

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4079875号
(P4079875)

(45) 発行日 平成20年4月23日(2008.4.23)

(24) 登録日 平成20年2月15日(2008.2.15)

(51) Int. Cl. F I
C 1 2 Q 1/68 (2006.01) C 1 2 Q 1/68 A
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 Z N A A

請求項の数 13 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2003-433247 (P2003-433247)	(73) 特許権者	303040161
(22) 出願日	平成15年12月26日(2003.12.26)		ノースウェスタン ユニヴァーシティ
(62) 分割の表示	特願平6-523287の分割		アメリカ合衆国 イリノイ州 60208
原出願日	平成6年4月6日(1994.4.6)		-1111, エヴァンストン, オーク
(65) 公開番号	特開2004-129672 (P2004-129672A)		ストリート 1880
(43) 公開日	平成16年4月30日(2004.4.30)	(74) 代理人	100078282
審査請求日	平成15年12月26日(2003.12.26)		弁理士 山本 秀策
(31) 優先権主張番号	08/046,032	(74) 代理人	100062409
(32) 優先日	平成5年4月12日(1993.4.12)		弁理士 安村 高明
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100113413
前置審査			弁理士 森下 夏樹
		(72) 発明者	ロバート エル レットシンガー
			アメリカ合衆国 イリノイ州 60091
			ウィルメット サード ストリート 3
			16

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 オリゴヌクレオチドの形成方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

診断のためのオリゴヌクレオチドプローブを調製するための方法であって、該方法は、以下の工程：

標的オリゴヌクレオチドまたは標的ポリヌクレオチドの隣接位置に少なくとも第1のオリゴヌクレオチドおよび第2のオリゴヌクレオチドを可逆的に結合する工程であって、これによって、添加試薬の非存在下で、該第1のオリゴヌクレオチド上の第1の反応基および第2のオリゴヌクレオチド上の第2の反応基が、互いに近接するように与えられ、その結果、チオホスホリルアセチルアミノ共有結合が、該第1のオリゴヌクレオチドの3'末端または5'末端のプロモアセチルアミノと該第2のオリゴヌクレオチドの5'末端または3'末端のホスホロチオエートと間に自発的に形成され；

ここで、該第1のオリゴヌクレオチドが複数のヌクレオチド塩基単位を含み、そして、該3'末端または5'末端のプロモアセチルアミノを含む第1の反応基を有し、該第1のオリゴヌクレオチドの該ヌクレオチド塩基単位が、該標的オリゴヌクレオチドまたは該標的ポリヌクレオチドの塩基単位の第1の配列に実質的に相補的であり；そして

ここで、該第2のオリゴヌクレオチドが複数のヌクレオチド塩基単位を含み、そして、該5'末端または3'末端のホスホロチオエートを含む第2の反応基を有し、該第2のオリゴヌクレオチドの該ヌクレオチド塩基単位が、該標的オリゴヌクレオチドまたは該標的ポリヌクレオチドの塩基単位の第2の配列に実質的に相補的であり、ここで、該第1の塩基配列および該第2の塩基配列は該標的ヌクレオチドまたは該標的ポリヌクレオチドの隣

接した位置にある、工程
を包含する、
方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法であって、前記第 1 のオリゴヌクレオチドおよび第 2 のオリゴヌクレオチドの各々は、本質的に、8 ~ 20 のヌクレオチド塩基からなる、方法。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の方法であって、ここで、前記プロモアセチルアミノが前記第 1 のオリゴヌクレオチドの 3' 末端に提供され、かつ、前記ホスホロチオエートが前記第 2 のオリゴヌクレオチドの 5' 末端に提供される、方法。

10

【請求項 4】

請求項 3 に記載の方法であって、前記第 1 のオリゴヌクレオチドが $ACACCCAAAT - NHC(=O)CH_2Br$ であり、そして、前記第 2 のオリゴヌクレオチドが $SPO_3 - CTGAAAATGG$ である、方法。

【請求項 5】

オリゴヌクレオチドプローブとしての用途のための、少なくとも第 1 のオリゴヌクレオチドおよび第 2 のオリゴヌクレオチドを含む生成物であって、該生成物は、以下：

該第 1 のオリゴヌクレオチドが、複数のヌクレオチド塩基単位を含み、そして、3' 末端または 5' 末端のプロモアセチルアミノを含む第 1 の反応基を有し、該第 1 のオリゴヌクレオチドの該ヌクレオチド塩基単位が、標的オリゴヌクレオチドまたは標的ポリヌクレオチドの塩基単位の第 1 の配列に実質的に相補的であり；

20

該第 2 のオリゴヌクレオチドが複数のヌクレオチド塩基単位を含み、そして、5' 末端または 3' 末端のホスホロチオエートを含む第 2 の反応基を有し、該第 2 のオリゴヌクレオチドの該ヌクレオチド塩基単位が、該標的オリゴヌクレオチドまたは該標的ポリヌクレオチドの塩基単位の第 2 の配列に実質的に相補的であり、ここで、該第 1 の塩基配列および該第 2 の塩基配列は該標的オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの隣接した位置にあり；

その結果、該第 1 のオリゴヌクレオチドおよび該第 2 のオリゴヌクレオチドは、該標的オリゴヌクレオチドまたは該標的ポリヌクレオチドの隣接した位置に可逆的結合し得、それによって、該第 1 の反応基および該第 2 の反応基が互いに近接して与えられ、その結果、チオホスホリルアセチルアミノ共有結合が、添加試薬の非存在下で、該第 1 のオリゴヌクレオチドの 3' 末端または 5' 末端プロモアセチルアミノと該第 2 のオリゴヌクレオチドの該 5' 末端または 3' 末端のホスホロチオエートと間に自発的に形成され得ること；
によって、特徴付けられる、生成物。

30

【請求項 6】

請求項 5 に記載の生成物であって、ここで、前記第 1 のオリゴヌクレオチドおよび前記第 2 のオリゴヌクレオチドの各々が、本質的に、8 ~ 20 ヌクレオチド塩基からなる、生成物。

【請求項 7】

請求項 5 または 6 に記載の生成物であって、前記プロモアセチルアミノが、前記第 1 のオリゴヌクレオチドの 3' 末端に提供され、かつ、前記ホスホロチオエートが前記第 2 のオリゴヌクレオチドの 5' 末端に提供される、生成物。

40

【請求項 8】

前記請求項 7 に記載の生成物であって、ここで、該第 1 のオリゴヌクレオチドが $ACACCCAAAT - NHC(=O)CH_2Br$ であり、そして、前記第 2 のオリゴヌクレオチドが $SPO_3 - CTGAAAATGG$ である、生成物。

【請求項 9】

インビトロで、診断用オリゴヌクレオチドプローブを形成する方法であって、該方法は、以下：

(a) 標的オリゴヌクレオチドまたは標的ポリヌクレオチドの隣接位置に少なくとも第

50

1 のオリゴヌクレオチドおよび第 2 のオリゴヌクレオチドを可逆的に結合する工程であって、ここで、

該第 1 のオリゴヌクレオチドが複数のヌクレオチド塩基単位を含み、そして、該 3' 末端または 5' 末端のプロモアセチルアミノを含む第 1 の反応基を有し、該第 1 のオリゴヌクレオチドの該ヌクレオチド塩基単位が、該標的オリゴヌクレオチドまたは該標的ポリヌクレオチドの塩基単位の第 1 の配列に実質的に相補的であり；そして

該第 2 のオリゴヌクレオチドが複数のヌクレオチド塩基単位を含み、そして、該 5' 末端または 3' 末端のホスホロチオエートを含む第 2 の反応基を有し、該第 2 のオリゴヌクレオチドの該ヌクレオチド塩基単位が、該標的オリゴヌクレオチドまたは該標的ポリヌクレオチドの塩基単位の第 2 の配列に実質的に相補的であり、ここで、該第 1 の塩基配列および該第 2 の塩基配列は該標的ヌクレオチドまたは該標的ポリヌクレオチドの隣接した位置にある、工程；

(b) 添加試薬の非存在下で、該標的オリゴヌクレオチドまたは該標的ポリヌクレオチドに対する、該第 1 のオリゴヌクレオチドおよび第 2 のオリゴヌクレオチドの結合の際に互いに隣接して与えられた、該第 1 の反応基および該第 2 の反応基を介して該第 1 のオリゴヌクレオチドおよび該第 2 のオリゴヌクレオチドを一緒にして共有結合させて、チオホスホリルアセチルアミノ結合を自発的に形成する工程を包含する、方法。

【請求項 10】

工程 (a) および工程 (b) が水溶液中で生じる、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記第 1 のオリゴヌクレオチドおよび第 2 のオリゴヌクレオチドの各々が、本質的に、8 ~ 20 ヌクレオチド塩基からなる、請求項 9 または 10 に記載の方法。

【請求項 12】

請求項 9 ~ 11 のいずれかに記載の方法であって、前記プロモアセチルアミノが、前記第 1 のオリゴヌクレオチドの 3' 末端に提供され、そして、前記ホスホロチオエートが前記第 2 のオリゴヌクレオチドの 5' 末端に提供される、方法。

【請求項 13】

請求項 12 に記載の方法であって、ここで、前記第 1 のオリゴヌクレオチドが $ACACC$ $CAATT - NHC(=O)CH_2Br$ であって、そして、前記第 2 のオリゴヌクレオチドが $SPO_3 - CTGAAAATGG$ である、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(オリゴヌクレオチドの形成方法発明の分野)

本発明はオリゴヌクレオチドの形成方法に関し、特にウイルス性疾患、ガン、及び遺伝子障害などを処置するのに可能性がある新規な治療方法、並びにオリゴヌクレオチドの診断応用としての使用を有する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

アンチセンス・オリゴヌクレオチドは、ウイルス性疾患、ガン、及び遺伝子障害のような疾患及び障害、並びに他の疾患及び障害を処置する新規なタイプの治療薬としての可能性が示されている¹。広範囲に研究が行われており、工業及び大学の研究室でこの可能性を探求する研究が続けられている²。

【0003】

アンチセンス・オリゴヌクレオチドを治療薬として利用するアプローチにおいて生じる問題は、生体での (in vivo) その治療薬の選択性に関するものである。細胞内に導入することができる細胞内ポリヌクレオチド・ターゲットが低濃度であること、及び細

10

20

30

40

50

胞内に導入することができる治療オリゴヌクレオチドが低濃度であることを考慮して、高い結合親和力を有するオリゴヌクレオチドが必要であることが理解される。結合親和力は、オリゴヌクレオチドの長さに関連があり、20量体及びそれ以上であるのが好ましい。しかし、短鎖のオリゴヌクレオチドの場合と比較して、長鎖のオリゴヌクレオチドの場合、塩基対の不整合 (mismatch) によって不安定にならない。ゆえに、所望である不安定にする効果が長鎖のオリゴヌクレオチドを用いることによって減少するが、選択性は増加する。

【0004】

専門家は「高配列特異性 ("high sequence specificity")」及び「高親和性」とは矛盾する要求であると注記している³。アンチセンス・オリゴヌクレオチドは完全に一致していないターゲット部位でRNAの開裂を生じさせることができるという程度をベースとして、多くの非ターゲットRNAの部分的な崩壊を少なくとも生じさせないで、試験された系内で、意図したターゲットRNAの特定の開裂を得ることは多分不可能であったと、さらに結論づけている⁴。ゆえに、この分野の専門家は、行った研究に基づき、特異性及び親和性という対立する要求は、克服するための大きなハードルであると結論づけている。

【0005】

オリゴヌクレオチドのブロックを水性溶媒内で共有結合する、いくつかの方法が報告されている^{5 a - l}。これらの方法はすべて、安定な連結生成物 (ligated product) を得るために、さらに化学薬品を必要とする。このアプローチによって、加えられた薬品は、水溶性カルボジイミド又はシアノイミダゾール^{5 a - k}のような「活性化剤」であってもよく、ナトリウム・シアノボロヒドリド^{5 l}のような還元剤であってもよい。そのような化合物は、毒性があり、水と反応し、かつ所望のカップリング反応を引き起こすのに十分な量で生体系内に導入することができないので、いずれの場合も、第3の薬品の必要性により、生体内での化学連結 (chemical ligation) を妨げる。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、低濃度で存在するオリゴヌクレオチドのブロックを、さらに縮合剤又は安定化剤を必要としないで、水性媒体中で共有結合させる新規な方法を提供する。ゆえに、本発明は、生体系内で現場で (in situ) 化学連結させる門戸を開く。相補的オリゴヌクレオチド配列の存在下で、反応は非常に促進するので、各々のオリゴヌクレオチド・ストランドに相補的で、共役な (consecutive) ヌクレオチド配列を含むターゲット・ポリヌクレオチド (例えば、ウイルス又はガン細胞からのm-RNA又はDNA) が存在する場合、原則として長いオリゴヌクレオチド・ストランドを生体内で (in vivo) 選択的に形成することができる。ターゲット・ヌクレオチドが存在するとき、高い親和力で結合する、長いオリゴヌクレオチド・ストランドを、ゆえに現場で (in situ) 低い親和力で結合する短いストランドから発生させることができる。ゆえに、本発明は、治療上の応用及び診断の応用において、高い親和力と高い特異性を達成するという矛盾する問題を解決することができる。

【課題を解決するための手段】

【0007】

項目1 . a) オリゴマーの塩基単位に相補的な塩基単位を含むオリゴ - 又はポリヌクレオチド上の適切な位置に、少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを可逆的に結合する工程であって、オリゴヌクレオチドのうち1つは、第1の反応基を有するヌクレオチドを含み、かつ第2の反応基を含む他のオリゴマーのヌクレオチドと近接し、第2の反応基が第1の反応基と共有結合を自発的に形成する工程と、 b) ポリヌクレオチド上のオリゴヌクレオチドの結合においてお互いに近接する第1及び第2の反応基を介してオリゴヌクレオチドを不可逆的に共有結合する工程とによるオリゴヌクレオチドの形成方法。

項目 2 . 前記第 1 の反応基が - ハロアシルであり、前記第 2 の反応基がホスホチオエートであり、前記工程 (b) が前記反応基を通して自発的にチオホスホリルアセチルアミノ結合を形成するものとしてさらに定義される項目 1 記載のオリゴヌクレオチド形成方法。
項目 3 . オリゴマーの各々が 8 ~ 20 ヌクレオチドからなる項目 1 記載のオリゴヌクレオチド形成方法。

項目 4 . 前記工程 (a) 及び (b) が水溶液中で生じる項目 1 記載のオリゴヌクレオチド形成方法。

項目 5 . a) オリゴヌクレオチドのうち 1 つが - ハロアシル基を含み、他のヌクレオチドがホスホチオエート基を含む、少なくとも 2 つのオリゴヌクレオチドを水溶液に配置する工程と、 b) - ハロアシル基及びホスホチオエート基を通して、それらの間にチオホスホリルアセチルアミノ基を自発的に形成して、共にオリゴヌクレオチドを共有結合する工程とによるオリゴヌクレオチドの形成方法。

項目 6 . オリゴヌクレオチドを含む水溶液を凍結させることにより反応を促進し、高い完結度で反応を行う工程 (c) をさらに含む項目 5 記載のオリゴヌクレオチド形成方法。

【 0 0 0 8 】

(発明の概要)

本発明により、オリゴマーの対の配列に相補的なヌクレオチド塩基配列を含むターゲット・ポリヌクレオチド上の適切な位置に水素結合することによりそれら自身可逆的に結合した、少なくとも 2 つのオリゴマーを非可逆的に共有結合することによるオリゴヌクレオチド形成方法であって、オリゴヌクレオチドのうち 1 つが他のオリゴマーのヌクレオチドに隣接した第 1 の反応基を有するヌクレオチドを含み、他のオリゴマーが自発的に第 1 の反応基と共有結合を形成することができる第 2 の反応基を含む、オリゴヌクレオチド形成方法が提供される。オリゴヌクレオチドは、第 1 及び第 2 の反応基を通じて一緒に結合し、ポリヌクレオチド上のオリゴヌクレオチドの結合によりお互いに近接することができる。

【 0 0 0 9 】

さらに本発明は、オリゴヌクレオチドのうち 1 つが - ハロアシル基を含み、他のヌクレオチドがホスホチオエート (phosphotioate) 基を有する、少なくとも 2 つのオリゴヌクレオチドを水溶液中に配置する (dispose) ことによる、オリゴヌクレオチド形成方法を提供する。オリゴヌクレオチドは - ハロアシル基及びホスホチオエート基を通じてともに共有結合され、それらの間にチオホスホリルアセチルアミノ基を自発的に形成する。

【 発明の効果 】

【 0 0 1 0 】

本発明によって、低濃度で存在するオリゴヌクレオチドのブロックを、さらに縮合剤又は安定化剤を必要としないで、水性媒体中で共有結合させる新規な方法が提供され、治療上の応用及び診断の応用において、高い親和力と高い特異性を達成するという矛盾する問題が解決された。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 1 1 】

(発明の詳細な説明)

本発明は、一般に少なくとも 2 つのオリゴヌクレオチドを水溶液中に配置する工程であって、オリゴヌクレオチドのうち 1 つが - ハロアシル基を含み、他のヌクレオチドがホスホチオエート基を含み、その後、 - ハロアシル基及びホスホチオエート基を通じてオリゴヌクレオチドが共有結合し、それらの間にチオホスホリルアセチルアミノ基を自発的に形成する工程による、オリゴヌクレオチド形成方法を提供する。

本明細書で記述するカップリング反応は、非常に希釈な水溶液では非常に遅いが、鋳型ポリヌクレオチドの存在下では速いという事実を本方法は活用する。即ち、プローブ・オリゴマーに相補的な配列部分を有するターゲット・ポリヌクレオチドの存在下で、反応は促進される。本発明は、治療薬として、ターゲット・ポリヌクレオチド上の適切な位置に結

10

20

30

40

50

合した後、自発的にともに共有結合することができる、2つの短いオリゴマー（例えば、8～20量体）を使用する。この系で、16～40量体のような長いオリゴマー・プローブの結合親和力及び認識特性に近づくが、短いプローブ（8～20量体）の依存性及び塩基対特質を保持する。換言すれば、本発明は、長いポリヌクレオチドの効果を保持しながら短いポリヌクレオチドの選択性を提供する。

【0012】

反応基が空間的にお互いに近接しているとき、自発的に反応して反応基の間に共有結合を形成する反応基を含むポリヌクレオチドの必要性及び使用は、本発明に固有のものである。特に、本発明は、少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを利用し、オリゴヌクレオチドの第1のセットは第1の反応基を含み、オリゴヌクレオチドの第2のセットはお互いに近接するように第2の反応基を含み、これらの反応基は、自発的に反応して、安定な共有結合を形成する。そのような反応基のペアとして、エステル+ヒドラジン、 $RC(O)S^- +$ ハロアルキル及び $RCH_2S^- +$ -ハロアシルが挙げられる。好ましくは、本発明は、プロモアセチルアミノ基のような -ハロアシル基及びチオホスホリル基を利用し、それらは希釈水性媒体中で、チオホスホリルアセチルアミノ架橋を効率的、選択的、非可逆的に形成する。以下に示すように、生成物は水中で安定で、相補的なポリヌクレオチドとよくハイブリッドする。

【0013】

オリゴマーが1 μ M未満のような低濃度で、かつ相補的の鑄型が存在しないとき、反応は非常に遅いが、その溶液を凍結することによって、2～3日以内で高転化率で行うことができる。凍結の技術は、以下に詳細に記述する。鑄型として働く相補的なオリゴヌクレオチドの存在下の溶液内でカップリングが行われると、カップリングは極めて速い（20分間に90%の転化率より大きい）。以下の実施例のセクションでこれについて示す。

【0014】

本発明の診断応用において、及び一般にオリゴヌクレオチドの使用において、選択性も大きな関心事である。本発明の新規な化学的性質により治療への応用に魅力的である本発明の特徴の同じ部分が、診断での使用にも魅力である。例えば、本発明は次の診断システムに利用することができる。

【0015】

図1を参照すると、Aは例えば鎖中にマーカ（*）及び3'-末端にプロモアセチルアミノ基を有する10量体からなるオリゴマーである。Bは、5'-末端にチオホスホリル基を有する他の短いオリゴマーである。Cは、A+Bに相補的な配列を有するターゲット・オリゴヌクレオチド配列である。希釈溶液で、鑄型の存在下のカップリングと比較して、鑄型の不存在下、AとBとのカップリングは十分に遅く、単に鑄型上のカップリングのみが重要となる。ゆえに、この化学連結系は、酵素連結系（リガーゼ連鎖反応（Ligase Chain Reaction）即ち、LCR）に類似した増幅及び検知に用いることができる。ある非特異的なカップリングは、酵素機構中に誤りの源を導くので、優れている可能性がある。オリゴヌクレオチドが非常に低い濃度で（即ち、診断応用に興味がある範囲で）、鑄型の不存在下での化学連結の速度が極度に遅くなるという事実は、鑄型不存在に従った（non-templatedirected）カップリングが本ケースでは重要ではないことを示す。

【実施例】

【0016】

図2に示されるように、オリゴマー1及び2との式1で示される連結は、ホスホロチオエートと -ハロアシル誘導体との容易な反応を活用する。特に、図2の化合物1（配列番号1）は、3'-末端に3'-（プロモアセチルアミノ）-3'-デオキシチミジン単位を有する。化合物1の調製で、0.4M水性N-スクシンイミジルプロモアセテート（N-succinimidyl bromoacetate）15 μ L（カルバイオケム（Calbiochem）より得た）を、3'-アミノデオキリボ-オリゴヌクレオチド前駆体の4.9A₂₆₀単位、ACACCCCAATT-NH₂に加えた。調製方法は、

10

20

30

40

50

グリアズノフ (Gryaznov) ら (1992年) に記載されている⁶。室温、0.2 Mホウ酸ナトリウム緩衝液10 μ L中で反応を行った。35分後、混合物を水0.5 mLで希釈し、NAP-5カラム (ファルマシア (Pharmacia) 製) 上のゲル濾過により脱塩化し、RP HPLC高速液体クロマトグラフィーによって精製し、再度脱塩化して、化合物1の4 A₂₆₀単位を得た。溶出時間は、次の通りである。RP HPLC, 17.4分; IE HPLC, 17.4分。

上記で行われたIE HPLC、及び以下で行われる同様な手順は、ダイオネクス・オムニ・パックNA100 (Dionex Omni Pak NA100) 4 x 250 mmカラム上、pH12 (水酸化ナトリウム10 mM) で、10 M水酸化ナトリウムに1分間に2%の割合で1.0 M塩化ナトリウムを濃度勾配をつけて行った。RP HPLCの場合、ハイパージルODS (Hypersil ODS) カラム (4.6 x 200 mm) をpH7のトリエチルアンモニウムアセテート緩衝液0.03 Mに、アセトニトリルを毎分1%の割合で濃度勾配をつけて行った。

化合物2 (配列番号2) を、ミリゲン/バイオサーチ・サイクロン・DNAシンセサイザー (Milligen/Biosearch Cyclone DNA Synthesizer) で、5' -ジメトキシトリチル - N - イソブチリルデオキシグアノシンを担持したLCAA CPGを用いて、1 μ モルのスケールで合成した。標準シアノエチルホスホルアミダイト (cyanoethyl phosphoramidite) の化学的性質を用いた。鎖の伸びが完了したとき、末端5' -ヒドロキシル基を、アセトニトリル中「ホスフェートON (登録商標Phosphate ON)」試薬 (クルアケム (Cruachem) 製) 0.1 M溶液150 μ L及びアセトニトリル中0.5 Mテトラゾール150 μ Lで亜リン酸化した。得られた亜リン酸塩を、ピリジン/二硫化炭素 (1:1、v/v、室温で45分) のイオウ5%溶液で処理することによって、硫化した。DMT基 (ジクロロメタン中DCA3%、1.5分) の開裂後、担持されたポリマーを、化合物1のケースとして取り上げた。

DMS及び水中でのハロアセチルアミノ芳香族誘導体とチオホスホリル - オリゴヌクレオチドとの反応が、染料 - オリゴヌクレオチド共役体 (dye-oligonucleotide conjugate) を調製するのに用いられた⁷。

本発明の使用及び所望の速度論に依存して、オリゴヌクレオチドのカップリングは、上述したように、水溶液中、氷中の凍結状態、又は鑄型の存在下での水溶液中のいずれかで行われ、それについて以下に示す。

【0017】

最初の実験で、化合物1 (0.39 A₂₆₀単位、4 μ M) を含む溶液1.0 mL (pH7.05、リン酸塩15 mM、NaCl85 mM) を調製し、0 で5日間貯蔵した。溶液を50 まで2.5時間あたため、最後に凍結し、-18 でさらに5日間貯蔵した。

2時間後及び48時間後のサンプルのIE HPLCの分析により、ゆっくり溶出する生成物、オリゴマー3 (図2) が、各々約25%及び80%の収率で形成したことがわかった。0 又は50 にあたためてさらに3日経過後も著しい変化は観察されなかった。しかし、反応は凍結状態でさらに進行し、図3に示すように、5日以内に高い転化率で化合物3 (配列番号3) を得た。氷のマトリクス中での反応の増大の程度は、氷の穴の中にオリゴヌクレオチド反応体が高い局所濃度で存在することによるものである。他の反応も、氷のマトリクス中で同様に行われた⁸。

【0018】

この結果から、同じ緩衝液中の化合物1及び2の当モル量の混合物 (各々2 μ M) を直接凍結し、-18 に保った。5時間後及びその後の日毎の、サンプルから得られたHPLCプロファイルから、5日中3日で高い収率が得られる進行が見られ、図4に代表的なデータを示す。

【0019】

相補的オリゴヌクレオチド鑄型 (CCATTTTCAGAA TTGGGTGT、化合物

10

20

30

40

50

4 (配列番号4)) の存在下、溶液中での化合物1及び2をカップリングするデータを図5を示す。この系は、鑄型4が存在すること(4 μM)を除いて、最初の実験と同じであった。この場合、反応は20分以内に>90%完了するまで進行し、本質的に2時間以内で完了した。

【0020】

化合物3とした構造は、モデル化合物(T-NHC(O)CH₂-SP(O)(O-)O-T、化合物3に用いるものより大きな規模で溶液中で調製した)の特性、ゲル電気泳動上の化合物3の移動度(化合物1、2及び4のそれぞれR_m0.89、0.95及び0.61と比較して、R_m0.58)、及び相補的なオリゴヌクレオチド4と形成した複合体の安定性によって支持されている。保持時間、RP HPLC 10.5分; FAB+質量分析スペクトル、M+H⁺620、M+Na⁺642; ³¹P NMR、D₂O中の18.7 ppm、先行文献にはアルキルチオホスフェート基の特質が開示されている⁹。

10

【0021】

R_m値は、20%ポリアクリルアミド/5%ビスアクリルアミド・ゲル中のプロモフェノール・ブルーに関する。T_m値は0.1M NaCl中56で、対応するすべてのホスホジエステル20量体と化合物4(60)とから形成される複合体の値に近づき¹⁰、化合物1又は2と化合物4(37及び31)とから形成される複合体の値とは著しく異なる。さらに、ヌクレオチド内-NH(CO)CH₂SP(O)(O-)-結合は、KI₃⁹での酸化で選択的に開裂することがわかった(図5)。特に、水100 μL中の化合物3及び4(各々0.3 A₂₆₀単位)を含む二本鎖分子を0.2M KI₃ aq. 100 μLで15分間、50で処理した。その後、1M DTT aq. 10 μLを溶液に加えた。5分後、混合物をNAP-5カラム上で脱塩化し、IE HPLCで分析した。

20

【0022】

上記の実験から、本発明は、水溶液中で、オリゴマー濃度4 μM以上の範囲で、選択的かつ不可逆的にオリゴヌクレオチドをカップリングする簡易な手段をもたらず新規の化学的性質を提供するという証拠をもたらす。生成物は、中性溶液中で安定であり、室温pH12であっても数時間安定であることがわかった。1 μM以下の濃度では液相での速度は極めて遅くなる。しかし、凍結状態で反応を完了近くまでに行わせることができる。カップリングの速度は、相補的オリゴヌクレオチド鑄型の存在によって著しく促進される。これらの特性は、化学増幅系(chemical amplification system)の設計、及びアンチセンス応用における現場での(in situ)連結、並びに既知の化学的性質に基づき、オリゴヌクレオチド・ブロックから複合体構造を建てるのに可能性をもたらす。

30

本発明を例を挙げて説明したが、用いられる用語は、限定のためというよりむしろ説明のための言語として用いられるものと理解すべきである。

本発明の多くの改良及び変形が、上記の教示から可能であることが明らかである。

(参考文献)

【0023】

40

【数 1】

1. (a) Bischofberger, N. and Wagner, R.W. "Antisense Approaches to Antiviral Agents", Virology, 3, 57-66 (1992).
- (b) Uhlmann, E. and Peyman, A. "Antisense Oligonucleotides: A New Therapeutic Principle", Chemical Reviews, 90, 543-584 (1990).
2. Proceedings, International Conference on Nucleic Acid Medical Applications, Cancun, Mexico, Jan 26-30, 1993; P.O.P. Ts'o and P. S. Miller, Organizers, John Hopkins University, Baltimore, M.D. 10
3. Proceedings, International Conference on Nucleic Acid Medical Applications, Cancun, Mexico, January, 1993, pg. 60.
4. Woolf, T.M., Melton, D.A., and Jennings, D.G.B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 7305-7309 (1992).
5. (a) Naylor, R.; Gilham, P.T. Biochemistry 1966. 5, 2722-2728.
- (b) Sokolova, N.I.; Ashirbekova, D.T.; Dolinnaya, N.G.; Shabarova, Z.A. FEBS Letters 1988, 232, 153-155. 20
- (c) Shabarova, Z.A. Biochemic 1988, 70, 1323-1334.
- (d) Chu, B.C.F.; Orgel, L.E. Nucleic Acids Res. 1988, 16, 3671-3691.
- (e) Kool, E.T. J. Am. Chem. Soc. 1991, 113, 6265-6266.
- (f) Ashley, G.W.; Kushlan, D.M. Biochemistry 1991. 30, 2927-2933.
- (g) Luebek, K.J.; Dervan, P.B. J. Am. Chem. Soc. 1991, 113, 7447-7448. 30
- (h) Luebek, K.J.; Dervan, P.B. Nucleic Acids Res. 1992, 20, 3005-3009.
- (i) Prakask, G.; Kool, E.T. J. Am. Chem. Soc. 1992, 114, 3523-3527.
- (j) Purmal, A.A., Shabarova, Z.A.; Gumpert, R.I. Nucleic Acids Res. 1992, 20, 3713-3719.
- (k) Gryaznov, S.M.; Letsinger, R.L., in press, Nucleic Acids Res. 40
- (l) Goodwin, J.T.; Lynn, D.G. J. Am. Chem. Soc. 1992, 114, 9197-9198.
6. Gryaznov, S.M.; Letsinger, R.L., Nucleic Acids Res., 1992, 20,

3403-3409.

7. (a) Thuong, N.T.; Chassignol, M. Tetrahedron Lett. 1987, 28,
4157-4160.

(b) Francois, J.C.; Saison-Behmoaras, T.; Barbier, C.;

Chassignol, M.; Thoung, N.T.; Helene, C.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989, 86, 9702-9706.

8. (a) Beukers, R.; Ylstra, J.; Berends, W. Rec. Trav. Chim. 1958, 77,
729-732. 10

(b) Letsinger, R.L.; Ramsay, O.B.; McCain, J.H. J. Am. Chem. Soc.

1965, 87, 2945-2953.

9. Mag, M.; Luking, S.; Engels, J.W. Nucleic Acids Res., 1991, 19,
1437-1441.

10. Letsinger, R.L.; Zhang, G.; Sun, D.K.; Ikeuchi, T.; Sarin, P.S. 20

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989, 86, 6553-6556.

【 0 0 2 5 】

本発明の他の利点は、添付図面に関連して考慮すると、上記の詳細な説明を参照することによって、よく理解できるようになり、そのとき、本発明の他の利点は即座に評価されるであろう。

【 0 0 2 6 】

(配列表)

配列表(1) 一般的な情報(i) 出願人: レットシンガー・ロバート・エル(Letsinger, Robert L.)

グリアズノフ・セルゲイ・エム(Gryaznov, Sergei M.) 30

(ii) 発明の名称: オリゴヌクレオチドの形成方法(iii) 配列の数: 4(iv) 通信住所: (A) 住所: ライジング、エシントン、バーナード、ペリー・アンド・ミルトン(Reising, Ethingthon, Barnard, Perry & Milton)

(B) 街: P. O. Box 4390 (C) 市: トロイ(Troy)

(D) 州: ミシガン(Michigan)

(E) 国: USA (F) 郵便番号(ZIP): 48099 (v) コンピュータ読取りフォーマット: (A) 媒体のタイプ: フロッピー(登録商標)ディスク (B) コンピュータ: IBM PC コンパチブル (C) オペレーティング・システム: PC-DOS/MS-DOS (D) ソフトウェア: パテントイン・リリース#1.0, バージョン#1.25 (Patent In Release #1.0, Version #1.25) 40

(vi) 出願データ: (A) 出願番号: US 08/046,032 (B) 出願日: 1993年4月12日 (C) クラス: (viii) 代理人(ATTORNEY/AGENT)

情報: (A) 名前: コーン、ケネス・アイ(Kohn, Kenneth I.)

(B) 登録番号: 30,955 (C) 参照/事件番号(REFERENCE/DOCKET NUMBER): NU9310 (ix) テレコミュニケーション情報: (A) 電話: (313) 689-3554 (B) テレファックス: (313) 689-4071 (2)

配列番号1の情報(i) 配列の性質: (A) 配列の長さ: 11塩基対 (B) 配列の型: 核酸 (C) 鎖の数: 両形態 (D) トポロジー: 両形態(ii) 配列の種類: DNA(genomic) 50

(i x) 配列の特徴： (A) 名前 / KEY : m i s c _ d i f f e r e n c e (B) 存在位置：置換 (1 . . 1 1 、 " ")

(D) 他の情報： / 注記 = " N はプロモアセチルアミノ基である " (x i) 配列：配列番号 1

【 0 0 2 7 】

【 化 1 】

ACACCCAATT N

11

【 0 0 2 8 】

(2) 配列番号 2 の情報 (i) 配列の性質： (A) 配列の長さ： 1 1 塩基対 (B) 配列の型：核酸 (C) 鎖の数：両形態 (D) トポロジー：両形態 (i i) 配列の種類：DNA (g e n o m i c)

10

(i x) 配列の特徴： (A) 名前 / KEY : m i s c _ d i f f e r e n c e (B) 存在位置：置換 (1 . . 2 、 " ")

(D) 他の情報： / 注記 = " N はチオホスホリル基である " (x i) 配列：配列番号 2

【 0 0 2 9 】

【 化 2 】

NCTGAAAATG G

11

【 0 0 3 0 】

(2) 配列番号 3 の情報 (i) 配列の性質： (A) 配列の長さ： 2 2 塩基対 (B) 配列の型：核酸 (C) 鎖の数：両形態 (D) トポロジー：両形態 (i i) 配列の種類：DNA (g e n o m i c)

20

(i x) 配列の特徴： (A) 名前 / KEY : m i s c _ d i f f e r e n c e (B) 存在位置：置換 (1 1 . . 1 2 、 " ")

(D) 他の情報： / 注記 = " NN はチオホスホリルアセチルアミノ基である " (x i) 配列：配列番号 3

【 0 0 3 1 】

【 化 3 】

ACACCCAATT NNCTGAAAAT GG

22

【 0 0 3 2 】

(2) 配列番号 4 の情報 (i) 配列の性質： (A) 配列の長さ： 2 0 塩基対 (B) 配列の型：核酸 (C) 鎖の数：両形態 (D) トポロジー：両形態 (i i) 配列の種類：DNA (g e n o m i c)

30

(i x) 配列の特徴： (A) 名前 / KEY : m i s c _ d i f f e r e n c e (B) 存在位置： 1 . . 2 0 (D) 他の情報： / 注記 = " NN のない配列番号 3 に相補的である " (x i) 配列：配列番号 4

【 0 0 3 3 】

【 化 4 】

CCATTTTCAG AATTGGGTGT

20

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 4 】

40

【 図 1 】 図 1 は、ターゲット鋳型 (t e m p l a t e) を利用する、本発明の 2 つの短いオリゴマーのカップリングを示す。

【 図 2 】 図 2 は、本発明による、オリゴヌクレオチド・ホスホロチオエートと - ハロアシル・オリゴヌクレオチド誘導体との容易な (f a c i l e) 反応を示す。

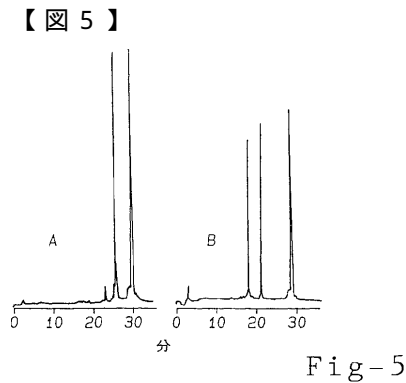
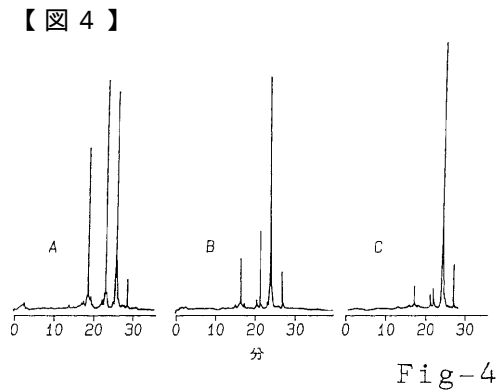
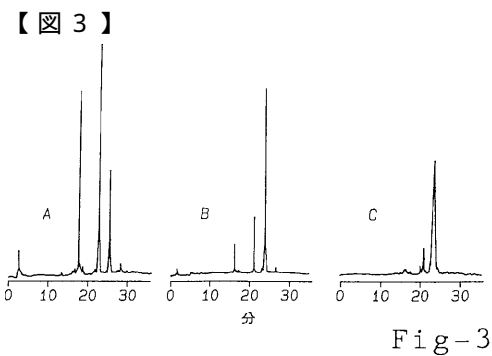
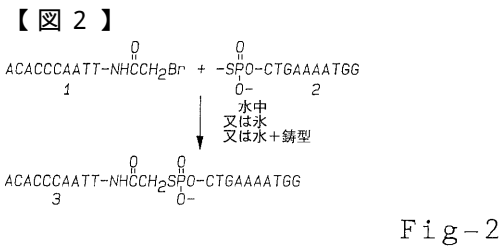
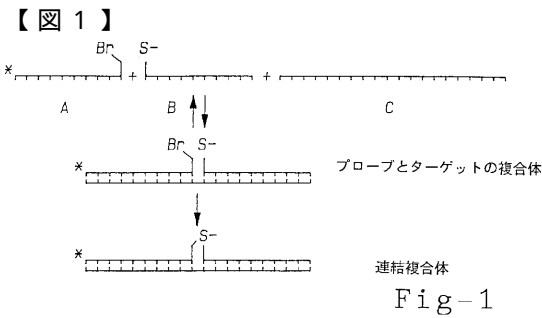
【 図 3 】 図 3 は、実験 1 による生成物のイオン交換高速液体クロマトグラフィー (I E H L P C) の結果を示す。ここで、A、0 で溶液中 2 時間後；B、0 で 2 日後；C、溶液を凍結し - 1 8 で 5 日間貯蔵した最終工程後であり、ピークは約 1 7 分、2 1 分、及び 2 4 分で、それぞれ化合物 1、化合物 2、及び化合物 3 に対応する。

【 図 4 】 図 4 は、第 2 の実験 (凍結、全体が - 1 8) による生成物の I E H L P C を示す。ここで、A、0 で溶液中 2 時間後；B、0 で 2 日後；C；A、5 時間後、B、

50

2日後、C、5日後であり、ピークは約17分、21分、及び24分で、それぞれ化合物1、化合物2、及び化合物3に対応し、27分のピークは、空気酸化により製造された化合物2の2量体誘導体に対応する。

【図5】図5は、次のものを示す。A、鑄型4の存在下、0で2時間後、化合物1及び2の反応による生成物のIE HPLCで、主なピークはカップリング生成物3及び鑄型4に対応し、化合物1（ピークが17分）はほとんど完全に消費されたことを注記する；B、KI₃で処理した後、ジチオトレイトール（Dithiothreitol）（DTT）によって処理した同じ生成物；化合物3は2つのオリゴヌクレオチド開裂生成物により置換され、18分及び22分で溶出した。



フロントページの続き

(72)発明者 セルゲイ エム グリアズノフ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94401 サン マテオ クラーク ドライヴ 2

審査官 石丸 聡

(56)参考文献 特表平04-503157(JP,A)
J. Am. Chem. Soc., 1992, Vol.114, No.23, pp.9197-9198
Nucleic Acids Res., March 25, 1993, Vol.21, No.6, pp.1403-1408
Tetrahedron Lett., 1987, Vol.28, No.36, pp.4157-4160

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12Q 1/68
C12N 15/09
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CAplus(STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq
UniProt/Genseq
JMEDPlus/JST7580/JSTPlus(JDream2)