

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5726520号
(P5726520)

(45) 発行日 平成27年6月3日(2015.6.3)

(24) 登録日 平成27年4月10日(2015.4.10)

(51) Int. Cl.	F I
C O 7 H 21/02 (2006.01)	C O 7 H 21/02 C S P
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A G
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A
C O 7 H 21/04 (2006.01)	C O 7 H 21/04
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105

請求項の数 21 (全 65 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-509534 (P2010-509534)	(73) 特許権者 513269893
(86) (22) 出願日 平成20年5月21日 (2008.5.21)	アークトゥラス・セラピューティクス・インコーポレイテッド
(65) 公表番号 特表2010-528041 (P2010-528041A)	Arcturus Therapeutics, Inc.
(43) 公表日 平成22年8月19日 (2010.8.19)	アメリカ合衆国92121カリフォルニア州サンディエゴ、メリーフィールド・ロウ3210番
(86) 国際出願番号 PCT/US2008/064417	(74) 代理人 100081422
(87) 国際公開番号 W02008/147824	弁理士 田中 光雄
(87) 国際公開日 平成20年12月4日 (2008.12.4)	(74) 代理人 100084146
審査請求日 平成23年5月12日 (2011.5.12)	弁理士 山崎 宏
(31) 優先権主張番号 PA200700751	(74) 代理人 100122301
(32) 優先日 平成19年5月22日 (2007.5.22)	弁理士 富田 憲史
(33) 優先権主張国 デンマーク (DK)	
(31) 優先権主張番号 PA200701718	
(32) 優先日 平成19年11月30日 (2007.11.30)	
(33) 優先権主張国 デンマーク (DK)	

最終頁に続く

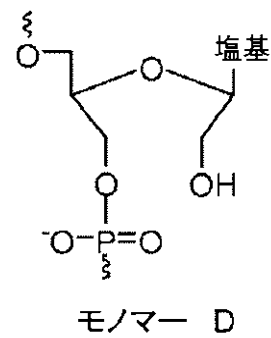
(54) 【発明の名称】 治療剤のためのUNAオリゴマー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

1個以上の2'-3'-セコ-RNAモノマーを含むオリゴマーであって、該オリゴマーは第1および第2のRNA鎖を有するRNA二本鎖部分を含み、該2'-3'-セコ-RNAモノマーがモノマーDであり、該オリゴマーはDNAモノマーも修飾DNAモノマーも含まず、且つ、該オリゴマーの少なくとも一部が標的RNA配列と相補的な配列を含む、オリゴマー。

【化1】



[式中、塩基は核酸塩基である。]

【請求項 2】

各々の鎖が 15 ~ 40 個のモノマーを含む、請求項 1 に記載のオリゴマー。

【請求項 3】

各々の鎖が 1 ~ 5 個の2' - 3' - セコ - RNA モノマーを含む、請求項 1 に記載のオリゴマー。

【請求項 4】

2' - O - アルキル - RNA モノマー、PNA モノマー、HNA モノマー、ANA モノマー、および CeNA モノマーからなる群より選択されるヌクレオチド類似体をさらに含む、請求項 1 に記載のオリゴマー。

【請求項 5】

1 個以上の 2' - O - アルキル - RNA ヌクレオチド類似体をさらに含む、請求項 1 に記載のオリゴマー。

10

【請求項 6】

ホスホロチオエート結合またはボラノホスフェート結合をさらに含む、請求項 1 に記載のオリゴマー。

【請求項 7】

該オリゴマーの一部に相補的な標的 RNA 配列の RISC 依存性翻訳抑制または分解を媒介することが可能なものである、請求項 1 に記載のオリゴマー。

【請求項 8】

14 ~ 26 個の数の塩基対を含む、請求項 1 に記載のオリゴマー。

20

【請求項 9】

少なくとも 1 つの突出を含む、請求項 1 に記載のオリゴマー。

【請求項 10】

1 ~ 14 個のヌクレオチドの突出を含む、請求項 1 に記載のオリゴマー。

【請求項 11】

少なくとも 1 つの 3' 突出を含む、請求項 1 に記載のオリゴマー。

【請求項 12】

少なくとも 1 つの、1 ~ 14 個のヌクレオチドの 3' 突出を含む、請求項 1 に記載のオリゴマー。

【請求項 13】

少なくとも 1 つの平滑末端を含む、請求項 1 に記載のオリゴマー。

30

【請求項 14】

2' - 3' - セコ - RNA モノマーの代わりに天然 RNA モノマーを有する同一のオリゴマーと比較して、低下したオフターゲット効果を有する、請求項 1 に記載のオリゴマー。

【請求項 15】

2' - 3' - セコ - RNA モノマーの代わりに天然 RNA モノマーを有する同一のオリゴマーと比較して、増大した又は持続する遺伝子サイレンシングの有効性を有する、請求項 1 に記載のオリゴマー。

【請求項 16】

2' - 3' - セコ - RNA モノマーの代わりに天然 RNA モノマーを有する同一のオリゴマーと比較して、酵素的分解に対する改善した安定性を有する、請求項 1 に記載のオリゴマー。

40

【請求項 17】

2' - 3' - セコ - RNA モノマーの代わりに天然 RNA モノマーを有する同一のオリゴマーと比較して、低減した免疫刺激を有する、請求項 1 に記載のオリゴマー。

【請求項 18】

一方の鎖が不連続なパッセージャー鎖である、請求項 1 に記載のオリゴマー。

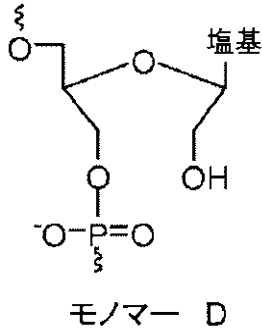
【請求項 19】

1 個以上の2' - 3' - セコ - RNA モノマーを含むオリゴマーであって、該オリゴマ

50

一はマイクロRNAであり、該2' - 3' - セコ - RNAモノマーがモノマーDであり、該オリゴマーはDNAモノマーも修飾DNAモノマーも含まず、且つ、該オリゴマーの少なくとも一部が標的RNA配列と相補的な配列を含む、オリゴマー。

【化2】



10

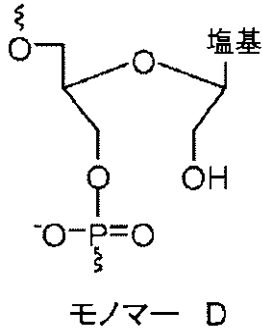
[式中、塩基は核酸塩基である。]

【請求項20】

1個以上の2' - 3' - セコ - RNAモノマーを含むオリゴマーであって、該オリゴマーはマイクロRNAを標的とする一本鎖RNAであり、該2' - 3' - セコ - RNAモノマーがモノマーDであり、該オリゴマーはDNAモノマーも修飾DNAモノマーも含まず、且つ、該オリゴマーの少なくとも一部が標的RNA配列と相補的な配列を含む、オリゴマー。

20

【化3】



30

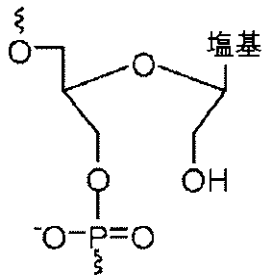
[式中、塩基は核酸塩基である。]

【請求項21】

1個以上の2' - 3' - セコ - RNAモノマーを含むオリゴマーであって、該オリゴマーは立体障害RNA結合性RNAであり、該2' - 3' - セコ - RNAモノマーがモノマーDであり、該オリゴマーはDNAモノマーも修飾DNAモノマーも含まず、且つ、該オリゴマーの少なくとも一部が標的RNA配列と相補的な配列を含む、オリゴマー。

40

【化 4】



モノマー D

10

[式中、塩基は核酸塩基である。]

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

(配列表)

本出願は、2009年11月2日に作成された、MD0807PC.txtという名前を付けられたASCIIファイルとして、EFS-Webにより、本明細書とともに提出された配列表を含む。この配列表は、大きさが30,894バイトであり、その全体が参照により本明細書に援用される。

20

RNA干渉(RNAi)は、標的遺伝子の発現を抑制する手段を提供することから、近年、多大な注目を集めている。RNAiは、遺伝的および生化学的経路、ならびに個々の遺伝子および遺伝子産物の機能を研究するための方法による基礎研究を提供する。その結果、RNA干渉は、製薬業界において標的バリデーシンのための重要なツールとなっている。また、薬剤として使用することができるRNA干渉複合体を媒介することができるRNA複合体を開発することを目的に、かなりの投資が行われている。

【0002】

治療での使用に対するRNAiの魅力は、その感度および配列特異性にある。しかしながら、例えば、RNA複合体の間違った鎖は、間違った標的核酸に対する反応を誘導する場合があるため、配列特異性に関して懸念されている。また、ある大きさのRNA複合体は、非特異的インターフェロン依存性応答を誘導するが、それも望ましくない。

30

【0003】

特許文献1では、アンチセンス鎖およびパッセンジャー鎖を含む、RNAiを媒介することができるRNA複合体であって、その鎖は、21~23個のヌクレオチドの長さであるRNA複合体が記載されている。このRNA複合体は、治療的適応に使用されることが示唆される。

【0004】

同様に、特許文献2では、アンチセンス鎖およびパッセンジャー鎖を含む、RNAiを媒介することができるRNA複合体であって、この複合体は、3'突出末端を含む、RNA複合体が記載されている。このRNA複合体は、治療的適応に使用されることが示唆される。

40

【0005】

特許文献3では、アンチセンス鎖およびパッセンジャー鎖を含む、RNAiを媒介することができる化学的改変ヌクレオチドを含有するRNAi複合体が記載されている。その明細書に記載されるRNA複合体は、LNA残基を含み、鎖のうちの1つの5'末端付近のLNA残基の取り込みは、その5'-末端にある最も弱い塩基対を形成する鎖がRISC複合体に取り込まれるため、どの鎖がRISC複合体に取り込まれるかを制御することができることと記載されている。

50

【0006】

RNAiは、本発明のRNA複合体を含み、オリゴヌクレオチドを使用して遺伝子発現の阻害を媒介するいくつかの方策のうち1つにすぎない。RNAアーゼH媒介RNA開裂、立体障害RNA結合、DNAザイムまたはリボザイム媒介RNA開裂およびsiRNAアプローチを含む、これらの異なる方策は、生物活性に適合する、選択された化学的改変ヌクレオチドの性質とともに、文献に記載されている[非特許文献1]。

【0007】

本発明のヒドロキシメチル置換モノマーB~Eは、DNA鎖に取り込まれているため、自動DNA/RNA合成に対するそれらのホスホラミダイト基本要素の調製のための手順が報告されている[非特許文献2；非特許文献3；非特許文献4]。DNA鎖に取り込まれているのは、独占的にチミンモノマーである。ヒドロキシメチル置換モノマーはどれも、あらかじめRNA鎖に取り込まれていない。

10

【0008】

一報告においては、1つまたは2つの2'-セコウリジンは、DNAオリゴヌクレオチドに取り込まれ、RNAアーゼH媒介RNA分解に対する好ましい効果がみられた(非特許文献5)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】米国特許出願公開第2003/0108923号明細書

20

【特許文献2】米国特許出願公開第2005/0234007号明細書

【特許文献3】国際公開第2005/073378号パンフレット

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】J. Kurreck, Eur. J. Biochem. 2003, 270, 1628

【非特許文献2】K. D. Nielsen, Bioorg. Med. Chem. 1995, 3, 1493

【非特許文献3】H. Thrane, Tetrahedron 1995, 51, 10389

30

【非特許文献4】P. Nielsen, Bioorg. Med. Chem. 1995, 3, 19

【非特許文献5】Mangos MM, Min KL, Viazovkina E, Gallarneau A, Elzagheid MI, Parniak MA, Damha MJ., J Am Chem Soc. 2003 Jan 22; 125(3): 654-61

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、RNA誘導遺伝子調節または遺伝子分析、特に、RNA干渉に対して使用するためのRNA鎖に取り込まれた1個または複数個のヒドロキシメチル置換モノマーを有するRNA複合体を提供する。そのため、本発明の目的は、通常使用されるRNA複合体と比較して、オフターゲット効果が低いRNA複合体を提供することである。別の目的は、インターフェロン応答性の低減を誘導するRNA複合体を提供することである。さらに別の目的は、細胞培養物中で、またはin vivoで酵素的分解への安定性に関する特性を改善したRNA複合体を提供することである。さらに別の目的は、未改変RNA複合体に対して、細胞培養物中で、またはin vivoで、遺伝子調節機能、例えば、遺伝子サイレンシング効果の強化を示すRNA複合体を提供することである。さらなる目的は、特定の器官または組織に対して標的とされるRNA複合体、および細胞膜を通過することができるRNA複合体を提供することである。本発明は、ヒドロキシメチル置換モノマ

40

50

一のオリゴヌクレオチドへの取り込みに適切なモノマー、およびそれらの合成のための方法も提供する。

本発明は、例えば以下の項目を提供する。

(項目 1)

非環式ヌクレオチドモノマーを含むオリゴヌクレオチド。

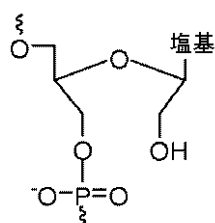
(項目 2)

前記非環式ヌクレオチドモノマーは、2'-3'-セコ-ヌクレオチドモノマーである、項目 2 に記載のオリゴヌクレオチド。

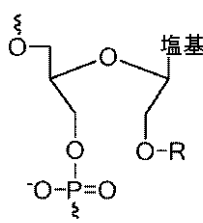
(項目 3)

前記非環式ヌクレオチドモノマーは、以下のモノマー D、F、G、H、I、および J から成る群より選択され、

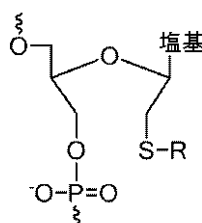
【化 27】



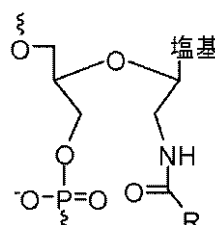
モノマー D



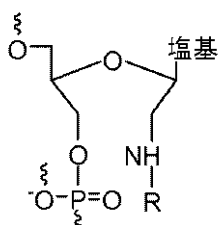
モノマー F



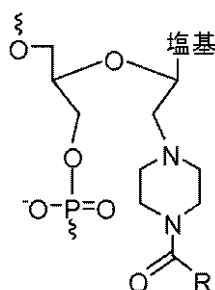
モノマー G



モノマー H



モノマー I



モノマー J

式中、Rは、H、アルキル、コレステロール誘導体、フルオロフォア、ポリアミン、脂肪酸、アミノ酸、単糖類、およびポリペプチドから成る群より選択される、項目 1 ~ 2 のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド。

(項目 4)

15 ~ 40 個のヌクレオチドモノマーを含む、項目 1 ~ 3 のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド。

(項目 5)

1 ~ 5 個の非環式ヌクレオチドモノマーを含む、項目 1 ~ 5 のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド。

(項目 6)

4 個未満の連続的 DNA モノマーを含む、項目 1 ~ 5 のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド。

(項目 7)

50% を上回る RNA モノマーを含む、項目 1 ~ 6 のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド。

(項目 8)

2'-O-アルキル-RNAモノマー、2'-アミノ-DNAモノマー、2'-フルオロ-DNAモノマー、LNAモノマー、PNAモノマー、HNAモノマー、ANAモノマー、FANAモノマー、CeNAモノマー、ENAモノマー、DNAモノマー、およびI

10

20

30

40

50

NAモノマーから成る群より選択されるヌクレオチド類似体をさらに含む、項目1～7のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド。

(項目9)

少なくとも2つのLNAヌクレオチド類似体を含む、項目1～8のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド。

(項目10)

ホスホロチオエート結合またはボラノホスフェート結合を含む、項目1～9のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド。

(項目11)

前記オリゴヌクレオチドは、該オリゴヌクレオチドに相補的な標的mRNAのRISC依存性翻訳抑制または分解を媒介することが可能である、項目1～10のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド。

10

(項目12)

項目1～11のいずれかに記載の少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを含む、RNA二本鎖。

(項目13)

15～40個の多数の塩基対を含む、項目12に記載のRNA二本鎖。

(項目14)

14～26個の多数の塩基対を含む、項目12に記載のRNA二本鎖。

(項目15)

少なくとも1つの突出を含む、項目12～14のいずれかに記載のRNA二本鎖。

20

(項目16)

前記突出の長さは、1～14個のヌクレオチドである、項目15に記載のRNA二本鎖。

(項目17)

少なくとも1つの3'突出を含む、項目12～15のいずれかに記載のRNA二本鎖。

(項目18)

前記少なくとも1つの3'突出の長さは、1～14個のヌクレオチドである、項目17に記載のRNA二本鎖。

(項目19)

少なくとも1つの平滑末端を含む、項目12に記載のRNA二本鎖。

30

(項目20)

前記RNA二本鎖は、標的mRNAに相補的なヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドを含み、ここで、該RNA二本鎖は、該標的mRNAの発現を低減させる、項目12～19のいずれかに記載のRNA二本鎖。

(項目21)

前記RNA二本鎖は、非環式モノマーの代わりに天然RNAモノマーを有する同一のRNA二本鎖と比較して、オフターゲット効果を低下させる、項目12～20のいずれかに記載のRNA二本鎖。

(項目22)

前記RNA二本鎖は、非環式モノマーの代わりに天然RNAモノマーを有する同一のRNA二本鎖と比較して、有効性を増大または持続させる、項目12～21のいずれかに記載のRNA二本鎖。

40

(項目23)

前記RNA二本鎖は、非環式モノマーの代わりに天然RNAモノマーを有する同一のRNA二本鎖と比較して、安定性を改善させる、項目12～22のいずれかに記載のRNA二本鎖。

(項目24)

前記RNA二本鎖は、非環式モノマーの代わりに天然RNAモノマーを有する同一のRNA二本鎖と比較して、免疫刺激を低減させる、項目12～23のいずれかに記載のRN

50

A 二本鎖。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】RNA複合体に取り込まれるヒドロキシメチル置換ヌクレオチドの異なる構造の例を示す。モノマーAは、比較のために示し、そのリボース足場を有する天然RNAモノマーである。本発明のRNA複合体に含まれるモノマーB～Eの特徴は、ヒドロキシメチル基（「遊離ヒドロキシメチル基」）である置換基を含有することであるため、本発明は、「ヒドロキシメチル置換RNAオリゴヌクレオチドおよびRNA複合体」と表題される。遊離ヒドロキシメチル基は、例えば、環式リボース足場のC4'原子または非環式リボース足場のC1'原子に付加する。本発明のヒドロキシメチル置換ヌクレオチドは、それぞれ、リン原子に付加する他の酸素原子を含有するため、ヌクレオチド間結合の形成を行う（図1参照）。これらの他の酸素原子の1個または複数個は、本発明のRNA複合体のヒドロキシメチル置換ヌクレオチドの1個または複数個が、RNA鎖の3'または5'末端に位置する場合に、ヒドロキシ基の一部になり得る。任意の末端に位置付けられた天然RNAモノマーの場合のように、本発明のRNA複合体のヒドロキシメチル置換ヌクレオチドの1つが、RNA鎖の3'末端および/または5'末端に位置する場合、このモノマーのヒドロキシ基はリン酸化することができる。本発明のヒドロキシメチル置換ヌクレオチドには、ウラシル、チミン、シトシン、5-メチルシトシン、アデニン、グアニン、または任意の他の公知の天然もしくは合成核酸塩基もしくは核酸塩基類似体（図1の「塩基」として指定される）のような核酸塩基が付加する。

10

20

【図2】ヒドロキシメチル置換モノマーの誘導體化、官能化および結合体化された変異体を示す。例として、ヒドロキシメチルで置換された2',3'-セコ-RNAモノマーDの誘導體化、官能化および結合体化された変異体を示す（図1参照）。モノマーFは、エーテル結合を介して結合するR基を含有する。モノマーGは、チオエーテル結合を介して結合するR基を含有する。モノマーHは、アミド結合を介して結合するR基を含有する。モノマーIは、アミノ結合を介して結合するR基を含有する。モノマーJは、ピペラジノ部分を介して結合するR基を含有する。そのようなモノマーの1つまたはいくつかの、本発明のRNA複合体への取り込みによって、RNA複合体の特性を調節することができる。例えば、生物学的安定性の増加、RNAターゲティング能力の増加、または特定の送達特性を導入することができ、検出のために、蛍光基を付加することができる。

30

【図3】オリゴヌクレオチドまたはRNA複合体のモノマーである場合があるヒドロキシメチル置換モノマー（モノマーCおよびモノマーD）の2つの構造の図である。

【図4】「モノマーX」（すなわち、2',3'-セコ-RNAモノマーD）を含有する本発明のsiRNA複合体に関する遺伝子サイレンシングの結果の図である。結果は、核酸塩基（W130センス鎖において「X」として示される）としてウラシルを有するモノマーDを含有するW130センス鎖（ヌクレオチド配列に関しては、図4参照）で得られた。本研究で使用するアンチセンス鎖の核酸配列は、この図の下部に掲載する（アンチセンス配列におけるすべてのXモノマーは、核酸塩基としてウラシルを有するモノマーDである）。上付き文字「L」が付くモノマーは、固定核酸（例えば、TLは、チミン固定核酸またはLNAを示す）を表す。図4は、出現の順に、それぞれ、配列番号44～52を開示する。

40

【図5】「モノマーX」（すなわち、2',3'-セコ-RNAモノマーD）を含有する本発明のsiRNA複合体に関する遺伝子サイレンシングの結果の図である。結果は、核酸塩基（W131センス鎖において「X」として示される）としてウラシルを有するモノマーDを含有するW131センス鎖（ヌクレオチド配列に関しては、図5参照）で得られた。本研究で使用するアンチセンス鎖の核酸配列は、図4の下部に掲載する（アンチセンス配列におけるすべてのXモノマーは、核酸塩基としてウラシルを有するモノマーDである）。図5は配列番号53を開示する。

【図6】「モノマーX」（すなわち、2',3'-セコ-RNAモノマーD）を含有する

50

本発明の siRNA 複合体に関する遺伝子サイレンシングの結果の図である。これらの結果は、核酸塩基として、シトシン (sC、W282 配列の 5' 末端から第 1 の X)、アデニン (sA、W282 配列の 5' 末端から第 2 の X)、およびシトシン (sC、W282 配列の 3' 末端から最後の X) を有するモノマー D を含有する W282 センス鎖 (ヌクレオチド配列に関しては、図 6 参照) で得られた。本研究で使用するアンチセンス鎖の核酸配列は、図 4 の下部に掲載する (アンチセンス配列におけるすべての X モノマーは、核酸塩基としてウラシルを有するモノマー D である)。図 6 は配列番号 54 を開示する。

【図 7】「モノマー X」(すなわち、2', 3'-セコ-RNA モノマー D) を含有する本発明の siRNA 複合体に関する遺伝子サイレンシングの結果の図である。これらの結果は、W194 センス鎖 (ヌクレオチド配列に関しては、図 7 参照) で得られた。本研究で使用するアンチセンス鎖の核酸配列は、図 4 の下部に掲載する (アンチセンス配列におけるすべての X モノマーは、核酸塩基としてウラシルを有するモノマー D である)。上付き文字「L」が付くモノマーは、固定核酸 (例えば、T^L は、チミン固定核酸または LNA を示す) を表す。図 7 は配列番号 55 を開示する。

【図 8】「モノマー X」(すなわち、2', 3'-セコ-RNA モノマー D) を含有する本発明の siRNA 複合体に関する遺伝子サイレンシングの結果の図である。これらの結果は、W181 センス鎖 (ヌクレオチド配列に関しては、図 8 参照) で得られた。本研究で使用するアンチセンス鎖の核酸配列は、図 4 の下部に掲載する (アンチセンス配列におけるすべての X モノマーは、核酸塩基としてウラシルを有するモノマー D である)。上付き文字「L」が付くモノマーは、固定核酸 (例えば、T^L は、チミン固定核酸または LNA を示す) を表す。図 8 は配列番号 56 を開示する。

【図 9】「モノマー X」(すなわち、2', 3'-セコ-RNA モノマー D) を含有する本発明の siRNA 複合体に関する遺伝子サイレンシングの結果の図である。これらの結果は、核酸塩基 (W129 センス鎖において「X」として示される) としてウラシルを有するモノマー D を含有する W129 センス鎖 (ヌクレオチド配列に関しては、図 9 参照) で得られた。本研究において含まれるアンチセンス鎖は、図 4 の下部に掲載する (アンチセンス配列におけるすべての X モノマーは、核酸塩基としてウラシルを有するモノマー D である)。上付き文字「L」が付くモノマーは、固定核酸 (例えば、T^L は、チミン固定核酸または LNA を示す) を表す。図 9 は配列番号 57 を開示する。

【発明を実施するための形態】

【0013】

本発明の一態様に記載される特定の特色は、本発明の他の態様にも適用する。例えば、第 1 の態様の RNA 複合体に関して記載される特色は、適切な場合は、第 9 の態様のオリゴヌクレオチド、および第 10 の態様の RNA 二本鎖にも適用する。

【0014】

第 1 の態様、RNA 複合体

siRNA 二本鎖または一本鎖 RNA の形態の RNA 複合体は、細胞における標的核酸の様々な改変を媒介することができる。この工程では、複合体のアンチセンス鎖は、アンチセンス鎖への配列相補性の拡張を有する標的核酸にハイブリダイズすることができるため、ガイドとして作用する。

【0015】

標的核酸を標的とする前に、アンチセンス鎖は、標的核酸に作用することができる、RNA 誘導タンパク質複合体 (RGPC) にしばしば取り込まれる。RNA 誘導タンパク質複合体の一例は、RNA 誘導サイレンシング複合体 (RISC) である。他のそのような RGPC が存在し、本発明の RNA 複合体は、これらの他の RGPC と併用される場合、または任意の RGPC と相互作用しなくても、有利であると考えられる。

【0016】

本発明の一目的は、生物媒体 (血清、in vivo、細胞培養中) における核酸分解に対して RNA 複合体を安定化させることである。

【0017】

10

20

30

40

50

本発明の別の目的は、二本鎖RNA複合体の遺伝子サイレンシング効果を改善することである。この改善は、例えば、有効性の増加、オフターゲット効果の低下、免疫刺激の低減、保存に対する安定性の増加、血清等のような生物媒体における安定性の増加、作用の持続時間の増加、および薬物動態特性の改善に関し、すべて天然型未改変RNA複合体に対するものである。

【0018】

本発明のさらに別の目的は、一本鎖RNAオリゴヌクレオチドの遺伝子サイレンシング効果を改善することである。この改善は、例えば、有効性の増加、オフターゲット効果の低下、免疫刺激の低減、保存に対する安定性の増加、血清等のような生物媒体における安定性の増加、作用の持続時間の増加、および薬物動態特性の改善に関し、すべて天然型未改変RNA複合体に対するものである。

10

【0019】

本発明のsiRNA複合体のパッセンジャー鎖ではなくアンチセンス鎖のみが、標的核酸の改変を媒介することを確実にすることが本発明の目的である。この目的の達成により、オフターゲット効果が低いRNA複合体が提供される。

【0020】

本発明の別の目的は、生物媒体におけるRNA複合体の十分な安定性を確実にすることである。したがって、未改変RNA複合体に対して、細胞培養中または*in vivo*で遺伝子調節機能、例えば、遺伝子サイレンシング効果の強化を示すRNA複合体を提供することが目的である。

20

【0021】

本発明の根本概念は、1個または複数個のヒドロキシメチル置換モノマーを、本発明のRNA複合体に取り込むことである。siRNAの場合、これにより、複合体の1つの鎖のみのRISCへの選択的取り込みがもたらされる。1個または複数個のヒドロキシメチル置換モノマーの1つ（または複数）のRNA鎖への取り込みによって、生物媒体中で、そして*in vivo*でRNA複合体の寿命が改善され、したがって、生物活性の改善、例えば、遺伝子調節活性の改善をもたらす。

【0022】

本発明のRNA複合体のRNA鎖は、天然RNAヌクレオチド、遺伝子サイレンシング活性に適合することが公知のRNA改変[Nawrot and Sipa, Curr. Topics Med. Chem. 2006, 6, 913-925]、およびヒドロキシメチル置換モノマー(図1)を含み得る。ホスホジエステル結合は、個々のモノマーを結合し得るが、ホスホチオエート結合のような改変された結合および当業者に公知の他の結合[Nawrot and Sipa, Curr. Topics Med. Chem. 2006, 6, 913-925]を代わりに使用してもよい。RNA複合体は、アンチセンス鎖(アンチセンス鎖は、本明細書において誘導鎖とも称される)およびパッセンジャー鎖(パッセンジャー鎖は、本明細書においてセンス鎖とも称される)から構成されるsiRNA二本鎖をともに構成する2つの鎖を含む場合があるが、一本鎖マイクロRNA模倣分子も、例えば、マイクロRNAを標的とするため有用な一本鎖アンチセンス分子であるため、本発明のRNA複合体として本明細書において考慮される。

30

40

【0023】

本発明の実施形態においては、RNA複合体は、1個または複数個のヒドロキシメチル改変ヌクレオチドモノマーを含む(図1参照)。1つのそのような例として、以下は、非環式ヌクレオチドモノマー、より好ましくはモノマーD~Jから成る群より選択される非環式モノマーである。そのため、ヒドロキシメチル改変ヌクレオチドモノマーに関する第1の態様において記載される実施形態は、非環式ヌクレオチドモノマーに関する他の実施形態に対して適用する。

【0024】

ヒドロキシメチル改変ヌクレオチドモノマーの使用は、いくつかの理由で有利である場合がある。それらは、例えば、RNA複合体の遺伝子サイレンシング効果を増加させるた

50

めに使用される場合があり、例えば、RNA複合体の末端への1個または複数個のヒドロキシメチル改変ヌクレオチドモノマーの取り込みは、核酸分解に対する著しい安定性を誘導する。それらを使用して、siRNA複合体のパスセンジャー鎖の遺伝子サイレンシング効果を低減させて、オフターゲット効果の数を低減させることができる。

【0025】

本発明の好ましい一実施形態においては、1個または複数個のヒドロキシメチル改変ヌクレオチドモノマーを含むRNA複合体は、一本鎖RNA構築物である。

本発明の好ましい一実施形態においては、1個または複数個のヒドロキシメチル改変ヌクレオチドモノマーを含むRNA複合体は、一本鎖アンチセンス分子として作用することによって遺伝子発現を阻害することができる一本鎖RNA構築物である。

10

【0026】

本発明の好ましい一実施形態においては、1個または複数個のヒドロキシメチル改変ヌクレオチドモノマーを含むRNA複合体は、マイクロRNAを機能的に模倣する一本鎖RNA構築物である。

【0027】

本発明の好ましい一実施形態においては、1個または複数個のヒドロキシメチル改変ヌクレオチドモノマーを含むRNA複合体は、siRNA構築物である。

【0028】

したがって、一実施形態においては、siRNA構築物のアンチセンス鎖は、1個または複数個のヒドロキシメチル改変ヌクレオチドモノマーを含む。

20

【0029】

他の実施形態においては、siRNA構築物のパスセンジャー鎖は、1個または複数個のヒドロキシメチル改変ヌクレオチドモノマーを含む。

【0030】

さらに他の実施形態においては、siRNA構築物の切れ目のあるパスセンジャー鎖の第1および第2のRNA分子は、それぞれ、1個または複数個のヒドロキシメチル改変ヌクレオチドモノマーを含有する。

【0031】

本発明の一実施形態においては、アンチセンス鎖におけるヒドロキシメチル改変ヌクレオチドモノマーの数は、10である。本発明の他の実施形態においては、アンチセンス鎖のヒドロキシメチル改変ヌクレオチドモノマーの数は、それぞれ9、8、7、6、5、4、3、2または1である。

30

【0032】

他の実施形態においては、アンチセンス鎖のすべてのヌクレオチドは、ヒドロキシメチル改変ヌクレオチドモノマーである。

【0033】

好ましい実施形態においては、アンチセンス鎖におけるすべてのヒドロキシメチル改変ヌクレオチドモノマーは、1~8の位置に存在し、位置は、5'末端から数えられる。さらにより好ましくは、アンチセンス鎖におけるヒドロキシメチル改変ヌクレオチドモノマーは、マイクロRNAのいわゆる種領域に対応する2~7の位置に存在する。そのため、前述の領域におけるヒドロキシメチル改変ヌクレオチドモノマーの存在によって、アンチセンス鎖がマイクロRNAとして作用することを防止し、アンチセンス鎖がsiRNAとして機能することを目的とする場合、オフターゲット効果を低下させる。

40

【0034】

好ましい実施形態においては、少なくとも1個のヒドロキシメチル改変ヌクレオチドモノマーが、9~16の位置に存在し、位置は、5'末端から数えられる。さらにより好ましくは、2、3、4、5または6個のヒドロキシメチル改変ヌクレオチドモノマーの存在が、9~16の位置に存在し、別の実施形態においては、アンチセンス鎖におけるヒドロキシメチル改変ヌクレオチドモノマーは、9~16の位置のすべてに存在する。一実施形態においては、ヒドロキシメチル改変ヌクレオチドモノマーは、9~16の領域のみに存

50

在し、残りのアンチセンス鎖には存在しない。

【0035】

さらにより好ましくは、アンチセンス鎖におけるヒドロキシメチル改変ヌクレオチドモノマーは、9～11の位置に存在し、好ましくは、残りのオリゴヌクレオチドには存在しない。前述の領域におけるヒドロキシメチル改変ヌクレオチドモノマーの存在は、ミクロRNAとして作用するアンチセンス鎖を誘導し、すなわち、siRNA効果が最小限になり、ミクロRNA効果がより高くなることを確実にする。この効果は、恐らく、非環式ヒドロキシメチル置換モノマー、例えば、モノマーDの存在によって引き起こされる親和性の低減のために、完全長結合に対する頻度の低減から生じる。

【0036】

同様に、本発明の別の実施形態においては、本発明のsiRNA複合体のパッセンジャー鎖におけるヒドロキシメチル改変ヌクレオチドモノマーの数は、10である。本発明の他の実施形態においては、本発明のsiRNA複合体のパッセンジャー鎖におけるヒドロキシメチル改変ヌクレオチドモノマーの数は、それぞれ9、8、7、6、5、4、3、2または1である。

【0037】

別の実施形態においては、本発明のsiRNA複合体のパッセンジャー鎖のヌクレオチドは、すべてヒドロキシメチル改変ヌクレオチドモノマーである。

一実施形態においては、本発明のsiRNA複合体のアンチセンス鎖およびパッセンジャー鎖の両方は、1個または複数個のヒドロキシメチル改変ヌクレオチドモノマーを含有する。

【0038】

一態様において、本発明は、標的核酸の核酸改変を媒介することができるRNA複合体を提供する。そのようなRNA複合体は、例えば、siRNA、ミクロRNAまたはミクロRNA前駆体(プレミクロRNA)であり得る。

【0039】

本発明のsiRNA複合体のRNA複合体は、アンチセンス鎖およびアンチセンス鎖にハイブリダイズされるパッセンジャー鎖を含む中核二本鎖領域を含む。

【0040】

本内容において言及される標的核酸は、複合体のアンチセンス鎖に対して有意な相補性を有する核酸である。好ましくは、相補性は、一続きのいくつかのヌクレオチドに対して完全である。

【0041】

したがって、一実施形態においては、相補性は、一続きの25ヌクレオチドに対して完全である。

【0042】

他の実施形態においては、相補性は、一続きの24個のヌクレオチド、23個のヌクレオチド、22個のヌクレオチド、21個のヌクレオチド、20個のヌクレオチド、19個のヌクレオチド、18個のヌクレオチド、17個のヌクレオチド、16個のヌクレオチド、15個のヌクレオチド、14個のヌクレオチド、13個のヌクレオチド、12個のヌクレオチド、11個のヌクレオチド、10個のヌクレオチド、9個のヌクレオチド、8個のヌクレオチド、7個のヌクレオチドまたは6個のヌクレオチドに対してそれぞれ完全である。

【0043】

一実施形態においては、一続きの相補性は、1つのミスマッチを含む。他の実施形態においては、一続きの相補性は、2つのミスマッチ、3つのミスマッチ、または4つのミスマッチをそれぞれ含む。1つのミスマッチは、一続きの相補性における領域であり、例えば、GがAの反対である場合、塩基対は形成することができない。より多くのミスマッチが存在する場合、それらは互いに隣接し得るか、または一続きの相補性の異なる領域において間隔を空けて存在し得る。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 4 】

本発明の *siRNA* 複合体の *RNA* 複合体は、好ましい実施形態において、実質的に二本鎖の領域である中核を含む。*RNA* 複合体における一本鎖領域は、主に、複合体の突出に関連する。

【 0 0 4 5 】

そのため、一実施形態においては、本発明の *siRNA* 複合体の二本鎖領域は、1つのミスマッチを含む。他の実施形態においては、二本鎖領域は、2つのミスマッチ、3つのミスマッチ、および4つのミスマッチをそれぞれ含む。

【 0 0 4 6 】

本明細書において使用されるように、「標的核酸」という用語は、標的開裂または立体障害等のアンチセンス鎖によって誘導される改変を受ける任意の *RNA* / *DNA* を包含する。標的 *RNA* / *DNA* は、例えば、ゲノム *DNA*、ゲノムウイルス *RNA*、*mRNA*、*pre-mRNA*、または非コード *RNA* であり得る。

10

【 0 0 4 7 】

本明細書において使用されるように、「標的核酸改変」という用語は、標的核酸の構造に影響を与えずに標的核酸の活性に影響を与える改変を含む、標的核酸に対する任意の改変を意味する。

【 0 0 4 8 】

本発明の好ましい標的核酸は、*mRNA* である。したがって、一実施形態においては、*RNA* 複合体によって媒介される核酸改変は、*RNA* 干渉 (*RNAi*) である。好ましい実施形態においては、*RNAi* は、*mRNA* の分解を媒介する。別の好ましい実施形態においては、*RNAi* は、*mRNA* の翻訳阻害を媒介する。別の実施形態においては、*RNAi* は、*mRNA* の翻訳阻害および分解の両方を媒介する。

20

【 0 0 4 9 】

他の好ましい実施形態においては、標的核酸は、非コード *RNA*、例えば、*tRNA*、*miRNA*、*snRNA*、*snRNA*、または *rRNA* である。

【 0 0 5 0 】

さらに別の実施形態においては、標的核酸は、ゲノム *DNA* である。そのような実施形態においては、好ましい核酸改変は、*DNA* メチル化および *DNA* 欠損を含む。

【 0 0 5 1 】

本発明の *RNA* 複合体の大きさは、本発明の1つまたは複数の目的を果たしながらも、異なり得る。これは、例えば、特定の目的がオフターゲット効果の低下である場合に適用する。

30

【 0 0 5 2 】

そのため、本発明の *siRNA* 複合体の中核二本鎖領域は、10個の塩基対、11個の塩基対、12個の塩基対、13個の塩基対、14個の塩基対、15個の塩基対、16個の塩基対、17個の塩基対、18個の塩基対、19個の塩基対、20個の塩基対、21個の塩基対、22個の塩基対、23個の塩基対、24個の塩基対、25個の塩基対、26個の塩基対、27個の塩基対、28個の塩基対、29個の塩基対、30個の塩基対、35個の塩基対、40個の塩基対、42個の塩基対、45個の塩基対、50個の塩基対、55個の塩基対、60個の塩基対、または62個の塩基対の群から選択される多数の塩基対を含む場合がある。

40

【 0 0 5 3 】

一実施形態においては、本発明の *siRNA* 複合体の中核二本鎖領域は、15 ~ 40個の塩基対を含む。

【 0 0 5 4 】

別の好ましい実施形態においては、本発明の *siRNA* 複合体の中核二本鎖領域は、18 ~ 22個の塩基対を含む。

【 0 0 5 5 】

一実施形態においては、本発明の *siRNA* 複合体の中核二本鎖領域は、40の塩基対

50

よりも長い、一部の細胞では、より長い二本鎖RNA複合体の導入は、インターフェロン依存性非特異応答を誘導することが知られている。そのような一実施形態においては、複合体は、RGP Cと結合する前に、より短い二本鎖RNA複合体へと処理されると考えられる。Dicer等の酵素のようなRNAアーゼIIIは、処理を行うことができる。Dicerも40個の塩基対より短い二本鎖RNAを処理し、そのようなRNA複合体(Dicer基質と称される)は、処理なしにRISCへ進入するsiRNAと比較して、様々な利点を有する。したがって、一実施形態においては、本発明のRNA複合体は、Dicer基質である。

【0056】

別の実施形態においては、RNA複合体は一本鎖であり、二本鎖領域を有さない。

10

【0057】

さらに別の実施形態においては、RNA複合体は一本鎖であるが、1つまたは複数の二本鎖領域を含有するように折り重なる。そのような実施形態は、例えば、マイクロRNAおよびそれらの機能を模倣するために有用である。

【0058】

さらに別の実施形態においては、本発明のsiRNA複合体の中核二本鎖領域は、10の塩基対より短いため、1~9個の塩基対を含む。

【0059】

本発明の一実施形態においては、RNA複合体の中核二本鎖領域は、2つより多いRNA鎖から成る。

20

【0060】

本発明の一実施形態においては、RNA複合体の中核二本鎖領域は、3つのRNA鎖から成る。

【0061】

本発明の別の実施形態においては、RNA複合体の中核二本鎖領域は、4つ以上のRNA鎖から成る。

【0062】

本発明の好ましい実施形態においては、本発明のsiRNA複合体は、突出を含む。本内容において使用される突出は、二本鎖領域に続く短い一本鎖領域を指す。

【0063】

一実施形態においては、本発明のsiRNA複合体のアンチセンス鎖は、3'突出を含む。

30

【0064】

別の実施形態においては、本発明のsiRNA複合体のパッセンジャー鎖は、3'突出を含む。

【0065】

さらに別の実施形態においては、本発明のsiRNA複合体のアンチセンス鎖は、5'突出を含む。

【0066】

さらに別の実施形態においては、本発明のsiRNA複合体のパッセンジャー鎖は、5'突出を含む。

40

【0067】

好ましい実施形態においては、本発明のsiRNA複合体のアンチセンス鎖およびパッセンジャー鎖は、両方とも3'突出を含む。

【0068】

本発明のsiRNA複合体の突出は、複合体の基本機能を干渉しない様々な長さであり得る。そのため、一実施形態においては、突出は、1個のヌクレオチド、2個のヌクレオチド、3個のヌクレオチド、4個のヌクレオチド、5個のヌクレオチド、6個のヌクレオチド、7個のヌクレオチド、および8個のヌクレオチドの長さを有する突出の群より選択される。

50

【0069】

本発明の s i R N A 複合体の最も好ましい突出は、それぞれ、1、2、および3個のヌクレオチドの長さを有する突出である。

【0070】

一実施形態においては、本発明の s i R N A 複合体のアンチセンス鎖の突出は、パッセンジャー鎖の突出と同じ長さを有する。

【0071】

別の実施形態においては、本発明の s i R N A 複合体のアンチセンス鎖の突出は、パッセンジャー鎖の突出と同じ長さを有さない。

【0072】

本発明の s i R N A 複合体のさらに別の実施形態においては、RNA複合体は、少なくとも1つの平滑末端を含む。「平滑末端」は、いかなる突出ヌクレオチドを有さない二本鎖核酸の末端を指し、すなわち、二本鎖核酸末端の両鎖は同じ位置にある。

【0073】

別の実施形態においては、本発明の s i R N A 複合体は、両末端が平滑末端である。

【0074】

本発明の好ましいRNA複合体は、全体構造においては、より長い二本鎖RNA複合体のDicer処理の生成物と同様である。別の実施形態においては、本発明のRNA複合体は、上記のDicer基質である。

【0075】

本発明の他の好ましいRNA複合体は、中核二本鎖領域が18~22個の塩基対を含む複合体、およびアンチセンス鎖およびパッセンジャー鎖がそれぞれ1~3個のヌクレオチドの3'突出を含む複合体である。

【0076】

本発明のRNA複合体のアンチセンス鎖は、複合体の機能を干渉しない様々な長さを有することができる。そのため、好ましい実施形態においては、アンチセンス鎖は、それぞれ、8-mer、9-mer、10-mer、11-mer、12-mer、13-mer、14-mer、15-mer、16-mer、17-mer、18-mer、19-mer、20-mer、21-mer、22-mer、23-mer、24-mer、25-mer、26-mer、27-mer、28-mer、29-mer、30-mer、31-mer、32-mer、33-mer、34-mer、35-mer、36-mer、37-mer、38-mer、39-mer、40-mer、41-mer、42-mer、43-mer、44-mer、45-mer、46-mer、47-mer、48-mer、49-mer、50-mer、51-mer、52-mer、53-mer、54-mer、55-mer、56-mer、57-mer、58-mer、59-mer、60-mer、61-mer、または62-merである。当然のことながら、例えば、19-merは、19個のモノマー、すなわち、19個のヌクレオチドのアンチセンス鎖である。

【0077】

別の好ましい実施形態としては、RNA複合体のアンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の以下の群より選択される：15-mer、16-mer、17-mer、18-mer、19-mer、20-mer、21-mer、22-mer、および23-mer。

【0078】

一実施形態においては、本発明の s i R N A 複合体のパッセンジャー鎖は、不連続である。本発明の s i R N A 複合体の一実施形態においては、パッセンジャー鎖は、いくつかの別々のRNA分子を含む。RNA分子の数は、1、2、3、4、5、または6であり得る。

【0079】

一実施形態においては、本発明の s i R N A 複合体のパッセンジャー鎖の個々のRNA分子の長さは、4個のモノマー以上である。他の実施形態においては、パッセンジャー鎖

10

20

30

40

50

の個々のRNA分子の長さは、それぞれ、5個のモノマー、6個のモノマー、7個のモノマー、8個のモノマー、9個のモノマー、10個のモノマー、11個のモノマー、および12個のモノマーより長い。

【0080】

他の実施形態においては、本発明のsiRNA複合体のパスセンジャー鎖の個々のRNA分子の長さは、それぞれ、5個のモノマー、6個のモノマー、7個のモノマー、8個のモノマー、9個のモノマー、10個のモノマー、11個のモノマー、および12個のモノマー未満である。

【0081】

本発明の一実施形態においては、本発明のsiRNA複合体の不連続のパスセンジャー鎖は、不連続のパスセンジャー鎖を共に形成する第1および第2のRNA分子を含み、第1のRNA分子は、アンチセンス鎖の下流部にハイブリダイズし、第2のRNA分子は、アンチセンス鎖の上流部にハイブリダイズする。

10

【0082】

一実施形態においては、本発明のsiRNA複合体のアンチセンス鎖は、不連続である。アンチセンス鎖の好ましい不連続性は、パスセンジャー鎖の好ましい不連続性と同じである。

【0083】

本発明のsiRNA複合体の鎖のうちの1つの不連続性は、切れ目であり得る。切れ目は、欠損リン酸ジエステル結合によって生じる二本鎖核酸の1つの鎖における不連続性として理解されるが、二本鎖核酸は、ヌクレオチドを欠損していない。そのため、切れ目の反対側の塩基は、切れ目のある鎖上の塩基にハイブリダイズする。

20

【0084】

本発明のsiRNA複合体の鎖のうちの1つの別の不連続性は、リン酸ジエステル結合以外の、糖-リン酸エステル骨格における1つの欠損結合、または2つ以上の欠損結合によって生じる二本鎖核酸の1つの鎖における不連続性として理解される選択的切れ目であるが、二本鎖核酸は、核酸塩基を欠損していない。そのため、切れ目の反対側の塩基は、切れ目のある鎖上の塩基にハイブリダイズできる。

【0085】

本発明のRNA複合体のRNA鎖の場合、指名として使用されるギャップは、少なくとも1ヌクレオチド、ヌクレオシド、または核酸塩基が、二本鎖核酸において欠損している場合の不連続性を有すると説明することができる。

30

【0086】

好ましくは、RNA複合体の5'末端は、リン酸化されるか、またはリン酸化に使用可能である。リン酸化に使用可能とは、例えば、5'-ヒドロキシ基が、5'-ヒドロキシ基付近における他の基との直接結合または他の結合（これは、この5'-ヒドロキシ基のリン酸化を妨害する）によって阻害されていないことを意味する。

【0087】

したがって、本発明の好ましい実施形態においては、RNA複合体のRNA分子は、5'末端リン酸エステルおよび3'-ヒドロキシ基を含む。

40

【0088】

別の実施形態においては、本発明のsiRNA複合体の第2のRNA分子は、5'末端リン酸エステルおよび3'-ヒドロキシ基を含む。

【0089】

さらに別の実施形態においては、アンチセンス鎖は、5'末端リン酸エステルおよび3'-ヒドロキシ基を含む。

【0090】

本発明の一部の実施形態においては、RNA複合体が、ヒドロキシメチル改変ヌクレオチド以外のヌクレオチド類似体を含むことが好ましい。ヒドロキシメチル改変ヌクレオチド以外のそのようなヌクレオチド類似体は、以下において、「選択的に改変されたヌクレ

50

オチド」と称される。

【0091】

選択的に改変されたヌクレオチドの使用は、いくつかの理由で有利である場合がある。例えば、本発明の s i R N A 複合体の中核二本鎖領域の融解温度を上昇させるために使用することができる。

【0092】

選択的に改変されたヌクレオチドの使用は、アンチセンス鎖と標的核酸との間に形成される二本鎖構造の融解温度を上昇させるために有利である場合がある。

【0093】

したがって、一実施形態においては、アンチセンス鎖は、選択的に改変されたヌクレオチドを含む。

【0094】

別の実施形態においては、本発明の s i R N A 複合体のパッセンジャー鎖は、選択的に改変されたヌクレオチドを含む。

【0095】

さらに別の実施形態においては、本発明の s i R N A 複合体のパッセンジャー鎖の第1および第2のRNA分子は、それぞれ、選択的に改変されたヌクレオチドを含有する。

【0096】

本発明の一実施形態においては、RNA複合体における選択的に改変されたヌクレオチドの数は、10である。本発明の他の実施形態においては、RNA複合体におけるヌクレオチド類似体の数は、それぞれ、9、8、7、6、5、4、3、2、または1である。

【0097】

本発明の一実施形態においては、アンチセンス鎖における選択的に改変されたヌクレオチドの数は、10である。本発明の他の実施形態においては、アンチセンス鎖におけるヌクレオチド類似体の数は、それぞれ、9、8、7、6、5、4、3、2、または1である。

【0098】

別の実施形態においては、アンチセンス鎖のすべてのヌクレオチドは、選択的に改変されたヌクレオチド、または選択的に改変されたヌクレオチドおよびヒドロキシメチル置換ヌクレオチドの組み合わせである。

【0099】

同様に、本発明の別の実施形態においては、本発明の s i R N A 複合体のパッセンジャー鎖におけるヌクレオチド類似体の数は、10である。本発明の他の実施形態においては、パッセンジャー鎖のヌクレオチド類似体の数は、それぞれ、9、8、7、6、5、4、3、2、または1つある。

【0100】

別の実施形態においては、本発明の s i R N A 複合体のパッセンジャー鎖のすべてのヌクレオチドは、ヌクレオチド類似体、または選択的に改変されたヌクレオチドおよびヒドロキシメチル置換ヌクレオチドの組み合わせである。

【0101】

一実施形態においては、本発明の s i R N A 複合体のアンチセンス鎖およびパッセンジャー鎖は、両方とも選択的に改変されたヌクレオチドを含有する。

【0102】

一実施形態においては、RNA複合体の選択的に改変されたヌクレオチドは、同一、すなわち、例えば、それらは、すべてLNAまたは、すべて2'-O-Me-RNAである。別の実施形態においては、様々な異なる選択的に改変されたヌクレオチドは、同じRNA複合体において使用される。

【0103】

一実施形態においては、RNA複合体は、ホスホロチオエート結合を含む。

【0104】

10

20

30

40

50

別の実施形態においては、RNA複合体は、天然リン酸ジエステルおよびホスホロチオエート結合の混合物を含む。

【0105】

本発明の好ましいヌクレオチド類似体は、2'-O-アルキル-RNAモノマー、2'-アミノ-DNAモノマー、2'-フルオロ-DNAモノマー、LNAモノマー、HNAモノマー、ANAモノマー、FANAモノマー、DNAモノマー、PNAモノマー、およびINAモノマーの群から選択されるヌクレオチド類似体であるが、他のモノマーも使用することができる [Nawrot and Sipa, Curr. Topics Med. Chem. 2006, 6, 913-925]。

【0106】

一実施形態においては、本発明のヒドロキシメチル置換モノマーのヒドロキシメチル置換基は、共役基 (conjugating group) によって官能化される。共役基は、本発明のRNA複合体の特性を変化、拡大、または改善する、当業者に公知の基である。そのような基は、細胞分布、臓器分布、組織分布、二本鎖融解温度、標的親和性、生物学的安定性、ハイブリダイゼーションのシグナル伝達等を調節するために有用であり得る。

【0107】

一実施形態においては、本発明のヒドロキシメチル置換モノマーのヒドロキシメチル置換基は、結合した基と、ヒドロキシメチル置換基のメチレン基との間にあるエーテル結合によって官能化される。図2参照 (モノマーF)。

【0108】

一実施形態においては、本発明のヒドロキシメチル置換モノマーのヒドロキシメチル置換基は、当業者に公知の方法を使用して、本発明のRNA複合体への取り込みの前に、チオエーテル官能基に変換される。図2参照 (モノマーG)。

【0109】

別の実施形態においては、本発明のヒドロキシメチル置換モノマーのヒドロキシメチル置換基は、当業者に公知の方法を使用して、本発明のRNA複合体への取り込みの前に、メルカプトメチル官能基に変換される。図2参照 (モノマーG、R=H)。このメルカプト官能基は、当業者に公知の方法を使用して、RNA合成の間、例えば、そのアセチル誘導体として適切に保護される。

【0110】

一実施形態においては、本発明のヒドロキシメチル置換モノマーのヒドロキシメチル置換基は、当業者に公知の方法を使用して、本発明のRNA複合体への取り込みの前に、アミン官能基に変換される。図2参照 (モノマーI、R=H)。このアミン官能基は、当業者に公知の方法を使用して、RNA合成の間、例えば、そのトリフルオロアセチルまたはFmoc誘導体として適切に保護される。

【0111】

一実施形態においては、本発明のヒドロキシメチル置換モノマーのヒドロキシメチル置換基は、アミド結合共役基の付加のためのハンドルとして作用している。これは、例えば、上記のような、ヒドロキシメチル置換基のヒドロキシル部分のアミン部分への変換、および、例えば、当業者に公知の方法を使用するアミド結合形成による、共役基でのこのアミノ基のさらなる誘導体化を伴う。これは、当業者に公知の方法を使用するRNA合成の前後に行われてもよい (図2、モノマーH)。

【0112】

一実施形態においては、本発明のヒドロキシメチル置換モノマーのヒドロキシメチル置換基は、アミノ結合共役基の付加のためのハンドルとして作用している。これは、例えば、上記のような、ヒドロキシメチル置換基のヒドロキシル部分のアミン部分への変換、および、例えば、当業者に公知の方法を使用するアミン結合形成による、共役基でのこのアミノ基のさらなる誘導体化を伴う。これは、当業者に公知の方法を使用するRNA合成の前後に行われてもよい (図2、モノマーI)。

10

20

30

40

50

【0113】

さらなる一実施形態においては、結合のために使用されるアミン基は、アミノ基、ピペラジノ基、またはジアミノアルキル基である。そのようなモノマーは、アミン誘導体化モノマーと称される。これらの基のそれぞれは、さらに誘導体化または結合体化される場合がある（図2、モノマーJ）。

【0114】

一実施形態においては、本発明のRNA複合体は、天然型RNA複合体と比較して、オフターゲット効果の低下がある。

【0115】

一好ましい実施形態においては、RNA複合体は、アンチセンス鎖において、本発明の少なくとも1個のヒドロキシメチル置換モノマーを有する。

10

【0116】

別の好ましい実施形態においては、RNA複合体は、アンチセンス鎖のいわゆる種領域、またはその周辺、すなわち、アンチセンス鎖の5'末端から位置番号1~12の少なくとも1つに取り込まれる、本発明の少なくとも1つのヒドロキシメチル置換モノマーを有する。

【0117】

別の好ましい実施形態においては、RNA複合体は、アンチセンス鎖の5'末端から位置番号2~10の少なくとも1つに取り込まれる、本発明の少なくとも1個のヒドロキシメチル置換モノマーを有する。

20

さらに別の好ましい実施形態においては、RNA複合体は、アンチセンス鎖の5'末端から位置番号3~8の1つに取り込まれる、本発明の1個のヒドロキシメチル置換モノマーを有する。

【0118】

さらに別の好ましい実施形態においては、RNA複合体は、アンチセンス鎖の5'末端から位置番号7~8の1つに取り込まれる、本発明の1個のヒドロキシメチル置換モノマーを有する。

【0119】

さらに別の好ましい実施形態においては、RNA複合体は、アンチセンス鎖の5'末端から位置番号7に取り込まれる、本発明の1個のヒドロキシメチル置換モノマーを有する。

30

【0120】

さらに別の好ましい実施形態においては、RNA複合体は、アンチセンス鎖の5'末端から位置番号9~16に取り込まれる、本発明の1個のヒドロキシメチル置換モノマーを有する。

【0121】

さらに別の好ましい実施形態においては、RNA複合体は、アンチセンス鎖の5'末端から位置番号9~11に取り込まれる、本発明の1つの個ヒドロキシメチル置換モノマーを有する。

【0122】

さらに別の好ましい実施形態においては、RNA複合体は、アンチセンス鎖の5'末端から位置番号9~10に取り込まれる、本発明の1個のヒドロキシメチル置換モノマーを有する。

40

【0123】

別の実施形態においては、本発明のRNA複合体は、天然型RNA複合体と比較して、免疫応答の低減をもたらす。

【0124】

さらに別の実施形態においては、本発明のRNA複合体は、天然型RNA複合体と比較して持続効果を有する。

【0125】

50

さらに別の実施形態においては、本発明のRNA複合体は、天然型RNA複合体と比較して増大した効果を有する。したがって、好ましい実施形態においては、RNA複合体は、例えば、標的mRNAのより効率的な分解、または標的mRNAのより効率的な翻訳阻害によって、天然型RNA複合体より効率的にRNAiを媒介する。

【0126】

さらに別の実施形態においては、本発明のRNA複合体は、ヒトまたは動物の特定の器官または組織に効率的に送達される。

【0127】

さらに別の実施形態においては、本発明のRNA複合体は、効率的に細胞膜に浸透することができる。

10

【0128】

さらに別の実施形態においては、本発明のRNA複合体は、天然RNA複合体より効率的に細胞膜に浸透することができる。

【0129】

一実施形態においては、本発明のRNA複合体は、人体におけるRNA複合体の保持を増加させるプラズマタンパク質に結合することができる。

【0130】

第2の態様、RNA複合体の調製

本発明の別の態様は、中核二本鎖領域を含むRNA複合体が形成される条件下で、アンチセンス鎖をパッセンジャー鎖とともに培養することを含む、本発明の二本鎖RNA複合体を調製する方法であって、このRNA複合体は、対応する細胞RNAのRNA干渉を媒介することが可能である。

20

【0131】

本態様の代替の実施形態においては、RNA複合体は、本発明のRNA二本鎖によって置換される(第10の態様)。

【0132】

第3の態様、核酸改変を媒介する方法

本発明のさらに別の態様は、以下のステップを含む、細胞または生物における標的核酸の核酸改変を媒介する方法である。

a. 標的核酸の改変を生じることができる条件下で、細胞または生物を本発明のRNA複合体に接触させるステップ、

30

b. それにより、標的核酸の改変を媒介するステップ。

【0133】

好ましい実施形態においては、標的核酸の核酸改変を媒介する方法は、*in vitro*で行われる。

【0134】

好ましい実施形態においては、標的核酸の核酸改変を媒介する方法は、*in vivo*、すなわち、動物、ヒト、または非ヒト動物において行われる。

【0135】

好ましい実施形態においては、標的核酸の核酸改変を媒介する方法は、細胞培養物中で行われる。

40

【0136】

さらに別の実施形態においては、上記方法は、単離細胞上で行われる。

【0137】

好ましい実施形態においては、上記方法の核酸改変は、RNA干渉、好ましくは、標的mRNAの分解、または標的mRNAの翻訳阻害、または他の種類のRNA、例えば、非コードRNAの阻害である。

【0138】

別の実施形態においては、核酸改変は、DNAメチル化である。

【0139】

50

本態様の代替の実施形態においては、RNA複合体は、本発明のオリゴヌクレオチド（第9の態様）または本発明のRNA二本鎖（第10の態様）のいずれかによって置換される。

【0140】

第4の態様、遺伝子機能を検査する方法

本発明の別の態様は、以下のステップを含む、細胞または生物における遺伝子の機能を検査する方法である。

- a. この遺伝子に対応する本発明のRNA複合体を細胞または生物に導入することによって、被検細胞または被検生物を産生するステップ、
- b. 標的核酸の改変を生じることができる条件下で、被検細胞または被検生物を維持するステップ、
- c. ステップbにおいて産生された被検細胞または被検生物の表現型を観察し、任意で、観察した表現型を適切な対照細胞または対照生物の表現型と比較することによって、遺伝子の機能に関する情報を提供するステップ。

10

【0141】

本発明のRNA複合体は、例えば、添付の実施例において概説されるトランスフェクションを使用して、細胞に導入することができる。

【0142】

生物または細胞の表現型は、例えば、タンパク質レベルを評価するためのプロテオミクス、またはRNAレベルを評価するためのマイクロアレイを使用して観察することができる。また、より明確な表現型、例えば、1つの特定の遺伝子の発現を使用することができる。

20

【0143】

遺伝子の機能に関して得られた情報は、特定の疾患に対して、遺伝子産物が、治療的介入に適切な標的であるかを判断するために使用することができる。そのため、ある遺伝子産物が、例えば、癌の特定の亜型において影響を受けることが公知のある生化学経路において作用することが証明される場合、遺伝子産物は、癌の前述の亜型の治療に対する治療的介入に適切な標的であり得る。

【0144】

細胞または生物における遺伝子の機能を検査する方法の好ましい実施形態においては、方法の核酸改変は、RNA干渉、好ましくは、標的mRNAの分解、または標的mRNAの翻訳阻害である。

30

【0145】

別の実施形態においては、核酸改変は、DNAメチル化である。

【0146】

細胞または生物における遺伝子の機能を検査する方法の好ましい実施形態においては、上記方法は、細胞培養物中で、*in vitro*、または*in vivo*で行われる。

【0147】

さらに別の実施形態においては、上記方法は、単離細胞上で行われる。

【0148】

本態様の代替の実施形態においては、RNA複合体は、本発明のオリゴヌクレオチド（第9の態様）または本発明のRNA二本鎖（第10の態様）のいずれかによって置換される。

40

【0149】

第5の態様、薬剤を評価する方法

本発明の別の態様は、以下のステップを含む、薬剤が遺伝子産物に作用するかを評価する方法である。

- a. この遺伝子に対応する本発明のRNA複合体を細胞または生物に導入することによって、被検細胞または被検生物を産生するステップ、
- b. 標的核酸の改変を生じる条件下で、被検細胞または被検生物を維持するステップ、

50

c . この薬剤を被検細胞または被検生物に導入するステップ、
d . ステップcにおいて産生された被検細胞または生物の表現型を観察し、任意で、観察した表現型を適切な対照細胞または対照生物の表現型と比較することによって、この薬剤が遺伝子産物に作用するかどうかに関する情報を提供するステップ。

【0150】

ステップdにおける好ましい対照は、導入されたステップaのRNA複合体を有していない被検細胞または被検生物である。

【0151】

上記薬剤が遺伝子または遺伝子産物に作用するかを評価する方法の好ましい実施形態においては、この方法の核酸改変は、RNA干渉、標的RNAの好ましい分解または標的RNAの標的の翻訳阻害である。別の実施形態においては、核酸改変の改変は、DNAメチル化である。

10

【0152】

薬剤が遺伝子産物上に作用するかを評価する方法の好ましい実施形態においては、方法は、細胞培養、*in vitro*、または*in vivo*で行われる。

【0153】

さらに別の実施形態においては、方法は、単離細胞上で行われる。

【0154】

本態様の代替の実施形態においては、RNA複合体は、本発明のオリゴヌクレオチド(第9の態様)または本発明のRNA二本鎖(第10の態様)のいずれかによって置換される。

20

【0155】

第6の態様、医薬組成物

本発明のさらに別の態様は、RNA複合体および医薬的に許容可能な希釈剤、担体、またはアジュバントである。本発明のRNA複合体が特定の遺伝子または遺伝子産物を標的とするように設計することができることは、当業者にとって明らかである。RNA複合体は、タンパク質ではなく、DNA配列またはRNA配列を標的とすることが理解されよう。しかしながら、タンパク質等の遺伝子産物のレベルは、そのmRNAまたは非コードRNAが、例えば、RNA分解または翻訳阻害によって改変される場合、間接的に影響を受ける場合がある。また、タンパク質をコードする遺伝子の発現は、例えば、DNAメチル化のために影響を受ける場合がある。

30

【0156】

本態様の代替の実施形態においては、RNA複合体は、本発明のオリゴヌクレオチド(第9の態様)または本発明のRNA二本鎖(第10の態様)のいずれかによって置換される。

【0157】

第7の態様、薬物の使用

したがって、別の態様は、薬物としての使用のための本発明のRNA複合体である。RNA複合体の特異性は、アンチセンス鎖の配列内のみにあるため、治療標的が確認されると、当業者は、標的のレベルおよび活性に影響を与えるRNA複合体を設計することができる。連続的パッセンジャー鎖を有する天然型RNA複合体に対しては、ガイド配列として作用するパッセンジャー鎖のため、オフターゲット効果に関連する問題が残る。

40

【0158】

本態様の代替の実施形態においては、RNA複合体は、本発明のオリゴヌクレオチド(第9の態様)または本発明のRNA二本鎖(第10の態様)のいずれかによって置換される。

【0159】

第8の態様、モノマー

本発明の態様は、本発明のヒドロキシメチル置換モノマーの取り込みに適切なモノマー、および容易に入手可能な出発物質からのそれらの調製のための方法である。本発明のヒ

50

ドロキシメチル置換モノマーのチミン - 1 - イル誘導体は、DNA鎖へ取り込まれ、自動DNA/RNA合成に対するそれらのホスホラミダイト基本要素の調製のための手順が報告されている [K. D. Nielsenら, Bioorg. Med. Chem. 1995, 3, 1493; H. Thraneら, Tetrahedron 1995, 51, 10389; P. Nielsenら, Bioorg. Med. Chem. 1995, 3, 19]。

【0160】

ほとんどの場合、本発明のRNA複合体は、当業者に公知の自動オリゴヌクレオチド合成によって調製される。本発明のヒドロキシメチル置換モノマーの本発明のRNA複合体への取り込みは、a) 自動RNA合成器でのRNA合成、b) RNA精密検査、c) RNA精製、およびd) RNA単離のための標準方法に従う [F. Eckstein, Oligonucleotides and Analogues, IRL Press, Oxford University Press, 1991]。ヒドロキシメチル置換RNAオリゴヌクレオチド (= RNA鎖) およびRNA複合体は、RNA合成のための標準技術を使用して、ホスホラミダイト誘導体を使用して合成することができる。

10

【0161】

好ましい実施形態においては、本発明のヒドロキシメチル置換モノマーのホスホラミダイト誘導体の調製の方法は、アデニン、グアニン、シトシン、および5 - メチルシトシンの塩基に対して、例えば、ベンゾイル、イソブチリル、アセチル、フェノキシアセチル、tert - ブチルフェノキシアセチル、または当業者に公知の他の標準塩基保護基のような塩基保護基を含有するリボヌクレオシド、例えば、リボヌクレオシドのO5' - DMT保護誘導体から開始する。

20

【0162】

好ましい実施形態においては、本発明は、2', 3' - 開裂炭素 - 炭素結合 (リボヌクレオシド命名法) を有するモノマーDおよびEの取り込みに適切なモノマー基本要素を調製するための方法を含む。

【0163】

他の好ましい実施形態においては、本発明は、2', 3' - 開裂炭素 - 炭素結合を有し、加えて、例えば、ヒドロキシ基以外の、例えば、その2' - 炭素原子 (リボヌクレオシド命名法) に官能基または基を持つF ~ Jのようなモノマーの取り込みに適切なモノマー基本要素を調製する方法を含む。

30

【0164】

本発明の好ましい実施形態においては、モノマーDのホスホラミダイト誘導体の調製の方法は、主要なステップの中でもとりわけ、2', 3' - グリコール開裂、得られた中間体の還元、選択的O2' - 保護、およびO3' - ホスフィチル化を含む。

【0165】

好ましい実施形態においては、2', 3' - グリコール開裂は、例えば、試薬としての過ヨウ素酸ナトリウムでの酸化開裂を使用して行われる。

【0166】

別の好ましい実施形態においては、過ヨウ素酸ナトリウム開裂後の中間体の還元は、例えば、水素化ホウ素ナトリウムに影響を受ける対応するジオールへと還元される。

40

【0167】

モノマーDの本発明のRNA複合体への取り込みに対して、2' - ヒドロキシ基 (リボヌクレオシド命名法) を保護することが必要である。本発明の好ましい実施形態においては、これはベンゾイル化によって行われる。保護の選択性、すなわち、O3' - ベンゾイル化に対するO2' - ベンゾイル化の量を最適化するため、1当量よりわずかに多いベンゾイル化試薬 (塩化ベンゾイル、または例えば、無水ベンゾイル) を使用することは有益な場合がある。好ましい一実施形態においては、ベンゾイル化は、室温以下で行われる。別の有用な実施形態においては、ベンゾイル化は、0 以下または - 50 以下でも行われる。

50

【0168】

別の好ましい実施形態においては、O2'-保護は、アセチル化、または有機合成分野の当業者に公知のアシル化試薬を使用するアシル化を行うことによって行われる。

【0169】

別の好ましい実施形態においては、O2'-保護は、シリル化試薬を使用するシリル化、および有機合成分野の当業者に公知の方法によって行われる。好ましいシリル化保護基は、tert-ブチルジメチルシリルである。

【0170】

次のホスフィチル化反応は、好ましい実施形態においては、いわゆる「PC1」試薬 [PC1(OCH₂CH₂CN)(N(iPr)₂)]、またはいわゆる「ビス-アミダイト」試薬 [P(OCH₂CH₂CN)(N(iPr)₂)₂] のいずれかを使用して行われる。

10

【0171】

モノマーDのホスホラミダイト誘導体の調製の方法の好ましい実施形態においては、出発物質は、アデニン、グアニン、シトシン、および5-メチルシトシンの塩基に対して、例えば、ベンゾイル、イソブチリル、アセチル、フェノキシアセチル、tert-ブチルフェノキシアセチル、または当業者に公知の他の標準塩基保護基のような塩基保護基を含有するリボヌクレオシド、例えば、リボヌクレオシドのO5'-DMT保護誘導体である。

【0172】

別の好ましい実施形態においては、本発明は、モノマーEのホスホラミダイト誘導体の調製の方法を提供する。

20

【0173】

本発明の好ましい実施形態においては、モノマーEのホスホラミダイト誘導体の調製の方法は、主要なステップの中でもとりわけ、2',3'-グリコール開裂、得られた中間体の還元、選択的O3'-保護、およびO2'-ホスフィチル化を含む。O3'-保護は、例えば、シリル化またはアシル化、もしくは、まず、O2'-ベンゾイル化、その後O3'-シリル化、およびその後O2'-脱ベンゾイル化のような組み合わせによって行うことができる。他の保護基も、当業者にとって明らかのように、適応することができる。

【0174】

別の好ましい実施形態においては、2',3'-開裂炭素-炭素結合を有し、加えて、ヒドロキシ基以外の、その2'-炭素原子(リボヌクレオシド命名法)に官能基を持つF~Jのようなモノマーの取り込みに適切なモノマー基本要素を調製する方法は、主要なステップの中でもとりわけ、リボヌクレオシド(例えば、O5'-DMT保護リボヌクレオシド)2',3'-グリコール開裂、得られた中間体の還元、選択的O3'-保護、2'-ヒドロキシ基の変換、O3'-脱保護、およびO3'-ホスフィチル化から開始するステップを含む。O3'-保護は、例えば、シリル化またはアシル化、もしくは、まず、O2'-ベンゾイル化、その後O3'-シリル化、およびその後O2'-脱ベンゾイル化のような組み合わせによって行うことができる。他の保護基も、当業者にとって明らかのように、適用することができる。2'-ヒドロキシ基の、アミノ、アシル化アミノ、アルキル化アミノ、ジアルキル化アミノ、カルバモイル化アミノ、ピペラジノ、アシル化ピペラジノ、アルキル化ピペラジノ、カルバモイル化ピペラジノ、メルカプト、アシル化メルカプト、アルキル化メルカプト、ジスルフィド、アシル化ヒドロキシ、アルキル化ヒドロキシ、カルバモイル化ヒドロキシ等のような別の基への変換、またはこれらの基の置換および/または保護誘導体による変換は、有機合成分野の当業者に公知の方法および手順を使用して行うことができる。そのような方法および手順は、2'-ヒドロキシ基またはアシル化の活性誘導体に対する置換反応、またはカルバモイル化反応を含む。そのような方法および手順は、アミノまたはメルカプトのような他のC2'付加基の包含後のO2'-アルキル化反応およびアルキル化反応も含む。さらに別の可能性は、例えば、求核試薬との反応によってさらに改変される場合があるアルデヒド官能基、または、例えば、活性エス

30

40

50

テルのような活性誘導体へのカルボキシ官能基の変換後の求核試薬との反応によってさらに改変される場合があるカルボキシ官能基を得るための2'-ヒドロキシ基の酸化である。

【0175】

本発明の別の実施形態においては、F~Jのようであるが、O2'原子がホスフィチル化され、C3'原子がヒドロキシ基以外の官能基と結合するように、3'-ヒドロキシ基が別の基に変換されるように「逆」（同様にモノマーDおよびEは、「逆」と考えられる）であるモノマーの取り込みに適切なモノマー基本要素を調製する方法は、主要なステップの中でもとりわけ、リボヌクレオシド（例えば、O5'-DMT保護リボヌクレオシド）2',3'-グリコール開裂、得られた中間体の還元、選択的O2'-保護、3'-ヒドロキシ基の変換、O2'-脱保護、およびO2'-ホスフィチル化から開始するステップを含む。O2'-保護は、例えば、シリル化またはアシル化、もしくは、それらの組み合わせによって行うことができる。他の保護基も、当業者にとって明らかなように、適応することができる。3'-ヒドロキシ基の、アミノ、アシル化アミノ、アルキル化アミノ、ジアルキル化アミノ、カルバモイル化アミノ、ピペラジノ、アシル化ピペラジノ、アルキル化ピペラジノ、カルバモイル化ピペラジノ、メルカプト、アシル化メルカプト、アルキル化メルカプト、ジスルフィド、アシル化ヒドロキシ、アルキル化ヒドロキシ、カルバモイル化ヒドロキシ等のような別の基への変換、またはこれらの基の置換および/または保護誘導体による変換は、有機合成分野の当業者に公知の方法および手順を使用して行うことができる。そのような方法および手順は、3'-ヒドロキシ基またはアシル化の活性誘導体に対する置換反応、またはカルバモイル化反応を含む。そのような方法および手順は、アミノまたはメルカプトのような他のC3'付加基の包含後のO3'-アルキル化反応およびアルキル化反応も含む。さらに別の可能性は、例えば、求核試薬との反応によってさらに改変される場合があるアルデヒド官能基、または、例えば、活性エステルのような活性誘導体へのカルボキシ官能基の変換後の求核試薬との反応によってさらに改変される場合があるカルボキシ官能基を得るための3'-ヒドロキシ基の酸化である。

【0176】

一実施形態においては、2'-C-ピペラジノ誘導体は、2'-ヒドロキシ基を脱離基（例えば、メシラート誘導体）に変換し、その後、大過剰のピペラジンと反応させることによって調製される。これは、例えば、構造アミダイトJのホスホラミダイトの合成に対するステップとして行うことができる（下図参照）。

【0177】

さらに別の実施形態においては、本発明は、天然核酸塩基とは異なる基または官能基をC1'原子（リボヌクレオシド命名法）に持つ、本発明のヒドロキシメチル置換モノマーの取り込みに適切なモノマー基本要素を調製する方法を含む。保護基を含む場合があるそのような基または官能基は、天然核酸塩基以外の、例えば、ピレン、ペリレン、フルオロフォア、水素、アルキル、反応基、および複素環を含む。

【0178】

さらに別の実施形態においては、本発明は、ホスホラミダイト誘導体の代わりにH-ホスホン酸誘導体として構成される、本発明のヒドロキシメチル置換モノマーの取り込みに適切なモノマー基本要素を調製する方法を含む。

【0179】

以下に、ホスホラミダイト（=アミダイト）基本要素（DMT=4,4'-ジメトキシトリチル；塩基=天然核酸塩基；CEtO=シアノエトキシ）に対する、本発明の一部の好ましい実施形態の構造の例を示す。

【0180】

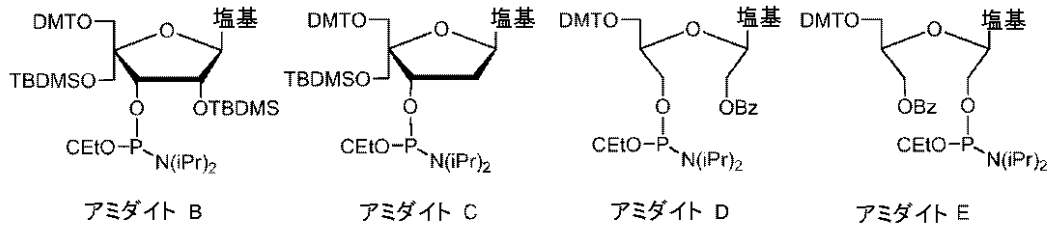
10

20

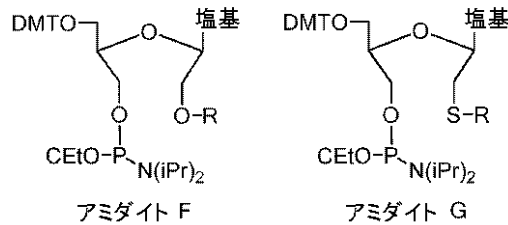
30

40

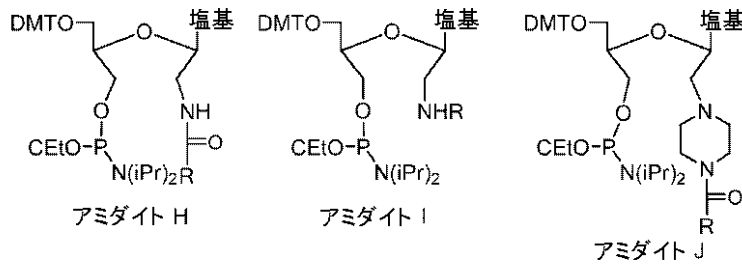
【化 1】



10



20



R=アルキル、コレステリル誘導体、フルオロフォア、ポリアミン、脂肪酸、アミノ酸、単糖類、またはポリペプチド等

30

第 9 の態様、非環式オリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド

本発明の第 9 の態様は、非環式ヌクレオチドモノマーを含むオリゴヌクレオチドである。詳細な説明および実施例のセクションから明らかであるように、そのようなオリゴヌクレオチドは、様々な用途および利点を有する。

【 0 1 8 1】

好ましい実施形態においては、非環式ヌクレオチドモノマーは、2' - 3' - セコ - ヌクレオチドモノマーである。非環式ヌクレオチドモノマーを含む本発明のオリゴヌクレオチドは、驚くことに、RNAi 機構の基質細胞酵素であることが分かり、場合によっては、これらのオリゴヌクレオチドは、非環式ヌクレオチドモノマーを有さない同一のオリゴヌクレオチドよりも優れている。

40

【 0 1 8 2】

好ましくは、非環式ヌクレオチドモノマーは、モノマー E、F、G、H、I、または J (図 1 参照) から成る群より選択される。当業者にとって明らかとなるように、G、F、H、I、または J は、すべて、モノマー D の合成前駆体から作成することができる。図 2 に示されるように、非環式モノマーは、コレステリル誘導体、アルキル、フルオロフォア、ポリアミン、アミノ酸、単糖類、ポリペプチド等の共役基を持つ誘導体に転換することができる。そのような共役基は、例えば、オリゴヌクレオチドが、細胞、器官、または生物における標的 mRNA の活性を調節するために使用される場合、より優れた生物学的安定性および/または生体内分布のために有用である場合がある。

50

【0183】

オリゴヌクレオチドの長さは、好ましくは10～40個のヌクレオチドモノマーである。さらにより好ましくは、18～30個のヌクレオチドモノマーの長さである。

【0184】

好ましい実施形態においては、本発明のオリゴヌクレオチドは、5個未満の非環式ヌクレオチドモノマーを含む。別の好ましい実施形態においては、オリゴヌクレオチドは、非環式ヌクレオチドモノマー以外の5個のヌクレオチドモノマーあたり1個以下の非環式ヌクレオチドモノマーを含む。さらにより好ましくは、非環式ヌクレオチドモノマー以外の8個のヌクレオチドモノマーあたり1個以下の非環式ヌクレオチドモノマーを含む。非環式ヌクレオチドモノマーの数が増える場合、相補核酸との本発明のオリゴヌクレオチドの結合親和性は、低下を示す。

10

【0185】

そのため、別の実施形態においては、オリゴヌクレオチドは、1～5個の非環式ヌクレオチドモノマーを含む。

【0186】

好ましい実施形態においては、非環式ヌクレオチドモノマーは、オリゴヌクレオチドの位置1～8、より好ましくは位置2～7の1つまたは複数だけに存在する。位置は、オリゴヌクレオチドの5'末端から数えられる。これらの領域の非環式ヌクレオチドモノマーは、これらの位置がマイクロRNAのいわゆる種領域と対応するため、オリゴヌクレオチドがマイクロRNAとして作用することを低減または妨害する。これは、例えば、オリゴヌクレオチドが、siRNAのガイド鎖として機能することを目的とする場合、該当する。

20

【0187】

好ましい実施形態においては、アンチセンス鎖におけるすべてのヒドロキシメチル改変ヌクレオチドモノマーは、位置9～16に存在し、位置は、5'末端から数えられる。さらにより好ましくは、アンチセンス鎖におけるヒドロキシメチル改変ヌクレオチドモノマーは、位置9～11に存在する。そのため、前述の領域におけるヒドロキシメチル改変ヌクレオチドモノマーの存在は、マイクロRNAとして作用するようにアンチセンス鎖を誘導し、すなわち、確実にsiRNA効果を最小限にし、マイクロRNA効果をより高くする。この効果は、恐らく、非環式ヒドロキシメチル置換モノマー、例えば、モノマーDの存在によって生じる親和性の低下のため、完全長結合に対する傾向の低下によって引き起こされる。

30

【0188】

好ましい実施形態においては、オリゴヌクレオチドは、8個より多い連続的DNAモノマーのDNA配列を含まない。さらにより好ましくは、6個以下の連続的DNAモノマー、およびより好ましくは、4個以下の連続的DNAモノマーである。連続的DNAモノマーは、通常、RNAの分解をもたらす、相補RNAと結合する場合、オリゴヌクレオチドがRNアーゼHを活性化することを可能にする。本発明の一部の実施形態においては、これは望ましくない。そのため、さらなる実施形態においては、オリゴヌクレオチドは、いかなるDNAモノマーも全く含有しない。

【0189】

他の実施形態においては、RNアーゼH活性は望ましく、オリゴヌクレオチドが4個より多い連続的DNAモノマー、より好ましくは6個より多いDNAモノマー、および、より好ましくは8個より多いDNAモノマーを含むことが好ましい。

40

【0190】

さらに別の実施形態においては、オリゴヌクレオチドは、50%を上回るRNAモノマーを含む。高い割合のRNAモノマーは、例えば、RISC等の細胞酵素に対する基質またはガイド(または共因子)として機能することにより、RNAと相互作用するタンパク質との相互作用を促進する。。

【0191】

そのため、別の実施形態においては、オリゴヌクレオチドのモノマーの80%より多く

50

が、RNAモノマーであることが好ましい。さらに別の実施形態においては、オリゴヌクレオチドのモノマーの90%より多くが、RNAモノマーであることが好ましい。

【0192】

明らかとなるように、オリゴヌクレオチドは、ヌクレオチドモノマー類似体も含む場合がある。そのような一実施形態においては、非環式ヌクレオチドモノマーおよびRNAモノマーは、すべてのヌクレオチドモノマーの80%より多く以上を占める。別の実施形態においては、非環式モノマーおよびRNAモノマーは、すべてのヌクレオチドモノマーの90%より多くを占める。

【0193】

オリゴヌクレオチドがヌクレオチドモノマー類似体を含む場合、それらが、2'-O-アルキル-RNAモノマー、2'-アミノ-DNAモノマー、2'-フルオロ-DNAモノマー、LNAモノマー、PNAモノマー、HNAモノマー、ANAモノマー、FANAモノマー、CeNAモノマー、ENAモノマー、DNAモノマー、およびINAモノマーから成る群より選択されることが好ましい。ヌクレオチド類似体は、通常、結合親和性を調節し、生物学的安定性を増加させ、概して、オリゴヌクレオチドにより薬物のような特性を与えるために使用される。

【0194】

一実施形態においては、オリゴヌクレオチドは、少なくとも2つのLNAヌクレオチド類似体を含む。非環式ヌクレオチドモノマーは、通常、相補核酸へ塩基対合した本発明のオリゴヌクレオチドの融解温度(すなわち、結合親和性)を低下させ、LNAヌクレオチドモノマーは、この融解温度の低下を妨げるために使用される場合がある。すなわち、一実施形態においては、非環式ヌクレオチドモノマーの数は、LNAヌクレオチドモノマーの数と同一である。

【0195】

好ましい実施形態においては、オリゴヌクレオチドは、非環式モノマーおよびRNAモノマーのみを含む。

【0196】

別の好ましい実施形態においては、オリゴヌクレオチドは、非環式ヌクレオチドモノマー、RNAモノマー、およびLNAヌクレオチド類似体のみを含む。

【0197】

好ましい実施形態においては、本発明のオリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート結合、ボラノホスフェート結合、エチルホスホン酸結合、ホスホロアミダート結合、およびホストリエステル結合から成る群より選択される1つまたは複数の結合を含む。ホスホロチオエート結合および/またはボラノホスフェート結合が最も好ましい。これらの結合は、オリゴヌクレオチドの生物学的安定性を改善し、オリゴヌクレオチドの生体内分布に対して好ましい効果を有することも示されている。好ましい実施形態においては、オリゴヌクレオチドは、前述のヌクレオチド間結合の50%より多く、さらにより好ましくは75%より多くを含む。一実施形態においては、全てのヌクレオチド間結合は、前述の型である。

【0198】

好ましい実施形態においては、本発明のオリゴヌクレオチドは、相補オリゴヌクレオチドへ塩基対合せず、すなわち、本発明のオリゴヌクレオチドは、一本鎖である。

【0199】

さらに別の実施形態においては、オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドに相補的な標的mRNAのRISC依存性翻訳抑制または分解を媒介することが可能である。当業者は、RISCをRNA誘導サイレンシング複合体として認識し、本実施形態においては、オリゴヌクレオチドは、RISCに対してガイド配列として作用するため、RISCをRNAオリゴヌクレオチド、通常、本発明のオリゴヌクレオチドへの部分的または完全相補性を有するmRNAへ誘導することを理解する。オリゴヌクレオチドがRISCを部分的相補性のmRNA標的へ誘導する場合、オリゴヌクレオチドは、マイクロRNA模倣体と

10

20

30

40

50

して見られる場合があり、オリゴヌクレオチドが RISC を完全相補性の mRNA 標的へ誘導する場合、一本または二本鎖 siRNA として見られる場合がある。

【0200】

RISC 依存性は、RISC 成分をコードする mRNA に対する siRNA を使用して、RISC の成分をロックアウトすることによって、細胞株において評価され、ロックアウト細胞株におけるオリゴヌクレオチドの活性を評価することができる。そのような実験は、当業者に周知である。

【0201】

第10の態様、本発明のオリゴヌクレオチドを含むRNA二本鎖

本発明の第10の態様は、本発明による第1のオリゴヌクレオチド、および第2のオリゴヌクレオチドを含むRNA二本鎖である。

10

【0202】

好ましい実施形態においては、RNA二本鎖の第2のオリゴヌクレオチドも、本発明のオリゴヌクレオチドである。

【0203】

明らかとなるように、第1の態様における本発明のRNA複合体に関して説明された特色の多くは、第10の態様のRNA二本鎖にも適用できる。

【0204】

好ましくは、本発明のRNA二本鎖は、15～40個の塩基対の数を含み、好ましい実施形態においては、18個の塩基対、19個の塩基対、20個の塩基対、21個の塩基対、22個の塩基対、および23個の塩基対の群から選択される多くの塩基対を含む。

20

【0205】

さらに別の実施形態においては、RNA二本鎖は、25～30個の塩基対、より好ましくは26～28個、より好ましくは27個の塩基対の数を含み。そのようなRNA二本鎖は、dicer基質RNAと称される場合がある。

【0206】

好ましい実施形態においては、本発明のRNA二本鎖は、突出を含む。

【0207】

別の実施形態においては、RNA二本鎖は、2つの突出を含む。

【0208】

さらに別の実施形態においては、第1のオリゴヌクレオチドは、3'-突出を含む。

30

【0209】

さらに別の実施形態においては、第2のオリゴヌクレオチドは、3'-突出を含む。

【0210】

好ましくは、突出の長さは、1～8個のヌクレオチドであり、さらにより好ましくは、突出の長さは、1個のヌクレオチド、2個のヌクレオチド、および3個のヌクレオチドの長さを有する突出から成る群より選択される。

【0211】

別の実施形態においては、RNA二本鎖は、少なくとも1つの平滑末端を含む。

【0212】

別の実施形態においては、RNA二本鎖は、両端が平滑末端化される。

40

【0213】

好ましい実施形態においては、RNA二本鎖は、18～22個の塩基対の二本鎖領域を含み、第1のオリゴヌクレオチドおよび第2のオリゴヌクレオチドは、それぞれ、1～3個のヌクレオチドの3'-突出を含む。そのようなRNA二本鎖は、正準siRNA（短干渉RNA）として認識される。

【0214】

一実施形態においては、RNA二本鎖の1つの鎖は、第1の態様において詳述されるように不連続である。

【0215】

50

一実施形態においては、RNA二本鎖は、RNA二本鎖の第1または第2のオリゴヌクレオチドに相補的な標的mRNAの翻訳抑制または分解を媒介することが可能である。すなわち、RNA二本鎖は、例えば、siRNA、マイクロRNA、またはプレマイクロRNAとして機能する。

【0216】

一実施形態においては、RNA二本鎖は、非環式モノマーの代わりにRNAモノマーを有する同一のRNA二本鎖と比較して、オフターゲット効果の低下を誘導しながら、標的mRNAの翻訳抑制または分解を媒介することが可能である。結合親和性の低下のため、そして第1または第2のオリゴヌクレオチドのいずれかが、RISCに対するガイド鎖として機能できないように改変される場合があるため、オフターゲットの低下が達成され得る。すなわち、RNA二本鎖のどのオリゴヌクレオチドが、パッセンジャー鎖（センス鎖）として機能し、どちらがガイド鎖（アンチセンス鎖）として機能するかを制御することができる。

10

【0217】

別の実施形態においては、RNA二本鎖は、特に、非環式モノマーが、siRNA二本鎖のガイド（アンチセンス）鎖において、オリゴヌクレオチドの5'末端から数えられる位置5～10に位置する場合、オフターゲット効果の低下を誘導しながら、標的mRNAの翻訳抑制または分解を媒介することが可能である。

【0218】

別の実施形態においては、RNA二本鎖は、特に、非環式モノマーが、siRNA二本鎖のガイド（アンチセンス）鎖における位置6～8に位置する場合、オフターゲット効果の低下を誘導しながら、標的mRNAの翻訳抑制または分解を媒介することが可能である。理論に制約されるわけではないが、これらの位置にある非環式モノマーの存在によって誘導される結合親和性の低下は、マイクロRNA系の効果を誘導するガイド鎖の能力の低下をもたらすと考えられる。すなわち、正確に位置する場合、非環式モノマーは、siRNA活性よりもマイクロRNA活性に対して重要であると考えられる、いわゆる種領域結合を低下させる。

20

【0219】

一実施形態においては、RNA二本鎖は、非環式モノマーの代わりにRNAモノマーを有する同一のRNA二本鎖と比較した増加した有効性により、RNA標的（例えば、遺伝子サイレンシングまたはRNA干渉）を媒介することが可能である。有効性の増加は、RISC反応の開裂生成物のオフ率の増加によって達成される。オフ率は、結合親和性の低下によって増加する場合がある。また、基質の柔軟性の増加は、加水分解率を増加させる場合がある。さらに、柔軟性の増加は、ガイド鎖のRISCへの取り込み前に、RNA二本鎖の巻き戻しを緩和する場合がある。

30

【0220】

一実施形態においては、RNA二本鎖は、非環式モノマーの代わりにRNAモノマーを有する同一のRNA二本鎖と比較して、持続した有効性によって、標的mRNAの翻訳抑制または分解を媒介することが可能である。例えば、RNA二本鎖のオリゴヌクレオチドおよび二本鎖自体が、エクソヌクレアーゼおよびエンドヌクレアーゼに対してより劣る基質であり、それによりオリゴヌクレオチドおよび二本鎖の安定性が増加するため、有効性の持続が達成される。

40

【0221】

一実施形態においては、RNA二本鎖は、非環式モノマーの代わりにRNAモノマーを有する同一のRNA二本鎖と比較して、標的mRNAの翻訳抑制または分解を媒介することが可能であり、RNA二本鎖は、生物学的安定性の改善を有する。

【0222】

さらに別の実施形態においては、RNA二本鎖は、非環式モノマーの代わりにRNAモノマーを有する同一のRNA二本鎖と比較して、標的mRNAの翻訳抑制または分解を媒介することが可能であり、RNA二本鎖は、低い免疫刺激を有する。免疫刺激の一理由は

50

、異質オリゴヌクレオチドを認識するトール様受容体との相互作用である。本発明のRNA二本鎖は、非天然であるため、それらは、トール様受容体による検出がより困難である。

参考文献

【 0 2 2 3 】

【 数 1 】

US2003/0108923

US2005/0234007

10

WO2005/073378

J. Kurreck, *Eur. J. Biochem.* **2003**, 270, 1628

K. D. Nielsen et al., *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, 3, 1493

H. Thrane et al., *Tetrahedron* **1995**, 51, 10389

20

P. Nielsen et al., *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, 3, 19

Nawrot and Sipa, *Curr. Topics Med. Chem.* **2006**, 6, 913-925

F. Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues*, IRL Press, Oxford University Press, 1991

M. Petersen and J. Wengel, *Trends Biotechnol.* **2003**, 21, 74-81

30

【 0 2 2 4 】

【数 2】

Pfundheller, Sørensen, Lomholt, Johansen, Koch and Wengel, J. "Locked Nucleic Acid Synthesis", *Methods Mol. Biol.* **2004**, vol. 288 (Oligonucleotide Synthesis), 127-145., P. Herdewijn, Ed., Humana Press Inc.

Furniss, Hannaford, Smith and Tatchell, *Vogel's Textbook of Organic Chemistry*, 1989, John Wiley & Sons

Bryld, Højland and Wengel, *Chem. Commun.* **2004**, 1064

Mokhir, Tetzlaff, Herzberger, Mosbacher and Richart, *J. Comb. Chem.* **2001**, 3, 374

Mangos MM, Min KL, Viazovkina E, Galarneau A, Elzagheid MI, Parniak MA, Damha MJ., *J Am Chem Soc.* 2003 Jan 22;125(3):654-61

【実施例】

【0225】

実験手順および実施例

(実施例1)

本発明のRNA複合体の合成

本発明のRNA複合体のヒドロキシメチル置換モノマーの自動DNA/RNA合成のためのホスホラミダイト基本要素の調製のための手順が報告されている[チミン誘導体; K. D. Nielsen, *Bioorg. Med. Chem.* 1995, 3, 1493; H. Thrane, *Tetrahedron* 1995, 51, 10389; P. Nielsen, *Bioorg. Med. Chem.* 1995, 3, 19]。アデニン、グアニン、シトシン、およびウラシルの例となるホスホラミダイト誘導体の調製のための手順の開示に関しては、実施例11を参照されたい。

【0226】

本発明のRNA複合体へのこれらのヒドロキシメチル置換モノマーの取り込みは、a) 自動RNA合成器でのRNA合成、b) RNAの完成、c) RNA精製、およびd) RNA単離のための標準方法に従う[F. Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues*, IRL Press, Oxford University Press, 1991]。これは、ヒドロキシメチル置換RNAオリゴヌクレオチド(=RNA鎖)およびRNA複合体が、RNA合成のための標準技術を使用して、公知のホスホラミダイト誘導体を使用して合成することができることを証明する。

【0227】

LNAは、1つまたは複数の2'-O, 4'-C-メチレン結合リボヌクレオチド(LNAヌクレオチド)を含有するオリゴヌクレオチドである[M. Petersen and J. Wengel, *Trends Biotechnol.* 2003, 21, 74-81]。LNA改変siRNAは、1個または複数個のLNAモノマーを含有するsiRNA構築物である。公知の方法は、市販のLNAホスホラミダイトの使用により、本発明のRNA複合体へLNAヌクレオチドを取り込むために使用されている[Pfundheller, Sørensen, Lomholt, Johansen, Koch and Wengel, J. "Locked Nucleic Acid Synthesis", *Methods Mol. Biol.* 2004, vol. 288 (Oligonucleotide Synthesis), 127-145., P. Herdewijn, Ed.

10

20

30

40

50

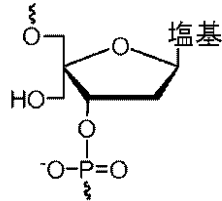
, Humana Press Inc.]。

【0228】

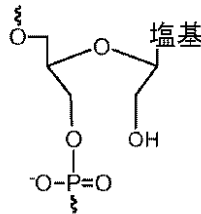
ヒドロキシメチル置換 *siRNA* (「ヒドロキシメチル置換小干渉RNA) は、1個または複数個のヒドロキシメチル置換ヌクレオチドモノマーを含有する *siRNA* 構築物である(ヒドロキシメチル置換ヌクレオチドモノマーの構造に関しては、図1参照)。例示されるモノマーは、以下に示される。

【0229】

【化2】



モノマー C (C, I)



モノマー D (X)

10

オリゴヌクレオチド - *siRNA* 構築物における選択したアンチセンス鎖：

20

【0230】

【化3】

RNA天然型	5'-ACU UGU GGC CGU UUA CGU CGC U (配列番号1)
JW1103	5'-ACU UGU GGC CGU UUA CGU <u>CG^LC^{MeL}</u> U (配列番号2)
JW1186	5'-ACU UG <u>I</u> GGC CGU UUA CGU <u>CG^LC^{MeL}</u> U (配列番号3)
JW1187	5'-AC <u>I</u> UG <u>I</u> GGC CGU U <u>A</u> CG <u>I</u> <u>CG^LC^{MeL}</u> U (配列番号4)
W123	5'-ACU UG <u>X</u> GGC CGU UUA CGU <u>CG^LC^{MeL}</u> U (配列番号5)
W124	5'-AC <u>X</u> UGU GGC CGU UUA CGU <u>CG^LC^{MeL}</u> U (配列番号6)
W125	5'-ACU UGU GGC CGU UUA CG <u>X</u> <u>CG^LC^{MeL}</u> U (配列番号7)
W126	5'-ACU UGU GGC CG <u>X</u> UUA CGU <u>CG^LC^{MeL}</u> U (配列番号8)
W127	5'-ACU UGU GGC CGU UUA CGT CG <u>X</u> U (配列番号9)
W128	5'-AC <u>X</u> UGU GGC CGU UUA CGT CG <u>X</u> U (配列番号10)

30

オリゴヌクレオチド - *siRNA* 構築物における選択したセンス鎖：

【0231】

【化4】

RNA天然型	5'-GAC GUA AAC GGC CAC AAG UUC U (配列番号11)	
JW1104	5'-GAC GUA AAC GGC CAC AAG <u>U^LC^{MeL}</u> U (配列番号12)	
JW1106	5'-GAC ^{MeL} GUA AAC ^{MeL} GGC CAC ^{MeL} AAG <u>U^LC^{MeL}</u> U (配列番号13)	
JW1188	5'-GAC GUA AAC GGC CAC AAG <u>TTC</u> (配列番号14)	
W043	5'-GAC GUA AAC GGC CAC AAG <u>UTC</u> U (配列番号15)	
W044	5'-GAC <u>GTA</u> AAC <u>CAC</u> GGC <u>CAC</u> AAG <u>UTC</u> U (配列番号16)	
JW1189	5'-GAC <u>GTA</u> AAC GGC CAC AAG <u>TTC</u> (配列番号17)	
W129	5'-GAC <u>GXA</u> AAC GGC CAC AAG <u>U^LC^{MeL}</u> U (配列番号18)	10
W130	5'-GAC <u>GXA</u> AAC <u>XGGC</u> CAC AAG <u>U^LC^{MeL}</u> U (配列番号19)	
W131	5'-GAC GUA AAC GGC CAC AAG <u>UUX</u> U (配列番号20)	
W132	5'-GAC <u>GXA</u> AAC GGC CAC AAG <u>UUX</u> U (配列番号21)	

合成されている他のヒドロキシメチル置換RNA鎖：

【0232】

【化5】

5'-ACU UGU GGC CGU UUA CGU <u>CGC</u> U (配列番号22)	20
5'-GAC <u>GTA</u> AAC <u>G</u> (配列番号23)	
5'-GC <u>CAC</u> AAG <u>UTC</u> U (配列番号24)	

- 上付き文字の「L」は、残基がLNAヌクレオチドであることを示す。
- 上付き文字の「MeL」は、残基が5-メチルシトシン塩基を有するLNAヌクレオチドであることを示す。
- 太字、下線付きのTは、ヒドロキシメチル置換ヌクレオチドモノマーである。本実施例においては、それは、C4'-分枝RNAモノマーCのチミン-1-イル誘導体である(図1参照)。
- 太字、下線付きのCは、ヒドロキシメチル置換ヌクレオチドモノマーである。本実施例においては、それは、C4'-分枝RNAモノマーCの5-メチルシトシン(5-methylcytosin)-1-イル誘導体である(図1参照)。
- 太字、下線付きのXは、ヒドロキシメチル置換非環式ヌクレオチドモノマーである。上記の配列においては、それは、2',3'-セコ-RNAモノマーDのウラシル-1-イル誘導体である(図1参照)。他の実施例および図においては、ウラシル以外の他の塩基改変体が含まれる。

【0233】

研究されたさらなる配列に関しては、実施例9および10参照。

【0234】

細胞研究(EGFPを発現する肺癌細胞株)が行われている。本発明を示すための例として、2つまたは3つのヌクレオチド突出(overhang)を含有するsiRNA二本鎖を使用する。本実施例の設計は、例示するためだけのものであり、多くの他の構築物は、本発明に含まれ、同様に作用する。したがって、例えば、平滑末端siRNA二本鎖、例示されるものより短いか、または長いsiRNA二本鎖、および一本鎖アンチセンス鎖が含まれる。同様に、アンチセンス鎖および不連続的なパッセンジャー鎖(「パッセンジャー鎖」は、「センス鎖」とも称される)を含むRNA複合体が含まれる。

【0235】

10

20

30

40

50

(実施例2)

本発明の siRNA 複合体のためのアニーリングおよびトランスフェクションの手順

細胞は、6 ウェルプレートにプレーティングさせ (plated)、40 ~ 60 % コンフルエンスになるまで増殖させた。トランスフェクションの直前に、細胞は、1 ウェルあたり 1 mL の完全増殖培地を再度プレーティングさせた。センスおよびアンチセンス鎖は、各 20 μ M の濃度でアニーリング緩衝液 (10 mM Tris-HCl、pH 7.3、50 mM NaCl) に混合し、95 °C で 1 分間、および 37 °C で 1 時間インキュベートした。6 - ウェルプレートの 1 ウェルあたり、次の溶液を調製した: 150 μ L の無血清 RPMI 培地中の 4 μ L の TransIT-TKO。アニーリングされた siRNA 複合体を添加し、注意して混合し、室温で 20 分間インキュベートし、細胞上に注入した。最終 RNA 複合体濃度は、50 nM であった。37 °C で 24 時間のインキュベーション後、培地を交換し、細胞を 37 °C でさらに 24 時間インキュベートした。細胞をトリプシン処理で除去し、次の RNA およびフロー分析のために半分に分割した。

【0236】

遺伝子サイレンシングが達成されると (以下参照)、ヒドロキシメチル置換モノマーを含有する本発明の RNA 複合体は、標準的なトランスフェクション条件下で細胞膜を浸透することができることが証明される。

【0237】

(実施例3)

遺伝子サイレンシング

mRNA およびタンパク質定量化のための手順。eGFP タンパク質の発現を、フローサイトメトリー分析によって分析した。ウエスタンブロット法を以下のように行った。細胞を、PBS で 2 回洗浄し、同量の細胞を 90 °C で 10 分間を 2 回、2 x SDS 試料緩衝液 [4 % ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、2.0 % グリセロール、125 mM Tris/HCl、pH 6.8、0.01 mg/mL のプロモフェノールブルー、10 % 2-メルカプトエタノール] 中で溶解し (lysed)、ゆっくりとしたピペット操作によって分離した。タンパク質を、8 % SDS-アクリルアミドゲル中で分離し、PVDF 膜 (Immobilion) 上で一晩エレクトロブロットした。フィルタは、10 % w/v のミルクを含有する PBS で 1 時間ブロックした。eGFP タンパク質は、ウサギポリクローナル eGFP 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) の 1 : 1000 希釈を使用して検出された。マウス hnRNP C1 抗体は、Seraphin Pinol-Roma から寄贈された。西洋ワサビペルオキシダーゼ (hrp) 結合した二次抗体 (DAKO) を、可視化のための ECL 試薬 (Amersham Biosciences) と共に使用した。eGFP mRNA を、標準手順に従い、ノーザンブロット法によって分析した。

【0238】

以下は、50 mM の siRNA 複合体濃度で行った遺伝子サイレンシング実験の結果の一覧である。結果は、ミスマッチの対照 siRNA 二本鎖で得られた遺伝子発現レベルに対して (100 % で設定)、パーセンテージで示す。

【0239】

【表 1】

エントリー	センス／アンチセンス	平均 GFP	EGFP mRNA	
1	RNA / RNA	13%	16%	
2	JW1104 / JW1103	13%	28%	
3	JW1188 / JW1103	7%	13%	
4	JW1189 / JW1103	6%	15%	
5	W043 / JW1103		~13%	
6	W044 / JW1103		~19%	10
7	JW1104 / JW1186	22%	31%	
8	JW1104 / JW1187	62%	90%	
9	W131 / W127	27%		
10	W132 / W128	86%		
11	W131 / W128	68%		
12	W132 / W127	47%		
13	W129 / JW1103	36%		
14	W130 / JW1103	39%		
15	JW1106 / W123	24%		20
16	JW1106 / W127	51%		
17	JW1106 / W125	34%		
18	JW1106 / W126	22%		

エントリー 1 は、未改変 s i R N A 複合体が効率的に G F P 遺伝子をサイレンシングしていることを示す。

【 0 2 4 0 】

エントリー 2 は、L N A 改変 s i R N A 複合体が効率的に G F P 遺伝子をサイレンシングしていることを示す。この構築物は、2 つの R N A 鎖の 3 ' 末端に対する 2 つの L N A 改変を有する。

【 0 2 4 1 】

エントリー 3 ~ 8 の実施例遺伝子サイレンシング実験においては、構造 T / C の C 4 ' - 分枝 R N A ヒドロキシメチル置換モノマーを含有する s i R N A 複合体が研究される (図 3) 。

【 0 2 4 2 】

エントリー 3 は、センス鎖の 3 ' 末端から位置 2 および 3 にヒドロキシメチル置換モノマーを有する本発明の s i R N A 複合体が、G F P 遺伝子をサイレンシングする際、高度に機能的であることを示す。

【 0 2 4 3 】

エントリー 3 の実施例、およびエントリー 4、5、6、13 および 14 の実施例において、例としてのアンチセンス鎖は、L N A 改変 R N A 鎖であるが、未改変 R N A アンチセンス鎖、または完全もしくは部分的に改変された R N A アンチセンス鎖も機能的である。得られた結果は、L N A モノマーのような選択的に改変されたモノマーは、本発明のヒドロキシメチル置換モノマーと完全に適合することを示す。

【 0 2 4 4 】

エントリー 4 は、センス鎖においてヒドロキシメチル置換モノマー T / C を有する本発明の s i R N A 複合体が、遺伝子サイレンシングを媒介する際、高度に効率的であることを確認する。

【 0 2 4 5 】

10

20

30

40

50

エントリー 5 および 6 は、センス鎖においてヒドロキシメチル置換モノマー T / C を有する本発明の s i R N A 複合体が、遺伝子サイレンシングを媒介する際、高度に効率的であることを確認する。

【 0 2 4 6 】

結果は、非常に効率的な遺伝子サイレンシングが、センス鎖に取り込まれたヒドロキシメチル置換モノマーを有する本発明の s i R N A 複合体によって達成されることを示す。データは、概して、未改変 s i R N A または L N A 改変 s i R N A によって達成される遺伝子サイレンシングと比較して、さらに改善された遺伝子サイレンシングが本発明のこれらの R N A 複合体によって達成されるという驚くべき発見を示す。さらに、サイレンシングは、中核領域 (c o r e r e g i o n) を形成する中央の二本鎖においていくつかのヒドロキシメチル置換モノマーを有するセンス R N A 鎖を含む R N A 複合体でも効率的である (例として、エントリー、W 0 4 4) 。

10

【 0 2 4 7 】

エントリー 7 および 8 は、本発明の s i R N A 複合体のアンチセンス鎖においてヒドロキシメチル置換モノマー T / C を有する該複合体が、遺伝子サイレンシングを媒介することができることを明らかにする。アンチセンス鎖に取り込まれるヒドロキシメチル置換モノマー T / C が多いほど、遺伝子サイレンシング活性がより低いと考えられる。

【 0 2 4 8 】

エントリー 7、8、15、16、17 および 18 の実施例において、例として、L N A 改変センス鎖が使用されるが、未改変 R N A センス鎖または完全もしくは部分的に改変された R N A センス鎖も機能的である。得られた結果は、L N A モノマーのような選択的に改変されたモノマーが、本発明のヒドロキシメチル置換モノマーと完全に適合することを示す。

20

【 0 2 4 9 】

エントリー 9 ~ 18 の実施例遺伝子サイレンシング実験においては、上記の図 3 に示される構造 X の 2 ' , 3 ' - セコ - R N A ヒドロキシメチル置換モノマーを含有する本発明の s i R N A 複合体が研究される。

【 0 2 5 0 】

エントリー 9 は、2 つの R N A 鎖 (2 つの鎖の 3 ' 末端に対する) のそれぞれにおいて 1 個のヒドロキシメチル置換モノマー X を有する本発明の s i R N A 複合体が、未改変 s i R N A のレベルに相当するレベルまで非常に効率的な遺伝子サイレンシングを媒介することを証明する。これは、驚くことに、ヒドロキシメチル置換モノマー X のリボース部分の非環式性質を考慮に入れている。

30

【 0 2 5 1 】

R N A 複合体の 2 つの鎖のそれぞれにおける付加的 X モノマーでは、遺伝子サイレンシング効率は非効率的である (エントリー 1 0) 。

【 0 2 5 2 】

エントリー 11 は、エントリー 10 と合わせて、アンチセンス鎖の 5 ' 末端付近のヒドロキシメチル置換モノマー X の取り込みにより、s i R N A 複合体の遺伝子サイレンシング効率が低下することを明らかにする。

40

【 0 2 5 3 】

エントリー 12 は、センス鎖の 5 ' 末端付近のヒドロキシメチル置換モノマー X の取り込みにより、別のモノマー X がセンス鎖の 3 ' 末端に取り込まれる場合、s i R N A 複合体の遺伝子サイレンシング効率が低下することを明らかにする。

【 0 2 5 4 】

エントリー 13 および 14 は、センス鎖の 5 ' 末端付近のヒドロキシメチル置換モノマー X の取り込みにより、s i R N A 複合体の遺伝子サイレンシング効率が低下することを確認する。結果は、s i R N A 構築物のセンス鎖の中心部におけるヒドロキシメチル置換モノマー X の取り込みにより、遺伝子サイレンシング活性が改善されることも、低下することもないことを示す。

50

【0255】

エントリー15～18は、LNA改変RNAセンス鎖、および1個のヒドロキシメチル置換モノマーXを有するアンチセンス鎖を含有する本発明のsiRNA複合体による遺伝子サイレンシング実験の結果を示す。

【0256】

結果は、アンチセンス鎖の中央の領域、例えば、W126およびW123においてヒドロキシメチル置換モノマーXを含有する本発明のsiRNA複合体が、非常に効率的な遺伝子サイレンシングを媒介することを示す。驚くべきことに、W131と合わせて非常に効率的な遺伝子サイレンシングを媒介するW127は、LNA改変RNAセンス鎖JW1106では中度の遺伝子サイレンシングしか誘導しない。このことにより、2つのRNA鎖(2つの鎖の3'末端に対する)のそれぞれにおいて1個のヒドロキシメチル置換モノマーXを有する本発明のsiRNA複合体が、未改変siRNAのレベルに相当するレベルまで非常に効率的な遺伝子サイレンシングを媒介するという観察(エントリー9)の驚くべき態様が強調される。

10

【0257】

上記と同様の結果を、ウラシル、チミン、または5-メチルシトシン以外の他の核酸塩基を有するヒドロキシメチル置換モノマーを含有する本発明のRNA複合体によって得ることができる。例えば、同様のプロトコル(protocol)を使用した同程度の遺伝子サイレンシング活性を、核酸塩基としてアデニン、シトシン、またはグアニンを有するヒドロキシメチル置換モノマーを含有する本発明のRNA複合体に対して得ることができる。

20

【0258】

(実施例4)

免疫刺激

ヒドロキシメチル置換モノマーを含有する本発明のRNA複合体は、対応する未改変RNA複合体に対して化学的改変がなされるため、対応する未改変RNA複合体より低い免疫刺激活性を示す。

【0259】

(実施例5)

オフターゲット効果

ヒドロキシメチル置換モノマーを含有する本発明のRNA複合体は、アンチセンス鎖改変siRNA複合体が不活性であるように、調節することができるため、オフターゲット効果がより低い遺伝子サイレンシングの構築が、本発明により可能になる。要所は、センス鎖がアンチセンス鎖として機能できないように、センス鎖をヒドロキシメチル置換モノマーで改変することである。これは、例えば、ヒドロキシメチル置換モノマーをセンス鎖の5'末端に対して取り込むことによって達成することができる。

30

【0260】

非環式モノマーXでは、オフターゲット効果の低下は、モノマーXを、アンチセンス鎖、最も好ましくは、アンチセンス鎖の5'末端から位置6～8の辺り、例えば、アンチセンス鎖の5'末端から位置7に取り込むことによって達成することができる。

40

【0261】

(実施例6)

官能化したおよび結合したヒドロキシメチルモノマーを含有する本発明のRNA複合体の合成

本発明のヒドロキシメチル置換モノマーのヒドロキシメチル置換基は、共役基によって官能化される。共役基は、本明細書において、本発明のRNA複合体の化学的、生物物理学的、または生物学的特性を調節、拡大、または改善する基として定義される。そのような基は、細胞分布、臓器分布、組織分布、融解温度、標的親和性、生物学的安定性、ハイブリダイゼーションのシグナル伝達等を調節するために有用であり得る。

【0262】

50

公知の方法を使用して、ヒドロキシメチル置換基を多様な化学誘導体に変換することができる [Furniss, Hannaford, Smith and Tatchell, Vogel's Textbook of Organic Chemistry, 1989, John Wiley & Sons]。これは、ヌクレオシドレベル、すなわち、自動DNA合成器上での自動RNA合成に有用なホスホラミダイト誘導体への変換前に達成することができる。有用な誘導体へのヒドロキシメチル基の変換後、自動RNA合成に必要なホスホラミダイト誘導体は、標準方法を使用して合成され、RNAオリゴヌクレオチド(鎖)への誘導体または結合モノマーの取り込みは、その後、標準方法を使用して、達成される(実施例1参照)。

【0263】

エーテル結合を介する結合 本発明のヒドロキシメチル置換モノマーのヒドロキシメチル置換基は、求核置換反応による、共役基 (conjugating group) とヒドロキシメチル置換基のメチレン基との間のエーテル結合によって官能化される。この反応は、例えば、メシル化、またはハロゲン化物への変換、その後のアルコールまたはアルコキシド誘導体による求核付加による、良好な脱離基へヒドロキシメチル置換基のヒドロキシ基の変換を伴う。

【0264】

チオエーテル結合を介する結合 本発明のヒドロキシメチル置換モノマーのヒドロキシメチル置換基は、求核置換反応による、共役基とヒドロキシメチル置換基のメチレン基との間のチオエーテル結合によって官能化される。この反応は、例えば、メシル化、またはハロゲン化物への変換、その後のアルキルチオールまたはチオアルコキシド誘導体による求核付加を伴う、良好な脱離基へヒドロキシメチル置換基のヒドロキシ基の変換を伴う。求核剤が、選択的にSH⁻である場合、例えば、アセチル化による保護は、本発明のRNA複合体へのメルカプト(SH)基の導入に有用なホスホラミダイト誘導体をもたらす。RNA複合体へメルカプト官能基を導入するための選択の手順として、ジスルフィド含有部分を有する結合を使用することができる。ジスルフィド含有RNA複合体の還元後、メルカプト基官能化RNA複合体が得られる。

【0265】

アミノメチル基への誘導体化 本発明のヒドロキシメチル置換モノマーのヒドロキシメチル置換基は、アミノメチル基へ変換することができる。この反応は、例えば、メシル化、またはハロゲン化物への変換、その後のアンモニア、または所望のアミノ誘導体を得るために脱保護される(例えば、RNA合成後)保護アミン誘導体(例えば、フタルイミドのような)による求核付加による、良好な脱離基へヒドロキシメチル置換基のヒドロキシ基の変換を伴う。トリフルオロアセチルまたはFmoc保護基は、自動RNA合成の間のアミノ保護に対する他の選択肢であり、標準的なオリゴヌクレオチド脱保護の後の遊離アミノ基の遊離を伴う。

【0266】

アミド結合を介する結合 本発明のヒドロキシメチル置換モノマーのヒドロキシメチル置換基は、アミド結合共役基の付加のハンドル(handle)として作用する。これは、例えば、上記のようなアミン構造単位(unit)へのヒドロキシメチル置換基のヒドロキシ構造単位の変換、および、例えば、公知の方法を使用してアミド結合形成を介する共役基による、このアミノ基のさらなる誘導体化を伴う。これは、当業者に公知の方法を使用して、RNA合成の前またはその後に行ってもよい[Bryld, Hojland and Wengel, Chem. Commun. 2004, 1064; Mokhir, Tetzlaff, Herzberger, Mosbacher and Richardt, J. Comb. Chem. 2001, 3, 374]。

【0267】

アミノ結合を介する結合 本発明のヒドロキシメチル置換モノマーのヒドロキシメチル置換基は、アミノ結合共役基の付加のハンドルとして作用する。これは、例えば、上記のようなアミン部分へのヒドロキシメチル置換基のヒドロキシ部分の変換、および、公知の

10

20

30

40

50

反応である還元的アミノ化反応による、例えば、アルデヒド官能基を含有する共役基による、このアミノ基のさらなる誘導体化を伴う [Furniss, Hannaford, Smith and Tatchell, Vogel's Textbook of Organic Chemistry, 1989, John Wiley & Sons]。これは、RNA合成の前またはその後に行ってもよい。

【0268】

ピペラジノ基または直鎖ジアミノアルキル基を介する結合 ピペラジノ基または直鎖ジアミノアルキル基も、記載される反応を行うことによる誘導体化に使用される [Bryld, Hoojland and Wengel, Chem. Commun. 2004, 1064-5]。例えば、RNAオリゴヌクレオチド合成の前またはその後のいずれかに、アミド結合形成または還元的アミノ化反応により、例えば、ピペラジノ基の遠位窒素原子(図2、モノマーJ参照)に他の共役基が付加することができるため、これらの基は、有用である [Bryld, Hoojland and Wengel, Chem. Commun. 2004, 1064; Mokhir, Tetzlaff, Herzberger, Mosbacher and Richard, J. Comb. Chem. 2001, 3, 374]。この方法で、例えば、コレステリルまたは脂肪酸構造単位は、ピペラジノ-メチル置換基を介して本発明のRNA複合体と結合することができる。

10

【0269】

これらの手順を使用して、例えば、コレステリル構造単位、アルキル構造単位、脂肪酸構造単位、ポリアミン誘導体、チオ誘導体、アミノ酸、ポリペプチド、単糖類誘導体、多糖類誘導体、またはフルオロフォア(そのすべてが、ヒドロキシメチル置換基のメチレン基を介して本発明のRNA複合体に結合することができる)を含有する本発明のRNA複合体を調製することができる。本明細書に掲載される基は、上記で例示される手順を使用して付加することができる基の例でしかない。結合モノマーの構造的な例に関しては、図2を参照されたい。

20

【0270】

(実施例7)

官能化および結合ヒドロキシメチルモノマーを含有する本発明のRNA複合体による遺伝子サイレンシング

遺伝子サイレンシングは、官能化および結合ヒドロキシメチルモノマー(例えば、図2または実施例6参照)を含有する本発明のRNA複合体により効率的である。

30

【0271】

効率的な遺伝子サイレンシングは、これらの官能化および結合ヒドロキシメチルモノマーが、siRNA複合体の2つの鎖の3'末端に位置するか、またはその付近に位置する場合に達成される。

【0272】

さらに、効率的な遺伝子サイレンシングは、これらの官能化および結合ヒドロキシメチルモノマーが、siRNA複合体のセンス鎖の3'末端および5'末端に位置するか、またはその付近に位置する場合に達成される。

【0273】

特に、効率的な遺伝子サイレンシングは、これらの官能化および結合ヒドロキシメチルモノマーが、siRNA複合体のセンス鎖の3'末端に位置するか、またはその付近に位置する場合に達成される。

40

【0274】

さらに、効率的な遺伝子サイレンシングは、これらの官能化および結合ヒドロキシメチルモノマーが、一本鎖アンチセンスRNAオリゴヌクレオチド内に位置する場合に達成される。

【0275】

薬物動態特性の調節は、本発明のRNA複合体の基(図2のR)が、コレステリル誘導体である場合、効率的な遺伝子サイレンシングと共に達成される。これは、例えば、組織

50

分布および細胞取り込みの改善、ならびに生物学的安定性の増加にもつながる。

【0276】

薬物動態特性の調節は、本発明のRNA複合体の基(図2のR)が、チオ誘導体である場合、効率的な遺伝子サイレンシングと共に達成される。これは、人体における循環時間の改善、すなわち、腎臓を介するクリアランスの低減をもたらす。

【0277】

薬物動態特性の調節は、本発明のRNA複合体の基(図2のR)が、アミノ基を含有する場合、効率的な遺伝子サイレンシングと共に達成される。これは、組織分布の改善をもたらす。

【0278】

(実施例8)

ヒドロキシメチル置換RNA複合体の生物学的安定性

安定性試験のための実験手順 ヒドロキシメチル置換RNA複合体は、D-MEM(Gibco)で希釈した10%ウシ胎仔血清(Gibco)において37℃でインキュベートした。5μLのサンプルを指示された時点で収集し、ドライアイス上で、直ちに15μLの1.33×TBE/10%グリセロール充填緩衝液中に凍結させ、15%ゲル上で非変性PAGEを行った。RNAは、SYBRゴールド(Invitrogen)で可視化した。

【0279】

そのような実験は、ヒドロキシメチル置換RNA複合体の安定性が、天然型(すなわち、「未改変」)対照RNA複合体に関して、生物学的媒体における安定性の改善を示すことを示す。したがって、ヒドロキシメチル置換siRNAは、通常のsiRNAより、10%血清において有意に安定する。したがって、1時間を超える長いインキュベーション期間にわたって、ヒドロキシメチル置換siRNAの大きさのごくわずかな減少がみられることを想定することができる。本発明者らは、ヒドロキシメチル置換モノマーを含有する本発明のRNA複合体は、細胞、動物、およびヒトにおいて非常に安定し、この特性は、それらの非常に効率的な遺伝子サイレンシング特性に貢献していると結論付ける。この顕著な生物学的安定性のため、ヒドロキシメチル置換モノマーを含有する本発明のRNA複合体は、それらの未改変対応物より長い期間、遺伝子サイレンシングを示す。

【0280】

(実施例9)

遺伝子サイレンシングに対する構造Dのモノマーの強力な能力を証明する一連の遺伝子サイレンシング実験

前の実験に記載される手順を使用して、遺伝子サイレンシング研究を、より初期に記載の配列のsiRNA二本鎖、およびさらなる配列のsiRNA二本鎖を使用して行った(本実施例の研究に含まれる配列に関しては、図4~9を参照)。これらの実験は、モノマーX(モノマーXの記載に関しては、実施例1を参照)の1個または複数個の取り込みを含有する配列を含んだ。モノマーXは、本明細書において、構造の例としてのみ使用され、例えば、モノマーE、モノマーF、モノマーG、モノマーI、およびモノマーJ(図1および図2参照)のような誘導体に対して、同様の結果が予測される。上付き文字のLが付いた、太字、下線付きのモノマーは、LNAモノマーである。本実施例においては、図4~9は、 $C^L = C^{MeL} = 5\text{-メチルシトシン}(5\text{-methylcytosine})\text{-1-イルLNAモノマー}$ を含んでいる。

【0281】

結果が図4に示される実験は、すべて、モノマーXの2つの取り込みを有するセンス鎖(W130)を伴う。以下のことが示される。

- 遺伝子サイレンシング官能基を示すヒドロキシメチル置換およびLNAモノマーの両方を含有する鎖から成るsiRNA二本鎖を設計することは可能である。
- 遺伝子サイレンシング官能基を示す、センス鎖におけるミスマッチモノマーXを有する鎖から成るsiRNA二本鎖を設計することは可能である。

10

20

30

40

50

- 完全RNAアンチセンス鎖（3'末端に対する2個のLNAモノマーを除く）は、耐容性良好である。

- 単一Xモノマーは、アンチセンス鎖において耐容性良好である（W123、W125、またはW126）。

- いくつかのXモノマーは、耐容性であるが、アンチセンス鎖としてW123、W125、またはW126によるよりか、W186およびW187による方が、効率性がより低い遺伝子サイレンシングが見られる。

- W188では、有意な遺伝子サイレンシング活性が見られるが、このアンチセンス鎖は、6個のLNAモノマーを含有し、アンチセンス鎖の中央に位置するモノマーXは、モノマーXが、対応するRNAモノマーで置換される状況と比較して、遺伝子サイレンシングを改善することができることを示す。

10

【0282】

結果が図5に示される実験は、すべて、鎖（W131）の3'末端に対して位置する1個のモノマーXを有するセンス鎖を伴う。以下のことが示される。

- 完全RNAアンチセンス鎖（3'末端に対する2個のLNAモノマーを除く）は、耐容性良好である。

- 単一Xモノマーは、アンチセンス鎖において耐容性良好であり得る（W123）。

- 単一Xモノマーは、未改変対照（siRNA-EGFP）と比較して、同様に良好なまたはさらに改善された遺伝子サイレンシングにつながり得る（W125またはW126）。

20

- いくつかのXモノマーは、むしろ耐容性良好である（アンチセンス鎖として、W186、W187、またはW281）。

- W188では、有意な遺伝子サイレンシング活性が見られるが、このアンチセンス鎖は、6個のLNAモノマーを含有し、アンチセンス鎖の中央に位置するモノマーXは、モノマーXが、対応するRNAモノマーで置換される状況と比較して、遺伝子サイレンシングを改善することができることを示す。

- LNAモノマーの共存がない状況において、アンチセンス鎖におけるモノマーXのいくつかの置換により、有意な遺伝子サイレンシングが見られる（W281）。

【0283】

結果が図6に示される実験は、すべて、センス鎖（W282）と共に分散する3個のXモノマーを有するセンス鎖を伴う。以下のことが示される。

30

- 完全RNAアンチセンス鎖（3'末端に対する2個のLNAモノマーを除く）は、耐容性良好である。

- 単一Xモノマーは、アンチセンス鎖において耐容性良好であり得、未改変対照（siRNA-EGFP）と比較して、同様に良好なまたはさらに改善された遺伝子サイレンシングが観察される3'末端に対して、最もそのように明白であり得る（W123、W125、W126）。

- いくつかのXモノマーは、むしろ耐容性良好である。（アンチセンス鎖として、W186、W187、またはW281）

- W188では、有意な遺伝子サイレンシング活性が見られるが、このアンチセンス鎖は、6個のLNAモノマーを含有し、アンチセンス鎖の中央に位置するモノマーXは、モノマーXが、対応するRNAモノマーで置換される状況と比較して、遺伝子サイレンシングを改善することができ、センス鎖が、いくつかのXモノマーを含有する場合も遺伝子サイレンシングを改善することができることを示す。

40

- LNAモノマーの共存がない状況においても、アンチセンス鎖におけるモノマーXのいくつかの置換により、遺伝子サイレンシングが見られる（W281）。

【0284】

結果が図7に示される実験は、すべて、モノマーXがないセンス鎖を伴う（W194）。以下のことが示される。

- 単一Xモノマーは、アンチセンス鎖において耐容性良好であり得る（W123）。

50

- 単一 X モノマーは、未改変対照 (s i R N A - E G F P) と比較して、同様に良好なまたはさらに改善された遺伝子サイレンシングにつながり得る (W 1 2 5 または W 1 2 6)

。
- いくつかの X モノマーは、むしろ耐容性良好である (アンチセンス鎖として、 W 1 8 6 、 W 1 8 7 、 または W 2 8 1) 。

- W 1 8 8 では、有意な遺伝子サイレンシング活性が見られるが、このアンチセンス鎖は、6 個の L N A モノマーを含有し、アンチセンス鎖の中央に位置するモノマー X は、モノマー X が、対応する R N A モノマーで置換される状況と比較して、遺伝子サイレンシングを改善することができることを示す。

- L N A モノマーの共存がない状況においても、アンチセンス鎖におけるモノマー X のいくつかの置換により、有意な遺伝子サイレンシングが見られる (W 2 8 1) 。

【 0 2 8 5 】

結果が図 8 に示される実験は、すべて、モノマー X はないが (W 1 8 1) 、二本鎖形成セグメント (3 ' 末端における 2 個の L N A モノマーを加えて) に取り込まれる 4 個の L N A モノマーを有するセンス鎖を伴う。以下のことが示される。

- 単一 X モノマーは、アンチセンス鎖において耐容性良好である (W 1 2 3 、 W 1 2 5 、 または W 1 2 6) 。

- いくつかの X モノマーは、むしろ耐容性良好である (アンチセンス鎖として、 W 1 8 6 、 W 1 8 7 、 または W 2 8 1) 。

- W 1 8 8 では、有意な遺伝子サイレンシング活性が見られるが、このアンチセンス鎖は、6 個の L N A モノマーを含有し、アンチセンス鎖の中央に位置するモノマー X は、モノマー X が、対応する R N A モノマーで置換される状況と比較して、遺伝子サイレンシングを改善することができることを示す。

- L N A モノマーの共存がない状況においても、アンチセンス鎖におけるモノマー X のいくつかの置換により、有意な遺伝子サイレンシングが見られる (W 2 8 1) 。

【 0 2 8 6 】

結果が図 9 に示される実験は、すべて、鎖の 5 ' 末端に対して位置する 1 個のモノマー X を有するセンス鎖を伴う (W 1 2 9) 。以下のことが示される。

- 完全 R N A アンチセンス鎖 (3 ' 末端に対する 2 個の L N A モノマーを除く) は、耐容性良好である。

- 単一 X モノマーは、アンチセンス鎖において耐容性良好であり得、未改変対照 (s i R N A - E G F P) と比較して、改善された遺伝子サイレンシングにつながり得る (W 1 2 3 、 W 1 2 5 、 または W 1 2 6) 。

- いくつかの X モノマーは、むしろ耐容性良好である (アンチセンス鎖として、 W 1 8 6 、 W 1 8 7 、 または W 2 8 1) 。

- W 1 8 8 では、有意な遺伝子サイレンシング活性が見られるが、このアンチセンス鎖は、6 個の L N A モノマーを含有し、アンチセンス鎖の中央に位置するモノマー X は、モノマー X が、対応する R N A モノマーで置換される状況と比較して、遺伝子サイレンシングを改善することができることを示す。

- L N A モノマーの共存がない状況において、アンチセンス鎖におけるモノマー X のいくつかの置換により、有意な遺伝子サイレンシングが見られる (W 2 8 1) 。

【 0 2 8 7 】

以下に示されるデータは、ヒドロキシメチル置換モノマーが、 s i s i R N A 法に適合することを示す。例として、W 1 2 3 アンチセンス鎖 + (W 0 0 4 + W 0 0 5) センス鎖の 3 分子の組み合わせの使用は、効率的な遺伝子サイレンシング (すなわち、 s i R N A 効果が、0 . 2 4 である場合、「 s i R N A 効果」は、低い値を有する) につながり、モノマー X が、 s i s i R N A 複合体のアンチセンス鎖において位置し得ることを示す (対照と比較して ; 読み出し 1 . 0) 。未改変 s i R N A に関するデータも示す。アンチセンス鎖の設計は、W 1 8 6 アンチセンス鎖 + (W 0 0 4 + W 0 0 5) センス鎖の組み合わせが、遺伝子サイレンシング効果を誘導することができないため、重要である。これは、ヒ

10

20

30

40

50

ドロキシメチル置換モノマー（例えば、モノマーD）の数は低く、最も好ましくは、1個のモノマーに制約されるべきであることを示す（アンチセンス鎖の突出における任意のヒドロキシメチル置換モノマーに加えて）。図9に示される研究に含まれる他のRNA複合体は、遺伝子サイレンシングに関して、同等に効率的である。

【0288】

【表2】

アンチセンス鎖	siRNA 効果
W123	0.24
W125	0.26
W126	0.23
W186	1.12
SiRNA	0.11
対照	1.0

10

（実施例10）

種（seed）改変は、オフターゲット効果を削減する

50 nM濃度のsiRNA二本鎖におけるセンス鎖として、アンチセンス鎖W124およびW207（5'-GAC GUA AAC GGC CAC AAG U^LC^Me^L）（配列番号25）を使用して、本発明者らは、モノマーXが、アンチセンス鎖のいわゆる種領域に存在する場合、より低いオフターゲット効果をもたらす選択性増強効果を有することを示した。したがって、実験の設定により、siRNA効果（鎖開裂を伴う遺伝子サイレンシング）とmiRNA効果（翻訳抑制；種領域の一致のみから成る4つの標的領域を有する、プラスミドに基づくオフターゲットセンサ）との識別を可能にした。上記の組み合わせを使用すると、siRNA効果は、未改変siRNA対照と同様であったが、一方、miRNA効果は、有意に低下した。同様の効果は、siDharma（アンチセンス鎖の5'末端からの位置番号2に取り込まれる2'-O-Me-RNAモノマーを有する市販品）に対して得られた。以上のように、これは、アンチセンス鎖のいわゆる種領域に存在するヒドロキシメチル置換モノマー（例えば、モノマーD）が、好ましい効果（すなわち、オフターゲット効果の低下または排除）をもたらすことを示す。そのため、RNA複合体のオフターゲット効果を低下または排除するための方法は、RNA複合体に1個または複数個のヒドロキシメチル置換モノマー（例えば、モノマーD）を取り込む工程、または1個または複数個のヒドロキシメチル置換モノマー（例えば、モノマーD）を含有するRNA複合体を調製する工程を含む。遺伝子サイレンシング（すなわち、「siRNA効果」）およびオフターゲット効果（すなわち、「miRNA効果」）の結果に関しては、以下の表を参照されたい。これらのデータは、1個または複数個のヒドロキシメチル置換モノマー（例えば、モノマーD）を含有するRNA複合体が、オフターゲット効果を最小限にしながら、標的の発現を削減することを示す。

20

30

40

【0289】

【表 3】

アンチセンス鎖	siRNA 効果	miRNA 効果
W124	0.12	0.38
W125	0.04	0.19
SiRNA	0.06	0.15
siDharma	0.08	0.37
対照	1.0	1.0

10

さらなる種の分野の研究に対して、本発明者らは、RNAモノマー（rA、rC、rG、およびrU）および、ヒドロキシメチル改変モノマー（モノマーD；アデニン（adenin）-9-イル、シトシン（cytosin）-1-イル、グアニン（guanin）-9-イル、およびウラシル-1-イル誘導体に対して、それぞれ、標識されたsA、sC、sG、およびsU）から成る以下の配列を調製した。モノマーXは、核酸塩基を有するモノマーDを表す。

【0290】

以下に示される最初の9オリゴヌクレオチドの番号付けは、以下の通りである（上から、1番から9番）。

20

【0291】

【化6】

W313; W314; W315; W316; W317; W123; W318; W319および W320

配列番号

sA	rC	rU	rU	rG	rU	rG	rG	rC	rC	rG	rU	rU	rU	rA	rC	rG	rU	rC	rG	rC	rU	<u>26</u>
rA	sC	rU	rU	rG	rU	rG	rG	rC	rC	rG	rU	rU	rU	rA	rC	rG	rU	rC	rG	rC	rU	<u>27</u>
rA	rC	sU	rU	rG	rU	rG	rG	rC	rC	rG	rU	rU	rU	rA	rC	rG	rU	rC	rG	rC	rU	<u>28</u>
rA	rC	rU	sU	rG	rU	rG	rG	rC	rC	rG	rU	rU	rU	rA	rC	rG	rU	rC	rG	rC	rU	<u>29</u>
rA	rC	rU	rU	rG	sU	rG	rG	rC	rC	rG	rU	rU	rU	rA	rC	rG	rU	rC	rG	rC	rU	<u>30</u>
rA	rC	rU	rU	rG	rU	sG	rG	rC	rC	rG	rU	rU	rU	rA	rC	rG	rU	rC	rG	rC	rU	<u>31</u>
rA	rC	rU	rU	rG	rU	sG	rG	rC	rC	rG	rU	rU	rU	rA	rC	rG	rU	rC	rG	rC	rU	<u>32</u>
rA	rC	rU	rU	rG	rU	rG	sG	rC	rC	rG	rU	rU	rU	rA	rC	rG	rU	rC	rG	rC	rU	<u>33</u>
rA	rC	rU	rU	rG	rU	rG	rG	sC	rC	rG	rU	rU	rU	rA	rC	rG	rU	rC	rG	rC	rU	<u>34</u>

30

sA	rC	rU	rU	rG	rU	rG	rG	rC	rC	rG	rU	rU	rU	rA	rC	rG	rU	rC	rG	sU	rU	<u>35</u>
rA	sC	rU	rU	rG	rU	rG	rG	rC	rC	rG	rU	rU	rU	rA	rC	rG	rU	rC	rG	sU	rU	<u>36</u>
rA	rC	sU	rU	rG	rU	rG	rG	rC	rC	rG	rU	rU	rU	rA	rC	rG	rU	rC	rG	sU	rU	<u>37</u>
rA	rC	rU	sU	rG	rU	rG	rG	rC	rC	rG	rU	rU	rU	rA	rC	rG	rU	rC	rG	sU	rU	<u>38</u>
rA	rC	rU	rU	sG	rU	rG	rG	rC	rC	rG	rU	rU	rU	rA	rC	rG	rU	rC	rG	sU	rU	<u>39</u>
rA	rC	rU	rU	rG	sU	rG	rG	rC	rC	rG	rU	rU	rU	rA	rC	rG	rU	rC	rG	sU	rU	<u>40</u>
rA	rC	rU	rU	rG	rU	sG	rG	rC	rC	rG	rU	rU	rU	rA	rC	rG	rU	rC	rG	sU	rU	<u>41</u>
rA	rC	rU	rU	rG	rU	rG	sG	rC	rC	rG	rU	rU	rU	rA	rC	rG	rU	rC	rG	sU	rU	<u>42</u>
rA	rC	rU	rU	rG	rU	rG	rG	sC	rC	rG	rU	rU	rU	rA	rC	rG	rU	rC	rG	sU	rU	<u>43</u>

40

遺伝子サイレンシング実験において、オリゴマーW313、W314、W315、W316、W317、W123、W318、W319、およびW320をアンチセンス鎖として、そしてオリゴマーJW1104をセンス鎖として有する上記実施例に記載されるのと同様の実験技法を使用することにより、ヒドロキシメチル置換モノマーDを含有するsiRNA構築物の有効性は、未改変siRNA、またはアンチセンス鎖の5'末端からの位置番号2に2'-O-Me-RNAモノマーを有する市販の化学的改変siRNA生成物

50

(Dharma)と比較して改善することができる。さらに、2', 3'-セコ-RNAモノマーDを含有するsiRNA複合体は、オフターゲット効果(miRNA効果)が参照未変換siRNA(SiRNA)と比較して低減されるように、このモノマーをsiRNA構築物に取り込むことができることを示す。

【0292】

1 nM、10 nM、および100 nMのRNA複合体に対する結果を、以下に表の形式で示す(対照; 1.0に調節したデータ)。siRNA効果およびmiRNA(マイクロRNA)効果による遺伝子サイレンシングを、指示される通り、異なるsiRNA二本鎖の様々な濃度で研究した。同様の結果が、RNAおよび非環式2', 3'-セコ-RNAモノマーを独占的に含有する、上記の9つの鎖のような鎖から予期される。アンチセンス鎖改変としてのヒドロキシメチル改変モノマーDは、オフターゲット効果を低下させ、遺伝子サイレンシングの有効性を増加させる。

【0293】

【表4】

	SiRNA効果			miRNA効果	
	1 nm	10 nm	100 nm	1 nm	10 nm
W313	0.45	0.76	0.81	0.52	0.67
W314	0.58	0.96	0.88	0.72	0.64
W315	0.48	0.82	0.85	0.62	0.64
W316	0.46	0.75	0.78	0.85	0.97
W317	0.26	0.32	0.92	0.39	0.52
W318	0.17	0.18	0.45	0.46	0.62
W319	0.34	0.50	0.66	0.23	0.29
W320	0.87	0.96	0.97	0.13	0.12
Dharma	0.52	0.47	0.89	0.37	0.40
SiRNA	0.23	0.24	0.54	0.12	0.14
対照	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

設計は重要であり、siRNA効果に対する上記の一連のオリゴマーのうち最も強力なものは、アンチセンス鎖の5'末端からの位置番号7にヒドロキシメチル置換モノマーDを有するW318である。W318は、また未変換siRNAまたは市販品(Dharma)と比較して、好ましい低いオフターゲット(miRNA)効果をもたらす。概して、取り込まれたヒドロキシメチル置換モノマーDを有する上記に掲載されるアンチセンス鎖の使用は、好ましい低いオフターゲット(miRNA)効果をもたらす。重要かつ驚くことに、高い有効性および低いオフターゲット効果が、ヒドロキシメチル置換モノマーDを含有するアンチセンス鎖を有する構築物を使用して同時に実現することができる(上表参照)。特に、W318の設計は、好ましくは、ヒドロキシメチル置換モノマーDが、アンチセンス鎖のいわゆる種領域の境界付近、最も好ましくは、例えば、アンチセンス鎖の5'末端からの位置番号7のような、アンチセンス鎖の5'末端からの位置番号5~10付近に、好ましくは、取り込むことができることを示す。1個または複数個のヒドロキシメチル置換モノマーDの付加的な取り込みを2つの鎖において実現することができる。

【0294】

さらに、効果は、モノマーXが、5'末端から数えて、位置9~16付近のアンチセンス鎖に位置する場合、逆転し得ることに注目してよい。例えば、アンチセンス鎖におけるモノマーXが、アンチセンス鎖の5'末端からの位置番号9に存在する場合、アンチセンス鎖および二本鎖は、マイクロRNAとして作用する(siRNA効果は最小となり、マイクロRNA効果は、より高くなる)。この効果は、潜在的に非環式ヒドロキシメチル置換モノマーX(=モノマーD)の存在によって生じる親和性の低下のため、完全長結合に対する低下傾向によって引き起こされる。

【0295】

10

20

30

40

50

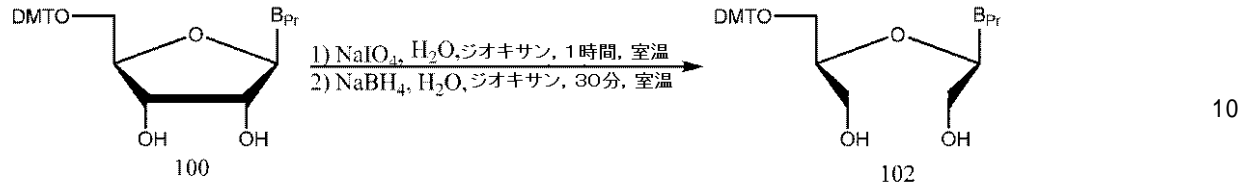
(実施例 11)

ホスホラミダイトモノマー基本要素の合成

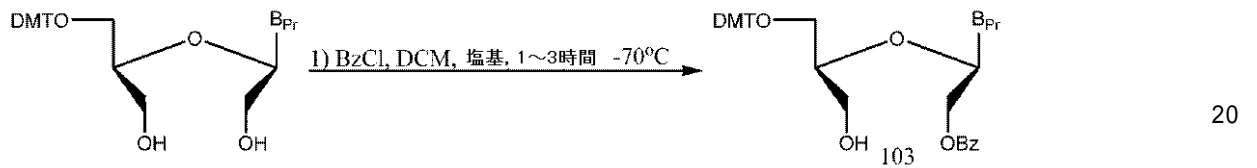
以下のスキームは、モノマーアミダイト (= ホスホラミダイト) 基本要素の合成を例示するために行われた手順を示す。

【0296】

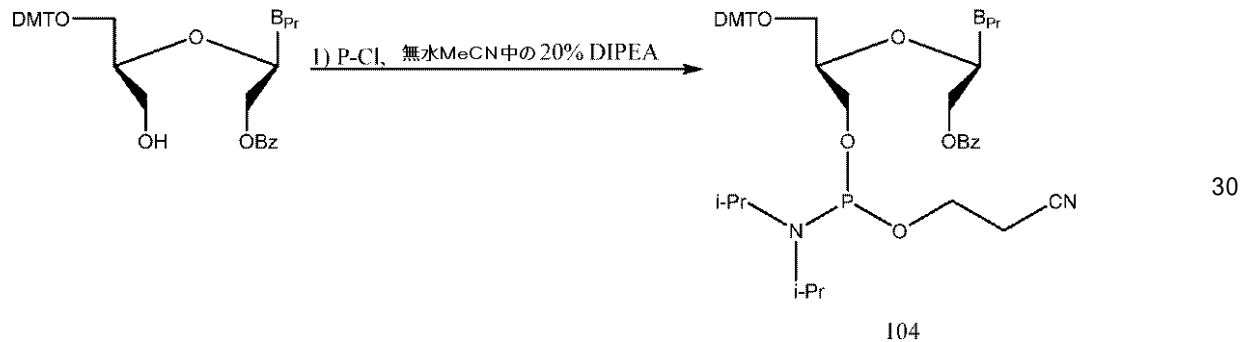
【化7】



B_{Pr} :
 ウリジン = 82%
 N6-Bz アデニン = 86%
 N4-Ac シトシン = 71%*
 N2-イソブチルグアニン = 68%*



B_{Pr} :
 ウリジン = 80%
 N6-Bz アデニン = 73%
 N4-Ac シトシン = 64%
 N2-イソブチルグアニン = 63%



B_{Pr} :
 ウリジン = 57%
 N6-Bz アデニン = 71%
 N4-Ac シトシン = 45%
 N2-イソブチルグアニン = 33%

ホスホラミダイトの全収率
 セコ U = 37%
 セコ A = 44%
 セコ C = 20%
 セコ G = 14%

* セコ G および セコ C を得るための開環ステップは、DMT 保護後の精製なしで行ったため、記載の収率は、2つのステップの全収率である。

化合物 100 は、リボヌクレオシド出発物質である。化合物 102 は、酸化開裂反応、その後の還元によって調製されるジオールである。化合物 103 は、化合物 102 の O 2' - ヒドロキシ基の選択的ベンゾイル化によって調製される O 2' - ベンゾイル化誘導体である。化合物 104 は、化合物 103 の O 3' - ヒドロキシ基の O 3' - リン酸化によって調製されるアミダイト (= ホスホラミダイト) である。以下は、詳細な手順、および手順の例として含まれる特性データである。

【0297】

5' - O - (4 , 4' - ジメトキシトリチル) - 2' , 3' - セコウリジン (102 - U)

10

20

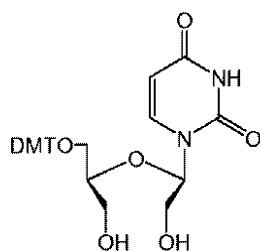
30

40

50

【0298】

【化8】



ヌクレオシド100-U(5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)ウリジン; 10
 0.35g, 18.94mmol)を、ジオキサン(250mL)および水(50mL)
 に溶解した。NaIO₄(4.47g, 20.90mmol)を水(50mL)に溶解し
 、溶解したヌクレオシドに添加した。混合物を1時間攪拌し、その間に白色沈殿物が形成
 された。さらにジオキサン(200mL)を添加し、懸濁液を15分間攪拌し、それから
 、懸濁液をガラスフィルタでろ過し、ろ過ケーキをジオキサン(100mL)で洗浄した
 。ろ液を合わせ、NaBH₄(797mg, 21.1mmol)を添加し、反応混合物を
 30分間攪拌した。反応混合物を緩衝液(ピリジン:AcOH 1:1, v/v, 約10
 mL)で中和した。混合物を約150mLまで蒸発させた後、CH₂Cl₂(100mL
)を添加し、混合物を飽和NaHCO₃水溶液(2×100mL)で洗浄した。有機相を
 分離し、Na₂SO₄で乾燥させ、乾燥するまで蒸発させ、得られた残渣をカラムクロマ
 トグラフィー(石油エーテル中の40%アセトン)で精製し、溶媒の蒸発後、白色発泡体
 として所望のヌクレオシド102-Uを得た。 20

収率: 8.53g (82%)

R_f: 0.2 (CH₂Cl₂中の10%MeOH)

¹H NMR (DMSO-d₆): 11.34 (br s, NH), 7.62 (d, 1
 H, J = 8.05 Hz, H6), 7.45 - 7.15 (m, 9H, ar), 6.85 (d
 , 4H, ar), 5.80 (t, 1H, J = 6.2 Hz, H1'), 5.52 (d, 1H
 , J = 8.05 Hz, H5), 5.12 (t, 1H, J = 5.86 Hz, 2' OH), 4
 .74 (t, 1H, J = 5.49 Hz, 3' OH), 3.72 (s, 6H, OCH₃),
 3.55 - 3.47 (m, 3H, H2'/H4'), 3.40 (t, 2H, J = 5.13
 Hz, H3'), 3.01 - 2.90 (m, 2H, H5') 30

¹³C NMR (DMSO-d₆): 163.2, 157.9, 151.4, 144.
 8, 141.1 (C5), 135.4, 129.5 (ar), 127.7, 127.5 (ar),
 126.5 (ar), 113.0, 101.6 (C6), 85.3, 83.6 (C1'),
 79.3 (C2'/C4'), 63.5 (C5'), 61.1, 60.5 (C2'/C4'),
 54.9 (-OCH₃)

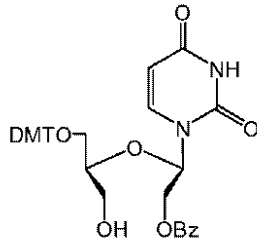
ESI-HiRes (mNa⁺): m/z: 571.1743 calc.: 571.2051。

【0299】

2'-O-ベンゾイル-5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2',3'-
 セコウリジン(103-U) 40

【0300】

【化9】



ヌクレオシド102-U (3.01g, 5.50mmol) を無水トルエン (15mL) で同時蒸発させた。得られた残渣を、無水ピリジン (4.4mL) と共に、無水DCM (150mL) に溶解し、混合物を -70℃ まで冷却した。塩化ベンゾイル (700μL, 6mmol) をゆっくりと反応混合物に添加し、-70℃ で1時間攪拌した。EtOH (5mL) を溶液に添加し、その後、室温になるまで放置した。反応混合物を飽和NaHCO₃水溶液 (3×100mL) およびブライン (100mL) で洗浄した。合わせた水相をCH₂Cl₂ (100mL) で逆抽出した。有機相を合わせ、蒸発させた。得られた残渣をカラムクロマトグラフィー (DCM中の3.5% MeOH) で精製し、溶媒の蒸発後、白色発泡体として生成物103-Uを得た。

収率: 3.44g (79%)

R_f: 0.3 (CH₂Cl₂中の5% MeOH)

¹H NMR (DMSO-d₆): 11.43 (s, 1H, NH, ex), 7.93 - 7.87 (m, 2H, ar), 7.80 (d, 1H, J = 8.05 Hz, H6), 7.70 - 7.63 (m, 1H), 7.56 - 7.48 (m, 2H, ar), 7.35 - 7.17 (m, 10H, ar), 6.89 - 6.81 (m, 4H, ar), 6.20 (t, 1H, J = 5.49 Hz, H1'), 5.56 (d, 1H, J = 8.05 Hz, H5), 4.83 (t, 1H, OH-3', ex), 4.58 (dq, 2H, H2'), 3.73 (s, 7H-OCH₃), 3.70 - 3.62 (m, 1H, H4'), 3.45 (t, 2H, H3'), 3.11 - 2.96 (m, 2H, H5')

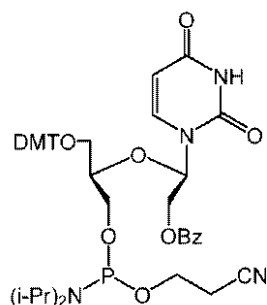
¹³C NMR (DMSO-d₆): 164.92, 162.98, 157.89, 151.00, 144.67, 140.51, 135.45, 135.35, 133.54, 129.49, 129.45, 129.13, 129.02, 128.92, 128.74, 128.61, 127.65, 127.51, 126.49, 113.16, 113.01, 102.06, 85.35, 80.84, 79.57, 71.8, 71.8, 63.4, 60.5, 54.9, 54.8

ESI-HiRes (mNa⁺): m/z: 675.1949 calc.: 675.2313

2'-O-ベンゾイル-3'-O-(2-シアノエトキシ(ジイソプロピルアミノ)ホスフィノ)-5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2',3'-セコウリジン (104-U)

【0301】

【化10】



10

20

30

40

50

ヌクレオシド103-U (679 mg, 1.04 mmol) を DCE (3 × 6 mL) で同時蒸発させ、真空中で12時間乾燥させた。残渣を MeCN 中の 20% DIPEA (6.5 mL) に溶解し、混合物を攪拌した。2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピルクロロホスホラミダイト [P(Cl)(OCH₂CH₂CN)(N(iPr)₂):0.66 mL, 3.02 mmol] を反応混合物に添加し、40分間攪拌し続けた。反応混合物を DCE (10 mL) に注入し、飽和 NaHCO₃ 水溶液 (10 mL) で洗浄し、水相を DCE (10 mL) で逆抽出した。有機相をプールのし、蒸発させ、白色発泡体を得た。粗生成物をカラムクロマトグラフィー (トルエン中の 0~20% EtOAc) で精製し、溶媒の蒸発後、白色固形物としてヌクレオシド104-Uを得た。

収率: 600 mg (68%)

R_f: 0.6 (トルエン中の 50% EtOAc)

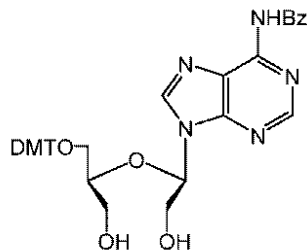
³¹P NMR (MeCN): 147.8

ESI-HiRes (mNa⁺): m/z: 875.2946 calc.: 875.3391

6-N-ベンゾイル-5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2',3'-セコアデノシン (102-A)

【0302】

【化11】



6-N-ベンゾイル-5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)アデノシン (100-A; 7.02 g, 10.42 mmol) をジオキサン (150 mL) および水 (25 mL) に溶解した。NaIO₄ (2.73 g, 11.77 mmol) を水 (25 mL) に溶解し、溶解したヌクレオシドに添加した。混合物を1時間攪拌し、その間、白色沈殿物が形成された。さらにジオキサン (100 mL) を添加し、懸濁液を15分間攪拌し、それから、懸濁液をガラスフィルタでろ過し、ろ過ケーキをジオキサン (50 mL) で洗浄した。ろ液を合わせ、NaBH₄ (435 mg, 11.5 mmol) を添加し、反応混合物を30分間攪拌した。その後、アセトンを添加し、残留 NaBH₄ をクエンチングした。反応混合物を緩衝液 (ピリジン: AcOH 1:1, v/v, 約10 mL) で中和した。反応混合物を約100 mL まで減らし、CH₂Cl₂ (100 mL) を添加し、混合物を飽和 NaHCO₃ 水溶液 (2 × 100 mL) で洗浄した。有機相を分離し、Na₂SO₄ で乾燥させ、乾燥するまで蒸発させ、得られた残渣を DCM および i-PrOH を使用してカラムクロマトグラフィーで精製し、溶媒の蒸発後、白色固形物として生成物を得た。

収率: 6.07 g (86%)

R_f: 0.22 (DCM 中の 5% i-PrOH)

¹H NMR (DMSO-d₆): 11.23 (br s, 1H, N6H), 8.76 (s, 1H, アデニン (adenin) C8/C2), 8.68 (s, 1H, アデニン (adenin) C8/C2), 8.07 (d, 2H, J = 6.96 Hz, Ar), 7.69 - 7.50 (m, 3H, Ar), 7.25 - 6.91 (m, 9H, Ar), 6.79 (dd, 4H, Ar), 6.06 (t, 1H, H1'), 5.29 (t, 1H, 2'OH), 4.84 (t, 1H, 3'OH), 4.19 - 4.02 (m, 2H, H2'), 3.90 - 3.80 (m, 1H, H4'), 3.69 (s, 6H, 2 × -OCH₃), 3.49 (t, 2H, H3'), 2.93 - 2.74 (m, 2H, H5')

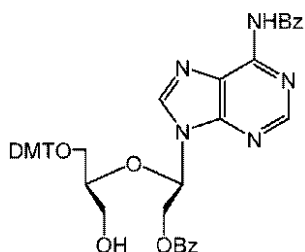
^{13}C NMR (DMSO- d_6): 165.6, 157.9, 152.8, 151.6 (アデニン (adenin) CH), 150.2, 144.6, 143.1 (アデニン (adenin) CH), 135.7, 135.4, 132.4 (Ar), 129.4 (Ar), 128.5 (Ar), 128.4 (Ar), 127.7 (Ar), 127.5 (Ar), 126.4 (Ar), 125.2, 113.0 (Ar), 85.0, 84.5 (1'C), 79.6 (4'C), 63.6 (5'C), 61.4 (2'C), 60.9 (3'C), 54.9 (-OCH₃)

6-N-ベンゾイル-2'-O-ベンゾイル-5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2',3'-セコアデノシン(103-A)

【0303】

【化12】

10



ヌクレオシド102-A(2.01g, 2.98mmol)を無水MeCN(2×30mL)で同時蒸着させ、一晚乾燥させた。得られた残渣を、無水DBU(900mg, 5.96mmol)と共に、無水DCM(150mL)に溶解し、混合物を-70℃まで冷却した。0.5M塩化ベンゾイル溶液(6.56mL, 3.28mmol)をゆっくりと反応混合物に添加した。反応混合物を-70℃で1時間攪拌し、その後、室温になるまで放置し、それから、EtOH(5mLを添加した)。反応混合物を飽和NaHCO₃水溶液(3×150mL)およびブライン(150mL)で洗浄した。合わせた水相をCH₂Cl₂(100mL)で逆抽出した。有機相を合わせ、蒸発させた。得られた残渣をカラムクロマトグラフィー(石油エーテル中の0~100%EtOAc)で精製し、溶媒の蒸発後、白色発泡体として生成物ヌクレオシド103-Aを得た。

収率: 1.69g(73%)

R_f: 0.49(EtOAc)

^1H NMR (DMSO- d_6): 11.28(s, 1H, NH), 8.82(s, 1H, アデニン CH), 8.76(s, 1H, アデニン CH), 8.06(d, 2H, Ar), 7.79(d, 2H, Ar), 7.55-7.40(m, 6H, Ar), 7.25-6.89(m, 10, Ar), 6.77(dd, 4H, Ar), 6.51(t, 1H, H1'), 4.99(m, 2H, H2'), 4.91(t, 1H, 3'OH), 3.89(ap.s, 1H, H4'), 3.72(s, 6H, 2×-OCH₃), 3.54(m, 2H, H3'), 2.81(m, 2H, H5')

^{13}C NMR (DMSO- d_6): 165.0, 157.9, 152.4, 150.5, 144.6, 142.9 (アデニンCH), 135.6, 133.6 (Ar), 132.4 (Ar), 129.0 (Ar), 128.8 (Ar), 128.4 (Ar), 127.5 (Ar), 125.2 (Ar), 113.0 (Ar), 85.1, 81.5 (C1'), 79.9 (C4'), 63.8 (C2'), 63.5, 54.9 (-OCH₃)

ESI-HiRes (mNa⁺): m/z: 802.2848 calcd.: 802.2847

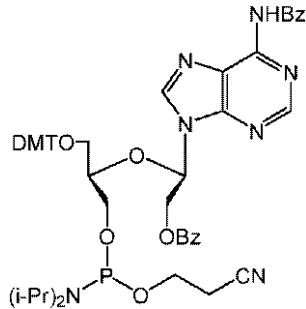
6-N-ベンゾイル-2'-O-ベンゾイル-3'-O-(2-シアノエトキシ(ジイソプロピルアミノ)ホスフィノ)-5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2',3'-セコアデノシン(104-A)

【0304】

30

40

【化13】



10

ヌクレオシド103-A(1.69g, 2.17mmol)を無水MeCN(2×20mL)で同時蒸発させ、真空で12時間乾燥させた。残渣をMeCN中(40mL)の20%DIPEAに溶解し、得られた混合物を攪拌した。2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピルクロロホスホラミダイト[P(Cl)(OCH₂CH₂CN)(N(iPr))₂]; 1.0mL]を反応混合物に添加し、40分間攪拌した。さらに2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピルクロロホスホラミダイト(0.2mL)を添加し、得られた混合物を3時間攪拌した。EtOH(5mL)を添加し、混合物を飽和NaHCO₃水溶液(3×50mL)で洗浄し、水相をDCM(50mL)で逆抽出した。有機相をプールの蒸発させた。粗生成物をカラムクロマトグラフィー(石油エーテル中の0~100%EtOAc)で精製し、溶媒の蒸発後、白色発泡体を得た。

20

収率: 1.52g(71%)

R_f: 0.75(DCM中の5%MeOH)

³¹P NMR(MeCN): 148.9

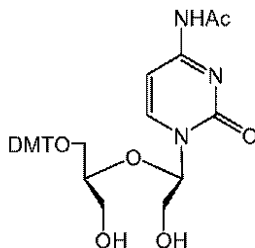
ESI-HiRes(mNa⁺): m/z: 1002.3885 calc.: 1002.3926

4-N-アセチル-5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2',3'-セコシチジン(102-C)

【0305】

【化14】

30



4-N-アセチルシチジン(11.75g, 41.18mmol)を無水ピリジン(50mL)で同時蒸発させた。得られた残渣を無水ピリジン(160mL)に溶解した。DMT-Cl(4,4'-ジメトキシトリチルクロリド; 16.76g, 49.42mmol)を固形物として添加し、得られた混合物を室温で2時間攪拌した。反応混合物を飽和NaHCO₃水溶液(3×50mL)で洗浄し、有機相を蒸発させ、白色発泡体を得、乾燥させた。この残渣をジオキサン(500mL)および水(100mL)に溶解した。NaIO₄(10.62g, 49.5mmol)を水(100mL)に溶解し、溶解したヌクレオシドに添加した。混合物を1時間攪拌し、その間に、白色沈殿物を得られた。さらに400mLのジオキサンを添加し、15分間攪拌し続けた。沈殿物をろ過し、ジオキサン(200mL)で洗浄した。ろ液を合わせ、NaBH₄(1720mg, 45.5mmol)を添加し、30分間攪拌し続けた。反応混合物を中和するために、緩衝液(10mL, 1:1-AcOH:ピリジン)を、pH7になるまで添加した。反応混合物を300

40

50

mLまで蒸発させ、EtOAc(150mL)で抽出した。有機相を飽和NaHCO₃水溶液(3×200mL)で洗浄し、蒸発させた。残渣を、EtOAc中のMeOHの勾配によりカラムクロマトグラフィーで精製し、溶媒の蒸発後、白色固形物として生成物を得た。

収率：17.24g(71%)

R_f：0.19(CHCl₃中の5%MeOH)

¹H NMR(DMSO-d₆)：10.94(s, 1H, NH), 8.08(d, 1H, J=7.32Hz, シチジンCH), 7.31-7.12(m, 12H, Ar/シチジンCH), 6.85(d, 4H, Ar), 5.96(t, 1H, H1'), 5.13(t, 1H, 2'OH), 4.74(t, 1H, 3'OH), 3.73(s, 6H, 2×-OCH₃), 3.63(m, 3H, H2'/H4'), 3.43(m, 2, H3'), 3.00(m, 2H, H5'), 2.13(s, 3H-CH₃)

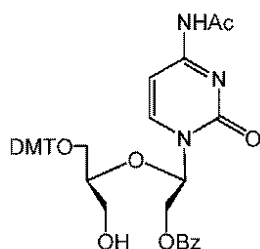
¹³C NMR(DMSO-d₆)：170.9, 162.3, 158.0, 155.4, 146.1(シチジンC5/C6), 144.6, 135.6, 129.6(ar), 127.7(ar), 126.6(ar), 113.1(ar), 95.4(シチジンC5/C6), 85.5, 84.7(C1'), 79.4(C2'/C4'), 63.8(C5'), 61.7(C2'/C4'), 60.5(C3'), 55.0(-OCH₃), 24.3(-CH₃)

E SI - Hi Res (mNa⁺) : m/z : 612.2298 calc. : 612.2316

4-N-アセチル-2'-O-ベンゾイル-5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2',3'-セコシチジン(103-C)

【0306】

【化15】



ヌクレオシド102-C(3.03g, 5.14mmol)を無水トルエン(2×30mL)で同時蒸発させ、真空で12時間乾燥させた。得られた残渣を、無水DBU(1.5mL, 10.3mmol)と共に、無水DCM(150mL)に溶解し、得られた混合物を-70℃まで冷却した。塩化ベンゾイル(6.56mL, 5.65mmol)をゆっくりと反応混合物に添加した。反応混合物を-70℃で1時間攪拌し、その後、室温になるまで放置し、それから、EtOH(4mL)を添加した。反応混合物を飽和NaHCO₃水溶液(2×150mL)で洗浄した。有機相を合わせ、蒸発させた。得られた残渣をカラムクロマトグラフィー(CHCl₃中の0~5%MeOH)で精製し、溶媒の蒸発後、白色発泡体として生成物ヌクレオシド103-Cを得た。

収率：2.08g(64%)

R_f：0.24(CHCl₃中の5%MeOH)

¹H NMR(DMSO-d₆)：10.97(s, 1H, NH), 8.25(d, 1H, シチジンCH), 7.91(d, 2H, Ar), 7.65(ap.t, 1H, Ar), 7.32-7.12(m, 12H, Ar/シチジンCH), 6.83(d, 4H, Ar), 6.34(t, 1H, H1'), 4.84(t, 1H, 3'OH), 4.58(dq, 2H, H2'), 3.74(s, 6H, 2×-OCH₃), 3.70-3.64(m, 1H, H4'), 3.48(m, 2H, H3'), 3.07(m, 2H, H5'), 2.14(s, 3H-CH₃)

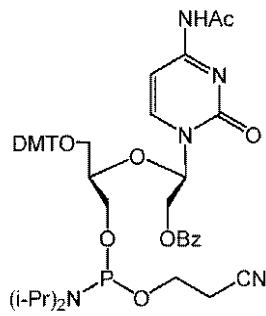
^{13}C NMR (DMSO- d_6): 171.0, 165.0, 162.5, 157.1, 145.5 (シチジン C5/C6), 144.6, 135.48, 133.6, 129.6 (Ar), 128.8 (Ar), 127.7 (Ar), 127.6 (Ar), 126.6 (Ar), 113.1 (Ar), 95.8 (シチジン C5/C6), 85.6, 82.0 (C1'), 79.6 (C4'), 79.2, 63.9 (C2'), 63.7, 60.5 (C3'), 54.9 (-OCH₃), 24.3 (-CH₃)

ESI-HiRes (mNa⁺): m/z: 716.2589 calc.: 716.2759

4-N-アセチル-2'-O-ベンゾイル-3'-O-(2-シアノエトキシ(ジイソプロピルアミノ)ホスフィノ)-5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2',3'-セコシチジン(104-C)

【0307】

【化16】



ヌクレオシド103-C(1.49g, 2.15mmol)を無水MeCN(2×20mL)で同時蒸発させた。残渣をMeCN中(20mL)の20%DIPEAに溶解し、混合物を攪拌した。2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピルクロロホスホラミダイト[P(Cl)(OCH₂CH₂CN)(N(iPr)₂); 0.8mL]を混合物に添加し、40分間攪拌し続けた。さらに2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピルクロロホスホラミダイト(0.4mL)を添加し、3時間攪拌し続けた。EtOH(5mL)を添加し、得られた混合物を飽和NaHCO₃水溶液(3×50mL)で洗浄し、水相をDCM(50mL)で逆抽出した。有機相をプールし、蒸発させた。残渣をカラムクロマトグラフィー(石油エーテル中の0~100%EtOAc)で精製し、溶媒の蒸発後、白色固形物としてヌクレオシド104-Cを得た。

収率: 940mg(44%)

R_f: 0.42(DCM中の5%MeOH)

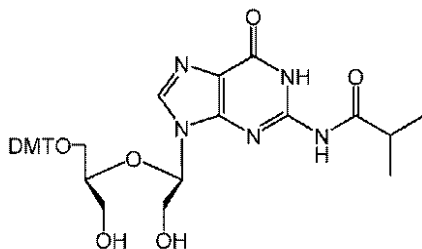
^{31}P NMR(MeCN): 148.8

ESI-HiRes(mNa⁺): m/z: 916.3622 calc.: 916.3657

5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2-N-イソブチリル-2',3'-セコグアノシン(102-G)

【0308】

【化17】



10

20

30

40

50

2-N-イソブチリルグアノシン(11.68g, 17.8mmol)を無水ピリジン(50mL)で同時蒸発させた。得られた残渣を無水ピリジン(100mL)に溶解した。DMT-Cl(4,4'-ジメトキシトリチルクロリド; 7.26g, 21.46mmol)を固形物として添加し、反応混合物を室温で1時間攪拌した。DMAP(50mg, 0.40mmol)を添加し、得られた混合物をさらに12時間攪拌した。その後、反応混合物を飽和NaHCO₃水溶液(3×50mL)で洗浄し、有機相を蒸発させ、白色発泡体を得た。この残渣をジオキサン(250mL)および水(50mL)に溶解した。NaIO₄(4.57g, 21.3mmol)を水(50mL)に溶解し、溶解したヌクレオシドに添加した。混合物を1時間攪拌し、その間に、白色沈殿物が形成された。さらに200mLのジオキサンを添加し、15分間攪拌し続けた。沈殿物をろ過し、ジオキサン(100mL)で洗浄した。ろ液を収集し、NaBH₄(748mg, 19.77mmol)を添加し、得られた混合物を室温で30分攪拌した。中和するために、緩衝液(10mL, 1:1-AcOH:ピリジン)を、pH7になるまで添加した。得られた混合物の量を150mLまで減らし、EtOAc(150mL)を使用して抽出を行った。有機相を飽和NaHCO₃水溶液(3×100mL)で洗浄し、蒸発させ、残渣を、DCM中の0-10%(1:1 MeOH:i-PrOH)の勾配を使用してカラムクロマトグラフィーで精製し、溶媒の蒸発後、白色固形物として生成物を得た。

収率: 8.02g (68%)

R_f: 0.24 (CH₂Cl₂中の7% MeOH)

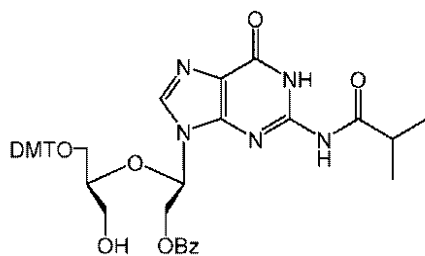
¹³C NMR (DMSO-d₆): 180.2, 157.9, 154.9, 147.8, 144.7, 135.4, 129.3 (Ar), 127.5 (Ar), 127.4 (Ar), 126.4 (Ar), 120.4, 113.0 (Ar), 85.2, 85.1 (C1'), 79.9 (C4'), 63.5 (C5'), 61.7 (C2'), 61.1 (C3'), 54.9 (-OCH₃), 34.7 (第四級 i-Pr), 18.9 (i-Pr), 18.8 (i-Pr)

MALDI-HiRes (mNa⁺): m/z: 680.2679 calc.: 680.2691

2'-O-ベンゾイル-5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2-N-イソブチリル-2',3'-セコグアノシン(103-G)

【0309】

【化18】



ヌクレオシド102-Gを無水トルエン(2×30mL)に懸濁し、蒸発させた。得られた残渣を真空で12時間乾燥させた。残渣を、無水DBU(0.9mL, 6.1mmol)と共に、無水DCM(100mL)に溶解し、得られた混合物を-70℃まで冷却した。塩化ベンゾイル(390μL, 3.36mmol)を反応混合物にゆっくりと添加した。反応混合物を-70℃で1時間攪拌し、その後、室温になるまで放置し、それから、EtOH(4mL)を添加した。得られた混合物を飽和NaHCO₃水溶液(2×100mL)で洗浄し、有機相を合わせ、蒸発させた。得られた残渣をカラムクロマトグラフィー(CHCl₃中の0~5% MeOH)で精製し、溶媒の蒸発後、白色発泡体としてヌクレオシド103-Gを得た。

収率: 1.49g (63%)

R_f: 0.47 (CH₂Cl₂中の7% MeOH)

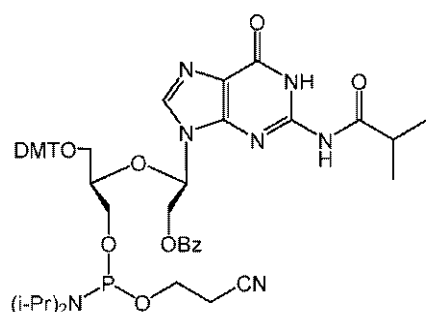
^1H NMR (DMSO- d_6): 12.10 (s, 1H, NH), 11.72 (s, 1H, NH), 8.32 (s, 1H, グアニジンH8), 7.85 - 7.79 (m, 2H, Ar), 7.65 - 7.63 (m, 1H, Ar), 7.51 - 7.45 (m, 2H, Ar), 7.26 - 6.97 (m, 11H, Ar), 6.79 (m, 4H, Ar), 6.18 (t, 1H, H1'), 5.04 - 4.82 (m, 3H, H2' / 3' OH), 3.82 (m, 1H, H4'), 3.72 (s, 6H, 2x-OCH₃), 3.49 (t, 2H, H3'), 3.03 - 2.74 (m, 3H, H5' / 第四級 i-Pr), 1.11 (app. t, 6H, 2x-CH₃)

^{13}C NMR (DMSO- d_6): 180.1, 164.9, 157.8, 154.8, 148.6, 147.9, 144.6, 138.4, 135.5, 135.3, 133.6, 129.3 (Ar), 129.0 (ar), 128.8 (ar), 128.7 (ar), 127.6 (ar), 127.4 (ar), 126.3 (ar), 120.6, 112.9 (ar), 85.1, 82.0 (C1'), 80.1 (C4'), 63.7, 63.3 (C5'), 61.0 (C3'), 54.8 (-OCH₃), 34.6 (第四級 i-Pr), 18.8 (-CH₃), 18.6 (-CH₃)

ESI-HiRes (mNa⁺): m/z: 784.2943 calc.: 784.2953

2'-O-ベンゾイル-3'-O-(2-シアノエトキシ(ジイソプロピルアミノ)ホスフィノ)-5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2-N-イソブチリル-2',3'-セコグアノシン(104-G)

【化19】



ヌクレオシド103-G (1.45g, 1.9mmol) を無水MeCN (2x20mL) で同時蒸発させた。残渣をMeCN (20mL) 中の20%DIPEAに溶解し、得られた混合物を攪拌した。2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピルクロロホスホリト [P(Cl)(OCH₂CH₂CN)(N(iPr)₂); 0.65mL] を反応混合物に添加し、40分間攪拌し続けた。EtOH (5mL) を添加し、得られた混合物を飽和NaHCO₃水溶液 (3x50mL) で洗浄し、水相をDCM (50mL) で逆抽出した。有機相をプールし、蒸発させた。残渣を、EtOAc中の溶液からの石油エーテルから沈殿させ、乾燥後、白色固形物としてアミダイト104-Gを得た。

収率: 607mg (33%)

R_f: 0.3 (1:3 アセトン:トルエン)

^{31}P NMR (MeCN): 148.6

ESI-HiRes (mNa⁺): m/z: 984.4028 calc.: 984.4031。

【0310】

(実施例12)

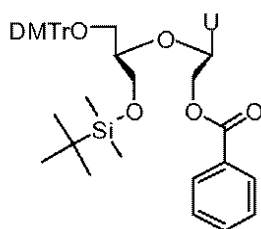
ピペラジノ-官能化モノマー基本要素の合成

実施例は、モノマーのC2'位置に付加するアミノ官能基を有するモノマーアミダイト基本要素の合成、すなわち、化合物105、106、107、108、109、および110を介してヌクレオシド103-Uから開始するC2'-ピペラジノ-官能化モノマー基本要素111(アミダイトJ; 塩基=ウラシル)の合成を例示するために行われた手順

を説明する。

【0311】

【化20】



10

2' - O - ベンゾイル - 3' - O - tert - ブチルジメチルシリル - 5' - O - (4 , 4' - ジメトキシトリチル) - 2' , 3' - セコウリジン (105)

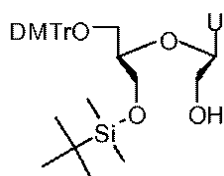
ヌクレオシド103-U (328 mg , 0.50 mmol) を無水ピリジン (2 mL) に溶解し、室温で攪拌した。TBDMSCl (113 mg , 0.75 mmol) を反応混合物に添加し、19時間攪拌した。その後、水 (1 mL) を添加し、さらに15分攪拌し続け、それから、反応混合物をDCM (50 mL) で希釈し、飽和NaHCO₃水溶液 (2 × 25 mL) およびブライン (25 mL) で洗浄した。有機相をNa₂SO₄で乾燥させ、ろ過し、減圧下で乾燥するまで蒸発させた。残渣を、溶離液としてDCM中のMeOH (0 ~ 8 %) を使用してシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、白色固形物としてヌクレオシド105を得た。収率294 mg (78 %) . ¹H NMR (300 MHz , DMSO - d₆) 11.46 (s , 1 H , NH) , 7.95 - 7.79 (m , 3 H) , 7.71 - 7.63 (m , 1 H) , 7.57 - 7.48 (m , 2 H) , 7.37 - 7.13 (m , 9 H) , 6.84 (d , J = 8.8 Hz , 4 H) , 6.22 (t , J = 5.7 Hz , 1 H , H1') , 5.58 (d , J = 8.0 Hz , 1 H , H5) , 4.69 - 4.45 (m , 2 H , H2') , 3.80 - 3.64 (m , 8 H , 2 × OMeおよびH4') , 3.54 (t , J = 4.7 Hz , 1 H , H3') , 3.09 - 2.97 (m , 2 H , H5') , 0.73 (s , 9 H , 3 × Me) , -0.07および-0.09 (2 × s , 6 H , 2 × Me) . ¹³C NMR (75.5 MHz , DMSO - d₆) : 165.0 , 163.1 , 158.0 , 151.1 , 144.7 , 140.6 , 135.5 , 135.4 , 133.7 , 129.6 , 129.1 , 129.0 , 128.8 , 127.8 , 127.6 , 126.6 , 113.1 , 102.3 , 85.5 , 81.1 , 79.2 , 63.4 , 63.1 , 62.1 , 55.0 , 25.6 , 17.7 , 2 × -5.7 . ESI - HRMS : m / z 789.3147 ([M + Na] ⁺ , C₄₃H₅₀N₂O₉Si · Na cal c . 789.3178)

20

30

【0312】

【化21】



40

3' - O - tert - ブチルジメチルシリル - 5' - O - (4 , 4' - ジメトキシトリチル) - 2' , 3' - セコウリジン (106)

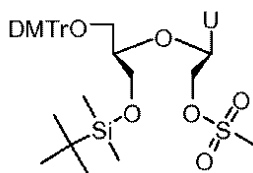
NaOH (845 mg , 21.1 mmol) を無水MeOH (200 mL) と混合し、得られた混合物を0℃まで冷却した。ヌクレオシド105 (3.10 g , 4.05 mmol) を無水MeOH (40 mL) に溶解し、得られた混合物を上記の混合物に添加し、得られた反応混合物を2.5時間攪拌した。飽和NH₄Cl水溶液 (10 mL) を添加し、さらに10分間攪拌し続けた。それから、水 (100 mL) を添加し、DCM (4 × 20

50

0 mL) を使用して抽出を行った。有機相を減圧下で乾燥するまで蒸発させ、その後、残渣を無水ピリジン (10 mL) で同時蒸発させた。残渣を、溶離液としてDCM中のMeOH (5~10%) を使用してシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、白色固形物としてヌクレオシド106を得た。収率2.54 g (95%)。¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) : 11.35 (s, 1H, NH), 7.66 (d, J=7.6 Hz, 1H, H6), 7.33-7.14 (m, 9H), 6.88-6.82 (m, 4H), 5.82 (t, J=6.0 Hz, 1H, H1'), 5.53 (d, J=8 Hz, 1H, H5), 5.11 (t, J=5.8 Hz, 1H, 2'-OH), 3.73 (s, 6H, 2xOMe), 3.69-3.45 (m, 5H, H2', H4' および H3'), 3.01-2.93 (m, 2H, H5'), 0.76 (s, 9H, 3xMe), -0.03 および -0.05 (2xs, 6H, 2xMe)。¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-d₆) : 163.2, 158.0, 151.6, 144.8, 135.6, 135.4, 129.6, 127.7, 127.6, 126.6, 113.1, 101.8, 85.4, 83.5, 78.5, 63.3, 61.8, 61.0, 55.0, 25.6, 17.7, 2x-5.6。ESI-HRMS : m/z 685.2885 ([M+Na]⁺, C₃₆H₄₆N₂O₈Si·Na calc. 685.2916)

【0313】

【化22】



3'-O-tert-ブチルジメチルシリル-5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-O-メタンスルホニル-2',3'-セコウリジン(107)

ヌクレオシド106 (927 mg, 1.40 mmol) を無水ピリジン (20 mL) に溶解し、得られた混合物を0 で攪拌した、MsCl (220 μL, 2.83 mmol) を滴下し、得られた混合物を室温で3時間攪拌した。EtOH (2 mL) を添加し、さらに10分間攪拌し続けた。その後、混合物を乾燥するまで蒸発させ、残渣を、溶離液としてDCM中のMeOH (0~7%) を使用してシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、白色発泡体としてヌクレオシド107を得た。収率834 mg (81%)。¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) : 11.49 (s, 1H, NH), 7.77 (d, J=8.2 Hz, 1H, H6), 7.35-7.14 (m, 9H), 6.86 (d, J=8.5 Hz, 4H), 6.11 (t, J=5.7 Hz, 1H, H1'), 5.60 (d, J=8.1 Hz, 1H, H5), 4.49 (d, J=5.5 Hz, 2H, H2'), 3.77-3.48 (m, 9H, 2xOMe, H4' および H3'), 3.22 (s, 3H, Me), 3.10-2.89 (m, 2H, H5'), 0.77 (s, 9H, 3xMe), -0.02 および -0.04 (2xs, 6H, 2xMe)。¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-d₆) : 163.1, 158.0, 151.7, 144.7, 140.5, 135.5, 135.3, 129.6, 127.8, 127.6, 126.6, 113.1, 102.4, 85.5, 80.6, 79.1, 67.8, 63.1, 61.8, 55.0, 36.8, 25.6, 17.7, -5.6, -5.7。ESI-HRMS : m/z 763.2662 ([M+Na]⁺, C₃₇H₄₈N₂O₁₀SSi·Na calc. 763.2692)

【0314】

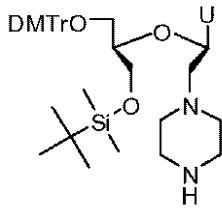
10

20

30

40

【化23】

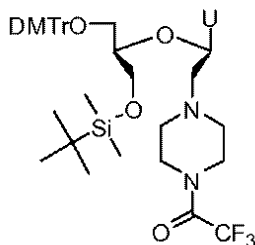


3'-O-tert-ブチルジメチルシリル-2'-デオキシ-5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-ピペラジノ-2',3'-セコウリジン(108)

ヌクレオシド107(276mg, 0.373mmol)を無水ピリジン(3mL)に溶解し、ピペラジン(3.21g, 37.3mmol)を室温で攪拌下しながら添加した。その後、反応混合物を150℃まで加熱し、1時間攪拌し、その後、室温まで冷却した。反応混合物を飽和NaHCO₃水溶液(200mL)で希釈し、それから、クロロホルム(7×100mL)を使用して抽出を行った。有機相をNa₂SO₄で乾燥させ、ろ過し、乾燥するまで蒸発させた。残渣を、溶離系として、まずDCM中のMeOH(0~5%)、その後、DCM中の半飽和メタノールアンモニア(5%)を使用して、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、白色固形物としてヌクレオシド108を得た。収率182mg(67%)。¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆): 7.64(d, J=8.1Hz, 1H, H6), 7.34-7.13(m, 9H), 6.85(d, J=7.8Hz, 4H), 5.98(t, J=6.0Hz, 1H, H1'), 5.53(d, J=8.1Hz, 1H, H5), 3.72(s, 6H, 2×OMe), 3.68-3.51(m, 3H, H4'およびH3'), 3.04-2.90(m, 2H, H5'), 2.77-2.54(m, 6H, H2', ピペラジノ), 2.48-2.27(m, 4H, ピペラジノ), 0.77, (s, 9H, 3×Me), -0.02および-0.04(2×s, 6H, 2×Me)。¹³C NMR(75.5MHz, DMSO-d₆): 163.2, 158.0, 151.3, 144.8, 141.1(C6), 135.6, 135.4, 129.5, 127.7, 127.6, 126.6, 113.1, 113.1, 101.8(C5), 85.4, 81.3(C1'), 78.3, 63.1, 62.1, 60.1, 55.0(OMe), 55.0(OMe), 53.8, 45.3, 25.7(Me), 17.8, -5.5(Me), -5.6(Me)。ESI-HRMS:m/z 731.3859([M+H]⁺, C₄₀H₅₄N₄O₇Si·H calcd. 731.3834)

【0315】

【化24】



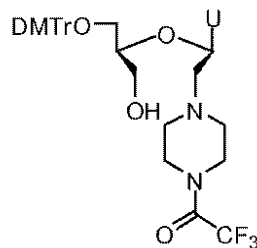
3'-O-tert-ブチルジメチルシリル-2'-デオキシ-5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-(4-N-トリフルオロアセチル)ピペラジノ-2',3'-セコウリジン(109)

ヌクレオシド108(102mg, 0.14mmol)を無水MeOH(2mL)に溶解し、得られた混合物を室温で攪拌した。DMAP(10mg, 0.08mmol)およびトリフルオロ酢酸エチル(22μL, 0.184mmol)を添加し、16時間攪拌し続けた。その後、混合を減圧下で乾燥するまで蒸発させ、残渣を、溶離液としてDCM中のMeOH(0~2%)を使用してシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、白色

固形体としてヌクレオシド109を得た。収率100mg(86%)。¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆): 11.37(s, 1H, NH), 7.66(d, J=7.8Hz, 1H, H6), 7.38-7.12(m, 9H), 6.93-6.80(m, 4H), 6.00(t, J=5.9Hz, 1H, H1'), 5.54(d, J=7.8Hz, 1H, H5), 3.73(s, 6H, 2×OMe), 3.70-3.40(m, 7H, H3', H4'およびピペラジノ), 3.08-2.92(m, 2H, H5'), 2.90-2.52(m, 6H, H2'およびピペラジノ), 0.77(s, 9H, 3×Me), 0.00および-0.04(2×s, 6H, 2×Me)。¹³C NMR(75.5MHz, DMSO-d₆): 163.2, 158.0, 151.3, 144.8, 140.8, 135.6, 135.4, 129.5, 127.7, 127.6, 126.6, 113.1, 102.0, 85.5, 81.0, 78.2, 63.1, 62.0, 58.9, 55.0, 52.6, 52.0, 45.4, 43.0, 25.6, 17.8, -5.6, -5.6。ESI-HRMS:m/z 849.3452([M+Na]⁺, C₄₂H₅₃F₃N₄O₈Si·Na calc. 849.3477)

【0316】

【化25】

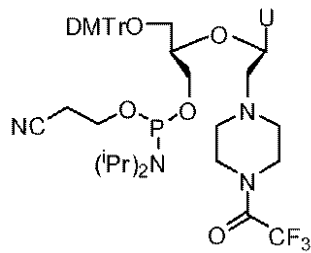


2'-デオキシ-5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-(N-トリフルオロアセチル)ピペラジノ-2',3'-セコウリジン(110)

ヌクレオシド109(251mg, 0.304mmol)を無水THF(2×5mL)で同時蒸発させ、その後、無水THF(10mL)に溶解した。THF中の1M TBAF(606μl, 0.606mmol)を、攪拌しながら室温で1時間の間、この混合物に滴下し、その後、室温で21時間攪拌し続けた。反応混合物を減圧下で乾燥するまで蒸発させ、その後、残渣をEtOAc(40mL)に溶解した。得られた混合物を飽和NaHCO₃水溶液(3×10mL)および水(3×10mL)で洗浄し、分離した有機相をNa₂SO₄で乾燥させ、ろ過し、減圧下で乾燥するまで蒸発させた。残渣を、溶離液として石油エーテル中のEtOAc(60~100%)を使用してシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、白色固形体としてヌクレオシド110を得た。収率111mg(51%)。¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆): 11.36(s, 1H, NH), 7.66(d, J=8.1Hz, 1H, H6), 7.34-7.27(m, 4H), 7.24-7.14(m, 5H), 6.92-6.82(m, 4H), 5.98(t, J=6.1Hz, 1H, H1'), 5.53(d, J=7.3Hz, 1H, H5), 4.80(t, J=5.3Hz, 1H, 3'-OH), 3.73(s, 6H, 2×OMe), 3.63-3.38(m, 8H, H4', H3'およびピペラジノ), 3.07-2.89(m, 2H, H5'), 2.77(t, J=5.8Hz, 2H, H2'), 2.66-2.54(m, 3H, ピペラジノ)。¹³C NMR(75.5MHz, DMSO-d₆): 163.2, 158.0, 151.2, 144.8, 140.9, 135.6, 135.5, 129.6, 129.6, 127.8, 127.6, 126.6, 113.1, 101.9, 85.4, 81.3, 79.2, 63.5, 60.7, 59.1, 55.0, 52.7, 52.1, 45.4, 42.9。ESI-HRMS:m/z 735.2585([M+Na]⁺, C₃₆H₃₉F₃N₄O₈·Na calc. 735.2612)

【0317】

【化 2 6】



3' - (2 - シアノエトキシ (ジイソプロピルアミノ) ホスフィノ) - 2' - デオキシ - 10
 5' - O - (4, 4' - ジメトキシトリチル) - 2' - (N - トリフルオロアセチル) ピ
 ペラジノ - 2', 3' - セコウリジン (111)

ヌクレオシド 110 (91 mg, 0.128 mmol) を無水 DCM (2 × 5 mL) で
 同時蒸発させ、その後、無水 DCM (2.5 mL) で溶解した。DIPEA (111 μL
 , 0.64 mmol) を、攪拌しながら室温で混合物に添加し、それから、2 - シアノエチ
 ル N, N - ジイソプロピルホスホラミドクロリダイト (57 μL, 0.256 mmol)
 を滴下した。室温で 1 時間攪拌し続け、それから、EtOH (0.5 mL) を添加し、そ
 の後、さらに 10 分間攪拌した。DCM (40 mL) を添加し、その後、飽和 NaHCO
 3 水溶液 (20 mL) で洗浄した。分離した有機相を Na₂SO₄ で乾燥させ、ろ過し、
 減圧下で乾燥するまで蒸発させた。残渣を、溶離液として石油エーテル中の EtOAc (20
 60 ~ 80 %) を使用してシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、白色固形体と
 してアミダイト 111 を得た。収率 106 mg (91%)。³¹P NMR (CDCl₃)
) 150.0 および 149.5。ESI - HRMS: m/z 913.3841 ([M +
 H]⁺, C₄₅H₅₆F₃N₆O₉P · H calcd. 913.3871)

(実施例 13)

ピペラジノ官能化モノマー基本要素を含有するオリゴヌクレオチドの合成

実施例 1 に記載される方法を使用することによって、ピペラジノ部分における遊離末端
 NH を有するモノマー J の効率的な取り込みが、RNA アミダイト類およびアミダイト 1
 11 を使用して遂行される。このアミダイトの収率を合わせると、95% を上回る。

【図1】

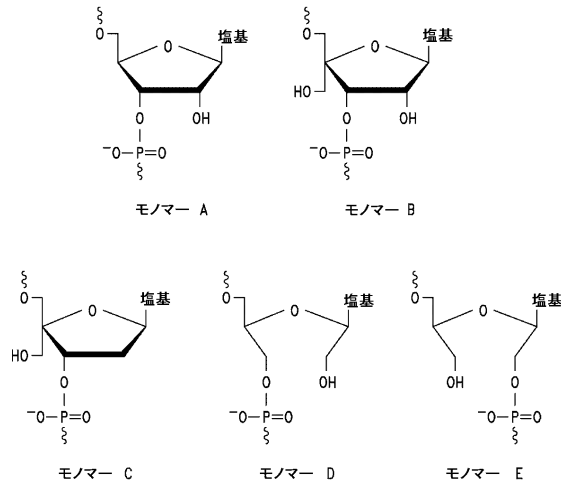
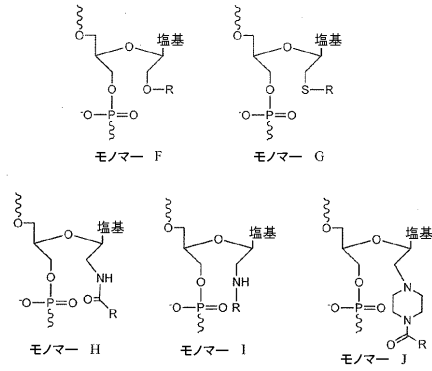


Fig. 1

【図2】



R=水素、アルキル、コレステリル誘導体、フルオロフォア、ポリアミン、脂肪酸、アミノ酸、単糖類、またはポリペプチド

Fig. 2

【図3】

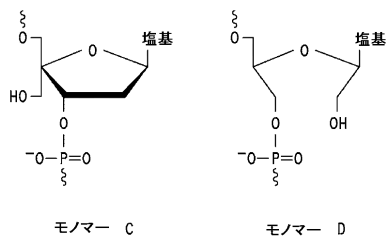
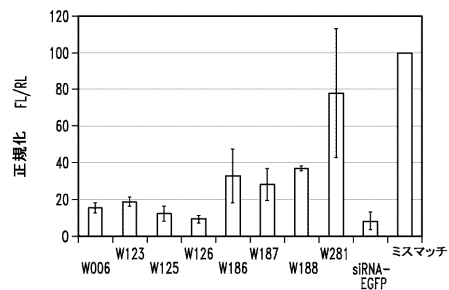


Fig. 3

【図4】



アンチセンス鎖 W006: 5' - ACUUGUGGCCGGUUACGUCG^LC^LU (配列番号 1)
 アンチセンス鎖 W123: 5' - ACUUGXGGCCGGUUACGUCG^LC^LU (配列番号)
 アンチセンス鎖 W125: 5' - ACUUGUGGCCGGUUACGXCG^LC^LU (配列番号)
 アンチセンス鎖 W126: 5' - ACUUGUGGCCGGXUUACGUCG^LC^LU (配列番号)
 アンチセンス鎖 W186: 5' - ACUUGXGGCCGGXUUACGXCG^LC^LU (配列番号)
 アンチセンス鎖 W187: 5' - ACUUGXGGCCGGXUUACGUCG^LC^LU (配列番号)
 アンチセンス鎖 W188: 5' - ACT^LUGT^LGGCCGXUT^LCACGT^LC^LC^LU (配列番号 4)
 アンチセンス鎖 W281: 5' - ACUUGUGGCCGGUUACGUCGXU (配列番号)
 センス鎖 W130: 5' - GACGXAAACXGCCACAAGGUT^LC^LU (配列番号)

Fig. 4

【 図 5 】

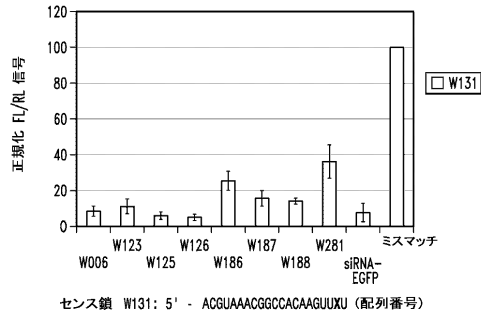


Fig. 5

【 図 7 】

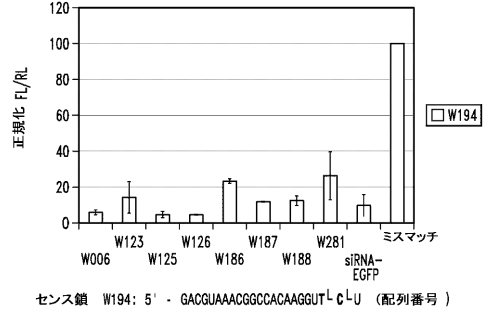


Fig. 7

【 図 6 】

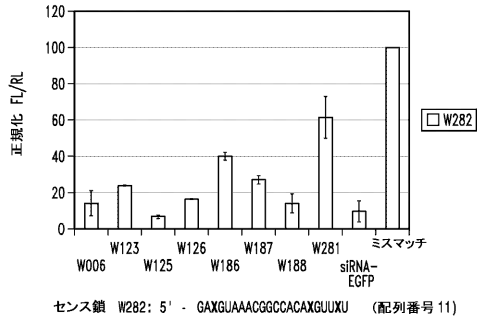


Fig. 6

【 図 8 】

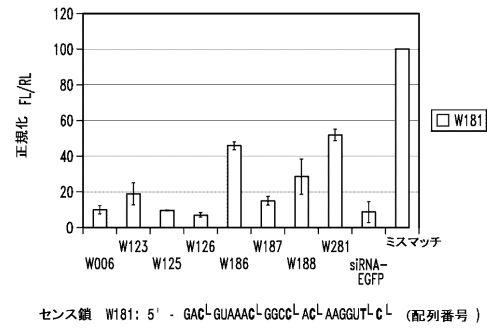


Fig. 8

【 図 9 】

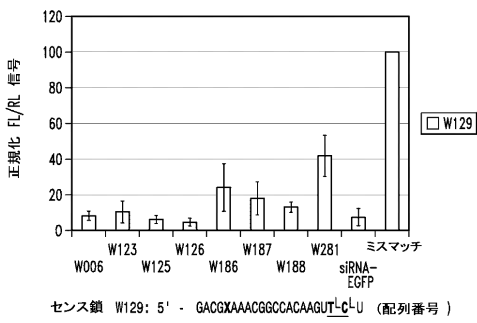


Fig. 9

【配列表】

0005726520000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K 31/711 (2006.01)		A 6 1 K 31/711
A 6 1 K 31/7125 (2006.01)		A 6 1 K 31/7125
A 6 1 K 48/00 (2006.01)		A 6 1 K 48/00
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00

(31)優先権主張番号 PA200701785
 (32)優先日 平成19年12月14日(2007.12.14)
 (33)優先権主張国 デンマーク(DK)
 (31)優先権主張番号 PA200800534
 (32)優先日 平成20年4月11日(2008.4.11)
 (33)優先権主張国 デンマーク(DK)

(74)代理人 100157956

弁理士 稲井 史生

(74)代理人 100170520

弁理士 笹倉 真奈美

(72)発明者 ウェンゲル, ジェスパー

デンマーク国 デーコー - 5 0 0 0 オーデンス セー, エスデーエル. ブールバード 4 4
 . 3

審査官 田村 聖子

(56)参考文献 特表2005-508634(JP,A)
 国際公開第2005/089287(WO,A1)
 国際公開第2006/085987(WO,A1)
 国際公開第2005/121372(WO,A1)
 国際公開第2007/022369(WO,A1)
 国際公開第2007/051303(WO,A1)
 J. Am. Chem. Soc., 2003年, Vol.125, No.3, P.654-661
 PANDOLFI D., NUCLEOSIDES & NUCLEOTIDES, 米国, MARCEL DEKKER, INC., 1999年, V18 N9
 , P2051-2069
 Bioorganic and Medicinal Chemistry, 1995年, Vol.3, No.1, P.19-28

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 H, C 1 2 N, A 6 1 K

C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)