

(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2006-518197

(P2006-518197A)

(43) 公表日 平成18年8月10日(2006.8.10)

(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 O 2 4
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 4
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 C O 8 6
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 3	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 86 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2006-501525 (P2006-501525)	(71) 出願人	504013269
(86) (22) 出願日	平成16年2月10日 (2004.2.10)		サントリス・ファルマ・アクティーゼルス
(85) 翻訳文提出日	平成17年9月7日 (2005.9.7)		カブ
(86) 国際出願番号	PCT/DK2004/000097		SANTARIS PHARMA A/S
(87) 国際公開番号	W02004/069992		デンマーク、デーコー-2970ヘルスホ
(87) 国際公開日	平成16年8月19日 (2004.8.19)		ルム、ページ・アレー3番
(31) 優先権主張番号	PA200300184	(74) 代理人	100068526
(32) 優先日	平成15年2月10日 (2003.2.10)		弁理士 田村 恭生
(33) 優先権主張国	デンマーク (DK)	(74) 代理人	100098925
(31) 優先権主張番号	PA200301539		弁理士 上田 敏夫
(32) 優先日	平成15年10月20日 (2003.10.20)	(74) 代理人	100126778
(33) 優先権主張国	デンマーク (DK)		弁理士 品川 永敏

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ラス発現の改変のためのオリゴマー化合物

(57) 【要約】

本発明は、H aーラスの発現を改変するためのH aーラス遺伝子に対するオリゴヌクレオチドを提供する。本発明の組成物は、H aーラスをコードする核酸を標的とするオリゴヌクレオチド、特にアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。H aーラス発現の改変のため、およびH aーラスの過剰発現もしくは突然変異H aーラスの発現のいずれかまたはその両方に関係する疾患の処置のための、これら化合物の使用方法を提供する。疾患としては例えば、肺癌、乳癌、大腸癌、前立腺癌、膵臓癌、肺癌、肝臓癌、甲状腺癌、腎臓癌、脳癌、精巣癌、胃癌、腸管癌、腸癌、脊髄癌、洞癌、膀胱癌、尿路癌、または卵巣癌である。該オリゴヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオシドもしくは核酸アナログ（例えば、ロックト核酸）またはその組み合わせから構成され得る。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

総計 8 ～ 50 のヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログを含む化合物であって、

少なくとも 8 個のヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログのサブ配列を含み、ここで、該サブ配列は、配列番号：2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、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 および 75 からなる群から選ばれる配列内にある、該化合物。

10

【請求項 2】

H aーラス、K iーラスまたはNーラスから選ばれるラスの発現を改変する、請求項 1 記載の化合物。

【請求項 3】

H aーラスをコードする核酸分子を標的とする総計 8 ～ 50 個のヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログを含む化合物であって、

H aーラスをコードする核酸と特異的にハイブリダイズし、H aーラスの発現を抑制し、そして少なくとも 8 個のヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログのサブ配列を含み、ここで、該サブ配列は、配列番号：2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、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 および 75 からなる群から選ばれる配列内にある、該化合物。

20

【請求項 4】

アンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 つに記載の化合物。

30

【請求項 5】

少なくとも 1 つのヌクレオチドアナログを含む、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 つに記載の化合物。

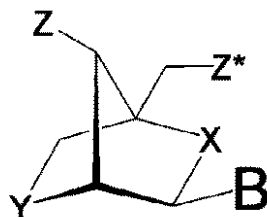
【請求項 6】

少なくとも 1 個のロケット核酸 (LNA) 単位を含む、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 つに記載の化合物。

【請求項 7】

ロケット核酸 (LNA) は、一般式：

【化 1】



40

[式中、

X および Y は独立して、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-N(H)-$ 、 $N(R)-$ 、 $-CH_2-$ 、または $-CH-$ (二重結合の部分の場合)、 $-CH_2-O-$ 、 $-CH_2-S-$ 、 $-CH_2-N(H)-$ 、 $-CH_2-N(R)-$ 、 $-CH_2-CH_2-$ 、または $-CH_2-CH-$ (二重結合

50

の部分の場合)、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ の群から選ばれて、ここで、Rは水素または $\text{C}_1 \sim 4$ -アルキルから選ばれ；

Zおよび Z^* は独立して、存在しないか、またはヌクレオシド間連結、末端基もしくは保護基から選ばれ；

Bは、天然または非天然の核酸塩基を構成し；そして、

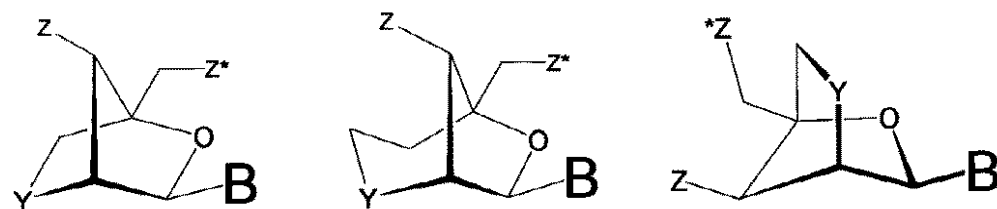
不斉基はいずれかの配向で存在し得る]

で示される構造式を有する、請求項6記載の化合物。

【請求項8】

少なくとも1個のヌクレオチドは、式：

【化2】



10

[式中、

Yは、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{NH}-$ または $\text{N}(\text{R}^{\text{H}})$ であり；

Zおよび Z^* は独立して、存在しないか、またはヌクレオシド間連結、末端基もしくは保護基から選ばれ；そして、

20

Bは、天然または非天然の核酸塩基を構成する]

のいずれかに記載のロックト核酸(LNA)を含む、請求項6記載の化合物。

【請求項9】

ヌクレオシド間連結は、 $-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{P}(\text{O},\text{S})-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{P}(\text{S})_2-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-\text{P}(\text{O},\text{S})-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-\text{P}(\text{S})_2-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{S}-$ 、 $-\text{O}-\text{P}(\text{O},\text{S})-\text{S}-$ 、 $-\text{S}-\text{P}(\text{O})_2-\text{S}-$ 、 $-\text{O}-\text{PO}(\text{R}^{\text{H}})-\text{O}-$ 、 $\text{O}-\text{PO}(\text{OCH}_3)-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{PO}(\text{NR}^{\text{H}})-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{PO}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{S}-\text{R})-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{PO}(\text{BH}_3)-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{PO}(\text{NHR}^{\text{H}})-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{NR}^{\text{H}}-$ 、 $-\text{NR}^{\text{H}}-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-$ 、 $-\text{NRH}-\text{CO}-\text{O}-$ からなる群から選ばれ得て、ここで、 R^{H} は水素または $\text{C}_1 \sim 4$ -アルキルから選ばれる、請求項6または7のいずれかに記載の化合物。

30

【請求項10】

核酸塩基は、5-メチルシトシン、イソシトシン、シュードイソシトシン、5-ブロモウラシル、5-プロピニルウラシル、6-アミノプリン、2-アミノプリン、イノシン、ジアミノプリン、2-クロロ-6-アミノプリンからなる群から選ばれる修飾核酸塩基である、請求項5、6または7のいずれか1つに記載の化合物。

【請求項11】

LNAは、D- β またはL- α のいずれかまたはそれらの組み合わせの立体配置であるオキシ-LNA、チオ-LNA、アミノ-LNAである、請求項6～8のいずれか1つに記載の化合物。

40

【請求項12】

総計8～50個のヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログを含む化合物であって、少なくとも8個のヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログのサブ配列を含み、該サブ配列は配列番号：2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15および75からなる群から選ばれる配列内にある、該化合物。

【請求項13】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、図1に提示するいずれかのデザインに記載するデザインである、請求項1～12のいずれか1つに記載の化合物。

【請求項14】

50

アンチセンスオリゴヌクレオチドはギャップマーである、請求項 1 2 記載の化合物。

【請求項 1 5】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0 または 2 1 個のヌクレオチドを含む、請求項 1 ～ 1 4 のいずれか 1 つに記載の化合物。

【請求項 1 6】

2、3、4、5、6、7、8、9、1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0 または 2 1 個の L N A 単位を含む、請求項 1 ～ 1 5 のいずれか 1 つに記載の化合物。

【請求項 1 7】

サブ配列は配列番号：2 a である、請求項 1 ～ 1 6 のいずれか 1 つに記載の化合物。

10

【請求項 1 8】

サブ配列は配列番号：3 a である、請求項 1 ～ 1 6 のいずれか 1 つに記載の化合物。

【請求項 1 9】

サブ配列は配列番号：4 a である、請求項 1 ～ 1 6 のいずれか 1 つに記載の化合物。

【請求項 2 0】

サブ配列は配列番号：5 a である、請求項 1 ～ 1 6 のいずれか 1 つに記載の化合物。

【請求項 2 1】

サブ配列は配列番号：6 a である、請求項 1 ～ 1 6 のいずれか 1 つに記載の化合物。

【請求項 2 2】

サブ配列は配列番号：7 a である、請求項 1 ～ 1 6 のいずれか 1 つに記載の化合物。

20

【請求項 2 3】

サブ配列は配列番号：8 a である、請求項 1 ～ 1 6 のいずれか 1 つに記載の化合物。

【請求項 2 4】

サブ配列は配列番号：9 a である、請求項 1 ～ 1 6 のいずれか 1 つに記載の化合物。

【請求項 2 5】

サブ配列は配列番号：1 0 a である、請求項 1 ～ 1 6 のいずれか 1 つに記載の化合物。

【請求項 2 6】

サブ配列は配列番号：1 1 a である、請求項 1 ～ 1 6 のいずれか 1 つに記載の化合物。

【請求項 2 7】

サブ配列は配列番号：1 2 a である、請求項 1 ～ 1 6 のいずれか 1 つに記載の化合物。

30

【請求項 2 8】

サブ配列は配列番号：1 3 a である、請求項 1 ～ 1 6 のいずれか 1 つに記載の化合物。

【請求項 2 9】

サブ配列は配列番号：1 4 a である、請求項 1 ～ 1 6 のいずれか 1 つに記載の化合物。

【請求項 3 0】

サブ配列は配列番号：1 5 a である、請求項 1 ～ 1 6 のいずれか 1 つに記載の化合物。

【請求項 3 1】

3' 末端 L N A を対応する天然ヌクレオシドによって置き代える、請求項 5 7 ～ 7 2 のいずれか 1 つに記載の化合物。

【請求項 3 2】

配列番号：2 a を含む、化合物。

40

【請求項 3 3】

配列番号：3 a を含む、化合物。

【請求項 3 4】

配列番号：4 a を含む、化合物。

【請求項 3 5】

配列番号：5 a を含む、化合物。

【請求項 3 6】

配列番号：6 a を含む、化合物。

【請求項 3 7】

50

配列番号：7 aを含む、化合物。

【請求項38】

配列番号：8 aを含む、化合物。

【請求項39】

配列番号：9 aを含む、化合物。

【請求項40】

配列番号：10 aを含む、化合物。

【請求項41】

配列番号：11 aを含む、化合物。

【請求項42】

配列番号：12 aを含む、化合物。

【請求項43】

配列番号：13 aを含む、化合物。

【請求項44】

配列番号：14 aを含む、化合物。

【請求項45】

配列番号：15 aを含む、化合物。

【請求項46】

原文なし。

【請求項47】

原文なし。

【請求項48】

原文なし。

【請求項49】

原文なし。

【請求項50】

3'末端LNAを対応するヌクレオチドによって置き代える、請求項34～45のいずれか1つ記載の化合物。

【請求項51】

請求項1～50のいずれか1つに記載の化合物を含有し、そして、少なくとも1つの非ヌクレオチドまたは非ポリヌクレオチド分子は該化合物と共有結合する、接合体。

【請求項52】

請求項1～51のいずれか1つに記載の化合物または請求項59記載の接合体、および医薬的に許容し得る希釈物、担体またはアジュバントを含有する、医薬組成物。

【請求項53】

更に、少なくとも1つの化学療法薬を含む、請求項51記載の医薬組成物。

【請求項54】

化学療法用化合物は、副腎皮質ステロイド（例えば、プレドニゾン、デキサメタゾンまたはデカドロン）；アルトレタミン（ヘキサレン、ヘキサメチルメラミン（HMM））；アミフォスチン（エチロール）；アミノグルテチミド（シタドレン）；アムサクリン（M-A M S A）；アナストロゾール（アリミデックス）；アンドロゲン（例えば、テストステロン）；アスパラギナーゼ（エルスパル）；バシラスカルメッテグリン；ピカルタミド（カソデックス）；ブレオマイシン（ブレオキサン）；ブスルファン（ミレラン）；カルボプラチン（パラプラチン）；カルムスチン（BCNU、BiCNU）；クロラムブシル（ルー克蘭）；クロロデオキシアデノシン（2-CDA、クラドリビン、ロイスタチン）；シスプラチン（プラチノール）；シトシンアラビノシド（シタラビン）；ダカルバジン（DTIC）；ダクチノマイシン（アクチノマイシン-D、コスメゲン）；ダウノルビシン（セルビジン）；ドセタキセル（タキソテール）；ドキソルビシン（アドリアマイシン）；エピルビシン；エストラムスチン（emcyt）；エストロゲン（例えば、ジエチルstilbestrol（DES））；エトポシド（VP-16、ベプシド、エトホホス

10

20

30

40

50

）；フルダラビン（フルダラ）；フルタミド（ユーレクシン）；5-FUDR（フロキシウリジン）；5-フルオロウラシル（5-FU）；ゲムシタピン（ジェムザール）；ゴセレリン（ゾダレックス）；ハーセプチン（トラスツズマブ）；ヒドロキシ尿素（ハイドレア）；イダルビシン（イダマイシン）；イホスファミド；IL-2（プロリュウキン、アルデスリュウキン）；インターフェロンアルファ（イントロンA、ロフェロンA）；イリノテカン（カンプトスター）；ロイプロリド（ループロン）；レバミソール（エルガミソール）；ロムスチン（CCNU）；メクロラタミン（ムスタルゲン、ナイトロジェンマスタード）；メルファラン（アルケラン）；メルカプトプリン（ピュリネソール、6-MP）；メトトレキセート（メキセート）；マイトマイシン-C（ムタムシン）；ミトキサントロン（ノバントロン）；オクトレオチド（サンドスタチン）；ペントスタチン（2-デオキシコホルマイシン、ニペント）；プリカマイシン（ミトラマイシン、ミタラシン）；プロロカルバジン（マツラン）；ストレプトゾシン；タモキシフェン（ノルバデックス）；タキソール（パクリタキセル）；テニポシド（ブモン、VM-26）；チオテパ；トポテカン（ハイカムチン）；トレチノイン（ベサノイド、オールトランスレチノイン酸）；ビンブラスチン（バルバン）；ビンクリスチン（オンコビン）；および、ビノレルビン（ナベルビン）からなる群から選ばれる、請求項52記載の医薬組成物。

10

【請求項55】

更に医薬的に許容し得る担体を含む、請求項1～50のいずれか1つに記載の化合物を含有する医薬組成物。

【請求項56】

医薬的に許容し得る塩で使用する、請求項1～50のいずれか1つに記載の化合物を含有する医薬組成物。

20

【請求項57】

プロドラッグを構成する、請求項1～50のいずれか1つに記載の化合物を含有する医薬組成物。

【請求項58】

更に、抗炎症化合物および／または抗ウイルス化合物を含む、請求項1～50のいずれか1つに記載の化合物を含有する医薬組成物。

【請求項59】

癌の処置のための医薬の製造における、請求項1～50のいずれか1つに記載の化合物または請求項51に記載の接合体の使用。

30

【請求項60】

癌は固形癌の形態である、請求項59記載の使用。

【請求項61】

癌は癌腫である、請求項59または60のいずれかに記載の使用。

【請求項62】

癌腫は、悪性黒色腫、基底細胞腫、卵巣癌、乳癌、非小細胞肺癌、腎細胞癌、膀胱癌、再発性表在性膀胱癌、胃癌、前立腺癌、膵臓癌、肺癌、子宮頸癌、子宮頸部異形成、喉頭乳頭腫症、大腸癌、結腸大腸癌、およびカルチノイド腫瘍からなる群から選ばれる、請求項61記載の使用。

40

【請求項63】

癌腫は、悪性黒色腫、非小細胞肺癌、乳癌、大腸癌、および腎細胞癌からなる群から選ばれる、請求項62記載の使用。

【請求項64】

悪性黒色腫は、表在拡大型メラノーマ、結節型メラノーマ、悪性黒子型メラノーマ、末端性メラノーマ、メラニン欠乏性黒色腫、および線維形成性黒色腫からなる群から選ばれる、請求項63記載の使用。

【請求項65】

癌は肉腫である、請求項60または61のいずれかに記載の使用。

【請求項66】

50

肉腫は、骨肉腫、ユーイング肉腫、軟骨肉腫、悪性線維性組織球腫、線維肉腫、およびカポジ肉腫からなる群から選ばれる、請求項 65 記載の使用。

【請求項 67】

癌は神経膠腫である、請求項 60 または 61 のいずれか記載の使用。

【請求項 68】

癌の処置方法であって、請求項 1～50 のいずれか 1 つ記載の化合物、請求項 51 記載の接合体、または請求項 52～58 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物を該処置が必要な患者に投与することを含む、該方法。

【請求項 69】

癌は固形腫瘍の形態である、請求項 68 記載の方法。

10

【請求項 70】

癌は癌腫である、請求項 68 または 69 のいずれかに記載の方法。

【請求項 71】

癌腫は、悪性黒色腫、基底細胞腫、卵巣癌、乳癌、非細胞肺癌、腎細胞癌、膀胱癌、再発性表在性膀胱癌、胃癌、前立腺癌、膵臓癌、肺癌、子宮頸癌、子宮頸部異形成、喉頭乳頭腫症、大腸癌、結腸大腸癌、およびカルチノイド腫瘍からなる群から選ばれる、請求項 70 記載の方法。

【請求項 72】

癌腫は、悪性黒色腫、非小細胞肺癌、乳癌、大腸癌、および腎細胞癌からなる群から選ばれる、請求項 71 記載の方法。

20

【請求項 73】

悪性黒色腫は、表在拡大型メラノーマ、結節型メラノーマ、悪性黒子型メラノーマ、末端性メラノーマ、メラニン欠乏性黒色腫、および線維形成性黒色腫からなる群から選ばれる、請求項 124 記載の方法。

【請求項 74】

癌は肉腫である、請求項 68 記載の方法。

【請求項 75】

肉腫は、骨肉腫、ユーイング肉腫、軟骨肉腫、悪性線維性組織球腫、線維肉腫、アテローム硬化症、乾癬、糖尿病性網膜症、関節リウマチ、喘息、いぼ、アレルギー性皮膚炎、およびカポジ肉腫からなる群から選ばれる、請求項 74 記載の方法。

30

【請求項 76】

癌は神経膠腫である、請求項 68 記載の方法。

【請求項 77】

細胞または組織中の H aーラスの発現を抑制するための方法であって、該細胞または組織を請求項 1～50 のいずれか 1 つに記載の化合物と接触させて、H aーラスの発現を抑制することを含む、該方法。

【請求項 78】

遺伝子発現を改変することによる、癌疾患に関与する遺伝子の発現を改変するための方法であって、該遺伝子または該遺伝子由来の R N A をオリゴマー化合物と接触させることを含み、ここで、該化合物は配列番号：2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、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 または 75 の少なくとも 8 個の核酸塩基部分を含有する配列を有する、該方法。

40

【請求項 79】

化合物は 1 個以上の L N A 単位を含む、請求項 77 記載の方法。

【請求項 80】

化合物を該遺伝子のメッセンジャー R N A と一緒にハイブリダイズしてその発現を抑制

50

する、請求項 77 または 78 のいずれか記載の方法。

【請求項 81】

癌疾患を患っているかまたは患い易い哺乳動物を処置するための方法であって、該哺乳動物に 1 個以上の LNA 単位を含む H aーラスを標的とするオリゴヌクレオチドの治療学的に有効な量を投与することを含む、該方法。

【請求項 82】

癌疾患は、肺、乳、大腸、前立腺、膵臓、肺、肝臓、甲状腺、腎臓、脳、精巣、胃、腸管、腸、脊髄、洞、膀胱、尿路、または卵巣の癌である、請求項 77～80 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 83】

赤血球の増殖、細胞増殖、鉄代謝、グルコースおよびエネルギー代謝、pH 改変、またはマトリックス代謝を改変するための方法であって、細胞を請求項 1～50 のいずれか 1 つに記載のアンチセンス化合物と接触させて、該細胞を改変することを含む、該方法。

【請求項 84】

細胞の増殖を抑制するための方法であって、インビトロで細胞を請求項 1～50 のいずれか 1 つに記載のアンチセンス化合物の有効な量と接触させて、該細胞の増殖を抑制することを含む、該方法。

【請求項 85】

細胞は癌細胞である、請求項 83 記載の方法。

【請求項 86】

ヒトの細胞または組織中での H aーラスの発現を抑制するための方法であって、ヒトの細胞または組織を請求項 1～50 のいずれか 1 つに記載の化合物と接触させて、H aーラスの発現を抑制することを含む、該方法。

【請求項 87】

H aーラスに関係する疾患または病気を有する動物を処置するための方法であって、H aーラスに関係する疾患または病気を有する動物に治療学的にまたは予防学的に有効な量の請求項 1 記載のアンチセンス化合物を投与して、その結果 H aーラスの発現を抑制することを含む、該方法。

【請求項 88】

疾患または病気は過剰増殖性疾患である、請求項 86 記載の方法。

【請求項 89】

過剰増殖性疾患は癌である、請求項 87 記載の方法。

【請求項 90】

アポトーシスの減少を特徴とする疾患または病気を有するヒトを処置するための方法であって、アポトーシスの減少を特徴とする疾患または病気を有するヒトに、予防学的にまたは治療学的に有効な量の請求項 1～50 のいずれか 1 つに記載のアンチセンス化合物を投与することを含む、該方法。

【請求項 91】

細胞中のアポトーシスを改変するための方法であって、細胞を請求項 1～50 のいずれか 1 つに記載のアンチセンス化合物と接触させて、アポトーシスを改変することを含む、該方法。

【請求項 92】

細胞中の細胞質分裂を改変するための方法であって、細胞を請求項 1～50 のいずれか 1 つに記載のアンチセンス化合物と接触させて、細胞質分裂を改変することを含む、該方法。

【請求項 93】

細胞中の細胞周期を改変するための方法であって、細胞を請求項 1～50 のいずれか 1 つに記載のアンチセンス化合物と接触させて、細胞周期を改変することを含む、該方法。

【請求項 94】

細胞の増殖を抑制するための方法であって、細胞を請求項 1～50 のいずれか 1 つに記

10

20

30

40

50

載のアンチセンス化合物の有効な量と接触させて、細胞の増殖を抑制することを含む、該方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は、プロトオンコジーンのスラファミリー（H aーラス、K iーラスおよびNーラスが好ましく、H aーラスが最も好ましい）の発現を改変するための組成物、および方法を提供する。特に、本発明は、スラをコードする核酸と特異的にハイブリダイズ可能なオリゴマー化合物（該オリゴマー化合物は、オリゴヌクレオチドが好ましい）に関する。該オリゴヌクレオチド化合物はスラの発現を改変することが分かり、そしてその医薬製剤および癌疾患の処置としてのそれらの使用を開示する。

【0002】

(背景技術)

スラプロトオンコジーンは、グアニンヌクレオチドと高いアフィニティーで結合する血漿膜関連Gータンパク質群をコードし、そしていくつかの別個のシグナル伝達カスケード（このものは、細胞生存の改変、増殖、および細胞外刺激（例えば、成長因子およびホルモン）に対する応答における分化に参与する）を活性化することが知られる、いくつかの下流効果タンパク質(effector protein)（例えば、r a fー1、P I 3ーKなどを含む）を活性化する。ハーバー(Harvey)ーラス（H aーラス）、キルステン(Kirsten)ーラス（K iーラス）4 aおよび4 b、並びに神経芽細胞腫ーラス（Nーラス）から構成される哺乳動物プロトオンコジーンの「古典的な」p 2 1スラファミリーは、小さいG T P a s eの速く広がるスラスーパーファミリーの最もよく知られる要素である。いくつかのインビトロ（および、インビボ）研究は、プロトオンコジーンのスラファミリーが悪性形質転換の誘発に参与することを実証している（例えば、Chinらによる(1999), Nature 400, 468-472を参照）。その結果として、該スラp 2 1スラファミリーは、抗癌薬の開発における重要な標的として見なされており、そして該スラタンパク質は全てのヒト癌の約25%において過剰発現するかまたは突然変異するかのいずれかである（このことにより、本質的に活性なスラタンパク質を与えることが多い）。興味深いことに、ほとんどの癌タイプにおけるスラ遺伝子の突然変異は、該スラ遺伝子のほんの1つに限定され、そして腫瘍タイプおよび組織に依存することが多い。H aーラスオンコジーン活性化突然変異は、コドン12、13および61で同定されている。該H aーラス遺伝子における突然変異は主に甲状腺、腎臓、尿路および膀胱の癌に限定されるが、一方でH aーラスの過剰発現は、主に乳癌および大腸癌において検出される。癌発生におけるスラ関与の証拠のために、スラの妨害は薬物開発のための大きな焦点である。スラの成熟および膜の局在化を抑制することまたはスラタンパク質の発現を抑制することのいずれかに、努力が集中している。

【0003】

タンパク質レベルでのスライソ型の特異的な抑制はアミノ酸配列相同性のために困難であることが分かっているので、m R N Aレベルでのスライソ型の特異的な標的化によるタンパク質発現の抑制を、リボザイム、アンチセンスコードベクター、およびアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて試みた。

【0004】

H aーラスを標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて処置した異種移植マウスモデルにおいて腫瘍増殖抑制を示すいくつかの研究が、公開されている。Grayらによる(1993), Cancer Research 53, 577-580は、H aーラスm R N Aの5' U T R中のイントロンを標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて予め処置したオンコジーンH aーラス形質転換N I Hー3 T 3細胞の腫瘍増殖の抑制を示した。同様なモデルを用いて、Wickstromらによる(1997), Oligonucleotide as Therapeutic Agents, Wiley, London, 124-141は、H aーラスコドン12の突然変異を標的とするアンチセンスO D Nの皮下注射によって処置されるオンコジーンH aーラス形質転換N I Hー3 T 3細胞の腫瘍

増殖の80%抑制を示した。

【0005】

Schwabらによる(1994), Proceedings of the National Academy of Science 91, 10640-10644は、ナノ粒子と結合したホスホロチオエートオリゴヌクレオチドがインビトロおよびインビボでオンコジーンH aーラス形質転換セルラインに及ぼす影響を研究した。H aーラスコドン12の突然変異を標的とする、粒子結合ーアンチセンスオリゴヌクレオチドは、腫瘍内注射によって投与する場合に、逆配列コントロールオリゴヌクレオチドと比較して、腫瘍増殖において5倍の低下を示した。

【0006】

Isis Pharmaceutical社によって開発されたH aーラス (ISIS 2503) のAUG開始コドン10
を標的とするアンチセンスホスホロチオエートオリゴは、インビトロでの強力なH aーラス下方改変およびインビボでのヒト腫瘍異種移植片における増殖抑制を示した。このアンチセンスオリゴは、ノーザンブロットによってアッセイされたラスmRNAの最も強力なインヒビターとして選択され、そしてそのものはIC50 = 45 nMを有することが分かった (Bennettらによる(1996), Antisense Therapeutics, Humana Press, Totowa, New Jersey, 13-47)。

【0007】

興味深いことに、マウスモデルにおけるISIS 2503H aーラスアンチセンスオリゴの抗腫瘍効果は、H aーラス突然変異異種移植片に限定されるわけではなく、これはまた、K iーラス突然変異異種移植片中での腫瘍増殖抑制を示した (Cowserによる(1997), Anti-
Cancer Drug Design 12, 359-371)。

【0008】

アフィニティーおよびヌクレアーゼ耐性の増大を与える第2世代の化合物を用いるISIS 2503の改変は、アンチセンス効果を有意に改善することを示した。2'-メトキシエチル (MOE) のISIS 2503中への導入は、効力 (IC50 = 14.7 nM) およびインビトロでのアンチセンス効果の持続期間を増大した (Cowserによる(1997), Anti-Cancer Drug Design 12, 359-371)。ISIS 2503は、単独でまたは様々な進行性癌に対する化学療法薬と組み合わせて、現在フェーズ I / II 臨床試験にある。

【0009】

Casey-Cunninghamらによる(2001), Cancer 92, 1265-1271は、進行性癌腫におけるISIS 2503のフェーズ I 研究において、該化合物が十分に耐性であるが、23患者の誰も完全なまたは部分的な応答のいずれも示さなかったことを報告した。しかしながら、4患者は2ヶ月以上安定な疾患を有した。

【0010】

典型的に20~25の間の塩基対の上記のホスホロチオエートおよびMOEアンチセンス化合物は、いくつかの特許出願 (W09222651、W09408003、W09428720、W09849349、W09902732、W099227723) 中に記載されている。しかしながら、全ての開示化合物は、H aーラス上における2個の部位、すなわちコドン12突然変異またはAUG開始コドン (これらは、標的全体の非常に小さい部分を構成するのみである) を標的とする。該コドン12突然変異はまた、W098500540に開示されるアンチセンス配列によって標的とされ、このものは異なるホスホロチオエート含有量を用いて試験されている。

【0011】

US6117848は、ホスホロチオエート化学またはO'-2-メチルをベースとするいくつかのK iーラスアンチセンスオリゴヌクレオチドを開示し、そしてUS5872242は、いくつかのNーラスホスホロチオエートオリゴヌクレオチドを開示している。

【0012】

US5874416は、5'-UTR領域の部分を標的とする1本の26merアンチセンスオリゴヌクレオチド (ここで、CGジヌクレオチドにおける全てのシトシン塩基は5-メチルシトシンである) を開示する。

【0013】

現在の臨床的な治験におけるオリゴヌクレオチドのほとんどは、1988年からのホスホロチオエート化学に基づいており、このものは、開発された第1の有用なアンチセンス化学であった。しかしながら、近年において明らかになってくるにつれて、この化学は、その臨床的な使用を制限する重大な欠点を有する。これらは、それらの標的mRNAに対する低いアフィニティーを含み、このことは効力に負の影響を及ぼし、その結果、いかに小さい活性オリゴヌクレオチドが製造を複雑にし、そして処置費用を増大させるかの点で制限を与える。また、低いアフィニティーは、標的mRNAに対する乏しい到達性に翻訳され、その結果、活性化化合物の同定を複雑とする。最後に、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドは、それらの治療学的なウィンドウを狭める広範囲の副作用を被る。

【0014】

10

これらの問題および他の問題を扱うために、改善された性質を有する新規なアナログを創製するのに多くの努力が払われている。以下の反応式1に示す通り、これらとしては例えば、完全に人口的なアナログ（例えばPNAおよびモルホリノ）、およびより便利なDNAアナログ（例えば、ボラノホスフェート(boranosphosphates)、N3'-P5'ホスホラミデートおよびいくつかの2'-修飾アナログ（例えば、2'-F、2'-OMe、2'-O-メトキシエチル(MOE)、および2'-O-(3-アミノプロピル)(AP)）を含む。より最近には、ヘキシトール核酸分子(HNA)、2'-F-アラビノ核酸分子(2'-F-ANA)、およびD-シクロヘキセニルヌクレオシド(CeNA)が紹介されている。

【0015】

20

これらのアナログの多数は、相補的な核酸分子との結合の改善、生物学的安定性の改善を示し、あるいはそれらは細胞酵素、RNAseH（これは、多数のアンチセンス化合物の作用様式に関与する）を補充する能力を保つ。しかしながら、それらのどれも、これらの利点の全てを合わせてはおらず、そして多くの場合に、該性質の1つの改善は、1個以上の他の性質を損なう。また、多くの場合において、いくつかの該アナログの商業的な価値を大きく制限する新規な合併症が述べられている。これらは例えば、低い溶解度、複雑なオリゴマー化の化学、非常に低い細胞の取り込み、他の化学との不適合性などを含む。例えば、該MOE化学は、いくつかの制限を有する。そのものは、中位のアフィニティーだけを有し、これは、いくつかのMOEがオリゴ中ヘエン・ブロック(en block)挿入する場合にだけ顕在化する。MOEは2'-修飾のファミリーに属し、そして該アンチセンス活性はインビトロでのRNA結合アフィニティーと直接的に相関する、この化合物群はよく知られる。c-r a fを標的とするMOE 20bpギャップマー(5MOE/PO-10PS-5MOE/PO)は、T24細胞中で約20nmのIC₅₀を有することが報告されており、そしてPKC-aを標的とするMOEギャップマーがA549細胞中で25nmのIC₅₀を有することが報告されている。比較のために、アンチセンス実験において使用されるホスホロチオエート化合物は典型的に、IC₅₀を150nmの範囲で示す(Stein, Kreigによる, Applied Antisense Oligonucleotide Technology, Wiley-Liss, 1988, 頁87-90)。

30

【0016】

本発明の実際的な目的は、H aーラスmRNAに対する新規なオリゴマー化合物を提供することである。本発明の化合物は、IC₅₀の低下（従って、活性の増大）を示し、その結果、H aーラスの発現が原因または関連物質として関与する様々な癌疾患の有効な処置を促進することを見出した。以下で説明する通り、この目的は、LNA（ロックト核酸）と呼ばれる非常に高いアフィニティーの利用によって最もよく達成される。

40

【0017】

本発明は、オリゴマー化合物（特に、LNAアンチセンスオリゴヌクレオチド）に関するものであって、このものは、H aーラスをコードする核酸を標的とし、そして該H aーラスの発現を改変する。この改変は、H aーラスmRNAの特に非常に強力な下方改変、並びにアポトーシス反応の誘発である。該LNA含有オリゴマー化合物は、8-merと同程度に低く、そして16-merと同程度に確かに非常に活性であり、このものはH a

50

ーラスを標的とする報告されているアンチセンス化合物よりもかなり短い。これらの16-merオリゴマー化合物は、ナノモル範囲以下のIC₅₀を有する。本発明により、薬理的な活性に必要なアフィニティーを損なうことなく、アンチセンスオリゴマーの通常の長さ(20~25merから、例えば8~16merに)のかかなりの短縮が可能となる。オリゴの内因性の特異性はその長さに逆に相関するので、該短縮はそのRNA標的に対するアンチセンス化合物の特異性を優位に増大させるであろう。更に、より短いオリゴマー化合物はより長いオリゴマー化合物よりもより高い生物学的安定性および細胞透過性を有すると見積もられる。少なくともこれらの理由で、本発明は当該分野に対するかなりの貢献である。

【0018】

10

(発明の概要)

本発明は、オリゴマー化合物、特にLNAアンチセンスオリゴヌクレオチドに関するものであって、このものは、プロトオンコジーンのラスファミリー(Haーラス、KiーラスおよびNーラスが好ましく、Haーラスが最も好ましい)をコードする核酸分子を標的とし、そして該ラスの発現を改変する。本発明のオリゴマー化合物を含有する医薬組成物および他の組成物をも提供する。

【0019】

本発明の中心的な態様は、8~50個のヌクレオシドを含む化合物を提供することであり、ここで、該化合物は少なくとも8個のヌクレオシドの配列を含み、該配列は表1および4中に例示するものから選ばれる配列中にある。

20

【0020】

更に、細胞または組織中でのラスの発現を改変するための方法を提供し、該方法は該細胞または組織を1個以上の本発明のオリゴマー化合物または組成物と接触させることを含む。治療学的にまたは予防学的に有効な量の1個以上の本発明のオリゴマー化合物または組成物を投与することによって、ラスの発現に関係する疾患または病気を患っているかまたは患い易い動物またはヒトを処置する方法をも開示する。更に、ラスの発現を抑制するためのおよびラス活性に関係する疾患を処置するためのオリゴマー化合物の使用方法を提供する。該疾患としては例えば、異なるタイプの癌、例えば肺、乳、大腸、前立腺、膵臓、肺、肝臓、甲状腺、腎臓、脳、精巣、胃、腸管、腸、脊髄、洞、膀胱、尿路、または卵巣の癌を挙げられる。

30

【0021】

(発明の記載)

本発明は、プロトオンコジーンのラスファミリー(Haーラス、KiーラスおよびNーラスが好ましく、Haーラスが最も好ましい)をコードする核酸分子の機能を改変するのに使用するための、オリゴマー化合物(特に、アンチセンスオリゴヌクレオチド)を使用する。該改変は結局、産生するラスの量の変化である。1実施態様において、これは、Haーラスをコードする核酸分子と特異的にハイブリダイズするアンチセンス化合物を供することによって達成される。該改変は、Haーラスの発現の抑制であることが好ましく、これにより産生する多数の機能性タンパク質の減少を生じる。

【0022】

40

本発明の第1の態様は、総計8~50個のヌクレオチドおよび/またはヌクレオチドアナログを含む化合物に関し、ここで、該化合物は、少なくとも8個のヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログのサブ配列を含み、該サブ配列は、配列番号: 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、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または75からなる群から選ばれる配列内にある。

【0023】

50

本明細書中の用語「ヌクレオシド」とはその通常の意味で使用し、すなわち、そのものは、2-デオキシリボース単位またはリボース単位を含み、これは、窒素性塩基：アデニン（A）、シトシン（C）、チミン（T）、ウラシル（U）またはグアニン（G）の1つとその番号1の炭素原子によって結合する。

【0024】

同様に、用語「ヌクレオチド」とは2-デオキシリボース単位またはRNA単位を意味し、これは、窒素性塩基：アデニン（A）、シトシン（C）、チミン（T）またはグアニン（U）、ウラシル（U）とその番号1の炭素原子によって結合し、そしてヌクレオシド間のホスフェート基または末端基とその番号5の炭素原子によって結合する。

【0025】

本明細書中で使用する用語「ヌクレオチドアナログ」とは非天然ヌクレオチドを意味し、ここでは、リボース単位が2-デオキシリボースもしくはRNAとは異なるか、および／または該窒素性塩基がA、C、TおよびGとは異なるか、および／または該ヌクレオチド間ホスフェート連結基が異なるかのいずれかである。ヌクレオチドアナログの具体例は、例えばFreier & Altmannによる, Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443およびUhlmannによる, Curr. Opinion in Drug Development, 2000, 3(2), 293-213によって記載されている。

【0026】

用語「対応するヌクレオチドアナログ」および「対応するヌクレオチド」は、ヌクレオチドアナログ中の核酸塩基およびヌクレオチドが同一であると示すことを意図する。例えば、ヌクレオチドの2-デオキシリボース単位がアデニンと連結する場合には、「対応するヌクレオチドアナログ」は、アデニンと連結したペントース単位（2-デオキシリボースとは異なる）を含む。

【0027】

用語「核酸」とは、2個以上のヌクレオチドの共有結合によって生成する分子と定義する。用語「核酸」および「ポリヌクレオチド」は、本明細書中で相互交換可能に使用する。

【0028】

用語「核酸アナログ」とは、非天然核酸と結合する化合物を意味する。

【0029】

ヌクレオチドアナログおよび核酸アナログは、例えばFreier & Altmannらによる, Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443、およびUhlmannらによる, Curr. Opinion in Drug & Development 2000, 3(2): 293-213中に記載されている。反応式1は、核酸を製造するのに適当なヌクレオチドアナログの選択例を例示する。

【0030】

用語「LNA」とは、1個の二環式のヌクレオチドアナログを含有するヌクレオチドを意味し、このものはまた、LNAモノマーまたは1個以上の二環式のヌクレオチドアナログを含有するオリゴヌクレオチドをも意味する。LNAモノマーは、WO 9914226、およびその後の出願、WO 0056746、WO 0056748、WO 0066604、WO 00125248、WO 0228875、WO 2002094250およびPCT/DK02/00488中に記載されている。チミジンLNAモノマーの1具体例は、(1S, 3R, 4R, 7S)-7-ヒドロキシー-1-ヒドロキシメチル-5-メチル-3-(チミン-1-イル)-2,5-ジオキサ-ビシクロ[2:2:1]ヘプタンである。

【0031】

本明細書中、用語「オリゴヌクレオチド」とは、オリゴマー（これはまた、オリゴと呼ばれる）、核酸ポリマー（例えば、リボ核酸（RNA）またはデオキシリボ核酸（DNA））もしくは当該分野において知られる核酸アナログ（ロクト核酸（LNA）が好ましい）、またはそれらの混合物を意味する、本用語は、天然核酸塩基、糖類、およびヌクレオチド間（骨格）連結を含むオリゴヌクレオチド、並びに非天然部分（これは、同様に機能したりまたは特定の改善された機能を有する）を有するオリゴヌクレオチドを含む。完全または部分的な修飾または置換されたオリゴヌクレオチドは、それらオリゴヌクレオチ

10

20

30

40

50

ドのいくつかの望ましい性質（例えば、細胞膜を透過する能力、細胞外および細胞間のヌクレアーゼに対する良好な耐性、該核酸標的に対する高いアフィニティーおよび特異性）のために、天然の形態よりも好ましいことが多い。上記の性質を示す該 L N A アナログが、特に好ましい。

【0032】

用語「単位」とは、モノマーであると理解する。

【0033】

用語「少なくとも1つ」とは、1以上の整数を含み、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17などが挙げられる。

【0034】

用語「チオール L N A」とは、反応式 2 中の X および Y の少なくとも1つが S または $-CH_2-S$ から選ばれる、ロックトヌクレオチドを含む。チオール L N A は、ベーター D およびアルファ L の両方の立体配置であり得る。

10

【0035】

用語「アミノ L N A」は、反応式 2 中の X または Y の少なくとも1つが $-N(H)-$ 、 $N(R)-$ 、 $-CH_2-N(H)-$ 、 $-CH_2-N(R)-$ であって、該 R は水素または C_{1-4} アルキルから選ばれる、ロックトヌクレオチドを含む。アミノ L N A は、ベーター D およびアルファ L の両方の立体配置であり得る。

【0036】

用語「オキシ L N A」は、反応式 2 中の X または Y の少なくとも1つが $-O-$ または $-CH_2-O-$ である、ロックトヌクレオチドを含む。オキシ L N A は、ベーター D およびアルファ L の両方の立体配置であり得る。

20

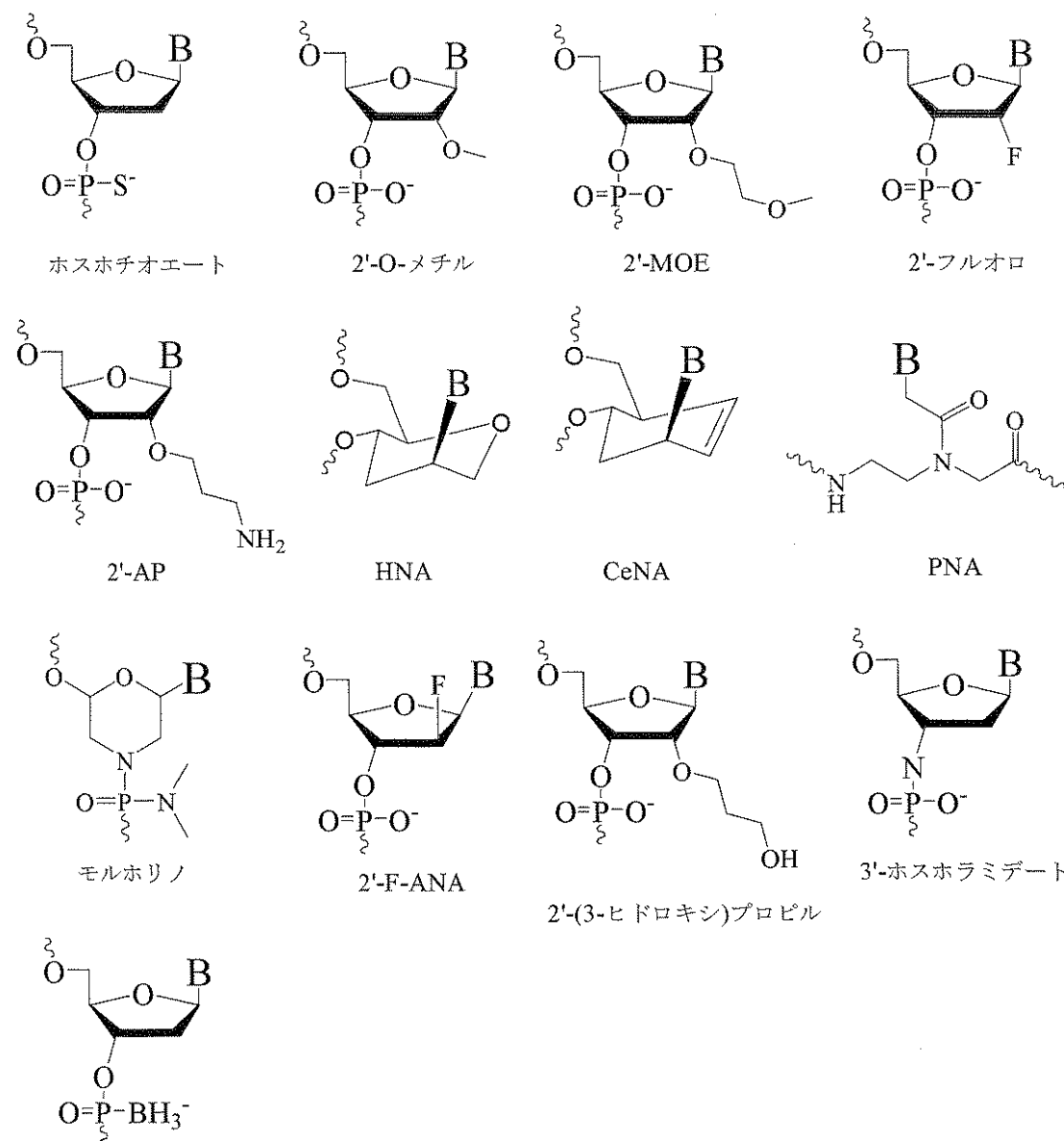
【0037】

用語「エナ(ena) L N A」は、反応式 2 中の Y が $-CH_2-O-$ である、ロックトヌクレオチドを含む。

【0038】

用語「アルファ L L N A」は、反応式 3（右の構造式）中に示す通りであるロックトヌクレオチドを含む。

【化 1】



反応式 1

【0039】

用語「LNA誘導体」は、反応式 2 中の全てのロックトヌクレオチド、並びにベーター D-メチレン LNA（例えば、チオール LNA、アミノ LNA、アルファー L-オキシ LNA、およびエナー LNA）を含む。

【0040】

用語「連結基」とは、2 個のヌクレオシド、2 個のヌクレオシドアナログ、ヌクレオシドおよびヌクレオシドアナログなどと共有的にカップリングすることができる基を意味すると意図する。具体的で且つ好ましい例としては、ホスフェート基およびホスホロチオエート基を含む。

【0041】

本明細書中、用語「接合体」とは、本明細書中に記載する化合物（すなわち、ヌクレシドまたはヌクレオシドアナログの配列を含有する化合物）と 1 個以上の非ヌクレオチドまたは非ポリヌクレオチド分子との共有結合によって生成する、外来分子を意味すると意図する。非ヌクレオチドまたは非ポリヌクレオチド分子としては例えば、マクロ分子薬物（例えば、タンパク質、脂肪酸鎖、糖類残基、糖タンパク質、ポリマー、またはそれらの組み合わせ）を含む。典型的なタンパク質は、標的タンパク質に対する抗体であり得る。典

10

20

30

40

50

型的なポリマーは、ポリエチレン(polyethelene)グリコールであり得る。

【0042】

用語「癌腫」とは、上皮起源の悪性腫瘍を示すと意図する。上皮組織は、身体の内側および外側の体表の身体表面を覆いまたは沿う。上皮組織とは例えば、身体腔および内部臓器（腸管、膀胱、子宮など）に沿う皮膚、粘膜および漿膜である。上皮組織はまた、腺（例えば、粘液分泌の腺）からより深い組織層にまでも拡張し得る。

【0043】

用語「肉腫」とは、結合組織（例えば、軟骨、脂肪、筋肉、腱および骨）から増殖する悪性腫瘍を意味すると意図する。

【0044】

本明細書中で使用する用語「神経膠腫」とは、膠細胞起源の悪性腫瘍を包含することを意図する。

【0045】

ヌクレオシド、ヌクレオシドアナログ、配列番号などについて使用する用語「a」とは、1個以上を意味すると意図する。特に、「---からなる群から選ばれる成分（例えば、ヌクレオシド、ヌクレオシドアナログ、配列番号など）」は、該引用成分の1個以上が選ばれることを意味すると意図する。従って、表現「A、BおよびCからなる群から選ばれる成分」とは、A、BおよびCの全ての組み合わせ（すなわち、A、B、C、A+B、A+C、B+C、およびA+B+C）を含むと意図する。

【0046】

本明細書中、用語「C₁~₄アルキル」とは、鎖が1~4個の炭素原子を有する直鎖または分枝の飽和炭化水素鎖を意味すると意図し、例えばメチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、およびtert-ブチルを挙げられる。

【0047】

本明細書中、用語「標的核酸」とは、サバイビン、例えばDNAから転写されるRNA（例えば、プレ-mRNAおよびmRNAを含む）をコードするDNA、および該RNA由来のcDNAを包含する。

【0048】

本明細書中、用語「遺伝子」とは、エキソン、イントロン、非コード5'および3'領域、調節要素、並びに全ての現在知られるその変異型およびいずれかの更なる変異型（このものは、解明され得る）を含む遺伝子を意味する。

【0049】

本明細書中、用語「オリゴマー化合物」とは、例えば標的遺伝子「キメラプラスト」および「TFO」；標的遺伝子「アンチセンスインヒビター」、「siRNA」、「リボザイム」および「オリゴザイム(oligozymes)」のRNA転写物；または、標的遺伝子「アプタマー」、「スピゲルマー(spiegelmer)」もしくは「デコイ(decoy)」によってコードされるタンパク質のいずれかとの水素結合による結合によって、ヒトにおいて所望する治療学的な効果を誘発することができるオリゴヌクレオチドを意味する。

【0050】

本明細書中の用語「mRNA」とは、標的遺伝子の現在知られるmRNA転写物、およびいずれか更なる転写物（このものは、解明され得る）を意味する。

【0051】

本明細書中の用語「改変」とは、遺伝子の発現の増大（刺激）または減少（抑制）のいずれかを意味する。本発明において、抑制は遺伝子発現の改変の好ましい形態であり、そしてmRNAは好ましい標的である。

【0052】

本明細書中の用語、アンチセンス化合物をある標的核酸に「標的（指向化）する」とは、該アンチセンスオリゴヌクレオチドを、該アンチセンス化合物がその意図する標的と結合しそして機能を改変することができるような様式で、細胞、動物またはヒトに供するこ

10

20

30

40

50

とを意味する。

【0053】

本明細書中の「ハイブリダイゼーション」とは、相補ヌクレオシドまたはヌクレオチド塩基の間の、ワトソン-クリック、ホルステイン(Holstein)であり得る水素結合、逆転ホルステイン水素結合などであり得る水素結合を意味する。ワトソンおよびクリックは、約50年前に、デオキシリボ核酸(DNA)が二本鎖中の反対の相補的な核酸塩基の間で形成する水素結合によってヘリカル立体配置に共に保持された二本鎖から構成されることを示した。DNA中に通常見られる4個の核酸塩基は、グアニン(G)、アデニン(A)、チミン(T)およびシトシン(C)であり、その内、G核酸塩基はCと対形成し、そしてA核酸塩基はTと対形成する。RNAの場合は、該核酸塩基チミンは、核酸塩基ウラシル(U)によって置き換えられ、このものはT核酸塩基と同様にAと対形成する。標準二本鎖形成に参与する核酸塩基中の化学的な基は、ワトソン-クリック面(face)を構成する。フーグステン(Hoogsteen)は数年後に、ワトソン-クリック面に加えて、プリン核酸塩基(GおよびA)がフーグステン面(これは、二本鎖の外側から認識し、そして水素結合によってピリミジンオリゴヌクレオチドと結合するのに使用して、その結果、三重ヘリックス構造を形成することができる)を有することを示した。

【0054】

本明細書中の「相補的」とは、2個のヌクレオチドまたはヌクレオシド配列間で相互に正確な対形成する能力を意味する。例えば、オリゴヌクレオチドのある位置でのヌクレオチドがDNAまたはRNA分子の対応する位置でヌクレオチドと水素結合することができる場合には、該オリゴヌクレオチドおよび該DNAまたはRNAは、該位置で互いに相補的であると考えられる。該オリゴヌクレオチド中の十分な数のヌクレオチドが標的DNAまたはRNA中の対応ヌクレオチドと水素結合を形成することができて、安定な複合体を形成することができる場合には、該DNAまたはRNAおよび該オリゴヌクレオチドは互いに相補的であると考えられる。インビトロまたはインビボで安定であるためには、アンチセンス化合物の配列はその標的核酸分子に対して100%相補的である必要はない。従って、用語「相補的」および「特異的にハイブリダイズ可能」とは、アンチセンス化合物が該標的分子と十分に強く且つ特異的に結合して、該標的の通常の機能との所望する干渉を与える一方で、非標的mRNAの機能に影響を及ぼさないことを意味する。

【0055】

本発明のアンチセンス化合物および他のオリゴマー化合物(このものは、該標的の発現を改変する)は、実験または該標的における配列情報に基づく合理的なデザイン、および所望する標的に対するオリゴマー化合物を設計するのに最もよい方法に関するノウハウによって同定する。これらの化合物の配列は、本発明の好ましい実施態様である。同様に、これらの好ましいオリゴマー化合物が相補的である該標的中の配列モチーフ(これは、「ホットスポット」と呼ばれる)は標的指向のための好ましい部位である。

【0056】

好ましいオリゴマー化合物は、少なくとも8個の核酸塩基部分を含み、該サブ配列は、配列番号: 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、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、76、77または79から選ばれ、そしてそれらの配列を表1、3および4中に提示する。本発明に記載するオリゴマー化合物は、標的の強力な改変物質である。例えば、標的のインビトロ抑制は、リアルタイムPCRによって測定される表1に示す。図2は、ノーザンブロット法によって測定される本発明に記載するオリゴマー化合物のインビトロ効力および特異性を示す。オリゴマー化合物の非常に低いIC₅₀を、表2に示す(これまでに報告されたIC₅₀との比較、「背景技術」の項目を参照)。本発明の化合物はまた、アポトーシスを誘発する(図6)。オリゴマー化合物の

インビボでの特異性および効力を、図 3 に示す。更に、従来の長鎖アンチセンス化合物と比較した短鎖オリゴマー化合物のインビボ優位性を、図 4 に示す。図 9 は、本発明の 2 個の化合物のインビボ効力を示す。全ての上記の実験的な観察は、本発明の化合物が医薬組成物中の活性化合物を構成し得ることを示す。

【0057】

1 実施態様において、該核酸塩基部分は、少なくとも 9、少なくとも 10、少なくとも 11、少なくとも 12、少なくとも 13、少なくとも 14 または少なくとも 15 から選ばれる。

【0058】

本発明の化合物は、表 1、3、4 および 5 中に示す。

10

【0059】

本発明の好ましいオリゴマー化合物は、配列番号：2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、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 および 75 である。

【0060】

本発明の別の実施態様において、該ヌクレオシドはホスホロチオエート基によって互いに連結する。本発明の関心ある実施態様は、配列番号：2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、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 および 75 の化合物に関し、ここで、各化合物内の各連結基はホスホロチオエート基である。該改変は、下付き S によって示す。言い換えれば、本発明の 1 態様は、配列番号：2_A、3_A、4_A、5_A、6_A、7_A、8_A、9_A、10_A、11_A、12_A、13_A、14_A、15_A、16_A、17_A、18_A、19_A、20_A、21_A、22_A、23_A、24_A、25_A、26_A、27_A、28_A、29_A、30_A、31_A、32_A、33_A、34_A、35_A、36_A、37_A、38_A、39_A、40_A、41_A、42_A、43_A、44_A、45_A、46_A、47_A、48_A、49_A、50_A、51_A、52_A、53_A、54_A、55_A、56_A、57_A、58_A、59_A、60_A、61_A、62_A、63_A、64_A、65_A、66_A、67_A、68_A、69_A、70_A、71_A、72_A、73_A、74_A および 75_A の化合物に関する。

20

30

【0061】

本発明の更なる態様は、配列番号：2_B、3_B、4_B、5_B、6_B、7_B、8_B、9_B、10_B、11_B、12_B、13_B、14_B、15_B、16_B、17_B、18_B、19_B、20_B、21_B、22_B、23_B、24_B、25_B、26_B、27_B、28_B、29_B、30_B、31_B、32_B、33_B、34_B、35_B、36_B、37_B、38_B、39_B、40_B、41_B、42_B、43_B、44_B、45_B、46_B、47_B、48_B、49_B、50_B、51_B、52_B、53_B、54_B、55_B、56_B、57_B、58_B、59_B、60_B、61_B、62_B、63_B、64_B、65_B、66_B、67_B、68_B、69_B、70_B、71_B、72_B、73_B、74_B および 75_B の化合物に関する。

40

【0062】

本発明の更なる態様は、配列番号：2_C、3_C、4_C、5_C、6_C、7_C、8_C、9_C、10_C、11_C、12_C、13_C、14_C、15_C、16_C、17_C、18_C、19_C、20_C、21_C、22_C、23_C、24_C、25_C、26_C、27_C、28_C、29_C、30_C、31_C、32_C、33_C、34_C、35_C、36_C、37_C、38_C、39_C

50

、40_C、41_C、42_C、43_C、44_C、45_C、46_C、47_C、48_C、49_C、50_C、51_C、52_C、53_C、54_C、55_C、56_C、57_C、58_C、59_C、60_C、61_C、62_C、63_C、64_C、65_C、66_C、67_C、68_C、69_C、70_C、71_C、72_C、73_C、74_C および 75_C の化合物に関する。

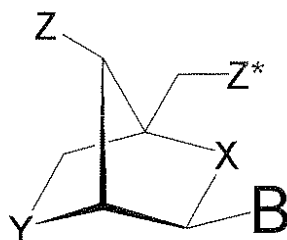
【0063】

本発明の1実施態様において、該オリゴマー化合物は、少なくとも1個の化学的な意味のLNA（ロケット核酸分子）を含有する。

【0064】

LNAモノマーは典型的に、国際特許出願W0 99/14226、およびその後の出願であるW0 0056746、W0 0056748、W0 0066604、W0 00125248、W0 0228875、W0 2002094250およびPCT 10 /DK02/00488（これらは全て本明細書の一部を構成する）中に記載される二環式ヌクレオシドアナログを意味する。好ましいLNAモノマー構造を、反応式2に例示する。

【化2】



反応式2

20

上記式中、XおよびYは独立して、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-N(H)-$ 、 $N(R)-$ 、 $-CH_2-$ 、または $-CH-$ （二重結合の部分の場合）、 $-CH_2-O-$ 、 $-CH_2-S-$ 、 $-CH_2-N(H)-$ 、 $-CH_2-N(R)-$ 、 $-CH_2-CH_2-$ 、または $-CH=CH-$ （二重結合の部分の場合）、 $-CH=CH-$ の群から選ばれて、ここで、Rは水素またはC₁～4-アルキルから選ばれる。不斉の基は、いずれかの配向で存在することができる。

【0065】

反応式2中、4個のキラル中心は、固定化された立体配置で示される。しかしながら、反応式2中の立体配置は、必ずしも固定化されない。本発明においては、一般的な反応式 2の化合物をも含む。ここで、該キラル中心は異なる立体配置（例えば、反応式3または 4中に示すもの）で存在する。従って、反応式2の例示の意図は、キラル中心の立体配置を限定するものではない。反応式2中の各キラル中心は、RまたはSのいずれかの立体配置で存在し得る。R（左旋性）およびS（右旋性）の定義は、IUPAC 1974 Recommendations, Section E, Fundamental Stereochemistry: The rules can be found in Pure Appl. Chem. 45, 13-30, (1976)および「Nomenclature of organic Chemistry」pergamon, New York, 1979中に記載されている。

【0066】

ZおよびZ*は独立して存在しないか、またはヌクレオシド間連結、末端基または保護基から選ばれる。

40

【0067】

該ヌクレオシド間連結は、 $-O-P(O)_2-O-$ 、 $-O-P(O,S)-O-$ 、 $-O-P(S)_2-O-$ 、 $-S-P(O)_2-O-$ 、 $-S-P(O,S)-O-$ 、 $-S-P(S)_2-O-$ 、 $-O-P(O)_2-S-$ 、 $-O-P(O,S)-S-$ 、 $-S-P(O)_2-S-$ 、 $-O-PO(R^H)-O-$ 、 $O-PO(OCH_3)-O-$ 、 $-O-PO(NR^H)-O-$ 、 $-O-PO(OCH_2CH_2S-R)-O-$ 、 $-O-PO(BH_3)-O-$ 、 $-O-PO(NHR^H)-O-$ 、 $-O-P(O)_2-NR^H-$ 、 $-NR^H-P(O)_2-O-$ 、 $-NR^H-CO-O-$ 、 $-O-CO-O-$ 、 $-O-CO-NR^H-$ 、 $-NR^H-CO-CH_2-$ 、 $-O-CH_2-CO-NR^H-$ 、 $-O-CH_2-CH_2-NR^H-$ 、 $-CO-NR^H-CH_2-$ 、 $-CH_2-NR^H-CO-$ 、 $-O-CH_2-CH_2-S-$ 、 $-S-CH_2-CH_2-O-$ 、 $-S-CH_2$ 50

—CH₂—S—、—CH₂—SO₂—CH₂—、—CH₂—CO—NR^H—、—O—CH₂—CH₂—NR^H—CO—、—CH₂—NCH₃—O—CH₂—からなる群から選ばれて、ここで、R^Hは水素またはC₁～4—アルキルから選ばれる。

【0068】

該末端基は独立して、水素、アジド、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、Prot—O—、Act—O—、メルカプト、Prot—S—、Act—S—、C₁～6—アルキルチオ、アミノ、Prot—N(R^H)—、Act—N(R^H)—、モノ—もしくはジ—(C₁～6—アルキル)アミノ、場合により置換されたC₁～6—アルコキシ、場合により置換されたC₁～6—アルキル、場合により置換されたC₂～6—アルケニル、場合により置換されたC₂～6—アルケニルオキシ、場合により置換されたC₂～6—アルキニル、場合により置換されたC₂～6—アルキニルオキシ、モノホスフェート、モノチオホスフェート、ジホスフェート、ジチオホスフェート、トリホスフェート、トリチオホスフェート、DNAインターカレーター(intercalators)、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、受容体基、リガンド、カルボキシ、スルホノ、ヒドロキシメチル、Prot—O—CH₂—、Act—O—CH₂—、アミノメチル、Prot—N(R^H)—CH₂—、Act—N(R^H)—CH₂—、カルボキシメチル、スルホノメチル(ここで、Protはそれぞれ—OH、—SH、および—NH(R^H)についての保護基であり、Actはそれぞれ—OH、—SH、および—NH(R^H)についての活性化基であり、そしてR^Hは水素またはC₁～6—アルキルから選ばれる)から選ばれる。

10

【0069】

ヒドロキシ置換基の保護基は、置換トリチル、例えば4,4'—ジメトキシトリチルオキシ(DMT)、4—モノメトキシトリチルオキシ(MMT)、およびトリチルオキシ、場合により置換された9—(9—フェニル)キサントニルオキシ(ピクシル(pixyl))、場合により置換されたメトキシテトラヒドロピラニルオキシ(mthp)、シリルオキシ(例えば、トリメチルシリルオキシ(TMS)、トリイソプロピルシリルオキシ(TIPS)、tert—ブチルジメチルシリルオキシ(TBDMs)、トリエチルシリルオキシ、およびフェニルジメチルシリルオキシ、tert—ブチルエーテル、アセタール(2個のヒドロキシ基を含む)、アシルオキシ(例えば、アセチル)またはハロゲン置換のアセチル(例えば、クロロアセチルオキシ、またはフルオロアセチルオキシ)、イソブチルオキシ、ピバロイルオキシ、ベンゾイルオキシ、および置換ベンゾイル、メトキシメチルオキシ(MOM)、ベンジルエーテルまたは置換ベンジルエーテル(例えば、2,6—ジクロロベンジルオキシ(2,6—Cl₂Bzl))を含む。或いは、ZまたはZ*がヒドロキシルである場合には、それらは場合により連結基によって固体担体と結合することによって保護し得る。

20

30

【0070】

ZまたはZ*がアミノ基である場合には、該アミノ保護基の例示的な例としては、フルオレニルメトキシカルボニルアミノ(Fmoc)、tert—ブチルオキシカルボニルアミノ(BOC)、トリフルオロアセチルアミノ、アリルオキシカルボニルアミノ(alloc、AOC)、Z—ベンジルオキシカルボニルアミノ(Cbz)、置換ベンジルオキシカルボニルアミノ(例えば、2—クロロベンジルオキシカルボニルアミノ(2—ClZ))、モノメトキシトリチルアミノ(MMT)、ジメチルオキシトリチルアミノ(DMT)、フタロイルアミノ、および9—(9—フェニル)キサントニルアミノ(ピクシル)が挙げられる。

40

【0071】

上記の実施態様において、Actはそれぞれ、—OH、—SH、および—NH(R^H)についての活性基を意味する。該活性基は、例えば場合により置換されたO—ホスホラミダイト、場合により置換されたO—ホスホトリエステル、場合により置換されたO—ホスホジエステル、場合により置換されたH—ホスホネート、および場合により置換されたO—ホスホネートから選ばれる。

【0072】

50

本明細書中、用語「ホスホラミダイト」とは、式 $-P(OR^x)-N(R^y)_2$ （式中、 R^x は、場合により置換されたアルキル基（例えば、メチル、2-シアノエチル、またはベンジル）であり、そして各 R^y は場合により置換されたアルキル基（例えば、エチルまたはイソプロピル）であるか、または基 $-N(R^y)_2$ （モルホリノ基（ $-N(CH_2CH_2)_2O$ を形成する）を意味する。 R^x は、2-シアノエチルであることが好ましく、そして該2個の R^y は同じであって、そしてイソプロピルであることが好ましい。従って、特に関連するホスホラミダイトは、N,N-ジイソプロピル- $O-(2-シアノエチル)$ ホスホラミダイトである。

【0073】

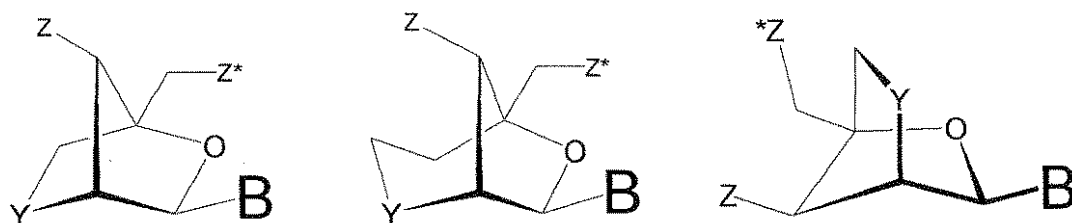
Bは、天然または非天然の核酸塩基であって、そしてこのものは、アデニン、シトシン、5-メチルシトシン、イソシトシン、シュードイソシトシン、グアニン、チミン、ウラシル、5-ブロモウラシル、5-プロピニルウラシル、5-プロピニル-6-フルオロウラシル、5-メチルチアゾールウラシル、6-アミノプリン、2-アミノプリン、イノシン、ジアミノプリン、7-プロピン-7-デアザアデニン、7-プロピン-7-デアザグアニン、および2-クロロ-6-アミノプリンから選ばれる。

10

【0074】

特に好ましい二環式構造を、以下の反応式3：

【化3】



20

反応式3

に示す。式中、Yは、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-$ または $N(R^H)$ であり；そして、Zおよび Z^* は独立して存在しないかまたはヌクレオシド間連結、末端基もしくは保護基から選ばれる。該ヌクレオシド間連結は、 $-O-P(O)_2-O-$ 、 $-O-P(O,S)-O-$ 、 $-O-P(S)_2-O-$ 、 $-S-P(O)_2-O-$ 、 $-S-P(O,S)-O-$ 、 $-S-P(S)_2-O-$ 、 $-O-P(O)_2-S-$ 、 $-O-P(O,S)-S-$ 、 $-S-P(O)_2-S-$ 、 $-O-PO(R^H)-O-$ 、 $O-PO(OCH_3)-O-$ 、 $-O-PO(NR^H)-O-$ 、 $-O-PO(OCH_2CH_2S-R)-O-$ 、 $-O-PO(BH_3)-O-$ 、 $-O-PO(NHR^H)-O-$ 、 $-O-P(O)_2-NR^H-$ 、 $-NR^H-P(O)_2-O-$ 、 $-NR^H-CO-O-$ であり得て、ここで、 R^H は水素または $C_1 \sim 4$ アルキルから選ばれる。

30

【0075】

該末端基は独立して、水素、アジド、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、 $Prot-O-$ 、 $Act-O-$ 、メルカプト、 $Pro-S-$ 、 $Act-S-$ 、 $C_1 \sim 6$ アルキルチオ、アミノ、 $Prot-N(R^H)-$ 、 $Act-N(R^H)-$ 、モノもしくはジ- $(C_1 \sim 6-アルキル)$ アミノ、場合により置換された $C_1 \sim 6$ アルコキシ、場合により置換された $C_1 \sim 6$ アルキル、場合により置換されたモノホスフェート、モノチオホスフェート、ジホスフェート、ジチオホスフェート、トリホスフェート、トリチオホスフェートから選ばれ、ここで、 $Prot$ はそれぞれ $-OH$ 、 $-SH$ 、および $-NH(R^H)$ についての保護基であり、そして R^H は水素または $C_1 \sim 6-アルキル$ から選ばれる。

40

【0076】

ヒドロキシ置換基の保護基は、置換トリチル（例えば、4,4'-ジメトキシトリチルオキシ（DMT）、4-モノメトキシトリチルオキシ（MMT）、場合により置換された9-(9-フェニル)キサントニルオキシ（ピクシル）、場合により置換されたメトキシテトラヒドロピラニルオキシ（mthp）、シリルオキシ（例えば、トリメチルシリルオキ

50

シ (TMS)、トリイソプロピルシリルオキシ (TIPS)、tert-ブチルジメチルシリルオキシ (TBDMs)、トリエチルシリルオキシ、およびフェニルジメチルシリルオキシ、tert-ブチルエーテル、アセタール (2 個のヒドロキシ基を含む)、アシルオキシ (例えば、アセチル) を含む。或いは、Z または Z* がヒドロキシである場合には、それらは場合により連結基によって固体の担体と結合することによって保護され得る。

【0077】

Z または Z* がアミノ基である場合には、該アミノ保護基の例示的な例としては、フルオレニルメトキシカルボニルアミノ (Fmoc)、tert-ブチルオキシカルボニルアミノ (BOC)、トリフルオロアセチルアミノ、アリルオキシカルボニルアミノ (alloc、AOC)、モノメトキシトリチルアミノ (MMT)、ジメトキシトリチルアミノ (DMT)、フタロイルアミノを挙げられる。

10

【0078】

上記の実施態様において、Act は、それぞれ -OH、-SH、および -NH(R^H) についての活性化基を示す。それら活性化基としては例えば、場合により置換された O-ホスホラミダイト、場合により置換された O-ホスホトリエステルの、場合により置換された O-ホスホジエステルの、場合により置換された H-ホスホネートの、または場合により置換された O-ホスホネートから選ばれる。

【0079】

本明細書中、用語「ホスホラミダイト」とは、式： $-P(OR^x)-N(R^y)_2$ の基を意味し、ここで、式中、R^x は、場合により置換されたアルキル基 (例えば、メチル、2-シアノエチルである) であり、そして各 R^y は、場合により置換されたアルキル基であり、R^x は 2-シアノエチルであることが好ましく、そして 2 個の R^y は同一であってそしてイソプロピルであることが好ましい。従って、特に関連するホスホラミダイトは、N, N-ジイソプロピル-O-(2-シアノエチル)ホスホラミダイトである。

20

【0080】

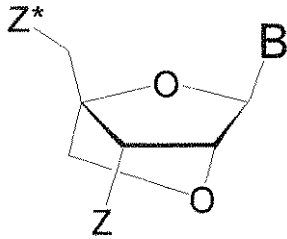
B は、天然または非天然の核酸塩基を構成し、そしてアデニン、シトシン、5-メチルシトシン、イソシトシン、シュードイソシトシン、グアニン、チミン、ウラシル、5-ブロモウラシル、5-プロピニルウラシル、6-アミノプリン、2-アミノプリン、イノシン、ジアミノプリン、2-クロロ-6-アミノプリンから選ばれる。

【0081】

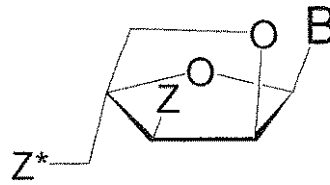
特に好ましい LNA 単位を反応式 4 に示す。B 並びに Z* および Z は、上に定義する通りである。

30

【化 4】

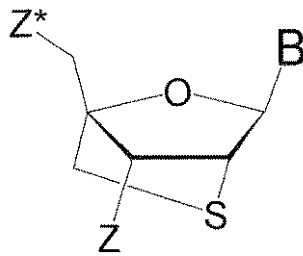


ベータ-D-オキシ-LNA

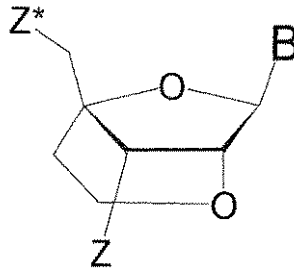


アルファ-L-オキシ-LNA

10

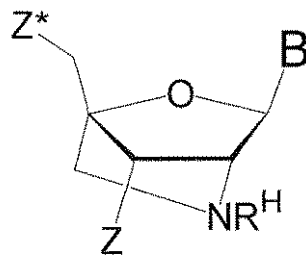


ベータ-D-チオ-LNA



ベータ-D-エノ-LNA

20



ベータ-D-アミノ-LNA

30

反応式 4

【0082】

(治療学的な原理)

当該分野の当業者は、LNAを含有するオリゴマー化合物を用いて、多数の異なる原理によってラズ関連疾患と闘うことができ、従ってこのことは本発明の精神の範囲内であると評価するであろう。

【0083】

例えば、LNAオリゴマー化合物はアンチセンスインヒビターとして設計することができ、このものはmRNAレベルでのインターベンションによって疾患の原因となるタンパク質の産生を防止する一本鎖核酸である。それらはまた、アンチセンスオリゴヌクレオチドであるリボザイムまたはオリゴザイムとして設計することができ、このものは標的結合ドメインに加えて、標的mRNA(リボザイム)を分解する触媒活性を含んだり或いは内在性酵素(RNase P)(このものは、標的mRNA(オリゴザイム)を分解する)を補充する外部ガイド配列(external guide sequence)(EGS)を含む。

【0084】

同様に、該LNAオリゴマー化合物はsiRNA'sとして設計することができ、このものは、未だに理解に乏しい「アンチセンス様」メカニズムによって特定の内因性または

40

50

外因性の遺伝子をサイレンスするために細胞によって使用される小さい二本鎖RNA分子である。

【0085】

同様に、LANオリゴマー化合物はまた、分子内水素結合によって三次元構造を採る核酸であるアプタマー（および、その改良物、このものはスピゲルマー(Spiegelmers)と呼ばれる）として設計し得る。これにより、それらは高いアフィニティーおよび特異性で生物学的な標的と結合しそしてブロックすることが可能である。また、LANオリゴマー化合物は、デコイ(Decoys)として設計し得る。このものは、DNA結合部位を選択的にブロックすることによって、細胞転写因子をそれらの標的遺伝子をトランス活性化することから防止する小さい二本鎖核酸である。

10

【0086】

その上、LANオリゴマー化合物はキメラプラストとして設計し得て、このものは、標的遺伝子配列と特異的に対形成しそして改変することができる小さい一本鎖核酸である。従って、この原理を利用するLAN含有オリゴマー化合物は、H aーラス遺伝子における変異によって生じるH aーラス関連疾患を処置するのに特に有用であり得る。

【0087】

最後に、LANオリゴマー化合物は、TFO's（三重形成性オリゴヌクレオチド）として設計することができる。このものは、二本鎖DNAと結合しそしてRNA転写レベルでのインターベンションによって疾患原因タンパク質の産生を防止する核酸である。

【0088】

オリゴヌクレオチドを操作することを意図する治療学的な原理によるものといくぶん示す場合には、本発明に記載する該LANオリゴマー化合物は、約8～約60個の核酸塩基、すなわち約8～約60個の連結ヌクレオチドを含むことが好ましい。特に好ましい化合物は、約12～約30個の核酸塩基を含有するアンチセンスオリゴヌクレオチド（約12～20個の核酸塩基を含有するアンチセンス化合物が最も好ましい）である。

20

【0089】

LANオリゴマー化合物がその治療学的な作用を顕現化することができる上記の原理について言う場合に、本発明の標的は、H aーラス遺伝子、mRNAまたはタンパク質であり得る。最も好ましい実施態様において、該LANオリゴマー化合物は、H aーラスのプレ-mRNAまたはH aーラスmRNAに対するアンチセンスインヒビターとして設計する。

30

【0090】

該オリゴヌクレオチドは、H aーラスプレ-mRNAまたはmRNAに沿ったいずれかの部位（例えば、5' -非翻訳リーダー、エキソン、イントロン、および3' 非翻訳末端内の部位）とハイブリダイズすることができる。

【0091】

好ましい実施態様において、該オリゴヌクレオチドは、翻訳ー開始部位を含むヒトH aーラスのプレ-mRNAまたはmRNAの部分とハイブリダイズする。該H aーラスオリゴヌクレオチドはCAT配列（このものは、H aーラスのプレ-mRNAまたはRNAのAUG開始配列と相補的である）を含むことがより好ましい。別の実施態様において、該H aーラスオリゴヌクレオチドは、ヒトH aーラスプレ-mRNAのスプライスドナー部位の部分とハイブリダイズする。更なる別の実施態様において、H aーラスオリゴヌクレチドは、ヒトH aーラスプレ-mRNAのスプライス受容体部位の部分とハイブリダイズする。別の実施態様において、該H aーラスオリゴヌクレオチドは、ポリアデニル化、輸送または分解に関与するヒトH aーラスのプレ-mRNAまたはmRNAの部分とハイブリダイズする。

40

【0092】

当該分野の当業者は、好ましいオリゴヌクレオチドは、配列が非関連遺伝子由来の転写物中には一般的には起こらないH aーラスのプレ-mRNAまたはmRNAの部分とハイブリダイズして、処置の特異性を保つものであると認めるであろう。

50

【0093】

本発明のオリゴマー化合物は、該標的と十分に相補的であるように設計して、所望する臨床的な応答を得て、例えば該オリゴマー化合物はその標的と十分な強さおよび特異性を持って結合して、所望する効果を与えなければいけない。1実施態様において、H aーラスを改変する化合物は、H aーラスをコードしない他の特異的な核酸を改変するようにも設計される。

【0094】

本発明のオリゴマー化合物は、分子内および分子間のオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを避けるように設計することが好ましい。

【0095】

多数の場合に、インビボでまたは臨床的にラス活性を改変するのに有効なLNAオリゴマー化合物の同定は、標的遺伝子に関する配列情報に基づく。しかしながら、当該分野の当業者は、該オリゴマー化合物もまた経験的な試験によって同定することができることを認めるであろう。例えば、好ましい実施態様のものと比較して、配列相同性が劣り、またはより大きくかもしくは小さく修飾されたヌクレオチド、またはより長いもしくは短い長さを有するが、しかしそれにも関わらず臨床的な処置において応答を示すH aーラスオリゴマー化合物もまた、本発明の範囲内である。

10

【0096】

(アンチセンス薬物)

本発明の1実施態様において、該オリゴマー化合物は、適当なアンチセンス薬物である。強力かつ安全なアンチセンス薬物は、多数のパラメータ（例えば、アフィニティー／特異性、生物学的な液体中の安定性、細胞取り込み、作用様式、薬物動態学的な性質、および毒性）の良好な調整を必要とする。

20

【0097】

(アフィニティーおよび特異性)

オキシメチレン2'-O,4'-C連結基を有するLNA(β-D-オキシ-LNA)は、DNAおよびRNAの標的配列に対する前例のない結合性質を示す。同様に、LNA誘導体(例えば、アミノ-、チオ-、およびα-L-オキシ-LNA)は、相補的なRNAおよびDNAに対する前例のないアフィニティーを示し、そしてチオ-LNAの場合には、RNAに対するアフィニティーは、β-D-オキシ-LNAの場合よりも良い。

30

【0098】

これらの著しいハイブリダイズの性質に加えて、LNAモノマーはDNAおよびRNAモノマー、並びに他の核酸分子アナログ(例えば、2'-O-アルキル修飾RNAモノマー)と混合し、そして協同的に作用することができる。例えば、本発明のオリゴヌクレチドは、完全にβ-D-オキシ-LNAモノマーから構成され得て、あるいはそのものは、β-D-オキシ-LNAおよびDNA、RNAまたは相補的な核酸分子アナログ(このものは例えば、アミノ-、チオ-、およびα-L-オキシ-LNAなどのLNA誘導体を含む)とのいずれかの組み合わせで構成され得る。DNAまたはRNA標的配列に対するLNAの前例のない結合アフィニティー、およびDNA、RNAと自由に混合するその能力、並びに広範囲の現在の核酸アナログは、有効かつ安全なアンチセンス化合物の開発のために、広範囲の本発明の重要な結果を有する。

40

【0099】

第1に、本発明の1実施態様において、薬物動態学的な活性に必要とされるアフィニティーを損なうことなく、アンチセンスオリゴの通常の長さのかなりの短縮(20~25merから、例えば12~15merへ)が可能となる。オリゴの内在的な特異性はその長さに逆に相関するので、そのような短縮は、アンチセンス化合物のそのRNA標的に対する特異性を有意に増大するであろう。本発明の1実施態様は、入手可能なヒトゲノムの配列および速く進行する遺伝子のアンテーションにより、標的mRNAにおける最も短いあり得る特異的な配列を同定することである。

【0100】

50

別の実施態様において、オリゴの大きさを低下させるためにLNAを使用することは、製造の方法および目的物(prize)を有意に容易とし、従って多様な疾患に対する商業的な競合的処置となるアンチセンス療法に対する基礎を与える。

【0101】

別の実施態様において、LNAの前例のないアフィニティーを用いて、アンチセンスオリゴの効力がその標的mRNAとインピボでハイブリダイズすることができる能力を実質的に増大し、その結果、他の化学品を用いる状況と比較して活性化合物を同定するのに要する時間および労力を有意に軽減することができる。

【0102】

別の実施態様において、LNAの前例のないアフィニティーを用いて、アンチセンスオリゴヌクレオチドの効力を増大し、その結果、臨床的な治験における現行のものよりも優れた治療学的なウィンドウを有する化合物の開発が可能となる。

10

【0103】

アンチセンスインヒビターとして設計される場合には、本発明のオリゴヌクレオチドは該標的核酸と結合し、そしてその同族タンパク質の発現を改変する。該改変は、正常な発現レベルと比較して少なくとも10%または20%の発現の抑制を生じることが好ましく、正常な発現レベルと比較して少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%または90%の抑制がより好ましい。

【0104】

典型的に、本発明のLNAオリゴヌクレオチドは、 β -D-オキシ-LNA以外の他の残基（例えば、天然のDNAモノマー、RNAモノマー、N3'-P5'ホスラミデート、2'-F, 2'-O-Me、2'-O-メトキシエチル(MOE)、2'-O-(3-アミノプロピル)(AP)、ヘキシトール(hexitol)核酸(HNA)、2'-F-アラビノ核酸(2'-F-ANA)およびD-シクロヘキセニルヌクレオシド(CeNA)を含む。また、 β -D-オキシ-LNA-修飾オリゴヌクレオチドはまた、オキシ-LNA基に加えてまたはそれに代えて、他のLNA単位を含み得る。特に、好ましい別のLNA単位は、D- β もしくはL- α またはそれらの組み合わせのいずれかの立体配置でのチオールLNAもしくはアミノ-LNAモノマー、またはエナーLNAを含む。通常、LNA修飾オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの全ヌクレオチドに基づいて、少なくとも約5、10、15または20%のLNA単位を、より典型的にはオリゴヌクレオチドの全塩基に基づいて少なくとも約20、25、30、40、50、60、70、80もしくは90%のLNA単位を含む。

20

30

【0105】

(生物学的な液体中での安定性)

本発明の1実施態様は、生物学的な液体中での得られたオリゴマー化合物の安定性を増大させるために（例えば、ヌクレアーゼ（エンドヌクレアーゼおよびエキソヌクレアーゼ）に対する耐性の増大による）、標準的なDNAまたはRNAオリゴヌクレオチド中にLNAモノマーを導入することを含む。安定性の大きさは、使用するLNAモノマーの数、オリゴヌクレオチド中のそれらの位置、および使用するLNAモノマーのタイプに依存する。DNAおよびホスホロチオエートと比較して、核酸(nucleolytic)分解に対してオリゴヌクレオチドを安定化する能力の以下の順序を確立することができる。DNA << ホスホロチオエート ~ オキシ-LNA < α -L-LNA < アミノ-LNA < チオール-LNA。

40

【0106】

LNAが標準的なDNA合成と適合し得て、そしてこのものは多数の現行の核酸アナログと自由に混合するという事実を考えると、LNA-オリゴマー化合物のヌクレアーゼ耐性は、ヌクレアーゼ安定性の増大を示す他のアナログを導入することによって、またはヌクレアーゼ耐性のヌクレオシド間連結（例えば、ホスホロモノチオエート、ホスホロジチオエート、およびメチルホスホネート連結など）を利用することによって、本発明に従って、更に増大することができる。

【0107】

50

(作用様式)

本発明に記載のアンチセンス化合物は、様々な機構によってそれらの治療学的な作用を発揮することができ、そしてこのものは、同一の化合物におけるこれらのいくつかと組み合わせることができる。1シナリオにおいて、該オリゴヌクレオチドのその標的(プレ-mRNAまたはmRNA)との結合は、標的の適当な機能に必要な他の因子(タンパク質、他の核酸分子など)との結合を防止するように作用する(すなわち、立体障壁によって機能する)。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、プレ-mRNAまたはmRNAのいずれかの配列モチーフ(これは、認識、スプライシングに關与するトランス作用(transacting)因子との結合、ポリーアデニル化、細胞輸送、RNA中のヌクレオチドの転写後の改変、5'末端のキャッピング、翻訳などにとって重要である)と結合し得る。10 プレ-mRNAスプライシングの場合には、オリゴヌクレオチドおよびその標的との間の相互作用の結果は、所望しないタンパク質の発現の抑制もしくは所望するタンパク質をコードする別のスプライシングmRNAの発生のいずれかまたはその両方であり得る。

【0108】

別の実施態様において、オリゴヌクレオチドとその標的との結合は、リボソームの仕組みに対する物理学的なブロックを作ることによって翻訳プロセスを無能とする(すなわち、翻訳停止)。

【0109】

別の実施態様において、該オリゴヌクレオチドとその標的との結合は、2次およびより高次の構造(これは、その適当な機能、すなわち構造的な妨害(interference)にとって重要である)に適合する該RNAの能力を妨害する。例えば、該オリゴヌクレオチドは、異なる機能(例えば、該RNAに対する更なる安定性を供すること、または異なるタンパク質にとっての必須の認識モチーフを適合させること)において重要な役割を果たすステムループ(stem-loop)構造の形成を妨害し得る。20

【0110】

更に別の実施態様において、該オリゴヌクレオチドの結合は、mRNAを分解する細胞酵素を補充することによって更なる細胞代謝プロセスに対する標的を失活する。例えば、該オリゴヌクレオチドは、DNA/RNA二本鎖のRNA部分を分解するリボヌクレアーゼH(RNase H)を補充する能力を有するヌクレオチドのセグメントを含み得る。同様に、該オリゴヌクレオチドは、二本鎖RNAase(例えば、RNAse III)を補充するセグメントを含め得て、あるいはそのものは、標的mRNAを分解する内在性酵素(RNase P)を補充する外部ガイド配列(EGS)を含み得る。また、該オリゴヌクレオチドはRNAse触媒活性を示す配列モチーフを含み得て、あるいは分子は、ハイブリダイズ事象によって標的と近接にある場合に更なる代謝活性から標的を無能とする該オリゴヌクレオチドと結合することができる。30

【0111】

β -D-オキシ-LNAは、RNase H活性を支持しないことが分かった。しかしながら、このことは、 β -D-オキシ-LNAおよびDNAを構成するキメラオリゴヌクレオチド(このものは、ギャップマー(gapmers)と呼ばれる)を作ることによって、本発明に従って変えることができる。ギャップマーは、4~12 ntのDNAの中心ストレッチ(stretch)、認識可能で且つRNAase H(ギャップ)によって切断可能な修飾モノマー(これは、典型的に β -D-オキシ-LNAの1~6個の残基によってフランキング(flanched)される)(フランク)をベースとする。該フランクはまた、LNA誘導体と一緒に構成することもできる。RNAase 媒介性の機構で作用することができる本発明の他のキメラ構成物が存在する。ヘッドマー(headmer)は、 β -D-オキシ-LNAまたは5'末端でのLNA誘導体の近接ストレッチ、続いてDNAの近接ストレッチまたは認識可能で且つ3'末端に対してRNAase Hによって切断可能な修飾モノマーによって画定される。そして、テイルマー(tailmer)は、DNAの近接ストレッチまたは認識可能で且つ5'末端でRNAase Hによって切断可能な修飾モノマー、続いて β -D-オキシ-LNAまたは3'末端に対するLNA誘導体の近接ストレッチによって画定される。本40 50

発明の他のキメラ（これは、DNAの別の構成成分、または認識可能で且つRNAase Hによって切断可能な修飾モノマー、 β -D-オキシ-LNAおよび／またはLNA誘導体から構成されるミックスマー(mixmers)と呼ばれる）はまた、RNAase Hの結合および切断を媒介し得る。 α -L-LNAはRNAase H活性をある程度までに補充するので、DNAのより小さいギャップ、または認識可能で且つギャップマー構成物についてRNAase Hによって切断可能な修飾モノマーは必要であり得て、そして該ミックスマー構成物におけるより大きなフレキシビリティを導入することができる。図1は、本発明の異なるデザインの概略を示す。

【0112】

アンチセンスオリゴヌクレオチドの臨床的な有用性は、それらの薬物動態学（例えば、吸収、分配、細胞取り込み、代謝および分泌）に有意な大きさに依存する。これらのパラメータは、該オリゴヌクレオチドの根底にある化学並びに大きさおよび三次元構造によって有意に誘導される。

10

【0113】

本発明の上記のLNAは1つではなくいくつかの関連する化学であるために（分子的には異なるが）、全ては、相補的なDNAまたはRNAに対するスタンニング(stunning)アフィニティを示す。従って、化学のLNAファミリーは、目的に合わせた薬物動態学的な性質（活性化化合物の大きさを改変するためにLNAのより大きなアフィニティを利用したりまたは該活性化化合物の正確な分子組成を改変するために異なるLNA化学を利用する）を有する本発明のオリゴの開発にユニークに適合する。後者の場合には、例えばオキシ-LNAよりもむしろアミノ-LNAの使用はオリゴの全荷電を変え、そして取り込みおよび分配の挙動に影響を及ぼすであろう。同様に、オキシ-LNAの代わりにチオール-LNAを使用することは、該オリゴヌクレオチドの親油性を増大し、従って親油性バリエーション（例えば、細胞膜）を通過するその能力に影響を及ぼす。

20

【0114】

本発明のLNAオリゴヌクレオチドの薬物動態学的な性質を改変することは、更に様々な異なる分子の連結によって達成し得る。例えば、オリゴヌクレオチドの細胞膜を通過する能力は、例えば脂質分子（例えば、コレステロール分子、チオエーテル、脂肪族鎖、リン脂質またはオリゴヌクレオチドに対するポリアミン）と連結することによって増大し得る。同様に、LNAオリゴヌクレオチドの細胞中への取り込みは、膜中の分子と相互作用するオリゴヌクレオチドと分子とを接合することによって増大し得て、これにより、細胞質中への運搬を媒介する。

30

【0115】

本発明に従って、オリゴマー取り込みを改善し、生物学的安定性を増大し（例えば、分解に対するオリゴマー耐性の増大）、および／または標的配列（例えば、mRNA配列）とのオリゴヌクレオチドのハイブリダイズ性質の特異性やアフィニティを増大する基を用いて、該薬力学的な性質は増大することができる。

【0116】

基本的には、アンチセンスオリゴに関係する2種類の毒性；配列依存性の毒性（これは、塩基配列に関係する）、および配列非依存性クラス関連の毒性が存在する。天然のCpG配列モチーフによる免疫刺激に関連する問題を除いて、アンチセンスオリゴヌクレオチドの開発において最も顕著である毒性は配列と独立のものであって、例えばオリゴヌクレオチドの化学、並びに投与の用量、様式、回数および期間に関連する。オリゴヌクレオチドのホスホロチオエートクラスは特に十分に確認されており、そしてこのものは多数の副作用（例えば、補体の活性化、長期間のPTT（部分トロンボプラスチン時間）、血小板減少症、肝毒性（肝臓酵素の増大）、心毒性、細網内皮細胞の脾腫大および肥厚化）を発揮することが分かった。

40

【0117】

上記の通り、該化学のLNAファミリーは、前例のないアフィニティ、非常に高い生物学的安定性、および該オリゴヌクレオチドの正確な分子組成を改変する能力を与える。

50

本発明の1実施態様において、LNAを含有する化合物は、いずれかのホスホロチオエート連結基と結合する場合にはほとんどない高い力価を合わせて有し、従って相補的なアンチセンス化合物よりもより良い効力および安定性を示すであろうオリゴヌクレオチドの開発を可能とする。

【0118】

本発明のオリゴおよびポリヌクレオチドは、有機化学の分野における当業者にとってよく知られる核酸化学の重合方法を用いて得ることができる。一般的に言えば、ホスホロアミダイト方法の標準的なオリゴマー化サイクル(S. L. BeaucageおよびR. P. Iyerによる, Tetrahedron, 1993, 49, 6123; S. L. BeaucageおよびR. P. Iyerによる, Tetrahedron, 1992, 48, 2223)を用いるが、例えばH-ホスホネート化学、ホスホトリエステル(phosphotriester)化学もまた使用することができる。

【0119】

本発明のいくつかのモノマーの場合には、より長いカップリング時間、および／または新しい試薬との繰り返しカップリング、および／またはより濃縮されたカップリング試薬の使用を用いた。使用するホスホラミダイトは、十分な>95%の逐次カップリング収率でカップリングする。該ホスフェートのチオール化は通常、例えばヨウ素／ピリジン／H₂O、ブケージ(Beaucage)試薬(商業的に入手可能)を用いる酸化によるホスホジエステルオリゴマーの合成に使用する酸化を拡張することによって行ない、他の満足すべき試薬をも含む。該ホスホロチオエートLNAオリゴマーは、逐次カップリング法を用いて効率よく合成して、>98%を得た。

【0120】

β-D-アミノ-LNA、β-D-チオ-LNAオリゴヌクレオチド、α-L-LNAおよびβ-D-メチルアミノ-LNAオリゴヌクレオチドはまた、ホスホラミダイト方法を用いる逐次カップリング法を用いて効率よく合成して、98%以上の収率を得た。

【0121】

LNAオリゴマー化合物の精製は、使い捨ての逆相精製カートリッジおよび／または逆相HPLCおよび／またはエタノールもしくはブタノールからの沈降を用いて行なった。キャピラリーゲル電気泳動、逆相HPLC、MALDI-MS、およびESI-MSを用いて、該合成したオリゴヌクレオチドの純度を確認した。更に、場合により保護された核酸塩基および場合により5'-OH保護されたLNAを固定化した固体の担体物質は、LNAモノマーが3'末端で含まれるLNA含有オリゴマー化合物の合成のための物質として特に興味深い。この場合に、該固体の担体物質は、CPG、例えば容易に(商業的に)入手可能なCPG物質またはポリスチレンであることが好ましい。ここで、3'-官能化のポリスチレン、場合により保護された核酸塩基、および場合により5'-OH保護されたLNAを、ある物質についての供給者によって述べられた条件を用いて、このものの上に連結する。

【0122】

ハーラスは、多数の基本的な生物学的機構(例えば、赤血球の増殖、細胞増殖、鉄代謝、グルコースおよびエネルギーの代謝、pH改変、マトリックスの代謝を含む)に関与する。例えば、ハーラスは、膀胱、甲状腺、腎臓癌腫(Bos(1989)による, Cancer Research 49: 4682-4689)中で突然変異することが多いことが分かった。ハーラスの過剰発現は、乳癌および大腸癌で見られる(P. Horan Handらによる(1987), Journal of the National Cancer Institute 79: 59-65)。本発明の方法は、癌が原因の疾患に対する治療もしくは予防、特に組織(例えば、肺癌、乳癌、大腸癌、前立腺癌、膵臓癌、肝臓癌、脳癌、精巣癌、胃癌、腸癌、腸管癌、腸癌、脊髄癌、洞癌、尿路癌または卵巣癌)中で起こり得る癌の処置のために使用することが好ましい。

【0123】

本明細書中に記載する本発明は、癌を予防または治療するための方法を包含し、該方法は、ハーラスを改変するオリゴマー化合物の治療学的に有効な量(例えば、高用量のオリゴマーを含むが、これに限定されない)を該処置が必要なヒトに投与することを含む

。本発明は更に、H aーラス改変オリゴマー化合物の短期間の投与の使用を包含する。正常な非癌性の細胞は、細胞タイプにとって特徴的な頻度で分裂する。細胞が癌性状態に形質転換する場合には、非制御性の細胞増殖および細胞死の低下が起こり、従って乱交雑の細胞分裂または細胞増殖は、癌性細胞タイプの特徴である。癌のタイプとしては例えば、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、白血病（例えば、急性白血病（例えば、急性リンパ性白血病、急性骨髄球性白血病、慢性骨髄球性白血病、慢性リンパ性白血病、多発性骨髄腫）、大腸癌、直腸癌、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、腎臓細胞癌、肝癌、胆管癌、絨毛癌、頸癌、精巣癌、肺癌、膀胱癌、黒色腫、頭頸部癌、脳癌、未知の原発部位の癌、末梢神経系の癌、中枢神経系の癌、腫瘍（例えば、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫(lymphangioendotheliosarcoma)、滑膜肉腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、扁平上皮癌、基底細胞腫、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭癌、乳頭子宮腺癌(papillary adenocarcinomas)、嚢胞腺癌(cystadenocarcinoma)、髄様癌、気管支原性肺癌、精上皮腫、胎児性癌、ウイルス腫瘍、小細胞肺癌、上皮肉腫、神経膠腫、星細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣細胞腫、松果体腫瘍、血管芽腫、聴神経鞘腫(acoustic neuroma)、乏突起細胞腫、髄膜腫、神経芽細胞腫、および網膜芽細胞腫)、H鎖病、転移、または非制御性のもしくは異常な細胞増殖を特徴とするいずれかの疾患もしくは障害を含むが、これらに限定されない。

【0124】

本発明はまた医薬組成物に関するものであって、このものは、活性成分として少なくとも1つの本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド構成物を含む。本発明の医薬組成物は場合により医薬的な担体を含み、そして該医薬組成物は場合により更にアンチセンス化合物、化学療法化合物、抗炎症化合物、抗ウイルス化合物および／または免疫改变化合物を含む、と理解されるべきである。

【0125】

本発明に包含されるオリゴマー化合物は、様々な医薬的に許容し得る塩で 사용할ことができる。本明細書中で使用する該用語は、本明細書中で同定する化合物の所望する生物学的な活性を保持し、そして最小の所望しない毒物学的な影響を示す塩を呼称する。該塩の非限定的な例は、有機アミノ酸と共に形成することができ、そして塩基付加塩は金属カチオン（例えば、亜鉛、カルシウム、ビスマス、バリウム、マグネシウム、アルミニウム、銅、コバルト、ニッケル、カドミウム、ナトリウム、カリウムなど）またはアンモニウムもしくはエチレンジアミンから形成されるカチオンなどと形成される塩；または、(c)(a)および(b)の組み合わせ；例えば、タンニン酸亜鉛塩(zinc tannate salt)などを含む。

【0126】

本発明の1実施態様は、プロドラッグ形態のオリゴマー化合物であり得る。オリゴヌクレオチドは、負に荷電したイオンでもある。細胞膜の親油性の性質のために、オリゴヌクレオチドの細胞取り込みは、天然または親油性の等価物と比較して低下する。この極性「障害」は、プロドラッグ方法（例えば、Crooke, R. M.(1998), in Crooke, S. T. Antisense research and Application. Springer-Verlag, Berlin, Germany, 131巻, 103-140頁を参照）を用いることによって回避することができる。この方法において、該オリゴヌクレオチドは、投与する場合にオリゴが中性となるような保護様式で製造する。これらの保護基は、それらが除去され、次いでオリゴが細胞によって摂取され得るように設計する。該タンパク質基は例えば、Sーアセチルチオエチル(SATE)またはSーピバロイルチオエチル(トープチル-SATE)を挙げられる。これらの保護基はヌクレアーゼ耐性であって、そしてこのものは細胞内で選択的に除去される。

【0127】

本発明の1実施態様において、該オリゴマー化合物はリガンド／接合体と連結する。そのものは、アンチセンスオリゴヌクレオチドの細胞取り込みを増大する方法である。この

接合は、末端位置 5' / 3' -OH で起こり得るが、しかし該リガンドはまた、糖類および／または塩基で起こり得る。特に、アンチセンスオリゴヌクレオチドが接合し得る増殖因子は、トランスフェリンまたは葉酸を含み得る。トランスフェリン-ポリリシン-オリゴヌクレオチド複合体または葉酸-ポリリシン-オリゴヌクレオチド複合体は、高レベルのトランスフェリンまたは葉酸受容体を発現する細胞による取り込みのために製造することができる。接合体／リガンドの他の例としては、コレステロール分子、二重インターカレーター（例えば、アクリジン、ポリ-L-リシン、1 個以上のヌクレアーゼ耐性連結基（例えば、ホスホロモノチオエートなど）を有する「末端-キャッピング」を挙げられる。

【0128】

細胞中へのオリゴヌクレオチド取り込みの担体としてのトランスフェリン複合体の製造は、Wagner らによる、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414 (1990) によって記載されている。葉酸受容体エンドサイトーシスによる葉酸-マクロ分子接合体の細胞運搬（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドの運搬を含む）は、Low らによる、米国特許第 5,108,921 号によって記載されている。また、Leamon らによる、Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 5572 (1991) をも参照。

【0129】

本発明はまた、本明細書中に開示する 1 個以上のオリゴヌクレオチド化合物の製剤化を含む。医薬的に許容し得る結合剤およびアジュバントは、製剤化される薬物の部を含み得る。カプセル剤、錠剤および丸剤などは、例えば以下の化合物を含み得る：結合剤としての微結晶性セルロース、ガムまたはゼラチン；賦形剤としてのデンプンまたはラクトース；滑沢剤としてのステアリン酸；様々な甘味剤または芳香剤。カプセル剤の場合には、用量単位は、液体担体似脂肪油を含み得る。糖または腸内薬物の同様なコーティング剤は、該用量単位の部であり得る。該オリゴヌクレオチド製剤はまた、活性な医薬成分の乳剤および液体形成性のミセル乳剤であり得る。

【0130】

本発明のオリゴヌクレオチドは、所望する作用を損なわないいずれかの物質、または所望する作用を補充するサプリメント、と混合し得る。これらは、他のヌクレオチド化合物を含有する他の薬物を含み得る。

【0131】

非経口、皮下、皮内または局所の投与の場合には、該製剤は、滅菌性の希釈物、緩衝化剤、毒性および抗菌性の改変物質を含み得る。該活性化合物は、分解または身体からの速効性の排除を防止する担体（例えば、徐放性を有するインプラントまたはマイクロカプセルを含む）を用いて製造することができる。静脈内投与の場合には、好ましい担体は、生理食塩水またはリン酸緩衝化生理食塩水である。

【0132】

オリゴマー化合物は、単位製剤（例えば、医薬的に許容し得る担体または希釈物）中に、処置する患者において重大な副作用を引き起こすことなく、治療学的に有効な量を患者に運搬するのに十分な量で含むことが好ましい。

【0133】

本発明の医薬組成物は、局所または全身性の処置が望まれるかどうかの点におよび処置する領域に依存する多数の方法で投与することができる。投与は、（a）経口（b）肺（例えば、粉剤もしくはエアロゾル（噴霧器によることを含む）の吸入もしくはガス注入による）；気管内、鼻腔内；（c）上皮、経皮、眼を含む局所および粘膜（例えば、例えば、膣および直腸運搬を含む）；または、（d）非経口（例えば、静脈内、動脈内、皮下、腹腔内もしくは筋肉内の注射もしくは注入；または、頭蓋内（例えば、クモ膜下腔内もしくは脳室内の投与）であり得る。1 実施態様において、該活性オリゴは、静脈内、腹腔内、経口、局所もしくはボーラス注射によって投与されるか、または標的臓器に直接に投与される。

【0134】

局所投与のための医薬的な組成物および製剤は、経皮パッチ、軟膏、ローション剤、クリーム剤、ゲル剤、点剤、スプレー剤、坐剤、液剤および散剤を含み得る。通常の医薬的な担体、水剤、散剤または油状の基剤、増粘剤などは必要でありまたは望まれ得る。コーティングコンドームおよびグローブなどはまた、有用であり得る。好ましい局所製剤は、本発明のオリゴヌクレオチドを局所用運搬剤（例えば、脂質、リポソーム、脂肪酸、脂肪酸エステル、ステロイド、キレート化剤、および界面活性剤）と一緒に混合する。経口投与のための組成物および製剤としては例えば、散剤または顆粒剤、マイクロ粒子(microparticulates)、ナノ粒子、水性もしくは非水性の媒質中の懸濁剤もしくは液剤、カプセル剤、ゲルカプセル剤、サッシェ剤、錠剤またはミニ錠剤(minitablets)を含むが、これらに制限されない。非経口、クモ膜下腔内または脳室内の投与のための組成物および製剤は減菌水性液剤を含み、このものはまた、緩衝化剤、希釈物および他の適当な添加物（例えば、浸透エンハンサー、担体化合物、および他の医薬的に許容し得る担体または賦形剤を含むが、これらに限定されない）を含み得る。

【0135】

本発明の医薬組成物として例えば、液剤、乳剤、およびリポソーム含有製剤を含むが、これらに限定されない。これらの組成物は、様々な構成成分（例えば、予め生成した(preformed)液体、半乳化固体、および半乳化半固体を含むが、これらに限定されない）から得ることができる。腫瘍組織への薬物の運搬は、担体-媒介性運搬（例えば、カチオン性リポソーム、シクロデキストリン、ポルフィリン誘導体、分枝デンドリマー、ポリエチレンイミンポリマー、ナノ粒子およびマイクロスフェアを含むが、これらに限定されない）によって増大し得る（Dass CR.による，J Pharm Pharmacol 2002; 54(1): 3-27）。

【0136】

本発明の医薬製剤は通常、1回剤形で供され得て、製薬業界においてよく知られる通常の技術に従って製造することができる。該技術は、活性成分を医薬的な担体または賦形剤と一緒に組み合わせる工程を含む。通常、該製剤は、該活性成分を液体担体もしくは細かく分けられた固体担体またはその両方と均一におよび密に組み合わせ、次いで必要ならば該生成物を成型することによって製造する。

【0137】

本発明の組成物は、いずれかの多数の可能な剤形（例えば、錠剤、カプセル剤、ゲルカプセル剤、液体シロップ剤、軟ゲル剤および坐剤を含むが、これらに限定されない）に製剤化することができる。本発明の組成物はまた、水性もしくは非水性または混合の媒質中での懸濁剤としても製剤化し得る。水性懸濁剤は更に、懸濁剤の粘性を増大する特定の物質（例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトールおよび／またはデキストランを含む）を含み得る。該懸濁剤はまた、安定化剤を含み得る。

【0138】

本発明のオリゴヌクレオチドはまた、活性薬物物質（例えば、アスピリン、イブプロフェン、スルファ(sulfa)薬物、抗糖尿病薬、抗菌薬または抗生物質）と接合することもできる。

【0139】

LNA含有オリゴマー化合物は、上で示す通り多数の治療学的な利用法にとって有用である。通常、本発明の治療学的な方法は、治療学的に有効な量のLNA-修飾オリゴヌクレオチドを哺乳動物（特に、ヒト）に投与することを含む。

【0140】

ある実施態様において、本発明は、（a）1個以上のアンチセンス化合物、および（b）1個以上の他の化学療法薬（このものは、非-アンチセンス機構によって機能する）を含有する医薬組成物を提供する。本発明の化合物と一緒に使用する場合、該化学療法薬は、別個に（例えば、ミトラマイシンおよびオリゴヌクレオチド）、連続して（例えば、ミトラマイシンおよびオリゴヌクレオチドを一定期間、続いて別の薬物およびオリゴヌクレオチド）、または1個以上の他のそれら化学療法薬と組み合わせてもしくは放射線療法と組み合わせ、使用することができる。当該分野の当業者にとって知られる全ての化学療

法薬を、本発明の化合物との組み合わせ処置として包含する。

【0141】

抗炎症薬（例えば、非ステロイド性抗炎症薬を含むが、これらに限定されない）、コルチコステロイド、抗ウイルス薬、および免疫改変薬はまた、本発明の組成物と組み合わせることができる。2個以上の組み合わせ化合物を、一緒にまたは連続して使用することができる。

【0142】

別の実施態様において、本発明の組成物は、1個以上のアンチセンス化合物、特に第1の核酸を標的とするオリゴヌクレオチド、および第2の核酸分子標的を標的とする1個以上の別のアンチセンス化合物を含み得る。2個以上の組み合わせ化合物は、一緒にまたは連続して使用することができる。

10

【0143】

該用量は、処置する疾患状態の激しさおよび応答性、並びに処置期間（数日間から数ヶ月間、あるいは治癒が有効となりまたは該疾患状態の減少が達成されるまで続く）に依存する。最適な投与スケジュールは、患者の身体中での薬物蓄積の測定から算出することができる。

【0144】

最適な用量は、個々のオリゴヌクレオチドの相対的な効力に依存して変わり得る。通常、そのものはEC50（これは、インビトロおよびインビボでの動物モデルにおいて有効であることが分かる）に基づいて見積もることができる。通常、用量は体重kg当たり0.01 μg～1 gであり、そしてこのものは毎日、毎週、毎月もしくは毎年1回以上、2～10年毎に1回、または連続注入によって数時間から数ヶ月まで、与えることができる。投与の反復の割合は、測定する滞留時間および身体の液もしくは組織中での薬物濃度に基づいて見積もることができる。十分な処置後に、患者は疾患状態の再発を予防するために維持療法を受けることが所望され得る。

20

【0145】

本発明のLNA含有オリゴマー化合物は、診断、治療および予防のための研究試薬として使用することができる。研究において、該アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて、細胞および実験動物中でのラス遺伝子の合成を特異的に抑制し、その結果、標的の機能分析もしくは治療学的なインターベンションのための標的としてのその有効性の評価を容易とすることができる。診断学において、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて、細胞および組織中でのラス発現をノーザンブロット、インシチュアハイブリダイゼーションまたは同様な方法によって検出しそして定量化することができる。治療のために、疾患もしくは障害を有すると予想される動物またはヒト（このものは、ラスの発現を改変することによって処置することができる）は、本発明に従ってアンチセンス化合物を投与することによって処置する。更に、ラスの発現に関係する疾患または病気を有しているかまたは患い易いと予想されるマウス、ラットおよびヒトを、1個以上の本発明のアンチセンス化合物または組成物の治療学的にまたは予防学的に有効な量を投与することによって、処置する方法を提供する。

30

【0146】

（実施例）

（実施例1：モノマー合成）

該LNAモノマービルディングブロックおよびその誘導体は、以下に公知の方法およびそれらの中に引用されている刊行物に従って製造した。以下を参照。

WO 03/095467 A1；

D. S. Pedersen, C. Rosenbohm, T. Kochによる, (2002) Preparation of LNA Phosphoramidites, Synthesis 6, 802-808；

M. D. Sorensen, L. Kvaerno, T. Bryld, A. E. Hakansson, B. Verbeure, G. Gaubert, P. Herdewijn, J. Wengelによる, (2002) α-L-ribo-configured Locked Nucleic Acid (α-l-LNA): Synthesis and Properties, J. Am. Chem. Soc., 124, 2164-2176；

50

S. K. Singh, R. Kumar, J. Wengelによる, (1998) Synthesis of Novel Bicyclo[2.2.1] Ribonucleosides: 2'-Amino- and 2'-Thio-LNA Monomeric Nucleosides, J. Org. Chem. 1998, 63, 6078-6079;

C. Rosenbohm, S. M. Christensen, M. D. Sorensen, D. S. Pedersen, L. E. Larsen, J. Wengel, T. Kochによる, (2003) Synthesis of 2'-amino-LNA: a new strategy, Org. Biomol. Chem. 1, 655-663.

【0147】

2'-チオLNAリボチミジンホスホラミダイトの合成。試薬および条件: i) Pd/C、H₂、アセトン、MeOH; ii) BzCl、ピリジン、DMF; iii) 0.25 M H₂SO₄ (水溶液)、DMF、80℃ (4から79%; 3工程); iv) Tf₂O、DMAP、CH₂Cl₂、0℃; v) Na₂S、DMF (7から72%、2工程); vi) NaOBz、DMF、100℃ (81%); vii) NH₃、MeOH (76%); viii) DMT-Cl、ピリジン (88%); ix) P(OCH₂CH₂CN)(N(iPr)₂)₂、4,5-ジシアノイミダゾール、CH₂Cl₂ (99%)。DMT = 4,4'-ジメトキシトリチル、PN₂ = 2-シアノエトキシ(ジイソプロピルアミノ)ホスフィノイル(phosphinoyl)。

【0148】

1-(3-O-ベンゾイル-5-O-メタンスルホニル-4-C-メタンスルホニルオキシメチル-β-D-トリオ-ペンチフラノシル)チミン (7、図5)

無水ヌクレオシド4 (C. Rosenbohm, S. M. Christensen, M. D. Sorensen, D. S. Pedersen, L. E. Larsen, J. Wengel, T. Kochによる, (2003) Synthesis of 2'-amino-LNA: a new strategy, Org. Biomol. Chem. 1, 655-663) (30.0g、58.1mmol) を、メタノール (1000cm³) およびアセトン (1000cm³) の混合物中で70℃まで加熱して、透明な溶液を得て、そして該溶液を室温まで達成させた。該反応フラスコをアルゴンを用いてフラッシュし、そしてPd/C (10重量%、Pd/C、6.2g、5.8mmol) を加えた。該混合物を水素ガスの雰囲気下で (バルーン) 激しく攪拌した。23時間後に、該スラリーをセライトのパッドを通してろ過した。該触媒をセライトから回収し、そしてDMF (1000cm³) 中で1時間還流した。該熱DMFスラリーをセライトのパッドを通してろ過し、そして該有機相を合わせて、真空下で蒸発させて、黄色粉末のヌクレオシド5を得た。残留溶媒を高真空ポンプを用いて終夜除去した。

【0149】

粗ヌクレオシド5 (23g) をDMF (300cm³) 中で70℃まで加熱して、透明黄色溶液を得て、このものを室温まで冷却した。塩化ベンゾイル (81.7g、58.1mmol、67.4cm³) を加え、続いてピリジン (70cm³) を加えた。18時間後に、該反応液をメタノール (200cm³) を用いてクエンチし、そして過剰量のメタノールを真空下で除去した。ヌクレオシド6の暗褐色溶液に、H₂SO₄ 水溶液 (0.25M、400cm³) を加えた。該溶液を油浴上で80℃まで加熱した (約50℃で沈降が起こる。該溶液は80℃で再び透明になる)。80℃で22時間後に、該溶液を室温まで冷却した。該反応混合物を酢酸エチル (1000cm³) を有する分液ろうとに移した。該有機相を飽和NaHCO₃ 水溶液 (2×1000cm³) を用いて洗浄した。該水相を合わせて酢酸エチル (1000+500cm³) を用いて抽出した。該有機相を合わせて、飽和NaHCO₃ 水溶液 (1000cm³) を用いて洗浄し、乾燥し (Na₂SO₄ を使用)、ろ過し、そして真空下で蒸発させて黄色液体を得た。残留溶媒を高真空ポンプを用いて終夜除去して、黄色シロップを得た。該生成物を乾燥カラム真空 (Dry Column Vacuum) クロマトグラフィー (id 10cm; 100cm³ 画分; 50~100容量%のEtOAc/n-ヘプタン-10%ずつ増加; 2~24容量%のMeOH/EtOAc-2%ずつ増加) によって精製した。該生成物を含有する画分を合わせて、そして真空下で蒸発させて、白色発泡体のヌクレオシド7 (25.1g、79%) を得た。

R_f = 0.54 (5容量% MeOH/EtOAc);

ESI-MS m/z 実測値 549.0 ([MH]⁺、計算値 549.1);

^1H NMR (DMSO- d_6) δ 11.39 (br s, 1H, NH), 8.10-8.08 (m, 2H, Ph), 7.74-7.70 (m, 1H, Ph), 7.60-7.56 (m, 2H, Ph), 7.51 (d, $J = 1.1$ Hz, 1H, H6), 6.35 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H, H1'), 6.32 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H, 2'-OH), 5.61 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, H3'), 4.69 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H), 4.59 (m, 1H, H2'), 4.55 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H), 4.52 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H), 4.46 (d, $J = 10.6$ Hz, 1H) (H5'およびH1''), 3.28 (s, 3H, Ms), 3.23 (s, 3H, Ms), 1.81 (s, 3H, CH₃);

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 164.5, 163.6 (C4, PhC(=O)), 150.3 (C2), 137.7 (C6), 133.8, 129.6, 128.7, 128.6 (Ph), 108.1 (C5), 84.8 (C1'), 81.1 (C4'), 78.0 (C3'), 73.2 (C2'), 68.0, 67.1 (C5', C1''), 36.7, 36.6 (2×Ms), 11.9 (CH₃);

元素分析 (C₂₀H₂₄N₂O₁₂S₂ · 0.33 H₂Oとして計算) (%); 計算値: C, 44.34; H, 4.65; N, 4.85。実測値: C, 44.32; H, 4.58; N, 4.77。 10

【0150】

(1R, 3R, 4R, 7R)-7-ベンジルオキシ-1-メタンスルホニルオキシメチル-3-(チミン-1-イル)-2-オキサ-5-チアピシクロ[2:2:1]ヘプタン (9)

1-(3-オ-ベンゾイル-5-オ-メタンスルホニル-4-C-メタンスルホニルオキシメチル-β-D-トレオ-ペントフラノシル)チミン (7) (10.00 g、18.23 mmol) をジクロロメタン (500 cm³) 中に溶解し、そしてこのものを0℃まで冷却した。ピリジン (15 cm³) およびDMA P (8.91 g、72.9 mmol) を加え、続いて無水トリフルオロメタンスルホン酸 (10.30 g、36.5 mmol、6.0 cm³) を滴下した。1時間後に、該反応液を飽和NaHCO₃水溶液 (500 cm³) を用いてクエンチし、そしてこのものを分液ろうとに移した。該有機相を1.0M塩酸 (500 cm³)、飽和NaHCO₃水溶液 (500 cm³) およびブライン (500 cm³) を用いて洗浄した。該有機相を真空下でトルエン (100 cm³) と一緒に蒸発させて、黄色粉末の1-(3-オ-ベンゾイル-5-オ-メタンスルホニル-4-C-メタンスルホニルオキシメチル-2-オ-トリフルオロメタンスルホニル-β-トレオ-ペントフラノシル)チミン (8) を得た。 20

【0151】

該粗ヌクレオシド8をDMF (250 cm³) 中に溶解し、そしてNa₂S (1.57 g、20.1 mmol) を加えて暗緑色スラリーを得た。3時間後に、該反応液を半飽和のNaHCO₃水溶液 (500 cm³) を用いてクエンチし、そしてジクロロメタン (500 + 2×250 cm³) を用いて抽出した。該有機相を合わせてブライン (500 cm³) を用いて洗浄し、乾燥し (Na₂SO₄を使用)、ろ過し、そして真空下で濃縮して、黄色液体を得た。残留溶媒を高真空ポンプを用いて終夜除去して黄色ガムを得て、このものを乾燥カラム真空クロマトグラフィー (id 6 cm; 50 cm³ の画分; 50~100容量%のEtOAc/n-ヘプタン-10%ずつ増加; 2~20容量%のMeOH/EtOAc-2%ずつ増加) によって精製して、黄色発泡体のヌクレオシド9 (6.15 g、72%) を得た。 30

$R_f = 0.27$ (20容量%のn-ヘプタン/EtOAc);

ESI-MS m/z 実測値: 469.0 ([MH]⁺、計算値: 469.1);

^1H NMR (CDCl₃) δ 8.70 (br s, 1H, NH), 8.01-7.99 (m, 2H, Ph), 7.67 (d, $J = 1.1$ Hz, 1H, H6), 7.65-7.61 (m, 1H, Ph), 7.50-7.46 (m, 2H, Ph), 5.98 (s, 1H, H1'), 5.34 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H3'), 4.66 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H, H5'a), 4.53 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H, H5'b), 4.12 (m (残留EtOAcと重なり), 1H, H2'), 3.15-3.13 (m, 4H, H1''aおよびMs), 3.06 (d, $J = 10.6$ Hz, 1H, H1''b), 1.98 (d, $J = 1.1$ Hz, 3H, CH₃); 40

^{13}C NMR (CDCl₃) δ 165.2, 163.5 (C4, PhC(=O)), 149.9 (C2), 134.1, 133.9, 129.8, 128.7, 128.3 (C6, Ph), 110.7 (C5), 91.1 (C1'), 86.8 (C4'), 72.6 (C3'), 65.8 (C5'), 50.5 (C2'), 37.9 (Ms), 35.1 (C1''), 12.5 (CH₃);

元素分析 (C₁₉H₂₀N₂O₈S₂ · 0.3 · 3 EtOAcとして計算) (%); 計算値: C, 49.21; H, 4.72; N, 5.47。実測値: C, 49.25; H, 4.64; N, 5.48。

【0152】

(1R, 3R, 4R, 7R)-7-ベンゾイルオキシ-1-ベンゾイルオキシメチル-3-(チミン-1-イル)-2-オキサ-5-チアビシクロ[2:2:1]ヘプタン (10)

ヌクレオシド 9 (1.92 g、4.1 mmol) を DMF (110 cm³) 中に溶解した。安息香酸ナトリウム (1.2 g、8.2 mmol) を加え、そして該混合物を 100 °C まで 24 時間加熱した。該反応混合物を半飽和のブライン (200 cm³) を有する分液ろうとに移し、そしてこのものを酢酸エチル (3 × 100 cm³) を用いて抽出した。該有機相を合わせて乾燥し (Na₂SO₄ を使用)、ろ過し、そして真空下で蒸発させて褐色液体を得た。該生成物を高真空ポンプ下に置いて、残留溶媒を除去した。得られた褐色ガムを乾燥カラム真空クロマトグラフィー (id 4 cm; 50 cm³ の画分; 0~100 容量%の EtOAc/n-ヘプタン-10%ずつ増加; 2~10 容量%の MeOH/EtOAc-2%ずつ増加) によって精製して、わずかに黄色発泡体のヌクレオシド 10 (1.64 g、81%) を得た。

R_f = 0.57 (20 容量%の n-ヘプタン/EtOAc);

ESI-MS m/z 実測値 495.1 ([MH]⁺、計算値 495.1);

¹H NMR (CDCl₃) δ 9.02 (br s, 1H, NH), 8.07-7.99 (m, 4H, Ph), 7.62-7.58 (m, 2H, Ph), 7.47-7.42 (m, 5H, Ph および H6), 5.95 (s, 1H, H1'), 5.46 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H3'), 4.93 (d, J = 12.8 Hz, 1H, H5'a), 4.60 (d, J = 12.8 Hz, 1H, H5'b), 4.17 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H2'), 3.27 (d, J = 10.6 Hz, 1H, H1'a), 3.16 (d, J = 10.6 Hz, 1H, H1'b), 1.55 (d, J = 1.1 Hz, 3H, CH₃);

¹³C NMR (CDCl₃) δ 165.8, 165.1, 163.7 (C4, 2 × PhC(O)), 150.0 (C2), 133.9, 133.7, 133.6, 129.8, 129.6, 129.0, 128.8, 128.6, 128.5 (C6, 2 × Ph), 110.3 (C5), 91.3 (C1'), 87.5 (C4'), 72.9 (C3'), 61.3 (C5'), 50.6 (C2'), 35.6 (C1''), 12.3 (CH₃);

元素分析 (C₂₅H₂₂N₂O₇S として計算) (%); 計算値: C, 60.72; H, 4.48; N, 5.66。実測値: C, 60.34; H, 4.49; N, 5.35。

【0153】

(1R, 3R, 4R, 7R)-7-ヒドロキシ-1-ヒドロキシメチル-3-(チミン-1-イル)-2-オキサ-5-チアビシクロ[2:2:1]ヘプタン (11)

ヌクレオシド 10 (1.50 g、3.0 mmol) をアンモニアで飽和としたメタノール (50 cm³) 中に溶解した。該反応フラスコを封し、そしてこのものを周囲温度で 20 時間攪拌した。該反応混合物を真空下で濃縮して黄色ガムを得て、このものを乾燥カラム真空クロマトグラフィー (id 4 cm、50 cm³ 画分; 0~16 容量%の MeOH/EtOAc-1%ずつ増加) によって精製して、透明針状晶ヌクレオシド 11 (0.65 g、76%) を得た。

R_f = 0.31 (10 容量% MeOH/EtOAc);

ESI-MS m/z 実測値 287.1 ([MH]⁺、計算値 287.1);

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 11.32 (br s, 1H, NH), 7.96 (d, J = 1.1 Hz, 1H, H6), 5.95 (s, 1H, H6), 5.70 (d, J = 4.2 Hz, 1H, 3'-OH), 5.62 (s, 1H, H1'), 4.49 (t, J = 5.3 Hz, 1H, 5'-OH), 4.20 (dd, J = 4.1 および 2.1 Hz, 1H, H3'), 3.77-3.67 (m, 2H, H5'), 3.42 (d, J = 2.0 Hz, 1H, H2'), 2.83 (d, J = 10.1 Hz, 1H, H1'a), 2.64 (d, J = 10.1 Hz, 1H, H1'b), 1.75 (d, J = 1.1 Hz, 3H, CH₃);

¹³C NMR (DMSO-d₆) δ 163.8 (C4), 150.0 (C2), 135.3 (C6), 107.5 (C5), 90.2, 89.6 (C1' および C4'), 69.4 (C3'), 58.0 (C5'), 52.1 (C2'), 34.6 (C1''), 12.4 (CH₃);

元素分析 (C₁₁H₁₄N₂O₅S として計算) (%); 計算値: C, 46.15; H, 4.93; N, 9.78。実測値: C, 46.35; H, 4.91; N, 9.54。

【0154】

(1R, 3R, 4R, 7R)-1-(4,4'-ジメトキシトリチルオキシメチル)-7-ヒドロキシ-5-メチル-3-(チミン-1-イル)-2-オキサ-5-チアビシクロ[2:2:1]ヘプタン (12)

ヌクレオシド 11 (0.60 g、2.1 mmol) をピリジン (10 cm³) 中に溶解

した。4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (0.88 g、2.6 mmol) を加え、そして該反応液を周囲温度で3時間攪拌した。該反応混合物を水 (100 cm³) を有する分液ろうとに移し、そしてこのものを酢酸エチル (100 + 2 × 50 cm³) を用いて抽出した。該有機相を合わせて飽和 NaHCO₃ 水溶液 (100 cm³)、ブライン (100 cm³) を用いて洗浄し、そして真空下で乾固するまで蒸発させて粘性黄色液体を得た。該生成物をトルエン (50 cm³) 中に再溶解し、そしてこのものを真空下で濃縮して黄色発泡体を得た。該発泡体を高真空ポンプを用いて終夜乾燥して、そして乾燥カラム真空クロマトグラフィー (id 4 cm; 50 cm³ 画分; 10~100 容量%の EtOAc / n-ヘプタン-10%ずつ増加) によって精製して、白色発泡体のヌクレオシド 12 (1.08 g、88%) を得た。

10

$R_f = 0.24$ (20 容量%の n-ヘプタン / EtOAc) ;

ESI-MS m/z 実測値 587.1 ([M-H]⁺、計算値 587.2) ;

¹H NMR (CDCl₃) δ 8.96 (br s, 1H, NH), 7.74 (d, J = 1.1 Hz, 1H, H6), 7.46-7.44 (m, 2H, Ph), 7.35-7.22 (m, 9H, Ph), 7.19-7.15 (m, 2H, Ph), 6.86-6.80 (m, 2H, Ph), 5.82 (s, 1H, H1'), 4.55 (dd, J = 9.3 および 2.1 Hz, 1H, H3'), 3.79 (s, 6H, OCH₃), 3.71 (d, J = 2.0 Hz, 1H, H2'), 3.50 (s, 2H, H5'), 2.81 (d, J = 10.8 Hz, 1H, H1''a), 2.77 (d, J = 10.8 Hz, 1H, H1''b), 2.69 (d, J = 9.2 Hz, 1H, 3'-OH), 1.42 (s, 3H, CH₃) ;

¹³C NMR (CDCl₃) δ 158.7 (C4), 150.1 (C2), 144.1, 135.2, 135.1, 130.1, 129.1, 128.1, 128.0, 127.1, 127.0, 113.3 (C6, 3×Ph), 110.0 (C5), 90.2 (C(Ph)₃), 89.6 (C1'), 87.0 (C4'), 71.7 (C3'), 60.9 (C5'), 55.2 (C2'), 34.7 (C1''), 12.2 (CH₃) ;

20

元素分析 (C₃₂H₃₂N₂O₇S · 0.5H₂O として計算) (%) ; 計算値 : C, 64.31; H, 5.57; N, 4.69. 実測値 : C, 64.22; H, 5.67; N, 4.47.

【0155】

(1R, 3R, 4R, 7R)-7-(2-シアノエトキシ(ジイソプロピルアミノ)ホスフィノキシ)-1-(4,4'-ジメトキシトリチルオキシメチル)-3-(チミン-1-イル)-2-オキサ-5-チアピシクロ[2.2.1]ヘプタン (13)

公知の方法 (D. S. Pedersen, C. Rosenbohm, T. Koch による, (2002) Preparation of LNA Phosphoramidites, Synthesis, 6, 802-808) に従って、ヌクレオシド 12 (0.78 g、1.33 mmol) をジクロロメタン (5 cm³) 中に溶解し、そしてアセトニトリル中の 4,5-ジシアノイミダゾールの 1.0 M 溶液 (0.93 cm³、0.93 mmol) を加え、続いて 2-シアノエチル-N,N,N',N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト (0.44 cm³、1.33 mmol) を滴下した。2時間後に、該反応液をジクロロメタン (40 cm³) を有する分液ろうとに移し、そしてこのものを NaHCO₃ 水溶液 (2 × 25 cm³) およびブライン (25 cm³) を用いて洗浄した。該有機相を乾燥 (Na₂SO₄ を使用) し、ろ過し、そして真空下で蒸発させて白色発泡体のヌクレオシド 13 (1.04 g、99%) を得た。 $R_f = 0.29$ および 0.37 - 2 個のジアステレオマー (20 容量%の n-ヘプタン / EtOAc を使用) ; ESI-MS m/z 実測値 789.3 ([MH]⁺、計算値 789.3) ; ³¹P NMR (DMSO-d₆) δ 150.39, 150.26.

30

【0156】

(実施例 2) : オリゴヌクレチド合成

オリゴヌクレチドを、Expedite 8900/MOSS シンセサイザー (多重オリゴヌクレチド合成システム) を用いるホスホラミダイト方法を用いて 1 または 15 μmol で合成した。合成の最後には (DMT-オン)、該オリゴヌクレチドをアンモニア水溶液を用いて室温で 1 時間、固体担体から切断し、そして更にこのものを 65 °C で 3 時間脱保護した。該オリゴヌクレチドを、逆相 HPLC (RP-HPLC) によって精製した。DMT-基を除去後に、該オリゴヌクレチドを IE-HPLC または RP-HPLC によって確認した。該オリゴヌクレチドの同一性は、ESI-MS によって確認する。より詳細については、以下を参照。

【0157】

40

50

(LNA スクシンニルヘミエステルの製造)

5'-O-Dmt-3'-ヒドロキシ-LNAモノマー (500 mg)、無水コハク酸 (1.2 当量) および DMAP (1.2 当量) を DCM (35 mL) 中に溶解した。該反応液を室温で終夜攪拌した。NaH₂PO₄ 0.1 M pH 5.5 (2×) およびブライン (1×) を用いて抽出後に、該有機相を更に無水Na₂SO₄ を用いて乾燥し、ろ過し、そして蒸発させた。該ヘミエステル誘導体を 95% 収率で得て、このものをいずれかの更なる精製することなく使用した。

【0158】

(LNA-担体の製造)

上で製造したヘミエステル誘導体 (90 μmol) を最少量の DMF、DIEA 中に溶解し、そして pyBOP (90 μmol) を加え、そして 1 分間一緒に混合した。この予め活性化した混合物を LCAA-CPG (500 Å、80~120 メッシュサイズ、300 mg) と一緒に手動式シンセサイザー中で混合し、そして攪拌した。室温で 1.5 時間後に、該担体をろ過して除き、そして DMF、DCM および MeOH を用いて洗浄した。乾燥後に、該ロードが 57 μmol/g であることを測定した (Tom Brown, Dorcas J. S. Brown による, 「Modern machine-aided methods of oligodeoxyribonucleotide synthesis」, in: F.Eckstein 編, Oligonucleotide and Analogues A Practical Approach. Oxford: IRL Press, 1991: 13-14 を参照)。

【0159】

(オリゴヌクレオチドの伸張)

ホスホラミダイト (A(bz)、G(ibz)、5-メチルーC(bz) または T-β-シアノエチルーホスホラミダイト) のカップリング反応は、アセトニトリル中の 5'-O-DMT-保護アミダイトの 0.1 M 溶液、および活性化剤としてのアセトニトリル中の DCI (4,5-ジシアノイミダゾール) 溶液 (0.25 M) を用いて行なった。該チオール化 (thiolation) は、塩化キサンタン (0.01 M アセトニトリル:ピリジン 10%) を用いることによって実施する。該試薬の残りは、典型的にオリゴヌクレオチド合成のために使用するものである。

RP-HPLC による精製:

カラム: XTerra、RP18、5 μm、7.8 × 50 mm カラム。

溶出液: 溶出液 A: 0.1 M NH₄OAc、pH: 10。

溶出液 B: アセトニトリル。

流速: 5 mL/分。

【表 1】

勾配:

時間 (分)	溶出液A	溶出液B
0,05分	95%	5%
5分	95%	5%
12分	65%	35%
16分	0%	100%
19分	0%	100%
21分	100%	0%

【0160】

(IE-HPLC による分析)

カラム: Dionex、DNAPac PA-100、2 × 250 mm カラム。

溶出液: 溶出液 A: 20 mM トリス-HCl、pH 7.6; 1 mM EDTA: 10

mM NaClO₄。

溶出液B：20mM トリス-HCl、pH7.6；1mM EDTA；1M NaClO₄。

流速：0.25mL/分。

【表2】

勾配：

時間(分)	溶出液A	溶出液B
1分	95%	5%
10分	65%	35%
11分	0%	100%
15分	0%	100%
16分	95%	5%
21分	95%	5%

10

【0161】

略語

DMT：ジメトキシトリチル；

DCI：4,5-ジシアノイミダゾール；

DMAp：4-ジメチルアミノピリジン；

DCM：ジクロロメタン；

DMF：ジメチルホルムアミド；

THF：テトラヒドロフラン；

DEA：N,N-ジイソプロピルエチルアミン；

PyBOP：ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリス-ピロリジノーホスホニウム・ヘキサフルオロホスフェート；

Bz：ベンゾイル；

Ibu：イソブチリル。

20

30

【0162】

(実施例3：オリゴマー化合物の設計の試験)

我々の関心は、H₂ラースを標的とするオリゴヌクレオチドについての最善のデザインを選択する重要性を証明するために、異なるデザインを有するオリゴヌクレオチドのアンチセンス活性を評価することであった。この目的のために、我々は、アンチセンスオリゴヌクレオチドによる下方改変後に、ホタル（北アメリカホタル(Photinus pyralis)）ルシフェラーゼの活性を測定することによって、多数の異なるオリゴヌクレオチドデザインをスクリーニングすることができるインビトロアッセイを設定した。図1は、本明細書中に記載するデザインのイラストを含む。

40

【0163】

第1のスクリーンにおいて、β-D-オキシ-LNAを含有するデザイン（これは、mRNA内の同じモチーフを全て標的とする）を評価した。異なるギャップサイズを有するギャップマー(gapmer)、異なるロード量のホスホロチオエートヌクレオシド間連結、および異なるロード量のLNAから構成されるデザインを試験した。異なるロード量のβ-D-オキシ-LNA、異なるロード量のホスホロチオエートヌクレオシド間連結、および異なるロード量のDNAを有するヘッドマー(headmer)およびテイルマー(tailmer)を製造した。様々な組成物のミックスマー(mixmer)（これは、β-D-オキシ-LNA、α-L-LNAおよびDNAの別の数の単位を有することを意味する）をまた、インビトロアッセイにおいて分析した。その上、異なるデザインのLNA誘導体をも含み、そしてそれらの

50

アンチセンス活性を評価した。良好なデザインの重要性は、ルシフェラーゼアッセイにおいて得ることができるデータによって影響を受ける。該ルシフェラーゼ発現レベルは%単位で測定し、そしてこのものは β -D-デオキシ-LNAおよびLNA誘導体を含む異なるデザインのアンチセンス活性の指標を与える。我々は、いくつかのデザインが強力なアンチセンスオリゴヌクレオチドであり、一方で他の物が中位から低い下方改変レベルを示すことを容易に知ることができる。従って、良好なアンチセンス活性および最適なデザインのオリゴヌクレオチドの間の密な相関は、非常に明白である。我々は、様々なデザインを用いて下方改変の良好なレベルを認めた。7~10 ntのDNAおよび骨格全般にわたるチオール化を有したまたは該フランクにおけるギャップおよびPOにおける排他的なチオール化を有するギャップマーは、良好な結果を示した。これらのデザインは、 β -D-デオキシ-LNAまたはLNA誘導体を含む。ホスホロチオエートヌクレオシド間連結が全骨格全般にわたるかまたはDNA-セグメント中にのみ存在する場合には、6 ntおよび8 ntの β -D-デオキシ-LNAのヘッドマーはまた、良好なレベルの下方改変をも示した。異なるミックスマーは、ルシフェラーゼアッセイにおいて良好なアンチセンス活性を示した。各々 α -L-デオキシ-LNA、 β -D-デオキシ-LNAまたはDNA組成物の別の数の単位は、ミックスマーを定義する(図1を参照)。ミックスマー3-9-3-1(これは、3'末端にデオキシヌクレシド残基を有する)は、有意なレベルの下方改変を示した。ミックスマー4-1-1-5-1-1-3の場合に、我々は、ギャップを中断する2個の α -L-デオキシ-LNA残基(フランク β -D-デオキシ-LNAである)を置いた。その上、我々は、2個の α -L-デオキシ-LNA残基でギャップを中断し、そして両方のフランクを α -L-デオキシ-LNAで置換した。両方のデザインは、有意なレベルの下方改変を示した。 α -L-デオキシ-LNAの存在は、デオキシヌクレオチド残基中にスパイクすることによってノース-ロックフランク(デオキシ-LNA)および α -L-デオキシ-LNA残基の間にフレキシブルなトランジション(transition)を導入し得る。 α -L-デオキシ-LNA残基がDNAストレッチを中断するデザイン4-3-1-3-5を研究することにも関心が持たれる。該ギャップ内の α -L-デオキシ-LNAに加えて、我々はまた、該フランクの端での2個のデオキシ-LNA残基を2個の α -L-デオキシ-LNA残基で置換した。ギャップ中のDNAのストレッチを中断するたった1個の β -D-デオキシ-LNA残基の存在により(デザイン4-3-1-3-5)、下方改変の劇的な低下を生じる。単に代わりに α -L-デオキシ-LNAを用いることによって、該デザインは、50 nMのオリゴヌクレオチド濃度で有意な下方改変を示す。ジャンクション中の α -L-デオキシ-LNAおよびギャップの中間での1個の α -L-デオキシ-LNAの設置はまた、下方改変を示した。

【0164】

α -L-デオキシ-LNAは、異なるミックスマーの構築を可能とする強力なツールであることを示し、このものは、高レベルのアンチセンス活性を示すことが可能である。他のミックスマー(例えば、4-1-5-1-5および3-3-3-3-3-1)をも示すことができる。我々は、いくつかのデザインが強力なアンチセンスオリゴヌクレオチドであって、一方で他の物は中位から低い下方改変レベルを示すことを容易に知ることができる。従って、再び、良好なアンチセンス活性およびオリゴヌクレオチドの最適なデザインの間の密な相関は非常に明白である。他の好ましいデザインは、DNA残基が該ギャップの各片側で3- β -D-デオキシ-LNAモノマーを有するフランク中に位置する、(1-3-8-3-1)である。更に好ましいデザインは、D-デオキシ-LNAフランクおよび3'末端にDNAを持つ9ギャップを有する、(4-9-3-1)である。

【0165】

(アッセイ)

X1/5ヒールセルライン(ECACC Ref. 番号: 95051229)(これは、「tet-off」ルシフェラーゼシステムを用いて安定にトランスフェクトされる)を使用した。テトラサイクリンの非存在下で、該ルシフェラーゼ遺伝子は恒常的に発現する。該発現は、該ルシフェラーゼ基質、ルシフェリンを加えた時の、ルミノメーター中での光として測定す

ることができる。該 X 1 / 5 ヒーラセルラインは、最小必須培地イーグル (Sigma M2279) (これは、1 × 非必須アミノ酸 (シグマ M7145)、1 × グルタマックス I (インビトロゲン 35050-38)、10 % FBS ウシ血清、25 μg / mL ゲンタマイシン (シグマ G1397)、500 μg / mL の G 4 1 8 (インビトロゲン 10131-027) および 300 μg / mL のハイグロマイシン B (インビトロゲン 10687-010) を用いて補足する) 中で増殖した。該 X 1 / 5 ヒーラ細胞は、トランスフェクトの前日に、白色 96 ウェルプレート (Nunc 136101) 中にウェル当たりの密度が 8000 細胞で播種した。トランスフェクト前に、該細胞をオプチ MEM (インビトロゲン社製) を用いて 1 回洗浄し、続いて 40 μL のオプチ MEM を 2 μg / mL のリポフェタミン 2000 (インビトロゲン社製) (2 μg / mL) と一緒に加えた。該細胞を 7 分間インキュベートし、その後に、該オリゴヌクレオチドを加えた。オリゴヌクレオチド溶液 (10 μL) を加え、そして該細胞を 37 °C で 5 % CO₂ 下、4 時間インキュベートした。4 時間インキュベートした後に、該細胞をオプチ MEM 中で 1 回洗浄し、そして増殖培地 (100 μL) を加えた。該ルシフェラーゼ発現は、翌日に測定した。ルシフェラーゼ発現は、定常 (steady) - G l o ルシフェラーゼアッセイシステム (Promega 社製) を用いて測定した。該定常 - G l o 試薬 (100 μL) を各ウェルに加え、そして該プレートを 700 rpm で 30 秒間振り混ぜた。インキュベートの 8 分後に、該プレートをルミノスキャン・アセント装置 (Luminoskan Ascent instrument) (ThermoLabsystems 社製) 中で読み取って、該細胞の全溶解を完結させた。該ルシフェラーゼ発現は、1 秒当たりの相対的な光単位 (Relative Light Units) (RLU / s) として測定する。該データはアセントソフトウェア (Ascent software) (v 2. 6) 中で加工処理し、そしてグラフをシグマ Plot 2001 で描いた。

10

20

【0166】

(実施例 4 : インビトロモデル : 細胞培養)

アンチセンス化合物が標的核酸に及ぼす影響は、該標的核酸が測定可能なレベルで存在するとの条件で、様々な細胞タイプのいずれかで試験することができる。標的は、内因的にまたは該核酸をコードする核酸の一時的なもしくは安定なトランスフェクトによって、発現することができる。標的核酸の発現レベルは、例えばノーザンブロット分析、リアルタイム PCR、リボヌクレアーゼ保護アッセイを用いて、ルーチンに測定することができる。以下の細胞タイプを例示目的で提示するが、該標的が選ばれた細胞タイプ中で発現するとの条件で、他の細胞タイプをルーチンに使用することができる。

30

【0167】

細胞を、以下に記載する通り適当な培地中で培養し、そしてこのものを 37 °C で 95 ~ 98 % 湿度および 5 % CO₂ で維持した。細胞を、週に 2 ~ 3 回ルーチンに継代させた。

【0168】

15PC3 : ヒト前立腺癌セルライン 15PC3 は、Dr. F. Baas, Neurozintuigen Laboratory, AMC, The Netherlands によって親切に寄付され、そしてこのものを DMEM (シグマ製) + 10 % 胎仔ウシ血清 (FBS) + グルタマックス (Glutamax) I + ゲンタマイシン中で培養した。

A549 : ヒト非小細胞肺癌セルライン A549 は、ATCC, Manassas から購入し、そしてこのものを DMEM (シグマ社製) + 10 % FBS + グルタマックス I + ゲンタマイシン中で培養した。

40

MDF7 : ヒト乳癌セルライン MDF7 は、ATCC から購入し、そしてこのものをイーグル MEM (シグマ社製) + 10 % FBS + グルタマックス I + ゲンタマイシン中で培養した。

SW480 : ヒト大腸癌セルライン SW480 は、ATCC から購入し、そしてこのものを L-15 Leibovitz (シグマ社製) + 10 % FBS + グルタマックス I + ゲンタマイシン中で培養した。

SW620 : ヒト大腸癌セルライン SW620 は、ATCC から購入し、そしてこのものを L-15 Leibovitz (シグマ社製) + 10 % FBS + グルタマックス I + ゲンタマイシン中で培養した。

50

H T 2 9 : ヒト前立腺癌セルラインH T 2 9 は、ATCCから購入し、そしてこのものをMcCoy's 5a MM (シグマ社製) + 1 0 % F B S + グルタマックス I + ゲンタマイシン中で培養した。

N C I H 2 3 : ヒト非細胞肺癌セルラインはATCCから購入し、そしてこのものをグルタマックス I (ギブコ社製) + 1 0 % F B S + H E P E S + ゲンタマイシンを有するR P M I 1 6 4 0 中で培養した。

H C T - 1 1 6 : ヒト大腸癌セルラインH C T - 1 1 6 は、ATCCから購入し、そしてこのものをMcCoy's 5a MM + 1 0 % F B S + グルタマックス I + ゲンタマイシン中で培養した。

M D A - M B - 2 3 1 : ヒト乳癌セルラインM D A - M B - 2 3 1 は、ATCCから購入し、そしてこのものをL - 1 5 Leibovitz + 1 0 % F B S + グルタマックス I + ゲンタマイシン中で培養した。 10

M D A - M B - 4 3 5 s : ヒト乳癌セルラインM D A - M B - 4 3 5 s は、ATCCから購入し、そしてこのものをL - 1 5 Leibovitz + 1 0 % F B S + グルタマックス I + ゲンタマイシン中で培養した。

D M S 2 7 3 : ヒト小細胞肺癌セルラインD M S 2 7 3 は、ATCCから購入し、そしてこのものをグルタミン (ギブコ社製) + 1 0 % F B S + ゲンタマイシンを有するWaymouth中で培養した。

P C 3 : ヒト前立腺癌セルラインP C 3 は、ATCCから購入し、そしてこのものをグルタミン (ギブコ社製) + 1 0 % F B S + ゲンタマイシンを有するF12 Coon's中で培養した。 20

U 3 7 3 : ヒト膠芽腫星細胞腫セルラインU 3 7 3 は、ECACCから購入し、そしてこのものをE M E M + 1 0 % F B S + グルタマックス + N E A A + ピルビン酸ナトリウム (sodium pyruvate) + ゲンタマイシン中で培養した。

【0169】

H U V E C - C ヒト臍帯静脈内皮細胞を、ATCCから購入し、そしてこのものを製造主の指示に従って増殖させた。

H M V E C - d (D M V E C の真皮ヒト微小血管内皮細胞) をCloneticsから購入し、そしてこのものを製造主によって記載される通りに培養した。

H M V E C ヒト微小血管内皮細胞は、Clonetics社から購入し、そしてこのものを製造主によって述べられている通りに培養した。 30

ヒトの胎仔の肺線維芽細胞はATCCから購入し、そしてこのものを製造主によって記載されている通りに培養した。

H M E C - 1 ヒト乳房上皮細胞を、Clonetics社から購入し、そしてこのものを商業主によって推奨されている通りに保った。

【0170】

(実施例5: インビトロモデル: アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いる処置)

該細胞を、トランスフェクションベヒクルとしてカチオン性リポソーム製剤LipofectAMINE 2000 (ギブコ社製) を用いて、オリゴヌクレオチドで処置した。細胞を12-ウェル細胞培養プレート (N U N C) 中に播種し、そして80~90%集密時に処置した。使用するオリゴ濃度は、125 nM ~ 0.2 nM の最終濃度の範囲とする。オリゴ-脂質複合体の製剤化は、本質的にDeanらによる (Journal of Biological Chemistry 1994, 269, 16416-16424) 中に記載する通り、血清なしのオプチMEM (ギブコ社製) および最終脂質濃度が10 µg/mL のLipofectAMINE 2000を総量500 µLで用いて実施した。細胞を37℃で4時間インキュベートし、そして処置を、オリゴ含有培地の除去によって終止させた。細胞を洗浄し、そして血清含有培地を加えた。オリゴ処置後に、細胞を18時間回収し、その後それらをRNAまたはタンパク質の分析のために収集した。 40

【0171】

(実施例6: インビトロモデル: RNAおよびcDNA合成の抽出)

(全RNA単離)

全RNAを、RNeasyミニキット (Qiagen社カタログ番号74104) またはトリゾー 50

ル試薬 (Life technologies社カタログ番号15596) のいずれかを用いて単離した。セルラインからのRNA単離の場合には、RNeasyは好ましい方法であり、組織試料の場合には、トリゾールは好ましい方法である。全RNAは、Qiagen RNA OPF Robot - BIO Robot 3000を用いて、製造主によって提示されるプロトコルに従って、セルラインから単離した。組織試料をUltra Turrax T8ホモジナイザー (IKA Analysen technik社製) を用いてホモジナイズし、そして全RNAを製造主によって提示されたトリゾール試薬プロトコルを用いて単離した。

【0172】

(一本鎖の製造)

一本鎖合成は、OmniScript逆転写酵素キット (カタログ番号205113, Qiagen社製) を用いて、製造主の指示に従って実施した。各試料0.5 µgについて、全RNAを、RNaseフリーH₂Oを用いて各12 µLにまで改変し、そして2 µLのポリ(dT)₁₂₋₁₈ (2.5 µg/mL) (Life Technologies社製, GibcoBRL, Roskilde, DK)、2 µLのdNTPミックス (各dNTP 5 mM)、2 µLの10×緩衝液RT、1 µLのRNaguard (登録商標) Rnase INHIBITOR (33.3 U/mL) (カタログ番号27-0816-01, Amersham Pharmacia Biotech社製, Horsholm, DK) および1 µLのOmniScript逆転写酵素 (4 U/µL) と一緒に混合し、続いて37°Cで60分間インキュベートし、そして酵素の熱失活を93°Cで5分間行なった。

【0173】

(実施例7: インビトロモデル: リアルタイムPCRによるH₂ラズ発現のオリゴヌクレオチド抑制の分析)

H₂ラズ発現のアンチセンス改変は、当該分野において知られる様々な方法でアッセイすることができる。例えば、H₂ラズmRNAレベルは、例えばノーザンブロット分析、競合的ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) またはリアルタイムPCRによって定量化することができる。リアルタイム定量的PCRが現在好ましい。RNA分析は、全細胞RNAまたはmRNAを用いて実施することができる。

【0174】

RNA単離およびRNA分析の方法 (例えば、ノーザンブロット分析) は当該分野においてルーチンであり、そしてこれは、例えばCurrent Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons中で教示されている。

【0175】

リアルタイム定量 (PCR) は、商業的に入手可能なiQマルチカラー (Multi-Color) リアルタイムPCR検出システム (BioRAD社から入手可能) を用いて容易に達成することができる。

【0176】

(H₂ラズmRNAのレベルのリアルタイム定量的PCR分析)

mRNAレベルの定量は、製造主の指示に従ってiQマルチカラーリアルタイムPCR検出システム (BioRAD社製) を用いてリアルタイム定量的PCRによって測定した。

リアルタイム定量的PCRは、当該分野においてよく知られる方法であり、そしてこのものは例えば、Heidらによる, Real time quantitative PCR, Genome Research (1996), 6: 986-994中に教示されている。

【0177】

プラチナ定量的PCRSuperMix UDG 2×PCRマスター(master)ミックスは、インビトロゲン社カタログ番号11730から得た。プライマーおよびTaqMan (登録商標) プローブを、MWG-Biotect AG, Ebersberg (独国) から得た。

【0178】

ヒトH₂ラズに対するプローブおよびプライマーは、公知の配列情報 (ジェーンバンク寄託番号J00277、これは配列番号1として本明細書の一部を構成する) を用いて、ヒトH₂ラズ配列にハイブリダイズするように設計した。

【0179】

ヒトH aーラスの場合、P C Rプライマーは以下の通りである。forwardプライマー：5'gccggatgcaggaaggag 3'（アッセイにおける最終濃度：0.3 μM reverseプライマー：5'gtccagcagcccttcctt 3'（アッセイにおける最終濃度：0.3 μM）（配列番号81）であり、そしてP C Rプローブは5'FAM-cgtccttccttccttccttccttccttcgtctg -TAMRA 3'（アッセイにおける最終濃度：0.1 μM）である。

【0180】

グリセルアルデヒド-3-ホスフェートのデヒドロゲナーゼ（G A P D H）m R N A 定量は、試料調製におけるいずれかの分散を正規化するための内因コントロールとして使用した。

【0181】

ヒトG A P D H m R N A の試料含有量を、ヒトGAPDH ABI Prism Pre-Developed TaqManアッセイ試薬（Applied Biosystems社カタログ番号4310884E）を用いて、製造主の指示に従って定量化した。

【0182】

マウスG A P D H m R N A の定量化の場合には、以下のプライマーおよびプローブを設計した。センス(Sense)プライマー5'aaggctgtgggcaagggtcatc 3'（最終濃度：0.3 μM）、アンチセンスプライマー5'gtcagatccacgacggacacatt（最終濃度：0.6 μM）、TaqManプローブ5'FAM-gaagctcactggcatggcatggccttcctgttcc-TAMRA 3'（最終濃度：0.2 μM）。

【0183】

（リアルタイムP C R）

実施例8に記載する通りに実施した一本鎖合成からのc D N Aを2～20倍に希釈し、そしてこのものをリアルタイム定量的PCRによって分析した。該プライマーおよびプローブを、2×プラチナ定量(Platinum Quantitative) SuperMix UDG（カタログ番号11730, インビトロゲン社製）と一緒に混合し、そしてこのものを3.3 μLのc D N Aに加えて最終容量を25 μLとした。各試料を3回分析した。2倍希釈のc D N A（このものは、関心あるR N Aを発現するセルラインから精製する物質について調製する）は、アッセイのための標準曲線を与えた。滅菌H₂Oを、非テンプレートコントロールのために、c D N Aの代わりに使用した。P C Rプログラム：50℃で2分間、95℃で10分間；続いて、95℃で15秒間、60℃で1分間を40サイクル。標的m R N A配列の相対量は、iCycler iQリアルタイム検出システムソフトウェアを用いて、算出された閾値サイクルから測定した。

【0184】

（実施例8：インビトロ分析：H aーラスm R N Aレベルのノーザンブロット分析）

ノーザンブロット分析は、本質的にCurrent Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sonsに記載されている通り当該分野においてよく知られる方法によって実施した。該ハイブリダイズプローブは、実施例8に記載する逆転写酵素P C Rによって得られる15 P C 3 c D N A由来の381bpフラグメントのP C R増幅によって得た。該反応は、各々0.5 μM 最終濃度で、プライマー5'aatctcggcaggctcaggac 3'（forward）および5'gggatgttcaagacagtctgtgc 3'（reverse）、200 nM 各d N T P、1.5 mM M g C l₂ およびプラチナ(Platinum)Taq DNAポリメラーゼ（インビトロゲンカタログ番号10966-018）を用いて実施した。該D N Aを、パーキンエルマー9700サーモサイクラー(thermocycler)で、以下のプログラムを用いて40サイクルで増幅した。94℃で2分間；次いで、94℃で30秒間そして72℃で30秒間を40サイクル（サイクル毎に0.5℃低下）、続いて72℃で7分間。

【0185】

増幅P C R産物を、S-400 MicroSpinカラム（Amersham Pharmacia Biotech社カタログ番号27-5140-01）を用いて製造主の指示に従って精製し、そして分光光度法によって定量化した。

【0186】

該ハイブリダイズプローブを、Redivue（登録商標） $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ 3000 Ci/mmol（Amersham Pharmacia Biotech社カタログ番号AA 0005）およびプライム(Prime)-It RmT標識キット（ストラタジーンカタログ番号300392）を用いて、製造主の指示に従って標識化し、そして放射性標識プローブを、S-300 MicroSpinカラム（Amersham Pharmacia Biotech社カタログ番号27-5130-01）を用いて精製した。使用前に、該プローブを96℃で変性し、そして直ぐに氷上に置いた。

【0187】

実施例7中に記載する通りに精製した全RNAの試料（1～5 μg）を変性し、そして2.2Mホルムアルデヒド/MOPSAガロースゲルを用いてサイズ分離した。RNAを、ターボブロッター(TurboBlotter)（Schleicher & Schuell）を用いる下向き(downward)キャピラリートランスファーによって正に荷電したナイロン膜に移し、そして該RNAを、ストラタジーンクロスリンカー(crosslinker)を用いるUV架橋によって膜に固定化した。該膜を、ExpressHybハイブリダイズ溶液（Clontech社カタログ番号8015-1）中、60℃で予めハイブリダイズし、そして該プローブをハイブリダイズのために引き続いて加えた。ハイブリダイスは60℃で行ない、そして該ブロットを低いストリンジェントな洗浄用緩衝液（2×SSC、0.1%SDS）を用いて室温で、および高ストリンジェントな洗浄用緩衝液（0.1×SSC、0.1%SDS）を用いて50℃で洗浄した。該ブロットをコダック保存用蛍光体(phosphor)スクリーンに曝露し、そしてこのものをBioRAD F X分子画像処理物質(imager)中でスキャンした。HアラスmRNAレベルは、クオリティーワンソフトウェア(Quantity One software)（BioRAD社製）によって定量化した。

【0188】

等量のRNA試料ロード量は、該ブロットを0.5%SDS/H₂O中、85℃でストリップし、そして本質的に上記の通り標識GAPDH（グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ）プローブを用いてプライマー5'-aac gga ttt ggt cgt att 3'（forward）および5'-taa gca gtt ggt ggt gca 3'（reverse）を用いてリプローブ(reprobing)することによって評価した。

【0189】

（実施例9：インビトロアッセイ：Hアラスタンパク質レベルのウェスタンブロット分析）

Hアラスのタンパク質レベルを、当該分野においてよく知られる様々な方法（例えば、免疫沈降法、ウェスタンブロット分析（イムノブロット）、ELISA、RIA（ラジオイムノアッセイ）、または蛍光標示式細胞分取器(FACS)）中で定量することができる。Hアラスに対する抗体は、様々な供給源（例えば、Upstate Biotechnologies社（Lake Placid, USA）、Novus Biologicals社（Littleton, Colorado）、Santa Cruz Biotechnology社（Santa Cruz, California））から同定しそして得ることができ、あるいは通常の抗体産生方法によって製造することができる。

【0190】

（ウェスタンブロット）

Hアラスに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いる処置の影響を測定するために、処置および非処置の細胞中でのHアラスのタンパク質レベルを、ウェスタンブロットを用いて測定した。実施例5に記載するオリゴヌクレオチドを用いた処置後に、細胞を氷溶解緩衝液（50mM トリス、pH 6.8、10mM NaF、10%グリセロール、2.5%SDS、0.1mM オルトバナジウム酸(orthovanadate)ナトリウム、10mM β-グリセロールホスフェート、10mM ジチオトレイトール(DTT)、完全(Complete)タンパク質インヒビターカクテル（Boehringer Mannheim社製））中で収集した。更に使用するまで、該溶解液を-80℃で保存した。該タンパク質溶解液のタンパク質濃度を、製造主によって記載される通り、BCAタンパク質アッセイキット（Pierce社製）を用いて測定した。

【0191】

（SDSゲル電気泳動）

上記の通りに調製したタンパク質試料を氷上で解凍し、そしてこのものを96℃で3分間変性した。試料を、1.0mmの4～20%NuPageトリスーグリシングル（イントロゲン社製）上にロードし、そしてゲルをXcell IIミニ細胞電気泳動モジュール（インビトロゲン社製）内のTGSランニングバッファー（BioRAD社製）中で操作した。

【0192】

（セミドライブロットティング）

電気泳動後に、分離したタンパク質を、セミドライブロットティングによってポリビニリドジフルオリド（PVDF）に移した。該ブロット方法を、セミードライトランスファーセル（CBS Scientific Co.社製）中で製造主の指示に従って実施した。膜をアミドブラック（amido black）を用いて染色して、移動したタンパク質を視覚化し、そしてこのものを更に使用するまで4℃で保存した。 10

【0193】

（免疫検出）

所望するタンパク質を検出するために、該膜を、該タンパク質に対するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれかと一緒にインキュベートした。

該膜を、ブロック用緩衝液（PBST-緩衝液（PBS+0.1%ツウィーン-20）中に溶解した5%脱脂乳粉末）中でブロックし、PBST-緩衝液中で簡単に洗浄し、そして室温でブロック緩衝液中、1次抗体と一緒にインキュベートした。以下の1次抗体および2次抗体、並びに濃度／希釈を使用した。

ポリクローナルウサギ抗-ヒトH-ラス抗体（カタログ番号sc-520, Santa Cruz社製） 20
1:200;

モノクローナル抗体マウス抗-ヒトチューブリンAb-4（カタログ番号MS-719-P1, NeoMarkers社製）1:500;

ペルオキシダーゼ-接合ブタ(Swine)抗-ウサギ免疫グロブリン（コード番号P0399, DAKO社製）1:300;

ペルオキシダーゼ-接合ヤギ抗-ウサギ免疫グロブリン（コード番号P0447, DAKO社製）1:1000。

【0194】

1次抗体と一緒にインキュベートした後に、該膜をPBS中で簡単に洗浄し、続いて室温で攪拌しながら、PBST中で3回の更なる10分間の洗浄を行ない、そしてブロック用緩衝液中、室温でペルオキシダーゼ接合2次抗体と一緒にインキュベートした。次いで、該膜をPBS中で洗浄し、続いて室温で攪拌しながらPBST中で3回の更なる10分間の洗浄を行なった。最後の洗浄後に、該膜をECL⁺プラス試薬（Amersham社製）と一緒にインキュベートし、そして化学ルミネッセンスをVersaDoc化学ルミネッセンス検出システム（BioRAD社製）またはX-omatフィルム（コダック社製）を用いて検出した。該膜を、96℃で1分間インキュベートすることによって、ddH₂O中でストリップした。ストリップ後に、該膜をPBS中に置き、そしてこのものを4℃で保存した。 30

【0195】

（実施例10：インビトロ分析：オリゴマー化合物によるヒトH-ラス発現のアンチセンス抑制） 40

本発明によれば、一群のオリゴヌクレオチドを、公知の配列（ジェーンバンク寄託番号J00277、これは配列番号1、図7として本明細書中の一部を構成する）を用いて、ヒトH-ラスRNAの異なる領域を標的とするように設計した。長さが16ヌクレオチドを有するオリゴマー化合物を、配列番号、数ならびに具体的なデザインA、BおよびCを有する表1中に示す。該化合物のいくつかはまた、内部「CUR」番号を有する。「標的部位」は、オリゴヌクレオチドが結合した特定の標的配列上の第1ヌクレオチド数を示す。表2は、4つの化合物についての低いIC₅₀を示す。

【0196】

表1：本発明のオリゴマー化合物

オリゴマー化合物は、15PC3細胞中でH-ラスmRNAをノックダウンするそれ 50

らの能力について評価した。該データは、偽(mock)トランスフェクト細胞に対する相対的な下方調節パーセントとして示す。転写定常状態(Transcript steady state)は、リアルタイムPCRによって追跡し、そしてこのものをGAPDH転写定常状態に正規化した。全LNA Cは5'-メチルシトシンであることに注意する。

【表3】

配列番号	標的 部位	オリゴマー化合物 配列 5' -3'	内部番号 & ID番号 + デザイン 番号	オリゴマー化合物の具体的な デザイン 大文字ボールド β-D-オキシ-LNA S= ホスホチオエート O= -O-P(0) ₂ -O- 小文字 DNA 糖	25 mM オリゴマーでの 抑制%
2	1742 (260 K- ラス)	ATTCGTCCACAAAATG	CUR2709 2A	A _S T _S T _S C _S g _S t _S c _S c _S a _S c _S a _S a _S A _S A _S T _S G	29
			2B	A _S T _S T _S C _S g _S t _S c _S c _S a _S c _S a _S a _S A _S A _S T _S g	
			2C	A ₀ T ₀ T ₀ C ₀ g _S t _S c _S c _S a _S c _S a _S a _S A ₀ A ₀ T ₀ G	
3	1733 (323 N- ラス)	CAAAATGGTTCTGGAT	CUR2710 3A	C _S A _S A _S A _S a _S t _S g _S g _S t _S t _S c _S t _S G _S G _S A _S T	60
			3B	C _S A _S A _S A _S a _S t _S g _S g _S t _S t _S c _S t _S G _S G _S A _S t	
			3C	C ₀ A ₀ A ₀ A ₀ a _S t _S g _S g _S t _S t _S c _S t _S G ₀ G ₀ A ₀ T	
4	1745 (263 K- ラス)	CGTATTCGTCCACAAA	CUR2711 4A	C _S G _S T _S A _S t _S t _S c _S g _S t _S c _S c _S a _S C _S A _S A _S A	67
			4B	C _S G _S T _S A _S t _S t _S c _S g _S t _S c _S c _S a _S C _S A _S A _S a	
			4C	C ₀ G ₀ T ₀ A ₀ t _S t _S c _S g _S t _S c _S c _S a _S C ₀ A ₀ A ₀ A	
5	2158	CACACACAGGAAGCCC	CUR2712 5A	C _S A _S C _S A _S c _S a _S c _S a _S g _S g _S a _S G _S C _S C _S C	62
			5B	C _S A _S C _S A _S c _S a _S c _S a _S g _S g _S a _S G _S C _S C _S c	
			5C	C ₀ A ₀ C ₀ A ₀ c _S a _S c _S a _S g _S g _S a _S G ₀ C ₀ C ₀ C	
6	3701	CCCATCTGTGCCCCGAC	CUR2713 6A	C _S C _S C _S A _S t _S c _S t _S g _S t _S g _S c _S c _S C _S G _S A _S C	90
			6B	C _S C _S C _S A _S t _S c _S t _S g _S t _S g _S c _S c _S C _S G _S A _S v	
			6C	C ₀ C ₀ C ₀ A ₀ t _S c _S t _S g _S t _S g _S c _S c _S C ₀ G ₀ A ₀ C	
7	2168 (491 N- ラス)	TGATGGCAAACACACA	CUR2714 7A	T _S G _S A _S T _S g _S g _S c _S a _S a _S c _S a _S C _S A _S C _S A	63

10

20

30

40

50

【表 4】

			7B	$T_s G_s A_s T_s g_s g_s c_s a_s a_s c_s a_s C_s A_s C_s a$	
			7C	$T_0 G_0 A_0 T_0 g_s g_s c_s a_s a_s c_s a_s C_0 A_0 C_0 A$	
8	2182	AGACTTGGTGTGTTG	CUR2715 8A	$A_s G_s A_s C_s t_s t_s g_s g_s t_s g_s t_s t_s G_s T_s T_s G$	57
			8B	$A_s G_s A_s C_s t_s t_s g_s g_s t_s g_s t_s t_s G_s T_s T_s g$	
			8C	$A_0 G_0 A_0 C_0 t_s t_s g_s g_s t_s g_s t_s t_s G_0 T_0 T_0 G$	
9	2383	GTCCCTCACCCTTTG	CUR2714 9A	$G_s T_s C_s C_s t_s t_s c_s a_s c_s c_s c_s T_s T_s T_s G$	67
			9B	$G_s T_s C_s C_s t_s t_s c_s a_s c_s c_s c_s T_s T_s T_s G$	
			9C	$G_0 T_0 C_0 C_0 t_s t_s c_s a_s c_s c_s c_s T_0 T_0 T_0 G$	
10	2393	CGTCATCCGAGTCCTT	CUR2717 10A	$C_s G_s T_s C_s a_s t_s c_s c_s g_s a_s g_s t_s C_s C_s T_s T$	66
			10B	$C_s G_s T_s C_s a_s t_s c_s c_s g_s a_s g_s t_s C_s C_s T_s t$	
			10C	$C_0 G_0 T_0 C_0 a_s t_s c_s c_s g_s a_s g_s t_s C_0 C_0 T_0 T$	
11	2431	AGCCAGGTCACACTTG	CUR2718 11A	$A_s G_s C_s C_s a_s g_s g_s t_s c_s a_s c_s a_s C_s T_s T_s G$	49
			11B	$A_s G_s C_s C_s a_s g_s g_s t_s c_s a_s c_s a_s C_s T_s T_s g$	
			11C	$A_0 G_0 C_0 C_0 a_s g_s g_s t_s c_s a_s c_s a_s C_0 T_0 T_0 G$	
12	2453	GCCGAGATTCCACAGT	CUR2719 12A	$G_s C_s C_s G_s a_s g_s a_s t_s t_s c_s c_s a_s C_s A_s G_s T$	77
			12B	$G_s C_s C_s G_s a_s g_s a_s t_s t_s c_s c_s a_s C_s A_s G_s t$	
			12C	$G_0 C_0 C_0 G_0 a_s g_s a_s t_s t_s c_s c_s a_s C_0 A_0 G_0 T$	
13	3228 (629 K- ラス)	CATCCTCCACTCOCTG	CUR2720 13A	$C_s A_s T_s C_s c_s t_s c_s c_s a_s c_s t_s c_s C_s C_s T_s G$	68
			13B	$C_s A_s T_s C_s c_s t_s c_s c_s a_s c_s t_s c_s C_s C_s T_s G$	
			13C	$C_0 A_0 T_0 C_0 c_s t_s c_s c_s a_s c_s t_s c_s C_0 C_0 T_0 G$	
14	3253	ATCTACGCACCAACG	CUR2721 14A	$A_s T_s C_s T_s c_s a_s c_s g_s c_s a_s c_s c_s A_s A_s C_s G$	89
			14B	$A_s T_s C_s T_s c_s a_s c_s g_s c_s a_s c_s c_s A_s A_s C_s g$	
			14C	$A_0 T_0 C_0 T_0 c_s a_s c_s g_s c_s a_s c_s c_s A_0 A_0 C_0 G$	
15	3506	TCCTCCTTCCGTCTGC	CUR2722 15A	$T_s C_s C_s T_s c_s c_s t_s t_s c_s c_s g_s t_s C_s T_s G_s C$	99

10

20

30

40

【表 5】

			15B	$T_s C_s C_s T_s c_s c_s t_s t_s c_s c_s g_s t_s C_s T_s G_s c$	
			15C	$T_0 C_0 C_0 T_0 c_s c_s t_s t_s c_s c_s g_s t_s C_0 T_0 G_0 C$	
16	1610	GGTCTCCTGCCCCACC			
17	1626	CGGGGTCTCTACAG			
18	1642	TCAGGGGCCTGCGGCC			
19	1658	ATTCCGTCATCGCTCC			
20	1674	ACCACCACCAGCTTAT			
21	1690	CACACCGCCGGCGCCC			
22	1706	TCAGCGCACTCTTGCC			
23	1738	GTCCACAAATGGTTC			
24	1754	TAGTGGGGTCGTATTC			
25	2037	CGGTAGGAATCCTCTA			
26	2053	AATGACCACCTGCTTC			
27	2069	GGCAGCTCTCCCCATC			
28	2085	TCCAGGATGTCCAACA			
29	2101	CTCCTGGCCGGCGGTA			
30	2117	GCATGGCGCTGTACTC			
31	2133	CGCATGTACTGGTCCC			
32	2149	GAAGCCCTCCCCGGTG			
33	2165	TGGCAAACACACACAG			
34	2181	GACTTGGTGTTGTGA			
35	2197	GTGGATGTCTCAAAA			
36	2213	TCTGCTCCCTGTACTG			
	エキソ ン-エキ ソン				
37	2382	TCCTTCACCCGTTTGA			
38	2398	GGGCACGTCATCCGAG			
39	2414	TCCCCACCAGCACCAT			
40	2430	GCCAGGTCACACTTGT			
41	2446	TTCCACAGTGCGTGCA			
42	2462	CCTGAGCCTGCCGAGA			
43	2478	TAGCTTCGGGCGAGGT			
44	2494	GATGTAGGGGATGCCG			
45	2510	TCTTGGCCGAGGTCTC			
46	2526	TCCACTCCCTGCCGGG			

10

20

30

40

【表 6】

	エキソ ン-エキ ソン	
47	3239	CGTGTAGAAGGCATCC
48	3255	GGATCTCACGCACCAA
49	3271	CGCAGCTTGTGCTGCC
50	3287	AGGAGGGTTTCAGCTTC
51	3303	CGGGGCCACTCTCATC
52	3319	TTGCAGCTCATGCAGC
53	3335	TCAGGAGAGCACACAC
54	3459	CTGAGCTTGTGCTGCG
55	3475	CCGGCACCTCCATGTC
56	3491	CACCTCCTTCCTGCAT
57	3507	CTCCTCCTTCGGTCTG
58	3523	CTTCCGTCCTTCCTTC
59	3539	CTTCCTTCCTTCCTTG
60	3555	CTGGGCTCCAGCAGCC
61	3571	CACGGTCCCGGGGTGA
62	3587	TGCAGTCACCTCGGCC
63	3603	CCTCCCTGGGAGGGTC
64	3619	GACAGTCTGTGCACAG
65	3635	CATTTGGGATGTTCAA
66	3651	GCTGGGGTTCCGGTGG
67	3667	GGGAGGGGAGCTAAGG
68	3683	GGGCCCACAGAGGCCT
69	3699	CATCTGTGCCCCGACAA
70	3715	TAATTTACTGTGATCC
71	3731	TTTCAAGACCATCCAA
72	1722	TGGATCAGCTGGATGG
73	1690	CACACCGTCGGCGCCC
74	2101	CTCCAGGCCGGCGGTA

10

20

30

40

別の化合物を、表 3、4 および 5、並びに図 2 中に示す。

【0197】

表 2 : LNA (β-D-オキシ-LNA) 含有オリゴマー化合物の IC₅₀ (nM)

オリゴマー化合物を、15PC3細胞中でのH_a-ラスmRNAをノックダウンするこれらの能力について評価した。転写定常状態を、リアルタイムPCRによって追跡し、そしてこのものをGAPDH転写定常状態に正規化した。全LNA Cは5'-メチルシトシンであることに注意する。

【表 7】

内部番号 & 配列番号	15PC3におけるIC50
CUR2710 (3A)	<0.5
CUR2713 (6A)	<0.5
CUR2721 (14A)	<1
CUR2722 (15A)	<0.5
CUR2524 (76A)	<1

10

【0198】

表 2 中の非常に強力な分子と比較して、H aーラスを標的とする 20-mer ホスホロチオエート（これは、ISIS2503と呼ばれる）は IC50 が 45 nM であることが報告されている（Bennettらによる，(1996) Antisense therapeutics, Humana Press, Totowa, NJ, 13-17）。

【0199】

表 1 および 2 中に示すとおり、配列番号 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 および 77 は、これらの実験において 25 nM で H aーラス発現の少なくとも 30 % 抑制を示し、従ってこれらのものは好ましい。

20

【0200】

特に関心ある化合物は、3A、4A、5A、6A、7A、8A、9A、10A、11A、12A、13A、14A、15A および 76A である。

【0201】

（実施例 11：H aーラスを標的とする LNA アンチセンスオリゴマー化合物によるアポトーシス誘発）

BD（登録商標） サイトメトリックビーズアレイ (cytometric bead array) (CBA)（カタログ番号 557816）を用いるアポトーシスの測定

細胞を、上記の通り（実施例 5 を参照）、リポフェタミン 2000 を用いてトランスフェクトした。トランスフェクトの 24 時間後に、該上清由来の細胞をスピンドウンし、そして接着細胞をトリプシン処理し、そしてスピンドウンした。該細胞ペレットを PBS 中に再懸濁し／洗浄し、そしてカウントして細胞濃度を 2×10^6 細胞／プロテアーゼインヒビター含有溶解緩衝液の mL とした。該方法を、製造主によって記載されている通り、以下の改変で進めた。細胞を溶解した後に、それらを 40 分間溶解し、そして 10 分間隔で渦巻いた。 1×10^5 細胞を、カスパーゼ 3 ビーズと一緒にインキュベートし、簡単に混合し、そして室温で 1 時間インキュベートし、その後に、それらをフローサイトメトリーによって分析した。該データを BD（登録商標） CBA ソフトウェアを用いて分析し、エクセル（ここで、全データは偽に対する（1 つにセットする））に移した（図 6 の上方パネルを参照）。

30

40

【0202】

その上、H aーラスまたはそのミスマッチコントロールに対するオリゴを、インビトロカスパーゼ 3 アッセイ (CBA) 中で試験した（2 個の異なるデザイン（アルファール LNA 対 オキシール LNA；化合物 2776、2778、2742 および 2744）（表 5 を参照）。該マッチおよびミスマッチのオキシール LNA は、マッチアルファール LNA と同様な大きさで（偽と比較して）アポトーシスを誘発し、一方でミスマッチアルファール LNA オリゴは、アポトーシスを著しく誘発しなかった。ここで示すデータは、アンチセンス抑制による H aーラスの下方改変はアポトーシスを誘発することを明白に実証した（カスパーゼ 3）（図 6 の下方パネルを参照）。

【0203】

50

(実施例 12 : 増殖性癌細胞における H a - ラスのアンチセンスオリゴヌクレオチド抑制)

細胞は、トランスフェクトの前日に D M E M 内の白色 9 6 ウェルプレート (Nunc 13610 1) 中で密度がウェル当たり 1 2 0 0 0 細胞にまで播種した。翌日に、細胞を予め温めた オブチ M E M 中で 1 回洗浄し、続いて更に 5 μ g / m L のリポフェクタミン 2000 (インビトロゲン社製) を含有する 7 2 μ L のオブチ M E M を加えた。細胞を 7 分間インキュベートし、その後に、オブチ M E M 中に希釈した 1 8 μ L のオリゴヌクレオチドを加えた。最終的なオリゴヌクレオチド濃度は、5 n M ~ 1 0 0 n M の範囲であった。処置の 4 時間後に、細胞をオブチ M E M 中で洗浄し、そして D M E M を含有する 1 0 0 μ L の血清を加えた。オリゴ処置の後に、細胞を示唆期間の間回収し、生存可能な細胞を 2 0 μ L のテトラゾリウム化合物 [3 - (4 , 5 - ジメチル - 2 - イル) - 5 - (3 - カルボキシメトキシフェニル) - 2 - (4 - スルホフェニル) - 2 H - テトラゾリウム内部塩 ; M T S] およびエレクトロンカップリング試薬 (フェナジンエトスルフェート ; P E S) (CellTiter 96 ^(登録商標) A Q _{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay, Promega 社製) を加えることによって測定した。生存可能な細胞をパワーウェーブ (Powerwave) (Biotek Instruments 社製) 中、4 9 0 n m で測定した。増殖速度 (Δ O D / 時間) を、オリゴ濃度に対してプロットした。

【 0 2 0 4 】

(実施例 13 : H a - ラスを標的とするオリゴマー化合物を用いる処置後の、細胞の倍数関係 (Ploidy) (細胞周期) および D N A 分解 (アポトーシス) の測定)

アポトーシスカスケードにおける後期の段階は、多数の小さい D N A フラグメントを生じ、このものは細胞のヨウ化プロピジウム染色によって分析することができ、更にヨウ化プロピジウム染色を用いて、処置細胞中での倍数関係を評価することができる。H a - ラスに対するオリゴマー化合物を用いて処置した細胞の倍数関係 / アポトーシスを評価するために、細胞を P B A 中で洗浄し、そしてこのものを 7 0 % E t O H 中、4 $^{\circ}$ C で 1 時間固定化した。5 0 μ g / m L R N A s e (シグマ社製) を用いて室温で 2 0 分間処置後に、細胞を P B S を用いて洗浄し、そして 4 0 μ g / m L のヨウ化プロピジウム (シグマ社製または B D 社製) と一緒に 3 0 分間インキュベートした。全試料を、蛍光標示式細胞分取器 (FACSCalibur, Becton Dickinson 社製) およびセルクエストソフトウェア (Cell Quest software) を用いて分析した。D N A ヒストグラムにおいて、低二倍体またはサブ - G 1 ピークはアポトーシス細胞について示す。

【 0 2 0 5 】

(実施例 14 : H a - ラスを標的とするオリゴマー化合物を用いた処置後の、細胞のミトコンドリア膜ポテンシャルにおける変化の測定)

ミトコンドリア膜ポテンシャルにおける変化を測定するために、ミトセンサー (MitoSensor) ^(登録商標) 試薬方法 (Becton Dickinson 社製、カタログ番号 K2017-1) を使用した。ミトセンサー ^(登録商標) 試薬を健康な細胞によって溶かし、このものは赤い蛍光を放射する凝集物を形成する。アポトーシス後に、該ミトコンドリア膜ポテンシャルは変化し、そしてこれにより、該試薬はミトコンドリア内で凝集し、従ってそのものは細胞質中でモノマー形態のままであり、緑色蛍光を放射する。H a - ラスに対するオリゴマー化合物を用いて処置した細胞を洗浄し、そしてこのものを製造主によって記載される通り、インキュベート用緩衝液中で希釈したミトセンサー試薬中でインキュベートした。オリゴ処置後の膜ポテンシャルの変化は、蛍光標示式細胞分取器 (FACSCalibur, Becton Dickinson 社製) およびセルクエストソフトウェアの使用によって検出した。

【 0 2 0 6 】

(実施例 15 : アンチセンスオリゴ処置後の内皮細胞のキャピラリー形成の抑制)

内皮単層細胞 (例えば、H U V E C) を、H a - ラスに対するアンチセンスオリゴと一緒にインキュベートした。チューブ形成は、2 個の以下の方法のいずれかによって分析した。第 1 の方法は、BD バイオコート血管形成チューブ形成システム (BioCoat angiogenesis tube formation system) である。細胞を、上記の通り (実施例 5) 、オリゴを用いてト

ランスフェクトした。トランスフェクト細胞を、マトリゲル重合BDバイオコート血管形成プレート上で 2×10^4 細胞/96ウェルで播種した。該プレートを、PMA (5~50 nM)、VEGF (20~200 ng/mL)、スラミンまたはビヒクルがあるなしで、示す時間/日数の間インキュベートした。該プレートを、製造主によって記載される通り、カゼイン(Casein)AMを用いて染色し、そして画像処理を行なった。全チューブの長さを、メタモルフ(MetaMorph)を用いて測定した。別法として、0.1容量の $10 \times$ DMEM中のラットテイルタイプIコラーゲン (3 mg/mL、Becton Dickinson社製) 中に細胞を播種し、滅菌1M NaOHを用いて中和し、そしてこのものを氷またはマトリゲル上に保った。細胞をコラーゲン懸濁液中に、最終濃度： 1×10^6 細胞/コラーゲンのmLで加えた。該細胞-コラーゲン混合物を6ウェルまたは35mmプレートに加え、そしてこのものを加湿インキュベーター中、37℃で置いた。ゲル化培地 (3 mL) + 余分な10% FBSを加え、そして細胞を、PMA (16 nM)、VEGF (50 ng/mL) のあるなしで示唆期間の間、キャピラー様血管を形成させた。ゲルのクリオスタット切片化後にチューブの形成を定量化し、そして位相差顕微鏡によって切片の検査を行なった。

10

【0207】

(実施例16：インビボモデル；オリゴマー化合物を用いた全身処置によるインビボで増殖したヒト腫瘍細胞の腫瘍増殖抑制)

6週齢の雌性NMRI胸腺欠損ヌードマウスをM&B (デンマーク国) から購入し、そしてこのものを参加(entering)実験前の少なくとも1週間順化させた。300 μ Lマトリゲル (BD Bioscience社製) 中に懸濁させた典型的に 10^6 細胞のヒト癌細胞を、7~8週齢のNMRI胸腺欠損雌性ヌードマウスの側腹部中に皮下注射した。腫瘍増殖が確立した後に、典型的には腫瘍細胞注射の7~12日後に、異なるアンチセンスオリゴヌクレオチドを、皮下インプラントしたALZET浸透性ポンプを用いて28日までの間、5 mg/kg/日で投与した。背部のインプラント前に、該ポンプを室温で終夜、滅菌PBS中でインキュベートして、該ポンプを始動させた。コントロール動物は、生理食塩水のみを同じ期間で与えた。各実験群は少なくとも5マウスを含む。抗腫瘍活性を、腫瘍の大きさの抑制によって見積もった。腫瘍増殖は、2垂直方向の直径を測定することによって定期的に追跡した。腫瘍の大きさは、式 ($\pi \times L \times D^2 / 6$) (式中、Lは最大直径であり、そしてDはLに対して垂直方向の腫瘍の直径である) に従って算出した。処置の最後に、該動物に麻酔をかけ、そして腫瘍の重量を測定した。群の平均的な腫瘍の大きさおよび重量を、マン・ホイットニー(Mann-Whitney)検定を用いて比較した。全ての分析は、ウィンドウズがSPSSバージョン11.0で行なった。

20

30

【0208】

最適には、ウェスタンブロット分析はまた、アンチセンスオリゴヌクレオチドがタンパク質レベルに及ぼす抑制効果を有するかどうかを測定するために実施することができる。従って、処置期間の最後に、マウスに麻酔をかけ、そして該腫瘍を切除し、そしてこのものを液体窒素中に直ぐに凍結した。

【0209】

該腫瘍を溶解緩衝液 (すなわち、20 mM トリス-HCl [pH 7.5] ; 2% トリトンX-100 ; 1/100 容量) 中でホモジナイズした。プロテアーゼインヒビターカクテルセット I I I (カルビオケム社製) ; 1/100 容量。プロテアーゼインヒビターカクテルセット I I (カルビオケム社製)、4℃、モーター駆動ホモジナイザーを使用する。100 mg の腫瘍組織当たり500 μ L の溶解緩衝液を適用した。マウスの各群由来の腫瘍ライセートを貯蔵し、そしてこのものを4℃で5分間遠心分離 (13,000 g) して、組織デブリを除去した。腫瘍エキスのタンパク質濃度を、BCAタンパク質アッセイ試薬キット (Pierce社製, Rockford) を用いて測定した。

40

【0210】

該タンパク質エキス (50~100 μ g) を、勾配SDS-PAGEゲルスパニング (4~20%) を用いて分画し、PVD F膜に移し、そしてアミノブラック染色によって視

50

覚化した。H aーラスの発現は、抗ーヒトH aーラス抗体、続いてホースラディッシュペルオキシダーゼー接合抗ーヤギI g G (D A K O社製)によって検出した。免疫反応性を、E C Lプラス (Amersham biotech社製)によって検出し、そしてこのものをベルサドック (Versadoc)5000ライト (lite)システム (Bio-Rad社製)によって定量化した。

【0211】

(実施例17：インビボモデル：L N Aアンチセンスオリゴを用いる腹腔内処置後の、ヌードマウス中に移植されるヒト腫瘍断片の腫瘍増殖抑制)

L N Aアンチセンスオリゴヌクレオチドの腫瘍増殖抑制活性は、Oncotest's (Freiburg社製、独国)繁殖コロニー由来の異物移植胸腺欠損ヌードマウス、N M R I n u / n u 中で試験した。乳癌 (MDA MB 231)、前立腺癌 (PC3) または肺癌 (LXFE 397, Oncotest) 由来のヒト腫瘍断片を、ヌードマウスにおける連続継代での異種移植片から得た。ドナーマウスから腫瘍を除去した後に、それらはカットして断片 (直径1~2 mm) とし、そしてこのものを皮下インプラントまで、R P M I 1640培地中に置いた。レシピエントマウスを、イソフルランの吸入によって麻酔をかけた。小さい切開を、該背中の皮膚に作った。該腫瘍断片 (マウス当たり2断片) を、ピンセットを用いて移植した。MDA MB 231およびLXFE 397腫瘍を雌性マウス中に移植し、PC3腫瘍は雄性マウス中に移植した。平均的な腫瘍直径が4~6 mmに達した後に、動物をランダム化し、そしてオリゴヌクレオチドを20 mg / kgで用いて、週末を除く3週間、1日1回腹腔内処置した。ビヒクル (生理食塩水) および正コントロール群 (タキソール、20 mg / kg / 日) は全実験中に含んだ。全ての群は、6マウスで構成した。該腫瘍の大きさを、ランダム化の日 (0日目)、次いで1週間に2回、ノギスを用いる2方向測定によって測定した。腫瘍の大きさを、式 $(a \times b^2) \times 0.5$ (式中、aは最大腫瘍の直径であり、そしてbは垂直方向の腫瘍の直径である) に従って算出した。腫瘍の大きさが2倍になるまで、ランダム化後の28日間、マウスを毎日観察した。腫瘍の直径が1.6 cmを超えた後に、マウスを殺生した。腫瘍の抑制の統計学的な有意性の評価のために、ウィルコクソン・マン・ホイットニー (Mann-Whitney-Wilcoxon) によるU-検定を実施した。慣習によって、p-値<0.05は、腫瘍の抑制の有意性を示す。

【0212】

(実施例18：マウスにおけるオリゴヌクレオチドの体内分布)

6週齢の雌性N M R I 胸腺欠損ヌードマウスをM&B (デンマーク国) から購入し、そしてこのものを参加実験前の少なくとも1週間順化させた。300 μ Lマトリゲル (BD Bioscience社製) 中に懸濁させた典型的な 10^6 細胞のヒト癌細胞を、7~8週齢のN M R I 胸腺欠損雌性ヌードマウスの側腹部中に皮下注射した。腫瘍増殖が確立した後に、トリチウム標識オリゴヌクレオチドを、皮下インプラントしたA L Z E T浸透性ポンプを用いて14日間、5 mg / kg / 日で投与した。該オリゴヌクレオチドを、Graham MJらによる (J Pharmacol Exp Ther 1998; 286(1): 447-458) によって記載される通り、トリチウム標識した。オリゴヌクレオチドを、全ての主要な臓器 (肝臓、腎臓、脾臓、心臓、胃、肺、小腸、大腸、リンパ節、皮膚、筋肉、脂肪、骨、骨髄) 由来の組織エキスをおよび皮下移植したヒト腫瘍組織のシンチレーションカウントによって定量化した。

【0213】

(実施例19：L N A含有オリゴマー化合物のインビトロ優位性)

ヒト前立腺癌セルライン15 P C 3を、実施例4に記載する通り保った。細胞を、Ten Asbroekらによる (2000), Polymorphisms in the large subunit of human RNA polymerase II as target for allele-specific inhibition中に記載されている通り、脂質トランスフェクト試薬D A C - 30 (Eurogentec社製) を用いてトランスフェクトした (図2を参照)。Nucleic Acid Research 28: 1133-1138。トランスフェクトのために使用するオリゴ濃度は、最終濃度が200 nM、400 nMおよび800 nMとした。H aーラスR N Aの発現レベルを、Ten Asbroekらによる (2000), Polymorphisms in the large subunit of human RNA polymerase II as target for allele-specific inhibitionに記載されているプロトコルを用いたノーザンブロット分析によって測定した (図2を参照)。Nu

cleic Acid Research 28: 1133-1138。ハイブリダイゼーションプローブをR T - P C Rによって得て、そして続いてpGEM-T Easyベクター（Promega社製）中にクローニングした。該H aーラスプローブは、配列番号1の位置1657～3485由来の配列（エキソン配列のみ）から構成される（図7を参照）。

【0214】

（実施例20：対応するホスホロチオエートと比較したL N Aオリゴマー化合物のインビボ優位性および特異性）

表3は、インビボ優位性および特異性の分析のために調製したアンチセンス化合物を示す。

【表8】

表3. インビボ優位性および特異性の分析のために調製したオリゴヌクレオチド

配列番号	Cureon番号/	長さおよびデザイン	配列(大文字はβ-D-オキシ-LNAであり、sはホスホロチオエートである)
75	75D Cur2522*	16-mer完全チオール化	5'-t _s c _s c _s g _s t _s c _s a _s t _s c _s g _s c _s t _s c _s c _s t _s c-3'
	75B Cur2524	16-mer LNAギャップマー3+3, 完全チオール化	5'-t _s C _s G _s t _s c _s a _s t _s c _s g _s c _s t _s C _s T _s c-3'
76A	76A Cur2525	16-mer, LNAギャップマー3+3, 完全チオール化, 5ミスマッチ	5'-t _s C _s A _s G _s t _s a _s a _s t _s a _s g _s c _s c _s C _s C _s A _s c-3'

*ベンチマークオリゴヌクレオチド；ISIS 2503 n-4、すなわち4 bp 短く調製した

ISIS 2503 オリゴヌクレオチド。

【0215】

（腫瘍増殖分析）

2個の別個の実験を行なった。7～8週齢雌性N M R Iヌードマウスを、M&Bから得た。マウスを各ゲージ中に5で保ち、そして参加実験前の少なくとも1週間、順応させた。マウスを、K. Fleuterによってこれまでに記載されている通り、マトリゲル（300 μL）中に懸濁させた10⁶個の15 P C 3ヒト前立腺癌細胞を皮下注射した。腫瘍細胞注射の1週間後に、該アンチ-H aラスオリゴヌクレオチド、ミスマッチコントロールオリゴおよびP B Sを、A L Z E T浸透性ポンプ（モデル1002）を用いて14日間、皮下投与した。背側のインプラント前に、該ポンプを滅菌P B S中、室温で終夜インキュベートした。各群は5～6マウスを含んだ。あるマウスは、2個の腫瘍について行なった。腫瘍の大きさは、式（ $\pi \times L \times D^2 / 6$ ）（式中、Lは最大直径であり、そしてDはLに対して垂直方向である腫瘍の直径である）に従って算出した。各腫瘍は、1個の実験単位として見なした。該実験は、盲検(blinded)とした。最後の処置後（14日後）に、マウスを殺し、そして腫瘍を切除し、冷蔵し、そしてタンパク質分析のために保った。腫瘍の重量をまた記録した。

【0216】

（結果）

腫瘍の増殖は、各フランク中に3 L N Aを含有する完全チオール化16-mer L N Aギャップマー（C u r 2 5 2 4）によってほとんど抑制された。この効果は、2.5 mg / k g / 日で実証された（図3）。しかしながら、5 b p ミスマッチを含有するミス

10

20

30

40

50

ッチコントロールオリゴヌクレオチド (Cur 2525) は、いずれの抗腫瘍効果を有しなかった。このことは、H aーラスを標的とする LNA 含有アンチセンスオリゴヌクレオチド (Cur 2524) のインビボ特異性を実証した。

【0217】

Cur 2524 (LNA-ギャップマー) の抗腫瘍効果を、16-mer ホスホロチオエート (Cur 2522) と比較した。Cur 2524 (LNA-ギャップマー) による腫瘍増殖の抑制が実証され、一方で等配列の (iso-sequential) 16-mer ホスホロチオエートは効果を全く有しなかった (図3)。

【0218】

(実施例21：長鎖ホスホロチオエート化合物と比較した短鎖 LNA オリゴマー化合物のインビボ優位性) 10

ISIS 2503 は、ISIS 医薬によって開発されたよく知られたアンチセンスオリゴヌクレオチドであり、このものは、H aーラスの発現を抑制し、そして臨床治験のために選択された化合物である。このオリゴヌクレオチドは、いくつかの腫瘍異種移植片モデル (例えば、15PC3 異種移植片) において腫瘍増殖を抑制することを示した (Fluterrらによる、Cancer Res. 62, 2024-2028)。この研究の目標は、ヌードマウスモデルにおいて、確立された ISIS 2503 と、H aーラスを標的とする LNA ギャップマーオリゴマー化合物とを比較することである。更なる目標は、長鎖ホスホロチオエート (20-mer) と比較した短鎖 (16-mer) LNA オリゴマー化合物の効力を研究することであった。 20

【0219】

(実験デザイン)

以下のオリゴヌクレオチドを合成した。Cur 2119 は、ISIS 2503 と同一である。該オリゴヌクレオチドを、完全にチオール化した。LNA ギャップマーは 16mer であるが、一方でベンチマークオリゴヌクレオチドは 20mer であることは重要である。該化合物を、MALDI-TOF 分析を用いて調べた (データは示さない)。該化合物を、インビボ実験において使用するために十分に精製した。

【表9】

表4. 16-mer である LNA 化合物および 20-mer であるベンチマーク
ホスホロチオエート 30

配列 番号	配列 (5' -3')	内部番号 & デザイン番号	長さおよびデザイン
77	tcogtcatcgctectcaggg	Cur 2119 77D	PS/DNA 20-mer
75	TCCGtcatcgctCCTC	Cur 2131 75A	β -D-オキシ-LNA (大文字)/DNA ギャップマー16-mer完全チオール 化 40

【0220】

(インビボ腫瘍増殖の抑制)

8~10週齢の NMRI nu/nu マウス (Charles River社製, オランダ国) に、マトリゲル (300 μ L) 中の 10^6 個のミアパカ (MiaPaca) II 細胞または 10^6 個の 15PC3 細胞 (Collaborative Biomedical products社製, Bedford, Ma, 米国) を用いて、側腹部に皮下注射した。トリプシン処置によって収集後の1時間以内に、該細胞を注入した。注射前に、該細胞を冷PBSを用いて洗浄し、血球計算器を用いて計数し、続いてこのものを氷上でマトリゲルと混合した。腫瘍細胞の注入の1週間後に (このとき、腫瘍 50

は陽性である)、浸透ミニポンプ (Alzet モデル 1002、ロット番号 10017-00、Alzet corp.社製、Palo Alto, Ca, 米国) を製造主の指示に従って背側にインプラントした。該浸透ミニポンプを 37℃で 20 時間、PBS 中でインキュベートし、その後に、該ポンプを始動させるためにインプラントした。該浸透ミニポンプを、オリゴヌクレオチド (1 mg/kg/日) または 0.9% 生理食塩水で満たした。腫瘍の大きさを、該浸透ミニポンプのインプラント後に、毎日追跡した。腫瘍の大きさを、これまでに記載されている通り (Meyerらによる, Int J. Cancer, 43: 851-856, 1989) 測定しそして算出した。全てのマウスを、IPTT-200 温度トランスポンダチップ (temperature transponder chips) (BMDS inc.社製, Seaford, Delaware, 米国) を用いてインプラントして温度測定を行ない、そして処置の期間中、DAS 5002 スキャナー (BMDS inc.社製) を用いてマウスの同定を行なった。 10

【0221】

ODN 処置の開始 1 週間前に、ヌードマウスに、MiaPacaII 細胞 (右側腹部) および 15PC3 細胞 (左側腹部) を皮下 (s.c.) 注射した。抗ハーラス化合物 (Cur 2119 および Cur 2131)、並びにコントロール (Cur 2120 および Cur 2132) を、背側にインプラントした Alzet 浸透ミニポンプ (モデル 1002) を用いて 14 日間投与した。使用する用量は 1 mg/kg/日とした。処置期間中、該腫瘍の増殖を追跡した。

【0222】

16mer LNA 含有ギャップマーは 20-mer ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドと比べてより強力である、と結論付けることができる (図 4 を参照)。 20

【0223】

(実施例 22: アルファー LNA オリゴマー化合物のインビボ効力は、ベーター D-オキシ LNA オリゴマー化合物と少なくとも同程度に良好である)

オリゴヌクレオチド処置の開始 1 週間前に、ヌードマウスに、MiaPacaII 細胞 (右側腹部) および 15PC3 細胞 (左側腹部) を皮下 (s.c.) 注射して、異種移植片増殖を行なった。抗ハーラスオリゴヌクレオチド (2713、2722、2742 および 2776) およびコントロールオリゴヌクレオチド (2744 および 2778) (表 5 を参照) を、背側にインプラントした Alzet 浸透ミニポンプ (モデル 1002) を用いて 14 日間投与した。これらの用量は、2722 および 2713 の場合を除いて (この場合、5 mg/kg/日の用量を投与した)、全ての場合に 1、2.5 および 5 mg/kg/日で使用した。処置期間中、該腫瘍の増殖を追跡した。腫瘍の増殖は、15PC3 細胞において 2742 および 2776 を 5 mg/kg/日、2.5 mg/kg/日 および 1 mg/kg/日の場合でさえ完全にほとんど抑制された (図 8)。コントロールオリゴヌクレオチド (ミスマッチを含有する 2744 および 2778) を用いる特異性は、用量が増大するにつれて増大した。1 mg/kg/日の用量の場合には、該実験は、特にアルファー L-オキシ LNA オリゴヌクレオチド (2742 および 2744) の場合に良好な特異性を示した。MiaPacaII 異種移植片腫瘍の場合に、該オリゴヌクレオチドの効果は通常、特異性が少し低いようである事実を除いて、15PC3 異種移植片の場合のその効果に匹敵する。2713 および 2722 の場合に、腫瘍増殖の強力な抑制がまた観察された (図 9 を参照) 40

)。アルファー L-オキシ LNA を含有するオリゴヌクレオチドは、試験する濃度範囲における腫瘍増殖の抑制において、ベーター D-オキシ LNA を含有するものと比べて、同程度に強力であるかまたは一層良好であり得ると結論付けることができる。

【表 10】

表 5. インビボ実験において用いられるアルファ-L-オキシ-LNA（大文字および α ）およびベータ-D-オキシ-LNA（大文字）を含有するオリゴヌクレオチド。残基 c は、cDNA2713 および 2722 を除いて、DNA および LNA の両方についてのメチル-c である。

配列番号	内部基準 & 配列番号 + デザイン番号	オリゴヌクレオチド	
75	2776 75F	$T^{\alpha}_s C^{\alpha}_s C^{\alpha}_s g_s t_s c_s a_s t_s c_s g_s c_s t_s C^{\alpha}_s C^{\alpha}_s T^{\alpha}_s c$	マッチ
77	2778 77F	$T^{\alpha}_s C^{\alpha}_s T^{\alpha}_s g_s t_s a_s a_s t_s a_s g_s c_s C^{\alpha}_s C^{\alpha}_s C^{\alpha}_s c$	ミスマッチコントロール
75	2742 75B	$T_s C_s C_s g_s t_s c_s a_s t_s c_s g_s c_s t_s C_s C_s T_s c$	マッチ
77	2744 77B	$T_s C_s T_s g_s t_s a_s a_s t_s a_s g_s c_s C_s C_s C_s c$	ミスマッチコントロール
6	2713 6A	$C_s C_s C_s A_s t_s c_s t_s g_s t_s g_s c_s c_s C_s G_s A_s C$	マッチ
15	2722 15A	$T_s C_s C_s T_s c_s c_s t_s c_s c_s g_s t_s t_s C_s T_s G_s C$	マッチ

【0224】

（実施例 23：H aーラスを標的とするアルファ-L-オキシ-LNA およびベータ-D-オキシ-LNA は、マウスにおいて低い毒性レベルを示す）

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ASAT）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALAT）およびアラニンホスファターゼの血清中レベルを測定し、ヌードマウスにおけるこの 14 日間処置のあり得る影響を研究した。血清試料を、14 日間の実験後に各マウスから採取した。該血清中の ALAT レベルは、250～500 U/L の間で変化した。ASAT レベルは、80～150 U/L の範囲であった（図 10 を参照）。該マウスは外面的には病気でないように思われ、そして行動における大きな変化は全く観察されなかった。処置の期間中、マウスの体温をまた I P T T-200 温度トランスポンダを用いて追跡した（図 10）。体温は、高用量の 5 mg/kg/日の場合でさえも処置の期間中、有意には変化せず、このことは大きな毒性影響が全く生じないことを示唆する。

【0225】

本発明は、好ましい実施態様により具体的に記載する。従って、実施例は本発明を例示するためにだけ役立ち、本発明を限定することを意図するものではない。

【図面の簡単な説明】

【0226】

【図 1】図 1 は、本発明の異なるデザイン：ギャップマー、ヘッドマー、およびテイルマー、並びに異なる組成のミックスマーのイラストを示す図面である。ミックスマーについて、番号は、DNA、 β -D-オキシ-LNA または α -L-DNA の別の近接ストレッ

10

20

30

40

50

チを示す。図面中、線はDNAであり、灰色の影は α -L-LNA残基に相当し、そして四角形は β -D-オキシ-LNAである。

【図2】図2は、インビトロシステムにおけるLNAオリゴマー化合物の効力および特異性を示す図面である。該LNA 16-merは、ホスホチオエート20-merよりもずっと良い有効な下方改変を示す。該LNAオリゴマー化合物はまた、6 mismatchesを含む化合物と比較して、良い特異性を示す（イタリックで示した4%は28Sバックグラウンドのスメアを有する。このことにより、28Sシグナル強度の過大評価を生じる。従って、%mRNAは左側の括弧に示し、そしてRNAロード量（すなわち、28Sシグナル）については補正しない）。

【図3】図3は、オリゴマー化合物であるCur 2524（LNA-ギャップマー）による腫瘍増殖の低下を示す図面である。等配列の16-merホスホチオエートおよびmismatchesコントロールがいずれの効果も有しないことも分かった。

【図4】図4は、16-mer LNAオリゴマー化合物であるCur 2131がベンチマーク化合物であるISIS 2503（ここでは、Cur 2119と呼び、このものはホスホチオエート20-merである）よりも強力であることを示す図面である。該インビボモデルは、1 mg/kg/日の該オリゴマー化合物をAlzet浸透性ポンプによって14日間投与されて処置されたヌードマウスにおける15PC3腫瘍増殖の抑制である。

【図5】図5は、チオ-LNAの合成の一般的な反応式を示す図面である。

【図6】図6の上方パネルは、2つの別々の実験からの2組について5および100 nMで試験した、オリゴマー化合物Cur 2713を用いたハーラスのアンチセンス抑制が、アポトーシスを誘発することを示す図面である。下方パネルは、オリゴマー化合物CUR 2742、CUR 2749、CUR 2776およびCUR 2778を100 nMで用いたハーラスのアンチセンス抑制がアポトーシスを誘発することを示す図面である。

【図7】図7は、配列番号1であるジェーンバンク寄託番号J00277を示す図面である。

【図8】図8は、アルファ-L-オキシ-LNAオリゴマー化合物のインビボ効力が、1 mg/kg/日および2.5 mg/kg/日を投与した15PC3およびミアパカ(Miapaca)腫瘍のヌードマウスモデルにおいて、ベータ-D-オキシ-LNAオリゴマー化合物と少なくとも同程度に良好であることを示す図面である。番号は、内部「Cur」番号を意味する。

【図9】図9は、ベータ-D-オキシ-LNAオリゴマー化合物2713および2722がミアパカおよび15PC3のヌードマウスモデルにおいて5 mg/kg/日を投与した場合に、腫瘍増殖の強力なインヒビターであることを示す図面である。番号は、内部「Cur」番号を意味する。

【図10】図10は、ハーラスを標的とするアルファ-L-オキシ-LNAおよびベータ-D-オキシ-LNAのオリゴマー化合物がマウスにおいて低い毒性を示すことを示す図面である。番号は、内部「Cur」番号を意味する。

10

20

30

【図 1】

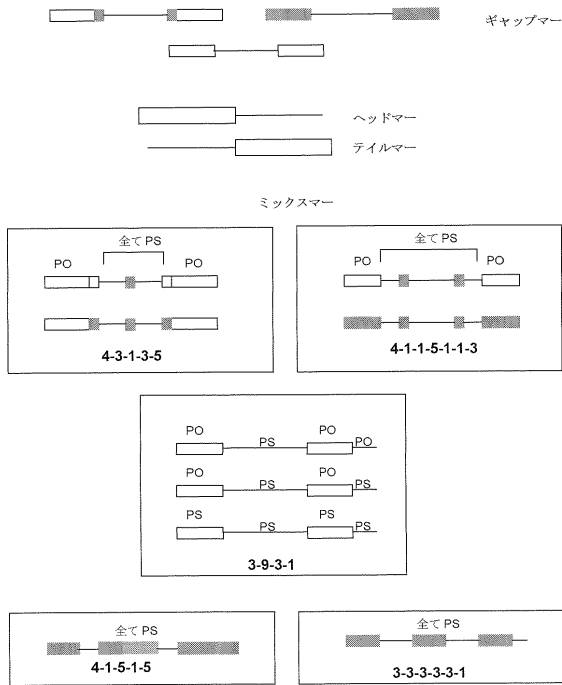


Fig. 1

【図 2 A】

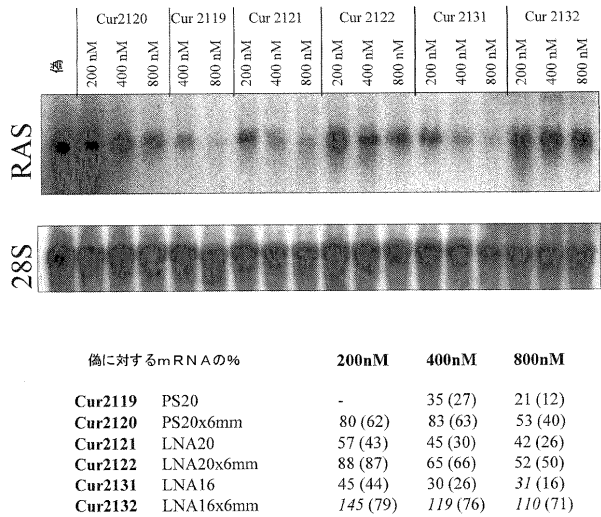


Fig. 2

【図 2 B】

命名	組成物	配列	大きさ	ターゲットに対する関係
Cur 2119 (ISIS 2503)	PS-DNA	5'-tccgcatcgcctctcaggg-3'	20mer	マッチ
Cur 2120 (ISIS コントロール)	PS-DNA	5'-tcagtaatagccccaagg-3'	20mer	6 ミスマッチ
Cur 2522	PS-DNA	5'-tccgcatcgcctctc-3'	16mer	マッチ
Cur 2131	PS-LNA ギャップマー	5'-TCCGtcatcgcTC-3'	16mer	マッチ
Cur 2132	PS-LNA ギャップマー	5'-TCAGtaatagccCAC-3'	16mer	5- ミスマッチ

図 2 の続き

【図 4】

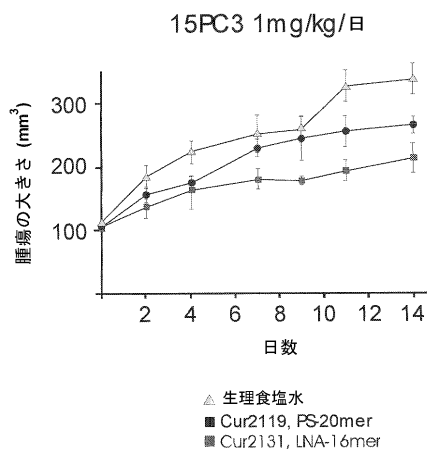


Fig. 4

【図 3】

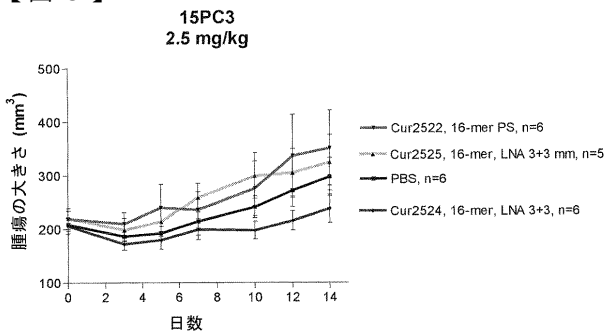


Fig. 3

【図 5】

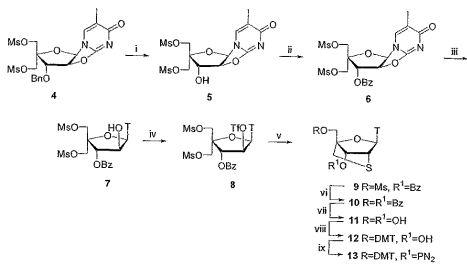
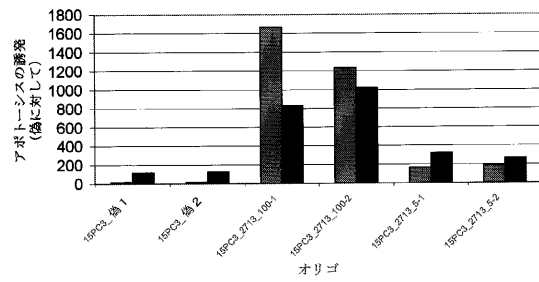


Fig. 5

【図 6】

H-Rasのアンチセンス抑制はアポトーシスを誘発する



H-Rasのアンチセンス抑制はアポトーシスを誘発する

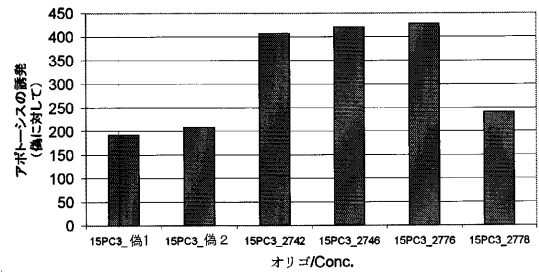


Fig. 6

【図 7】

Seq ID NO: 1

1 GSATCCACAG CTITCCACAG CCCTAGACCC GGGACCTCC GCGTGGGG
 CTAAGGTCG GAAGAGGGTC GGGCATCGGG GCGCTGGAGG CGCACCCGCG
 51 GCGCGGCGCT CGCGGCGCAG GAGAGGGCTC TGCTGACCGG GCACCGCTGA
 CGCGGGCGCA CGCGGCGCTC CTCCCGGAGG ACACCGCTGG CTTGGGCACT
 101 GTGCGGTTCT CTGCGGGCCG TGTTCCCGGG AGAGCCCGGG GCGCTGCTCG
 CAGCCCAAGA GAGCGCCCGG ACAGAGGGCC TCTCGGGCCC CGGAGCAGAG
 151 GAGATGCGCG CGCGGCGCCG CAGACACCGG CTCTCGGGCC TTCTCGAGAG
 CTCTAGCGGG GCGCGCGGGG GTCTGTGGCC GAGGAGACGG AAGGAGCTCG
 201 AAGCCCGAGC TGCGCTCCGG TCTCGAGCCA AGCCCAACCC CGAGAGGCGG
 TTGGGGCTCG AGCCGAGGCC AGAGGCTGGT TCGGGTTGGG GCTCTCGGGC
 251 CGGCGCTACT GCGTCGCGCT CGCGGTTGG TCCCGGAGAG CGCGCCGAGC
 GCGCGGATGA CCGAGGCGGA GGGCGCAACG AGGCGCTTGG GGGCGGGCTG
 301 CGCGGCTCTT GACAGAGCGG CGCGCTAGCG AACCGGGGTC GGGCGGGGCG
 GCGCGGAGGA CTGCTGCGCC GCGGAGCTGG TTGGCCCGAC CGCGCCCGCG
 351 CGATGGGCGG CAGCGATAGG TAGGCGCGCG CTGGCAGAGG GAGCGGGGCG
 GCTACCGGCG GTGGGTTAGC ATCGCGCGCG GACCGTCTCG CTGCGCGGCG
 401 GGGCGGGGCG TGCGCAGGCC CGCGGAGTTC TCGCGCGGCC GTGCGCTGCG
 CGCGCGCGCG AGCGGCTCGG GCGGGCTCGG AGCGGGGCGG CAGCGGAGCG
 451 CCGCGCAACC GAGCGGACCG CGCGCGGAGG GAGACCGATG CGCGGGGCGA
 GGGCGTTGGG CTGCGCGTGG GCGCGGCTTC CTTGGGATAG GCGCGCGGCT
 501 ACCCGCGGCG CGCGCGCGCG CGCGCGCGCG GCGTCTGGCC CGCGCGCGCG
 TGCGCGCGCG GCGCGGGGCG GGGGCGGGCG CGGAGCGCGG GCGCGGAGCG
 551 CCGCGGGGCG GTGCGCGCTG TGAGCGGTGA GTGCGGGGAG GATCGGCGCG
 GGGCGCGGCG CAGCGGAGCG ACTTGGCAGT CAGCGCGGCT CTAGCGCGCG
 601 GAGCGCGGCG CTCTCTCGCG CCGAGGCGCG AGCATATCGG GCGCGCGGGG
 CGCGCGCGCG GAGAGAGCGG GGGTTCGCGCG TGCTTATGCG CGCGCGCGCG
 651 CGGGGGGCGG GGGGCGCGCG GCGCATAGCG GCGCGCGCGG GCGCGGGTGG
 GCGCGCGCGG CGCGCGCGCG GCGCATAGCG GCGCGCGCGG GCGCGCGCGG
 701 GTGCGGGCGG GCGCGGGGCG CGGCGCAGGG TGAGCGGGCG TGCGGGGCTG
 CAGCGCGCGG CGCGCGGGCG GCGCGGTGCG ACTCGCGCGG AGCGCGCGCG
 751 CGCGGGGCGG GCGCGGTTCT CTGCGTGGGG CTGCGGGGGA TCGCGGGGCG
 GCGCGCGCGG CGCGGGGAGG GAGGAGCGCG GAGCGCGCTT AGCGCGGGG
 801 ACCCGGTGCG TGCGGCTGGG CAGCGTCCCG AGCGCGGGGT ACCCGGAGCG
 TGCGCGCGCG AGCGCGAGCG GTGCGAGGGG TGCGCGCGCG TGCGCGCGCG

Fig. 7

851 CTGCGGCGCG GCGCGCTCAC ACCCGGGGGG GTCTGGGAGG AGCGGCGCGG
 GAGCGCGGGG CGCGGGAGTG TGCGGCGCGG CAGACCTCTC CTGCGCGGGG
 901 GCGCACGCGA CGCGCGGCGA CCGCGGATTC AGCATCACAG GTGCGGAGCC
 CGGCTGCGGT GCGCGGCGGT GGGGCGTAGT TCGTAGTCTC CAGCGCTTGG
 951 AGCGGCGGGG CTGAGCGCC AGTGCGTTT CCGTCTCGG GTCTCCCGCG
 TCGCGGCGCG GAGGCTCGGG TCAGCGAAGA GAGAGAGGCG CAGAGGGGCG
 1001 CGCGTTCTCG GCGCGTTCTT GTGCGTAGT CCGTCTTCC CAGGAGCTCC
 GCGAGAGGCG GGGGAGAGA CAGCGAGTCA GAGAGAGAGG GTCTCTGAGG
 1051 TCTGTCTCT CAGCTTTCT GTGCGTGAAG GATGCGCGCG GTTCCCGCG
 AGACAGAGA GTCTGAAGA CAGCGACTTT CTACGCGGGG CAGGCGGCGG
 1101 GGGGCTGCGG GCGCGTCCCG GCGCTGCGCC TCGCGTGGG GCGCGTACT
 CCGCGAGCGG CGCGGAGCGG CCGAGAGGGG AGGGGAGCGG CCGCGGATCA
 1151 AGCGAGTAGG CGCTAGAGA ATACTTGTTC GAGGAGCAGG CGCGCGGGG
 TGCGCTATCC GCGAGTCTTT TATGAGAGCG CTGCGTGGT GCGCGCGCGG
 1201 CTGCGAGGCT GCGAGTAGCC TGCGGCGGCA CGCGTGGG CCGTCTGCGG
 GAGCGTCCGA CGGTGATGCG AGCGGCGCGT GCGCGAGCGG GCGAGGCGCG
 1251 TGCGCAGAGC TGTTCTGGAG GAGGCGTACC TCAAGCGTCC GCGCGCTCC
 AGCGGTCTGG ACAAGAGCTC CTGCGATTGG AGTGGGAGG CGCGGAGGG
 1301 TTATGCGTTT CTGCGGAGCC AGCAGCTTCT AATTGGGTT GCGGTTGAG
 AATCGGAGA GAGCGCTGGG TGCTGAGA GAATAACCG CAGCAGATC
 1351 AGCGCTCAGG TGTCAGCGCT GCGTTTGAAG GCGGTTGCC TTTCCTCATC
 TGCGGAGTGG CAGGTGAGGA GCGAGATCC GAGCGGAGG AAGAGGGTAG
 1401 ACTGGGTGAT TAGAGAGTAG TGCGGCGGAG GCGAGCGGCC TCGCGAGCG
 TGAGCGAGTA ATCTCTGTTT ACCCGCGTCT CCGTCTGGG AGGCGGTGCG
 1451 TGCGGTGAGG CTGACAGGT AGGCAAGCTG CAGTCTTGG TCGCTGGCGT
 ACCCAAGCTC GAGGTGCTCA TCGTGGAG CTACAGAGG AGGAGCGCA
 1501 TGCGGCGGAG GAGCGGCTGT GCGTTTGGCC TTGAGATGG CCGCGCGCGT
 ACCCGCGGCT CTGCGGAGCA CCGAAGCGG AAGTCTAGCG GAGCGGTGCT
 1551 GCTGCGCTGT GGGGCGTGGG CTGCGGCTGG GCGCTGGCT AGCAGGCGCG
 CGAGGAGACA CCGCGGAGCC GAGCGGAGG CCGGAGCGG TCGTCCCGG
 1601 TCCTTGGGAG GTGGGCGAGG AGACCGTGT GAGAGACCG GCGCGCGCGG
 AGGAGCGCT CAGCGCGTCT TCTGGGAGAT CCGTGGGG CCGCGCGCTC
 1651 CCGCTGAGGA GCGATAGCG AATATAGCT GGTGGTGGT GCGCGCGCGG
 GGGGACTCTT CGCTACTGCC TTATATTCGA CAGCGAGCG CCGCGCGCGG
 1701 GTGTGGGCGA GAGTGGCTG ACCATCCAGG TGTATCAGAA CATTATTCG
 CAGCGCGCTT CTACCGCGAG TGGTAGGTG ACTAGCTCTT GGTAAACAC
 1751 GAGCAATACG ACCCGACTAT AGAGGTGAG CTAGCGCGCG GGTCAAGGTG
 CTGCTATGCG TGCGGTGATA TCTCGACTCG GATCGCGCGG CAGGTGCGC
 1801 CAGCAGCTG CTGCGGCGGA CCGCGAGACA CAGCGAGAT AGGCTGGCT
 GGTGCTGAG CAGCGCGCTC GCGCTCTGT GTGCGCTTA TCGCGAGCGA

Fig. 7 continued

1851 GAGGCCCTTG GTCCCTTGCA TGGTGTCTGC GCGCTGTCTC CTGCTTCCTC
 CGTCCGGGAC CAGGGGACGT ACCACGACAC CGGGACAGAG GAGGAGGAG
 1901 TAGAGGGAGG GAGTCCCTGC TCTCAGACAC CCAGAGAGAG AGGGGGCATY
 ATCTCTCTCC CTACGGAGAC AGAGTGTGAG GGTCTCTCTC TCCCTCCGAC
 1951 AGGGGCTATG GAGGTACGAG GGGAGGGGTG GGTGTGTGAA TCCCTCCGAC
 TCCCTGACT CTCTCTGTCT CTCTCCGAG CAGACACTT GAGGGGGGTG
 2001 GAGAGGCTCT GAGGGGGTCT CTGAGCGGCT TCTCTCTGCA GGAATCTTAC
 CTTTCCAGGA CTCCCTCCAG GACTCGGAC AGGAGGAGCT CTATAGGATG
 2051 CGGAGAGAGG TGGTCAITTA TGGGAGAGCT TGGCTGTGGA ACATCTGGA
 GCTTCTGTCT ACCATATGCT ACCCTCTGCT AGGAGACAC CTATAGGACT
 2101 TACCGCCGGC CAGGAGAGGT ACAGCGGCTT GCGGAGCAG TACATGCGCA
 ATGGCGGGCT GTCTCTCTCA TGTGCGGTA GCGCTGTGCT ATGTAGCGGT
 2151 CGGGGGGGGG CTCTCTGTCT GTGTCTGCA TCAACACAC CAGTCTTTT
 GCGCTCTCTC GAGGAGACCA CCAAAAGCTT AGTGTGTGCT GTTCAAGAAA
 2201 GAGGACATCC ACCAGTACAG GTGAACCGCT TGGGCTGTGC CGGGGAGGCC
 CTCTGTAGG TGGTCAITTA CACTTGGGCT ACTCCGACCG GCGCTCTGGG
 2251 ACCTCCGACA GGTGGGGCCA GCGCGGCTGC GTCCAGGAG GCGCTCTGGG
 TGGCGGGTGT CCACTGCTGT GAGTGGGCT GCGCTCTGGG CCGGAGGAGC
 2301 TCTCTCTGCT GAGTGTCTGT GAGTGGGCT GCGCTCTGGG CCGGAGGAGC
 AGGAGAGAGC CTAAGGAGC TACGCGGCT GCGGAGGCT GCGGAGGAGC
 2351 AGCTCTGCT TCTCACTCT CAGGAGGAG TCAAAAGGCT TGAAGGAGCT
 TCGAGAGGAG AGGAGGAGG TCTCTGTCT TGGTGTGCT ACTTCTGAG
 2401 GAGTACGCT GCGTGTGCT TGGTGGGAA CAGTGTGCT CTGGCTGAC
 CTAATGAGC GGGTACGAG ACCACCTCT GTTCACTGCT GAGCGGAGT
 2451 GCACTGTGGA ATCTCGGAG GCTCAGAGC TGGCGGAGG CTAAGGAGCT
 CGTGAGACT TAGAGGCTGT GAGTGTGCT AGCGGCTGT GAGTGTGCT
 2501 CCTTACATCG AGACCTCGG CAGAGGCTGT GAGTGTGCT GAGTGTGCT
 GGGATGTAG TGTGAGGCT GTTCTGGGCT GTCCACTGCT TCGAGAGGCT
 2551 CCGACAGCTA GCGAGGAGC GCGCGGCTGT GCGCGGCTGT GCGCGGCTGT
 GGGTGTGCT GGTGTGTGCT GCGCGGCTGT GCGCGGCTGT GCGCGGCTGT
 2601 ACTCACTGAC CTCTCTCTCT GAGACAGGCT GCGCGGCTGT GCGCGGCTGT
 TGAATGAGT GGGAGGAGG CTGTGTGCT TCGCGGAGC CAGAGTGTG
 2651 CAGCTCGGAG ACCCTCTGCT ACCCGGCTGT ACCCGGCTGT ACCCGGCTGT
 GTCGAGGCT TGGGAGGCT TGGGAGGCT TGGGAGGCT TGGGAGGCT
 2701 CCGCGAGCT TGGTGTGCT GGGAGGCT TGGGAGGCT TGGGAGGCT
 GGGAGGCT TGGTGTGCT GGGAGGCT TGGGAGGCT TGGGAGGCT
 2751 CGGGGCTGT GGGAGGCT TGGGAGGCT TGGGAGGCT TGGGAGGCT
 GCGCGGCTGT GGGAGGCT TGGGAGGCT TGGGAGGCT TGGGAGGCT
 2801 AAGGCGGAGG TCGTGTGCT GAGTGTGCT GAGTGTGCT GAGTGTGCT
 TCGCGGCTGT GGGAGGCT TCGGAGGCT TCGGAGGCT TCGGAGGCT

Fig. 7 continued

2851 CCTCGGGGCT GCGCGGCTGT TGTCCGAGG GTGTCCGAG GGCAGCTGT
 GGGAGGAGCT GCGCGGAGG ACAGGGGCT CAGGGGCTCT CCGTGTGAGA
 2901 GGTCTGTGAT CTATGTGGGG CTACTGGGAG CAGGGGCTCT CCGTGTGAGA
 CAGAGACTCA GAGTACGCT GATGAGGCT GTCCCGGAG TCGAGTGTG
 2951 AGAGCTGGGT GAGGGGTGAT CAGAGGCTGT GAGTGTGAGA TCGAGTGTG
 TCTGAGGCA GTCCGAGCA GTTGGGAGT GGTCTGTGCT TCGAGTGTG
 3001 GCGCGGAGCT GAGTGTGCT TTTGGGAGT TCGAGTGTGCT TCGAGTGTG
 CGGGGAGCT GGGAGGCTT AAGTCCGCT AGAGTGTGT ACTGAGGCT
 3051 GCGCGGAGCT GAGTGTGCT GCGAGGCTT GAGTGTGCT TCGAGTGTG
 CGGGAGGCT TGAAGCTCTA CCGTCTGAG GTCCAGGCT ACAGAGGCT
 3101 GCGCGGAGCT GAGTGTGCT GCGAGGCTT GAGTGTGCT TCGAGTGTG
 CGGGAGGCT TGAAGGCTT CCGTCTGAG GTCCAGGCT ACAGAGGCT
 3151 TGAAGGCTT GAGTGTGCT GCGAGGCTT GAGTGTGCT TCGAGTGTG
 AGTGTGAGT GCGTCTGCT GGGAGGCTT GCGTCTGCT GCGTCTGCT
 3201 TCGTCTGTA TCGTCTGCT CCGTCTGCT GCGTCTGCT TCGAGTGTG
 AGGAGGCTT GAGTGTGCT GCGAGGCTT GAGTGTGCT TCGAGTGTG
 3251 GAGTGTGCT GCGTGTGCT GCGAGGCTT GAGTGTGCT TCGAGTGTG
 GTGAGGCTT GCGTGTGCT GCGAGGCTT GAGTGTGCT TCGAGTGTG
 3301 GAGTGTGCT GCGTGTGCT GCGAGGCTT GAGTGTGCT TCGAGTGTG
 GAGTGTGCT GCGTGTGCT GCGAGGCTT GAGTGTGCT TCGAGTGTG
 3351 GCGAGGCTT GCGTGTGCT GCGAGGCTT GAGTGTGCT TCGAGTGTG
 GCGTGTGCT GCGTGTGCT GCGAGGCTT GAGTGTGCT TCGAGTGTG
 3401 GCGTGTGCT GCGTGTGCT GCGAGGCTT GAGTGTGCT TCGAGTGTG
 GCGTGTGCT GCGTGTGCT GCGAGGCTT GAGTGTGCT TCGAGTGTG
 3451 GCGTGTGCT GCGTGTGCT GCGAGGCTT GAGTGTGCT TCGAGTGTG
 GCGTGTGCT GCGTGTGCT GCGAGGCTT GAGTGTGCT TCGAGTGTG
 3501 GCGTGTGCT GCGTGTGCT GCGAGGCTT GAGTGTGCT TCGAGTGTG
 GCGTGTGCT GCGTGTGCT GCGAGGCTT GAGTGTGCT TCGAGTGTG
 3551 GCGTGTGCT GCGTGTGCT GCGAGGCTT GAGTGTGCT TCGAGTGTG
 GCGTGTGCT GCGTGTGCT GCGAGGCTT GAGTGTGCT TCGAGTGTG
 3601 GCGTGTGCT GCGTGTGCT GCGAGGCTT GAGTGTGCT TCGAGTGTG
 GCGTGTGCT GCGTGTGCT GCGAGGCTT GAGTGTGCT TCGAGTGTG
 3651 GCGTGTGCT GCGTGTGCT GCGAGGCTT GAGTGTGCT TCGAGTGTG
 GCGTGTGCT GCGTGTGCT GCGAGGCTT GAGTGTGCT TCGAGTGTG
 3701 GCGTGTGCT GCGTGTGCT GCGAGGCTT GAGTGTGCT TCGAGTGTG
 GCGTGTGCT GCGTGTGCT GCGAGGCTT GAGTGTGCT TCGAGTGTG
 3751 GCGTGTGCT GCGTGTGCT GCGAGGCTT GAGTGTGCT TCGAGTGTG
 GCGTGTGCT GCGTGTGCT GCGAGGCTT GAGTGTGCT TCGAGTGTG
 3801 GCGTGTGCT GCGTGTGCT GCGAGGCTT GAGTGTGCT TCGAGTGTG
 GCGTGTGCT GCGTGTGCT GCGAGGCTT GAGTGTGCT TCGAGTGTG

Fig. 7 continued

3851 GGGAGGCTGT GGGAGGCTGT GGGAGGCTGT TGGGCTGTGT TGTCTCTCTC
 CCTCTCCAGC CCTCTCCGCT CAGTCCGAGC ACCGAGGCTT ACAGAGGAG
 3901 TCCGCTCTGC CCGAGTGTCT CAGGCTGTCT CAGAGGAGCT CTGAGGAGC
 AGGGGAGGCT GGGTGTGAG TCGGAGGAGC GGTCTCTGCA GAGTGTGTG
 3951 AGGAGGCTGT TGGAGGAGCT GAGGAGGCT TGTCTCTGCA CAGTGTGTG
 TCGTGTGAT ATCTCTGCT CTGAGGAGCT ACAGAGGAG TGTGTCTCTC
 4001 GCGTGTGCT GCGTGTGCT GGGAGGCTT CAGGAGGCTT GAGTGTGTG
 CCGAGGAGCT GAGGAGGCT CTGAGGAGCT ACCGAGGCT CTAAGAGGCT
 4051 GGGTGTGCT GCGTGTGCT GGGAGGCTT TGGGAGGCTT GAGGAGGCT
 GCGAGGAGCT CCGAGGAGCT CCGAGGAGCT ACCGAGGCT CTAAGAGGCT
 4101 CTCTCTGAG TGTCTCCGAG GCGTGTGCT GCGAGGAGCT TGTGTGTG
 GAGGAGGCT TGTCTCCGAG GCGTGTGCT GCGAGGAGCT TGTGTGTG
 4151 ATAGGAGGCT GCGTGTGCT GCGTGTGCT GCGAGGAGCT TGTGTGTG
 TATCTCTGAG GCGTGTGCT GCGTGTGCT GCGAGGAGCT TGTGTGTG
 4201 GCGTGTGCT GCGTGTGCT GCGTGTGCT GCGAGGAGCT TGTGTGTG
 CAGGAGGCT GCGTGTGCT GCGTGTGCT GCGAGGAGCT TGTGTGTG
 4251 GCGTGTGCT GCGTGTGCT GCGTGTGCT GCGAGGAGCT TGTGTGTG
 CCGAGGAGCT GCGTGTGCT GCGTGTGCT GCGAGGAGCT TGTGTGTG
 4301 GGGAGGCTGT CCGTGTGCT GCGTGTGCT GCGAGGAGCT TGTGTGTG
 CCGTGTGCT GCGTGTGCT GCGTGTGCT GCGAGGAGCT TGTGTGTG
 4351 CCGTGTGCT GCGTGTGCT GCGTGTGCT GCGAGGAGCT TGTGTGTG
 GCGAGGAGCT GCGTGTGCT GCGTGTGCT GCGAGGAGCT TGTGTGTG
 4401 GCGTGTGCT GCGTGTGCT GCGTGTGCT GCGAGGAGCT TGTGTGTG
 CCGAGGAGCT GCGTGTGCT GCGTGTGCT GCGAGGAGCT TGTGTGTG
 4451 TGGTGTGCT TGTGTGTG TACAGGAGCT CTGCGAGGCT CTCTGTGCA
 ACCGAGGCTT GAGGAGGCTT ATGTGTGCT GAGGAGGCTT GAGGAGGCTT
 4501 AGGGGCTGT GCGTGTGCT GCGTGTGCT GCGAGGAGCT TGTGTGTG
 TCGGAGGCTT GCGTGTGCT GCGTGTGCT GCGAGGAGCT TGTGTGTG
 4551 CAGGAGGCTT CCGTGTGCT GCGTGTGCT GCGAGGAGCT TGTGTGTG
 TGTGTGTGCT GCGTGTGCT GCGTGTGCT GCGAGGAGCT TGTGTGTG
 4601 GCGTGTGCT GCGTGTGCT TCGGAGGCT GCGTGTGCT GCGTGTGCT
 GCGGAGGCT GCGTGTGCT GCGTGTGCT GCGAGGAGCT TGTGTGTG
 4651 CCGTGTGCT GCGTGTGCT TCGGAGGCT GCGTGTGCT TCGGAGGCT
 GCGGAGGCT GCGTGTGCT GCGTGTGCT GCGAGGAGCT TGTGTGTG
 4701 TGGGAGGCT GCGTGTGCT GCGTGTGCT GCGAGGAGCT TGTGTGTG
 ACCGAGGCT GCGTGTGCT GCGTGTGCT GCGAGGAGCT TGTGTGTG
 4751 ACTGCGGCTT TGTGTGTG ATACGAGCT TCGGAGGCT CTCTGTGCA
 TGGGAGGCTT ATACGAGCT TGTGTGTG GCGGAGGCT TGTGTGTG
 4801 CAGGAGGCT GCGTGTGCT CCGAGGAGCT CCGAGGAGCT GCGTGTGCT
 GCGTGTGCT GCGGAGGCT GCGTGTGCT GCGAGGAGCT TGTGTGTG

Fig. 7 continued

4851 AGGGAGGCTT ACAGTGTGCT TGTCTGTGAG GGGAGGCTT ACTGCGGCTT
 TCGGAGGCTT TGTGTGTG AGGAGGCTT CCGTGTGCT TGGGAGGCTT
 4901 CTCTGTGAG GAGGAGGCTT TCGGAGGCTT CCGTGTGCT TGGGAGGCTT
 GAGGAGGCTT CTCTGTGAG GAGGAGGCTT CCGTGTGCT TGGGAGGCTT
 4951 GCGTGTGCT CCGAGGAGCT CCGAGGAGCT CCGTGTGCT TGGGAGGCTT
 CCGAGGAGCT GCGTGTGCT GCGTGTGCT CCGAGGAGCT CCGTGTGCT
 5001 ACAGTGTGCT TGTGTGTG GCGGAGGCTT CCGTGTGCT TGGGAGGCTT
 TGTGTGTG GCGGAGGCTT CCGTGTGCT TGGGAGGCTT CCGTGTGCT
 5051 GCGGAGGCTT TCGGAGGCTT GCGGAGGCTT CCGTGTGCT TGGGAGGCTT
 CTCTGTGCT GCGGAGGCTT CCGTGTGCT TGGGAGGCTT CCGTGTGCT
 5101 CCGGAGGCTT CCGAGGAGCT CCGTGTGCT TCGGAGGCTT CCGTGTGCT
 GCGTGTGCT GCGGAGGCTT CCGTGTGCT TGGGAGGCTT CCGTGTGCT
 5151 TGTGTGTG GCGGAGGCTT CCGTGTGCT TCGGAGGCTT CCGTGTGCT
 AGGAGGCTT CCGTGTGCT TCGGAGGCTT CCGTGTGCT TGGGAGGCTT
 5201 TCGGAGGCTT CCGAGGAGCT CCGTGTGCT TCGGAGGCTT CCGTGTGCT
 AGGAGGCTT GCGTGTGCT GCGTGTGCT CCGAGGAGCT CCGTGTGCT
 5251 CCGAGGCTT CCGTGTGCT TCGGAGGCTT CCGTGTGCT TGGGAGGCTT
 GCGTGTGCT GCGGAGGCTT CCGTGTGCT TGGGAGGCTT CCGTGTGCT
 5301 GCGGAGGCTT CCGTGTGCT TCGGAGGCTT CCGTGTGCT TGGGAGGCTT
 CCGTGTGCT TCGGAGGCTT GCGGAGGCTT CCGTGTGCT TGGGAGGCTT
 5351 CCGAGGAGCT CCGTGTGCT CCGTGTGCT CCGAGGAGCT CCGTGTGCT
 GCGTGTGCT GCGGAGGCTT GCGGAGGCTT CCGTGTGCT TGGGAGGCTT
 5401 CCGTGTGCT TCGGAGGCTT CCGTGTGCT TCGGAGGCTT CCGTGTGCT
 GCGGAGGCTT CCGTGTGCT TCGGAGGCTT CCGTGTGCT TGGGAGGCTT
 5451 ACTGCGGCTT CCGTGTGCT GCGGAGGCTT CCGTGTGCT TGGGAGGCTT
 TGGGAGGCTT GCGGAGGCTT CCGTGTGCT TGGGAGGCTT CCGTGTGCT
 5501 GCGGAGGCTT CCGTGTGCT TCGGAGGCTT CCGTGTGCT TGGGAGGCTT
 GCGGAGGCTT GCGGAGGCTT CCGTGTGCT TGGGAGGCTT CCGTGTGCT
 5551 AGGAGGCTT GCGGAGGCTT CCGTGTGCT TCGGAGGCTT CCGTGTGCT
 TCGGAGGCTT CCGTGTGCT TCGGAGGCTT CCGTGTGCT TGGGAGGCTT
 5601 GCGGAGGCTT CCGTGTGCT TCGGAGGCTT CCGTGTGCT TGGGAGGCTT
 CCGTGTGCT GCGGAGGCTT CCGTGTGCT TGGGAGGCTT CCGTGTGCT
 5651 GCGTGTGCT TCGGAGGCTT CCGTGTGCT TCGGAGGCTT CCGTGTGCT
 CCGTGTGCT GCGGAGGCTT CCGTGTGCT TGGGAGGCTT CCGTGTGCT
 5701 ATCTGTGAG CTGCTGTGCT GCGTGTGCT CCGTGTGCT TGGGAGGCTT
 TGGGAGGCTT GCGGAGGCTT CCGTGTGCT TGGGAGGCTT CCGTGTGCT
 5751 CAGGAGGCTT GCGGAGGCTT CCGTGTGCT TCGGAGGCTT CCGTGTGCT
 GCGGAGGCTT CCGTGTGCT TCGGAGGCTT CCGTGTGCT TGGGAGGCTT
 5801 GCGTGTGCT TCGGAGGCTT CCGTGTGCT TCGGAGGCTT CCGTGTGCT
 CCGTGTGCT GCGGAGGCTT CCGTGTGCT TGGGAGGCTT CCGTGTGCT

Fig. 7 continued

```

5851 GAAGTGTGGG AAGCATCCAG GTCCCTGGGT GGTTCANCA GGAATTCAG
CTTGACACCC TTCTAGGTTC CAGGACCCA CCGAAGTTGT CTCAAGGTC
5901 CACGGGAAOC ACTGGACAC CAGGGGTGTG TCCTGATCTG GGGACAGGCC
GTGCCCCTGG TGACTGTGTG GACCCACAC AGGACTAGAC CCCTGTCCGG
5951 AGCCACACCC CGAGTCTTAG GGAATCCAG GAGACGCCA CTGCTCTGGG
TCGCTGTGGG GCTCAGGATC CTGAGGTCT CTGCTCGGT GAGGGGACCC
6001 CTCACGGAA GCCCCTCAT GCGCTAGGC CTGCTCGGT GAGGACGCC
GAGGTGCTT CGGGGAGTA CGGCTACCG GACCGAGAC CCCTGTCCGG
6051 AGCTAGGCCA GTGTGTGGCA GGAACAGGCC CCAATGTGG AGCTGACCC
TCGATCCGGT CACACACCGT CCTGCTCCG GGTATACCC TCGATGGGG
6101 TTGGGATTCT GGAAGTGTGC TGAAGGCGG GGGAGAGCCA GCTCTCCCC
AACCTTAGA CCTCAGACG ACTACCCGT CCTCTCGT GAGGAGGGG
6151 TTGAGGGAG GTCTTAGTC CTGGGTTAC CCGAGAGGC CTGGGTGCC
AACTCCCTCC CAGAACTAC GACCCCAAT GCGCTCCGG GACCCGCGC
6201 GGAAGCTCC CGGTGTGGT GAAAGGAAG CAGATGTGT CAGCTTCTCC
CCTGCGAGGG GCCAAGCGA CTTCCTTTC GTCTACACA GTGAGAGAG
6251 ACTGAGGCCA TCTGCTCTT CCGGGGTGG GCCCATAGA TCTGGTCCC
TGACTCGGT AGACAGAGG GCGCCGAGC GCGGTATCT AGACCGAGG
6301 TGTGTGGCC CCTGTGTG ATGCGAGGA TACCCCTGA AACTGCCAAT
ACACACGGG GGGACGAGC TACGCTCTT ATGGGAGCT TTGAGGTTA
6351 CCCAGAGGAC AAGACTGGG AGTCCCTGC GGGAGAGCC ATCCCGCAC
GGGTCTCTG TTCTGACCT TCAAGGAGT CCTCTCGG TAGGGGCTG
6401 CCTGACCCAC AAGAGGGACT CCGCTGCC ACACAGGATC CTTCAAGGA
GAGCTGGGT TTCTCCCTGA GAGCAGCGG TGCTCCGAG GAGGTGCC
6451 TCC
      AGG

```

Fig. 7 continued

【図 8】

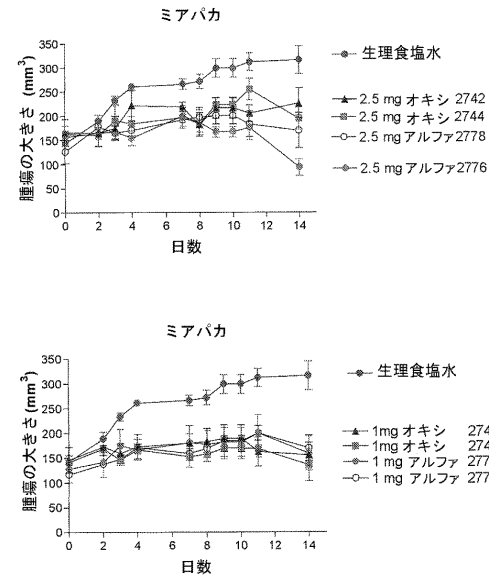


Fig. 8

【図 9 A】

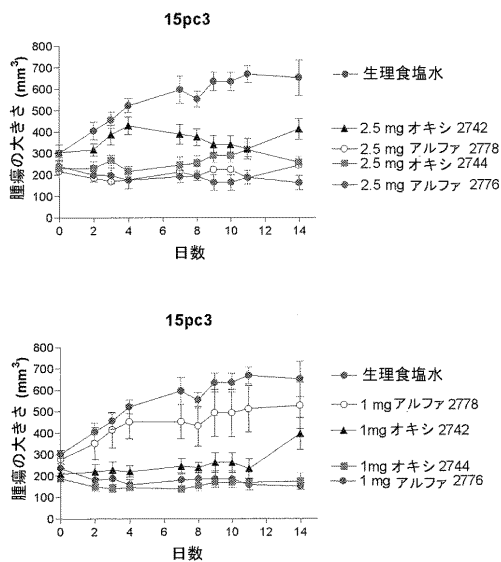


Fig. 9

【図 9 B】

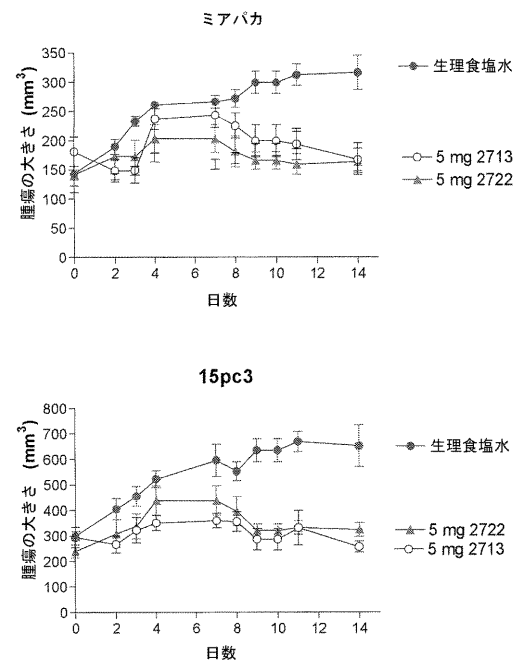
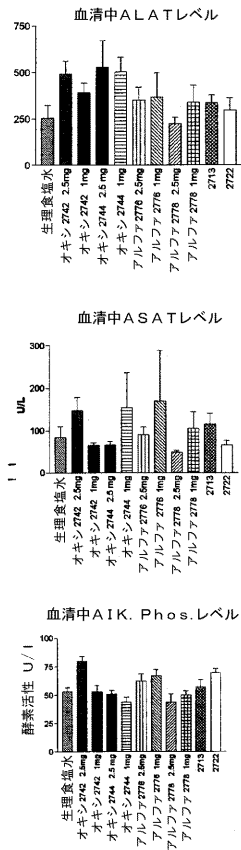


図 9 の続き

【図 10 A】



F i g . 10

【図 10 B】

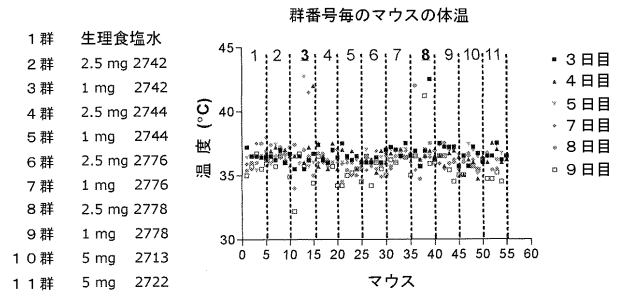


図 10 の続き

【手続補正書】

【提出日】平成17年9月7日(2005.9.7)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2006518197000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DK2004/000097

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/11 A61K31/7088 A61P35/00

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)

IPC 7 C12N A61K A61P

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 078 782 A (IGEN INT. INC.; LELAND SHAH KENTEN GOODMAN LOWKE NAMBA BLACKBURN MASSEY) 20 June 2000 (2000-06-20) SEQ ID NO:8 column 29, lines 40,41	1-4
X	US 5 962 218 A (IGEN INT. INC. (US) LELAND SHAH KENTEN GOODMAN LOWCKE BLACKBURN MASSEY) 5 October 1999 (1999-10-05) SEQ ID NO:8 column 30, lines 34,35	1-4
A	US 5 582 972 A (ISIS PHARMACEUTICALS, INC. (US); LIMA W.; MONIA B.; FREIER S.; ECKER D) 10 December 1996 (1996-12-10) the whole document	1
	----- -/-	



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in 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.

"G" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 September 2004

Date of mailing of the international search report

12.01.2005

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

Macchia, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DK2004/000097

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99/02732 A (ISIS PHARMACEUTICALS, INC. (US); MONIA B.P.; COWSERT L.M.; MANOHARAN M) 21 January 1999 (1999-01-21) cited in the application the whole document	1-5,10, 13-15, 51,52, 55,56, 59-63, 68-72, 76,77, 79, 81-88,93
A	WO 01/48190 A (EXIQON A/S (DK); DRUM HENRIK; KOCH TROEL; SKOUV JAN; JAKOBSEN MOGEN H) 5 July 2001 (2001-07-05) the whole document	6-9,11, 13,14, 16,78,80
A	BIESSEN E.A.L. ET AL.: "Design of a targeted peptide nucleic acid prodrug to inhibit hepatic human microsomal triglyceride transfer protein expression in hepatocytes" BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 13, 2002, pages 295-302, XP002290397 the whole document	57
A	KURRECK J. ET AL.: "Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 30, no. 9, 1 May 2002 (2002-05-01), pages 1911-1918, XP002281375 ISSN: 0305-1048 the whole document	6-9,11, 13,14, 16,78,80
A	KOJI MORITA ET AL.: "2'-O,4'-C-ethylene-bridged nucleic acid (ENA): highly nuclease resistant and thermodynamically stable oligonucleotides for antisense drug" BIOORGANIC AND MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, vol. 12, 2002, pages 73-76, XP002290399 the whole document	6-8,11, 16,78,80
A	ALTMANN K.-H. ET AL.: "NOVEL CHEMISTRY" 1998, APPLIED ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDE TECHNOLOGY; STEIN C.A. AND KRIEG A.M. EDS. WILEY-LISS INC., US , XP002119324 ISBN: 0-471-17279-0 the whole document	9,10

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DK2004/000097

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RAIT A.S. ET AL.: "Inhibitory effects of the combination of HER-2 antisense oligonucleotide and chemotherapeutic agents used for the treatment of human breast cancer" CANCER GENE THERAPY, vol. 8, no. 10, 2001, pages 728-739, XP008005112 ISSN: 0929-1903 the whole document	53,54
A	CUNNINGHAM C.C. ET AL.: "A phase I trial of H-ras antisense oligonucleotide ISIS 2503 administered as a continuous intravenous infusion in patients with advanced carcinoma" CANCER, AMERICAN CANCER SOCIETY, vol. 92, no. 5, 1 September 2001 (2001-09-01), pages 1265-1271, XP002232130 PHILADELPHIA, PA, US ISSN: 0008-543X cited in the application page 1266, paragraph 2	
A	BENNETT C.F., ET AL.: "Pharmacology of antisense therapeutic agents. Cancer and inflammation" 1996, METHODS IN MOLECULAR MEDICINE. ANTISENSE THERAPEUTICS. S. AGRAWAL ED. HUMANA PRESS INC. , TOTOWA NJ US , XP002952127 ISBN: 0-89603-305-8 in particular page 20 page 13 - page 46	
A	COWSERT L.M.: "In vitro and in vivo activity of antisense inhibitors of ras: potential for clinical development" ANTI-CANCER DRUG DESIGN, vol. 12, no. 5, 1997, pages 359-371, XP008035632 cited in the application	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/DK2004/000097

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.: 46-49
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 68-82 and 85-93 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.: 46-49
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:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(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:

see additional sheet

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.:
17-19, 32-34 all totally; 1-16, 31, 50-93 all partially

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/ DK2004/ 000097

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 17-19, 32-34 all totally; 1-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:2-4, 23, 24 and 72.

Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

2. claims: 20, 22, 23, 35, 37, 38 all totally; 1-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:5, 7, 8, 32-34.

Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

3. claims: 21, 36 all totally; 1-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:6, 69, 70.

Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

4. claims: 24, 25, 39, 40 all totally; 1-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:9, 10.

Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

5. claims: 26, 41 all totally; 1-16, 31, 50-93 all partially

International Application No. PCT/DK2004/000097

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:11. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

6. claims: 27, 42 all totally; 1-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:12. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

7. claims: 28, 43 all totally; 1-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:13. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

8. claims: 29, 44 all totally; 1-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:14. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

9. claims: 30, 45 all totally; 1-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:15. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

10. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

International Application No. PCT/DK2004/000097

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:16. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

11. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:17. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

12. claims: 1-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:18, 19, 75. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

13. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:20. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

14. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:21. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

15. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

International Application No. PCT/ DK2004/ 000097

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:22. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

16. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:25. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

17. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:26. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

18. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:27. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

19. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:28. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

20. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

International Application No. PCT/DK2004/000097

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:29. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

21. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:30. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

22. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:31. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

23. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:35. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

24. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:36. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

25. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

International Application No. PCT/ DK2004/ 000097

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:37. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

26. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:38. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

27. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:39. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

28. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:40. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

29. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:41. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

30. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

International Application No. PCT/ DK2004/ 000097

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:42. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

31. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:43. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

32. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:44. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

33. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:45. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

34. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:46. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

35. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

International Application No. PCT/ DK2004/ 000097

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:47. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

36. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:48. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

37. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:49. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

38. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:50. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

39. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:51. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

40. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

International Application No. PCT/DK2004/000097

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:52. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

41. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:53. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

42. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:54. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

43. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:55. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

44. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:56. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

45. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

International Application No. PCT/ DK2004/ 000097

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:57. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

46. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:58. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

47. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:59. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

48. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:60. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

49. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:61. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

50. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

International Application No. PCT/ DK2004/ 000097

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:62. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

51. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:63. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

52. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:64. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

53. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:65. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

54. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:66. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

55. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

International Application No. PCT/DK2004/000097

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:67. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

56. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:68. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

57. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:71. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

58. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:73. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

59. claims: 1-11, 13-16, 31, 50-93 all partially

A compound consisting of a total of 8-50 nucleotides and/or nucleotide analogues, wherein said compound comprises a subsequence of at least 8 nucleotides or nucleotide analogues, said subsequence being located within a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:74. Compounds, conjugates, compositions, uses and methods related thereto.

International Application No. PCT/DK2004/000097

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 68-82 and 85-93 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.

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 46-49

Present set of claims lacks claims 46-49. Consequently, these claims could not be searched.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DK2004/000097

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6078782	A	20-06-2000	US 5935779 A	10-08-1999
			US 6325973 B1	04-12-2001
			US 5779976 A	14-07-1998
			US 5962218 A	05-10-1999
			AT 173542 T	15-12-1998
			AU 668085 B2	26-04-1996
			AU 1420692 A	07-09-1992
			AU 1530492 A	07-09-1992
			CA 2103674 A1	07-08-1992
			CN 1065339 A ,B	14-10-1992
			CN 1064945 A ,B	30-09-1992
			DE 69227624 D1	24-12-1998
			DE 69227624 T2	08-07-1999
			DK 570518 T3	02-08-1999
			EP 1286164 A2	26-02-2003
			EP 0570518 A1	24-11-1993
			EP 0877252 A2	11-11-1998
			ES 2126591 T3	01-04-1999
			GR 3029446 T3	28-05-1999
			HK 1017970 A1	11-08-2000
			IE 920380 A1	12-08-1992
			IE 920381 A1	12-08-1992
			IL 100866 A	31-10-1995
			IL 100867 A	08-12-1995
			JP 3182515 B2	03-07-2001
			JP 11148901 A	02-06-1999
			JP 3128541 B2	29-01-2001
			JP 11125601 A	11-05-1999
			JP 3061416 B2	10-07-2000
			JP 6509412 T	20-10-1994
			JP 3013937 B2	28-02-2000
			JP 6508203 T	14-09-1994
			KR 226231 B1	15-10-1999
			NZ 241537 A	25-06-1993
			NZ 241538 A	25-02-1993
			WO 9214138 A1	20-08-1992
			WO 9214139 A1	20-08-1992
			US 5635347 A	03-06-1997
			US 2003008339 A1	09-01-2003
			US 5705402 A	06-01-1998
			US 6448091 B1	10-09-2002
			US 5770459 A	23-06-1998
			US 5746974 A	05-05-1998
			US 5798083 A	25-08-1998
			ZA 9200803 A	25-11-1992
			ZA 9200804 A	30-12-1992
			AT 180057 T	15-05-1999
			AU 637775 B2	10-06-1993
			AU 4635789 A	28-05-1990
			CA 2002101 A1	03-05-1990

US 5962218	A	05-10-1999	AT 173542 T	15-12-1998
			AU 668085 B2	26-04-1996
			AU 1420692 A	07-09-1992
			CA 2103674 A1	07-08-1992
			CN 1064945 A ,B	30-09-1992
			DE 69227624 D1	24-12-1998
			DE 69227624 T2	08-07-1999

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DK2004/000097

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
US 5962218	A	DK 570518 T3	02-08-1999	
		EP 1286164 A2	26-02-2003	
		EP 0570518 A1	24-11-1993	
		EP 0877252 A2	11-11-1998	
		ES 2126591 T3	01-04-1999	
		GR 3029446 T3	28-05-1999	
		HK 1017970 A1	11-08-2000	
		IE 920380 A1	12-08-1992	
		IL 100867 A	08-12-1995	
		JP 3182515 B2	03-07-2001	
		JP 11148901 A	02-06-1999	
		JP 3061416 B2	10-07-2000	
		JP 6509412 T	20-10-1994	
		KR 226231 B1	15-10-1999	
		NZ 241537 A	25-06-1993	
		WO 9214139 A1	20-08-1992	
		US 6325973 B1	04-12-2001	
		US 5935779 A	10-08-1999	
		US 5779976 A	14-07-1998	
		US 6078782 A	20-06-2000	
		US 5635347 A	03-06-1997	
		US 2003008339 A1	09-01-2003	
		US 5705402 A	06-01-1998	
		US 6448091 B1	10-09-2002	
		US 5770459 A	23-06-1998	
		US 5746974 A	05-05-1998	
		US 5798083 A	25-08-1998	
		AT 180057 T	15-05-1999	
		AU 637775 B2	10-06-1993	
		AU 4635789 A	28-05-1990	
		CA 2002101 A1	03-05-1990	
		DE 68928994 D1	17-06-1999	
		DE 68928994 T2	16-12-1999	
		EP 0446245 A1	18-09-1991	
		EP 0757252 A2	05-02-1997	
		IL 92164 A	19-01-1996	
		JP 2992974 B2	20-12-1999	
		JP 4502209 T	16-04-1992	
		KR 143993 B1	15-07-1998	
		SG 60022 A1	22-02-1999	
		WO 9005301 A1	17-05-1990	
		ZA 8908290 A	26-06-1991	
		AU 1530492 A	07-09-1992	
US 5582972	A	10-12-1996	AT 186072 T	15-11-1999
		AU 672175 B2	26-09-1996	
		AU 2249792 A	12-01-1993	
		BR 9206156 A	17-10-1995	
		CA 2111472 A1	23-12-1992	
		DE 69230223 D1	02-12-1999	
		DE 69230223 T2	17-02-2000	
		DK 590082 T3	08-11-1999	
		EP 0590082 A1	06-04-1994	
		ES 2138972 T3	01-02-2000	
		JP 2726754 B2	11-03-1998	
		JP 6504679 T	02-06-1994	
		WO 9222651 A1	23-12-1992	
		WO 9408003 A1	14-04-1994	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DK2004/000097

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5582972	A	US 5582986 A	10-12-1996
		US 5576208 A	19-11-1996
		US 5965722 A	12-10-1999
WO 9902732	A 21-01-1999	US 5872242 A	16-02-1999
		AU 732144 B2	12-04-2001
		AU 8289998 A	08-02-1999
		CA 2296535 A1	21-01-1999
		EP 1009860 A1	21-06-2000
		JP 2001509394 T	24-07-2001
		WO 9902732 A1	21-01-1999
		US 6784290 B1	31-08-2004
		US 2004072786 A1	15-04-2004
		US 2003013670 A1	16-01-2003
WO 0148190	A 05-07-2001	AU 3041701 A	09-07-2001
		CA 2395320 A1	05-07-2001
		EP 1240322 A2	18-09-2002
		WO 0148190 A2	05-07-2001
		JP 2003524637 T	19-08-2003
		US 2002068709 A1	06-06-2002

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 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 13/10 (2006.01)	A 6 1 P 13/10	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 13/08 (2006.01)	A 6 1 P 13/08	
A 6 1 P 1/18 (2006.01)	A 6 1 P 1/18	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 17/12 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 17/12	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
	A 6 1 P 25/00	
	A 6 1 P 43/00	1 0 5

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,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,IT,LU,MC,NL,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,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)
ウィンドウズ

- (72)発明者 ボー・ハンセン
デンマーク、デーコーー 1 3 5 2 コペンハーゲン・コー、1 チル・ヘイレ、レーアホルムスギャーゼ 3 番
- (72)発明者 シャルロッテ・アルベク・トゥルーエ
デンマーク、デーコーー 1 3 2 5 コペンハーゲン・コー、スチューエン、デルフィンギャーゼ 4 8 番
- (72)発明者 カミール・ドゥモング・ペーターセン
デンマーク、デーコーー 4 3 2 0 ライア、サンバンケン 4 0 番
- (72)発明者 マイケン・ヴェスターゴー
デンマーク、デーコーー 3 4 6 0 ビルケレズ、エレバッケン 5 番
- (72)発明者 マルギット・ヴィッセンバッハ
デンマーク、デーコーー 3 4 8 0 フレゼンスボー、エンルupp・ビヴァイ 5 番

F ターム (参考) 4B024 AA01 CA01 CA11

4C084 AA13 AA19 MA13 MA16 MA22 MA23 MA24 MA28 MA31 MA32
MA34 MA35 MA37 MA41 MA43 MA52 MA55 MA56 MA59 MA60

	MA63	MA66	NA05	NA14	NA15	ZA012	ZA332	ZA452	ZA592	ZA662
	ZA812	ZA892	ZA912	ZA962	ZB112	ZB132	ZB152	ZB212	ZB262	ZB332
4C086	AA01	AA02	AA03	EA16	MA01	MA02	MA04	NA05	NA14	NA15
	ZA01	ZA33	ZA45	ZA59	ZA66	ZA81	ZA89	ZA91	ZA96	ZB11
	ZB13	ZB15	ZB21	ZB26	ZB33					