

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2013-49714

(P2013-49714A)

(43) 公開日 平成25年3月14日(2013.3.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/14 (2006.01)	A 6 1 P 25/14 Z N A	

審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 163 頁)

(21) 出願番号	特願2012-263073 (P2012-263073)	(71) 出願人	505369158 アルナイラム ファーマシューティカルズ 、 インコーポレイテッド ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC. アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02 142, ケンブリッジ, サード スト リート 300
(22) 出願日	平成24年11月30日(2012.11.30)		
(62) 分割の表示	特願2008-527194 (P2008-527194) の分割	(71) 出願人	505231659 ユニバーシティ オブ マサチューセッツ アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2108 ポストン 26スフロアー ワ ンビーコンストリート
原出願日	平成18年8月18日(2006.8.18)	(74) 代理人	100068755 弁理士 恩田 博宣
(31) 優先権主張番号	60/709,985		
(32) 優先日	平成17年8月18日(2005.8.18)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/833,234		
(32) 優先日	平成18年7月25日(2006.7.25)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

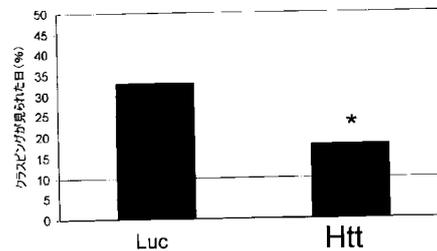
(54) 【発明の名称】 神経疾患を治療するための方法および組成物

(57) 【要約】

【課題】 神経障害を治療するための組成物を提供する。

【解決手段】 iRNA剤と神経系細胞とを、該iRNA剤の該細胞内への取り込みと該iRNA剤の軸索輸送とが可能な十分な時間接触させることを含み、(i) iRNA剤はRNA二重鎖を形成するセンス鎖およびアンチセンス鎖を含み、(ii) iRNA剤は親油性部分を含み、かつ(iii) iRNA剤のアンチセンス鎖の配列は、標的遺伝子から発現されるRNAのうち約18~25ヌクレオチドの標的配列に対し十分相補的なヌクレオチド配列を含む。

【選択図】 図5



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

投与部位よりも遠位の神経系細胞における標的遺伝子の発現を下方制御する方法であって、該方法は、

iRNA 剤と神経系細胞とを、該 iRNA 剤の該細胞内への取り込みと該 iRNA 剤の軸索輸送とが可能な十分な時間接触させることを含み、

(i) iRNA 剤は RNA 二重鎖を形成するセンス鎖およびアンチセンス鎖を含み、(ii) iRNA 剤は親油性部分を含み、かつ

(iii) iRNA 剤のアンチセンス鎖の配列は、標的遺伝子から発現される RNA のうち約 18 ~ 25 ヌクレオチドの標的配列に対し十分相補的なヌクレオチド配列を含むことを特徴とする方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、神経疾患を治療するための方法および組成物に関し、より詳細には、神経疾患を治療するために神経系細胞に iRNA 剤を送達する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

RNA 干渉または「RNAi」は、二本鎖 RNA (dsRNA) が線虫に導入されると遺伝子発現を阻止することが可能であるという観察を説明するために、ファイア (Fire) および共同研究者らによって最初に作られた用語である (非特許文献 1)。短い dsRNA は、脊椎動物を含む多くの生物において遺伝子特異的な転写後サイレンシングをもたらし、かつ遺伝子の機能を研究するための新規なツールを提供してきた。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0003】

【非特許文献 1】ファイア (Fire) ら、1998 年、Nature 第 391 巻、p. 806 ~ 811

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

30

【0004】

神経障害を治療するための組成物を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明の態様は、神経障害を治療するための組成物および該組成物の使用方法に関する。1つの態様では、本発明は、神経障害を有するかまたは神経障害を発症するリスクを有する対象を、神経系細胞内で発現される遺伝子の発現を阻害する iRNA 剤を投与することにより治療する方法を特徴とする。1つの実施形態では、iRNA 剤は神経系細胞内への該 iRNA 剤の取り込みを促進する結合物を含む。好ましい実施形態において、結合物は親油性部分であり、例えばコレステロールである。別の実施形態では、iRNA 剤は、神経疾患または神経障害に関与する神経系細胞内で発現される遺伝子の発現を阻害する。さらに別の実施形態では、iRNA 剤は、神経障害を有するかまたは神経障害を発症するリスクを有する患者を治療するために使用される。1つの実施形態では、神経系細胞内への取り込み強化のために修飾された iRNA 剤は、ハンチントン病 (HD) であるかまたはハンチントン病を発症するリスクを有するヒトにおいて、ハンチンチン (htt) 遺伝子の発現を阻害するかまたは低下させることができる。

40

【0006】

好ましい実施形態において、対象はヒトなどの哺乳動物、例えば、神経障害を有するかまたは神経障害を発症するリスクを有すると診断された対象である。

1つの実施形態では、iRNA 剤のセンス鎖は該オリゴヌクレオチド剤のアンチセンス

50

鎖内に少なくとも1つのミスマッチを含みうる。このミスマッチは、RNA誘導型サイレンシング複合体(RISC)によるアンチセンス鎖の選択を増強することなどによりiRNA剤に利点をもたらすことができる。1つの実施形態では、ミスマッチはセンス鎖の3'端ヌクレオチドから少なくとも1、2、3、4または5ヌクレオチド離れている。

【0007】

1つの実施形態では、iRNA剤はGenBank登録番号NM_002111(2005年8月8日)に規定された配列を含むかまたは該配列と重複するヒトhtt遺伝子領域によりコードされる配列とほぼ相補的なアンチセンス鎖を含む。

【0008】

ある実施形態では、iRNA剤はhttRNAを標的とし、表1または表2に列挙されたセンス配列またはアンチセンス配列のうち少なくともいずれかを含みうる。好ましい実施形態において、iRNA剤は、神経系細胞内への取り込み強化のための親油性部分に加えて少なくとも1つの修飾を含む。この少なくとも1つの追加修飾は、例えばホスホロチオエートまたは2'-O-メチル(2'-OMe)修飾の場合がある。

10

【0009】

【表1】

表1. httを標的とするiRNA剤

iRNA剤ID	配列 ^a	鎖 ^b	配列番号:
E1-4	5'-CCCUGGAAAAGCUGAUGACCG- <u>chol</u>	S	27
	3'-CUGGGACCUUUUCGACUACUU	as	28
7246	5'-CCCUCAUCCACUGUGUGCCCU- <u>chol</u>	S	29
	3'-GAGGGAGUAGGUGACACCGU	as	30
T2886C-6	5'-UGUGCUGACUCUGAGGAAAAG- <u>chol</u>	S	50
	3'-CUACACGACUGAGACUCCUUG	as	51
E1-3	5'-CCCUGGAAAAGCUGAUGAAGG- <u>chol</u>	S	52
	3'-CUGGGACCUUUUCGACUACUU	as	53

20

^a「chol」はコレステロールリガンドを示し、下線を付したヌクレオチドはアンチセンス鎖に対してミスマッチであり、太字のヌクレオチドはSNP部位を表す

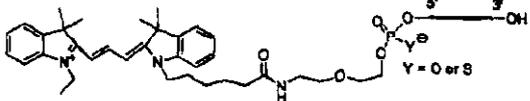
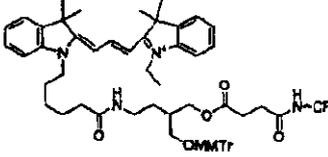
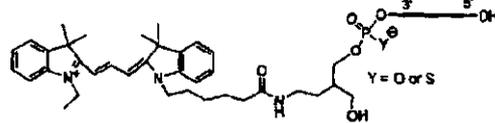
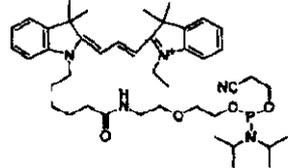
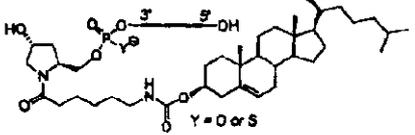
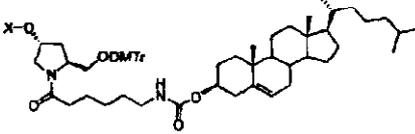
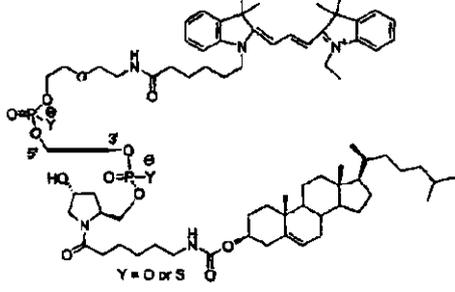
30

^b「s」はセンス鎖を示し、「as」はアンチセンス鎖を示す

【0010】

【表 2】

表2. ハンチントンを標的とするsiRNA

オリゴヌクレオチドリガンド結合体	リガンド構成単位
 <p>5'-(Cy-3) 結合体</p>	 <p>3'-(Cy-3) 構成単位 (CPG)</p>
 <p>3'-(Cy-3) 結合体</p>	 <p>5'-(Cy-3) 構成単位</p>
 <p>3'-コレステロール結合体</p>	 <p>コレステロール結合体構成単位</p>
 <p>5'-(Cy-3), 3'-コレステロール結合体</p>	

10

20

30

プロジェクト/ 標的	配列番号:	ALN配列番号	配列(5'-3')	質量		純度 COE (%)
				計算値	実測値	
htt	1	3005	5' CsCCUGGAAAAGCUGAUGACsGsG 3'	6822.3	6821.8	82.2
	2	3006	5' U ₁ UCAUCAGCUU ₁ UCCAGGG ₁ U ₁ C 3'	6635.08	6634.63	85.6
htt	3	3007	5' CsCsCUGGAAAAGCUGAUGA ₁ CsCsG 3'	6854.43	6853.69	81.1
	4	3008	5' U ₁ U ₁ CAUCAGCUU ₁ UCCAGGG ₁ U ₁ C 3'	6887.21	6886.59	86.4
htt	5	3009	5' U ₁ U ₁ GUGCUGACUCUGAGGAAA ₁ AsGsG 3'	6824.27	6821.95	90.7
	6	3010	5' G ₁ U ₁ UCCUCAGAGUCAGCACAsU ₁ C 3'	6680.17	6679.8	88.2
htt	7	3011	5' U ₁ U ₁ GUGCUGACUCUGAGGAAA ₁ AsAsG 3'	6856.40	6856.13	90.2
	8	3012	5' G ₁ U ₁ U ₁ UCCUCAGAGUCAGCACAsU ₁ C 3'	6712.30	6712.05	89.3
htt	9	3072	5' CsCC U ₁ -OMe GG AAA AGC U ₁ -OMe GA U ₁ -OMe GA CsGsG 3'	6854.38	6853.79	87.9
	10	3073	5' U ₁ -OMe sG U ₁ -OMe GC U ₁ -OMe GAC UC U ₁ -OMe GAG GAA AsAsG 3'	6880.38	6879.82	85.7
htt	11	3076	5' CCCUCAUCCACUGUGGCCCU 3'	6520.8	6520.69	88.5
	12	3077	5' UGCACACAGUGGAUGAGGGAG 3'	6854.15	6853.92	86.3
htt	13	3108	5'-CCACAUGAAAGCAGCAGCACUU-3'	6678.06	6677.93	89.1
	14	3109	5'AAGUCGUGCUGCUUC AUGUGG ₁ -OMe U ₁ -OMe C 3'	7345.37	7344.25	86.2
htt	15	3075	5' CsCCUGGAAAAGCUGAUGACsGsGs-Chol 3'	7542.37	7543.06	98.7
	16	3112	5' Cy-3sCCCUGGAAAAGCUGAUGACsGsGs-Chol 3'	8363.08 8363.08	8363.8 8179	93.78
htt	17	3137	5' CsCCUGGAAAAGCUGAUGACGsGs-Chol 3'	7526.30	7526.62	84.2
	18	3142	5' CsCCUCAUCCACUGUGGCCCsUs-Chol 3'	7273.06	7273.91	82.0
htt	19	3144	5' Cy-3sCsCCUCAUCCACUGUGGCCCsUs-Chol 3'	7908.8	7961.3	89.0
	20	3110	5' CCACAUGAAAGCAGCAGCACTU-Chol 3'	7382.06	7382.81	84.73
htt	21	3074	5' Cy-3sCCCUGGAAAAGCUGAUGACsGsG 3'	7459.08	7458.07	78.43
	22	3111	5' Cy-3-AAGUCGUCUGCUUCAUGUGG ₁ -OMe U ₁ -OMe C 3'	7981.37	7982.74	82.0
htt	23	3112	5' Cy-3sCCC UGG AAA AGC UGA UGA CsGsGs Chol 3'	8383.08	8363.8 8179	93.78
	24	3139	5' Cy-3sCCCUGGAAAAGCUGAUGACGsGsChol 3'	8163.1	8165.0	89.2
htt	25	3143	5' U ₁ GCACACAGUGGAUGAGGGAsGs-Cy-3 3'	7576.4	7577.0	81.2
	26	3138	5' U ₁ UCAUCAGCUU ₁ UCCAGGGU ₁ Cs-Cy-3 3'	7309.1	7308.3	86.0

「s」はホスホロチオエートを示し、「N₁'-OMe」(N=A,C,GまたはU)は2'-O-メチル糖修飾を示し、「Chol」はコレステロール結合体を表し、「Cy-3」はCy3結合体を表す(Cy3 Quasar構成単位は米国カリフォルニア州パト所在のバイオサーチ・テクノロジーズ(Biosearch Technologies)から購入した)

【0012】

好ましい実施形態において、親油性物質と結合したiRNA剤のアンチセンス鎖は、表1または表2に列挙されたアンチセンス鎖の配列を有するか、あるいは表1または表2に列挙されたアンチセンス鎖との違いが1、2、3、4または5ヌクレオチド以下である。別の好ましい実施形態では、親油性物質と結合したiRNA剤のセンス鎖は、表1または表2に列挙されたアンチセンス鎖の配列を有するか、あるいは表1または表2に列挙されたアンチセンス鎖との違いが1、2、3、4または5ヌクレオチド以下である。別の好ま

10

20

30

40

50

しい実施形態では、iRNA剤のアンチセンス鎖は表1または表2に記載の修飾（例えば、コレステロール、2'-OMe、ホスホロチオエート、またはCy3（TM）による修飾）を少なくとも1つ有する。別の好ましい実施形態では、アンチセンス鎖が表1または表2に示した修飾を有することになる。iRNA剤のアンチセンス鎖は、例えば表1または表2に示した種類の1つ以下の修飾を有してもよいし、例えば表1または表2に示した種類の追加修飾を1つ以上有してもよい。別の好ましい実施形態では、iRNA剤のセンス鎖は表1または表2に記載の修飾（例えば、コレステロール、2'-OMe、ホスホロチオエート、またはCy3（TM）による修飾）を少なくとも1つ有する。別の好ましい実施形態では、センス鎖が表1または表2に示した修飾を有することになる。iRNA剤のセンス鎖は、例えば表1または表2に示した種類の1つ以下の修飾を有してもよいし、例えば表1または表2に示した種類の追加修飾を1つ以上有してもよい。

10

20

30

40

50

【0013】

別の実施形態では、iRNA剤はh t tの核酸を標的とする。1つの実施形態では、iRNA剤のアンチセンス鎖は、本明細書に記載のアンチセンス配列、例えば表1または表2に列挙されたアンチセンス配列を含む。別の実施形態では、iRNA剤のセンス鎖は、本明細書に記載のセンス鎖のヌクレオチド配列、例えば表1または表2に列挙されたセンス配列を含む。さらに別の実施形態では、iRNA剤のアンチセンス鎖は、本明細書に記載のアンチセンス配列、例えば表1または表2に列挙されたアンチセンス配列と、例えば少なくとも1、5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、または24個のヌクレオチドが重複する。同様に、iRNA剤のセンス鎖は、本明細書に記載のセンス配列、例えば表1または表2に列挙されたセンス配列と、例えば1、5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、または24個のヌクレオチドが重複する。

【0014】

特に好ましい実施形態では、iRNA剤は神経疾患に關与する核酸を標的とする。iRNA剤は、標的とする核酸のヌクレオチド配列に相補的なアンチセンス鎖と、該アンチセンス鎖にハイブリダイズするのに十分な相補性を有するセンス鎖とを有する。iRNA剤は、神経系細胞内への取り込み強化のための親油性部分も含む。好ましい実施形態では、親油性部分はコレステロールである。別の実施形態では、iRNA剤は、生体試料中におけるiRNA剤の安定性または分布を改善する修飾を含む。iRNA剤はさらに単離形態であってもよいし、本明細書に記載の方法に使用される医薬組成物、特に神経系細胞内に送達するために製剤化されたかまたは非経口投与用に製剤化された医薬組成物の一部であってもよい。医薬組成物は1以上のiRNA剤を含むことが可能であり、一部の実施形態では、2以上のiRNA剤を含むこともある。1つの実施形態において、iRNA剤は、2'修飾ヌクレオチド、例えば2'-O-メチル化ヌクレオチドを含む。別の実施形態では、iRNA剤はホスホロチオエートを含む。

【0015】

別の実施形態において、iRNA剤は、神経障害の発症に關与する野生型の核酸、例えば野生型h t t RNAを標的とし、さらに別の実施形態において、iRNA剤は、該核酸の多型または突然変異を標的とする。ある実施形態において、iRNA剤は、オープンリーディングフレームのコードン中の配列、神経障害に關与する遺伝子のmRNA転写物の3'UTRまたは5'UTRを標的とし得る。1つの実施形態において、iRNA剤はスプライシングされたmRNAアイソフォームを標的とする。

【0016】

1つの実施形態において、CAGトリヌクレオチドリピートが例えば30個を超えるCAGトリヌクレオチドリピート（例えば35、40、50、60、70、80、90、100またはそれ以上のCAGトリヌクレオチドリピート）に伸長し、その結果としてハンチンチンポリペプチドの正常なポリグルタミン鎖が伸長している異常型ハンチンチンポリペプチドを生じる、ある種類のハンチンチン遺伝子をヒトが有している。別の実施形態では、ヒトがハンチントン病（HD）であると診断されている。1つの実施形態では、ヒト

はハンチンチン遺伝子に多型または突然変異を有している。例えば、ヒトは、ハンチンチン遺伝子内に、GenBank登録番号NM_002111(2005年8月8日)における該配列の番号付けで171位の多型、例えばA171C多型を有する場合がある。別の実施形態では、iRNA剤は、ハンチンチンタンパク質と相互作用することが知られているポリペプチドをコードする核酸を標的とする。例えば、iRNA剤はハンチンチン結合タンパク質1(Huntingtin-associated protein-1:HAP-1)の核酸を標的とする場合がある。

【0017】

好ましい実施形態では、神経系細胞内への取り込み強化のために修飾されたiRNA剤は、 β -シヌクレイン(SNCA)RNAを標的としない。

10

別の実施形態では、神経系細胞内への取り込み強化のために修飾された、例えばコレステロールと結合されたiRNA剤は、少なくとも21ヌクレオチド長であってセンスRNA鎖およびアンチセンスRNA鎖を含み、アンチセンスRNA鎖の長さは25ヌクレオチド以下であり、iRNA剤の二重鎖領域の長さは18~25ヌクレオチドである。iRNA剤はさらに、1~4個の非対合ヌクレオチドを有するヌクレオチド突出部を含む場合もあり、非対合ヌクレオチドは少なくとも1つのホスホロチオエートによるジヌクレオチド結合を有することもある。ヌクレオチド突出部は、例えばiRNA剤のアンチセンス鎖の3'端にあってもよい。

【0018】

1つの態様では、本発明は、神経系細胞内における標的遺伝子の発現を下方制御(ダウンレギュレーション)する方法を特徴とする。1つの実施形態において該方法は、iRNA剤と神経系細胞とを、iRNA剤が該細胞内に取り込まれるのに十分な時間接触させることを含む。別の実施形態では、iRNA剤は、RNA二重鎖を形成するセンス鎖およびアンチセンス鎖を含む。iRNA剤は、親油性部分例えばコレステロールも含み、iRNA剤のアンチセンス鎖は標的遺伝子から発現されるRNAの約18~25ヌクレオチドの標的配列に十分相補的なヌクレオチド配列を含んでなる。好ましい実施形態では、親油性部分は、センス鎖の少なくとも一端、例えばセンス鎖の3'端に結合される。別の実施形態では、センス鎖およびアンチセンス鎖は、表1または表2に列挙されたセンス鎖およびアンチセンス鎖から選択された配列を有する。

20

【0019】

別の態様では、本発明は、神経障害を有するかまたは神経障害を発症するリスクを有すると診断されたヒトを特定することと、神経系細胞内で発現される遺伝子を標的とするiRNA剤をそのヒトに投与することとを含む、ヒトを治療する方法を特徴とする。1つの実施形態では、該遺伝子の発現は神経障害の症状と関連している。別の実施形態では、iRNA剤はRNA二重鎖を形成するセンス鎖およびアンチセンス鎖を含み、かつiRNA剤は親油性部分(例えばコレステロール)を含む。別の実施形態では、iRNA剤のアンチセンス鎖は、標的遺伝子から発現されるRNAの約18~25ヌクレオチドの標的配列に十分相補的なヌクレオチド配列を含む。好ましい実施形態において親油性部分は、センス鎖の少なくとも一端、例えばセンス鎖の3'端に結合され、別の実施形態では、iRNA剤はホスホロチオエートまたは2'修飾、例えば2'OMe修飾または2'フルオロ修飾を含む。1つの実施形態では、センス鎖およびアンチセンス鎖は、表1または表2に列挙されたセンス鎖およびアンチセンス鎖から選択された配列を含む。

30

40

【0020】

1つの実施形態では、iRNA剤のアンチセンス鎖はhttRNAの多型に相補的な配列を含む。別の実施形態では、ヒトはハンチントン病であるかまたはハンチントン病を発症するリスクを有する。別の実施形態では、ヒトはParkin遺伝子またはユビキチンカルボキシ末端加水分解酵素L1(UCHL1)遺伝子に遺伝的変異を有し、かつそのヒトはパーキンソン病であるかまたはパーキンソン病を発症するリスクを有する。別の実施形態では、ヒトはアルツハイマー病、多系統萎縮症、またはレーヴィ小体痴呆であるかまたは該疾患を発症するリスクを有する。

50

【0021】

別の態様では、本発明は、神経系細胞内への取り込み強化のために親油性部分と結合された、例えばコレステロール分子と結合された*iRNA*剤と、薬学的に許容可能な担体とを含んでなる医薬組成物を特徴とする。好ましくは、*iRNA*剤は神経疾患または神経障害に關与する核酸を標的とする。

【0022】

特に好ましい実施形態では、医薬組成物は、*htt*核酸を標的とする*iRNA*剤と薬学的に許容可能な担体とを含む。*iRNA*剤は、*httRNA*のヌクレオチド配列に相補的なアンチセンス鎖と、該アンチセンス鎖にハイブリダイズするのに十分な相補性を有するセンス鎖とを有する。1つの実施形態では、*iRNA*剤は、神経系細胞内への取り込みを促進する親油性部分を含む。1つの実施形態では、親油性部分はカチオン基を含むリガンドである。別の実施形態では、親油性部分は、*iRNA*剤の一方または両方の鎖の一端または両端に取り付けられる。好ましい実施形態では、親油性部分は、*iRNA*剤のセンス鎖の一端に取り付けられ、別の好ましい実施形態では、リガンドはセンス鎖の3'端に取り付けられる。ある実施形態では、親油性物質は例えばコレステロール、ビタミンE、ビタミンK、ビタミンA、葉酸またはCy3のようなカチオン染料である。好ましい実施形態では、親油性部分はコレステロールである。

10

【0023】

別の実施形態では、医薬組成物の*iRNA*剤は、生体試料中における*iRNA*剤の安定性または分布を改善する修飾を含む。*iRNA*剤はさらに単離形態であってもよいし、本明細書に記載の方法に使用される医薬組成物、特に神経系細胞内に送達するために製剤化されたかまたは非経口投与用に製剤化された医薬組成物の一部であってもよい。医薬組成物は1以上の*iRNA*剤を含むことが可能であり、一部の実施形態では、2以上の*iRNA*剤を含むこともある。1つの実施形態において、*iRNA*剤は、2'修飾ヌクレオチド、例えば2'-O-メチル化ヌクレオチドを含む。別の実施形態では、*iRNA*剤はホスホロチオエートを含む。

20

【0024】

特に好ましい実施形態では、神経系細胞の*httRNA*レベルは、対象の神経系細胞を、神経系細胞内への取り込み強化のために修飾された*iRNA*剤と接触させることにより低下する。好ましい実施形態では、リガンドはコレステロールである。

30

【0025】

別の態様では、本発明は、神経系細胞で発現される核酸を標的とし、かつ神経系細胞内への取り込み強化のために修飾された*iRNA*剤を、製造する方法を特徴とする。該方法は、標的*mRNA*(例えば*htt mRNA*)のヌクレオチド配列から長さ18~25ヌクレオチドのヌクレオチド配列を選択することと、*iRNA*剤を合成することとを含む。*iRNA*剤のセンス鎖は標的*RNA*から選択されたヌクレオチド配列を含み、アンチセンス鎖は該センス鎖にハイブリダイズするのに十分な相補性を有する。該方法は、*iRNA*剤に、例えば*iRNA*剤のセンス鎖の少なくとも一端に、少なくとも1つの親油性部分を組み込むことを含む。好ましい実施形態では、親油性部分は*iRNA*剤のセンス鎖の3'端に組み込まれる。1つの実施形態では、カチオン染料(例えばCy3)が*iRNA*剤の少なくとも一方の鎖に、例えば*iRNA*剤の3'端または5'端に組み込まれる。1つの実施形態では、2以上の親油性部分、例えば2以上の異なる種類の親油性部分が*iRNA*剤に組み込まれる。ある実施形態では、*iRNA*剤は表1または表2に例証されたりガンド結合体を含む。他の実施形態では、*iRNA*剤を製造する方法は、表1または表2に例証された構成単位の使用を含む。さらに他の実施形態では、本発明において主要な方法は、*httRNA*を標的とする表1または表2に列挙された*iRNA*剤を製造する方法を含む。1つの実施形態では、該方法はさらに、*iRNA*剤を、対象に、例えば哺乳類の対象に、例えばヒト対象に、例えば神経疾患もしくは神経障害であるかまたは神経疾患もしくは神経障害を発症するリスクを有するヒトに、投与することを含む。1つの実施形態では、ヒトはHDであるかまたはHDを発症するリスクを有する。

40

50

【0026】

別の態様では、本発明は、iRNA剤、例えば神経系細胞内への取り込み強化のために親油性物質と結合されたiRNA剤を評価する方法を特徴とする。該方法は、神経系細胞内への取り込み強化のために修飾された、例えばコレステロール分子と結合された候補iRNA剤を提供することと、iRNA剤が神経系細胞内へ取り込まれるかどうか測定することとを含む。1つの実施形態では、iRNA剤は、検出可能なマーカー、例えばCy3またはCy5のような蛍光マーカーと結合され、細胞内への取り込みが蛍光によって分析される。別の実施形態では、例えば本明細書に記載の試験系のうち1以上を使用することによって、前記候補剤が標的遺伝子の発現を変化させる（例えば阻害する）かどうか分析される。

10

【0027】

好ましい実施形態では、該方法は、第1の試験系でiRNA剤を評価することと、所定レベルの遺伝子発現が観察された場合に、該候補を第2の、好ましくは異なる試験系で評価することと、を含む。特に好ましい実施形態では、第2の試験系は、動物の神経系細胞に候補iRNA剤を投与することと、該動物における標的遺伝子の発現に対する候補剤の作用を評価することと、を含む。

【0028】

試験系は、候補iRNA剤と標的核酸（例えばh tt RNAのような神経系細胞で発現される核酸）とを接触させることを含む。iRNAを好ましくはin vitroで標的核酸と接触させ、相互作用、例えば標的への候補剤の結合があるかどうかを測定する。試験系は、候補剤と神経系細胞とを接触させることと、神経遺伝子の発現（例えばh tt 遺伝子の発現）の変化を評価することとを含むこともできる。例えばこの試験系は、h tt RNA（内因性遺伝子由来または外因性構築物由来）を発現することができる神経系細胞と候補iRNA剤とを接触させることと、h ttレベルまたはh tt RNAレベルを評価することとを含むことができる。好ましい実施形態では、候補iRNA剤は、神経系細胞内への候補iRNA剤の取り込みを強化する修飾を含む。特に好ましい実施形態では、該修飾はコレステロール分子、例えばiRNA剤のセンス鎖（例えばセンス鎖の3'端）に取り付けられたコレステロールである。別の実施形態では、試験系は、異種配列（例えばマーカータンパク質であって例えばGFPのような蛍光タンパク質）に連結された神経系細胞遺伝子の一部（その構築物は染色体上にあってもエピソーム上にあってもよい）由来のRNAまたはタンパク質を発現する細胞と候補剤とを接触させることと、RNAレベルまたはタンパク質レベルに対する作用を測定することとを含む。試験系はまた、候補iRNA剤をin vitroで、組織試料（例えば脳組織試料であって例えば薄片または切片、視覚組織試料、または神経組織を含むその他の試料）と接触させることと、神経のポリペプチドまたはRNA（例えばh ttポリペプチドまたはRNA）のレベルを評価することとを含むこともできる。試験系は、動物に候補iRNA剤をin vivoで投与することと、神経のポリペプチドまたは神経のRNA（例えばh ttポリペプチドまたはh tt RNA）のレベルを評価することとを含むこともできる。これらのうちいずれにおいても、神経遺伝子の発現に対する候補剤の作用は、遺伝子発現を所定の標準（例えば対照であって例えば未処置の細胞、組織または動物）と比較することとを含むことができる。遺伝子発現は、例えば候補iRNA剤と接触させる前と後とで比較することができる。該方法により、iRNA剤がh tt遺伝子の発現を阻害するのに役立つかどうか測定することが可能になる。

20

30

40

【0029】

「神経遺伝子」とは、神経系細胞内で発現される遺伝子である。神経遺伝子は神経系細胞内でのみ発現されるものでもよいし、あるいは神経系細胞に加えて他の種類の細胞内でも発現されるものでもよい。

【0030】

1つの実施形態において、神経遺伝子の発現は、神経のRNAレベルを調べる方法（例えば、ノーザンブロット分析、RT-PCR、またはRNAse保護アッセイ）または神

50

経のポリペプチドレベルを調べる方法（例えば、ウエスタンブロット法、免疫組織化学法、または自己蛍光アッセイ（例えば GFP または ルシフェラーゼの発現を検出））によって評価可能である。

【0031】

「神経系細胞」とは、神経系（例えば末梢神経系または中枢神経系）の細胞である。神経系細胞は、神経細胞（すなわちニューロン）、例えば感覚ニューロンまたは運動ニューロンでもよいし、グリア細胞でもよい。ニューロンの例には、脊髄の後根神経節、脊髄運動ニューロン、網膜双極細胞、脳の皮質細胞および線条体細胞、海馬錐体細胞、ならびに小脳のプルキンエ細胞が挙げられる。グリア細胞の例には、中枢神経系のオリゴデンドロサイトおよびアストロサイト、ならびに末梢神経系のシュワン細胞が挙げられる。

10

【0032】

「神経系細胞内への取り込みの強化」とは、修飾および非修飾の各タイプの iRNA 剤に曝露される細胞が *in vitro* 条件または *in vivo* 条件の同じ条件下で処理される場合、非修飾 iRNA 剤よりも多くの修飾 iRNA 剤が神経系細胞に取り込まれることを意味する。

【0033】

1つの実施形態において、例えば、第2の試験として、薬剤を動物に、例えば哺乳動物（マウス、ラット、ウサギ、ヒト、またはヒト以外の霊長類など）に投与し、この動物を同剤の作用についてモニタする。例えば、脳組織など動物の組織を、神経遺伝子の発現に対する薬剤の作用について調べる。組織を、例えば、神経の RNA および / またはタンパク質の存在について調べてもよい。1実施形態では、動物を観察して認知的症状の改善または安定化についてモニタする。薬剤は、任意の方法によって、例えば経口的に、またはクモ膜下腔内もしくは実質への注射により、例えば、脳への立体視による注射により動物に投与可能である。

20

【0034】

特に好ましい実施形態において、本発明は、神経系細胞において発現される核酸（例えば htt 核酸）を標的とする iRNA 剤、例えば本明細書に記載の iRNA 剤を評価する方法を特徴とする。この方法は、神経系細胞において発現される核酸（例えば、htt RNA）を標的とする iRNA 剤を提供する工程と；該核酸を含み、かつ発現可能である細胞と iRNA 剤とを接触させる工程と；該核酸の発現に対する iRNA 剤の作用を、例えば、遺伝子発現を（例えば、細胞内で）対照と比較することによって評価する工程とを包含する。遺伝子発現は、例えば、細胞と iRNA 剤とを接触させる前後で比較することができる。この方法により、iRNA 剤が遺伝子発現を阻害するために有用であるか否かを測定することが可能となる。例えば、iRNA 剤が、例えば所定の基準値と比較して（例えば、細胞と該 iRNA 剤とを接触させる前の神経の RNA またはタンパク質の量と比較して）、発現を所定の量（例えば、10%、25%、50%、75%、または90%）低減する場合、該 iRNA 剤は神経遺伝子の発現を阻害するために有用であると測定することができる。神経遺伝子は内在性として発現されてもよいし外来性として発現されてもよい。

30

【0035】

本発明において特徴付けられる方法および組成物、例えば、本明細書に記載の神経障害を治療するための方法および iRNA 剤は、本明細書に記載される任意の投薬量および / または製剤で、かつ本明細書に記載される任意の投与経路を用いて使用可能である。

40

【0036】

したがって、別の態様では、本発明は、神経系細胞における遺伝子の発現を阻害する薬剤を投与することにより対象を治療する方法を特徴とする。好ましい実施形態では、対象はヒトなどの哺乳動物であり、例えば神経疾患もしくは神経障害を有するかまたは神経疾患もしくは神経障害を発症するリスクを有すると診断された対象である。神経遺伝子の発現を阻害する薬剤には、htt RNA を標的とする iRNA 剤およびアンチセンス分子が挙げられる。

50

【0037】

「ほぼ同一な」配列は、標的遺伝子に対して十分相同な領域を含み、かつiRNA剤（例えば神経系細胞への取り込み強化のために親油性部分に結合されたiRNA剤）またはそのフラグメントが標的遺伝子の下方制御を仲介可能な十分な長さのヌクレオチド数を有する。標的遺伝子にほぼ同一なiRNA剤の配列は、典型的には二本鎖iRNA剤のセンス鎖上の配列である。

【0038】

「ほぼ相補的な」配列は、標的遺伝子に対して十分相補的な領域を含み、かつiRNA剤（例えば神経系細胞への取り込み強化のために親油性部分に結合されたiRNA剤）またはそのフラグメントが標的遺伝子の下方制御を仲介可能な十分な長さのヌクレオチド数を有する。標的遺伝子にほぼ相補的なiRNA剤の配列は、典型的には二本鎖iRNA剤のアンチセンス鎖上の配列である。したがって、iRNA剤は、標的のRNA転写物（例えば、神経系細胞内で発現されるRNA転写物）に対して少なくとも部分的に、またある実施形態においては完全に相補的な領域であるか、またはそのような領域を含む。iRNA剤と標的との間に完全な相補性が存在する必要性はないが、両者の対応は、iRNA剤またはその切断産物が、例えば、標的RNA（例えば、mRNA）のRNA切断による配列特異的サイレンシングをもたらすことができるように十分でなければならない。標的鎖との相補性、または相同性の程度は、アンチセンス鎖において最も重要である。特にアンチセンス鎖において完全な相補性が望まれることが多いが、ある実施形態は、特にアンチセンス鎖において、1つ以上であるが好ましくは6、5、4、3、2個以下の（標的RNAに対する）ミスマッチを含み得る。このミスマッチは、特にアンチセンス鎖において、末端領域において最も許容されやすく、存在する場合は、5'末端および/または3'末端から例えば6、5、4、または3ヌクレオチド以内の末端領域中にあることが好ましい。センス鎖は、分子の全体的な二本鎖の性質を維持する程度にアンチセンス鎖と十分に相補的でありさえすればよい。

10

20

【0039】

「RNA剤」は、本明細書において使用される場合、非修飾RNA、修飾RNA、またはヌクレオシド代用物であり、これらのすべてが本明細書において記載されているかまたはRNA合成の分野でよく知られている。多数の修飾RNAおよびヌクレオシド代用物が記載されるが、好ましい例には、非修飾RNAよりもヌクレアーゼ分解に対して耐性の高いものが含まれる。好ましい例には、2'糖修飾、一本鎖突出部（好ましくは3'一本鎖突出部）における修飾、または、特に一本鎖の場合、1つまたは複数のリン酸基もしくは1つまたは複数のリン酸基アナログを含む5'修飾を有するものが含まれる。

30

【0040】

「iRNA剤」（「干渉（interfering）RNA剤」の略語）は、本明細書において使用される場合、標的遺伝子、好ましくは神経系細胞内で発現される内在性または病原体由来の標的RNA、の発現を下方制御可能なRNA剤である。理論によって束縛されることは望まないが、iRNA剤は、当技術分野においてRNAiと呼ばれることもある標的mRNAの転写後切断、または転写前もしくは翻訳前のメカニズムを含む多数のメカニズムのうち1つ以上によって作用する可能性がある。iRNA剤は、二本鎖（ds）iRNA剤であることが好ましい。

40

【0041】

本発明の1つまたは複数の実施形態の詳細について、添付の図面および以下の説明において述べる。本発明の他の特徴、目的、および利点は、この説明から、また特許請求の範囲から明らかであろう。本願は、引用されたすべての参考文献、特許、および特許出願の全体を、すべての目的のために本願明細書に援用する。

【図面の簡単な説明】

【0042】

【図1】レンチウイルス-mut-httで処理されたマウスに見い出されたハンチントン病の病理学的特徴のin situ染色像を示す図。染色はhttタンパク質に対する

50

免疫組織化学法による。1 Aは線条体組織の *in situ* 染色である。1 B、1 Cおよび1 Dは淡蒼球近くの線条体の *in situ* 染色である。スケールバー = 25 μ m。

【図2】ハンチンチンを標的とするコレステロール結合 dsRNA (AL-DP-1799) の線条体内への注射により、ハンチントン病のマウスモデルにおける細胞のハンチンチン免疫反応性パターンが変化することを示す図。

【図3】ハンチンチンを標的とするコレステロール結合 dsRNA (AL-DP-1799) の線条体内への注射により、ハンチントン病のマウスモデルにおいて、皮質および線条体におけるハンチンチン免疫反応性の封入体の大きさが縮小し、かつニューロピル凝集体が減少することを示す図。

【図4】ハンチンチンを標的とするコレステロール結合 dsRNA (AL-DP-1799) の線条体内への注射により、ハンチントン病のマウスモデルにおいて線条体中のハンチンチン免疫反応性の細胞数が増加することを示す図。

【図5】ハンチンチンを標的とするコレステロール結合 dsRNA (AL-DP-1799) の線条体内への注射により、ハンチントン病のマウスモデルにおいて異常なクラスピング行動が減少することを示す図。

【発明を実施するための形態】

【0043】

二本鎖 RNA (dsRNA) は、RNA 干渉 (RNAi) として知られるプロセスを通して mRNA の配列特異的サイレンシングをもたらす。このプロセスは、哺乳動物および他の脊椎動物を含めた広範な種々の生物に存在する。

【0044】

dsRNA の 21 ~ 23 nt フラグメントが、例えば RNA の分解を引き起こすことによる RNA サイレncing の配列特異的メディエータであることが実証されてきた。理論によって束縛されることは望まないが、これらの 21 ~ 23 nt フラグメント中に存在する、特定の長さのフラグメントにすぎない分子シグナルが、RNAi を仲介する細胞因子を発動している可能性がある。本明細書に記載されるのは、これらの 21 ~ 23 nt フラグメントおよび他の iRNA 剤を調製および投与するための方法、ならびに神経系細胞における遺伝子機能を特異的に不活性化するための前記 21 ~ 23 nt フラグメントおよび他の iRNA 剤の使用についてである。iRNA 剤 (または同一もしくは類似の性質を有する組換え生産もしくは化学合成されたオリゴヌクレオチド) の使用により、哺乳動物細胞におけるサイレンシングのために特定の mRNA を標的とすることが可能となる。さらに、より長い dsRNA 剤フラグメントも、例えば後述のようにして使用可能である。

【0045】

哺乳動物細胞において、長い dsRNA は、有害であることの多いインターフェロン応答を誘導し得るが、短い dsRNA (sRNA) は、少なくとも細胞および宿主に対して有害なほどはインターフェロン応答を誘発しない。特に、sRNA 剤中の iRNA 剤の鎖の長さは、例えば、有害なインターフェロン応答を誘導しないように十分に短く、31、30、28、25、または 23 nt 未満とすることができる。したがって、哺乳動物細胞への sRNA 剤の組成物 (例えば、本明細書に記載されるように製剤化された組成物) の投与は、インターフェロン応答を回避しながら標的遺伝子の発現をサイレンシングするために使用され得る。さらに、個別の種類 iRNA 剤の使用により、例えば、対立遺伝子についてヘテロ接合の対象において、標的遺伝子の一方の対立遺伝子を選択的に標的とすることが可能である。

【0046】

さらに、1つの実施形態において、哺乳動物細胞は、インターフェロン応答の構成因子 (例えば、dsRNA で活性化されるプロテインキナーゼ PKR) を破壊する iRNA 剤で処理される。このような細胞は、標的 RNA に相補的な配列を含みかつ前記処理がなければインターフェロン応答を誘発する長さを有する第2の iRNA 剤で処理することができる。

【0047】

10

20

30

40

50

代表的な実施形態において、対象は、ウシ、ウマ、マウス、ラット、イヌ、ブタ、ヤギ、または霊長類などの哺乳動物である。対象は、乳用哺乳類（例えばウシまたはヤギ）またはその他の飼育動物（例えばニワトリ、シチメンチョウ、ヒツジ、ブタ、魚、エビ）であってもよい。より好ましい実施形態において、対象はヒトであり、例えば、健常人、あるいは、神経疾患もしくは神経障害を有するか、神経疾患もしくは神経障害を有すると診断されるか、または神経疾患もしくは神経障害になる素因を有する人である。

【0048】

神経疾患または神経障害は、神経系（中枢神経系または末梢神経系）に影響するあらゆる疾患または障害である。典型的な神経疾患および神経障害には、ハンチントン病（HD）、パーキンソン病（PD）、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、アルツハイマー病、レーヴィ体痴呆、多系統萎縮症、球脊髄性筋萎縮症（ケネディ病）、トゥーレット症候群、常染色体優性遺伝性脊髄小脳変性症（SCA）（例えば、タイプ1のSCA1、タイプ2のSCA2、タイプ3（マシャド-ジョセフ病）のSCA3/MJD、タイプ6のSCA6、タイプ7のSCA7、タイプ8のSCA8、フリードライヒ失調症および歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症DRPLA/Haw River症候群）、統合失調症、加齢に伴う記憶障害、自閉症、注意欠陥障害、双極性障害および抑うつが挙げられる。

10

【0049】

オリゴヌクレオチド剤によって仲介される調節は、オリゴヌクレオチド剤組成物の投与後数日間持続するので、多くの場合において、組成物の投与は1日当たり1回未満の頻度とすることが可能であり、また場合によっては、治療計画全体について1回のみとすることが可能である。例えば、ある種のがん性神経系細胞の治療は単回ボラス投与によってなされるかもしれないし、慢性のウイルス感染症には定期的な（例えば、1週間に一度または1か月に一度の）投与が必要かもしれない。例えば、星状細胞腫の治療は、親油性物質に結合させたiRNA剤の単回ボラス投与で扱われるかもしれない。

20

【0050】

神経疾患および神経障害の治療

神経疾患および神経障害のあらゆる患者が、本明細書に記述された方法または組成物を用いる治療に対する候補である。発症前の対象者も、神経系細胞に対して標的設定されたiRNA剤を用いる治療の候補になりうる。例えば、HDのリスクを有すると判定された発症前のヒトは、神経系細胞への送達のために親油性分子（例えばコレステロール分子）に結合させた抗h tt iRNA剤を用いる治療の候補である。1つの実施形態では、発症前の候補者は、リスク要因のプロファイリングおよび機能的な神経画像検査のうちいずれかまたは両方により（例えばフルオロドーパおよび陽電子放射断層撮影により）特定される。例えば、候補対象者はリスク要因のプロファイリング後に機能的な神経画像検査を行うことにより特定することができる。

30

【0051】

特定の遺伝子型を有する個人は治療候補である。いくつかの実施形態では、患者は、その患者が神経系の障害（例えばHD）を発症するリスクを高くする特定の遺伝子突然変異を有するであろう。例えば、h tt中にCAGトリヌクレオチドの伸長（例えば、リピート数が36より多い）を有する人はHDを発症するリスクが高く、本発明でされたiRNA剤、例えば、神経系細胞内への取り込み強化のためにコレステロール分子に結合されたiRNA剤を用いる治療の候補である。iRNA剤は好ましくはh tt遺伝子を標的とする。さらに、h tt遺伝子中のSNPは、HDを誘発する伸長CAGリピートの存在の指標であることが分かった。このSNPは、GenBank登録番号NM_002111における該配列の番号付けで171位におけるA C多型である。したがって、このSNPを有している人は、本発明で着目されたiRNA剤を用いる治療の候補であるか、あるいは少なくとも、その人が、h ttを標的としかつニューロンへの送達を強化するために修飾されたiRNA剤を用いる治療に対する候補かどうかをさらに判断することになるさらなる遺伝学的検討（CAGリピートの伸長に関する試験など）の候補である。

40

【0052】

50

別の実施例において、PDに関する非遺伝性のリスク要因には、年齢（例えば年齢が30、35、40、45、または50歳を超える年代）、性別（男性は一般に女性よりリスクが高い）、農薬への曝露、重金属への曝露、および頭部外傷が含まれる。一般的に、内在性および外因性の要因であって、ユビキチンプロテアソーム経路を破壊するもの、もしくはより特異的にプロテアソームを阻害するもの、またはミトコンドリア機能を破壊するもの、または酸化ストレスを生じるものが、ある人がPDを発症するリスクを増大させる可能性があり、かつPDの病因に寄与する可能性がある。これらの要因を、神経系細胞内への取り込み強化のために修飾された（例えば、コレステロール分子に結合させた）iRNA剤を用いる治療の候補対象者のリスク因子を評価する際に考慮することができる。

【0053】

iRNA剤の設計および選択

候補iRNA剤は、例えば遺伝子ウォーキング分析を実行することによって設計可能である。転写される領域の全体または一部に対応する、重複し、隣接し、または近接しているが間隔のあいた候補薬剤を作製し試験することが可能である。各iRNA剤について、標的遺伝子の発現を下方制御する能力に関して試験および評価することが可能である（後述する「候補iRNA剤の評価」を参照のこと）。

【0054】

iRNA剤は、配列情報および所望の特徴に基づいて合理的に設計することができる。例えば、iRNA剤を、候補二重鎖の相対的融解温度に従って設計することができる。一般的に、二重鎖は、アンチセンス鎖の3'末端よりもアンチセンス鎖の5'末端において低い融解温度を有することになる。合理的設計についてのこの要素および他の要素は、以下により詳細に議論される（例えば、「パリンδροーム」「非対称性」および「Z-X-Y」、ならびに「末端における二重鎖の安定性についての差別的修飾」および「ワトソン-クリック以外の対合」と記された節を参照のこと）。

【0055】

候補iRNA剤の評価

候補iRNA剤（例えば親油性部分に結合させた候補iRNA剤）を、神経系細胞内に取り込まれる能力について評価することができる。例えば、親油性部分に結合させた候補iRNA剤を、余分な親油性部分や、細胞内への取り込みを促進するトランスフェクション試薬を含んでいない溶液中に提供する。「トランスフェクション試薬」には、オリゴヌクレオチド剤に対する細胞の透過性を大きく変化させるイオンまたはその他の物質が挙げられる。典型的なトランスフェクション剤には、Lipofectamine (TM)（米国カリフォルニア州カールスバード所在のインビトロジェン (Invitrogen)）、Lipofectamine 2000 (TM)、TransIT-TKO (TM)（米国ウィスコンシン州マディソン所在のミラス (Mirus)）、FuGENE 6（米国インディアナ州インディアナポリス所在のロッシュ (Roche)）、ポリエチレンイミン、X-tremeGENE Q2（米国インディアナ州インディアナポリス所在のロッシュ）、DOTAP、DOSPER、Metafectene (TM)（ドイツ国ミュンヘン所在のビオンテクス (Biontex)）、あるいはその他のトランスフェクション試薬が挙げられる。

【0056】

親油性部分に結合させた候補iRNA剤を、神経系細胞培養物中などの細胞培養系で評価することができる。神経系細胞内への取り込みについて所定のレベルが観察される場合、その候補iRNA剤を動物で（例えばマウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコまたはサルにおいて）評価することができる。細胞培養物は、マウス、ラットまたはヒトの細胞培養物のような、哺乳動物の細胞培養物でよい。典型的な神経系細胞培養物には、皮質細胞株、線条体細胞株（例えばST14A）、褐色細胞腫細胞株（例えばPC12）、神経芽腫細胞株（例えばN2a）などが含まれる。細胞培養物は例えば非腫瘍由来または腫瘍由来のニューロン細胞株でもよく、例えば神経膠腫、膠芽腫、髄芽腫、網膜芽細胞腫または神経内分泌系の細胞株に由来するものでよい。典型的な細胞株はアメリカン・タイプ・カル

10

20

30

40

50

チャー・コレクション (ATCC) (米国ヴァージニア州マナッサス) より供給を受けることができる。

【0057】

親油性部分 (例えばコレステロール) を含んでいる候補 iRNA 剤は、神経系細胞内の標的 RNA (例えば htt RNA) に十分に相補的なアンチセンス鎖を含むことができ、iRNA 剤を評価する方法は、同剤が細胞内の標的 RNA の発現を減少させるかどうか測定することを含みうる。

【0058】

神経系細胞内へ取り込まれうる候補 iRNA 剤を、*in vivo* における神経系細胞内への取り込みに関してさらに試験することができる。例えば、動物体内への (例えば動物の脳内への) 直接注射などによって iRNA 剤を投与した後、注射部位の組織を iRNA 剤の取り込みについて調べることができる。iRNA 剤の検出は様々な方法によって遂行することができる。例えば、iRNA 剤が Cy3、Cy5、ローダミンまたは FITC 標識のような蛍光分子で標識される場合、iRNA 剤の取り込みはこの蛍光標識の取り込みをモニタリングすることにより分析可能である。検出はまた、例えば iRNA の存在を検出するために、オリゴヌクレオチドプローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーションによって遂行することもできる。標的遺伝子の生成物 (標的 RNA または標的タンパク質) を検出する分析も、神経系細胞内への候補 iRNA 剤の取り込みをモニタするために使用することができる。検出は、例えば、標的 RNA を検出するオリゴヌクレオチドプローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーションまたは標的ポリペプチドを検出する免疫組織化学法によるものでよい。別例として、神経系細胞を含んでいる組織から標的 RNA または標的タンパク質を単離し、RNA を例えばノーザンプロット分析、RT-PCR、または RNAse 防護アッセイにより、標的タンパク質をウエスタンプロット法により検出することが可能である。RNA またはタンパク質のレベルの減少が検出される場合は、観察されたような RNA またはタンパク質の発現の減少を引き起こすのに十分な量の iRNA 剤が細胞内に入っていると判断することができる。

【0059】

例えば、親油性部分に結合させた候補 iRNA 剤を提供し、神経系細胞、例えば htt 遺伝子などの標的遺伝子を発現する神経系細胞と接触させることが可能である。候補 iRNA 剤との接触の前後における標的遺伝子の発現レベルを比較することができる。標的遺伝子は、細胞内の内在性遺伝子でも外来遺伝子でもよい。標的遺伝子から発現される RNA またはタンパク質の量が iRNA 剤との接触後に低くなることが測定されれば、該 iRNA 剤が標的遺伝子の発現を下方制御すると結論付けることができる。細胞中の標的 RNA または標的タンパク質のレベルは、所望の任意の方法によって測定可能である。例えば、標的 RNA のレベルは、ノーザンプロット分析、ポリメラーゼ連鎖反応を伴う逆転写反応 (RT-PCR)、または RNAse 保護アッセイによって測定可能である。タンパク質のレベルは、例えばウエスタンプロット分析によって測定可能である。

【0060】

親油性部分 (例えばコレステロール) に結合させた iRNA 剤は、*in vitro* の系および *in vivo* の系のうち少なくともいずれかにおいて試験可能である。例えば、標的遺伝子またはそのフラグメントを、プラスミド上のレポーター遺伝子に融合させることが可能である。このプラスミドを iRNA 剤候補とともに用いて細胞 (例えば神経系細胞) をトランスフェクションすればよい。iRNA 剤の効力は、レポーター遺伝子の発現をモニタすることによって評価可能である。このレポーター遺伝子は、例えば、蛍光または *in situ* ハイブリダイゼーション法などによって *in vivo* でモニタ可能である。典型的な蛍光レポーター遺伝子には、緑色蛍光タンパク質およびルシフェラーゼが含まれるがこれらに限定されない。レポーター遺伝子の発現は、上記のような、ノーザンプロット、RT-PCR、RNAse 保護アッセイ、またはウエスタンプロット分析によってモニタすることができる。

【0061】

親油性部分（例えばコレステロール）に結合させた iRNA 剤の効力は、哺乳動物の細胞株（例えば、哺乳動物の神経系細胞株、例えばヒト神経芽細胞腫の細胞株など）において試験可能である。例えば、抗 h t t iRNA 剤の効力を試験するために有用な細胞株は、線条体細胞株（例えば S T 1 4 A 細胞株）である。親油性部分に結合させた iRNA 剤を取り込むことが可能なその他の哺乳動物の神経系細胞株には、ニューロンに分化した褐色細胞腫（例えば P C 1 2 細胞）、ニューロン初代培養物（例えばマウスまたはラットから単離してすぐに培養したもの）、および神経芽細胞腫細胞株が挙げられる。神経芽細胞腫の細胞株には、B E (2) - M 1 7、S H - S Y 5 Y（いずれもヒト）、および N 2 a（マウス）が挙げられる。

【 0 0 6 2 】

対照には、

(1) 例えば、内在性または外来性の、標的ではない（標的外の）RNA またはタンパク質の発現と比較することによって、標的遺伝子の発現の減少についてアッセイし、iRNA 剤の効力および特異性を試験すること；および

(2) 標的遺伝子の発現に対する効果の特異性を、「機能しない」iRNA 剤を投与することによって試験することが含まれる。

【 0 0 6 3 】

対照の機能しない iRNA 剤は、

(a) 細胞中で発現されない遺伝子を標的とするもの；

(b) ナンセンス配列（例えば、試験 iRNA を乱雑化（スクランブル）したもの）であるもの；または

(c) 標的遺伝子に対して相補的な配列を有するが、遺伝子発現をサイレンシングする能力を欠くことが事前の実験によってわかっているものであってよい。

【 0 0 6 4 】

親油性分子に結合させた候補 iRNA 剤は、ヌクレアーゼ耐性のための他の修飾を含むこともできる。分解性物質に対する耐性は以下のように評価することができる。修飾された候補 iRNA 剤（および好ましくは対照分子であって通常はヌクレアーゼ耐性に必要であると考えられている修飾を含まないもの）を、分解条件に曝露、例えば、分解性物質（例えばヌクレアーゼ）を含んでいる環境に曝露することができる。例えば、生体試料、例えば治療的使用において遭遇するかもしれない環境に類似の試料、例えば血液または細胞分画（例えば無細胞のホモジェネートまたは破碎した細胞）を使用することができる。その後、候補剤および対照を、多くの手法のうち任意のものによって耐分壊性について評価することができるであろう。例えば、候補剤および対照を、好ましくは曝露の前に、例えば放射標識もしくは酵素標識、または C y 3 または C y 5 のような蛍光標識で標識することができるであろう。対照 RNA および修飾 RNA を、分解性物質および任意選択で対照物（例えば不活性化（例えば熱で不活性化）した分解性物質）とともにインキュベートすることができる。次いで、修飾型分子および対照分子の物理的パラメータ（例えばサイズ）を測定する。パラメータは、物理的方法によって、例えば、分子がその元の長さを維持しているかどうかを評価するためにポリアクリルアミドゲル電気泳動法またはサイズ分離用カラムによって測定してもよいし、あるいは機能によって評価してもよい。別例として、ノーザンブロット分析を用いて未標識の修飾型分子の長さを分析することもできる。

【 0 0 6 5 】

候補剤を評価するために機能分析を使用することもできる。機能分析を、最初に、または初期の非機能的分析（例えば耐分壊性に関するアッセイ）の後に適用して、修飾が該分子の遺伝子発現サイレンシング能力を変化させるかどうか測定することもできる。例えば、細胞（例えばマウス細胞またはヒト細胞のような哺乳動物細胞）を、蛍光性タンパク質（例えば G F P）を発現するプラスミドと、該蛍光性タンパク質をコードする転写物に対して相同な候補 RNA 剤とともに同時トランスフェクションすることができる。例えば、

10

20

30

40

50

GFPのmRNAに相同な修飾siRNAを、GFP発現を阻害する能力について、トランスフェクションに候補siRNAを含めなかった対照細胞、例えば物質を何も加えない対照または非修飾RNAを加えた対照のうち少なくともいずれか一方との比較として細胞の蛍光の減少をモニタすることにより、分析することができる。遺伝子発現に対する候補剤の効力は、修飾および非修飾iRNA剤の存在下での細胞の蛍光を比較することにより評価することができる。

【0066】

標的RNAのレベルに対する修飾iRNA剤の作用は、陰性対照との比較として、標的mRNAのレベルの減少について分析するノーザンプロット法により、または標的タンパク質のレベルの減少について分析するウエスタンプロット法により、確認することができる。対照には、物質を何も加えない細胞または非修飾iRNA剤を加えた細胞のうち少なくともいずれか一方を含めることができる。

10

【0067】

アッセイには、iRNA剤によるサイレンシングの安定性および持続時間をモニタする経時的実験、ならびに分裂中の細胞と分裂していない細胞との比較モニタリングが含まれる。おそらく、分裂中の細胞においては、iRNAは時間の経過とともに希釈され、したがってサイレンシング効果の持続時間が減少する。この意味するところは、*in vivo*では投薬量を調整しなければならないこと、および/またはサイレンシング効果を維持するためにiRNA剤をより頻繁に投与しなければならないことである。分裂していない細胞をモニタするためには、血清の使用を中止して細胞を分裂停止させればよい。ニューロンは分裂終了細胞であり、したがって神経系細胞は、神経系の障害（例えばHDのような神経障害）の治療のための治療用組成物において使用するためのiRNA剤（例えば、抗*htt* iRNA剤）の安定性をアッセイするために適している。

20

【0068】

iRNA剤候補を、種間の交差反応性について評価することも可能である。例えば、異なる種（例えば、マウス対ヒト）から誘導された細胞株、または異なる種から単離された生体試料（例えば、血清または組織抽出物）を、親油性部分（例えばコレステロール）に結合させた候補iRNA剤でトランスフェクションすることができる。iRNA剤の効力を、異なる種由来の細胞について測定すればよい。

【0069】

30

iRNA剤の安定性試験、修飾、および再試験

神経系細胞への取り込み強化のために親油性物質と結合させた候補iRNA剤を、該iRNA剤が対象の身体に導入される場合などの、エンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼによる切断に対する感受性に関して評価することができる。修飾、特に切断（例えば、対象の体内に見出される成分による切断）に感受性を有する部位を同定するための方法を利用可能である。この成分（例えば、エキソヌクレアーゼまたはエンドヌクレアーゼ）は、特定の組織、器官、または体液（例えば、血液、血漿、または血清）などの身体の特定の領域に特異的である可能性がある。身体の特定の領域におけるエンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼによる切断のいずれかに感受性を有する、iRNA剤中の部位は、身体の他の領域における切断に対しては耐性である可能性がある。例示的な方法には

40

（1）対象の体内に存在する物質、および好ましくは治療用dsRNAが導入されるはずの身体のコマパートメント（治療剤が直接導入されるコマパートメント（例えば、循環系）ならびに治療剤が最終的に標的とするコマパートメントがあるが、場合によっては（例えば、眼および脳）、2つのコマパートメントは同じである）中に存在する成分が、dsRNA（例えば、iRNA剤）を切断する箇所を決定する工程、および

（2）dsRNA中の、（例えば、エンドヌクレアーゼ、エキソヌクレアーゼ、またはその両方による）1つまたは複数の切断箇所を同定する工程が含まれる。任意選択で、この方法はさらに、このような部位における切断を阻害するために修飾されたRNAを提供する工程を包含する。

50

【0070】

これらの工程は、以下のアッセイのうち1つ以上を使用することによって達成可能である。

(i)(a) 候補 dsRNA 剤 (例えば、iRNA 剤) を試験物質 (例えば、生体物質) と接触させる、

(b) サイズに基づくアッセイ (例えば、ゲル電気泳動) を使用して、iRNA 剤が切断されるか否かを決定する。好ましい実施形態では、経時変化が測定され、異なる時間インキュベートされた多数の試料がサイズに基づくアッセイに供される。好ましい実施形態では、候補の dsRNA は標識されない。この方法は、「ステインオール (stain all)」方法であってもよい。

10

【0071】

(ii)(a) 放射標識された候補 dsRNA (例えば、iRNA 剤) を供給する；

(b) 試験物質と候補 dsRNA を接触させる、

(c) サイズに基づくアッセイ (例えば、ゲル電気泳動) を使用して、iRNA 剤が切断されるか否かを決定する。好ましい実施形態では、経時変化が測定されるが、その場合は多数の試料が異なる時間インキュベートされてサイズに基づくアッセイに供される。好ましい実施形態において、測定は、フラグメント中に存在するヌクレオチド数の決定が可能な条件下でなされる。例えば、インキュベートされた試料を、切断産物の長さを決定可能にするマーカーを有するゲルで泳動する。このゲルは、「ラダー」状の消化物である標準品を含んでもよい。センス鎖またはアンチセンス鎖のいずれかを標識してもよい。好ましくは、一方の鎖のみが特定の実験において標識される。標識は、5' 末端、3' 末端、または内部の位置に組み込むことが可能である。フラグメントの長さ (おおよびしたがって切断箇所) は、上記のラダーに基づくフラグメントのサイズ、おおよび RNAse T1 などの部位特異的エンドヌクレアーゼを用いたマッピングから決定可能である。

20

【0072】

(iii) 任意の方法 (例えば、上記のうちの1つ) によって生じたフラグメントを質量分析法によって分析可能である。試験物質と iRNA 剤を接触させた後、iRNA 剤を、例えば、フェノール-クロロホルム抽出とその後の沈殿処理によって精製 (例えば、部分精製) 可能である。次いで、液体クロマトグラフィを使用してフラグメントを分離可能であり、そして質量分析法を使用して各フラグメントの分子量を決定することができる。このことにより、切断のメカニズム、例えば、5' または 3' エキソヌクレアーゼ切断などの直接的なリン酸の切断によるものか、または環状リン酸の形成を介して 2' OH によって仲介されているかを決定することができる。

30

【0073】

2 以上の iRNA 剤 (例えば、抗 htt iRNA 剤) を評価することが可能である。この評価を用いて、治療用 iRNA 剤に使用する配列を選択することが可能である。例えば、評価することによって、対象の体内の関連コンパートメント中に存在する物質 (例えば、酵素) によって切断される最適な (通常最小の) 数の部位を有する配列を選択することが可能になる。最適化された配列を選択するために、2 以上の iRNA 候補を評価すればよい。例えば、2 以上の候補を評価し、最適な特性を有するもの (例えば、切断部位がより少ないもの) を選択することが可能である。

40

【0074】

切断部位に関する情報は、修飾 (例えば、切断を減少させるための修飾) のためのバックボーン原子、糖、または塩基を選択するために使用可能である。

例示的な修飾には、本明細書に記載される修飾などの、エンドヌクレアーゼによる分解を阻害する修飾が含まれる。特に好ましい修飾には：2' - 修飾、例えば、センス鎖またはアンチセンス鎖 (とりわけセンス鎖) の U への 2' OMe 部分の付与；バックボーンの修飾、例えば、リン酸バックボーン内の O を S に置換する修飾、例えば、特にアンチセンス鎖の U または A またはその両方へのホスホロチオエート修飾の付与；U から C5 アミノリンカーへの置換；A から G への置換 (配列の変化はセンス鎖上に配置されアンチセンス

50

鎖上には配置されないことが好ましい) ; および 2' 位、6' 位、7' 位、または 8' 位の修飾、が含まれる。好ましい実施形態は、これらの修飾のうち 1 つ以上がセンス鎖上に存在するがアンチセンス鎖上には存在しない実施形態、またはアンチセンス鎖が有するような修飾がより少ない実施形態である。

【0075】

例示的な修飾には、エキソヌクレアーゼによる分解を阻害する修飾も含まれる。エキソヌクレアーゼによる分解を阻害する修飾の例は本明細書において見出され得る。特に好ましい修飾には：2' - 修飾、例えば、3' 突出部の例えば 3' 末端 (3' 末端とは、文脈から示されるように、分子の 3' 位の原子または最も 3' 側の構成部分、例えば最も 3' 側の P または 2' 位を意味する) への 2' OMe 部分の付与 ; バックボーンの修飾、例えば、P から S への置換を伴う修飾、例えば、ホスホロチオエート修飾の付与、または 3' 突出部の例えば 3' 末端におけるメチル化 P の使用 ; 2' - 修飾の組み合わせ、例えば、2' OMe 部分およびバックボーンの修飾 (例えば、P から S への置換を伴う修飾、例えば、ホスホロチオエート修飾の供給、または 3' 突出部の例えば 3' 末端におけるメチル化 P の使用) の付与 ; 3' アルキルを用いる修飾 ; 3' 突出部の例えば 3' 末端における脱塩基ピロリジンをを用いる修飾 ; ナプロキセン、イブプロフェン、または分解を阻害する他の部分を用いる 3' 末端の修飾、が挙げられる。

10

【0076】

これらの方法は、神経系細胞への取り込み強化のために親油性部分 (例えばコレステロール) に結合させた治療用 iRNA 剤を選択およびまたは最適化するために使用可能である。

20

【0077】

該方法は、親油性部分に結合させた候補 iRNA 剤、および修飾 (例えば、分解を阻害する修飾、dsRNA 分子を標的とする修飾、またはハイブリダイゼーションを調節する修飾) をさらに含む候補 iRNA 剤を評価するために使用可能である。このような修飾は本明細書に記載されている。切断アッセイを、修飾または非修飾の候補が標的をサイレンシングする能力を測定するためのアッセイと組み合わせることも可能である。例えば、標的 (または標的でない配列) をサイレンシングする能力を評価するために候補剤を (任意選択で) 試験し、切断に対する感受性を評価し、修飾された候補剤を作製するために候補剤を (例えば、本明細書に記載されるように、例えば、分解を阻害するために) 修飾し、修飾された候補剤を、サイレンシング能力および分解耐性のうち一方または両方について試験することができよう。この手順を繰り返しても良い。修飾は、一度に 1 つ導入してもよいし、まとめて導入してもよい。iRNA 剤がサイレンシングする能力をモニタするために、細胞を用いる方法を使用することもできる。これに続いて、活性を確認するために異なる方法 (例えば、動物全体を用いる方法) を実施することも可能である。

30

【0078】

試験物質とは、生体物質、例えば、生体試料、組織抽出物もしくは調製物、血清、dsRNA を修飾 (例えば、切断) することが知られている既知の酵素またはその他の分子 (例えば、エンドヌクレアーゼ) を指す。試験物質は、RNAi 剤が曝露されることになる体内コンパートメントに存在し得る。例えば、神経組織に (例えば、脳または脊髄に) 直接的に投与される iRNA 剤については、試験物質は脳組織抽出物または脊髄液であり得る。眼に直接的に供給される iRNA 剤は、眼の抽出物とともにインキュベートすればよい。

40

【0079】

in vivo 試験

親油性部分と結合され、かつ培養中の神経系細胞に侵入する能力が強化されていると特定された iRNA 剤を、動物モデル (例えば、マウスまたはラットなどの哺乳動物のモデル) において *in vivo* での機能性について試験することができる。例えば、iRNA 剤を動物に投与して、該 iRNA 剤の生体内分布 (例えば神経系細胞への取り込み)、安定性、および神経系細胞内の標的遺伝子の発現を阻害する能力に関して評価することが

50

できる。

【0080】

iRNA 剤は、ヒトに投与するのと同じ様式で動物モデルに投与することができる。例えば、iRNA 剤を脳の標的領域に（例えば、皮質、黒質、淡蒼球、海馬、または線条体に）直接注射し、一定時間の後に脳を採取し組織薄片を同剤の分布について調べることができる。

【0081】

iRNA 剤について、その細胞内分布についても評価することができる。この評価は、iRNA 剤が細胞に取り込まれたか否かを測定することを包含し得る。この評価は、iRNA 剤の安定性（例えば、半減期）を測定することを包含し得る。in vivoでのiRNA 剤の評価は、追跡可能なマーカー（例えば、Cy3、Cy5、FITC、ローダミン、またはフルオレセインなどの蛍光マーカー；³²P、³³P、もしくは³Hなどの放射活性標識；金粒子；または免疫組織化学法のための抗原粒子）と結合させたiRNA 剤の使用によって容易となりうる。

10

【0082】

生体内分布をモニタするために有用なiRNA 剤は、in vivoでの遺伝子サイレンシング活性を欠いていてもよい。例えば、該iRNA 剤は、その動物には存在しない遺伝子を標的としていてもよいし（例えば、マウスに注射されるiRNA 剤がルシフェラーゼを標的としていてもよい）、またはiRNA 剤がいかなる遺伝子も（例えば、内在性のいかなる遺伝子も）標的としないナンセンス配列を有していてもよい。iRNA の局在化/生体内分布は、iRNA 剤に結合された追跡可能な標識、例えば、上記の追跡可能な薬剤などによってモニタ可能である。

20

【0083】

親油性部分に結合されたiRNA 剤を、標的遺伝子の発現を下方制御する能力に関して評価することができる。in vivoでの標的遺伝子の発現レベルは、例えばin situハイブリダイゼーションによって、またはiRNA 剤に曝露させる前後に組織からRNAを単離することによって測定可能である。標的RNAは、RT-PCR、ノーザンプロット、またはRNAase保護アッセイを含むがこれらに限定されない任意の所望の方法によって検出可能である。代替例として、または追加として、標的遺伝子の発現を、iRNA 剤で処理された組織抽出物についてウエスタンプロット分析を実行することによってモニタすることが可能である。

30

【0084】

神経系細胞内への取り込み強化のために親油性物質に結合されたiRNA 剤を、マウスの神経疾患モデルで試験することができる。例えば、親油性物質に結合されたiRNA 剤を、ヒトhtt遺伝子の野生型コピーを有しているマウスのようなマウスのHDモデルで、あるいは突然変異型のヒトhtt（例えば、伸長したCAGリピートを有しているhtt遺伝子）を有しているマウスで試験することができる。治療処理したマウスモデルを、HDに伴う症状の減少（例えばクラスピングの減少）について観察することができる。治療処理したマウスを、他の表現型、例えば、脳細胞（例えば脳の中型有棘ニューロン）内のDARPPタンパク質の発現について評価することもできる。1つの実施形態では、そのような第2のアッセイには、ウエスタンプロット分析または有棘ニューロンを含む脳組織のin situハイブリダイゼーション用の、マウス脳の解剖が必要である。

40

【0085】

iRNA の化学

本明細書中に記載されているのは、RNAiを仲介する単離iRNA 剤（例えば、dsRNA分子）である。このiRNA 剤は、神経系細胞への取り込み強化のために、該iRNA を少なくとも1つの親油性部分（例えば、コレステロール分子）に結合させることにより修飾されている。

【0086】

概して、本発明において着目されたiRNA 剤は、該iRNA 剤またはそのフラグメン

50

トが標的遺伝子の下方制御を仲介することができるように、標的遺伝子（例えば、神経系細胞内で発現される標的遺伝子）に対して十分な相同性を有する領域を含み、かつヌクレオチドの長さが十分であるべきである。iRNA剤と標的との間に必ずしも完全な相補性が存在する必要はないが、その一致は、iRNA剤またはその切断産物が、例えば、標的RNA（例えば、mRNA）のRNAi切断によって、配列特異的なサイレンシングをもたらすのを可能にするために十分でなくてはならない。したがって、本発明で着目されるiRNA剤は、センス鎖およびアンチセンス鎖からなる薬剤を含み、各鎖は、鎖あたり1、2、または3個以下のヌクレオチドがそれぞれ他のヌクレオチドで置換されている（例えばアデノシンがウラシルに置き換えられる）ことを除いて、神経系細胞中で発現される遺伝子の配列と（以下に定義されるように）本質的に同一の、少なくとも16、17または18ヌクレオチドの配列を含んでなり、同時に哺乳動物細胞における標的遺伝子の発現を阻害する能力は本質的に保持している。したがって、典型的なiRNA剤は、標的遺伝子の配列と同一の少なくとも15ヌクレオチドを有するが、ただし標的mRNAの配列に関して、またはセンス鎖とアンチセンス鎖との間に、1、2または3塩基のミスマッチが導入されているものでよい。特にアンチセンス鎖における、標的mRNAの配列に対するミスマッチは、末端領域において最も寛容性が高く、存在する場合、好ましくは末端領域にあり、例えば、5'末端および/または3'末端の6ヌクレオチド以内、5ヌクレオチド以内、4ヌクレオチド以内、または3ヌクレオチド以内であり、もっとも好ましくは、センス鎖の5'末端またはアンチセンス鎖の3'末端の6ヌクレオチド以内、5ヌクレオチド以内、4ヌクレオチド以内、または3ヌクレオチド以内にある。センス鎖には、該分子の二本鎖全体の性質を維持するために十分なアンチセンス鎖との相補性があればよい。

10

20

30

40

50

【0087】

iRNA剤の一本鎖領域は、修飾されているかまたはヌクレオシド代用物を含むことが多く、例えば、ヘアピン構造の対合していない領域（例えば、2つの相補性領域をつなぐ領域）は、修飾またはヌクレオシド代用物を有し得る。iRNA剤の3'末端もしくは5'末端のうち一方または両方を、例えば、エキソヌクレアーゼに対して安定化するために修飾すること、またはアンチセンスsRNA剤をRISC内に優先的に入れるために修飾することも好ましい。修飾は、C3（またはC6、C7、C12）アミノリンカー、チオールリンカー、カルボキシルリンカー、非ヌクレオチド性スパーサー（C3、C6、C9、C12、脱塩基、トリエチレングリコール、ヘキサエチレングリコール）、特殊なピオチン、あるいは、ホスホロアミダイトとして提供され、かつ新たなDMT保護されたヒドロキシル基を有し、RNA合成の際に複数のカップリングを可能にするフルオレセイン試薬を含むことが可能である。本明細書中の他所で議論するように、iRNA剤は修飾されるか、またはヌクレオチド代用物に加えてSRMSを含むことが多いであろう。SRMSはリボヌクレオチドのリボース糖を、別の部分、例えば糖質以外の（好ましくは環式の）担体で置換する。SRMSについては後に詳細に説明する。

【0088】

哺乳動物の細胞において、長いds iRNA剤は、有害なことの多いインターフェロン応答を誘導する可能性があるが、短いds iRNA剤は、少なくとも細胞または宿主に対して有害なほどにはインターフェロン応答を誘発しない。本発明のiRNA剤は、哺乳動物の細胞においてインターフェロン応答を誘発しない十分に短い分子を含む。従って、iRNA剤の組成物（例えば、本明細書に記載のように製剤化されたもの）を哺乳動物の細胞に投与して、神経系細胞において発現される遺伝子（例えばhett遺伝子）の発現をサイレンシングすると同時にインターフェロン応答を回避することが可能である。インターフェロン応答を誘発しない程度に十分短い分子は、本明細書中では、sRNA剤または短いiRNA剤と呼ばれる。「sRNA剤または短いiRNA剤」は、本明細書中で使用される場合、iRNA剤であって、例えば、ヒト細胞において有害なインターフェロン応答を誘導しない十分に短い二本鎖RNA剤または一本鎖RNA剤を指し、例えば、同RNA剤は、60ヌクレオチド対未満、しかし好ましくは50、40、または30ヌクレオチド対未満の二本鎖領域を有する。

【0089】

標的RNAに対する相同性および標的遺伝子を下方制御する能力に加えて、iRNA剤は好ましくは以下の特性のうち1つ以上を有することになる：

(1) 後述の式1、2、3、または4のものである；

(2) 一本鎖である場合、1つ以上のリン酸基または1つ以上のリン酸基アナログを含む5'修飾を有する；

(3) 非常に多数の塩基が修飾されていても、特異的な塩基対を形成し、かつ標的RNAとともに熱力学的安定性が十分な二重鎖構造を形成して標的RNAの活性を変化させることが可能である；

(4) 非常に多数またはすべてのヌクレオシドが修飾されているにもかかわらず、なお「RNA様の」特性を有する。すなわち、リボヌクレオチドに基づく含量では独占的でなく、または部分的でさえあるにも関わらず、RNA分子の全体的な構造上の特性、化学的特性および物理的特性を有する。例えば、すべてのヌクレオチド糖が2'ヒドロキシルの代わりに例えば2'OMeまたは2'フルオロを含むことが可能である。このようなデオキシリボヌクレオチド含有剤は、なおRNA様の特性を示すことが予測されうる。理論によって束縛されることは望まないが、電気的に陰性のフッ素は、リボースのC2'位に結合されたときに軸方向に配向する傾向がある。このフッ素の空間的な優先傾向は、ひいては、糖のC_{3'}内部にくぼみを形成させる。これは、RNA分子中で観察されるのと同じくぼみ形成様式であり、RNAに特徴的なAファミリー型ヘリックスを生じる。さらに、フッ素は良好な水素結合のアクセプターであるので、RNA構造を安定化させることが知られている水分子と同じ水素結合相互作用に関与することが可能である。一般的には、糖の2'位で修飾された部分は、デオキシリボヌクレオチドの2' H部分よりも、リボヌクレオチドの2' OH部分により特徴的である水素結合に参加することができることが好ましい。好ましいiRNA剤は：その糖の全体または少なくとも50、75、80、85、90、もしくは95%において、C_{3'}内部にくぼみを示し；RNAに特徴的なAファミリー型ヘリックスを生じることが可能な程度に十分な量の糖においてC_{3'}内部のくぼみを示し；C_{3'}内部のくぼみ構造ではない20個、10個、5個、4個、3個、2個、または1個以下の糖を有する。これらの制限はアンチセンス鎖において特に好ましく；

糖のC_{3'}内部のくぼみを備えた好ましい2'修飾には：

2' OH、2' OMe、2' Oメトキシエチル、2' Oアミノプロピル、2' F、2' OCH₂CO NHMe、2' OCH₂CH₂OCH₂CH₂N(Me)₂、LNAが含まれる；

(5) 修飾の性質にかかわらず、またオリゴヌクレオチド剤がデオキシヌクレオチドまたは修飾デオキシヌクレオチドを含むことが可能であるとしても、DNA分子、あるいは分子中のヌクレオチドの50、60、もしくは70%より多くがデオキシリボヌクレオチドであるかまたは2'位がデオキシである修飾デオキシリボヌクレオチドである任意の分子は、オリゴヌクレオチド剤の定義から除外することが好ましい。

【0090】

「ds iRNA剤」(「二本鎖(ds) iRNA剤」の略語)は、本明細書中で使用される場合、鎖間のハイブリダイゼーションにより二本鎖構造を形成することが可能な、2以上、好ましくは2本の鎖を含むiRNA剤である。

【0091】

二本鎖iRNA剤のアンチセンス鎖は、14、15、16、17、18、19、25、29、40、または50ヌクレオチド長に等しいか、または少なくとも14、15、16、17、18、19、25、29、40、または50ヌクレオチド長であるべきである。この鎖は、60、50、40、または30ヌクレオチド長以下であるべきである。好ましい範囲は、15~30、17~25、19~23、および19~21ヌクレオチド長である。

【0092】

二本鎖iRNA剤のセンス鎖は、14、15、16、17、18、19、25、29、

10

20

30

40

50

40、または50ヌクレオチド長に等しいか、あるいは少なくとも14、15、16、17、18、19、25、29、40、または50ヌクレオチド長であるべきである。該センス鎖は、60、50、40、または30ヌクレオチド長以下であるべきである。好ましい範囲は、17~25、19~23、および19~21ヌクレオチド長である。

【0093】

二本鎖iRNA剤の二本鎖部分は、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、29、40、または50ヌクレオチド対の長さであるか、または少なくとも15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、29、40、または50ヌクレオチド対の長さであるべきである。該二本鎖部分は、60、50、40、または30ヌクレオチド対以下の長さであるべきである。好ましい範囲は、15

10

【0094】

二本鎖iRNA剤のアンチセンス鎖およびセンス鎖の一方または両方を修飾することが望ましい場合がある。ある例において、これらの鎖は同じ修飾または同じ部類の修飾を有するが、他の例において、センス鎖およびアンチセンス鎖は異なる修飾を有し、例えば、ある例ではセンス鎖のみが修飾されることが望ましい。センス鎖のみを、例えばセンス鎖を不活性化するために修飾することが望ましい場合があり、例えば、センス鎖は、センス鎖を不活性化し、かつ活性なiRNA/タンパク質またはRISCの形成を妨害するために修飾可能である。これは、センス鎖の5'リン酸化を妨害する修飾によって、例えば、5'-O-メチルリボヌクレオチドを用いる修飾によって達成可能である(ニーケネン(Nykaenen)ら、(2001)「ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway.」Cell 第107巻、p.309~321を参照のこと)。リン酸化を妨害する他の修飾、例えば、単に5'-OHをO-MeではなくHによって置換することもまた使用可能である。代替例として、大きな嵩高い基が5'リン酸基に付加されてこの基がホスホジエステル結合に転換されてもよいが、これは、ホスホジエステラーゼがこのような結合を切断して機能的なsRNA 5'末端を生じる可能性があるため、あまり望ましくないかもしれない。アンチセンス鎖の修飾には、5'リン酸化ならびに本明細書中で議論される任意の他の5'修飾が含まれる。

20

【0095】

センス鎖およびアンチセンス鎖は、ds iRNA剤が該分子の一端または両端に一本鎖領域または非対合領域を含むように選択されることが好ましい。したがって、ds iRNA剤は、好ましくは突出部(例えば、1つまたは2つの5'または3'突出部であるが好ましくは2~3ヌクレオチドの3'突出部)を含むように対合したセンス鎖およびアンチセンス鎖を含む。多くの実施形態は3'突出部を有する。好ましいiRNA剤は、一本鎖突出部、好ましくは、各々の末端に1~4(または好ましくは2~3)ヌクレオチド長の3'突出部を有する。この突出部は、ある鎖が他の鎖よりも長い結果として生じてもよいし、または、ずれを有する同じ長さの2つの鎖から生じてもよい。5'末端はリン酸化されることが好ましい。

30

【0096】

二重鎖領域についての好ましい長さは、例えば、上記に議論したiRNA剤の範囲において、15~30ヌクレオチド長、最も好ましくは18、19、20、21、22、および23ヌクレオチド長である。iRNA剤は、長さおよび構造において、長いdsRNA由来の天然のDicer処理産物に類似していてもよい。sRNA剤の2つの鎖が連結される(例えば、共有結合される)実施形態もまた含まれる。ヘアピン、または他の一本鎖構造物であって必要とされる二本鎖領域および好ましくは3'突出部を提供するものもまた、本発明の範囲内にある。

40

【0097】

本明細書中で使用される場合、語句「RNAiを仲介する」とは、ある作用物質が配列特異的な様式で標的遺伝子をサイレンシングする能力をいう。「標的遺伝子のサイレンシング」とは、該作用物質と接触していないときには標的遺伝子の一定の産物を含有かつノ

50

または分泌している神経系細胞が、該作用物質と接触すると、その遺伝子産物を、該作用物質と接触しなかった同じ神経系細胞と比べて少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%少なく含有かつ/または分泌するようになるプロセスを意味する。例えば、標的遺伝子のそのような産物は、メッセンジャーRNA (mRNA)、タンパク質、または調節因子であってよい。理論によって束縛されることを望まないが、本明細書に記載の作用物質によるサイレンシングは、RNAiの機構またはプロセスおよびガイドRNA (例えば、15~30ヌクレオチド対のiRNA剤)を使用すると考えられる。

【0098】

本明細書中で使用される場合、用語「相補的」は、安定かつ特異的な結合が本発明の化合物と標的RNA分子 (例えば、h tt mRNA分子)との間に起こるような、十分な程度の相補性を示すために使用される。特異的結合には、特異的結合が望まれる条件下で、すなわち、インビボアッセイもしくは治療的処置の場合においては生理学的条件下で、またはインビトロアッセイの場合においてはそのアッセイが実行される条件下で、オリゴマー化合物が非標的配列に非特異的に結合するのを回避するために十分な程度の相補性が必要である。非標的配列は、一般的には少なくとも4ヌクレオチド異なる。

10

【0099】

本明細書において使用されるように、iRNA剤は、該iRNA剤が標的mRNAによってコードされるタンパク質の産生を低減する場合、標的RNA (例えば、標的mRNA)に「十分に相補的」である。iRNA剤はまた、標的RNAに対して (SRMS含有サブユニットを除外して)「厳密に相補的」であってもよく、例えば、標的RNAおよびiRNA剤は、好ましくは、厳密に相補的な領域においてワトソン-クリック塩基対のみから構成されるハイブリッドを形成するようにアニールすることができる。「十分に相補的な」標的RNAは、標的RNA (例えば、h tt RNA)に厳密に相補的である領域 (例えば、少なくとも7ヌクレオチドの領域)を含み得る。さらに、ある実施形態において、iRNA剤は、単一ヌクレオチドの違いを特異的に区別する。

20

【0100】

神経系細胞への取り込み強化のために親油性物質と結合させたiRNA剤には、例えば、効力を改善するためにさらに修飾されたiRNA剤、およびヌクレオシド代用物のポリマーが含まれる。未修飾のRNAとは、核酸の成分、すなわち、糖、塩基、およびリン酸の部分が、天然に存在する、好ましくは人体において天然に存在するのと同じかまたは実質的に同じである分子をいう。当該分野では、修飾RNAのような、希少または異常であるが天然に存在するRNAについて言及されており、例えば、リンバック (Limback)ら、(1994)、Nucleic Acids Res. 22: 2183~2196を参照されたい。しばしば修飾RNAと呼ばれるこのような希少RNAまたは異常RNAは、一般的には転写後修飾の結果であるが、本明細書中で使用される場合には用語「非修飾RNA」の範囲内にある。修飾RNAは、本明細書中で使用される場合、1つ以上の核酸の成分、すなわち、糖、塩基、およびリン酸の部分が、天然に存在するものと異なる、好ましくは人体において存在するものと異なる分子をいう。これらは修飾RNAと呼ばれるが、当然、修飾されているので厳密に言えばRNAではない分子を含むことになる。ヌクレオシド代用物は、リボリン酸バックボーンが、塩基が正しい空間的關係に提示され、その結果ハイブリダイゼーションがリボリン酸バックボーンの場合に見られるのと同様になることを可能にする非リボリン酸構築物 (例えば、リボリン酸バックボーンの非荷電型模倣物)で置き換えられている分子である。上記のすべての例について本明細書中で議論する。

30

40

【0101】

以下の議論の多くが一本鎖分子に言及する。しかしながら、当然であるがds iRNA剤 (例えば、部分的なds iRNA剤)が必要または好適である。したがって、当然ながら、以下に記載される一本鎖構造から作られる二本鎖構造 (例えば、2つの別々の分子が接触して二本鎖領域を形成する場合、または二本鎖領域が分子内対合によって形成さ

50

れる場合（例えば、ヘアピン構造）は本発明の範囲内にある。好ましい長さについては本明細書中の他の箇所に述べる。

【0102】

核酸は、サブユニットまたはモノマーの重合体であるので、以下に記載される修飾の多くが核酸内で反復される位置に存在する（例えば、塩基、またはリン酸部分、またはリン酸部分の結合していないOの修飾）。ある場合において修飾は核酸中の対象位置すべてに存在するが、しかし、多くの場合および実際上大部分においては、そうではない。例として、修飾は、3'または5'末端位置にのみ存在する場合があります、末端領域（例えば、末端ヌクレオチド上の位置または鎖の最後の2、3、4、5、もしくは10ヌクレオチド）にのみ存在する場合もある。修飾は、二本鎖領域、一本鎖領域、または両方に存在することができる。修飾は、RNAの二本鎖領域中にのみ存在してもよいし、またはRNAの一本鎖領域にのみ存在してもよい。リガンドが、3'末端、5'末端、または内側の位置、またはこれらを組み合わせた位置に結合していてもよい。例えば、リガンドは3'末端および5'末端にあってもよいし；3'末端と1以上の内側の位置にあってもよいし；5'末端と1以上の内側の位置にあってもよいし；3'末端、5'末端および1以上の内側の位置にあってもよい。例えば、結合していないOの位置のホスホロチオエート修飾が、一方もしくは両方の末端にのみ存在してもよいし、末端領域（例えば、末端ヌクレオチド上の位置または鎖の最後の2、3、4、5、もしくは10ヌクレオチド内）にのみ存在してもよいし、または二本鎖および一本鎖の領域に、特に末端に存在することも可能である。同様に、修飾はセンス鎖上でも、アンチセンス鎖上でも、両方の鎖上にあってもよい。ある場合には、センス鎖およびアンチセンス鎖は同じ修飾または同じ部類の修飾を有するが、別の場合にはセンス鎖およびアンチセンス鎖は異なる修飾を有し、例えばある例では一方の鎖（例えばセンス鎖）のみを修飾することが望ましい。5'末端がリン酸化されてもよい。特定の好ましい実施形態では、センス鎖はコレステロールの付加により3'末端が修飾される。

10

20

【0103】

ある実施形態では、一本鎖突出部（例えば、5'もしくは3'突出部、もしくはその両方）において、例えば、安定性を増強すること、突出部に特定の塩基を含めること、または修飾ヌクレオチドもしくはヌクレオチド代用物を含めることが特に好ましい。例えば、突出部にプリンヌクレオチドを含めることが望ましいことがあり得る。ある実施形態において、3'または5'の突出部の塩基のすべてまたは一部の塩基が、例えば、本明細書中に記載される修飾を用いて修飾される。修飾には、例えば、リボース糖の2'OH基の修飾の使用、例えば、リボヌクレオチドの代わりとしてのデオキシリボヌクレオチド（例えば、デオキシチミジン）の使用、およびリン酸基の修飾（例えば、ホスホチオエート修飾）が含まれる。突出部は、標的配列と相同である必要はない。

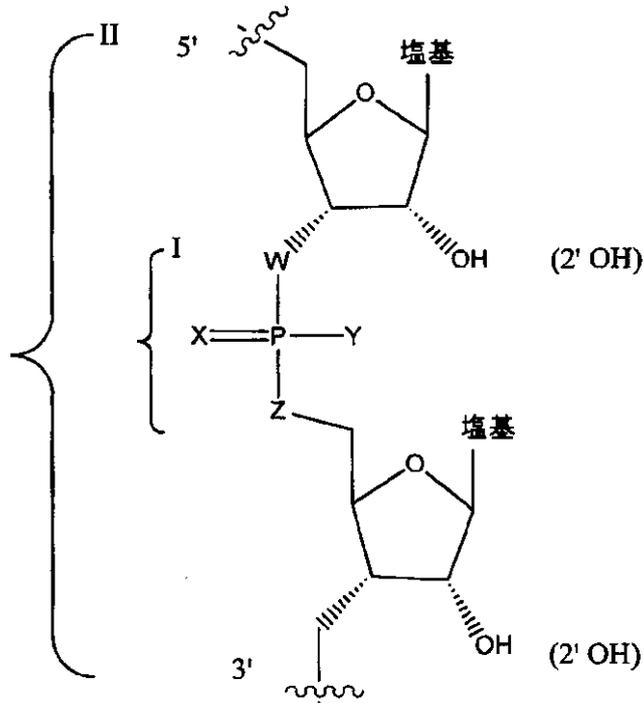
30

【0104】

修飾およびヌクレオチド代用物について以下に議論する。

【0105】

【化 1】



式1

10

20

【0106】

上記に式1において提示される骨格はリボ核酸の一部を表す。基本成分はリボース糖、塩基、末端のリン酸、およびヌクレオチド間リン酸リンカーである。塩基が天然に存在する塩基（例えば、アデニン、ウラシル、グアニン、またはシトシン）であり、糖が非修飾2'ヒドロキシルリボース糖（示されているとおり）であり、かつW、X、およびZがすべてOである場合、式1は天然に存在する非修飾オリゴリボヌクレオチドを表す。

【0107】

非修飾オリゴリボヌクレオチドは、ある適用においては最適とはいえない場合があり、例えば、非修飾オリゴリボヌクレオチドは、例えば細胞のヌクレアーゼによる分解を受けやすい可能性がある。ヌクレアーゼは核酸のホスホジエステル結合を加水分解することができる。しかし、上記のRNA成分の1つ以上を化学修飾すると特性を改善することが可能であり、例えば、オリゴリボヌクレオチドをヌクレアーゼに対してより安定性にすることが可能である。未修飾のオリゴリボヌクレオチドはまた、iRNA剤にリガンドまたは他の構成部分を結合するための係留地点を提供するという観点で最適とはいえない場合もある。

30

【0108】

修飾核酸およびヌクレオチド代用物は、以下の1つ以上を含むことが可能である：

40

(i) 変更、例えば、結合していないリン酸の酸素（XおよびY）の一方もしくは両方の置換、および/または結合しているリン酸の酸素（WおよびZ）の1つ以上の置換（リン酸が末端位置にある場合、位置WまたはZの1つは、天然に存在するリボ核酸中ではさらなるエレメントにリン酸を結合しないことになる。しかし、用語の単純化のために、別途注記される場合以外は、核酸の5'末端のW位置および核酸の3'末端のZ位置は、本明細書中で使用される用語「結合していないリン酸の酸素」の範囲内にある）；

(ii) 変更、例えば、リボース糖の構成成分（例えば、リボース糖上の2'ヒドロキシル）の置換、またはリボース糖の、リボース以外の構造（例えば、本明細書中に記載されるようなもの）による大規模置換；

(iii) リン酸部分（括弧I）の、「リンを含まない（dephospho）」リン

50

カーによる大規模置換；

(i v) 天然に存在する塩基の修飾または置換；

(v) リボース - リン酸バックボーン (括弧 I I) の置換または修飾；

(v i) RNA の 3 ' 末端もしくは 5 ' 末端の修飾、例えば、末端リン酸基の除去、修飾、または置換、あるいは RNA の 3 ' 末端もしくは 5 ' 末端のいずれかへの、構成部分 (例えば、蛍光標識部分) の結合。

【 0 1 0 9 】

用語「置換」、「修飾」、「変更」などは、この文脈で使用される場合、任意のプロセスの限定を意味するものではなく、例えば、修飾とは、標準のまたは天然に存在するリボ核酸を用いて開始しかつそれを修飾して修飾リボ核酸を産生しなくてはならないことを意味するものではなく、「修飾された」とは、単に天然に存在する分子との違いを意味する。

10

【 0 1 1 0 】

当然のことであるが、ある化学的実体の実際の電子的構造を、たった 1 つの標準的な型 (すなわち、ルイス構造) によって十分に表すことは可能ではない。理論によって束縛されることを望まないが、実際の構造はそうではなく、共鳴型または共鳴構造として集合的に知られる 2 以上の標準的な型の何らかの混合物または加重平均であり得る。共鳴構造は、個別の化学的実体ではなく、紙の上でのみ存在する。これらは、特定の化学的実体についての結合電子および非結合電子の配置または「局在」においてのみ、互いに異なっている。1 つの共鳴構造が他の構造よりも高い程度で混合物に寄与することが可能である。したがって、本発明の実施形態について記載かつ図示される説明は、特定の種類についての主要な共鳴型として当該分野で認識されているものに関してなされる。例えば、すべてのホスホロアミデート (結合していない酸素の窒素による置換) は、上記の図においては $X = O$ および $Y = N$ で表される。

20

【 0 1 1 1 】

リン酸基の置換

リン酸基は、リン以外のものを含む接続部によって置換可能である (上記の式 1 中の括弧 I を参照のこと) 。理論によって束縛されることは望まないが、荷電したホスホジエステル基はヌクレアーゼ分解における反応中心なので、この基を中性の構造模倣物で置換するとヌクレアーゼ安定性が強化されるはずであると考えられる。やはり理論によって束縛されることは望まないが、ある実施形態においては、荷電したリン酸基を中性部分によって置換する変更を導入することが望ましい可能性がある。

30

【 0 1 1 2 】

リン酸基を置換することが可能な構成部分の例には、シロキサシ、カーボネート、カルボキシメチル、カルバメート、アミド、チオエーテル、エチレンオキサイドリンカー、スルホネート、スルホンアミド、チオホルムアセタール、ホルムアセタール、オキシム、メチレンイミノ、メチレンメチルイミノ、メチレンヒドラゾ、メチレンジメチルヒドラゾ、およびメチレンオキシメチルイミノが挙げられる。好ましい置換基には、メチレンカルボニルアミノ基およびメチレンメチルイミノ基が含まれる。

【 0 1 1 3 】

候補の修飾は後述のようにして評価可能である。

リボリン酸バックボーンの置換

リン酸リンカーおよびリボース糖がヌクレアーゼ耐性のヌクレオシドまたはヌクレオチド代用物によって置換されている、オリゴヌクレオチドを模倣するバックボーンを構築することも可能である (上記の式 1 の括弧 I I を参照のこと) 。理論によって束縛されることは望まないが、反復的に荷電したバックボーンが存在しなければ、ポリアニオンを認識するタンパク質 (例えば、ヌクレアーゼ) への結合が減少すると考えられる。やはり理論によって束縛されることは望まないが、ある実施形態においては、塩基を中性の代用バックボーンに連結する変更を導入することが望ましい可能性がある。

40

【 0 1 1 4 】

50

例には、モルホリノ、シクロブチル、ピロリジン、およびペプチド核酸 (PNA) などのヌクレオシド代用物が含まれる。好ましい代用物は PNA 代用物である。

候補の修飾は後述のようにして評価可能である。

【0115】

末端修飾

オリゴヌクレオチドの 3' 末端および 5' 末端を修飾することが可能である。このような修飾は、分子の 3' 末端、5' 末端、または両方の末端にあってもよい。該修飾には、末端のリン酸全体の、または末端リン酸基の 1 つ以上の原子の、修飾または置換が含まれる。例えば、オリゴヌクレオチドの 3' 末端および 5' 末端を、他の機能的分子実体、例えば標識部分 (例えば、ピレン、TAMRA、フルオレセイン、Cy3 色素もしくは Cy5 色素などのフルオロフォア) または保護基 (例えば、硫黄、ケイ素、ホウ素、もしくはエステルを含む基など) に結合させることが可能である。前記機能的分子実体は、リン酸基またはスパーサーのうち少なくともいずれか一方を介して糖に結合することが可能である。スパーサーの末端原子は、該リン酸基の連結原子または糖の C-3' もしくは C-5' の O、N、S、もしくは C 基を接続または置換することが可能である。代替例として、スパーサーは、ヌクレオチド代用物 (例えば、PNA) の末端原子を接続または置換することが可能であってもよい。これらのスパーサーまたはリンカーは、例えば、 $-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_nN-$ 、 $-(CH_2)_nO-$ 、 $-(CH_2)_nS-$ 、 $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OH$ (例えば、 $n=3$ または 6)、脱塩基糖、アミド、カルボキシ、アミン、オキシアミン、オキシイミン、チオエーテル、ジスルフィド、チオ尿素、スルホンアミド、またはモルホリノなど、またはビオチン試薬およびフルオレセイン試薬を含み得る。「スパーサー/リン酸 機能的分子実体 スパーサー/リン酸」という配列構造が、iRNA 剤の 2 つの鎖の間に介在するとき、この配列構造は、ヘアピン型 RNA 剤中のヘアピン RNA ループの代わりに機能することが可能である。3' 末端は -OH 基であり得る。理論に束縛されることは望まないが、特定の部分を結合することにより、輸送、ハイブリダイゼーションおよび特異性についての特性を改善することが可能であると考えられる。やはり理論に束縛されることは望まないが、ヌクレアーゼ耐性を改善する末端の変更を導入することが望ましい可能性がある。

10

20

【0116】

末端修飾の他の例には、色素、インターカレート剤 (例えば、アクリジン)、架橋剤 (例えば、ソラレン、マイトマイシン C)、ポルフィリン (TPPC4、テキサフィリン、サフィリン)、多環式芳香族炭化水素 (例えば、フェナジン、ジヒドロフェナジン)、人工エンドヌクレアーゼ (例えば、EDTA)、親油性担体 (例えば、コレステロール、コール酸、アダマンタン酢酸、1-ピレン酪酸、ジヒドロテストステロン、1,3-ビス-O(ヘキサデシル)グリセロール、ゲラニルオキシヘキシル基、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メントール、1,3-プロパンジオール、ヘプタデシル基、パルミチン酸、ミリスチン酸、O3-(オレオイル)リトコール酸、O3-(オレオイル)コール酸、ジメトキシトリチル、またはフェノキサジン) およびペプチド結合体 (例えば、アンテナペディアペプチド、Tat ペプチド)、アルキル化剤、リン酸、アミノ、メルカプト、PEG (例えば、PEG-40K)、MPEG、[MPEG]₂、ポリアミノ、アルキル、置換アルキル、放射線標識マーカ、酵素、ハプテン (例えば、ビオチン)、輸送/吸収促進剤 (例えば、アスピリン、ビタミン E、葉酸)、合成リボヌクレアーゼ (例えば、イミダゾール、ビスイミダゾール、ヒスタミン、イミダゾールクラスター、アクリジン-イミダゾール結合体、テトラアザマクロ環の Eu³⁺ 錯体) が含まれる。

30

40

【0117】

末端修飾は、本明細書中の他の箇所で議論されるような理由など多くの理由から、活性を調節するために、または分解に対する耐性を調節するために、付与可能である。好ましい修飾には、最も 3' 端側の結合へのメチルホスホネートの付与; 3'-C5'-アミノアルキル-dT; 3' カチオン基; または 3'-5' エキソヌクレアーゼ分解を阻害するその他の 3' 結合物が挙げられる。

50

【0118】

活性を調節するために有用な末端修飾には、リン酸またはリン酸アナログによる5'末端の修飾が含まれる。例えば、好ましい態様において、iRNA剤、とりわけアンチセンス鎖は、5'リン酸化されるか、または5'末端にリン酸基アナログを含む。5'リン酸修飾には、RISC介在性の遺伝子サイレンシングと適合可能であるものが含まれる。適切な修飾には、5'一リン酸((HO)2(O)P-O-5')；5'二リン酸((HO)2(O)P-O-P(HO)(O)-O-5')；5'三リン酸((HO)2(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5')；5'-グアノシンキャップ(7-メチル化または非メチル化)(7m-G-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5')；5'-アデノシンキャップ(Appp)、および任意の修飾または非修飾ヌクレオチドキャップ構造(N-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5')；5'モノチオリン酸(ホスホロチオエート；(HO)2(S)P-O-5')；5'モノジチオリン酸(ホスホロジチオエート；(HO)(HS)(S)P-O-5')、5'ホスホロチオール酸((HO)2(O)P-S-5')；酸素/硫黄で置換された一リン酸、二リン酸、および三リン酸の任意のさらなる組合せ(例えば、5'-チオ三リン酸、5'-チオ三リン酸など)、5'-ホスホロアミデート((HO)2(O)P-NH-5'、(HO)(NH2)(O)P-O-5')、5'-アルキルホスホン酸(R=アルキル=メチル、エチル、イソプロピル、プロピルなど、例えば、RP(OH)(O)-O-5'、(OH)2(O)P-5'-CH2-)、5'-アルキルエーテルホスホン酸(R=アルキルエーテル=メトキシメチル(MeOCH2-)、エトキシメチルなど、例えば、RP(OH)(O)-O-5'-)が挙げられる。

10

20

【0119】

末端修飾はまた、分布をモニタするためにも有用でありうるが、そのような場合において、付加されるべき好ましい基には、フルオロフォア、例えば、フルオレセインまたはAlexa色素(例えば、Alexa 488)が含まれる。末端修飾はまた、取り込みを増強するために有用でありうるが、このために有用な修飾にはコレステロールが含まれる。末端修飾はまた、RNA剤を別の部分に架橋するためにも有用でありうるが、このための有用な修飾にはマイトマイシンCが含まれる。

30

【0120】

ヌクレアーゼ耐性の強化

神経系細胞内への取り込み強化のために親油性部分に結合されたiRNA剤のヌクレアーゼ耐性を強化することができる。

【0121】

ヌクレアーゼ耐性または標的への結合親和性のうち少なくともいずれか一方を強化するために、iRNA剤、例えば、iRNA剤のセンス鎖またはアンチセンス鎖のうち少なくともいずれか一方に、例えば、2'修飾型リボース・ユニットまたはホスホロチオエート結合のうち少なくともいずれか一方を含めることができる。例えば、2'ヒドロキシル基(OH)を修飾するか、あるいは多くの異なる「オキシ」または「デオキシ」置換基に置き換えることができる。

40

【0122】

「オキシ」型の2'ヒドロキシル基修飾の例には、アルコキシまたはアリールオキシ(OR、例えばR=H、アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリールまたは糖)；ポリエチレングリコール(PEG)、O(CH2CH2O)nCH2CH2OR)；2'ヒドロキシルが例えばメチレン架橋によって同じリボース糖の4'炭素に接続されている「ロックされた」核酸(LNA)；O-AMINEおよびアミノアルコキシ、O(CH2)nAMINE(例えば、AMINE=NH2；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリルアミノ、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、ポリアミノ)が挙げられる。注目すべきことは、メトキシエチル基(MOE)、(OCH2CH2OCH3、PE

50

G誘導体)のみを含んでいるオリゴヌクレオチドが、強健なホスホロチオエート修飾で修飾されたものに匹敵するヌクレアーゼ安定性を示すことである。

【0123】

「デオキシ」修飾には、水素(つまり、部分的 dsRNA の突出部に特に関連しているデオキシリボース糖); ハロ(例えばフルオロ); アミノ(例えば NH₂; アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、またはアミノ酸); NH(CH₂CH₂NH)_nCH₂CH₂-AMINE (AMINE = NH₂; アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリルアミノ、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノ)、-NHC(O)R (R = アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリールまたは糖)、シアノ; メルカプト; アルキルチオアルキル; チオアルコキシ; ならびに、任意選択で例えばアミノ官能性で置換されている場合もあるアルキル、シクロアルキル、アリール、アルケニルおよびアルキニル、が挙げられる。

10

【0124】

好ましい置換基は、2'-メトキシエチル、2'-OCH₃、2'-O-アシル、2'-C-アシル、および2'-フルオロである。

ある態様では、iRNA 剤のヌクレアーゼ耐性は、ヌクレアーゼ感受性の部位を特定し、切断を阻害するために当該部位を修飾することによって強化される。例えば、ジヌクレオチド 5'-UA-3'、5'UG3'、5'-CA-3'、5'UU-3'、または 5'-CC-3' は、切断部位としての役割を果たす可能性がある。したがって、ヌクレアーゼ耐性の強化は、5'ヌクレオチドを修飾して、例えば、ウリジンが 2'-修飾ヌクレオチドである少なくとも1つの 5'-ウリジン-アデニン-3' (5'-UA-3') ジヌクレオチド; 5'-ウリジンが 2'-修飾ヌクレオチドである少なくとも1つの 5'-ウリジン-グアニン-3' (5'-UG-3') ジヌクレオチド; 5'-シチジンが 2'-修飾ヌクレオチドである少なくとも1つの 5'-シチジン-アデニン-3' (5'-CA-3') ジヌクレオチド; 5'-ウリジンが 2'-修飾ヌクレオチドである少なくとも1つの 5'-ウリジン-ウリジン-3' (5'-UU-3') ジヌクレオチド; または 5'-シチジンが 2'-修飾ヌクレオチドである少なくとも1つの 5'-シチジン-シチジン-3' (5'-CC-3') ジヌクレオチドを生じることにより達成可能である。iRNA 剤は、このようなジヌクレオチドを少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、または少なくとも5個含み得る。ある実施形態では、iRNA 剤の全てのピリミジンが 2'-修飾を有し、したがって該 iRNA 剤は高いエンドヌクレアーゼ耐性を有する。

20

30

【0125】

ヌクレアーゼ耐性を最大にするために、2'修飾を1以上のリン酸リンカー修飾(例えばホスホロチオエート)と組み合わせて使用することができる。いわゆる「キメラ」オリゴヌクレオチドは、2以上の異なる修飾を含むものである。

【0126】

オリゴヌクレオチドのバックボーン中にフラノース糖を含めることによって、エンドヌクレアーゼによる切断を減少させることができる。iRNA 剤は、3'カチオン基を含めることにより、あるいは3'-末端のヌクレオチドを 3'-3'結合を用いて逆向きにする事により、さらに修飾することができる。別の代替例では、3'末端をアミノアルキル基(例えば 3'C5アミノアルキル dT)でブロックすることができる。その他の3'結合物も 3'-5'エキソヌクレアーゼによる切断を阻害することができる。理論に束縛されることは望まないが、3'結合物、たとえばナプロキセンまたはイブプロフェンは、エキソヌクレアーゼがオリゴヌクレオチドの3'末端に結合するのを立体的に妨害することによりエキソヌクレアーゼによる切断を阻害するのかもしれない。小さなアルキル鎖、アリール基もしくはヘテロシクリルの結合物、または修飾された糖(Dリボース、デオキシリボース、グルコースなど)でも、3'-5'エキソヌクレアーゼを妨害することができる。

40

50

【0127】

同様に、5'結合物は5'-3'エキソヌクレアーゼによる切断を阻害することができる。理論に束縛されることは望まないが、5'結合物、たとえばナプロキセンまたはイブプロフェンは、エキソヌクレアーゼがオリゴヌクレオチドの5'末端に結合するのを立体的に妨害することによりエキソヌクレアーゼによる切断を阻害するのかもしれない。小さなアルキル鎖、アリアル基もしくはヘテロシクリルの結合物、または修飾された糖（Dリボース、デオキシリボース、グルコースなど）でも、3'-5'エキソヌクレアーゼを妨害することができる。

【0128】

二重鎖iRNA剤が少なくとも一端に一本鎖ヌクレオチド突出部を含んでいる場合、該iRNA剤は高いヌクレアーゼ耐性を有することができる。好ましい実施形態では、ヌクレオチド突出部は1~4個、好ましくは2~3個の非対合ヌクレオチドを有している。好ましい実施形態では、末端のヌクレオチド対に直接隣接している一本鎖突出部の非対合ヌクレオチドはプリン塩基を含み、末端のヌクレオチド対はG-C塩基対であるか、または最後の4対の相補的ヌクレオチド対のうち少なくとも2つがG-C塩基対である。さらなる実施形態では、ヌクレオチド突出部は1~2個の非対合ヌクレオチドを有する場合もあり、典型的な実施形態ではヌクレオチド突出部は5'-GC-3'である。好ましい実施形態では、ヌクレオチド突出部はアンチセンス鎖の3'末端上にある。1つの実施形態では、iRNA剤はアンチセンス鎖の3'末端にモチーフ5'-CGC-3'を含み、2ntの突出部5'-GC-3'が形成されるようになっている。

10

20

【0129】

したがって、iRNA剤は、分解（例えば、対象の体内に見出される、例えばエンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼなどのヌクレアーゼによる分解）を阻害するような修飾を含むことができる。これらのモノマーは、本明細書ではNRM、すなわちヌクレアーゼ耐性促進モノマー（Nuclease Resistance promoting Monomer）と呼ばれ、対応する修飾はNRM修飾と呼ばれる。多くの場合、これらの修飾は、iRNA剤の他の特性、例えばタンパク質（例えば輸送タンパク質（例えば血清アルブミン）またはRISC構成物）と相互作用する能力、または第1および第2の配列が互いに二重鎖を形成するもしくは別の配列（例えば標的分子）と二重鎖を形成する能力をも同様に变化させることになる。

30

【0130】

1以上の異なるNRM修飾を、1つのiRNA剤あるいはiRNA剤の1つの配列中に導入することができる。NRM修飾は、1つの配列または1つのiRNA剤中で2回以上使用することができる。

【0131】

NRM修飾には、末端にのみ配置可能なものと、任意の位置に配置可能なその他のものが含まれる。一般に、これらの修飾はハイブリダイゼーションを阻害する可能性があるため、末端領域でのみ該修飾を使用することが好ましく、対象の配列または遺伝子を標的とする配列であって特にアンチセンス鎖上の配列の切断部位または切断領域には該修飾を使用しないことが好ましい。ただしds-iRNA剤の2つの鎖の間に十分なハイブリダイゼーションが維持されるのであれば、センス鎖内の任意の場所に該修飾を使用することができる。いくつかの実施形態では、NRMをセンス鎖の切断部位または切断領域に置くことが望ましいが、これは標的外のサイレンシングを最小限にすることができるからである。

40

【0132】

ほとんどの場合、NRM修飾はセンス鎖に含まれるかまたはアンチセンス鎖に含まれるかに依存して様々な分配されることになる。アンチセンス鎖上の場合、エンドヌクレアーゼ切断を妨害または阻害する修飾は、RISCを仲介した切断の対象領域（例えば切断部位または切断領域）に挿入されるべきではない。本明細書で使用されるように、切断部位とは、標的上の、または標的にハイブリダイズするiRNA剤の鎖上の、切断部位のいず

50

れかの側のヌクレオチドを指す。切断領域とは、切断部位からいずれかの方向に1、2または3ヌクレオチド以内にあるヌクレオチドを意味する。

【0133】

そのような修飾は、末端領域内に、例えば、末端位置または末端から2、3、4、もしくは5位以内に導入することができる。

リボース模倣体

本明細書に記載のモノマーおよび方法を用いて、リボース模倣体を組み込んだオリゴヌクレオチド剤を調製することができる。

【0134】

したがって、本発明の1態様は、iRNA剤の有効性の増大または同剤へのヌクレアーゼ耐性の付与のうち少なくともいずれか一方が可能である、第二級ヒドロキシル基を含むiRNA剤を特徴とする。ヌクレアーゼ、例えば細胞ヌクレアーゼは、核酸のホスホジエステル結合を加水分解することが可能であり、その結果核酸は部分的または完全に分解される。第二級ヒドロキシル基は、この修飾を欠くiRNAと比べて、iRNA剤がヌクレアーゼ分解を受ける傾向を低下させることによって、iRNA剤にヌクレアーゼ耐性を付与する。理論によって縛られることは望まないが、iRNA剤上の第二級ヒドロキシル基の存在が3'リボースのヒドロキシル基の構造上の模倣体として働くことによって、iRNA剤が分解を受けにくくなると考えられる。

10

【0135】

第二級ヒドロキシル基とは、2つの他の炭素および1つの水素によって置換された炭素原子に結合している「OH」基を指す。上記のようにヌクレアーゼ耐性を与える第二級ヒドロキシル基は、任意の非環式炭素含有基の一部であってよい。該ヒドロキシル基は、任意の環式炭素含有基の一部であってよく、以下の条件、すなわち(1)ヒドロキシル基と末端リン酸基の間にリボース部分が存在しないこと、または(2)該ヒドロキシル基は塩基と結合した糖部分には存在しないこと、のうち1つ以上に見合うことが好ましい。該ヒドロキシル基は、iRNA剤の末端リン酸基のリンから、少なくとも2結合(化学結合2個)の位置にある(例えば、少なくとも3結合離れて、少なくとも4結合離れて、少なくとも5結合離れて、少なくとも6結合離れて、少なくとも7結合離れて、少なくとも8結合離れて、少なくとも9結合離れて、少なくとも10結合離れている、など)。好ましい実施形態では、末端リン酸基のリンと第二級ヒドロキシル基との間に5つの介在結合が存在する。

20

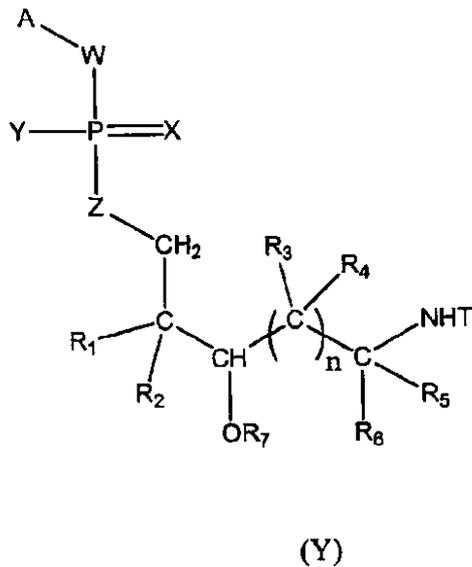
【0136】

末端リン酸基のリンと第二級ヒドロキシル基との間に5つの介在結合を有する、好ましいiRNA剤送達モジュールは、以下の構造を有する(以下の式Yを参照)：

30

【0137】

【化 2】



10

【0138】

式 Y を参照すると、A は、本明細書に記載の任意の iRNA 剤などの iRNA 剤である。該 iRNA 剤は、リン酸基の「W」と直接結合していてもよいし、間接的に（例えばスパーサーまたはリンカーを介して）結合していてもよい。これらのスパーサーまたはリンカーには、例えば $-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_nN-$ 、 $-(CH_2)_nO-$ 、 $-(CH_2)_nS-$ 、 $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OH$ （例えば、 $n=3$ または 6 ）、脱塩基糖、アミド、カルボキシ、アミン、オキシアミン、オキシイミン、チオエーテル、ジスルフィド、チオ尿素、スルホンアミド、もしくはモルホリノ、またはビオチン試薬およびフルオレセイン試薬が挙げられる。

20

【0139】

iRNA 剤の末端リン酸基は、非修飾状態（例えば、W、X、Y、および Z が O）であっても修飾されていてもよい。修飾されているリン酸基では、W および Z は独立に NH、O または S であってよく；X および Y は独立に S、Se、 BH_3^- 、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、H、O、 O^- 、アルコキシまたはアミノ（アルキルアミノ、アリールアミノなどを含む）であってよい。W、X および Z が O であり、Y が S であることが好ましい。

30

【0140】

R_1 および R_3 はそれぞれ独立に、水素；または $C_1 \sim C_{100}$ アルキルであり、 $C_1 \sim C_{100}$ アルキルは任意選択でヒドロキシル、アミノ、ハロ、リン酸または硫酸基で置換されているか、あるいは任意選択で N、O、S、アルケニルまたはアルキニルが挿入されているかのうち少なくともいずれかである。

【0141】

R_2 は、水素； $C_1 \sim C_{100}$ アルキルであって任意選択でヒドロキシル、アミノ、ハロ、リン酸または硫酸基で置換されているか、あるいは任意選択で N、O、S、アルケニルまたはアルキニルが挿入されているかのうち少なくともいずれかである $C_1 \sim C_{100}$ アルキルであり；あるいは、 n が 1 であるとき、 R_2 が R_4 または R_6 と合わさって 5 ~ 12 原子の環を形成してもよい。

40

【0142】

R_4 は、水素； $C_1 \sim C_{100}$ アルキルであって任意選択でヒドロキシル、アミノ、ハロ、リン酸または硫酸基で置換されているか、あるいは任意選択で N、O、S、アルケニルまたはアルキニルが挿入されているかのうち少なくともいずれかである $C_1 \sim C_{100}$ アルキルであり；あるいは、 n が 1 であるとき、 R_4 が R_2 または R_5 と合わさって 5 ~ 12 原子の環を形成してもよい。

50

【0143】

R₅ は、水素、C₁ ~ C₁₀₀ アルキルであって任意選択でヒドロキシル、アミノ、ハロ、リン酸または硫酸基で置換されているか、あるいは任意選択でN、O、S、アルケニルまたはアルキニルが挿入されているかのうち少なくともいずれかであるC₁ ~ C₁₀₀ アルキルであり；あるいは、nが1であるとき、R₅がR₄と合わさって5 ~ 12原子の環を形成してもよい。

【0144】

R₆ は、水素、C₁ ~ C₁₀₀ アルキルであって任意選択でヒドロキシル、アミノ、ハロ、リン酸または硫酸基で置換されているか、あるいは任意選択でN、O、S、アルケニルまたはアルキニルが挿入されているかのうち少なくともいずれかであるC₁ ~ C₁₀₀ アルキルであり、あるいは、nが1であるとき、R₆がR₂と合わさって6 ~ 10原子の環を形成してもよい。

10

【0145】

R₇ は水素、C₁ ~ C₁₀₀ アルキル、またはC(O)(CH₂)_qC(O)NHR₉であり；Tは水素または官能基であり；nおよびqはそれぞれ独立に1 ~ 100であり；R₈はC₁ ~ C₁₀ アルキルまたはC₆ ~ C₁₀ アリールであり；かつR₉は水素、C₁ ~ C₁₀ アルキル、C₆ ~ C₁₀ アリールまたは固形支持体物質である。

【0146】

好ましい実施形態は、以下のiRNA剤送達モジュールのサブセットのうち1つまたは複数を含むことが可能である。

20

RNA i剤送達モジュールの1つのサブセットでは、Aは該RNA剤の末端3'または5'リボース糖の炭素を介して、直接的あるいは間接的に結合することが可能である。

【0147】

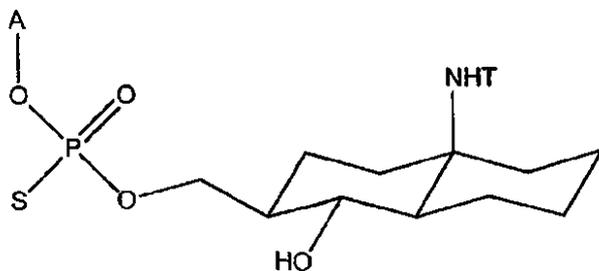
RNA i剤送達モジュールの他のサブセットでは、X、WおよびZがOであり、YがSである。

RNA i剤送達モジュールのさらに他のサブセットでは、nは1であり、R₂とR₆が合わさって6原子を含む環を形成し、R₄とR₅が合わさって6原子を含む環を形成する。環系はトランス-デカリンであることが好ましい。例えば、このサブセットのRNA i剤送達モジュールは、式(Y-1)の化合物を含むことが可能である：

30

【0148】

【化3】



40

【0149】

官能基は例えば、標的設定(ターゲティング)基(例えばステロイドまたは糖質)、レポーター基(例えばフルオロフォア)、または標識(同位元素で標識された部分)であってよい。標的設定基にはさらに、タンパク質結合物質、内皮細胞に向けて標的設定する基(例えばRGDペプチドおよびRGD模倣体)、癌細胞に向けて標的設定する基(例えば葉酸ビタミンB12、ビオチン)、骨細胞に向けて標的設定する基(例えばビスホスホネート、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸)、多価マンノース(例えばマクロファージ試験用)、ラクトース、ガラクトース、N-アセチル-ガラクトサミン、モノクローナル抗体、糖タンパク質、レクチン、メラノトロピン、またはチロトロピンが挙げられる。

【0150】

50

当業者には理解され得るように、本明細書中の式の化合物を合成する方法は当業者には明らかであろう。合成した化合物を反応混合物から分離し、カラムクロマトグラフィ、高速液体クロマトグラフィ、または再結晶化などの方法によってさらに精製することが可能である。さらに、様々な合成工程を他の順序または順番で実施して所望の化合物を得ることも可能である。本明細書に記載した化合物を合成する際に有用な、合成化学変換および保護基に関する方法（保護および脱保護）は当分野で知られており、例えば R・ラロック (R・Larock)、「Comprehensive Organic Transformations」、VCH 出版 (VCH Publishers) (1989); T・W・グリーン (T・W・Greene) および P・G・M・ワッツ (P・G・M・Wuts)、「Protective Groups in Organic Synthesis」、第 2 版、ジョンワイリーアンドサンズ (John Wiley and Sons) (1991); L・ファイザー (L・Fieser) および M・ファイザー (M・Fieser)、「Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis」、ジョンワイリーアンドサンズ (1994); および L・パケッテ (L・Paquette) 編「Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis」、ジョンワイリーアンドサンズ (1995)、ならびにその後続版に記載されたものなどを含む。

10

20

30

40

50

【0151】

糖置換修飾サブユニット

神経系細胞への取り込み強化のため修飾される iRNA 剤は、リガンド、例えば親油性リガンドに接続される。該リガンドは該オリゴヌクレオチド剤に対し、モノマー（例えばオリゴヌクレオチド剤の中に組み込まれる化学修飾モノマー）を介して接続される。好ましい実施形態では、この接続は本明細書に記載の係留部またはリンカー（または両方）により行われ、該複合物は式：

リガンド [リンカー]_{任意} [係留部]_{任意} オリゴヌクレオチド剤
で表される。

【0152】

多くの場合、実施形態はいくつかのヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド剤に関して説明されるが、本発明は以下の構造：

リガンド [リンカー]_{任意} [係留部]_{任意} モノマー
を有するモノマーサブユニットを包含する。

【0153】

モノマーを製造してオリゴヌクレオチド剤に組み込む方法、および該オリゴヌクレオチド剤の使用方法は、本発明に含まれる。

好ましい実施形態において、オリゴヌクレオチド剤の糖（例えば、ヌクレオチド（例えば、リボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、または修飾ヌクレオチド）の 1 または複数のリボース糖）サブユニットは、他の構成部分、例えば非糖質の（好ましくは環式の）担体で置換することが可能である。ヌクレオチド・サブユニットであって該サブユニットの糖がそのように置換されているものを、本願明細書では糖置換修飾サブユニット (SRMS) と呼ぶ。これは本明細書において「係留部」と呼ばれることも多い。環式担体は炭素環系（すなわち、すべての環原子が炭素原子）であってもよいし、あるいはヘテロ環系（すなわち、1 つまたは複数の環原子がヘテロ原子、例えば窒素、酸素、イオウ）であってもよい。環式担体は単環系であってもよいし、あるいは 2 つ以上の環、例えば縮合環を含むことも可能である。環式担体は完全に飽和した環系であってもよいし、あるいは 1 つまたは複数の二重結合を含んでいてもよい。

【0154】

担体はさらに、(i) 少なくとも 2 つの「バックボーン結合点」および (ii) 少なくとも 1 つの「係留結合点」を含む。本願明細書で使用する「バックボーン結合点」とは、官能基（例えばヒドロキシル基）、または一般的に、バックボーン（例えばリボ核酸のリン酸バックボーンまたはイオウを含むなどの修飾リン酸バックボーン）への担体の取り込みに利用可能かつ好適な結合を指す。本願明細書で使用する「係留結合点」とは、環式担体の構成環原子、例えば炭素原子またはヘテロ原子（バックボーン結合点を提供する原子

とは異なるもの)であって、選択した構成部分と結合する原子を指す。選択した構成部分は、例えばリガンド(例えば標的設定部分または送達成分)、または物理的性質を変化させる構成部分であってよい。最も好ましい構成部分の1つは、細胞内への侵入を促進する構成部分、例えば親油性部分(例えば、コレステロール)である。理論に束縛されることは望まないが、親油性物質の結合によりオリゴヌクレオチド剤の親油性が増大すると考えられる。場合によっては、選択した構成部分を、係留部を介在させて環式担体と接続する。したがって選択した構成部分は、官能基(例えばアミノ基)を含むか、または一般的に、他の化学的実体(例えば構成環に対するリガンド)の取り込みまたは連結に適した結合を与えることが多くなる。

【0155】

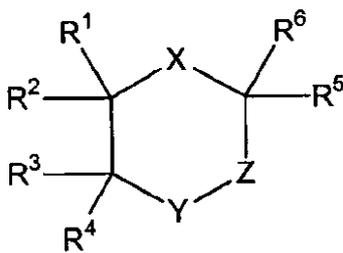
本願明細書に記載の1または複数のSRMSをオリゴヌクレオチド剤中に取り込むことにより、特に適切な実体に係留させた場合、1または複数の新しい性質を該オリゴヌクレオチド剤に付与し、かつ/あるいは該オリゴヌクレオチド剤の1または複数の既存の性質を変更、強化、または調節することが可能である。例えば、親油性またはヌクレアーゼ耐性のうち1つまたは複数を変更することが可能である。本願明細書に記載の1または複数のSRMSをオリゴヌクレオチド剤中に組み込むことによって、特にSRMSが適切な実体に係留された場合、標的RNA(例えば対象または対象の病原体のプレmRNA、mRNAまたはmiRNA)に対するオリゴヌクレオチド剤の結合親和性を調節する(例えば増大させる)ことが可能である。1または複数のSRMSを組み込むことにより、分布を変化させること、オリゴヌクレオチド剤の標的を身体の特定期間部分に向けること、(例えばRISC形成時および鎖の分離時の)核酸結合タンパク質との相互作用を改変すること、あるいは(例えば的外れな標的指向性を抑制するための)配列特異性の増大が可能である。

【0156】

したがって、1態様では、本発明は、好ましくは式(I)の構造を有する少なくとも1つのサブユニットを含んでなるオリゴヌクレオチド剤を特徴とする。

【0157】

【化4】



(I)

【0158】

(式中、

XはN(CO)R⁷、NR⁷またはCH₂であり；

YはNR⁸、O、S、CR⁹R¹⁰であるかまたは存在せず；

ZはCR¹¹R¹²であるかまたは存在せず；

R¹、R²、R³、R⁴、R⁹、およびR¹⁰のそれぞれは独立にH、OR^a、OR^b、(CH₂)_nOR^a、または(CH₂)_nOR^bであって、ただし、R¹、R²、R³、R⁴、R⁹、およびR¹⁰のうち少なくとも1つはOR^aまたはOR^bであり、かつR¹、R²、R³、R⁴、R⁹、およびR¹⁰のうち少なくとも1つは(CH₂)_nOR^a、または(CH₂)_nOR^bであり(SRMSが末端に存在するとき、R¹、R²、R³、R⁴、R⁹、およびR¹⁰のうち1つはR^aを含み、かつ1つはR^bを含み；SRMSが内部に存在するとき、R¹、R²、R³、R⁴、R⁹、およびR¹⁰のうち2つがそ

10

20

30

40

50

れぞれ R^b を含む) ; さらに、 OR^a は $(CH_2)_n OR^b$ とともにのみ存在し、 $(CH_2)_n OR^a$ は OR^b とともにのみ存在することが好ましく ;

R^5 、 R^6 、 R^{11} 、および R^{12} のそれぞれは独立に、H、任意選択で 1 ~ 3 個の R^{13} で置換された $C_1 \sim C_6$ アルキル、または $C(O)NHR^7$ であり ; あるいは、 R^5 および R^{11} が合わさって、任意選択で R^{14} により置換された $C_3 \sim C_8$ シクロアルキルをなし ;

R^7 はリガンドであってよく、例えば R^7 は R^d であってもよいし、あるいは R^7 は担体に間接的に (例えば、係留部分を介して) 係留されたりガンド、例えば $NR^c R^d$ で置換された $C_1 \sim C_{20}$ アルキル ; または $NHC(O)R^d$ で置換された $C_1 \sim C_{20}$ アルキルであり ;

R^8 は $C_1 \sim C_6$ アルキルであり ;

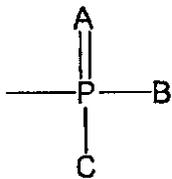
R^{13} はヒドロキシ、 $C_1 \sim C_4$ アルコキシ、またはハロゲンであり ;

R^{14} は $NR^c R^7$ であり ;

R^a は、

【0159】

【化5】



10

20

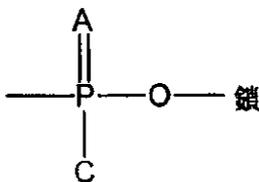
【0160】

であり ;

R^b は、

【0161】

【化6】



30

【0162】

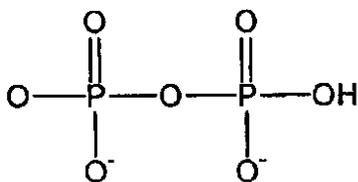
であり ;

A および C のそれぞれは独立に、O または S であり ;

B は OH、 O^- 、または

【0163】

【化7】



40

【0164】

であり ;

50

R^c は H または $C_1 \sim C_6$ アルキルであり；

R^d は H または リガンド（例えば親油性リガンド、例えばコレステロール）であり；

n は 1 ~ 4 である。）

実施形態は、以下の特徴のうち 1 以上を含むことができる。

【0165】

R^1 が CH_2OR^a で R^3 が OR^b であるか； R^1 が CH_2OR^a で R^9 が OR^b であるか； R^1 が CH_2OR^a で R^2 が OR^b であってよい。

R^1 が CH_2OR^b で R^3 が OR^b であるか； R^1 が CH_2OR^b で R^9 が OR^b であるか； R^1 が CH_2OR^b で R^2 が OR^b であるか； R^1 が CH_2OR^b で R^3 が OR^a であるか； R^1 が CH_2OR^b で R^9 が OR^a であるか； R^1 が CH_2OR^b で R^2 が OR^a であってよい。

10

【0166】

R^1 が OR^a で R^3 が CH_2OR^b であるか； R^1 が OR^a で R^9 が CH_2OR^b であるか； R^1 が OR^a で R^2 が CH_2OR^b であってよい。

R^1 が OR^b で R^3 が CH_2OR^b であるか； R^1 が OR^b で R^9 が CH_2OR^b であるか； R^1 が OR^b で R^2 が CH_2OR^b であるか； R^1 が OR^b で R^3 が CH_2OR^a であるか； R^1 が OR^b で R^9 が CH_2OR^a であるか； R^1 が OR^b で R^2 が CH_2OR^a であってよい。

【0167】

R^3 が CH_2OR^a で R^9 が OR^b であるか； R^3 が CH_2OR^a で R^4 が OR^b であってよい。

20

R^3 が CH_2OR^b で R^9 が OR^b であるか； R^3 が CH_2OR^b で R^4 が OR^b であるか； R^3 が CH_2OR^b で R^9 が OR^a であるか； R^3 が CH_2OR^b で R^4 が OR^a であってよい。

【0168】

R^3 が OR^b で R^9 が CH_2OR^a であるか； R^3 が OR^b で R^4 が CH_2OR^a であるか； R^3 が OR^b で R^9 が CH_2OR^b であるか； R^3 が OR^b で R^4 が CH_2OR^b であってよい。

【0169】

R^3 が OR^a で R^9 が CH_2OR^b であるか； R^3 が OR^a で R^4 が CH_2OR^b であってよい。

30

R^9 が CH_2OR^a で R^{10} が OR^b であってよい。

【0170】

R^9 が CH_2OR^b で R^{10} が OR^b であるか； R^9 が CH_2OR^b で R^{10} が OR^a であってよい。

好ましい実施形態では、リボースはピロリン骨格または 4 - ヒドロキシピロリン由来の骨格で置換され、かつ X は $N(CO)R^7$ または NR^7 であり、Y は CR^9R^{10} であり、かつ Z は存在しない。

【0171】

R^1 および R^3 はシス位にあってもよいし、 R^1 および R^3 はトランス位にあってもよい。

40

n は 1 でよい。

【0172】

A は O または S でよい。

R^1 が $(CH_2)_nOR^b$ で R^3 が OR^b であるか； R^1 が $(CH_2)_nOR^a$ で R^3 が OR^b であってよい。

【0173】

R^7 は $(CH_2)_5NHR^d$ または $(CH_2)_5NHR^d$ であってよい。 R^d は、葉酸基；コレステロール基；糖質基；ビタミン A 基；ビタミン E 基；ビタミン K 基から選択することができる。好ましくは、 R^d はコレステロール基である。

50

【0174】

R^1 が OR^b で R^3 が $(CH_2)_n OR^b$ であるか； R^1 が OR^b で R^3 が $(CH_2)_n OR^a$ であるか； R^1 が OR^a で R^3 が $(CH_2)_n OR^b$ であるか； R^1 が $(CH_2)_n OR^b$ で R^9 が OR^a であってよい。

【0175】

R^1 および R^9 はシス位にあってもよいし、 R^1 および R^9 はトランス位にあってもよい。

R^1 が OR^a で R^9 が $(CH_2)_n OR^b$ であるか； R^1 が $(CH_2)_n OR^b$ で R^9 が OR^b であるか； R^1 が $(CH_2)_n OR^a$ で R^9 が OR^b であるか； R^1 が OR^b で R^9 が $(CH_2)_n OR^b$ であるか； R^1 が OR^b で R^9 が $(CH_2)_n OR^a$ であってよい。

10

【0176】

R^3 が $(CH_2)_n OR^b$ で R^9 が OR^a であるか； R^3 が $(CH_2)_n OR^b$ で R^9 が OR^b であるか； R^3 が $(CH_2)_n OR^a$ で R^9 が OR^b であるか； R^3 が OR^a で R^9 が $(CH_2)_n OR^b$ であるか； R^3 が OR^b で R^9 が $(CH_2)_n OR^b$ であるか； R^3 が OR^b で R^9 が $(CH_2)_n OR^a$ であってよい。

【0177】

R^3 および R^9 はシス位にあってもよいし、 R^3 および R^9 はトランス位にあってもよい。

別の実施形態では、リボースはピペリジン骨格で置換され、かつ X は $N(CO)R^7$ または NR^7 であり、 Y は CR^9R^{10} であり、かつ Z は $CR^{11}R^{12}$ である。

20

【0178】

R^9 が $(CH_2)_n OR^b$ で R^{10} が OR^a であってよい。

n は 1 または 2 でよい。

R^9 が $(CH_2)_n OR^b$ で R^{10} が OR^b であるか； R^9 が $(CH_2)_n OR^a$ で R^{10} が OR^b であってよい。

【0179】

A は O または S でよい。

R^7 は $(CH_2)_5 NHR^d$ または $(CH_2)_5 NHR^d$ であってよい。 R^d は、葉酸基；コレステロール基；糖質基；ビタミンA基；ビタミンE基；ビタミンK基から選択することができる。好ましくは、 R^d はコレステロール基である。

30

【0180】

R^3 が $(CH_2)_n OR^b$ で R^4 が OR^a であるか； R^3 が $(CH_2)_n OR^b$ で R^4 が OR^b であるか； R^3 が $(CH_2)_n OR^a$ で R^4 が OR^b であってよい。

R^1 が $(CH_2)_n OR^b$ で R^2 が OR^a であるか； R^1 が $(CH_2)_n OR^b$ で R^2 が OR^b であるか； R^1 が $(CH_2)_n OR^a$ で R^2 が OR^b であってよい。

【0181】

R^3 が $(CH_2)_n OR^b$ で R^9 が OR^a であってよい。

R^3 および R^9 はシス位にあってもよいし、 R^3 および R^9 はトランス位にあってもよい。

40

【0182】

R^3 が $(CH_2)_n OR^b$ で R^9 が OR^b であるか； R^3 が $(CH_2)_n OR^b$ で R^9 が OR^a であるか； R^3 が $(CH_2)_n OR^a$ で R^9 が OR^b であってよい。

R^1 が $(CH_2)_n OR^b$ で R^3 が OR^a であってよい。

【0183】

R^1 および R^3 はシス位にあってもよいし、 R^1 および R^3 はトランス位にあってもよい。

R^3 が OR^a で R^9 が $(CH_2)_n OR^b$ であってよい。

【0184】

R^1 が OR^a で R^3 が $(CH_2)_n OR^b$ であってよい。

50

別の実施形態では、リボースはピペラジン骨格で置換され、かつXはN(CO)R⁷またはNR⁷であり、YはNR⁸であり、かつZはCR^{1 1}R^{1 2}である。

【0185】

R¹が(CH₂)_nOR^bでR³がOR^aであってよい。

R¹およびR³はシス位にあってもよいし、R¹およびR³はトランス位にあってもよい。

【0186】

nは1でよい。

R¹が(CH₂)_nOR^bでR³がOR^bであるか；R¹が(CH₂)_nOR^aでR³がOR^bであってよい。

10

【0187】

AはOまたはSでよく、好ましくはSである。

R⁷は(CH₂)₅NHR^dまたは(CH₂)₅NHR^dであってよい。R^dは、葉酸基；コレステロール基；糖質基；ビタミンA基；ビタミンE基；ビタミンK基から選択することができる。好ましくは、R^dはコレステロール基である。

【0188】

R⁸はCH₃でよい。

R¹がOR^aでR³が(CH₂)_nOR^bであってよい。

別の実施形態では、リボースはモルホリノ骨格で置換され、かつXはN(CO)R⁷またはNR⁷であり、YはOであり、かつZはCR^{1 1}R^{1 2}である。

20

【0189】

R¹が(CH₂)_nOR^bでR³がOR^aであってよい。

R¹およびR³はシス位にあってもよいし、R¹およびR³はトランス位にあってもよい。

【0190】

nは1でよい。

R¹が(CH₂)_nOR^bでR³がOR^bであるか；R¹が(CH₂)_nOR^aでR³がOR^bであってよい。

【0191】

AはOまたはSでよい。

R⁷は(CH₂)₅NHR^dまたは(CH₂)₅NHR^dであってよい。R^dは、葉酸基；コレステロール基；糖質基；ビタミンA基；ビタミンE基；ビタミンK基から選択することができる。好ましくは、R^dはコレステロール基である。

30

【0192】

R⁸はCH₃でよい。

R¹がOR^aでR³が(CH₂)_nOR^bであってよい。

別の実施形態では、リボースはデカリン骨格で置換され、かつXはCH₂であり；YはCR⁹R^{1 0}であり；かつZはCR^{1 1}R^{1 2}であり；かつR⁵およびR^{1 1}は一体となってC⁶シクロアルキルをなす。

40

【0193】

R⁶はC(O)NHR⁷でよい。

R^{1 2}は水素でよい。

R⁶およびR^{1 2}はトランス位にあってよい。

【0194】

R³がOR^aでR⁹が(CH₂)_nOR^bであってよい。

R³およびR⁹はシス位にあってもよいし、R³およびR⁹はトランス位にあってもよい。

【0195】

nは1または2でよい。

R³がOR^bでR⁹が(CH₂)_nOR^bであるか；R³がOR^bでR⁹が(CH₂)

50

n OR^aであってよい。

【0196】

AはOまたはSでよい。

R⁷は(CH₂)₅NHR^dまたは(CH₂)₅NHR^dであってよい。R^dは、葉酸基；コレステロール基；糖質基；ビタミンA基；ビタミンE基；ビタミンK基から選択することができる。好ましくは、R^dはコレステロール基である。

【0197】

別の実施形態では、リボースはデカリン/インダン骨格で置換され、例えば、XはCH₂であり；YはCR⁹R¹⁰であり；かつZはCR¹¹R¹²であり；かつR⁵およびR¹¹は一体となってC⁵シクロアルキルをなす。

10

【0198】

R⁶はCH₃でよい。

R¹²は水素でよい。

R⁶およびR¹²はトランス位にあってよい。

【0199】

R³がOR^aでR⁹が(CH₂)_nOR^bであってよい。

R³およびR⁹はシス位にあってもよいし、R³およびR⁹はトランス位にあってもよい。

【0200】

nは1または2でよい。

20

R³がOR^bでR⁹が(CH₂)_nOR^aであるか；R³がOR^bでR⁹が(CH₂)_nOR^aであってよい。

【0201】

AはOまたはSでよい。

R¹⁴はN(CH₃)R⁷でよい。R⁷は(CH₂)₅NHR^dまたは(CH₂)₅NHR^dであってよい。R^dは、葉酸基；コレステロール基；糖質基；ビタミンA基；ビタミンE基；ビタミンK基から選択することができる。好ましくは、R^dはコレステロール基である。

【0202】

別の態様において、本発明は式(II)の構造を有する少なくとも1つのサブユニットを含んでなるオリゴヌクレオチド剤を特徴とする。

30

【0203】

【化8】



(II)

40

【0204】

(式中、

XはN(CO)R⁷またはNR⁷であり；

R¹およびR²はそれぞれ独立にOR^a、OR^b、(CH₂)_nOR^a、または(CH₂)_nOR^bであって、ただし、R¹およびR²のうち一方がOR^aまたはOR^bで他方が(CH₂)_nOR^aまたは(CH₂)_nOR^bであり(SRMSが末端にあるとき、R¹またはR²のうち1つがR^aを含み、かつ1つがR^bを含むことになり、SRMSSが内部にあるとき、R¹およびR²の両方がそれぞれR^bを含むことになる)；さらに、OR^aは(CH₂)_nOR^bとともにのみ存在し、(CH₂)_nOR^aはOR^bとともにのみ存在することが好ましく；

50

R^7 は NR^cR^d で置換された $C_1 \sim C_{20}$ アルキルであり；

R^8 は $C_1 \sim C_6$ アルキルであり；

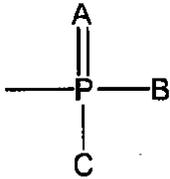
R^{13} はヒドロキシ、 $C_1 \sim C_4$ アルコキシ、またはハロゲンであり；

R^{14} は NR^cR^7 であり；

R^a は、

【0205】

【化9】



10

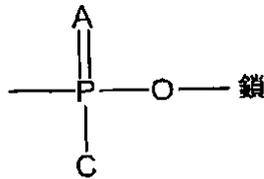
【0206】

であり；

R^b は、

【0207】

【化10】



20

【0208】

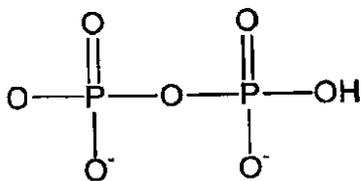
であり；

A および C のそれぞれは独立に、O または S であり；

B は OH、 O^- 、または

【0209】

【化11】



30

【0210】

であり；

R^c は H または $C_1 \sim C_6$ アルキルであり；

R^d は H またはリガンドであり；

n は 1 ~ 4 である。）

結合体中のオリゴヌクレオチド剤は実質的に一本鎖であり、約 12 ~ 約 29 個のサブユニット、好ましくは約 15 ~ 約 25 個のサブユニットを含んでなる。実質的に一本鎖のオリゴヌクレオチド剤は、少なくとも 60%、70%、80% または 90% 以上の、二重鎖を成さないヌクレオチドを含む。

40

【0211】

実施形態は、上述の特徴のうち 1 つ以上を含むことができる。

さらなる態様では、本発明は、式 (I) または式 (II) を含む少なくとも 1 つのサブ

50

ユニットを有するオリゴヌクレオチド剤を特徴とする。

【0212】

1つの態様では、本発明は、式(I)または式(II)のうち少なくともいずれかを含む少なくとも2つのサブユニットを有するオリゴヌクレオチド剤を特徴とする。

別の態様では、本発明は、式(I)または(II)のうち少なくともいずれかを含む少なくとも1つのサブユニットを有する本明細書に記載のオリゴヌクレオチド剤を製造する方法を提供する。さらなる態様では、本発明は、標的遺伝子の発現を調節する方法を提供する。該方法は、式(I)または(II)のうち少なくともいずれかを含む少なくとも1つのサブユニットを有する本明細書に記載のオリゴヌクレオチド剤を、対象に投与することを含む。

10

【0213】

1つの態様では、本発明は、式(I)または(II)のうち少なくともいずれかを含む少なくとも1つのサブユニットを有する本明細書に記載のオリゴヌクレオチド剤と、薬学的に許容可能な担体とを有する、医薬組成物を特徴とする。

【0214】

本明細書に記載のSRMSまたは係留部は、本明細書に記載の任意のオリゴヌクレオチド剤に組み込むことが可能である。オリゴヌクレオチド剤は、本明細書に記載のSRMSを1つ以上含む。SRMSはオリゴヌクレオチド剤中の1箇所または複数個所に導入することができる。SRMSは、オリゴヌクレオチドの3'または5'末端に、あるいは該末端の近く(1、2または3位以内)に配置可能である。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの5'末端またはその近く(1、2または3位以内)にはSRMSを有していないことが好ましい。SRMSは内側にあってもよく、標的への結合に重要ではない領域に配置されることが好ましい。

20

【0215】

ある実施形態では、オリゴヌクレオチド剤は3'末端(または3'末端から1、2または3位以内)にSRMSを有する場合がある。

別の実施形態では、オリゴヌクレオチド剤は内側の位置にSRMSを有する場合がある。他の実施形態では、オリゴヌクレオチド剤は、3'末端に1つのSRMS、および内側の位置に1つのSRMSを有する場合がある。

【0216】

本明細書に記載の糖、塩基またはバックボーンへの他の修飾を、オリゴヌクレオチド剤に組み込むこともできる。

オリゴヌクレオチド剤は、本明細書に記載のアーキテクチャまたは構造をとることができる。

30

【0217】

オリゴヌクレオチド剤は、本明細書に記載の遺伝子のうち任意のものなど広範囲の任意の遺伝子を標的とするように選択可能である。

好ましい実施形態では、オリゴヌクレオチド剤は本明細書に記載のアーキテクチャ(アーキテクチャとは、全長のうち1つ以上を指す)を有する。本明細書に記載のオリゴヌクレオチド剤のSRMS含有塩基に加えて、ヌクレアーゼ耐性モノマー(NRM)を含むことができる。

40

【0218】

別の態様では、本発明は、オリゴヌクレオチド剤であって、親油性部分(例えばコレステロール)が例えば該オリゴヌクレオチド剤のSRMSへの結合によって結合している、オリゴヌクレオチド剤を特徴とする。好ましい実施形態では、親油性部分は、細胞内へのオリゴヌクレオチド剤の侵入を強化する。好ましい実施形態では、細胞は、生物、組織または細胞株(例えば初代細胞株、不死化された細胞株、もしくは本明細書に記載の任意の種類細胞株)の一部である。したがって、該結合オリゴヌクレオチド剤は、生物(例えば哺乳動物、例えばヒト)における標的遺伝子の発現を阻害するため、あるいは細胞株または生物体外にある細胞における標的遺伝子の発現を阻害するために、使用することがで

50

きる。

【0219】

親油性部分は、例えば、脂質、コレステロール、オレイル基、レチニル基、コレステリル基、コール酸、アダマンタン酢酸、1ピレン酪酸、ジヒドロテストステロン、1,3ビスO(ヘキサデシル)グリセロール、ゲラニルオキシヘキシル基、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メントール、1,3プロパンジオール、ヘプタデシル基、パルミチン酸、ミリスチン酸、O3(オレオイル)リトコール酸、O3(オレオイル)リトコール酸、O3(オレオイル)コラン酸、ジメトキシトリチル、またはフェノキサジンから成る群から、選択することができる。好ましい親油性部分はコレステロールである。

10

【0220】

オリゴヌクレオチド剤には、式(I)または式(II)を有する少なくとも1つのサブユニットが組み込まれていてよい。オリゴヌクレオチド剤は本明細書に記載の1以上の任意の特徴を有することができる。例えば、サブユニットが式(I)のものである場合、R^dはコレステロールであってよく；XがN(CO)R⁷またはNR⁷、YがCR⁹R¹⁰、Zが存在せず、R¹が(CH₂)_nOR^bでR³がOR^aであってよいし；XがN(CO)R⁷またはNR⁷、YがCR⁹R¹⁰、ZがCR¹¹R¹²、R⁹が(CH₂)_nOR^bでR¹⁰がOR^aであってよいし；XがN(CO)R⁷またはNR⁷、YがNR⁸、ZがCR¹¹R¹²、R¹が(CH₂)_nOR^bでR³はOR^aであってよいし；XがCH₂；YがCR⁹R¹⁰；ZがCR¹¹R¹²であって、このときR⁶がC(O)NHR⁷であってよく；あるいは、XがCH₂；YがCR⁹R¹⁰；ZがCR¹¹R¹²であって、このときR¹¹またはR¹²はC(O)NHR⁷であるか、R⁵およびR¹が合わさってN(CH₃)R⁷で置換されたC₅またはC₆シクロアルキルをなしてもよい。

20

【0221】

係留されるリガンド

種々様々な物をオリゴヌクレオチド剤に(例えばリガンド結合モノマーの担体に)係留することができる。リガンド結合モノマーに関連して以下に例を述べるが、それは単に1つの好ましい実施形態にすぎない。オリゴヌクレオチド剤に対し他の接点で物を接続することもできる。

30

【0222】

オリゴヌクレオチド剤(例えば、miRNAを標的とするオリゴヌクレオチド剤)に係留されたリガンドは、同剤に対し好ましい効果を有することができる。例えば、リガンドは安定性、標的核酸とのハイブリダイゼーション熱力学、特定の組織または細胞種に対する標的設定、あるいは細胞透過性(例えば、エンドサイトーシス依存的または非依存的メカニズムによるもの)を改善することができる。リガンドおよび関連する修飾は、配列特異性を増大させる結果としての外れな標的設定を減少させることもできる。

【0223】

係留されるリガンドには、インターカレータとして機能することができる1以上の修飾された塩基または糖が挙げられる。これらは、miRNA/標的二重鎖のバルジ内など、内側領域に位置することが好ましい。インターカレータは、芳香族化合物、例えば多環式芳香族化合物またはヘテロ環式芳香族化合物であってよい。多環式インターカレータはスタッキング能を有することができ、2つ、3つまたは4つの縮合された環を備えた系を含むことができる。本明細書に記載のユニバーサル塩基をリガンドに含めることもできる。

40

【0224】

1つの実施形態では、リガンドは、標的核酸の切断による標的遺伝子の障害に寄与する、切断用の基を含むことができる。切断用の基は、例えば、プレオマイシン(例えばプレオマイシン-A5、プレオマイシン-A2、またはプレオマイシン-B2)、ピレン、フェナントロリン(例えばO-フェナントロリン)、ポリアミン、トリペプチド(例えばlys-tyr-lystripeptide)あるいは金属イオンキレート基であってよい。金属

50

イオンキレート基には、例えば $\text{Lu}(\text{III})$ または $\text{Eu}(\text{III})$ の大環状錯体、 $\text{Zn}(\text{II})_2$ 、9-ジメチルフェナントロリン誘導体、 $\text{Cu}(\text{II})$ テルピリジン、あるいは、 $\text{Lu}(\text{III})$ のような遊離金属イオンによって標的 RNA のバルジ部位における選択的切断を促進することができるアクリジンが挙げられる。いくつかの実施形態では、標的 RNA の（例えばバルジ領域での）切断を促進するために、ペプチドリガンドを miRNA に係留することができる。例えば、標的 RNA の切断を促進するために、1,8-ジメチル-1,3,6,8,10,13-ヘキサアザシクロテトラデカン（サイクラム（cyclam））をペプチドに（例えばアミノ酸誘導体により）結合させることができる。

【0225】

係留されるリガンドは、オリゴヌクレオチド剤のハイブリダイゼーション特性または配列特異性の改善をもたらすアミノグリコシド・リガンドであってもよい。典型的なアミノグリコシドには、グリコシル化ポリリシン、ガラクトシル化ポリリシン、ネオマイシン B、トブラマイシン、カナマイシン A ならびにアミノグリコシドのアクリジン結合体、例えば Neo-N-アクリジン、Neo-S-アクリジン、Neo-C-アクリジン、Tobra-N-アクリジンおよび Kana A-N-アクリジンが挙げられる。アクリジン・アナログの使用により配列特異性を増大させることができる。例えば、ネオマイシン B は DNA に比べて RNA に対し高い親和性を有するが、配列特異性は低い。アクリジン・アナログである Neo-S-アクリジンは、HIV の RRE (Response element) に対する親和性が高められている。いくつかの実施形態では、アミノグリコシド・リガンドのグアニジン・アナログ（グアニジノグリコシド）がオリゴヌクレオチド剤に係留される。グアニジノグリコシドでは、アミノ酸上のアミン基がグアニジン基に交換されている。グアニジン・アナログを結合させることにより、オリゴヌクレオチド剤（例えば、miRNA または premiRNA を標的とするオリゴヌクレオチド剤）の細胞透過性を強化することができる。

【0226】

係留されるリガンドは、オリゴヌクレオチド剤の細胞への取り込みを強化することができるポリアルギニンペプチド、ペプトイドまたはペプチド模倣体であってもよい。

好ましい構成部分はリガンドであり、リガンドは、好ましくは共有結合により、直接的あるいは係留部を介在させて間接的に、リガンド結合担体に接続される。好ましい実施形態では、リガンドは係留部を介在させて担体に結合される。先に論じたように、リガンドまたは係留リガンドは、モノマーが伸長する鎖に組み込まれるときにモノマー上に存在していてもよい。いくつかの実施形態では、「前駆体」リガンド結合モノマーを伸長する鎖に組み込ませた後に、「前駆体」リガンド結合モノマーサブユニットにリガンドを組み込むことが可能である。例を挙げれば、例えばアミノ末端を有する係留部（例えば $\text{TAP}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ ）を備えたモノマーを、伸長するオリゴヌクレオチド鎖に組み込むことが可能である。後の操作において、すなわち前駆体モノマーを鎖に組み込ませた後、続いて、求電子基（例えばペンタフルオロフェニルエステルまたはアルデヒド基）を有するリガンドを、リガンドの求電子基と前駆体モノマーサブユニット係留部の末端求核基とのカップリングによって、前駆体モノマーサブユニットと結合させることが可能である。

【0227】

好ましい実施形態では、リガンドは、同リガンドが組み込まれたオリゴヌクレオチド剤の分布、標的指向性または寿命を変化させる。好ましい実施形態では、リガンドは、例えばこのようなリガンドが存在しない分子種と比較して、選択された標的、例えば分子、細胞または細胞種、コンパートメント（例えば細胞または器官のコンパートメント）、組織、器官または身体の領域に対する高い親和性をもたらす。

【0228】

好ましいリガンドは、輸送、ハイブリダイゼーション、および特異性を向上させることが可能であり、生成する天然または修飾オリゴリボヌクレオチド、または本願明細書に記載のモノマーおよび/または天然もしくは修飾リボヌクレオチドの任意の組合せを含んでなるポリマー分子の、ヌクレアーゼ耐性を向上させることも可能である。

10

20

30

40

50

【0229】

一般的なリガンドとしては、例えば取り込みを増大させるための治療用調節物質；例えば分布をモニタするための診断用化合物またはレポーター基；架橋剤；ヌクレアーゼ耐性を与える構成部分；ならびに天然核酸塩基または異常核酸塩基が挙げられる。一般例には、親油性物質、脂質、ステロイド（例えば、ウバオール、ヘシゲニン（*hecigenin*）、ジオスゲニン（*diosgenin*）、テルペン類（例えば、トリテルペン、例えばサルササボゲニン、フリーデリン、エピフリーデラノール誘導リトコール酸）、ビタミン（例えば、葉酸、ビタミンA、ピオチン、ピリドキサル）、糖質、タンパク質、タンパク質結合物質、インテグリン指向性分子、ポリカチオン、ペプチド、ポリアミン、およびペプチド模倣体がある。

10

【0230】

リガンドには、天然に存在する物質、（例えば、ヒト血清アルブミン（HSA）、低密度リポタンパク質（LDL）、またはグロブリン）；糖質（例えば、デキストラン、プルラン、キチン、キトサン、イヌリン、シクロデキストリンまたはヒアルロン酸）；アミノ酸、または脂質が挙げられる。リガンドは組換え分子でも合成分子でもよく、例えば合成ポリマー、例えば合成ポリアミノ酸であってもよい。ポリアミノ酸の例には、ポリリシン（PLL）、ポリL-アスパラギン酸、ポリL-グルタミン酸、スチレン-無水マレイン酸コポリマー、ポリ（L-ラクチド-コ-グリコリド）コポリマー、ジビニルエーテル-無水マレイン酸コポリマー、N-（2-ヒドロキシプロピル）メタクリルアミドコポリマー（HMPA）、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリビニルアルコール（PVA）、ポリウレタン、ポリ（2-アクリル酸エチル）、N-イソプロピルアクリルアミドポリマー、またはポリホスファジンがある。ポリアミンの例には、ポリエチレンイミン、ポリリシン（PLL）、スペルミン、スペルミジン、ポリアミン、プソイドペプチド-ポリアミン、ペプチド模倣ポリアミン、デンドリマーポリアミン、アルギニン、アミジン、プロタミン、カチオン性脂質、カチオン性ポルフィリン、ポリアミンの第四級塩、またはらせん状ペプチドがある。

20

【0231】

リガンドはまた、標的設定基、例えば細胞または組織を標的とする物質、例えばレクチン、糖タンパク質、脂質またはタンパク質、例えば腎臓細胞などの特定の細胞種と結合する抗体も含み得る。標的設定基は、チロトロピン、メラノトロピン、レクチン、糖タンパク質、サーファクタントプロテインA、ムチン、炭水化物、多価ラクトース、多価ガラクトース、N-アセチルガラクトサミン、N-アセチルグルコサミン、多価マンノース、多価フコース、グリコシル化されたポリアミノ酸、多価ガラクトース、トランスフェリン、ビスホスホネート、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、脂質、コレステロール、ステロイド、胆汁酸、葉酸、ビタミンB12、ピオチン、あるいはRGDペプチドまたはRGDペプチド模倣体でよい。

30

【0232】

リガンドの他の例には、染料、インターカレート剤（例えばアクリジンおよび置換型アクリジン）、架橋剤（例えばソラレン、マイトマイシンC）、ポルフィリン（TPPC4、テキサフィリン、サフィリン）、多環式芳香族炭化水素（例えば、フェナジン、ジヒドロフェナジン、フェナントロリン、ピレン）、Lys-tyr-Lysトリペプチド、アミノグリコシド、グアニジンアミノグリコシド、人工エンドヌクレアーゼ（例えばEDTA）、親油性分子、例えば、コレステロール（およびそのチオアナログ）、コール酸、コラン酸、リトコール酸、アダマンタン酢酸、1-ピレン酪酸、ジヒドロテストステロン、グリセロール（例えば、エステル（例えば、モノ、ビス、トリス脂肪酸エステル、例えばC₁₀、C₁₁、C₁₂、C₁₃、C₁₄、C₁₅、C₁₆、C₁₇、C₁₈、C₁₉、もしくはC₂₀脂肪酸）およびそのエーテル、例えばC₁₀、C₁₁、C₁₂、C₁₃、C₁₄、C₁₅、C₁₆、C₁₇、C₁₈、C₁₉、もしくはC₂₀アルキル；例えば、1,3-ビス-O（ヘキサデシル）グリセロール、1,3-ビス-O（オクタデシル）グリセロール）、ゲラニルオキシヘキシル基、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、

40

50

メンソール、1,3-プロパンジオール、ヘプタデシル基、パルミチン酸、ステアリン酸（例えば、ジステアリン酸グリセリル）、オレイン酸、ミリスチン酸、O3-（オレオイル）リトコール酸、O3-（オレオイル）コール酸、ジメトキシトリチル、またはフェノキサジン）、およびペプチド複合体（例えば、アンテナペディアペプチド、Tatペプチド）、アルキル化剤、リン酸、アミノ、メルカプト、PEG（例えばPEG-40K）、MPEG、[MPEG]₂、ポリアミノ、アルキル、置換アルキル、放射標識マーカー、酵素、ハプテン（例えばビオチン）、輸送/吸収促進物質（例えばアスピリン、ナプロキセン、ビタミンE、葉酸）、合成リボヌクレアーゼ（例えば、イミダゾール、ビスイミダゾール、ヒスタミン、イミダゾールクラスター、アクリジン-イミダゾール複合体、テトラアザマクロ環のEu³⁺錯体）、ジニトロフェニル、HRP、またはAPがある。

10

【0233】

リガンドは、タンパク質（例えば糖タンパク質）またはペプチドであってよく、例えば共通のリガンドに関する特異的親和性を有する分子、または抗体（例えばがん細胞、内皮細胞、または骨細胞などの特定の細胞種と結合する抗体）であってよい。リガンドは、ホルモンおよびホルモン受容体も含み得る。リガンドは、脂質、レクチン、糖質、ビタミン、補因子、多価ラクトース、多価ガラクトース、N-アセチルガラクトサミン、N-アセチルグルコサミン多価マンノース、または多価フコースなどの、非ペプチド性の分子種も含み得る。リガンドは、例えば、リポ多糖、p38MAPキナーゼの活性化因子、またはNF- κ Bの活性化因子であってよい。

20

【0234】

リガンドは、例えば細胞の細胞骨格を破壊することによって（例えば細胞の微小管、マイクロフィラメント、および/または中間径フィラメントを破壊することによって）細胞内へのオリゴヌクレオチド剤の取り込みを増大させることが可能な物質、例えば薬物であってよい。該薬物は例えば、タキソン（taxon）、ピンクリスチン、ピンブラスチン、サイトカラシン、ノコダゾール、ジャブラキノライド（japlakinolide）、ラトランクリンA、ファロイジン、スウィンホライドA、インダノシン（indanocine）、またはミオセルビン（myoservin）であってよい。

【0235】

リガンドは、例えば、炎症応答を活性化することによって細胞内へのオリゴヌクレオチド剤の取り込みを増大させることが可能である。このような効果を有すると思われる例示的なリガンドには、腫瘍壊死因子（TNF）、インターロイキン-1、またはインターフェロンがある。

30

【0236】

1態様では、リガンドは脂質または脂質系分子である。このような脂質または脂質系分子は、血清タンパク質、例えばヒト血清アルブミン（HSA）と結合しやすい。HSA結合性リガンドは、標的組織（例えば身体の腎臓以外の標的組織）に本発明の結合体が分布するのを可能にする。例えば、標的組織は肝臓（肝臓の肝実質細胞を含む）である。HSAと結合することが可能である他の分子も、リガンドとして使用することが可能である。例えば、ネプロキシンまたはアスピリンを使用することが可能である。脂質または脂質系リガンドは、（a）結合体の分解耐性を増大させること、（b）標的の細胞または細胞膜への標的指向性または輸送を増大させることが可能であり、かつ/あるいは（c）血清タンパク質、例えばHSAとの結合を調節するために使用することが可能である。

40

【0237】

脂質系リガンドを使用して、結合体と標的組織との結合を調節（例えば制御）することが可能である。例えば、より強くHSAと結合する脂質または脂質系リガンドは、腎臓に対する標的指向性がより低くなると思われ、したがって身体からより除去されにくくなると思われる。より弱くHSAと結合する脂質または脂質系リガンドは、結合体を腎臓に向かわせるために使用することができる。

【0238】

好ましい実施形態では、脂質系リガンドはHSAと結合する。脂質系リガンドは、結合

50

体が非腎臓組織に優先的に分布するように、十分な親和性でHSAと結合することができる。しかしながら、その親和性は、HSAとリガンドとの結合が不可逆的であるほど強くはないことが好ましい。

【0239】

別の実施形態では、脂質系リガンドは、結合体が腎臓に優先的に分布するように、HSAと弱く結合するかまたは全く結合しない。腎臓細胞を標的としうるその他の構成部分も、脂質系リガンドの代わりに、または脂質系リガンドに加えて使用することが可能である。

【0240】

他の態様では、リガンドは、標的細胞（例えば増殖している細胞）によって取り込まれる構成部分、例えばビタミンである。これらのリガンドは、望ましくない細胞増殖、例えば悪性または非悪性型の細胞増殖、例えばがん細胞の増殖によって特徴付けられる障害を治療するのに特に有用である。例示的なビタミンには、ビタミンA、E、およびKがある。他の例示的なビタミンには、Bビタミン、例えば葉酸、B12、リボフラビン、ピオチン、ピリドキサル、あるいはがん細胞によって取り込まれるその他のビタミンまたは栄養素がある。HSAおよび低密度リポタンパク質（LDL）も含まれる。

10

【0241】

他の態様では、リガンドは、細胞透過性物質、好ましくはらせん状の細胞透過性物質である。該物質は両親媒性であることが好ましい。例示的な物質は、tatまたはアンテナペディアなどのペプチドである。該物質がペプチドである場合、ペプチジル模倣体、イン

20

【0242】

増殖している細胞中に豊富なマーカーを標的とするペプチドを使用することもできる。例えば、RGD含有ペプチドおよびペプチド模倣体は、がん細胞、特に α_3 インテグリンを提示する細胞を標的とすることができる。したがって、RGDペプチド、RGDを含んでいる環状ペプチド、D-アミノ酸を含んでいるRGDペプチド、ならびに合成RGD模倣体を使用することが可能であろう。RGDに加えて、 α_3 インテグリン・リガンドを標的とする他の部分を使用することもできる。一般に、そのようなリガンドは、増殖している細胞および血管新生を制御するために使用することができる。このタイプの好ましい結合体は、PECAM-1、VEGF、または他のがん遺伝子（例えば本明細書に記載のがん遺伝子）を標的とするオリゴヌクレオチド剤を含んでいる。

30

【0243】

本発明のオリゴヌクレオチド剤は、肝臓に向けて標的設定する場合に特に有用である。例えば、本発明で着目した一本鎖オリゴヌクレオチド剤は、肝臓に豊富なmiRNAを標的とすることが可能であり、該オリゴヌクレオチド剤は、肝臓への送達を高めるためのリガンドを含むことができる。肝臓を標的とするリガンドで誘導体化されたモノマーを組み込むことにより、オリゴヌクレオチド剤を肝臓に向けて標的設定することができる。例えば、肝臓を標的とする物質は親油性部分でよい。好ましい親油性部分には、脂質、コレステロール、オレイル、レチニル、またはコレステリル残基がある。肝臓を標的とする物質として機能しうるその他の親油性部分には、コール酸、アダマンタン酢酸、1ピレン酪酸、ジヒドロテストステロン、1,3ビスO(ヘキサデシル)グリセロール、ゲラニルオキシヘキシル基、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メントール、1,3プロパンジオール、ヘプタデシル基、パルミチン酸、ミリスチン酸、O3(オレイル)リトコール酸、O3(オレイル)コラン酸、ジメトリシトリチル、またはフェノキサジンがある。

40

【0244】

オリゴヌクレオチド剤は、ラクトシル化LDLのような低密度リポタンパク質（LDL）との会合によって肝臓に向けて標的設定することもできる。糖残基とともに複合体化さ

50

れたポリマー担体も、オリゴヌクレオチド剤を肝臓に向けて標的設定する機能を果たすことができる。

【0245】

糖（例えば、ガラクトースおよび/またはそのアナログ）を組み込んだ標的設定物質は特に有用である。これらの物質は、特に、肝臓の肝実質細胞を標的とする。例えば、標的設定部分は、2以上または好ましくは2～3個の、互いに約15オングストローム間隔のガラクトース部分を含むことができる。別例として標的設定部分は、ガラクトースに連結されたグルコースであるラクトース（例えば3個のラクトース部分）でもよい。標的設定部分はN アセチルガラクトサミン、N - A c - グルコサミンであってもよい。マンノースまたはマンノース - 6 - リン酸を標的とする部分は、マクロファージへの標的設定のために使用することができる。

10

【0246】

リガンドは、ペプチドまたはペプチド模倣体であってよい。ペプチド模倣体（本願明細書ではオリゴペプチド模倣体とも呼ぶ）は、天然のペプチドと同様の一定の3次元構造にフォールディングすることが可能な分子である。ペプチドおよびペプチド模倣体と、オリゴヌクレオチド剤が結合することによって、細胞の認識および吸収を高めることなどにより、iRNAの薬物動態学的分布に影響を与えることが可能である。ペプチドまたはペプチド模倣体の構成部分は、約5～50アミノ酸長、例えば約5、10、15、20、25、30、35、40、45、または50アミノ酸長であってよい（例えば表3を参照）。

【0247】

20

【表3】

表3. 細胞透過性ペプチドの例

細胞透過性ペプチド	アミノ酸配列	参考文献
ベネトラチン	RQIKIWFQNRRMKWKK (配列番号:31)	Derossi <i>et al.</i> , J. Biol. Chem. 269:10444, 1994
Tat断片 (48-60)	GRKKRRQRRRPPQC (配列番号:32)	Vives <i>et al.</i> , J. Biol. Chem., 272:16010, 1997
シグナル配列由来ペプチド	GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV (配列番号:33)	Chaloin <i>et al.</i> , Biochem. Biophys. Res. Commun., 243:601, 1998
PVEC	LLIILRRRIRKQAHAAHSK (配列番号:34)	Elmqvist <i>et al.</i> , Exp. Cell Res., 269:237, 2001
トランスポーター	GWTLNSAGYLLKINLKALAALAKKIL (配列番号:35)	Pooga <i>et al.</i> , FASEB J., 12:67, 1998
両親媒性モデルペプチド	KLALKLALKALKAALKLA (配列番号:36)	Oehlke <i>et al.</i> , Mol. Ther., 2:339, 2000
Arg ₉	RRRRRRRRR (配列番号:37)	Mitchell <i>et al.</i> , J. Pept. Res., 56:318, 2000
細菌細胞壁透過性	KFFKFFKFFK (配列番号:38)	
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRN LVPRTES (配列番号:39)	
セクロピンP1	SWLSKTAKKLENSAKKRISGIAIAIQGGP R (配列番号:40)	
α-デフェンシン	ACYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLWAFC C (配列番号:41)	
b-デフェンシン	DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQTGTCYR GKAKCCK (配列番号:42)	
バクテネシン	RKCRIVVIRVCR (配列番号:43)	
PR-39	RRRPRPPYLPRPRPPPFPPRLPPRIPPGFPP RFPPRFPGKR-NH ₂ (配列番号:44)	
インドリジン	ILPWKWPWWPWR-NH ₂ (配列番号:45)	

【0248】

ペプチドまたはペプチド模倣体は、例えば細胞透過性ペプチド、カチオン性ペプチド、両親媒性ペプチド、または疎水性ペプチド（例えば、主に Tyr、Trp または Phe から構成されるもの）であってよい。ペプチド部分は、 dendriマーペプチド、制約型 (constrained) ペプチドまたは架橋ペプチドであってよい。ペプチド部分は、L-ペプチドでもD-ペプチドでもよい。他の代替例では、ペプチド部分は、疎水性の膜移行配列 (MTS) を含むことが可能である。例示的な疎水性 MTS 含有ペプチドは、アミノ酸配列 AAVALLPAVLLALLAP (配列番号46) を有する RFGF である。疎水性 MTS を含む RFGF アナログ (例えば、アミノ酸配列 AALLPVLLAAP (

10

20

30

40

50

配列番号47))も、標的設定部分となり得る。該ペプチド部分は、ペプチド、オリゴヌクレオチド、およびタンパク質を含めた大きな極性分子を、細胞膜を横切って運ぶことができる「送達」ペプチドとなりうる。例えば、HIV Tatタンパク質由来の配列(GRKKRRQRPPQ(配列番号48))、およびショウジョウバエのアンテナペディヤ・タンパク質由来の配列(RQIKIWFQNRMRMKWK(配列番号49))は、送達ペプチドとして機能しうることが見出されている。ペプチドまたはペプチド模倣体は、ファージ・ディスプレイ・ライブラリ、または1ピーズ1化合物(OBOC)コンビナトリアル・ライブラリから同定されたペプチドなど、ランダムなDNA配列によってコードされてもよい(Lamら、Nature、354:82~84、1991)。取り込まれたモノマーユニットを介してiRNA剤に係留されるペプチドまたはペプチド模倣体は、アルギニン-グリシン-アスパラギン酸(RGD)ペプチド、またはRGD模倣体などの、細胞を標的とするペプチドであることが好ましい。ペプチド部分の長さは、約5アミノ酸~約40アミノ酸の範囲であってよい。ペプチド部分は、安定性を増大させるため、あるいは立体構造上の特性を指定するためなどの、構造上の修飾を有することもできる。以下に記載する任意の構造上の修飾を使用することが可能である。

10

20

30

40

50

【0249】

「細胞透過性ペプチド」は、細胞、例えばヒト細胞などの哺乳動物の細胞に浸透することが可能である。細胞透過性ペプチドは、核局在化シグナル(NLS)を含む場合もある。例えば、細胞透過性ペプチドは、HIV-1 gp41の融合ペプチドドメインとSV40大型T抗原のNLSとに由来するMPGなどの、2部分からなる両親媒性ペプチドであってよい(Simeoniら、Nucleic Acids Res. 31:2717~2724、2003)。

【0250】

1実施形態では、SRMSに係留される標的設定ペプチドは、両親媒性のらせん状ペプチドであってよい。例示的な両親媒性のらせん状ペプチドには、セクロピン、ライコトキシン、パラダキシン、プフォリン、CPF、ボンビニン様ペプチド(BLP)、カテリシディン、セラトトキシン、サッカメーバ・クラバ(Sclava)のペプチド、メクラウナギ腸管の抗菌性ペプチド(HFIAP)、マガイニン、プレビニン-2、ダーマセプチン、メリチン、プレウロシディン、H₂Aペプチド、アフリカツメガエルのペプチド、エスカレンチン-1、およびカエリンがあるが、これらに限定はされない。らせんの安定性を完全に保つために、いくつかの要因を考慮することが好ましいであろう。例えば、らせん安定化残基を最大数使用し(例えばleu、ala、またはlys)、らせん不安定化残基を最小数とする(例えばプロリン、または環状モノマーユニット)。キャッピング残基も考慮する(例えば、GlyはNキャッピング残基の例であり、かつ/あるいはC末端アミド化を使用して、らせんを安定化させるために追加のH結合を与えることが可能である)。i±3、あるいはi±4位離れた、正反対の電荷を有する残基間の塩架橋の形成によって、安定性をもたらすことができる。例えば、リシン、アルギニン、ホモアルギニン、オルニチンまたはヒスチジンなどのカチオン性残基は、アニオン性の残基であるグルタミン酸またはアスパラギン酸と塩架橋を形成することが可能である。

【0251】

ペプチドおよびペプチド模倣体のリガンドには、天然型または修飾型ペプチド、例えばDまたはLペプチド; 、 、またはペプチド; N-メチルペプチド; アザペプチド; 1つまたは複数のアミドを有するペプチド、すなわち1つまたは複数の尿素、チオ尿素、カルバメート、またはスルホニル尿素結合で結合が置換されたペプチド; または環状ペプチド、を有するリガンドがある。

【0252】

iRNA剤を製造するための方法

神経系細胞内への取り込み強化のために親油性部分に結合させたiRNA剤は、修飾塩基または非天然塩基、例えば本願明細書に記載の塩基を含むことが可能である。さらに、iRNA剤は、修飾塩基または非天然塩基と、本願明細書に記載するその他の要素とを有

することができる。

【0253】

オリゴヌクレオチド・ペプチド結合体の合成および精製は、確立されている方法によって実施することが可能である。例えば、テュルフェルト (Truferf) ら、Tetrahedron、52:3005、1996；およびエスティー クルーク (S.T. Crooke) 編「Antisense Drug Technology」、2001年、マルセル デッカー インコーポレイティッド (Marcel Dekker, Inc.) の中のマノハラン (Manoharan) 著「Oligonucleotide Conjugates in Antisense Technology」を参照のこと。

【0254】

本発明の1実施形態では、ペプチド模倣体を修飾して、明確で特異的な好ましい立体構造をとる制約型ペプチドを製造することが可能であり、該立体構造によってペプチドの効力および選択性を増大させることが可能である。例えば、制約型ペプチドはアザペプチドであってよい (ガンテ (Gante)、Synthesis、405~413、1989)。アミノ酸側鎖の構造を変えずに、該アミノ酸の炭素を窒素原子で置換することによって、アザペプチドが合成される。例えば、伝統的なペプチド合成カップリング法においてヒドラジンを使用し、ヒドラジンを「カルボニル・ドナー」、例えばクロロギ酸フェニルと反応させることなどによって、アザペプチドを合成することが可能である。

【0255】

本発明の1実施形態では、ペプチドまたはペプチド模倣体 (例えば、SRMSに係留されるペプチドまたはペプチド模倣体) は、N-メチルペプチドであってよい。N-メチルペプチドはN-メチルアミノ酸から構成されるが、N-メチルアミノ酸はペプチドのバックボーン中に追加のメチル基を与えることによってタンパク質分解酵素による切断に対する追加の抵抗手段を与える可能性がある。N-メチルペプチドは、当分野で知られている方法によって合成することが可能である (例えば、リンドグレン (Lindgren) ら、Trends Pharmacol. Sci. 21:99、2000；「Cell Penetrating Peptides: Processes and Applications」、ランゲル (Langel) 編、米国フロリダ州ボカラトン所在のCRC Press、2002；フィッシュエ (Fische) ら、Bioconjugate Chem. 12:825、2001；ワンダー (Wander) ら、J. Am. Chem. Soc.、124:13382、2002を参照)。例えば、AntペプチドまたはTatペプチドが、N-メチルペプチドであってよい。

【0256】

本発明の1実施形態では、ペプチドまたはペプチド模倣体 (例えば、SRMSに係留されるペプチドまたはペプチド模倣体) は、 α -ペプチドであってよい。 α -ペプチドは、溶液中でらせん、プリーツ・シート、ターンおよびヘアピンなどの安定した2次構造を形成する。 α -ペプチドの環状誘導体は、固体状態で折りたたまれてナノチューブになりうる。 α -ペプチドは、タンパク質分解酵素による分解に対して耐性がある。 α -ペプチドは、当分野で知られている方法によって合成することが可能である。例えば、AntペプチドまたはTatペプチドが α -ペプチドであってよい。

【0257】

本発明の1実施形態では、ペプチドまたはペプチド模倣体 (例えば、SRMSに係留されるペプチドまたはペプチド模倣体) は、ペプチド模倣体のアミド結合が尿素部分で置換されているオリゴ尿素結合体 (またはオリゴチオ尿素結合体) であってよい。アミド結合の置換によって、タンパク質分解酵素、例えば胃腸管のタンパク質分解酵素による分解に対する耐性が増大する。1実施形態では、オリゴ尿素結合体を、経口送達において使用するためにiRNA剤に係留させる。オリゴ尿素ペプチド模倣体のそれぞれの繰り返しユニット中のバックボーンは、天然アミノ酸と比較して1炭素原子分だけ広がる可能性がある。1炭素原子の広がりによって、例えばペプチドの安定性および親油性が増大する可能性がある。したがってオリゴ尿素ペプチドは、iRNA剤が細菌細胞壁の通過を目的とするとき、あるいは神経障害の治療などのためにiRNA剤が血液-脳関門を横断しなければ

10

20

30

40

50

ならないときに、有利である可能性がある。1実施形態では、受容体との高い親和性を生み出すために、水素結合ユニットをオリゴ尿素ペプチドに結合させる。例えば、AntペプチドまたはTatペプチドが、オリゴ尿素結合体（またはオリゴチオ尿素結合体）であってもよい。

【0258】

本発明のdsRNA・ペプチド結合体は、iRNA剤上の様々な位置に存在するSRMSと関連付ける、例えば係留させることが可能である。例えば、ペプチドを、センス鎖上またはアンチセンス鎖上のいずれかにおいて末端に結合させてもよいし、ペプチドをビス結合してもよい（1つのペプチドがそれぞれの末端に係留され、一端がセンス鎖に結合し、一端がアンチセンス鎖に結合する）。他の選択肢では、ペプチドは、短いヘアピン構造のiRNA剤のループ中など、内部に結合し得る。さらに他の選択肢では、ペプチドはペプチド-担体複合体などの複合体と関連付けられてもよい。

10

【0259】

オリゴヌクレオチド剤を対象に投与するために使用可能ないくつかの例示的な送達経路について述べる。さらに、オリゴヌクレオチド剤を、本明細書に記載の例示的な方法に従って製剤化することができる。

【0260】

RGDペプチド部分は、内皮系腫瘍細胞または乳がん腫瘍細胞のような腫瘍細胞を標的とするために使用することができる（ツイツマン（Zitzmann）ら、Cancer Res.、62：5139-43、2002年）。RGDペプチドは、オリゴヌクレオチド剤（例えば、miRNAまたはpremiRNAを標的とするオリゴヌクレオチド剤）を肺、腎臓、脾臓または肝臓を含む様々なその他の組織の腫瘍に対して標的設定するのを容易にすることもできる（アオキ（Aoki）ら、Cancer Gene Therapy 8：783-787、2001年）。好ましくは、RGDペプチドは、オリゴヌクレオチド剤を腎臓に対して標的設定するのを容易にするだろう。RGDペプチドは直線状でも環状でもよく、また、例えば、特定の組織に対する標的設定を容易にするためのグリコシル化またはメチル化など、修飾されていてもよい。例えば、グリコシル化RGDペプチドは、 α_3 を発現している腫瘍細胞にオリゴヌクレオチド剤を送達することができる（ホーブナー（Haubner）ら、J. Nucl. Med.、42：326-336、2001年）。

20

30

【0261】

増殖している細胞中に豊富なマーカーを標的とするペプチドを使用することもできる。例えば、RGD含有ペプチドおよびペプチド模倣体は、がん細胞、特に α_3 インテグリンを提示する細胞を標的とすることができる。したがって、RGDペプチド、RGDを含んでいる環状ペプチド、D-アミノ酸を含んでいるRGDペプチド、ならびに合成RGD模倣体を使用することが可能であろう。RGDに加えて、 α_3 インテグリン・リガンドを標的とする他の部分を使用することもできる。一般に、そのようなリガンドは、増殖している細胞および血管新生を制御するために使用することができる。このタイプの好ましい結合体には、PECAM-1、VEGF、または他のがん遺伝子（例えば本明細書に記載のがん遺伝子）を標的とするオリゴヌクレオチド剤が含まれる。

40

【0262】

「細胞透過性ペプチド」は、細胞（例えば細菌または真菌の細胞などの微生物細胞、あるいはヒト細胞のような哺乳動物細胞）に浸透することができる。微生物細胞透過性ペプチドは、例えばらせん状直鎖ペプチド（例えばLL-37またはセクロピンP1）、ジスルフィド結合含有ペプチド（例えばデフェンシン、デフェンシンまたはバクテネシン）、またはわずか1~2個の中心的なアミノ酸を含んでいるペプチド（例えばPR-39、インドリシジン）であってよい。細胞透過性ペプチドは核移行シグナル（NLS）を含むこともできる。例えば、細胞透過性ペプチドは、HIV-1 gp41の融合ペプチドドメインとSV40大型T抗原のNLSとに由来するMPGなどの、2部分からなる両親媒性ペプチドであってよい（シメオニ（Simeoni）ら、Nucl. Acid

50

s Res. 31: 2717~2724, 2003)。

【0263】

1実施形態では、リガンド結合モノマーに係留される標的設定ペプチドは、両親媒性のらせん状ペプチドであってよい。例示的な両親媒性のらせん状ペプチドには、セクロピン、ライコトキシン、パラダキシン、プフォルリン、C P F、ボンピニン様ペプチド(B L P)、カテリシディン、セラトトキシン、サッカメーバ・クラバ(S. clavata)のペプチド、メクラウナギ腸管の抗菌性ペプチド(H F I A P)、マガイニン、プレビニン-2、ダーマセプチン、メリチン、プレウロシディン、H₂Aペプチド、アフリカツメガエルのペプチド、エスカレンチン-1、およびカエリンがあるが、これらに限定はされない。らせんの安定性を完全に保つために、いくつかの要因を考慮することが好ましいであろう。例えば、らせん安定化残基を最大数使用し(例えばleu、ala、またはlys)、らせん不安定化残基を最小数使用する(例えばプロリン、または環状モノマーユニット)。キャッピング残基も考慮し(例えば、GlyはN キャッピング残基の例である)、かつ/あるいはC末端アミド化を使用して、らせんを安定化させるために追加のH結合を与えることも可能である。i ± 3、あるいはi ± 4位離れた、正反対の電荷を有する残基間の塩架橋の形成によって、安定性をもたらすことができる。例えば、リシン、アルギニン、ホモアルギニン、オルニチンまたはヒスチジンなどのカチオン性残基は、アニオン性の残基であるグルタミン酸またはアスパラギン酸と塩架橋を形成することが可能である。

10

【0264】

ペプチドおよびペプチド模倣体のリガンドには、天然型または修飾型ペプチド、例えばDまたはLペプチド; 、 、または ペプチド; N-メチルペプチド; アザペプチド; 1つまたは複数のアミドを有するペプチド、すなわち1つまたは複数の尿素、チオ尿素、カルバメート、またはスルホニル尿素結合で結合が置換されたペプチド; または環状ペプチド、を有するリガンドがある。

20

【0265】

一部の実施形態では、ペプチドはカチオン性または疎水性のうち少なくともいずれか一方である部分を有することができる。

一部の実施形態では、リガンドは本明細書に記載の核酸塩基のうち任意のものであってよい。

30

【0266】

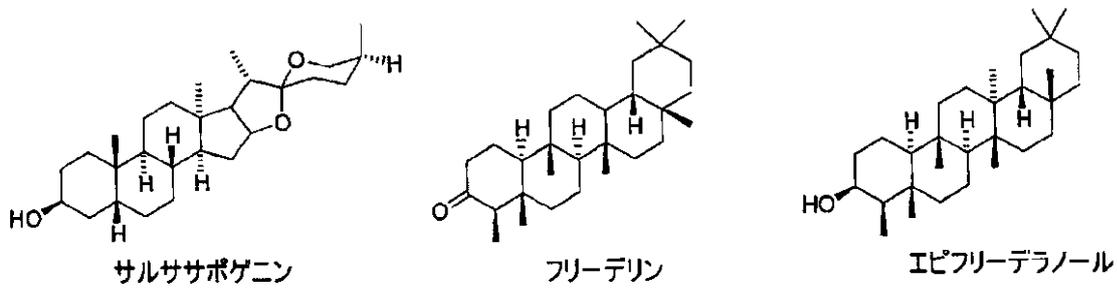
一部の実施形態では、リガンドは置換アミン(例えばジメチルアミノ)であってよい。一部の実施形態では、置換アミンを例えばプロトン化またはアルキル化によって四級化し、カチオンにすることができる。一部の実施形態では、置換アミンは、比較的疎水性の高い係留部(例えばアルキレン)の末端位置にあってもよい。

【0267】

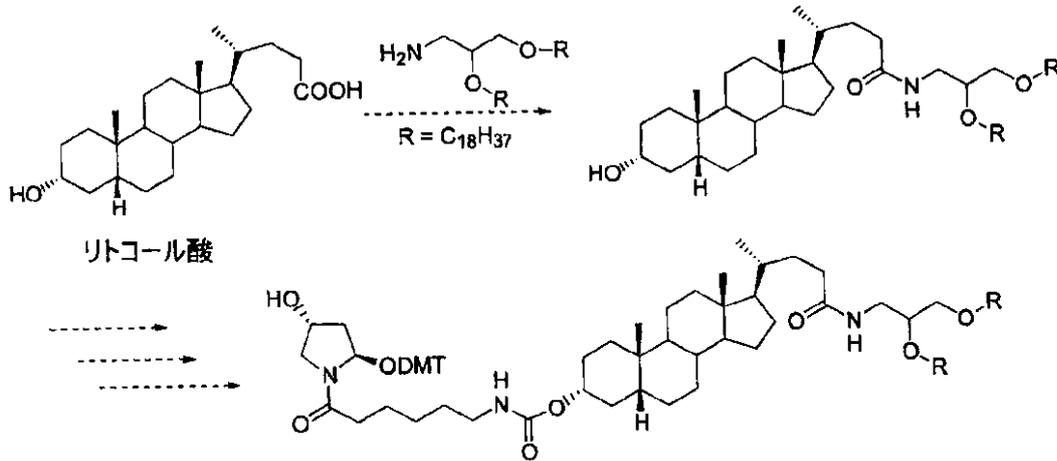
一部の実施形態では、リガンドは次のトリテルペンのうちの1つであってよい。

【0268】

【化 1 2】



10



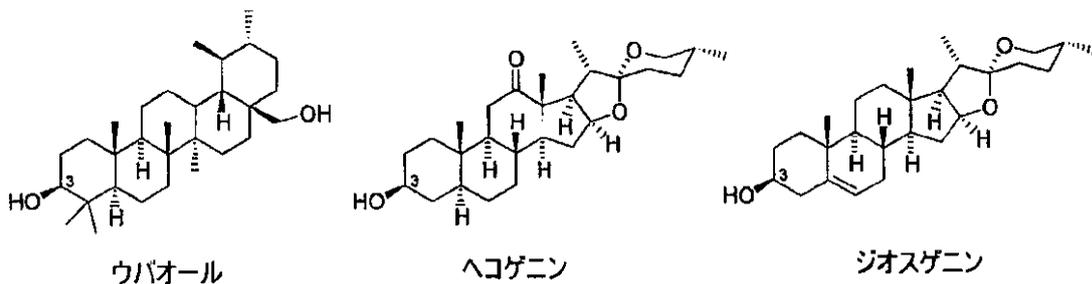
20

【 0 2 6 9】

一部の実施形態では、リガンドは置換または非置換のコレステロール、あるいはその立体異性体、あるいは次のステロイドのうち1つであってよい。

【 0 2 7 0】

【化 1 3】



40

【 0 2 7 1】

一部の実施形態では、係留されるリガンドは、対応する未係留または未結合リガンドよりも1つ以上多い原子を含むことができる（例えば、ヘテロ原子を含む官能基の1以上のプロトンまたはヘテロ原子を含む官能基全体が、担体または係留部へのリガンドの結合時に未結合のリガンドから除かれる場合がある）。例えば、コレステロールの3-ヒドロキシル基のプロトンは係留部によって置換される可能性があり（例えば、コレステロール-3-OH（未結合状態）およびコレステロール-3-O-係留部（結合状態））、あるいはコレステロールの3-ヒドロキシル基全体が硫黄原子によって置換される可能性がある（例えばコレステロール-3-OH（未結合状態）およびコレステロール-3-S-係留部（結合状態、例えばチオコレステロール））。

50

【0272】

オリゴヌクレオチド剤を製造する方法

本明細書に記載の異常塩基を含んでいるリボヌクレオシドのリストは、パミラ F. クレイン (Pamela F. Crain)、ジェフ ロゼンスキー (Jeff Rozenski) およびジェームズ A. マックロスキー (James A. McCloskey) (米国84112ユタ州ソルトレークシティ所在のユタ大学、Medicinal Chemistry and Biochemistry) によって維持されている「RNA 修飾データベース (RNA Modification Database)」に記載されている。

【0273】

5' シリル保護基をリボヌクレオシドの2' 位の酸不安定なオルトエステルと共に使用して、ホスホロアミダイト法によってオリゴヌクレオチドを合成することができる。最後の脱保護条件は、RNA 生成物をそれほど分解しないことが分かっている。異常塩基およびユニバーサル塩基上の官能基は、実施される本明細書に記載の操作に適合した保護基を用いて、オリゴヌクレオチド合成の際にブロッキングされる。合成はすべて任意の自動または手動シンセサイザにおいて、大規模、中規模、または小規模で行うことができる。この合成は、マルチウェルプレートまたはスライドガラスで行うこともできる。

10

【0274】

5' O シリル基は、フッ化物イオンへの接触によって除去することが可能であり、該フッ化物イオンには、任意のフッ化物イオン供給源、例えば無機カウンターイオンと組み合わせるフッ化物イオンを含む塩類 (例えばフッ化セシウムおよびフッ化カリウム)、または有機カウンターイオンと組み合わせるフッ化物イオンを含む塩類 (例えばフッ化テトラアルキルアンモニウム) が挙げられる。クラウンエーテル触媒を無機フッ化物と組み合わせる脱保護反応に利用することができる。好ましいフッ化物イオン供給源は、フッ化テトラブチルアンモニウムまたはフッ化水素酸アミン (例えばHF水溶液と二極性の非プロトン性溶媒 (例えばジメチルホルムアミド) 中のトリエチルアミンとの組み合わせ) である。

20

【0275】

亜リン酸トリエステルおよびホスホトリエステルの使用する保護基の選択により、フッ化物に対するトリエステルの安定性を変更することができる。ホスホトリエステルまたは亜リン酸トリエステルのメチル基保護は、フッ化物イオンに対抗して結合を安定させて、工程歩留まりを改善することができる。

30

【0276】

リボヌクレオチドは反応性の2' ヒドロキシル置換基を有するので、RNA 中のこの反応性の2' 位を、5' O シリル保護基と両立する保護基 (例えば、フッ化物に対し安定なもの) で保護することが望ましいかもしれない。オルトエステルはこの基準を満たし、最終的な酸脱保護ステップで容易に除去可能であり、RNA の分解を最小限にすることができる。

【0277】

テトラゾール触媒を標準的なホスホロアミダイトカップリング反応に使用することができる。好ましい触媒には、例えばテトラゾール、S-エチル-テトラゾール、p-ニトロフェニルテトラゾールがある。

40

【0278】

一般的なプロセスは以下のとおりである。ヌクレオチドを適切に保護処理し、固相または液相のRNA オリゴヌクレオチド合成に使用するために官能化する。リボヌクレオチド中の2' -ヒドロキシル基は、トリス・オルトエステル試薬を使用して修飾することができる。酸性触媒 (例えばp-トルエンスルホン酸ピリジニウム) の存在下でリボヌクレオチドをトリス・オルトエステル試薬と反応させることにより、2' -ヒドロキシルを修飾して2' O オルトエステル・ヌクレオチドを生成させることができる。この反応は当業者には周知である。その後、生成物を、当業者に周知の反応によってオリゴヌクレオチドまたはポリマー内に組み込むための所望の試薬 (例えばヌクレオチド・ホスホロアミダ

50

イト)を生成するために、さらなる保護基反応(例えば5' O シリル化)ならびに官能化(例えば3' O ホスフィチル化)に供することができる。

【0279】

好ましいオルトエステルには、アシル保護基またはエステル保護基で保護されたエチレングリコール・リガンドを含んでいるものがある。具体的には、好ましいアシル基はアセチルである。次いで、当業者であれば、該ヌクレオシド試薬を市販のシンセサイザ(例えばGene Assembler Plus(ファルマシア)、380B(アプライド・バイオシステムズ))でRNAオリゴヌクレオチドを合成するために使用することができる。オリゴヌクレオチドまたはポリマーの合成(液相または固相のいずれか)に続き、生成物を、非酸性の試薬を使用して1以上の反応に供することができる。これらの反応のうち1つは強塩基条件(例えば40%メチルアミン水溶液、55 で10分間)の場合があり、エチレングリコール・リガンドからアシル保護基を除去するがオルトエステル部分は結合したまま残ることになる。得られたオルトエステルは、ポリマーまたはオリゴヌクレオチドがその後の用途に使用される時に結合したままでもよいし、最終的な弱酸性反応、例えば50mM酢酸(pH3.0)中55 で10分間、続いて等容の150mMトリス緩衝液を添加して55 で10分間の反応で除去されてもよい。

10

【0280】

ユニバーサル塩基は、「Survey and Summary: The Applications of Universal DNA base analogues」、ロークス、D.(Loakes, D.)、Nucleic Acid Research 2001年、29、p.2437に記載されており、同文献は参照によってその全体を組み入れる。具体例は以下の文献に記載されている:Liu, D.; Moran, S.; Kool, E. T. Chem. Biol., 1997, 4, 919-926; Morales, J. C.; Kool, E. T. Biochemistry, 2000, 39, 2626-2632; Matray, T, J.; Kool, E. T., J. Am. Chem. Soc, 1998, 120, 6191-6192; Moran, S. Ren, R. X.-F.; Rumney IV, S.; Kool, E. T., J. Am. Chem. Soc, 1997, 119, 2056-2057; Guckian, K. M.; Morales, J. C.; Kool, E. T., J. Org. Chem., 1998, 63, 9652-9656; Berger, M.; Wu, Y.; Ogawa, A. K.; McMinn, D. L.; Schultz, P.G.; Romesberg, F. E., Nucleic Acids Res., 2000, 28, 2911-2914; Ogawa, A. K.; Wu, Y.; McMinn, D. L.; Liu, J.; Schultz, P. G.; Romesberg, F. E., J. Am. Chem. Soc, 2000, 122, 3274-3287; Ogawa, A. K.; Wu, Y.; Berger, M.; Schultz, P. G.; Romesberg, F. E., J. Am. Chem. Soc, 2000, 122, 8803-8804; Tae, E. L.; Wu, Y.; Xia, G.; Schultz, P. G.; Romesberg, F. E., J. Am. Chem. Soc, 2001, 123, 7439-7440; Wu, Y.; Ogawa, A. K.; Berger, M.; McMinn, D. L.; Schultz, P. G.; Romesberg, F. E., J. Am. Chem. Soc, 2000, 122, 7621-7632; McMinn, D. L.; Ogawa, A. K.; Wu, Y.; Liu, J.; Schultz, P. G.; Romesberg, F. E., J. Am. Chem. Soc, 1999, 121, 11585-11586; Brotschi, C; Haberli, A.; Leumann, C, J. Angew. Chem. Int. Ed., 2001, 40, 3012-3014; Weizman, H.; Tor, Y., J. Am. Chem. Soc, 2001, 123, 3375-3376; Lan, T.; McLaughlin, L. W., J. Am. Chem. Soc, 2000, 122, 6512-13.

20

30

【0281】

上記に議論されるように、本明細書に記載のモノマーおよび方法は、修飾RNA分子、すなわちポリマー分子であって本明細書に記載のモノマー化合物および/または天然リボヌクレオチドまたは修飾リボヌクレオチド(1以上のサブユニットが異常塩基もしくはユニバーサル塩基を含んでいる)の任意の組み合わせを含んでなるポリマー分子の調製に使用可能である。修飾RNA分子には、例えば化学的または立体化学的に修飾されたヌクレオシド(例えば、1以上のバックボーン修飾(例えばホスホロチオエートまたはP-アルキル)を有するもの; 1以上の糖修飾(例えば2'-OCH₃、2'-F)を有するもの; または1以上の塩基修飾(例えば5-アルキルアミノまたは5-アリルアミノ)を有するもの)のうち少なくともいずれか)あるいはヌクレオシド代用物を含んでいる分子が挙げられる。

40

【0282】

5'-ヒドロキシル基をホスホロアミダイトとカップリングすると亜リン酸エステル中

50

間物が形成され、これが次いで（例えばヨウ素で）酸化されてリン酸塩ジエステルになる。別例として、該垂リン酸エステルを、例えば硫黄、セレン、アミノ、およびホウ素試薬で処理して修飾リン酸バックボーンを形成してもよい。本明細書に記載のモノマーとヌクレオシドまたはオリゴヌクレオチド鎖との間の結合も、ヨウ素、硫黄、セレン、アミノおよびホウ素試薬で処理して、非修飾および修飾リン酸バックボーンをそれぞれ形成することができる。同様に、本明細書に記載のモノマーを、本明細書に記載の、任意の修飾を含むヌクレオシドもしくはオリゴヌクレオチドまたはヌクレオシド代用物と結合させてもよい。

【0283】

オリゴヌクレオチド・ペプチド結合体の合成および精製は、確立されている方法によって実施することが可能である。例えば、テュルーフェルト (Truferf) ら、Tetrahedron, 52:3005, 1996; および S. T. クルーク (S. T. Crooke) 編「Antisense Drug Technology」、2001年、マルセル デッカー インコーポレイテッド (Marcel Dekker, Inc.) の中のマノハラン (Manoharan) 著「Oligonucleotide Conjugates in Antisense Technology」を参照のこと。

10

【0284】

本発明の1実施形態では、ペプチド模倣体を修飾して、明確で特異的な好ましい立体構造をとる制約型ペプチドを製造することが可能であり、該立体構造によってペプチドの効力および選択性を増大させることが可能である。例えば、制約型ペプチドはアザペプチドであってよい (ガンテ (Gante), Synthesis, 405~413, 1989)。アミノ酸側鎖の構造を変えずに、該アミノ酸の炭素を窒素原子で置換することによって、アザペプチドが合成される。例えば、伝統的なペプチド合成カップリング法においてヒドラジンを使用し、ヒドラジンを「カルボニル・ドナー」、例えばクロロギ酸フェニルと反応させることなどによって、アザペプチドを合成することが可能である。

20

【0285】

本発明の1実施形態では、ペプチドまたはペプチド模倣体 (例えば、リガンド結合モノマーに係留されるペプチドまたはペプチド模倣体) は、N-メチルペプチドであってよい。N-メチルペプチドはN-メチルアミノ酸から構成されるが、N-メチルアミノ酸はペプチドのバックボーン中に追加のメチル基を与えることによってタンパク質分解酵素による切断に対する追加の抵抗手段を与える可能性がある。N-メチルペプチドは、当分野で知られている方法によって合成することが可能である (例えば、リンドグレン (Lindgren) ら、Trends Pharmacol. Sci., 21:99, 2000; ランゲル (Langel) 編「Cell Penetrating Peptides: Processes and Applications」、米国フロリダ州ボカラトン所在のCRC Press, 2002; フィッシュ (Fische) ら、Bioconjugate Chem., 12:825, 2001; ワンダー (Wander) ら、J. Am. Chem. Soc., 124:13382, 2002を参照)。例えば、AntペプチドまたはTatペプチドが、N-メチルペプチドであってよい。

30

【0286】

本発明の1実施形態では、ペプチドまたはペプチド模倣体 (例えば、リガンド結合モノマーに係留されるペプチドまたはペプチド模倣体) は、
 - ペプチドであってよい。
 - ペプチドは、溶液中でらせん、ブリーツ・シート、ターンおよびヘアピンなどの安定した2次構造を形成する。
 - ペプチドの環状誘導体は、固体状態で折りたたまれてナノチューブになりうる。
 - ペプチドは、タンパク質分解酵素による分解に対して耐性がある。
 - ペプチドは、当分野で知られている方法によって合成することが可能である。例えば、AntペプチドまたはTatペプチドが
 - ペプチドであってよい。

40

【0287】

本発明の1実施形態では、ペプチドまたはペプチド模倣体 (例えば、リガンド結合モノマーに係留されるペプチドまたはペプチド模倣体) は、オリゴカルバメートであってよい

50

。オリゴカルバメートペプチドは、カルバメート輸送体により促進される輸送経路により細胞内に取り込まれる。例えば、A n t ペプチドまたはT a t ペプチドがオリゴカルバメートであってもよい。

【0288】

本発明の1実施形態では、ペプチドまたはペプチド模倣体（例えば、リガンド結合モノマーに係留されるペプチドまたはペプチド模倣体）は、ペプチド模倣体のアミド結合が尿素部分で置換されているオリゴ尿素結合体（またはオリゴチオ尿素結合体）であってよい。アミド結合の置換によって、タンパク質分解酵素、例えば胃腸管のタンパク質分解酵素による分解に対する耐性が増大する。1実施形態では、オリゴ尿素結合体を、経口送達において使用するためにオリゴヌクレオチド剤に係留させる。オリゴ尿素ペプチド模倣体のそれぞれの繰り返しユニット中のバックボーンは、天然アミノ酸と比較して1炭素原子分だけ広がる可能性がある。1炭素原子の広がりによって、例えばペプチドの安定性および親油性が増大する可能性がある。したがってオリゴ尿素ペプチドは、オリゴヌクレオチド剤が細菌細胞壁の通過を目的とするとき、あるいは神経障害の治療などのためにオリゴヌクレオチド剤が血液-脳関門を横断しなければならないときに、有利である可能性がある。1実施形態では、受容体との高い親和性を生み出すために、水素結合ユニットをオリゴ尿素ペプチドに結合させる。例えば、A n t ペプチドまたはT a t ペプチドが、オリゴ尿素結合体（またはオリゴチオ尿素結合体）であってもよい。

10

【0289】

本発明のs i R N A ・ペプチド結合体は、オリゴヌクレオチド剤上の様々な位置に存在するリガンド結合モノマーと関連付ける、例えば係留させることが可能である。例えば、ペプチドを、センス鎖上またはアンチセンス鎖上のいずれかにおいて末端に結合させてもよいし、ペプチドをピス結合してもよい（それぞれの末端に1つのペプチドが係留され、一端がセンス鎖に結合し、一端がアンチセンス鎖に結合する）。他の選択肢では、ペプチドは、短いヘアピン構造のオリゴヌクレオチド剤のループ中など、内側に結合し得る。さらに他の選択肢では、ペプチドはペプチド-担体複合体などの複合体と関連付けられてもよい。

20

【0290】

ペプチド 担体複合体は、少なくとも、（生物系および/または細胞への送達などのために）1以上のオリゴヌクレオチド剤を封入することができる担体分子と、該担体分子の外側に係留された、担体複合体を特定の組織または細胞種に向けて標的指定するためなどのペプチド部分とで構成される。担体複合体は、該複合体の外表面上に追加の標的指定分子を、あるいは細胞への送達を援助する融合剤を担持することもできる。担体内に封入される1以上のオリゴヌクレオチド剤は、担体内部への同剤の送達を援助することができる親油性分子に結合されていてもよい。

30

【0291】

担体分子または担体構造体は、例えばミセル、リポソーム（例えばカチオン性リポソーム）、ナノ粒子、ミクロスフェアあるいは生分解性ポリマーであってよい。ペプチド部分は、様々な結合、例えばジスルフィド結合、酸不安定な結合、ペプチドを用いた結合、オキシアミノ結合あるいはヒドラジン結合などによって担体分子に係留することができる。例えば、ペプチドを用いた結合はG F L G ペプチドであってよい。特定の結合は特定の長所を有することになり、その長所（あるいは短所）は、組織標的または意図される用途によって考慮することができる。例えば、ペプチドを用いた結合は血流中では安定であるが、リソソーム中の酵素的切断には弱い。

40

【0292】

保護されたモノマー化合物を反応液から分離し、カラムクロマトグラフィ、高圧液体クロマトグラフィ、または再結晶のような方法によってさらに精製することができる。当業者には当然のことであるが、本明細書中の式の化合物を合成する別の方法は当分野の通常の技術者には明らかである。さらに、様々な合成ステップを、所望の化合物を得るために別の順序または順番で実施することもできる。本明細書に記載の化合物を合成するのに有

50

用なその他の合成化学変換、保護基（例えば、塩基上にあるヒドロキシル、アミノなど）および保護基の方法論（保護および脱保護）は当分野で周知であり、例えば、以下の文献、すなわち R. ラロック (R. Larock)、「Comprehensive Organic Transformations」、VCH 出版 (VCH Publishers) (1989)；T. W. グリーン (T. W. Greene) および P. G. M. ワッツ (P. G. M. Wuts)、「Protective Groups in Organic Synthesis」、第 2 版、ジョンワイリーアンドサンズ (John Wiley and Sons) (1991)；L. ファイザー (L. Fieser) および M. ファイザー (M. Fieser)、「Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis」、ジョンワイリーアンドサンズ (1994)；および L. パケット (L. Paquette) 編「Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis」、ジョンワイリーアンドサンズ (1995)、ならびにその後続版に記載されたものなどがある。

10

【0293】

本発明の保護されたモノマー化合物は、1つ以上の不斉中心を含む可能性があり、従ってラセミ化合物およびラセミ混合物、単一立体異性体、個々のジアステレオマーおよびジアステレオマー混合物として生じる可能性がある。これらの化合物のそのような異性体はすべて、明らかに本発明に含まれる。本明細書に記載の化合物は、さらに結合（例えば炭素-炭素結合および炭素窒素結合、例えばアミド）あるいは結合の回転を制限しうる（例えば環または二重結合の存在に起因する制限を与うる）置換を含むことができる。従って、シス/トランス、E/Z 異性体、および回転異性体（ロータマー）はすべて、明らかに本願に含まれる。本発明の化合物は、そのような例においては、複数の互変異性体で表わすことも可能であり、本発明は本明細書に記載の化合物のすべての互変異性体を明らかに含んでいる（例えば、環系のアルキル化により複数の部位がアルキル化される可能性があるが、本発明は明らかにそのような反応生成物をすべて含んでいる）。そのような化合物のそのような異性体はすべて本発明に明らかに含まれている。本明細書に記載の化合物のすべての結晶形は本発明に明らかに含まれている。

20

【0294】

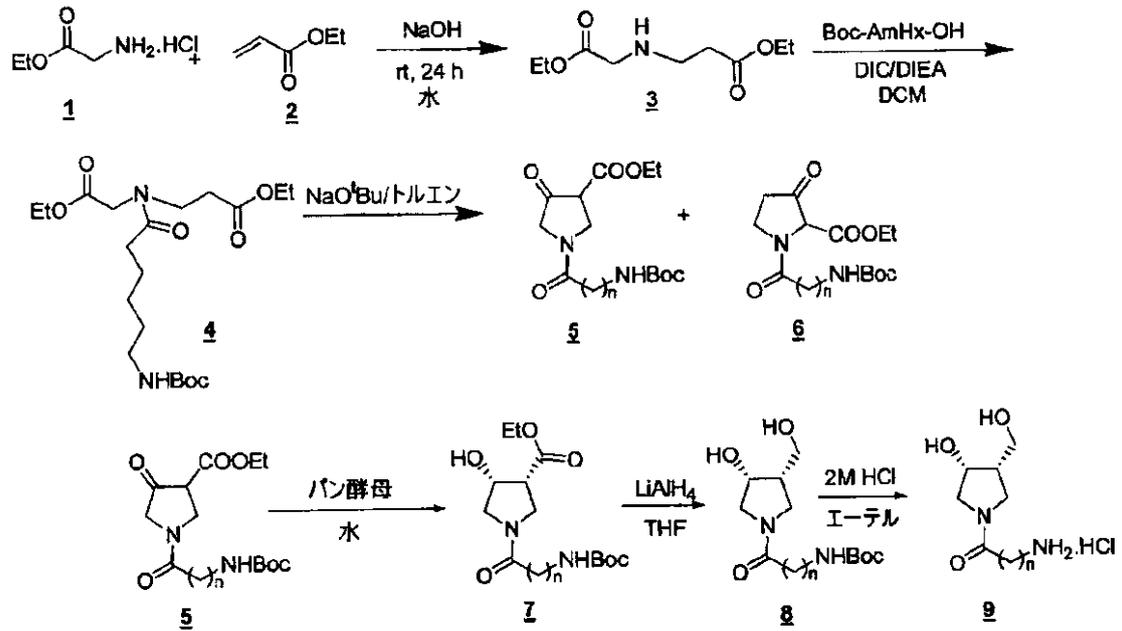
本明細書に記載の代表的なリガンド結合モノマー、ならびにリガンド結合モノマーおよび関連化合物を調製するための典型的な合成法については後述する。他所で議論されるように、リガンド結合モノマーのヒドロキシル基のための保護基（例えば OFG¹）には、ジメトキシトリチル基 (DMT) が挙げられるが、これに限定はされない。例えば、一部の実施形態においては、保護基として OFG¹ の代わりにシリコン系保護基を使用することが望ましいこともある。したがって、シリコン系保護基は、必要または所望に応じて、DMT 基と併用してもよいし DMT 基の代わりに使用してもよい。したがって、以下に示すリガンド結合モノマーおよび合成法は、OFG¹ 用の保護基として DMT 保護基を特色としているが、本発明をどのようにも限定するものと解釈すべきではない。

30

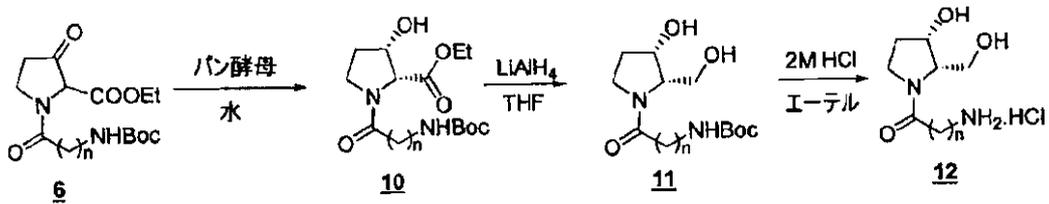
【0295】

【化14】

ピロリン担体の合成



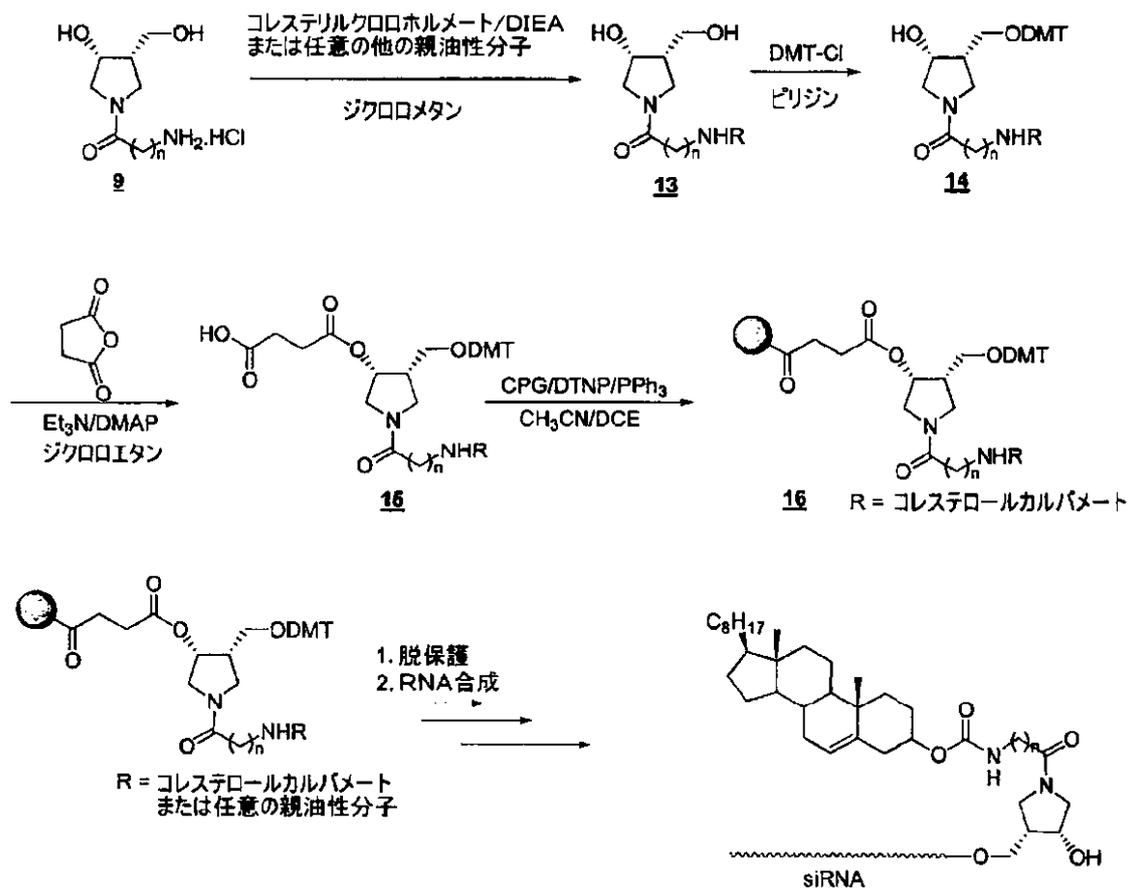
スキーム1. シス-(3S, 4R)-ピロリジンジオールの合成



スキーム2. シス-(2R, 3S)-ピロリジンジオールの合成

【0296】

【化 1 5】



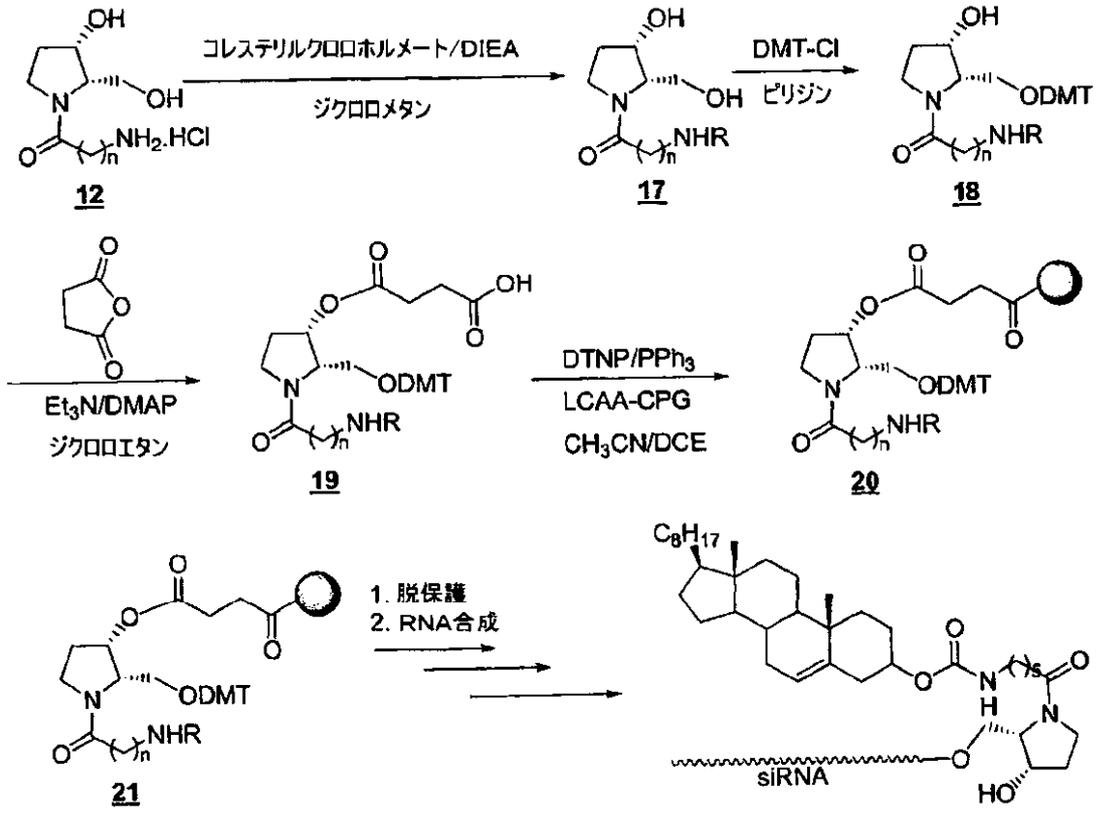
10

20

【 0 2 9 7 】

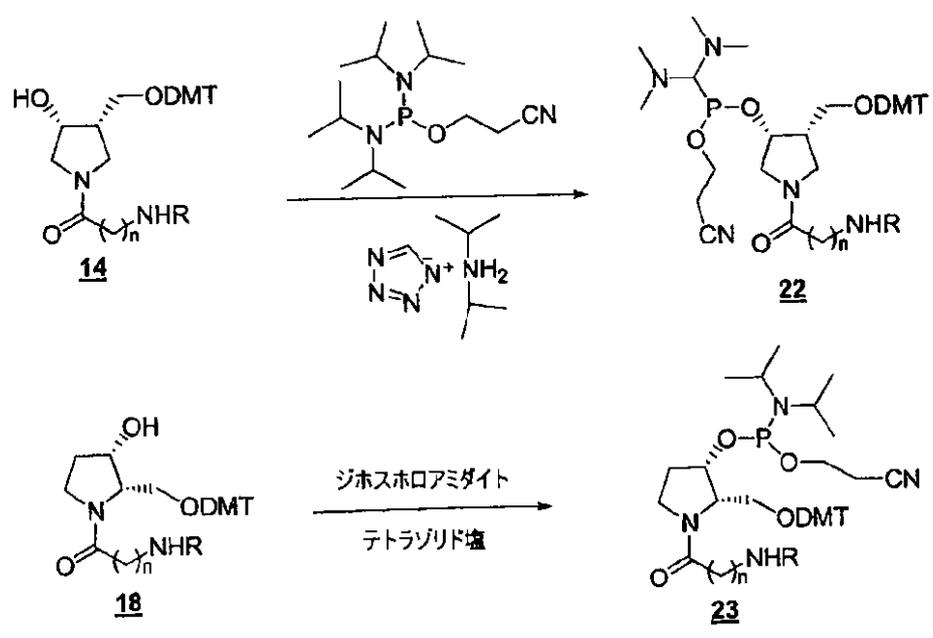
30

【化16】



10

20



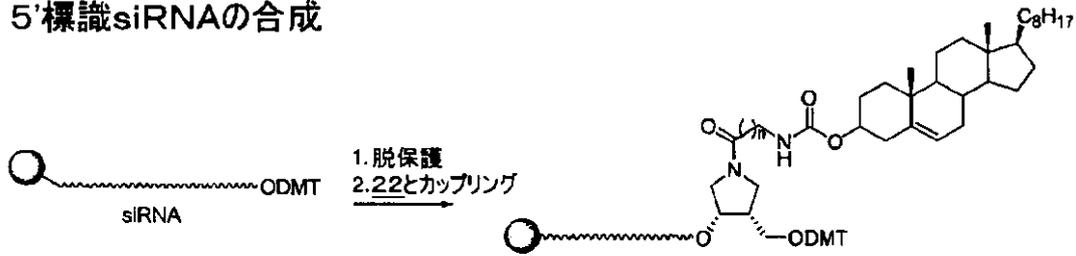
30

40

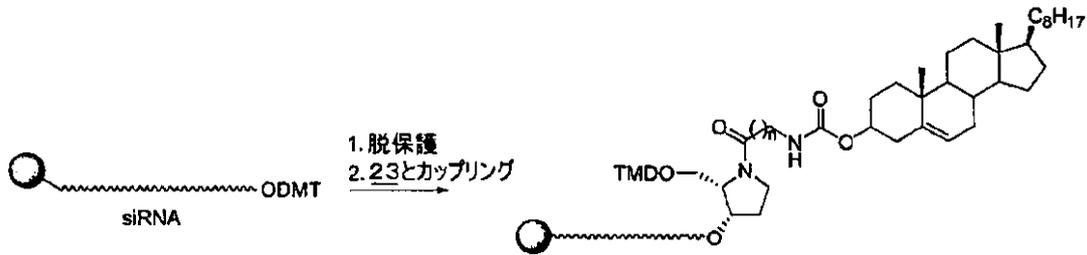
【0298】

【化17】

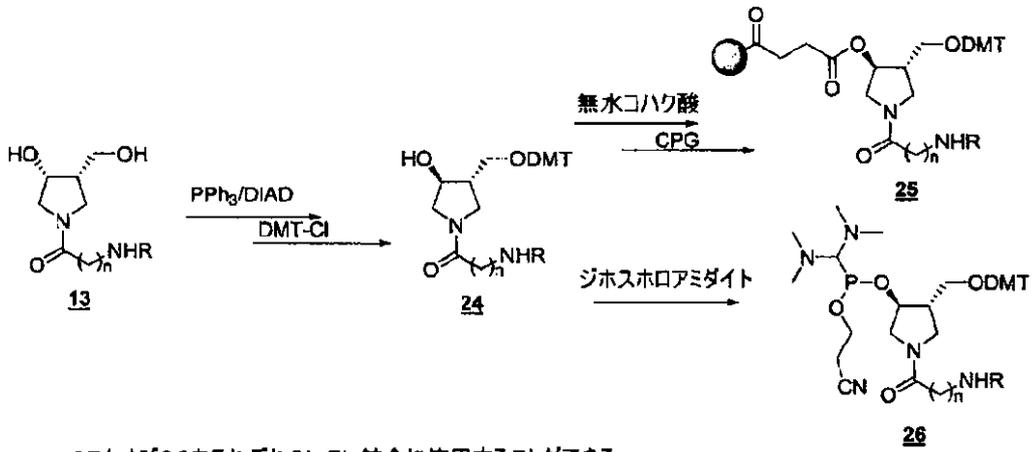
5'標識siRNAの合成



10

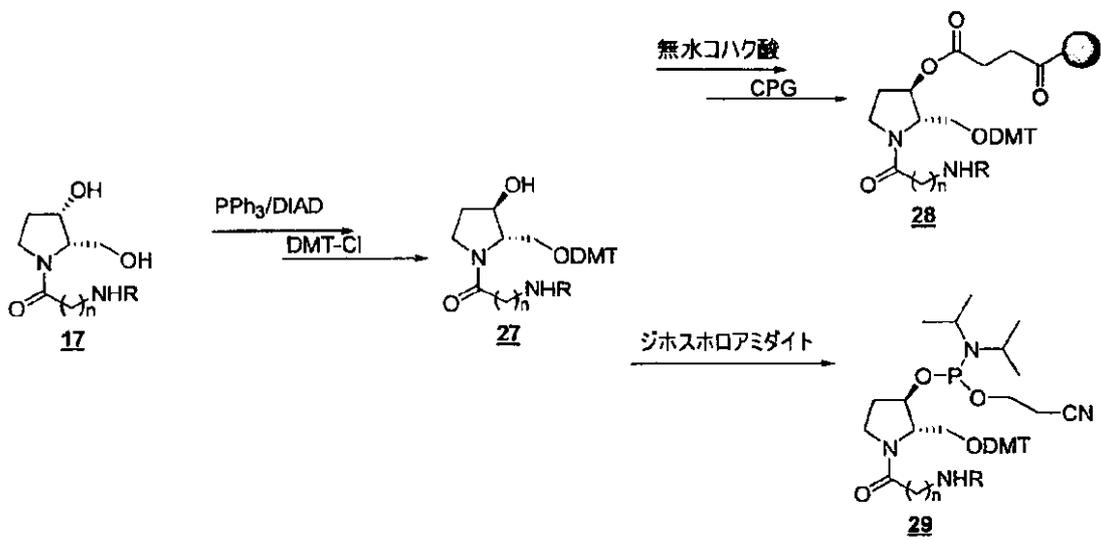


20



30

25および26をそれぞれ3'、5'-結合に使用することができる。

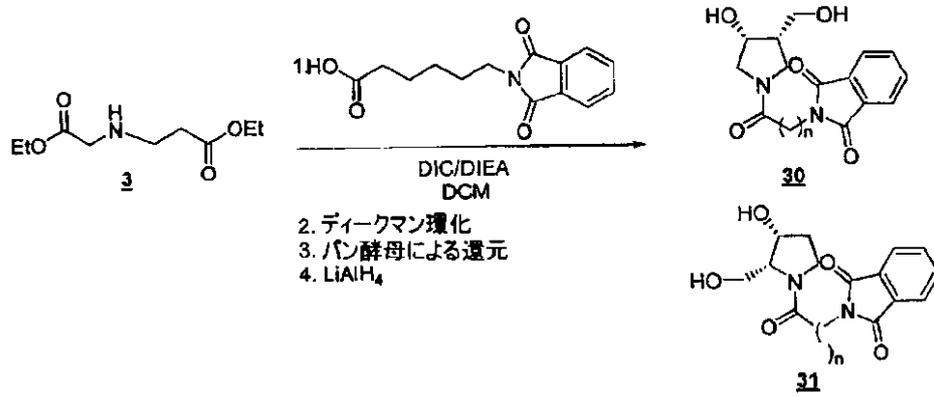


40

【0299】

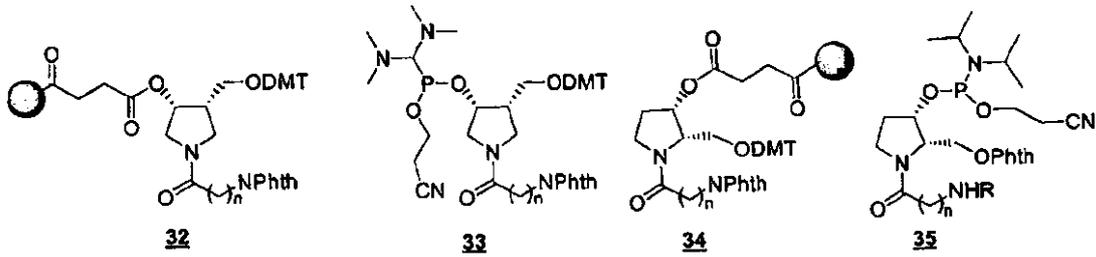
【化 1 8】

フタルイミド誘導体の合成



10

30および31を、siRNAの3'および5'結合についてスキーム2-4に示したようにして同様の誘導体に変換することができる

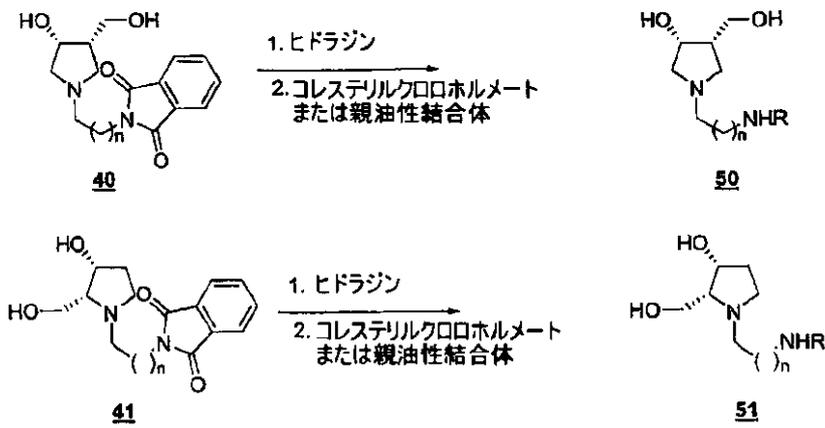


20

【 0 3 0 0 】

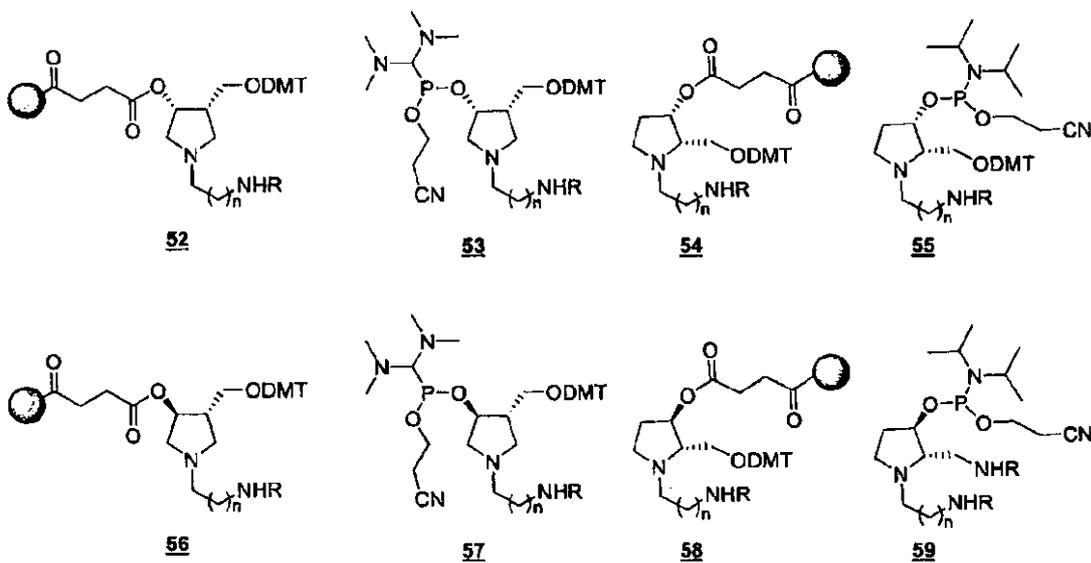
【化20】

N-アルキルピロリン誘導体の合成



10

中間体50および51を交換して、同じ反応を用いてsiRNAと結合させることが可能なアナログにすることができる



20

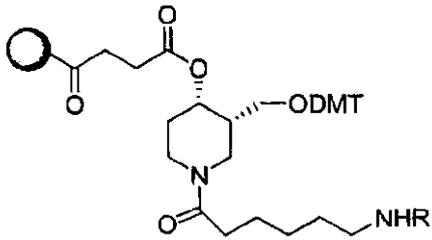
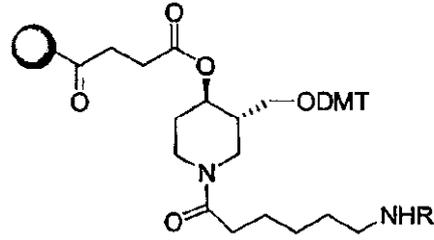
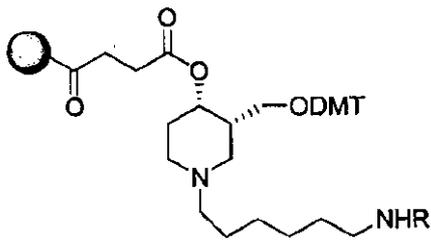
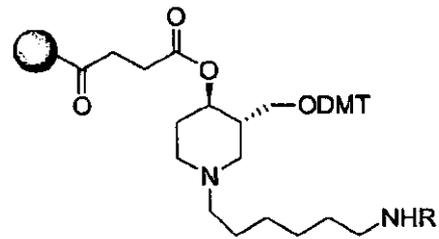
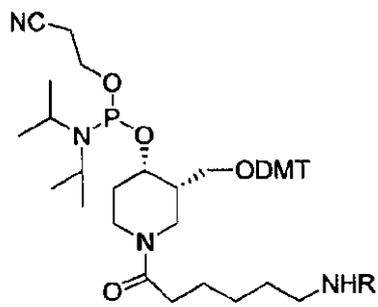
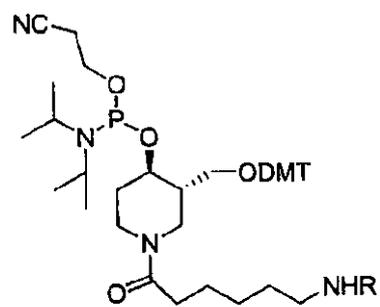
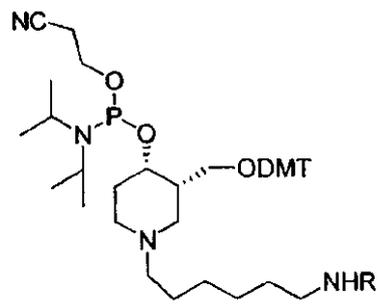
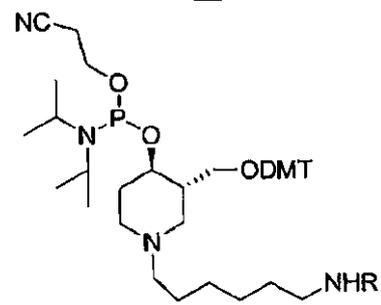
30

【0302】

【化 2 1】

ピペリジン系リガンド:

ピロリン系と同様にピペリジン系を合成することができる

**60****61****62****63****64****65****66****67**

10

20

30

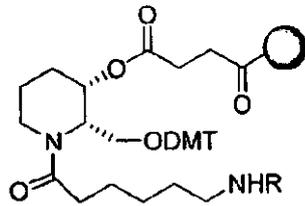
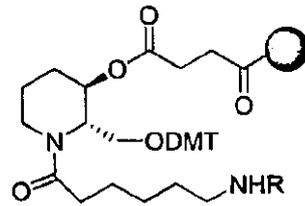
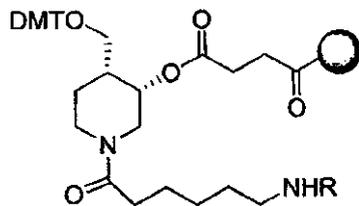
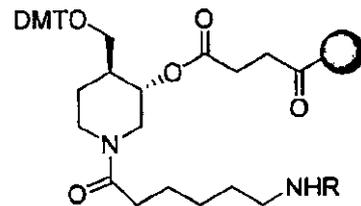
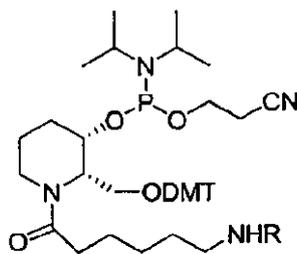
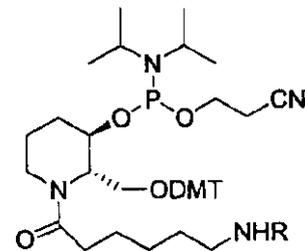
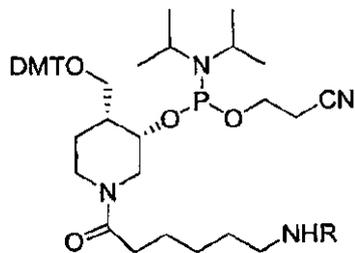
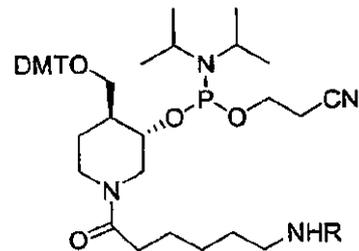
40

【 0 3 0 3 】

【化 2 2】

ピペリジン系リガンド:

ピロリン系と同様にピペリジン系を合成することができる

**68****69****70****71****72****73****74****75**

10

20

30

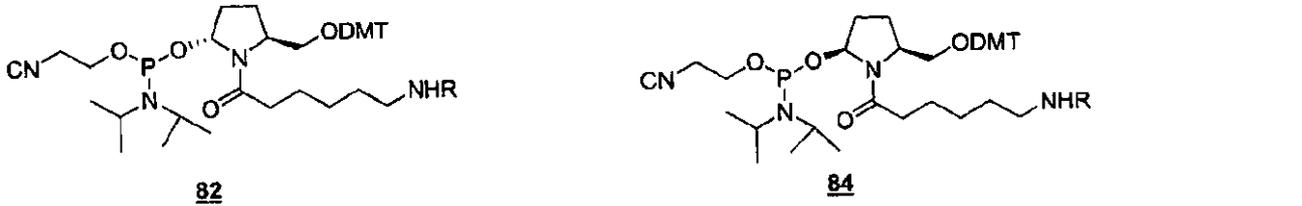
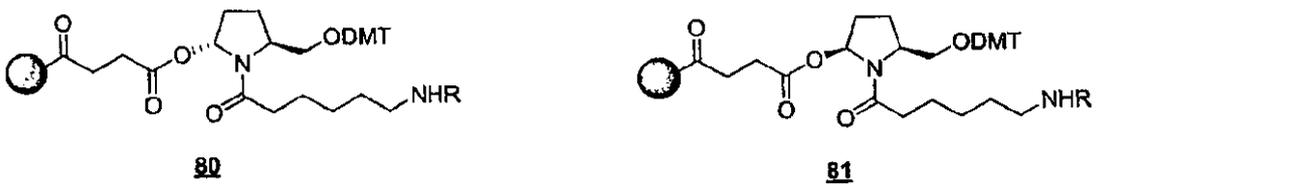
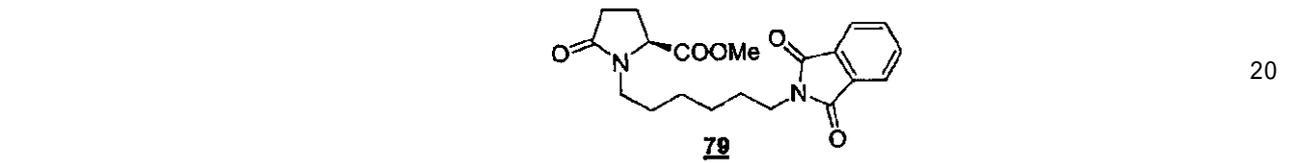
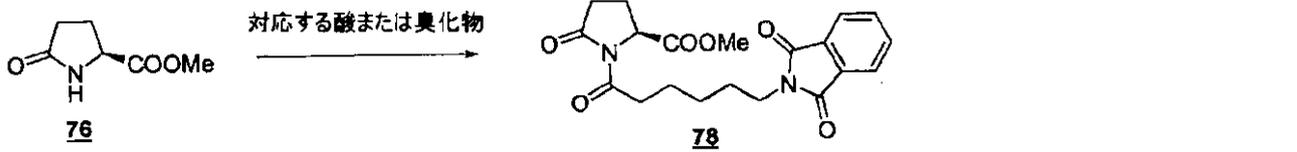
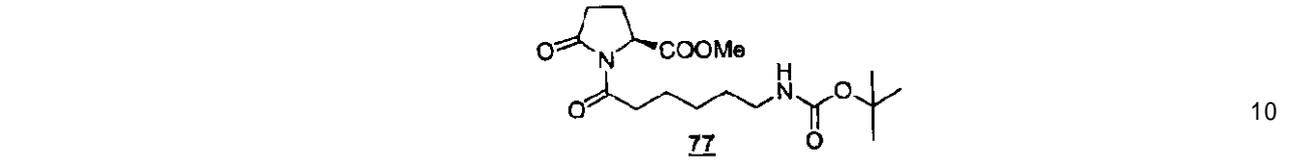
40

【 0 3 0 4 】

【化 2 3】

ヒドロキシピロリン系リンカー:

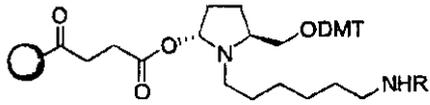
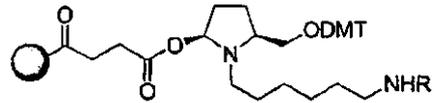
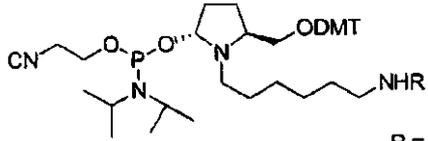
市販のシス-3-ヒドロキシピロリンおよび(s)-ピロリドンカルボキシレートより



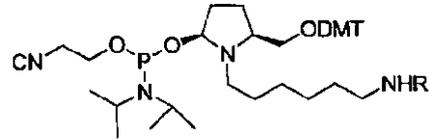
R = 親油性結合体

【 0 3 0 5 】

【化24】

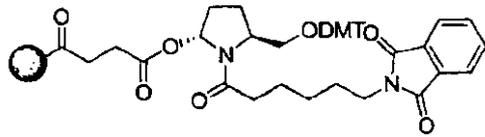
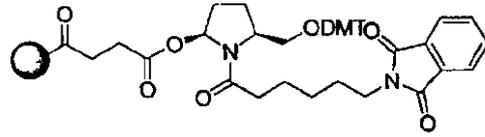
**85****86****87**

R = 親油性結合体

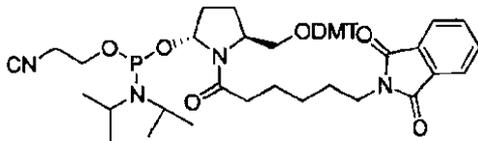
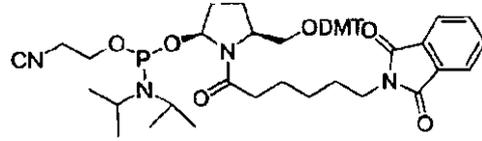
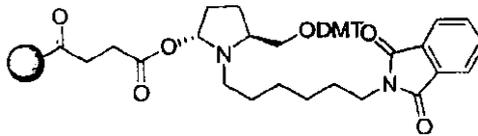
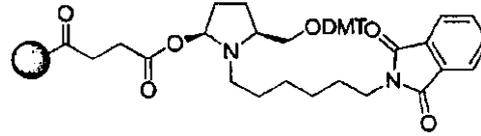
**88**

10

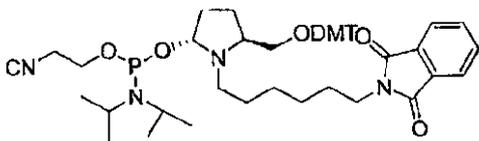
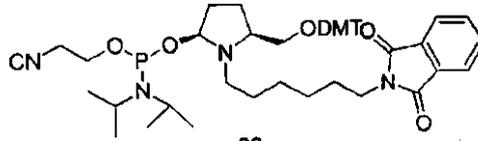
siRNAを安定化するフタルイミド誘導体

**89****90**

20

**91****92****93****94**

30

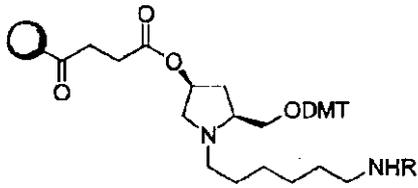
**95****96**

40

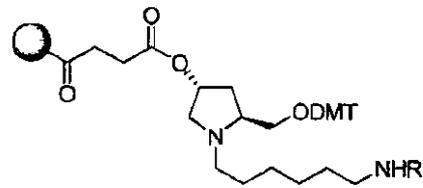
【0306】

【化 2 5】

4-ヒドロキシピロリン誘導体

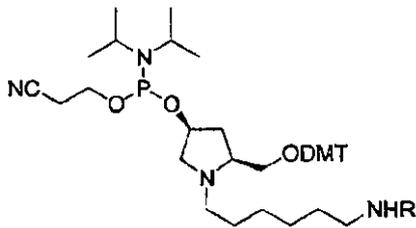


97

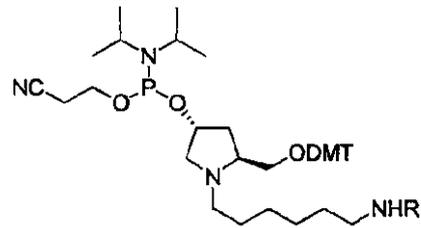


98

10



99

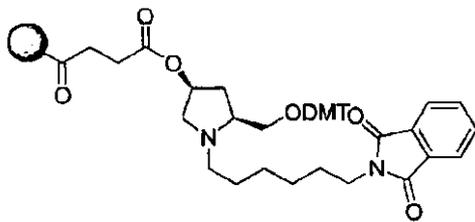


100

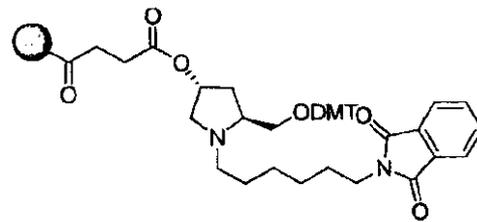
R = 親油性結合体

20

フタルイミド誘導体

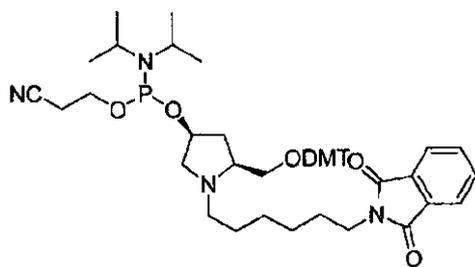


101

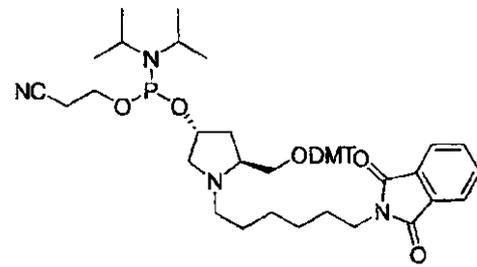


102

30



103



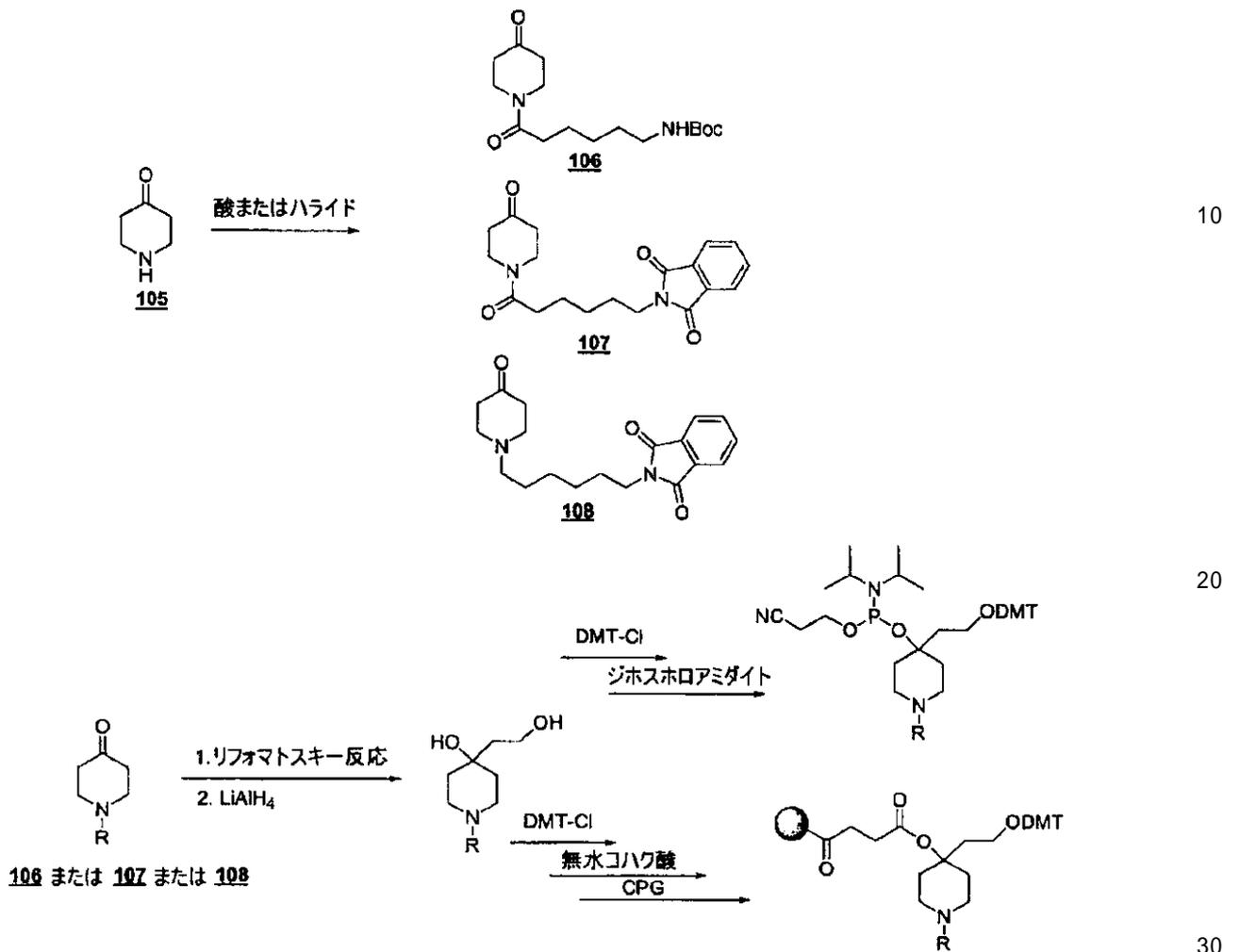
104

40

【 0 3 0 7 】

【化26】

6員環リンカーの合成

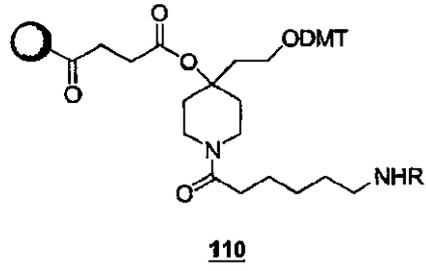
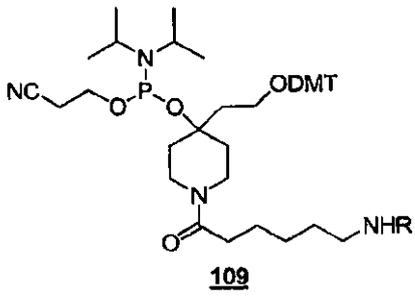


2-ピペリドンおよび3-ピペリドンを用いて同様の反応を実施することができる

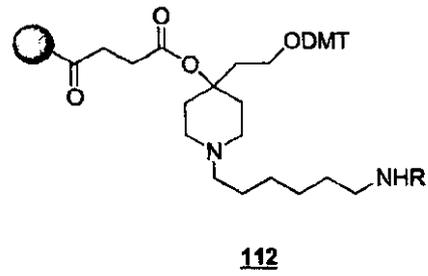
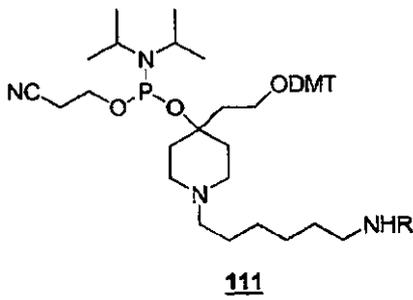
【0308】

【化 27】

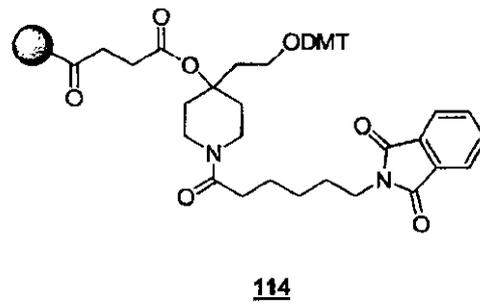
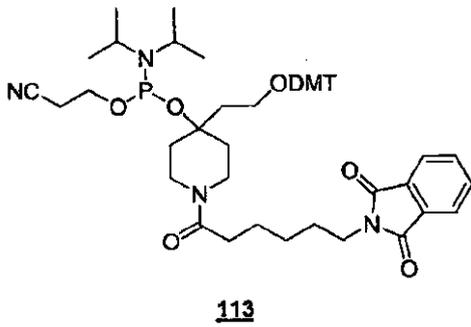
4-ピペリドン由来リンカー



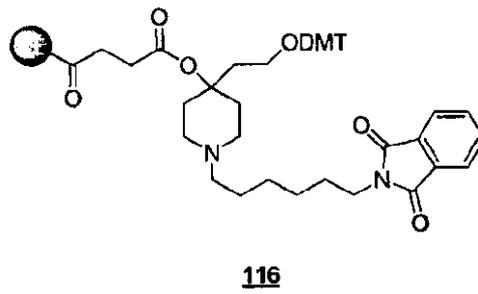
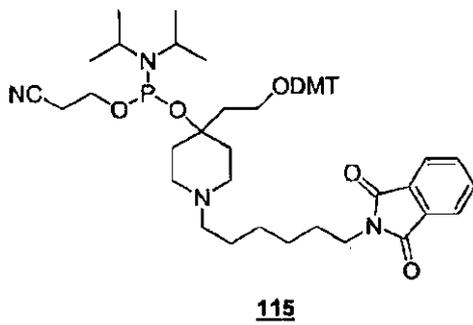
10



20



30

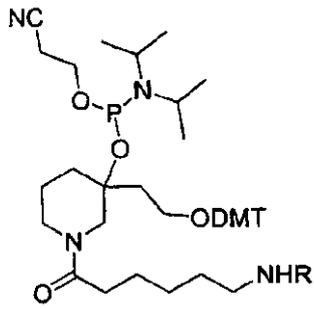


40

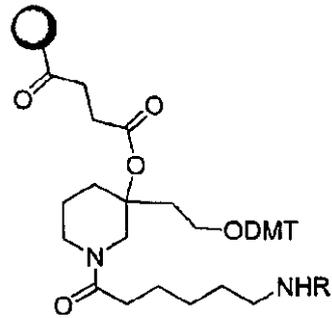
【 0 3 0 9 】

【化 2 8】

3-ピペリドン由来リンカー

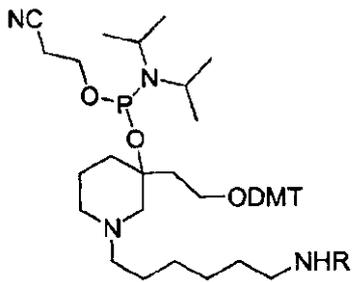


117

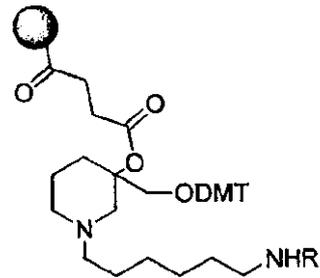


118

10

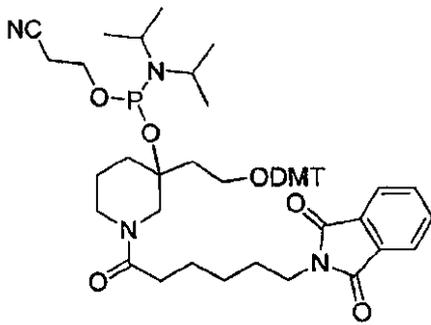


119

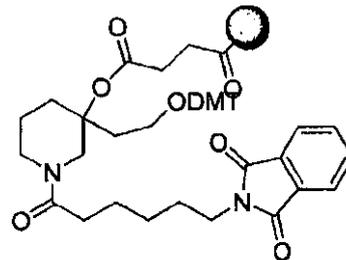


120

20

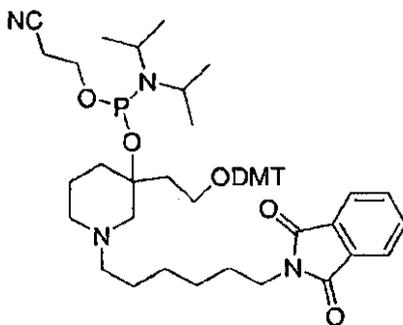


121

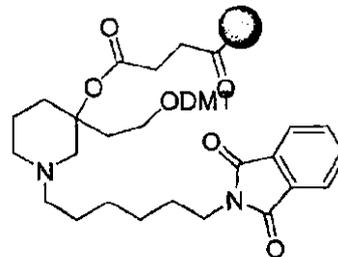


122

30



123



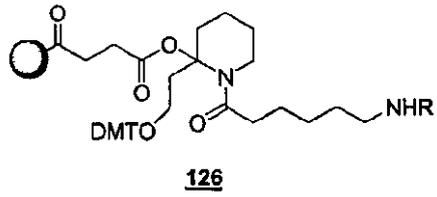
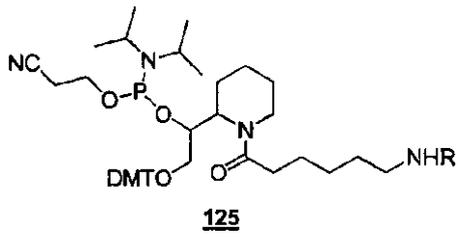
124

40

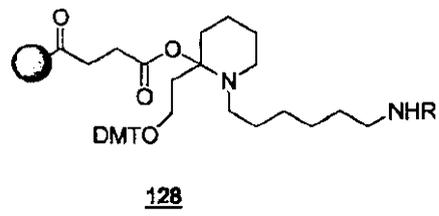
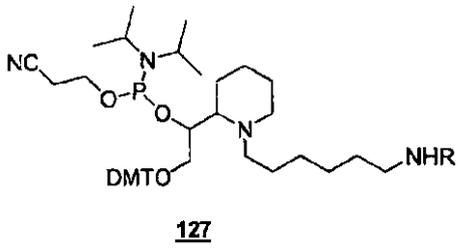
【 0 3 1 0 】

【化 2 9】

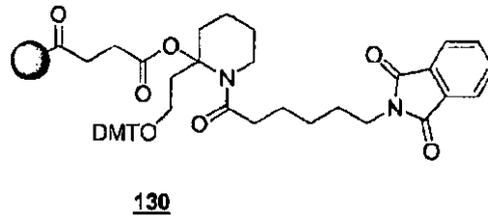
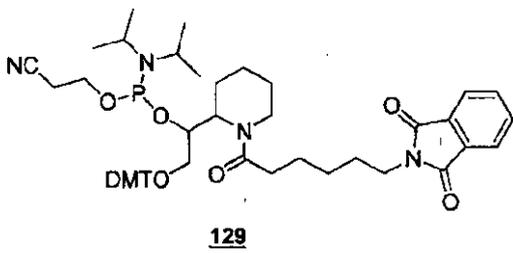
2-ピペリドン由来リンカー



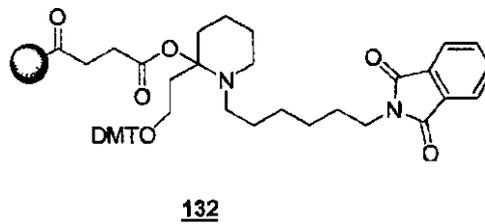
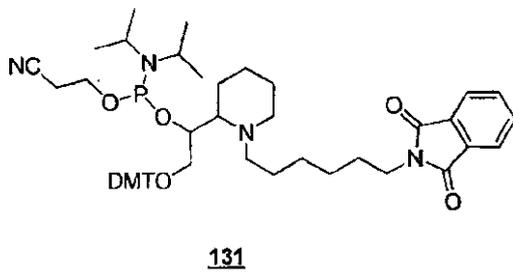
10



20



30

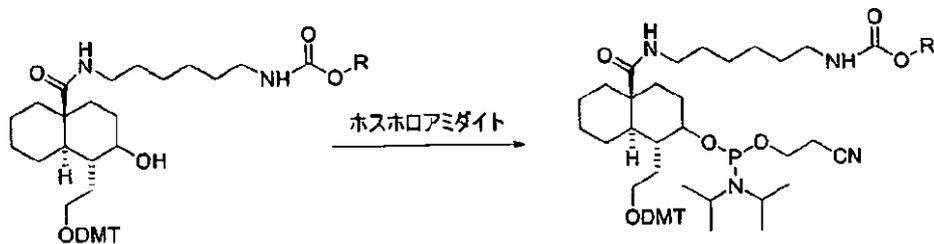
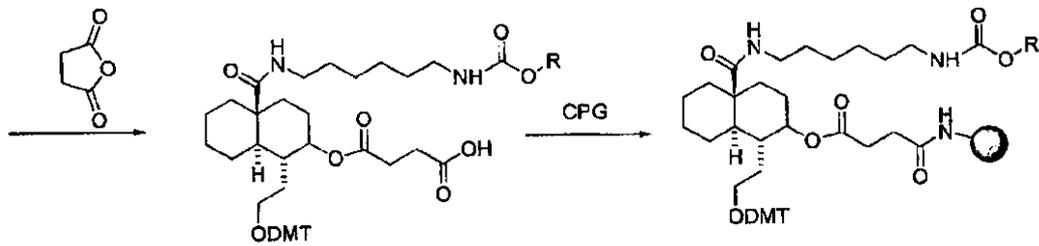
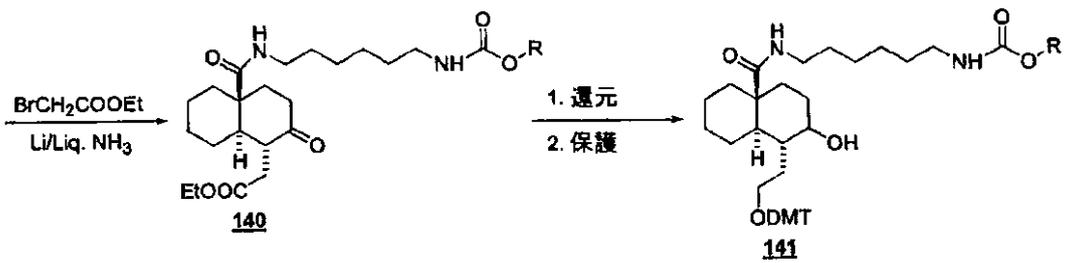
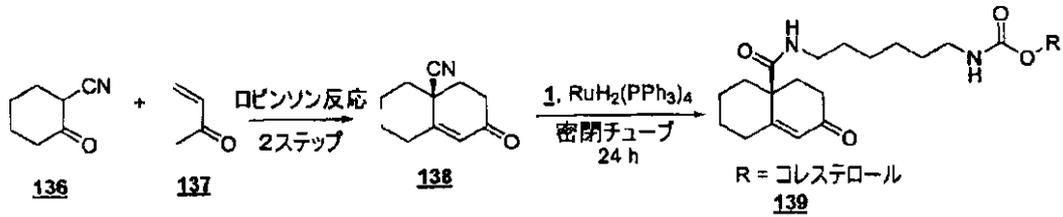
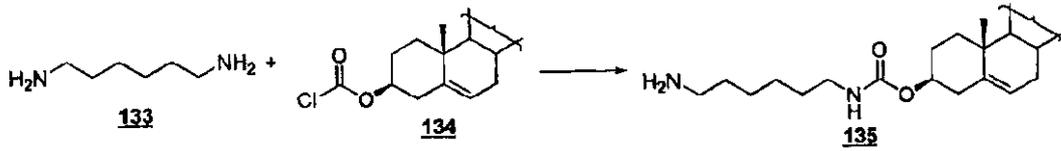


40

【 0 3 1 1 】

【化30】

デカリン系を介した結合



【0312】

10

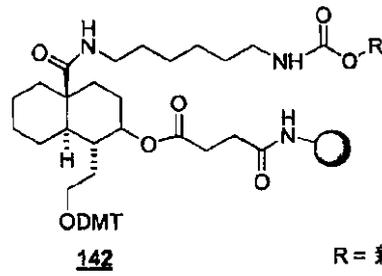
20

30

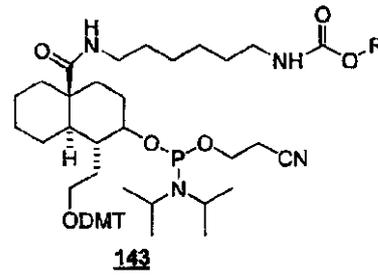
40

【化 3 1】

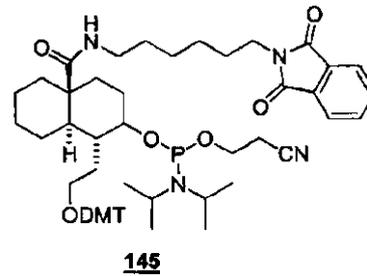
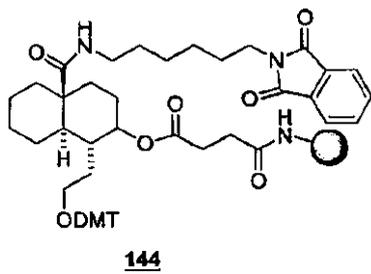
デカリン系由来の結合体:



R = 親油性結合体

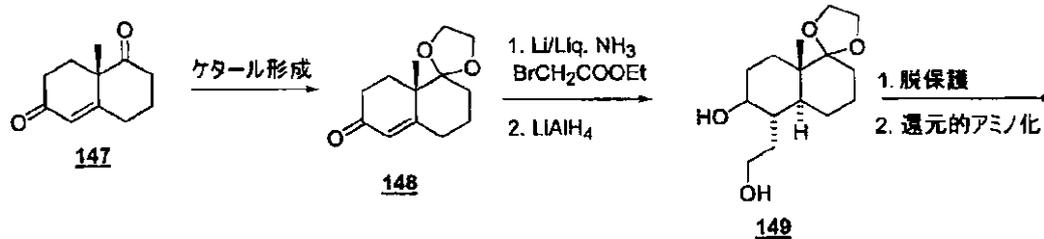
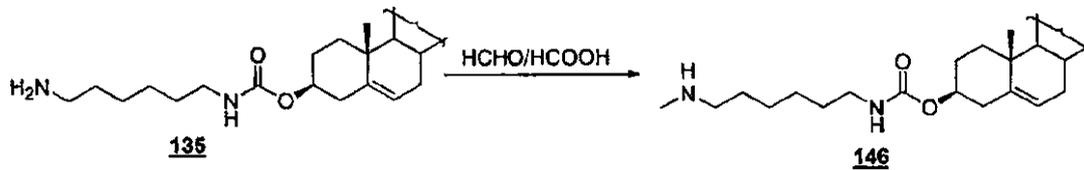


10

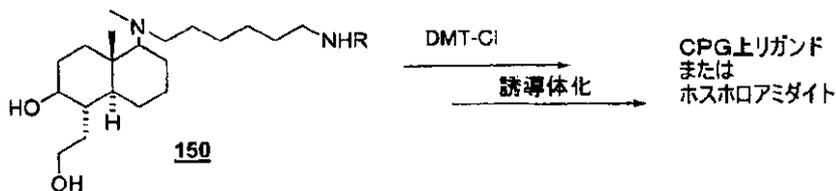


20

ウィーランドミーシャーケトン由来のデカリンリンカー



30

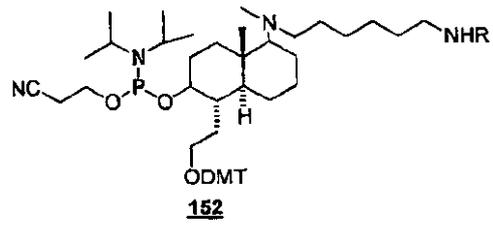
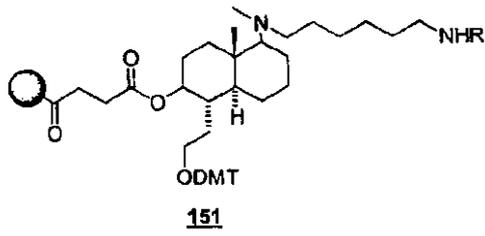


40

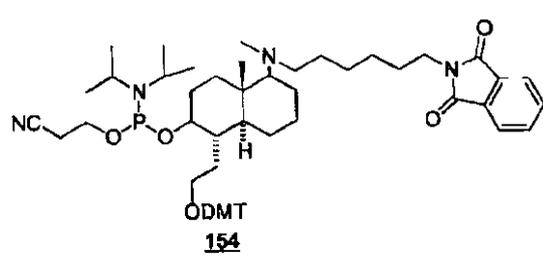
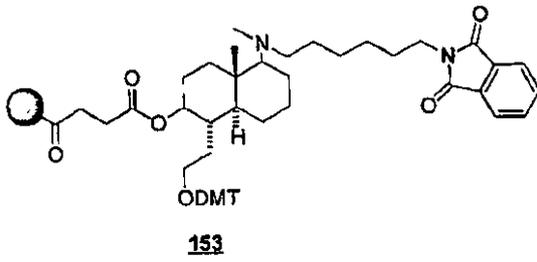
【 0 3 1 3 】

【化 3 2】

ウィーランドミーシャーケトン由来の結合体



10

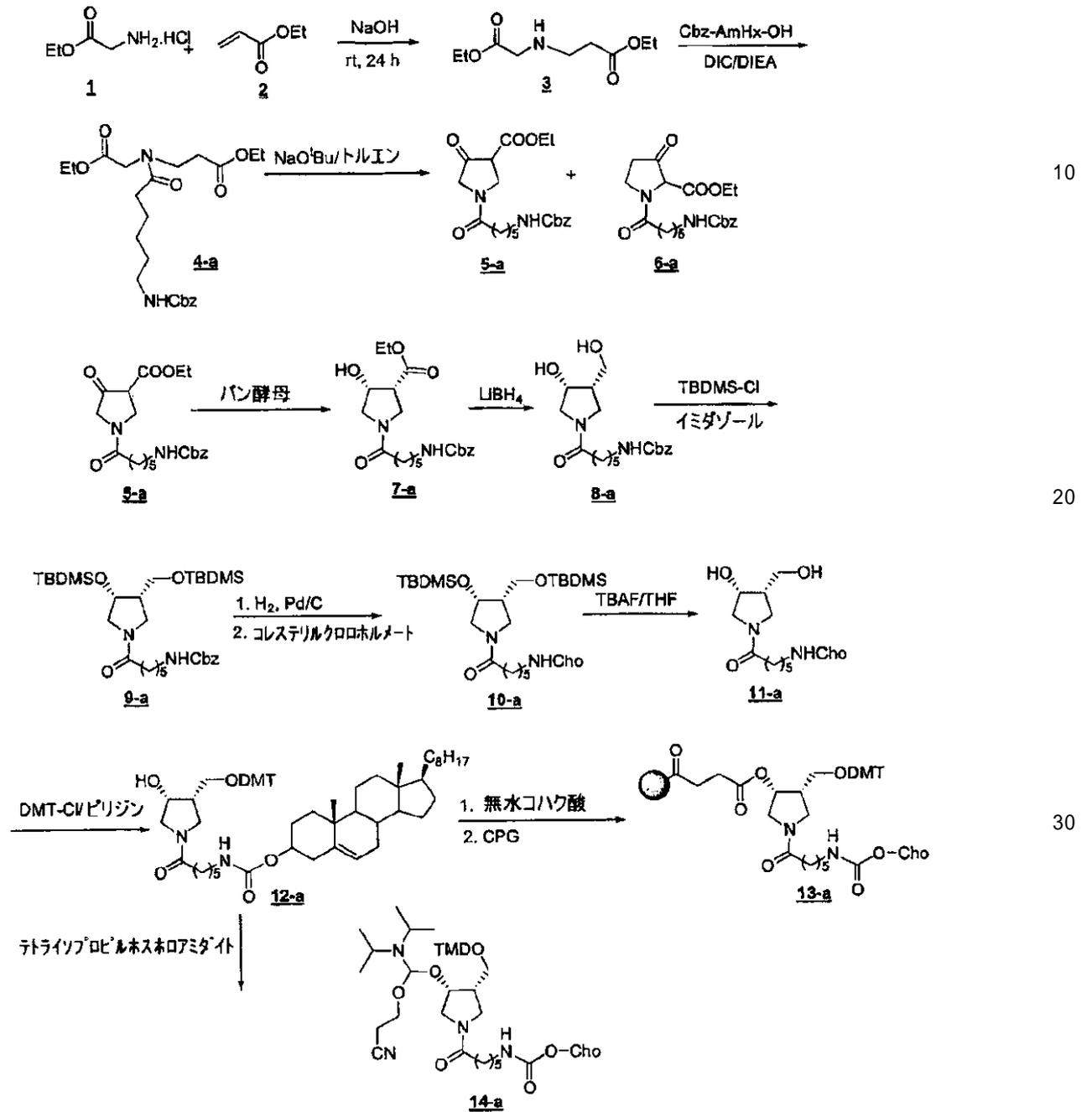


20

【 0 3 1 4 】

【化 3 3】

ピロリンリンカーの合成:

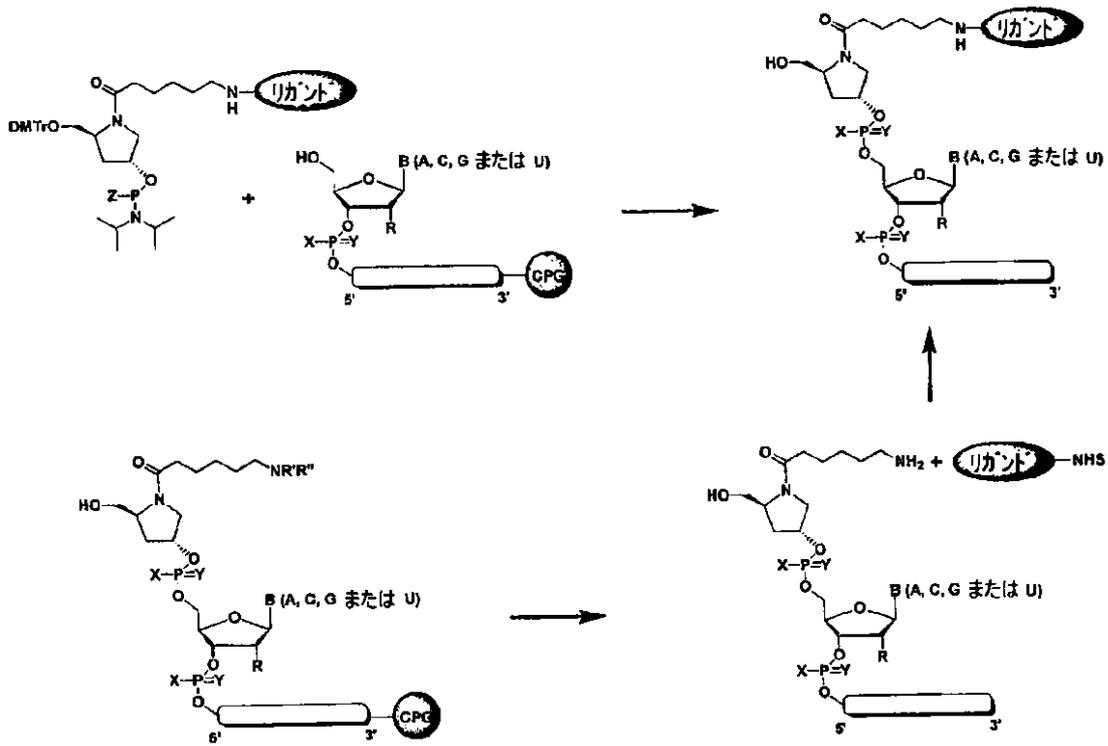


【 0 3 1 5 】

40

【化 3 4】

固相合成および合成後の結合：

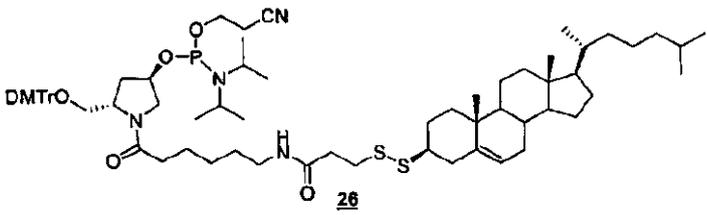
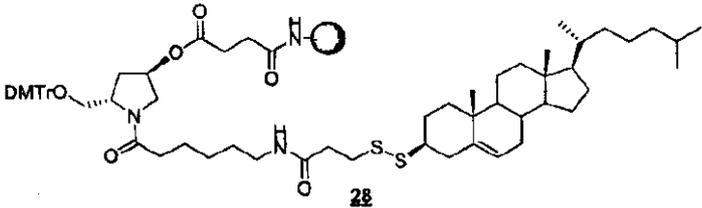
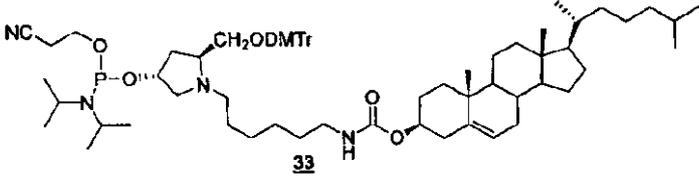
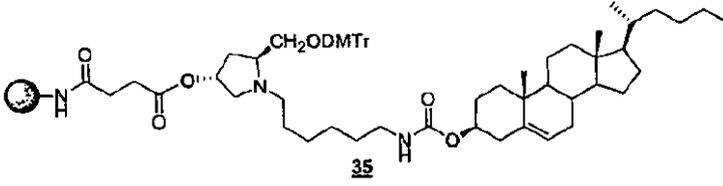
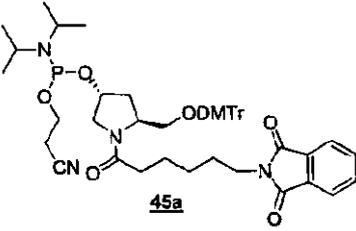
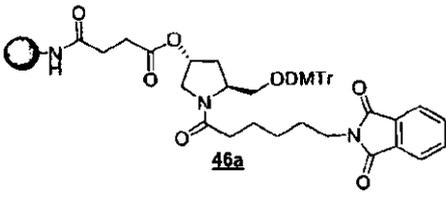


10

20

【 0 3 1 6 】

【化 3 6】

7	 <p>26</p>
8	 <p>28</p>
9	 <p>33</p>
10	 <p>35</p>
11	 <p>45a</p>
12	 <p>46a</p>

10

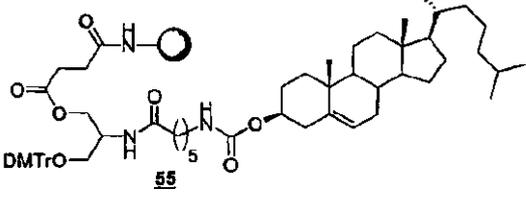
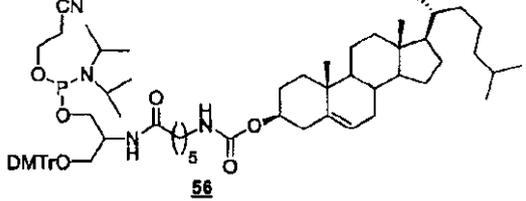
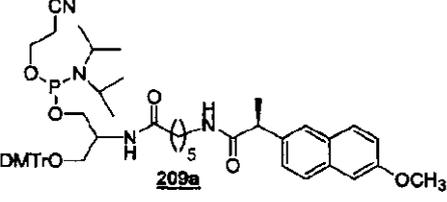
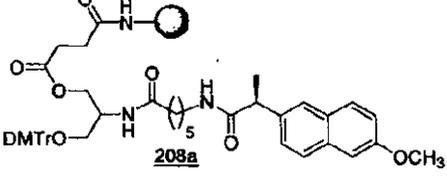
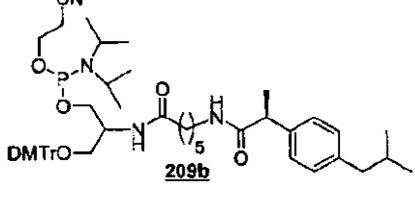
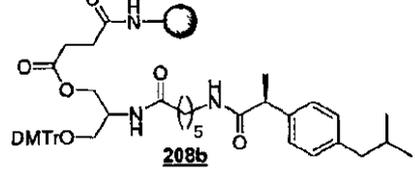
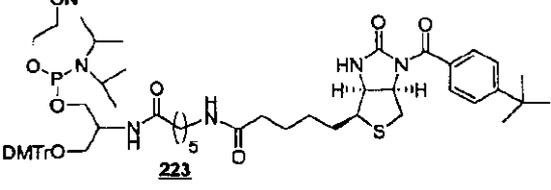
20

30

40

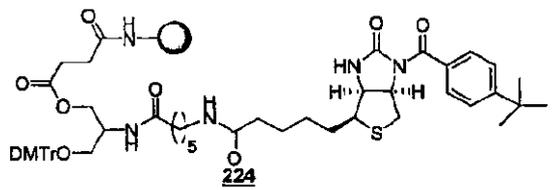
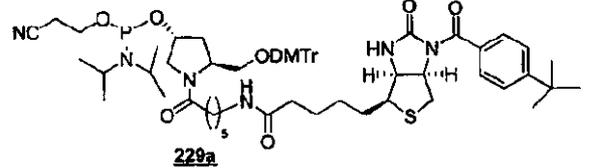
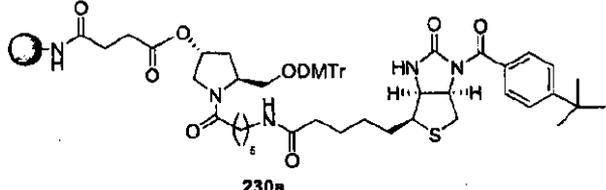
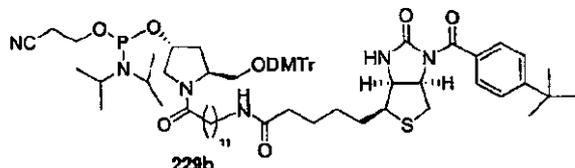
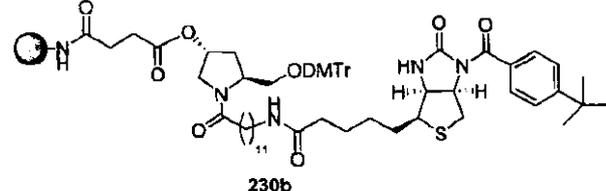
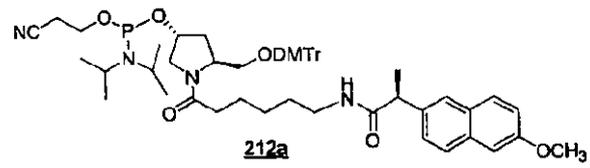
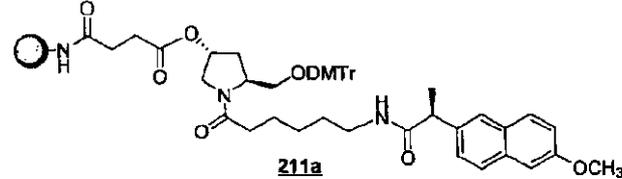
【 0 3 1 8 】

【化 3 7】

13	 <p>55</p>	
14	 <p>56</p>	10
15	 <p>209a</p>	20
16	 <p>208a</p>	
17	 <p>209b</p>	30
18	 <p>208b</p>	40
19	 <p>223</p>	

【 0 3 1 9 】

【化 3 8】

20	 <p>224</p>
21	 <p>229a</p>
22	 <p>230a</p>
23	 <p>229b</p>
24	 <p>230b</p>
25	 <p>212a</p>
26	 <p>211a</p>

10

20

30

40

【 0 3 2 0 】

【化 3 9】

27	<p style="text-align: center;">100</p>
28	<p style="text-align: center;">102</p>
29	<p style="text-align: center;">212b</p>
30	<p style="text-align: center;">211b</p>
31	<p style="text-align: center;">67</p>
32	<p style="text-align: center;">89</p>
33	<p style="text-align: center;">95</p>

10

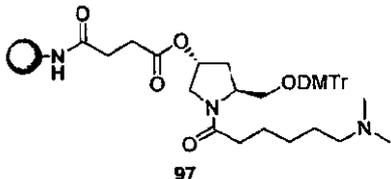
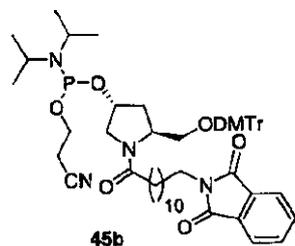
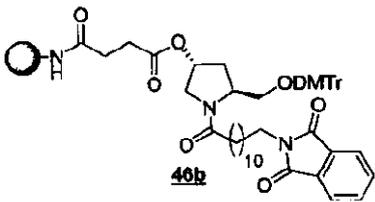
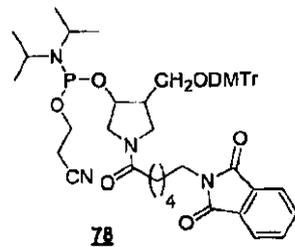
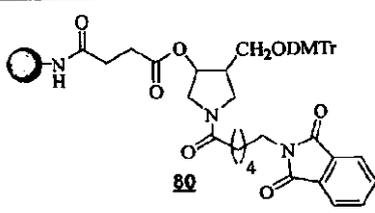
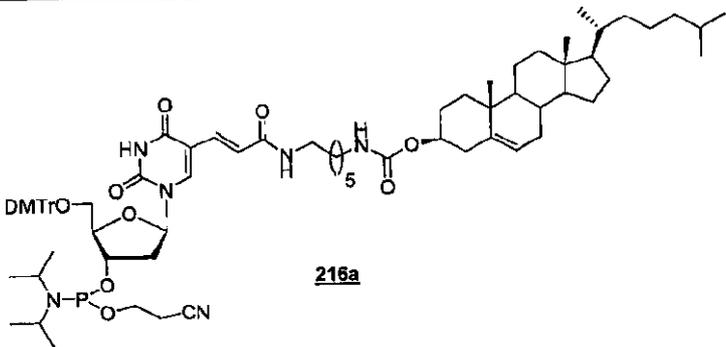
20

30

40

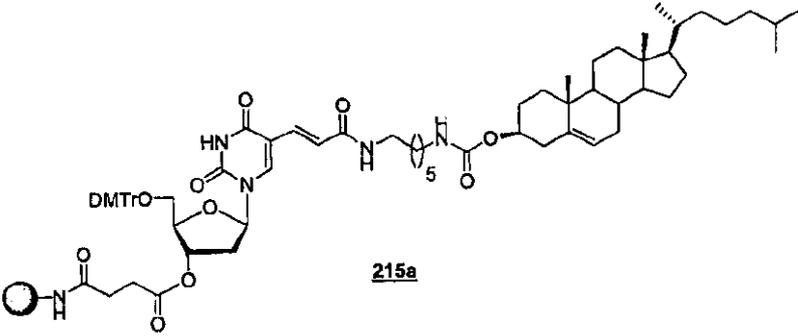
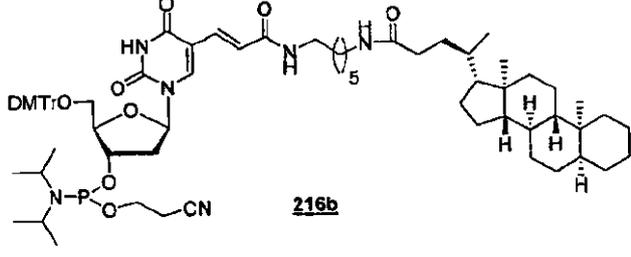
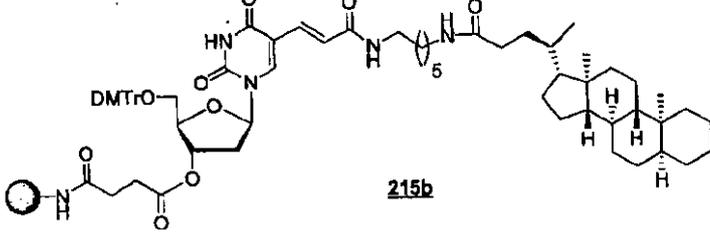
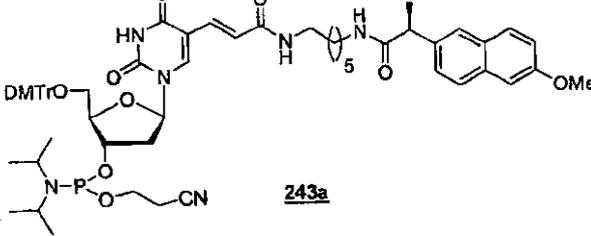
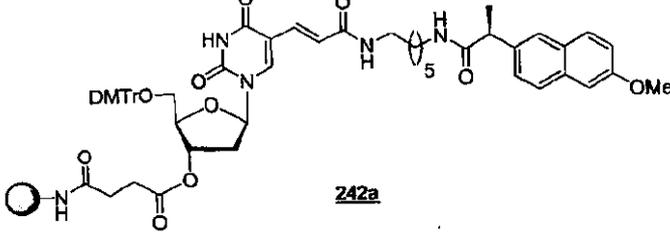
【 0 3 2 1 】

【化 4 0】

34	 <p style="text-align: center;">97</p>	
35	 <p style="text-align: center;">45b</p>	10
36	 <p style="text-align: center;">46b</p>	20
37	 <p style="text-align: center;">78</p>	
38	 <p style="text-align: center;">80</p>	30
39	 <p style="text-align: center;">216a</p>	40

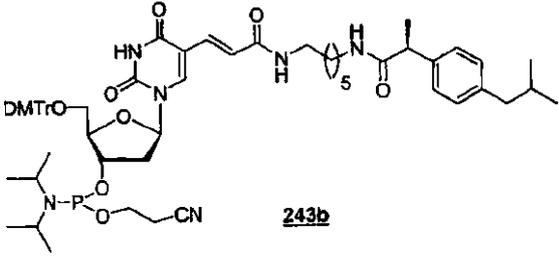
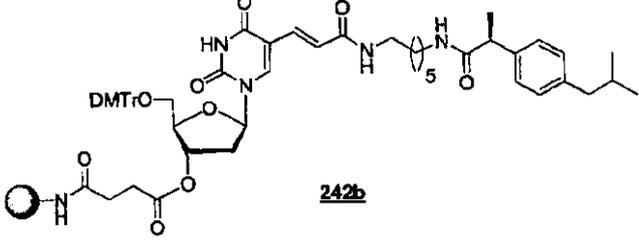
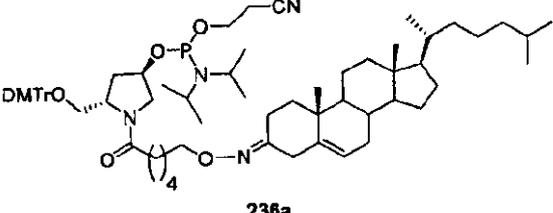
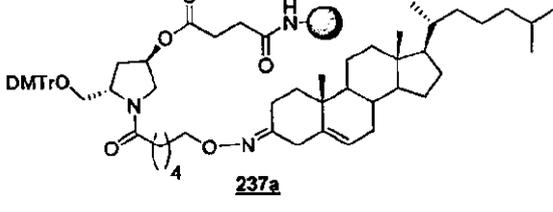
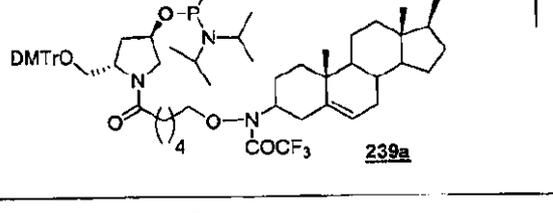
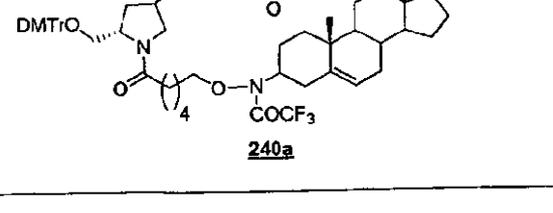
【 0 3 2 2】

【化 4 1】

40	 <p style="text-align: center;">215a</p>	10
41	 <p style="text-align: center;">216b</p>	20
42	 <p style="text-align: center;">215b</p>	30
43	 <p style="text-align: center;">243a</p>	40
44	 <p style="text-align: center;">242a</p>	40

【 0 3 2 3 】

【化 4 2】

45	 <p style="text-align: center;">243b</p>	10
46	 <p style="text-align: center;">242b</p>	20
47	 <p style="text-align: center;">236a</p>	30
48	 <p style="text-align: center;">237a</p>	40
49	 <p style="text-align: center;">239a</p>	
50	 <p style="text-align: center;">240a</p>	

【 0 3 2 4 】

【化 4 3】

51	<p>85</p>
52	<p>87</p>
53	<p>91</p>
54	<p>93</p>
55.	<p>106</p> <p>ジオスゲニン</p>
56.	<p>108</p> <p>ジオスゲニン</p>

10

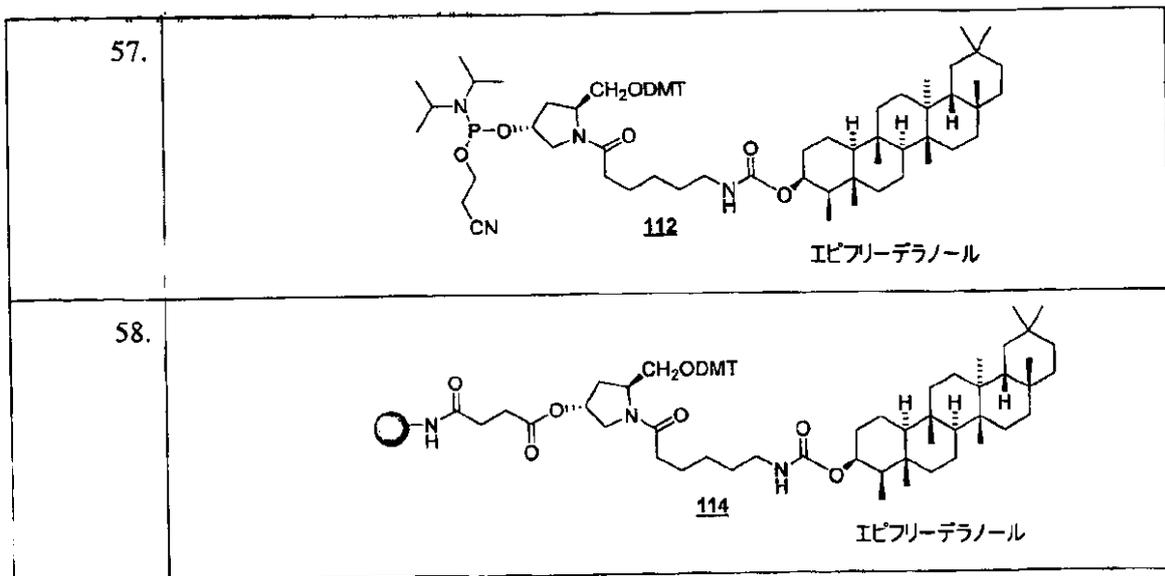
20

30

40

【 0 3 2 5 】

【化 4 4】



10

【 0 3 2 6 】

20

オリゴヌクレオチド剤へのリガンドの結合

オリゴヌクレオチド剤、例えば、miRNAまたはプレmiRNAを標的とするオリゴヌクレオチド剤にリガンドを結合すると、同剤の調整作用に好ましい影響を及ぼす可能性がある。例えば、オリゴヌクレオチド剤の薬物動態、安定性または組織特異性のうち少なくともいずれかが向上する可能性がある。

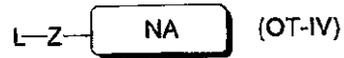
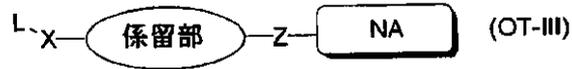
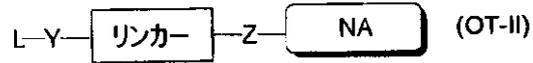
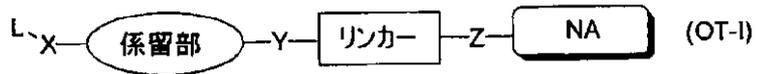
【 0 3 2 7 】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド剤（以下のOT-I～OT-IVにおいて「NA」とされる、例えばRNA、DNA、キメラ状態のRNA-DNA、DNA-RNA、RNA-DNA-RNAもしくはDNA-RNA-DNA）は、リガンドを含む部分の結合により化学修飾されていてもよく、該部分はオリゴヌクレオチドまたは核酸に対して該リガンド（L）を結合するための1以上の化学結合を有している。オリゴヌクレオチド剤のリガンドは、係留部およびリンカーのうち一方または両方により連結可能である。下記の略図では、典型的な化学結合がX、YおよびZとして表わされている。これらは係留部またはリンカーの一部であってよい。

30

【 0 3 2 8 】

【化 4 5】



10

【0329】

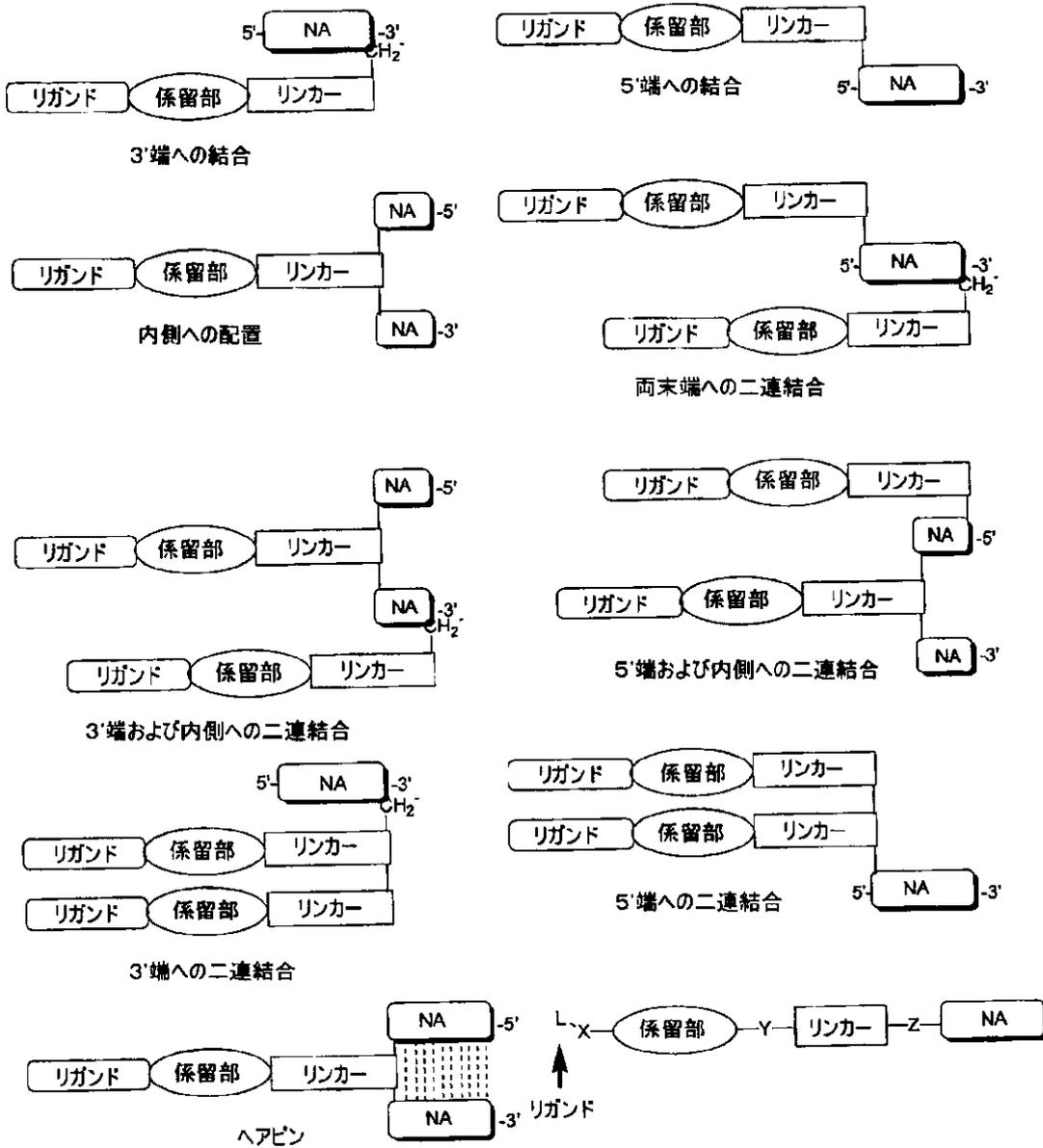
リガンドは、3'端、5'端のうち一方または両方、および内側の位置に結合させることができる。ある実施形態では、オリゴヌクレオチド剤は、式OT-Iを有する1以上の部分を結合させることにより化学修飾することができる。表4は、様々な結合体について示している。

20

【0330】

【表4】

表4.



10

20

30

【0331】

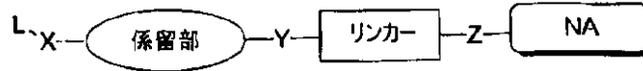
典型的なリガンドを表5に列挙し、また本明細書の他所で議論する。表5に示す典型的なリガンド(L)が好ましい。

40

【0332】

【表5】

表5.



L =

コレステロール
 チオコレステロール
 5β-コラン酸
 コール酸
 リトコール酸
 ビオチン
 ビタミンE
 ナプロキセン
 イブuproフェン
 アミン(モノ、ジ、トリ、テトラアルキル、またはアリール)
 葉酸
 糖(N-アセチルガラクトサミン、ガラクトサミン、ガラクトース、マンノース)

10

$-(CH_2)_nNQ_1Q_2$, (式中、 $n=0-40$, $Q_1, Q_2=H, Me$ または Et ; $Q_1=H, Q_2=H, Me, Et$ またはアリール)
 $-(CH_2)_pCH=CH(CH_2)_qNQ_1Q_2$, (式中、 $n=0-40$, $Q_1, Q_2=H, Me$ または Et ; $Q_1=H, Q_2=H, Me, Et$
 またはアリールであってE配置かつ/またはZ配置を有する)

$-(CH_2)_pCH=CH(CH_2)_qNQ_1Q_2$, (式中、 p かつ/または $q=0-40$, $Q_1, Q_2=H, Me$ または Et ; $Q_1=H$,
 $Q_2=H, Me, Et$ またはアリール)

20

$-(CH_2)_pCH=CH(CH_2)_qCH=CH(CH_2)_rNQ_1Q_2$, (式中、 p, q かつ/または $r=0-40$, $Q_1, Q_2=H, Me$
 または Et ; $Q_1=H, Q_2=H, Me, Et$ またはアリールであってE配置かつ/またはZ配置を有する)

$-O(CH_2)_m(OCH_2CH_2)_n-OR$, (式中、 $m, n=0-40$ および $R=H, Me, NQ_1Q_2, -C(O)NR'R''-C(S)NR'R''$)

$-NH(CH_2)_m(OCH_2CH_2)_n-OR$, (式中、 $m, n=0-40$ および $R=H, Me, NQ_1Q_2, -C(O)NR'R''-C(S)NR'R''$)

$-O(CH_2)_m(NHCH_2CH_2)_n-R$, (式中、 $m, n=0-40$ および $R=H, OH, Me, NQ_1Q_2, -C(O)NR'R''-C(S)NR'R''$)

$-NH(CH_2)_m(NHCH_2CH_2)_n-R$, (式中、 $m, n=0-40$ および $R=H, OH, Me, NQ_1Q_2, -C(O)NR'R''-C(S)NR'R''$)

ジアルキルグリセロール($sn3, sn1, sn2$ およびラセミ体)であってメチレン数0-40

ジアシルグリセロール($sn3, sn1, sn2$ およびラセミ体)であってメチレン数0-40

ジアルキルグリセロール($sn3, sn1, sn2$ およびラセミ体)であってメチレン数0-40および

アルキル鎖が1以上の二重結合を含みE/Z異性体を有する

ジアシルグリセロール($sn3, sn1, sn2$ およびラセミ体)であってメチレン数0-40および

アルキル鎖が1以上の二重結合を含みE/Z異性体を有する

脂質

30

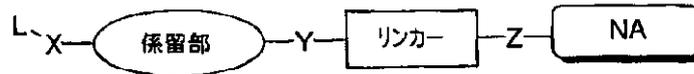
【0333】

典型的なX、YおよびZ部分を表6に示す。X、YおよびZ部分は互いに独立に選択することができる。

【0334】

【表 6】

表6.



X =	Y =	Z =	
-NHC(O)-	-NHC(O)-	-NHC(O)-	
-C(O)NH-	-C(O)NH-	-C(O)NH-	10
-OC(O)NH-	-OC(O)NH-	-OC(O)NH-	
-NHC(O)O-	-NHC(O)O-	-NHC(O)O-	
-O-	-O-	-O-	
-S-	-S-	-S-	
-SS-	-SS-	-SS-	
-S(O)-	-S(O)-	-S(O)-	
-S(O ₂)-	-S(O ₂)-	-S(O ₂)-	
-NHC(O)NH-	-NHC(O)NH-	-NHC(O)NH-	
-NHC(S)NH-	-NHC(S)NH-	-NHC(S)NH-	
-C(O)O-	-C(O)O-	-C(O)O-	
-OC(O)-	-OC(O)-	-OC(O)-	20
-NHC(S)-	-NHC(S)-	-NHC(S)-	
-NHC(S)O-	-NHC(S)O-	-NHC(S)O-	
-C(S)NH-	-C(S)NH-	-C(S)NH-	
-OC(S)NH-	-OC(S)NH-	-OC(S)NH-	
-NHC(S)O-	-NHC(S)O-	-NHC(S)O-	
-CH ₂ -	-CH ₂ -	-CH ₂ -	
-CH ₂ CH=CH-	-CH ₂ CH=CH-	-CH ₂ CH=CH-	
-C(O)CH=CH-	-C(O)CH=CH-	-C(O)CH=CH-	
-NH-CH ₂ CH=CH-	-NH-CH ₂ CH=CH-	-NH-CH ₂ CH=CH-	
-O-P(O)(OH)-O-	-O-P(O)(OH)-O-	-O-P(O)(OH)-O-	
-O-P(S)(OH)-O-	-O-P(S)(OH)-O-	-O-P(S)(OH)-O-	
-O-P(S)(SH)-O-	-O-P(S)(SH)-O-	-O-P(S)(SH)-O-	30
-S-P(O)(OH)-O-	-S-P(O)(OH)-O-	-S-P(O)(OH)-O-	
-O-P(O)(OH)-S-	-O-P(O)(OH)-S-	-O-P(O)(OH)-S-	
-S-P(O)(OH)-S-	-S-P(O)(OH)-S-	-S-P(O)(OH)-S-	
-O-P(S)(OH)-S-	-O-P(S)(OH)-S-	-O-P(S)(OH)-S-	
-S-P(S)(OH)-O-	-S-P(S)(OH)-O-	-S-P(S)(OH)-O-	
-O-P(O)(R)-O-	-O-P(O)(R)-O-	-O-P(O)(R)-O-	
-O-P(S)(R)-O-	-O-P(S)(R)-O-	-O-P(S)(R)-O-	
-S-P(O)(R)-O-	-S-P(O)(R)-O-	-S-P(O)(R)-O-	
-S-P(S)(R)-O-	-S-P(S)(R)-O-	-S-P(S)(R)-O-	
-S-P(O)(R)-S-	-S-P(O)(R)-S-	-S-P(O)(R)-S-	
-O-P(S)(R)-S-	-O-P(S)(R)-S-	-O-P(S)(R)-S-	40

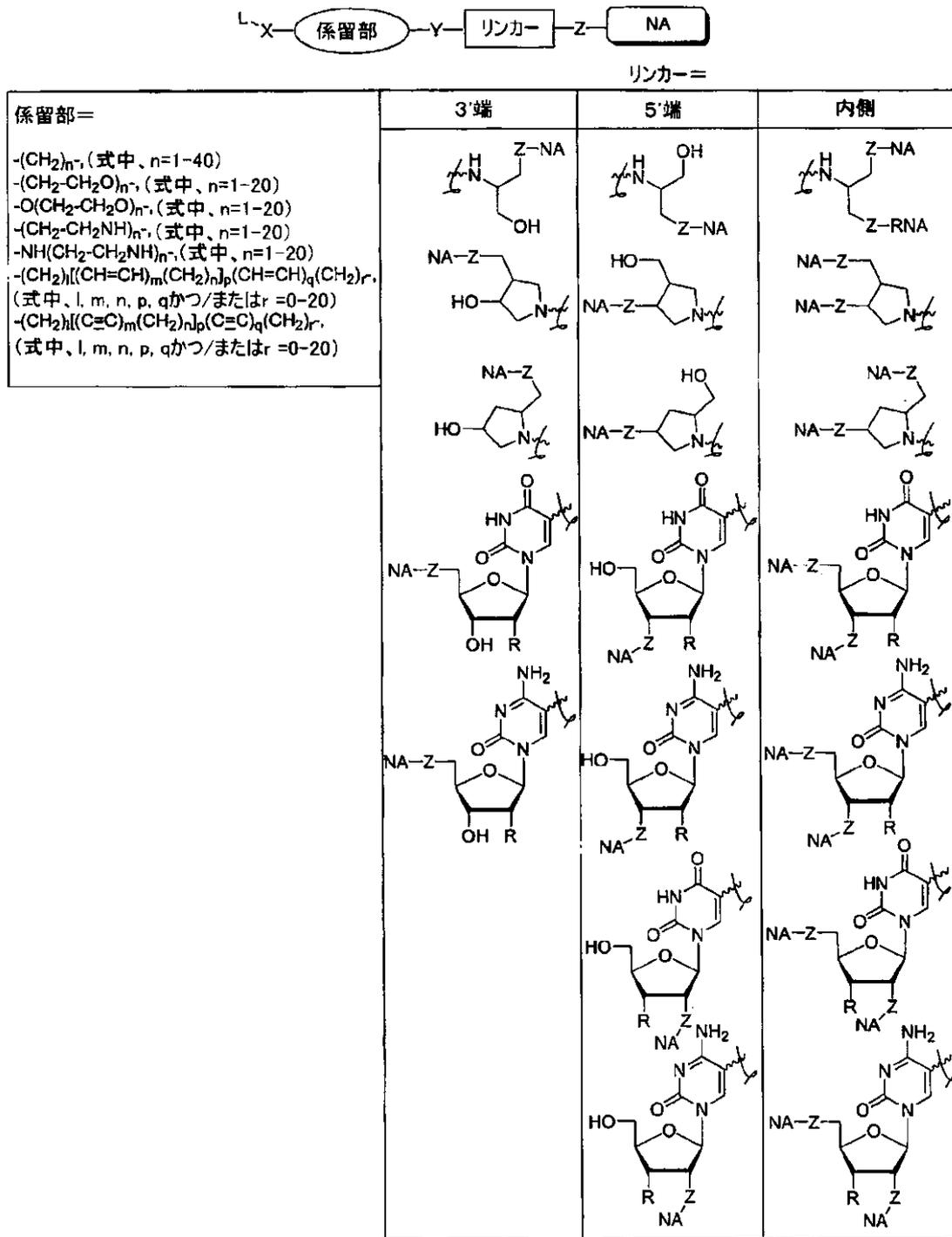
R = アルキル、フルオロアルキル、アリーールまたはアラルキル

【 0 3 3 5 】

典型的な係留部を表 7 に示す。

【 0 3 3 6 】

【表 7】



10

20

30

40

【0337】

本明細書に記載の化合物は、本明細書に記載の方法により、または市販の試薬および出発物質から従来の方法により調製することができる。

化合物 1 は、フレーザー (Fraser) らの報告 (Tetrahedron Lett. 41: 1523, 2000年) のようにして調製される。ステップ (ii)、(iii) (a)、(iii) (c)、(iv)、(v) および (vii) は、文献の手順 (フレーザー (Fraser) ら、Tetrahedron Lett. 41: 1523, 2

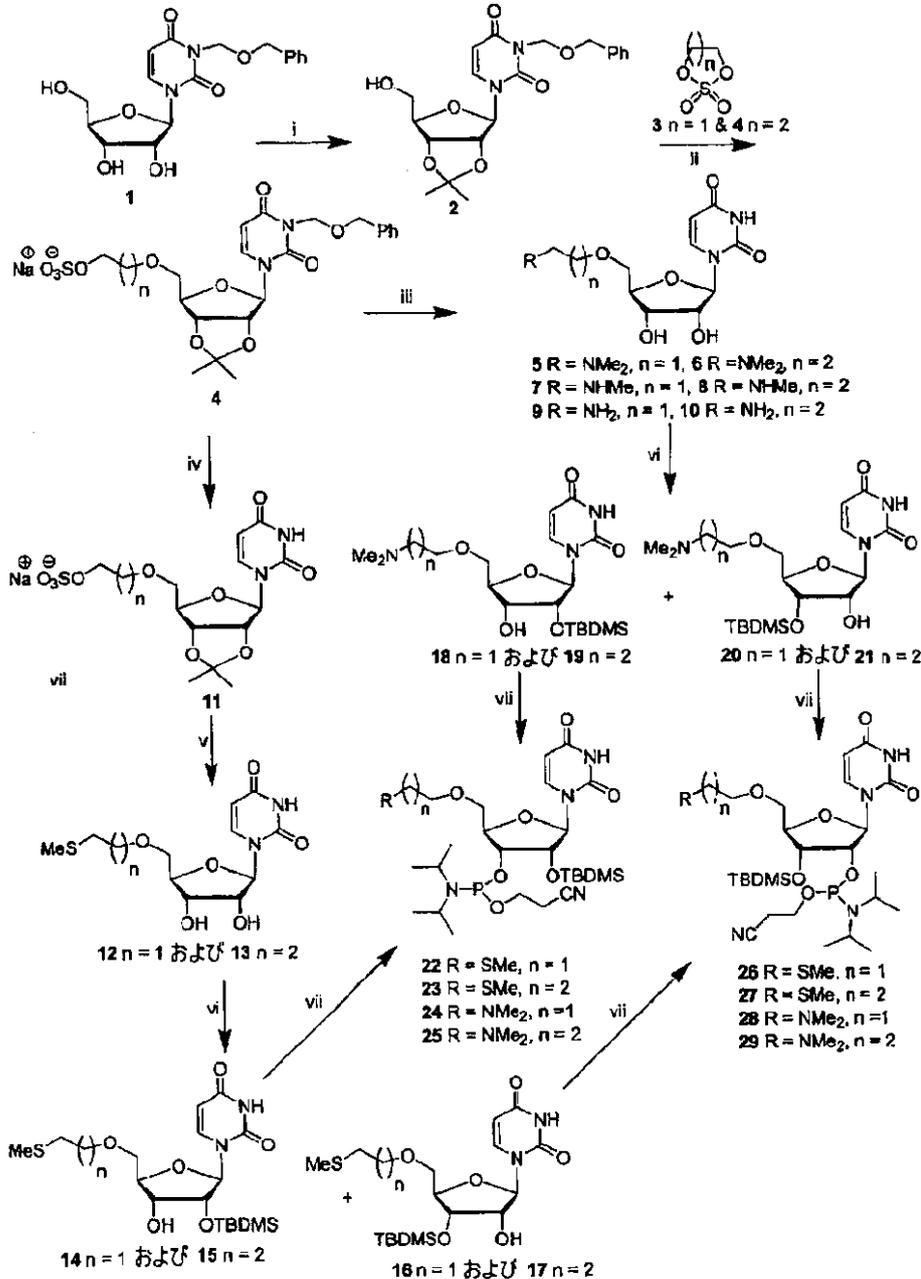
50

000年)に従って行なわれる。ステップ(iii)(b)および(v)(b)は、文献(Bioorg. Med. Chem. Lett. 13: 1713、2003年)に報告されるようにして実施される。ステップ(iv)は、文献(コーリー(Corey)およびベンケイテスワール(Venkateswarlu)、J. Am. Chem. Soc. 94: 6190、1972年)に報告されるようにして実施される。

【0338】

【化46】

スキーム1^a



^a (i) 2, 2-ジ-O-メチルピロパン, PTSA; (ii) NaH/DMF, 3または4, -45°C~室温; (iii) (a) NH₃, NH₂MeまたはNHMe₂, THF, オートクレーブ, (b) HCOOH-H₂Oおよび(c) Pd(OH), EtOH, AcOH, H₂ (0.379MPa (55psi)); (iv) Pd(OH), EtOH, AcOH, H₂ (0.379MPa (55psi)); (v) NaSMc/DMF, 80°Cおよび(b) HCOOH-H₂O; (vi) TBDMS-Cl, イミダゾール/Py; (vii) ジイソプロピルアミンテトラソリド, 2-シアノエチル-N, N, N', N'-テトライソプロピルホスホロアミダイト/CH₂Cl₂

【0339】

10

20

30

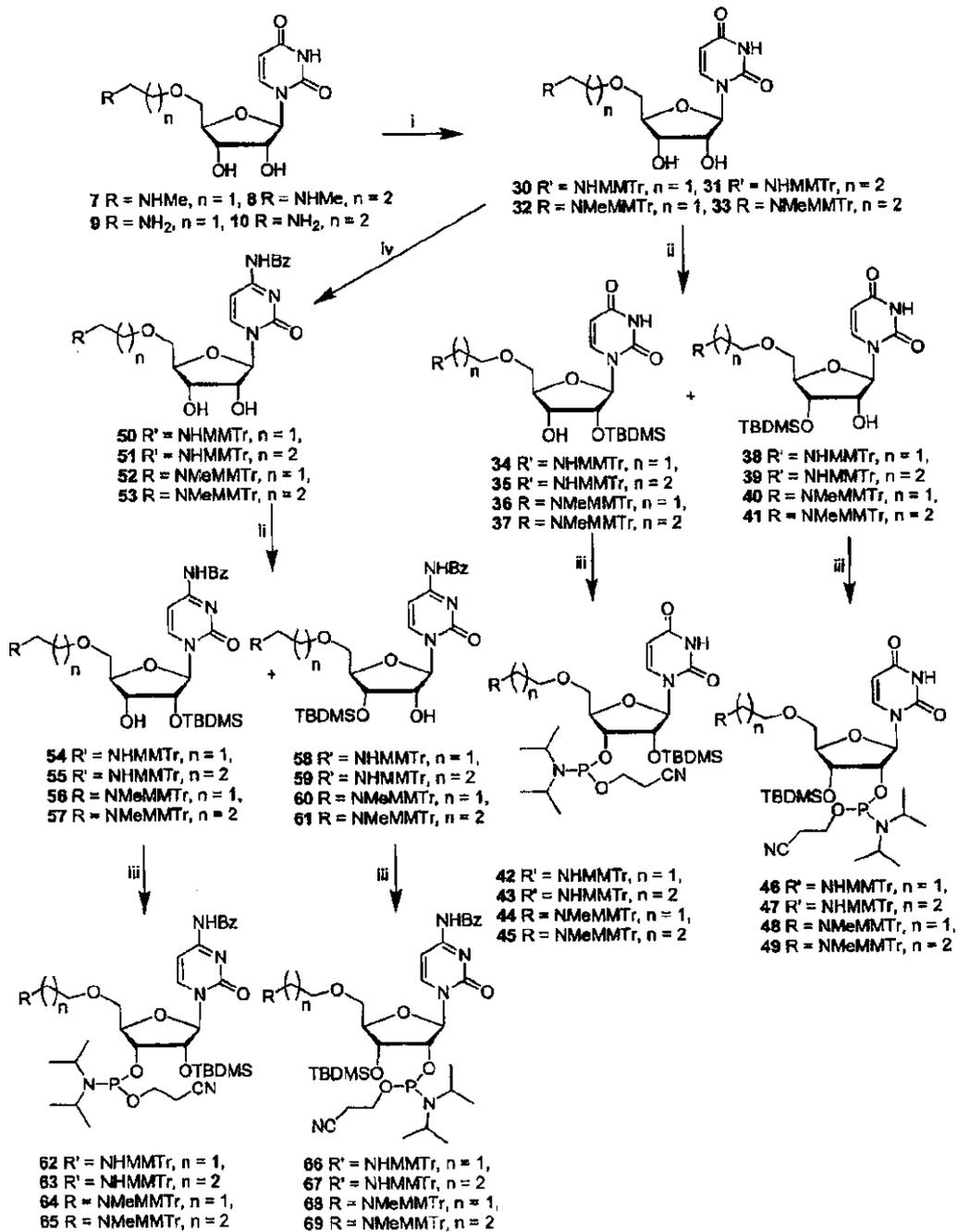
40

50

ある化合物の合成について以下のスキーム2に述べる。ステップ(i)はデュボウイック(Dubowchik)およびラディア(Radia)の報告(Tetrahedron Lett. 38:5257、1997年)のようにして実施し；ステップ(ii)はコーリー(Corey)およびベンケイテスパール(Venkateswarlu)の報告(J. Am. Chem. Soc. 94:6190、1972年)のようにして実施し；ステップ(iii)はフレーザー(Fraser)らの報告(Tetrahedron Lett. 41:1523、2000年)のようにして実施し；ステップ(iv)はミラー(Miller)ら著(「Current Protocol in Nucleic Acids Chemistry」、2000、2.5.1-2.5.36、ジョンワイリーアンドサンズ社)に記載されているようにして実施する。

【0340】

【化47】

スキーム2^a

^a (i) MMTr-Cl, TEA/CH₂Cl₂; (ii) TBDMS-Cl, イミダゾール/Py; (iii) ジイソプロピルアミンテトラリド, 2-シアノエチル-N, N, N', N'-テトライソプロピルホスホロアミダイト/CH₂Cl₂; (iv) (a) Ac₂O/Py, (b) トリアゾール, TEA, 4-クロロフェニルジクロロホスフェート/MeCN, (c) NH₄OHおよび(d) ペンタフルオロフェニルベンゾエート/Py

【0341】

ある化合物の合成は以下のスキーム3に記載のようにして実施する。ステップ(i)は、ミラー(Miller)ら著(「Current Protocol in Nucleic Acids Chemistry」、2000、2.5.1-2.5.36、ジョンワイリーアンドサンズ社)に記載されているようにして実施し;ステップ(ii)は、コーリー(Corey)およびベンケイテスパール(Venkateswarlu)の報告(J. Am. Chem. Soc. 94: 6

10

20

30

40

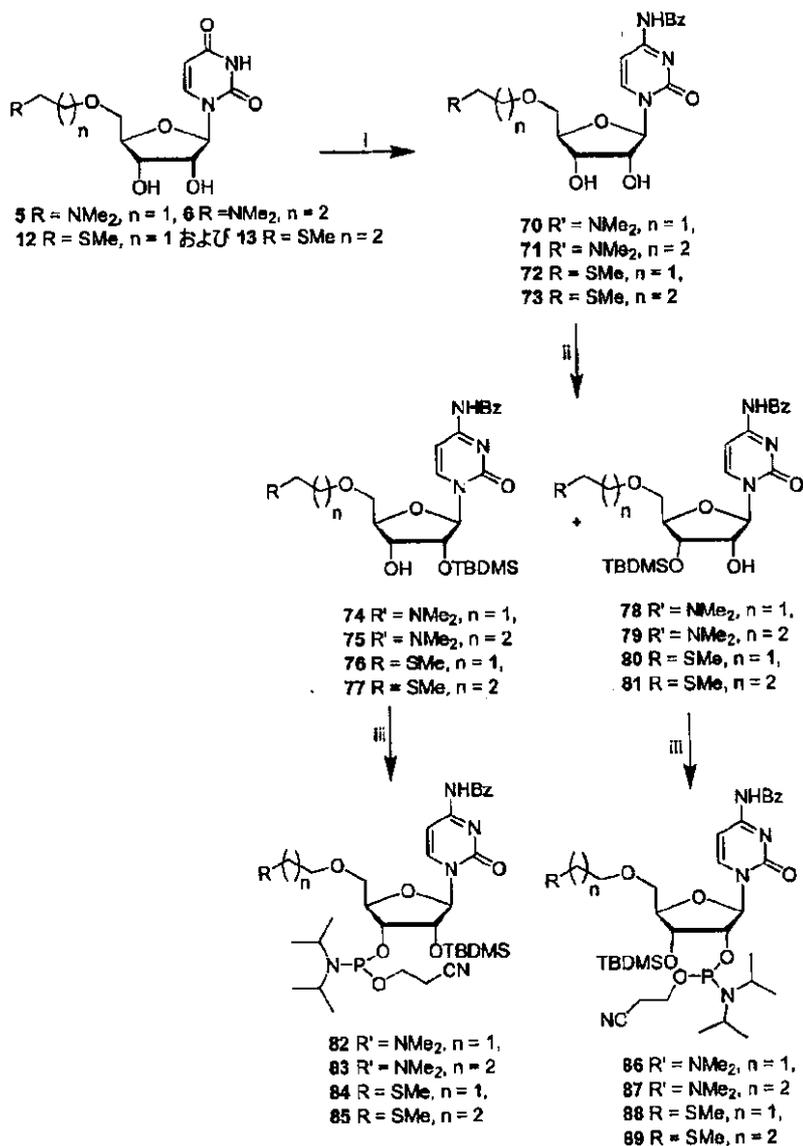
50

190、1972年)のようにして実施し、ステップ(iii)は、フレーザー(Fraser)らの報告(Tetrahedron Lett. 41:1523、2000年)のようにして実施する。

【0342】

【化48】

スキーム3^a



^a (i) (a) Ac₂O/Py, (b) トリアゾール, TEA, 4-クロロフェニルジクロロホスフェート/MeCN, (c) NH₄OH および (d) ペンタフルオロフェニルベンゾエート/Py (ii) TBDMS-Cl, イミダゾール/Py; (iii) ジイソプロピルアミンテトラゾリド, 2-シアノエチル-N, N, N', N'-テトライソプロピルホスホロアミダイト/CH₂Cl₂

【0343】

ある化合物の合成は以下のスキーム4に記載のようにして実施する。ステップ(ii)は、コーリー(Corey)およびベンケイテスパール(Venkateswarlu)の報告(J. Am. Chem. Soc. 94:6190、1972年)のようにして実施し、ステップ(iii)は、フレーザー(Fraser)らの報告(Tetrahedron Lett. 41:1523、2000年)のようにして実施する。

10

20

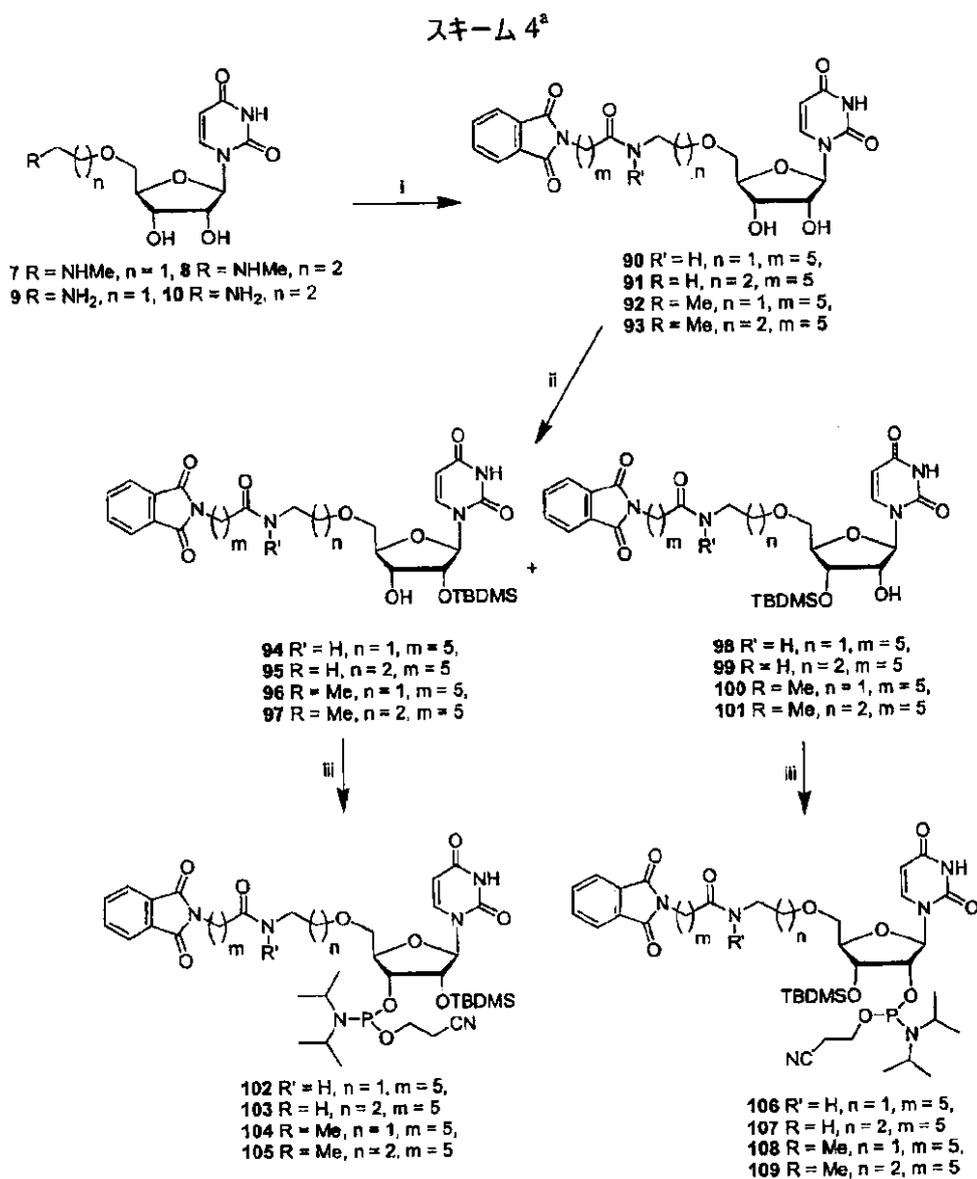
30

40

50

【 0 3 4 4 】

【 化 4 9 】



10

20

30

^a (i) N-フルイミド-6-アミノカプロン酸, DCC, DMAP, HOBT; (ii) TBDMS-Cl, イミダゾール/Py; (iii) ジイソプロピルアミンテトラリド, 2-シアノエチル-N, N, N', N'-テトライソプロピルホスホロアミダイト/CH₂Cl₂

40

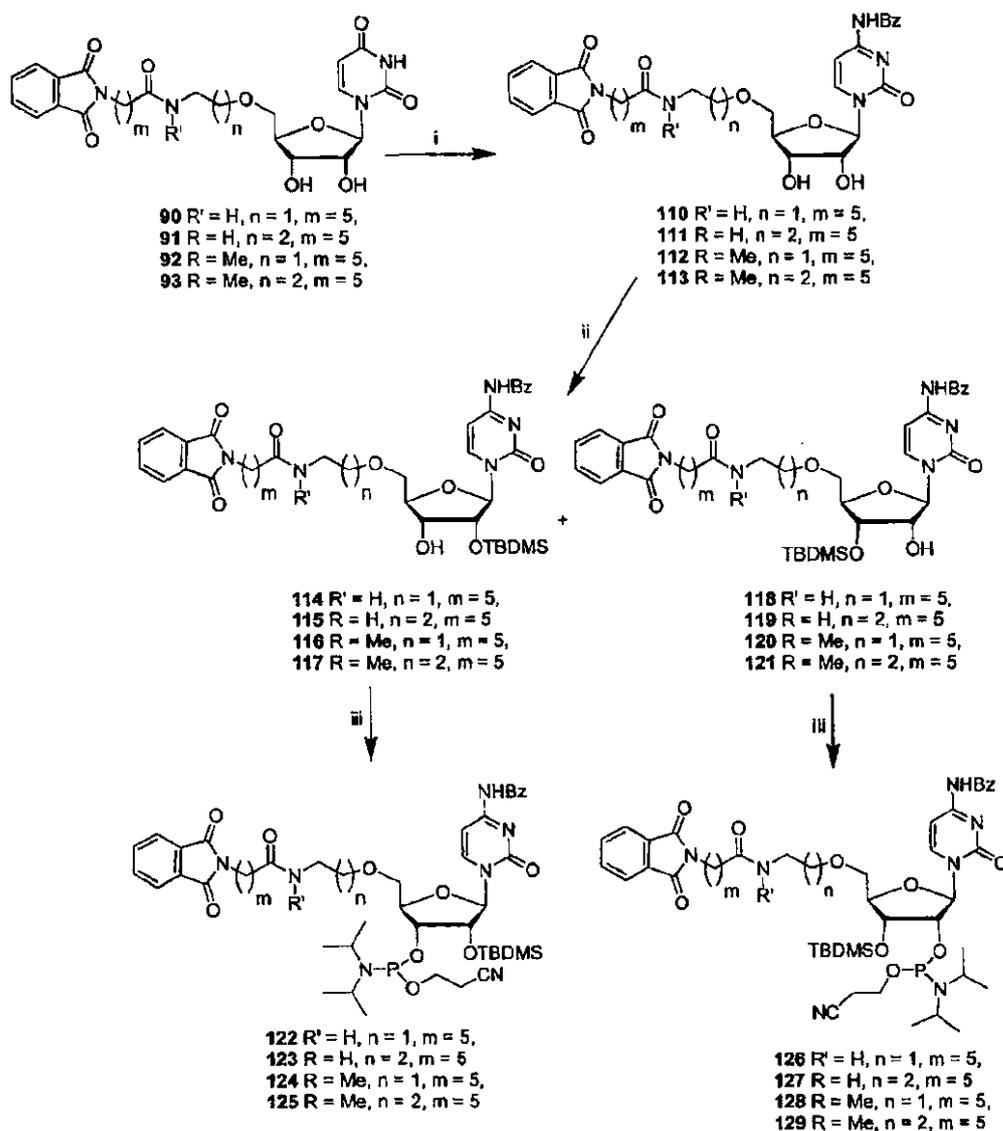
【 0 3 4 5 】

ある化合物の合成について以下のスキーム 5 に述べる。ステップ (i) は、ミラー (Miller) ら著 (「Current Protocol in Nucleic Acids Chemistry」、2000、2.5.1-2.5.36、ジョンワイリーアンドサンズ社) に記載されているようにして実施し; ステップ (ii) は、コーリー (Corey) およびベンケイテスパー (Venkateswarlu) の報告 (J. Am. Chem. Soc. 94: 6190、1972年) のようにして実施し、ステップ (iii) は、フレーザー (Fraser) らの報告 (Tetrahedron Lett. 41: 1523、2000年) のようにして実施する。

50

【 0 3 4 6 】

【 化 5 0 】

スキーム 5^a

^a (i) (a) Ac₂O/Py, (b) トリアゾール, TEA, 4-クロロフェニルジクロロホスフェート/MeCN, (c) NH₄OHおよび (d) ペンタフルオロフェニルベンゾエート/Py (ii) TBDMS-Cl, イミダゾール/Py; (iii) ジイソプロピルアミンテトラゾリド, 2-シアノエチル-N, N, N', N'-テトライソプロピルホスホロアミダイト/CH₂Cl₂

10

20

30

40

【 0 3 4 7 】

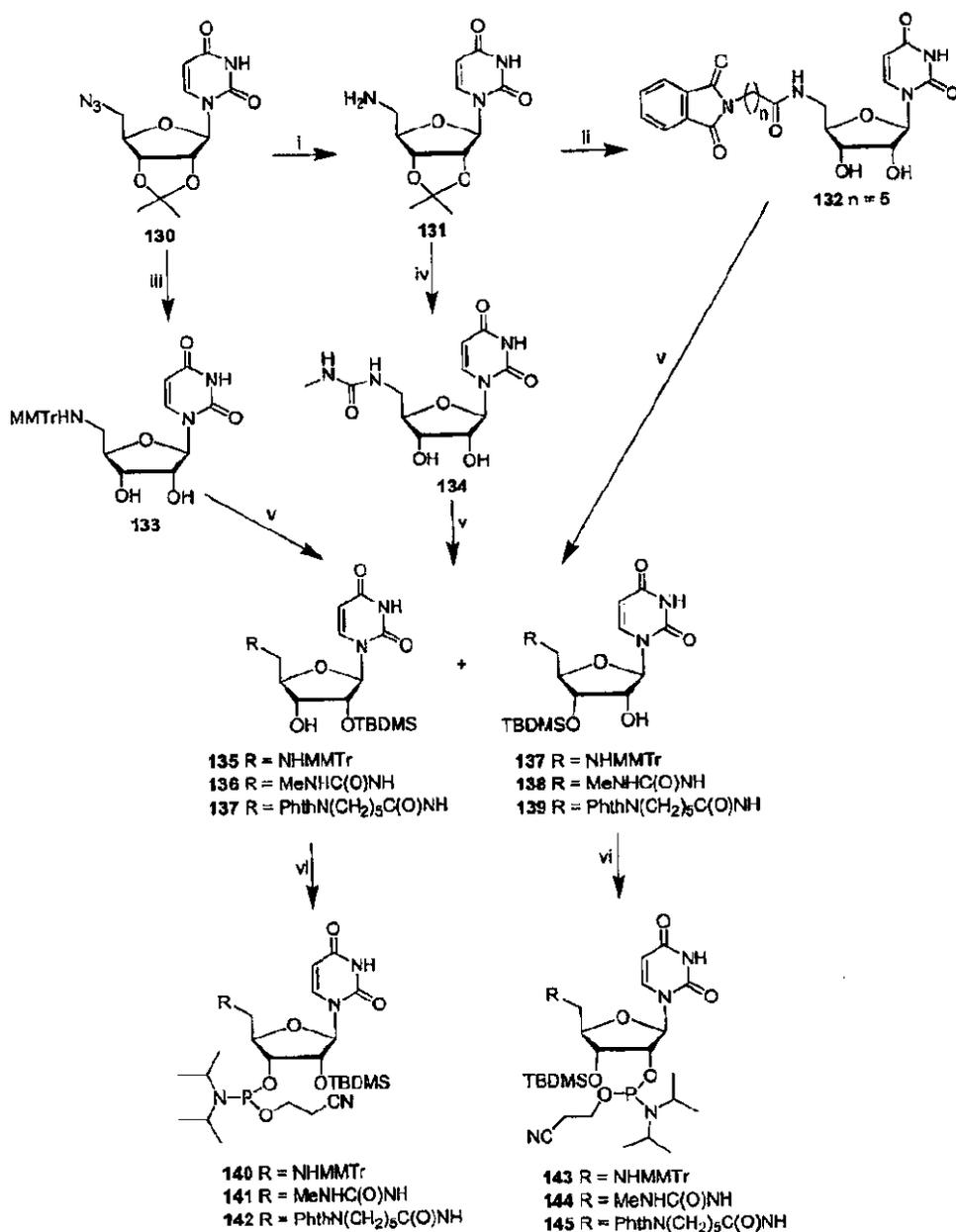
ある化合物の合成について以下のスキーム 6 に述べる。スキーム 6 に示す化合物 130 は、リウ (Liu) および オースティン (Austin) の報告 (J. Org. Chem. 66: 8643, 2001 年) のようにして得られる。ステップ (i) および (iii) (b) は、文献 (Chem. Rev., 1954 年, 第 54 巻, p. 1) に報告されているようにして実施し; ステップ (ii) (a) は、文献の手順 (J. Org. Chem., 1993 年, 第 58 巻, p. 2334) に従って実施し; ステップ (ii) (b)、(iii) (a) および (iv) (b) は、文献 (Bioorg. Med. Chem. Lett., 2003 年, 第 13 巻, p. 1713) に報告されているようにして実施し;

50

ステップ (iii) (c) は、デュボウィック (Dubowchik) およびラディア (Radi a) の報告 (Tetrahedron Lett. 38 : 5257、1997年) のようにして実施し ; ステップ (iv) (a) は、文献 (Organic Lett.、2001年、第3巻、p. 1809) に報告されているようにして実施し ; ステップ (v) は、コーリー (Corey) およびベンケイテスパール (Venkateswarlu) の報告 (J. Am. Chem. Soc. 94 : 6190、1972年) のようにして実施し、ステップ (vi) は、フレーザーら (Fraser) らの報告 (Tetrahedron Lett. 41 : 1523、2000年) のようにして実施する。

【0348】

【化51】

スキーム6^a

^a (i) H₂, Pd-C(10%) / MeOH 1atm; (ii) (a) N-フタルイミド-6-アミノカプロン酸, DCC, DMAP, HOBTおよび (b) HCOOH-H₂O; (iii) (a) HCOOH-H₂O, (b) H₂, Pd-C(10%) / MeOH 1atmおよび (c) MMTr-Cl, TEA / CH₂Cl₂; (iv) (a) CDI(カルボニルジイミダゾール) / THF, MeNH₂または p-ニトロフェニルクロロホルメート, DMAP / Py, MeNH₂および (b) HCOOH-H₂O (v) TBDMS-Cl, イミダゾール / Py; (vi) ジイソプロピルアミンテトラゾリド, 2-シアノエチル-N, N, N', N'-テトライソプロピルホスホロアミダイト / CH₂Cl₂

【0349】

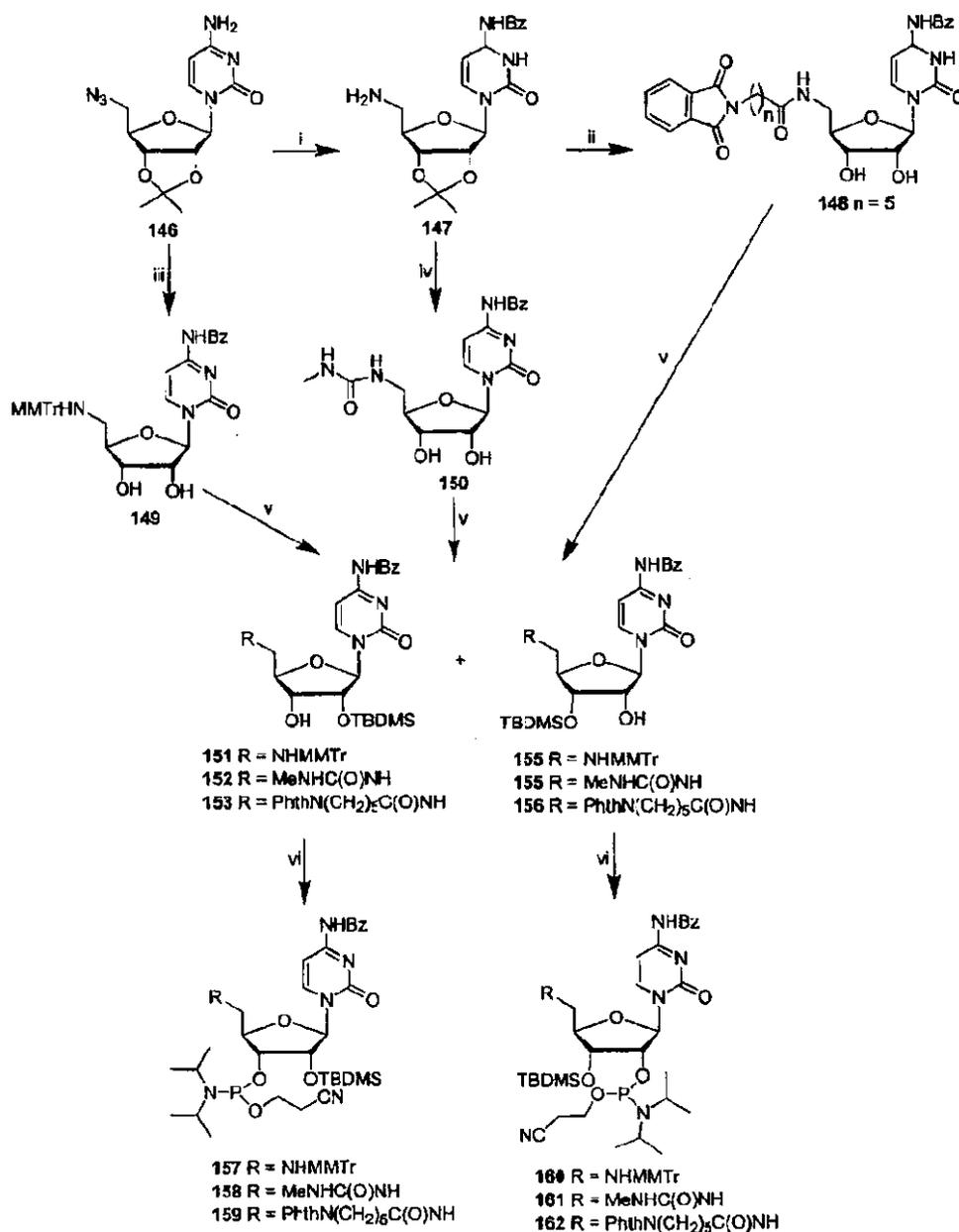
ある化合物の合成について以下のスキーム7に述べる。化合物146は、リウ(Liu)およびオースティン(Austin)の報告(J. Org. Chem. 66: 8643、2001年)のようにして得られる。ステップ(i)(b)および(iii)(c)は、文献(Chem. Rev., 1954年、第54巻、p. 1)に報告されているようにして実施し; ステップ(ii)(a)は、文献の手順(J. Org. Chem., 1993年、第58巻、p. 2334)に従って実施し; ステップ(ii)(b)、(iii)(b)および(iv)(b)は、文献(Bioorg. Med. Chem. Lett.,

2003年、第13巻、p. 1713)に報告されているようにして実施し；ステップ(iii)(d)は、デュボウイック(Dubowchik)およびラディア(Radia)の報告(Tetrahedron Lett. 38: 5257、1997年)のよう
にして実施し；ステップ(iv)(a)は、文献(Organic Lett.、2001年、第3巻、p. 1809)に報告されているようにして実施し；ステップ(v)は、コ
ーリー(Corey)およびベンケイテスパール(Venkateswarlu)の報告(J. Am. Chem. Soc. 94: 6190、1972年)のよう
にして実施し、ス
テップ(vi)は、フレーザーら(Fraser)らの報告(Tetrahedron
Lett. 41: 1523、2000年)のよう
にして実施する。

【0350】

【化52】

スキーム



^a (i) (a) Bz₂O / Py および (b) H₂, Pd-C (10%) / MeOH 1 atm; (ii) (a) N-フルイミド-6-アミノカプロン酸, DCC, DMAP, HOBT および (b) HCOOH-H₂O; (iii) (a) Bz₂O / Py, (b) HCOOH-H₂O, (c) H₂, Pd-C (10%) / MeOH 1 atm および (d) MMTTr-Cl / Py; (iv) (a) CDI (カルボニルジイミダゾール) / THF, MeNH₂ または p-ニトロフェニルクロロホルメート, DMAP / Py, MeNH₂ および (b) HCOOH-H₂O (v) TBDMS-Cl, イミダゾール / Py; (vi) ジイソプロピルアミンテトラゾリド, 2-シアノエチル-N, N, N', N'-テトライソプロピルホスホロアミド / CH₂Cl₂

【0351】

ある化合物の合成について以下のスキーム8に述べる。化合物163は、リウ(Liu)およびオースティン(Austin)の報告(J. Org. Chem. 66: 8643、2001年)のようにして得られる。

【0352】

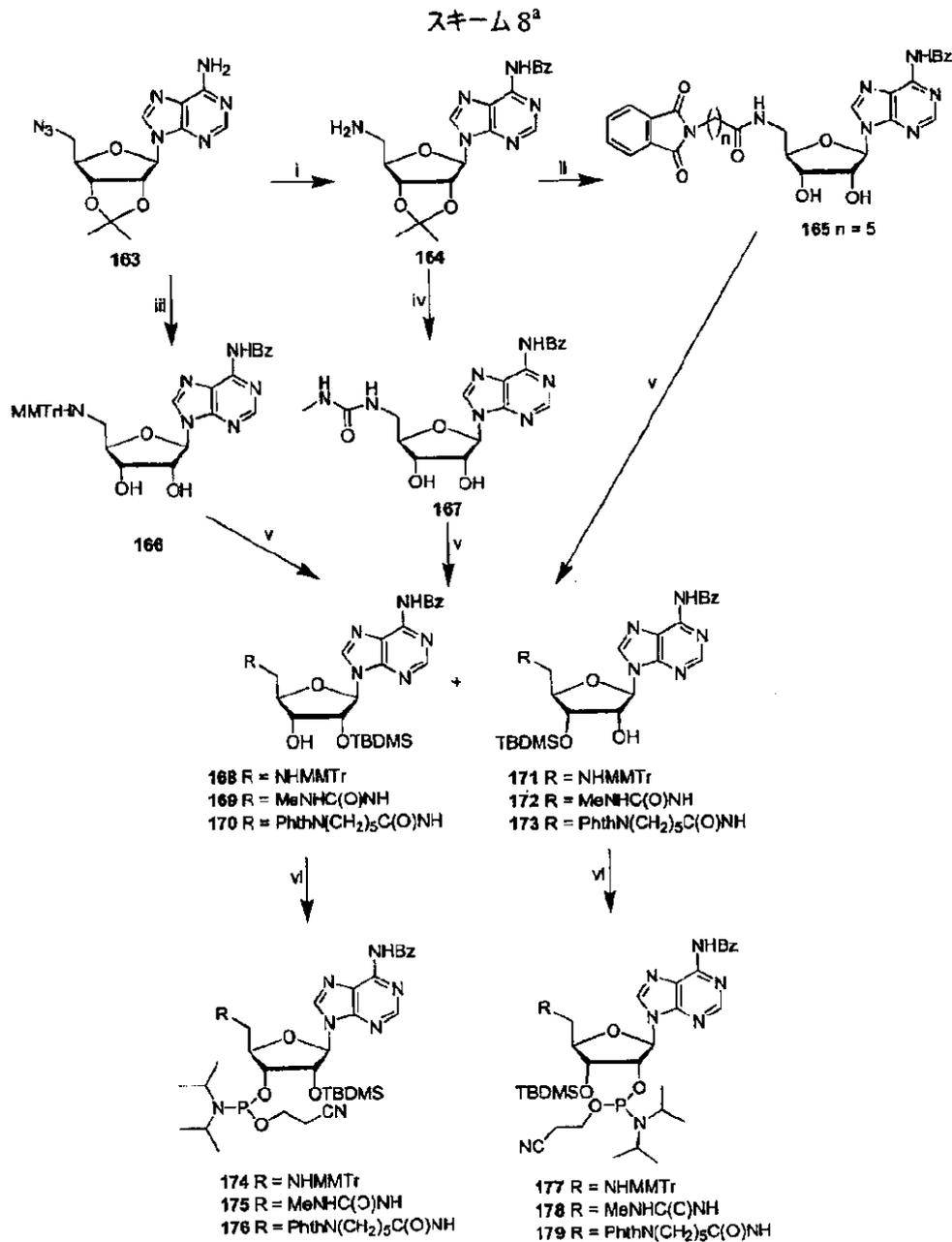
10

20

30

40

【化53】



^a (i) (a) Bz₂O/Pyおよび(b) H₂, Pd-C(10%)/MeOH 1atm; (ii) (a) N-フルイミド-6-アミノカプロン酸, DCC, DMAP, HOBTおよび(b) HCOOH-H₂O; (iii) (a) Bz₂O/Py, (b) HCOOH-H₂O, (c) H₂, Pd-C(10%)/MeOH 1atmおよび(d) MMTTr-Cl/Py; (iv) (a) CDI(カルボニルジイミダゾール)/THF, MeNH₂またはp-ニトロフェニルクロロホルメート, DMAP/Py, MeNH₂および(b) HCOOH-H₂O (v) TBDMS-Cl, イミダゾール/Py; (vi) ジイソプロピルアミンテトラゾリド, 2-シアノエチル-N, N, N', N'-テトライソプロピルホスホロアミダイト/CH₂Cl₂

【0353】

ある化合物の合成について以下のスキーム9に述べる。化合物180は、リウ(Liu)およびオースティン(Austin)の報告(J. Org. Chem. 66: 8643、2001年)のようにして得られる。

【0354】

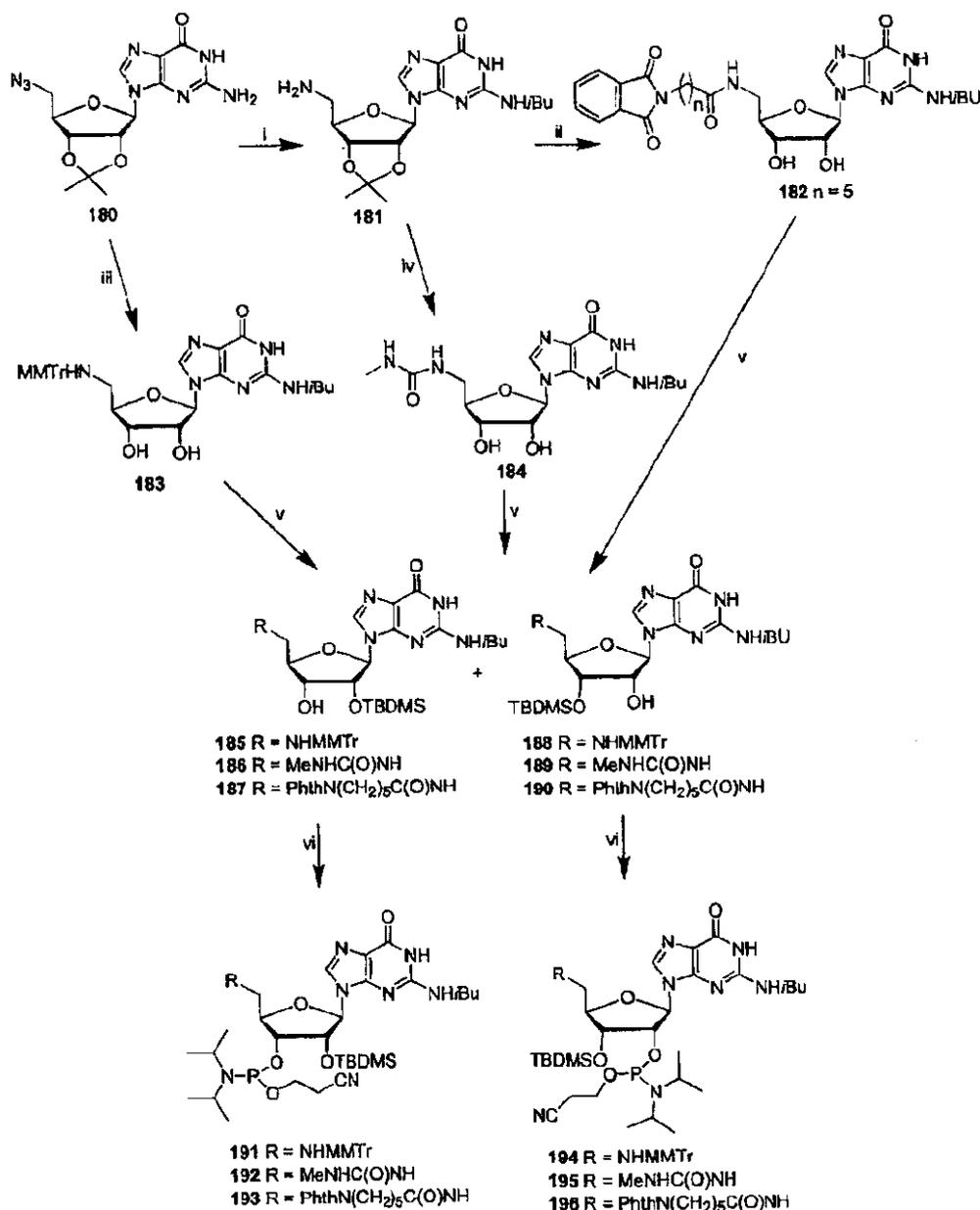
10

20

30

40

【化54】

スキーム 9^a

^a (i) (a) *i*BuCOCl/Pyおよび(b) H₂, Pd-C(10%)/MeOH 1atm; (ii) (a) N-フタルイミド-6-アミノカプロン酸、DCC, DMAP, HOBTおよび(b) HCOOH-H₂O; (iii) (a) *i*BuCOCl/Py, (b) HCOOH-H₂O, (c) H₂, Pd-C(10%)/MeOH 1atmおよび(d) MMTr-Cl/Py; (iv) (a) CDI(カルボニルジイミダゾール)/THF, MeNH₂またはp-ニトロフェニルクロロホルメート, DMAP/Py, MeNH₂および(b) HCOOH-H₂O; (v) TBDMS-Cl, イミダゾール/Py; (vi) ジイソプロピルアミンテトラソリド、2-シアノエチル-N, N, N', N'-テトライソプロピルホスホロアミダイト/CH₂Cl₂

【0355】

リガンド結合モノマーサブユニットならびにオリゴヌクレオチド合成用モノマー定義

用語「ハロ」は、フッ素、塩素、臭素またはヨウ素の任意の基を指す。

【0356】

用語「アルキル」は、示した数の炭素原子を含む直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を指す。例えば、C₁~C₁₂アルキルとは、該基が(全部で)1個~12個の炭素原子をその中に有しうることを示す。用語「ハロアルキル」は、1つまたは複数の水素原子がハロに

10

20

30

40

50

よって置換されているアルキルを指し、すべての水素が八口によって置換されているアルキル部分（例えばペルフルオロアルキル）を含む。アルキルおよび八口アルキル基は、任意選択でO、N、またはSが挿入されていてもよい。用語「アラルキル」は、アルキル水素原子がアリール基によって置換されているアルキル部分を指す。アラルキルは、2つ以上の水素原子がアリール基によって置換されている基を含む。「アラルキル」の例には、ベンジル基、9-フルオレニル基、ベンズヒドリル基、およびトリチル基がある。

【0357】

用語「アルケニル」は、2～8個の炭素原子を含み、1つまたは複数の二重結合を有することを特徴とする、直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を指す。典型的なアルケニルの例には、アリル基、プロペニル基、2-ブテニル基、3-ヘキセニル基および3-オクテニル基があるが、これらに限定はされない。用語「アルキニル」は、2～8個の炭素原子を含み、1つまたは複数の三重結合を有することを特徴とする、直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を指す。典型的なアルキニルのいくつかの例は、エチニル、2-プロピニル、および3-メチルブチニル、およびプロパルギルである。sp²およびsp³炭素が、任意選択で、それぞれアルケニル基およびアルキニル基の取り付け部位としての役割を果たしてもよい。

10

【0358】

用語「アルキルアミノ」および「ジアルキルアミノ」は、それぞれNH(アルキル)基およびNH(アルキル)₂基を指す。用語「アラルキルアミノ」は、NH(アラルキル)基を指す。用語「アルコキシ」はOアルキル基を指し、用語「シクロアルコキシ」および「アラルコキシ」はそれぞれOシクロアルキル基およびOアラルキル基を指す。用語「シロキシ」は、R₃SiO基を指す。用語「メルカプト」はSH基を指す。用語「チオアルコキシ」は、Sアルキル基を指す。

20

【0359】

用語「アルキレン」は、2価アルキル(すなわちR)、例えばCH₂、CH₂CH₂、およびCH₂CH₂CH₂を指す。用語「アルキレンジオキシ」は、構造OROR(Rはアルキレンを表す)の2価の分子種を指す。

【0360】

用語「アリール」は、芳香族性の単環、二環、または三環炭化水素環系を指し、任意の環原子が置換されていてよい。アリール部分の例には、フェニル、ナフチル、アントラセニル、およびピレニルがあるが、これらに限定はされない。

30

【0361】

本願明細書で使用する用語「シクロアルキル」は、3～12個の炭素を有する飽和単環、二環、三環、または多環炭化水素基を含み、任意の環原子が置換されていてよい。本願明細書に記載するシクロアルキル基は、縮合環も含み得る。縮合環は、共通の炭素-炭素結合または共通の炭素原子を共有する環(例えば、スピロ縮合環)である。シクロアルキル部分の例には、シクロヘキシル、アダマンチル、ノルボルニル、およびデカリンがあるが、これらに限定はされない。

【0362】

用語「ヘテロシクリル」は、非芳香族性の3～10員の単環、8～12員の二環、または11～14員の三環の環系であって、単環の場合1～3個のヘテロ原子、二環の場合1～6個のヘテロ原子、または三環の場合1～9個のヘテロ原子を有し、前記ヘテロ原子がO、N、またはSから選択されることを特徴とする環系(例えば炭素原子と、N、OまたはSのヘテロ原子を単環、二環、または三環の場合にそれぞれ1～3個、1～6個、または1～9個)であり、任意の環原子が置換されていてよい。本願明細書に記載するヘテロシクリル基は、縮合環も含み得る。縮合環は、共通の炭素-炭素結合または共通の炭素原子を共有する環(例えば、スピロ縮合環)である。ヘテロシクリルの例には、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル、ペペリジニル、モルホリノ、ピロリニルおよびピロリジニルがあるが、これらに限定はされない。

40

【0363】

50

本明細書で使用する用語「シクロアルケニル」は、部分的に不飽和の、非芳香族性の、単環、二環、三環、または多環の5～12個の炭素（好ましくは5～8個の炭素）を有する炭化水素基を含み、任意の環原子が置換されていてよい。本明細書に記載のシクロアルケニル基は、縮合環も含み得る。縮合環は、共通の炭素-炭素結合または共通の炭素原子を共有する環（例えば、スピロ縮合環）である。シクロアルケニル部分の例には、シクロヘキセニル、シクロヘキサジエニル、またはノルボネニルがあるが、これらに限定はされない。

【0364】

用語「ヘテロシクロアルケニル」は、部分的に飽和した、非芳香族性の、5～10員の単環、8～12員の二環、または11～14員の三環の環系であって、単環の場合1～3個のヘテロ原子、二環の場合1～6個のヘテロ原子、または三環の場合1～9個のヘテロ原子を有し、前記ヘテロ原子がO、N、またはSから選択されることを特徴とする環系（例えば炭素原子と、N、OまたはSのヘテロ原子を単環、二環、または三環の場合にそれぞれ1～3個、1～6個、または1～9個）を指し、任意の環原子が置換されていてよい。本明細書に記載のヘテロシクロアルケニル基は、縮合環も含み得る。縮合環は、共通の炭素-炭素結合または共通の炭素原子を共有する環（例えば、スピロ縮合環）である。ヘテロシクロアルケニルの例には、テトラヒドロピリジルおよびジヒドロピランがあるが、これらに限定はされない。

10

【0365】

用語「ヘテロアリール」は、芳香族性の5～8員の単環、8～12員の二環、または11～14員の三環の環系であって、単環の場合1～3個のヘテロ原子、二環の場合1～6個のヘテロ原子、または三環の場合1～9個のヘテロ原子を有し、前記ヘテロ原子がO、N、またはSから選択されることを特徴とする環系（例えば炭素原子と、N、OまたはSのヘテロ原子を単環、二環、または三環の場合にそれぞれ1～3個、1～6個、または1～9個）を指し、任意の環原子が置換されていてよい。本明細書に記載のヘテロアリール基は、共通の炭素-炭素結合を共有する縮合環も含み得る。

20

【0366】

用語「オキシ」は、炭素と結合している場合はカルボニルを形成し、窒素と結合している場合はN-オキシドを形成し、イオウと結合している場合はスルホキシドまたはスルホン形成する酸素原子を指す。

30

【0367】

用語「アシル」は、いずれも置換基によってさらに置換することが可能な、アルキルカルボニル、シクロアルキルカルボニル、アリールカルボニル、ヘテロシクリルカルボニル、またはヘテロアリールカルボニル置換基を指す。

【0368】

用語「置換基」は、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクロアルケニル、シクロアルケニル、アリール、またはヘテロアリール基上で該基の任意の原子について「置換された」基を指す。適切な置換基には、制限を設けるものではないが、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、ハロ、ヒドロキシ、シアノ、ニトロ、アミノ、 SO_3H 、硫酸、リン酸、ペルフルオロアルキル、ペルフルオロアルコキシ、メチレンジオキシ、エチレンジオキシ、カルボキシル、オキシ、チオオキシ、イミノ（アルキル、アリール、アラルキル）、 $\text{S}(\text{O})_n$ アルキル（ n は0～2）、 $\text{S}(\text{O})_n$ アリール（ n は0～2）、 $\text{S}(\text{O})_n$ ヘテロアリール（ n は0～2）、 $\text{S}(\text{O})_n$ ヘテロシクリル（ n は0～2）、アミン（モノ-、ジ-、アルキル、シクロアルキル、アラルキル、ヘテロアラルキル、およびこれらの組合せ）、エステル（アルキル、アラルキル、ヘテロアラルキル）、アミド（モノ-、ジ-、アルキル、アラルキル、ヘテロアラルキル、およびこれらの組合せ）、スルホンアミド（モノ-、ジ-、アルキル、アラルキル、ヘテロアラルキル、およびこれらの組合せ）、非置換アリール、非置換ヘテロアリール、非置換ヘテロシクリル、および非置換シクロアルキルがある。1態様では、基上の置換基は独立に、前述の置換基のいずれか1つ、またはいずれかのサブセットである。

40

50

【 0 3 6 9 】

用語「アデニル、シトシル、グアニル、チミル、およびウラシル」などは、アデニン、シトシン、グアニン、チミン、およびウラシルの基を指す。

「保護された」部分とは、反応性を有する官能基（例えばヒドロキシル基もしくはアミノ基）、または1つ以上の官能基を有する分子種（例えば糖）であって、該官能基の反応性が、保護基の結合によって一時的に阻害されているものを指す。本明細書に記載のモノマーおよび方法に有用な保護基は、例えば、グリーン、T.W. (Greene, T.W.) 著「Protective Groups in Organic Synthesis」(ジョンワイリーアンドサンズ：ニューヨーク)、1981年に見出すことができる。同文献は参照によって本願に組み込まれる。

10

【 0 3 7 0 】

本願明細書で使用する「異常」核酸塩基は、以下のうち任意のものを含みうる：

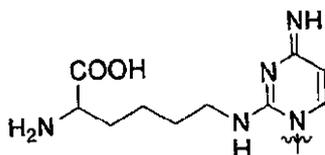
- 2 - メチルアデニル、
- N 6 - メチルアデニル、
- 2 - メチルチオ - N 6 - メチルアデニル、
- N 6 - イソペンテニルアデニル、
- 2 - メチルチオ - N 6 - イソペンテニルアデニル、
- N 6 - (シス - ヒドロキシイソペンテニル) アデニル、
- 2 - メチルチオ - N 6 - (シス - ヒドロキシイソペンテニル) アデニル、
- N 6 - グリシニルカルバモイルアデニル、
- N 6 - トレオニルカルバモイルアデニル、
- 2 - メチルチオ - N 6 - トレオニルカルバモイルアデニル、
- N 6 - メチル - N 6 - トレオニルカルバモイルアデニル、
- N 6 - ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデニル、
- 2 - メチルチオ - N 6 - ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデニル、
- N 6 , N 6 - ジメチルアデニル、
- 3 - メチルシトシル、
- 5 - メチルシトシル、
- 2 - チオシトシル、
- 5 - ホルミルシトシル、

20

30

【 0 3 7 1 】

【 化 5 5 】



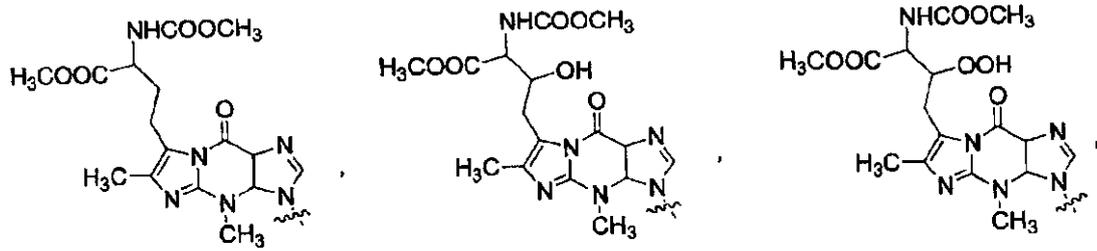
【 0 3 7 2 】

- N 4 - メチルシトシル、
- 5 - ヒドロキシメチルシトシル、
- 1 - メチルグアニル、
- N 2 - メチルグアニル、
- 7 - メチルグアニル、
- N 2 , N 2 - ジメチルグアニル、

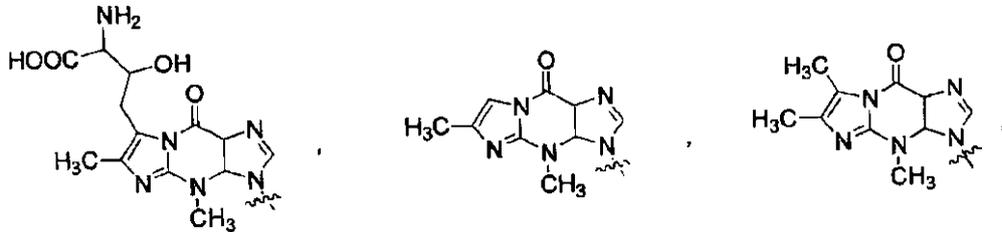
40

【 0 3 7 3 】

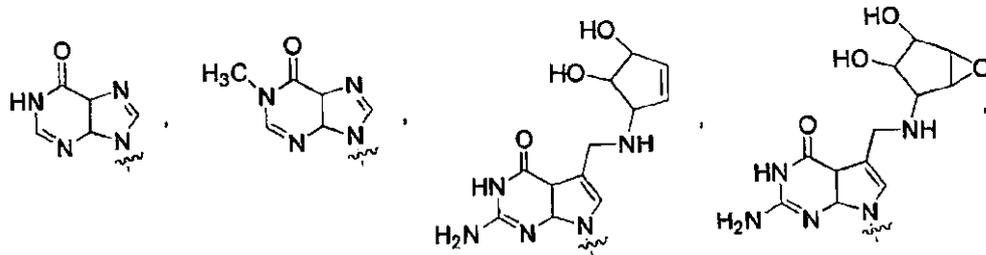
【化 5 6】



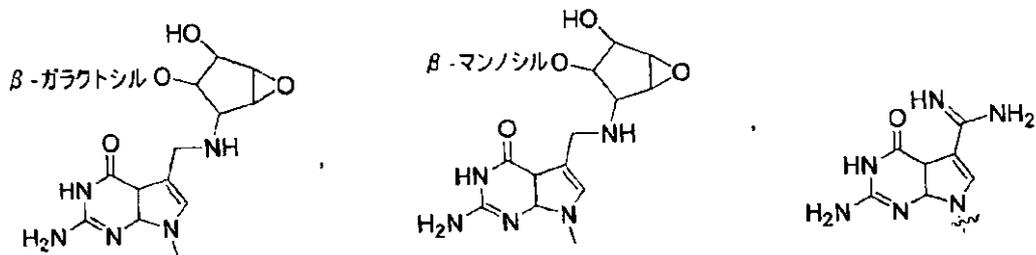
10



20



30



【 0 3 7 4 】

- N 2 , 7 - ジメチルグアニニル、
- N 2 , N 2 , 7 - トリメチルグアニニル、
- 1 - メチルグアニニル、
- 7 - シアノ - 7 - デアザグアニニル、
- 7 - アミノメチル - 7 - デアザグアニニル、
- プソイドウラシリル、
- ジヒドロウラシリル、
- 5 - メチルウラシリル、
- 1 - メチルプソイドウラシリル、
- 2 - チオウラシリル、
- 4 - チオウラシリル、
- 2 - チオチミニル

40

50

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

10

20

【 0 3 7 5 】

ユニバーサル塩基は、天然の DNA / RNA 塩基の各々の間の区別をほとんどせずに該塩基と塩基対を形成することができる。一般に、ユニバーサル塩基は、スタッキング相互作用により例えば二重鎖 RNA または RNA 様分子を安定化することが可能な、非水素結合する疎水性の芳香族部分である。ユニバーサル塩基は水素結合する置換基を含むこともできる。

【 0 3 7 6 】

概要

オリゴヌクレオチド剤（例えば結合オリゴヌクレオチド剤）であって、限定するものではないが好適なリガンド結合モノマーサブユニットを含むものを、式 (I I) として以下に示す。担体（一部の実施形態では「リンカー」とも呼ばれる）は、環式部分でも非環式部分でもよく、2つの「バックボーン結合点」（例えばヒドロキシル基）および1つのリガンドを含んでいる。リガンドは、担体に直接取り付けられてもよいし（例えば、結合させる）、あるいは、係留部（例えば1以上の原子の非環式の鎖；または核酸塩基、例えば任意選択で1以上の化学修飾、例えば異常塩基を有する天然の核酸塩基；またはユニバーサル塩基）を介在させて担体に間接的に取り付けられて（例えば、結合されて）もよい。したがって担体は、それぞれリガンドおよび係留部 / 係留部付リガンドのための「リガンドまたは係留結合点」も含んでいる。

30

40

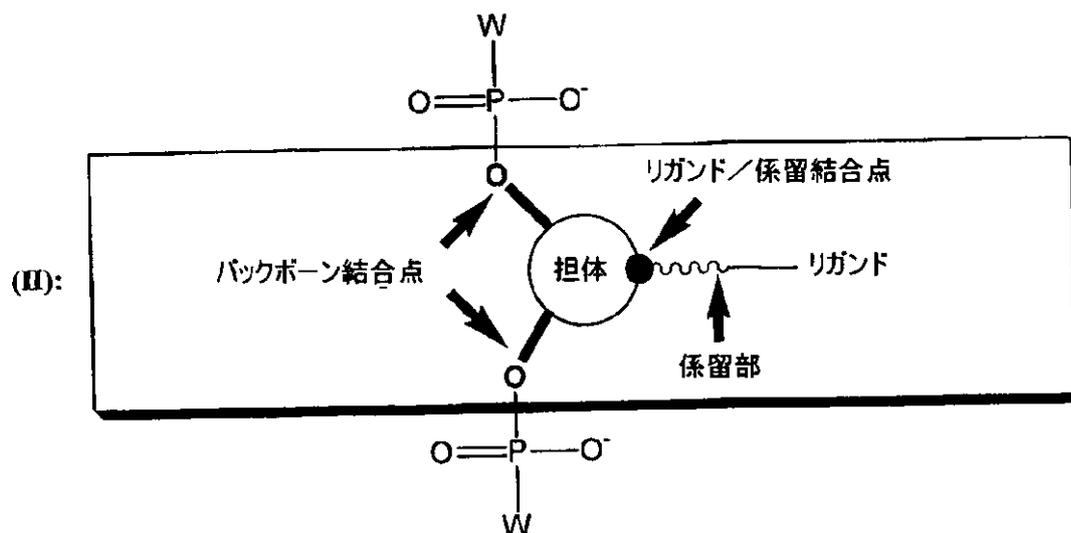
【 0 3 7 7 】

リガンド結合モノマーサブユニットは RNA 分子の 5' 末端または 3' 末端のサブユニットであってもよい、つまり2つの「W」基のうち的一方がヒドロキシル基で、他方の「W」基が2以上の非修飾リボヌクレオチドまたは修飾リボヌクレオチドの鎖であってもよい。別例として、リガンド結合モノマーサブユニットは内側の位置を占める場合もあり、両方の「W」基が1以上の非修飾リボヌクレオチドまたは修飾リボヌクレオチドであってもよい。2以上のリガンド結合モノマーサブユニットが1つの RNA 分子（例えばオリゴヌクレオチド剤）の中に存在してもよい。係留部付リガンド結合モノマーサブユニット（例えば、親油性部分（例えばコレステロール）が担体に係留されているもの）を含めるのに好適な位置は、3' 末端、5' 末端、または内側の位置である。

50

【 0 3 7 8 】

【 化 5 7 】



10

【 0 3 7 9 】

式 (I I) の修飾 RNA 分子は当技術分野で既知のオリゴヌクレオチド合成法を使用して得ることができる。好ましい実施形態では、式 (I I) の修飾 RNA 分子は、例えばホスホロアミダイトまたは H - ホスホネートを連結する手法を利用して、成長している鎖に 1 以上の対応するモノマー化合物 (例えば下記の A、B、C を参照) を組み込むことにより調製することができる。

20

【 0 3 8 0 】

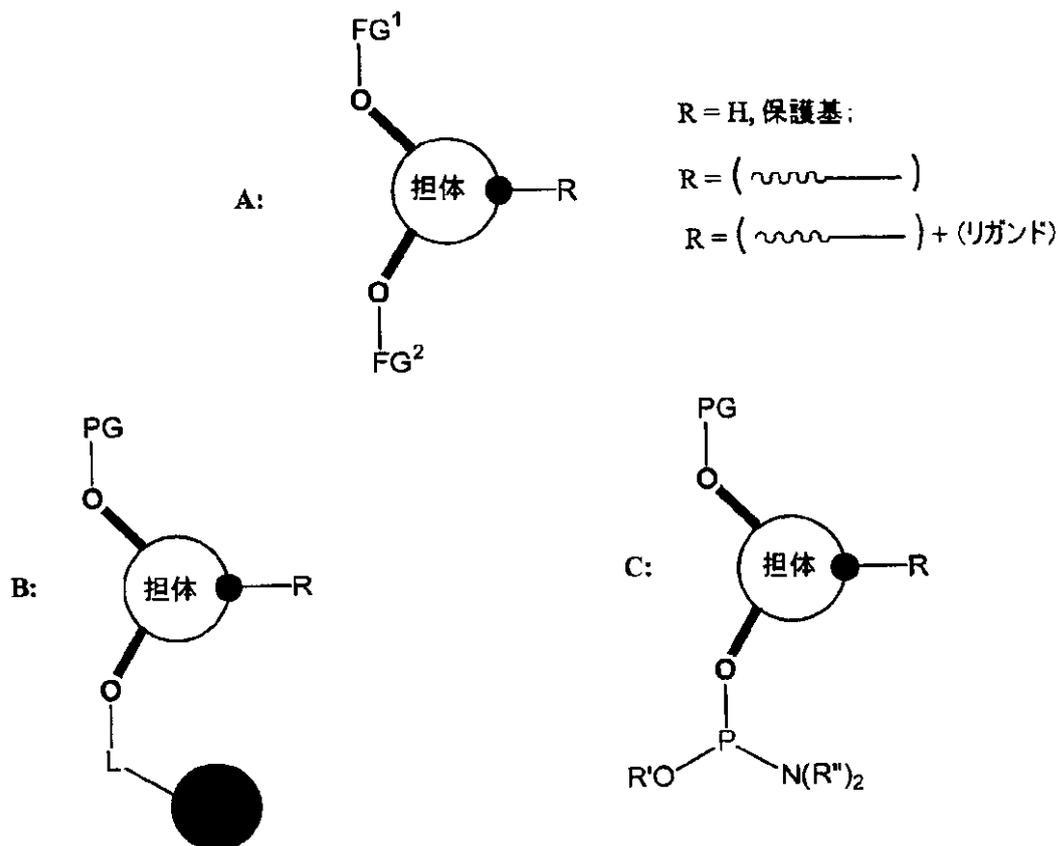
モノマー、例えばリガンド結合モノマーは、一般に、2つの異なる官能化を施されたヒドロキシル基 (OH^1 および OH^2) であって担体分子に連結される (下記の A を参照) ヒドロキシル基と、リガンド/係留結合点とを含んでいる。本明細書で使用されるように、用語「官能化を施されたヒドロキシル基」は、ヒドロキシルプロトンが別の置換基に置き換えられていることを意味する。以下の代表的な構造 B および C に示されるように、担体上の一方のヒドロキシル基 (OH^1) は保護基 (PG) で官能化される。他方のヒドロキシル基 (OH^2) は、(1) 直接またはリンカー (B に示す L) を介して間接的に、液相または固相合成の支持体試薬 (塗りつぶした円) で官能化されてもよい、(2) リン含有部分、例えば C に示すようなホスホロアミダイトで官能化されてもよい。係留結合点は、成長している鎖にモノマーが組み込まれる時に、水素原子、適切な保護基、係留部、または係留部付リガンドに接続されていてよい (以下の A における変更可能な「R」を参照)。したがって、係留されるリガンドは、成長している鎖にモノマーが組み込まれる時にモノマーに取り付けられていてもよいが、必ずしも取り付けられることが必要ではない。ある実施形態では、係留部、リガンドまたは係留部付リガンドは、「前駆体」リガンド結合モノマーサブユニットが鎖に組み込まれた後で「前駆体」リガンド結合モノマーサブユニットに連結されてもよい。下記に (ならびに本明細書の他所で) 使用される波線は接続を表し、構成部分と結合点との間、または構成部分と係留分子 (構成部分と結合点との間に置かれる) との間の直接の結合を表わすことができる。直接係留される、とは、該部分が結合点に直接結合することを意味する。間接的に係留される、とは、結合点と部分との間に係留分子が置かれていることを意味する。

30

40

【 0 3 8 1 】

【化58】



10

20

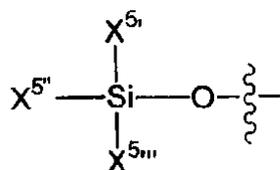
【0382】

(OFG¹) 保護基は、例えば T. W. グリーン (T. W. Greene) および P. G. M. ワッツ (P. G. M. Wuts)、「Protective Groups in Organic Synthesis」第2版、ジョンワイリーアンドサンズ(1991)から所望に応じて選択可能である。保護基は、アミダイト合成条件、貯蔵条件およびオリゴヌクレオチド合成条件の下で安定であることが好ましい。ヒドロキシル基(OH)は求核基(すなわちルイス塩基)であって、酸素を介して求電子(すなわちルイス酸)と反応する。水素が保護基(例えばトリアルキルメチル基またはトリアルキルシリル基)に置き換えられているヒドロキシル基は、置換反応において求核分子としての反応性をほとんど有していない。したがって、保護されたヒドロキシル基は、例えばオリゴヌクレオチド合成の際に構造Cを例とする化合物のホモ結合を防ぐのに有用である。いくつかの実施形態では、好ましい保護基はジメトキシトリチル基である。他の実施形態では、好ましい保護基は下式:

30

【0383】

【化59】



40

【0384】

を有するシリコン系保護基である。

X^{5'}、X^{5''}、およびX^{5'''}は、置換または非置換のアルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、アルコキシ、シクロアルコキシ、アラルコキシ、アリールオキシ、ヘテロアリールオキシ、またはシロキシ(すなわちR₃SiO、3

50

つの「R」基は上記に列挙された基の任意の組み合わせでよい)から選択することができる。X^{5'}、X^{5''}、およびX^{5'''}はすべて同じであっても異なってもよく; X^{5'}、X^{5''}、およびX^{5'''}のうちの2つが同一で3番目が異なっている組み合わせとして考えることもできる。ある実施形態では、X^{5'}、X^{5''}、およびX^{5'''}は少なくとも1つのアルコキシ基またはシロキシ基を含んでいる。好ましい組み合わせとしては、X^{5'}、X^{5''} = トリメチルシロキシおよびX^{5'''} = 1, 3 (トリフェニルメトキシ) 2 プロポキシまたはシクロドデシルオキシが挙げられる。

【0385】

X^{5'}、X^{5''}、およびX^{5'''}のその他の好ましい組み合わせには、以下に述べる脱保護および安定性の基準を満たすOFG¹基が得られるものが挙げられる。該OFG¹基は、アミダイト合成条件、貯蔵条件およびオリゴヌクレオチド合成条件の下で安定であることが好ましい。シリル基は、例えば支持体に結合したオリゴヌクレオチドから迅速に(すなわち1分未満で)除去することが望ましい。迅速な除去により合成時間を縮小することによって、成長しているオリゴヌクレオチド鎖が試薬に曝露される時間を縮小することができるからである。シリル保護基が(例えば発色団シリル置換基の付加により)脱保護中に視認可能であれば、オリゴヌクレオチド合成が改善されうる。

10

【0386】

シリル保護基の選択は、安定性および除去し易さという最も重要な特性の競合しあう要求、ならびにこれらの競合する目的のバランスをとる必要から、複雑になる可能性がある。安定性を増大させるほとんどの置換基は、シリル基の除去に必要な反応時間も増大させ、おそらくはこの基の除去の難しさを増大させる可能性がある。

20

【0387】

OFG¹シリコン含有保護基へのアルコキシ置換基およびシロキシ置換基の付加は、該保護基のシリルエーテル結合のフッ化物切断に対する感受性を増加させる。該置換基の立体化学的な嵩を増加させると、安定性は保存されると同時にフッ化物不安定性は同じ程度までは減少しない。シリル基上の置換基の適切なバランスにより、シリルエーテルが実現可能なヌクレオチド保護基になる。

【0388】

OFG¹シリコン含有保護基の候補を、候補OFG¹基を担持した好ましい担体のテトラヒドロフラン溶液を室温で5モル等量のテトラヒドロフランに曝露することにより、試験することができる。反応時間は、薄層クロマトグラフィによる出発物質の消失をモニタすることにより決定することができる。

30

【0389】

Bの中のOFG²が、可溶性または不溶性の支持体試薬に接続されたリンカー(例えば比較的長い有機リンカー)を含んでいる場合、OFG¹が脱保護されて求核分子として自由に求電子基(例えばアミダイト基)を含む別のヌクレオチドまたはモノマーと反応するようになれば、液相または固相合成の技術を使用して、天然リボヌクレオチドおよび/または修飾リボヌクレオチドの鎖を構築することができる。別例として、天然または修飾リボヌクレオチドまたはオリゴリボヌクレオチド鎖を、アミダイト基またはH₂ホスホネートを介してモノマーCのOFG²に接続することができる。この操作に続いて、OFG¹を脱保護し、回復した求核性のヒドロキシル基を、求電子基を含む別のヌクレオチドまたはモノマーと反応させることができる。R'は置換または非置換のアルキルまたはアルケニルであってよい。好ましい実施形態では、R'はメチル、アリルまたは2-シアノエチルである。R''は、C₁-C₁₀アルキル基であってよく、好ましくは、3つ以上の炭素を含んでいる分枝を有する基(例えばイソプロピル)である。

40

【0390】

BにおけるOFG²がリンカーで官能化されたヒドロキシル基であって、該リンカーがさらにリンカーの他端に液相または固相合成の支持体試薬を含んでいてもよい。支持体試薬は本明細書に記載のモノマーを支持することができる任意の支持媒体であってよい。モノマーをリンカー(L)によって不溶性の支持体に取り付け、モノマー(および成長してい

50

る鎖)が該支持体の置かれた溶媒中で可溶化されうるようにすることができる。可溶化されたが固定化されているモノマーは、周囲の溶媒中の試薬と反応することが可能であり；未反応の試薬および可溶性の副産物を、モノマーまたはモノマー由来生成物が取り付けられている固体支持体から容易に洗い流すことができる。別例として、モノマーを可溶性の支持体部分、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)に取り付けることも可能であり、液相合成技術を用いて鎖を構築することができる。リンカーおよび支持媒体の選択は当分野の技術範囲内にある。一般に、リンカーは $C(O)(CH_2)_qC(O)$ 、または $C(O)(CH_2)_qS$ (式中、 q は0、1、2、3または4でよい)であってよく；好ましくは、オキサリル、スクシニルまたはチオグリコリルである。標準的な多孔質ガラスの固相合成支持体は、該ガラスがフッ化物によって分解し、完全長の生成物の量が著しく減少するので、フッ化物に不安定な5'シリル保護基と共に使用することはできない。フッ化物に安定なポリスチレン系支持体またはPEGが好ましい。

【0391】

リガンド/係留結合点は、任意の二価、三価、四価、五価、六価の原子であってよい。いくつかの実施形態では、リガンド/係留結合点は、炭素、酸素、窒素または硫黄原子であってよい。例えば、リガンド/係留結合点の前駆体官能基は、求核性のヘテロ原子(例えばSH、 NH_2 、第二級アミノ、 ONH_2 、または NH_2NH_2)を有しうる。別例として、リガンド/係留結合点の前駆体官能基は、オレフィン、例えば、 $CH=CH_2$ またはディールスアルダー(Diels-Alder)ジエンもしくはジエノフィルであってよく、該前駆体官能基は、例えば、遷移金属で触媒される炭素-炭素(例えばオレフィンメタセシス)プロセスまたは付加環化(例えばディールスアルダー)を使用して、リガンド、係留部、または係留部付リガンドに結合させることができる。さらなる例として、リガンド/係留結合点の前駆体官能基は求電子性部分(例えばアルデヒド)であってよい。担体が環式担体である場合、リガンド/係留結合点は、環内の原子(つまり環式部分の中の構成原子、例えば窒素原子)であってもよいし、環外の原子(つまり、環式部分の中の構成原子に結合している原子または原子団)であってもよい。

【0392】

担体は、 OFG^1 、 OFG^2 およびリガンドのための結合点を含んだ任意の有機分子であってよい。ある実施形態では、担体は環式分子であってヘテロ原子(例えばO、NまたはS)を含みうる。例えば、担体分子はアリール(例えばベンゼン、ピフェニルなど)、シクロアルキル(例えばシクロヘキサン、シスまたはトランスデカリンなど)、またはヘテロシクリル(ピペラジン、ピロリジンなど)を含みうる。他の実施形態では、担体は非環式部分、例えば、セリノールを主成分としていてもよい。上記の環系のうち任意のものが、 OFG^1 、 OFG^2 およびリガンドに加えて置換基を含む場合もある。

【0393】

糖を主成分としたモノマー

一部の実施形態では、担体分子は酸素を含んだヘテロ環である。好ましくは、担体は構造LCM-Iに示すようなリボース糖である。この実施形態では、リガンド結合モノマーはヌクレオシドである。

【0394】

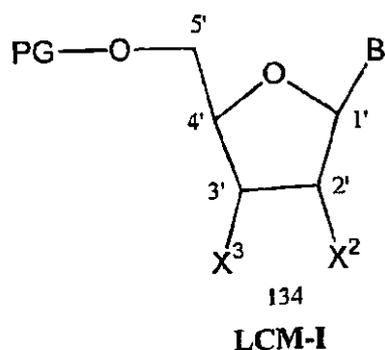
10

20

30

40

【化 6 0】



10

【 0 3 9 5】

「B」は核酸塩基、例えば任意選択で1以上の化学修飾（例えば異常塩基）を有する天然の核酸塩基；またはユニバーサル塩基を表す。

本願明細書で使用する「異常」核酸塩基は、以下のうち任意のものを含みうる：

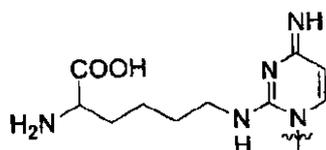
- 2 - メチルアデニル、
- N 6 - メチルアデニル、
- 2 - メチルチオ - N 6 - メチルアデニル、
- N 6 - イソペンテニルアデニル、
- 2 - メチルチオ - N 6 - イソペンテニルアデニル、
- N 6 - (シス - ヒドロキシイソペンテニル) アデニル、
- 2 - メチルチオ - N 6 - (シス - ヒドロキシイソペンテニル) アデニル、
- N 6 - グリシニルカルバモイルアデニル、
- N 6 - トレオニルカルバモイルアデニル、
- 2 - メチルチオ - N 6 - トレオニルカルバモイルアデニル、
- N 6 - メチル - N 6 - トレオニルカルバモイルアデニル、
- N 6 - ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデニル、
- 2 - メチルチオ - N 6 - ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデニル、
- N 6 , N 6 - ジメチルアデニル、
- 3 - メチルシトシニル、
- 5 - メチルシトシニル、
- 2 - チオシトシニル、
- 5 - ホルミルシトシニル、

20

30

【 0 3 9 6】

【化 6 1】



40

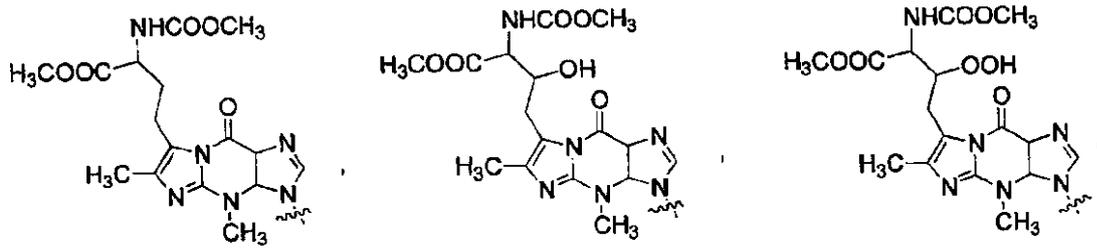
【 0 3 9 7】

- N 4 - メチルシトシニル、
- 5 - ヒドロキシメチルシトシニル、
- 1 - メチルグアニル、
- N 2 - メチルグアニル、
- 7 - メチルグアニル、
- N 2 , N 2 - ジメチルグアニル、

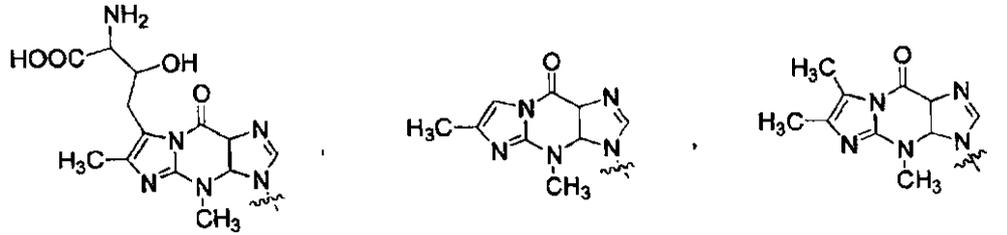
50

【 0 3 9 8 】

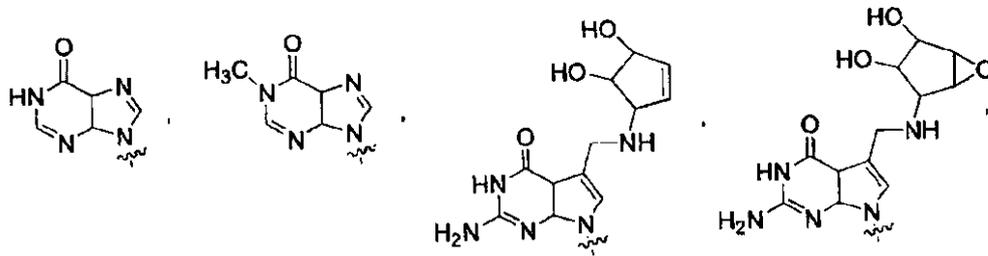
【 化 6 2 】



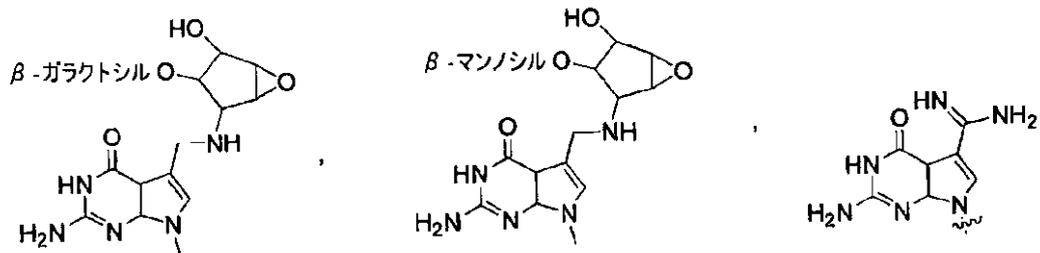
10



20



30



40

【 0 3 9 9 】

- N 2 , 7 - ジメチルグアニニル、
- N 2 , N 2 , 7 - トリメチルグアニニル、
- 1 - メチルグアニニル、
- 7 - シアノ - 7 - デアザグアニニル、
- 7 - アミノメチル - 7 - デアザグアニニル、
- プソイドウラシリル、
- ジヒドロウラシリル、
- 5 - メチルウラシリル、
- 1 - メチルプソイドウラシリル、
- 2 - チオウラシリル、
- 4 - チオウラシリル、
- 2 - チオチミニル

50

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

10

20

【0400】

ユニバーサル塩基は、天然の DNA / RNA 塩基の各々の間の区別をほとんどせずに該塩基と塩基対を形成することができる。一般に、ユニバーサル塩基は、スタッキング相互作用により例えば二重鎖 RNA または RNA 様分子を安定化することが可能な、非水素結合する疎水性の芳香族部分である。ユニバーサル塩基は水素結合する置換基を含むこともできる。

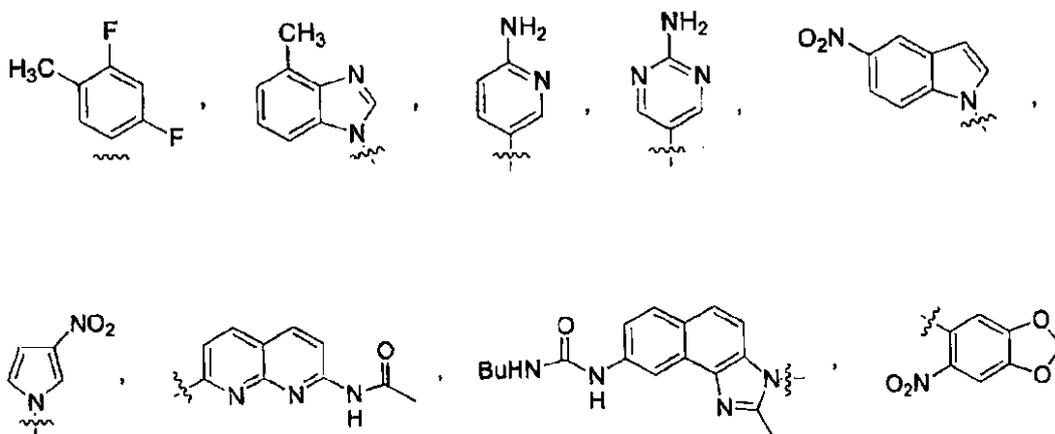
【0401】

本願明細書で使用するように、「ユニバーサル塩基」は、アントラセン、ピレン、または以下のうち任意のものを含みうる：

30

【0402】

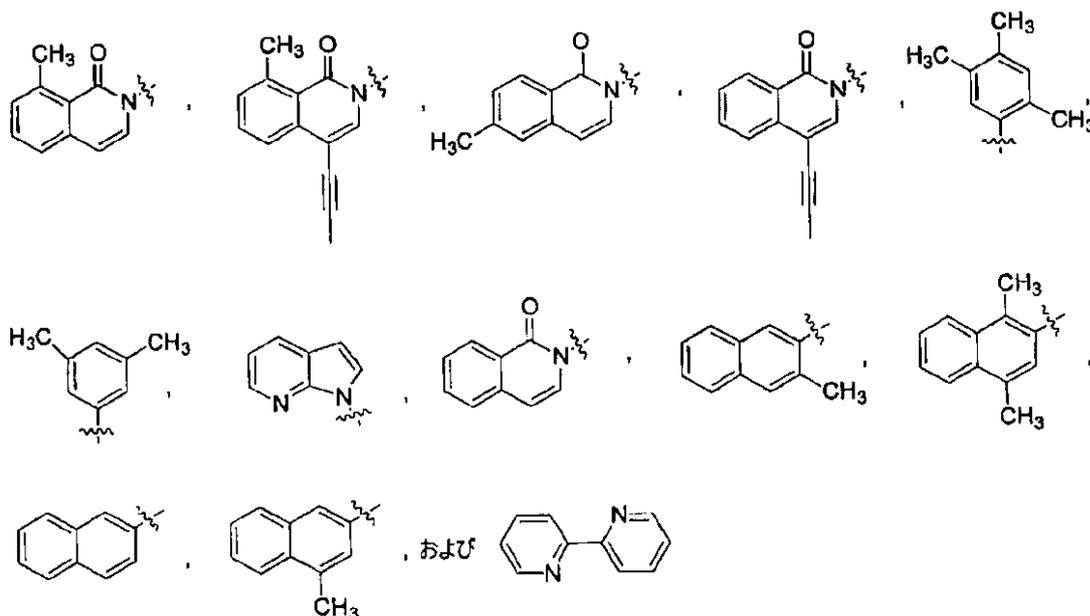
【化63】



40

【0403】

【化 6 4】



10

20

【0404】

いくつかの実施形態では、Bは、担体にリガンドを接続する係留部の一部を形成することができる。例えば、係留部は $B - CH = CH - C(O)NH - (CH_2)_5 - NHC(O) -$ リガンドであってよい。好ましい実施形態では、二重結合はトランス型であり、リガンドは置換または非置換のコレステロリル基（例えば、D環側鎖またはC-3ヒドロキシルを介して結合されたもの）；アラルキル部分であって少なくとも1つの立体中心および少なくとも1つの置換基を該アラルキル基のアリール部分上に有するもの；あるいは核酸塩基である。ある実施形態では、上述の係留部において、Bはウラシルまたはユニバーサル塩基（例えばアリール部分、例えばフェニルであって任意選択で追加の置換基（例えば1以上のフルオロ基）を有するもの）である。Bは、係留部の残りの部分のどの原子が置換されていてもよい。

30

【0405】

X^2 は、 $2' - OH$ の代わりに「オキシ」または「デオキシ」置換基を含んでいてもよいし、リガンドまたは係留部付きリガンドであってよい。

「オキシ」置換基の例には、アルコキシまたはアリールオキシ（OR、例えばR = H、アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、糖、または保護基）；ポリエチレングリコール（PEG）、 $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$ ； $2'$ ヒドロキシルが例えばメチレン架橋によって同じリボース糖の $4'$ 位の炭素に接続されている「ロックされた」核酸（LNA）；O-保護AMINE（AMINE = NH_2 ；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、ポリアミノ）およびアミノアルコキシ、 $O(CH_2)_n$ 保護AMINE（例えばAMINE = NH_2 ；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、ポリアミノ）、ならびにオルトエステルが挙げられる。アミン保護基には、ホルミル、アミド、ベンジル、アリルなどがある。

40

【0406】

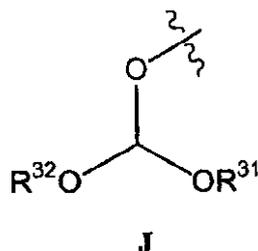
好ましいオルトエステルは一般式Jを有する。基 R^{31} および R^{32} は同じであっても異なってもよい。好ましいオルトエステルは「ACE」基であり、構造Kとして以下に示す。

50

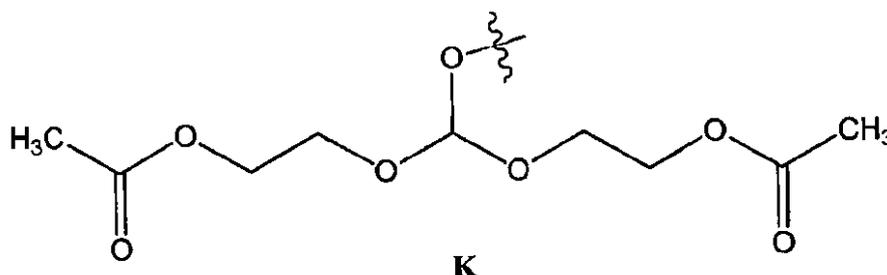
【0407】

【化65】

1.



10



20

【0408】

「デオキシ」置換基には、水素（つまりデオキシリボース糖）；ハロ（例えばフルオロ）；保護されたアミノ（例えばNH₂；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、またはすべてのアミノが保護されているアミノ酸）；完全に保護されたポリアミノ（例えばNH(CH₂CH₂NH)_nCH₂CH₂AMINE、ここでAMINE = NH₂；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノであり、かつアミノ基がすべて保護されている）、NHC(O)R（R = アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリールまたは糖）、シアノ；アルキルチオアルキル；チオアルコキシ；ならびにアルキル、シクロアルキル、アリール、アルケニルおよびアルキニルであって任意選択で例えば保護されたアミノ官能基で置換されているもの、が挙げられる。好ましい置換基は2'-メトキシエチル、2'-OCH₃、2'-Oアリル、2'-Cアリルおよび2'-フルオロである。

30

【0409】

X³は上記のOFG²について説明したとおりである。

PGは、トリアリールメチル基（例えば、ジメトキシトリチル基）またはSi(X^{5'})(X^{5''})(X^{5'''})（式中、(X^{5'})、(X^{5''})および(X^{5'''})については別記のとおり）であってよい。

40

【0410】

糖置換系モノマー

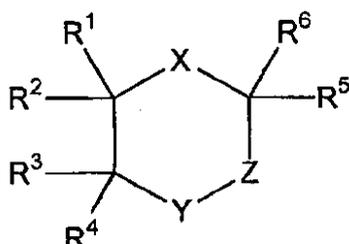
環式の糖置換系モノマー、例えば糖置換系のリガンド結合モノマーは、本明細書では糖置換モノマーサブユニット(SRMS)モノマー化合物とも呼ばれる。好ましい担体は以下に示す一般式(LCM-2)を有する。その構造では、好ましいバックボーン結合点は、R¹またはR²；R³またはR⁴；あるいはYがCR⁹R¹⁰の場合はR⁹およびR¹⁰から選択することができる（2つのバックボーン結合点を生じるために2つの位置（例えばR¹とR⁴、またはR⁴とR⁹）が選ばれる）。好ましい係留結合点には、R⁷；XがCH₂である場合はR⁵またはR⁶が挙げられる。該担体については、鎖に組み込むこ

50

とができる実体として以下に説明する。したがって、当然ながら、該構造はさらに、結合点（例えば R^1 または R^2 ; R^3 または R^4 ; あるいは R^9 または R^{10} (Y が CR^9R^{10} である場合)) のうちの1つ（末端位置の場合）または2つ（内側位置の場合）が、リン酸バックボーンまたは修飾（例えば硫黄を含む）リン酸バックボーンに接続されている状態をも包含する。例えば、上記に命名された R 基のうちの1つが、 CH_2 であって結合の1つが担体に、1つがバックボーンの原子（例えば連結している酸素または中央のリン原子）に接続されているものであってもよい。

【0411】

【化66】



(LCM-2)

10

20

【0412】

(上記式中、

X は $N(CO)R^7$ 、 NR^7 または CH_2 であり；

Y は NR^8 、 O 、 S 、 CR^9R^{10} であり；

Z は $CR^{11}R^{12}$ であるかまたは存在せず；

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^9 および R^{10} の各々は、独立に、 H 、 OR^a または $(CH_2)_nOR^b$ であり、ただし R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^9 および R^{10} のうち少なくとも2つは OR^a または $(CH_2)_nOR^b$ のうち少なくとも1つであり；

R^5 、 R^6 、 R^{11} および R^{12} の各々は、独立に、リガンド、 H 、任意選択で1~3個の R^{13} で置換された $C_1 - C_6$ アルキル、または $C(O)NHR^7$ であるか；あるいは R^5 と R^{11} とが一緒になって、任意選択で R^{14} で置換された $C_3 - C_8$ シクロアルキルをなし；

30

R^7 はリガンドであってもよいし（例えば R は R^d であってもよい）、あるいは R^7 は該担体に間接的に（例えば係留部分を介して）係留されたりガンド、例えば NR^cR^d で置換された $C_1 - C_{20}$ アルキルまたは $NHC(O)R^d$ で置換された $C_1 - C_{20}$ アルキルであってもよく；

R^8 は H または $C_1 - C_6$ アルキルであり；

R^{13} はヒドロキシ、 $C_1 - C_4$ アルコキシ、またはハロゲンであり；

R^{14} は NR^cR^7 であり；

R^{15} は、任意選択でシアノで置換された $C_1 - C_6$ アルキル、または $C_2 - C_6$ アルケニルであり；

40

R^{16} は $C_1 - C_{10}$ アルキルであり；

R^{17} は液相または固相の支持体試薬であり；

L は $C(O)(CH_2)_qC(O)$ 、または $C(O)(CH_2)_qS$ であり；

R^a は保護基、例えば CAr_3 （例えばジメトキシトリチル基）または $Si(X^{5'})$ ($X^{5''}$) ($X^{5'''}(X^{5''''})$) (式中、 $(X^{5'})$ 、 $(X^{5''})$ 、および $(X^{5'''}(X^{5''''}))$ は他所で説明したとおり) であり；

R^b は、 $P(O)(O^-)H$ 、 $P(OR^{15})N(R^{16})_2$ または $L - R^{17}$ であり；

50

R^c は H または $C_1 - C_6$ アルキルであり；

R^d は H または リガンド であり ;

A_r はそれぞれ独立に、任意選択で $C_1 - C_4$ アルコキシで置換された $C_6 - C_{10}$ アリール であり ;

n は 1 - 4 であり ; q は 0 - 4 である。

【 0 4 1 3 】

典型的な担体には、例えば、 X が $N(CO)R^7$ または NR^7 、 Y が CR^9R^{10} 、および Z が存在しないもの ; あるいは X が $N(CO)R^7$ または NR^7 、 Y が CR^9R^{10} 、および Z が $CR^{11}R^{12}$ であるもの ; あるいは X が $N(CO)R^7$ または NR^7 、 Y が NR^8 、および Z が $CR^{11}R^{12}$ であるもの ; あるいは X が $N(CO)R^7$ または NR^7 、 Y が O 、および Z が $CR^{11}R^{12}$ であるもの ; あるいは X が CH_2 ; Y が CR^9R^{10} ; Z が $CR^{11}R^{12}$ 、および R^5 と R^{11} とが一緒になって C_6 シクロアルキルを形成するもの ($H, z = 2$)、あるいはインダン環系、例えば X が CH_2 ; Y が CR^9R^{10} ; Z が $CR^{11}R^{12}$ 、および R^5 と R^{11} とが一緒になって C_5 シクロアルキルを形成するもの ($H, z = 1$) が挙げられる。

10

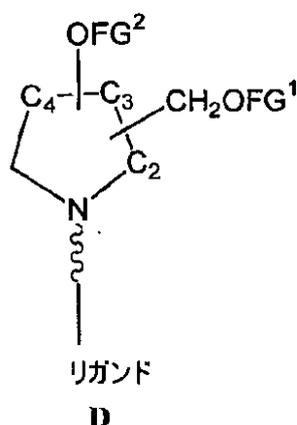
【 0 4 1 4 】

ある実施形態では、担体はピロリン環系または 4-ヒドロキシピロリン環系を基本とするもの、例えば、 X が $N(CO)R^7$ または NR^7 、 Y が CR^9R^{10} 、および Z が存在しないもの (D) であってよい。

【 0 4 1 5 】

【 化 6 7 】

20



30

【 0 4 1 6 】

OFG^1 は、5員環の炭素のうちの1つに接続している第1級炭素、例えば環外のアルキレン基 (例えばメチレン基) に取り付けられることが好ましい (Dにおける CH_2OFG^1)。 OFG^2 は、5員環の炭素のうちの1つに直接取り付けられることが好ましい (Dにおける OFG^2)。ピロリン系の担体については、 CH_2OFG^1 が C_2 に取り付けられ、 OFG^2 が C_3 に取り付けられてもよいし、または CH_2OFG^1 が C_3 に取り付けられ、 OFG^2 が C_4 に取り付けられてもよい。ある実施形態では、 CH_2OFG^1 および OFG^2 で上述の炭素のうち1つがジェミナル置換されてもよい。3-ヒドロキシピロリン系担体については、 CH_2OFG^1 が C_2 に取り付けられ、 OFG^2 が C_4 に取り付けられてよい。従って、ピロリン系および4-ヒドロキシピロリン系のモノマーは、連結 (例えば炭素-炭素結合) であってその特定の連結の周囲で結合回転が制限される (例えば環の存在により制限される) 連結を含む場合がある。よって、 CH_2OFG^1 および OFG^2 は上記の対のいずれにおいても互いにシス位でもトランス位でもよい。従って、すべてのシス/トランス異性体が明らかに含まれる。モノマーは1以上の不斉中心を含む場合もあり、従ってラセミ化合物およびラセミ混合物、単一立体異性体、個々のジアステレオマーおよびジアステレオマー混合物として生じる可能性がある

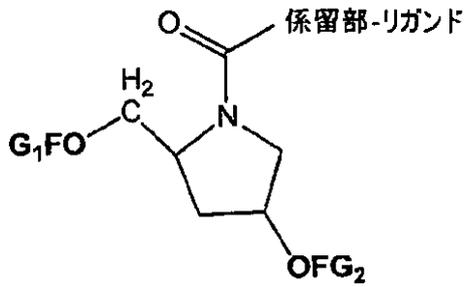
40

50

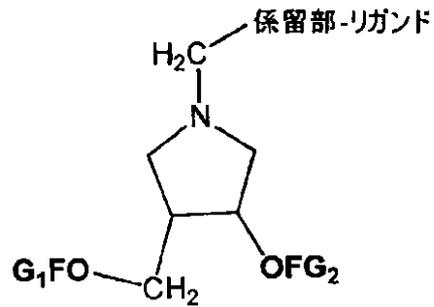
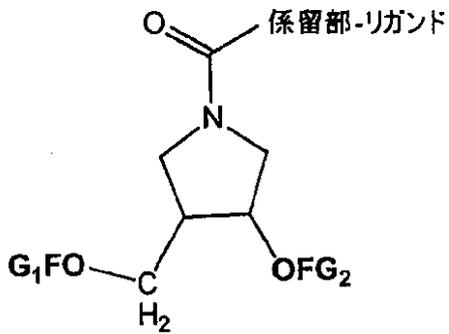
。モノマーのそのような異性体はすべて明らかに含まれる（例えば、 CH_2OFG^1 および OFG^2 を担持する中心が両方とも R 配置であってもよいし；両方とも S 配置であってもよいし；一方の中心が R 配置で他方の中心が S 配置であってもよいし、その逆でもよい）。係留結合点は窒素であることが好ましい。担体 D の好ましい例としては、以下のものが挙げられる。

【0417】

【化68】



10



20

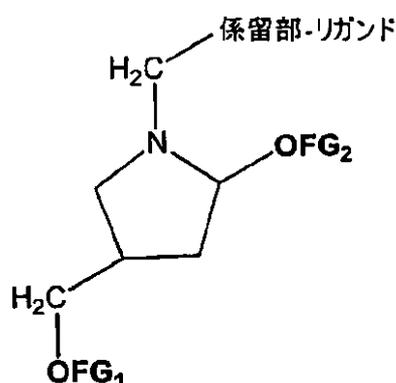
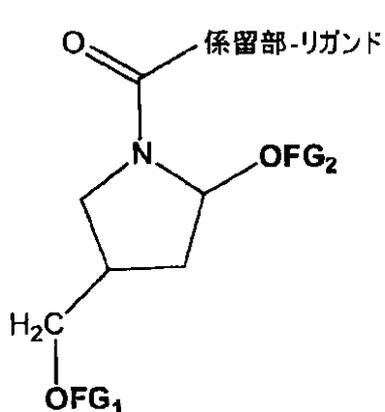
30

【0418】

【化69】



10



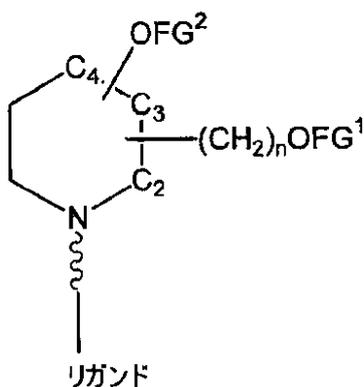
20

【0419】

ある実施形態では、担体はピペリジン環系（E）であってよく、例えば、XがN（CO）R⁷またはNR⁷、YがCR⁹R¹⁰、およびZがCR¹¹R¹²であるものである。

【0420】

【化70】



E

30

40

【0421】

OFG¹は、6員環の炭素のうちの1つに接続している第1級炭素、例えば環外のアルキレン基（例えばメチレン基（n = 1）またはエチレン基（n = 2））に取り付けられることが好ましい[Eにおける (CH₂)_nOFG¹]。OFG²は、6員環の炭素のうちの1つに直接取り付けられることが好ましい(Eにおける OFG²)。(CH₂)_nOFG¹およびOFG²は環上でジェミナル位に配置されうる、すなわち、両方の基が同

50

じ炭素、例えばC₂、C₃、またはC₄に取り付けられる場合がある。別例として、(CH₂)_nOFG¹およびOFG²は環上でビシナル位に配置されうる、すなわち、両方の基が隣接する環炭素原子に取り付けられる場合があり、例えば(CH₂)_nOFG¹がC₂に取り付けられOFG²がC₃に取り付けられてもよいし；(CH₂)_nOFG¹がC₃に取り付けられOFG²がC₂に取り付けられてもよいし；(CH₂)_nOFG¹がC₃に取り付けられOFG²がC₄に取り付けられてもよいし；(CH₂)_nOFG¹がC₄に取り付けられOFG²がC₃に取り付けられてもよい。従って、ペリジジン系のモノマーは、連結（例えば炭素-炭素結合）であってその特定の連結の周囲で結合回転が制限される（例えば環の存在により制限される）連結を含む場合がある。よって、(CH₂)_nOFG¹およびOFG²は上記の対のいずれにおいても互いにシス位でもトランス位でもよい。従って、すべてのシス/トランス異性体が明らかに含まれる。モノマーは1以上の不斉中心を含む場合もあり、従ってラセミ化合物およびラセミ混合物、単一立体異性体、個々のジアステレオマーおよびジアステレオマー混合物として生じる可能性がある。モノマーのそのような異性体はすべて明らかに含まれる（例えば、CH₂OFG¹およびOFG²を担持する中心が両方ともR配置であってもよいし；両方ともS配置であってもよいし；一方の中心がR配置で他方の中心がS配置であってもよいし、その逆でもよい）。係留結合点は窒素であることが好ましい。

10

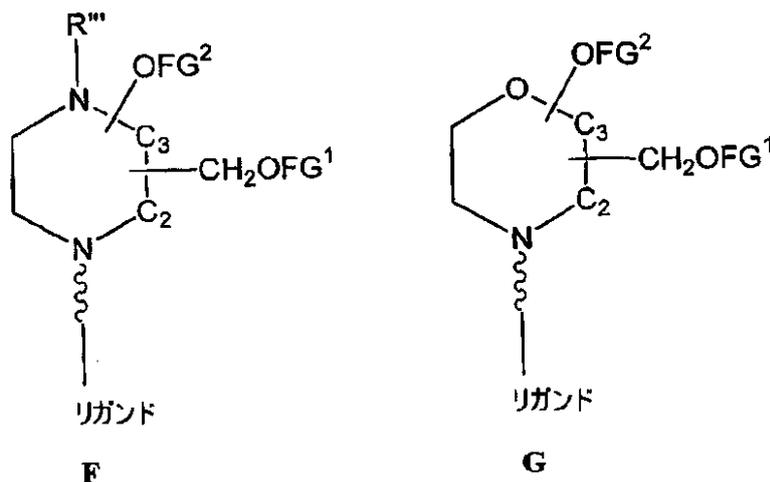
【0422】

ある実施形態では、担体は、ピペラジン環系（F）であって、例えば、XがN(CO)R⁷またはNR⁷、YがNR⁸、およびZがCR^{1 1}R^{1 2}であるものでもよいし、あるいはモルホリン環系（G）であって、例えば、XがN(CO)R⁷またはNR⁷、YがO、およびZがCR^{1 1}R^{1 2}であるものでもよい。

20

【0423】

【化71】



30

【0424】

OFG¹は、6員環の炭素のうちの1つに接続している第1級炭素、例えば環外のアルキレン基（例えばメチレン基）に取り付けられることが好ましい[FまたはGにおけるCH₂OFG¹]。OFG²は、6員環の炭素のうちの1つに直接取り付けられることが好ましい（FまたはGにおけるOFG²）。FおよびGのいずれについても、CH₂OFG¹がC₂に取り付けられ、OFG²がC₃に取り付けられてもよいし、またはその逆でもよい。ある実施形態では、CH₂OFG¹およびOFG²で上述の炭素のうち1つがジェミナル置換されてもよい。従って、ピペラジン系およびモルホリン系のモノマーは、連結（例えば炭素-炭素結合）であってその特定の連結の周囲で結合回転が制限される（例えば環の存在により制限される）連結を含む場合がある。よって、CH₂OFG¹およびOFG²は上記の対のいずれにおいても互いにシス位でもトランス位でもよい。従

40

50

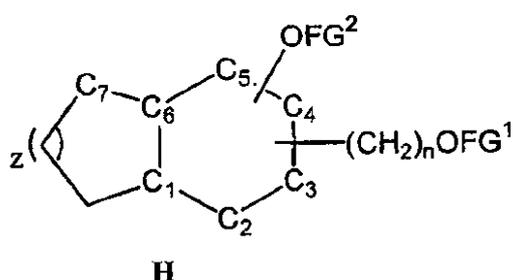
って、すべてのシス/トランス異性体が明らかに含まれる。モノマーは1以上の不斉中心を含む場合もあり、従ってラセミ化合物およびラセミ混合物、単一立体異性体、個々のジアステレオマーおよびジアステレオマー混合物として生じる可能性がある。モノマーのそのような異性体はすべて明らかに含まれる（例えば、 CH_2OFG^1 および OFG^2 を担持する中心が両方ともR配置であってもよいし；両方ともS配置であってもよいし；一方の中心がR配置で他方の中心がS配置であってもよいし、その逆でもよい）。R'は例えば $\text{C}_1 - \text{C}_6$ アルキル、好ましくは CH_3 である。FおよびGのいずれにおいても係留結合点は窒素であることが好ましい。

【0425】

ある実施形態では、担体は、デカリン環系であって、例えば、Xが CH_2 ；Yが CR^9
 R^{10} ；Zが $\text{CR}^{11}\text{R}^{12}$ 、および R^5 と R^{11} とが一緒になって C_6 シクロアルキルを形成するもの（ H 、 $z = 2$ ）であってもよいし、あるいはインダン環系であって、例えば、Xが CH_2 ；Yが CR^9R^{10} ；Zが $\text{CR}^{11}\text{R}^{12}$ 、および R^5 と R^{11} とが一緒になって C_5 シクロアルキルを形成するもの（ H 、 $z = 1$ ）であってもよい。

【0426】

【化72】



【0427】

OFG^1 は、 C_2 、 C_3 、 C_4 、または C_5 のうちの1つに接続している第1級炭素、例えば環外のメチレン基（ $n = 1$ ）またはエチレン基（ $n = 2$ ）に取り付けられることが好ましい〔 H における $(\text{CH}_2)_n\text{OFG}^1$ 〕。 OFG^2 は、 C_2 、 C_3 、 C_4 、または C_5 のうちの1つに直接取り付けられることが好ましい（ H における OFG^2 ）。 $(\text{CH}_2)_n\text{OFG}^1$ および OFG^2 は環上でジェミナル位に配置されうる、すなわち、両方の基が同じ炭素、例えば C_2 、 C_3 、 C_4 、または C_5 に取り付けられる場合がある。別例として、 $(\text{CH}_2)_n\text{OFG}^1$ および OFG^2 は環上でビシナル位に配置されうる、すなわち、両方の基が隣接する環炭素原子に取り付けられる場合があり、例えば $(\text{CH}_2)_n\text{OFG}^1$ が C_2 に取り付けられ OFG^2 が C_3 に取り付けられてもよいし； $(\text{CH}_2)_n\text{OFG}^1$ が C_3 に取り付けられ OFG^2 が C_2 に取り付けられてもよいし； $(\text{CH}_2)_n\text{OFG}^1$ が C_3 に取り付けられ OFG^2 が C_4 に取り付けられてもよいし； $(\text{CH}_2)_n\text{OFG}^1$ が C_4 に取り付けられ OFG^2 が C_3 に取り付けられてもよいし； $(\text{CH}_2)_n\text{OFG}^1$ が C_4 に取り付けられ OFG^2 が C_5 に取り付けられてもよいし； $(\text{CH}_2)_n\text{OFG}^1$ が C_5 に取り付けられ OFG^2 が C_4 に取り付けられてもよい。従って、デカリン系またはインダン系のモノマーは、連結（例えば炭素-炭素結合）であってその特定の連結の周囲で結合回転が制限される（例えば環の存在により制限される）連結を含む場合がある。よって、 $(\text{CH}_2)_n\text{OFG}^1$ および OFG^2 は上記の対のいずれにおいても互いにシス位でもトランス位でもよい。従って、すべてのシス/トランス異性体が明らかに含まれる。モノマーは1以上の不斉中心を含む場合もあり、従ってラセミ化合物およびラセミ混合物、単一立体異性体、個々のジアステレオマーおよびジアステレオマー混合物として生じる可能性がある。モノマーのそのような異性体はすべて明らかに含まれる（例えば、 CH_2OFG^1 および OFG^2 を担持する中心が両方ともR配置であってもよいし；両方ともS配置であってもよいし；一方の中心がR配置で他方の中心がS配置であってもよいし、その

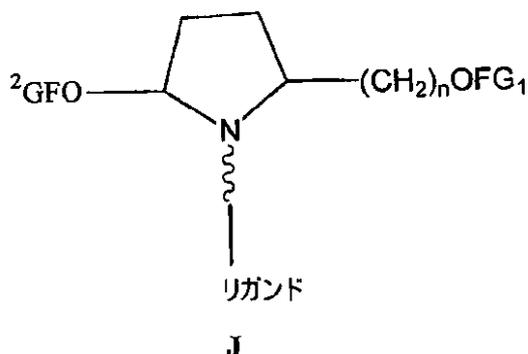
逆でもよい)。好ましい実施形態では、C 1 および C 6 の置換基は互いにトランス位にある。係留結合点は C 6 または C 7 であることが好ましい。

【0428】

別の担体には、3 ヒドロキシプロリン系のものが挙げられる (J)。

【0429】

【化73】



10

【0430】

上述のように、 $(\text{CH}_2)_n\text{OFG}^1$ および OFG^2 は互いにシス位でもトランス位でもよい。従って、すべてのシス/トランス異性体が明らかに含まれる。モノマーは1以上の不斉中心を含む場合もあり、従ってラセミ化合物およびラセミ混合物、単一立体異性体、個々のジアステレオマーおよびジアステレオマー混合物として生じる可能性がある。モノマーのそのような異性体はすべて明らかに含まれる (例えば、 CH_2OFG^1 および OFG^2 を担持する中心が両方とも R 配置であってもよいし; 両方とも S 配置であってもよいし; 一方の中心が R 配置で他方の中心が S 配置であってもよいし、その逆でもよい)。係留結合点は窒素であることが好ましい。

20

【0431】

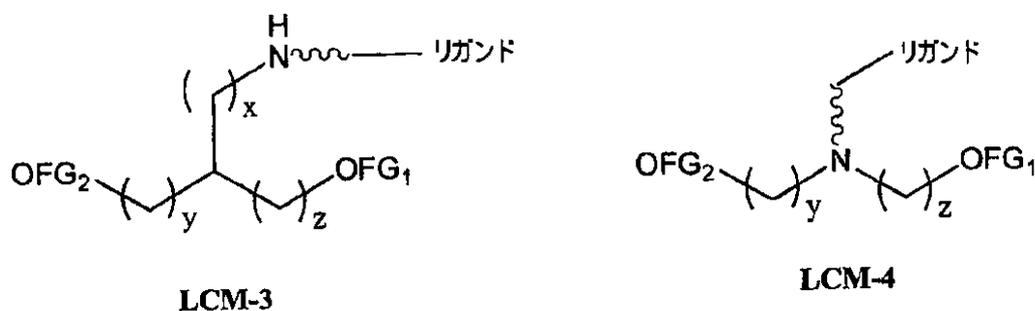
糖置換系モノマー (非環式)

非環式の糖置換系モノマー、例えば糖置換系のリガンド結合モノマーは、本明細書では糖置換モノマーサブユニット (SRMS) モノマー化合物とも呼ばれる。好ましい非環式担体は以下に示す式 LCM-3 または LCM-4 を有する。

30

【0432】

【化74】



40

【0433】

一部の実施形態では、 x 、 y 、および z の各々は、互いに独立に 0、1、2、または 3 であってもよい。式 LCM-3 において、 y および z が異なるとき、第 3 級炭素は R 配置または S 配置のいずれかを有する。好ましい実施形態では、式 LCM-3 において x がゼロで y および z が各々 1 であり (例えば、セリノール系)、式 LCM-3 において y および z が各々 1 である。式 LCM-3 または LCM-4 はそれぞれ任意選択で、例えばヒドロキシ、アルコキシ、ペルハロアルキルによって、置換されていてもよい。

50

【0434】

係留部

ある実施形態では、構成部分、例えば、リガンドは、介在する係留部を仲介として担体に間接的に接続される場合がある。係留部は担体の係留結合点(TAP)に接続され、任意のC₁-C₁₀₀炭素含有部分(例えばC₁-C₇₅、C₁-C₅₀、C₁-C₂₀、C₁-C₁₀; C₁、C₂、C₃、C₄、C₅、C₆、C₇、C₈、C₉またはC₁₀)であって好ましくは少なくとも1つの窒素原子を有するものを挙げる事ができる。好ましい実施形態では、窒素原子は、係留部上の末端のアミノ基もしくはアミド(NHC(O)-)基の一部を形成し、該基はリガンド用の接続点として役立つ場合がある。好ましい係留部(下線部)には、TAP-(CH₂)_nNH-; TAP-C(O)(CH₂)_nNH-; TAP-NR''''(CH₂)_nNH-; TAP-C(O)-(CH₂)_n-C(O)-; TAP-C(O)(CH₂)_n-C(O)O-; TAP-C(O)-O-; TAP-C(O)-(CH₂)_n-NH-C(O)-; TAP-C(O)-(CH₂)_n-; TAP-C(O)-NH-; TAP-C(O)-; TAP-(CH₂)_n-C(O)-; TAP-(CH₂)_n-C(O)O-; TAP-(CH₂)_n-; または TAP-(CH₂)_n-NH-C(O)- (式中、nは1~20(例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19もしくは20)であり、R''''はC₁-C₆アルキルである)がある。好ましくは、nは5、6、または11である。他の実施形態では、窒素は、末端のオキシアミノ基(例えば-OH₂)、またはヒドラジノ基(-NHNH₂)の一部を形成しうる。係留部は、任意選択で例えばヒドロキシ、アルコキシ、ペルハロアルキルで置換されているか、または1以上の追加のヘテロ原子(例えばN、O、またはS)が任意選択で挿入されているかのうち少なくともいずれかであってよい。好ましい係留リガンドには、例えば TAP-(CH₂)_nNH (リガンド); TAP-C(O)(CH₂)_nNH (リガンド); TAP-NR''''(CH₂)_nNH (リガンド); TAP-(CH₂)_nONH (リガンド); TAP-C(O)(CH₂)_nONH (リガンド); TAP-NR''''(CH₂)_nONH (リガンド); TAP-(CH₂)_nNHNH₂ (リガンド)、TAP-C(O)(CH₂)_nNHNH₂ (リガンド); TAP-NR''''(CH₂)_nNHNH₂ (リガンド); TAP-C(O)(CH₂)_n-C(O) (リガンド); TAP-C(O)-(CH₂)_nC(O)O (リガンド); TAP-C(O)-O (リガンド); TAP-C(O)-(CH₂)_n-NH-C(O) (リガンド); TAP-C(O)-(CH₂)_n (リガンド); TAP-C(O)-NH (リガンド); TAP-C(O) (リガンド); TAP-(CH₂)_n-C(O) (リガンド); TAP-(CH₂)_n-C(O)O (リガンド); TAP-(CH₂)_n (リガンド); または TAP-(CH₂)_n-NH-C(O) (リガンド) がある。いくつかの実施形態では、アミノ末端を有する係留部(例えばNH₂、ONH₂、NH₂NH₂)は、リガンドとともにイミノ結合(すなわちC=N)を形成することができる。いくつかの実施形態では、アミノ末端を有する係留部(例えばNH₂、ONH₂、NH₂NH₂)は、例えば、C(O)CF₃でアシル化されていてもよい。

10

20

30

【0435】

いくつかの実施形態では、係留部は、メルカプト基(すなわちSH)またはオレフィン(例えばCH=CH₂)を末端としていてもよい。例えば、係留部は、TAP-(CH₂)_n-SH、TAP-C(O)(CH₂)_nSH、TAP-(CH₂)_n-(CH=CH₂)、または TAP-C(O)(CH₂)_n-(CH=CH₂) (式中、nは別途記載のとおりである)であってよい。ある実施形態では、オレフィンはディールスアルダー反応のジエンまたはジエノフィルであってよい。係留部は、任意選択で例えばヒドロキシ、アルコキシ、ペルハロアルキルで置換されているか、または1以上の追加のヘテロ原子(例えばN、O、またはS)が任意選択で挿入されているかのうち少なくともいずれかであってよい。二重結合は、シス型でもトランス型でもよいし、E型でもZ型でもよい。

40

【0436】

他の実施形態では、係留部は(好ましくは係留部の末端位置に)求電子部分を含みうる

50

。好ましい求電子部分には、例えばアルデヒド、ハロゲン化アルキル、メシレート、トシレート、ノシレート、もしくはプロシレート、または活性カルボン酸エステル（例えばNHSEステルまたはペンタフルオロフェニルエステル）が挙げられる。好ましい係留部（下線部）には、 $\underline{TAP - (CH_2)_n CHO}$ ； $\underline{TAP - C(O)(CH_2)_n CHO}$ ；または $\underline{TAP - NR''(CH_2)_n CHO}$ （式中、 n は1 - 6であり、 R'' は $C_1 - C_6$ アルキルである）；あるいは $\underline{TAP - (CH_2)_n C(O)ONHS}$ ； $\underline{TAP - C(O)(CH_2)_n C(O)ONHS}$ ；または $\underline{TAP - NR''(CH_2)_n C(O)ONHS}$ （式中、 n は1 - 6であり、 R'' は $C_1 - C_6$ アルキルである）； $\underline{TAP - (CH_2)_n C(O)OC_6F_5}$ ； $\underline{TAP - C(O)(CH_2)_n C(O)OC_6F_5}$ ；または $\underline{TAP - NR''(CH_2)_n C(O)OC_6F_5}$ （式中、 n は1 - 11であり、 R'' は $C_1 - C_6$ アルキルである）；あるいは、 $\underline{-(CH_2)_n CH_2 LG}$ ； $\underline{TAP - C(O)(CH_2)_n CH_2 LG}$ ；または $\underline{TAP - NR''(CH_2)_n CH_2 LG}$ （式中、 n は別途記載のとおりであり、 R'' は $C_1 - C_6$ アルキルである）（LGは脱離基、例えばハロゲン化物、メシレート、トシレート、ノシレート、プロシレートでよい）がある。係留は、リガンドの求核基（例えばチオール基またはアミノ基）を係留部の求電子基とカップリングすることにより行うことができる。

10

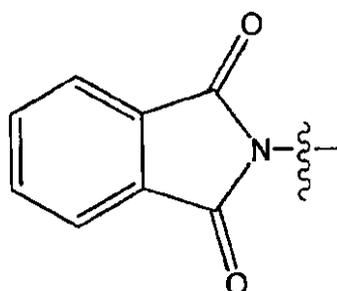
【0437】

他の実施形態では、該リガンド結合モノマーまたはあるリガンド結合モノマーが係留部の末端位置にフタルイミド基（K）を含むことが望ましい。

20

【0438】

【化75】



K

30

【0439】

他の実施形態では、その他の保護されたアミノ基、例えばアロック、モノメトキシトリチル（MMT）、トリフルオロアセチル、Fmoc、アリールスルホニル（例えば、アリール基を含む部分がオルト、ニトロフェニルまたはオルト、パラジニトロフェニルであってよい）が係留部の末端位置にあってもよい。

【0440】

本明細書に記載の係留部のうち任意のものが、1以上の追加の連結基、例えば、 $-O - (CH_2)_n -$ 、 $-(CH_2)_n - SS -$ 、 $-(CH_2)_n -$ 、または $-(CH=CH) -$ をさらに含む。

40

【0441】

非対称的な修飾

RNA、例えばiRNA剤は、本明細書中に記載するように、かつ2004年3月8日付けで出願された国際特許出願第PCT/US04/07070号（参照により本願に援用される）に記載されるように、非対称的に修飾することができる。

【0442】

非対称的に修飾されたiRNA剤とは、ある鎖が他方の鎖上に存在しない修飾を有しているiRNA剤である。非対称的な修飾とは、一方の鎖上に見られるが、他方の鎖上には見られない修飾である。任意の修飾、例えば本明細書中に記載する任意の修飾は、非対称的な修飾として存在し得る。非対称的な修飾により、修飾に伴う望ましい特性のうち任意

50

のもの、例えば本明細書中で論述した特性を付与することができる。例えば、非対称的な修飾は、分解に対する耐性、半減期の変更をもたらすこともできるし、iRNA剤を特定の標的（例えば、特定の組織）に対して標的設定することもできるし、鎖の相補体又は標的配列に対する該鎖の親和性を調節（例えば、増大又は低減）することもできるし、あるいは末端部分の修飾（例えば、キナーゼ又はRISC機構の経路に關与する他の酵素による修飾）を妨害又は促進することもできる。ある修飾について1つの特性を有するものとして指定しても、該修飾が他の特性を有していないことを意味するわけではない（例えば、安定化を促進する修飾として言及される修飾が、標的設定を増強することもありうる）。

【0443】

理論又はいかなる特定の機構モデルによっても拘束されることは望まないが、非対称的な修飾により、iRNA剤をセンス鎖及びアンチセンス鎖の異なる機能すなわち「非対称的な」機能という観点で最適化させることが可能であると考えられる。例えば、両方の鎖がヌクレアーゼ耐性を増大するように修飾されてもよいが、変更によってはRISC活性を阻害しうるものがあるため、そのような変更はセンス鎖に關して選択することができる。さらに、一部の修飾、例えば標的設定部分は、例えばRISC複合体の切断活性を妨害しうる大きな嵩高い基を付加する可能性があるため、そのような修飾はセンス鎖に配置されることが好ましい。したがって、標的設定部分、特に嵩高い標的設定部分（例えば、コレステロール）は、センス鎖に優先的に付加される。一実施形態では、バックボーンのリン酸をSで置換する非対称的修飾、例えばホスホロチオエート修飾がアンチセンス鎖に存在し、かつ2'修飾、例えば2'OMeがセンス鎖に存在する。標的設定部分は、iRNA剤のセンス鎖の5'又は3'末端のいずれか（又は両方）に存在し得る。好ましい例では、アンチセンス鎖においてはバックボーンのPがSで置き換えられ、2'OMeがセンス鎖に存在し、標的設定部分がiRNA剤のセンス鎖の5'又は3'末端のいずれかに付加される。

【0444】

好ましい実施形態では、非対称的に修飾されたiRNA剤は、アンチセンス鎖上では見られない修飾をセンス鎖上に有し、アンチセンス鎖は、センス鎖上では見られない修飾を有する。

【0445】

鎖はそれぞれ、1以上の非対称的修飾を包含し得る。例を挙げると、一方の鎖がiRNA剤に第1の特性を付与する第1の非対称的修飾を包含し、他方の鎖がiRNA剤に第2の特性を付与する第2の非対称的修飾を有することができる。例えば、一方の鎖、例えばセンス鎖がiRNA剤の標的をある組織に対して設定する修飾を有し、他方の鎖、例えばアンチセンス鎖が標的遺伝子配列とのハイブリダイゼーションを促進する修飾を有することができる。

【0446】

一部の実施形態では、両方の鎖が同じ特性を最適化するように、例えば核酸分解に対する耐性を増大させるように両鎖を修飾することができるが、例えば該修飾がさらに他の特性に対して影響を及ぼすという理由から、センス鎖及びアンチセンス鎖に關して異なる修飾が選ばれる。例えば、ある種の変更はRISC活性に影響を及ぼし得るため、そのような修飾はセンス鎖について選ばれる。

【0447】

ある実施形態では、一方の鎖が非対称的な2'修飾、例えば2'OMe修飾を有し、他方の鎖がリン酸バックボーンの非対称的修飾、例えばホスホロチオエート修飾を有する。したがって、一実施形態では、アンチセンス鎖が非対称的な2'OMe修飾を有し、センス鎖が非対称的なホスホロチオエート修飾を有する（あるいは、その逆でもよい）。特に好ましい実施形態では、iRNA剤は、センス鎖上に非対称的な2'-Oアルキル（好ましくは2'-OMe）修飾を、アンチセンス鎖には非対称的なバックボーンのP修飾（好ましくはホスホロチオエート修飾）を有することになる。1つまたは複数の2'-OMe

10

20

30

40

50

修飾が存在することができ、例えば、センス鎖の少なくとも2個、3個、4個、5個又は6個のサブユニットを2'-OMe修飾することができる。1つまたは複数のホスホロチオエート修飾が存在することができ、例えば、アンチセンス鎖の少なくとも2個、3個、4個、5個又は6個のサブユニットをホスホロチオエート修飾することができる。センス鎖上に複数の2'-OMe修飾及びアンチセンス鎖上に複数のホスホロチオエート修飾が存在するiRNA剤を有することが好ましい。一方又は両方の鎖上のすべてのサブユニットを前記のように修飾することもできる。両方の鎖における複数の非対称的修飾の特に好ましい実施形態は、長さが約20~21サブユニット、好ましくは19サブユニットの二本鎖領域、及び長さが約2サブユニットの1個又は2個の3'突出部を有する。

【0448】

非対称的な修飾は、ヌクレアーゼ、例えばエンドヌクレアーゼによる分解に対する耐性を促進するのに有用である。iRNA剤は、分解に対する耐性を促進する1以上の非対称的修飾を包含することができる。好ましい実施形態では、アンチセンス鎖上の修飾は、標的のサイレンシングを妨害しない修飾、例えば標的の切断を妨害しない修飾である。鎖上の、すべてではないにしてもほとんどの部位が、エンドヌクレアーゼによる分解に対してある程度不安定である。相対的に不安定な部位を特定し、分解を阻害する非対称的修飾を挿入することができる。多くの場合、iRNA剤においてUA部位の非対称的修飾を提供することが望ましく、場合によっては、両方の鎖上のUA配列に非対称的修飾を提供することが好ましい。エンドヌクレアーゼによる分解を阻害する修飾の例は、本明細書中に見出すことができる。特に好適な修飾としては、2'位修飾（例えば特にセンス鎖上のUへの2'OMe部分の付与）、バックボーンの修飾（例えば、特にアンチセンス鎖上のU若しくはA又はその両方についてリン酸バックボーンのOをSで置き換えること（例えば、ホスホロチオエート修飾の提供）による修飾）、UをC5アミノリンカーで置き換えること、AをGで置き換えること（配列の変更は、センス鎖上に位置し、アンチセンス鎖上には位置しないことが好ましい）、及び2'、6'、7'又は8'位の修飾が挙げられる。好ましい実施形態は、1以上のこれらの修飾がセンス鎖上に存在するが、アンチセンス鎖上には存在しない実施形態、あるいはアンチセンス鎖のほうがこのような修飾の数が少ない実施形態である。

【0449】

非対称的な修飾は、エキソヌクレアーゼによる分解を阻害するために使用することができる。非対称的な修飾としては、一方の鎖のみが修飾されるもの、ならびに両方が修飾されるものを挙げることができる。好ましい実施形態では、アンチセンス鎖上の修飾は、標的のサイレンシングを妨害しない修飾、例えば標的の切断を妨害しない修飾である。一部の実施形態は、センス鎖上、例えば3'突出部の例えば3'末端と、アンチセンス鎖上、例えば3'突出部の例えば3'末端に、非対称的修飾を有することになる。これらの修飾により異なる大きさの構成部分が導入される場合、大きいほうがセンス鎖上に存在することが好ましい。修飾により異なる電荷の構成部分が導入される場合、より大きな電荷を有する部分がセンス鎖上に存在することが好ましい。

【0450】

エキソヌクレアーゼによる分解を阻害する修飾の例は、本明細書中に見出すことができる。特に好適な修飾としては、2'位修飾（例えば3'突出部の例えば3'末端への2'OMe部分の提供（3'末端とは、文脈により示されるように、分子の3'位の原子または最も3'側の構成部分、例えば最も3'側のP又は2'位を意味する））；バックボーンの修飾、例えばPをSで置き換えることによる修飾（例えば、ホスホロチオエート修飾の提供）もしくは3'突出部の例えば3'末端にメチル化Pを使用することによる修飾；2'位修飾（例えば、2'OMe部分の提供）と、バックボーンの修飾（例えばPをSで置き換えること（例えば、ホスホロチオエート修飾の提供）もしくは3'突出部の例えば3'末端におけるメチル化Pの使用）との組合せ；3'アルキルによる修飾；3'突出部の例えば3'末端における脱塩基ピロリジンによる修飾；ナプロキセン、イブプロフェン又はその他の分解を阻害する構成部分による3'末端の修飾が挙げられる。好ましい実施

10

20

30

40

50

形態は、1以上のこれらの修飾がセンス鎖上に存在するが、アンチセンス鎖上には存在しないもの、あるいはアンチセンス鎖のほうがこのような修飾の数が少ない実施形態である。

【0451】

標的設定に影響を及ぼす修飾、例えば本明細書中に記載の修飾を、非対称的修飾として提供することが可能である。例えば標的の切断を阻害することによりサイレンシングを阻害する可能性のある標的設定修飾は、センス鎖の非対称的修飾として提供され得る。体内分布を変化させる構成部分（例えばコレステロール）は、センス鎖における1以上（例えば、2つ）の非対称的修飾として提供され得る。比較的大きな分子量（例えば400、500又は1,000ダルトンを上回る分子量）を有する構成部分を導入する標的設定修飾、あるいは電荷を有する構成部分（例えば、2以上の正電荷又は1つの負電荷を有する構成部分）を導入する標的設定修飾は、センス鎖上に配置することができる。

10

【0452】

鎖の相補体又は標的に対する該鎖の親和性を調節する（例えば、増大又は低下させる）修飾、例えば本明細書中に記載の修飾は、非対称的修飾として提供され得る。これらの修飾としては、5メチルU、5メチルC、プソイドウリジン、ロックされた核酸、2チオU及び2-アミノ-Aが挙げられる。一部の実施形態では、これらのうち1つ以上がアンチセンス鎖上に提供される。

【0453】

iRNA剤は、センス鎖及びアンチセンス鎖を有する規定構造を有し、多くの場合、例えば2または3ヌクレオチドの短い一本鎖の突出部が一方又は両方の3'末端に存在する。非対称的な修飾を使用して、例えばiRNA内に選択的に配置することにより、このような構造体の活性を最適化することができる。例えば、センス鎖の5'末端及びアンチセンス鎖の3'末端により規定されるiRNA剤の末端領域は、機能上重要である。この領域には、末端の2、3または4対のヌクレオチド対と任意の3'突出部とが含まれる。好ましい実施形態では、以下の修飾、すなわち、センス鎖のキナーゼ活性化を阻害するセンス鎖5'末端の修飾（例えば、該分子を標的設定する結合体を取り付けること、又は5'エキソヌクレアーゼによる分解に対して保護的に作用する修飾の使用など）；あるいはいずれか一方の鎖（好ましくはセンス鎖）の修飾であってセンス鎖とアンチセンス鎖との間の結合を増強することにより分子のこの末端の「緊密な」構造をより緊密にする修飾、のうち1以上を生じる非対称的修飾が使用される。

20

30

【0454】

センス鎖の3'末端及びアンチセンス鎖の5'末端により規定されるiRNA剤の末端領域もまた機能にとって重要である。この領域には、末端の2、3または4対のヌクレオチド対と任意の3'突出部とが含まれる。好ましい実施形態は、いずれか一方の鎖、好ましくはセンス鎖に、センス鎖とアンチセンス鎖との間の結合を弱めることにより分子のこの末端の「開放的な」構造をより開放的にする非対称的修飾を包含する。このような修飾としては、該分子を標的設定する結合体を配置すること、あるいはこの領域におけるセンス鎖のヌクレアーゼ耐性を促進する修飾が挙げられる。キナーゼ活性化を阻害するアンチセンス鎖の修飾は、好ましい実施形態では回避される。

40

【0455】

センス鎖に非対称的に配置される例示的な修飾としては、以下のものが挙げられる。

(a) バックボーン修飾（例えば、バックボーンのPの修飾）であって、PをSで置き換えること、またはアルキルもしくはアリル（例えば、Me）で置換されたP、及びジチオエート（S-P=S）を含むもの；これらの修飾は、ヌクレアーゼ耐性を促進するのに使用することができる；

(b) 2'-Oアルキル（例えば、2'-OMe）、3'-Oアルキル（例えば、3'-OMe）（末端及び内側位置の少なくともいずれかを修飾）；これらの修飾は、ヌクレアーゼ耐性を促進するため、又はアンチセンス鎖へのセンス鎖の結合を増強するために使用することができ、3'位修飾は、RISCによるセンス鎖活性化を回避するためにセン

50

ス鎖の 5' 末端で使用することができる；

(c) 2' - 5' 結合 (2' - H、2' - OH 及び 2' - OMe によるもの、及び P = O 又は P = S によるもの)；これらの修飾は、ヌクレアーゼ耐性を促進するため、又はアンチセンス鎖へのセンス鎖の結合を阻害するために使用することもできるし、あるいは RISC によるセンス鎖活性化を回避するためにセンス鎖の 5' 末端で使用することもできる；

(d) L 糖 (例えば、2' - H、2' - OH 及び 2' - OMe を有する L - リボース、L - アラビノース)；これらの修飾は、ヌクレアーゼ耐性を促進するため、又はアンチセンス鎖へのセンス鎖の結合を阻害するために使用することもできるし、あるいは RISC によるセンス鎖活性化を回避するためにセンス鎖の 5' 末端で使用することもできる；

10

(e) 修飾糖 (例えば、ロックされた核酸 (LNA)、ヘキソース核酸 (HNA) 及びシクロヘキセン核酸 (CeNA))；これらの修飾は、ヌクレアーゼ耐性を促進するため、又はアンチセンス鎖へのセンス鎖の結合を阻害するために使用することもできるし、あるいは RISC によるセンス鎖活性化を回避するためにセンス鎖の 5' 末端で使用することもできる；

(f) 核酸塩基修飾 (例えば、C - 5 修飾ピリミジン、N - 2 修飾プリン、N - 7 修飾プリン、N - 6 修飾プリン)；これらの修飾は、ヌクレアーゼ耐性を促進するために、又はアンチセンス鎖へのセンス鎖の結合を増強するために使用することができる；

(g) カチオン基及び双性イオン基 (末端にあることが好ましい)；これらの修飾は、ヌクレアーゼ耐性を促進するために使用することができる；

20

(h) 結合体基 (末端位置にあることが好ましい)、例えば、ナプロキセン、ピオチン、コレステロール、イブプロフェン、葉酸、ペプチド及び糖質；これらの修飾は、ヌクレアーゼ耐性を促進するため、又は分子を標的設定するために使用することもできるし、あるいは RISC によるセンス鎖活性化を回避するためにセンス鎖の 5' 末端で使用することもできる。

【0456】

アンチセンス鎖に非対称的に配置される例示的な修飾としては、以下のものが挙げられる；

(a) バックボーン修飾 (例えば、バックボーンの P の修飾) であって、P を S で置き換えること、又はアルキルもしくはアリル (例えば、Me) で置換された P、及びジチオエート (S - P = S) を含むもの；

30

(b) 2' - Oアルキル (例えば、2' - OMe) (末端位置を修飾)；

(c) 2' - 5' 結合 (2' - H、2' - OH 及び 2' - OMe によるもの)、例えば 3' 末端での末端修飾；例えば P = O 又は P = S による好ましくは 3' 末端の修飾；これらの修飾は、キナーゼ活性のような RISC 酵素活性を妨害し得るため、5' 末端領域からは排除されることが好ましい；

(d) L 糖 (例えば、2' - H、2' - OH 及び 2' - OMe を有する L - リボース、L - アラビノース)；例えば、3' 末端での末端修飾；例えば P = O 又は P = S による好ましくは 3' 末端の修飾；これらの修飾は、キナーゼ活性を妨害し得るため、5' 末端領域から排除されることが好ましい；

40

(e) 修飾糖 (例えば、LNA、HNA 及び CeNA)；これらの修飾は、センス鎖とアンチセンス鎖との間の対合の望ましくない増強に寄与し得るが、多くの場合は 5' 領域において「緩い」構造を有することが好ましいので、さらに該修飾はキナーゼ活性を妨害し得るので、5' 末端領域からは排除されることが好ましい；

(f) 核酸塩基修飾 (例えば、C - 5 修飾ピリミジン、N - 2 修飾プリン、N - 7 修飾プリン、N - 6 修飾プリン)；

(g) カチオン基及び双性イオン基 (末端にあることが好ましい)；

核酸塩基修飾としての、糖の 2' 位、糖の 3' 位にあるカチオン基及び双性イオン基 (例えば、C - 5 修飾ピリミジン、N - 2 修飾プリン、N - 7 修飾プリン、N - 6 修飾プリン)；

50

結合体基（末端位置にあることが好ましい）、例えば、ナプロキセン、ビオチン、コレステロール、イブプロフェン、葉酸、ペプチド及び糖質であるが、但し、嵩高い基又は概してRISC活性を阻害する基はあまり好ましくないはずである。

【0457】

アンチセンス鎖の5'-OHは、活性を促進するように遊離型に保たれるべきである。幾つかの好ましい実施形態では、ヌクレアーゼ耐性を促進する修飾は、3'末端、特に3'突出部に包含されるべきである。

【0458】

別の態様では、本発明は、iRNA剤を最適化する方法、例えば安定化する方法を特徴とする。該方法は、活性を有する配列を選択すること、該配列に1つ又はそれ以上の非対称的な修飾を導入することを包含し、非対称的な修飾の導入によりiRNA剤の特性が最適化されるが、活性の減少はもたらされない。

10

【0459】

活性の減少とは、予め選択されたレベルの減少よりも小さい減少とすることができる。好ましい実施形態では、活性の減少とは、修飾が導入されないこと以外は同じiRNAと比較した場合に、5%、10%、20%、40%又は50%未満の減少であることを意味する。活性は、例えば、*in vivo*又は*in vitro*で計測することができ、いずれにおける結果も、所要の活性維持を実証するのに十分である。

【0460】

最適化される特性は、本明細書中に記載する任意の特性、特に本明細書中の非対称的な修飾に関するセクションで論じる特性であり得る。修飾は、任意の非対称的な修飾、例えば、本明細書中の非対称的な修飾に関するセクションに記載の非対称的な修飾であり得る。特に好ましい非対称的な修飾は、特にセンス配列における2'-Oアルキル修飾（例えば2'-OMe修飾）、及びアンチセンス鎖におけるバックボーンのOの修飾、特にホスホロチオエート修飾である。

20

【0461】

好ましい実施形態では、センス配列が選択されて非対称的な修飾が付与される一方で、他の実施形態ではアンチセンス配列が選択されて非対称的な修飾が付与される。幾つかの実施形態では、センス配列及びアンチセンス配列がともに選択され、それぞれ1つ又はそれ以上の非対称的な修飾が付与される。

30

【0462】

多数の非対称的な修飾が、センス配列及びアンチセンス配列の一方又は両方に導入され得る。配列は、少なくとも2個、4個、6個、8個又はそれ以上の修飾を有することができ、配列のすべてのモノマー又はほぼすべてのモノマーを修飾することもできる。

【0463】

末端における二重鎖の安定性についての差別的修飾

一態様では、本発明は、末端における二本鎖の安定性についての差別的修飾（DMTDS）を有することができるiRNA剤を特徴とする。

【0464】

さらに、本発明は、DMTDS及び本明細書中に記載の別の要素を有するiRNA剤を包含する。例えば、本発明は、本明細書中に記載のiRNA剤、例えば、パリンドローム構造のiRNA剤、非標準的な対合を有するiRNA剤、本明細書中に記載の遺伝子（例えば、*htt*遺伝子）を標的とするiRNA剤、本明細書中に記載のアーキテクチャ又は構造を有するiRNA剤、本明細書中に記載の両親媒性送達物質と結合されたiRNA、本明細書中に記載の薬物送達モジュールと結合されたiRNA、本明細書中に記載するように投与されるiRNA剤、又は本明細書中に記載するように製剤化されるiRNA剤であって、DMTDSも取り入れたiRNA剤を包含する。

40

【0465】

iRNA剤は、アンチセンス鎖二重鎖の5'末端の領域において、該二重鎖が解離又は融解する傾向を増大させること（二重鎖の会合の自由エネルギーを減少させること）によ

50

り最適化することができる。このことは、例えば、アンチセンス鎖の5'末端の領域に、二重鎖が解離又は融解する傾向を増大させるサブユニットを含めることにより達成することができる。また、5'末端の領域に、二重鎖が解離又は融解する傾向を増大させるリガンドを取り付けることにより達成することもできる。理論により拘束されることは望まないが、その効果は、ヘリカーゼのような酵素の作用を促進すること、例えばアンチセンス鎖の5'末端に近接した酵素の作用を促進することに起因し得る。

【0466】

本発明者等はまた、アンチセンス鎖二重鎖の3'末端の領域において、該二重鎖が解離又は融解する傾向を減少させること（二重鎖の会合の自由エネルギーを増大させること）により最適化することができることも発見した。このことは、例えばアンチセンス鎖の3'末端の領域に、二重鎖が解離又は融解する傾向を減少させるサブユニットを含めることにより達成することができる。また、5'末端の領域に、二重鎖が解離又は融解する傾向を減少させるリガンドを取り付けることにより達成することもできる。

10

【0467】

二重鎖の5'末端が解離する傾向を増大させる修飾は、単独で、あるいは本明細書中に記載の他の修飾と、例えば二重鎖の3'末端が解離する傾向を減少させる修飾と組み合わせて使用することができる。同様に、二重鎖の3'末端が解離する傾向を減少させる修飾は、単独で、あるいは本明細書中に記載の他の修飾と、例えば二重鎖の5'末端が解離する傾向を増大させる修飾と組み合わせて使用することができる。

20

【0468】

二重鎖のAS 5'末端の安定性の減少

サブユニット対は、解離又は融解を促進する傾向に基づいて順位付けすることができる（例えば、特定の対の会合又は解離の自由エネルギーに関して、最も簡単なアプローチは、個々の対ごとに対を検査することであるが、次の同類又は同様の分析もまた使用することができる）。解離を促進するという観点では、

A : Uは、G : Cよりも好ましく、

G : Uは、G : Cよりも好ましく、

I : Cは、G : Cよりも好ましく（I = イノシン）；

ミスマッチ、例えば非標準的な対合すなわち標準的対合以外の対合（本明細書中の他の箇所に記載するようなもの）は、標準的な対合（A : T、A : U、G : C）よりも好ましく；

30

ユニバーサル塩基を含む対合は、標準的な対合よりも好ましい。

【0469】

典型的なds iRNA剤は、以下の通りに図示することができる：

S 5' R₁ N₁ N₂ N₃ N₄ N₅ [N] N₋₅ N₋₄ N₋₃ N₋₂ N₋₁ R₂ 3'

AS 3' R₃ N₁ N₂ N₃ N₄ N₅ [N] N₋₅ N₋₄ N₋₃ N₋₂ N₋₁ R₄ 5'

S : AS P₁ P₂ P₃ P₄ P₅ [N] P₋₅ P₋₄ P₋₃ P₋₂ P₋₁ 5'

Sはセンス鎖を示し、ASはアンチセンス鎖を示し、R₁は任意選択の（かつ好ましくない）5'センス鎖突出部を示し、R₂は任意選択の（しかし、好ましい）3'センス鎖突出部を示し、R₃は任意選択の（しかし、好ましい）3'アンチセンス鎖突出部を示し、R₄は任意選択の（かつ好ましくない）5'アンチセンス鎖突出部を示し、Nはサブユニットを示し、[N]は、さらなるサブユニット対が存在し得ることを示し、P_xは、センス鎖のN_xとアンチセンス鎖のN_xとの対を示す。Pの図では突出部は示していない。一部の実施形態では、本明細書中の他の箇所に記載するように、3'AS突出部は領域Zに相当し、二重鎖領域は領域Xに相当し、3'S鎖突出部は領域Yに相当する。（図は、最大又は最小の長さを暗に示すことを意味するものではない。長さに関する案内は、本明細書中の他の箇所に提供されている）。

40

【0470】

50

二重鎖を形成する傾向を減少させる対合が、二重鎖の A S 鎖 5' 末端の 1 箇所以上の位置において使用されることが好ましい。末端の対 (A S 鎖に関して最も 5' 側の対) を P_{-1} とし、それに続く二重鎖内の対合の位置 (A S 鎖から見ると 3' 方向に向かっていく) は、 P_{-2} 、 P_{-3} 、 P_{-4} 、 P_{-5} 等とする。二重鎖形成を変更または調節するための好ましい領域は、 $P_{-5} \sim P_{-1}$ 、より好ましくは $P_{-4} \sim P_{-1}$ 、さらに好ましくは $P_{-3} \sim P_{-1}$ である。 P_{-1} の修飾は特に好ましく、単独でも、あるいは他の位置 (複数可) (例えば、上記に同定された位置のいずれか) の修飾 (複数可) との併用でもよい。上述の領域のうち 1 つの少なくとも 1 個、より好ましくは 2 個、3 個、4 個又は 5 個の対は、独立に、以下の群、すなわち

A : U
G : U
I : C

ミスマッチな対、例えば非標準的すなわち標準的なもの以外の対合、あるいはユニバーサル塩基を含む対合から選ばれることが好ましい。

【0471】

好ましい実施形態では、解離を促進する対合を達成するのに必要とされるサブユニット変更はセンス鎖内で行われるが、一部の実施形態では該変更がアンチセンス鎖内で行われる。

【0472】

好ましい実施形態では、 $P_{-1} \sim P_{-4}$ における少なくとも 2 個又は 3 個の対が、解離を促進する対である。

好ましい実施形態では、 $P_{-1} \sim P_{-4}$ における少なくとも 2 個又は 3 個の対は、A : U である。

【0473】

好ましい実施形態では、 $P_{-1} \sim P_{-4}$ における少なくとも 2 個又は 3 個の対は、G : U である。

好ましい実施形態では、 $P_{-1} \sim P_{-4}$ における少なくとも 2 個又は 3 個の対は、I : C である。

【0474】

好ましい実施形態では、 $P_{-1} \sim P_{-4}$ における少なくとも 2 個又は 3 個の対は、ミスマッチな対、例えば、非標準的すなわち標準的なもの以外の対である。

好ましい実施形態では、 $P_{-1} \sim P_{-4}$ における少なくとも 2 個又は 3 個の対は、ユニバーサル塩基を含む対である。

【0475】

二重鎖の A S 3' 末端の安定性の増大

サブユニット対は、安定性を促進し、かつ解離又は融解を阻害する傾向に基づいて順位付けすることができる (例えば、特定の対の会合又は解離の自由エネルギーに関して、最も簡単な手法は、個々の対ごとに對を検査することであるが、次の同類又は同様の分析もまた使用することができる)。二重鎖の安定性を促進するという観点では、

G : C は、A : U よりも好ましく、

ワトソン - クリックの対合 (A : T、A : U、G : C) は、非標準的な対合すなわち標準的なもの以外の対合よりも好ましく、

安定性を増大させるアナログは、ワトソン - クリックの対合 (A : T、A : U、G : C) よりも好ましく、

2 - アミノ - A : U は、A : U よりも好ましく、

2 - チオ U または 5 Me - チオ - U : A は、U : A よりも好ましく、

G - クランプ (4 個の水素結合を有する C のアナログ) : G は、C : G よりも好ましく、

グアナジニウム - G - クランプ : G は、C : G よりも好ましく、

10

20

30

40

50

プソイドウリジン：Aは、U：Aよりも好ましく、

結合を増強する糖修飾、例えば2'位修飾（例えば、2' F、ENAまたはLNA）は、非修飾部分よりも好ましく、二重鎖の安定性を増強するために一方又は両方の鎖上に存在することができる。二重鎖を形成する傾向を増大させる対合が、二重鎖のAS鎖の3'末端の1以上の位置に使用されることが好ましい。末端の対（AS鎖から見て最も3'側の対）をP₁とし、これに続く二重鎖内の対合の位置（AS鎖から見て5'方向に向かっていく）は、P₂、P₃、P₄、P₅等とする。二重鎖形成を調節するための修飾を施すための好ましい領域は、P₅～P₁、より好ましくはP₄～P₁、さらに好ましくはP₃～P₁である。P₁での修飾は特に好ましく、単独でも、あるいは他の位置（複数可）（例えば、上記に同定された位置のいずれか）の修飾（複数可）と併用されてもよい。上述の領域に存在する少なくとも1個、より好ましくは2個、3個、4個又は5個の対は、独立に、以下の群、すなわち

G：C

ワトソン-クリックの対合（A：T、A：U、G：C）よりも安定性を増大させるアナログを有する対

2-アミノ-A：U

2-チオUまたは5Me-チオ-U：A

G-クランプ（4個の水素結合を有するCのアナログ）：G

グアナジニウム-G-クランプ：G

プソイドウリジン：A

一方又は両方のサブユニットが、結合を増強する糖修飾、例えば2'位修飾（例えば、2' F、ENA又はLNA）を有する対から選ばれることが好ましい。

【0476】

好ましい実施形態では、P₁～P₄における少なくとも2個又は3個の対は、二重鎖の安定性を促進する対である。

好ましい実施形態では、P₁～P₄における少なくとも2個又は3個の対は、G：Cである。

【0477】

好ましい実施形態では、P₁～P₄における少なくとも2個又は3個の対は、ワトソン-クリックの対合よりも安定性を増大させるアナログを有する対である。

好ましい実施形態では、P₁～P₄における少なくとも2個又は3個の対は、2-アミノ-A：Uである。

【0478】

好ましい実施形態では、P₁～P₄における少なくとも2個又は3個の対は、2-チオUまたは5Me-チオ-U：Aである。

好ましい実施形態では、P₁～P₄における少なくとも2個又は3個の対は、G-クランプ：Gである。

【0479】

好ましい実施形態では、P₁～P₄における少なくとも2個又は3個の対は、グアナジニウム-G-クランプ：Gである。

好ましい実施形態では、P₁～P₄における少なくとも2個又は3個の対は、プソイドウリジン：Aである。

【0480】

好ましい実施形態では、P₁～P₄における少なくとも2個又は3個の対は、一方又は両方のサブユニットが、結合を増強する糖修飾、例えば2'位修飾（例えば、2' F、ENAまたはLNA）を有する対である。

【0481】

G-クランプ及びグアナジニウムG-クランプについては、以下の参考文献で論じられている。ホルムズ（Holmes）及びガイト（Gait）「The Synthesis of 2'-O-Me

10

20

30

40

50

thyl G-Clamp Containing Oligonucleotides and Their Inhibition of the HIV-1 Tat-TAR Interaction」、Nucleotides、Nucleotides & Nucleic Acids、第22巻：1259～1262ページ、2003年；ホルムズ(Holmes)ら「Steric inhibition of human immunodeficiency virus type-1 Tat-dependent trans-activation in vitro and in cells by oligonucleotides containing 2'-O-methyl G-clamp ribonucleoside analogues」、Nucleic Acids Research、第31巻：2759～2768ページ、2003年；ワイルズ(Wilds)ら「Structural basis for recognition of guanosine by a synthetic tricyclic cytosine analogue: Guanidinium G-clamp」、Helvetica Chimica Acta、第86巻：966～978ページ、2003年；ラジェエフ(Rajeev)ら「High-Affinity Peptide Nucleic Acid Oligomers Containing Tricyclic Cytosine Analogues」、Organic Letters、第4巻：4395～4398ページ、2002年；アウシン(Ausin)ら「Synthesis of Amino- and Guanidino-G-Clamp PNA Monomers」、Organic Letters、第4巻：4073～4075ページ、2002年；マイヤー(Maier)ら「Nuclease resistance of oligonucleotides containing the tricyclic cytosine analogues phenoxazine and 9-(2-aminoethoxy)-phenoxazine ("G-clamp") and origins of their nuclease resistance properties」、Biochemistry、第41巻：1323～7ページ、2002年；フラナガン(Flanagan)ら「A cytosine analog that confers enhanced potency to antisense oligonucleotides」、Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America、第96巻：3513～8ページ、1999年。

【0482】

二重鎖のAS 5'末端の安定性の減少と二重鎖のAS 3'末端の安定性の増大を同時に行うこと

上述のように、iRNA剤は、二重鎖のAS 5'末端の安定性を減少させ、かつ二重鎖のAS 3'末端の安定性を増大させるように修飾することができる。このことは、二重鎖のAS 5'末端における1以上の安定性を減少させる修飾を、二重鎖のAS 3'末端における1以上の安定性を増加させる修飾と組み合わせることにより達成することができる。したがって、好ましい実施形態は、 $P_{-5} \sim P_{-1}$ 、より好ましくは $P_{-4} \sim P_{-1}$ 、さらに好ましくは $P_{-3} \sim P_{-1}$ における修飾を包含する。 P_{-1} での修飾は特に好ましく、単独でも、あるいは他の位置(例えば、上記に同定された位置)との併用でもよい。二重鎖領域のAS 5'末端の上述の領域の1つに存在する少なくとも1個、より好ましくは2個、3個、4個又は5個の対は、独立に、以下の群から選ばれることが好ましく、その群とは、

A : U
G : U
I : C

ミスマッチな対、例えば非標準的な対合、すなわち標準的なもの以外のユニバーサル塩基を含む対合、ならびに

$P_{-5} \sim P_{-1}$ 、より好ましくは $P_{-4} \sim P_{-1}$ 、さらに好ましくは $P_{-3} \sim P_{-1}$ での修飾である。 P_{-1} での修飾は特に好ましく、単独でも、あるいは他の位置(例えば、上記に同定された位置)との併用でもよい。二重鎖領域のAS 3'末端の上述の領域の1つに存在する少なくとも1個、より好ましくは2個、3個、4個又は5個の対は、独立に、以下の群から選ばれることが好ましく、その群とは、

G : C

ワトソン-クリックの対合(A : T、A : U、G : C)よりも安定性を増大させるアナログを有する対

2 - アミノ - A : U

2 - チオUまたは5 Me - チオ - U : A

G - クランプ (4 個の水素結合を有する C のアナログ) : G

グアナジニウム - G - クランプ : G

プソイドウリジン : A

一方又は両方のサブユニットが、結合を増強する糖修飾、例えば 2' 位修飾 (例えば、2' F、ENA 又は LNA) を有する対である。

【 0 4 8 3 】

本発明はまた、DMTDS を有する iRNA 剤を選択および作製する方法を包含する。例えば、iRNA 剤として使用するための候補配列に関して標的配列をスクリーニングする場合、本明細書中に記載の DMTDS 特性を有する配列、または、所望のレベルの DMTDS を付与するために、好ましくはできる限り変化を少なく、特に AS 鎖に対して修飾を施すことができる配列を選択することができる。

10

【 0 4 8 4 】

本発明はまた、iRNA 剤候補配列を提供すること、ならびに、DMTDS iRNA 剤を提供するために P₅ ~ P₁ における少なくとも 1 個の P または P₅ ~ P₁ における少なくとも 1 個の P のうち少なくともいずれかを修飾することを包含する。

【 0 4 8 5 】

DMTDS iRNA 剤は、本明細書中に記載の任意の方法において、例えば h t t の RNA をサイレンシングするために、本明細書中に記載の任意の障害 (例えば、神経変性障害) を治療するために、本明細書中に記載の任意の製剤中で、ならびに一般に本明細書中の他の箇所に記載する方法及び組成物において、かつ / または該方法及び組成物とともに、使用することができる。DMTDS iRNA 剤は、本明細書中に記載の他の修飾、例えば標的設定物質を取り付けること又は安定性を増強する修飾を含めること (例えばヌクレアーゼ耐性モノマーを含めること) もしくは自己会合して鎖内二重鎖構造を形成する一本鎖突出部 (例えば、3' AS 鎖突出部及び / または 3' S 鎖突出部) を含めること、を取り入れることができる。

20

【 0 4 8 6 】

好ましくは、これらの iRNA 剤は、本明細書中に記載のアーキテクチャを有する。

その他の実施形態

RNA、例えば iRNA 剤は、例えば細胞内へ送達される外来の DNA 鋳型から、in vivo で細胞において産生され得る。例えば、該 DNA 鋳型をベクターに挿入して、遺伝子治療ベクターとして使用することができる。遺伝子治療ベクターは、例えば静脈内注射、局所投与 (米国特許第 5, 328, 470 号) により、あるいは定位注射 (例えば、チェン (Chen) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 第 91 巻 : 3054 ~ 3057 ページ、1994 年を参照) により対象へ送達することができる。遺伝子治療ベクターの医薬調製物は、許容可能な希釈剤中に遺伝子治療ベクターを含めることもできるし、あるいは該遺伝子送達ビヒクルを包埋する徐放性マトリックスを含むこともできる。例えば、DNA 鋳型は、2 つの転写ユニット (1 つは iRNA 剤の上鎖を包含する転写物を産生するもの、1 つは iRNA 剤の下鎖を包含する転写物を産生するもの) を包含することができる。鋳型が転写されると、iRNA 剤が産生され、プロセッシングを受けて遺伝子サイレンシングを仲介する sRNA 剤断片となる。

30

40

【 0 4 8 7 】

生理学的作用

本明細書中に記載の iRNA 剤は、該 iRNA 剤と、ヒトの配列およびヒト以外の動物の配列の両方との相補性によって、治療上の毒性の測定がより容易になされるように設計することができる。これらの方法では、RNA 剤は、ヒト由来の核酸配列 および 少なくとも 1 種類のヒト以外の動物 (例えばヒト以外の哺乳類、例えば、げっ歯類、反すう類又は霊長類) 由来の核酸配列に完全に相補的である配列から構成され得る。例えば、ヒト以外の哺乳類は、マウス、ラット、イヌ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、サル、ピグミーチンパンジー、ナミチンパンジー、アカゲザル又はカニクイザルであり得る。iRNA 剤の配列

50

は、ヒト以外の哺乳類及びヒトの相同遺伝子、例えば発がん遺伝子又は腫瘍抑制遺伝子の中の配列に相補的であるということもありうる。ヒト以外の哺乳類における*iRNA*剤の毒性を測定することにより、ヒトにおける*iRNA*剤の毒性を推定することができる。より厳しい毒性試験のためには、*iRNA*剤を、ヒト及び2以上（例えば2種類又は3種類又はそれ以上）のヒト以外の動物に対して相補的とすることができる。

【0488】

本明細書中に記載の方法は、ヒトに対する*iRNA*剤の任意の生理学的作用、例えば毒性作用のような任意の望ましくない作用、または任意の好ましい作用、すなわち所望の作用を関連付けるのに使用することができる。

【0489】

両親媒性送達物質

本明細書中に記載の*iRNA*剤は、本明細書中に記載のものなどの両親媒性送達結合体またはモジュールとともに使用することができる。

【0490】

両親媒性分子は、疎水性領域および親水性領域を有する分子である。このような分子は、脂質（例えば、細胞の脂質二重層）と相互作用する（例えば、浸透又は破壊する）ことができる。したがって、両親媒性分子は、関連付けられた（例えば、結合された）*iRNA*（例えば、本明細書中に記載の*iRNA*又は*sRNA*）のための送達物質として作用することができる。本明細書中に記載の組成物（例えば、本明細書中に記載の両親媒性*iRNA*構築物）で使用されるべき好ましい両親媒性分子は、ポリマーである。該ポリマーは、二次構造、例えば反復性の二次構造を有し得る。

【0491】

両親媒性ポリマーの一例は、両親媒性ポリペプチド、例えば該ポリペプチドが親水面及び疎水面を有するような二次構造を有するポリペプチドである。両親媒性ペプチド構築物（例えば、らせん状ポリペプチド）の設計は、当業者には日常的な作業である。例えば、以下の参考文献に手引きが提供されている：グレル（Grell）ら（2001年）、*J Pept Sci* 第7巻（3）：146～51ページ；チェン（Chen）ら（2002年）、*J Pept Res* 第59巻（1）：18～33ページ；イワタ（Iwata）ら（1994年）、*J Biol Chem* 第269巻（7）：4928～33ページ；コーナット（Cornutt）ら（1994年）、*FEBS Lett* 第349巻（1）：29～33ページ；ネグレート（Negrete）ら（1998年）、*Protein Sci* 第7巻（6）：1368～79ページ。

【0492】

両親媒性ポリマーの別の例は、2以上の両親媒性サブユニット、例えば環状部分（例えば、1つ以上の親水性基及び1つ以上の疎水性基を有する環状部分）を含有する2以上のサブユニットから構成されるポリマーである。例えば、該サブユニットは、ステロイド（例えばコル酸）又は芳香族部分を含有してもよい。このような構成部分は、それらがポリマー構造中にあるときに対向する親水面及び疎水面を形成することができるように、アトロブ異性を示すことができることが好ましい。

【0493】

推定上の両親媒性分子の、脂質膜（例えば、細胞膜）と相互作用する能力は、日常作業的な方法により、例えば無細胞アッセイ又は細胞アッセイにおいて試験することができる。例えば、試験化合物を、合成脂質二重層、細胞膜分画又は細胞と混合するかまたは接触させて、試験化合物が、その脂質二重層、細胞膜又は細胞と相互作用するか、浸透するか、あるいは破壊する能力に関して評価する。試験化合物を、脂質二重層、細胞膜又は細胞との相互作用の検出のために標識することもできる。別のタイプのアッセイでは、試験化合物をレポーター分子又は*iRNA*剤（例えば、本明細書中に記載の*iRNA*又は*sRNA*）に連結させて、そのレポーター分子又は*iRNA*剤が脂質二重層、細胞膜又は細胞に浸透する能力を評価する。2工程アッセイを実施することも可能であり、該2工程アッセイでは、第1のアッセイが、試験化合物単独の、脂質二重層、細胞膜または細胞と相互作用

10

20

30

40

50

用する能力を評価し、第2のアッセイが、試験化合物とレポーターまたはiRNA剤とを含む構築物（例えば、本明細書中に記載の構築物）の、脂質二重層、細胞膜または細胞と相互作用する能力を評価する。

【0494】

本明細書中に記載の組成物において有用な両親媒性ポリマーは、少なくとも2個、好ましくは少なくとも5個、より好ましくは少なくとも10個、25個、50個、100個、200個、500個、1,000個、2,000個、50,000個またはそれ以上のサブユニット（例えば、アミノ酸又は環状サブユニット）を有する。1つの両親媒性ポリマーを、1つ又はそれ以上、例えば2個、3個、5個、10個又はそれ以上のiRNA剤（例えば、本明細書中に記載のiRNA又はsRNA剤）に連結させることもできる。一部の実施形態では、両親媒性ポリマーは、アミノ酸および環状サブユニット（例えば、芳香族サブユニット）の両方を含有することができる。

10

【0495】

本発明は、両親媒性分子と関係付けられたiRNA剤（例えば、本明細書中に記載のiRNA又はsRNA）を包含する組成物を特徴とする。このような組成物は、本明細書中では「両親媒性iRNA構築物」とも呼ばれる。このような組成物及び構築物は、iRNA剤の送達又は標的設定、例えばiRNA剤を細胞へと送達又は標的設定するのに有用である。理論により拘束されることは望まないが、このような組成物及び構築物は、例えばiRNA剤の細胞内への進入が可能となるように、脂質（例えば、細胞の脂質二重層）の多孔性を増大させる（例えば、浸透又は崩壊させる）ことができる。

20

【0496】

一態様では、本発明は、両親媒性分子に連結されたiRNA剤（例えば、本明細書中に記載のiRNA剤又はsRNA剤）を含む組成物に関する。該iRNA剤および両親媒性分子は、共有結合又は非共有結合のいずれかにより、互いに持続的に接触した状態に保持されていてもよい。

【0497】

該組成物又は構築物の両親媒性分子は、リン脂質以外である、例えばミセル、膜または膜断片以外であることが好ましい。

組成物又は構築物の両親媒性分子は、好ましくはポリマーである。該ポリマーは、2以上の両親媒性サブユニットを含みうる。1以上の親水性基及び1以上の疎水性基がポリマー上に存在してもよい。ポリマーは、反復性の二次構造ならびに第1の面および第2の面を有してもよい。反復性の二次構造に沿った親水性基及び疎水性基の分布は、ポリマーの一方の面が親水面であり、かつポリマーの他方の面が疎水面であるような分布であり得る。

30

【0498】

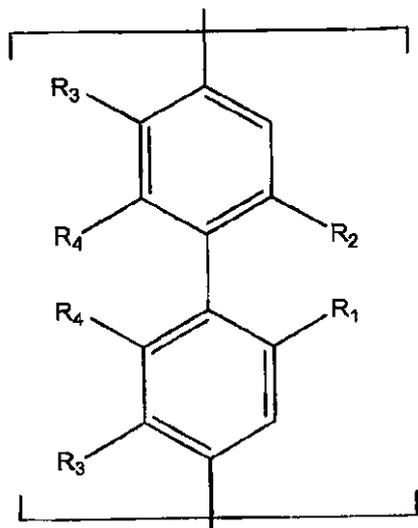
両親媒性分子は、ポリペプチド、例えばその二次構造としてらせん構造を含むポリペプチドであってもよい。

一実施形態では、両親媒性ポリマーは、1つ以上の環状部分（例えば、1以上の親水性基または1以上の疎水性基のうち少なくともいずれかを有する環状部分）を含有する1つ以上のサブユニットを包含する。一実施形態では、ポリマーは、環状部分が交互に疎水性基及び親水性基を有するような環状部分のポリマーである。例えば、サブユニットは、ステロイド（例えば、コル酸）を含有してもよい。別の例では、サブユニットは、芳香族部分を含有してもよい。芳香族部分は、アトロプ異性を示すことができるもの、例えば2,2'-ビス（置換）-1,1'-ピナフチルまたは2,2'-ビス（置換）ピフェニルであり得る。サブユニットは、式（M）：

40

【0499】

【化 7 6】



(M)

10

20

【0500】

を有する芳香族部分を含んでもよい。

本発明は、両親媒性分子と関連付けられた iRNA 剤（例えば、本明細書中に記載の iRNA 又は sRNA）を包含する組成物を特徴とする。このような組成物は、本明細書中では「両親媒性 iRNA 構築物」と呼ばれ得る。このような組成物及び構築物は、iRNA 剤の送達または標的設定、例えば細胞への iRNA 剤の送達または標的設定において有用である。理論により拘束されることは望まないが、このような組成物及び構築物は、例えば iRNA 剤の細胞内への進入が可能となるように、脂質（例えば、細胞の脂質二重層）の多孔性を増大させる（例えば浸透または破壊する）ことができる。

30

【0501】

式 M を参照すると、 R_1 は、任意選択でアリール、アルケニル、アルキニル、アルコキシまたはハロで置換されているか、任意選択で O、S、アルケニルまたはアルキニルが挿入されているかのうち少なくともいずれかである $C_1 \sim C_{100}$ アルキル； $C_1 \sim C_{100}$ ペルフルオロアルキル；あるいは OR_5 である。

【0502】

R_2 は、ヒドロキシ、ニトロ、サルフェート、リン酸、リン酸エステル、スルホン酸、 OR_6 、あるいは、任意選択でヒドロキシ、ハロ、ニトロ、アリールスルフィニルもしくはアルキルスルフィニル、アリールスルホニルもしくはアルキルスルホニル、サルフェート、スルホン酸、リン酸、リン酸エステル、置換もしくは非置換アリール、カルボキシル、カルボン酸、アミノカルボニルまたはアルコキシカルボニルで置換されているか、任意選択で O、NH、S、 $S(O)$ 、 SO_2 、アルケニルまたはアルキニルが挿入されているかのうち少なくともいずれかである $C_1 \sim C_{100}$ アルキルである。

40

【0503】

R_3 は、水素であるか、または R_4 と一体となって融合フェニル環を形成する。

R_4 は、水素であるか、または R_3 と一体となって融合フェニル環を形成する。

R_5 は、任意選択でアリール、アルケニル、アルキニル、アルコキシまたはハロで置換されているか、任意選択で O、S、アルケニルまたはアルキニルが挿入されているかのうち少なくともいずれかである $C_1 \sim C_{100}$ アルキル、あるいは $C_1 \sim C_{100}$ ペルフルオロアルキルであり、 R_6 は、任意選択でヒドロキシ、ハロ、ニトロ、アリールスルフィニルもしくはアルキルスルフィニル、アリールスルホニルもしくはアルキルスルホニル、

50

サルフェート、スルホン酸、リン酸、リン酸エステル、置換もしくは非置換アリール、カルボキシル、カルボン酸、アミノカルボニルまたはアルコキシカルボニルで置換されているか、任意選択でO、NH、S、S(O)、SO₂、アルケニルまたはアルキニルが挿入されているかのうち少なくともいずれかであるC₁~C₁₀₀アルキルである。

【0504】

iRNA剤は、2004年3月8日出願の共願のPCT出願第PCT/US2004/07070号に記載されているようなZXY構造を有することができる。

iRNA剤のセンス配列およびアンチセンス配列はパリンδροームであってもよい。パリンδροームiRNA剤の典型的な特徴は、2004年3月8日出願の共願のPCT出願第PCT/US2004/07070号に記載されている。

10

【0505】

別の実施形態では、iRNA剤はモジュラー複合体を特徴とする送達物質と複合体化される。該複合体は、(a)縮合剤(例えば、核酸を例えばイオン相互作用または静電相互作用により誘引(例えば、結合)することが可能な物質)、(b)融合剤(例えば、細胞膜と融合すること、または細胞膜を通過して輸送されることのうち少なくともいずれかが可能な物質)、及び(c)標的設定基、例えば、細胞または組織を標的とする物質(例えば、レクチン、糖タンパク質、脂質または特定の種類の細胞に結合するタンパク質(例えば抗体)、のうち1つ以上(好ましくは2つ又はそれ以上、より好ましくは3つすべて)、に連結させた担体物質を包含することができる。送達物質と複合体化されたiRNA剤については、2004年3月8日出願の共願のPCT出願第PCT/US2004/07070号に記載されている。

20

【0506】

iRNA剤は、標準的ではない対合を、例えばiRNA二重鎖のセンス配列とアンチセンス配列の間に有することができる。標準的ではないiRNA剤の典型的な特徴は、2004年3月8日出願の共願のPCT出願第PCT/US2004/07070号に記載されている。

【0507】

d sRNAの細胞内取り込みの増大

本発明の方法は、iRNA剤、ならびにiRNA剤の細胞内への取り込みに影響を及ぼす薬物の投与を包含し得る。該薬物は、iRNA剤が投与される前に、iRNA剤が投与された後に、あるいはiRNA剤が投与されるのと同時に投与され得る。薬物は共有結合によりiRNA剤に連結されてもよい。薬物は、細胞に対する一過性の作用を有していてもよい。

30

【0508】

薬物は、例えば細胞の細胞骨格を崩壊させることにより、例えば細胞の微小管、ミクロフィラメントおよび中間フィラメントのうち少なくともいずれかを崩壊させることにより、iRNA剤の細胞内への取り込みを増大させることができる。該薬物は、例えば、タキソール、ビンクリスチン、ビンブラスチン、サイトカラシン、ノコダゾール、ジャブラキノライド(japlakinolide)、ラトランクリンA、ファロイジン、スウィンホライド(swinholide)A、インダノシン(indanocine)またはミオセルビン(myoserbin)であり得る。

40

【0509】

iRNA結合体

神経系細胞内への取り込みを強化するために親油性物質に結合されたiRNA剤を、第2の作用物質にカップリング(例えば、共有結合)させることができる。例えば、特定の神経障害を治療するのに使用されるiRNA剤は、第2の治療薬、例えばiRNA剤以外の作用物質にカップリングさせることができる。第2の治療薬は、同じ神経障害の治療を目的とするものであってよい。例えば、HDを治療するのに使用されるiRNAの場合では、iRNA剤を、HDの治療に有用であることが知られている第2の作用物質にカップリングさせることができる。

50

【0510】

iRNAの生産

iRNAは、例えば大量に、各種方法により生産することができる。例示的な方法としては、有機合成及びRNA切断（例えば、*in vitro*での切断）が挙げられる。

【0511】

有機合成

iRNAは、二本鎖RNA分子の各々の鎖を別個に合成することにより作製することができる。次に、構成成分の鎖をアニーリングさせることができる。

【0512】

大型のバイオリアクタ（例えば、ファルマシア バイオテクAB（Pharmacia Biotec AB）（スウェーデン国ウプサラ所在）のOligoPilot（商標）II）を用いて、所定のiRNA用の特定のRNA鎖を大量に生産することができる。OligoPilotIIリアクタは、わずか1.5モル濃度過剰のホスホロアミダイトヌクレオチドを使用して、効率的にヌクレオチドをカップリングすることができる。RNA鎖を作製するためには、リボヌクレオチドアミダイトが使用される。標準的なモノマー添加サイクルを使用して、iRNA用の21～23ヌクレオチドの鎖を合成することができる。通常、2つの相補的な鎖を別個に生産し、次いで、例えば固体支持体から放出させて脱保護した後にアニーリングさせる。

10

【0513】

有機合成を使用して、別個のiRNA種を生産することもできる。特定の標的遺伝子に対する該iRNA種の相補性を、正確に指定することができる。例えば、該iRNA種は、多型、例えば一塩基多型を含む領域に相補的であってもよい。さらに、多型の位置を正確に規定することも可能である。一部の実施形態では、多型は、内側領域、例えば末端の一方または両方から少なくとも4、5、7または9ヌクレオチドの位置にある。

20

【0514】

dsRNA切断

iRNAはまた、より大きなds iRNAを切断することにより作製することもできる。切断は、*in vitro*でも*in vivo*でも実現され得る。例えば、*in vitro*での切断によりiRNAを生産するために、以下の方法を使用することができる。

30

【0515】

*in vitro*転写： 核酸（DNA）セグメントを両方向に転写することによりdsRNAが生産される。例えば、HiScribe（商標）RNAi転写キット（ニューヨーク バイオラプス（New England Biolabs））は、ベクターと、該ベクター内でいずれかの側にT7プロモータが隣接する位置にクローニングされた核酸セグメントに関してdsRNAを生産する方法とを提供する。dsRNA用の2つの相補鎖のT7転写用に、別個の鋳型が生成される。該鋳型は、T7RNAポリメラーゼの添加により*in vitro*で転写され、dsRNAが生産される。PCR及び/又は他のRNAポリメラーゼ（例えば、T3ポリメラーゼ又はSP6ポリメラーゼ）を用いる同様の方法を使用することもできる。一実施形態では、この方法により生成されるRNAは、組換え酵素の調製物に混入している可能性のあるエンドトキシンを除去するように慎重に精製される。

40

【0516】

*in vitro*切断： dsRNAは、例えばダイサー（Dicer）または匹敵するRNAアーゼIII系の活性を用いて、*in vitro*で切断されてiRNAとなる。例えば、dsRNAは、ショウジョウバエ由来の*in vitro*抽出物中で、あるいは精製された成分（例えば、精製RNAアーゼまたはRISC複合体（RNA誘導性サイレンシング複合体））を用いて、インキュベートすることができる。例えば、ケッティング（Ketting）ら、Genes Dev 2001年10月15日、第15巻（20）：2654～9ページおよびハモンド（Hammond）、Science 200

50

1年8月10日；第293巻(5532)：1146～50ページを参照されたい。

【0517】

dsRNAの切断により、概して複数のiRNA種が生産され、それぞれがもとのdsRNA分子の特定の21～23ntフラグメントである。例えば、もとのdsRNA分子の重なり合う領域や隣接する領域に相補的な配列を含むiRNAが存在し得る。

【0518】

合成方法にかかわらず、iRNA調製物は、製剤化に適した溶液(例えば、水溶液および/または有機溶液)中で調製することができる。例えば、iRNA調製物は、純粋な二重に蒸留した蒸留水中で沈殿および再溶解され、凍結乾燥されてもよい。続いて、乾燥させたiRNAは、意図される製剤化プロセスに適した溶液中に再懸濁させることができる。

10

【0519】

修飾iRNA剤およびヌクレオチド代用物のiRNA剤の合成は後述する。

製剤化

本明細書中に記載のiRNA剤は、対象への投与用に製剤化することができる。

【0520】

説明を簡略化するために、本項での製剤、組成物及び方法は、主として非修飾iRNA剤に関して論述する。しかしながら、これらの製剤、組成物及び方法は、他のiRNA剤、例えば修飾iRNA剤を用いて実施することができ、かつそのような実施は本発明の範囲内にあることが理解されるべきである。

20

【0521】

製剤化されたiRNA組成物は、様々な状態であると仮定することができる。幾つかの例では、組成物は、少なくとも部分的に結晶性であるか、一様に結晶性であるか、かつ/または無水(例えば、水分が80%未満、50%未満、30%未満、20%未満又は10%未満)である。別の例では、iRNAは水相中(例えば水を含む溶液中)に存在する。

【0522】

水相組成物または結晶性組成物は、例えば送達ビヒクル、例えばリポソーム(特に水相に関して)または粒子(例えば、結晶性組成物に関して適切であり得るような微粒子)に組み込むことができる。概して、iRNA組成物は、意図される投与方法と相性の良い様式で製剤化される。

30

【0523】

特定の実施形態では、組成物は、以下の方法：噴霧乾燥、凍結乾燥、真空乾燥、蒸発、流動床乾燥(fluid bed drying)またはこれらの技法の組合せ、あるいは液体を用いた超音波処理、フリーズドライ、凝縮およびその他の自己集合、のうち少なくとも1つにより調製される。

【0524】

iRNA調製物は、別の作用物質、例えば別の治療薬またはiRNAを安定化する作用物質(例えば、iRNAと複合体形成してiRNPを形成するタンパク質)と組み合わせて製剤化することができる。さらに別の作用物質としては、例えばEDTAなどのキレート化剤(例えば、 Mg^{2+} のような二価カチオンを除去するため)、塩、RNAアーゼ阻害剤(例えば、RNAsinのような広域特異性のRNAアーゼ阻害剤)等が挙げられる。

40

【0525】

一実施形態では、iRNA調製物は、別のiRNA剤、例えば第2の遺伝子または同じ遺伝子に関してRNAiを仲介することができる第2のiRNAを包含する。さらに別の調製物は、少なくとも3個、5個、10個、20個、50個もしくは100個またはそれ以上の異なるiRNA種を包含することができる。このようなiRNAは、同様の数の異なる遺伝子に関してRNAiを仲介することができる。

【0526】

一実施形態では、iRNA調製物は、少なくとも1つの第2の治療薬(例えば、RNA

50

又はDNA以外の作用物質)を包含する。例えば、神経疾患、例えば神経変性疾患(例えば、PD)の治療用のiRNA組成物が、既知のPD治療剤(例えば、レバドパ(levodopa)またはデプロニル(deproniol))を含むことが考えられよう。

【0527】

標的設定

説明を簡略化するために、本項での製剤、組成物および方法は、主として非修飾iRNA剤に関して論述する。しかしながら、これらの製剤、組成物および方法は、他のiRNA剤、例えば修飾iRNA剤を用いて実施することができ、かつかかる実施は本発明の範囲内にあることが理解されるべきである。

【0528】

10

一部の実施形態では、iRNA剤、例えば二本鎖のiRNA剤、またはsRNA剤(例えば、前駆体、例えばsRNA剤へプロセシングされ得るより大きなiRNA剤、あるいはDNAであって例えば二本鎖のiRNA剤もしくはsRNA剤などのiRNA剤またはそれらの前駆体をコードするDNA)は、特定の細胞に対して標的設定される。例えば、iRNAを包含するリポソームもしくは粒子または他の構造は、標的細胞上の特定の分子を認識する標的設定部分を包含することもできる。標的設定部分は、標的細胞に関して特異的な親和性を有する分子であり得る。標的設定部分には、標的細胞の表面上に見られるタンパク質に対する抗体、あるいは標的細胞の表面上に見られる分子に関するリガンドまたはリガンドの受容体結合部分を挙げるができる。

【0529】

20

iRNAを脳内の神経系細胞に対して標的設定するために抗原を使用することも可能である。

一実施形態では、標的設定部分はリポソームに取り付けられる。例えば、米国特許第6,245,427号明細書は、タンパク質またはペプチドを用いてリポソームを標的設定する方法について記載している。別の例では、リポソームのカチオン性脂質成分が、標的設定部分で誘導体化される。例えば、国際公開公報第96/37194号パンフレットは、N-グルタリルジオレオイルホスファチジルエタノールアミンをN-ヒドロキシスクシンイミド活性エステルに変換することについて記載している。該生成物は続いてRGDPペプチドにカップリングされた。

【0530】

30

治療方法および送達経路

神経系細胞で発現する遺伝子を標的とするiRNA剤を含む組成物は、種々の経路によって対象に送達可能である。例示的な経路には、クモ膜下腔内、(例えば、脳内の)実質、鼻、および眼への送達が含まれる。組成物は、例えば静脈内、皮下または筋肉内注射により全身へ送達することも可能であり、これはiRNA剤を末梢ニューロンに送達するのに特に有用である。好ましい送達経路は、脳への直接送達、例えば脳室内または視床下部内、あるいは脳の側部領域または後部領域である。神経系細胞への送達用のiRNA剤は、投与に適した医薬組成物中に組み込まれ得る。例えば、組成物は、1種以上のiRNA剤および薬学的に許容可能な担体を含み得る。本明細書で使用される場合、用語「薬学的に許容可能な担体」とは、薬学的投与に適合しうる任意のあらゆる溶媒、分散媒体、コーティング剤、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などを含むことを意図する。薬学的に許容可能な担体には、本発明のiRNA剤に結合される親油性部分に追加されるトランスフェクション試薬または神経系細胞への取り込みを容易にする試薬は含まれない。薬学的に活性な物質のためにこのような媒体および薬剤を使用することは、当該分野において周知である。任意の従来媒体または薬剤は、活性化化合物とは相容れない場合を除き、本発明の組成物中における使用が意図される。補助的な活性化化合物もまた、組成物に組み込み可能である。

40

【0531】

本発明の医薬組成物は、局所治療が所望されるか全身治療が所望されるかにより、また治療すべき領域により、多数の方法で投与可能である。投与は、局所(点眼、鼻内投与、

50

経皮投与など)でもよいし、経口でも非経口でもよい。非経口投与には、静脈内点滴、皮下、腹腔内、もしくは筋肉内の注射、またはクモ膜下腔内もしくは脳(心)室内(例えば、脳室内)への投与がある。

【0532】

送達経路は、患者の障害によって変わりうる。例えば、HDと診断された対象に、親油性物質と結合させた抗*htt* *iRNA* 剤を、脳内に直接(例えば、淡蒼球内または基底核の線条体内、および線条体の中型有棘ニューロン付近に)投与可能である。多系統萎縮症と診断された対象には、脳内に、例えば、脳の線条体および黒質の領域に、および脊髄に*iRNA* 剤を直接投与可能である。レーヴィ小体痴呆と診断された対象には、脳内に直接、例えば、脳の皮質内に直接*iRNA* 剤を投与可能であり、かつ投与は拡散性のものであってよい。神経系細胞への送達強化のために修飾された*iRNA* 剤に加えて、二次療法、例えば、緩和治療および/または疾患特異的な治療を患者に施しても良い。二次療法は、例えば、対症的なもの(例えば症状の軽減のため)でもよいし、神経を保護するもの(例えば、疾患の進行を減速または停止するため)でもよいし、あるいは回復させるもの(例えば、疾患の進行を逆行させるため)でもよい。対象は抗*SNC A* *iRNA* を投与されていないことが好ましい。

10

【0533】

HDの治療については、例えば、対症療法として薬物のハロペリドール、カルバマゼピン、またはバルプロエートが挙げられる。その他の治療には、心理療法、理学療法、言語療法、コミュニケーションおよび記憶の補助(装置)、社会的支援活動、ならびに食事療法の指導が挙げられる。

20

【0534】

パーキンソン病の治療については、対症療法として薬物のカルビドパ/レボドパ、エンタカポン、トルカポン、プラミベキソール、ロピネロール、ペルゴリド、プロモクリプチン、セレゲリン、アマンタジン、および数種の抗コリン作用剤が挙げられる。脳深部刺激手術ならびに定位脳手術もまた、対症的軽減をもたらす可能性がある。神経を保護する治療には、例えば、カルビドパ/レボドパ、セレゲリン、ビタミンE、アマンタジン、プラミベキソール、ロピネロール、コエンザイムQ10、およびGDNFが含まれる。回復治療には、例えば、幹細胞の外科的移植が含まれ得る。

【0535】

親油性部分が結合している*iRNA* 剤を脳の神経系細胞に送達することができる。組成物が血液脳関門を通過する必要のない送達方法を利用することができる。例えば、*iRNA* 剤を含む医薬組成物を、疾患の影響を受けた細胞を含む領域へ直接注射することによって患者に送達可能である。例えば、医薬組成物を、脳内への直接的注射によって送達可能である。この注射は、脳の特定の領域(例えば、黒質、皮質、海馬、線条体、または淡蒼球)への定位的な注射であり得る。*iRNA* 剤は、中枢神経系の複数の領域に(例えば、脳の複数の領域に、および/または脊髄に)送達可能である。*iRNA* 剤は、脳の広範な領域に送達可能である(例えば、脳の皮質への拡散性送達)。

30

【0536】

1つの実施形態において、*iRNA* 剤は、組織、例えば、脳(例えば、脳の黒質、海馬、線条体、または淡蒼球)に一端が移植されたカニューレまたは他の送達デバイスによって送達可能である。カニューレは*iRNA* 剤のリザーバに接続可能である。フローまたは送達は、ポンプ、例えば、浸透圧ポンプまたはミニポンプ(例えば米国カリフォルニア州クパチーノ所在のデュレクト(Direct)のAlzet(R)ポンプ)によって調節可能である。1つの実施形態において、ポンプまたはリザーバは組織から離れた領域に、例えば、腹部に移植され、送達は、ポンプまたはリザーバから放出部位まで通じている導管によって行われる。脳への送達のためのデバイスは、例えば、米国特許第6,093,180号および同第5,814,014号明細書に記載されている。

40

【0537】

親油性部分(例えばコレステロール)に結合された*iRNA* 剤は、血液脳関門を通過で

50

きるようにさらに修飾可能である。例えば、iRNA 剤は、該薬剤が血液脳関門を通過できるようにする分子に結合されてもよい。このような修飾 iRNA 剤は、任意の所望の方法によって、例えば、脳室内もしくは筋肉内注射によって、または肺送達によって投与可能である。

【0538】

神経系細胞内への取り込み強化のために親油性部分に結合された iRNA 剤は、例えば、網膜の障害（例えば、網膜症）を治療するために眼に投与可能である。例えば、医薬組成物を、眼の表面または周辺組織、例えば、瞼の内部に施用可能である。該組成物は、局所的に、例えば、噴霧することによって、点眼として、眼洗浄液として、または軟膏として施用可能である。軟膏または点眼液は、当該分野で既知の眼への送達系、例えば、アプリケータまたは点眼器によって送達されてもよい。このような組成物は、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、もしくはポリ（ビニルアルコール）などの粘膜炎模倣物、ソルビン酸、EDTA、もしくはベンジルクロミウムクロライドなどの保存剤、ならびに通常量の希釈剤および/または担体を含み得る。医薬組成物はまた、眼の内部に投与可能であり、かつ選択された領域または構造に組成物を導入することが可能な針または他の送達デバイスによって導入可能である。iRNA 剤を含む組成物はまた、眼用パッチを介して施用可能である。

10

【0539】

投与は、投与対象者によって為されても良いし、または別の人、例えば、別の介護者によって為されても良い。介護者は、ヒトを介護することに関する任意の存在であってよく：例えば、病院、ホスピス、医院、外来診察室；医師、看護師、もしくは他の実務者などの医療従事者；または配偶者もしくは保護者（例えば、親）などである。投薬は、計測された用量で、または計量された用量を送達するディスペンサで供給可能である。

20

【0540】

対象を、浮腫または脳内出血などの治療に対する反応についてモニタすることが可能である。例えば、患者を MRI によって、例えば、注射後毎日または毎週、または注射後定期的な時間間隔でモニタすることが可能である。

【0541】

対象を、疾患の症状の改善または安定化についてモニタすることも可能である。このようなモニタリングは、例えば、経時的な臨床評価（例えば、統合パーキンソン病評価尺度を使用して）、または機能的神経画像化によって達成可能である。モニタリングはまた、未治療の対象から収集した規準データに対して治療した対象を比較する、線条体ドーパミン作動性機能の経時的な定量的計測値（例えば、フルオロドーパおよびポジトロン放出断層撮影）を含み得る。別の成果尺度には、生存ならびに緩和治療および診療所への入所なしでの生存を含み得る。治療した対象および未治療の対象についてのこれらの計測値および成果における統計学的に有意な違いは、治療効力の証拠である。

30

【0542】

神経系細胞内への取り込み強化のために親油性部分に結合された iRNA 剤を含む医薬組成物は、HD などの神経障害を有するかまたは発症するリスクがあると診断された任意の患者に投与可能である。1つの実施形態において、患者は神経障害を有すると診断され、その患者は他の点では概して良好な健康状態にある。例えば、この患者は末期症状にはなく、かつこの患者は診断後少なくとも2年、3年、5年、または10年またはそれ以上生存すると思われる。この患者は診断後すぐに治療されてもよいし、または患者がより消耗性の症状（例えば、PD 患者における動揺性動作障害および運動障害）を経験するまで治療を遅延してもよい。別の実施形態において、患者は疾患の重症な段階に達しておらず、例えば、患者は、ホーン（Hoehn）およびヤール（Yahr）の PD の段階 5 に達していない（ホーン（Hoehn）およびヤール（Yahr）、Neurology 第 17 巻、427～442 ページ、1967 年）。一般的に、親油性部分に結合された iRNA 剤は、任意の適切な方法によって投与可能である。本明細書において使用される場合、局所送達とは、身体の任意の表面（眼、粘膜、体腔の表面、または任意の内部表面など

40

50

)へのiRNA剤の直接的施用を指すことが可能である。局所投与のための製剤には、経皮パッチ、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、点眼剤、スプレー、およびリキッド剤が含まれる。従来の薬学的担体、水性、粉末、または油性の基剤、増粘剤などが必要であるか、または望ましい場合がある。局所投与は、対象の表皮もしくは真皮、または表皮もしくは真皮の特定の層、または下層組織にiRNA剤を選択的に送達するための手段としても使用可能である。

【0543】

クモ膜下腔内投与または脳(心)室内(例えば、脳室内)投与のための組成物は滅菌水性溶液を含んでもよく、該水性溶液はさらに緩衝剤、希釈剤、および他の適切な添加剤を含んでもよい。クモ膜下腔内投与または脳(心)室内投与のための組成物は、iRNA剤に取り付けられた親油性部分以外にトランスフェクション試薬または追加の親油性部分を含まないことが好ましい。

10

【0544】

非経口投与のための製剤は滅菌水性溶液を含んでもよく、該水性溶液はさらに緩衝剤、希釈剤、および他の適切な添加物を含んでもよい。脳室内注射は、例えばリザーバに連結された脳室内カテーテルによって容易に実施可能である。静脈内で使用するためには、溶質の総濃度を調節して、調製物を等張にするべきである。

【0545】

神経系細胞内への取り込み強化のために親油性部分に結合されたiRNA剤は、肺送達によって対象に投与されてもよい。肺送達組成物は、患者が分散物を吸入することによって、分散物中の組成物、好ましくはiRNAが肺に到達可能となり、肺において肺泡領域を介して血液循環中に直接容易に吸収されるように送達することができる。肺送達は、全身への送達、および肺の疾患を治療するための局所送達のいずれにおいても有効であり得る。1つの実施形態において、肺送達によって投与されるiRNA剤は、血液脳関門を通過可能であるように修飾されている。

20

【0546】

肺送達は、霧状、エアロゾル状、ミセル状、および乾燥粉末状の製剤の使用など、種々の手法によって達成可能である。送達は、液体噴霧器、エアロゾル系の吸入器、および乾燥粉末分散物用デバイスを用いて達成可能である。計量式デバイスが好ましい。アトマイザまたは吸入器を使用する利点の1つは、デバイスが内蔵型であるために夾雑物混入の可能性が最小化される可能性があることである。乾燥粉末分散物用デバイスは、例えば、乾燥粉末として容易に製剤化可能な薬物を送達する。iRNA組成物は、単独または適切な粉末担体と組み合わせて凍結乾燥粉末もしくは噴霧乾燥粉末として安定に保存可能である。吸入用組成物の送達は投薬調節要素を介して行うことも可能であり、該投薬調節要素には、デバイスに組み込まれたときに、エアロゾル医薬の投与時における用量の追跡、服薬の監視、および/または患者への投薬開始を可能にする、タイマー、用量計測器、時間計測デバイス、または時間表示器が含まれる。

30

【0547】

用語「治療有効量」は、治療される対象において期待の生理学的応答を生じさせる所望の薬物レベルを提供するために必要な、組成物中に存在する量である。

40

用語「生理学的有効量」は、所望の緩和効果または治癒効果を与えるために対象に送達される量である。

【0548】

用語「薬学的に許容可能な担体」とは、その担体が、肺に対して有意な毒性副作用を伴わずに肺に取り込まれることを意味する。

担体として有用である医薬賦形剤の種類には、ヒト血清アルブミン(HSA)などの安定剤、糖質、アミノ酸、およびポリペプチドなどの充填剤; pH調整剤または緩衝剤; 塩化ナトリウムなどの塩; その他が含まれる。これらの担体は、結晶型でもアモルファス型でもよく、またはこの2つの混合物であってもよい。

【0549】

50

特に有用な充填剤には、共用可能な糖質、ポリペプチド、アミノ酸、またはそれらの組み合わせが含まれる。適切な糖質には、ガラクトース、D-マンノース、ソルボースなどの単糖；ラクトース、トレハロースなどの二糖；2-ヒドロキシプロピル-β-D-シクロデキストリンなどのシクロデキストリン；およびラフィノース、マルトデキストリン、デキストランなどの多糖；マンニトール、キシリトールなどのアルジトールが含まれる。好ましい糖質の群には、ラクトース、トレハロース、ラフィノース、マルトデキストリン、およびマンニトールが含まれる。適切なポリペプチドにはアスパルテムが含まれる。アミノ酸には、アラニンおよびグリシンが含まれ、グリシンが好ましい。

【0550】

適切なpH調整剤または緩衝剤には、クエン酸ナトリウム、アスコルビン酸ナトリウムなどの有機酸および有機塩基から調製した有機塩が含まれ；クエン酸ナトリウムが好ましい。

10

【0551】

神経系細胞内への取り込み強化のために親油性部分に結合されたiRNA剤は、経口および経鼻送達によって投与可能である。例えば、これらの膜を通して投与される薬物は、作用開始が迅速であり、治療的な血漿レベルを提供し、肝代謝の初回通過効果を回避し、かつ敵対的な胃腸(GI)環境に対する薬物の曝露を回避する。さらなる利点には、薬物が容易に適用、局在化、および除去されうよう膜部位へ接近しやすいことが含まれる。1つの実施形態において、経口または経鼻送達によって投与されるiRNA剤は、血液脳関門を通過可能であるように修飾されている。

20

【0552】

1つの実施形態において、iRNAを含む組成物の単位用量または計測された用量が、移植されたデバイスによって投与される。このデバイスは、対象の体内のパラメータをモニタするセンサを含み得る。例えば、このデバイスは、浸透圧ポンプなどのポンプ、および任意選択で関連する電子部品を備え得る。

【0553】

iRNA剤は、ウイルスの天然のカプシドにパッケージングされてもよいし、化学的もしくは酵素的に作製された人工のカプシドまたはそこから誘導される構造物にパッケージングされてもよい。

【0554】

投薬量：神経系細胞内への取り込み強化のために修飾されたiRNA剤は、体重1kg当たり約1.4mg未満の単位用量、または体重1kg当たり10、5、2、1、0.5、0.1、0.05、0.01、0.005、0.001、0.0005、0.0001、0.00005、もしくは0.00001mg未満の単位用量で投与可能であり、体重1kg当たり200ナノモル未満(例えば、約 4.4×10^{16} コピー)のRNA剤、または体重1kg当たり1500、750、300、150、75、15、7.5、1.5、0.75、0.15、0.075、0.015、0.0075、0.0015、0.00075、0.00015ナノモル未満のRNA剤の単位用量で投与可能である。この単位用量を、例えば、注射(例えば、静脈内注射もしくは筋肉内注射、クモ膜下腔内注射、または脳への直接的な注射)、吸入投薬、または局所的施用によって投与可能である。特に好ましい投薬量は、体重1kgあたり2、1、または0.1mg未満である。

30

40

【0555】

器官への直接的な(例えば、脳への直接的な)iRNA剤の送達は、器官当たり約0.00001mg~約3mg、または好ましくは器官当たり約0.0001~0.001mg、器官当たり約0.03~3.0mg、眼当たり約0.1~3.0mg、または器官当たり約0.3~3.0mgのオーダーの投薬量であり得る。

【0556】

投薬量は、神経疾患または神経障害、例えばHDを治療または予防するために有効な量であり得る。

1つの実施形態において、単位用量は、1日に1回未満の頻度で、例えば、2日毎、4

50

日毎、8日毎、または30日毎に1回未満の頻度で投与される。別の実施形態において、単位用量は、一定の頻度で投与されない（例えば、定期的な投与頻度ではない）。例えば、単位用量が単回投与されてもよい。

【0557】

1つの実施形態において、有効用量が他の従来の治療様式と一緒に投与される。1つの実施形態において、対象はPDを有し、該治療様式はiRNA剤以外、例えば、二本鎖iRNA剤またはsRNA剤以外の治療剤である。この治療様式は、例えば、レバドパまたはデプロニルであり得る。

【0558】

1つの実施形態において、対象に、初回用量および1回以上の維持用量のiRNA剤、例えば、二本鎖iRNA剤、またはsRNA剤（例えば、前駆体、例えば、プロセシングされてsRNA剤になる大きなiRNA剤、またはiRNA剤（例えば、二本鎖iRNA剤、またはsRNA剤、またはそれらの前駆体）をコードするDNA）が投与される。維持用量は、一般的に初回用量よりも少なく、例えば、初回用量の半分である。維持投薬計画は、1日につき体重1kg当たり0.01μg~1.4mgの範囲、例えば、1日につき体重1kg当たり10、1、0.1、0.01、0.001、または0.00001mgの用量で対象を治療することを包含し得る。維持用量は、5日、10日、または30日毎に1回以下投与されることが好ましい。さらに、治療計画の継続期間は、特定の疾患の性質、その重症度、および患者の全身状態に依存して変化しうる。好ましい実施形態において、投薬量は、1日に1回以下、例えば、24時間、36時間、48時間、またはそれ以上の時間当たりで1回以下、例えば、5日毎または8日毎に1回以下送達されうる。治療後、患者の状態の変化について、および疾患状態の症状の緩和について患者をモニタしてもよい。化合物の投薬量は、患者が現在の投薬量レベルに対して有意に応答しない場合には増加してもよいし、疾患状態の症状の緩和が観察される場合、疾患状態が除去された場合、もしくは望ましくない副作用が観察される場合には用量を減少してもよい。

10

20

【0559】

有効用量は、特定の状況下で所望されるかまたは適切と考えられるように、単回投与または2回以上の投与として投与可能である。反復または頻繁な注入を容易にすることが所望される場合、送達デバイス（例えば、ポンプ、半永久ステント（例えば、静脈内、腹腔内、槽内、または嚢内））、またはリザーバの移植が推奨されることがある。

30

【0560】

1つの実施形態において、iRNA剤の医薬組成物は、複数種のiRNA剤を含む。別の実施形態において、複数種の該iRNA剤の配列は、天然に存在する標的配列に関して別の種類のiRNA剤と重複せず、かつ隣接しない。別の実施形態において、複数種のiRNA剤は、天然に存在する異なる標的遺伝子に特異的である。別の実施形態において、iRNAは対立遺伝子特異的である。

【0561】

治療に成功した後、疾患状態の再発を予防するために、患者に維持治療を受けさせることが望ましいことがある。該維持治療において、本発明の化合物は、体重1kg当たり0.01μg~100gの範囲の維持用量で投与される（米国特許第6,107,094号明細書を参照のこと）。

40

【0562】

iRNA剤組成物の濃度は、障害の治療もしくは予防に有効であるために十分な量、またはヒトにおける生理学的状態を調節するために十分な量である。投与されるiRNA剤の濃度または量は、同剤について測定されるパラメータ、および投与方法（例えば、鼻、口腔、または肺）に依存する。例えば、点鼻用製剤は、鼻腔の刺激および炎症を回避するために、一部の成分を非常に低濃度とする必要がある傾向を有する。適切な点鼻用製剤を提供するために、経口製剤を10~100倍まで希釈することが望ましい場合がある。

【0563】

疾患または障害の重症度、以前の治療、対象の全体的な健康状態および/または年齢、

50

ならびに存在する他の疾患など（これらに限定されない）の特定の要因は、対象を有効に治療するために必要な投薬量に影響を与える可能性がある。さらに、治療有効量の*iRNA*剤、例えば、二本鎖*iRNA*剤、または*sRNA*剤（例えば、前駆体、例えば、プロセシングされて*sRNA*剤となりうる大きな*iRNA*剤、または*iRNA*剤（例えば、二本鎖*iRNA*剤、または*sRNA*剤、またはそれらの前駆体）をコードするDNA）を用いる対象の治療は、単回の治療を含んでもよいし、好ましくは、一連の治療を含んでもよい。当然のことながら、治療のために使用される*iRNA*剤（例えば、*sRNA*剤）の有効投薬量が特定の治療の過程にわたって増加または減少されてもよい。投薬量の変化は、本明細書に記載されるような診断アッセイの結果に起因することもあり、かつ該結果から明らかとなることもある。例えば、*iRNA*剤組成物の投与後に対象をモニタ可能である。モニタリングからの情報に基づいて、追加量の*iRNA*剤組成物を投与することができる。

10

【0564】

投薬は、治療される疾患状態の重症度および応答性に依存し、治療の期間は数日から数カ月まで続くか、または治癒がもたらされるまで、もしくは疾患状態の減少が達成されるまでである。最適な投薬スケジュールは、患者の身体における薬物の蓄積の計測から計算可能である。当業者は、最適な投薬量、投薬方法論、および反復の程度を容易に決定可能である。最適投薬量は、個々の化合物の相対的効力に依存して変化しうるものであり、一般的には、*in vitro*および*in vivo*の動物モデルにおいて有効であることが見出されたEC50に基づいて推定することができる。一部の実施形態において、動物モデルは、ヒト遺伝子（例えば、標的RNA（例えば、神経系細胞で発現されるRNA）を産生する遺伝子）を発現するトランスジェニック動物を含む。トランスジェニック動物は、対応する内在性RNAが欠損していてもよい。別の実施形態において、試験のための組成物は、動物モデル中の標的RNAとヒト中の標的RNAとの間で保存されている配列に対して、少なくとも内側領域において相補的である*iRNA*剤を含む。

20

【0565】

キット： 特定の他の態様において、本発明は、*iRNA*剤、例えば、二本鎖*iRNA*剤、または*sRNA*剤（例えば、前駆体、例えば、プロセシングされて*sRNA*剤になりうる大きな*iRNA*剤、または*iRNA*剤（例えば、二本鎖*iRNA*剤、または*sRNA*剤、またはそれらの前駆体）をコードするDNA）の医薬製剤を含む適切な容器を含むキットを提供する。特定の実施形態において、医薬製剤の個々の成分は1つの容器中で提供され得る。別例として、医薬製剤の成分を2つ以上の容器中で別々に提供する、例えば、1つの容器は*iRNA*剤調製物用とし、少なくとももう1つの容器は担体化合物用とすることが望ましい場合もある。キットは、多数の異なる構成（例えば、単一の箱の中に1つまたは複数の容器など）としてパッケージすることが可能である。異なる成分を、例えば、キットとともに提供される指示書に従って組み合わせることが可能である。成分を、例えば医薬組成物を調製および投与するために、本明細書に記載の方法に従って組み合わせることが可能である。キットが送達デバイスを含むこともできる。

30

【0566】

本発明を以下の実施例によってさらに例証するが、実施例はさらなる限定と解釈されるべきではない。

40

【実施例1】

【0567】

コレステロールが結合した*siRNA*は線条体の一次ニューロンに取り込まれる。

線条体の一次ニューロンを、妊娠15.5日のマウス胎児組織から単離した。この単離細胞を、NeuroBasal (TM) 培地 (Gibco) で7日間培養した。GFPを標的とする、コレステロールおよびCy3と結合された*siRNA* (Chol-*siRNA*-Cy3と呼ぶ) のPBS溶液を、マウスから単離された線条体の一次ニューロン培養物に導入した (終濃度 = 50 nM)。細胞をChol-*siRNA*-Cy3とともに6~12時間培養し、次に培地を交換して細胞内に取り込まれなかったあらゆるChol-s

50

i R N A - C y 3 を洗い流した。トランスフェクション試薬は使用しなかった。ほぼすべての一次ニューロンが、ニューロンの細胞質に C h o l - s i R N A - C y 3 を含んでいることが観察された。s i R N A - C y 3 (コレステロールの結合なし)は、一次ニューロンが同じ条件下で培養された時、コレステロールが結合した s i R N A よりも非常に少ない程度までしか一次ニューロンに取り込まれないことが見出された。

【実施例 2】

【0568】

コレステロールが結合した s i R N A を i n v i v o でニューロンに投与した。

G F P を標的とする C h o l - s i R N A - C y 3 を、単回の直接注射により、ならびに A l z e t (R) ポンプ (米国カリフォルニア州クパチーノ所在のデュレクト株式会社 (D U R E C T C o r p o r a t i o n)) によって7日間にわたり、マウス線条体中に投与した。直接注射には P B S 中 5 0 μ M 溶液 1 μ l を含め、A l z e t ポンプは1日当たり 1 μ l 中 5 0 μ M を送達するものとした。C h o l - s i R N A を、高用量の非結合型 s i R N A - C y 3 と、同じ投薬量と比較した。蛍光顕微鏡法によって、いずれの s i R N A セットも多くの脳細胞に入ることが見出された。観察の結果、C h o l - s i R N A - C y 3 は、A l z e t ポンプによる投与において非結合型 s i R N A よりも細胞に入る頻度が高かった。C h o l - s i R N A - C y 3 の直接注射では1週間後に C y 3 s i R N A の存在が示されたが、非結合型 s i R N A の直接注射では1週間後に C y 3 標識はほとんど示されなかった。

10

【0569】

別の実験では、P B S 中 5 0 μ M の C h o l - s i R N A - C y 3 (2 μ l) を、マウスの線条体に注射した。3日後、マウスを灌流し、D A R R P 3 2 の免疫蛍光分析 (F I T C) のために線条体の切片を調製した。D A R R P 3 2 は、中型有棘ニューロン (ハンチントン病で影響を受けるニューロンのタイプ) のマーカーとしての役割を果たす。データから、試験に用いた体積の C h o l - s i R N A が線条体の範囲の至る所に広がり、中型有棘ニューロン内に入ることが示された。切片を 6 0 × 油浸で観察し、C y 3 標識がニューロンの表面ではなく内部に存在することを確認した。3つの線条体領域それぞれの切片について計数した (全部で 1 1 1 3 個の細胞)。各々の線条体領域の細胞の 9 8 % において、F I T C (D A R R P 3 2) および C y 3 (C h o l - s i R N A) が共局在化していた。これらの試験的研究は、修飾 s i R N A が脳に送達され、ニューロンに入ることができることを支持している。

20

30

【0570】

コレステロールが結合した s i R N A (以下、コレステロール結合 s i R N A とする) が i n v i v o で線条体の細胞に対し有毒かどうかを調べるために、細胞を、アポトーシス細胞死のマーカーである f l u o r o j a d e (R) で染色した。F l u o r o j a d e 染色は注射部位に沿って観察されたが、周囲の細胞中には観察されなかった。陽性対照実験では、f l u o r o j a d e 染色は、N M D A 受容体アゴニストであるキノリン酸 (ニューロンの細胞死を引き起こすことが知られている) の注入後に i n v i v o で線条体の細胞において観察された。これらの実験から、C h o l - s i R N A が i n v i v o で線条体の細胞に対し有毒ではないことが示された。

40

【実施例 3】

【0571】

G F P の発現は、G F P - h t t で安定的にトランスフェクションされた P C 1 2 細胞中で阻害された。

G F P を標的とする C h o l - s i R N A が G F P の発現をノックダウンできるかどうかを試験し、さらにこの R N A i 活性の期間も調べた。G F P に対する C h o l - s i R N A (終濃度 5 0 n M) を、1 0 0 Q の増幅を有するヒト m u t - h t t に融合させた G F P で安定的にトランスフェクションされた P C 1 2 細胞に加えた (チン (Q i n) ら、H u m M o l G e n e t . , 1 2 : 3 2 3 1 - 4 4 , 2 0 0 3 年、電子版 2 0 0 3 年 1 0 月 2 1 日) 。プロナステロン (p r o n a s t e r o n e) で処理すると、プロモ

50

ータによるGFP-httタンパク質の発現は増大するが、安定的にトランスフェクションされた細胞におけるGFPの蛍光は著しく縮小する。対照のプロナステロン処理されたPC12培養物を、ルシフェラーゼを標的とするChol-siRNAのPBS溶液(終濃度=100nM)で処理し;試験用のプロナステロン処理されたPC12細胞培養物を、GFPを標的とするChol-siRNA(終末濃度100nM)で処理した。トランスフェクション試薬は使用しなかった。Chol-siRNAを培地中に6~12時間維持した後、培地を交換し、したがって細胞内に取り込まれなかったChol-siRNAを洗い流した。細胞の蛍光に対する影響を評価するために、1週間後に撮像した。GFPの蛍光は、ルシフェラーゼを標的とするChol-siRNAで処理された細胞中よりも、GFPを標的とするChol-siRNAで処理された細胞においてはるかに大きく減少した。

【実施例4】

【0572】

siRNAはハンチンチンにより引き起こされるニューロンの機能不全を防止する。

Chol-siRNAが脳細胞に入って標的遺伝子の発現をノックダウンすることができるとい証拠(上記参照)から、100Qの増幅を有するHttmut-httに対してChol-siRNAをin vivoで試験した。ハンチントン病のマウスモデルでは、レンチウイルス-mut-htt(1 μ l、 1×10^{10} 個の粒子)を導入すると、5日後にクラスピングが生じる。本発明者らは4匹のマウスの皮質および線条体にレンチウイルス-mut-httを注射した。マウスのうち2匹については、htt mRNAに対するChol-siRNAを同時に注射した。1匹のマウスについては、ルシフェラーゼを標的とするChol-siRNAを同時に注射し、別のマウスについてはビヒクルを同時に注射した。httに対するChol-siRNAを注射された2匹のマウスは、7日目においてクラスピングを示さなかった。対照のマウスは予想通りにクラスピングを起こした。結果を表8に示す。

【0573】

【表8】

表8. in vivoにおいてコレステロールsiRNAを試験する実験

処置	動物			
	1	2	3	4
レンチウイルス-mut-htt	+	+	+	+
mut-httを標的とするChol-siRNA	+	+	-	-
GFPを標的とするChol-siRNA	-	-	+	-
siRNAなし	-	-	-	+
行動:クラスピング	No	No	Yes	Yes

【実施例5】

【0574】

レンチウイルス-mut-httで処理されたマウスではハンチントン病の特徴が見い出される。

【0575】

マウスは、片側の線条体にレンチウイルス-mut-httを投与した後7か月の間クラスピングを示し続ける。他の点では、マウスは予想通りの成長と動きを示した。更に、レンチウイルス-WT-htt(CAGリピートは18個)で処理したマウスは、注射後

3週までとした実験計画書の期間ではクラスピングの証拠を示していない。図1A 1Dの像は、レンチウイルス-mut-httを注射した7か月後のマウスの線条体から得たものである。免疫組織化学分析のために、組織をハンチンチンのN末端に対する抗血清(Ab1)で処理した。顕著な表現型としては、成人発病のヒトHDで見いだされるのに似た核封入体(矢じり表示)および異常栄養神経突起(矢印表示)がある(ディフィリア(DiFiglia)ら、Science、277:1990-3、1997年を参照)。レンチウイルスモデルの使用は、siRNAの同時注射とともに使用するのに便利である。同時注射により、トランスジェニックマウスのモデルにおけるsiRNAの送達を複雑にする可能性のある時間的および空間的不具合を低減することが可能である。

【実施例6】

【0576】

ハンチンチンを標的とするsiRNAの線条体内への単回投与により、ハンチントン病のマウスモデルにおける神経病理が低減する。

ハンチンチンを標的とするsiRNAの作用を、ハンチントン病のAAVマウスモデルで評価した。このハンチントン病マウスモデルでは、100個のCAGリピートからなるポリグルタミン増幅を有する変異型ヒトハンチンチン遺伝子の一部を、ウイルス(AAV)送達によって脳内に導入する。0.5ナノモル(7.5ug)のsiRNAの線条体内への単回注射を施した場合、ハンチンチンを標的とするコレステロール結合siRNAであるAL-DP-1799(E1-4)は、ルシフェラーゼを標的とする非生理的なsiRNAであるAL-DP-1956と比較して、線条体(図2,3)および皮質(図3A)における封入体の大きさを縮小し、線条体におけるニューロピル凝集体を縮小した(図3B)。さらに、線条体中のハンチンチン免疫反応性の細胞の数は著しく増加し、これは線条体へのAL-DP-1799の単回注射後における線条体ニューロンの存続の増大と一致していた(図3)。

【0577】

成体雌のSJL/B6マウス(6月齢)に、力価 1.1×10^{13} ユニットのAAV-htt-100Q(3uL)を、0.5ナノモル(7.5ug)のsiRNAと一緒に注射した。AAV-htt-100Qは、アミノ酸1~400をコードするヒトハンチンチン遺伝子の一部を100個のCAGリピート(100Q)とともに送達するためにAAV血清型8を含むものとした。試験するsiRNAは、ハンチンチンを標的とするコレステロール結合siRNA(AL-DP-1799、下記)あるいはルシフェラーゼを標的とする無関係のコレステロール結合siRNA(AL-DP-1956)のいずれかとした。各マウスについて、0.5uLの1mM siRNAを線条体の片側に100nL/分の速度で注射した。注射の座標は、AP+1.0mm、外側+1.8mm、腹側2.3mmとした。免疫組織化学分析については、マウスをsiRNA注射の14日後に屠殺し、4%のパラホルムアルデヒドで心臓灌流した。脳を摘出し、30~40μm厚のピラトーム凍結切片を切り出した。ヒトおよびマウスのハンチンチンの両方を認識するハンチンチンに対する一次抗体(Ab1)を、以前に記述されているようにして作製した(ディフィリアM(DiFigliaM)、サップE(SappE)、チェイスK(ChaseK)、シュワルツC(SchwarzC)、メローニA(MeloniA)、ヤングC(YoungC)、マーティンE(MartinE)、ボンサッテルJ-P(VonsattelJ-P)、キャラウェイR(CarrawayR)、リーブスSA(ReevesSA)、ボイスFM(BoyceFM)、キャラウェイR(CarrawayR)およびアロニンN(AroninN)、「Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons.」、Neuron 14:1075-1081、1995年;アロニンN(AroninN)、チェイスK(ChaseK)、ヤングC(YoungC)、サップE(SappE)、シュワルツC(SchwarzC)、マッタN(MattaN)、コルンライヒR(KornreichR)、シーサA(SethA)、ランドベールマイヤーB(LandwehrmeyerB)、バー

10

20

30

40

50

ド E (Bird E)、ボンサッテル J - P (Vonsattel J - P)、スミス T (Smith T)、キャラウェイ R (Carraway R)、ボイス FM (Boyce FM)、ビール MF (Beal MF)、ヤング AB (Young AB)、ペニー JB (Penney JB) およびディフィリア M (DiFigli a M)、「CAG expansion affects the expression of mutant huntingtin in the Huntington' s disease brain.」、Neuron 15 : 1193 - 1201、1995年)。免疫吸着させた抗血清 Ab 1 は、1 μ g / ml の濃度で使用した。二次抗体はヤギ抗ウサギ抗体 (米国カリフォルニア州所在のベクターラボラトリーズ (Vector Laboratories)) とし、1 : 10,000 で使用した。DAB の組織学的処理については、キットを使用した (米国イリノイ州所在のピアスラボラトリ (Pierce Laboratory))。

【0578】

【化77】

コレステロール結合型dsRNAであるAL-DP-1799の配列

AL-DP-番号	センス : 5'-3'	アンチセンス : 5'-3'
AL-DP-1799	CsCCUGGAAAAGCUGAUGACGsGsChol (配列番号17)	UsUCAUCAGCUUUUCCAGGGsUsC (配列番号2)

注)「s」は隣接する塩基間のホスホロチオエート結合を表し、「Chol」はコレステロールの結合を表す

【0579】

AAV - htt - 100Q を注射されたマウスは、注射されたのがルシフェラーゼを標的とするコレステロール結合 siRNA (AL - DP - 1956 ; 図 2 A) であるか、あるいはハンチンチンを標的とするコレステロール結合 siRNA (AL - DP - 1799 ; 図 2 D) であるかにかかわらず、同側の線条体および皮質にハンチンチン免疫反応性を示した。しかしながら、AAV - htt - 100Q を注射されたマウスにおけるハンチンチンに関する細胞内染色の様子は、封入体の大きさが、AL - DP - 1956 (ルシフェラーゼを標的とするコレステロール結合 siRNA、図 2 C) で処理されたマウスの同側の線条体よりも AL - DP - 1799 (ハンチンチンを標的とするコレステロール結合 siRNA、図 2 F) で処理されたマウスの同側の線条体においてより小さく見えるという点で、明白に異なっていた。反対側の線条体は、AAV - htt - 100Q を注射されたマウスにおいて、該マウスがルシフェラーゼを標的とするコレステロール結合 siRNA を注射されたか (AL - DP - 1956 ; 図 2 B) あるいはハンチンチンを標的とするコレステロール結合 siRNA を注射されたか (AL - DP - 1799 ; 図 2 E) にかかわらず、ハンチンチンに関し弱い染色を示した。AL - DP - 1956 で処理されたマウス (n = 8) および AL - DP - 1799 で処理されたマウス (n = 8) において、同側の線条体および皮質における封入体の大きさを定量すると (マウス 1 匹当たり 70 ~ 100 個の封入体を計測)、封入体の大きさは、AL - DP - 1956 で処理されたマウスに比べて AL - DP - 1799 で処理されたマウスで著しく (p < 0.02) 縮小していた。同側の皮質および線条体に関する封入体の大きさのメジアンを図 3 A に散布図として示す。したがって、ハンチンチンを標的とするコレステロール結合 siRNA の線条体への単回注射は、線条体および皮質の病理を低減し、ハンチントン病の有効治療の提供への新たなアプローチを表わしている。

【0580】

さらに、同じマウスを線条体におけるニューロピル凝集体について評価すると (図 3 B)、AAV - htt - 100Q および AL - DP - 1799 (ハンチンチンを標的とするコレステロール結合 siRNA) を注射されたマウスは、AAV - htt - 100Q およ

10

20

30

40

50

びAL-DP-1956(ルシフェラーゼを標的とするコレステロール結合siRNA)を注射されたマウスと比較してニューロピル凝集体の数のおよそ3分の2が低減されていた($p < 0.02$)。ニューロピル凝集体の総数を、マウス1匹当たり6つの切片を使用して 2500um^2 の面積について計測した。これらのデータは、ハンチンチンを標的とするコレステロール結合siRNAの線条体への単回注射の結果、神経病理が減少し、かつ該注射がハンチントン病の有効治療の提供への新たなアプローチを表わすという、さらなる証拠を提供するものである。

【0581】

ハンチンチン免疫反応性の細胞の数を、AAV-htt-100QおよびAL-DP-1799(ハンチンチンを標的とするコレステロール結合siRNA、「Htt」)を注射された8匹のマウス、ならびにAAV-htt-100QおよびAL-DP-1956(ルシフェラーゼを標的とするコレステロール結合siRNA、「Luc」)を注射された8匹のマウスの、皮質および線条体についてスコア化した。線条体(図4)では、統計的に有意な増加($p < 0.001$)が見出されたのは、AL-DP-1799(ハンチンチンを標的とするコレステロール結合siRNA)で処理されたマウスにおける面積 2500um^2 あたりのハンチンチン免疫反応性の細胞総数の平均数を、AL-DP-1956(ルシフェラーゼを標的とするコレステロール結合siRNA)で処理されたマウスと比較した場合であった。皮質(図4)では、AL-DP-1799(ハンチンチンを標的とするコレステロール結合siRNA)で処理されたマウスにおける面積 2500um^2 あたりのハンチンチン免疫反応性の細胞総数の平均数が、AL-DP-1956(ルシフェラーゼを標的とするコレステロール結合siRNA)で処理されたマウスと比較して増加する傾向があった。核封入体および細胞質内凝集体を有する細胞(「+inc/+cyto」)を、核封入体を有するが細胞質内凝集体を含まない細胞(「+inc/-cyto」)とは別々にスコア化した場合、線条体において、核封入体および細胞質内凝集体を有する細胞の数が統計的に有意に増加していた($p < 0.001$)。この結果に関する1つの説明は、AAV-htt-100Qを注射され、かつAL-DP-1799(ハンチンチンを標的とするコレステロール結合siRNA)で処理されたマウスではより多くの線条体ニューロンが生き残っているということである。これらのデータは、ハンチンチンを標的とするコレステロール結合siRNAの線条体への単回注射の結果として線条体ニューロンが保護されること、ならびに該注射がハンチントン病の有効治療の提供への新たなアプローチを表わしていることを示唆するものである。

【実施例7】

【0582】

ハンチンチンを標的とするsiRNAの線条体への単回投与は、ハンチントン病のマウスモデルにおける異常なクラスピング行動を低減する。

ハンチンチンを標的とするsiRNAの作用を、ハンチントン病のAAVマウスモデルにおいて、クラスピング行動(ハンチントン病の動物モデルに特徴的な常同かつ異常行動)の評価によってさらに検討した。後で病理学的に評価される同じマウスにおいて、クラスピングを14日間にわたり毎日のyes/noの二択の評価としてスコア化し、次いでクラスピングが観察された日の割合(%)をマウスごとに測定した。クラスピングした日の割合(%)の平均は、ハンチンチンを標的とするコレステロール結合siRNA(AL-DP-1799)で処理されたマウス(「Htt」、図5)では、ルシフェラーゼを標的とする非生理学的なsiRNA(AL-DP-1956)で処理されたマウス(「Luc」、図5)と比較して、およそ半分($p < 0.01$)が低減された。これらのデータは、ハンチンチンを標的とするコレステロール結合siRNAの線条体への単回注射の結果、機能が改善し、したがって該注射はハンチントン病の有効治療の提供への新たなアプローチを表わしていることを実証するものである。

【0583】

その他の実施形態

本発明のいくつかの実施形態に関して説明してきた。しかしながら、本発明の思想およ

10

20

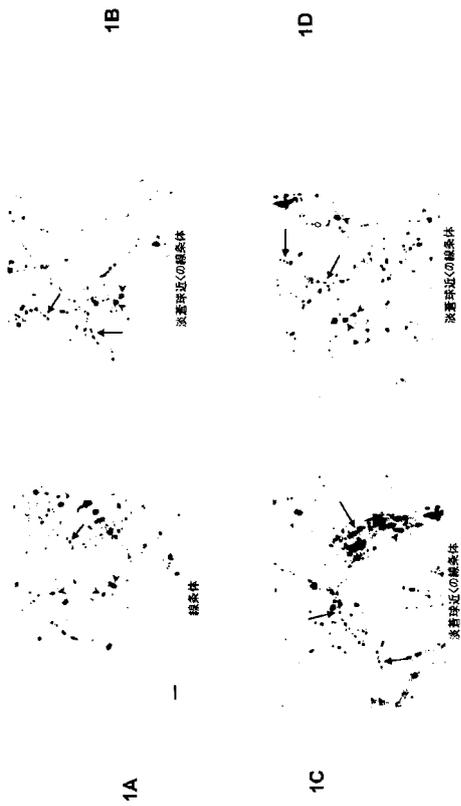
30

40

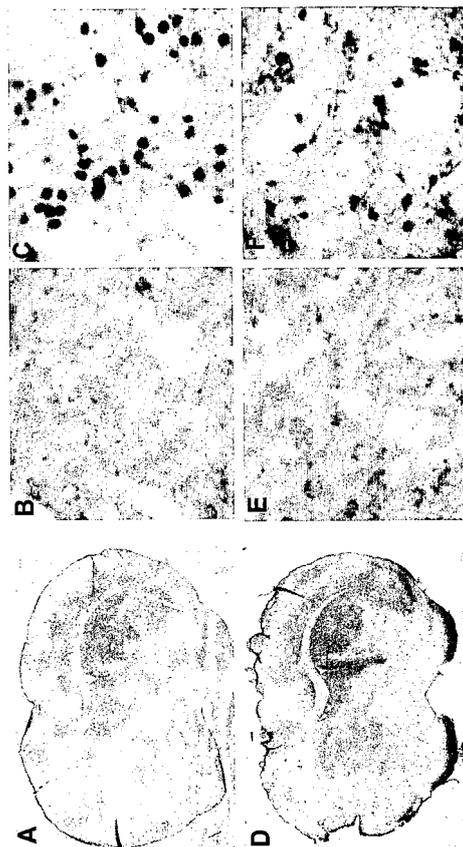
50

び範囲を逸脱することなく種々の変更を施すことが可能であることは理解されよう。従って、その他の実施形態は添付の特許請求の範囲内にある。

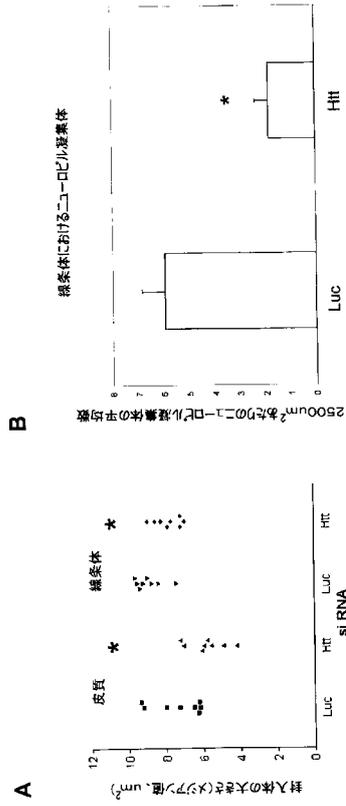
【図 1】



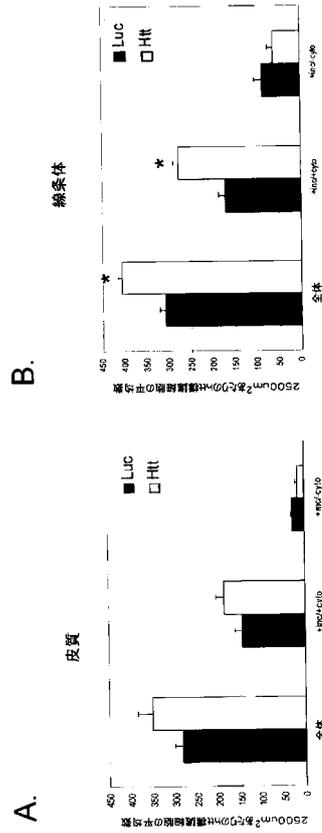
【図 2】



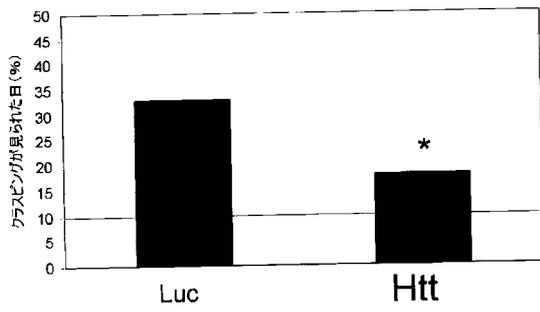
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【配列表】

2013049714000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100105957

弁理士 恩田 誠

(74)代理人 100142907

弁理士 本田 淳

(72)発明者 マノハーラン、ムシア

アメリカ合衆国 0 2 4 9 3 マサチューセッツ州 ウェストン ローリング レーン 1 9

(72)発明者 アロニン、ニール

アメリカ合衆国 0 2 1 6 0 マサチューセッツ州 ニュートン ホイッティア ロード 1 9

Fターム(参考) 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA02 ZA15