(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第4180681号
(P4180681)
(45)発行日　平成20年11月12日(2008.11.12)　(24)登録日　平成20年9月5日(2008.9.5)

(51)Int.Cl.		F I		
C07H 21/04	(2006.01)	C07H	21/04	ZNAB
A61K 48/00	(2006.01)	A61K	48/00	
A61K 31/712	(2006.01)	A61K	31/712	
A61P 31/14	(2006.01)	A61P	31/14	
A61P 31/16	(2006.01)	A61P	31/16	

請求項の数 5　(全 19 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平9-309711
(22)出願日　平成9年10月23日(1997.10.23)
(65)公開番号　特開平11-130793
(43)公開日　平成11年5月18日(1999.5.18)
審査請求日　平成16年10月22日(2004.10.22)

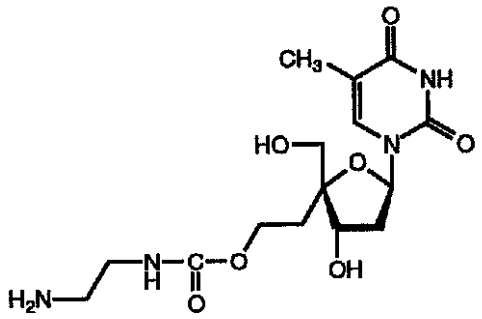
(73)特許権者　591167430
株式会社ＫＲＩ
京都府京都市下京区中堂寺南町１３４番地
(74)代理人　100088948
弁理士　間宮　武雄
(72)発明者　松田　彰
札幌市北区北２４条西１２－１－７－５０１
(72)発明者　上野　慶仁
札幌市北区北１７条西３－２１－８０８
(72)発明者　周東　智
札幌市西区平和２－１０－２－１０

審査官　渕野　留香

最終頁に続く

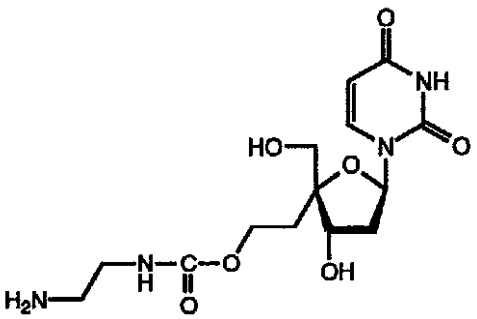
(54)【発明の名称】アンチセンスオリゴヌクレオチド

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
チミジンの糖部の４’位のα位にアミノ側鎖を導入した、化１に構造式を示すチミジン誘導体を構成成分として含むアンチセンスオリゴヌクレオチド。
【化１】

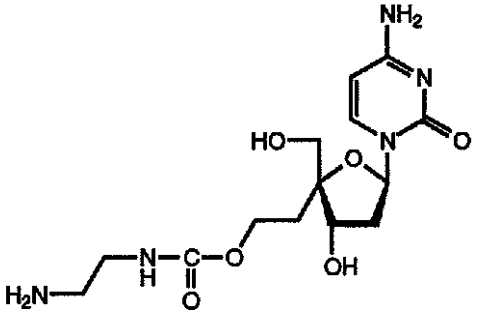


【請求項２】
デオキシウリジンの糖部の４’位のα位にアミノ側鎖を導入した、化２に構造式を示すデオキシウリジン誘導体を構成成分として含むアンチセンスオリゴヌクレオチド。

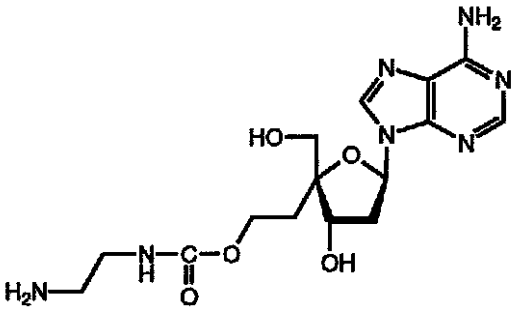
【化２】



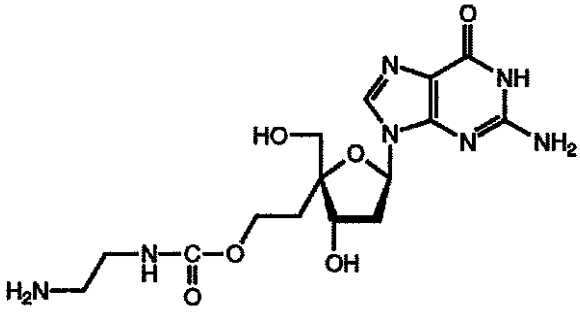
【請求項３】
デオキシシチジンの糖部の４’位のα位にアミノ側鎖を導入した、化３に構造式を示すデオキシシチジン誘導体を構成成分として含むアンチセンスオリゴヌクレオチド。
【化３】



【請求項４】
デオキシアデノシンの糖部の４’位のα位にアミノ側鎖を導入した、化４に構造式を示すデオキシアデノシン誘導体を構成成分として含むアンチセンスオリゴヌクレオチド。
【化４】

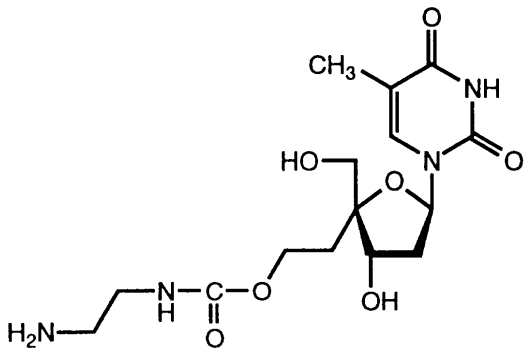


【請求項５】
デオキシグアノシンの糖部の４’位のα位にアミノ側鎖を導入した、化５に構造式を示すデオキシグアノシン誘導体を構成成分として含むアンチセンスオリゴヌクレオチド。
【化５】

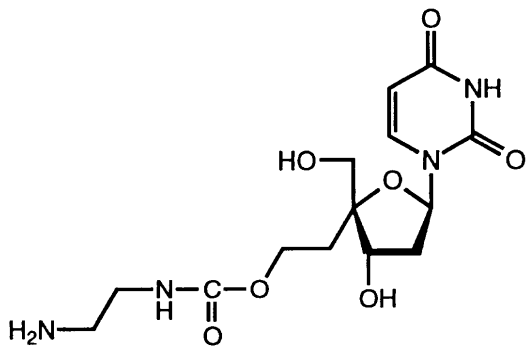


【発明の詳細な説明】
【０００１】
【発明の属する技術分野】
この発明は、第二世代のアンチセンスオリゴヌクレオチドに関し、より詳しくは、デオキシリボヌクレオシドの糖部を修飾した修飾デオキシヌクレオシドを含むアンチセンスオリゴヌクレオチドに関する。
【０００２】
【従来の技術】
疾病の原因が遺伝子の発現調節によるものであって、遺伝子産物（蛋白質）が感染症や癌などの原因となっている場合に、それらの原因物質の産生を抑制するために、原因物質の遺伝子情報を伝達するメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）の働きを抑える方法の概念が近年生まれた。すなわち、ｍＲＮＡをセンスＲＮＡとし、それに対して相補的なＤＮＡまたはＲＮＡをアンチセンスＤＮＡまたはアンチセンスＲＮＡと呼び、アンチセンスＤＮＡまたはアンチセンスＲＮＡがｍＲＮＡと二本鎖を形成することによりｍＲＮＡの働きを抑制し、疾病を治療する、といった考え方である。この概念に基づいて、エイズ（ＡＩＤＳ）等のウイルス感染症や癌などの疾病治療を目的としたアンチセンスオリゴヌクレオチドについての提案が種々なされており（例えば特開平３－９９０９３号公報、特開平４－１５４７９４号公報、特開平６－４１１８５号公報、特開平６－１７９６９４号公報等参照）、また、そのアンチセンスオリゴヌクレオチドの合成法や生物活性などについて盛んに研究され学会等で報告されている。
【０００３】
アンチセンスオリゴヌクレオチドは、試験管内や細胞レベルでの研究では有効であるとされているが、ヌクレアーゼによるアンチセンスオリゴヌクレオチドの分解反応に対する安定性や細胞膜の透過性に問題があるとされている。それらの問題を解決するために、ＤＮＡやＲＮＡの天然型リン酸ジエステルをホスホン酸エステルやチオリン酸エステル或いはアミノ酸結合に変換したりするなどの工夫が従来なされている。
【０００４】
【発明が解決しようとする課題】
しかしながら、従来から検討されているようにアンチセンスオリゴヌクレオチドのリン酸エステルをホスホン酸エステルやチオリン酸エステルに変換したものは、非天然型の異性体を生じることから、それらの生理的効果が低いと推定されている。また、リン酸エステルをチオリン酸エステル型やアミノ酸結合型に変換したアンチセンスオリゴヌクレオチドは、非特異的アンチセンス効果を示し、そのことが問題となっている。
【０００５】
なお、オリゴヌクレオチドの塩基部の変換によりアンチセンスオリゴヌクレオチドの効果を高めようとする研究は、天然型のヌクレオチドを用いた例が僅かに報告されているが、極めて希である。
【０００６】
この発明は、以上のような状況下でなされたものであり、天然型のリン酸ジエステル結合を有し、生物学的安定性を示し、すなわちヌクレアーゼによる加水分解に対して抵抗性を示し、標的とするｍＲＮＡに対して特異的でかつ熱力学的に安定な相補的結合を有する二本鎖を形成する有用なアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供することを目的とする。
【０００７】
【課題を解決するための手段】
請求項１ないし請求項５に係る各発明はそれぞれ、デオキシリボヌクレオシドの糖部の４’位のα位にアミノ側鎖を導入したヌクレオシド誘導体を構成成分として含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを形成した。すなわち、請求項１に係る発明は、チミジンの糖部の４’位のα位にアミノ側鎖を導入した、化１に構造式を示すチミジン誘導体、すなわち４’－Ｃ－（Ｎ－アミノエチルカルバモイル）オキシエチルチミジンを構成成分として含んでアンチセンスオリゴヌクレオチドを形成したことを特徴とする。

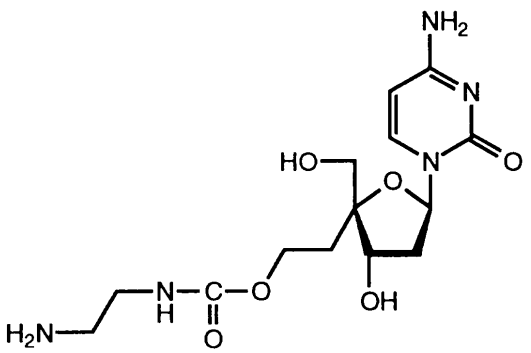
【０００８】
【化１】



【０００９】
請求項２に係る発明は、デオキシウリジンの糖部の４’位のα位にアミノ側鎖を導入した、化２に構造式を示すデオキシウリジン誘導体、すなわち４’－Ｃ－（Ｎ－アミノエチルカルバモイル）オキシエチル－２’－デオキシウリジンを構成成分として含んでアンチセンスオリゴヌクレオチドを形成したことを特徴とする。
【００１０】
【化２】



【００１１】
請求項３に係る発明は、デオキシシチジンの糖部の４’位のα位にアミノ側鎖を導入した、化３に構造式を示すデオキシシチジン誘導体、すなわち４’－Ｃ－（Ｎ－アミノエチルカルバモイル）オキシエチル－２’－デオキシシチジンを構成成分として含んでアンチセンスオリゴヌクレオチドを形成したことを特徴とする。
【００１２】
【化３】

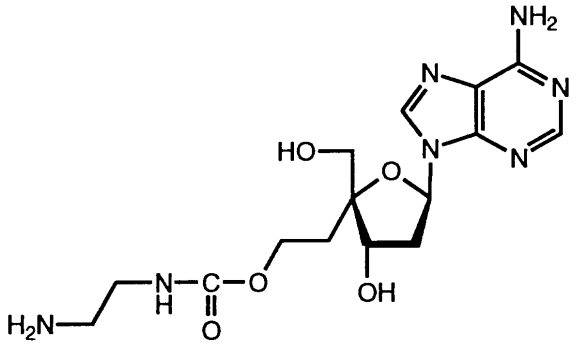


【００１３】

請求項４に係る発明は、デオキシアデノシンの糖部の４’位のα位にアミノ側鎖を導入した、化４に構造式を示すデオキシアデノシン誘導体、すなわち４’－Ｃ－（Ｎ－アミノエチルカルバモイル）オキシエチル－２’－デオキシアデノシンを構成成分として含んでアンチセンスオリゴヌクレオチドを形成したことを特徴とする。

【００１４】

【化４】

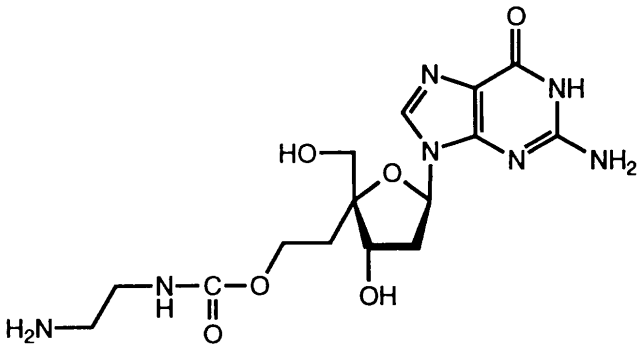


【００１５】

請求項５に係る発明は、デオキシグアノシンの糖部の４’位のα位にアミノ側鎖を導入した、化５に構造式を示すデオキシグアノシン誘導体、すなわち４’－Ｃ－（Ｎ－アミノエチルカルバモイル）オキシエチル－２’－デオキシグアノシンを構成成分として含んでアンチセンスオリゴヌクレオチドを形成したことを特徴とする。

【００１６】

【化５】



【００１７】

請求項１ないし請求項５に係る各発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドはそれぞれ、ヌクレアーゼによる加水分解に対して抵抗性を示し、また、相補鎖と二本鎖を形成させたときに熱安定性を示す。

【００１８】

【発明の実施の形態】

以下、この発明の最良の実施形態について説明する。

【００１９】

まず、アンチセンスオリゴヌクレオチドを化学的に合成する場合の第１段階として、図１に示すように、それぞれ官能基を保護したデオキシリボヌクレオシド誘導体（化合物１）からオリゴヌクレオチド合成ユニット（化合物２）を合成する。化合物１および化合物２のそれぞれの構造式中、Ｂは塩基、すなわちチミン、ウラシル、シトシン、アデニンまたはグアニンである。例えば、塩基Ｂがチミンであるときは、化合物１は５’－Ｏ－ジメトキシトリチル－４’－Ｃ－［Ｎ－（Ｎ－トリフルオロアセチルアミノエチル）カルバモイル］オキシエチルチミジン、化合物２は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－ジメトキシトリチル－４’－Ｃ－［Ｎ－（Ｎ－トリフルオロアセチルアミノエチル）カルバモイル］オキシエチルチミジンであり、塩基Ｂがウラシルであるときは、化合物１は５’－Ｏ－ジメトキシトリチル－４’－Ｃ－［Ｎ－（Ｎ－トリフルオロアセチルアミノエチル）カルバモイル］オキシエチル－２’－デオキシウリジン、化合物２は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－ジメトキシトリチル－４’－Ｃ－［Ｎ－（Ｎ－トリフルオロアセチルアミノエチル）カルバモイル］オキシエチル－２’－デオキシウリジンである。

【００２０】

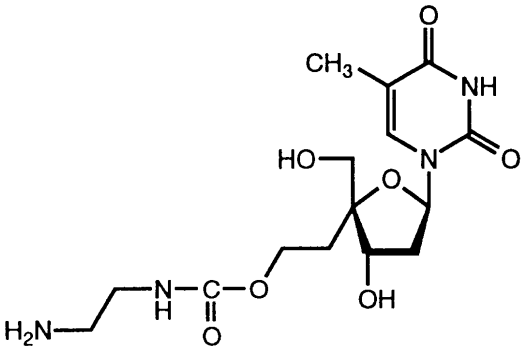
続いて、第２段階として、上記したオリゴヌクレオチド合成ユニットからアンチセンスオリゴヌクレオチドを合成する。オリゴヌクレオチドは、公知の固相合成法により、ＤＮＡ合成機を使用して合成する。

【００２１】

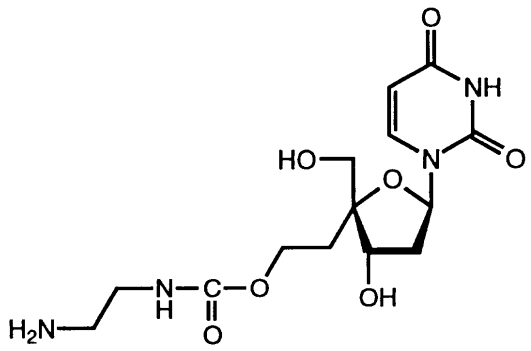
以上のようにして合成されたオリゴヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオシドの糖部の４’位のα位にアミノ側鎖を導入したヌクレオシド誘導体を構成成分として含む。すなわち、化合物２の構造式中の塩基Ｂがチミンであるオリゴヌクレオチド合成ユニットからは、チミジンの糖部の４’位のα位にアミノ側鎖を導入した、化１に構造式を示すチミジン誘導体、すなわち４’－Ｃ－（Ｎ－アミノエチルカルバモイル）オキシエチルチミジンを、塩基Ｂがウラシルであるオリゴヌクレオチド合成ユニットからは、デオキシウリジンの糖部の４’位のα位にアミノ側鎖を導入した、化２に構造式を示すデオキシウリジン誘導体、すなわち４’－Ｃ－（Ｎ－アミノエチルカルバモイル）オキシエチル－２’－デオキシウリジンを、塩基Ｂがシトシンであるオリゴヌクレオチド合成ユニットからは、デオキシシチジンの糖部の４’位のα位にアミノ側鎖を導入した、化３に構造式を示すデオキシシチジン誘導体、すなわち４’－Ｃ－（Ｎ－アミノエチルカルバモイル）オキシエチル－２’－デオキシシチジンを、塩基Ｂがアデニンであるオリゴヌクレオチド合成ユニットからは、デオキシアデノシンの糖部の４’位のα位にアミノ側鎖を導入した、化４に構造式を示すデオキシアデノシン誘導体、すなわち４’－Ｃ－（Ｎ－アミノエチルカルバモイル）オキシエチル－２’－デオキシアデノシンを、塩基Ｂがグアニンであるオリゴヌクレオチド合成ユニットからは、デオキシグアノシンの糖部の４’位のα位にアミノ側鎖を導入した、化５に構造式を示すデオキシグアノシン誘導体、すなわち４’－Ｃ－（Ｎ－アミノエチルカルバモイル）オキシエチル－２’－デオキシグアノシンを、それぞれ構成成分として含むアンチセンスオリゴヌクレオチドが合成される。

【００２２】

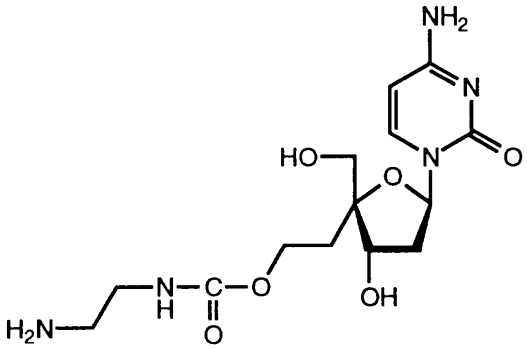
【化１】



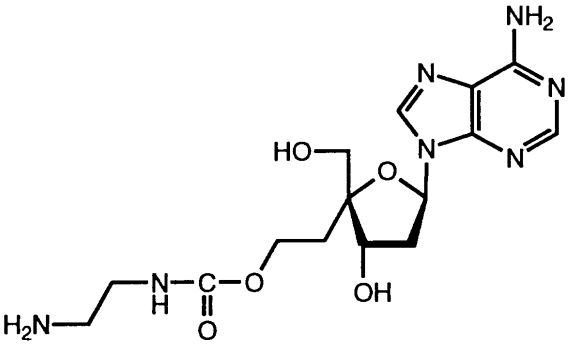
【化２】



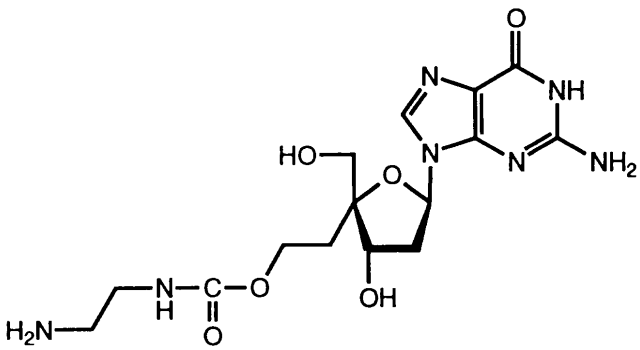
【化３】



【化４】



【化５】



【００２３】

例えば、化１に構造式を示すチミジン誘導体を構成成分として含むＤＮＡオリゴヌクレオチド（ＸＴ－１～ＸＴ－８）の塩基配列の例を、配列番号１～８にそれぞれ示す。

【００２６】
また、配列番号１～８に配列を示したオリゴヌクレオチドの、化１に構造式を示したチミジン誘導体をチミジンに置き換えたオリゴヌクレオチドのＣ（デオキシシチジン）、Ｔ（チミジン）、Ａ（デオキシアデノシン）またはＧ（デオキシグアノシン）を、化３に構造式を示すデオキシシチジン誘導体、化２に構造式を示すデオキシウリジン誘導体、化４に構造式を示すデオキシアデノシン誘導体、または化５に構造式を示すデオキシグアノシン誘導体でそれぞれ置き換えた各種のアンチセンスオリゴヌクレオチドを合成することが可能である。
【００２７】
上記したようにして得られたオリゴヌクレオチドに含まれるヌクレオシド誘導体は、それぞれの相補的ヌクレオシドと水素結合対を形成して、熱安定性およびヌクレアーゼに対する抵抗性を示すものと想定される。
【００２８】
【実施例】
以下に、この発明に係るアンチセンスオリゴヌクレオチドの具体的な製法例、ならびに、得られたアンチセンスオリゴヌクレオチドの熱安定性およびヌクレアーゼに対する抵抗性について検討した結果を示す。
【００２９】
〔オリゴヌクレオチド合成ユニット：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－ジメトキシトリチル－４’－Ｃ－［Ｎ－（Ｎ－トリフルオロアセチルアミノエチル）カルバモイル］オキシエチルチミジンの合成例〕
アルゴンガス雰囲気下において、５’－Ｏ－ジメトキシトリチル－４’－Ｃ－［Ｎ－（Ｎ－トリフルオロアセチルアミノエチル）カルバモイル］オキシエチルチミジン（化合物１）４２３ｍｇ（０．５５ｍｍｏｌ）を塩化メチレン１０ｍｌに溶解させ、この溶液にジイソプロピルエチルアミン１９２μｌ（１．１ｍｍｏｌ，２ｅｑ）と２－シアノエチル－Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルクロロホスホロアミダイト１８４μｌ（０．８３ｍｍｏｌ，１．５ｅｑ）を添加し、その混合液を室温で３０分間撹拌した。その後さらに、混合液にジイソプロピルエチルアミン４８μｌ（０．５ｅｑ）と２－シアノエチル－Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルクロロホスホロアミダイト６１μｌ（０．５ｅｑ）を添加し、その混合液を室温で１時間半、撹拌した。次に、反応液にクロロホルム５０ｍｌを添加し、飽和重曹水４０ｍｌで２回分液し、飽和食塩水４０ｍｌで１回分液した。そして、抽出された有機層を無水硫酸ナトリウムによって乾燥させた後、溶媒を留去させ、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（中性シリカゲル：φ３．０×１３ｃｍ、カラムクロマトグラフィー溶媒：ヘキサン－酢酸エチル（ヘキサン：酢酸エチル＝１：１～１：３）または酢酸エチルのみ）により精製し、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－ジメトキシトリチル－４’－Ｃ－［Ｎ－（Ｎ－トリフルオロアセチルアミノエチル）カルバモイル］オキシエチルチミジン（化合物２）を３８５ｍｇ（０．４ｍｍｏｌ、収率７２％）、白色泡状物質として得た。機器分析値は、ＦＡＢ－ＭＳ（ｍ／ｚ）：９７１（$M^{+}+1$）、^{31}Ｐ－ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ：１５０．２８，１４９．８８であった。
【００３０】
〔オリゴデオキシヌクレオチドの合成例および精製例〕
合成は、ＤＮＡ自動合成機（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ ３９１ＤＮＡ ｓｙｎｔｈｅｓｉｚｅｒ）を使用し、ホスホロアミダイト法に従って、１μｍｏｌスケールで行なった。デオキシアデノシン、デオキシグアノシン、デオキシシチジンおよびチミジンの各ホスホロアミダイト体については、それぞれの濃度を０．１Ｍとしたアセトニトリル溶液として、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－ジメトキシトリチル－４’－Ｃ－［Ｎ－（Ｎ－トリフルオロアセチルアミノエチル）カルバモイル］オキシエチルチミジンについては、その濃度を０．１２Ｍとしたアセトニトリル溶液としてそれぞれ用いた。

【００３１】
合成されたオリゴヌクレオチドに濃アンモニア水３ｍｌを添加し、その溶液を５５℃の温度で１６時間静置させ、樹脂からの切り出しおよびアミノ基の脱保護を行った。樹脂を濾去させた後、濾液の溶媒を留去させ、残渣をＣ－１８逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（φ１．０×１２ｃｍ、溶媒：０～４０％アセトニトリルを含むトリエチルアンモニウムアセテート緩衝液により精製した。逆相高速液体クロマトグラフィー（逆相ＨＰＬＣ）により、目的物を高純度に含むフラクションを確認し、それらを集め、濃縮した。続いて、水で数回共沸させた後、残渣を８０％酢酸４ｍｌに溶解させ、エーテルで洗浄した。その後に、水層を濃縮し、逆相ＨＰＬＣによりオリゴヌクレオチドの純度を確認し、必要な場合には、さらに分取精製して、高純度のオリゴヌクレオチド（配列番号１～８に配列を示したＸＴ－１～ＸＴ－８）を得た。

【００３２】
〔二本鎖の熱安定性の検討〕
上記したようにして合成、精製された、配列番号１～８に配列を示したオリゴヌクレオチドＸＴ－１～ＸＴ－８のそれぞれと、それらと相補的なオリゴヌクレオチド（配列番号９に配列を示した標的ＤＮＡおよび配列番号１０に配列を示した標的ＲＮＡ）のそれぞれとで二本鎖を形成させて、それぞれの場合における二本鎖の熱安定性を測定した。これには、まず、配列番号１～５に配列を示したオリゴヌクレオチドＸＴ－１～ＸＴ－５のそれぞれと相補的なオリゴデオキシリボヌクレオチド（標的ＤＮＡ）：配列番号９、および、配列番号６～８に配列を示したオリゴヌクレオチドＸＴ－６～ＸＴ－８のそれぞれと相補的なオリゴリボヌクレオチド（標的ＲＮＡ）：配列番号１０をそれぞれ、公知の方法により合成する。また、コントロールオリゴヌクレオチドとして、配列番号１に示したオリゴヌクレオチドＸＴ－１のチミジン誘導体をチミジンに置き換えたＣｏｎｔｒｏｌ－１：配列番号１１、および、配列番号６に示したオリゴヌクレオチドＸＴ－６のチミジン誘導体をチミジンに置き換えたＣｏｎｔｒｏｌ－２：配列番号１２をそれぞれ、公知の方法により合成する。続いて、配列番号１～５に配列を示したオリゴヌクレオチドＸＴ－１～ＸＴ－５のそれぞれと相補的なオリゴデオキシリボヌクレオチド（配列番号９に配列を示した標的ＤＮＡ）と配列番号１１に配列を示したコントロールオリゴヌクレオチドＣｏｎｔｒｏｌ－１および配列番号１～５に配列を示した新規なオリゴヌクレオチドＸＴ－１～ＸＴ－５との二本鎖をそれぞれ形成させて、それぞれの場合における二本鎖の熱安定性を測定した。また、配列番号６～８に配列を示したオリゴヌクレオチドＸＴ－６～ＸＴ－８のそれぞれと相補的なオリゴリボヌクレオチド（配列番号１０に配列を示した標的ＲＮＡ）と配列番号１２に配列を示したコントロールオリゴヌクレオチドＣｏｎｔｒｏｌ－２および配列番号６～８に配列を示した新規なオリゴヌクレオチドＸＴ－６～ＸＴ－８との二本鎖をそれぞれ形成させて、それぞれの場合における二本鎖の熱安定性を測定した。

【００３３】
二本鎖の熱安定性の測定は、緩衝液として、配列番号１～５に配列を示したオリゴヌクレオチドＸＴ－１～ＸＴ－５および配列番号１１に配列を示したコントロールオリゴヌクレオチドＣｏｎｔｒｏｌ－１のそれぞれと配列番号９に配列を示した標的ＤＮＡとでそれぞれ形成された二本鎖については０．０５Ｍの塩化ナトリウムと０．０１Ｍの燐酸ナトリウムとの混合水溶液（ｐＨ７．０）を用い、配列番号６～８に配列を示したオリゴヌクレオチドＸＴ－６～ＸＴ－８および配列番号１２に配列を示したコントロールオリゴヌクレオチドＣｏｎｔｒｏｌ－２と配列番号１０に配列を示した標的ＲＮＡとでそれぞれ形成された二本鎖については０．５Ｍの塩化ナトリウムと０．０１Ｍの燐酸ナトリウムとの混合水溶液（ｐＨ７．０）を用い、それぞれオリゴマーの３μＭの溶液を調製して、それぞれの溶液の融点Ｔｍを測定することにより行った。その結果を表１に示す。

【００３４】
【表１】

標的ＤＮＡ	配列番号９	Ｔｍ（℃）
アンチセンスオリゴヌクレオチド		
Control-1	配列番号１１	６４．４
ＸＴ－１	配列番号１	６４．１
ＸＴ－２	配列番号２	６３．３
ＸＴ－３	配列番号３	６４．３
ＸＴ－４	配列番号４	６４．２
ＸＴ－５	配列番号５	６４．０
標的ＲＮＡ	配列番号１０	
アンチセンスオリゴヌクレオチド		
Control-2	配列番号１２	６１．１
ＸＴ－６	配列番号６	６０．６
ＸＴ－７	配列番号７	６１．４
ＸＴ－８	配列番号８	６０．２

【００３５】
表１に示した結果より、アンチセンスオリゴヌクレオチドに含まれるチミジンを、チミジンの糖部の４’位のα位にアミノ側鎖を導入したチミジン誘導体に置き換えても、二本鎖の熱安定性が低下することはなく、二本鎖が安定に存在することが分かる。
【００３６】
〔ヌクレアーゼに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの抵抗性試験〕
一方、アンチセンスオリゴヌクレオチドの生体内での安定性を調べるために、ヌクレアーゼによるアンチセンスオリゴヌクレオチドの加水分解に対する抵抗性を検討した。
【００３７】
試験は、次のような方法により行った。すなわち、エキソヌクレアーゼによる加水分解では、オリゴヌクレオチドＸＴ－５：配列番号５を用いて表２に示すような組成の溶液を調製し、また、エンドヌクレアーゼによる加水分解では、オリゴヌクレオチドＸＴ－１：配列番号１を用いて表３に示すような組成の溶液を調製した。
【００３８】
【表２】

リン32-標識オリゴヌクレオチド（XT-5）	10pmol
蛇毒ボスホジエステラーゼ（0.4mg / ml）	1μl
250mMトリス塩酸緩衝液（pH8.0）、50mM塩化マグネシウム	3μl
トルラ酵母RNA（130 ODunits / ml）	2.5μl
蒸留水	13.5μl
合計	20μl

【００３９】
【表３】

リン32-標識オリゴヌクレオチド（XT-1）	10pmol
ウシ膵臓デオキシリボヌクレアーゼＩ（1Unit / μl）	1μl
200mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH6.0）	10μl
25mM塩化マグネシウム	4μl
トルラ酵母RNA（130 ODunits / ml）	3μl
蒸留水	3μl
合計	20μl

【００４０】
そして、調製された溶液を３７℃に加温し、１０、２０、３０、６０、１２０分後にそれぞれ溶液４μｌずつを５ｍＭのエチレンジアミン四酢酸水溶液１０μｌと混合させ、１００℃の温度で５分間加熱した後に濃縮乾固させた。この操作によって得られた試料を２０％ポリアクリルアミドの電気泳動によって解析した。また、コントロールオリゴヌクレオチドＣｏｎｔｒｏｌ－１：配列番号１１を用いて表２および表３に示すような組成の溶液をそれぞれ調製して、上記と同様の解析を行った。それらの結果を図２および図３にそれぞれ示す。
【００４２】
図２に示すように、２時間以内においてはエキソヌクレアーゼによる分解がほとんど観察されなかった。これは、ヌクレオシドの糖部の４’位に導入されたアミノ側鎖の存在がヌクレアーゼに対する抵抗性を増強することを示唆している。
【００４３】
以上のことより、この発明に係るオリゴヌクレオチドは新規のアンチセンスオリゴヌクレオチドとして応用することが可能であることが分かった。
【００４４】
【発明の効果】
請求項１ないし請求項５に係る各発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、生物学的安定性を示すとともに、標的とするｍＲＮＡに対して特異的でかつ熱力学的に安定な相補的結合を有する二本鎖を形成するので、エイズウイルス、サイトメガロウイルスなどに対する抗ウイルス剤や慢性骨髄性白血病等に対する抗癌剤として開発が進められているアンチセンスオリゴヌクレオチドで問題となっている特異性、熱安定性及び生体内安定性の要求

を克服することができ、より効果的な薬剤としての利用が期待される。

【００４５】

【配列表】

配列番号：１

配列の長さ：１９

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸　　合成オリゴヌクレオチド

アンチセンス：Ｙｅｓ

配列の特徴

　特徴を表す記号：ｍｏｄｉｆｉｅｄ－ｓｉｔｅ

　存在位置：１６

　特徴を決定した方法：Ｅ

　他の情報：チミジンの糖部の４’位のα位にアミノ側鎖を導入

配列：ＣＴＧＧＣＴＣＡＧＣ　ＴＣＧＴＣＴＣＡＴ　　１９

【００４６】

配列番号：２

配列の長さ：１９

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸　　合成オリゴヌクレオチド

アンチセンス：Ｙｅｓ

配列の特徴

　特徴を表す記号：ｍｏｄｉｆｉｅｄ－ｓｉｔｅ

　存在位置：２

　特徴を決定した方法：Ｅ

　他の情報：チミジンの糖部の４’位のα位にアミノ側鎖を導入

配列：ＣＴＧＧＣＴＣＡＧＣ　ＴＣＧＴＣＴＣＡＴ　　１９

【００４７】

配列番号：３
配列の長さ：１９
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　　合成オリゴヌクレオチド
アンチセンス：Ｙｅｓ
配列の特徴
　特徴を表す記号：ｍｏｄｉｆｉｅｄ－ｓｉｔｅ
　存在位置：２，１６
　特徴を決定した方法：Ｅ
　他の情報：チミジンの糖部の４’位のα位にアミノ側鎖を導入
配列：ＣＴＧＧＣＴＣＡＧＣ　ＴＣＧＴＣＴＣＡＴ　　１９

【００４８】

配列番号：４
配列の長さ：１９
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　　合成オリゴヌクレオチド
アンチセンス：Ｙｅｓ
配列の特徴
　特徴を表す記号：ｍｏｄｉｆｉｅｄ－ｓｉｔｅ
　存在位置：２，１１，１６
　特徴を決定した方法：Ｅ
　他の情報：チミジンの糖部の４’位のα位にアミノ側鎖を導入
配列：ＣＴＧＧＣＴＣＡＧＣ　ＴＣＧＴＣＴＣＡＴ　　１９

【００４９】

配列番号：５
配列の長さ：１９
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　　合成オリゴヌクレオチド
アンチセンス：Ｙｅｓ
配列の特徴
　特徴を表す記号：ｍｏｄｉｆｉｅｄ－ｓｉｔｅ
　存在位置：２，６，１１，１６
　特徴を決定した方法：Ｅ
　他の情報：チミジンの糖部の４’位のα位にアミノ側鎖を導入
配列：ＣＴＧＧＣＴＣＡＧＣ　ＴＣＧＴＣＴＣＡＴ　　１９

【００５０】

配列番号：６
配列の長さ：１７
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　　合成オリゴヌクレオチド
アンチセンス：Ｙｅｓ
配列の特徴
　特徴を表す記号：ｍｏｄｉｆｉｅｄ－ｓｉｔｅ
　存在位置：１０
　特徴を決定した方法：Ｅ
　他の情報：チミジンの糖部の４’位のα位にアミノ側鎖を導入
配列：ＣＴＣＧＴＡＣＣＡＴ　ＴＣＣＧＣＴＣ　　１７

【００５１】

配列番号：７
配列の長さ：１７
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　　合成オリゴヌクレオチド
アンチセンス：Ｙｅｓ
配列の特徴
　特徴を表す記号：ｍｏｄｉｆｉｅｄ－ｓｉｔｅ
　存在位置：５，１１
　特徴を決定した方法：Ｅ
　他の情報：チミジンの糖部の４’位のα位にアミノ側鎖を導入
配列：ＣＴＣＧＴＡＣＣＡＴ　ＴＣＣＧＣＴＣ　　１７

【００５２】

配列番号：８
配列の長さ：１７
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　　合成オリゴヌクレオチド
アンチセンス：Ｙｅｓ
配列の特徴
　特徴を表す記号：ｍｏｄｉｆｉｅｄ－ｓｉｔｅ
　存在位置：２，５，１０，１６
　特徴を決定した方法：Ｅ
　他の情報：チミジンの糖部の４’位のα位にアミノ側鎖を導入
配列：ＣＴＣＧＴＡＣＣＡＴ　ＴＣＣＧＣＴＣ　　１７

【００５３】

配列番号：９
配列の長さ：１９
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　　合成オリゴヌクレオチド
アンチセンス：Ｎｏ
配列：ＡＴＧＡＧＡＣＧＡＧ　ＣＴＧＡＧＣＣＡＧ　　１９

【００５４】
配列番号：１０
配列の長さ：１７
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　　合成オリゴヌクレオチド
アンチセンス：Ｎｏ
配列：ＧＡＧＣＧＧＡＡＵＧ　ＧＵＡＣＧＡＧ　　１７

【００５５】
配列番号：１１
配列の長さ：１９
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　　合成オリゴヌクレオチド
アンチセンス：Ｙｅｓ
配列：ＣＴＧＧＣＴＣＡＧＣ　ＴＣＧＴＣＴＣＡＴ　　１９

【００５６】

配列番号：１２

配列の長さ：１７

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸　　合成オリゴヌクレオチド

アンチセンス：Ｙｅｓ

配列：ＣＴＣＧＴＡＣＣＡＴ　ＴＣＣＧＣＴＣ　１７

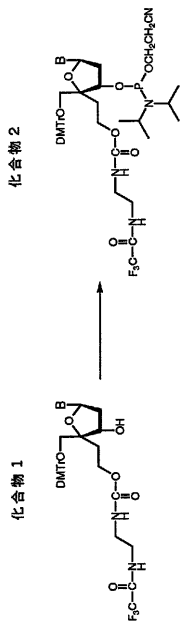
【図面の簡単な説明】

【図１】この発明に係るアンチセンスオリゴヌクレオチドを化学的に合成する場合の第１段階として、それぞれ官能基を保護したデオキシリボヌクレオシド誘導体（化合物１）からオリゴヌクレオチド合成ユニット（化合物２）を合成する場合の反応式を示す。

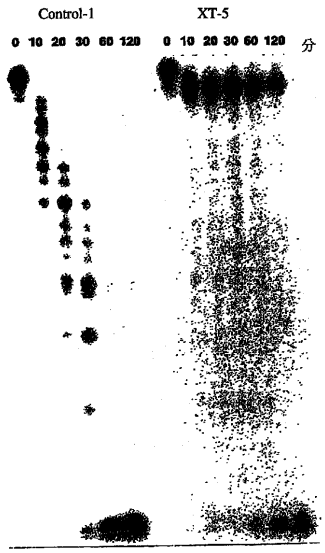
【図２】この発明に係るアンチセンスオリゴヌクレオチドの、エキソヌクレアーゼに対する抵抗性試験の結果を示す図である。

【図３】この発明に係るアンチセンスオリゴヌクレオチドの、エンドヌクレアーゼに対する抵抗性試験の結果を示す図である。

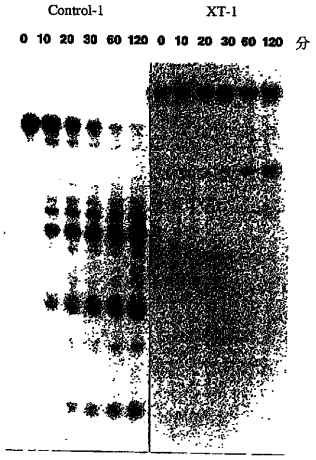
【図１】



【図２】



【図３】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
Ａ６１Ｐ 35/00 (2006.01) Ａ６１Ｐ 35/00

(56)参考文献 国際公開第９６／１４３２９（WO，Ａ１）
特開平０９－０９５４９５（ＪＰ，Ａ）
Bioconjugate Chemistry，１９９３年，Vol.4，p.499-508
Nucleic Acids Research，１９９７年１０月 １日，Vol.25，No.19，p.3777-3782

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C07H 21/00
C07H 19/00
REGISTRY(STN)
CAplus(STN)