

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3766592号

(P3766592)

(45) 発行日 平成18年4月12日(2006.4.12)

(24) 登録日 平成18年2月3日(2006.2.3)

(51) Int. Cl. F I  
**C 1 2 N 15/09 (2006.01)** C 1 2 N 15/00 Z N A A  
**C O 7 H 21/00 (2006.01)** C O 7 H 21/00

請求項の数 3 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2000-530600 (P2000-530600)	(73) 特許権者	500361537
(86) (22) 出願日	平成11年2月3日(1999.2.3)		メチルジーン・インコーポレーテッド
(65) 公表番号	特表2002-502602 (P2002-502602A)		カナダ国ケベック エイチ4エス 2エイ
(43) 公表日	平成14年1月29日(2002.1.29)		1, サンローラン, フレデリック・バンテ
(86) 国際出願番号	PCT/CA1999/000092		イング 7220
(87) 国際公開番号	W01999/040186	(74) 代理人	100089705
(87) 国際公開日	平成11年8月12日(1999.8.12)		弁理士 社本 一夫
審査請求日	平成14年12月25日(2002.12.25)	(74) 代理人	100076691
(31) 優先権主張番号	09/018,034		弁理士 増井 忠武
(32) 優先日	平成10年2月3日(1998.2.3)	(74) 代理人	100075270
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 小林 泰
前置審査		(74) 代理人	100080137
			弁理士 千葉 昭男
		(74) 代理人	100096013
			弁理士 富田 博行

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 DNAメチルトランスフェラーゼ配列と相補的な最適化アンチセンスオリゴヌクレオチド

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

DNA MeTaseをコードしているRNAまたは二本鎖DNAの核酸配列と相補的で、DNAメチルトランスフェラーゼ遺伝子発現を阻害する、配列番号：8 (CCAGGTAGCC CTCCTCGGAT)、配列番号：9 (AAGCATGAGC ACCGTTCTCC)、配列番号：10 (TTCATGTCAG CCAAGGCCAC)、配列番号：11 (CGAACCTCAC ACAACAGCTT)、配列番号：12 (GATAAGCGAA CCTCACACAA)、配列番号：13 (CCAAGGCCACA AACACCAATG)、配列番号：15 (CCAGGTAGCC CTCCTCGGAU)、配列番号：16 (AAGCATGAGC ACCGTTTCUCC)、配列番号：17 (UUCATGTCAG CCAAGGCCAC)、配列番号：18 (CGAACCTCAC ACAACAGCUU)、配列番号：19 (GAUAAGCGAA CTCACACAA)、及び配列番号：20 (CCAAGGCCACA AACACCAUG) からなる群から選択されるアンチセンスオリゴヌクレオチド。

## 【請求項2】

オリゴヌクレオチドがホスホロチオエート、ホスホジエステルまたはホスホロジチオエート領域およびアルキルホスホネートまたはアルキルホスホチオエート領域から成るキメラオリゴヌクレオチドである請求項1に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

## 【請求項3】

オリゴヌクレオチドがリボヌクレオチドまたは2'-O-置換リボヌクレオチド領域お

よびデオキシリボヌクレオチド領域を含む請求項 1 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

【0001】

#### 技術分野

本発明は遺伝子発現の調節に関し、特に、本発明はDNAメチルトランスフェラーゼをコードしている遺伝子発現の調節、および酵素DNAメチルトランスフェラーゼにより制御されている遺伝子発現の調節に関する。

【0002】

#### 背景技術

遺伝子発現の調節は、種々の細胞過程およびそれらの基礎をなす生化学的経路を理解するためにますます重要になってきている。その理解は科学的知識を豊富にし、そのような経路のどのような異常が重度の疾患状態を導くことができるかについての新しい発見をもたらす手助けとなる。究極的には、そのような発見はこれらの疾患の有効な治療処置の開発を導くことができる。

【0003】

特に興味を持たれる細胞過程の一つの型は、どのように細胞が遺伝子の発現を制御しているのであろうかということである。異常遺伝子発現は広範囲の遺伝的遺伝子疾患に関係しているようであり、また多数の癌およびその他の疾患に関係しているとされている。遺伝子発現の制御は複雑な過程であり、この過程の多くの様相はまだ解っていない。この過程の一つの謎は、多細胞生物体を構成しているすべての組織中で遺伝情報が同一であるにもかかわらず、ゲノムによりコードされている機能の発現は異なった組織で著しく変化するという事実から生じている。

【0004】

いくつかの事例において、組織特異的転写因子がこの現象において一つの役割を果たしていることが知られている。(Maniatis et al., *Science* 236: 1237 - 1245 (1987); Ingarham et al., *Annual Review of Physiology* 52: 773 - 791 (1990)を参照されたい)。しかしながら、転写因子の作用単独では容易に説明できないいくつかの重要な事例が存在する。例えば、Midgeon, *Trends Genet* 10: 230 - 235 (1994)はX不活性化において、不活性X染色体上にある遺伝子の対立遺伝子は不活性化されるが、活性X染色体上の対立遺伝子は引き続けて発現されることを示している。さらに、Peterson and Sapienza, *Annu. Rev. Genet.* 27: 7 - 31 (1993)は、一方の親から遺伝した遺伝子の対立遺伝子は活性であるが、他方の親から遺伝した他の対立遺伝子は不活性である”親刷り込み”について記載している。これらの事例の両方において、両方の対立遺伝子は同一の転写因子を含んでいる環境下に存在するが、一つの遺伝子は発現され、他方は発現されない。従って、転写因子以外のなにかがこれらの現象に関与していなければならない。

【0005】

研究者達はゲノム発現パターンのこの追加の調節にどのような型の”後成的情報”が含まれているのであろうかについて探査してきた。Holliday, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 326: 329 - 338 (1990)はそのような後成的遺伝におけるDNAメチル化が果たす役割の可能性を議論している。DNAは、遺伝子配列にはコードされていないが異なった酵素装置を使用してDNAへ共有結合的に付加されている修飾の組を含んでいる。これらの修飾はCpGジヌクレオチド中のシトシン塩基の5位にメチル化する形をとる。そのようなメチル化はかなり遺伝子発現の制御に関係しているであろうことを多くの研究が示唆しているが、その正確な役割はつかみどころのないものとして未だに解っていない。例えば、Lock et al., *Cell* 48: 39 - 46 (1987)は過度のメチル化およびX不活性化のタイミングがメチル化の原因となる役割と一致しているかどうかについての疑問を投げかけて

10

20

30

40

50

いる。同様に、Bartolomei et al., *Genes Dev.* 7: 1663 - 1673 (1993) および Brandeis et al., *EMBO J.* 12: 3669 - 3677 (1993) は親刷り込みにおけるメチル化の役割に対するタイミング/原因問題を記載している。

【0006】

現存する、遺伝子発現におけるDNAメチル化の役割研究のいくつかの短所は、研究を実施するために現在利用できる手段に起因している。多くの研究はDNAメチル化を阻害するために5-azacを利用してきた。しかしながら、5-azacはDNAメチル化以外の細胞機構に多様な影響を与えるヌクレオシド類似体であり、これらの研究から得られたデータを説明するのを困難にしている。同様に、5-azadCはDNA内への組込みにより仕組みに基づいた阻害剤を形成するが、DNAメチルトランスフェラーゼ(以後、DNA MeTase)の捕捉を起こすことができ、データ説明を曖昧にするであろう毒性を生じる。

10

【0007】

最近Szyf et al., *J. Biol. Chem.* 267: 12831 - 12836 (1995) は癌細胞でのメチル化の影響を研究するためにDNA MeTase遺伝子に相補的なアンチセンスRNAの発現を使用したより見込みのある方法を記載している。Szyfおよびvon Hofe、米国特許第5,578,716号は腫瘍発生を阻害するため、DNA MeTase遺伝子に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用を開示している。これらの進展は多くの細胞過程におけるメチル化の役割を探索するための強力な新規手段を提供した。加えて、これらはDNAメチル化を調節できる治療化合物を開発するための将来有望な新しい方法を提供した。これらの方法の約束事ではDNAメチルトランスフェラーゼ遺伝子発現の阻害に最適の活性を持つ、DNAメチルトランスフェラーゼ配列と相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチド開発の重要性が強調されている。従って、そのような最適化されたアンチセンスオリゴヌクレオチドが必要とされている。

20

【0008】

発明の開示

発明の要約

本発明はDNAメチルトランスフェラーゼ遺伝子発現の阻害に最適の活性を持つ、DNAメチルトランスフェラーゼ配列と相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。ある態様において、最適化されたアンチセンスオリゴヌクレオチドは驚くほど高い効能を提供する核酸配列を持っていることにより特徴付けられる。これらの態様のいくつかにおいて、本発明の最適化されたアンチセンスオリゴヌクレオチドはそれらの効能をさらに増加させる他と全く別な化学修飾を持っていることによりさらに特徴付けられる。最後に、本発明は分析および診断手段として、トランスジェニック植物および動物研究および遺伝子治療法の増強剤として、および可能性のある治療剤としてそのようなアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用するための方法を提供する。

30

【0009】

第一の態様において、本発明はこれまで知られているオリゴヌクレオチドよりも低い濃度レベルのオリゴヌクレオチドでDNA MeTaseの遺伝子発現を阻害する新規最適化アンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。そのようなアンチセンスオリゴヌクレオチドはDNA MeTaseをコードしているRNAまたは二本鎖DNAの核酸配列と相補的である。好適には、そのようなアンチセンスオリゴヌクレオチドは一つまたはそれ以上の修飾ヌクレオシド内結合を含んでおり、随意にデオキシリボヌクレオシド、リボヌクレオシド、2'-O-置換リボヌクレオシドまたはそれらの任意の組み合わせを含んでいてもよい。本発明のこの態様に従った特に好適なアンチセンスオリゴヌクレオチドはキメラオリゴヌクレオチドおよびハイブリッドオリゴヌクレオチドを含んでいる。

40

【0010】

第二の態様において、本発明は腫瘍細胞の増殖を含んだ細胞増殖におけるDNA MeT

50

a s eの役割を調べるための方法を提供する。本発明のこの態様に従った方法においては、問題とする細胞型を本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドと接触させ、細胞中のDNA Me T a s eの発現阻害を生じさせる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは問題とする細胞型の増殖におけるDNA Me T a s eの役割を決定するため、細胞周期の異なった時点で、または細胞増殖の促進剤または阻害剤と関連させて投与できる。

#### 【0011】

第三の態様において、本発明は、ヒトを含む哺乳類に本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与することから成る腫瘍増殖を阻害するための方法を提供する。本発明のこの態様に従った方法においては、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドの治療的有効量が、その体に腫瘍細胞が存在するヒトを含む哺乳類に治療的に有効な期間投与される。

10

#### 【0012】

##### 発明の詳細な説明

本発明は遺伝子発現の調節に関する。特に、本発明はDNAメチルトランスフェラーゼ(DNA Me T a s e)をコードしている遺伝子発現の調節、および酵素DNA Me T a s eにより制御されている遺伝子発現の調節に関する。本明細書で示されている特許および出版物は本分野の当業者には知られており、本明細書において援用される。

#### 【0013】

本発明は、DNAメチルトランスフェラーゼ遺伝子発現の阻害において最適な活性を持つ、最適な標的DNA Me T a s eに相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。ある態様において、最適化されたアンチセンスオリゴヌクレオチドは驚くほど高い効能を提供する核酸配列を持っていることにより特徴付けられる。これらの態様のいくつかにおいて、本発明の最適化されたアンチセンスオリゴヌクレオチドはそれらの効能をさらに増加させる他と全く別な化学修飾を持っていることによりさらに特徴付けられる。最後に、本発明は分析および診断手段として、トランスジェニック植物および動物研究および遺伝子治療法の増強剤として、および可能性のある治療剤としてそのようなアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用するための方法を提供する。

20

#### 【0014】

第一の態様において、本発明は最適化アンチセンスオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションの好適な標的として使用されるべき最適な標的DNA Me T a s eヌクレオチド配列を提供する。分子内塩基対形成は配列を隔離することに重要な役割を果たしており、アンチセンス活性に必須な分子内対形成を防止している。アンチセンスオリゴヌクレオチドおよび標的配列間の二重鎖形成はヌクレーションの部位として適した接触可能構造を提供し、従って不對塩基を持っている領域に制限されている。二重鎖形成はヌクレーション部位から"ジッパー形成"過程により進行し、この過程がエネルギー障壁に出会った時点で停止するであろう。そのような障壁には例えば、ステム末端または折り畳まれたRNAにおける急カーブが含まれるであろう。従って、アンチセンスへの標的配列の相互作用感受性は配列の一部分と別の部分で非常に変化し、ヘテロ二重鎖へ組み立てられる可能性のある特異的配列へ直接的に関係している。

30

#### 【0015】

特定の理論に縛り付けるわけではないが、発明者の努力により二重鎖形成に開かれているDNA Me T a s e配列の同定が導びかれたと信じられる。

40

最適化されたアンチセンスオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションの好適な標的として使用されるべき最適標的DNA Me T a s eヌクレオチド配列の例は図1に示されている。追加の最適DNA Me T a s eヌクレオチド配列は、図1に示された標的配列と少なくとも一つのヌクレオチド重複を含む配列を持っている。

#### 【0016】

本発明の第一の態様はまたDNA Me T a s e遺伝子発現を阻害する新規最適化アンチセンスオリゴヌクレオチドも提供する。そのようなアンチセンスオリゴヌクレオチドはDNA Me T a s e(好適にはヒトDNA Me T a s e)をコードしているRNAまたは二本鎖DNAの最適標的核酸配列と相補的であり、100 nM未満、好適には90 nM

50

またはそれ未満、より好適には80 nMまたはそれ未満、さらにより好適には70 nMまたはそれ未満、さらにより好適には60 nMまたはそれ未満、および最も好適には50 nMまたはそれ未満のIC<sub>50</sub>でDNAメチルトランスフェラーゼ遺伝子発現を阻害するその能力で特徴付けられる。好適には、そのような阻害はインビトロでA549ヒト肺癌細胞におけるDNAメチルトランスフェラーゼmRNAのレベルを決定することにより測定される。本発明の目的のためには、“相補的”とはゲノム領域、遺伝子またはそれらのRNA転写体である最適標的DNA MeTaseヌクレオチド配列へ生理学的条件下でハイブリダイズする能力を持つのに十分に相補的であることを意味している。そのようなハイブリダイゼーションは通常相補鎖間の塩基特異的水素結合（好適にはワトソン-クリックまたはフーグスティーン塩基対を形成するものであるが、他の様式の水素結合、ならびに塩基の積み重ねもまたハイブリダイゼーションを導くことができる）の結果である。本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドはハイブリダイゼーションできる一つまたはそれ以上の修飾塩基を含んでいてもよい。本明細書で使用される場合、用語“修飾塩基”とは5つの伝統的窒素性塩基：アデニン、チミン、グアニン、ウリジンおよびシトシン以外の塩基を意味している。そのような修飾塩基は相補的な伝統的塩基または修飾塩基とハイブリダイゼーションできる。従って例えば、本発明に従ったアンチセンスオリゴヌクレオチドはイノシン、5-プロモシトシンまたは5-フルオロシトシン（それらの各々は標的DNA MeTase配列中のグアニン塩基とハイブリダイズできる）を含んでいてもよい。本発明に従った修飾塩基には4-アセチルシチジン、5-（カルボキシヒドロキシメチル）ウリジン、2'-O-メチルウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン、ジヒドロウリジン、2'-O-メチルプソイドウリジン、ベータ-D-ガラクトロシルキューオシン、2'-O-メチルグアノシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデノシン、1-メチルイノシン、1,2-ジメチルグアノシン、2-メチルアデノシン、2-メチルグアノシン、3-メチルシチジン、5-メチルシチジン、N6-メチルアデノシン、7-メチルグアノシン、5-メチルアミノメチルウリジン、5-メトキシアミノメチル-2-チオウリジン、ベータ-D-マンノシルキューオシン、5-メトキシカルボニルメチルウリジン、5-メトキシウリジン、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデノシン、N-（（9-ベータ-D-リボフラノシル-2-メチルチオプリン-6-イル）カルバモイル）スレオニン、N-（（9-ベータ-D-リボフラノシルプリン-6-イル）N-メチル-カルバモイル）スレオニン、ウリジン-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウリジン-5-オキシ酢酸（v）、ワイプトキシシン、プソイドウリジン、キューオシン、2-チオシチジン、5-メチル-2-チオウリジン、2-チオウリジン、4-チオウリジン、5-メチルウリジン、N-（（9-ベータ-D-リボフラノシルプリン-6-イル）カルバモイル）スレオニン、2'-O-メチル-5-メチルウリジン、2'-O-メチルウリジン、ワイプトシン、および3-（3-アミノ-3-カルボキシプロピル）ウリジン、（acp3）uが含まれるが、これらに制限されるわけではない。実際問題として、そのような相補性は前記のような特異的DNA MeTase遺伝子発現阻害の観察から推測できる。好適には、そのようなアンチセンスオリゴヌクレオチドは一つまたはそれ以上の修飾ヌクレオシド内結合を含んでおり、随意にデオキシリボヌクレオシド、リボヌクレオシドまたは2'-O-置換リボヌクレオシドまたは任意のそれらの組み合わせを含んでいてもよい。本発明のこの態様に従った特に好適なアンチセンスオリゴヌクレオチドにはキメラオリゴヌクレオチドおよびハイブリッドオリゴヌクレオチドが含まれる。

#### 【0017】

本発明の目的には、用語“オリゴヌクレオチド”は二つまたはそれ以上のデオキシリボヌクレオシド、リボヌクレオシドまたは2'-O-置換リボヌクレオシド残基または任意のそれらの組み合わせのポリマーを含んでいる。好適には、そのようなオリゴヌクレオチドは約8から約50ヌクレオシド残基、好適には約21から約50ヌクレオシド残基、より好適には約21から約35ヌクレオシド残基、最も好適には約13から約19ヌクレオシド残基を持っている。ヌクレオシド残基はお互いに任意の多数の既知のヌクレオシド内結

10

20

30

40

50

合により結合されているであろう。そのようなヌクレオシド内結合にはホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、アルキルホスホネート、アルキルホスホノチオエート、ホスホトリエステル、ホスホロアミデート、シロキサソ、カーボネート、カルボキシメチルエステル、アセトアミデート、カーバメート、チオエーテル、架橋ホスホロアミデート、架橋メチレンホスホネート、架橋ホスホロチオエートおよびスルホンヌクレオシド内結合が含まれるがこれらに制限されるわけではない。ある好適な態様において、これらのヌクレオシド内結合はホスホジエステル、ホスホトリエステル、ホスホロチオエートまたはホスホロアミデート結合またはこれらの組み合わせであろう。用語オリゴヌクレオチドはまた化学的に修飾された塩基または糖を持っているおよび/または親油性基、インターカレーティング剤、ジアミンおよびアダマンタンを含んでいる（これらに制限されるわけではない）追加の置換基を持っているポリマーも包含している。本発明の目的には、用語“2'-O-置換”とは、1-6の飽和または不飽和炭素原子を含んでいる-O-低級アルキル基、または2-6の炭素原子を持っている-O-アリールまたはアリル基でのペントース残基の2'位の置換を意味しており、ここでそのようなアルキル、アリールまたはアリル基は無置換であってもよいし、または例えば、ハロ、ヒドロキシ、トリフルオロメチル、シアノ、ニトロ、アシル、アシロキシ、アルコキシ、カルボキシル、カルボアルコキシまたはアミノ基で置換されていてもよく；またはそのような2'置換ではヒドロキシ基（リボヌクレオシドを生成するため）、アミノまたはハロ基で置換されてもよいが、2'-H基では置換されていない。

10

#### 【0018】

本発明のDNA MetaseをコードするRNAまたは二本鎖DNAに相補的な最適化アンチセンスオリゴヌクレオチドの好適な非制限的例は図2に示されている。追加の好適なオリゴヌクレオチドは、図2に示されたヌクレオチド配列を含む約21から約35のヌクレオチド配列を持っている。さらに追加の好適なオリゴヌクレオチドは、図2に示されたヌクレオチド配列の約13から約19ヌクレオチドのヌクレオチド配列を持っている。

20

#### 【0019】

本発明のこの態様に従った特に好適なアンチセンスオリゴヌクレオチドにはキメラオリゴヌクレオチドおよびハイブリッドオリゴヌクレオチドが含まれる。

本発明の目的には、“キメラオリゴヌクレオチド”とは一つの型以上のヌクレオシド内結合を持っているオリゴヌクレオチドを指している。そのようなキメラオリゴヌクレオチドの一つの好適な例は、ホスホロチオエート、ホスホジエステルまたはホスホロジチオエート領域（好適には約2から約12のヌクレオチド）およびアルキルホスホネートまたはアルキルホスホノチオエート領域を含んでいるキメラオリゴヌクレオチドである。好適には、そのようなキメラオリゴヌクレオチドはホスホジエステルおよびホスホロチオエート結合またはそれらの組み合わせから選択される少なくとも3つの連続的なヌクレオシド内結合を含んでいる。

30

#### 【0020】

本発明の目的には、“ハイブリッドオリゴヌクレオチド”とは1つの型以上のヌクレオシドを持っているオリゴヌクレオチドを指している。そのようなハイブリッドオリゴヌクレオチドの1つの好適な態様はリボヌクレオチドまたは2'-O-置換リボヌクレオチド領域（好適には約2から約12の2'-O-置換ヌクレオチド）およびデオキシリボヌクレオチド領域を含んでいる。好適には、そのようなハイブリッドオリゴヌクレオチドは少なくとも3つの連続したデオキシリボヌクレオシドを含んでいるであろうし、また、リボヌクレオチド、2'-O-置換リボヌクレオチドまたはそれらの組み合わせも含んでいるであろう。好適な態様において、デオキシヌクレオチド領域の両わきには2'-O-置換領域が隣接している。1つの特に好適な態様において、2'-O-置換領域は2'-O-メチル領域であり、最も好適には4つの2'-O-メチルヌクレオチドを持っている。ある好適な態様において、オリゴヌクレオチドの全主鎖はホスホロチオエート主鎖である。本発明に従ったハイブリッドオリゴヌクレオチドの優位性は本明細書の後の部分で示されている。

40

50

## 【0021】

本発明に従ったアンチセンスオリゴヌクレオチドの厳格なヌクレオチド配列および化学構造は、オリゴヌクレオチドが本明細書に記載したような高レベルの効率でDNA MeTase発現を阻害する能力を保持している限り変化しうる。このことは特定のアンチセンスオリゴヌクレオチドがDNA MeTase mRNAアッセイ、DNA MeTase酵素アッセイ、軟寒天増殖アッセイ、またはインビボ腫瘍増殖アッセイ（これらはすべて本明細書において詳細に説明されている）において活性であるかどうかを試験することにより容易に決定される。

## 【0022】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドはH-ホスホネート化学、ホスホロアミダイト化学またはH-ホスホネート化学およびホスホロアミダイト化学の組み合わせ（即ち、いくつかのサイクルに対してH-ホスホネート化学および他のサイクルに対してホスホロアミダイト化学）を含むよく知られた化学合成法を使用して、適した固体支持体上で都合よく合成される。適した固体支持体には制御された孔を持つガラス（CPG）のような固相オリゴヌクレオチド合成に使用される標準固体支持体が含まれる（例えば、Pon, Methods in Molec. Biol. 20:465(1993)を参照されたい）。

## 【0023】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは種々の目的に有用である。例えば、実験的細胞培養または動物システムにおいてDNAメチルトランスフェラーゼの活性を阻害し、そのようなDNA MeTase活性を阻害する効果を評価することに使用することにより、DNA MeTaseの生理学的機能の”プローブ”として使用できる。このことは本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを細胞または動物に投与し、表現型の影響を観察することにより達成される。この使用において、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、使用がより容易でありおよび発育または分化の選択された段階でDNA MeTase活性を阻害するために使用できるので、伝統的な”遺伝子ロックアウト”法より望ましい。従って、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは発育の種々の段階におけるDNAメチル化の役割を試験するためのプローブとして働くことができる。

## 【0024】

最後に、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは良性および悪性腫瘍および遺伝子発現の抑制が関与する他のヒト疾患のための治療の取り組みにおいて有用である。本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドの抗腫瘍有用性は本明細書の別の部分で詳細に説明されている。加えて、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは沈黙化遺伝子を活性化し、失われている遺伝子機能を与えて疾患徴候を改善する。例えば、ベータサラセミア症および鎌状赤血球貧血は成人ベータグロビン遺伝子の異常発現により起こされる。これらの疾患を患っているほとんどの個体はベータグロビン胎児遺伝子の正常コピーを持っている。しかしながら、胎児遺伝子は過度にメチル化されており、活動していない。胎児グロビン遺伝子の活性化は必要とされるグロビン機能を供給し、疾患徴候を改善する。

## 【0025】

治療的使用のためには、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは随意によく知られた医薬として受容可能な担体または希釈剤と処方されるであろう。この処方にはさらに一つまたはそれ以上のDNA MeTase阻害剤および/または一つまたはそれ以上の追加の抗DNA MeTaseアンチセンスオリゴヌクレオチドを含んでいてもよいし、または他の薬理的に活性な薬剤を含んでいてもよい。

## 【0026】

第二の態様において、腫瘍細胞の増殖を含む細胞増殖におけるDNA MeTaseの役割を調べるための方法を本発明は提供する。本発明のこの態様に従った方法においては、問題とする細胞型を本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドと接触させ、細胞中のDNA MeTaseの発現阻害を生じさせる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは問題とする細胞型の増殖におけるDNA MeTaseの役割を決定するため、細胞周期の異なっ

10

20

30

40

50

た時点で、または細胞増殖の促進剤または阻害剤と関連させて投与できる。

【0027】

第三の態様において、ヒトを含む哺乳類に本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与することから成る腫瘍増殖を阻害するための方法を本発明は提供する。本発明のこの態様に従った方法においては、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドの治療的有効量が、その体に腫瘍細胞が存在するヒトを含む哺乳類に治療的に有効な期間投与される。

【0028】

本明細書で使用される場合、用語“腫瘍増殖”とは腫瘍細胞の増殖を意味して使用される。“腫瘍細胞”とは新生物性細胞である。腫瘍細胞は良性（即ち、転移を行わず、隣接する正常組織を侵襲および破壊しないもの）でも悪性（即ち、周辺組織を侵襲し、転移を行い、除去が試みられた後に再発し、宿主の死を起こすであろうもの）でもよい。

10

【0029】

用語“治療的に有効量”および“治療的に有効な期間”とは、腫瘍細胞増殖を減少させるために有効な用量および期間での既知の処置を意味して使用される。好適には、そのような投与は非経口、経口、舌下、経皮、局所、鼻孔内または直腸内でなければならない。全身的に投与された場合、治療組成物は好適には、約0.01 μMから10 μMのアンチセンスオリゴヌクレオチド血中レベルが達成されるのに十分な用量で投与される。局所的投与には、これより低い濃度で有効であろうし、より高い濃度が許容できるであろう。好適には、DNA M e T a s e 阻害剤の総投与量は患者当たりおよび1日当たりで約0.1 mg オリゴヌクレオチドから、体重kg当たりおよび1日当たりで約200 mg オリゴヌクレオチドであろう。

20

【0030】

別の態様に従うと、一つまたはそれ以上の本発明のオリゴヌクレオチドが動物に投与される。本発明のこの態様は、連続的にかまたは同時に、治療的に有効量でおよび治療的に有効な期間、本発明の一つ以上のアンチセンスオリゴヌクレオチドを動物（ヒトを含む）に投与することから成る腫瘍増殖を阻害するための方法を提供する。

【0031】

以下の実施例は本発明の好適な態様をさらに例示することを意図しているものであり、本質的に本発明を制限するものではない。

実施例 1

30

ヒトまたはマウス細胞から調製された核抽出物で測定されたDNA M e T a s e 発現の阻害

核抽出物は標準細胞培養条件下で増殖させた  $1 \times 10^8$  対数増殖期中期のヒトH446細胞またはマウスY1細胞から調製された。細胞は1 mg/mlのDNA M e T a s e RNA転写体の配列に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは無作為体（陰性対照）オリゴヌクレオチドを加えた培地で処理した。細胞を採取し、リン酸緩衝溶液（PBS）で2度洗浄し、次に他の各成分から核を分離するために細胞ペレットを0.5 mlの緩衝液A（10 mM トリス pH 8.0、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、5 mM KCl<sub>2</sub>、0.5 mM DTT、0.5 mM PMSFおよび0.5% ノニデットP40）に再懸濁した。Eppendorf微量遠心機中、4、2、000 RPMで15分の遠心分離により核をペレット化した。核は緩衝液Aで1回洗浄して再ペレット化し、緩衝液B（20 mM トリス pH 8.0、0.25% グリセロール、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.5 mM PMSF、0.2 mM EDTA、0.5 mM DTTおよび0.4 mM NaCl）に再懸濁した。再懸濁した核は氷上で15分間インキュベートし、15、000 RPMで遠心分離して核破片をペレット化した。上清中の核抽出物をペレットから分離してDNA M e T a s e 活性のアッセイに使用した。各々のアッセイは三重に行われ、20 mM トリス-HCl（pH 7.4）、10 mM EDTA、2.5% グリセロール、0.2 mM PMSFおよび20 mM 2-メルカプトエタノールを含んでいる緩衝液中、0.1 μgの合成33塩基対ヘミメチル化DNA分子基質とメチル供与体としての0.5 μCi S-[<sup>3</sup>H]アデノシル-L-メチオニン（78.9 Ci/mmol）を含んでいる反応混

40

50

合液に3  $\mu$ gの核抽出物が使用された。反応混合液はDNA MeTaseの初速度を測定するために、37で1時間インキュベートする。DNAを沈殿させるために10% TCAを加えることにより反応を停止させ、続いて試料を4で1時間インキュベートし、TCA沈殿物をGFCフィルター(Fischer, Hampton, NH)を用いて洗浄した。対照は、核抽出物不在下の反応混合物中でインキュベートされたDNA、およびDNA不在下の反応混合物中でインキュベートされた核抽出物である。フィルターを5mlのシンチレーションカクテルを含んだシンチレーションバイアルに入れ、DNA内へ取り込まれたトリチウム化メチル基を常法に従ってシンチレーションカウンターで計数する。DNA MeTase発現阻害を測定するため、オリゴヌクレオチド処理細胞からの核抽出物の比活性が非処理細胞からの抽出物の比活性と比較された。本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドによる細胞処理は、核抽出物中のDNA MeTase活性を減少させた。

10

### 【0032】

#### 実施例2

#### A549細胞中のmRNAにより測定されたDNA MeTase発現の阻害

培養液で増殖しているA549細胞を、6.25  $\mu$ g/mlのリポフェクチン(GIBCO BRL)Optimem無血清培地(GIBCO)溶液存在下、DNAメチルトランスフェラーゼアンチセンスオリゴヌクレオチドで4時間処理し、次に細胞はPBSで1回洗浄して10%ウシ胎児血清を含むDMEM培地(GIBCO)へ戻した。オリゴヌクレオチドを添加して24時間後、A549細胞から全細胞性RNAを単離し、変性アガロースゲルで分離し、ナイロン膜へ移した(ノーザンブロット)。膜は放射性標識DNAメチルトランスフェラーゼ特異的プローブとハイブリダイズさせ、洗浄後、X線フィルムへ曝露した。対照および処理細胞中のDNAメチルトランスフェラーゼ発現レベルはDNAメチルトランスフェラーゼ信号を定量することにより決定した。次に膜をはがし、非特異的効果および充填総RNA量を照らし合わせるための非アンチセンス標的遺伝子としてのG3PDH(グリセルアルデヒド3-リン酸、デヒドロゲナーゼ)に特異的なプローブと再ハイブリダイズさせた。DNAメチルトランスフェラーゼレベルはDNAメチルトランスフェラーゼで得られた信号をG3DPHで得られた信号で割ることにより決定された。

20

### 【0033】

#### 実施例3

#### アンチセンスオリゴヌクレオチドで処理された細胞における細胞性DNAメチル化の分析

核抽出物は実施例1に説明したように、無作為体オリゴヌクレオチド処理細胞およびアンチセンスオリゴヌクレオチド処理細胞(1  $\mu$ Mオリゴヌクレオチド)から調製された。DNAペレットは0.5mlのDNA抽出緩衝液(0.15M NaCl、1%SDS、20mMトリス-HCl pH8.0、5mM EDTA)に再懸濁し、100  $\mu$ gのプロテイナーゼKを加え、懸濁液は50で16時間インキュベートする。0.25mlのフェノールおよび0.25mlのクロロホルムを加えることによりDNAをフェノール-クロロホルムに抽出する。懸濁液を混合し、微量遠心分離機中、15,000RPMで10分間遠心分離することにより有機および水相を分離する。水相に1mlの無水エタノールを加え、微量遠心分離機中、15,000RPMで15分間遠心分離することによりDNAを沈殿させる。DNAペレットは70%エタノールで洗浄し、遠心分離により再ペレット化する。DNAは100  $\mu$ lの20mMトリス-HCl pH8.0、1mM EDTAに再懸濁する。

40

### 【0034】

2  $\mu$ gのDNAは0.1単位のDNase、2.5  $\mu$ lの<sup>32</sup>P-dGTP(3000Ci/mmol, Amersham, Cleveland, OH)と37で15分インキュベートし、次に2単位のコンバーグDNAポリメラーゼ(Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)を加えてさらに30で25分間インキュベートする。次に50  $\mu$ lのH<sub>2</sub>Oを加え、Microspin S-300 HR

50

カラム (Pharmacia, Piscataway, NJ) で遠心分離することにより取り込まれなかった放射活性を除去する。標識 DNA (20  $\mu$ l) は 70  $\mu$ g のミクロコッカスヌクレアーゼ (Pharmacia, Piscataway, NJ、使用説明書に推薦されている緩衝液に溶解) を用いて 37 で 10 時間分解する。等量の放射活性を TLC ホスホセルロースプレート (Merck, Darmstadt, Germany) 上加え、66 : 33 : 1 イソ酪酸 / H<sub>2</sub>O / NH<sub>4</sub>OH で展開する一次元クロマトグラフィにより 3' モノヌクレオチドを分離する。クロマトグラムを XAR フィルム (Eastman Kodak, Rochester, NY) に曝露し、オートラジオグラムをレーザーデンストメトリー (Scanalytics, CSPI, Billerica, MA) で走査した。シトシンおよび 5-メチルシトシンに相当するスポットを定量し、非メチル化 CG ジヌクレオチドのパーセントを決定する。結果は、無作為体処理細胞と比較して、アンチセンスオリゴヌクレオチド処理細胞中の非メチル化 CG ジヌクレオチドパーセントの全体の減少を示すことが期待される。

10

## 【0035】

特異的遺伝子の脱メチル化を評価するため、J. Biol. Chem. 270: 12690 - 12696 (1995) に一般的に説明されているような方法が実施された。簡単に説明すると、ゲノム DNA (10  $\mu$ g) を抽出し、25 単位の Hind III により分解し、続いて 25 単位の Msp I (CGメチル化不感性) かまたは 25 単位の Hpa II (CGメチル化感受性) を用いて 37 で 8 時間分解する。分解した DNA は 1.5% アガロースゲルで分離し、サザンブロッティングにかけて特異的プローブでハイブリダイゼーションする。試験細胞中で通常大量にメチル化されている遺伝子はメチル化が少なくなるのに対し、試験細胞中で通常大量にメチル化されていない遺伝子は有意に影響されないことを示すことが結果から期待される。

20

## 【0036】

## 実施例 4

アンチセンスオリゴヌクレオチドによるインビトロ腫瘍増殖の阻害

Y1 または H446 細胞を 80,000 細胞/ウェルの密度で 6 ウェルプレートに播種する。DNA Methylase 非コード領域に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドホスホロチオエート (約 0.5 から 20  $\mu$ M) を細胞に加える。細胞は 7 日間同様に処理する。次に、細胞を採取し、3,000 の生きている細胞を例えば、Freedman and Shin, Cell 3: 355 - 359 (1974) に記載されているように軟寒天に播種する。播種 2 週間後、軟寒天に形成されたコロニーの数を目で数える。活性アンチセンスオリゴヌクレオチドの場合、コロニー数の用量依存性減少が観察される。

30

## 【0037】

## 実施例 5

インビボにおける腫瘍増殖の阻害

10 から 12 週齢のメス BALB/c マウス (Taconic Labs, Great Barrington, NY) の側腹部皮下に  $2 \times 10^6$  の前もって条件付けした A549 ヒト肺癌腫細胞または Colo205 ヒト結腸癌細胞を注射した。これらの細胞の前もっての条件付けは、同系マウスでの最小限 3 回の連続的腫瘍移植により行われた。続いて、約 25 mg の腫瘍断片を切り出し、Forene 麻酔下、マウスの左側腹部領域の皮下に移植した (Abbott Labs., Geneva, Switzerland)。腫瘍が 100 mm<sup>3</sup> の平均容量に達した時、2 mg / Kg の本発明のオリゴヌクレオチドを含んでいるオリゴヌクレオチド塩調製液を用いマウスへの静脈注射により処置した (尾静脈内への毎日の塊状注入により)。オリゴヌクレオチドの最適最終濃度は常法に従った用量応答実験により確立される。腫瘍容量は毎注入 2 日後に、標準法に従って計算された (例えば、Meyer et al. Int. J. Cancer 43: 851 - 856 (1989))。本発明のオリゴヌクレオチドによる処置は無作為化または逆アンチセンス配列で処理された対照と比較して腫瘍重量および容量の著しい減少が起こった (データは示されていない)。加えて、DNA Methylase 酵素の活性が測定され、

40

50

無作為化体処置対照と比較して著しく減少していることが観察された。これらの結果は、本発明のオリゴヌクレオチドはDNA MeTase 酵素活性および腫瘍増殖を阻害できることを示している。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1はDNA MeTase RNAと相補的である好適なオリゴヌクレオチドのための最適標的DNA MeTaseヌクレオチド配列を示しており、それらは配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6または配列番号：7として配列リストに示されている。

【図2】 図2はDNA MeTase RNAと相補的である好適なオリゴヌクレオチドのためのヌクレオチド配列を示しており、それらは配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18、配列番号：19および配列番号：20として配列リストに示されている。

10

【図3】 図3はDNA MeTase mRNAと相補的な種々の好適なアンチセンスオリゴヌクレオチドのIC<sub>50</sub>値を示しており、インビトロでA549ヒト肺癌細胞におけるDNA MeTase mRNAレベルの減少で測定されている。

【図4】 図4は本発明の最適化アンチセンスオリゴヌクレオチド( - 黒四角 - )で処理されたMDA-231ヒト乳癌腫細胞におけるDNA MeTase mRNAのレベルを示しており、従来から既知のオリゴヌクレオチド( - 黒菱形 - )と比較されている。

【図1】

5' AUCCGAGGAGGGCUACCCUGG 3' [SEQ ID NO 1]  
 5' GGAGAACGGGUCUCAUGCUU 3' [SEQ ID NO 2]  
 5' GUGGCCUUGGCUGACAUGAA 3' [SEQ ID NO 3]  
 5' AAGCUGUUGUGUGAGGUUCG 3' [SEQ ID NO 4]  
 5' UUGUGUGAGGUUCGUUAUC 3' [SEQ ID NO 5]  
 5' CAUGGUGUUGUGGCCUUGG 3' [SEQ ID NO 6]  
 5' UAGAGUGGGAUUGGCAGAUG 3' [SEQ ID NO 7]

FIGURE 1

【図2】

5' CCAGGTAGCCCTCCTCGGAT 3' [SEQ ID NO 8]  
 5' AAGCATGAGCACCGTTCCTCC 3' [SEQ ID NO 9]  
 5' TTCATGTCAGCCAAGGCCAC 3' [SEQ ID NO 10]  
 5' CGAACCTCACACAACAGCTT 3' [SEQ ID NO 11]  
 5' GATAAGCGAACCTCACACAA 3' [SEQ ID NO 12]  
 5' CCAAGGCCACAACACCATG 3' [SEQ ID NO 13]  
 5' CCAGGTAGCCCTCCTCGGAU 3' [SEQ ID NO 15]  
 5' AAGCATGAGCACCGTTCUCC 3' [SEQ ID NO 16]  
 5' UUCATGTCAGCCAAGGCCAC 3' [SEQ ID NO 17]  
 5' CGAACCTCACACAACAGCUU 3' [SEQ ID NO 18]  
 5' GAUAAGCGAACCTCACACAA 3' [SEQ ID NO 19]  
 5' CCAAGGCCACAACACCAUG 3' [SEQ ID NO 20]

FIGURE 2

【 図 3 】

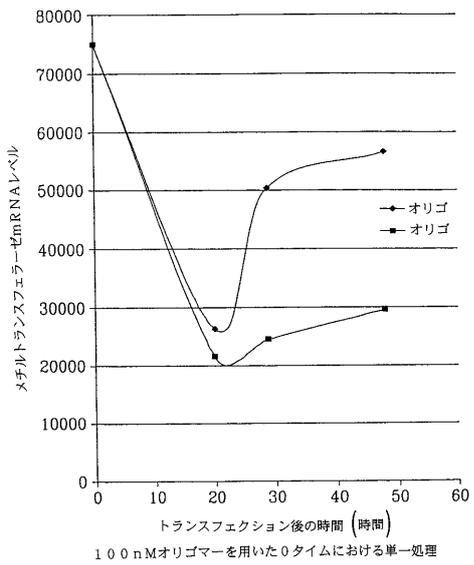
配列	SEQ ID NO	IC <sub>50</sub> (nM) <sup>1</sup>	SEQ ID NO	IC <sub>50</sub> (nM) <sup>2</sup>
5' CCAGGTAGCCCTCCTCGGAT 3'	[8]	90	[15]	70
5' AAGCATGAGCACCGTTCTCC 3'	[9]	66	[16]	43
5' TTCATGTCAGCCAAGGCCAC 3'	[10]	67	[17]	60
5' CGAACCTCACACAACAGCTT 3'	[11]	96	[18]	75
5' GATAAGCGAACCTCACACAA 3'	[12]	90	[19]	81
5' CCAAGGCCACAAACACCATG 3'	[13]	66	[20]	60
5' CATCTGCCATTCCCACCTCTA 3'	[14] <sup>3</sup>	133	[21]	114
スクランブルされた配列	--	>>250	--	>>250

<sup>1</sup>オリゴデオキシヌクレオシド ホスホロチオエート

<sup>2</sup>各々の末端に4つの2'-O-メチルリボヌクレオシドおよび中間にデオキシリボヌクレオシドを持つハイブリッドオリゴヌクレオシド ホスホロチオエート、アンチセンスオリゴヌクレオチドの5' または3' 末端からの4つのヌクレオチド内のチミジンは、ハイブリッドオリゴヌクレオチドではウリジンで置換されている。

<sup>3</sup>翻訳開始部位におよぶ従来の技術による対照オリゴヌクレオチド

【 図 4 】



100 nMオリゴマーを用いた0タイムにおける単一処理

---

フロントページの続き

(72)発明者 マクリオド, ロバート・エイ  
カナダ国ケベック エイチ3ズィー 2イー8, ウエストマウント, ハロウェル・ストリート 6  
7

審査官 松田 芳子

(56)参考文献 特表平09-511125(JP, A)  
Proc. Am. Assoc. Cancer Res. Annu. Meet., 1996, Vol.37 p.353 #2409  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, Vol.94, pages 684-9  
J. Biol. Chem., 1995, Vol.270, pages 8037-43

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C12N 15/09 ZNA  
BIOSIS/WPI(DIALOG)