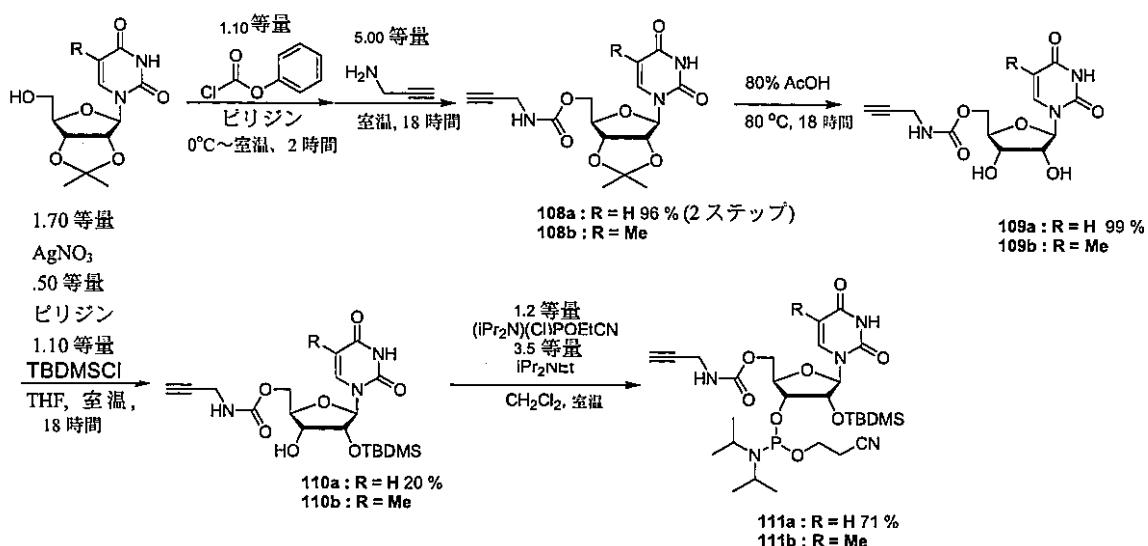


【0469】

実施例5. 5' - O - プロパルギルカルバモイルヌクレオシド誘導体の合成

【化56】

スキーム8



40

【0470】

化合物108a

ピリジン (350 mL) における 2' - 3' - O - イソプロピリデンウリジン (10.00 g、35.18 ミリモル) を、フェニルクロロ炭酸塩 (4.8 mL、38.70 ミリモル) を用いて室温において 2 時間処理した。プロパルギルアミン (7.3 mL、175.89 ミリモル) を溶液に添加した。18 時間室温において活発に攪拌した後、TLC モニタリングは反応が完了したことを示した。溶液を、DCM および放置した NaHCO3 aq を用いて直接分割した。有機層を硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、減圧下で濃縮し、暗色の残渣を生じた。残渣をシリカゲル上でクロマトグラフした。DCM における 2% M

50

MeOH を含む溶出剤によって、白い泡（11.73 g、32.10ミリモル、91%（2ステップ）として108aを生じた。[$\text{M} + \text{H}$]⁺に対するLC-MS計算値：366.0、実測値：366.0。

【0471】

化合物108b

108aと同様の手順によって、108bを生じる。

【0472】

化合物109a

MeOH （20 mL）における108a（11.73 g、32.10ミリモル）を、80% AcOH （200 mL）を用いて18時間還流した。反応の完了を、LC-MSによって確認した。反応溶液を減圧下で濃縮し、黄色い粘着性のシロップを生じた。シロップを MeOH （50 mL）を用いて処理し、30分間超音波処理した。超音波処理によって白色結晶を生じた。ろ過および吸引漏斗における乾燥および真空によって、白色結晶（10.34 g、31.78ミリモル、99%）として109aを生じた。10

【0473】

化合物109b

109aと同様の手順によって、109bを生じる。

【0474】

化合物110a

無水THF（30 mL）における109a（10.34 g、28.30ミリモル）を、硝酸銀（5.77 g、34.00ミリモル）、ピリジン（17.0 mL、209.4ミリモル）、および第3ブチルジメチルシリルクロライド（4.27 g、28.30ミリモル）を用いて室温において18時間処理した。そして溶液をDCM／水を用いて分割した。有機層を硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、減圧下で濃縮し、残渣をシリカゲル上でクロマトグラフした。110aおよび3'-O-異性体（4.00 g、32%）を、ヘキサン／EtOAc（1:1）を用いて同時に溶出した。混合物をアルミニウムゲル上でクロマトグラフした。DCMにおける2% MeOH を含む溶出剤によって、純粋な110aを生じた。[$\text{M} + \text{Na}$]⁺に対するLC-MS計算値462.1、実測値：462.1。20

【0475】

化合物110b

110aと同様の手順によって、110bを生じる。

【0476】

化合物111a

無水DCM（12 mL）における110a（452 mg、1.02ミリモル）を、ジイソプロピルエチルアミン（612 μ l、3.41ミリモル）および2-シアノエチル-N，N-ジイソプロピルクロロホスホラミダイト（380 mL、1.71ミリモル）を用いて室温において6時間処理した。溶液をDCM／ブラインを用いて抽出した。有機層を硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、減圧下で濃縮し、た黄色い残渣を生じた。残渣をシリカゲル上でクロマトグラフした。TEA／ヘキサン／EtOAc（0.5:50:50）を含む溶出剤によって、白い泡として111a（469 mg、0.73ミリモル、71%）を生じた。40

【0477】

化合物111b

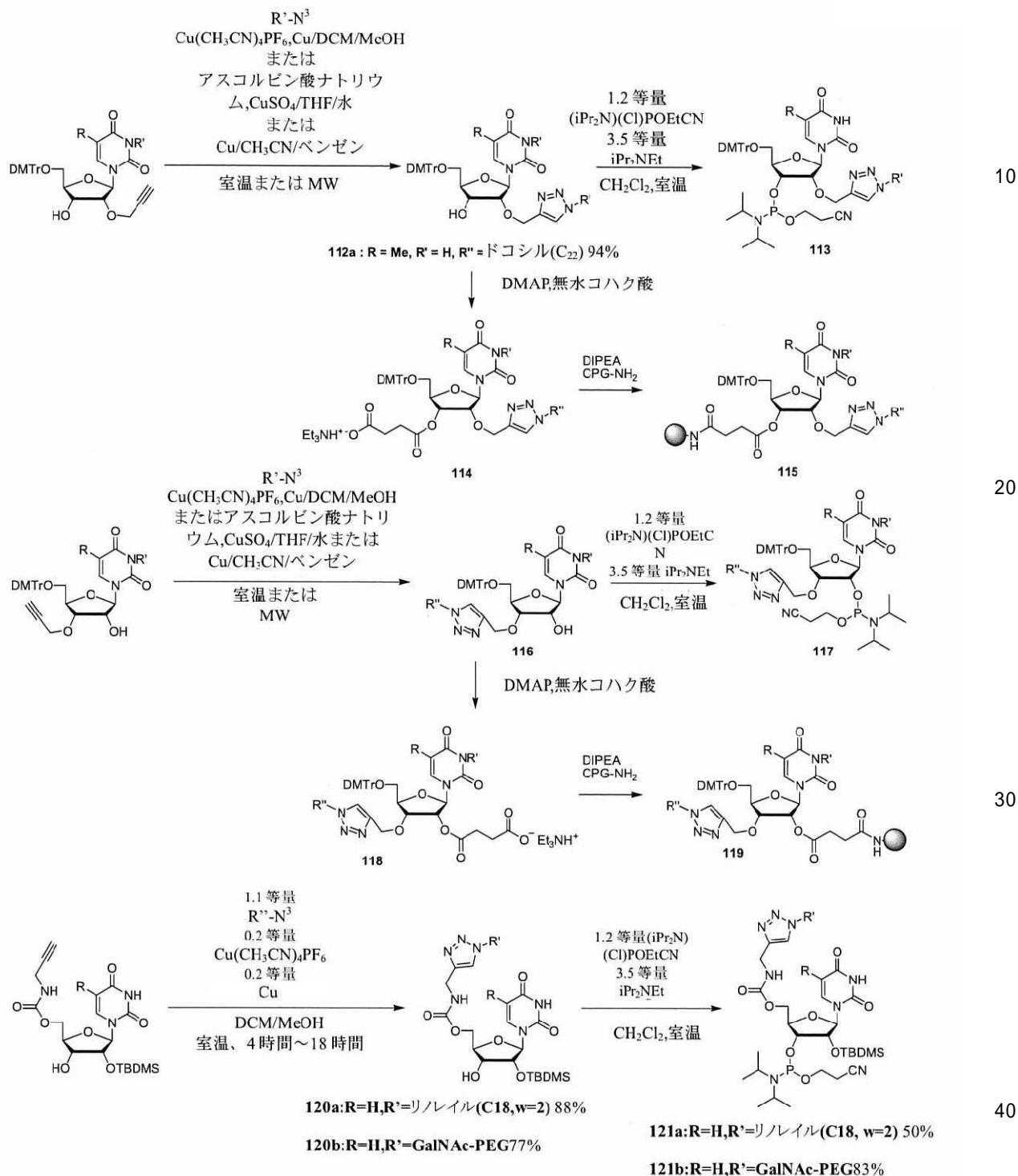
111aと同様の手順によって、111bを生じる。

【0478】

実施例6. プロパルギルヌクレオシドおよびアジ化物の使用による「クリックした」化合物

【化57】

スキーム9



【0479】

化合物112a

DCM / MeOH (4 : 1, v / v) (0.5 mL) における 103b (25 mg, 0.04 ミリモル) を、1 (14 mg, 0.04 ミリモル)、テトラキスアセトニトリル銅ヘキサフルオロリン酸塩 (3 mg, 0.01 ミリモル)、および銅 (1 mg, 0.01 ミリモル) を用いて処理した。1 時間後、溶液を DCM / ブラインを用いて抽出した。有機

50

層を減圧下で濃縮し、緑色の残渣を生じた。残渣をシリカゲル上でクロマトグラフした。D C M における 1 % M e O H を含む溶出剤によって、白い泡 (3 6 m g 、 0 . 0 3 7 ミリモル、 9 7 %) として 1 1 2 a を生じた。 [M + N a] ⁺ に対する L C - M S 計算値 : 9 7 2 . 5 、実測値 : 9 7 2 . 5 。

【 0 4 8 0 】

化合物 1 1 3

典型的なホスフィチレーションによって 1 1 3 を生じる。

【 0 4 8 1 】

化合物 1 1 4

典型的なサクシニル化によって 1 1 4 を生じる。

【 0 4 8 2 】

化合物 1 1 5

C P G に対する典型的な固定化によって 1 1 5 を生じる。

【 0 4 8 3 】

化合物 1 1 6

1 1 2 a と同様の手順によって、 1 1 6 を生じる。

【 0 4 8 4 】

化合物 1 1 7

典型的なホスフィチレーションによって 1 1 7 を生じる。

【 0 4 8 5 】

化合物 1 1 8

典型的なサクシニル化によって 1 1 8 を生じる。

【 0 4 8 6 】

化合物 1 1 9

C P G に対する典型的な固定化によって 1 1 9 を生じる。

【 0 4 8 7 】

化合物 1 2 0 a

D C M / M e O H (4 : 1 、 v / v) (2 m L) における 1 1 0 a (1 0 0 m g 、 0 . 1 7 ミリモル) を、 3 (5 9 m g 、 0 . 1 7 ミリモル) 、テトラキスマセトニトリル銅ヘキサフルオロリン酸塩 (1 3 m g 、 0 . 0 3 ミリモル) 、および銅 (2 m g 、 0 . 0 3 ミリモル) を用いて室温において 3 時間処理した。溶液を減圧下で濃縮し、水系後処理せずに、シリカゲル上でクロマトグラフした。ヘキサン / E t O A c (1 : 3) を含む溶出剤によって、泡 (1 2 2 m g 、 0 . 1 6 ミリモル、 9 8 %) として 1 2 0 a を生じた。 [M + H] ⁺ に対する L C - M S 計算値 : 7 3 1 . 2 、実測値 : 7 3 1 . 2 。

【 0 4 8 8 】

化合物 1 2 0 b

D C M / M e O H (4 : 1 、 v / v) における 1 1 0 a (5 0 0 m g 、 1 . 1 4 ミリモル) を、 3 2 5 (4 6 0 m g 、 1 . 1 4 ミリモル) 、テトラキスマセトニトリル銅ヘキサフルオロリン酸塩 (4 2 m g 、 0 . 1 1 ミリモル) 、および銅 (7 m g 、 0 . 1 1 ミリモル) を用いて室温において 1 8 時間処理した。溶液を減圧下で濃縮し、水系後処理せずに直接シリカゲル上でクロマトグラフした。 D C M / M e O H (1 0 : 1) を含む溶出剤によって、白い泡 (8 0 0 m g 、 0 . 8 8 ミリモル、 8 8 %) として 1 2 0 b を生じた。

【 0 4 8 9 】

化合物 1 2 1 a

無水 D C M (1 0 m L) における 1 2 0 a (7 3 0 m g 、 1 . 0 0 ミリモル) を、ジイソプロピルエチルアミン (5 2 5 μ l 、 3 . 0 0 ミリモル) および 2 - シアノエチル - N , N - ジイソプロピルエチルホスホラミダイト (3 3 5 μ l 、 1 . 5 0 ミリモル) を用いて室温において 4 時間処理した。溶液を D C M / ブライン用いて抽出した。有機層を硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、減圧下で濃縮し、暗色の残渣を生じた。残渣をシリカゲル上でクロマトグラフした。 T E A / ヘキサン / E t O A c (0 . 5 : 6 0 : 3 0) を含む

10

20

30

40

50

溶出剤によって、白い泡（463mg、0.50ミリモル、50%）として116aを生じた。

【0490】

化合物121b

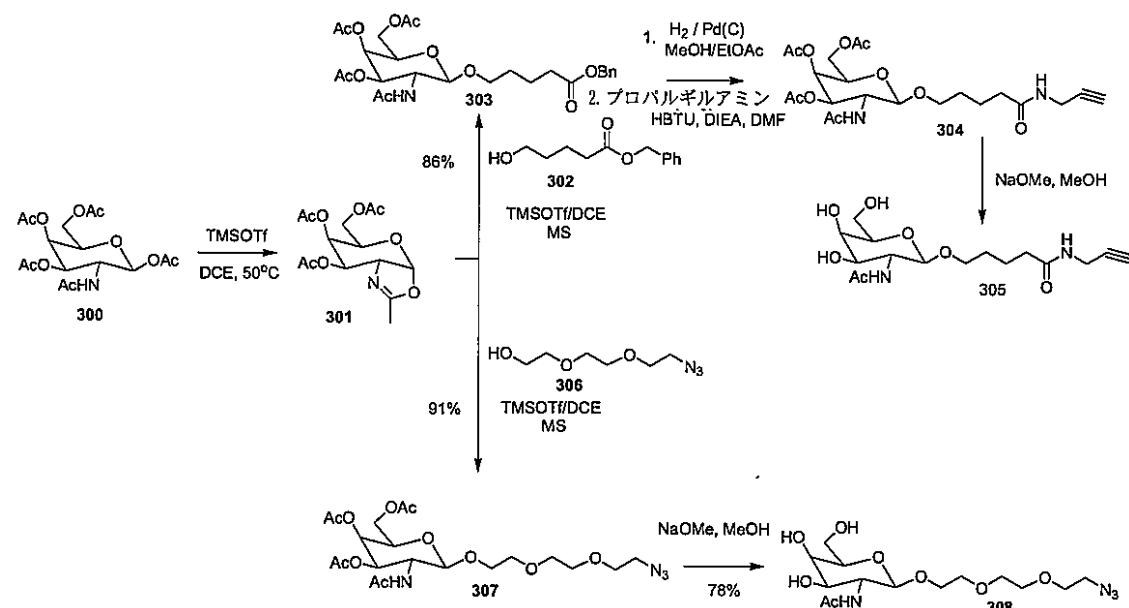
無水DCM(4mL)における120b(400g、0.44ミリモル)を、ジイソブロピルエチルアミン(230μl、1.33ミリモル)および2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピルエチルホスホラミダイト(150μl、0.67ミリモル)を用いて室温において6時間処理した。溶液をDCM/ブラインを用いて分割した。有機層を硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、減圧下で濃縮し、黄色い残渣を生じた。残渣をシリカゲル上でクロマトグラフした。TEA/MeOH/EtOAc(0.5:2:100)を含む溶出剤によって、白い泡(403mg、0.36ミリモル、83%)として120bを生じた。¹⁰ [M+Na]⁺に対するLC-MS計算値：1123.3、実測値：1123.3。

【0491】

実施例7.機能性のアルキンまたはアジ化物を含む糖リガンド

【化58】

スキーム10



【0492】

319の調製：

ガラクトサミンペントアセテート300(52.00g、133.63ミリモル)を外界温度においてジクロロエタン(300mL)に取り入れた。TMSOTf(44.55g、200.44ミリモル)を添加し、混合物を50で90分間水浴において攪拌し、加熱を止め、混合物を室温において一晩攪拌した。それを氷冷のナトリウム炭酸水素溶液に注ぎ、ジクロロメタンを用いて抽出し、水で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥した。溶媒を真空中で取り除き、残渣を一晩高真空下で乾燥し、暗色のゴム(TLC: CHCl₃における15%MeOH、R_f値: 0.5, 44.50g、定量的)として化合物301を得る。それをそれ以上の精製なしに次の反応のために使用した。¹H NMRおよびMALDIによって、産物形成を確認した。¹H NMR(CDCl₃, 400MHz) = 6.01(d, J = 6.8Hz, 1H)、5.46(t, J = 3.01Hz, 1H)、4.91(dd, J = 3.29, 7.30Hz, 1H)、4.26-3.93(m, 4H)、2.12(s, 3H)、2.07(s, 6H)、2.05(s, 3H)。MS: C₄H₁₉NO₈に対する分子量計算値: 329.11；実測値: 352.1(M+Na)⁴⁰

10

20

30

40

50

。

【0493】

303の調製：

化合物301(43.70g、133.56ミリモル)およびベンジルエステル302(41.71g、200.34ミリモル)を、ジクロロエタン(300mL)において溶解し、分子ふるい(50g)を溶液に添加し、30分間攪拌した。TMSOTf(14.50g、66.78ミリモル)を添加し、混合物を室温において一晩攪拌した。それを炭酸水素ナトリウムの氷冷溶液に注ぎ、産物をジクロロメタンに抽出し、水で洗浄し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥した。溶媒を真空中で取り除き、残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(勾配溶出：20-100%酢酸エチル/ヘキサン)によって精製し、薄茶色の粘着性の液体(60.50g、86%)として、必要な化合物303を得た。¹H NMR(DMSO-d₆ 400MHz) = 7.76(d, J=9.03Hz, 1H)、7.25-7.38(m, 5H)、5.20(d, J=3.17Hz, 1H)、5.05(s, 2H)、4.95(dd, J=3.41, 11.23Hz, 1H)、4.48(d, J=8.30Hz, 1H)、3.70-4.20(m, 4H)、3.35-3.45(m, 2H)、2.33(t, J=7.32Hz, 2H)、2.08(s, 3H)、1.97(s, 3H)、1.87(s, 3H)、1.73(s, 3H)、1.50-1.63(m, 4H)。MS: C₂₆H₃₅NO₁₁に対する分子量計算値：537.22；実測値：560.21(M+Na)。

10

【0494】

304の調製：

化合物303(60.00g、111.68ミリモル)を、メタノール/酢酸エチルの混合物において溶解し、アルゴンを用いて脱気した。Pd/C(6.00g、10wt% Degussa、湿式)を添加し、一晩、バルーン圧下で水素化した。セライトの小さなパッドを介してろ過し、メタノールを用いて洗浄し、高真空中で、一晩乾燥し、酸(48.85g、98%)を得た。¹H NMR(DMSO-d₆ 400MHz) = 11.97(bs, 1H)、7.78(d, J=9.20Hz, 1H)、5.21(d, J=3.16Hz, 1H)、4.96(dd, J=3.42, 11.30Hz, 1H)、4.47(d, J=8.26Hz, 1H)、3.73-4.22(m, 4H)、3.32-3.45(m, 2H)、2.09(s, 3H)、1.98(s, 3H)、1.87(s, 3H)、1.75(s, 3H)、1.51-1.64(m, 4H)。MS: C₁₉H₂₉NO₁₁に対する分子量計算値：447.17；実測値：469.9(M+Na)。酸(5g、11.17ミリモル)、プロパルギルアミン(0.690g、12.29ミリモル)、およびHBTU(4.23g、11.17ミリモル)の一部を、DMF(50mL)において溶解した。DIEAを反応混合物に添加し、反応混合物を一晩攪拌する。減圧下で溶媒を取り除き、残渣をジクロロメタンを用いて抽出し、水で洗浄し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥した。溶媒を真空中で取り除き、残渣をシリカゲルクロマトグラフィーによって精製し、産物304を得る。MS: C₂₂H₃₂NO₁₀に対する分子量計算値：484.21。

30

【0495】

305の調製：

化合物304(3.00g、6.19ミリモル)を、DCM/MeOHの混合物(1:2、20mL)において溶解し、ナトリウムメトキシド溶液(20mL、MeOHにおいて0.5M)をそれに添加し、混合物を一晩攪拌する。AcOHを用いて反応混合物を中和し、減圧下で、溶媒を取り除く。残渣をシリカゲルクロマトグラフィーによって精製し、必要な産物305を得る。MS: C₁₆H₂₆NO₇に対する分子量計算値：358.39

40

307の調製：

化合物301(42.30g、128.43ミリモル)およびアジドエタノール306(26g、192.45ミリモル)を、ジクロロエタン(300mL)において溶解し、

50

分子ふるい(50g)を溶液に添加し、30分間攪拌した。TMSOTf(14.29g、64.21ミリモル)を添加し、混合物を室温において一晩攪拌した。それを炭酸水素ナトリウムの氷冷溶液に注ぎ、産物をジクロロメタンに抽出し、水で洗浄し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥した。溶媒を真空中で取り除き、残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(勾配溶出：20~100%酢酸エチル/ヘキサンに続いて5~10%メタノール/酢酸エチル)によって精製し、薄茶色の粘着性の液体(59.23g、91.00%)として必要な化合物307を得た。¹H NMR(DMSO-d₆ 400MHz)=7.77(d, J=9.27Hz, 1H)、5.20(d, J=3.15Hz, 1H)、4.97(dd, J=3.39, 11.34Hz, 1H)、4.55(d, J=8.64Hz, 1H)、3.72-4.22(m, 5H)、3.30-3.63(m, 11H)、2.09(s, 3H)、1.98(s, 3H)、1.88(s, 3H)、1.76(s, 3H)、MS: C₂₀H₃₂N₄O₁₁:に対する分子量計算値: 504.21; 実測値: 527.1(M+Na)。

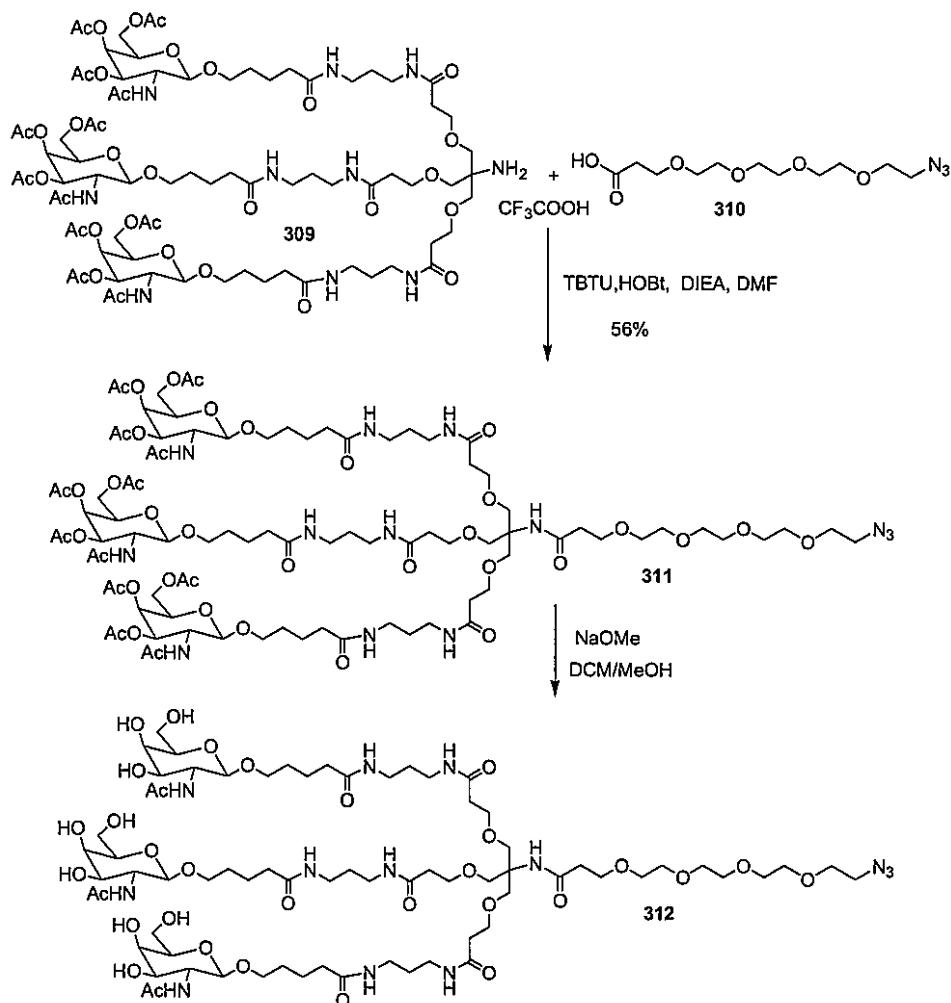
【0496】

308の調製:

化合物307(5.85g、11.59ミリモル)を、DCM/MeOHの混合物(1:2、50mL)において溶解し、ナトリウムメトキシド溶液(20mL、MeOHにおいて0.5M)をそれに添加し、混合物を一晩攪拌する。AcOHを用いて反応混合物を中和し、減圧下で、溶媒を取り除いた。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(DCM、20%MeOH/DCM)によって精製し、必要な産物308を得た。MS: C₁₄H₂₆N₄O₈に対する分子量計算値: 378.18; 実測値: 401.19(M+Na)。

【化59】

スキーム11



【0497】

311の調製：

PEG酸310(5.50g、2.908ミリモル)を、DMF(50mL)において溶解し、TBTU(1.23g、3.83ミリモル)、HOBr(0.520g、3.83ミリモル)、およびDIEA(3.2mL、5等量)を混合物に添加し、3~4分間攪拌した。DMFにおける309の溶液(1.02g、1.2等量)を混合物に添加し、反応混合物を一晩攪拌した。TLCを確認し、溶媒を減圧下で取り除いた。残渣をジクロロメタンにおいて溶解し、炭酸水素ナトリウム溶液(50mL)、水(50mL)を用いて洗浄し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥した。溶媒を真空中で取り除き、(酢酸エチル、後に勾配溶出5~15%MeOH/DCMが続く)シリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、残渣をオフホワイトの固体(3.30g、56%)として産物311を得た。MS: C₉H₁₄N₃O₄に対する分子量計算値: 2065.98; 実測値: 2089.09(M+Na)。

【0498】

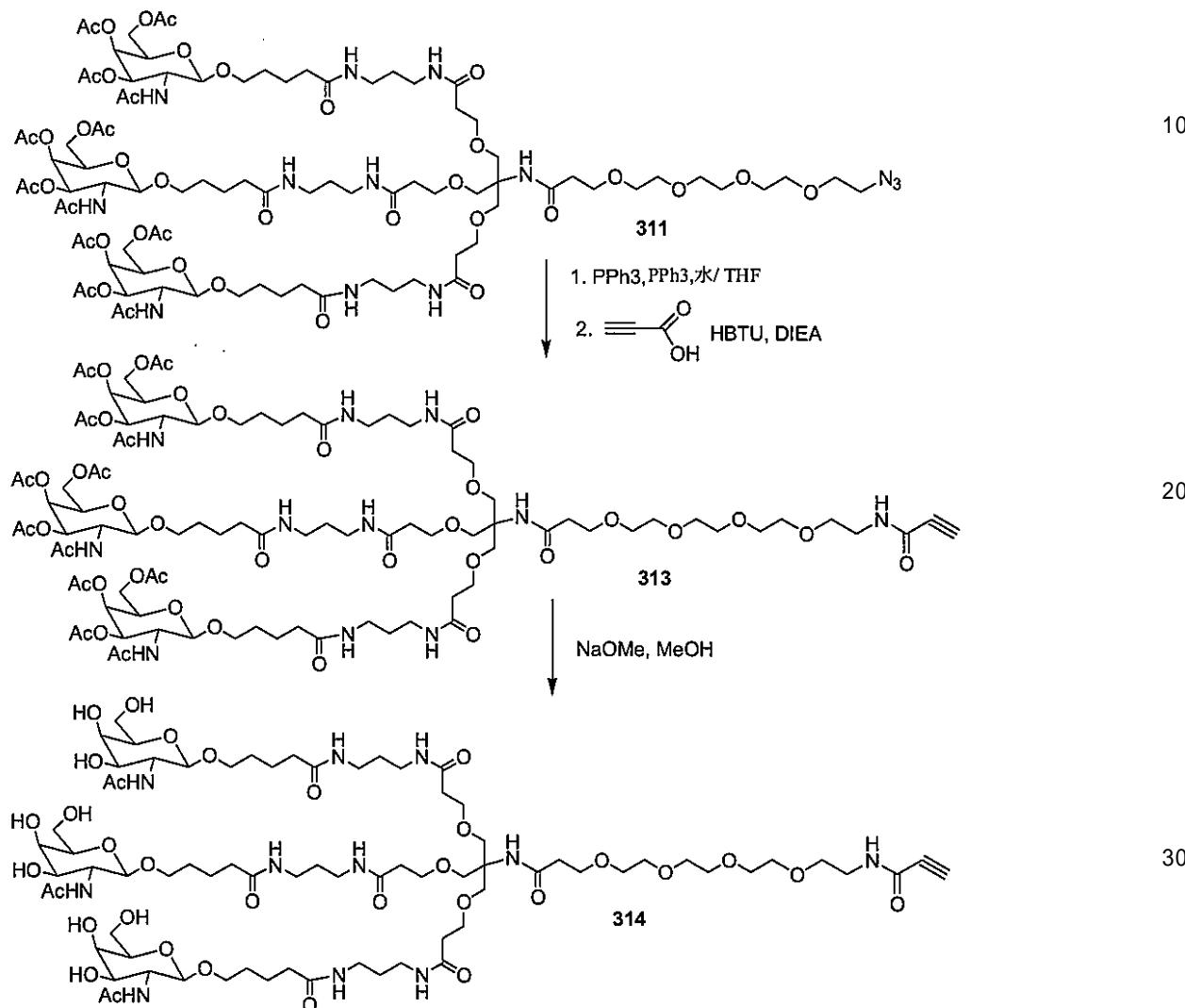
312の調製：

化合物311(0.92g、0.445ミリモル)をMeOH(10mL)によって溶解し、ナトリウムメトキシド溶液(10mL、MeOHにおいて0.5M)をそれに添加し、混合物を一晩攪拌した。反応をTLCで監視し、混合物によってCMセファロース樹脂のカラムを通過した。MeOHを用いて洗浄し、真空中で溶媒を取り除き、産物312

(0.42 g、57%)を得た。MS: C₇₂H₁₂₉N₁₃O₃₂に対する分子量計算値: 1687.89; 実測値: 1710.90 (M+Na)。

【化60】

スキーム12



【0499】

313の調製:

化合物311(2.00 g、0.967ミリモル)をTHF(20 mL)において溶解し、PPh₃(0.380 g、1.45ミリモル)を添加し、混合物を48時間攪拌する。出発物質の完全消失を確かめるためにTLCを確認する。水(0.1 mL、5等量)を反応混合物に添加し、24時間攪拌する。TFA(0.140 g、1.20ミリモル)およびトルエン(30 mL)を添加し、減圧下で濃縮する。残渣によってトルエン(2×30 mL)を用いて2回同時蒸発し、高真空中で乾燥する。したがって、追加の精製なしに同日に、得られた産物を次の反応に使用することができる。MS: C₉₀H₁₄₉N₁₁O₄₁に対する分子量計算値: 2039.99。上記の反応の化合物およびプロピノン酸(0.081 g、1.2等量)をDMF(20 mL)において溶解する。HBTU(0.440 g、1.16ミリモル)およびDIEAをそれに添加し、混合物を一晩攪拌する。溶媒を減圧下で取り除く。残渣をジクロロメタンにおいて溶解し、炭酸水素ナトリウム溶液、水を用いて洗浄し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥する。溶媒を真空中で取り除き、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、産物313を得る。

40

50

【0500】

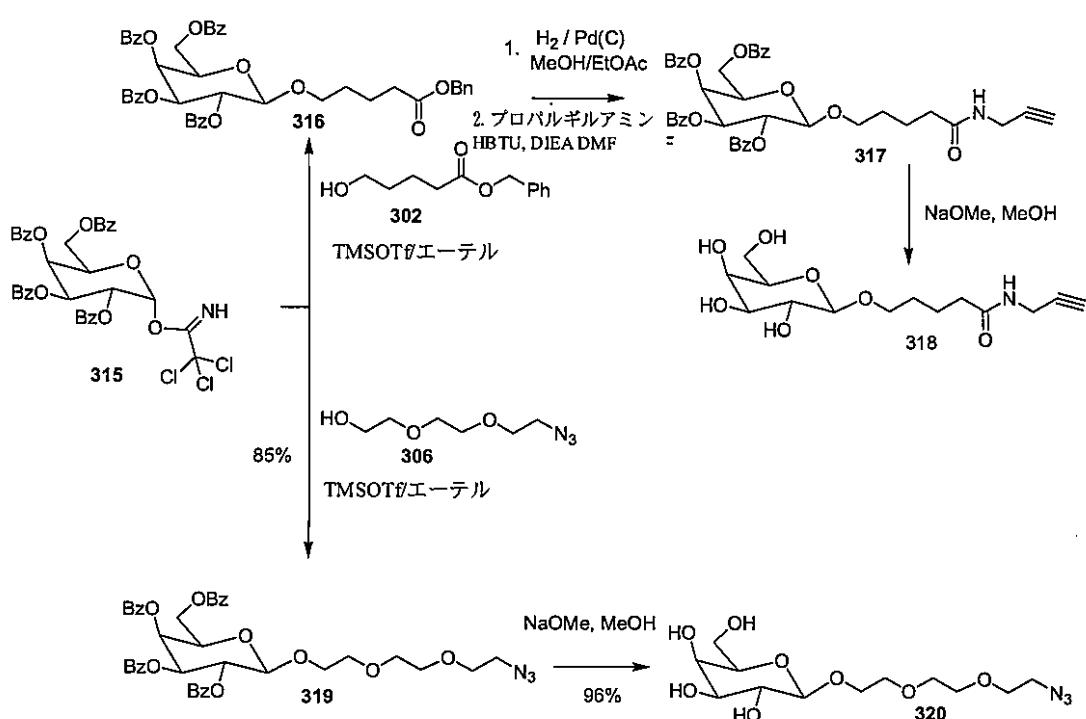
314の調製：

化合物311(1.00g、0.447ミリモル)をMeOH(10mL)において溶解し、ナトリウムメトキシド溶液(10mL、MeOHにおける0.5M)をそれに添加し、混合物を一晩攪拌する。反応をTLCにより監視し、混合物によってCMセファロース樹脂のカラムを通過する。MeOHを用いて洗浄し、溶媒を真空中で取り除き、産物314を得る。

【化61】

スキーム13

10



【0501】

316の調製：

ガラクトーストリクロロアセトイミダート315(10.00g、13.53ミリモル)およびベンジルエステル302(3.90g、14.88ミリモル)を、トルエン(2X40mL)を用いて2回同時蒸発し、高真空下で乾燥した。無水エーテル(50mL)および分子ふるい(20g)を溶液に添加し、氷浴で冷却する。TMSOTf(0.300g、1.349ミリモル)を添加し、混合物を15分間攪拌する。溶媒を取り除き、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(勾配溶出：20~60%酢酸エチル/ヘキサン)によって精製し、必要な化合物316を得る。

【0502】

317の調製：

化合物316(5.00g、6.35ミリモル)をMeOHに取り込み、Pd/Cを使用して、バルーン圧下で水素化し、酸を得る。粗酸およびプロパルギルアミン(0.384g、6.99ミリモル)およびHBTU(2.40g、6.35ミリモル)をDMF(50mL)において溶解する。DIIEAを添加し、反応混合物を一晩攪拌する。溶媒を取り除き、残渣をシリカゲルクロマトグラフィーによって精製し、必要な産物317を得る。

【0503】

318の調製：

40

50

化合物 317 (2.00 g、2.72 ミリモル) を、DCM / MeOH の混合物 (1:2、50 mL) において溶解し、ナトリウムメトキシド溶液 (20 mL、MeOH において 0.5 M) をそれに添加し、混合物を一晩攪拌する。AcOH を用いて反応混合物を中和し、減圧下で、溶媒を取り除く。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (DCM、20% MeOH / DCM) によって精製し、必要な産物 318 を得る。

【0504】

319 の調製：

ガラクトーストリクロロアセトイミダート 315 (10.00 g、13.53 ミリモル) およびアジドアルコール 306 (2.60 g、14.88 ミリモル) をトルエン (2 X 40 mL) を用いて 2 回同時蒸発し、高真空中で乾燥した。無水エーテル (50 mL) および分子ふるい (20 g) を溶液に添加し、氷浴で冷却した。TMSOTf (0.300 g、1.349 ミリモル) を添加し、混合物を 15 分間攪拌し、TLC を確認し、反応混合物を、TEA を用いて反応を停止した。溶媒を取り除き、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (勾配溶出：20 ~ 60% �酢酸エチル / ヘキサン) によって精製し、無色の液体 (8.623 g、85%) として必要な化合物 319 を得た。MS : C₄₀H₃₉N₃O₁₂ に対する分子量計算値：753.25；実測値：776.30 (M + Na)。
10

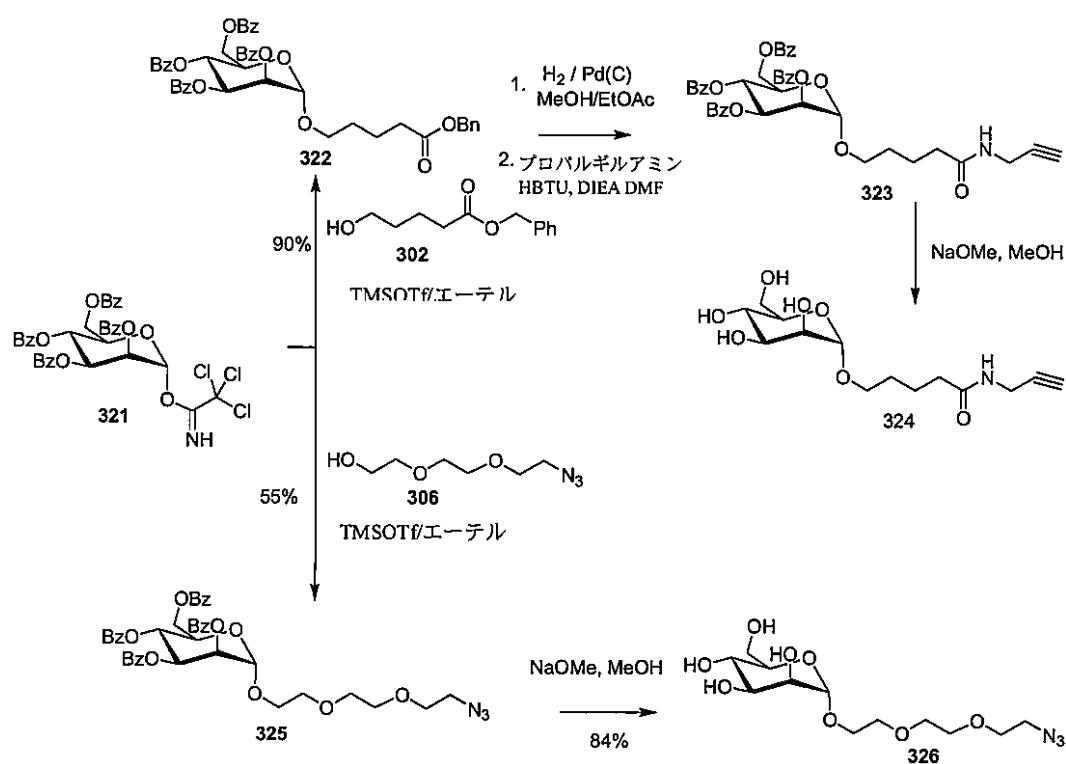
【0505】

320 の調製：

化合物 319 (4.19 g、5.55 ミリモル) を、DCM / MeOH の混合物 (1:2、50 mL) において溶解し、ナトリウムメトキシド溶液 (55 mL、MeOH において 0.5 M) をそれに添加し、混合物を一晩攪拌する。AcOH を用いて反応混合物を中和し、減圧下で、溶媒を取り除いた。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (DCM、20% MeOH / DCM) によって精製し、無色の液体 (1.80 g、96%) として必要な産物 320 を得た。MS : C₁₂H₂₃N₃O₈ に対する分子量計算値：337.15；実測値：360.15 (M + Na)。
20

【化62】

スキーム 14



【0506】

322の調製：

マンノーストリクロロアセトイミダート321(15.23g、20.55ミリモル)および302(4.36g、1.02等量)を、トルエンにおいて溶解し、2回、共沸混合物化した。残渣を高真空下で、一晩乾燥した。無水ジエチルエーテル(30mL)および分子ふるい(10g)をそれに添加した。反応混合物を氷水浴において冷却した。TMSOTf(0.5mL、0.1等量)をそれに添加し、混合物を10分間攪拌した。反応をTLCで監視し、TEAを用いて反応を停止した。分子ふるいをろ過したものおよび溶媒を減圧下で取り除いた。残渣をクロマトグラフィー(ヘキサン、15~25%EtOAc/ヘキサン)によって精製し、無色の液体(14.52g、90%)として化合物322を得た。MS: C₄₆H₄₂O₁₂に対する計算値：786.27、実測値：809.25((M+Na))。

10

【0507】

323の調製：

マンノースベンジルエステル(14.30g、18.17ミリモル)を酢酸エチル(100mL)において溶解し、2滴の酢酸をそれに添加した。脱気したPd/C(1.50g、10wt%Degussa湿式)を添加し、バルーン圧下で24時間水素化した。反応をTLCおよびMALDIで監視した。それをセライトの小さなパッドを介してろ過し、酢酸エチルを用いて洗浄した。溶媒を取り除き、残渣を高真空下で乾燥し、無色の油(11.20g、90%)として化合物を得た。MS: C₃₉H₃₆O₁₂に対する計算値：696.22、実測値：719.18(M+Na)。粗酸(4.40g、6.35ミリモル)およびプロパルギルアミン(0.384g、6.99ミリモル)およびHBTU(2.40g、6.35ミリモル)をDMF(50mL)において溶解する。DIEAを添加し、反応混合物を一晩攪拌する。溶媒を取り除き、残渣をシリカゲルクロマトグラフィーによって精製し、必要な産物323を得る。

20

【0508】

324の調製：

化合物323(2.00g、2.72ミリモル)を、DCM/MeOHの混合物(1:2、50mL)において溶解し、ナトリウムメトキシド溶液(20mL、MeOHにおいて0.5M)をそれに添加し、混合物を一晩攪拌する。AcOHを用いて反応混合物を中和し、減圧下で、溶媒を取り除く。残渣をシリカゲルクロマトグラフィーによって精製し、必要な産物324を得る。

30

【0509】

325の調製：

マンノーストリクロロアセトイミダート321(15.00g、20.24ミリモル)およびアジドアルコール306(4.25g、1.2等量)をトルエンにおいて溶解し2回、共沸混合物化した。残渣を高真空下で、一晩乾燥した。無水ジエチルエーテル(30mL)および分子ふるい(10g)を混合物に添加した。反応混合物を氷水浴において冷却した。TMSOTf(0.5mL、0.1等量)を添加し、混合物を10分間攪拌した。反応をTLCで監視し、TEAを用いて反応を停止した。分子ふるいをろ過したものおよび溶媒を減圧下で取り除いた。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(20~50%EtOAc/ヘキサン)によって精製し、無色の液体(8.36g、55%)として化合物325を得た。¹H NMR(DMSO-d₆、400MHz)=8.05(d、J=7.2Hz、2H)、7.19~7.92(m、18H)、6.00(t、J=10.4Hz、1H)、5.72(dd、J=3.2、10.4Hz、1H)、5.62(dd、J=2.3.2Hz、1H)、5.25(d、J=1.6Hz、1H)、4.50~4.65(m、3H)、3.60~3.95(m、10H)、3.36(t、J=4.8Hz、2H)。MS: C₄₀H₃₉N₃O₁₂に対する分子量計算値：753.25；実測値：776.23(M+Na)。

40

【0510】

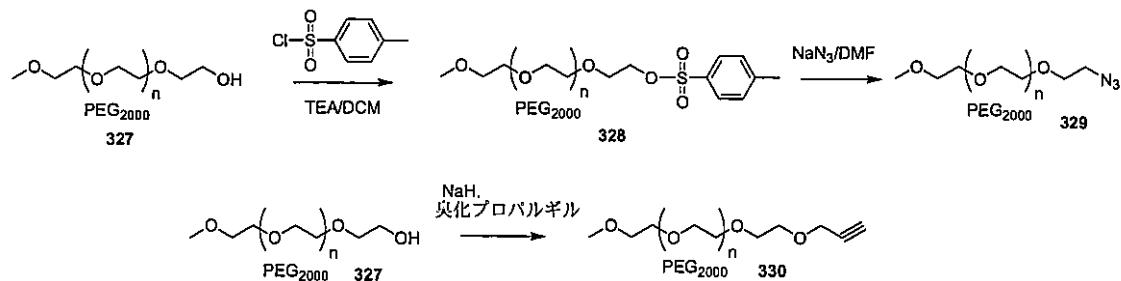
50

326の調製：

化合物319(5.30g、7.03ミリモル)を、DCM/MeOHの混合物(1:2、50mL)において溶解し、ナトリウムメトキシド溶液(70mL、MeOHにおいて0.5M)をそれに添加し、混合物を一晩攪拌する。AcOHを用いて反応混合物を中和し、減圧下で、溶媒を取り除いた。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(DCM、20%MeOH/DCM)によって精製し、無色の液体(1.98g、84%)として必要な産物320を得た。MS: C₁₂H₂₃N₃O₈に対する分子量計算値: 337.15; 実測値: 360.15(M+Na)。

【化63】

スキーム15



【0511】

329の調製：

mPEG₂₀₀₀(20.00g、10.00ミリモル)およびTEA(4.08mL、3等量)を、DCM(100mL)において溶解し、氷浴で冷却したそれに対してDCM(20mL)におけるトリルクロライドの溶液(3.00g、1.45等量)を滴加し、混合物を一晩攪拌した。DCMを用いて希釈し、水および飽和炭酸水素ナトリウム溶液を用いて洗浄した。硫酸ナトリウム上乾燥し、真空中で溶媒を取り除き、必要なトリレート328を得た。トリレートおよびNaN₃(25g)をDMFに取り入れ、耐圧瓶において一晩100℃で熱した。RBフラスコへ移し、減圧下で溶媒を取り除いた。DCMを用いて倍散し、DCMを用いて洗浄した焼結漏斗を介してろ過した。粗産物をシリカゲルクロマトグラフィーによって精製し、白い粉末(18.10g、82%)として必要な産物を得た。

【0512】

330の調製：

mPEG₂₀₀₀327(20.00g、10.00ミリモル)をDMF(100mL)において溶解し、氷浴で冷却した。NaH(1.00g、過剰、60%)を添加し、混合物を30分間攪拌した。臭化プロパルギル(3.00g、1.5等量)およびTBAI(2.00g)を添加し、混合物を一晩攪拌した。氷水を用いて反応を停止し、減圧下で溶媒を取り除いた。DCMにおける残渣を溶解し、水を用いて洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥した。粗産物をシリカゲルクロマトグラフィーによって精製し、薄茶色の固体として必要な産物330(18.20g、81%)を得た。

10

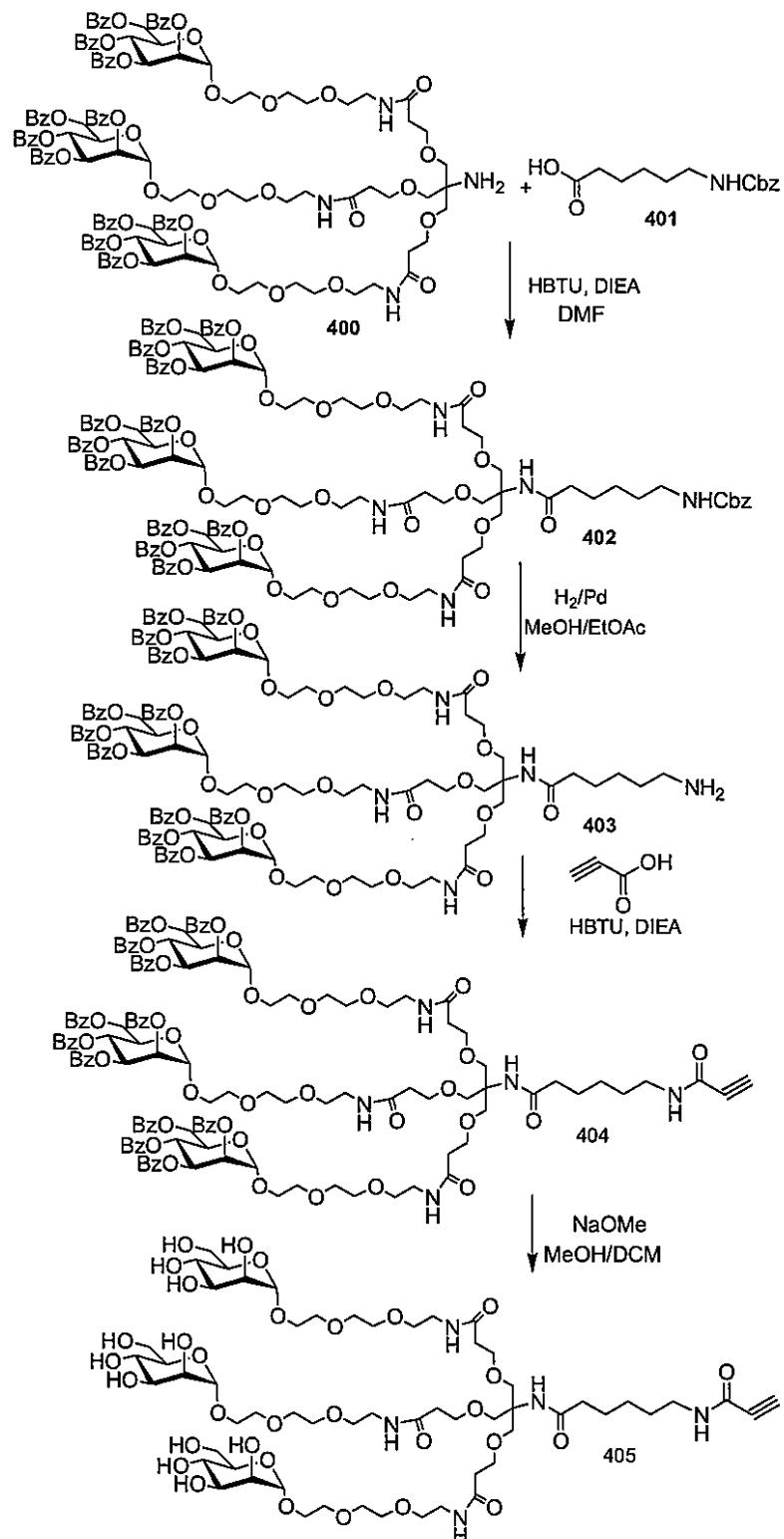
20

30

40

【化64】

スキーム16



【0513】

402の調製：

Zアミノカプロン酸401(1.00g、3.76ミリモル)を、DMF(50mL)において溶解する。HBTU(1.43g、3.76ミリモル)およびDIPEA(3.26mL、5.00等量)をそれに添加し、混合物を数分攪拌する。50mLのDMFにお

いてマンノースアミン 400 (7.41 g、3.00 ミリモル) を溶解し、それを反応混合物に添加し、48時間攪拌する。溶媒を真空中で取り除き、残渣を DCM において溶解し、NaHCO₃ 溶液および水を用いて洗浄する。無水硫酸ナトリウム上で乾燥し、溶媒を減圧下で取り除く。化合物をシリカゲルクロマトグラフィーによって精製し、必要な化合物 402 を得る。

【0514】

403 の調製：

メタノール (50 mL) に化合物 402 (3.00 g、1.10 ミリモル) を取り入れ、1 mL の酢酸を添加する。Pd/C (0.300 g、10 wt% Degussa 湿式) を使用して、バルーン圧下で水素化し、化合物 403 を得る。

10

【0515】

404 の調製：

化合物 403 (2.00 g、0.776 ミリモル) を、ペプチドの共役状況下で、プロピノン酸と反応させ、化合物 404 を得る。

【0516】

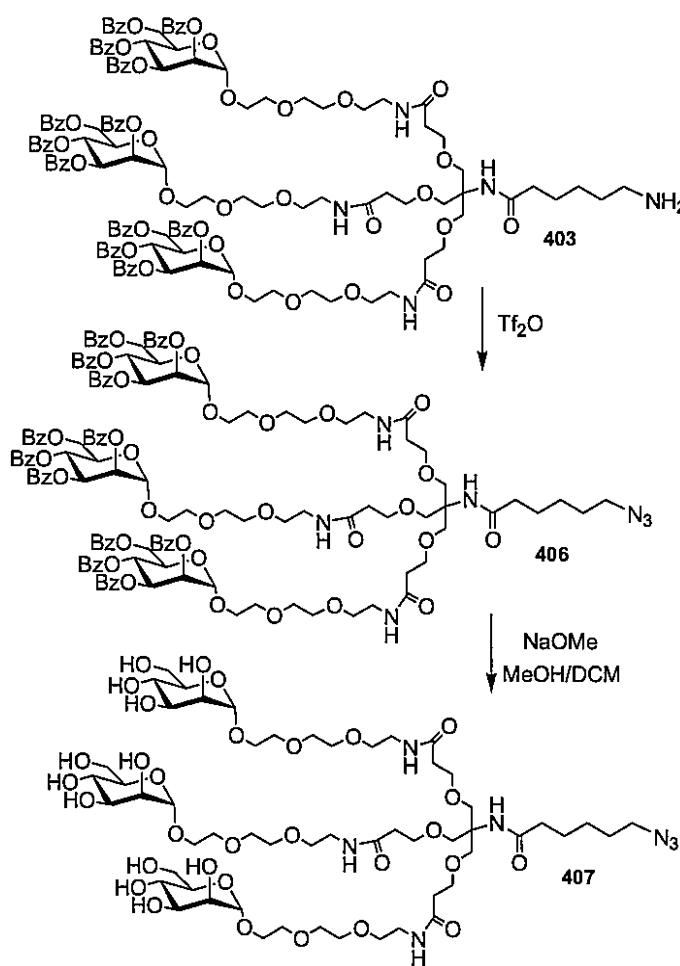
405 の調製：

化合物 404 (1.00 g、0.380 ミリモル) を MeOH (10 mL) において溶解し、ナトリウムメトキシド溶液 (10 mL、MeOH における 0.5 M) をそれに添加し、混合物を一晩攪拌する。反応を TLC により監視し、混合物によって CM セファロース樹脂のカラムを通過する。MeOH を用いて洗浄し、溶媒を真空中で取り除き、産物 405 を得る。

20

【化65】

スキーム 17



30

40

50

50

【 0 5 1 7 】

4 0 6 の調製 :

化合物 4 0 3 (2 . 0 0 g、 0 . 7 7 6 ミリモル) を、 トリフリック無水物およびアジ化ナトリウムと反応させ、 化合物 4 0 6 を得る。

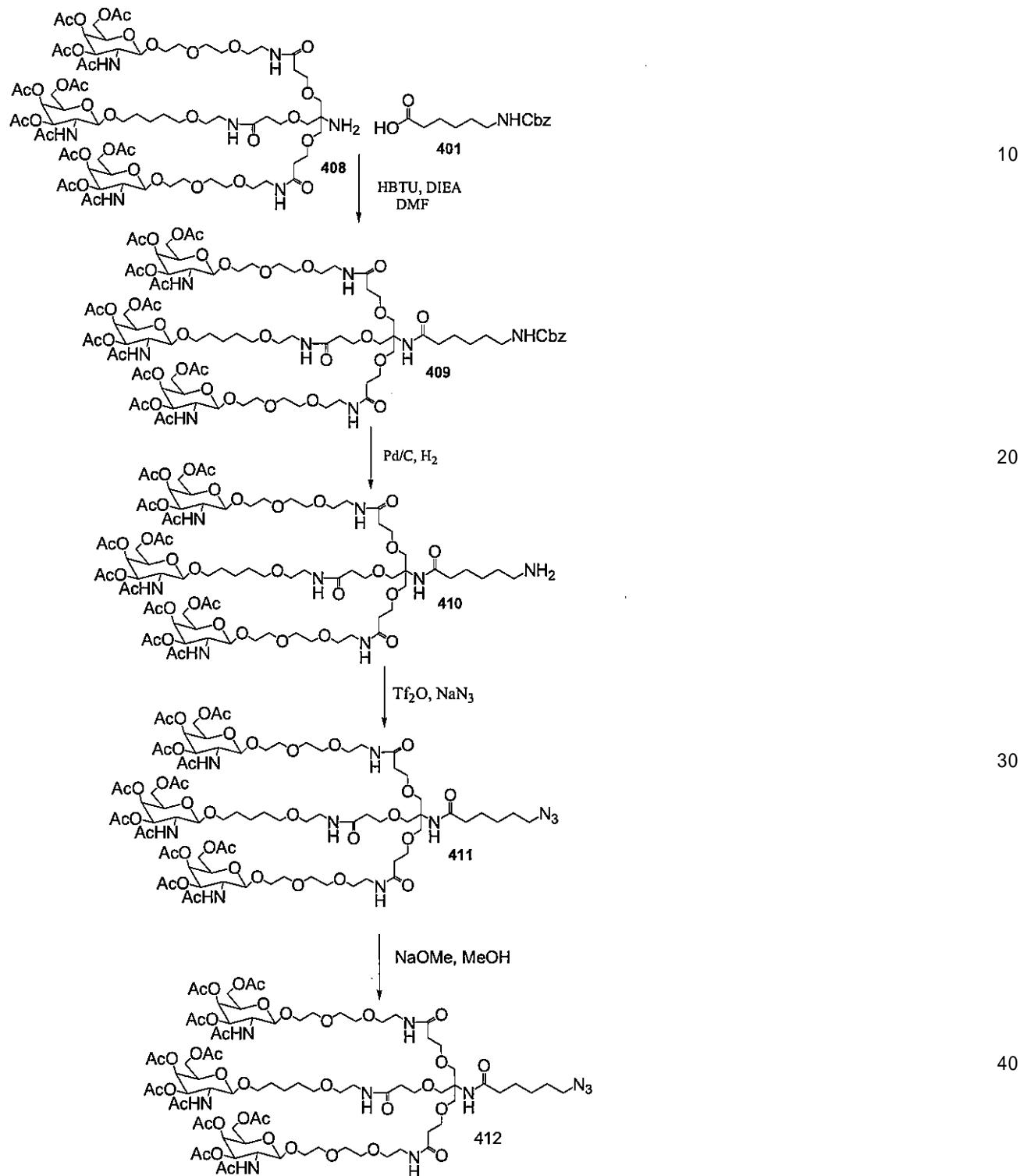
【 0 5 1 8 】

4 0 7 の調製 :

化合物 4 0 6 (1 . 0 0 g、 0 . 3 8 4 ミリモル) を M e O H (1 0 m L) において溶解し、 ナトリウムメトキシド溶液 (1 0 m L 、 M e O H における 0 . 5 M) をそれに添加し、 混合物を一晩攪拌する。 反応を T L C により監視し、 混合物によって C M セファロース樹脂のカラムを通過する。 M e O H を用いて洗浄し、 溶媒を真空中で取り除き、 産物 4 0 7 を得る。

【化66】

スキーム18



【0519】

409の調製：

Zアミノカプロン酸401(2.19g、8.25ミリモル)を、DMF(50mL)において溶解した。HBTU(3.13g、8.25ミリモル)およびDIEA(7.19mL、5.00等量)をそれに添加し、混合物を数分攪拌した。GalNAcアミン408(10.10g、5.52ミリモル)をDMFの50mLにおいて溶解し、反応混合

50

物に対して添加し、48時間攪拌した。TLCおよびMALDIを産物形成に対して確認した。溶媒を真空中で取り除き、残渣をDCMにおいて溶解し、NaHCO₃溶液および水を用いて洗浄した。無水硫酸ナトリウム上で乾燥し、溶媒を減圧下で取り除いた。残渣を(酢酸エチルを用いて溶出し、後に5~15%MeOH/DCMの勾配溶出が続く)シリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、オフホワイトの固体(6.20g、57%)として必要な化合物409を得る。¹H NMR(DMSO-d₆ 400MHz)=7.89(t, J=5.12Hz, 3H)、7.80(d, J=9.27Hz, 3H)、7.15-7.40(m, 7H)、5.20(d, J=3.41Hz, 3H)、4.98(s, 2H)、4.95(dd, J=3.40, 11.30Hz, 3H)、4.54(d, J=8.64Hz, 3H)、3.72-4.10(m, 12H)、3.10-3.65(m, 52H)、2.28(t, J=6.20Hz, 6H)、2.09(s, 9H)、1.98(s, 9H)、1.88(s, 9H)、1.76(s, 9H)、1.09-1.30(m, 6H)。MS: C₈H₁₃N₈O₄に対する分子量計算値: 1964.88; 実測値: 1987.75(M+Na)。

【0520】

410の調製:

化合物409(6.10g、3.10ミリモル)をメタノール(50mL)において溶解し、それに1mLの酢酸を添加した。反応混合物を脱気し、Pd/C(0.700g、10wt%Degussa湿式)を溶液に添加し、36時間バルーン圧下で水素化した。反応混合物をセライトの小さなパッドを介してろ過し、MeOHを用いて洗浄した。濾液へ、1.25等量のTFAおよびトルエン(50mL)を添加し、溶媒を減圧下で取り除いた。残渣をトルエンを用いて2回同時蒸発し、オフホワイトの固体(6.10g、定量的)として必要な化合物410を得るために、高真空中で一晩乾燥した。この化合物をこれ以上精製なしに、次の反応のためにそれ自体で使用する。MS: C₇H₁₃N₈O₄に対する分子量計算値: 1830.84; 実測値: 1853.81(M+Na)。

【0521】

411の調製:

化合物410(2.00g、1.09ミリモル)を、Tf₂Oおよびアジ化ナトリウムと反応させ、化合物411を得る。

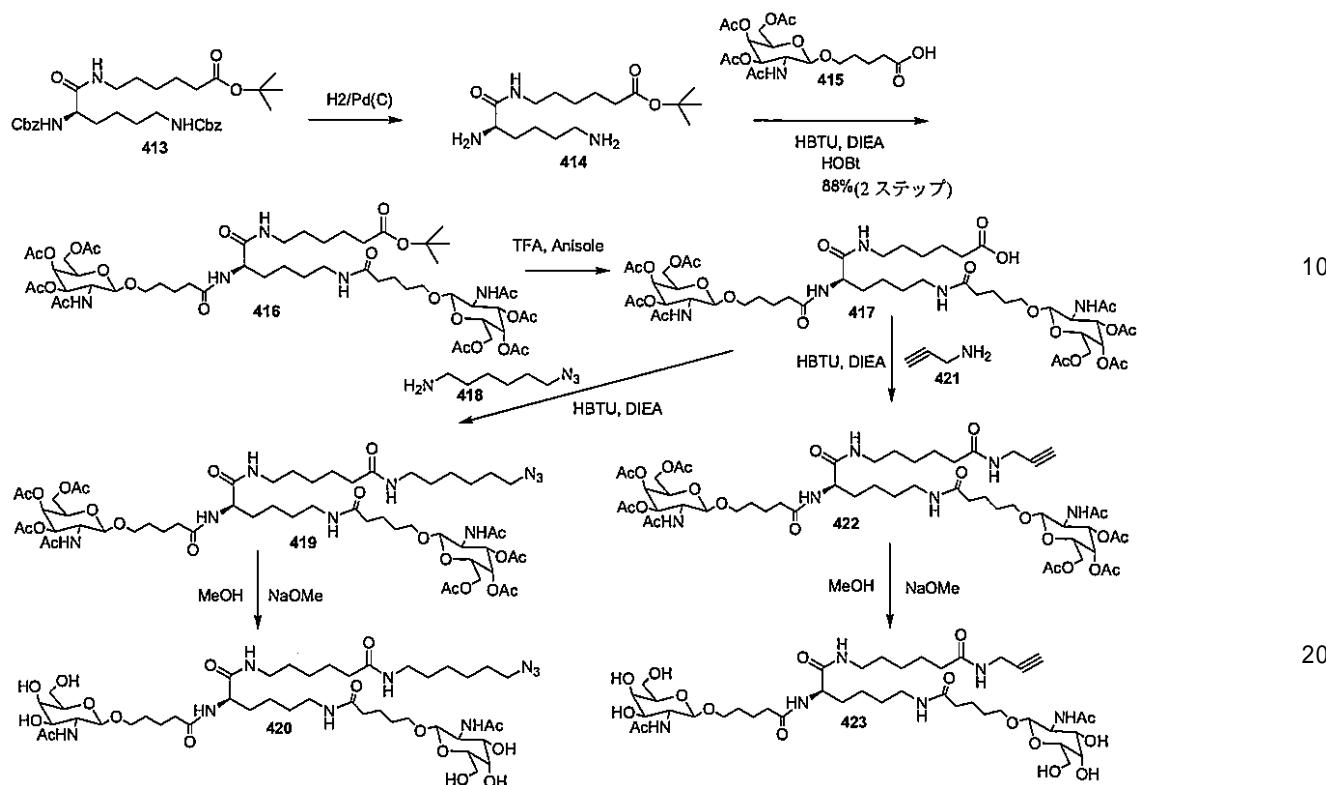
【0522】

412の調製:

化合物411(1.00g、0.539ミリモル)をMeOH(10mL)において溶解し、ナトリウムメトキシド溶液(10mL、MeOHにおける0.5M)をそれに添加し、混合物を一晩攪拌する。反応をTLCにより監視し、混合物によってCMセファロース樹脂のカラムを通過する。MeOHを用いて洗浄し、溶媒を真空中で取り除き、産物412を得る。

【化67】

スキーム19



【0523】

414の調製：

化合物413(3.30g、5.65ミリモル)をMeOH/EtOAcの混合物(60mL、1:2)において溶解し、Pd/C(500mg、Degussa湿式)を添加し、一晩バルーン圧下で水素化した。反応混合物を、セライトの小さなパッドを介してろ過し、溶媒を取り除き、必要な産物414を得る。粗産物を追加の精製なしに、次の反応のために使用した。MS: C₁₆H₃₃N₃O₃に対する分子量計算値: 315.25；実測値: 316.22(M+H)。

【0524】

416の調製：

GalNAc酸415(5.81g、12.99ミリモル)およびHBTU(4.976g、13.02ミリモル)をDMF(50mL)において溶解し、DIEA(6.79mL、5等量)をそれに添加し、混合物を数分間攪拌した。DMFにおいて化合物414の溶液をそれに添加し、一晩室温において攪拌した。溶媒を真空中で取り除き、残渣をDCMにおいて溶解し、NaHCO₃溶液および水を用いて洗浄した。無水硫酸ナトリウム上で乾燥し、溶媒を減圧下で取り除いた。残渣を(酢酸エチルを用いて溶出し、後に3~15%MeOH/DCMの勾配溶出が続く)シリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、オフホワイトの固体(5.25g、79%)として必要な化合物416を得た。MS: C₅₄H₈₇N₅O₂₃に対する分子量計算値: 1173.58；実測値: 1196.60(M+Na)。

【0525】

417の調製：

化合物416(5.15g、4.40ミリモル)をDCM(30mL)において溶解し、TFA(DCMの20mLにおける30mL)をそれに添加し、2時間室温において攪拌した。TLCを確認し、溶媒を取り除いた。トルエンを用いて2回同時蒸発し、高真空下で乾燥した。粗産物を次の反応で使用した。MS: C₅₀H₇₉N₅O₂₃に対する分

子量計算値 : 1117.52 ; 実測値 : 1140.55 (M + Na)。

【 0 5 2 6 】

419 の調製：

HBTU 媒介ペプチド共役を使用して化合物 419 を 418 および 417 から調製する。

〔 0 5 2 7 〕

420 の調製：

化合物419(1.00g、0.805ミリモル)をMeOH(10mL)において溶解し、ナトリウムメトキシド溶液(10mL、MeOHにおける0.5M)をそれに添加し、混合物を一晩攪拌する。反応をTLCにより監視し、混合物によってCMセファロース樹脂のカラムを通過する。MeOHを用いて洗浄し、溶媒を真空中で取り除き、産物420を得る。

【 0 5 2 8 】

422 の調製・

HBTU 媒介ペプチド共役を使用して化合物 422 を 421 および 417 から調製する。

[0 5 2 9]

423 の調製・

化合物 4-2-2 (1.00 g, 0.866 ミリモル) を MeOH (10 mL) において溶解し、ナトリウムメトキシド溶液 (10 mL, MeOH における 0.5 M) をそれに添加し、混合物を一晩攪拌する。反応を TLC により監視し、混合物によって CM セファロース樹脂のカラムを通過する。MeOH を用いて洗浄し、溶媒を真空中で取り除き、産物 4-2-3 を得る。

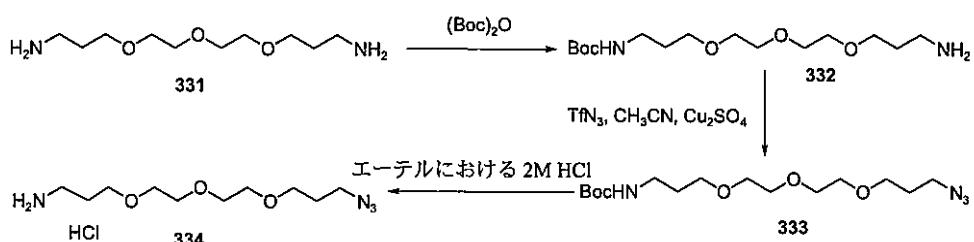
【 0 5 3 0 】

実施例8 クリック化学に対する葉酸の構成要素

葉酸共役体を含有するアジド官能基を合成するために、以下の戦略を使用した。スキーム 1-0 に示される通り、市販のジアミン 3-3-1 から開始し、アジドアミンテザー 3-3-4 を合成した。

【化 6 8】

スキーム2.0



【 0 5 3 1 】

アミン 3 3 2 の合成：

ジオキサン(1L)における(Boc)₂O(66g、0.303モル)の溶液、ジオキサン(1L)におけるジアミンの冷却した(0)溶液(400g、1.82モル)に4時間以上液滴の様式で添加し、混合物を室温において一晩攪拌した。水系後処理後、カラムクロマトグラフィーによって純粋なモノBocアミン332(83g、86%)を得た。MS: C₁₅H₃₂N₂O₅に対する分子量計算値: 320.42; 実測値: 321.41(MH⁺)。

[0 5 3 2]

アジ化物 3-3-3 の合成：

トリフリックアジド原液を Tetrahedron Letters 47 (2006) 2382-2385 において報告される通りに調製した。アミン (0.96 g, 3 ミリモル)

ル)、炭酸水素ナトリウム(0.85 mg、10ミリモル)、および硫酸銅(II)五水和物(22 mg、0.1ミリモル)を水(3 mL)において溶解した。トリフリックアジド原液(5 mL)を添加し、次にメタノール(20 mL)を追加し、均一系を得た。 TLC および MS が出発アミンの完全消失を示した後、青い混合物を30分間攪拌した。反応混合物を回転蒸発器中に濃縮し、シリカゲル(溶出剤：ジクロロメタンメタノール)上で、残渣をクロマトグラフィーによって精製し、油として純粋なアジ化物333(1 g、96%)を得た。MS : C₁₅H₃₀N₄O₅に対する分子量計算値：346.42；実測値：347.41(MH⁺)。¹HNMR(CDCl₃、400 MHz) = 4.68(b s, 1 H)、3.40-3.30(m, 12 H)、3.16(t, J = 6.4 Hz, 2 H)、3.00-2.95(m, 2 H)、1.68-1.54(m, 4 H)、1.04(s, 9 H)。 10

【0533】

334の合成：

アジ化物333(1 g、2.88ミリモル)をエタノール(10 mL)において溶解し、エーテルにおけるHC1の2M溶液をこれに添加し、混合物を室温において一晩攪拌した。MSは、出発物質の不在を示した。反応混合物を濃縮した結果、得られた油を、追加の精製なしに次の反応のために、それ自体で使用した。MS : C₁₀H₂₃ClN₄O₃に対する分子量計算値：246.17；実測値：247.17(MH⁺)。¹HNMR(DMSO-d₆、400 MHz) = 8.96(b s, 1 H)、7.92(b s, 2 H)、3.52-3.40(m, 12 H)、3.37(t, J = 6.8 Hz, 2 H)、2.85-2.77(m, 2 H)、1.81-1.70(m, 4 H)。 20

【0534】

市販のブテロイン酸335を、t-ブチルジフェニルシリル基を用いて一過性に保護し、無水イソ酪酸を用いて処理し、次に酸性後処理を行い、グルタミン酸のメチルtブチルエステルとの共役際に、完全保護葉酸338を得た環外アミン保護ブテロイン酸336を得た。TFAとtブチルエステルとの加水分解によって、アジドアミンテザー334と共に得た酸339を得て、油として共役の産物340を得た。水酸化リチウム、その後にメチルアミンを用いたこの化合物の処理によって、アジド化合物341を得た。

【0535】

336の合成：

ブテロイン酸の懸濁液(25 g、61.2ミリモル)および無水ピリジン(400 mL)におけるDMAP(11.25 g、92ミリモル)へ、TB DPSクロライド(42 g、153ミリモル)を添加した。無水イソ酪酸(14.6 g、92ミリモル)を添加し混合物を少し温めた後、反応混合物を室温において30時間攪拌した。追加の60 mLのピリジンも添加し、反応混合物を室温において一晩攪拌した。ピリジンおよび他の揮発物質を回転蒸発器中に濃縮した後、反応混合物は均一になった。残渣を、EtOAc(1 L)および酢酸(100 mL)および水(500 mL)を用いて24時間攪拌した。したがって、得られたスラリーをろ過し、残渣を水(500 mL)、EtOAc(1 L)を用いて洗浄し、乾燥し、白い固体(26.1 g、89%)として純粋な産物を得た。¹HNMR(DMSO-d₆、400 MHz) = 8.87(s, 1 H)、7.95(d, J = 8.6 Hz, 2 H)、7.67(d, J = 8.6 Hz, 2 H)、5.21(s, 2 H)、2.79-2.74(m, 1 H)、1.12(d, J = 6.83 Hz, 6 H)、¹³C NMR(DMSO-d₆) = 180.72、166.49、159.25、149.87、147.68、142.69、136.34、134.45、130.54、129.16、128.86、127.49、34.96、33.09、26.52、18.88、18.74。¹⁹F NMR(DMSO-d₆) - - - 6.4.32. MS。C₂₀H₁₇F₃N₆O₅に対する分子量、計算値：478.12、実測値：479.12(MH⁺)。 40

【0536】

338の合成：

30

40

50

代表的な手順において、ブテロイン酸前駆物質 336 (2.4 g、5ミリモル)を、無水 D M F (20 mL)において溶解し、H B T U (1.9 g、1等量)後にD I E A (1 mL、5等量)を添加し、20分間攪拌した。D M F (6 mL)における溶液として、アミンハイドロクロライド 337 (1.2 g、1等量)を、この反応混合物に添加した。反応をT L Cで監視した (8%MeOH / D C M、P M A染色)。反応混合物のT L Cは、反応の完了を示した。反応混合物を、活発に攪拌しながら氷にゆっくり注いだ。沈殿産物をろ過し、白い固体として産物 338 (産生量 = 2.85 g、86%)を得た。¹H N M R (D M S O - d₆、400 MHz) = 12.33 (s, 1 H)、11.94 (s, 1 H)、8.88 (s, 1 H)、8.82 (d, J = 7.3 Hz, 1 H)、7.90 (d, J = 8.6 Hz, 2 H)、7.68 (d, J = 8.4 Hz, 2 H)、5.22 (s, 2 H)、4.46 - 4.40 (m, 1 H)、3.62 (s, 3 H)、2.86 - 2.73 (m, 1 H)、2.32 (t, J = 7.4 Hz, 2 H) 2.05 - 1.90 (m, 2 H)、1.35 (m, 9 H)、1.12 (d, J = 6.8 Hz, 6 H)。¹³C N M R (D M S O - d₆) = 180.75、172.13、171.45、165.64、159.10、154.80、149.97、149.79、147.72、141.75、134.15、130.53、128.70、128.49、117.50、114.64、79.79、51.96、51.91、34.96、31.22、27.68、25.71、18.72。M S . C₃₀H₃₄F₃N₇O₈に対する分子量、計算値：677.63、実測値：676.72 (M - H⁻)。

【0537】

10

20

339の合成：

エステル 338 (2 g、2.9ミリモル)を、ジクロロメタンにおける20 mLの50%T F Aにおいて溶解し、T L Cが発生エステルの完全消失を示した後、溶液を室温において30分間攪拌した。反応混合物を濃縮し、残渣をC H₂C l₂ : ヘキサン (2 : 3)から結晶化し、結晶化した産物をろ過し、乾燥し、オフホワイトの粉末として純粋な産物 339 (1.76 g、96%)を得た。¹H N M R (D M S O - d₆、400 MHz) = 12.32 (bs, 1 H)、11.94 (s, 1 H)、8.88 (s, 1 H)、8.84 (d, J = 7.4 Hz, 1 H)、7.90 (d, J = 8.3 Hz, 2 H)、7.69 (d, J = 8.3 Hz, 2 H)、5.22 (s, 2 H)、4.45 - 4.41 (m, 1 H)、3.62 (s, 3 H)、2.78 - 2.75 (m, 1 H)、2.35 (t, J = 7.4 Hz, 2 H) 2.07 - 1.92 (m, 2 H)、1.12 (d, J = 6.8 Hz, 6 H)。¹³C N M R (D M S O - d₆) = 180.77、173.70、172.19、165.70、159.21、155.54、149.93、149.84、147.75、141.78、134.18、130.53、128.71、128.49、117.51、114.64、53.98、52.06、51.93、34.97、30.11、25.68、18.73。M S . C₂₆H₂₆F₃N₇O₈に対する分子量、計算値：621.18、実測値：620.18 (M - H⁻)。

30

【0538】

340の合成：

338の合成で使用した同様の手順を使用したアミン 334 (0.6 g)と酸 339 (1.2 g)との共役によって、薄黄色の泡として共役アジ化物 340 (1.68 g、93%)を得た。¹H N M R (D M S O - d₆、400 MHz) = 12.34 (s, 1 H)、11.95 (s, 1 H)、8.89 (s, 2 H)、7.92 (d, J = 8.4 Hz, 2 H)、7.81 (m, 1 H)、7.70 (d, J = 8.4 Hz, 2 H)、5.22 (s, 2 H)、4.40 - 4.34 (m, 1 H)、3.62 (s, 3 H)、3.50 - 3.31 (m, 15 H)、3.09 - 3.00 (m, 2 H)、2.80 - 2.72 (m, 1 H)、2.20 (t, J = 7.4 Hz, 2 H) 2.10 - 1.89 (m, 2 H)、1.76 - 1.54 (m, 4 H)、1.12 (d, J = 6.8 Hz, 6 H)。M S . C₃₆H₄₆F₃N₁₁O₁₀に対する分子量、計算値：849.81、実測値：850.2 (M H⁺)。

40

50

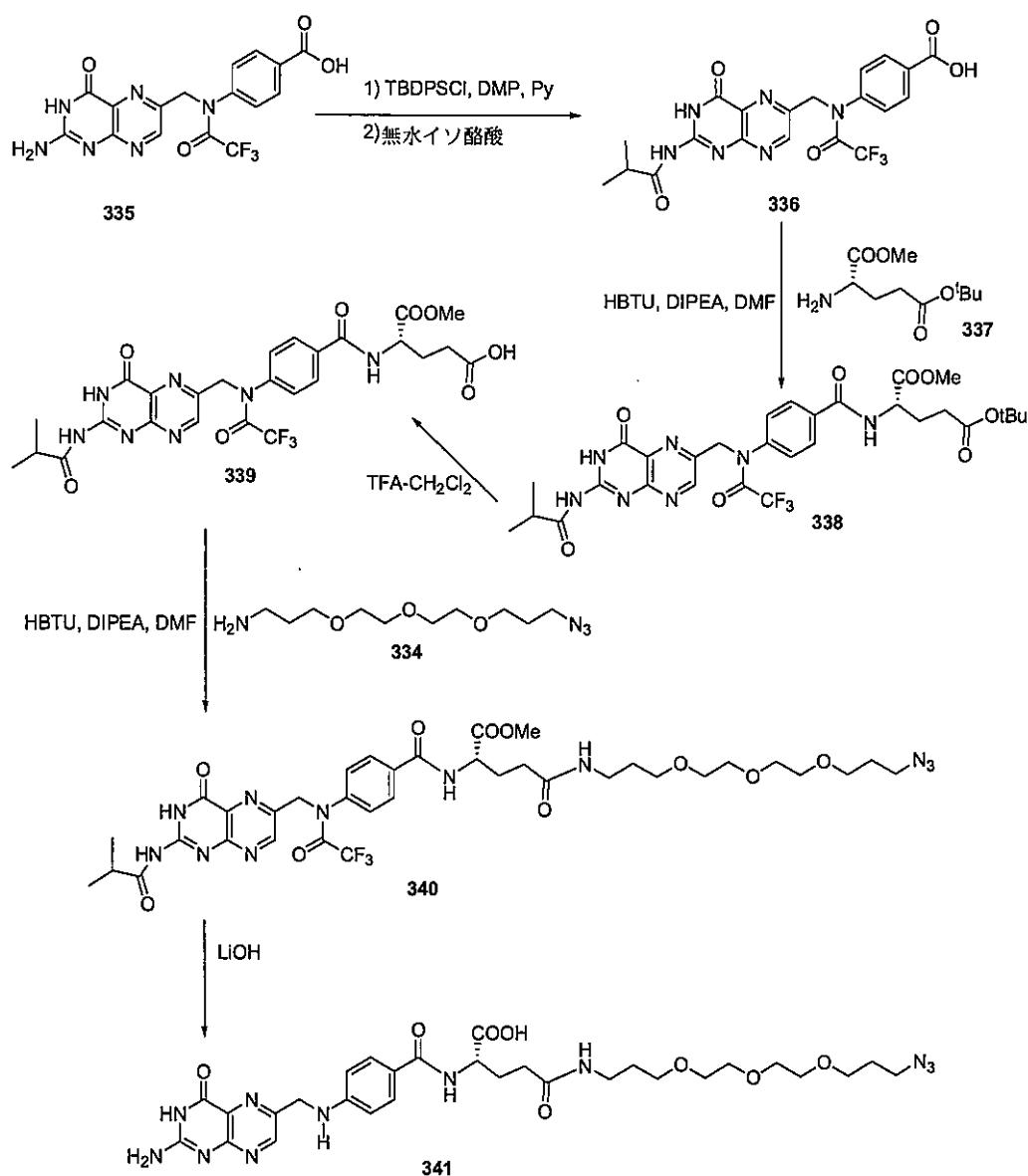
[0 5 3 9]

3.4.1 の合成：

アジ化物 340 (1 g) を THF (20 mL) において溶解し、水酸化リチウムの水溶液 (2 mL の水において 100 mg) を添加し、MS が SM の完全消失を示した後、溶液を室温において 4 時間攪拌した。反応混合物を pH 5 に酢酸を使用して酸性化し、RM を酢酸エチル (100 mL) を用いて希釈した。沈殿した産物をろ過し、水および酢酸エチルを用いて洗浄し、真空中で 40 °C で一晩乾燥し、オレンジ色の固体として純粋なアジ化物 341 (0.455 g 55%) を得た。¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) = 8.59 (s, 1 H)、7.85 (bs, 1 H)、7.72 (bs, 1 H)、7.56 (d, J = 8.4 Hz, 2 H)、6.88 (bs, 1 H)、6.65 (d, J = 8.4 Hz, 2 H)、4.45 (s, 2 H)、4.00 - 4.02 (m, 1 H)、3.50 - 3.33 (m, 14 H)、3.04 - 3.00 (m, 2 H)、2.07 - 1.83 (m, 4 H)、1.76 - 1.54 (m, 4 H)。MS. C₂₉H₃₉N₁₁O₈ に対する分子量、計算値: 669.69、実測値: 668.2 (M-H⁻)。

【化 6 9】

スキーム21

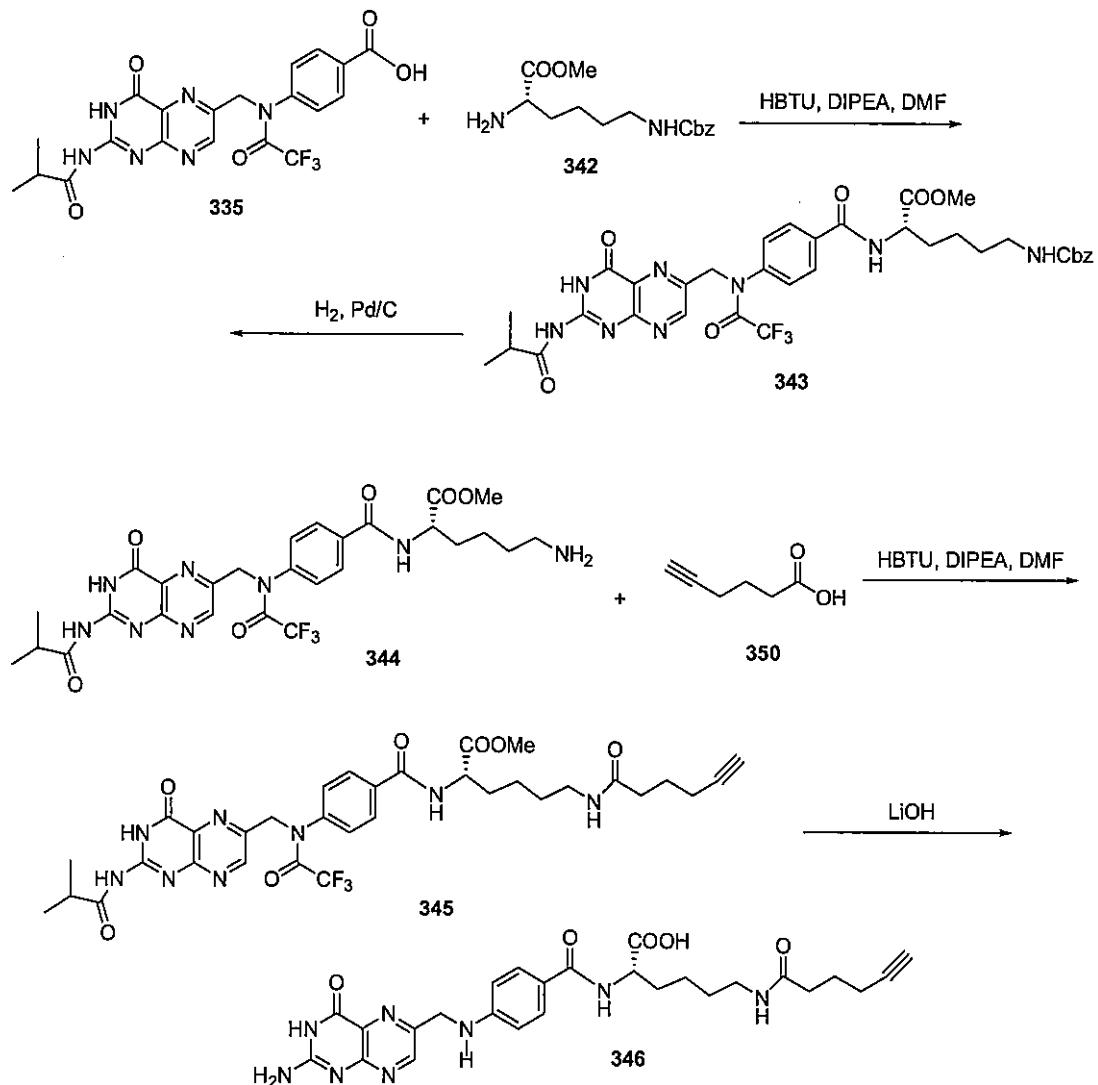


〔 0 5 4 0 〕

別の実施形態では、以下の通りに合成する葉酸を含有したアルキンを合成した。この場合、保護プロテオイン酸 335 を、保護リジン 342 と共に役し、Cbz 脱保護上にアミン 344 を得た共役産物 343 を得た。酸 350 とアミン 344 との共役によって、精製および脱保護によって以下に記載された通り産物 346 を得た後、共役産物 345 を得た。

【化70】

スキーム22



【0541】

343 の合成：

338 の合成のために使用した同様の手順を使用して、リジン誘導体 342 と酸 335 との共役によって、95% 産生量において白い固体として共役産物 343 を得た。

【0542】

344 の合成：

Pd/C を用いた水素化における化合物 343 において、黄色い固体として脱保護アミン 344 を得た。

【0543】

345 の合成：

338 の合成のために使用した手順を使用して、酸 350 とアミン 344 との共役によって、高い産生量で産物 345 を得た。

【0544】

346 の合成：

50

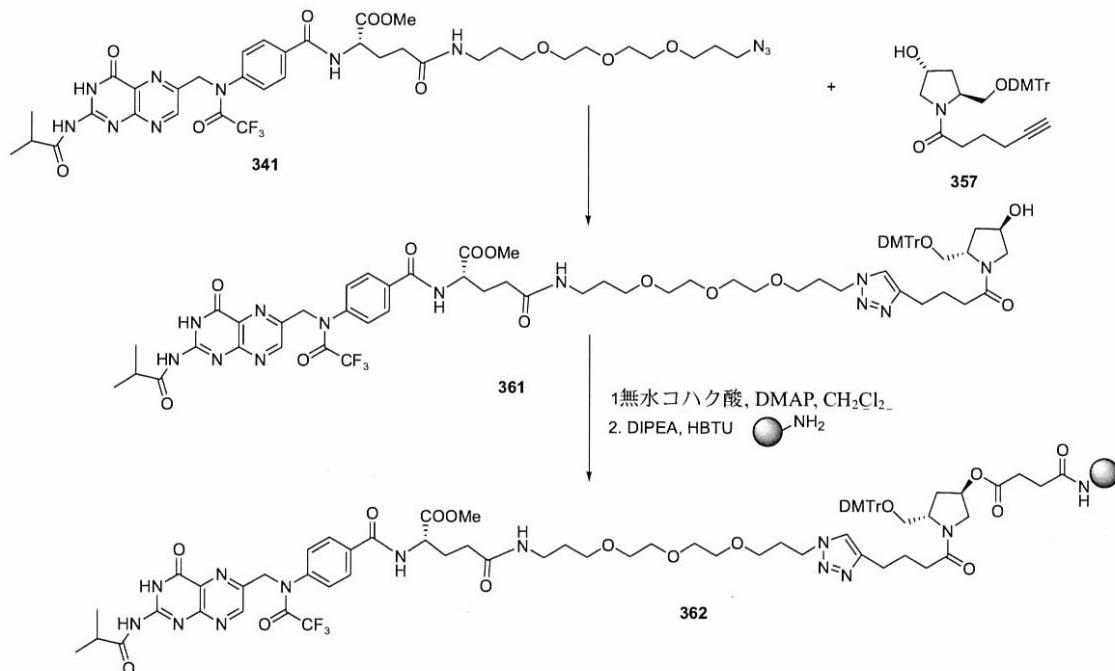
保護基の脱保護を、完全脱保護アルキン 346 を単離するために、341 の合成のために記載される同様の手順を使用して達成する。

【0545】

別の実施形態において、葉酸共役したオリゴ構成要素を以下の通りに合成する。構成要素 362 の合成を 115 と同様の手順を使用して実行し、アミダイトの合成を 121 の合成のために記載した通りに実行する。

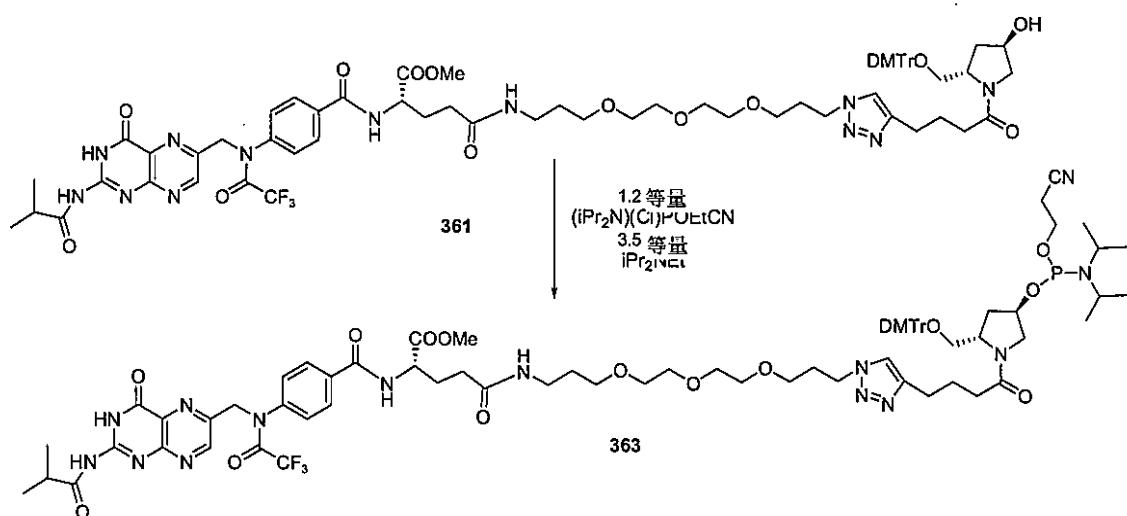
【化71】

スキーム23



【化72】

スキーム24



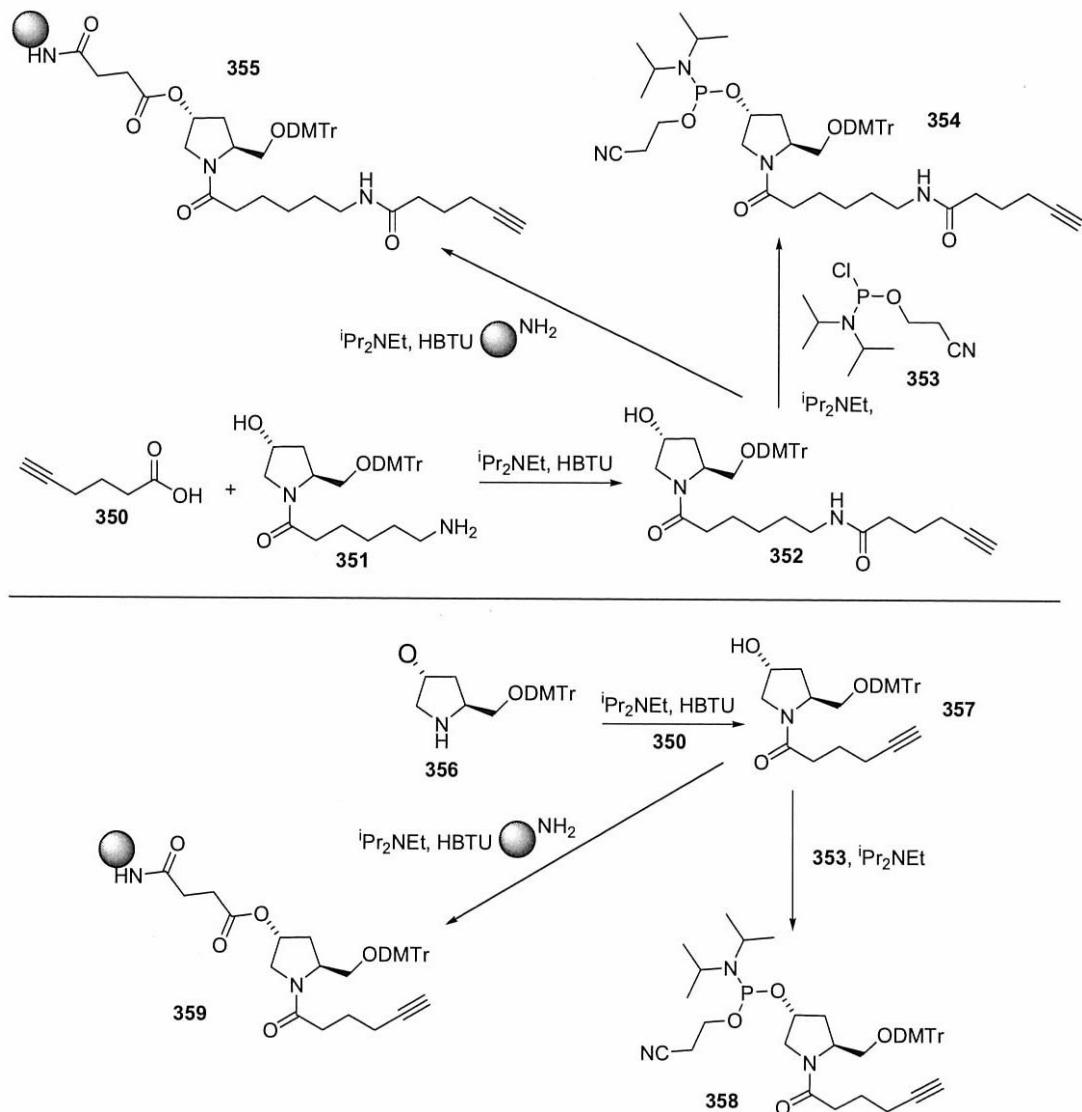
【0546】

実施例9. クリックケミストリーに対する脂質構成要素

以下のアセチリン CPG 支持体およびホスホラミダイトを通常の方法で調製した。

【化73】

スキーム25



【0547】

化合物352の調製

D C M (300mL)における化合物351(8g、1.5ミリモル)の溶液を、ヒュニッヒ塩基(2.5等量)、350(1.1等量)、およびHBTU(1.05等量)を用いて無事処理した。溶液を室温において一晩攪拌した。水系後処理、そしてカラムクロマトグラフィーによって純粋な化合物352を得た。産生量7.3g、78%。

【0548】

化合物357の調製

化合物357を、化合物352に対して記載したものと類似した手順を使用して調製した。

【0549】

化合物354の調製

化合物354を、化合物358に対して記載したものと類似した手順を使用して調製した。産生量5.7g、84%。

【0550】

化合物358の調製

ヒュニッヒ塩基(2等量)の溶液およびDCM(50mL)における化合物357(

10

20

30

40

50

5.0 g、9.7ミリモルをアミダイト試薬(1.5等量)を用いて処理した。10分間攪拌した後、TLCは完全反応を示した。水系後処理後、カラムクロマトグラフィーによって、純粋な化合物358(6.1 g、88%)を得た。

【0551】

化合物359の調製

DCM(150 mL)における化合物357(2.07 g、4.03ミリモル)の溶液をD MAP(3等量)、そして無水コハク酸(2等量)を用いて処理し、室温において一晩攪拌した。カラムクロマトグラフィーによって、¹H N E t₃塩として中間コハク酸(2.5 g、87%)を得た。DMF(200 mL)におけるこの中間体(2.49 g、4.07ミリモル)の溶液を、ヒューニッヒ塩基(5等量)、HBTU(1等量)、その後500、140 μモル/g CPG-NH₂(29.1 g、1等量)を用いて無事に処理した。1時間振とうした後、支持体をろ過によって採取した後、1時間振とうすることによって、Ac₂O/py(4:1、200 mL)を用いてキャップした。ろ過による採取、および真空中での乾燥後、22.4 gの359を得た。負荷は、90 μモル/gと計算された。

10

【0552】

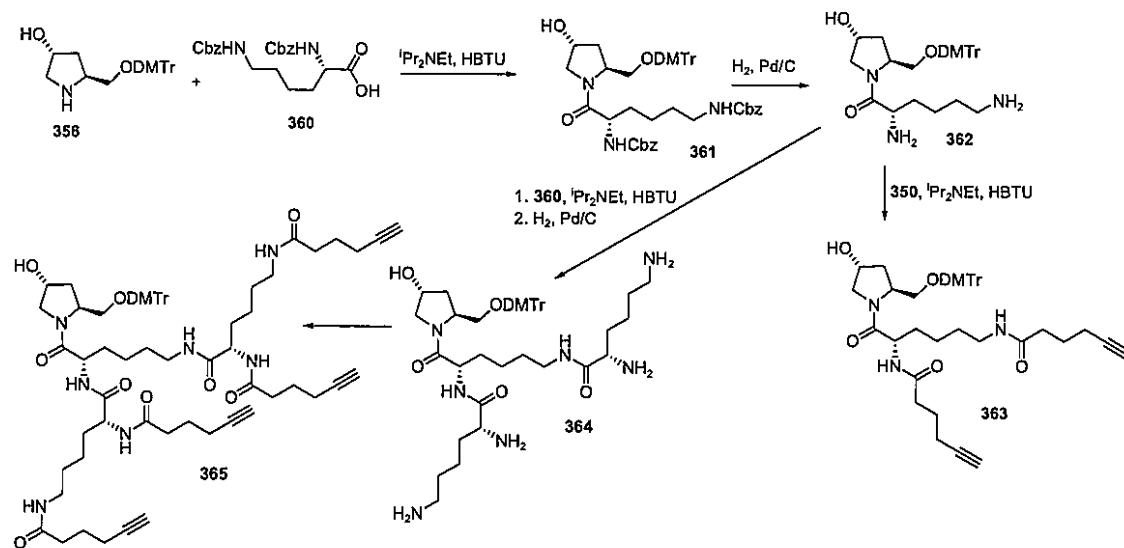
化合物355の調製

化合物354を、化合物359に対して記載したものと類似した手順を使用して調製した。負荷91 μモル/gを含む22.4 gを得た。

【化74】

20

スキーム26



30

【0553】

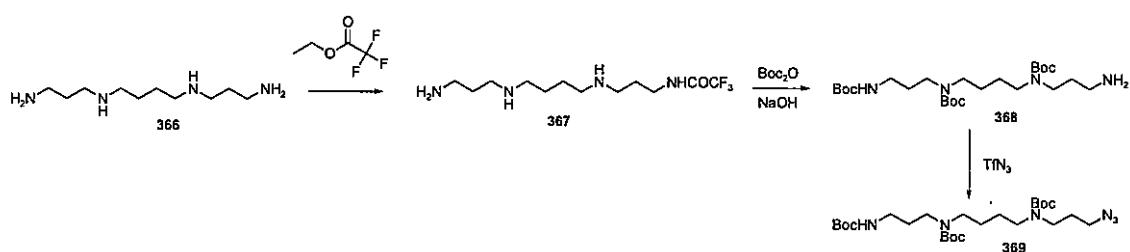
化合物361の調製

化合物361を、化合物352に対して記載したものと類似した手順を使用して調製した。

40

【化75】

スキーム27



10

【0554】

化合物368の調製

スペルミン366（6.0 g、30ミリモル）をMeOH（350 mL）において溶解し、-78℃で冷却し、トリフルオロ酢酸エチル（4.1 mL、35ミリモル）を添加した。溶液を室温に温め、1時間攪拌し、MeOH（30 mL）におけるBoc₂O（30.5 g、410ミリモル）の溶液を粗中間体367に滴加した。室温において16時間後、混合物を水性NaOHの追加によって加水分解した。EAへの抽出後、カラムクロマトグラフィーによって純粋な化合物3（5.7 g、38%）を得た。

【0555】

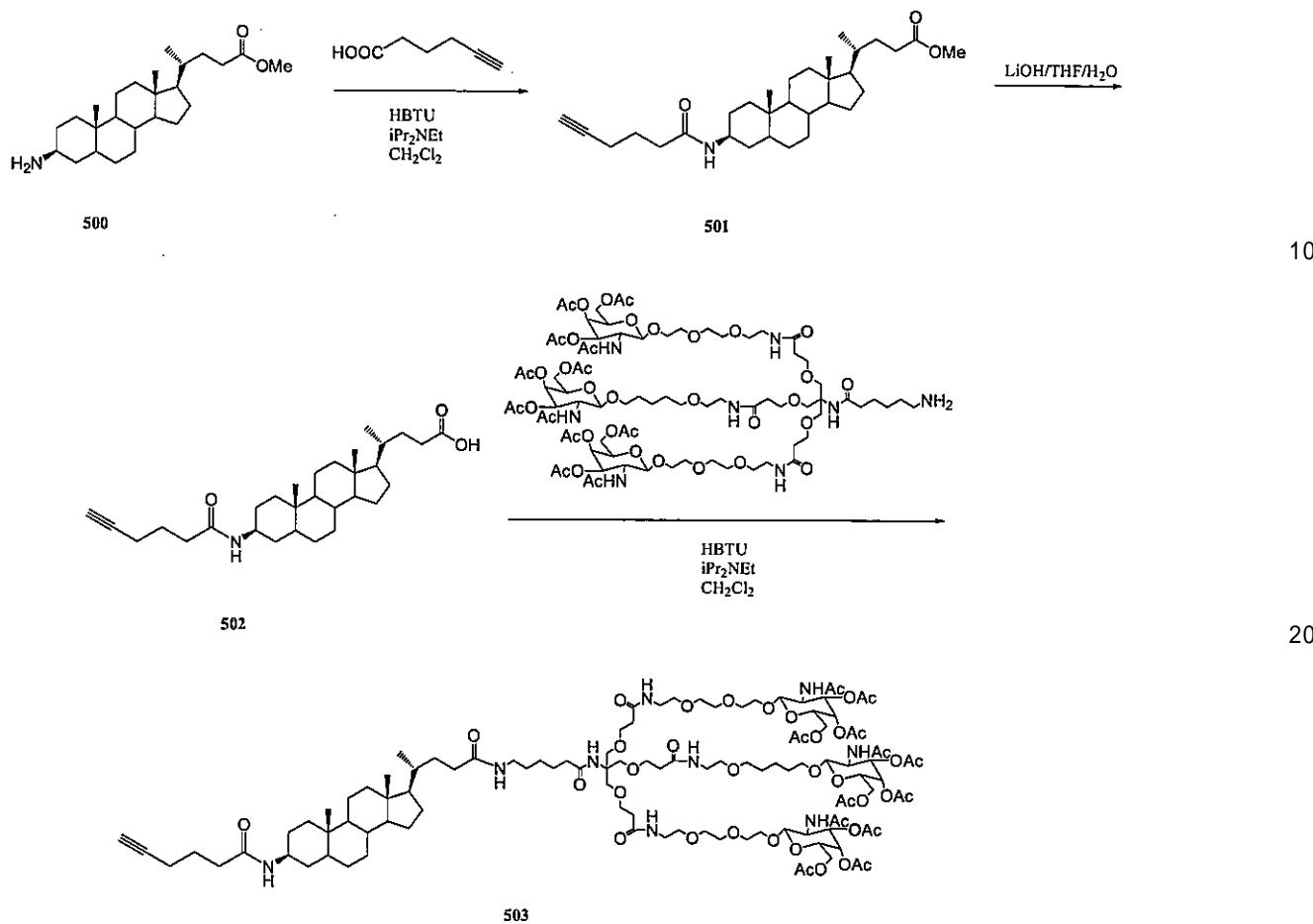
実施例10. クリックケミストリーに対する糖脂質構成要素

20

501を得るため、アセチレン単位を、ペプチド連鎖を通してリソコール酸誘導体500と共に役した。加水分解後、GalNAc単位を502と共に役し、503を得る。

【化 7 6】

スキーム28



【 0 5 5 6 】

化合物 5 0 1 :

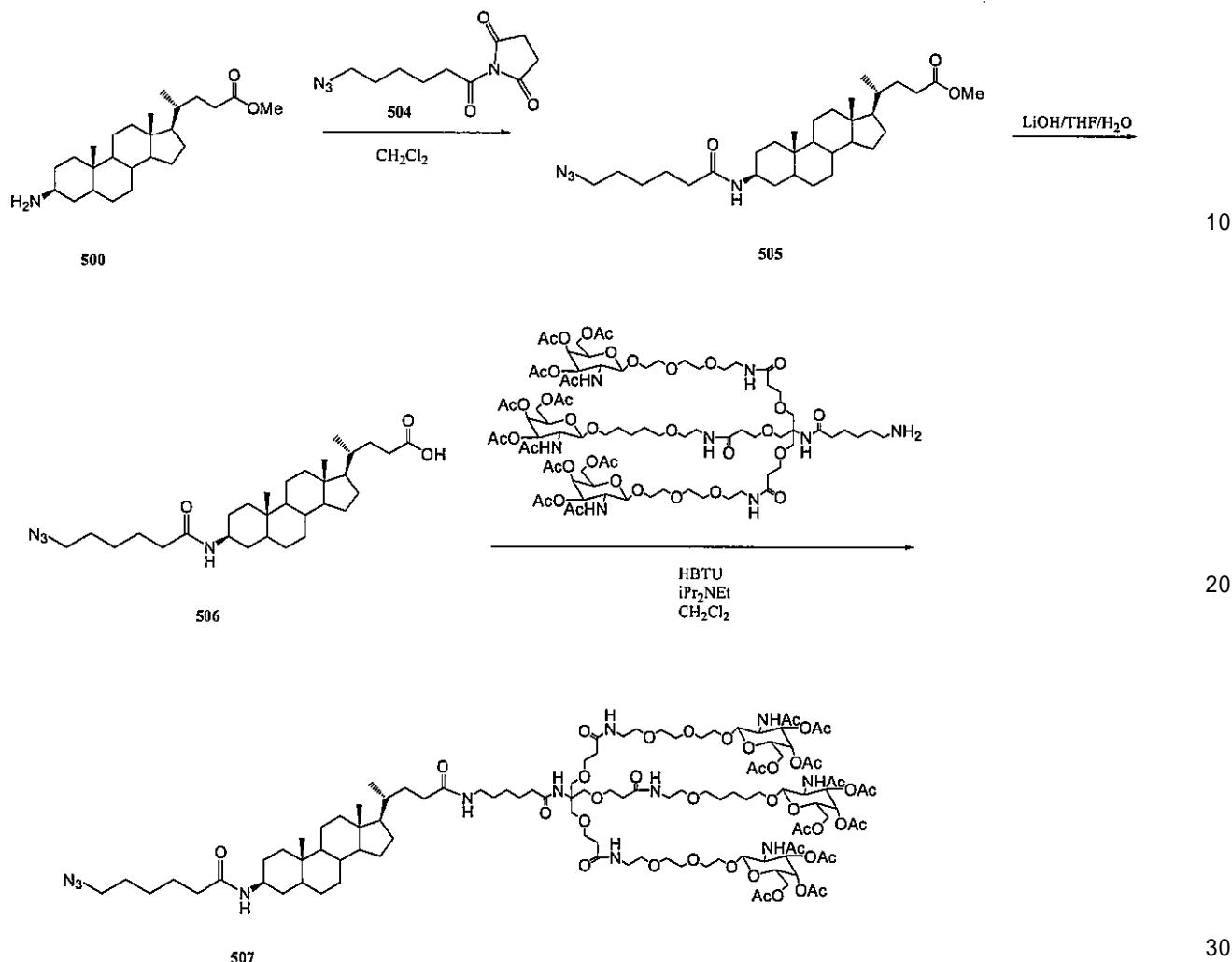
D M F (5 0 m L) における 5 - ヘキシン酸 (9 0 7 m g , 8 . 0 9 ミリモル) の溶液へ H B T U (3 . 0 7 g , 8 . 0 9 ミリモル) および i P r ₂ N E t (6 . 7 1 m L , 3 8 . 5 ミリモル) を添加した。5 分後、化合物 5 0 0 (3 . 0 g , 7 . 7 ミリモル) を溶液に添加した。反応混合物を室温において 1 4 時間攪拌した。E t ₂ O (3 0 0 m L) および N a H C O ₃ 水溶液 (1 5 0 m L) を用いて抽出後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : E t O A c = 2 : 1 , R _f = 0 . 3 7) による精製によって、化合物 5 0 1 (3 . 6 3 g , 7 . 5 0 ミリモル , 9 8 %) を得た。¹ H N M R (D M S O - d ₆ , 4 0 0 M H z) 7 . 7 0 (d , J = 7 . 2 H z , 1 H) , 3 . 9 5 - 3 . 9 7 (m , 1 H) , 3 . 5 7 (s , 3 H) , 2 . 7 8 (t , J = 2 . 6 H z , 1 H) , 0 . 8 6 - 2 . 3 4 (m , 4 0 H) , 0 . 6 1 (s , 3 H) 。¹ ³ C N M R (D M S O - d ₆ , 1 0 0 M H z) • 1 7 3 . 6 , 1 7 0 . 7 , 8 4 . 1 , 7 1 . 2 , 5 5 . 9 , 5 5 . 4 , 5 1 . 1 , 4 4 . 2 , 4 2 . 2 , 3 9 . 1 , 3 6 . 3 , 3 5 . 1 , 3 4 . 7 , 3 4 . 5 , 3 4 . 1 , 3 0 . 5 , 3 0 . 3 , 2 7 . 6 , 2 6 . 3 , 2 5 . 7 , 2 4 . 5 , 2 4 . 4 , 2 3 . 7 , 2 3 . 4 , 2 0 . 6 , 1 8 . 0 , 1 7 . 4 。 C ₃ ₁ H ₅ ₀ N O ₃ (M + H) ⁺ に対する分子量、計算値 4 8 4 . 3 8 、実測値 4 8 4 . 3 。

【 0 5 5 7 】

市販のアジ化物単位 504 を、リソコール酸誘導体 500 と共に役し、505を得た。加水分解後、506 によって GalNAc 単位と共に役し、アシド基 507 を含有する糖脂質分子を得るであろう。

【化77】

スキーム29

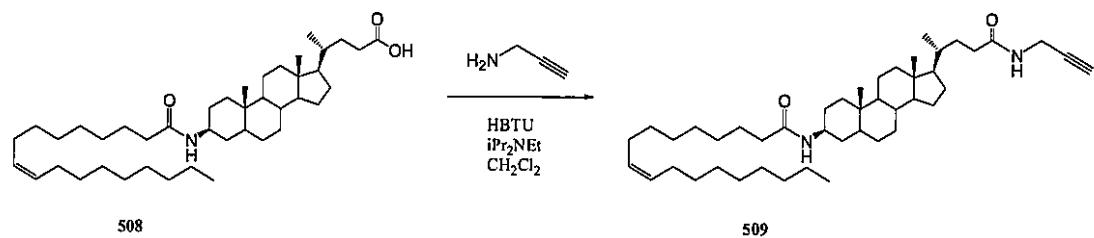


【0558】

オレイル - リソコール酸アセチレン誘導体 509 を、プロパルギルアミンを使用して標準ペプチド共役によって 508 から調製するであろう。市販のジアミンを保護し、対応するアジド誘導体 512 に変換するであろう。オレイル - リソコール酸アジ化物誘導体 513 を精製するために、アジ化物を 508 と共役するであろう。

【化 7 8】

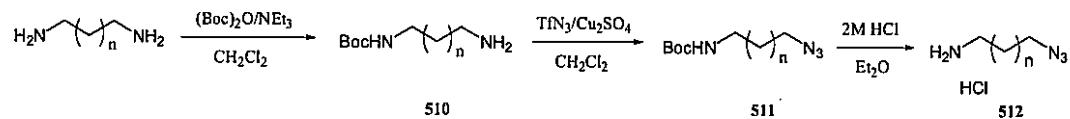
スキーム30



508

509

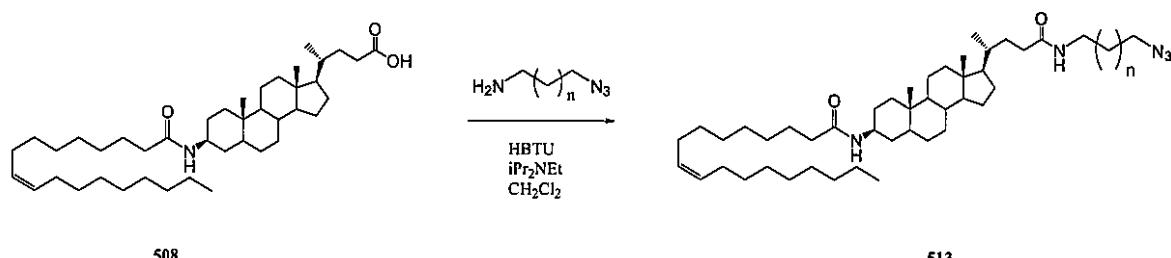
10



510

51

512



508

513

20

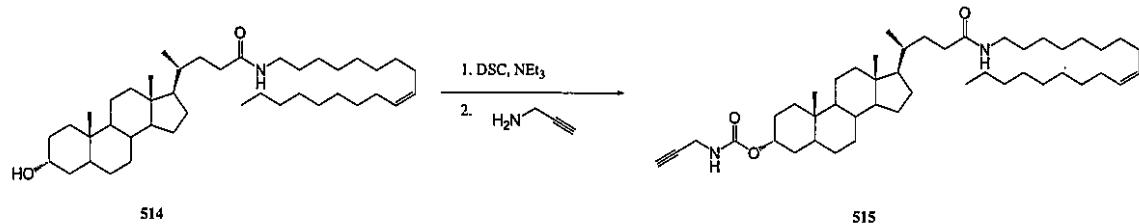
【 0 5 5 9 】

別のオレイル-リソコール酸誘導体 514 を、プロパルギルアミンおよびアジド化合物 512 を用いて機能し、515 および 516 をそれぞれ得るであろう。

30

【化 7 9】

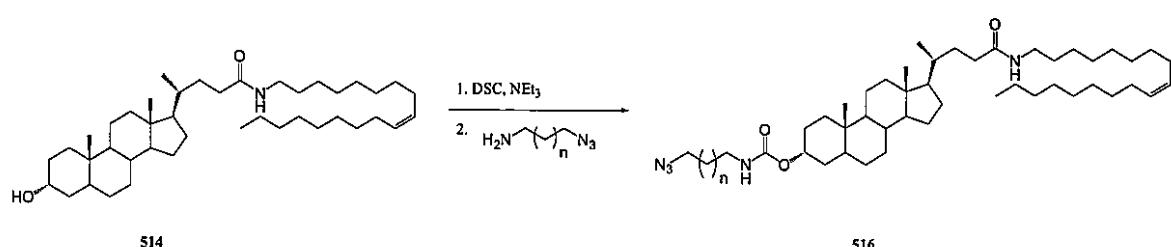
スキーム 31



514

515

40



514

516

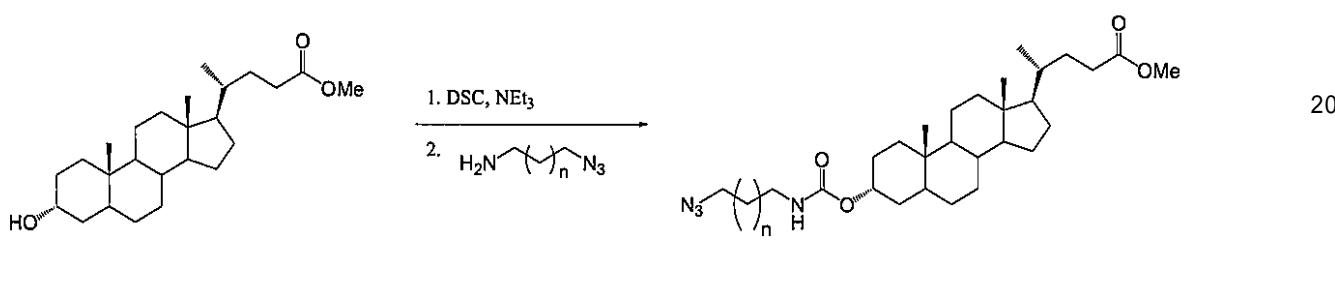
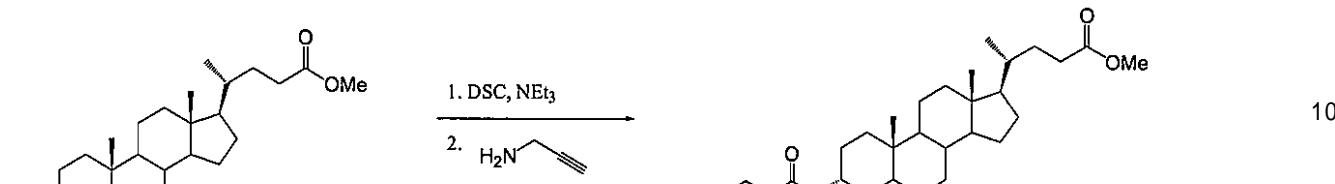
50

[0 5 6 0]

リソコール酸エステル 517 を、化合物 518 を生成するために、プロパルギルアミンと共に役した。カルバミン酸結合を通してアジド化合物 512 と 517 との結合し、519を得る。

【化 8 0】

スキーム32



【 0 5 6 1 】

化合物 5-18:

化合物 517 のヒドロキシル基の活性化を、CH₂Cl₂においてN,N'-炭酸ジサクシンイミジルおよびトリエチルアミンを使用して実施した。水系後処理後、粗物質(3.03 g, 5.88 ミリモル)をCH₂Cl₂(60 mL)において溶解した。その後、トリエチルアミン(1.64 mL, 11.76 ミリモル)およびプロパルギルアミン(0.524 mL, 7.64 ミリモル)を溶液に添加した。反応混合物を室温において14時間攪拌した。水系後処理およびカラムクロマトグラフィー(ヘキサン:EtOAc = 5:1~2:1)による精製によって、化合物 518(2.25 g, 4.77 ミリモル、81%)を得た。¹H NMR(DMSO-d₆, 400 MHz) δ 7.44(t, J = 5.5 Hz, 1H)、4.43-4.51(m, 1H)、3.73-3.75(m, 2H)、3.57(s, 3H)、3.08(t, J = 2.2 Hz, 1H)、2.16-2.36(m, 2H)、0.86-1.93(m, 32H)、0.61(s, 3H)。¹³C NMR(DMSO-d₆, 100 MHz) δ 173.6, 155.5, 81.5, 73.6, 72.7, 55.9, 55.4, 51.1, 42.2, 41.2, 39.9, 35.3, 34.7, 34.5, 34.1, 32.3, 30.5, 30.3, 29.6, 27.6, 26.6, 26.5, 25.9, 23.7, 23.0, 20.3, 18.0, 11.8。C₂₉H₄₅NNaO₄(M+Na)⁺に対する分子量、計算値 494.32、実測値 494.2。

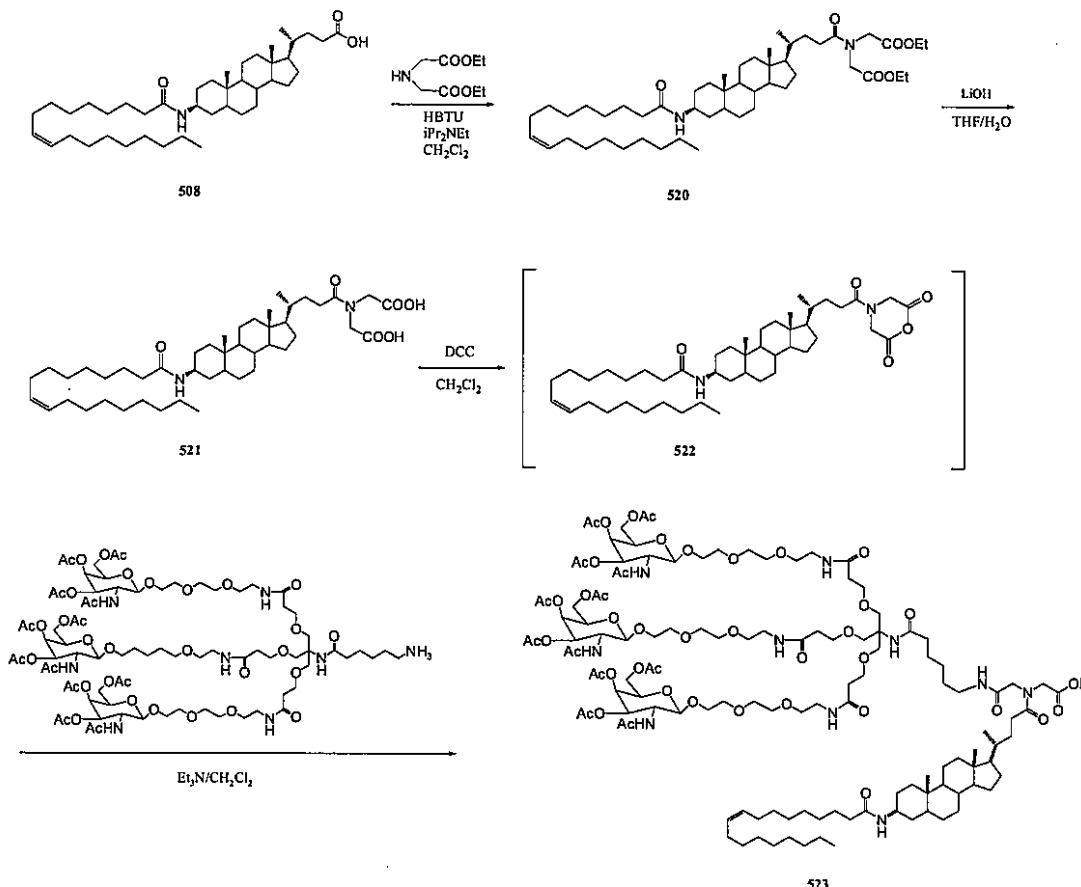
[0 5 6 2]

オレイル-リソコール酸 GalNAc 構成要素を、スキーム 19 によって合成するであろう。化合物 523 を化合物 508 から調製した (Rensen, P. C. N. et al., J. Med. Chem., 2004, 47, 5798-5808)。簡潔に、エチルイミノジアセテートと 508 との標準ペプチド共役によって 520 を得た。エステル加

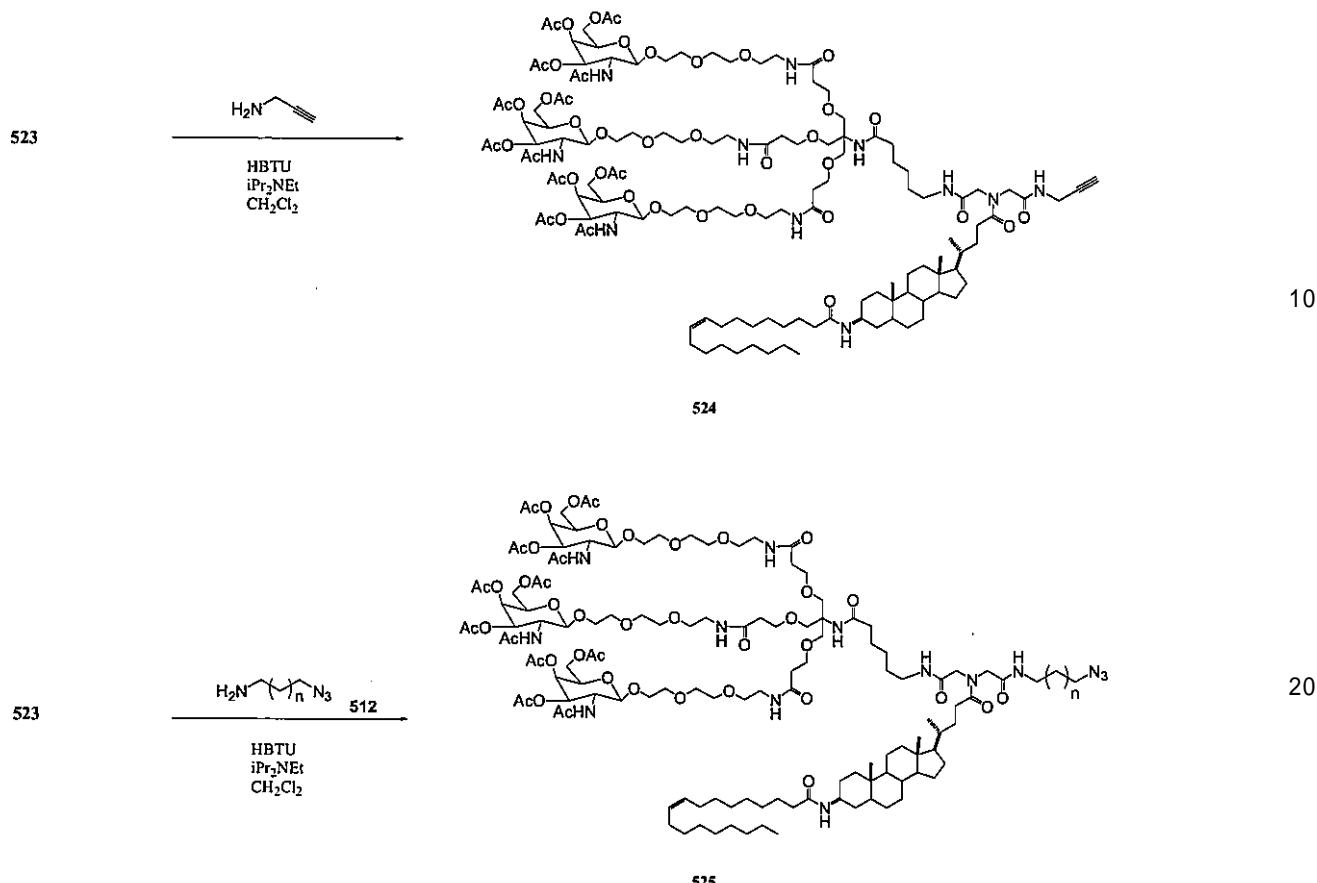
水分解によって対応する二酸 521 を得た。二酸を、アンヒドロ中間体 522 を通して、GalNAc と共に役し、523 を得た。523 をプロパルギルアミンおよびアジド化合物 512 を用いて機能し、524 および 525 をそれぞれ得るであろう。

【化 8 1】

スキーム 33



【化 8 2】



【0563】

化合物 520 の調製 :

化合物 508 (10.5 g、16.4 ミリモル、Renssen, P.C.N.e.t.a. 1., J. Med. Chem., 2004, 47, 5798 - 5808) および $\text{CH}_2\text{C}_1\text{L}_2$ (170 mL) における HBTU (6.54 g、17.2 ミリモル) の溶液を iPr₂N*E*t (14.3 mL、82.1 ミリモル) およびジエチルイミノジアセテート (3.26 g、17.2 ミリモル) を用いて無事に処理し、69 時間室温において攪拌することができた。水系後処理後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 1 : 1、 $R_f = 0.47$) によって化合物 520 を得た。

【0564】

産生量: 11.1 g、83%。¹H NMR (CDCl_3 、400 MHz) δ 5.66 (d, $J = 8.0 \text{ Hz}$ 、1H)、5.33 - 5.36 (m, 2H)、4.14 - 4.26 (m, 9H)、0.86 - 2.38 (m, 71H)、0.64 (s, 3H)。¹³C NMR (CDCl_3 、100 MHz) δ 174.0、172.1、169.4、169.0、129.9、129.7、61.6、61.2、60.8、56.4、56.1、50.2、47.9、44.9、42.7、40.1、39.7、38.1、37.1、35.6、35.3、35.0、31.9、31.4、30.9、30.6、29.7、29.6、29.60、29.5、29.3、29.24、29.22、29.1、28.1、27.2、27.1、26.7、26.1、25.9、24.8、24.1、22.6、21.0、18.4、14.18、14.16、14.11、14.09、12.0。 $\text{C}_{50}\text{H}_{87}\text{N}_2\text{O}_6$ ($M + H$)⁺ に対する分子量、計算値 811.66、実測値 811.6。

【0565】

化合物 521 の調製 :

化合物 520 (6.05 g、7.46 ミリモル) を、THF (110 mL) および H_2

10

20

30

40

50

O(22 mL)において水酸化リチウムー水和物(1.25 g、29.8ミリモル)を用いて処理した。4時間後、70 mLのアンバーライトIR-120(plus)イオン交換樹脂を添加し、その後10分間攪拌した。得られた透明な溶液をろ過し、THF/H₂Oおよび蒸発を用いて洗浄した。トルエンを用いた同時蒸発によって、白い固形として化合物521を得た。

【0566】

産生量: 4.81 g、85%。¹H NMR(CDCl₃、400 MHz) 5.99 (d, J = 7.2 Hz, 1H)、5.32 - 5.36 (m, 2H)、4.13 - 4.24 (m, 5H)、0.86 - 2.37 (m, 65H)、0.64 (s, 3H)。¹³C NMR(CDCl₃、100 MHz) 175.3、173.7、173.0、171.5、130.0、129.7、107.9、67.7、56.4、55.9、45.6、42.7、40.1、39.8、38.1、36.9、35.6、35.3、35.0、31.9、30.9、30.4、29.8、29.75、29.70、29.6、29.5、29.4、29.3、29.2、29.1、28.2、27.3、27.2、26.7、26.1、26.0、25.9、24.2、24.1、23.9、22.7、21.0、18.4、14.1、12.0。C₄₆H₇₇N₂O₆(M-H)に対する分子量、計算値753.58、実測値753.5。

【0567】

化合物523の調製:

CH₂Cl₂(25 mL)における化合物521(583 mg、0.772ミリモル)の溶液に、室温において、CH₂Cl₂(0.772 mL、0.772ミリモル)の1M DCC溶液を、添加し、反応混合物を中間体522を形成するため、1.5時間攪拌した。そして、化合物5(1.50 g、0.772ミリモル)およびCH₂Cl₂(5 mL)におけるEt₃N(0.377 mL、2.70ミリモル)の溶液を添加した。反応混合物を一晩攪拌した。化合物523を产生するために、粗製物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(2% Et₃Nを含むCH₂Cl₂における5% MeOH、R_f = 0.24)によって精製した。産生量: 1.62 g、トリエチルアンモニウム塩として79%。¹H NMR(CDCl₃、400 MHz) 5.68 (d, J = 7.2 Hz, 1H)、5.29 - 5.34 (m, 5H)、5.15 - 5.18 (m, 3H)、4.77 - 4.79 (m, 3H)、3.41 - 4.16 (m, 59H)、2.93 - 3.24 (m, 6H)、0.85 - 2.56 (m, 117H)、0.61 (s, 3H)。¹³C NMR(CDCl₃、100 MHz) 174.9、173.5、172.2、171.6、170.8、170.43、170.36、129.9、129.7、101.63、101.58、70.63、70.60、70.5、70.3、69.8、69.69、29.69、26.69、22.69、69.22、69.1、68.75、68.67、67.3、66.80、66.75、62.9、61.6、59.6、56.43、56.37、56.1、56.0、53.4、52.7、50.63、50.56、45.6、44.9、42.7、40.1、40.07、40.05、39.8、39.7、39.30、39.27、39.1、38.1、37.1、36.5、35.6、35.44、35.38、35.0、31.9、31.4、30.6、29.72、29.67、29.5、29.3、29.2、29.1、28.2、27.2、27.1、26.7、26.1、25.9、25.3、24.8、24.15、24.11、23.2、22.6、21.0、20.9、20.7、18.5、14.1、12.0、8.5、7.7。C₁₂₅H₂₀₅N₁₀O₄₅Na(M+Na)⁺に対するMALDI-TOF MS計算値: 2589.40、実測値: 2588.76。

【0568】

クリックケミストリーに対するプソイドウリジン構成要素

プソイドウリジンにおけるN1を、メチルアクリレートを用いてアルキル化し、526を得た。このエステルを加水分解し、対応する酸誘導体527を得た。プロパルギルアミンおよびアジド化合物を用いた527の標準ペプチド共役は、クリックケミストリーを通

20

10

30

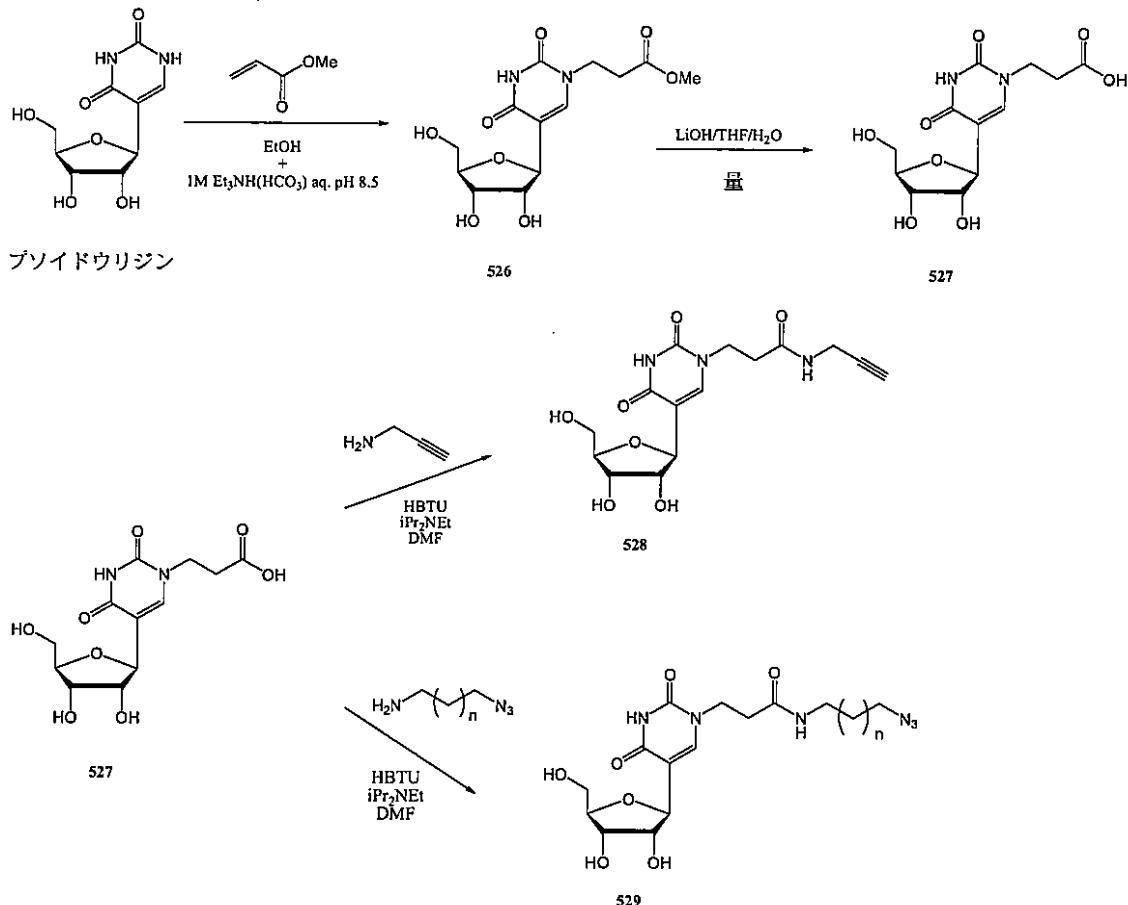
40

50

して、共役に対してそれぞれ 528 および 529 を得るであろう。

【化 8 3】

スキーム 34



【0569】

化合物 526 :

1 M 炭酸水素トリエチルアンモニウム緩衝液 (pH 8.5, 780 mL) および EtOH (940 mL) におけるブソイドウリジン (20 g, 81.9 ミリモル) の溶液に、メチルアクリレートを滴加した。反応混合物を一晩攪拌した。16 時間後、TLC は完全反応を示した。溶媒を取り除き、真空中で乾燥し、白い泡を得た。粗物質をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CH₂Cl₂ における 10% MeOH, R_f = 0.23) によって精製し、526 (26.6 g, 80.5 ミリモル, 98%) を得た。¹H NMR (MeOH-d₄, 400 MHz) δ 7.77 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 4.58 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 4.15 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 4.05 (t, J = 5.0 Hz, 1H), 3.98 - 4.02 (m, 2H), 3.91 - 3.94 (m, 1H), 3.80 (dd, J = 12.0 Hz, 3.3 Hz, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.66 (dd, J = 12.0 Hz, 3.3 Hz, 1H), 2.73 - 2.77 (m, 2H)。¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 173.1, 165.4, 152.5, 145.8, 112.9, 85.6, 81.5, 75.6, 72.6, 63.3, 52.5, 46.2, 33.7。C₁₃H₁₉N₂O₈ (M + H)⁺ に対する分子量、計算値 330.11、実測値 331.0。

【0570】

化合物 527 :

THF (100 mL) および H₂O (20 mL) における化合物 526 (5.00 g, 15.1 ミリモル) の溶液に、水酸化リチウム水和物 (1.03 g, 25.5 ミリモル) を添加した。反応混合物を一晩攪拌した。追加の水酸化リチウム水和物 (500 mg)

10

20

30

40

50

、11.9ミリモル)を添加した。2時間後、反応混合物をアンバーライトIR-120(plus)イオン交換樹脂を用いて処理した。樹脂をろ過し、THF/H₂Oを用いて洗浄した。濾液を蒸発し、白い固体(4.78g、定量的)として化合物527を得た。

¹H NMR(DMSO-d₆、400MHz) 11.34(s、1H)、7.75(s、1H)、4.92-4.93(m、1H)、4.70-4.72(m、1H)、4.45(d、J=4.0Hz、1H)、3.80-3.93(m、4H)、3.68-3.72(m、1H)、3.61(dd、J=12.0Hz、3.2Hz、1H)、3.47(dd、J=12.0Hz、4.0Hz、1H)、3.17(d、J=3.2Hz、1H)、2.59(t、J=7.0Hz、2H)。¹³C NMR(DMSO-d₆、100MHz) 172.1、163.0、150.4、143.6、111.4、83.2、79.0、73.7、70.4、61.3、44.1、32.7。C₁₂H₁₅N₂O₈(M-H)⁻に対する分子量、計算値：315.08、実測値：315.1。

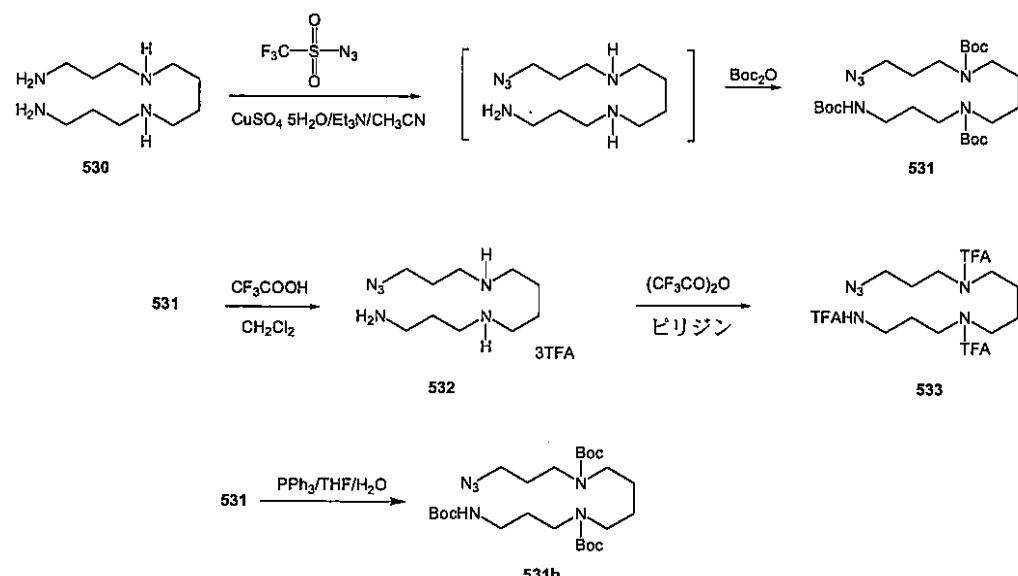
【0571】

実施例11.オリゴヌクレオチドとの共役のためのスペルミンアジドの合成

クリックケミストリーを使用した生体結合体化のため、アジ化物含有スペルミン誘導体を合成した。

【化84】

スキーム35



【0572】

化合物531:

アセトニトリル(80mL)におけるアジ化ナトリウム(4.36g、67ミリモル)の懸濁液を、氷浴において冷却した。トリフルオロメタンスルホン酸無水物(15.7g、9.4mL、55.6ミリモル)を、10分間以上滴下漏斗を使用して混合物へ、滴加した。反応を氷浴において2時間実行した後、反応混合物を、沈殿物を取り除くためにろ過した。沈殿を20mLのアセトニトリルを用いて洗浄した。トリフリックアジドを含有した混合アセトニトリル溶液を、次のアジド移動反応のために直接使用した。

【0573】

スペルミン(530、11.25g、55.6ミリモル)を、アセトニトリル(50mL)において溶解した。その後、硫酸銅五水和物(139mg、0.556ミリモル)およびトリエチルアミン(15.5mL、111.2ミリモル)を攪拌しながら、溶液に添加した。混合物を氷浴において冷却し、その後上記の調製したトリフリックアジド溶液を、混合物へゆっくり添加した。反応混合物を室温まで温めることを可能にし、一晩実行した。二炭酸ジ-tert-ブチル(60.7g、278ミリモル)をゆっくり溶液に添加

10

20

30

40

50

し、反応混合物を2時間攪拌した。蒸発後、粗製物をEtOAcおよびH₂Oを用いて抽出し、無水Na₂SO₄上で乾燥し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン:EtOAc = 2:1、R_f = 0.46)によって精製し、531(13.12g、24.8ミリモル、45%)を得た。¹H NMR(DMSO-d₆、400MHz) 6.77(brs, 1H)、3.30-3.34(m, 2H)、3.11-3.19(m, 8H)、2.86-2.90(m, 2H)、1.71-1.72(m, 2H)、1.54-1.56(m, 2H)、1.37-1.39(m, 29H)。C₂₅H₄₈N₆NaO₆(M+Na)⁺に対する分子量、計算値551.35、実測値551.2。

【0574】

化合物531b:

THF(20mL)およびH₂O(1mL)における化合物531(1.5g、2.84ミリモル)の溶液へ、トリフェニルホスフィン(1.49g、5.68ミリモル)を添加した。反応混合物を一晩室温において攪拌した。蒸発後、粗製物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CH₂Cl₂:MeOH = 4:1、R_f = 0.70)によって精製し、531b(1.13g、2.25ミリモル、79%)を得た。¹H NMR(DMSO-d₆、400MHz) 6.78(brs, 1H)、3.10-3.15(m, 8H)、2.87-2.89(m, 2H)、2.48-2.51(m, 2H)、1.37-1.55(m, 35H)。C₂₅H₅₁N₄O₆(M+H)⁺に対する分子量、計算値503.38、実測値503.2。

【0575】

化合物532:

CH₂Cl₂(36mL)における化合物531(1.37g、2.59ミリモル)の溶液へ、トリフルオロ酢酸(4mL)をゆっくり0で添加した。反応混合物を室温において5時間攪拌した。溶媒を取り除いた後、粗製物をEt₂Oにおいて沈殿し、化合物532(950mg、1.67ミリモル、64%)をTFA塩として得た。¹H NMR(DMSO-d₆、400MHz) 8.78(brs, 2H)、8.68(brs, 2H)、7.93(brs, 3H)、3.48(t, J = 6.4Hz, 2H)、2.94-2.95(m, 10H)、1.82-1.93(m, 4H)、1.62(brs, 4H)。

【0576】

C₁₀H₂₅N₆(M+H)⁺に対する分子量、計算値229.21、実測値229.3。

【0577】

化合物533:

ピリジン(5mL)において化合物532(324mg、0.568ミリモル)の溶液へ、トリフルオロ酢酸無水物(0.316mL、2.27ミリモル)を0で滴加した。反応混合物を室温において14時間攪拌した。CH₂Cl₂およびNaHCO₃水溶液を用いた抽出後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン:EtOAc = 1:1、R_f = 0.34)によって精製し、粗製物を化合物533(214mg、0.414ミリモル、73%)を得た。¹H NMR(DMSO-d₆、400MHz) 9.48-9.53(m, 1H)、3.18-3.43(m, 12H)、1.75-1.80(m, 4H)、1.51-1.54(m, 4H)。¹⁹F NMR(376MHz, DMSO-d₆) -70.91、-70.95、-70.97、-71.01、-71.04、-71.15、-71.17、-77.23、-77.25、-77.38。C₁₆H₂₁F₉N₆NaO₃(M+Na)⁺に対する分子量、計算値539.14、実測値539.0。

【0578】

アジド基を含有する拡張したスペルミン類似体も、合成した。

10

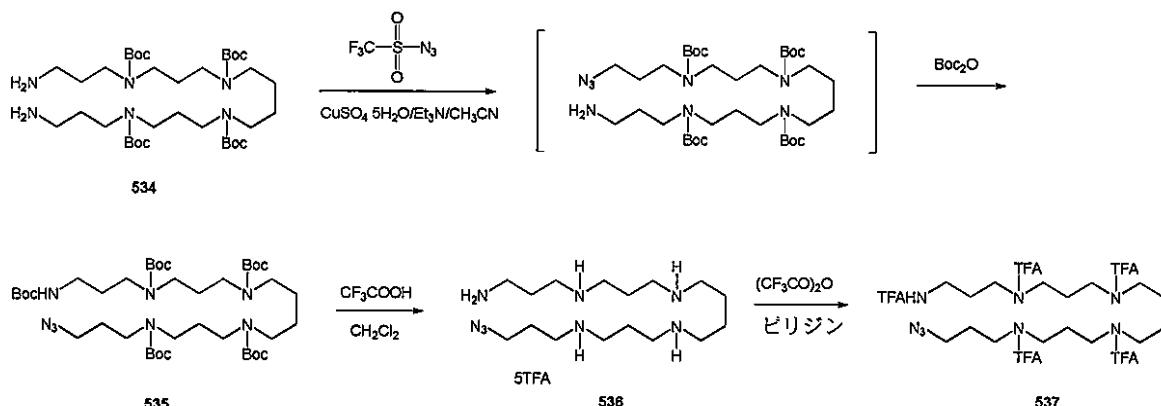
20

30

40

【化 8 5】

スキーム 3 6



【0 5 7 9】

化合物 5 3 5 :

アセトニトリル (8 mL) におけるアジ化ナトリウム (436 mg、6.70 ミリモル) の懸濁液を、氷浴において冷却した。その後、トリフルオロメタンスルホン酸無水物 (0.944 mL、5.56 ミリモル) をゆっくり混合物へ添加した。反応を氷浴において 2 時間実行した後、反応混合物を、沈殿物を取り除くためにろ過した。沈殿を 20 mL のアセトニトリルを用いて洗浄した。トリフリックアジドを含有した混合アセトニトリル溶液を、次のジアゾ移動反応のために直接使用した。

【0 5 8 0】

化合物 534 (J. Med. Chem. 2005, 48, 2589 - 2599; 5 g、6.97 ミリモル) を、アセトニトリル (30 mL) において溶解した。その後、硫酸銅五水和物 (28 mg、0.112 ミリモル) およびトリエチルアミン (7.75 mL、55.6 ミリモル) を溶液へ添加した。混合物を氷浴において冷却し、その後上記の調製したトリフリックアジド溶液を、混合物へゆっくり添加した。反応混合物を室温まで温めることを可能にし、一晩実行した。この溶液の半分 (~32 mL) を異なるフラスコへ移した後、二炭酸ジ-tert-ブチル (1.52 g、6.98 ミリモル) をゆっくり添加し、反応混合物を 2 時間攪拌した。蒸発後、残渣を EtOAc および H₂O を用いて抽出し、無水 Na₂SO₄ 上で乾燥し、ろ過し、真空中で濃縮した。粗製物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン: EtOAc = 1:1、R_f = 0.35) によって精製し、535 (281 mg、0.333 ミリモル、5%) を得た。¹H NMR (DMSO-d₆、400 MHz) δ 6.73 (br s, 1 H)、3.05 - 3.33 (m, 18 H)、2.86 - 2.88 (m, 2 H)、1.36 - 1.70 (m, 57 H)。C₄₁H₇₈N₈NaO₁₀ (M + Na)⁺に対する分子量、計算値 865.57、実測値 865.55。

【0 5 8 1】

化合物 5 3 6 :

CH₂Cl₂ (8 mL) における化合物 535 (275 mg、0.326 ミリモル) の溶液へ、トリフルオロ酢酸 (2 mL) を 0°で滴加した。反応混合物を 0°で 30 分間、その後室温において 90 分間攪拌した。溶媒を取り除いた後、粗製物を Et₂O において沈殿し、化合物 536 (235 mg、0.257 ミリモル、79%) を TFA 塩として得た。¹H NMR (D₂O、400 MHz) δ 3.50 (t, J = 6.0 Hz, 2 H)、3.09 - 3.15 (m, 18 H)、2.06 - 2.10 (m, 6 H)、1.94 - 1.97 (m, 2 H)、1.76 (br s, 4 H)。C₁₆H₃₉N₈ (M + H)⁺に対する分子量、計算値 343.33、実測値 343.2。

【0 5 8 2】

化合物 537 :

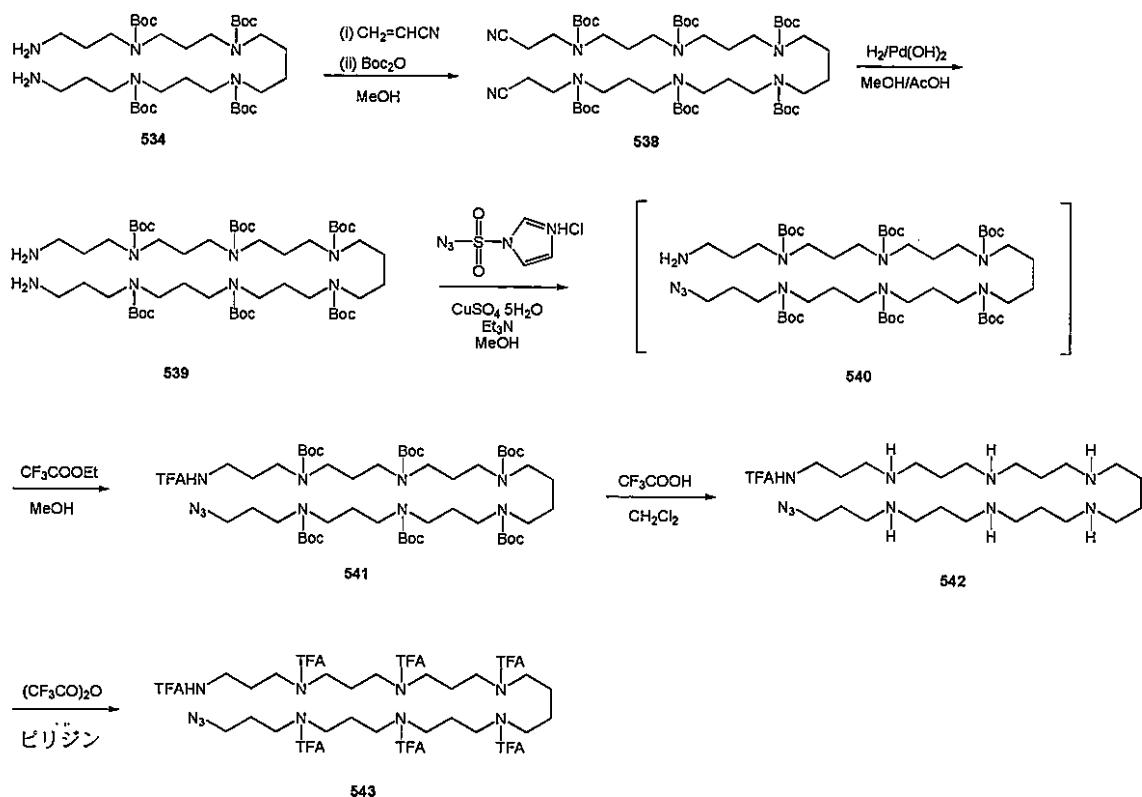
ピリジン (3 mL) において化合物 536 (200 mg、0.219 ミリモル) の溶液へ、トリフルオロ酢酸無水物 (0.245 mL、1.75 ミリモル) を 0°で滴加した。反応混合物を室温において 14 時間攪拌した。溶媒を取り除いた後、粗製物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : EtOAc = 1 : 2、 $R_f = 0.34$) によって精製し、化合物 537 (127 mg、0.154 ミリモル、70%)を得た。¹H NMR (DMSO-d_6 、400 MHz) δ 9.45 - 9.53 (m, 1 H)、3.30 - 3.44 (m, 12 H)、3.22 (t, $J = 6.0 \text{ Hz}$, 2 H)、1.80 - 1.89 (m, 8 H)、1.55 (br s, 4 H)。¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-d_6) -70.90、-70.92、-70.96、-70.98、-71.06、-71.11、-71.13、-71.16、-71.20、-71.34、-77.26、-77.28、-77.41。 $C_{26}H_{33}F_{15}N_8NaO_5$ ($M + Na$)⁺に対する分子量、計算値 845.22、実測値 845.3。

【0583】

アジド機能を含むオリゴアミン誘導体を、以下の通りに合成した。

【化86】

スキーム 37



【0584】

化合物 538 :

メタノール (300 mL) における化合物 534 (40 g、55.8 ミリモル) の溶液へ、トリエチルアミン (64 mL) およびアクリロニトリル (7.35 mL、111.6 ミリモル) を添加した。反応物を室温において 14 時間攪拌した。その後、二炭酸ジ-tert-ブチル (37.1 g、170 ミリモル) を 0°でゆっくり添加し、混合物を室温において 14 時間攪拌した。水系後処理後、粗製物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : EtOAc = 1 : 4、 $R_f = 0.72$) によって精製し、538 (23.9 g、23.4 ミリモル、42%)を得た。¹H NMR (DMSO-d_6 、400 MHz) δ 3.40 (t, $J = 6.4 \text{ Hz}$, 4 H)、3.09 - 3.15 (m, 20 H)、2.

6.9 (t, J = 6.4 Hz, 4H)、1.36 - 1.65 (m, 66H)。¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) δ 170.3, 154.5, 119.0, 79.1, 78.3, 78.2, 59.7, 45.0, 44.1, 42.4, 28.0, 27.9, 20.7, 14.1。C₅₂H₉₄N₈NaO₁₂(M+Na)⁺に対する分子量、計算値 1045.69、実測値 1045.5。

【0585】

化合物 539 :

メタノール(80 mL)における化合物 538 (7.88 g, 7.70 ミリモル)および酢酸(10 mL)の溶液を、14時間水素ガス圧力 50 psiにおいて Pd(OH)₂/C (8.0 g)上で水素化した。セライトを介してろ過後、濾液を真空中で濃縮した。残渣を CHCl₃ (300 mL) および 1 M NaOH (40 mL) を用いて抽出した。有機層を分離し、無水 MgSO₄ 上で乾燥し、ろ過し、粘性油として化合物 539 (7.90 g, 7.66 ミリモル、99%) を生成するために濃縮した。¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ 3.62 (br s, 4H), 3.08 - 3.14 (m, 24H), 1.36 - 1.63 (m, 70H)。¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) δ 154.6, 154.5, 154.4, 79.1, 78.3, 78.2, 46.3, 44.3, 38.5, 30.8, 28.0, 27.2, 25.1。C₅₂H₁₀₃N₈O₁₂(M+H)⁺に対する分子量、計算値 1031.77、実測値 1031.5。

【0586】

化合物 541 :

メタノール(72 mL)における化合物 539 (7.40 g, 7.18 ミリモル)の溶液へ、トリエチルアミン(2.5 mL, 18.0 ミリモル)、硫酸銅五水和物(18 mg, 0.072 ミリモル)、およびイミダゾール-1-スルホニルアジドハイドロクロライド(903 mg, 4.31 ミリモル)を添加した。反応混合物を、室温において2時間攪拌した(540; C₅₂H₁₀₁N₁₀O₁₂(M+H)⁺に対する分子量、計算値 1057.76、実測値 1057.5)。その後、エチルトリフルオロ酢酸(2.60 mL, 21.5 ミリモル)を添加し、混合物を室温において2時間攪拌した。水系後処理後、粗製物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン:EtOAc = 1:1, R_f = 0.38)によって精製し、541 (1.75 g, 1.52 ミリモル、21%)を得た。¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ 9.38 (br s, 1H), 3.10 - 3.33 (m, 28H), 1.31 - 1.71 (m, 70H)。¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-d₆) δ -77.27。¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) δ 156.3, 155.9, 154.5, 154.4, 120.2, 117.3, 114.5, 78.4, 78.3, 78.2, 63.4, 48.4, 46.3, 44.2, 37.0, 27.9, 27.3, 25.1。C₅₄H₉₉F₃N₁₀NaO₁₃(M+Na)⁺に対する分子量、計算値 1175.72、実測値 1175.3。

【0587】

化合物 542 :

CH₂Cl₂ (40 mL)における化合物 541 (1.75 g, 1.52 ミリモル)の溶液へ、トリフルオロ酢酸(10 mL)をゆっくり 0 度で添加した。反応混合物を 0 度で1時間、その後室温において6時間攪拌した。真空中で溶媒の除去によって、白い泡として化合物 542 を生成した。この物質を追加の精製なしに次の反応のために使用した。C₂₄H₅₂F₃N₁₀O(M+H)⁺に対する分子量、計算値 553.43、実測値 553.3。

【0588】

化合物 543 :

ピリジン(20 mL)における化合物 542 (1.52 ミリモル)の溶液に、トリフルオロ酢酸無水物(2.11 mL, 15.2 ミリモル)を 0 度で滴加した。反応混合物を室温において14時間攪拌した。溶媒を取り除いた後、粗製物を CH₂Cl₂ および H₂O を用いて抽出した。有機層を無水 Na₂SO₄ 上で乾燥し、その後ろ過し、真空中で濃縮

10

20

30

40

50

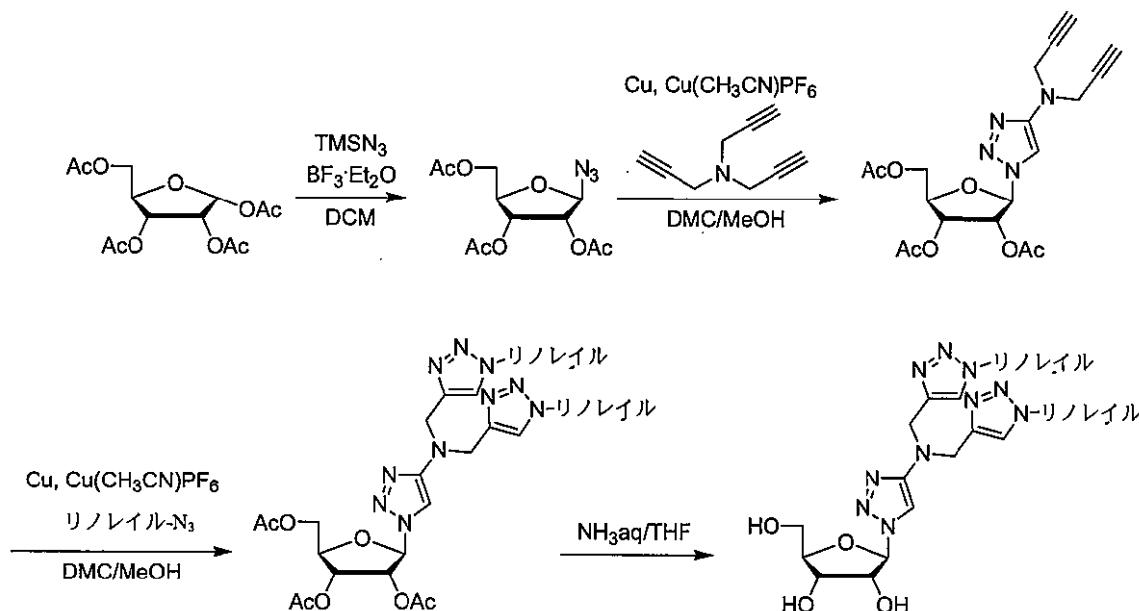
した。粗製物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc) によって精製し、化合物 543 (1.45 g, 1.28 ミリモル、85%) を得た。¹H NMR (DMSO-d₆、400 MHz) δ 9.43 - 9.51 (m, 1H)、3.32 - 3.38 (m, 2H)、3.21 - 3.23 (m, 2H)、1.80 - 1.87 (m, 12H)、1.55 (br s, 4H)。¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-d₆) -71.00、-71.05、-71.13、-71.21、-71.26、-71.32、-71.35、-71.40、-77.32、-77.35、-77.47。¹³C NMR (DMSO-d₆、100 MHz) δ 156.5、155.8、155.6、155.5、155.3、120.5、117.7、114.8、114.4、111.9、48.3、47.9、46.7、45.9、44.6、44.2、44.0、43.7、36.9、36.4、27.7、27.4、25.9、25.7、25.3、25.0、24.0、23.5、23.3。C₃₆H₄₄F₂N₁₀O₇ (M-H)⁻に対する分子量、計算値 1127.31、実測値 1127.0。

【0589】

実施例 12 : 1'-トリアゾリルリボフラノース誘導体の調製

【化87】

スキーム 38



【0590】

実施例 13 . オリゴヌクレオチドとの共役のための機能性ペプチド

表 5 に示されるペプチドを、クリックケミストリーアプローチを通してオリゴヌクレオチドと共にするために、固形相 Fmoc 化学に従って合成する。ペプチド P1 ~ P3 は、アジド部分を含有し、ペプチド P4 ~ P6 は、相補的機能基とオリゴヌクレオチドまたは担体分子とを共役するために末端アルキンを含有する。

10

20

30

40

【表5】

表5. 共役のための機能性ペプチド

	ペプチド	共役のための官能基
P1	N ₃ -(CH ₂) ₁₅ -CO-Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Pro-Pr o-Gln-NH ₂	アジ化物
P2	シクロ-[Phe-Arg-Gly-Asp-Lys(N ₃ -(CH ₂) ₁₅ -COOH)]	アジ化物
P3	N ₃ -(CH ₂) ₁₅ -CO-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-NH ₂	アジ化物
P4	C≡C-(CH ₂) ₃ -CO-Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Pro-P ro-Gln-NH ₂	アルキン
P5	シクロ-[Phe-Arg-Gly-Asp-Lys(C≡C-(CH ₂) ₃ -COOH)]	アルキン
P6	C≡C-(CH ₂) ₃ -CO-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-NH ₂	アルキン

10

20

30

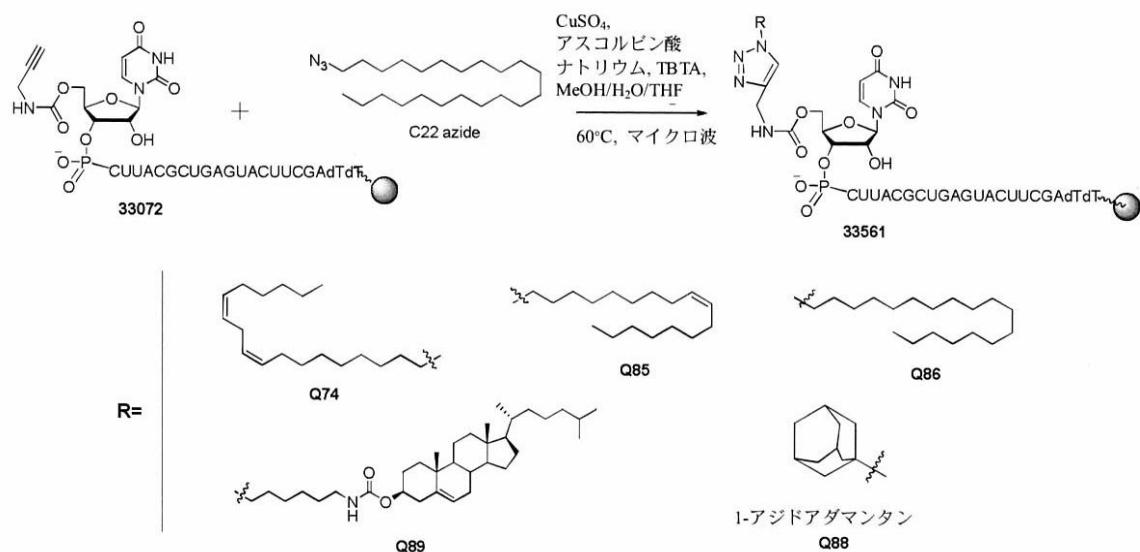
40

【0591】

実施例14. オリゴヌクレオチド合成後の、合成後のクリックケミストリーについて
スキーム39は、クリックケミストリーによるリガンドとオリゴヌクレオチドとの支持結合における代表例を示す。1等量のオリゴヌクレオチド・アルキン(1μモルスケール合成0)を、0.25等量のCuSO₄および2等量のアスコルビン酸ナトリウムの存在下で、10等量のC22-アジ化物(MeOH/THF 1:1 v/v)と反応させた。得られた共役したオリゴヌクレオチド(33561)をHPLCによって解析し、結果を図12に示す。共役したオリゴヌクレオチドを88%純度に、HPLC解析、図13によって測定した通り、RP-HPLCによって精製した。

【化88】

スキーム39



【0592】

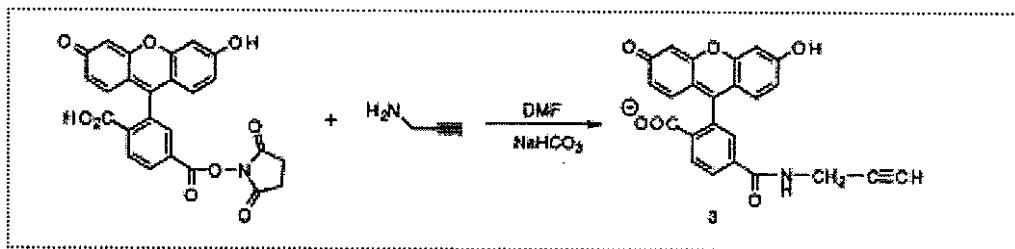
実施例15：クリックケミストリーによる6-カルボキシフルオセインを用いたオリゴヌクレオチドの合成後の標識

a. 6-カルボキシフルオセイン-プロパルギルアミン(アルキニルFAM)の合成

50

【化89】

スキーム40



10

【0593】

D M F (1 . 0 m L) におけるプロパルギルアミンの $6 . 8 \mu l$ (0 . 1 ミリモル) の溶液を、 D M F (1 . 0 m L) および 0 . 1 M N a H C O 3 (0 . 2 m L) 緩衝液における 6 - カルボキシフルオセイン N H S エステルの 2 2 m g (0 . 0 4 6 ミリモル) の溶液に添加した。室温において一晩攪拌した後、溶媒を真空下で取り除いた。少量の反応混合物を L C - M S 解析のために提出した。粗混合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製した。(D C M : M e O H 9 : 1)。 L C - M S 解析によってアルケニル F A M が形成されることを確認する。計測量 : 4 1 4 . 0 9 、実測量 : 4 1 4 . 0 。

20

【0594】

b. アジド標識オリゴヌクレオチドの合成

アジド標識したオリゴヌクレオチドの略図を図 1 4 に示す。 s i R N A の 3 ' 末端におけるアジド基を組み込むために、 1 0 0 μl の 0 . 2 M N a H C O 3 緩衝液 (p H 9 . 0) における 1 0 0 ナノモルのアミノ修飾 s i R N A (A 1 - 3 9 9 1) は、 2 5 μl の D M F における 2 . 0 u モルのアジドエステルを用いて 1 5 時間、室温においてインキュベートした。 1 5 時間後、試料を I E X 解析によって解析した。反応を完了するために、室温において試料を 9 時間放置した。 2 4 時間後、試料を L C - M S によって解析し、化合物の完全性を確認する。計測量 : 7 2 6 9 . 3 5 、実測量 : 7 2 6 8 . 5 6 。

30

【0595】

c. クリックケミストリー

図 1 5 は、クリックケミストリーによって、アジド標識したオリゴヌクレオチドと共に役した 6 - カルボキシフルオセイン - プロパルギルアミンを示す。 1 0 0 μl の水におけるアジド - オリゴヌクレオチド (5 . 0 ナノモル) を、 7 2 時間 8 0 ° で 2 5 μl の乾燥 D M S O において 1 5 0 倍のアルキニル F A M の過剰量と反応させた。未反応の染色を、 P D - 1 0 カラムにおける分子ふるいクロマトグラフィーによって取り除いた。 L C - M S データは、アルキニル 6 - カルボキシフルオセイン (F A M) およびアジド標識した一本鎖 R N A 間の 1 , 3 - 双極性付加環化を、 F A M 標識 s i R N A 、図 1 6 を生成するために、水性状態下で実施したことを示す。フルオレセイン共役オリゴマー (n) : 計測量 : 7 6 8 4 、実測量 7 6 8 2 . 3 、非共役出発物質 (b) : 計測量 : 7 2 6 9 、実測量 7 2 7 7 。

40

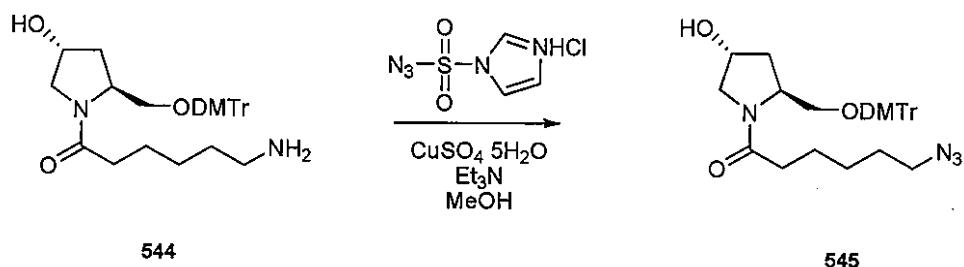
【0596】

実施例 1 6 : アジド修飾 C 6 - アミノヒドロキシプロリノル

D M T r 保護 C 6 - アミノプロリノールを、以下の通り対応するアジ化誘導体に変換した。

【化90】

スキーム41



10

【0597】

化合物545：

メタノール(5 mL)における化合物544(200 mg、0.375ミリモル)の溶液へ、トリエチルアミン(0.157 mL、1.13ミリモル)、硫酸銅五水和物(1 mg、0.00375ミリモル)、およびイミダゾール-1-スルホニルアジドハイドロクロライド(94 mg、0.45ミリモル)を添加した。反応混合物を室温において1時間攪拌した。産物形成を、質量分析によって確認した。 $\text{C}_{32}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{NaO}_5$ ($M + N_a$)⁺に対する分子量、計算値581.27、実測値581.0、 $\text{C}_{32}\text{H}_{39}\text{N}_4\text{O}_5$ ($M + H$)⁺計算値559.29、実測値559.0。

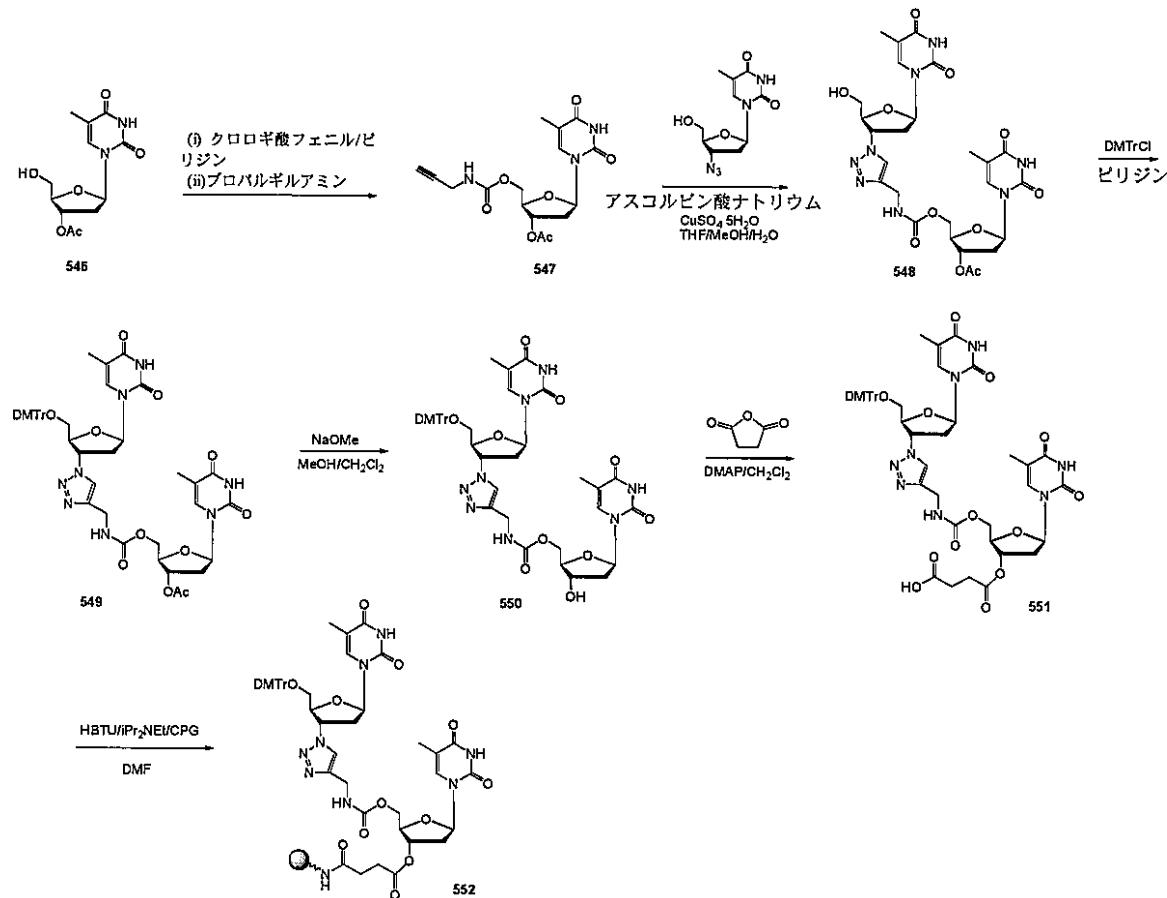
20

【0598】

実施例17：トリアゾール結合ヌクレオシド構成要素

【化91】

スキーム42



30

40

50

【0599】

化合物547：

ピリジン(30mL)における化合物546(Prime organics、2.13g、7.49ミリモル)の溶液へ、フェニルクロロ口炭酸塩(1.04mL、8.24ミリモル)を0で添加した。室温において2時間攪拌した後、プロパルギルアミンを0で添加した。混合物を室温において14時間攪拌した。溶媒の除去後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン：EtOAc = 1:2、R_f = 0.19)によって精製し、水系後処理および547(2.73g、7.47ミリモル、99%)を得る。¹H NMR(DMSO-d₆、400MHz) 11.37(s、1H)、7.88(t、J = 5.6Hz、1H)、7.46(s、1H)、6.19(dd、J = 5.8Hz、9.0Hz、1H)、5.17-5.18(m、1H)、4.23-4.26(m、1H)、4.10-4.15(m、2H)、3.81(dd、J = 2.4Hz、5.6Hz、2H)、3.13(t、J = 2.4Hz、1H)、2.43-2.47(m、1H)、2.24(dd、J = 5.8Hz、13.8Hz、1H)、2.07(s、3H)、1.79(s、3H)。¹³C NMR(DMSO-d₆、100MHz) 170.0、163.6、155.5、150.5、135.6、109.9、83.7、81.4、81.1、74.3、73.2、64.2、35.6、29.8、12.2。C₁₆H₁₉N₃NaO₇(M+Na)⁺に対する分子量、計算値388.11、実測値388.0。

【0600】

化合物548：

THF(50mL)およびMeOH(50mL)における、化合物547(2.59g、7.09ミリモル)および3'-アジドチミジン(1.89g、7.09ミリモル)の溶液へH₂O(25mL)、(+)-ナトリウムL-アスコルビン酸(140mg、0.709ミリモル)、および硫酸銅五水和物(35mg、0.142ミリモル)を添加した。反応混合物を70で2時間熱した。溶媒の除去後、ピリジンを用いた2回の同時蒸発によって、薄黄色の泡(定量的産生量)を得た。物質を次の反応に使用した。解析試料を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(CH₂Cl₂における10%MeOH、R_f = 0.36)によって得た。¹H NMR(DMSO-d₆、400MHz) 11.38(s、1H)、11.37(s、1H)、8.16(s、1H)、7.97(t、J = 5.6Hz、1H)、7.81(d、J = 0.8Hz、1H)、7.46(d、J = 1.2Hz、1H)、6.41(t、J = 6.6Hz、1H)、6.19(dd、J = 6.0Hz、8.8Hz、1H)、5.33-5.37(m、1H)、5.29(t、J = 5.2Hz、1H)、5.18(d、J = 6.8Hz、1H)、4.09-4.29(m、6H)、3.66-3.71(m、1H)、3.57-3.62(m、1H)、2.61-2.73(m、2H)、2.44-2.46(m、1H)、2.20-2.25(m、1H)、2.07(s、3H)、1.81(s、3H)、1.72(s、3H)。¹³C NMR(DMSO-d₆、100MHz) 170.1、163.7、163.6、155.9、149.6、145.2、136.3、135.9、124.0、122.7、110.0、109.8、84.7、84.0、83.9、81.6、74.6、64.2、60.7、59.4、47.6、37.2、35.9、35.6、20.8、12.2、12.1。C₂₆H₃₂N₈NaO₁₁(M+Na)⁺に対する分子量、計算値655.21、実測値655.0。

【0601】

化合物549：

ピリジン(70mL)における化合物548(~7.09ミリモル)の溶液へ、DMTrCl(2.76g、8.15ミリモル)を添加した。反応混合物を室温において14時間攪拌した。溶媒の除去後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(CH₂Cl₂における5%MeOH、R_f = 0.26)によって精製し、水系後処理および549(5.69g、6.09ミリモル、86%)を得る。¹H NMR(DMSO-d₆、400MHz) 11.38(s、2H)、8.17(s、1H)、7.97(t、J = 5.8Hz、

1 H)、7.66 (s, 1 H)、7.46 (s, 1 H)、7.21 - 7.35 (m, 9 H)、6.86 - 6.87 (m, 4 H)、6.42 (t, J = 6.4 Hz, 1 H)、6.20 (dd, J = 6.0 Hz, 8.8 Hz, 1 H)、5.54 (dd, J = 7.2 Hz, 14.4 Hz, 1 H)、5.19 (d, J = 6.0 Hz, 1 H)、4.10 - 4.35 (m, 6 H)、3.73 (s, 6 H)、3.26 - 3.34 (m, 2 H)、2.73 - 2.77 (m, 2 H)、2.44 - 2.46 (m, 1 H)、2.21 - 2.26 (m, 1 H)、2.06 (s, 3 H)、1.71 (s, 3 H)、1.59 (s, 3 H)。¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) 170.0, 163.6, 155.8, 150.4, 145.2, 144.5, 135.7, 135.1, 126.7, 122.2, 113.2, 109.9, 109.8, 85.9, 83.8, 83.8, 82.2, 81.4, 74.4, 64.1, 63.0, 59.2, 55.0, 37.2, 35.9, 35.5, 20 20.8, 12.1, 11.8。C₄₇H₄₉N₈O₁₃(M-H)⁻に対する分子量、計算値933.34、実測値933.0。

【0602】

化合物550：

CH₂Cl₂(90 mL)およびMeOH(10 mL)における化合物549(5.48 g, 5.86ミリモル)の溶液へ、MeOH(22.8 mL, 11.4ミリモル)における0.5 M NaOMeを添加した。反応混合物を室温において14時間攪拌した。溶媒の除去後、粗製物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(CH₂Cl₂における10% MeOH、R_f = 0.46)によって精製し、550(4.59 g, 5.14ミリモル、88%)を得る。¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) 11.39 (s, 1 H)、11.30 (s, 1 H)、8.15 (s, 1 H)、7.87 (t, J = 5.8 Hz, 1 H)、7.65 (s, 1 H)、7.42 (s, 1 H)、7.20 - 7.34 (m, 9 H)、6.85 - 6.87 (m, 4 H)、6.40 (t, J = 6.6 Hz, 1 H)、6.18 - 6.21 (m, 1 H)、5.52 (dd, J = 7.2 Hz, 14.4 Hz, 1 H)、5.37 (d, J = 4.4 Hz, 1 H)、4.20 - 4.32 (m, 6 H)、4.03 - 4.06 (m, 1 H)、3.91 - 3.93 (m, 1 H)、3.73 (s, 6 H)、3.06 - 3.27 (m, 1 H)、2.72 - 2.76 (m, 2 H)、2.19 - 2.26 (m, 1 H)、2.03 - 2.07 (m, 1 H)、1.71 (s, 3 H)、1.59 (s, 3 H)。¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) 163.7, 163.6, 156.0, 150.4, 145.3, 144.5, 135.9, 135.1, 126.8, 122.2, 113.2, 109.8, 109.7, 85.9, 84.2, 83.8, 82.2, 70.4, 63.0, 59.2, 55.0, 38.6, 37.2, 35.9, 12.1, 11.8。C₄₅H₄₇N₈O₁₂(M-H)⁻に対する分子量、計算値891.33、実測値891.0。

【0603】

化合物551：

CH₂Cl₂(75 mL)における化合物550(3.56 g, 3.99ミリモル)の溶液へ、DMAP(1.46 g, 12.0ミリモル)および無水コハク酸(799 mg, 7.98ミリモル)を添加した。反応混合物を、室温において一晩攪拌した。粗混合物のシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CH₂Cl₂における5% MeOH / 5% Et₃N、R_f = 0.11)による精製によって、対応するトリエチルアンモニウム塩(4.29 g, 3.92ミリモル、98%)として化合物551を得た。¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) 11.34 (br s, 2 H)、8.17 (s, 1 H)、7.98 (t, J = 5.8 Hz, 1 H)、7.65 (s, 1 H)、7.45 (s, 1 H)、7.20 - 7.34 (m, 9 H)、6.84 - 6.86 (m, 4 H)、6.40 (t, J = 6.4 Hz, 1 H)、6.19 (dd, J = 6.0 Hz, 8.8 Hz, 1 H)、5.53 (dd, J = 7.0 Hz, 14.6 Hz, 1 H)、5.18 (d, J = 6.0 Hz, 1 H)、4.08 - 4.32 (m, 6 H)、3.72 (s, 6 H)、3.23 - 3.39 (m, 2 H)、2.72 - 2.76 (m, 2 H)、2.41 - 2.54 (m, 5 H)、2.19 40 50。

- 2 . 2 4 (m、 1 H)、 1 . 7 0 (s、 3 H)、 1 . 5 8 (s、 3 H)。 ^{13}C NMR (DMSO - d₆、 1 0 0 MHz) 1 7 3 . 7、 1 7 2 . 1、 1 6 3 . 7、 1 6 3 . 6、 1 5 5 . 8、 1 5 0 . 4、 1 4 5 . 2、 1 4 4 . 5、 1 3 5 . 7、 1 3 5 . 1、 1 2 6 . 7、 1 2 2 . 2、 1 1 3 . 2、 1 0 9 . 8、 8 5 . 9、 8 3 . 8、 8 2 . 2、 8 1 . 4、 7 4 . 4、 6 4 . 2、 6 3 . 0、 6 2 . 5、 5 9 . 2、 5 2 . 0、 3 7 . 2、 3 5 . 8、 3 5 . 5、 2 9 . 4、 2 9 . 2、 1 2 . 1、 1 1 . 8。 C₄₉H₅₁N₈O₁₅ (M - H) ⁻ に対する分子量、計算値 9 9 1 . 3 5、 実測値 9 9 1 . 0。

【 0 6 0 4 】

化合物 5 5 2 :

化合物 5 5 1 (4 . 2 1 g、 3 . 8 5 ミリモル) を、 DMF (2 5 0 mL) において溶解した。 HBTU (1 . 5 3 g、 4 . 0 4 ミリモル) そして iPr₂NEt (3 . 3 5 mL、 1 9 . 3 ミリモル) および最後に CPG - NH₂ (Prime Synthesis CPG - 5 8 5 オングストローム、 NH₂ 負荷 = 1 2 4 μ モル / g) (3 4 . 2 g、 4 . 2 4 ミリモル) を連続して添加した。混合物を室温において 4 時間振り、その後固形をろ過によって収集し、 CH₂Cl₂ (5 0 0 mL) 、その後 5 0 % MeOH / CH₂Cl₂ (5 0 0 mL) を用いて洗浄し真空中で乾燥した。アミノ残渣を、 Ac₂O / ピリジン / Et₃N (8 0 mL / 2 4 0 mL / 1 6 mL) を用いて 1 時間振とうすることによってキャップした。ろ過および CH₂Cl₂ (5 0 0 mL) および 5 0 % MeOH / CH₂Cl₂ (5 0 0 mL) をもちいた洗浄、そして一晩真空中で乾燥することによって、化合物 5 5 2 (~ 3 6 g、 6 4 μ モル / g) を得た。

【 0 6 0 5 】

実施例 1 8 : 固形支持体上でクリックケミストリーを通した RNA と遊離スペルミン分子との結合

化合物 5 5 4 :

(1) 固形支持体上の RNA アルキン、 A - 3 3 0 7 2 . 1、 (1 1 mg、 0 . 6 2 μ モル) を、 CuSO₄ · 5 H₂O (0 . 6 2 μ モル) およびアスコルビン酸ナトリウム (3 . 1 μ モル) の存在下で、スペルミンアジド (5 5 3、 3 . 5 3 mg、 6 . 1 8 μ モル) を用いて処理し、混合物を 6 5 で 2 時間熱したブロック上に保持した。反応の溶媒量を t - BuOH / H₂O (v / v) (1 mL) の 1 : 1 比として維持した。反応後、ビーズをその後に水、メタノール、およびアセトニトリルを用いて洗浄し、室温において乾燥することを可能にした。(2) 脱保護 : 反応したビーズを、水性メチルアミン (1 2 5 μ l) を用いて 2 0 分間 6 5 で処理し、 - 2 0 で 2 0 分間冷却した。濾液を採取し、ビーズを、 DMSO (1 0 0 μ l × 3) を用いて洗浄し、それらを濾液と組み合わせ、 - 2 0 で 1 0 分間冷却した。トリエチルアミン三塗化水素酸塩 (1 7 5 μ l) を組み合わせた濾液へ添加し、混合物を 6 5 で 2 0 分間保持した。透析後、粗反応混合物を、逆相 HPLC および LC - MS 、図 1 7 によって解析した。(3) RP - HPLC および LC - MS : 物質を、 2 つの緩衝系 (0 . 1 M TEAA 、 pH 7 . 0 およびアセトニトリル) 、 % B = 0 - 4 0 % / 2 0 分、 ~ 1 0 0 % / 3 0 分、 1 mL / 分、直線状勾配、 UV : 2 6 0 nm 、カラム : X Terra RP - 1 8 、 4 . 6 × 2 5 0 mm を使用して勾配上で解析 RP - HPLC へ負荷した。粗物質も LC - MS (計算量 7 2 2 0 、実測量 7 2 1 9 および 7 2 6 0) を用いて解析した。

10

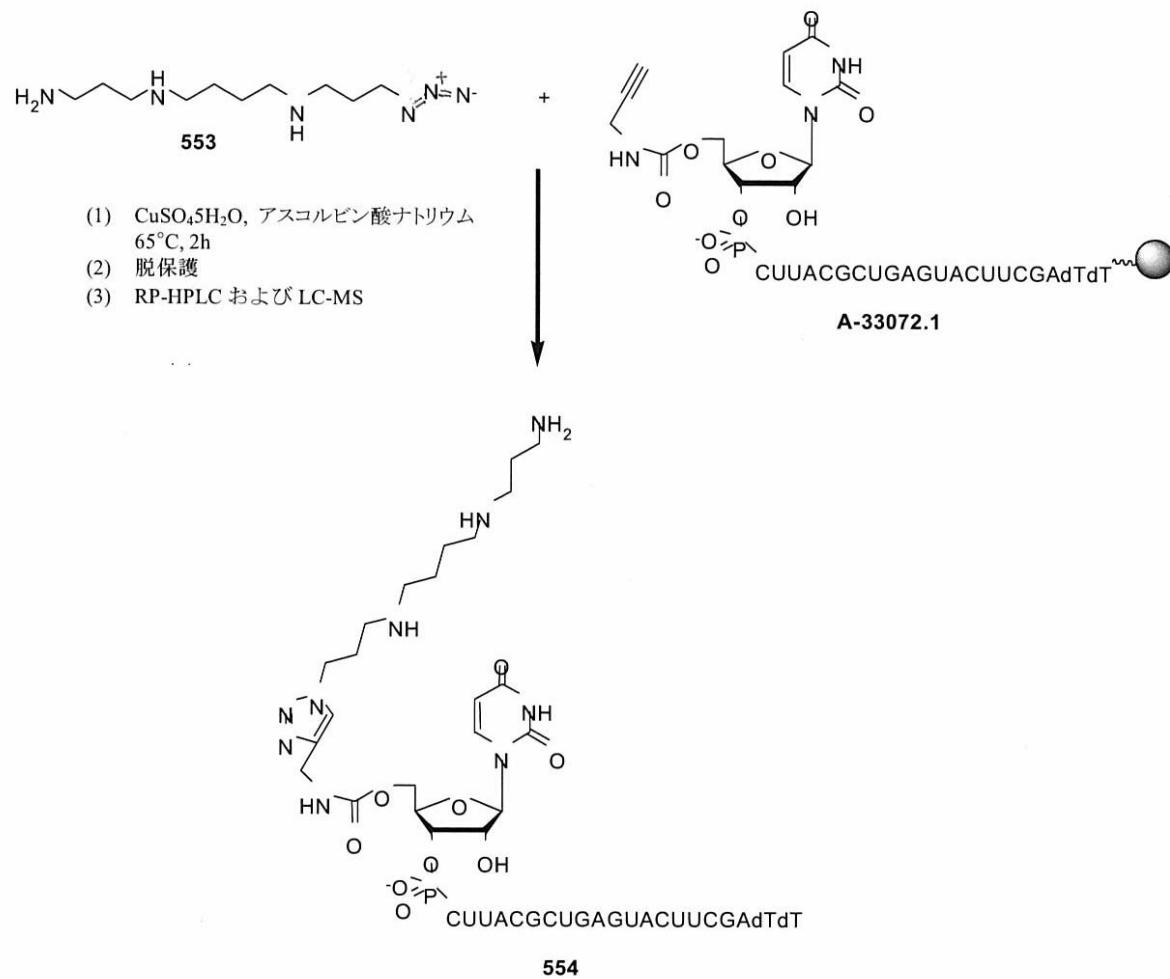
20

30

40

【化92】

スキーム43



【0606】

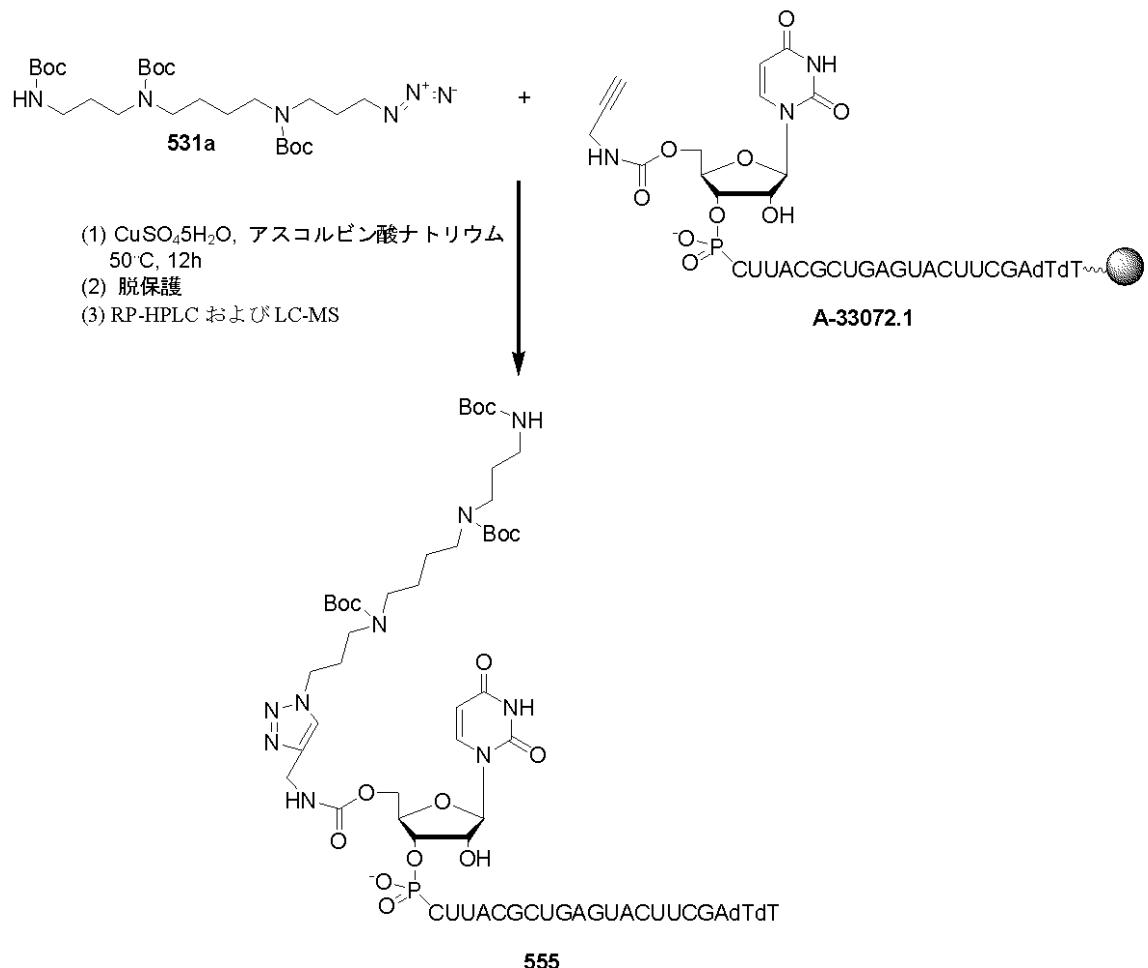
実施例19：クリックケミストリーを通した固体支持体におけるRNAとBooc保護スペルミン分子との結合

化合物555：

固体支持体におけるbooc保護スペルミンアジド531aとRNAアルキンA-33072.1との間の反応を以下に記載した。Booc保護スペルミンアジドを、クリックケミストリーのためにRNAアルキンとのモデル反応を確立するために使用した。

【化93】

スキーム44



【0607】

(1) 固形支持体におけるRNAアルキン、A-33072.1、(11mg、0.62 μ モル)を、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.93 μ モル)およびアスコルビン酸ナトリウム(3.1 μ モル)の存在下でboc保護スペルミンアジド(531a、過剰量)を用いて処理し、混合物を50℃で12時間、熱したブロック上に保持した。反応のための溶媒量をt-BuOH/H₂O(v/v)(1mL)の1:1比として維持した。反応後、ビーズをその後に水、メタノール、およびアセトニトリルを用いて洗浄し、室温において乾燥することを可能にした。

【0608】

(2) 脱保護：反応したビーズを、水性メチルアミン(125 μ l)を用いて20分間65℃で処理し、-20℃で20分間冷却した。濾液を採取し、ビーズを、DMSO(100 μ l×3)を用いて洗浄し、それらを濾液と組み合わせ、-20℃で10分間冷却した。トリエチルアミン三塩化水素酸塩(175 μ l)を組み合わせた濾液へ添加し、混合物を65℃で20分間保持した。透析後、粗反応混合物を、逆相HPLCおよびLC-MSによって解析した。

【0609】

(3) RP-HPLC および LC-MS：物質を、2つの緩衝系(0.1M TEAA、pH 7.0およびアセトニトリル)、%B=0-60%/20分、~100%/30分、1mL/分、直線状勾配、UV: 260 nm、カラム：X Terra RP-18、4.6×250 mmを使用して勾配上で解析RP-HPLCへ負荷した。粗物質もLC-M

10

20

30

40

50

S（計算量 7520、実測量 7519）、図18を用いて解析した。

【0610】

実施例20：クリックケミストリーを通じた固体支持体におけるRNAとTFA保護スペルミン分子との結合

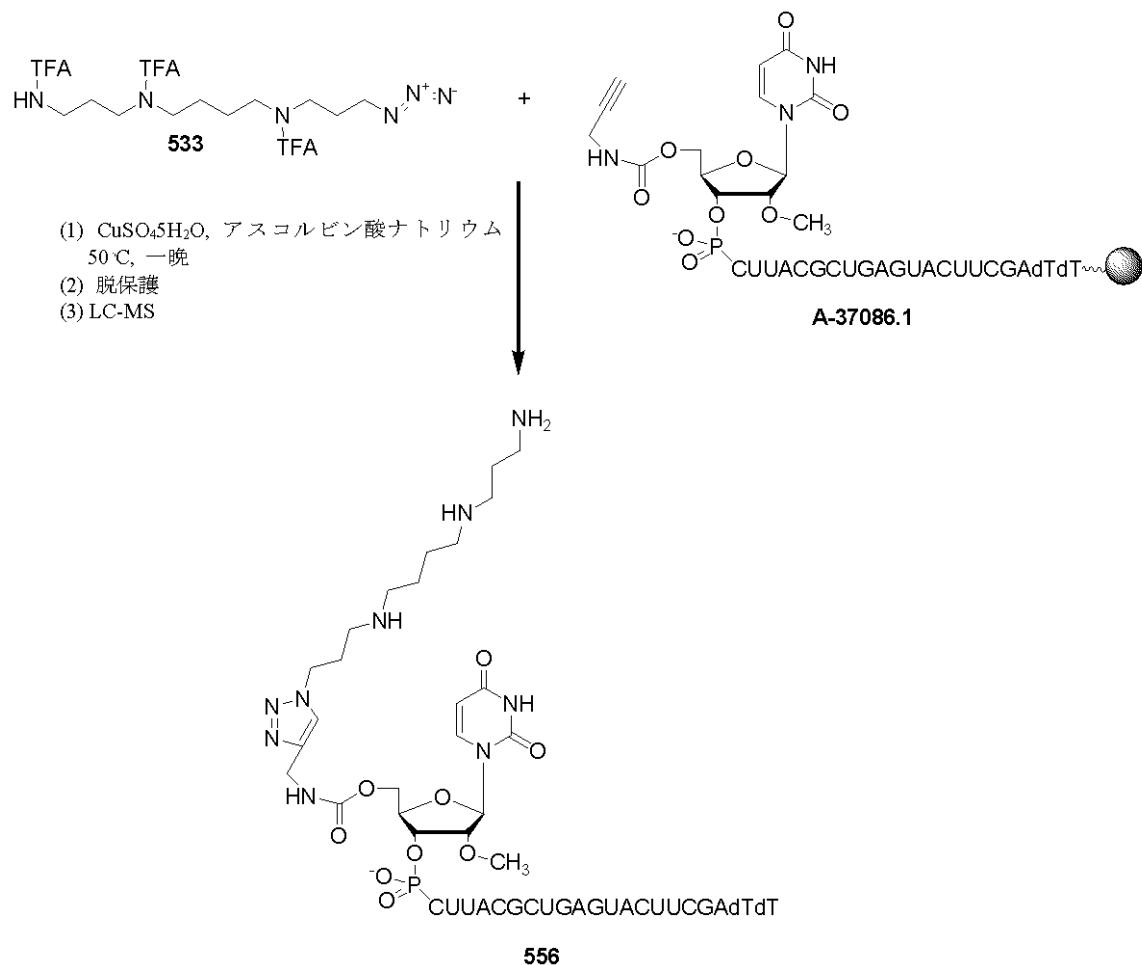
化合物556：

固体支持体におけるTFA-保護スペルミンアジド533とRNAアルキンA-37068.1との間の反応を以下に記載した。

【化94】

スキーム45

10



20

30

【0611】

(1) 固体支持体におけるRNAアルキン、A-37086.1、(11mg、1μモル)を、CuSO₄·5H₂O(1.5μモル)およびアスコルビン酸ナトリウム(5μモル)の存在下でTFA-保護スペルミンアジド(533、過剰量)を用いて処理し、混合物を一晩の間50℃で熱したブロック上に保持した。反応溶媒量をt-BuOH/H₂O(v/v)(1mL)の1:1比として維持した。反応後、ビーズをその後に水、メタノール、およびアセトニトリルを用いて洗浄し、室温において乾燥することを可能にした。

40

【0612】

(2) 脱保護：反応したビーズを、水性メチルアミン(125μl)を用いて20分間65℃で処理し、-20℃で20分間冷却した。濾液を採取し、ビーズを、DMSO(100μl×3)を用いて洗浄し、それらを濾液と組み合わせ、-20℃で10分間冷却した。トリエチルアミン三塩化水素酸塩(175μl)を組み合わせた濾液へ添加し、混合物を65℃で20分間保持した。

50

【0613】

(3) LC-MS：透析後、粗反応混合物をLC-MSによって解析した（計算量7235、実測量7234）。

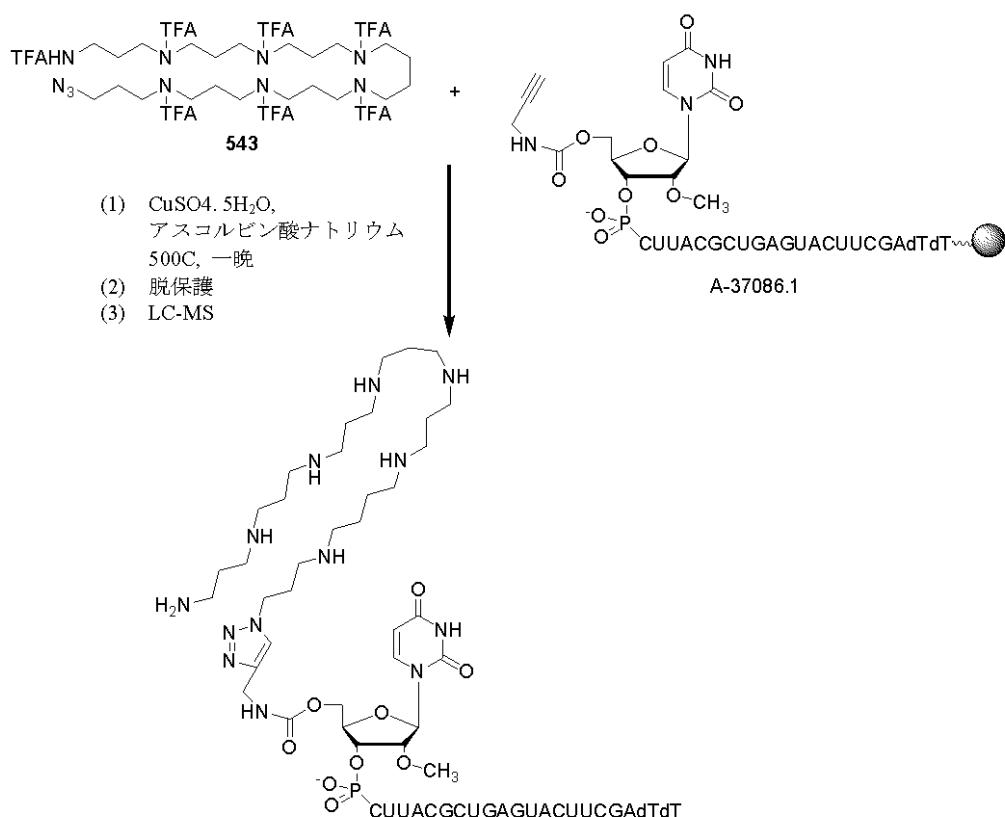
【0614】

実施例21：クリックケミストリーを通した固体支持体におけるRNAとTFA保護スペルミン（7個のアミン）との結合

化合物557を、実施例19または20のものと同様の手順および拡張したスペルミン543を利用することによって合成することができる。

【化95】

スキーム46



10

20

30

557

【0615】

実施例22：オリゴヌクレオチド

1. 固相法による一本鎖RNAの合成

RNAオリゴヌクレオチド（表6）を、ウリジン（U）、4-N-ベンゾイルシチジン（C^{Bz}）²）、6-N-ベンゾイルアデノシン（A^{Bz}）²）および2'-O-t-ブチルジメチルシリル保護ホスホラミダイトを含む2-Nイソブチリルグアノシン（G^{iBz}）²）、および5'-O-(4',4'-ジメトキシトリチル)-2'-チミジン-3'-O-(2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピル)ホスホラミダイト（T）の市販の5'-O-(4',4'-ジメトキシトリチル)-3'-O-(2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピル)ホスホラミダイトモノマーを用いて、標準ホスホラミダイト化学を使用してDNA合成機 ABI 394において合成した。修飾したRNAホスホラミダイトおよびこの調査で使用したCPGを、図19および20に示す。切断および脱保護後、RNAオリゴヌクレオチドをアニオン交換または逆相高速液体クロマトグラフィー（AX-HPLCまたは

40

50

R P - H P L C) によって精製し、L C - M S によって特徴付けた。

【 0 6 1 6 】

2 . R N A アルキン骨格の合成

固体支持リン酸トリエステルアルキン骨格（表 7 における 3' 、 5' 末端位置および内部位置）を、アルキンモノマーが関与する際はいつでも、拡張ヌクレオチド共役時間（ 30 分）を除く、前項に記載されたものと同様に合成した。合成後、 C P G のごく一部を脱保護し、A X - H P L C および L C - M S を用いて解析した。

【 0 6 1 7 】

3 . C u (I) 触媒 1 , 3 - 双極性付加環化反応最適化

クリック反応条件を、 C P G において 5' - アルキン修飾した R N A を使用して最適化した（配列番号 33072 、表 8 ）。出発物質の等量の効果、温度、および溶媒を、配列番号 33072 のクリック反応において 1 - アジド - ドコサン（ C 22 - アジ化物）を用いて調査した（スキーム 39 ）。最適化結果を、表 9 において合成した。この調査において使用される条件において T B T A がクリック反応を促進することができる事が見出される可能性がある。クリックは T B T A （反応第 1 および 2 ）なしで発生しなかった。 C u²⁺ レベルは、あるレベル（反応第 5 における 0.4 等量のアルキン）において維持されるべきであり、低すぎる C u²⁺ レベルは、クリック反応（反応第 9 ）を悪化させる。 D M F 、 D M S O を、共溶媒として使用することができるが、それらは T H F と同じほど良く示さなかった（反応第 5 、 7 、 8 ）ことも、認められた。マイクロ波援助反応は、より早かった。反応は、 2 日後に完了した。この軽い条件を、いくつかの熱的に非安定な R N A 配列に対して使用することができる（反応第 12 ~ 13 ）。要約すれば、 C 22 - アジ化物を含む R N A アルキンのクリック反応において我々が認めた最適な条件は、 R N A - アルキン : アジ化物 : C u : T B T A : N a A s c (1 : 2 . 9 : 0 . 4 : 2 . 8 : 3 . 2) のモル比、 H₂O / M e O H / T H F (8 / 8 / 5 v / v / v) において 45 分間 60 におけるマイクロ波援助加熱を含む。

【 0 6 1 8 】

反応最適化後、異なるアジ化物（図 21 ）を、最適条件においてこの R N A - アルキンを用いて 1 , 3 - 双極性付加環化について試験した。全てのクリック反応が、 50 % のみ完了した 1 - アジド - アダマンタンを除く、優れた反応完了率を得たことを示した。表 9 。その立体環境が遅いクリック反応の原因となると予想された。 90 分間に拡張された反応は、反応完了率を改善しなかった（データ表示せず）。

【 0 6 1 9 】

4 . C u (I) 触媒 1 , 3 - 双極性付加環化の基本手順

表 8 (0 . 62 μ モル) における固体支持オリゴアルキンリン酸トリエステル配列番号 33072 ~ 37088 へ、アジ化物（図 21 ）（アルキンによる 3 等量、 1 . 8 μ モル、 T H F における 36 μ L の 50 mM 溶液）、 C u S O₄ (0 . 4 等量、 0 . 25 μ モル、 H₂O における 5 μ L の 50 mM 溶液）、新たに調製したアスコルビン酸ナトリウム（ 3 . 2 等量、 2 . 0 μ モル、 H₂O における 12 μ L の 50 mM 溶液）、 T B T A (2 . 8 等量、 1 . 7 μ モル、 T H F における 35 μ L の 50 mM 溶液）の混合物を添加した。水、 M e O H 、および T H F を、添加し（約 8 : 8 : 5 v / v / v ）、 1200 μ L の総容積を得た。得られた調製を、 100 W においておよび 30 秒間の予混合時間、 E x p l o r e r - 48 (C E M) マイクロ波合成機を用いて密封ガラス管において熱した。温度を、内部赤外プローブを用いて 45 分間 60 で監視した。溶液を取り除き、 C P G 支持体を、 T H F および M e O H を用いて洗浄し、乾燥した。切断および脱保護後、クリック反応の進行を R P - H P L C によって解析し、産物を L C - M S によって特徴付けた。

【 0 6 2 0 】

クリック反応混合物を、 40 分間 0 ~ 90 % A C N (緩衝液 B) 勾配を含む半分取 D e l t a P a k C 4 カラム（水）を使用して R P - H P C L によって精製した。精製された R N A を、 R P - H P C L および L C - M S によって解析した。精製したクリック産物の H P L C プロファイルを図 23 に示した。

10

20

30

40

50

【0621】

表11は、合成したクリック修飾オリゴヌクレオチドを要約する。

【表6】

表6：固相配列によって作製されたRNAおよび修飾RNA配列

鎖番号	鎖(S/AS)	配列(5'-3')	計算量	観測量	産生量(OD)	純度
1000	S	CUUACGCUGAGUACUUUCGATT	6607.0	-	ストック	-
1001	AS	UCGAAGGUACUCAGCGUAAGTT	6693.1	-	ストック	-
33024.1	S	C(Uda)UACGCUGAGUACUUUCGATT	6915.6	6914	53.0	93%
33025.1	S	CU(Uda)ACGCUGAGUACUUUCGATT	6915.6		108.0	92%
33026.1	S	CUUACGC(Uda)GAGUACUUUCGATT	6915.6		229.0	91%
33027.1	S	CUUACGCUGAG(Uda)ACUUUCGATT	6915.6		110.0	95%
33028.1	S	CUUACGCUGAGUAC(Uda)UCGATT	6915.6		200.0	97%
33029.1	S	CUUACGCUGAGUACU(Uda)CGATT	6915.6		213.0	96%
33031.1	S	CUUACGCUGAGUACUUUCGAT(Uda2p)	6917.5		72.0	93%
33032.1	S	CUUACGCUGAG(Uda)ACUUUCGAT(Uda2p)	7226.1		68.0	88%
33033.1	S	C(Uda)UACGCUGAGUACUUUCGAT(Uda2p)	7226.1		79.0	86%
33035.1	AS	UCGAAGGUACUCAGCGUAAGT(Uda2p)	7003.6		36.0	86%
33034.1s	S	Q74CUUACGCUGAGUACUUUCGATT	7285.7		59.0	93%
33071.1	S	Q75CUUACGCUGAGUACUUUCGATT	7328.5		37.0	92%

注釈:(Uda):2'ーードコサノイルーウリジンー3'ーリン酸塩

(Uda2p):3'ーードコサノイルーウリジンー2'ーリン酸塩(アミダイトおよびCPG)

Q74:ウリジンー5'ー(N1ーリノリルー4ーメチルアミノカルボニルー1, 2, 3トリアゾール)ー3'ーリン酸塩

Q75:ウリジンー5'ー[N1ー(GalNAcー1ーエチルオキシエチル)ー1, 2, 3トリアゾール]ー3'ーリン酸塩

10

20

30

【表7】

表7：本調査におけるクリック反応用に作製されたRNA-アルキン骨格

鎖番号	配列(5'-3')	計算量	観測量	粗純度 ¹
33072.1	Q83CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT	6994.2	6992	62.3%
36594.1	AAcGcuGGGcGuuAAucAAdTdTL123	7191.7	7190	68.8%
37074.1	CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT(Tpy)	6965.2	6964	61.2%
37076.1	CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT(T3py)	6965.2	6964	58.7%
37078.1	CUUACGCUGAG(Tpy)ACUUUCGAdTdT	6659.1	6657	46.9%
37080.1	CUUACGCUGAG(T3py)ACUUUCGAdTdT	6659.1	6658	58.9%
37082.1	(Tpy)CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT	6965.23	6964	43.5%
37084.1	(T3py)CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT	6965.23	6963	68.0%
37086.1	(u5py)CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT	7009.26	7006	68.0%
37088.1	(u5pe)CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT	7037.32	7034	67.3%

¹純度をRP-HPLCを用いて測定した(DeltaPak C4カラム、150×3.9mm I. D.、5 μm、300 Å; 緩衝液A: 50mM TEAA、pH7.0; 緩衝液B: ACN; 勾配: 24分間0~70%緩衝液B; 30°C、1mL/分)

10

20

【表8】

表8：Cu(I)触媒1、3-双極性付加環化反応最適化(RNAアルキン配列番号3072をスキーム39におけるC22アジ化物とクリックする)

反応番号	出発物質(アルキンのモル比: アジ化物:Cu:TBTA:NaAsc)	溶媒	温度(°C) 時間(分)	反応完了(%)	正しい量?
1	1:16:0.4:0:3.2	H ₂ O/MeOH/THF	60°C、45分	No rxn	No
2	1:16:0.4:2.8:3.2	H ₂ O/MeOH/THF	60°C、45分	70.8%	Yes
3	1:8.6:0.4:2.8:3.2	H ₂ O/MeOH/THF	60°C、45分	98.1%	Yes
4	1:5.7:0.4:2.8:3.2	H ₂ O/MeOH/THF	60°C、45分	~100%	Yes
5	1:2.9:0.4:2.8:3.2	H ₂ O/MeOH/THF	60°C、45分	98.9%	Yes
6	1:2.9:0.1:2.8:3.2	H ₂ O/MeOH/THF	60°C、45分	49.4%	Yes
7	1:2.9:0.4:2.8:3.2	H ₂ O/MeOH/DMSO	60°C、45分	88.3%	Yes
8	1:2.9:0.4:2.8:3.2	H ₂ O/MeOH/DMF	60°C、45分	78.5%	Yes
9 ²	1:2.9:0.4:2.8:3.2 (10x希釈)	H ₂ O/MeOH/DMF	60°C、45分	56.5%	Yes
10 ³	1:2.9:0.4:2.8:3.2(10x濃縮)	H ₂ O/MeOH/DMF	60°C、45分	59.7%	Yes
11	1:2.9:0.4:2.8:3.2	H ₂ O/MeOH/THF	60°C、5分	57.0%	Yes
12	1:2.9:0.4:2.8:3.2	H ₂ O/MeOH/THF	室温、17時間	88.4%	Yes
13	1:2.9:0.4:2.8:3.2	H ₂ O/MeOH/THF	室温、48時間	~100%	Yes

30

40

¹反応完了は、RP-HPLCによって測定された(DeltaPak C4カラム、150×3.9mm I. D.、5 μm、300 Å; 緩衝液A: 50mM TEAA、pH7.0; 緩衝液B: ACN; 勾配: 24分間0~70%; 30°C、1mL/分)

²反応溶液におけるアジ化物濃縮は、14.9mMであった;

³反応溶液におけるアジ化物濃縮は、0.5mMであった;

50

【表9】

表9：異なるアジ化物を含むCu(I)触媒1, 3-双極性付加環化

アジ化物	鎖番号	配列	反応完了(%) ¹	計算量	観測量
1-アジド-ドコサン(C22-アジ化物)	33561.1	Q87CUUACGCUGAGUACU UCGAdTdT	98.1%	7345.8	7344
1-アジド-オクタデカ-6,9-ジエン(C18($\omega=2$)-アジ化物)	33034.1c	Q74CUUACGCUGAGUACU UCGAdTdT	93.4%	7285.7	7284
1-アジド-オクタデカ-9-ジエン(C18($\omega=1$)-アジ化物)	33559.1	Q85CUUACGCUGAGUACU UCGAdTdT	88.9%	7287.7	7285
1-アジド-オクタデカン(C18-アジ化物)	33560.1	Q86CUUACGCUGAGUACU UCGAdTdT	95.3%	7289.7	7288
1-アジド-アダマンタン	33562.1	Q88CUUACGCUGAGUACU UCGAdTdT	50.6%	7171.5	7169
コレステロール-アジ化物	33563.1	Q89CUUACGCUGAGUACU UCGAdTdT	95.7%	7549.1	7547

¹反応完了は、RP-HPLCによって測定された(DeltaPak C4カラム、150x3.9mm I. D.、5 μm、300Å、緩衝液A:50mM TEAA、pH7.0; 緩衝液B:ACN; 勾配:24分間0~70%緩衝液B; 30°C、1mL/分)

【表10】

表10：1-アジドーオクタデカ-6, 9-ジエン (C18 ($\omega=2$) -アジ化物 (図
22) と異なるRNAアルキンのCu (I)触媒1, 3-双極性付加環化反応

RNA アルキ ン位置	鎖番号	配列(5' -3')	反応完了(%)	計算量	観測量
3'末端	38103.1	AAcGcuGGGcGuuAAucAAdTd TL125	51.7% ¹	7483.2	7482
	37075.1	CUUACGCUGAGUACUUCGA dTdT(Tly)	~100%	7256.7	7255
	37077.1	CUUACGCUGAGUACUUCGA dTdT(T3ly)	90.3%	7256.7	7255
5'末端	33561.1	Q87CUUACGCUGAGUACUU CGAdTdT	98.1%	7345.8	7344
	37083.1	(Tly)CUUACGCUGAGUACUU CGAdTdT	~100%	7256.7	7255
	37085.1	(T3ly)CUUACGCUGAGUACU UCGAdTdT	96.6%	7256.7	7256
	37087.1	(u5ly1)CUUACGCUGAGUACU UCGAdTdT	91.0%	7300.7	7299
	37089.1	(u5ly2)CUUACGCUGAGUACU UCGAdTdT	84.0%	7328.8	7326
内部	37079.1	CUUACGCUGAG(Tly)ACUUC GAdTdT	~100%	6950.5	6949
	37081.1	CUUACGCUGAG(T3ly)ACUUC GAdTdT	91.5%	6950.5	6949

¹アルキン:アジ化物:Cu:TBTA:NaAscのモル比が、他の条件の変更なしに1:5. 8:0. 8:5. 6:6. 4

である場合、反応完了は~100%に達した。

10

20

【表11】

表11：本調査において全体的に得られた精製したクリック産物

鎖番号	配列(5'-3')	計算量	観測量	産生量(OJ)	純度
33034.1c ¹	Q74CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT	7285.7	7284	9.4	94%
33559.1	Q85CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT	7287.7	7285	10.6	94%
33560.1	Q86CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT	7289.7	7288	8.1	94%
33561.1	Q87CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT	7345.8	7344	15.5	89%
33562.1	Q88CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT	7171.5	7169	4.04	97%
33563.1	Q89CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT	7549.1	7547	24.1	95%
38103.1	AAcGcuGGGcGuuAAucAAdTdTL125	7483.2	7482	45.4	87%
37075.1	CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT(Tly)	7256.7	7255	46.2	96%
37077.1	CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT(T3ly)	7256.7	7255	71.0	90%
37079.1	CUUACGCUGAG(Tly)ACUUUCGAdTdT	6950.5	6949	6.3	80%
37081.1	CUUACGCUGAG(T3ly)ACUUUCGAdTdT	6950.5	6949	35.5	84%
37083.1	(Tly)CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT	7256.7	7255	20.0	79%
37085.1	(T3ly)CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT	7256.7	7256	44.0	89%
37087.1	(u5ly1)CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT	7300.7	7299	36.0	89%
37089.1	(u5ly2)CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT	7328.8	7326	11.7	90%

¹33034. 1cを、固相合成によって得られた33034-1のように正確な配列とのクリック反応によって得た
(表1を参照);

【0622】

5.3' - エキソヌクレアーゼ安定アッセイ

オリゴヌクレオチドのヌクレアーゼ安定を、当該技術分野において知られており、当業者が利用可能な方法およびプロトコルを使用して容易に測定することができる。

【0623】

実施例23：オリゴヌクレオチドのRNA干渉活性

1. RNA干渉評価のためのデュアルルシフェラーゼアッセイ

固相合成およびクリック反応によって得られた修飾を、デュアルルシフェラーゼアッセイにおけるRNA干渉について評価をした。二重鎖を、95°で2分間熱すること、および1Xリン酸緩衝食塩水において2時間室温において冷却することによって調製した。(表12～14)。

【0624】

遺伝子発現を抑制するための修飾siRNAの能力を、ウミシイタケおよびホタルルシフェラーゼ遺伝子を含有したpGL4ベクター(Promega)を使用してデュアルルシフェラーゼアッセイによって調査した。siRNA配列を、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を標的にするように設計した。安定的に形質移入されたHeLa細胞を、siRNAの指示量を用いて形質移入し、ホタルルシフェラーゼのシグナルを、ウミシイタケルシフェラーゼのものに基準化した。HeLaSS6細胞を、ホタル(標的)およびウミシイタケ(対照)ルシフェラーゼをコードするプラスミドを用いて、安定的に形質移入した。

【0625】

RNA干渉方法：HeLa細胞を、10%ウシ胎仔血清(FBS)および1%抗生物質を追加したダルベッコ変法イーグル培地(DMEM、GIBCO)において37°、5%

10

20

30

40

50

C O₂において、増殖した。細胞を指数増殖期において維持した。形質移入において約90%の集密に達するために、細胞を96ウェルプレート(1ウェルにつき0.1mL培地)内に蒔いた。形質移入を37で24時間進行することが可能であり、2日目に、培地をOPTIMEM1に変更し、血清培地(GIBCO)を縮小した。Promegaの2つのルシフェラーゼプラスミド、ウミシイタケルシフェラーゼ(pRL-CMV)、およびホタルルシフェラーゼ(pGL3)をそれぞれ対照およびレポーターとして使用した。siRNAの形質移入を、リポフェクタミン2000(Invitrogen)を用いて接着細胞株の製造者によって説明された通り実施した。最終容積は、1ウェルにつき150μlであった。2日目に、細胞をリポフェクタミン2000試薬(Invitrogen)によって媒介される2pM~8nMの範囲の変動濃縮のsiRNA、ホタルルシフェラーゼ標的を用いて形質移入した。24時間後、細胞を、2秒の遅延時間および10秒の統合時間でプレートルミノメーターを使用して、ホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼ発現の両方に対して解析した。(VICTOR2、PerkinElmer、Boston、MA)およびDual-Gloルシフェラーゼアッセイキット(Promega)、図24。ホタル/ウミシイタケルシフェラーゼ発現率を、未処理の(siRNAなし)対照に対して遺伝子サイレンシング率を測定するために使用した。生成された値は、3倍の平均を表す。

10

【0626】

スクリーニング処理は、全ての化合物を比較対象として親の未修飾二重鎖に対してスクリーンした、一次スクリーンから開始した。親の数倍低いIC50値を示した、このスクリーンからの強力な二重鎖のうちのいくつかを、二次スクリーンまたは直接比較のために選択した。全ての化合物は、親の二重鎖よりも強力に見えた。しかし、少なくとも5倍改善した効力を示したものは、センス鎖(表15)における2、15、および16の位置におけるUda(C22リンカー)を含む二重鎖であった。化合物の最終セットを我々の最高の修飾AD3202のうちの1つと比較し、これらの化合物が効力においてAD3202と合うこと分かるが、Uda修飾が活性改善に対して貢献することによる正確なメカニズムは、さらなる調査を通して検討されるであろう。

20

【0627】

材料および方法 -

30

細胞および試薬

デュアルHeLa(ルシフェラーゼ発現のために、PGL4プラスミドを形質移入されたHeLa細胞)

Invitrogen(Carlsbad, CA)から購入した組織培養、トリプシンおよびリポフェクタミン2000

10%ウシ胎仔血清、1%抗生物質溶液を追加したDMEM。

【0628】

siRNA治療を1mg/mLのリポフェクタミン2000を含むOpti-MEM(Invitrogen)を使用して実施した。

フェノールレッド、Promega Dual-Gloルシフェラーゼアッセイキット、0.25%トリプシン(Invitrogen)なしのDMEM。

40

【表12】

表12：二重鎖情報およびIC50値(Part I)

二重鎖	鎖番号	S/AS	配列5'~3'	修飾	IC50値(nM)
AD-1000	1000	S	CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT	なし	人工産物 0.906
	1001	AS	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	なし	範囲 0.2~0.3
AD-20271	37079	S	CUUACGCUGAG(Tly)ACUUCGAdTdT	U12-->(Tly)	0.22
	1001	AS	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	なし	
AD-20272	37081	S	CUUACGCUGAG(T3ly)ACUUCGAdTdT	U12-->(T3ly)	0.228
	1001	AS	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	なし	
AD-20273	37083	S	(Tly)CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT	5'(Tly)	0.348
	1001	AS	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	なし	
AD-20274	37085	S	(T3ly)CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT	5'(T3ly)	0.324
	1001	AS	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	なし	
AD-20275	37087	S	(u5ly1)CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT	5'(u5ly1)	0.263
	1001	AS	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	なし	
AD-20276	37089	S	(u5ly2)CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT	5'(u5ly2)	0.376
	1001	AS	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	なし	
AD-20201	36862	S	CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdTL125	3'L125	0.922
	1001	AS	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	なし	
AD-20202	37075	S	CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT(Tly)	3'(Tly)	1.12
	1001	AS	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	なし	
AD-20203	37077	S	CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT(T3ly)	3'(T3ly)	1.41
	1001	AS	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	なし	
AD-20321	38103.1	S	AAcGcuGGGcGuuAAucAAdTdTL125	2'OMe-全てPy および3'L125	範囲外
	24599	AS	UUGAUuAACGCCcAGCGU UdTs dT	なし	

10

20

30

【表13】

表13：二重鎖情報およびIC50値（Part II）

二重鎖	鎖番号	S/AS	配列5'~3'	修飾	IC50 値 (nM)	親と比べた活性の倍増
AD-1000	1000	S	CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT	なし	0.38	親
	1001	AS	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	なし		
AD-20151	33024.1	S	C(Uda)UACGCUGAGUACUUCGAdTdT	U2-->Uda	0.07	5倍
	1001	AS	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	なし		
AD-20152	33026.1	S	CUUACGC(Uda)GAGUACUUCGAdTdT	U8-->Uda	0.176	2倍
	1001	AS	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	なし		
AD-20153	33027.1	S	CUUACGCUGAG(Uda)ACUUCGAdTdT	U12-->Uda	0.044	8倍
	1001	AS	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	なし		
AD-20154	33028.1	S	CUUACGCUGAGUAC(Uda)UCGAdTdT	U15-->Uda	0.092	4倍
	1001	AS	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	なし		
AD-20155	33029.1	S	CUUACGCUGAGUACU(CGA)dTdT	U16-->Uda	0.073	5倍
	1001	AS	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	なし		
AD-20156	33031.1	S	CUUACGCUGAGUACUUCGAdT(Uda2p)	Uda2p-3'end	1.18	
	1001	AS	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	なし		
AD-20157	33032.1	S	CUUACGCUGAG(Uda)ACUUCGAdT(Uda2p)	U12-->Uda,U da2p-3'末端	NA 範囲外	
	1001	AS	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	なし		
AD-20158	33033.1	S	C(Uda)UACGCUGAGUACUUCGAdT(Uda2p)	U2-->Uda,Ud a2p-3'末端	1.5	2倍
	1001	AS	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	なし		
AD-20159	33034.1	S	Q74CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT	Q74-5'末端	0.154	2倍
	1001	AS	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	なし		
AD-20160	1000	S	CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT	なし	2.03	
	33035.1	AS	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdT(Uda2p)	Uda2p-3'末端 -AS		
AD-20161	33071.1	S	Q75CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT	Q75-5'末端	0.43	
	1001	AS	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	なし		

10

20

30

【表14】

表14：二重鎖情報およびIC50値(Part III)

二重鎖	一本鎖番号	S/AS	配列5'～3'	修飾	IC50値(nM)	親と比べた活性の倍増
AD-1000	1000	S	CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT	なし	0.326	親
	1001	AS	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	なし		
AD-20162	33558.1	S	Q84CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT	Q84 5'末端	0.125	2.6倍
	1001	AS	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	なし		
AD-20163	33559.1	S	Q85CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT	Q85 5'末端	0.126	2.6倍
	1001	AS	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	なし		
AD-20164	33560.1	S	Q86CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT	Q86 5'末端	0.206	1.6倍
	1001	AS	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	なし		
AD-20165	33561.1	S	Q87CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT	Q87 5'末端	0.35	
	1001	AS	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	なし		
AD-20166	33562.1	S	Q88CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT	Q88 5'末端	0.318	
	1001	AS	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	なし		
AD-20167	33563.1a	S	Q89CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT	Q89 5'末端	0.771	
	1001	AS	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	なし		
AD-20168	33563.1b	S	Q89CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT	Q89 5'末端	0.953	
	1001	AS	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	なし		

【表15】

表15：二重鎖情報およびIC50値（Part IV）

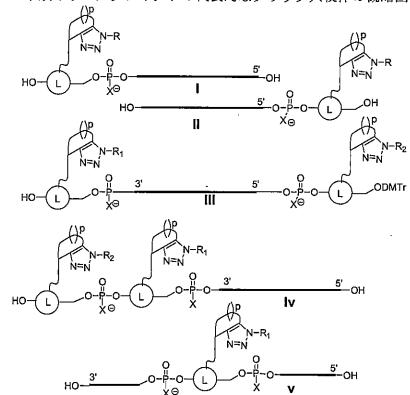
二重鎖	一本鎖番号	S/AS	配列5'~3'	修飾	IC50値(nM)	親と比べた活性の倍増
AD-1000	1000	S	CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT	なし	0.242	
	1001	AS	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	なし		
AD-20151	33024.1	S	C(Uda)UACGCUGAGUACUUCGAdTdT	U2-->Uda	0.036	6.5倍
	1001	AS	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	なし		
AD-20152	33026.1	S	CUUACGC(Uda)GAGUACUUCGAdTdT	U8-->Uda	0.083	3倍
	1001	AS	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	なし		
AD-20153	33027.1	S	CUUACGCUGAG(Uda)ACUUCGAdTdT	U12-->Uda	0.052	4倍
	1001	AS	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	なし		
AD-20154	33028.1	S	CUUACGCUGAGUAC(Uda)UCGAdTdT	U15-->Uda	0.044	5倍
	1001	AS	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	なし		
AD-20155	33029.1	S	CUUACGCUGAGUACU(Uda)CGAdTdT	U16-->Uda	0.046	6倍
	1001	AS	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	なし		
AD-20162	33558.1	S	Q84CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT	Q84 5'末端	0.074	3倍
	1001	AS	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	なし		
AD-20163	33559.1	S	Q85CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT	Q85 5'末端	0.062	4倍
	1001	AS	UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT	なし		

10

20

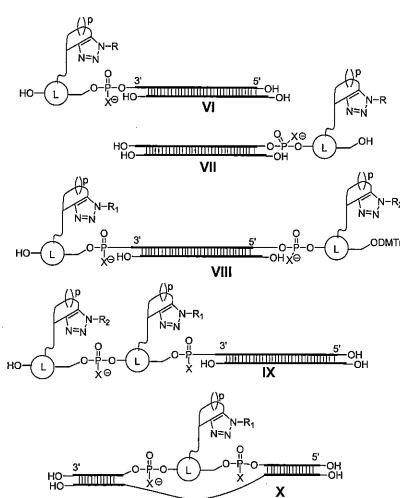
【図1】

一本鎖オリゴスクレオチドの代表的なクリック共役体の概略図



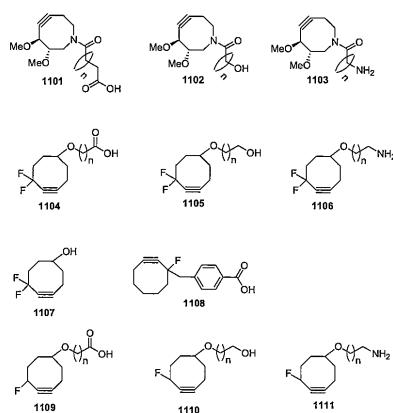
【図2】

二本鎖オリゴスクレオチドの代表的なクリック共役体の概略図



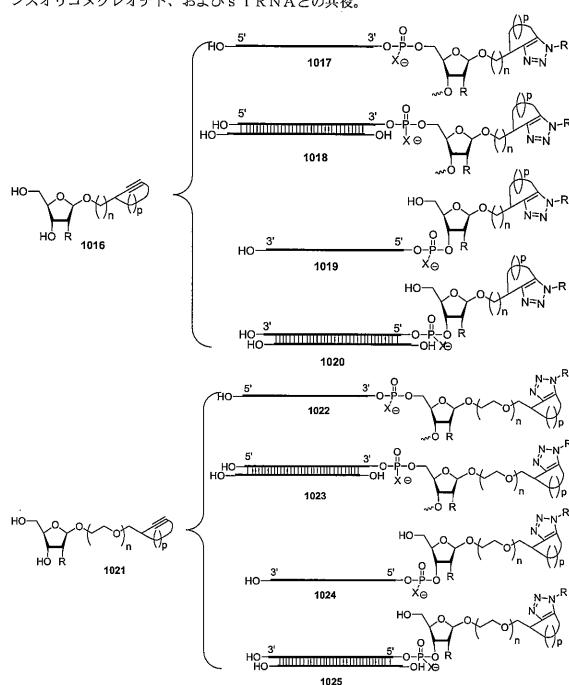
【図3】

銅を含まないクリックケミストリーに対する環ひずみアルキン

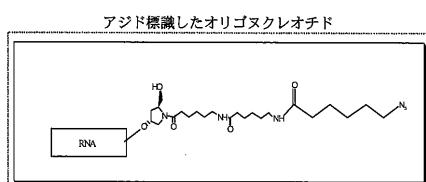


【図6】

脱塩基リンカーよりクリック化学を使用した、リガンドとアンタゴm i r、アンチセントスオリゴスクレオチド、およびs i RNAとの共役。

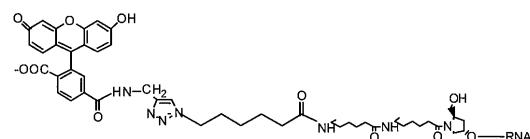


【図14】

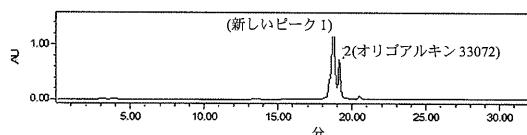


【図15】

クリックケミストリーによってアジド標識したオリゴヌクレオチドと共に役する6-カルボキシフルオセイントロバロパルギルアミン

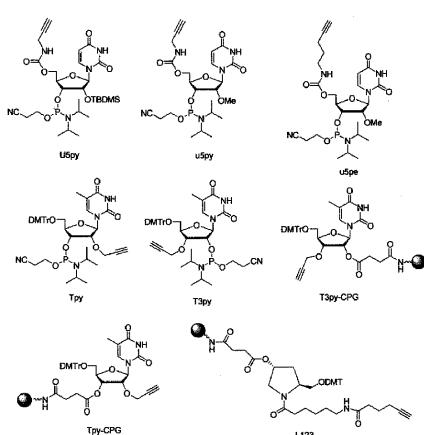


【図17】

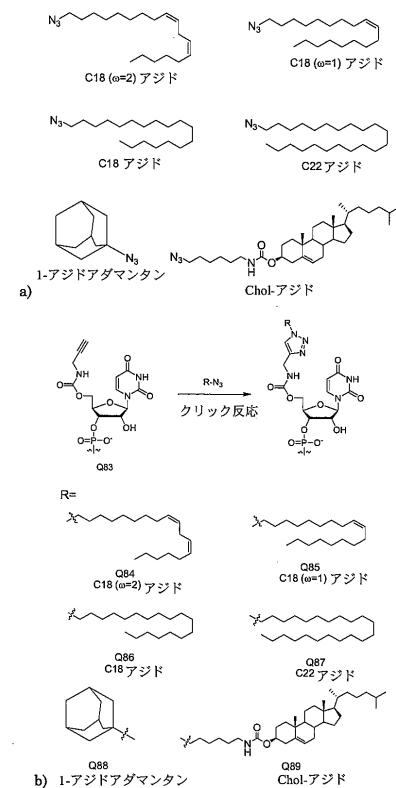


【図20】

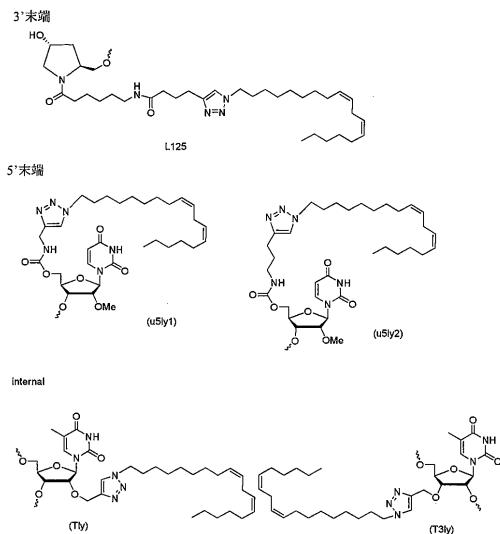
Figure 20



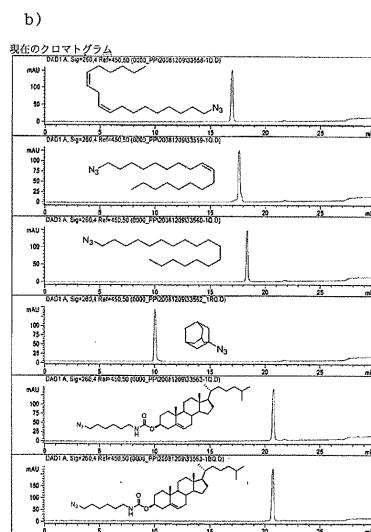
【図21】



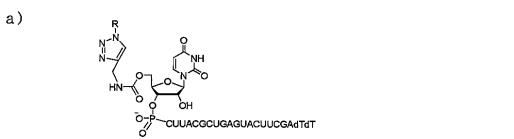
【図22】



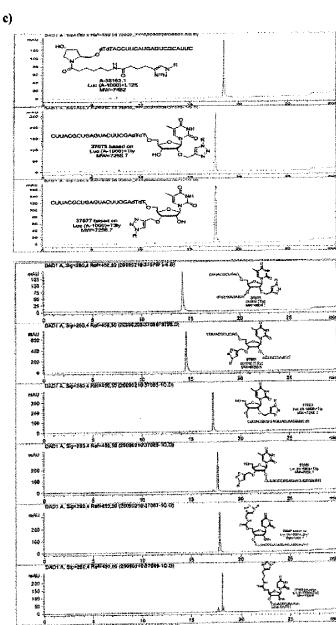
【図23b】



【 図 2 3 a 】

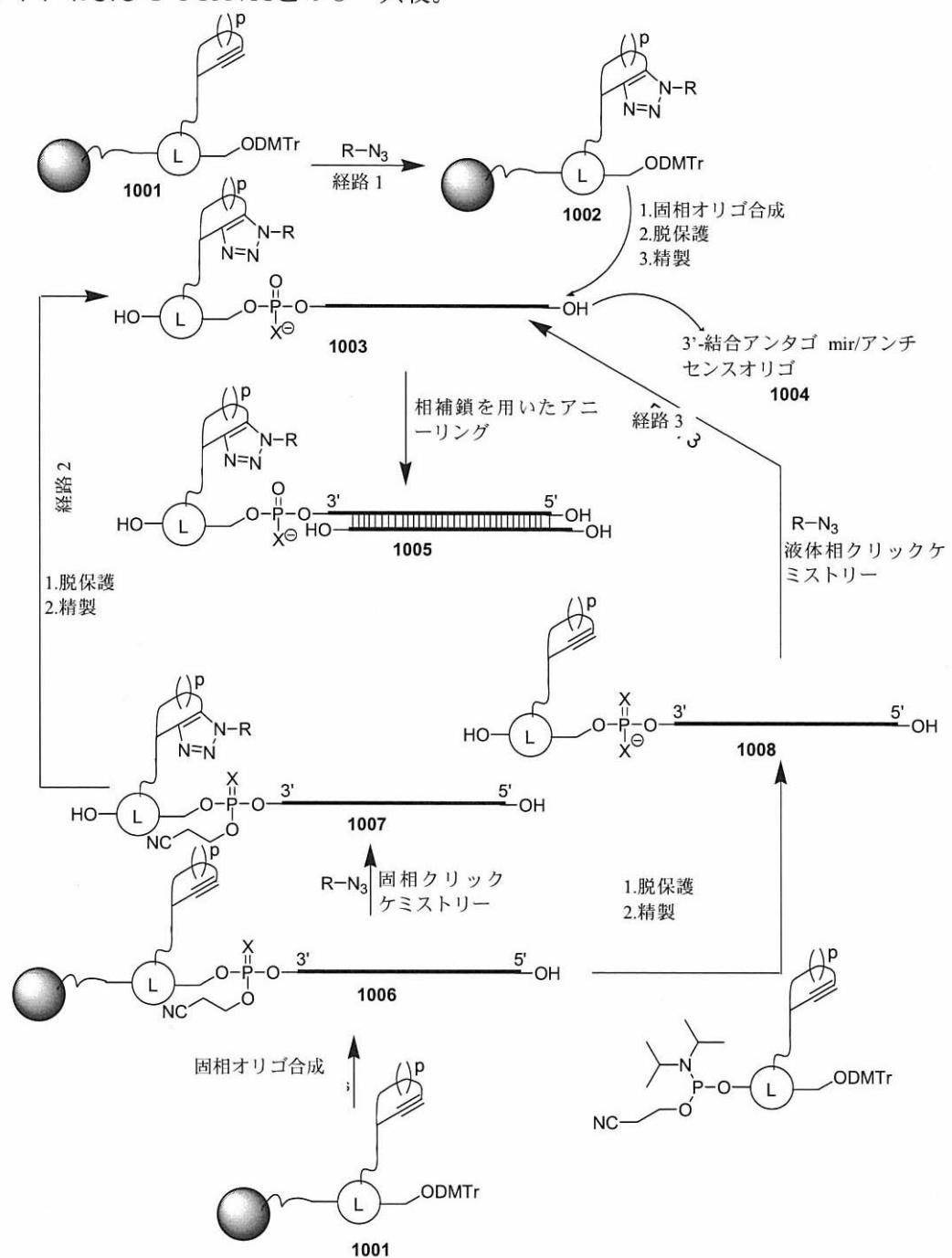


【 図 2 3 c 】



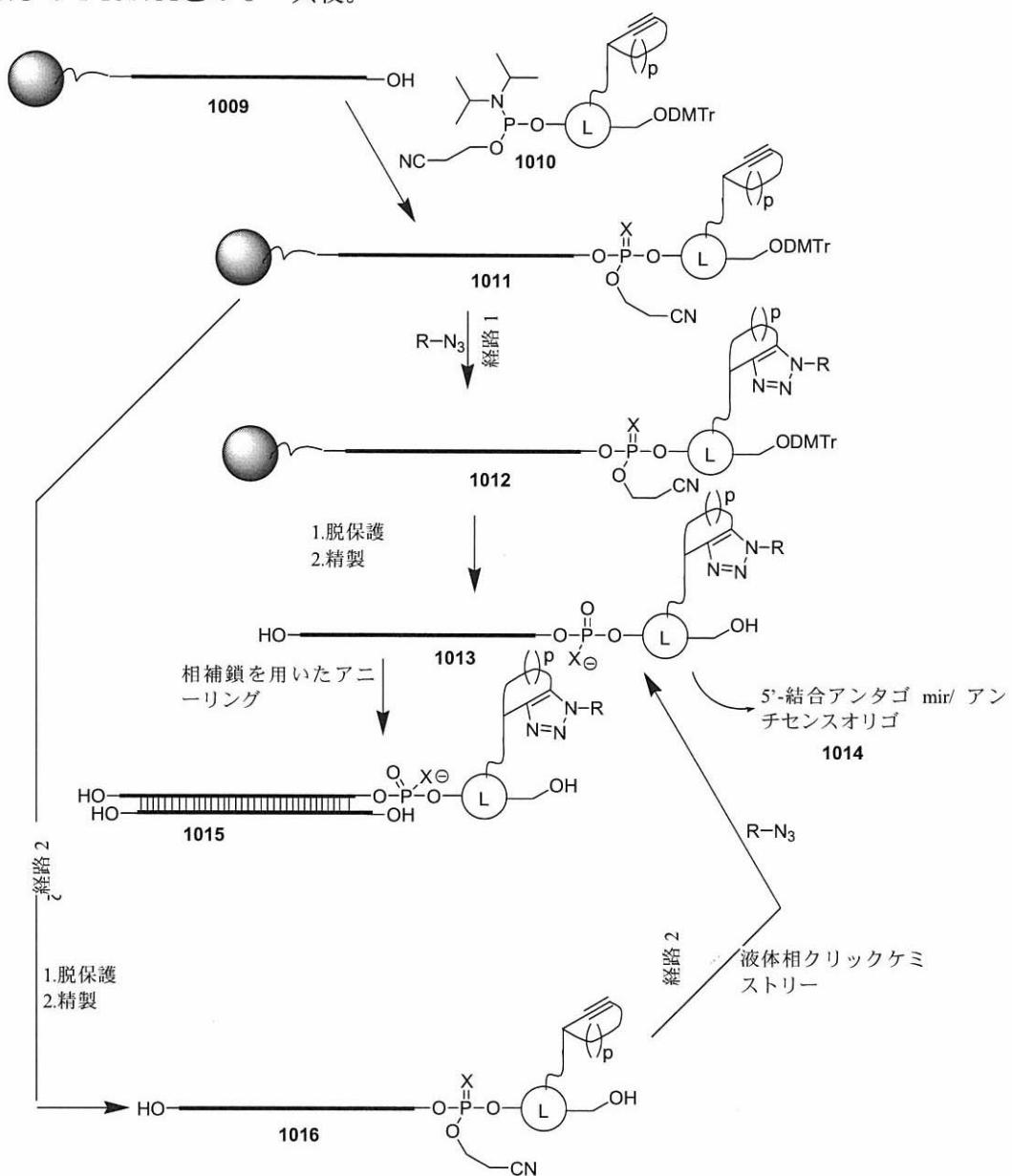
【図4】

クリックケミストリーを使用した、リガンドとアンタゴ mir、アンチセンスオリゴヌクレオチド、および si RNAとの3'共役。



【図5】

クリック化学を使用した、リガンドとアンタゴ mir、アンチセンスオリゴヌクレオチド、および si RNAとの5'共役。

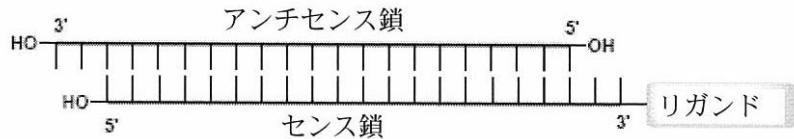


【図7】

siRNAのリガンド結合点

siRNA のリガンド部位

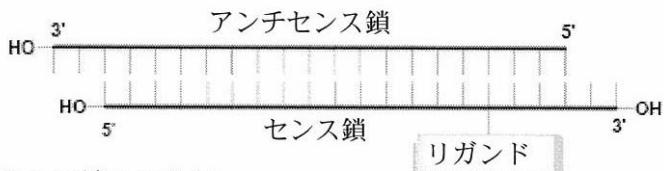
1.センス鎖の3'末端



2.センス鎖の5'末端



3.センス鎖の内部位置

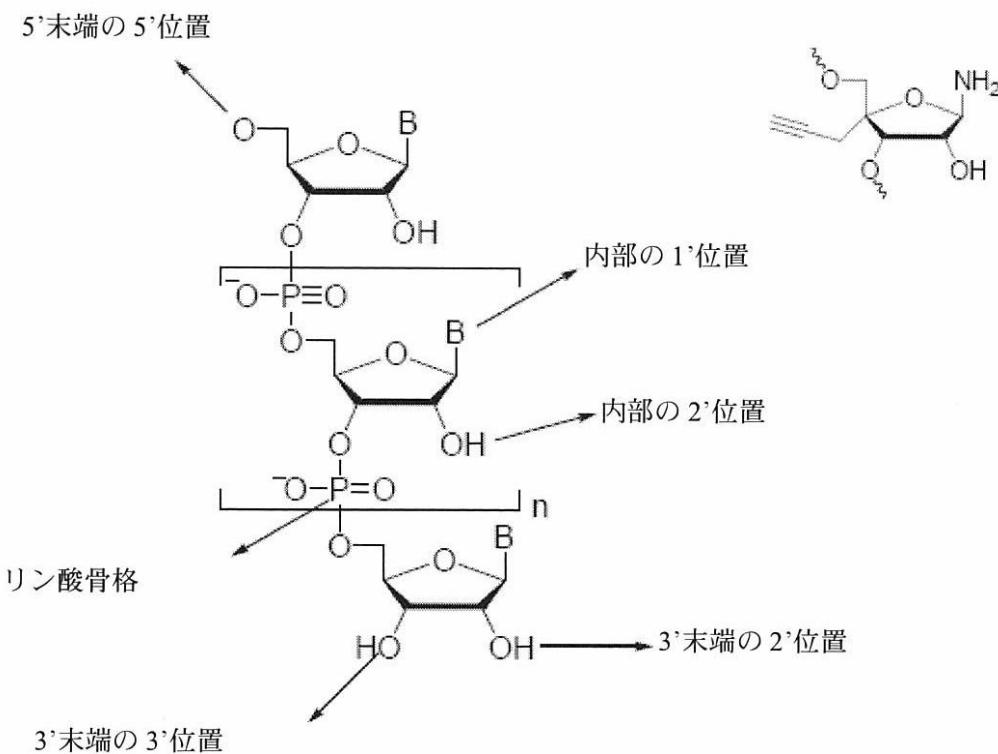


4.必要であればアンチセンス鎖の3'位置

リガンド =脂質、コレストロール、炭水化物、葉酸、ポリアミン、ペプチド等。

【図 8】

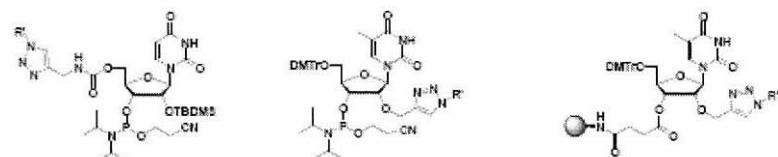
オリゴヌクレオチドのリガンド付着点
糖鎖骨格のリガンド部位



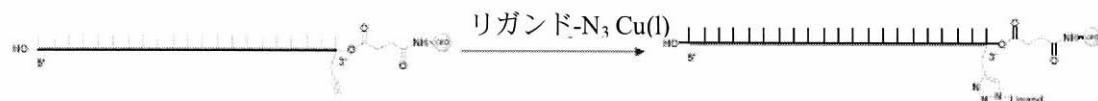
【図 9】

クリックケミストリーによるリガンドとオリゴヌクレオチドとの共役
クリックケミストリーによるリガンドと RNA との共役のための戦略

1.クリックケミストリーによる構成要素作製

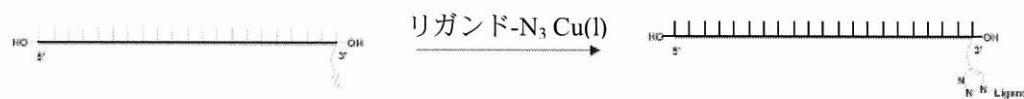


2. 固形担体:固相 RNA 合成後の、合成後クリックケミストリー



各種のリガンドを組み込むことができる

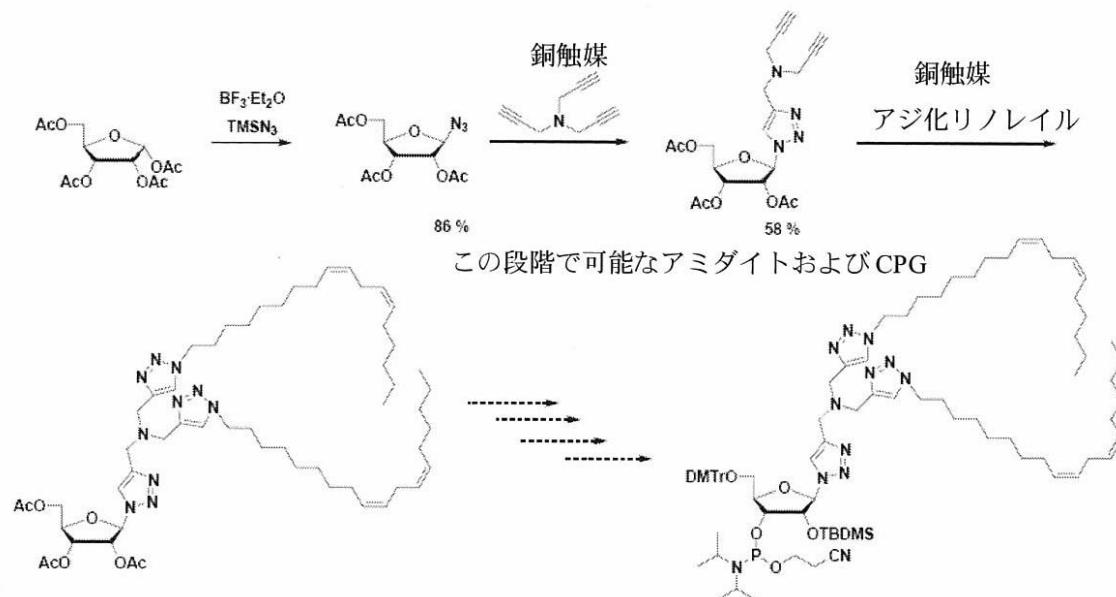
3. 溶液内:アンモニアを用いて処理した後、合成後クリックケミストリー



塩基不安定リガンドを組み込むことができる。

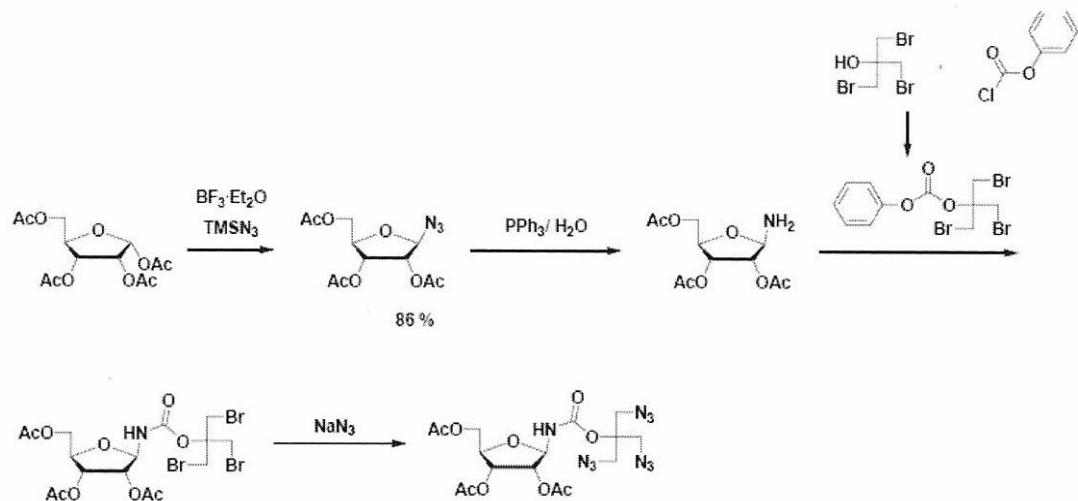
【図 10】

クリックケミストリーのための脱塩基リンカーおよびその使用



【図 1 1】

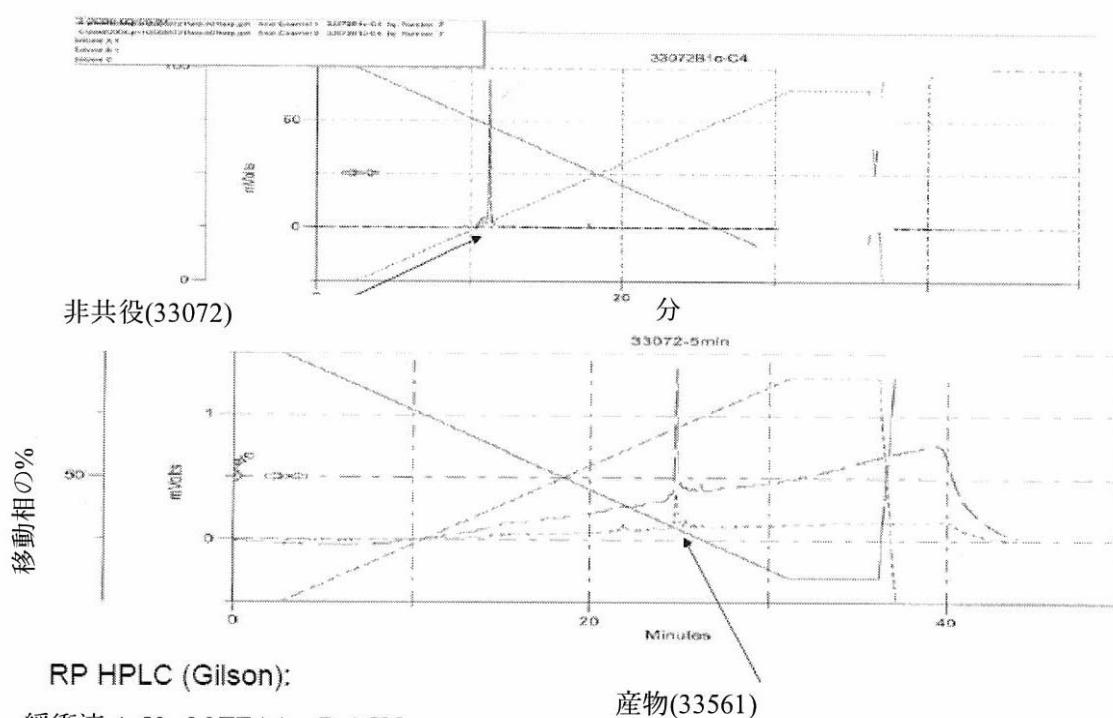
クリックケミストリーのための脱塩基リンカー



【図 1 2】

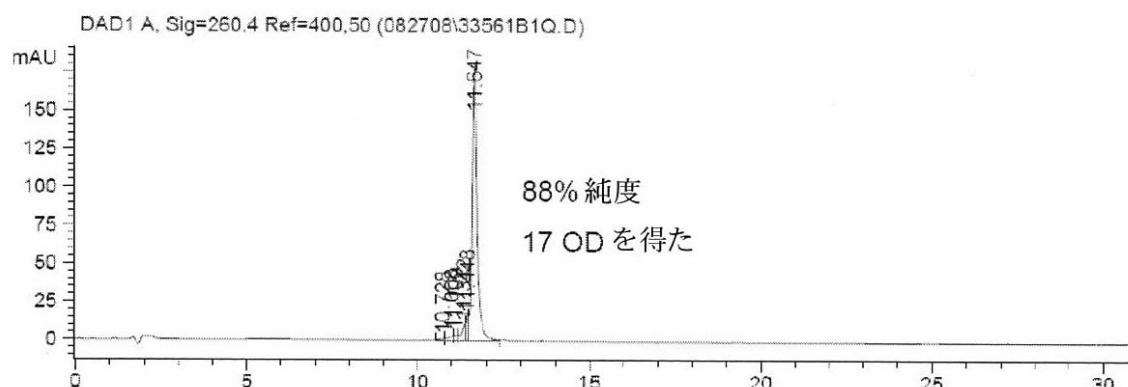
クリックケミストリー共役の HPLC 解析

HPLC 解析



【図 1 3】

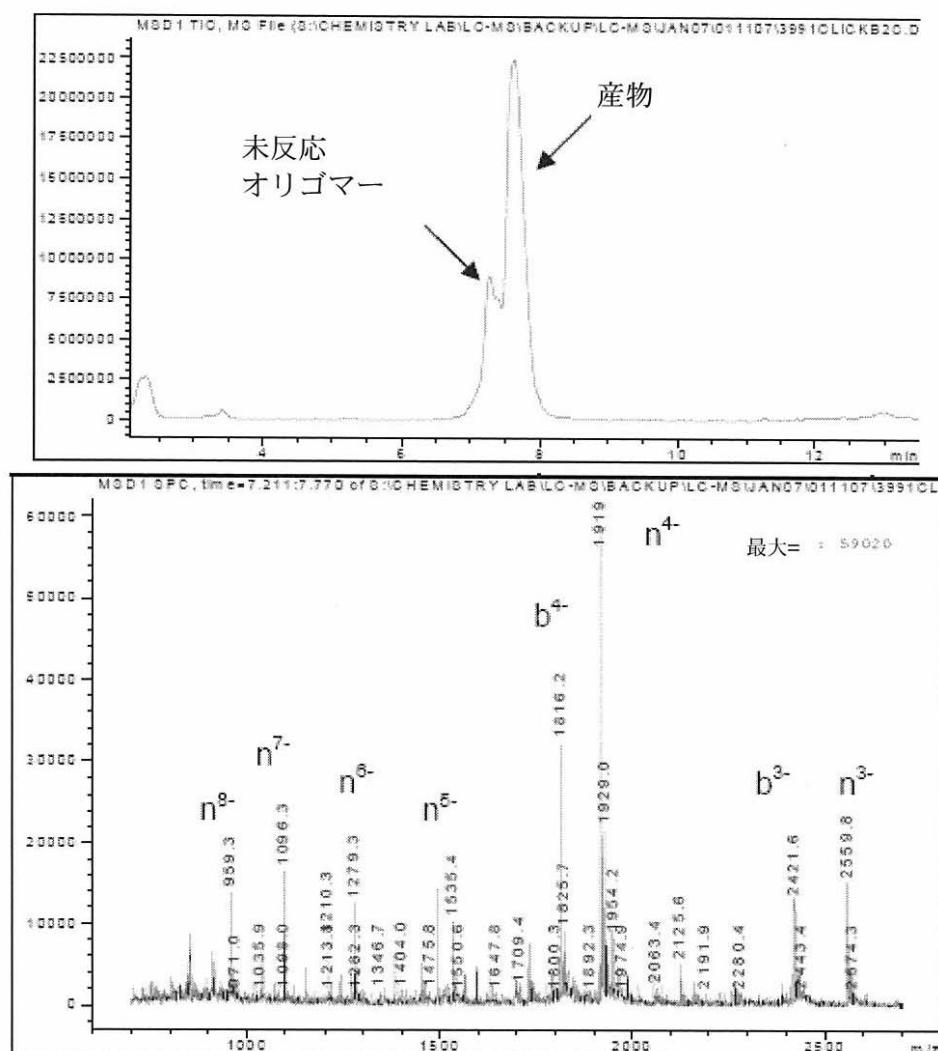
精製したクリックケミストリー共役のHPLC解析
最終QC解析



33561 を RP HPLC によって精製した(勾配:30 分間における 0~90%緩衝液 B)

【図16】

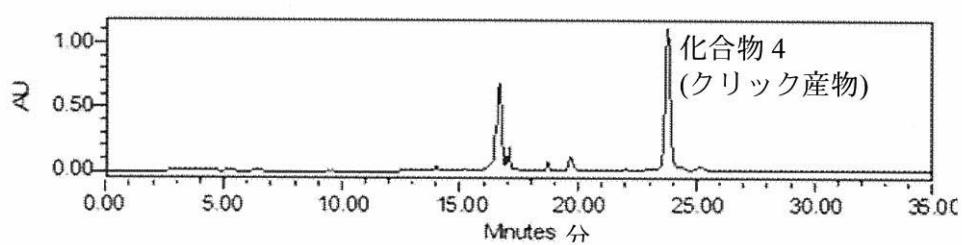
6-カルボキシフルオセイン-プロパルギルアミンとアジ化物標識したオリゴヌクレオチドとの間のクリックケミストリー反応の粗産物のLC-MS解析。



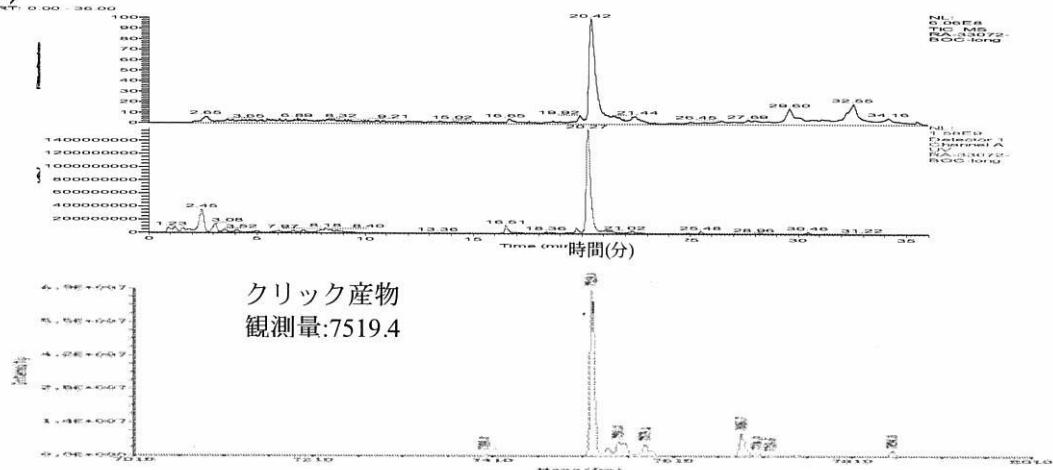
a、フルオレセイン共役オリゴマー、MW計算値：7684、MW実測値：7682.3
 b、非共役出発物質（アジド）、MW計算値：7269、MW実測値：7277

【図18】

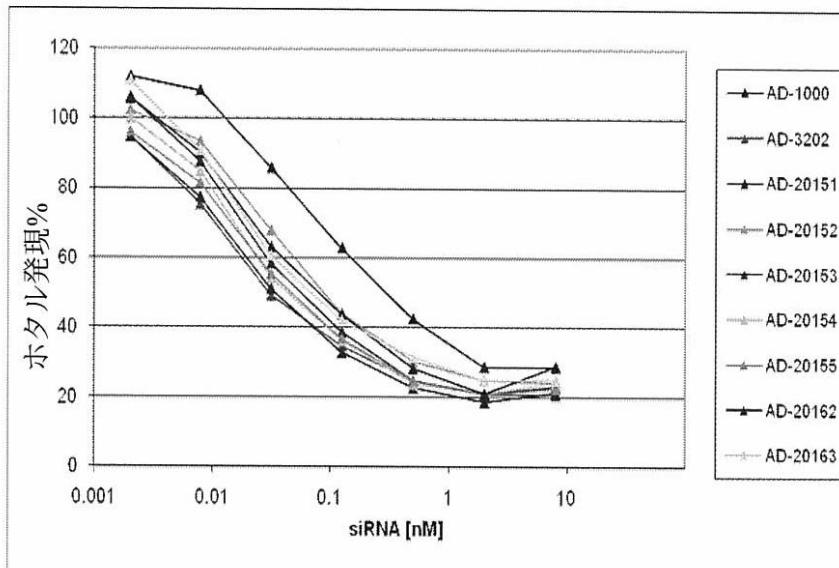
a)



b)



【図24】



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 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
C 0 7 H 21/02 (2006.01)	C 0 7 H 21/02	
C 0 7 H 19/067 (2006.01)	C 0 7 H 19/067	
C 0 7 H 19/056 (2006.01)	C 0 7 H 19/056	
C 0 7 H 15/08 (2006.01)	C 0 7 H 15/08	
C 0 7 H 15/18 (2006.01)	C 0 7 H 15/18	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(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,SE,SI,S,K,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,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,I,S,JP,KE,KG,KM,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,PE,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

- (72)発明者 マノハラン , ムシアー
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 2 ケンブリッジ サード ストリート 3 0 0
 アルニラム ファーマスティカルズ インコーポレイテッド
- (72)発明者 ラジーフ , カラントタットヒル ジー
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 2 ケンブリッジ サード ストリート 3 0 0
 アルニラム ファーマスティカルズ インコーポレイテッド
- (72)発明者 山田 剛史
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 2 ケンブリッジ サード ストリート 3 0 0
 アルニラム ファーマスティカルズ インコーポレイテッド
- (72)発明者 バトラー , デイヴィッド
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 2 ケンブリッジ サード ストリート 3 0 0
 アルニラム ファーマスティカルズ インコーポレイテッド
- (72)発明者 ジャヤプラカシュ , ケイ ナラヤナンナエー
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 2 ケンブリッジ サード ストリート 3 0 0
 アルニラム ファーマスティカルズ インコーポレイテッド
- (72)発明者 ジයිලාමන , මසසාමි
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 2 ケンブリッジ サード ストリート 3 0 0
 アルニラム ファーマスティカルズ インコーポレイテッド
- (72)発明者 松田 成夫
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 2 ケンブリッジ サード ストリート 3 0 0
 アルニラム ファーマスティカルズ インコーポレイテッド
- (72)発明者 パンディー , ラジェンドラ ケイ
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 2 ケンブリッジ サード ストリート 3 0 0
 アルニラム ファーマスティカルズ インコーポレイテッド
- (72)発明者 ペン , チャン ゲン
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 2 ケンブリッジ サード ストリート 3 0 0
 アルニラム ファーマスティカルズ インコーポレイテッド

F ターム(参考) 4B024 AA01 CA01 CA06 CA20 HA17
 4C057 AA03 AA18 BB02 CC01 DD01 LL07 LL10 LL18 MM02 MM09
 4C084 AA02 AA13 MA13 MA17 MA22 MA23 MA28 MA31 MA32 MA35
 MA37 MA41 MA43 MA52 MA56 MA57 MA58 MA59 MA60 MA63
 MA66 MA67 NA05 ZA022 ZB072 ZB082 ZB092 ZB132 ZB262 ZB332
 ZB352 ZB372

4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA05 ZA02 ZB07 ZB08
ZB09 ZB13 ZB26 ZB33 ZB35 ZB37