

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3911703号
(P3911703)

(45) 発行日 平成19年5月9日(2007.5.9)

(24) 登録日 平成19年2月9日(2007.2.9)

(51) Int. Cl.	F I
C O 7 H 21/02 (2006.01)	C O 7 H 21/02
C O 7 H 21/04 (2006.01)	C O 7 H 21/04 Z
A 6 1 K 31/7115 (2006.01)	A 6 1 K 31/7115
A 6 1 K 31/7125 (2006.01)	A 6 1 K 31/7125
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1
請求項の数 3 (全 20 頁) 最終頁に続く	

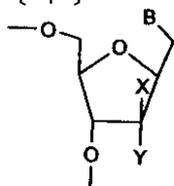
<p>(21) 出願番号 特願平8-518608 (86) (22) 出願日 平成7年12月15日(1995.12.15) (86) 国際出願番号 PCT/JP1995/002584 (87) 国際公開番号 W01996/018640 (87) 国際公開日 平成8年6月20日(1996.6.20) 審査請求日 平成14年8月27日(2002.8.27) (31) 優先権主張番号 特願平6-312251 (32) 優先日 平成6年12月15日(1994.12.15) (33) 優先権主張国 日本国(JP)</p>	<p>(73) 特許権者 日本新薬株式会社 京都府京都市南区吉祥院西ノ庄門口町14番地 (72) 発明者 大木 忠明 滋賀県大津市国分2丁目24-33 (72) 発明者 石山 幸一 滋賀県草津市南笠町1481-88 審査官 山田 拓</p> <p style="text-align: right;">最終頁に続く</p>
--	--

(54) 【発明の名称】 アンチセンス核酸同族体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

リン酸ジエステル結合が修飾されていてもよい天然のDNA又はRNAにおいて、その5'及び3'の両末端それぞれの1つ以上同数の連続するヌクレオシドが、次の部分構造式〔1〕



〔1〕

(式中、Bは、アデニン-9-イル、グアニン-9-イル、ヒポキサンチン-9-イル、チミン-1-イル、ウラシル-1-イル又はシトシン-1-イルを表す。X, Yは、同一又は異なって水素、ヒドロキシ、ハロゲン又は低級アルコキシを表す。)で表されるヌクレオシドであり、その構成比が全ヌクレオシドの60%以下であることを特徴とする、総塩基数が4~30の化合物若しくはその塩又はそれらの溶媒和物。

【請求項2】

修飾されているリン酸ジエステル結合が、ホスホロチオエート結合、アルキルホスホロチオエート結合、N-アルキルホスホアミデート結合、ホスホロジチオエート結合及びアル

キルホスホネート結合からなる群から選択される結合である請求項 1 記載の化合物。

【請求項 3】

請求項 1 又は請求項 2 記載の化合物を有効成分とする医薬。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、医薬品として有用な、アンチセンス核酸同族体に関する。更に詳しくは、DNA 又は RNA に特異的に結合し、複合体を形成することにより、当該 DNA 又は RNA が担っていた遺伝子情報の伝達を選択的に不活性化、活性化又は制御する機能を有するアンチセンス分子に関する。

背景技術

遺伝子は通常、相補的な塩基配列からなる二本鎖 DNA の形態を有し、一方の鎖上にアミノ酸配列情報としての意味を持つ暗号配列（センス配列）がコードされている。この配列に相補的なオリゴヌクレオチドは、センス配列に特異的に結合することができ、この結合が強固な場合には目的とする一定領域に蓋をする形で遺伝子機能を選択的に不活性化、活性化又は制御することができる。このような機能を持った化合物をアンチセンス分子という。

アンチセンス分子は、このように DNA に対して結合して、メッセンジャー RNA が生成する過程を阻害することができる。また、RNA に対しても結合し、メッセンジャー RNA から蛋白質が翻訳される過程を選択的に阻害することができる（Harold M. Weintraub、Scientific American、34-40 1990）。

以上の原理に基づき、アンチセンス分子は、生体機能の鮮明や制御に役立てることができることから、式〔101〕～〔108〕、〔111〕～〔112〕で示す（式中、B は核酸塩基、R、R' は水素、アルキル基又はその他の置換基を表す）核酸同族体が合成されている（村上ら、有機合成化学、第48巻第3号、180～193 1990；村上章、細胞工学、第13巻第4号、259～266 1994）。

(A) DNA 型オリゴヌクレオチド誘導体（部分構造を式〔101〕に示す）

(B) RNA 型オリゴヌクレオチド誘導体（部分構造を式〔102〕に示す）

(C) リン酸トリエステル型オリゴヌクレオチド誘導体（部分構造を式〔103〕に示す）

(D) メチルホスホネート型オリゴヌクレオチド誘導体（部分構造を式〔104〕に示す）

(E) ホスホロアミデート型オリゴヌクレオチド誘導体（部分構造を式〔105〕に示す）

(F) ホスホロチオエート型オリゴヌクレオチド誘導体（部分構造を式〔106〕に示す）

(G) ホスホロジチオエート型オリゴヌクレオチド誘導体（部分構造を式〔107〕に示す）

(H) カルバメート型オリゴヌクレオチド誘導体（部分構造を式〔108〕に示す）

(I) チオカルバメート型オリゴヌクレオチド誘導体（構造を式〔109〕に示す）

(J) チオカルバメートホスホジエステル型オリゴヌクレオチド誘導体（構造を式〔110〕に示す）

(K) -アノマー型オリゴヌクレオチド誘導体（部分構造を式〔111〕に示す）

(L) エナンチオ型オリゴヌクレオチド誘導体（部分構造を式〔112〕に示す）

(M) その他非リン酸結合型オリゴヌクレオチド誘導体（部分構造を式〔113〕～〔116〕に示す）

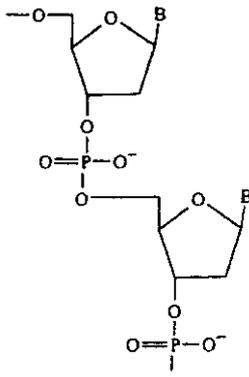
いずれも天然の核酸構造（部分構造式〔1〕）を改造することで、生体内で機能するアンチセンス分子を提供することを目指したものである。

10

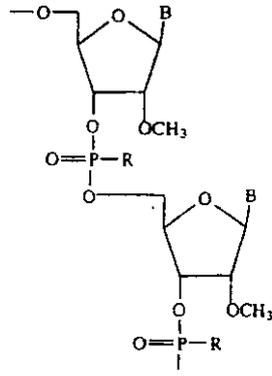
20

30

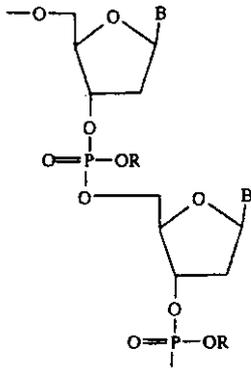
40



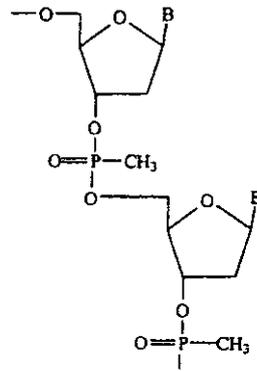
式〔101〕



式〔102〕

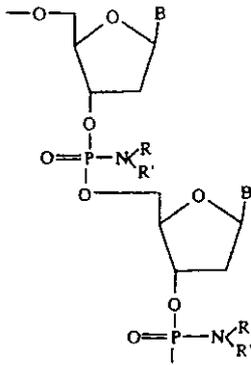


式〔103〕

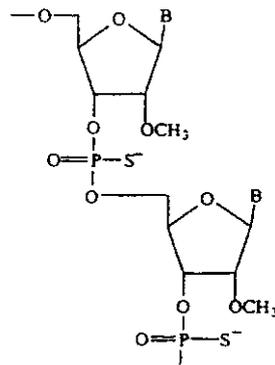


式〔104〕

10

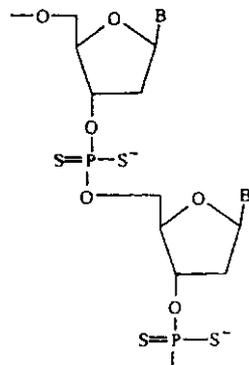


式〔105〕



式〔106〕

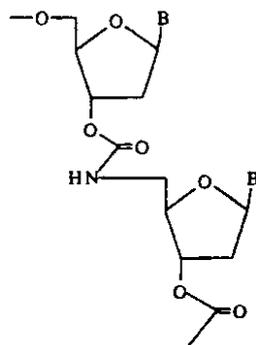
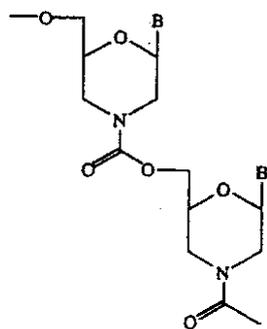
20



式〔107〕

30

40

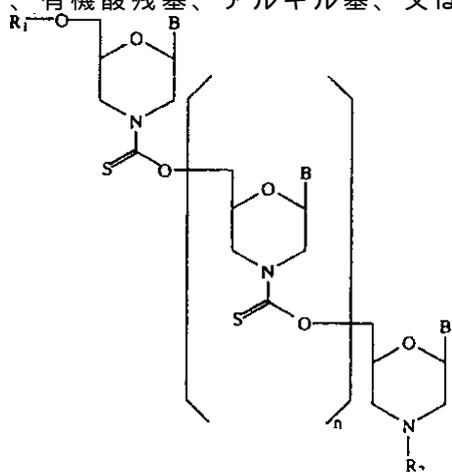


及び

10

式〔108〕

次に構造式〔109〕を表す。式中Bは、核酸塩基を表し、R₁、R₂は水素、無機酸残基、有機酸残基、アルキル基、又はアシル基を表す。nは、自然数を表す。

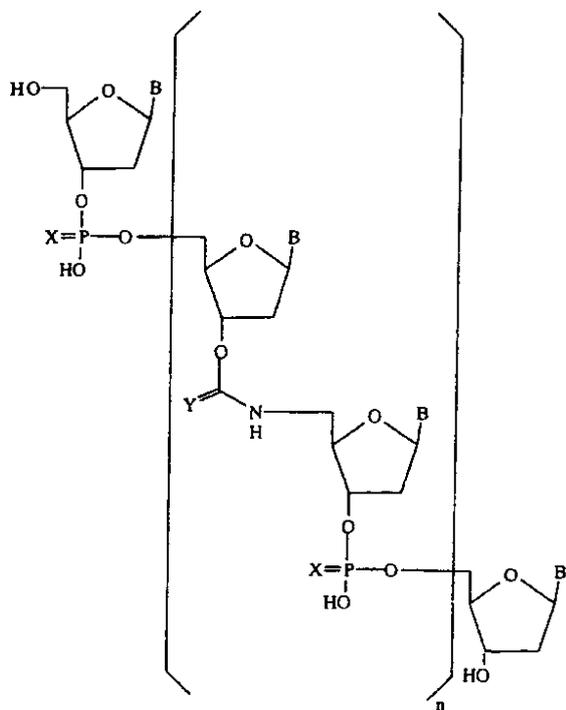


20

式〔109〕

次に構造式〔110〕を表す。式中Bは、核酸塩基を表し、X、Yは同一又は異なって、硫黄又は酸素を表す。nは自然数を表す。

30

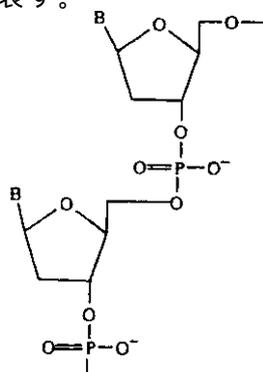
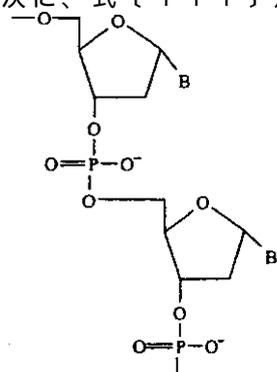


10

式〔110〕

20

次に、式〔111〕及び式〔112〕を表す。

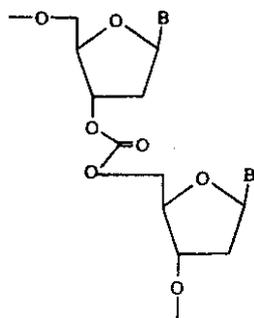


30

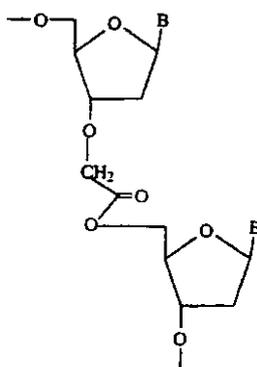
式〔111〕

式〔112〕

次に式〔113〕、式〔114〕、式〔115〕、式〔116〕を示す。式中Bは核酸塩基を表す。Rはアルキル基又は、フェニル基を表す。

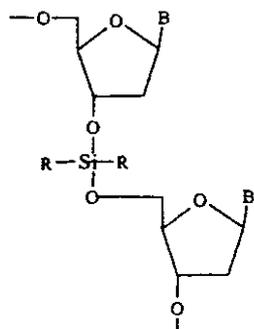


式〔113〕

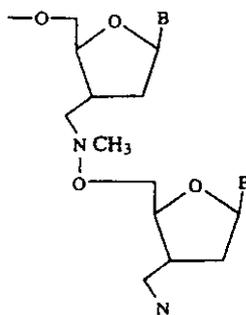


式〔114〕

10



式〔115〕



式〔116〕

20

この他にも核酸同族体について報告されているが (John A. Montgomery and Kathleen Hewson., J. Heterocycl. Chem., 7 Apr. 443-445 1970; Antonium Holy., Collection Czechoslov. Chem. Commun., 35 81-88 1970; Michael W. Winkley., Carbohydr. Res., 31 245-254 1973.)、これらは、いずれもアンチセンスへの適用は開示されていない。また、上記の化合物を含め他にも多くの核酸同族体が合成されているが (例えば、米国特許第5,034,506号記載の核酸同族体など)、必ずしも満足すべき効果は得られておらず、次の1)~8)の条件を十分に備えた実用性の高いアンチセンス分子の開発には至っていない。

30

1) DNA 又は、RNA への結合安定性 (複合体形成能)

2) 核酸分解酵素に対する抵抗性

3) 酸、アルカリ、温度、湿度に対する物理的・化学的安定性

4) 低細胞毒性

5) 認識配列への結合特異性

6) 合成の簡便性

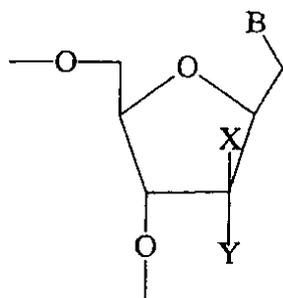
7) 水又は緩衝液に対する溶解性

8) 不斉リンの発生が伴わない調製、即ち、従来の調整法の欠点である、リン酸エステル部分の修飾に伴う、不斉リンジアステロマーの発生により、核酸が長くなるにつれて多くの異性体 (n マーに対して 2^{n-1} 個の異性体; ここで n は自然数を示す) が生じることによる、有用な分子の含量の相対的な減少を解消すること

40

発明の開示

本発明者らは、前記1)~8)の条件を十分に備えた実用性の高いアンチセンス分子の開発を目的として鋭意検討を行った結果、次の部分構造式〔1〕



〔1〕

(式中、Bは、アデニン-9-イル、グアニン-9-イル、ヒポキサンチン-9-イル、チミン-1-イル、ウラシル-1-イル又はシトシン-1-イルを表す。X、Yは、同一又は異なって水素、ヒドロキシ、ハロゲン又はアルコキシを表す)で表されるヌクレオシド同族体を、DNA、RNA又はリン酸ジエステル結合が修飾若しくは置換された核酸同族体の同一鎖中に、少なくとも一つ以上含むアンチセンス分子が、上記目的を解決し優れたアンチセンス分子としての性質を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

部分構造式〔1〕で表されるヌクレオシドに含まれるハロゲンとしては、塩素、臭素又はフッ素が挙げられる。低級アルコキシとしては、直鎖状又は分枝鎖状の炭素数1から8のものが挙げられる。具体的には、メトキシ、エトキシ、n-プロポキシ、イソプロポキシ、n-ブトキシ、iso-ブトキシ、sec-ブトキシ又はt-ブトキシが挙げられる。

本発明のアンチセンス分子は、部分構造式〔1〕で表される部分構造を有するヌクレオシドを含むことにより、各種の核酸分解酵素に対し抵抗性を示すことができる。特に5'末端若しくは3'末端又は両末端に該ヌクレオシドを有する分子は、エキソヌクラーゼに対し顕著な抵抗性を示す。更に、両末端付近に連続的に又は断続的に複数個、例えばそれぞれ2～9残基の該ヌクレオシド同族体を含むものは、より強い抵抗性を示すことが期待できる。

本発明に含まれるヌクレオシドは、特に従来のアンチセンス分子の構成要素(例えば、カルバメート型オリゴヌクレオチド誘導体(式〔108〕)を構成するカルバメート型ヌクレオシド)に比べて、水等に対する溶解性が極めて高い。従って、該ヌクレオシドをDNA、RNA又はリン酸ジエステル結合が修飾若しくは置換された核酸同族体に、一残基以上無制限に含んでも水等に対する溶解性は顕著には低下しない。

天然のDNA又はRNA中に該ヌクレオシドが適当数含まれる方が、立体構造の自由度が制限されることは少なくなり、会合が安定となりアンチセンス分子としての機能を発揮し易く好ましい。

該ヌクレオシドの含量は1アンチセンス核酸同族体中に、1残基以上、分子を構成する全ての残基の80%以下が適当である。好ましいのは5'、3'の両末端にそれぞれ1残基以上ほぼ同数の該ヌクレオシドを連続して有し、その構成比が、含まれる分子の全てのヌクレオシド残基の60%以下である。

また、該ヌクレオシドの糖の部分の構造は、含まれるアンチセンス核酸同族体を構成している他の核酸(例えばリボース又はデオキシリボース)と同一である方が、側鎖の立体ラセン構造の均一性が保たれ、特に認識配列への結合特異性に優れることが期待される。一方、分解酵素に対する抵抗性は、糖部分の構造が天然型と異なる方が大きいと考えられ、必要性に応じて適宜選択するのがよい。

本発明のアンチセンス分子は、従来のアンチセンス分子と比較し、前述の1)の条件を保ちながら2),3),4),5),6),7)の条件において、極めて優れた特性を有する。

本発明のアンチセンス分子は、特に従来のアンチセンス分子(例えば、カルバメート型オリゴヌクレオチド誘導体(式〔108〕)に比べて、その水等に対する溶解性が極めて高い。従って、本発明のアンチセンス分子は、水溶性の高いDNA又はRNAと結合する割合が高くなるので、医療分野において高い有用性を期待することができる。

本発明のアンチセンス核酸同族体は、生体内に投与する際、特にカチオニックリボソーム

10

20

30

40

50

と複合体を形成することにより、細胞内への移行がしやすくなり、天然のDNA等と核酸と同等以上のアンチセンス効果を発揮する。

分解酵素に対してより強力な抵抗性が要求される場合においては、例えば〔101〕～〔106〕で示されたリン酸ジエステル結合部分の修飾又は置換と組み合わせることも可能である。リン酸エステル結合の修飾体又は置換体としては、ホスホロチオエート結合、アルキルホスホロチオエート結合、N-アルキルホスホアミデート結合、ホスホロジチオエート結合又はアルキルホスホネート結合等が挙げられるが、短鎖のアルキル又はシクロアルキル構造も有用である。勿論必要に応じ、他の結合も選択することができる。

アンチセンス分子は、一般に塩基の数が増える程、活性及び選択性が高くなる。本発明のアンチセンス核酸同族体1分子に含まれる塩基の数は1～50が好ましく、4～30が更に好ましい。

10

本発明アンチセンス核酸同族体の塩基配列は、不活性化、活性化又は制御されるべきDNA又はRNAの塩基配列と相補的なものが選ばれる。

本発明のアンチセンス分子はRNase Hの基質になることが判っている。この性質は生体内に投与したとき、遺伝子の不活性化のみならず、ハイブリッドを形成したmRNAを積極的に分解することに関与することを示し、高い有用性を有している。

後述するように、本発明アンチセンス分子は、HER-2発現細胞における膜受容体蛋白質の合成抑制作用等の薬理作用を有するので、例えば抗癌剤等として極めて有用である。

本発明に係るアンチセンス分子の用途としては、本発明アンチセンス分子がその相補的な遺伝子情報を不活性化することから、生体に侵入した異物、例えば、ヘルペスウイルス、インフルエンザウイルス、ヒト免疫不全症ウイルス(HIV、エイズウイルス等)等の感染や癌遺伝子の働きを抑える医薬としての利用が可能である。また、積極的に動物や植物の遺伝子を制御して、品種改良等の技術に応用され得る。更に、遺伝子機能の解析や、遺伝性疾患、細菌及びウイルスの感染チェック等のDNAプローブとしての可能性も有しており、また上記記載以外にも多くの有用性が考えられる。

20

本発明アンチセンス核酸同族体の主構成要素である該ヌクレオシドは、天然のヌクレオシドと同等に細胞毒性が低く、従って、DNA又はRNAに該ヌクレオシドが含まれたアンチセンス分子の毒性も天然の核酸と同等に、極めて低い。

本発明アンチセンス分子を医薬として用いる場合、本発明の化合物をそのまま、又は医薬的に許容される無毒性かつ不活性の単位中に包含させて投与する。

30

担体としては、液状、固形、又は半固形の希釈剤、充填剤、及びその他の処方用の助剤が一種以上用いられる。医薬組成物は、投与担体形態で投与することが望ましい。本発明アンチセンス分子は、経口投与、組織内投与、局所投与又は経直腸的に投与することができる。

これらの投与方法に適した剤型、例えば、各種の経口剤、注射剤、吸入剤、点眼剤、軟膏剤、坐剤等、で投与されるのはもちろんである。特に、組織内投与、局所投与が好ましい。

用量としては、疾病の種類、症状、年齢、体重等によって異なるが、例えばヘルペスの治療に用いる場合、成人に対し1日1回、アンチセンス分子として1mg～1gの局所投与が適している。また、エイズの治療に際しては、成人に対し1日1回、アンチセンス分子として1mg～10gの点滴静注するのが一般的である。

40

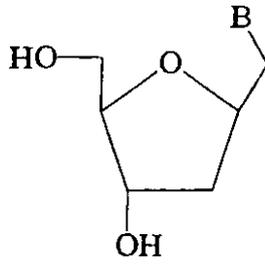
投与方法や投与量は、治療目的や用いる本発明アンチセンス分子の種類により、適宜変化させるのがよい。

(合成方法)

次に、本発明アンチセンス核酸同族体の一般的な合成方法を記述する。

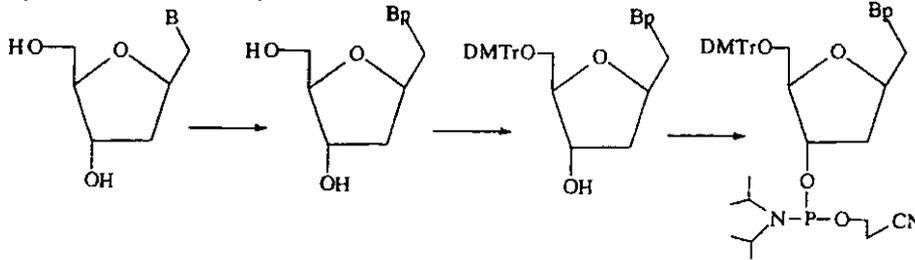
次の式中Bは、アデニン-9-イル、グアニン-9-イル又はシトシン-1-イルを、Bpは保護されたアデニン-9-イル、グアニン-9-イル若しくはシトシン-1-イルを又は保護処理を受けないヒポキサンチン-9-イル、チミン-1-イル若しくはウラシル-1-イルを表す。

(ヌクレオシド誘導体)



〔11〕

(アミダイト試薬)



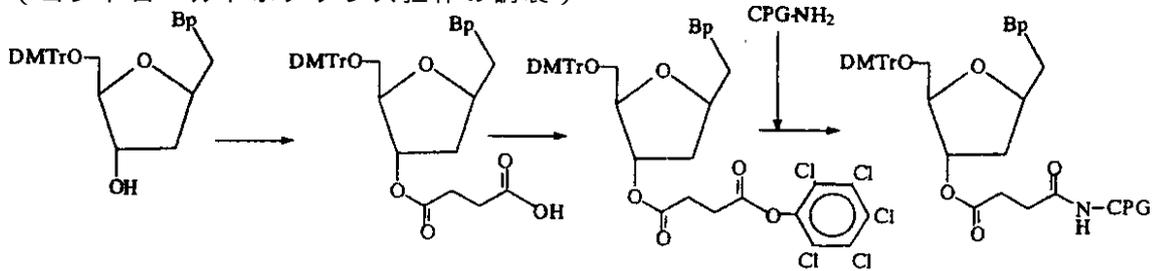
〔11〕

〔12〕

〔13〕

〔14〕

(コントロールドポアガラス担体の調製)



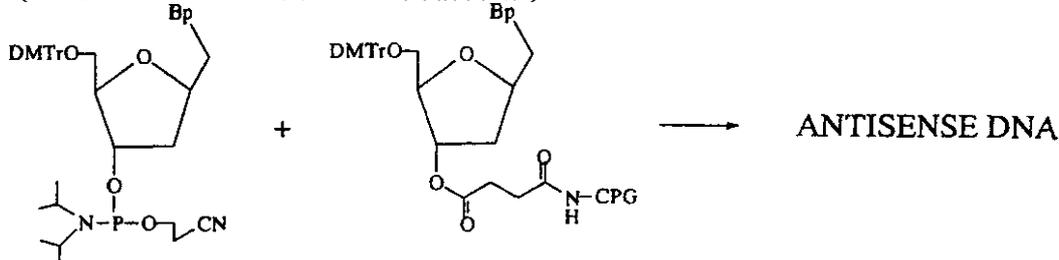
〔13〕

〔15〕

〔16〕

〔17〕

(フォスファタイド法による固相合成)



〔14〕

〔17〕

〔18〕

操作1 大木らの方法(WO95/15964)で調製したホモタイプヌクレオシド〔11〕を、Bがアデニン-9-イル又はシトシン-1-の場合には、例えばピリジン溶液中で塩化ベンゾイルと、Bがグアニン-9-イルの場合には例えば塩化イソブチリルと反応させた後、水酸化ナトリウム溶液による加水分解、次いで中和の過程を経て、塩基部を保護されたヌクレオシド誘導体〔12〕を得ることができる。Bがヒポキサンチン-9-イル、チミン-1-イル又はウラシル-1-イルの場合、大木らの方法で調製したホモタイプヌクレオシドをそのままBpとして用いることができる。

操作2 操作1で得た〔12〕を例えばピリジン溶液中、4、4'-ジメトキシトリチルクロライドと反応させることにより、5'-水酸基が保護されたジメトキシトリチル体〔13〕を得ることができる。

操作3 固相法のうち、いわゆるアミダイト法による自動合成用の試薬にするために、例えば化合物〔13〕をリン酸化剤とケスター等の方法(H.Koester等、Nucleic Acids Res

10

20

30

40

50

上記に準じた方法により合成することができる。

本発明に係る化合物は遊離のリン酸のまま治療に用いることができるが、公知の方法により薬学的に許容される塩の形にして用いることもできる。塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩を挙げることができる。

例えば、本発明に係る、遊離のリン酸を有する化合物のアルカリ金属塩は、好ましくは、アルコール系溶媒中で、水酸化ナトリウム又は水酸化カリウムなどを加えることにより得ることができる。

本発明に係る化合物は、通常分離精製手段、例えば、抽出、濃縮、中和、ろ過、再結晶、カラムクロマトグラフィー、逆層クロマトグラフィーなどの手段を用いることにより単離精製することができる。

本発明に係る化合物又はその塩の溶媒和物（水和物を含む）も本発明に含まれる。溶媒和物は通常、対応する溶媒又は対応する溶媒を含む適当な混合溶媒から過剰な溶媒を除去することにより得ることができる。

発明を実施するための最良の形態

以下に実施例、参考例、試験例及び比較例により、本発明を更に詳しく説明するが、本発明は、これらに限定されない。

実施例

実施例 1 式〔1〕において $X = H$ 、 $Y = H$ であるヌクレオシドを含む、DNAタイプアンチセンス分子： $5' a a a a a A A A A A A A A A A A A A a a a a a 3'$ （ a はヌクレオシド同族体のうち塩基がアデニン-9-イルのもの、 A はデオキシアデノシンをそれぞれ表す。特記しない限り、ヌクレオシド間の結合は3' 5'のホスホジエステル結合を示す。以下 $hA_{10}A_{15}$ と表記する）の合成。

1) アミダイト試薬の合成

1-1) 化合物〔12〕（但し、 Bp は N^6 -ベンゾイルアデニン-9-イルの場合）の合成

大木らの方法（WO 95 / 15964）により得た式〔11〕で表されるヌクレオシド同族体のうち塩基がアデニンのもの（以下ホモタイプアデノシンという）2.60gをピリジン30mlに懸濁・攪拌し、氷冷下、塩化ベンゾイル8.43gを加えた後、室温で1時間反応させた。クロロホルム100ml、氷70g及び炭酸水素ナトリウム5.48gの混合物に上記反応液を加えた後、分液処理し有機層を分取した。残った水層を更に塩化メチレン50mlで2回抽出し、有機層を合わせ、硫酸ナトリウム乾燥後、溶媒を減圧留去した。

残渣にピリジン20ml、エタノール30mlを加え、氷冷下2規定水酸化ナトリウム溶液40mlとエタノール40mlの混液を加えた。室温で30分攪拌後、2規定塩酸を40ml加えて中和した。更に水200mlを加えた後、エーテルで水層を抽出分液した後、水層を減圧濃縮した。これを冷暗所で一夜放置すると、化合物〔12〕（但し、 Bp は N^6 -ベンゾイルアデニンの場合）が白色沈澱物として3.11g得られた。

1-2) 化合物〔13〕（但し、 Bp は N^6 -ベンゾイルアデニン-9-イルの場合）の合成

1-1)で得た化合物〔12〕3.0gをピリジン35mlに溶解し、4、4'-ジメトキシトリチルクロライド（和光純薬（株））3.03gを加え室温で一夜反応した。反応液にメタノール5mlを加えた後、溶媒を減圧留去した。塩化メチレン-水にて分液処理し得られた有機層を硫酸ナトリウム乾燥後、減圧濃縮乾固した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（シリカゲル-120g、メタノール/塩化メチレン）で精製し、白色粉末として化合物〔13〕3.97gを得た。

1-3) 化合物〔14〕（但し、 Bp は N^6 -ベンゾイルアデニン-9-イルの場合）の合成

1-2)で得た化合物〔13〕200mgを使用直前にピリジンと共沸し、次いでトルエンと共沸、そしてテトラヒドロフラン（以下THFと略す）と共沸し、容器内を窒素ガス置換後、無水THF 3mlに溶解した。この溶液に N,N -ジイソプロピルエチルアミンを0.22ml、2-シアノエチル N,N -ジイソプロピルクロロホスホアミダイト（シグマ社製）を0.15ml加え、室温で30分攪拌した。析出した塩をガラスフィルターで濾去し、濾液を減圧濃縮し、乾固した。それぞれ窒素ガスで飽和した酢酸エチル及び飽和炭酸水素ナトリウム溶液で残渣を分配し、得られた有機層を硫酸ナトリウム乾燥後、減圧濃縮乾固した。この残渣を窒素ガ

10

20

30

40

50

スで飽和したn-ヘキサンで粉末化し、化合物〔14〕（但し、BpはN⁶-ベンゾイルアデニン-9-イルの場合）を白色粉末として174mg得た。高速原子衝撃質量分析法（以下FAB法と略す）にて分子量を測定したところ、分子量は871であった。この化合物〔14〕を以下DNA自動合成機（パーキン・エルマー社）のための試薬として用いた。

2) DNA合成機用CPG担体の調製

1-2)で得た化合物〔13〕470mgを塩化メチレン3mlに溶解し、4-ジメチルアミノピリジン23mg及び無水コハク酸105mgを加えて室温で3時間攪拌した。塩化メチレン10ml及び0.5Mリン酸二水素カリウム液10mlを加えて分配し、有機層を分取した。この有機層を水洗し、硫酸ナトリウム乾燥後、減圧乾固した。その結果、白色粉末としてコハク酸誘導体〔15〕（但し、BpはN⁶-ベンゾイルアデニン-9-イルの場合）が509mg得られた。

10

このコハク酸誘導体〔15〕（但し、BpはN⁶-ベンゾイルアデニン-9-イルの場合）500mgを無水N,N-ジメチルホルムアミドに溶解し、ペンタクロロフェノールを190mgそしてDCCを200mg加えて室温で一夜攪拌した。析出物をガラスフィルターで濾去し、濾液を減圧濃縮乾固した。残渣に少量のベンゼンを加え再度不溶物を濾去した。濾液を減圧濃縮乾固し、n-ペンタンで粉末化を行うと、白色粉末として492mgの活性化体化合物〔16〕を得た。FAB法にて分子量を測定したところ、分子量は1020であった。

この活性化体化合物〔16〕412mgとアミノ化CPG（Long chain amino-alkyl CPG 500 オングストローム、フナコシ（株））2g、そして無水N,N-ジメチルホルムアミド10mlを混和、懸濁し、トリエチルアミンを0.44ml加えて、室温で3日間振盪した。CPG担体をフィルター濾取し、N,N-ジメチルホルムアミド、次いでピリジン、そして塩化メチレンで洗

20

浄し、減圧乾燥した。このCPG担体に無水酢酸2mlとピリジン6mlを加え懸濁し、室温で一夜振盪した。CPG担体をフィルター濾取し、ピリジンに続いて塩化メチレンで洗浄し、減圧乾燥後、CPG担体〔17〕を2g得た。

3) 5' a a a a a A A A A A A A A A A A A A A a a a a a 3'の合成

核酸塩基1 μ Mに相当する量のCPG担体〔17〕（但し、BpはN⁶-ベンゾイルアデニン-9-イルの場合）約25mgをDNA自動合成機用カラムに充填した。

アミダイト試薬〔14〕170mgを無水アセトニトリル3.4mlに溶解した。市販のアミダイト試薬、[N⁶-ベンゾイル-5'-0-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-デオキシアデノシン3'-0-(2-シアノエチルN,N-ジイソプロピルホスホアミダイト)]（パーキンエルマー社）500mgも無

30

水アセトニトリル5mlに溶解し、これら二つの試薬をDNA自動合成機（パーキンエルマー社）に装着し、合成機のプログラムに従って自動合成を行った。反応終了後、捕集バイアル中のサンプル溶液（濃アンモニア溶液）を55 $^{\circ}$ Cで18時間処理した後、減圧濃縮乾固した。残渣を50mM酢酸-トリエチルアンモニウム緩衝液（pH7.0）（以下TEAA緩衝液と略す）5mlに溶解し、分取用逆相クロマトグラフィー（Preparative RP-18(55~105 μ m)、125オングストローム、 ϕ =10mm \times 100mmカラム ウォーターズ（株））で分取・精製を行った。A液=50mM TEAA緩衝液、B液=40%アセトニトリル（50mM TEAA緩衝液中）を用い、B液が0~100%の濃度勾配で溶出を行った。分画したフラクションの内、酢酸を加えるとオレンジ色を呈する画分を集め、溶媒を減圧留去した後、5mlの80%酢酸を加え15分間室温で放置した。保護基が外れたことをTLCで確認した後、溶媒を減

40

圧留去した。酢酸エチルと水で分液抽出し、水層を減圧乾固すると、目的物が80 O.D. (260 nm)得られた。

実施例2 式〔1〕においてX=H, Y=Hであるヌクレオシドを含む、DNAタイプアンチセンス分子：5' t C C G G T C C C A A T G G A G G G G A A t 3'（tはヌクレオシド同族体のうち塩基がチミン-1-イルのもの、Cはデオキシシトシン、Gはデオキシグアノシン、Tはデオキシチミジン、Aはデオキシアデノシンをそれぞれ表す。特記しない限り、ヌクレオシド間の結合は3' 5'のホスホジエステル結合を示す）の合成。

1) アミダイト試薬の合成

実施例1の1)に示したものと同様の方法でアミダイト試薬〔14〕（但し、Bpはチミン-1-イルの場合）を白色粉末として260mg得た。FAB法にて分子量を測定したところ

50

い限り、ヌクレオシド間の結合は3' 5'のホスホジエステル結合を示す。以下hA₂₂A₃と表記する)の合成。

実施例1と同様の操作により目的物を61 0.D.(260nm)得た。

試験例

試験例1 マウス繊維芽細胞に対する毒性試験

実施例2で得た5't C C G G T C C C A A T G G A G G G G A A t 3'のHER-2遺伝子を発現したマウス繊維芽細胞、NIH3T3-HER2細胞(ディフィオーレら、Methods in Enzymol., 198 272-277, 1991)に対する細胞毒性を、目下のところ最も臨床研究が進んでいるホスホリボチオエート型オリゴヌクレオチドと比較した。対照として用いたホスホリボチオエート型オリゴヌクレオチドの配列は5' C G G T C C C A A T G G A G G G G A A T 3'とし、シユタイン等の方法(シユタイン等、Nucleic Acid Res., 16 3209-3221 1988)により調製した。各被験物質の細胞内への透過性を高める目的で、カチオニックリボソームとの複合体をも試験に用いた。カチオニックリボソームの成分は3-0-(2-ジエチルアミノエチル)カルバモイル-1,2-0-ジオレイルグリセロール(W094/19314号公開参照)と卵黄ホスファチジルエタノールアミン(日本油脂(株))の混合比3:1からなるものを用いた。各被験物質はヌクレオシドの濃度として各々10、3、1又は0.1μMとなるように培地に加えた。カチオニックリボソームとアンチセンスオリゴヌクレオチドとの混合比は2:1とした。NIH3T3-HER2細胞をコーニング社製24穴プレート中で10⁵細胞/ウェルの密度で撒いた後、ダルベッコ変法イーグル培地中で37 °C、5%CO₂の条件で一晩培養した。

培地を新しいものに交換した後、各被験物質を上清中に添加し一晩培養した。

細胞形態を顕微鏡下で判定し、細胞が著しく萎縮した被験物質を細胞毒性有り(表中+で表した)、細胞の形態に変化がなかった被験物質を細胞毒性なし(表中-で表した)とした。結果を表1に示す。

表1. 細胞毒性試験

アンチセンス分子	細胞毒性 (μM)			
	10	3	1	0.1
ホスホリボチオエート型オリゴヌクレオチド	+	-	-	-
ホスホリボチオエート型オリゴヌクレオチド +カチオニックリボソーム	NT	NT	+	-
本発明アンチセンス分子	-	-	-	-
本発明アンチセンス分子 +カチオニックリボソーム	NT	NT	-	-

NT ; 未実験

ホスホリボチオエート型オリゴヌクレオチドは単独でも細胞毒性が比較的強く、カチオニックリボソームとの複合体を形成するとその毒性はより一層増強されるが、一方本発明のアンチセンス分子は単独で添加しても10μMの濃度まで、カチオニックリボソームとの複合体として投与しても1μMの濃度までは毒性を示さなかった。

また実施例3で得た、全てヌクレオシド同族体で構成されている本発明のアンチセンス分

10

20

30

40

50

子も10 μ Mの濃度までは毒性を示さないことも確認されている。試験例2 実施例2で合成した5' t C C G G T C C C A A T G G A G G G G A A t 3'のHER-2合成抑制作用及び毒性試験

実施例2で得た5' t C C G G T C C C A A T G G A G G G G A A t 3'の細胞での蛋白質合成抑制作用を見た。この塩基配列は、EGF受容体ファミリーのひとつであり乳癌の悪性度に関与していると考えられているHER-2遺伝子の5'キャップ領域近傍のアンチセンス配列を示している(ウールリッヒ等、Science, 230 1132-1139 1985)。対照として同じ配列のDNA及び5' C G G T C C C A A T G G A G G G G A A T 3'の配列のホスホロチオエート型オリゴヌクレオチドを用いた。DNAは常法に従いDNA合成機(アプライドバイオシステム社 モデル380B)により、ホスホロチオエート型オリゴヌクレオチド

10

は試験例1に示した方法により調製した。

細胞は、試験例1で示したNIH3T3-HER2細胞を用いた。

各被験物質の細胞内への透過性を高める目的で、カチオニックリポソームとの複合体を細胞に投与した。用いたカチオニックリポソーム及び添加方法は試験例1と同様である。各被験物質はヌクレオシドの濃度として各々1、0.1又は0.01 μ Mとなるように培地に加えた。

NIH3T3-HER2細胞をコーニング社製24穴プレート中で10⁵細胞/ウェルの密度で撒いた後、ダルベッコ変法イーグル培地中で37 $^{\circ}$ C、5%CO₂の条件で一晩培養した。

0.2%の仔牛血清を含む培地に交換して、被験物質の1回目の添加を行なった。7~8時間経過後に仔牛血清濃度を5%にして一晩培養した。メチオニンを含まない0.2%の仔牛血清を含む培地に交換した後、各被験物質の2回目の添加を行なった。添加濃度は1回目と同様である。7~8時間後に³⁵Sメチオニン(アマシャム社、3TBq/mmol)を添加し、仔牛血清濃度を5%にして一晩培養した。

20

細胞形態を顕微鏡下で判定し、細胞が著しく萎縮した被験物質を細胞毒性有り(表中+で表した)、細胞の形態に変化がなかった被験物質を細胞毒性なし(表中-で表した)とした。

細胞を回収し、抗ヒトHER-2抗体(ニチレイ社)を用いて常法によりHER-2蛋白質を免疫沈降した。

7%ポリアクリルアミドゲルSDS電気泳動を行なった後に、イメージアナライザー(FUJIX BAS 2000)を用いてHER-2タンパク質の³⁵Sメチオニンの放射活性を測定することによりHER-2タンパク質の合成量を算定した。被験物質を加えない細胞のHER-2タンパク質の合成量を100%とし、各被験物質添加時のHER-2タンパク質の合成量の減少率を抑制率として表した。

30

毒性試験については試験例1と同様である。

結果を表2に示す。

表2. アンチセンス分子のHER-2蛋白発現抑制作用及び毒性

作用濃度 (μM)	抑制率 (%)	細胞毒性	
ホスホチオエート型オリゴヌクレオチド			
0.01	0	—	
0.1	0	—	
1.0		+	10
DNA			
1.0	42.7		
本発明アンチセンス分子			
1.0	57.8	—	20

本発明のアンチセンス分子はDNAと同濃度でDNAと同等以上のHER-2タンパク質の合成抑制活性を示した。

ホスホチオエート型オリゴヌクレオチドは、0.01~0.1 μM では効果がなく、本発明のアンチセンス分子又はDNAが有効な活性を示す。1.0 μM の濃度では細胞毒性が発現し、活性は測定できなかった。

また、本発明の化合物及びDNAのHER-2遺伝子の5'キャップ領域近傍のセンス配列はHER-2タンパク質の合成抑制活性を示さない。

試験例3 本発明化合物の核酸分解酵素 (Nuclease S1) に対する抵抗性

本発明化合物hA₂₅を被験物質とした。コントロールとして、同じ配列を有する天然DNAオリゴマーdA₂₅を用いた。 30

30mM酢酸緩衝液 (pH4.5) に塩化ナトリウムが50mM、硫酸亜鉛が30mMとなるように加え、この緩衝液に、各被験物質を最終濃度が4 O.D. (260nm) になるように加えた。更に、核酸分解酵素Nuclease S1 (ベーリンガー・マンハイム山之内社) を2000U/mlになるように加え (最終容積50 μl)、37 $^{\circ}\text{C}$ で一夜インキュベートした。反応液をサンプリングし、Lichrospher RP-18 (4 mm I.D. \times 125mm) カラムを用いたHPLCにて被験物質のピークの減少度を測定することにより分解度を算定した。結果を表3に示す。

表3. 本発明物質のNuclease S1 に対する抵抗性

	分解度 (%)	
被験物質	0.7	40
コントロール	>62.9	

コントロールは60%以上が分解されるのに対し、本発明物質は一夜反応後においても、99%以上が分解されずに残った。

試験例4 蛇毒ホスホジエステラーゼに対する本発明物質の抵抗性

実施例2で合成した本発明物質の5' t C C G G T C C C A A T G G A G G G G A A t 3' を被験物質とした。コントロールとして、同じ配列を有する天然DNAオリゴマーを用いた。

各検体を100mM Tris-HCl緩衝液 (pH8.9)、100mM塩化ナトリウム、14mM塩化マグネシウム 50

溶液に最終濃度が4 0.D.(260nm)になるように調製し、蛇毒ホスホジエステラーゼ(コッホ・ライト社)を3.6U/ml濃度になるように加えた(最終容積0.1ml)。37℃で1時間インキュベートし、最終濃度50mMのEDTAを加え反応を止めた。反応液をサンプリングし、Lichrospher RP-18(4 mm I.D. x 125mm)カラムを用いたHPLCにて被験物質のピークの減少度を測定することにより分解度を算定した。結果を表4に示す。

表4. 本発明物質の蛇毒ホスホジエステラーゼに対する抵抗性

	分解度 (%)
被験物質	10.2
コントロール	>62.7

10

コントロールが60%以上分解されるのに対して、本発明の物質は10%程度しか分解されず、蛇毒ホスホジエステラーゼに対する強い抵抗性を示した。

試験例5 仔牛脾臓ホスホジエステラーゼに対する本発明物質の抵抗性

実施例2で合成した本発明物質の5' t C C G G T C C C A A T G G A G G G G A A t 3'を被験物質とした。コントロールとして、同じ配列を有する天然DNAオリゴマーを用いた。

各被験物質を100mMコハク酸アンモニウム緩衝液(pH8.9)、1mM EDTA溶液に最終濃度が4 0.D.(260nm)になるように調製し、仔牛脾臓ホスホジエステラーゼ(ベーリンガー社)を0.2U/ml濃度になるように加えた(最終容積0.1ml)。37℃で一時間インキュベートし、反応液をサンプリングし、Lichro-spher RP-18(4 mm I.D. x 125mm)カラムを用いた高速液体クロマトグラフ(以下HPLCと略す)にて被験物質のピークの減少度を測定することにより分解度を算定した。結果を表5に示す。

20

表5. 本発明物質の仔牛脾臓ホスホジエステラーゼに対する抵抗性

	分解度 (%)
被験物質	<0.9
コントロール	27.6

コントロールが30%近く分解されるのに対して、本発明の物質の分解度は1%以下であり、仔牛脾臓ホスホジエステラーゼに対する強い抵抗性を示した。

30

試験例6 本発明物質に対するRNase Hの基質特異性

本発明物質が天然のRNAとハイブリッドを形成し、RNase Hの基質として認識され、RNAが分解されるか否かにつき調べた。

被験物質としてhA₂₅, hA₂₂A₃, hA₁₈A₇, hA₁₄A₁₁, hA₁₀A₁₅, hA₆A₁₉及びhA₂A₂₃を、コントロールとしてdA₂₅を用いた。ハイブリッドを形成するRNAとしてpoly(U)(S₂₀, W6.6、ヤマサ醤油(株))を用いた。

40mM Tris-HCl緩衝液(pH7.7)、1mMジチオスレイトール、4mM塩化マグネシウム、4%(W/V)グリセロール、0.003%(W/V)仔牛血清アルブミン溶液に最終濃度がそれぞれ4 0.D.(260nm)のpoly(U)及び各被験物質を加え、大腸菌RNase H(宝酒造(株))を100U/ml濃度になるように加えた(最終容積0.1ml)。20℃で18時間インキュベートし、-20℃で凍結し反応を止めた。反応液を解凍後直ちに、TSK G4000PW_{XL}(7.8mm I.D. x 300mm)ゲルろ過カラムを用いたHPLCにてpoly(U)のピークの減少度を測定することにより分解度を算定した。結果を表6に示した。

40

表6. 本発明物質に対するRNase Hの基質特異性

	分解度 (%)
dA ₂₅ (コントロール)	100
hA ₂ A ₂₃	98.3
hA ₆ A	100
hA ₁₀ A ₁₅	98.3
hA ₁₄ A ₁₁	98.3
hA ₁₈ A ₇	96.6

10

hA₁₈A₇, hA₁₄A₁₁, hA₁₀A₁₅, hA₆A₁₉ 及び hA₂A₂₃ は、コントロールとして用いた dA₂₅ と同程度に RNase H の基質になることが示された。

試験例7 DNA又はRNAへの結合安定性

核酸同士が複合体を形成している場合、温度を上げてゆくとある温度の前後で急激に吸光度が増大する。これは核酸のいわゆる淡色効果(hypochromicity)の減少によるものであるが、この前後の吸光度差の2分の1まで吸光度が増大したときの温度(以下T_mという)を測定することにより、核酸との複合体形成能を知ることができる。

被験物質としてhA₂₅, hA₂₂A₃, hA₁₈A₇, hA₁₄A₁₁, hA₁₀A₁₅, hA₆A₁₉ 及び hA₂A₂₃ を、コントロールとしてdA₂₅を用いた。ハイブリッドを形成するRNAとしてPoly(U) (S_{20,w}6.6、ヤマサ醤油(株))を用いた。

20

被験物質又はコントロールとPoly(U)との複合体を形成させ、被験物質濃度100 μM、0.15M塩化ナトリウム、10mMリン酸ナトリウム(pH7.0)、昇温速度0.5 /分の条件下で測定しT_m値を求めた。

表7. 本発明物質のPoly(U)に対するT_m値

	T _m 値 (°C)
dA ₂₅ (コントロール)	46.7
hA ₂ A ₂₃	47.8
hA ₆ A	47.4
hA ₁₀ A ₁₅	43.3
hA ₁₄ A ₁₁	37.8
hA ₁₈ A ₇	35.2
hA ₂₂ A ₃	33.0
hA ₂₅	27.7

30

40

本発明物質は、天然のRNAと良好な複合体形成能を有していた。ヌクレオシド同族体の含量が増すにつれT_m値は低下する傾向にあったが、その含量が40%(hA₁₀A₁₅)までは天然のDNAと比べて遜色のないことも示された。

これらの結果から、本発明のアンチセンス分子は低毒性で、ヘルペスウイルス、インフルエンザウイルス、ヒト免疫不全症ウイルス等の感染や癌遺伝子の働きを抑える医薬として利用し得る。

フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I
A 6 1 P 31/12 (2006.01) A 6 1 P 31/12
A 6 1 P 35/00 (2006.01) A 6 1 P 35/00

(56) 参考文献 国際公開第 9 5 / 0 1 5 9 6 4 (WO, A 1)
国際公開第 9 4 / 0 1 9 3 2 7 (WO, A 1)
Collection Czechoslov. Chem. Commun., 1 9 7 0 年, Vol.35, pages 81-88
Collection Czechoslov. Chem. Commun., 1 9 7 1 年, Vol.36, pages 3043-3046

(58) 調査した分野(Int.Cl., DB名)
C07H 21/00 - 21/04
A61K 31/7052 - 31/713
CA(STN)
REGISTRY(STN)
WPIDS(STN)