

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4177455号
(P4177455)

(45) 発行日 平成20年11月5日(2008.11.5)

(24) 登録日 平成20年8月29日(2008.8.29)

(51) Int. Cl. F I
C 0 7 H 21/00 (2006.01) C O 7 H 21/00
A 6 1 K 31/7125 (2006.01) A 6 1 K 31/7125
A 6 1 K 48/00 (2006.01) A 6 1 K 48/00
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 Z N A A

請求項の数 9 (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願平9-509535
 (86) (22) 出願日 平成8年8月16日(1996.8.16)
 (65) 公表番号 特表平11-512088
 (43) 公表日 平成11年10月19日(1999.10.19)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1996/013371
 (87) 国際公開番号 W01997/006662
 (87) 国際公開日 平成9年2月27日(1997.2.27)
 審査請求日 平成15年6月3日(2003.6.3)
 (31) 優先権主張番号 08/516,454
 (32) 優先日 平成7年8月17日(1995.8.17)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者
 イデラ・ファーマシューティカルズ・イン
 コーポレイテッド
 アメリカ合衆国02139マサチューセッ
 ツ州ケンブリッジ、バッサー・ストリート
 345番
 (74) 代理人
 弁理士 青山 稔
 (74) 代理人
 弁理士 田村 恭生
 (72) 発明者
 アグラワル, サドヒル
 アメリカ合衆国01545マサチューセッ
 ツ州 シュルーズベリー、ランプライター
 ・ロード61番

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 逆キメラおよびハイブリッドオリゴヌクレオチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

2個のオリゴデオキシリボヌクレオチドホスホロチオエート領域間にある2'-O-置換リボヌクレオチドの領域からなるハイブリッドオリゴヌクレオチドであって、該2'-O-置換リボヌクレオチドの領域が4~13のヌクレオチドを有し、該オリゴデオキシリボヌクレオチドホスホロチオエート領域が5~46のデオキシリボヌクレオチドを有し、ここで2'-O-置換が、1~6の飽和または不飽和炭素原子を含む-O-低級アルキル基による、または2~6の炭素原子を有する-O-アリールまたはアリル基(かかるアルキル、アリールまたはアリル基は非置換かまたは置換されていてよい)による、ペントース残基の2'位の置換を意味することを特徴とする、ハイブリッドオリゴヌクレオチド。

【請求項2】

該オリゴヌクレオチドが15~50ヌクレオチドを有する請求項1に記載のハイブリッドオリゴヌクレオチド。

【請求項3】

該2'-O-置換リボヌクレオチド領域が4~10ヌクレオチドを有する請求項1に記載のハイブリッドオリゴヌクレオチド。

【請求項4】

該2'-O-置換リボヌクレオチドが、互いに5' 3'ホスホロチオエート、ホスホトリエステルまたはホスホジエステル結合により連結している、請求項1に記載のハイブリッドオリゴヌクレオチド。

10

20

【請求項 5】

ペントース残基の 2' 位が - O - 低級アルキル基により置換されている、請求項 1 に記載のハイブリッドオリゴヌクレオチド。

【請求項 6】

請求項 1 ないし 5 のいずれかに記載のハイブリッドオリゴヌクレオチドおよび薬理的に許容しうる担体を含む、副作用が減少した遺伝子発現抑制用医薬組成物。

【請求項 7】

請求項 1 ないし 5 のいずれかに記載のハイブリッドオリゴヌクレオチドおよび薬理的に許容しうる担体を含み、該オリゴヌクレオチドが哺乳動物で発現される遺伝子に相補的であることを特徴とする、副作用を減少した哺乳動物における遺伝子発現の調節用医薬組成物。

10

【請求項 8】

請求項 1 ないし 5 のいずれかに記載のハイブリッドオリゴヌクレオチドおよび薬理的に許容しうる担体を含み、該オリゴヌクレオチドが異常型で発現される遺伝子と相補的であることを特徴とする、異常遺伝子発現に起因する疾病を副作用を抑えて治療するための医薬組成物。

【請求項 9】

遺伝子発現抑制用医薬組成物を調製するための請求項 1 ないし 5 のいずれかに記載のハイブリッドオリゴヌクレオチドの使用。

【発明の詳細な説明】

20

発明の背景発明の分野

本発明は遺伝子発現の研究およびアンチセンス治療法に有用である修飾したオリゴヌクレオチドに関する。

関連技術の要約

アンチセンス治療法における特異的遺伝子発現のインヒビターとしてのオリゴヌクレオチドの利用の可能性は、最初に 1977 年および 1978 年に発表された 3 つの記事に示唆された。パターンソン (Paterson) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 74 : 4370 - 4374 (1977) は mRNA の無細胞系の翻訳が該 mRNA に相補的なオリゴヌクレオチドが結合することによって阻害され得ることを開示している。ザメクニク (Zamecnik) およびステフェンソン (Stephenson)、Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 75 : 280 - 284 および 285 - 288 (1978) はラウス肉腫ウイルス (RSV) ゲノムの一部に相補的である 13 マーの合成オリゴヌクレオチドが、感染細胞培養中の RSV 複製を阻害することができ、初代ニワトリ線維芽細胞の悪性肉腫細胞への RSV - 媒介形質転換を阻害することができることを開示している。

30

これらの初期の研究以来、アンチセンスオリゴヌクレオチドがウイルス増殖を抑制する可能性がしっかりと確立している。米国特許第 4,806,463 号は、ヒト免疫不全ウイルス増殖が該 HIV ゲノムの多様な領域の任意の部分に相補的であるオリゴヌクレオチドによって抑制することができることを教示している。米国特許第 5,194,428 号は、インフルエンザウイルスポリメラーゼ 1 遺伝子に相補的なホスホロチオエートオリゴヌクレオチドによるインフルエンザウイルス複製の阻害を開示している。アグラワル (Agrawal)、Trends in Biotechnology 10 : 152 - 158 (1992) は抗ウイルス剤としてのアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用を概説する。

40

アンチセンスオリゴヌクレオチドはまた、抗寄生虫剤として開発されてきている。PCT 公開番号第 WO 93 / 13740 号は薬剤耐性マラリア寄生虫の増殖を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用を開示する。タオ (Tao) ら、Antisense Research and Development 5 : 123 - 129 (1995) はアンチセンスオリゴヌクレオチドによる住血吸虫寄生虫の増殖の阻害を教示する。

より最近、アンチセンスオリゴヌクレオチドは細胞遺伝子の発現に起因する疾患の治療的応用の候補としての見込みを示している。PCT 公開番号第 WO 95 / 09236 号は

50

アミロイド発現を阻害するオリゴヌクレオチドによる - アミロイド誘発神経細胞株の形態学的異常の消滅 (reversal) を開示する。 P C T 公開番号第 W O 9 4 / 2 6 8 8 7 号は、グロビン遺伝子転写物のある一部に相補的であるオリゴヌクレオチドによる該遺伝子転写物の変型プライミングの消滅を開示する。 P C T 出願番号第 P C T / U S 9 4 / 1 3 6 8 5 号は、 D N A メチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子に相補的なオリゴヌクレオチドによる腫瘍発生性 (tumorigenicity) の阻害を開示する。

治療剤および診断剤としての多様なアンチセンスオリゴヌクレオチドの開発は最近アグラワルおよびアイヤー (Iyer)、 B i o t e c h n o l o g y 6 : 1 2 - 1 9 (1 9 9 5) 中の C u r r e n t O p i n i o n によって概説されている。

アンチセンス治療法における興味が増大しているので、糖 - リン酸骨格を修飾することによってオリゴヌクレオチドの薬学的特性を改良する多様な努力がなされている。米国特許第 5 , 1 4 9 , 7 9 7 号は、従来のキメラオリゴヌクレオチドがメチルホスフェートまたはホスホルアミデートフランキング領域に挿入されたホスホロチオエートコア領域を有することを記載している。 P C T 公開番号第 W O 9 4 / 0 2 4 9 8 号は、 D N A コア領域をフランキングする 2 ' - O - 置換リボヌクレオチド領域を有することを開示している。

現在、オリゴヌクレオチドの薬学的特性について多くが発見されている。アグラワルら、 C l i n i c a l P h a r m a c o k i n e t i c s 2 8 : 7 - 1 6 (1 9 9 5) およびザン (Zhang) ら、 C l i n i c a l P h a r m a c o l o g y a n d T h e r a p e u t i c s 5 8 : 4 4 - 5 3 (1 9 9 5) はヒト患者における抗 - H I V オリゴヌクレオチドの薬物動態学を開示している。これらの新規の発見のいくつかを治療剤としてのオリゴヌクレオチドの最適化のため克服されるべき新規の挑戦へと導く。例えば、クニープ (Kniep) ら、 N a t u r e 3 7 4 : 5 4 6 - 5 4 9 (1 9 9 5) は他の配列によってフランキングされる C G ジヌクレオチドを含むヌクレオチドが、イン・ピボにおけるマイトジェン効果を有することを開示している。ガルブレイス (Galbraith) ら、 A n t i s e n s e R e s e a r c h a n d D e v e l o p m e n t 4 : 2 0 1 - 2 0 6 (1 9 9 4) はオリゴヌクレオチドによる補体の活性化を開示する。ヘンリー (Henry) ら、 P h a r m . R e s . 1 1 : P P D M 8 0 8 2 (1 9 9 4) はオリゴヌクレオチドが潜在的に血液凝固により妨げられ得ることを開示する。

それゆえ、従来のオリゴヌクレオチドよりも生み出される副作用が少なく、遺伝子発現阻害特性を有する修飾したオリゴヌクレオチドの必要性がある。

発明の簡単な概要

本発明は、遺伝子発現の研究およびアンチセンス治療法に有用である修飾したオリゴヌクレオチドに関する。本発明は遺伝子発現を阻害し、従来のオリゴヌクレオチドより生み出す副作用が少ない修飾したオリゴヌクレオチドを提供する。特に、本発明は分裂性 (mitogenicity) を減少させ、補体の活性および抗トロンビン活性を減少させる。

第 1 の側面において、本発明は逆ハイブリッドおよび逆キメラオリゴヌクレオチドおよび低減した副作用を有する特異的遺伝子発現を阻害するための組成物を提供する。遺伝子発現のそのような阻害は、特異的な遺伝子の生物学的機能を決定するための変異分析の別法として使用されることができる。遺伝子発現のそのような阻害はまた、ウイルスまたは病原の遺伝子の発現または細胞遺伝子の不適切な発現によって引き起こされる疾患を治療するためにも使用されることができる。

本発明の本側面による好ましい 1 つの態様において、組成物は 1 またはそれ以上のオリゴデオキシリボヌクレオチドホスホロチオエート領域によってフランキングされる 1 またはそれ以上の 2 ' - O - 置換 R N A 領域を有する修飾したオリゴヌクレオチドを含む。ある特に好ましい態様において、該 2 ' - O - 置換 R N A 領域は 2 つのオリゴデオキシリボヌクレオチド領域間にあり、従来のハイブリッドオリゴヌクレオチドに比較して「逆の (inverted) 」構造である。本発明のこの側面の他の好ましい態様において、組成物には 1 またはそれ以上のオリゴヌクレオチドホスホロチオエート領域によってフランキングされた 1 またはそれ以上の非イオン性オリゴヌクレオチドを有する修飾したオリゴヌクレオチドを含む。好ましい態様において、非イオン性領域はアルキルホスフェートおよび / またはホスホルアミデートおよび / またはホスホルトリエステルインターヌクレオシド結合を含

10

20

30

40

50

む。ある特に好ましい態様において、非イオン性オリゴヌクレオチド領域は、2つのオリゴヌクレオチドホスホロチオエート領域間に存在し、その構造は、従来のキメラオリゴヌクレオチドに比較して「逆の」ものである。

第2の側面において、本発明は副作用が減少した哺乳動物中の遺伝子発現を調節する方法を提供する。本発明の本側面の方法において、本発明の第1の側面の組成物を哺乳動物に投与し、該オリゴヌクレオチドは該哺乳動物中に発現されている遺伝子に相補的である。好ましい態様において、物質の組成物を投与された後、1またはそれ以上の補体の活性化、マイトジェン産生およびトロンピン凝固形成よりなる群から選択される生物学的効果について計測される。

第3の側面において、本発明は副作用が少なく、変型遺伝子発現により引き起こされた疾患を治療学的に治療するための方法を提供し、該方法はオリゴヌクレオチドが疾患を引き起こすような変型発現をする遺伝子に相補的である、本発明の第1側面による組成物を疾患を有する個体に投与することを含む。この文脈において、変型遺伝子発現とはウイルスまたは原核生物または真核生物病原体の増殖または宿主細胞遺伝子の不適切な発現に必要である遺伝子の宿主期間中に発現することを意味する。不適切な宿主細胞遺伝子発現には、細胞遺伝子の変異アレルの発現、または細胞遺伝子の正常なアレルの過少発現または過剰発現などの不適切な宿主細胞遺伝子発現により疾患を生じるようなものが含まれる。好ましい態様において、該組成物が補体の活性化、マイトジェン産生およびトロンピン凝固形成の阻害よりなる群から選択される生物学的効果について測定される。

【図面の簡単な説明】

図1は、本研究で使用した逆ハイブリッドオリゴヌクレオチド、ハイブリッドオリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドホスホジエステルおよびホスホロチオエートを示す。2'-O-メチルリボ-ヌクレオチドを略述し、ホスホジエステル結合したヌクレオチドに下線を付す；その他のすべてはホスホロチオエート結合したヌクレオチドである。

図2は、本研究で使用した混合骨格、キメラおよび逆キメラオリゴヌクレオチドを示す。メチルホスホネート結合したヌクレオチドに下線を付す；その他すべてはホスホロチオエート結合したヌクレオチドである。

図3は、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの濃度の機能としてかまたは多様な逆ハイブリッドオリゴヌクレオチドのいずれかの機能としてのマウス脾臓細胞によるチミジン取り込みを示す。

図4は、血清がホスホロチオエートオリゴヌクレオチドまたは多様な逆ハイブリッドオリゴヌクレオチドのいずれかで処理される場合に見られる補体-媒介溶血の阻害の程度を示す。

図5は、正常ヒト血清がホスホロチオエートオリゴヌクレオチドまたは多様な逆ハイブリッドオリゴヌクレオチドのいずれかで処理される場合に得られるaPPTTの延長を示す。

図6は、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの濃度の機能としてかまたは多様な逆キメラオリゴヌクレオチドのいずれかの機能としてのマウス脾臓細胞によるチミジンの取り込みを示す。

図7は、血清がホスホロチオエートオリゴヌクレオチドまたは多様な逆キメラオリゴヌクレオチドのいずれかで処理される場合に見られる補体-媒介溶血の阻害の程度を示す。

図8は、正常ヒト血清がホスホロチオエートオリゴヌクレオチドまたは多様な逆キメラオリゴヌクレオチドのいずれかで処理される場合に得られるaPPTTの延長を示す。

好ましい態様の詳細な説明

本明細書中に引用するすべての米国特許、特許出願および科学的文献は、当該技術分野における知見レベルを明示するものであり、参照のため本明細書中に引用する。

本発明は、遺伝子発現の研究およびアンチセンス療法に有用な修飾オリゴヌクレオチドに関する。本発明は、遺伝子発現を抑制し、従来のオリゴヌクレオチドに比べて副作用の少ない修飾オリゴヌクレオチドを提供する。とりわけ、本発明は、従来のオリゴヌクレオチドに比べてマイトジェン活性が低く、補体の活性化が低く、抗トロンピン活性が低い修飾オリゴヌクレオチドを提供する。

10

20

30

40

50

第一の側面において、本発明は、逆ハイブリッド (inverted hybrid) および逆キメラオリゴヌクレオチド (inverted chimeric oligonucleotide) および副作用が減少し特定の遺伝子発現を抑制するための組成物を提供する。かかる遺伝子発現の抑制は、特定の遺伝子の生物学的機能を決定するための突然変異体分析や遺伝子「ロックアウト」実験の代替法として用いることができる。かかる遺伝子発現の抑制はまた、ウイルスもしくは病原体の遺伝子の発現により、または細胞遺伝子の不適当な発現により引き起こされる疾患を治療するのにも用いることができる。

本発明のこの側面による副作用が減少した特定の遺伝子発現を抑制するための組成物は、発現を抑制しようとするゲノム領域もしくは遺伝子の一部または該遺伝子から転写されたRNAに相補的な修飾オリゴヌクレオチドを含む。本発明の目的のためには、オリゴヌクレオチドなる語は、2またはそれ以上のデオキシリボヌクレオチドモノマー、リボヌクレオチドモノマーまたは2'-O-置換リボヌクレオチドモノマー、またはそれらの組み合わせのポリマーを含む。オリゴヌクレオチドなる語はまた、化学的に修飾した塩基または糖を有するおよび/または他の置換基、たとえば、これらに限られるものではないが、親油性基、インターカレント剤、ジアミンおよびアダマンタンを有するポリマーを包含する。好ましくは、かかるオリゴヌクレオチドは約12~約50ヌクレオチド、最も好ましくは約17~約35ヌクレオチドを有するであろう。相補的な語は、ゲノム領域、遺伝子またはそのRNA転写物に生理的条件下でハイブリダイズする能力を有することを意味する。かかるハイブリダイゼーションは、通常、相補的な鎖間でのワトソン-クリック型またはフーグステン型塩基対を形成する塩基特異的な水素結合の結果であるが、他の型の水素結合並びに塩基の積み重ねもまたハイブリダイゼーションに導きうる。実際問題として、かかるハイブリダイゼーションは、特定の遺伝子発現の抑制を観察することにより推定できる。修飾オリゴヌクレオチド配列が相補的である遺伝子配列またはRNA転写物配列は、修飾しようとする生物学的作用に依存するであろう。幾つかの場合において、ゲノム領域、遺伝子またはそのRNA転写物はウイルスからのものである。好ましいウイルスとしては、これらに限られるものではないが、ヒト免疫不全ウイルス(1型または2型)、インフルエンザウイルス、単純ヘルペスウイルス(1型または2型)、エプスタイン-バーウイルス、サイトメガロウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、インフルエンザウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルスおよびパピローマウイルスが挙げられる。他の場合には、ゲノム領域、遺伝子またはそのRNA転写物は、内生の哺乳動物(ヒトを含む)の染色体DNAからのものであってよい。かかるゲノム領域、遺伝子またはそのRNA転写物の好ましい例としては、これらに限られるものではないが、血管内皮増殖因子(VEGF)、ベータアミロイド、DNAメチルトランスフェラーゼ、プロテインキナーゼA、Apoptosisタンパク質、p-糖蛋白、c-MYCタンパク質、BCL-2タンパク質およびCAPLが挙げられる。さらに他の場合では、ゲノム領域、遺伝子またはそのRNA転写物は、真核または原核病原体、たとえば、これらに限られるものではないが、プラスモジウム・ファルシパルム(Plasmodium falciparum)、プラスモジウム・マラリエ(Plasmodium malarie)、プラスモジウム・オバレ(Plasmodium ovale)、スキストゾーマ・エスピーピー(Schistosoma spp.)およびマイコバクテリウム・チューバーキュロシス(Mycobacterium tuberculosis)からのものであってよい。

本発明による修飾オリゴヌクレオチドに加えて、副作用の減少した遺伝子発現を抑制するための組成物は、よく知られた薬理的に許容しうる担体または希釈剤のいずれかを任意に含有してよい。この組成物はさらに、本発明による1またはそれ以上の他のオリゴヌクレオチドを含んでいてよく、該他のオリゴヌクレオチドは逆ハイブリッドオリゴヌクレオチドであるかまたは逆キメラオリゴヌクレオチドのいずれかであってよい。別の態様において、この組成物は、オリゴヌクレオチドホスホロチオエート、ハイブリッドオリゴヌクレオチド、またはキメラオリゴヌクレオチドなどの1またはそれ以上の従来のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含んでいてよく、他の薬理的に活性な剤を含んでいてもよい。

本発明のこの側面による一つの好ましい態様において、組成物は、1またはそれ以上のオ

10

20

30

40

50

リゴデオキシリボヌクレオチドホスホロチオエート領域によりフランキングされた1またはそれ以上の2'-O-置換RNA領域を有する修飾オリゴヌクレオチドを含む。ある特定の好ましい態様において、2'-O-置換RNA領域が2つのオリゴデオキシリボヌクレオチドホスホロチオエート領域の間に存在し、これは従来のハイブリッドオリゴヌクレオチドに比べて「逆の」構造である。従って、この態様によるオリゴヌクレオチドは逆ハイブリッドオリゴヌクレオチドと称される。2'-O-置換RNA領域は、互いに5'-3'インターヌクレオシド結合により連結された、好ましくは約4~約10または13の2'-O-置換ヌクレオシド、最も好ましくは約4~約8のかかる2'-O-置換ヌクレオシドを有する。好ましくは、逆ハイブリッドオリゴヌクレオチドの全体のサイズは、約15から約35または50ヌクレオチドであろう。最も好ましくは、2'-O-置換リボヌクレオシドは、互いに5'-3'ホスホロチオエート、ホスホトリエステルまたはホスホジエステル結合により連結しているであろう。本発明の目的のためには、「2'-O-置換」とは、1~6の飽和または不飽和炭素原子を含む-O-低級アルキル基により、-O-アリールまたはアリル(2~6の炭素原子を有する)(かかるアルキル、アリールまたはアリル基は非置換か、または、たとえばハロ、ヒドロキシ、トリフルオロメチル、シアノ、ニトロ、アシル、アシルオキシ、アルコキシ、カルボキシル、カルブアルコキシル、またはアミノ基により置換されていてよい)による、またはヒドロキシ、アミノもしくはハロによる、ペントース残基の2'位の置換を意味する。ホスホロチオエートフランキング領域は、互いに5'-3'ホスホロチオエート結合により連結した約4から約46ヌクレオシド、好ましくは約5から約26のかかるホスホロチオエート結合ヌクレオシドを有する。最も好ましくは、ホスホロチオエート領域は約5から約15のホスホロチオエート結合ヌクレオシドを有するであろう。ホスホロチオエート結合は、混合R_pおよびS_pエナンシオマーであってよく、またはR_pかまたはS_pのいずれかの形態での立体規則的な(stereoregular)または実質的に立体規則的なものであってよい[アイアー(Iyer)ら、Tetrahedron Asymmetry 6: 1051~1054(1995)を参照]。

本発明のこの側面による他の好ましい態様において、組成物は、1またはそれ以上のオリゴヌクレオチドホスホロチオエートの領域によってフランキングされた1またはそれ以上の非イオン性オリゴヌクレオチド領域を有する修飾オリゴヌクレオチドを含む。好ましい態様において、非イオン性領域は、アルキルホスホネートおよび/またはホスホルアミデートおよび/またはホスホトリエステルインターヌクレオシド結合を含む。ある特別の好ましい態様において、非イオン性オリゴヌクレオチド領域は2つのオリゴヌクレオチドホスホトリエステル領域の間にあり、これは従来のキメラオリゴヌクレオチドに比べて逆の構造である。従って、この態様によるオリゴヌクレオチドは逆キメラオリゴヌクレオチドと称する。非イオン性領域は、互いに5'-3'非イオン性結合、好ましくはアルキルホスホネート、ホスホルアミデートまたはホスホトリエステル結合により連結された約4から約10または12のヌクレオシドを有し、好ましくは約4から約8のかかる非イオン結合ヌクレオシドを有する。ホスホロチオエートフランキング領域は、互いに5'-3'ホスホロチオエート結合により連結した約4から約46のヌクレオシドを有し、好ましくは約8から約26のかかるホスホロチオエート結合ヌクレオシドを有する。最も好ましくは、ホスホロチオエート領域は約5から約15のホスホロチオエート結合ヌクレオシドを有するであろう。ホスホロチオエート結合は、混合R_pおよびS_pエナンシオマーであってよく、またはR_pかまたはS_pのいずれかの形態での立体規則的なまたは実質的に立体規則的なものであってよい[アイアーら、Tetrahedron Asymmetry 6: 1051~1054(1995)を参照]。最も好ましい態様において、オリゴヌクレオチドは、いずれかの側でホスホロチオエート領域(それぞれ約6から約10のホスホロチオエート結合ヌクレオシドを有する)によりフランキングされた、約6~約8のメチルホスホネート結合ヌクレオシドを有する非イオン性領域を有する。

当業者であれば、これら好ましい態様の要素を組み合わせ得ることを認識するであろうし、本発明者はかかる組み合わせを意図するものである。たとえば、2'-O-置換リボヌクレオチド領域は、1から全非イオン性インターヌクレオシド結合を含んでいてよい。別

10

20

30

40

50

の態様として、非イオン性領域は1から全2'-O-置換リボヌクレオシドを含んでいてよい。さらに、本発明によるオリゴヌクレオチドは、いずれかまたはともにホスホロチオエート領域によりフランキングされた、1またはそれ以上の2'-O-置換リボヌクレオチド領域および1またはそれ以上の非イオン性領域の組み合わせを含んでいてよい[関連する合成法についてはNucleosides & Nucleotides 14: 1031~1035(1995)を参照]。

第二の局面において、本発明は、副作用の低い、哺乳動物における遺伝子発現を調節する(modulate)方法を提供する。本発明のこの局面に応じた方法において、本発明の第一の局面に応じた物質の組成物は哺乳動物に投与される(ここで、該オリゴヌクレオチドは哺乳動物に発現している遺伝子と相補的である)。好ましくは、そのような投与は非経口的、経口的、鼻内、または直腸内に行ってよい。好ましい態様では、物質の組成物を投与した後に、補体活性化、有糸分裂誘発およびトロンピン凝塊形成の阻害からなる群から選ばれる生物学的副作用について1またはそれ以上測定を行う。

第三の局面において、本発明は、本発明の第一の局面に応じた物質の組成物を、異常な遺伝子発現によって生じる疾病を治療的に処置するための、副作用の低い方法、該疾病を有する個体に本発明の第一の局面に応じた物質の組成物を投与することを含む方法を提供する(ここで、オリゴヌクレオチドは異常に発現した遺伝子と相補的であり、そのような異常な発現が疾病を引き起こす)。この状況において、異常な遺伝子発現は、ウイルス、または原核性もしくは真核性病原体の増殖に必要な遺伝子の宿主生物における発現、または宿主細胞遺伝子の不適切な発現を意味する。不適切な宿主細胞遺伝子の発現には、そのような不適切な宿主細胞遺伝子の発現が疾病を引き起こすような細胞遺伝子の突然変異体アレルの発現、または細胞遺伝子の正常なアレルの発現不足や過剰発現が含まれる。好ましくは、そのような投与は、非経口的、経口的、舌下、経皮的、局所的、鼻内、または直腸内に行われるべきである。治療的組成物の投与は、該疾病の症状または代用マーカーを低下させるのに有効な用量と時間で既知の手順を用いて実施することができる。全身性に投与する場合は、治療的組成物を、約0.01 μ M~約10 μ Mの血中オリゴヌクレオチドレベルを保持するのに十分な用量で投与するのが好ましい。局所投与では、これよりはるかに低濃度で有効であるかも知れないし、はるかに高濃度が許容されるかも知れない。好ましくは、オリゴヌクレオチドの総用量は、オリゴヌクレオチド約0.1mg/患者/日~オリゴヌクレオチド約200mg/kg体重/日の範囲であろう。単回処置では、個体に対して本発明の1またはそれ以上の治療的組成物の治療的有効量を同時にまたは続いて投与することが望ましいかも知れない。好ましい態様において、物質の組成物を投与した後に、補体活性化、有糸分裂誘発およびトロンピン凝塊形成の阻害からなる群から選ばれる生物学的作用について1またはそれ以上の測定を行う。

以下の実施例において、本発明のある好ましい態様をさらに例示するが、これらは本発明の範囲を何ら限定するものではない。

実施例 1

オリゴヌクレオチドの合成、脱保護および精製

オリゴヌクレオチドホスホロチオエートを、10 μ molスケールの -シアノエチルホスホラミダイト法を用い、自動DNA合成装置(Model 8700, Biosearch, Bedford, MA)を用いて合成した。ホスホロチオエート連結を生じるために、各カップリング後に、得られた中間体ホスファイト連結を、3H, 1, 2-ベンゾジチオール-3H-オン-1, 1-ジオキシドを用いて酸化した(Beaucage, In Protocols for Oligonucleotides and Analogs: Synthesis and Properties, Agrawal編, Humana Press, Totowa, NJ.33-62頁(1993)参照)。標準的酸化を標準的ヨウ素試薬を用いて行う他は同様の合成を行い、ホスホジエステル連結を生じさせた。逆キメラオリゴヌクレオチドの合成は、メチルホスホネート連結をヌクレオシドメチルホスホナミダイト(Glen Research, Sterling, VA)を用いて組み立て、次いでテトラヒドロフラン/2, 6-ルチジン/水(75:25:0.25)中の0.1Mヨウ素で酸化する(Agrawal & Goodchild, Tet.Lett.28:3539-3542(1987)参照)以外は同様に行った。逆ハイブリッドオリゴヌクレオチドの合成は、2'-O-メチ

10

20

30

40

50

ルリボヌクレオチドを含む断片を 2' - O - メチルリボヌクレオシドホスホラミダイトを用いて組み立て、次いで上記のごとく酸化してホスホロチオエートまたはホスホジエステル連結とする以外は同様に行った。オリゴヌクレオチドがメチルホスホネート含有領域を含む以外は標準の手順に従ってオリゴヌクレオチドの脱保護および精製を行った (Padmapriyaら、Antisense Res.& Dev.4:185-199 (1994) 参照)。該オリゴヌクレオチドについて、C P G 結合オリゴヌクレオチドを、室温で 1 時間濃水酸化アンモニウムで処理し、上清を取り出し、蒸発させて淡黄色残留物を得、次いでこれを室温で 6 時間エチレンジアミン/エタノール (1 : 1 v / v) 混合物で処理し、減圧下で再度乾燥させた。

実施例 2

逆ハイブリッドおよび逆キメラオリゴヌクレオチドによる *in vitro* 補体活性化の低下
補体のオリゴヌクレオチド介在性の枯渇に対する逆ハイブリッドまたは逆キメラ構造の相
10 対的効果を検討するため以下の実験を行った。健康な成人ボランティアから静脈血を収集
した。市販の添加剤を含まないバキュテイナー (vacutainer) (Becton Dickinson #6430
Franklin Lakes, NJ) 中に血液を回収し、溶血補体アッセイ用に血清を調製した。血液
を室温で 30 分間凝固させ、15 分間氷冷し、次いで 4 で遠心し血清を分離した。回収
した血清を氷上に保ち同じ日にアッセイするか、または -70 に貯蔵した。次に、緩衝
液、オリゴヌクレオチドホスホロチオエート、逆ハイブリッドオリゴヌクレオチド、また
は逆キメラオリゴヌクレオチドを血清とインキュベーションした。各被験血清につき少な
くとも 5 希釈をデュプリケートで測定する、抗ヒツジ赤血球抗体 (ヘモリシン、Diamedix
, Miami, FL) で感作したヒツジ赤血球 (Colorado Serum Co.) の補体介在性溶解のため
20 の標準的 C H 5 0 アッセイ (KabatおよびMayer (編): Experimental Immunochimistry,
第二版、Springfield, IL, CC Thoms (1961), 125頁) を行い、次いで無細胞上清へのヘモ
グロビン放出を 541 nm で分光光度法的に測定した。

実施例 3

逆ハイブリッドおよび逆キメラオリゴヌクレオチドの *in vitro* 有糸分裂誘発性 (mitogeni
city) の減少

オリゴヌクレオチド介在性有糸分裂誘発性に対する逆ハイブリッドまたは逆キメラ構造の
相対的効果を検討するために以下の実験を行った。雄 C D 1 マウス (4 - 5 週齢、20 -
22 g ; Charles River, Wilmington, MA) から脾臓を得た。単一細胞懸濁液を、ガラス
スライドのフロスト端で静かに細かく刻んで調製した。次に、細胞を R P M I 完全培地 [30
10% ウシ胎児血清 (F B S)、50 μM 2 - メルカプトエタノール (2 - M E)、100
U / m L ペニシリン、100 μg / m L ストレプトマイシン、2 m M L - グルタミン
添加 R P M I 培地] 中で培養した。オリゴヌクレオチドの分解を最少限にするため、F B
S を最初に 65 (ホスホジエステル含有オリゴヌクレオチド) または 56 (他のすべ
てのオリゴヌクレオチド) で 30 分間加熱した。細胞を 100,000 個 / ウェルで 96 ウェル
ディッシュに接種した (容量 100 μL / ウェル)。T E 緩衝液 (10 m M トリス - H
C l、p H 7 . 5、1 m M E D T A) 10 μL 中のオリゴヌクレオチドを各ウェルに加
えた。37 で 4 4 時間培養した後、R P M I 培地 20 μL 中の 1 μC i トリチウム化チ
ミジン (Amersham, Arlington Heights, IL) を加え、4 時間パルス標識した。次に、細胞
を、自動セルハーベスター (Skatron, Sterling, VA) で回収し、シンチレーションカウン
ターを用いてフィルターの評価を行った。有糸分裂誘発性のコントロール実験では、培地
(陰性コントロール) またはコンカナバリン A (陽性コントロール) のいずれかをオリゴ
ヌクレオチドの代わりに細胞に加える他は同様に細胞を処理した。これらの試験結果を
図 1 に示す。すべての逆ハイブリッドオリゴヌクレオチドはホスホロチオエートオリゴヌ
クレオチドより免疫原性が低いと考えられた。2' - O - メチル領域にホスホジエステル連
結を有する逆ハイブリッドオリゴヌクレオチドは、該領域にホスホロチオエート連結を有
するものより免疫原性がわずかに低いようであった。2' - O - メチルリボヌクレオチド
領域を 13 ヌクレオチドから 11 または 9 ヌクレオチドに切りつめても、有糸分裂誘発性
に有意差はみられなかった。逆キメラオリゴヌクレオチドは一般的にホスホロチオエート
オリゴヌクレオチドより有糸分裂誘発性も低かった。さらに、少なくとも伝統的キメラオ
50

リゴヌクレオチドが3'末端付近にかなりの数のメチルホスホネート連結を有する場合、該オリゴヌクレオチドは伝統的キメラオリゴヌクレオチドより有糸分裂誘発性が低いようであった。該オリゴヌクレオチドの真ん中のメチルホスホネートリンカー数の5から6または7への増加は、有糸分裂誘発性に対する有意な作用を有するようには思われなかった。これらの結果は、オリゴヌクレオチドに逆ハイブリッドまたは逆キメラ構造を組み込むことによりその有糸分裂誘発性を低下させ得ることを示している。

実施例 4

逆ハイブリッドおよび逆キメラオリゴヌクレオチドによるインビトロでの凝固阻害低減

オリゴヌクレオチド・誘導有糸分裂誘発性に対する逆ハイブリッドまたは逆キメラ構造の相対的作用を測定するために、下記の実験が行われた。健康な成人志願者から静脈血を集めた。凝固時間の試験のための血漿は、クエン酸ナトリウム含有ケイ素処理真空容器 (vacutainer) (Becton Dickson #367705) 中に集めた血液を入れ、ついで、4 にて2回遠心分離して、血小板を減少させた血漿を調製して用意した。血漿の1部は氷で冷却し、種々の試験化合物を添加し、凝固試験前の - 20 に貯蔵するために直後または急速のいずれかにドライアイスで凍結させて試験した。活性化部分 (partial) トロンボプラスチン時間 (a P T T) を、添付の操作説明書に従って、エレクトラ 1000 C (Medical Laboratory Automation, Mount Vernon, ニューヨーク) で、血餅形成開始のためのアクチン (Baxter Dade、マイアミ、FL) およびカルシウム用いて2連で行い、これを分光光度定量で測定した。a P T Tの延長をオリゴヌクレオチドにより生じた凝固阻害副作用の指標として採用した。逆ハイブリッドオリゴヌクレオチドについて、結果を図5に示し、逆キメラオリゴヌクレオチドについては図8に示した。すべての被験オリゴヌクレオチドのうち、伝統的なホスホロチオエートオリゴヌクレオチドはa P T Tを大きく延長させた。伝統的なハイブリッドオリゴヌクレオチドはいくらか a P T Tの延長を短縮した。伝統的なホスホロチオエートまたは伝統的なハイブリッドオリゴヌクレオチドと比較すると、被験逆ハイブリッドオリゴヌクレオチドのすべてが、著しく a P T Tの延長を短縮した。2'-O-置換リボヌクレオチド領域にホスホジエステル結合をもつ逆ハイブリッドオリゴヌクレオチドはこの副作用を大きく減少させ、13個のヌクレオチドの2'-O-メチルRNAホスホジエステル領域を有するそのようなオリゴヌクレオチドの1つでは、100マイクログラム/mlのオリゴヌクレオチドの濃度であっても、非常にわずかなa P T Tの延長しか示さなかった。伝統的なキメラオリゴヌクレオチドは伝統的なホスホロチオエートよりa P T Tの延長は少なかった。一般に、逆キメラオリゴヌクレオチドはこの特徴を保持した。9個のヌクレオチドのホスホロチオエート領域に近接する7個のヌクレオチドのホスホン酸メチルを有する逆キメラオリゴヌクレオチドの少なくとも1個はこの試験で、最も高い被験オリゴヌクレオチド濃度以外のすべての濃度で、伝統的なキメラオリゴヌクレオチドより良い結果を示した。これらの結果は逆ハイブリッドおよび逆キメラオリゴヌクレオチドが、インビボにおける遺伝子発現を調節するために投与された時に凝固阻害の副作用を減少させる利点をもたらすことができることを示している。

実施例 5

逆ハイブリッドまたは逆キメラオリゴヌクレオチドによるインビボでの補体活性化の低減

アカゲザル (体重 4 ~ 9 kg) を、実験前少なくとも7日間実験室条件に馴化させた。実験当日に各動物をケタミン - HCl (10 mg / kg) およびジアゼパム (0.5 mg / kg) で軽度鎮静させた。実験操作中ずっと連続的ケタミン点滴静注により、外科手術可能な程度の麻酔を誘導し維持した。ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドまたは逆ハイブリッドもしくは逆キメラオリゴヌクレオチドを通常の食塩水に溶解させ、頭部静脈カテーテルを経て注入速度 0.42 ml / 分にてプログラム可能な注入ポンプを用いて静脈内に注入した。各オリゴヌクレオチドにつき、0、0.5、1、2、5、および 10 mg / kg を 10 分間の注入時間にわたって、それぞれ 2 匹の動物に投与した。動脈血試料をオリゴヌクレオチド投与 10 分前、注入開始 2、5、10、20、40 および 60 分後および 24 時間後に採取した。血清は補体 CH50 の測定のために用い、ひつじ赤血球法 (Kabat および Mayer, 1961年、上掲参照) の通常用いる補体 - 依存性溶解を用いた。最も高

10

20

30

40

50

い投与量で、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドでは、注入開始5分以内に血清補体CH50の減少が始まる。逆ハイブリッドおよびキメラオリゴヌクレオチドはこれらの条件下では血清補体CH50のより大きな減少または検出不可能な減少を示すものと予想される。

実施例6

逆ハイブリッドまたは逆キメラオリゴヌクレオチドによるインビボでの有糸分裂誘発性低減

CD1マウスに投与量50mg/kg体重のホスホロチオエートオリゴヌクレオチド、逆ハイブリッドオリゴヌクレオチドまたは逆キメラオリゴヌクレオチドを腹腔内投与する。48時間後、動物を安楽死させ、脾臓を摘出し、計量する。逆ハイブリッドまたは逆キメラオリゴヌクレオチドで処理した動物は脾臓重量に顕著な増加を示さないものと予想されるが、一方オリゴヌクレオチドホスホロチオエートで処理された動物は脾臓重量にまあまあの増加を示すもの予想される。

10

実施例7

逆ハイブリッドまたは逆キメラオリゴヌクレオチドによるインビボでの凝固阻害の低減
アカゲザルを実施例5と同様に処理する。採取された全血から凝固試験のための血漿を調製し、この試験を実施例4と同様に行った。伝統的なオリゴヌクレオチドホスホロチオエートと比較して、逆ハイブリッドオリゴヌクレオチドおよび逆キメラオリゴヌクレオチドの両方につき、aPTTの延長が実質的に減少することが予想される。

20

実施例8

RNアーゼH活性に対する逆ハイブリッドまたはキメラ構造の作用

相補RNA分子に結合したときにRNアーゼHを活性化する逆ハイブリッドオリゴヌクレオチドおよび逆キメラオリゴヌクレオチドの能力を測定するために、下記の実験を行った。オリゴヌクレオチドホスホロチオエート、逆ハイブリッドオリゴヌクレオチドまたは逆キメラオリゴヌクレオチドを相補性オリゴヌクレオチド1モル等量(各0.266マイクロモル濃度)とともに、RNアーゼH緩衝液(20mMトリス-HCl、pH7.5、10mM MgCl₂、0.1M KCl、2%グリセリン、0.1mM DTT)の1ml最終容量を含有するキュベット中でインキュベートした。試料を95℃に加熱し、ついでゆっくりと室温に戻し、アニールさせ、2本鎖を形成させた。アニールさせた2本鎖を37℃にて10分間インキュベートし、ついで5ユニットのRNアーゼHを添加し、3時間にわたってデータの収集を始めた。GBC920(GBC Scientific Equipment、ビクトリア、オーストラリア)分光光度計を用いて259nmにてデータを収集した。RNアーゼH分解は濃色シフトによって測定した。

30

結果を下記の表Iに示す。

表 I

オリゴヌクレオチドのRNアーゼH分解

オリゴNo. (特徴)	半減期	オリゴNo. (特徴)	半減期
GEM91(すべてP0)	8.8 秒	Hyb115(5' MP)	11.5 秒
GEM91(すべてPS)	22.4 秒	Hyb116(キメラ)	9.7 秒
GEM91H(ハイブリッド)	32.7 秒	Hyb117(キメラ)	8.1 秒
Hyb108(逆ハイブリッド)	15.4 秒	Hyb118(逆キメラ)	11.5 秒
Hyb109(逆ハイブリッド)	7.9 秒	Hyb119(逆キメラ)	14.4 秒
Hyb110(逆ハイブリッド)	10.4 秒	Hyb120(逆キメラ)	9.3 秒
Hyb111(逆ハイブリッド)	12.9 秒	Hyb121(3' MP)	21.2 秒
Hyb112(逆ハイブリッド)	12.5 秒	Hyb122(キメラ)	23.0 秒
Hyb113(逆ハイブリッド)	10.9 秒	Hyb123(キメラ)	41.8 秒
Hyb114(逆ハイブリッド)	20.3 秒	Hyb124(キメラ)	検出せず

予想通り、ホスホジエステルオリゴヌクレオチドは、分解半減期 8.8 秒の RNA の RN アーゼ H - 媒介分解のための非常に良好な共基質として行動した。ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドは長い半減期である 22.4 秒を示した。オリゴヌクレオチドのいずれかの末端への 2' - O - メチルリボヌクレオチド切片の導入はさらに RN アーゼ H 活性を悪化させた (半減期 = 32.7 秒)。反対に、オリゴヌクレオチドの中間への 2' - O - メチル切片の導入 (逆ハイブリッド構造) は常に、RN アーゼ H 媒介分解の改善をもたらした。13 個の 2' - O - メチルリボヌクレオチドホスホジエステルの領域が両側でホスホロチオエート DNA と近接しているときは、最も良好な RN アーゼ H 活性が観察され、半減期は 7.9 秒であった。ホスホン酸メチル - 結合ヌクレオシドの大きな塊のオリゴヌクレオチドの 3' 末端への導入は、キメラ立体配置のときでさえ、効果がないか、または RN アーゼ活性をさらに悪化させた。しかし、ホスホン酸メチル - 結合ヌクレオシドのオリゴヌクレオチドの 5' 末端への導入は、特に、3' 末端での単一のホスホン酸メチルリンカーを有するキメラ立体配置では RN アーゼ H 活性を改善させた (最良半減期 = 8.1 秒)。ホスホロチオエート領域が近接したホスホン酸メチルコア領域を有する逆キメラオリゴヌクレオチドはすべて良好な RN アーゼ活性結果を示し、9.3 ~ 14.4 秒の半減期であった。これらの結果は、ホスホロチオエート - 含有オリゴヌクレオチド中への逆ハイブリッドまたは逆キメラ構造の導入が、RN アーゼ H のための共基質として働くオリゴヌクレオチドの能力、有効なアンチセンス剤のための潜在的に重要な特性、のかなりまたはすべてを回復させることを示している。

実施例 9

融解温度に対する逆ハイブリッドまたはキメラ構造の効果

アンチセンスオリゴヌクレオチドと標的分子との間で形成された二本鎖の安定性に対する逆ハイブリッドまたは逆キメラ構造の効果測定のために、次の実験を行った。デュアルルーセルに備え付けられた 10 mm のキュベットを 6 つ有する GBC 920 分光光度計を使用して、熱融解 (T_m) データを集めた。 T_m 実験では、製造業者の指示に従い、GBC により提供されたソフトウェアを使用して、コンピューターによるペルチエ効果温度制御装置によって、その温度を指示して制御した。そのソフトウェアにより行われる一次導関数法および中点法の両方により、 T_m データを分析した。 T_m 実験は、10 mM PIPE

S, pH 7.0、1mM EDTA、1M NaClを含む緩衝液中で行った。VWR 1166 (VWR、ボストン、マサチューセッツ) 冷凍浴をペルチエ効果温度制御装置に接続して、熱を吸収した。260nmでの吸光度値を使用し、吸光係数を考慮に入れて、オリゴヌクレオチド鎖濃度を測定した。
その結果を以下の表IIに示す。

表 II

オリゴヌクレオチドの二本鎖の安定性

オリゴの番号 (特徴)	T _m (°C) *	
GEM91 (全てPO)	72.0	10
GEM91 (全てPS)	63.6	
GEM91H (ハイブリッド)	67.0	
Hyb108 (逆方向ハイブリッド)	76.4	
Hyb109 (逆方向ハイブリッド)	80.0	
Hyb110 (逆方向ハイブリッド)	74.2	20
Hyb111 (逆方向ハイブリッド)	76.9	
Hyb112 (逆方向ハイブリッド)	72.1	
Hyb113 (逆方向ハイブリッド)	74.3	
Hyb114 (逆方向ハイブリッド)	71.3	
Hyb115 (5' MP)	61.8	30
Hyb116 (キメラ)	61.0	
Hyb117 (キメラ)	60.5	
Hyb118 (逆方向キメラ)	57.9	
Hyb119 (逆方向キメラ)	57.7	
Hyb120 (逆方向キメラ)	56.8	
Hyb121 (3' MP)	60.7	40
Hyb122 (キメラ)	60.5	
Hyb123 (キメラ)	59.0	
Hyb124 (キメラ)	検出されなかった	

* = 相補的RNAを有する。

これらの結果は、ホスホジエステルオリゴヌクレオチドのホスホロチオエートオリゴヌクレオチドへの転換が二本鎖の安定性の減少を引き起こし、またメチルホスホネート結合の導入がさらに二本鎖の安定性を減少させることを示す。二本鎖の安定性は、2'-O-M

チルリボヌクレオチドを添加することにより回復させることができ、逆ハイブリッド構造が使用される場合には、ホスホジエステルオリゴヌクレオチドの安定性を上回り得る。逆に、逆キメラ構造の使用は、メチルホスホネートを含むオリゴヌクレオチドのいずれのハイブリダイジングに関して観察されるより最も低い融解温度を生ずるが、二本鎖の安定性は、それでもなお生理的溫度以上に十分であった。ひとまとめに考えてみると、これらの結果は、特定の実験的または治療的応用において所望される特定の二本鎖の安定性のために、逆ハイブリッドまたは逆キメラ構造が注文設計のオリゴヌクレオチドに使用され得ることを示す。

【 図 1 】

Hyb108 5' CTC TCG CAC CCA UCU CUC UCC TTC T [配列番号: 1]
 Hyb109 5' CTC TCG CAC CCA UCU CUC UCC TTC T [配列番号: 2]
 Hyb110 5' CTC TCG CAC CCA UCU CUC TCC TTC T [配列番号: 3]
 Hyb111 5' CTC TCG CAC CCA UCU CUC TCC TTC T [配列番号: 4]
 Hyb112 5' CTC TCG CAC CCA UCU CUC TCC TTC T [配列番号: 5]
 Hyb113 5' CTC TCG CAC CCA UCU CUC TCC TTC T [配列番号: 6]
 Hyb114 5' CTC TCG CAC CCA UCU CTC TCC TTC T [配列番号: 7]
 Gem91-H 5' CUC UCG CAC CCA TCT CTC TCC UUC U [配列番号: 8]
 Gem91 5' CTC TCG CAC CCA TCT CTC TCC TTC T [配列番号: 9]
 Gem91PO 5' CTC TCG CAC CCA TCT CTC TCC TTC T [配列番号: 10]

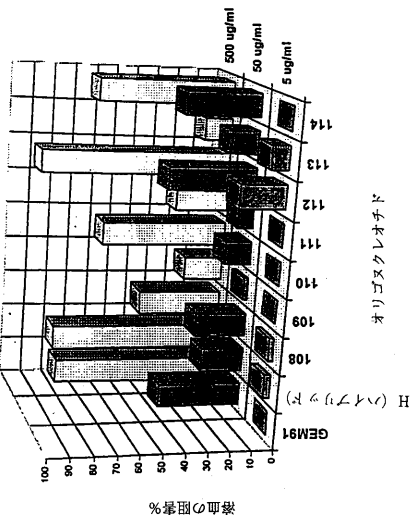
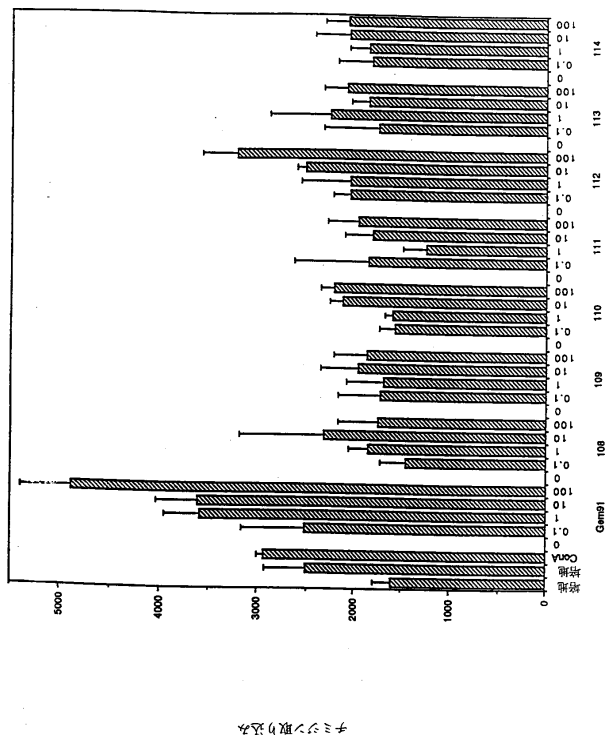
Fig. 1

【 図 2 】

Hyb115 5' CTC TCG CAC CCA TCT CTC TCC TTC T 3' [配列番号: 11]
 Hyb116 5' CTC TCG CAC CCA TCT CTC TCC TTC T 3' [配列番号: 12]
 Hyb117 5' CTC TCG CAC CCA TCT CTC TCC TTC T 3' [配列番号: 13]
 Hyb118 5' CTC TCG CAC CCA TCT CTC TCC TTC T 3' [配列番号: 14]
 Hyb119 5' CTC TCG CAC CCA TCT CTC TCC TTC T 3' [配列番号: 15]
 Hyb120 5' CTC TCG CAC CCA TCT CTC TCC TTC T 3' [配列番号: 16]
 Hyb121 5' CTC TCG CAC CCA TCT CTC TCC TTC T 3' [配列番号: 17]
 Hyb122 5' CTC TCG CAC CCA TCT CTC TCC TTC T 3' [配列番号: 18]
 Hyb123 5' CTC TCG CAC CCA TCT CTC TCC TTC T 3' [配列番号: 19]
 Hyb124 5' CTT CCT CTC TCT ACC ACA GCT CTC T 3' [配列番号: 20]

Fig. 2

FIG. 4



凝血阻害%

凝血阻害%

【図5】

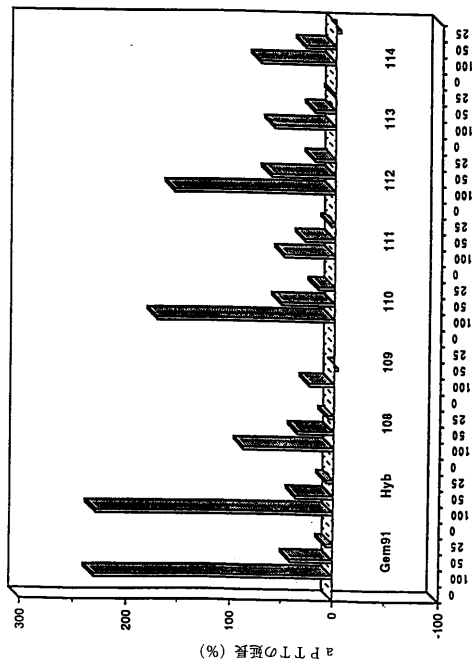
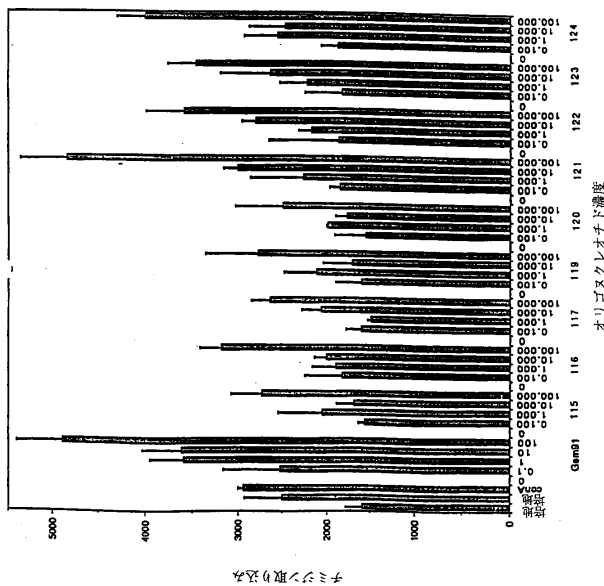


Fig 5

濃度 (μg/ml)



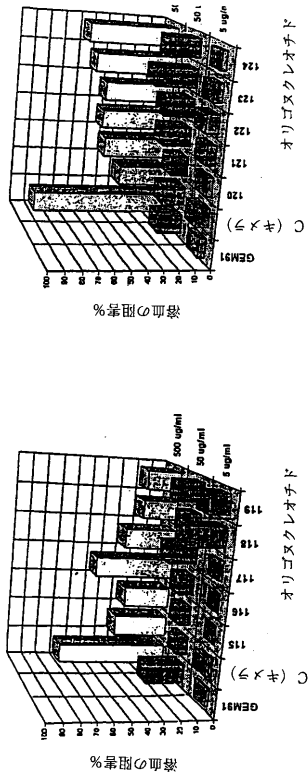
aPTTの延長 (%)

チミン取り込み

オリゴスクレオチド濃度

【図7】

化合物HYB0108-0124との比較データ



【図8】

Fig.7

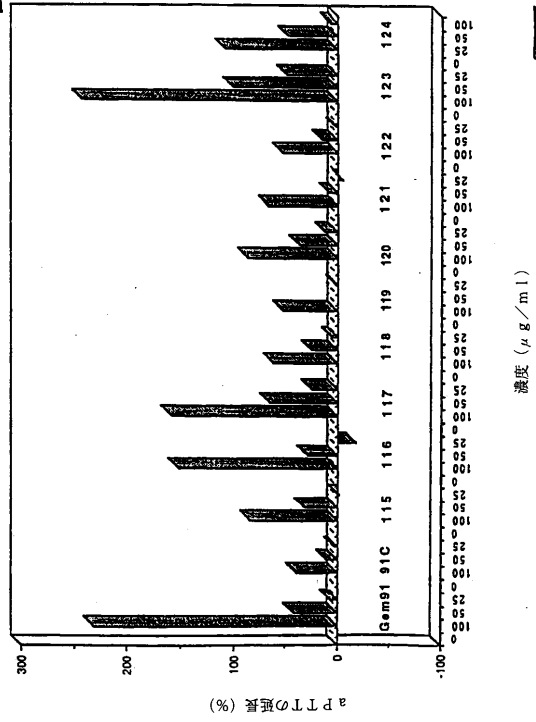


Fig.8

フロントページの続き

審査官 新留 素子

- (56)参考文献 特表平06-504679(JP,A)
特表平07-503856(JP,A)
特表平06-511387(JP,A)
国際公開第94/007367(WO,A1)
国際公開第94/023028(WO,A1)
Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1994年, Vol.4, No.24, pp.2929-2934
The Journal of Biological Chemistry, 1993年, Vol.268, No.19, pp.14514-14522

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07H 21/00
A61K 31/7125
A61K 48/00
C12N 15/09
CAplus(STN)
CAOLD(STN)
REGISTRY(STN)
MEDLINE(STN)
BIOSIS(STN)
EMBASE(STN)