

(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2007-505138

(P2007-505138A)

(43) 公表日 平成19年3月8日(2007.3.8)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 H 21/00 (2006.01)	C 0 7 H 21/00 C S P	4 B O 2 4
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088 Z N A	4 C O 5 7
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C O 8 4
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 6
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 80 頁)		

(21) 出願番号	特願2006-526330 (P2006-526330)	(71) 出願人	595104323
(86) (22) 出願日	平成16年9月9日 (2004.9.9)		アイシス・ファーマシューティカルス・インコーポレーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成18年5月9日 (2006.5.9)		I s i s P h a r m a c e u t i c a l s I n c
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/029650		アメリカ合衆国カリフォルニア州92008, カールズバッド, ラザフォード・ロード 1896
(87) 国際公開番号	W02005/023825	(74) 代理人	100089705
(87) 国際公開日	平成17年3月17日 (2005.3.17)		弁理士 社本 一夫
(31) 優先権主張番号	60/501, 719	(74) 代理人	100140109
(32) 優先日	平成15年9月9日 (2003.9.9)		弁理士 小野 新次郎
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100075270
(31) 優先権主張番号	60/568, 039		弁理士 小林 泰
(32) 優先日	平成16年5月3日 (2004.5.3)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/568, 489		
(32) 優先日	平成16年5月6日 (2004.5.6)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 末端に連結された二環糖部分を有する、ギャップ化オリゴマー化合物

(57) 【要約】

本発明は、二環ヌクレオシド、およびこうしたヌクレオシドを少なくとも1つ含むオリゴマー化合物に関する。これらのオリゴマー化合物は、典型的には、非修飾オリゴマー化合物に比較して、増進した結合親和性およびヌクレアーゼ抵抗特性を有する。該オリゴマー化合物は、例えば研究目的および療法目的に有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

構造：



式中：

各 Nu_1 および Nu_3 は、独立に、高親和性修飾ヌクレオシドであり、ここで、 Nu_1 および Nu_3 の少なくとも一方が、4' - CH_2 - O - 2' 架橋または 4' - (CH_2)₂ - O - 2' 架橋を含む、二環糖修飾ヌクレオシドである；

各 Nu_2 は 2' - デオキシヌクレオシドであり；

各 L_1 、 L_2 および L_3 は、独立に、ヌクレオシド間連結基であり；

10

各 T_1 および T_2 は、独立に、H、ヒドロキシ保護基、場合によって連結されるコンジュゲート基、または固体支持体への共有結合であり；

n_1 は 1 ~ 約 6 であり；

n_2 は 11 ~ 約 18 であり；そして

n_3 は 2 ~ 約 6 である

を含むオリゴマー化合物。

【請求項 2】

高親和性修飾ヌクレオシドの各々が、独立に、二環糖修飾ヌクレオシド、2' - O - (CH_2)₂ - O - CH_3 修飾ヌクレオシド、2' - F 修飾ヌクレオシド、または 2' - O - CH_2 - C(=O) - NR_1R_2 修飾ヌクレオシドである、ここで各 R_1 および R_2 は、独立に、H、窒素保護基、置換または非置換 $C_1 - C_{10}$ アルキル、置換または非置換 $C_2 - C_{10}$ アルケニル、置換または非置換 $C_2 - C_{10}$ アルキニルである、ここで置換は、 OR_3 、 SR_3 、 NH_3^+ 、 NR_3R_4 、グアニジノまたはアシルである、ここでアシルは酸アミドまたはエステルであるか、あるいは R_1 および R_2 が一緒に窒素保護基であるか、または N および O から選択されるさらなるヘテロ原子を場合によって含む環構造において、 R_1 および R_2 が連結されている、請求項 1 のオリゴマー化合物。

20

【請求項 3】

二環糖修飾ヌクレオシドの各々が、独立に、4' - CH_2 - O - 2' 架橋または 4' - (CH_2)₂ - O - 2' 架橋を有する、請求項 2 のオリゴマー化合物。

【請求項 4】

各 R_1 および R_2 が、独立に、H、窒素保護基、または $C_1 - C_{10}$ アルキルである、請求項 2 のオリゴマー化合物。

30

【請求項 5】

T_1 が H またはヒドロキシル保護基である、請求項 1 のオリゴマー化合物。

【請求項 6】

T_2 が H またはヒドロキシル保護基である、請求項 1 のオリゴマー化合物。

【請求項 7】

ヒドロキシル保護基の各々が、独立に、4, 4' - ジメトキシトリチル、モノメトキシトリチル、9 - フェニルキサンテン - 9 - イル、9 - (p - メトキシフェニル) キサンテン - 9 - イル、t - ブチル、t - ブトキシメチル、メトキシメチル、テトラヒドロピラニル、1 - エトキシエチル、1 - (2 - クロロエトキシ) エチル、2 - トリメチルシリルエチル、p - クロロフェニル、2, 4 - ジニトロフェニル、ベンジル、2, 6 - ジクロロベンジル、ジフェニルメチル、p, p - ジニトロベンズヒドリル、p - ニトロベンジル、トリフェニルメチル、トリメチルシリル、トリエチルシリル、t - ブチルジメチルシリル、t - ブチルジフェニルシリル、トリフェニルシリル、ベンゾイルホルメート、アセチル、クロロアセチル、トリクロロアセチル、トリフルオロアセチル、ピバロイル、ベンゾイル、p - フェニルベンゾイル、メシル、トシル、4, 4', 4'' - トリス - (ベンジルオキシ) トリチル、4, 4', 4'' - トリス - (4, 5 - ジクロロフタルイミド) トリチル、4, 4', 4'' - トリス (レプリニルオキシ) トリチル、3 - (イミダゾリルメチル) - 4, 4' - ジメトキシトリチル、4 - デシルオキシトリチル、4 - ヘキサデシルオキシト

40

50

リチル、9 - (4 - オクタデシルオキシフェニル) キサンテン - 9 - イル、1 , 1 - ビス - (4 - メトキシフェニル) - 1 ' - ピレニルメチル、p - フェニルアゾフェニルオキシカルボニル、9 - フルオレニル - メトキシカルボニル、2 , 4 - ジニトロフェニルエトキシカルボニル、4 - (メチルチオメトキシ) プチリル、2 - (メチルチオメトキシメチル) - ベンゾイル、2 - (イソプロピルチオメトキシメチル) ベンゾイル、2 - (2 , 4 - ジニトロベンゼンスルフェニルオキシメチル) ベンゾイル、またはレプリニル基である、請求項 1 のオリゴマー化合物。

【請求項 8】

T_1 および T_2 の一方が、支持体への共有結合である、請求項 1 のオリゴマー化合物。

【請求項 9】

支持体が、調節孔ガラス、オキサリル調節孔ガラス、シリカ含有粒子、ポリスチレンのポリマー、ポリスチレンのコポリマー、スチレンおよびジビニルベンゼンのコポリマー、ジメチルアクリルアミドおよび N , N ' - ビスアクリロイルエチレンジアミンのコポリマー、可溶性支持体、または P E P S である、請求項 8 のオリゴマー化合物。

【請求項 10】

各 L_1 、 L_2 および L_3 が、独立に、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、キラル・ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、メチルホスホネート、アルキルホスホネート、5 ' - アルキレンホスホネート、キラル・ホスホネート、ホスフィネート、ホスホロアミデート、3 ' - アミノホスホロアミデート、アミノアルキルホスホロアミデート、チオノホスホロアミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、セレノホスフェート、またはボラノホスフェートである、請求項 1 のオリゴマー化合物。

【請求項 11】

各 L_1 、 L_2 および L_3 が、独立に、ホスホジエステルまたはホスホロチオエート・ヌクレオシド間連結基である、請求項 10 のオリゴマー化合物。

【請求項 12】

各 L_1 、 L_2 および L_3 が、ホスホジエステル・ヌクレオシド間連結基である、請求項 10 のオリゴマー化合物。

【請求項 13】

各 L_1 、 L_2 および L_3 が、独立に、シロキサン、スルフィド、スルホキシド、スルホン、ホルムアセチル、チオホルムアセチル、メチレンホルムアセチル、チオホルムアセチル、スルファメート、メチレンイミノ、メチレンヒドラジノ、スルホネート、スルホンアミド、またはアミドである、請求項 1 のオリゴマー化合物。

【請求項 14】

ヌクレオシド間連結基が、独立に、 $-CH_2-NH-O-CH_2-$ 、 $-CH_2-N(CH_3)-O-CH_2-$ または $-CH_2-O-N(CH_3)-CH_2-$ 、 $-CH_2-N(CH_3)-N(CH_3)-CH_2-$ 、または $-O-N(CH_3)-CH_2-CH_2-$ である、請求項 13 のオリゴマー化合物。

【請求項 15】

各ヌクレオシドが、独立に、アデニン、グアニン、チミン、シトシン、ウラシル、5 - メチルシトシン、5 - ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2 - アミノアデニン、アデニンおよびグアニンのアルキル誘導体、2 - チオウラシル、2 - チオチミン、2 - チオシトシン、5 - ハロウラシル、5 - ハロシトシン、5 - プロピニルウラシル、5 - プロピニルシトシン、6 - アゾウラシル、6 - アゾシトシン、6 - アゾチミン、5 - ウラシル (シュードウラシル)、4 - チオウラシル、8 - 置換アデニン類およびグアニン類、5 - 置換ウラシル類およびシトシン類、7 - メチルグアニン、7 - メチルアデニン、8 - アザグアニン、8 - アザアデニン、7 - デアザグアニン、7 - デアザアデニン、3 - デアザグアニン、または 3 - デアザアデニンである複素環塩基部分を含む、請求項 1 のオリゴマー化合物。

【請求項 16】

10

20

30

40

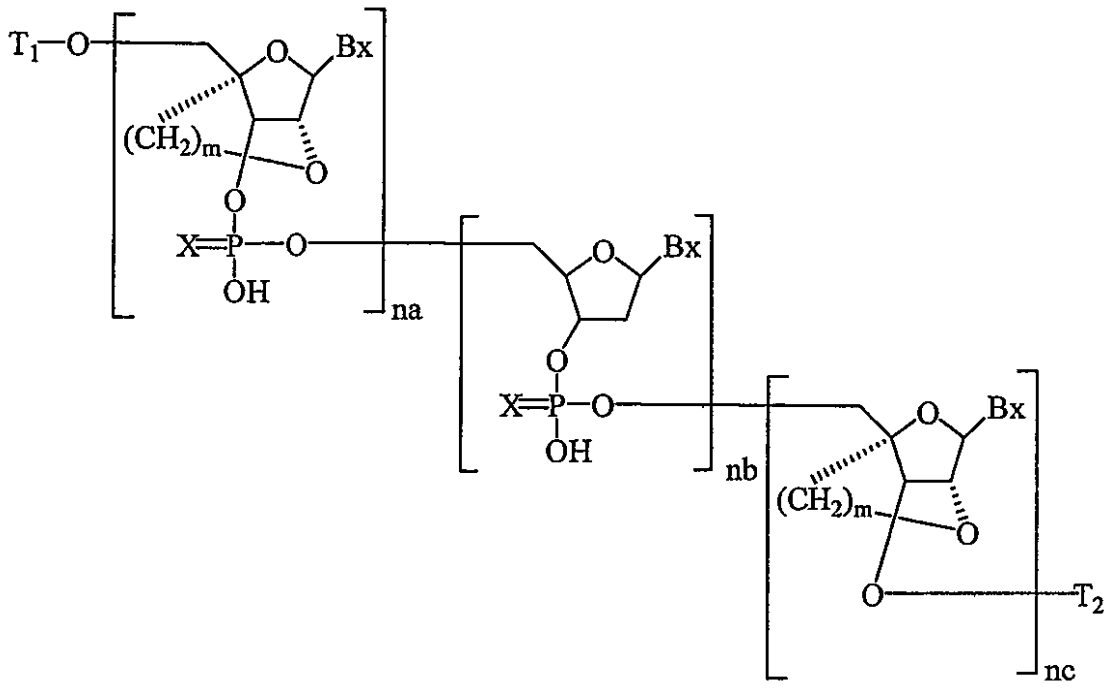
50

- n 1 が 1 ~ 約 5 である、請求項 1 のオリゴマー化合物。
- 【請求項 17】
- n 1 が 1 ~ 約 3 である、請求項 1 のオリゴマー化合物。
- 【請求項 18】
- n 1 が 2 ~ 約 3 である、請求項 1 のオリゴマー化合物。
- 【請求項 19】
- n 3 が 2 ~ 約 5 である、請求項 1 のオリゴマー化合物。
- 【請求項 20】
- n 3 が 2 ~ 約 3 である、請求項 1 のオリゴマー化合物。
- 【請求項 21】 10
- n 2 が 12 ~ 約 18 である、請求項 1 のオリゴマー化合物。
- 【請求項 22】
- n 2 が 12 ~ 約 16 である、請求項 1 のオリゴマー化合物。
- 【請求項 23】
- n 2 が 14 ~ 約 16 である、請求項 1 のオリゴマー化合物。
- 【請求項 24】
- n 1、n 2 および n 3 の合計が 14 ~ 約 30 である、請求項 1 のオリゴマー化合物。
- 【請求項 25】
- n 1、n 2 および n 3 の合計が 14 ~ 24 である、請求項 1 のオリゴマー化合物。
- 【請求項 26】 20
- n 1、n 2 および n 3 の合計が 14 ~ 21 である、請求項 1 のオリゴマー化合物。
- 【請求項 27】
- n 1、n 2 および n 3 の合計が 16 ~ 21 である、請求項 1 のオリゴマー化合物。
- 【請求項 28】
- n 1 が 1 ~ 約 3 であり、n 2 が 12 または 13 であり、そして n 3 が 2 または 3 である、請求項 1 のオリゴマー化合物。
- 【請求項 29】
- n 1 が 3 であり、n 2 が 12 であり、そして n 3 が 3 である、請求項 1 のオリゴマー化合物。
- 【請求項 30】 30
- n 1 が 1 ~ 約 3 であり、n 2 が 14 または 15 であり、そして n 3 が 2 または 3 である、請求項 1 のオリゴマー化合物。
- 【請求項 31】
- n 1 が 2 であり、n 2 が 14 であり、そして n 3 が 2 である、請求項 1 のオリゴマー化合物。
- 【請求項 32】
- n 1 が 1 ~ 約 3 であり、n 2 が 16 または 17 であり、そして n 3 が 2 または 3 である、請求項 1 のオリゴマー化合物。
- 【請求項 33】
- n 1 が 2 であり、n 2 が 16 であり、そして n 3 が 2 である、請求項 1 のオリゴマー化合物。 40
- 【請求項 34】
- 少なくとも 1 つの Nu₁ ヌクレオシドおよび少なくとも 1 つの Nu₃ ヌクレオシドが LNA または ENA である、請求項 1 のオリゴマー化合物。
- 【請求項 35】
- 最も 5' 末端または最も 3' 末端の親和性修飾ヌクレオシドの少なくとも一方が LNA または ENA である、請求項 1 のオリゴマー化合物。
- 【請求項 36】
- 遺伝子発現を阻害する方法であって、1 以上の細胞、組織、または動物と、請求項 1 のオリゴマー化合物を接触させることを含む、前記方法。 50

【請求項 37】

構造：

【化 1】



式中：

各 B x は複素環塩基部分であり；

各 X は、独立に、O または S であり；

T₁ および T₂ は、各々、独立に、H、ヒドロキシ保護基、場合によって連結されるコンジュゲート基、または固体支持体への共有結合であり；

各 m は、独立に、1 または 2 であり；

n a は 1 ～ 約 6 であり；

n b は 11 ～ 約 18 であり；そして

n c は 2 ～ 約 6 である

を含むオリゴマー化合物。

【請求項 38】

各 m が 1 である、請求項 37 のオリゴマー化合物。

【請求項 39】

各 m が 2 である、請求項 37 のオリゴマー化合物。

【請求項 40】

T₁ および T₂ の少なくとも一方が、H またはヒドロシル保護基である、請求項 37 のオリゴマー化合物。

【請求項 41】

ヒドロシル保護基の各々が、独立に、4, 4'-ジメトキシトリチル、モノメトキシトリチル、9-フェニルキサンテン-9-イル、9-(p-メトキシフェニル)キサンテン-9-イル、t-ブチル、t-ブトキシメチル、メトキシメチル、テトラヒドロピラニル、1-エトキシエチル、1-(2-クロロエトキシ)エチル、2-トリメチルシリルエチル、p-クロロフェニル、2, 4-ジニトロフェニル、ベンジル、2, 6-ジクロロベンジル、ジフェニルメチル、p, p'-ジニトロベンズヒドリル、p-ニトロベンジル、トリフェニルメチル、トリメチルシリル、トリエチルシリル、t-ブチルジメチルシリル、t-ブチルジフェニルシリル、トリフェニルシリル、ベンゾイルホルメート、アセチル、クロロアセチル、トリクロロアセチル、トリフルオロアセチル、ピバロイル、ベンゾイル、p-フェニルベンゾイル、メシル、トシル、4, 4', 4''-トリス-(ベンジルオキ

シ)トリチル、4, 4', 4'' - トリス - (4, 5 - ジクロロフタルイミド)トリチル、4, 4', 4'' - トリス(レプリニルオキシ)トリチル、3 - (イミダゾリルメチル) - 4, 4' - ジメトキシトリチル、4 - デシルオキシトリチル、4 - ヘキサデシルオキシトリチル、9 - (4 - オクタデシルオキシフェニル)キサンテン - 9 - イル、1, 1 - ビス - (4 - メトキシフェニル) - 1' - ピレニルメチル、p - フェニルアゾフェニルオキシカルボニル、9 - フルオレニル - メトキシカルボニル、2, 4 - ジニトロフェニルエトキシカルボニル、4 - (メチルチオメトキシ)ブチリル、2 - (メチルチオメトキシメチル) - ベンゾイル、2 - (イソプロピルチオメトキシメチル)ベンゾイル、2 - (2, 4 - ジニトロベンゼンスルフェニルオキシメチル)ベンゾイル、またはレプリニル基である、請求項40のオリゴマー化合物。

10

【請求項42】

T₁ および T₂ の一方が、支持体への共有結合である、請求項37のオリゴマー化合物。

【請求項43】

支持体が、調節孔ガラス、オキサリル調節孔ガラス、シリカ含有粒子、ポリスチレンのポリマー、ポリスチレンのコポリマー、スチレンおよびジビニルベンゼンのコポリマー、ジメチルアクリルアミドおよびN, N' - ビスアクリロイルエチレンジアミンのコポリマー、可溶性支持体、またはPEPSである、請求項42のオリゴマー化合物。

【請求項44】

各L₁、L₂ および L₃ が、独立に、ホスホジエステルまたはホスホロチオエート・ヌクレオシド間連結基である、請求項37のオリゴマー化合物。

20

【請求項45】

各L₁、L₂ および L₃ が、ホスホジエステル・ヌクレオシド間連結基である、請求項44のオリゴマー化合物。

【請求項46】

各B_xが、独立に、アデニン、グアニン、チミン、シトシン、ウラシル、5 - メチルシトシン、5 - ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2 - アミノアデニン、アデニンおよびグアニンのアルキル誘導体、2 - チオウラシル、2 - チオチミン、2 - チオシトシン、5 - ハロウラシル、5 - ハロシトシン、5 - プロピニルウラシル、5 - プロピニルシトシン、6 - アゾウラシル、6 - アゾシトシン、6 - アゾチミン、5 - ウラシル(シュードウラシル)、4 - チオウラシル、8 - 置換アデニン類およびグアニン類、5 - 置換ウラシル類およびシトシン類、7 - メチルグアニン、7 - メチルアデニン、8 - アザグアニン、8 - アザアデニン、7 - デアザグアニン、7 - デアザアデニン、3 - デアザグアニン、または3 - デアザアデニンである、請求項37のオリゴマー化合物。

30

【請求項47】

n_a が1 ~ 約5である、請求項37のオリゴマー化合物。

【請求項48】

n_a が1 ~ 約3である、請求項37のオリゴマー化合物。

【請求項49】

n_a が2 ~ 約3である、請求項37のオリゴマー化合物。

40

【請求項50】

n_c が2 ~ 約5である、請求項37のオリゴマー化合物。

【請求項51】

n_c が2 ~ 約3である、請求項37のオリゴマー化合物。

【請求項52】

n_b が12 ~ 約18である、請求項37のオリゴマー化合物。

【請求項53】

n_b が12 ~ 約16である、請求項37のオリゴマー化合物。

【請求項54】

n_b が14 ~ 約16である、請求項37のオリゴマー化合物。

50

【請求項 55】

n a、n b および n c の合計が 14 ~ 約 30 である、請求項 37 のオリゴマー化合物。

【請求項 56】

n a、n b および n c の合計が 14 ~ 24 である、請求項 37 のオリゴマー化合物。

【請求項 57】

n a、n b および n c の合計が 14 ~ 21 である、請求項 37 のオリゴマー化合物。

【請求項 58】

n a、n b および n c の合計が 16 ~ 21 である、請求項 37 のオリゴマー化合物。

【請求項 59】

n a が 1 ~ 約 3 であり、n b が 12 または 13 であり、そして n c が 2 または 3 である、請求項 37 のオリゴマー化合物。 10

【請求項 60】

n a が 3 であり、n b が 12 であり、そして n c が 3 である、請求項 37 のオリゴマー化合物。

【請求項 61】

n a が 1 ~ 約 3 であり、n b が 14 または 15 であり、そして n c が 2 または 3 である、請求項 37 のオリゴマー化合物。

【請求項 62】

n a が 2 であり、n b が 14 であり、そして n c が 2 である、請求項 37 のオリゴマー化合物。 20

【請求項 63】

n a が 1 ~ 約 3 であり、n b が 16 または 17 であり、そして n c が 2 または 3 である、請求項 37 のオリゴマー化合物。

【請求項 64】

n a が 2 であり、n b が 16 であり、そして n c が 2 である、請求項 37 のオリゴマー化合物。

【請求項 65】

遺伝子発現を阻害する方法であって、1 以上の細胞、組織、または動物と、請求項 37 のオリゴマー化合物を接触させることを含む、前記方法。

【発明の詳細な説明】 30

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、新規二環糖部分を含むヌクレオシド組成物、およびこうしたヌクレオシドを少なくとも 1 つ含むオリゴマー化合物に関する。本発明のオリゴマー化合物は、典型的には、非修飾オリゴマー化合物に比較して、増進した結合親和性を有するであろう。該オリゴマー化合物は、例えば研究目的および療法目的に有用である。

【0002】

発明の背景

多細胞生物における疾患状態のほぼすべてに、タンパク質の作用が関与する。古典的な療法アプローチは、タンパク質の疾患誘引活性または疾患増強活性を抑える試みの中で、タンパク質と他の分子の相互作用に重点を置いてきた。より最近の療法アプローチでは、タンパク質産生の調節が追求されてきている。現在の療法アプローチのいくつかの一般的な目的は、遺伝子発現に干渉するか、または別の方式で遺伝子発現を調節することである。 40

【0003】

特定の遺伝子の発現を阻害する 1 つの方法は、オリゴヌクレオチド、特に特定の標的メッセンジャー RNA (mRNA) 配列に相補的なオリゴヌクレオチドの使用を伴う。近年、前途有望な研究結果が得られているため、オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド類似体は、現在、療法および診断法に優れた見込みを持つ療法剤として認められている 50

。

【0004】

オリゴヌクレオチドおよびその類似体は、特定の特性を有するように設計することも可能である。オリゴマー化合物には、療法剤としての有用性を増す、いくつかの化学的修飾が導入されてきている。こうした修飾には、標的鎖への結合親和性を増加させ、細胞浸透を増加させ、オリゴヌクレオチドの構造または活性を分解するかまたはそれに干渉するヌクレアーゼおよび他の酵素に対して安定化させ、オリゴヌクレオチドがひとたび標的に結合したならば、分解の様式（終結事象）を提供し、そしてオリゴヌクレオチドの薬物動態学的特性を改善するように設計されたものが含まれる。

【0005】

コンホメーション的にロックされた、二環糖部分を有する二環ヌクレオシド化合物の1つの群は、ロック化核酸またはLNAである（Koshkinら, Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630; 米国特許第6,268,490号および第6,670,461号）。これらの化合物はまた、文献中で、二環ヌクレオチド類似体（国際特許出願WO 98/39352）とも称されるが、この用語はまた、LNAに加えて他の類似体を含む化合物属にも適用可能である。LNAは、リボヌクレオシド模倣体（mimics）が望まれる、多くの研究で用いられてきている。こうした修飾ヌクレオシドは、天然リボヌクレオシドの3'-エンド糖コンホメーションを模倣し、結合親和性が増進し、そしてヌクレアーゼに対する耐性が増加する利点がある。LNAは、以下により徹底的に論じられる。

【0006】

1つのグループが、LNAの2', 4' 架橋基に、さらなるメチレン基を付加している（例えば4'-CH₂-CH₂-O-2'（ENA）、Kanekoら、米国特許出願第U.S. 2002/0147332号、日本特許出願HEI-11-33863、1999年2月12日；米国特許出願公報第2003/0207841号および第2002/0147332号もまた参照されたい）。

【0007】

別の公報は、多様な立体配置および化学的組成を有する二環糖を生成する多様な架橋を伴う多様な二環糖部分を有する、ヌクレオシドの大きな属を報告する（米国特許出願公報第US 2002/0068708号）。

【0008】

これらの進歩にもかかわらず、当該技術分野には、オリゴマー化合物の結合親和性およびヌクレアーゼ耐性特性を改善する手段の開発に対する必要性が存在する。

発明の簡単な概要

本発明は、構造 $T_1 - (Nu_1 - L_1)_{n_1} - (Nu_2 - L_2)_{n_2} - (Nu_3 - L_3)_{n_3} - T_2$ 、式中、各 Nu_1 および Nu_3 は、独立に、高親和性修飾ヌクレオシドであり、ここで、 Nu_1 の少なくとも1つのヌクレオシドおよび/または Nu_3 の少なくとも1つのヌクレオシドが、4'-CH₂-O-2' 架橋または4'-(CH₂)₂-O-2' 架橋を含む、二環糖修飾ヌクレオシドである、を含むオリゴマー化合物を提供する。各 Nu_2 は2'-デオキシヌクレオシドであり、そして各 L_1 、 L_2 および L_3 は、独立に、ヌクレオシド間連結基である。各 T_1 および T_2 は、独立に、H、ヒドロキシル保護基、場合によって連結されるコンジュゲート基、または固体支持体への共有結合である。 n_1 は1～約6であり、 n_2 は11～約18であり、そして n_3 は2～約6である。

【0009】

いくつかの態様において、高親和性修飾ヌクレオシドの各々は、独立に、二環糖修飾ヌクレオシド、2'-O-(CH₂)₂-O-CH₃ 修飾ヌクレオシド、2'-F 修飾ヌクレオシド、または2'-O-CH₂-C(=O)-NR₁R₂ 修飾ヌクレオシドである、ここで各 R_1 および R_2 は、独立に、H、窒素保護基、置換または非置換C₁-C₁₀ アルキル、置換または非置換C₂-C₁₀ アルケニル、置換または非置換C₂-C₁₀ アルキニルである、ここで置換は、OR₃、SR₃、NH₃⁺、NR₃R₄、グアニジノまた

10

20

30

40

50

はアシルである、ここでアシルは酸アミドまたはエステルであるか、あるいは R_1 および R_2 が一緒に窒素保護基であるか、または N および O から選択されるさらなるヘテロ原子の場合によって含む環構造において、 R_1 および R_2 が連結されている。

【0010】

いくつかの態様において、ヒドロキシル保護基の各々は、独立に、4, 4'-ジメトキシトリチル、モノメトキシトリチル、9-フェニルキサンテン-9-イル、9-(p-メトキシフェニル)キサンテン-9-イル、t-ブチル、t-ブトキシメチル、メトキシメチル、テトラヒドロピラニル、1-エトキシエチル、1-(2-クロロエトキシ)エチル、2-トリメチルシリルエチル、p-クロロフェニル、2, 4-ジニトロフェニル、ベンジル、2, 6-ジクロロベンジル、ジフェニルメチル、p, p-ジニトロベンズヒドリル、p-ニトロベンジル、トリフェニルメチル、トリメチルシリル、トリエチルシリル、t-ブチルジメチルシリル、t-ブチルジフェニルシリル、トリフェニルシリル、ベンゾイルホルメート、アセチル、クロロアセチル、トリクロロアセチル、トリフルオロアセチル、ピバロイル、ベンゾイル、p-フェニルベンゾイル、メシル、トシル、4, 4', 4"-トリス-(ベンジルオキシ)トリチル、4, 4', 4"-トリス-(4, 5-ジクロロフタルイミド)トリチル、4, 4', 4"-トリス(レプリニルオキシ)トリチル、3-(イミダゾリルメチル)-4, 4'-ジメトキシトリチル、4-デシルオキシトリチル、4-ヘキサデシルオキシトリチル、9-(4-オクタデシルオキシフェニル)キサンテン-9-イル、1, 1-ビス-(4-メトキシフェニル)-1'-ピレニルメチル、p-フェニルアゾフェニルオキシカルボニル、9-フルオレニル-メトキシカルボニル、2, 4-ジニトロフェニルエトキシカルボニル、4-(メチルチオメトキシ)ブチリル、2-(メチルチオメトキシメチル)-ベンゾイル、2-(イソプロピルチオメトキシメチル)ベンゾイル、2-(2, 4-ジニトロベンゼンスルフェニルオキシメチル)ベンゾイル、またはレプリニル基である。

10

20

【0011】

いくつかの態様において、支持体は、調節孔ガラス、オキサリル調節孔ガラス、シリカ含有粒子、ポリスチレンのポリマー、ポリスチレンのコポリマー、スチレンおよびジビニルベンゼンのコポリマー、ジメチルアクリルアミドおよび N, N'-ビスアクリロイルエチレンジアミンのコポリマー、可溶性支持体、または PEP S である。

【0012】

いくつかの態様において、各 L_1 、 L_2 および L_3 は、独立に、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、キラル・ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、メチルホスホネート、アルキルホスホネート、5'-アルキレンホスホネート、キラル・ホスホネート、ホスフィネート、ホスホロアミデート、3'-アミノホスホロアミデート、アミノアルキルホスホロアミデート、チオホスホロアミデート、チオアルキルホスホネート、チオアルキルホスホトリエステル、セレノホスフェート、ボラノホスフェート、シロキサン、スルフィド、スルホキシド、スルホン、ホルムアセチル、チオホルムアセチル、メチレンホルムアセチル、チオホルムアセチル、スルファメート、メチレンイミノ、メチレンヒドラジノ、スルホネート、スルホンアミド、またはアミドである。いくつかの態様において、ヌクレオシド間連結基の各々は、独立に、 $-CH_2-NH-O-CH_2-$ 、 $-CH_2-N(CH_3)-O-CH_2-$ 、または $-CH_2-O-N(CH_3)-CH_2-$ 、 $-CH_2-N(CH_3)-N(CH_3)-CH_2-$ 、または $-O-N(CH_3)-CH_2-CH_2-$ である。

30

40

【0013】

いくつかの態様において、各ヌクレオシドは、独立に、アデニン、グアニン、チミン、シトシン、ウラシル、5-メチルシトシン、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、アデニンおよびグアニンのアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミン、2-チオシトシン、5-ハロウラシル、5-ハロシトシン、5-プロピニルウラシル、5-プロピニルシトシン、6-アゾウラシル、6-アゾシトシン、6-アゾチミン、5-ウラシル(シュードウラシル)、4-チオウラシル、8

50

- 置換アデニン類およびグアニン類、5 - 置換ウラシル類およびシトシン類、7 - メチルグアニン、7 - メチルアデニン、8 - アザグアニン、8 - アザアデニン、7 - デアザグアニン、7 - デアザアデニン、3 - デアザグアニン、または3 - デアザアデニンである複素環塩基部分を含む。

【0014】

いくつかの態様において、 n_1 は、1 ~ 約5、または1 ~ 約3、または2 ~ 約3である。いくつかの態様において、 n_3 は、2 ~ 約5、または2 ~ 約3である。いくつかの態様において、 n_2 は、12 ~ 約18、または12 ~ 約16、または14 ~ 約16である。いくつかの態様において、 n_1 、 n_2 および n_3 の合計は、14 ~ 約30、または14 ~ 24、または14 ~ 21、または16 ~ 21である。いくつかの態様において、 n_1 は1 ~ 約3であり、 n_2 は12または13であり、そして n_3 は2または3であるか；あるいは n_1 は3であり、 n_2 は12であり、そして n_3 は3であるか；あるいは n_1 は1 ~ 約3であり、 n_2 は14または15であり、そして n_3 は2または3であるか；あるいは n_1 は2であり、 n_2 は14であり、そして n_3 は2であるか；あるいは n_1 は1 ~ 約3であり、 n_2 は16または17であり、そして n_3 は2または3であるか；あるいは n_1 は2であり、 n_2 は16であり、そして n_3 は2である。

10

【0015】

いくつかの態様において、少なくとも1つの Nu_1 ヌクレオシドおよび少なくとも1つの Nu_3 ヌクレオシドは、LNAまたはENAである。いくつかの態様において、最も5'末端または最も3'末端の親和性修飾ヌクレオシドの少なくとも一方は、LNAまたはENAである。

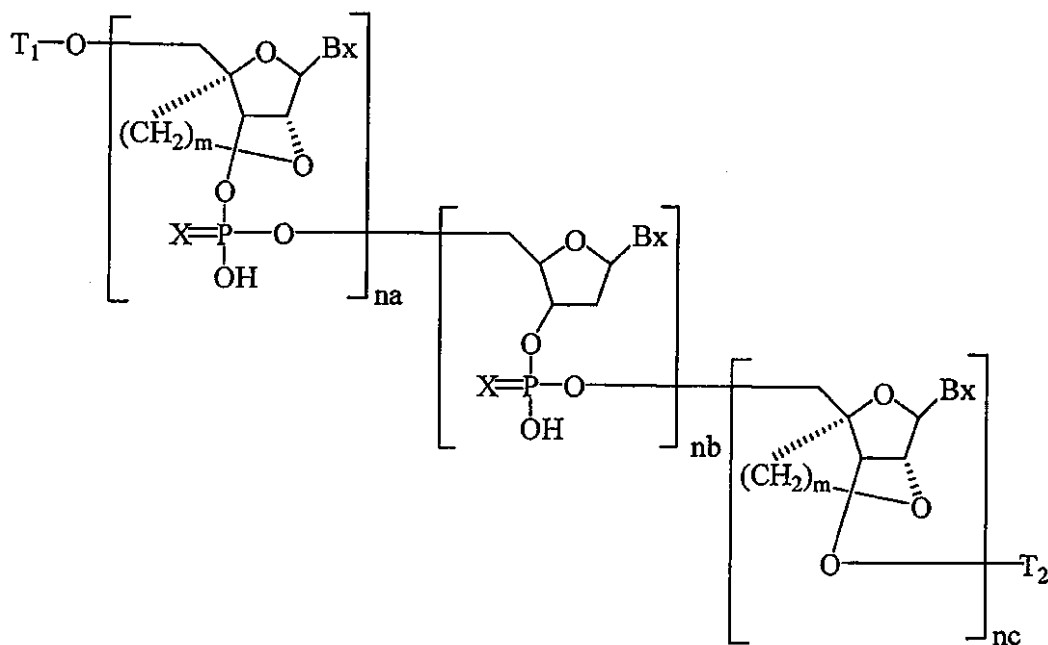
20

【0016】

本発明はまた、構造：

【0017】

【化1】



30

40

【0018】

式中、各Bxは複素環塩基部分であり；各Xは、独立に、OまたはSであり； T_1 および T_2 は、各々、独立に、H、ヒドロキシ保護基、場合によって連結されるコンジュゲート基、または固体支持体(support medium)への共有結合であり；各mは、独立に、1または2であり；naは1 ~ 約6であり；nbは11 ~ 約18であり；そしてncは2 ~ 約6である。

を含むオリゴマー化合物も提供する。

【0019】

50

いくつかの態様において、各 m は 1 または 2 である。いくつかの態様において、 T_1 および T_2 の少なくとも一方は、 H またはヒドロキシル保護基、例えば、4, 4' - ジメトキシトリチル、モノメトキシトリチル、9 - フェニルキサンテン - 9 - イル、9 - (p - メトキシフェニル) キサンテン - 9 - イル、 t - ブチル、 t - ブトキシメチル、メトキシメチル、テトラヒドロピラニル、1 - エトキシエチル、1 - (2 - クロロエトキシ) エチル、2 - トリメチルシリルエチル、 p - クロロフェニル、2, 4 - ジニトロフェニル、ベンジル、2, 6 - ジクロロベンジル、ジフェニルメチル、 p , p - ジニトロベンズヒドリル、 p - ニトロベンジル、トリフェニルメチル、トリメチルシリル、トリエチルシリル、 t - ブチルジメチルシリル、 t - ブチルジフェニルシリル、トリフェニルシリル、ベンゾイルホルメート、アセチル、クロロアセチル、トリクロロアセチル、トリフルオロアセチル、10
 ピバロイル、ベンゾイル、 p - フェニルベンゾイル、メシル、トシル、4, 4', 4'' - トリス - (ベンジルオキシ) トリチル、4, 4', 4'' - トリス - (4, 5 - ジクロロフタルイミド) トリチル、4, 4', 4'' - トリス (レプリニルオキシ) トリチル、3 - (イミダゾリルメチル) - 4, 4' - ジメトキシトリチル、4 - デシルオキシトリチル、4 - ヘキサデシルオキシトリチル、9 - (4 - オクタデシルオキシフェニル) キサンテン - 9 - イル、1, 1 - ビス - (4 - メトキシフェニル) - 1' - ピレニルメチル、 p - フェニルアゾフェニルオキシカルボニル、9 - フルオレニル - メトキシカルボニル、2, 4 - ジニトロフェニルエトキシカルボニル、4 - (メチルチオメトキシ) ブチリル、2 - (メチルチオメトキシメチル) - ベンゾイル、2 - (イソプロピルチオメトキシメチル) ベンゾイル、2 - (2, 4 - ジニトロベンゼンスルフェニルオキシメチル) ベンゾイル、20
 またはレプリニル基である。

【0020】

いくつかの態様において、支持体は、調節孔ガラス、オキサリル調節孔ガラス、シリカ含有粒子、ポリスチレンのポリマー、ポリスチレンのコポリマー、スチレンおよびジビニルベンゼンのコポリマー、ジメチルアクリルアミドおよび N , N' - ビスアクリロイルエチレンジアミンのコポリマー、可溶性支持体、または PEP S である。

【0021】

いくつかの態様において、各 B_x は、独立に、アデニン、グアニン、チミン、シトシン、ウラシル、5 - メチルシトシン、5 - ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2 - アミノアデニン、アデニンおよびグアニンのアルキル誘導体、2 - チオウラシル、2 - チオチミン、2 - チオシトシン、5 - ハロウラシル、5 - ハロシトシン、5 - プロピニルウラシル、5 - プロピニルシトシン、6 - アゾウラシル、6 - アゾシトシン、6 - アゾチミン、5 - ウラシル (シュードウラシル)、4 - チオウラシル、8 - 置換アデニン類およびグアニン類、5 - 置換ウラシル類およびシトシン類、7 - メチルグアニン、7 - メチルアデニン、8 - アザグアニン、8 - アザアデニン、7 - デアザグアニン、7 - デアザアデニン、3 - デアザグアニン、または 3 - デアザアデニンである。

【0022】

いくつかの態様において、 n_a は、1 ~ 約 5、または 1 ~ 約 3、または 2 ~ 約 3 である。いくつかの態様において、 n_c は、2 ~ 約 5、または 2 ~ 約 3 である。いくつかの態様において、 n_b は、12 ~ 約 18、または 12 ~ 約 16、または 14 ~ 約 16 である。いくつかの態様において、 n_a 、 n_b および n_c の合計は、14 ~ 約 30、または 14 ~ 24、または 14 ~ 21、または 16 ~ 21 である。いくつかの態様において、 n_a は 1 ~ 約 3 であり、 n_b は 12 または 13 であり、そして n_c は 2 または 3 であるか；あるいは n_a は 3 であり、 n_b は 12 であり、そして n_c は 3 であるか；あるいは n_a は 1 ~ 約 3 であり、 n_b は 14 または 15 であり、そして n_c は 2 または 3 であるか；あるいは n_a は 2 であり、 n_b は 14 であり、そして n_c は 2 であるか；あるいは n_a は 1 ~ 約 3 であり、 n_b は 16 または 17 であり、そして n_c は 2 または 3 であるか；あるいは n_a は 2 であり、 n_b は 16 であり、そして n_c は 2 である。

【0023】

本発明はまた、遺伝子発現を阻害する方法であって、1 以上の細胞、組織、または動物

10

20

30

40

50

と、本明細書記載のオリゴマー化合物いずれかを接触させることを含む、前記方法も提供する。

【0024】

発明の詳細な説明

本発明は、二環ヌクレオシド類似体、およびこれらの二環ヌクレオシド類似体を少なくとも1つ有するオリゴマー化合物を提供する。二環ヌクレオシド類似体の各々は、リボフラノース糖部分の2'位および4'位間に架橋を有する。これらの二環ヌクレオシド類似体を少なくとも1つ有するオリゴマー化合物は、遺伝子発現の調節に有用であろう。より具体的には、本発明のオリゴマー化合物は、核酸標的にハイブリダイズして、標的核酸の正常な機能の損失を生じることによって、遺伝子発現を調節するのである。

10

【0025】

本発明は、デオキシヌクレオシドをギャップ中に有し、そして非修飾ヌクレオシドに比較して増進した親和性を有するように修飾されたヌクレオシドをウィング中に有するギャップ化オリゴヌクレオシドを提供する。適切な連結には、ホスホロチオエート、ホスホジエステル、並びにホスホロチオエートおよびホスホジエステルの組み合わせが含まれる。増進した親和性を有するヌクレオシド（高親和性修飾ヌクレオシド）の少なくとも1つは、二環糖部分を含む。

【0026】

二環糖部分を有する適切なヌクレオシドには、リボシル糖環の2'-ヒドロキシル基が、糖環の4'炭素原子に連結して、それによって2'-C、4'-C-オキシメチレン連結を形成して、二環糖部分を連結する、「ロック化核酸」(LNA)が含まれる(Elayadiら, Curr. Opinion Inven. Drugs, 2001, 2, 558-561; Braaschら, Chem. Biol., 2001, 8, 1-7; およびOrumら, Curr. Opinion Mol. Ther., 2001, 3, 239-243に概説される; 米国特許6,268,490および6,670,461もまた参照されたい)。用語、ロック化核酸はまた、文献中で、糖コンホメーションをロックするいかなる二環構造も含むように、より広い意味でも用いられてきており、例えば、1つの配向において、糖を3'-エンド・コンホメーションにロックする、前述の2'-C、4'-C-オキシメチレン連結も含まれる。

20

【0027】

二環糖部分を有する適切なヌクレオシドにはまた、ENATMも含まれ、この場合、過剰なメチレン基が架橋に付加されてENATMが生じる(2'-O、4'-エチレン架橋核酸、4'-(CH₂)₂-O-2'; Singhら, Chem. Commun., 1998, 4, 455-456; ENA: Moritaら, Bioorganic Medicinal Chemistry, 2003, 11, 2211-2266)。架橋を有するものを含む二環糖部分、例えば4'-(CH₂)_n-O-2'、式中、nは1または2である、は、相補的DNAおよびRNAとの非常に高い二重鎖熱安定性(T_m=+3~+10°C)、3'-エキソ核酸分解に対する安定性、および優れた可溶性を示す。LNAは、ProLigo(フランス・パリおよび米国コロラド州ボルダー)から商業的に入手可能であり、そしてENATMは、Sigma Genosys Japanから商業的に入手可能である。

30

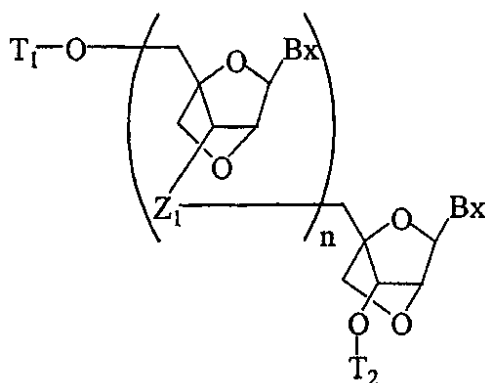
40

【0028】

二環系を示すLNAの基本的な構造を以下に示す：

【0029】

【化 2】



10

【0030】

式中、 n は多様であることも可能であるが、日常的に調製されるのは1～約40であり、各 T_1 および T_2 は、独立に、水素、ヒドロキシル保護基、連結されたヌクレオシドまたは連結されたオリゴマー化合物であり、 Bx は複素環塩基部分であり、そして各 Z_1 は、独立に、例えばホスホジエステルまたはホスホロチオエートなどの、ヌクレオシド間連結基である。

【0031】

2D NMR分光法によって決定されるLNAのコンホメーションは、LNAヌクレオチドのロックされた配向によって、一本鎖LNAおよび二重鎖の両方において、N型コンホメーションがより高い割合で導入されるような方式で、リン酸主鎖が拘束されることを示している(Petersenら, J. Mol. Recognit., 2000, 13, 44-53)。これらのコンホメーションは、核酸塩基スタッキングの改善と関連付けられている(Wengelら, Nucleosides Nucleotides, 1999, 18, 1365-1370)。

20

【0032】

LNAは、非常に安定なLNA:LNA二重鎖を形成することが示されてきている(Koshkinら, J. Am. Chem. Soc., 1998, 120, 13252-13253)。LNA:LNAハイブリダイゼーションは、熱的に最も安定な核酸型二重鎖系であることが示され、そしてLNAのRNA模倣特性が、二重鎖レベルで確立された。3つのLNA単量体(TまたはA)を導入すると、DNA相補体に対する融点が増加した($T_m = +15 / +11$)。非常に安定なLNA:LNA二重鎖が形成されることから、LNAが仲介するハイブリダイゼーションが普遍的であることが強調されてきている。LNAのRNA模倣は、単量体のN型コンホメーション拘束に関して、そしてLNA:RNA二重鎖の二次構造に関して、反映された。

30

【0033】

LNAはまた、高い熱親和性で、相補的なDNA、RNAまたはLNAとの二重鎖を形成する。円二色(CD)スペクトルは、完全に修飾されたLNAを含む二重鎖(特にLNA:RNA)が、A型RNA:RNA二重鎖に構造的に似ていることを示す。LNA:DNA二重鎖の核磁気共鳴(NMR)検査によって、LNA単量体が3'-エンド・コンホメーションであることが確認された。二本鎖DNAを認識することもまた立証され、LNAが鎖に侵入することが示唆されている。ミスマッチ配列の研究によって、LNAがワトソン-クリック塩基対形成規則にしがたい、一般的に、対応する非修飾参照鎖に比較して、改善された選択性を持つことが示される。DNA:LNAキメラは、ルシフェラーゼmRNA内の多様な領域(5'非翻訳領域、開始コドン領域またはコード領域)を標的とした際、効率的に遺伝子発現を阻害することが示されてきている(Braaschら, Nucleic Acids Research, 2002, 30, 5160-5167)。

40

【0034】

50

新規種類の LNA - オリゴマー化合物とともに LNA は、広い範囲の診断適用および療法適用に有用である。これらの中には、アンチセンス適用、PCR 適用、鎖置換オリゴマー、核酸ポリメラーゼの基質、および一般的に、ヌクレオチドに基づく薬剤がある。

【0035】

LNA を含有する、強力で、そして非毒性のアンチセンス・オリゴヌクレオチドが記載されてきている (Wahlestedt ら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2000, 97, 5633 - 5638)。著者らは、LNA が、アンチセンス化合物にいくつかの望ましい特性を与えることを立証した。LNA / DNA コポリマーは、血清および細胞抽出物中で、容易には分解しなかった。LNA / DNA コポリマーは、生存ラット脳における G タンパク質共役型受容体シグナル伝達、および大腸菌 (*Escherichia coli*) におけるレポーター遺伝子の検出のように、共通点のないアッセイ系において、強力なアンチセンス活性を示した。リポフェクシンが仲介する、LNA の生存ヒト乳癌細胞への効率的な搬送もまた、達成されてきている。LNA を伴うさらなる *in vivo* 研究によって、毒性なしに、ラット・デルタ・オピオイド受容体のノックダウンが成功することが示され (Wahlestedt ら, Proc. Natl. Acad. Sci., 2000, 97, 5633 - 5638)、そして別の研究において、RNA ポリメラーゼ II の大サブユニットの翻訳が遮断されることが示された (Fluiter ら, Nucleic Acids Res., 2003, 31, 953 - 962)。

10

【0036】

LNA 単量体、アデニン、シトシン、グアニン、5 - メチル - シトシン、チミンおよびウラシルの合成および調製とともに、そのオリゴマー化、並びに核酸認識特性が記載されてきている (Koshkin ら, Tetrahedron, 1998, 54, 3607 - 3630)。LNA およびその調製はまた、WO 98 / 39352 および WO 99 / 14226 にも記載されている。

20

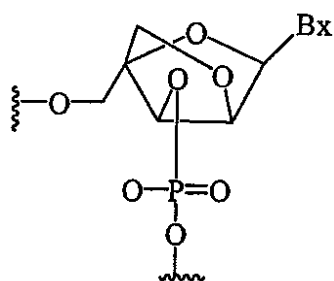
【0037】

やはり研究されている LNA の異性体は、3' - エキソヌクレアーゼに対して、優れた安定性を有することが示されている、- L - LNA である (Frieden ら, Nucleic Acids Research, 2003, 21, 6365 - 6372)。- L - LNA は、アンチセンス・ギャップマーおよびキメラに取り込まれ、これらは強力なアンチセンス活性を示した。- L - LNA の構造を以下に示す：

30

【0038】

【化3】



40

【0039】

調製されそして研究されてきた別の類似の二環糖部分は、糖環の 4' 炭素原子への、単一のメチレン基を介した、3' - ヒドロキシル基からの架橋を有し、それによって、3' - C、4' - C - オキシメチレン連結を形成する (米国特許 6,043,060 を参照されたい)。

【0040】

LNA の第一の類似体、ホスホロチオエート - LNA および 2' - チオ - LNA もまた、調製されている (Kumar ら, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219 - 2222)。核酸ポリメラーゼの基質としてオリゴ

50

デオキシリボヌクレオチド二重鎖を含有するロック化ヌクレオシド類似体の調製もまた、記載されてきている (Wengelら、PCT国際出願WO 98-DK393 19980914)。さらに、ハンドルを含む、新規のコンホメーション制限された高親和性オリゴヌクレオチド類似体、2'-アミノ-LNAの合成が当該技術分野において記載されてきている (Singhら、J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039)。さらに、2'-アミノ-LNAおよび2'-メチルアミノ-LNAが調製され、そして相補RNA鎖および相補DNA鎖との二重鎖の熱安定性が先に報告されている。

【0041】

ENATMは、LNA(4'-(CH₂)-O-2')に類似の特性を有する。ENATMは、DNA/RNAに対して、増進した親和性を有し、ヌクレアーゼ分解に非常に耐性であり、そしてアンチセンス核酸として、研究されてきている (Moritaら、Bioorg. Med. Chem., 2002, 12, 73-76; Moritaら、Bioorg. Med. Chem., 2003, 11, 2211-2226; Moritaら、Nucleic Acids Res. Suppl., 2002, Suppl. 2, 99-100; Moritaら、Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids., 2003, 22, 1619-1621; およびTakagiら、Nucleic Acids Res., 2003, Suppl. 3, 83-84を参照されたい)。

【0042】

本明細書において、用語「標的核酸」および「核酸標的」は、便宜的に、標的とされることが可能ないかなる核酸も含むように用いられ、限定なしに、DNA、こうしたDNAから転写されるRNA(プレ-mRNAおよびmRNAまたはその一部を含む)、およびまたこうしたRNAに由来するcDNAが含まれる。本発明のいくつかの態様において、標的核酸は、RNAアーゼHなどのヌクレアーゼを伴う機構によって分解される、メッセンジャーRNAである。標的核酸と本発明のオリゴマー化合物のハイブリダイゼーションは、一般的に「アンチセンス」と称される。その結果、本発明のいくつかの態様の実施に含まれると考えられる1つの機構は、本明細書において、「アンチセンス阻害」と称される。こうしたアンチセンス阻害は、典型的には、少なくとも1つの鎖またはセグメントが切断され、分解され、または別の方式で機能不能になるように、オリゴヌクレオチド鎖またはセグメントの水素結合に基づくハイブリダイゼーションに基づく。これに関連して、現在、こうしたアンチセンス阻害のため、特定の核酸分子およびその機能を標的とすることが、適切である。

【0043】

干渉されるべきDNAの機能には、限定されるわけではないが、複製および転写が含まれる。複製および転写は、例えば、内因性細胞テンプレート、ベクター、プラスミド構築物またはその他のものからであることも可能である。干渉されるべきRNAの機能には、限定されるわけではないが、タンパク質翻訳部位へのRNAの転写位置、RNA合成部位から離れた細胞内の部位へのRNAの転写位置、RNAからのタンパク質の翻訳、1以上のRNA種を生じるRNAのスプライシング、およびRNAによって作用されうるまたはRNAによって促進される、RNAが関係する触媒活性または複合体形成などの機能が含まれる。

【0044】

本発明の関連において、「調節」および「発現の調節」は、遺伝子をコードする核酸分子、例えばDNAまたはRNAの量またはレベルの増加(刺激)または減少(阻害)いずれかを意味する。阻害は、しばしば、発現調節の好ましい型であり、そしてmRNAは、しばしば、適切な標的核酸である。

【0045】

本発明の化合物

本発明の関連において、用語「オリゴマー化合物」は、核酸分子の領域にハイブリダイ

10

20

30

40

50

ズ可能なポリマー構造を指す。この用語には、オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシド、オリゴヌクレオチド類似体、オリゴヌクレオチド擬似体 (mimetics) およびこれらの組み合わせが含まれる。オリゴマー化合物は、日常的には、直鎖で調製されるが、連結することも可能であるし、または環状であるように調製することも可能であり、そしてまた分枝を含むことも可能である。オリゴマー化合物は、ハイブリダイズして二本鎖化合物を形成することも可能であり、こうした二本鎖化合物は、平滑末端であることも可能であるし、また突出部 (overhang) を含むことも可能である。一般的に、オリゴマー化合物は、連結単量体サブユニットの主鎖を含み、ここで各連結単量体サブユニットは、直接または間接的に複素環塩基部分に付着する。単量体サブユニット、糖部分または代用物 (surrogates) および複素環塩基部分をつなぐ連結を、独立に修飾して、複数のモチーフを生じさせ、その結果、ヘミマー、ギャップマー、およびキメラを含む、オリゴマー化合物を生じることも可能である。

10

【0046】

当該技術分野に知られるように、ヌクレオシドは塩基 - 糖の組み合わせである。ヌクレオシドの塩基部分は、通常、複素環塩基部分である。こうした複素環塩基の2つの最も一般的な種類は、プリン類およびピリミジン類である。ヌクレオチドは、ヌクレオシドの糖部分に共有結合するリン酸基をさらに含む、ヌクレオシドである。ペントフラノシル糖を含むヌクレオシドに関しては、リン酸基は、該糖の2'、3'または5'ヒドロキシル部分のいずれに連結することも可能である。オリゴヌクレオチドを形成する際、リン酸基は、互いに、隣接するヌクレオシドと共有結合して、直鎖ポリマー化合物を形成する。ハイブリダイゼーションによって、または共有結合の形成によって、この直鎖ポリマー構造のそれぞれの端をつないで、環状構造を形成することも可能であるが、開いた直鎖構造が、一般的に適切である。オリゴヌクレオチド構造内で、リン酸基は、一般的に、オリゴヌクレオチドのヌクレオシド間連結を形成すると称される。RNAおよびDNAの通常のヌクレオシド間連結は、3' - 5'ホスホジエステル連結である。

20

【0047】

本発明の関連において、用語「オリゴヌクレオチド」は、リボ核酸 (RNA) またはデオキシリボ核酸 (DNA) のオリゴマーまたはポリマーを指す。この用語には、天然に存在する核酸塩基、糖および共有ヌクレオシド間連結で構成されるオリゴヌクレオチドが含まれる。用語「オリゴヌクレオチド類似体」は、オリゴヌクレオチドに類似の方式で機能する、1以上の非天然存在部分を有するオリゴヌクレオチドを指す。こうした非天然存在オリゴヌクレオチドは、例えば、細胞取り込み増進、核酸標的に対する増進した親和性、およびヌクレアーゼの存在下での増加した安定性などの望ましい特性のため、しばしば、天然存在型より望ましい。

30

【0048】

本発明の関連において、用語「オリゴヌクレオシド」は、リン原子を持たないヌクレオシド間連結によってつながれるヌクレオシドを指す。この種のヌクレオシド間連結には、短鎖アルキル、シクロアルキル、混合ヘテロ原子アルキル、混合ヘテロ原子シクロアルキル、1以上の短鎖ヘテロ原子および1以上の短鎖複素環が含まれる。これらのヌクレオシド間連結には、限定されるわけではないが、シロキサン、スルフィド、スルホキシド、スルホン、アセチル、ホルムアセチル、チオホルムアセチル、メチレンホルムアセチル、チオホルムアセチル、アルケニル、スルファメート；メチレンイミノ、メチレンヒドラジノ、スルホネート、スルホンアミド、アミド、並びに混合N、O、SおよびCH₂構成要素部分を有する他のものが含まれる。

40

【0049】

上記のオリゴヌクレオシドの調製を解説する代表的な米国特許には、限定されるわけではないが、U.S. : 5,034,506 ; 5,166,315 ; 5,185,444 ; 5,214,134 ; 5,216,141 ; 5,235,033 ; 5,264,562 ; 5,264,564 ; 5,405,938 ; 5,434,257 ; 5,466,677 ; 5,470,967 ; 5,489,677 ; 5,541,307 ; 5,561,225 ;

50

5, 596, 086; 5, 602, 240; 5, 610, 289; 5, 602, 240;
5, 608, 046; 5, 610, 289; 5, 618, 704; 5, 623, 070;
5, 663, 312; 5, 633, 360; 5, 677, 437; 5, 792, 608;
5, 646, 269および5, 677, 439が含まれる。

【0050】

本発明にさらに含まれるのは、アンチセンス・オリゴマー化合物、アンチセンス・オリゴヌクレオチド、リボザイム、外部ガイド配列 (EGS) オリゴヌクレオチド、選択的スプライサー、プライマー、プローブ、および標的核酸の少なくとも一部にハイブリダイズする他のオリゴマー化合物などのオリゴマー化合物である。こうしたものとして、これらのオリゴマー化合物は、一本鎖、二本鎖、環状またはヘアピン・オリゴマー化合物の形で導入されることも可能であり、そして内部または末端のバルジまたはループなどの構造要素を含有することも可能である。系にひとたび導入されたら、本発明のオリゴマー化合物は、1以上の酵素または構造タンパク質の作用を誘発して、標的核酸の修飾を達成することも可能である。

10

【0051】

こうした酵素の1つの限定されない例は、RNA:DNA二重鎖のRNA鎖を切断する細胞性エンドヌクレアーゼ、RNAアーゼHである。当該技術分野には、「DNA様」の一本鎖アンチセンス・オリゴマー化合物が、RNAアーゼHを誘発することが知られる。したがって、RNAアーゼHの活性化は、RNA標的の切断を生じ、それによって、オリゴヌクレオチドが仲介する遺伝子発現阻害の効率が非常に増進する。RNAアーゼIIIおよびリボヌクレアーゼL酵素ファミリー中のものなどの他のリボヌクレアーゼに関して、類似の役割が推論されてきている。

20

【0052】

アンチセンス・オリゴマー化合物の1つの型は、一本鎖アンチセンス・オリゴヌクレオチドであるが、多くの種では、二本鎖RNA (dsRNA) 分子などの二本鎖構造を導入すると、アンチセンスが仲介する、遺伝子またはその関連遺伝子産物の機能の、強力で、そして特異的な減少が誘導されることが示されてきている。この現象は、植物および動物の両方で起こり、そしてウイルス防御およびトランスポゾン・サイレンシングに進化的な連関を有すると考えられる。

【0053】

上述の修飾に加えて、多様な他の修飾が、単独で、または他のヌクレオシドと組み合わせて、上述の望ましい特性の1以上を増進する限り、本発明のオリゴマー化合物のヌクレオシドは、これらの他の修飾を有することも可能である。したがって、本発明のオリゴヌクレオチドに取り込まれたヌクレオチドに関しては、これらのヌクレオチドは、天然存在の糖または修飾された糖に対応する糖部分を有することも可能である。代表的な修飾された糖には、炭素環または非環糖、2'位、3'位または4'位の1以上に置換基を有する糖、および糖の1以上の水素原子の代わりに置換基を有する糖が含まれる。改変された塩基部分およびまたは改変された糖部分を有する、本発明に受け入れられるさらなるヌクレオシドが、米国特許3,687,808およびPCT出願PCT/US89/02323に開示される。

30

40

【0054】

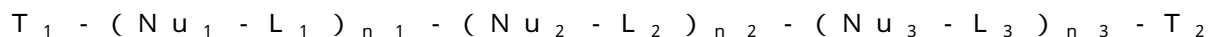
改変された塩基部分または改変された糖部分にはまた、本発明の要旨と一致した他の修飾も含まれる。こうしたオリゴヌクレオチドは、最適には、天然存在または合成の野生型オリゴヌクレオチドと、構造的に区別可能であるが、それでもなお機能的に交換可能なものとして説明される。こうしたオリゴヌクレオチドはすべて、これらが望ましいRNA鎖またはDNA鎖の構造を模倣するように、有効に機能する限り、本発明に含まれる。代表的な塩基修飾の種類には、「Gクランプ」と称される三環シトシン類似体が含まれる (Linら, J. Am. Chem. Soc., 1998, 120, 8531)。この類似体は、標的とされるグアニン (G) のワトソン-クリック面およびフーグステーン面を同時に認識することによって、らせん内の相補Gに対して、4つの水素結合を

50

作る。このGクランプ修飾がホスホロチオエート・オリゴヌクレオチドに取り込まれると、細胞培養において、アンチセンス有効性が劇的に増進する。本発明のオリゴヌクレオチドにはまた、Flanaganら, Nat. Biotechnol., 1999, 17, 48-52に開示される型のフェノキサジン置換塩基が含まれることも可能である。

【0055】

本発明は、構造：



式中：

各 Nu_1 および Nu_3 は、独立に、高親和性修飾ヌクレオシドであり、ここで、 Nu_1 および Nu_3 の少なくとも一方が、4'-CH₂-O-2'架橋または4'-(CH₂)₂-O-2'架橋を含む、二環糖修飾ヌクレオシドである；

各 Nu_2 は2'-デオキシヌクレオシドであり；

各 L_1 、 L_2 および L_3 は、独立に、ヌクレオシド間連結基であり；

各 T_1 および T_2 は、独立に、H、ヒドロキシ保護基、場合によって連結されるコンジュゲート基、または固体支持体への共有結合であり；

n_1 は1～約6であり；

n_2 は11～約18であり；そして

n_3 は2～約6である

を含むオリゴマー化合物を提供する。

【0056】

いくつかの態様において、高親和性修飾ヌクレオシドの各々は、独立に、二環糖修飾ヌクレオシド、2'-O-(CH₂)₂-O-CH₃修飾ヌクレオシド、2'-F修飾ヌクレオシド、または2'-O-CH₂-C(=O)-NR₁R₂修飾ヌクレオシドである、ここで各 R_1 および R_2 は、独立に、H、窒素保護基、置換または非置換C₁-C₁₀アルキル、置換または非置換C₂-C₁₀アルケニル、置換または非置換C₂-C₁₀アルキニルである、ここで置換は、OR₃、SR₃、NH₃⁺、NR₃R₄、グアニジノまたはアシルである、ここでアシルは酸アミドまたはエステルであるか、あるいは R_1 および R_2 と一緒に窒素保護基であるか、またはNおよびOから選択されるさらなるヘテロ原子を場合によって含む環構造において、 R_1 および R_2 が連結されている。いくつかの態様において、各 R_1 および R_2 は、独立に、H、窒素保護基、またはC₁-C₁₀アルキルである。いくつかの態様において、 T_1 はHまたはヒドロキシル保護基である。いくつかの態様において、 T_2 はHまたはヒドロキシル保護基である。

【0057】

いくつかの態様において、ヒドロキシル保護基の各々は、独立に、4,4'-ジメトキシトリチル、モノメトキシトリチル、9-フェニルキサントゲン-9-イル、9-(p-メトキシフェニル)キサントゲン-9-イル、t-ブチル、t-ブトキシメチル、メトキシメチル、テトラヒドロピラニル、1-エトキシエチル、1-(2-クロロエトキシ)エチル、2-トリメチルシリルエチル、p-クロロフェニル、2,4-ジニトロフェニル、ベンジル、2,6-ジクロロベンジル、ジフェニルメチル、p,p-ジニトロベンズヒドリル、p-ニトロベンジル、トリフェニルメチル、トリメチルシリル、トリエチルシリル、t-ブチルジメチルシリル、t-ブチルジフェニルシリル、トリフェニルシリル、ベンゾイルホルメート、アセチル、クロロアセチル、トリクロロアセチル、トリフルオロアセチル、ピバロイル、ベンゾイル、p-フェニルベンゾイル、メシル、トシル、4,4',4''-トリス-(ベンジルオキシ)トリチル、4,4',4''-トリス-(4,5-ジクロロフタルイミド)トリチル、4,4',4''-トリス(レプリニルオキシ)トリチル、3-(イミダゾリルメチル)-4,4'-ジメトキシトリチル、4-デシルオキシトリチル、4-ヘキサデシルオキシトリチル、9-(4-オクタデシルオキシフェニル)キサントゲン-9-イル、1,1-ビス-(4-メトキシフェニル)-1'-ピレニルメチル、p-フェニルアゾフェニルオキシカルボニル、9-フルオレニル-メトキシカルボニル、2,4

- ジニトロフェニルエトキシカルボニル、4 - (メチルチオメトキシ)ブチリル、2 - (メチルチオメトキシメチル) - ベンゾイル、2 - (イソプロピルチオメトキシメチル)ベンゾイル、2 - (2, 4 - ジニトロベンゼンスルフェニルオキシメチル)ベンゾイル、またはレプリニル基である。

【0058】

いくつかの態様において、 T_1 および T_2 の一方は、支持体、例えば、調節孔ガラス、オキサリル調節孔ガラス、シリカ含有粒子、ポリスチレンのポリマー、ポリスチレンのコポリマー、スチレンおよびジビニルベンゼンのコポリマー、ジメチルアクリルアミドおよび N, N' - ビスアクリロイルエチレンジアミンのコポリマー、可溶性支持体、または P E P S への共有結合である。

10

【0059】

いくつかの態様において、各 L_1 、 L_2 および L_3 は、独立に、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、キラル・ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、メチルホスホネート、アルキルホスホネート、5' - アルキレンホスホネート、キラル・ホスホネート、ホスフィネート、ホスホロアミデート、3' - アミノホスホロアミデート、アミノアルキルホスホロアミデート、チオホスホロアミデート、チオアルキルホスホネート、チオアルキルホスホトリエステル、セレノホスフェート、またはボラノホスフェートである。いくつかの態様において、各 L_1 、 L_2 および L_3 は、独立に、ホスホジエステルまたはホスホロチオエート・ヌクレオシド間連結基である。いくつかの態様において、各 L_1 、 L_2 および L_3 は、独立に、シロキサン、スルフィド、スルホキシド、スルホン、ホルムアセチル、チオホルムアセチル、メチレンホルムアセチル、チオホルムアセチル、スルファメート、メチレンイミノ、メチレンヒドラジノ、スルホネート、スルホンアミド、またはアミドである。いくつかの態様において、ヌクレオシド間連結基の各々は、独立に、 $-CH_2-$ 、 $-NH-O-CH_2-$ 、 $-CH_2-N(CH_3)-O-CH_2-$ 、または $-CH_2-O-N(CH_3)-CH_2-$ 、 $-CH_2-N(CH_3)-N(CH_3)-CH_2-$ 、または $-O-N(CH_3)-CH_2-CH_2-$ である。

20

【0060】

いくつかの態様において、各ヌクレオシドは、独立に、アデニン、グアニン、チミン、シトシン、ウラシル、5 - メチルシトシン、5 - ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2 - アミノアデニン、アデニンおよびグアニンのアルキル誘導体、2 - チオウラシル、2 - チオチミン、2 - チオシトシン、5 - ハロウラシル、5 - ハロシトシン、5 - プロピニルウラシル、5 - プロピニルシトシン、6 - アゾウラシル、6 - アゾシトシン、6 - アゾチミン、5 - ウラシル(シュドウラシル)、4 - チオウラシル、8 - 置換アデニン類およびグアニン類、5 - 置換ウラシル類およびシトシン類、7 - メチルグアニン、7 - メチルアデニン、8 - アザグアニン、8 - アザアデニン、7 - デアザグアニン、7 - デアザアデニン、3 - デアザグアニン、または 3 - デアザアデニンである複素環塩基部分を含む。

30

【0061】

いくつかの態様において、 n_1 は、1 ~ 約 5、または 1 ~ 約 3、または 2 ~ 約 3 である。いくつかの態様において、 n_3 は、2 ~ 約 5、または 2 ~ 約 3 である。いくつかの態様において、 n_2 は、12 ~ 約 18、または 12 ~ 約 16、または 14 ~ 約 16 である。いくつかの態様において、 n_1 、 n_2 および n_3 の合計は、14 ~ 約 30 であり；または n_1 、 n_2 および n_3 の合計は、14 ~ 24 であり；または n_1 、 n_2 および n_3 の合計は、16 ~ 21 である。いくつかの態様において、 n_1 は 1 ~ 約 3 であり、 n_2 は 12 または 13 であり、そして n_3 は 2 または 3 であるか；あるいは n_1 は 3 であり、 n_2 は 12 であり、そして n_3 は 3 であるか；あるいは n_1 は 1 ~ 約 3 であり、 n_2 は 14 または 15 であり、そして n_3 は 2 または 3 であるか；あるいは n_1 は 2 であり、 n_2 は 14 であり、そして n_3 は 2 であるか

40

50

；あるいは n_1 は 1 ～ 約 3 であり、 n_2 は 16 または 17 であり、そして n_3 は 2 または 3 であるか；あるいは n_1 は 2 であり、 n_2 は 16 であり、そして n_3 は 2 である。

【0062】

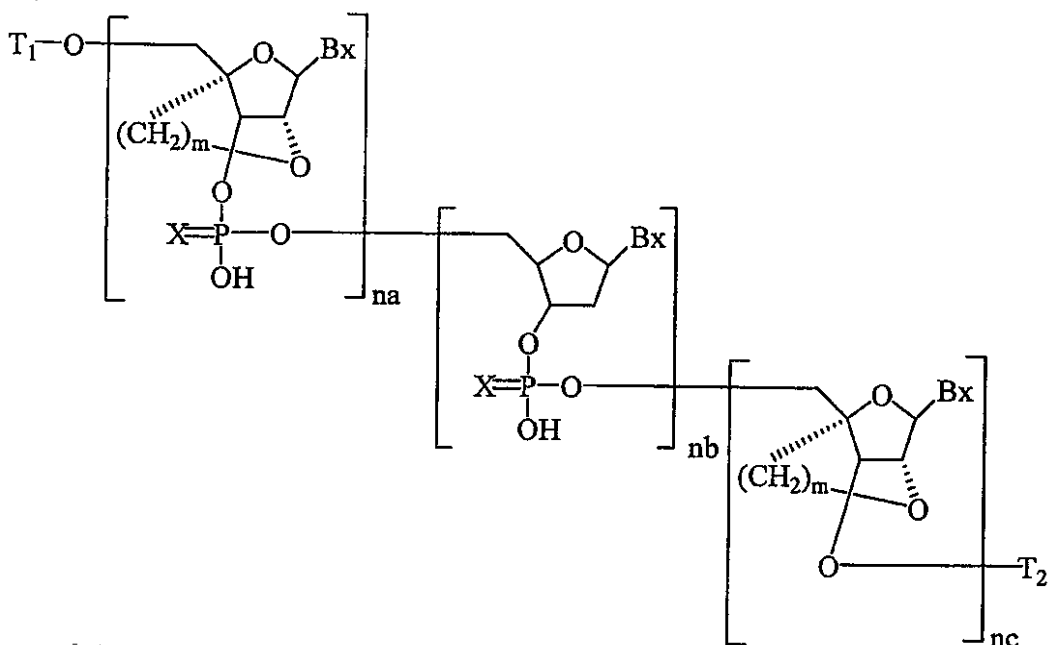
いくつかの態様において、少なくとも 1 つの Nu_1 ヌクレオシドおよび少なくとも 1 つの Nu_3 ヌクレオシドは、LNA または ENA である。いくつかの態様において、最も 5' 末端または最も 3' 末端の親和性修飾ヌクレオシドの少なくとも一方は、LNA または ENA である。したがって最も末端の 5' および / または 3' ヌクレオシドは、独立に、LNA または ENA のいずれかであることも可能である。

【0063】

本発明はまた、構造：

【0064】

【化 4】



【0065】

式中：

各 Bx は複素環塩基部分であり；

各 X は、独立に、O または S であり；

T_1 および T_2 は、各々、独立に、H、ヒドロキシ保護基、場合によって連結されるコンジュゲート基、または固体支持体への共有結合であり；

各 m は、独立に、1 または 2 であり；

n_a は 1 ～ 約 6 であり；

n_b は 11 ～ 約 18 であり；そして

n_c は 2 ～ 約 6 である

を含むオリゴマー化合物も提供する。

【0066】

いくつかの態様において、各 m は 1 または 2 である。いくつかの態様において、 T_1 および T_2 の少なくとも一方は、H またはヒドロシル保護基である。いくつかの態様において、ヒドロシル保護基の各々は、独立に、4, 4'-ジメトキシトリチル、モノメトキシトリチル、9-フェニルキサントゲン-9-イル、9-(p-メトキシフェニル)キサントゲン-9-イル、t-ブチル、t-ブトキシメチル、メトキシメチル、テトラヒドロピラニル、1-エトキシエチル、1-(2-クロロエトキシ)エチル、2-トリメチルシリルエチル、p-クロロフェニル、2, 4-ジニトロフェニル、ベンジル、2, 6-ジクロロベンジル、ジフェニルメチル、p, p'-ジニトロベンズヒドリル、p-ニトロベンジル、トリフェニルメチル、トリメチルシリル、トリエチルシリル、t-ブチルジメチルシリ

ル、*t*-ブチルジフェニルシリル、トリフェニルシリル、ベンゾイルホルメート、アセチル、クロロアセチル、トリクロロアセチル、トリフルオロアセチル、ピバロイル、ベンゾイル、*p*-フェニルベンゾイル、メシル、トシル、4, 4', 4''-トリス-(ベンジルオキシ)トリチル、4, 4', 4''-トリス-(4, 5-ジクロロフタルイミド)トリチル、4, 4', 4''-トリス(レブリニルオキシ)トリチル、3-(イミダゾリルメチル)-4, 4'-ジメトキシトリチル、4-デシルオキシトリチル、4-ヘキサデシルオキシトリチル、9-(4-オクタデシルオキシフェニル)キサンテン-9-イル、1, 1-ビス-(4-メトキシフェニル)-1'-ピレニルメチル、*p*-フェニルアゾフェニルオキシカルボニル、9-フルオレニル-メトキシカルボニル、2, 4-ジニトロフェニルエトキシカルボニル、4-(メチルチオメトキシ)ブチリル、2-(メチルチオメトキシメチル)-ベンゾイル、2-(イソプロピルチオメトキシメチル)ベンゾイル、2-(2, 4-ジニトロベンゼンスルフェニルオキシメチル)ベンゾイル、またはレブリニル基である。

【0067】

いくつかの態様において、 T_1 および T_2 の一方は、支持体、例えば、調節孔ガラス、オキサリル調節孔ガラス、シリカ含有粒子、ポリスチレンのポリマー、ポリスチレンのコポリマー、スチレンおよびジビニルベンゼンのコポリマー、ジメチルアクリルアミドおよび N, N' -ビスアクリロイルエチレンジアミンのコポリマー、可溶性支持体、または PEP S への共有結合である。

【0068】

いくつかの態様において、各 L_1 、 L_2 および L_3 は、独立に、ホスホジエステルまたはホスホロチオエート・ヌクレオシド間連結基である。いくつかの態様において、各 L_1 、 L_2 および L_3 は、ホスホジエステル・ヌクレオシド間連結基である。

【0069】

いくつかの態様において、各 B_x は、独立に、アデニン、グアニン、チミン、シトシン、ウラシル、5-メチルシトシン、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、アデニンおよびグアニンのアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミン、2-チオシトシン、5-ハロウラシル、5-ハロシトシン、5-プロピニルウラシル、5-プロピニルシトシン、6-アゾウラシル、6-アゾシトシン、6-アゾチミン、5-ウラシル(シュードウラシル)、4-チオウラシル、8-置換アデニン類およびグアニン類、5-置換ウラシル類およびシトシン類、7-メチルグアニン、7-メチルアデニン、8-アザグアニン、8-アザアデニン、7-デアザグアニン、7-デアザアデニン、3-デアザグアニン、または 3-デアザアデニンである。

【0070】

いくつかの態様において、 n_1 は、1~約5(例えば1、2、3、4、5)、または1~約3(例えば1、2、3)、または2~約3である。いくつかの態様において、 n_3 は、2~約5(例えば2、3、4、5)、または2~約3である。いくつかの態様において、 n_2 は、12~約18(例えば12、13、14、15、16、17、18)、または12~約16(例えば12、13、14、15、16)、または14~約16(例えば14、15、16)である。いくつかの態様において、 n_1 、 n_2 および n_3 の合計は、14~約30(例えば14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30)であるか；または n_1 、 n_2 および n_3 の合計は、14~24(例えば14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24)であるか；または n_1 、 n_2 および n_3 の合計は、14~21(例えば14、15、16、17、18、19、20、21)であるか；または n_1 、 n_2 および n_3 の合計は、16~21(例えば16、17、18、19、20、21)である。いくつかの態様において、 n_1 は1~約3であり、 n_2 は12または13であり、そして n_3 は2または3であるか；あるいは n_1 は3であり、 n_2 は12であり、そして n_3 は3であるか；あるいは n_1 は1~約3であり、 n_2 は14または15であり、そして n_3 は2または3であるか；あるいは n_1 は2であり、 n_2 は14であり、そして n_3 は2であるか；あ

るいは n_1 は 1 ~ 約 3 であり、 n_2 は 16 または 17 であり、そして n_3 は 2 または 3 であるか；あるいは n_1 は 2 であり、 n_2 は 16 であり、そして n_3 は 2 である。

【0071】

オリゴマー合成

適切のように、DNA 合成 (Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Agrawal 監修 (1993), Human a Press) および / または RNA 合成 (Scarlinge, Methods (2001), 23, 206-217. Gaitr, Applications of Chemically synthesized RNA in RNA: Protein Interactions, Smith 監修 (1998), 1-36. G 10
allo, Tetrahedron (2001), 57, 5707-5713) のための文献の方法にしたがって、修飾および非修飾ヌクレオシドのオリゴマー化を行う。さらに、本発明のオリゴマー化合物の合成のための特定のプロトコルを、以下の実施例に例示する。

【0072】

本発明にしたがって用いるオリゴマー化合物を、便宜的に、そして日常的に、周知の固相合成技術にしたがって作成することも可能である。例えば Applied Biosystems (カリフォルニア州フォスターシティ) を含む、いくつかの業者によって、こうした合成のための装置が販売されている。当該技術分野に知られる、こうした合成の 20
他の手段いずれかを、さらに、または別に、使用することも可能である。ホスホロチオエートおよびアルキル化誘導体などのオリゴヌクレオチドを調製する類似の技術の使用が周知である。

【0073】

本発明はまた、少なくとも 1 つの 2' - O 保護されたヌクレオシドを取り込んだ、オリゴマー化合物の調製にも有用である。取り込まれ、そして適切に脱保護された後、2' - O 保護ヌクレオシドは、取り込まれた位置で、リボヌクレオシドに変換されるであろう。最終オリゴマー化合物中の 2 - リボヌクレオシド単位の数および位置は、いずれかの部位の 1 つから多様であることも可能であるし、また完全な 2' - OH 修飾オリゴマー化合物になるまで調製する戦略を用いることも可能である。オリゴマー化合物の合成に受け入れ 30
られるすべての 2' - O 保護基が、本発明に含まれる。一般的に、例えばスクシネート・リンカーによって、保護されたヌクレオシドを固体支持体に付着させる。次いで、5' 末端ヒドロキシル基を脱保護し、さらなるヌクレオシド単位をカップリングし、キャップ処理し、そして酸化する (あるいは硫化する) 周期を反復することによって、オリゴヌクレオチドを伸長する。より頻繁に用いられる合成法において、アンモニア溶液で処理することによって、リン酸保護基および環外アミノ保護基を除去することで、完成したオリゴヌクレオチドを固体支持体から切断する。次いで、2' - ヒドロキシル基の保護に用いる、より特殊化された保護基には、通常、さらなる脱保護工程が必要であり、これによって、完全に脱保護されたオリゴヌクレオチドが得られるであろう。

【0074】

オリゴリボヌクレオチドの合成には、多数の 2' - O 保護基が用いられてきているが、 40
年を追って、より有効な基が発見されてきている。有効な 2' - O 保護基に重要なのは、2' - O 位に選択的に導入可能であり、そして合成後、望ましくない副産物の形成を伴わずに、容易に取り除きうることである。保護基はまた、オリゴリボヌクレオチド合成に必要な、一般的な脱保護工程、カップリング工程、およびキャッピング工程に対して、不活性であることも必要である。オリゴリボヌクレオチド合成に最初に用いられた保護基のいくつかには、テトラヒドロピラン - 1 - イルおよび 4 - メトキシテトラヒドロピラン - 4 - イルが含まれた。これらの 2 つの基は、5' - O 保護基のすべてとは適合せず、したがって、5' - DMT 基とともに、1 - (2 - フルオロフェニル) - 4 - メトキシピペリジン - 4 - イル (Fpm p) などの修飾型が用いられた。Reese は、オリゴリボヌクレオチド合成に有用ないくつかのピペリジン誘導体 (Fpm p に類似) を同定しており、こ 50

れらには1 - ((クロロ - 4 - メチル) - フェニル) - 4' - メトキシピペリジン - 4 - イルが含まれる (Reeseら, Tetrahedron Lett., 1986, 27, 2291)。別のアプローチは、標準的な5' - DMT (ジメトキシトリチル) 基を、レプリニルおよび9 - フルオレニルメトキシカルボニルなどの、非酸性条件下で除去される保護基で置き換えることであった。こうした基は、オリゴリボヌクレオチド合成のために、酸不安定性2' 保護基の使用を可能にする。オリゴリボヌクレオチドの合成のために、より広く最初に用いられた別の保護基は、t - ブチルジメチルシリル基であった (Ogilvieら, Tetrahedron Lett., 1974, 2861; Hakimelahiら, Tetrahedron Lett., 1981, (22), 2543; および Jonesら, J. Chem. Soc. Perkin I., 2762)。2' - O保護基は、取り除くために特殊な試薬を必要とする可能性もあり、例えばt - ブチルジメチルシリル基は、通常、他の切断工程/脱保護工程がすべて終了した後、オリゴマー化合物をテトラブチルアンモニウムフロリド (TBAF) で処理することによって、取り除かれる。

【0075】

研究者の1グループは、いくつかの2' - O保護基を調べた (Pitsch, Chimia, 2001, (55), 320 - 324)。このグループは、中程度の条件を用いて取り除かれる、フッ化物不安定性保護基および光不安定性保護基を調べた。調べた1つの光不安定性基は、(2 - (ニトロベンジル) オキシ) メチル (nbm) 保護基であった (Schwartzら, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1992, 2, 1019)。調べた他の基には、いくつかの構造的に関連するホルムアルデヒドアセタール由来の2' - O保護基が含まれた。やはり調製されたのは、2' - O - アルキル化ヌクレオシド・ホスホロアミダイトを調製するための、いくつかの関連する保護基であり、2' - O - ((トリイソプロピルシリル) オキシ) メチル (2' - O - CH₂ - O - Si (iPr)₃, TOM) が含まれた。TOM基に直交して用いるために調製された1つの2' - O保護基は、2' - O - ((R) - 1 - (2 - ニトロフェニル) エチルオキシ) メチル ((R) - mnbm) であった。

【0076】

フッ化物不安定性5' - O保護基 (非酸不安定性) および酸不安定性2' - O保護基を用いる別の戦略が報告されてきている (Scarlinge, Stephen A., Methods, 2001, 23, 206 - 217)。5' - O保護に関して、いくつかの可能なシリルエーテルが調べられ、そして2' - O保護に関して、いくつかのアセタールおよびオルトエステルが調べられた。最適な結果を生じる保護スキームは、5' - O - シリルエーテル - 2' - ACE (5' - O - ビス (トリメチルシロキシ) シクロドデシルオキシシリルエーテル (DOD) - 2' - O - ビス (2 - アセトキシエトキシ) メチル (ACE) であった。このアプローチは、修飾ホスホロアミダイト合成アプローチを用い、このアプローチでは、RNA/DNA合成に日常的には用いられない、いくつかの異なる試薬が必要である。

【0077】

多くの研究がオリゴリボヌクレオチド合成に重点を置いてきているが、現在、商業的に用いられている主なRNA合成戦略には、5' - O - DMT - 2' - O - t - ブチルジメチルシリル (TBDMS)、5' - O - DMT - 2' - O - (1 (2 - フルオロフェニル) - 4 - メトキシピペリジン - 4 - イル) (FPMP)、2' - O - ((トリイソプロピルシリル) オキシ) メチル (2' - O - CH₂ - O - Si (iPr)₃ (TOM)、および5' - O - シリルエーテル - 2' - ACE (5' - O - ビス (トリメチルシロキシ) シクロドデシルオキシシリルエーテル (DOD) - 2' - O - ビス (2 - アセトキシエトキシ) メチル (ACE) が含まれる。現在、RNA製品を提供する、主な企業のいくつかの現在のリストには、Pierce Nucleic Acid Technologies、Dharmacon Research Inc.、Ameri Biotechnologies Inc.、およびIntegrated DNA Technologies

es, Inc. が含まれる。1つの企業、Princeton Separations は、RNA 合成活性化因子を市販し、特に TOM および TBDM S 化学反応でカップリング時間を減少させると広告している。こうした活性化因子もまた、本発明に受け入れられるであろう。

【0078】

商業的 RNA 合成に用いられている主な基は：

TBDM S = 5' - O - DMT - 2' - O - t - ブチルジメチルシリル；

TOM = 2' - O - ((トリイソプロピルシリル) オキシ) メチル；

DOD / ACE = (5' - O - ビス (トリメチルシロキシ) シクロドデシルオキシシリルエーテル - 2' - O - ビス (2 - アセトキシエトキシ) メチル

FPMP = 5' - O - DMT - 2' - O - (1 (2 - フルオロフェニル) - 4 - メトキシピペリジン - 4 - イル)

である。

【0079】

前述の RNA 合成戦略はすべて、本発明に受け入れられる。例えば 1つの戦略からの 5' 保護基と別の戦略からの 2' - O 保護基を用いる、上記のハイブリッドである戦略もまた、本発明に受け入れられる。

【0080】

リボヌクレオチド、および少なくとも 1つのリボヌクレオチドを取り込んだオリゴマー化合物、並びにこれらの 2つの両端の間に属する可能な立体配置すべての調製が、本発明に含まれる。対応するオリゴマー化合物は、相補性領域を有するオリゴリボヌクレオチドを含む、さらなるオリゴマー化合物とハイブリダイズして、二本鎖 (二重鎖) オリゴマー化合物を形成することも可能である。当該技術分野において、こうした二本鎖オリゴヌクレオチド部分は、アンチセンス機構を介して、標的発現を調節し、そして翻訳とともに RNA プロセッシングを制御することが示されてきている。さらに、二本鎖部分は、化学的修飾の対象となることも可能である (Fire ら, Nature, 1998, 391, 806 - 811; Timmons および Fire, Nature 1998, 395, 854; Timmons ら, Gene, 2001, 263, 103 - 112; Tabara ら, Science, 1998, 282, 430 - 431; Montgomery ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95, 15502 - 15507; Tuschl ら, Genes Dev., 1999, 13, 3191 - 3197; Elbashir ら, Nature, 2001, 411, 494 - 498; Elbashir ら, Genes Dev., 2001, 15, 188 - 200)。例えば、こうした二本鎖部分は、二重鎖のアンチセンス鎖が標的に古典的にハイブリダイズし、それによって標的の酵素的分解を誘発することによって、標的を阻害することが示されてきている (Tijsterman ら, Science, 2002, 295, 694 - 697)。

【0081】

本発明のオリゴマー化合物を調製する方法を、薬剤発見および標的検証の分野に適用することもまた可能である。本発明は、薬剤を発見する試みの中で、本明細書で同定するオリゴマー化合物および適切な標的を使用して、タンパク質、および疾患状態、表現型または状態の間に存在する関係を解明することを含む。これらの方法には、標的ペプチドを検出するか、または調節する方法であって、試料、組織、細胞、または生物と、本発明のオリゴマー化合物を接触させて、標的の核酸レベルまたはタンパク質レベル、並びに / あるいは関連する表現型または化学的終点を、処理後のある時点で測定し、そして場合によって、測定した値を非処理試料または本発明のさらなるオリゴマー化合物で処理した試料と比較することを含む、前記方法が含まれる。これらの方法を、他の実験と平行して、または他の実験と組み合わせて行って、標的検証のプロセスのため、未知の遺伝子の機能を決定するか、あるいは特定の疾患、状態、または表現型の治療または予防の標的として、特定の遺伝子産物の妥当性を決定することもまた可能である。

【0082】

存在する文献にしたがって、RNAi活性に対するヌクレオシド修飾の影響を評価する (Elbashirら, Nature (2001), 411, 494-498; Nishikuraら, Cell (2001), 107, 415-416; および Bassら, Cell (2000), 101, 235-238)。

【0083】

いくつかの化学的官能基が、ブロッキングされた型で本発明の化合物に導入され、そして続いて脱ブロッキングされて、最終的な望ましい化合物を形成することも可能である。複素環塩基に直接または間接的に付着する基、ヌクレオシド間連結、並びに2'位、3'位および5'位での糖置換基などである。反復オリゴヌクレオチド合成中、成長しつつあるオリゴマー化合物中に位置する官能基をブロッキングするように保護基を選択することも可能であり、一方、必要に応じて、他の位を選択的に脱ブロッキングすることも可能である。一般的に、ブロッキング基は、より大きい分子の化学的官能性を、特定の反応条件に対して不活性であるようにし、そして後で、分子の残りに実質的に損傷を与えずに、こうした官能性から取り除かれることも可能である (GreeneおよびWuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 第3版, John Wiley & Sons, ニューヨーク, 1999)。例えば、アミノ基の窒素原子は、フタルイミド基として、9-フルオレニルメトキシカルボニル (FMOC) 基として、そしてトリフェニルメチルスルフェニル、t-BOCまたはベンジル基で、ブロッキング可能である。カルボキシル基は、アセチル基としてブロッキング可能である。代表的なヒドロキシル保護基は、Beaucageら, Tetrahedron 1992, 48, 2223に記載される。適切なヒドロキシル保護基は、酸不安定性であり、例えばトリチル、モノメトキシトリチル、ジメトキシトリチル、トリメトキシトリチル、9-フェニルキサンチン-9-イル (Pixyl) および9-(p-メトキシフェニル)キサンチン-9-イル (MOX) である。

【0084】

化学的官能基を前駆体型の中に含むことによって「ブロッキング」することもまた可能である。したがって、アジド基は容易にアミンに変換されるため、アジド基をアミンの「ブロッキング」型とみなして用いることも可能である。オリゴヌクレオチド合成に利用される、さらなる代表的な保護基が、Agrawalら, Protocols for Oligonucleotide Conjugates, 監修, Humana Press; ニュージャージー州, 1994; Vol. 26 pp. 1-72に論じられる。

【0085】

ヒドロキシル保護基の例には、限定されるわけではないが、t-ブチル、t-ブトキシメチル、メトキシメチル、テトラヒドロピラニル、1-エトキシエチル、1-(2-クロロエトキシ)エチル、2-トリメチルシリルエチル、p-クロロフェニル、2,4-ジニトロフェニル、ベンジル、2,6-ジクロロベンジル、ジフェニルメチル、p, =-ジニトロベンズヒドリル、p-ニトロベンジル、トリフェニルメチル、トリメチルシリル、トリエチルシリル、t-ブチルジメチルシリル、t-ブチルジフェニルシリル、トリフェニルシリル、ベンゾイルホルメート、アセテート、クロロアセテート、トリクロロアセテート、トリフルオロアセテート、ピバロエート、ベンゾエート、p-フェニルベンゾエート、9-フルオレニルメチルカーボネート、メシレートおよびトシレートが含まれる。

【0086】

酸処理に安定であるアミノ保護基は、塩基処理で選択的に取り除かれ、そして置換に選択的に利用可能な反応性アミノ基を作成するのに用いられる。こうした基の例はFmoc (E. AthertonおよびR.C. Sheppard, The Peptides 中, S. Udenfriend, J. Meienhofer 監修, Academic Press, オランダ, 1987, 第9巻, p. 1)、およびNsc基に例示される多様な置換スルホニルエチルカルバメート (Samukovら, T

etrahedron Lett, 1994, 35:7821; VerhartおよびTesser, Rec. Trav. Chim. Pays-Bas, 1987, 107, 621)である。

【0087】

さらなるアミノ保護基には、限定されるわけではないが、カルバメート保護基、例えば2-トリメチルシリルエトキシカルボニル(Teoc)、1-メチル-1-(4-ビフェニル)エトキシカルボニル(Bpoc)、t-ブトキシカルボニル(BOC)、アリルオキシカルボニル(Alloc)、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)、およびベンジルオキシカルボニル(Cbz);アミド保護基、例えばホルミル、アセチル、トリハロアセチル、ベンゾイル、およびニトロフェニルアセチル;スルホンアミド保護基、例えば2-ニトロベンゼンスルホニル;およびイミンおよび環状イミド保護基、例えばフタルイミドおよびジチアスクシノイルが含まれる。

【0088】

オリゴマー化合物調製のため、現在選択される方法は、支持体を利用する。支持体は、第一のヌクレオシドまたは他のシントンの付着に用いられ、これが次いで反復して伸長されて、最終オリゴマー化合物または他のポリマー、例えばポリペプチドを生じる。不溶性であるように、または異なる溶媒中で多様な可溶性を有するように、支持体を選択して、望ましいように、支持体に結合した、成長するポリマーが、溶液内または溶液外いずれかにあるのを可能にすることも可能である。固体支持体などの伝統的な支持体は、大部分、不溶性であり、そして日常的に反応容器中に入れられ、一方、最終ポリマー化合物が切断されるまで、試薬および溶媒が、成長する鎖と反応し、そしてまたは鎖を洗浄する。より最近のアプローチは、可溶性ポリマー支持体を含む可溶性支持体を導入して、合成の望ましい点で、反復して合成される産物の沈殿および溶解を可能にしている(Gravertら, Chem. Rev., 1997, 97, 489-510)。

【0089】

用語、支持体は、オリゴマー化合物および関連化合物、例えばペプチドの合成のため、当該技術分野に知られる支持体のすべての型を含むよう意図される。本発明の方法に受け入れられる、いくつかの代表的な支持体には、限定されるわけではないが、以下:調節孔ガラス(CPG);オキサリル調節孔ガラス(例えばAlulら, Nucleic Acids Research 1991, 19, 1527を参照されたい);シリカ含有粒子、例えば多孔性ガラスビーズ、並びにトリクロロ-(3-(4-クロロメチル)フェニル)プロピルシランおよび多孔性ガラスビーズの反応によって形成されるものなどのシリカゲル(ParrおよびGrohmann, Angew. Chem. International. Ed. 1972, 11, 314を参照されたい、Waters Associates、米国マサチューセッツ州フラミンガムによって、登録商標「PORASIL E」として販売される);1,4-ジヒドロキシメチルベンゼンおよびシリカモノエステル(BayerおよびJung, Tetrahedron Lett., 1970, 4503を参照されたい、Waters Associatesによって、登録商標「BIOPAK」として販売される);TENTAGEL(例えばWrightら, Tetrahedron Letters 1993, 34, 3373を参照されたい);架橋スチレン/ジビニルベンゼンコポリマー・ビーズ化マトリックスまたはPOROS、ポリスチレン/ジビニルベンゼンのコポリマー(Perceptive Biosystemsから入手可能);可溶性支持体、ポリエチレングリコールPEG(Bonoraら, Organic Process Research & Development, 2000, 4, 225-231)が含まれる。

【0090】

本発明に受け入れられる、さらなる支持体には、限定なしに、ペンダント長鎖ポリスチレン(PS)グラフトを有するポリエチレン(PE)フィルムであるPEPS支持体(分子量、約 10^6 (Bergら, J. Am. Chem. Soc., 1989, 111, 8024および国際特許出願WO 90/02749を参照されたい))が含ま

れる。フィルムの装填能は、ビーズ化マトリックスのものと同程度に高く、多数の合成に同時に対処しうる、さらなる柔軟性を持つ。PEPSフィルムは、各々が個々の区画として働く、別個の標識されたシートの形で構築されることも可能である。合成周期のすべての同一の工程の間、シートは単一の反応容器中にともに維持されて、慣用的な方法による単一ペプチドの合成に近い速さで、多数のペプチドの同時調製を可能にする。また、例えば不織フェルト、編んだネット、スティックまたはマイクロウェルプレートなどのPEPSポリマーの他の形状での実験も、合成の有効性にいかなる限界も示していない。

【0091】

本発明に受け入れられる、さらなる支持体には、限定なしに、既知の量のN-tert
ブトキシカルボニル-ベータ-アラニル-N'-アクリロイルヘキサメチレンジアミンを 10
含む、N,N'-ビスアクリロイルエチレンジアミンと架橋したジメチルアクリルアミド
のコポリマーに基づく粒子が含まれる。典型的には、ベータ・アラニル基を介して、いく
つかのスペーサー分子が付加され、その後、アミノ酸残基サブユニットが続く。また、重
合中に、ベータ・アラニル含有単量体の代わりにアクリロイル・サフコシン(safco
sine)単量体を用いて、樹脂ビーズを形成することも可能である。重合に続いて、エ
チレンジアミンとビーズを反応させて、共有結合した官能性として一級アミンを含有する
樹脂粒子を形成する。ポリアクリルアミドに基づく支持体は、ポリスチレンに基づく支持
体より、比較的親水性であり、そして通常、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミ
ド、N-メチルピロリドン等を含む、極性非プロトン性溶媒とともに用いられる(Ath
ertonら, J. Am. Chem. Soc., 1975, 97, 658 20
4, Bioorg. Chem. 1979, 8, 351、およびJ.C.S.
Perkin I 538(1981)を参照されたい)。

【0092】

本発明に受け入れられる、さらなる支持体には、限定なしに、使用する有機合成反応条
件に対して実質的に不活性である、樹脂および別の材料の合成物(composite)
が含まれる。1つの典型的な合成物(Scottら, J. Chrom. Sci.,
1971, 9, 577)は、反応性クロロメチル基を含有する、疎水性架橋スチレ
ンポリマーでコーティングされたガラス粒子を利用し、そしてこれは、米国コネティカッ
ト州ハムデンのNorthgate Laboratories, Inc.に供給される。別の典型的な合成物は、フッ素化エチレンポリマーのコアを含有し、この上にポリス 30
チレンがグラフトされている(KentおよびMerrifield, Israel
J. Chem. 1978, 17, 243およびvan Riettschoten
Peptides中 1974, Y. Wolman監修, Wiley and
Sons, ニューヨーク, 1975, pp. 113-116を参照されたい)。P
EPS以外の連続的固体支持体、例えばコットンシート(LeblおよびEichler
, Peptide Res. 1989, 2, 232)およびヒドロキシプロピル
アクリレートでコーティングしたポリプロピレン膜(Danielsら, Tetrah
edron Lett. 1989, 4345)。成長するペプチド鎖を固定し、そし
て区画化合成を行う、アクリル酸グラフトポリエチレン・ロッドおよび96マイクロタイ
ターウェル(Geyssenら, Proc. Natl. Acad. Sci. US 40
A, 1984, 81, 3998)。伝統的に用いられるポリマービーズを含有する
「ティーバッグ」(Houghten, Proc. Natl. Acad. Sci.
. USA, 1985, 82, 5131)。異なる密度を持つ2つの異なる支持体
の同時使用(Tregear, Chemistry and Biology of
Peptides, J. Meienhofer監修, Ann Arbor Sci.
. Pub., アナーバー, 1972 pp. 175-178)。マニホールドを介
した反応容器の組み合わせ(Gorman, Anal. Biochem., 198
4, 136, 397)。マルチカラム固相合成(例えばKrchnakら, Int
. J. Peptide Protein Res., 1989, 33, 209
)、並びにHolmおよびMeldal, "Proceedings of the 50

20th European Peptide Symposium”中、G. JungおよびE. Bayer監修、Walter de Gruyter & Co.、ベルリン、1989 pp. 208-210)。セルロース・ペーパー(Eichlerら、Collect. Czech. Chem. Commun., 1989, 54, 1746)。ペプチドの支持体媒介合成もまた報告されてきている(Synthetic Peptides: A User's Guide, Gregory A. Grant監修、Oxford University Press 1992; US-A-4,415,732; 4,458,066; 4,500,707; 4,668,777; 4,973,679; 5,132,418; 4,725,677およびRe-34,069を参照されたい)。

10

【0093】

支持体に結合したオリゴヌクレオチド合成は、成長する鎖の一端へのヌクレオチドの連続付加に基づく。典型的には、第一のヌクレオシド(存在する環外アミン官能性いずれにも保護基を有する)を適切なガラスビーズ支持体に付着させて、そして活性化ホスファイト化合物(典型的には、やはり適切な保護基を有するヌクレオチド・ホスホロアミダイト)を段階的に付加して、成長するオリゴヌクレオチドを伸長させる。固相合成のさらなる方法が、Caruthers、米国特許第4,415,732号;第4,458,066号;第4,500,707号;第4,668,777号;第4,973,679号;および第5,132,418号;並びにKoster、米国特許第4,725,677号およびRe-34,069に見出されうる。

20

【0094】

オリゴマー化合物および関連化合物の支持体に基づく合成に日常的に用いられる、商業的に入手可能な装置が、いくつかの業者によって販売されており、これらの業者には、例えば、Applied Biosystems(カリフォルニア州フォスターシティ)が含まれる。当該技術分野に知られる、こうした合成の他の手段いずれも、さらに、または別に、使用可能である。自動化合成技術を含む、適切な固相技術が、F. Eckstein(監修)、Oligonucleotides and Analogues, a Practical Approach, Oxford University Press, ニューヨーク(1991)に記載される。

30

【0095】

オリゴマーおよび単量体修飾

当該技術分野に知られるように、ヌクレオシドは塩基-糖の組み合わせである。ヌクレオシドの塩基部分は、通常、複素環塩基である。こうした複素環塩基の2つの最も一般的な種類は、プリン類およびピリミジン類である。ヌクレオチドは、ヌクレオシドの糖部分に共有結合するリン酸基をさらに含む、ヌクレオシドである。ペントフラノシル糖を含むヌクレオシドに関しては、リン酸基は、該糖の2'、3'または5'ヒドロキシル部分のいずれに連結することも可能である。オリゴヌクレオチドを形成する際、リン酸基は、互いに、隣接するヌクレオシドと共有結合し、直鎖ポリマー化合物を形成する。次に、この直鎖ポリマー化合物のそれぞれの端をつないで、さらに環状化合物を形成することも可能であるが、直鎖化合物が、一般的に好ましい。さらに、直鎖化合物は、内部核酸塩基相補性を有することも可能であり、そしてしたがって、完全にまたは部分的に二本鎖である化合物を産生する方式でフォールディングすることも可能である。オリゴヌクレオチド内で、リン酸基は、一般的に、ヌクレオシド間連結を形成するか、または糖環と組み合わせて、オリゴヌクレオチドの主鎖を形成すると称される。RNAおよびDNAの主鎖を構成する通常のヌクレオシド間連結は、3'-5'ホスホジエステル連結である。

40

【0096】

修飾ヌクレオシド間連結

本発明に有用な、適切なオリゴマー化合物の特定の例には、修飾連結、例えば非天然存在ヌクレオシド間連結を含有するオリゴヌクレオチドが含まれる。本明細書に定義するように、修飾ヌクレオシド間連結を有するオリゴヌクレオチドには、リン原子を保持するヌ

50

クレオシド間連結、およびリン原子を持たないヌクレオシド間連結が含まれる。本明細書の目的のための、そして当該技術分野に時に引用されるような、ヌクレオシド間主鎖にリン原子を持たない修飾オリゴヌクレオチドもまた、オリゴヌクレオシドとみなすことも可能である。

【0097】

線虫 (*C. elegans*) 系において、ヌクレオチド間連結の修飾 (ホスホロチオエート) は、RNAi 活性に有意には干渉しなかった。この観察に基づいて、本発明の特定のオリゴマー化合物もまた、1 以上の修飾ヌクレオシド間連結を有することも可能であることが示唆される。適切なリン含有修飾ヌクレオシド間連結は、ホスホロチオエート・ヌクレオシド間連結である。

10

【0098】

リン原子を含有する、適切な修飾オリゴヌクレオチド主鎖には、例えば、ホスホロチオエート類、キラル・ホスホロチオエート類、ホスホロジチオエート類、ホスホトリエステル類、アミノアルキルホスホトリエステル類、3' - アルキレンホスホネート類、5' - アルキレンホスホネート類、およびキラル・ホスホネート類を含む、メチルおよび他のアルキルホスホネート類、ホスフィネート類、3' - アミノホスホロアミデート類およびアミノアルキルホスホロアミデート類を含む、ホスホロアミデート類、チオノホスホロアミデート類、チオノアルキルホスホネート類、チオノアルキルホスホトリエステル類、セレノホスフェート類、並びにボラノホスフェート類であって、通常の 3' - 5' 連結を有する前記修飾オリゴヌクレオチド、これらの 2' - 5' 連結類似体、並びに 1 以上のヌクレオチド間連結が 3' - 3'、5' - 5' または 2' - 2' 連結である、逆転した極性を有するものが含まれる。逆転した極性を有する、適切なオリゴヌクレオチドは、最も 3' のヌクレオチド間連結で、単一の 3' - 3' 連結、すなわち無塩基性である (核酸塩基が失われているか、またはその代わりにヒドロキシル基を有する) ことも可能な単一の逆転したヌクレオシド残基を含む。多様な塩、混合塩および遊離酸型もまた、含まれる。

20

【0099】

上記のリン含有連結の調製を解説する代表的な米国特許には、限定されるわけではないが、U.S. : 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,196; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,306; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; 5,194,599; 5,565,555; 5,527,899; 5,721,218; 5,672,697 および 5,625,050 が含まれる。

30

【0100】

本発明のいくつかの態様において、オリゴマー化合物は、1 以上のホスホロチオエートおよび/またはヘテロ原子ヌクレオシド間連結、特に -CH₂-NH-O-CH₂-、-CH₂-N(CH₃)-O-CH₂- (メチレン (メチルイミノ) または MMI 主鎖として知られる)、-CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-、-CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-CH₂- および -O-N(CH₃)-CH₂-CH₂- (天然ホスホジエステル・ヌクレオチド間連結は -O-P(=O)(OH)-O-CH₂- として示される) を有する。MMI 型ヌクレオシド間連結が、上に引用する米国特許 5,489,677 に開示される。適切なアミド・ヌクレオシド間連結が、上に引用する米国特許 5,602,240 に開示される。

40

【0101】

リン原子を含まない適切な修飾オリゴヌクレオチド主鎖は、短鎖アルキルまたはシクロアルキル・ヌクレオシド間連結、混合ヘテロ原子およびアルキルまたはシクロアルキル・ヌクレオシド間連結、あるいは 1 以上の短鎖ヘテロ原子または複素環ヌクレオシド間連結によって形成される主鎖を有する。これらには、モルホリノ連結を有するもの (部分的に

50

ヌクレオシドの糖部分から形成される)；シロキサン主鎖；スルフィド、スルホキシドおよびスルホン主鎖；ホルムアセチルおよびチオホルムアセチル主鎖；メチレンホルムアセチルおよびチオホルムアセチル主鎖；リボアセチル主鎖；アルケン含有主鎖；スルファメート主鎖；メチレンイミノおよびメチレンヒドラジノ主鎖；スルホネートおよびスルホンアミド主鎖；アミド主鎖を有するもの；並びに混合N、O、SおよびCH₂構成要素部分を有する他のものが含まれる。

【0102】

上記のオリゴヌクレオシドの調製を解説する代表的な米国特許には、限定されるわけではないが、U.S. : 5,034,506 ; 5,166,315 ; 5,185,444 ; 5,214,134 ; 5,216,141 ; 5,235,033 ; 5,264,562 ; 5,264,564 ; 5,405,938 ; 5,434,257 ; 5,466,677 ; 5,470,967 ; 5,489,677 ; 5,541,307 ; 5,561,225 ; 5,596,086 ; 5,602,240 ; 5,610,289 ; 5,602,240 ; 5,608,046 ; 5,610,289 ; 5,618,704 ; 5,623,070 ; 5,663,312 ; 5,633,360 ; 5,677,437 ; 5,792,608 ; 5,646,269 および 5,677,439 が含まれる。

10

【0103】

いくつかの態様において、オリゴマー化合物のヌクレオシド構成要素は、場合によって保護されるホスホロチオエート・ヌクレオシド間連結によって、互いに連結される。ホスファイト連結、ホスホジエステル連結およびホスホロチオエート連結などのリン含有ヌクレオシド間連結の代表的な保護基には、-シアノエチル、ジフェニルシリルエチル、-シアノブテニル、シアノp-キシリル(CPX)、N-メチル-N-トリフルオロアセチルエチル(META)、アセトキシフェノキシエチル(APE)およびブテン-4-イル基が含まれる。例えば米国特許第4,725,677号およびRe.34,069(-シアノエチル) ; Beaucage, S.L. および Iyer, R.P., Tetrahedron, 49 No.10, pp.1925-1963(1993) ; Beaucage, S.L. および Iyer, R.P., Tetrahedron, 49 No.46, pp.10441-10448(1993) ; Beaucage, S.L. および Iyer, R.P., Tetrahedron, 48 No.12, pp.2223-2311(1992)を参照されたい。

20

30

【0104】

オリゴマー擬似体(オリゴヌクレオチド模倣体)

本発明に受け入れられるオリゴマー化合物の別の適切な群には、オリゴヌクレオチド擬似体が含まれる。用語、擬似体は、オリゴヌクレオチドに適用された場合、フラノース環のみ、またはフラノース環およびヌクレオチド間連結の両方が、新規基で置換されているオリゴマー化合物を含むよう意図され、フラノース環のみの置換はまた、当該技術分野において、糖代用物とも称される。複素環塩基部分または修飾複素環塩基部分は、適切な標的核酸とのハイブリダイゼーションのため、維持される。こうしたオリゴマー化合物の1つは、優れたハイブリダイゼーション特性を有することが示されてきているオリゴヌクレオチド擬似体であって、ペプチド核酸(PNA)と称される。PNAオリゴマー化合物において、オリゴヌクレオチドの糖-主鎖は、アミド含有主鎖、特にアミノエチルグリシン主鎖と置き換えられる。核酸塩基は保持され、そして主鎖のアミド部分のアザ窒素原子と、直接または間接的に結合される。PNAオリゴマー化合物の調製を解説する代表的な米国特許には、限定されるわけではないが、U.S. : 5,539,082 ; 5,714,331 ; および 5,719,262 が含まれる。PNAオリゴマー化合物のさらなる解説を、Nielsenら, Science, 1991, 254, 1497-1500に見出すことも可能である。

40

【0105】

優れたハイブリダイゼーション特性を有することが報告されてきている1つのオリゴヌクレオチド擬似体は、ペプチド核酸(PNA)である。PNA化合物の主鎖は、2以上の

50

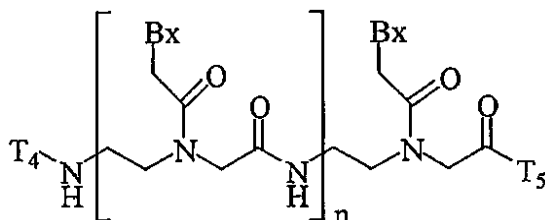
連結されたアミノエチルグリシン単位であり、これがPNAにアミド含有主鎖を与える。複素環塩基部分は、主鎖のアミド部分のアザ窒素原子と、直接または間接的に結合される。PNA化合物の調製を解説する代表的な米国特許には、限定されるわけではないが、U.S.: 5,539,082; 5,714,331; および5,719,262が含まれる。PNA化合物のさらなる解説を、Nielsenら, Science, 1991, 254, 1497-1500に見出すことも可能である。

【0106】

PNAは、基本的なPNA構造が最初に調製されて以来、修飾されて、多くの修飾を取り込んできている。基本的な構造を以下に示す：

【0107】

【化5】



【0108】

式中：

Bxは複素環塩基部分であり；

T₄は、水素、アミノ保護基、-C(O)R₅、置換または非置換C₁-C₁₂アルキル、置換または非置換C₂-C₁₂アルケニル、置換または非置換C₂-C₁₂アルキニル、アルキルスルホニル、アリールスルホニル、化学官能基、レポーター基、コンジュゲート基、-カルボキシル基を介して、または場合によって、アミノ酸がアスパラギン酸もしくはグルタミン酸であるとき、-カルボキシル基を通じて連結されているDまたはL-アミノ酸、あるいはカルボキシル基を通じて連結されているD、Lまたは混合DおよびLアミノ酸由来のペプチドであり、ここで置換基は、ヒドロキシル、アミノ、アルコキシ、カルボキシ、ベンジル、フェニル、ニトロ、チオール、チオアルコキシ、ハロゲン、アルキル、アリール、アルケニルおよびアルキニルから選択される；

T₅は、-OH、-N(Z₁)Z₂、R₅、-アミノ基を介して、または場合によって、アミノ酸がリジンもしくはオルニチンであるとき、-アミノ基を通じて連結されているDまたはL-アミノ酸、あるいはアミノ基を通じて連結されているD、Lまたは混合DおよびLアミノ酸由来のペプチド、化学官能基、レポーター基、あるいはコンジュゲート基であり；

Z₁は、水素、C₁-C₆アルキル、またはアミノ保護基であり；

Z₂は、水素、C₁-C₆アルキル、アミノ保護基、-C(=O)-(CH₂)_n-J-Z₃、-カルボキシル基を介して、または場合によって、アミノ酸がアスパラギン酸もしくはグルタミン酸であるとき、-カルボキシル基を通じて連結されているDまたはL-アミノ酸、あるいはカルボキシル基を通じて連結されているD、Lまたは混合DおよびLアミノ酸由来のペプチドであり；

Z₃は、水素、アミノ保護基、-C₁-C₆アルキル、-C(=O)-CH₃、ベンジル、ベンゾイル、または-(CH₂)_n-N(H)Z₁であり；

各Jは、O、SまたはNHであり；

R₅はカルボニル保護基であり；そして

nは2～約50である。

【0109】

研究されてきている別の種類のオリゴヌクレオチド模倣体は、モルホリノ環に付着した複素環塩基を有する、連結モルホリノ単位(モルホリノ核酸)に基づく。モルホリノ核酸において、モルホリノ単量体単位を連結する、いくつかの連結基が報告されてきている。

1つの種類の連結基は、非イオン性オリゴマー化合物を生じるように選択されてきている。非イオン性のモルホリノに基づくオリゴマー化合物は、細胞性タンパク質と望ましくない相互作用を有する可能性がより低い。モルホリノに基づくオリゴマー化合物は、細胞性タンパク質と望ましくない相互作用を形成する可能性がより低い、オリゴヌクレオチドの非イオン性模倣体である (Dwaine A. BraaschおよびDavid R. Corey, Biochemistry, 2002, 41(14), 4503 - 4510)。モルホリノに基づくオリゴマー化合物が、米国特許5,034,506、1991年7月23日発行に開示される。単量体サブユニットをつなぐ、多様な異なる連結基を有する、モルホリノ種のオリゴマー化合物が調製されてきている。

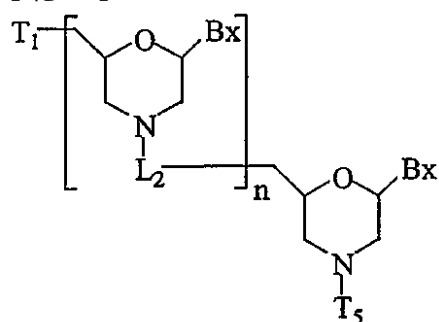
【0110】

10

単量体サブユニットをつなぐ、多様な異なる連結基 (L_2) を有する、モルホリノ核酸が調製されてきている。基本的な式を以下に示す：

【0111】

【化6】



20

【0112】

式中：

T_1 は、ヒドロキシルまたは保護されたヒドロキシルであり；

T_5 は、水素またはホスフェートまたはホスフェート誘導体であり；

L_2 は連結基であり；そして

n は2～約50である。

【0113】

30

オリゴヌクレオチド擬似体のさらなる種類は、シクロヘキセニル核酸 (CeNA) と称される。DNA/RNA分子に通常存在するフラノース環が、シクロヘニル (cyclohexenyl) 環で置換される。CeNA DMT保護ホスホロアミダイト単量体が調製されており、そして古典的なホスホロアミダイト化学反応にしたがって、オリゴマー化合物合成に用いられてきている。完全に修飾されたCeNAオリゴマー化合物、およびCeNAで修飾された特定の位を有するオリゴヌクレオチドが調製され、そして研究されてきている (Wangら, J. Am. Chem. Soc., 2000, 122, 8595 - 8602を参照されたい)。一般に、DNA鎖にCeNA単量体を取り込むと、DNA/RNAハイブリッドの安定性が増加する。CeNAオリゴアデニレートは、天然複合体と類似の安定性で、RNA相補体およびDNA相補体と複合体を形成した。天然核酸構造へのCeNA構造の取り込みを研究すると、NMRおよび円二色法によって、簡単なコンホメーション適応を伴って進行することが示された。さらに、RNAを標的とする配列にCeNAを取り込むと、血清に対して安定であり、そして大腸菌RNAアーゼを活性化して、標的RNA鎖の切断を生じることが可能であった。

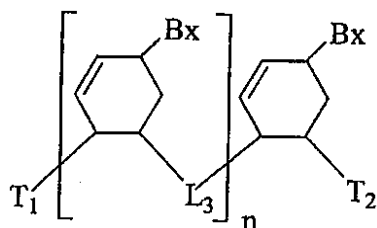
40

【0114】

CeNAの一般式を以下に示す：

【0115】

【化 7】



【 0 1 1 6 】

式中：

各 B x は複素環塩基部分であり；

T₁ は、ヒドロキシルまたは保護されたヒドロキシルであり；そして

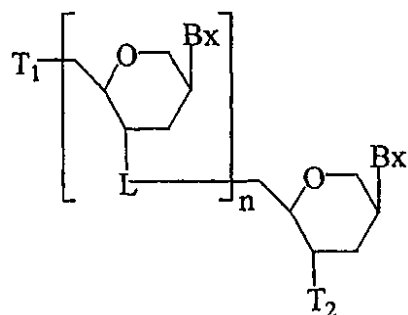
T₂ は、ヒドロキシルまたは保護されたヒドロキシルである。

【 0 1 1 7 】

1 以上のアンヒドロヘキシトール・ヌクレオシドから、別の種類のオリゴヌクレオチド擬似体（アンヒドロヘキシトール核酸）を調製することも可能であり（Wouters および Herdewijn, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1999, 9, 1563 - 1566）、そしてこの擬似体は、一般式：

【 0 1 1 8 】

【化 8】



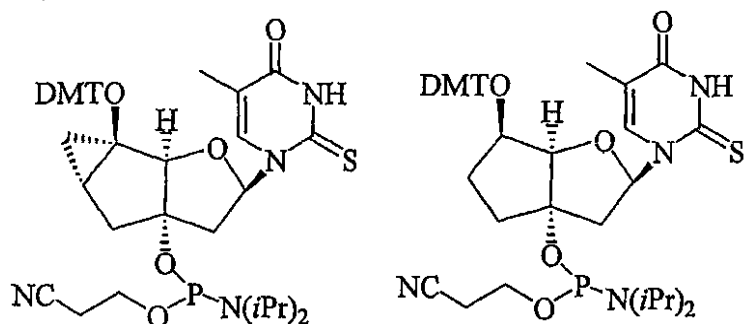
【 0 1 1 9 】

を有する。

式（アミダイト単量体を示す）：

【 0 1 2 0 】

【化 9】



【 0 1 2 1 】

を有する二環および三環ヌクレオシド類似体を含むように、さらなるオリゴヌクレオチド擬似体が調製されてきている（Steffensら, Helv. Chim. Acta, 1997, 80, 2426 - 2439; Steffensら, J. Am. Chem. Soc., 1999, 121, 3249 - 3255; および Rennebergら, J. Am. Chem. Soc., 2002, 124, 5993 - 6002 を参照されたい）。ホスホロアミダイト・アプローチを用いて、これら

10

20

30

40

50

の修飾ヌクレオシド類似体がオリゴマー化されてきており、そして三環ヌクレオシド類似体を含む、生じたオリゴマー化合物は、DNA、RNAおよびそれ自体にハイブリダイズした際、増加した熱安定性（ T_m ）を示してきている。二環ヌクレオシド類似体を含むオリゴマー化合物は、DNA二重鎖のものに近い熱安定性を示してきている。

【0122】

別の種類のオリゴヌクレオチド擬似体は、ホスホモノエステル核酸と称され、主鎖にリン基を取り込む。この種のオリゴヌクレオチド擬似体は、遺伝子発現阻害の分野（アンチセンス・オリゴヌクレオチド、リボザイム、センス・オリゴヌクレオチドおよび三重鎖形成オリゴヌクレオチド）で、核酸検出のプロープとして、そして分子生物学で使用する補助剤として、有用な物理的および生物学的および薬理学的特性を有すると報告されている。

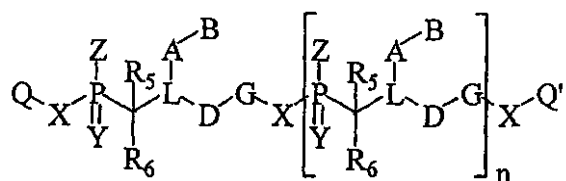
10

【0123】

一般式（マーカッシュ変動の定義に関しては：米国特許5,874,553および6,127,346を参照されたい）を以下に示す。

【0124】

【化10】



20

【0125】

フラノシル環がシクロブチル部分で置換されている、別のオリゴヌクレオチド擬似体が報告されてきている。

修飾糖

本発明のオリゴマー化合物はまた、1以上の置換糖部分を含むことも可能である。適切なオリゴマー化合物は：OH；F；O-、S-、またはN-アルキル；O-、S-、またはN-アルケニル；O-、S-、またはN-アルキニル；あるいはO-アルキル-O-アルキルであって、該アルキル、アルケニルおよびアルキニルが、 $C_1 - C_{12}$ アルキルまたは $C_2 - C_{12}$ アルケニルおよびアルキニルで置換されていることもまたは非置換であることも可能であるもの、から選択される糖置換基を含む。特に適切であるのは、 $O((CH_2)_nO)_mCH_3$ 、 $O(CH_2)_nOCH_3$ 、 $O(CH_2)_nNH_2$ 、 $O(CH_2)_nCH_3$ 、 $O(CH_2)_nONH_2$ 、および $O(CH_2)_nON((CH_2)_nCH_3)_2$ であって、 n および m が1～約10であるものである。他の適切なオリゴヌクレオチドは： $C_1 - C_{12}$ の低級アルキル、置換低級アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリル、アラルキル、O-アルカリルまたはO-アラルキル、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリル、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、RNA切断基、レポーター基、挿入剤（intercalator）、オリゴヌクレオチドの薬物動態特性を改善するための基、またはオリゴヌクレオチドの薬力学特性を改善するための基、および同様の特性を有する他の置換基、から選択される糖置換基を含む。1つの修飾には、2'-メトキシエトキシ（2'-O-CH₂CH₂OCH₃、2'-O-（2-メトキシエチル）または2'-MOEとしても知られる）（Martinら、Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504）、すなわちアルコキシアルコキシ基が含まれる。別の修飾には、以下の実施例に記載するような、2'-DMAOEとしても知られる2'-ジメチルアミノオキシエトキシ、すなわち $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$ 基、および2'-ジメチルアミノエトキシエトキシ（当該技術分野において、2'-O-ジメチル-アミノ-エトキシ-エチルまたは2'-DMAEOEとしても知られる）、すなわち2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₃)₂が含まれる。

30

40

50

【 0 1 2 6 】

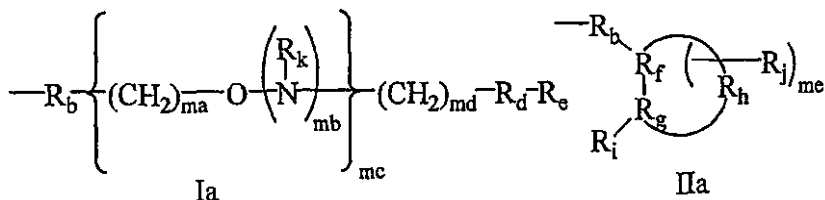
他の糖置換基には、メトキシ (- O - C H ₃)、アミノプロポキシ (- O C H ₂ C H ₂ C H ₂ N H ₂)、アリル (- C H ₂ - C H = C H ₂)、 - O - アリル (- O - C H ₂ - C H = C H ₂) およびフルオロ (F) が含まれる。2' - 糖置換基は、アラビノ (上) 位またはリボ (下) 位であることも可能である。1つの2' - アラビノ修飾は、2' - Fである。同様の修飾はまた、オリゴマー化合物上の他の位、特に3' 末端ヌクレオシド上のまたは2' - 5' 連結オリゴヌクレオチド内の糖の3' 位、および5' 末端ヌクレオチドの5' 位で行うことも可能である。オリゴマー化合物はまた、ペントフラノシル糖の代わりにシクロブチル部分などの糖擬似体を有することも可能である。こうした修飾糖構造の調製を解説する代表的な米国特許には、限定されるわけではないが、U . S . : 4 , 9 8 1 , 9 5 7 ; 5 , 1 1 8 , 8 0 0 ; 5 , 3 1 9 , 0 8 0 ; 5 , 3 5 9 , 0 4 4 ; 5 , 3 9 3 , 8 7 8 ; 5 , 4 4 6 , 1 3 7 ; 5 , 4 6 6 , 7 8 6 ; 5 , 5 1 4 , 7 8 5 ; 5 , 5 1 9 , 1 3 4 ; 5 , 5 6 7 , 8 1 1 ; 5 , 5 7 6 , 4 2 7 ; 5 , 5 9 1 , 7 2 2 ; 5 , 5 9 7 , 9 0 9 ; 5 , 6 1 0 , 3 0 0 ; 5 , 6 2 7 , 0 5 3 ; 5 , 6 3 9 , 8 7 3 ; 5 , 6 4 6 , 2 6 5 ; 5 , 6 5 8 , 8 7 3 ; 5 , 6 7 0 , 6 3 3 ; 5 , 7 9 2 , 7 4 7 ; および 5 , 7 0 0 , 9 2 0 が含まれ、前記特許のあるものは、本出願と同一所有である。

【 0 1 2 7 】

さらなる代表的な糖置換基には、式 I _a または II _a :

【 0 1 2 8 】

【 化 1 1 】



【 0 1 2 9 】

式中：

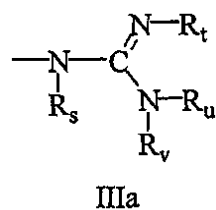
R_b は、O、S または NH であり；

R_d は、単結合、O、S または C (= O) であり；

R_e は、C₁ - C₁₂ アルキル、N (R_k) (R_m)、N (R_k) (R_n)、N = C (R_p) (R_q)、N = C (R_p) (R_r) であるか、または式 II _a

【 0 1 3 0 】

【 化 1 2 】



【 0 1 3 1 】

を有し；

R_p および R_q は、各々、独立に、水素または C₁ - C₁₂ アルキルであり；

R_r は - R_x - R_y であり；

各 R_s、R_t、R_u、および R_v は、独立に、水素、C (O) R_w、置換または非置換 C₁ - C₁₂ アルキル、置換または非置換 C₂ - C₁₂ アルケニル、置換または非置換 C₂ - C₁₂ アルキニル、アルキルスルホニル、アリールスルホニル、化学官能基またはコンジュゲート基であり、ここで置換基は、ヒドロキシル、アミノ、アルコキシ、カルボキシ、ベンジル、フェニル、ニトロ、チオール、チオアルコキシ、ハロゲン、アルキル、アリール、アルケニルおよびアルキニルから選択される；

あるいは場合によって、 R_u および R_v は、一緒に、これらが付着する窒素原子を伴って、フタルイミド部分を形成し；

各 R_w は、独立に、置換または非置換 $C_1 - C_{12}$ アルキル、トリフルオロメチル、シアノエチルオキシ、メトキシ、エトキシ、*t*-ブトキシ、アリルオキシ、9-フルオレニルメトキシ、2-(トリメチルシリル)-エトキシ、2, 2, 2-トリクロロエトキシ、ベンジルオキシ、ブチリル、イソ-ブチリル、フェニルまたはアリールであり；

R_k は、水素、窒素保護基または $-R_x - R_y$ であり；

R_p は、水素、窒素保護基または $-R_x - R_y$ であり；

R_x は、結合または連結部分であり；

R_y は、化学官能基、コンジュゲート基または固体支持体であり；

10

各 R_m および R_n は、独立に、H、窒素保護基、置換または非置換 $C_1 - C_{12}$ アルキル、置換または非置換 $C_2 - C_{12}$ アルケニル、置換または非置換 $C_2 - C_{12}$ アルキニルであり、ここで置換基は、ヒドロキシル、アミノ、アルコキシ、カルボキシ、ベンジル、フェニル、ニトロ、チオール、チオアルコキシ、ハロゲン、アルキル、アリール、アルケニル、アルキニル； NH_3^+ 、 $N(R_u)(R_v)$ 、グアニジノおよびアシル、ここで前記アシルは酸アミドまたはエステルである、から選択される；

あるいは R_m および R_n は、一緒に、窒素保護基であるか、場合によってNおよびOから選択されるさらなるヘテロ原子を含む環構造に連結されるか、または化学官能基であり；

R_i は、 OR_z 、 SR_z 、または $N(R_z)_2$ であり；

20

各 R_z は、独立に、H、 $C_1 - C_8$ アルキル、 $C_1 - C_8$ ハロアルキル、 $C(=NH)N(H)R_u$ 、 $C(=O)N(H)R_u$ または $OC(=O)N(H)R_u$ であり；

R_f 、 R_g および R_h は、約4～約7の炭素原子を有するか、または約3～約6の炭素原子および1もしくは2のヘテロ原子を有する環系を含み、ここで前記ヘテロ原子は、酸素、窒素、およびイオウから選択され、そして前記環系は、脂肪族、不飽和脂肪族、芳香族、または飽和もしくは不飽和複素環である；

R_j は、1～約10の炭素原子を有するアルキルまたはハロアルキル、2～約10の炭素原子を有するアルケニル、2～約10の炭素原子を有するアルキニル、6～約14の炭素原子を有するアリール、 $N(R_k)(R_m)OR_k$ 、ハロ、 SR_k または CN であり；

m_a は1～約10であり；

30

各 m_b は、独立に、0または1であり；

m_c は、0または1～10の整数であり；

m_d は1～10の整数であり；

m_e は、0、1、または2であり；そして

但し m_c が0の場合、 m_d は1より大きい。

の基が含まれる。

【0132】

式Iの代表的な置換基が、米国特許出願第09/130, 973号、1998年8月7日出願、標題「キャップ化2'-オキシエトキシ・オリゴヌクレオチド」に開示される。

式IIの代表的な環状置換基が、米国特許出願第09/123, 108号、1998年7月27日出願、標題「コンホメーション的にあらかじめ編成された、RNA標的化2'-オリゴマー化合物」に開示される。

40

【0133】

特に適切な糖置換基には、 $O((CH_2)_nO)_mCH_3$ 、 $O(CH_2)_nOCH_3$ 、 $O(CH_2)_nNH_2$ 、 $O(CH_2)_nCH_3$ 、 $O(CH_2)_nONH_2$ 、および $O(CH_2)_nON((CH_2)_nCH_3)_2$ 、式中、 n および m は1～約10である、が含まれる。

【0134】

式IIIおよびIVに示す代表的なグアニジノ置換基は、共有される米国特許出願09/349, 040、表題「官能化オリゴマー」、1999年7月7日出願に開示される。

50

代表的なアセトアミド置換基が、米国特許 6, 147, 200 に開示される。

【0135】

代表的なジメチルアミノエチルオキシエチル置換基が、国際特許出願 PCT / US 99 / 17895、表題「2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル-オリゴマー化合物」、1999年8月6日出願に開示される。

【0136】

修飾核酸塩基 / 天然存在核酸塩基

オリゴマー化合物にはまた、核酸塩基（当該技術分野において、しばしば単に「塩基」または「複素環塩基部分」と称される）修飾または置換も含むことも可能である。本明細書において、「非修飾」または「天然」核酸塩基には、プリン塩基、アデニン（A）およびグアニン（G）、並びにピリミジン塩基、チミン（T）、シトシン（C）およびウラシル（U）が含まれる。本明細書においてまた複素環塩基部分とも称される修飾核酸塩基には、他の合成および天然核酸塩基が含まれ、例えば 5 - メチルシトシン（5 - me - C）、5 - ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2 - アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの 6 - メチルおよび他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの 2 - プロピルおよび他のアルキル誘導体、2 - チオウラシル、2 - チオチミンおよび 2 - チオシトシン、5 - ハロウラシルおよびシトシン、5 - プロピニル（-C≡C-CH₃）ウラシルおよびシトシンおよびピリミジン塩基の他のアルキニル誘導体、6 - アゾウラシル、シトシンおよびチミン、5 - ウラシル（シュードウラシル）、4 - チオウラシル、8 - ハロ、8 - アミノ、8 - チオール、8 - チオアルキル、8 - ヒドロキシルおよび他の 8 - 置換アデニン類およびグアニン類、5 - ハロ、特に 5 - ブロモ、5 - トリフルオロメチルおよび他の 5 - 置換ウラシル類およびシトシン類、7 - メチルグアニンおよび 7 - メチルアデニン、2 - F - アデニン、2 - アミノ - アデニン、8 - アザグアニンおよび 8 - アザアデニン、7 - デアザグアニンおよび 7 - デアザアデニン、並びに 3 - デアザグアニンおよび 3 - デアザアデニンがある。

【0137】

複素環塩基部分にはまた、プリン塩基またはピリミジン塩基が、他の複素環、例えば 7 - デアザ - アデニン、7 - デアザグアニン、2 - アミノピリジンおよび 2 - ピリドンで置換されたものが含まれることも可能である。さらなる核酸塩基には、米国特許 3, 687, 808 に開示されるもの、The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, 858 - 859 ページ, Kroschwitz, J.I. 監修, John Wiley & Sons, 1990 に開示されるもの、Englisch, Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613 に開示されるもの、および Sanghvi, Y.S., 第15章, Antisense Research and Applications, 289 - 302 ページ, Crooke, S.T. および Lebleu, B. 監修, CRC Press, 1993 に開示されるものが含まれる。これらの核酸塩基の特定のものは、本発明のオリゴマー化合物の結合親和性を増加させるのに特に有用である。これらには、5 - 置換ピリミジン類、6 - アザピリミジン類、並びに N - 2、N - 6 および O - 6 置換プリン類が含まれ、2 - アミノプロピルアデニン、5 - プロピニルウラシルおよび 5 - プロピニルシトシンが含まれる。5 - メチルシトシン置換は、核酸二重鎖安定性を、0.6 ~ 1.2 増加させることが示されてきており（Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. および Lebleu, B. 監修, Antisense Research and Applications, CRC Press, ボカトン, 1993, pp. 276 - 278）、そして現在、適切な塩基置換であり、2'-O - メトキシエチル糖修飾と組み合わせられた場合、さらにより適している。

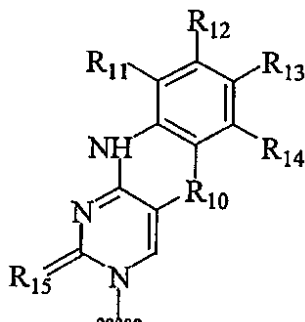
【0138】

本発明の 1 つの側面において、1 以上の複素環塩基部分の代わりに、多環複素環化合物を有するオリゴマー化合物が調製される。いくつかの三環複素環化合物が、先に報告され

ている。これらの化合物は、標的鎖への修飾された鎖の結合特性を増加させるため、アンチセンス適用で日常的に用いられる。最も研究されている修飾は、グアノシンを標的とし、したがって、これらはG-クランプまたはシチジン類似体と称されている。これらの多環複素環化合物の多くは、一般式：

【0139】

【化13】



10

【0140】

を有する。

第二の鎖のグアノシンと3つの水素結合を作成する、代表的なシトシン類似体には、1,3-ジアザフェノキサジン-2-オン ($R_{10} = O$, $R_{11} - R_{14} = H$) (Kurc 20 havovra, Nucleosides and Nucleotides, 1997, 16, 1837-1846)、1,3-ジアザフェノチアジン-2-オン ($R_{10} = S$, $R_{11} - R_{14} = H$) (Lin, K.-Y.; Jones, R.J.; Matteucci, M.J. Am. Chem. Soc. 1995, 117, 3873-3874) および 6,7,8,9-テトラフルオロ-1,3-ジアザフェノキサジン-2-オン ($R_{10} = O$, $R_{11} - R_{14} = F$) (Wang, J.; Lin, K.-Y. Matteucci, M. Tetrahedron Lett. 1998, 39, 8385-8388) が含まれる。オリゴヌクレオチドに取り込まれると、これらの塩基修飾は、相補グアニンとハイブリダイズすることが示され、そして後者はまた、アデニンとハイブリダイズし、そして延長されたスタッキング相互作用によって、らせん熱安定性を増進することも示された (米国特許出願、表題「修飾ペプチド核酸」 30、2002年5月24日出願、第10/155,920号；および米国特許出願、表題「ヌクレアーゼ耐性キメラ・オリゴヌクレオチド」、2002年5月24日出願、第10/013,295号も参照されたい)。

【0141】

シトシン類似体/置換が、強固な1,3-ジアザフェノキサジン-2-オン骨格に付着する、アミノエトキシ部分を有する場合 ($R_{10} = O$, $R_{11} = -O-(CH_2)_2-NH_2$, $R_{12} - R_{14} = H$)、さらなるらせん安定化特性が観察されてきている (Lin, K.-Y.; Matteucci, M.J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 8531-8532)。結合研究によって、単一の取り込みが、その相補標的DNAまたはRNAへのモデルオリゴヌクレオチドの結合親和性を増進しうることが立証され、これは5-メチルシトシン ($dC5^{me}$) に比較して、最高18°の T_m を持ち、これまでに知られる単一修飾の親和性増進の最高である。一方、らせん安定性が増大しても、オリゴヌクレオチドの特異性は損なわれない。 T_m データによって、 $dC5^{me}$ に比較して、完全マッチ配列およびミスマッチ配列間のより大きな区別が示される。束縛されたアミノ基が、相補グアニンのフーグスティーン面、すなわちO6と相互作用する、さらなる水素結合ドナーとして働き、それによって、4つの水素結合を形成することが示唆された。これは、G-クランプの親和性増加が、延長された塩基スタッキングおよびさらなる特異的水素結合の組み合わせによって仲介されることを意味する。

40

【0142】

本発明に受け入れられる、さらなる三環複素環化合物およびこれらを用いる方法が、米

50

国特許第6,028,183号、2000年5月22日発行、および米国特許第6,007,992号、1999年12月28日発行に開示される。

【0143】

フェノキサジン誘導体の結合親和性が増進されるとともに、その配列特異性が損なわれないことから、こうした誘導体は、より強力なアンチセンスに基づく薬剤の開発のため、価値ある核酸塩基類似体となる。実際、フェノキサジン置換を含有する7ヌクレオチドが、RNアーゼHを活性化し、細胞取り込みを増進し、そして増加したアンチセンス活性を示すことが可能であることを立証する、*in vitro*実験から、見込みのあるデータが得られている(Linら, J. Am. Chem. Soc., 1998, 120, 8531-8532)。活性増進は、G-クランプの場合、さらにより顕著であり、これは単一置換が、20量体2'-デオキシホスホロチオエート・オリゴヌクレオチドの*in vitro*効力を有意に改善することが示されたためである(Flanaganら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, 96, 3513-3518)。にもかかわらず、オリゴヌクレオチド設計を最適にし、そして生物学的活性に対するこれらの複素環修飾の影響をよりよく理解するため、オリゴマーのヌクレアーゼ安定性に対する影響を評価することが重要である。

10

【0144】

複素環塩基として有用なさらなる修飾多環複素環化合物が、限定されるわけではないが、上記のU.S. 3,687,808とともに、U.S. : 4,845,205; 5,130,302; 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,434,257; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,594,121; 5,596,091; 5,614,617; 5,645,985; 5,646,269; 5,750,692; 5,830,653; 5,763,588; 6,005,096; および5,681,941; 並びに米国特許出願第09/996,292号、2001年11月28日出願に開示される。

20

【0145】

コンジュゲート

本発明のオリゴマー化合物に付加することも可能な別の置換は、生じるオリゴマー化合物の活性、細胞分布、または細胞取り込みを増進する、1以上の部分またはコンジュゲートの連結を伴う。1つの態様において、こうした修飾オリゴマー化合物は、ヒドロキシル基またはアミノ基などの官能基に、コンジュゲート基を共有結合させることによって調製される。本発明のコンジュゲート基には、挿入剤、レポーター分子、ポリアミン、ポリアミド、ポリエチレングリコール、ポリエーテル、オリゴマーの薬力学特性を増進する基、およびオリゴマーの薬物動態特性を増進する基が含まれる。典型的なコンジュゲート基には、コレステロール、脂質、リン脂質、ビオチン、フェナジン、フォレート、フェナントリジン、アントラキノン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、クマリン、および色素が含まれる。薬力学特性を増進する基には、本発明の関連において、オリゴマー取り込みを改善する基、分解に対するオリゴマー耐性を増進する基、および/またはRNAとの配列特異的ハイブリダイゼーションを強化する基が含まれる。薬物動態特性を増進する基には、本発明の関連において、オリゴマー取り込み、分布、代謝または排出を改善する基が含まれる。代表的なコンジュゲート基は、国際特許出願PCT/US92/09196、1992年10月23日出願に開示される。

30

40

【0146】

コンジュゲート部分には、限定されるわけではないが、脂質部分、例えばコレステロール部分(Letsingerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556)、コール酸(Manoharanら, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053-1060)、チオエーテル、例えば、ヘキシル-S-トリチルチオール(Manoharanら, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660, 3

50

06-309; Manoharanら, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765-2770)、チコレステロール(Oberhauserら, Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538)、脂肪族鎖、例えばドデカンジオールまたはウンデシル残基(Saison-Behmoarasら, EMBO J., 1991, 10, 1111-1118; Kabanovら, FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svinarchukら, Biochimie, 1993, 75, 49-54)、リン脂質、例えばジ-ヘキサデシル-rac-グリセロールまたはトリエチルアンモニウム 1,2-ジ-O-ヘキサデシル-rac-グリセロ-3-H-ホスホネート(Manoharanら, Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Sheaら, Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783)、ポリアミンまたはポリエチレングリコール鎖(Manoharanら, Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973)、あるいはアダマンタン酢酸(Manoharanら, Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654)、パルミチル部分(Mishraら, Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237)、あるいはオクタデシルアミンまたはヘキシルアミノ-カルボニル-オキシコレステロール部分(Crookeら, J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923-937)が含まれる。

10

20

【0147】

本発明のオリゴマー化合物を、活性薬剤物質、例えばアスピリン、ワーファリン、フェニルブタゾン、イブプロフェン、スプロフェン、フェンブフェン、ケトプロフェン、(S)-(+) - プラノプロフェン、カルプロフェン、ダンシルザルコシン、2,3,5-トリヨード安息香酸、フルフェナム酸、フォリン酸、ベンゾチアジアジド、クロロチアジド、ジアゼピン、インドメタシン、バルビツレート、セファロスポリン、サルファ剤、抗糖尿病剤、抗細菌剤または抗生物質にコンジュゲート化することもまた可能である。オリゴヌクレオチド-薬剤コンジュゲートおよびその調製が、米国特許出願09/334,130(1999年6月15日出願)に記載される。

30

【0148】

こうしたオリゴヌクレオチド・コンジュゲートの調製を解説する代表的な米国特許には、限定されるわけではないが、U.S.: 4,828,979; 4,948,882; 5,218,105; 5,525,465; 5,541,313; 5,545,730; 5,552,538; 5,578,717; 5,580,731; 5,580,731; 5,591,584; 5,109,124; 5,118,802; 5,138,045; 5,414,077; 5,486,603; 5,512,439; 5,578,718; 5,608,046; 4,587,044; 4,605,735; 4,667,025; 4,762,779; 4,789,737; 4,824,941; 4,835,263; 4,876,335; 4,904,582; 4,958,013; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,245,022; 5,254,469; 5,258,506; 5,262,536; 5,272,250; 5,292,873; 5,317,098; 5,371,241; 5,391,723; 5,416,203; 5,451,463; 5,510,475; 5,512,667; 5,514,785; 5,565,552; 5,567,810; 5,574,142; 5,585,481; 5,587,371; 5,595,726; 5,597,696; 5,599,923; 5,599,928および5,688,941が含まれる。

40

【0149】

キメラ・オリゴマー化合物

オリゴマー化合物のすべての位が均質に修飾されていることは必要ではなく、そして実

50

際、上述の修飾の1より多くが、単一のオリゴマー化合物に、またはオリゴマー化合物内のヌクレオシドなどの単一の単量体サブユニットに取り込まれていることさえ可能である。本発明はまた、キメラ・オリゴマー化合物であるオリゴマー化合物も含む。本発明の関連において、「キメラ」オリゴマー化合物または「キメラ」は、各々少なくとも1つの単量体単位、すなわち核酸に基づくオリゴマーの場合、ヌクレオチドで構成される、2以上の化学的に異なる領域を含有する、オリゴマー化合物である。

【0150】

キメラ・オリゴマー化合物は、典型的には、ヌクレアーゼ分解に対する増加した耐性、増加した細胞取り込み、および/または標的核酸に対する増加した結合親和性を与えるように修飾されている、少なくとも1つの領域を含有する。オリゴマー化合物のさらなる領域は、RNA:DNAハイブリッドまたはRNA:RNAハイブリッドを切断することが可能な酵素の基質として働くことも可能である。例として、RNAアーゼHは、RNA:DNA二重鎖のRNA鎖を切断する細胞性エンドヌクレアーゼである。RNAアーゼHの活性化は、したがって、RNA標的の切断を生じ、それによって、遺伝子発現の阻害効率を非常に増進させる。その結果、キメラを用いた場合、例えば同じ標的領域にハイブリダイズするホスホロチオエート・デオキシオリゴヌクレオチドに比較して、より短いオリゴマー化合物で、匹敵する結果を得ることも、しばしば可能である。RNA標的の切断は、ゲル電気泳動、および必要な場合、当該技術分野に知られる関連する核酸ハイブリダイゼーション技術によって、日常的に検出可能である。

10

【0151】

本発明のキメラ・オリゴマー化合物は、2以上の上述のようなオリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド類似体、オリゴヌクレオシド、および/またはオリゴヌクレオチド類似体の混成構造として形成されることも可能である。こうしたオリゴマー化合物はまた、当該技術分野に、ハイブリッド、ヘミマー、ギャップマーまたは反転ギャップマーと称されてきている。こうしたハイブリッド構造の調製を解説する、代表的な米国特許には、限定されるわけではないが、U.S.: 5,013,830; 5,149,797; 5,220,007; 5,256,775; 5,366,878; 5,403,711; 5,491,133; 5,565,350; 5,623,065; 5,652,355; 5,652,356; および5,700,922が含まれる。

20

【0152】

3'-エンド修飾

本発明の1つの側面において、オリゴマー化合物には、3'-エンド糖コンホメーションを誘導するように合成的に修飾されたヌクレオシドが含まれる。ヌクレオシドは、複素環塩基、糖部分または両方に、望ましい3'-エンド糖コンホメーションを誘導する、合成修飾を取り込むことも可能である。これらの修飾ヌクレオシドを用いて、RNA様ヌクレオシドを模倣して、オリゴマー化合物の特定の特性が増進されうようにする一方、望ましい3'-エンド・コンホメーション形状が維持されるようにする。RNA干渉の必要条件(例えばトリガー)として、RNA型二重鎖(A型らせん、主に3'-エンド)への見かけの優先性があり、これは、2'-デオキシ-2'-F-ヌクレオシドで構成される二重鎖が、線虫系において、RNAi反応を誘発するのに効率的であるようであるという事実によって、部分的に支持される。より安定な3'-エンド・ヌクレオシドを用いることによって増進される特性には、限定されるわけではないが、タンパク質結合、タンパク質解離速度、吸収およびクリアランスの修飾を通じた、薬物動態特性の調節;ヌクレアーゼ安定性ととも化学的安定性の調節;結合親和性およびオリゴマー特異性の調節(酵素とともに相補配列に対する親和性および特異性);並びにRNA切断有効性の増加が含まれる。本発明は、C3'-エンド型コンホメーションを支持するような方式で修飾された1以上のヌクレオシドを有するRNAiのオリゴマー・トリガーを提供する。

30

40

【0153】

【化 1 4】

スキーム 1



C 2' - エンド / サザン

C 3' - エンド / ノーザン

10

【0 1 5 4】

ヌクレオシド・コンホメーションは、ペントフラノシル糖の 2' 位、3' 位または 4' 位での置換を含む多様な要因によって影響を受ける。電気陰性置換基は、一般的に、アキシアル位を好み、一方、立体的に制約のある置換基は、一般的に、エクアトリアル位を好む (Principles of Nucleic Acid Structure, Wolfgang Sanger, 1984, Springer-Verlag)。

以下の図 2 に例示するように、認識要素として、2' - OH を維持しつつ、3' - エンド・コンホメーションを支持する 2' 位の修飾が達成可能である (Gallo ら, Tetrahedron (2001), 57, 5707 - 5713. Harry - O'kuru ら, J. Org. Chem., (1997), 62 (6), 1754 - 1759 および Tang ら, J. Org. Chem. (1999), 64, 747 - 754)。あるいは、3' - エンド・コンホメーション配置を採用して、電気陰性フッ素原子をアキシアル位に配置する、2' デオキシ - 2' F - ヌクレオシド (Kawasaki ら, J. Med. Chem. (1993), 36, 831 - 841) に例示されるように、2' - OH の欠失によって、3' - エンド・コンホメーションの優先性を達成することも可能である。リボース環の他の修飾、例えば 4' - F 修飾ヌクレオシドを生じる 4' 位での置換 (Guillerm ら, Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters (1995), 5, 1455 - 1460 および Owen ら, J. Org. Chem. (1976), 41, 3010 - 3017)、または例えばメタノカルバ (methanocarba) ヌクレオシド類似体を生じる修飾 (Jacobson ら, J. Med. Chem. Lett. (2000), 43, 2196 - 2203 および Lee ら, Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters (2001), 11, 1333 - 1337) もまた、3' - エンド・コンホメーションに対する優先性を誘導する。類似の方式で、RNAi 反応のオリゴマー・トリガーは、コンホメーションが C 3' - エンド型コンホメーションにロックされた方式で修飾された 1 以上のヌクレオシド、すなわちロック化核酸 (LNA、Singh ら, Chem. Commun. (1998), 4, 455 - 456)、およびエチレン架橋核酸 (ENA、Morita ら, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (2002), 12, 73 - 76) で構成されることも可能である。本発明に受け入れられる修飾ヌクレオシドの例を以下の表 I に示す。これらの実施例は、代表であって、そして包括的ではないことが意味される。

20

30

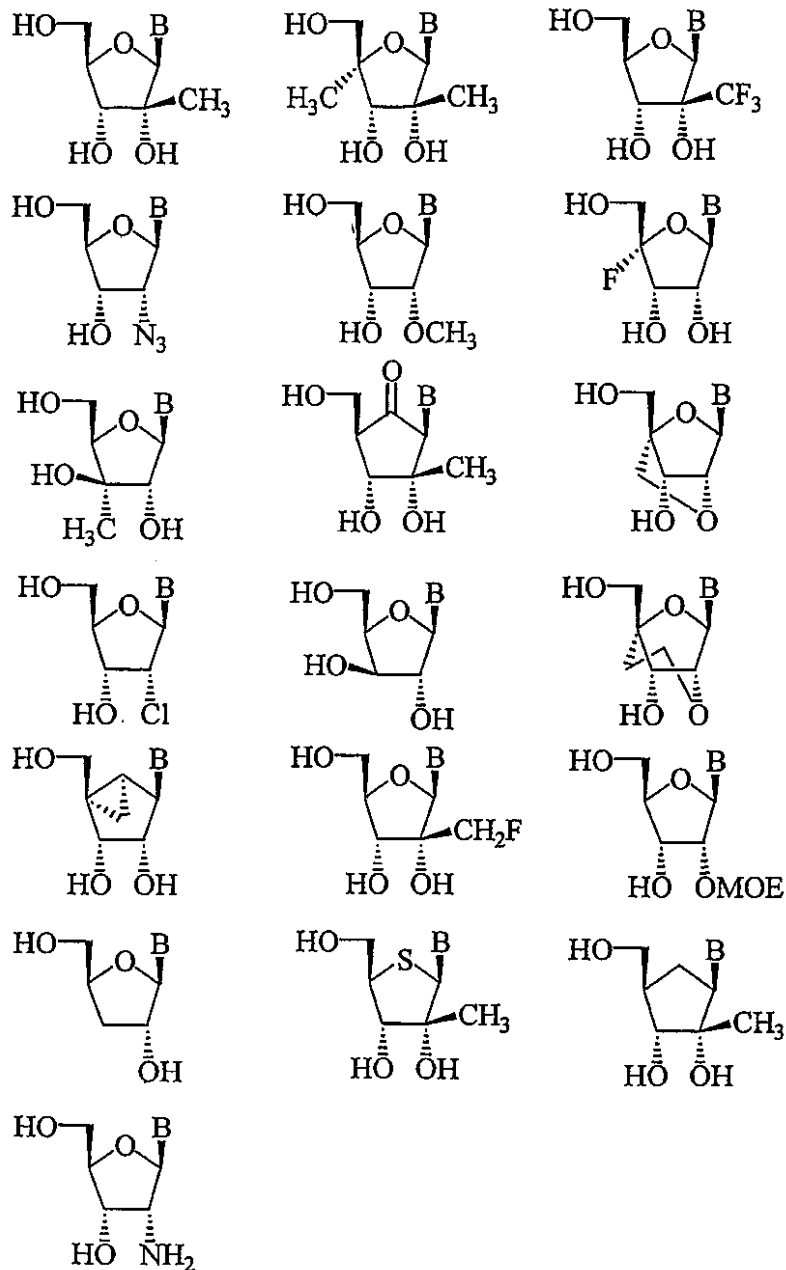
40

【0 1 5 5】

表 I

【0 1 5 6】

【表 1】



10

20

30

【0157】

分子力学計算、核磁気共鳴分光およびCD測定などの多様な方法によって、修飾ヌクレオシドおよびそのオリゴマーの1つのコンホメーションを概算することも可能である。したがって、RNA様コンホメーション、オリゴマーの背景におけるA型二重鎖形状を誘導すると予測される修飾が、本発明の修飾オリゴヌクレオチドで使用するために選択される。本発明に受け入れられる、多くの修飾されたヌクレオシドの合成が、当該技術分野に知られる（例えばChemistry of Nucleosides and Nucleotides Vol 1-3, Leroy B. Townsend監修, 1988, Plenum Press、および以下の実施例セクションを参照されたい）。RNA依存性RNAポリメラーゼの阻害剤/基質であることが知られるヌクレオシド（例えばHCV NS5B）。

40

【0158】

1つの側面において、本発明は、核酸標的に対して、天然RNAに比較して増進された特性を有するように調製されたオリゴヌクレオチドに関する。標的を同定し、そして標的配列の部分に相補的な、有効な長さおよび配列を有するオリゴヌクレオチドを選択する。

50

選択される配列の各ヌクレオシドは、可能な増進修飾に関して精査される。別の修飾は、3'-エンド・コンホメーション形状を有するヌクレオシドでの、1以上のRNAヌクレオシドの置換であろう。こうした修飾は、天然RNAに比較して、化学的安定性およびヌクレアーゼ安定性を増進させうる一方、同時に、合成し、そして/またはオリゴヌクレオチドに取り込むのがより安価で、そしてより容易である。選択される配列は、さらに、領域に分割可能であり、そしてキメラ立体配置の結果であることも可能な増進修飾に関して、各領域のヌクレオシドを評価することも可能である。末端ヌクレオシドの1以上に作成することも可能な、好適な修飾がしばしばあるため、5'末端および3'末端にもまた考慮を払う。本発明のオリゴマー化合物には、単一鎖上に、あるいは単数または複数の二本鎖配列の少なくとも1つの5'位上に、少なくとも1つの5'修飾リン酸基を含む。ヌクレオシド間連結、コンジュゲート基、置換糖または塩基、1以上のヌクレオシドのヌクレオシド擬似体での置換、および意図される標的に対して、選択される配列を増進可能な他の修飾いずれかなどのさらなる修飾もまた考慮される。

10

【0159】

ホモ二重鎖核酸のコンホメーション形状を記載するのに用いられる用語は、RNAに関しては「A型」、そしてDNAに関しては「B型」である。RNA二重鎖およびDNA二重鎖のそれぞれのコンホメーション形状は、核酸繊維のX線回折分析から決定された(ArnotおよびHukins, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1970, 47, 1504)。一般的に、RNA:RNA二重鎖は、DNA:DNA二重鎖よりも、より安定であり、そしてより高い融点(T_m)を有する(Sangerら, Principles of Nucleic Acid Structure, 1984, Springer-Verlag; ニューヨーク州ニューヨーク; Lesnikら, Biochemistry, 1995, 34, 10807-10815; Conteら, Nucleic Acids Res., 1997, 25, 2627-2634)。RNAの安定性増加は、いくつかの構造特徴に起因すると考えられているが、最も顕著なのは、A型形状から生じる、改善された塩基スタッキング相互作用である(Searleら, Nucleic Acids Res., 1993, 21, 2051-2056)。RNA中に2'ヒドロキシルが存在すると、糖がC3'エンド・パッカー(pucker)、すなわちノーザン・パッカーとも称されるゆがみに偏向し、これによって二重鎖がA型形状を支持するようになる。さらに、RNAの2'ヒドロキシル基が、水が仲介する水素結合のネットワークを形成して、RNA二重鎖を安定化させるのを補助することも可能である(Egliら, Biochemistry, 1996, 35, 8489-8494)。一方、デオキシ核酸は、C2'エンド糖パッカー、すなわちサザン・パッカーとも称される、を選択し、これは、より安定でないB型形状を与えると考えられる(Sanger, W. (1984) Principles of Nucleic Acid Structure, Springer-Verlag, ニューヨーク州ニューヨーク)。本明細書において、B型形状は、C2'-エンド・パッカーおよびO4'-エンド・パッカー両方を包含する。これは、B型二重鎖を生じるフラノース・コンホメーションを考慮する際は、O4'-エンド・パッカーの貢献もまた考慮すべきであることを指摘する、Bergerら, Nucleic Acids Research, 1998, 26, 2473-2480と一致する。

20

30

40

【0160】

しかし、DNA:RNAハイブリッド二重鎖は、通常、純粋なRNA:RNA二重鎖よりも安定でなく、そして配列に応じて、DNA:DNA二重鎖より安定であることも、また安定でないこともありうる(Searleら, Nucleic Acid Res., 1993, 21, 2051-2056)。ハイブリッド二重鎖の構造は、A型およびB型形状の中間であり、劣ったスタッキング相互作用を生じうる(Laneら, Eur. J. Biochem., 1993, 215, 297-306; Fedoroffら, J. Mol. Biol., 1993, 233, 509-523

50

; Gonzalezら, Biochemistry, 1995, 34, 4969 - 4982; Hortonら, J. Mol. Biol., 1996, 264, 521 - 533)。標的RNAおよび合成配列間に形成される二重鎖安定性は、限定されるわけではないが、アンチセンスおよびRNA干渉などの療法の中核となり、これはこれらの機構が、RNA標的鎖への合成オリゴヌクレオチド鎖の結合を必要とするためである。アンチセンスの場合、mRNAの有効な阻害には、アンチセンスDNAがmRNAと非常に高い結合親和性を有することが必要である。そうでなければ、合成オリゴヌクレオチド鎖および標的mRNA鎖の間の望ましい相互作用が、まれにしか起こらず、有効性が減少するであろう。

【0161】

1つの日常的に用いられる糖パッカリングの修飾法は、糖形状に影響を及ぼす置換基での、糖の2'位の置換である。環コンホメーションに対する影響は、2'位の置換基の性質に依存する。糖パッカリング効果を決定するため、いくつかの異なる置換基が研究されてきている。例えば、2'-ハロゲンが研究されてきており、2'-フルオロ誘導体がC3'-エンド型の最大集団(65%)を示し、そして2'-ヨードが最低集団(7%)を示すことが示されている。アデノシン(2'-OH)対デオキシアデノシン(2'-H)の集団は、それぞれ36%および19%である。さらに、アデノシン二量体の2'-フルオロ基(2'-デオキシ-2'-フルオロアデノシン-2'-デオキシ-2'-フルオロアデノシン)の影響は、スタッキングされるコンホメーションの安定化とさらに関連する。

【0162】

予期されるように、2'-OH基を2'-F基で置換することによって、相対的二重鎖安定性を増進して、それによってC3'-エンド集団を増加させることも可能である。2'-F結合が非常に極性の性質であり、そしてC3'-エンド・パッカリングを非常に優先することから、スタッキングされるコンホメーションが、A型二重鎖に安定化されうると推測される。UV淡色効果、円二色法、および¹H NMRのデータもまた、ハロ置換基の電気陰性度が減少するにつれて、スタッキングの度合いが減少することを示す。さらに、糖部分の2'位の立体バルクは、B型二重鎖よりもA型二重鎖によりよく適合する。したがって、二ヌクレオシドリン酸の3'末端上の2'置換基は、スタッキング・コンホメーションにいくつかの影響を発揮すると考えられる：立体反発作用、フラノース・パッカリング優先性、静電反発作用、疎水性誘引、および水素結合能。これらの置換基の影響は、置換基の分子の大きさ、電気陰性度、および疎水性によって決定されると考えられる。相補鎖の融点もまた、2'置換アデノシン二リン酸で増加する。コンホメーションの3'-エンド優先性または置換基の存在が、結合増加に関与するかどうかは明らかでない。しかし、隣接する塩基の重複(スタッキング)の増大は、3'-エンド・コンホメーションを用いて達成可能である。

【0163】

ヌクレアーゼ耐性を増加させ、そしてヌクレオチドへの非常に高い結合親和性を生じさせる、1つの合成2'修飾は、2'-メトキシエトキシ(2'-MOE、2'-OCH₂CH₂OCH₃)側鎖である(Bakerら, J. Biol. Chem., 1997, 272, 11944 - 12000)。2'-MOE置換が直ちに生じる利点の1つは、結合親和性の改善であり、これは、多くの類似の2'修飾、例えばO-メチル、O-プロピル、およびO-アミノプロピルよりも大きい。2'-O-メトキシエチル置換基を有するオリゴヌクレオチドもまた、遺伝子発現のアンチセンス阻害剤であることが示されてきており、これはin vivoでの使用に見込みがある特徴を伴う(Martin, P., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486 - 504; Altmannら, Chimia, 1996, 50, 168 - 176; Altmannら, Biochem. Soc. Trans., 1996, 24, 630 - 637; および Altmannら, Nucleosides Nucleotides, 1997, 16, 917 - 926)。DNAに比較して、2'-MOE

10

20

30

40

50

修飾を有するオリゴヌクレオチドは、改善されたRNA親和性およびより高いヌクレアーゼ耐性を示す。ウィング・ヌクレオシドに2'-MOE置換基を、そしてデオキシ-ホスホロチオエート・ヌクレオチドの内部領域を有するキメラ・オリゴヌクレオチド（ギャップ化オリゴヌクレオチドまたはギャップマーとも称される）は、低用量で、動物モデルにおける腫瘍増殖の有効な減少を示した。2'-MOE置換オリゴヌクレオチドはまた、いくつかの疾患状態において、アンチセンス剤として、顕著な見込みを示している。1つのこうしたMOE置換オリゴヌクレオチドが、現在、CMV網膜炎治療の臨床試験において、研究されている。

【0164】

化学的性質の定義

本明細書において、別に定義しない限り、アルキルは、 $C_1 - C_{12}$ 、 $C_1 - C_8$ 、または $C_1 - C_6$ の直鎖または（可能な場合）分枝鎖脂肪族ヒドロカルビル（hydrocarbon）を意味する。

【0165】

本明細書において、別に定義しない限り、ヘテロアルキルは、鎖の末端部分を含めて、鎖中に少なくとも1つまたは約1～約3のヘテロ原子を含有する、 $C_1 - C_{12}$ 、 $C_1 - C_8$ 、または $C_1 - C_6$ の直鎖または（可能な場合）分枝鎖脂肪族ヒドロカルビルを意味する。適切なヘテロ原子には、N、OおよびSが含まれる。

【0166】

本明細書において、別に定義しない限り、シクロアルキルは、 $C_3 - C_{12}$ 、 $C_3 - C_8$ 、または $C_3 - C_6$ の脂肪族ヒドロカルビル環を意味する。

本明細書において、別に定義しない限り、アルケニルは、直鎖または（可能な場合）分枝鎖ヒドロカルビル部分であることも可能であり、少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を含有する、 $C_2 - C_{12}$ 、 $C_2 - C_8$ 、または $C_2 - C_6$ のアルケニルを意味する。

【0167】

本明細書において、別に定義しない限り、アルキニルは、直鎖または（可能な場合）分枝鎖ヒドロカルビル部分であることも可能であり、少なくとも1つの炭素-炭素三重結合を含有する、 $C_2 - C_{12}$ 、 $C_2 - C_8$ 、または $C_2 - C_6$ のアルキニルを意味する。

【0168】

本明細書において、別に定義しない限り、ヘテロシクロアルキルは、少なくとも3つの環員を含有し、そのうちの少なくとも1つが炭素であり、そしてそのうちの1、2または3つの環員が炭素以外である、環部分を意味する。炭素原子の数は、1～約12、または1～約6の間で多様であることも可能であり、そして環員の総数は、3～約15、または約3～約8の間で多様であることも可能である。適切な環ヘテロ原子は、N、OおよびSである。適切なヘテロシクロアルキル基には、モルホリノ、チオモルホリノ、ピペリジニル、ピペラジニル、ホモピペリジニル、ホモピペラジニル、ホモモルホリノ、ホモチオモルホリノ、ピロロジニル、テトラヒドロオキサゾリル、テトラヒドロイミダゾリル、テトラヒドロチアゾリル、テトラヒドロイソキサゾリル、テトラヒドロピラゾリル、フラニル、ピラニル、およびテトラヒドロイソチアゾリルが含まれる。

【0169】

本明細書において、別に定義しない限り、アリールは、少なくとも1つのアリール環を含有する炭化水素環構造いずれも意味する。適切なアリール環は、約6～約20の環炭素を有する。適切なアリール環には、フェニル、ナフチル、アントラセニル、およびフェナントレニルが含まれる。

【0170】

本明細書において、別に定義しない限り、ヘタリールは、少なくとも1つの完全に不飽和である環であって、炭素および非炭素原子からなる前記環を含有する環部分を意味する。環系は、約1～約4の環を含有することも可能である。炭素原子の数は、1～約12、または1～約6の間で多様であることも可能であり、そして環員の総数は、3～約15、または約3～約8の間で多様であることも可能である。適切な環ヘテロ原子は、N、Oお

10

20

30

40

50

よびSである。適切なヘタリール部分には、限定されるわけではないが、ピラゾリル、チオフェニル、ピリジル、イミダゾリル、テトラゾリル、ピリジル、ピリミジニル、プリニル、キナゾリニル、キノキサリニル、ベンズイミダゾリル、ベンゾチオフェニル等が含まれる。

【0171】

本明細書において、別に定義しない限り、部分が、化合物部分、例えばヘタリールアルキル（ヘタリールおよびアルキル）、アラルキル（アリールおよびアルキル）等として定義される場合、下位部分の各々は、本明細書に定義するとおりである。

【0172】

本明細書において、別に定義しない限り、電子求引基は、付着している炭素から電荷を求引する基、例えばシアノ基またはイソシアナート基である。注目すべき他の電子求引基には、その電気陰性度が、炭素のものを超える、例えばハロゲン、ニトロ、あるいは1以上のシアノ基、イソチオシアナート基、ニトロ基またはハロ基でオルト位またはパラ位が置換されたフェニルが含まれる。

【0173】

本明細書において、別に定義しない限り、用語、ハロゲンおよびハロは、通常の意味を有する。適切なハロ（ハロゲン）置換基は、Cl、Br、およびIである。

前述の場合による置換基は、本明細書において、別に定義しない限り、望ましい特性に応じて適切な置換基である。含まれるのは、ハロゲン（Cl、Br、I）、アルキル、アルケニル、およびアルキニル部分、NO₂、NH₃（置換および非置換）、酸部分（例えば -CO₂H、-OSO₃H₂ など）、ヘテロシクロアルキル部分、ヘタリール部分、アリール部分等である。先行する式のすべてにおいて、波線（～）は、5'-ホスフェートの酸素またはイオウへの結合を示す。

【0174】

ホスフェート保護基には、US特許、US 5,760,209、US 5,614,621、US 6,051,699、US 6,020,475、US 6,326,478、US 6,169,177、US 6,121,437、US 6,465,628に記載されるものが含まれる。

【0175】

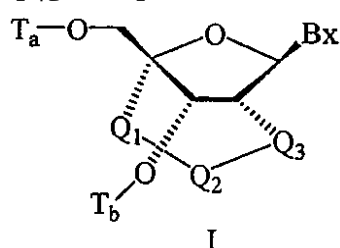
本発明は、二環糖部分を含む新規ヌクレオシド、およびこうしたヌクレオシドを少なくとも1つ含むオリゴマー化合物を開示する。二環糖部分は、天然RNAヌクレオシドと関連する望ましくない特性のいくつかを伴わず、RNA様の、A型を有するヌクレオシドを提供する、ロック化3'-エンド糖コンホメーションを有する。直ちに生じる利点の1つは、ロック化、例えば二環糖ヌクレオシドでRNAヌクレオシドを置換することによって得られる、ヌクレアーゼ安定性である。二環糖修飾ヌクレオシドはまた、LNAに関して先に報告されている結合親和性の増進を有すると期待される（修飾あたり3～8）。

【0176】

本発明のヌクレオシドは、2'位から4'位に架橋を有し、これは、以下の構造Iに示すような-Q₁-Q₂-Q₃-によって定義される。

【0177】

【化15】



【0178】

式中：

10

20

30

40

50

B x は複素環塩基部分であり；

各 T_a および T_b は、独立に、H、ヒドロキシル保護基、活性化リン部分、コンジュゲート基または支持体への共有結合であり；

- Q₁ - Q₂ - Q₃ - は、- CH₂ - N (R₁) - CH₂ -、- C (= O) - N (R₁) - CH₂ -、- CH₂ - O - N (R₁) - または N (R₁) - O - CH₂ - であり；そして

R₁ は、C₁ - C₁₂ アルキルまたはアミノ保護基である。

【 0 1 7 9 】

本発明はまた、構造 I の二環糖部分を有する少なくとも 1 つのヌクレオシドを有するオリゴマー化合物も提供する。構造 I のヌクレオシドを用いて、オリゴマー化合物の特性を修飾することも可能である。こうしたヌクレオシドを、単一の位または複数の位で、オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオシドに入れて、ヘミマー、ブロックマー、ギャップマー、またはさらなる複雑な交互のオリゴマー化合物またはキメラ・オリゴマー化合物を生成することも可能である。構造 I を有するヌクレオシドを用いて、さらなる複雑な化学特性を含む、オリゴマー化合物の特性を修飾して、本質的にオリゴヌクレオチド模倣体であるオリゴマー化合物、例えばペプチド核酸 (P N A)、モルホリノ核酸、シクロヘキセニル核酸 (C e N A)、アンヒドロヘキシトール核酸、ロック化核酸 (L N A および E N A)、二環および三環核酸、ホスホノモノエステル核酸およびシクロブチル核酸を調製することも可能である。

10

【 0 1 8 0 】

本発明の組成は、カップリング反応において、活性化リン組成物 (例えば活性化リン含有置換基を有する化合物) の使用を例示する。本明細書において、用語「活性化リン組成物」には、別の単量体またはオリゴマー化合物のヒドロキシル基と反応性である、活性化リン含有置換基を有し、リン含有ヌクレオチド間連結を形成する、単量体およびオリゴマー化合物が含まれる。こうした活性化リン基は、P^{I I I} 原子価状態の活性化リン原子を含有し、そして当該技術分野に知られ、そして限定されるわけではないが、ホスホロアミダイト、H - ホスホネート、ホスフェートリエステルおよびキラル補助基が含まれる。1 つの合成固相合成は、活性化ホスフェートとしてホスホロアミダイトを利用する。ホスホロアミダイトは、P^{I I I} の化学的性質を利用する。続いて、既知の方法を用いて、中間体ホスファイト化合物を P^V 状態に酸化して、いくつかの態様において、ホスホジエステルまたはホスホロチオエート・ヌクレオチド間連結を得る。さらなる活性化ホスフェートおよびホスファイトが、T e t r a h e d r o n R e p o r t 第 3 0 9 号 (B e a u c a g e および I y e r , T e t r a h e d r o n , 1 9 9 2 , 4 8 , 2 2 2 3 - 2 3 1 1) に開示される。

20

30

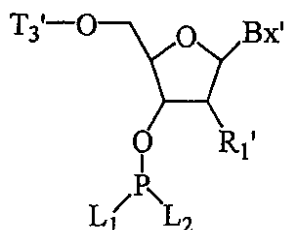
【 0 1 8 1 】

活性化リン基は、限定されるわけではないが、オリゴヌクレオシドおよびオリゴヌクレオチドとともに、塩基または糖あるいは両方が他の基で修飾されたかまたは他の基とコンジュゲート化したオリゴヌクレオチドを含む、広い範囲のオリゴマー化合物の調製に有用である。やはり含まれるのは、限定されるわけではないが、ペプチド核酸 (P N A)、モルホリノ核酸、シクロヘキセニル核酸 (C e N A)、アンヒドロヘキシトール核酸、ロック化核酸 (L N A および E N A)、二環および三環核酸、ホスホノモノエステル核酸、およびシクロブチル核酸を含むオリゴヌクレオチド擬似体である。活性化リン基と反応性ヒドロキシル基のカップリングを利用する、1 つの種類のオリゴマー合成の代表的な例は、広く用いられるホスホロアミダイト・アプローチである。適切な条件下で、ホスホロアミダイト・シントンを反応性ヒドロキシル基と反応させて、ホスファイト連結を形成し、これをさらに、ホスホジエステル連結またはホスホロチオエート連結に酸化する。このアプローチは、一般的に、式：

40

【 0 1 8 2 】

【化 16】



【0183】

式中：

Bx' は、場合によって保護された複素環塩基部分であり；

R1' は、独立に、Hまたは場合によって保護された糖置換基であり；

T3' は、H、ヒドロキシル保護基、ヌクレオシド、ヌクレオチド、オリゴヌクレオシド、またはオリゴヌクレオチドであり；

L1 は N(R1)R2 であり；

R1 および R2 は、独立に、C1 - C12 直鎖または分枝鎖アルキルであり；

あるいは R1 および R2 は、一緒に連結されて、R1 および R2 が付着する窒素原子を含む、4 ~ 7 員複素環系を形成し、ここで環系は、場合によって、O、N および S から選択される、少なくとも1つのさらなるヘテロ原子を含む；

L2 は、Pg - O -、Pg - S -、C1 - C12 直鎖または分枝鎖アルキル、CH3 (CH2)0 - 10 - O - または - NR5R6 であり；

Pg は、保護 / ブロッキング基であり；そして

R5 および R6 は、独立に、水素、C1 - C12 直鎖または分枝鎖アルキル、シクロアルキルまたはアリールであるか；

あるいは場合によって、R5 および R6 は、これらが付着する窒素原子と一緒に、O、S および N から選択される、さらなるヘテロ原子を含むことも可能な環状部分を形成し；あるいは

L1 および L2 は、L1 および L2 が付着するリン原子と一緒に、キラル補助基を形成する

のヌクレオシド・ホスホロアミダイトを利用する。

【0184】

酸化の前および後にヌクレオチド間連結のリン原子に付着する基 (L1 および L2) は、モルホリンなどの、窒素含有環状部分を含むことも可能である。こうした酸化ヌクレオシド間連結には、ホスホロモルホリドチオエート連結が含まれる (Wilkinson, Nucleosides and nucleotides, 1991, 10, 319 - 322)。本発明に受け入れられる、さらなる環状部分には、オキソ、アシル、アルコキシ、アルコキシカルボニル、アルキル、アルケニル、アルキニル、アミノ、アミド、アジド、アリール、ヘテロアリール、カルボン酸、シアノ、グアニジノ、ハロ、ハロアルキル、ハロアルコキシ、ヒドラジノ、ODMT、アルキルスルホニル、ニトロ、スルフィド、スルホン、スルホンアミド、チオールおよびチオアルコキシなどの基で置換されていることも可能な、単環、二環または三環部分が含まれる。窒素を含む適切な二環構造は、フタルイミドである。

【0185】

ハイブリダイゼーション

本発明の関連において、「ハイブリダイゼーション」は、オリゴマー化合物の相補鎖の対形成を意味する。本発明において、対形成の1つの機構は、オリゴマー化合物の鎖の相補的ヌクレオシドまたはヌクレオチド塩基 (核酸塩基) 間の、ワトソン - クリック、フーグスティーヌまたは逆フーグスティーヌ水素結合であることも可能な水素結合を伴う。例えば、アデニンおよびチミンは、水素結合の形成を通じて対形成する、相補的核酸塩基である。ハイブリダイゼーションは、多様な環境下で起こることも可能である。

【0186】

アンチセンス・オリゴマー化合物は、該化合物の標的核酸への結合が、標的核酸の正常な機能に干渉して、活性損失を生じ、そして特異的結合が望ましい条件下、すなわち *in vivo* アッセイまたは療法処置の場合は生理学的条件下、そして *in vitro* アッセイの場合は、アッセイが行われる条件下で、非標的核酸配列へのアンチセンス・オリゴマー化合物の非特異的結合を回避するために十分な度合いで相補性であるならば、特異的にハイブリダイズ可能である。

【0187】

本発明において、句「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」または「ストリンジェントな条件」は、本発明のオリゴマー化合物が、標的配列にハイブリダイズするが、最も少数の他の配列にしかハイブリダイズしない条件を指す。ストリンジェントな条件は、配列依存性であり、そして異なる環境で多様であろうし、そして本発明の関連において、オリゴマー化合物が標的配列にハイブリダイズする「ストリンジェントな条件」は、オリゴマー化合物の性質および組成、並びに該化合物を調べるアッセイによって、決定される。

10

【0188】

「相補的」は、本明細書において、2つの核酸塩基がどこに位置するかにかかわらず、2つの核酸塩基の正確な対形成の能力を指す。例えば、オリゴマー化合物の特定の位の核酸塩基が、DNA、RNA、またはオリゴヌクレオチド分子である標的核酸の特定の位の核酸塩基と水素結合することが可能である場合、該オリゴヌクレオチドおよび該標的核酸間の水素結合の位は、相補的な位であるとみなされる。各分子において、十分な数の相補的な位が、互いに水素結合することが可能な核酸塩基で占められている場合、オリゴマー化合物およびさらなるDNA、RNA、またはオリゴヌクレオチド分子は互いに相補的である。したがって、「特異的にハイブリダイズ可能」および「相補的」は、安定で、そして特異的な結合が、オリゴヌクレオチドおよび標的核酸間で起こるような、十分な数の核酸塩基に渡る、十分な度合いの正確な対形成または相補性を示すのに用いられる用語である。

20

【0189】

アンチセンス・オリゴマー化合物の配列は、特異的にハイブリダイズ可能であるために、その標的核酸と100%相補的である必要はないことが、当該技術分野に理解されている。さらに、オリゴヌクレオチドは、間にあるセグメントまたは隣接するセグメントがハイブリダイゼーション事象に関与しないように、1以上のセグメントに渡ってハイブリダイズすることも可能である（例えばループ構造またはヘアピン構造）。本発明のオリゴマー化合物は、標的とする標的核酸配列内の標的領域に、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%の配列相補性を含むことも可能である。例えば、アンチセンス・オリゴマー化合物の20核酸塩基のうち18が標的領域に相補的であり、そしてしたがって特異的にハイブリダイズする、アンチセンス・オリゴマー化合物は、90%の相補性に相当するであろう。この例では、残りの非相補的核酸塩基は、クラスター化されていることも、または相補核酸塩基の中に散在していることも可能であり、そして互いにまたは相補的核酸塩基に対して隣接している必要はない。こうしたものとして、標的核酸と完全な相補性を持つ2つの領域が隣接する、4つの非相補核酸塩基を有する、長さ18の核酸塩基であるアンチセンス・オリゴマー化合物は、標的核酸と、全体で77.8%の相補性を有し、そしてしたがって、本発明の範囲に属するであろう。当該技術分野に知られるBLASTプログラム（基本的局所並列検索ツール）およびPowerBLASTプログラム（Altschulら, J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; ZhangおよびMadden, Genome Res., 1997, 7, 649-656）を用いて、アンチセンス・オリゴマー化合物と、標的核酸の領域の相補性パーセントを日常的に決定することも可能である。

30

40

【0190】

50

本発明の標的

本発明の関連において、特定の核酸分子へのアンチセンス・オリゴマー化合物の「標的化」は、多段階プロセスであることも可能である。該プロセスは、通常、その機能を調節すべき核酸配列の同定で始まる。この標的核酸は、例えば、その発現が特定の障害または疾患状態と関連する細胞性遺伝子（または該遺伝子から転写される mRNA）、あるいは感染性病原体由来の核酸分子であることも可能である。

【0191】

標的化プロセスは、通常、望ましい効果、例えばタンパク質調節が生じるであろうように、アンチセンス相互作用が起こるための、標的核酸内の少なくとも1つの標的領域、セグメント、または部位の決定もまた含む。本発明の関連内で、用語「領域」は、少なくとも1つの同定可能な構造、機能、または特性を有する標的核酸の部分と定義される。標的核酸の領域内にセグメントがある。「セグメント」は、標的核酸内のより小さい部分または領域の下位部分と定義される。「部位」は、本発明において、標的核酸内の位置と定義される。用語、領域、セグメント、および部位はまた、本発明のオリゴマー化合物、例えば3つの別個のセグメントを有するギャップ化オリゴマー化合物を記載するのにも使用可能である。

10

【0192】

当該技術分野に知られるように、翻訳開始コドンは、典型的には、5' - AUG（転写された mRNA 分子において；対応する DNA 分子では 5' - ATG）であるため、翻訳開始コドンはまた、「AUG コドン」、「開始コドン」または「AUG 開始コドン」とも称される。少数の遺伝子は、RNA 配列、5' - GUG、5' - UUG または 5' - CUG を有する翻訳開始コドンを有し、そして 5' - AUA、5' - ACG および 5' - CUG が *in vivo* で機能することが示されてきている。したがって、用語「翻訳開始コドン」および「開始コドン」は、各例のイニシエーターアミノ酸が、典型的にはメチオニン（真核生物）またはホルミルメチオニン（原核生物）であっても、多くのコドン配列を含むことも可能である。真核遺伝子および原核遺伝子が、2以上の代替開始コドンを有する可能性もあり、そのいずれか1つが、特定の細胞種または組織において、あるいは一組の特定の条件下で、翻訳開始に優先的に利用される可能性もあることもまた当該技術分野に知られる。本発明の関連において、「開始コドン」および「翻訳開始コドン」は、こうしたコドンの配列（単数または複数）に関わらず、核酸標的をコードする遺伝子から転写される mRNA の翻訳を開始するのに、*in vivo* で用いられる、単数または複数のコドンを指す。遺伝子の翻訳終結コドン（または「終止コドン」）は、3つの配列、すなわち 5' - UAA、5' - UAG および 5' - UGA（対応する DNA 配列は、それぞれ、5' - TAA、5' - TAG および 5' - TGA である）の1つを有することも可能であることもまた、当該技術分野に知られる。

20

30

【0193】

用語「開始コドン領域」および「翻訳開始コドン領域」は、翻訳開始コドンからどちらかの方向（すなわち 5' または 3'）の約 25 ~ 約 50 の隣接するヌクレオチドを含む mRNA または遺伝子の部分を指す。同様に、用語「終止コドン領域」および「翻訳終結コドン領域」は、翻訳終結コドンからどちらかの方向（すなわち 5' または 3'）の約 25 ~ 約 50 の隣接するヌクレオチドを含む mRNA または遺伝子の部分を指す。その結果、「開始コドン領域」（または「翻訳開始コドン領域」）および「終止コドン領域」（または「翻訳終結コドン領域」）は、本発明のオリゴマー化合物で有効に標的化可能な、すべての領域である。

40

【0194】

翻訳開始コドンおよび翻訳終結コドンの間の領域を指すことが当該技術分野に知られるオープンリーディングフレーム（ORF）または「コード領域」もまた、有効に標的化可能な領域である。本発明の関連内で、適切な領域は、遺伝子のオープンリーディングフレーム（ORF）の翻訳開始コドンまたは終結コドンを含む、遺伝子内領域である。

【0195】

50

他の標的領域には、翻訳開始コドンから 5' 方向の mRNA の部分を指すことが当該技術分野に知られ、そしてしたがって mRNA の 5' キャップ部位および翻訳開始コドンの間のヌクレオチド（または遺伝子上の対応するヌクレオチド）を含む、5' 非翻訳領域（5' UTR）、並びに翻訳終結コドンから 3' 方向の mRNA の部分を指すことが当該技術分野に知られ、そしてしたがって mRNA の翻訳終結コドンおよび 3' 端の間のヌクレオチド（または遺伝子上の対応するヌクレオチド）を含む、3' 非翻訳領域（3' UTR）が含まれる。mRNA の 5' キャップ部位は、5' - 5' 三リン酸連結を介して、mRNA の最も 5' の残基に連結している、N7 - メチル化グアノシン残基を含む。mRNA の 5' キャップ領域は、5' キャップ構造自体とともに、キャップ部位に隣接する最初の 50 ヌクレオチドを含むとみなされる。5' キャップ領域もまた、標的とするのに適切である。 10

【0196】

直接翻訳される真核 mRNA 転写物もあるが、多くは、翻訳される前に転写物から切除される「イントロン」として知られる、1 以上の領域を含有する。残った（そしてしたがって翻訳される）領域は、「エクソン」として知られ、そして一緒にスプライシングされ、連続する mRNA 配列を形成する。スプライシング部位、すなわちイントロン - エクソン接合部またはエクソン - イントロン接合部の標的化もまた、異常なスプライシングが疾患に関連付けられている状況、または特定のスプライシング産物の過剰発現が疾患に関連付けられている状況で、特に有用でありうる。再編成または欠失による異常な融合接合部もまた適切な標的部位である。異なる遺伝子供給源から、2 つ（以上）の mRNA のスプライシングのプロセスを介して産生される mRNA 転写物が、「融合転写物」として知られる。例えば DNA または プレ mRNA を標的とするアンチセンス・オリゴマー化合物を用いて、イントロンを有効に標的化可能であることもまた知られる。 20

【0197】

当該技術分野において、代替 RNA 転写物が、DNA の同一ゲノム領域から産生可能であることもまた知られる。これらの代替転写物は、一般的に、「変異体」として知られる。より具体的には、「プレ mRNA 変異体」は、同一ゲノム DNA から産生される転写物であって、同一ゲノム DNA から産生される他の転写物と、開始位置または停止位置のいずれかが異なり、そしてイントロン配列およびエクソン配列両方を含有する、前記転写物である。 30

【0198】

スプライシング中の 1 以上のエクソン領域またはイントロン領域、あるいはその一部の切除に際して、プレ mRNA 変異体は、より小さい「mRNA 変異体」を産生する。その結果、mRNA 変異体は、プロセシングされたプレ mRNA であり、そしてユニークな各プレ mRNA 変異体は、常に、スプライシングの結果、ユニークな mRNA 変異体を産生するはずである。これらの mRNA 変異体はまた、「選択的スプライシング変異体」としても知られる。プレ mRNA 変異体のスプライシングがまったく起こらないのであれば、プレ mRNA 変異体は、mRNA 変異体と同一である。

【0199】

当該技術分野において、変異体が、転写を開始するかまたは停止する代替シグナルの使用を通じて、産生可能であり、そしてプレ mRNA および mRNA が、1 より多い開始コドンまたは停止コドンを有しうることもまた、当該技術分野に知られる。代替開始コドンを用いて、プレ mRNA または mRNA から生じる変異体は、そのプレ mRNA または mRNA の「代替開始変異体」として知られる。代替停止コドンを用いる転写物は、そのプレ mRNA または mRNA の「代替停止変異体」として知られる。1 つの特別な種類の代替停止変異体は、「ポリ A 変異体」であり、ここでは、産生される多数の転写物が、転写機構による「ポリ A 停止シグナル」の 1 つの代替選択から生じ、それによって、ユニークなポリ A 部位で終結する転写物を産生する。本発明の関連内で、本明細書に記載する種類の変異体もまた、適切な標的核酸である。 40

【0200】

オリゴマー化合物がハイブリダイズする標的核酸上の位置は、本明細書において、以下、「適切な標的セグメント」と称される。本明細書において、用語「適切な標的セグメント」は、活性オリゴマー化合物が標的とする標的領域の少なくとも8核酸塩基部分と定義される。理論に束縛されることは望ましくないが、これらの標的セグメントは、現在、ハイブリダイゼーションのため接近可能な標的核酸部分に相当すると考えられる。

【0201】

典型的で適切なオリゴマー化合物には、標的核酸、例えば細胞性遺伝子または該遺伝子から転写されるmRNAの5'末端から少なくとも8つの隣接核酸塩基を含むオリゴマー化合物が含まれる（残りの核酸塩基は、標的核酸に特異的にハイブリダイズ可能な化合物の5'末端のすぐ上流から始まって、そしてオリゴヌクレオチドが約8～約80核酸塩基を含有するまで続く、同じオリゴヌクレオチドの連続ストレッチである）。さらなる適切なオリゴマー化合物は、例示化合物の1つの3'末端から少なくとも8つの隣接核酸塩基を含むオリゴヌクレオチド配列に代表される（残りの核酸塩基は、標的核酸に特異的にハイブリダイズ可能な化合物の3'末端のすぐ下流から始まって、そしてオリゴヌクレオチドが約8～約80核酸塩基を含有するまで続く、同じオリゴヌクレオチドの連続ストレッチである）。本明細書に例示する適切な化合物を手にした当業者は、過度な実験を伴わずに、さらなるオリゴマー化合物を同定可能であろう。

【0202】

ひとたび1以上の標的領域、セグメントまたは部位が同定されてきたら、標的に十分に相補的な、すなわち十分によく、そして十分な特異性でハイブリダイズし、望ましい効果を与える、オリゴマー化合物を選択する。

【0203】

本発明の1つの態様にしたがって、本発明のオリゴマー化合物およびその相補体を含む、一連の核酸二重鎖を、単数または複数の特定の標的のため、設計することも可能である。1以上の天然または修飾核酸塩基を付加することによって、鎖の末端を修飾して、突出部を形成することも可能である。次いで、アンチセンス鎖の相補体として、二重鎖のセンス鎖を設計し、そして合成し、そしてまたセンス鎖は、いずれの末端にも、修飾または付加を含有することも可能である。例えば、1つの態様において、二重鎖の両方の鎖は、中央部の核酸塩基に渡って相補的であり、各々、一方または両方の末端に突出部を有する。

【0204】

例えば、配列CGAGAGGCGGACGGGACCG（配列番号1）を有し、そしてデオキシチミジン（dT）の2核酸塩基突出部を有する、アンチセンス・オリゴマー化合物を含む二重鎖は、以下の構造：

【0205】

【化17】

```
cgagaggcggacgggaccgTT      アンチセンス鎖（配列番号1）
|||||
TTgctctccgcctgcctggc      相補鎖（配列番号2）
```

【0206】

を有するであろう。

本明細書に開示する方法によって、二重鎖のRNA鎖を合成することも可能であるし、または例えばDharmacon Research Inc.（コロラド州ラファイエット）などの多様なRNA合成企業から購入することも可能である（以下のRNA合成に関するセクションも参照されたい）。ひとたび合成したら、相補鎖をアニーリングする。一本鎖をアリコットし、そして50μMの濃度に希釈する。ひとたび希釈したら、30μlの各鎖を15μlのアニーリング緩衝液の5x溶液と合わせる。緩衝液の最終濃度は、100mM酢酸カリウム、30mM HEPES-KOH、pH7.4、および2mM酢酸マグネシウムである。最終量は75μlである。この溶液を90℃で1分間インキュベーションし、そして次いで15秒間遠心分離する。試験管を37℃で1時間静置し、この

10

20

30

40

50

時点で、dsRNA二重鎖を実験に用いる。dsRNA化合物の最終濃度は20 μMである。この溶液を凍結して(-20)保存するか、または最大5回まで凍結融解する。

【0207】

ひとたび調製したら、標的発現を調節する能力に関して、望ましい合成二重鎖を評価する。細胞が80%集密(confluency)に達したら、本発明の少なくとも1つのオリゴマー化合物を含む合成二重鎖で、これら进行处理する。96ウェルプレートで増殖させた細胞に関しては、ウェルを200 μlのOPTI-MEM-1血清減少培地(Gibco BRL)で1回洗浄し、そして次いで、12 μg/mlのLIPOFECTIN(Gibco BRL)および最終濃度200 nMの望ましいdsRNA化合物を含有する130 μlのOPTI-MEM-1で処理する。5時間処理した後、培地を新鮮な培地と交換する。処理16時間後、細胞を採取し、この時点でRNAを単離し、そしてRT-PCRによって標的減少を測定する。

10

【0208】

別の態様において、本明細書に同定される「適切な標的セグメント」を、標的発現を調節するさらなるオリゴマー化合物のスクリーニングに使用することも可能である。「調節剤」は、標的をコードする核酸分子の発現を減少させるかまたは増加させ、そして適切な標的セグメントに相補的な、少なくとも8つの核酸塩基部分を含む、オリゴマー化合物である。スクリーニング法は、標的をコードする核酸分子の適切な標的セグメントと、1以上の候補調節剤を接触させ、そして標的をコードする核酸分子の発現を減少させるかまたは増加させる1以上の候補調節剤に関して選択する工程を含む。ひとたび、単数または複数の候補調節剤が、標的をコードする核酸分子の発現を調節可能である(例えば減少させるかまたは増加させるかいずれか)ことが示されたら、標的の機能の研究に、あるいは、本発明にしたがって研究剤、診断剤、または療法剤としての使用のため、該調節剤を使用することも可能である。

20

【0209】

本発明に適した標的セグメントを、本発明のそれぞれの相補的アンチセンス・オリゴマー化合物と合わせて、安定化された二本鎖(二重鎖)オリゴヌクレオチドを形成することも可能である。

【0210】

スクリーニングおよび標的検証

さらなる態様において、選択されるタンパク質の発現を調節する、さらなるオリゴマー化合物に関するスクリーニングにおいて、「適切な標的セグメント」を使用することも可能である。「調節剤」は、タンパク質をコードする核酸分子の発現を減少させるかまたは増加させ、そして適切な標的セグメントに相補的な、少なくとも8核酸塩基部分を含む、オリゴマー化合物である。スクリーニング法は、タンパク質をコードする核酸分子の適切な標的セグメントと、1以上の候補調節剤を接触させ、そしてタンパク質をコードする核酸分子の発現を減少させるかまたは増加させる1以上の候補調節剤に関して選択する工程を含む。ひとたび、単数または複数の候補調節剤が、ペプチドをコードする核酸分子の発現を調節可能である(例えば減少させるかまたは増加させるかいずれか)ことが示されたら、ペプチド機能のさらなる研究に、あるいは、本発明にしたがって研究剤、診断剤、または療法剤としての使用のため、該調節剤を使用することも可能である。

30

40

【0211】

本発明のオリゴマー化合物を、薬剤発見および標的検証の分野に適用することもまた可能である。本発明は、薬剤を発見する試みの中で、本明細書で同定するオリゴマー化合物および適切な標的を使用して、タンパク質および疾患状態、表現型、または状態の間に存在する関係を解明することを含む。これらの方法には、標的ペプチドを検出するかまたは調節する方法であって、試料、組織、細胞、または生物と、本発明のオリゴマー化合物を接触させ、標的の核酸レベルまたはタンパク質レベル、並びに/あるいは関連する表現型終点または化学的終点を、処理後のある時点で測定し、そして場合によって、測定した値を非処理試料の測定値または本発明のさらなるオリゴマー化合物で処理した試料の測定値

50

に比較することを含む、前記方法が含まれる。これらの方法を、他の実験と平行して、または組み合わせて行って、標的検証プロセスのため、未知の遺伝子の機能を決定するか、あるいは特定の疾患、状態、または表現型の治療または防止の標的として、特定の遺伝子産物の妥当性を決定することもまた可能である。

【0212】

存在する文献にしたがって、RNAi活性に対するヌクレオシド修飾の効果を評価する (Elbashirら, Nature (2001), 411, 494-498; Nishikuraら, Cell (2001), 107, 415-416; および Bassら, Cell (2000), 101, 235-238)。

【0213】

キット、研究試薬、および療法剤

本発明のオリゴマー化合物を、診断剤、療法剤、予防剤に、そして研究試薬およびキットとして利用することも可能である。さらに、特定の遺伝子の機能を解明するか、または生物学的経路の多様なメンバーの機能間を区別するため、一般の当業者は、しばしば、非常に強い特異性で遺伝子発現を阻害することが可能なアンチセンス・オリゴヌクレオチドを用いる。

【0214】

キットおよび診断剤において用いるため、本発明のオリゴマー化合物を、単独で、または他のオリゴマー化合物または療法剤と組み合わせて、示差分析および/またはコンビナトリアル分析におけるツールとして用いて、細胞および組織内で発現される遺伝子の一部または完全な相補体の発現パターンを解明することも可能である。

【0215】

限定されない例の1つとして、1以上のアンチセンス・オリゴマー化合物で処理した細胞または組織内の発現パターンを、アンチセンス・オリゴマー化合物で処理していない対照細胞または組織と比較して、そして例えば、調べた遺伝子の疾患関連、シグナル伝達経路、細胞局在、発現レベル、サイズ、構造または機能に関連するような、遺伝子発現の示差レベルに関して、生じたパターンを分析する。これらの分析を、刺激細胞または非刺激細胞に対して、そして発現パターンに影響を及ぼす他の化合物およびまたはオリゴマー化合物の存在下または非存在下で、行うことも可能である。

【0216】

当該技術分野に知られる遺伝子発現分析の方法の例には、DNAアレイまたはマイクロアレイ (BrazmaおよびVilo, FEBS Lett., 2000, 480, 17-24; Celisら, FEBS Lett., 2000, 480, 2-16)、SAGE (遺伝子発現の連続分析) (Maddenら, Drug Discov. Today, 2000, 5, 415-425)、READS (消化したcDNAの制限酵素増幅) (PrasharおよびWeissman, Methods Enzymol., 1999, 303, 258-72)、TOGA (総遺伝子発現分析) (Sutcliffeら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2000, 97, 1976-81)、タンパク質アレイおよびプロテオミクス (Celisら, FEBS Lett., 2000, 480, 2-16; Jungblutら, Electrophoresis, 1999, 20, 2100-10)、発現配列タグ (EST) 配列決定 (Celisら, FEBS Lett., 2000, 480, 2-16; Larssonら, J. Biotechnol., 2000, 80, 143-57)、サブトラクティブRNAフィンガープリンティング (SuRF) (Fuchsら, Anal. Biochem., 2000, 286, 91-98; Larsonら, Cytometry, 2000, 41, 203-208)、サブトラクティブクローニング、示差ディスプレイ (DD) (JurecicおよびBelmont, Curr. Opin. Microbiol., 2000, 3, 316-21)、比較ゲノムハイブリダイゼーション (Carulliら, J. Cell Biochem. Suppl., 1998,

10

20

30

40

50

31, 286-96)、FISH(蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション)技術 (Going および Gusterson, Eur. J. Cancer, 1999, 35, 1895-904) および質量分析法 (To, Comb. Chem. High Throughput Screen, 2000, 3, 235-41) が含まれる。

【0217】

本発明のオリゴマー化合物は、タンパク質をコードする核酸にハイブリダイズするため、研究および診断に有用である。例えば、有効なタンパク質阻害剤であるように、本明細書に開示する有効性で、そして条件下で、ハイブリダイズすることが示されたオリゴヌクレオチドはまた、遺伝子増幅または検出を支持する条件下で、それぞれ、有効なプライマーまたはプローブであろう。これらのプライマーおよびプローブは、タンパク質をコードする核酸分子の特異的検出を必要とする方法において、そして検出のため、またはさらなる研究で使用するための核酸分子の増幅において、有用である。当該技術分野に知られる手段によって、本発明のアンチセンス・オリゴヌクレオチド、特にプライマーおよびプローブと、核酸とのハイブリダイゼーションを検出することも可能である。こうした手段には、オリゴヌクレオチドへの酵素のコンジュゲート化、オリゴヌクレオチドの放射標識または他の適切な検出手段いずれかが含まれることも可能である。試料において、選択されたタンパク質のレベルの検出のため、こうした検出手段を用いるキットもまた、用意することも可能である。

10

【0218】

アンチセンスの特異性および感度はまた、療法的使用のため、当業者によって利用されている。アンチセンス・オリゴマー化合物は、ヒトを含む動物における疾患状態の治療において、療法部分として使用されてきている。リボザイムを含むアンチセンス・オリゴヌクレオチド薬剤は、ヒトに安全にそして有効に投与されてきており、そして多くの臨床試験が現在行われている。したがって、アンチセンス・オリゴマー化合物は、有用な療法様式であることも可能であり、該化合物を、細胞、組織および動物、特にヒトの治療用の治療措置において、有用に設定することも可能である。

20

【0219】

療法のため、選択されるタンパク質の発現を調節することによって処置可能な疾患または障害を有すると推測されるヒトなどの動物を、本発明記載のアンチセンス・オリゴマー化合物を投与することによって、処置する。例えば、1つの限定されない態様において、該方法は、処置の必要がある動物に、療法的に有効な量のタンパク質阻害剤を投与する工程を含む。本発明のタンパク質阻害剤は、タンパク質の活性を有効に阻害するか、またはタンパク質の発現を阻害する。いくつかの態様において、動物または *in vitro* におけるタンパク質の活性または発現は、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、または100%、阻害される。

30

【0220】

例えば、タンパク質発現の減少を、動物の血清、脂肪組織、肝臓または他の体液、組織または臓器において、測定することも可能である。分析する体液、組織または臓器内に含有される細胞が、タンパク質をコードする核酸分子および/またはタンパク質自体を含有することも可能である。

40

【0221】

有効量のオリゴマー化合物を、適切な薬学的に許容しうる希釈剤またはキャリアーに添加することによって、本発明のオリゴマー化合物を薬剤組成物において利用することも可能である。本発明のオリゴマー化合物および方法の使用はまた、予防的に有用であることも可能である。

【0222】

配合物

50

本発明のオリゴマー化合物はまた、例えばリポソーム、受容体標的化分子、経口、直腸、局所または他の配合物のように、取り込み、分布および/または吸収を補助するため、他の分子、分子構造または化合物の混合物と混合し、これらに被包し、これらとコンジュゲート化し、または別の方法で関連させることも可能である。こうした取り込み、分布および/または吸収補助配合物の調製を解説する代表的な米国特許には、限定されるわけではないが、U.S. : 5, 108, 921; 5, 354, 844; 5, 416, 016; 5, 459, 127; 5, 521, 291; 5, 543, 158; 5, 547, 932; 5, 583, 020; 5, 591, 721; 4, 426, 330; 4, 534, 899; 5, 013, 556; 5, 108, 921; 5, 213, 804; 5, 227, 170; 5, 264, 221; 5, 356, 633; 5, 395, 619; 5, 416, 016; 5, 417, 978; 5, 462, 854; 5, 469, 854; 5, 512, 295; 5, 527, 528; 5, 534, 259; 5, 543, 152; 5, 556, 948; 5, 580, 575; および 5, 595, 756 が含まれる。

10

【0223】

本発明のアンチセンス・オリゴマー化合物は、いかなる薬学的に許容しうる塩、エステル、またはこうしたエステルの塩も、あるいはヒトを含む動物に投与した際、生物学的に活性がある代謝産物またはその残基を（直接または間接的に）提供することが可能な、いかなる他の化合物も含む。したがって、例えば、本開示はまた、本発明のオリゴマー化合物のプロドラッグおよび薬学的に許容しうる塩、こうしたプロドラッグの薬学的に許容しうる塩、並びに他の生物学的等価物にも関する。

20

【0224】

用語「プロドラッグ」は、内因性酵素または他の化学薬品および/または状態の作用によって、体内または体の細胞内で活性型（すなわち薬剤）に変換される、不活性型で調製されている療法剤を示す。特に、本発明のオリゴヌクレオチドのプロドラッグ型は、Gosselinらに対するWO 93/24510、1993年12月9日公開、またはImbachらに対するWO 94/26764およびU.S. 5,770,713に開示される方法にしたがったSATE（（S-アセチル-2-チオエチル）ホスフェート）誘導体として調製される。

【0225】

用語「薬学的に許容しうる塩」は、本発明のオリゴマー化合物の生理学的および薬学的に許容しうる塩：すなわち親化合物の望ましい生物学的活性を保持し、そしてその望ましくない毒性効果を与えない塩を指す。オリゴヌクレオチドに関しては、薬学的に許容しうる塩およびその使用の例が、米国特許6,287,860にさらに記載される。

30

【0226】

本発明はまた、本発明のアンチセンス・オリゴマー化合物を含む、薬剤組成物および配合物も含む。局所または全身処置が望ましいかどうかに応じて、そして治療しようとする領域に応じて、本発明の薬剤組成物をいくつかの方式で投与することも可能である。投与は、局所（眼、並びに膣および直腸搬送を含む粘膜に対するものを含む）、例えば、噴霧器によるものを含む、粉末またはエアロゾルの吸入（inhalation、insufflation）による、肺；気管内、鼻内、上皮、皮内および経皮、経口または非経口であることも可能である。非経口投与には、静脈内、動脈内、皮下、腹腔内または筋肉内注射または注入；あるいは頭蓋内、例えば鞘内または脳室内、投与が含まれる。少なくとも1つの2'-O-メトキシエチル修飾を持つオリゴヌクレオチドは、経口投与に特に有用であると考えられる。局所投与のための薬剤組成物および配合物は、経皮パッチ、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、ドロップ、座薬、スプレー、液体および粉末を含むことも可能である。慣用的な薬学的キャリアー、水性、粉末または油性基剤、粘稠化剤等が必要であるか、または望ましい可能性もある。コーティング・コンドーム、手袋等もまた、有用である可能性もある。

40

【0227】

本発明の薬剤配合物は、便宜的に単位投薬型で提示されることも可能であり、こうした

50

薬剤配合物を、薬剤産業に周知の慣用的技術にしたがって、調製することも可能である。こうした技術には、活性成分と薬剤キャリアー（単数または複数）または賦形剤（単数または複数）を会合させる工程が含まれる。一般的に、均一にそして緊密に、活性成分と液体キャリアーまたは細かく分割された固体キャリアーまたは両方を会合させ、そして次いで、必要に応じて産物を成型することによって、配合物を調製する。

【0228】

本発明の組成物を、限定されるわけではないが、錠剤、カプセル、ゲルカプセル、液体シロップ、ソフトゲル、座薬、および浣腸剤などの多くの可能な投薬型のいずれかに配合することも可能である。また、本発明の組成物を、水性、非水性、または混合媒体中の懸濁物として配合することも可能である。水性懸濁物は、例えばカルボキシメチルセルロース・ナトリウム、ソルビトールおよび/またはデキストランを含む懸濁物の粘性を増加させる物質をさらに含有することも可能である。懸濁物はまた、安定化剤も含有することも可能である。

10

【0229】

本発明の薬剤組成物には、限定されるわけではないが、溶液、エマルジョン、泡およびリポソーム含有配合物が含まれる。本発明の薬剤組成物および配合物は、1以上の浸透増進剤、キャリアー、賦形剤、または他の活性もしくは不活性成分を含むことも可能である。

【0230】

エマルジョンは、典型的には、通常、直径0.1 μmを超える小滴の形で、別の液体中に分散した1つの液体の不均一系である。エマルジョンは、分散相に加えて、さらなる構成要素および活性薬剤を含有することも可能であり、活性薬剤は、水性相、油相、または分離相としてのそれ自体のいずれかの中に、溶液として存在することも可能である。本発明の態様として、マイクロエマルジョンが含まれる。エマルジョンおよびその使用は、当該技術分野に周知であり、そして米国特許6,287,860にさらに記載される。

20

【0231】

本発明の配合物には、リポソーム配合物が含まれる。本発明において、用語「リポソーム」は、単数または複数の球状二層に配置された両親媒性脂質で構成される小胞を意味する。リポソームは、親油性成分、および搬送しようとする組成物を含有する水性の内部から形成される、膜を有する単層または多層小胞である。陽イオン性リポソームは、陽性に荷電するリポソームであり、陰性に荷電するDNA分子と相互作用して、安定な複合体を形成すると考えられる。pH感受性または陰性荷電であるリポソームは、DNAと複合体を形成するよりも、DNAを捕捉すると考えられる。陽イオン性および非陽イオン性リポソームの両方が、DNAを細胞に搬送するのに用いられてきている。

30

【0232】

リポソームにはまた、「立体的に安定化された」リポソームも含まれ、この用語は、本明細書において、1以上の特殊化脂質であって、リポソームに取り込まれた際に、こうした特殊化脂質を欠くリポソームに比較して、増進した循環寿命を生じる、前記特殊化脂質を含む、リポソームを指す。立体的に安定したリポソームの例は、リポソームの小胞形成脂質部分の一部が、1以上の糖脂質を含むか、または1以上の親水性ポリマー、例えばポリエチレングリコール（PEG）部分で誘導体化されているものである。リポソームおよびその使用は、米国特許6,287,860にさらに記載される。

40

【0233】

本発明の薬剤配合物および組成物は、界面活性剤を含むこともまた可能である。薬剤製品、配合物、およびエマルジョン中の界面活性剤の使用は、当該技術分野に周知である。界面活性剤およびその使用は、米国特許6,287,860にさらに記載される。

【0234】

1つの態様において、本発明は、核酸、特にオリゴヌクレオチドの効率的な搬送を達成するため、多様な浸透増進剤を使用する。非親油性薬剤の細胞膜を渡る拡散を補助するのに加えて、浸透増進剤はまた、親油性薬剤の浸透性も増進する。浸透増進剤は、5つの広

50

いカテゴリー、すなわち界面活性剤、脂肪酸、胆汁酸塩、キレート剤、および非キレート非界面活性剤の1つに属すると分類可能である。浸透増進剤およびその使用は、米国特許6,287,860にさらに記載される。

【0235】

当業者は、配合物が、その意図される使用、すなわち投与経路にしたがって、日常的に設計されることを認識するであろう。

局所投与に適した配合物には、本発明のオリゴヌクレオチドが、局所搬送剤、例えば脂質、リポソーム、脂肪酸、脂肪酸エステル、ステロイド、キレート剤および界面活性剤と混合されているものが含まれる。適切な脂質およびリポソームには、中性（例えばジオレオイルホスファチジルDOPEエタノールアミン、ジミリストイルホスファチジルコリンDMP C、ジステアロイルホスファチジルコリン）、陰性（例えばジミリストイルホスファチジルグリセロールDMP G）および陽イオン性（例えばジオレオイルテトラメチルアミノプロピルDOTAPおよびジオレオイルホスファチジルエタノールアミンDOTMA）のものが含まれる。

10

【0236】

局所または他の投与のため、本発明のオリゴヌクレオチドをリポソーム内に被包するか、またはリポソームと、特に陽イオン性リポソームと複合体を形成させることも可能である。あるいは、オリゴヌクレオチドを脂質、特に陽イオン性脂質と複合体形成させることも可能である。適切な脂肪酸およびエステル、薬学的に許容しうるその塩、およびその使用は、米国特許6,287,860にさらに記載される。局所配合物は、米国特許出願09/315,298、1999年5月20日出願に詳細に記載されている。

20

【0237】

経口投与のための組成物および配合物には、粉末または顆粒、マイクロ粒子、ナノ粒子、水または非水性媒体中の懸濁物または溶液、カプセル、ゲルカプセル、サシェー剤(sachet)、錠剤またはミニ錠剤が含まれる。粘稠化剤、フレーバー剤(flavoring agents)、希釈剤、乳化剤、分散補助または結合剤が望ましい可能性もある。適切な経口配合物は、本発明のオリゴヌクレオチドが、1以上の浸透増進剤、界面活性剤およびキレート剤と組み合わせて投与されるものである。適切な界面活性剤には、脂肪酸および/またはそのエステルまたは塩、胆汁酸および/またはその塩が含まれる。適切な胆汁酸/塩および脂肪酸、並びにその使用は、米国特許6,287,860にさらに記載される。やはり適切なのは、浸透増進剤の組み合わせ、例えば胆汁酸/塩と組み合わせた脂肪酸/塩である。適切な組み合わせはラウリン酸、カプリン酸およびUDCAのナトリウム塩である。さらなる浸透増進剤には、ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン-20-セチルエーテルが含まれる。本発明のオリゴヌクレオチドを、スプレー乾燥させた粒子を含む顆粒型で経口搬送することも可能であるし、または複合体化させて、マイクロ粒子またはナノ粒子を形成することも可能である。オリゴヌクレオチド複合体化剤およびその使用が、米国特許6,287,860にさらに記載される。オリゴヌクレオチドのための経口配合物およびその調製は、米国特許出願09/108,673(1998年7月1日出願)、09/315,218(1999年5月20日出願)および10/071,822、2002年12月8日出願に詳細に記載される。

30

40

【0238】

非経口、鞘内または脳室内投与のための組成物および配合物は、緩衝剤、希釈剤および他の適切な添加物、例えば限定されるわけではないが、浸透増進剤、キャリアー化合物および他の薬学的に許容しうるキャリアーまたは賦形剤もまた含有することも可能な、無菌水性溶液を含むことも可能である。

【0239】

本発明の特定の態様は、1以上のオリゴマー化合物、および非アンチセンス機構によって機能する1以上の他の化学療法剤を含有する薬剤組成物を提供する。こうした化学療法剤の例には、限定されるわけではないが、癌化学療法剤、例えばダウノルピシン、ダウノマイシン、ダクチノマイシン、ドキソルピシン、エピルピシン、イダルピシン、エソル

50

ビシン、ブレオマイシン、マホスファミド、イホスファミド、シトシン・アラビノシド、
 ビス・クロロエチルニトロソ尿素、ブスルファン、マイトマイシンC、アクチノマイシン
 D、ミトラマイシン、プレドニゾン、ヒドロキシプロゲステロン、テストステロン、タモ
 キシフェン、ダカルバジン、プロカルバジン、ヘキサメチルメラミン、ペンタメチルメラ
 ミン、ミトキサントロン、アムサクリン、クロラムブシル、メチルシクロヘキシルニトロ
 ソ尿素、ナイトロジェンマスタード、メルファラン、シクロホスファミド、6-メルカプ
 トプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-アザシチジン、ヒドロキシ尿素、デオキ
 シコホルマイシン、4-ヒドロキシペルオキシシクロホスホロアミド、5-フルオロウラ
 シル(5-FU)、5-フルオロデオキシウリジン(5-FUdR)、メトトレキセート
 (MTX)、コルヒチン、タキソール、ピンクリスチン、ピンブラスチン、エトポシド(10
 VP-16)、トリメトトレキセート、イリノテカン、トポテカン、ゲムシタピン、テニポ
 シド、シスプラチンおよびジエチルスチルベストロール(DES)が含まれる。本発明の
 オリゴマー化合物とともに用いた場合、こうした化学療法剤を、個々に(例えば5-FU
 およびオリゴヌクレオチド)、連続して(例えば、ある期間、5-FUおよびオリゴヌク
 レオチド、その後、MTXおよびオリゴヌクレオチド)、または1以上の他のこうした化
 学療法剤と組み合わせて(例えば5-FU、MTXおよびオリゴヌクレオチド、または5
 -FU、放射療法およびオリゴヌクレオチド)、用いることも可能である。限定されるわ
 けではないが、非ステロイド性抗炎症薬剤およびコルチコステロイドを含む抗炎症薬剤、
 並びに限定されるわけではないが、リビビリン、ビダラビン、アシクロビルおよびガンシ
 クロビルを含む抗ウイルス薬剤もまた、本発明の組成物と組み合わせ可能である。アンチ 20
 センス・オリゴマー化合物および他の非アンチセンス薬剤の組み合わせもまた、本発明の
 範囲内である。2つのオリゴマー化合物、またはさらなる化合物と組み合わせた1つのオ
 リゴマー化合物などの、2以上の組み合わせた化合物を、ともに、または連続して、用い
 ることも可能である。

【0240】

別の関連する態様において、本発明の組成物は、第一の核酸を標的とする、1以上のア
 ンチセンス・オリゴマー化合物、特にオリゴヌクレオチド、および第二の核酸標的を標的
 とする、1以上のさらなるアンチセンス・オリゴマー化合物を含有することも可能である
 。あるいは、本発明の組成物は、同じ核酸標的の異なる領域を標的とする、2以上のアン
 チセンス・オリゴマー化合物を含有することも可能である。アンチセンス・オリゴマー化 30
 合物の多くの例が当該技術分野に知られる。2以上の組み合わせた化合物を、一緒に、ま
 たは連続して用いることも可能である。

【0241】

投薬

療法組成物の配合およびそれに続く投与(投薬)は、当業者の技術範囲内であると考え
 られる。投薬は、治療しようとする疾患状態の重症度および反応性次第であり、治療過程
 は数日~数ヶ月、あるいは治癒が達成されるまで、または疾患状態の軽減が達成されるま
 で持続する。最適投薬計画は、患者の体内の薬剤蓄積の測定値から計算可能である。一般
 の当業者は、容易に、最適投薬、投薬方法論および反復率を決定することも可能である。
 最適投薬は、個々のオリゴヌクレオチドの相対効力に応じて多様である可能性もあり、そ
 して一般的に*in vitro*および*in vivo*動物モデルで有効であることが見出 40
 されたEC₅₀に基づいて、概算可能である。一般的に、投薬は、体重1kgあたり0.01μg~100g、
 体重1kgあたり0.1μg~10g、体重1kgあたり1μg~1g、体重1kgあたり10μg~100mg、
 体重1kgあたり100μg~10mg、または体重1kgあたり100μg~1mgであり、そして毎日、毎週、毎月または毎
 年1回以上、あるいは2~20年ごとに1回投与されることも可能である。一般の当業者
 は、体液または組織における薬剤の測定された滞在時間および濃度に基づいて、投薬反復
 率を容易に概算することも可能である。治療成功に続いて、患者に、疾患状態の再発を防
 止する維持療法を施すことが望ましい可能性もあり、この場合、体重1kgあたり0.01μg~100gの範囲で、毎日1回以上から20年ごとに1回、オリゴヌクレオチドを 50

維持用量で投与する。

【0242】

本発明は、特定の態様にしたがって、特異性を持って記載されてきたが、以下の実施例は、本発明の例示のみとして働き、そして本発明を限定することを意図しない。

(実施例1)

キメラLNA/ENA-DNAオリゴヌクレオチドの合成

キメラLNA/ENA 2'-デオキシ・オリゴヌクレオチドには、連結しているLNA/ENAヌクレオチドの5'および3'「ウィング」セグメントの間に置かれる、連結している2'-デオキシヌクレオチドの「ギャップ」セグメントが含まれる。この種のオリゴヌクレオチドは、「ギャップマー」またはギャップ化オリゴヌクレオチドとして当該技術分野に知られる。

10

【0243】

(LNA)--(2'-デオキシ)--(LNA)キメラ・ホスホロチオエート・オリゴヌクレオチド

以下に記載するように、General Electric自動化DNA合成装置AKTA10(10のホスホロアミダイト・ポートを用いて、いかなる既定の配列の組み立ても可能にする)を用いて、LNAホスホロチオエートおよび2'-デオキシ・ホスホロチオエート・オリゴヌクレオチド・セグメントを有するキメラ・オリゴヌクレオチドを合成することも可能である。

【0244】

自動化合成装置、並びにDNA部分のための2'-デオキシ-5'-ジメトキシトリチル-3'-O-ホスホロアミダイト、並びに5'および3'ウィングのための5'-ジメトキシトリチル-LNA-3'-O-ホスホロアミダイトを用いて、オリゴヌクレオチドを合成することも可能である(LNAアミダイトは、Glen ResearchまたはExiqonから入手可能である)。用いたLNAホスホロアミダイトを以下に列挙する：

20

- 5'-ジメトキシトリチル-N-ベンゾイル-(2'-O, 4'-Cメチレン)-アデノシン, 3'-[(2'-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホロアミダイト

- 5'-ジメトキシトリチル-N-ベンゾイル-5-メチル-(2'-O, 4'-Cメチレン)-シチジン, 3'-[(2'-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホロアミダイト

30

- 5'-ジメトキシトリチル-N-ジメチルホルムアミジン-(2'-O, 4'-Cメチレン)-グアノシン, 3'-[(2'-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホロアミダイト

- 5'-ジメトキシトリチル-5-メチル-(2'-O, 4'-Cメチレン)-ウリジン, 3'-[(2'-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホロアミダイト

記載する合成で使用する固体支持体は、ポリマー性キャリアー(PRIMER、Amersham/GEから入手可能)およびAndrei Guzayev(J. Am. Chem. Soc., 125(9), 2380-2381, 2003)に記載される普遍的リンカー(UNILINKERの修飾型)からなった。Acharya Chemicalsから入手可能なフェニルアセチルジスルフィド(PADS)を用いて、ホスホロチオエート連結を生成した。

40

【0245】

5'-ジメトキシトリチル-LNA-3'-O-ホスホロアミダイト(5'-ジメトキシトリチル-ENA-3'-O-ホスホロアミダイト)を取り込むため、カップリング反応時間が増加したカップリング工程を取り込むことによって、標準的合成周期を修飾することも可能である。次いで、2'-シアノエチル基を取り除く(そしてCNET形成を排除する)ため、トリエチルアミン/アセトニトリル(1/1、v/v)の混合物で、完全に

50

保護されたオリゴヌクレオチド（固体支持体に付着）を洗浄することも可能である。続いて、部分的に脱保護されたオリゴヌクレオチド産物を支持体から切断し、そして濃アンモニア（ NH_4OH ）中、55 で12～16時間、脱保護する。キャピラリー電気泳動および質量分析によって、収量および純度に関して、脱保護されたオリゴを分光光度的に分析する。

【0246】

合成周期

トルエン中の10% DCAの溶液を用いて、40 μmol カラム（1.2 ml）に入れた、普遍的固体支持体を脱トリチル化した（498 nmでのUVシグナルに基づいて、脱トリチル化）。

10

【0247】

続いて、3.5当量の対応する3'-O-ホスホロアミダイト（無水アセトニトリル中、0.2 M溶液）および10.5当量のアセトニトリル中の1H-テトラゾール溶液で、固体支持体を処理した。カップリング時間は、2'-デオキシ・ホスホロアミダイトに関しては、等しく3分間（単一カップリング、リサイクリング）、そしてLNAおよびENAホスホロアミダイトに関しては、15分間（単一カップリング、リサイクリング）に等しかった。カップリング反応後、アセトニトリル洗浄（5カラム容積）を行った。

【0248】

ピコリンおよびアセトニトリル（1/1、v/v）の混合物中のフェニルアセチルジスルフィド（PADS）の0.3 M溶液を用いて、硫化を5分間行った。反応後、アセトニトリル洗浄（2カラム容積）を行った。

20

【0249】

キャッピング溶液A（無水酢酸/ピリジン/THF、0.4/0.4/3.2、v/v/v）およびキャッピング溶液B（N-メチルイミダゾール/THF、0.4/3.6、v/v/v）の等量混合物を用いて、キャッピングを1分間行った。反応後、アセトニトリル洗浄（2カラム容積）を行った。

【0250】

2-シアノエチル基の除去

支持体に付着したオリゴヌクレオチド産物を、トリエチルアミン/アセトニトリル（1/1、v/v）の混合物で洗浄した。

30

【0251】

最終切断および脱保護

部分的に脱保護されたオリゴヌクレオチド産物を支持体から切断し、そして濃アンモニア（ NH_4OH ）中、55 で12～16時間、完全に脱保護した。

【0252】

（ENA）- - （2'-デオキシ）- - （ENA）キメラ・ホスホロチオエート・オリゴヌクレオチド

LNAキメラ・オリゴヌクレオチドに関して上述する方法にしたがって、5'-ジメトキシトリチル-LNA-3'-O-ホスホロアミダイトの代わりに5'-ジメトキシトリチル-ENA-3'-O-ホスホロアミダイトを用いて、キメラ・ホスホロチオエート・オリゴヌクレオチドを調製した。

40

【0253】

オリゴヌクレオチド単離

固体支持体から切断し、そして濃水酸化アンモニウム中、55 で12～16時間脱ブロッキングした後、イオン交換カラムに直接装填する（ NH_4OH 除去を伴わない）ことによって、オリゴヌクレオチド産物を精製した。

【0254】

EXPLORER HPLC系（AMERSHAM）を用いて、イオン交換HPLCを達成した。UNICORNソフトウェア・パッケージによって、HPLC系の構成要素を管理した。SOURCE Q 30、250 x 25 mmカラム、および一定濃度のNaO

50

H (5 0 m M) で、3 0 分間の 2 . 5 M N a C l の 0 % ~ 6 0 % の直線勾配を用いて、合成オリゴマーを精製した。流速は 1 2 m l / 分であった。9 0 % より高い純度の産物を含む分画を合わせて、そして R P - H P L C を用いて脱塩した。エレクトロスプレー質量分析 (分子量決定) によって、そしてキャピラリーゲル電気泳動によって、精製オリゴヌクレオチドを分析し、そして少なくとも 9 2 ~ 9 5 % が全長成分であると判断した。

【 0 2 5 5 】

(実施例 2)

マウス T R A D D を標的とする L N A ギャップマー : *i n v i v o* 研究

6 週齢のオス B a l b / c マウス (J a c k s o n L a b o r a t o r y 、メイン州バーハーバー) に、T R A D D を標的とする化合物を注射した。各処置群は、4 匹の動物からなった。3 週間に渡って、週 2 回、腹腔内注射を介して動物に投薬した。L N A ギャップマー、I S I S 3 3 5 3 8 5 、I S I S 3 5 3 8 7 8 、および I S I S 3 5 3 8 7 9 を 4 0 、1 2 、または 4 m g / k g (それぞれ 4 . 5 、1 . 5 、または 0 . 5 μ m o l / k g) の用量で評価した。2 ' - M O E ギャップマー、I S I S 3 2 5 5 8 5 、I S I S 3 2 5 5 8 7 、および I S I S 3 2 5 5 8 8 を同様に投与した。生理食塩水を注射した動物、および対照 2 ' - M O E ギャップマー、I S I S 1 4 1 9 2 3 を注射した動物が、対照群として働いた。最後の用量のオリゴヌクレオチドを投与した後、動物を屠殺し、そして肝臓、腎臓、および脂肪組織を採取した。

【 0 2 5 6 】

リアルタイム P C R を用いて、研究終了時、肝臓中の標的減少を測定した。記載するような化合物 4 0 m g / k g (4 . 5 μ m o l / k g) で処置した動物に関して、結果を表 2 に提示する。データを生理食塩水で処置した対照に標準化して、そして対照のパーセントとして表し、ここで 1 0 0 未満のパーセンテージは、標的 m R N A 減少の指標となる。

【 0 2 5 7 】

表 2

マウス肝臓における T R A D D を標的とする L N A 化合物による標的減少

【 0 2 5 8 】

【 表 2 】

ISIS #	配列	化学的性質	配列番号	% 対照
141923	CCTTCCCTGAAGGTTCTCTCC	5-10-5 MOE	3	94
335385	CTCATACTCGTAGGCC	3-10-3 LNA	4	20
353878	GCTCATACTCGTAGGCCA	3-12-3 LNA	5	17
353879	GCTCATACTCGTAGGCCA	2-14-2 LNA	6	30
325585	CTCATACTCGTAGGCC	3-10-3 MOE	7	65
325588	GCTCATACTCGTAGGCCA	3-12-3 MOE	8	19
325587	GCTCATACTCGTAGGCCA	2-14-2 MOE	9	17

【 0 2 5 9 】

M O E または L N A ウィングおよびデオキシギャップを持つ完全ホスホロチオエート
表 2 に示すように、T R A D D を標的とする化合物はすべて、マウス肝臓中の m R N A レベルを減少させるのに有効であり、一方、対照オリゴヌクレオチドの I S I S 1 4 1 9 2 3 は、実質的な標的減少を引き起こさなかった。3 ' 端および 5 ' 端の両方に 3 つの L N A が隣接した 1 0 の 2 ' - デオキシヌクレオチドギャップで構成されるオリゴマー化合物である I S I S 3 3 5 3 8 5 は、3 ' 端および 5 ' 端両方に 3 つの 2 ' - M O E ヌクレオチドが隣接した 1 0 の 2 ' - デオキシヌクレオチドギャップで構成されるオリゴマー化合物である I S I S 3 2 5 5 8 5 に比較した際、T R A D D m R N A レベルを実質的に減少させた。3 ' 端および 5 ' 端両方に 3 つの L N A が隣接した 1 2 の 2 ' - デオキシヌクレオチドギャップで構成されるオリゴマー化合物である I S I S 3 5 3 8 7 8

は、3'端および5'端両方に3つの2'-MOEヌクレオチドが隣接した12の2'-デオキシヌクレオチドギャップで構成されるオリゴマー化合物であるISIS 325588に産生されるものに匹敵する、TRADD mRNAレベルの減少を引き起こした。

【0260】

(実施例3)

ヌクレオシド・ホスホロアミダイトの合成

アミダイトおよびその中間体を含む、以下の化合物を、米国特許6,426,220および公開PCT WO 02/36743に記載されるように調製した；5-メチル dC アミダイトのための5'-O-ジメトキシトリチルチミジン中間体、5-メチル dC アミダイトのための5'-O-ジメトキシトリチル-2'-デオキシ-5-メチルシチジン中間体、5-メチル dC アミダイトのための5'-O-ジメトキシトリチル-2'-デオキシ-N⁴-ベンゾイル-5-メチルシチジン、最後から2番目の中間体、(5'-O-(4,4'-ジメトキシトリフェニルメチル)-2'-デオキシ-N⁴-ベンゾイル-5-メチルシチジン-3'-O-イル)-2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピルホスホロアミダイト(5-メチル dC アミダイト)、2'-フルオロデオキシアデノシン、2'-フルオロデオキシグアノシン、2'-フルオロウリジン、2'-フルオロデオキシシチジン、2'-O-(2-メトキシエチル)修飾アミダイト、2'-O-(2-メトキシエチル)-5-メチルウリジン中間体、5'-O-DMT-2'-O-(2-メトキシエチル)-5-メチルウリジン、最後から2番目の中間体、(5'-O-(4,4'-ジメトキシトリフェニルメチル)-2'-O-(2-メトキシエチル)-5-メチルウリジン-3'-O-イル)-2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピルホスホロアミダイト(MOE Tアミダイト)、5'-O-ジメトキシトリチル-2'-O-(2-メトキシエチル)-5-メチルシチジン中間体、5'-O-ジメトキシトリチル-2'-O-(2-メトキシエチル)-N⁴-ベンゾイル-5-メチルシチジン、最後から二番目の中間体、(5'-O-(4,4'-ジメトキシトリフェニルメチル)-2'-O-(2-メトキシエチル)-N⁴-ベンゾイル-5-メチルシチジン-3'-O-イル)-2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピルホスホロアミダイト(MOE 5-Me-Cアミダイト)、(5'-O-(4,4'-ジメトキシトリフェニルメチル)-2'-O-(2-メトキシエチル)-N⁶-ベンゾイルアデノシン-3'-O-イル)-2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピルホスホロアミダイト(MOE Aアミダイト)、(5'-O-(4,4'-ジメトキシトリフェニルメチル)-2'-O-(2-メトキシエチル)-N⁴-イソブチリルグアノシン-3'-O-イル)-2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピルホスホロアミダイト(MOE Gアミダイト)、2'-O-(アミノオキシエチル)ヌクレオシドアミダイトおよび2'-O-(ジメチルアミノオキシエチル)ヌクレオシドアミダイト、2'-O-(ジメチルアミノオキシエトキシ)ヌクレオシドアミダイト、5'-O-tert-ブチルジフェニルシリル-O²-2'-アンヒドロ-5-メチルウリジン、5'-O-tert-ブチルジフェニルシリル-2'-O-(2-ヒドロキシエチル)-5-メチルウリジン、2'-O-(2-フタルイミドオキシ)エチル)-5'-tert-ブチルジフェニルシリル-5-メチルウリジン、5'-O-tert-ブチルジフェニルシリル-2'-O-(2-ホルマドクスイミノオキシ)エチル)-5-メチルウリジン、5'-O-tert-ブチルジフェニルシリル-2'-O-(N,Nジメチルアミノオキシエチル)-5-メチルウリジン、2'-O-(ジメチルアミノオキシエチル)-5-メチルウリジン、5'-O-DMT-2'-O-(ジメチルアミノオキシエチル)-5-メチルウリジン、5'-O-DMT-2'-O-(2-N,N-ジメチルアミノオキシエチル)-5-メチルウリジン-3'-O-(2-シアノエチル)-N,N-ジイソプロピルホスホロアミダイト、2'-O-(アミノオキシエトキシ)ヌクレオシドアミダイト、N²-イソブチリル-6-O-ジフェニルカルバモイル-2'-O-(2-エチルアセチル)-5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)グアノシン-3'-O-(2-シアノエチル)-N,N-ジイソプロピルホスホロアミダイト、2'-ジメチルアミノエトキシエトキシ(2'-DMAEOE)ヌクレオシドアミダイト、2'-O-(2-(2-N,N-

ジメチルアミノエトキシ)エチル)-5-メチルウリジン、5'-O-ジメトキシトリチル-2'-O-(2(2-N,N-ジメチルアミノエトキシ)-エチル))-5-メチルウリジンおよび5'-O-ジメトキシトリチル-2'-O-(2(2-N,N-ジメチルアミノエトキシ)-エチル))-5-メチルウリジン-3'-O-(シアノエチル-N,N-ジイソプロピル)ホスホロアミダイト。

【0261】

(実施例4)

オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオシド合成

本発明にしたがって用いるアンチセンス・オリゴマー化合物を、便宜的に、そして日常的に、周知の固相合成技術にしたがって作成することも可能である。例えばApplied Biosystems(カリフォルニア州フォスターシティ)を含む、いくつかの業者によって、こうした合成のための装置が販売されている。当該技術分野に知られる、こうした合成の他の手段いずれかを、さらに、または別に、使用することも可能である。ホスホロチオエートおよびアルキル化誘導体などのオリゴヌクレオチドを調製する類似の技術を用いることが周知である。

10

【0262】

オリゴヌクレオチド：ヨウ素による酸化を伴う標準的ホスホロアミダイト化学反応を用いて、自動化DNA合成装置(Applied Biosystemsモデル394)上で、非置換および置換ホスホジエステル(P=O)オリゴヌクレオチドを合成する。

【0263】

以下の例外を伴って、ホスホジエステル・オリゴヌクレオチドと同様に、ホスホロチオエート(P=S)を合成する：ホスファイト連結の酸化のため、アセトニトリル中の3, H-1, 2-ベンゾジチオール-3-オン 1, 1-ジオキシドの10% w/v溶液を利用することによって、チオ化を達成した。チオ化反応工程時間を180秒に増やし、そして続いて通常のカップリング工程を行った。CPGカラムから切断し、そして、濃水酸化アンモニウム中、55で脱ブロッキングした(12~16時間)後、1M NH₄OAc溶液から>3倍量のエタノールで沈殿させることによって、オリゴヌクレオチドを回収した。ホスフィネート・オリゴヌクレオチドを、米国特許5,508,270に記載されるように調製する。

20

【0264】

アルキルホスホネート・オリゴヌクレオチドを、米国特許4,469,863に記載されるように調製する。

30

3'-デオキシ-3'-メチレンホスホネート・オリゴヌクレオチドを、米国特許5,610,289または5,625,050に記載されるように調製する。

【0265】

ホスホロアミダイト・オリゴヌクレオチドを、米国特許5,256,775または米国特許5,366,878に記載されるように調製する。

アルキルホスホチオエート・オリゴヌクレオチドを、公開PCT出願PCT/US94/00902およびPCT/US93/06976(それぞれWO 94/17093およびWO 94/02499として公開)に記載されるように調製する。

40

【0266】

3'-デオキシ-3'-アミノホスホロアミダイト・オリゴヌクレオチドを、米国特許5,476,925に記載されるように調製する。

ホスホトリエステル・オリゴヌクレオチドを、米国特許5,023,243に記載されるように調製する。

【0267】

ボラノホスフェート・オリゴヌクレオチドを、米国特許5,130,302および5,177,198に記載されるように調製する。

オリゴヌクレオシド：メチレンメチルイミノ連結オリゴヌクレオシドは、MMI連結オリゴヌクレオシド、メチレンジメチルヒドラゾ連結オリゴヌクレオシドとも同定され、ま

50

たMDH連結オリゴヌクレオシド、およびメチレンカルボニルアミノ連結オリゴヌクレオシドとも同定され、またアミド-3連結オリゴヌクレオシド、およびメチレンアミノカルボニル連結オリゴヌクレオシドとも同定され、またアミド-4連結オリゴヌクレオシドとも同定されるが、該オリゴヌクレオシド並びに、例えば交互にMMIおよびP=OまたはP=S連結を有する混合主鎖オリゴマー化合物を、米国特許5,378,825、5,386,023、5,489,677、5,602,240および5,610,289に記載されるように調製する。

【0268】

ホルムアセタールおよびチオホルムアセタール連結オリゴヌクレオシドを、米国特許5,264,562および5,264,564に記載されるように調製する。

10

エチレンオキシド連結オリゴヌクレオシドを、米国特許5,223,618に記載されるように調製する。

【0269】

(実施例5)

RNA合成

一般的に、RNA合成化学反応は、戦略的な中間反応で、多様な保護基を選択的に取り込むことに基づく。一般の当業者は、有機合成における保護基の使用を理解するであろうが、保護基の有用な種類には、シリルエーテルが含まれる。特に、2'-ヒドロキシル上の酸不安定性オルトエステル保護基と組み合わせ、大きいシリルエーテルを用いて、5'-ヒドロキシルを保護する。次いで、標準的固相合成技術で、この保護基セットを用いる。他の合成工程すべての後で、酸不安定性オルトエステル保護基を最後に取り除くことが重要である。さらに、合成中にシリル保護基を早期に使用することで、望ましい場合には、望ましくない2'-ヒドロキシルの脱保護を伴わずに、容易に除去することが可能になる。

20

【0270】

異なって取り除かれ、そして異なって化学的に不安定である保護基によって、2'-ヒドロキシルの保護と組み合わせた5'-ヒドロキシルの連続した保護のためのこの方法にしたがって、RNAオリゴヌクレオチドを合成した。

【0271】

段階的な方式で、RNAオリゴヌクレオチドを合成する。各ヌクレオチドを連続して(3'から5'方向に)固体支持体に結合したオリゴヌクレオチドに付加する。鎖の3'端の第一のヌクレオシドを固体支持体に共有結合する。ヌクレオチド前駆体、リボヌクレオシド・ホスホロアミダイト、および活性化剤を添加し、第一のヌクレオシドの5'端に第二の塩基をカップリングする。支持体を洗浄し、そして未反応の5'-ヒドロキシル基を無水酢酸でキャッピングして、5'-アセチル部分を生じる。次いで、連結を酸化して、より安定で、そして最終的に望ましいP(V)連結にする。ヌクレオチド付加周期の最後に、フッ化物を用いて、5'-シリル基を切断する。続くヌクレオチドの各々で、この周期を反復する。

30

【0272】

合成後、DMF中の1M二ナトリウム-2-カルバモイル-2-シアノエチレン-1,1-ジチオレート三水和物(S_2Na_2)を利用して、ホスフェート上のメチル保護基を30分間切断する。水を用いて、固体支持体に結合したオリゴヌクレオチドから脱保護溶液を洗浄する。次いで、支持体を水中の40%メチルアミンで、55で10分間処理する。これによって、RNAオリゴヌクレオチドが溶液中に放出され、環外アミンが脱保護され、そして2'-基が修飾される。この段階で、陰イオン交換HPLCによって、オリゴヌクレオチドを分析することも可能である。

40

【0273】

2'-オルトエステル基が取り除かれる最後の保護基である。Dharmacon Research, Inc. (コロラド州ラファイエット)によって開発されたエチレングリコール・モノアセテート・オルトエステル保護基は、以下の重要な特性を有する、有

50

用なオルトエステル保護基の一例である。該保護基は、ヌクレオシド・ホスホロアミダイト合成およびオリゴヌクレオチド合成の条件に対して安定である。しかし、オリゴヌクレオチド合成後、オリゴヌクレオチドをメチルアミンで処理し、これは固体支持体からオリゴヌクレオチドを切断するだけでなく、オルトエステルからアセチル基を取り除く。オルトエステル上に生じる2-エチル-ヒドロキシル置換基は、アセチル化前駆体より、電子求引性が低い。その結果、修飾オルトエステルは、酸が触媒する加水分解により不安定になる。特に、切断速度は、アセチル基が除去された後は、およそ10倍速い。したがって、このオルトエステルは、オリゴヌクレオチド合成に適合するための十分な安定性を有し、そしてなお、続いて修飾されると、最終RNAオリゴヌクレオチド産物と適合する、比較的穏やかな水性条件下で、脱保護を実行することを可能にする。

10

【0274】

さらに、RNA合成法は当該技術分野に周知である(Scarlinge, S. A. Ph. D. Thesis, University of Colorado, 1996; Scarlinge, S. A. *ら*, J. Am. Chem. Soc., 1998, 120, 11820-11821; Matteucci, M. D. および Caruthers, M. H. J. Am. Chem. Soc., 1981, 103, 3185-3191; Beaucage, S. L. および Caruthers, M. H. Tetrahedron Lett., 1981, 22, 1859-1862; Dahl, B. J. *ら*, Acta Chem. Scand., 1990, 44, 639-641; Reddy, M. P. *ら*, Tetrahedron Lett., 1994, 25, 4311-4314; Wincott, F. *ら*, Nucleic Acids Res., 1995, 23, 2677-2684; Griffin, B. E. *ら*, Tetrahedron, 1967, 23, 2301-2313; Griffin, B. E. *ら*, Tetrahedron, 1967, 23, 2315-2331)。

20

【0275】

本明細書の方法によって、本発明のRNAアンチセンス・オリゴマー化合物(RNAオリゴヌクレオチド)を合成することも可能であるし、またはDharmacon Research, Inc (コロラド州ラファイエット)から購入することも可能である。ひとたび合成したら、次いで、当該技術分野に知られる方法によって、相補的RNAアンチセンス・オリゴマー化合物をアニーリングして、二本鎖(二重鎖)アンチセンス・オリゴマー化合物を形成することも可能である。例えば、各30 μ lのRNAオリゴヌクレオチドの各相補鎖(50 μ M RNAオリゴヌクレオチド溶液)および15 μ lの5xアニーリング緩衝液(100 mM 酢酸カリウム、30 mM HEPES-KOH pH 7.4、2 mM 酢酸マグネシウム)を合わせ、その後、90 で1分間、次に37 で1時間加熱することによって、二重鎖を形成することも可能である。生じた二重鎖アンチセンス・オリゴマー化合物を、キット、アッセイ、スクリーニング、または他の方法で用いて、標的核酸の役割を調べることも可能である。

30

【0276】

(実施例6)

40

キメラ・オリゴヌクレオチドの合成

本発明のキメラ・オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシドまたは混合オリゴヌクレオチド/オリゴヌクレオシドは、いくつかの異なるタイプのものであることも可能である。これらには、連結しているヌクレオシドの「ギャップ」セグメントが、連結しているヌクレオシドの5'および3'「ウィング」セグメントの間に置かれる第一のタイプ、並びに「ギャップ」セグメントがオリゴマー化合物の3'末端または5'末端のいずれかに位置する第二の「オープン端」タイプが含まれる。第一のタイプのオリゴヌクレオチドはまた、当該技術分野に「ギャップマー」またはギャップ化オリゴヌクレオチドとしても知られる。第二のタイプのオリゴヌクレオチドはまた、当該技術分野に「ヘミマー(hemimer)」または「ウィングマー」としても知られる。

50

【0277】

(2'-O-Me) - - (2'-デオキシ) - - (2'-O-Me) キメラ・ホスホロチオエート・オリゴヌクレオチド

2'-O-アルキルホスホロチオエートおよび2'-デオキシホスホロチオエート・オリゴヌクレオチド・セグメントを有するキメラ・オリゴヌクレオチドを、上述のように、Applied Biosystems 自動化DNA合成装置、モデル394を用いて合成する。オリゴヌクレオチドは、自動化合成装置、並びにDNA部分のための2'-デオキシ-5'-ジメトキシトリチル-3'-O-ホスホロアミダイト、並びに5'および3'ウィングのための5'-ジメトキシトリチル-2'-O-メチル-3'-O-ホスホロアミダイトを用いて合成する。5'-ジメトキシトリチル-2'-O-メチル-3'-O-ホスホロアミダイトの反応時間を増加させたカップリング工程を取り込むことによって、標準的合成周期を修飾する。完全に脱保護されたオリゴヌクレオチドを支持体から切断し、そして濃アンモニア(NH₄OH)中、55℃で12~16時間脱保護する。次いで、脱保護されたオリゴを適切な方法(沈殿、カラムクロマトグラフィー)によって回収し、真空で容積を減少させ、そしてキャピラリー電気泳動によって、そして質量分析によって、収量および純度に関して、分光光度的に分析する。

10

【0278】

(2'-O-(2-メトキシエチル)) - - (2'-デオキシ) - - (2'-O-(メトキシエチル)) キメラ・ホスホロチオエート・オリゴヌクレオチド

2'-O-メチル・キメラ・オリゴヌクレオチドに関する上記の方法にしたがい、2'-O-メチルアミダイトの代わりに2'-O-(メトキシエチル)アミダイトを用いて、(2'-O-(2-メトキシエチル)) - - (2'-デオキシ) - - (2'-O-(メトキシエチル)) キメラ・ホスホロチオエート・オリゴヌクレオチドを調製した。

20

【0279】

(2'-O-(2-メトキシエチル)ホスホジエステル) - - (2'-デオキシホスホロチオエート) - - (2'-O-(2-メトキシエチル)ホスホジエステル) キメラ・オリゴヌクレオチド

2'-O-メチル・キメラ・オリゴヌクレオチドに関する上述の方法にしたがい、2'-O-メチルアミダイトの代わりに、2'-O-(メトキシエチル)アミダイトを用い、ヨウ素で酸化し、キメラ構造のウィング部分内にホスホジエステル・ヌクレオチド間連結を生成し、そして3', H-1', 2'-ベンゾジチオール-3'-オン 1', 1'-ジオキシド(Beaueage 試薬)を利用して硫化し、中央ギャップにホスホロチオエート・ヌクレオチド間連結を生成して、(2'-O-(2-メトキシエチル)ホスホジエステル) - - (2'-デオキシホスホロチオエート) - - (2'-O-(メトキシエチル)ホスホジエステル) キメラ・オリゴヌクレオチドを調製する。

30

【0280】

他のキメラ・オリゴヌクレオチド、キメラ・オリゴヌクレオシドおよび混合キメラ・オリゴヌクレオチド/オリゴヌクレオシドを、米国特許5,623,065にしたがって、合成する。

【0281】

40

(実施例7)

オリゴヌクレオチド単離

調節孔ガラス固体支持体から切断し、そして濃水酸化アンモニウム中、55℃で12~16時間脱ブロッキングした後、>3倍量のエタノールを用い、1M NH₄OAcからの沈殿によって、オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオシドを回収する。エレクトロスプレー質量分析(分子量測定)によって、そしてキャピラリーゲル電気泳動によって、合成されたオリゴヌクレオチドを分析し、そして全長成分が少なくとも70%であると判断した。-16原子質量単位(+/-32 +/-48)に比較した、正しい分子量の比によって、合成で得られるホスホロチオエートおよびホスホジエステル連結の相対量を決定した。いくつかの研究では、オリゴヌクレオチドを、Chiangら, J. Biol

50

. Chem. 1991, 266, 18162-18171に記載されるように、HPLCによって精製した。HPLC精製成分で得られた結果は、非HPLC精製成分で得られたものと同様であった。

【0282】

(実施例8)

オリゴヌクレオチド合成 - 96ウェルプレート形式

96ウェル形式で、同時に96の配列を組み立てることが可能な自動化合成装置上で、固相P (III) ホスホロアミダイト化学反応を介して、オリゴヌクレオチドを合成した。水性ヨウ素での酸化によって、ホスホジエステル・ヌクレオチド間連結を得た。無水アセトニトリル中の3, H-1, 2 ベンゾジチオール-3-オン 1, 1-ジオキシド (Beaucage試薬) を利用した硫化によって、ホスホロチオエート・ヌクレオチド間連結を生成した。標準的塩基保護ベータ-シアノエチル-ジイソ-プロピル・ホスホロアミダイトを、商業的業者 (例えばPE- Applied Biosystems、カリフォルニア州フォスターシティ、またはPharmacia、ニュージャージー州ピスカタウェイ) から購入した。非標準的ヌクレオシドを、標準法または特許の方法にしたがって合成する。これらを、塩基保護ベータ-シアノエチルジイソプロピル・ホスホロアミダイトとして利用する。

10

【0283】

オリゴヌクレオチドを支持体から切断し、そして濃NH₄OHを用いて、上昇させた温度 (55~60) で12~16時間、脱保護し、そして次いで、遊離した産物を真空中で乾燥させた。次いで、乾燥産物を無菌水に再懸濁し、マスタープレートを得て、ここからその後、ロボットピペッターを利用し、すべての分析および試験プレート試料を希釈した。

20

【0284】

(実施例9)

オリゴヌクレオチド分析 - 96ウェルプレート形式

各ウェル中のオリゴヌクレオチド濃度を、試料の希釈およびUV吸収分光によって評価した。個々の産物の全長完全性 (integrity) を、96ウェル形式 (Beckman P/ACETM MDQ) で、または個々に調製された試料に関しては商業的CE装置 (例えばBeckman P/ACETM 5000、ABI 270) 上で、キャピラリー電気泳動 (CE) によって評価した。エレクトロスプレー質量分析を利用したオリゴマー化合物の質量分析によって、塩基および主鎖組成を確認した。単一および多チャンネルロボットピペッターを用い、すべてのアッセイ試験プレートをマスタープレートから希釈した。プレート上の少なくとも85%のオリゴマー化合物が全長の少なくとも85%である場合、プレートは許容しうると判断した。

30

【0285】

(実施例10)

細胞培養およびオリゴヌクレオチド処理

標的核酸が測定可能なレベルで存在する限り、オリゴマー化合物の標的核酸発現に対する影響を、いかなる多様な細胞種において試験することも可能である。例えばPCRまたはノーザンブロット分析を用い、日常的にこれを測定することも可能である。以下の細胞種を、例示目的のため提供するが、選択した細胞種において標的が発現されている限り、他の細胞種も日常的に用いることも可能である。これは、当該技術分野において日常的方法、例えばノーザンブロット分析、リボヌクレアーゼ保護アッセイ、またはRT-PCRによって、容易に測定可能である。

40

【0286】

T-24細胞:

ヒト移行上皮膀胱癌細胞株T-24を、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ATCC) (バージニア州マナサス) から得た。T-24細胞を、10%ウシ胎児血清 (Invitrogen Corporation、カリフォルニア州カールスバッド

50

)、ペニシリン100単位/ml、およびストレプトマイシン100マイクログラム/ml (Invitrogen Corporation、カリフォルニア州カールスバッド)を補った、完全McCoyの5A基本培地 (Invitrogen Corporation、カリフォルニア州カールスバッド) 中で日常的に培養した。細胞が90%集密に達したとき、トリプシン処理および希釈によって日常的に細胞を継代した。RT-PCR分析に使用するには、細胞を、96ウェルプレート (Falcon-Primaria #353872) に7000細胞/ウェルの密度で蒔いた。

【0287】

ノーザンブロッティングまたは他の分析には、細胞を、100mmまたは他の標準的な組織培養プレートに蒔き、そして適切な量の培地およびオリゴヌクレオチドを用い、同様に処理することも可能である。

10

【0288】

A549細胞:

ヒト肺癌細胞株A549を、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ATCC) (バージニア州マナサス) から得た。A549細胞を、10%ウシ胎児血清 (Invitrogen Corporation、カリフォルニア州カールスバッド)、ペニシリン100単位/ml、およびストレプトマイシン100マイクログラム/ml (Invitrogen Corporation、カリフォルニア州カールスバッド)を補った、DMEM基本培地 (Invitrogen Corporation、カリフォルニア州カールスバッド) 中で日常的に培養した。細胞が90%集密に達したとき、トリプシン

20

【0289】

NHDF細胞:

ヒト新生皮膚線維芽細胞 (NHDF) を、Clonetics Corporation (メリーランド州ウォークーズビル) から得た。NHDFを、供給者により推奨されるように補った、線維芽細胞増殖培地 (Clonetics Corporation、メリーランド州ウォークーズビル) 中で日常的に維持した。細胞を、供給者によって推奨されるように、10継代まで維持した。

【0290】

HEK細胞:

ヒト胚性角化細胞 (HEK) を、Clonetics Corporation (メリーランド州ウォークーズビル) から得た。HEKを、供給者により推奨されるように配合した、角化細胞増殖培地 (Clonetics Corporation、メリーランド州ウォークーズビル) 中で日常的に維持した。細胞を、供給者によって推奨されるように、10継代まで日常的に維持した。

30

【0291】

MCF-7細胞

ヒト乳癌細胞株MCF-7を、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (バージニア州マナサス) から得る。これらの細胞は、野生型p53遺伝子を含む。MCF-7細胞を、10%ウシ胎児血清 (Gibco/Life Technologies、メリーランド州ガイザーズバーグ) を補ったDMEM低グルコース (Gibco/Life Technologies、メリーランド州ガイザーズバーグ) 中で日常的に培養する。細胞が90%集密に達したとき、トリプシン処理および希釈によって日常的に細胞を継代する。本発明のオリゴマー化合物で処理するため、細胞を、96ウェルプレート (Falcon-Primaria #3872) に7000細胞/ウェルの密度で蒔く。

40

【0292】

HepB3細胞

ヒト肝腫瘍細胞株HepB3 (Hep3B2.1-7) を、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ATCC-ATCCカタログ#HB-8064) (バージニア州マナサス) から得る。この細胞株は、元来、8歳の黒人男性の肝細胞癌に由来した。この

50

細胞は、形態的には上皮であり、そしてヌードマウスにおいて、腫瘍形成性である。アールの平衡化塩溶液、2 mM L - グルタミン、1.5 g / l 重炭酸ナトリウム、0.1 mM 非必須アミノ酸、1.0 mM ピルビン酸ナトリウム (ATCC # 20 - 2003、バージニア州マナサス)、および熱不活性化した10%ウシ胎児血清 (Gibco / Life Technologies、メリーランド州ガイザーズバーグ) を補った最小必須培地 (MEM) 中で、Hep B 3 細胞を日常的に培養する。細胞が90%集密に達したとき、トリプシン処理および希釈によって日常的に細胞を継代する。

【0293】

初代マウス肝細胞

Charles River Labs から購入したCD - 1 マウスから、初代マウス肝細胞を調製する。初代マウス肝細胞を、10%ウシ胎児血清 (Invitrogen Life Technologies、カリフォルニア州カールスバッド)、250 nM デキサメタゾン (Sigma - Aldrich Corporation、ミズーリ州セントルイス)、10 nM ウシ・インスリン (Sigma - Aldrich Corporation、ミズーリ州セントルイス) を補った肝細胞付着培地 (Invitrogen Life Technologies、カリフォルニア州カールスバッド) 中で、日常的に培養する。本発明のオリゴマー化合物で処理するため、4000 ~ 6000 細胞 / ウェルの密度で、96 ウェルプレート (Falcon - Primaria # 353872、BD Biosciences、マサチューセッツ州ベッドフォード) に細胞を蒔く。

10

【0294】

オリゴマー化合物での処理：

細胞が65 ~ 75%集密に達したとき、オリゴヌクレオチドで処理する。96 ウェルプレートで増殖させた細胞に関しては、ウェルを100 μ l のOPTI - MEMTM - 1 血清減少培地 (Invitrogen Corporation、カリフォルニア州カールスバッド) で1回洗浄し、そして次いで、3.75 μ g / ml のLIPOFECTINTM (Invitrogen Corporation、カリフォルニア州カールスバッド) および望ましい濃度のオリゴヌクレオチドを含有する、130 μ l のOPTI - MEMTM - 1 で処理した。3つ組で細胞を処理し、そしてデータを得る。37 °Cでの処理の4 ~ 7 時間後、培地を新鮮な培地で置き換えた。オリゴヌクレオチド処理16 ~ 24 時間後に細胞を採取した。

20

30

【0295】

用いるオリゴヌクレオチドの濃度は、細胞株間で多様である。特定の細胞株に関して最適なオリゴヌクレオチド濃度を決定するため、ある範囲の濃度の陽性対照オリゴヌクレオチドで細胞を処理する。ヒト細胞では、陽性対照オリゴヌクレオチドを、ヒトH - ras を標的とするISIS 13920 (TCCGTCATCGCTCCCTCAGGG、配列番号10)、またはヒトJun - N末端キナーゼ - 2 (JNK2) を標的とするISIS 18078 (GTGCGCGCGAGCCCGAATC、配列番号11) いずれかから選択する。両方の対照は、ホスホロチオエート主鎖を持つ、2' - O - メトキシエチル・ギャップマーである (2' - O - メトキシエチルを太字で示す)。マウスまたはラット細胞では、陽性対照オリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート主鎖を持つ、2' - O - メトキシエチル・ギャップマー (2' - O - メトキシエチルを太字で示す)、ISIS 15770、ATGCATTCTGCCCCCAAGGA、配列番号12であり、これはマウスおよびラット両方のc - raf を標的とする。次いで、c - H - ras (ISIS 13920 に関して)、JNK2 (ISIS 18078 に関して) またはc - raf (ISIS 15770 に関して) mRNA の80%阻害を生じる陽性対照オリゴヌクレオチドの濃度を、その細胞株に対する、続く実験における新規オリゴヌクレオチドのスクリーニング濃度として利用する。80%阻害が達成されない場合、c - H - ras、JNK2 またはc - raf mRNA の60%阻害を生じる陽性対照オリゴヌクレオチドの最低濃度を、その細胞株に対する、続く実験における新規オリゴヌクレオチドのスクリーニング濃度として利用する。60%阻害が達成されない場合、その特定の細胞株は、オリゴ

40

50

ヌクレオチド・トランスフェクション実験には適していないとみなされる。本明細書において、用いたアンチセンス・オリゴヌクレオチドの濃度は、50 nM ~ 300 nMである。

【0296】

(実施例11)

標的発現のオリゴヌクレオチド阻害の分析

標的発現のアンチセンス調節を、当該技術分野に知られる多様な方法でアッセイすることも可能である。例えば標的mRNAレベルを、例えばノーザンブロット分析、競合ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、またはリアルタイムPCR(RT-PCR)によって、定量化することも可能である。リアルタイム定量的PCRが、現在、適切である。総細胞RNAまたはポリ(A)+ mRNAに対して、RNA分析を行うことも可能である。本発明のRNA分析の1つの方法は、本明細書の他の実施例に記載するような総細胞性RNAの使用である。RNA単離の方法が当該技術分野に周知である。ノーザンブロット分析もまた、当該技術分野において日常的である。PE-Applied Biosystems、カリフォルニア州フォスターシティから入手可能である、商業的に入手可能なABI PRISMTM 7600、7700、または7900配列検出系を、製造者の指示にしたがって用いて、リアルタイム定量的(PCR)を便宜的に達成することも可能である。

10

【0297】

標的タンパク質レベルを、当該技術分野に周知の多様な方法、例えば免疫沈降、ウェスタンブロット分析(イムノブロッティング)、酵素連結免疫吸着アッセイ(ELISA)または蛍光活性化細胞分取(FACS)で定量化することも可能である。標的に対して向けられる抗体を、多様な供給源、例えばMSRS抗体カタログ(Aerie Corporation、ミシガン州パーミンガム)から同定し、そして得ることも可能であるし、あるいは慣用的なモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体生成法を介して調製することも可能である。

20

【0298】

(実施例12)

標的阻害剤を使用するための表現型アッセイおよびin vivo研究の設計 表現型アッセイ

本明細書に開示する方法によって、標的阻害剤が同定されたら、各々、特定の疾患状態または状態の治療における有効性を予測する、測定可能な終点を有する、1以上の表現型アッセイにおいて、オリゴマー化合物をさらに調べる。

30

【0299】

表現型アッセイ、その使用のためのキットおよび試薬が当業者に周知であり、そして本明細書において、健康および疾患における標的の役割および/または関連を調べるためにこれらを用いる。いくつかの商業的業者のいずれの1つからも購入可能な代表的な表現型アッセイには、細胞生存度、細胞傷害性、増殖または細胞生存を測定するもの(Molecular Probes、オレゴン州ユージーン; PerkinElmer、マサチューセッツ州ボストン)、酵素アッセイを含むタンパク質に基づくアッセイ(Panvera, LLC、ウィスコンシン州マディソン; BD Biosciences、ニュージャージー州フランクリンレークス; Oncogene Research Products、カリフォルニア州サンディエゴ)、細胞制御、シグナル伝達、炎症、酸化プロセスおよびアポトーシス(Assay Designs Inc.、ミシガン州アナーバー)、トリグリセリド集積(Sigma-Aldrich、ミズーリ州セントルイス)、血管形成アッセイ、管形成アッセイ、サイトカインおよびホルモンアッセイ並びに代謝アッセイ(Cheicon International Inc.、カリフォルニア州テムキュラ; Amersham Biosciences、ニュージャージー州ピスカタウェイ)が含まれる。

40

【0300】

50

1つの限定されない例において、特定の表現型アッセイに適していることが決定されている細胞（すなわち乳癌研究のために選択されるMCF-7細胞；肥満研究のための脂肪細胞）を、上述の方法によって決定される最適濃度で、*in vitro*研究で同定された標的阻害剤並びに、対照化合物で処理する。アッセイに特異的な1以上の方法によって、処理期間の終了時、処理細胞および未処理細胞を分析して、表現型結果および終点を決定する。表現型終点には、ある期間または処理用量に渡る細胞形態の変化とともに、タンパク質、脂質、核酸、ホルモン、糖または金属などの細胞構成要素のレベルの変化が含まれる。pH、細胞周期の段階、細胞による生物学的指標の取り込みまたは排出を含む細胞状態の測定もまた、重要な終点である。

【0301】

処理後の細胞の遺伝子型の分析（細胞の1以上の遺伝子の発現測定）もまた、標的阻害剤の有効性または強度の指標として用いられる。ホールマーク遺伝子、または特定の疾患状態、状態、または表現型と関連すると推測される遺伝子を、処理細胞および未処理細胞両方で測定する。

【0302】

in vivo 研究

本明細書に記載する*in vivo*研究の個々の被験者は、ヒトを含む温血脊椎動物である。

【0303】

臨床試験を厳しい規制に供して、個体が不必要にリスクを与えられないようにし、そして被験者に、研究における被験者の役割を完全に知らせる。

処置を受ける際の精神的影響を考慮するため、志願者にランダムにプラセボまたは標的阻害剤を提供する。さらに、医師が処置中に偏見をもつのを防ぐため、投与中の薬剤が標的阻害剤またはプラセボのいずれであるか、医師には知らせない。このランダム化アプローチを用いると、各志願者は、新規治療またはプラセボのいずれかを投与される、同一の見込みを有する。

【0304】

志願者らは、標的阻害剤またはプラセボのいずれかを8週間投与され、示される疾患状態または状態と関連する生物学的パラメーターを、研究期間中、開始時（いかなる処理よりも前のベースライン測定値）、終了時（最終処置の後）、および定期的な間隔で測定する。こうした測定には、処置前レベルと比較した、体液、組織または臓器における、標的をコードする核酸分子のレベルまたは標的タンパク質レベルが含まれる。他の測定には、限定されるわけではないが、治療中の疾患状態または状態、体重、血圧、疾患または毒性の薬理学的指標の血清力価の指標並びにADME（吸収、分布、代謝および排出）測定が含まれる。

【0305】

各患者に関して記録される情報には、年齢（歳）、性別、身長（cm）、疾患状態または状態の家族歴（あり／なし）、意欲評点（ある程度／中程度／非常に）、並びに表示される疾患または状態の先の治療措置の数および種類が含まれる。

【0306】

この研究に参加した志願者は、健康な成人（18～65歳）であり、そしてこの研究に参加したのは、おおよそ同数の男性および女性である。特定の特性を持つ志願者が、プラセボおよび標的阻害剤治療に同等に分布する。一般的に、プラセボで処置した志願者は、処置にほとんどまたはまったく反応せず、一方、標的阻害剤で処置した志願者は、研究終了時に、疾患状態または状態指標において、陽性の傾向を示す。

【0307】

（実施例13）

RNA単離

ポリ(A) + mRNA単離

Miuraら(Clin. Chem., 1996, 42, 1758-1764)

10

20

30

40

50

にしがって、ポリ(A) + mRNAを単離した。ポリ(A) + mRNA単離のための他の方法が当該技術分野において日常的である。簡潔には、96ウェルプレート上で増殖させた細胞に関しては、増殖培地を細胞から除去し、そして各ウェルを200 μ lの冷PBSで洗浄した。60 μ lの溶解緩衝液(10 mM Tris-HCl、pH 7.6、1 mM EDTA、0.5 M NaCl、0.5 % NP-40、20 mM バナジル-リボヌクレオシド複合体)を各ウェルに添加し、プレートを穏やかに攪拌し、そして次いで、室温で5分間インキュベーションした。55 μ lの溶解物をオリゴd(T)コーティング96ウェルプレート(AGCT Inc.、カリフォルニア州アービン)に移した。プレートを室温で60分間インキュベーションし、200 μ lの洗浄緩衝液(10 mM Tris-HCl pH 7.6、1 mM EDTA、0.3 M NaCl)で3回洗浄した。最後の洗浄後、プレートの水分を紙タオル上で吸い取り、過剰な洗浄緩衝液を除去し、そして次いで5分間空気乾燥した。あらかじめ70 $^{\circ}$ Cに加熱した60 μ lの溶出緩衝液(5 mM Tris-HCl、pH 7.6)を、各ウェルに添加し、プレートを90 $^{\circ}$ Cのホットプレート上で5分間インキュベーションし、そして次いで溶出物を新鮮な96ウェルプレートに移した。

10

【0308】

すべての溶液を適切な量で用いて、100 mmまたは他の標準的プレート上で増殖させた細胞を、同様に処理することも可能である。

総RNA単離

製造者の推奨する方法にしたがって、Qiagen Inc. (カリフォルニア州バレンシア) から購入したRNEASY 96TM キットおよび緩衝液を用い、総RNAを単離した。簡潔には、96ウェルプレート上で増殖させた細胞に関しては、増殖培地を細胞から除去し、そして各ウェルを200 μ lの冷PBSで洗浄した。150 μ lの緩衝液RLTを各ウェルに添加し、そしてプレートを20秒間、激しく攪拌した。次いで、1 μ lの70 %エタノールを各ウェルに添加し、そして上下に3回ピペッティングすることによって、内容物を混合した。次いで、廃水収集トレーを取り付けそして真空供給源につないだQIAC MANIホールドにつないだRNEASY 96TM ウェルプレートに試料を移した。真空を1分間適用した。500 μ lの緩衝液RW1をRNEASY 96TM プレートの各ウェルに添加し、そして15分間インキュベーションし、そして再び真空を1分間適用した。さらに500 μ lの緩衝液RW1をRNEASY 96TM プレートの各ウェルに添加し、そして真空を2分間適用した。次いで、1 mlの緩衝液RPEをRNEASY 96TM プレートの各ウェルに添加し、そして真空を90秒間適用した。次いで、緩衝液RPE洗浄を繰り返し、そして真空をさらに3分間適用した。次いで、プレートをQIACTM マニホールドから取り除き、そして紙タオルで水分を吸い取った。次いで、プレートを再び、1.2 mlの収集試験管を含有する収集試験管ラックを取り付けたQIACTM マニホールドにつないだ。次いで、140 μ lのRNA不含有水を各ウェルにピペッティングし、1分間インキュベーションし、そして次いで、真空を3分間適用することによって、RNAを溶出した。

20

30

【0309】

QIAGEN Bio-Robot 9604 (Qiagen, Inc.、カリフォルニア州バレンシア) を用いて、反復ピペッティング工程および溶出工程を自動化することも可能である。本質的には、培養プレート上の細胞を溶解した後、プレートをロボット・デッキに移し、ここでピペッティング、DNアーゼ処理および溶出工程が行われる。

40

【0310】

(実施例14)

標的mRNAレベルのリアルタイム定量的PCR分析

製造者の指示にしたがい、ABI PRISMTM 7600、7700、または7900配列検出系(PE-Applied Biosystems、カリフォルニア州フォスターシティ)を用い、リアルタイム定量的PCRによって、標的mRNAレベルの定量化を達成した。これは、閉管のゲルに基づかない蛍光検出系であり、リアルタイムでポ

50

リメラーゼ連鎖反応 (PCR) 産物の高処理定量化を可能にする。増幅産物が PCR の完了後に定量化される、標準的 PCR と対照的に、リアルタイム定量的 PCR の産物は、集積しながら定量化される。これは、PCR 反応において、順方向および逆方向 PCR プライマーの間に特異的にアニーリングし、そして 2 つの蛍光色素を含有するオリゴヌクレオチドプローブを含むことによって、達成される。レポーター色素 (例えば、PE - Applied Biosystems、カリフォルニア州フォスターシティ、Operon Technologies Inc.、カリフォルニア州アラメダまたは Integrated DNA Technologies Inc.、アイオワ州コーラルビル) のいずれかから得られる、FAM または JOE) をプローブの 5' 端に付着させ、そして消光色素 (例えば、PE - Applied Biosystems、カリフォルニア州フォスターシティ、Operon Technologies Inc.、カリフォルニア州アラメダ、または Integrated DNA Technologies Inc.、アイオワ州コーラルビル) のいずれかから得られる、TAMRA) をプローブの 3' 端に付着させる。プローブおよび色素が損なわれていない場合、レポーター色素発光は、3' 消光色素が近接することによって、消光される。増幅中、プローブが標的配列にアニーリングすることによって、Taq ポリメラーゼの 5' - エキソヌクレアーゼ活性により切断することが可能な基質が生成される。PCR 増幅周期の伸長期中、Taq ポリメラーゼがプローブを切断することで、残りのプローブから (そしてしたがって消光剤部分から) レポーター色素が遊離し、そして配列特異的蛍光シグナルが生成される。各周期で、さらなるレポーター色素分子がそれぞれのプローブから切断され、そして ABI PRISMTM 配列検出系に取り付けられたレーザー・オプティクスにより、規則正しい間隔で蛍光強度が監視される。各アッセイにおいて、未処理対照試料由来の mRNA の連続希釈を含有する一連の平行反応は、試験試料のアンチセンス・オリゴヌクレオチド処理後、阻害パーセントを定量化するのに用いられる標準曲線を生成する。

【0311】

定量的 PCR 分析の前に、GAPDH 増幅反応と「多重化 (multiplexed)」する能力に関して、測定する標的遺伝子に特異的なプライマー・プローブ・セットを評価する。多重化では、標的遺伝子および内部標準遺伝子 GAPDH 両方を、単一試料中で同時に増幅する。この分析において、未処理細胞から単離した mRNA を連続希釈する。各希釈物を、GAPDH のみ、標的遺伝子のみ (「単一化 (single-plexing)」)、または両方 (多重化) に特異的なプライマー・プローブ・セットの存在下で増幅する。PCR 増幅後、単一化および多重化両方の試料から、希釈の関数としての GAPDH および標的の mRNA シグナルの標準曲線を生成する。多重化試料から生成される GAPDH および標的のシグナルの傾斜および相関係数両方が、単一化試料から生成される対応する値の 10% 以内に属する場合、その標的に特異的なプライマー・プローブ・セットは多重化可能とみなされる。PCR の他の方法もまた、当該技術分野に知られる。

【0312】

PCR 試薬を、Invitrogen Corporation (カリフォルニア州カールスバッド) から得た。20 μ l の PCR カクテル (MgCl₂ を除いた 2.5 \times PCR 緩衝液、6.6 mM MgCl₂、各 375 μ M の dATP、dCTP、dCTP および dGTP、各 375 nM の順方向プライマーおよび逆方向プライマー、125 nM のプローブ、4 単位の RNアーゼ阻害剤、1.25 単位の PLATINUM (登録商標) Taq、5 単位の MuLV 逆転写酵素、並びに 2.5 \times ROX 色素) を、30 μ l の総 RNA 溶液 (20 ~ 200 ng) を含有する 96 ウェルプレートに添加することによって、RT-PCR 反応を行った。48 で 30 分間インキュベーションすることによって、RT 反応を行った。95 で 10 分間インキュベーションし、PLATINUM (登録商標) Taq を活性化した後、40 周期の 2 段階 PCR プロトコルを行った: 95 で 15 秒間 (変性) の後、60 で 1.5 分間 (アニーリング/伸長)。

【0313】

発現が一定である遺伝子、GAPDH の発現レベルを用いるか、または Ribogre 50

enTM (Molecular Probes, Inc., オレゴン州ユージーン)を用いて総RNAを定量化するか、いずれかによって、リアルタイムRT-PCRによって得られる遺伝子標的量を標準化する。多重化するか、または別個に、標的と同時に実行することによって、リアルタイムRT-PCRによってGAPDH発現を定量化する。RiboGreenTM RNA定量化試薬 (Molecular Probes, Inc., オレゴン州ユージーン)を用いて、総RNAを定量化する。RiboGreenTM によるRNA定量化の方法は、Jones, L. J.ら (Analytical Biochemistry, 1998, 265, 368-374)に解説される。

【0314】

このアッセイにおいて、170 μ lのRiboGreenTM ワーキング試薬 (10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、pH 7.5 中で1:350に希釈されたRiboGreenTM 試薬)を、30 μ lの精製細胞性RNAを含有する96ウェルプレートにピペティングする。485 nm励起および530 nm発光で、CytoFluor 4000 (PE Applied Biosystems) 中でプレートを読み取る。

【0315】

公開される配列情報を用いて、ヒト標的配列にハイブリダイズするように、プローブを設計する。

(実施例 15)

標的mRNAレベルのノーザンプロット分析

アンチセンス処理の18時間後、細胞単層を冷PBSで2回洗浄し、そして1 ml RNAzolTM (TEL-TEST "B" Inc., テキサス州フレンズウッド) 中で溶解した。製造者が推奨するプロトコルにしたがって総RNAを調製した。MOPS緩衝系 (AMRESCO, Inc., オハイオ州ソロン)を用いて1.1%ホルムアルデヒドを含有する1.2%アガロースゲルを通じた電気泳動によって、20マイクログラムの総RNAを分画した。ノーザン/サザン・トランスファー緩衝系 (TEL-TEST "B" Inc., テキサス州フレンズウッド)を用いて、一晚、キャピラリー・トランスファーすることによって、RNAをゲルからHYBONDTM - N+ナイロン膜 (Amersham Pharmacia Biotech, ニュージャージー州ピスカタウェイ)に移した。RNAトランスファーをUV視覚化によって確認した。STRATALINKERTM UVクロスリンカー2400 (Stratagene, Inc., カリフォルニア州ラホヤ)を用いて、UV架橋することによって膜を固定し、そして次いで、ストリンジェントな条件に関する製造者の推奨を用い、QUICKHYBTM ハイブリダイゼーション溶液 (Stratagene, カリフォルニア州ラホヤ)を用いて探査した (probed)。

【0316】

ヒト標的を検出するため、PCRによってヒト標的的特異的プライマー・セットを調製する。装填およびトランスファー効率の変動を標準化するため、膜をストリップし、そしてヒト・グリセロアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) RNA (Clontech, カリフォルニア州パロアルト) に関して探査した。

【0317】

PHOSPHORIMAGERTM およびIMAGEQUANTTM ソフトウェアV3.3 (Molecular Dynamics, カリフォルニア州サニーベール)を用いて、ハイブリダイズした膜を視覚化し、そして定量化した。未処置対照のGAPDHレベルにデータを標準化した。

【0318】

(実施例 16)

オリゴヌクレオチドによるヒト標的発現のアンチセンス阻害

本発明にしたがって、ヒト標的RNAの異なる領域を標的とするように、一連のオリゴマー化合物を設計する。本明細書の他の実施例に記載するように、定量的リアルタイムPCRによって、ヒト標的mRNAレベルに対するその影響に関して、オリゴマー化合物を

10

20

30

40

50

分析する。データは3つの実験由来の平均である。これらの適切な配列が相補的である標的領域は、本明細書において、「適切な標的セグメント」と称され、そしてしたがって、本発明のオリゴマー化合物が標的とするのに適している。該配列は、適切なアンチセンス・オリゴマー化合物の逆相補体に相当する。

【0319】

これらの「適切な標的セグメント」は、本発明のアンチセンス・オリゴマー化合物とのハイブリダイゼーションに対してオープンであり、そして接近可能であることが、実験によって見出されているため、当業者は、日常的な実験以上のものを用いずに、これらの適切な標的セグメントに特異的にハイブリダイズし、そしてその結果、標的の発現を阻害する他のオリゴマー化合物を含む、本発明のさらなる態様を認識するか、または確かめることが可能であろう。

10

【0320】

本発明にしたがって、アンチセンス・オリゴマー化合物には、アンチセンス・オリゴマー化合物、アンチセンス・オリゴヌクレオチド、リボザイム、外部ガイド配列 (EGS) オリゴヌクレオチド、選択的スプライサー、プライマー、プローブ、および標的核酸の少なくとも一部にハイブリダイズする、他の短いオリゴマー化合物が含まれる。

【0321】

(実施例17)

標的タンパク質レベルのウェスタンブロット分析

標準法を用いて、ウェスタンブロット分析 (イムノブロット分析) を行う。オリゴヌクレオチド処理の16~20時間後、細胞を採取し、PBSで1回洗浄し、Laemmli 緩衝液 (100 μ l / ウェル) に懸濁し、5分間煮沸し、そして16% SDS-PAGE ゲル上に装填した。ゲルを150Vで1.5時間泳動し、そしてウェスタンブロッティングのため、膜に移した。標的に向けられる適切な一次抗体を、一次抗体種に対して向けられる放射標識または蛍光標識二次抗体とともに用いる。PHOSPHORIMAGERTM (Molecular Dynamics、カリフォルニア州サニーベール) を用いて、バンドを視覚化する。

20

【0322】

当業者には、前述の説明から、本明細書記載のものに加えて、本発明の多様な修飾が明らかであろう。こうした修飾はまた、付随する請求項の範囲内に属することも意図される。本出願に引用される、各参考文献 (限定されるわけではないが、論文、米国特許および非米国の特許、特許出願刊行物、国際特許出願刊行物、遺伝子バンク寄託番号等) が、本明細書に完全に援用される。米国出願第10/872,106号、2004年6月18日出願、米国仮出願第60/501,719号、2003年9月9日出願、米国仮出願第60/568,039号、2004年5月3日出願、および米国仮出願第60/568,489号、2004年5月6日出願が、各々、本明細書に完全に援用される。

30

【配列表】

2007505138000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成18年10月6日 (2006.10.6)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0205

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0205】

【化 1 7】

cgagagggcggacgggaccgTT アンチセンス鎖（配列番号 2）
| | | | | | | | | | | | | | | |
TTgctctccgcctgcctggc 相補鎖（配列番号 1 3）

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US04/29650

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) : C07H 21/04; A61K 48/00

US CL : 536/24.5; 514/44

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)

U.S. : 536/24.5; 514/44

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 practicable, search terms used)
EAST, STN: gapmer, hemimer, LNA, BNA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GRUNWELLER et al. Comparison of different antisense strategies in mammalian cells using locked nucleic acids, 2'-O-methyl RNA, phosphorothioates and small interfering RNA Nucleic Acids Research June 2003, Vol 31, No. 12, pages 3185-3193, see entire document.	1-65
X	US 20020068709 A1 (ORUM et al.) 6 June 2002 (06.06.2002), see entire document.	1-65

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle 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, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 October 2005 (12.10.2005)

Date of mailing of the international search report

04 NOV 2005

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US

Commissioner for Patents

P.O. Box 1450

Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. (571) 273-3201

Authorized officer

Tracy Vivlenore

Telephone No. 571-272-1600

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 10/872,106

(32)優先日 平成16年6月18日(2004.6.18)

(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, 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, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, 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, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100080137

弁理士 千葉 昭男

(74)代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(74)代理人 100106080

弁理士 山口 晶子

(72)発明者 スウェイジ, エリック・イー

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 0 0 9, カールスバッド, パレンケ・ストリート 7 7 8 9

(72)発明者 ミガワ, マイケル・ティー

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 0 1 1, カールスバッド, ウィンド・ドラフト・ドライブ 9 3 0

(72)発明者 ウィルシキーヴィッツ, タデウシュ・クリシュトフ

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 0 0 8, カールスバッド, コープ・ドライブ 4 5 2 5, ナンバー 2

F ターム(参考) 4B024 AA01 CA05 CA11 DA02 GA11 HA12 HA17

4C057 BB02 BB07 BB10 MM01 MM09

4C084 AA13 MA13 MA16 MA17 MA22 MA23 MA24 MA28 MA31 MA32

MA34 MA35 MA37 MA43 MA52 MA56 MA58 MA59 MA60 MA63

MA66 NA12 NA14 ZC202

4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA12 NA14 ZC20