

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-507272

(P2004-507272A)

(43) 公表日 平成16年3月11日(2004.3.11)

(51) Int. Cl.⁷

C 1 2 N 15/09
A 6 1 K 31/712
A 6 1 K 48/00
A 6 1 P 31/12
A 6 1 P 43/00

F I

C 1 2 N 15/00 Z N A A
 A 6 1 K 31/712
 A 6 1 K 48/00
 A 6 1 P 31/12
 A 6 1 P 43/00 1 1 1

テーマコード (参考)

4 B O 2 4
 4 C O 8 4
 4 C O 8 6

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 80 頁)

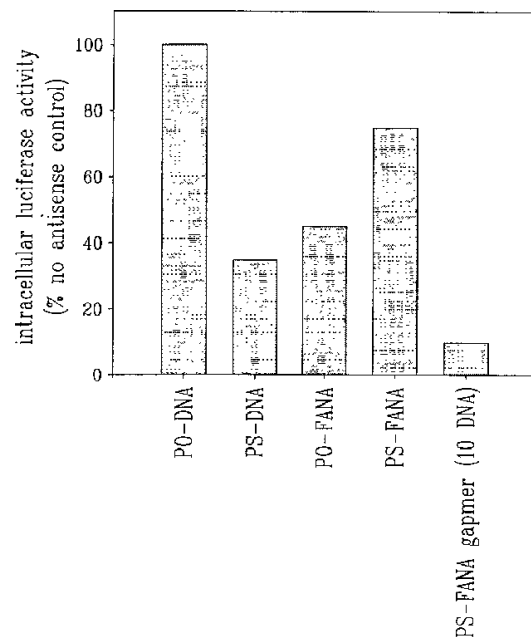
(21) 出願番号 特願2002-525780 (P2002-525780)
 (86) (22) 出願日 平成13年9月4日 (2001.9.4)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年3月6日 (2003.3.6)
 (86) 国際出願番号 PCT/CA2001/001252
 (87) 国際公開番号 W02002/020773
 (87) 国際公開日 平成14年3月14日 (2002.3.14)
 (31) 優先権主張番号 60/230,414
 (32) 優先日 平成12年9月6日 (2000.9.6)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 500539088
 マクギル ユニバーシティー
 カナダ国 ケベック州 モントリオール
 シャープルック ストリート 845
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100108774
 弁理士 橋本 一憲
 (72) 発明者 ダンハ マサド ジョゼ
 カナダ国 ケベック州 セイントーヒュー
 バート ピエール ティー. ハーチャー
 3166
 (72) 発明者 パーニエイク ミシェル エー.
 アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 ビッ
 ツバーグ フォーベス テラス 20
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アラビノフラノース類似体およびデオキシリボースヌクレオチドのキメラアンチセンス

(57) 【要約】

本発明は、配列特異的方法において遺伝子の転写および発現を選択的に妨害するために治療的物質として使用される新規オリゴヌクレオチドキメラに関する。特に本発明は、一連の可変長デオキシリボースヌクレオチド残基が隣接している、アラビノヌクレオチド残基または修飾されたアラビノヌクレオチド残基から構築されたオリゴヌクレオチドを用いるアンチセンス戦略によりタンパク質合成を選択的に阻害することに向けられる。詳細に述べると、本発明は、細胞mRNA、ウイルスRNAなどの相補的RNAへハイブリダイズするための、一連の可変長デオキシリボースヌクレオチド残基が隣接している、アラビノヌクレオチド残基または修飾されたアラビノヌクレオチド残基から構築されたアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用に関する。より詳細に述べると、本発明は、相補的RNAへハイブリダイズしその切断 (RNase H活性化による) を誘導するための、一連の可変長デオキシリボースヌクレオチド残基が隣接している、アラビノヌクレオチド残基または修飾されたアラビノヌクレオチド残基から構築されたアンチセンスオリゴ



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列特異的方法において遺伝子発現を選択的に妨害する、オリゴヌクレオチド「キメラ」であり、(a)ヌクレアーゼ安定性、(b)相補的RNA配列へのハイブリダイゼーションの結合強度、(c)該オリゴヌクレオチドの細胞への透過性、(d)RNase Hによる標的RNAの切断、または(e)リボース転位の物理的阻止(「翻訳抑制(translation arrest)」)のうち、少なくとも1種を誘導するために、1本鎖RNAにハイブリダイズする修飾されたアラビノースと2'-デオキシ糖とのキメラが含まれる、オリゴヌクレオチド「キメラ」。

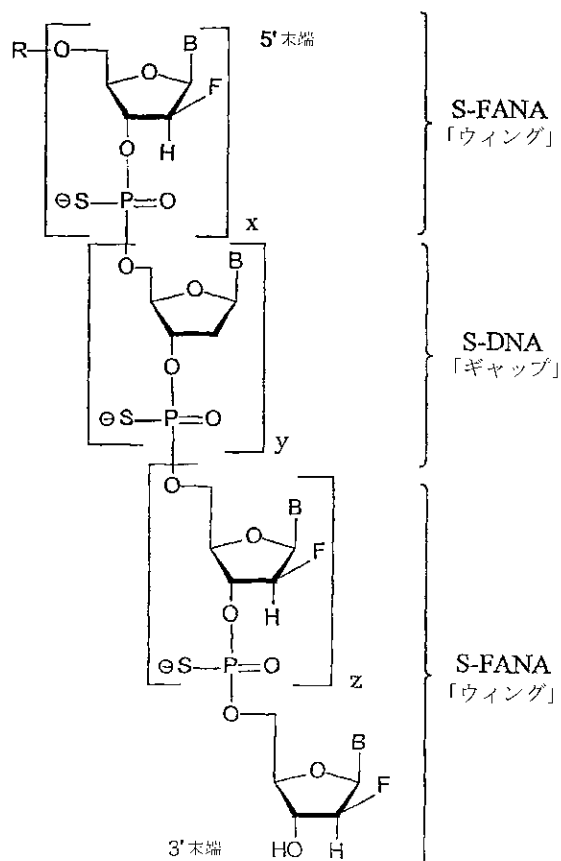
【請求項 2】

一般骨格組成「[FANA ウィング] - [DNA ギャップ] - [FANA ウィング]」、または5' RO (FANA-p) x - (DNA-p) y - (FANA-p) z - (FANA) 3' OHを有する、請求項1記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 3】

一般式

【化 1】



(式中、

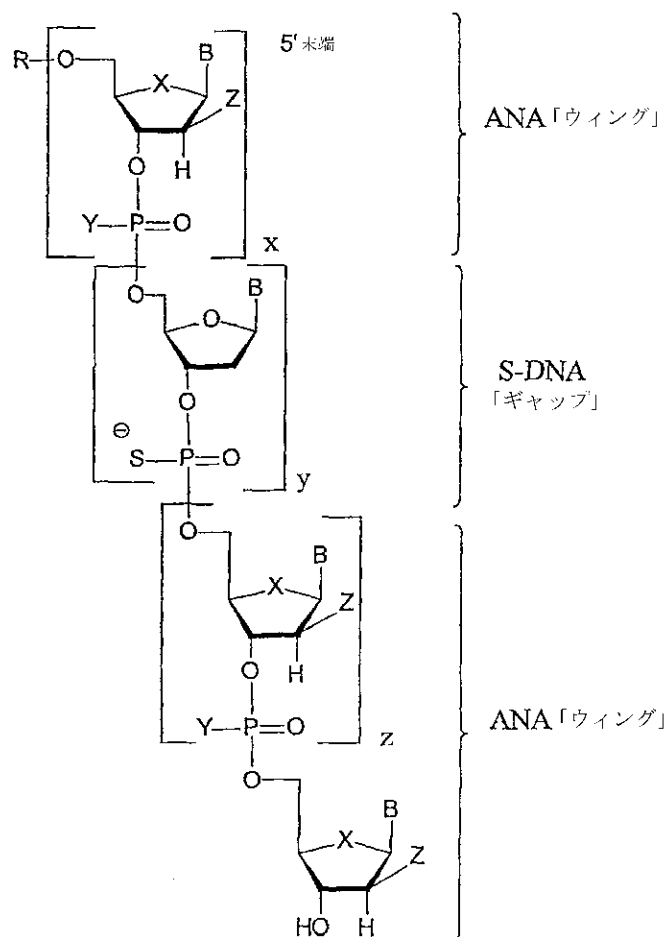
$x \geq 1$ 、 $y \geq 1$ 、および $z \geq 0$ であり、ならびに

Rは、水素、チオリン酸、およびこのようなオリゴヌクレオチドの細胞取込みを増強するリンカー部分からなる群より選択される)を有する請求項2記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 4】

オリゴヌクレオチドが下記式

【化 2】



10

20

(式中、

 $x \geq 1$ 、 $y \geq 1$ 、および $z \geq 0$ であり；

Rは、水素、チオリン酸、およびこのようなオリゴヌクレオチドの細胞取込みを増強するリンカー部分からなる群より選択され； 30

Bは、アデニン、グアニン、ウラシル、チミン、シトシン、イノシン、および5-メチルシトシンからなる群より選択され；

Yは、ヌクレオチド間リン酸結合において、イオウ、酸素、メチル、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ（このアルキル基は1～約20個の炭素原子を有する）、メトキシ、およびエトキシからなる群より選択され；

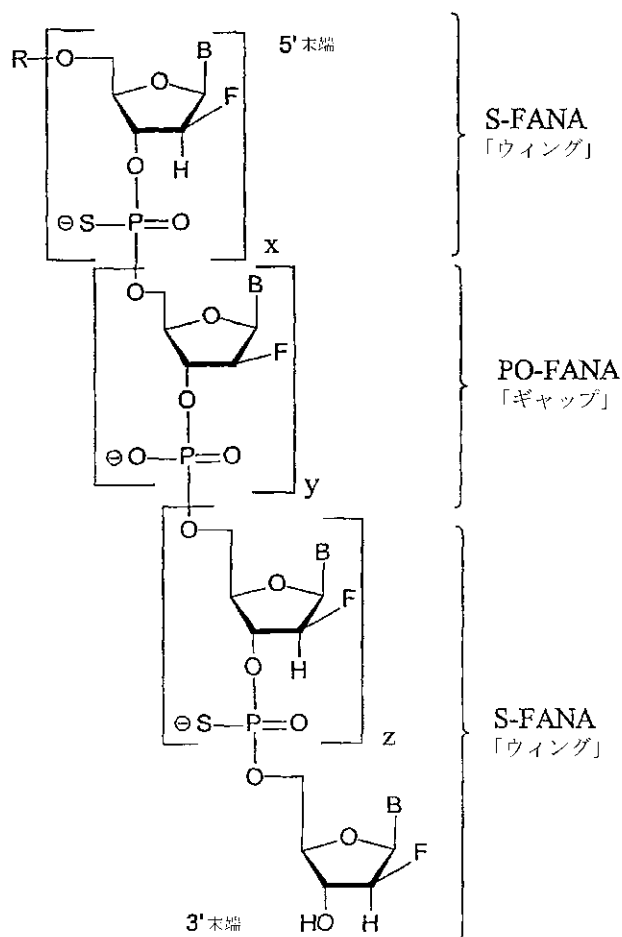
Xは、フラノース環（4'位）において、酸素、イオウ、およびメチレン（ CH_2 ）からなる群より選択され；ならびに

Zは、この糖環の2'位において、ハロゲン（フッ素、塩素、臭素、ヨウ素）、アルキル、ハロゲン化アルキル（例えば、 $-\text{CH}_2\text{F}$ ）、アリル、アミノ、アリール、アルコキシ、およびアジドからなる群より選択される）を有する請求項1記載のオリゴヌクレオチド。 40

【請求項5】

オリゴヌクレオチドが下記式

【化 3】



10

20

(式中、

 $x \geq 1$ 、 $y \geq 1$ 、および $z \geq 0$ であり；

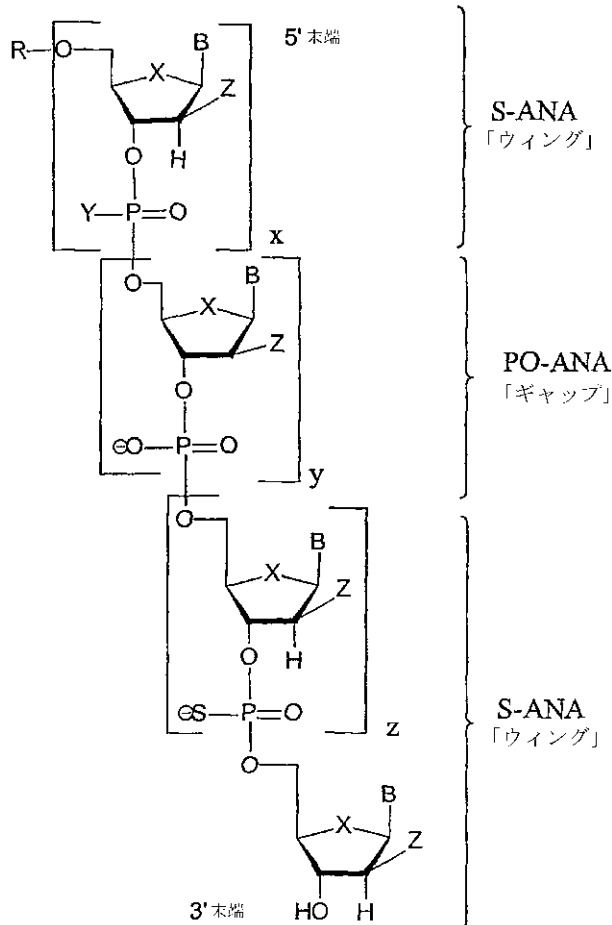
Rは、水素、チオリン酸、およびこのようなオリゴヌクレオチドの細胞取込みを増強するリンカー部分からなる群より選択され； 30

Bは、アデニン、グアニン、ウラシル、チミン、シトシン、イノシン、および5-メチルシトシンからなる群より選択される)を有する請求項1記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項6】

オリゴヌクレオチドが下記式

【化 4】



10

20

30

40

(式中、

$x \geq 1$ 、 $y \geq 1$ 、および $z \geq 0$ であり；

Rは、水素、チオリン酸、およびこのようなオリゴヌクレオチドの細胞取込みを増強するリンカー部分からなる群より選択され；

Bは、アデニン、グアニン、ウラシル、チミン、シトシン、イノシン、および5-メチルシトシンからなる群より選択され；

Yは、ヌクレオチド間リン酸結合において、イオウ、酸素、メチル、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ（このアルキル基は1～約20個の炭素原子を有する）、メトキシ、およびエトキシからなる群より選択され；

Xは、フラノース環（4'位）において、酸素、イオウ、およびメチレン（ CH_2 ）からなる群より選択され；ならびに

Zは、この糖環の2'位において、ハロゲン（フッ素、塩素、臭素、ヨウ素）、ヒドロキシル、アルキル、ハロゲン化アルキル（例えば、 CH_2F ）、アリル、アミノ、アリール、アルコキシおよびアジドからなる群より選択される）を有する請求項1記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項7】

下記の工程を含む、1本鎖RNAの切断法：

(c) 配列特異的方法において請求項1～6記載のオリゴヌクレオチドを1本鎖RNAへハイブリダイズし、RNase H活性を誘導する工程；および

(d) 該誘導したRNase Hに、該ハイブリダイズした1本鎖RNAを切断させる工程。

【請求項8】

配列特異的方法において請求項1～6記載のキメラオリゴヌクレオチドを1本鎖RNAへハイブリダイズし、これにより該1本鎖RNAにコードされる特異的タンパク質の産生を

50

妨害する工程を含む、該 1 本鎖 R N A の翻訳を妨害する方法。

【請求項 9】

R N A が相補的 R N A である、請求項 7 または 8 記載の方法。

【請求項 10】

相補的 R N A が、細胞 m R N A またはウイルス R N A である、請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】

1 本鎖 R N A を切断するための医薬品を調製するための請求項 1 ～ 6 記載のオリゴヌクレオチドの使用であり、ここで該オリゴヌクレオチドは、配列特異的方法において 1 本鎖 R N A にハイブリダイズし、該ハイブリダイズした 1 本鎖 R N A を切断する R N a s e H 活性を誘導する、オリゴヌクレオチドの使用。

10

【請求項 12】

相補的 R N A が、細胞 m R N A またはウイルス R N A である、請求項 11 記載の使用。

【請求項 13】

1 本鎖 R N A を切断するためのプローブまたは実験試薬を調製するための請求項 1 ～ 6 記載のオリゴヌクレオチドの使用であり、ここで該オリゴヌクレオチドは、配列特異的方法において 1 本鎖 R N A にハイブリダイズし、該ハイブリダイズした 1 本鎖 R N A を切断する R N a s e H 活性を誘導する、オリゴヌクレオチドの使用。

【請求項 14】

相補的 R N A が、細胞 m R N A またはウイルス R N A である、請求項 13 記載の使用。

【請求項 15】

配列特異的方法において遺伝子発現を選択的に妨害する薬学的組成物であり、薬学的に許容される担体と共に、請求項 1 ～ 6 記載のオリゴヌクレオチド「キメラ」を有効量含有する、組成物。

20

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の背景

(a) 発明の技術分野

本発明は、配列特異的方法において遺伝子の転写および発現を選択的に防止するための治療的物質として使用される新規オリゴヌクレオチドキメラに関する。特に本発明は、一連の可変長デオキシリボースヌクレオチド残基が隣接している、アラビノヌクレオチド残基または修飾されたアラビノヌクレオチド残基から構築されたオリゴヌクレオチドを用いるアンチセンス戦略による、タンパク質生合成の選択的阻害に関する。詳細に述べると、本発明は、一連の可変長デオキシリボースヌクレオチド残基が隣接している、アラビノヌクレオチド残基または修飾されたアラビノヌクレオチド残基から構築されたアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用し、細胞 m R N A、ウイルス R N A などの相補的 R N A にハイブリダイズすることに関する。より詳細に述べると、本発明は、一連の可変長デオキシリボースヌクレオチド残基が隣接している、アラビノヌクレオチド残基または修飾されたアラビノヌクレオチド残基から構築されたアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用し、相補的 R N A にハイブリダイズしその切断 (R N a s e H 活性化による) を誘導することに関する。

30

40

【0002】

(b) 先行技術の説明

アンチセンス戦略

アンチセンスオリゴヌクレオチド (A O N) は、配列特異的方法において特異的遺伝子発現を阻害することができる治療的物質である。現在多くの A O N が、癌およびウイルス性疾患の治療に関して臨床試験中である。臨床的有用性に関し、A O N は、血清および細胞ヌクレアーゼによる分解に対する安定性を発揮し、血清および細胞タンパク質に対して低い非特異的結合を示し (この結合は、標的 R N A との塩基対形成に利用可能なアンチセンスオリゴヌクレオチドの量を減少させるので)、標的 R N A 配列の認識を増強させ (別の表現をすると、生理的温度で、アンチセンスー標的 R N A 二重鎖の安定性を増大させる)

50

、かつある程度は、細胞膜透過性を示さなければならない。標的遺伝子発現のアンチセンス阻害は、少なくとも2種の主要な機構によって生じると考えられている。第一のものは、「翻訳抑止 (translation arrest)」であり、ここでは、アンチセンスオリゴマーとその標的RNAとの間の二重鎖形成が、リボソームの完全なmRNA配列を認識する能力を阻止することにより、RNAのタンパク質への完全な翻訳を妨げている。第二の機構は、おそらくより重要であり、これはアンチセンスオリゴヌクレオチドの、標的mRNAのリボヌクレアーゼH (RNase H) で触媒された分解を指示する能力に関する。RNase Hは、RNAが、相補的DNAオリゴヌクレオチド (またはアンチセンスオリゴヌクレオチド) 成分と二重鎖化された場合に、RNAを特異的に分解する内在性細胞酵素である。例えば、アンチセンスDNAオリゴヌクレオチドが、細胞mRNAへ相補的塩基対形成を介してハイブリダイズする場合に、細胞RNase Hは、得られるDNA/RNAハイブリッド二重鎖を認識し、次にその部位でmRNAを分解する。これら両方の機構により遺伝子発現を変調することができるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、インビボにおいて可能性のあるアンチセンス化合物の効能を増大させるので、非常に望ましい。

10

【0003】

オリゴヌクレオチド類似体

天然型 (リボースまたはデオキシリボース) 糖およびホスホジエステル (PO) 結合を含むオリゴヌクレオチドは、血清および細胞内のヌクレアーゼにより速やかに分解され、このことは有効な治療的物質としてのそれらの有用性を制限している。ヌクレアーゼ安定性を改善するための化学戦略は、糖部分、塩基部分の修飾、および/またはヌクレオチド間ホスホジエステル結合の修飾または置換を含む。今日まで、最も広く研究された類似体は、ホスホロチオエート (PS) オリゴデオキシヌクレオチドであり、これはホスホジエステル骨格の非架橋 (non-bridging) 酸素原子のひとつがイオウで置換されている。多くのS-DNAオリゴヌクレオチド類似体が、癌、感染症および他のヒト病理発生の治療について臨床試験において評価中であり、そのいくつかは既に新薬承認申請 (NDA) が提出されている。S-DNAアンチセンスは、標的mRNAのRNase H分解を誘発することができ、かつこれらは血清および細胞ヌクレアーゼによる分解に対しかなり不応性 (refractory) である。しかし、PS-DNAアンチセンスは、ホスホジエステル (PO) 結合を伴うオリゴデオキシヌクレオチドよりも、熱力学的安定性が低い標的RNA核酸との二重鎖を形成する傾向がある。更にS-DNAアンチセンスは、対応するPO-DNAよりも、標的RNAのRNase H分解を誘発する効率が低い。

20

30

【0004】

作用の特異性は、新規オリゴヌクレオチド類似体の開発により改善され得る。新規オリゴヌクレオチドを作出する現在の戦略は、ヌクレオチド間のリン酸骨格、ヘテロ環式塩基、および糖環、またはこれらの組合せを変更することである。ヌクレオチド間の結合の変更または完全な交換は、最も一般的な方法であり、1994年以降60種を超える修飾されたリン酸骨格が研究されている。ホスホロチオエート骨格を除けば、わずかに2種の他のもの、すなわち、ホスホロジチオエート (PS₂) およびボラノホスホネート骨格が、RNase H活性を活性化することが報告されている。ホスホロジチオエート結合した (PS₂) オリゴデオキシヌクレオチドは、その高いイオウ含量のために、ホスホロチオエート (PS) オリゴマーよりもより緊密にタンパク質に結合し、かつPS類似体と比べ低い効率でRNase H媒介型切断を活性化するように見える。ボラノホスホネート結合したオリゴデオキシヌクレオチドは、RNase Hが媒介するRNA標的の切断を活性化するが、PO結合またはPS結合したオリゴデオキシヌクレオチドよりもはるかに少ない。

40

【0005】

報告されたように、糖修飾したオリゴヌクレオチドにおいて、そのほとんどは5員環を有し、DNA (D-2-デオキシリボース) およびRNA (D-リボース) の糖によく似て

50

いる。これらの例は、 α -オリゴデオキシヌクレオチド類似体であり、ここでは1'（またはアノマー）炭素の立体配置が逆位となっている。これらの類似体は、ヌクレアーゼ抵抗性（resistant）であり、DNA配列およびRNA配列と共に安定した二重鎖を形成し、かつRNase Hとは無関係のアンチセンス機構により、 β -グロビンmRNA翻訳を阻害することが可能である。別の例は、キシロDNA、2'-O-Me RNAおよび2'-F-RNAである。これらの類似体は、RNA標的と安定した二重鎖を形成するが、これらの二重鎖は、RNase Hの基質ではない。この制限を克服するために、糖修飾したオリゴヌクレオチドセグメントが両側に隣接したホスホジエステル（PO）およびホスホロチオエート（PS）のオリゴデオキシヌクレオチドセグメントのいずれかで構成された混合型骨格オリゴヌクレオチド（「MBO」）が、合成された（Zha o 10
G. ら、Biochem. Pharmacol.、51:173（1996）；C r o o k e, S. T. ら、J. Pharmacol Exp. Ther.、277:923（1996））。これらのMBOの中で、今日までに最も研究されているものは、[2'-OMe RNA]-[PS DNA]-[2'OMe RNA]キメラである。この鎖の中央のPSセグメントは、RNase H活性化ドメインとして利用される一方で、隣接している2'-OMe RNA領域は、MBO鎖の標的RNAへの親和性を増大する。MBOは、インビボにおいて増大した安定性を有し、インビトロおよびインビボの両方におけるそれらの生物活性について、ホスホロチオエート類似体よりもより効果的であるように見える。オリゴヌクレオチドの隣接領域に2'-OMeおよび他のアルコキシ置換基を組込むこの方法の例は、インビボにおける抗腫瘍活性が増強されたことにより、M o n i 20
a らによって説明された（Monia, P. B. ら、Nature Med.、2:668（1996））。これらの類似体の前臨床試験がいくつか進行中である。

【0006】

ペントフラノース糖の代わりにヘキソピラノースを含むオリゴヌクレオチドの合成も報告されている。2、3のこれらの類似体は、増大した酵素安定性を有するが、全般的には標的配列との二重鎖形成能の低下により損なわれている。注目すべき例外は、高度に予め組織化（pre-organized）された糖構造により、RNAと非常に安定した複合体を形成する1, 5-アンヒドロヘキシトール単位から構成された6'→4'連結オリゴマーである。しかし、これらのヘキソピラノースオリゴヌクレオチド類似体が、RNase 30
H活性を誘発することは示されてはいない。最近、完全に変更された骨格を含むオリゴヌクレオチドが合成された。注目すべき例は、非環式骨格を伴うペプチド核酸（「PNA」）である。これらの化合物は、例外的ハイブリダイゼーション特性、ならびにヌクレアーゼおよびプロテアーゼに対する安定性を有する。しかしアンチセンス構築体としてPNAオリゴマーを使用しようとする試みには、水への低い溶解度、自己凝集特性、細胞取込み不良、およびRNase H活性化の不能が足枷となっている。ごく最近になって、キメラのPS-DNA部分によってRNase H媒介型切断が維持されるように、PNA-[PS-DNA]-PNAキメラが設計された。

【0007】

アラビノヌクレオシドおよびアラビノ核酸（ANA）

アラビノヌクレオシドは、糖環の2'位の立体化学のみが異なる、リボヌクレオシドの異性体である。本発明者らは先に、アラビノースまたは修飾されたアラビノース（特に2'-Fアラビノース）糖を含むヌクレオチドにより全体が構築されたアンチセンスオリゴヌクレオチドは、相補的標的RNAのRNase H分解を誘発することができることを示した（Damha, M. J. ら、JACS、120:12976（1998）；N o r 40
o n h a, A. M. ら、Biochemistry、39:7050（2000））。本発明者らは更に、アラビノースオリゴヌクレオチドとRNAからなる二重鎖の熱安定性が、類似体DNA/RNA二重鎖のそれよりも低いことにも注目した（Noronha, A. M. ら、Biochemistry、39:7050（2000））。しかし対照的に、RNAでハイブリダイズされた2'-Fアラビノースヌクレオチドで合成されたオリゴヌクレオチドからなる二重鎖の熱安定性は、一般に類似体DNA/RNA二重鎖のそ 50

れよりも高い (Damha, M. J. ら、JACS、120:12976 (1998))。Giannaris および Damha は、ANA オリゴヌクレオチド中のホスホジエステル (PO) 結合のホスホロチオエート (PS) 結合との交換は、PS-ANA/PO-RNA 二重鎖の安定性を著しく低下することを発見した (Giannaris, P. A.; Damha, M. J.; Can. J. Chem.、72:909 (1994))。この不安定化は、類似体 DNA オリゴヌクレオチドの PO 結合が、S ヌクレオチド間結合により交換された場合に認められるものよりも大きかった (Giannaris, P. A.; Damha, M. J.; Can. J. Chem.、72:909 (1994))。

【0008】

Watanabe とその同僚らは、2'-デオキシ-2'-フルオロ-β-D-アラビノフラノシルピリミジンヌクレオシド (2'-F-a-r-a-N、ここで N=C、U および T) を、PO-DNA 鎖で主に構成されているオリゴヌクレオチド内のいくつかの位置に組み込み、このような (2'-F) ANA-DNA 「キメラ」の相補的 DNA に対するハイブリダイゼーション特性を評価した (Koiss, P. ら、Nucleosides & Nucleotides、12:1093 (1993))。2'-F-a-r-a-U および 2'-F-a-r-a-C による置換は、全体が-DNA/RNA の二重鎖と比べ、二重鎖安定性を不安定にしたのに対し、2'-F-a-r-a-T との置換は、二重鎖を安定化した。Marqueuz とその同僚らは最近、2 個の内部チミジンが 2'-F-a-r-a-T で交換された DNA 鎖の自己一会合を評価した (Ikeda ら、Nucleic Acids Res.、26:2237 (1998))。彼らは、内部 2'-F-a-r-a-T 残基は、DNA 二重らせんを顕著に安定化するという Watanabe とその同僚らの知見を確認した。これらの (2'-F) ANA-DNA 「キメラ」の相補的 RNA (典型的アンチセンス標的) との会合は報告されていない。

【0009】

アンチセンスオリゴヌクレオチドによる標的 RNA の細胞 RNase H 分解の誘発
アンチセンスオリゴヌクレオチドが指示した遺伝子発現の阻害に関する最も重要な機構のひとつは、細胞 RNase H により認識され得る標的 RNA により二重鎖化される場合の、これらのアンチセンスオリゴヌクレオチド構造の形成能である。これは、アンチセンスオリゴヌクレオチド RNA が塩基対形成した二重鎖の領域内での、RNase H が媒介する RNA 標的の分解を可能にする (Monia ら、J. Biol. Chem.、268:14514 (1993))。

【0010】

RNase H は、DNA/RNA ヘテロ二重鎖の RNA 鎖を選択的に分解する。大腸菌 (*Escherichia coli*) 由来の RNase H1 は、最も簡単に入手でき、かつ最も良く特徴付けられた酵素である。RNase H を含む真核細胞抽出物を用いる研究は、原核生物および真核生物の両方の酵素は、類似した RNA 切断特性を示すが、細菌酵素が長さの小さい二重鎖をより良く切断することができることを示している (Monia ら、J. Biol. Chem.、268:14514 (1993))。大腸菌 RNase H1 は、DNA/RNA 二重らせんの小さい溝に結合し、エンドヌクレアーゼおよびプロセシブ 3' から 5' エキソヌクレアーゼの両方の活性により RNA を切断すると考えられている。RNase H の分解効率は、最小の配列依存性を示し、アンチセンスオリゴヌクレオチドの化学変化に対し極めて敏感である。例えば RNase H は、S-DNA/RNA 二重鎖の RNA は容易に分解するが、これは、RNA と共にメチルホスホネート DNA、α-DNA、または 2'-OMe RNA アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む二重鎖は分解することができない。更に大腸菌 RNase H は、RNA/RNA 二重鎖に結合するが、RNA/RNA 二重鎖の全体的らせん状のコンホメーションは DNA/RNA 基質二重鎖のコンホメーション (「A」型らせん) に類似しているという事実にもかかわらず、これはいずれの RNA 鎖も切断することはできない。これらの結果は、DNA/RNA (基質) 二重鎖と RNA/RNA (基質) 二重鎖の間の局所構造の差異

10

20

30

40

50

が基質の識別に寄与することを示唆している。

【0011】

RNase H活性のアクチベーターとしてのアラビノ核酸

アンチセンスアプローチにおいて必須の要件は、オリゴヌクレオチドまたはその類似体が、その相補的標的RNAを認識しかつこれに緊密に結合することである。得られたアンチセンスオリゴヌクレオチド/RNA二重鎖のRNase Hの基質として役立つ能力は、おそらくこの酵素を活性化することができないアンチセンスオリゴヌクレオチドと比べアンチセンス作用を増強することにより、治療的価値を有するであろう。PS-DNA（ホスホロチオエート）、PS₂-DNA（ホスホロジチオエート）、ボラノホスホネート結合したDNA、および内部PS-DNAセグメントを含むMBOオリゴ以外の、RNase H活性を誘発する完全に修飾されたオリゴヌクレオチドの唯一の例は、アラビノヌクレオチド（ANA）または修飾されたアラビノヌクレオチド残基から構築されたものである（国際公開公報第99/67378号で公開された国際出願；Damha, M. J. ら、JACS、120:12976（1998）；Noronha, A. M. ら、Biochemistry、39:7050（2000））。これらのANAオリゴヌクレオチドは、天然型β-D-フラノース立体配置を維持しており、DNA鎖のコンホメーションを模倣している（例えば、C2'末端コンホメーションにパッカーされた糖により）。後者の必要要件は、天然基質のアンチセンス鎖はDNAであるという事実に端を発しており、かつ先に示したように、その一次構造（および/またはコンホメーション）は、RNase H/基質の切断に必須であるように思われ；DNA/RNAハイブリッドのDNA糖は、主としてC2'末端コンホメーションを採用している。ANAは、糖環の2'位の立体化学のみが異なるRNAの立体異性体である。ANA/RNA二重鎖は、DNA/RNA基質（「A」型）に非常に類似したらせん構造を採用しており、このことはこれらの複合体の類似した円偏光二色性スペクトルにより示された（Damha, M. J. ら、JACS、120:12976（1998）；Noronha, A. M. ら、Biochemistry、39:7050（2000））。

【0012】

アンチセンスオリゴヌクレオチドとしての混合型骨格または「ギャップマー」オリゴヌクレオチド構築体

糖修飾されたオリゴヌクレオチド「ウィング（wing）」セグメントが5'および3'両端に隣接したホスホジエステルまたはホスホロチオエートオリゴデオキシヌクレオチド「ギャップ」セグメントで構成された混合型骨格オリゴヌクレオチド（MBO）が、合成された（Zhao, G. ら、Biochem. Pharmacol.、51:173（1996）；Crooke, S. T. ら、J. Pharmacol. Exp. Ther.、277:923（1996））。おそらく今日までに研究されたほとんどのMBOは、[2'-OMe RNA] - [PS DNA] - [2'-OMe RNA] キメラであろう。2'-OMe RNA単独で構成されたオリゴヌクレオチドも、非常に高い親和性で標的RNAへ結合するが、その標的RNAのRNase H分解を誘発することはできない。[2'-OMe RNA] - [PS DNA] - [2'-OMe RNA] キメラオリゴヌクレオチドにおいて、鎖の中央部のPS-DNAセグメントは、標的のRNase H分解を誘発するために役立つのに対し、この隣接している2'-OMe RNA「ウィング」領域は、このMBO鎖の標的RNAに対する親和性を増大させる。MBOは、インビボにおいて増大した安定性を有し、インビトロおよびインビボの両方におけるそれらの生物活性において、同じ配列のPS-DNA類似体よりも、より効果的であるように見える。オリゴヌクレオチドの隣接領域に2'-OMeおよび他のアルコキシ置換基を組込むこのアプローチの例は、インビボにおいて抗腫瘍活性が増強することにより、Moniaらによって明らかにされている（Monia, P. B. ら、Nature Med.、2:668（1996））。これらの類似体についていくつかの前臨床試験が進行中である。

【0013】

しかし、2'-OMe RNAはRNase H活性を誘発することができないので、[2

’-OMe RNA] - [PS DNA] - [2’-OMe RNA] キメラオリゴヌクレオチドのDNAギャップサイズは、慎重に決定されなければならない。大腸菌RNase Hは、DNAヌクレオチド4個ほどのDNAギャップを伴う2’-OMe RNA MBOを認識し使用することができるが(Shen, L. X. ら、Biorg. Med. Chem.、6:1695(1998))、真核生物RNase H(例えばヒトRNase H)は、最適な分解活性のためには実質的により大きいDNAギャップ(7個のDNAヌクレオチドまたはそれ以上)を必要とする(Monia, B. P. ら、J. Biol. Chem.、268:14514(1993))。一般に、[2’-OMe RNA] - [PS DNA] - [2’-OMe RNA] キメラオリゴヌクレオチドによる、真核生物のRNase H媒介型標的RNA切断効率は、DNAギャップ長の減少に伴い減少し、6個のDNAヌクレオチドよりも小さいDNAギャップサイズでは次第に無視できるようになる。従って、[2’-OMe RNA] - [PS DNA] - [2’-OMe RNA] キメラオリゴヌクレオチドのアンチセンス活性は、DNAギャップサイズに高度に依存している(Monia, B. P. ら、J. Biol. Chem.、268:14514(1993); Agrawal, S. およびKandimalia, E. R.、Mol. Med. Today、6:72(2000))。

10

【0014】

最近になって、完全に変更された骨格を含むオリゴヌクレオチドが合成された。注目すべき例は、非環式骨格を持つペプチド核酸(「PNA」)である。これらの化合物は、例外的ハイブリダイゼーション特性、ならびにヌクレアーゼおよびプロテアーゼに対する安定性を有する。しかしアンチセンス構築体としてPNAオリゴマーを使用する試みには、水への低い溶解度、自己凝集特性、細胞取込み不良、およびRNase H活性化の不能が足枷となっている。ごく最近になって、キメラのPS-DNA部分によってRNase H媒介型切断が維持されるように、PNA-[PS-DNA]-PNAが設計された。

20

【0015】

相補的mRNAへの会合(およびRNase Hが媒介する相補的mRNAの切断)による遺伝子発現の配列特異的阻害のために、一連の可変長デオキシリボースヌクレオチド残基が隣接している、アラビノヌクレオチド残基または修飾されたアラビノヌクレオチド残基から構成されたオリゴヌクレオチドが提供されることが非常に望ましい。

【0016】

発明の概要

本発明のひとつの目的は、その標的RNA配列と二重鎖を形成する、一連の可変長デオキシリボースヌクレオチド残基が隣接している、アラビノヌクレオチド残基または修飾されたアラビノヌクレオチド残基から構築されたアンチセンスオリゴヌクレオチドキメラを提供することである。このような得られたアンチセンスオリゴヌクレオチド/RNA二重鎖は、この二重鎖を認識しかつRNA標的部分を分解する酵素であるRNase Hの基質である。RNase Hが媒介するRNA標的の切断は、アンチセンスオリゴヌクレオチドの作用の主要な機構であると考えられる。

30

【0017】

本発明は、あるアンチセンスハイブリッドキメラ、特にβ-D-2’-デオキシリボヌクレオチド(DNA)から構築された限定の配列が隣接している2’-デオキシ-2’-フルオロ-β-D-アラビノヌクレオチド(FANA)から構築されたものが、β-D-2’-デオキシリボヌクレオチド(DNA)から構築された限定の配列に隣接している2’-O-メチル-β-D-リボヌクレオチド(OMeNA)から構築されたアンチセンスハイブリッドキメラよりも優れていることの発見に関連している。

40

【0018】

従って、β-D-2’-デオキシリボヌクレオチド(DNA)から構築された限定の配列が隣接している2’-デオキシ-2’-フルオロ-β-D-アラビノヌクレオチド(FANA)から構築されたアンチセンスハイブリッドキメラは、治療的物質ならびに/または細胞および器官における特異的遺伝子発現の研究および制御の道具として有用である可能

50

性がある。

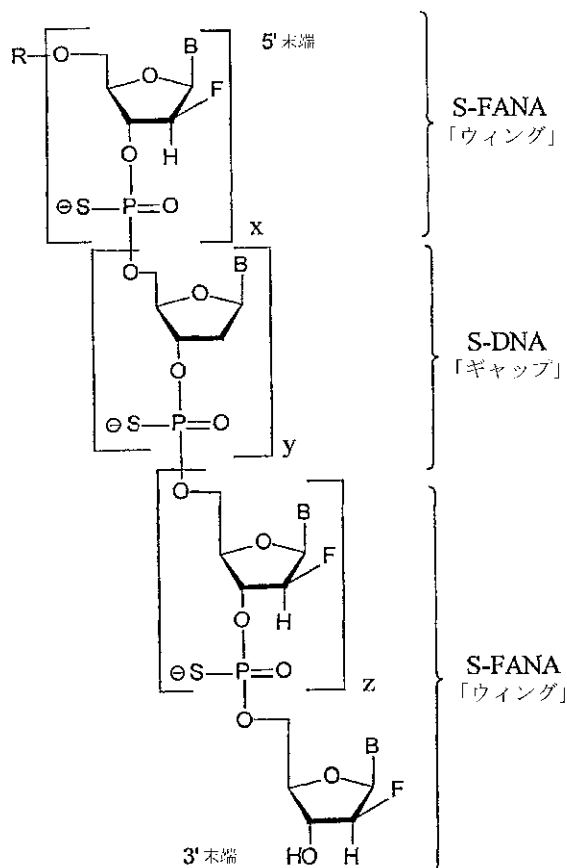
【0019】

本発明に従い、配列特異的方法において遺伝子発現を選択的に妨害するオリゴヌクレオチド「キメラ」が提供されるが、これには修飾されたアラビノースと1本鎖RNAにハイブリダイズしている2'-デオキシ糖とのキメラが含まれ、下記の少なくともひとつを誘導する：(a)ヌクレアーゼ安定性、(b)相補的RNA配列へのハイブリダイゼーションの結合強度、(c)オリゴヌクレオチドの細胞への透過性、(d)RNase Hによる標的RNAの切断、または(e)リボース転位の物理的阻止(「翻訳抑止」)。

【0020】

このようなオリゴヌクレオチドは、「[FANA ウィング] - [DNAギャップ] - [FANA ウィング]」、または5' RO (FANA-p) x - (DNA-p) y - (FANA-p) z - (FANA) 3' OHの一般骨格組成を有し、およびより正確には一般式

【化5】



(式中、 $x \geq 1$ 、 $y \geq 1$ 、および $z \geq 0$ であり、ならびに R は、水素、チオリン酸、およびこのようなオリゴヌクレオチドの細胞取込みを増強するリンカー部分からなる群より選択される)を有する。

【0021】

本発明に従い、下記式

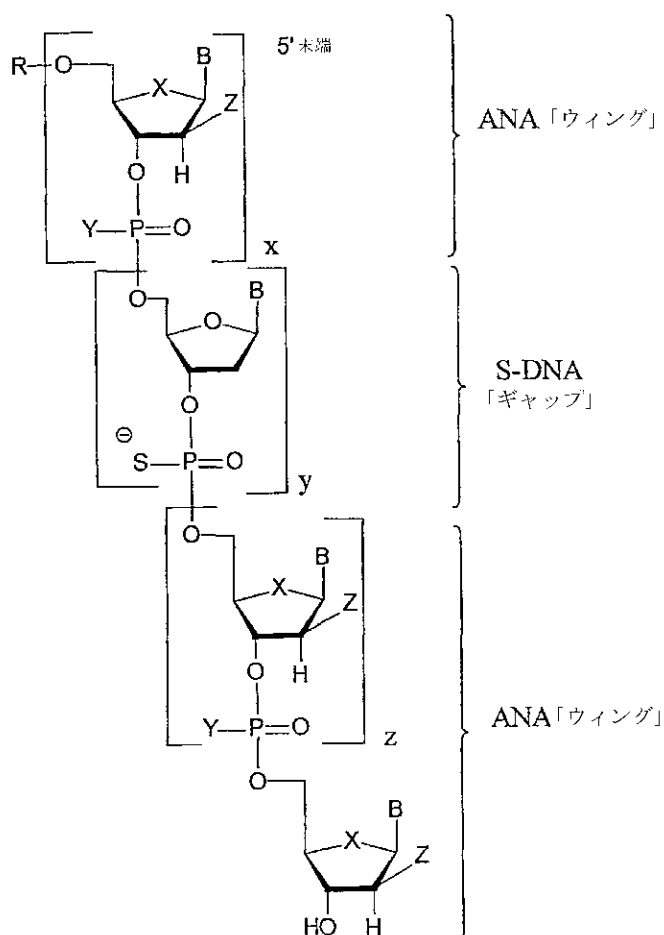
【化6】

10

20

30

40



10

20

(式中、 $x \geq 1$ 、 $y \geq 1$ 、および $z \geq 0$ であり；

Rは、水素、チオリン酸、およびこのようなオリゴヌクレオチドの細胞取込みを増強するリンカー部分からなる群より選択され；

Bは、アデニン、グアニン、ウラシル、チミン、シトシン、イノシン、および5-メチルシトシンからなる群より選択され； 30

Yは、ヌクレオチド間リン酸結合において、イオウ、酸素、メチル、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ（このアルキル基は1～約20個の炭素原子を有する）、メトキシ、およびエトキシからなる群より選択され；

Xは、フラノース環（4'位）において、酸素、イオウ、およびメチレン（ CH_2 ）の群より選択され；ならびに

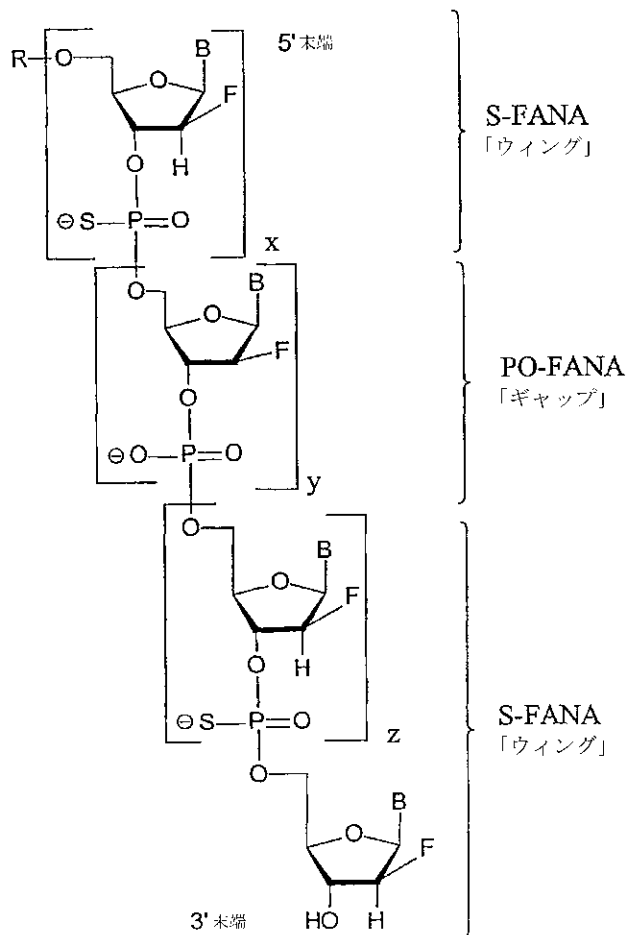
Zは、この糖環の2'位において、ハロゲン（フッ素、塩素、臭素、ヨウ素）、アルキル、ハロゲン化アルキル（例えば、 CH_2F ）、アリル、アミノ、アリール、アルコキシおよびアジドからなる群より選択される）

を有するオリゴヌクレオチドが提供される。 40

【0022】

本発明に従い、下記式

【化7】



10

20

30

(式中、 $x \geq 1$ 、 $y \geq 1$ 、および $z \geq 0$ であり；

Rは、水素、チオリン酸、およびこのようなオリゴヌクレオチドの細胞取込みを増強するリンカー部分からなる群より選択され；

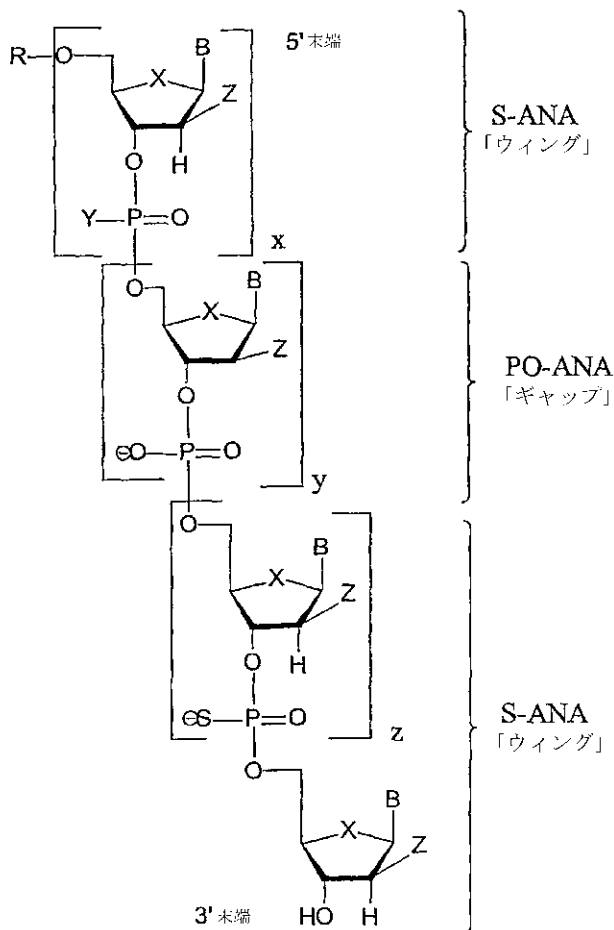
Bは、アデニン、グアニン、ウラシル、チミン、シトシン、イノシン、および5-メチルシトシンからなる群より選択される)

を有するオリゴヌクレオチドが提供される。

【0023】

本発明に従い、下記式

【化8】



10

20

30

40

50

(式中、 $x \geq 1$ 、 $y \geq 1$ 、および $z \geq 0$ であり；

Rは、水素、チオリン酸、およびこのようなオリゴヌクレオチドの細胞取込みを増強するリンカー部分からなる群より選択され；

Bは、アデニン、グアニン、ウラシル、チミン、シトシン、イノシン、および5-メチルシトシンからなる群より選択され；

Yは、ヌクレオチド間リン酸結合において、イオウ、酸素、メチル、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ（このアルキル基は1～約20個の炭素原子を有する）、メトキシ、およびエトキシからなる群より選択され；

Xは、フラノース環（4'位）において、酸素、イオウ、およびメチレン（ CH_2 ）からなる群より選択され；ならびに

Zは、この糖環の2'位において、ハロゲン（フッ素、塩素、臭素、ヨウ素）、ヒドロキシル、アルキル、ハロゲン化アルキル（例えば、 $-\text{CH}_2\text{F}$ ）、アリル、アミノ、アリール、アルコキシおよびアジドからなる群より選択される）

を有するオリゴヌクレオチドが提供される。

【0024】

本発明に従い、下記の工程を含む、1本鎖RNAの切断法が提供される：

(a) 配列特異的方法において本発明のオリゴヌクレオチドを1本鎖RNAへハイブリダイズし、RNase H活性を誘導する工程；および

(b) 誘導したRNase Hに、ハイブリダイズした1本鎖RNAを切断させる工程。

【0025】

本発明に従い、この1本鎖RNAの翻訳を妨害する方法が提供され、これは配列特異的方法において請求項2～5記載のキメラオリゴヌクレオチドを1本鎖RNAへハイブリダイズし、これにより1本鎖RNAにコードされる特定のタンパク質の産生を妨害する工程を含む。

このRNAは、細胞mRNAまたはウイルスRNAのような、相補的RNAであってよい

。

【0026】

本発明に従い、1本鎖RNAを切断する医薬品を調製するための本発明のオリゴヌクレオチドの使用が提供され、ここでオリゴヌクレオチドは、配列特異的方法において1本鎖RNAにハイブリダイズし、ハイブリダイズした1本鎖RNAを切断するRNase H活性を誘導する。

【0027】

本発明に従い、1本鎖RNAを切断するためのプローブまたは実験用試薬を調製するための本発明のオリゴヌクレオチドの使用が提供され、ここでオリゴヌクレオチドは、配列特異的方法において1本鎖RNAへハイブリダイズし、ハイブリダイズした1本鎖RNAを切断するRNase H活性を誘導する。

10

【0028】

本発明に従い、配列特異的方法において遺伝子発現を選択的に妨害する組成物が提供され；これは、薬学的に許容される担体と共に、本発明のオリゴヌクレオチド「キメラ」を有効量含有している。

【0029】

発明の詳細な説明

本発明に従い、 β -D-アラビノースとその誘導体から、その標的RNA配列と二重鎖を形成する、一連の可変長デオキシリボースヌクレオチド残基が隣接している、 β -D-アラビノース糖部分または修飾された β -D-アラビノース糖部分を持つヌクレオチドから構築されたアンチセンスオリゴヌクレオチド、およびそのような化合物の治療的用途が提供される。本発明の目的は、特定の遺伝子の発現を阻害する目的のために、mRNAまたはウイルスRNA（レトロウイルスRNAを含む）であることができる相補的核酸とハイブリダイズする新規アンチセンスオリゴヌクレオチド類似体を提供することである。より詳細に述べると、本発明は、特異的標的RNA配列にハイブリダイズしかつ細胞RNase Hの作用による標的RNAの切断を誘発するために、一連の可変長デオキシリボースヌクレオチド残基が隣接している、 β -D-アラビノース糖部分または修飾された β -D-アラビノース糖部分を持つヌクレオチドから構築されたアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用することに関する。

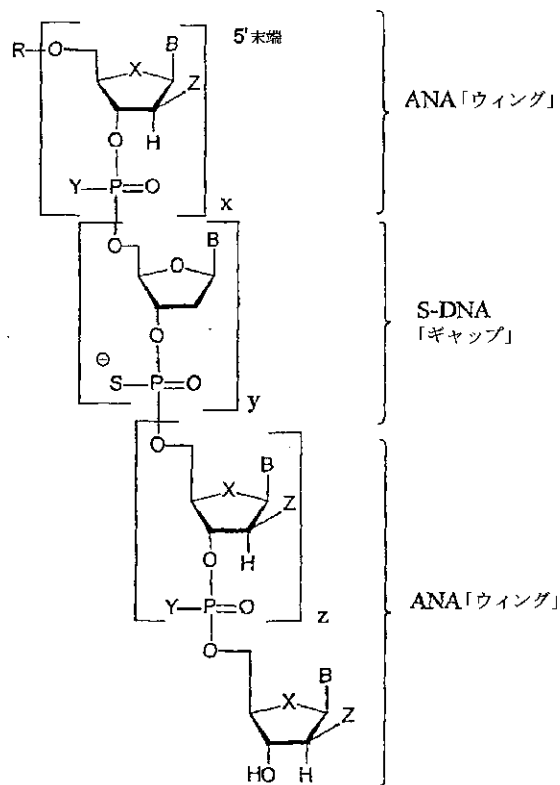
20

【0030】

本発明のオリゴヌクレオチドは、下記式（I）

30

【化9】



10

20

(式中、Bは、アデニン、グアニン、シトシン、チミンおよびウラシルのような通常のプリンまたはピリミジン塩基を含むが、必ずしもこれらに限定されるものではない)により表される。このオリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチドの5'および3'末端(「ウィング」)に多くのβ-D-アラビノフラノースまたは修飾されたβ-D-アラビノフラノースヌクレオチドが隣接したDNA伸長(stretch)(DNA「ギャップ」)を含み、これによりANA-DNA-ANA、2'-F-ANA-DNA-2'-F-ANAなどの「ギャップマー」を形成する。ヌクレオチド間リン酸結合は、酸素、イオウ、メチル、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、メトキシおよびエトキシを含むが、必ずしもこれらに限定されるものではない。アラビノース糖の2'置換基は、フッ素、ヒドロキシル、アミノ、アジド、メチル、メトキシおよび他のアルコキシ基(例えば、エトキシ、プロポキシ、メトキシエトキシなど)を含むが、これらに限定されるものではない。

30

40

【0031】

本発明のギャップマーアンチセンスオリゴヌクレオチドは、mRNA、またはウイルスゲノムRNAの特異的配列に相補的である配列を含み、その結果これらのギャップマーオリゴヌクレオチドは、各々、このmRNAにコードされるタンパク質の生合成を特異的に阻害するか、またはウイルス複製を阻害することができる。それらのアンチセンス特性(例えばヌクレアーゼ抵抗性)を増強するために5'および/または3'末端、またはリン酸骨格もしくは糖残基に対し示されたオリゴヌクレオチドの部分的修飾は、本発明の範囲内である。

【0032】

好ましい本発明において有用なオリゴヌクレオチドの一群は、Bが天然型塩基(アデニン、グアニン、シトシン、チミン、ウラシル)であり、「ウィング」の糖部分がβ-D-2'-デオキシ-2'-F-アラビノフラノースであり、およびヌクレオチド間リン酸結合がイオウ(ホスホロチオエート結合として)を含むものである。これらの修飾は、1本鎖RNAに対し高い親和性を示すオリゴヌクレオチドを生じる。加えて、これらのオリゴヌクレオチドは、アンチセンス療法に必要な要件に合致することが示されている。例えば、これらのオリゴヌクレオチドは、細胞RNase Hによる標的RNAの分解を誘発し、

50

これにより標的RNAにコードされる特異的タンパク質の細胞内量および活性を減少させる。

【0033】

本発明のギャップマーアンチセンスオリゴヌクレオチドは、多くの望ましい特性を示す：

(1) これらは、RNAase Hを活性化することにより、1本鎖RNAに結合し切断することがわかっている。特にβ-D-2'-デオキシ-2'-F-アラビノフラノースヌクレオチドで構成された「ウィング」を有するギャップマーオリゴヌクレオチドは、RNA標的に対し優れた親和性を有し、これは2'-O-メチルリボヌクレオチドで構成された「ウィング」を有するギャップマーオリゴヌクレオチドに匹敵し、同じ配列DNAのものよりも顕著に優れていることがわかっている。

(2) β-D-2'-デオキシ-2'-F-アラビノフラノースヌクレオチドで構成された「ウィング」を有するギャップマーオリゴヌクレオチドは、同一配列のDNAオリゴヌクレオチドよりも、細胞内遺伝子発現の配列特異的阻害がより良く作用することがわかっている。大きいDNAギャップ(10個のDNAオリゴヌクレオチド)を伴うβ-D-2'-デオキシ-2'-F-アラビノフラノースヌクレオチドで構成された「ウィング」を有するギャップマーオリゴヌクレオチドの細胞内アンチセンス活性は、2'-O-メチルリボヌクレオチドで構成された「ウィング」を有する同一配列のギャップマーオリゴヌクレオチドのものと同程度であった。比較的小さいDNAギャップ(6個のDNAまたはそれ未満)により、β-D-2'-デオキシ-2'-F-アラビノフラノースヌクレオチドで構成された「ウィング」を有するギャップマーオリゴヌクレオチドの細胞内アンチセンス活性は、2'-O-メチルリボヌクレオチドで構成された「ウィング」を有する同一配列のギャップマーオリゴヌクレオチドのものよりも顕著に優れていた。

【0034】

これらの知見により、DNAの内部配列(「ギャップ」)が隣接しているβ-D-2'-デオキシ-2'-F-アラビノフラノースヌクレオチドで構成された「ウィング」を有するギャップマーオリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチド物質の優れたモデルであり、かつ治療的物質ならびに／または細胞および生物における遺伝子発現を研究および制御する上での価値のある道具として利用されることが証明される。

【0035】

以下の実施例は、本発明の範囲を限定するためではなく本発明を説明するために提供されており、本発明は以下の実施例を参照することでより容易に理解されるであろう。

【0036】

実施例1

β-D-2'-デオキシリボヌクレオチド(DNA)から構築された所定の配列が隣接している2'-デオキシ-2'-フルオロ-β-D-アラビノヌクレオチド(FANA)から構築されたアンチセンスオリゴヌクレオチドの調製

1. FANA、S-[FANA]およびS-[FANA-DNA-FANA]の合成
PO-FANAの合成は、既報のように行った(Damhara, J. Am. Chem. Soc., 120:12976-12977 (1998))。S-FANAおよびS-[FANA-DNA-FANA]キメラの合成は、Expedite 8909 DNA合成装置を用い、1マイクロモルのスケールで行った。長鎖のアルキルアミンで制御された多孔質ガラス(long-chain alkylamine controlled-pore glass (LCAA-CPG))を固相支持体として使用した。合成サイクルは下記工程からなる：

1) CPG結合したヌクレオシド／チドの脱トリチル化(3%トリクロロ酢酸／ジクロロメタン)：150秒

2) 2'-F-アラビノヌクレオシドまたは2'-デオキシリボヌクレオシド3'-ホスホロアミダイトモノマーのカップリング：15分。使用したモノマーの濃度は、araF-T、araF-CおよびDNAモノマーについて50mg/mLであり、araAおよびaraF-Gについて60mg/mLであった(溶媒アセトニトリル)。

3) アセチル化を用いる標準のキャッピング工程：20秒。キャッピング溶液は、1：1（v/v）の「cap A」および「cap B」試薬からなる。Cap A：無水酢酸／コリジン／THF（1：1：8ml）；cap B：N-メチルイミダゾール／THF（4：21ml）。

4) アセトニトリルによる過度の洗浄（50パルス）。

5) アセトニトリルを溶媒とする0.2M 3H-1, 2-ベンゾジチオール-3-オンの新鮮な溶液による硫化：10分。

6) アセトニトリルによる洗浄：20パルス。

7) キャッピング試薬の添加による固相支持体の乾燥（工程3参照）：5秒。

8) アセトニトリルによる洗浄（20パルス）。

10

【0037】

鎖を集成した後、オリゴヌクレオチドを固相支持体から切断し、既報のように脱保護した（Noronhaら、Biochemistry、39：7050-7062（2000））。粗オリゴマーを、(a) 分取ゲル電気泳動（24%アクリルアミド、7M尿素）、その後の脱塩（Sephadex（登録商標）G-25）、もしくは(b) アニオン交換HPLC、その後の脱塩（Sep Pak（登録商標）カートリッジ）のいずれかにより精製した。収量：5-30 A₂₆₀単位。

【0038】

HPLC精製条件：

カラム：タンパク質Pak DEAE-5PW（7.5mm X 7.5cm、Waters（登録商標））

溶媒：緩衝液A：H₂O；緩衝液B：1M NaClO₄、

勾配：100%緩衝液A定組成、12分間

100%A-15%B、直線状（5分間以上）

15%B-55%B、直線状（60分以上）。

【0039】

負荷は、分析のためには1-2 A₂₆₀単位で、および分取的分離のためには30-50 A₂₆₀単位で行った。流量は1mL/分に設定し、温度は50℃に調節した。検出器は、分析のためには260nmに、分取クロマトグラフィーのためには290nmに設定した。これらの条件下で、望ましい完全長オリゴマーは、最後に流出した。

30

【0040】

2. S-DNAおよびS-[2'OMe-RNA-DNA-2'-OMe-RNA]キメラの合成

ホスホロチオエート化したDNA（S-DNA）およびS-[2'OMe-RNA-DNA-2'OMe-RNA]キメラは、カルガリー大学DNA合成実験施設（カルガリー、ALTA）から購入した。これらは、前述のように（前記パート1参照）、精製し（HPLC）、脱塩した（Sep Pak（登録商標）カートリッジ）。

【0041】

合成した様々なオリゴヌクレオチドの塩基配列およびハイブリダイゼーション特性を、表1に示した。

40

【0042】

【表1】アンチセンスオリゴヌクレオチド（AON）配列および相補的標的RNA^aを伴うAON二重鎖の融点（Tm）

ID #	AON 名称	AON 配列 ^b	T _m (°C) ^c
1	S-FANAギャップ(10 DNA)	S- <u>ATA Tcc</u> ttg tcg taT CCC	64
2	S-FANAギャップ(8 DNA)	S- <u>ATA TCC</u> ttg tcg taT CCC	65
3	S-FANAギャップ(6 DNA)	S- <u>ATA TCC</u> ttg tcg TAT CCC	68
4	S-FANAギャップ(4 DNA)	S- <u>ATA TCC Ttg</u> tcG TAT CCC	70
5	S-FANAギャップ(2 x1DNA)	S- <u>ATA TCC TTg</u> TCg TAT CCC	71
6	S-FANA	S- <u>ATA TCC TTG TCG</u> TAT CCC	72
7	PO-FANA	O- <u>ATA TCC TTG TCG</u> TAT CCC	82
8	2'OMeギャップ(10 DNA)	S- <u>ATA Tcc</u> ttg tcg taT CCC	66
9	2'OMeギャップ(6 DNA)	S- <u>ATA TCC</u> ttg tcg TAT CCC	68
10	2'OMeギャップ(4 DNA)	S- <u>ATA TCC Ttg</u> tcG TAT CCC	72
11	S-DNA	S- ata tcc ttg tcg tat ccc	62
12	PO-DNA	O- ata tcc ttg tcg tat ccc	70

10

^a : 二重鎖の 2.5×10^{-6} M 水溶液。緩衝液: 140 nM KCl、1 mM MgCl₂、5 mM Na₂HPO₄ (pH 7.2)。^b コード: N = FANAヌクレオチド; n = DNAヌクレオチド; N = 2'OMe-RNAヌクレオチド; S = ホスホロチオエート結合含有; PO = ホスホジエステル結合含有。^c $\pm 1^\circ\text{C}$ 。

【0043】

実施例 2

様々なアンチセンスオリゴヌクレオチドの細胞内遺伝子発現の阻害効率

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、選択された標的 mRNA の特異的塩基配列を基に、ほぼ全ての遺伝子の発現を阻害する可能性がある。本発明者らは、一連の可変長 2'-デオキシリボースヌクレオチド残基 (S-FANAギャップマー) が隣接している 2'-デオキシ-2'-フルオロ-β-D-アラビノヌクレオチド (FANA) から構築されたアンチセンスオリゴヌクレオチドの、ルシフェラーゼ遺伝子により安定的にトランスフェクションされた細胞において、良く特徴付けられたマーカーモデルの発現、すなわち酵素ルシフェラーゼの発現を妨害する能力を試験した。S-FANAギャップマーの細胞内ルシフェラーゼ発現を阻害する効率を、全体が 2'-デオキシ-2'-フルオロ-β-D-アラビノヌクレオチドから構築されるかまたは全体が 2'-デオキシリボヌクレオチドから構築されている同じ配列のアンチセンスオリゴヌクレオチドと比較した。ヌクレオチド間の結合は、ホスホジエステル (PO) またはホスホロチオエート (PS) のいずれかである。特異的アンチセンスオリゴヌクレオチド配列は、

20

30

5'-ATA TCC TTG TCG TAT CCC-3'

であり、これはルシフェラーゼ遺伝子のコード領域塩基 1511~1528 位と相補的である。対照として、ランダム化されたオリゴヌクレオチド配列 (5'-TAA TCC CTA TCG TCG CTT-3')

を使用した: 特異的 AON 配列と同じ塩基組成が存在するが、ルシフェラーゼ遺伝子の一部分に対する相補性は持たない。これらのランダム化されたオリゴヌクレオチドは、標的ルシフェラーゼ発現阻害には作用することができない。

40

【0044】

ルシフェラーゼをコードしている mRNA の特異領域に対し相補的なオリゴヌクレオチドの能力を、HeLa X1/5 細胞 (European Collection of Cell Cultures、サリスベリー、英国から入手) におけるルシフェラーゼ活性発現の阻害について試験した。HeLa X1/5 細胞は、ルシフェラーゼ遺伝子で安定的にトランスフェクションされ、機能性ルシフェラーゼ酵素を発現する。

【0045】

オリゴヌクレオチドは、サイトフェクチン GS V GS3815 (Glen Research 社、スターリング、VA、米国) でオリゴヌクレオチドを複合体化することにより、細胞に送達した。簡単に述べると、オリゴヌクレオチドを、ウシ胎仔血清 (FBS) を含

50

まないDMEMで希釈し、オリゴヌクレオチドの最終濃度を、細胞が曝露される最終濃度よりも10倍高くした。サイトフェクチンGSVを、血清非含有DMEM中で、最終濃度25 µg/mlとなるよう調製した。等容量のオリゴヌクレオチドおよびサイトフェクチン溶液を、ポリスチレンプラスチック中で混合し、室温で15分間インキュベーションし、その後この混合液を、10% FBSを含有するDMEMで5倍希釈した。

【0046】

X1/5細胞を、96穴プレートに、密度1.5~2 x 10⁴ 個細胞/ウェルとなるように播種し、DMEM/10% FBS中で24時間増殖させた。これは一般に、顕微鏡で検査した集密度80%の細胞密度を提供した。次にこの培養培地を、細胞から除去し、細胞をリン酸緩衝生理食塩水で数回洗浄し、その後オリゴヌクレオチド/サイトフェクチン混合液を含有する培地を積層した。24時間インキュベーションした後、HeLa細胞を収集し、ホモジナイズし、ルシフェラーゼ活性についてアッセイした。ルシフェラーゼ活性は、Promega社（マジソン、WI、米国）から入手したルシフェラーゼアッセイキット構成成分を使用するルミネセンス測定法により、アッセイした。

10

【0047】

様々な異なるヌクレオチドおよび連結化学物質から構築された、アンチセンスオリゴヌクレオチド（配列

5'-ATA TCC TTG TCG TAT CCC-3'

）の、X1/5細胞ルシフェラーゼ活性を阻害する能力を比較した実験結果を、図1に示す。全ての場合において、細胞は、最終濃度250 nMのアンチセンスオリゴヌクレオチドに、ルシフェラーゼ活性をアッセイする前に24時間曝露した。ホスホジエステル結合によりβ-D-2'-デオキシリボースから全体が構築されたアンチセンスオリゴヌクレオチド（PO-DNA；ID#12、表1）は、X1/5細胞ルシフェラーゼ活性の阻害に作用することができなかったが、ホスホロチオエート結合によりβ-D-2'-デオキシリボースから構築されたアンチセンスオリゴヌクレオチド（PS-DNA；ID#11、表1）は、ほぼ60%の阻害を提供した。ホスホジエステル結合（PO-FANA；表1のID#7）またはホスホロチオエート結合（PS-FANA；ID#6、表1）のいずれかにより2'-デオキシ-2'-フルオロ-β-D-アラビノヌクレオチドから全体が構築されたアンチセンスオリゴヌクレオチドは、各々、ルシフェラーゼ活性のおよそ55%および25%の阻害を提供した。同じ条件下で、全てホスホロチオエート結合で結合した一連の10個の2'-デオキシリボースヌクレオチド残基が隣接している2'-デオキシ-2'-フルオロ-β-D-アラビノヌクレオチドから構築されたアンチセンスオリゴヌクレオチド（S-FANAギャップマー、ID#1、表1）は、X1/5細胞ルシフェラーゼ活性の少なくとも90%阻害を提供した。この実験で使用した条件下では、いずれのアンチセンスオリゴヌクレオチドによっても、明らかな細胞毒性は、認められなかった。

20

30

【0048】

これらの結果（図1）は、S-FANAギャップマー（10 DNAギャップ）が、X1/5細胞ルシフェラーゼ活性発現において、PO-DNA、S-DNA、PO-FANAまたはS-FANAのいずれよりも有意に優れたインヒビターであることを示している。X1/5細胞を、様々なアンチセンスオリゴヌクレオチド（最終濃度250 nM）と共にインキュベーションし、全てルシフェラーゼmRNAの同じ標的配列に対して示した。適宜インキュベーションした後、細胞内のルシフェラーゼ活性残留レベルを測定した。

40

【0049】

実施例 3

S-DNAおよびS-FANAギャップマー（10 DNA）アンチセンスオリゴヌクレオチドの細胞内遺伝子発現阻害の比較

S-DNA（ID#11、表1）およびS-FANAギャップマー（ID#1、表1）の溶液を、実施例2に記したように、サイトフェクチンGSV GS3815により調製し

50

た。H e l a X 1 / 5 細胞を、二つ組の 6 穴プレートに、密度 5×10^5 個細胞 / ウェルで播種し、D M E M / 10 % F B S 中で 24 時間増殖させた。その後培養培地を細胞から取除き、細胞を数回リン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、その後オリゴヌクレオチド / サイトフェクチン混合液を含有する培地で積層した。24 時間インキュベーションした後、H e l a X 1 / 5 細胞を収集し、その後のアッセイ手法に適した方法で処理した（下記に示す）。

【0050】

(a) ルシフェラーゼ酵素活性アッセイ法

ルシフェラーゼ酵素活性アッセイ法は、P r o m e g a 社（マジソン、W I、米国）のルシフェラーゼアッセイキットシステムを、製造業者のプロトコールに従い用いて行った。10
簡単に述べると、細胞をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、次にこのキットに付属している細胞溶解緩衝液で溶解した。細胞溶解液の二つ組のアリコートをし、96 ウェルアッセイプレートに移した。ルシフェリン基質溶液を添加し、直ぐに、ルミネセンス読み取りモードに設定した S P E C T R A m a x G E M T N I X S マイクロプレート分光蛍光計（M o l e c u l a r D e v i c e s 社、サニーベール、C A、米国）を用い、ルミネセンスを測定した。結果を、個々の試料の総細胞タンパク質濃度中の変動に関して正規化した（同じアリコートについて B i o - R a d 社タンパク質アッセイ試薬を用いて決定した）。

【0051】

(b) ルシフェラーゼタンパク質発現のアッセイ法

アンチセンス処理および未処理の X 1 / 5 細胞中のルシフェラーゼタンパク質レベルを、20
ウェスタンブロット分析により決定した。X 1 / 5 細胞のタンパク質抽出液は、ルシフェラーゼ酵素アッセイ法のための試料の調製に使用したのと同じ溶解緩衝液中で細胞を溶解し、その後遠心により透明化して、調製した。個々の試料のタンパク質含量を、B i o - R a d タンパク質アッセイ試薬（B i o - R a d 社、ヘラクレス、C A、米国）を用いて測定した。同量の細胞タンパク質（およそ $20 \mu\text{g}$ ）を含有する試料を、S D S - P A G E にかき、その後ニトロセルロース膜（ $0.45 \mu\text{m}$ ）へ移した。この膜を、5 % スキムミルクを含有する T T B S （ 500mM N a C l および 0.05% T w e e n 20 を含有する 20mM T r i s - H C l）中で、少なくとも 1 時間インキュベーションした。これらのブロットを次に、ホタルのルシフェラーゼ（C h e m i c o n I n t e r n a t i o n a l 社、テメキュラ、C A、米国から入手）と特異的に反応するヤギ抗体と共に 30
、T T B S 中抗体濃度 $1 \text{mg} / \text{ml}$ を用い、インキュベーションした。1 時間インキュベーションした後、これらの膜を十分に T T B S で洗浄し、次に T T B S 中に 1 : 10, 000 希釈したホースラディッシュペルオキシダーゼを複合した抗ヤギ I g G （C h e m i c o n I n t e r n a t i o n a l 社、テメキュラ、C A、米国）と共にインキュベーションした。その後ペルオキシダーゼ反応領域を、R e n a i s s a n c e ウェスタンブロットケミルミネセンス試薬キット（N E N L i f e S c i e n c e P r o d u c t s 社、ボストン、M A、米国）および K o d a k 社 X - O M A T フィルムを製造業者の指示に従って用い、検出した。その後現像したフィルムの濃度測定分析により、ルシフェラーゼタンパク質レベルを定量した。

【0052】

(c) ルシフェラーゼ m R N A のアッセイ法

X 1 / 5 細胞から総 R N A を単離し、かつルシフェラーゼ m R N A レベルのノーザンブロットアッセイ法を行った。総細胞 R N A （ $10 \sim 20 \mu\text{g}$ ）の正規化した量を、2.2 M ホルムアルデヒドを含有する 1 % アガロースゲル上でサイズ分画し、その後 $0.45 \mu\text{m}$ ニトロセルロース膜（B i o - R a d 社、ヘラクレス、C A、米国）に転写した。ルシフェラーゼ m R N A のハイブリダイゼーションプローブは、A m e r s h a m - P h a r m a c i a B i o t e c h 社（ピスカタウェイ、N J、米国）のオリゴ標識キットを用いて作成した、ホタルのルシフェラーゼ遺伝子の完全長 c D N A （プラスミド p G E M - L u c、P r o m e g a 社、マジソン、W I、米国）由来の ^{32}P で内部標識した D N A であった。放射標識したプローブの膜結合した R N A へのハイブリダイゼーションは、50 % 40

ホルムアミド、0.5%ドデシル硫酸ナトリウムおよびブロッキング試薬を含有する6xSSC緩衝液(90mMクエン酸ナトリウムを含有する、900mM塩化ナトリウム、pH7.0)中に行った。ハイブリダイゼーションは、42℃で16時間行った。その後膜を0.1%SDSを含有する1xSSCにより、室温で2回洗浄し、その後0.1%SDSを含有する0.1xSSCにより室温で、最後に0.5%SDSを含有する0.1xSSCにより42℃で洗浄した。膜に結合した放射能は、オートラジオグラフィーにより局在化し、デンストメトリーにより定量した。

【0053】

図2の結果は、15nM~250nMを変動する濃度範囲のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、S-FANAギャップマー(10DNA)が、X1/5細胞ルシフェラーゼ活性の阻害において、S-DNAよりも有意により効果的であることを示している(パネルA)。

【0054】

X1/5細胞のS-FANAギャップマー(10DNA)による処理により、総ルシフェラーゼタンパク質において用量依存的な減少が生じた(パネルB)が、これはS-DNAアンチセンスで処理した細胞においては明白ではなかった。加えて、X1/5細胞のS-FANAギャップマー(10DNA)による処理は、総ルシフェラーゼmRNAにおいて用量依存的な減少が生じ(パネルC)；この減少は、S-DNAアンチセンスによる作用よりも大きかった。ルシフェラーゼタンパク質レベルは、ルシフェラーゼに対し特異性を示す抗体を用いるウェスタンブロット分析により評価した。ルシフェラーゼmRNAレベルは、ルシフェラーゼmRNAの配列に対して特異性を示すDNAプローブを用いたノーザンブロット分析により評価した。

【0055】

実施例4

S-DNAおよびS-FANAギャップマー(10DNA)アンチセンスオリゴヌクレオチド処理の細胞ルシフェラーゼタンパク質およびmRNAに対する作用

S-DNA(ID#11、表1)およびS-FANAギャップマー(ID#1、表1)の溶液を、実施例2に示したように、サイトフェクチンGSVGS3815により調製した。HeLa X1/5細胞を、二つ組で6穴プレートに、密度 5×10^5 個細胞/ウェルで播種し、DMEM/10%FBS中で24時間増殖させた。その後培養培地を細胞から取除き、細胞を数回リン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、その後オリゴヌクレオチド/サイトフェクチン混合液を含有する培地で積層し、指定された最終濃度のS-DNAまたはS-FANAギャップマー(10DNA)アンチセンスオリゴヌクレオチドを提供した。24時間インキュベーションした後、HeLa X1/5細胞を収集し、正確には実施例3に記したように、ルシフェラーゼタンパク質レベルまたはルシフェラーゼmRNAレベルの分析に適した方法で処理した。

【0056】

図3パネル(A)の結果は、S-DNA(上側)またはS-FANAギャップマー(10DNA)(下側)の異なる濃度で処理した、X1/5細胞抽出液中のルシフェラーゼタンパク質レベルのウェスタンブロット分析を示している。(A)X1/5細胞を漸増量のPS-DNAまたはPS-FANAギャップマー(10DNA)アンチセンスオリゴヌクレオチドのいずれかに曝露後のルシフェラーゼタンパク質レベルの変動。

【0057】

S-FANAギャップマー(10DNA)で処理された細胞は、総ルシフェラーゼタンパク質の用量依存的な減少を示すのに対し、この作用はS-DNAで処理した細胞においては余り明白ではないことは容易に認められる。ルシフェラーゼタンパク質レベルの定量は、図2のパネル(B)に示した。(B)PS-FANAギャップマー(10DNA)アンチセンスオリゴヌクレオチドは細胞内ルシフェラーゼmRNAのRNase H切断を誘発する。1は、完全長ルシフェラーゼmRNAに相当し、2および3は、切断産物である。+は、250nM PS-FANAギャップマー(10DNA)で処理した細胞から単

離した mRNA を表し、－は、アンチセンスに曝露されていない細胞から単離した mRNA を表している。

【0058】

図3パネル(B)の結果は、X1/5細胞の250 nM S-FANAギャップマー(10 DNA)処理が、ルシフェラーゼ mRNA 容易に識別可能な切断を生じる(レーン+)ことを示している。3種のルシフェラーゼ mRNA が認められ、これは完全長(1)、ならびにこのアンチセンスオリゴヌクレオチドにより標的化された領域の完全長 mRNA の RNase H分解から予想された切断産物に相当する2個の小さい種(2および3)であった。いかなるアンチセンスにも曝露されていない細胞のルシフェラーゼ mRNA プロフィールは、(－)印したレーンに示している。

10

【0059】

実施例5

ギャップマーアンチセンスオリゴヌクレオチドの細胞特異的遺伝子発現を阻害する能力に対するDNA「ギャップ」サイズの作用

本発明者らは、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合(S-FANAギャップマー)により一連の可変長2'-デオキシリボースヌクレオチド残基が隣接している2'-デオキシ-2'-フルオロ-β-D-アラビノヌクレオチド(FANA)で構築されたアンチセンスオリゴヌクレオチドを、2'-O-メチルRNAウィングで構築された類似のMBO、ならびに非-ギャップマーPS-DNAおよびPS-FANAオリゴヌクレオチドと、それらの細胞内ルシフェラーゼ活性の発現を阻害する能力について、HeLa X1/5細胞において比較した。この特異的アンチセンスオリゴヌクレオチド配列は、

20

5'-ATA TCC TTG TCG TAT CCC-3'

であり、これはルシフェラーゼ遺伝子コード領域の塩基1511～1528位と相補的である。

【0060】

オリゴヌクレオチドは、正確には実施例2に説明したように、オリゴヌクレオチドをサイトフェクチンGSV GS3815(Glen Research社、スターリング、VA、米国)と複合化することにより、細胞へ送達した。

【0061】

X1/5細胞を、96穴プレートに密度1.5～2×10⁴個細胞/ウェルで播種し、DMEM/10%FBS中で24時間増殖させた。その後培養培地を細胞から取除き、細胞を数回リン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、その後オリゴヌクレオチド/サイトフェクチン混合液を含有する培地で積層し、アンチセンスオリゴヌクレオチドの最終濃度250 nMを提供した。24時間インキュベーションした後、HeLa細胞を収集し、ホモジナイズし、Promega社(マジソン、WI、米国)から得たルシフェラーゼアッセイキット構成成分を用いるルミネセンス測定法によりルシフェラーゼ活性についてアッセイした。

30

【0062】

様々な異なるヌクレオチドから構築されたアンチセンスオリゴヌクレオチド(配列

5'-ATA TCC TTG TCG TAT CCC-3'

40

)のX1/5細胞ルシフェラーゼ活性を阻害する能力を比較する実験結果を、図4に示した。このデータは、最終濃度250 nMのアンチセンスオリゴヌクレオチドへ曝露後の残留細胞内ルシフェラーゼ活性を表している。全てのアンチセンスは、ルシフェラーゼ mRNA の同じ配列に対するものである。S-DNAはPS-DNAであり、S-FANAはDNAギャップを伴わないPS-FANAであり、S-FANAギャップマーは、指定された長さ(図示)の一連のデオキシリボースヌクレオチド残基が隣接している2'-フルオロアラビノヌクレオチドから構築されたアンチセンスオリゴヌクレオチドであり、2'-OMeギャップマーは、指定された長さ(図示)の一連のデオキシリボースヌクレオチド残基が隣接している2'-O-メチルリボヌクレオチドから構築されたアンチセンスオ

50

リゴヌクレオチドである。

【0063】

全ての場合において、これらの細胞は、最終濃度 250 nM のアンチセンスオリゴヌクレオチドに、ルシフェラーゼ活性のアッセイ前に 24 時間曝露されている。ホスホロチオエート結合により β -D-2'-デオキシリボヌクレオチドから全体が構築されたアンチセンスオリゴヌクレオチド (S-DNA; ID#11、表1) は、ルシフェラーゼ発現を約 65% 阻害したのに対し、ホスホロチオエート結合により β -D-2'-デオキシ-2'-F-アラビノヌクレオチドから全体が構築されたもの (S-FANA; ID#6、表1) は、より効果が少なく、ルシフェラーゼ発現の平均 20% の阻害を提供したのみであった。10 DNA ギャップセグメントを伴う S-FANA および 2'-O-メチル RNA MBO ギャップマー (各々、ID#1 および 8、表1) は、同等の非常に効果的なインヒビターであり、細胞内ルシフェラーゼ活性のおよそ 85~90% の低下をもたらした。しかし、2'-O-メチル RNA MBO ギャップマーのアンチセンス活性は、DNA ギャップサイズの低下と共に劇的に低下し；実際、4 個の DNA ギャップを伴う 2'-O-メチル RNA MBO ギャップマー (ID#10、表1) は、X1/5 細胞ルシフェラーゼ発現に対する阻害活性をほとんどもしくは全く示さなかった。明らかに対照的に、S-FANA のアンチセンス活性は、DNA ギャップの減少 (DNA 長が 4 個に減少) の影響を受けなかった。興味深いことに、1 個の DNA ギャップを伴う S-FANA ギャップマー (ID#5、表1) のアンチセンス活性は、対応する全 S-DNA オリゴヌクレオチド (ID#11、表1) のものと同様に良好であった。このことは、全 S-FANA オリゴヌクレオチドはこの点に関して余り優れていなかったもので予想外であった。

【0064】

この実験の結果は、S-FANA で構成されたウィングで構築された MBO アンチセンスオリゴヌクレオチドが、S-2'-O-メチル RNA で構成されたウィングで構築された対応する MBO により示される強力な DNA ギャップサイズ依存性とは異なり、DNA ギャップサイズへの最小限の依存性を示すことを示唆している。

【0065】

実施例 6

ギャップマーアンチセンスオリゴヌクレオチドの細胞特異的遺伝子発現を阻害する能力に対する DNA 「ギャップ」 サイズの作用—アンチセンスオリゴヌクレオチド濃度の作用

S-2'-O-メチル RNA ギャップマー MBO と比べ S-FANA ギャップマーのアンチセンス活性をより良く定義するために、本発明者らは、アンチセンスオリゴヌクレオチド濃度の関数としての X1/5 細胞ルシフェラーゼ発現の阻害の用量依存的関係を試験した。

【0066】

X1/5 細胞を、96 穴プレートに密度 $1.5 \sim 2 \times 10^4$ 個細胞/ウェルで播種し、DMEM/10% FBS 中で 24 時間増殖させた。その後培養培地を細胞から取除き、細胞を数回リン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、その後オリゴヌクレオチド/サイトフェクシン混合液を含有する培地で積層し、アンチセンスオリゴヌクレオチドの最終濃度範囲 0~250 nM を提供した。24 時間インキュベーションした後、HeLa 細胞を収集し、ホモジナイズし、Promega 社 (マジソン、WI、米国) から得たルシフェラーゼアッセイキット構成成分を用いるルミネセンス測定法によりルシフェラーゼ活性についてアッセイした。

【0067】

この実験の結果を図 5 に示した (パネル A および B)。このデータは、X1/5 細胞が様々な指示された最終濃度のアンチセンスオリゴヌクレオチドに曝露された後で残留する細胞内ルシフェラーゼ活性を表している。全てのアンチセンスは、ルシフェラーゼ mRNA の同じ配列に対するものである。S-DNA は P-S-DNA であり、S-FANA ギャップマーは、指定された長さ (図示) の一連のデオキシリボースヌクレオチド残基が隣接している 2'-フルオロアラビノヌクレオチドから構築されたアンチセンスオリゴヌクレオ

チドであり、OMeギャップマーは、指定された長さ（図示）の一連のデオキシリボースヌクレオチド残基が隣接している2'-O-メチルリボヌクレオチドから構築されたアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【0068】

図5Aにおいて、ギャップ間が4～10個のS-DNAヌクレオチドである全てのS-FANAGャップマーは、S-DNA単独よりもはるかに優れた、細胞内ルシフェラーゼ発現のインヒビターであることが示されている。この阻害の IC_{50} 値は、約15nM（10DNAギャップ；ID#1、表1）から<<15nM（8、6および4DNAギャップオリゴヌクレオチド；各々、ID#2、3および4、表1）の範囲であった。対照的に、S-DNA（ID#11、表1）アンチセンス阻害の IC_{50} 値は、約100nMであった。1DNAギャップを伴うS-FANAMBO（ID#5、表1）の IC_{50} 値は、全S-DNAオリゴヌクレオチドと同じであった。

10

【0069】

図5Bにおいて、S-2'-O-メチルRNAギャップマー（10DNAギャップ；ID#8、表1）の能力に関する IC_{50} 値は、対応するS-FANAGャップマー（ID#1、表1）のものと本質的に同じであることが認められた。対照的に、試験したその他のS-2'-O-メチルRNAギャップマー（6および4DNAギャップ；各々、ID#9および10、表1）のアンチセンス活性の IC_{50} 値は、>>250nMであった。実際に後者のギャップマーは、X1/5細胞ルシフェラーゼ発現のアンチセンスインヒビターとしてほとんど無効であった。

20

【0070】

本発明は、その具体的態様に関連して説明されているが、これは更なる修正が可能であり、本願明細書は、概して本発明の原則に従う、本発明のあらゆる変形、用途、または適応に及ぶものであり、かつ本発明が属する技術分野において公知または慣習的実践の範囲であり、かつ前述の本質的特徴に適用され、添付の特許請求の範囲に従うような本説明からの逸脱を含むことが意図されていることは理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、細胞内遺伝子発現を阻害する、様々なアンチセンスオリゴヌクレオチドの効能を説明している。

【図2】図2A～Cは、PS-DNAおよびPS-FANAGャップマー（10DNA）アンチセンスオリゴヌクレオチドの細胞内遺伝子発現の阻害を比較説明している。

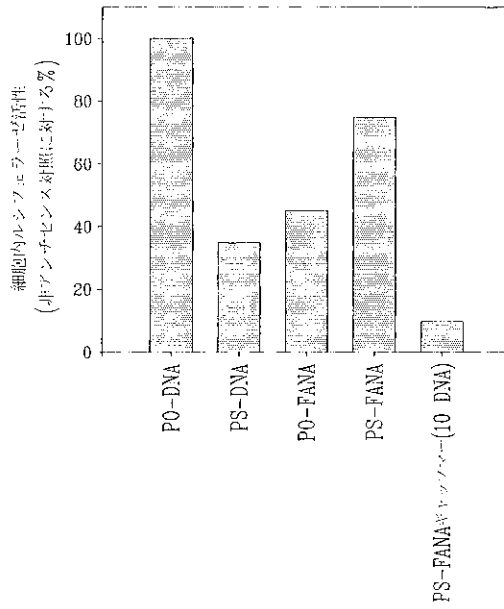
30

【図3】図3A～Bは、PS-DNAおよびPS-FANAGャップマー（10DNA）アンチセンスオリゴヌクレオチドによる処理の、細胞ルシフェラーゼタンパク質およびmRNAに対する作用を説明している。

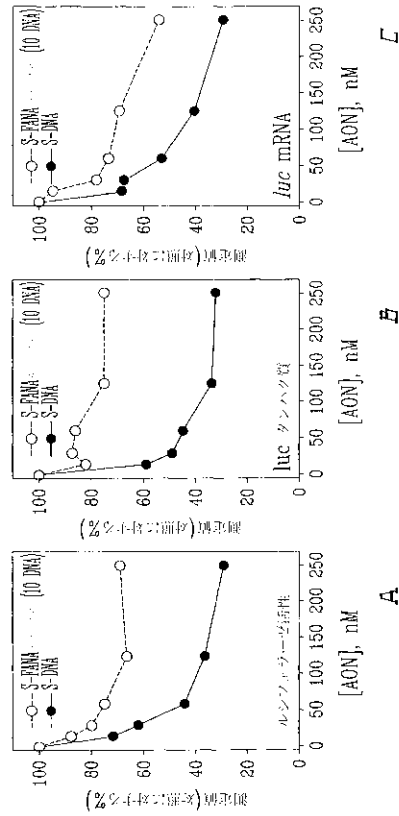
【図4】図4は、ギャップマーアンチセンスオリゴヌクレオチドの細胞特異的遺伝子発現阻害能に対する、DNA「ギャップ」サイズ的作用を説明している。

【図5】図5は、ギャップマーアンチセンスオリゴヌクレオチドの細胞の特異的遺伝子発現阻害能に対する、DNA「ギャップ」サイズ的作用—アンチセンスオリゴヌクレオチド濃度の作用を説明している。

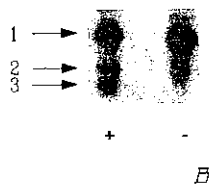
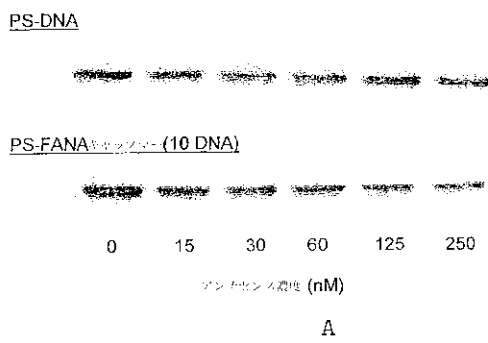
【図 1】



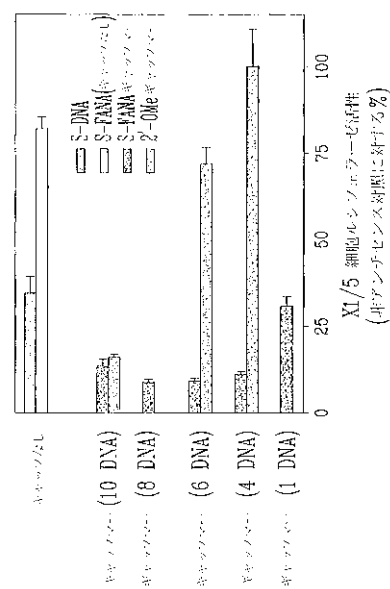
【図 2】



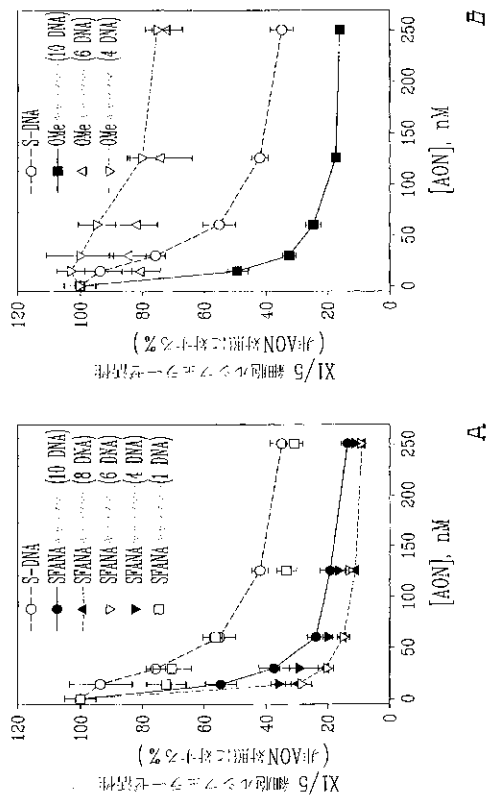
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
14 March 2002 (14.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/20773 A2

- (51) International Patent Classification: C12N 15/11
- (21) International Application Number: PCT/CA91/01252
- (22) International Filing Date:
4 September 2001 (04.09.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/250,414 6 September 2000 (06.09.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): MCGILL UNIVERSITY [CA/CA]; 845 Sherbrooke Street, Montreal, Quebec H3A 2T5 (CA).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): DAMHA, Masad, Jose [CA/CA]; 3166 Pierre T. Humeau, St Hubert, Quebec J5Y 8Y9 (CA); PARNIAK, Michael, A. [CA/US]; 20 Forbes Terrace, Pittsburgh, PA 15217 (US); LOK, Chuu-Nann [CN/CA]; 1866 Shurel Drive, Ottawa, Ontario K1H 6W4 (CA); VIAZOVSKINA, Ekaterina [RU/CA]; 323 Caré St-Louis, Apt. 3, Montréal, Québec H2X 1A7 (CA).
- (74) Agents: OGILVY RENAUDI et al., Suite 1600, 1981 McGill College Avenue, Montréal, Québec H3A 2Y3 (CA).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GG, GL, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, NO, NZ, FI, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, NL, PT, SE, TR); OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/20773 A2

(54) Title: CHIMERIC ANTISENSE OF ARABINOFURANOSE ANALOGUE AND DEOXYRIBOSE NUCLEOTIDES

(57) Abstract: The present invention relates to novel oligonucleotide chimera used as therapeutic agents to selectively prevent gene transcription and expression in a sequence-specific manner. In particular, this invention is directed to the selective inhibition of protein biosynthesis via antisense strategy using oligonucleotides constructed from arabinonucleotide or modified arabinonucleotide residues, flanking a series of deoxyribose nucleotide residues of variable length. Particularly this invention relates to the use of anti-sense oligonucleotides constructed from arabinonucleotide or modified arabinonucleotide residues, flanking a series of deoxyribose nucleotide residues of variable length, to hybridize to complementary RNA such as cellular messenger RNA, viral RNA, etc. More particularly this invention relates to the use of antisense oligonucleotides constructed from arabinonucleotide or modified arabinonucleotide residues, flanking a series of deoxyribose nucleotide residues of variable length, to hybridize to and induce cleavage of (via RNaseH activation) the complementary RNA.

WO 02/20773

PCT/CA01/01252

**CHIMERIC ANTISENSE OF ARABINOFURANOSE
ANALOGUE AND DEOXYRIBOSE NUCLEOTIDES**

BACKGROUND OF THE INVENTION

5 (a) Field of the Invention

The invention relates to novel oligonucleotide chimera used as therapeutic agents to selectively prevent gene transcription and expression in a sequence-specific manner. In particular, this invention is directed to the selective inhibition of protein biosynthesis via antisense strategy using oligonucleotides constructed from arabinonucleotide or modified arabinonucleotide residues, flanking a series of deoxyribose nucleotide residues of variable length. Particularly this invention relates to the use of antisense oligonucleotides constructed from arabinonucleotide or modified arabinonucleotide residues, flanking a series of deoxyribose nucleotide residues of variable length, to hybridize to complementary RNA such as cellular messenger RNA, viral RNA, etc. More particularly this invention relates to the use of antisense oligonucleotides constructed from arabinonucleotide or modified arabinonucleotide residues, flanking a series of deoxyribose nucleotide residues of variable length, to hybridize to and induce cleavage of (via RNaseH activation) the complementary RNA.

20 (b) Description of Prior Art

The Antisense Strategy

Antisense oligonucleotides (AON) are therapeutic agents that can inhibit specific gene expression in a sequence-specific manner. Many AON are currently in clinical trials for the treatment of cancer and viral diseases. For clinical utility, AON should exhibit stability against degradation by serum and cellular nucleases, show low non-specific binding to serum and cell proteins (since this binding would diminish the amount of antisense oligonucleotide available to base-pair with the target RNA), exhibit enhanced recognition of the target RNA sequence (in other words, provide increased stability of the antisense-target RNA duplex at physiological temperature), and to some extent, demonstrate cell-membrane permeability. Antisense inhibition of target gene expression is believed to occur by at least two main mechanisms. The first is "translation arrest", in which the formation of a duplex between the antisense oligomer and its target RNA prevents the complete translation of that RNA into protein, by blocking the ability of the ribosome to recognize the complete mRNA sequence. The second, and probably more important, mechanism concerns the ability of the antisense

WO 02/20773

PCT/CA01/01252

- 2 -

oligonucleotide to direct the ribonuclease H (RNaseH) catalyzed degradation of the target mRNA. RNaseH is an endogenous cellular enzyme that specifically degrades RNA when it is duplexed with a complementary DNA oligonucleotide (or antisense oligonucleotide) component. For example, when an antisense DNA oligonucleotide hybridizes to a cellular mRNA via complementary base pairing, cellular RNaseH recognizes the resulting DNA/RNA hybrid duplex and then degrades the mRNA at that site. Antisense oligonucleotides that can modulate gene expression by both mechanisms are highly desirable as this increases the potential efficacy of the antisense compound *in vivo*.

10 Oligonucleotide Analogs

Oligonucleotides containing natural (ribose or deoxyribose) sugars and phosphodiester (PO) linkages are rapidly degraded by serum and intracellular nucleases, which limits their utility as effective therapeutic agents. Chemical strategies to improve nuclease stability include modification of the sugar moiety, the base moiety, and/or modification or replacement of the internucleotide phosphodiester linkage. To date, the most widely studied analogues are the phosphorothioate (PS) oligodeoxynucleotides, in which one of the non-bridging oxygen atoms in the phosphodiester backbone is replaced with a sulfur. Numerous S-DNA oligonucleotide analogues are undergoing clinical trial evaluation for the treatment of cancer, infectious diseases and other human pathologies, and some are already subjects of New Drug Application (NDA) filings. S-DNA antisense are able to elicit RNaseH degradation of the target mRNA and they are reasonably refractory to degradation by serum and cellular nucleases. However, PS-DNA antisense tend to form less thermodynamically-stable duplexes with the target RNA nucleic acid than oligodeoxynucleotides with phosphodiester (PO) linkages. Furthermore, S-DNA antisense can be less efficient at eliciting RNaseH degradation of the target RNA than the corresponding PO-DNA.

Specificity of action may be improved by developing novel oligonucleotide analogues. Current strategies to generate novel oligonucleotides are to alter the internucleotide phosphate backbone, the heterocyclic base, and the sugar ring, or a combination of these. Alteration or complete replacement of the internucleotide linkage has been the most popular approach, with over 60 types of modified phosphate backbones studied since 1994. Apart from the phosphorothioate backbone, only two others have been reported to activate RNaseH activity, i.e., the phosphorodithioate (PS₂) and the boranophosphonate

WO 02/20773

PCT/CA01/01252

- 3 -

backbones. Because of the higher sulfur content of phosphorodithioate-linked (PS₂) oligodeoxynucleotides, they appear to bind proteins tighter than the phosphorothioate (PS) oligomers, and to activate RNaseH mediated cleavage with reduced efficiency compared to the PS analogue. Boranophosphate-linked oligodeoxynucleotides activate RNaseH mediated cleavage of RNA targets, but less well than PO- or PS-linked oligodeoxynucleotides.

Among the reported sugar-modified oligonucleotides most of them contain a five-membered ring, closely resembling the sugar of DNA (D-2-deoxyribose) and RNA (D-ribose). Example of these are α -oligodeoxynucleotide analogs, wherein the configuration of the 1' (or anomeric) carbon has been inverted. These analogues are nuclease resistant, form stable duplexes with DNA and RNA sequences, and are capable of inhibiting β -globin mRNA translation via an RNaseH-independent antisense mechanism. Other examples are xylo-DNA, 2'-O-Me RNA and 2'-F RNA. These analogues form stable duplexes with RNA targets; however, these duplexes are not substrates for RNaseH. To overcome this limitation, mixed-backbone oligonucleotides ("MBO") composed of either phosphodiester (PO) and phosphorothioate (PS) oligodeoxynucleotide segments flanked on both sides by sugar-modified oligonucleotide segments have been synthesized (Zhao, G. *et al.*, *Biochem. Pharmacol.* 1996, 51, 173; Crooke, S.T. *et al. J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1996, 277, 923). Among the MBOs most studied to date is the [2'-OMe RNA]-[PS DNA]-[2'-OMe RNA] chimera. The PS segment in the middle of the chain serves as the RNaseH activation domain, whereas the flanking 2'-OMe RNA regions increases affinity of the MBO strand for the target RNA. MBOs have increased stability *in vivo*, and appear to be more effective than phosphorothioate analogues in their biological activity both *in vitro* and *in vivo*. Examples of this approach incorporating 2'-OMe and other alkoxy substituents in the flanking regions of an oligonucleotide have been demonstrated by Monia *et al.* by enhanced antitumor activity *in vivo* (Monia, P.B. *et al. Nature Med.* 1996, 2, 668). Several pre-clinical trials with these analogues are ongoing.

The synthesis of oligonucleotides containing hexopyranoses instead of pentofuranose sugars has also been reported. A few of these analogues have increased enzymatic stability but generally suffer from a reduced duplex forming capability with the target sequence. A notable exception is 6' $\rightarrow$ 4' linked oligomers constructed from 1,5-anhydrohexitol units which, due to their highly pre-organized sugar structure, form very stable complexes with RNA. However,

none of these hexopyranose oligonucleotide analogues have been shown to elicit RNaseH activity. Recently, oligonucleotides containing completely altered backbones have been synthesized. Notable examples are the peptide nucleic acids ("PNA") with an acyclic backbone. These compounds have exceptional hybridization properties, and stability towards nucleases and proteases. However, efforts to use PNA oligomers as antisense constructs have been hampered by poor water solubility, self-aggregation properties, poor cellular uptake, and inability to activate RNaseH. Very recently, PNA-[PS-DNA]-PNA chimeras have been designed to maintain RNaseH mediated cleavage via the PS-DNA portion of the chimera.

Arabinonucleosides and Arabinonucleic Acids (ANA)

Arabinonucleosides are isomers of ribonucleosides, differing only in the stereochemistry at the 2'-position of the sugar ring. We have previously shown that antisense oligonucleotides constructed entirely from nucleotides comprising arabinose or modified arabinose (especially 2'-F arabinose) sugars are able to elicit RNaseH degradation of the complementary target RNA (Damha, M.J. et al. *JACS* 1998, 120, 12976; Noronha, A.M. et al. *Biochemistry* 2000, 39, 7050). We also noted that the thermal stability of duplexes consisting of an arabinose oligonucleotide with RNA was less than that of the analogous DNA/RNA duplex (Noronha, A.M. et al. *Biochemistry* 2000, 39, 7050). In contrast however, the thermal stability of duplexes consisting of an oligonucleotide synthesized with 2'-F arabinose nucleotides hybridized with RNA is generally greater than that of the analogous DNA/RNA duplex (Damha, M.J. et al. *JACS* 1998, 120, 12976). Giannaris and Damha found that replacement of the phosphodiester (PO) linkage in ANA oligonucleotides with phosphorothioate (PS) linkages significantly decreased the stability of the PS-ANA/PO-RNA duplex (Giannaris, P.A.; Damha, M.J. *Can. J. Chem.* 1994, 72, 909). This destabilization was greater than that observed when the PO linkages of an analogous DNA oligonucleotide were replaced with S internucleotide linkages (Giannaris, P.A.; Damha, M.J. *Can. J. Chem.* 1994, 72, 909).

Watanabe and co-workers incorporated 2'-deoxy-2'-fluoro- β -D-arabinofuranosylpyrimidine nucleosides (2'-F-ara-N, where N=C, U and T) at several positions within an oligonucleotide primarily comprised of a PO-DNA chain and evaluated the hybridization properties of such (2'-F)ANA-DNA "chimeras" towards complementary DNA (Kois, P. et al. *Nucleosides &*

Nucleotides 1993, 12, 1093). Substitutions with 2'-F-araU and 2'-F-araC destabilized duplex stability compared to the all-DNA/RNA duplex, whereas substitutions with 2'-F-araT stabilized the duplex. Marquez and co-workers recently evaluated the self-association of a DNA strand in which two internal thymidines were replaced by 2'-F-araT's (Ikeda *et al. Nucleic Acids Res.* 1998, 26, 2237). They confirmed the findings of Watanabe and co-workers that internal 2'-F-araT residues stabilize significantly the DNA double helix. The association of these (2'-F)ANA-DNA "chimeras" with complementary RNA (the typical antisense target) was not reported.

10 **Elicitation of cellular RNaseH degradation of target RNA by antisense oligonucleotides**

One of the most important mechanisms for antisense oligonucleotide directed inhibition of gene expression is the ability of these antisense oligonucleotides to form a structure, when duplexed with the target RNA, that can be recognized by cellular RNaseH. This enables the RNaseH-mediated degradation of the RNA target, within the region of the antisense oligonucleotide-RNA base-paired duplex (Monia *et al. J. Biol. Chem.* 1993, 268, 14514).

RNase H selectively degrades the RNA strand of a DNA/RNA heteroduplex. RNaseH1 from the bacterium *Escherichia coli* is the most readily available and the best characterized enzyme. Studies with eukaryotic cell extracts containing RNase H suggest that both prokaryotic and eukaryotic enzymes exhibit similar RNA-cleavage properties, although the bacterial enzyme is better able to cleave duplexes of small length (Monia *et al. J. Biol. Chem.* 1993, 268, 14514). *E. coli* RNaseH1 is thought to bind in the minor groove of the DNA/RNA double helix and to cleave the RNA by both endonuclease and processive 3'-to-5' exonuclease activities. The efficiency of RNase H degradation displays minimal sequence dependence and is quite sensitive to chemical changes in the antisense oligonucleotide. For example, while RNaseH readily degrades RNA in S-DNA/RNA duplexes, it cannot do so in duplexes comprising methylphosphonate-DNA, α -DNA, or 2'-OMe RNA antisense oligonucleotides with RNA. Furthermore, while *E. coli* RNaseH binds to RNA/RNA duplexes, it cannot cleave either RNA strand, despite the fact that the global helical conformation of RNA/RNA duplexes is similar to that of DNA/RNA substrate duplexes ("A"-form helices). These results suggest that local structural differences between DNA/RNA (substrate) and RNA/RNA (substrate) duplexes contribute to substrate discrimination.

Arabinonucleic Acids as Activators of RNaseH Activity

An essential requirement in the antisense approach is that an oligonucleotide or its analogue recognize and bind tightly to its complementary target RNA. The ability of the resulting antisense oligonucleotide/RNA duplex to serve as a substrate of RNaseH is likely to have therapeutic value by enhancing the antisense effect relative to antisense oligonucleotides that are unable to activate this enzyme. Apart from PS-DNA (phosphorothioates), PS₂-DNA (phosphorodithioates), boranophosphonate-linked DNA, and MBO oligos containing an internal PS-DNA segment, the only examples of fully modified oligonucleotides that elicit RNaseH activity are those constructed from arabinonucleotide (ANA) or modified arabinonucleotide residues (International Application published under No. WO 99/67378; Damha, M.J. et al. *JACS* 1998, 120, 12976; Noronha, A.M. et al. *Biochemistry* 2000, 39, 7050). These ANA oligonucleotides retain the natural β-D-furanose configuration and mimic the conformation of DNA strands (e.g., with sugars puckered in the C2'-endo conformation). The latter requirement stems from the fact that the antisense strand of natural substrates is DNA, and as indicated above, its primary structure (and/or conformation) appears to be essential for RNaseH/substrate cleavage; the DNA sugars of DNA/RNA hybrids adopt primarily the C2'-endo conformation. ANA is a stereoisomer of RNA differing only in the stereochemistry at the 2'-position of the sugar ring. ANA/RNA duplexes adopt a helical structure that is very similar to that of DNA/RNA substrates ("A"-form), as shown by similar circular dichroism spectra of these complexes (Damha, M.J. et al. *JACS* 1998, 120, 12976; Noronha, A.M. et al. *Biochemistry* 2000, 39, 7050).

Mixed-backbone or "gapmer" oligonucleotide constructs as antisense oligonucleotides

Mixed-backbone oligonucleotides (MBO) composed of a phosphodiester or phosphorothioate oligodeoxynucleotide "gap" segment flanked at both the 5'- and 3'-ends by sugar-modified oligonucleotide "wing" segments have been synthesized (Zhao, G. et al. *Biochem. Pharmacol.* 1996, 51, 173; Crooke, S.T. et al. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1996, 277, 923). Probably the most studied MBO to date is the [2'-OMe RNA]-[PS DNA]-[2'-OMe RNA] chimera. Oligonucleotides comprised of 2'-OMe RNA alone bind with very high affinity to target RNA, but are unable to elicit RNaseH degradation of that target RNA. In [2'-OMe RNA]-[PS DNA]-[2'-OMe RNA] chimera oligonucleotides, the PS-DNA segment in the middle of the chain serves to elicit RNaseH degradation of the

WO 02/20773

PCT/CA01/01252

- 7 -

target, whereas the flanking 2'-OMe RNA "wing" regions increase the affinity of the MBO strand for the target RNA. MBOs have increased stability *in vivo*, and appear to be more effective than same-sequence PS-DNA analogues in their biological activity both *in vitro* and *in vivo*. Examples of this approach incorporating 2'-OMe and other alkoxy substituents in the flanking regions of an oligonucleotide have been demonstrated by Monia *et al.* by enhanced antitumor activity *in vivo* (Monia, P.B. *et al. Nature Med.* 1996, 2, 668). Several pre-clinical trials with these analogues are ongoing.

Nonetheless, because 2'-OMe RNA cannot elicit RNaseH activity, the DNA gap size of the [2'-OMe RNA]-[PS DNA]-[2'-OMe RNA] chimera oligonucleotides must be carefully defined. While *E. coli* RNaseH can recognize and use 2'-OMe RNA MBO with DNA gaps as small as 4 DNA nucleotides (Shen, L.X. *et al* 1998 *Bioorg. Med. Chem.* 6, 1695), the eukaryotic RNaseH (such as human RNaseH) requires substantially larger DNA gaps (7 DNA nucleotides or more) for optimal degradation activity (Monia, B.P. *et al* 1993 *J. Biol. Chem.* 268, 14514). In general, with [2'-OMe RNA]-[PS DNA]-[2'-OMe RNA] chimera oligonucleotides, eukaryotic RNaseH-mediated target RNA cleavage efficiency decreases with decreasing DNA gap length, and becomes increasingly negligible with DNA gap sizes of less than 6 DNA nucleotides. Thus, antisense activity of [2'-OMe RNA]-[PS DNA]-[2'-OMe RNA] chimera oligonucleotides is highly dependent on DNA gap size (Monia, B.P. *et al* 1993 *J. Biol. Chem.* 268, 14514; Agrawal, S. and Kandimalia, E.R. 2000 *Mol. Med. Today*, 6, 72).

Recently, oligonucleotides containing completely altered backbones have been synthesized. Notable examples are the peptide nucleic acids ("PNA") with an acyclic backbone. These compounds have exceptional hybridization properties, and stability towards nucleases and proteases. However, efforts to use PNA oligomers as antisense constructs have been hampered by poor water solubility, self-aggregation properties, poor cellular uptake, and inability to activate RNaseH. Very recently, PNA-[PS-DNA]-PNA chimeras have been designed to maintain RNaseH mediated cleavage via the PS-DNA portion of the chimera.

It would be highly desirable to be provided with oligonucleotides constructed from arabinonucleotide or modified arabinonucleotide residues, flanking a series of deoxyribose nucleotide residues of variable length, for the

sequence specific inhibition of gene expression via association to (and RNaseH mediated cleavage of) complementary messenger RNA.

SUMMARY OF THE INVENTION

5 One aim of the present invention is to provide antisense oligonucleotides chimera constructed from arabinonucleotide or modified arabinonucleotide residues, flanking a series of deoxyribose nucleotide residues of variable length, that form a duplex with its target RNA sequence. Such resulting
10 antisense oligonucleotide/RNA duplex is a substrate for RNaseH, an enzyme that recognizes this duplex and degrades the RNA target portion. RNaseH mediated cleavage of RNA targets is considered to be a major mechanism of action of antisense oligonucleotides.

The present invention relates to the discovery that certain antisense hybrid chimeras, specifically those constructed from 2'-deoxy-2'-fluoro-β-D-arabinonucleotides (FANA) flanking a defined sequence constructed from β-D-2'-
15 deoxyribonucleotides (DNA), are superior to antisense hybrid chimeras constructed from 2'-O-methyl-β-D-ribonucleotides (OMeNA) flanking a defined sequence constructed from β-D-2'-deoxyribonucleotides (DNA).

Accordingly, antisense hybrid chimeras constructed from 2'-deoxy-2'-
20 fluoro-β-D-arabinonucleotides (FANA) flanking a defined sequence constructed from β-D-2'-deoxyribonucleotides (DNA), have potential utility as therapeutic agents and/or tools for the study and control of specific gene expression in cells and organisms.

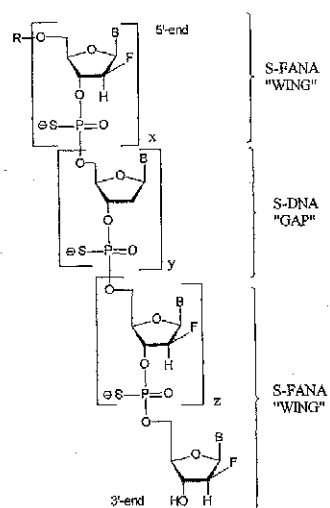
In accordance with the present invention there is provided an
25 oligonucleotide 'chimera' to selectively prevent gene expression in a sequence-specific manner, which comprises a chimera of modified arabinose and 2'-deoxy sugars hybridizing to a single stranded RNA to induce at least one of the following: (a) nuclease stability, (b) binding strength of hybridization to complementary RNA sequences, (c) permeability of said oligonucleotide into cells;
30 (d) cleavage of target RNA by RNaseH; or (e) physical blockage of ribosome translocation ('translation arrest').

Such an oligonucleotide has a general backbone composition of "[FANA WING]-[DNA GAP]-[FANA WING]", or 5'RO(FANA-p)x-(DNA-p)y-(FANA-p)z-(FANA)3'OH, and more precisely has the general structure:

WO 02/20773

PCT/CA01/01252

- 9 -



WO 02/20773

PCT/CA01/01252

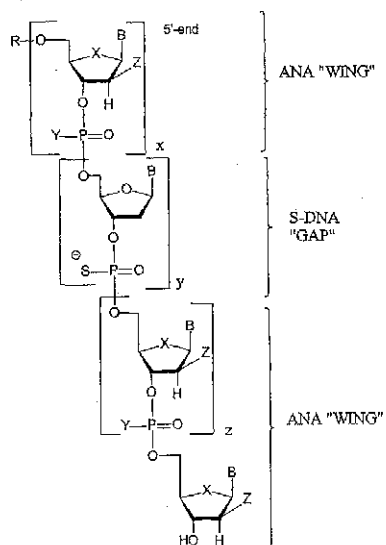
- 10 -

wherein,

$x \geq 1$, $y \geq 1$, and $z \geq 0$, and

R is selected from a group consisting of hydrogen, thiophosphate, and a linker moiety that enhances cellular uptake of such oligonucleotide.

- 5 In accordance with the present invention there is provided an oligonucleotide which has the formula:



wherein,

$x \geq 1$, $y \geq 1$, and $z \geq 0$;

- 10 R is selected from a group consisting of hydrogen, thiophosphate, and a linker moiety that enhances cellular uptake of such oligonucleotide;
- B is selected from the group consisting of adenine, guanine, uracil, thymine, cytosine, inosine, and 5-methylcytosine;

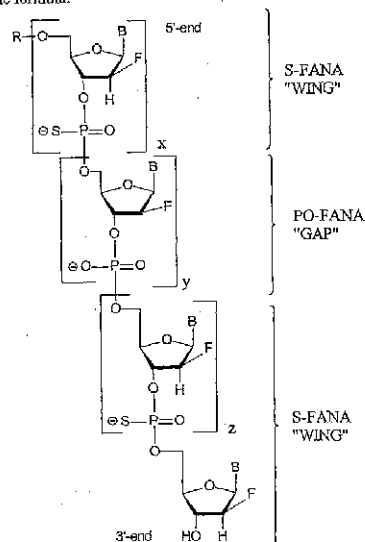
WO 02/20773

PCT/CA01/01252

- 11 -

- Y at the internucleotide phosphate linkage is selected from the group consisting of sulfur, oxygen, methyl, amino, alkylamino, dialkylamino (the alkyl group having one to about 20 carbon atoms), methoxy, and ethoxy;
- X at the furanose ring (position 4') is selected from the groups oxygen, sulfur, and methylene (CH_2); and
- 5 Z at the 2' position of the sugar ring is selected from the group consisting of a halogen (fluorine, chlorine, bromine, iodine), alkyl, alkylhalide (e.g., $-\text{CH}_2\text{F}$), allyl, amino, aryl, alkoxy, and azido.

- 10 In accordance with the present invention there is provided an oligonucleotide which has the formula:



wherein,

$x \geq 1$, $y \geq 1$, and $z \geq 0$;

WO 02/20773

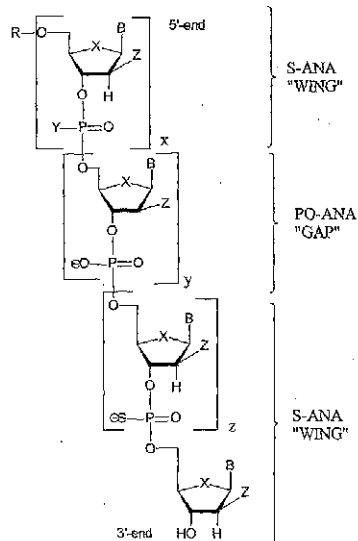
PCT/CA01/01252

- 12 -

- R is selected from a group consisting of hydrogen, thiophosphate, and a linker moiety that enhances cellular uptake of such oligonucleotide;
- B is selected from the group consisting of adenine, guanine, uracil, thymine, cytosine, inosine, and 5-methylcytosine.

5

In accordance with the present invention there is provided an oligonucleotide which has the formula:



wherein,

$x \geq 1$, $y \geq 1$, and $z \geq 0$,

- 10 R is selected from a group consisting of hydrogen, thiophosphate, and a linker moiety that enhances cellular uptake of such oligonucleotide;
- B is selected from the group consisting of adenine, guanine, uracil, thymine, cytosine, inosine, and 5-methylcytosine;

WO 02/20773

PCT/CA01/01252

- 13 -

Y at the internucleotide phosphate linkage is selected from the group consisting of sulfur, oxygen, methyl, amino, alkylamino, dialkylamino (the alkyl group having one to about 20 carbon atoms), methoxy, and ethoxy;

X at the furanose ring (position 4') is selected from the groups oxygen, sulfur, and methylene (CH₂); and

Z at the 2' position of the sugar ring is selected from the group consisting of a halogen (fluorine, chlorine, bromine, iodine), hydroxyl, alkyl, alkylhalide (e.g., -CH₂F), allyl, amino, aryl, alkoxy, and azido.

In accordance with the present invention there is provided a method for cleaving single stranded RNA, which comprises the steps of:

- (a) hybridizing in a sequence specific manner an oligonucleotide of the present invention to a single stranded RNA to induce RNase H activity; and
- (b) allowing said induced RNase H to cleave said hybridized single stranded RNA.

In accordance with the present invention there is provided a method to prevent translation of said single stranded RNA, which comprises hybridizing in a sequence specific manner chimeric oligonucleotides of claims 2 to 5 to single stranded RNA, and thereby prevent production of specific protein encoded by said single stranded RNA.

The RNA may be complementary RNA, such as cellular mRNA or viral RNA.

In accordance with the present invention there is provided the use of an oligonucleotide of the present invention for the preparation of a medicament for cleaving single stranded RNA, wherein said oligonucleotide hybridizes in a sequence specific manner to a single stranded RNA to induce RNase H activity in cleaving said hybridized single stranded RNA.

In accordance with the present invention there is provided the use of an oligonucleotide of the present invention for the preparation of a probe or laboratory reagent for cleaving single stranded RNA, wherein said oligonucleotide hybridizes in a sequence specific manner to a single stranded RNA to induce RNase II activity in cleaving said hybridized single stranded RNA.

In accordance with the present invention there is provided a composition to selectively prevent gene expression in a sequence-specific manner, which comprises an effective amount of an oligonucleotide 'chimera' of the present invention in association with a pharmaceutically acceptable carrier.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Fig. 1 illustrates the efficacy of various antisense oligonucleotides to inhibit intracellular gene expression.

5 Figs. 2A-C illustrate the comparison of PS-DNA and PS-FANA gapmer (10 DNA) antisense oligonucleotides to inhibit intracellular gene expression.

Figs. 3A-B illustrate the effect of treatment with PS-DNA and PS-FANA gapmer (10 DNA) antisense oligonucleotides on cellular luciferase protein and mRNA.

10 Fig. 4 illustrates the effect of DNA "gap" size on the ability of gapmer antisense oligonucleotides to inhibit cellular specific gene expression.

Fig. 5 illustrates the effect of DNA "gap" size on the ability of gapmer antisense oligonucleotides to inhibit cellular specific gene expression - effect of antisense oligonucleotide concentration.

15

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

In accordance with the present invention, there is provided antisense oligonucleotides constructed constructed from nucleotides possessing β -D-arabinose or modified β -D-arabinose sugar moieties, flanking a series of deoxyribose nucleotide residues of variable length, that form a duplex with its target RNA sequence. from β -D-arabinose and its derivatives and the therapeutic use of such compounds. It is the object of the present invention to provide new antisense oligonucleotide analogues that hybridize to complementary nucleic acids which may be mRNA or viral RNA (including retroviral RNA), for the purpose of inhibiting the expression of specific genes. More particularly this invention relates to the use of antisense oligonucleotides constructed constructed from nucleotides possessing β -D-arabinose or modified β -D-arabinose sugar moieties, flanking a series of deoxyribose nucleotide residues of variable length, to hybridize to specific target RNA sequences and elicit the cleavage of said target RNA through the action of cellular RNaseH.

20

25

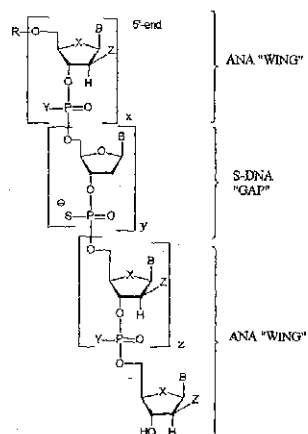
30

WO 02/20773

PCT/CA01/01252

- 15 -

The oligonucleotides of this invention may be represented by the following formula (I):



- where B includes but it is not necessarily limited to a common purine or pyrimidine base such as adenine, guanine, cytosine, thymine, and uracil. The oligonucleotides include stretches of DNA (DNA "gap") flanked by a number of β -D-arabinofuranose or modified β -D-arabinofuranose nucleotides at the 5'- and 3'-ends ("wings") of the antisense oligonucleotide, thereby forming "gapmers" such as ANA-DNA-ANA, 2'-F-ANA-DNA-2'-F-ANA, etc. The internucleotide phosphate linkage includes but it is not necessarily limited to oxygen, sulfur, methyl, amino, alkylamino, dialkylamino, methoxy, and ethoxy. The 2'-substituent of the arabinose sugar includes but is not limited to fluorine, hydroxyl, amino, azido, methyl, methoxy and other alkoxygroups (e.g., ethoxy, propoxy, methoxyethoxy, etc.).
- The gapmer antisense oligonucleotide of this invention contains a sequence that is complementary to a specific sequence of a messenger RNA, or viral genomic RNA, such that the gapmer oligonucleotide can specifically inhibit

WO 02/20773

PCT/CA01/01252

- 16 -

the biosynthesis of proteins encoded by the mRNA, or inhibit virus replication, respectively. Partial modifications to the oligonucleotide directed to the 5' and/or 3'-terminus, or the phosphate backbone or sugar residues to enhance their antisense properties (e.g. nuclease resistance) are within the scope of the invention.

5 A preferred group of oligonucleotides useful in this invention, are those wherein B is a natural base (adenine, guanine, cytosine, thymine, uracil), the sugar moiety of the "wings" is β -D-2'-deoxy-2'-F-arabinofuranose, and the internucleotide phosphate linkages contain sulfur (as phosphorothioate linkages). These modifications give rise to oligonucleotides that exhibit high affinity for
10 single stranded RNA. In addition, these oligonucleotides have been shown to meet the requirements necessary for antisense therapeutics. For example, they elicit the degradation of the target RNA by cellular RNaseH, thereby decreasing the intracellular amount of and activity of the specific protein encoded by the target RNA.

15 The gapmer antisense oligonucleotides of this invention exhibit a number of desirable properties:

- (1) They were found to bind to and cleave single stranded RNA by activating RNaseH. The gapmer oligonucleotides possessing "wings" comprised of β -D-2'-deoxy-2'-F-arabinofuranose nucleotides in particular were found to have
20 excellent affinity towards RNA targets, comparable to gapmer oligonucleotides possessing "wings" comprised of 2'-O-methylribonucleotides, and significantly better than that of identical sequence DNA.
- (2) The gapmer oligonucleotides possessing "wings" comprised of β -D-2'-deoxy-2'-F-arabinofuranose nucleotides were found to better effect sequence-specific
25 inhibition of intracellular gene expression than the same-sequence DNA oligonucleotides. With large DNA gaps (10 DNA oligonucleotides), the intracellular antisense activity of gapmer oligonucleotides possessing "wings" comprised of β -D-2'-deoxy-2'-F-arabinofuranose nucleotides was equivalent to that of same-sequence gapmer oligonucleotides possessing "wings"
30 comprised of 2'-O-methylribonucleotides. With smaller DNA gaps (6 DNA or less), the intracellular antisense activity of gapmer oligonucleotides possessing "wings" comprised of β -D-2'-deoxy-2'-F-arabinofuranose nucleotides was significantly better than that of same-sequence gapmer oligonucleotides possessing "wings" comprised of 2'-O-methylribonucleotides.

WO 02/20773

PCT/CA01/01252

- 17 -

These observations establish that gapmer oligonucleotides possessing "wings" comprised of β -D-2'-deoxy-2'-F-arabinofuranose nucleotides flanking an internal sequence of DNA (the "gap") are excellent models of antisense oligonucleotide agents, and should serve as therapeutics and/or valuable tools for studying and controlling gene expression in cells and organisms.

The present invention will be more readily understood by referring to the following examples which are given to illustrate the invention rather than to limit its scope.

EXAMPLE I

Preparation of antisense oligonucleotides constructed from 2'-deoxy-2'-fluoro- β -D-arabinonucleotides (FANA) flanking a defined sequence constructed from β -D-2'-deoxyribonucleotides (DNA)

1. Synthesis of FANA, S-[FANA], and S-[FANA-DNA-FANA]

The synthesis of FO-FANA was conducted as previously described (Damha *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* 120, 12976-12977 (1998)). Synthesis of S-FANA and S-[FANA-DNA-FANA] chimeras were synthesized on a 1 micromol scale using an Expedite 8909 DNA-synthesizer. Long-chain alkylamine controlled-pore glass (LCAA-CPG) was used as the solid support. The synthesis cycle consisted of the following steps:

- 1) Detritylation of nucleoside/tide bound to CPG (3% trichloroacetic acid/dichloromethane): 150 sec.
- 2) Coupling of 2'-F-arabinonucleoside or 2'-deoxyribonucleoside 3'-phosphoramidite monomers: 15 min. Concentration of monomers used were 50 mg/mL for araF-T, araF-C and DNA monomers, and 60 mg/mL for araA and araF-G (acetonitrile as solvent).
- 3) Acetylation using the standard capping step: 20 sec. The capping solution consisted of 1:1 (v/v) of "capA" and "capB" reagents. CapA: acetic anhydride/collidine/THF (1:1:8 ml); cap B: N-Methylimidazole/THF (4:21 ml).
- 4) Extensive washing with acetonitrile (50 pulses).
- 5) Sulfuration with a fresh solution of 0.2M 3H-1,2-benzodithiol-3-one in acetonitrile: 10 min.
- 6) Washing with acetonitrile: 20 pulses.

WO 02/20773

PCT/CA01/01252

- 18 -

7) Drying of the solid support by addition of the capping reagent (see step 3): 5 sec.

8) Washing with acetonitrile (20 pulses).

Following chain assembly, oligonucleotides were cleaved from the solid support and deprotected as previously described (Noronha *et al. Biochemistry* 39, 7050-7062 (2000)). The crude oligomers were purified by either (a) preparative gel electrophoresis (24% acrylamide, 7M Urea) following by desalting (Sephadex™ G-25), or (b) anion-exchange HPLC following by desalting (SepPak™ cartridges). Yields: 5-30 A₂₆₀ units

10 Conditions for HPLC Purification:

Column: Protein Pak DEAE-5PW (7.5mm X 7.5cm, Waters™),

Solvents: Buffer A: H₂O; Buffer B: 1M NaClO₄,

Gradient: 100% buffer A isocratic for 12 min,

100% A- 15% B, linear (over 5 min),

15 15% B - 55% B, linear (over 60 min).

Loading was 1-2 A₂₆₀ units for analysis and 30-50 A₂₆₀ units for preparative separation. Flow rate was set at 1 ml/min, temperature was adjusted at 50°C. The detector was set at 260 nm for analytical and 290 nm for preparative chromatography. Under these conditions, the desired full-length oligomer eluted

20 last.

2. Synthesis of S-DNA and S-[2'-OMe-RNA-DNA-2'-OMe-RNA] chimeras

Phosphorothioated DNA (S-DNA) and S-[2'-OMe-RNA-DNA-2'-OMe-RNA] chimeras were obtained commercially from the University of Calgary DNA Synthesis Laboratory (Calgary, ALTA). They were purified (HPLC) and desalted

25 (SepPak™ cartridges) as described above (see part 1 above).

The base sequence and hybridization properties of the various oligonucleotides synthesized are given in Table 1.

WO 02/20773

PCT/CA01/01252

- 19 -

TABLE 1

Antisense oligonucleotide (AON) sequences and melting temperatures (T_m) of duplexes of AON with complementary target RNA^a

ID #	AON Designation	AON Sequence ^b	T_m (°C) ^c
1	S-FANA gap (10 DNA)	S-ATA Tcc ttg tgg taT CCC	64
2	S-FANA gap (8 DNA)	S-ATA TCC ttg tgg taT CCC	65
3	S-FANA gap (6 DNA)	S-ATA TCC ttg tgg TAT CCC	68
4	S-FANA gap (4 DNA)	S-ATA TCC Ttg tgg TAT CCC	70
5	S-FANA gap (2 x10DNA)	S-ATA TCC Ttg TCG TAT CCC	71
6	S-FANA	S-ATA TCC TTG TCG TAT CCC	72
7	PO-FANA	O-ATA TCC TTG TCG TAT CCC	82
8	2'OMe gap (10 DNA)	S-ATA Tcc ttg tgg taT CCC	66
9	2'OMe gap (8 DNA)	S-ATA TCC ttg tgg TAT CCC	68
10	2'OMe gap (6 DNA)	S-ATA TCC Ttg tgg TAT CCC	72
11	S-DNA	S- ata tcc ttg tgg tat ccc	82
12	PO-DNA	O- ata tcc ttg tgg tat ccc	70

^aAqueous solutions of 2.5×10^{-6} M of duplex. Buffer: 140 mM KCl, 1mM MgCl₂, 5mM Na₂HPO₄ (pH 7.2). ^bcode: N = FANA nucleotide; n = DNA nucleotide; N' = 2'OMe-RNA nucleotide; S- = containing phosphorothioate bonds; PO- = containing phosphodiester bonds. ^c $\pm 1^\circ\text{C}$

EXAMPLE 2

Efficacy of various antisense oligonucleotides to inhibit intracellular gene expression

Antisense oligonucleotides have the potential to inhibit expression of virtually any gene, based on the specific base sequence of the chosen target mRNA. We studied the ability of antisense oligonucleotides constructed from 2'-deoxy-2'-fluoro- β -D-arabinonucleotides (FANA) flanking a series of 2'-deoxyribose nucleotide residues of variable length (S-FANA gapmer) to interfere with the expression of a well-characterized marker model, namely expression of the enzyme luciferase, in cells stably transfected with the luciferase gene. The efficacy of the S-FANA gapmer to inhibit intracellular luciferase expression was compared with identical sequence antisense oligonucleotides constructed entirely from 2'-deoxy-2'-fluoro- β -D-arabinonucleotides or entirely from 2'-deoxyribonucleotides. Linkages between nucleotides were either phosphodiester (PO) or phosphorothioate (PS). The specific antisense oligonucleotide sequences were 5'-ATA TCC TTG TCG TAT CCC-3', which is complementary to bases 1511-1528 of the coding region of the luciferase gene. As a control, randomized oligonucleotide sequences (5'-TAA TCC CTA TCG TCG CTT-3') were used;

WO 02/20773

PCT/CA01/01252

- 20 -

these are of the same base composition as the specific AON sequence, but have no complementarity to any portion of the luciferase gene. These randomized oligonucleotides were unable to effect inhibition of target luciferase expression.

The ability of oligonucleotides complementary to a specific region of mRNA coding for luciferase was tested for inhibition of luciferase activity expression in HeLa X1/5 cells (obtained from the European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK). HeLa X1/5 cells are stably transfected with the luciferase gene and express functional luciferase enzyme.

Oligonucleotides were delivered to the cells by complexing the oligonucleotide with cytofectin GSV GS3815 (Glen Research, Sterling, VA, USA). Briefly, oligonucleotides were diluted with DMEM in the absence of fetal bovine serum (FBS) to provide a final concentration of oligonucleotide 10-fold higher than the final concentration to which the cells would be exposed. Cytofectin GSV was prepared in serum-free DMEM at a final concentration of 25 µg/ml. Equal volumes of oligonucleotide and cytofectin solutions were mixed in polystyrene plastic and incubated for 15 min at room temperature, then the mixture was diluted 5-fold with DMEM containing 10% FBS.

X1/5 cells were plated in 96-well plates at a density of $1.5 - 2 \times 10^4$ cells/well and allowed to grow for 24h in DMEM/10% FBS. This generally provided a cell density of 80% confluence, as assessed by microscopy. The culture medium was then removed from the cells, the cells were washed several times with phosphate-buffered saline, and then overlaid with the medium containing the oligonucleotide/cytofectin mixture. After 24h incubation, the HeLa cells were harvested, homogenized and assayed for luciferase activity. Luciferase activity was assayed by a luminometric method using the luciferase assay kit components obtained from Promega (Madison, WI, USA).

The results of an experiment comparing the ability of antisense oligonucleotides (sequence 5'-ATA TCC TTG TCG TAT CCC-3'), constructed from a variety of different nucleotide and linkage chemistries, to inhibit X1/5 cell luciferase activity is given in Fig. 1. In all cases, the cells were exposed to a final concentration of 250 nM of antisense oligonucleotide, for 24h prior to assay of luciferase activity. The antisense oligonucleotide constructed entirely from β-D-2'-deoxyribose with phosphodiester bonds (PO-DNA; ID# 12 in Table 1) was unable to effect any inhibition of X1/5 cell luciferase activity, whereas the antisense oligonucleotide constructed entirely from β-D-2'-deoxyribose with

phosphorothioate bonds (PS-DNA; ID# 11 in Table 1) provided approximately 60% inhibition. Antisense oligonucleotides constructed entirely from 2'-deoxy-2'-fluoro- β -D-arabinonucleotides with either phosphodiester bonds (PO-FANA; ID# 7 in Table 1) or phosphorothioate bonds (PS-FANA; ID# 6 in Table 1) provided approximately 55% and 25% inhibition of luciferase activity, respectively. Under the same conditions, the antisense oligonucleotide constructed from 2'-deoxy-2'-fluoro- β -D-arabinonucleotides flanking a series of ten 2'-deoxyribose nucleotide residues, all joined with phosphorothioate bonds (S-FANA gapmer; ID# 1 in Table 1), provided at least a 90% inhibition of X1/5 cell luciferase activity. No obvious cell toxicity was noted with any of the antisense oligonucleotides under the conditions used in this experiment.

The results (Fig. 1) show that the S-FANA gapmer (10 DNA gap) is a significantly better inhibitor of X1/5 cell luciferase activity expression than any of PO-DNA, S-DNA, PO-FANA or S-FANA. X1/5 cells were incubated with various antisense oligonucleotides (250 nM final concentration), all directed against the same target sequence of luciferase mRNA. Following appropriate incubation, the residual level of intracellular luciferase activity was determined.

EXAMPLE 3

20 Comparison of S-DNA and S-FANA gapmer (10 DNA) antisense oligonucleotides to inhibit intracellular gene expression

Solutions of S-DNA (ID# 11, Table 1) and S-FANA gapmer (ID# 1, Table 1) were prepared with Cytofectin GSV GS3815 as described in Example 2. HeLa X1/5 cells were plated in replicate 6-well plates at a density of 5×10^5 cells/well and allowed to grow for 24h in DMEM/10% FBS. The culture medium was then removed from the cells, the cells were washed several times with phosphate-buffered saline, and then overlaid with the medium containing the oligonucleotide/cytofectin mixture. After 24h incubation, the HeLa X1/5 cells were harvested and treated in a manner appropriate for the subsequent assay procedures (described below).

30 (a) Assay for luciferase enzyme activity

Luciferase enzyme activity assays were performed using the luciferase assay kit system from Promega, Madison, WI, USA, according to the manufacturer's protocol. Briefly, cells were washed with phosphate-buffered saline and then lysed with the cell lysis buffer provided in the kit. Replicate aliquots of the cell lysates were transferred to 96 well assay plates. Luciferin substrate solution

was added and luminescence was measured immediately using a SPECTRAMax GEMINI XS microplate spectrofluorometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) set at the luminescence reading mode. Results were normalized for any variation in total cell protein concentration in the individual samples (determined using the Bio-Rad protein assay reagent on identical aliquots).

(b) Assay for luciferase protein expression.

Levels of luciferase protein in antisense-treated and untreated X1/5 cells were determined by Western blot analysis. Protein extracts of X1/5 cells were prepared by lysing the cells in the same lysis buffer used for preparation of the samples for luciferase enzyme assays, followed by clarification by centrifugation. The protein content of individual samples was measured using the Bio-Rad protein assay reagent (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Samples containing identical amounts of cell protein (approximately 20 µg) were subjected to SDS-PAGE, then transferred to nitrocellulose membranes (0.45 µ). The membrane was incubated in TTBS (20 mM Tris-HCl containing 500 mM NaCl and 0.05% Tween 20) containing 5% skim milk for at least one hour. The blots were then incubated with a goat antibody specifically reacting with firefly luciferase (obtained from Chemicon International Inc, Temecula, CA, USA), using antibody at a concentration of 1 mg/ml in TTBS. After 1h incubation, the membranes were washed extensively with TTBS, then incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-goat IgG (Chemicon International Inc., Temecula, CA, USA) at a 1:10,000 dilution in TTBS. The peroxidase-reactive regions were then detected using the Renaissance Western blot Chemiluminescence Reagent Kit (NEN Life Science Products, Boston, MA, USA) and Kodak X-OMAT film, according to manufacturer's instructions. Luciferase protein levels were then quantified by densitometric analysis of the developed film.

(c) Assay for luciferase mRNA.

The isolation of total RNA from X1/5 cells and Northern blot assays for luciferase mRNA levels were carried. Normalized amounts of total cell RNA (10-20 µg) were size-fractionated on 1% agarose gels containing 2.2 M formaldehyde then transferred to 0.45 µ nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The hybridization probe for luciferase mRNA was ³²P-internally labeled DNA derived from the full-length cDNA for the firefly luciferase gene (from plasmid pGEM-Luc, Promega, Madison, WI, USA) generated using the oligolabeling kit from Amersham-Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ, USA). Hybridization of the radiolabeled probe with membrane bound RNA was carried out in 6x SSC buffer (900 mM sodium chloride containing 90 mM sodium citrate at pH 7.0) containing 50% formamide, 0.5% sodium dodecyl sulfate and blocking reagents. Hybridizations were carried out at 42°C for 16 hours. The membranes were then washed twice with 1x SSC containing 0.1% SDS at room temperature, then 0.1x SSC containing 0.1% SDS at room temperature, and finally 0.1x SSC containing 0.5% SDS at 42°C. Membrane-associated radioactivity was localized by autoradiography, and quantified by densitometry.

The results of Fig. 2 show that S-FANA gapmer (10 DNA) was significantly more effective than S-DNA at inhibiting X1/5 cell luciferase activity over a range of concentrations varying from 15 nM to 250 nM antisense oligonucleotide (panel A).

Treatment of X1/5 cells with the S-FANA gapmer (10 DNA) resulted in a dose-dependent decrease in total luciferase protein (panel B) that was not evident in cells treated with the S-DNA antisense. In addition, treatment of X1/5 cells with the S-FANA gapmer (10 DNA) resulted in a dose-dependent decrease in total luciferase mRNA (panel C); this decrease was greater than that effected by the S-DNA antisense. Luciferase protein levels were assessed by Western blot analysis using an antibody specifically directed towards luciferase. Luciferase mRNA levels were assessed by Northern blot analysis using a DNA probe specifically directed towards a sequence of the luciferase mRNA.

EXAMPLE 4**Effect of treatment with S-DNA and S-FANA gapmer (10 DNA) antisense oligonucleotides on cellular luciferase protein and mRNA**

Solutions of S-DNA (ID# 11, Table 1) and S-FANA gapmer (ID# 1, Table 1) were prepared with Cytofectin GSV GS3815 as described in Example 2. 5 HeLa X1/5 cells were plated in replicate 6-well plates at a density of 5×10^5 cells/well and allowed to grow for 24h in DMEM/10% FBS. The culture medium was then removed from the cells, the cells were washed several times with phosphate-buffered saline, and then overlaid with the medium containing the oligonucleotide/cytofectin mixture to provide the indicated final concentrations of 10 S-DNA or S-FANA gapmer (10 DNA) antisense oligonucleotides. After 24h incubation, the HeLa X1/5 cells were harvested and treated in a manner appropriate for analysis of luciferase protein levels or luciferase mRNA levels, exactly as described in Example 3.

15 The results in Fig. 3, panel (A), show the Western blot analysis of luciferase protein levels in extracts of X1/5 cells treated with varying concentrations of S-DNA (upper series) or S-FANA gapmer (10 DNA) (lower series). (A) Variation in luciferase protein levels following exposure of X1/5 cells to increasing amounts of either PS-DNA or PS-FANA gapmer (10 DNA) antisense oligonucleotides.

It is readily seen that the cells treated with S-FANA gapmer (10 DNA) show a dose-dependent decrease in total luciferase protein, whereas this effect is much less apparent in cells treated with S-DNA. Quantitation of the luciferase protein levels is provided in panel (B) of Fig. 2. (B) The PS-FANA gapmer (10 DNA) antisense oligonucleotide elicits RNaseH cleavage of intracellular luciferase mRNA. 1 corresponds to the full-length luciferase mRNA, 2 and 3 are the cleaved products. + represents mRNA isolated from cells treated with 250 nM PS-FANA gapmer (10 DNA), - represents mRNA isolated from cells not exposed to antisense.

30 The results in Fig. 3, panel (B), show that treatment of X1/5 cells with 250 nM S-FANA gapmer (10 DNA) results in a readily discernible cleavage of luciferase mRNA (lane +). Three species of luciferase mRNA are seen, full-length (1), and two smaller species (2 and 3) that correspond to the cleavage products expected from RNaseH degradation of the full-length mRNA in the region targeted

by the antisense oligonucleotide. The luciferase mRNA profile in cells not exposed to any antisense is shown in the lane marked (-).

EXAMPLE 5

Effect of DNA "gap" size on the ability of gapmer antisense oligonucleotides to inhibit cellular specific gene expression

We compared antisense oligonucleotides constructed from 2'-deoxy-2'-fluoro-β-D-arabinonucleotides (FANA) flanking a series of 2'-deoxyribose nucleotide residues of variable length with phosphorothioate internucleotide linkages (S-FANA gapmer) to similar MBO constructed with 2'-O-methyl RNA wings, and to non-gapmer PS-DNA and PS-FANA oligonucleotides, in their ability to inhibit the expression of intracellular luciferase activity in Hela X1/5 cells. The specific antisense oligonucleotide sequence was 5'-ATA TCC TTG TCG TAT CCC-3', which is complementary to bases 1511-1528 of the coding region of the luciferase gene.

Oligonucleotides were delivered to the cells by complexing the oligonucleotide with cytofectin GSV GS3815 (Glen Research, Sterling, VA, USA), exactly as described for Example 2.

X1/5 cells were plated in 96-well plates at a density of $1.5 - 2 \times 10^4$ cells/well and allowed to grow for 24h in DMEM/10% FBS. The culture medium was then removed from the cells, the cells were washed several times with phosphate-buffered saline, and then overlaid with the medium containing the oligonucleotide/cytofectin mixture, to provide a final concentration of 250 nM of antisense oligonucleotide. After 24h incubation, the Hela cells were harvested, homogenized and assayed for luciferase activity by a luminometric method using the luciferase assay kit components obtained from Promega (Madison, WI, USA).

The results of an experiment comparing the ability of antisense oligonucleotides (sequence 5'-ATA TCC TTG TCG TAT CCC-3'), constructed from a variety of different nucleotide, to inhibit X1/5 cell luciferase activity is given in Fig. 4. The data represent residual intracellular luciferase activity following exposure to a final concentration of 250 nM antisense oligonucleotide. All antisense were directed to the same sequence of luciferase mRNA. S-DNA is PS-DNA, S-FANA is PS-FANA without a DNA gap, S-FANA gapmer is an antisense oligonucleotide constructed from 2'-fluoroarabinonucleotides flanking a series of deoxyribose nucleotide residues of defined length (indicated), 2'-OMe gapmer is an antisense oligonucleotide constructed from 2'-O-

methylnucleotides flanking a series of deoxyribose nucleotide residues of defined length (indicated).

In all cases, the cells were exposed to a final concentration of 250 nM of antisense oligonucleotide, for 24h prior to assay of luciferase activity. The antisense oligonucleotide constructed entirely from β -D-2'-deoxyribonucleotides with phosphorothioate bonds (S-DNA; ID# 11 in Table 1) inhibited luciferase expression by about 65%, whereas that constructed entirely from β -D-2'-deoxy-2'-F-arabinonucleotides with phosphorothioate bonds (S-FANA; ID# 6 in Table 1) was much less effective, providing only an average of 20% inhibition of luciferase expression. Both S-FANA and 2'-O-methyl RNA MBO gapmers with a ten DNA gap segment (ID# 1 and 8, respectively, in Table 1) were equally and very effective inhibitors, providing an approximate 85-90% decrease in intracellular luciferase activity. However, the antisense activity of 2'-O-methyl RNA MBO gapmers decreased dramatically with decreasing size of the DNA gap; indeed, the 2'-O-methyl RNA MBO gapmer with a 4 DNA gap (ID# 10, Table 1) showed little or no inhibitory activity against X1/5 cell luciferase expression. In sharp contrast, the antisense activity of the S-FANA was unaffected with decreasing DNA gaps, down to a 4 DNA length. Interestingly, the antisense activity of the S-FANA gapmer with a single DNA gap (ID# 5, Table 1) was as good as that of the corresponding all S-DNA oligonucleotide (ID# 11, Table 1). This was unexpected, since the all S-FANA oligonucleotide was very poor in this respect.

The results of this experiment show that MBO antisense oligonucleotides constructed with wings comprised of S-FANA show minimal dependence on DNA gap size, unlike the strong DNA gap size dependence exhibited by the corresponding MBO constructed with wings comprised of S-2'-O-methyl RNA.

EXAMPLE 6

Effect of DNA "gap" size on the ability of gapmer antisense oligonucleotides to inhibit cellular specific gene expression - effect of antisense oligonucleotide concentration

In order to better define the antisense activity of S-FANA gapmers compared to S-2'-O-methyl RNA gapmer MBO, we studied the dose-response relationships of inhibition of X1/5 cell luciferase expression as a function of antisense oligonucleotide concentration.

WO 02/20773

PCT/CA01/01252

- 27 -

X1/5 cells were plated in 96-well plates at a density of $1.5 \sim 2 \times 10^4$ cells/well and allowed to grow for 24h in DMEM/10% FBS. The culture medium was then removed from the cells, the cells were washed several times with phosphate-buffered saline, and then overlaid with the medium containing the oligonucleotide/cytosfectin mixture, to provide final concentrations of antisense oligonucleotides ranging from 0 to 250 nM. After 24h incubation, the HeLa cells were harvested, homogenized and assayed for luciferase activity by a luminometric method using the luciferase assay kit components obtained from Promega (Madison, WI, USA).

The results of this experiment are shown in Figs. 5 (panels A and B). The data represent residual intracellular luciferase activity following exposure of X1/5 cells to the various indicated final concentrations of antisense oligonucleotide. All antisense were directed to the same sequence of luciferase mRNA. S-DNA is PS-DNA, S-FANA gapmer is an antisense oligonucleotide constructed from 2'-fluoroarabinonucleotides flanking a series of deoxyribose nucleotide residues of defined length (indicated), OMe gapmer is an antisense oligonucleotide constructed from 2'-O-methylribonucleotides flanking a series of deoxyribose nucleotide residues of defined length (indicated).

In Fig. 5A, it can be seen that all of the S-FANA gapmers with gaps between 4 and 10 S-DNA nucleotides were very effective inhibitors of intracellular luciferase expression, much better than S-DNA alone. The IC_{50} values for this inhibition ranged from about 15 nM (for the 10 DNA gap; ID# 1, Table 1) to << 15 nM (for the 8, 6 and 4 DNA gap oligonucleotides; ID# 2, 3 and 4 respectively, in Table 1). In contrast, the IC_{50} value for S-DNA (ID# 11, Table 1) antisense inhibition was about 100 nM. The IC_{50} for the S-FANA MBO with 1 DNA gaps (ID# 5, Table 1) was identical to that of the all S-DNA oligonucleotide.

In Fig. 5B, it can be seen that the IC_{50} for the ability of the S-2'-O-methyl RNA gapmer (10 DNA gap; ID# 8, Table 1) was essentially identical to that of the corresponding S-FANA gapmer (ID# 1, Table 1). In contrast, the IC_{50} values for the antisense activity of the other S-2'-O-methyl RNA gapmers tested (6 and 4 DNA gaps; ID# 9 and 10 respectively in Table 1) were >> 250 nM. Indeed, the latter gapmers were virtually ineffective as antisense inhibitors of X1/5 cell luciferase expression.

While the invention has been described in connection with specific embodiments thereof, it will be understood that it is capable of further

WO 02/20773

PCT/CA01/01252

- 28 -

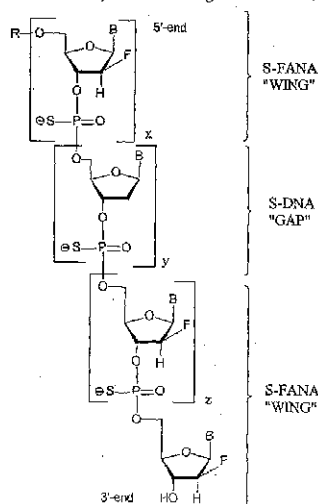
modifications and this application is intended to cover any variations, uses, or adaptations of the invention following, in general, the principles of the invention and including such departures from the present disclosure as come within known or customary practice within the art to which the invention pertains and as may be
5 applied to the essential features hereinbefore set forth, and as follows in the scope of the appended claims.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An oligonucleotide 'chimera' to selectively prevent gene expression in a sequence-specific manner, which comprises a chimera of modified arabinose and 2'-deoxy sugars hybridizing to a single stranded RNA to induce at least one of the following: (a) nuclease stability, (b) binding strength of hybridization to complementary RNA sequences, (c) permeability of said oligonucleotide into cells; (d) cleavage of target RNA by RNaseH; or (e) physical blockage of ribose translocation ('translation arrest').

2. The oligonucleotide of claim 1, which has the general backbone composition "[FANA WING]-[DNA GAP]-[FANA WING]", or 5'RO(FANA-p)x-(DNA-p)y-(FANA-p)z-(FANA)3'OH.

3. The oligonucleotide of claim 2, which has the general structure:



WO 02/20773

PCT/CA01/01252

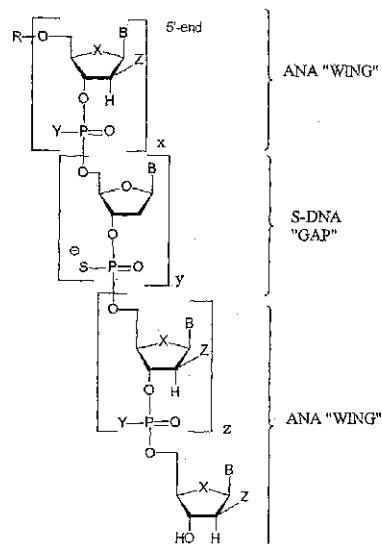
- 30 -

wherein,

$x \geq 1$, $y \geq 1$, and $z \geq 0$, and

R is selected from a group consisting of hydrogen, thiophosphate, and a linker moiety that enhances cellular uptake of such oligonucleotide.

4. The oligonucleotide of claim 1 wherein said oligonucleotide has the formula:



wherein,

$x \geq 1$, $y \geq 1$, and $z \geq 0$;

R is selected from a group consisting of hydrogen, thiophosphate, and a linker moiety that enhances cellular uptake of such oligonucleotide;

B is selected from the group consisting of adenine, guanine, uracil, thymine, cytosine, inosine, and 5-methylcytosine;

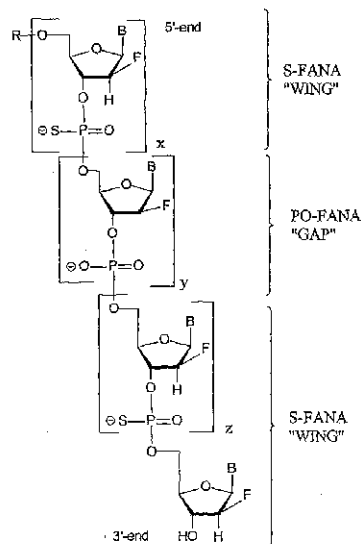
WO 02/20773

PCT/CA01/01252

- 31 -

- Y at the internucleotide phosphate linkage is selected from the group consisting of sulfur, oxygen, methyl, amino, alkylamino, dialkylamino (the alkyl group having one to about 20 carbon atoms), methoxy, and ethoxy;
- X at the furanose ring (position 4') is selected from the groups oxygen, sulfur, and methylene (CH₂); and
- Z at the 2' position of the sugar ring is selected from the group consisting of a halogen (fluorine, chlorine, bromine, iodine), alkyl, alkylthio (e.g., -CH₂F), allyl, amino, aryl, alkoxy, and azido.

5. The oligonucleotides of claim 1 wherein said oligonucleotide has the formula:



wherein,

$x \geq 1$, $y \geq 1$, and $z \geq 0$;

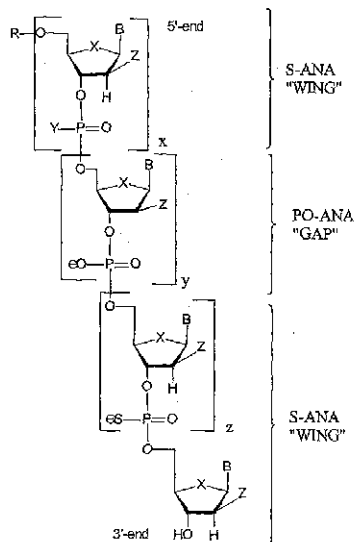
WO 02/20773

PCT/CA01/01252

- 32 -

- R is selected from a group consisting of hydrogen, thiophosphate, and a linker moiety that enhances cellular uptake of such oligonucleotide;
- B is selected from the group consisting of adenine, guanine, uracil, thymine, cytosine, inosine, and 5-methylcytosine.

6. The oligonucleotides of claim 1, wherein said oligonucleotide has the formula:



wherein,

$x \geq 1$, $y \geq 1$, and $z \geq 0$;

- R is selected from a group consisting of hydrogen, thiophosphate, and a linker moiety that enhances cellular uptake of such oligonucleotide;
- B is selected from the group consisting of adenine, guanine, uracil, thymine, cytosine, inosine, and 5-methylcytosine;

WO 02/20773

PCT/CA01/01252

- 33 -

- Y at the internucleotide phosphate linkage is selected from the group consisting of sulfur, oxygen, methyl, amino, alkylamino, dialkylamino (the alkyl group having one to about 20 carbon atoms), methoxy, and ethoxy;
- X at the furanose ring (position 4') is selected from the groups oxygen, sulfur, and methylene (CH₂); and
- Z at the 2' position of the sugar ring is selected from the group consisting of a halogen (fluorine, chlorine, bromine, iodine), hydroxyl, alkyl, alkylhalide (e.g., -CH₂F), allyl, amino, aryl, alkoxy, and azido.
7. A method for cleaving single stranded RNA, which comprises the steps of:
- (c) hybridizing in a sequence specific manner an oligonucleotide of claims 1 to 6 to a single stranded RNA to induce RNase H activity; and
 - (d) allowing said induced RNase H to cleave said hybridized single stranded RNA.
8. A method to prevent translation of said single stranded RNA, which comprises hybridizing in a sequence specific manner chimeric oligonucleotides of claims 1 to 6 to single stranded RNA, and thereby prevent production of specific protein encoded by said single stranded RNA.
9. The method of claim 7 or 8, wherein said RNA is complementary RNA.
10. The method of claim 9, wherein said complementary RNA is cellular mRNA or viral RNA.
11. The use of an oligonucleotide of claims 1 to 6 for the preparation of a medicament for cleaving single stranded RNA, wherein said oligonucleotide hybridizes in a sequence specific manner to a single stranded RNA to induce RNase H activity in cleaving said hybridized single stranded RNA.
12. The use of claim 11, wherein said complementary RNA is cellular mRNA or viral RNA.

13. The use of an oligonucleotide specified in claims 1 to 6 for the preparation of a probe or laboratory reagent for cleaving single stranded RNA, wherein said oligonucleotide hybridizes in a sequence specific manner to a single stranded RNA to induce RNase H activity in cleaving said hybridized single stranded RNA.

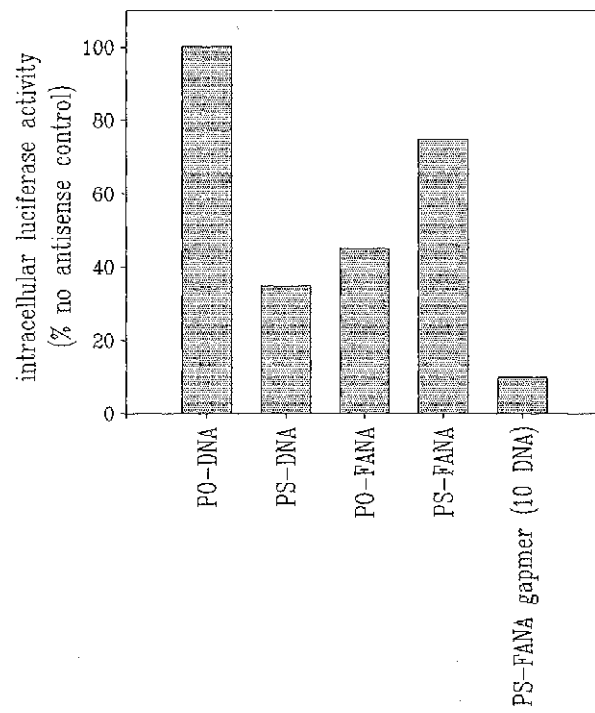
14. The use of claim 13, wherein said complementary RNA is cellular mRNA or viral RNA.

15. A pharmaceutical composition to selectively prevent gene expression in a sequence-specific manner; which comprises an effective amount of an oligonucleotide 'chimera' of claims 1 to 6 in association with a pharmaceutically acceptable carrier.

WO 02/20773

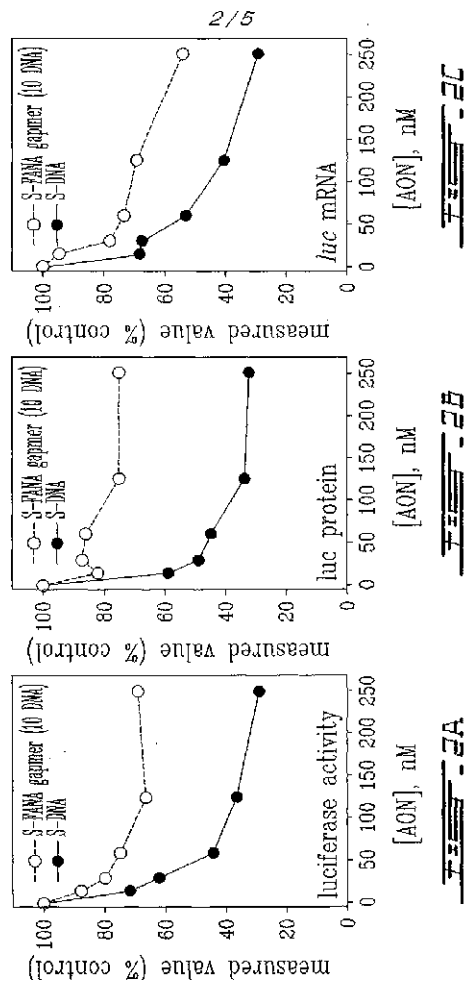
PCT/CA01/01252

1/5

Figure 1

WO 02/20773

PCT/CA01/01252



WO 02/20773

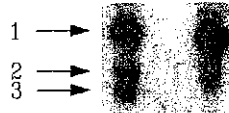
PCT/CA01/01252

3/5

PS-DNAPS-FANA gapmer (10 DNA)

0 15 30 60 125 250

antisense concentration (nM)

A schematic diagram of a gapmer structure, consisting of a horizontal line with a central rectangular box and a small vertical tick mark on the left side.
- 5A

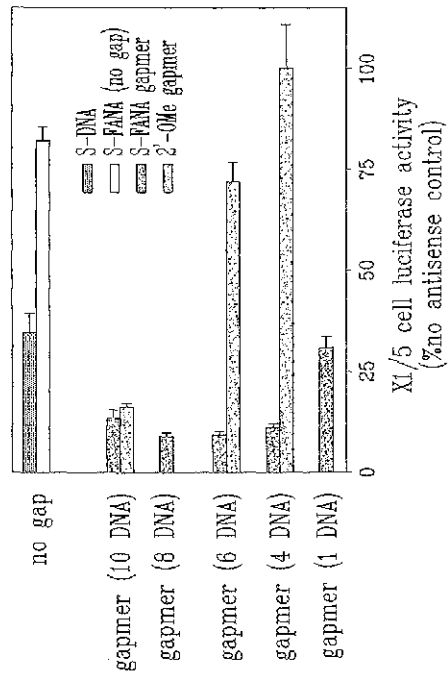
+ -

A schematic diagram of a gapmer structure, consisting of a horizontal line with a central rectangular box and a small vertical tick mark on the left side.
- 5B

WO 02/20773

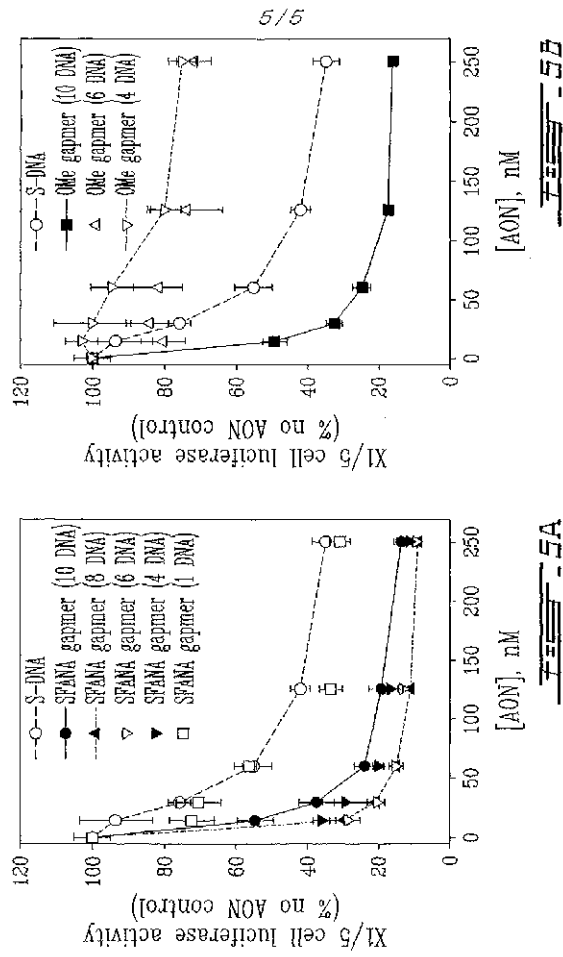
PCT/CA01/01252

4/5



WO 02/20773

PCT/CA01/01252



【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
14 March 2002 (14.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/020773 A3(51) International Patent Classification:
C02H 21/00, A61K 3/7712

C12N 15/11

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): DAMHA, Masad,

José [CA/CA]; 3165 Route L. Harwood, St. Hubert, Québec

J3Y 8N9 (CA); PARNIAK, Michael, A. (CA/US);

20 Inches Terrace, Pittsburgh, PA 15217 (US); LOK,

Chun-Nam (CN/CA); 1266 Strand Drive, Ottawa, Ontario

K1H 6W4 (CA); VTASOVSKINA, Ekaterina (RU/CA);

322 Carte St Louis, Apt. 3, Montréal, Québec H2X 1A7

(CA).

(21) International Application Number: PCT/CA01/01252

(22) International Filing Date:

4 September 2001 (04.09.2001)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(74) Agents: OGHIVY RENAULT et al., Suite 1600, 1981

McGill College Avenue, Montréal, Québec H3A 2Y3

(CA).

(30) Priority Data:

60/230,414 6 September 2000 (06.09.2000) US

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,

AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,

CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GR, GU, HK,

CA, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,

LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,

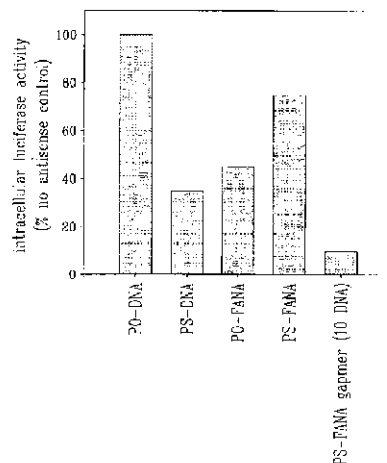
[Continued on next page]

(71) Applicant (for all designated States except US): MCGILL

UNIVERSITY [CA/CA]; 815 Sherbrooke Street, Montréal,

Québec H3A 2T5 (CA)

(54) Title: CHIMERIC ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES OF ARABINOURACOSYL ANALOGUES AND DEOXYRIBOSYL NUCLEOTIDES



(57) Abstract: The present invention relates to novel oligonucleotide chimera used as therapeutic agents to selectively prevent gene transcription and expression in a sequence-specific manner. In particular, this invention is directed to the selective inhibition of protein biosynthesis via antisense strategy using oligonucleotides constructed from arabinonucleotide or modified arabinonucleotide residues, flanking a series of deoxyribose nucleotide residues of variable length. Particularly this invention relates to the use of arabinose oligonucleotides constructed from arabinonucleotide or modified arabinonucleotide residues, flanking a series of deoxyribose nucleotide residues of variable length, to hybridize to complementary RNA such as cellular messenger RNA, viral RNA, etc. More particularly this invention relates to the use of antisense oligonucleotides constructed from arabinonucleotide or modified arabinonucleotide residues, flanking a series of deoxyribose nucleotide residues of variable length, to hybridize to and induce cleavage of (via RNaseH activation) the complementary RNA.

WO 02/020773 A3

WO 02/020773 A3



MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZW.

Published:
— with international search report

(84) Designated States (regionally): ARIPO patent (GH, GB),
KP, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW); Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LI, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI patent (BF, BJ, CI,
CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

(88) Date of publication of the international search report:
25 January 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

【手続補正書】

【提出日】平成15年1月15日(2003.1.15)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

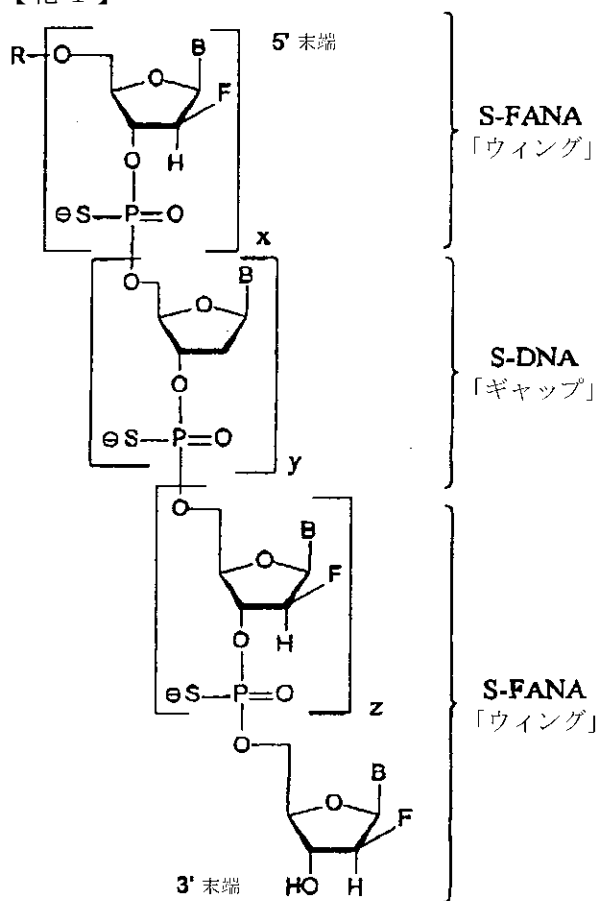
【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列特異的方法において遺伝子発現を選択的に妨害する、オリゴヌクレオチド「キメラ」であり、(a)ヌクレアーゼ安定性、(b)相補的RNA配列へのハイブリダイゼーションの結合強度、(c)該オリゴヌクレオチドの細胞への透過性、(d)RNase Hによる標的RNAの切断、または(e)リボソーム転位の物理的阻止(「翻訳抑制(translation arrest)」)のうち、少なくとも1種を誘導するために、1本鎖RNAにハイブリダイズする修飾されたアラビノースと2'-デオキシ糖とのキメラが含まれ、一般式

【化1】



(式中、

$x \geq 1$ 、 $y \geq 1$ 、および $z \geq 0$ であり、ならびに

Rは、水素、チオリン酸、およびこのようなオリゴヌクレオチドの細胞取込みを増強するリンカー部分からなる群より選択される)を有するオリゴヌクレオチド「キメラ」。

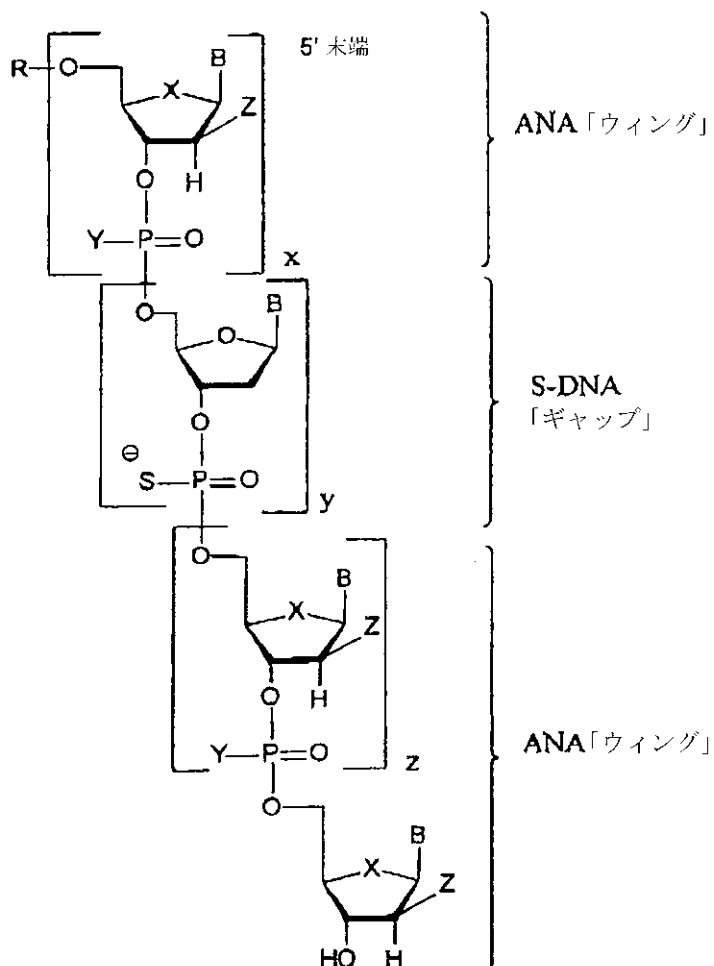
【請求項2】

配列特異的方法において遺伝子発現を選択的に妨害する、オリゴヌクレオチド「キメラ」であり、(a)ヌクレアーゼ安定性、(b)相補的RNA配列へのハイブリダイゼーションの結合強度、(c)該オリゴヌクレオチドの細胞への透過性、(d)RNase Hによる標的RNAの切断、または(e)リボソーム転位の物理的阻止(「翻訳抑制」)のう

ち、少なくとも1種を誘導するために、1本鎖RNAにハイブリダイズする修飾されたアラビノースと2'-デオキシ糖とのキメラが含まれ、

一般式

【化2】



(式中、

$x \geq 1$ 、 $y \geq 1$ 、および $z \geq 0$ であり；

Rは、水素、チオリン酸、およびこのようなオリゴヌクレオチドの細胞取込みを増強するリンカー部分からなる群より選択され；

Bは、アデニン、グアニン、ウラシル、チミン、シトシン、イノシン、および5-メチルシトシンからなる群より選択され；

Yは、ヌクレオチド間リン酸結合において、イオウ、酸素、メチル、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ（このアルキル基は1～約20個の炭素原子を有する）、メトキシ、およびエトキシからなる群より選択され；

Xは、フラノース環（4'位）において、酸素、イオウ、およびメチレン（ CH_2 ）からなる群より選択され；ならびに

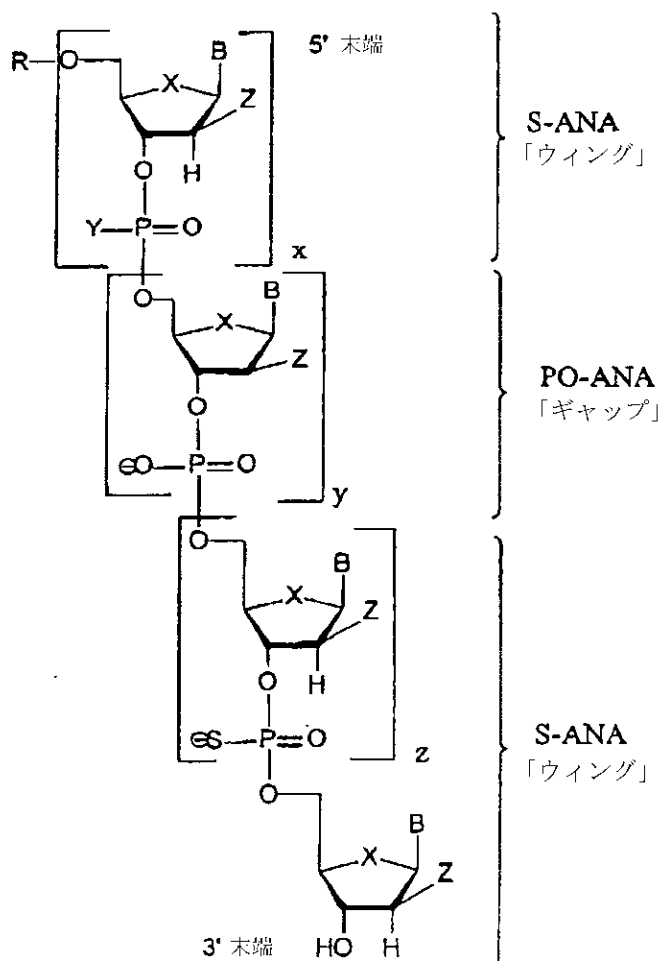
Zは、この糖環の2'位において、ハロゲン（フッ素、塩素、臭素、ヨウ素）、アルキル、ハロゲン化アルキル（例えば、 $-\text{CH}_2\text{F}$ ）、アリル、アミノ、アリール、アルコキシおよびアジドからなる群より選択される）を有するオリゴヌクレオチド「キメラ」。

【請求項3】

配列特異的方法において遺伝子発現を選択的に妨害する、オリゴヌクレオチド「キメラ」であり、(a)ヌクレアーゼ安定性、(b)相補的RNA配列へのハイブリダイゼーションの結合強度、(c)該オリゴヌクレオチドの細胞への透過性、(d)RNase Hによる標的RNAの切断、または(e)リボソーム転位の物理的阻止（「翻訳抑制」）のうち、少なくとも1種を誘導するために、1本鎖RNAにハイブリダイズする修飾されたア

ラビノースと 2'-デオキシ糖とのキメラが含まれ、
一般式

【化 3】



(式中、

$x \geq 1$ 、 $y \geq 1$ 、および $z \geq 0$ であり；

Rは、水素、チオリン酸、およびこのようなオリゴヌクレオチドの細胞取込みを増強するリンカー部分からなる群より選択され；

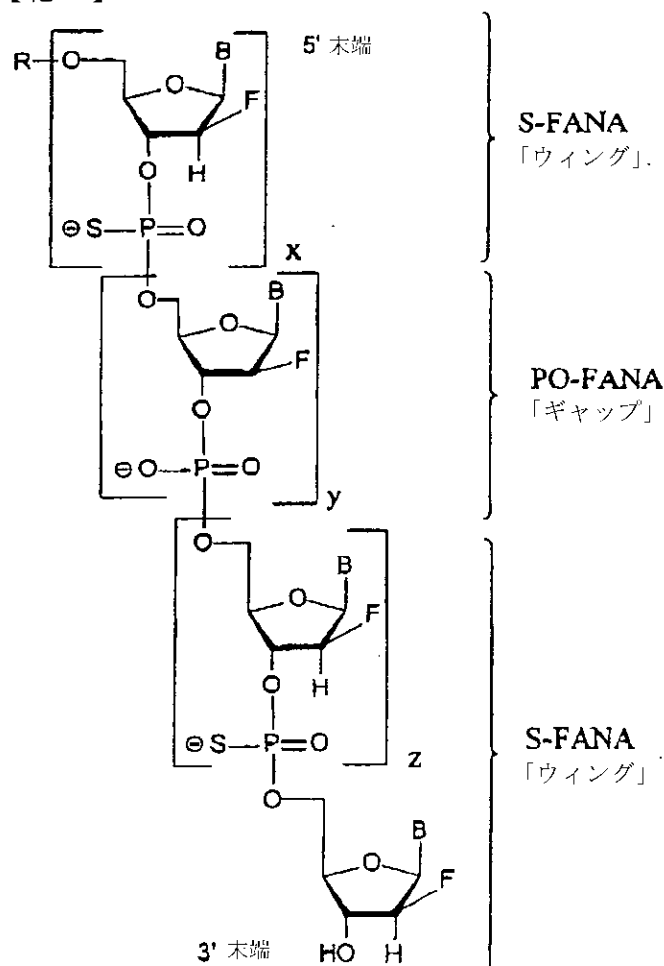
Bは、アデニン、グアニン、ウラシル、チミン、シトシン、イノシン、および5-メチルシトシンからなる群より選択される)を有するオリゴヌクレオチド「キメラ」。

【請求項 4】

配列特異的方法において遺伝子発現を選択的に妨害する、オリゴヌクレオチド「キメラ」であり、(a)ヌクレアーゼ安定性、(b)相補的RNA配列へのハイブリダイゼーションの結合強度、(c)該オリゴヌクレオチドの細胞への透過性、(d)RNAse Hによる標的RNAの切断、または(e)リボソーム転位の物理的阻止(「翻訳抑制」)のうち、少なくとも1種を誘導するために、1本鎖RNAにハイブリダイズする修飾されたアラビノースと2'-デオキシ糖とのキメラが含まれ、

一般式

【化 4】



(式中、

$x \geq 1$ 、 $y \geq 1$ 、および $z \geq 0$ であり；

Rは、水素、チオリン酸、およびこのようなオリゴヌクレオチドの細胞取込みを増強するリンカー部分からなる群より選択され；

Bは、アデニン、グアニン、ウラシル、チミン、シトシン、イノシン、および5-メチルシトシンからなる群より選択され；

Yは、ヌクレオチド間リン酸結合において、イオウ、酸素、メチル、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ（このアルキル基は1～約20個の炭素原子を有する）、メトキシ、およびエトキシからなる群より選択され；

Xは、フラノース環（4'位）において、酸素、イオウ、およびメチレン（ CH_2 ）からなる群より選択され；ならびに

Zは、この糖環の2'位において、ハロゲン（フッ素、塩素、臭素、ヨウ素）、ヒドロキシル、アルキル、ハロゲン化アルキル（例えば、 CH_2F ）、アリル、アミノ、アリール、アルコキシおよびアジドからなる群より選択される）オリゴヌクレオチド「キメラ」。

【請求項 5】

下記の工程を含む、1本鎖RNAの切断法：

(a) 配列特異的方法において請求項1～4記載のオリゴヌクレオチドを1本鎖RNAへハイブリダイズし、RNase H活性を誘導する工程；および

(b) 該誘導したRNase Hに、該ハイブリダイズした1本鎖RNAを切断させる工程。

【請求項 6】

配列特異的方法において請求項1～4記載のキメラオリゴヌクレオチドを1本鎖RNAへハイブリダイズし、これにより該1本鎖RNAにコードされる特異的タンパク質の産生を

妨害する工程を含む、該1本鎖RNAの翻訳を妨害する方法。

【請求項7】

RNAが相補的RNAである、請求項5または6記載の方法。

【請求項8】

相補的RNAが、細胞mRNAまたはウイルスRNAである、請求項7記載の方法。

【請求項9】

1本鎖RNAを切断するための医薬品を調製するための請求項1～4記載のオリゴヌクレオチドの使用であり、ここで該オリゴヌクレオチドは、配列特異的方法において1本鎖RNAにハイブリダイズし、該ハイブリダイズした1本鎖RNAを切断するためのRNAse H活性を誘導する、オリゴヌクレオチドの使用。

【請求項10】

相補的RNAが、細胞mRNAまたはウイルスRNAである、請求項9記載の使用。

【請求項11】

1本鎖RNAを切断するためのプローブまたは実験試薬を調製するための請求項1～4記載のオリゴヌクレオチドの使用であり、ここで該オリゴヌクレオチドは、配列特異的方法において1本鎖RNAにハイブリダイズし、該ハイブリダイズした1本鎖RNAを切断するためのRNAse H活性を誘導する、オリゴヌクレオチドの使用。

【請求項12】

相補的RNAが、細胞mRNAまたはウイルスRNAである、請求項11記載の使用。

【請求項13】

配列特異的方法において遺伝子発現を選択的に妨害する薬学的組成物であり、薬学的に許容される担体と共に、請求項1～4記載のオリゴヌクレオチド「キメラ」を有効量含有する、組成物。

【請求項14】

一連の可変長デオキシリボースヌクレオチド残基が隣接している、アラビノヌクレオチド残基または修飾されたアラビノヌクレオチド残基を含むオリゴヌクレオチドであり、一連のデオキシリボースヌクレオチド残基が、10デオキシリボースヌクレオチド残基以下のギャップを含む、請求項1～4のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項15】

一連の可変長デオキシリボースヌクレオチド残基が隣接している、アラビノヌクレオチド残基または修飾されたアラビノヌクレオチド残基を含むオリゴヌクレオチドであり、一連のデオキシリボースヌクレオチド残基が、10デオキシリボースヌクレオチド残基のギャップを含む、請求項1～4のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項16】

一連の可変長デオキシリボースヌクレオチド残基が隣接している、アラビノヌクレオチド残基または修飾されたアラビノヌクレオチド残基を含むオリゴヌクレオチドであり、一連のデオキシリボースヌクレオチド残基が、8デオキシリボースヌクレオチド残基のギャップを含む、請求項1～4のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項17】

一連の可変長デオキシリボースヌクレオチド残基が隣接している、アラビノヌクレオチド残基または修飾されたアラビノヌクレオチド残基を含むオリゴヌクレオチドであり、一連のデオキシリボースヌクレオチド残基が、6デオキシリボースヌクレオチド残基のギャップを含む、請求項1～4のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項18】

一連の可変長デオキシリボースヌクレオチド残基が隣接している、アラビノヌクレオチド残基または修飾されたアラビノヌクレオチド残基を含むオリゴヌクレオチドであり、一連のデオキシリボースヌクレオチド残基が、4デオキシリボースヌクレオチド残基のギャップを含む、請求項1～4のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項19】

一連の可変長デオキシリボースヌクレオチド残基が隣接している、アラビノヌクレオチド

残基または修飾されたアラビノヌクレオチド残基を含むオリゴヌクレオチドであり、一連のデオキシリボースヌクレオチド残基が、2 x 1 デオキシリボースヌクレオチド残基のギャップを含む、請求項 1～4 のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/CA 01/01252
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/11 C07H21/00 A61K31/712		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07H A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim no.
X	WO 99 67378 A (MCGILL UNIVERSITY) 29 December 1999 (1999-12-29) * See pages 21 (definitions of X and Y), 22 (ANA-DNA ANA etc) and 45 (Example 7/ PS-DT18) *	1,2,7-15
A	WILDS ET AL: "Duplex recognition by oligonucleotides containing 2'-deoxy-2'-fluoro-D-arabinose and 2'-deoxy-2'-fluoro-D-ribose. Intermolecular 2'-OH-phosphate contacts versus sugar puckering in the stabilization of triple-helical complexes" BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 10, no. 2, March 1999 (1999-03), pages 299-305, XP002119328 ISSN: 1043-1802 * See page 300 (Figure 1) *	1-15
-/-		
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document relating to the general state of the art which is not considered in the prior art search. *E* earlier document but published on or after the international filing date. *L* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (to specify). *O* document relating to an oral disclosure, test, exhibition or other means. *P* document published prior to the international filing date but which has not yet been made available. *T* later document published after the international filing date or priority date and not included in the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention. *X* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone. *Y* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents. *Z* document number of the same patent family.		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
21 August 2002	03/09/2002	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5011, D-50453 Essen 1 Tel. (+49-201) 640-2000, Fax (+49-201) 640-2010	Authorized Officer Korsner, S-E	

Form PCT/ISA/210, second sheet (July 1998)

C. (Continued) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *		Relevant to claim No.
Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages		
A	DAMHA ET AL: "Hybrids of RNA and arabinonucleic acids (ANA and 2'-F-ANA) are substrates of ribonuclease H" JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 120, no. 49, 16 December 1998 (1998-12-16), pages 12976-12977, XP002119329 ISSN: 0002-7863 * See page 12977 (Table 1) *	1-15
A	GIANNARIS ET AL: "Hybridization properties of oligoarabinonucleotides" CANADIAN JOURNAL OF CHEMISTRY, vol. 72, no. 3, 1994, pages 909-918, XP002119322 ISSN: 0008-4042 cited in the application * See pages 913 (Table 1/phosphorothioates) and 915 (Conclusions) *	1-15
A	MANOHARAN: "2'-Carbohydrate modifications in antisense oligonucleotide therapy: importance of conformation, configuration and conjugation" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1489, no. 1, 10 December 1999 (1999-12-10), pages 117-130, XP004275527 ISSN: 0167-4781 * See pages 125-6 (Section 10) *	1-15
P, A	WILDS ET AL: "2'-deoxy-2'-fluoro-beta-arabinonucleosides and oligonucleotides (2'-F-ANA): synthesis and physicochemical studies" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 28, no. 18, 15 September 2000 (2000-09-15), pages 3625-3635, XP002210405 * See page 3630 (Table 1) *	1-15

Form PCT/ISA/210 (continuation of record sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.
PCT/CA 01/01252

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members)	Publication date
WO 9967378 A	29-12-1999	AU 4595399 A	10-01-2000
		WO 9967378 A1	29-12-1999
		EP 1088066 A1	04-04-2001

Form PCT/2002/12 (patent family members table, 1998)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 ロック チュンナム

カナダ国 オンタリオ州 オタワ シャレール ドライブ 1866

(72)発明者 ビアゾフキーナ エカテリーナ

カナダ国 ケベック州 モントリオール アパートメント 3 カレ セイントールイス 323

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA20 CA04 CA05 CA06 CA07 CA09 CA10 CA11 CA12

HA08 HA12 HA14 HA17

4C084 AA13 NA14 ZB332 ZC412

4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB33 ZC41

【要約の続き】

ヌクレオチドの使用に関する。