

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3940407号  
(P3940407)

(45) 発行日 平成19年7月4日(2007.7.4)

(24) 登録日 平成19年4月6日(2007.4.6)

(51) Int. Cl.		F I		
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 1 2 N</b>	<b>15/00</b>
<b>C O 7 H</b>	<b>21/04</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C O 7 H</b>	<b>21/04</b>
<b>C 1 2 N</b>	<b>9/00</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 1 2 N</b>	<b>9/00</b>

請求項の数 4 (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願2004-121910 (P2004-121910)	(73) 特許権者	500203684
(22) 出願日	平成16年4月16日(2004.4.16)		サーナ・セラピューティクス・インコーポ
(62) 分割の表示	特願平7-508146の分割		レイテッド
原出願日	平成6年8月19日(1994.8.19)		Sirna Therapeutics,
(65) 公開番号	特開2004-215675 (P2004-215675A)		Inc.
(43) 公開日	平成16年8月5日(2004.8.5)		アメリカ合衆国 94107 カリフォル
審査請求日	平成16年4月16日(2004.4.16)		ニア州 サンフランシスコ, ペリー スト
(31) 優先権主張番号	08/116, 177		リート 185 スウィート 6504
(32) 優先日	平成5年9月2日(1993.9.2)	(74) 代理人	100062144
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 青山 稔
(31) 優先権主張番号	08/152, 481	(74) 代理人	100106518
(32) 優先日	平成5年11月12日(1993.11.12)		弁理士 松谷 道子
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	08/233, 748		
(32) 優先日	平成6年4月19日(1994.4.19)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

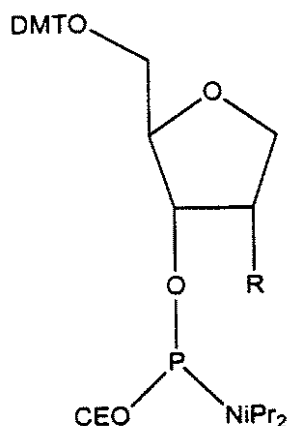
(54) 【発明の名称】 非ヌクレオチドを含有する酵素性核酸

(57) 【特許請求の範囲】

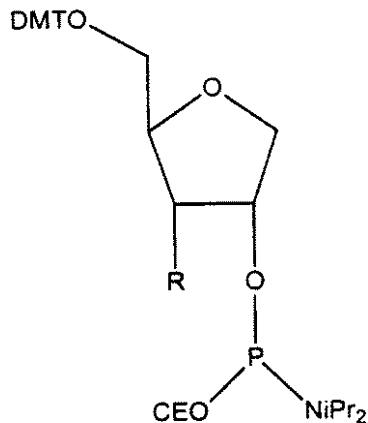
【請求項1】

以下の化合物4および化合物5によって示される化合物からなる群から選択される化合物を用いて核酸分子に非塩基(abasic)ヌクレオチドが組み込まれている、非塩基ヌクレオチドを少なくとも1つ含む核酸分子：

## 【化 1】



化合物 4



化合物 5

10

[式中、DMTはジメトキシトリチル、CEはシアノエチル、RはHまたはO - t e r t - ブチルジメチルシリルである]。

## 【請求項 2】

該核酸分子が、2' 糖の修飾を有するヌクレオチドを少なくとも1つ含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

20

## 【請求項 3】

該核酸分子が、ホスフェート骨格の修飾を有するヌクレオチドを少なくとも1つ含む、請求項 1 または 2 に記載の核酸分子。

## 【請求項 4】

該核酸分子が、5' キャップまたは3' キャップあるいは5' キャップと3' キャップの両方を含む、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の核酸分子。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は化学合成された非ヌクレオチドを含む酵素性核酸に関する。

30

## 【背景技術】

## 【0002】

酵素性RNA分子もしくはリボザイムの発見の歴史およびその活性について簡単に述べる。この歴史は完全なものではなく、以下に説明する本発明の理解の補助とするためのものである。このまとめは以下に示したすべてが特許請求の範囲に対する従来技術であるということの意味するのではない。

## 【0003】

1970年代以前はすべての遺伝子は、遺伝子によってコードされるタンパク質と一対一で対応すると考えられていた。この単純な考えは、すべての遺伝子は紙テープに書かれたメッセージのごときのものであって、各三連のDNAの「文字」は1つのタンパク質である「言葉」に翻訳されると考えられていた。タンパク質合成は遺伝子のDNAからRNAへの書き換え(文字を異なる形態の文字とする)、次いでRNAをタンパク質へと翻訳する(1度に3文字)。1970年代中盤において、遺伝子のうちのいくつかは、自身のコード化するタンパク質と正確に一対一の対応をしないことが発見された。かかる遺伝子はコーディング配列内にあって、タンパク質への翻訳前にRNAから除去すなわち「スプライス」される中断領域を有していることが見いだされた。このようなコーディング領域における中断部には介在配列、すなわち「イントロン」という名前がつけられおり、そしてこのイントロンがRNAから除去される過程には「スプライシング」と名付けられている。少なくとも3つの異なる機構がRNAからイントロンを除去する機構として見いだされて

40

50

いる。かかるスプライシング機構のうちの2つには様々なタンパク質因子が結合し、その働きにより正しい位置でRNAが切断、連結されるものである。第3の機構はRNAをイントロン自身により切断および連結させる機構であり、これが触媒的RNAについての初めての発見である。

#### 【0004】

セッシュと共同研究者らは池に棲む単細胞生物であるテトラヒメナ・サーモフィラ (*Tetrahymena thermophila*) においていかにしてRNAスプライシングが発生するかにつき研究した。セッシュはRNAの介在配列が自身を周囲のRNAから切り離すスプライシング因子として作用することを報告した。1980年代初頭においてはテトラヒメナのイントロンの複雑な構造をはっきりさせ、セルフスプライシングの機構を解読するためにさらなる研究が行われた。多くの研究グループによりテトラヒメナのイントロンの特別な折り畳み構造が切断され、スプライスされるRNA部分に伴ってあることを支持していた。スプライシングが終わった後でも、遊離したイントロンは触媒性構造を保持する。その結果、遊離したイントロンはさらなる切断およびスプライシング反応を自身に対して行い、イントロン環を形成する。1986年までに、セッシュは短くされたテトラヒメナイントロンが、RNAの他の切片に対して様々な切断および結合反応をもたらしことを示すことができた。この証明によって、テトラヒメナイントロンが真の酵素として働くことが導かれる：(i) 各イントロン分子は多くの基質分子を切断することができるが、イントロン自体は変化せず維持される、そして(ii) 反応は唯一の配列(CUCU)を含有するRNA分子に特異的であり、かかる配列によってイントロンがRNAを認識し、結合する。ザウとセッシュは「リボザイム」という用語をすべての酵素様性質を有すRNAを表現する用語として新造した。

#### 【0005】

同じ1986年に、セッシュはテトラヒメナのリボザイムによって認識されるRNA基質配列がリボザイム自身の内部の配列を変化させることによって変え得ることを見いだした。この性質は他のRNA配列を切断するよう個々にデザインされる多くの部位特異的リボザイムの開発につながった。

#### 【0006】

テトラヒメナのイントロンは最もよく研究されており、現在では大きな一群のイントロン、すなわちグループIイントロンとして認識されている。いくつかの配列要素を含有する完全に折り畳まれた構造はグループIのイントロン内で保存されており、一般的なスプライシング機構に関与している。テトラヒメナのイントロンのごとく、グループIに含まれるイントロンのうちのいくつかは触媒活性を有する、すなわちイントロン自身が自己スプライシング反応を生じる。他のグループIのイントロンは他の(タンパク質)因子を、例えばイントロンの折り畳みおよび/または活性構造の維持のために必要とすると考えられている。

#### 【0007】

リボヌクレアーゼP (RNAアーゼP) はRNAおよびタンパク質成分の両方からなる酵素であり、前駆体tRNA分子の一方の末端から過剰のRNAを取り除きその最終形態へと導く。RNAアーゼPの活性は試験したすべての生物において認められた。シドニー・アルトマンとその共同研究者らは、RNAアーゼP中のRNA成分はかかるプロセシング活性に必要であることを示した；しかしながら、彼らは彼らの用いた条件においてはタンパク質成分もまたプロセシングに必要であることもまた示した。セッシュがテトラヒメナのイントロンによって自己スプライシングを発見した後、RNAアーゼP内のタンパク質とRNA成分が再調査された。1983年、アルトマンとパースがRNAアーゼP複合体の酵素的成分がRNAであることを発見した。このことは、あるRNA分子を実際の酵素として作用し得、自分自身に変化を受けることなく数多くのtDNA分子を変化させることができることを示すものであった。

#### 【0008】

RNAアーゼP RNAの折り畳み構造が調べられている。異なる生物間において、RNA

10

20

30

40

50

Aの配列は正確に保存されていないが、より高次の構造については保存されていた。このことはRNAアーゼP複合体のタンパク質成分が、インビボにおいて折り畳まれたRNAの構造を安定化させているからであると考えられる。

#### 【0009】

シモンズとその共同研究者らは2種類の自己切断RNAを同定したが、これらすでに報告されていた触媒性RNAの他の形態と異なっていた。シモンズは、アボガド植物に感染するRNAウイルスであるアボカド・サンブロット・ウイロイド (avocado sunblotch viroid(ASV))の繁殖について研究していた。シモンズは55ヌクレオチドの小ささのASVのRNAが自己を2切片へと切断するよう、折り畳まれ得ることを証明した。これらのRNAのインビボ自己切断によって、ウイルスの増殖の間に、RNAが1ゲノム長の断片に切断されると考えられている。シモンズはASVからのさまざまな最小触媒配列が他の植物病原性RNAにも認められることを発見した。これらの配列を比較したところ、3本のステムと多くの保存された(RNA間で変化しない)ヌクレオチドを有する中心ループで接続されたループから構成される一般的な構造が判明した。この触媒性RNAに対して予測される二次構造には、ハンマーヘッド型の検索部位を有している；従ってこれはハンマーヘッドと名付けられる。

#### 【0010】

ウーレンベック (Uhlenbek) はリボザイムの触媒領域を基質から単離することに成功した。すなわち、2つ(または3つ)の小さな合成RNAから、ハンマーヘッドリボザイムを組み立てることが可能となったのである。19個のヌクレオチドからなる触媒領域および24個のヌクレオチドからなる基質が特定の切断を行うには十分である。多くのハンマーヘッド型リボザイムの触媒性部位がウーレンベックのグループとシモンズのグループの両方によって研究されており、ここでは特定の組み立ておよび触媒活性に必要なヌクレオチドの決定および様々な条件下における切断速度の測定が行われている。

#### 【0011】

ヘーゼロフ (Haseloff) とゲルラック (Gerlach) はハンマーヘッドリボザイムのドメインを異なる方法によって分けることができることを示した。そうすることによって、鎖中において必要とされる配列のほとんどを切断されない部位に置き(リボザイム)、鎖中にUH (H = C, AまたはU)がある場合のみに切断される(基質)ようにデザインすることが可能となる。このことによって、触媒リボザイムは長い「基質認識」配列の中にはめ込まれているどのUH RNA配列をも切断するように設計できる。長いmRNAの特別な切断を、いくつかのハンマーヘッドリボザイムを用いて予言した方法によって行うことが、1988年に報告されている。

#### 【0012】

ある植物病原性RNA (タバコリングスポットウイルスのネガティブ配列から得た) は自己切断を受けるが、上述のコンセンサスなハンマーヘッド構造に折り畳まれない。ブルーニング (Bruening) とその共同研究者らは、このRNAに対して50ヌクレオチドの触媒ドメインを同定した。1990年ハンペル (Hampel) とトリッツ (Tritz) は触媒性ドメインを2つの部分に分け、それぞれ基質とリボザイムとして、多段階繰り返し切断反応を行わせることに成功した。ハンマーヘッドリボザイムのごとく、触媒性部位には触媒活性に必要とされる配列のほとんどを含んでおり、標的においては短い配列(この場合にはGUC)のみが必要とされる。ハンペルとトリッツはこのRNAの折り畳まれた構造を、シングルヘアピンを構成しているとして表現し、「ヘアピン」リボザイム (ブルーニングと共同研究者らはこのリボザイムモチーフに対して「紙ばさみ」と名付けた) と命名した。その後研究によって、標的RNAの結合および切断の機構において、ヘアピンとハンマーヘッドリボザイムの間の類似性が増加することが示されている。

#### 【0013】

肝炎デルタウイルス (HDV) は、ゲノムが一本鎖RNAであるウイルスである。ゲノムRNAおよび相補的なアンチゲノムRNAの両方における小さな領域(約80ヌクレオチド)があれば自己切断を行える。1991年にビーン (Been) とペロッタ (Perrotta) はH

10

20

30

40

50

D VのRNAの二次構造がゲノムRNAとアンチゲノムRNA間で保存されており、これが触媒活性に必要であることを提案した。HDVのRNAを「リボザイム」と「基質」部分へ分離することが近年になってピーンにより達成された。ピーンはさらにHDVリボザイムの大きさを約60ヌクレオチドにまで減少させることに成功した。

#### 【0014】

以下の表には上述のリボザイムの性質を挙げた：

(表1)

リボザイムの性質

#### グループI イントロン

大きさ：～300から>1000ヌクレオチド

10

切断部位の5'につながる標的配列においてUが必要である。

切断部位の5'側において4～6ヌクレオチドが結合する

このクラスにおいて100を超える公知のヌクレオチドが、テトラヒメナ・サーモフィラのrRNA、微ミトコンドリア、クロロプラスト、ファージT4、ブルー・グリーンアルガエおよび他のものから単離されている。

#### RNAアーゼP RNA (M1 RNA)

大きさ：～290から400ヌクレオチド

リボヌクレオチド酵素のRNA部分。tRNAプレカーサーを切断して成熟tRNAを作製する。このグループはおよそ10個公知のものがあるが、すべては細菌由来である。

#### ハンマーヘッドリボザイム

20

大きさ：～13から40ヌクレオチド

切断部位の5'に直接ついているUH標的配列が必要である

さまざまな数のヌクレオチドが切断部位の両側へ結合する。

このクラスには14個の公知のものがある。RNAを感染剤として用いる植物病原(ウイルス)に認められる(図1)。

#### ヘアピンリボザイム

大きさ：～50ヌクレオチド

切断部位の3'に直接ついているGUC配列が必要である。

切断部位の5'側に4ヌクレオチドが結合し、様々な数のヌクレオチドが切断部位の3'側に結合している。

30

このクラスには1個のみの公知のヌクレオチドがある。これはRNAを感染用に用いる植物病原(タバコリングスポットウイルスのサテライトRNA)から得られたものである(図2)。

#### 肝炎デルタウイルス(HDV)リボザイム

大きさ：～60ヌクレオチド(現在)

標的RNAを切断することが近年証明された。

必要とする配列は完全には解明されていない。

結合部位と構造的な要求性に関しても完全には解明されていないが、切断部位の5'側にはいずれの配列も必要とはされない。

このクラスには1個のみの公知のヌクレオチドがある。これはヒトのHDVから単離されたものである(図3)。

40

#### 【0015】

エクスタイン(Eckstein)らの国際公開番号WO92/07065；ペラウルト(Perrault)らのネイチャー1990、344：565；ピーケン(Pieken)らのサイエンス1991、253：314；ウスマン(Usman)とセダーグレン(Cedergren)、トレンズ・イン・バイオケム・サイ、1992、17：334；ウスマンら国際公開番号WO93/15187；およびロッシ(Rossi)ら、国際公開番号WO91/03162には、酵素性核酸分子の糖部分へ施す様々な化学的变化が記載されている。

【特許文献1】国際公開第WO92/07065号パンフレット

【特許文献2】国際公開第WO93/15187号パンフレット

50

【特許文献3】国際公開第W O 9 1 / 0 3 1 6 2号パンフレット

【非特許文献1】ペラウルト (Perrault)らのネイチャー 1 9 9 0、3 4 4 : 5 6 5

【非特許文献2】ピーケン (Pieken)らのサイエンス 1 9 9 1、2 5 3 : 3 1 4

【非特許文献3】ウスマン (Usman)とセダーグレン (Cedergren)、トレンズ・イン・バイオケム・サイ、1 9 9 2、1 7 : 3 3 4

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0016】

本発明は、化学合成された非ヌクレオチドを含む酵素性核酸を提供することを目的とする。

10

【課題を解決するための手段】

【0017】

本発明は、二本鎖核酸（例えばRNAもしくはDNA）のステム（二重らせんステム）のベースまたは酵素核酸の一本鎖領域、触媒コア、ループもしくは認識アームにおけるスパー要素としての非ヌクレオチド分子の使用に関する。二重らせんステムは、酵素RNA分子中に遍在する構造要素である。上記ステムは、通常一本鎖ヌクレオチド連鎖によって接続されているが、かようなステムの合成を容易にするため、単一塩基もしくは塩基対の擬似体（ミメティック：mimetic）を使用して、このような分子を合成する際のヌクレオチドの必要数を減らし、かつヌクレアーゼ耐性を付与する（これら擬似体は非核酸要素であるから）ことができる。またこのことは、リボザイムの触媒コアと認識アームの両者にも当てはまる。

20

【0018】

このような非ヌクレオチド擬似体の例を図4に示し、これらのハンマーヘッドリボザイム中への組み込みを図5に示す。これら非ヌクレオチドのリンカーは、ポリエーテル、ポリアミン、ポリアミドまたはポリ炭化水素の化合物でもよい。具体例としては、SeelaおよびKaiser、Nucleic Acids Res.、18巻、6353頁、1990年およびNucleic Acids Res.、15巻、3113頁、1987年；CloadおよびSchepartz、J. Am. Chem. Soc.、113巻、6324頁、1991年；RichardsonおよびSchepartz、J. Am. Chem. Soc.、113巻、5109頁、1991年；Maら、Nucleic Acids Res.、21巻、2585頁、1993年、およびBiochemistry、32巻、1751頁、1993年；Durrant、Nucleic Acids Res.、18巻、6353頁、1990年；McCurdyら、Nucleosides & Nucleotides、10巻、287頁、1991年；Jaschkeら、Tetrahedron Lett.、34巻、301頁、1993年；Onoら、Biochemistry、30巻、9914頁、1991年；Arnoldら、国際特許願公開第W O 89/02439号、標題「Non-nucleotide Linking Reagents for Nucleotide Probes」；ならびにFeretおよびVerdine、J. Am. Chem. Soc.、113巻、4000頁、1991年に記載されている化合物がある。なおこれら文献はすべて本明細書に援用するものである。

30

【0019】

したがって本発明は、第一の態様で、一つ以上の非ヌクレオチド成分を有しかつRNAまたはDNA分子を切断する酵素活性を有する酵素性核酸を提供するものである。

【0020】

このような非ヌクレオチド擬似体の例を図4に示し、それらのハンマーヘッドリボザイムへの組み込みを図5に示す。これらの非ヌクレオチドリリンカーはポリエーテル、ポリアミン、ポリアミドまたはポリ炭化水素の化合物でもよい。

40

【0021】

好ましい実施態様で、その酵素性核酸はRNAの一つ以上の領域（stretch）を含有し、その領域は、分子の酵素活性を提供し、非ヌクレオチドの部分に連結される。

【0022】

「非ヌクレオチド」という用語は、糖および/またはホスフェートの置換を含めて一つ以上のヌクレオチド単位の代わりに核酸連鎖中に組み込むことができかつ残りの塩基にその触媒活性を示させることができる基または化合物を意味する。その基または化合物は、アデノシン、グアニン、シトシン、ウラシルまたはチミンのような公知のヌクレオチド塩基

50

を含有していない点で非塩基である。その基または化合物は、当該技術分野で報告されているように2'もしくは3'のHもしくはOHが置換されていてもよい(EcksteinらおよびUsmanらの前記文献参照)。

【0023】

好ましい実施態様で、その酵素性核酸はRNAの一つ以上の領域を含有し、その領域は分子酵素活性を提供し、非ヌクレオチドの部分に連結される。必要なRNA成分は当該技術分野で公知である(例えばUsmanの前記文献参照)。

【0024】

「非ヌクレオチド含有酵素性核酸」という用語は、本願で用いる場合、リボザイムの一部、例えば限定されないが二本鎖ステム、一本鎖「触媒コア」配列、一本鎖ループまたは一本鎖認識配列を置換する少なくとも一つの非ヌクレオチド要素を含有する核酸分子を意味する。これらの分子は、別のRNAまたはDNAの分子を、ヌクレオチド塩基配列に特異的な方式で切断(好ましくは繰返し切断)することができる。またこのような分子は、所望に応じて分子内で切断するよう作用させることができる。このような酵素分子は事実上、RNAの転写を標的にすることができる。またかような分子としては、エキソヌクレアーゼによる消化を防止するキャップ形成基として有用な3'-または5'-に非ヌクレオチドを有する核酸分子がある。

【0025】

本発明の酵素分子は、まず標的のRNAまたはDNAに結合することによって作用する。このような結合は、標的のRNAまたはDNAを切断する作用がある分子の酵素部分のごく近くに保持されている酵素の標的結合部分を通じて起こる。したがってその分子は、まず標的核酸を認識し次いで相補的塩基対形成によって標的核酸を捕捉し、そして正しい部位に一旦結合されると酵素として作用して標的を切断する。このような標的の効果的な切断によって、コードされているタンパク質の合成を制御する標的核酸の性能が破壊される。本発明の酵素は、その標的を捕捉して切断した後、その標的から放出され、別の標的を探して、新しい標的を繰返し捕捉して切断することができる。

【0026】

本発明の酵素の酵素特性は、他の方法、例えばアンチセンス法(この場合、核酸分子は単に核酸標的に結合して核酸標的の翻訳を遮断するだけである)を超えて有利である。というのは、治療処置を行うのに必要な酵素の有効濃度がアンチセンスオリゴヌクレオチドの有効濃度より低いからである。この利点は本発明の酵素が酵素として作用する性能を反映している。即ち、単一の酵素分子が多数の標的RNA分子を切断することができる。その上本発明の酵素は、高度に特異的な阻害剤であり、その阻害作用の特異性は、結合に際しての塩基対生成の機構のみならず、その分子が結合するRNAの発現を阻害する機構に依存している。すなわち、その阻害作用は標的の切断によって起こり、その特異性は、標的核酸の切断率/非標的核酸の切断率の比率と定義する。この切断機構は、塩基対生成に関与する因子の外に追加される因子に依存している。したがって本発明の酵素の作用の特異性は、同じ標的部位を捕捉するアンチセンスオリゴヌクレオチドの作用の特異性より大きいと考えられる。

【0027】

「フレーズ酵素(phrase enzyme)」という用語は、基質結合領域に、指定の核酸標的に対する相補性を有しかつその標的中のRNAまたはDNAを特異的に切断する酵素活性も有する非ヌクレオチド含有触媒核酸分子を意味する。すなわち、その酵素は、分子内または分子間が、RNAまたはDNAを切断して、標的のRNAまたはDNAの分子を不活性化することができる。この相補性は、本発明の酵素分子を標的のRNAまたはDNAと十分にハイブリッドを形成させて切断を起こす機能がある。100%の相補性が好ましいが、50~75%と低い相補性でもこの発明に有用である。

【0028】

本発明の好ましい実施態様では、本発明の酵素分子は一般にハンマーヘッドのモチーフで形成されるが、ヘアピン、肝炎デルタウイルス、グループIイントロンまたはRNAアー

10

20

30

40

50

ゼ P RNA (RNA ガイド配列と関連する) のモチーフで形成することもできる。このようなハンマーヘッドモチーフの例は Rossi ら、Acids Research and Human Retroviruses、8 巻、183 頁、1992 年に記載されており；ヘアピンモチーフの例は、Hampel らの 1988 年 9 月 20 日付け出願の米国特許第 07/247,100 号の一部継続出願である 1989 年 9 月 20 日付け出願の「RNA Catalyst for Cleaving Specific RNA Sequences」；Hampel and Tritz、Biochemistry、28 巻、4929 頁、1989 年および Hampel ら、Nucleic Acids Research、19 巻、299 頁、1990 年に記載されており；肝炎デルタウイルスモチーフの例は Perrotta および Been、Biochemistry、31 巻、16 頁、1992 年に記載され；RNAアーゼ P のモチーフの例は Guerrier-Takada ら、Cell、35 巻、849 頁、1983 年に記載され；ならびにグループ I イントロンのモチーフの例は Cech らの米国特許第 4,987,071 号に記載されている。本発明はこれらの特異的モチーフに限定されるものではなく、当該技術分野の当業者は、本発明の酵素分子において重要なことは、その酵素分子が少なくとも一つの非ヌクレオチド部分および標的遺伝子の RNA 領域の一つ以上に相補的な特異的基質結合部位を有し、かつ核酸切断活性をその酵素分子に付与する基質結合部位の中またはその部位を囲むヌクレオチド配列を有することであることが分かるであろう。

10

#### 【0029】

本発明は、所望の標的の核酸に対して高い特異性を示すクラスの切断酵素剤の製造方法を提供するものである。本発明の酵素分子は、標的の高度に保存された配列領域を標的とすることが好ましく、その結果、疾患また症状の特異的な治療を単一の酵素で行うことができる。このような酵素分子は、必要に応じて特定の細胞に対して外因的に送達することができる。好ましいハンマーヘッドのモチーフにおいて、小さい分子（長さが 60 個未満のヌクレオチド好ましくは 30 ~ 40 個のヌクレオチド）を用いれば、他のリボザイムのモチーフより治療費用が減少する。

20

#### 【0030】

長さが 100 ヌクレオチドを超える核酸分子は自動化された方法を用いて合成することは困難なのでこのような分子の治療費用は法外なものになる。本発明では、外因的送達に、小さな酵素のモチーフ（例えばハンマーヘッドのモチーフ）を用いる。これらの分子は構造が単純なので、酵素が mRNA 構造の標的領域に侵入する性能が増大する。ハンマーヘッド構造が長い転写物内に含まれている場合と異なり、酵素構造の正しい折畳みまたは相補的領域を妨害する非酵素の隣接配列は存在しない。

30

#### 【0031】

本発明のその外の特徴と利点は、下記の、本発明の好ましい発明を実施するための最良の形態と特許請求の範囲から明らかになるであろう。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0032】

図面：

図 1 は当該技術分野で公知のハンマーヘッドリボザイム領域の線図である。

図 2 は当該技術分野で公知のヘアピンリボザイム領域の一般構造の線図である。

図 3 は当該技術分野で公知の肝炎デルタウイルスリボザイム領域の一般構造の線図である。

40

図 4 は核酸酵素に組込むことができる各種の非ヌクレオチド擬似体（ミメティック）の線図である。図 4 では標準的な略語を用いている。化合物 1 において、X は各々、独立して、酸素、窒素、硫黄または置換炭素を含有するアルキル、アルケンまたは炭素原子 1 ~ 10 個の長さの均等な連鎖である。化合物 6、6 a、7、8、9 および 10 において、Y は各々、独立して、核酸酵素の他の部分に対するホスホジエステル、エーテルまたはアミド結合部分である。化合物 4 と 5 において、R は各々、独立して H、OH、保護された OH、O - アルキル、アルケニルもしくはアルキニル、または炭素原子が 1 ~ 10 個のアルキル、アルケニルもしくはアルキニルである。

図 5 は各種の非ヌクレオチド擬似体（ミメティック）と核酸酵素に組込むのに好ましい位置を示す線図である。具体的に述べると、擬似体 1 ~ 10 は、ステム II の二つのストラン

50



ドを接続するループ（図5中に / \_\_\_\_\_ / で示す）を置換することができる。ステムII自体は1～10個の塩基対である。後記の実施例1と2では、化合物1と2が、長さが1～5個の塩基対のステムIIを有する分子中に組込まれた。また化合物1、4および5は、ステムIとIIIの認識アームの中のヌクレオチド、またはステムII自体の中のヌクレオチドを置換する。

図6はペリレンベースの非ヌクレオチド擬似体のホスホルアミダイト3の合成を示す線図である。

図7は非塩基のデオキシリボースまたはリボースの非ヌクレオチド擬似体ホスホルアミダイトの合成を示す線図である。

図8aと8bはそれぞれ、8nMまたは40nMの各種リボザイムによる基質の切断を示す線図である。

10

#### 【0033】

##### 非ヌクレオチド擬似体

本発明に有用な非ヌクレオチド擬似体としては先に一般的に述べたものがある。当該技術分野の当業者は、これらの擬似体は、標準の方法によって酵素分子中に所望の位置に組込むことができることが分かるであろう。標準の実験を行い例えば分子を合成してその酵素活性を試験することによってその最適位置を決定して、適切な選択を行うことができる。最適の分子は、酵素活性を得るのに必要な公知のリボヌクレオチドを含有し、かつ分子の構造を簡単なものに変える非ヌクレオチドを含有している。要求されることは、いくつかのヌクレオチドが一つの非ヌクレオチドで置換され、酵素分子合成の合成ステップが節約されて、RNAまたはDNAにさえ比べて酵素分子の安定性が高められることである。

20

#### 【実施例】

#### 【0034】

以下に、非ヌクレオチド擬似体を含有する触媒核酸の非ヌクレオチドホスホルアミダイトを用いる合成の実施例を示すが、本発明を限定するものではない。

#### 【0035】

実施例1：非ヌクレオチド擬似体：ポリエステルスペーサーを含有するハンマーヘッドリボザイムの合成

ポリエステルスペーサーである化合物1（図4；X=0、n=2または4）の、n=2もしくは4のものを単独でまたはn=2のものを二重に、ハンマーヘッドリボザイムのステムIIのベースにループ2を置換して組込んだところ触媒効率が低いリボザイムが生成したことが分かった。利用した合成法は、Usmanら、J.Am.Chem.Soc.、109巻、7845頁、1987年；およびScaringeら、Nucleic Acids Res.、18巻、5433頁、1990年に記載されているような通常のRNA合成法の手順にしたがった合成法であり、通常の核酸保護基と核酸カップリング基が用いられ、例えば5'末端ではジメトキシトリチルが3'末端ではホスホルアミダイトが用いられる。段階的カップリングの平均収率は>98%であった。これらの型の擬似体の構造はまだ最適化されていないが、先に述べたように、このことは標準の試験法を用いて容易に達成することができるであろう。これらの試験は、このような擬似体が、触媒活性を維持しながらリボザイムのループと一部分を置換する可能性を示している。これらの擬似体はハンマーヘッドリボザイム中に組込むことができるだけでなく、ヘアピン、肝炎デルタウイルス、またはグループ1もしくはグループ2のイントロン中にも組込むことができる。したがってこれら擬似体は任意の核酸構造中に置換モチーフとして汎用することができる。このような擬似体を用いると、非ヌクレオチド擬似体なしのオリゴヌクレオチドを使用する場合と比べて、最終の核酸分子から約2～10個のヌクレオチドを省略することができる。

30

40

#### 【0036】

実施例2：非ヌクレオチド擬似体：芳香族スペーサーを含有するハンマーヘッドリボザイムの合成

別の実施例で、ハンマーヘッドリボザイムのステムIIC-Gのベースに対する特異的なリンカーを設計した。本発明の発明者は、C-Gの塩基対のC1'炭素間の距離は約16オ

50

ングストロームであると考えている。これら二つのRNAピースを、共有結合類似体のC-G塩基対で結合するため、GとCそれぞれの残基の3'-OHと5'-OHの間にリンカーを含有する新しい型の二量体ホスホルアミダイトを構築することができる。図4に示す二つの型の塩基対擬似体2または3は剛性の芳香族スペーサーである。これらのスペーサーを、実施例1に記載されているようにして、ループ2を置換してハンマーヘッドリボザイムのステムIIのベースに組込んだところ、触媒効率が低いリボザイムが生成することが分かった。他の擬似体は、Nielsenら、Science、254巻、1497頁、1991年に記載されているポリアミド骨格に類似の可撓性のアルキルスペーサーである（図4の6またはその誘導体6a；Zuckermanら、J.Am.Chem.Soc.、114巻、10464頁、1992年参照）。このような擬似体を使用すると、非ヌクレオチド擬似体なしのオリゴヌクレオチドを使用する場合と比べて、最終の核酸分子から約2～10個のヌクレオチドを省略することができる。

10

#### 【0037】

##### 実施例3：非ヌクレオチド擬似体の芳香族スペーサーのホスホルアミダイト2の合成

この化合物は、Salunkheら、J.Am.Chem.Soc.、114巻、6324頁、1992年に初めて報告された。その合成法は以下のように改変した。DMF（12ml）中のテレフタル酸（1.0g、6.0mmol）に、EDC（2.54g、13.2mmol）、アミノヘキサノール（1.55g、13.2mmol）およびN-メチルモルホリン（1.45ml、13.2mmol）を添加した。その反応混合物を一夜撹拌したがその時、溶液は濁っていた。その反応混合物に水を添加して生成物を沈澱させた。固形分をろ取して水で洗浄し乾燥して562mg（25.7%）のジオールを得た。

#### 【0038】

20

DMSO（40ml）中の上記ジオール（250mg、0.687mmol）に、トリエチルアミン（287μl、2.06mmol）、ジメトキシトリチルクロリド（220mg、0.653mmol）および触媒DMA-Pを添加した。その反応混合物を40℃まで加熱して一夜撹拌した。得られた混合物を室温（約20～25℃）まで冷却し、水で反応を停止させ、次いでEtOAcで3回抽出した。固体の沈澱が有機層中に残留したので、これを単離したところ出発物質のジオール（50mg、20%）であることが分かった。有機層をNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥し次に蒸発させた。得られた油状物をフラッシュクロマトグラフィー（ヘキサン中10%のEtOAc～100%EtOAc）で精製して250mg（55%）のモノトリチル化合物を得た。

#### 【0039】

0 のTHF（1ml）中の上記アルコール（193mg、0.29mmol）に、ジイソプロピルエチルアミン（101μl、0.58mmol）を添加し、次に2-シアノエチルN,N-ジイソプロピルアミノクロロホスホルアミダイト（78μl、0.35mmol）を滴下した。得られた混合物を5分間撹拌し次に室温まで昇温させた。1時間後、反応混合物の反応をメタノールで停止させ次に該混合物を蒸発させた。得られた油状物をフラッシュクロマトグラフィー（1：1ヘキサン：EtOAc）で精製して158mg（63%）のホスホルアミダイトを得た。

30

#### 【0040】

##### 実施例4：非ヌクレオチド擬似体の芳香族スペーサーホスホルアミダイト3の合成

図6に示すように、キノリン（10ml）中の3、4、9、10-ペリレンテトラカルボン酸二無水物11（1.0g、2.55mmol）に、エタノールアミン（919μl、15.3mmol）とZnOAc・2.5H<sub>2</sub>O（140mg、0.638mmol）を添加した。反応混合物を190℃で8時間加熱した。得られた溶液を冷却し、1NHClを添加して生成物を沈澱させ、次いでその混合物をろ過した。固形分を、ろ液がもはや淡緑色でなくなるまで熱10%CaCO<sub>3</sub>溶液で洗浄した。残留した鮮やかな赤色の沈澱12を乾燥した。

40

#### 【0041】

得られたジオール12を、2について先に述べたようにして処理し、ホスホルアミダイト3を得た。

#### 【0042】

##### 実施例5：非ヌクレオチド擬似体：非塩基のヌクレオチド4と5を含有するハンマーヘッドリボザイムの合成

化合物4（R=H）をIyerら、Nucleic Acids Res.、18巻、2855頁、1990年にしたがっ

50

て製造した。図 7 に示すように、化合物 4 と 5 (  $R = o - t - \text{ブチルジメチルシリル}$  ) のホスホルアミダイトを以下のようにして製造した。

#### 【 0 0 4 3 】

N , N - ジメチルホルムアミド ( 250ml ) に D - リボース ( 20.0g、0.105mol ) を溶解して得た溶液に、2 , 2 - ジメトキシプロパン ( 50ml ) と p - トルエンスルホン酸一水和物 ( 300mg ) を添加した。その反応混合物を室温で 16 時間攪拌し次いで蒸発乾固した。得られた粗生成物をピリジン (  $2 \times 150\text{ml}$  ) とともに同時蒸発させたのち乾燥ピリジン ( 300ml ) に溶解し、次に 4 , 4 - ジメトキシトリチルクロリド ( 37.2g、0.110mol ) を添加し、室温で 24 時間攪拌した。得られた反応混合物をメタノール ( 50ml ) で希釈し次いで蒸発乾固した。残留物をクロロホルム ( 800ml ) に溶解し、5 %  $\text{NaHCO}_3$  (  $2 \times 200\text{ml}$  )、食塩水 ( 300ml ) で洗浄し、乾燥し、蒸発させ、トルエン (  $2 \times 100\text{ml}$  ) とともに同時に蒸発させ次にフラッシュクロマトグラフィー (  $\text{CHCl}_3$  ) で精製して 40.7g ( 78.1% ) の化合物 a を得た。

#### 【 0 0 4 4 】

ジメトキシトリチル誘導体の ( 9.0g、18.3mmol ) と DMA P ( 4.34g、36mmol ) を乾燥  $\text{CH}_3\text{CN}$  に溶解して得た溶液に、クエノキシチオカルボニルクロリド ( 3.47g、20.1mmol ) をアルゴン雰囲気下滴下して加えた。得られた反応混合物を室温で 16 時間放置し次いで蒸発乾固した。得られた残留物をクロロホルム ( 200ml ) に溶解し、5 %  $\text{NaHCO}_3$ 、食塩水で洗浄し、乾燥し、蒸発し、次いでフラッシュクロマトグラフィー (  $\text{CHCl}_3$  ) で精製して、- アノマーとして 8.0g ( 69.5% ) の化合物 b を得た。

#### 【 0 0 4 5 】

中間体 b ( 3.0g、4.77mmol ) のトルエン ( 50ml ) 溶液に、AIBN ( 0.82g、5.0mmol ) と  $\text{Bu}_3\text{SnH}$  ( 1.74g、6.0mmol ) をアルゴン雰囲気下で添加し、その反応混合物を 80 で 7 時間保持した。その溶液を蒸発し、得られた残留物をフラッシュクロマトグラフィー (  $\text{CHCl}_3$  ) で精製して、1.5g ( 66% ) の保護されたりピトール c を得た。

#### 【 0 0 4 6 】

次にすべての保護基を酸処理によって除去し次いでトリチル化を行い保護されたりピトール d を得た。このリピトール d を、Scaringt ら、Nucleic Acids Res.、18 巻、5433 頁、1990 年に記載されている一般的な方法によって目的物のホスホルアミダイト 4 と 5 に変換した。

#### 【 0 0 4 7 】

#### 実施例 6

図 8 a と 8 b を参照して、基質の切断を、8 n M と 40 n M の濃度で各種修飾リボザイムを未修飾リボザイムと比較することによって示す。具体的に述べると、配列 ucuccA UCU GAU GAG GCC GAA AGG CCG AAA Auc ccu ( 小文字は、2' - O - メチル基を含有する ) の対照リボザイムを、リボザイム A ( ucu ccA UCU GAU GAG GCC SGG CCG AAA Auc ccu )、B ( ucu ccA UCU GAU GAG CSG CG AAA Auc ccu )、C ( ucu ccA UCU GAU GAG GCC bbb bGG CCG AAA Auc ccu )、および D ( ucu ccA UCU GAU GAG Cbb bbG CGAA AAu ccc u ) (  $S =$  ヘキサエチレングリコールリンカー；および b = 非塩基のヌクレオチド 4 ) と比較した。これらはすべて、基質を切断する活性を有していた。

#### 【 0 0 4 8 】

#### リボザイムの投与

選択されたりボザイムは例えば、イオン導入法、電気穿孔法またはイオン対分子もしくは共有結合付加物、およびその外の薬理的に承認された送達法を用いて、適切な送達ビヒクル例えばリボソーム、放出調節媒体により関連組織にリボザイムを外因的に送達することによって、ウイルス感染患者または疾病患者に予防的に投与することができる。投与経路としては、筋肉内、エアゾール、経口 ( 錠剤または丸剤の形態 )、局所、全身、眼、腹腔内および / またはくも膜下の経路がある。

#### 【 0 0 4 9 】

任意の選択されたりボザイムの特定の送達経路は、リボザイムの用途によって決まる。

一般に各リボザイムの特定の送達プログラムは、細胞内局在に関する未修飾リボザイムの取込み次いで効力の実証に集中している。あるいは、動物の臓器または組織内のこれら同じ細胞への送達を追跡してもよい。取込みの試験法としては、送達ビヒクルまたは送達法にかかわらず細胞のリボザイム取込みを評価する取込み検定法がある。このような検定法によって、取込みによるリボザイムの細胞内局在性も測定され、結局、標的配列を含有している細胞コンパートメント（細胞核および／または細胞質）内の定常状態濃度を維持するのに必要な条件が確認される。次に効力と細胞毒性を測定する。毒性は細胞生存能力のみならず細胞機能にも関連する。

#### 【 0 0 5 0 】

使用できる送達法としては以下のものがある。

- a . リボソーム内への封入
- b . レトロウイルスベクターによる形質導入
- c . コレステロールとの接合
- d . 大部分の s n R N A または核タンパク質に見られる抗原結合部位または核標的部位を利用する核コンパートメントへの局在化
- e . ヌクレオチド誘導体を用いることによるリボザイムの電荷の中和、および f . 血液幹細胞を用いて行うリボザイムの全身体への分布、である。

#### 【 0 0 5 1 】

本発明に有用な送達法には、リボザイムの修飾および粒子担体の医薬送達ビヒクルを含む。恐らく大部分が小分子の未修飾リボザイムは、ゆっくりではあるが細胞によって吸収される。細胞の取込みを増大させるため、リボザイムはその電荷を減らす特定の官能基を維持する方式で、ほとんどランダムに修飾することができる。その結果、細胞膜を横切って拡散できる分子が得られ、透過性にかかるバリエーションが除かれる。

#### 【 0 0 5 2 】

電荷を減らすために行うリボザイムの修飾は、これらの大きい分子の細胞取込みを増大する方法である。しかし上記のランダム法は、リボザイムが構造および機能の面で、小さい医薬分子より複雑なので得策ではない。リボザイムの触媒活性を維持するのに必要な構造上の必要条件は当該技術分野の当業者は充分理解していることである。これらの必要条件は、細胞送達を強化するために修飾を計画するときに考慮される。この修飾は、ヌクレアーゼによる分解に対する感受性を低下させるためにも計画される。これら両者の特徴はリボザイムの効力を大きく改善するはずである。細胞の取込みは、リボザイムの切断活性のために必要なホスホジエステル結合を変える必要なしでいく桁も増大させることができる。

#### 【 0 0 5 3 】

ホスフェートの骨格の化学的修飾で、負の電荷が減少し、膜を横切って自由に拡散できるようになる。この原理は、アンチセンス D N A 法について実証され成功している。D N A と R N A とは化学的組成が類似しているので、この方法は便利な方法である。体内では、修飾リボザイムを組織の細胞中に拡散させるには外部の濃度（external concentration）を維持することが必要である。疾患組織が一過性高濃度の医薬に暴露され、その医薬が全身吸収によってゆっくり分散される投与経路が好ましい。リボザイムの循環半減期を増大するために計画された医薬担体とともに静脈内投与する方法も利用できる。医薬担体の大きさと組成によって、血液流からの迅速なクリアランス（clearance）が制限される。感染部位に蓄積するように製造された担体は、リボザイムを分解プロセスから保護することができる。

#### 【 0 0 5 4 】

医薬送達ビヒクルは全身投与と局所投与の両者に対して有効である。これらの媒体は、除放用容器として働くようにまたはその内容物を標的細胞に直接送達するように設計することができる。直接伝達医薬媒体を用いる利点は、1回の取込み当たり多数の分子が送達されることである。このような媒体は、他の方法では血液流から速やかに除去される医薬の循環半減期を増大させることができることが示されている。この範疇に入るかような特

10

20

30

40

50

別の医薬送達ビヒクルの例としては、リポソーム類、ヒドロゲル類、シクロデキストリン類、生分解性ナノカプセル類および生物接着性ミクロスフェア (bioadhesive microsphere) 類がある。

【 0 0 5 5 】

この範疇の送達系のうちリポソームが好ましい。リポソームは細胞内安定性を増大し、取込み効率を高め、そして生物活性を改善する。

【 0 0 5 6 】

リポソームは、細胞膜を構成している脂質と類似の方式で配列された脂質で構成された中空の球状媒体である。リポソームは、水溶性化合物を保有する内部水性空間を有し、大きさは直径が0.05～数ミクロンの範囲にある大きさである。いくつかの試験の結果、リポソームはRNAを細胞に送達することができかつそのRNAは生物活性を保有したままであることが分かった。

10

【 0 0 5 7 】

例えば、研究用具として最初設計されたリポソーム送達ビヒクルのリポフェクチン (Lipofectin) は、無傷のmRNA分子を細胞に送達して対応するタンパク質を産生させ得ることが分かった。他の試験では、長さが3500ヌクレオチドでかつHIVの構造タンパク質に対してアンチセンスのRNA分子を含有する抗体標的 (antibody targeted) リポソーム伝達系は、配列特異的にウイルスの増殖を阻害した。その抗体はリポソームを目標の感染細胞に向けたのみならず、感染細胞によるリポソームのインターナリゼーションをトリガーした。エンドサイトーシスをトリガーすることはウイルスを阻害するのに有用である。最終的に、リポソームで送達された合成のリボザイムは、H9細胞 (HIV感受性細胞の一例) の核に集中して機能することが分かり、それらリボザイムが配列を細胞内で切断することが実証された。一層小さいリボザイム (長さが142個未満のヌクレオチド) を用いて他の細胞型にリポソームで伝達すると、異なる細胞内局在を示す。

20

【 0 0 5 8 】

リポソームはいくつもの利点を提供する。すなわちリポソームは組成が非毒性でかつ生物分解性であり；リポソームは長い循環半減期を示し；そして認識分子をその表面に容易に結合して、組織をターゲティングすることができる。最終的に、液体懸濁物または凍結乾燥物の製品のリポソームベース医薬をコスト面で効率的に製造できたので、この方法が容認可能な医薬伝達系として実施できることが実証された。

30

【 0 0 5 9 】

ナノカプセルおよびヒドロゲルのような他の徐放性医薬送達系をリボザイムの送達ビヒクルとして用いてもよい。これらの担体は化学療法剤およびタンパク質ベースの医薬用に開発されたものであるので、リボザイムの送達に適応させることができる。

【 0 0 6 0 】

リボザイムの局所投与は、投与部位に濃度が局在して全身吸収が最少になるので有利である。このことから疾患部位に対するリボザイムの送達法が簡単になり、毒性の程度が低下する。さらに、塗布すべき物質の量が他の投与経路の場合に必要な量よりはるかに少ない。有効な送達を行うにはリボザイムが感染細胞中に拡散する必要がある。負の電荷を中和するためリボザイムを化学的に中和することが浸透させるのに必要である。しかし、電荷の中和が不十分な場合、修飾リボザイムを、アゾン (Azon) またはオレイン酸のような浸透エンハンサーをリポソーム中に混合して調合してもよい。リポソームが、修飾リボザイムと浸透エンハンサーがリポソームから感染細胞中に移動する場合に除放性を与える媒体であるか、または、リポソームのリン脂質が、修飾リボザイムと浸透エンハンサーの細胞への送達を容易にすることとに直接参画する。場合によっては、リボザイムと浸透エンハンサーの両者を、除放性を付与するため坐剤に配合してもよい。

40

【 0 0 6 1 】

またリボザイムは全身投与を行ってもよい。全身吸収とは、薬剤が血流中に蓄積され次いで全身に分布されることを意味する。全身吸収をもたらす投与経路としては、静脈内、皮下、腹腔内、鼻腔内、くも膜下および眼の経路がある。これらの各投与経路によって、

50

接近可能な疾患組織がリボザイムに対して暴露される。皮下投与の場合は局在リンパ節に注入されそこからリンパネットワークを通じて循環が行われる。循環系に入る速度は分子量または大きさの関数であることが示されている。リボソームなどの医薬担体を使用すると、リボザイムはリンパ節に局在する。そのリボザイムは細胞中に拡散するよう修飾することができ、または未修飾リボザイムまたは修飾リボザイムを細胞中に送達するのにリボソームは直接参画することができる。この方法は、抗HIVリボザイムを用いてAIDSを治療するのに特に有用である。

#### 【0062】

AIDS療法に好ましいのは、オリゴヌクレオチドをリンパ球とマクロファージに送達できるリボソーム配合物を使用することである。このオリゴヌクレオチド送達系は、感染した一次免疫細胞内でHIVの増殖を阻害する。この配合物は37℃にて8時間後に、90%のリンパ球が吸収することを全血の試験結果が示している。生体分布(biodistribution)および薬物動態学の予備試験では、静脈内投与を行ってから1時間後に、脾臓組織の1g当たり注射された投与量の70%が脾臓で得られた。この配合物は、二つの理由から、抗AIDSリボザイムに用いる優れた送達ビヒクルを提供する。第一に、Tヘルパーリンパ球とマクロファージがウイルスに感染した一次細胞であり、そして第二に皮下投与によって、リボザイムが、リンパ節内に常在しているHIVに感染したリンパ球とマクロファージに送達される。リボソームはリンパ系を出て循環系に入り、次いで脾臓内に蓄積され、脾臓内でリボザイムが、常在しているリンパ球とマクロファージに送達される。

#### 【0063】

腹腔内投与の場合もやはり循環系に入り、リボザイム送達ビヒクルの複合体の分子量または大きさが循環系に入る速度を制御している。

静脈内に注射されたリボソームは、肝臓、肺および脾臓への蓄積を示す。その組成と大きさを調節して、注射投与量の30~40%が蓄積されるようにすることができる。残りの投与量は血流中を24時間まで循環する。

#### 【0064】

選択される送達方法は、感染細胞中の細胞質への蓄積が行われねばならずかつ分子は最適の投与を行うためある種のヌクレアーゼ耐性を有していなければならない。核への送達も利用できるが余り好ましくない。最も好ましい送達法としては、リボソーム(10~400nm)、ヒドロゲル、放出制御ポリマー、マイクロインジェクションもしくは電気穿孔法(エキソビポ処置の場合に用いる)およびその外の薬学的に許容される媒体が挙げられる。投与量は疾患の症状と投与経路によって決まるが、体重1kg当たり1日に100~200mgである。治療期間は、疾患の症状の過程によって定まり、通常少なくとも14~16日間、可能であれば連続して行う。局所投与、眼への投与および腔への投与の場合、毎日複数回投与することが考えられる。その投与回数は、疾患送達ビヒクルおよび臨床試験による効力のデータによって決まる。

#### 【0065】

リボザイムの細胞内治療濃度は、取込みと分解の速度によって決定される。分解度が低下するとリボザイムの細胞内半減期が延長される。したがって、化学的に修飾されたリボザイム、例えばホスフェート骨格の修飾またはリボザイムの5'と3'の末端のヌクレオチド類似体によるキャッピングを行ったリボザイムでは異なる投与量を投与する必要がある。有用な系の説明は上記技術中に提供されているが、これらはすべて本明細書に援用するものである。

#### 【0066】

リボザイムの設計に関するさらに詳細な説明については1993年8月6日付けで出願されたDraperの米国特許願第08/103,243号を参照のこと。なおこの文献はすべて本明細書に援用するものである。

その外の実施態様は後記の特許請求の範囲に含まれている。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0067】

10

20

30

40

50

【図 1】図 1 は当該技術分野で公知のハンマーヘッドリボザイム領域の線図である。

【図 2】図 2 は当該技術分野で公知のヘアピンリボザイム領域の一般構造の線図である。

【図 3】図 3 は当該技術分野で公知の肝炎デルタウイルスリボザイム領域の一般構造の線図である。

【図 4】図 4 は核酸酵素に組込むことができる各種の非ヌクレオチド擬似体（ミメティック）の線図である。

【図 5】図 5 は各種の非ヌクレオチド擬似体（ミメティック）と核酸酵素に組込むのに好ましい位置を示す線図である。

【図 6】図 6 はペリレンベースの非ヌクレオチド擬似体のホスホルアミダイト 3 の合成を示す線図である。

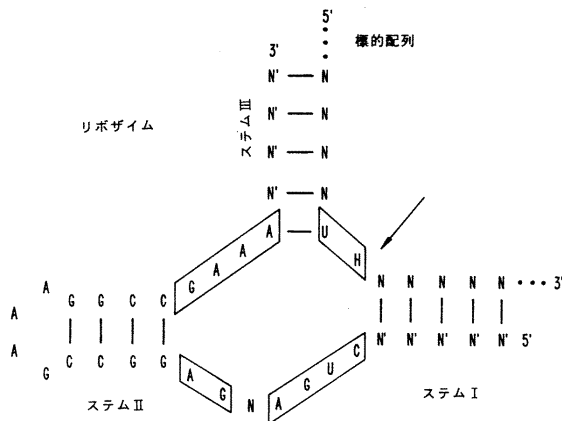
【図 7】図 7 は非塩基のデオキシリボースまたはリボースの非ヌクレオチド擬似体ホスホルアミダイトの合成を示す線図である。

【図 8】図 8 - a と 8 - b はそれぞれ、8 n M または 4 0 n M の各種リボザイムによる基質の切断を示す線図である。

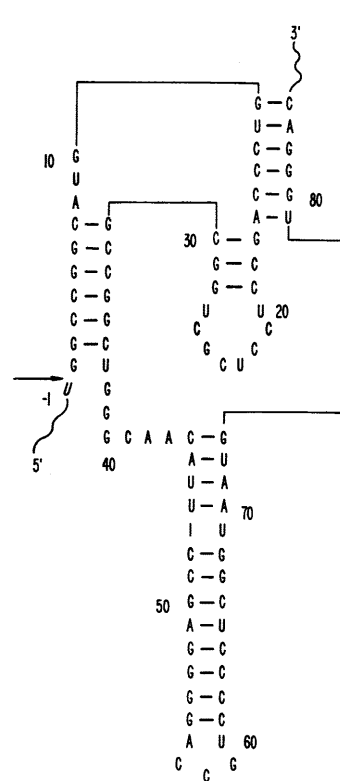
【図 9】図 9 - a から 9 - e は配列を示す図である。

10

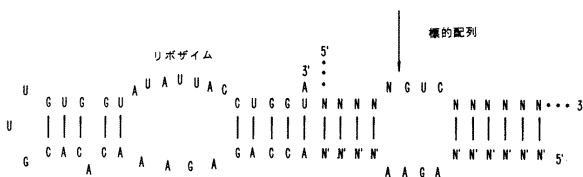
【図 1】



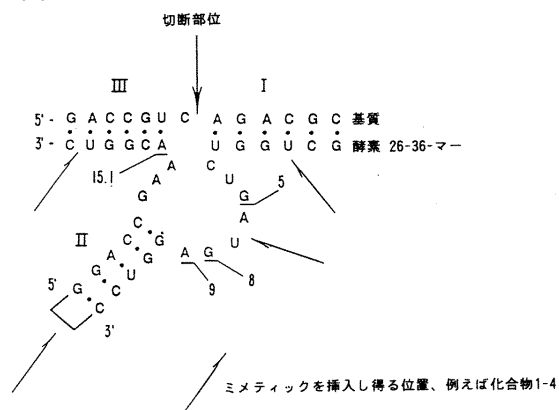
【図 3】



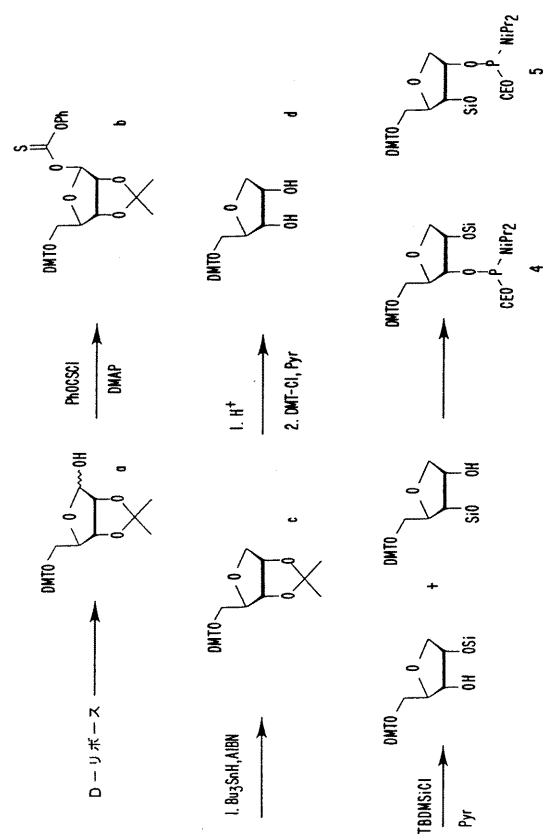
【図 2】



【 図 5 】

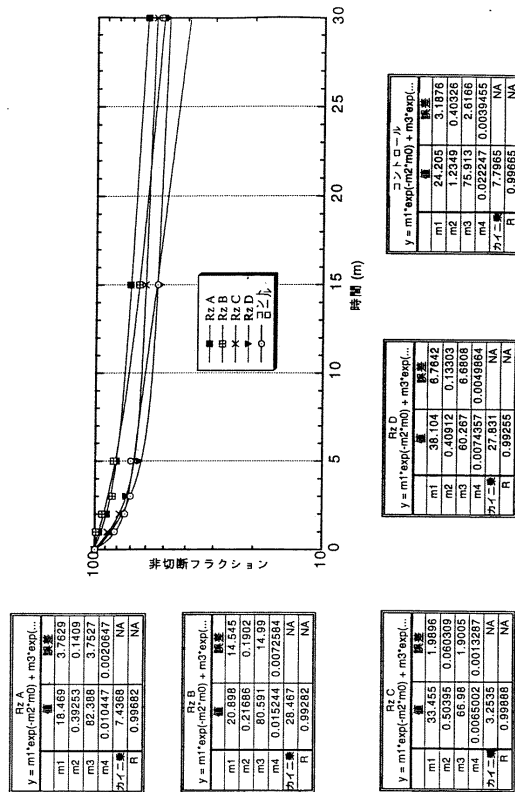


【圖 7】

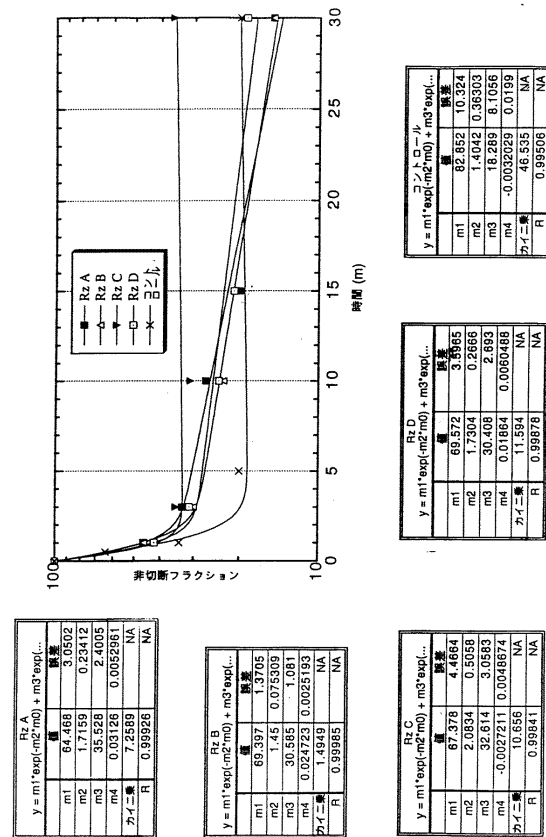




【図 8 - a】



【図 8 - b】



【図 9 - a】

配列表

## 一般情報

出願人：ナッシュ・ウスマン、フランシス・イー・ウィンコット、ジェセンカ・マチュリク・アダミク、レオニド・バイゲルマン

発明の名称：非ヌクレオチド含有酵素性核酸

配列の数：5

通知送付先：

受取人：リヨン・アンド・リヨン

住所：611 ウェスト 6 番街

都市名：ロスアンゼルス

州名：カリフォルニア

国名：アメリカ合衆国

郵便番号 (zip)：90017

コンピュータが呼出し可能なフォーム：

媒体の種類：3.5" ディスケット、1.44Mb 記憶

コンピュータ：IBN コンパチブル

オペレーティングシステム：IBM P. C. DOS (Version 5.0)

ソフトウェア：Word Perfect (Version 5.1)

原出願のデータ：

原出願には、合計 2 件の下記出願が含まれている。

(A) 出願番号：08/152,488

(B) 出願日：1993年11月12日

(A) 出願番号：08/116,177

(B) 出願日：1993年9月2日

代理人の情報：

氏名：ウォーバーグ・リチャード・ジェイ

登録番号：32,327

名簿番号：206/267

【図 9 - b】

(2) 配列番号： 1：

(i) 配列の性質：

- (A) 長さ： 11  
 (B) 型： 核酸  
 (C) 鎖の数： 一本鎖  
 (D) トポロジー： 直鎖状

(ix) 配列の特徴：

- (D) 他の情報： 「N」はいずれの塩基でもよい。  
 「H」は C 又は A 若しくは U を示す。

(ii) 配列： 配列番号： 1：

NNNNNUHNNNN N

11

(2) 配列番号： 2：

(i) 配列の性質：

- (A) 長さ： 32  
 (B) 型： 核酸  
 (C) 鎖の数： 一本鎖  
 (D) トポロジー： 直鎖状

(ix) 配列の特徴：

- (D) 他の情報： 「N」はいずれの塩基でもよい。

(ii) 配列： 配列番号： 2：

NNNNNCUGAN GAGGCCGAAA GGCCGAAANN NN

32

## 【図 9 - c】

(2)配列番号: 3:

(i)配列の性質:

(A)長さ: 14  
(B)型: 核酸  
(C)鎖の数: 一本鎖  
(D)トポロジー: 直鎖状

(ix)配列の特徴:

(D)他の情報: 「N」はいずれの塩基でもよい。

(ii)配列: 配列番号: 3:

NNNNNGUCNN NNNN

14

(2)配列番号: 4:

(i)配列の性質:

(A)長さ: 50  
(B)型: 核酸  
(C)鎖の数: 一本鎖  
(D)トポロジー: 直鎖状

(ix)配列の特徴:

(D)他の情報: 「N」はいずれの塩基でもよい。

(ii)配列: 配列番号: 4:

NNNNNNAGAA NNNNACCAGA GAAACACACG UUGUGGUAUA UUACCCUGUA

50

## 【図 9 - d】

(2)配列番号: 5:

(i)配列の性質:

(A)長さ: 85  
(B)型: 核酸  
(C)鎖の数: 一本鎖  
(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列: 配列番号: 5:

UGGCCGGCAU GGUCCAGCC UCCUCGCGG CGCCGGCUGG GCAACAUUCC

50

GAGGGGACCG UCCCCCGGU AAUGGCGAAU GGGAC

85

(2)配列番号: 6:

(i)配列の性質:

(A)長さ: 36  
(B)型: 核酸  
(C)鎖の数: 一本鎖  
(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列: 配列番号: 6:

UCUCCAUCUG AUGAGGCCGA AAGGCCGAAA AUCCCU

36

(2)配列番号: 7:

(i)配列の性質:

(A)長さ: 33  
(B)型: 核酸  
(C)鎖の数: 一本鎖  
(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列: 配列番号: 7:

UCUCCAUCUG AUGAGGCCG GCGAAAAAUC CCU

33

## 【図 9 - e】

(2)配列番号: 8:

(i)配列の性質:

(A)長さ: 29  
(B)型: 核酸  
(C)鎖の数: 一本鎖  
(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列: 配列番号: 8:

UCUCCAUCUG AUGAGCGCG AAAAUCCCU

29

(2)配列番号: 9:

(i)配列の性質:

(A)長さ: 36  
(B)型: 核酸  
(C)鎖の数: 一本鎖  
(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列: 配列番号: 9:

UCUCCAUCUG AUGAGGCCBB BBGGCCGAAA AUCCCU

36

(2)配列番号: 10:

(i)配列の性質:

(A)長さ: 32  
(B)型: 核酸  
(C)鎖の数: 一本鎖  
(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列: 配列番号: 10:

UCUCCAUCUG AUGAGCBBB GCGAAAAUCC CU

32

【配列表】

0003940407000001.app

---

フロントページの続き

- (72)発明者 ナッシム・アスマン  
アメリカ合衆国 8 0 3 0 4 コロラド、ボウルダー、カルミア・ナンバー 3 7、2 9 5 4 番
- (72)発明者 フランシン・イー・ウィンコット  
アメリカ合衆国 8 0 5 0 1 コロラド、ロングモント、エヌ・ナインティーフィフス・ストリート 7  
9 2 0 番
- (72)発明者 ジェセンカ・マチュリク - アダミク  
アメリカ合衆国 8 0 3 0 3 コロラド、ボウルダー、サウス・フォーティセカンド・ストリート 7 6  
0 番
- (72)発明者 レオニド・ベイゲルマン  
アメリカ合衆国 8 0 5 0 3 コロラド、ロングモント、コルト・ドライブ 5 5 3 0 番

審査官 光本 美奈子

- (56)参考文献 Nucleic Acids Res 18(10) p.2855-2859 (1990)  
Nucleic Acids Res 12(19) p.7435-7453 (1984)  
Science, 1 9 9 1 年, 253(5017), 314-317  
Chemical Reviews, 1 9 9 0 年, 90(4), 543-584  
J Org Chem 61 p.3909-3911 (1996)  
Proc Natl Acad Sci USA 89 p.918-921 (1992)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0  
C 1 2 N 9 / 0 0