



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C07H 21/02, 21/04, C12N 15/00	A1	(11) 国際公開番号 WO97/47639 (43) 国際公開日 1997年12月18日(18.12.97)
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/01959 (22) 国際出願日 1997年6月9日(09.06.97) (30) 優先権データ 特願平8/170632 1996年6月10日(10.06.96) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 分子バイオホトニクス研究所 (LABORATORY OF MOLECULAR BIOPHOTONICS)[JP/JP] 〒434 静岡県浜北市平口5000番地 Shizuoka, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 塩野博文(SHIONO, Hirofumi)[JP/JP] 小玉啓文(KODAMA, Hirofumi)[JP/JP] 〒434 静岡県浜北市平口5000番地 株式会社 分子バイオホトニクス研究所内 Shizuoka, (JP) 小嶋牧子(KOJIMA, Makiko)[JP/JP] 〒390 長野県松本市島内3430-1-G101 Nagano, (JP) (74) 代理人 弁理士 長谷川芳樹, 外(HASEGAWA, Yoshiki et al.) 〒104 東京都中央区京橋二丁目13番10号 京橋ナショナルビル6F 創英国際特許事務所 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AU, CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
(54)Title: PHOTOCLEAVABLE CYCLIC OLIGONUCLEOTIDE (54)発明の名称 光開裂性環状オリゴヌクレオチド (57) Abstract A photocleavable cyclic oligonucleotide having a base sequence capable of hybridizing with a target DNA or RNA and a structure cyclized with a photocleavable linkage. The oligonucleotide is not decomposed by nucleases in the living body owing to its cyclic structure, so that it can be diffused to predetermined positions in the body by taking a sufficiently prolonged time. Further, the linkage is cleaved by irradiation with a suitable light after the lapse of a predetermined time, by which the cyclic oligonucleotide is converted into a linear one, thus acting as an antisense oligonucleotide.		

(57) 要約

本発明に係る光開裂性環状オリゴヌクレオチドは、ターゲットたるDNAまたはRNAに対するハイブリダイゼーション能力を有する塩基配列を有するオリゴヌクレオチドであって、さらに、光開裂性基により環状化されている構造を有するものである。従って、本発明に係る光開裂性環状オリゴヌクレオチドは、生体内に導入された後、その環状構造のため、ヌクレアーゼ分解反応を受けることなく、生体内の所定の位置へ十分な時間をかけて拡散することが可能となるものである。さらに、所定の時間後に、適当な光を照射することにより、上記光開裂性基が光開裂し、特定の結合が切断され、環状構造であったオリゴヌクレオチドが直鎖状オリゴヌクレオチドとなり、アンチセンスオリゴヌクレオチドとしての作用が発現するものである。

参考情報

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	ES	スペイン	LR	リベリア	SG	シンガポール
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LS	レソト	SI	スロヴェニア
AT	オーストリア	FR	フランス	LT	リトアニア	SK	スロヴァキア共和国
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BA	ボスニア・エルツェゴビナ	GE	グルジア	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ共和国	TD	チャド
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TG	トーゴ
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TJ	タジキスタン
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	ML	マリ	TM	トルクメニスタン
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TR	トルコ
BR	ブラジル	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	TT	トリニダード・トバゴ
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UA	ウクライナ
CA	カナダ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UG	ウガンダ
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	US	米国
CG	コンゴ	IT	イタリア	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン
CH	スイス	JP	日本	NO	ノルウェー	VN	ヴェトナム
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	YU	ユーゴスラビア
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	PT	ポルトガル		
CU	キューバ	KR	大韓民国	RO	ルーマニア		
CZ	チェコ共和国	KZ	カザフスタン	RU	ロシア連邦		
DE	ドイツ	LC	セントルシア	SD	スーダン		
DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン		
EE	エストニア	LK	スリランカ				

明細書

光開裂性環状オリゴヌクレオチド

技術分野

本発明は、光開裂性基により環状化されたオリゴヌクレオチドに関する。

背景技術

オリゴヌクレオチドは、核酸の検出において特異的配列を認識し検出するためのプローブとして、また遺伝子工学の重要な手法であるPCR法のためのプライマーとして、更には近年の遺伝子治療の分野で活発に研究開発されているアンチセンス法におけるアンチセンスオリゴヌクレオチドとして、生物および医療の分野で非常に重要で有用な物質であることが知られている。

上記のオリゴヌクレオチドがそれぞれの機能を発揮するためには、いずれもオリゴヌクレオチドの有する塩基配列部の相補配列へのいわゆるハイブリダイゼーション能力を必要としている。

さらに、上記のアンチセンスオリゴヌクレオチドについては、ハイブリダイゼーション能力のみならず、その生体内での安定性も要求される。例えばアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた遺伝情報の制御についての試みがいくつかなされてきているが（例えば、Zamecnick, Stephenson等、Proc.Natl.Acad.Sci.,US A, 75, 280-284(1978)）、この目的で使用されるオリゴヌクレオチドは通常天然由来のもので、ヌクレアーゼに対しては極めて低い耐性しかもたないものが多く、生体内で望ましくない分解反応を受けることが問題となる。従って、実際これらの欠点を補うような種々の修飾オリゴヌクレオチドが開発されている。

例えば、ホスホロチオエート(phosphorothioate)結合を有するオリゴヌクレオチドであり、S-オリゴ(S-oligo) (DeClercq等、Science 165, 1137-1139(1969))

と呼ばれているものであって、DNA自動合成機で容易に合成され得るものであり、比較的ヌクレアーゼ耐性がある (Wickstrom等、J.Biol.Biophys.Meth.,13 97-102(1986))ことが知られている。また、メチルホスホネート(methylphosphonate)結合を有するオリゴヌクレオチドであり、MP-オリゴ(MP-Oligo)(Miller等、Biochemistry, 18,5134-5142(1979))と呼ばれているものであって、天然型のDNAのリン酸結合の酸素のうちの1つをメチル基に置き換えることにより、ヌクレアーゼ耐性を有すると共に、リン酸部の電荷が無くなり膜透過性が比較的良くなるものである。

しかし、上記S-オリゴは、リン酸結合部にキラル中心を持つ多くの異性体をもつラセミ混合物であり、RNAまたはDNAとの親和性が低いという欠点があり(Cosstick等、Biochemistry 24, 3630-3638(1985))、さらに十分な生体内での安定性(すなわち、対ヌクレアーゼ耐性)も有していないという欠点がある。

また、MP-オリゴも、S-オリゴ同様のラセミ混合物であり、RNAまたはDNAとの親和性が低いという欠点があり、さらにリン酸部の電荷が無いことから水への溶解性が低いという欠点がある。

さらには、従来知られているアンチセンスオリゴヌクレオチドは、一度生体内に導入された後は、全くその活性発現(例えば濃度、及び場所、時間)に関しては制御不可能であるという欠点がある。

図面の簡単な説明

図1は本発明に係る光開裂性環状オリゴヌクレオチドの1例を示すものであり、黒四角は、光開裂基を、塩基配列Aは、ターゲットの塩基配列Tとハイブリダイズ可能な塩基配列を示す。

図2は図1に示す本発明に係る光開裂性環状オリゴヌクレオチド(小さな○で示す)が、細胞内に導入され、拡散した後、細胞の一部を光照射されることで光開裂性基が開裂し、直鎖状オリゴヌクレオチドに変換され、ターゲットDNAと

ハイブリダイズしてアンチセンス活性を発現することを示す図である。

図3は本発明に係る光開裂性環状オリゴヌクレオチドの1例を示すものであり、黒四角は、光開裂基を、塩基配列Aはターゲットの塩基配列Tとハイブリダイズ可能な塩基配列を、塩基配列Bはターゲットの塩基配列Sと相互作用可能な塩基配列を示す。

図4は図3に示す本発明に係る光開裂性環状オリゴヌクレオチド（小さな○で示す）が、細胞内に導入され、拡散した後、ターゲット核酸と相互作用して、複合体を形成し、さらに細胞の一部を光照射されることで光開裂性基が開裂し、直鎖状オリゴヌクレオチドに変換され、ターゲットDNAとハイブリダイズしてアンチセンス活性を発現することを示す図である。

図5はニトロベンジル型光開裂性基により、2種類のオリゴヌクレオチドがリン酸エステル基で結合されており、その結合が、光照射によりリン酸基と、ニトロソフェニル誘導体になることを示す図である。

図6はニトロベンジル型光開裂性基により、2種類のオリゴヌクレオチドがリン酸エステル基で結合されており、その結合が、光照射によりリン酸基と、ニトロソフェニル誘導体になることを示す図である。

図7は本発明に係る、ホスホアミダイト試薬の合成例を示す図である。

図8は本発明に係る、他のホスホアミダイト試薬の合成例を示す図である。

図9は本発明に係る光開裂性環状オリゴヌクレオチドの調製法の一例を示すものであり、光開裂性基を導入したオリゴヌクレオチドの5'末端をリン酸化したものを、ビオチンが結合したテンプレートオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせ、DNAリガーゼ反応により環状化することを示す図である。

図10は本発明に係る環状または直鎖状オリゴヌクレオチドについてのヌクレアーゼ耐性試験を示す図である。

図11は本発明に係る環状または直鎖状オリゴヌクレオチドについての光開裂反応のポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を示す写真であり、レーン1：直

鎖状40mer(2)、2：直鎖状40mer(2)を光照射したもの、3：合成30mer(5)、4：環状40mer(2')、5：環状40mer(2')を光照射したもの、6：合成40mer(6)を示す。

図12は本発明に係る環状または直鎖状オリゴヌクレオチドについての光開裂反応のポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を示す写真であり、レーン1：直鎖状40mer(8)、2：直鎖状40mer(8)を光照射したもの、3：合成30mer(5)、4：環状40mer(8')、5：環状40mer(8')を光照射したもの、6：合成40mer(6)を示す。

図13は直鎖状オリゴヌクレオチド(2)の光照射前のHPLC分析結果を示す図である。

図14は直鎖状オリゴヌクレオチド(2)の光照射後のHPLC分析結果を示す図である。

図15は直鎖状オリゴヌクレオチド(2)の光照射による光開裂を示す図である。

図16は直鎖状オリゴヌクレオチド(8)の光照射による光開裂を示す図である。

図17は本発明に係る環状オリゴヌクレオチドとターゲット核酸の相互作用により形成される複合体を示すHPLCの結果である。

図18は本発明に係る直鎖状オリゴヌクレオチドとターゲット核酸の相互作用により形成されるハイブリダイズ体を示すHPLCの結果である。

発明の開示

本発明者は、上記説明した従来の修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドの有する欠点に鑑みなされたもので、これら欠点を解消し、RNAまたはDNAとの親和性が十分高く、しかも生体内で十分なヌクレアーゼ耐性を兼備する新規構造を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドを見出し本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明に係る光開裂性環状オリゴヌクレオチドは、ターゲットたるDNAまたはRNAに対してハイブリダイズするオリゴヌクレオチドであって、さらに、光開裂性基により環状化されている構造を有するものである。ここで上記光開裂性基とは、従来より光ケイジド試薬として知られている基を有するものであり、

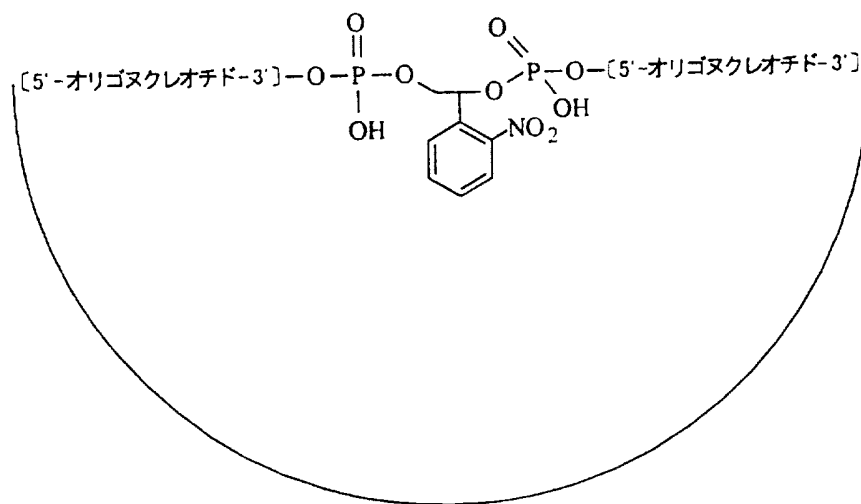
特定の光照射により、特定の結合が切断されるものである。

従って、本発明に係る光開裂性環状オリゴヌクレオチドは、生体内に導入された後、その環状構造のため、ヌクレアーゼ分解反応を受けることなく、生体内の所定の位置へ十分な時間をかけて拡散することが可能となるものである。さらに、所定の時間後に、適当な光を照射することにより、上記光開裂性基が光分解し、特定の結合が切断され、環状構造であったオリゴヌクレオチドが直鎖状オリゴヌクレオチドとなり、ターゲットたるRNAまたはDNAとハイブリダイズ可能となるものである。

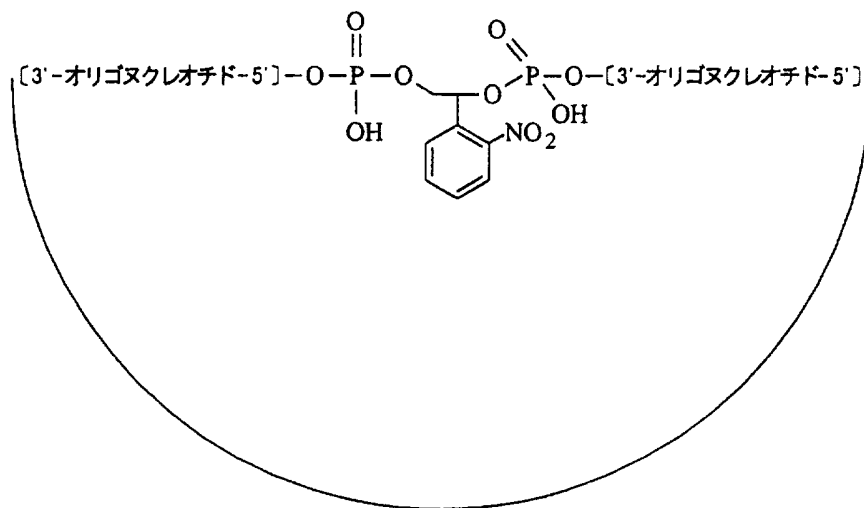
さらには、ターゲットDNAまたはRNAの存在する領域に拡散した後、ターゲットDNA、またはRNAの一部の塩基配列と相互作用することにより複合体を形成し、光照射により光分解して直鎖状となりアンチセンスオリゴヌクレオチドとしての活性を効果的に発揮し得るものである。

より詳しくは、本発明は、分子中に少なくとも1つの光開裂性基で結合された環状オリゴヌクレオチドを提供するものである。

また、本発明は、前記光開裂性基が、次式に示す構造を有することを特徴とする前記記載の環状オリゴヌクレオチドを提供するものである。



さらに、本発明は、前記光開裂性基が、次式に示す構造を有することを特徴とする前記記載の環状オリゴヌクレオチドを提供するものである。



また、本発明は、前記環状オリゴヌクレオチドが10～200個の塩基からなることを特徴とする前記記載の環状オリゴヌクレオチドを提供するものである。

また、本発明は、前記環状オリゴヌクレオチドが30～100個の塩基からなることを特徴とする前記記載の環状オリゴヌクレオチドを提供するものである。

さらに、本発明は、前記環状オリゴヌクレオチドが、前記光開裂性基の開裂により、ターゲット核酸の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列とハイブリダイズ可能な第1の塩基配列を有することを特徴とする前記記載の環状オリゴヌクレオチドを提供するものである。

また、本発明は、前記環状オリゴヌクレオチドが、前記光開裂性基の開裂によりターゲット核酸の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列とハイブリダイズ可能な第1の塩基配列と、前記環状オリゴヌクレオチドが、ターゲット核酸と複合体を形成する第2の塩基配列を有することを特徴とする前記記載の環状オリゴヌクレオチドを提供するものである。

発明を実施するための最良の形態

本発明に係る光開裂性環状オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの光開裂性基により環状化構造を有するオリゴヌクレオチドである。さらに、本発明に係る光開裂性環状オリゴヌクレオチドの塩基配列は、ターゲットたる核酸（DNA、RNA等）に相補的にハイブリダイズ可能な塩基配列をその一部に有するものである。さらに、本発明に係る光開裂性環状オリゴヌクレオチドは、ターゲットたる核酸と複合体を形成可能な塩基配列をその一部に有するものである。

本発明に係る光開裂性環状オリゴヌクレオチドの好ましい例の1つとしては、図1に模式的に示されるような構造を有するものであり、光開裂性基で環状化された特定の塩基配列（光開裂後に直鎖状となり、ターゲット核酸へアンチセンスオリゴヌクレオチドとしてハイブリダイズ可能な塩基配列、図1では塩基配列Aで表されている）を有するオリゴヌクレオチドである。図2に示されるように、係る光開裂性環状オリゴヌクレオチドがターゲット核酸の存在する部分へ導入された際、その環状構造のために種々のヌクレアーゼに対して耐性を有し、加水分解を受けることなく十分ターゲット核酸の近傍へ拡散することが可能となる。さらに、望ましい位置及び時間に、また望ましい強度の光を照射することにより本発明に係る光開裂性環状オリゴヌクレオチドの光開裂性基が開裂し、直鎖状のオリゴヌクレオチドとなる。係る直鎖状オリゴヌクレオチドは、近傍に存在するターゲット核酸の特定の塩基配列にハイブリダイズすることが可能となり、アンチセンスオリゴヌクレオチドの作用を発揮し得るものである。この際、ターゲット核酸とハイブリダイズしない該直鎖状オリゴヌクレオチドは速やかに近傍に存在するヌクレアーゼにより加水分解される。

本発明に係る光開裂性環状オリゴヌクレオチドの好ましい構造の他の例はさらに、図3に模式的に示されるように、光開裂性基で環状化された特定の塩基配列（光開裂後に直鎖状となりターゲット核酸へアンチセンスオリゴヌクレオチドとしてハイブリダイズ可能な塩基配列、図3においては塩基配列Aと表されている）

と、環状状態でターゲット核酸と相互作用可能な塩基配列（図3では塩基配列Bと表されている）を有するオリゴヌクレオチドである。図4に示されるように、係る光開裂性環状オリゴヌクレオチドは、ターゲット核酸の存在する部分へ導入された際、その環状構造のために種々のヌクレアーゼに対して耐性を有し、加水分解を受けることなく十分ターゲット核酸の近傍へ拡散し、さらにターゲット核酸の一部（図3では塩基配列Sと表されている）へ相互作用して複合体を形成することが可能となる。この場合、望ましい位置及び時間に、また望ましい強度の光を照射することにより本発明に係る光開裂性環状オリゴヌクレオチドの光開裂性基が開裂し、直鎖状のオリゴヌクレオチドとなる。係る直鎖状オリゴヌクレオチドは、前記複合体形成のため極めて近傍に存在するターゲット核酸の特定の塩基配列に効果的にハイブリダイズすることが可能となり、アンチセンスオリゴヌクレオチドの作用を効果的に発揮し得るものである。上記相互作用可能な塩基配列Bの種類及び塩基数は特に制限はないが、塩基配列Aよりも長い塩基数を有することがより好ましい。

以下本発明に係る光開裂性環状オリゴヌクレオチドの構造上の特徴を説明する。

（光開裂性基）

本発明に係る光開裂性環状オリゴヌクレオチドは、その分子内に光照射により光開裂する基を有するものである。係る光開裂性基は光照射により光開裂し、その結果環状構造が直鎖状となりアンチセンスオリゴヌクレオチドとしての活性が現われるものである（図1、3参照）。

従って、係る光開裂性基は、アンチセンスオリゴヌクレオチドとして作用すべき塩基配列を含む1本の直鎖状オリゴヌクレオチドの5'及び3'末端を結合し、環状構造を形成するものであり、該結合の少なくとも1つが、光照射により開裂するものである。従って、本発明において、その目的に使用可能な構造は特に限定されることなく、上記性質を有する官能基であればよい。例えば、従来より、光ケイジド試薬として知られている官能基は好ましく使用可能なものの1種

類である。本発明においては、さらに、当該官能基がリン酸エステル結合を形成するものが好ましい。

さらには、該官能基を有する光開裂性基が、通常のオリゴヌクレオチド自動合成機（例えばアミダイト法に基づく）により分子内に取り込まれるための官能基を有することが必要である。上記の2つの機能を有する光開裂性基としては、例えば、以下のような構造を有するニトロベンジル型のものが好適に使用される。

図5、及び図6に示されるように、この構造は、適当な光の照射を受けて選択的にリン酸エステルの1つが切断され、リン酸部分と、ニトロソフェニル誘導体を有する部分とに分れることが知られている。

従って、図5、6に示されるニトロベンジル型の光開裂性基を、アミダイト法を用いてオリゴヌクレオチドの任意の位置に導入するためには、例えば以下の構造を有するホスホアミダイト試薬が使用可能である。

この試薬はそれぞれ、例えば、図7、8に示される合成方法で調製することが可能である。すなわち、3-クロロ-N,N-ジイソプロピルアミノ-（2-シアノエトキシ）ホスフィン(3-chloro-N,N-diisopropylamino-(2-cyanoethoxy)phosphine)(1a)及び、1-O-ジメトキシトリチル-2-(o-ニトロフェニル)-1,2-エタンジオール(1-O-dimethoxytrityl-2-(o-nitrophenyl)-1,2-ethanediol)(1b)の反応により、該ホスホアミダイト試薬 [1-(o-ニトロフェニル)-2-ジメトキシトリチルオキシ] エトキシ-N,N-ジイソプロピルアミノ-2-シアノエトキシホスフィン ([1-(o-nitrophenyl)-2-dimethoxytrityloxy] ethoxy-N,N-diisopropylamino-2-cyanoethoxyphosphine) (1)が合成され得る。同様の方法で実施例に示された方法により(1')が合成可能である。

得られるホスホアミダイト試薬はそのまま、アミダイト法による自動合成機の試薬として使用され得るものである。

(環状オリゴヌクレオチド)

本発明に係る環状オリゴヌクレオチドの塩基配列については限定されない。し

かし、この環状オリゴヌクレオチド中に導入される光開裂性基の部分で分子が光開裂し、直鎖状のオリゴヌクレオチドを与えることになるがこの開裂した後の塩基配列が、ターゲットたるRNAまたはDNA（ターゲット核酸）にハイブリダイズし、アンチセンスオリゴヌクレオチドとして作用し得るように塩基配列を任意に選択することが出来るものである。

さらに、環状構造を保持したまま、ターゲット核酸と相互作用し、複合体を形成し得る塩基配列を含むものである。係る塩基配列はターゲットの一部の塩基配列と相補的な塩基配列であり、相互作用（例えば、ハイブリダイゼーション）可能な塩基数であればよい。係る塩基の種類と数は適時選択可能であるが、好ましくは10～200塩基数、より好ましくは30～100塩基数のものである。係る範囲の塩基数の場合は、通常アンチセンス核酸として使用される15～30塩基数のオリゴヌクレオチド部分を含み、かつ必要ならば、ターゲット核酸に相互作用可能な塩基部分を有する環状光開裂オリゴヌクレオチドを合成することが可能となる。

さらに、本発明においては、上記得られる直鎖状（光開裂性基を含むもの、含まないもの）オリゴヌクレオチドを、環状化するためには、特に制限はされないが、リガーゼによる結合が好ましく使用される。このためには、5'末端をリン酸化し、さらに、適当なテンプレートを用いて、通常のリガーゼ反応をおこなうことで可能となる。この際リガーゼ反応のためのテンプレートとしてのオリゴヌクレオチドの調製もまた、通常の自動合成機等を用いて容易に得ることができる。

また、該リガーゼ反応についても特に制限はないが、例えば、テンプレートオリゴヌクレオチドにビオチンを結合して使用することは、後処理が容易となる。

図9においては、本発明に係る環状オリゴヌクレオチドの調製の一例を示した。

また、短い環状オリゴヌクレオチドの合成には、他の方法、例えば、5'末端をリン酸化したオリゴヌクレオチドと、テンプレートを用意し、三重鎖を形成させ、それをBrCN-イミダゾールで環状化を行うことで可能である（Prakash, G

and Kool, E. T., J. Chem. Soc., Chem. Commun., (1991)1161-1163)。

さらに、固相合成法により環状オリゴヌクレオチドを合成することも可能である(Napoli, L. D., Montesarchio, D., Piccialli, G., Santacroce, C., Mayol, L., Gal eone, A., Messere, A., Gazzetta Chimica Italiana 121(1991)505-508)。

(光開裂反応)

本発明に係る光開裂性基を有する環状オリゴヌクレオチドの光開裂反応については、特に制限はない。例えばニトロベンジル型の官能基については、照射光の波長、強度等の条件はよく知られており、その条件をそのまま使用可能である。

さらに、照射光は試料全体に照射しても、一部にしぼって照射してもよい。試料の一部の特定の位置にしぼって光照射する際には、図2、又は4にも示されているが、特定の位置でのみアンチセンス活性が発現することとなる。

実施例

以下実施例に基づき本発明を具体的に説明するが、本発明はその要旨を超えない限り以下の実施例に限定されるものではない。

3-クロロ-N, N-ジイソプロピルアミノ-(2-シアノエトキシ)ホスフィン(3-chloro-N,N-diisopropylamino-(2-cyanoethoxy)phosphine)(1a)の合成。

窒素ガス導入用管、磁気攪拌器、滴下ロートを備えた反応装置中で、窒素ガス雰囲気下、3-ジクロロ-(2-シアノエトキシ)ホスフィン(3-dichloro-(2-cyanoethoxy)phosphine)27.0 gを無水ジエチルエーテル80 mlに溶解し、これを-15℃に冷却した。十分に攪拌しつつ無水ジエチルエーテル30 mlに溶解したジイソプロピルアミン31 gをゆっくりと滴下した。そのまま18時間攪拌後、析出したジイソプロピルアミン塩酸塩を濾過分別した。

溶媒を減圧で留去した後、粗生成物を淡黄色透明油状物として得た。これを減圧蒸留(108-115℃/0.1 mmHg)により分離精製した(22 g、ガスクロマトグラ

フによる純度は95%以上)。¹H NMR (JEOL JNM-PMX 60、重クロロホルム) による構造解析: δ 3.6-4.2 (4H、m、シアノエトキシ基のエチレン)、2.9 (2H、t、イソプロピル基のメチン)、1.3 (12H、d、イソプロピル基のメチル)。

o-ニトロフェニル-1, 2-エタンジオール(o-nitrophenyl-1,2-ethanediol) のジメトキシトリチル(dimethoxytrityl)化。

100ml フラスコに、磁気攪拌器及び滴下ロートを備えた反応装置に、o-ニトロフェニル-1, 2-エタンジオール2.5gと、無水ピリジン50mlを加え、5℃に冷却しつつ、ジメトキシトリチルクロリド4.6gを加えた。18時間攪拌して反応させた後、大部分のピリジンを減圧留去し、残留物に酢酸エチル100ml及び、飽和食塩水100mlを加えた。有機溶媒層を飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧で留去し赤色油状物6.7gを得た。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフ (0.5%トリエチルアミン含有クロロホルム溶出液) により精製し、6.0gの目的物、1-O-ジメトキシトリチル-2-(o-ニトロフェニル)-1, 2-エタンジオール(1-O-dimethoxytrityl-2-(o-nitrophenyl)-1,2-ethanediol)(1b)を得た。¹H NMR (JEOL JNM-PMX 60、重クロロホルム) による構造解析: δ 6.9-8.1 (17H、m、ジメトキシトリチル基のフェニル、ニトロフェニル基のフェニル)、4.0 (6H、s、ジメトキシフェニル基メトキシ)、3.8 (1H、t、メチン基)、3.4 (2H、d、メチレン)。

[1-(o-ニトロフェニル)-2-ジメトキシトリチルオキシ]エトキシ-N, N-ジイソプロピルアミノ-2-シアノエトキシホスフィン ([1-(o-nitrophenyl)-2-dimethoxytrityloxy] ethoxy-N,N-diisopropylamino-2-cyanoethoxyphosphine) (1)の合成。

上記得られた 1-O-ジメトキシトリチル-2-(o-ニトロフェニル)-1,2-エタンジオール6.0gと、トリエチルアミン3.1gを無水塩化メチレン50mlに溶解し、5℃に冷却しつつ、無水塩化メチレン10mlに溶解した 3-クロロ-N,N-ジイソプロピルアミノ-(2-シアノエトキシ)ホスフィン3.6gを滴下した。1時間反応させた後、反応液に酢酸エチル150mlを加え、飽和食塩水で3回洗浄した。後、溶媒を留去して得られた粗生成物を、シリカゲルカラムクロマトグラフ(ヘキサン/酢酸エチル2:1(0.5%トリエチルアミン含有)溶出液)により精製し、8.9gの目的物(逆相によるHPLCによる純度98%)を得た。¹H NMR(JEOL JNM-PMX60、重クロロホルム)による構造解析:
 δ 6.8-8.1 (17H, m、ジメトキシトリチル基フェニル、ニトロフェニル基フェニル)、4.0 (1H, t, メチン基)、3.7 (6H, s, ジメトキシフェニル基のメチル基)、3.3-3.6 (6H, m, シアノエトキシ基のメチレン、ニトロフェニルエタンジオールのメチレン基)、2.3 (2H, t, イソプロピル基のメチン)、1.2 (12H, d, イソプロピル基のメチル)。
)。分子量(TOF-MS、669.30)(計算値669.76)。

o-ニトロフェニル-1,2-エタンジオール(o-nitrophenyl-1,2-ethanediol)のtert-ブチルジメチルシリル(tert-butyldimethylsilyl)化

暗室中で窒素雰囲気下、攪拌装置を備えた反応容器にジクロロメタン100ml、トリエチルアミン10ml、ジメチルアミノピリジン5mg、及びo-ニトロフェニル-1,2-エタンジオール10.0gを加えて混合し、得られた溶液を5℃に冷却した。さらに、この溶液に、tert-ブチルジメチルシリルクロライド9.8gを数回に分けて添加し、約3時間攪拌した。反応の終了はTLCにより追跡し、原料の消失を認めて反応終了とした。TLC上で反応生成物の純度を確認し、さらに精製することなく次のステップに使用した。

1-0-tert-ブチルメチルシリル-2-(o-ニトロフェニル)-1,2-エタンジオール (1-0-tert-butyldimethylsilyl-2-(o-nitrophenyl)-1,2-ethanediol)のジメトキシトリチル(dimethoxytrityl化)

上記反応液にそのままトリエチルアミン10mlを加え、さらに室温でジメトキシトリチルクロライド18.6gを数回に分けて添加した。そのまま一夜攪拌反応を続け、TLCにより反応の終了を確認した。溶媒を減圧で留去し、得られた残渣に酢酸エチル200mlを加え、さらに水、飽和食塩水で十分洗浄して乾燥し、溶媒を減圧で除き21gの油状物を得た。得られた残渣をクロロホルムを溶出液とするシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、22.0gの油状物を得た。¹HNMR (JEOLJNM-PMX60、重クロロホルム中、 δ (ppm)) による構造解析結果：6.6-7.8 (17H, m, ジメトキシトリチル基フェニル、ニトロフェニル基フェニル)、5.5 (1H, t, メチン基)、3.9 (2H, d, メチレン基)、3.8 (6H, s, ジメトキシメチル基のメチル基)、1.0 (9H, s, tert-ブチルジメチルシリル基tert-ブチル基)、0.1 (6H, s, tert-ブチルジメチルシリル基メチル基)。

1-0-tert-ブチルジメチルシリル-2-0-ジメトキシトリチル-2-(o-ニトロフェニル)-1,2-エタンジオール (1-0-tert-butyldimethylsilyl-2-0-dimethoxytrityl-2-(o-nitrophenyl)-1,2-ethanediol)の脱tert-ブチルジメチルシリル(tert-butyldimethylsilyl) 化

常温で、磁気攪拌装置を備えた反応装置に1-0-tert-ブチルジメチルシリル-2-ジメトキシトリチル-2-(o-ニトロフェニル)-1,2-エタンジオール21.0g及びテトラヒドロフラン100mlをとり、激しく攪拌しながらテトラブチルアンモニウムフルオリド2.6gを数回に分けて添加した。そのまま、約1時間攪拌を続け、反応終了をTLCにより確認した後、反応液を濃縮して反応を終了した。残留物に酢酸エチルを加え、水及び飽和食塩水により洗浄し、乾燥後溶媒を減圧下除き油状残渣18gを得た。これにクロロホルムを溶出液としたシリカゲルカラムクロマトグラ

フィーにより精製し、油状生成物16.0gを得た。

[2-ジメトキシトリチルオキシ-2-(*o*-ニトロフェニル)] エトキシ-N,N-ジイソ
プロピルアミノ-2-シアノエトキシホスフィン [2-dimethoxytrityloxy-2-(*o*-nit
rophenyl)] ethoxy-N,N-diisopropylamino-2-cyanoethoxy phosphine) (1')

暗室条件下、攪拌装置を備えた反応装置にジクロロメタン100ml、トリエチルアミン7.0g、及び1-ジメトキシトリチル-1-(*o*-ニトロフェニル)-1,2-エタンジオール16.0gを、室温で3-クロロ-N,N-ジイソプロピルアミノ-2-シアノエトキシホスフィン8.5gのジクロロメタン溶液を滴下した。反応は速やかに進行し、約30分で完了した。溶媒を減圧で除き、残渣を酢酸エチルに溶解し、水及び飽和食塩水で洗浄して、後乾燥した。溶媒を減圧で除き、粗生成物19gを得た。ヘキサン・酢酸エチル (2:1)を溶出液としたシリカゲルカラムフラッシュクロマトグラフィーにより精製し、生成物 (1') 11gを得た。¹HNMR (JEOLJNM-PMX60、重クロロホルム中、 δ (ppm)) による構造解析結果：6.6-7.9(17H, m, ジメトキシトリチル基フェニル、ニトロフェニル基フェニル)、5.4(1H, t, メチン基)、3.9(2H, d, メチレン基)、3.7(6H, s, ジメトキシトリチル基のメチル基)、3.3-3.6(4H, m, シアノエトキシ基のメチレン)、2.3(2H, t, イソプロピル基メチン)、1.3(12H, d, イソプロピル基のメチル。質量分析 (島津/KRATOS KOMPACT MALDI IV)、669.51 (計算値669.76)

直鎖状オリゴヌクレオチドの合成。

5' - pCGCAAGCTTC-X-GCCAAGCGCGCAATTAAAC
CCCTCAAACCGC-3' (2)、5' - pCGCAAGCTTCGCCA
AGCGCGCAATTAAACCCCTCAAACCGC-3' (3)、5' - ビ
オチン-GAAGCTTGCGGCGGTTTGAG-3' (4)、5' - pGC
CAAGCGCGCAATTAAACCCCTCAAACCGC-3' (5)、5'

— pGCCAAGCGCGCAATTAAACCCCTCAAACCGCCGC
AAGCTTC—3' (6)、5' —pCGCAAGCTTCp—3' (7)、5' —
pCGCAAGCTTC—Y—GCCAAGCGCGCAATTAAACCCCT
CAAACCGC—3' (8)の合成には、アプライドバイオシステム社製モデル
394 (Applied Biosystems, Model 394)により、(2)については上で合成した試
薬(1)を用いて(式中、Xとして記載されている基)、(8)については上で合成し
た試薬(1')を用いて(式中、Yとして記載されている基)通常のアミダイト法に
より合成した。

オリゴヌクレオチド(2)、(3)、(5)、(6)、(7)についてはさらにDNA自動合
成機でアミダイト法により5'末端にリン酸基を付加し、(4)についてはさらに、
DNA自動合成機でアミダイト法により5'末端にビオチンを付加した。

得られたオリゴヌクレオチドは、アンモニア処理(30% NH₄OH、室温1
時間、55°C 8時間)により脱保護基等の後処理を行い、さらに、Oligo-PakSP
(ミリポア社製)により粗精製した後((4)のみ)ファルマシア社製NAP-25カラ
ムによる脱塩後、遠心濃縮した。

それぞれのオリゴヌクレオチドの精製はイオン交換あるいは逆相によるHPLC
(島津製作所製、LC-10A)を用いたHPLCで行った。

同様に、上記光開裂基Xを含む70merオリゴヌクレオチド5'-pCGCAAGCTTCGCCCCG
CACCGATCGC-X-GCCAAGCGCGCAATTAAACCCCTTCCCAACAGTTGCTCAAACCGC-3'を同じ方法
でDNA自動合成機により合成し、精製した。

環状オリゴヌクレオチドの調製。

上記得られた直鎖状オリゴヌクレオチド(2)、(3)、または(8)を10 μ l (100pmol/ μ l)、環状化用テンプレートとして(4)を10 μ l (100pmol/ μ l)、超純水89
30 μ l、T4 DNAリガーゼ緩衝液(宝酒造)1mlを混合し、27°Cで30分遮光放置
し、続いて16°Cで遮光数分放置してから、T4 DNA Ligase 50 μ l(宝酒造、350Uni

t/ μ l)を加え、そのまま4時間放置した。遠心濃縮後、NAP-25カラムによる脱塩操作の後、ふたたび遠心濃縮し、アビジンをコートした磁気ビーズ (DYNAL製、DYNABEADS M280 Streptavidine) により環状化用テンプレートを除去した。精製は、HPLCによる分取を行い、目的とするフラクションを集め脱塩した。使用したHPLC条件は、以下の通りである。得られた環状オリゴヌクレオチドをそれぞれ(2'), (3'), 及び(8')とする。

カラム、TOSOH TSKgel DNA-NPR4.6mm ϕ x7.5mm

流量、1.0ml/min

カラムオープン温度、37°C

緩衝液A、20mM Tris-HCl pH9

緩衝液B、緩衝液A中に1.0M NaCl

グラジエント、A/B(%)60/40から40/60まで30分

得られた環状オリゴヌクレオチドについて、20%ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (以下PAGEと略する) で分析すると、直鎖状40merのオリゴヌクレオチドと環状40merのオリゴヌクレオチドの移動度がそれぞれ異なった。環状オリゴヌクレオチドの方が直鎖状に比べて少し移動度が大きいことが確認された。

同様に、上記合成した70mer直鎖状オリゴヌクレオチドも、同様の操作によりリガーゼ反応により環状化し、環状化オリゴヌクレオチドを得た。PAGEによる分析において、直鎖状70merと、環状70merオリゴヌクレオチドの移動度が異なることが確認された。

環状オリゴヌクレオチドのヌクレアーゼ耐性実験

光開裂性基を含まない、HPLCで精製した直鎖状オリゴヌクレオチド(2)と、環状オリゴヌクレオチド(2')を用い、ヌクレアーゼ耐性試験を行った (以後、直鎖状オリゴヌクレオチドをLinear、環状オリゴヌクレオチドをCircularとする)。

使用したヌクレアーゼは、①エキソヌクレアーゼとして、ExonucleaseIII, Ex

onuclease V, Exonuclease VII, λ Exonucleaseの4種類、②エンドヌクレアーゼとして、S1 Nuclease, Mung Bean Nuclease, BAL 31 Nucleaseの3種類であった。

実験は以下の手順で行った(図10参照)。

①エキソヌクレアーゼ耐性試験：

まず、オリゴヌクレオチド (Linear, Circular)を15 μ lのエキソヌクレアーゼ反応液 (Exonuclease III, 50mM Tris-HCl(pH8.0), 5mM MgCl₂, 10mM 2-メルカプトエタノール; Exonuclease V, 66.7mM グリシン-NaOH(pH9.4), 30mM MgCl₂, 8.3mM 2-メルカプトエタノール, 0.5mM ATP; Exonuclease VII, 50mM Tris-HCl(pH7.9), 50mM リン酸カリウム(pH7.6), 8.3mM EDTA, 10mM 2-メルカプトエタノール; λ Exonuclease, 67mM グリシン-KOH(pH9.4), 2.5mM MgCl₂, 0.05% BSA) に各15 pmol程度加え、酵素 (Exonuclease III, 90U; Exonuclease V, 3.8U; Exonuclease VII, 5U; λ Exonuclease, 2.5U) を添加した。それぞれの反応液を37°Cの恒温層で30分間インキュベートした後、20% PAGE (20mA, 40分, 染色エチジウムブロミド(EtBr)30分) にかけて、Linear とCircularの分解の度合いを調べた。

②エンドヌクレアーゼ耐性試験：

まず、オリゴヌクレオチド (直鎖状; Linear, 環状; Circular)を150 μ lのエンドヌクレアーゼ反応液 (S1 Nuclease, 30mM 酢酸ナトリウム(pH4.6), 280mM NaCl, 1mM ZnSO₄; Mung Bean Nuclease, 30mM 酢酸ナトリウム(pH5.0), 100mM NaCl, 5% グリセロール; BAL 31 Nuclease, 20mM Tris-HCl(pH8.0), 600mM NaCl, 12mM MgCl₂, 1mM EDTA) に各150pmol程度加え、酵素 (S1 Nuclease, 0.5U; Mung Bean Nuclease, 1U; BAL 31 Nuclease, 0.2U) を添加した。反応液は37°C (S1, Mung Bean) あるいは30°C (BAL31) でインキュベートして反応させた。反応開始後、0, 2, 5分後に反応液を50 μ lずつ分取し、5 μ lの0.5M EDTAが入った新しいチューブに移し換え、酵素反応を完全に停止させた。

反応終了後の反応液を、HPLC (TOSOH TSKgel DNA-NPR, 溶媒A:20mM Tr

is-HCl(pH9.0), 溶媒B:A中に1M NaClをグラジエントA/B=100/0から40/60まで60分間)で分析し、LinearとCircularの分解の程度を調べ、HPLC分析から得られた変化を表1にまとめた。

表1

S1 Nucleaseを用いた場合

-Linear -

時間 (min)	親ピークの面積 (mVxsec)	ピーク面積合計 (40-52min)	親ピーク比率 (40-52min)	親ピーク減少度 (%)
-------------	---------------------	-----------------------	----------------------	----------------

0	195.07	201.68	96.72%	---
2	127.82	178.83	71.47%	26.11%
5	66.04	208.51	31.67%	67.26%

- Circular -

時間 (min)	親ピークの面積 (mVxsec)	ピーク面積合計 (40-52min)	親ピーク比率 (40-52min)	親ピーク減少度 (%)
-------------	---------------------	-----------------------	----------------------	----------------

0	137.77	138.56	99.43%	---
2	79.72	81.91	97.33%	2.11%
5	49.96	54.44	91.77%	7.70%

Mung Bean Nucleaseを用いた場合

-Linear -

時間	親ピークの面積	ピーク面積合計	親ピーク比率	親ピーク減少度
----	---------	---------	--------	---------

(min)	(mVxsec)	(40-52min)	(40-52min)	(%)
0	275.52	281.17	97.99%	---
2	205.09	258.38	79.38%	18.99%
5	145.43	287.89	50.52%	48.45%

- Circular -

時間	親ピークの面積	ピーク面積合計	親ピーク比率	親ピーク減少度
(min)	(mVxsec)	(40-52min)	(40-52min)	(%)
0	183.06	190.16	96.27%	---
2	144.50	153.76	93.98%	2.38%
5	96.17	107.98	89.06%	7.49%

BAL31 Nucleaseを用いた場合

- Linear -

時間	親ピークの面積	ピーク面積合計	親ピーク比率	親ピーク減少度
(min)	(mVxsec)	(40-52min)	(40-52min)	(%)
0	54.97	87.62	62.74%	---
2	12.93	122.95	10.52%	83.24%
5	4.44	186.08	2.38%	96.20%

- Circular -

時間	親ピークの面積	ピーク面積合計	親ピーク比率	親ピーク減少度
----	---------	---------	--------	---------

(min)	(mVxsec)	(40-52min)	(40-52min)	(%)
0	102.89	107.65	95.57%	---
2	60.76	67.32	90.25%	5.57%
5	23.94	30.34	78.91%	17.44%

以上の結果をまとめると以下の様な一般的な傾向を認めることができる。

エキソヌクレアーゼ	Circular	Linear
Exonuclease III	-	(+)
Exonuclease V	-	+
Exonuclease VII	-	+
λ Exonuclease	-	+

エンドヌクレアーゼ		
S1 Nuclease	15分までに完全分解	5分で完全分解
Mung Bean Nuclease	30分後でも残る	30分で完全分解
BAL 31 Nuclease	10分で完全分解	5分で完全分解

すなわち、エキソヌクレアーゼ耐性を試験した酵素では、環状オリゴヌクレオチドは分解されなかった。すなわち、PAGEにおいてバンドに変化は見られず、環状オリゴヌクレオチドには、これらのエキソヌクレアーゼに対する耐性があることが明らかである。

また、エンドヌクレアーゼ耐性を試験したすべてのエンドヌクレアーゼで、Linear とCircularで分解の程度に差が見られた。従って、オリゴヌクレオチドを

環 状化することにより、エンドヌクレアーゼに対する耐性が得られることは明らかである。

光開裂性基を含む直鎖状及び環状オリゴヌクレオチドの光照射

以下のオリゴヌクレオチドについて光照射実験を実施した。

- ・ 光開裂性基 X を有する直鎖状 40mer オリゴヌクレオチド (2)
- ・ (2) が光照射を受ける際に生成する 5' 末端リン酸化 30mer のオリゴヌクレオチド (5)
- ・ 光開裂性基 X を有する環状 40mer オリゴヌクレオチド (2')
- ・ (2') が光照射を受けたときに生成する、5' 末端リン酸化 40mer オリゴヌクレオチド (6)

ここで、(2) は 10mer オリゴヌクレオチドと 30mer オリゴヌクレオチドを光開裂性基 X で結合しているため、光照射により 10mer と 30mer に分れることになる。また、光開裂された部分では、10mer 生成物の 3' 末端にニトロソフェニル基、30mer 生成物の 5' 末端にリン酸基が残ることになる。

さらに、環状オリゴヌクレオチド (2') は、光照射を受けると光開裂された部分で切断され、1本の直鎖状 40mer オリゴヌクレオチドが生成することとなるが、この1本鎖直鎖状オリゴヌクレオチドの 5' 末端にはニトロソフェニル基が結合していることとなる。(2), (2') を 50pmol/10 μ l の濃度で TE 緩衝液に溶解し、キセノン ランプ (USHIO, 300W, フィルターなし、室温) に 30 分照射した後、20%PAGE にて分析した。

この結果 (図 11)、(2) (レーン 1) の光照射後の生成物 (レーン 2) は、(5) (レーン 3) とほぼ同じ位置にくることがわかり、(2') (レーン 4) の光照射後の生成物 (レーン 5) は (6) (レーン 6) とほぼ同じ位置にくることがわかった。

さらに以下のオリゴヌクレオチドについて光照射実験を実施した。

- ・ 光開裂性基 Y を有する直鎖状 40mer オリゴヌクレオチド (8)

- ・(2)が光照射を受ける際に生成する5'末端リン酸化30merのオリゴヌクレオチド(5)
- ・光開裂性基Xを有する環状40merオリゴヌクレオチド(8')
- ・(8')が光照射を受けたときに生成する、5'末端リン酸化40merオリゴヌクレオチド(6)

ここで、(8)は10merオリゴヌクレオチドと30merオリゴヌクレオチドを光開裂性基Yで結合しているため、光照射により10merと30merに分れることになる。また、光開裂された部分では、10mer生成物の5'末端にニトロソフェニル基、30mer生成物の3'末端にリン酸基が残ることになる。

さらに、環状オリゴヌクレオチド(8')は、光照射を受けると光開裂された部分で切断され、1本の直鎖状40merオリゴヌクレオチドが生成することとなるが、この1本鎖直鎖状オリゴヌクレオチドの5'末端にはニトロソフェニル基が結合していることとなる。(8),(8')を50pmol/10 μ lの濃度でTE緩衝液に溶解し、キセノンランプ(USHIO,300W,フィルターなし、室温)に30分照射した後、20%PAGEにて分析した。

この結果(図12)、(8)(レーン1)の光照射後の生成物(レーン2)は、(5)(レーン3)とほぼ同じ位置にくることがわかり、(8')(レーン4)の光照射後の生成物(レーン5)は(6)(レーン6)とほぼ同じ位置にくることがわかった。

従って、光照射により直鎖状及び環状のオリゴヌクレオチドがそれぞれ光開裂性基の部分で切断されたことが明かである(図11及び図12)。

直鎖状オリゴヌクレオチド(2)の光照射前及び後のHPLC分析結果(カラム: TOSOH TSKgel DNA-NPR 4.6mm ϕ x7.5cm、カラム温度: 37°C、流速: 0.75ml/min、緩衝液A: 20mMTris-HClpH9.0、緩衝液B: Aに1.0MNaClO₄添加、グラジエント: A/B=95/5から65/35まで45分、検出: 260nmUV)を図13及び14に示した。これより、(2)自体は25.621分の保持時間で単一ピークあったが、光照射後に、14.

744分 及び、24.427分の保持時間を有する2つのピークになった。24.427分のピークはオリゴヌクレオチド(5)によるピーク(24.382分)と一致する。従って、以上の結果から、オリゴヌクレオチド(2)は図15及び16に示すように光開裂したことが示された。同様にオリゴヌクレオチド(8)は図16に示すように光開裂した。

なお、本発明において合成されたオリゴヌクレオチドは、1つは、配列の長さ：41、配列の型：核酸、鎖の数：1本鎖、トポロジー：直鎖状、配列の種類：DNA、配列：pCGCAAGCTTC XGCCAAGCGC GCAATTAACC CCTCAAACCG C（ここでpCは、5'末端をリン酸化したシトシンを、またXは不特定のヌクレオチドを示す）であり、また、配列の長さ：40、配列の型：核酸、鎖の数：1本鎖、トポロジー：直鎖状、配列の種類：DNA、配列：pCGCAAGCTTC GCCAAGCGCG CAATTAACCC CTCAAACCGCであり、また、配列の長さ：40、配列の型：核酸、鎖の数：1本鎖、トポロジー：サイクリック、配列の種類：DNA、配列：CGCAAGCTTC GCCAAGCGCG CAATTAACCC CTCAAACCGCであって環状構造を有しているもの、配列の長さ：20、配列の型：核酸、鎖の数：1本鎖、トポロジー：直鎖状、配列の種類：DNA、配列：BiotinGAAGCTTGCG GCGGTTTGAG（BiotinGはビオチン化したグアニンを示す）であり、配列の長さ：30、配列の型：核酸、鎖の数：1本鎖、トポロジー：直鎖状、配列の種類：DNA、配列：pGCCAAGCGCG CAATTAACCC CTCAAACCGC（ここでpGは5'末端をリン酸化したグアニンを示す）であり、配列の長さ：40、配列の型：核酸、鎖の数：1本鎖、トポロジー：直鎖状、配列の種類：DNA、配列：pGCCAAGCGCG CAATTAACCC CTCAAACCGC CGCAAGCTTC（ここでpGは5'末端をリン酸化したグアニンを示す）であり、配列の長さ：10、配列の型：核酸、鎖の数：1本鎖、トポロジー：直鎖状、配列の種類：DNA、配列：pCGCAAGCTTCp（ここでpCは、5'末端をリン酸化したシトシンを、Cpは3'末端をリン酸化したシトシンを示す）である。さらに、配列の長さ：71、配列の型：核酸、鎖の数：1本鎖、トポロジー：直鎖状、配列の種類：DNA、配列の特徴、存在位置：1 特徴を決定

した方法：E 他の情報：5'末端をリン酸化 配列：CGCAAGCTTC GCCCGCACCG ATC GCXGCCA AGCGCGCAAT TAACCCCTT CCCAACAGTT GCTCAAACCG C（ここでXは不特定のヌクレオチドを示す）。さらに、配列の長さ：71、配列の型：核酸、鎖の数：1本鎖、トポロジー：サイクリック、配列の種類：DNA、配列の特徴、配列：CGCAAGCTTC GCCCGCACCG ATCGCXGCCA AGCGCGCAAT TAACCCCTT CCCAACAGTT GCTCAAACCG Cである（ここでXは不特定のヌクレオチドを示す）。

環状オリゴヌクレオチドと1本鎖核酸との相互作用

相補的配列を有する1本鎖40merオリゴヌクレオチド（ターゲット）として、5' - G C G G T T T G A G G G G T T A A T T G C G C G C T T G G C G A A G C T T G C G - 3' を使用し、係る塩基配列を環状にした環状40merオリゴヌクレオチドを調製した。

上記ターゲット(100 μ M)を36 μ lと、上記環状オリゴヌクレオチド(100 μ M)を36 μ lとを、10xBuffer(0.1M NaCl, 10mMリン酸緩衝液、pH7.0)12 μ l、ホルムアミド30 μ l、超純水36 μ l（合計150 μ l）中で混合したものを以下の条件でアニーリング（95℃で5分間後、50℃で20分保持した後室温）した。

得られた溶液の260nmでの吸光度変化を、温度変化（30℃/時間で、30℃から85℃へ昇温）に対し測定した。

比較として、上記ターゲットと相補的な塩基配列を有する40merの1本鎖オリゴヌクレオチドを用いて同様の測定を行った。

上記の条件下で、環状オリゴヌクレオチドも、1本鎖オリゴヌクレオチドも、ターゲットと混合することにより温度-吸光度変化が観測された。ここでは、通常用いられている核酸の融点（ある条件下で2本鎖から1本鎖になる温度）の測定方法に準じて、温度-吸光度変化曲線の変曲点を融点とした。得られた融点は、環状オリゴヌクレオチドの場合は、61℃であり、比較としての1本鎖オリゴヌクレオチドの場合は67℃であった。

この結果は、上記 40mer の環状オリゴヌクレオチドが、1 本鎖オリゴヌクレオチドと同様に、ターゲットと強く相互作用し、その生成物は、通常の 2 本鎖形成と近似した構造を有するものであることを示唆している。

上記 40mer の環状オリゴヌクレオチドと 1 本鎖オリゴヌクレオチドとの相互作用に基づく安定な複合体の生成物を、陰イオン交換 HPLC により分離確認した。

HPLC 分析条件：陰イオン交換 HPLC

カラム 東ソー TSKgel DNA-NPR 4.6mm ϕ x7.5cm

カラム温度 37 $^{\circ}$ C

バッファー A = 20mM Tris-HCl、pH9.0

バッファー B = バッファー A 中で 1.0M NaCl

グラジエント A/B (%) 80/20 から 20/80 まで 10 分。

流速 0.8ml/min

検出波長 260nm

図 17 には、ターゲットのみ (24.5 分)、環状オリゴヌクレオチドのみ (24.3 分) とは異なる位置にターゲットと環状オリゴヌクレオチドとの複合体によるピーク (30 分) の存在が明確に示されている。さらに、図 18 には、ターゲットのみ (24.5 分)、1 本鎖オリゴヌクレオチドのみ (24.1 分) とは異なる位置にターゲットと環状オリゴヌクレオチドとのハイブリッド体によるピーク (25.3 分) が示されている。保持時間の差は、ターゲットと環状オリゴヌクレオチドとの複合体の溶液中の構造に基づくイオン性が、ターゲットと環状オリゴヌクレオチドとのハイブリッド体 (完全 2 本鎖形成) の構造に基づくイオン性と異なるものであることを示唆している。

産業上の利用可能性

本発明に係る光開裂性環状オリゴヌクレオチドは、生体内に導入された後、そ

の環状構造のため、生体内でのヌクレアーゼ分解反応を受けることが少なく、生体内の所定の位置へ十分な時間をかけて拡散することが可能となる。さらに、所定の時間後に、適当な光を照射することにより、上記光開裂性基が光開裂し、特定の結合が切断される。これにより環状構造であったオリゴヌクレオチドが直鎖状オリゴヌクレオチドとなり、ターゲットたるDNAまたはRNAとハイブリダイズ可能となるものである。

従って、本発明に係る構造を有する光開裂性環状オリゴヌクレオチドを生体内に導入し、任意の場所（例えば、1つの特定の細胞やある特定の位置）へ拡散するの十分な時間後、特定の位置へ光照射を行い、該光が照射された時および場所にのみアンチセンスオリゴヌクレオチドが発現し、遺伝子制御可能とするものである。

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：41

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列の特徴

存在位置：1

特徴を決定した方法：E

他の情報：5'末端をリン酸化；

Xは、1又は2-（オ-ニトロフェニル基）エタンジオールとリン酸エステル結合する基である。

配列

CGCAAGCTTC XGCCAAGCGC GCAATTAACC CCTCAAACCG C

配列番号：2

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列の特徴

存在位置：1

特徴を決定した方法：E

他の情報：5'末端をリン酸化

配列

CGCAAGCTTC GCCAAGCGCG CAATTAACCC CTCAAACCGC

配列番号：3

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：1 本鎖

トポロジー：サイクリック

配列の種類：DNA

配列

CGCAAGCTTC GCCAAGCGCG CAATTAACCC CTCAAACCGC

配列番号：4

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：1 本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列の特徴

存在位置：1

特徴を決定した方法：E

他の情報：5' 末端をビオチン化

配列

GAAGCTTGCG GCGGTTTGAG

配列番号：5

配列の長さ : 30

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : D N A

配列の特徴

存在位置 : 1

特徴を決定した方法 : E

他の情報 : 5' 末端をリン酸化

配列

GCCAAGCGCG CAATTAACCC CTCAAACCGC

配列番号 : 6

配列の長さ : 40

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : DNA

配列の特徴

存在位置 : 1

特徴を決定した方法 : E

他の情報 : 5' 末端をリン酸化

配列

GCCAAGCGCG CAATTAACCC CTCAAACCGC CGCAAGCTTC

配列番号 : 7

配列の長さ：10

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列の特徴

存在位置：1、10

特徴を決定した方法：E

他の情報：1番目シトシンの5'末端、および10番目シトシンの3'末端がリン酸化

配列

CGCAAGCTTC

配列番号：8

配列の長さ：71

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列の特徴

存在位置：1

特徴を決定した方法：E

他の情報：5'末端をリン酸化

Xは、1又は2-(*o*-ニトロフェニル基)エタンジオールとリン酸エステル結合する基である。

配列

CGCAAGCTTC GCCCGCACCG ATCGCXGCCA AGCGCGCAAT TAACCCCTT CCCAACAGTT
GCTCAAACCG C

配列番号 : 9

配列の長さ : 41

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : サイクリック

配列の種類 : DNA

他の情報 :

Xは、1 又は 2 - (オ-ニトロフェニル基) エタンジオールとリン酸エステル
結合する基である。

配列

CGCAAGCTTC XGCCAAGCGC GCAATTAACC CCTCAAACCG C

配列番号 : 10

配列の長さ : 70

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : サイクリック

配列の種類 : DNA

配列の特徴

配列

CGCAAGCTTC GCCCGCACCG ATCGCGCCAA GCGCGCAATT AACCCCTTC CCAACAGTTG
CTCAAACCGC

配列番号：11

配列の長さ：71

配列の型：核酸

鎖の数：1 本鎖

トポロジー：サイクリック

配列の種類：DNA

他の情報：

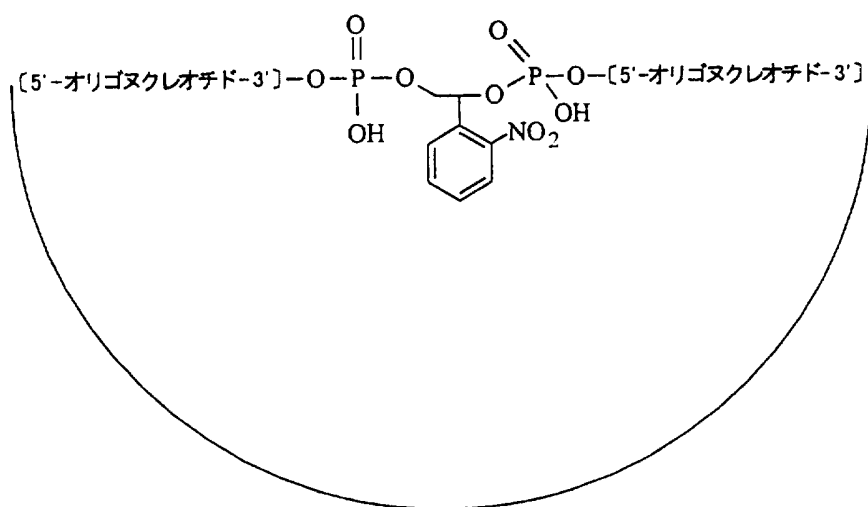
Xは、1 又は 2 - (o-ニトロフェニル基) エタンジオールとリン酸エステル
結合する基である。

配列

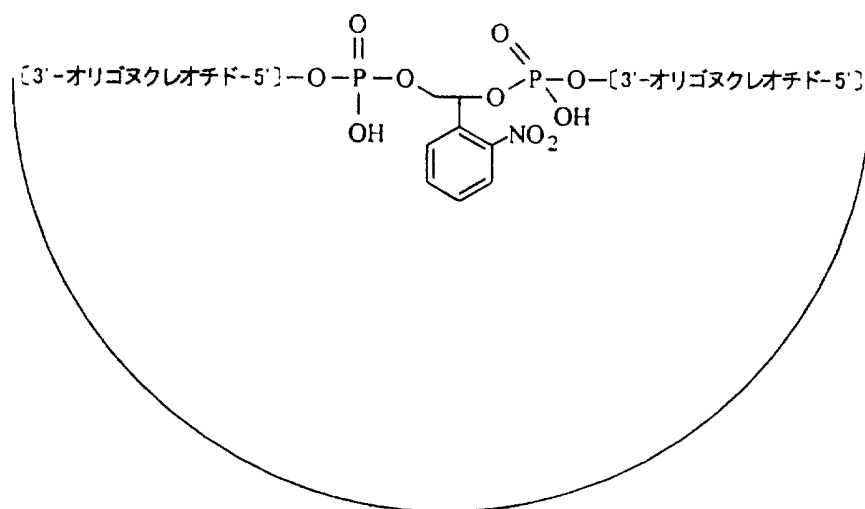
CGCAAGCTTC GCCCGCACCG ATCGCXGCCA AGCGCGCAAT TAACCCCTT CCCAACAGTT
GCTCAAACCG C

請求の範囲

1. 分子中に少なくとも 1 つの光開裂性基で結合された環状オリゴヌクレオチド。
2. 前記光開裂性基が、次式に示す構造を有することを特徴とする請求項 1 に記載の環状オリゴヌクレオチド。



3. 前記光開裂性基が、次式に示す構造を有することを特徴とする請求項 1 に記載の環状オリゴヌクレオチド。



4. 前記環状オリゴヌクレオチドが10～200個の塩基からなることを特徴とする請求項1に記載の環状オリゴヌクレオチド。

5. 前記環状オリゴヌクレオチドが30～100個の塩基からなることを特徴とする請求項1に記載の環状オリゴヌクレオチド。

6. 前記環状オリゴヌクレオチドが、前記光開裂性基の開裂により、ターゲット核酸の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列とハイブリダイズ可能な第1の塩基配列を有することを特徴とする請求項1に記載の環状オリゴヌクレオチド。

7. 前記環状オリゴヌクレオチドが、前記光開裂性基の開裂によりターゲット核酸の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列とハイブリダイズ可能な第1の塩基配列と、前記環状オリゴヌクレオチドが、ターゲット核酸と複合体を形成する第2の塩基配列を有することを特徴とする請求項1に記載の環状オリゴヌクレオチド。

Fig.1

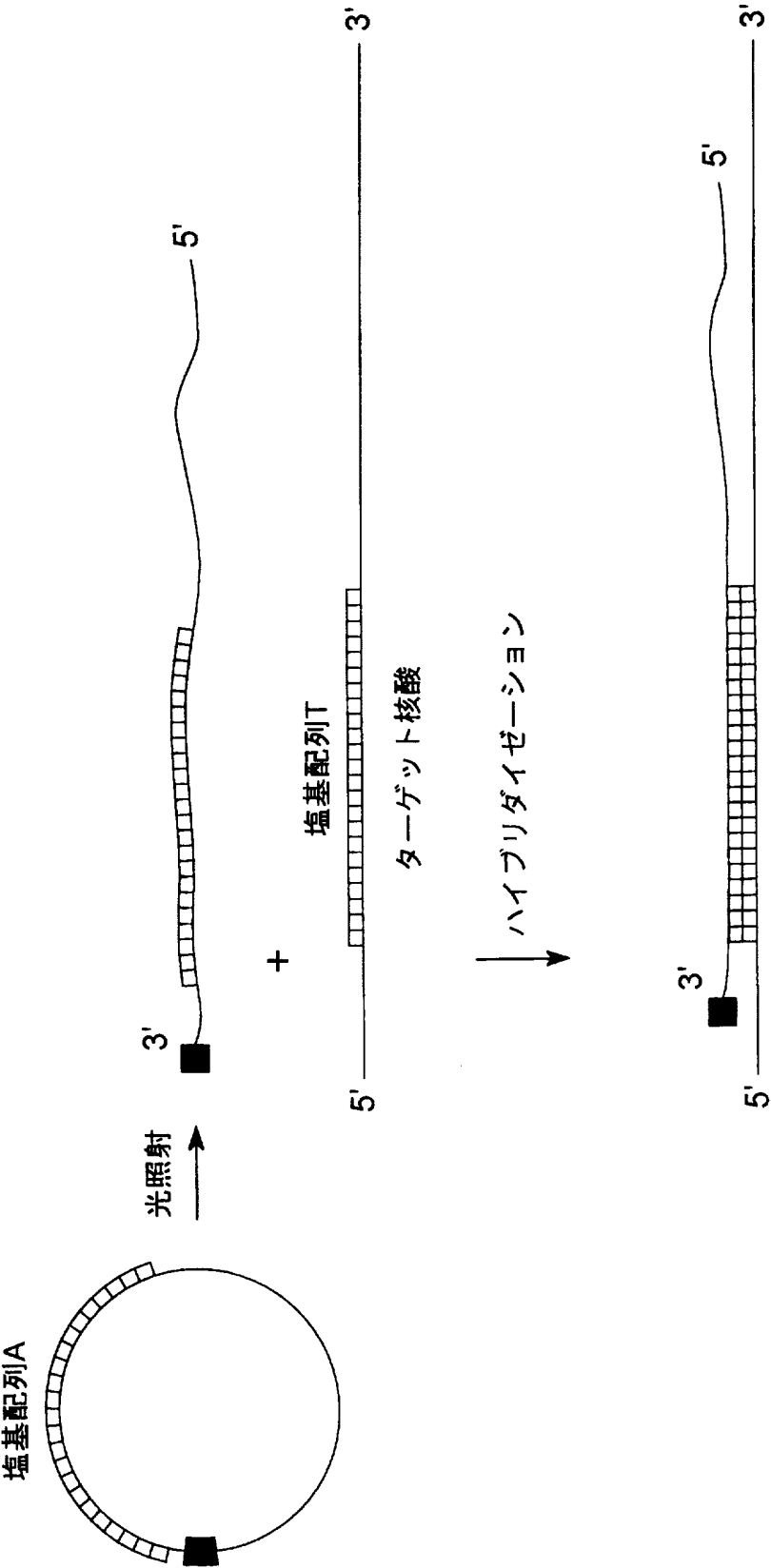
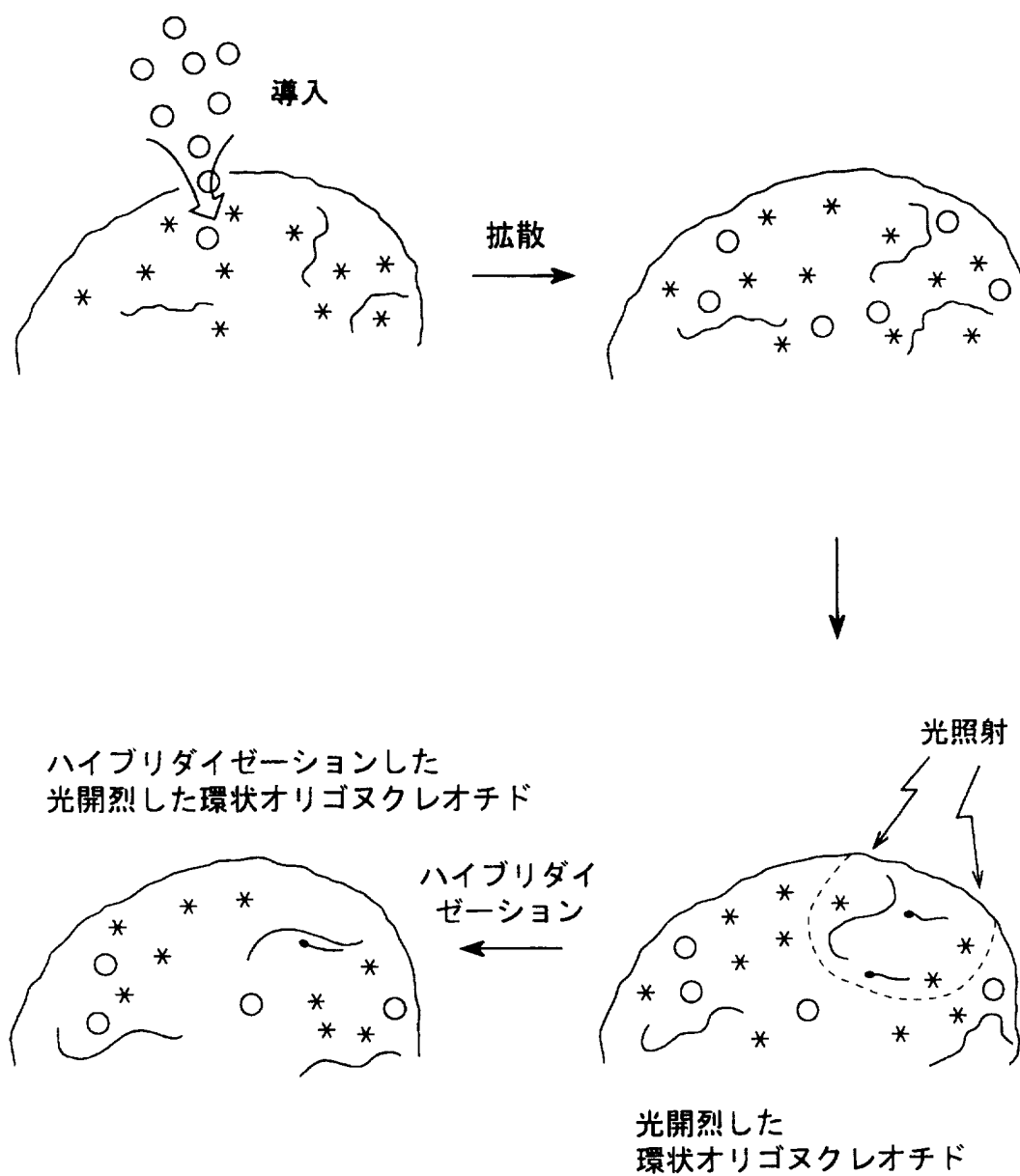


Fig.2

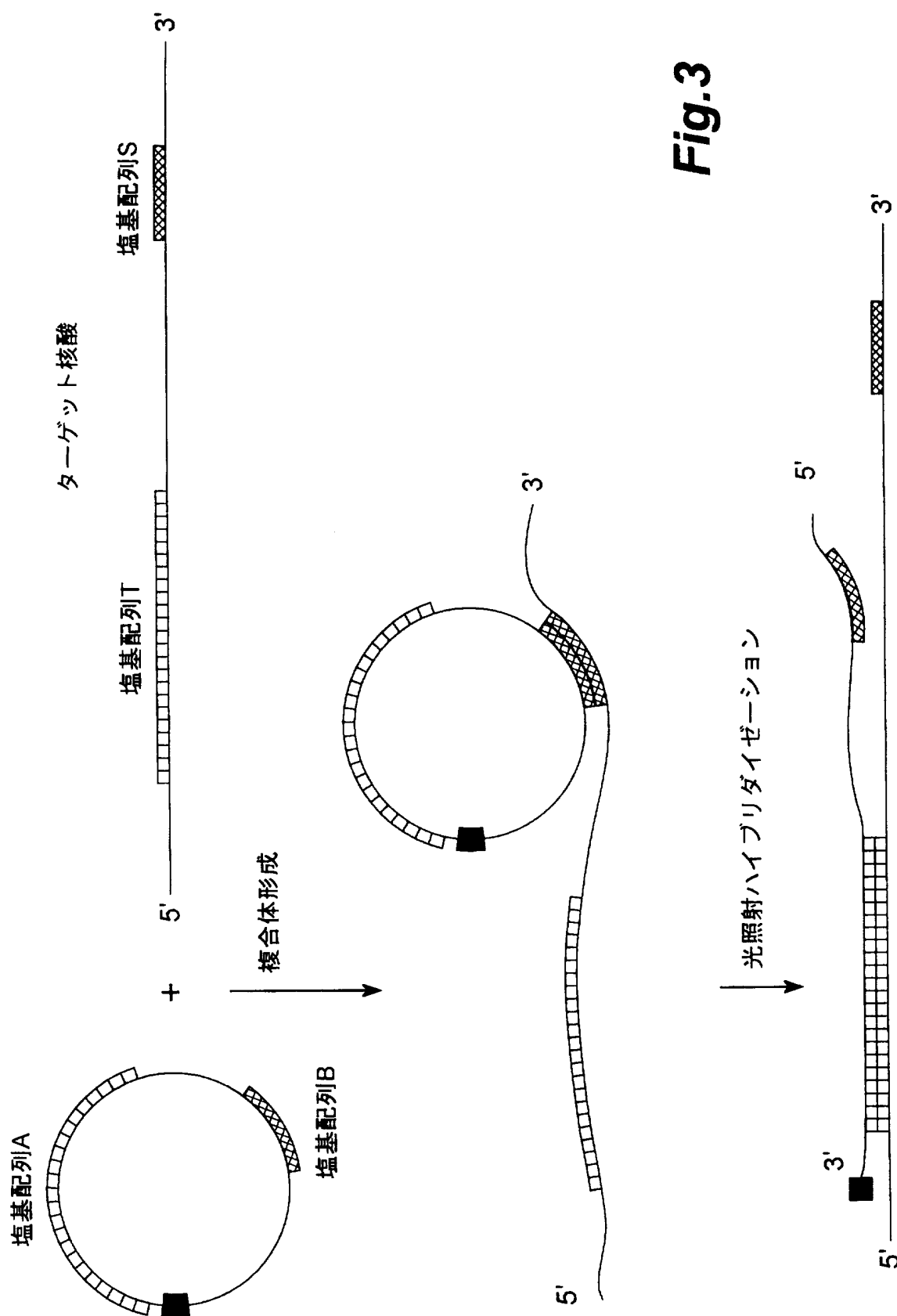


Fig.3

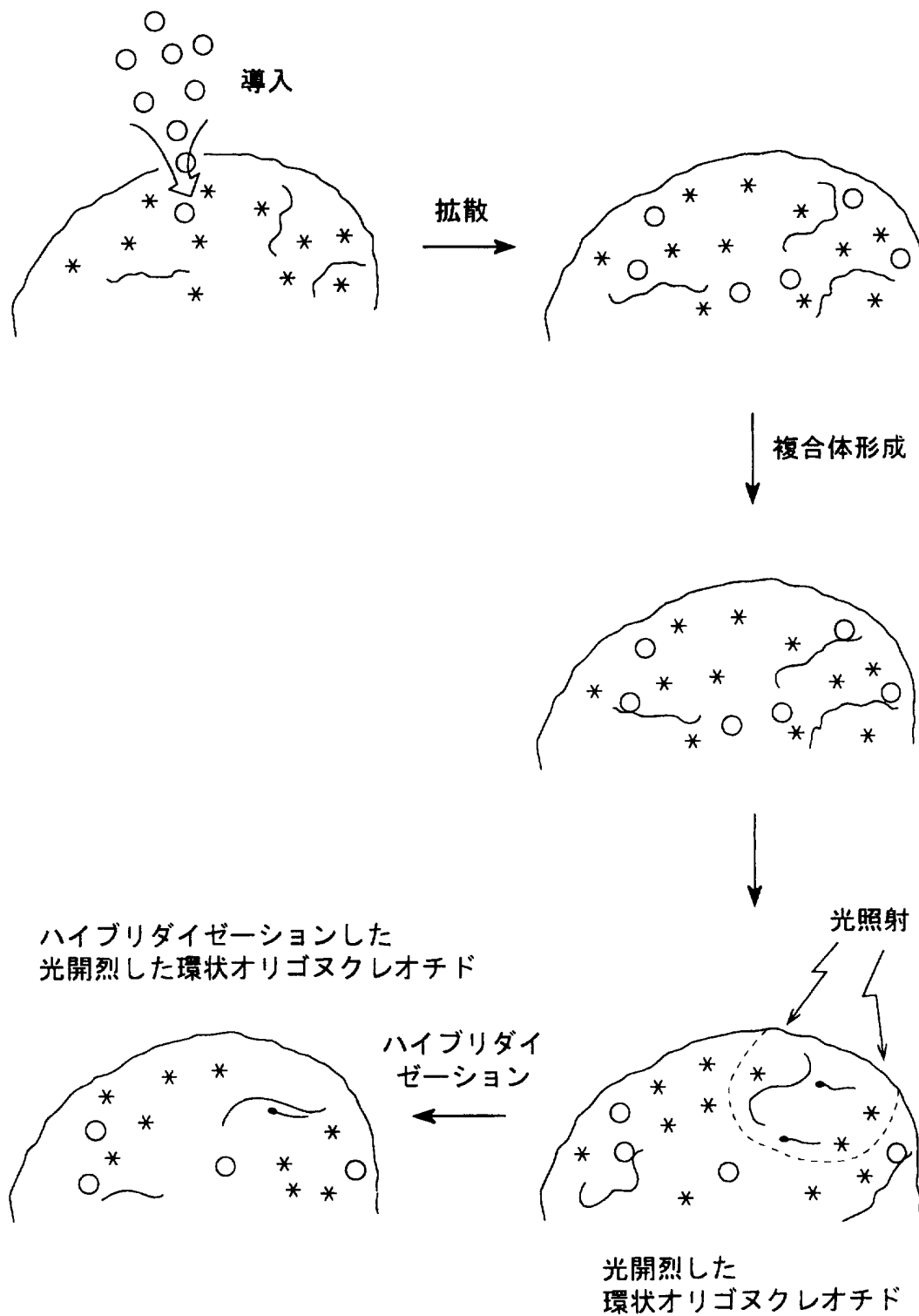
Fig.4

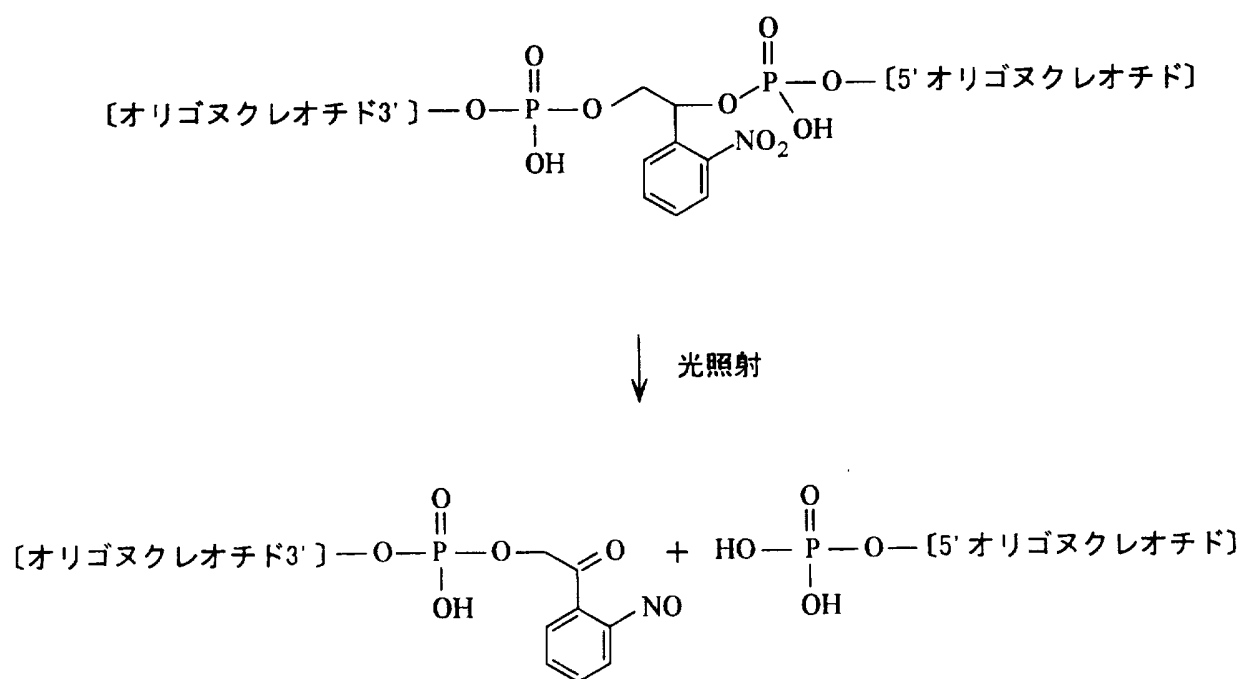
Fig.5

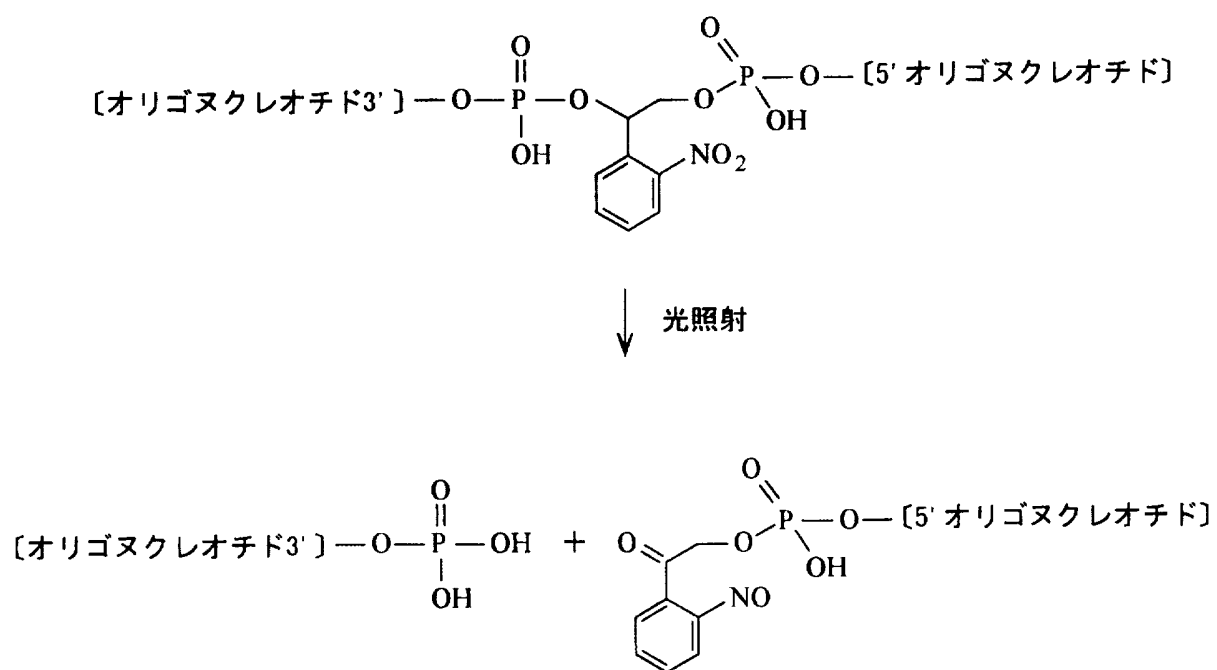
Fig.6

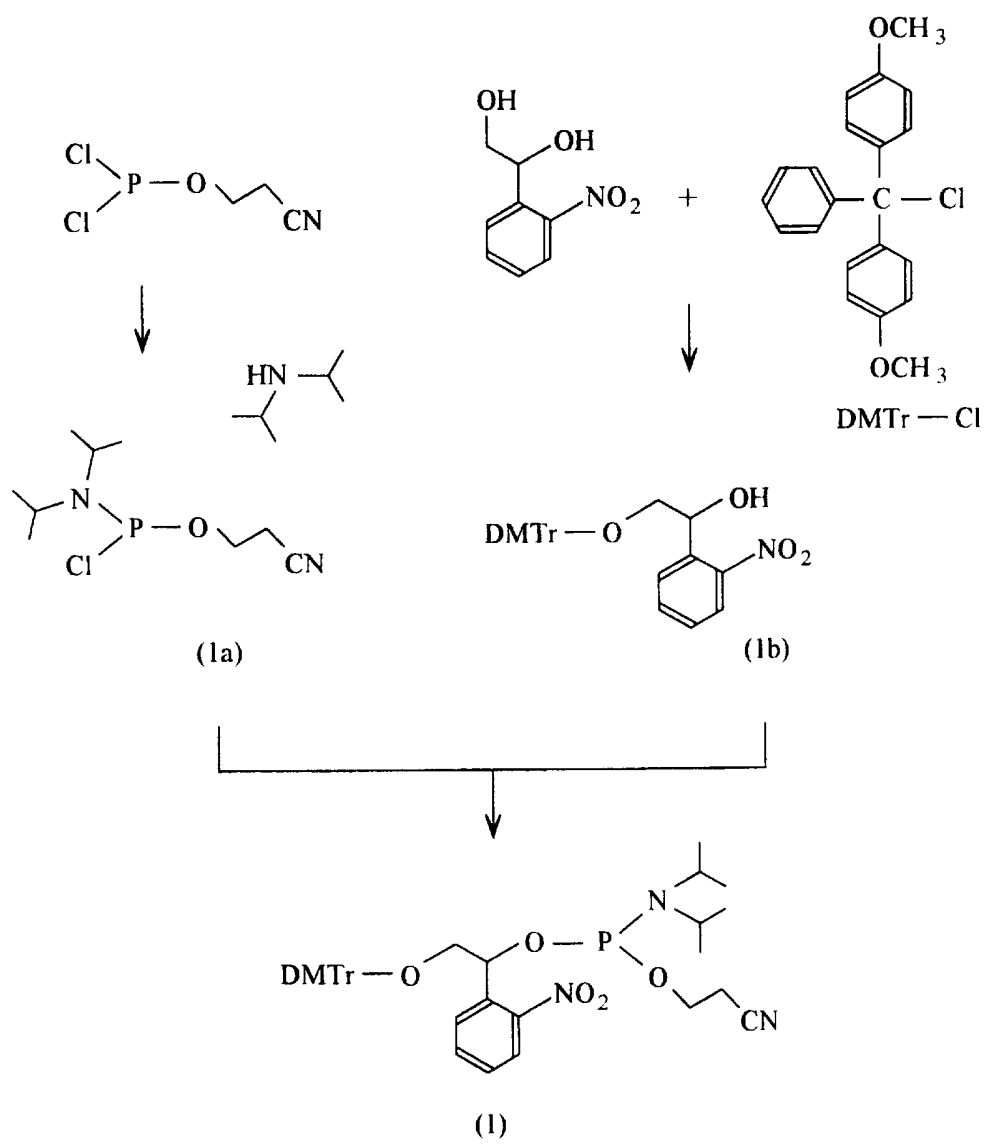
Fig.7

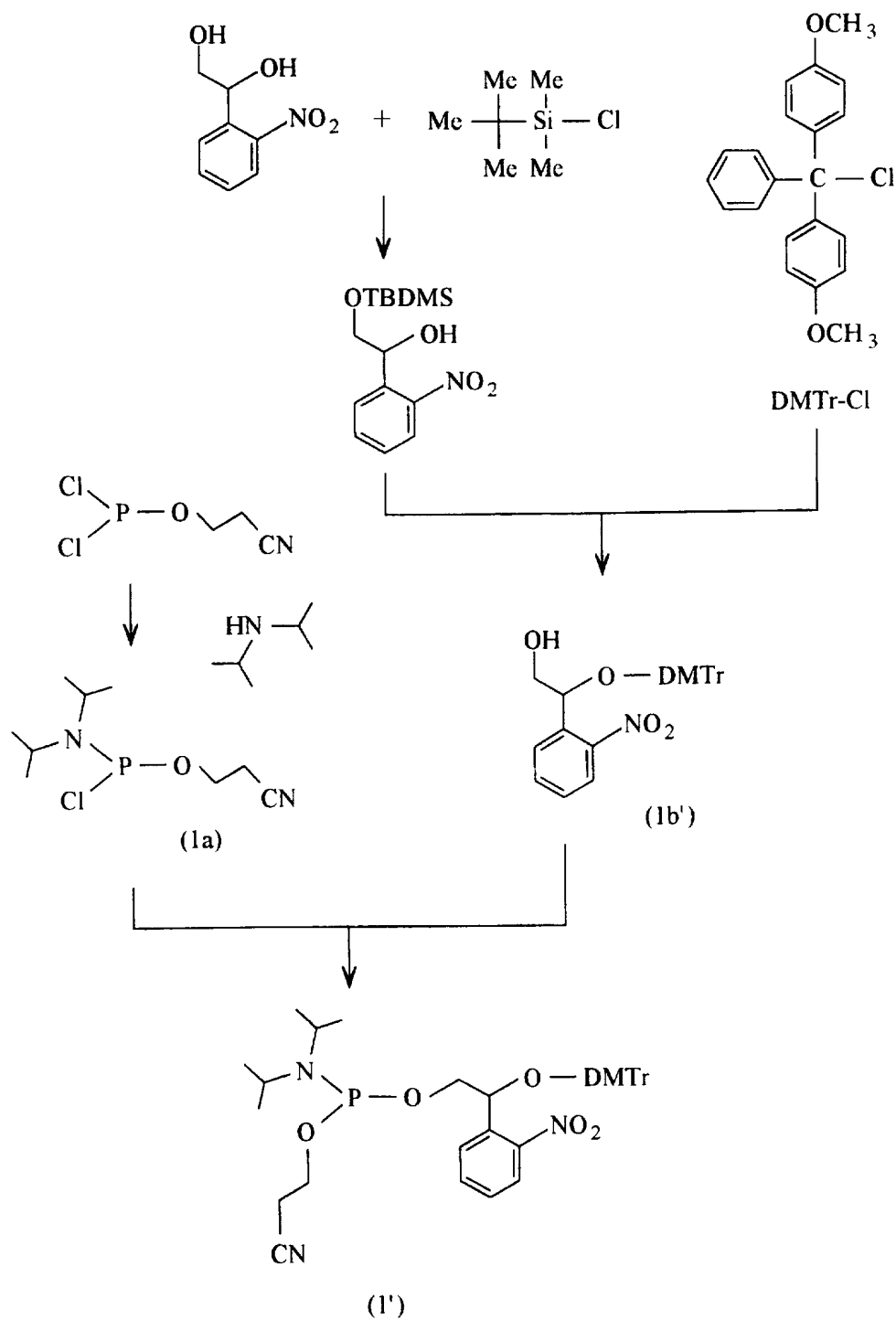
Fig.8

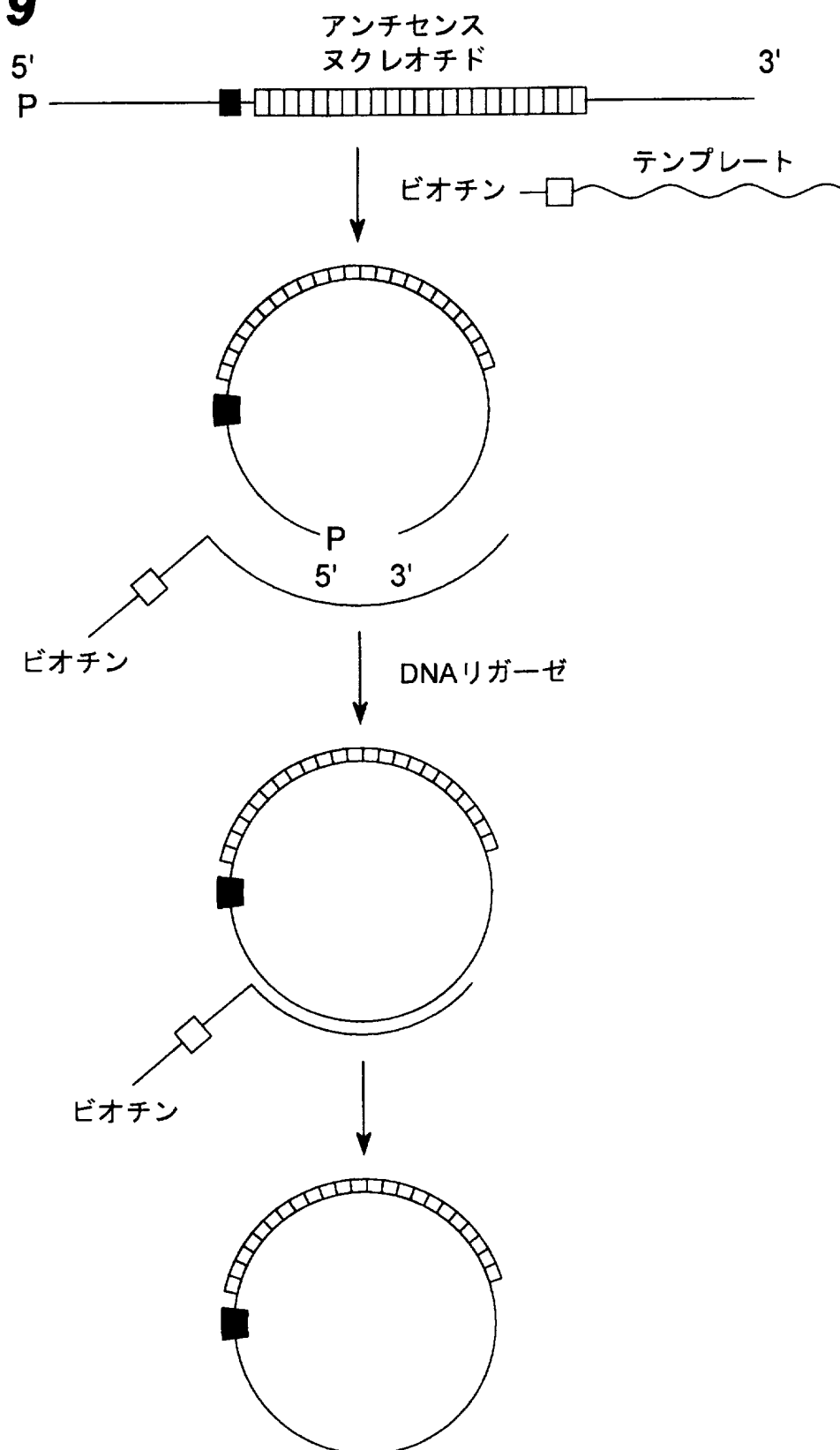
Fig.9

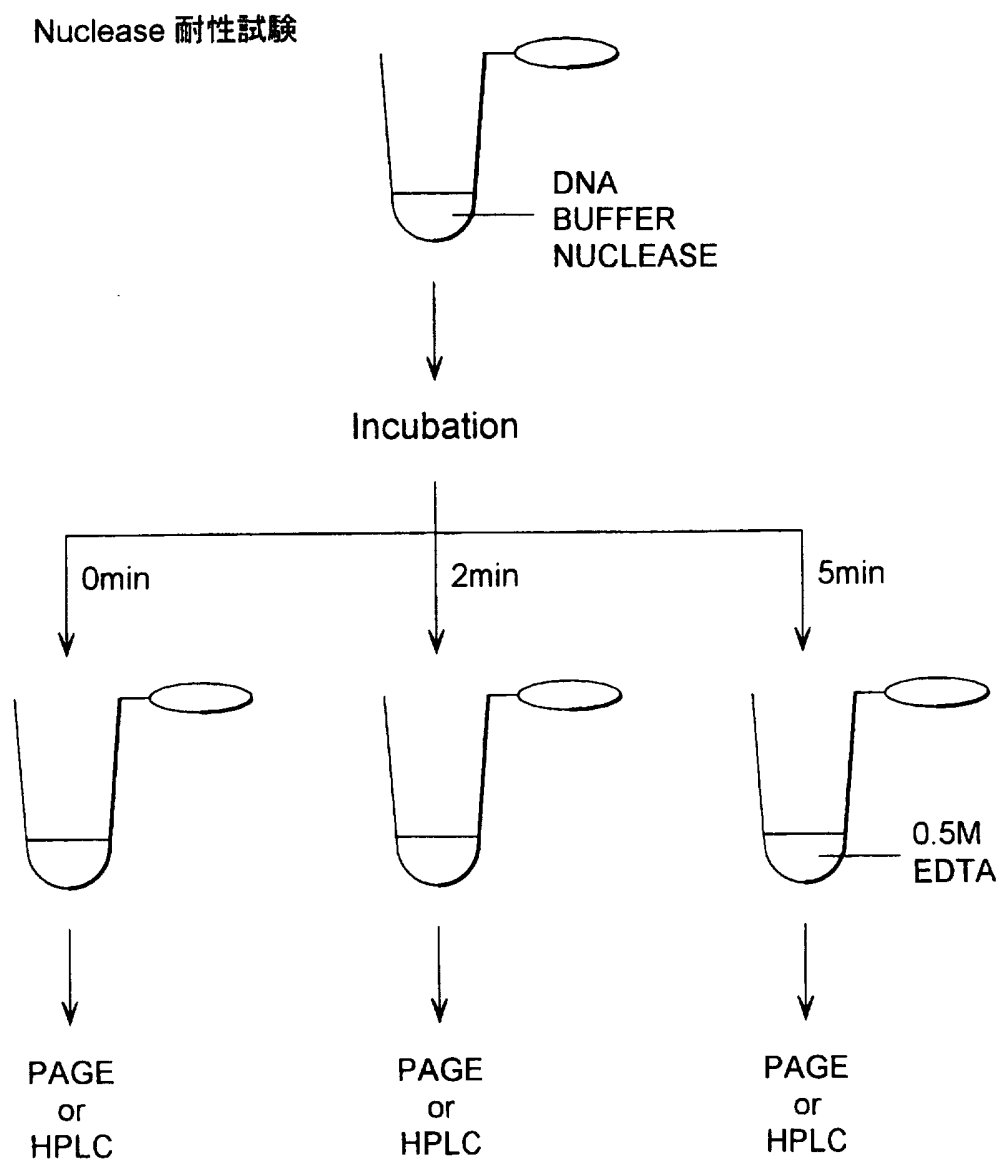
Fig.10

Fig.11

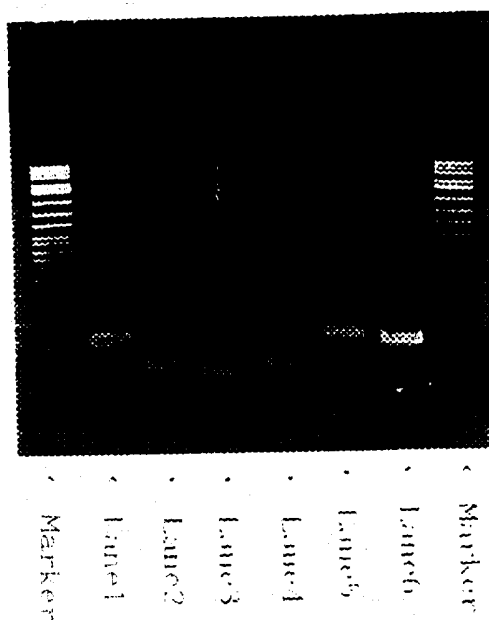


Fig.12

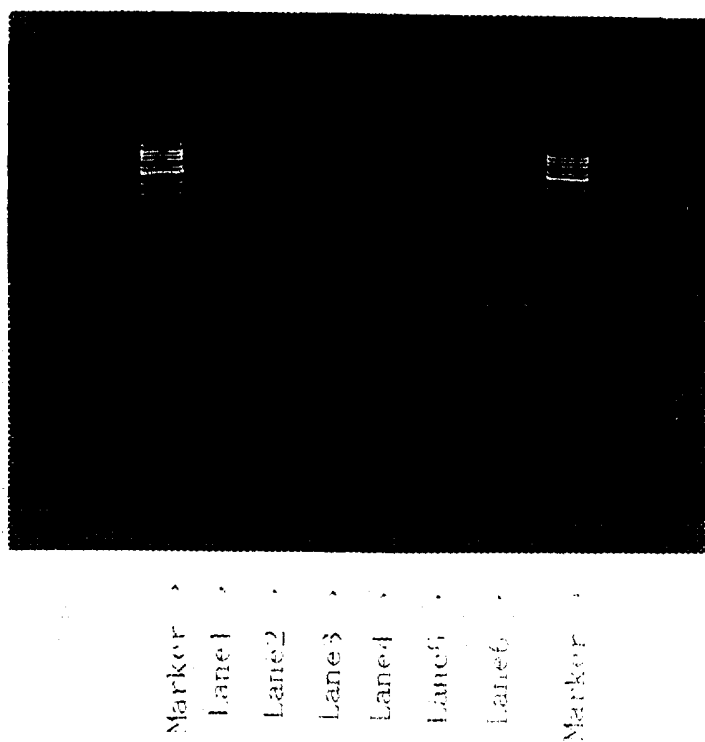


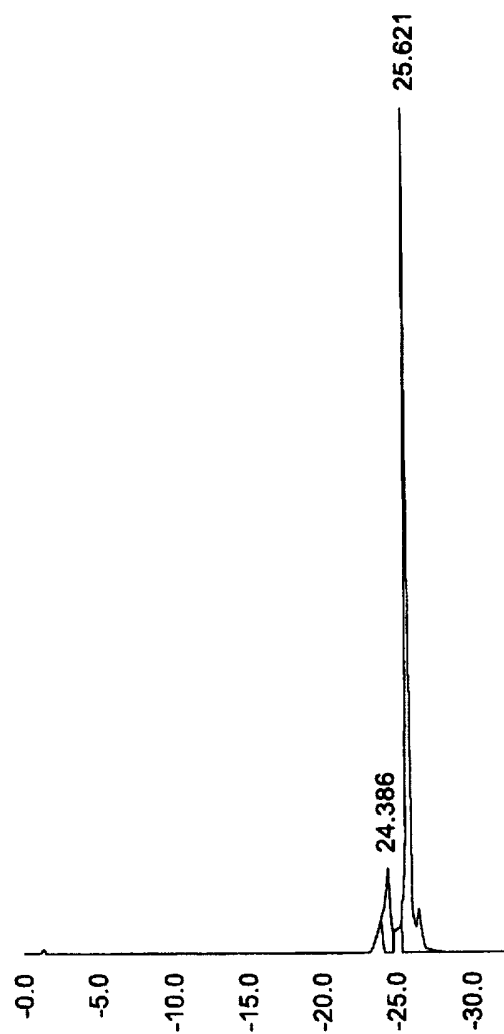
Fig.13

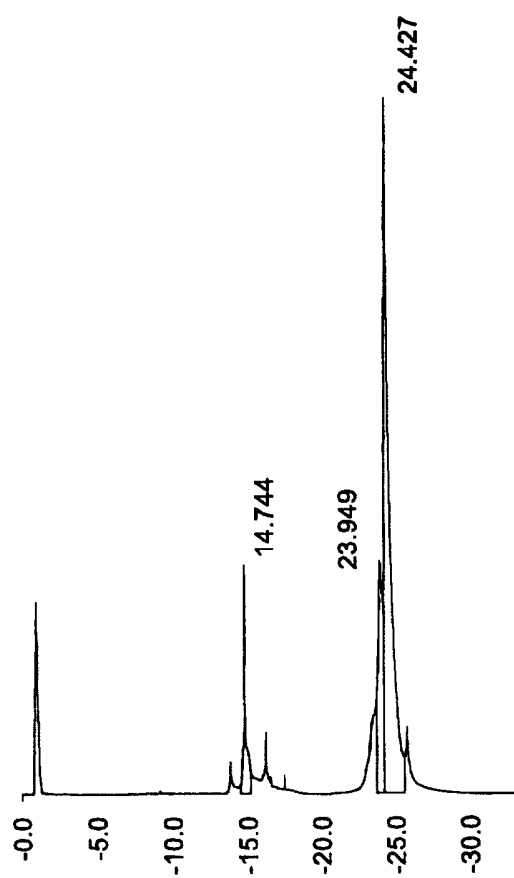
Fig.14

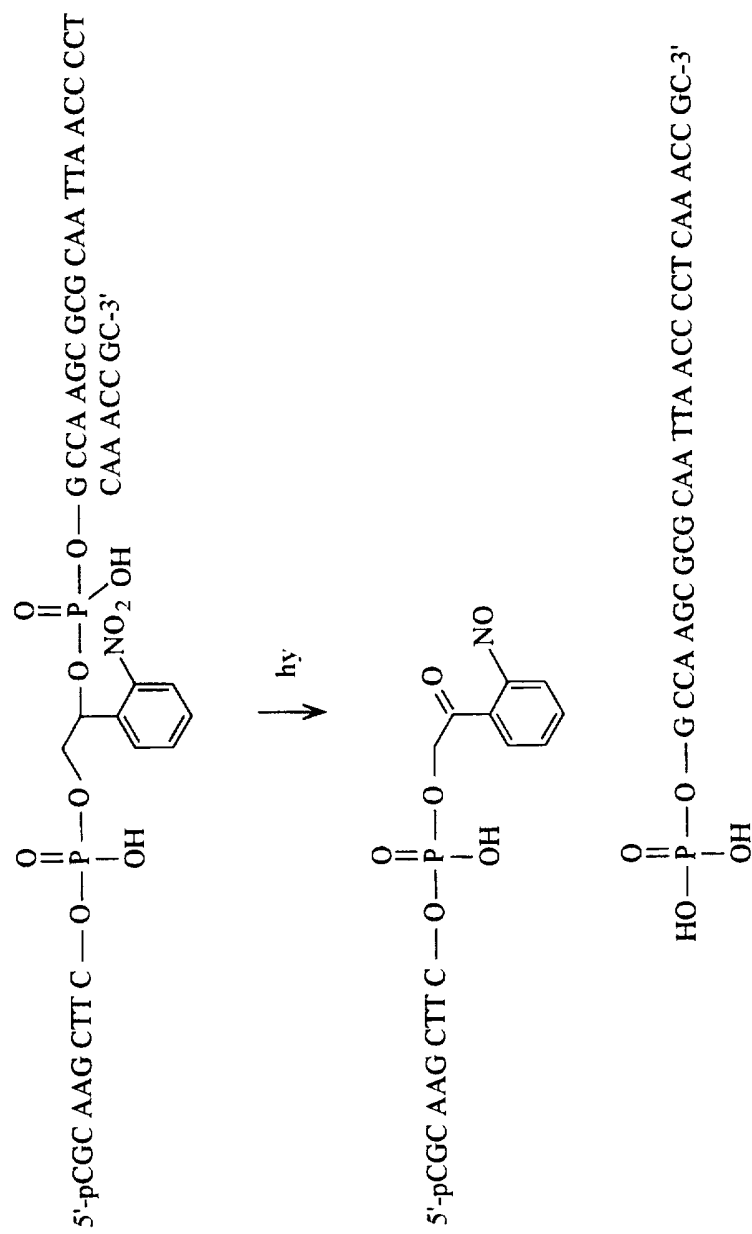
Fig.15

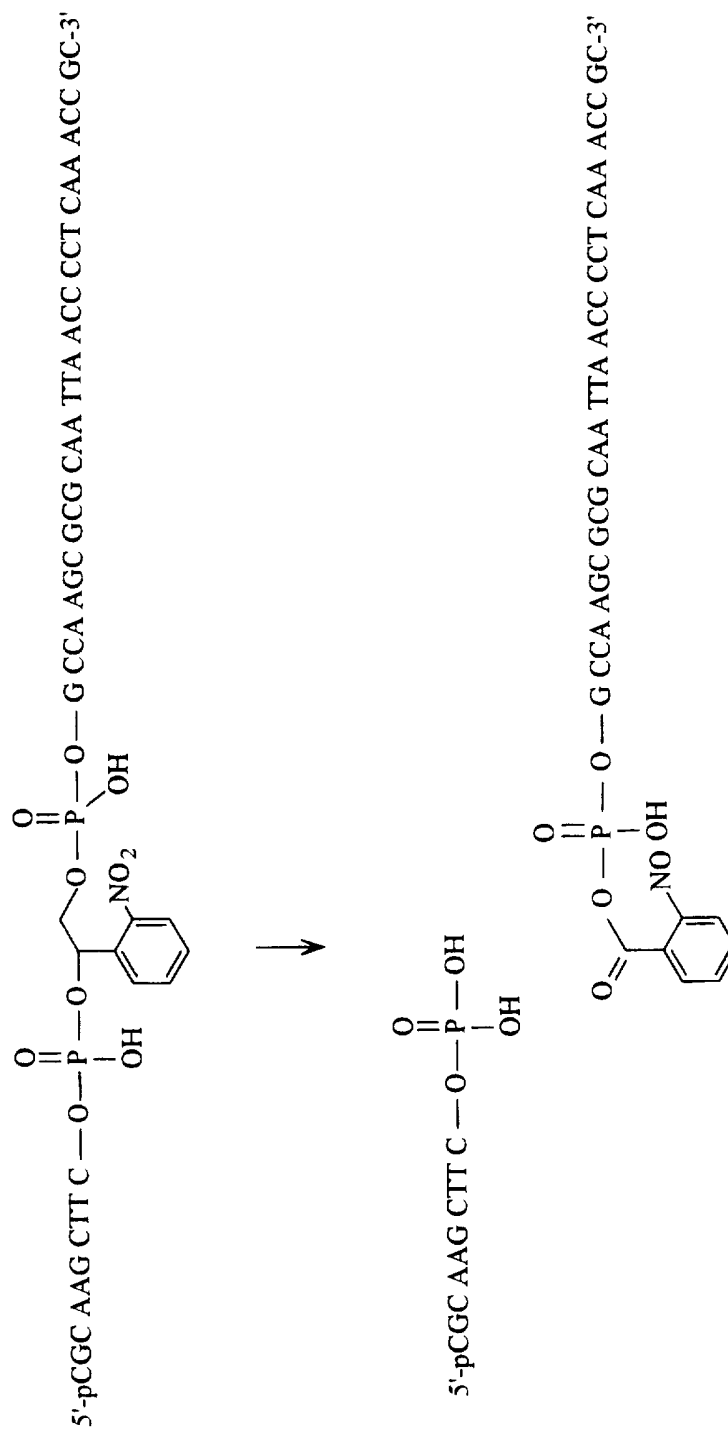
Fig. 16

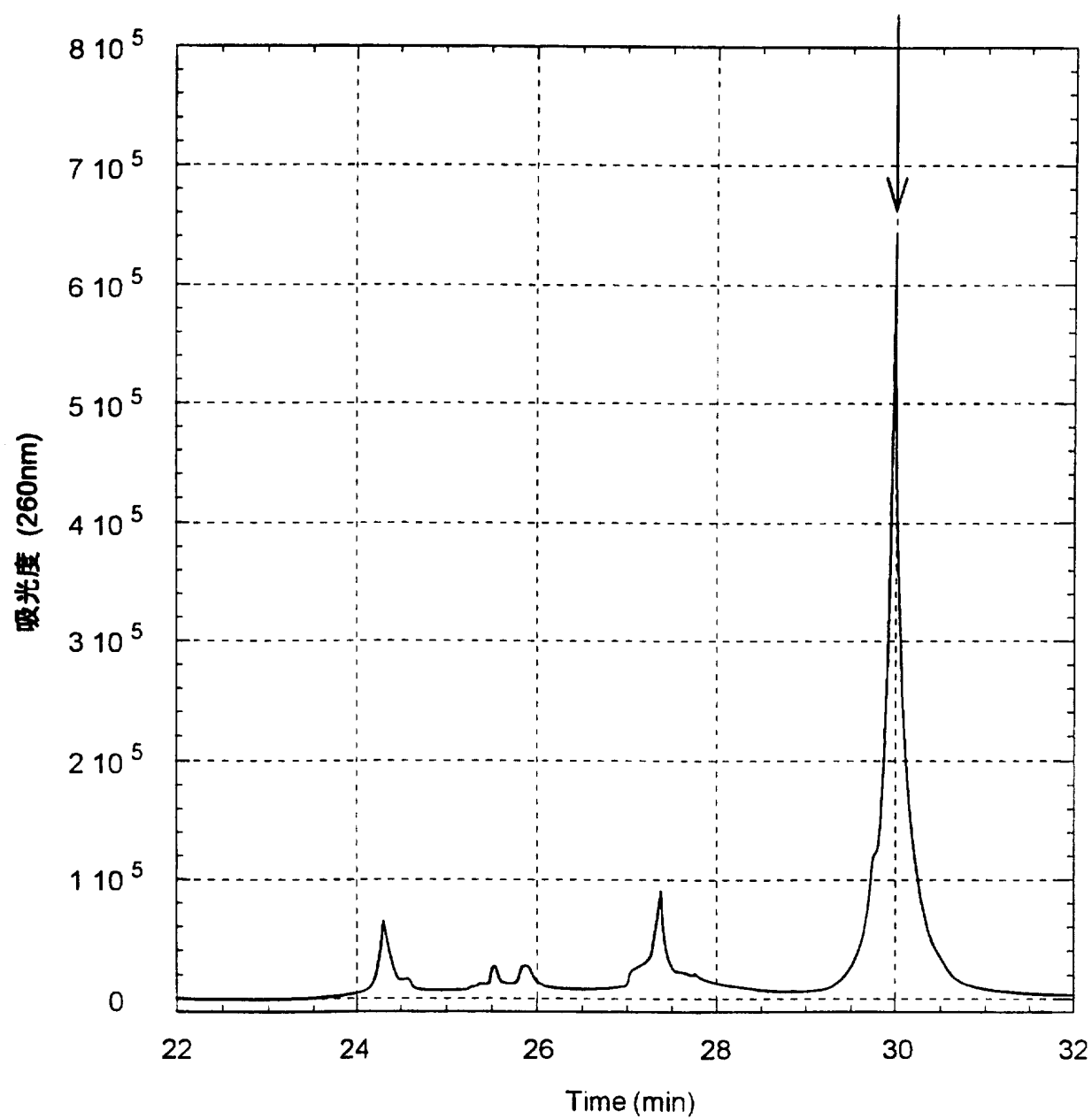
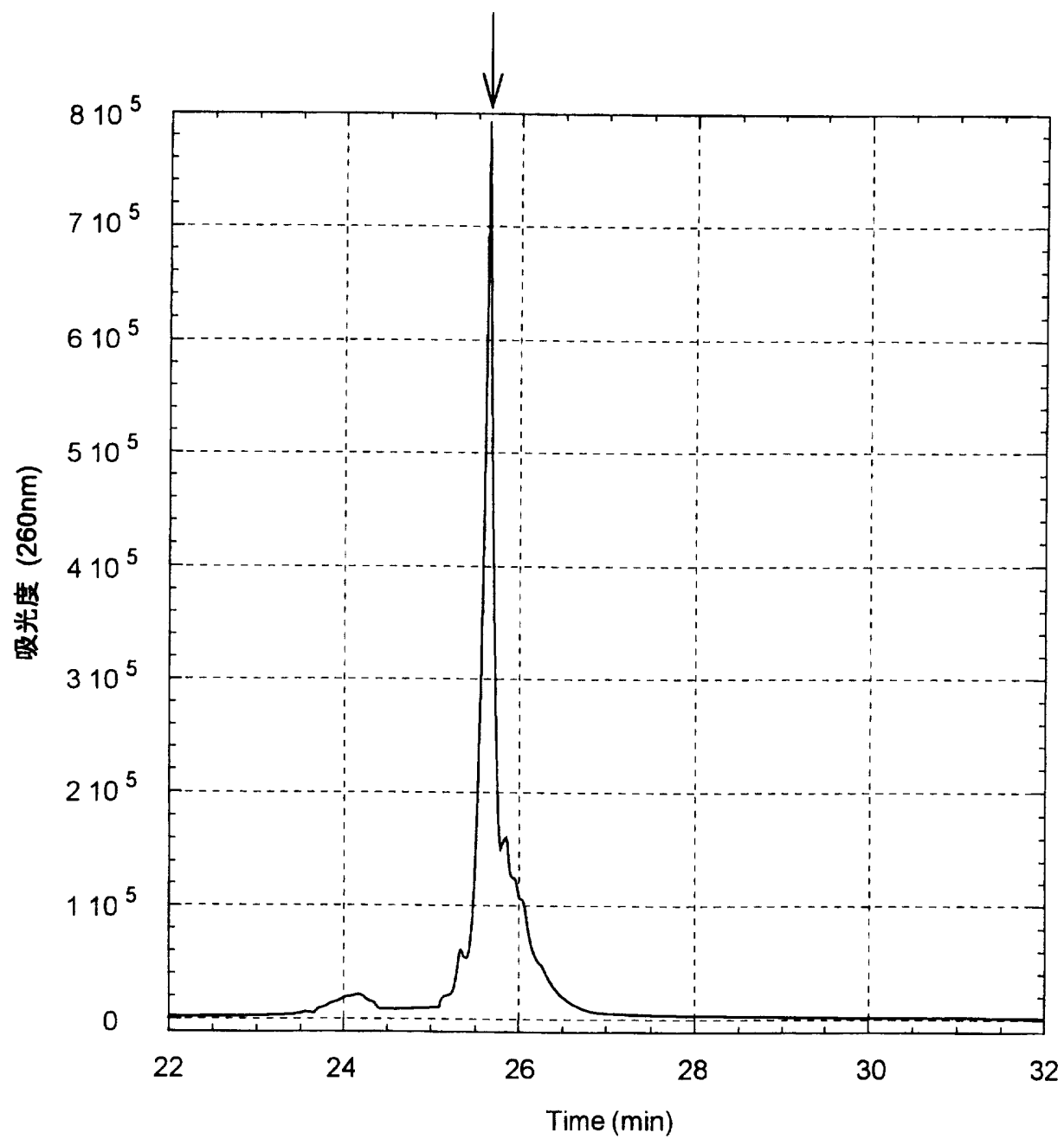
Fig.17

Fig.18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/01959

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl ⁶ C07H21/02, C07H21/04, C12N15/00 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) Int. Cl ⁶ C07H21/02, C07H21/04, C12N15/00 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) CAS ONLINE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	P. Ordoukhanian et al., Design and synthesis of aversatile photocleavavle DNA building block. Application to phototriggered hybridization. J. Am. Chem. Soc., Vol. 117, No. 37 (1995), p. 9570-9571	1 - 7
A	FR, 2675803, A (Genest SA), October 30, 1992 (30. 10. 92) (Family: none)	1 - 7
A	M. Puttaraju et al. A circular trans-acting hepatitis delta virus ribozyme. Nucleic Acids Res., Vol. 21, No. 18 (1993) p. 4253-4258	1 - 7
A	J. Piette, Guanine alteration and production of strand breaks in DNA photosensitized by proflavine. Arch. Int. Physiol. Biochem., Vol. 87, No. 5 (1979), p. 1050-1051	1 - 7
A	G. condorelli et al., Molecular mechanism of drug photosensitization 7. Photocleavage of DNA sensitized by suprofen. Photochem. Photobiol.,	1 - 7
☒ 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 document but 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 August 22, 1997 (22. 08. 97)		Date of mailing of the international search report September 2, 1997 (02. 09. 97)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/01959

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Vol. 62, No. 1 (1995) p. 155-161 JP, 8-56679, A (Hoechst AG.), March 5, 1996 (05. 03. 96) & EP, 693287, A	1 - 7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁴ C07H21/02, C07H21/04, C12N15/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁴ C07H21/02, C07H21/04, C12N15/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE, BIOSIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	P. Ordoukhanian et al., Design and synthesis of aversatile photocleavable DNA building block. Application to phototriggered hybridization. J. Am. Chem. Soc., Vol. 117, No. 37(1995)p. 9570-9571	1-7
A	FR, 2 6 7 5 8 0 3, A (GENEST SA) 3 0. 1 0 月. 1 9 9 2 (3 0. 1 0. 9 2) (ファミリーなし)	1-7
A	M. Puttaraju et al. A circular trans-acting hepatitis delta virus ribozyme. Nucleic Acids Res., Vol. 21, No. 18(1993)p. 4253-4258	1-7
A	J. Piette, Guanine alteration and production of strand breaks in DNA photosensitized by proflavine. Arch. Int. Physiol. Biochem., Vol. 87, No. 5(1979)p. 1050-1051	1-7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22.08.97

国際調査報告の発送日

02.09.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富士 美香

4C

9551

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	G. Condorelli et al., Molecular mechanism of drug photosensitization 7. Photocleavage of DNA sensitized by suprofen. Photochem. Photobiol., Vol. 62, No. 1(1995)p. 155-161	1-7
A	J P, 8-56679, A (ヘキスト・アクチエンゲゼルシャフト) 5. 3月. 1996 (05. 03. 96) & EP, 693287, A	1-7