

## G.研究発表

### 1. 論文発表

なし（投稿準備中）。

### 2.学会発表

（国内学会）

1. 車戸祐, 高間雅志, 堀切勇児, 村上正裕. 新規ポーラスマイクロスフィア調製法：調製条件及び比表面積評価. 日本薬学会近畿支部総会, 京都府, 2013.10.12.

（国際学会）

1. Murakami M, Watanabe C, Shimoda H, Matsumoto Y, Miyata K, Kataoka K, Yoshida K, Nishina K, Yokota T. Liver-specific delivery of siRNA achieved by a lipoprotein-mediated transport via the intestinal lymphatic route. Asian Federation for Pharmaceutical Science Conference 2013, Jeju Republic of Korea, 2013.11.22.
2. Murakami M, Watanabe C, Murakami K, Matsumoto Y, Miyata K, Kataoka K, Nishiyama N, Yoshida-Tanaka K, Nishina K, Yokota T. An enteral delivery technique of siRNA for hepatic gene silencing via the lymphatic route. 12th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems, Lahaina Hawaii, 2013.12.18.

## H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

### 1.特許取得

特になし

### 2.実用新案登録

特になし

### 3.その他

特になし

## 肝臓に対する新規 DDS を活用した経口遺伝子治療法の開発

研究分担者 和田 猛 東京理科大学薬学部生命創薬科学科

### 研究要旨

A 型二重らせん構造を有する二本鎖核酸に選択的に結合し、その熱力学的安定性を向上させ、ヌクレアーゼによる分解を阻害するカチオン性人工オリゴ糖として、これまでに合成したグルコース誘導体に加え、新たにマンノースおよびガラクトース誘導体を合成し、RNA 二重鎖に対する結合能、熱力学的安定化能を比較、評価した。その結果、ガラクトース誘導体が最も強く RNA 二重鎖に結合し、二重鎖を熱力学的に安定化した。さらに、RNA 二重鎖のヌクレアーゼ耐性を向上させる効果も示した。

### A. 研究目的

核酸医薬の経口治療薬の開発を目指し、二本鎖核酸に強く結合し、生体内でその高次構造を安定化し、様々な分解酵素による分解を阻害する人工分子の合成をおこなう。さらに、その分子にビタミン E を結合させ、核酸医薬と複合体を形成させることにより、ビタミン E の代謝経路を利用した肝細胞特異的なデリバリーを可能にする新規 DDS の開発をおこなう。

### B. 研究方法

A 型二重らせん構造を有する二本鎖核酸のメジャーグループの幅に合致し、核酸のリン酸ジエステル部位の負電荷と効果的に相互作用可能な正電荷を有するオリゴジアミノ糖として、新たにオリゴ 2,6-ジアミノ-2,6-ジデオキシ- $\alpha$ -D-マンノース (ODMan) およびオリゴ 2,6-ジアミノ-2,6-ジデオキシ- $\beta$ -D-ガラクトース (ODGal) を合成し、その物性と機能を評価する。

(倫理面への配慮)

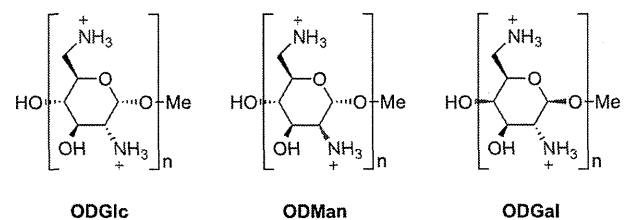
現時点では特に倫理面への配慮は必要ない。

### C. 研究結果

オリゴ 2,6-ジアミノ-2,6-ジデオキシ- $\alpha$ -D-グルコース (ODGlc) と同様の機能が期待される湾曲した構造を有するオリゴジアミノ糖として、オリゴジア

ミノマンノース (ODMan) およびオリゴジアミノガラクトース (ODGal) を合成した (Fig. 1)。これらの誘導体は、ODGlc と比較して、骨格構築の鍵反応であるグリコシル化反応の立体選択性が高いという、合成化学的な利点がある。

Fig. 1 湾曲した構造を有するオリゴジアミノ糖



RNA 二重鎖とオリゴジアミノ糖の相互作用を解析するために、自己相補的な塩基配列を有する RNA 二重鎖、r(CGCGAAUUCGCG)<sub>2</sub> とオリゴジアミノ糖の複合体を形成させ、*T<sub>m</sub>* 値を測定したところ、オリゴジアミノ糖誘導体の中ではガラクトース骨格を有する ODGal の二重鎖の安定化効果が最も高かった ( $\Delta T_m=11.6^\circ\text{C}$ )。また、CD スペクトルの測定から、これらのオリゴジアミノ糖は RNA 二重鎖が A 型らせん構造を維持したまま結合することがわかった。

次に、同様の塩基配列を有する RNA オリゴマーの 5'-末端に蛍光基としてフルオレセインを導入し、蛍光異方性測定により、カチオン性ペプチドと RNA 二重鎖の解離定数 (*K<sub>d</sub>* 値) を測定した。*T<sub>m</sub>* で最も

二重鎖の安定化効果が高かったガラクトース骨格を有する ODGal の  $K_d$  値は  $0.01 \mu\text{M}$  以下であり、RNA 二重鎖に対して極めて強く結合することが示された。Table 1 に  $\Delta T_m$  と  $K_d$  値をまとめて示す。

Table 1 オリゴジアミノ糖と (rCGCGAAUUCGCG)<sub>2</sub> の相互作用 ( $T_m$  測定は 3 当量のオリゴジアミノ糖を使用)

Diamino sugar	$\Delta T_m$ (°C)	$K_d$ ( $\times 10^{-6}$ M)
ODGlc (4mer)	7.0	0.011
ODMan (4mer)	4.3	0.15
ODGal (4mer)	11.6	< 0.01
Neomycin B	4.9	0.091

次に、RNA 二重鎖、r(CGCGAAUUCGCG)<sub>2</sub> と 3 量体または 4 量体の ODGal (1 当量) の複合体を形成させ、二本鎖 RNA を切断するエンドヌクレアーゼである RNase A で処理した後に、逆相 HPLC によって加水分解生成物を解析した。その結果、dsRNA 単独では完全に分解される条件で、ODGal 3 量体は dsRNA の分解をほとんど抑制できなかったが、ODGal 4 量体は顕著に dsRNA の分解を抑制した。

#### D. 考察

これまでに報告したオリゴ 2,6-ジアミノ-2,6-ジデオキシ- $\alpha$ -D-グルコース (ODGlc) に加え、本研究で新たにオリゴ 2,6-ジアミノ-2,6-ジデオキシ- $\alpha$ -D-マンノース (ODMan) およびオリゴ 2,6-ジアミノ-2,6-ジデオキシ- $\beta$ -D-ガラクトース (ODGal) 誘導体を合成し、その性質を明らかにすることができた。我々が合成したオリゴジアミノ糖誘導体の中で、ガラクトース骨格を有する ODGal が最も強く二本鎖 RNA に結合し、その熱力学的安定性を向上させることがわかった。さらに、ODGal 4 量体は 3 量体と比較して、顕著に RNase A による dsRNA の分解を抑制した。

#### E. 結論

A 型二重らせん構造を有する二本鎖核酸に選択的に結合し、その熱力学的安定性を向上させ、ヌクレアーゼによる分解を阻害するカチオン性人工オリゴ糖として、グルコース、マンノース、ガラクトース骨格を有する誘導体の機能を比較し、ガラクトース誘導体が最も優れた性質を有することが示された。今後、この誘導体を用いた siRNA 経口治療薬の開発が大いに期待される。

#### F. 健康危険情報

本研究で合成したオリゴ糖誘導体やビタミン E 誘導体は極めて生体適合性の高い分子であると考えられるが、新規化合物であり、今後細胞毒性や安全性に関する試験を適宜おこなう必要がある。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Uehara S, Hiura S, Higashida R, Oka N, Wada T. Solid-phase synthesis of p-boronated oligonucleotides by the h-boranophosphonate method. *J Org Chem* 2014; 79: 3465-3472.
2. Saito K, Wada T. 3-Nitro-1,2,4-triazol-1-yl-tris(pyrrolidin-1-yl)phosphonium hexafluorophosphate (PyNTP) as a condensing reagent for solid-phase peptide synthesis. *Tetrahedron Lett* 2014; 55: 1991-1993.
3. Iwata R, Nishina K, Yokota T, Wada T. Synthesis and properties of double-stranded RNA-bindable oligodiaminogalactose derivatives conjugated with vitamin E. *Bioorg Med Chem* 2014; 22: 1394-1403.
4. Noro M, Fujita S, Wada T. Stereoselective Synthesis of P-Modified  $\alpha$ -Glycosyl Phosphates by the Oxazaphospholidine Approach. *Org Lett* 2013; 15: 5948-5951.
5. Ohmuro-Matsuyama Y, Nakano K, Kimura A, Ayabe K, Ihara M, Wada T, Ueda H. A protein-protein interaction assay based on

the functional complementation of mutant firefly luciferases. *Anal Chem* 2013; 85: 7935-7940.

6. Oka N, Tatsumi S, Matsumura F, Wada T. Glycosylation of alcohols using glycosyl boranophosphates as glycosyl donors. *Tetrahedron Lett* 2013; 54: 3731-3734.
7. Oka N, Murakami R, Kondo T, Wada T. Stereocontrolled synthesis of dinucleoside phosphorothioates using a fluorine tag. *J Fluor Chem* 2013; 150: 85-91.
8. Maeda Y, Iwata R, Wada T. Synthesis of novel oligo cationic peptides binding to RNA duplexes. *Peptide Science* 2013; 2012, 23-24.

## 2. 学会発表

1. 和田猛, 伊藤弘暁, 首藤智仁, 植原渉. 2'-O-CEM 保護 H-ボラノホスホネート法によるボラン修飾型 RNA 類縁体の固相合成. 日本化学会第 94 春季年会, 名古屋, 2014.3.30.
2. 前田雄介, 岩田倫太郎, 和田猛. 核酸医薬を標的とした新規カチオン性人工ペプチドの合成. 日本化学会第 94 春季年会, 名古屋, 2014.3.30.
3. 濱村友香, 額賀陽平, 和田猛. リン原子修飾型核酸の立体選択的合成のための新規保護基の開発. 日本化学会第 94 春季年会, 名古屋, 2014.3.27.
4. 岩田倫太郎, 和田猛. A 型二重鎖核酸結合性オリゴアミノガラクトースの合成とその性質. 日本化学会第 94 春季年会, 名古屋, 2014.3.27.
5. 齋藤敬太, 和田猛. ホスホニウムトリアゾリド型縮合剤を用いたペプチド固相合成法の開発. 日本化学会第 94 春季年会, 名古屋, 2014.3.27.
6. 和田猛. 核酸医薬への合成化学的アプローチ. 第 25 回歯工学連携講演会, 福岡県, 2014.1.22.
7. 影山雅幸, 新井浩一郎, 内山直樹, 和田猛. 新規 2'-O-ハロエトキシメチル RNA の合成と性質. 第 23 回アンチセンスシンポジウム, 徳島県, 2013.11.28.

8. 植原渉, 日浦進吾, 東田廉平, 岡夏央, 和田猛. Synthesis of Boron-Containing Antisense Molecules by the H-Boranophosphonate Method. 第 40 回国際核酸化学シンポジウム (ISNAC 2013 The 38th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2013, 神奈川, 2013.11.13).
9. 藤巻春奈, 前田雄介, 和田猛. Synthesis of Novel Cationic  $\beta$ -Hairpin Peptides which Bind to Nucleic Acid Duplexes. 第 50 回ペプチド討論会及び 4th Asia-Pacific international Peptide Symposium, 大阪, 2013.11.7.
10. 前田雄介, 岩田倫太郎, 和田猛. Synthesis and Properties of Novel Oligocationic Peptides which Bind to A-type Nucleic Acid Duplexes. 第 50 回ペプチド討論会及び 4th Asia-Pacific international Peptide Symposium, 大阪, 2013.11.7.
11. 野呂美穂子, 藤田正一, 和田猛. リン原子修飾糖 1-リン酸誘導体の立体選択的合成. 第 32 回日本糖質学会年会, 大阪, 2013.8.7.
12. 和田猛. New synthetic strategies for RNA drugs. 第 15 回 RNA ミーティング, 愛媛県, 2013.7.25.
13. 和田猛. リン原子修飾核酸医薬の立体制御. Symposium on Innovative Research at KUT Part 1, 高知県, 2013.7.19.
14. 和田猛. 有機合成で創り出す核酸医薬への新しいアプローチ. 第 23 回万有福岡シンポジウム, 福岡県, 2013.6.1.
15. 和田猛. リン原子修飾核酸医薬の立体制御. 次世代医薬「核酸医薬」創出に向けた Strategy, 品川, 2013.4.26.

## H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1. 特許出願  
発明の名称:  $\beta$ -Hairpin Peptides Which Bind to Nucleic Acid Duplexes.  
出願人: 東京医科歯科大学, 東京理科大学

発明人：和田猛, 前田雄介, 横田隆徳,  
仁科一隆.

米国出願番号：US 61/888,200.

出願日：2013.10.8.

発明の名称：ボラノホスフェート化合物、及び核酸  
オリゴマー.

出願人：東京理科大学

発明人：和田猛, 植原渉.

出願番号：特願 2013-234384

出願日：2013.11.12.

発明の名称：二重鎖核酸結合剤、当該結合剤-二重  
鎖核酸複合体、当該複合体を含有する  
医薬品組成物、及び、当該複合体の製  
造方法.

出願人：東京医科歯科大学, 東京理科大学.

発明人：和田猛, 前田雄介, 横田隆徳,  
仁科一隆.

国際出願番号：PCT/JP2014/5785

出願日：2014.3.20

## 2. 実用新案登録

特になし

## 3. その他

特になし

## 経口遺伝子治療に資するヌクレアーゼ耐性型 DNA-RNA ヘテロ二重鎖核酸の 設計と合成及び機能評価

研究分担者 小比賀 聡 大阪大学大学院薬学研究科

### 研究要旨

本研究グループでは、横田グループ（東京医科歯科大学）、村上グループ（大阪大谷大学）と連携し、経口遺伝子治療に資するヌクレアーゼ耐性型 DNA-RNA ヘテロ二重鎖核酸の設計、合成を実施した。さらに、村上グループにて開発された腸管環境をミミックした核酸のヌクレアーゼ耐性評価系を利用し、今回設計、合成した数種の化学修飾型 cRNA 及び ASO の安定性を評価した。その結果、腸管環境において化学修飾した ASO 鎖が極めて安定である事、さらには cRNA 鎖においても化学修飾を適切に施す事により、十分な安定性を付与することが可能である事を明らかにした。

### A.研究目的

核酸医薬は、これまで治療法が確立していない難病や稀少疾患にも応用可能な創薬手法として世界的にも大いに期待されている。一般に医薬品が薬効を発揮するには、生体内での安定性を高める事が必要不可欠であるとされている。これは核酸医薬にもあてはまる。すなわち天然の DNA や RNA を核酸医薬の素子として利用した場合、速やかに生体内で分解を受けるため十分な薬効を発揮できない事が知られている。しかし一方で核酸は他のバイオ医薬とは異なり、幅広い有機合成化学の技術が利用できる。実際に、核酸自身の構造を有機化学的に改変することで、生体内の安定性を高める事が可能である。我々は、これまでに数多くの化学修飾型人工核酸を開発し、優れた機能性を発揮する架橋型人工核酸を見出すことに成功している。これら架橋型人工核酸は、標的となる mRNA に対する結合親和性が極めて高いばかりか、生体内での安定性にも優れている事が確認されており、特にホスホロチオアート化と呼ばれるリン酸ジエステル結合の改変を併用する事で、極めて高い生体内安定性（ヌクレアーゼ耐性）を付与する事が可能である。

一方で、昨年度までの研究において、通常一本鎖で利用されるアンチセンス核酸（ASO）に対し、相補的な RNA 鎖（cRNA）をあらかじめハイブリさせておき二本鎖として細胞や動物に投与する事で優れた薬効を示すことが分かってきた。これを経口遺伝子治療に応用するためには、ASO 鎖のみならず、cRNA 鎖についても生体内における安定性の付与が必要不可欠となる。とりわけ、経口投与において注意しなくてはならないのが、腸管にて RNA 分解に関わるとされている RNase A と呼ばれるヌクレアーゼである。そこで本研究では、横田グループ（東京医科歯科大学）、村上グループ（大阪大谷大学）との共同研究のもと、村上グループにて開発された腸管環境をミミックした核酸のヌクレアーゼ耐性評価系を利用し、数種の化学修飾型 cRNA の安定性評価を実施した。

### B.研究方法

[RNaseA 耐性を付与した cRNA の設計と合成]

RNaseAは通常一本鎖のRNAをピリミジン（CまたはU）の3'末端にて切断することが知られている。そこで、cRNA 鎖に含まれるピリミジン鎖に対する化学修飾を種々検討することとした。通常、核酸の

酵素耐性能を高めるためには、リン酸ジエステル結合をホスホロチオアート化する事が定法とされている。また、このホスホロチオアート化核酸については、すでに臨床応用もされており、一定の安全性が知られている。このホスホロチオアート化に加え、ここでは、ヌクレオシドの2'位修飾をあわせて検討した。すなわち、これまでにアプタマー医薬の素子としても利用されている2'-F体及び2'-OMe体を配列に導入することとした。

一方で、用いるASO鎖の配列としては、昨年度までに検討を重ねてきたマウスアポリポ蛋白B (apoB)を標的としたLNA-DNA gapmer型の13塩基からなる一本鎖ASO (ssASO)を継続して用いることとし、当該ASO鎖に相補的な13塩基長のcRNAに対して、上記の化学修飾を施した。合成は、一般的な核酸合成法に従い実施し、得られた各cRNA (cRNA0~cRNA4)は逆相HPLCにて精製した後、MALDI-TOF-MSによってその構造を決定している。以下に用いたASO並びに各cRNAの配列とその化学修飾様式を示す。

ASO:

5'-G(L)\*A(L)\*A\*G\*G\*T\*C\*A\*T\*G\*G(L)\*C(L)\*A(L)

cRNA0: 5'-u\*g\*c\*CAUGACCU\*u\*c-3'

cRNA1: 5'- u\*g\*c\*C\*AU\*GAC\*C\*U\*u\*c-3'

cRNA2: 5'- u\*g\*c\*C\*A\*U\*G\*A\*C\*C\*U\*u\*c-3'

cRNA3: 5'- u\*g\*c\*CAUGACCU\*u\*c-3'

cRNA4: 5'- u\*g\*c\*cAuGAccu\*u\*c-3'

なお、上記配列中の化学修飾様式は以下の通りである。

X(L): LNA, X: DNA, X: RNA, x: 2'-OMe, X: 2'-F,

\*: PS結合

[腸管内をミミックした評価系における酵素耐性能の評価]

ICR雄性マウス(8~10週齢)を麻酔下、腸管ループを作製し、生理食塩水を注入して2時間インキュベートした。残存する腸内インキュベーション液及び粘膜上皮組織を採取し、生理食塩水を加えてホモジナイズした後、4℃、3,000×gにて遠心分離し

て沈殿を除去した。RNase A活性を $1 \times 10^{-5}$  unit/ $\mu$ lに調整した粘膜ホモジネート液又は腸内インキュベーション液に、cRNA又はASO(2.5  $\mu$ M)を添加し、37℃でインキュベーションした後、一定時間後に酵素反応を停止したものをサンプルとした。各サンプルをポリアクリルアミド(15%)電気泳動後、核酸染色し、分解性の評価を行った。

(倫理面への配慮)

本研究に含まれる動物実験については、動物愛護及び実験動物の適正管理、動物実験の適正化の観点から、大阪大谷大学の各動物実験委員会規定と動物実験指針に基づいて行った。

### C.研究結果

化学合成した各種cRNAのマウス結腸粘膜ホモジネート中での安定性を調べた。その結果、コントロールとして用いた天然型RNA(naked ssRNA)が5分以内に分解されるのに対し、cRNA0~cRNA4については、その化学修飾の種類や程度に応じて分解耐性特性が異なっていた。すなわち、配列の5'側3残基と3'側2残基のみ2'-OMe体の導入に加えリン酸ジエステル結合をホスホロチオアート化(PS結合)したcRNA0は、天然型RNAと同じく5分以内に分解されたが、一方で、配列中央部のピリミジン残基部位をPS化したcRNA1においては、安定性向上が認められた。また、配列中央部を全てPS化したcRNA2については、cRNA1と顕著な違いは認められず、プリン残基部分のPS化による安定性向上は限定的である事が確認された。cRNA3とcRNA4については、配列中央部のピリミジン残基をそれぞれ2'-F体及び2'-OMe体に変換したものであり、配列の両末端側以外にリン酸ジエステル結合部分のPS化修飾は行なっていない。しかし、特にcRNA4において優れた安定化効果が認められている。なお、本条件化においてASOは極めて高い酵素耐性能を示す事が確認された。

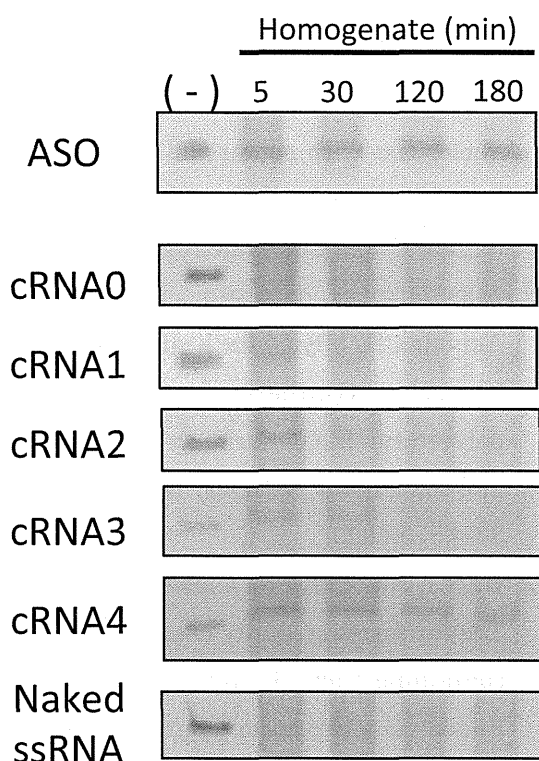


図 マウス結腸粘膜ホモジネート中における各 cRNA の安定性

#### D. 考察

今回、新たに構築した核酸の生体内安定性評価系、すなわち腸管内をミミックした酵素耐性能評価系を用いる事により、経口投与に資する人工核酸創成の基盤となるデータが得られた。

まず第一に、両末端を LNA 修飾し全てのリン酸ジエステル結合を PS 化した ASO については、腸管内をミミックした環境下においても極めて安定であり、核酸医薬としての高いポテンシャルを示す結果となった。

一方、cRNA2 は ASO と同じく配列中の全てのリン酸ジエステル結合が PS 化されているにも関わらず、安定化は限定的であった。この結果は、PS 化修飾が生体内安定性を大きく向上させるとされてきたこれまでの知見と必ずしも合致するものではなく、ある意味予想外の結果であった。ASO と cRNA2 は化学構造上大きな違いが何点かあるが、その最たる違いは ASO 鎖が DNA をベースにしたものであり、cRNA2 は RNA ベースの構造であるという点である

う。すなわち、RNA 鎖に対して PS 化を行なうことにより、一定程度の酵素耐性能は付与できるものの (図中 cRNA0 vs cRNA2)、腸管内をミミックした条件下においては、ASO、つまり DNA 鎖をベースにした配列ほどの安定性は得られない可能性が示唆された。これは今後 RNA 鎖を含む核酸医薬を開発していく際の重要な知見の一つであろう。

今回の検討に用いた cRNA の中で cRNA4 が最も優れた安定性を示した。配列中央部分を PS 化していないにも関わらず、cRNA4 が良好な成績を示した事は本研究の中で特筆すべき点であり、経口投与を視野に入れた RNA 鎖の化学修飾における 2'-OMe 体の有用性を端的に示した結果である。今回 cRNA4 では配列中央部分のピリミジン塩基のみを 2'-OMe 化しており、プリン塩基については天然の RNA を利用している。cRNA の配列を詳しく見てみると、配列中央部に存在するプリン鎖は 3 残基あり、そのうち 2 残基は連続している。すなわち、腸管内をミミックした系においても、2 残基程度の天然型プリン RNA の連続は十分に許容されるということが明らかとなった。今後、様々な配列を用いて本結果の検証を進めることで、その一般性を明らかにしていく事が重要となろう。さらに、プリン塩基への 2'-OMe 化の検討、ASO/cRNA ヘテロ二重鎖を形成した際の安定性の確認、またこれら安定性と薬効の相関についても明らかにしていく事で、経口投与可能な核酸医薬素材の開発研究が大きく進むと考えられる。

#### E. 結論

経口投与可能な核酸医薬の開発には、ADME の観点からも従来の低分子医薬の開発とは比較できないほどの大きな障壁が立ちはだかっている。しかし、本研究により、腸管環境において ASO 鎖が極めて安定である事、さらには cRNA 鎖においても化学修飾を適切に施す事により、十分な安定性を付与することが可能である事が見いだされた。これらの知見は経口投与に資する核酸医薬開発の基盤となる重要な成果であると言える。



## F.健康危険情報

特記事項なし

## G.研究発表

### 1. 論文発表

- Morihiro K, Kodama T, Mori S, Obika S. Photoinduced Changes in hydrogen bonding patterns of 8-thiopurine nucleobase analogues in a DNA strand. *Org Biomol Chem* 2014; 12: 2468-2473.
- Shrestha AR, Kotobuki Y, Hari Y, Obika S. Guanidine bridged nucleic acid (GuNA): an effect of cationic bridged nucleic acid on DNA binding affinity. *Chem Commun* 2014; 50: 575-577.
- Morihiro K, Kodama T, Waki R, Obika S. Light-triggered strand exchange reaction using the change in the hydrogen bonding pattern of the nucleobase. *Analog Chem Sci* 2014; 5: 744-750.
- Yamamoto T, Obika S, Nakatani M, Yasuhara H, Wada F, Shibata E, Shibata M, Shiba M. Locked nucleic acid antisense inhibitor targeting apolipoprotein C-III efficiently and preferentially removes triglyceride from large very low-density lipoprotein particles in murine plasma. *Eur J Pharmacol* 2013; 723: 353-359.
- Hari Y, Nakahara M, Ijitsu S, Obika S. The ability of 1-aryltriazole-containing nucleobases to recognize a TA base pair in triplex DNA. *Heterocycles* 2014; 88: 377-386.
- Hari Y, Morikawa T, Osawa T, Obika S. Synthesis and properties of 2'-O,4'-C-ethyleneoxy bridged 5-methyluridine. *Org Lett* 2013; 15: 3702-3705.
- Hari Y, Akabane M, Obika S. 2',4'-BNA bearing a chiral guanidinopyrrolidine-containing nucleobase with potent ability to recognize the CG base pair in parallel-motif DNA triplex. *Chem Commun* 2013; 49: 7421-7423.
- Akiyama H, Miyashita K, Hari Y, Obika S, Imanishi T. Synthesis of novel polyesteramine dendrimers by divergent and convergent methods. *Tetrahedron* 2013; 33: 6810-6820.
- Hari Y, Nakahara M, Obika S. Triplex-forming ability of oligonucleotides containing 1-aryl-1,2,3-triazole nucleobases linked via a two atom-length spacer. *Bioorg Med Chem* 2013; 21: 5583-5588.
- Hari Y, Kashima S, Inohara H, Ijitsu S, Imanishi T, Obika S. Base-pair recognition ability of hydroxyphenyl nucleobases in parallel triplex DNA. *Tetrahedron* 2013; 69: 6381-6391.
- Hari Y, Osawa T, Kotobuki Y, Yahara A, Shrestha AR, Obika S. Synthesis and properties of thymidines with six-membered amide bridge. *Bioorg Med Chem* 2013; 21: 4405-4412.
- Morihiro K, Kodama T, Kentefu, Moai Y, Veedu RN, Obika S. Selenomethylene-locked nucleic acid enables reversible hybridization in response to redox changes. *Angew Chem Int Ed* 2013; 52: 5074-5078.

### 2.学会発表

- 小比賀聡. 核酸創薬の新展開. 大阪大学未来戦略機構創薬シンポジウム アカデミア基盤研究から未来創薬へ, 東京, 2014.3.27.

2. 小比賀聡. 核酸創薬研究における新たな取り組み. 第7回レドックス・ライフイノベーションシンポジウム, 東京, 2014.3.6.
3. 小比賀聡. 生命科学・医薬研究を拓くマイクロRNAの研究最前線核酸創薬を目指した人工核酸の開発研究. 千里ライフサイエンスセミナー, 大阪, 2014.2.21.
4. 小比賀聡. 核酸医薬開発の現状と今後の展開 -高機能化技術/核酸修飾技術-. JST 研究開発戦略センター 次世代バイオ医薬品の俯瞰に関するワークショップ, 東京, 2013.12.19.
5. 小比賀聡. 核酸医薬の有効性・安全性評価における課題. 第10回医薬品レギュラトリーサイエンスフォーラム, 東京, 2013.12.12.
6. 小比賀聡. 核酸創薬に向けた我々の取り組み～基礎から最前線まで～. 新科学技術推進協会ライフサイエンス技術部会・分科会講演会, 東京, 2013.11.14.
7. 小比賀聡. 新規架橋型人工核酸の開発研究. ヒューマンサイエンス振興財団規制基準委員会規制動向調査 WG 勉強会, 大阪, 2013.7.10.

## H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

### 1.特許取得

特になし

### 2.実用新案登録

特になし

### 3.その他

特になし

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

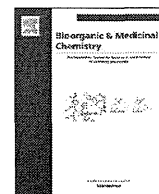
## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 英文原著

著者名	論文題名	雑誌名	巻	頁	出版 西暦年	GRANT への 謝辞の 有無
Iwata R, Nishina K, Yokota T, Wada T.	Synthesis and properties of double-stranded RNA-bindable oligodiaminogalactose derivatives conjugated with vitamin E.	Bioorg Med Chem	22	1394-1403	2014	有
Piao W, Nishina K, Yoshida-Tanaka K, Kuwahara H, Nishina T, Sakata M, Mizusawa H, Yokota T.	Efficient in vivo delivery of antisense oligonucleotide to choroid plexus.	J Med Dent Sci	60	9-16	2013	無
Kim HJ, Miyata K, Nomoto T, Zheng M, Kim A, Liu X, Cabral H, Christie RJ, Nishiyama N, Kataoka K.	siRNA delivery from triblock copolymer micelles with spatially-ordered compartments of PEG shell, siRNA-loaded intermediate layer, and hydrophobic core.	Biomaterials	35	4548-4556	2014	無
Pittella F, Cabral H, Maeda Y, Mi P, Watanabe S, Takemoto H, Kim HJ, Nishiyama N, Miyata K, Kataoka K.	Systemic siRNA delivery to a spontaneous pancreatic tumor model in transgenic mice by PEGylated calcium phosphate hybrid micelles.	J Control Release	178	18-24	2014	有
Deshayes S, Cabral H, Ishii T, Miura Y, Kobayashi S, Yamashita T, Matsumoto A, Miyahara Y, Nishiyama N, Kataoka K.	Phenylboronic acid-installed polymeric micelles for targeting sialylated epitopes in solid tumors.	J Am Chem Soc	135	15501-15507	2013	無
Miura Y, Takenaka T, Toh K, Wu S, Nishihara H, M. R. Kano, Ino Y, Nomoto T, Matsumoto Y, Koyama H, Cabral H, Nishiyama N, Kataoka K.	Cyclic RGD-linked polymeric micelles for targeted delivery of platinum anticancer drugs to glioblastoma through the blood-brain tumor barrier.	ACS Nano	7	8583-8592	2013	無
Takemoto H, Miyata K, Hattori S, Ishii T, Suma T, Uchida S, Nishiyama N, Kataoka K.	Acidic pH-responsive siRNA conjugate for reversible carrier stability and accelerated endosomal escape with reduced IFN $\alpha$ -associated immune response.	Angew Chem Int Ed	52	6218-6221	2013	有
Gouda N, Miyata K, Christie RJ, Suma T, Kishimura A, Fukushima S, Nomoto T, Liu X, Nishiyama N, Kataoka K.	Silica nanogelling of environment-responsive PEGylated polyplexes for enhanced stability and intracellular delivery of siRNA.	Biomaterials	34	562-570	2013	無
Uehara S, Hiura S, Higashida R, Oka N, Wada T.	Solid-phase synthesis of p-boronated oligonucleotides by the h-boranophosphonate method.	J Org Chem	79	3465-3472	2014	無
Saito K, Wada T.	3-Nitro-1,2,4-triazol-1-yl-tris(pyrrolidin-1-yl)phosphonium hexafluoro phosphate (PyNTP) as a condensing reagent for solid-phase peptide synthesis.	Tetrahedron Lett	55	1991-1993	2014	無
Noro M, Fujita S, Wada T.	Stereoselective Synthesis of P-Modified $\alpha$ -Glycosyl Phosphates by the Oxazaphospholidine Approach.	Org Lett	15	5948-5951	2013	無

著者名	論文題名	雑誌名	巻	頁	出版 西暦年	GRANT への 謝辞の 有無
Ohmuro-Matsuyama Y, Nakano K, Kimura A, Ayabe K, Ihara M, Wada T, Ueda H.	A protein-protein interaction assay based on the functional complementation of mutant firefly luciferases.	Anal Chem	85	7935- 7940	2013	無
Tatsumi S, Matsumura F, Oka N, Wada T.	Glycosylation of alcohols using glycosyl boranophosphates as glycosyl donors.	Tetrahedron Lett	54	3731- 3734	2013	無
Oka N, Murakami R, Kondo T, Wada T.	Stereocontrolled synthesis of dinucleoside phosphorothioates using a fluorous tag.	J Fluor Chem	150	85-91	2013	無
Maeda Y, Iwata R, Wada T.	Synthesis of novel oligo cationic peptides binding to RNA duplexes.	Peptide Science 2012		23-24	2013	無
Morihiro K, Kodama T, Mori S, Obika S.	Photoinduced changes in hydrogen bonding patterns of 8-thiopurine nucleobase analogues in a DNA strand.	Org Biomol Chem	12	2468- 2473	2014	無
Shrestha AR, Kotobuki Y, Hari Y, Obika S.	Guanidine bridged nucleic acid (GuNA): an effect of cationic bridged nucleic acid on DNA binding affinity.	Chem Commun	50	575- 577	2014	無
Morihiro K, Kodama T, Waki R, Obika S.	Light-triggered strand exchange reaction using the change in the hydrogen bonding pattern of the nucleobase.	Analog Chem Sci	5	744- 750	2014	無
Yamamoto T, Obika S, Nakatani M, Yasuhara H, Wada F, Shibata E, Shibata M, Harada-Shiba M.	Locked nucleic acid antisense inhibitor targeting apolipoprotein C-III efficiently and preferentially removes triglyceride from large very low-density lipoprotein particles in murine plasma.	Eur J Pharmacol	723	353- 359	2013	無
Hari Y, Nakahara M, Ijitsu S, Obika S.	The ability of 1-aryl-1,2,3-triazole-containing nucleobases to recognize a TA base pair in triplex DNA.	Heterocycles	88	377- 386	2014	無
Hari Y, Morikawa T, Osawa T, Obika S.	Synthesis and properties of 2'-O,4'-C-ethyleneoxy bridged 5-methyluridine.	Org Lett	15	3702- 3705	2013	無
Hari Y, Akabane M, Obika S.	2',4'-BNA Bearing a chiral guanidinopyrrolidine-containing nucleobase with potent ability to recognize the CG base pair in parallel-motif DNA triplex.	Chem Commun	49	7421- 7423	2013	無
Akiyama H, Miyashita K, Hari Y, Obika S, Imanishi T.	Synthesis of novel polyesteramine dendrimers by divergent and convergent methods.	Tetrahedron	33	6810- 6820	2013	無
Hari Y, Nakahara M, Obika S.	Triplex-forming ability of oligonucleotides containing 1-Aryl-1,2,3-triazole nucleobases linked via a two atom-length spacer.	Bioorg Med Chem	21	5583- 5588	2013	無
Hari Y, Kashima S, Inohara H, Ijitsu S, Imanishi T, Obika S.	Base-pair recognition ability of hydroxyphenyl nucleobases in parallel triplex DNA.	Tetrahedron	69	6381- 6391	2013	無
Hari Y, Osawa T, Kotobuki Y, Yahara A, Shrestha AR, Obika S.	Synthesis and properties of thymidines with six-membered amide bridge.	Bioorg Med Chem	21	4405- 4412	2013	無
Morihiro K, Kodama T, Kentefu, Moai Y, Veedu RN, Obika S.	Selenomethylene-locked nucleic acid enables reversible hybridization in response to redox changes.	Angew Chem Int Ed	52	5074- 5078	2013	無

#### IV. 研究成果の刊行物、別刷



## Synthesis and properties of double-stranded RNA-bindable oligodiaminogalactose derivatives conjugated with vitamin E



Rintaro Iwata<sup>a,b</sup>, Kazutaka Nishina<sup>c</sup>, Takanori Yokota<sup>c</sup>, Takeshi Wada<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science, 2641 Yamazaki, Noda, Chiba 278-8510, Japan

<sup>b</sup> Department of Medical Genome Sciences, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, Bioscience Building 702, 5-1-5 Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-8562, Japan

<sup>c</sup> Department of Neurology and Neurological Science, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 10 October 2013

Revised 24 December 2013

Accepted 27 December 2013

Available online 4 January 2014

#### Keywords:

Oligodiaminogalactose

Vitamin E

RNA interference

RNA duplex

Drug delivery system

### ABSTRACT

RNA interference (RNAi) is a gene-regulating system that is controlled by external short interfering RNAs (siRNAs). Sequence selective gene silencing by siRNA shows promise in clinical research. However, there have been few efficient methods for delivering siRNAs to target cells. In this study, we propose a novel type of RNA duplex-bindable molecule with an oligodiaminosaccharide structure. These 2,6-diamino-2,6-dideoxy-(1-4)- $\beta$ -D-galactopyranose oligomers (oligodiaminogalactoses; ODAGals) conjugated with  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E; VE) or a VE analog were designed as novel siRNA-bindable molecules that can be utilized to deliver RNAi drugs to the liver. Among these compounds, the VE analog-bound ODAGal was suggested to bind to RNA duplexes without inhibiting RNAi activity.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Since the discovery of RNA interference (RNAi),<sup>1</sup> short interfering RNAs (siRNAs) have been receiving a lot of attention as candidates for next-generation drugs.<sup>2–4</sup> SiRNAs are composed of double-stranded RNA. Because they target complementary sequences of mRNAs, siRNAs promise high target specificity. Furthermore, RNA molecules are smaller than antibody drugs and can cross cell membranes using a suitable drug delivery system (DDS). In principle, therefore, siRNAs can be delivered to any tissue and target mRNA in any cell. However, DDSs for nucleic acid drugs are far from established.

For the effective transfection and DDS of siRNAs, a variety of methods have previously been reported, including viral and non-viral delivery methods. Viral delivery is much effective, but there are problems of cytotoxicity and immunological response.<sup>5</sup> Non-viral delivery strategies have included the use of a variety of RNA-conjugates and carriers, such as cationic lipids, polymers, and other molecules.<sup>6–8</sup> Among these strategies, cationic carriers are one of the dominant methods, and cationic polymers, represented by Lipofectamine™, have been widely used for in vivo experiments. However, these cationic carriers generally need to

be used in large doses to form nanoparticles, and suffer from cytotoxicity because of the increased quantities of cations.<sup>9–11</sup>

We previously reported that ‘oligodiaminosaccharides,’ which have amino groups at the 2- and 6-positions of  $\alpha$ -1-4 linked oligo-D-glucose, exhibit A-type nucleic acid duplex-binding properties.<sup>12</sup> These ‘oligodiaminoglucoses (ODAGlcs)’ can specifically interact with RNA duplexes rather than B-type DNA duplexes. The 4mer of an ODAGlc can bind to the 12mer of an RNA duplex in approximately a stoichiometric ratio. Thus, these RNA duplex-specific-binding oligodiaminosaccharides can be useful as a component of siRNA carriers.

Herein we report the synthesis of a novel type of oligodiaminosaccharide conjugated with vitamin E or its analogs that can be useful as a carrier of siRNA drugs. Vitamin E (VE), known as  $\alpha$ -tocopherol, is a fat-soluble vitamin. Such lipophilic compounds are transported to liver cells with chylomicrons after absorption from the small intestine. The liver-endocytosed vitamin E is drawn to the cytosol of liver cells by  $\alpha$ -tocopherol transfer protein ( $\alpha$ -TTP).<sup>13</sup>

Previously, a vitamin E-conjugated siRNA was reported to be efficiently transported to mouse liver cells. Importantly, vitamin E had very low cytotoxicity,<sup>14</sup> and the vitamin E-conjugated siRNA did not show any side effects.<sup>15</sup>

In the present study, we attempted to construct vitamin E-siRNA conjugates through noncovalent interaction with oligodiaminosaccharides. The noncovalent approach can prevent vitamin E

\* Corresponding author. Tel./fax: +81 4 7121 3671.

E-mail address: [twada@rs.tus.ac.jp](mailto:twada@rs.tus.ac.jp) (T. Wada).

from the sterically hindering the RNAi process if the binding molecules become disassociated from the siRNA in cytoplasm. Conjugates of vitamin E and its analogs with 2,6-diamino-2,6-dideoxy- $\beta$ -D-oligogalactopyranoside are expected to have similar structures and functions as those of ODAGlcs. We thus propose these 'oligodiaminogalactoses (ODAGals)' as novel RNA duplex-bindable molecules.

It has been previously reported that vitamin E is recognized by  $\alpha$ -TTP at the chroman ring, rather than at the alkyl chain.<sup>16,17</sup> Thus, we synthesized two types of ODAGal derivatives: one ODAGal derivative was conjugated with native vitamin E, whose phenolic hydroxy group was used to covalently bind vitamin E to the ODAGal moiety, and the other ODAGal derivative was conjugated with a VE analog whose phenolic hydroxyl group was preserved.

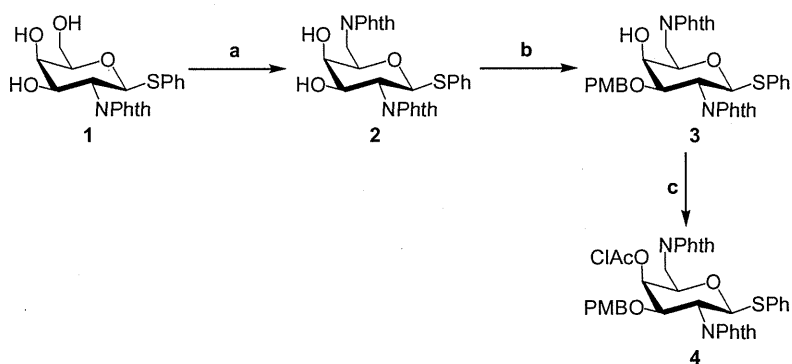
## 2. Results and discussion

### 2.1. Preparation of the glycosyl donor

To construct the  $\beta$ -linked oligodiaminogalactose structure via glycosylation, an adequately designed glycosyl donor was synthesized from the known galactosamine derivative **1**, which was synthesized by the procedure described in the literature.<sup>18</sup> Next, the 6-OH group of **1** was converted to a phthalimide group via the Mitsunobu reaction to afford **2**.<sup>19</sup> The 3-OH group of **2** was then selectively protected with a *p*-methoxybenzyl (PMB) group using dibutyltin oxide to obtain **3**.<sup>20</sup> Finally, the 4-OH group of **3** was chloroacetylated to afford the glycosyl donor **4** (Scheme 1).

### 2.2. Elongation of sugar chains

In the glycosylation reaction, commonly used *N*-iodosuccinimide and trifluoromethanesulfonic acid were employed for activation of the thiophenyl glycoside **4**. However, when using dichloromethane or dichloromethane–diethyl ether (1:1, v/v) as the solvent, partial removal and iodination of the PMB group were observed (Scheme 3). Furthermore, the iodinated PMB group was more stable and difficult to remove than the unmodified PMB group under acidic conditions (data not shown). In this study, these side reactions were inhibited using dichloromethane–diethyl ether (1:3, v/v) as the solvent, and the glycosylation reaction proceeded in good yield. Dechloroacetylation was then carried out under weak basic conditions, as shown in Scheme 1. When the 4-O-acetylated glycosyl donor was used, however, the acetyl group could not be selectively removed under basic, acidic, or enzymatic conditions. Thus, by repeating the synthetic cycle including glycosylation and dechloroacetylation, the trimer of ODAGal **7** was obtained (Scheme 2).



**Scheme 1.** Synthesis of the glycosyl donor **4**. Reagents and conditions: (a) DIAD, phthalimide, PPh<sub>3</sub>, THF, rt, 1 h, 71%; (b) (i) Bu<sub>2</sub>SnO, toluene, reflux, 12.5 h, (ii) PMBCl, TBAI, toluene, reflux, 5.5 h, 93% over two steps; (c) ClAcCl, pyridine, 0 °C, 30 min, 93%.

The PMB groups of trisaccharide **7** were removed in good yield under acidic conditions using trifluoroacetic acid, although a minor amount of cleavage of the glycoside bond occurred as a side reaction. It is noteworthy that in the case of 3-*O*-benzyl trisaccharide, the benzyl groups were not efficiently removed. In reductive reactions, such as catalytic reduction using palladium on carbon, the reaction rate was very slow, and two of the benzyl groups remained even after one day. Under acidic conditions, the desired compound was not obtained because nearly all of the glycoside bonds were cleaved.

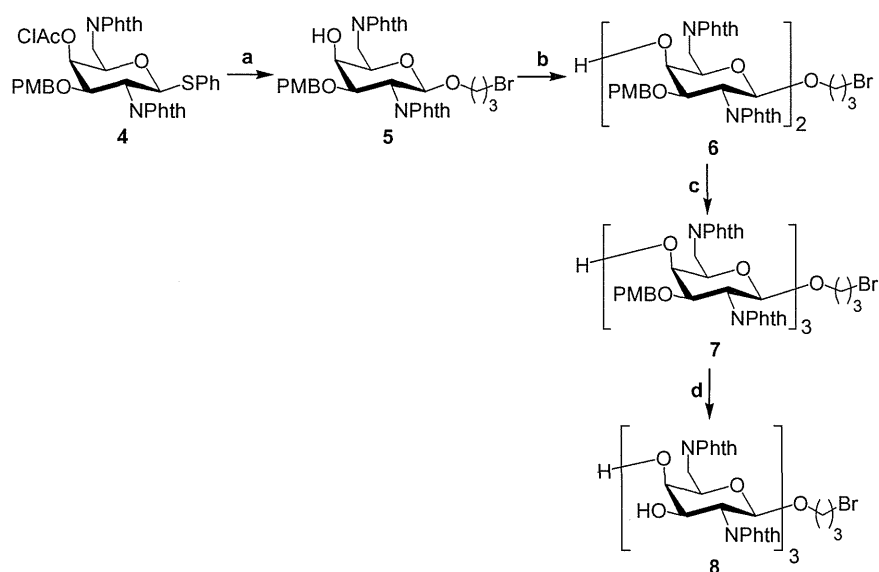
As shown in Schemes 4–6, the trisaccharide bromide **8** was azidated and conjugated with a propargylated vitamin E (**11**), vitamin E analog (**16**<sup>17</sup>), and the 4-methoxytriphenylmethyl (MMTr) group (**19**) via the Huisgen reaction<sup>21</sup> to obtain triazole-linked trisaccharides **13**, **17** and **20**, respectively. The phthalimide groups of **13** and **17** were then removed by treatment with hydrazine monohydrate and the products were purified by reverse-phase HPLC to afford the VE and VE analog conjugated ODAGal derivatives **14** and **18**. Separately, the MMTr group was removed following dephthaloylation of **20** to obtain the non-conjugated ODAGal **21**.

### 2.3. Evaluation of the interactions between the ODAGal derivatives and RNA–RNA duplexes

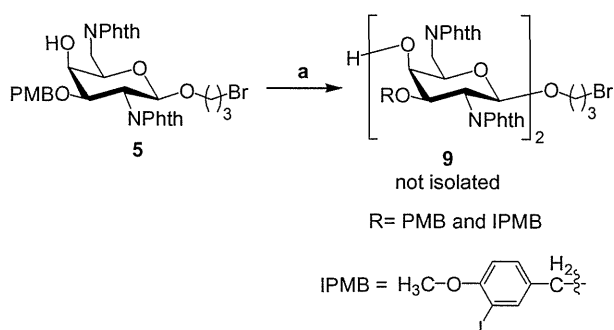
To evaluate whether ODAGals can interact with and induce structural changes or thermodynamic stabilization of RNA duplexes, UV melting, CD spectrometry, and fluorescence anisotropy measurements were carried out. All of the experiments were performed under near to physiological conditions with a 10 mM phosphate buffer containing 100 mM NaCl at pH 7.0. Figures 1 and 2 present the results of the UV melting analyses of the non-conjugated ODAGal **21** complexed with the RNA duplexes (5'-rCGCGAAUUCGCG-3')<sub>2</sub> (RNA-I) and (5'-rAAAAAUUUUUU-3')<sub>2</sub> (RNA-II) (1 equiv of **21** was added to the RNA duplex solution) respectively. The melting temperatures (*T*<sub>m</sub>) for the two systems increased by 2.0 °C and 2.2 °C, respectively (Table 1). These results suggest that the ODAGal moiety did interact with the RNA duplexes, and thermodynamically stabilized them. On the other hand, when 4 equiv of **21** were added to the RNA duplex solutions, the *T*<sub>m</sub> values were slightly decreased. These results suggest that an excess amount of ODAGal thermodynamically destabilizes the duplexes, or aggregation of **21** occurs at such a high concentration.

The UV melting curves for the complexes of VE-bound ODAGal **14** with RNA-I and RNA-II are shown in Figures 3 and 4, respectively. Although the curves for both RNA-I and RNA-II were significantly changed, an increase in the *T*<sub>m</sub> values was not observed in either case. In addition, when 4 equiv of **14** were added, the *T*<sub>m</sub> values for RNA-I decreased and the UV melting curve showed an





**Scheme 2.** Synthesis of the protected tri-diaminogalactose **8**. Reagents and conditions: (a) (i) NIS, TfOH, 3-bromo-1-propanol,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 20 min, (ii) NaOMe,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH,  $0^\circ\text{C}$ , 12.5 h, 85% over 2 steps; (b) (i) **4**, NIS, TfOH,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ - $\text{Et}_2\text{O}$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 1.5 h, (ii) NaOMe,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH,  $0^\circ\text{C}$ , 13 h, 79% over two steps; (c) (i) **4**, NIS, TfOH,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ - $\text{Et}_2\text{O}$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 1.5 h, (ii) NaOMe,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH,  $0^\circ\text{C}$ , 14 h, 77% over two steps; (d) 10%TFA in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 2 h, 71%.



**Scheme 3.** Side reaction in glycosylation reaction.

abnormal shape, while the  $T_m$  value for RNA-II could not be determined. These results indicate that, unlike the non-conjugated ODAGal **21**, the VE-bound **14** did not bind efficiently to the RNA duplexes.

In contrast, the VE analog-bound ODAGal **18** stabilized the RNA duplexes. As shown in Figures 5 and 6, although the addition of 1 equiv of **18** induced no significant change in the UV melting curves, an increase in the melting temperatures was observed when 4 equiv of **18** were added to the RNA solutions. In this case, the  $T_m$  values increased by  $2.7^\circ\text{C}$  for RNA-I and  $9.4^\circ\text{C}$  for RNA-II. These results suggest that the VE analog-bound ODAGal **18** interacts with the RNA duplexes in a manner similar to that of ODAGlc and non-conjugated ODAGal. However, for RNA-II, a second flexion point was observed at  $50$ – $60^\circ\text{C}$ . This phenomenon can be attributed to other events rather than dissociation of the duplex.

This difference in the properties of the VE-bound ODAGal **14** and VE analog-bound ODAGal **18** likely result from steric hindrance near the oligodiaminogalactose moiety. In the case of VE-bound ODAGal **14**, the methyl groups on the aromatic ring are in proximity to the ODAGal moiety and prevent it from interacting with the RNA duplexes. On the other hand, the VE analog-bound ODAGal **18** is less sterically hindered and advantageous for RNA binding.

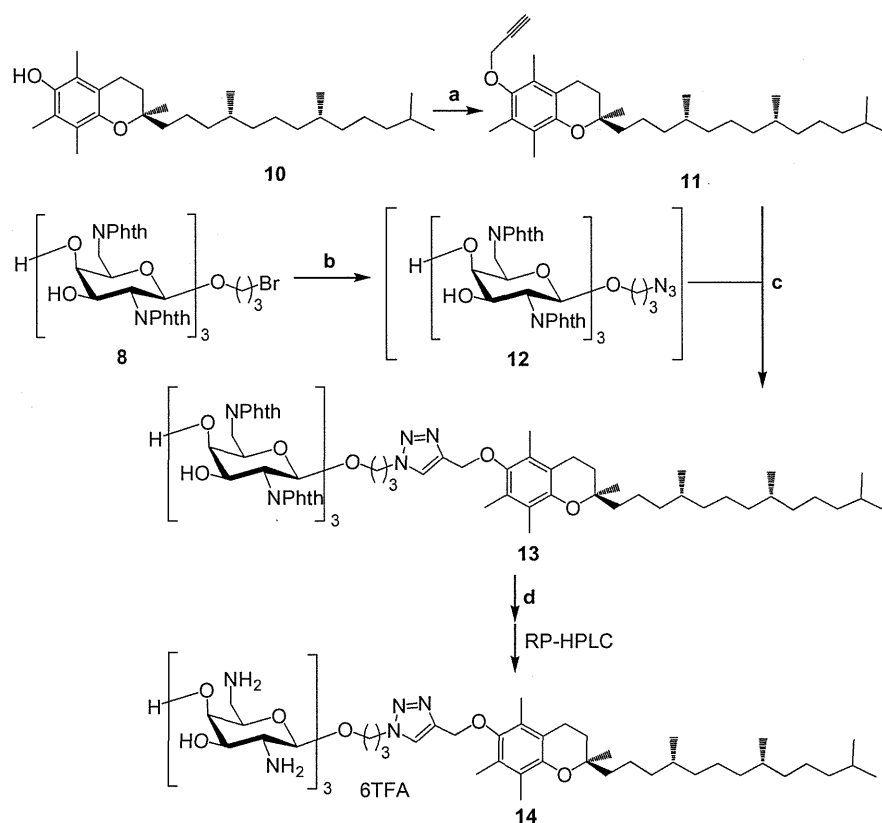
Next, to detect the structural changes in the RNA duplexes, CD spectra were measured for RNA-I and VE analog-bound ODAGal **18**, which possibly binds to the duplex. Figure 7 shows the CD spectra

of RNA-I in the presence and absence of **18**. Upon addition of VE analog-bound ODAGal **18**, changes in the spectra of the RNA-RNA duplex were observed. The positive peak near  $265\text{ nm}$  shifted  $1$ – $2\text{ nm}$  to a longer wavelength, its peak intensity increased, and the molar ellipticity near  $230\text{ nm}$  continuously changed. These changes in the peak at  $265\text{ nm}$  are very similar to those observed in our previous study upon addition of ODAGlcs to RNA duplexes.<sup>12</sup> On the basis of the combined results for UV melting and CD analyses, it can be concluded that the VE analog-bound ODAGal **18** interacts with RNA duplexes in a manner similar to that for ODAGlcs.

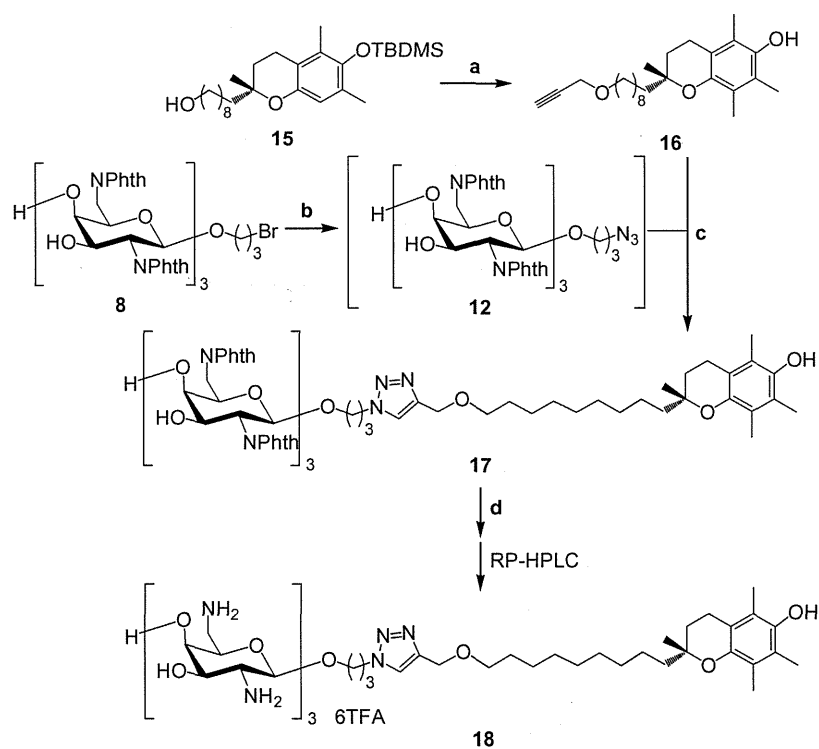
Finally, we measured the binding affinity of the VE derivative-bound ODAGals for RNA duplexes using direct fluorescence anisotropy titration. A fluorophore-labeled RNA duplex ( $5'$ -FAM-CGCGAAUUCGCG)<sub>2</sub> was used in this experiment. Figure 8 clearly shows that the VE analog-bound ODAGal **18** binds to the RNA duplex with  $K_d 3.8 \pm 1.2 (\times 10^{-8}\text{ M})$ . On the other hand, the affinity of VE-bound ODAGal **14** for the RNA duplex could not be confirmed from the titration (see SI). In addition, with **14**, the observed values did not converge and anisotropy could not be measured at more than  $0.5\ \mu\text{M}$  **14**.

#### 2.4. Evaluation of RNAi activity in the presence of ODAGal derivatives

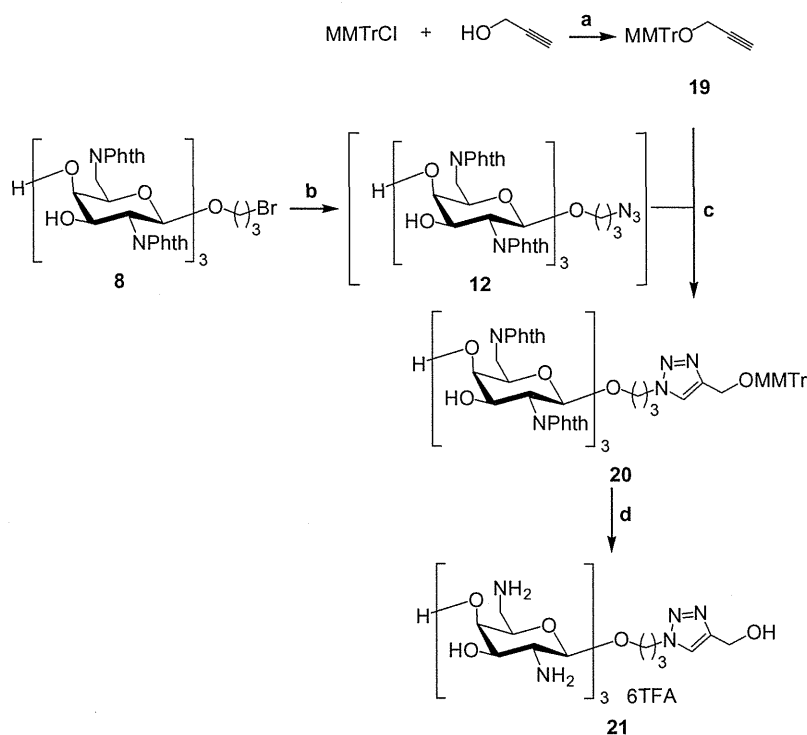
On the basis of the above results, it can be concluded that at least a portion of the ODAGal derivatives interact and form complexes with RNA duplexes. Therefore, experiments designed to evaluate RNA interference in the presence of the ODAGal derivatives were performed using an siRNA that targets apoB1 mRNA.<sup>22</sup> In these experiments, only the VE analog-bound ODAGal **18** was used because it was determined that the VE-bound ODAGal **14** had no or only a weak binding ability with RNA duplexes. Before the RNAi experiments were conducted, UV melting analyses of the siRNA  $r(5'$ -GUCAUCACACUGAAUACCAAU-3)- $r(3'$ -CACAGUAGUGUGACUUAUGGU-5') with added **18** were carried out. Interestingly, it was observed that the  $T_m$  value of the RNA was only slightly increased upon addition of **18** (see SI). These results are likely to derive from the high  $T_m$  value of the siRNA ( $71^\circ\text{C}$ ). It has been previously shown that the oligodiaminosaccharides



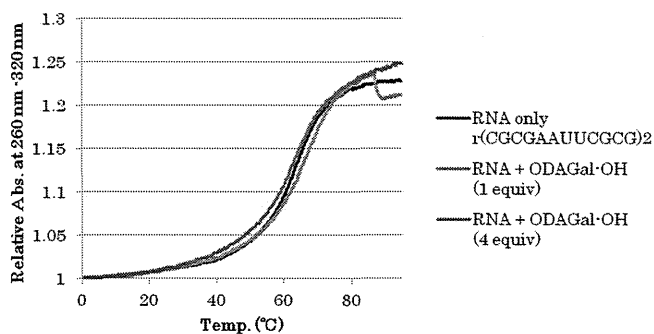
**Scheme 4.** Synthesis of the VE bound ODAGal **14**. Reagents and conditions: (a) 3-bromopropyne, NaH, DMF, rt, 20 min, 82%; (b) NaN<sub>3</sub>, DMF, 80 °C, 15 h; (c) Cu powder, *t*-BuOH–water, 80 °C, 19 h, 66% over two steps from **8**; (d) 3%NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, EtOH, 80 °C, 4.5 h, 29%.



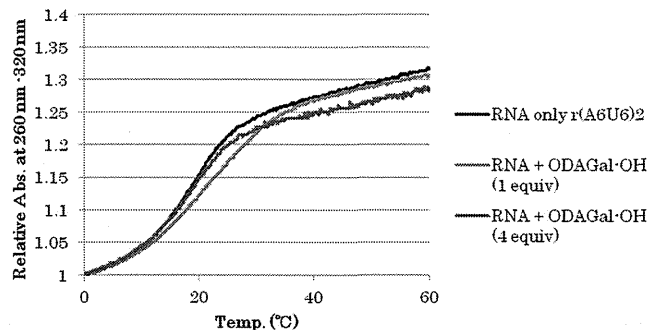
**Scheme 5.** Synthesis of the VE analog bound ODAGal **18**. Reagents and conditions: (a) (i) 3-bromopropyne, NaH, THF, 60 °C, 6 h, (ii) 1 M TBAF, THF, rt, 30 min, 75% over two steps; (b) NaN<sub>3</sub>, DMF, 80 °C, 12 h; (c) Cu powder, *t*-BuOH–water, 80 °C, 3.5 h, 91% over two steps from **8**; (d) 3%NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, EtOH, 90 °C, 4.5 h, 59%.



**Scheme 6.** Synthesis of the VE unbound ODAGal **21**. Reagents and conditions: (a) pyridine, rt, 3 d, 82%; (b)  $\text{NaN}_3$ , DMF, 80 °C, 12 h; (c) Cu powder, *t*-BuOH–water, 80 °C, 3.5 h, quant over two steps from **8**; (d) (i) 3%  $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , EtOH, 90 °C, 4 h, (ii) 80% AcOHaq, 11% over two steps.



**Figure 1.** UV melting curves of (5'-rCGCGAAUUCGCG-3')<sub>2</sub> in the presence of VE unbound ODAGal **21**.

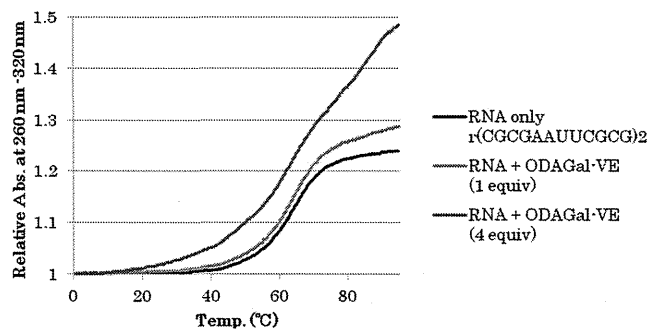


**Figure 2.** UV melting curves of (5'-rAAAAUUUUUU-3')<sub>2</sub> in the presence of VE unbound ODAGal **21**.

increase the  $T_m$  values of RNA duplexes that have low  $T_m$  values, and not high  $T_m$  values.<sup>12</sup> Next, RNAi activity in the presence and absence of the ODAGal derivative **18** was determined, and the results are shown in Figure 9.

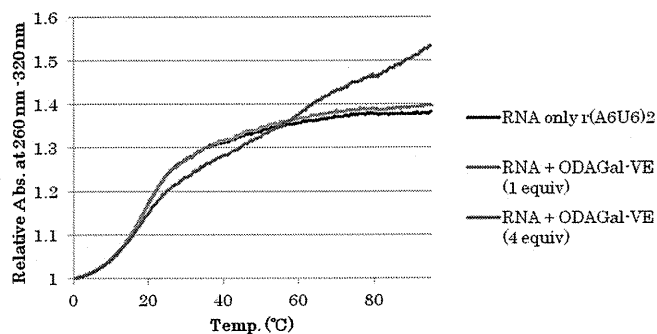
**Table 1**  
Melting temperatures of RNA duplexes in the presence of ODAGal derivatives

		RNA-I		RNA-II	
		$T_m$ (°C)	$\Delta T_m$ (°C)	$T_m$ (°C)	$\Delta T_m$ (°C)
<b>21</b>	RNA only	19.7	–	63.2	–
	1 equiv	21.9	2.2	65.2	2.0
	4 equiv	18.8	–0.9	62.4	–0.8
<b>14</b>	1 equiv	19.8	0.1	62.5	–0.7
	4 equiv	17.6	–2.1	n.d.	–
<b>18</b>	1 equiv	20.1	0.4	63.8	0.6
	4 equiv	29.1	9.4	65.9	2.7

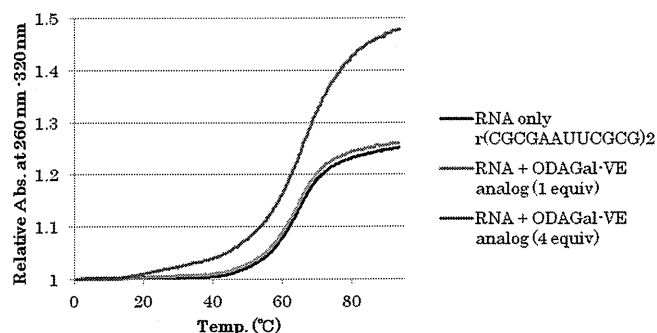


**Figure 3.** UV melting curves of (5'-rCGCGAAUUCGCG-3')<sub>2</sub> in the presence of VE bound ODAGal **14**.

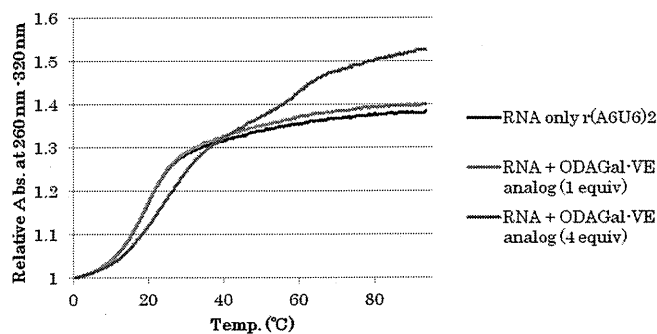
The level of apoB1 mRNA was evaluated using a quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR). The cell lines showed nearly the same RNAi activity regardless of the addition of the ODAGal derivative. This result confirms that the ODAGal did not affect the RNAi activity. Although there is room for further discussion as to whether the ODAGal derivative **18**



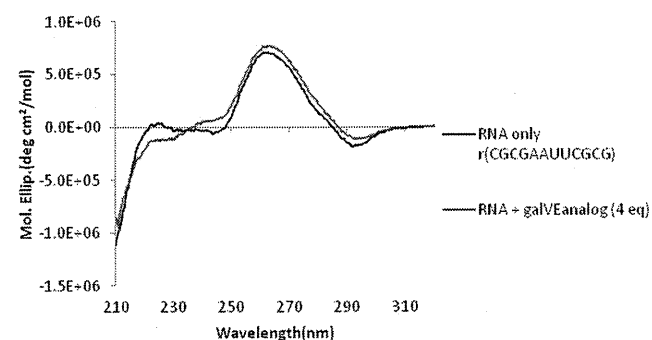
**Figure 4.** UV melting curves of (5'-rAAAAUUUUU-3')<sub>2</sub> in the presence of VE unbound ODAGal **14**.



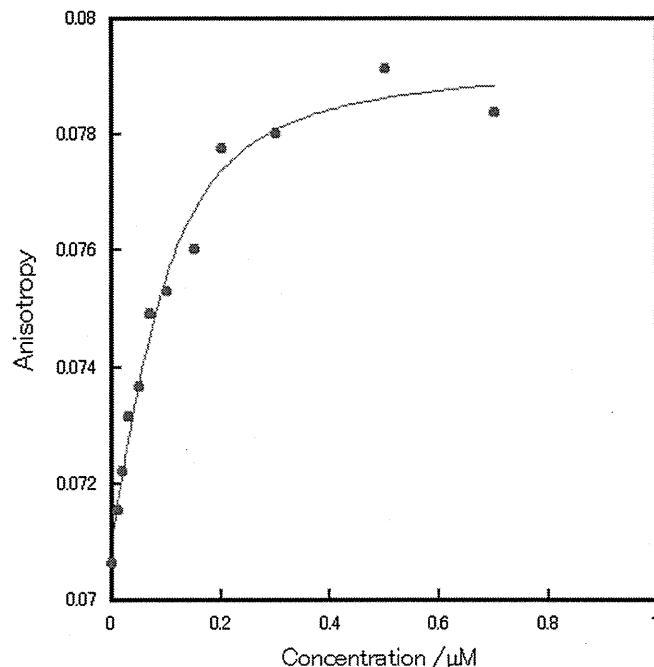
**Figure 5.** UV melting curves of (5'-rCGCGAAUUCGCG-3')<sub>2</sub> in the presence of VE analog bound ODAGal **18**.



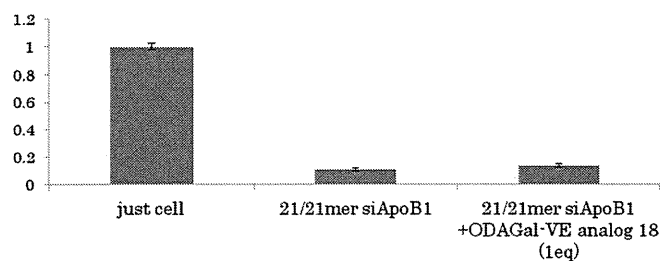
**Figure 6.** UV melting curves of (5'-rAAAAUUUUU-3')<sub>2</sub> in the presence of VE analog bound ODAGal **18**.



**Figure 7.** UV melting curves of (5'-rCGCGAAUUCGCG-3')<sub>2</sub> in the presence of VE analog bound ODAGal **18**.



**Figure 8.** Fluorescence anisotropy of 100 nM of 5'-FAMlabeled RNA duplex was titrated by increasing concentration of VE analog-bound ODAGal **18** at 20 °C. The formation of the **18**-RNA complex is reflected an increase in the observed anisotropy values.



**Figure 9.** Evaluation of siRNA activity in the presence of ODAGal derivatives; Cell line name: McA-RH7777; Transfection reagent: Lipofectamine 2000 in culture cells of McA-RH7777. m ± SEM Sense Sequence: 5'-GUCAUCACACUGAAUACCAAU-3' Antisense Sequence: 3'-CACAGUAGUGACUUAUGGU-5'.

binds to siRNAs, it appears that the compound does not inhibit the process of RNA interference, such as RISC formation.

### 3. Conclusion

Novel oligodiaminosaccharides, 2,6-diamino-2,6-dideoxy-β-D-oligogalactopyranoside derivatives conjugated with VE and its analog, were synthesized. The analysis of UV melting and CD spectral observations suggests that, like ODAGlcs, the ODAGal moiety efficiently interacts with and thermodynamically stabilizes RNA duplexes with small structural changes, although steric hindrance likely affects their binding ability. RNA interference experiments also demonstrated that the addition of the VE analog-bound ODAGal **18** to an siRNA did not affect the RNAi activities. This VE analog has recognition sites for α-TTP, and thus, the ODA derivative **18** may have potential as a useful carrier of RNAi drugs with the ability to bind to RNA duplexes without inhibiting RNAi activity. Further in vitro and in vivo experiments, including siRNA delivery to liver cells are now in progress.