(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2004-123754
(P2004-123754A)
(43)公開日　平成16年4月22日(2004.4.22)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
C07H 21/02	C07H	21/02　ZNA	4B024
A61K 31/7088	A61K	31/7088	4B050
A61K 31/7125	A61K	31/7125	4C057
A61K 47/48	A61K	47/48	4C076
A61K 48/00	A61K	48/00	4C084

審査請求 有　請求項の数 17　ＯＬ　（全 16 頁）　最終頁に続く

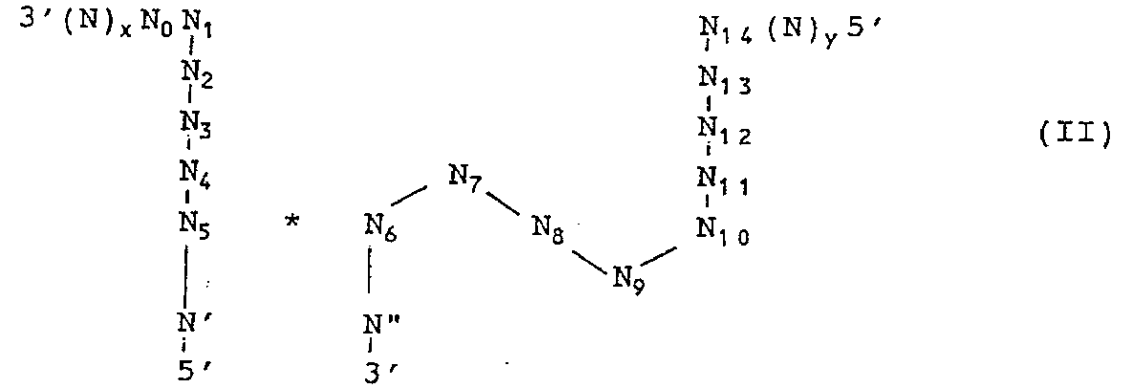
(21)出願番号　特願2003-389904(P2003-389904)
(22)出願日　平成15年11月19日(2003.11.19)
(62)分割の表示　特願平4-160564の分割
原出願日　平成4年6月19日(1992.6.19)
(31)優先権主張番号　P4120406.9
(32)優先日　平成3年6月20日(1991.6.20)
(33)優先権主張国　ドイツ(DE)
(31)優先権主張番号　P4216134.7
(32)優先日　平成4年5月15日(1992.5.15)
(33)優先権主張国　ドイツ(DE)

(71)出願人　592133162
オイロペイシェス　ラボラトリウム　フュア　モレクラールビオロギー　(エー　エム　ベー　エル)
ドイツ連邦共和国　ハイデルベルク　1　マイヤーホーフシュトラーセ　1
(74)代理人　100105991
弁理士　田中　玲子
(74)代理人　100106840
弁理士　森田　耕司
(72)発明者　ブライアン　スプロート
ドイツ連邦共和国　ハイデルベルク　レントゲンシュトラーセ　３８

最終頁に続く

(54)【発明の名称】合成触媒オリゴヌクレオチド

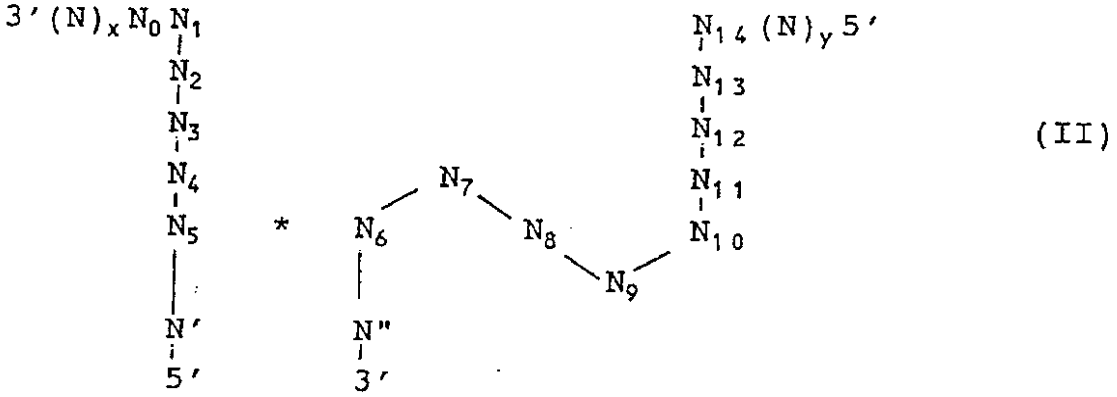
(57)【要約】
【課題】　核酸の目標配列を切断するのに適した合成触媒オリゴヌクレオチド構造を提供すること。
【解決手段】　リボ核酸の目標配列を切断しうる合成触媒オリゴヌクレオチドであって、次の一般構造式（ＩＩ）：
【化１】



(II)

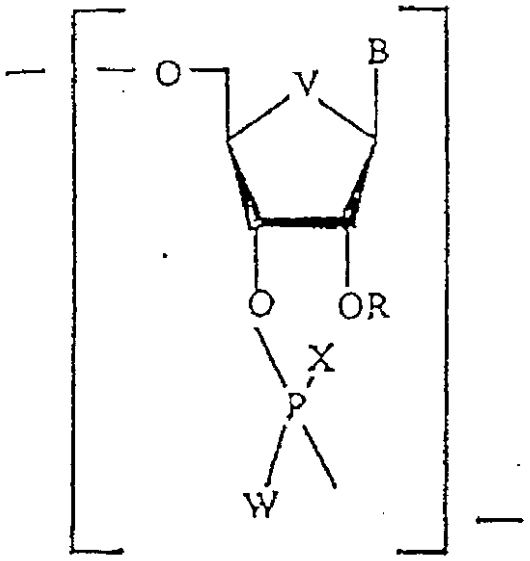
で示され、式（ＩＩ）中のヌクレオチドN_2，N_3，N_5，N_6，N_7，N_9，N_{13}及びN_{14}の

【特許請求の範囲】
【請求項１】
リボ核酸の目標配列を切断しうる合成触媒オリゴヌクレオチドであって、次の一般構造式（ＩＩ）：
【化１】



(II)

{式中、
Ｎはそれぞれ一般構造式（Ｉ）：
【化２】



(I)

［式中、Ｂは、アデニン－９－イル（Ａ）、シトシン－１－イル（Ｃ）、グアニン－９－イル（Ｇ）、ウラシル－１－イル（Ｕ）、ウラシル－５－イル（ψ）、ヒポキサンチン－９－イル（Ｉ）、チミン－１－イル（Ｔ）及び２－アミノアデニン－９－イルから成る群から選択されているヌクレオシド塩基を表わし、Ｖは各ヌクレオチドにおいてＯであり、Ｘ及びＷはそれぞれヌクレオチドにおいて同じかまたは異なっていてもよくかつ相互に独立的にＯ，Ｓ，NH_2基、炭素原子１～１０個を有するアルキル基またはアルコキシ基であり、Ｒは水素または炭素原子１～１０個を有する、非置換またはハロゲン、シアノ基、イソシアノ基、ニトロ基、アミノ基、カルボキシル基、ヒドロキシル基または／及びメルカプト基で置換された直鎖または枝分れアルキル基、アルケニル基またはアルキニル基である］
で示されるヌクレオチドを表わし、ｘ及びｙは同じかまたは異なっていてもよく、かつｘ≧１，ｙ≧２であり、N_5及びN_6はそれぞれ相互に相補的なヌクレオチドであり、＊は塩基対を表わし、Ｎ′及びＮ″は少なくとも部分的に相互に相補的なヌクレオチドを含む２個のヌクレオチド配列を表わす（この場合には２個のヌクレオチド配列の間の安定な塩基対が形成されうる）か、またはＮ′及びＮ″は一緒になって単一のヌクレオチド配列を表

わし（この場合にはこの配列の少なくとも一部分が相補的ヌクレオチドの間の塩基対によって１個の二本鎖ステムを形成しうる）、１個以上の付加的ヌクレオチドＮがN_7または／及びN_9の後に挿入されうる}
で示され、式（ＩＩ）中のヌクレオチドN_2，N_3，N_5，N_6，N_7，N_9，N_{13}及びN_{14}の少なくとも１個において式（Ｉ）のＲ基が水素以外のものであり、式（ＩＩ）中のヌクレオチドN_1，N_4，N_8，N_{10}，N_{11}及びN_{12}において式（Ｉ）のＲ基が水素であり、かつオリゴヌクレオチドの遊離３′末端に３′－デオキシリボヌクレオチドまたは／及び３′－Ｏ－アルキルリボヌクレオチドが存在することを特徴とするオリゴヌクレオチド。

【請求項２】
該オリゴヌクレオチドの空間的配置を安定化するために、さらに、交差結合剤によって修飾されたヌクレオシド塩基を有するヌクレオチドも含む請求項１記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項３】
交差結合剤がプソラーレンである、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の細胞内組込みまたは／及び特異的細胞局在化を改善するために、ポリアミノ酸、脂質、ホルモンまたはペプチドから選択された補欠分子族に結合されている、請求項１から請求項３までのいずれか１項記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項５】
Ｘ及びＷが、同じかまたは異なっていてもよく、かつ相互に独立的にＯ，Ｓ，NH_2基、炭素原子１～４個を有するアルキル基またはアルコキシ基である、請求項１から請求項４までのいずれか１項記載の合成触媒オリゴヌクレオチド。

【請求項６】
ヌクレオチドN_1，N_4，N_8及びN_{11}において、式（Ｉ）のＢ基がそれぞれＡまたは２－アミノアデニン－９－イル、Ｇ、Ｇ及びＧである、請求項１から請求項５までのいずれか１項記載のオリゴヌクレオチド。

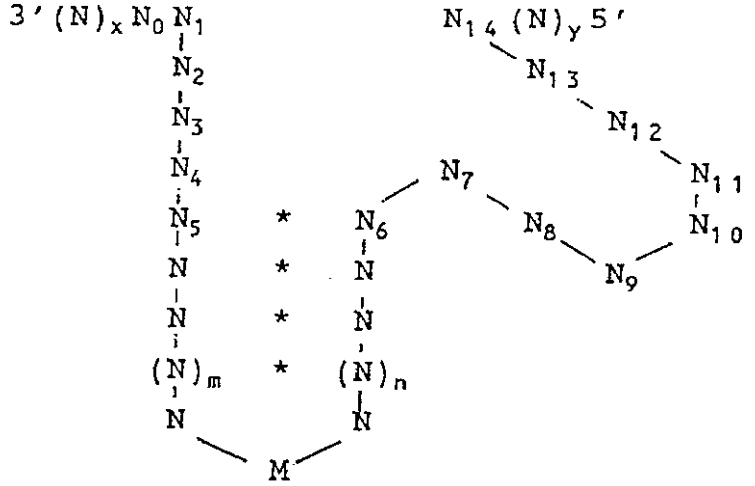
【請求項７】
式（Ｉ）のＶ，Ｗ及びＸ基がＯである、請求項１から請求項６までのいずれか１項記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項８】
式（１）の水素以外のＲ基が炭素原子１～６個を有する、請求項１から請求項７までのいずれか１項記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項９】
式（Ｉ）の水素以外のＲ基がメチル基、エチル基、プロピル基、アリル基、ジメチルアリル基、ブチル基またはシアノメチル基から成る群から選択されている、請求項８記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項１０】
次の一般構造式（ＩＩＩ）：

【化３】



(III)

［式中Ｎ，ｘ及びｙは請求項１で定義したものを表わし、Ｍは化学共有結合またはヌクレオチド配列（Ｎ）$_a$を表わし、ここでａ≧１であり、ｍ及びｎは同じかまたは異なっており、１個以上の付加的ヌクレオチドがN_7または／及びN_9の後に挿入されうる］で示される、請求項１から請求項９までのいずれか１項記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項１１】

N_1，N_4，N_8，N_{10}，N_{11}及びN_{12}以外のすべてのヌクレオチドにおいて式（ＩＩＩ）のＲ基が水素以外のものである、請求項１０記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項１２】

式（Ｉ）のＶ，Ｗ及びＸがＯであり、式（Ｉ）または（ＩＩＩ）のヌクレオチドN_1～N_{14}においてＢ及びＲ基が、

N_1 ：Ｂ＝Ａ 及び Ｒ＝Ｈ
N_2 ：Ｂ＝Ａ 及び Ｒ＝アリル
N_3 ：Ｂ＝Ａ 及び Ｒ＝アリル
N_4 ：Ｂ＝Ｇ 及び Ｒ＝Ｈ
N_5 ：Ｂ＝Ｃ 及び Ｒ＝アリル
N_6 ：Ｂ＝Ｇ 及び Ｒ＝アリル
N_7 ：Ｂ＝Ａ 及び Ｒ＝アリル
N_8 ：Ｂ＝Ｇ 及び Ｒ＝Ｈ
N_9 ：Ｂ＝Ｕ 及び Ｒ＝アリル
N_{10}：Ｂ＝Ａ 及び Ｒ＝Ｈ
N_{11}：Ｂ＝Ｇ 及び Ｒ＝Ｈ
N_{12}：Ｂ＝Ｕ 及び Ｒ＝Ｈ
N_{13}：Ｂ＝Ｃ 及び Ｒ＝アリル
N_{14}：Ｂ＝Ｕ 及び Ｒ＝アリル

である請求項１から請求項１１までのいずれか１項記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項１３】

式（Ｉ）のＶ，Ｗ及びＸが、N_{11}とN_{12}との間の結合がリンチオエート基（Ｘ＝Ｏ及びＷ＝Ｓ）であることを例外にして、Ｏでありかつ式（Ｉ）または（ＩＩＩ）のヌクレオチドN_1～N_{14}においてＢ基及びＲ基が請求項１２に記載のものを表わす、請求項１から請求項１１までのいずれか１項記載のオリゴヌクレオチド。

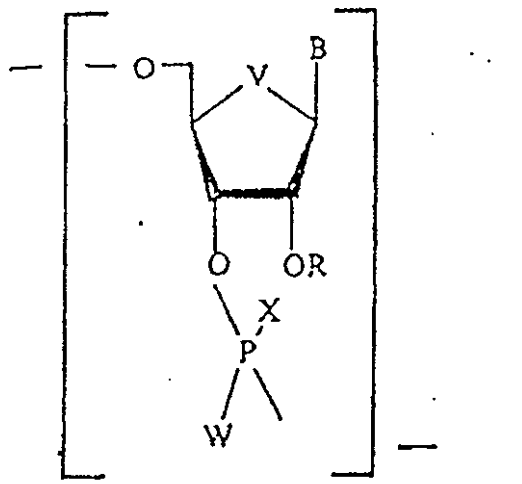
【請求項１４】

式（Ｉ）のＶ，Ｗ及びＸがＯであり、式（Ｉ）または（ＩＩＩ）のヌクレオチドN_1～N_{14}においてＢ基が請求項１２のものを表わし、N_9に関してはＲ＝３，３－ジメチルアリルであり、N_2，N_3，N_5，N_6，N_7，N_{13}及びN_{14}に関してはＲ＝アリルである、請求項１から請求項１１までのいずれか１項記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項１５】
式（Ｉ）のＶ，Ｗ及びＸがＯであり、式（Ｉ）または（ＩＩＩ）のヌクレオチドN_1～N_{14}においてＢ基が請求項１２記載のものを表わし、N_3に関してはＲ＝３，３－ジメチルアリルであり、N_2，N_5，N_6，N_7，N_9，N_{13}及びN_{14}に関してはＲ＝アリルである、請求項１から請求項１１までのいずれか１項記載のオリゴヌクレオチド。
【請求項１６】
式（Ｉ）のＶ，Ｗ及びＸはＯであり、式（Ｉ）または（ＩＩＩ）のヌクレオチドN_1～N_{14}においてＢ基は請求項１２記載のものを表わし、N_2，N_3，N_7，N_9及びN_{13}に関してはＲ＝シアノメチルであり、N_5、N_6及びN_{14}に関してはＲ＝アリルである、請求項１から請求項１１までのいずれか１項記載のオリゴヌクレオチド。
【請求項１７】
式（Ｉ）のＶ，Ｗ及びＸがＯであり、式（Ｉ）または（ＩＩＩ）のヌクレオチドN_1～N_{14}においてＢ基は請求項１２記載のものを表わし、N_5及びN_6に関してはＲ＝ブチルであり、N_2，N_3，N_7，N_9，N_{13}及びN_{14}に関してはＲ＝アリルであり、場合により式（ＩＩ）で塩基対の形で存在する１個以上のＮ基に関してはＲ＝ブチルである、請求項１から請求項１１までのいずれか１項記載のオリゴヌクレオチド。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、核酸の目標配列の切断に適していて、修飾されたヌクレオチドを含む合成触媒オリゴヌクレオチド構造に関する。また本発明は修飾された合成触媒オリゴヌクレオチド構造を使用して核酸の目標配列を切断する方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
ＲＮＡによって媒介される触媒作用の発見後に、特異的ＲＮＡ分子の不活性化の種々の実験が試験管内及び生体内で行われた。ハンマーヘッドーリボザイムが、少なくとも試験管内では所与の特異的ＲＮＡを認識し、切断することができる（Ｈａｓｅｌｏｆｆ 及びＧｅｒｌａｙ，１９８８）多目的酵素の生成に役立ちうる、という発見は、極めて有益であると判明した。このようなリボザイムの多くの使用例は、所定の混合物内で特異的ＲＮＡを有効に認識して切断するというリボザイムの能力に基づいている。ＲＮＡ酵素の使用方法はＲＮＡ制限酵素の生成から細胞中の遺伝子の特異的不活性化にまで及ぶ。特別な生物医学的関心は、多数の形の腫瘍を含む多くの疾病が特異的遺伝子の発現に相関して生じているという事実に基づいている。このような遺伝子を所属するｍＲＮＡの切断によって不活性化することは、前記のような疾病の制御及び最終的治癒の可能な方法となるであろう。さらに、抗ウイルス性薬剤の開発に対する大きな要求もあるが、ＲＮＡ酵素がおそらくこのような薬剤になりうるであろう、それというのもウイルス性の発現はウイルスＲＮＡ分子の切断によって選択的に阻止されうるからである。
【０００３】
適当な遺伝子を細胞に移入することによって細胞内でリボザイムを発現させるための従来の実験は、あまり有効でないことが判明した、それというのも特異的ＲＮＡを不活性化するためには、極めて高い発現が必要であったからである。またＲＮＡ分子の直接投与も、ＲＮａｓｅによる分解に対するＲＮＡの感受性及びＲＮＡ分子とタンパク質との相互作用のために、おそらく不可能であろう。
【０００４】
本発明に関連する先行技術文献情報としては以下のものがある。
【特許文献１】特開平3-128391
【特許文献２】特開昭61-291595
【特許文献３】DE A 3928900 (1991)
【非特許文献１】Nature, Vol. 344, (1990), p. 565-567
【非特許文献２】Trends Biotechnol., Vol. 8, (1990), p. 179-183

【非特許文献３】Trends Biotechnol., Vol. 8, (1990), p. 174-178
【非特許文献４】Nature, Vol. 334, (1998), p. 585-591
【非特許文献５】Nucleic Acids Research, Vol. 8, (1990), p. 299-304
【非特許文献６】proc. Natl., Acad., Sci., USA, Vol. 87, (1990), p. 7747-7751

【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【０００５】
従って、従来の技術の欠点が少なくとも部分的に除去されているＲＮＡ酵素を開発するという極めて大きな要求が生じた。
【課題を解決するための手段】
【０００６】
本発明の基礎になっている課題は、ＲＮＡ分子の代りに２′－アルコキシ－置換基を有する人工ヌクレオチドを基礎とする新規の型の核酸を使用することによって解決される。このような分子は自然のＲＮＡ分子よりも著しく安定である。それというのも該分子はＲＮａｓｅによってもＤＮａｓｅによっても切断されず、またＲＮＡ又はＤＮＡ結合タンパク質との相互作用が少なくなるからである。該分子は細胞環境において相応の自然ＲＮＡ分子よりも大きな効果を約束する。しかしこのような修飾された核酸は通常は触媒として作用しない。しかし意外にも、分子の特定位置で極めて小数のヒドロキシル基を導入すると、該修飾核酸の活性が保存されていることが確認された。しかもまた意外にも特徴的な性質、特に安定性及びタンパク質との減少された相互作用が保存されている。
【０００７】
従って本発明の対象は、核酸の目標配列を切断するために適していて、次の一般構造式（Ｉ）：
【化４】



(I)

［式中Ｂは、特に、アデニン－９－イル（Ａ）、シトシン－１－イル（Ｃ）、グアニン－９－イル（Ｇ）、ウラシル－１－イル（Ｕ）、ウラシル－５－イル（ψ）、ヒポキサンチン－９－イル（Ｉ）、チミン－１－イル（Ｔ）及び２－アミノアデニン－９－イルから成る群から選択されたヌクレオシド塩基を表わし、Ｖは各ヌクレオチドの場合独立的にＯ原子又はCH_2基であり、Ｘ及びＷはそれぞれヌクレオチドにおいて同じか又は異なっていてもよく、相互に独立的にＯ，Ｓ，NH_2基、炭素原子１～１０個、好ましくは１～４個のアルキル基又はアルコキシ基であり、Ｒは水素又は炭素原子１～１０個を有し、場合によりハロゲン、シアノ基、イソシアノ基、アミノ基、カルボキシル基、ヒドロキシル基又は／及びメルカプト基で置換された直鎖又は枝分れアルキル基、アルケニル基又はアルキニル基である］で示されるヌクレオチドを有する合成触媒オリゴヌクレオチド構造であって、その特徴とするところは、少なくとも１個のヌクレオチドで式（Ｉ）のＲ基が水素以外のものであることである。

【０００８】
Ｂは任意のプリン－又はピリミジンヌクレオシド塩基であってよい。適当なプリンヌクレオシド塩基の例は、例えばアデニン－９－イル、グアニン－９－イル、ピポキサンチン－９－イル及び２－アミノアデニン－９－イルである。ピリミジンヌクレオシド塩基の例は例えばシトシン－１－イル、ウラシル－１－イル、ウラシル－５－イル及びチミン－１－イルである。

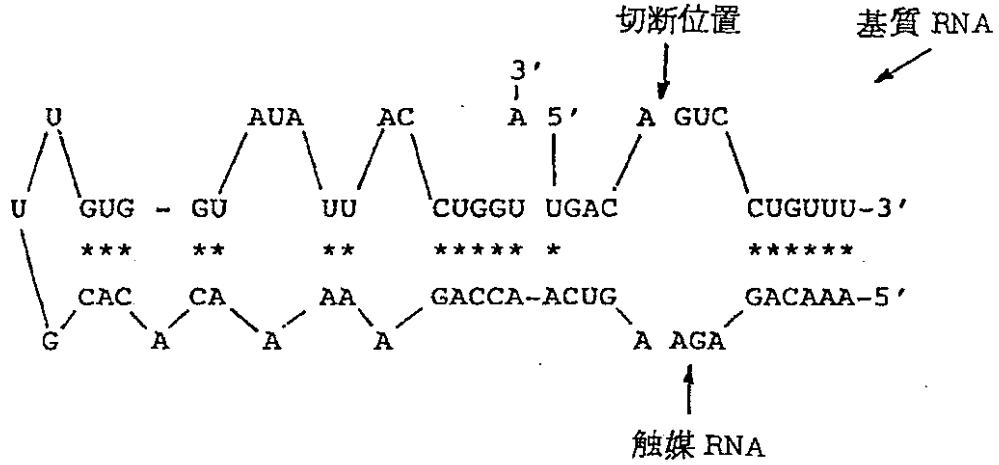
【０００９】
Ｖは各ヌクレオチドにおいて独立的にＯ又はCH_2基であり、好ましくはＯである。Ｘ及びＷは一つのヌクレオチドにおいて同じか又は異なっていて、相互に独立的にＯ，Ｓ，NH_2基、炭素原子１～１０個、好ましくは１～４個を有するアルキル基又はアルコキシ基を表わすことができる。Ｘ及びＷは特に好ましくはそれぞれＯである（この場合には１個のＯ原子は二重結合を介して燐に結合されており、他のＯ原子は単結合を介して結合されていて、負電荷を有するであろう）。

【００１０】
Ｒは水素又は炭素原子１～１０個を有し、場合によりハロゲン（弗素、塩素、臭素、沃素）、シアノ基、イソシアノ基、ニトロ基、アミノ基、カルボキシル基、ヒドロキシル基又は／及びメルカプト基によって置換された直鎖又は枝分れアルキル基、アルケニル基又はアルキニル基である。水素以外のＲ基は、好ましくは１～６個の炭素原子を有する。好ましいＲ基の例は、メチル基、エチル基、プロピル基、アリル基、ジメチルアリル基、ブチル基又はシアノメチル基である。特に好ましくはＲは炭素原子１～４個を有するアルケニル基、例えばアリル基である。

【００１１】
本発明による触媒オリゴヌクレオチド構造物は、少なくとも１個のヌクレオチドで式（Ｉ）のＲ基が水素とは別のものであることを特徴としている。この場合、オリゴヌクレオチド構造物が、Ｒが水素を表わすヌクレオチドをできるだけ少数含む場合が有利である。このようなオリゴヌクレオチドはヌクレアーゼに対する高い抵抗性を有していて、核酸が結合するタンパク質との小さい相互作用を示す。また、すべてのヌクレオチドにおいてＲ基は水素以外のものであってはならない、それというのもさもなければオリゴヌクレオチドはもはや触媒活性を有しないからである。特に本発明によるオリゴヌクレオチドの触媒活性中心内には、Ｒ基が水素原子である個々のヌクレオチドが存在している。本発明によるオリゴヌクレオチド構造の触媒活性中心は好ましくはハンマーヘッド又はヘアピン構造を有する。

【００１２】
触媒ヘアピン構造は、例えばトリツ（Ｔｒｉｔｚ）及びハンペル（Ｈａｍｐｅｌ）［Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ２８（１９８９），４９２９頁］及びハンペル等［Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１８（１９９０），２９９～３０４頁］の論文に記載されている。このようなヘアピン構造は４個のヘリックスを有していて、そのうち２個は基質と触媒ＲＮＡとの間に形成されている。次に、タバコリングスポットウイルス（Ｔｏｂａｃｃｏ－Ｒｉｎｇｓｐｏｔ－Ｖｉｒｕｓ）由来のＲＮＡヘアピン構造の形の触媒中心の例を示してある：

【化５】



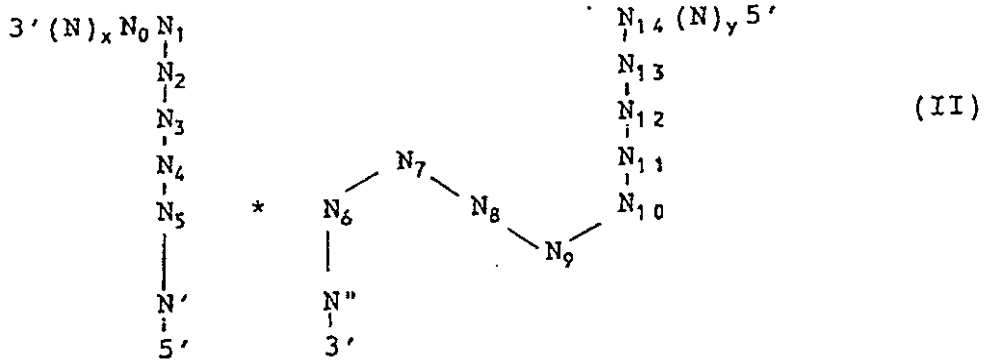
【００１３】

また触媒ＲＮＡの活性中心は所謂ハンマーヘッド構造を有していてもよい［Ｈｏｔｃｈｉｎｓ等：Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１４（１９８６），３６２７頁；Ｋｉｅｓｅ及び Ｓｙｍｏｎｓ：Ｖｉｒｏｉｄｓ ａｎｄ ｖｉｒｏｉｄ－ｌｉｋｅ ｐａｔｈｏｇｅｎｓ，Ｊ．Ｓ．Ｓｅｍａｎｃｉｋ 編集（ＣＲＣ－Ｐｒｅｓｓ，Ｂｏｃａｒａｔａｎ，Ｆｌｏｒｉｄａ（１９８７），１～４７頁］。ハンマーヘッド構造の触媒中心は３個のステムを有し、ＲＮＡの隣接配列部分によって又は多数のヌクレオチドによって相互に分離されている部分によって形成されていてもよい。

【００１４】

従って本発明の対象は、一般構造式（ＩＩ）：

【化６】



［式中Ｎはそれぞれ一般構造式（Ｉ）によるヌクレオチドを表わし、ｘ及びｙは同じか又は異なっていてよもく、ｘ≧１及びｙ≧２であり、N_5及びN_6は相互に相補的なヌクレオチドであり、＊は塩基対を表わし、Ｎ′及びＮ″は、少なくとも部分的に相互に相補的なヌクレオチドを有する２個のヌクレオチド配列を表わし（この場合両ヌクレオチド配列の間に安定な塩基対が形成可能である）、又はＮ′及びＮ″は一緒に単一のヌクレオチド配列を表わし（この場合該配列の少なくとも一部分が相補的ヌクレオチドの間の塩基対によって二本鎖ステムを形成してもよい）、場合により１個以上の付加的ヌクレオチドＮがN_7又は／及びN_9の後に挿入されうる］を有するハンマーヘッドオリゴヌクレオチド構造であって、その特徴とするところは、式（ＩＩ）中の少なくとも１個のヌクレオチドN_2，N_3，N_5，N_6，N_7，N_9，N_{10}，N_{12}，N_{13}及びN_{14}において式（Ｉ）のＲ基が水素以外のものであることである。

【００１５】

N_1～N_{14}の部分がオリゴヌクレオチド構造（ＩＩ）の触媒中心を含む。$(N)_x$及び$(N)_y$で表示したヌクレオチドは、活性中心の外に存在しかつ核酸の特異的目標配列との

対合を惹起する部分を有する。この部分の長さは、ｘ≧１，ｙ≧２でなければならないような長さである。好ましくはｘ及びｙ≦２０であって、ｘ又は／及びｙのより大きい値は特別な利点をもたらさず、オリゴヌクレオチドの合成を困難にする。オリゴヌクレオチド（ＩＩ）は１個のつながっている分子であるか又は２個の異なる分子から成っていてもよい、つまりＮ′およびＮ″は一緒に単一のヌクレオチド配列か又は２個の異なるヌクレオチド配列を表わす。本発明の構造については、ヌクレオチド配列Ｎ′及びＮ″が、少なくとも部分的に相互に相補的であり、両ヌクレオチド配列の間に安定な塩基対を形成しうる部分を含むことが重要である。ここで安定な塩基対という概念は、オリゴヌクレオチド構造が生理学的条件下で室温、好ましくは最高４０℃までの温度で二本鎖として存在することを意味する。

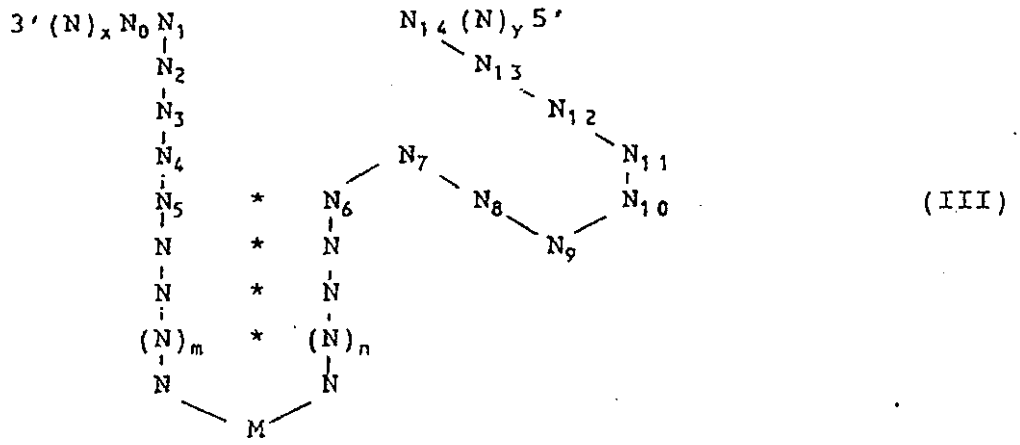
【００１６】

本発明によるオリゴヌクレオチドは、ヌクレオチドN_2，N_3，N_5，N_6，N_7，N_9，N_{10}，N_{12}，N_{13}及びN_{14}の少なくとも１個、好ましくは数個において式（Ｉ）のＲ基が水素以外のものである点によって優れている。これに対してヌクレオチドN_1，N_4，N_8及びN_{11}においては式（Ｉ）のＲ基は好ましくは水素である。さらに、N_1におけるヌクレオシド塩基がアデニン－１－イル又は２－アミノアデニン－９－イルであり、ヌクレオチドN_4，N_8及びN_{11}におけるヌクレオシド塩基がそれぞれグアニン－１－イル（又はヒポキサンチン－９－イル）である場合が有利である。

【００１７】

本発明の特に好ましい対象は、一般構造式（ＩＩＩ）：

【化７】



(III)

［式中Ｎ，ｘ及びｙは式（ＩＩ）に関して定義したものを表わし、Ｍは化学結合又はヌクレオチド配列$(N)_a$を表わし、ここでａ≧１であり、ｍ及びｎは同じか又は異なっていて、場合により１個以上の付加的ヌクレオチドがN_7又は／及びN_9の後に挿入されてもよい］で示されるオリゴヌクレオチド構造である。

【００１８】

式（ＩＩＩ）のヌクレオチドN_1，N_4，N_8，N_{10}，N_{11}及びN_{12}におけるＲ基は好ましくは水素である。式（ＩＩＩ）のN_1，N_4，N_8，N_{10}，N_{11}及びN_{12}以外のすべてのヌクレオチドにおけるＲ基は好ましくは水素以外のものである。

【００１９】

触媒中心としてのハンマーヘッド構造を有する本発明のオリゴヌクレオチドの好ましい具体的な例は式（ＩＩ）又は（ＩＩＩ）による構造を有し、その特徴とするところは、式（Ｉ）のＶ，Ｗ及びＸ基がＯでありかつ式（Ｉ）又は式（ＩＩＩ）のヌクレオチドN_1～N_{14}においてＢ及びＲ基が次の条件：

N_1 ：Ｂ＝Ａ 及び Ｒ＝Ｈ

N_2 ：Ｂ＝Ａ 及び Ｒ＝アリル

N_3 ：Ｂ＝Ａ 及び Ｒ＝アリル

N_4 ：Ｂ＝Ｇ 及び Ｒ＝Ｈ
N_5 ：Ｂ＝Ｃ 及び Ｒ＝アリル
N_6 ：Ｂ＝Ｇ 及び Ｒ＝アリル
N_7 ：Ｂ＝Ａ 及び Ｒ＝アリル
N_8 ：Ｂ＝Ｇ 及び Ｒ＝Ｈ
N_9 ：Ｂ＝Ｕ 及び Ｒ＝アリル
N_{10}：Ｂ＝Ａ 及び Ｒ＝Ｈ
N_{11}：Ｂ＝Ａ 及び Ｒ＝Ｈ
N_{12}：Ｂ＝Ｕ 及び Ｒ＝Ｈ
N_{13}：Ｂ＝Ｃ 及び Ｒ＝アリル
N_{14}：Ｂ＝Ｕ 及び Ｒ＝アリル
を有することである。

【００２０】

触媒中心としてのハンマーヘッド構造を有するオリゴヌクレオチドの他の好ましい具体的な例は、式（Ｉ）のＶ，Ｗ及びＸ基が、N_{11}とN_{12}との間の結合が燐チオエート基（Ｘ＝Ｏ及びＷ＝Ｓ）であることを除いてＯであり、かつ式（Ｉ）又は（ＩＩＩ）中のヌクレオチドN_1～N_{14}においてＢ及びＲ基が上記のものを表わすことを特徴としている。

【００２１】

また他のオリゴヌクレオチドの例は、式（Ｉ）のＶ，Ｗ及びＸがＯであり、式（Ｉ）又は（ＩＩＩ）のヌクレオチドN_1～N_{14}においてＢ基が上記のものを表わし、かつN_1，N_4，N_8，N_{10}，N_{11}及びN_{12}に関してはＲ＝Ｈであり、N_9に関してはＲ＝３，３－ジメチルアリルであり、N_2，N_3，N_5，N_6，N_7，N_{13}及びN_{14}に関してはＲ＝アリルであることを特徴としている。また他のオリゴヌクレオチドは、N_3に関してはＲ＝３，３－ジメチルアリルであり、N_9に関してはＲ＝アリルであることによってのみ、前記構造とは異なっている。

【００２２】

さらに他の構造の場合には、N_1，N_4，N_8，N_{10}，N_{11}及びN_{12}に関してはＲ＝Ｈであり、N_2，N_3，N_7，N_9及びN_{13}に関してはＲ＝シアノメチルであり、N_5、N_6及びN_{14}に関してはＲ＝アリルであり、Ｂ基は上記に記載したものを表わす。

【００２３】

さらにまた、本発明によるオリゴヌクレオチド構造において、細胞による触媒構造の組込みを改善するためには１個以上のＲ基＝ブチルであることが好ましい場合もある。この場合の具体的例は、N_1，N_4，N_8，N_{10}，N_{11}及びN_{12}に関してはＲ＝Ｈであり、N_5及びN_6に関してはＲ＝ブチルであり、N_2，N_3，N_7，N_9，N_{13}及びN_{14}に関してはＲ＝アリルであり、場合によっては式（ＩＩＩ）において塩基対の形（星印によって示す）で存在するＮ基の１個、１個以上又はすべてに関してＲが同様にブチルであってもよい構造のオリゴヌクレオチドである。

【００２４】

本発明によるオリゴヌクレオチド構造をさらに安定化するために、その遊離の３′末端に３′－デオキシリボヌクレオチド又は／及び３′－Ｏ－アルキルリボヌクレオチドが存在していてもよい。このようにして本発明によるオリゴヌクレオチドは、３′－エキソヌクレアーゼ分解から防止される。

【００２５】

さらに本発明によるオリゴヌクレオチドは、その空間的配置を安定化するために、交差結合剤によって修飾されたヌクレオシド塩基をもつヌクレオチドを有していてもよい。このような交差結合剤の例はプソラーレン（Ｐｓｏｒａｌｅｎ）又はプソラーレン誘導体である。このようにして２本鎖オリゴヌクレオチド構造は共有交差結合によって修飾されうる。交差結合剤を用いて修飾されたヌクレオチドの製造はＤＥ－Ａ３９２８９００に詳述されている。

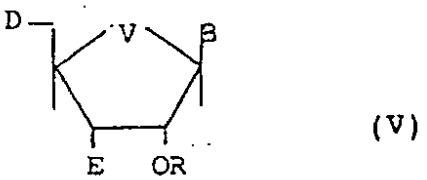
【００２６】

また本発明によるオリゴヌクレオチド構造は、細胞における組込み又は／及びオリゴヌクレオチド構造の特異的細胞局在化を改善するために補欠分子族に結合されていてもよい。このような補欠分子族の例はポリアミノ酸（例えばポリリシン）、脂質、ホルモン又はペプチドである。このような補欠分子族の結合は通常本発明のオリゴヌクレオチド構造の遊離５′末端及び３′末端を介して行われ、同結合は直接又はリンカーを介して行われてもよい。リンカーの例は、例えば末端５′－燐酸に存在していて、アミノ又は燐酸官能基を有するか又はメルカプトアルコキシ基を有するジエステルである。

【００２７】

本発明のオリゴヌクレオチド構造の合成はモノマー単位から公知のようにして行われる。このようなモノマー単位は通常一般式（Ｖ）：

【化８】



(V)

［式中Ｖ，Ｂ及びＲは式（Ｉ）で定義したものを表わし、Ｄ及びＥは３′～５′の中間ヌクレオチド結合を形成することのできる反応性基を表わす］で示される。このようなモノマー単位の群は当業者には周知であり、例えばＢ．Ｓｐｒｏａｔ等：Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１８（１９９０）、４１－４９ならびに要約的にはＥ．Ｌ．Ｗｉｎｎａｃｋｅｒ：Ｇｅｎｅ ｕｎｄ Ｋｌｏｎｅ，ＶＣＨ－Ｖｅｒｌａｇｓｇｅｓｅｌｌｓｃｈａｆｔ ｍｂＨ，Ｗｅｉｎｈｅｉｍ（ドイツ国）（１９８５）、特に４４－４９頁及びＦｒｏｅｈｌｅｒ及びＭａｔｔｅｕｃｃｉ：Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔ．（１９８６），４６９－４７２頁に記載されている。式（Ｖ）の反応性モノヌクレオチドを用いて本発明のオリゴヌクレオチド構造が公知法で、特に固相により製造することができる。

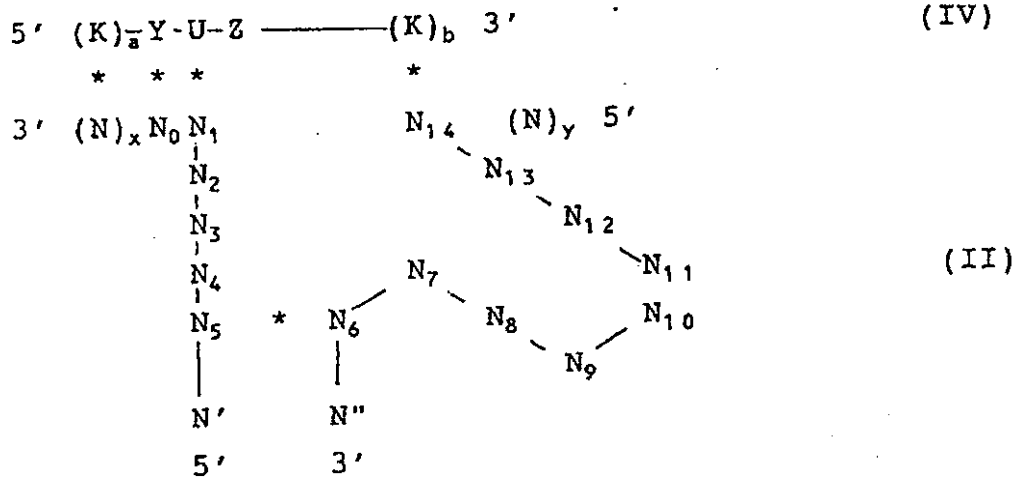
【００２８】

本発明の他の対象は、本発明による合成触媒オリゴヌクレオチド構造を使用して核酸の目標配列を切断する方法である。この場合該核酸の目標配列は合成触媒オリゴヌクレオチド構造自体の一部分であってもよいし、あるいは該目標配列は合成触媒オリゴヌクレオチド構造とは異なる分子であってもよい。

【００２９】

核酸の目標配列を切断するために、一般式（ＩＩ）で示されるハンマーヘッド構造を有する本発明のオリゴヌクレオチドを使用する場合には、次式：

【化９】



(IV)

(II)

で示される構造を有する中間段階が形成される。

【００３０】
上記式中Ｎ，Ｎ′，Ｎ″，ｘ，ｙ及び＊は式（ＩＩ）で定義したものを表わし、Ｋ，Ｙ，Ｕ及びＺは核酸の目標配列のヌクレオチドであり、Ｕはウリジンであり；Ｚはアデノシン、シチジン又はウリジンから成る群から選択された未修飾リボヌクレオチドであり；Ｋ及びＹは任意のヌクレオチドであり、ａ≧１、ｂ≧３であり、核酸の目標配列の切断はヌクレオチド配列ＹＵＺの３′側で行われ、場合によっては核酸目標配列（ＩＶ）の５′末端と$(N)_x$におけるオリゴヌクレオチド（ＩＩ）の３′末端との間に化学結合が存在するか又は核酸の目標配列（ＩＶ）の３′末端と$(N)_y$におけるオリゴヌクレオチド（ＩＩ）の５′末端との間に化学結合が存在する。
【００３１】
核酸の目標配列中のヌクレオチドＹは好ましくはグアノシン基であり、Ｚは好ましくはアデノシン又はシチジンを表わす。核酸の目標配列は、Ｚが未修飾リボヌクレオチドであるならば、任意のオリゴ－又はポリヌクレオチドであってよい。目標配列の基は例えばＤＮＡ、２′－Ｏ－アルキル－ＲＮＡ又は混合構造であってよい。しかし核酸の目標配列は好ましくはＲＮＡである。特定の核酸の目標配列に対する本発明のオリゴヌクレオチドの切断特異性は、触媒成分（Ｎｏ$(N)_x$及び$(N)_yN_{14}$）の対合腕の配列が、同配列が所望の目標配列の切断位置に隣接する配列に対して相補的であるように変えられることによって得られる。
【００３２】
本発明方法は、生細胞内及び試験管内で実施することができる。切断は好ましくは２価陽イオン、特にMg^{2+}の存在で、ｐＨ約７～９、特に好ましくは約８で実施される。
【００３３】
また本発明は、作用物質として本発明のオリゴヌクレオチド構造を、場合により常用の薬剤学的賦形剤、助剤、増量剤又は／及び希釈剤と一緒に含有する、抗ウイルス性薬剤に関する。また本発明は、ヒト、動物及び植物における抗ウイルス療法の薬剤の製造方法に関し、この場合作用物質として本発明のオリゴヌクレオチド構造を使用する。このような抗ウイルス療法の例は本発明のオリゴヌクレオチドを用いるエイズの撲滅であろう（参照：例えばＳａｒｖｅｒ等、Ｓｃｉｅｎｃｅ２４７（１９９０），１２２２－１２２５）。
【００３４】
また本発明は、成分として本発明のオリゴヌクレオチド構造を含有する診断試薬及びこのような診断試薬の製造方法に関する。該診断試薬は例えば遺伝的検査処理のために使用することができる。
【実施例１】
【００３５】
本発明をさらに、次の実施例及び配列実験記録ＳＥＱ ＩＤ Ｎｏ．１及びＳＥＱ ＩＤ Ｎｏ．２によって説明する。
ＳＥＱ ＩＤ Ｎｏ．１：基質－ＲＮＡのヌクレオチド配列
ＳＥＱ ＩＤ Ｎｏ．２：触媒活性リボザイム－ＲＮＡのヌクレオチド配列
【００３６】
例１
オリゴヌクレオチド合成、脱遮断及び精製
２′－Ｏ－メチルリボヌクレオシド－３′－Ｏ－ホスホラミジット－構成要素の合成は、Ｓｐｒｏａｔ等（Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１８（１９９０），４１－４９）の方法により行った。２′－Ｏ－アリルリボヌクレオシド－３′－Ｏ－ホスホラミジット－構成要素は、Ｓｐｒｏａｔ等（ＮｕｃｌｅｉｃＡｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１８（１９９０），５１４３－５１５１）の方法により合成した。
【００３７】
２′－Ｏ－［１－（２－フルオルフェニル）－４－メトキシピペリジン－４－イル］リボヌクレオチド－３′－Ｏ－ホスホラミジット－構成要素は、Ｂｅｉｊｅｒ等（Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１８（１９９０），５１４３－５１５１）の方法により合成

した。

【００３８】

これらのオリゴヌクレオチドを、β－シアノエチル ホスホラミジット法により調節細孔ガラス（Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｐｏｒｅ Ｇｌａｓｓ）上で修飾ＤＮＡ－合成サイクルを用いて応用生体系合成装置で合成した。縮合段階の活用剤としてテトラゾールの代りに５－（４－ニトロフェニル）－１Ｈ－テトラゾールを使用し、縮合の反応時間を１２分に高めた（参照：Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１８（１９９０），４１－４９及び５１４１－５１５１）。

【００３９】

脱遮断及び精製を次のように行った。先ず十分に遮断されたオリゴヌクレオチドが結合された担体を密閉無菌容器中で２５％水性アンモニア溶液で６０℃で１０分間処理した。次に冷却した溶液を無菌容器で真空で蒸発乾固した。次に５′－末端５′－Ｏ－ジメトキシトリチル－保護基及び若干の２′－Ｏ－Ｆｐｍｐ－保護基を有するオリゴヌクレオチドの粗生成物を、溶離剤として水性０．１ｍｏｌ／ｌトリエチルアンモニウムアセテート（ｐＨ７．０）中のアセトニトリル勾配を用い、逆相ＨＰＬＣによってμ－Ｂｏｎｄａｐａｋ C_{18}－カラムで精製した。生成物を集めて、溶剤を真空で除去した。残留物を水中の１０％グリセリン１ｍｌ中で再懸濁し、この溶液を１０分間遠心分離した。上澄みをＧ１５セファデックスカラム（３０ｍｌ）上に注ぎ、このカラムに無菌蒸留水で溶離を施した。カラムのボイドボリューム（約９ｍｌ）を棄て、３ｍｌ－画分を集めた。同画分は部分的に遮断されたオリゴヌクレオチドを含有する。次に無菌水性塩酸（２７０μｌ、０．１ｍｏｌ／ｌ）を加えた、これによってｐＨは２～２．５の範囲に保たれた。同溶液を２０～２５℃で２０時間保ち、酸に不安定なＤＭＴｒ－及びＦｐｍｐ－保護基を除去する。次に溶液を２０００ｒ．ｐ．ｍで１０分間遠心分離した。上澄みをトリス酢酸２ｍｏｌ／ｌ（７５μｌ，ｐＨ７．９）を加えて中和させた。１－ブタノールを用いる抽出の反復によって水性溶液から完全に脱遮断された純オリゴヌクレオチドが得られた（Ｃａｔｈａｌａ及びＢｒｕｎｎｅｌ：Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１８（１９９０），２０１）。オリゴヌクレオチドペレットを乾燥し、トリス緩衝液（１０ｍｍｏｌ／ｌ，ｐＨ７．５，１ｍｍｏｌ／ｌ ＥＤＴＡ）１００μｌ中に溶かした。

【００４０】

例２

基質ＲＮＡの製造及び標識

化学的に合成した基質オリゴヌクレオチドを、γ－^{32}Ｐ－ＡＴＰ及びキナーゼ又はＲＮＡ－リガーゼ及び^{32}Ｐ－ｐＣｐを用いて、その都度の酵素のメーカーによって提案された標準操作により標識した。

【００４１】

さらにまた、ＲＮＡをその都度の鋳型を適当な制限酵素で切断した後ＳＰ６－ＲＮＡポリメラーゼを用いる転写によって合成した。転写物中にα－^{32}Ｐ－ＵＴＰを導入することによってＲＮＡ分子を標識した。転写条件は次のとおりであった：

トリス（ｐ７．５）	４０ ｍｍｏｌ／ｌ
$MgCl_2$	６ ｍｍｏｌ／ｌ
スペルミジン	２ ｍｍｏｌ／ｌ
ジチオトレイトール	１０ ｍｍｏｌ／ｌ
ヌクレオシドトリホスフェート（Ａ，Ｃ，Ｇ）	５００ｍｍｏｌ／ｌ
ＵＴＰ	１００ μｍｏｌ／ｌ
α－^{32}Ｐ－ＵＴＰ	１０ μＣｉ
ＳＰ６－ポリメラーゼ	１０Ｕ／μｌ
ＲＮａｓｅ阻害剤（ヒト胎盤）	２０Ｕ／μｌ

【００４２】

３７℃で２時間インキュベーションした後、鋳型として使用したＤＮＡをＲＮａｓｅを含まないＤＮａｓｅで分解した。ＲＮＡをゲル電気泳動によって尿素７ｍｍｏｌ／ｌの存

在で６％ポリアクリルアミドゲル（アクリルアミド：ビスアクリルアミド＝１：３０）上で分離した。ＲＮＡのバンドを拡散によって溶離し、ＲＮＡをエタノール沈殿によって得た。活性測定は、基質ＲＮＡ（１０ｎＭ～１μＭ）、トリス（ｐＨ７．５）５０ｍＭ、$MgCl_2$ ２０ｍＭ、リボザイム０．０１～１０ｐＭｏｌを含有する反応混合物１０μｌ中で行った。この混合物を５０℃で６０分間インキュベートした。切断生成物を尿素７Ｍの存在で７％ポリアクリルアミドゲル上で分離した。

【００４３】

例３

種々の修飾触媒オリゴヌクレオチドの活性の測定

目標配列としては、ヒトのフィブロネクチン－ｍＲＮＡのＥＤＢエキソンをベースとする、化学的に合成されたヌクレオチド１７個の長さのオリゴヌクレオチドを使用した。配列（ＳＥＱ ＩＤ Ｎｏ．１）は次のとおりであった：

５′－ｒ［ＵＡＣＡＣＡＧＵＣＡＣＡＧＧＧＣＵ］

この配列を切断するために使用したリボザイムは次に示すヌクレオチド配列（ＳＥＱ ＩＤ Ｎｏ．２）を有していた：

５′－ｒ［ＧＣＣＣＵＧＵＣＵＧＡＵＧＡＧＵＣＣＧＵＧＡＧＧＡＣＧＡＡＡＣＵＧＵＧＵ］

【００４４】

上記配列はＥ０と呼ぶ。下線を施した部分は、式（ＩＩＩ）のヌクレオチドN_{14}～N_6及びN_5～N_0を表わす。また次のようなＥ０の類似配列（同一塩基構成を有する）も合成した：

Ｅ１：N_1，N_4，N_8，N_{10}，N_{11}及びN_{12}に関してはＲ＝Ｈ；他のすべてのＮに関してはＲ＝アリル。

Ｅ２：N_1，N_4，N_8，N_{10}及びN_{11}に関してはＲ＝Ｈ；他のすべてのＮに関してはＲ＝アリル。

Ｅ３：N_1，N_4，N_8，N_{10}，N_{11}及びN_{12}に関してはＲ＝Ｈ；N_{11}とN_{12}との間の結合はリンチオエート基であり（すなわち式（Ｉ）によりＸ＝Ｏ及びＷ＝Ｓである）；他のすべてのＮに関してはＲ＝アリル。

Ｅ４：N_1，N_4，N_8，N_{10}，N_{11}及びN_{12}に関してはＲ＝Ｈ；N_9に関してはＲ＝３，３－ジメチルアリル；他のすべてのＮに関してはＲ＝アリル。

Ｅ５：N_1，N_4，N_8，N_{10}，N_{11}及びN_{12}に関してはＲ＝Ｈ；N_3に関してはＲ＝３，３－ジメチルアリル；他のすべてのＮに関してはＲ＝アリル。

Ｅ６：N_1，N_4，N_8，N_{10}，N_{11}及びN_{12}に関してはＲ＝Ｈ；N_5及びN_6ならびに塩基対部分を形成する他の６Ｎ（ＵＣＣ及びＧＧＡ）に関してはＲ＝ブチル；他のすべてのＮに関してはＲ＝アリル。

Ｅ７：N_1，N_4，N_8，N_{10}，N_{11}及びN_{12}に関してはＲ＝Ｈ；N_2，N_3，N_7，N_9及びN_{13}に関してはＲ＝シアノメチル；他のすべてのＮに関してはＲ＝アリル。

【００４５】

切断活性を測定するためのテストは、基質ＲＮＡ（１０ｎｍｏｌ／ｌ～１μｍｏｌ／ｌ）、トリス（ｐＨ７．５）５０ｍｍｏｌ／ｌ、$MgCl_2$ ２０ｍｍｏｌ／ｌ及びリボザイム０．０１～１０ｐｍｏｌを含有する、１０μｌの反応体積で行った。反応混合物を５０℃で６０分間インキュベートした。切断生成物は尿素７ｍｏｌ／ｌの存在でポリアクリルアミド－ゲル電気泳動法によって分離した。

【００４６】

反応速度は、５０℃で切断時間１．５分、１０分及び１５分に^{32}Pで放射性標識した基質の量を測定することによって決定した。基質濃度は２５、５０、１００、２５０ｎｍｏｌ／ｌであった；リボザイム濃度は４ｎｍｏｌ／ｌ～２０ｎｍｏｌ／ｌであった。試料は予熱し、反応はリボザイムを加えて開始させた。所定の反応時間後にＥＤＴＡ２０ｍｍｏｌ／ｌを２容加えることによって反応を停止した。生成物をポリアクリルアミド－尿素－ゲル電気泳動法によって分離し、分子動的燐画像装置（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｙｎａｍ

ｉｃｓ ＰｈｏｓｐｈｏｒＩｍａｇｅｒ）で定量的に分析した。

【００４７】

表１には上記の触媒オリゴヌクレオチドＥ０，Ｅ１，Ｅ２，Ｅ３，Ｅ４，Ｅ５，Ｅ６及びＥ７の相対活性及びＲＮａｓｅの感受性を記載してある。

表１

触媒構造	相対活性	ＲＮａｓｅ Ａの感受性
Ｅ０	１	１
Ｅ１	０．２	０．０１
Ｅ２	＜０．０５	安定
Ｅ３	０．１	０．００１
Ｅ４	約 ０．２	０．０１
Ｅ５	約 ０．２	０．０１
Ｅ６	約 ０．２	０．０１
Ｅ７	約 ０．２	０．０１

【配列表】

2004123754000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ 43/00	Ａ６１Ｐ 43/00	１１１	４Ｃ０８６
Ｃ１２Ｎ 9/00	Ｃ１２Ｎ 9/00		
Ｃ１２Ｎ 15/09	Ｃ１２Ｎ 15/00	Ａ	

(72)発明者 アンガス レイモンド
ドイツ連邦共和国 ヴィーゼンバッハ シラーシュトラーセ ３６
(72)発明者 ジョヴァンニ パオレッラ
ドイツ連邦共和国 ガイベルク レルヒェンシュトラーセ 1

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 BA07 CA05 HA17
4B050 CC04 LL01
4C057 BB02 CC01 DD01 MM02 MM05
4C076 AA95 CC26 EE59
4C084 AA13 NA13 NA14 ZC202
4C086 AA02 AA03 EA16 NA13 NA14 ZC20

【要約の続き】
少なくとも１個において式（Ｉ）のＲ基が水素以外のものであり、式（ＩＩ）中のヌクレオチドN_1，N_4，N_8，N_{10}，N_{11}及びN_{12}において式（Ｉ）のＲ基が水素であり、かつ
オリゴヌクレオチドの遊離３′末端に３′－デオキシリボヌクレオチドまたは／及び３′－Ｏ－アルキルリボヌクレオチドが存在することを特徴とするオリゴヌクレオチド。