

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5265067号
(P5265067)

(45) 発行日 平成25年8月14日(2013.8.14)

(24) 登録日 平成25年5月10日(2013.5.10)

(51) Int.Cl.

F 1

A 61 K 31/7125	(2006.01)	A 61 K 31/7125
A 61 K 31/7115	(2006.01)	A 61 K 31/7115
A 61 K 31/712	(2006.01)	A 61 K 31/712
C 07 H 21/00	(2006.01)	C 07 H 21/00
C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N 15/09

A

請求項の数 1 (全 11 頁)

(21) 出願番号

特願平10-513822

(86) (22) 出願日

平成9年9月10日(1997.9.10)

(65) 公表番号

特表2001-500511(P2001-500511A)

(43) 公表日

平成13年1月16日(2001.1.16)

(86) 国際出願番号

PCT/US1997/016017

(87) 国際公開番号

W01998/011211

(87) 国際公開日

平成10年3月19日(1998.3.19)

審査請求日 平成16年9月7日(2004.9.7)

審判番号 不服2011-20141(P2011-20141/J1)

審判請求日 平成23年9月16日(2011.9.16)

(31) 優先権主張番号 08/711,568

(32) 優先日 平成8年9月10日(1996.9.10)

(33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 398032717

イデラ ファーマシューティカルズ イン
コーポレイテッド
I d e r a P h a r m a c e u t i c a
l s , I n c .アメリカ合衆国O 2 1 3 9マサチューセッ
ツ州ケンブリッジ、 シドニー・ストリー
ト167番

(74) 代理人 100081422

弁理士 田中 光雄

(74) 代理人 100084146

弁理士 山崎 宏

(74) 代理人 100122301

弁理士 富田 慎史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】修飾C p Gジスクレオチドを有するオリゴヌクレオチドの使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

特定の遺伝子発現を抑制するための修飾C p G - 含有ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドであって、該オリゴヌクレオチドは、長さが12～50ヌクレオチドであり、発現の抑制をしようとするゲノム領域または遺伝子の一部分に、またはそのような遺伝子から転写されたRNAに、相補的であり、各C p Gが、アルキルホスホネートC p G、インバーテッドC p Gおよび2' - O - 置換C p Gから選ばれた修飾C p Gであり、該オリゴヌクレオチドは、投与前に比べて投与後の血小板枯渇の程度が20%以下であって、かつ非修飾C p G - 含有ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドに比べて血小板枯渇を減少させることができる、修飾C p G - 含有ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド。

10

【発明の詳細な説明】

発明の背景技術分野

本発明は、遺伝子発現の研究およびアンチセンス治療法に有用である修飾オリゴヌクレオチドに関する。

関連技術の要約

アンチセンス治療法における特異的な遺伝子発現のインヒビターとして、オリゴヌクレオチドを使用する可能性は、最初に1977年および1978年に刊行された3つの文献で示唆された。パターソン(Paterson)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:4370-4374(1977)はmRNAの無細胞系翻訳が、相補的であるオリゴヌクレオチドを

20

該mRNAに結合させることによって開始することができることを開示している。ザメクニク (Zamecnik) およびステフェンソン (Stephenson)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 285 - 288 (1978) はラウス肉腫ウイルス (RSV) ゲノムの一部に相補的である 13 - マーの合成オリゴヌクレオチドが感染細胞培養中で RSV 複製を阻害することができ、ついで悪性肉腫細胞中に初代ニワトリ線維芽細胞の RSV-媒介形質転換を阻害することができることを開示している。

これらの初期の研究以来、アンチセンスオリゴヌクレオチドがウイルス増殖を阻害することができる能力が確固として確認された。米国特許第 4,806,463 号は、ヒト免疫不全疾患ウイルスの増殖が該HIVゲノムの多様な領域に相補的なオリゴヌクレオチドによって阻害することができることを教示する。米国特許第 5,194,428 号は、インフルエンザウイルスピリメラーゼ 1 遺伝子に相補的なホスホロチオエートオリゴヌクレオチドによるインフルエンザウイルス複製の阻害を開示する。アグラワル (Agrawal)、Trends in Biotechnology 10: 152 - 158 (1992) は抗ウイルス剤としてのアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用を概説する。

アンチセンスオリゴヌクレオチドはまた、抗 - 寄生虫剤として開発された。PCT 国際出願公開番号第 WO 93/13740 号は、薬剤耐性マラリア原虫の増殖を阻害するためにアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用することを開示している。タオ (Tao) ら、Antisense Research and Development 5: 123 - 129 (1995) はアンチセンスオリゴヌクレオチドによる住血吸虫寄生虫の増殖の阻害を教示している。

一層最近では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは細胞遺伝子の発現から生じる疾患の治療的応用の候補として見込みがあることを示す。PCT 国際出願公開番号第 WO 95/09236 号は、アミロイド発現を阻害するオリゴヌクレオチドによるアミロイド誘発神経細胞株の形態的異常の完全消滅を開示する。PCT 国際出願公開番号第 WO 94/26887 号は、グロビン遺伝子転写物の異常なスプライシングが、該転写物のある部分に相補的であるオリゴヌクレオチドによって消滅することを開示する。PCT 国際出願公開番号第 WO 94/13685 号は、DNA メチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子に相補的なオリゴヌクレオチドによって腫瘍発生性が阻害されることを開示している。

治療剤および診断剤としての多様なアンチセンスオリゴヌクレオチドの開発は、最近アグラワルおよびアイエル (Iyer)、Current Opinion in Biotechnology 6: 12 - 19 (1995) に概説されている。

アンチセンス治療法における関心が高まるにつれ、糖 - リン酸骨格を修飾することにより、オリゴヌクレオチドの薬理学的特性を改良するための多様な努力がなされてきた。米国特許第 5,149,797 号は、メチルホスホネートまたはホスホルアミデートフランキング領域間に置かれたホスホロチオエートコア領域を有するキメラオリゴヌクレオチドを記載している。PCT 国際出願公開番号第 WO 94/02498 号は、DNA コア領域をフランкиングする 2' - O - 置換リボヌクレオチド領域を有するハイブリッドオリゴヌクレオチドを開示している。

最近、オリゴヌクレオチドの薬理学的特性について一層多くが見出されている。アグラワルら、Clinical Pharmacokinetics 28: 7 - 16 (1995) およびザン (Zhang) ら、Clinical Pharmacokinetics 58: 44 - 53 (1995) は、ヒト患者における抗 - H1V オリゴヌクレオチドの薬物動態を開示している。これらの新規発見のいくつかは、治療剤としてのオリゴヌクレオチドの最大限での活用化に関して克服されるべき新規のチャレンジへと導く。例えば、クニープ (Kniep) ら、Nature 374: 546 - 549 (1995) は他のある配列によってフランキングされた CGジヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドが有糸分裂促進効果を保有することを開示している。本発明者らは、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドによって生じる多くの副作用が、ホスホロチオエート - 結合 CpGジヌクレオチドの結果であることを見出した。それゆえ、遺伝子発現の阻害特性は保有しているが、従来のホスホロチオエートオリゴヌクレオチドより副作用の減少した修飾オリゴヌクレオチドの必要性がある。

本発明は、遺伝子発現の実験およびアンチセンス治療法に有用である修飾オリゴヌクレオチドに関する。本発明は遺伝子発現を阻害し、かつ従来のホスホロチオエートオリゴヌクレオチドより生じる副作用の減少した修飾オリゴヌクレオチドを提供する。特に、本発明は、従来の C p G - 含有ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドに比べて脾腫を低減し、血小板の枯渇を減少させて遺伝子発現を調節するために C p G - 含有ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドを使用する方法を提供する。

第 1 の局面において、本発明は修飾 C p G - 含有ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドおよび副作用が減少した、特定の遺伝子発現を阻害するための物質の組成物を提供する。そのような遺伝子発現の阻害は細胞または動物モデルにおいて特定の遺伝子の生物学的機能を決定するための突然変異分析の別法として使用することができる。そのような遺伝子発現の阻害はまた、ウイルスまたは病原の遺伝子発現または不適切な細胞遺伝子の発現によって引き起こされる疾患の治療に使用することができる。本発明のこの局面による好ましい 1 態様において、物質の組成物は 1 またはそれ以上の修飾 C p G ジヌクレオシドを有するホスホロチオエートオリゴヌクレオチドを含む。ある特に好ましい態様において、オリゴヌクレオチド中に存在するすべての C p G ジヌクレオシドが修飾される。本発明のこの局面において、C p G ジヌクレオシドは修飾されて、その結果修飾されていないホスホロチオエート C p G ジヌクレオシドを有する同一の、別のオリゴヌクレオチドに比較して、哺乳動物に投与されると脾腫および血小板枯渇を引き起こす低減された能力をオリゴヌクレオチドに与えることができる。10

第 2 の局面において、本発明は、副作用の減少した、哺乳類における遺伝子発現を調節する方法を提供する。本発明のこの局面に応じた方法において、本発明の第 1 の局面に応じた物質の組成物は哺乳動物に投与される（ここで、該オリゴヌクレオチドは哺乳動物に発現している遺伝子と相補的である）。20

第 3 の局面において、本発明は、異常な遺伝子発現によって生じる疾病を治療的に処置するための、副作用の低い方法を提供し、該方法は、該疾病を有する個体に本発明の第 1 の局面に応じた物質の組成物を投与することを含む（ここで、オリゴヌクレオチドは異常に発現した遺伝子と相補的であり、そのような異常な発現が疾病を引き起こす）。この状況において、異常な遺伝子発現は、ウイルスまたは原核性もしくは真核性病原体の増殖に必要な遺伝子の宿主生物における発現、または宿主細胞遺伝子の不適切な発現を意味する。宿主細胞遺伝子の不適切な発現には、そのような不適切な宿主細胞遺伝子の発現が疾病を引き起こすような細胞遺伝子の突然変異体アレルの発現または細胞遺伝子の正常なアレルの発現不足または過剰発現を含む。30

【図面の簡単な説明】

図 1 は、生理食塩水、従来のホスホロチオエートオリゴヌクレオチド（91）、メチルホスホネート - 修飾 C p G オリゴヌクレオチド（255）、インバーテッド C p G オリゴヌクレオチド（256）、および 5 - メチル C C p G オリゴヌクレオチド（257）を腹腔内投与した CD 1 マウスの血小板数の結果を示す。

図 2 は、生理食塩水、従来のホスホロチオエートオリゴヌクレオチド（91）、メチルホスホネート - 修飾 C p G オリゴヌクレオチド（255）、インバーテッド C p G オリゴヌクレオチド（256）、および 5 - メチル C C p G オリゴヌクレオチド（257）を腹腔内投与した CD 1 マウスの脾臓重量分析の結果を示す。40

図 3 は、生理食塩水、従来のホスホロチオエートオリゴヌクレオチド（1）、インバーテッド C p G オリゴヌクレオチド（2）、インバーテッド C p G オリゴヌクレオチド（3）、5 - メチル C C p G オリゴヌクレオチド（4）、メチルホスホネート - 修飾 C p G オリゴヌクレオチド（5）、2' - O - 置換オリゴヌクレオチド（6）を腹腔内投与した Fisher ラットの血小板の数（パネル A）、ALT レベル（パネル B）および AST レベル（パネル C）の分析の結果を示す。

好ましい態様の詳細な記載

本発明は遺伝子発現の実験およびアンチセンス治療法に有用な修飾オリゴヌクレオチドに関する。本明細書中に引用したすべての米国特許、特許公報および科学文献は、当該技術50

分野における知見レベルを明示するものであり、それゆえ参考のため本明細書に引用する。

本発明は、遺伝子発現を阻害し、従来のホスホロチオエートオリゴヌクレオチドより副作用の產生が少ない修飾オリゴヌクレオチドを提供する。特に、本発明は哺乳動物に投与される場合に、従来の C p G - 含有ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドに比較して、脾腫を低減し、かつ血小板の枯渇を減少させる結果となる修飾 C p G - 含有オリゴヌクレオチドを提供する。本発明は、遺伝子の異常発現により引き起こされる疾患治療のための使用を含む、イン・ビボでの遺伝子発現を調節するためにそのようなオリゴヌクレオチドを使用する方法さらに提供する。

第一の態様において、本発明は修飾 C p G - ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドおよび副作用が少なく特定の遺伝子発現を阻害する原因となる組成物を提供する。そのような遺伝子発現の阻害は細胞または動物モデルにおける特定の遺伝子の生物学的な機能を決定するための変異分析の別法として使用されることができる。遺伝子発現のそのような阻害はまた、ウイルスまたは病原体の遺伝子発現または細胞遺伝子の不適切な発現によって引き起こされる疾患を治療上処置するために使用することができる。

本発明のこの局面の好ましい一態様において、問題の組成物は 1 またはそれ以上の修飾 C p G ジヌクレオシドを有するホスホロチオエートオリゴヌクレオチドを含む。C p G ジヌクレオシドは 5' - C p G - 3' 、すなわち 5' から 3' の方向において、インターヌクレオシド結合により G ヌクレオシドに共有結合的に結合した C ヌクレオシドである。本発明の目的のため、C p G ジヌクレオシドはインターヌクレオシド結合がラセミ体ホスホロチオエート結合であります。C ヌクレオシドの 5' 位が水素原子で占められる場合に、「修飾されていない」と考えられるべきである。ある特に好ましい態様において、該オリゴヌクレオチド中に存在するすべての C p G ジヌクレオシドが修飾されている。本発明の目的のため、哺乳動物に投与されると、修飾されていないホスホロチオエート C p G ジヌクレオシドを有する他のすべての点では同一のオリゴヌクレオチドに関して、脾腫および血小板の枯渇を引き起こす弱い能力をオリゴヌクレオチドに付与することができるよう修飾されていない C p G ジヌクレオシドから変えられる場合に、C p G ジヌクレオシドは「修飾された」という。本発明の本局面によると、特定の遺伝子発現を低減した副作用で阻害する物質の組成物は、発現の阻害が望まれているゲノム領域の一部または遺伝子、またはそのような遺伝子から転写された R N A に相補的である修飾 C p G 含有ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドをいう。本発明の目的のためには、オリゴヌクレオチドなる語句には、2 またはそれ以上のデオキシリボヌクレオチドモノマー、リボヌクレオチドモノマーまたは 2' - O - 置換リボヌクレオチドモノマー、またはその任意の組み合わせのポリマーを含む。オリゴヌクレオチドなる語句にはまた、化学的に修飾した塩基または糖を有するポリマーおよび / または他の置換基、例えば、これらに制限するものではないが、親油性基、インターナレント剤 (intercalating agents) 、ジアミンおよびアダマンタンなどを有するポリマーを含む。本発明の目的のために「ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド」なる語句は、少なくとも 1 つのホスホロチオエートインターヌクレオシド結合、好ましくは約 20 % から約 100 % のホスホロチオエートインターヌクレオシド結合、および最も好ましくは約 50 % から約 100 % のホスホロチオエートインターヌクレオシド結合を含むオリゴヌクレオチドを意味する。好ましくはかかるオリゴヌクレオチドは約 12 ~ 約 50 ヌクレオチド、最も好ましくは約 17 ~ 約 35 ヌクレオチドを有するであろう。本発明の目的のためには、「2' - O - 置換」なる語句は、1 - 6 の飽和または不飽和炭素原子を含む - O - 低級アルキル基による、 - O - アリールまたはアリル (2 - 6 炭素原子を有する) 基 (かかるアルキル、アリールまたはアリル基は置換されていないか、または例えば、ハロ、ヒドロキシ、トリフルオロメチル、シアノ、ニトロ、アシル、アシルオキシ、アルコキシ、カルボキシル、カルボアルコキシまたはアミノ基により置換されていてよい) による、またはヒドロキシ、アミノまたはハロによる、ペントース残基の 2' 位の置換を意味するが、2' - H 基の置換ではない。「相補的」なる語句はゲノム領域、遺伝子、またはその R N A 転写産物に生理学的条件下でハイブリダイズする能力を有すること

10

20

30

40

50

を意味する。かかるハイブリダイゼーションは通常、相補鎖間での好ましくはワトソン - クリック型またはフーグスティーン型塩基対を形成する塩基特異的な水素結合の結果であるが、他の型の水素結合ならびに塩基積み重ねもまたハイブリダイゼーションに導き得る。実際問題として、かかるハイブリダイゼーションは特定の遺伝子発現阻害の観察から推論することができる。修飾オリゴヌクレオチド配列が相補的である遺伝子配列または RNA 転写配列は、修飾しようとされる生物学的效果に依存するであろう。いくつかの場合において、ゲノム領域、遺伝子またはその RNA 転写物はウイルス由来からのものである。好ましいウイルスには、これらに制限するものではないが、ヒト免疫不全ウイルス（1型または2型）、インフルエンザウイルス、単純ヘルペスウイルス（1型または2型）、エプスタイン - バーウイルス、サイトメガロウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、インフルエンザウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルスおよびパピローマウイルスが含まれる。他の場合においては、ゲノム領域、遺伝子またはその RNA 転写物は内生哺乳類（ヒトも含まれる）染色体DNAからのものであってよい。かかるゲノム領域、遺伝子またはその RNA 転写物の好ましい例には、これらに制限するものではないが、血管内皮増殖因子（VEGF）、アミロイド、DNAメチルトランスフェラーゼ、プロテインキナーゼA、ApoE 4 タンパク質、p - 糖タンパク、c - MYC タンパク質、BCL - 2 タンパク質およびCAPL をコードする配列を含む。更に別の場合には、ゲノム領域、遺伝子またはその転写物は真核または原核病原体、たとえば、これらに制限するものではないが、プラスモディウム・ファルシバルム (*Plasmodium falciparum*)、プラスモディウム・マラリエ (*Plasmodium malariae*)、プラスモディウム・オバレ (*Plasmodium ovale*)、スキストソーマ (*Schistosoma*) 種、およびマイコバクテリウム・ツベルクロシス (*Mycobacterium tuberculosis*) からのものであってよい。
10

本発明の修飾オリゴヌクレオチドに加えて提供される副作用の少ない遺伝子発現を抑制する組成物は、所望により、公知の医療上許容される担体または希釈剤を含んでいてもよい。この組成物はさらに1以上の追加の本発明のオリゴヌクレオチドを含んでいてもよい。別態様として、この組成物は、オリゴヌクレオチドホスホロチオエート、ハイブリッドオリゴヌクレオチド、キメラオリゴヌクレオチド等の慣例的なアンチセンスオリゴヌクレオチドの1以上を含んでいてもよく、また他の薬理活性剤を含んでいてもよい。

この観点から好ましい態様では、修飾 CpGジヌクレオチドは、アルキルホスホネートCpG、インバーテッドCpG、5' - メチルシトシンCpG、2' - O - 置換CpG、立体特異的ホスホロチオエートCpG、ホスホトリエステルCpG、ホスホルアミデートCpGおよび2' - 5' CpGから選ばれる。
30

アルキルホスホネートCpGは、そのCヌクレオシドとGヌクレオシドとがアルキルホスホネートインターヌクレオシド結合を介して互いに共有結合したCpGジヌクレオシドである。アルキルホスホネートCpG含有オリゴヌクレオチドは、アルキルホスホネートCpGジヌクレオシドを、アルキルホスホネートインターヌクレオシド結合のオリゴヌクレオチドへの標準的な導入方法によって製造する以外は、CpG含有オリゴヌクレオチドの製造に通常用いられる固相合成プロトコールを用いて有利に製造される。

この工程のとくに好ましい一つの方法はアイエルらの文献 [Iyer et al, Bio organic and Medicinal Chemistry Letters 6: 1393 - 1398 (1996)] に記載されている。好ましくは、アルキルホスホネート結合のアルキル部分は炭素数1 ~ 6の低級アルキル基で、それらは任意に置換されてもよいし、および / または置換されてもよい。最も好ましいアルキルホスホネートCpGはメチルホスホネートCpGである。
40

インバーテッドCpGは5' - GpC - 3'ジヌクレオシドである。インバーテッドCpG含有オリゴヌクレオチドは、GモノマーシントンをCモノマーシントンの代りに（およびその逆）用いる以外は、オリゴヌクレオチド製造に通常用いられる固相合成プロトコールを用いて製造される。

5' - メチルCpCpGは、そのCヌクレオシドがシトシン塩基の5位でメチル化されたCpGジヌクレオシドである。5' - メチルCpCpG含有オリゴヌクレオチドは、5' - メチルCモノマーシントンをCモノマーシントンの代りに用いる以外は、オリゴヌクレオチド
50

製造に通常用いられる固相合成プロトコールを用いて製造される。

2' - O - 置換 C p G は、ペントース部分の 2' 位が置換され、1 ~ 6 個の飽和または不飽和炭素原子を含む - O - 低級アルキル基または 2 ~ 6 個の炭素原子を有する - O - アリールまたはアリル基を有し、該アルキル、アリールまたはアリル基は非置換でもよく、またはハロゲン、ヒドロキシ、トリフルオロメチル、シアノ、ニトロ、アシル、アシルオキシ、アルコキシ、カルボキシ、カルボアルコキシまたはアミノで置換されていてもよく、またはヒドロキシ、アミノまたはハロゲン置換されていてもよいが 2' - H 基では置換されていてはならない。

最も好ましい 2' - O - 置換 C p G は、2' - O - メチルシトシン含有 C p G または 2' - O - メチルグアノシン含有 C p G または両者である。2' - O - 置換 C p G 含有オリゴヌクレオチドは、2' - O - 置換モノマーシントンをモノマーシントンの代りに用いる以外は、オリゴヌクレオチドの製造に通常用いられる固相合成プロトコールを用いて製造される。

ホスホトリエステル C p G は、その C ヌクレオシドおよび G ヌクレオシドがホスホトリエステルインターヌクレオシド結合を介して互いに共有結合した C p G ジヌクレオシドである。ホスホトリエステル C p G 含有オリゴヌクレオチドは、ホスホトリエステル C p G ジヌクレオシドを、ホスホトリエステルインターヌクレオシド結合のオリゴヌクレオチドへの標準的な導入方法によって製造する以外は、C p G 含有オリゴヌクレオチドの製造に通常用いられる固相合成プロトコールを用いて有利に製造される。この工程のとくに好ましい方法はアイエルらの文献 [Iyer et al, Tetrahedron Letters 37 : 1539 - 1542 (1996)] に記載されている。好ましいホスホトリエステル結合はメチルホスホトリエステル結合である。

ホスホルアミデート C p G は、その C ヌクレオシドと G ヌクレオシドとがホスホルアミデートインターヌクレオシド結合を介して互いに共有結合した C p G ジヌクレオシドである。ホスホルアミデート C p G 含有オリゴヌクレオチドは、ホスホルアミデート C p G ジヌクレオシドを、ホスホルアミデートインターヌクレオシド結合のオリゴヌクレオチドへの標準的な導入方法によって製造する以外は、C p G 含有オリゴヌクレオチドの製造に通常用いられる固相合成プロトコールを用いて有利に製造される。この工程のとくに好ましい方法はアイエルらの文献 [Iyer et al, Tetrahedron Letters 37 : 1539 - 1542 (1996)] に記載されている。最も好ましいホスホルアミデート結合は第 1 級ホスホルアミデートインターヌクレオシド結合である。

立体特異的ホスホロチオエート C p G は、その C ヌクレオシドと G ヌクレオシドとが立体特異的ホスホロチオエートインターヌクレオシド結合を介して互いに共有結合した C p G ジヌクレオシドである。立体特異的ホスホロチオエート C p G 含有オリゴヌクレオチドは、ホスホルアミデート C p G ジヌクレオシドを、立体特異的ホスホロチオエートインターヌクレオシド結合のオリゴヌクレオチドへの標準的な導入方法によって製造する以外は、C p G 含有オリゴヌクレオチドの製造に通常用いられる固相合成プロトコールを用いて有利に製造される。好ましくはアイエルらの文献 [Iyer et al, Tetrahedron Asymmetry 6 : 1051 - 1054 (1995)] に記載されている方法である。

2' - 5' C p G は、その C ヌクレオシドと G ヌクレオシドとが 2' - 5' インターヌクレオシド結合を介して互いに共有結合した C p G ジヌクレオシドである。2' - 5' C p G 含有オリゴヌクレオチドは、2' - 5' C p G ジヌクレオシドを、立体特異的ホスホロチオエートインターヌクレオシド結合のオリゴヌクレオチドへの導入方法によって製造する以外は、C p G 含有オリゴヌクレオチドの製造に通常用いられる固相合成プロトコール、例えば、ダファティらの文献 [Dougherty et al, J. Am. Chem. Soc. 114 : 6254 (1992)] またはハシモトおよびスウェイツァーの文献に記載の方法、を用いて有利に製造される。

C p G ジヌクレオシドの他の修飾は、ホスホロチオエートインターヌクレオシド結合を、これらに限られるものではないがホスホロジチオエート、アルキルホスホノチオエート、シロキサン、カーボネート、カルボキシメチルエステル、アセトアミデート、架橋メチレ

10

20

30

40

50

ンホスホネート、架橋ホスホロチオエート、およびスルホンインターヌクレオシド結合等を含む、他のインターヌクレオシド結合で置き換える場合が含まれる。

この観点から本発明の組成物の好ましい態様では、そのオリゴヌクレオチドは、「キメラ」または「ハイブリッド」オリゴヌクレオチドとして構成されるもので、それぞれ、米国特許第5149797号およびPCT公開WO94/02498号に記載される。概略説明すれば、キメラオリゴヌクレオチドは、イオン性インターヌクレオシド結合を有するオリゴヌクレオチド領域および非イオン性インターヌクレオシド結合を有するオリゴヌクレオチド領域を含有する。ハイブリッドオリゴヌクレオチドは、DNA含有オリゴヌクレオチド領域およびRNAまたは2'-O-置換RNA含有オリゴヌクレオチド領域を有する。当該技術分野の習熟者ならば、これらの好ましい態様の要素を組合せることもでき、また、発明者がそれらの組合せも意図していることは容易に理解し得るであろう。例えば、2'-O-置換リボヌクレオシド領域は非イオンインターヌクレオシド結合の1部または全部を含んでいてもよい。別態様では、非イオン領域は2'-O-置換リボヌクレオシドの1部または全部を有していてもよい。さらに、本発明のオリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート含有DNA領域によりフランキングされたオリゴヌクレオチドのコア領域に2'-O-置換または非イオン領域を含有する、またはその逆でもよく、また、さらに、1以上の2'-O-置換リボヌクレオチド領域および1以上の非イオン領域の組合せであって、その一方または双方がホスホロチオエート領域によりフランキングされているものを含有してもよい〔その合成技術はNucleosides & Nucleotides 14 : 1031 - 1035 (1995) を参照〕。

本発明の第二は、副作用を減じて哺乳動物において遺伝子発現を調節する方法を提供するものである。この観点による本発明方法では、第一の発明による組成物を哺乳動物に投与するものであって、その場合、オリゴヌクレオチドは哺乳動物で発現される遺伝子に相補的である。好ましくは、投与は非経口、経口、経鼻腔または直腸内投与にて行なわれる。オリゴヌクレオチドの総投与量は、好ましくは、約0.1mgオリゴヌクレオチド/kg/日から約200mgオリゴヌクレオチド/kg/日の範囲である。好ましい態様では、該組成物の投与により、脾腫および血小板減少の生物学的作用が、修飾CpGジヌクレオシドの代りに非修飾ジヌクレオシドを含む以外は同じであるオリゴヌクレオチドの同量を含む他の組成物を投与した場合の同作用に比べて、減少する。この好ましい生物学的效果はオリゴヌクレオチド投与前後の血小板の血中濃度を測定することによりモニターし得る。好ましくは、血小板は約20%以下、より好ましくは約10%以下で枯渇しうる。その生物学的效果は、オリゴヌクレオチド投与後の血清アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)および血清アスパルテートアミノトランスフェラーゼ(AST)濃度を測定することによっても観察し得る。好ましくは、血清ALTおよびASTを2.5倍以下、最も好ましくは2.0倍以下まで増加し得る。

第三の発明態様では、本発明は、副作用を抑えて、遺伝子発現異常に起因する疾病的治療方法を提供するものであり、該疾病を有する患者に本発明の第一の発明の組成物を投与することからなり、その場合、該オリゴヌクレオチドは異常に発現される遺伝子に相補的である。このように、これは、上記第二の発明の哺乳動物における遺伝子発現を調節する方法の好ましい例に相当する。本明細書では、遺伝子発現異常とは、宿主生物における、ウイルスや原核または真核病原体の増殖に必要な遺伝子の発現、または宿主細胞遺伝子の不適当な発現を意味する。不適当な宿主細胞遺伝子の発現は、細胞遺伝子の変異アレルの発現、または細胞遺伝子の正常アレルの発現不足または過剰発現を含み、それら不適当な宿主細胞遺伝子の発現により疾病が引き起される。好ましい投与方法は、非経口、経口、舌下、経皮、局所、経鼻または直腸内投与である。治療用組成物の投与は、公知の投与方法により疾病的症状または代用マーカーの減少をもたらす有効期間行う。全身的投与する場合は、治療用組成物は、オリゴヌクレオチドの血中濃度が約0.01μモル～約10μモルに達するに充分な量で投与するのが好ましい。局所投与の場合は、この濃度より相当低い濃度で有効であり、より高い濃度でも耐えられる。好ましくは、オリゴヌクレオチドの総用量が約0.1mgオリゴヌクレオチド/患者/日～約200mgオリゴヌクレオチド/体

重kg／日である。本発明の治療用組成物の1種または2種以上の治療有効量を、单一治療当たり、個体に同時にまたは順次に投与するのが好ましい。好ましい態様では、組成物を投与したのち、脾腫、血小板減少の生物学的効果が、修飾CpGジヌクレオシドの代りに非修飾CpGジヌクレオシドを含む以外は同じであるオリゴヌクレオチドの同量を含有する組成物を投与した場合に得られる効果に比べて減少する。この好ましい生物学的効果は、オリゴヌクレオチド投与前後の血小板血中濃度を測ることによりモニターできる。好ましくは、血小板は約20%以下、より好ましくは約10%以下で枯渇しうる。その好ましい生物学的効果は、オリゴヌクレオチド投与後の血清アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)および血清アスパルテートアミノトランスフェラーゼ(AST)濃度を測定することによっても観察し得る。好ましくは、血清ALTおよびASTを2.5倍以下、最も好ましくは2.0倍以下まで増加し得る。
10

以下の実施例は本発明のある種の好ましい態様をさらに説明するためのものであるが、本発明の範囲を限定するものではない。

実施例1

オリゴヌクレオチドの合成、脱保護および精製

- シアノエチルホスホルアミダイト法を用いた自動DNA合成機（モデル8700、バイオサーチ（Biosearch）、ベッドフォード、マサチューセッツ）を用いてオリゴヌクレオチドホスホチオエートを10マイクロモルスケールで合成した。ホスホチオエート結合を生成させるため、各カップリングの後に得られた中間体のホスファイト結合を3H, 1, 2 - ベンゾジチオール - 3H - オン - 1, 1 - ジオキシド（ボーケージ（Beaucage）
20
、Protocols for Oligonucleotides and Analogs: Synthesis and Properties, アグラワル（Agrawal）（編）、ヒューマナ・プレス、トトワ、ニュージャージー、33~62頁（1993）を参照）を用いて酸化した。ホスホジエステル結合を生成させるために同様の合成を行ったが、標準ヨウ素試薬を用いて標準酸化を行った。メチルホスホネートCpG含有オリゴヌクレオチドの合成も同様の仕方で行ったが、メチルホスホネート結合の組み立てはヌクレオシドメチルホスホルアミダイト（グレン・リサーチ（Glen Research）
、スターリング、バージニア）を用い、ついでテトラヒドロフラン / 2, 6 - ルチジン /
水（75 : 25 : 0.25）中の0.1Mヨウ素で酸化することにより行った（アグラワル & グッドチャイルド（Goodchild）、Tet. Let. 28 : 3539 ~ 3542 (1987)
30 参照）。オリゴヌクレオチドの脱保護および精製は、メチルホスホネート含有領域を含むオリゴヌクレオチド以外は標準法に従った（パドマブリヤ（Padmapriya）ら、Antisense Res. & Dev. 4 : 185 ~ 199 (1994)）。これらオリゴヌクレオチドについては、CpG - 結合オリゴヌクレオチドを濃水酸化アンモニウムで室温にて1時間処理し、上澄み液を除去し、蒸発させて薄黄色の残さを得、ついでこれをエチレンジアミン / エタノール（1 : 1、v / v）で室温にて6時間処理し、再び減圧下で乾燥させた。

実施例2

修飾CpG - 含有オリゴヌクレオチドを用いて減少したインビボ脾腫

CD-1マウスおよびフィッシャーラット（チャールズ・リバー・ラボラトリーズ（Charles River Laboratories）、レイレイ、ノースカロライナ）に、CpG - 含有ホスホチオエートオリゴヌクレオチド、メチルホスホネートCpG - 含有ホスホチオエートオリゴヌクレオチド、インバーテッドCpG - 含有ホスホチオエートオリゴヌクレオチド、5' - メチルCpG - 含有ホスホチオエートオリゴヌクレオチド、2' - O - 置換CpG、または対照としての食塩水を3 ~ 30mg / kg 体重の投与量で静脈内に毎日、7日間注射した。8日目に動物を安楽死させ、脾臓を取りだし、重さを計量した。メチルホスホネートCpG - 含有ホスホチオエートオリゴヌクレオチド、インバーテッドCpG - 含有ホスホチオエートオリゴヌクレオチド、5' - メチルCpG - 含有ホスホチオエートオリゴヌクレオチド、または2' - O - 置換CpGで処理した動物は、CpG - 含有ホスホチオエートオリゴヌクレオチドで処理した動物に比べて脾臓重量の増大が有意に小さかった。同様の結果は、ホスホトリエステルCpG - 含有ホスホチオエートオリゴヌクレオチド、ホスホルアミデートCpG - 含有ホスホチオエートオリゴヌクレオチ
40
50

ドおよび 2' - 5' C p G - 含有ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドについても観察されることが期待される。

実施例 3

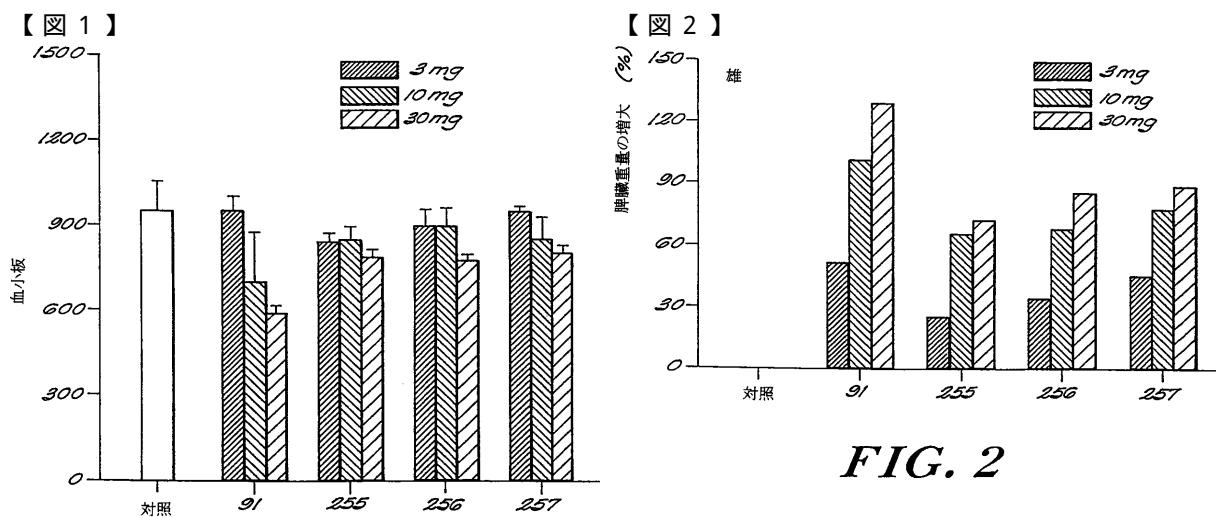
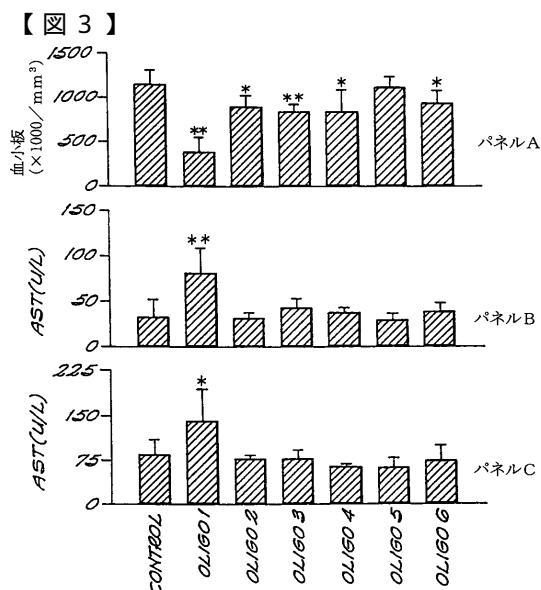
修飾 C p G - 含有オリゴヌクレオチドを用いて減少したインビボ血小板枯渇

C D - 1 マウスおよびフィッシャーラットに、C p G - 含有ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド、メチルホスホネート C p G - 含有ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド、インバーテッド C p G - 含有ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド、5 - メチル C C p G - 含有ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド、2' - O - 置換 C p G、または対照としての食塩水を 3 ~ 30 mg / kg 体重の投与量で静脈内に毎日、7 日間注射した。8 日目に動物から採血し、血小板数をカウントした。メチルホスホネート C p G - 含有ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド、インバーテッド C p G - 含有ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド、または 5 - メチル C C p G - 含有ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドで処理した動物は、C p G - 含有ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドで処理した動物に比べて血小板の枯渇が有意に小さかった。同様の結果は、ホスホトリエステル C p G - 含有ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド、ホスホルアミデート C p G - 含有ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドおよび 2' - 5' C p G - 含有ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドについても観察されることが期待される。10

実施例 4

修飾 C p G - 含有オリゴヌクレオチドを用いて減少した血清 A L T および A S T レベルのインビボ上昇

C D - 1 マウスおよびフィッシャーラットに、C p G - 含有ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド、メチルホスホネート C p G - 含有ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド、インバーテッド C p G - 含有ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド、5 - メチル C C p G - 含有ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド、2' - O - 置換 C p G、または対照としての食塩水を 3 ~ 30 mg / kg 体重の投与量で静脈内に毎日、7 日間注射した。8 日目に動物から採血し、ロシュ・コバ・ファラ・ケミストリー・アナライザー (Roche Cobas Fara Chemistry Analyzer) (ロシュ・ダイアグノスティック・システムズ (Roche Diagnostic Systems)、プランチバーグ、ニュージャージー) を用いて血清 A L T および A S T レベルを測定した。メチルホスホネート C p G - 含有ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド、インバーテッド C p G - 含有ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド、5 - メチル C C p G - 含有ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドまたは 2' - O - 置換 C p G 含有ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドで処理した動物は、C p G - 含有ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドで処理した動物に比べて血清 A L T および A S T レベルの上昇が有意に小さかった。同様の結果は、ホスホトリエステル C p G - 含有ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド、ホスホルアミデート C p G - 含有ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドおよび 2' - 5' C p G - 含有ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドについても観察されることが期待される。2030

**FIG. 1****FIG. 2****FIG. 3**

フロントページの続き

(74)代理人 100156111

弁理士 山中 伸一郎

(72)発明者 アグラワル, サドヒル

アメリカ合衆国 01545 マサチューセッツ州 シュルーズベリー、ランプライター・ドライブ 61
番

合議体

審判長 内田 淳子

審判官 天野 貴子

審判官 大久保 元浩

(56)参考文献 Quyan Zhao et al., 1996年 1月15日, Vol. 51, pp. 173 - 182

Ivan Habus et al., Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 1996年, Vol. 6, No. 12, pp. 1393 - 1398

Arthur M. Krieg et al., Nature, 1995年, Vol. 374, No. 6, pp. 546 - 549

Glenn D. Hoke et al., Nucleic Acids Research, 1991年, Vol. 19, No. 20, pp. 5743 - 5748

Jeannette M. Campbell et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 1990年, Vol. 20, pp. 259 - 267

Ulla M. Sarmiento et al., Antisense Research and Development, 1994年, Vol. 4, pp. 99 - 107

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07H21/00

C12N15/00

CA, MEDLINE, BIOSIS/STN