

(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2010-504355  
(P2010-504355A)

(43) 公表日 平成22年2月12日(2010.2.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07H 21/02 (2006.01)</b>	C07H 21/02 ZNA	4B024
<b>C12N 15/09 (2006.01)</b>	C12N 15/00 A	4B065
<b>C12N 5/10 (2006.01)</b>	C12N 5/00 B	4C057
<b>A61K 31/713 (2006.01)</b>	A61K 31/713	4C076
<b>A61K 47/48 (2006.01)</b>	A61K 47/48	4C084
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 92 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-529396 (P2009-529396)  
 (86) (22) 出願日 平成19年9月20日 (2007. 9. 20)  
 (85) 翻訳文提出日 平成21年5月25日 (2009. 5. 25)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/079051  
 (87) 国際公開番号 W02008/036825  
 (87) 国際公開日 平成20年3月27日 (2008. 3. 27)  
 (31) 優先権主張番号 60/826, 702  
 (32) 優先日 平成18年9月22日 (2006. 9. 22)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 60/867, 706  
 (32) 優先日 平成18年11月29日 (2006. 11. 29)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 505175825  
 ダーマコン, インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 コロラド 80026,  
 ラファイエット, クレセント ドライ  
 ブ 2650, スイート 100  
 (74) 代理人 100064414  
 弁理士 磯野 道造  
 (72) 発明者 ヤマダ, クリスティーナ  
 アメリカ合衆国、コロラド州 80404  
 、ボルダー、アスペン シーティー 3  
 640  
 (72) 発明者 クヴォロヴァ, アナスタシア  
 アメリカ合衆国、コロラド州 80305  
 、ボルダー、スクアイアーズ サークル  
 4450

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 二本鎖オリゴヌクレオチド複合体、RNA干渉による遺伝子サイレンシング方法、および医薬品組成物

(57) 【要約】

形質移入剤を用いることなく細胞、組織または臓器に吸収され、標的遺伝子をサイレンシングすることができる二本鎖オリゴヌクレオチド複合体を提供する。前記二本鎖オリゴヌクレオチド複合体は、細胞、組織または臓器への前記二本鎖オリゴヌクレオチド複合体の輸送および吸収を促進するコンジュゲート部を有する。

【選択図】 図18C

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

二本鎖オリゴヌクレオチド複合体であって、前記二本鎖オリゴヌクレオチド複合体は、  
18個から30個のヌクレオチドよりなるセンス鎖と、  
18個から30個のヌクレオチドよりなるアンチセンス鎖と、  
コンジュゲート部と、  
長さが3個から9個の原子数からなるリンカ分子とから構成され、

前記アンチセンス鎖は前記センス鎖および標的遺伝子双方に対して高い相補性を有し、  
前記センス鎖と前記アンチセンス鎖とは二本鎖を形成し、  
前記センス鎖のヌクレオチドの40%から90%、および前記アンチセンス鎖のヌクレオチドの40%から90%は、化学的に修飾されたヌクレオチドあり、  
前記コンジュゲート部は細胞内への輸送を促進し、  
前記リンカ分子は前記コンジュゲート部を前記センス鎖と結合させることを特徴とする二本鎖オリゴヌクレオチド複合体。

10

## 【請求項 2】

前記アンチセンス鎖の10、11、12、13または14番目のヌクレオチドと、前記センス鎖の相対するヌクレオチドとの間にミスマッチを有する、請求項1に記載の二本鎖オリゴヌクレオチド複合体。

## 【請求項 3】

前記アンチセンス鎖の14番目のヌクレオチドと、前記センス鎖の相対するヌクレオチドとの間に前記ミスマッチを有する、請求項2に記載の二本鎖オリゴヌクレオチド複合体。

20

## 【請求項 4】

前記化学的に修飾された各ヌクレオチドが、2'F修飾ヌクレオチドおよび2'-O-メチル修飾ヌクレオチドからなる群から選ばれる、請求項1に記載の二本鎖オリゴヌクレオチド複合体。

## 【請求項 5】

前記センス鎖の1番目および2番目のヌクレオチド、全Cヌクレオチド、および全Uヌクレオチドは2'-O-メチル修飾ヌクレオチドであり、前記アンチセンス鎖の全Cヌクレオチドおよび全Uヌクレオチドは2'F修飾ヌクレオチドである、請求項4に記載の二本鎖オリゴヌクレオチド複合体。

30

## 【請求項 6】

前記コンジュゲート部は、コレステロール、コレスタノール、スチグマステロール、コラン酸、およびエルゴステロールよりなる群から選ばれる、請求項1に記載の二本鎖オリゴヌクレオチド複合体。

## 【請求項 7】

前記リンカ分子は5個から8個の原子よりなる長さを持つ、請求項1に記載の二本鎖オリゴヌクレオチド複合体。

## 【請求項 8】

前記センス鎖の5'末端に結合した色素分子を少なくとも一つ有する、請求項7に記載の二本鎖オリゴヌクレオチド複合体。

40

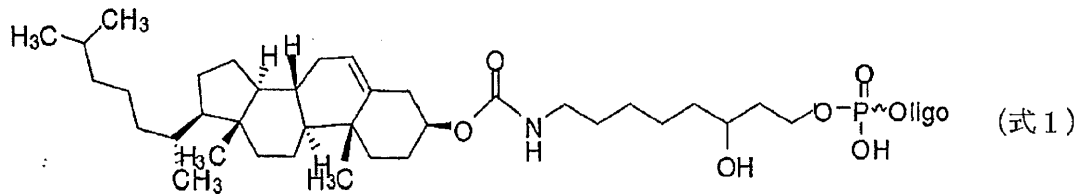
## 【請求項 9】

前記リンカ分子によってコンジュゲート部が前記センス鎖の3'末端に結合されている、請求項1に記載の二本鎖オリゴヌクレオチド複合体。

## 【請求項 10】

前記コンジュゲート部はコレステロールであり、前記リンカ分子は8個の原子よりなる長さを持ち、前記センス鎖が(式1)に示す構造を有する、請求項9に記載の二本鎖オリゴヌクレオチド複合体。

## 【化 1】

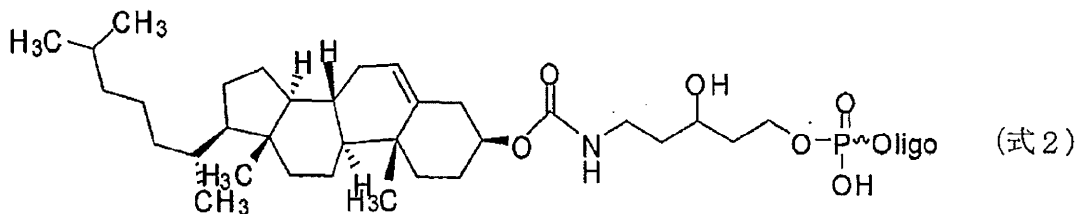


## 【請求項 1 1】

前記コンジュゲート部はコレステロールであり、前記リンカ分子は 5 個の原子よりなる長さを持ち、前記センス鎖が (式 2) に示す構造を有する、請求項 9 に記載の二本鎖オリゴヌクレオチド複合体。

10

## 【化 2】



## 【請求項 1 2】

前記センス鎖の 1 番目および 2 番目のヌクレオチド、全 C ヌクレオチド、および全 U ヌクレオチドは、2' - O - メチル修飾され、前記アンチセンス鎖の全 C ヌクレオチドおよび全 U ヌクレオチドは、2' F 修飾される、請求項 1 1 に記載の二本鎖オリゴヌクレオチド複合体。

20

## 【請求項 1 3】

ホスフェート基がアンチセンス鎖の 5' 末端にある、請求項 1 2 に記載の二本鎖オリゴヌクレオチド複合体。

## 【請求項 1 4】

前記センス鎖は 19 個から 23 個のヌクレオチドよりなる長さをもつ、前記アンチセンス鎖は 19 個から 23 個のヌクレオチドよりなる長さをもつ、請求項 1 3 に記載の二本鎖オリゴヌクレオチド複合体。

30

## 【請求項 1 5】

前記アンチセンス鎖の 10、11、12、13 または 14 番目のヌクレオチドと、前記センス鎖の相対するヌクレオチドとの間にミスマッチを有する、請求項 1 4 に記載の二本鎖オリゴヌクレオチド複合体。

## 【請求項 1 6】

前記アンチセンス鎖の 14 番目のヌクレオチドと、前記センス鎖の相対するヌクレオチドとの間に前記ミスマッチを有する、請求項 1 5 に記載の二本鎖オリゴヌクレオチド複合体。

## 【請求項 1 7】

前記アンチセンス鎖の 3' 末端にオーバーハングを有し、前記オーバーハングはホスホロチオエート連結部を有する、請求項 1 6 に記載の二本鎖オリゴヌクレオチド複合体。

40

## 【請求項 1 8】

二本鎖オリゴヌクレオチド複合体であって、前記二本鎖オリゴヌクレオチド複合体は、18 個から 30 個のヌクレオチドよりなるセンス鎖と、

18 個から 30 個のヌクレオチドよりなるアンチセンス鎖と、

前記センス鎖 3' 末端に C5 リンカ分子を介して結合したコレステロール分子と、

前記アンチセンス鎖の 5' 末端に位置するホスフェート基とから構成され、

前記アンチセンス鎖は前記センス鎖および標的遺伝子双方に対して高い相補性を有し、

前記センス鎖および前記アンチセンス鎖は二本鎖を形成し、

前記センス鎖に結合したコレステロール - リンカ分子は (式 3) に示す構造を有し、

50



願日：2006年11月29日)に基づいて優先権を主張するものであり、前記出願のすべての記載をここに引用するものである。

【0002】

本発明は修飾ポリヌクレオチドを用いた遺伝子サイレンシング分野に関する。より具体的には、細胞、組織、または臓器にオリゴヌクレオチドを効率的に輸送するコンジュゲート部を有する二本鎖オリゴヌクレオチド複合体、ならびにその複合体を標的遺伝子のサイレンシングに用いる方法に関する。

【背景技術】

【0003】

RNA干渉(以下RNAiという)は、マイクロRNA(以下miRNAという)によって媒介される、ほぼどこにでもある転写後遺伝子制御である。これら小さな、非コーディングRNAによる遺伝子ノックダウンには、形質移入を分裂させおよび/または翻訳能を弱めるためにmRNA 3'UTRを標的化する目的で、miRNAガイド鎖2位から7位のシード領域を使ったRNA誘発サイレンシング複合体(以下RISCという)が利用される。小さな、合成dsRNA(以下、小さな干渉RNAまたはsiRNAという)がこのために利用できることが発見されてから、RNA干渉は機能的ゲノミックスのツールとして用いられてきた。

10

【発明の概要】

【0004】

本発明は、以下のように構成される二本鎖オリゴヌクレオチド複合体を提供するものである。

20

- a. 約18個から30個のヌクレオチドよりなるセンス鎖；
- b. 約18個から30個のヌクレオチドよりなるアンチセンス鎖；
- c. 細胞輸送を促進するコンジュゲート部；
- d. 長さが約3個から約9個の原子数からなり、前記コンジュゲート部を前記センス鎖と結合させるリンカ分子より構成され、

前記アンチセンス鎖は前記センス鎖および標的遺伝子双方に対して高い相補性を有し、前記センス鎖ならびに前記アンチセンス鎖は二本鎖を形成する。

【0005】

前記センス鎖のヌクレオチドの約40%から約90%、および前記アンチセンス鎖のヌクレオチドの約40%から約90%は、化学的に修飾されたヌクレオチドである。

30

【0006】

本発明の実施形態では、前記二本鎖オリゴヌクレオチド複合体は、前記アンチセンス鎖の10、11、12、13、または14番目のヌクレオチドと、前記センス鎖の相対するヌクレオチドの間にミスマッチを構成する。好ましくは、前記アンチセンス鎖の14番目のヌクレオチドと前記センス鎖の相対するヌクレオチドの間にミスマッチを有する。

【0007】

本発明の別の実施形態では、前記二本鎖オリゴヌクレオチド複合体の化学修飾された各ヌクレオチドは、2'F修飾ヌクレオチドおよび2'-O-メチル修飾ヌクレオチドよりなる群から選択される。好ましくは、前記アンチセンス鎖の1番目および2番目のヌクレオチド、全Cヌクレオチド、および全Uヌクレオチドは、2'F修飾ヌクレオチドである。

40

【0008】

また、本発明の別の実施形態では、前記コンジュゲート部はコレステロール、コレスタノール、スチグマステロール、コラン酸、またはエルゴステロールよりなる群から選ばれる。

【0009】

また、本発明の別の実施形態では、前記リンカ分子は5個から8個の原子よりなる長さを持つ。

【0010】

また、本発明の別の実施形態では、前記二本鎖オリゴヌクレオチド複合体は、前記センス

50

鎖の 5' 末端に結合した色素分子を少なくとも一つ有する。

【0011】

また、本発明の別の実施形態では、前記リンカ分子によってコンジュゲート部が前記センス鎖の 3' 末端に結合される。

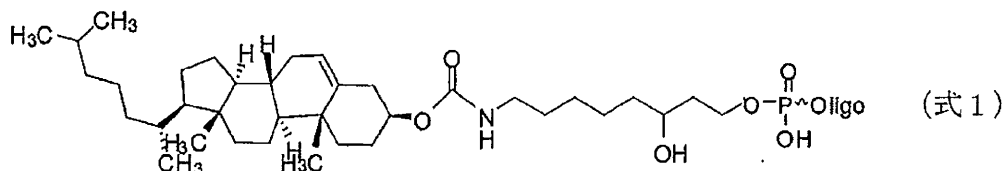
【0012】

また、本発明の別の実施形態では、前記二本鎖オリゴヌクレオチド複合体は(式1)に示す構造を有する。即ち、前記コンジュゲート部はコレステロールであり、前記リンカ分子は 8 原子数の長さを持ち、前記リンカ分子により前記コレステロールが前記センス鎖の 3' 末端に結合される。

【0013】

10

【化1】



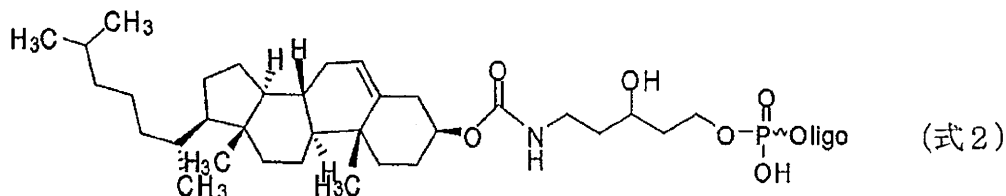
【0014】

また、本発明の別の実施形態では、前記二本鎖オリゴヌクレオチド複合体は(式2)に示す構造を有する。即ち、前記コンジュゲート部はコレステロールであり、前記リンカ分子は 5 原子数の長さを持ち、前記リンカ分子により前記コレステロールが前記センス鎖の 3' 末端に結合される。

20

【0015】

【化2】



【0016】

30

好適には、上記実施形態において、前記センス鎖の 1 番目および 2 番目のヌクレオチド、全 C ヌクレオチド、および全 U ヌクレオチドは、2' - O - メチル修飾を施され、前記アンチセンス鎖の全 C ヌクレオチドおよび全 U ヌクレオチドは、2' F 修飾を施される。また、上記実施形態の二本鎖オリゴヌクレオチド複合体は、前記アンチセンス鎖の 5' 末端にホスフェート基を有してもよい。上記実施形態のセンス鎖は、好ましくは、ヌクレオチドから約 19 個から約 23 個分の長さを持ち、アンチセンス鎖はヌクレオチド約 19 個から約 23 個分の長さを持つ。さらに、上記実施形態の二本鎖オリゴヌクレオチド複合体は、好ましくは、前記アンチセンス鎖の 10、11、12、13、または 14 番目のヌクレオチドと、前記センス鎖の相対するヌクレオチドの間に mismatches を有し、より好ましくは、前記アンチセンス鎖の 14 番目のヌクレオチドと前記センス鎖の相対するヌクレオチドの間に mismatches を有する。また、上記実施形態の二本鎖オリゴヌクレオチド複合体は、アンチセンス鎖 3' 末端にオーバーハングを有してもよく、前記オーバーハングはホスフォロチオエート結合部を有する。

40

【0017】

また、本発明は別の一面において、以下のように構成される二本鎖オリゴヌクレオチド複合体を提供するものである。

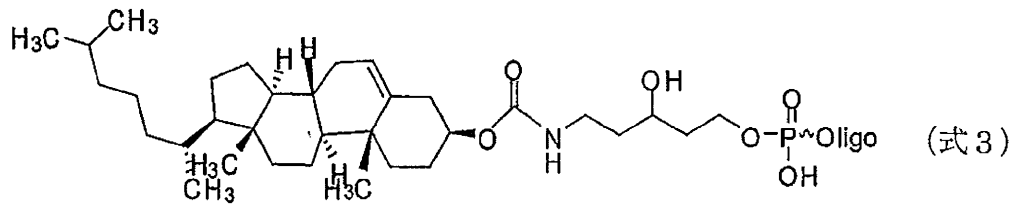
- a. 約 18 個から 30 個のヌクレオチドよりなるセンス鎖；
- b. 約 18 個から 30 個のヌクレオチドよりなるアンチセンス鎖；
- c. C 5 リンカ分子を介して前記センス鎖 3' 末端に結合したコレステロール分子；
- d. 前記アンチセンス鎖の 5' 末端にホスフェート基を有し、

50

前記アンチセンス鎖は前記センス鎖および標的遺伝子双方に対して高い相補性を有し、前記センス鎖ならびに前記アンチセンス鎖は二本鎖を形成し、前記コレステロール-リンカ分子-センス鎖は(式3)に示す構造を有する。

【0018】

【化3】



10

【0019】

前記センス鎖のヌクレオチドの約40%から約90%、および前記アンチセンス鎖のヌクレオチドの約40%から約90%は、化学的に修飾されたヌクレオチドである。好ましくは、前記センス鎖のヌクレオチド1およびヌクレオチド2、全てのCヌクレオチド、および全てのUヌクレオチドには、2'-O-メチル修飾が施され、前記アンチセンス鎖の全てのCヌクレオチドおよびUヌクレオチドには、2' F修飾が施される。好ましくは、前記アンチセンス鎖の10、11、12、13、または14番目のヌクレオチドと、前記センス鎖の相対するヌクレオチドとの間にミスマッチが存在し、より好ましくは、前記アンチセンス鎖の14番目のヌクレオチドと、前記センス鎖の相対するヌクレオチドとの間にミスマッチが存在する。また、前記二本鎖オリゴヌクレオチド複合体は、好ましくはホスフォロチオエート結合部を有する前記アンチセンス鎖の3'末端に、2つのヌクレオチドのオーバーハングを有する。

20

【0020】

また、本発明は別の一面において、細胞内標的遺伝子の発現を抑制する方法を提供するものである。この方法は、先の実施形態で述べた二本鎖オリゴヌクレオチド複合体を細胞内に輸送する方法である。実施形態では、逆形質移入によって前記二本鎖オリゴヌクレオチド複合体が細胞内に輸送される。また、別の実施形態では、生体内において前記二本鎖オリゴヌクレオチド複合体が細胞内に輸送される。

【0021】

また、本発明は別の一面において、先に述べた実施例の二本鎖オリゴヌクレオチド複合体から構成される医薬品組成物を提供するものであり、更に、医薬品として許容される担体または希釈液を少なくとも一つ含む医薬品組成物を提供する。

30

【0022】

また、本発明は別の一面において、コンテナより構成されるキットを提供する。前記コンテナは、先に述べた実施例の二本鎖オリゴヌクレオチド複合体を含み、更には、希釈血清組織培養培地を含む。

本発明の更なる側面および実施形態を、以下の記載によって明らかにする。

【図面の簡単な説明】

【0023】

以下の図は、本発明の理解をさらに深めるためにこの明細書の一部に組み込まれ含まれるものであり、本発明の原理を説明する詳細な記述とともに本発明の好ましい実施形態を例示するものであるが、これによって、本発明は何ら限定されるものではない。

【図1】 - アミノ-1,3-ジオールリンカ分子合成についての一般的合成スキームを表す。

【図2A】 1-アミノ-5-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)ペンタン-3-オール(「C5」リンカ分子)合成に関する合成スキームを表す。

【図2B】 本発明の好ましい実施形態である、コレステリル 5-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)-3-ヒドロキシフェニルカルバメート(以下「CHOL-5C」という)合成に関する合成スキームを表す。合わせて、CHOL-C5のオ

40

50

リゴヌクレオチド合成に用いる、固相用担体およびホスホラミダイト（コレステリル 5 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ) - 3 - ((ジイソプロピルアミノ)(メトキシ)ホスフィノオキシ)ペンチルカルバメート)合成に関する合成スキームを表す。

【図3】(a)は、コンジュゲート部 - - アミノアルコールリンカ分子合成に関する一般的合性スキームを表す。(b)は、コンジュゲート部 - - アミノアルコールリンカ分子ホスホラミダイト合成に関する一般的合性スキームを表す。

【図4】ヒドロキシメチルピロリジノールリンカ分子合成に関する一般的合性スキームを表す。

【図5A】5 - ((ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)メチル)ピロリジン - 3 - オール合成に関する合成スキームを表す。

【図5B】コレステリル 6 - (2 - ((ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)メチル) - 4 - ヒドロキシピロリジン - 1 - イル) - 6 - オキソヘキシルカルバメート(以下「CHOL - C6 - HP」という)合成に関する合成スキームを表す。

【図5C】CHOL - C6 - HPを用いたオリゴヌクレオチド合成用固相用担体合成に関する合成スキームを表す。

【図6A】コレステリル 3 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ) - 2 - ヒドロキシプロピルカルバメート(以下「CHOL - C3」という)合成に関する合成スキームを表す。

【図6B】CHOL - C3を用いたオリゴヌクレオチド合成に関する固相用担体の合成を表す。

【図7】オリゴヌクレオチド合成用固相用担体に結合したコンジュゲート部 - 1, 3 - ジオールリンカ分子合成の一般的合性スキームを表す

【図8A】5'および3'センス鎖コンジュゲート結合を有する二本鎖の、500ナノモル、1マイクロモル、および5マイクロモルにおける相対的機能を棒グラフで表す。低濃度において、3'センス鎖コンジュゲートがより強い機能を示すことを表す。

【図8B】3'センス鎖または3'アンチセンス鎖にコレステロールコンジュゲート結合を有する二本鎖を、1マイクロモルと0.5マイクロモル濃度で比較した結果を表す。3'センス鎖コンジュゲートが3'アンチセンス鎖よりも強い遺伝子ノックアウト能を有することを示している。ここで、Y軸は発現の割合を表し、「xx」はヌクレオチド間ホスフォロチオエート修飾の位置を表す。mGAPDH SOSはコレステロールコンジュゲート非保持のGAPDH標的分子を表す。なお、SOS修飾型には、センス鎖の全C、全Uでの2'-O-メチル修飾、アンチセンス鎖の全C、全Uでの2'F修飾、アンチセンス鎖5'末端位の5'ホスフェート基、および(5'末端より数えて)センス鎖の1位、2位における2'-O-メチル修飾が含まれる。また、「NTC#10C8-Chol」は、C8リンカ分子を介しコレステロールで修飾した非標的コントロール複合体を表す。表1 1から表1 4、表2 1から表2 2に異なるリンカ分子の構造式を示した。

【図9】リンカ分子の長さを変えたときの比較を表す。各分子はエレクトロポレーションを用いて細胞内に導入した。矢印で示したオリゴヌクレオチドとコンジュゲートとの間に、5(以下「C5」という)、6(以下「PIP」という)、7(以下「ABA」という)原子数を有するリンカ分子は、より強い機能を示した。ここで、発現の割合をパーセントとしてY軸で示した。

【図10A】Jurkat細胞におけるコレステロールコンジュゲート分子の機能を表す。PPIB\_3 siRNAは、ヒトPPIB遺伝子を標的とする。NSC#1を、非特異的コントロールにおいた。C8は、リンカ分子長を表す(表1 1から表1 4、表2 1から表2 2参照)。Cholは、コレステロールを表す。発現は分岐DNAアッセイ(BDNA、Genospectra)を用いて測定し、生育能はAlamar Blueアッセイを用いて測定した。

【図10B】SHSY5Y細胞におけるコレステロールコンジュゲート分子の機能を表す。なお、図中の記号は図10Aと同様の意味を表す。

10

20

30

40

50



【図10C】H U V E C細胞におけるコレステロールコンジュゲート分子の機能を表す。なお、図中の記号は図10Aと同様の意味を表す。

【図10D】E S - D 3幹細胞におけるコレステロールコンジュゲート分子の機能を表す。なお、m G A P D HはマウスG A P D H標的s i R N Aを表し、その他の図中の記号は図10Aと同様の意味を表す。

【図10E】3 T 3 N I H幹細胞におけるコレステロールコンジュゲート分子の機能を表す。なお、図中の記号は図10Dと同様の意味を表す。

【図11】アンチセンス鎖3'オーバーハングにおける、ヌクレオチド間結合部の修飾対非修飾での機能の違いを表す。ここで、両分子はS O S修飾型を有し、センス鎖の全C、全Uでの2'-O-メチル修飾、アンチセンス鎖の全C、全Uでの2'F修飾、アンチセンス鎖5'末端位の5'ホスフェート基、および(5'末端より数えて)センス鎖の1位、2位における2'-O-メチル修飾が含まれる。この結果は、ヌクレオチド間安定化リンカ分子の導入は、明らかに全体の機能を向上させることを示した。ここで、N C Sは、非特異的配列を表し、「N a k e d」は、非修飾型の二本鎖を表す。

【図12】アセチル基キャップのC 8またはC 1 4リンカ分子を有する二本鎖の機能と、コレステロールに結合するC 8リンカ分子を有する二本鎖の機能との比較を表す。「N T C」は非標的コントロール(n o n - t a r g e t i n g c o n t r o l e)配列を表し、「A c」はリンカ分子のアセチル基キャップを表し、「S O S」は修飾型を表し、この中にはセンス鎖の全C、全Uでの2'-O-メチル修飾、アンチセンス鎖の全C、全Uでの2'F修飾、アンチセンス鎖5'末端位の5'ホスフェート基、および(5'末端より数えて)センス鎖の1位、2位における2'-O-メチル修飾が含まれる。また、「C h o l」はコレステロールを表す。この結果から、輸送ならびに遺伝子サイレンシングには、コレステロールをコンジュゲートさせることが非常に有効であるが、一方、単純なアセチル基キャップでは無効であることが証明された。

【図13A】C 8リンカ分子保有二本鎖にコンジュゲートするコレステロールに適用可能な化学修飾を表す。

【図13B】ヒト(H e L a)、マウス(3 T 3 N I H)細胞における、図13Aで示す化学修飾保有のP P I BならびにG A P D H標的二本鎖の機能を表す。

【図14A】受動輸送における遺伝子ノックダウンの動力学を表す。グラフから、T P 5 3標的G 4 s i R N Aを0.1マイクロモルおよび1.0マイクロモル濃度でH e L a細胞に形質移入した結果、72時間でノックダウンがピークに達したことが示される。ここで、Y軸は発現された標的遺伝子の割合を表し、X軸は受動輸送開始後の時間を表す。

【図14B】G 4 s i R N A誘発遺伝子ノックダウンの寿命を表す。P P I B標的G 4 s i R N Aは受動輸送によってH e L a細胞に導入した。1マイクロモル濃度において、75%を超えるサイレンシングが少なくとも4日間持続することが証明された。ここで、Y軸は発現された標的遺伝子の割合を表し、X軸は受動輸送開始後の時間を表す。

【図15A】100nM、1000nM(s i R N A - コレステロール)でのG 4 s i R N A受動輸送、1000nMでのリポフェクタミン2000媒介輸送、および脂質処理単独の各条件下において誘発された遺伝子数を表す。Y軸はアップレギュレーションされた遺伝子数を表し、白棒はアップレギュレーションされた遺伝子の総数を、黒棒は前炎症性遺伝子の数を表す。

【図15B】s i R N Aが、G 4受動輸送中および脂質媒介輸送中に誘発されたI L 6、I L 8の誘発レベルを表す。「H y Q R S」は希釈血清培地を表し、「G 4 # 1 - 4」は4つの異なるG 4 s i R N Aを表し、「29mer」は強いI L 6、I L 8反応を誘発した29塩基対の二本鎖を表し、更に、「21mer」は脂質形質移入によって輸送された21塩基対の二本鎖を表す。この結果から、脂質輸送型s i R N Aが強いI L 6、I L 8サイトカイン反応を誘発する一方で、受動輸送型G 4 s i R N Aはほとんど内在的免疫反応を誘発しなかった。

【図15C】脂質輸送媒介型s i R N Aおよび受動輸送型G 4 s i R N Aを用いたときの、標的ノックダウンならびにオフターゲットノックダウンを表す。P P I Bを標的とする

10

20

30

40

50

s i R N A の脂質媒介輸送後に、および P P I B を標的とする G 4 s i R N A 受動輸送後に、標的遺伝子 ( P P I B ) ならびに 6 個のオフターゲット遺伝子の発現レベルを観察した。Y 軸は正常と比較した場合の各遺伝子の発現の割合を % で表す。受動輸送型 G 4 s i R N A は、オフターゲット作用をほとんどまたは全く誘発しなかった。

【図 1 6】希釈血清培地における G 4 s i R N A 安定性を示したグラフを表す。希釈血清培地で P P I B 標的 G 4 s i R N A 保存溶液を調製し、+ 4 で保存した。合成した分子の活性は、P P I B 遺伝子ノックダウンを測定することにより ( 分岐 D N A アッセイ ) 3 1 日間にわたり異なる時点で試験した。比較用に、ユニバーサルバッファー中 - 2 0 保存した G 4 P P I B s i R N A を解凍し、希釈血清培地に添加、4 試料と並べて比較した。ここで Y 軸は P P I B 発現の割合を表す。これらの結果から、希釈血清培地にて G 4 s i R N A は活性を失うことなく長期間保存可能なことが示された。なお、「N T C」は非標的コントロール ( n o n - t a r g e t i n g c o n t r o l ) を表す。

【図 1 7 A】G 4 s i R N A を用いて連続遺伝子ノックダウンを起こすためのプロトコルを図で表したものである。

【図 1 7 B】連投実験中における P P I B および G A P D H 遺伝子ノックダウン結果を表す。これらの結果から、先に述べたプロトコルにより、少なくとも 3 0 日間は強い遺伝子ノックダウンが起きることが明らかに示された。

【図 1 8 A】コレステロール、コレステロール、スチグマステロール、プレグネノロン、アンドロステロン、エルゴステロール、およびコラン酸の構造を表す。丸で囲まれた部分は、コレステロールと化学構造上特に異なる部分を表す。

【図 1 8 B】コレステロール、スチグマステロール、エルゴステロール、またはコラン酸とコンジュゲートした G 4 s i R N A を、H e L a 細胞にて遺伝子ノックダウン能を比較した結果を表す。

【図 1 8 C】コレステロール、コレステロール、スチグマステロール、またはコラン酸とコンジュゲートした G 4 s i R N A を、3 T 3 N I H 細胞にて遺伝子ノックダウン能を比較した結果を表す。

【図 1 8 D】コレステロール ( 例えば m G A P D H - C 5 - A N D R )、プレグネノロン ( 例えば m G A P D H - C 5 - P R E G )、アンドロステロン ( 例えば m G A P D H - C 5 - A N D R ) 修飾 s i R N A を有する h P P I B ならびに m G A P D H G 4 s i R N A の遺伝子ノックダウン能を、マウス 3 T 3 N I H 細胞およびヒト H e L a 細胞にて比較した結果を表す。

【図 1 9 A】ウシ胎仔血清 ( F C S ) が G 4 s i R N A 受動輸送に与える影響を表したものである。N I H 3 T 3 細胞を、1  $\mu$  M の G 4 G A P D H 標的 s i R N A に対して血清濃度を変化させて ( 0 - 1 0 % F C S、v / v ) 暴露し、t = 7 2 時間にて遺伝子サイレンシング能を定量した。ここで、Y 軸は標準化した G A P D H 発現レベルを示す。この結果から、血清濃度の増加は受動輸送に悪影響を与えることが示された。

【図 1 9 B】H e L a 細胞にて血清濃度が G 4 s i R N A 受動輸送に与える影響を表したものである。血清濃度は 0 - 3 % の範囲で変化させ、P P I B 標的 G 4 s i R N A の濃度は 0 . 1 から 1 . 0  $\mu$  M の間で変化させた。この結果から、P P I B 発現を G 4 s i R N A がサイレンシングする能力に対し、血清濃度が重要な役割を果たしていることが示された。

【図 1 9 C】S H S Y - 5 Y 細胞にて血清濃度が G 4 s i R N A 受動輸送に与える影響を表す。血清濃度は 0 - 3 % の範囲で変化させ、P P I B 6 9 ならびに P P I B 3 9 ) G 4 s i R N A の濃度は 0 . 1 から 1 . 0  $\mu$  M の間で変化させた。この結果から、P P I B 発現を G 4 s i R N A がサイレンシングする能力に対し、血清濃度が重要な役割を果たしていることが示された。

【図 1 9 D】3 種の異なるコレステロール結合タンパク質 / タンパク質複合体 ( アルブミン、L D L、および H D L ) が、遺伝子発現に与える影響を表す。3 T 3 N I H 細胞を、共存するそれぞれの前記タンパク質濃度を 0 - 1 0  $\mu$  M の範囲で変化させながら、0 . 5  $\mu$  M の G 4 G A P D H 標的 s i R N A に暴露した。ここで、Y 軸は G A P D H 発現の割

10

20

30

40

50

合を示した。この結果から、各コレステロール結合タンパク質の濃度の増加は、G4 siRNAの受動輸送に悪影響を及ぼすことが示された。

【図20A】C5ならびにHP6リンカ分子の化学構造式を表す。

【図20B】PPAR-ガンマならびにアポB標的G4 siRNAが、腎臓、脾臓、肝臓、心臓、および肺の遺伝子に対しての標的能力を表す。この結果から、G4 siRNAは多様な組織において遺伝子をサイレンシングさせることが可能であることが示された。

【図21A】G4 siRNAのセンス6位-10位(センス鎖5'位から数えて)でのセンス鎖とアンチセンス鎖間のシングルミスアマッチが及ぼす影響を表す。配列変換はセンス鎖において起きるので、アンチセンス鎖と標的mRNA間の相補性は完全に保存される。この結果から、センス鎖6位または7位でのミスアマッチ導入は、著しく遺伝子ノックダウンを増強することが示された。

【図21B】広範囲の実験で6位ミスアマッチがG4 siRNA機能に与える影響を表す。G4(-mm)またはG4(+mm)二本鎖として合成された87個のsiRNAが、1μM濃度で細胞内に形質移入された。これらの実験のために、6位に導入されたミスアマッチは、センス鎖固有のヌクレオチドをアンチセンス鎖の対応位置に見られるヌクレオチドに常に置換して構成された(例えばA-A、G-G、C-C、U-Uミスアマッチなど)。また、遺伝子ノックダウンの評価には分岐DNAアッセイを用いた。この結果から、センス鎖6位(19ヌクレオチドセンス鎖に対し、5'末端より数えてアンチセンス鎖14位)でのミスアマッチ導入が、著しい割合でG4 siRNA機能を増強することが示された。

【図22】G4 siRNAによって起きる、一連のヒトおよびマウス遺伝子のノックダウン能を表す。個々のまたはプーリングされた二本鎖によるG4 siRNAノックダウンに伴う各遺伝子(マウスまたはヒト)の発現レベルを相対的に表す。ここで、Y軸は標的遺伝子が発現する割合を示す。X軸は個々のG4 siRNAによって標的にされる参照遺伝子を示す。「F75」とは、75%ノックダウンを表す。

【発明を実施するための形態】

【0024】

本発明の様々な実施形態の上記詳細な説明は、例示および説明を目的としてなされたものであり、網羅的な説明を意図したものでも、開示された実施形態そのものに本発明を制限することを意図したものでない。種種の変形や変更が可能なのは当業者には明らかである。前記実施形態は、本発明の原理およびその実用的な応用を最もよく説明するために選ばれて記載されたものであり、その説明によって、企図された具体的な利用目的に応じた種種の実施形態および種種の変更が本発明により可能であることを、当業者は理解することができる。本発明の範囲は、上記の請求項およびその均等物によって定義されるものである。

【0025】

本発明は、RNA干渉を行うための組成物ならびに方法に関する入門書を開示するものではない。本発明はRNA干渉を行うための組成物ならびに方法に関するものであり、siRNAならびにmiRNA誘発遺伝子サイレンシング、miRNA阻害等を含む。本願の修飾ポリヌクレオチドおよびその誘導体を使用することによって、RNA干渉への適応効率を向上することができる。

【0026】

一般にここで用いられる用語ならびに成句は、技術的に認められた意味を有し、当業者に知られた標準的な本、雑誌文献を参照することで見出すことができる。以下の用語の定義は、本発明の記載における用例を明らかにするために記載するものである。

【0027】

(アルキル)

用語「アルキル」とは、飽和または不飽和、さらに置換または未置換型であるヒドロカルビル部分のことをいう。それは、直鎖状、分岐状、環状、および/または複素環状であり、かつエーテル、ケトン、アルデヒド、カルボン酸塩等の官能基を含む部分から構成されるものであってもよい。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 2 8 】

典型的なアルキル基として、限定されるものではないが、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、ウンデシル、ドデシル、トリデシル、テトラデシル、ペンタデシル、ヘキサデシル、ヘプタデシル、オクタデシル、ノナデシル、エイコシル、およびより大きい炭素数のアルキル基、同様に 2 - メチルプロピル、2 - メチル - 4 - エチルブチル、2 , 4 - ジエチルプロイル、3 - プロピルブチル、2 , 8 - ジブチルデシル、6 , 6 - ジメチルオクチル、6 - プロピル - 6 - ブチルオクチル、2 - メチルブチル、2 - メチルペンチル、3 - メチルペンチル、および 2 - エチルヘキシルが挙げられる。上記用語アルキルはまた、アルケニル基、例えばビニル、アリル、アラルキル、およびアルキニル基も包含する。特に限定しない限り、アルキル基は置換型ではない。

10

## 【 0 0 2 9 】

アルキル基内での置換としては、アルキル部分で許容される任意の原子または基を含むことができ、限定されるものではないが、ハロゲン、硫黄、チオール、チオエーテル、チオエステル、アミン（一級、二級、または三級）、アミド、エーテル、エステル、アルコール、ならびに酸素が挙げられる。一例として、アルキル基は、アゾ基、ケト基、アルデヒド基、カルボキシル基、ニトロ、ニトロソまたはニトリル基等の修飾と、イミダゾールなどの複素環、ヒドラジノまたはヒドロキシルアミノ基、イソシアネートまたはシアネート基、スルホキシド、スルホン、スルフィド、ジスルフィド等の硫黄含有基を、含んでいてもよい。特に限定しない限り、アルキル基は、ハロゲン、硫黄、チオール、チオエーテル、チオエステル、アミン、アミド、エーテル、エステル、アルコール、酸素、または上記修飾を含まない。

20

## 【 0 0 3 0 】

さらに、アルキル基はまた、ヘテロ置換を含むものであってもよく、このような置換では、炭素原子が、例えば窒素、酸素、もしくは硫黄によって置換されるもので、複素環置換は、1つ以上のヘテロ原子を持つアルキル環のことをいう。ヘテロ環部分の例として、限定されるものではないが、モルホリノ、イミダゾール、およびピロリジノが挙げられる。特に限定しない限り、アルキル基は、ヘテロ置換基または1つ以上のヘテロ原子を含むアルキル環（例えば複素環置換基）を含まない。

30

## 【 0 0 3 1 】

2' 位修飾の好ましいアルキル基としては、リボシル部の 2' 位炭素に O - 結合をもつメチル基、例えば、2' - O - メチル基を有する 2' - O - アルキルなどが挙げられる。

## 【 0 0 3 2 】

（ 2' - O - アルキル修飾ヌクレオチド ）

「 2' - O - アルキル修飾ヌクレオチド」という成句は、糖部分を有するヌクレオチド単位のことをいい、例えば、該ヌクレオチド単位は糖部分、該糖の 2' 位に位置した炭素原子とアルキル基との両方に酸素原子が結合するようにして 2' 位で修飾されるデオキシリボシル部分が挙げられる。種々の実施形態において、前記アルキル部分は炭素および水素から構成されるが、特に好ましい実施形態としては、メチル基が挙げられる。

40

## 【 0 0 3 3 】

（ アンチセンス鎖 ）

本明細書で用いられる成句であり、「AS」と表わされることもある「アンチセンス鎖」は、目的とするところの標的核酸に対して、実質的に（例えば 80% 以上）または 100% 相補的であるポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの一領域のことをいう。アンチセンス鎖は、ポリヌクレオチド領域、すなわち RNA、DNA、またはキメラ RNA / DNA から構成可能である。例えば、アンチセンス鎖は、一分子の伝令 RNA ( mRNA )、mRNA ではない RNA 配列（例えば、tRNA、rRNA、および hnRNA）、あるいはコードまたは非コードの DNA 配列に対して全体的または部分的に相補的であってもよい。前記「アンチセンス鎖」としては、2本の異なる鎖から形成されるポリヌクレオチドのアンチセンス領域と、ヘアピン構造を形成することができる単分子の siRNA と

50

が挙げられる。「アンチセンス鎖」および「アンチセンス領域」という成句は、等価であることを意図しており、同義的に使われる。前記アンチセンス鎖は、低分子および/またはコンジュゲートの多様な群によって修飾することができる。

【0034】

(2'炭素修飾)

「2'炭素修飾」とは、糖サブユニット2'位が修飾された糖部分を有するヌクレオチド単位のことをいう。この位置で、糖の2'位に位置した炭素原子と、2'-O-メチル、2'-O-エチル、2'-O-プロピル、2'-O-イソプロピル、2'-O-ブチル、2'-O-イソブチル、2'-O-エチル-O-メチル(-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)、および2'-O-エチル-OH(-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)等のアルキル基との両方に、酸素原子が結合するようにして、「2'-O-アルキル修飾ヌクレオチド」は修飾される。「2'炭素センス修飾」とは、センス鎖上またはポリヌクレオチドのセンス領域内にあるヌクレオチドの2'炭素位における修飾のことをいう。「2'炭素アンチセンス修飾」とはアンチセンス鎖上またはポリヌクレオチドのアンチセンス領域内にあるヌクレオチドの2'炭素位における修飾のことをいう。

10

【0035】

(相補性)

用語「相補性」とは、互いに塩基対を形成するポリヌクレオチドの能力のことをいう。塩基対は、逆平行ポリヌクレオチド鎖または領域内のヌクレオチド単位間の水素結合によって、一般的に形成される。相補性ポリヌクレオチド鎖または相補性ポリヌクレオチド領域は、ワトソン・クリック方式(A対T、A対U、C対Gなど)で塩基対を形成することができ、あるいは安定な二本鎖を形成することが可能な他の任意の方法で塩基対を形成することができる。

20

【0036】

完全相補性または100%相補性とは、一方のポリヌクレオチド鎖または領域の各々のヌクレオチド単位が他方のポリヌクレオチド鎖または領域の各のヌクレオチドと水素結合を形成することができる状況のことをいう。完全相補性に満たないとは、2本の鎖または2つの領域の、すべてではないがいくつかのヌクレオチド単位が互いに水素結合することができることをいう。例えば、2つの20量体に関して、もし各鎖上の2つの塩基対のみが互いに水素結合することができる場合、それらのポリヌクレオチド鎖またはポリヌクレオチド領域の相補性が10%であることを示している。同じ例で、各鎖または各領域上の18塩基対が互いに水素結合することができる場合、ポリヌクレオチド鎖は90%相補性を示す。実質的な相補性とは、80%以上の相補性を示すポリヌクレオチド鎖またはポリヌクレオチド領域のことをいう。

30

【0037】

(二本鎖)

用語「二本鎖」とは、鎖と鎖とが塩基対をなす結果、2本の非平行なポリヌクレオチドによって形成された二本鎖構造を有する領域のことをいう。二本鎖は、2本の異なるポリヌクレオチドで形成されてもよいし、単一のポリヌクレオチド配列をもつ鎖、例えばヘパリンの「ループ」部分によって2本の鎖が互いに非平行な構造をとることができるヘパリン構造など、で形成されてもよい。更に、二本鎖構造をミスマッチやループとして解釈してもよい。例えば、非平行な2本の鎖が同じ長ではあるが配列では100%の相補性ではないところでは、二本鎖領域はミスマッチがあるために塩基対をしない領域として解釈される。

40

【0038】

(デオキシヌクレオチド)

用語「デオキシヌクレオチド」とは、2'および/または3'炭素に結合した水素を持つ代わりに、適当な結合および/または2'、3'末端ジデオキシを持つ糖部分の2'または3'位で、OH基を欠いているヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのことをいう。

【0039】

50

(デオキシリボヌクレオチド)

用語「デオキシリボヌクレオチド」および「DNA」は、リボシル部分の2'位にHを持つ少なくとも1つのリボシル部分を含むヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのことをいう。

【0040】

(遺伝子)

用語「遺伝子」とは、転写および非転写両要素を有するものとして定義される。例えば、遺伝子には、特定のmRNA形質移入、または非コーディングRNA発現のレベル、タイミング、組織特異性を決定する役割を持つ任意の非転写エンハンサーおよび/またはプロモーター(例えばゲノミックDNA)を含めることができる。更に、miRNA、piRNA、tRNA、rRNAなどの非コーディングRNA、および5'UTR、ORF、3'UTR、イントロン等が遺伝子の要素として含まれる。

10

【0041】

(脂質非依存型輸送剤)

用語「脂質非依存型輸送剤」とは、技術的に認められた核酸輸送剤(リポフェクタミン、リポフェクタミン2000、ダーマFECTなど)を用いることなく輸送能を高めるために用いる、核酸にコンジュゲート可能な任意の数の分子のことをいう。このようなコンジュゲートは、天然の脂質であるか、あるいはタンパク質、炭水化物などで構成される。

【0042】

(ミスマッチ)

用語「ミスマッチ」とは、センス鎖ヌクレオチドとアンチセンス鎖ヌクレオチドの間でワトソン-クリック型塩基対が形成されないことをいう。ミスマッチの例としては、A対G、C対A、U対C、A対A、G対G、C対Cなどが挙げられるが、同じく、非塩基残基対ヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチド、非環状残基対ヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチド、ギャップ、または非対ループも含まれる。広い意味において、ここで用いられるミスマッチには、特定の位置における二本鎖の熱力学的安定性がその位置におけるワトソン-クリック型塩基対の熱力学的安定性よりも低くなるように、前記の位置またはその近傍での熱力学的安定性を減少させる、その位置での任意の変換も含まれる。

20

【0043】

(ヌクレオチド)

用語「ヌクレオチド」とは、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチド、あるいはそれらの修飾された形態、さらにはそれらの類似体のことをいう。ヌクレオチドとして、プリン、例えばアダニン、ヒポキサンチン、グアニン、およびそれらの誘導体および類似体が挙げられ、さらにピリミジンとして、例えばシトシン、ウラシル、チミン、およびそれらの誘導体および類似体が挙げられる。「ヌクレオチド」は、好ましくは、シトシン、ウラシル、チミン、アデニン、またはグアニン部分を有する。

30

【0044】

ヌクレオチド類似体としては、塩基、糖、および/またはリン酸塩の化学構造に修飾を持つヌクレオチドが挙げられる。該ヌクレオチドとしては、5位ピリミジン修飾、8位プリン修飾、シトシン環外アミン、および5-プロモウラシル置換のヌクレオチド、ならびに2'位糖修飾として、糖修飾リボヌクレオチドが挙げられる。ここで、該リボヌクレオチドの2'-OHは、H、OR、R、H、SH、SR、NH<sub>2</sub>、NHR、NR<sub>2</sub>、もしくはCN等によって置換され、Rは本明細書に定義したようにアルキル部であるが、これらに限定されるものではない。また、ヌクレオチド類似体は、イノシン、キューオシン、キサンチンなどの塩基、2'-メチルリボースなどの糖、メチルホスホネート、ホスホロチオエートなどの非天然型ホスホジエステルヌクレオチド間連結部、ならびにペプチドが含まれていてもよい。

40

【0045】

ここにおいて、修飾塩基とはヌクレオチド塩基のことを表し、該塩基として、例えば、アデニン、グアニン、シトシン、チミン、ならびに、1つ以上の原子もしくは基の置換また

50

は付加によって修飾されたウラシル、キサンチン、イノシン、およびキューオシンが挙げられる。塩基部分が修飾されたヌクレオチドの塩基修飾の例としては、アルキル化、ハロゲン化、チオール化、アミン化、アミド化、またはアセチル化された種々の組み合わせの塩基が挙げられるが、これによって限定されるものではない。より特異的な修飾塩基としては、例えば、5 - プロピニルウリジン、5 - プロピニルシチジン、6 - メチルアデニン、6 - メチルグアニン、N, N - ジメチルアデニン、2 - プロピルアデニン、2 - プロピルグアニン、2 - アミノアデニン、1 - メチルイノシン、3 - メチルウリジン、5 - メチルシチジン、5 - メチルウリジンおよび5位に修飾を持つ他のヌクレオチド、5 - (2 - アミノ)プロピルウリジン、5 - ハロシチジン、5 - ハロウリジン、4 - アセチルシチジン、1 - メチルアデノシン、2 - メチルアデノシン、3 - メチルシチジン、6 - メチルウリジン、2 - メチルグアノシン、7 - メチルグアノシン、2, 2 - ジメチルグアノシン、5 - メチルオキシウリジン、2 - メチルアミノエチルウリジン、デアザヌクレオチド、例えば7 - デアザ - アデノシン、6 - アゾウリジン、6 - アゾシチジン、6 - アゾチミジン、5 - メチル - 2 - チオウリジンが挙げられる。さらに、他のチオ塩基、例えば2 - チオウリジンおよび4 - チオウリジン、および2 - チオシチジン、ジヒドロウリジン、シュードウリジン、キューオシン、アルカエオシン、ナフチルおよび置換ナフチル基、任意のO - およびN - アルキル化プリンおよびピリミジン、例えばN 6 - メチルアデノシン、5 - メチルカルボニルメチルウリジン、ウリジン5 - オキシ酢酸、ピリジン - 4 - オン、ピリジン - 2 - オン、フェニルおよび修飾フェニル基、例えばアミノフェノールもしくは2, 4, 6 - トリメトキシベンゼン、G - クランプ・ヌクレオチドとして作用する修飾シトシン、8 - 置換アデニン、およびグアニン、5 - 置換ウラシルおよびチアミン、アザピリミジン、カルボキシヒドロキシアルキルヌクレオチド、カルボキシアルキルヌクレオチド、およびアルキルカルボニルアクリル化ヌクレオチドが挙げられる。修飾ヌクレオチドもまた、糖部分に関して修飾されたヌクレオチドと、さらにリボシルではない糖または類似体を持つヌクレオチドとが挙げられる。例えば、糖部分は、マンノース、アラビノース、グルコピラノース、ガラクトピラノース、4' - チオリボース、ならびに他の糖、ヘテロ環、または炭素環が挙げられる。ヌクレオチドという用語もまた、広範な塩基として当業者に知られているものを含むことが意図されている。例えば、広範な塩基として、3 - ニトロピリジン、5 - ニトロインドール、またはネブラリンが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

10

20

30

## 【0046】

さらに、用語「ヌクレオチド」には、ヌクレオチドに結合する放射活性、蛍光活性部分を検出可能な標識として有するヌクレオチド、または質量ラベルをもつヌクレオチドも含まれる。

## 【0047】

(オフ・ターゲット)

用語「オフ・ターゲット」および成句「オフ・ターゲット効果」とは、所定の標的に向けられたsiRNAおよびshRNAが、別のmRNA配列、DNA配列、または細胞タンパク質もしくは他の部分と直接あるいは間接的に相互作用することによって、意図されない効果を生ずるといった任意の事例のことをいう。例えば、「オフ・ターゲット効果」は、siRNAまたはshRNAのセンスおよび/またはアンチセンス鎖と他の転写産物との間の部分的相同性または相補性によって、他の転写産物が同時に分解する時に、生ずる可能性があるものである。

40

## 【0048】

(オーバーハング)

用語「オーバーハング」とは、第1の鎖または領域が二本鎖を形成する相補性鎖の末端を越えて延びる1本の鎖または領域から生ずる、末端塩基対非形成型ヌクレオチドのことをいう。水素結合によって二本鎖を形成することが可能な1つ以上のポリヌクレオチドがオーバーハングを持つことができる。二本鎖の3'位および/または5'位末端を越えて伸張する単一鎖領域もオーバーハングである。

50

## 【0049】

(リボヌクレオチドおよびリボ核酸)

用語「リボヌクレオチド」およびフレーズ「リボ核酸」(RNA)は、少なくとも1つのリボヌクレオチド単位を含む修飾または未修飾のヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのことをいう。リボヌクレオチド単位は、N-グリコシド連結部においてリボシル部分1'位で結合した窒素塩基を持つリボシル部分の2'位に結合する酸素を有する。さらに、別のヌクレオチドに対する連結を可能にするか、もしくは連結を不可能にするリボシル部分の2'位に結合する酸素を含む。

## 【0050】

(RNA干渉およびRNAi)

成句「RNA干渉」および用語「RNAi」は同義であり、Drosha、RISC、Dicer等を含むが、これらに限定されるわけではなく、siRNA、shRNA、miRNA、piRNAなどの、単一の、2つ、または3つの分子が、RNAi経路における1つ以上の過程で相互作用して生物学的プロセスに影響を与えるプロセスを表す。このプロセスは、限定されるものではないが、mRNAを分解し、翻訳能を弱める作用、tRNA、rRNA、hnRNA、cDNA、およびゲノムDNAとの相互作用、付加的なタンパク質によりDNAメチル化が阻害されることによって引き起こされる遺伝子サイレンシングプロセスを含む。更に、siRNA、piRNA、miRNA阻害剤などのRNAi調整分子が、RNAi経路を増強させる分子として挙げられる(Tomari, Y等、Genes Dev. 2005, 19(5), 517-529)。

10

20

## 【0051】

(センス鎖)

成句「センス鎖」とは、伝令RNAまたはDNA配列等の標的核酸として、部分的または全体的に、同一のヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチドまたは領域のことをいう。ある配列が与えられた場合、慣例によって特に明記しない限り、その配列はセンス鎖(または領域)を表すが、それと相補的なアンチセンス鎖(または領域)が存在していることも意味している。

## 【0052】

(サイレンシング)

成句「サイレンシング」とは、PCR法、ノーザンブロット分析、分岐DNA、ウエスタンブロット分析、およびその他技術的に認められた技術を含む任意の数の方法によって測定される、RNAi媒介による遺伝子発現の減少として定義される。

30

## 【0053】

(siRNA、すなわち短い干渉RNA)

用語「siRNA」および句「短干渉RNA」とは、単分子の核酸のことをいい、またはRNAiを行うことが可能であり、かつ塩基対の長さが約18から30である二本鎖を持つ、2本の異なる鎖から構成される核酸のことをいう。また、用語「siRNA」および句「短干渉RNA」としては、リボヌクレオチド部分以外の部分も含む核酸が挙げられ、該部分としては、限定されるものでないが、修飾ヌクレオチド、修飾ヌクレオチド間連結部、非ヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、および上記ヌクレオチドの類縁体が挙げられる。

40

## 【0054】

(医薬的に許容される担体)

成句「医薬的に許容される担体」とは、動物またはヒトに本発明の組成物を輸送するための医薬的に許容される塩、溶媒、分散剤、またはビークルをいう。前記担体は、液体、半固体または固体であってよく、しばしば希釈液、賦形剤、または塩と同義に用いられる。成句「医薬的に許容される」とは、成分、賦形剤、担体、希釈液が、合理的な利益/危険率(比)をもち、毒性、刺激、アレルギー反応などの副作用を起こすことなくヒトおよび/または動物に用いることができることを表す。Remington's Pharmaceutical Science 第16版、Osol, A 編集(1980)参照。

50



## 【0055】

以下の実施形態は、本発明の理解を助けるために示されるものであって、本願の発明をいかなる意味においても限定するものではない。本願を読んで当業者にとって明らかである全ての変更、および等価体は本願の発明の範囲に含まれる。

## 【0056】

本発明はその第一の特徴として、以下のように構成される二本鎖オリゴヌクレオチド複合体を提供するものである。

1. 約18個から30個のヌクレオチドよりなるセンス鎖；
2. 約18個から30個のヌクレオチドよりなるアンチセンス鎖；
3. 細胞輸送を促進するコンジュゲート部；
4. 長さが約3個から約9個の原子数からなるリンカ分子より構成され、

前記アンチセンス鎖は標的遺伝子と同じく前記センス鎖に対して高い相補性を有し、前記センス鎖ならびに前記アンチセンス鎖は二本鎖を形成し、前記リンカ分子は前記コンジュゲート部を前記センス鎖と結合させる。

## 【0057】

「標的遺伝子と同じく前記センス鎖に対して高い相補性を有し」とは、前記アンチセンス鎖が二本鎖を形成するに十分なセンス鎖との相補性を有する、および二本鎖オリゴヌクレオチド複合体の *Dicer* 処理に続いてRNA干渉が生じるに十分な標的遺伝子との相補性も有するということである。前記アンチセンス鎖は、好ましくはセンス鎖および標的遺伝子に対し少なくとも80%の相補性、つまり実質的な相補性を示す。以下に、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチド複合体の個々の特徴を述べる。

## 【0058】

<コンジュゲート部>

本発明のコンジュゲート部（単に「コンジュゲート」とも呼ぶ）は、色々な構造を持つことが可能で、様々な手段による細胞内への導入を対象にできる。例えば、コンジュゲート部を天然の脂質とすることが可能であり、*siRNA* または他の核酸といった被輸送物を、エンドサイトシスを含む作用機序によって膜に挿入して細胞に吸収させることで、細胞内に輸送することが可能である。例えば、脂質型コンジュゲート部は、カチオン性脂質、中性脂質、スフィンゴ脂質、ならびにステアリン酸、オレイン酸、エライジン酸、リノレイン酸、リノレアイジン酸、リノレン酸、およびミリスチン酸を含む脂肪酸を含むことが可能である。他方、コンジュゲート部を、TAT、ペネトレイン、MAPなどの膜貫通型タンパク質、またはポリ(Lys)、ポリ(Arg)、ポリ(His)、ポリ(Lys/Arg/His)、プロタミンなどのカチオン性タンパク質を含む天然のタンパク質とすることも可能である。

## 【0059】

または、前記コンジュゲート部は、例えば特定の受容体または標的にするか膜の中に自身を挿入することができ、エンドサイトシス経路で吸収され得る小分子であってもよい。従って、アダマンタン、ナフタレン、フェナントレン、ピレンなどのポリ芳香族炭化水素、マクロシル、ステロイド、または別の化学的骨格に由来する小分子は、全て本発明のコンジュゲートであってもよい。

## 【0060】

または、コンジュゲート部はカチオン性ポリマに基づくものであってよい。数多くの研究から、カチオン性アルブミンのようなカチオン性ポリマが、特定の細胞形および/または組織（例えば脳輸送、*Journal of Control Release* 107, 428-448, 2005, Lu, Wら、参照）。カチオン性ポリマ分子がもつ利点を考慮すると、前記コンジュゲート部はポリエチレンジイミン、デンドルイミン、ポリ(アルキルピリジニウム)塩、またはカチオン性アルブミンなどのカチオン性ポリマであってよい。

## 【0061】

いくつかの例において、前記コンジュゲート部は受容体のリガンドであってよいし、受容体に結合する分子に結合するものであってよい。この場合には、胆汁酸、小分子薬物リガ

10

20

30

40

50

ンド、ビタミン、アプタマー、炭水化物、ペプチド（ホルモン、タンパク質、タンパク質の断片、抗生物質、抗生物質の断片を含むがこれに限定されるものではない）、カプサイドのようなウイルス性タンパク質、バクテリア毒素のような毒素、その他が前記コンジュゲート部に含まれる。更に、コレステロール、コレスタノール、コラン酸、スチグマステロール、プレグノロン、プロゲステロン、コルチコステロン、アルドステロン、テストステロン、エストラジオール、エルゴステロールなどの天然のスレロイド類がコンジュゲートに含まれる。本発明の好ましいコンジュゲート部には、コレステロール（C H O L）、コレスタノール（C H L N）、コラン酸（C H L A）、スチグマステロール（S T I G）、およびエルゴステロール（E R G O）が含まれる。好ましい実施形態では、前記コンジュゲート部はコレステロールである。

10

#### 【0062】

コンジュゲート部がコレステロールの場合、分子は一つ以上のタンパク質または血液中のタンパク質複合体（アルブミン、LDL、HDL、IDL、VLDL、カイロミクロン断片、カイロミクロンなど）に結合して、LDLR（低密度リポタンパク質受容体）などの複合体に対する適当な受容体によって細胞内に輸送される。コレステロール-LDLによる輸送例は、数多くのsiRNAが単一のLDL粒子中で輸送されるために、特に注目される。この理由から、本発明の発明者らは、生体内においてLDLなどの一つ以上の天然の担体に、コレステロールでコンジュゲートされたsiRNA、またはコレステロール誘導体にコンジュゲートしたsiRNAを内包し、これを生体内輸送システムとして利用することを考案した。

20

#### 【0063】

また、別の実施形態では、コンジュゲートしたsiRNAの活性低下を防ぐ目的で特定の受容体を標的とする分子を飾修した。例えば、コレステロールコンジュゲートsiRNAを通常血清の共存下で加えると、その大部分は血清中のアルブミンおよび/または他のタンパク質に連結するため、siRNAがLDLとの相互作用が不可能になる。この理由から、本発明のコンジュゲート部は、LDLなどの目的とする標的には結合または連結し続けるが、一方、血清アルブミンなど目的ではない結合相手とは親和力を低くするように修飾することが可能である。

#### 【0064】

<リンカ分子>

定義や規定によって限定されるものではないが、本発明におけるリンカ分子の長さは、コンジュゲート部をリンカ分子に結合する原子と、リンカ分子がオリゴヌクレオチドに結合するのに用いられ、オリゴヌクレオチドに結合する末端ホスフェート部の酸素原子との間が、最短距離として表される原子の数として記述される。例えば、コンジュゲート部がカルバメート連結部を介してリンカ分子に結合している実施形態では、リンカ分子の長さは、カルバメート連結部の窒素原子とホスフェート連結部の酸素原子との間が、最短距離として表わされる原子の数として記述される。環状構造がある場合には、最短距離となる環周りの原子の数で表すことが好ましい。

30

#### 【0065】

本発明の組成物で用いられるコンジュゲート-リンカ分子の構造と製造方法について、表1-1から表1-4に示した。ここで、表1-1から表1-4に例示されるリンカ分子は、他の合成法を用いて製造してもよく、同様な長さで製造することが可能である。例えば、-アミノ-1,3-ジオール、-アミノ-1,2-ジオール、ヒドロキシプロピロール、-アミノ-アルカノール、ジエタノールアミン、-ヒドロキシ-1,3-ジオール、-ヒドロキシ-1,2-ジオール、-チオ-アルカノール、-カルボキシ-アルカノール、官能基置換オリゴエチレングリコール、アリルアミン、アクリル酸、アリルアルコール、プロパギルアミン、プロパギルアルコールによるリンカ分子/リンカ分子合成法を、適当な長さを持つリンカ分子の合成に応用することが可能である。

40

#### 【0066】

ある実施形態においては、リンカ分子は、コンジュゲート部に結合するための単なるサイ

50

トになるだけでなく、固相担体に結合し、オリゴヌクレチド合成を開始するための機能的なサイトにもなる。好ましくは、これらのサイトは水酸基、より好ましくは、一級水酸基ならびに二級水酸基であって、コンジュゲート修飾固相担体の合成中にこれら水酸基は化学的に区別される。ここで、水酸基のあるものは、好ましくは一級水酸基であるが、当業者にとってよく知られた方法により、オリゴヌクレチド合成の第一段階において除去可能な保護基によって保護される。好ましくは、この保護基はクロモフォアであり、固相担体に結合するコンジュゲート部の量を見積もることができる。さらに好ましくは、これら保護基は、トリフェニルメチル (Tr)、モノメトキシトリフェニルメチル (MMTr)、ジメトキシトリフェニルメチル (DMTr)、およびトリメトキシトリフェニルメチル (TMTr) より選ばれる。また、他の水酸基は、好ましくは二級水酸基であるが、当業者にとってよく知られた方法により、固相合成用担体の官能基と反応して共有結合可能な官能基を持つ鎖状分子と反応して結合される。前記鎖状分子の好ましい例としては、コハク酸、グルタル酸、シュウ酸、ジグリコール酸、ならびに O, O' - ジ酢酸ヒドロキノンなどのジカルボン酸が挙げられる。ここにおいて、前記鎖状分子のカルボン酸官能基の一方が前記水酸基と反応して、水酸化物、炭酸化合物、またはアミンなどの塩基によって開列可能なエステル結合となる。また、もう一方のカルボン酸官能基は、固相担体上のアミン官能基とアミド結合を形成して、固相合成用担体と結合する。

10

**【0067】**

さらに、リンカ分子によって、水溶性の向上、コンジュゲート部とオリゴヌクレチド間の距離の最適化、柔軟性 (または剛性)、特異的配向性、分岐などの好ましい性質がオリゴヌクレチドコンジュゲートに付与される。

20

**【0068】**

リンカ分子とコンジュゲート部間の化学結合としては、好ましくはカルバメート連結部が挙げられるが、本発明の範囲に含まれる他の化学構造部であってもよい。コンジュゲート部と化学結合するリンカ分子上の官能基の例としては、水酸基、アミン、カルボン酸、カルボン酸ハライド、カルボン酸活性エステル、カルボニル、クロロカルボニル、イミダゾリルカルボニル、チオール、マレイミド、ハロアルキル、スルホニル、アリル、およびプロパギル基が挙げられるが、これに限定されるものではない。リンカ分子とコンジュゲート部との間に形成される化学結合の例としては、カルバメート、エーテル、エステル、アミド、ジスルフィド、チオエーテル、ホスフォジエステル、ホスフォロチオエート、ホス

30

**【0069】**

同じ長さを持ち二つ以上のコンジュゲートと連結可能なリンカ分子も、特に注目されるリンカ分子である。

40

**【0070】**

また、別の実施形態では、リンカ分子はヌクレオシド誘導体であってもよい。前記ヌクレオシド誘導体としては、例えば、リボヌクレオシド、2' - デオキシリボヌクレオシド、または、2' - O - メチル、2' - フルオロなどの 2' 修飾 - 2' - デオキシリボヌクレオシドが挙げられる。更に、アラビノヌクレオシド、または 2' - 修飾アラビノヌクレオシドなどが挙げられる。また、当業者に周知な方法により、コンジュゲート部に結合するためのリンカ分子や官能基を提供するために、プリンおよびピリミジンヌクレオシドの塩基の特定の部位が修飾されていてもよい。例えば、ウリジン、シチジンなどのピリミジンヌクレオシドは、酢酸水銀、パラジウム触媒、または、アリルアミン、アリルアルコール、アクリル酸などのアリル系試剤を用い、ウラシル塩基またはチトシン塩基の 5' 位を修

50

飾してもよい。更に、5-ヨードピリミジン類は、パラジウム触媒、プラバギルアミン、プロバギルアルコール、プロバギル酸などのプロバギル系試剤を用いて5'位を修飾してもよい。さらに、ウリジンは、トリアゾール、スルホニルクロリドによる活性化と、それに続くジアミン、アミノアルコール、アミノ酸との反応によって4位を修飾してもよい。シチジンは、同様に亜硫酸水素塩処理およびそれに続くジアミン、アミノアルコールあるいはアミノ酸との反応によって4位を修飾してもよく、プリンも、上記と同様な一連の反応により7位、8位、9位を修飾してもよい。

【0071】

好ましい実施形態としては、リンカ分子は約3から約9個の原子数を長さとして持つものが好ましく、具体的には、4、5、6、7、8、または9個の原子数をその長さとして有し、より好ましくは、5または8個の原子数をその長さとして持つ。最も好ましい例は、リンカ分子にコンジュゲート部を連結させる原子と、リンカ分子をオリゴヌクレオチドに連結するのに用いられるオリゴヌクレオチド連結用の末端リン酸部の酸素原子との間に、5つの炭素原子を持つ直鎖のC5リンカ分子である。従って、カルバメート連結部を介してC5リンカ分子にコンジュゲート部が連結される場合には、前記カルバメート連結部の窒素原子と、前記リン酸連結部の酸素原子との間には、5個の炭素原子が存在する。

10

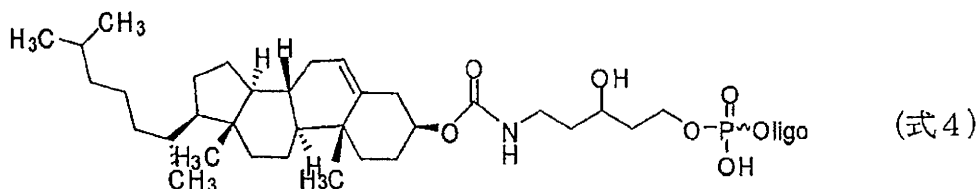
【0072】

好ましい実施形態としては、コンジュゲート部はコレステロール、リンカ分子はカルバメート基を介してコレステロールに結合した、5個の原子を持つC5リンカ分子であり、コレステロール-C5コンジュゲート-リンカ分子(表1-1から表1-4参照)が形成される。二本鎖であるセンスおよび/またはアンチセンスオリゴヌクレオチドの5'位および/または3'位末端にホスフォジエステル連結部を介して結合する場合、コンジュゲート-リンカ分子-オリゴヌクレオチドの構造は(式4)のようになる。

20

【0073】

【化4】



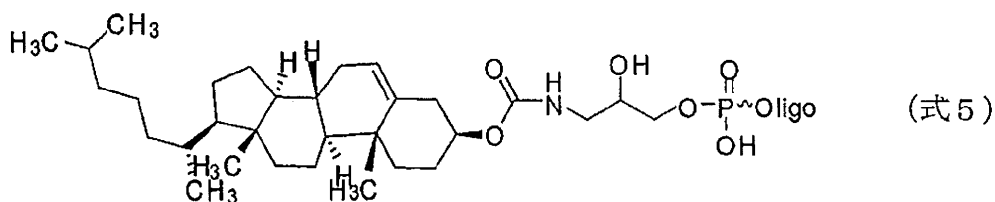
30

【0074】

さらに別の好ましい実施形態では、コンジュゲート部はコレステロール、リンカ分子はカルバメート基を介してコレステロールに結合した、C3リンカ分子であり、コレステロール-C3コンジュゲート-リンカ分子(表1-1から表1-4参照)が形成される。センスおよび/またはアンチセンスオリゴヌクレオチドの5'位および/または3'位末端にホスフォジエステル連結部介して結合する場合、コンジュゲート-リンカ分子-オリゴヌクレオチドの構造は(式5)のようになる。

【0075】

【化5】



40

【0076】

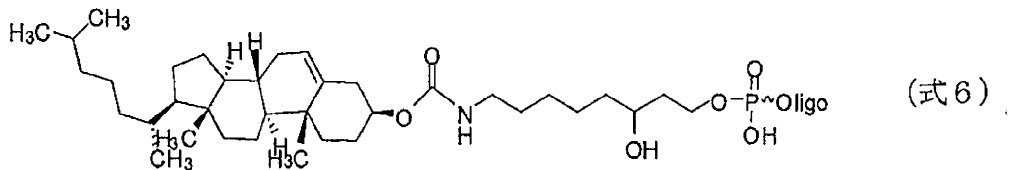
さらに別の好ましい実施形態では、コンジュゲート部はコレステロール、リンカ分子はカルバメート基を介してコレステロールに結合した、C8リンカ分子(8原子リンカ分子)であり、コレステロール-C8コンジュゲート-リンカ分子(表1-1から表1-4参照)

50

）が形成される。センスおよび／またはアンチセンスオリゴヌクレオチドの5'位および／または3'位末端にホスホジエステル連結部を介して結合する場合、コンジュゲート-リンカ分子-オリゴヌクレオチドの構造は(式6)のようになる。

【0077】

【化6】



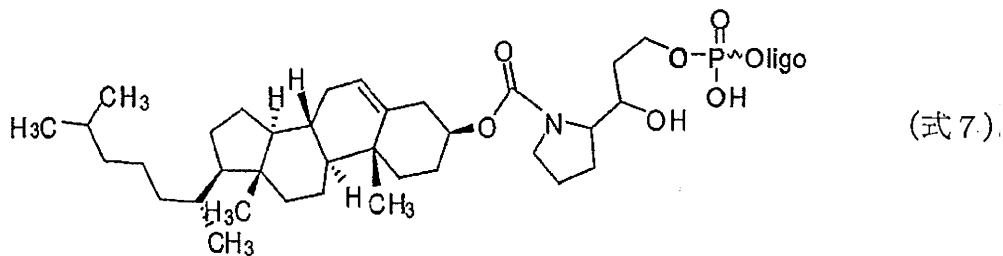
10

【0078】

さらに別の好ましい実施形態では、コンジュゲート部はコレステロール、リンカ分子はカルバメート基を介してコレステロールに結合した、PROリンカ分子(4原子リンカ分子)であり、コレステロール-PROコンジュゲート-リンカ分子(表1-1から表1-4参照)が形成される。センスおよび／またはアンチセンスオリゴヌクレオチドの5'位および／または3'位末端にホスホジエステル連結部を介して結合する場合、コンジュゲート-リンカ分子-オリゴヌクレオチドの構造は(式7)のようになる。

【0079】

【化7】



20

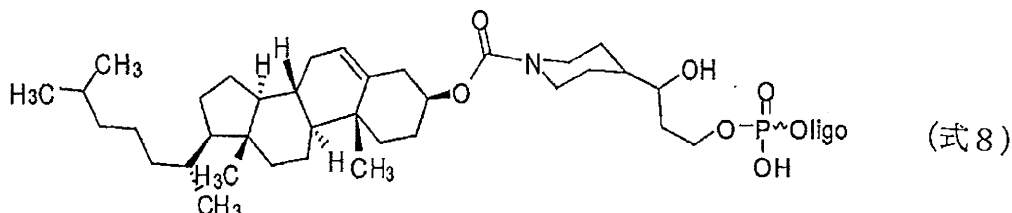
【0080】

さらに別の好ましい実施形態では、コンジュゲート部はコレステロール、リンカ分子はカルバメート基を介してコレステロールに結合した、PIPリンカ分子(6原子リンカ分子)であり、コレステロール-PIPコンジュゲート-リンカ分子(表1-1から表1-4参照)が形成される。センスおよび／またはアンチセンスオリゴヌクレオチドの5'位および／または3'位末端にホスホジエステル連結部を介して結合する場合、コンジュゲート-リンカ分子-オリゴヌクレオチドの構造は(式8)のようになる。

30

【0081】

【化8】



40

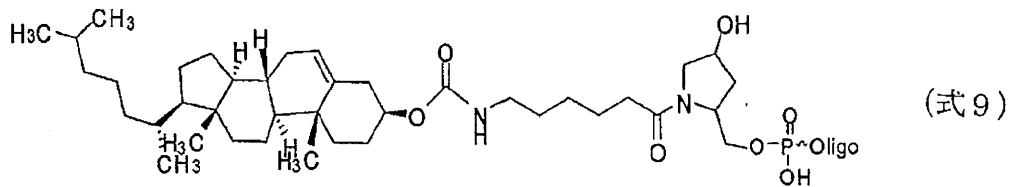
【0082】

さらに別の好ましい実施形態では、コンジュゲート部はコレステロール、リンカ分子はカルバメート基を介してコレステロールに結合した、C6-HP(以後「HP6」という)リンカ分子(9原子リンカ分子)であり、コレステロール-C6-HPコンジュゲート-リンカ分子(表1-1から表1-4参照)が形成される。センスおよび／またはアンチセンスオリゴヌクレオチドの5'位および／または3'位末端にホスホジエステル連結部を介して結合する場合、コンジュゲート-リンカ分子-オリゴヌクレオチドの構造は(式9)のようになる。

50

【 0 0 8 3 】

【 化 9 】



【 0 0 8 4 】

表 1 に示したコレステロールに結合するその他のリンカ分子と合わせ、本実施形態に記載される C 5、C 3、C 8、P R O、C 6 - H P ならびに P I P リンカ分子は、コレステロール以外のコンジュゲート部とともに用いることができることが明らかに予期される。例えば、このようなコンジュゲート部には、コレスタノール（以下 C H L N という）、コラン酸（以下 C H L A という）、スチグマステロール（以下 S T I G という）、ならびにエルゴステロール（以下 E R G O という）が含まれる。また、表 1 1 から表 1 4 に示したその他のリンカ分子と合わせ、先に例示した C 5、C 3、C 8、P R O、C 6 - H P ならびに P I P リンカ分子は、コンジュゲート部をリンカ分子と結合させるカルバメート基とともに示されているが、後述する別の化学構造を持つ結合部を用いてもよい。さらに、前記した実施形態に記載される C 5、C 3、C 8、P R O、C 6 - H P ならびに P I P リンカ分子は、ホスフォジエステル連結部を介してオリゴヌクレオチドに結合するように示されているが、後で述べるように、オリゴヌクレオチドへの結合用に、別の部位を用いてもよいし別の化学構造を持つものを用いてもよい。

【 0 0 8 5 】

また、ある実施形態では、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチド複合体は、色素分子または放射性ラベルなどの検知可能な標識を有する。好ましい色素分子としては、蛍光色素分子や燐光色素分子などが挙げられる。好ましい蛍光色素分子としては、T A M R A、B O D I P Y、C y 3 または C y 5 D a b s y l などのシアニン誘導体、フルオロセイン、または当技術分野で知られた適当なフルオロフォアが挙げられる。検知可能な標識は、二本鎖オリゴヌクレオチド複合体の任意の位置において結合してもよいが、一つ以上ある鎖の 5' 末端または 3' 末端で結合するのが好ましい。より好ましくは、前記検出可能な標識は、センス鎖 5' 末端に結合した蛍光色素分子である。前記検出可能な標識は、当技術分野で知られた方法を用いて結合してよく、先に述べた任意のリンカ分子を用いて結合してもよい。このように色素分子を用いることで、当業者は前記二本鎖オリゴヌクレオチド複合体の形質移入効率を観察できるようになる。

【 0 0 8 6 】

<二本鎖オリゴヌクレオチド複合体におけるコンジュゲート - リンカ分子の位置>  
二本鎖オリゴヌクレオチド複合体におけるコンジュゲート - リンカ分子の位置は、コンジュゲートされた一本または複数鎖（センス鎖、アンチセンス鎖、あるいはセンス鎖アンチセンス鎖の両方）や、修飾されるセンス鎖上の一つまたは複数の位置（例えば、一本または複数鎖上でのヌクレオチドの位置）、または糖、塩基などのヌクレオチドの修飾位置、などによって変わらえる。コンジュゲート - リンカ分子は、本発明の一本または複数鎖上の 5' 末端および / または 3' 末端に置くことが可能である。例えば、コンジュゲート - リンカ分子は、センス鎖 5' 末端、および / またはセンス鎖 3' 末端、および / またはアンチセンス鎖 5' 末端、および / またはアンチセンス鎖 3' 末端に位置してよい。また、コンジュゲート - リンカ分子は、ホスフォジエステル結合を介して鎖の 5' および / または 3' 末端に結合できる。好ましくは、本実施形態のコンジュゲート - リンカ分子は、ホスフォジエステル結合を介してセンス鎖の一方の端または両端に結合でき、より好ましくは、センス鎖 3' 末端に結合される。

【 0 0 8 7 】

また、コンジュゲート - リンカ分子はセンス鎖および / またはアンチセンス鎖の内部にも

結合可能である。更に、ウリジン 5 位、シチジン 5 位、シチジン 4 位、グアノシン 7 位、アデノシン 7 位、グアノシン 8 位、アデノシン 8 位、アデノシン 6 位、リボース 2' 位、リボース 5' 位、リボース 3' 位、を含むヌクレオチドの複数の位置がコンジュゲート部を核酸に結合するために用いることができる。

#### 【0088】

< センス鎖およびアンチセンス鎖によって形成された二本鎖 >

センス鎖およびアンチセンス鎖の大きさは、約 18 個から約 30 個つながったヌクレオチドの大きさに相当し、具体的には、ヌクレオチドが、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または 30 個つながった長さになる。好ましいセンス鎖およびアンチセンス鎖の長さは、ヌクレオチド 19 個から 23 個の長さになるが、更に好ましくは、以下に示したようにヌクレオチド 19 個の長さになる。二本鎖オリゴヌクレオチド複合体のセンス鎖および/またはアンチセンス鎖の配列は、前記配列がオフ・ターゲット作用または有害な作用を全くまたは最小限しか示さずに標的遺伝子を効率的にサイレンシングさせる場合には、当業者に知られる様々な方法、即ち、遺伝子配列に基づくランダムセレクションや、合理的設計法（多くの技術的に認められたアルゴリズムおよび/または神経ネットワークのうちの任意の方法を用いる）といった様々な方法によって、選定することが可能である。効率的な遺伝子サイレンシングに用いられるアンチセンス鎖の合理的設計法の基準の詳細に関しては、下記の文献、WO 2004/045543、WO 2006/006948、WO 2005/078095、WO 2005/097992、ならびに WO 2005/090606 に記載される。

#### 【0089】

安定性、Dicer または RISC 処理、機能、および/または特異性を向上させるために、センス鎖ならびにアンチセンス鎖の広い範囲において化学修飾することが可能である。さらに、23 bp よりも長い dsRNA に対して細胞が一般に有する内在的免疫反応を最小限に抑えるために、化学修飾を用いることができる (Reynolds, A 等、(2006) RNA. 12(6): 988-930 参照)。全体の安定性や酵素処理能を高めることができる内部ヌクレオチド結合部の化学修飾としては、ホスフォロチオエート、ホスフォロジチオエート、アルキルホスホネート、ホスフォノアセテート、ホスフォノアセトアミド、ホスフォノ酢酸エステル、ホスフォノアミデート、ホスフォノアルコール、ホスフォノアルコールエステル、ホスフォノホルメート、ホウ素化ホスホネート、ペプチド、核酸などが挙げられる。同様に、オリゴヌクレオチドの安定性、機能、酵素処理、特異性を高めるために、糖構造が修飾された化学修飾ヌクレオチドを用いることが可能である。ここで、糖環状構造に対する化学修飾としては、2'-O-アルキルリボース、2'-ハロ-2'-デオキシリボース、2'-デオキシリボース、2'-アミノ-2'-デオキシリボース、2'-チオ-2'-デオキシリボース、アラビノース、L-リボース、2'-ハロ-2'-デオキシアラビノース、2'-O-アルキルアラビノース、2'-アミノ-2'-デオキシアラビノース、2'-チオ-2'-デオキシアラビノース、2'-O-4'-C-メチレンピシクロリボース、4'-アミノアルキルリボース、5'-アミノアルキルリボース、4-チオリボースなどが挙げられる。

#### 【0090】

さらに、センス鎖の約 40% から約 90% のヌクレオチド、アンチセンス鎖の約 40% から約 90% のヌクレオチドが、化学修飾されたヌクレオチドであることが好ましい。好ましい化学修飾としては、1) 5' 末端から数えてセンス鎖の 1 番目および/または 2 番目のヌクレオチドにおける 2'-O-アルキル修飾、好ましくは 2'-O-メチル修飾、および/または 2) センス鎖の C および U の一部または全部における 2'-O-アルキル修飾、好ましくは 2'-O-メチル修飾、および/または 3) アンチセンス鎖の C および U の一部または全部における 2' ハロゲン修飾、好ましくは 2' F 修飾が挙げられる。好ましい実施形態の一例としては、センス鎖の第 1 および第 2 番目のヌクレオチド、また C および U ヌクレオチドの全てが 2'-O-メチル修飾ヌクレオチドであり、アンチセンス鎖の C および U ヌクレオチドの全てが 2' F 修飾ヌクレオチドである例が挙げられる。

## 【0091】

内部ヌクレオチドや糖の修飾に加えて、多数の塩基類縁体をセンス鎖および/またはアンチセンス鎖の中に組み込むことが可能である。そのような類縁体は、特異性や機能を増強し、RNA干渉過程または標的遺伝子の一つ以上のタンパク質との相互作用を促進または最小限に抑えるために、更に、内在的免疫反応の活性化を最小限に抑えるために、所望の位置で塩基対の形成能を促進または最小限とするように、組み込むことが可能である。塩基類縁体としては、イソシチジン/イソグアノシン、2-アミノプリン、シュードウリジン、5-メチルウリジン、3-メチルウリジン、ニトロインドール、イミダゾール、ピリジン、5-アザピリミジン、6-アザピリミジン、7-デアザプリン、5-ハロピリミジン、8-ハロプリン、8-オキソプリン、2-チオピリミジン、6-チオグアノシン、4-チオウリジン、2,6-ジアミノプリンなどが挙げられる。上記の3種類の修飾のほかに、モリホリノヌクレオチド、1',5'-アンハイドロヘキシトールヌクレオチド、2,3-ジデオキシヘキソピラノシルヌクレオチド、カルボン酸ヌクレオチド、C-ヌクレオチド、およびアシクロビル、ガンシクロビル、ペンシクロビル、デシクロビルなどの非環式ヌクレオチド、および塩基対を形成可能な任意の数の化学修飾を含むヌクレオチド修飾が、本発明に含まれる。

10

## 【0092】

さらに、センス鎖およびアンチセンス鎖によって形成される二本鎖は少なくとも一つのオーバーハングを持ち、各オーバーハングは少なくとも一つのヌクレオチドを含む。前記オーバーハングの位置としては、センス鎖5'末端、センス鎖3'末端、センス鎖5'および3'末端、アンチセンス鎖5'末端、アンチセンス鎖3'末端、アンチセンス鎖5'および3'末端、センス鎖5'末端ならびにアンチセンス鎖5'末端、または、センス鎖3'末端およびアンチセンス鎖3'末端、が可能である。

20

## 【0093】

好ましい実施形態としては、オーバーハングはアンチセンス鎖の3'末端に位置する。より好ましくは、アンチセンス鎖3'末端上にあるオーバーハングは、2ヌクレオチドオーバーハングである。オーバーハングにあるヌクレオチドの塩基は任意に選ぶことができる。オーバーハングのヌクレオチドは、標的mRNAと塩基対を形成しても形成しなくともよい。便宜上ここにおいて、2ヌクレオチドオーバーハングを、UUオーバーハングとする(AA、GG、CC、AC、CA、AG、GA、GC、およびCG2ヌクレオチドオーバーハング、その他も考慮のこと。Vermeulen等、(2005)RNA11(5):674-678参照)。オーバーハングにあるヌクレオチドおよび/または内部ヌクレオチドの連結部は、先に述べたヌクレオチドまたは内部ヌクレオチドの連結部の任意の化学修飾を用いて修飾してもよい。好ましい実施形態の一例としては、アンチセンス鎖において、2ヌクレオチドUUオーバーハングがアンチセンス鎖3'末端に位置し、3'末端Uを二番目のUヌクレオチドにつなぐホスフォロチオエート連結部をもち、前記二番目のUヌクレオチドを5'方向のその次のヌクレオチドにつなぐホスフォロチオエート連結部をもつようなアンチセンス鎖のオーバーハングが可能である。

30

## 【0094】

ある実施形態では、センス鎖5'末端、および/またはセンス鎖3'末端、および/またはアンチセンス鎖5'末端、および/またはアンチセンス鎖3'末端は、末端ホスフェートを有する。好ましくは、一つの末端ホスフェートは、アンチセンス鎖5'末端に位置する。

40

## 【0095】

ある実施形態では、アンチセンス鎖のヌクレオチドとセンス鎖のヌクレオチドとの間に少なくとも一つのミスマッチを有するが、好ましくは、アンチセンス鎖の10、11、12、13、または14番目のヌクレオチドと、センス鎖の相対するヌクレオチドとの間にミスマッチが存在する。ここで、この位置番号は5'末端からの番号であり5'末端に位置するいかなるオーバーハングも数に入れない。また、ある好ましい実施形態では、二本鎖はアンチセンス鎖の5'末端から数えて14番目のヌクレオチドとセンス鎖の相対するヌ

50



クレオチドとの間にミスマッチを有する。ここで、センス鎖とアンチセンス鎖がオーバーハングは数えないでヌクレオチド19個分の長さを持つ場合、アンチセンス鎖の14位はセンス鎖の6位と相対する。ここで、位置番号は、各鎖の5'末端からの数え、オーバーハングは数えない。また、センス鎖およびアンチセンス鎖が、オーバーハングは数えないでヌクレオチド18、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30個分の長さを持つ場合、アンチセンス鎖の14位は、センス鎖の5、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、または17位にそれぞれ相対する。ここで、位置番号は各鎖の5'末端から数えた番号であり、オーバーハングは数えない。

【0096】

ミスマッチを持たない同じ二本鎖に比べて、ミスマッチを持つ二本鎖は、センス鎖上に単一のヌクレオチド置換を有し、アンチセンス鎖と標的mRNAとの間で相補性を完全に保つ。そのようなミスマッチを持つ二本鎖では、センス鎖中のミスマッチヌクレオチドは、アンチセンス鎖中14番目のヌクレオチドと同じ塩基を有し、この結果、もし14番目のヌクレオチドがAの場合にはA/A、もし14番目のヌクレオチドがUの場合にはU/U、もし14番目のヌクレオチドがGの場合にはG/G、更にもし14番目のヌクレオチドがCの場合にはC/Cミスマッチを形成する。

【0097】

<組み合わせについて>

本発明の二本鎖オリゴヌクレオチド複合体を提供するために、センス鎖およびアンチセンス鎖によって形成される二本鎖の設計、リンカ分子の属性、コンジュゲート部の属性、コンジュゲート-リンカ分子の位置、化学的修飾を受けたヌクレオチドの位置など、先に述べたような本発明の特徴の組み合わせ方には数多くの組み合わせ方があるということは、当業者にとっては容易に認識されることである。あらゆる可能な組み合わせ方は明確に想定される。以下に挙げた二本鎖オリゴヌクレオチド複合体は、新規特徴が組み合わせられた実施例として示されるものであり、これによって限定されるものではない。

【0098】

二本鎖オリゴヌクレオチド複合体の例を以下に示す。

1. 約18個から約30個のヌクレオチドよりなるセンス鎖であって、5'末端より数えて1番目と2番目のヌクレオチドは2'-O-メチル修飾ヌクレオチドであり、全てのCヌクレオチドおよびUヌクレオチドは2'-O-メチル修飾ヌクレオチドであり、

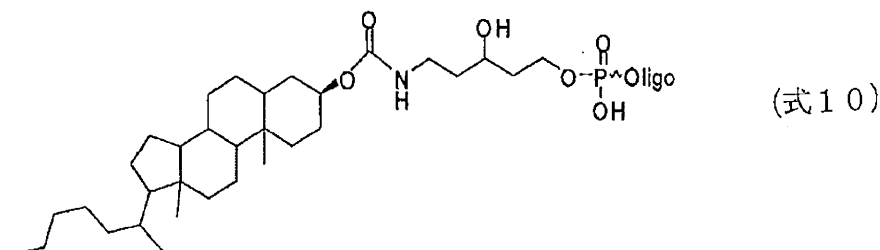
2. 約18個から約30個のヌクレオチドよりなるアンチセンス鎖であって、全てのCヌクレオチドおよびUヌクレオチドは2'-F修飾ヌクレオチドであり、前記アンチセンス鎖は前記センス鎖および標的遺伝子双方に対して高い相補性を有し、前記センス鎖ならびに前記アンチセンス鎖は二本鎖を形成し、

3. 前記アンチセンス鎖3'末端に位置する2ヌクレオチドオーバーハングはホスホロチオエート連結部を有し、

4. C5リンカ分子を介して前記センス鎖3'末端に結合するコレスタノール分子を有し、コレスタノール-リンカ分子-センス鎖は(式10)の構造を持ち、

【0099】

【化10】



【0100】

5. 前記アンチセンス鎖の5'末端にホスフェート基を有し、

6. さらに前記アンチセンス鎖中の5'末端より数えて14番目のヌクレオチドと前記

センス鎖中相対するヌクレオチドとの間のミスマッチを有していてもよい。

【0101】

さらに、二本鎖オリゴヌクレオチド複合体の別の例を以下に示す。

1. 約18個から約30個のヌクレオチドよりなるセンス鎖であって、5'末端より数えて1番目と2番目のヌクレオチドは2'-O-メチル修飾ヌクレオチドであり、全てのCヌクレオチドおよびUヌクレオチドは2'-O-メチル修飾ヌクレオチドであり、

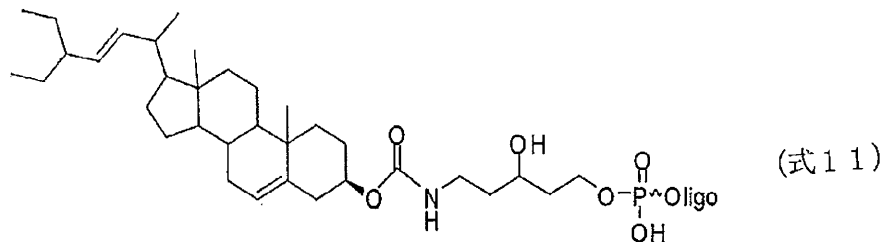
2. 約18個から約30個のヌクレオチドよりなるアンチセンス鎖であって、全てのCヌクレオチドおよびUヌクレオチドは2'-F修飾ヌクレオチドであり、前記アンチセンス鎖は前記センス鎖および標的遺伝子双方に対して高い相補性を有し、前記センス鎖ならびに前記アンチセンス鎖は二本鎖を形成し、

3. 前記アンチセンス鎖3'末端に位置する2ヌクレオチドオーバーハングはホスフォリチオエート結合部を有し、

4. C5リンカ分子を介して前記センス鎖3'末端に結合するスチグマステロール分子を有し、スチグマステロール-リンカ分子-センス鎖は(式11)の構造を持ち、

【0102】

【化11】



【0103】

5. 前記アンチセンス鎖の5'末端にホスフェート基を有し、

6. 前記アンチセンス鎖中の5'末端より数えて14番目のヌクレオチドと前記センス鎖中相対するヌクレオチドとの間に、ミスマッチを随意に有する。

【0104】

さらに、二本鎖オリゴヌクレオチド複合体の別の例を以下に示す。

1. 約18個から約30個のヌクレオチドよりなるセンス鎖であって、5'末端より数えて1番目と2番目のヌクレオチドは2'-O-メチル修飾ヌクレオチドであり、全てのCヌクレオチドおよびUヌクレオチドは2'-O-メチル修飾ヌクレオチドであり、

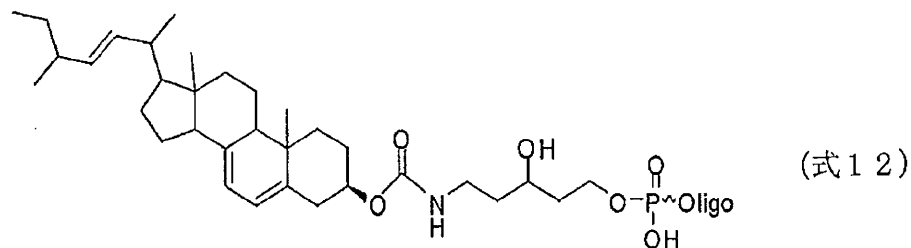
2. 約18個から約30個のヌクレオチドよりなるアンチセンス鎖であって、全てのCヌクレオチドおよびUヌクレオチドは2'-F修飾ヌクレオチドであり、前記アンチセンス鎖は前記センス鎖および標的遺伝子双方に対して高い相補性を有し、前記センス鎖ならびに前記アンチセンス鎖は二本鎖を形成し、

3. 前記アンチセンス鎖3'末端に位置する2ヌクレオチドオーバーハングはホスフォリチオエート連結部を有し、

C5リンカ分子を介して前記センス鎖3'末端に結合するエルゴステロール分子を有し、エルゴステロール-リンカ分子-センス鎖は(式12)の構造を持ち、

【0105】

【化12】



【0106】

10

20

30

40

50

4. 前記アンチセンス鎖の5'末端にホスフェート基を有し、

5. 前記アンチセンス鎖中の5'末端より数えて14番目のヌクレオチドと前記センス鎖中相対するヌクレオチドとの間に、ミスマッチを随意に有する。

【0107】

さらに、二本鎖オリゴヌクレオチド複合体の別の例を以下に示す。

1. 約18個から約30個のヌクレオチドよりなるセンス鎖であって、5'末端より数えて1番目と2番目のヌクレオチドは2'-O-メチル修飾ヌクレオチドであり、全てのCヌクレオチドおよびUヌクレオチドは2'-O-メチル修飾ヌクレオチドであり、

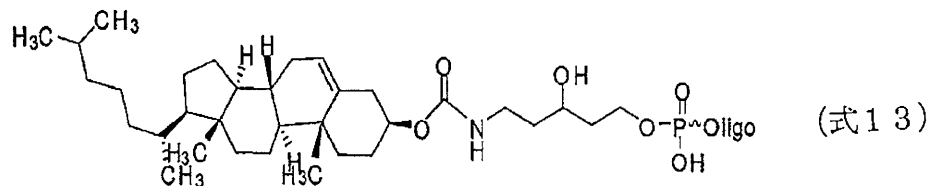
2. 約18個から約30個のヌクレオチドよりなるアンチセンス鎖であって、全てのCヌクレオチドおよびUヌクレオチドは2'-F修飾ヌクレオチドであり、前記アンチセンス鎖は前記センス鎖および標的遺伝子双方に対して高い相補性を有し、前記センス鎖ならびに前記アンチセンス鎖は二本鎖を形成し、

3. 前記アンチセンス鎖3'末端に位置する2ヌクレオチドオーバーハングはホスフォロチオエート連結部を有し、

C5リンカ分子を介して前記センス鎖3'末端に結合するコレステロール分子を有し、コレステロール-リンカ分子-センス鎖は(式13)の構造を持ち、

【0108】

【化13】



【0109】

4. 前記アンチセンス鎖の5'末端にホスフェート基を有し、

5. 前記アンチセンス鎖中の5'末端より数えて14番目のヌクレオチドと前記センス鎖中相対するヌクレオチドとの間に、ミスマッチを随意に有する。

【0110】

このようなChol-C5複合体は、包括して「G4複合体」、「G4siRNA」、または単に「G4」と呼ぶことにする。具体的なG4siRNAを述べるときに、接尾語「(+mm)」はG4siRNAが5'末端より数えてアンチセンス鎖中14番目のヌクレオチドとセンス鎖中の相対するヌクレオチドとの間にミスマッチを有することを表し、前記接尾語「(-mm)」はG4siRNA中にはミスマッチが無いということを表す。

【0111】

<間接的コンジュゲートおよび処方>

数多くの間接的コンジュゲートを、本発明の任意の二本鎖オリゴヌクレオチド複合体と連結するために用いることが可能である。従って、前記したG4などの任意の二本鎖オリゴヌクレオチド複合体を、抗体などのタンパク質の融合物や、ポリカチオン、カチオン性ペプチド、ジンクフィンガー、アプタマー、ヒストン、dsRNA結合タンパク質、単鎖核酸結合タンパク質、ヘパリン結合ドメイン、KHドメイン、PAZドメイン、ウイルス性カプシドタンパク質、形質移入因子またはドメインとともに用いることができる。また、ペプチド、リポまたはポリプレックス、デンドリマー、ヘパリン、コレステロール、アルブミン、LDL阻害分子、受容体阻害分子、エンドゾーム破壊化合物または混合物、天然脂質、ポリヒスチジン、プロタミン、アミノ酸、タキソール、徐方処方、ナノ粒子に基づいた処方、本願の二本鎖オリゴヌクレオチド複合体に全て適用可能である。

【0112】

<輸送方法>

本発明の二本鎖オリゴヌクレオチド複合体は、先に述べたように、RNA干渉方法に用いられる。RNA干渉方法としては、siRNA、shRNA、miRNA、またはpiR

10

20

30

40

50

NAによる一つあるいは複数の遺伝子標的化が挙げられるが、これらに限定されるものではない。さらに、阻害剤による siRNA、shRNA、miRNA、または piRNA の標的化も、RNA 干渉方法に含まれる。

#### 【0113】

本発明の二本鎖オリゴヌクレオチド複合体は、RNA 干渉経路による遺伝子サイレンシング能において極めて強力である。コンジュゲートとして、コレステロール (CHOL)、コレスタノール (CHLN)、コラン酸 (CHLA)、スチグマステロール (STIG)、およびエルゴステロール (ERGO) を有する本発明の二本鎖オリゴヌクレオチド複合体は、特に G4 複合体などの C5 リンカ分子を介してセンス鎖 3' 末端に連結している場合、非常に有用である。遺伝子をサイレンシングまたはノックダウンするために、これらのコンジュゲートが結合した二本鎖オリゴヌクレオチドを、培養または他の環境にある細胞中に形質移入試剤を用いない受動輸送するのに利用できるからである。これら G4 などの分子は、培養プレート、培養皿、多孔プレートなどで培養される細胞に受動輸送されるが、これら容器に限定されるものではない。また、これら G4 などの分子は、0% 血清条件 (無血清) を含む希釈血清条件下、細胞内に輸送される。この条件には、Invitrogen、HyClone を含む多くの会社から市販品として入手可能な、標準的希釈血清培地で培養された細胞が含まれる。上記方法の一例を挙げると次のようになる。まず細胞を血清培地中プレATINGし、次にこの血清培地を本発明の G4 などの二本鎖オリゴヌクレオチドを含む希釈血清培地と 24 時間置換し、その後前記希釈血清培地を血清培地へと置換する。

10

20

#### 【0114】

受動輸送される G4 siRNA が効率よく遺伝子サイレンシングに用いられる細胞株には、以下が挙げられる。ヒト接着細胞：SH-SY5Y：神経芽細胞腫、IMR32：神経芽細胞腫、LAN5：神経芽細胞腫、HeLa：Cervix、腺がん、HeLaS3：Cervix、腺がん、LNCap：前立腺細胞、転移腫、MCF10A：上皮細胞、内分泌細胞、293T：上皮細胞、腎、MCF-7：肺がん、SK-BR3：肺がん、Huh7：肝細胞腫、DU145：前立腺、mets：脳腫瘍、GTM-3：緑内障網状組織、HT1080：結合組織、繊維肉腫、U2OS：骨、骨肉腫、上皮細胞、DLDD-1：上皮細胞、大腸、結腸直腸腺がん、A-375：上皮、皮膚、悪性黒色腫、HepG2：肝臓、肝細胞がん、THP-1：単球、急性単核白血病、Jurkat：T-白血球、急性 T 細胞白血病、ヒト分化幹細胞、骨芽細胞：hMSC 由来、脂肪細胞：hMSC 由来、初代細胞、臍帯静脈、内皮細胞、HUASMS (60% KD)：平滑筋初代細胞、肝細胞：マウス、肝臓、hMSC：非分化間葉、PBMS：末梢血単核細胞、NHA：ヒト星状細胞、その他の種：3T3NIH：マウス、胚、繊維芽細胞、ES-D3：マウス、多能性胚芽幹細胞、C2C12：マウス、筋芽細胞、および H9c2：ラット、心臓、心筋。

30

#### 【0115】

本発明の二本鎖オリゴヌクレオチド複合体は、無血清培地を含む希釈血清培地に予め混合した状態で提供できる。本発明の二本鎖オリゴヌクレオチド複合体は、遺伝子サイレンシング活性を著しく損なうことなしに、上記培地に 4 にて長期保存が可能である。従って、本発明はその一面として、一つ以上のコンテナを持ち、各コンテナには希釈血清培地および G4 複合体などの本発明の二本鎖オリゴヌクレオチド複合体が含まれるようなキットを提供するものである。前記キットには、本発明に基づいて、当業者が細胞内に前記二本鎖オリゴヌクレオチド複合体を受動輸送できるようにその方法を記した取り扱い説明書が入っているもよい。このようにして、消費者は、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチド複合体を安定かつすぐに使用可能な処方で購入することができる。遺伝子サイレンシングは、追加の形質移入処置を施さないで決められた処方単に細胞を培養するだけで実施することが可能である。さらに、前記処方が複数の二本鎖オリゴヌクレオチド複合体を含み、各二本鎖オリゴヌクレオチド複合体が特定の遺伝子に対して特異的である場合には、複数遺伝子を同時にサイレンシングするのに単一の処方を用いてもよい。さらに、もし単一の遺伝子をサイレンシングする場合には、前記処方は本発明の二本鎖オリゴヌクレオチド複合

40

50

体を一つだけ含んでいてもよいが、二本鎖オリゴヌクレオチド複合体のプールとして構成されていてもよい。それぞれの二本鎖オリゴヌクレオチド複合体は、それぞれの標的 mRNA 上の異なる領域を標的化する。

【0116】

さらに、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチド複合体は、「逆形質移入」フォーマット中で培養細胞中遺伝子をサイレンシングする目的で用いることができる。このフォーマットでは、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチド複合体を、先ずガラススライドなどの固体担体上にディスペンスし、次にその固体担体上で細胞を培養する。こうして、固体担体上で培養した細胞は受動輸送で二本鎖オリゴヌクレオチド複合体を取り込む。好ましい実施形態としては、複数の異なる二本鎖オリゴヌクレオチド複合体を固体担体上決められた位置にプリンティング、ピペティングにより付着させ、二本鎖オリゴヌクレオチド複合体マイクロアレイを調製する。この結果、固体担体上培養した細胞は、異なる二本鎖オリゴヌクレオチド複合体に位置決めされて接着する。前記担体は、前記二本鎖の保持あるいは輸送を促進する目的で、または固体担体への細胞接着を促進する目的で、一種類以上のポリマーによって修飾することが可能であるが、修飾しないままでもよい。

10

【0117】

本発明の二本鎖オリゴヌクレオチド複合体は、コレステロール (CHOL)、コレスタノール (CHLN)、コラン酸 (CHLA)、スチグマステロール (STIG)、またはエルゴステロール (ERGO) をコンジュゲートとして有するが、特に G4 複合体などの C5 リンカ分子を介してセンス鎖 3' 末端に連結している場合、細胞への連投用として特に有用である。本発明の二本鎖オリゴヌクレオチド複合体の連投は、標的遺伝子の長期ノックダウンを行うのに有効である。また、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチド複合体を連投された細胞は、常法の脂質媒介型形質移入が可能である。従って、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチド複合体を特定の遺伝子をノックダウンさせるために用いることが可能である。また、別の遺伝子を同時にノックダウンする目的で siRNA などの RNA 干渉を媒体する試薬を脂質媒介輸送させるのにも使用可能である。このようにして、目的のフェノタイプ用に、特定遺伝子の連続ノックダウンの「バックグラウンド」にて、異なる siRNA をパネルスクリーニングすることが可能となる。

20

【0118】

ある実施形態では、本発明の構成物は、基礎研究用、薬物輸送用、ADME - 毒性用、治療 / 予防用として適用される。

30

【0119】

また、別の実施形態では、リンカ分子、コンジュゲート、輸送物を様々に組み合わせて機能スクリーンをする方法を述べる。

【0120】

また、別の実施形態では、核酸輸送、好ましくは、siRNA、miRNA、miRNA ミミック、piRNA、miRNA および piRNA 阻害剤の輸送を促進させるコンジュゲート構造をスクリーンするためのコンビケム手法も述べる。

【0121】

また、別の実施形態では、小分子スクリーニングを実施する目的で本発明の一または複数の構成物が用いられる。

40

【0122】

また、別の実施形態では、血清タンパク質など本発明分子の相互作用能を阻害する分子を同定する目的で、本発明の一または複数の構成物および / または方法が用いられる。

【0123】

また、別の実施形態では、リガンド結合のバックグラウンドを最適化する目的で、本発明の一または複数の構成物および / または方法が用いられる。

【0124】

また、別の実施形態では、形質移入工程の開発用キットに用いる目的で、本発明の一または複数の構成物が用いられる。このような工程としては、1) ウェルに細胞をプレーティ

50

ングし、受動輸送用にウエルに本発明の一または複数の構成物を添加する工程、2)ウエルにまたはスライドに本発明の一または複数の構成物を配置し、本発明の分子の受動輸送を開始するように細胞を加える工程がある。どちらの場合でも、上記の方法は細胞中に分子を均一に導入する、または細胞中にs i R N Aゲノムコレクションなどの多構成物を導入する目的で用いることができる。

【0125】

また、別の実施形態では、ハイスループットスクリーニング手法に、本発明の構成物が用いられる。

【0126】

また別の実施形態では、J u r k a t細胞、幹細胞、神経由来細胞、脊髄由来細胞などの難形質移入細胞にs i R N Aなどの核酸を導入する目的で、本発明の構成物が用いられる。

10

【0127】

また別の実施形態では、初代細胞にs i R N Aなどの核酸を導入する目的で、本発明の構成物が用いられる。

【0128】

また別の実施形態では、非接着懸濁細胞にs i R N Aなどの核酸を導入する目的で、本発明の構成物が用いられる。

【0129】

また別の実施形態では、幅広い種類の核酸を導入する目的で、本発明の構成物が用いられるが、これら核酸としては、s i R N A、m i R N A、m i R N Aミミックおよび阻害剤、p i R N A、p i R N A阻害剤、プラスミド、アンチセンス分子、修飾・非修飾型核酸、DNA-RNAハイブリッドなどのハイブリッド核酸その他が挙げられる。本発明は、病原性ウイルスなどの病原体ゲノム、糖尿病、アルツハイマー、がんなどの疾患に関するヒトゲノムの、あるいは、病原体の侵入、複製、包合、放出、あるいは病原体の複製過程において重要な過程において重要な役割を果たす転写後遺伝子の、m i R N A、s i R N A、p i R N Aを輸送する目的に用いることができる。

20

【0130】

また別の実施形態では、単一遺伝子の複数の部位を標的するs i R N Aプール、複数遺伝子を標的するs i R N Aプール、m i R N Aまたはp i R N Aミミックのプール、m i R N Aまたはp i R N A阻害剤のプール、その他などの核酸集合体を輸送する目的で、本発明の構成物が用いられる。さらに、特定の疾患に関連したm i R N Aミミックまたはm i R N A阻害剤のプールは、本発明の構成物を用いて一度に輸送することが可能である。

30

【0131】

また別の実施形態では、s i R N Aなどの無作為に選ばれた核酸を輸送する目的で、本発明の構成物が用いられる。

【0132】

また別の実施形態では、合理的設計法によって選ばれた一つあるいは複数の核酸を輸送する目的で、本発明の構成物が用いられる。

【0133】

また別の実施形態では、本発明の構成物はコントロール化合物として用いられる。これら化合物は、R I S C導入ができないもの、毒性を引き起こすもの、標識化して形質移入効率を評価する目的で用いられる。

40

【0134】

また別の実施形態では、特定の遺伝子またはRNA干渉用遺伝子群を標的する分子を輸送する目的で、本発明の構成物が用いられる。例えば、前記遺伝子群としては、キノメなどを標的するs i R N A群、G P C R、膜再構成に関わる遺伝子、ゲノムセット、完全ゲノムその他が挙げられる。

【0135】

また別の実施形態では、G 4などの本発明の二本鎖オリゴヌクレオチド複合体およびそれ

50

を用いる方法は、診断、予防、治療、農業、獣医、研究ツール、化粧、その他に用いることができる。治療、予防に用いる例では、G 4 あんどの本発明の構成物は、動物、好ましくは哺乳類、より好ましくはヒトの疾患治療剤の製造に用いることができる。本発明により製造された薬剤の投与量は、検体に対してマイクログラム/キロから数百ミリグラム/キロの範囲で用いてよい。また、技術的に知られるように、投与量は、投与される哺乳動物の体重、性状、疾患の重さ、検体の血清中での薬剤安定性、またはその他当業者によく知られた要因に基づいて変わってくる。特定の標的核酸の取り扱いによって変わる、疾患を有すると疑われる組織は、本発明の構成物を投与することで治療される。その治療の結果として、特定の疾患が改善、一時緩和、予防、および/または診断される。

【0136】

また、治療や予防の例では、G 4 などの本発明の二本鎖オリゴヌクレオチド複合体は、様々な治療薬、輸送薬、服用方法と組み合わせて用いることができる。医薬的に許容される担体、賦形剤、希釈液は当業者に知られたものが用いられる。細胞や組織への投与方法は、当業者に知られたものが用いられる。投与方法は、治療される疾患に対する反応の重さや程度によるが、日から月にまたがる治療期間、疾患に対する治療効果が現れるまでの期間などに拠る。ある疾患に対して所望する効果を継続させるために、本発明分子の長期投与が必要なこともある。好ましい投与方法は、本発明の一または複数の分子を、医薬的に許容される担体や希釈液を用い、医薬的に許容される輸送経路によって投与量を調整しながら投与することにより決めることが可能であり、さらに体内に蓄積される薬物量を投与後何点かの時間で測定することが可能である。同様に、所望の効果を本発明分子の投与後何点かの時間で測定することができるが、このデータは、体内あるいは臓器への蓄積といった別の薬動学的データと関連着けることもできる。当業者は、最適な投与量、投与方法、などをこうして決めることが可能であり、試験管内ならびに生体内動物モデルで得られたEC50データを、臨床試験を行うためのデータとして用いてもよい。

【0137】

また、別の実施形態として、本発明の構成物や方法は、併合療法、特に、がん、アルツハイマー、その他てんかんなどの神経系疾患を含むヒトの疾患を軽減、最小化する目的の併合療法に用いられる。

【0138】

また、別の実施形態として、本発明の構成物や方法は、別の標的用骨格を設計・試験するために構造/機能研究用として用いられる。

【0139】

本発明の分子は、導入される細胞型や細胞種に関係なく作用するので、別の実施形態では本発明を、植物、動物、原生動物、バクテリア、ウイルス、真菌などの幅広い生物に核酸を輸送するために用いられるが、これらに限定されるものではない。本発明は特に、ウシ、ウマ、ヤギ、ブタ、ヒツジ、イヌなどの哺乳類、ハムスター、マウス、ラットなどのげっ歯類、ゴリラ、ガラゴ、チンパンジー、ヒトなどの霊長類に使用できる利点を持つ。

【0140】

また、別の実施形態として、本発明の構成物や方法は、特定の組織、特に心臓組織、神経組織、胃腸管、筋肉組織、肺組織、がん性組織、病原体感染組織、などの疾患組織に対して用いることができる。本発明は、初代細胞、胚芽細胞株、体細胞株などの多様な細胞型に用いてもよい。前記細胞型としては、胎芽細胞、精子、脂肪細胞、繊維芽細胞、心臓細胞、内皮細胞、神経細胞、血球細胞、リンパ球、マクロファージ、マストセル、白血球、顆粒球、ケラチノサイト、骨肉腫、肝細胞、外分泌・内分泌細胞が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0141】

また、別の実施形態としては、静脈注射、インハレーション、筋肉注射、皮下注射、経皮投与、経鼻投与、経口投与、直腸、点眼や、あるいは所望の標的核酸がある臓器、組織、細胞の近傍に本発明分子を放出する装置を用いた組織注入により、または検体に核酸を導入する技術的に認められた方法によって、本発明の構成物を輸送する。本発明分子は、ク

10

20

30

40

50

リーム、軟膏によって、また、カプセル、錠剤、懸濁液、溶液のような経口投与によって服用できる。

【0142】

<二本鎖オリゴヌクレオチド複合体の合成方法>

また、本発明はG4などの二本鎖オリゴヌクレオチド複合体の合成方法を提供するものである。ある実施形態では、コンジュゲート部誘導体を、固相合成用担体に結合したままでオリゴヌクレオチド鎖の所望の位置に導入することが可能である。好ましくは、ホスホoramidate、H-ホスホネートなどといったオリゴヌクレオチド合成に用いたのと同じ合成法、またはオリゴヌクレオチド合成の開始部位として所望のコンジュゲート部を有する固相合成法を用いて実施される。別法として、オリゴヌクレオチド合成中に保護基を持つ官能基をオリゴヌクレオチドに導入し、オリゴヌクレオチド保護基と固体担体連結部と併用可能な反応条件で合成中適当な段階で脱保護し、コンジュゲート部の活性化体と共有結合させてもよい。

10

【0143】

別の実施形態では、担体からの分離、脱保護の後、完成したオリゴヌクレオチドを所望のコンジュゲート部誘導体と反応させる。この反応は非特異的であってよく、コンジュゲート部オリゴヌクレオチド上部位への無作為な共有結合的反応であるか、オリゴヌクレオチドにイオンの相互作用、水素結合、疎水的相互作用など、非共有結合的に相互作用する。または、適当なコンジュゲート部反応性誘導体との反応でオリゴヌクレオチドに特定の官能基が導入されている場合には、完成したオリゴヌクレオチドを所望のコンジュゲート部誘導体との反応は、特異的に行われる。

20

【0144】

上記のように、コンジュゲート部はオリゴヌクレオチド合成を開始する部位として固相オリゴヌクレオチド合成担体に結合できる。ある実施形態では、リンカ分子がコンジュゲート部に付き、担体への結合用、オリゴヌクレオチド合成の開使用としての機能を持たせている。好ましくは、これらの部位としては、水酸基が挙げられ、より好ましくは、コンジュゲート修飾固相担体合成中に化学的に識別されるように一級水酸基、二級水酸基が挙げられる。

【0145】

ある実施形態では、オリゴヌクレオチド鎖で行う合成法と同じ合成法をコンジュゲート部誘導体に適用し、3'末端以外の部位でオリゴヌクレオチドにコンジュゲート部が導入される。つまり、4つの標準ヌクレオチドモノマーでは使わない、自動合成機の試薬挿入部にコンジュゲート部を入れ、適当な位置で所望の配列に導入されるように合成プログラムするコンジュゲートの付加は、最も効率的な導入に必要な溶液濃度、結合時間などの条件を除いて、モノマー合成と同様に行われる。今日行われる最も一般的なオリゴヌクレオチド合成法は、好ましくはコンジュゲート部がホスホoramidateであるホスホoramidate法である。

30

【0146】

先の章で述べられたリンカ分子は、合成用の骨格として用いられ、その上にコンジュゲート部の所望するホスホoramidate誘導体を構築する。リンカ分子の水酸基の一つは、好ましくは一級水酸基であるが、当業者によく知られた方法によって、オリゴヌクレオチド合成に用いられるジメチルトリチル、シリル基などの保護基で保護される。また、別の水酸基は、好ましくは二級水酸基であるが、当業者によく知られた方法で三級塩基共存下、保護基を持つクロロホスフィンと反応し、またはテトラゾール、トリアゾール、イミダゾール誘導体の共存下、保護基を持つホスホoramidateと反応し、所望のホスホoramidateを合成する。このようなリンカ分子コンジュゲート部ホスホoramidate誘導体は、得られるオリゴヌクレオチドコンジュゲートの活性を害さないオリゴヌクレオチド配列中ほぼ任意の位置にコンジュゲート部を設置するのに用いることができる。

40

【0147】

また別の実施形態では、先に述べたように前記リンカ分子はヌクレオチド誘導体であって

50



よい。

【0148】

また別の実施形態では、コンジュゲートの位置は、オリゴヌクレオチド5'末端であり、リンカ分子はコンジュゲート部と共有結合を形成できる官能基およびホスホラミダイト誘導体変換用の水酸基一つを有してさえいればよい。これは、5'末端でのコンジュゲートがオリゴヌクレオチド合成の最終工程であり、この後はモノマーの付加はもう行われなからである。先に述べたリンカ分子に加えて、 $\alpha$ -アミノアルカノール、 $\beta$ -ヒドロキシアルカノール、 $\gamma$ -ヒドロキシアルカンチオール、および $\delta$ -ヒドロキシアルキルカルボン酸などのリンカ分子が用いられる。

【0149】

本明細書中で、温度、時間、%配列、配列相補性、長さ、構成、濃度などの範囲が示された場合、その範囲にある個々の値のみならず全ての部分的範囲も、本発明に含まれる。

【0150】

本願に引用される引用文件は全て、首尾一貫した完全な形でこの中に記載されている。

【実施例】

【0151】

以下の実施例によって本発明を説明するが、先に述べたように本発明はこれら実施例によって限定されるものではない。

【実施例1】

【0152】

<  $\alpha$ -アミノ-1,3-ジオール リンカ分子の一般的合成 >

実施例1から実施例51において、全ての原料および溶媒は市販品または当業者にとって公知な方法によって調製されたものである。実施例1から実施例51の全ての反応によって得られた生成物は分析され、 $^1\text{H NMR}$ 分析法およびESI-TOF質量分析法によって構造を確認した。

【0153】

図1に、 $\alpha$ -アミノ-1,3-ジオールを用いた種々のリンカ分子の一般的な合成経路を示した。なお、同じ生成化合物を得るために、ここに具体的に記載された合成方法や原料が適宜変更可能であることは、当業者にとって周知である。ベンジルオキシカルボニル保護(Cbz)アミノ酸を、2,2-ジメチル-1,3-ジオキサン-4,6-ジオン(メルドラム酸)、ジエチルシアノホスホナート、およびトリエチルアミンと混合し、塩化メチレン溶液中室温にて12-18時間攪拌し、さらにメタノール中で4時間加熱還流した。こうして得られたCbz保護 $\alpha$ -アミノ-b-ケトエステルは、過剰の水素化ホウ素リチウムと、テトラヒドロフラン溶液中室温にて12-18時間反応させた。次に、こうして得られたCbz保護 $\alpha$ -アミノ-1,3-ジオールを、4,4'-ジメトキシトリチルクロリドと、ピリジン中室温にて12-18時間反応させた。次に、こうして得られたCbz保護1-O-DMTr- $\alpha$ -アミノ-1,3-ジオールを、パラジウムカーボン触媒にてメタノール溶液中、室温下4-16時間、水素添加し、1-O-DMTr- $\alpha$ -アミノ-1,3-ジオールを得た。

【0154】

以下の実施例2-実施例5および図2Aに、上記一般合成経路による1-アミノ-5-(ビス(4-メトキシフェニル)-(フェニル)メトキシ)ペンタン-3-オールの詳細な合成法を示した。

【実施例2】

【0155】

<メチル5-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)-3-オキシペンタノエート(I)の合成>

3-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)プロパン酸[N-Cbz-b-アラニン](5.0g、22.4mmol)を塩化メチレン(100mL)に懸濁させ、2,2'-ジメチル-1,3-ジオキサン-4,6-ジオン(3.3g、22.9mmol)、トリエチ

10

20

30

40

50

ルアミン ( 8 . 5 m L , 6 1 . 0 m m o l ) 、 およびジエチルシアノホスフォナート ( 3 . 7 m M , 2 2 . 8 m m o l ) を加えた。全ての固体は速やかに溶解し、反応液は黄色になった。この反応溶液を室温にて16時間攪拌した後、塩化メチレン ( 1 0 0 m L ) で希釈し、塩酸水溶液 ( 3 M , 各 5 0 m L ) で3回、水 ( 各 5 0 m L ) で3回、および飽和食塩水 ( 5 0 m L ) にて洗浄した。反応混合物溶液を無水硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過、溶媒を留去して橙色のシロップを得た。この油状物を無水エタノール ( 2 0 0 m L ) に溶かし、16時間加熱還流した。メタノールを留去して得られた粗製物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ( シリカゲル : 1 5 0 m L ) を用い、溶出液に塩化メチレン ( 5 0 0 m L ) 、塩化メチレン/メタノール ( 5 0 0 m L 、 9 9 . 5 : 0 . 5 v / v ) 、塩化メチレン/メタノール ( 1 0 0 0 m L 、 9 9 : 1 v / v ) を用いて精製した。薄層クロマトグラフィーで目的物を含むフラクションを集め、溶媒留去して淡黄色油状物を得た。更に真空中で十分に乾燥した。収量は 4 . 5 g ( 収率 6 8 % ) である。

10

【 0 1 5 6 】

同様にして、以下の化合物を合成した。

【 0 1 5 7 】

i ) メチル 8 - ( ベンジルオキシカルボニルアミノ ) - 3 - オキソオクタノエートを、6 - ( ベンジルオキシカルボニルアミノ ) - ヘキサン酸より合成した。

【 0 1 5 8 】

i i ) メチル 1 0 - ( ベンジルオキシカルボニルアミノ ) - 3 - オキソオクタノエートを、8 - ( ベンジルオキシカルボニルアミノ ) - オクタン酸より合成した。

20

【 0 1 5 9 】

i i i ) メチル 1 4 - ( ベンジルオキシカルボニルアミノ ) - 3 - オキソオクタノエートを、1 0 - ( ベンジルオキシカルボニルアミノ ) - デカン酸より合成した。

【 0 1 6 0 】

i v ) メチル 3 - ( 4 - ( ベンジルオキシカルボニルアミノ ) フェニル ) - 3 - オキソプロパノエートを、4 - ( ベンジルオキシカルボニルアミノ ) - 安息香酸より合成した。

【 0 1 6 1 】

v ) ベンジル 4 - ( 3 - メトキシ - 3 - オキソプロパノイル ) ピペリジン - 1 - カルボキシレートを、1 - ( ベンジルオキシカルボニル ) ピペリジン - 4 - カルボン酸より合成した。

30

【 0 1 6 2 】

v i ) ベンジル 2 - ( 3 - メトキシ - 3 - オキソプロパノイル ) ピロリジン - 1 - カルボキシレートを、1 - ( ベンジルオキシカルボニル ) ピロリジン - 2 - カルボン酸より合成した。

【 実施例 3 】

【 0 1 6 3 】

< ベンジル 3 , 5 - ジヒドロキシペンチルカルバメート ( I I ) の合成 >

メチル 5 - ( ベンジルオキシカルボニルアミノ ) - 3 - オキソペンタノエート ( 4 . 5 g , 1 5 . 5 m m o l ) を無水テトラヒドロフラン ( 2 5 m L ) に溶解し、氷冷下、水素化ホウ素リチウム無水テトラヒドロフラン溶液 ( 2 M , 2 5 m L , 5 0 m m o l ) に徐々に滴下した。滴下終了後、氷浴を除去し、反応液を室温にて更に16時間攪拌した。無色透明な反応溶液を再び氷浴にて冷却し、塩酸水溶液 ( 1 M , 5 0 m L ) を徐々に滴下して過剰の還元剤を分解した ( この時ガスが発生する ) 。均一な溶液になった反応混合物を濃縮し、テトラヒドロフランを除去した。混合物に酢酸エチル ( 1 0 0 m M ) を加えて十分に振蕩し、分液ロートに移し、下層の水層と分離した。水層を2回以上酢酸エチル ( 各 1 0 0 m L ) と振蕩し、得られた酢酸エチル溶液を合して飽和食塩水 ( 5 0 m L ) で洗浄した。酢酸エチル溶液を、無水硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過、溶媒留去して淡褐色のシロップを得た。この粗精物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ( シリカゲル、2 0 0 m L ) を用い、溶出液に酢酸エチル ( 5 0 0 m L ) 、酢酸エチル/メタノール ( 5 0 0 m L 、 9 9 : 1 v / v ) 、更に、酢酸エチル/メタノール ( 1 0 0 0 m L 、 9 5 : 5 v / v ) を

40

50

用いて精製した。薄層クロマトグラフィーで目的物を含むフラクションを集め、溶媒留去して淡黄色油状物を得た。更に真空中で十分に乾燥した。収量は3.6g(収率92%)である。

【0164】

同様にして、以下の化合物を合成した。

【0165】

i) ベンジル 6, 8 - ジヒドロキシオクチルカルバメートを、メチル 8 - (ベンジルオキシカルボニルアミノ) - 3 - オキソ - オクタノエートより合成した。

【0166】

ii) ベンジル 8, 10 - ジヒドロキシドデシルカルバメートを、メチル 10 - (ベンジルオキシカルボニルアミノ) - 3 - オキソ - オクタノエートより合成した。

10

【0167】

iii) ベンジル 12, 14 - ジヒドロキシテトラデシルカルバメートを、メチル 14 - (ベンジルオキシカルボニルアミノ) - 3 - オキソ - オクタノエートより合成した。

【0168】

iv) ベンジル 4 - (1, 3 - ジヒドロキシプロピル)フェニルカルバメートを、メチル 3 - (4 - (ベンジルオキシカルボニルアミノ)フェニル) - 3 - オキソ - プロパノエートより合成した。

【0169】

v) ベンジル 4 - (1, 3 - ジヒドロキシプロピル)ピペリジン - 1 - カルボキシレートを、ベンジル 4 - (3 - メトキシ - 3 - オキソプロパノイル)ピペリジン - 1 - カルボキシレートより合成した。

20

【0170】

vi) ベンジル 2 - (1, 3 - ジヒドロキシプロピル)ピロリジン - 1 - カルボキシレートを、ベンジル 2 - (3 - メトキシ - 3 - オキソプロパノイル)ピロリジン - 1 - カルボキシレートより合成した。

【実施例4】

【0171】

<ベンジル 5 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ) - 3 - ヒドロキシペンチルカルバメート(III)の合成>

30

ベンジル 3, 5 - ジヒドロキシカルバメート(7.3g, 28.8mmol)を無水ピリジン(各100mL)と2回共沸留去し、無水ピリジン(300mL)に溶解した。氷浴冷却下、4, 4' - ジメトキシトリチルクロリド(9.8g, 28.9mmol)を加え、室温にて16時間攪拌した。得られた黄色反応溶液から溶媒を留去し、残渣を無水トルエン(250mL)に溶解した。このトルエン溶液を4 にて1時間冷却した後、ろ過した。得られた固体をトルエン(50mL)で洗い、洗液をろ液と合わせて溶媒を留去し、暗黄色のシロップを得た。このシロップを室温にて少なくとも24時間真空中乾燥した。粗製物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(シリカゲル、500mL)を用い、溶出液にヘキサン/酢酸エチル/トリエチルアミン(300mL、90:5:5v/v/v)、ヘキサン/酢酸エチル/トリエチルアミン(1000mL、85:10:5v/v/v)、更にヘキサン/酢酸エチル/トリエチルアミン(1000mL、80:15:5v/v/v)、更にヘキサン/酢酸エチル/トリエチルアミン(1000mL、75:20:5v/v/v)、更にヘキサン/酢酸エチル/トリエチルアミン(2000mL、70:25:5v/v/v)、更にヘキサン/酢酸エチル/トリエチルアミン(2000mL、50:45:5v/v/v)を用いて精製した。薄層クロマトグラフィーで目的物を含むフラクションを集め、溶媒留去して淡黄色油状物を得た。更に真空中で十分に乾燥した。収量は15.4g(収率96%)である。

40

【0172】

同様にして、以下の化合物を合成した。

【0173】

50

i) ベンジル 8 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ) - 6 - ヒドロキシオクチルカルバメートを、ベンジル 6, 8 - ジヒドロキシペンチルカルバメートより合成した。

【0174】

ii) ベンジル 10 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ) - 8 - ヒドロキシドデシルカルバメートを、ベンジル 8, 10 - ジヒドロキシペンチルカルバメートより合成した。

【0175】

iii) ベンジル 14 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ) - 12 - ヒドロキシテトラデシルカルバメートを、ベンジル 12, 14 - ジヒドロキシペンチルカルバメートより合成した。

10

【0176】

iv) ベンジル 4 - (3 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ) - 1 - ヒドロキシプロピル)フェニルカルバメートを、ベンジル 4 - (1, 3 - ジヒドロキシプロピル)フェニルカルバメートより合成した。

【0177】

v) ベンジル 4 - (3 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ) - 1 - ヒドロキシプロピル)ピペリジン - 1 - カルボキシレートを、ベンジル 4 - (1, 3 - ジヒドロキシプロピル)ピペリジン - 1 - カルボキシレートより合成した。

【0178】

vi) ベンジル 2 - (3 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ) - 1 - ヒドロキシプロピル)ピロリジン - 1 - カルボキシレートを、ベンジル 2 - (1, 3 - ジヒドロキシプロピル)ピロリジン - 1 - カルボキシレートより合成した。

20

【実施例5】

【0179】

<ベンジル 1 - アミノ - 5 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)ペンタン - 3 - オール(IV)の合成>

ベンジル 5 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ) - 3 - ヒドロキシペンチルカルバメート(15.4 g、27.7 mmol)をメタノール(250 mL)に溶解し、水素添加用フラスコに入れた。10%パラジウムカーボン(1.5 g、50%水/重量)を加え、フラスコを密閉した。ダイヤフラムポンプを用いて空気を除いた後、乾燥アルゴンガスで置換し10 psiとした。この置換操作を4回以上行った。反応フラスコを再度減圧し、水素を充填して30 psiとした。反応懸濁を室温にて16時間激しく振蕩して攪拌した。反応開始後4時間は、必要に応じて水素を再置換して30 psiとした。反応終了後、減圧下水素を除去し、アルゴンガスで再置換して大気圧に戻した。触媒を0.45 mmナイロン膜で別し、更にメタノール(100 mL)で洗浄した。このメタノール洗液を母液と合し、溶媒を乾固するまで留去し、無色のガラス状泡状物を得た。このものを更に真空中で乾燥させた。収量は11.4 g(収率98%)である。

30

【0180】

同様にして、以下の化合物を合成した。

40

【0181】

i) 8 - アミノ - 1 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)オクタン - 3 - オールを、ベンジル 8 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ) - 6 - ヒドロキシオクチルカルバメートより合成した。

【0182】

ii) 10 - アミノ - 1 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)ドデカン - 3 - オールを、ベンジル 10 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ) - 8 - ヒドロキシドデシルカルバメートより合成した。

【0183】

iii) 14 - アミノ - 1 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)テ

50

トラデカン - 3 - オールを、ベンジル 14 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ) - 12 - ヒドロキシテトラデシルカルバメートより合成した。

【0184】

iv) 1 - (4 - アミノフェニル) - 3 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)プロパン - 1 - オールを、ベンジル 4 - (3 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ) - 1 - ヒドロキプロピル)フェニルカルバメートより合成した。

【0185】

v) 3 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ) - 1 - (ピペリジン - 4 - イル)プロパン - 1 - オールを、ベンジル 4 - (3 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ) - 1 - ヒドロキプロピル)ピペリジン - 1 - カボキシレートより合成した。

10

【0186】

vi) 3 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ) - 1 - (ピロリジン - 2 - イル)プロパン - 1 - オールを、ベンジル 2 - (3 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ) - 1 - ヒドロキプロピル)ピロリジン - 1 - カボキシレートより合成した。

【実施例6】

【0187】

<コンジュゲート部 - - アミノ - 1, 3 - ジオール リンカ分子の一般的な合成法>  
 - アミノ - 1, 3 - ジオール リンカ分子にコンジュゲート部を共有結合でつなげるためには、リンカ分子上のアミノ基と反応しうるコンジュゲート部誘導体が必要である。好ましい反応活性を持つ誘導体としては、カルボン酸無水物、カルボン酸クロリド、N - ヒドロキシスクシイミドイル、N - ヒドロキシベンゾトリアゾリルなどのカルボン酸活性エステル、または、ペンタフルオロフェニル、クロロホルメート、4 - ニトロフェニルカルボナート、スルホニルクロリドなどが例としてあげられる。このような、反応活性誘導体は、精製物として合成・単離することもできるが、使用前に速やかに *in situ* で合成して用いることもできる。一般的な方法としては、当量の反応活性コンジュゲート誘導体とアミノ化リンカ分子とをともに好適な溶媒に溶かし、室温にて1ないし24時間反応させる。なお、好適な溶媒は、反応試剤の溶解性および反応のタイプによって異なる。例えば、N, N - ジメチルホルムアミドは、カルボン酸活性エステルと - アミノ - 1, 3 - ジオール リンカ分子との縮合反応においてよく使われる溶媒である。一方、ピリジンは、カルボン酸無水物、カルボン酸クロリド、またはクロトホルメートなど、酸副生成物が生成する場合に、より適している溶媒である。

20

30

【0188】

一般的合成経路について先に述べたが、以下の実施例7では、コレステリル 5 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ) - 3 - ヒドロキシフェニルカルバメートの詳細な合成方法を説明する。図2Bにその反応式を示した。この例では、コンジュゲート部にはコレステロールが、反応誘導体としてはコレステリルクロリドが相当する。実施例7 - 実施例16にコレステロール以外のステロイドコンジュゲート部の詳細な合成法を示した。

40

【実施例7】

【0189】

<コレステリル 5 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ) - 3 - ヒドロキシベンチルカルバメート(V)の合成>

1 - アミノ - 5 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)ペンタン - 3 - オール(4.3 g、10.3 mmol)を無水ピリジン(各50 mL)と2回共沸させた後、無水ピリジン(70 mL)に溶解した。この溶液を氷浴にて冷却し、無水トルエン(15 mL)に溶かしたコレステリル クロロホルメート(4.8 g、10.8 mmol)をゆっくり滴下した。更に、反応液を室温にて1時間攪拌した。メタノール(25 mL

50

)を加えた後、反応混合物から溶媒を留去し乾固させた。得られた残渣は、無水トルエン(各50mL)と2回共沸させて粗製物を得た。この粗製物は、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用い(シリカゲル、250mL)、溶出液にヘキサン/アセトン/トリエチルアミン(500mL、93:5:2v/v/v)、同(1000mL、88:10:2v/v/v)、更に同(1000mL、78:20:2v/v/v)を用いて精製した。薄層クロマトグラフィーで目的物を含むフラクションを集め、溶媒留去して淡黄色樹脂状物を得た。更に真空中で十分に乾燥した。収量は6.6g(収率76%)である。

【0190】

同様にして以下の化合物を合成した。

【0191】

i) コレステリル 8 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ) - 6 - ヒドロキシオクチルカルバメートを、ピリジン中、8 - アミノ - 1 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)オクタン - 3 - オールおよびコレステリル クロロホルムより合成した。

10

【0192】

ii) コレステリル 10 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ) - 8 - ヒドロキシドデシルカルバメートを、ピリジン中、10 - アミノ - 1 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)ドデカン - 3 - オールおよびコレステリル クロロホルムより合成した。

20

【0193】

iii) コレステリル 14 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ) - 12 - ヒドロキシテトラデシルカルバメートを、ピリジン中、14 - アミノ - 1 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)オクタン - 3 - オールおよびコレステリル クロロホルムより合成した。

【0194】

iv) コレステリル 4 - (3 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ) - 1 - ヒドロキシプロピル)フェニルカルバメートを、ピリジン中、1 - (4 - アミノフェニル) - 3 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)プロパン - 1 - オールおよびコレステリル クロロホルムより合成した。

30

【0195】

v) コレステリル 4 - (3 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ) - 1 - ヒドロキシプロピル)ピペリジン - 1 - カルボキシレートを、ピリジン中、3 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ) - 1 - (ピペリジン - 4 - イル)プロパン - 1 - オールおよびコレステリル クロロホルムより合成した。

【0196】

vi) コレステリル 2 - (3 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ) - 1 - ヒドロキシプロピル)ピロリジン - 1 - カルボキシレートを、ピリジン中、3 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ) - 1 - (ピロリジン - 2 - イル)プロパン - 1 - オールおよびコレステリル クロロホルムより合成した。

40

【0197】

vii) N - (8 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ) - 6 - ヒドロキシオクチル)アセトアミドを、N, N - ジメチルホルムアミド中、8 - アミノ - 1 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)オクタン - 3 - オールおよび4 - ニトロフェニル アセテートより合成した。

【0198】

viii) コレステリル 6 - (8 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ) - 6 - ヒドロキシオクチルアミノ) - 6 - オキソ - ヘキシルカルバメートを、N, N - ジメチルホルムアミド中、8 - アミノ - 1 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)オクタン - 3 - オールおよび1H - ベンゾ[d][1, 2, 3]トリアゾール - 1 - イル 6 - (ベンジルオキシカルボニルアミノ)ヘキサナートより合成した。1H

50

- ベンゾ[d][1, 2, 3]トリアゾール-1-イル 6-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)ヘキサナートは、N, N-ジメチルホルムアミド中 *in situ*にて、6-(コレステリルオキシカルボニルアミノ)ヘキサン酸、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物およびN, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミドより合成した。6-(コレステリルオキシカルボニルアミノ)ヘキサン酸は、ピリジン中、6-アミノヘキサン酸およびコレステリル クロロホルメートより合成した。

【0199】

i x) コレステリル 12-(8-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)-6-ヒドロキシオクチルアミノ)-12-オキソ-ドデシルカルバメートを、N, N-ジメチルホルムアミド中、8-アミノ-1-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)オクタン-3-オールおよび1H-ベンゾ[d][1, 2, 3]トリアゾール-1-イル 12-(コレステリルオキシカルボニルアミノ)ドデカナートより合成した。1H-ベンゾ[d][1, 2, 3]トリアゾール-1-イル 12-(コレステリルオキシカルボニルアミノ)ドデカナートは、N, N-ジメチルホルムアミド中 *in situ*にて、12-(コレステリルオキシカルボニルアミノ)ドデカン酸、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物およびN, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミドより合成した。12-(コレステリルオキシカルボニルアミノ)ドデカン酸は、ピリジン中、12-アミノドデカン酸およびコレステリル クロロホルメートより合成した。

10

【実施例8】

【0200】

< 5a-コレスタン-3b-オール 4-ニトロフェニル カルボナートの合成 >  
5a-コレスタン-3b-オール(3.9g、10.0mmol)を無水トルエン(50mL)と共沸させた後、無水トルエン(100mL)に溶解した。トルエン溶液を室温にて攪拌させながら、トリエチルアミン(1.4mL、10.0mmol)を加え、続いて、4-ニトロフェニル クロロホルメート(2.0g、9.9mmol)を加え、反応混合物を終夜攪拌した。攪拌中、トリエチルアミン塩酸塩の無色沈殿物が生成した。反応混合物を、乾固するまで溶媒留去し粗製物を得た。この粗製物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用い(シリカゲル、200mL)、溶出液にヘキサン/酢酸エチル(2000mL、95:5v/v)を用いて精製した。薄層クロマトグラフィーで目的物を含むフラクションを集め、溶媒留去してアモルファス状の無色固体を得た。更に真空中で十分に乾燥した。収量は3.5g(収率63%)である。

20

30

【0201】

同様にして以下の化合物を合成した。

【0202】

i) スチグマステロール 4-ニトロフェニルカルボナートを、トルエン中、スチグマステロール、4-ニトロフェニル クロロホルメート、およびトリエチルアミンより合成した。

【0203】

ii) エルゴステロール 4-ニトロフェニルカルボナートを、トルエン中、エルゴステロール、4-ニトロフェニル クロロホルメート、およびトリエチルアミンより合成した。

40

【0204】

iii) トランス-アンドロステロン 4-ニトロフェニルカルボナートを、酢酸エチル中、トランス-アンドロステロン、4-ニトロフェニル クロロホルメート、およびトリエチルアミンより合成した。

【0205】

iv) プレグネノロン 4-ニトロフェニルカルボナートを、テトラヒドロフラン中触媒量(10mol%)のN, N-ジメチルホルムアミドを添加し、プレグネノロン、4-ニトロフェニル クロロホルメート、およびトリエチルアミンより合成した。

【0206】

50

v) 5 - アンドロスタン - 3 - オール 4 - ニトロフェニルカルボナートを、トルエン中、5 - アンドロスタン - 3 - オール、4 - ニトロフェニル クロロホルメート、およびトリエチルアミンより合成した。

【0207】

vi) 5 - アンドロスタン - 17 - オール 4 - ニトロフェニルカルボナートを、トルエン中、5 - アンドロスタン - 17 - オール、4 - ニトロフェニル クロロホルメート、およびトリエチルアミンより合成した。

【実施例9】

【0208】

< 5 - コレスタン - 3 - イル 5 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ) - 3 - ヒドロキシペンチルカルバメートの合成 >

1 - アミノ - 5 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)ペンタン - 3 - オール(1.2 g、2.8 mmol)を無水トルエン(20 mL)に溶解した。トルエン溶液を室温にて攪拌させながら、トリエチルアミン(0.4 mL、2.9 mmol)を加え、続いて、5 - コレスタン - 3 - オール 4 - ニトロフェニル カルボナート(1.6 g、2.8 mmol)のトルエン溶液(25 mmol)を加え、反応混合物を終夜攪拌した。反応混合物を、乾固するまで溶媒留去し黄色ガラス状の泡状粗製物を得た。この粗製物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用い(シリカゲル、150 mL)、溶出液にヘキサン/酢酸エチル/トリエチルアミン(700 mL、80:20:2 v/v/v)、続いて同(1000 mL、70:30:2 v/v/v)を用いて精製した。薄層クロマトグラフィーで目的物を含むフラクションを集め、溶媒留去してアモルファス状の無色ガラス状泡状物を得た。更に真空中で十分に乾燥した。収量は2.0 g(収率87%)である。

【0209】

同様にして以下の化合物を合成した。

【0210】

i) スチグマステリル 5 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ) - 3 - ヒドロキシペンチルカルバメートを、トルエン中、1 - アミノ - 5 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)ペンタン - 3 - オール、スチグマステロール 4 - ニトロフェニル カルボナート、およびトリエチルアミンより合成した。

【0211】

ii) エルゴステリル 5 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ) - 3 - ヒドロキシペンチルカルバメートを、トルエン中、1 - アミノ - 5 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)ペンタン - 3 - オール、エルゴステロール 4 - ニトロフェニル カルボナート、およびトリエチルアミンより合成した。

【0212】

iii) トランス - アンドロステロニル 5 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ) - 3 - ヒドロキシペンチルカルバメートを、トルエン中、1 - アミノ - 5 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)ペンタン - 3 - オール、トランス - アンドロステロン 4 - ニトロフェニル カルボナート、およびトリエチルアミンより合成した。

【0213】

iv) プレグネノロニル 5 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ) - 3 - ヒドロキシペンチルカルバメートを、トルエン中、1 - アミノ - 5 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)ペンタン - 3 - オール、プレグネノロン 4 - ニトロフェニル カルボナート、およびトリエチルアミンより合成した。

【0214】

v) 5 - アンドロスタン - 3 - イル 5 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ) - 3 - ヒドロキシペンチルカルバメートを、トルエン中、1 - アミノ - 5 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)ペンタン - 3 - オール、5

10

20

30

40

50



- アンドロスタン - 3 - オール 4 - ニトロフェニル カルボナート、およびトリエチルアミンより合成した。

【0215】

vi) 5 - アンドロスタン - 17 - イル 5 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ) - 3 - ヒドロキシペンチルカルバメートを、トルエン中、1 - アミノ - 5 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)ペンタン - 3 - オール、5 - アンドロスタン - 17 - オール 4 - ニトロフェニル カルボナート、およびトリエチルアミンより合成した。

【実施例10】

【0216】

<コラン酸 4 - ニトロフェニルエステルの合成>

コラン酸(3.6 g、10.0 mmol)を塩化メチレン(200 mL)に懸濁し、室温にて激しく撹拌した。4 - ニトロフェノール(1.4 g、10.1 mmol)およびN, N' - ジシクロヘキシルカルボジイミド(2.1 g、10.2 mmol)を加え、反応混合物を終夜撹拌した。反応混合物をろ過し、固体を少量の塩化メチレンにて洗浄し、ろ液を乾固するまで減圧留去して、黄色固体を得た。粗製物を酢酸エチル(100 mL)に溶かし、ろ過した。ろ液を減圧留去して白色がかった固体を得、ヘキサンより再結晶した。収量は3.9 g(収率80%)である。

【実施例11】

【0217】

<コラニル 5 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ) - 3 - ヒドロキシペンチルアミドの合成>

1 - アミノ - 5 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)ペンタン - 3 - オール(1.2 g、2.8 mmol)を無水トルエン(20 mL)に溶解した。トルエン溶液を室温にて撹拌させながら、トリエチルアミン(0.4 mL、2.9 mmol)を加え、続いて、コラン酸 4 - ニトロフェニル エステル(1.4 g、2.9 mmol)のトルエン溶液(25 mmol)を加え、反応混合物を終夜撹拌した。反応混合物を、乾固するまで溶媒留去し黄色液状物を得た。この粗製物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用い(シリカゲル、200 mL)、溶出液にヘキサン/酢酸エチル/トリエチルアミン(1500 mL、60:40:2 v/v/v)を用いて精製した。薄層クロマトグラフィーで目的物を含むフラクションを集め、溶媒留去して淡黄色ガラス状の泡状物を得た。更に真空中で十分に乾燥した。収量1.7 gは(収率80%)である。

【実施例12】

【0218】

<3 - O - アセチルリトコール酸の合成>

【0219】

リトコール酸(5.5 g、14.6 mmol)を無水酢酸(55 mL)に懸濁し、90 ~ 95 °Cにて終夜撹拌した。反応の間に、固体は全て溶解した。反応混合物を室温まで冷却し、減圧留去して、無色の固体を得た。この粗製物をメタノールより再結晶した。収量4.3 g。この固体の約35%は、メタノールでの再結晶中に粗製物に混在した3' - O - アセチルリトコール酸混合無水物より生成したと思われる、3' - O - アセチルリトコール酸メチルエステルであった。この混合物を精製せずにこのまま次の工程に使用した。

【実施例13】

【0220】

<3' - O - アセチルリトコール酸 4 - ニトロフェニルエステルの合成>

実施例12で得られた混合物(4.3 g)を塩化メチレン(100 mL)に溶かし、室温にて撹拌した。4 - ニトロフェノール(1.4 g、10.1 mmol)およびN, N' - ジシクロヘキシルカルボジイミド(2.1 g、10.2 mmol)を加え、終夜撹拌した。反応混合物をろ過し、固体を少量の塩化メチレンで洗い、ろ液を減圧留去して黄色液状物を得た。この粗製物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用い(シリカゲル、2

10

20

30

40

50

00 mL)、溶出液にヘキサン/酢酸エチル(1500 mL、90:10:v/v)を用いて精製した。薄層クロマトグラフィーで目的物を含むフラクションを集め、溶媒留去して無色の固体を得た。この粗製物をアセトニトリルより再結晶した収量3.9 g。この生成物は、目的物の4-ニトロフェニルエステルとメチルエステルの70:30(モル比)であった。この混合物を精製せずにこのまま次の工程に使用した。

【実施例14】

【0221】

<3-O-アセチルリトコリル 5-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)-3-ヒドロキシペンチルアミドの合成>

1-アミノ-5-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)ペンタン-3-オール(1.0 g、2.4 mmol)を無水トルエン(20 mL)に溶解した。トルエン溶液を室温にて攪拌させながら、トリエチルアミン(0.4 mL、2.9 mmol)を加え、続いて、3-O-アセチルリトコール酸 4-ニトロフェニル エステル(実施例13の生成物、1.8 g、2.4 mmol)のトルエン溶液(25 mmol)を加え、反応混合物を終夜攪拌した。反応混合物を、乾固するまで溶媒留去し黄色液状物を得た。この粗製物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用い(シリカゲル、200 mL)、溶出液にヘキサン/酢酸エチル/トリエチルアミン(600 mL、60:40:2 v/v/v)、続いて、ヘキサン/酢酸エチル/トリエチルアミン(1500 mL、50:50:2 v/v/v)を用いて精製した。薄層クロマトグラフィーで目的物を含むフラクションを集め、溶媒留去して無色ガラス状の泡状物を得た。更に真空中で十分に乾燥した。収量は1.4 g(収率71%)である。

【実施例15】

【0222】

<リトコール酸 メチルアミドの合成>

実施例13で得られた3-O-アセチルリトコール酸 4-ニトロフェニルエステル(2.0 g)を冷却した33%(w/v)メチルアミン/エタノールに懸濁し、塩化メチレン(20 mL)を加えた。反応フラスコを密栓にて固く密封し、室温にて3日間攪拌した。黄色になった反応溶液を乾固するまで減圧留去し、残渣を塩化メチレン(300 mL)および1 M水酸化ナトリウム水溶液(200 mL)で分液した。液層を分離し、塩化メチレン溶液をさらに1 M水酸化ナトリウム水溶液(200 mL)、飽和食塩水(200 mL)にて洗浄した。塩化メチレン溶液を無水硫酸ナトリウムにて乾燥し、ろ過、減圧留去して淡黄色泡状物を得た。<sup>1</sup>H NMR(CDC13)測定にて、アセチル基の除去が不十分であると認められたため、粗製物をクロロホルム(30 mL)およびメタノール(10 mL)混合溶液に溶かし、10 M水酸化ナトリウム水溶液(1 mL)を加えた。混合溶液を室温にて4時間攪拌し、その後、氷酢酸(1 mL)、続いて酢酸エチル(50 mL)を加えた。反応溶液を水(各50 mL)にて3回洗浄し、無水硫酸ナトリウムにて乾燥し、ろ過、減圧留去して無色の固体を得た。収量1.9 g。上記メチルアミンエタノール溶液との反応では、4-ニトロフェニルエステルのみならず、メチルエステルもメチルアミドに変換された。

【実施例16】

【0223】

<リトコール酸メチルアミド 4-ニトロフェニルカルボナートの合成>

リトコール酸メチルアミド(1.4 g、3.6 mmol)を無水トルエン(50 mL)と共沸した後、無水トルエン(50 mL)およびクロロホルム(50 mL)の混合溶液に溶かした。反応溶液を室温にて攪拌下、トリエチルアミン(0.6 mL、4.3 mmol)、続いて、4-ニトロフェニル クロロホルメート(0.7 g、3.5 mmol)を加えた。この反応溶液を室温にて終夜攪拌した。薄層クロマトグラフィーにて(塩化メチレン:酢酸エチル、1:1、v/v)反応が完結していないことが認められたため、更にトリエチルアミン(0.6 mL、4.3 mmol)および4-ニトロフェニル カルボナート(0.7 g)を加え、更に反応を2日間続けた。反応溶液を、ほぼ乾固するまで減圧留去

し、得られた粗製物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用い（シリカゲル、200 mL）、溶出液に塩化メチレン（500 mL）、続いて、塩化メチレン/酢酸エチル（1000 mL、3：1 v/v）を用いて精製した。薄層クロマトグラフィーで目的物を含むフラクションを集め、溶媒留去して無色の固体を得た。更に真空中で十分に乾燥した。収量は1.7 g（収率85%）である。

【実施例17】

【0224】

<リトコール酸メチルアミド 5 - (ビス(4 - メトキシフェニル) (フェニル) メトキシ) - 3 - ヒドロキシペンチルカルバメートの合成 >

1 - アミノ - 5 - (ビス(4 - メトキシフェニル) (フェニル) メトキシペンタン - 3 - オール (1.2 g、2.8 mmol) を無水トルエン (20 mL) に溶解した。トルエン溶液を室温にて攪拌させながら、トリエチルアミン (0.4 mL、2.9 mmol) を加え、続いて、リトコール酸メチルアミド 4 - ニトロフェニル カルボナート (1.4 g、2.9 mmol) およびトルエン (25 mL) を加えた。その後、反応混合物を3日間攪拌した。反応混合物を、ほぼ乾固するまで溶媒留去し黄色液状物を得た。この粗製物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用い（シリカゲル、200 mL）、溶出液に塩化メチレン/トリエチルアミン (500 mL、100：2 v/v)、続いて、塩化メチレン/酢酸エチル/トリエチルアミン (1000 mL、80：20：2 v/v/v) を用いて精製した。薄層クロマトグラフィーで目的物を含むフラクションを集め、溶媒留去して無色ガラス状の泡状物を得た。更に真空中十分に乾燥した。収量2.5 g。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) によれば、この生成物には約25% (モル比) の出発原料であるリトコール酸メチルアミド 4 - ニトロフェニル カルボナートが含まれていた。この混合物をそのまま精製せずに次の工程に使用した。

【0225】

以上実施例を説明してきたが、下記に続く実施例を分かりやすくかつ明確に説明するために、表1-1から表1-4に実施例の化合物の構造式を記載し、その名称を省略形で記載した。

【実施例18】

【0226】

<オリグヌクレオチド合成用固相担持形コンジュゲート部 - - アミノ - 1, 3 - ジオールリンカ分子の一般的合成法 >

コンジュゲート部 - - アミノ - 1, 3 - ジオールリンカ分子は、固相合成用の担体に分子鎖を用いて結合することができる。先に述べたように、分子鎖としてはジカルボン酸が汎用される。先ず、環状酸無水物を形成しやすいジカルボン酸を用いる場合は、ほぼ当量のコンジュゲート部 - - アミノ - 1, 3 - ジオールリンカ分子および環状酸無水物を、トリエチルアミン、1 - メチルイミダゾールを含む塩化メチレンに溶解し、この反応溶液を室温にて12時間ないし数日間攪拌した。また、環状酸無水物を生成しにくいジカルボン酸を用いる場合には、カルボジイミド試剤により先ずカルボン酸を活性化させ、小過剰のコンジュゲート部 - - アミノ - 1, 3 - ジオールリンカ分子と、触媒量のN, N - ジメチルアミノピリジンの存在下、室温にて12時間ないし数日間反応させた。どちらの場合においても、ジカルボン酸分子鎖を含むコンジュゲート部 - - アミノ - 1, 3 - ジオールリンカ分子を、クロマトグラフィーの後にトリエチルアミン塩として単離した。

【0227】

次に、ジカルボン酸分子鎖を含むコンジュゲート部 - - アミノ - 1, 3 - ジオールリンカ分子を、固相合成用の担体に結合させた。オリグヌクレオチド合成用の典型的な担体としては、アミノ官能基制御多孔ガラスまたは架橋アミノメチルポリスチレンのいずれかを用いた。先ず、コンジュゲート部 - - アミノ - 1, 3 - ジオールリンカ分子の遊離カルボン酸部分を、以下に述べるカルボン酸活性化剤で活性化した、すなわち、ヘキサフルオロホスフェート [HBTU]、またはベンゾトリアゾール - 1 - イル - オキシ - トリス (ジメチルアミノ) ホスホニウム ヘキサフルオロホスフェート [BOP] を、N, N - ジメチ

ルホルムアミド溶液中、三級アミンおよび1-ヒドロキシベンゾトリアゾールの共存下、反応させた。活性化カルボン酸溶液の一部を、N,N-ジメチルホルムアミド中、固相合成用の担体の懸濁液に加え、混合物を室温にて1-2時間振騰した。固相合成用の担体に結合した(充填した)ジカルボン酸分子鎖を含むコンジュゲート部 - アミノ - 1, 3 - ジオールリンカ分子の量は、当業者によく知られた測定方法を用いて定量した。すなわち、少量の担体試料を適当な溶媒で洗い、DMTr-保護基を除去するために、試料を、3% v/v ジクロロ酢酸の塩化メチレン溶液などの無水の酸溶液で処理し、得られた酸溶液の498 nmにおける吸収を測定し、ベールの法則および70,000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>のモル定数を用いてDMTrカチオン量を計算して測定した。こうして好ましい充填結果が得られるまで、必要に応じて、固相合成用担体に前記の活性化カルボン酸溶液を一部ずつ加えた。充填量は、固相用担体1gに対し、約5~約35 μmolのコンジュゲート部 - アミノ - 1, 3 - ジオールリンカ分子であった。

10

## 【0228】

上記一般的合成法による、固相用ポリスチレン担体結合の4-(1-(コレステリルオキシカルボキシアミノ)-5-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)ペンタン-3-イルオキシ)-4-オキソブタン酸合成法の詳細を、以下の実施例19、実施例20、および図2Bに示した。ジカルボン酸鎖としてはコハク酸を用いた。

## 【実施例19】

## 【0229】

<4-(1-(コレステリルオキシカルボニルアミノ)-5-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)ペンタン-3-イルオキシ)-4-オキソブタン酸 トリエチルアミン塩(VI)の合成>

20

コレステリル 5-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)-3-ヒドロキシペンチルカルバメート(6.6g、7.9 mmol)、コハク酸無水物(0.8g、8.0 mmol)、トリエチルアミン(3.3 mL、23.7 mmol)および1-メチルイミダゾール(0.3 mL、3.9 mmol)を塩化メチレン溶液(60 mL)に溶解した。反応溶液を室温にて3日間攪拌した。この間、反応溶液は暗色になった。次に、反応溶液を塩化メチレン(100 mL)にて希釈し、氷冷したクエン酸水溶液(10% w/v、各50 mL)にて2回洗浄、飽和食塩水(50 mL)にて1回洗浄した。塩化メチレン溶液を無水硫酸ナトリウムにて乾燥し、ろ過、減圧留去して暗色の樹脂を得た。この粗製物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用い(シリカゲル、175 mL)、溶出液に塩化メチレン/トリエチルアミン(1000 mL、95:5 v/v)、続いて、塩化メチレン/メタノール/トリエチルアミン(1000 mL、90:5:5 v/v/v)を用いて精製した。薄層クロマトグラフィーで目的物を含むフラクションを集め、溶媒留去して淡黄色の樹脂を得た。更に真空中十分に乾燥して白色がかったガラス状の泡状物を得た。収量は6.3g(収率85%)である。

30

## 【0230】

同様にして、以下の化合物を合成した。

## 【0231】

i) 4-(8-(コレステリルオキシカルボニルアミノ)-1-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)オクタン-3-イルオキシ)-4-オキソブタン酸 トリエチルアミン塩を、コレステリル 8-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)-6-ヒドロキシオクチルカルバメートより合成した。

40

## 【0232】

ii) 4-(10-(コレステリルオキシカルボニルアミノ)-1-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)オクタン-3-イルオキシ)-4-オキソブタン酸 トリエチルアミン塩を、コレステリル 10-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)-8-ヒドロキシドデシルカルバメートより合成した。

## 【0233】

iii) 4-(14-(コレステリルオキシカルボニルアミノ)-1-(ビス(4-メト

50

キシフェニル) (フェニル)メトキシ)オクタン - 3 - イルオキシ) - 4 - オキソブタン酸 トリエチルアミン塩を、コレステリル 14 - (ビス(4 - メトキシフェニル) (フェニル)メトキシ) - 12 - ヒドロキシテトラデシルカルバメートより合成した。

【0234】

iv) 4 - (1 - (4 - (コレステリルオキシカルボニル)フェニル) - 3 - (ビス(4 - メトキシフェニル) (フェニル)メトキシ)プロポキシ) - 4 - オキソブタン酸 トリエチルアミン塩を、コレステリル 4 - (3 - (ビス(4 - メトキシフェニル) (フェニル)メトキシ) - 1 - ヒドロキシプロピル)フェニルカルバメートより合成した。

【0235】

v) 4 - (1 - (1 - (コレステリルオキシカルボニル)ピペリジン - 4 - イル) - 3 - (ビス(4 - メトキシフェニル) (フェニル)メトキシ)プロポキシ) - 4 - オキソブタン酸 トリエチルアミン塩を、コレステリル 4 - (3 - (ビス(4 - メトキシフェニル) (フェニル)メトキシ) - 1 - ヒドロキシプロピル)ピペリジン - 1 - カルボキシレートより合成した。

10

【0236】

vi) 4 - (1 - (1 - (コレステリルオキシカルボニル)ピロリジン - 2 - イル) - 3 - (ビス(4 - メトキシフェニル) (フェニル)メトキシ)プロポキシ) - 4 - オキソブタン酸 トリエチルアミン塩を、コレステリル 2 - (3 - (ビス(4 - メトキシフェニル) (フェニル)メトキシ) - 1 - ヒドロキシプロピル)ピロリジン - 1 - カルボキシレートより合成した。

20

【0237】

vii) 4 - (8 - アセトアミド - 1 - (ビス(4 - メトキシフェニル) (フェニル)メトキシ)オクタン - 3 - イルオキシ) - 4 - オキソブタン酸 トリエチルアミン塩を、コレステリル N - (8 - (ビス(4 - メトキシフェニル) (フェニル)メトキシ) - 6 - ヒドロキシオクチル)アセトアミドより合成した。

【0238】

viii) 4 - (8 - ((6 - コレステリルオキシカルボニル)アミノヘキサンアミド - 1 - (ビス(4 - メトキシフェニル) (フェニル)メトキシ)オクタン - 3 - イルオキシ) - 4 - オキソブタン酸 トリエチルアミン塩を、コレステリル 6 - (8 - (ビス(4 - メトキシフェニル) (フェニル)メトキシ) - 6 - ヒドロキシオクチルアミノ) - 6 - オキソヘキシルカルバメートより合成した。

30

【0239】

ix) 4 - (8 - ((12 - コレステリルオキシカルボニル)アミノドデカンアミノ - 1 - (ビス(4 - メトキシフェニル) (フェニル)メトキシ)オクタン - 3 - イルオキシ) - 4 - オキソブタン酸 トリエチルアミン塩を、コレステリル 12 - (8 - (ビス(4 - メトキシフェニル) (フェニル)メトキシ) - 6 - ヒドロキシオクチルアミノ) - 12 - オキソドデシルカルバメートより合成した。

【実施例20】

【0240】

<架橋アミノメチルポリスチレンに結合した4 - (1 - (コレステリルオキシカルボニルアミノ) - 5 - (ビス(4 - メトキシフェニル) (フェニル)メトキシ)ペンタン - 3 - イルオキシ) - 4 - オキソブタン酸(VII)の合成>

40

AM - ポリスチレン(5.0g、約33 $\mu$ molアミノ基/g; Applied Biosystem社)を、ラバーセプタムで栓をした一口丸底フラスコ(250mL)中、遊離アミンを含まない無水N,N - ジメチルホルムアミド(37.5mL)に懸濁させた。反応フラスコを振盪器に取り付け、室温にて固体が十分攪拌する程度に振盪した。また、別のフラスコ(50mL)に、4 - (1 - (コレステリルオキシカルボニルアミノ) - 5 - (ビス(4 - メトキシフェニル) (フェニル)メトキシ)ペンタン - 3 - イルオキシ) - 4 - オキソブタン酸 トリエチルアミン塩酸塩(105mg、113 $\mu$ mol)、遊離アミンを含まない無水N,N - ジメチルホルムアミド(25.0mL)、トリエチルアミ

50

ン(31  $\mu$ L、225.0  $\mu$ mol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物(18 mg、117.5  $\mu$ mol)およびBPO(55 mg、124  $\mu$ mol)を加えた。この混合物を固体が溶けるまでよく振騰し、カルボン酸を活性化させるために室温にて5分間放置した。こうして活性化したカルボン酸溶液(4.5 mL、20.3  $\mu$ mol)の一部を、振騰中の固相担体にシリンジにて加えた。反応混合物を1.5時間振騰し、固相担体の一部40 mgを取り出した。先に述べた測定方法により充填を測定した結果、11.0  $\mu$ mol/gであった。更に活性化したカルボン酸溶液(4.5 mL、20.3  $\mu$ mol)を固相懸濁液に加え、1時間振騰した。充填は14.5  $\mu$ mol/gであった。固相懸濁液をガラスろ過漏斗にかけ、液体を真空下除去した。固体をN,N-ジメチルホルムアミド(200 mL)、アセトン(200 mL)、アセトニトリル(200 mL)で十分に洗浄し、更に真空中乾燥させた。担体に残留したアミノ基は、無水酢酸アセトニトリル溶液(10% v/v、25 mL)および1-メチルイミダゾールアセトニトリル溶液(10% v/v、25 mL)混合溶液中に固相担体を懸濁させ、室温にて2.5時間振騰させてキャップした。次に、固相担体の懸濁液をガラスろ過漏斗にかけ、液体を真空にて除去した。固相担体を、アセトニトリル(500 mL)にて十分に洗い、真空中で終夜乾燥させた。

10

## 【0241】

同様にして、実施例19 i)~ix)に記載した化合物を約15.0 + 1.0  $\mu$ mol/g 担持した固相担体を合成した。

20

## 【0242】

上記一般合成法による固相担体ポリスチレン担体に結合した4-(1-(コレステリルオキシカルボニルアミノ)-5-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)ペンタン-3-イルオキシ)-2-オキソエトキシ)酢酸の詳細な合成方法を、以下の実施例21および実施例22に示した。この場合は、ジカルボン酸にジグリコール酸を用いた。

## 【実施例21】

## 【0243】

<4-(1-(コレスタニルオキシカルボニルアミノ)-5-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)ペンタン-3-イルオキシ)-2-オキソエトキシ)酢酸 トリエチルアミン塩の合成>

30

コレスタニル 5-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)-3-ヒドロキシペンチルカルバメート(2.0 g、2.4 mmol)、ジグリコール酸無水物(0.4 g、3.6 mmol)、トリエチルアミン(1.0 mL、7.2 mmol)および1-メチルイミダゾール(0.2 mL、2.4 mmol)を塩化メチレン溶液(25 mL)に溶解した。反応溶液を室温にて3日間攪拌した。この間、反応溶液は暗色になった。次に、反応溶液を塩化メチレン(200 mL)にて希釈し、5%(w/v)リン酸二カリウム水溶液(50 mL)にて洗浄した。塩化メチレン溶液を無水硫酸ナトリウムにて乾燥し、ろ過、減圧留去して褐色の油状物を得た。この粗製物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用い(シリカゲル、100 mL)、溶出液に塩化メチレン/トリエチルアミン(400 mL、95:5 v/v)、続いて、塩化メチレン/メタノール/トリエチルアミン(1000 mL、93:2:5 v/v/v)を用いて精製した。薄層クロマトグラフィーで目的物を含むフラクションを集め、溶媒留去して淡黄褐色のガラス状の泡状物を得た。更に真空中で十分に乾燥した。収量は2.0 g(収率79%)である。

40

## 【0244】

同様にして、以下の化合物を合成した。

## 【0245】

i)4-(1-(コレステリルオキシカルボニルアミノ)-5-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)ペンタン-3-イルオキシ)-2-オキソエトキシ)酢酸 トリエチルアミン塩を、コレステリル 5-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)-3-ヒドロキシペンチルカルバメートより合成した。

50

## 【0246】

i i ) 4 - ( 1 - ( スチグマステリルオキシカルボニルアミノ ) - 5 - ( ( ビス ( 4 - メトキシフェニル ) ( フェニル ) メトキシ ) ペンタン - 3 - イルオキシ ) - 2 - オキソエトキシ ) 酢酸 トリエチルアミン塩を、スチグマステリル 5 - ( ビス ( 4 - メトキシフェニル ) ( フェニル ) メトキシ ) - 3 - ヒドロキシペンチルカルバメートより合成した。

## 【0247】

i i i ) 4 - ( 1 - ( エルゴステリルオキシカルボニルアミノ ) - 5 - ( ( ビス ( 4 - メトキシフェニル ) ( フェニル ) メトキシ ) ペンタン - 3 - イルオキシ ) - 2 - オキソエトキシ ) 酢酸 トリエチルアミン塩を、エルゴステリル 5 - ( ビス ( 4 - メトキシフェニル ) ( フェニル ) メトキシ ) - 3 - ヒドロキシペンチルカルバメートより合成した。

10

## 【0248】

i v ) 4 - ( 1 - ( トランス - アンドロステロニルオキシカルボニルアミノ ) - 5 - ( ( ビス ( 4 - メトキシフェニル ) ( フェニル ) メトキシ ) ペンタン - 3 - イルオキシ ) - 2 - オキソエトキシ ) 酢酸 トリエチルアミン塩を、トランス - アンドロステロニル 5 - ( ビス ( 4 - メトキシフェニル ) ( フェニル ) メトキシ ) - 3 - ヒドロキシペンチルカルバメートより合成した。

## 【0249】

v ) 4 - ( 1 - ( プレグネノルオキシカルボニルアミノ ) - 5 - ( ( ビス ( 4 - メトキシフェニル ) ( フェニル ) メトキシ ) ペンタン - 3 - イルオキシ ) - 2 - オキソエトキシ ) 酢酸 トリエチルアミン塩を、プレグネノル 5 - ( ビス ( 4 - メトキシフェニル ) ( フェニル ) メトキシ ) - 3 - ヒドロキシペンチルカルバメートより合成した。

20

## 【0250】

v i ) 4 - ( 1 - ( 5a - アンドロスタン - 3b - イルオキシカルボニルアミノ ) - 5 - ( ( ビス ( 4 - メトキシフェニル ) ( フェニル ) メトキシ ) ペンタン - 3 - イルオキシ ) - 2 - オキソエトキシ ) 酢酸 トリエチルアミン塩を、5a - アンドロスタン - 3b - イル 5 - ( ビス ( 4 - メトキシフェニル ) ( フェニル ) メトキシ ) - 3 - ヒドロキシペンチルカルバメートより合成した。

## 【0251】

v i i ) 4 - ( 1 - ( 5a - アンドロスタン - 17b - イルオキシカルボニルアミノ ) - 5 - ( ( ビス ( 4 - メトキシフェニル ) ( フェニル ) メトキシ ) ペンタン - 3 - イルオキシ ) - 2 - オキソエトキシ ) 酢酸 トリエチルアミン塩を、5a - アンドロスタン - 17b - イル 5 - ( ビス ( 4 - メトキシフェニル ) ( フェニル ) メトキシ ) - 3 - ヒドロキシペンチルカルバメートより合成した。

30

## 【0252】

v i i i ) 4 - ( 1 - ( コラニルアミノ ) - 5 - ( ( ビス ( 4 - メトキシフェニル ) ( フェニル ) メトキシ ) ペンタン - 3 - イルオキシ ) - 2 - オキソエトキシ ) 酢酸 トリエチルアミン塩を、コラニル 5 - ( ビス ( 4 - メトキシフェニル ) ( フェニル ) メトキシ ) - 3 - ヒドロキシペンチルアミドより合成した。

## 【0253】

i x ) 4 - ( 1 - ( 3 - O - アセチルリトコリルアミノ ) - 5 - ( ( ビス ( 4 - メトキシフェニル ) ( フェニル ) メトキシ ) ペンタン - 3 - イルオキシ ) - 2 - オキソエトキシ ) 酢酸 トリエチルアミン塩を、3 - O - アセチルリトコリル 5 - ( ビス ( 4 - メトキシフェニル ) ( フェニル ) メトキシ ) - 3 - ヒドロキシペンチルアミドより合成した。

40

## 【0254】

x ) 4 - ( 1 - N - メチルアミドリトコリルアミノ ) - 5 - ( ( ビス ( 4 - メトキシフェニル ) ( フェニル ) メトキシ ) ペンタン - 3 - イルオキシ ) - 2 - オキソエトキシ ) 酢酸 トリエチルアミン塩を、リトコール酸メチルアミド 5 - ( ビス ( 4 - メトキシフェニル ) ( フェニル ) メトキシ ) - 3 - ヒドロキシペンチルカルバメートより合成した。

## 【実施例22】

## 【0255】

50

< 架橋アミノメチルポリスチレン結合 4 - ( 1 - ( コレスタニルオキシカルボニルアミノ ) - 5 - ( ( ビス ( 4 - メトキシフェニル ) ( フェニル ) メトキシ ) ペンタン - 3 - イルオキシ ) - 2 - オキソエトキシ ) 酢酸の合成 >

AM - ポリスチレン ( 5 . 0 g、約 33  $\mu\text{mol}$  アミノ基 / g ; Applied Biosystem 社 ) を、ラバーセブタムで栓をした一口丸底フラスコ ( 250 mL ) 中、遊離アミンを含まない無水 N , N - ジメチルホルムアミド ( 37 . 5 mL ) に懸濁させた。反応フラスコを振騰器に取り付け、室温にて固体が十分攪拌する程度に振騰した。また、別のフラスコ ( 50 mL ) に、4 - ( 1 - ( コレステリルオキシカルボニルアミノ ) - 5 - ( ( ビス ( 4 - メトキシフェニル ) ( フェニル ) メトキシ ) ペンタン - 3 - イルオキシ - 2 - オキソエトキシ ) 酢酸 トリエチルアミン塩 ( 50 mg、50  $\mu\text{mol}$  )、遊離アミンを含まない無水 N , N - ジメチルホルムアミド ( 12 . 5 mL )、トリエチルアミン ( 10  $\mu\text{L}$ 、90  $\mu\text{mol}$  )、1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物 ( 10 mg、50  $\mu\text{mol}$  ) および BPO ( 20 mg、50  $\mu\text{mol}$  ) を加えた。この混合物を固体が溶けるまでよく振騰し、カルボン酸を活性化させるために室温にて 5 分間放置した。こうして活性化したカルボン酸溶液の一部 ( 9 . 0 mL、36  $\mu\text{mol}$  ) を、振騰中の固相担体にシリンジにて加えた。反応混合物を 1 . 5 時間振騰し、固相担体の一部 40 mg を取り出した。先に述べた測定方法により充填量を測定した結果、5 . 2  $\mu\text{mol}$  / g であった。更に活性化したカルボン酸溶液 ( 1 . 3 mL、5 . 2  $\mu\text{mol}$  ) を固相懸濁液に加え、1 時間振騰した。充填量は 6 . 0  $\mu\text{mol}$  / g であった。固相懸濁液をガラスろ過口に空け、液体を真空下除去した。固体を N , N - ジメチルホルムアミド ( 200 mL )、アセトン ( 200 mL )、アセトニトリル ( 200 mL ) で十分に洗浄し、更に真空中乾燥させた。担体に残留したアミノ基は、無水酢酸アセトニトリル溶液 ( 10 % v / v、25 mL ) および 1 - メチルイミダゾールアセトニトリル溶液 ( 10 % v / v、25 mL ) 混合溶液中に固相担体を懸濁させ、室温にて 2 . 5 時間振騰させてキャップした。次に、固相担体の懸濁液をガラスろ過口に空け、液体を真空にて除去した。固相担体を、アセトニトリル ( 500 mL ) にて十分に洗い、真空中で終夜乾燥させた。

【 0 2 5 6 】

同様にして、実施例 2 1 i ) ~ x ) に記載した化合物を約 6 . 0 + 0 . 5  $\mu\text{mol}$  / g 担持した固相担体を合成した。

【 実施例 2 3 】

【 0 2 5 7 】

< コンジュゲート部 - アミノ - 1 , 3 - ジオール リンカ分子ホスホラミダイトの一般的合成法 >

- アミノ - 1 , 3 - ジオール リンカ分子にコンジュゲート部は、当業者によく知られた方法を用いてホスホラミダイト誘導体に変換することができる。

【 0 2 5 8 】

先に述べた一般的合成法によるコレステリル 5 - ( ビス ( 4 - メトキシフェニル ) ( フェニル ) メトキシ ) - 3 - ( ( ジイソプロピルアミノ ) ( メトキシ ) ホスフィノオキシ ) ペンチルカルバメートの詳細な合成方法を、以下の実施例 2 4 および図 2 B に示した。

【 実施例 2 4 】

【 0 2 5 9 】

< コレステリル 5 - ( ビス ( 4 - メトキシフェニル ) ( フェニル ) メトキシ ) - 3 - ( ( ジイソプロピルアミノ ) ( メトキシ ) ホスフィノオキシ ) ペンチルカルバメート ( V I I I ) の合成 >

コレステリル 5 - ( ビス ( 4 - メトキシフェニル ) ( フェニル ) メトキシ ) - 3 - ヒドロキシペンチルカルバメート ( 1 . 3 g、1 . 6 mmol ) を N , N - ジイソプロピルアミン ( 224  $\mu\text{L}$ 、1 . 6 mmol ) を含む無水塩化メチレン ( 3 . 2 mL ) に溶解した。別のフラスコに、メチル N , N , N ' , N ' - テトライソプロピルホスフォロジアミジト ( 0 . 6 g、2 . 4 mmol ) を、塩化メチレン ( 3 . 2 mL )、N , N - ジイソプロピルアミン ( 224  $\mu\text{L}$ 、1 . 6 mmol ) テトラゾール アセトニトリル溶液 ( 0 .

10

20

30

40

50



5 M、1.6 mL、0.8 mmol)の混合溶液に溶かした。この溶液を室温にて5分攪拌し、先に調製した溶液に一回で加えた。この反応混合物を6時間攪拌した。反応混合物にメタノール(5 mL)を加え、溶媒留去して濃厚な油状物を得た。この粗製物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用い(シリカゲル、75 mL)、溶出液にヘキサン/アセトン/トリエチルアミン(500 mL、95:5:2 v/v/v)を用いて精製した。薄層クロマトグラフィーで目的物を含むフラクションを集め、溶媒留去して透明無色の油状物を得た。更に、トルエンと2回共騰して無色のガラス状泡状物を得、これを真空中で十分に乾燥した。収量は1.4 g(収率88%)である。

【実施例25】

【0260】

<コンジュゲート部 - アミノアルコール リンカ分子の一般的合成法>

コンジュゲート部を - アミノアルコールリンカ分子に共有結合でつなげるためには、リンカ分子のアミノ基と反応性に富むコンジュゲート部誘導体が必要である。好適な反応性誘導体としては、実施例で示したように、カルボン酸無水物、カルボン酸クロリド、N-ヒドロキシスクシイミド、N-ヒドロキシベンゾトリアゾール、またはペンタフルオロフェニル基などで活性化したカルボン酸エステル、クロロホルメート、4-ニトロフェニルカルボナート、および塩化スルホニルなどがあげられる。これらの反応性誘導体は、純粋な化合物として合成、単離できるが、または反応直前に *in situ* で合成してもよい。一般的な合成方法としては、当量の活性コンジュゲート誘導体とw-アミノアルコールリンカ分子とを、好適な溶媒に溶解し、室温にて1ないし24時間反応させる。好適な溶媒としては、例えば、N,N-ジメチルホルムアミドが活性カルボン酸エステルと - アミノアルコールリンカ分子との縮合に用いられるが、反応時に酸副生成物が生じるような、カルボン酸無水物、カルボン酸クロリド、クロロホルメートなどの場合には、ピリジンがより好ましい溶媒である。

【実施例26】

【0261】

<コレステリル 2-ヒドロキシエチルカルバメートの合成>

2-アミノエタノール(0.4 mL、6.7 mmol)を無水ピリジン(150 mL)に溶かし、コレステリル クロロホルメート(3.0 g、6.7 mmol)を加えた。反応混合物を室温にて終夜攪拌した。反応混合物から溶媒を留去し、得られた粗製物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用い(シリカゲル、500 mL)、溶出液に塩化メチレン/メタノール(2000 mL、100:4 v/v)を用いて精製した。薄層クロマトグラフィーで目的物を含むフラクションを集め、溶媒留去して無色ガラス状の泡状物を得た。これを更に真空中で十分に乾燥した。収量は2.8 g(収率87%)である。

同様にして以下の化合物を合成した。

【0262】

i) コレステリル 3-ヒドロキシプロピルカルバメートをコレステリル クロロホルメートおよび3-アミノプロパン-1-オールより合成した。

【0263】

ii) コレステリル 4-ヒドロキシブチルカルバメートをコレステリル クロロホルメートおよび4-アミノプロパン-1-オールより合成した。

【0264】

iii) コレステリル 5-ヒドロキシペンチルカルバメートをコレステリル クロロホルメートおよび5-アミノプロパン-1-オールより合成した。

【0265】

iv) コレステリル 6-ヒドロキシヘキシルカルバメートをコレステリル クロロホルメートおよび6-アミノプロパン-1-オールより合成した。

【0266】

v) コレステリル 8-ヒドロキシプロピルカルバメートをコレステリル クロロホルメートおよび8-アミノプロパン-1-オールより合成した。8-アミノプロパン-1-オ

10

20

30

40

50

ールは、8 - プロモオクタン - 1 - オールをアジ化ナトリウムと95%エタノール中加熱還流させた後に、接触水素添加(10%Pd/C触媒、30psi H<sub>2</sub>)して合成した。

【0267】

v i ) コレステリル 12 - ヒドロキシドデシルカルバメートをコレステリル クロロホルメートおよび12 - アミノドデカン - 1 - オールより合成した。12 - アミノドデカン - 1 - オールは、12 - プロモドデカン - 1 - オールをアジ化ナトリウムと95%エタノール中加熱還流させた後に、接触水素添加(10%Pd/C触媒、30psi H<sub>2</sub>)して合成した。

【0268】

v i i ) コレステリル 4 - (ヒドロキシメチル)ペンチルカルバメートをコレステリル クロロホルメートおよび4 - アミノベンジルアルコールより合成した。

【0269】

v i i i ) コレステリル 4 - ヒドロキシピペリジン - 1 - カルボキシレートを、コレステリル クロロホルメートおよび4 - ヒドロキシピペリジンより合成した。

【0270】

以下に続く実施例を分かりやすく明確にするために、表2-1から表2-2に上記化合物およびその簡略名を示した。

【実施例27】

【0271】

<コンジュゲート部 - - アミノアルコール リンカ分子ホスホラミダイトの一般的合成法>

コンジュゲート部 - - アミノアルコールリンカ分子は、当業者によく知られた方法を用いてホスホラミダイト誘導体に変換することができる。

【0272】

図3(b)にコンジュゲート部 - - アミノアルコールリンカ分子ホスホラミダイトの一般的合成スキームを示した。続く実施例28に、先に述べた一般的合成スキームによるコレステリル 2 - ((ジイソプロピルアミノ)(メトキシ)ホスフィノオキシ)エチルカルバメートの詳細な合成方法を示した。

【実施例28】

【0273】

<コレステリル 2 - ((ジイソプロピルアミノ)(メトキシ)ホスフィノオキシ) - エチルカルバメートの合成>

コレステリル 2 - ヒドロキシエチルカルバメート(2.8g、5.8mmol)を、N,N - ジイソプロピルアミン(810μL、5.8mmol)を含む無水塩化メチレン(11.6mL)に溶かし、室温にて攪拌した。別のフラスコに、メチル N,N,N',N' - テトライソプロピルホスフォロジアミジト(2.3g、8.7mmol)を、塩化メチレン(11.6mL)およびN,N - ジイソプロピルアミン(810μL、5.8mmol)、5 - エチルチオ - 1H - テトラゾール アセトニトリル溶液(0.5M、5.8mL、2.9mmol)の混合溶液に溶かした。この溶液を室温にて5分間攪拌し、先に調製した溶液に一度に加えた。この反応混合物を室温にて終夜攪拌し、溶媒留去して濃厚な液体を得た。得られた粗製物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用い(シリカゲル、400mL)、溶出液にヘキサン/アセトン/トリエチルアミン(1000mL、94:3:3 v/v/v)を用いて精製した。薄層クロマトグラフィーで目的物を含むフラクションを集め、溶媒留去して透明な無色の液体を得た。これを更に真空中で十分に乾燥した。収量は3.1g(収率85%)である。

【0274】

同様にして以下の化合物を合成した。

【0275】

i ) コレステリル 3 - ((ジイソプロピルアミノ)(メトキシ)ホスフィノオキシ)ブ

10

20

30

40

50

ロピルカルバメートを、コレステリル 3 - ヒドロキシプロピルカルバメートより合成した。

【0276】

i i) コレステリル 4 - ( (ジイソプロピルアミノ) (メトキシ) ホスフィノオキシ) ブチルカルバメートを、コレステリル 4 - ヒドロキシブチルカルバメートより合成した。

【0277】

i i i) コレステリル 5 - ( (ジイソプロピルアミノ) (メトキシ) ホスフィノオキシ) ペンチルカルバメートを、コレステリル 5 - ヒドロキシペンチルカルバメートより合成した。

10

【0278】

i v) コレステリル 6 - ( (ジイソプロピルアミノ) (メトキシ) ホスフィノオキシ) ヘキシルカルバメートを、コレステリル 6 - ヒドロキシヘキシルカルバメートより合成した。

【0279】

v) コレステリル 8 - ( (ジイソプロピルアミノ) (メトキシ) ホスフィノオキシ) オクチルカルバメートを、コレステリル 8 - ヒドロキシオクチルカルバメートより合成した。

【0280】

v i) コレステリル 12 - ( (ジイソプロピルアミノ) (メトキシ) ホスフィノオキシ) ドデシルカルバメートを、コレステリル 12 - ヒドロキシドデシルカルバメートより合成した。

20

【0281】

v i i) コレステリル 4 - ( ( (ジイソプロピルアミノ) (メトキシ) ホスフィノオキシ) メチル) フェニルカルバメートを、コレステリル 4 - (ヒドロキシメチル) フェニルカルバメートより合成した。

【0282】

v i i i) コレステリル 4 - ( (ジイソプロピルアミノ) (メトキシ) ホスフィノオキシ) ピペリジン 1 - カルボキシレートを、コレステリル 4 - ヒドロキシピペリジン - 1 - カルボキシレートより合成した。

30

【0283】

i x) コレステリル メチル ジイソプロピルホスホラミダイトを、コレステロールより合成した。

【実施例 29】

【0284】

<ヒドロキシメチルピロリジノールリンカ分子の一般的合成法>

図 4 に、ヒドロキシメチルプロパンジオールを用いたリンカ分子類合成の一般的合成スキームを示した。なお、当業者においては、ここで説明される具体的な方法、試薬を変更しても、同じ化合物を得ることができることは明らかである。まず、ヒドロキシプロリン化合物に適当な N - 保護基 (例えば、Fmoc、Boc および Cbz など) を作用させて N - 保護ヒドロキシプロリンとした。この化合物を、ボラン - メチルスルフィド錯体と無水テトラヒドロフラン中 1 時間加熱還流することにより還元し、N - 保護ヒドロキシメチルピロリジノールとした。次に、4, 4' - ジメトキシトリチルクロリドと、ピリジン中室温にて 12 ないし 18 時間反応させて、N - 保護 O - DMT - 保護ヒドロキシメチルピロリジノールへと誘導した。前記 N - 保護基を、適当な脱保護反応を用い、所望のヒドロキシメチルピロリジノールリンカ分子を得た。

40

【0285】

以下の実施例 30 ないし実施例 33 および図 5 A に、上記一般合成スキームによる 5 - ( (ビス (4 - メトキシフェニル) (フェニル) メトキシ) ピロリジン - 3 - オールの詳細な合成法を示した。

50

## 【実施例 30】

## 【0286】

< 1 - ( ( 9 H - フルオレン - 9 - イル ) メトキシ ) カルボニル ) - 4 - ヒドロキシピロリジン - 2 - カルボン酸 ( IX ) の合成 >

トランス - 4 - ヒドロキシプロリン ( 5 . 0 g 、 3 8 . 1 m m o l ) を、ジオキサン ( 7 5 m L ) および水 ( 7 5 m L ) の混合溶媒に懸濁させ、室温にて激しく攪拌した。炭酸水素ナトリウム ( 8 . 0 g 、 9 5 . 2 m m o l ) を加え、固体が溶解するまで攪拌した。次に、9 - フルオレニルメチル クロロホルメート ( 1 1 . 4 g 、 4 4 . 0 m m o l ) のトルエン ( 2 5 m L ) 溶液を、徐々に滴下して加え、16時間攪拌した。この反応混合物に、水 ( 5 0 m L ) および飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 ( 5 0 m L ) を加えた。分液ロートに移した後、ジエチルエーテル ( 1 0 0 m L ) にて洗浄した。有機層と分離後、水層を濃塩酸にて pH 試験紙を指標に約 pH 2 に調整した。この溶液に酢酸エチル ( 1 5 0 m L ) を加え、よく振騰した後に、分液ロートで分液した。水層を再度酢酸エチル ( 1 5 0 m L ) にて抽出し、酢酸エチル層を合して無水硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過、溶媒留去して無色のガラス状泡状物を得た。この粗製物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用い ( シリカゲル、400 mL )、溶出液に酢酸エチル / 酢酸 ( 1 8 0 0 m L 、 1 0 0 : 2 v / v )、続いて、酢酸エチル / メタノール / 酢酸 ( 1 0 0 0 m L 、 9 5 : 5 : 2 v / v ) を用いて精製した。薄層クロマトグラフィーで目的物を含むフラクションを集め、溶媒留去して透明な無色の液体を得た。この液体をトルエン ( 各 1 5 0 m L ) と3回共沸させて、残留酢酸を留去した。得られた無色の固体を真空中で十分に乾燥した。収量は 1 2 . 0 g ( 収率 8 9 % ) である。

10

20

## 【実施例 31】

## 【0287】

< ( 9 H - フルオレン - 9 - イル ) メチル 4 - ヒドロキシ-2-(ヒドロキシメチル)ピロリジン - 1 - カルボキシレート ( X ) の合成 >

1 - ( ( 9 H - フルオレン - 9 - イル ) メトキシ ) カルボニル ) - 4 - ヒドロキシピロリジン - 2 - カルボン酸 ( 1 3 . 3 g 、 3 7 . 6 m m o l ) を無水テトラヒドロフラン ( 2 5 0 m L ) に溶かした。この溶液を室温にて攪拌し、ボラン - メチルスルフィド錯体テトラヒドロフラン溶液 ( 2 M 、 4 0 m L 、 8 0 m m o l ) を、ゆっくりと先の溶液にシリンジにて加えた。気体の発生が収まった後、反応フラスコに冷却器およびドライライト乾燥管を付け、1時間加熱還流した。この間に無色の沈殿物が生じた。次に、メタノール ( 1 5 m L ) をまだ熱い反応混合物に注意深く加え、更に15分加熱還流させた。この間に、先の固体は溶解した。反応混合物を放冷後、溶媒留去して透明な液状物を得た。ホウ酸塩を除くために、この液状物をメタノール ( 各 1 0 0 m L ) と3回共沸させた。得られた無色の固体を真空中で乾燥した。収量は 1 2 . 7 g ( 収率 9 9 % ) である。

30

## 【実施例 32】

## 【0288】

< ( 9 H - フルオレン - 9 - イル ) メチル 2-((ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)-4-ヒドロキシピロリジン - 1 - カルボキシレート ( XI ) の合成 >

( 9 H - フルオレン - 9 - イル ) メチル 4 - ヒドロキシ - 2 - ( ヒドロキシメチル ) ピロリジン - 1 - カルボキシレート ( 1 0 . 6 g 、 3 1 . 2 m m o l ) を無水ピリジン ( 各 5 0 m L ) と2回共沸させた後、無水ピリジン ( 2 0 0 m L ) に溶かした。反応溶液を氷浴にて冷却し、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド ( 1 1 . 0 g 、 3 2 . 5 m m o l ) を、各3回に分けて30分間隔で加えた。添加終了後、フラスコを密栓し、4 にて16時間保存した。次に、反応混合物を溶媒留去し、濃厚な黄色の液状物を得た。これをトルエン ( 1 0 0 m L ) に溶かし、ろ過した後に溶媒留去した。残渣を塩化メチレン ( 3 5 0 m L ) に溶かし、冷却したクエン酸水溶液 ( 1 0 % v / v 、 1 5 0 m L )、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 ( 1 5 0 m L )、飽和食塩水 ( 1 5 0 m L ) にて洗浄した。塩化メチレン溶液を、無水硫酸にて乾燥し、ろ過、溶媒留去して黄色の泡状物を得た。この粗製物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用い ( シリカゲル、500 mL )、溶出液に

40

50

酢酸エチル/ヘキサン/トリエチルアミン(1300 mL、50:50:1 v/v/v)、続いて、同(1800 mL、67:33:1 v/v/v)、更に、酢酸エチル/トリエチルアミン(1000 mL、99:1 v/v)を用いて精製した。薄層クロマトグラフィーで目的物を含むフラクションを集め、溶媒留去して白みがあったアモルファス状の固体を得た。更に、真空中で十分に乾燥した。収量は17.7(収率88%)である。

【実施例33】

【0289】

<5-( (ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)メチル)ピロリジン-3-オール(XII)の合成>

(9H-フルオレン-9-イル)メチル-2-( (ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)メチル)-4-ヒドロキシピロリジン-1-カルボキシレート(3.4 g、5.3 mmol)を無水N,N-ジホルムアミド(15 mL)に溶かした。反応溶液を室温にて攪拌し、ピペリジン(1.1 mL、11 mmol)を加えた。1時間後、多量の無色沈殿物が生成した。水(100 mL)および酢酸エチル(75 mL)を加え、先の固体がすべて溶解するまで攪拌した。2層を分離後、水層を酢酸エチル(75 mL)で抽出した。酢酸エチル層を合して、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(50 mL)、飽和食塩水(50 mL)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ過した。ろ液の溶媒を留去して、アモルファス状の無色固体を得た。この粗製物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用い(シリカゲル、150 mL)、溶出液に塩化メチレン/メタノール/トリエチルアミン(700 mL、94:1:5 v/v/v)、続いて、塩化メチレン/メタノール/トリエチルアミン(700 mL、90:5:5 v/v/v)を用いて精製した。薄層クロマトグラフィーで目的物を含むフラクションを集め、溶媒留去して無色ガラス状の泡状物を得た。更に、真空中で十分に乾燥した。収量は2.2(収率99%)である。

【実施例34】

【0290】

<コンジュゲート部-ヒドロキシメチルピロリジノール リンカ分子の一般的合成法>

以下に述べる化合物の合成方法は、先に述べたコンジュゲート部-アミノ-1,3-ジオールリンカ分子の場合と同様である。

【0291】

以下の実施例35、実施例36、および図5Bに、先に述べた一般的合成スキームによる、コレステリル-6-(2-( (ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)-4-ヒドロキシピロリジン-1-イル)-6-オキソヘキシルカルバメートの詳細な合成法を示した。この場合、コンジュゲート部はコレステロール、反応誘導体は6-コレステリルオキシカルボニルアミノヘキサン酸である。

【実施例35】

【0292】

<6-コレステリルオキシカルボニルアミノヘキサン酸(XIII)の合成>

6-アミノヘキサン酸(3.9 g、29.7 mmol)を無水ピリジン(60 mL)に懸濁させ、氷浴にて冷却しながら攪拌した。塩化トリメチルシラン(15 mL、118.6 mmol)をシリンジにて加え、反応混合物を1時間攪拌した。この間に固体は全て溶解した。次に、コレステリル クロロホルメート(7.0 g、15.6 mmol)を先の冷却溶液に加え、1時間後に更にコレステリル クロロホルメート(6.5 g、14.5 mmol)を加えた。氷浴を取り除き、反応混合物を室温にて3時間攪拌した。再び反応混合物を氷浴にて冷却、冷却した塩酸水溶液(0.7 M、150 mL)をゆっくりと加えた。15分後、反応混合物を分液ロートに注ぎ、塩化メチレン(200 mL)を加えた。フラスコの内容物を十分振騰し、水層、有機層を分離した。水層は、更に塩化メチレン(200 mL)にて抽出した。塩化メチレン層を合し、塩酸水溶液(0.7 M、200 mL)、飽和食塩水(200 mL)にて洗い、無水硫酸にて乾燥、ろ過した。ろ液をから溶媒を留去して、アモルファス状の無色固体を得た。この固体をアセトン(150 mL)に溶かし、塩酸水溶液(1 M、200 mL)を加えて生成物を沈殿させた。この固体をろ過、水

で洗浄、真空中で乾燥した。収量は15.8g(収率97%)である。

【実施例36】

【0293】

<コレステリル 6-(2-((ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)メチル)-4-ヒドロキシピロリジン-1-イル)-6-オキソヘキシルカルバメート(XIV)の合成>

6-コレステリルオキシカルボニルアミノヘキサノ酸(2.9g、5.3mmol)を塩化メチレン(50mL)に溶かし、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物(0.9g、5.6mmol)、続いてN,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(1.1g、5.3mmol)を加えた。この反応混合物を室温にて1時間攪拌した。この間、N,N'-ジシクロヘキシルウレアの無色沈殿が生成した。次に、5-((ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)メチル)ピロリジン-3-オール(2.2g、5.2mmol)を加え、反応混合物を4時間攪拌した。反応混合物をろ過し、少量(約25mL)まで濃縮した。酢酸エチル(200mL)を加え、溶液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(各100mL)にて3回洗浄し、飽和食塩水(100mL)で洗浄した。この酢酸エチル溶液を、無水硫酸ナトリウムにて乾燥し、ろ過、溶媒留去して淡黄色のガラス状泡状物を得た。この粗製物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用い(シリカゲル、250mL)、溶出液に塩化メチレン/ヘキサン/トリエチルアミン(1000mL、75:20:5 v/v/v)、続いて、塩化メチレン/トリエチルアミン(500mL、95:5 v/v)を用いて精製した。薄層クロマトグラフィーで目的物を含むフラクションを集め、溶媒留去して白みがかかったガラス状の泡状物を得た。更に、真空中で十分に乾燥した。収量は4.4(収率88%)である。

10

20

【実施例37】

【0294】

<オリゴヌクレオチド固相合成用担体に結合したコンジュゲート部-ヒドロキシメチルピロリジノール リンカ分子の一般的合成法>

以下に述べる化合物の合成方法は、先に述べたコンジュゲート部-アミノ-1,3-ジオールリンカ分子の場合と同様である。

【0295】

以下の実施例38、実施例39、および図5Cに、先に述べた一般的合成スキームによる、固相合成用ポリスチレン担体に結合した4-(5-((ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)メチル)-1-(6-((コレステリルオキシ)カルボニルアミノ)ヘキサノイル)ピロリジン-3-イルオキシ)-4-オキソブタン酸の詳細な合成法を示した。この場合、ジカルボン酸結合鎖にはコハク酸を用いた。

30

【実施例38】

【0296】

<4-(5-((ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)メチル)-1-(6-((コレステリルオキシ)カルボニルアミノ)ヘキサノイル)ピロリジン-3-イルオキシ)-4-オキソブタン酸 トリエチルアミン塩(XV)の合成>

コレステリル 6-(2-((ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)メチル)-4-ヒドロキシピロリジン-1-イル)-6-オキソヘキシルカルバメート(4.3g、4.6mmol)、コハク酸無水物(0.5g、5.0mmol)、トリエチルアミン(1.9mL、13.6mmol)および1-メチルイミダゾール(0.2mL、2.3mmol)を塩化メチレン溶液(50mL)に溶解した。反応溶液を室温にて24時間攪拌した。次に、反応溶液を塩化メチレン(100mL)にて希釈し、氷冷した10%(w/v)クエン酸水溶液(50mL)にて2回、更に飽和食塩水(50mL)にて洗浄した。塩化メチレン溶液を無水硫酸ナトリウムにて乾燥し、ろ過、減圧留去して黄色の樹脂を得た。この粗製物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用い(シリカゲル、150mL)、溶出液に塩化メチレン/トリエチルアミン(500mL、95:5 v/v)、続いて、塩化メチレン/メタノール/トリエチルアミン(1000mL、90:5

40

50

: 5 v / v / v ) を用いて精製した。薄層クロマトグラフィーで目的物を含むフラクションを集め、溶媒留去して白みがあったガラス状の泡状物を得た。更に真空中で十分に乾燥した。収量は 4.3 g (収率 82%) である。

【実施例 39】

【0297】

< 架橋アミノメチルポリスチレンに結合した 4 - ( 5 - ( (ビス(4 - メトキシフェニル) (フェニル)メトキシ)メチル) - 1 - ( 6 - ( (コレステリルオキシ)カルボニルアミノ)ヘキサノイル)ピロリジン - 3 - イルオキシ) - 4 - オキソブタン酸 (XVI) の合成 >

AM - ポリスチレン ( 5.0 g、約 33  $\mu\text{mol}$  アミノ基 / g ; Applied Biosystem 社 ) を、ラバーセプタムで栓をした一口丸底フラスコ ( 250 mL ) 中、遊離アミンを含まない無水 N, N - ジメチルホルムアミド ( 37.5 mL ) に懸濁させた。反応フラスコを振騰器に取り付け、室温にて固体が十分攪拌する程度に振騰した。また、別のフラスコ ( 50 mL ) に、4 - ( 5 - ( (ビス(4 - メトキシフェニル) (フェニル)メトキシ)メチル) - 1 - ( 6 - ( (コレステリルオキシ)カルボニルアミノ)ヘキサノイル)ピロリジン - 3 - イルオキシ) - 4 - オキソブタン酸 トリエチルアミン塩 ( 241 mg、210  $\mu\text{mol}$  )、遊離アミンを含まない無水 N, N - ジメチルホルムアミド ( 25.0 mL )、トリエチルアミン ( 58  $\mu\text{L}$ 、420  $\mu\text{mol}$  )、1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物 ( 34 mg、252  $\mu\text{mol}$  ) および BPO ( 102 mg、231  $\mu\text{mol}$  ) を加えた。この混合物を固体が溶けるまでよく振騰し、カルボン酸を活性化させるために室温にて 5 分間放置した。こうして活性化したカルボン酸溶液の一部 ( 9.0 mL、75.6  $\mu\text{mol}$  ) を、振騰中の固相担体にシリンジにて加えた。反応混合物を 2.5 時間振騰し、固相担体の一部 40 mg を取り出した。先に述べた測定方法により充填量を測定した結果、12.2  $\mu\text{mol}$  / g であった。更に活性化したカルボン酸溶液 ( 2.5 mL、21.0  $\mu\text{mol}$  ) を固相懸濁液に加え、2 時間振騰した。充填量は 15.0  $\mu\text{mol}$  / g であった。固相担体の懸濁液をガラスろ過ポートに空け、液体を真空下除去した。固体を N, N - ジメチルホルムアミド ( 200 mL )、アセトン ( 200 mL )、アセトニトリル ( 200 mL ) で十分に洗浄し、更に真空中終夜乾燥させた。担体に残留したアミノ基は、無水酢酸 アセトニトリル溶液 ( 10% v / v、25 mL ) および 1 - メチルイミダゾール アセトニトリル溶液 ( 10% v / v、25 mL ) 混合溶液中に固相担体を懸濁させ、室温にて 2.5 時間振騰させてキャップした。次に、固相担体の懸濁液をガラスろ過ポートに空け、液体を真空にて除去した。固相担体を、アセトニトリル ( 500 mL ) にて十分に洗い、真空中で終夜乾燥させた。

【実施例 40】

【0298】

< コンジュゲート部 - - アミノ - 1, 2 - ジオールリンカ分子の一般的合成法 >

以下の化合物は、先に説明したコンジュゲート部 - - アミノ - 1, 3 - ジオールリンカ分子と同様に合成した。

【0299】

以下の実施例 41、実施例 42 および図 6A に、上記一般的スキームに基づくコレステリル 3 - (ビス(4 - メトキシフェニル) (フェニル)メトキシ) - 2 - ヒドロキシプロピルカルバメートの詳細な合成方法を示した。

【実施例 41】

【0300】

< コレステリル 2, 3 - ジヒドロキシプロピルカルバメート (XVII) の合成 >

3 - アミノ - 1, 2 - プロパンジオール ( 2.0 g、22.0 mmol ) を無水ピリジン ( 各 50 mL ) と 2 回共沸し、その後無水ピリジン ( 147 mL ) に溶かした。反応溶液を氷浴にて攪拌しながら、コレステリル クロロホルメート ( 10.4 g、23.1 mmol ) のトルエン ( 50 mL ) 溶液を、30 分かけて滴下した。滴下終了後、反応溶液から氷浴を取り除き、室温にて 16 時間攪拌した。溶媒を留去し、残渣をトルエン ( 各 50

10

20

30

40

50

mL)と2回共沸させた。この粗製物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用い(シリカゲル、300 mL)、溶出液にヘキサン/アセトン(1000 mL、90:10 v/v)、続いて、ヘキサン/アセトン(1000 mL、85:15 v/v)、ヘキサン/アセトン(1000 mL、70:30 v/v)、ヘキサン/アセトン(1000 mL、65:35 v/v)、を用いて精製した。薄層クロマトグラフィーで目的物を含むフラクションを集め、溶媒留去して液状物を得た。更に真空中で十分に乾燥した。収量は5.7 g(収率51%)である。

【実施例42】

【0301】

<コレステリル 3 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ) - 2 - ヒドロキシプロピルカルバメート(XVIIII)の合成>

コレステリル 2, 3 - ジヒドロキシプロピルカルバメート(5.7 g、11.4 mmol)を無水ピリジン(50 mL)に溶かし、氷浴にて攪拌した。4, 4' - ジメトキシトリチルクロリド(4.1 g、12.1 mmol)のピリジン(26 mL)溶液をゆっくりと滴下した。滴下終了後、反応溶液から氷浴を取り除き、室温にて16時間攪拌した。溶媒を留去し、濃厚な黄色液状物を得た。この粗製物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用い(シリカゲル、250 mL)、溶出液にヘキサン/アセトン/トリエチルアミン(1000 mL、95:5:2 v/v/v)、続いて、ヘキサン/アセトン/トリエチルアミン(2000 mL、90:10:2 v/v/v)を用いて精製した。薄層クロマトグラフィーで目的物を含むフラクションを集め、溶媒留去して樹脂を得た。更に真空中で十分に乾燥した。収量は8.1 g(収率88%)である。

【実施例43】

【0302】

<オリゴヌクレオチド固相合成用担体に結合したコンジュゲート部 - アミノ - 1, 2 - ジオール リンカ分子の一般的合成法>

以下に述べる化合物の合成方法は、先に述べたコンジュゲート部 - アミノ - 1, 3 - ジオール リンカ分子の場合と同様である。

【0303】

以下の実施例44、実施例45、および図6Cに、先に述べた一般的合成スキームによる、固相合成用ポリスチレン担体に結合した4 - (1 - ((ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ) - 3 - ((コレステリルオキシ)カルボニルアミノ)プロパン - 2 - イルオキシ) - 4 - オキソブタン酸の詳細な合成法を示した。この場合、ジカルボン酸結合鎖にはコハク酸を用いた。

【実施例44】

【0304】

<コレステリル 3 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ) - 3 - ((コレステリルオキシ)カルボニルアミノ)プロパン - 2 - イルオキシ) - 4 - オキソブタン酸 トリエチルアミン塩(XIX)の合成>

コレステリル 3 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ) - 2 - ヒドロキシプロピルカルバメート(8.1 g、10.0 mmol)、コハク酸無水物(1.0 g、10.0 mmol)、トリエチルアミン(4.2 mL、30.0 mmol)および1 - メチルイミダゾール(0.4 mL、5.0 mmol)を塩化メチレン(81 mL)に溶解した。反応溶液を室温にて24時間攪拌した。次に、反応溶液を塩化メチレン(100 mL)にて希釈し、氷冷した10%(w/v)クエン酸水溶液(50 mL)にて2回、更に飽和食塩水(50 mL)にて洗浄した。塩化メチレン溶液を無水硫酸ナトリウムにて乾燥し、ろ過、減圧留去して黄色の樹脂を得た。この粗製物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用い(シリカゲル、200 mL)、溶出液に塩化メチレン/トリエチルアミン(1000 mL、95:5 v/v)、続いて、塩化メチレン/メタノール/トリエチルアミン(1000 mL、93:2:5 v/v/v)を用いて精製した。薄層クロマトグラフィーで目的物を含むフラクションを集め、溶媒留去してガラス状の泡状物を得た。



更に真空中で十分に乾燥した。収量は 8.6 g (収率 94%) である。

【実施例 45】

【0305】

<架橋アミノメチルポリスチレンに結合した 4-(1-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)-3-(コレステリルオキシ)カルボニルアミノ)プロパン-2-イルオキシ)-4-オキソブタン酸 (XX)の合成>

AM-ポリスチレン(5.0 g、約 33 μmol アミノ基/g; Applied Biosystem社)を、ラバーセプタムで栓をした一口丸底フラスコ(250 mL)中、遊離アミンを含まない無水N,N-ジメチルホルムアミド(37.5 mL)に懸濁させた。反応フラスコを振騰器に取り付け、室温にて固体が十分攪拌する程度に振騰した。また、別のフラスコ(50 mL)に、4-(1-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)-3-(コレステリルオキシ)カルボニルアミノ)プロパン-2-イルオキシ)-4-オキソブタン酸 トリエチルアミン塩(113 mg、113 μmol)、遊離アミンを含まない無水N,N-ジメチルホルムアミド(25.0 mL)、トリエチルアミン(31 μL、225 μmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物(18 mg、135 μmol)およびBPO(55 mg、124 μmol)を加えた。この混合物を固体が溶けるまでよく振騰し、カルボン酸を活性化させるために室温にて5分間放置した。こうして活性化したカルボン酸溶液の一部(16.7 mL、75.4 μmol)を、振騰中の固相担体にシリンジにて加えた。反応混合物を1.5時間振騰し、固相担体の一部40 mgを取り出した。先に述べた測定方法により充填量を測定した結果、12.5 μmol/gであった。更に活性化したカルボン酸溶液(2.7 mL、12.2 μmol)を固相懸濁液に加え、2時間振騰した。充填量は14.7 μmol/gであった。固相担体の懸濁液をガラスろ過口に空け、液体を真空下除去した。固体をN,N-ジメチルホルムアミド(200 mL)、アセトン(200 mL)、アセトニトリル(200 mL)で十分に洗浄し、更に真空中終夜乾燥させた。担体に残留したアミノ基は、無水酢酸アセトニトリル溶液(10% v/v、25 mL)および1-メチルイミダゾールアセトニトリル溶液(10% v/v、25 mL)混合溶液中に固相担体を懸濁させ、室温にて2.5時間振騰させてキャップした。次に、固相担体の懸濁液をガラスろ過口に空け、液体を真空にて除去した。固相担体を、アセトニトリル(500 mL)にて十分に洗い、真空中で終夜乾燥させた。

10

20

30

【実施例 46】

【0306】

<オリゴヌクレオチド固相合成用担体に結合したコンジュゲート部-1,3-ジオールリンカ分子の一般的合成法>

本発明の好適なコンジュゲート部は、直接リンカ分子として機能しうるように変換される官能基を構造中に有する。例えば、コンジュゲート部の機能を妨げないようなカルボキシル基をもつコンジュゲート部は、先に-アミノ1,3-ジオールリンカ分子の合成で述べたのと同様な化学変換によって、コンジュゲート部-リンカ分子へと直接変換される。同様に、コンジュゲート部の機能を妨げないような水酸基をもつコンジュゲート部は、先に述べたのと同様な化学変換によって、ホスホラミダイト誘導体へと直接変換される。

40

【0307】

以下の実施例 47ないし実施例 51、および図 7に、先に述べた一般的合成スキームによる、固相合成用ポリスチレン担体に結合した 4-(1-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)エイコサン-3-イルオキシ)-4-オキソブタン酸の詳細な合成法を示した。この場合、ジカルボン酸結合鎖にはコハク酸を用いた。

【実施例 47】

【0308】

<メチル 3-オキソエイコサノエート (XXI)の合成>

ステアリン酸(5.0 g、17.6 mmol)を塩化メチレン(88 mL)に懸濁し、2

50

、2-ジメチル1,3-ジオキサン-4,6-ジオン(2.7g、18.5mmol)、トリエチルアミン(6.7mL、48.0mmol)、およびジエチルシアノホスホナート(2.7mL、17.6mmol)を加えた。固体はすべて速やかに溶けた。反応溶液を室温にて16時間攪拌した。次に、塩化メチレン(100mL)にて稀釈し、注意深く、塩酸水溶液(3M、各50mL)で3回洗浄した。更に、水(各50mL)と3回、飽和食塩水(50mL)で1回洗浄した。この反応混合物を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過、溶媒を留去した。得られた液体を無水メタノール(100mL)に溶かし、16時間加熱還流した。メタノールを留去し、得られた粗製物をヘキサを温めて溶かし、シリカゲルに充填した(シリカゲル、150mL)。溶出液にヘキサン(500mL)、続いて、ヘキサン/アセトン(1000mL、98:2 v/v)を用いて精製した。薄層クロマトグラフィーで目的物を含むフラクションを集め、溶媒留去して油状物を得た。更に真空中で十分に乾燥した。収量は5.2g(収率87%)である。

【0309】

同様にして以下の化合物を合成した。

【0310】

i)メチル 3-オキソデカノエートを、カプリン酸から合成した。

【0311】

ii)(E)-メチル 3-オキソエイコサ-11-エノエートを、エライジン酸から合成した。

【0312】

iii)(Z)-メチル 3-オキソエイコサ-11-エノエートを、オレイン酸から合成した。

【0313】

iv)(11Z,14Z)-メチル 3-オキソエイコサ-11,14-ジエノエートを、リノレイン酸から合成した。

【実施例48】

【0314】

<エイコサン-1,3-ジオール(XXII)の合成>

メチル 3-オキソエイコサノエート(5.2g、15.3mmol)を無水テトラヒドロフラン(31mL)に溶かし、この溶液を氷冷した水素化ホウ素リチウムの無水テトラヒドロフラン溶液(2M、31mL、61.2mmol)にゆっくりと滴下した。滴下終了後、氷浴を取り除き、反応溶液を室温にて16時間攪拌した。この透明無色の溶液を再び氷浴にて冷却し、過剰の還元剤を分解するために、塩酸水溶液(1M、62mL)をゆっくりと滴下した(ガスが発生した)。均一な溶液になった後に、この反応混合物を濃縮してテトラヒドロフランを留去した。次に、塩化メチレン(100mL)を加え、よく振騰後、分液ロートに入れた。層が分離した後に、水層を取り出した。この水層を塩化メチレン(100mL)で抽出し、先の塩化メチレン層と合し、飽和食塩水(50mL)にて洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過、メタノール(各50mL)と5回共沸、得られた油状物を真空中で十分に乾燥した。収量は3.7g(収率77%)である。

【0315】

同様にして以下の化合物を合成した。

【0316】

i)デカン-1,3-ジオールを、メチル 3-オキソデカノエートから合成した。

【0317】

ii)(E)-エイコサ-11-エン-1,3-ジオールを、(E)-メチル 3-オキソエイコサ-11-エノエートから合成した。

【0318】

iii)(Z)-エイコサ-11-エン-1,3-ジオールを、(Z)-メチル 3-オキソエイコサ-11-エノエートから合成した。

【0319】

10

20

30

40

50

iv) (11Z, 14Z) - エイコサ - 11, 14 - ジエン - 1, 3 - ジオールを、 (11Z, 14Z) メチル 3 - オキソエイコサ - 11, 14 - ジエノエートから合成した。

【実施例 49】

【0320】

< 1 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)エイコサン - 3 - オール (XXIII) の合成 >

エイコサン - 1, 3 - ジオール (3.7 g、11.8 mmol) を無水ピリジン (各 50 mL) と 2 回共沸し、無水ピリジン (60 mL) に溶解した。この溶液を氷浴にて冷却し、4, 4' - ジメトキシトリチルクロリド (4.2 g、12.4 mmol) を加えた。反応溶液を室温にもどし、16 時間攪拌した。残留する 4, 4' - ジメトキシトリチルクロリドをメタノール (10 mL) で処理し、得られた黄色溶液をほぼ乾固するまで溶媒留去した。残渣を無水トルエン (50 mL) と 2 回共沸し、得られた粗製物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用い、溶出液にヘキサン/アセトン/トリエチルアミン (500 mL 95.5 : 5 : 0.5 v/v/v) を用いて精製した。薄層クロマトグラフィーで目的物を含むフラクションを集め、溶媒留去して淡黄色液状物を得た。更に真空中で十分に乾燥した。収量は 6.8 g (収率 93%) である。

10

【0321】

同様にして以下の化合物を合成した。

【0322】

i) 1 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)デカン - 3 - オールを、デカン - 1, 3 - ジオールから合成した。

20

【0323】

ii) (E) - 1 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)エイコサ - 11 - エン - 3 - オールを、(E) - エイコサ - 11 - エン - 1, 3 - ジオールから合成した。

【0324】

iii) (Z) 1 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)エイコサ - 11 - エン - 3 - オールを、(Z) - エイコサ - 11 - エン - 1, 3 - ジオールから合成した。

30

【0325】

iv) (11Z, 14Z) - 1 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)エイコサ - 11, 14 - ジエン - 3 - オールを、(11Z, 14Z) エイコサ - 11, 14 - ジエン - 1, 3 - ジオールから合成した。

【実施例 50】

【0326】

< 4 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)エイコサン - 3 - イルオキシ) - 4 - オキソブタン酸 トリエチルアミン塩 (XXIV) の合成 >

1 - (ビス(4 - メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)エイコサン - 3 - オール (6.8 g、11.0 mmol)、コハク酸無水物 (1.1 g、11.0 mmol)、トリエチルアミン (4.6 mL、33.0 mmol) および 1 - メチルイミダゾール (0.4 mL、5.5 mmol) を塩化メチレン (68 mL) に溶解した。反応溶液を室温にて 5 日間攪拌した。この間、反応溶液は暗色になった。次に、反応溶液を塩化メチレン (100 mL) にて希釈し、氷冷した 10% (w/v) クエン酸水溶液 (50 mL) にて 2 回、更に飽和食塩水 (50 mL) にて洗浄した。塩化メチレン溶液を無水硫酸ナトリウムにて乾燥し、ろ過、減圧留去して暗色の樹脂を得た。この粗製物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用い (シリカゲル、200 mL)、溶出液に塩化メチレン/トリエチルアミン (500 mL、95 : 5 v/v)、続いて、塩化メチレン/メタノール/トリエチルアミン (1000 mL、93 : 2 : 5 v/v/v) を用いて精製した。薄層クロマトグラフィーで目的物を含むフラクションを集め、溶媒留去して樹脂を得た。更に真空中

40

50

で十分に乾燥した。収量は 2.4 g (収率 30%) である。

【0327】

同様にして以下の化合物を合成した。

【0328】

i) 1-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)デカン-3-イルオキシ)-4-オキソブタン酸 トリエチルアミン塩を、1-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)デカン-3-オールから合成した。

【0329】

ii) (E)-1-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)エイコサ-11-エン-3-イルオキシ)-4-オキソブタン酸 トリエチルアミン塩を、(E)-1-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)エイコサ-11-エン-3-オールから合成した。

10

【0330】

iii) (Z)-1-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)エイコサ-11-エン-3-イルオキシ)-4-オキソブタン酸 トリエチルアミン塩を、(Z)-1-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)エイコサ-11-エン-3-オールから合成した。

【0331】

iv) (11Z, 14Z)-1-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)エイコサ-11, 14-ジエン-3-イルオキシ)-4-オキソブタン酸 トリエチルアミン塩を、(11Z, 14Z)-1-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)エイコサ-11, 14-ジエン-3-オールから合成した。

20

【実施例 51】

【0332】

<架橋アミノメチルポリスチレンに結合した 4-(1-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)エイコサン-3-イルオキシ)-4-オキソブタン酸(XV)の合成>

AM-ポリスチレン(5.0 g、約 33  $\mu\text{mol}$  アミノ基/g; Applied Biosystem社)を、ラバーセプタムで栓をした一口丸底フラスコ(250 mL)中、遊離アミンを含まない無水N,N-ジメチルホルムアミド(37.5 mL)に懸濁させた。反応フラスコを振騰器に取り付け、室温にて固体が十分攪拌する程度に振騰した。また、別のフラスコ(50 mL)に、4-(1-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)エイコサン-3-イルオキシ)-4-オキソブタン酸 トリエチルアミン塩(49 mg、60  $\mu\text{mol}$ )、遊離アミンを含まない無水N,N-ジメチルホルムアミド(25.0 mL)、トリエチルアミン(17  $\mu\text{L}$ 、120.0  $\mu\text{mol}$ )、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物(10 mg、72  $\mu\text{mol}$ )およびBPO(29 mg、66  $\mu\text{mol}$ )を加えた。この混合物を固体が溶けるまでよく振騰し、カルボン酸を活性化させるために室温にて5分間放置した。こうして活性化したカルボン酸溶液の一部(16.7 mL、40.0  $\mu\text{mol}$ )を、振騰中の固相担体にシリンジにて加えた。反応混合物を1.5時間振騰し、固相担体の一部40 mgを取り出した。先に述べた測定方法により充填量を測定した結果、11.9  $\mu\text{mol}/\text{g}$ であった。更に活性化したカルボン酸溶液(1.0 mL、2.4  $\mu\text{mol}$ )を固相懸濁液に加え、1時間振騰した。充填量は16  $\mu\text{mol}/\text{g}$ であった。固相担体の懸濁液をガラスろ過ポートに空け、液体を真空で除去した。固体をN,N-ジメチルホルムアミド(200 mL)、アセトン(200 mL)、アセトニトリル(200 mL)で十分に洗浄し、更に真空中終夜乾燥させた。担体に残留したアミノ基は、無水酢酸 アセトニトリル溶液(10% v/v、25 mL)および1-メチルイミダゾール アセトニトリル溶液(10% v/v、25 mL)混合溶液中に固相担体を懸濁させ、室温にて2.5時間振騰させてキャップした。次に、固相担体の懸濁液をガラスろ過ポートに空け、液体を真空にて除去した。固相担体を、アセトニトリル(500 mL)にて十分に洗い、真空中で終夜乾燥させた。

30

40

50

## 【0333】

同様に、実施例 50 i) ~ iv) に記載した化合物を約 15.0 + 1.0 μmol/g 担持した固相担体を合成した。

## 【0334】

## 【表 1 - 1】

化合物名	構造式	略号
コレステリル 5-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メキシ)-3-ヒドロキシフェニルカルバメート		CHOL-C5
コレステリル 8-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メキシ)-6-ヒドロキシオクチルカルバメート		CHOL-C8
コレステリル 10-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メキシ)-8-ヒドロキシデシルカルバメート		CHOL-C10
コレステリル 14-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メキシ)-12-ヒドロキシテトラデシルカルバメート		CHOL-C14
コレステリル 4-(3-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メキシ)-1-ヒドロキシプロピル)フェニルカルバメート		CHOL-ABA
コレステリル 4-(3-ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メキシ)-1-ヒドロキシプロピル)ピペリジン-1-カルバメート		CHOL-PIP

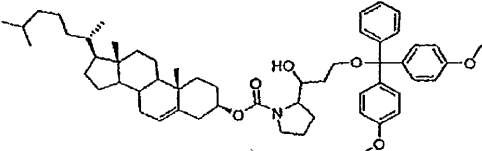
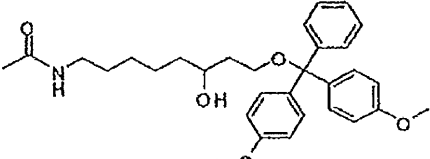
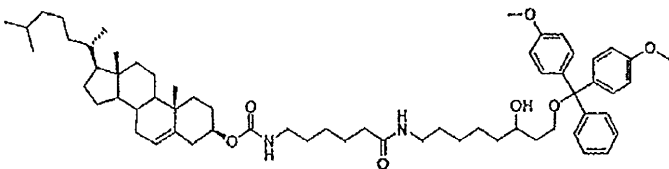
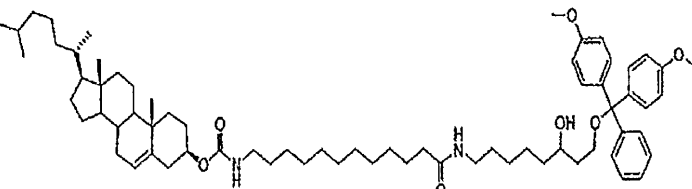
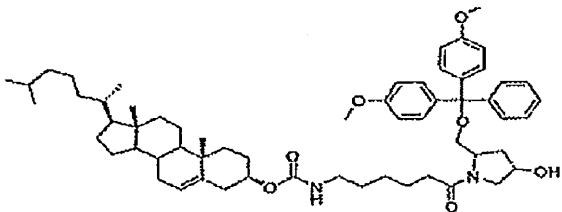
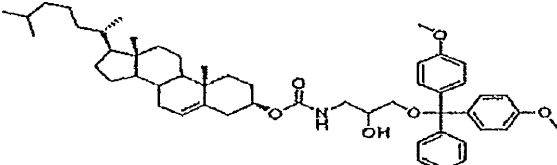
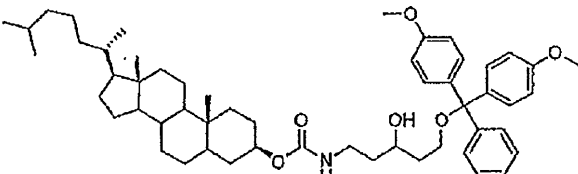
10

20

30

40

【表 1 - 2】

化合物名	構造式	略号
コレステリル 2-(3-ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)-1-ヒドロキシプロピル)ピロリジン-1-カルバメート		CHOL-PRO
N-(8-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)-6-ヒドロキシオクチル)アセトアミド		Ac-C8
コレステリル 6-(8-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)-6-ヒドロキシオクチルアミノ)-6-オキソヘキシルカルバメート		CHOL-C8 +C6
コレステリル 12-(8-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)-6-ヒドロキシオクチルアミノ)-12-オキソドデシルカルバメート		CHOL-C8 +C12
コレステリル 6-(2-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)メチル)-4-ヒドロキシピロリジン-1-イル)-6-オキソヘキシルカルバメート		CHOL-C6 -Hp
コレステリル 3-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)-2-ヒドロキシプロピルカルバメート		CHOL-C3
5α-コレスタン-3β-イル 5-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)-3-ヒドロキシペンチルカルバメート		CHLN-C5

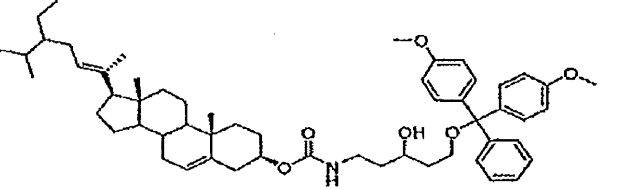
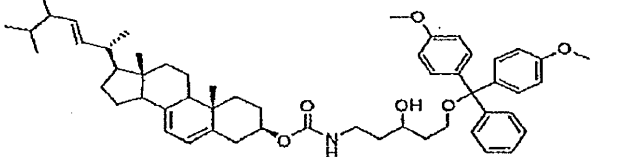
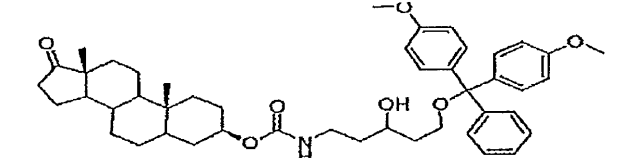
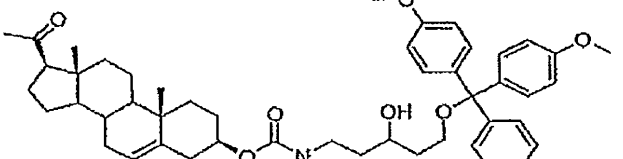
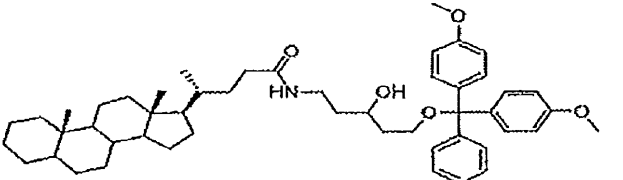
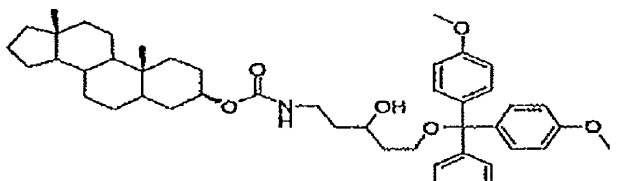
10

20

30

40

【表 1 - 3】

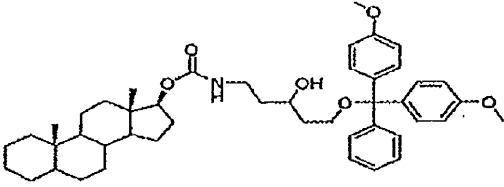
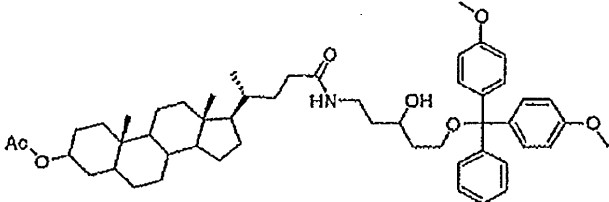
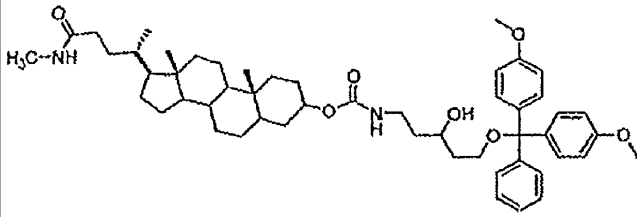
化合物名	構造式	略号
ステグマステリル 5-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メキシ)-3-ヒドロキシペンチルカルバメート		STIG-C5
エルゴステリル 5-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メキシ)-3-ヒドロキシペンチルカルバメート		ERGO-C5
トランス-アンドロステロニル 5-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メキシ)-3-ヒドロキシペンチルカルバメート		ANDR-C5
プレグネノロニル 5-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メキシ)-3-ヒドロキシペンチルカルバメート		PREG-C5
コラニル 5-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メキシ)-3-ヒドロキシペンチルアミン		CHLA-C5
5α-アンドロスタン-3β-イル 5-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メキシ)-3-ヒドロキシペンチルカルバメート		3BAND-C5

10

20

30

【表 1 - 4】

化合物名	構造式	略号
5 $\alpha$ -アンドロスタン-17 $\beta$ -イル 5-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)-3-ヒドロキシペンチルカルバメート		17BAND-C5
3-O-アセチルリトコリル 5-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)-3-ヒドロキシペンチルアミド		ACLITH-C5
リトコール酸メチルアミド 5-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)-3-ヒドロキシペンチルカルバメート		LITHNM-C5

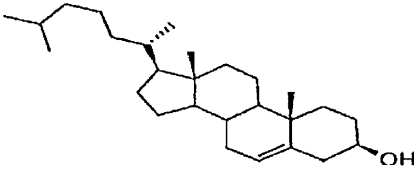
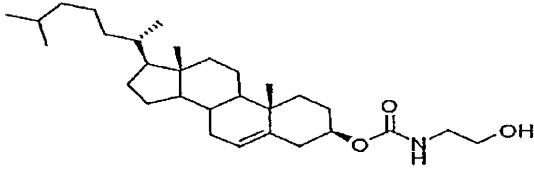
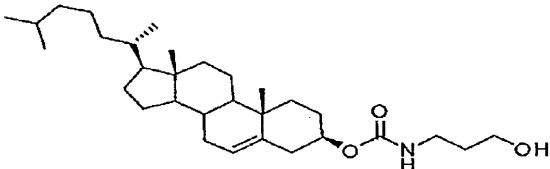
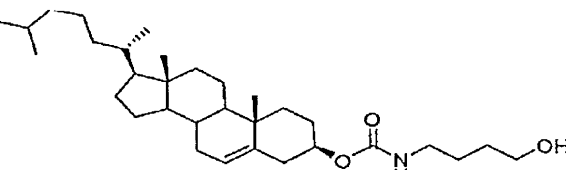
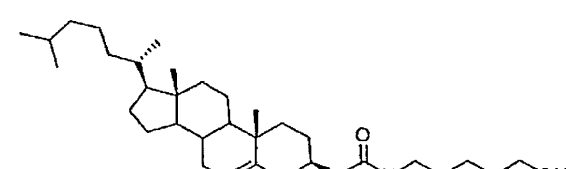
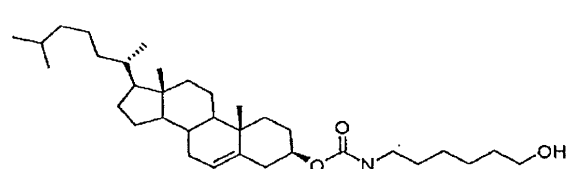
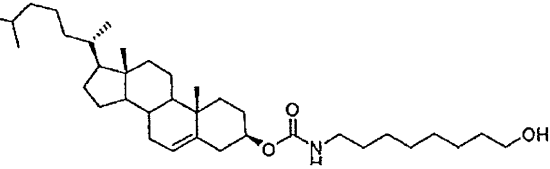
10

20

【 0 3 3 5 】



【表 2 - 1】

化合物名	構造式	略号
コレステロール		5' C0
コレステリル 2-ヒドロキシエチルカルバメート		5' C2
コレステリル 3-ヒドロキシプロピルカルバメート		5' C3
コレステリル 4-ヒドロキシブチルカルバメート		5' C4
コレステリル 5-ヒドロキシペンチルカルバメート		5' C5
コレステリル 6-ヒドロキシヘキシルカルバメート		5' C6
コレステリル 8-ヒドロキシオクチルカルバメート		5' C8

10

20

30

40

【表 2 - 2】

化合物名	構造式	略号
コレステリル 12-ヒドロキシオドデシルカルバメート		5' C12
コレステリル 4-(ヒドロキシメチル)フェニルカルバメート		5' ABA
コレステリル 4-ヒドロキシピペリジン-1-カルボキシレート		5' PIP

10

20

## 【0336】

以下の表 3 に、リンカ分子構造部分の別の簡略名、およびオリゴヌクレオチドリン酸基とコンジュゲートのカルバメート結合部をつなぐ原子数をまとめた。

## 【0337】

【表 3】

化合物	省略名	siRNAとコンジュゲート部との間の原子数
C3	Chol-C3	3
PRO	Chol-PRO	4
C5	Chol-C5	5
PIP	Chol-PIP	6
ABA	Chol-ABA	7
C8	Chol-C8	8
Ac-C8		8
Chol-C6-Hp	Hp6	9
C10	Chol-C10	10
C14	Chol-C14	14
C14-Ac		14
C8+C6	Chol-C8+C6	15
PEG	Dharm	16
C8+C12	Chol-C8+C12	22

30

40

50

## 【0338】

註：ここで「Ac」は、コレステリル基と置き換わったアセチル基を示す。

## 【実施例52】

## 【0339】

<一般的な試験方法>

## 【0340】

コンジュゲートされたsiRNAの遺伝子発現ノックダウン能を試験するために、2.5 - 5Kの細胞(96穴フォーマット)を、10%ウシ胎仔血清(FCS)と懸濁させた培地(DMEM)にて、終夜(37、5%CO<sub>2</sub>)培養した。翌日細胞を被った培地を、0.1 - 2 μM濃度のG4オリゴヌクレオチド二本鎖複合体を含む無血清培地(例えば、希釈血清培地、MEM、HyCloneなど)と置換した。受動輸送のまま4時間から終夜放置し、続いて、培地を交換(培地+FCS)して更にインキュベーションした(一般的に48時間 - 72時間)。

10

## 【0341】

脂質輸送は、以下の条件で行った：10,000細胞、DMEM、0.2 μ/ウエル ダーマFECT1、24時間インキュベーション、1 - 100 nmol siRNA。エレクトロポレーションの輸送条件は、20,000細胞、DMEM、矩形波プロトコール、24時間インキュベーション、133ナノモルsiRNAで行った。

## 【0342】

この試験でアッセイされた標的遺伝子の多くは、ヒト細胞株でPPIB(NM\_011149)、マウス細胞株でGAPDH(NM\_0010001303)である。配列は、二本鎖で、hPPIB#3(センス：5'ACAGCAA AUUCCAUCGUGU)(SEQ ID NO:1)、およびmGAPDH(センス：5'CACUCAAGA UUGUCAGCAA)(SEQ ID NO:2)である。

20

## 【0343】

全ての実験において、総合的な培養生育力を非処理または偽処理細胞とAlamar blue(Biosource International社)を用いて比較し、標的ノックダウンを分岐状DNA(BDNA, Genospectra社)を用いて評価した。ヒト細胞株には、非付着細胞株ではTHP-1、Jurkat、付着細胞株ではSHSY5Y、HeLa、HeLa-S3、MCF10A、293T、MCF7、およびHuVECを使用した。マウス細胞株の実験には、3T3NIHおよびES-D3細胞(両者ともに付着細胞)を使用した。

30

## 【0344】

<総体的遺伝子プロファイル分析方法>

siRNAをトランスフェクトした細胞の遺伝子プロファイルを評価するのに、以下のプロトコールを用いた。

## 【0345】

## 1. 試料採集方法

マイクロアレイ分析用のウェルプレートが減圧して培地を除去した。70 μLのRLTバッファ(Qiagen, Cat. #79216)を用い、業者の手引書に従ってベータ-メルカプトエタノールの1:100希釈液で細胞を添加した。その日のうちに全RNA精製を行わない場合は、同じウェルプレートをプールして試料を-80で保存した。

40

## 【0346】

形質移入効率評価用のウェルプレートは、1) bDNA(Quantigene: Panomic社、フレモント、カリフォルニア)を用いたポジティブおよびネガティブコントロール標的遺伝子のsiRNA媒介ノックダウン、および、2) alamarBlue™アッセイ(Biosource、Intl、カマリコ、カリフォルニア)を用いた培地生存能によって評価した。これら二つのアッセイは、ともに互換的であり、一つのプレート上でアッセイができる。生存能(90 - 95%生育能)およびノックダウン閾値(ポジティブコントロールsiRNAにおける90%基準ノックダウン)の基準を満たした形

50

質移入を、マイクロアレイアッセイ許容とした。

【0347】

2. 定量性の評価方法ならびに発現プロファイリング用RNAの定量方法

Qiagen社のDNaseを有するRNeasy Miniカラムを用い、業者のプロトコール ([http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/PDF/RNASTabilizationAndPurification/FromAnimalAndPlantTissuesBacteriaYeastAndFungi/RNY\\_Mini/1035969\\_HB\\_BenchProtocol.pdf](http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/PDF/RNASTabilizationAndPurification/FromAnimalAndPlantTissuesBacteriaYeastAndFungi/RNY_Mini/1035969_HB_BenchProtocol.pdf)) に従って、全RNAをライセートから単離した。全RNA濃度は、NanoDrop (NanoDrop社、ウイリントン、デラウェア) によりアッセイし、試料を100ng/μL (一般的な収量 > 100ng/μL) に希釈した。必要に応じて、試料は-80℃で保存可能である。全RNAの品質は、2100Bioanalyzer (Agilent社、サンタクララ、カリフォルニア) を用い、6000NanoLabChipにて評価した。試料として許容されるものは、少なくとも9のRNA Integrity Number (RIN) を有し、-80℃で保存可能である。

10

【0348】

3. RNA増殖方法およびラベル化方法

全RNAを増殖し、Low Input RNA Fluorescent Linear Amplification Kit (Agilent社、サンタクララ、カリフォルニア) を用い、業者のプロトコール (<http://www.chem.agilent.com/>) に従ってラベルした。Cy5CTPおよびCy3CTPは、Perkin Elmer社 (ウエルズリー、マサチューセッツ) より入手した。一般に、一回の処理には650ngの全RNAを使用した。実験試料はCy5でラベル化し、偽試料 (脂質処理の) はCy5とCy3で別々にラベル化した。非トランスフェクト試料はCy3でラベル化した。過剰の色素をラベル化した試料からQiagen RNeasy Miniカラムで、Agilentのプロトコールに記載されるように、2回1分「ドライ」スピンをかけて除いた。

20

【0349】

ラベル化試料の収量は、NanoDrop機器 (NanoDrop社) により定量した。一般に、全RNA650ngから300-500ng/μLのラベル化試料が得られ、フルオロフォア (Cy3はピンク、Cy5は青) によって統一して色分けした。色素導入の評価は、NanoDrop機器に関する「マイクロアレイ」プロトコールに従い、各々の色素の波長 (Cy3: 550nm、Cy5: 650nm) を測定して行った。

30

【0350】

4. ハイブリダイゼーション方法およびスキャニング方法

ヒト1A (V2) マイクロアレイ (Agilent) へのハイブリダイゼーションは、一アレイごとのCy5およびCy3ラベル化試料各750ngを用い、業者の手引書に従って行った。試料は以下の通りである:

- i) siRNAで形質移入した試料 (Cy5) は、それぞれ偽トランスフェクト試料 (Cy3) をレファレンスにおいてハイブリダイズした。
- ii) 形質移入による遺伝子発現効果を調べるためのコントロールアレイを、偽形質移入 (Cy5) および非形質移入 (Cy3) 試料を用いて組み入れた。
- iii) 色素偏向標的を検知するのみならず、非siRNA処理のシグナル/発現レベルを評価するためのコントロールアレイを、偽形質移入 (Cy5) および偽形質移入 (Cy3) 試料 (自アレイ - 自アレイ) を用いて組み入れた。

40

【0351】

60、17-20時間ハイブリダイゼーションを行った後に、0.0025% N-ラウロイルサルコシンを用い、アレイを6Xおよび0.06XのSSPEで洗浄した。続いて、アレイをアセトニトリルに浸し、非水系の乾燥および安定化バッファー (Agilent) にて洗浄した。アレイは、Agilent社製モデルG2505Bスキャナーを用いて分析し、得られたtifイメージをFeature Extraction v9.1のデフォルトプロトコールに従って処理した。

【0352】

50

## 5. データ分析

データ分析は、先ずマイクロソフト社製のエクセルを用いて行った。ファイルは、特徴識別をする列（識別番号、並、列、コントロールタイプ、遺伝子名、系統名、および利用可能な記述子）、および試料ごとに選ばれたデータ列（Log比、P値、Log Ratio、g Processed Signal、r Processed Signal、g Is Well Above BG、r Is Well Above BG）で構成した。偽アレイ - 偽アレイからとった飽和シグナルの処理データは、偽アレイ - 偽アレイから計算した赤色および緑色シグナルの合計の対数値（g Processed Signal + r Processed Signal）を示した列とともに、別の列に、飽和した緑色のシグナルを（g Is Saturated）として、また、飽和した赤色のシグナルを（r Is Saturated）のように記録した。

10

### 【0353】

更に、Functional Genomics Moduleを用いて、Spotfire Decision Site 8.2による分析を行った。データは、先ず、コントロールプローブおよび低シグナル/低発現プローブで、シグナル（Log比 - 0.3）の2倍減衰を正確に検知することが困難な配列を除くためにフィルタにかけた。この処理は、偽アレイ - 偽アレイからのLog値（合算シグナル）が2.8以下、または約630ピクセル以下であるプローブをフィルタにかけることで達成した。処理したシグナルの絶対範囲は、1バッチのアレイ全ての中からそれぞれのハイブリデーションができたことを確認して評価した。偽アレイ - 偽アレイにおける各チャンネルで飽和を示したプローブについても除外した。一般に、上で述べた手法を採ることによって、分析用のプローブセットは、21,073件から約13,000 - 15,000件にまで減少した。

20

### 【0354】

どの試料においても、2倍以上変化しないプローブ（即ち、 $-0.3 < \text{Log Ratio} < 0.3$ ）は除外した。残りのプローブは、非管理階層クラスタリング（非重み付け平均、ユークリッド距離、平均値）後にヒートマップ上にプロットした。また、siRNA処理試料列と偽 - 偽および偽 - 非形質移入 ハイブリダイゼーションとを更に比較することによって、これらコントロールアレイまたは本質的にノイズであるもの（例えば、試験中、3またはそれ以上のアレイにおいて対モック値が  $\text{Log Ratio} < -0.2$ ）のいずれかにおいて、特異的な発現を示すものは除外された。

30

### 【0355】

以下の全実施例において、G4 siRNAに関するオーバーハングはUUオーバーハングを有する。

### 【実施例53】

### 【0356】

< 5'位対3'位末端修飾に関する選択性の同定 >

先ず、コレステロール基結合が、siRNAセンス鎖の5'位または3'位末端に対してどのように影響を与えるのかを試験した。マウス3T3NIH細胞を先に述べた方法によって培養し、3種類の濃度（500 nM、1 μM、および5 μM）でコレステロールコンジュゲートsiRNA（二本鎖、mGAPDH 20:5' - CACUCAAGA UUGUCAGCAA - 3'）（SEQUID No: 3）と試験を行った。これら試験に使用されたリンカ分子は、オリゴヌクレオチドおよびコレステロールコンジュゲート部の間に16原子入ったPEGリンカ分子である。

40

### 【0357】

図8Aにこの実験結果を示したが、低濃度側（500 nM、1 μM）でセンス鎖3'末端にコレステロール結合した場合は、5'末端（囲み領域を参照）に結合した場合よりもsiRNA機能をよく保存した。どちらの場合も有意な毒性は示さなかった（データ示さず）。

### 【0358】

更に、センス鎖3'末端とアンチセンス鎖3'末端のコンジュゲートを有する二本鎖の効

50

果を比較する試験を行った。この試験では、リンカ分子にはC8を用いた。図8Bに示すように、明らかに3'末端の方が有効であった。このため、以下の試験ではセンス3'末端に位置するリンカ分子-コンジュゲートを使用した。

【実施例54】

【0359】

<好適なコレステロール媒介型核酸輸送用リンカ分子長の同定>

好適なコレステロール媒介型核酸輸送用リンカ分子長を同定するために、種類のリンカ分子長を有する3'センス鎖コレステロールコンジュゲートを持つマウスGAPDH標的siRNA二本鎖を合成した。そのリンカ分子配列を表1-1から表1-4に示した(上記参照)。配列どうしの比較は、受動、脂質媒介、およびエレクトロポレーションプロトコールに従って細胞に形質移入させて行った。更に、リンカ分子単独に比較して受動形質移入に対するコレステロールの寄与を測定するために、C14-アセチル基リンカ分子をこの試験に含めた。

10

【0360】

図9のデータが示すように、3種の輸送システム全てにおいて好適なリンカ分子長の範囲は狭く、特に、C5リンカ分子、PIP(C6)リンカ分子、およびABA(C7)リンカ分子が優れた抑制効果を示した。C3およびC8リンカ分子も、ある条件下ではよい抑制効果を示した。これらの試験から、4-8個の原子長を有するリンカ分子、特に5-7個の長さを有するリンカ分子が、核酸-コレステロール適用型として好適であることが同定された。

20

【0361】

このデザインを種類の細胞型における受動輸送に応用するために、マウスおよびヒト遺伝子標的かつ3'コレステロールコンジュゲート(C8リンカ分子)を有するsiRNAを、0.01-1マイクロモルの濃度にて、ヒト(非接着および接着)およびマウス(接着)細胞で試験した。

【0362】

これらの試験結果を図10A-10Eに示したが、短めの(C8)リンカ分子長において広い範囲で接着および非接着、ヒトおよび非ヒト細胞株に対して適用できることが示された。細胞濃度が2,500または10,000細胞/ウエルでもこの結果は同じであった。

30

【実施例55】

【0363】

<ヌクレオチド間結合部の修飾>

受動輸送におけるオーバーハング安定化効果を試験するために、マウスGAPDA標的およびコレステロールにコンジュゲートするセンス鎖3'末端にC8リンカ分子を有するsiRNAを、オーバーハングのホスフォロチオエートヌクレオチド間連結部を有するもの、有さないもので合成した。次に、マウス3T3NIH細胞(2,500細胞/ウエル)を、0.5および1マイクロモル濃度で希釈血清培地にて上記合成分子に暴露した。

【0364】

上記の試験結果を、図11に示したが、C8リンカ分子を有するコレステロールコンジュゲート部3'オーバーハングに安定化修飾を施したもののほど高い機能を発現することが示された。

40

【実施例56】

【0365】

<機能の向上がコンジュゲートの結果でありリンカ分子ではないことに関する証明>

先に観測したリンカ分子とコレステロール含有二本鎖の脂質非依存型輸送が、リンカ分子単独の結果であるか否かを決定するために、GADPH標的かつC8-コレステロール(センス鎖3'末端における)保有のsiRNAの機能を、アセチル基(つまり、コレステロール無しの)を末端とするC8またはC14リンカ分子保有の同じsiRNAと比較した。形質移入の条件は、先に述べた方法と同様(2.5k3T3NIH、72時間、Hy-

50

MEM-RS)であり、遺伝子ノックダウンの測定は、標準化にACTBを用いた分岐DNAによって行った。

【0366】

これらの試験結果を図12に示した。コレステロール結合GAPDH siRNAは、0.5マイクロモルにて強いノックダウン(~80%)を起こす一方、リンカ分子単独(つまり、C8-Ac、C14-Ac)の二本鎖は0.5、1.0マイクロモルいずれの濃度においてもノックダウンを起こなかった。これらの結果から、先に観測した非脂質媒介型輸送が、リンカ分子とコンジュゲート(コレステロール)との組み合わせの結果であることが明らかに示された。

【実施例57】

【0367】

<二本鎖設計用化学修飾パターン検証による機能増強組合せ方法の同定>

siRNA機能を増強することのできる化学修飾の特有の組み合わせ方法を同定するために、PPIBおよびGAPDH標的かつセンス鎖3'末端C8-コレステロール保有の二本鎖を、図13Aに示したセンスおよび/又はアンチセンス修飾パターンのリストに基づいて合成した。次に、これら合成分子を適当なタイプの細胞(例えば、HeLa又はNIH3T3細胞)に、0.5マイクロモル濃度、脂質非存在下で導入し、72時間後に遺伝子ノックダウン評価を行った。

【0368】

これらの試験結果を図13Bに示したが、この結果から、最も化学修飾された(つまり安定化された)siRNAが、この形の輸送に対して最も効果があることが証明された。特に、センス鎖の全Cおよび全Uに2'-O-メチル含有、センス鎖最初の2ヌクレオチドの2'-O-メチル修飾、アンチセンス鎖の全Cおよび全Uの2'F修飾、アンチセンス鎖3'オーバーハングのヌクレオチド間結合部のホスフォロチオエート修飾、を有する分子が、最も高い機能(75-95%ノックダウン)を発現した。先に実施例55に示したが、ASの3'オーバーハングにおけるホスフォロチオエートヌクレオチド間修飾を加えた分子が、著しくその活性を増強させた。ゆえに、オーバーハング安定化が活性に好ましいと思われる。また、どの実験においても問題となる毒性は見られなかった。

【実施例58】

【0369】

<G4媒介ノックダウンの動力学>

受動輸送媒介G4 siRNAによる遺伝子ノックダウンの動力学を明らかにするために、以下の実験を行った。第一の実験では、HeLa細胞(2.5k細胞/ウエル/96穴プレート)を、無血清培地(センス鎖5'GCUUCGAGAUUUCCGAGA3')(SEQ ID NO:4)中、P53(0.1、1.0μM)を標的とするG4 siRNA(具体的には、G4(-mm)siRNA)に、暴露した(回数は後記)。続いて、P53遺伝子ノックダウンのレベルを、24、48および72時間後に測定し、遺伝子ノックダウンが最適に見られる時間を同定した。

【0370】

これらの実験結果を図14Aに示したが、遺伝子ノックダウンの動力学は、どちらの濃度条件においても同じであることが示された。24時間後には約60%の遺伝子サイレンシングが観測され、72時間後にノックダウンレベルはピーク(~70-80%KD)に達した。これらの結果から、細胞へのG4 siRNA単回投与において遺伝子発現が速やかにノックダウンされることが示された。

【0371】

先の実験と平行して、G4 siRNAによるノックダウンの寿命を試験する実験を行った。PPIB)標的G4 siRNA(具体的に、G4(-mm)siRNA)を、0.1および1.0μM濃度にて希釈血清培地(センス鎖5'-ACAGCAAAUUCCAUUCGUGU3')(SEQ ID NO:5)中、細胞に導入した。24時間後に、培地を10%FCSに交換し、PPIBノックダウンレベルを、1、3、4、5、7、

10

20

30

40

50

および9日後に評価した。この試験結果より、1.0 μM濃度におけるG4 siRNA単回投与は、80%以上のノックダウンを最短でも4日間与えた(図14B)。よって、このようにして輸送されたG4 siRNAは、長い期間においても強いサイレンシングを起こすことが示された。

【実施例59】

【0372】

< G4誘発による内在的免疫応答およびオフ・ターゲットの影響の検証 >

脂質媒介形質移入による細胞へのsiRNA導入は、非特異的(内在的免疫性)および特異的(オフ・ターゲット媒介)応答の両方を誘発することが示された。実験データの解釈に際しこの効果が悪影響を与える可能性があるために、包括的遺伝子プロファイリングおよびサーチライトサイトカインアレイを用い、脂質媒介輸送siRNAを受動輸送G4 siRNAと比較検討した。

10

【0373】

< 内在的免疫応答 >

PPIB(具体的にG4(-mm))標的G4 siRNAを、0.1および1.0 μM濃度にて受動的に細胞に導入した。72時間後、細胞を採取しmRNAを包括的遺伝子プロファイリング用に(上記プロトコール参照)精製した。平行して、同一の配列をコレステロール-C5無しで合成し、リポフェクタミン2000(脂質)を用いて細胞(0.1 μM)に形質移入した。形質移入24時間後に、mRNA試料を同様にして調整しゲノムプロファイリングにより評価した。

20

【0374】

図15Aに示すように、脂質単独処理および脂質+siRNA処理は、約50ないし70個の遺伝子において2倍以上のアプレギュレーションを誘発した。これら遺伝子の多くは、前炎症性反応(例えば、CFHR5、IFI27、IL6、DDX58、IL8、IL1F9、ENST、CXCL1、G1P2、IFNGR1、IFIT2、IFIT1、CCL8、CXCL1、SERP1、CXCL3、HMOX1)に関連する遺伝子であったことから、この結果は、細胞を脂質および脂質+siRNA混合物に暴露すると細胞ストレスが誘発されることを示唆した。

【0375】

また、G4 siRNAを用いたsiRNAの受動輸送では、どの濃度においても脂質媒介輸送で見られた反応を、部分的に誘発したに過ぎなかった。G4 siRNA処理培養においてアプレギュレーションされた遺伝子総数は、図15Aに示すように脂質媒介輸送において見られた遺伝子数の三分の一未満であった。更に、この試験において3ないし4個の前炎症性遺伝子しか認められなかったことは、受動輸送による細胞障害の程度が脂質媒介輸送に比べて非常に低いことを示唆した。

30

【0376】

また、脂質媒介輸送siRNAおよび受動輸送G4 siRNAによる内在的免疫反応を定量するために、IL6およびIL8反応の分析をサーチライトTMアレイ技術(Pierce Biotechnology)を用いて行った。具体的には、2.5k HeLa細胞を、希釈血清培地(配列については下記表3参照)において、1)4種のG4 siRNA(-mm)のうちの1種、2)21bp siRNA(100nM、脂質輸送)、または3)脂質単独、と処理した。更に、サイトカイン反応を誘発することが知られている29bp siRNAを、ポジティブコントロールとして試験に加えた。72時間後、IL6およびIL8のレベルを製造元の手引き(<http://www.endogen.com/>)に従い、培地にて評価した。

40

【0377】



## 【表 4】

実施例 59 において用いられた配列

分子	5' 位から3' 位のセンス鎖配列	SEQ ID NO:
G4#1	GAUGGUGGGAAUUCGGGAA	6
G4#2	UGUUGGACUUCACGGGCAA	7
G4#3	GGAUUAUGAGAGACUGGAUU	8
G4#4	CCAUACGGCUCUAACAGAU	9
29 mer	UGGAAUGAGCUGAAAGGGACUCCAAGGA	10
21 mer	GAUGGUGGGAAUUCGGGAA	11

10

## 【0378】

図 15 B にこれらの実験結果を示した。脂質および脂質 + s i R N A が強い I L 6 および I L 8 反応 ( 6 0 0 - 2 , 5 0 0 ピコグラム / m L ) を起こす一方で、4 種の G 4 s i R N A 全てに対する反応は、培地コントロール ( < 5 0 ピコグラム / m L ) と同じであった。先の実験結果と合わせ、上記試験結果から、受動輸送 G 4 s i R N A は、内在的免疫反応をほとんどまたは全く起こさない効率的な遺伝子ノックアウトであることが示された。

20

## 【0379】

< オフ・ターゲット プロファイル >

受動輸送 G 4 s i R N A および脂質媒介輸送 s i R N A によるオフ・ターゲットの影響を比較する目的で、P P I B 標的二本鎖を、1) G 4 s i R N A 受動輸送 ( G 4 ( - m m ) 複合体を使用)、または、2) リポフェクタミン 2 0 0 0 媒介輸送 ( G 4 s i R N A の場合と同じ二本鎖オリゴヌクレオチドを使用、但し、コレステロール - C 5 無し) によって H e L a 細胞に導入した。続いて、細胞を採取し、上で述べたように包括的遺伝子プロファイリング用に処理した。各実験には、対照試料として、1) G 4 - s i R N A 用として希釈血清培地 ( 無 s i R N A ) にて同様に処理した細胞、2) 脂質処理試料用として、脂質処理した試料 ( 無 s i R N A ) を、加えた。

30

## 【0380】

図 15 C にオフ・ターゲット分析の結果を示した。どちらの輸送方法においても、標的 P P I B に対して 8 0 % を超える遺伝子ノックダウンを与えたが、オフ・ターゲットの影響に差が見られた。即ち、脂質媒介輸送において、T H C 1 9 7 8 5 3 5、F E R D 3 L、C 1 0 o r f 7 0、Y T H D F 1、C K L F S F 8、および S P C 1 8 を含む 6 つの異なる遺伝子が、約 2 倍以上のダウンレギュレーションを示すものとして同定された。これとは対照的に、先の 6 つのオフ・ターゲット遺伝子の何れの発現に対しても、G 4 s i R N A は最小の影響を与えたのみであった。つまり、G 4 s i R N A は、R N A 干渉 - 媒介遺伝子ノックダウンを行う時に、オフ・ターゲットの影響を限定する目的で使用できることが示された。

40

## 【実施例 60】

## 【0381】

< 無血清培地における G 4 s i R N A の安定性 >

希釈血清培地での G 4 s i R N A の安定性を試験する目的で、P P I B ・標的 G 4 s i R N A ( 5 ' - A C A G C A A A U U C C A U C G U G U ) ( S E Q I D N O : 1 2 ) センス鎖保有 G 4 ( - m m ) または非標的コントロール ( 5 ' - U A A G G C U A U G A A G A G A U A C ) ( S E Q I D N O : 1 3 センス鎖 ) s i R N A の保存溶液を、希釈血清培地 ( H y C l o n e ) にて調製し、+ 4 にて保存した ( G 4 s i R N A 濃度 : 1 . 0、0 . 5 および 0 . 1 μ M )。この + 4 G 4 保存溶液調製から、1、6、13、20、および 27 日後に、H e L a 細胞を D M E M + 1 0 % F C S 培地にプレーティング

50

した。次の日に、培地を除去して + 4 保存溶液に交換した。コントロールには、20にてパファ-保存された G 4 s i R N A を用いた。次に細胞を3日間培養し、遺伝子ノックダウンを評価した。

【0382】

図16にこれらの結果を示したが、希釈血清培地に G 4 s i R N A を30日間保存しても、遺伝子発現ノックダウン能力に何ら影響がなかった。1  $\mu$ M濃度における P P I B 遺伝子ノックダウンは、この実験を通して > 90%維持された。0.1  $\mu$ M濃度にては、遺伝子ノックダウンレベルは若干 (~ 80% K D) 低下したが、この効力は実験期間中維持された。0.5  $\mu$ M濃度における非標的コントロールは、全体の遺伝子発現には影響を与えなかった。以上の結果から、+ 4 希釈血清培地中 G 4 s i R N A は、遺伝子サイレンシング活性を著しく失活することなく保存できることが示された。

10

【実施例61】

【0383】

< G 4 s i R N A 細胞連続投与誘発による長期の遺伝子発現ノックダウン >

G 4 s i R N A が標的遺伝子に対し長期間ノックダウンを起こすために使用できるか否かを評価するために連続投与の実験を行った。この試験を行うために、以下のプロトコルを用いた(図17A参照)。

1日目: H e L a 細胞を D M E M 培地 + 10% F C S にプレATINGする。

2日目: 培地を、P P I B 標的、G A P D H 標的、または、非標的コントロール G 4 s i R N A (具体的に、G 4 ( - m m ) s i R N A ) 含有、0.1 - 1.0  $\mu$ M濃度、希釈血清培地に置換する。

20

3日目: 培地を D M E M + 血清に戻す。

5日目: 細胞を分け再びプレATINGする。

6日目: 細胞を無血清培地にて再度 G 4 s i R N A 処理する。

【0384】

細胞を繰り返して G 4 s i R N A に暴露するこのサイクルプロトコルを、30日間を通して繰り返した。2、6、14、18、22、および30日目において、処理された細胞試料は採取して分岐 D N A アッセイを用い標的遺伝子ノックアウトごとに評価した。

【0385】

図17Bにこの実験結果を示したが、上記のプロトコルを用いることで、G 4 s i R N A により、連続して遺伝子ノックダウンを達成できることが示された。0.5および1.0  $\mu$ M濃度において、80%を超える遺伝子ノックダウンがこの実験期間中全てにわたって維持された。また、0.1  $\mu$ M濃度では、遺伝子ノックダウンレベルは若干低下したが (~ 75% K D) , この実験期間中再びこのレベルは維持された。一方、非標的コントロールによる実験結果は、非処理細胞の結果を反映した。G A P D H 標的 G 4 s i R N A コントロール(0.5  $\mu$ M)は、例外データ(26日目)を除き、強いノックダウン (~ 80%) を起こし、~ 50%サイレンシングを示した。総体的に言って、この実験結果から、プラスミドまたはウイルス媒介 R N A 干渉のように、G 4 s i R N A 連続投与によって長期に渡る遺伝子ノックダウンが可能であることが示された。

30

【実施例62】

40

【0386】

< C 5 リンカ分子と互換性のある別のコンジュゲートの同定 >

3' センス鎖 C 5 リンカ分子を持つ s i R N A と、別のコンジュゲート部を持つ s i R N A との互換性を試験する目的で、P P I B または G A P D H を標的にする機能二本鎖を、コレステロール、スチグマステロール、プレグネロン、アンドステロン、エルゴステロール、またはコラン酸をコンジュゲート部として(図18A参照)合成した。各分子は、先に述べた方法で合成した。こうして得られた複合体は、G 4 のコレステロールがコレステロール、スチグマステロール、プレグネロン、アンドステロン、エルゴステロール、またはコラン酸に置き換えられていることを除いて、G 4 複合体(具体的に、G 4 ( - m m ) 複合体)と同じ修飾パターンを示した。

50

## 【0387】

合成に続いて、受動輸送による目指す遺伝子標的への各分子のノックダウン能を、以下のようにして試験した。(1) HeLa細胞(2.5k細胞/ウエル、96穴プレート)を完全培地(DMEM+10%FCS)中、培養した。(2) 0.1-2.0 $\mu$ M濃度にて試験分子を含む希釈血清培地に、培地を交換する。24時間後、DMEM+10%FCSに培地を交換する。試験分子を処理して72時間後、データ標準化ごとに、非標的二本鎖処理細胞または非処理細胞を用いて遺伝子ノックダウンを評価した。

## 【0388】

図18Bから図18Dにこの実験結果を示した。以下にその結果をまとめる。

## 【0389】

コレステロールおよびスチグマステロール：コレステロール(CHLN)およびスチグマステロール(STIG)にコンジュゲートしたPPIB siRNAは、コレステロールにコンジュゲートした分子と同様に機能し、0.1 $\mu$ Mと低濃度にて80%を超えるノックダウンを起こした。同じコンジュゲートパターンを有するGAPDH標的分子は、非ヒト細胞(マウス3T3NIH)においても効果を示すことが分かった。この結果から、コレステロールおよびスチグマステロールコンジュゲートリンカ分子コンジュゲーションを有するsiRNA受動輸送が、広い範囲で適用可能であることが示唆された。

## 【0390】

エルゴステロール：C5リンカ分子を介したエルゴステロール(ERGO)にコンジュゲートしたPPIB siRNAは、1 $\mu$ M、2 $\mu$ Mの濃度において、それぞれ約60%、約80%の遺伝子ノックダウンを起こした。また、低い濃度では受動輸送が急勾配で低下した。マウス3T3NIH細胞を用いた実験においても、同じ結果が得られた。

## 【0391】

プレグネロンおよびアンドステロン：C5リンカ分子を用いたセンス鎖3'末端へのプレグネロンまたはアンドステロンの結合は、試験したどの濃度においても標的遺伝子発現のサイレンシングを起こさなかった。この結果は、用いた細胞株(HeLaまたは3T3NIH細胞など)によらず観測された。

## 【0392】

以上の結果から、数多くの部分構造が、siRNAセンス鎖3'末端に効果的にコンジュゲート(C5リンカ分子使用)して受動輸送および強い遺伝子ノックダウンを起こすことができることが同定された。また、必ずしも全てのステロール化合物が、この形の受動輸送において互換性があるとは限らないことが証明された。

## 【実施例63】

## 【0393】

<G4 siRNA受動輸送に血清およびコレステロール結合タンパク質が与える影響>  
コレステロールコンジュゲートsiRNAの受動輸送に様々な組織培養の条件が及ぼす影響を明らかにする目的で、2種類の実験を行った。第1の実験では、受動輸送中、血清濃度を変化させたときの遺伝子ノックダウンレベルを測定した。このために、2.5k 3T3NIH、HeLa、およびSHSY-5Y細胞を、10%FCSで懸濁させたDMEM培地にて先ず終夜培養した。翌日、培地を除去し、(1)GAPDHまたはPPIB(センス鎖PPIB69 5'UCACGACAGUCAAGACAGC3'(SEQ ID NO:14)およびPPIB39センス鎖5'CAGCAA AUUCCAUCGUGUA3'(SEQ ID NO:15))標的のG4 siRNAを0.1-1 $\mu$ M濃度で含む、または(2)ウシ胎仔血清(FCS)を0-10%(v/v)の濃度範囲で含む、希釈血清培地と交換した。更に48時間細胞を上記条件下で保ち、分岐DNAを用いて遺伝子ノックダウンを評価した。G4 siRNAには全てG4(-mm)を用いた。

## 【0394】

図19Aから図19Cに示したように、この実験結果から、G4 siRNAの受動輸送は、その受動輸送中、培地での血清濃度に強く依存することが示された。2.5%FCSのような低濃度側では、遺伝子ノックダウンレベルに全体として若干影響した。一方、高濃

10

20

30

40

50

度側では、G4 siRNAの受動輸送に作用し、遺伝子ノックダウンに著しい影響を与えた。

【0395】

ウシ胎仔血清には、コレステロールに関連した多種のタンパク質及びタンパク質複合体が含まれる。次に、3種のコレステロール結合タンパク質(LDL、HDL、およびアルブミン)が、FCSによるG4 siRNA媒介遺伝子ノックダウンの抑制に關与するか否かを試験する目的で、FCSに代わりLDL、HDL、またはBSAの何れかで置き換えて上で述べた試験を繰り返した。この試験結果より、上記3種のコレステロール結合タンパク質のいずれを培地に加えても、G4 siRNAの受動輸送が強く抑制されることが示された。図19D参照。

10

【実施例64】

【0396】

<生体内におけるG4の効果>

遺伝子サイレンシングを起こすG4 siRNAの生体内での効果を試験する目的で、以下のように設計されたsiRNAを合成した。

1. 非標的コントロールG4(-mm)、(5' U A A G G C U A U G A A G A G A U A C、センス鎖)(SEQ ID NO:16)

2. PPAR- 標的G4(-mm)、(5' G A C A U G A A U U C C U U A A U G A、センス鎖)(SEQ ID NO:17)

3. アポB標的G4(-mm)(5' G U C A U C A C A C U G A A U A C C A、センス鎖)(SEQ ID NO:18)

20

4. HP6リンカ分子を介するコレステロールコンジュゲート含有アポB標的siRNA(C5リンカ分子の代わりにHP6リンカ分子である点を除いて上記3に同じ)

【0397】

図20AにC5およびHP6リンカ分子の構造式を示した。それぞれの分子は、体重20-30グラムの雄ICRマウス(1群5匹)に導入し、生理食塩水をコントロールとして与えられたマウスと遺伝子ノックダウン能を比較した。投与は、50mg/kg、尾静脈低圧静注、一日一回投与にて、3日連続して行った。最後の静注から72時間後、マウスを処理し、肝臓、脾臓、肺、心臓、および腎臓から組織を取り出した。取り出した組織は4つの部位に解剖され、液体窒素にて瞬間冷凍し、-80で保存した。全RNAはTRIzol<sup>®</sup> Plus RNA Purification System社(Invitrogen、カタログ番号-12183-555)を用いて精製し、mRNAノックダウンを分岐DNA(Panomics社)にて分析した。

30

【0398】

図20Bで示すように、先の2つの遺伝子実験(アポBまたはPPAR-)のうち少なくとも1つの実験において、生体内で輸送されたG4 siRNAは、脾臓、肝臓、心臓、および肺にておよそ50%の遺伝子ノックダウンを起こした。即ち、この分析結果より、最適化していない輸送方法でも、G4 siRNAは強い遺伝子ノックダウンを多種の組織で誘発することが証明された。また、リンカ分子を修飾することで組織特異的な差異も生じることを、図20Bに並んで示した。アポBのG4およびHP6媒介ノックダウン能は、腎臓、心臓、および肺で同様に見られた。他方、G4のC5リンカ分子は、脾臓および肝臓でノックダウン能を向上させた。従って、脾臓および肝臓組織において遺伝子ノックダウンが必要なときに、G4 siRNAは特に有用といえる。

40

【実施例65】

【0399】

<G4 siRNA機能を増強させる二次的構造の同定>

二次的構造の導入によって、全体の機能を増強させ得るか否かを明らかにする目的で、異なる位置でミスマッチを有するG4 siRNAを合成した。このために、センス鎖6位から10位でミスマッチとなる全ての可能なセンス-アンチセンス鎖を有する、低機能GAPDH標的siRNAを合成した。続いて、これら分子の各々が、受動輸送を介してGA

50

P D H ノックダウンを誘発する能力を、分岐 D N A を用いて評価した（受動輸送の条件：2 . 5 k H e L a 細胞をプレATING、s i R N A 濃度 = 0 . 1 μ M、または 1 μ M、希釈血清培地、7 2 時間後ノックダウンを評価）。

【 0 4 0 0 】

図 2 1 a にこの実験結果を示した。この結果から、センス鎖 6 位および / または 7 位にミスマッチを導入した場合、G 4 s i R N A 機能を非常に増強させることが証明された。この増強はミスマッチのタイプ（C - A = C - C など）に関連しないと思われ、この特徴は配列には依存しないことが示唆された。1 9 ヌクレオチド G 4 センス鎖および 1 9 ヌクレオチド G 4 アンチセンス鎖に対して、センス鎖の 6 位および 7 位（5 ' 末端より番号を振って）は、アンチセンス鎖の 1 4 位および 1 3 位（5 ' 末端より番号を振って）とそれぞれ相対した。

10

【 0 4 0 1 】

6 位ミスマッチの効果を更に試験する目的で、センス鎖 6 位ミスマッチ（アンチセンス鎖では 1 4 位）を有する（G 4（- m m）など）、または保有しない（G 4（- m m）など）8 7 個の異なる h P P I B 標的 G 4 s i R N A を合成した。図 2 1 b に示したように、ミスマッチ導入により全体として遺伝子サイレンシング能の増強がこの数において認められ、遺伝子発現を 7 5 % サイレンシングする二本鎖数は、3 0 % から 4 3 % へと増加した。

【 実施例 6 6 】

【 0 4 0 2 】

< 遺伝子発現をサイレンシングする G 4 s i R N A の効果 >

広範な標的 m R N A をノックダウンするミスマッチ含有 G 4 s i R N A の効果を試験する目的で、ラットおよびマウス遺伝子（P P I B および G A P D H）とともに、ヒト遺伝子（L M N A、C D C 2、T P 5 3、A K T 1、R B 1、H R I、M E T、および P L K）を標的にする G 4（+ m m）s i R N A を合成し（配列およびアクセス番号のリストは以下の表 5 を参照）、先に述べたプロトコールに従い、個々の s i R N A または集団の s i R N A として、H e L a 細胞に受動的に 1 μ M で導入した。

20

【 0 4 0 3 】

図 2 2 に示したように、試験した 3 6 個の個々の二本鎖は 7 5 % 以上の遺伝子サイレンシング能を示した。また、これらの配列をプールして用いたときは、1 2 プール中 1 1 プールにおいて、遺伝子発現を 7 5 % 以上サイレンシングした。同様な結果が、抗生物質（アンピシリンなど）の存在に関わり無く得られた。これらの知見から、G 4 s i R N A は異なる種の広い範囲の遺伝子に対して適用可能であり、プーリング戦略とも併用可能なことが証明された。

30

【 0 4 0 4 】

【表 5】

標的記号	遺伝子名	アクセス番号	5'位から3'位のセンス鎖配列	SEQ ID NO:
LMNA	Lamin A/C	NM_005572	GCAACAAGUCCAUGAGGA	19
			UCACCGAGUCUGAAGAGGU	20
			GUGAGGAGUUUAAGGAGCU	21
CDC2	cell division cycle 2	NM_001786	CCAUGGAUCUGAAGAAUA	22
			UCCUAGUACUGCAAUUCGG	23
			GAGUUGUGUAUAAGGGUAG	24
TP53	tumor protein p53	NM_000546	UGCUCAGGGUCAAUUCUU	25
			CUCUUGUAUAUGAUGAUCU	26
			CCCUCACUGUUGAAUUUUC	27
AKT1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	NM_005163	GUGCCAUGAUCUGUAUUUA	28
			GUAUUUUGAUGAGGAGUUC	29
			GGUUUAAAUUUGUUUUUGU	30
RBI	retinoblastoma 1	NM_000321	GCUUUGAUUAUGAAGGAUC	31
			UCGUCAGGCUUGAGUUUGA	32
			CUUGUAACAUCUAAUGGAC	33
HRI	heme-regulated initiation factor 2-alpha kinase	NM_014413	CCAAAAUUCUGGAAUUGUU	34
			GUAGUUAAUCUGGAAUGUAA	35
			GUAUGAUUUUGCUGAAUUU	36
MET	met proto-oncogene	NM_000245	CCUGCAAUCUACAAGGUUU	37
			CUGUUGUCAUCAGAAGUA	38
			GCAUGAAGCAGGAAGGAAC	39
PLK	polo-like kinase 1	NM_005030	CCAAGGUUUUCGAUUGCUC	40
			GAAUUGUACAGAAUUAUUC	41
			UCGUAGGAUUCACGGGCUU	42
rPPIB	cyclophilin B	NM_022536	CCUUUGGACUCUUUGGAAA	43
			GCAAGUUCCAUCGUGUCAU	44
			UCAUUGUAGACUGUGGCAA	45
rGAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NM_017008	UCUACAUGUCCAGUAUGA	46
			CCAUGUAUCCGUUGUGGA	47
			CUGCCAAGUAUGAUGACAU	48
mGAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NM_008084	CCUGGUAUGACAAUGAAUA	49
			UCGUGGAGUCUACUGGUGU	50
			GUGUGAACCAAGAGAAUA	51
mPPIB	cyclophilin B	NM_011149	CCGUCGUCUCCUUUUGCU	52
			GAAAGAGCAUCUAUGGUGA	53
			GGUAUACUUUGAUUUACAA	54

実施例 66 で用いた、異なる 3 種の siRNA におけるセンス鎖配列

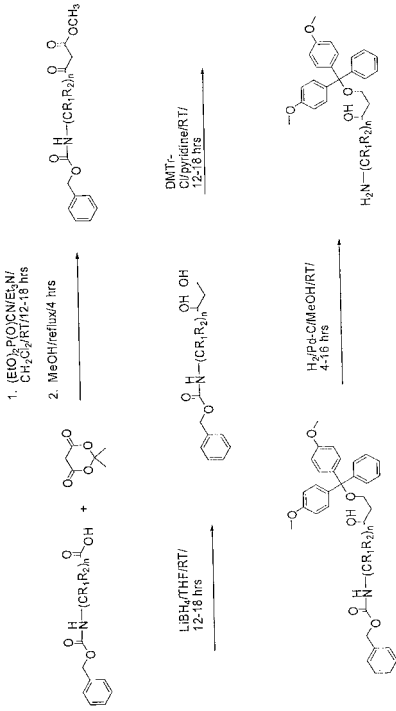
10

20

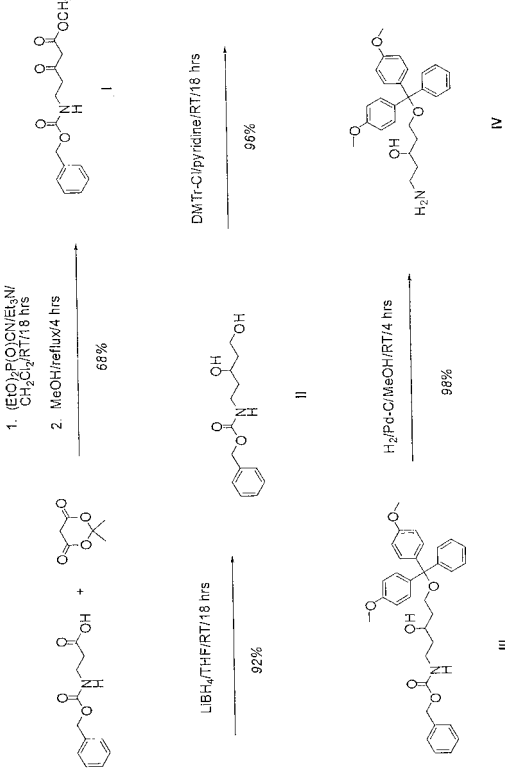
30

40

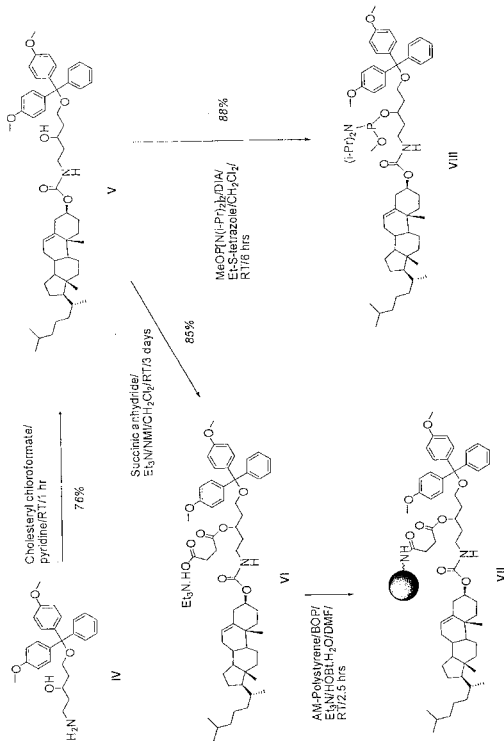
【 1 】



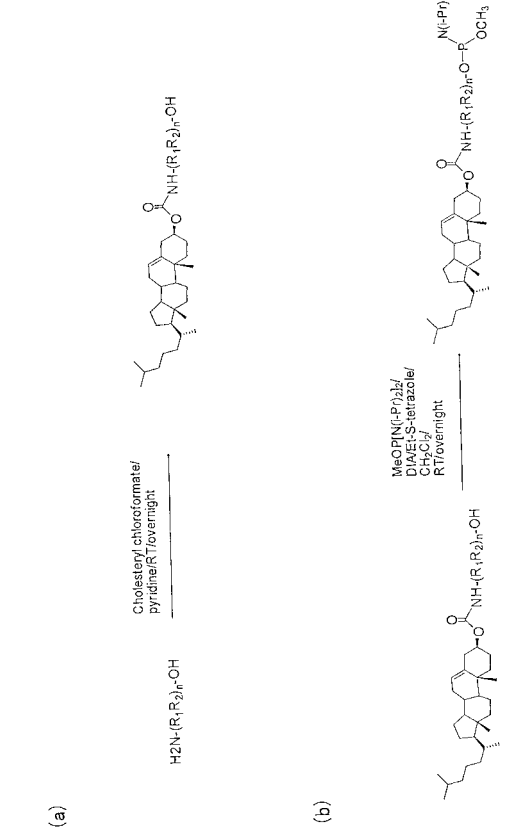
【 2 A 】



【 2 B 】



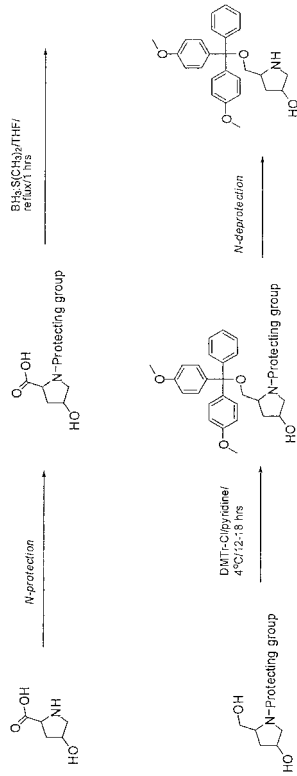
【 3 】



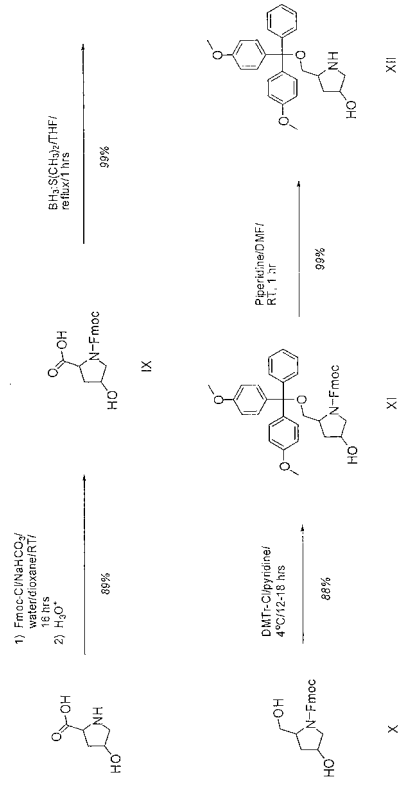
(a)

(b)

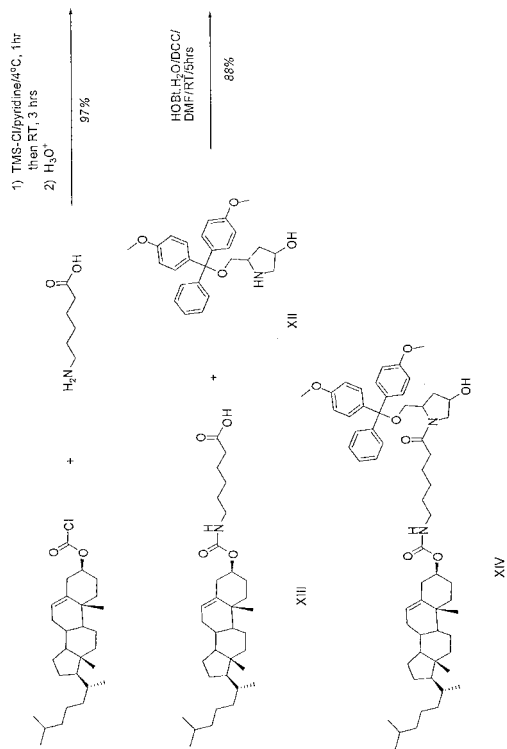
【 4 】



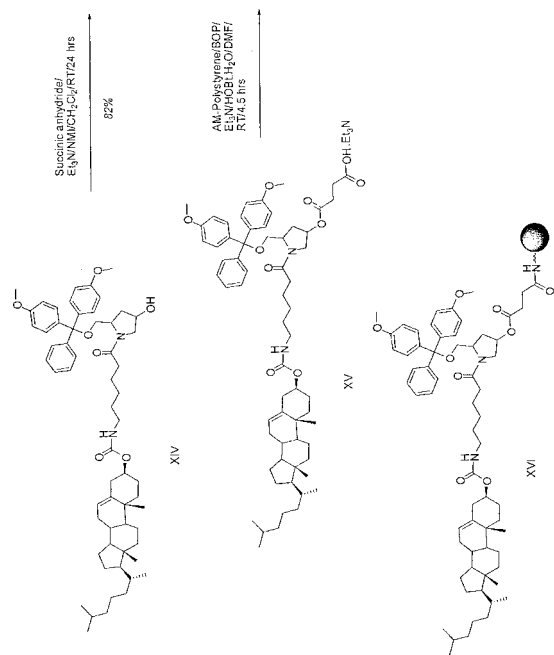
【 5 A 】



【 5 B 】

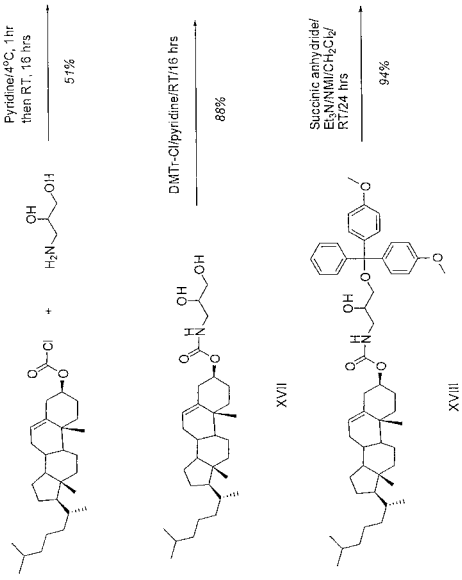


【 5 C 】

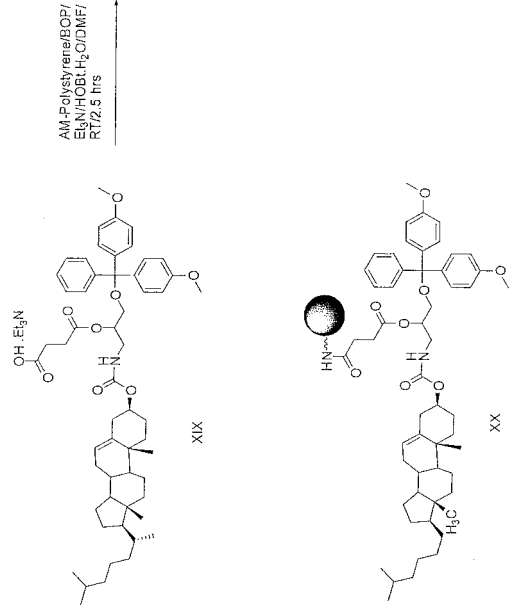




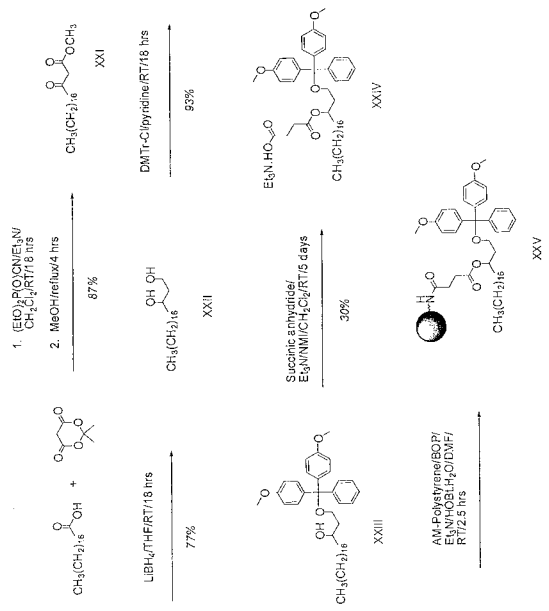
【 6 A 】



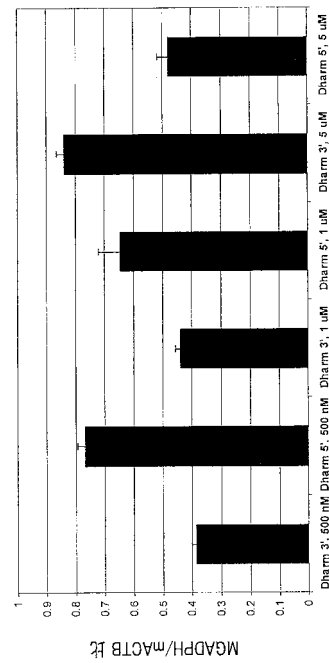
【 6 B 】



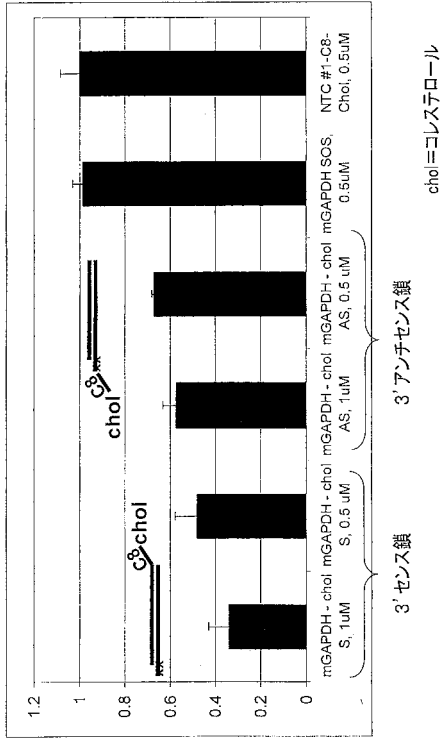
【 7 】



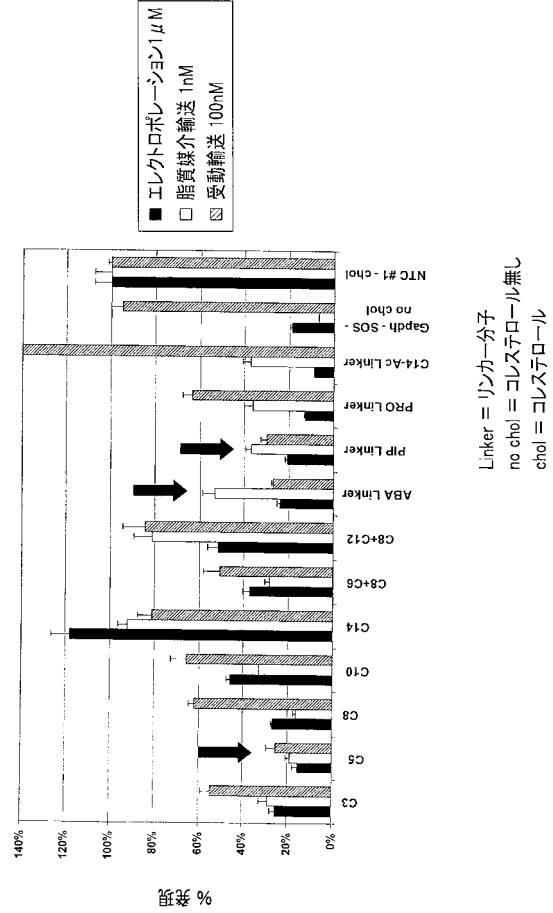
【 8 A 】



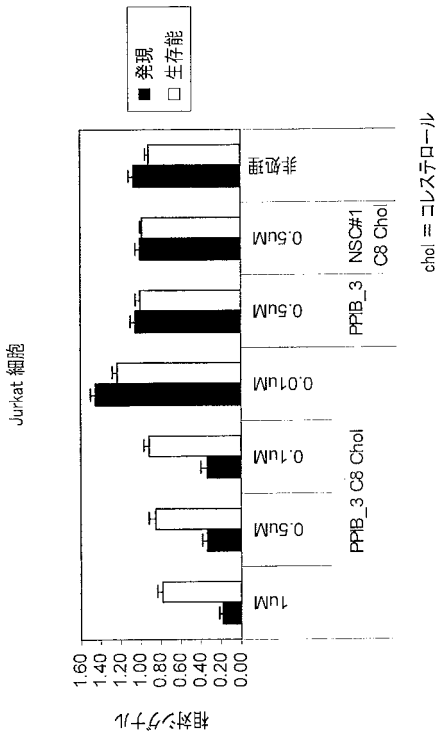
【 図 8 B 】



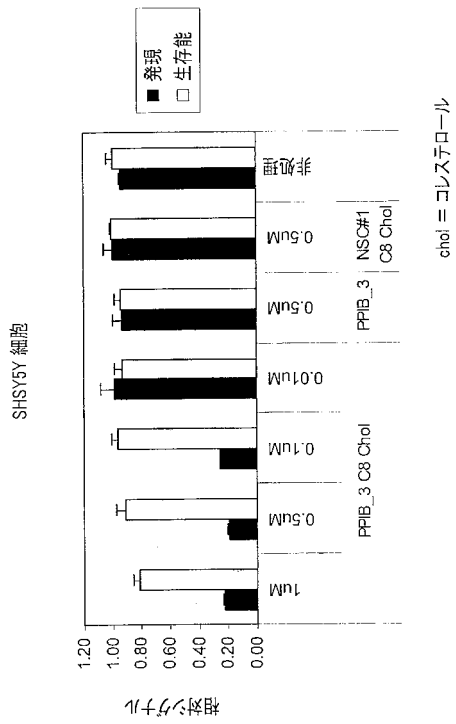
【 図 9 】



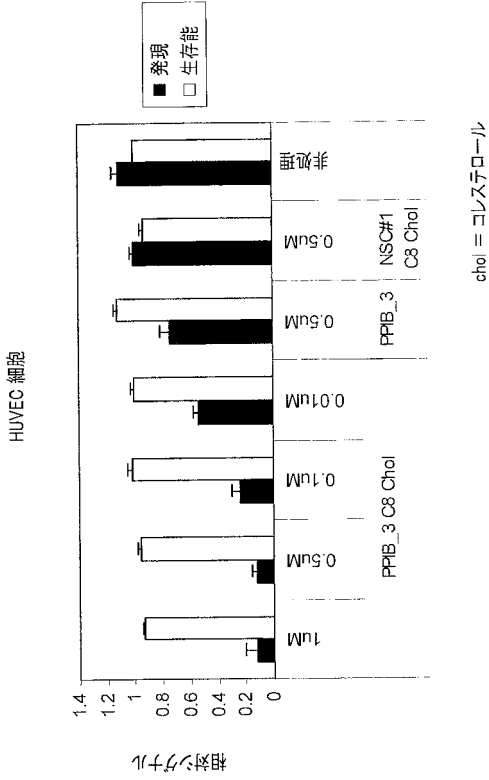
【 図 10 A 】



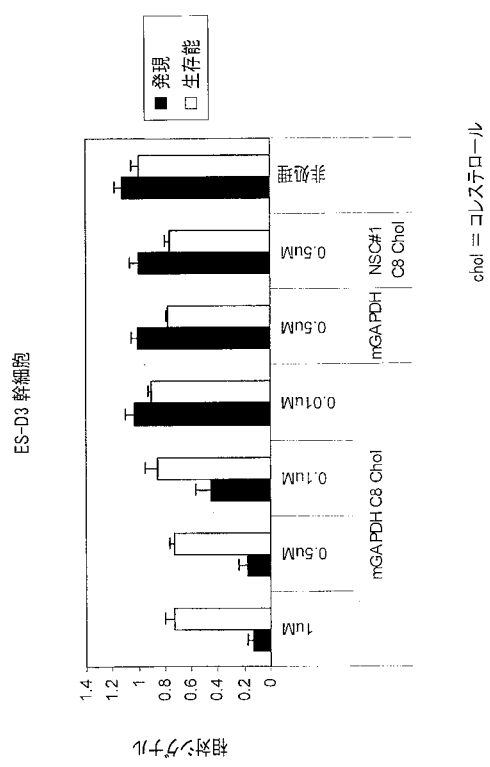
【 図 10 B 】



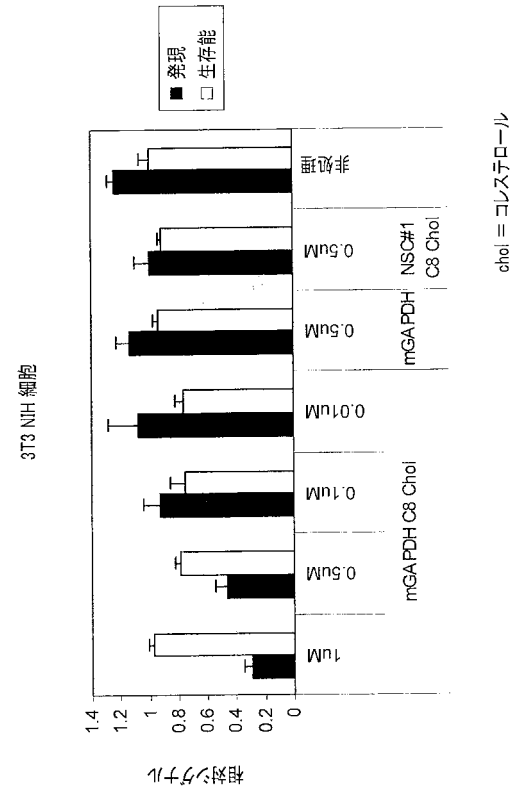
【図 10C】



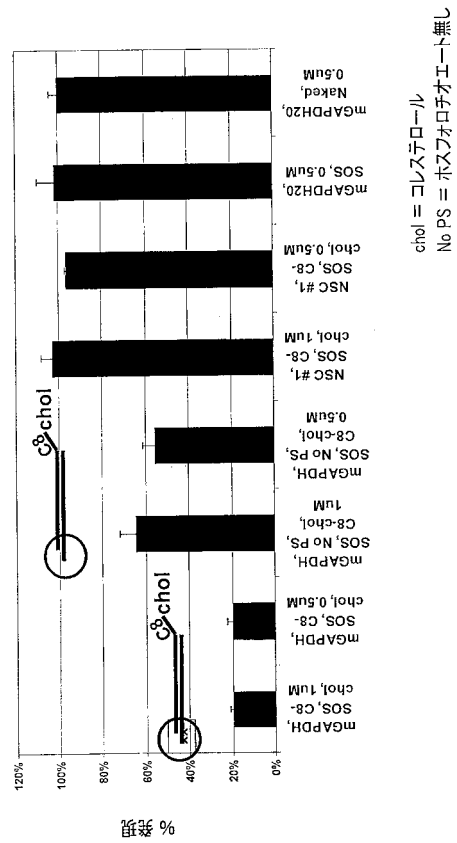
【図 10D】



【図 10E】

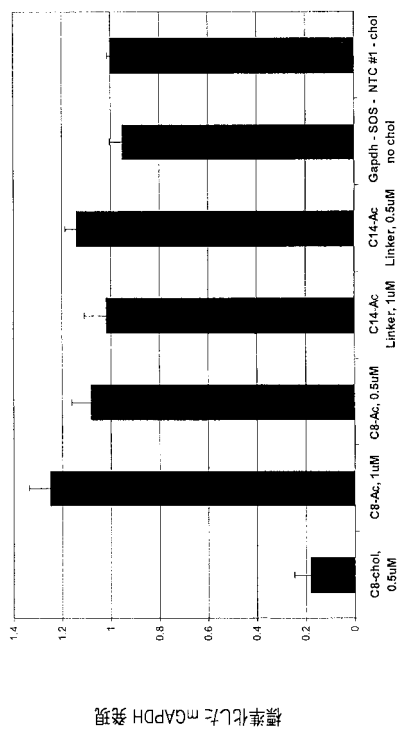


【図 11】



chol = コレスチロール  
No PS = ホスホオロチオエート無し

【 図 1 2 】



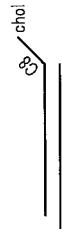
chol = コレステロール  
 no chol = コレステロール無し  
 Linker = リンカー分子

標準化した mGAPDH 発現

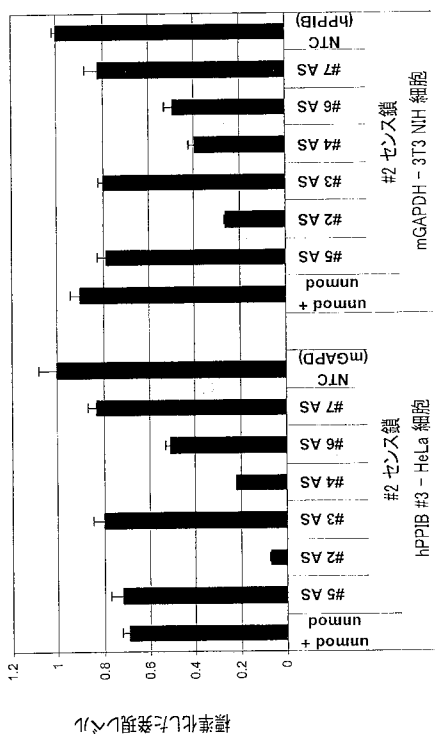
【 図 1 3 A 】

- センズ鎖
- 1 Unmod
  - 2 2'OMe C, 2'OMe U, 最初の2塩基 - 2'OMe - no overhangs
  - 3 2'OMe C, 2'OMe U, 最初の2塩基 - 2'OMe
  - 4 2'OMe C, 2'OMe U, 最初の2塩基 - 2'OMe
  - 5 2'OMe C, 2'OMe U, 最初の2塩基 - 2'OMe
  - 6 2'OMe C, 2'OMe U, 最初の2塩基 - 2'OMe
  - 7 2'OMe C, 2'OMe U, 最初の2塩基 - 2'OMe
- アンチセンス鎖
- 1 Unmod, 3'PO Overhang, 5'P
  - 2 2'F C, 2'F U, PS on 3' PS Overhang
  - 3 Unmod, blunt - 5'P
  - 4 Unmod, 3'PS Overhang, 5'P
  - 5 Unmod, 3'PS Overhang, 5'P
  - 6 Unmod, 2'OMe (5', 3'PS, 5'P より2番目の位置)
  - 7 Unmod, 2'OMe (5', 3'PO, 5'P より2番目の位置)

chol = コレステロール  
 Unmod = 非修飾  
 no overhangs = オーバーハング無し  
 Overhang = オーバーハング



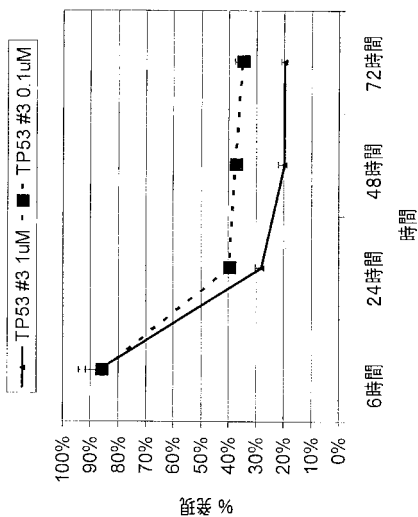
【 図 1 3 B 】



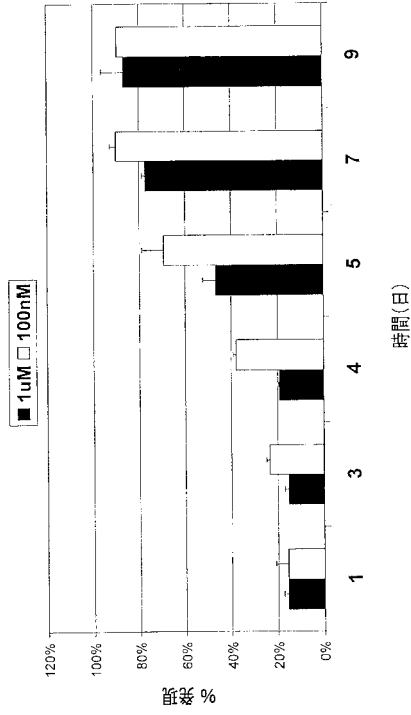
unmod = 非修飾

標準化した発現レベル

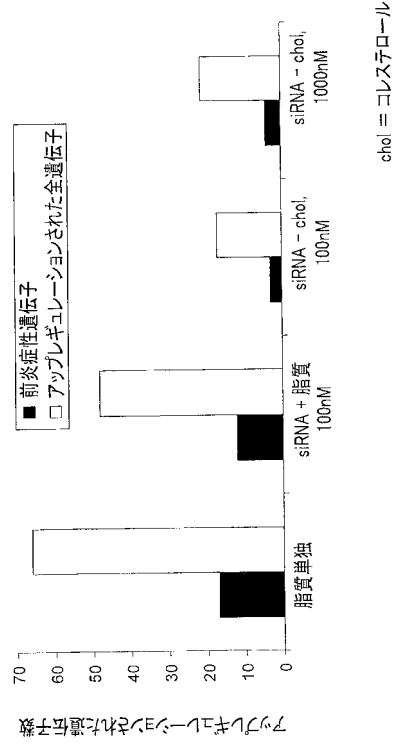
【 図 1 4 A 】



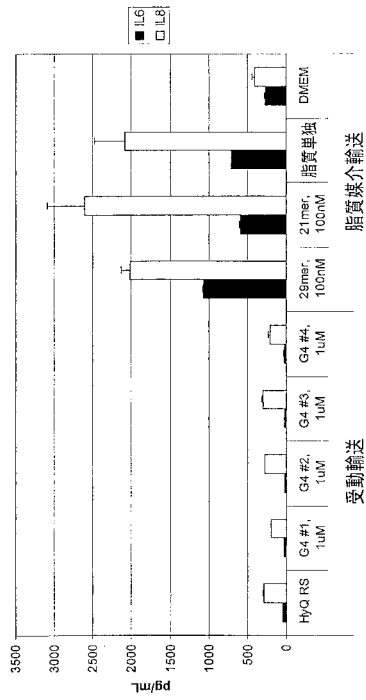
【図 14 B】



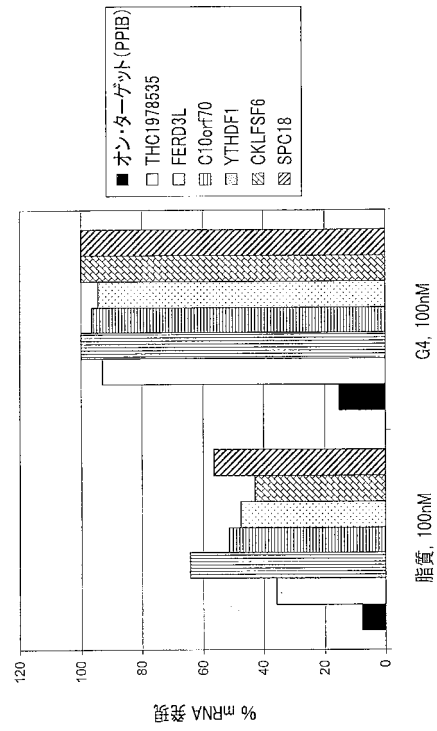
【図 15 A】



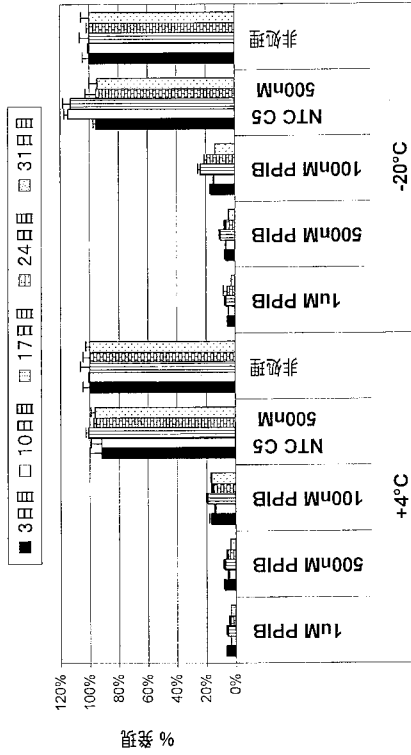
【図 15 B】



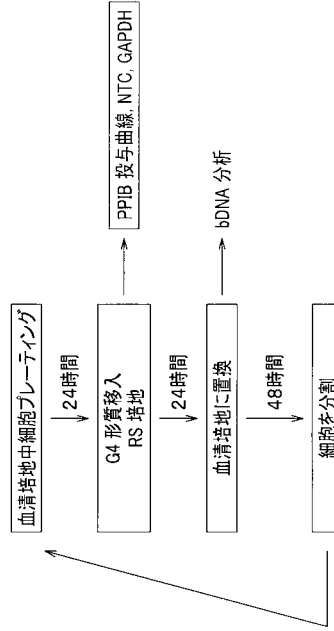
【図 15 C】



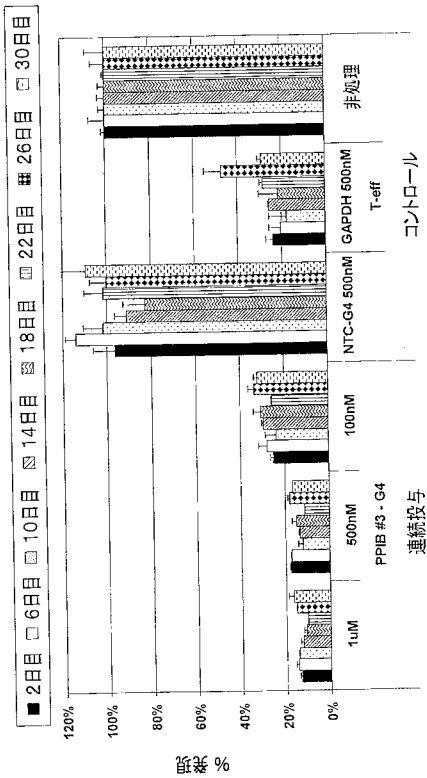
【 図 1 6 】



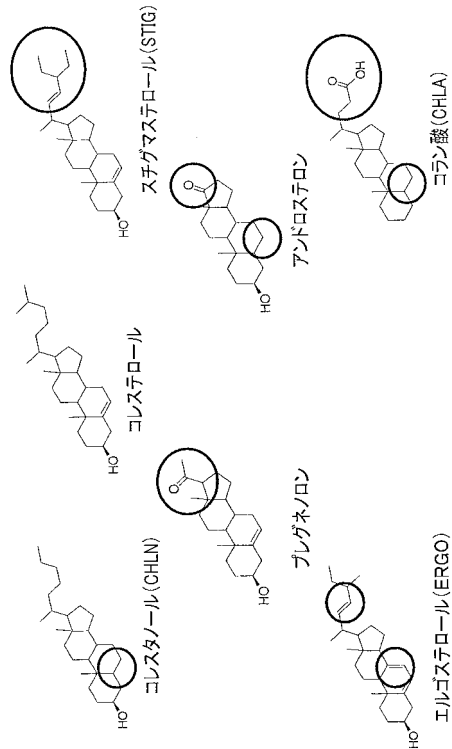
【 図 1 7 A 】



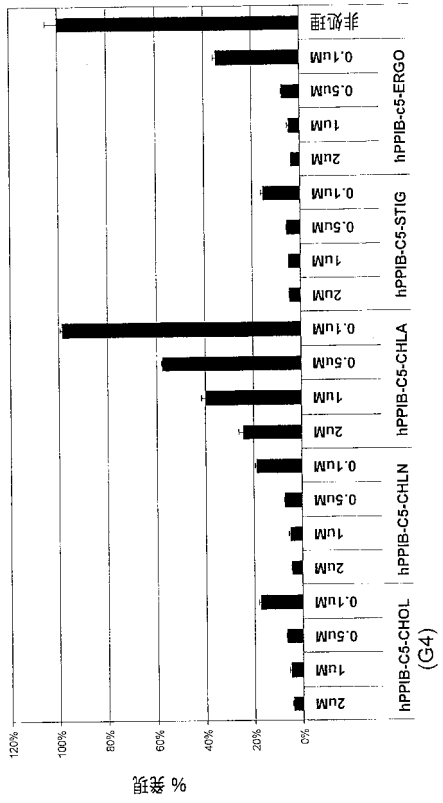
【 図 1 7 B 】



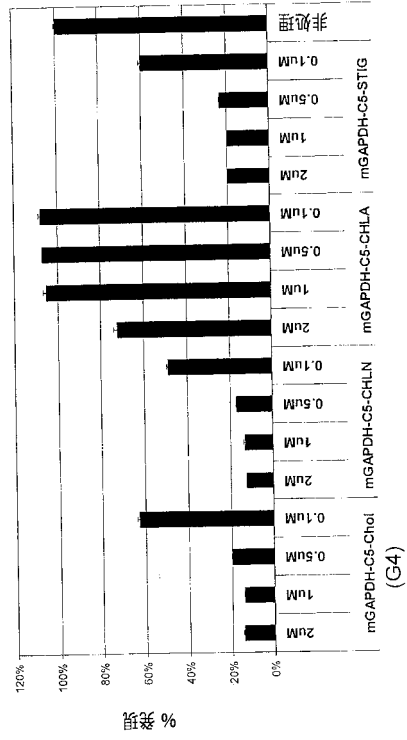
【 図 1 8 A 】



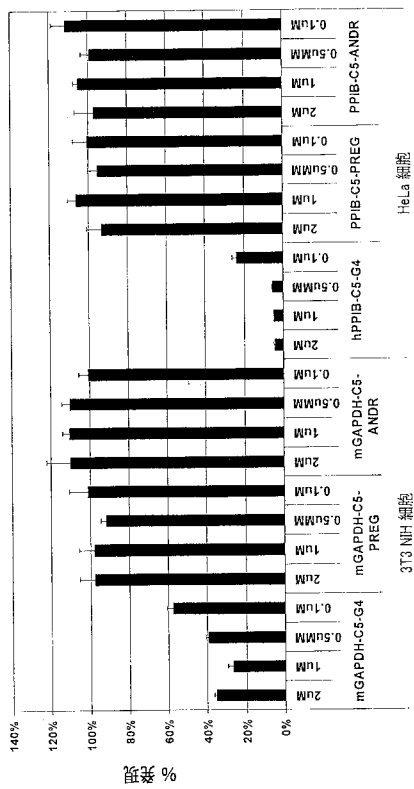
【 図 1 8 B 】



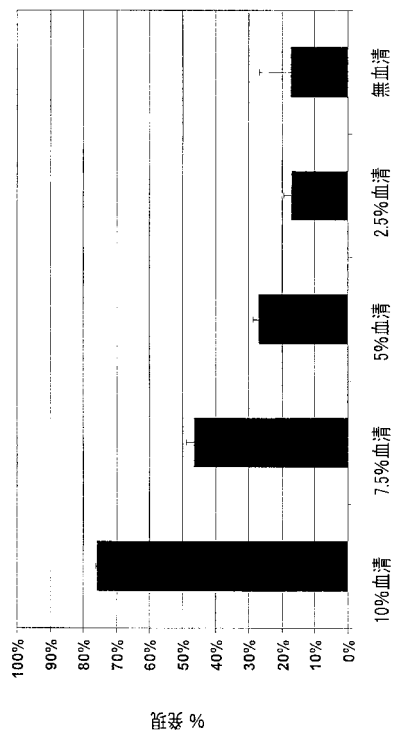
【 図 1 8 C 】



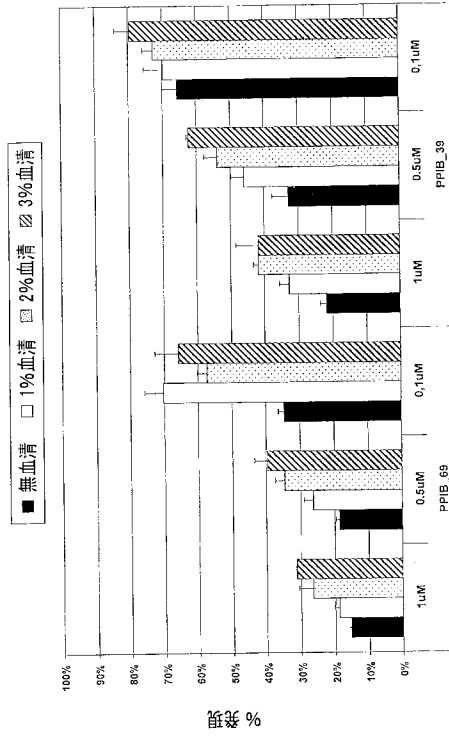
【 図 1 8 D 】



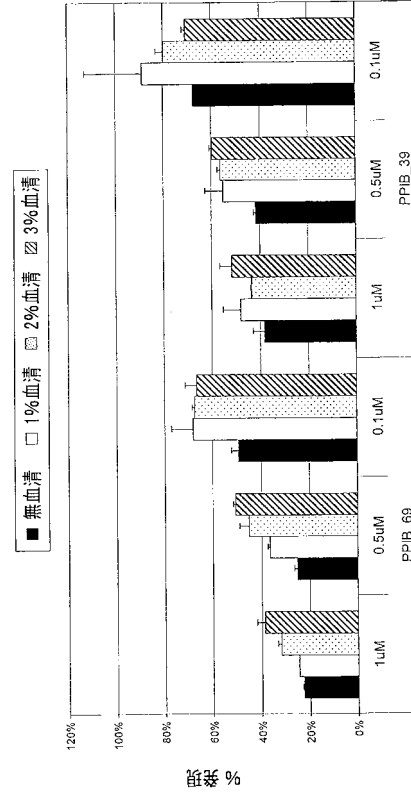
【 図 1 9 A 】



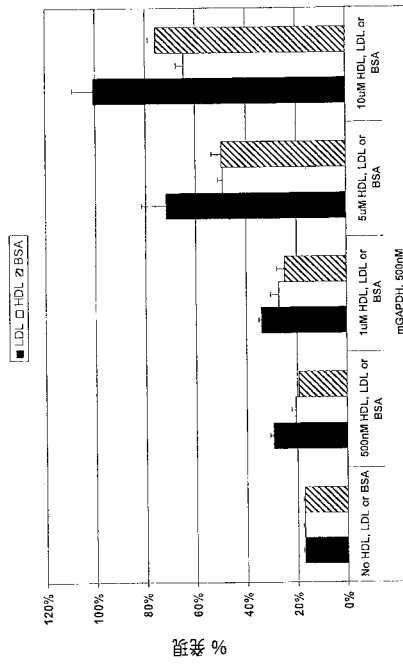
【図19B】



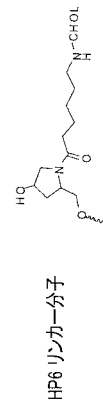
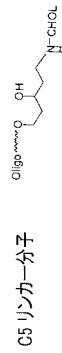
【図19C】



【図19D】



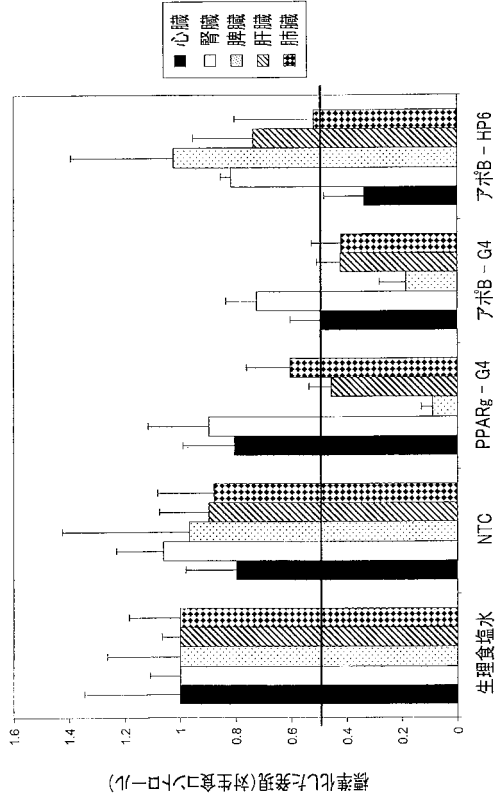
【図20A】



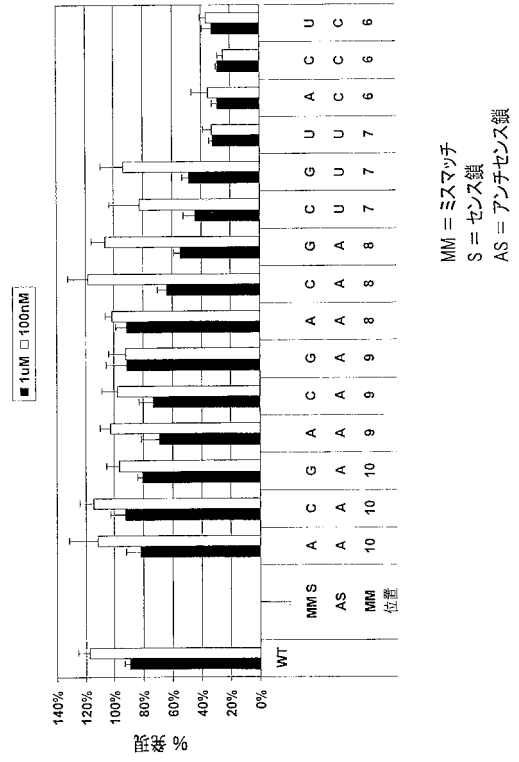
Oligo = オリゴスクレオチド  
 CHOL = コレステロール



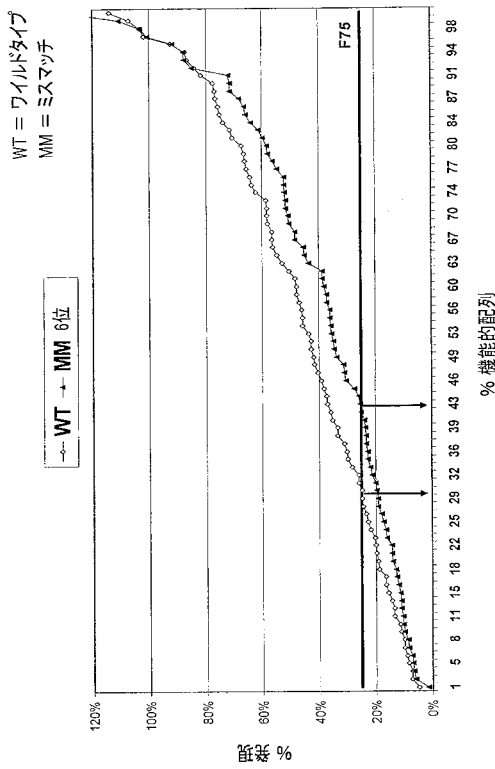
【図 20 B】



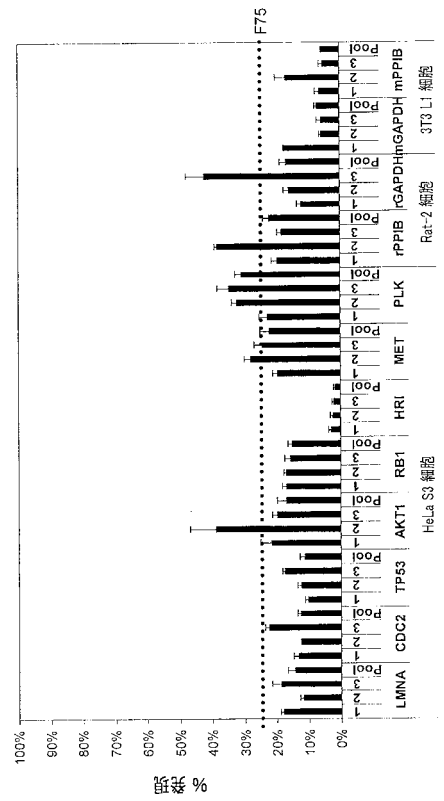
【図 21 A】



【図 21 B】



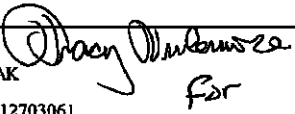
【図 22】



【配列表】

2010504355000001.xml

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US07/79051									
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC: C07H 21/02( 2006.01)  USPC: 536/23.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC											
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 536/23.1  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, SCISEARCH											
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Category *</th> <th style="width: 70%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="width: 20%;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">X</td> <td>US 2005/0176024 A1 (McSwiggen, et al.) 11 August 2005 (11.08.2005), p.4 paragraph 21; p.6, paragraph 34; p.18, paragraph 118; p.26, paragraph 187; p.41, paragraph 315.</td> <td style="text-align: center;">1-27</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">X</td> <td>US 2006/0094032 A1 (DeFougerolles, et al.) 04 May 2006 (04.05.2006), pages 2-3 and page 12, paragraphs 176-183.</td> <td style="text-align: center;">1-27</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	US 2005/0176024 A1 (McSwiggen, et al.) 11 August 2005 (11.08.2005), p.4 paragraph 21; p.6, paragraph 34; p.18, paragraph 118; p.26, paragraph 187; p.41, paragraph 315.	1-27	X	US 2006/0094032 A1 (DeFougerolles, et al.) 04 May 2006 (04.05.2006), pages 2-3 and page 12, paragraphs 176-183.	1-27
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
X	US 2005/0176024 A1 (McSwiggen, et al.) 11 August 2005 (11.08.2005), p.4 paragraph 21; p.6, paragraph 34; p.18, paragraph 118; p.26, paragraph 187; p.41, paragraph 315.	1-27									
X	US 2006/0094032 A1 (DeFougerolles, et al.) 04 May 2006 (04.05.2006), pages 2-3 and page 12, paragraphs 176-183.	1-27									
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.											
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family											
Date of the actual completion of the international search 11 August 2008 (11.08.2008)		Date of mailing of the international search report									
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer  JENNIFER PITRAK Telephone No. 5712703061									

## 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 48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	4 C 0 8 6
A 6 1 K 47/28	(2006.01)	A 6 1 K	47/28	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5

(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, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, IS, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 カイザー, ロブ  
 アメリカ合衆国、コロラド州 8 0 0 2 0、ブルームフィールド、ティール クリーク ドライブ  
 1 3 8 9 5

(72) 発明者 アンダーソン, エミリー  
 アメリカ合衆国、コロラド州 8 0 0 2 6、ラファイエット、ビー ミロ サークル 1 0 3 5

(72) 発明者 リーク, デビン  
 アメリカ合衆国、コロラド州 8 0 2 3 8、デンバー、クリントン ウェー 2 6 3 1

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA20 CA11 GA11 GA18 HA17  
 4B065 AA90X AB01 BA01 BC50 CA44  
 4C057 AA18 CC03 DD03 MM02 MM05  
 4C076 AA95 CC26 CC41 DD70 EE59 FF63  
 4C084 AA13 NA13 ZB212  
 4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA13 ZB21