

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3662027号

(P3662027)

(45) 発行日 平成17年6月22日(2005.6.22)

(24) 登録日 平成17年4月1日(2005.4.1)

(51) Int. Cl.⁷

C 1 2 N 15/09

C 1 2 Q 1/68

// A 6 1 K 31/70

A 6 1 K 48/00

F I

C 1 2 N 15/00

Z N A A

C 1 2 Q 1/68

A

A 6 1 K 31/70

A 6 1 K 48/00

請求項の数 25 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願平9-511772	(73) 特許権者	エグズィリオン ゲーエムペーハー アン ド カンパニー カーゲー
(86) (22) 出願日	平成8年9月13日(1996.9.13)		ドイツ国, フランクフルト アム マイン 6 5 9 2 6
(65) 公表番号	特表平11-514220	(74) 代理人	弁理士 稲葉 良幸
(43) 公表日	平成11年12月7日(1999.12.7)		
(86) 国際出願番号	PCT/GB1996/002275	(74) 代理人	弁理士 田中 克郎
(87) 国際公開番号	W01997/010332		
(87) 国際公開日	平成9年3月20日(1997.3.20)	(74) 代理人	弁理士 大賀 真司
審査請求日	平成15年8月13日(2003.8.13)	(72) 発明者	シュミット, ギュンター
(31) 優先権主張番号	9518864.5		イギリス国, キャンプス ビーイー 1 7
(32) 優先日	平成7年9月14日(1995.9.14)		2 ビーキュー ホートン, ホートン マナ ー
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 キメラオリゴヌクレオチド及びアンチセンス結合部位の確認におけるそれらの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

mRNAにハイブリダイズして二本鎖を形成することのできる各々異なるキメラオリゴヌクレオチドであって、各々のヌクレオチド配列が7～20塩基の共通の長さを有し、各々がランダムにまたは標的mRNAの配列を特徴づける情報により生成したものであるものを複数含む、標的mRNAのアンチセンス結合部位の確認に使用するためのキメラオリゴヌクレオチドライブラリーであって、標的mRNA中に存在する共通する長さのヌクレオチド配列に相補的な配列からなるオリゴヌクレオチドの実質的に全てが該ライブラリー中に存在し、且つ各ヌクレオチド配列が

a) mRNAにハイブリダイズしたときに二本鎖切断RNアーゼにより認識され得るヌクレオチド配列を含む認識領域と、

b) mRNAに十分に強固に結合して、二本鎖切断RNアーゼによる二本鎖のmRNAの切断のために、二本鎖を安定化する化学的に修飾されたヌクレオチドの配列を含むフランキング領域と、からなり、該フランキング領域を構成するヌクレオチドが認識領域を構成するヌクレオチドとは異なるものであり、そして、各オリゴヌクレオチドがエキソヌクレアーゼの攻撃から保護されているライブラリー。

【請求項 2】

前記ヌクレオチド配列の共通の長さが、10～20塩基である請求項 1 記載のライブラリー。

【請求項 3】

前記認識領域が、mRNAにハイブリダイズしたときにRNアーゼHにより認識され得るヌクレ

10

20

オチド配列を含む請求項1または2記載のライブラリー。

【請求項4】

前記認識領域を構成するヌクレオチドが、デオキシリボヌクレオチドまたはホスホロチオエートデオキシリボヌクレオチドである請求項1～3のいずれか1項に記載のライブラリー。

【請求項5】

前記認識領域が少なくとも4個のヌクレオチドを含む先行する請求項のいずれか1項に記載のライブラリー。

【請求項6】

前記認識領域が、5～10個のヌクレオチドを含む請求項5記載のライブラリー。

10

【請求項7】

前記ランキンク領域を構成する化学的に修飾されたヌクレオチドが、糖部分で2'修飾されている先行する請求項のいずれか1項に記載のライブラリー。

【請求項8】

前記化学的に修飾されたヌクレオチドが、2'-Oメチルリボヌクレオチドまたは2'-Oアリルリボヌクレオチドである請求項7記載のライブラリー。

【請求項9】

前記認識領域を構成するヌクレオチドが、デオキシリボヌクレオチドまたはホスホロチオエートデオキシリボヌクレオチドである請求項1～3のいずれか1項に記載のライブラリー。

20

【請求項10】

前記ランキンク領域を構成する化学的に就職されたヌクレオチドが、リン酸部分で修飾され、ホスホン酸メチル、トリエステル、ホスホルアミデート、ホスホロジチレート、ボランホスフェート同族体である請求項1～6のいずれか1項に記載のライブラリー。

【請求項11】

前記ヌクレオチド配列が、前記認識領域の両側に一つずつの二つのランキンク領域を有する先行する請求項のいずれか1項に記載のライブラリー。

【請求項12】

前記ランキンク領域の各々が、エキソヌクレアーゼの攻撃に対して保護されている請求項11に記載のライブラリー。

30

【請求項13】

前記ランキンク領域の各々がリバースTにより保護されている請求項12に記載のライブラリー。

【請求項14】

オリゴヌクレオチド配列シンセサイザーによりランダムに生成され、少なくとも 10^6 の各々異なるヌクレオチド配列を含む先行する請求項のいずれか1項に記載のライブラリー。

【請求項15】

既知配列の標的mRNAの配列を特徴づける情報により、オリゴヌクレオチド配列シンセサイザーに該情報をプログラムし、それぞれ標的mRNA配列の一部に相補的で共通の長さを有する各々異なるオリゴヌクレオチドを生成させることにより生成される請求項1～13のいずれか1項に記載のライブラリー。

40

【請求項16】

標的mRNA中のアンチセンス結合部位の確認法における、先行する請求項のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチドライブラリーの使用であって、

前記オリゴヌクレオチドライブラリーが、各々が7～20塩基の共通の長さを有し、且つ各々がmRNAにハイブリダイズした場合に二本鎖切断RNアーゼのための基質を含む各々異なるヌクレオチド配列を複数含み、該ライブラリーが、ランダムにまたは標的mRNAの配列を特徴づける情報により生成されるものであり、その結果、標的mRNA中に存在する共通の長さのヌクレオチド配列に相補的な配列からなるオリゴヌクレオチドの実質的に全てが該ライブラリー中に存在する、オリゴヌクレオチドライブラリーの使用。

50

【請求項 17】

各ヌクレオチド配列が、ホスホロチオエートデオキシリボヌクレオチド配列を含む請求項16記載の使用。

【請求項 18】

前記ヌクレオチド配列の共通の長さが、10～20塩基である請求項16または17に記載の使用。

【請求項 19】

標的mRNAのアンチセンス結合部位を確認する方法であって、

1) 標的mRNAがアンチセンス結合部位で切断される条件下で、標的mRNAと共に、オリゴヌクレオチドライブラリー及び二本鎖切断RNアーゼをインキュベートする工程、及び

2) mRNAの切断部位からアンチセンス結合部位を確認する工程を含み、

該オリゴヌクレオチドライブラリーが、請求項1～15のいずれか1項に記載されたものである、方法。

10

【請求項 20】

前記二本鎖切断RNアーゼが細胞抽出物由来である請求項19記載の方法。

【請求項 21】

前記細胞抽出物が、さらに標的mRNAを含む請求項20記載の方法。

【請求項 22】

前記mRNAの切断部位が単離された切断標的mRNAをシーケンスすることにより決定される請求項19～21のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項 23】

前記切断標的mRNAが単離の前に増幅される請求項22記載の方法。

【請求項 24】

前記切断標的mRNAが逆転写酵素及びポリメラーゼ連鎖反応により増幅される請求項23記載の方法。

【請求項 25】

請求項19～24のいずれか1項に記載の方法により、アンチセンス結合部位を確認する工程と、該部位に結合することのできるオリゴヌクレオチドを合成する工程と、を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドの製造方法。

【発明の詳細な説明】

30

発明の分野

本発明は、オリゴヌクレオチドライブラリー、特にキメラオリゴヌクレオチド、及び標的mRNAのアンチセンス結合部位の確認及び潜在的な治療用薬剤の提供におけるそれらの使用に関する。

発明の背景

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、遺伝物質のコードまたは“センス”鎖に相補的な一本鎖核酸である。従って、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、遺伝物質から生成するmRNAにも相補的である。アンチセンスDNAまたはRNAがmRNAと共に細胞内に存在すると、ハイブリダイゼーションが起り、二本鎖が形成され、これによりmRNAがリボソームによりタンパク質を合成するのが妨げられる。従って、アンチセンスRNAは、タンパク質を合成する遺伝子の発現を阻止するのに使用することができる。

40

遺伝子発現を抑制するためのアンチセンスのアプローチは、概念的には簡単であるが、技術的には努力を要するものである。様々な大学のグループ及びバイオテクノロジーの会社により、様々な取り組みがなされてきた。オリゴヌクレオチドは、2'-Oアリルリボヌクレオチドのような糖修飾、及びホスホロチオエートデオキシリボヌクレオチドのようなリン酸基の主鎖修飾を用いて合成されてきた。しかしながら、特定の標的mRNAに対して潜在的に有効なアンチセンス化合物を確認する方法は極めて困難であるため、アンチセンス療法、標的医薬の確認のための試薬または手段として適用するための個々のオリゴヌクレオチドの製造は妨げられてきた。mRNAの三次元構造及びRNAとタンパク質との会合のため、既知の配列のmRNAでさえ、標的mRNA中のどのような副配列がアンチセンス結合に利用され

50

得るかを予測するのは困難であることが多い。

化学的に修飾されたオリゴヌクレオチドを用いる別のアプローチとして、Lieber及びStrauss（参考文献22）は、標的RNAの開裂部位を選択するためのリボザイム発現ライブラリーの使用を報告している。このリボザイムのアプローチには、GUCまたはCUCを含有する開裂部位が必要であるため、全ての可能な開裂部位に一般的に適用することはできないという欠点がある。さらに、開裂の効率は比較的低く、リボザイムライブラリーの化学合成は困難である。

発明の要約

一つの観点によると、本発明は、mRNAにハイブリダイズして二本鎖を形成することのできる各々異なるキメラオリゴヌクレオチドであって、各々のヌクレオチド配列が7〜20塩基の共通の長さを有し、各々がランダムにまたは標的mRNAの配列を特徴づける情報により生成したものであるものを複数含む、標的mRNAのアンチセンス結合部位の確認に使用するためのキメラオリゴヌクレオチドライブラリーであって、標的mRNA中の副配列として存在する共通する長さの配列の実質的に全てが該ライブラリー中に存在し、且つ各ヌクレオチド配列が a) mRNAにハイブリダイズしたときに二本鎖切断RNアーゼにより認識され得るヌクレオチド配列を含む認識領域、及び b) mRNAに十分に強固に結合して、二本鎖切断RNアーゼによる二本鎖のmRNAの切断のために、二本鎖を安定化する化学的に修飾されたヌクレオチドの配列を含むフランキング領域を含み、該フランキング領域を構成するヌクレオチドが認識領域を構成するヌクレオチドとは異なるものであり、そして、各オリゴヌクレオチドがエキソヌクレアーゼの攻撃から保護されているものに関する。

mRNAはヒトもしくは他のほ乳類由来、または無脊椎動物由来である。ここで使用されるmRNAの語は、植物、ウイルス及び細菌由来の対応するRNAをも含む。

キメラオリゴヌクレオチド

ライブラリーを形成する各キメラオリゴヌクレオチドは、一般的に入手可能なオリゴヌクレオチド配列シンセサイザーを用いて合成され得る。ヌクレオチド配列の的確な長さは、必要な特性を達成することと、コストをできるだけ低減するために長さを最短に維持することとのバランスを反映する。好ましくは、該ヌクレオチド配列の長さは、10〜20塩基の範囲、より好ましくは14〜17塩基、さらに好ましくは約15塩基である。

オリゴヌクレオチドは好ましくは、細胞内での分解を最小限にとどめ、安定性を高めるために、ヌクレアーゼの攻撃に対して保護されている。これは、治療用のアンチセンス化合物を目的とする場合に特に重要である。エキソヌクレアーゼの攻撃に対する保護は、オリゴヌクレオチドの一端または好ましくは両端を、例えばリバースTまたは他の良く知られた方法により保護することにより行われる。いくつかのヌクレオチドは他のものに比べてヌクレアーゼ抵抗性が高いので、認識及びフランキング領域を構成するヌクレオチドを選択することも、ヌクレアーゼに対する安定性に寄与し得る。

好ましくは、各キメラオリゴヌクレオチドは、認識領域の両側に一つずつの二つのフランキング領域を含む。このようにして、認識領域は、二つのフランキング領域によりフランクされ、その結果、mRNAと共に二本鎖一切断RNアーゼのための基質を形成する“ウィンドウ”として考えられる。好ましい実施態様においては、フランキング領域の各々が、好ましくはリバースTにより、エンドヌクレアーゼの攻撃から保護されている。好ましい二本鎖切断RNアーゼは、RNアーゼHであり、内在性RNアーゼH（参考文献23）が有利である。認識領域を構成するヌクレオチドは、修飾されたヌクレオチドでも非修飾ヌクレオチドでも良い。好ましくは、デオキシリボヌクレオチドまたはホスホロチオエートデオキシリボヌクレオチドである（図4c参照）。これらのヌクレオチドは、mRNAにハイブリダイズしたときに、RNアーゼHにより認識される。典型的には、認識領域は、少なくとも4個のヌクレオチドを含み、好ましくは5〜10個のヌクレオチドを含む。特に好ましい実施態様においては、認識領域は5個のヌクレオチドを含む。

フランキング領域を構成するヌクレオチドはオリゴヌクレオチドの標的mRNAへのハイブリダイゼーションの結合定数が大きくなり、好ましくはin vivoでのオリゴヌクレオチドの安定性が高まるように、化学的に修飾される。特に好ましいアンチセンスオリゴヌクレオ

10

20

30

40

50

チドにおいては、mRNAへのハイブリダイゼーションの効率は濃度の関数である。従って、特定の濃度においてハイブリダイゼーションを改良するためには、ハイブリダイズした二本鎖の安定性を高めなければならない。この目的のためにオリゴヌクレオチドに導入することができる化学的修飾は数多くあり、三つの広いクラスに分けられる（図1、領域1、2及び3参照）。

糖の修飾

糖部分における2'位置に、様々な修飾を行うことができる。例えば、2'-Oメチルオリゴヌクレオチド及び2'-Oアシルオリゴヌクレオチドの両者が有用で有り得る（参考文献1及び2並びに図2a及びb参照）。これらの同族体は、RNアーゼHの基質となるRNAとのハイブリッド二本鎖を形成しない。本発明の特に好ましい実施態様においては、各々が修飾された糖を含有するオリゴヌクレオチドの一つを4または5個有する二つのフランキン

10

塩基修飾

フランキン領域を構成する化学的に修飾されたヌクレオチドは、塩基部分で修飾されていても良い。dT及びdCのプロピン同族体、5-プロピニルデオキシウリジン（図3a参照）、及び5-プロピニルデオキシシチジン（図3b参照）、両者とも二本鎖ハイブリダイゼーション温度を上昇させ、二本鎖を安定化する。この安定化は、ワトソンクリック対に対する水素結合の強度の増加、または塩基スタッキングの増加（またはその両方）に起因すると考えられる。2-アミノアデニンは、dAの同族体であり（図3c参照）、これも二本鎖の安定性を強化する。これは、チミンとの第三の水素結合の形成に起因すると考えられる。2-アミノアデニン-チミン塩基対は、GC及びAT塩基対の中間の安定性である。

20

リン酸修飾

フランキン領域を構成する化学的に修飾されたヌクレオチドは、リン酸部分で修飾されていても良い。低い塩濃度のような一定の条件の下では、ホスホン酸メチル（図4a）、トリエステル（図4b）及びホスホルアミデート（図4c）のような同族体は、二本鎖安定性を高めることが示された。このハイブリダイゼーション二本鎖はRNアーゼHの基質ではない。他のリン酸修飾には、ホスホロジチレート（phosphorodithirite）（図4d）及びボラン

30

ホスフェート（図4f）が含まれ、各々オリゴヌクレオチドの安定性を高める。リンの硫黄による等量置換により、オリゴヌクレオチドがヌクレアーゼ抵抗性になる（参考文献14参照）。リンまたは結合する酸素の炭素による置換も可能である（図5参照）。使用に際して、本発明のキメラオリゴヌクレオチドは、標的mRNAにアンチセンス結合部位で特異的に結合するアンチセンス化合物として作用し、その結果、ここで二本鎖切断RNアーゼによるmRNAの開裂または切断が起こる。このキメラオリゴヌクレオチドは、標的mRNAに結合して二本鎖を形成するであろう。認識領域は、二本鎖切断RNアーゼにより認識される。フランキン領域は、二本鎖を十分に安定にして、RNアーゼが二本鎖のmRNAを効率的に切断できるようにする。一度切断されると、mRNAとオリゴヌクレオチドは離れ、これによりオリゴヌクレオチドの他のmRNAへの結合が可能になる。このようにして、キメラオリゴヌクレオチドは触媒的に作用する。

40

オリゴヌクレオチドライブラリー

別の観点において、本発明は、標的mRNA内のアンチセンス結合部位の確認法におけるオリゴヌクレオチドライブラリーの使用を提供する。ここで、オリゴヌクレオチドライブラリーは、各々が7~20塩基、好ましくは10~20塩基の共通の長さを有し、且つ各々がmRNAにハイブリダイズした場合に二本鎖切断RNアーゼのための基質を含む各々異なるヌクレオチド配列を複数含み、このライブラリーは、ランダムにまたは標的mRNAの配列を特徴づける情報により生じるものであり、その結果、標的mRNAに副配列として存在する共通の長さを有するヌクレオチドの実質的に全てがライブラリー中に存在する。前記のように、このヌ

50

クレオチド配列は、修飾されたヌクレオチド、例えばホスホロチオエートを含んでいても良い。このヌクレオチドはキメラでも非キメラでも良い。

一つの実施態様において、このライブラリーは、オリゴヌクレオチド配列シンセサイザーによりランダムに生じさせたものである。配列をランダムに生じさせる目的は、特定の長さのヌクレオチドを可能な限り全て生じさせることにある。

10塩基の長さ（10-mer）の配列については、可能性の全てをカバーするには、 4^{10} の各々異なるヌクレオチド配列を生じさせる必要があるであろう。これは、約 10^6 の各々異なるヌクレオチド配列に換算される。15-merについては、ライブラリーは、約 $10^9 \sim 10^{10}$ のヌクレオチド配列を必要とするであろう。各ヌクレオチドは、共通の長さを有するであろう（即ち、それらは全て10-merであるか、全て11-merである等である）。この目的のためには、アプライドバイオシステム（Applied Biosystem）により供給されているような任意の一般的に入手し得るオリゴヌクレオチド配列シンセサイザーを使用することができる。適当にプログラムされた装置に、適当なヌクレオチドまたは修飾されたヌクレオチドを用いて、4つの可能性のある塩基を全て供給する。

他の実施態様においては、ヌクレオチド配列を、ランダムに生じさせる代わりに、標的mRNAの配列を特徴づける情報により生じさせる。標的mRNAの配列は、知られている必要があり、オリゴヌクレオチド配列シンセサイザーにプログラムされ得る。例えば、450ヌクレオチドのmRNAを生じる遺伝子の場合、合計で436の各々異なるヌクレオチド配列により、15-merのライブラリーが形成されるであろう（即ち、mRNAの長さからヌクレオチドの長さを引き、1を加える）。このようにして、mRNAの全ての可能な配列がライブラリー内で表されるであろう。これは、潜在的に有用なヌクレオチド配列が、ランダムに生成した標的mRNA内には存在しない配列により希釈されることがないため、ライブラリーのランダムな形成よりも有利である。mRNAの副配列の全てが、形成されるライブラリー内に存在することを保証する別の方法は、450ヌクレオチドのmRNAの場合、30の15-merを生じさせることである（即ちヌクレオチド配列の長さでmRNAの長さを割る）。

別の観点において、本発明は、下記の工程：

- 1) 標的mRNAがアンチセンス結合部位で切断される条件下で、標的mRNAと共に、オリゴヌクレオチドライブラリー及び二本鎖切断RNアーゼをインキュベートする工程、及び
- 2) mRNAの切断部位からアンチセンス結合部位を確認する工程を含み、該オリゴヌクレオチドライブラリーが、各々が7～20塩基、好ましくは10～20塩基の共通の長さを有し、且つ各々がmRNAにハイブリダイズした場合に二本鎖切断RNアーゼのための基質を含む各々異なるヌクレオチド配列を複数含み、このライブラリーは、ランダムにまたは標的mRNAの配列を特徴づける情報により生じるものであり、その結果、標的mRNA内に副配列として存在する共通の長さを有するヌクレオチドの実質的に全てがライブラリー中に存在する標的mRNAのアンチセンス結合部位を確認する方法を提供する。

このようにオリゴヌクレオチドライブラリーを使用すると、標的mRNAにおける1またはそれ以上のアンチセンス結合部位の確認が可能になり、そのような確認は、公知の方法に比べて非常に迅速に行い得る。このアンチセンス結合部位の確認は実験的なものである。mRNAの三次元構造についての情報は要求されない。標的mRNAとオリゴヌクレオチドライブラリーと二本鎖切断RNアーゼとのインキュベーションは、反応条件を適当に変えることにより、1またはそれ以上のアンチセンス結合部位で切断された標的mRNAを生成し得る。これは、ライブラリーが、そのような結合部位に相補的な1またはそれ以上のオリゴヌクレオチドを含み、適当な条件下でそこに結合して二本鎖を生じるであろうからである。

二本鎖は、二本鎖切断RNアーゼの基質として作用する。mRNAが結合部位で切断されると、オリゴヌクレオチドが放出され、これにより別の結合に利用可能になる。したがって、オリゴヌクレオチドは触媒的に作用し、二本鎖切断RNアーゼは酵素的に作用する。二本鎖切断RNアーゼはオリゴヌクレオチドライブラリーとは別個のものであり、好ましくは細胞抽出物由来のものである。好ましくは、二本鎖切断RNアーゼはRNアーゼHである。標的mRNAも好ましくは細胞抽出物由来である。従って、RNアーゼH及びmRNAが同じ細胞抽出物に存在し、これとオリゴヌクレオチドライブラリーがインキュベートされるのが有利である。

mRNA内の切断部位は、単離された切断mRNAをシーケンスすることにより決定され得る。好ましくは、単離前に、切断標的mRNAを、例えば逆転写及びポリメラーゼ連鎖反応により増幅する。

一度アンチセンス結合部位がmRNA内の切断部位から確認され、シーケンスされれば、該部位に結合し得るアンチセンスオリゴヌクレオチドを合成し得る。このようにして、アンチセンスオリゴヌクレオチドの製造方法が提供される。従って、上記で論じたタイプのキメラオリゴヌクレオチドが得られる。そのようなキメラオリゴヌクレオチドの重要な用途は、標的mRNAにおいて特定のアンチセンス結合部位にハイブリダイズすることのできる治療用薬剤としてのものである。このキメラオリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列は、この目的のためにはアンチセンス結合部位に特異的である必要がある。

10

要約すれば、ここで論じるライブラリーのアプローチを用いれば、特定の標的mRNAに有効なアンチセンス化合物の最適の配列を確認できる。アンチセンス化合物は、潜在的な治療薬として、標的薬物の確認の手段として、診断に、及び研究用試薬として有用である。ここで、添付図面を参照しながら、本発明をさらに詳細に説明するが、これは例示にすぎない。

図1は、ヌクレオチドの一般化した構造を示す。

図2は、ヌクレオチドに存在する糖部分の一般化した構造を示す。

図3は、ヌクレオチド内の修飾された塩基部分の一般化した構造を示す。

図4は、ヌクレオチド内の修飾されたリン酸部分の一般化した構造を示す。

図5は、ヌクレオチド内のリン酸部分の等量修飾を示す。

20

図6は、切断されたmRNAからアンチセンス結合部位を確認するための方法の模式図を示す。

図7a及び7bは、標準及びサンプルのオリゴヌクレオチドの量に対する蛍光強度を示す測定グラフを示す。

図8乃至図12は、TNF α mRNAの二次構造及びその切断部位のコンピューター予測を示す。

ヌクレオチド修飾

図1はヌクレオチドの一般化した構造を示し、該構造においては、塩基2は糖1に結合し、リン酸3は糖リン酸エステル主鎖において糖と次の糖とを連結する。図2によると、置換基Aは、O-アルキル基、アリール基、またはアルカリール基である（特にO-Me）（参考文献1参照）。もしくは、置換基Aは、O-アリール基（参考文献2）、F（参考文献3）、またはNH₂（参考文献4）でもあり得る。

30

図3a、3及び3cに示した塩基は、各々参考文献5、6及び7で論じられている。図4を参照すると、下記の表Iに要約されているように、種々のリン酸修飾がなされ得る。

X	Y	Ref
CH ₃	O	8
OR	O	9
S	O	10
S	S	11
NHR	O	12
BH ₃	O	13

R = 任意のアルキル

40

図5を参照すると、リン酸部分は、下記の表IIに従って、置換し得る。

X	Y	Z	Ref
O	CH ₂	O	15
O	CH ₂	S	16
S	CH ₂	O	17
O	C=O	O	18
O	C=O	NH	19
CH ₂	NH	O	20
CH ₂	NCH ₃	O	

50

CH₂ O NCH₃ 21

実施例 1

以下、図 6 を参照して、標的 mRNA 内のアンチセンス結合部位を確認するための、及びその結合部位に関するアンチセンスキメラオリゴヌクレオチドを製造するための好ましい方法を説明する（参考文献 22 も参照）。

ここに記載したタイプのキメラオリゴヌクレオチドライブラリーを、mRNA 基質とインキュベートする。この実施例において、標的 mRNA は細胞抽出物中の TNF- α mRNA である。インキュベーションは 1 ～ 3 時間行なう。図 6 の工程 1 に示すように、二つの切断部位が各々 0.15% 及び 0.05% の収量で得られる。標的 mRNA のほとんど（99.8%）は、未切断である。この工程において、N 及び n は、上記ヌクレオチドの化学のセクションで論じたような、各々異なるヌクレオチドを示す。このライブラリーは、完全にランダムであっても（すなわち 10⁹ 種類のオーダー）、標的 TNF- α に特異的であっても（すなわち 1600 種類のオーダー）よい。

工程 2 により、逆転写酵素（RT）を用いて、第一の cDNA 鎖を合成する。mRNA 断片は、ポリ A テールを有しているの、オリゴ dT をプライマーとして使用する。アルカリ性条件下での加熱変性により、第一の cDNA の一本鎖が得られる。工程 3 により第一の cDNA 鎖を dC または dG でテーリングして、少なくとも 10、通常 10 ～ 100 の塩基を得る。ここで、全ての生成物（標的 mRNA 及び非標的 mRNA を含む）は、dT 及び dC または dG テールを有する。

工程 4 において、問題の遺伝子に特異的なプライマーをポリ A 部位の 5' 側領域にデザインする。該遺伝子及び dG（dC）テーリングに相補的なプライマーを用いて PCR を行い、完全長の標的 mRNA 及び切断された標的 mRNA の生成物を増幅する。

工程 5 において、分離またはポリアクリルアミドゲル電気泳動により、PCR 生成物を分析する。このようにして、切断された生成物を、完全長の標的 mRNA から大きさにより分離する。切断された生成物は、小さなバンドとして確認され、ゲル精製により精製できる。この段階で、RNアーゼ H の切断効率を、染色の強度を見ることにより測定することができる（例えばエチジウムブロマイド染色アガロースゲル）。潜在的なアンチセンス医薬の有効性は、切断効率に依存する。従って、この段階で優勢なバンドは、RNアーゼ H により最も有効に切断され、有効であり得る生成物と確認されるであろう。ブルースクリプト（Blue script）のような細菌ベクターにおけるクローニングのために選択されるのは、これらのバンドである。

図 6 の工程 6 により、3' 末端チミジン有する T ベクターを用いて、切断断片の TA クローニングが行なわれる。切断断片を PCR により増幅し、PCR 反応の間、シングルのデオキシアデノシン（dA）を添加する。有効な化合物の特定の認識配列を確認するために、クローニングされた切断 RT PCR 生成物をシーケンスする。該生成物の末端は、ジデオキシシーケンスにより、シーケンスされ、その特異的部位は、工程 3 で製造されたポリ G またはポリ C に続くであろう。従って、各アンチセンス結合部位の部分的配列は、この方法で確認され、アンチセンス結合部位の全配列は、シーケンスデータバンクから推定される。この全配列の情報は、適当なオリゴヌクレオチド（例えば他のキメラオリゴヌクレオチド）の合成に使用され、細胞ベースの系における有効性について適当な対照を用いて試験され得る。例えば、非アンチセンスメカニズムが影響している可能性を排除するためには、対照として、有効な配列または同じ残基を含有する配列のランダム化した変異体及び対応するセンス配列の両方が用いられるであろう。

実施例 2

TNA α mRNA に対して最適なアンチセンス活性を有するオリゴヌクレオチドの確認

キメラオリゴヌクレオチドライブラリーを標的 mRNA、この場合は TNA α 遺伝子のものと共にインキュベートした。

実験方法：

アンチセンスオリゴヌクレオチドライブラリーの構築

特定の mRNA ハイブリダイゼーションに要求されるアンチセンスオリゴヌクレオチドの最適長さを調べるために、8nt 及び 12nt のオリゴヌクレオチドライブラリーが、Oswel DNA Ser

10

20

30

40

50

vices Ltd.により合成された。このライブラリーは下記のものを含む：

- ・可能な全配列の組み合わせを含むランダムヌクレオチド配列
- ・下記に対する特異的アンチmRNA配列

シリーズ1:5'非翻訳キャップ領域（mRNAのヌクレオチド1～96、付表1参照）

シリーズ2:mRNA転写物の範囲内の安定なステムループ領域（mRNAのヌクレオチド1225～1321、付表2参照）

シリーズ3:mRNAの3'非翻訳領域（mRNAのヌクレオチド1489～1585、付表3参照）

in vitro転写構築物の製造

下記のdUTP含有プライマーを用いて、TNF α cDNAをpE4から増幅した（ATCCから得られるTNF α cDNA構築物）。 10

F1（センス） 5'-CAUCAUCACAUTTCTGCTCTAAAAGCTGCTG-3'

R2（アンチセンス） 5'-CUACUACUACUACCTAAGCAACCTTTATTTCTCG-3'

dUTPタグは、cDNAのベクター挿入物pAMP1へのディレクショナルクローニング（directional cloning）の手段を提供し、且つクローニング反応自体に重要な役割を果たす。

最適な熱サイクルパラメーターは下記のとおりであった。

温度 サイクル数 時間

96°C 1 2分間

94°C 25 30秒間

53°C 1 30秒間

72°C 1 90秒間 20

72°C 1 10分間

Quiaquick PCR精製キット（Quiagen）を用いて、増幅されたcDNA生成物を精製した。一度精製した後、cDNA50ngを、増幅生成物のための迅速なクローニングのためのCloneAmp pAMP1システム（GibcoBRL）を用い、製造者のプロトコルに従って、pAMP1にクローニングして、プラスミドpTNF8を作成した。構築物の配列完成度は配列分析により確認された。

50 μ gのpTNF8のBamH Iによる線状化によりin vitro転写鋳型を製造し、その後、PromegaのRibomax large scale RNA製造システム-T7RNAポリメラーゼを用いて転写を行った。

挿入されなかったリボヌクレオチド及び未成熟終結転写物をスピнкаラムクロマトグラフィー（Chromspin-400 DEPC処理、Clontech）により除去し、ホルムアルデヒドゲル電気泳動（Sambrook et al,1989）により分析した。 30

遺伝子特異的ライブラリーを用いたmRNAの開裂

1) 下記の反応物を総容量100 μ lで準備した。

20 μ M TNF α mRNA

200nM各アンチセンスTNF α オリゴヌクレオチド（12ntまたは8ntの連続配列）

20mM KCl

10mM MgCl₂

20mM Tris-HCl, pH7.5

0.1mM EDTA

0.1mM DTT

2) 反応物を37°Cで5分間インキュベートした後、0.1 μ g/ μ lのRNアーゼHを添加した。 40

3) 上記のものを37°Cで40分間インキュベートした。

4) RNアーゼH活性をフェノール/クロロホルム抽出により抑制した。

5) この反応生成物に20ngのグリコーゲンを添加した。

6) アンチセンスオリゴヌクレオチドライブラリーを、スピнкаラムクロマトグラフィー（Chromspin-30 DEPC処理、Clontech）により除去した。

7) 2.5容量（100 μ l）のエタノール、0.1容量の3M酢酸ナトリウム, pH5.2を添加することにより、RNAを沈澱させた。

8) ペレット化したRNAを70%エタノールで洗浄した後、DEPC処理水16 μ lに再懸濁した。 50

ランダムライブラリーを用いたmRNAの開裂

上記で使用した200nMに代えてランダムライブラリーを20 μ M用いること以外は、上記の遺伝子特異的ライブラリーの反応プロトコルを行った。

mRNA断片のプライマー伸長分析

オリゴヌクレオチドライブラリーを、in vitro転写TNF α mRNA及びRNアーゼHとインキュベートした。切断部位にフランクする配列を確認するために、上記インキュベーションで生じた断片を、該RNAの種々の領域を標的とするいくつかのプライマーを用いてPCRにより増幅した。これにより切断断片の組み合わせが、増幅工程で失われることがなくなる。下記のFAM-標識プライマーのうちの一つを各々2pmol用いて、プライマー伸長分析実験を行った。これは、上記のプロトコルで生じた8 μ lのRNA開裂生成物の逆転写を、製造者の指示に従ってSuperscript IIR NアーゼH逆転写酵素 (GibcoRL) を用いて、開始するの

10

に使用された。プライマー伸長反応は、各プライマーについてRNアーゼHネガティブの対照が試験されるように、二通り行われた。このように生成したcDNA断片を、ABI (Applied Biosystems Inc) 377プリズムシーケンス装置中、4%アクリルアミド変性ゲル上で分析し、続いて、GeneScanバージョン2.0ソフトウェアを用いて分析した。

ABI377装置のためのサンプルは、蛍光標識されており、ゲル分離は、バンドがゲルを走査する蛍光検出器を特定ポイントに至らせるのに要する時間として測定される。GeneScanソフトウェアは、この時間分析データを通常のフォーマットに戻して変換するか、またはサンプル中に蛍光標識されたサイズスタンダードが存在すれば直接大きさを計算することが

20

プライマー伸長分析で使用するプライマー

プライマーコード	プライマー配列
F2	GATTCAGGAATGTGTGGCCT 956: CCTGG GATTCAGGAATGTGTGGCCT GCACA: 975
F3	CAACCTCCTCCTCTGCCATCAAG 586: AAGCT CAACCTCCTCCTCTGCCATCAAG AGCCC: 607
T8836	GTTCTCAGCCTCTTCTCCTTC 178: TGCTT GTTCTCAGCCTCTTCTCCTTC CTGAT:199
T8837	GAAAACGGAGGCTGAACAATAG 1366: TCCGT GAAAACGGAGGCTGAACAATAG GCTGT:1387
T8838	CTACTATTTCAGTGGCCGAGAAA 1544: TCGGC CTACTATTTCAGTGGCCGAGAAA TAAAG:1564

30

40

切断部位が決定されたら、対応ODNが媒介する開裂のどれが最も有効であるかを決定するのが有利である。この目的のために、定量的RT PCR分析を開発した。

非開裂mRNAの量を、標的mRNAの全mRNAがオーバーラップする領域によりカバーされるように分割したオーバーラップする領域をPCR反応を用いて分析することにより分析した。

このアプローチを用いると、研究者はアンチセンスODNの結合部位を知る必要がなく、従って、この方法は、ランダムライブラリーアプローチで使用する場合並びに標的アンチセンスODNの場合に理想的である。選択されたオーバーラップ領域に対応する配列のコピーを、合理的な大きさ、例えば約50bpの特異的内部欠失を除去して生成させ、クローン化して、欠失断片のin vitro転写を可能にする。これらの欠失断片は、定量的RT PCRのための内部標準RNA対照として使用され得る。

10

既知量の標準の一つを分析すべきRNAサンプルに添加した。遺伝子特異的プライマーを用いてこの混合物を逆転写した後、蛍光標識したプライマーを用いてPCRを行った。反応物をABI377プリズムシーケンス装置にかけ、各生成物の量に対応するピークを調べた。標準の出発量は既知であるので、他の生成物の量は、生成物の蛍光の強さを標準のもので校正することにより導くことができる。

このような内部標準を作ることにより、定量的RT PCRに関連する問題の多くを克服することができる。第一に、個々のRT反応の間で変化する効率のための対照として作用する。第二に、標準及びPCR標的物は同じプライマー配列及び同じ内部配列（対照の内部欠失は別として）を有するので、それらは、PCR反応において、同様に挙動するであろう。従って、PCR反応がlog相で終止した場合は同じ効率で増幅される。

20

定量的RNA PCRの方法

TNF α mRNAを三つの分析用オーバーラップPCR断片、断片A（塩基14-557）、断片B（塩基502-1062）及び断片C（塩基1035-1575）に分割した。

プライマー配列：

A 進行 CTGCCAGGCAGGTTCTCTTCC
逆 TGATGGTGTGGGTGAGGAGC
B 進行 CTTCAAGGGCCAAGGCTGCCC
逆 CTCCCTGGTCTCCAGATTCC
C 進行 CCTACAGCTTTGATCCCTG
逆 CAACCTTTATTTCTCGCCACTG

30

（全ての進行プライマーは5' FAM蛍光部分で標識されている。）

1. 内部競合RNA標準の製造

内部競合RNA標準として使用するための50bpの欠失（約）を有する断片A、B及びCを得るために、“欠失プライマー”を製造した。これらのプライマーは、適当な進行配列（A、BまたはC）を有し、該進行配列の3'の配列50bp（約）の20bp（約）がそれに続く。欠失プライマー及び適当な逆プライマーによりPCRを行うと、生じた断片は、前記進行プライマーの3'に50bp（約）の欠失を有するA、BまたはC断片となる。

断片A欠失進行プライマー

40

GCTGCCAGGCAGGTTCTCTTCCGCACTGAAAGCATGATCCGGG

断片B欠失進行プライマー

CTTCAAGGGCCAAGGCTGCCCCAAGGTCAACCTCCTCTCTGC

断片C欠失進行プライマー

GCCTACAGCTTTGATCCCTGGGACTTGAGAAGACCTCACC

1.1 PCR反応をパーキンフィルマー（Perkin Filmer）9600PCR装置により、パーキンフィルマーアンプリタク（Amplitaq）ポリメラーゼ（1単位）を用いて、適当な進行欠失プライマー及び逆プライマーを各々30pmol、1.5mMのMgCl₂、10mMのdNTP、10ngのpTNF8 TNF α クローンをを用いて行った。サイクル数は、95℃で5分間を1サイクル、95℃で30秒間、48℃で1分間、72℃で2分間を35サイクル、そして、72℃で10分間の最終サイクルを1回で

50

ある。

1.2 PCR生成物を、2%アガロースゲル上で分離した。バンドをクイアゲン (Quiagen) のクイアquick (Quiaquick) ゲル抽出キットを用いて、製造者のプロトコルに従って切り取り、精製した。精製されたバンドを、TAクローニングキット (Invitrogen) を用いて、製造者のプロトコルにより、pCR2.1ベクター (Invitrogen) にクローニングした。挿入物の配列及び配向を、標準的な方法を用いてシーケンスすることにより確認した。

1.3 pCR2.1のT7RNAポリメラーゼ部位から転写した時に、TNF α mRNAと同じセンスのRNAを生成するクローンを選択した。各欠失断片のRNAを、RiboMAX RNA製造システムを用い、T7 RNAポリメラーゼ (Promega) を用いて、製造者の指示に従って、適当なクローンから転写した。その後、転写されたRNAをSephacryl S-500HRゲルろ過カラム (Pharmacia) により、DEPC処理25mMTris-HCl、150mMのNaCl、24mMのMgCl₂、pH7.4緩衝液を用いて、4℃で重力流の下で精製した。110-130mlでRNAがカラムから溶出され、2.5容量の100%エタノールを用いて沈澱させ、100 μ Lの蒸留水に再懸濁させた。

ここで、RNA TNF α 欠失体 (内部競合RNA標準) をAD (A断片欠失について)、BD (B断片欠失について) 及びCD (C断片欠失について) として記す。

2. 開裂したTNF α mRNAの競合RNAPCRによる定量

この方法を説明するために、具体的な例を用いる。

アンチセンス開裂実験は、C断片内で開裂するアンチセンスオリゴを用いて行われる。この開裂したRNAは、ここではXと記す。

2.1 0.05ngのXを断片Cのためのプライマーと共に含有する6個のEZrTth RNA PCR (パーキンエルマー) 反応物 (C1-C6)、及び断片Bのプライマーと共に含有する6個の同一の反応物 (B1-B6) を、製造者の指示に従って準備する。その後、一連のCDの希釈物をC1-6に、即ち50ngのCDをC1に、5ngのCDをC2に、0.5ngのCDをC3に、0.05ngのCDをC4に、0.005ngのCDをC5に、0.0005ngのCDをC6に添加する。BDの対応する一連の希釈も、B1-6に添加する。

2.2 その後、RNA PCR反応をパーキンフィルマー (Perkin Filmer) 9600PCR装置により、下記のサイクルで行った: 94℃で0秒間、48℃で0秒間、65℃に上昇させながら5分間、35分間保持を1サイクル、95℃で1分間を1サイクル、95℃で25秒間、65℃で1分間を32サイクル*、そして、65℃で7分間を1サイクル。

(*32サイクルは、反応がlog相で止まるように用いた。)

2.3 その後、反応物をABI377にかけ、各サンプルについてC/B断片及びCD/BD断片のピークの高さが得られた。

2.4 その後、グラフにCD濃度対C及びCDピーク高さをプロットし (図7a参照)、同様にB反応について図7bにプロットした。二つの線が交わる点は、CD RNA濃度が利用可能なC断片RNAの濃度と等モルである点を示す。アンチセンスオリゴが断片C内で開裂すると、利用可能なCのRNA濃度は、B反応のグラフの交点で得られる濃度より低くなる。従って、二つの図を比較することにより、TNF α のアンチセンスオリゴによる開裂を定量することができる。

結果

12nt遺伝子特異的オリゴヌクレオチドのシリーズ1からの断片のプライマー伸長
プライマー伸長実験に使用したプライマーはT8836である。

124nt断片及び134nt断片を検出した。これらは、ヌクレオチド76及び66のmRNAのアンチセンス切断部位に対応する (図8参照)。

開裂部位76は、下記のアンチセンスオリゴヌクレオチドに対応する:

GTGTCCTTTCCA

開裂部位66は、下記のアンチセンスオリゴヌクレオチドに対応する:

GGGGAGAGAGGG

8nt遺伝子特異的オリゴヌクレオチドのシリーズ1からの断片のプライマー伸長
プライマー伸長実験に使用したプライマーはT8836である。

121nt断片及び136nt断片を検出した。これらは、ヌクレオチド79及び64のmRNAのアンチセ

10

20

30

40

50

ンス切断部位に対応する（図9参照）。

開裂部位79は、下記のアンチセンスオリゴヌクレオチドに対応する：

CCTTTCCA

開裂部位64は、下記のアンチセンスオリゴヌクレオチドに対応する：

GGGGAGAG

12nt遺伝子特異的オリゴヌクレオチドのシリーズ2からの断片のプライマー伸長

プライマー伸長実験に使用したプライマーはT8838である。

主な断片、261nt,265nt及び275ntを検出した。これらは、ヌクレオチド1289,1297及び1303のmRNAのアンチセンス切断部位に対応する（図10参照）。

早期の実験において、僅かに異なる条件下で、幾つかのマイナーなピークが発見された。これは、281nt及び282ntの断片に対応する。 10

開裂部位1303は、下記のアンチセンスオリゴヌクレオチドに対応する：

GGTCTCCCAAAT

開裂部位1297は、下記のアンチセンスオリゴヌクレオチドに対応する：

AAATACATTCAT

8nt遺伝子特異的オリゴヌクレオチドのシリーズ2からの断片のプライマー伸長

プライマー伸長実験に使用したプライマーはT8838である。

主な断片、264ntを検出した。これらは、ヌクレオチド1300のmRNAのアンチセンス切断部位に対応する（図11参照）。

開裂部位1300は、下記のアンチセンスオリゴヌクレオチドに対応する： 20

TCCCAAAT

12nt遺伝子特異的オリゴヌクレオチドのシリーズ3からの断片プライマー伸長

プライマー伸長実験に使用したプライマーはT8838である。

残念ながら、これらの実験またはシリーズ38merライブラリーからは、信頼できるデータが得られなかった。

ランダム12ntオリゴヌクレオチドからの断片のプライマー伸長

この方法に置いて列記した五つのプライマー全てをこれらのプライマー伸長実験に使用した。

プライマー	断片長さ	切断部位
F 2	1 1 2	8 6 3 n t
F 3	1 0 0	5 0 7 n t
T 8 8 3 6	6 9	1 3 1 n t
T 8 8 3 7	なし	なし
T 8 8 3 8	1 0 4	1 4 6 0 n t

mRNA開裂部位

予測されたアンチセンス配列

1 3 1 n t G A G C G C C T C C T C

5 0 7 n t T G G C C C T T G A G A

1 4 6 0 n t T A G A C A A C T T A A

シリーズ2オリゴヌクレオチドについての定量的RNAPCRの結果

使用した条件下では、これらの三つの実験の結果は、試験したオリゴヌクレオチドの開裂有効性において、何ら違いを検出しなかった。結果は、5つが全て殆ど100%の効率で開裂したことを示す。

オリゴ	bピーク 高さ	bdピーク 高さ @5ng con	bの量 (5xbl [°] -ク高さ/ bdl [°] -ク高さ)	cl [°] -ク 高さ	cdl [°] -ク 高さ @5ng con	cの量 (5xcl [°] -ク高さ/ cdl [°] -ク高さ)
TCATCTGT	130680	16906	38.6	75712	139347	2.7
AAATACAT	73597	42672	8.6	0	96686	0
TCCCAAAT	108621	34437	15.7	22336	1104770	1.06
AAATACATT	na	na	na	49785	234045	1.06
CAT						
GGTCTCCCA	81504	51354	7.9	0	40134	0

AAT

試験したオリゴヌクレオチド

1283-90 CATCTGT

1291-98 AATACAT

1299-1306 CCCAAAT

1287-98 AATACATTCAT

1299-1310 GTCTCCCAAAT

参考文献：

J.Sambrook,E.F.Fritsch,T.Manietis,“Molecular Cloning:a Laboratory Manual”,Second Edition,Cold Spring Harbour Laboratory Press,1989

参考文献

1. Guinosso,C.J.,Hoke G.D.,Freier,S.M.Martin,J.F.,Ecker,D.J.,Mirabelle,C.K.,Crooke,S.T.,Cook,P.D.Nucleosides Nucleotides (1991) 10259-262

2. Carmo-Fonseca,M.,Pepperkok,R.,Sproat,B.S.,Ansorge,W.,Swanson,M.S.,Lamond,A.I.Embo J. (1991) ,7,1863-1873

3a. Cook,P.D.Anti-Cancer Drug Des. (1991) 6 585-607

b Wagner,R.W.Nature (1994) 372 333-335

4. Uhlmann E.& Payman A,Chemical Reviews 90 (1990) 544

5. Wagner,R.W.et al Science (1993) 260 1510-1513

6. Fenster,S.D.,Wagner,R.W.,Froehler,B.C.& CHIN,D.J.Biochemistry (1994) 33 8391-8398

7. Chollet,A.,& Kawashima,E Nucleic Acids Res (1988) 16 305-317

8. Miller,P.S.,Reddy,M.P.,Murakami,A.,Blake,K.R.,Lin,S-B.,& Agris,C.H.,Biochemistry (1986) 25 5092-5097

9. Letsinger,R.L.,Groody,E.P.,Lander,N.,& Tanaka,T.Tetrahedron (1984) 40 137-143

10a Stein,C.A.,Subasinghe,C.,Shinozuka,K.,& Cohen J.S. (1988) Nucleic Acids Res ,16 3209-3221

b Stec,W.J.,Gratkowski,A.,Koziolkiewicz,M.;Uznanski,B.Nucleic Acids Res., (1991) 19 5883-5888

11. Marshall W.S., Caruthers,M.Science (1993) 259 1564-1570

12. Froehler,B.,NG.P.,Matteucci,M.Nucleic Acids Res. (1988) 16 4831-4839

13. Sood,A.,Shaw,R.B.,Spieluogel,B.F.J.AM.Chem.Soc. (1991) 1129000-9007

14. Milligan,J.F.,Matteucci,M.D.,Martin,J.C.J.Med Chem (1993) 36 (14) 1923-1937

15. Matteucci,M.,Lin,K.Y.,Butcher,S.,Moulds,C.

16. J.Am.Chem.Soc. (1991) , 113 7767 7768

10

20

30

40

50

17. Jones, B., Ling, K.Y., Milligan, J.F., Wadwani, S., Matteucci, M.J. Org. Chem. (1993) 58 2983—2991
18. Gait, M.J., Jones, A.S., Jones, M.D., Shepherd, M.J., Walker, R.T.J. Chem. Soc. Perkin Trans 1 (1979) 1389—1394
19. Strichak, E.P., Summerton, J.E., Waller, D.D.J Org Chem (1987) 52 4204—4206
20. Vasseur, J.J., Debart, F., Sanghui, Y.S., Cook, P.D.J Am. Chem. Soc (1992) ,114, 4006—4007
21. Debart F., Vasseur, J.J., Sanghui, Y.S., Cook, P.D. Bioogr. Med. Chem. Lett. (1992) 2 1479—1482
22. Lieber A, Strausse M, Molecular & Cellular Biology (1995) , 15 10
23. Field, A.K. and Goodchild, J., Exp. Opin. Invest. Drugs (1995) , 4 (9) , 799—821

T.N.F. α オリゴヌクレオチド

センスオリゴヌクレオチド

シリーズ 1

(1—96bp)

8—オリゴヌクレオチド

- 1) CAGACCCCT
- 2) GACAAGCT
- 3) GCCAGGCA
- 4) GGTTCTCT
- 5) TCCTCTCA
- 6) CATACTGA
- 7) CCCACGGC
- 8) TCCACCCCT
- 9) CTCTCCCC
- 10) TGGAAAGG
- 11) ACACCATG
- 12) AGCACTGA

12—オリゴヌクレオチド

- 1) CACACCCTGACA
- 2) AGCTGCCAGGCA
- 3) GGTTCTCTTCCT
- 4) CTCACATACTGA
- 5) CCCACGGCTCCA
- 6) CCCTCTCTCCCC
- 7) TGGAAAGGACAC
- 8) CATGAGCACTGA

シリーズ 2

(1225—1321bp)

8—オリゴヌクレオチド

- 1) CTGTATTT
- 2) ATGTTTGC
- 3) ACTTGTGA
- 4) TTATTTAT
- 5) TATTTATT
- 6) TATTATTT
- 7) ATTTATTT
- 8) ACAGATGA
- 9) ATGTATTT

20

30

40

50

10) ATTTGGGA

11) GACCGGGG

12) TATCCTGG

12-オリゴヌクレオチド

1) CTCTATTTATGT

2) TTGCACTTGTGA

3) TTATTTATTATT

4) TATTTATTATTT

5) ATTTATTTACAG

6) ATGAATGTATTT

7) ATTTGGGAGACC

8) GGGGTATCCTGG

シリーズ 3

(1489-1585bp)

8-オリゴヌクレオチド

1) CTGTCACT

2) CATTGCTG

3) AGGCCTCT

4) GCTCCCCA

5) GGGAGTTG

6) TGTCTGTA

7) ATCGGCCT

8) ACTATTCA

9) GTGGCGAG

10) AAATAAAG

11) GTTGCTTA

12) GGAAAGAA

12-オリゴヌクレオチド

1) CTGTCACTCATT

2) GCTGAGGCCTCT

3) GCTCCCCAGGGA

4) GTTGTGTCTGTA

5) ATCGGCCTACTA

6) TTCAGTGGCGAG

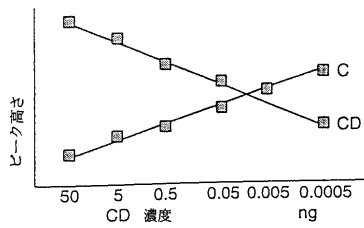
7) AAATAAAGGTTG

8) CTTAGGAAAGAA

10

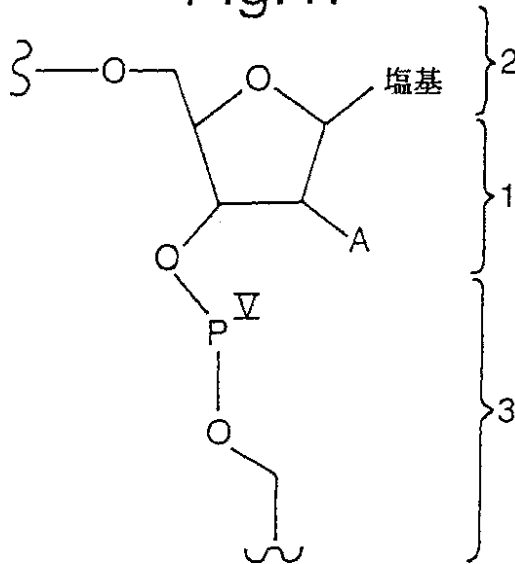
20

30

【図 7 a】
Fig.7a.

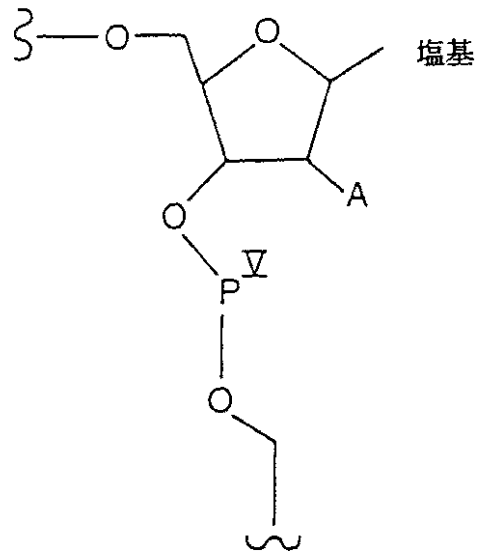
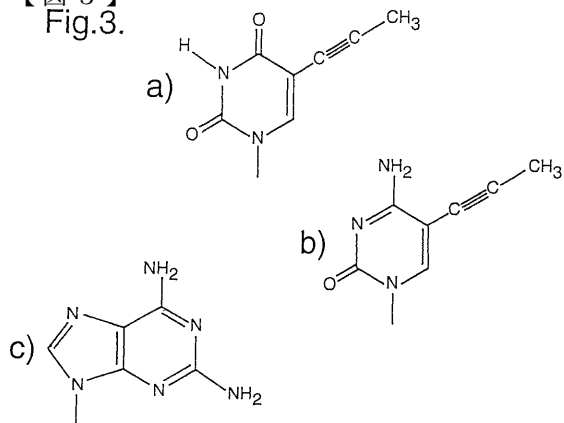
【図 1】

Fig.1.



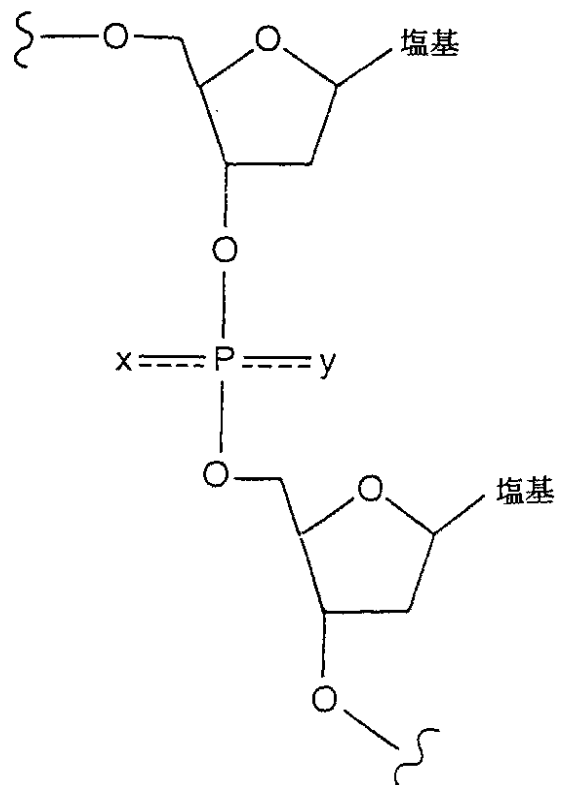
【図 2】

Fig.2.

【図 3】
Fig.3.

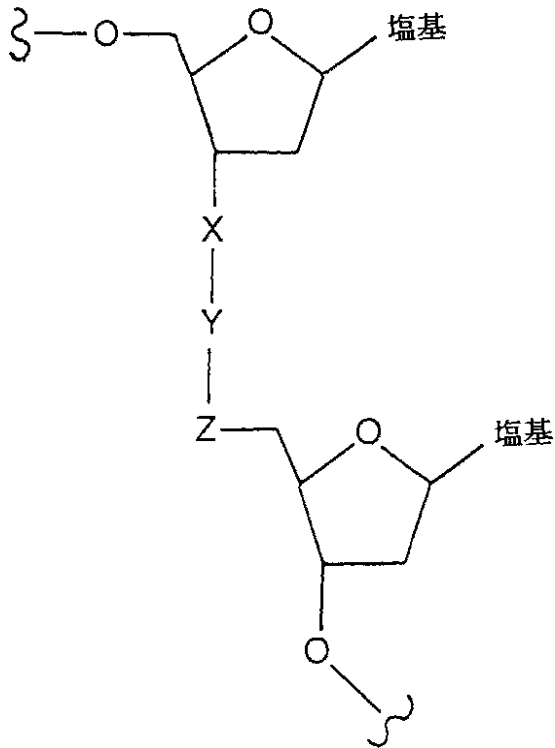
【図 4】

Fig.4.



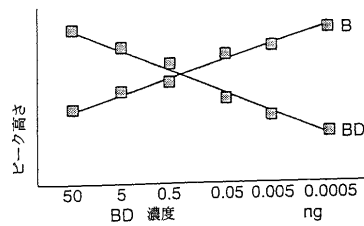
【図 5】

Fig.5.



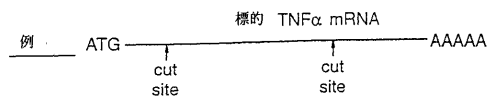
【図 7 b】

Fig.7b.



【図 6】

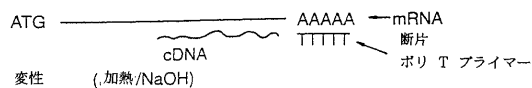
Fig.6.



1. CAO_S NNNNNnnnnnnNNNNN (15-mer)

収量	TNFα mRNA	完全長 mRNA (非切断)
99.8%	ATG -> cut site -> AAAAA	完全長 mRNA (非切断)
0.15%	ATG -> cut site 1 -> AAAAA	切断片 1 (mRNA 断片)
0.05%	ATG -> cut site 2 -> AAAAA	切断片 2 (mRNA 断片)

2. RT-PCR 第一の cDNA 鎖の RT-PCR 合成



3. cDNA 1st cDNA 鎖

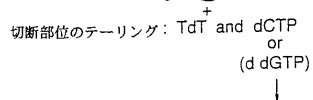
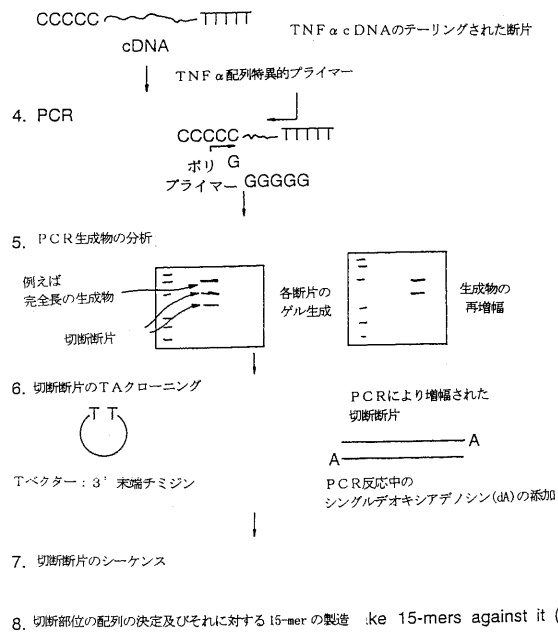
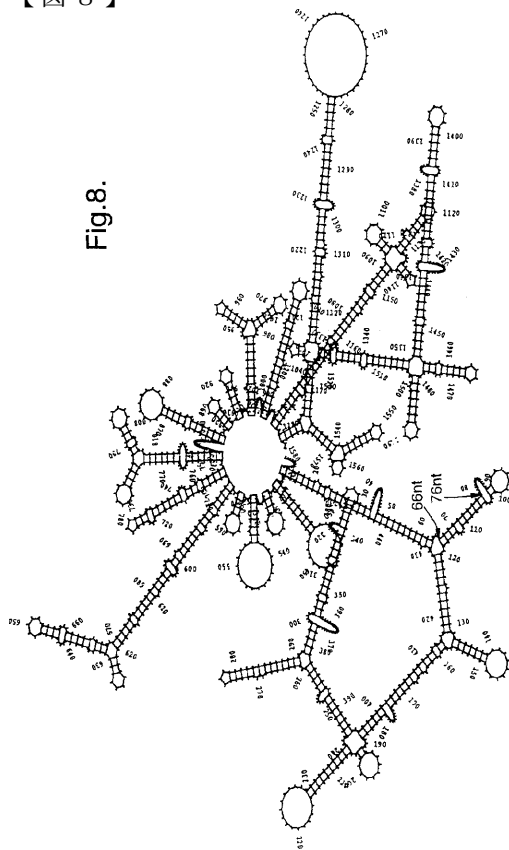


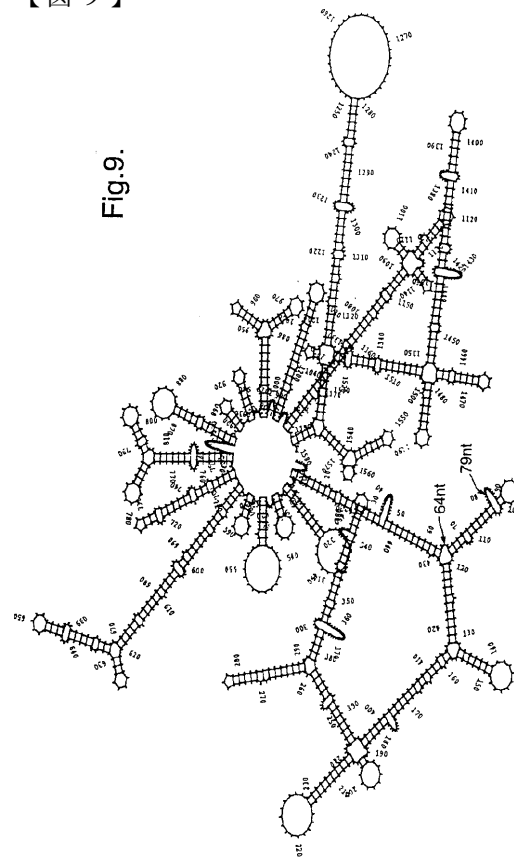
Fig.6 (Cont).



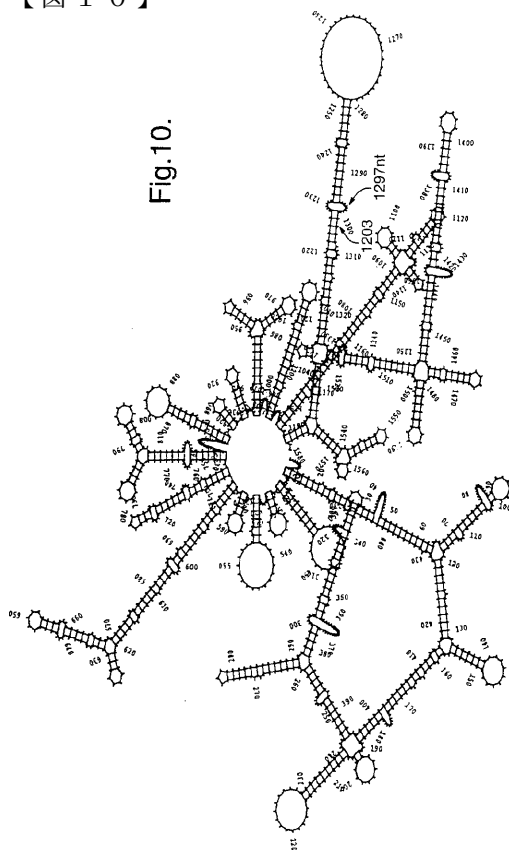
【図 8】



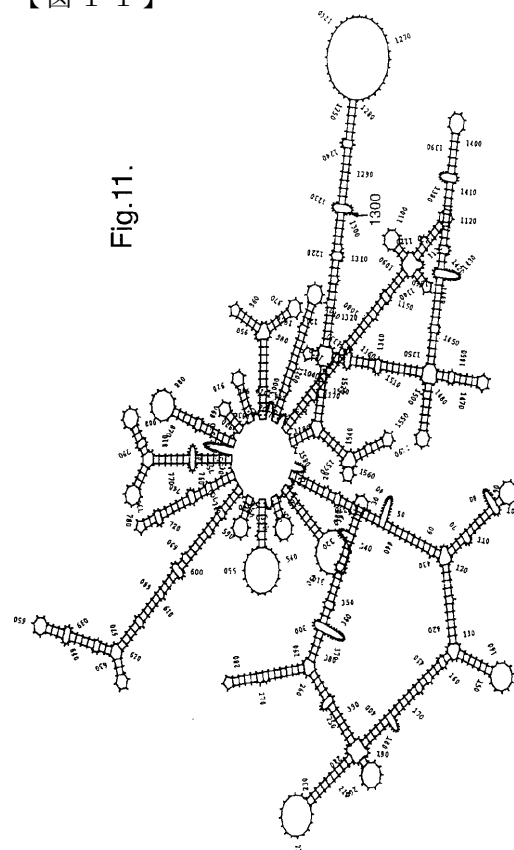
【図 9】



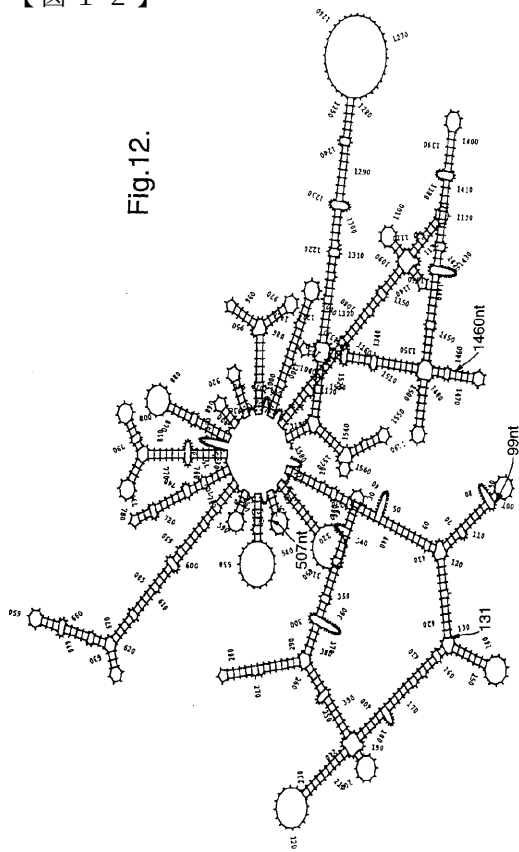
【図 10】



【図 11】



【図 12】



フロントページの続き

審査官 田中 晴絵

(56)参考文献 J. Am. Chem. Soc., 1994, Vol. 116, No. 2, p. 437-442
Antisense Res. Dev., 1995 Spring, Vol. 5, No. 1, p. 87-88, OP-10

(58)調査した分野(Int. Cl.⁷, DB名)
C12N 15/09 - 15/90
C12Q 1/68
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
EUROPAT(QUESTEL)