

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-508527

(P2009-508527A)

(43) 公表日 平成21年3月5日 (2009. 3. 5)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
C 1 2 N 5/10 (2006. 01)	C 1 2 N 5/00 B	4 B 0 6 5
A 6 1 K 48/00 (2006. 01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/7088 (2006. 01)	A 6 1 K 31/7088	4 C 0 8 6
A 6 1 P 3/10 (2006. 01)	A 6 1 P 3/10	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 49 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2008-532324 (P2008-532324)	(71) 出願人	505121394 ジョンソン・アンド・ジョンソン・ファーマシユーチカル・リサーチ・アンド・デベロップメント・エルエルシー アメリカ合衆国ニュージャージー州08869ラリタン・ピーオーボックス300・920ユーエスルート202
(86) (22) 出願日	平成18年9月19日 (2006. 9. 19)	(74) 代理人	110000741 特許業務法人小田島特許事務所
(85) 翻訳文提出日	平成20年4月9日 (2008. 4. 9)	(72) 発明者	モニア, ブレット・ピー アメリカ合衆国カリフォルニア州92024エンシニタス・カサハーモサコート2306
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/036527		
(87) 国際公開番号	W02007/035759		
(87) 国際公開日	平成19年3月29日 (2007. 3. 29)		
(31) 優先権主張番号	60/718, 685		
(32) 優先日	平成17年9月19日 (2005. 9. 19)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 グルココルチコイド受容体発現の調節

(57) 【要約】

グルココルチコイド受容体の発現を調節するための化合物、組成物および方法が提供される。該組成物は、グルココルチコイド受容体をコードする核酸を標的とした、特定の *in vivo* 特性を有するアンチセンス化合物、とりわけアンチセンスオリゴヌクレオチドを含んでなる。グルココルチコイド受容体発現を調節するため、および疾患の処置のためのこれらの化合物の使用方法が提供される。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

G C C R をコードする核酸分子を標的としかつ配列番号 3 4、3 3、3 5、3 6、3 7、4 2、4 5、5 6、6 1、6 3 若しくは 9 6 の最低 8 核酸塩基部分を含んでなる、長さ 2 0 核酸塩基のアンチセンスオリゴヌクレオチドであって、該オリゴヌクレオチドが、その 5 ' および 3 ' 端で 1 ないし 4 個の 2 ' - O - (2 - メトキシエチル) ヌクレオチドで隣接されている長さ 1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7 若しくは 1 8 核酸塩基のデオキシヌクレオチド領域を含んでなり、かつ、該オリゴヌクレオチドが G C C R に特異的にハイブリダイズし、かつ、その発現を低下せしめる、上記オリゴヌクレオチド。

【請求項 2】

5 ' および 3 ' 端でデオキシヌクレオチド領域に隣接するヌクレオチドの数が同一である、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】

5 ' および 3 ' 端でデオキシヌクレオチド領域に隣接するヌクレオチドの数が同一でない、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 4】

最低 1 個のヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合である、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 5】

最低 1 個のシトシンが 5 - メチルシトシンである、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 6】

配列番号 3 7 の核酸塩基配列を有する、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 7】

その 5 ' および 3 ' 端で 2 個の 2 ' - O - (2 - メトキシエチル) ヌクレオチドで隣接された 1 6 - デオキシヌクレオチドの領域を特徴とする、請求項 6 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 8】

最低 1 個のヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合である、請求項 7 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 9】

最低 1 個のシトシンが 5 - メチルシトシンである、請求項 7 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 1 0】

その 5 ' および 3 ' 端で 3 個の 2 ' - O - (2 - メトキシエチル) ヌクレオチドで隣接された 1 4 - デオキシヌクレオチドの領域を特徴とする、請求項 6 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 1 1】

最低 1 個のヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合である、請求項 1 0 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 1 2】

最低 1 個のシトシンが 5 - メチルシトシンである、請求項 1 0 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 1 3】

その 5 ' および 3 ' 端で 4 個の 2 ' - O - (2 - メトキシエチル) ヌクレオチドで隣接された 1 2 - デオキシヌクレオチドの領域を特徴とする、請求項 6 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 1 4】

最低 1 個のヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合である、請求項 1 3 に記載の

10

20

30

40

50

アンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 15】

最低 1 個のシトシンが 5 - メチルシトシンである、請求項 13 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 16】

その 5' および 3' 端で 1 個の 2' - O - (2 - メトキシエチル)ヌクレオチドで隣接された 18 - デオキシヌクレオチドの領域を特徴とする、請求項 6 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 17】

最低 1 個のヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合である、請求項 16 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 18】

最低 1 個のシトシンが 5 - メチルシトシンである、請求項 16 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 19】

その 5' および 3' 端で 1 若しくは 2 個の 2' - O - (2 - メトキシエチル)ヌクレオチドで隣接された 17 - デオキシヌクレオチドの領域を特徴とする、請求項 6 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 20】

最低 1 個のヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合である、請求項 19 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 21】

最低 1 個のシトシンが 5 - メチルシトシンである、請求項 19 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 22】

配列番号 33 の核酸塩基配列を有する、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 23】

その 5' および 3' 端で 2 個の 2' - O - (2 - メトキシエチル)ヌクレオチドで隣接された 16 - デオキシヌクレオチドの領域を特徴とする、請求項 22 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 24】

最低 1 個のヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合である、請求項 23 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 25】

最低 1 個のシトシンが 5 - メチルシトシンである、請求項 23 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 26】

その 5' および 3' 端で 3 個の 2' - O - (2 - メトキシエチル)ヌクレオチドで隣接された 14 - デオキシヌクレオチドの領域を特徴とする、請求項 22 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 27】

最低 1 個のヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合である、請求項 26 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 28】

最低 1 個のシトシンが 5 - メチルシトシンである、請求項 26 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 29】

その 5' および 3' 端で 4 個の 2' - O - (2 - メトキシエチル)ヌクレオチドで隣接された 12 - デオキシヌクレオチド領域のを特徴とする、請求項 22 に記載のアンチセン

10

20

30

40

50

スオリゴヌクレオチド。

【請求項 30】

最低 1 個のヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合である、請求項 29 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 31】

最低 1 個のシトシンが 5 - メチルシトシンである、請求項 29 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 32】

その 5' および 3' 端で 1 個の 2' - O - (2 - メトキシエチル)ヌクレオチドで隣接された 18 - デオキシヌクレオチドの領域を特徴とする、請求項 22 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

10

【請求項 33】

最低 1 個のヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合である、請求項 32 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 34】

最低 1 個のシトシンが 5 - メチルシトシンである、請求項 32 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 35】

その 5' および 3' 端で 1 若しくは 2 個の 2' - O - (2 - メトキシエチル)ヌクレオチドで隣接された 17 - デオキシヌクレオチド領域を特徴とする、請求項 22 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

20

【請求項 36】

最低 1 個のヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合である、請求項 35 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 37】

最低 1 個のシトシンが 5 - メチルシトシンである、請求項 35 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 38】

配列番号 45 の核酸塩基配列を有する、請求項 1 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

30

【請求項 39】

その 5' および 3' 端で 2 個の 2' - O - (2 - メトキシエチル)ヌクレオチドで隣接された 16 デオキシヌクレオチドの領域を特徴とする、請求項 38 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 40】

最低 1 個のヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合である、請求項 39 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 41】

最低 1 個のシトシンが 5 - メチルシトシンである、請求項 39 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

40

【請求項 42】

その 5' および 3' 端で 3 個の 2' - O - (2 - メトキシエチル)ヌクレオチドで隣接された 14 - デオキシヌクレオチドの領域を特徴とする、請求項 38 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 43】

最低 1 個のヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合である、請求項 42 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 44】

最低 1 個のシトシンが 5 - メチルシトシンである、請求項 42 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

50

【請求項 45】

その 5' および 3' 端で 4 個の 2' - O - (2 - メトキシエチル) ヌクレオチドで隣接された 12 - デオキシヌクレオチドの領域を特徴とする、請求項 38 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 46】

最低 1 個のヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合である、請求項 45 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 47】

最低 1 個のシトシンが 5 - メチルシトシンである、請求項 45 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

10

【請求項 48】

その 5' および 3' 端で 1 個の 2' - O - (2 - メトキシエチル) ヌクレオチドで隣接された 18 - デオキシヌクレオチドの領域を特徴とする、請求項 38 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 49】

最低 1 個のヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合である、請求項 48 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 50】

最低 1 個のシトシンが 5 - メチルシトシンである、請求項 48 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

20

【請求項 51】

その 5' および 3' 端で 1 若しくは 2 個の 2' - O - (2 - メトキシエチル) ヌクレオチドで隣接された 17 - デオキシヌクレオチドの領域を特徴とする、請求項 38 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 52】

最低 1 個のヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合である、請求項 51 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 53】

最低 1 個のシトシンが 5 - メチルシトシンである、請求項 51 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

30

【請求項 54】

請求項 1 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド、および、場合によっては、製薬学的に許容できる担体、希釈剤増強剤若しくは賦形剤を含んでなる、製薬学的組成物。

【請求項 55】

請求項 54 に記載の製薬学的組成物と細胞若しくは組織を接触させることを含んでなる、前記細胞若しくは組織中のグルコルチコイド受容体の発現の低下方法。

【請求項 56】

組織が脂肪若しくは肝組織である、請求項 55 に記載の方法。

【請求項 57】

請求項 54 に記載の製薬学的組成物の有効量と動物を接触させることを含んでなる、前記動物でのグルコルチコイド発現により媒介される疾患若しくは状態の処置方法。

40

【請求項 58】

疾患若しくは状態が、糖尿病、肥満、代謝性症候群 X、高血糖症若しくは高脂血症である、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 59】

疾患が 2 型糖尿病である、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 60】

疾患が、上昇された血中コレステロール若しくは上昇された血中トリグリセリド濃度を伴う高脂血症である、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 61】

50

状態が肝臓脂肪症である、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 6 2】

脂肪症が脂肪性肝炎である、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 3】

脂肪症が非アルコール性脂肪性肝炎である、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 4】

請求項 5 4 に記載の製薬学的組成物の治療的有效量を動物に投与することを含んでなる、前記動物での血糖値の低下方法。

【請求項 6 5】

動物がヒトである、請求項 6 4 に記載の方法。

10

【請求項 6 6】

血糖値が空腹時血糖値である、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 7】

請求項 5 4 に記載の製薬学的組成物の治療的有效量を動物に投与することを含んでなる、前記動物での血中脂質濃度の低下方法。

【請求項 6 8】

血中脂質濃度が血中コレステロール濃度である、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 6 9】

血中脂質濃度が血中トリグリセリド濃度である、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 7 0】

請求項 5 4 に記載の製薬学的組成物の治療的有效量を動物に投与することを含んでなる、前記動物での肝トリグリセリド濃度の低下方法。

20

【請求項 7 1】

請求項 5 4 に記載の製薬学的組成物の治療的有效量を動物に投与することを含んでなる、前記動物での体脂肪量の低下方法。

【請求項 7 2】

請求項 5 4 に記載の製薬学的組成物の治療的有效量を動物に投与することを含んでなる、前記動物のインスリン感受性を低下せしめる改善方法。

【請求項 7 3】

請求項 5 4 に記載の製薬学的組成物の治療的有效量を動物に投与することを含んでなる、前記動物での肝グルコース産生の阻害方法。

30

【請求項 7 4】

請求項 5 4 に記載の製薬学的組成物の治療的有效量を動物に投与することを含んでなる、前記動物での血中脂質濃度若しくは血糖値の増加の発生の遅延若しくは予防方法。

【請求項 7 5】

付加的な治療効果を達成するための、PPAR-、二重 PPAR 若しくはパン (pan) PPAR アゴニストを包含する PPAR アゴニスト、ジペプチジルペプチダーゼ (DPP-4) 阻害剤、GLP-1 アナログ、インスリンおよびインスリンアナログ、インスリン分泌促進物質、SGLT2 阻害剤、プラムリンチドを包含するヒトアミリンアナログ、グルコキナーゼ活性化物質、ビッグアニドならびに - グルコシダーゼ阻害剤を含んでなる群から選択される抗糖尿病薬と組合せの請求項 1 に記載の化合物を動物に投与することを含んでなる、代謝性疾患若しくは状態を有する動物の処置方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

配列表

37,122 バイト (MS-DOS で測定される) でありかつ 2006 年 9 月 19 日に作成された、BIOL0065WSEQ.txt と命名されたファイルを含むディスク上のコンピュータで読出し可能な形態の配列表が、引用することにより本明細書に組み込まれる。

50

【 0 0 0 2 】

細胞、組織若しくは動物のグルココルチコイド受容体の発現を調節するための化合物、組成物および方法が本明細書に開示される。

【 背景技術 】

【 0 0 0 3 】

増大された糖新生は糖尿病での増大された糖産生の主供給源であると考えられるため、肝グルコース産生の阻害のための多数の治療標的が検討された。動物モデルの糖尿病を改善する、グルココルチコイド受容体（核受容体サブファミリー3、グループC、メンバー1；NR3C1；GCCR；GCR；GRL；グルココルチコイド受容体、リンパ球としてもまた知られる）のアゴニストの能力により、こうした化合物は探求されている潜在的治療薬のひとつである。しかしながら、HPA系の活性化を包含する、グルココルチコイド受容体アンタゴニストの有害な全身的影響が存在する（非特許文献1）。増大されたHPA系の活動は免疫関連の炎症作用の抑制を伴い、これは感染性病原体および新生物に対する感受性を増大し得る。HPA系若しくはその標的組織の欠陥による免疫媒介性の炎症の抑制と関連する状態は、クッシング症候群、慢性ストレス、慢性アルコール依存症およびメランコリー性うつ病を包含する（非特許文献2）。従って、肝および脂肪特異的グルココルチコイド受容体アンタゴニストを開発することは非常に価値がある。

10

【 0 0 0 4 】

【非特許文献1】Link、Curr Opin Investig Drugs、2003、4、421-429

20

【非特許文献2】Chrousos、N Engl J Med、1995、332、1351-1362

【 発明の開示 】

【 0 0 0 5 】

[発明の要約]

本発明は、GCCRの発現を調節する、GCCRをコードする核酸分子を標的としかつそれとハイブリダイズ可能なオリゴマー化合物に向けられる。5'および3'端のそれぞれで1ないし4個の2'-O-メトキシエチルヌクレオチドから構成される「ウイング」で隣接されたデオキシヌクレオチド領域すなわち「ギャップ」を含んでなる、「ギャップマー」と称されるキメラオリゴヌクレオチドが本明細書で提供される。本発明のオリゴヌクレオチドのデオキシヌクレオチド領域は10以上のデオキシヌクレオチドから構成され、従って、本発明のギャップマーは、米国特許公開第US2005-0164271号明細書（そっくりそのまま引用することにより本明細書に組み込まれる）に例示されるような10デオキシヌクレオチドのギャップ領域を含んでなるキメラ化合物に比較して「ギャップ拡張（gap-widened）」されている。いくつかの態様において、同一配列を有するがしかし5'および3'双方の端で5個の2'-O-（2-メトキシエチル）ヌクレオチドで隣接された10デオキシヌクレオチドの領域を含んでなるオリゴヌクレオチドと比較して、ギャップ拡張オリゴヌクレオチドは、肝でのオリゴヌクレオチドの高められた蓄積を伴わずに比較可能な若しくは改良された抗力を有する。従って、本発明の態様は、標的組織でのオリゴヌクレオチドの高められた蓄積を伴わず、同一配列を有するがしかし5'および3'双方の端で5個の2'-O-（2-メトキシエチル）ヌクレオチドで隣接された10デオキシヌクレオチドの領域を含んでなるオリゴヌクレオチドの効力に抗力が比較可能であるか若しくはそれより良好である、GCCRを標的とするギャップ拡張オリゴヌクレオチドを包含する。

30

40

【 0 0 0 6 】

本発明の別の態様は、肝のような標的組織で抗力を維持若しくは改良しつつ、前記オリゴヌクレオチドの腎濃度が、同一配列を有するがしかし5'および3'双方の端で5個の2'-O-（2-メトキシエチル）ヌクレオチドで隣接された10デオキシヌクレオチドの領域を含んでなるオリゴヌクレオチドのものに匹敵する若しくはそれに関して低下されている、GCCRを標的とするギャップ拡張オリゴヌクレオチドを包含する。

50

【 0 0 0 7 】

本発明の化合物若しくは組成物の1種若しくはそれ以上と細胞、組織若しくは動物を接触させることを含んでなる、前記細胞、組織若しくは動物でのGCCRの発現の調節方法がさらに提供される。例えば、一態様において、本発明の化合物若しくは組成物は細胞、組織若しくは動物でのGCCRの発現を低下するのに使用し得る。

【 0 0 0 8 】

一態様において、本発明は、本発明の化合物の有効量と動物を接触させることを含んでなる、動物でのグルコルチコイド発現により媒介される疾患若しくは状態の処置方法を提供する。該疾患若しくは状態は、糖尿病、2型糖尿病、肥満、代謝性症候群X、高血糖症、高脂血症若しくは肝臓脂肪症を包含する。いくつかの態様において、高脂血症は、血中コレステロールのような上昇された脂質若しくは上昇された血中トリグリセリドを伴う。血中脂質は血漿脂質および血清脂質を包含する。本発明の化合物を投与することによる、動物での血中脂質濃度の低下方法、体脂肪量の低下方法、肝トリグリセリド濃度の低下方法およびインスリン感受性の改善方法がさらに提供される。

10

【 0 0 0 9 】

本発明の化合物を投与することを含んでなる動物での血糖値の低下方法もまた提供される。血糖値は空腹時若しくは食後血糖値であることができ、また、血糖値は血清若しくは血漿グルコース値を包含する。インスリン感受性の増大方法および肝グルコース産生の阻害方法がさらに提供される。

【 0 0 1 0 】

本発明の別の局面は、本発明の化合物を投与することによる動物での血中脂質濃度若しくは血糖値の増大の発生の遅延若しくは予防方法である。

20

【 0 0 1 1 】

本出願は米国特許出願第60/718,684号明細書(そっくりそのまま引用することにより組み込まれる)にもまた関する。本出願は米国特許出願第11/231,243号およびPCT出願第PCT/US2005/033837号明細書(それらのそれぞれはそっくりそのまま引用することにより本明細書に組み込まれる)にもまた関する。

【 0 0 1 2 】

[詳細な記述]

概要

30

GCCRをコードする核酸分子の発現の調節における使用のためのアンチセンスオリゴヌクレオチドおよび他のアンチセンス化合物を包含するオリゴマー化合物を本明細書で開示する。これは、GCCRをコードする1種若しくはそれ以上の標的核酸分子とハイブリダイズするオリゴマー化合物を提供することにより達成される。

【 0 0 1 3 】

GCCR(グルコルチコイド受容体;核受容体サブファミリー3、グループC、メンバー1;GR;GRL;およびNR3C1としてもまた知られる)の発現を調節するための組成物および方法が本発明による。GCCRを標的とするオリゴマー化合物を設計するのに使用しうる配列のGENBANK^(R)受託番号を表1に列挙する。本発明のオリゴマー化合物は、表1に示される1種若しくはそれ以上の標的核酸分子とハイブリダイズするオリゴマー化合物、ならびにGCCRをコードする他の核酸分子にハイブリダイズするオリゴマー化合物を包含する。

40

【 0 0 1 4 】

該オリゴマー化合物は、GCCRをコードする核酸分子のいずれの領域、セグメント若しくは部位も標的としうる。適する標的領域、セグメントおよび部位は、限定されるものでないが、5'UTR、開始コドン、終止コドン、コーディング領域、3'UTR、5'キャップ領域、イントロン、エキソン、イントロン-エキソン結合部、エキソン-イントロン結合部およびエキソン-エキソン結合部を挙げることができる。

【 0 0 1 5 】

【表 1】

表 1
遺伝子の標的

種	GENBANK® 受託番号若しくは記述	配列番号
ヒト	NM_000176.1	1
マウス	NM_012576.1	2
ラット	NM_008173.1	3

10

【0016】

活性のオリゴマー化合物がハイブリダイズする標的核酸上の位置は本明細書で下で「有効標的セグメント (validated target segment)」と称される。本明細書で使用されるところの「有効標的セグメント」という用語は、活性のオリゴマー化合物が標的とする標的領域の最低 8 核酸塩基部分と定義する。理論により束縛されることを願わない一方、これらの標的セグメントは、ハイブリダイゼーションのため接近可能である標的核酸の部分を表すと現在考えられている。

【0017】

本発明はキメラ化合物であるオリゴマー化合物を包含する。キメラ化合物の一例は、デオキシヌクレオチド以外の領域すなわち「ウイング」により隣接される 2' - デオキシヌクレオチド領域すなわち「ギャップ」を有するギャップマーである。理論により束縛されることを願わない一方、ギャップマーのギャップは、RNA 標的に結合される場合に RNアーゼ H により認識可能な基質を提示する一方、ウイングは至適の基質でないが、しかし二重鎖の安定性若しくは有利な薬物動態効果に寄与することのような他の特性を賦与し得る。各ウイングは 1 個若しくはそれ以上のデオキシオリゴヌクレオチド以外の単量体であり得る。一態様において、ギャップマーは 5' および 3' 端のそれぞれで 2 個の 2' - O - (2 - メトキシエチル)ヌクレオチドのウイングにより隣接された 16 個の 2' - デオキシヌクレオチドの領域から構成される。これは 2 - 16 - 2 ギャップマーと称される。従って、このキメラオリゴマー化合物すなわちギャップマーの「モチーフ」は 2 - 16 - 2 である。別の態様において、ヌクレオチド間結合の全部はホスホロチオエート結合である。別の態様においてギャップマーのシトシンは 5 - メチルシトシンである。

20

30

【0018】

本発明の態様は、5' および 3' 端のそれぞれで最低 1 個の 2' - O - (2 - メトキシエチル)ヌクレオチドで隣接された、長さが 10 核酸塩基以上のデオキシヌクレオチド領域を含んでなる、長さが 13 ないし 26 ヌクレオチドの配列を含んでなるオリゴマー化合物を包含する。好ましい「ギャップ拡張」オリゴヌクレオチドは該オリゴヌクレオチドのギャップ部分に 11、12、13、14、15、16、17 若しくは 18 デオキシヌクレオチドを含んでなる。好ましい 5' および 3' 隣接領域は、1、2、3 若しくは 4 個の 2' - O - (2 - メトキシエチル)ヌクレオチドを含んでなる。好ましいギャップ拡張ギャップマーは、1 - 18 - 1、1 - 17 - 2、2 - 17 - 1、2 - 16 - 2、3 - 14 - 3 および 4 - 12 - 4 を包含するモチーフを有する。

40

【0019】

好ましい態様において、オリゴマー化合物は GCCR RNA を標的とするか若しくはそれとハイブリダイズする。別の態様において、オリゴマー化合物は GCCR RNA の発現を低下する。他の態様において、オリゴマー化合物は GCCR の発現を低下し、GCCR の発現は、最低 10%、最低 20%、最低 30%、最低 35%、最低 40%、最低 45%、最低 50%、最低 55%、最低 60%、最低 65%、最低 70%、最低 75%、最低 80%、最低 85%、最低 90%、最低 95% 若しくは最低 100% 低下される。

【0020】

50

本発明のオリゴヌクレオチドは、同一配列を有するがしかし5'および3'双方の端で5個の2'-O-(2-メトキシエチル)ヌクレオチドで隣接された10デオキシヌクレオチドの領域を含んでなるオリゴヌクレオチドに関して、前記オリゴヌクレオチドの腎濃度が低下されるものを包含する。本発明のオリゴヌクレオチドは、同一配列を有するがしかし5'および3'双方の端で5個の2'-O-(2-メトキシエチル)ヌクレオチドで隣接された10デオキシヌクレオチドの領域を含んでなるオリゴヌクレオチドの腎濃度に関して、前記オリゴヌクレオチドの腎濃度が比較可能若しくは低下されるものを包含する。本発明のオリゴヌクレオチドは、標的の減少に関する効力すなわち治療効果が、標的組織でのオリゴヌクレオチドの高められた蓄積を伴わず、同一配列を有するがしかし5'および3'双方の端で5個の2'-O-(2-メトキシエチル)ヌクレオチドで隣接された10デオキシヌクレオチドの領域を含んでなるオリゴヌクレオチドのものと比較可能若しくはより良好であるものを包含する。好ましい標的組織は肝および脂肪組織を包含する。

10

【0021】

本発明は、GCCRをコードする核酸分子を標的とする長さ13ないし26核酸塩基のアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供し、該オリゴヌクレオチドは第一の領域、第二の領域および第三の領域を含んでなり、前記第一の領域は最低11デオキシヌクレオチドを含んでなり、かつ、前記第二および第三の領域は1ないし4個の2'-O-(2-メトキシエチル)ヌクレオチドを含んでなり、前記第二および第三の領域は前記第一の領域の5'および3'端で第一の領域に隣接する。

20

【0022】

いくつかの態様において、本発明のオリゴヌクレオチドはGCCRに特異的にハイブリダイズしかつGCCRの発現を低下する。いくつかの態様において、「ギャップ」領域は11、12、13、14、15、16、17若しくは18核酸塩基を含んでなる。いくつかの態様において、該アンチセンスオリゴヌクレオチドは長さが20核酸塩基である。

【0023】

オリゴマー化合物は、約8ないし約80核酸塩基（すなわち約8から約80個までの連結されたヌクレオチド）、好ましくは約13ないし約26の間の核酸塩基を含み得る。当業者は、企図している好ましいオリゴマー化合物が、長さが13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25若しくは26核酸塩基である化合物を包含することを認識するであろう。

30

【0024】

本発明の化合物は、具体的に説明するアンチセンス化合物の1種の5'末端からの最低8個の連続する核酸塩基を含んでなるオリゴヌクレオチド配列を包含する（残存する核酸塩基は、標的核酸に特異的にハイブリダイズ可能であるアンチセンス化合物の5'末端のすぐ上流で開始しかつ該オリゴヌクレオチドが約13ないし約26核酸塩基を含むまで連続する同一オリゴヌクレオチドの連続する伸長である）。他の化合物は、具体的に説明するアンチセンス化合物の1種の3'末端からの最低8個の連続する核酸塩基を含んでなるオリゴヌクレオチド配列により表される（残存する核酸塩基は、標的核酸に特異的にハイブリダイズ可能であるアンチセンス化合物の3'末端のすぐ下流で開始しかつ該オリゴヌクレオチドが約13ないし約26核酸塩基を含むまで連続する同一オリゴヌクレオチドの連続する伸長である）。化合物は、具体的に説明する化合物の配列の内部部分からの最低8個の連続する核酸塩基を含んでなるオリゴヌクレオチド配列により表されることができ、そして該オリゴヌクレオチドが約13ないし約26核酸塩基を含有するまでいずれか若しくは双方の方向に伸長しうることもまた理解される。

40

【0025】

本発明のオリゴヌクレオチドは、GCCRをコードしかつ配列番号34、33、35、36、37、42、45、56、61、63若しくは96の最低8核酸塩基部分を含んでなる核酸分子を標的とする長さ20核酸塩基のアンチセンスオリゴヌクレオチドを包含する。一態様において、本発明のオリゴヌクレオチドは、GCCRをコードしかつ配列番号34、33、35、36、37、42、45、56、61、63若しくは96の配列を有

50

する核酸分子を標的とする長さ20核酸塩基のアンチセンスオリゴヌクレオチドである。
一態様において、本発明のオリゴヌクレオチドは配列番号37の核酸塩基配列を有する。

【0026】

本発明は、配列番号37の核酸塩基配列を含んでなるアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。一態様において、本発明のオリゴヌクレオチドは、配列番号37の核酸塩基配列の最低8核酸塩基部分を含んでなる。

【0027】

一態様において、本発明は、GCCRをコードしかつ配列番号34、33、35、36、37、42、45、56、61、63若しくは96の最低8核酸塩基部分を含んでなる核酸分子を標的とする長さ20核酸塩基のアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供し、該オリゴヌクレオチドは、その5'および3'端で1ないし4個の2'-O-(2-メトキシエチル)ヌクレオチドで隣接されている長さ12、13、14、15、16、17若しくは18核酸塩基のデオキシヌクレオチド領域を含んでなり、かつ、該オリゴヌクレオチドはGCCR RNAに特異的にハイブリダイズしかつその発現を低下する。

【0028】

一態様において、隣接領域は対称(3'隣接領域と同一の数のヌクレオチドを5'隣接領域に有する)である。別の態様において、隣接領域は非対称(3'隣接領域に比較して異なる数のヌクレオチドを5'隣接領域に有する)である。

【0029】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、最低1個の改変ヌクレオシド間結合を含有しうる。改変ヌクレオシド間結合はホスホロチオエート結合を包含する。本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは最低1個の修飾核酸塩基もまた含有しうる。好ましい態様において、最低1個のシトシンが5-メチルシトシンである。

【0030】

他の態様において、本発明は配列番号37の核酸塩基配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドを包含し、該アンチセンスオリゴヌクレオチドは、その5'および3'端で4個の2'-O-(2-メトキシエチル)ヌクレオチドで隣接された12-デオキシヌクレオチドの領域、その5'および3'端で3個の2'-O-(2-メトキシエチル)ヌクレオチドで隣接された14-デオキシヌクレオチドの領域、その5'および3'端で2個の2'-O-(2-メトキシエチル)ヌクレオチドで隣接された16-デオキシヌクレオチドの領域、その5'および3'端で1若しくは2個の2'-O-(2-メトキシエチル)ヌクレオチドで隣接された17-デオキシヌクレオチドの領域、またはその5'および3'端で1個の2'-O-(2-メトキシエチル)ヌクレオチドで隣接された18-デオキシヌクレオチドの領域を特徴とする。

【0031】

特定の一態様において、該アンチセンスオリゴヌクレオチドは配列番号37の核酸塩基配列を有し、該アンチセンスオリゴヌクレオチドはその5'および3'端で4個の2'-O-(2-メトキシエチル)ヌクレオチドで隣接された12-デオキシヌクレオチドの領域を有する。さらなる一態様において、該アンチセンスオリゴヌクレオチドはGCCRに特異的にハイブリダイズしかつその発現を低下する。さらなる一態様において、最低1個のヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合である。さらなる一態様において、最低1個のシトシンが5-メチルシトシンである。

【0032】

特定の一態様において、該アンチセンスオリゴヌクレオチドは配列番号37の核酸塩基配列を有し、該アンチセンスオリゴヌクレオチドは、その5'および3'端で3個の2'-O-(2-メトキシエチル)ヌクレオチドで隣接された14-デオキシヌクレオチドの領域を有する。さらなる一態様において、該アンチセンスオリゴヌクレオチドはGCCRに特異的にハイブリダイズしかつその発現を低下する。さらなる一態様において、最低1個のヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合である。さらなる一態様において、最低1個のシトシンが5-メチルシトシンである。

【0033】

特定の一態様において、該アンチセンスオリゴヌクレオチドは配列番号37の核酸塩基配列を有し、該アンチセンスオリゴヌクレオチドはその5'および3'端で2個の2'-O(2-メトキシエチル)ヌクレオチドで隣接された16-デオキシヌクレオチドの領域を有する。さらなる一態様において、該アンチセンスオリゴヌクレオチドはGCCRに特異的にハイブリダイズしかつその発現を低下する。さらなる一態様において、最低1個のヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合である。さらなる一態様において、最低1個のシトシンが5-メチルシトシンである。

【0034】

特定の一態様において、該アンチセンスオリゴヌクレオチドは配列番号37の核酸塩基配列を有し、該アンチセンスオリゴヌクレオチドはその5'および3'端で1若しくは2個の2'-O(2-メトキシエチル)ヌクレオチドで隣接された17-デオキシヌクレオチドの領域を有する。さらなる一態様において、該アンチセンスオリゴヌクレオチドはGCCRに特異的にハイブリダイズしかつその発現を低下する。さらなる一態様において、最低1個のヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合である。さらなる一態様において、最低1個のシトシンが5-メチルシトシンである。

10

【0035】

特定の一態様において、該アンチセンスオリゴヌクレオチドは配列番号37の核酸塩基配列を有し、該アンチセンスオリゴヌクレオチドはその5'および3'端で1個の2'-O(2-メトキシエチル)ヌクレオチドで隣接された18-デオキシヌクレオチドの領域を有する。さらなる一態様において、該アンチセンスオリゴヌクレオチドはGCCRに特異的にハイブリダイズしかつその発現を低下する。さらなる一態様において、最低1個のヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合である。さらなる一態様において、最低1個のシトシンが5-メチルシトシンである。

20

【0036】

別の態様において、該アンチセンスオリゴヌクレオチドは配列番号33の核酸塩基配列を有する。一態様において、本発明のオリゴヌクレオチドは、配列番号33の核酸塩基配列の最低8核酸塩基部分を含んでなる。

【0037】

他の態様において、本発明は配列番号33の核酸塩基配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドを包含し、該アンチセンスオリゴヌクレオチドは、その5'および3'端で4個の2'-O-(2-メトキシエチル)ヌクレオチドで隣接された12-デオキシヌクレオチドの領域、その5'および3'端で3個の2'-O-(2-メトキシエチル)ヌクレオチドで隣接された14-デオキシヌクレオチドの領域、その5'および3'端で2個の2'-O-(2-メトキシエチル)ヌクレオチドで隣接された16-デオキシヌクレオチドの領域、その5'および3'端で1若しくは2個の2'-O-(2-メトキシエチル)ヌクレオチドで隣接された17-デオキシヌクレオチドの領域、またはその5'および3'端で1個の2'-O-(2-メトキシエチル)ヌクレオチドで隣接された18-デオキシヌクレオチドの領域を特徴とする。

30

【0038】

特定の一態様において、該アンチセンスオリゴヌクレオチドは配列番号33の核酸塩基配列を有し、該アンチセンスオリゴヌクレオチドは、その5'および3'端で4個の2'-O(2-メトキシエチル)ヌクレオチドで隣接された12-デオキシヌクレオチドの領域を有する。さらなる一態様において、該アンチセンスオリゴヌクレオチドはGCCRに特異的にハイブリダイズしかつその発現を低下する。さらなる一態様において、最低1個のヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合である。さらなる一態様において、最低1個のシトシンが5-メチルシトシンである。

40

【0039】

特定の一態様において、該アンチセンスオリゴヌクレオチドは配列番号33の核酸塩基配列を有し、該アンチセンスオリゴヌクレオチドは、その5'および3'端で3個の2'

50

- O (2 - メトキシエチル) ヌクレオチドで隣接された 1 4 - デオキシヌクレオチドの領域を有する。さらなる一態様において、該アンチセンスオリゴヌクレオチドは G C C R に特異的にハイブリダイズしかつその発現を低下する。さらなる一態様において、最低 1 個のヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合である。さらなる一態様において、最低 1 個のシトシンが 5 - メチルシトシンである。

【 0 0 4 0 】

特定の一態様において、該アンチセンスオリゴヌクレオチドは配列番号 3 3 の核酸塩基配列を有し、該アンチセンスオリゴヌクレオチドは、その 5 ' および 3 ' 端で 2 個の 2 ' - O (2 - メトキシエチル) ヌクレオチドで隣接された 1 6 - デオキシヌクレオチドの領域を有する。さらなる一態様において、該アンチセンスオリゴヌクレオチドは G C C R に特異的にハイブリダイズしかつその発現を低下する。さらなる一態様において、最低 1 個のヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合である。さらなる一態様において、最低 1 個のシトシンが 5 - メチルシトシンである。

【 0 0 4 1 】

特定の一態様において、該アンチセンスオリゴヌクレオチドは配列番号 3 3 の核酸塩基配列を有し、該アンチセンスオリゴヌクレオチドは、その 5 ' および 3 ' 端で 1 若しくは 2 個の 2 ' - O (2 - メトキシエチル) ヌクレオチドで隣接された 1 7 - デオキシヌクレオチドの領域を有する。さらなる一態様において、該アンチセンスオリゴヌクレオチドは G C C R に特異的にハイブリダイズしかつその発現を低下する。さらなる一態様において、最低 1 個のヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合である。さらなる一態様において、最低 1 個のシトシンが 5 - メチルシトシンである。

【 0 0 4 2 】

特定の一態様において、該アンチセンスオリゴヌクレオチドは配列番号 3 3 の核酸塩基配列を有し、該アンチセンスオリゴヌクレオチドは、その 5 ' および 3 ' 端で 1 個の 2 ' - O (2 - メトキシエチル) ヌクレオチドで隣接された 1 8 - デオキシヌクレオチドの領域を有する。さらなる一態様において、該アンチセンスオリゴヌクレオチドは G C C R に特異的にハイブリダイズしかつその発現を低下する。さらなる一態様において、最低 1 個のヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合である。さらなる一態様において、最低 1 個のシトシンが 5 - メチルシトシンである。

【 0 0 4 3 】

本発明は配列番号 4 5 の核酸塩基配列を含んでなるアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。一態様において、本発明のオリゴヌクレオチドは、配列番号 4 5 の核酸塩基配列の最低 8 核酸塩基部分を含んでなる。

【 0 0 4 4 】

他の態様において、本発明は配列番号 4 5 の核酸塩基配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドを包含し、該アンチセンスオリゴヌクレオチドは、その 5 ' および 3 ' 端で 4 個の 2 ' - O - (2 - メトキシエチル) ヌクレオチドで隣接された 1 2 - デオキシヌクレオチドの領域、その 5 ' および 3 ' 端で 3 個の 2 ' - O - (2 - メトキシエチル) ヌクレオチドで隣接された 1 4 - デオキシヌクレオチドの領域、その 5 ' および 3 ' 端で 2 個の 2 ' - O - (2 - メトキシエチル) ヌクレオチドで隣接された 1 6 - デオキシヌクレオチドの領域、その 5 ' および 3 ' 端で 1 若しくは 2 個の 2 ' - O - (2 - メトキシエチル) ヌクレオチドで隣接された 1 7 - デオキシヌクレオチドの領域、またはその 5 ' および 3 ' 端で 1 個の 2 ' - O - (2 - メトキシエチル) ヌクレオチドで隣接された 1 8 - デオキシヌクレオチドの領域を特徴とする。

【 0 0 4 5 】

特定の一態様において、該アンチセンスオリゴヌクレオチドは配列番号 4 5 の核酸塩基配列を有し、該アンチセンスオリゴヌクレオチドは、その 5 ' および 3 ' 端で 4 個の 2 ' - O (2 - メトキシエチル) ヌクレオチドで隣接された 1 2 - デオキシヌクレオチドの領域を有する。さらなる一態様において、該アンチセンスオリゴヌクレオチドは G C C R に特異的にハイブリダイズしかつその発現を低下する。さらなる一態様において、最低 1 個

のヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合である。さらなる一態様において、最低1個のシトシンが5-メチルシトシンである。

【0046】

特定の一態様において、該アンチセンスオリゴヌクレオチドは配列番号45の核酸塩基配列を有し、該アンチセンスオリゴヌクレオチドは、その5'および3'端で3個の2'-O(2-メトキシエチル)ヌクレオチドで隣接された14-デオキシヌクレオチドの領域を有する。さらなる一態様において、該アンチセンスオリゴヌクレオチドはGCCRに特異的にハイブリダイズしかつその発現を低下する。さらなる一態様において、最低1個のヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合である。さらなる一態様において、最低1個のシトシンが5-メチルシトシンである。

10

【0047】

特定の一態様において、該アンチセンスオリゴヌクレオチドは配列番号45の核酸塩基配列を有し、該アンチセンスオリゴヌクレオチドは、その5'および3'端で2個の2'-O(2-メトキシエチル)ヌクレオチドで隣接された16-デオキシヌクレオチドの領域を有する。さらなる一態様において、該アンチセンスオリゴヌクレオチドはGCCRに特異的にハイブリダイズしかつその発現を低下する。さらなる一態様において、最低1個のヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合である。さらなる一態様において、最低1個のシトシンが5-メチルシトシンである。

【0048】

特定の一態様において、該アンチセンスオリゴヌクレオチドは配列番号45の核酸塩基配列を有し、該アンチセンスオリゴヌクレオチドは、その5'および3'端で1若しくは2個の2'-O(2-メトキシエチル)ヌクレオチドで隣接された17-デオキシヌクレオチドの領域を有する。さらなる一態様において、該アンチセンスオリゴヌクレオチドはGCCRに特異的にハイブリダイズしかつその発現を低下する。さらなる一態様において、最低1個のヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合である。さらなる一態様において、最低1個のシトシンが5-メチルシトシンである。

20

【0049】

特定の一態様において、該アンチセンスオリゴヌクレオチドは配列番号45の核酸塩基配列を有し、該アンチセンスオリゴヌクレオチドは、その5'および3'端で1個の2'-O(2-メトキシエチル)ヌクレオチドで隣接された18-デオキシヌクレオチドの領域を有する。さらなる一態様において、該アンチセンスオリゴヌクレオチドはGCCRに特異的にハイブリダイズしかつその発現を低下する。さらなる一態様において、最低1個のヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合である。さらなる一態様において、最低1個のシトシンが5-メチルシトシンである。

30

【0050】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド、および、場合によっては、製薬学的に許容できる担体、希釈剤、増強剤若しくは賦形剤を含んでなる製薬学的組成物もまた本明細書で企図している。本発明の化合物は、GCCRにより媒介されるグルココルチコイド活性に関係する疾患および障害の処置のための医薬品の製造でもまた使用し得る。

【0051】

本発明の態様は、本発明の製薬学的組成物若しくはアンチセンスオリゴヌクレオチドと細胞若しくは組織を接触させることを含んでなる、前記組織若しくは細胞でのGCCRの発現の低下方法、動物に本発明の製薬学的組成物を投与することを含んでなる、前記動物での血糖値、血中トリグリセリド濃度若しくは血中コレステロール濃度の低下方法を包含する。血中濃度は血漿若しくは血清濃度でありうる。本発明の製薬学的組成物を動物に投与することを含んでなる、前記動物でのインスリン感受性の増大方法、肝トリグリセリド濃度の低下方法および肝グルコース産生の阻害方法もまた企図している。増大されたインスリン感受性は循環インスリン濃度の低下により示されうる。本発明の別の局面は動物の体脂肪量の低下方法である。

40

【0052】

50

本発明の他の態様は、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドの治療的若しくは予防的有効量を動物に投与することを含んでなる、グルココルチコイド受容体発現と関連する疾患若しくは状態を有する動物の処置方法を包含する。該疾患若しくは状態は代謝性疾患若しくは状態でありうる。いくつかの態様において、代謝性疾患若しくは状態は、糖尿病、肥満、代謝性症候群 X、高血糖症、高脂血症若しくはインスリン抵抗性である。いくつかの態様において、糖尿病は 2 型糖尿病である。いくつかの態様において、肥満は食餌誘発性である。いくつかの態様において、高脂血症は上昇された血中脂質濃度を伴う。脂質はコレステロールおよびトリグリセリドを包含する。一態様において、状態は肝臓脂肪症である。いくつかの態様において、脂肪症は脂肪性肝炎若しくは非アルコール性脂肪性肝炎である。

10

【0053】

動物での上昇された血糖値若しくは血中脂質濃度の発生の予防若しくは遅延方法もまた提供される。

【0054】

本発明の化合物は、ヒトのようなそれを必要とする動物で G C C R の発現を調節するのに使用し得る。制限しない一態様において、該方法は、G C C R の発現を低下するアンチセンス化合物の有効量を前記動物に投与する段階を含んでなる。一態様において、本発明のアンチセンス化合物は G C C R R N A のレベル若しくは機能を効果的に低下する。G C C R の m R N A レベルの低下は同様に発現の G C C R タンパク質産物の変化につながり得るため、こうした結果として生じる変化もまた測定し得る。G C C R R N A 若しくは発現のタンパク質産物のレベル若しくは機能を効果的に低下する本発明のアンチセンス化合物は、活性のアンチセンス化合物とみなされる。一態様において、本発明のアンチセンス化合物は G C C R の発現を低下させて、本明細書の例示されるアッセイにより測定されるところの最低 10 %、最低 20 %、最低 25 %、最低 30 %、最低 40 %、最低 50 %、最低 60 %、最低 70 %、最低 75 %、最低 80 %、最低 85 %、最低 90 %、最低 95 %、最低 98 %、最低 99 % 若しくは 100 % の R N A の減少を引き起こす。

20

【0055】

アンチセンスの機構

「アンチセンスの機構」は、ハイブリダイゼーションの結果若しくは影響が、関与する細胞の機構、例えば転写若しくはスプライシングの付随する失速を伴う標的の分解若しくは標的の占有のいずれかである、標的核酸との化合物のハイブリダイゼーションを伴う全部である。

30

【0056】

標的

本明細書で使用されるところの「標的核酸」および「G C C R をコードする核酸分子」という用語は、G C C R をコードする D N A、こうした D N A から転写された R N A (プレ m R N A および m R N A 若しくはそれらの部分を包含する)、ならびにまたこうした R N A 由来の c D N A を包含するために便宜上使用する。

【0057】

領域、セグメントおよび部位

40

ターゲッティング過程は、通常、所望の効果、例えば発現の調節が生じることができるよう、アンチセンス相互作用が起こるための標的核酸内の最低 1 個の標的領域、セグメント若しくは部位の決定もまた包含する。「領域」は、最低 1 個の同定可能な構造、機能若しくは特徴を有する標的核酸の一部と定義する。標的核酸の領域内にセグメントがある。「セグメント」は標的核酸内の領域のより小さいすなわち下位部分と定義する。本発明で使用されるところの「部位」は標的核酸内の独特の核酸塩基位置と定義する。

【0058】

1 個若しくはそれ以上の標的領域、セグメント若しくは部位が一旦決定されれば、所望の効果を示すために標的に十分に相補的である、すなわち十分に良好にかつ十分な特異性でハイブリダイズするオリゴマー化合物を設計する。

50

【 0 0 5 9 】

バリエーション

選択的 RNA 転写物が DNA の同一ゲノム領域から産生されうることもまた当該技術分野で既知である。これらの選択的転写物は「バリエーション」として公知である。より具体的には、「プレ mRNA バリエーション」は、同一ゲノム DNA から産生される他の転写物とそれらの開始若しくは終止位置いずれかが異なりかつイントロンおよびエキソン双方の配列を含有する、同一ゲノム DNA から産生される転写物である。

【 0 0 6 0 】

スプライシングの間の 1 個若しくはそれ以上のエキソン若しくはイントロン領域またはそれらの部分の除去に際して、プレ mRNA バリエーションはより小さい「mRNA バリエーション」を生じる。結果、mRNA バリエーションはプロセシングされたプレ mRNA バリエーションであり、そして、各独特のプレ mRNA バリエーションは、スプライシングの結果として独特の 1 mRNA バリエーションを常に産生するはずである。これらの mRNA バリエーションは「選択的スプライスバリエーション」としてもまた知られる。プレ mRNA バリエーションのスプライシングが発生しない場合には、該プレ mRNA バリエーションは mRNA バリエーションに同一である。

10

【 0 0 6 1 】

バリエーションは、転写を開始若しくは終了させるための選択的シグナルの使用により産生され得ること、ならびに、プレ mRNA および mRNA は 1 個以上の開始コドン若しくは終止コドンを有し得ることもまた当該技術分野で既知である。代替の開始コドンを使用するプレ mRNA 若しくは mRNA から発するバリエーションは、そのプレ mRNA 若しくは mRNA の「選択的開始バリエーション」として知られる。代替の終止コドンを使用する転写物はそのプレ mRNA 若しくは mRNA の「選択的終止バリエーション」として知られる。1 つの特定の型の選択的終止バリエーションは、産生される複数の転写物が、転写機構により「ポリ A 終止シグナル」の 1 個の選択的選択から生じて、それにより独特のポリ A 部位で終止する転写物を産生する「ポリ A バリエーション」である。結果、本明細書に記述されるバリエーションの型もまた適する標的核酸である。

20

【 0 0 6 2 】

標的発現の調節

「調節」は、機能の動揺、例えば発現の増大（刺激若しくは誘導）または減少（阻害若しくは低下）のいずれも意味している。別の例として、発現の調節はプレ mRNA のプロセシングのスプライス部位の選択を動揺することを包含し得る。「発現」は、それにより遺伝子のコードされた情報が細胞中で存在しかつ作動する構造に変換される全部の機能を包含する。これらの構造は転写および翻訳の産物を包含する。「発現の調節」はこうした機能の動揺を意味している。「調節物質」は、GCCR の発現を調節しかつ有効標的セグメントに相補的である最低 8 核酸塩基部分を含んでなる化合物である。

30

【 0 0 6 3 】

標的核酸の発現の調節は、いずれかの数の核酸（DNA 若しくは RNA）機能の変化により達成し得る。調節されるべき DNA の機能は複製および転写を包含し得る。複製および転写は、例えば、内因性の細胞性鋳型、ベクター、プラスミド構築物または別の方法からであり得る。調節されるべき RNA の機能は、限定されるものでないがタンパク質翻訳の部位への RNA の転位、RNA 合成の部位から離れている細胞内の部位への RNA の転位を挙げることができる転位機能、および RNA の転位からのタンパク質の翻訳を包含し得る。調節され得る RNA プロセシング機能は、限定されるものでないが、1 種若しくはそれ以上の RNA 種を生じるための RNA のスプライシング、RNA のキャッピング、RNA の 3' 成熟、および該 RNA に関与しうる若しくはそれにより助長されうる該 RNA が関わる触媒活性若しくは複合体形成を挙げることができる。発現の調節は、一時的な若しくは正味の定常状態レベルによるのいずれかの、1 種若しくはそれ以上の核酸種の増大されたレベルまたは 1 種若しくはそれ以上の核酸種の低下されたレベルをもたらし得る。標的核酸の機能のこうした妨害の 1 つの結果が GCCR の発現の調節である。従って、一

40

50

態様において、発現の調節は標的RNA若しくはタンパク質レベルの増大若しくは低下を意味し得る。別の態様において、発現の調節は、1種若しくはそれ以上のRNAスプライス産物の増大若しくは減少、または2種若しくはそれ以上のスプライス産物の比の変化を意味し得る。

【0064】

ハイブリダイゼーションおよび相補性

「ハイブリダイゼーション」はオリゴマー化合物の相補鎖の対形成を意味している。特定の機構に制限されない一方、対形成の最も一般的な機構は、オリゴマー化合物の鎖の相補ヌクレオチド若しくはヌクレオチド塩基（核酸塩基）間のワトソン・クリック、フーグスティーン若しくは逆フーグスティーン水素結合でありうる水素結合を伴う。例えば、アデニンおよびチミンは、水素結合の形成により対形成する相補核酸塩基である。ハイブリダイゼーションは変動する環境下で起こり得る。オリゴマー化合物は、特異的結合が望ましい条件下、すなわち*in vivo*アッセイ若しくは治療的処置の場合には生理学的条件下、および*in vitro*アッセイの場合にはアッセイを実施する条件下で、該オリゴマー化合物の標的以外の核酸配列への非特異的結合を回避するのに十分な程度の相補性が存在する場合に、特異的にハイブリダイズ可能である。

10

【0065】

「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」若しくは「ストリンジェントな条件」は、オリゴマー化合物がその標的配列にしかし最少数の他の配列にハイブリダイズすることができる条件を指す。ストリンジェントな条件は配列依存性でありかつ多様な環境で異なることができ、そして、オリゴマー化合物が標的配列にハイブリダイズする「ストリンジェントな条件」は、オリゴマー化合物の性質および組成、ならびにそれらが検討されているアッセイにより決定される。

20

【0066】

本明細書で使用されるところの「相補性」は、1若しくは2本のオリゴマー化合物鎖上の2核酸塩基間の正確な対形成のための能力を指す。例えば、アンチセンス化合物のある1位置の核酸塩基が、標的核酸のある1位置の核酸塩基と水素結合することが可能である場合には、オリゴヌクレオチドと標的核酸の間の水素結合の位置は相補的位置であるとみなされる。オリゴマー化合物およびさらなるDNA若しくはRNAは、各分子中の十分な数の相補的位置が相互と水素結合し得る核酸塩基により占有される場合に、相互と相補的である。従って、「特異的にハイブリダイズ可能」および「相補的」は、安定かつ特異的な結合がオリゴマー化合物と標的核酸の間で発生するような、十分な数の核酸塩基にわたる十分な程度の正確な対形成すなわち相補性を示すのに使用される用語である。

30

【0067】

オリゴマー化合物の配列は、特異的にハイブリダイズ可能であるためにその標的核酸の配列に100%相補的である必要はないことが当該技術分野で理解されている。さらに、オリゴヌクレオチドは、介在若しくは隣接セグメントがハイブリダイゼーション事象に関与しないような1個若しくはそれ以上のセグメントにハイブリダイズしうる（例えばループ構造、塩基対不適正若しくはヘアピン構造）。本発明のオリゴマー化合物は、それらが標的とされる標的核酸配列内の標的領域に対する最低70%、若しくは最低75%、若しくは最低80%、若しくは最低85%、若しくは最低90%、若しくは最低92%、若しくは最低95%、若しくは最低97%、若しくは最低98%、若しくは最低99%の配列相補性を含んでなる。例えば、アンチセンス化合物の20核酸塩基の18個が標的領域に相補的でありかつ従って特異的にハイブリダイズするとみられるオリゴマー化合物は、90パーセントの相補性を表すとみられる。この例で、残存する非相補的核酸塩基は集団を形成していても若しくは相補的核酸塩基とともに散在していてもよく、そして相互に若しくは相補核酸塩基に連続する必要はない。であるから、標的核酸と完全に相補的な2領域により隣接される4個の非相補的核酸塩基を有する長さ18核酸塩基であるオリゴマー化合物は、標的核酸と77.8%の全体的相補性を有するとみられ、そして従って本発明の範囲内にあるとみられる。標的核酸の一領域とのオリゴマー化合物の相補性パーセントは

40

50

、当該技術分野で既知のBLASTプログラム（基本的局所アライメント検索ツール（basic local alignment search tools）およびPowerBLASTプログラム（Altschulら、J. Mol. Biol.、1990、215、403-410；ZhangとMadden、Genome Res.、1997、7、649-656）を使用して慣例に決定し得る。相同性パーセント、同一性若しくは相補性パーセントは、例えば、SmithとWatermanのアルゴリズム（Adv. Appl. Math.、1981、2、482-489）を使用する、デフォルトの設定を使用するGapプログラム（Wisconsin Sequence Analysis Package、Version 8 for Unix、Genetics Computer Group、University Research Park、ウィスコンシン州マディソン）により決定し得る。

10

【0068】

オリゴマー化合物

「オリゴマー化合物」という用語は、核酸分子の一領域にハイブリダイズすることが可能なポリマー構造を指す。本用語は、オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシド、オリゴヌクレオチドアナログ、オリゴヌクレオチド模倣物、およびこれらのキメラの組合せを包含する。オリゴマー化合物は慣例に直鎖状に製造されるが、しかし環状になるように結合され得るか若しくは別の方法で製造し得る。さらに分枝状構造が当該技術分野で既知である。「アンチセンス化合物」若しくは「アンチセンスオリゴマー化合物」は、それがハイブリダイズしかつその発現を調節（増大若しくは減少）する核酸分子の領域に少なくとも部分的に相補的であるオリゴマー化合物を指す。結果、全部のアンチセンス化合物はオリゴマー化合物と言われることができる一方、全部のオリゴマー化合物がアンチセンス化合物ではない。「アンチセンスオリゴヌクレオチド」は核酸に基づくオリゴマーであるアンチセンス化合物である。アンチセンスオリゴヌクレオチドは化学修飾し得る。オリゴマー化合物の制限しない例は、プライマー、プローブ、アンチセンス化合物、アンチセンスオリゴヌクレオチド、外的ガイド配列（external guide sequence）（EGS）オリゴヌクレオチド、選択的スプライス体（splicer）およびsiRNAを包含する。であるから、これらの化合物は、一本鎖、二本鎖、環状、分枝状若しくはヘアピンの形態で導入し得、そして内的若しくは末端バルジ若しくはループのような構造要素を含有し得る。オリゴマーの二本鎖化合物は、二本鎖化合物を形成するようにハイブリダイズされた二本鎖、または、ハイブリダイゼーションおよび完全に若しくは部分的に二本鎖の化合物の形成を見込むのに十分な自己相補性をもつ一本鎖であり得る。

20

30

【0069】

本発明の状況での「キメラ」オリゴマー化合物若しくは「キメラ」は、それぞれが最低1個の単量体単位、すなわちオリゴヌクレオチド化合物の場合にはヌクレオチドを含んでなる2個若しくはそれ以上の化学的に別個の領域を含有する、オリゴヌクレオチドのような一本若しくは二本鎖オリゴマー化合物である。

【0070】

「ギャップマー」は、デオキシヌクレオチド以外のセグメントにより隣接された2'-デオキシオリゴヌクレオチド領域を有するオリゴマー化合物、一般にはオリゴヌクレオチドと定義する。中央領域は「ギャップ」と称される。隣接セグメントは「ウイング」と称される。ウイングの一方が0個のデオキシオリゴヌクレオチド以外の単量体を有する場合は「ヘミマー」が記述される。

40

【0071】

NAFLD

「非アルコール性脂肪肝疾患」（NAFLD）という用語は、肝細胞中の単純なトリグリセリド蓄積（肝臓脂肪症）から炎症を伴う肝臓脂肪症（脂肪性肝炎）、線維症および肝硬変までの範囲にわたる疾患範囲を包含する。非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）は、トリグリセリドの沈着を超えたNAFLDの進行から発生する。壊死、炎症および線維症を誘導することが可能な第二の的の中がNASHの発生に必要とされる。該第二の的の中の

50

候補は、広範な範疇、すなわち酸化ストレスの増大を引き起こす因子および炎症前サイトカインの発現を促進する因子にグループ分けし得る。増大された肝トリグリセリドが動物およびヒトの肝細胞での増大された酸化ストレスにつながることを示唆され、肝トリグリセリド蓄積、酸化ストレスおよび肝臓脂肪症のNASHへの進行の間の潜在的因果関係を示す(BrowningとHorton、J. Clin. Invest.、2004、114、147-152)。高トリグリセリド血症および高脂肪酸血症は、末梢組織でのトリグリセリド蓄積を引き起こし得る(Shimamuraら、Biochem. Biophys. Res. Commun.、2004、322、1080-1085)。本発明の一態様は、本発明のオリゴマー化合物の予防的若しくは治療的有效量を投与することによる動物の肝の脂質の減少方法である。本発明の別の態様は、本発明のオリゴマー化合物の予防的若しくは治療的有效量を投与することによる動物での肝臓脂肪症の処置方法である。いくつかの態様において、脂肪症は脂肪性肝炎である。いくつかの態様において、脂肪症はNASHである。

10

【0072】

化学修飾

修飾および代替核酸塩基

本発明のオリゴマー化合物は、該化合物中のヌクレオチド位置の1個若しくはそれ以上に異なる塩基が存在するバリエーションもまた包含する。例えば、第一のヌクレオチドがアデノシンである場合、この位置にチミジン、グアノシン若しくはシチジンを含有するバリエーションを製造しうる。これは該オリゴマー化合物の位置のいずれでも行いうる。これらの化合物をその後、GCCR mRNAの発現を低下させるそれらの能力を決定するために本明細書に記述される方法を使用して試験する。

20

【0073】

オリゴマー化合物は核酸塩基(しばしば、複素環塩基若しくは単に「塩基」ともまた当該技術分野で称される)の修飾若しくは置換もまた包含し得る。本明細書で使用されるところの「未修飾」若しくは「天然の」核酸塩基は、プリン塩基アデニン(A)およびグアニン(G)、ならびにピリミジン塩基チミン(T)、シトシン(C)およびウラシル(U)を包含する。「置換」は未修飾すなわち天然の塩基の別の未修飾すなわち天然の塩基での置き換えである。「修飾」核酸塩基は、5-メチルシトシン(5-me-C)、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの6-メチルおよび他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの2-プロピルおよび他のアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミンおよび2-チオシトシン、5-ハロウラシルおよびシトシン、5-プロピニル(-C≡CH₃)ウラシルおよびシトシン、ならびにピリミジン塩基の他のアルキニル誘導体、6-アゾウラシル、シトシンおよびチミン、5-ウラシル(プソイドウラシル)、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシルおよび他の8-置換アデニンおよびグアニン、5-ハロ、とりわけ5-プロモ、5-トリフルオロメチルおよび他の5-置換ウラシルおよびシトシン、7-メチルグアニンおよび7-メチルアデニン、2-F-アデニン、2-アミノアデニン、8-アザグアニンおよび8-アザアデニン、7-デアザグアニンおよび7-デアザアデニンならびに3-デアザグアニンおよび3-デアザアデニンのような他の合成および天然の核酸塩基を意味している。さらなる修飾核酸塩基は、フェノキサジンシチジン(1H-ピリミド(5,4-b)(1,4)ベンゾキサジン-2(3H)-オン)、フェノチアジンシチジン(1H-ピリミド(5,4-b)(1,4)ベンゾチアジン-2(3H)-オン)、置換フェノキサジンシチジン(例えば9-(2-アミノエトキシ)-H-ピリミド(5,4-b)(1,4)ベンゾキサジン-2(3H)-オン)、カルバゾールシチジン(2H-ピリミド(4,5-b)インドール-2-オン)、ピリドインドールシチジン(H-ピリド(3',2':4,5)ピロロ(2,3-d)ピリミジン-2-オン)のようなG-クランプ(G-clamp)のような三環性ピリミジンを包含する。修飾核酸塩基は、プリン若しくはピリミジン塩基が他の複素環で置換されているもの、例えば7-デアザアデニン、7-デアザグアニン、2-

30

40

50

アミノピリジンおよび2 - ピリドンもまた包含しうる。さらなる核酸塩基は、米国特許第3,687,808号明細書に開示されるもの、The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering、858 - 859ページ、Kroschwitz, J. I. 編、John Wiley & Sons、1990に開示されるもの、Englisch's, Angewandte Chemie, International Edition、1991、30、613により開示されるもの、およびSanghvi, Y. S.、第15章、Antisense Research and Applications、289 - 302ページ、Crooke, S. T. と Lebleu, B. 編、CRC Press、1993により開示されるものを包含する。これらの核酸塩基のあるものは、本発明の化合物の結合アフィニティーを増大させるのに適するとして当業者に既知である。これらは、5 - 置換ピリミジン、6 - アザピリミジン、ならびに2 - アミノプロビルアデニンを包含するN - 2、N - 6およびO - 6置換プリン、5 - プロビルウラシルならびに5 - プロビルシトシンを包含する。5 - メチルシトシン置換は核酸二重鎖の安定性を0.6 ~ 1.2 増大させることが示されており、そして、なおより具体的には2' - O - メトキシエチル糖修飾と組合せられる場合に、現在適する塩基置換である。塩基の修飾は、核酸配列中の置換を生じさせるためのような化学修飾を伴わないことが当該技術分野で理解されている。

10

【0074】

上に示される修飾核酸塩基ならびに他の修飾核酸塩基のあるものの製造法を教示する代表的米国特許は、限定されるものでないが、上で示された米国特許第3,687,808号、ならびに米国特許第4,845,205号；5,130,302号；5,134,066号；5,175,273号；5,367,066号；5,432,272号；5,457,187号；5,459,255号；5,484,908号；5,502,177号；5,525,711号；5,552,540号；5,587,469号；5,594,121号；5,596,091号；5,614,617号；5,645,985号；5,830,653号；5,763,588号；6,005,096号；5,681,941号；および5,750,692号明細書を挙げることができる。

20

【0075】

本発明のオリゴマー化合物は、天然に存在する複素環塩基部分の1個若しくはそれ以上の代わりに多環複素環化合物もまた包含し得る。多数の三環性複素環化合物が以前に報告されている。これらの化合物は、修飾鎖の標的鎖への結合特性を増大させるためのアンチセンスの応用で慣例に使用されている。最も研究された修飾はグアノシンを標的とし、これゆえにそれらはG - クランプ若しくはシチジンアナログと命名された。第二鎖中のグアノシンと3個の水素結合を作成する代表的シトシンアナログは、1,3 - ジアザフェノキサジン - 2 - オン (Kurchavovら、Nucleosides and Nucleotides、1997、16、1837 - 1846)、1,3 - ジアザフェノチアジン - 2 - オン、(Lin, K. - Y. ; Jones, R. J. ; Matteucci, M. J. Am. Chem. Soc. 1995、117、3873 - 3874) および6,7,8,9 - テトラフルオロ - 1,3 - ジアザフェノキサジン - 2 - オン (Wang, J. ; Lin, K. - Y. , Matteucci, M. Tetrahedron Lett. 1998、39、8385 - 8388) を包含する。オリゴヌクレオチドに組み込まれて、これらの塩基修飾は相補グアニンとハイブリダイズすることが示され、そして後者はアデニンとハイブリダイズし、かつ、拡大されたスタッキング相互作用によりらせんの熱安定性を高めることもまた示された (米国特許付与前公開第20030207804号および同第20030175906号明細書もまた参照されたい)。

30

40

【0076】

さらなるらせん安定化特性が、柔軟性のない1,3 - ジアザフェノキサジン - 2 - オン足場構造に結合したアミノエトキシ部分をシトシンアナログ / 代替物が有する場合に観察された (Lin, K. - Y. ; Matteucci, M. J. Am. Chem. Soc. 1998、120、8531 - 8532)。結合研究は、単一の取り込みが、5 - メチル

50

シトシン (dC5^{m e}) に関して 18 までの T_m を伴い、モデルオリゴヌクレオチドのその相補標的 DNA 若しくは RNA への結合アフィニティーを高め得ることを示し、これは単一修飾の高アフィニティー増強である。他方、らせん安定性の増大は該オリゴヌクレオチドの特異性を損なわない。

【0077】

本発明での使用に従いやすいさらなる三環性複素環化合物およびそれらの使用方法は、米国特許第 6,028,183 号および同第 6,007,992 号明細書に開示される。

【0078】

それらの損なわれない配列特異性と一緒のフェノキサジン誘導体の高められた結合アフィニティーは、それらを、より強力なアンチセンスに基づく薬物の開発のための貴重な核酸塩基アナログにする。事実、フェノキサジン置換を含有するヘプタヌクレオチドは、RNアーゼHを活性化し、細胞取り込みを高めかつ増大されたアンチセンス活性を表すことが可能であることを示す有望なデータが *in vitro* 実験から得られている (Lin, K.-Y.; Matteucci, M. J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 8531-8532)。該活性増強は、単一置換が 20mer の 2'-デオキシホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの *in vitro* 効力を有意に向上することを示したため、G-クランプの場合になおより顕著であった (Flanagan, W. M.; Wolf, J. J.; Olson, P.; Grant, D.; Lin, K.-Y.; Wagner, R. W.; Matteucci, M. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 1999, 96, 3513-3518)。

【0079】

複素環塩基として有用なさらなる修飾多環複素環化合物は、限定されるものでないが上で示された米国特許第 3,687,808 号、ならびに米国特許第 4,845,205 号; 5,130,302 号; 5,134,066 号; 5,173,273 号; 5,367,066 号; 5,432,272 号; 5,434,257 号; 5,457,187 号; 5,459,255 号; 5,484,908 号; 5,502,177 号; 5,525,711 号; 5,552,540 号; 5,587,469 号; 5,594,121 号、5,596,091 号; 5,614,617 号; 5,645,985 号; 5,646,269 号; 5,750,692 号; 5,830,653 号; 5,763,588 号; 6,005,096 号; および 5,681,941 号; ならびに米国特許付与前公開第 20030158403 号明細書に開示される。

【0080】

組合せ

本発明の組成物は 2 種若しくはそれ以上のオリゴマー化合物を含有し得る。別の関係する態様において、本発明の組成物は、第一の核酸を標的とする 1 種若しくはそれ以上のアンチセンス化合物、とりわけオリゴヌクレオチド、および第二の核酸標的を標的とする 1 種若しくはそれ以上の付加的なアンチセンス化合物を含有し得る。あるいは、本発明の組成物は、同一の核酸標的の異なる領域を標的とする 2 種若しくはそれ以上のアンチセンス化合物を含有し得る。2 種若しくはそれ以上の組合せた化合物は一緒に若しくは連続して使用しうる。

【0081】

併用療法

本発明の化合物は、本発明の 1 種若しくはそれ以上の化合物および状態を処置するための 1 種若しくはそれ以上の他の適する治療/予防的化合物を投与することにより付加的な効果が達成される併用療法で使用しうる。適する治療/予防的化合物 (1 種若しくは複数) は、限定されるものでないが血糖降下薬、抗肥満薬および脂質低下薬を挙げることができる。血糖降下薬は、限定されるものでないが、ホルモン、ホルモン模倣物若しくはインクレチン模倣物 (例えば吸入インスリンを包含するインスリン、GLP-1、またはリラグルチド若しくはエキセナチドのような GLP-1 アナログ)、DPP (IV) 阻害剤、スルホニル尿素 (例えばアセトヘキサミド、クロルプロバミド、トルブタミド、トラザミ

10

20

30

40

50

ド、グリメピリド、グリピジド、グリブリド若しくはグリクラジド)、ピグアニド(メトホルミン)、メグリチニド(例えばナテグリニド若しくはレバグリニド)、チアゾリジンジオン若しくは他のPPAR-アゴニスト(例えばピオグリタゾン若しくはロシグリタゾン)-グルコシダーゼ阻害剤(例えばアカルボース若しくはミグリトール)、あるいはGCCRを標的としないアンチセンス化合物を挙げることができる。二重PPARアゴニスト(例えば、Bristol-Myers Squibbにより開発されているムラグリタザール(muraglitazar)、若しくはAstra-Zenecaにより開発されているテサグリタザール(tesaglitazar))もまた包含される。開発中の他の糖尿病処置(例えば、Novartisにより開発されているLAF237; Merckにより開発されているMK-0431; 若しくはSanofi-Aventisにより開発されているリモナバン(rimonabant))もまた包含される。抗肥満薬は、限定されるものでないが、食欲抑制剤(例えばフェンテルミン若しくはMeridiaTM)、オルリスタットのような脂肪吸収阻害剤(例えばXenicalTM)、および食欲を刺激する飢餓シグナルを阻害する改変された形態の毛様体神経栄養因子を挙げることができる。脂質低下薬は、限定されるものでないが、胆汁酸塩捕捉樹脂(例えばコレステラミン、コレステポールおよび塩酸コレセベラム)、HMGCoA還元酵素阻害剤(例えばロバスタチン、プラバスタチン、アトロバスタチン、シンバスタチンおよびフルバスタチン)、ニコチン酸、フィブリン酸誘導体(例えばクロフィブラート、ゲムフィブロジル、フェノフィブラート、ベザフィブラートおよびシプロフィブラート)、プロブコール、ネオマイシン、デキストロチロキシン、植物スタノールエステル、コレステロール吸収阻害剤(例えばエゼチミブ)、CETP阻害剤(例えばトルセトラピブおよびJTT-705)MTP阻害剤(例えばインプリタピド(implitapide))、胆汁酸輸送体の阻害剤(apical sodium-dependent bile acid transporter)、肝CYP7aの調節物質、ACAT阻害剤(例えばAvasimibe)、エストロゲン補充治療薬(例えばタモキシゲン)、合成HDL(例えばETC-216)、抗炎症薬(例えばグルココルチコイド)、若しくはGCCRを標的としないアンチセンス化合物を挙げることができる。これらの薬物の1種若しくはそれ以上を、付加的な治療効果を達成するためにGCCRのアンチセンス阻害剤の1種若しくはそれ以上と組合せうる。

【0082】

オリゴマー合成

修飾および未修飾ヌクレオチドのオリゴマー化は、DNA(Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Agrawal編(1993)、Humana Press)および/若しくはRNA(Scaringe, Methods(2001)、23、206-217。RNA:Protein Interactions, Smith編(1998)中Gaitら、Applications of Chemically synthesized RNA、1-36。Galloら、Tetrahedron(2001)、57、5707-5713)についての文献の手順、ならびに米国特許公開第US2005-0164271号明細書(引用することにより本明細書に組み込まれる)に従って慣例に実施し得る。

【0083】

本発明のオリゴマー化合物は固相合成の公知の技術により便宜的かつ慣例に作成し得る。こうした合成の機器は、例えばApplied Biosystems(カリフォルニア州フォスターシティ)を包含するいくつかの供給元により販売されている。当該技術分野で既知のこうした合成のいずれの他の手段も付加的に若しくは代替で使用しうる。ホスホロチオエートおよびアルキル化誘導体のようなオリゴヌクレオチドを製造するために類似の技術を使用することが公知である。

【0084】

オリゴマーの精製および分析

オリゴヌクレオチドの精製および分析方法は当業者に既知である。分析方法はキャピラ

10

20

30

40

50

リー電気泳動 (CE) およびエレクトロスプレー質量分析を包含する。こうした合成および分析方法はマルチウェルプレートで実施し得る。

【0085】

制限しない開示および引用することによる組込み

本発明のある種の化合物、組成物および方法がある態様に従って特殊性を伴い記述した一方、本明細書の実施例は本発明の化合物を具体的に説明するためのみにはたらき、そしてそれを制限することを意図していない。本出願で引用される参考文献、GENBANK (R) 受託番号などのそれぞれは、そっくりそのまま引用することにより本明細書に組み込まれる。

【実施例1】

【0086】

発現の調節のアッセイ

GCCR発現の調節は当該技術分野で既知の多様な方法でアッセイし得る。GCCR mRNAレベルは、例えばノーザンブロット分析、競合ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 若しくはリアルタイムPCRにより定量し得る。RNA分析は当該技術分野で既知の方法により全細胞RNA若しくはポリ (A) + mRNAで実施し得る。RNAの単離方法は、例えばAusubel, F.M.ら、Current Protocols in Molecular Biology、第1巻、pp. 4.1.1 - 4.2.9および4.5.1 - 4.5.3、John Wiley & Sons, Inc., 1993に教示される。

【0087】

ノーザンブロット分析は当該技術分野で慣例であり、そして、例えばAusubel, F.M.ら、Current Protocols in Molecular Biology、第1巻、pp. 4.2.1 - 4.2.9、John Wiley & Sons, Inc., 1996に教示される。リアルタイム定量的 (PCR) は、PE - Applied Biosystems、カリフォルニア州フォスターシティから入手可能かつ製造元の説明書に従って使用する、商業的に入手可能なABI PRISMTM 7700配列検出装置を使用して便宜的に達成し得る。

【0088】

GCCRによりコードされるタンパク質のレベルは、免疫沈降法、ウエスタンブロット分析 (イムノブロッティング)、ELISA若しくは蛍光標示式細胞分取 (FACS) のような当該技術分野で公知の多様な方法で定量し得る。GCCRによりコードされるタンパク質に向けられる抗体は、MSRS抗体カタログ (Aerie Corporation、ミシガン州バーミンガム) のような多様な供給源から同定しかつ得ることができるか、若しくは慣習的抗体生成法を介して製造し得る。ポリクローナル抗血清の製造方法は、例えばAusubel, F.M.ら、Current Protocols in Molecular Biology、第2巻、pp. 11.12.1 - 11.12.9、John Wiley & Sons, Inc., 1997に教示される。モノクローナル抗体の製造法は、例えばAusubel, F.M.ら、Current Protocols in Molecular Biology、第2巻、pp. 11.4.1 - 11.11.5、John Wiley & Sons, Inc., 1997に教示される。

【0089】

免疫沈降法は当該技術分野で標準的であり、そして例えばAusubel, F.M.ら、Current Protocols in Molecular Biology、第2巻、pp. 10.16.1 - 10.16.11、John Wiley & Sons, Inc., 1998に見出し得る。ウエスタンブロット (イムノブロット) 分析は当該技術分野で標準的であり、そして例えばAusubel, F.M.ら、Current Protocols in Molecular Biology、第2巻、pp. 10.8.1 - 10.8.21、John Wiley & Sons, Inc., 1997に見出し得る。酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA) は当該技術分野で標準的であり

10

20

30

40

50

、そして例えば Ausubel, F. M. ら、Current Protocols in Molecular Biology、第2巻、pp. 11.2.1 - 11.2.2、John Wiley & Sons, Inc.、1991に見出し得る。

【0090】

標的核酸発現に対する本発明のオリゴマー化合物の影響は多様な細胞型のいずれでも試験し得るが、但し、標的核酸が測定可能なレベルで存在する。標的核酸発現に対する本発明のオリゴマー化合物の影響は、例えばPCR若しくはノーザンブロット分析を使用して慣例で測定し得る。細胞株は正常組織および細胞型、ならびに多様な障害（例えば過剰増殖障害）と関連する細胞の双方に由来する。複数の組織および種由来の細胞株は、American Type Culture Collection (ATCC、バージニア州マナサス)、日本癌研究資源バンク (Japanese Cancer Research Resources Bank) (東京)、若しくは応用微生物学研究センター (Centre for Applied Microbiology and Research) (英国ウィルトシャー州) から得ることができる。

10

【0091】

初代細胞、すなわち動物から単離されかつ連続培養にかけられていない細胞は、当該技術分野で既知の方法に従って製造し得るか、若しくは多様な商業的供給元から得ることができる。加えて、初代細胞は臨床の設定でドナーヒト被験体（すなわち血液ドナー、外科手術患者）から得るものを包含する。

20

【0092】

細胞型

標的核酸発現に対するオリゴマー化合物の影響はHepG2細胞および初代ラット肝細胞で試験した。

【0093】

HepG2細胞：

ヒト肝芽細胞腫細胞株HepG2はAmerican Type Culture Collection (バージニア州マナサス) から得た。HepG2細胞は、10%ウシ胎児血清、1mM非必須アミノ酸および1mMピルビン酸ナトリウムを補充したイーグルMEM (Invitrogen Life Technologies、カリフォルニア州カールズバッド) 中で慣例に培養した。細胞は、それらがおよそ90%コンフルエンスに達した場合にトリプシン処理および希釈により慣例に継代した。マルチウェル培養プレートは、1型ラット尾コラーゲン (BD Biosciences、マサチューセッツ州ベッドフォード) のリン酸緩衝生理的食塩水中100倍希釈で被覆することにより細胞培養のため準備する。コラーゲン含有プレートを37℃でおよそ1時間インキュベートし、その後コラーゲンを除去しかつウェルをリン酸緩衝生理的食塩水で2回洗浄した。細胞を、オリゴマー化合物トランスフェクション実験での使用のため、およそ8,000細胞/ウェルの密度で96ウェルプレート (Falcon-Primaria #353872、BD Biosciences、マサチューセッツ州ベッドフォード) に播種した。

30

【0094】

初代ラット肝細胞：

初代ラット肝細胞は、Charles River Labs (マサチューセッツ州ウィルミントン) から購入したSprague-Dawleyラットから調製し、そして10%ウシ胎児血清 (Invitrogen Life Technologies、カリフォルニア州カールズバッド)、1mLあたり100単位のペニシリン、および100μg/mLのストレプトマイシン (Invitrogen Life Technologies、カリフォルニア州カールズバッド) を補充した高グルコースDMEM (Invitrogen Life Technologies、カリフォルニア州カールズバッド) 中で慣例に培養する。細胞を、およそ4,000~6,000細胞/ウェルの密度で96ウェルプレート (Falcon-Primaria #353872、BD Biosciences、マサチューセッツ州ベッドフォード) に播種する本発明のオリゴマー化

40

50

合物での処理。

【0095】

オリゴマー化合物での処理

細胞が適切なコンフルエンスに達した場合に、記述されるところのトランスフェクション法を使用してそれらをオリゴヌクレオチドで処理した。当該技術分野で既知の他の適するトランスフェクション試薬は、限定されるものでないが LIPOFECTAMINETM、OLIGOFECTAMINETM および FUGENETM を挙げることができる。当該技術分野で既知の他の適するトランスフェクション法は限定されるものでないが電気穿孔法を挙げることができる。

【0096】

LIPOFECTINTM

細胞が65～75%コンフルエンスに達した場合にそれらをオリゴヌクレオチドで処理する。オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの所望の濃度、および100nMオリゴヌクレオチドあたり2.5若しくは3μg/mLのLIPOFECTINTM濃度を達成するように、Opti-MEMTM-1減血清培地(Invitrogen Life Technologies、カリフォルニア州カールズバッド)中でLIPOFECTINTM Invitrogen Life Technologies、カリフォルニア州カールズバッド)と混合する。このトランスフェクション混合物を室温でおよそ0.5時間インキュベートする。96ウェルプレート中で増殖する細胞について、ウェルを100μLのOpti-MEMTM-1で1回洗浄し、そしてその後130μLのトランスフェクション混合物で処理する。24ウェルプレート若しくは他の標準的組織培養プレートで増殖する細胞は、適切な容量の培地およびオリゴヌクレオチドを使用して同様に処理する。2検体若しくは3検体で細胞を処理しかつデータを得る。37℃でおよそ4～7時間の処理後に、トランスフェクション混合物を含有する培地を新鮮培地で置き換える。オリゴヌクレオチド処理の16～24時間後に細胞を収集する。

【0097】

CYTOFECTINTM

細胞が65～75%コンフルエンスに達した場合にそれらをオリゴヌクレオチドで処理する。オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの所望の濃度、および100nMオリゴヌクレオチドあたり2若しくは4μg/mLのCYTOFECTINTM濃度を達成するように、Opti-MEMTM-1減血清培地(Invitrogen Life Technologies、カリフォルニア州カールズバッド)中でCYTOFECTINTM (Gene Therapy Systems、カリフォルニア州サンディエゴ)と混合する。このトランスフェクション混合物を室温でおよそ0.5時間インキュベートする。96ウェルプレート中で増殖する細胞について、ウェルを100μLのOpti-MEMTM-1で1回洗浄し、そしてその後130μLのトランスフェクション混合物で処理する。24ウェルプレート若しくは他の標準的組織培養プレートで増殖する細胞は、適切な容量の培地およびオリゴヌクレオチドを使用して同様に処理する。2検体若しくは3検体で細胞を処理しかつデータを得る。37℃でおよそ4～7時間の処理後に、トランスフェクション混合物を含有する培地を新鮮培地で置き換える。オリゴヌクレオチド処理の16～24時間後に細胞を収集する。

【0098】

対照オリゴヌクレオチド

対照オリゴヌクレオチドは特定の細胞株の至適のオリゴマー化合物濃度を決定するために使用する。さらに、本発明のオリゴマー化合物をオリゴマー化合物スクリーニング実験若しくは表現型アッセイで試験する場合、対照オリゴヌクレオチドを本発明の化合物と同時に試験する。いくつかの態様において、対照オリゴヌクレオチドを陰性対照オリゴヌクレオチド、すなわち遺伝子発現若しくは表現型に対する影響の非存在を測定するための手段として使用する。代替の態様において、対照オリゴヌクレオチドを陽性対照オリゴヌクレオチド、すなわち遺伝子発現若しくは表現型に影響を及ぼすことが既知のオリゴヌクレ

10

20

30

40

50

オチドとして使用する。対照オリゴヌクレオチドを表 2 に示す。「標的名」は該オリゴヌクレオチドが標的とする遺伝子を示す。「標的の種」は該オリゴヌクレオチドが標的 mRNA に完全に相補的である種を示す。「モチーフ」は該オリゴヌクレオチドを含んでなる化学的に別個の領域を示す。表 2 のある化合物は、「ウイング」により双方の側 (5' および 3') で隣接されている 2' - デオキシヌクレオチドよりなる中央の「ギャップ」領域から構成されるキメラオリゴヌクレオチドである。ウイングは、2' - MOE ヌクレオチドとしてもまた知られる 2' - O - (2 - メトキシエチル) ヌクレオチドから構成される。各ギャップマーオリゴヌクレオチドの「モチーフ」は表 2 に具体的に説明され、そして各ギャップ領域およびウイングのヌクレオチドの数を示し、例えば、「5 - 10 - 5」は 5 ヌクレオチドのウイングにより隣接された 10 ヌクレオチドのギャップ領域を有するギャップマーを示す。ISIS 29848 は無作為化オリゴマー化合物の混合物であり、その配列は表 2 に示し、ここで N は A、T、C 若しくは G であり得る。ヌクレオシド間 (バックボーン) 結合は表 2 のオリゴヌクレオチド全体でホスホロチオエートである。未修飾のシトシンはヌクレオチド配列中で「C」により示し; 全部の他のシトシンは 5 - メチルシトシンである。

【0099】

【表 2】

表 2

細胞株試験、オリゴマー化合物スクリーニングおよび表現型アッセイの対照オリゴヌクレオチド

ISIS #	標的名	標的の種	配列 (5' から 3')	モチーフ	配列番号
113131	CD86	ヒト	CGTGTGTCTGTGCTAGTCCC	5-10-5	4
289865	フォークヘッドボックス O1A (横紋筋肉種)	ヒト	GGCAACGTGAACAGGTCCAA	5-10-5	5
25237	インテグリン β 3	ヒト	GCCCATTGCTGGACATGC	4-10-4	6
196103	インテグリン β 3	ヒト	AGCCCATTGCTGGACATGCA	5-10-5	7
148715	Jagged 2	ヒト; マウス; ラット	TTGTCCCAGTCCCAGGCCTC	5-10-5	8
18076	Jun N-末端キナーゼ - 1	ヒト	CTTTC ^u CGTTGGA ^u C ^u CCCTGGG	5-9-6	9
18078	Jun N-末端 キナーゼ - 2	ヒト	GTGCG ^u CG ^u CGAG ^u C ^u C ^u CGAAA TC	5-9-6	10
183881	キネシン様 1	ヒト	ATCCAAGTGCTACTGTAGTA	5-10-5	11
29848	なし	なし	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN N	5-10-5	12
226844	Notch (ショウジョウバエ) ホモログ 1	ヒト; マウス	GCCCTCCATGCTGGCACAGG	5-10-5	13
105990	ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ	ヒト	AGCAAAAGATCAATCCGTTA	5-10-5	14
336806	Raf キナーゼ C	ヒト	TACAGAAGGCTGGGCCTTGA	5-10-5	15
15770	Raf キナーゼ C	マウス; マウス肉腫ウイルス; ラット	ATGCATT ^u CTG ^u C ^u C ^u C ^u CAAG GA	5-10-5	16

【0100】

使用されるオリゴヌクレオチドの濃度は細胞株ごとに変動する。特定の 1 細胞株の至適のオリゴヌクレオチド濃度を決定するため、細胞をある範囲の濃度の陽性対照オリゴヌク

レオチドで処理する。陽性対照は表 2 に示す。例えば、ヒトおよびヒト以外の霊長類の細胞について、陽性対照オリゴヌクレオチドは I S I S 3 3 6 8 0 6 若しくは I S I S 1 8 0 7 8 から選択しうる。マウスおよびラット細胞について、陽性対照オリゴヌクレオチドは例えば I S I S 1 5 7 7 0 でありうる。I S I S 1 5 7 7 0 に対する標的 mRNA、例えばラット Raf キナーゼ C の 8 0 % 低下をもたらす陽性対照オリゴヌクレオチドの濃度をその後、その細胞株の後の実験での新たなオリゴヌクレオチドのスクリーニング濃度として利用する。8 0 % 低下が達成されない場合は、標的 mRNA の 6 0 % 低下をもたらす陽性対照オリゴヌクレオチドの最低濃度をその後、その細胞株の後の実験でのオリゴヌクレオチドスクリーニング濃度として利用する。6 0 % 低下が達成されない場合は、その特定の細胞株はオリゴヌクレオチドトランスフェクション実験に不適と思われる。

本明細書で使用するアンチセンスオリゴヌクレオチドの濃度は、リボソーム試薬を使用して該アンチセンスオリゴヌクレオチドをトランスフェクトする場合に 5 0 n M から 3 0 0 n M まで、および電気穿孔法により該アンチセンスオリゴヌクレオチドをトランスフェクトする場合に 1 μ M ないし 4 0 μ M である。

【実施例 2】

【0 1 0 1】

G C C R mRNA レベルのリアルタイム定量的 P C R 分析

G C C R mRNA レベルの定量は、製造元の説明書に従って A B I P R I S M ^T M 7 6 0 0、7 7 0 0 若しくは 7 9 0 0 配列検出装置 (P E - A p p l i e d B i o s y s t e m s、カリフォルニア州フォスターシティ) を使用するリアルタイム定量的 P C R により達成した。

【0 1 0 2】

R T、リアルタイム P C R により得られる遺伝子標的量は、その発現が一定である遺伝子 G A P D H の発現レベルを使用して、若しくは R i b o G r e e n ^T M (M o l e c u l a r P r o b e s, I n c. オレゴン州ユージーン) を使用して全 RNA を定量することによるかのいずれかで正規化した。全 RNA は R i b o G r e e n ^T M RNA 定量試薬 (M o l e c u l a r P r o b e s, I n c. オレゴン州ユージーン) を使用して定量した。1 7 0 μ L の R i b o G r e e n ^T M 作業試薬 (1 0 m M トリス - H C l、1 m M E D T A、p H 7 . 5 で 3 5 0 倍希釈した R i b o G r e e n ^T M 試薬) を、3 0 μ L の精製した細胞 RNA を含有する 9 6 ウェルプレートにピペットで移した。4 8 5 n m の励起および 5 3 0 n m の測定を用いて C y t o F l u o r 4 0 0 0 (P E A p p l i e d B i o s y s t e m s) で該プレートを読取った。

【0 1 0 3】

G A P D H 発現は、標的の定量と同時に若しくは別個にのいずれかで R T、リアルタイム P C R により定量した。標的レベルの測定と同時の測定のため、測定されている標的遺伝子に特異的なプライマー - プローブ組を、定量的 P C R 分析の前に、G A P D H 増幅反応で「多重化される (m u l t i p l e x e d)」それらの能力について評価した。多重化は単一チューブ中の複数の DNA 種 (この場合は標的および内因性 G A P D H 対照) の検出を指し、これは G A P D H のプライマー - プローブ組が標的の増幅を妨害しないことを必要とする。

【0 1 0 4】

リアルタイム P C R での使用のためのプローブおよびプライマーは標的特異的配列にハイブリダイズするよう設計した。プライマーおよびプローブの設計方法は当該技術分野で既知である。リアルタイム P C R での使用のためのプライマーおよびプローブの設計は、商業的に入手可能なソフトウェア、例えば P r i m e r E x p r e s s ^(R)、P E A p p l i e d B i o s y s t e m s、カリフォルニア州フォスターシティを使用して実施し得る。該プライマーおよびプローブ、ならびにそれらがハイブリダイズする標的核酸配列を表 4 に提示する。標的特異的 P C R プローブは、5 ' 端に共有結合された F A M および 3 ' 端に共有結合された T A M R A 若しくは M G B を有し、ここで F A M は蛍光色素でありかつ T A M R A および M G B はクエンチャー色素である。

10

20

30

40

50

【0105】

単離後に、RNAを連続逆転写(RT)反応およびリアルタイムPCR(その双方は同一ウェル中で実施する)にかける。RTおよびPCR試薬はInvitrogen Life Technologies(カリフォルニア州カルズバッド)から得た。RT、リアルタイムPCRは、20 μ LのPCRカクテル(MgCl₂を除く2.5 \times PCR緩衝液、6.6mM MgCl₂、375 μ MのdATP、dCTP、dCTPおよびdGTPのそれぞれ、375nMのフォワードプライマーおよびリバースプライマーのそれぞれ、125nMのプロープ、4単位のRNAアーゼ阻害剤、1.25単位のPLATINUM^(R)Taq、5単位のMuLV逆転写酵素、ならびに2.5 \times ROX色素)を、30 μ Lの全RNA溶液(20~200ng)を含有する96ウェルプレートに添加することにより同一で実施した。RT反応は48 $^{\circ}$ Cで30分間のインキュベーションにより実施した。PLATINUM^(R)Taqを活性化するための95 $^{\circ}$ Cでの10分インキュベーション後に、40サイクルの2段階PCRプロトコルを実施した。すなわち95 $^{\circ}$ C 15秒間(変性)次いで60 $^{\circ}$ C 1.5分間(アニーリング/伸長)。

10

【0106】

本発明の化合物は、ヒトGCCRにハイブリダイズするよう設計したプライマー-プロープ組を使用する本明細書の他の実施例で記述されるところの定量的リアルタイムPCRにより、ヒト標的mRNAレベルに対するそれらの影響について評価した。例えば：

フォワードプライマー：TTGACATTTTTCAGGATTTTGGAA(配列番号17として本明細書に組み込まれる)

20

リバースプライマー：CCAAGGACTCTCATTTCTCTCTTT(配列番号18として本明細書に組み込まれる)

およびPCRプロープ：

FAM-TTCTCTCTGGGTCCCC-MGB(配列番号19として本明細書に組み込まれる)、ここでFAMは蛍光色素でありかつMGBは非蛍光のクエンチャー色素である。

【0107】

本発明の化合物は、ラットGCCRにハイブリダイズするよう設計したプライマー-プロープ組を使用する本明細書の他の実施例で記述されるところの定量的リアルタイムPCRにより、ラット標的mRNAレベルに対するそれらの影響について評価した。例えば：

30

フォワードプライマー：AAACAATAGTTCTCTGCAGCATTAAC(配列番号20として本明細書に組み込まれる)

リバースプライマー：CATACAACAACCTCTGGGTTCATAATC(配列番号21として本明細書に組み込まれる)

およびPCRプロープ：

FAM-ACCCCTACCTTTGGTGTCACTGCT-TAMRA(配列番号22として本明細書に組み込まれる)、ここでFAMは蛍光色素でありかつTAMRAはクエンチャー色素である。

【0108】

本発明の化合物は、マウスGCCRにハイブリダイズするよう設計したプライマー-プロープ組を使用する本明細書の他の実施例で記述されるところの定量的リアルタイムPCRにより、マウス標的mRNAレベルに対するそれらの影響について評価した。例えば：

40

フォワードプライマー：GACATCTTTGCAGGATTTTGGAGTT(配列番号23として本明細書に組み込まれる)

リバースプライマー：AACAGGTCTGTACCTCCAGGACT(配列番号24として本明細書に組み込まれる)

およびPCRプロープ：

FAM-CGGGTCCCCAGGTAAAGAGACAAACGA-TAMRA(配列番号25として本明細書に組み込まれる)、ここでFAMは蛍光色素でありかつTAMRAはクエンチャー色素である。

50

【実施例 3】

【0109】

5 - 10 - 5 ギャップマーによるヒト G C C R 発現のアンチセンス阻害

一連のオリゴマー化合物を、表 1 に引用される公表された配列を使用して、ヒト G C C R の多様な領域を標的とするよう設計した。該化合物を表 3 に示す。表 3 の全化合物は、5 ヌクレオチドの「ウイング」により双方の側 (5 ' および 3 ') で隣接されている 10 個の 2 ' - デオキシヌクレオチドよりなる中央「ギャップ」領域から構成される長さ 20 ヌクレオチドのキメラオリゴヌクレオチド (「ギャップマー」) である。ウイングは、2 ' - M O E ヌクレオチドとしてもまた知られる 2 ' - O - (2 - メトキシエチル) ヌクレオチドから構成される。ヌクレオシド間 (バックボーン) 結合は該オリゴヌクレオチド全体でホスホロチオエートである。全部のシチジン残基は 5 - メチルシチジンである。該オリゴヌクレオチドの配列、および該化合物が結合する標的配列上の第一 (最も 5 ') の位置である標的部位を表 3 に示す。該化合物を、ヒト G C C R にハイブリダイズするよう設計したプライマー - プローブ組を使用する本明細書の他の実施例に記述されるところの定量的リアルタイム P C R により、遺伝子標的の m R N A レベルに対するそれらの影響について分析した。

10

【0110】

データは、L I P O F E C T I N ^{T M} を使用して、開示されるオリゴマー化合物 50 n M で H e p G 2 細胞を処理した 3 回の実験からの平均である。発現の減少は表 3 で阻害パーセントとして表す。存在する場合、「N . D . 」は「測定されず」を示す。これらのオリゴマー化合物がそれに対し阻害性である標的領域は、本明細書で「有効標的セグメント」と称する。

20

【0111】

【表 3】

表 3

5-10-5 ギャップマーによるヒト GCCR mRNA レベルの阻害

5-10-5 の ISIS 番号	標的配列 番号	標的 部位	配列	% 阻害 w/5-10-5	配列 番号
361132	1	394	TCTGTCTCTCCCATATACAG	65	26
361133	1	398	TGTTTCTGTCTCTCCCATAT	56	27
361134	1	402	CTTTTGTCTGTCTCTCTCCC	60	28
361135	1	406	ATCACTTTTGTCTGTCTCTC	80	29
180272	1	497	GTTTGCAATGCTTTCTTCCA	74	30
345188	1	501	TGAGGTTTGCAATGCTTTCT	71	31
361136	1	505	CTATTGAGGTTTGCAATGCT	10	32
361137	1	509	CGACCTATTGAGGTTTGCAA	80	33
180274	1	514	CTGGTCGACCTATTGAGGTT	68	34
180275	1	672	CTGTGGTATACAATTTCACA	44	35
180276	1	679	CTTTGGTCTGTGGTATACAA	78	36
345198	1	689	GTCAAAGGTGCTTTGGTCTG	79	37
180279	1	877	GGTTTAGTGTCCGGTAAAAT	60	38
361138	1	954	CTTTTTCTGTTTTCACTTGG	70	39
180280	1	1000	TTCTCTTGCTTAATTACCCC	77	40
345218	1	1004	CAGTTTCTCTTGCTTAATTA	67	41
180281	1	1007	GCCCAGTTTCTCTTGCTTAA	74	42
361139	1	1058	TTTATTACCAATTATATTTG	0	43
361140	1	1062	ACATTTTATTACCAATTATA	35	44
361141	1	1066	GCAGACATTTTATTACCAAT	78	45
361142	1	1070	AATGGCAGACATTTTATTAC	40	46
361143	1	1074	CAGAAATGGCAGACATTTTA	63	47
361144	1	1078	TGAACAGAAATGGCAGACAT	61	48
180283	1	1081	CCATGAACAGAAATGGCAGA	69	49
361145	1	1085	CACACCATGAACAGAAATGG	30	50
361146	1	1089	TACTCACACCATGAACAGAA	60	51
361147	1	1093	GAGGTACTCACACCATGAAC	71	52
361148	1	1097	TCCAGAGGTACTCACACCAT	75	53
361149	1	1101	GTCCTCCAGAGGTACTCACA	69	54
361150	1	1105	ATCTGTCCTCCAGAGGTACT	53	55
361151	1	1109	GTACATCTGTCCTCCAGAGG	75	56
361152	1	1113	AGTGGTACATCTGTCCTCCA	62	57
361153	1	1117	TCATAGTGGTACATCTGTCC	52	58
361154	1	1121	CATGTCATAGTGGTACATCT	57	59
361155	1	1125	TATTCATGTCATAGTGGTAC	41	60
361156	1	1129	GCTGTATTCATGTCATAGTG	67	61
361157	1	1133	GGATGCTGTATTCATGTCAT	67	62
361158	1	1137	AAAGGGATGCTGTATTCATG	45	63
180288	1	1141	TGAGAAAGGGATGCTGTATT	62	64
180289	1	1181	TGGTGGAATGACATTAAAAA	54	65
361159	1	1185	GAATTGGTGAATGACATTA	24	66
361160	1	1324	GAGCTTACATCTGGTCTCAT	59	67
361161	1	1328	AGGAGAGCTTACATCTGGTC	65	68

10

20

30

40

【表 4】

5-10-5 の ISIS 番号	標的配列 番号	標的 部位	配列	% 阻害 w/5-10-5	配列 番号
361162	1	1332	ATGGAGGAGAGCTTACATCT	18	69
361163	1	1336	CTGGATGGAGGAGAGCTTAC	50	70
361164	1	1339	GAGCTGGATGGAGGAGAGCT	49	71
361165	1	1468	TGTCCTTCCACTGCTCTTTT	61	72
361166	1	1472	GTGCTGTCCTTCCACTGCTC	65	73
361167	1	1476	AATTGTGCTGTCCTTCCACT	62	74
361168	1	1480	AGGTAATTGTGCTGTCCTTC	52	75
361169	1	1543	CGGCATGCTGGGCAGTTTTT	78	76
361170	1	1547	ATAGCGGCATGCTGGGCAGT	58	77
361171	1	1549	CGATAGCGGCATGCTGGGCA	65	78
361172	1	1570	ATTCCAGCCTGAAGACATTT	24	79
361173	1	1574	GTTTCATTCCAGCCTGAAGAC	52	80
361174	1	1597	TTCTTTGTTTTTCGAGCTTC	62	81
361175	1	1601	TTTTTCTTTGTTTTTCGAG	48	82
180297	1	1680	CAGGAACCTATTGTTTTGTTA	33	83
361176	1	1682	TGCAGGAACCTATTGTTTTGT	46	84
361177	1	1765	GAGCTATCATATCCTGCATA	71	85
361178	1	1769	AACAGAGCTATCATATCCTG	51	86
361179	1	1773	CTGGAACAGAGCTATCATAT	67	87
361180	1	1840	TTCCTGCTGCAATCACTTG	52	88
361181	1	1844	CCATTTCACTGCTGCAATCA	55	89
361182	1	1848	TTGCCCATTTCCTGCTGCA	70	90
361183	1	1999	ATAATCAGATCAGGAGCAAA	36	91
361184	1	2003	ATTAATAATCAGATCAGGAG	10	92
361185	1	2007	GCTCATTAATAATCAGATCA	43	93
361186	1	2011	CTCTGCTCATTAATAATCAG	0	94
180302	1	2015	CATTCTCTGCTCATTAATAA	23	95
180304	1	2053	AGCATGTGTTTACATTGGTC	73	96
361187	1	2119	AAGGTTTTTCATACAGAGATA	38	97
361188	1	2123	CAGTAAGGTTTTTCATACAGA	22	98
361189	1	2127	GAAGCAGTAAGGTTTTTCATA	46	99
180307	1	2131	GAGAGAAGCAGTAAGGTTTT	32	100
361190	1	2212	GCTTTTCCTAGCTCTTTGAT	74	101
361191	1	2215	ATGGCTTTTCCTAGCTCTTT	68	102
361192	1	2347	ATGGTCTTATCCAAAAATGT	63	103
361193	1	2351	ACTCATGGTCTTATCCAAAA	66	104
361194	1	2355	CAATACTCATGGTCTTATCC	54	105
361195	1	2359	AATTCAATACTCATGGTCTT	69	106
361196	1	2383	ATGATTTTCAGCTAACATCTC	1	107
180311	1	2386	GTGATGATTTTCAGCTAACAT	59	108
361197	1	2407	GAATATTTTGGTATCTGATT	59	109
361198	1	2411	ATTTGAATATTTTGGTATCT	20	110
361199	1	2415	TTCCATTTGAATATTTTGGT	65	111
361200	1	2419	ATATTTCCATTTGAATATTT	51	112
361202	1	2425	TTTTTGATATTTCCATTTGA	20	113

【 0 1 1 3 】

G C C R 発現を最低 3 0 % 低下した、表 3 に示される 5 - 1 0 - 5 ギャップマーオリゴ

ヌクレオチドが好ましい。これらの好ましい配列が相補的である標的セグメントは、本明細書で「好ましい標的セグメント」と称され、そして従って本発明の化合物により標的とするのに好ましい。本発明の別の局面は、配列番号 26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112 若しくは 113 の 8 核酸塩基部分を含んでなる、G C C R を標的とするアンチセンス化合物であり、前記化合物は G C C R と特異的にハイブリダイズしかつその発現を低下する。一態様において、アンチセンス化合物は、その 5' および 3' 端で 5 個の 2' - O - (2 - メトキシエチル)ヌクレオチドで隣接された 10 デオキシヌクレオチド領域を特徴とする長さ 20 核酸塩基のアンチセンスオリゴヌクレオチドである。一態様において、ヌクレオシド間結合の全部がホスホロチオエート結合である。一態様において、シトシンの全部が 5 - メチルシトシンである。

10

【実施例 4】**【0114】**

ギャップ拡張オリゴヌクレオチドによるヒト G C C R 発現のアンチセンス阻害

本発明により、表 4 に記述される化合物と同一の配列を有するギャップ拡張オリゴヌクレオチドもまた試験した。表 4 の全化合物は、双方の側 (5' および 3') で 2 ヌクレオチドの「ウイング」により隣接されている 16 個の 2' - デオキシヌクレオチドよりなる中央の「ギャップ」領域から構成される長さ 20 ヌクレオチドのキメラオリゴヌクレオチド (「ギャップマー」) である。ウイングは 2' - M O E ヌクレオチドとしてもまた知られる 2' - O - (2 - メトキシエチル)ヌクレオチドから構成される。ヌクレオシド間 (バックボーン) 結合は該オリゴヌクレオチド全体でホスホロチオエートである。全部のシチジン残基は 5 - メチルシチジンである。該オリゴヌクレオチドの配列、および該化合物が結合する標的配列上の第一 (最も 5') の位置である標的部位を表 4 に示す。2 - 16 - 2 モチーフの化合物を、本明細書に記述されるところの定量的リアルタイム P C R により遺伝指標的 m R N A レベルに対するそれらの影響について分析した。

20

30

【0115】

データは、L I P O F E C T I N^{T M} を使用して、開示されるオリゴマー化合物 50 n M で H e p G 2 細胞を処理した 3 回の実験からの平均である。発現の減少は表 4 で阻害パーセントとして表す。存在する場合、「N . D .」は「測定されず」を示す。これらのオリゴマー化合物がそれに対し阻害性である標的領域は、本明細書で「有効標的セグメント」と称される。

【0116】

【表 5】

表 4

2-16-2 ギャップマーによるヒト GCCR mRNA レベルの阻害

2-16-2 の ISIS 番号	標的配列 番号	標的 配列	配列	% 阻害 w/ 2-16- 2	配列 番号
372350	1	394	TCTGTCTCTCCCATATACAG	69	26
372376	1	398	TGTTTCTGTCTCTCCCATAT	72	27
372331	1	402	CTTTTGTCTGTCTCTCTCCC	67	28
372341	1	406	ATCACTTTTGTCTGTCTCTC	63	29
352983	1	497	GTTTGCAATGCTTTCTTCCA	64	30
372365	1	501	TGAGGTTTGCAATGCTTTCT	69	31
372387	1	505	CTATTGAGGTTTGCAATGCT	70	32
372316	1	509	CGACCTATTGAGGTTTGCAA	73	33
372310	1	514	CTGGTCGACCTATTGAGGTT	70	34
372315	1	672	CTGTGGTATACAATTTCACA	35	35
372326	1	679	CTTTGGTCTGTGGTATACAA	54	36
372339	1	689	GTCAAAGGTGCTTTGGTCTG	81	37
372322	1	877	GGTTTAGTGTCCGGTAAAAT	78	38
372361	1	954	CTTTTTCTGTTTTCACTTGG	70	39
372308	1	1000	TTCTCTTGCTTAATTACCCC	84	40
372304	1	1004	CAGTTTCTCTTGCTTAATTA	66	41
352984	1	1007	GCCCAGTTTCTCTTGCTTAA	80	42
372372	1	1058	TTTATTACCAATTATATTTG	0	43
372327	1	1062	ACATTTTATTACCAATTATA	11	44
372311	1	1066	GCAGACATTTTATTACCAAT	65	45
372352	1	1070	AATGGCAGACATTTTATTAC	54	46
372337	1	1074	CAGAAATGGCAGACATTTTA	36	47
372323	1	1078	TGAACAGAAATGGCAGACAT	73	48
372347	1	1081	CCATGAACAGAAATGGCAGA	86	49
372383	1	1085	CACACCATGAACAGAAATGG	73	50
372348	1	1089	TACTCACACCATGAACAGAA	82	51
372363	1	1093	GAGGTACTCACACCATGAAC	47	52
372334	1	1097	TCCAGAGGTACTCACACCAT	82	53
372359	1	1101	GTCCTCCAGAGGTACTCACA	69	54
372344	1	1105	ATCTGTCCTCCAGAGGTACT	72	55
372307	1	1109	GTACATCTGTCCTCCAGAGG	74	56
372370	1	1113	AGTGGTACATCTGTCCTCCA	69	57
372374	1	1117	TCATAGTGGTACATCTGTCC	0	58
372355	1	1121	CATGTCATAGTGGTACATCT	65	59
372385	1	1125	TATTCATGTCATAGTGGTAC	18	60
372319	1	1129	GCTGTATTCATGTCATAGTG	23	61
372366	1	1133	GGATGCTGTATTCATGTCAT	37	62
372330	1	1137	AAAGGGATGCTGTATTCATG	80	63
372333	1	1141	TGAGAAAGGGATGCTGTATT	68	64
372358	1	1181	TGGTGGAATGACATTAAAAA	67	65
372381	1	1185	GAATTGGTGGAAATGACATTA	30	66
372377	1	1324	GAGCTTACATCTGGTCTCAT	45	67
372309	1	1328	AGGAGAGCTTACATCTGGTC	63	68

10

20

30

40

【表 6】

2-16-2 の ISIS 番号	標的配列 番号	標的 配列	配列	% 阻害 w/ 2-16- 2	配列 番号
372388	1	1332	ATGGAGGAGAGCTTACATCT	55	69
372321	1	1336	CTGGATGGAGGAGAGCTTAC	51	70
372312	1	1339	GAGCTGGATGGAGGAGAGCT	60	71
372324	1	1468	TGTCCTTCCACTGCTCTTTT	73	72
372332	1	1472	GTGCTGTCCTTCCACTGCTC	81	73
372335	1	1476	AATTGTGCTGTCCTTCCACT	42	74
372342	1	1480	AGGTAATTGTGCTGTCCTTC	100	75
372345	1	1543	CGGCATGCTGGGCAGTTTTT	82	76
372356	1	1547	ATAGCGGCATGCTGGGCAGT	73	77
372305	1	1549	CGATAGCGGCATGCTGGGCA	80	78
372367	1	1570	ATTCCAGCCTGAAGACATTT	78	79
372353	1	1574	GTTTCATTCCAGCCTGAAGAC	70	80
372364	1	1597	TTCTTTGTTTTTCGAGCTTC	47	81
372340	1	1601	TTTTTCTTTGTTTTTCGAG	100	82
372369	1	1680	CAGGAAGTATTGTTTTGTTA	56	83
372378	1	1682	TGCAGGAAGTATTGTTTTGT	41	84
372317	1	1765	GAGCTATCATATCCTGCATA	84	85
372351	1	1769	AACAGAGCTATCATATCCTG	69	86
372389	1	1773	CTGGAACAGAGCTATCATAT	76	87
372362	1	1840	TTCAGTCTGCAATCACTTG	64	88
372328	1	1844	CCATTTCACTGCTGCAATCA	81	89
372338	1	1848	TTGCCCATTTCAGTCTGCA	82	90
372349	1	1999	ATAATCAGATCAGGAGCAAA	10	91
372373	1	2003	ATTAATAATCAGATCAGGAG	30	92
372360	1	2007	GCTCATTAATAATCAGATCA	27	93
372384	1	2011	CTCTGCTCATTAATAATCAG	100	94
372380	1	2015	CATTCTCTGCTCATTAATAA	2	95
372320	1	2053	AGCATGTGTTTACATTGGTC	75	96
372371	1	2119	AAGGTTTTTCATACAGAGATA	37	97
372382	1	2123	CAGTAAGGTTTTTCATACAGA	44	98
372306	1	2127	GAAGCAGTAAGGTTTTTCATA	48	99
372343	1	2131	GAGAGAAGCAGTAAGGTTTT	46	100
372313	1	2212	GCTTTTCCTAGCTCTTTGAT	66	101
372325	1	2215	ATGGCTTTTCCTAGCTCTTT	69	102
372336	1	2347	ATGGTCTTATCCAAAAATGT	65	103
372318	1	2351	ACTCATGGTCTTATCCAAAA	70	104
372375	1	2355	CAATACTCATGGTCTTATCC	85	105
372346	1	2359	AATTCAATACTCATGGTCTT	47	106
372386	1	2383	ATGATTTTCAGCTAACATCTC	74	107
372354	1	2386	GTGATGATTTTCAGCTAACAT	66	108
372357	1	2407	GAATATTTTGGTATCTGATT	13	109
372368	1	2411	ATTTGAATATTTTGGTATCT	0	110
372379	1	2415	TTCCATTTGAATATTTTGGT	44	111
372390	1	2419	ATATTTCCATTTGAATATTT	0	112
372329	1	2425	TTTTTGATATTTCCATTTGA	0	113

【 0 1 1 8 】

G C C R 発現を最低 3 0 % 低下した、表 4 に示される 2 - 1 6 - 2 オリゴヌクレオチド

が好ましい。これらの好ましい配列が相補的である標的セグメントは、本明細書で「好ましい標的セグメント」と称され、そして従って本発明の化合物により標的とするのに好ましい。

【0119】

本発明の別の局面は、配列番号26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112若しくは113の8核酸塩基部分を含んでなる、GCCRを標的とするアンチセンス化合物であり、前記化合物はGCCRと特異的にハイブリダイズしかつその発現を低下する。一態様において、アンチセンス化合物は、その5'および3'端で2個の2'-O-(2-メトキシエチル)ヌクレオチドで隣接された16デオキシヌクレオチドの領域を特徴とする長さ20核酸塩基のアンチセンスオリゴヌクレオチドである。一態様において、ヌクレオチド間結合の全部がホスホロチオエート結合である。一態様において、シトシンの全部が5-メチルシトシンである。

10

【実施例5】

【0120】

GCCRを標的とする異種間(cross-species)オリゴヌクレオチド
 前の実施例に記述される数種のオリゴヌクレオチドは種を横断して相補的であり、そして従って種を横断してグルコシルコイド受容体の発現を低下することが期待される。こうした異種間オリゴヌクレオチドの配列、ならびに該オリゴヌクレオチドの5'-10'-5モチーフバージョンおよび2-16-2モチーフバージョンのISIS番号を表5に示す。該化合物が結合するヒト標的配列(NM_000176.1、配列番号1として本明細書に組み込まれる)上の第一(最も5')の位置である標的部位もまた各配列について示す。ヒト、カニクイザル、ラットおよびマウスGCCR mRNAに対する相補性を示す(「yes」は完全な相補性を意味し、そして「1mm」は完全な相補性からの1個の塩基対不適正を意味している)。

20

30

【0121】

【表 7】

表 5

GCCR を標的とする異種間オリゴヌクレオチド

5-10-5 ギャップ マーの ISIS #	2-16-2 ギャップ マーの ISIS #	配列 番号	配列	配列番 号 1 上 の位置	完全に相補的			
					ヒト	サル	ラット	マウス
361137	372316	33	cgacctattgaggtttgca a	509	yes	yes	yes	yes
180276	372326	36	ctttggtctgtgtatacaa	679	yes	1 mm	1 mm	yes
345198	372339	37	gtcaaaggtgcttggctc g	689	yes	yes	yes	yes
180304	372320	96	agcatgtgtttacattggc	2053	yes	yes	yes	yes
180275	372315	35	ctgtgtatacaatttcaca	672	yes	1 mm	1 mm	yes
361141	372311	45	gcagacattttattaccaat	1066	yes	yes	yes	1 mm
180281	352984	42	gccagtttctcttgcctaa	1007	yes	yes	yes	yes
361151	372307	56	gtacatctgtcctccagag g	1109	yes	yes	yes	yes
180274	372310	34	ctggtcgacctattgaggt t	514	yes	yes	yes	yes
361156	372319	61	gctgtattcatgtcatagtg	1129	yes	yes	yes	yes

10

20

【実施例 6】

【0122】

ヒトおよびラット GCCR mRNA レベルのアンチセンス阻害 - 5 - 10 - 5 ギャップマーでの用量応答試験

本発明のさらなる一態様において、11種のオリゴヌクレオチドを付加的な用量応答試験に選択した。初代ラット肝細胞を、5、10、25、50、100若しくは200 nM の ISIS 180274、ISIS 180275、ISIS 180276、ISIS 180281、ISIS 180304、ISIS 361137、ISIS 361141、ISIS 361151、ISIS 361156、ISIS 345198、ISIS 361137、若しくは陰性対照オリゴヌクレオチド ISIS 141923 (CCTTCCCTGAAGGTTCTCTCC、配列番号114として本明細書に組み込まれる)で処理し、そしてmRNAレベルを本明細書の他の実施例に記述されたとおり測定した。ISIS 141923は、2'-MOEウイングにより隣接された10デオキシヌクレオチドのギャップ、およびホスホロチオエートバックボーンを含んでなる5-10-5ギャップマーである。全部のシトシンは5-メチルシトシンである。それに対しデータを正規化した未処理細胞が対照としてはたらいた。

30

【0123】

これらの試験の結果を表6に示す。標的mRNAレベルは本明細書に記述されるところのリアルタイムPCRにより測定した。データは3回の実験からの平均であり、そして未処理対照に関する阻害パーセントとして表す。

40

【0124】

【表 8】

表 6

ラット初代肝細胞での GCCR 発現の用量依存性阻害

ISIS #	配列番号	% 阻害					
		オリゴヌクレオチドの用量 (nM)					
		5	10	25	50	100	200
180274	34	16	33	29	65	84	89
180275	35	0	13	56	84	84	90
180276	36	23	43	43	68	89	93
180281	42	0	20	33	75	86	87
180304	96	42	51	47	75	86	91
361137	33	40	30	48	81	83	89
361141	45	36	61	48	77	87	92
361151	56	10	28	42	77	90	94
361156	61	22	47	46	66	84	92
345198	37	0	35	53	81	77	85
361158	63	34	50	47	79	91	93
141923	114	0	10	18	43	0	12

10

20

【0125】

本発明のさらなる一態様において、同一オリゴヌクレオチドを、示される用量での GCCR mRNA 発現を低下するそれらの能力について、ヒト HepG2 細胞株で試験した。それに対しデータを正規化した未処理細胞が対照としてはたらいた。

【0126】

これらの試験の結果を表 7 に示す。標的 mRNA レベルは本明細書に記述されるところのリアルタイム PCR により測定した。データは 3 回の実験からの平均であり、そして未処理対照に関する阻害パーセントとして表す。

30

【0127】

【表 9】

表 7

HepG2 細胞での GCCR 発現の用量依存性阻害

ISIS #	配列番号	% 阻害					
		オリゴヌクレオチドの用量 (nM)					
		1	10	25	50	100	200
180274	34	0	31	54	66	77	83
180275	35	13	54	75	86	93	94
180276	36	26	77	87	92	94	98
180281	42	3	46	68	80	90	84
180304	96	0	64	90	90	92	91
361137	33	18	71	84	91	92	86
361141	45	1	49	81	85	73	78
361151	56	22	42	71	82	89	91
361156	61	7	75	75	79	80	82
345198	37	17	71	79	86	80	82
361158	63	11	35	78	80	82	77
141923	114	15	12	20	12	14	3

10

20

【0128】

表 6 および表 7 に示されるとおり、GCCR を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒトおよびラット双方の標的 mRNA レベルの低下で用量依存性の様式で有効である。

【実施例 7】

30

【0129】

ラット GCCR mRNA レベルのアンチセンス阻害 - 5 - 10 - 5 ギャップマーでの *in vivo* 用量応答試験

5 - 10 - 5 ギャップマーモチーフのオリゴヌクレオチドの 5 種 (ISIS 180281、ISIS 361137、ISIS 345198、ISIS 180304 および ISIS 361141) を、肝の GCCR mRNA レベルを低下させるそれらの能力についてラットで多様な用量で評価した。8 週齢の Sprague Dawley ラットを処置群に分割し、それらは 1 種の指定されるオリゴヌクレオチドの 50、25 もしくは 12.5 mg/kg の用量を注入を介して受領した。各処置群は 4 動物から構成され、そして週 2 回 3 週間投与した。生理的食塩水単独を注入した動物が対照群としてはたらい。動物は標準的血液パラメータ (ALT/AST、コレステロール、トリグリセリドおよびグルコース) について週 1 回評価した。動物を試験の終了時に殺し、そして肝組織を収集し、かつ本明細書に記述されるリアルタイム PCR 分析法を使用して標的の減少について分析した。結果を、示される用量の示されるオリゴヌクレオチドで処置後に測定した GCCR mRNA の減少パーセントとして、表 8 a および 8 b (別個の実験) に示す。

40

【0130】

【表 10】

表 8a

in vivo ラットスクリーニング- GCCR アンチセンスオリゴヌクレオチド

化合物	ラット肝の GCCR mRNA の減少% (生理的食塩水処置した対照に比較して)		
	50 mg/kg	25 mg/kg	12.5 mg/kg
ISIS 180281	68	65	48
ISIS 180304	52	34	0
ISIS 345198	63	58	52

10

【0131】

【表 11】

表 8b

in vivo ラットスクリーニング- GCCR アンチセンスオリゴヌクレオチド

化合物	ラット肝の GCCR mRNA の減少% (生理的食塩水処置した対照に比較して)		
	50 mg/kg	25 mg/kg	12.5 mg/kg
ISIS 180281	62	62	59
ISIS 361137	59	47	32
ISIS 361141	61	49	22

20

【0132】

表 8 a および 8 b のデータは、GCCR を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドが、in vivo での発現の低下で用量依存性の様式で有効であることを示す。ISIS 345198 (GTC A A A G G T G C T T T G G T C T G ; 配列番号 37) を、ギャップの至適化を焦点とする構造活性実験でのさらなる評価のため選んだ。この化合物は、マウス、ラット、ヒト、サル、ウサギおよびモルモットのグルココルチコイド受容体 RNA に完全に相補的である。

30

【実施例 8】

【0133】

in vivo での GCCR mRNA レベルのアンチセンス阻害 - ギャップ至適化試験
変動する大きさのデオキシヌクレオチドギャップおよび 2' - MOE ウイングをもつ連のオリゴマー化合物を、GCCR を標的とするよう設計した。試験したオリゴヌクレオチドのそれぞれは同一の核酸塩基配列 (GTC A A A G G T G C T T T G G T C T G、配列番号 37 として本明細書に組み込まれる) を有し、そして従って配列番号 1 の同一セグメント (核酸塩基 689 ないし 709) を標的とする。実施例 5 に示されるとおり、本オリゴヌクレオチドはラット GCCR にもまた完全に相補的である。

40

【0134】

該化合物を表 9 に示す。標準文字はデオキシヌクレオチドを示し、そして核酸塩基は太字で示し、下線を付けた文字は 2' - O - (2 - メトキシエチル) ヌクレオチドである。ヌクレオチド間結合は全体でホスホロチオエートであり、そして全部のシトシンは 5 - メチルシトシンである。該オリゴヌクレオチドを含んでなる化学的に別個の領域を示す各化合物の「モチーフ」を表 9 に示す。

【0135】

【表 1 2】

表 9

ラット GCCR を標的とするアンチセンス化合物

ISIS 番号	化学	配列番号	モチーフ
345198	GTCAAAGGTGCTTTGGTCTG	37	5-10-5 キャップマー
372339	GTCAAAGGTGCTTTGGTCTG	37	2-16-2 キャップマー
377130	GTCAAAGGTGCTTTGGTCTG	37	3-14-3 キャップマー
377131	GTCAAAGGTGCTTTGGTCTG	37	4-12-4 キャップマー

10

【0 1 3 6】

9 週齢の Sprague - Dawley 雄性ラットを、50、25、12.5 および 6.25 mg / kg の用量の表 9 に提示されるオリゴヌクレオチドで週 2 回 3 週間処置した。生理的食塩水単独を注入した動物が対照としてはたらいだ。各処置群は 4 動物から構成され、そして動物は血漿トランスアミナーゼ、脂質、グルコース濃度および体重増加について週 1 回モニターした。正常動物について期待されたとおり、グルコースの実質的变化は観察されなかった。基礎（処置の開始前）の血漿コレステロール（CHOL）およびトリグリセリド（TRIG）濃度ならびに第 3 週に測定した濃度を、各処置群の平均として表 10 に mg / dL で示す。

20

【0 1 3 7】

【表 1 3】

表 10

正常ラットの血漿脂質濃度に対する GCCR 標的としたオリゴヌクレオチドの影響

処置	基礎 TRIG (mg/dL)	第 3 週 TRIG (mg/dL)	基礎 CHOL (mg/dL)	第 3 週 CHOL (mg/dL)
生理的食塩水	78	70	77	62
345198, 50 mg/kg	50	23	66	35
345198, 25 mg/kg	99	34	69	39
345198, 12.5 mg/kg	71	52	64	42
345198, 6.25 mg/kg	139	99	78	58
372339, 50 mg/kg	93	29	75	54
372339, 25 mg/kg	86	33	70	40
372339, 12.5 mg/kg	104	71	69	49
372339, 6.25 mg/kg	103	102	71	56
377130, 50 mg/kg	91	21	65	41
377130, 25 mg/kg	82	32	75	41
377130, 12.5 mg/kg	84	68	72	47
377130, 6.25 mg/kg	76	67	70	52
377131, 50 mg/kg	96	28	85	48
377131, 25 mg/kg	83	25	75	42
377131, 12.5 mg/kg	64	49	79	44
377131, 6.25 mg/kg	119	110	75	60

10

20

【0 1 3 8】

表 10 に示されるとおり、GCCR を標的としたアンチセンスオリゴヌクレオチドでの処置は、コレステロールおよびトリグリセリド濃度の用量依存性の低下を引き起こした。従って、本発明の一態様は、動物にギャップ拡張オリゴヌクレオチドを投与することを含んでなる前記動物での血中脂質濃度の低下方法である。好ましい一態様において、ギャップ拡張オリゴヌクレオチドは配列番号 37 の配列を有する。他の好ましい態様において、ギャップ拡張オリゴヌクレオチドは I S I S 3 7 2 3 3 9、I S I S 3 7 7 1 3 0 若しくは I S I S 3 7 7 1 3 1 である。

30

【0 1 3 9】

試験の終了時に動物を殺し、臓器重量を測定し、そして標的の減少およびオリゴヌクレオチド濃度の測定のため組織を収集した。

【0 1 4 0】

白色脂肪組織を、本明細書に記述されるリアルタイム PCR 分析法を使用して、標的の減少について分析した。結果を、示される用量の示されるオリゴヌクレオチドでの処置後に測定した GCCR の mRNA の減少パーセントとして表 11 a、11 b および 11 c (別個の実験) に示す。各ギャップ拡張オリゴヌクレオチドで処置した動物からの組織を、比較のための 5 - 10 - 5 モチーフオリゴヌクレオチドで処置した動物からの組織と一緒に、標的の減少についてアッセイした。

40

【0 1 4 1】

【表 1 4】

表 12a

2-16-2 オリゴヌクレオチドでの白色脂肪組織の GCCR 濃度の in vivo 低下

処置群	% 阻害			
	オリゴヌクレオチドの用量 (mg/kg)			
	50	25	12.5	6.25
ISIS 345198	56	26	17	7
ISIS 372339	34	0	8	8

10

【0 1 4 2】

【表 1 5】

表 11b

3-14-3 オリゴヌクレオチドでの白色脂肪組織の GCCR 濃度の in vivo 低下

処置群	% 阻害			
	オリゴヌクレオチドの用量 (mg/kg)			
	50	25	12.5	6.25
ISIS 345198	59	49	27	22
ISIS 377130	54	37	21	18

20

【0 1 4 3】

【表 1 6】

表 11c

4-12-4 オリゴヌクレオチドでの白色脂肪組織の GCCR 濃度の in vivo 低下

処置群	% 阻害			
	オリゴヌクレオチドの用量 (mg/kg)			
	50	25	12.5	6.25
ISIS 345198	56	23	21	7
ISIS 377131	55	23	15	0

30

【0 1 4 4】

肝組織もまた、本明細書に記述されるリアルタイムPCR分析法を使用して、標的の減少について分析した。結果を、示される用量の示されるオリゴヌクレオチドでの処置後に測定したGCCRのmRNAの減少パーセントとして表12a、12bおよび12c（別個の実験）に示す。各ギャップ拡張オリゴヌクレオチドで処置した動物からの組織を、比較のための5 - 10 - 5モチーフオリゴヌクレオチドで処置した動物からの組織と一緒に、標的の減少についてアッセイした。

40

【0 1 4 5】

【表 17】

表 12a

2-16-2 オリゴヌクレオチドでの肝の GCCR 濃度の in vivo 低下

処置群	% 阻害			
	オリゴヌクレオチドの用量 (mg/kg)			
	50	25	12.5	6.25
ISIS 345198	78	77	65	51
ISIS 372339	83	77	56	44

10

【0146】

【表 18】

表 12b

3-14-3 オリゴヌクレオチドでの肝の GCCR 濃度の in vivo 低下

処置群	% 阻害			
	オリゴヌクレオチドの用量 (mg/kg)			
	50	25	12.5	6.25
ISIS 345198	78	80	67	54
ISIS 377130	87	78	68	43

20

【0147】

【表 19】

表 12c

4-12-4 オリゴヌクレオチドでの肝の GCCR 濃度の in vivo 低下

処置群	% 阻害			
	オリゴヌクレオチドの用量 (mg/kg)			
	50	25	12.5	6.25
ISIS 345198	76	75	58	49
ISIS 377131	82	64	60	61

30

【0148】

表 11a、11b および 11c に示されるとおり、試験したギャップ拡張オリゴヌクレオチドの全部が、in vivo での GCCR 濃度の低下で用量依存性の様式で有効であった。加えて、ギャップ拡張オリゴヌクレオチドは、肝で 5 - 10 - 5 ギャップマーより大きい効力への傾向を示す。

40

【0149】

加えて、薬物動態に対するギャップの大きさを変えることの影響を決定するため、腎および肝のオリゴヌクレオチド濃度を測定した。組織中のオリゴヌクレオチド濃度の測定方法は当該技術分野で既知である (Gearry ら、Anal Biochem、1999、274、241 - 248)。全オリゴヌクレオチドは組織中で検出される全オリゴヌクレオチド代謝物の総和である。示される濃度の示されるオリゴヌクレオチドで処置した動物の肝の全濃度および完全長オリゴヌクレオチドの濃度 ($\mu\text{g/g}$ で) を表 12 に示す。

【0150】

【表 2 0】

表 12

ラット肝での GCCR オリゴヌクレオチド濃度

処置	モチーフ	用量	肝全オリゴ	肝完全長
ISIS 345198	5-10-5	25 mg/kg	507	408
		12.5 mg/kg	318	224
ISIS 372339	2-16-2	25 mg/kg	450	306
		12.5 mg/kg	311	183
ISIS 377130	3-14-3	25 mg/kg	575	315
		12.5 mg/kg	350	212
ISIS 377131	4-12-4	25 mg/kg	584	424
		12.5 mg/kg	354	265

10

20

【0151】

表 12 に示されるとおり、肝の完全長オリゴヌクレオチドの濃度は、ISIS 372339 および ISIS 377130 について、ISIS 345198 と比較して比較可能であるか若しくは低下される。表 11 に示されるところの標的の減少と結合して、これらのデータは、ギャップ拡張化合物の高められた効力が肝での該化合物の高められた蓄積によらないことを示す。従って、本発明の好ましいオリゴヌクレオチドは、標的組織での該化合物の高められた蓄積を伴わずに、対応する 5 - 10 - 5 ギャップマーまでの標的の減少に関する高められた若しくは比較可能な効力を示すギャップ拡張オリゴヌクレオチドを包含する。いくつかの態様において、標的組織は脂肪であり、そしていくつかの態様において、標的組織は肝である。

30

【配列表】

[2009508527000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US2006/036527												
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/11 A61K31/7088 A61P3/00 C07H21/00 ADD. A61K38/00														
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC														
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N A61K														
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched														
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, Sequence Search, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE, WPI Data														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 03/099215 A2 (PHARMACIA CORP [US]; CROSBY SETH D [US]; NALSETH AMY E [US]) 4 December 2003 (2003-12-04) paragraphs [0001], [0029], [0036], [0046], [0189] page 61 - page 62 example 14 table 1 claim 8</td> <td>1-75</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2005/164271 A1 (BHANOT SANJAY [US] ET AL) 28 July 2005 (2005-07-28) paragraphs [0002], [0010], [0086], [0095], [0099], [0170] - [0181], [0246] - [0256] examples 12,13,26 claim 14</td> <td>1-75</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: center;">-/-</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	WO 03/099215 A2 (PHARMACIA CORP [US]; CROSBY SETH D [US]; NALSETH AMY E [US]) 4 December 2003 (2003-12-04) paragraphs [0001], [0029], [0036], [0046], [0189] page 61 - page 62 example 14 table 1 claim 8	1-75	Y	US 2005/164271 A1 (BHANOT SANJAY [US] ET AL) 28 July 2005 (2005-07-28) paragraphs [0002], [0010], [0086], [0095], [0099], [0170] - [0181], [0246] - [0256] examples 12,13,26 claim 14	1-75	-/-		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
X	WO 03/099215 A2 (PHARMACIA CORP [US]; CROSBY SETH D [US]; NALSETH AMY E [US]) 4 December 2003 (2003-12-04) paragraphs [0001], [0029], [0036], [0046], [0189] page 61 - page 62 example 14 table 1 claim 8	1-75												
Y	US 2005/164271 A1 (BHANOT SANJAY [US] ET AL) 28 July 2005 (2005-07-28) paragraphs [0002], [0010], [0086], [0095], [0099], [0170] - [0181], [0246] - [0256] examples 12,13,26 claim 14	1-75												
-/-														
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.														
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family														
Date of the actual completion of the international search 18 December 2006		Date of mailing of the international search report 10/01/2007												
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Surdej, Patrick												

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/036527

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2005/042030 A (AEGERA THERAPEUTICS INC [CA]; LACASSE ERIC [CA]; MCMANUS DANIEL [CA];) 12 May 2005 (2005-05-12) page 2 page 4, last paragraph - page 5, paragraph 1 claims 17-24	1-75
Y	WO 03/070888 A2 (RIBOZYME PHARMACEUTICALS INCOP [US]; MCSWIGGEN JAMES [US]; BEIGELMAN L) 28 August 2003 (2003-08-28) page 6 page 33 figure 10	1-75
Y	WO 03/070887 A2 (SIRNA THERPEUTICS INC [US]; MCSWIGGEN JAMES [US]; BEIGELMAN LEONID [US]) 28 August 2003 (2003-08-28) pages 6,26,32 figure 10	1-75

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/036527

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 55-75 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 8.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2006/036527

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 03099215	A2	04-12-2003	AU	2003233634 A1	12-12-2003
			EP	1534728 A2	01-06-2005
			JP	2005525829 T	02-09-2005
US 2005164271	A1	28-07-2005	US	2006025373 A1	02-02-2006
WO 2005042030	A	12-05-2005	AU	2004284855 A1	12-05-2005
			BR	PI0415779 A	26-12-2006
			CA	2542884 A1	12-05-2005
			EP	1691842 A1	23-08-2006
WO 03070888	A2	28-08-2003	AU	2003213057 A1	09-09-2003
			EP	1465910 A2	13-10-2004
WO 03070887	A2	28-08-2003	AU	2003213054 A1	09-09-2003
			EP	1472265 A2	03-11-2004

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード (参考)
A 6 1 P 3/04 (2006.01)	A 6 1 P	3/04	
A 6 1 P 3/06 (2006.01)	A 6 1 P	3/06	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P	3/00	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 マツケイ , ロバート

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 0 6 4 ボウエイ・ゴールデンアイレーン 1 2 4 6 7

(72) 発明者 フ라이어 , スーザン・エム

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 1 2 2 サンディエゴ・ルノールトストリート 2 9 4 6

(72) 発明者 バノト , サンジャイ

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 0 0 9 カールスバド・パセオアラヤン 8 0 9 4

(72) 発明者 ワツツ , リネッタ

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 0 0 9 カールスバド・カレメジャー 7 7 7 8

F ターム (参考) 4B024 AA01 CA01 DA02 EA04 GA11 HA17

4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA44

4C084 AA13 MA01 NA14 ZA702 ZA752 ZC212 ZC332 ZC352 ZC412

4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA70 ZA75

ZC21 ZC33 ZC35 ZC41