

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-141402

(P2006-141402A)

(43) 公開日 平成18年6月8日(2006.6.8)

(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 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
審査請求 未請求 請求項の数 28 O L (全 62 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2006-258 (P2006-258)	(71) 出願人	595104323
(22) 出願日	平成18年1月4日 (2006.1.4)		アイシス・ファーマシューティカルス・インコーポレーテッド
(62) 分割の表示	特願2000-574727 (P2000-574727) の分割		I s i s P h a r m a c e u t i c a l s I n c
原出願日	平成11年8月19日 (1999.8.19)		アメリカ合衆国カリフォルニア州92008, カールズバッド, ラザフォード・ロード 1896
(31) 優先権主張番号	09/166, 203	(74) 代理人	100089705
(32) 優先日	平成10年10月5日 (1998.10.5)		弁理士 社本 一夫
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100076691
			弁理士 増井 忠武
		(74) 代理人	100075270
			弁理士 小林 泰
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 インテグリン α 4発現のアンチセンス調節

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 ヒトインテグリン α 4の発現を調節するための組成物および方法を提供する。【解決手段】 ヒトインテグリン α 4をコード化する核酸に特異的にハイブリダイズ可能なアンチセンス化合物、特にアンチセンスオリゴヌクレオチドからなる。ヒトインテグリン α 4発現を調節するために、およびインテグリン α 4発現に関連する疾患の治療のためにこれらの化合物を使用する方法からなる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトインテグリン $\alpha 4$ をコード化する核酸分子を標的とし、ヒトインテグリン $\alpha 4$ の発現を阻害する、8 から 30 ヌクレオチド長のアンチセンス化合物。

【請求項 2】

アンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項 1 に記載のアンチセンス化合物。

【請求項 3】

アンチセンスオリゴヌクレオチドが SEQ ID NO: 13、15、35、37、39 または 46 を含む、請求項 2 に記載のアンチセンス化合物。

【請求項 4】

少なくとも一つの修飾ヌクレオシド間結合を含む、請求項 2 に記載のアンチセンス化合物。

【請求項 5】

修飾ヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合である、請求項 4 のアンチセンス化合物。

【請求項 6】

少なくとも一つの修飾糖部分を含む、請求項 2 に記載のアンチセンス化合物。

【請求項 7】

修飾糖部分が 2'-O-メトキシエチル糖部分である、請求項 6 に記載のアンチセンス化合物。

【請求項 8】

少なくとも一つの修飾ヌクレオ塩基を含む、請求項 2 に記載のアンチセンス化合物。

【請求項 9】

修飾ヌクレオ塩基が 5-メチルシトシンである、請求項 8 に記載のアンチセンス化合物。

【請求項 10】

キメラオリゴヌクレオチドである、請求項 2 に記載のアンチセンス化合物。

【請求項 11】

請求項 1 のアンチセンス化合物および医薬的に許容可能な担体または希釈剤を含む医薬組成物。

【請求項 12】

コロイド状分散系をさらに含む、請求項 11 に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

アンチセンス化合物がアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項 11 に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

ヒト細胞または組織においてインテグリン $\alpha 4$ の発現を阻害する方法であって、インテグリン $\alpha 4$ の発現が阻害されるように該細胞または組織と請求項 1 のアンチセンス化合物を接触させることを含む方法。

【請求項 15】

インテグリン $\alpha 4$ に関連する疾患または状態を持っているヒトを処置する方法であって、インテグリン $\alpha 4$ の発現が阻害されるように該動物に治療的または予防的に有効量の請求項 1 のアンチセンス化合物を投与することを含む方法。

【請求項 16】

疾患または状態が炎症性疾患または状態または自己免疫疾患または状態である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

疾患または状態が、冒された組織内への白血球移動により特徴付けられる、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 18】

冒された組織が中枢神経系組織である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

10

20

30

40

50

疾患または状態が慢性関節リウマチ、多発性硬化症、喘息、炎症性腸疾患、糖尿病、肝炎、同種移植片拒絶または腫瘍転移である、請求項15に記載の方法。

【請求項20】

ヒト細胞または組織中のVLA-4レベルを低下させる方法であって、VLA-4のレベルが低下するように該細胞または組織と請求項1のアンチセンス化合物を接触させることを含む方法。

【請求項21】

ヒト細胞または組織中の $\alpha 4\beta 7$ レベルを低下させる方法であって、 $\alpha 4\beta 7$ のレベルが低下するように該細胞または組織と請求項1のアンチセンス化合物を接触させることを含む方法。

10

【請求項22】

ヒトにおいて循環系内への造血前駆細胞の動員を増加させる方法であって、循環系内への該造血前駆細胞の動員が増加するように該ヒトと請求項1のアンチセンス化合物を接触させることを含む方法。

【請求項23】

アンチセンスオリゴヌクレオチドがSEQ ID NO: 67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、81、82、84、85、86、87、88、89、90、91、92または93を含む、請求項2に記載のアンチセンス化合物。

【請求項24】

疾患または状態が転移性疾患または状態である、請求項15に記載の方法。

20

【請求項25】

疾患または状態がメラノーマである、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

第一の型の細胞の第二の型の細胞への接着を減少させる方法であって、該細胞型の少なくとも一つを請求項1のアンチセンス化合物と接触させることを含む方法。

【請求項27】

該第一の細胞型がメラノーマ細胞またはリンパ球である、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

該第二の細胞型が内皮細胞である、請求項26に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

30

【発明の詳細な説明】

【0001】

技術分野

本発明はインテグリン $\alpha 4$ の発現を調節するための組成物および方法を提供する。特に、本発明はヒトインテグリン $\alpha 4$ をコード化する核酸に特異的にハイブリダイズ可能なアンチセンス化合物、特にオリゴヌクレオチドに関する。そのようなオリゴヌクレオチドはヒトインテグリン $\alpha 4$ 発現を調節することが示されている。

【0002】

背景技術

炎症とは、感染性または損傷性因子の破壊および損傷を受けた組織の単離を生じる、損傷、感染または組織破壊に応答して組織により惹起される局所的な保護的応答である。典型的な炎症応答は以下のように進行する：外来物としての抗原の認識または組織損傷の認識、可溶性炎症メディエーターの合成および放出、感染または組織損傷部位への炎症性細胞の動員、侵襲している生物体または損傷を受けた組織の破壊および除去、および侵襲している生物体または損傷が解決された後のシステム不活性化。炎症性成分を含む多くのヒト疾患において、炎症性応答を減弱させる通常の恒常性機構は不完全であり、正常組織の損傷および破壊を生じる。

40

【0003】

上記段階の各々での免疫応答の活性化に、細胞-細胞相互作用が関係している。正常炎症応答において最も早く検出可能な出来事の一つは、血管内皮細胞への白血球の付着であ

50

り、血管系から感染または損傷部位への白血球の移動が続いて起こる。血管内皮細胞へのこれらの白血球（または白血球細胞）の付着は、血管系からの移動における必須の段階である（Harlan, J.M., Blood 1985, 65, 513-525）。この応答は白血球および血管内皮細胞の表面に発現された接着分子の相互作用により媒介される。超後期抗原-4（VLA-4、 $\alpha 4 \beta 1$ またはCD49d / CD29とも称される）は非共有結合的に連結された α および β サブユニットからなるホモダイマー性接着レセプターであり、サイトカイン刺激内皮細胞上に発現される血管細胞接着分子-1（VCAM-1）への白血球の付着を媒介するために働いている。VCAM-1およびVLA-4間のこの相互作用は多発性硬化症（MS）、慢性関節リウマチ、喘息、乾癬およびアレルギーを含む急性および慢性炎症状態における白血球の血管外遊出に寄与している。

10

【 0 0 0 4 】

フィブロネクチンもまたVLA-4のリガンドである。フィブロネクチンは胎児発生、傷治癒および腫瘍細胞転移を含む多くの過程で重要な役割を果たしている（Guan, J.-L. and Hynes, R.O., Cell 1990, 60, 53-61）。

【 0 0 0 5 】

VLA-4は $\alpha 4$ インテグリンおよび $\beta 1$ インテグリンのヘテロダイマーである。 $\alpha 4$ インテグリンはまた $\beta 7$ インテグリン鎖とヘテロダイマーを形成でき、その主たるリガンドが粘膜血管指向性MadCAM-1であるので粘膜ホーミングレセプターとして知られているインテグリン $\alpha 4 \beta 7$ を形成する。 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンは腸管に対する指向性を持つ記憶T細胞の副群を同定し、一方、 $\alpha 4 \beta 1$ （VLA-4）はほとんどの単核白血球上で構成的に発現されているが、循環している好中球では発現されない。VCAM-1とVLA-4の相互作用は、VLA-4がアテローム性動脈硬化症、アレルギーおよび喘息、関節炎および腫瘍細胞転移を含む炎症性疾患の治療標的となる可能性があることを示唆している（Kassner, P.D., et al., Adv. Exp. Med. Biol. 1992, 323, 163-170）。VLA-4はまた骨髄において、造血幹細胞接着の促進（即ち、保持）においても役割を果たしていることが観察されている（Papayannopoulou and Nakamoto, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1993, 90, 9374-9378）。

20

【 0 0 0 6 】

喘息は肺への好酸球浸潤に関連した炎症性疾患である。VLA-4は好酸球上に発現される。Metzger, W.J.は（Springer Semin. Immunopathol. 1995, 16, 467-478）、喘息のウサギモデルを用い、抗VLA-4抗体およびCS-1ペプチドの両方が肺への好酸球の浸潤を減少させ、および喘息の発生を減少させることができることを示している。

30

【 0 0 0 7 】

慢性関節リウマチは炎症に関連する別の疾患である。Muler-Ladner, U.らは（J. Rheumatology 1997, 24, 1873-1880）、CS-1を含む別々にスプライシングされた形のフィブロネクチンがリウマチ様滑膜中に発現されていることを観察している。さらに彼らは、フィブロネクチンの発現はVLA-4発現細胞の動員を生じるのみでなく、リウマチ様滑膜中の線維芽細胞がVLA-4を発現していることも観察している。Seiffge, D.は（J. Rheumatology 1996, 23, 2086-2091）関節炎のラットモデルを用い、VLA-4の $\alpha 4$ 鎖に対するモノクローナル抗体が徴候の改善を生じたことを示している。

【 0 0 0 8 】

VLA-4はまた多くの自己免疫疾患にも関係している。Marazuela, M.らは（Eur. J. Immunol. 1994, 24, 2483-2490）、グレーブス病および橋本甲状腺炎においてVLA-4 / VCAM-1およびLFA-1 / ICAM-1、3経路の両方の発現が上昇していることを観察しており、この両方がこれらの疾患に関係していることを示唆している。VLA-4はまた多発性硬化症にも関係している。VLA-4に対する抗体は、多発性硬化症に類似した、実験的に誘導された疾患である実験的自己免疫脳脊髄炎（EAE）を防止することが観察されている（Yednock, T.A., et al., Nature 1992, 356, 63-66）。VLA-4発現レベルの上昇は全身性紅斑性狼瘡の患者でも検出されている（Takeuchi, T., et al., Clin. Rheumatology 1995, 14, 370-374）。VLA-4は二つの手術過程、移植および血管再構成過程に対する細胞性応答に関与している。同種移植片拒絶は外来組織の移植における普通の応答である。CS-1ペプチドはフィブ

40

50

ロネクチンへのVLA-4結合を阻止することにより、急性拒絶 (Coito, A.J., et al., Transplantation 1998, 65, 699-706) および慢性拒絶 (Korom, S., et al., Transplantation 1998, 65, 854-859) の両方を防止することが観察されている。血管再構成手術の間、失敗の共通の原因は単球およびリンパ球の蓄積により生じる血管内膜過形成である。バルーンモデルにおいて、Lumsden, A.B.らは (J. Vasc. Surg. 1997, 26, 87-93)、抗VLA-4抗体が血管内膜過形成を減少させることを示している。

【0009】

VLA-4はまた腫瘍細胞転移にも関係している。転移において、腫瘍細胞は細胞外マトリックスを通過し、循環系に入り、および新しい組織を侵襲しなければならない。Bao, L.らは (Differentiation 1993, 52, 239-246)、乳癌腫、メラノーマ、および腎臓癌腫を含む多くのヒト腫瘍細胞株のVLA-4発現を検出しており、およびVLA-4の存在が転移能とよく相関することを観察している。Kawaguchi, S.らは (Jpn. J. Cancer Res. 1992, 83, 1304-1316)、VLA-4の $\alpha 4$ サブユニットをコード化するcDNAをヒト線維肉腫細胞株内へトランスフェクトした。これらの細胞はVLA-4を過剰発現し、in vitroでの侵襲能力の増加を示した。IL-1 (Garofalo, A., et al., Cancer Res. 1995, 55, 414-419) およびTNF- α (Okahara, H., et al., Cancer Res. 1994, 54, 3233-3236) による転移の促進はVLA-4およびVCAM-1間の相互作用に関係していることが示されている。これらの著者らは、この相互作用の阻害を目指す治療は、カヘキシー、敗血症、手術ストレスまたはTNF- α 治療的応用を含むTNF- α の高血清濃度に関連する状態での転移の危険性を減少させるのに有用であろうことを示唆している。腫瘍細胞はしばしばIL-1およびTNF- α を分泌するので、そのような治療はそのような腫瘍細胞に関連する転移の危険性を減少させるのに有用であろう。

【0010】

VLA-4は骨髄中の造血前駆細胞の保持を促進することに関係している。インテグリン $\alpha 4$ (インテグリン $\beta 2$ ではない) の抗体は血流内へ前駆/幹細胞を選択的に移動させることが観察されている (Papayannopoulou and Nakamoto, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1993, 90, 9374-9378)。この移動は循環血中で造血前駆細胞を利用可能にすることにより骨髄を回収する必要性を不要にするので、骨髄移植の分野において臨床的に適切である。

【0011】

ステロイドおよび他の抗炎症剤は炎症性疾患および状態の処置するのに有用であるが、長期間の使用は食細胞白血球移動および機能の障害により起こされるような感染の危険性を増加させるような副作用をしばしば導いている。ウサギにおいて $\beta 1$ (CD18とも称される) モノクローナル抗体により示されているように (Foster, C.A., 1996, J. Allergy Clin. Immunol., 98, 270-277)、 $\beta 1$ インテグリン鎖機能の障害が、感染に対する感受性を増加させることと関連していることにいくらかの関心が持たれている。 $\alpha 4$ 鎖の選択的障害はより望ましい方法と信じられている。 $\alpha 4$ 鎖の障害はVLA-4ヘテロダイマーならびに $\alpha 4\beta 7$ ヘテロダイマーのレベルを減少させるようであると信じられている。

【0012】

VLA-4を標的とする治療的介入剤として可能性のあるものにはモノクローナル抗体およびペプチドアンタゴニストが含まれる。Leger, O.J.P.らは (Human Antibodies 1997, 8, 3-16)、VLA-4に対するモノクローナル抗体は多発性硬化症のフェーズII臨床試験であることを記載している。CS-1ペプチドアンタゴニストはJackson, D.Y.らにより記載されている (J. Med. Chem. 1997, 40, 3359-3369)。

【0013】

Hayashiらは (Cell Struct. Funct. 1991, 16, 241-249)、インテグリン $\beta 1$ 発現を減少させるためにニワトリインテグリン $\beta 1$ と相補的なRNAを発現するベクターを使用し、細胞の接着および形を変化させている。

【0014】

種々のインテグリンを標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドが複合体組み立てにおけるインテグリンの機能的相互作用を詳細に吟味するための道具として使用された。La

IllierおよびBronner-Fraser (*Science*, 1993, 259, 692-695) は、細胞接着に対するインテグリンの影響を決定するため、ニワトリ $\beta 1$ 、ヒト $\alpha 4$ 。ラット $\alpha 1$ およびヒト $\alpha 5$ インテグリンの保存的および非保存的領域を標的とするホスホロチオエートオリゴヌクレオチドを使用した。これらと同一のオリゴヌクレオチドはまた、鳥類胚の頭蓋神経堤遊走経路内へ注射され、*in vitro* で細胞接着を阻害するこれらのオリゴヌクレオチドは *in vivo* で神経堤および / または神経管異常を起こすことが示されている (Kil et al., *Devel. Biol.* 1996, 179, 91-101)。

【 0 0 1 5 】

EP特許出願688 784 (Carolus et al.) はVLA-4の $\beta 1$ サブユニットを標的とする配列を含む、3' 誘導体化オリゴヌクレオチド類似体を開示している。

10

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、インテグリン $\alpha 4$ の発現を調節する、およびその発現に関連する疾患を処置するのに有用な手段を代表すると信じられている。

【 0 0 1 6 】

発明の概要

本発明はインテグリン $\alpha 4$ をコード化する核酸を標的とし、インテグリン $\alpha 4$ の発現を調節するアンチセンス化合物、特にオリゴヌクレオチドに関する。本発明のアンチセンス化合物を含む医薬およびその他の組成物もまた提供される。さらに、細胞または組織中のインテグリン $\alpha 4$ の発現を調節する方法が提供され、該方法は該細胞または組織と一つまたはそれ以上の本発明のアンチセンス化合物または組成物を接触させることを含む。さらに、治療的にまたは予防的に有効量の、一つまたはそれ以上の本発明のアンチセンス化合物または組成物を投与することにより、インテグリン $\alpha 4$ の発現に関係する疾患または状態を有するかまたは傾向があることが疑われる動物、特にヒトを治療するための方法が提供される。

20

【 0 0 1 7 】

発明の詳細な説明

本発明はインテグリン $\alpha 4$ をコード化する核酸分子機能を調節し、最終的に産生されるインテグリン $\alpha 4$ の量を調節するためのオリゴマーアンチセンス化合物、特にオリゴヌクレオチドを用いる。このことはインテグリン $\alpha 4$ をコード化する一つまたはそれ以上の核酸に特異的にハイブリダイズするアンチセンス化合物を提供することにより達成される。本明細書で使用される場合、用語“ 標的核酸分子 ” および“ インテグリン $\alpha 4$ をコード化する核酸 ” とはインテグリン $\alpha 4$ をコード化するDNA、そのようなDNAから転写されたRNA (プレ-mRNAおよびmRNAを含む) およびそのようなRNAから誘導されたcDNAも含む。その標的核酸へのオリゴマー化合物の特異的ハイブリダイゼーションは核酸の正常機能を妨害する。特異的にハイブリダイズする化合物による標的核酸機能のこの調節は一般に、“ アンチセンス ” と称されている。妨害されるべきDNAの機能には複写および転写が含まれる。妨害されるべきRNAの機能には、例えば、タンパク質翻訳部位へのRNAの転位、RNAからのタンパク質の翻訳、一つまたはそれ以上のmRNA種を得るためのRNAのスプライシング、およびRNAにより引き出されるまたは容易にされるであろう触媒活性などのようなすべての生命機能が含まれる。標的核酸機能に対するそのような妨害の全体での影響はインテグリン $\alpha 4$ 発現の調節である。本発明の文脈において、“ 調節 ” とは遺伝子発現における増加 (刺激) または減少 (阻害) の両方を意味している。本発明の文脈において、阻害が遺伝子発現調節の好適な形であり、mRNAが好適な標的である。

30

40

【 0 0 1 8 】

アンチセンスについては特異的核酸を標的にするのが好適である。本発明の文脈において、特定の核酸へのアンチセンス化合物の“ 標的化 ” は多工程過程である。本過程は通常、その機能が調節されるべき核酸配列の同定で始まる。これは、例えば、その発現が特定の障害または疾患状態に関連している細胞性遺伝子 (または遺伝子から転写されたmRNA) 、または感染性作用因子からの核酸分子であろう。本発明において、標的はインテグリン $\alpha 4$ をコード化する核酸分子である。標的化過程はまた、所望の効果 (例えば、タンパク質発現の検出または調節) が得られるように、アンチセンス相互作用のための遺伝子内の

50

1または複数の部位の決定も含む。本発明の文脈において、好適な遺伝子内部位は、遺伝子のオープンリーディングフレーム（ORF）の翻訳開始または終止コドンを含んでいる領域である。本分野で知られているように、翻訳開始コドンは典型的には5'-AUG（転写されたmRNA分子において；対応するDNA分子においては5'-ATG）であるので、翻訳開始コドンはまた“AUGコドン”、“開始コドン”または“AUG開始コドン”とも称される。少数の遺伝子はRNA配列5'-GUG、5'-UUGまたは5'-CUGを有する翻訳開始コドンを持ち、および5'-AUA、5'-ACGおよび5'-CUGはin vivoで機能することが示されている。従って、用語“翻訳開始コドン”および“開始コドン”は多くのコドン配列を含むことができるが、各々の例においての開始アミノ酸は典型的にはメチオニン（真核生物において）またはホルミルメチオニン（原核生物において）であろう。本分野においてはまた、真核生物および原核生物遺伝子は二つまたはそれ以上の別の開始コドンを持っていてもよいことも知られており、その一つは特定の細胞型または組織で、または特定の組の条件下で翻訳の開始のために優先的に利用される。本発明の文脈において、“開始コドン”および“翻訳開始コドン”とはそのような（1または複数の）コドンの配列に関わらず、インテグリン $\alpha 4$ をコード化する遺伝子から転写されたmRNA分子の翻訳を開始するためにin vivoで使用される1または複数のコドンを意味している。

10

【0019】

本分野ではまた、遺伝子の翻訳終結コドン（または“停止コドン”）は三つの配列、即ち、5'-UAA、5'-UAGおよび5'-UGA（対応するDNA配列は各々5'-TAA、5'-TAGおよび5'-TGAである）の内の一つを有するであろうことが知られている。用語“開始コドン領域”および“翻訳開始コドン領域”とは翻訳開始コドンから両方向（即ち、5'または3'）に約25から約50の連続したヌクレオチドを含むmRNAまたは遺伝子の部分を意味している。同様に、“停止コドン領域”および“翻訳終結コドン領域”とは翻訳終結コドンから両方向（即ち、5'または3'）に約25から約50の連続したヌクレオチドを含むmRNAまたは遺伝子の部分を意味している。

20

【0020】

オープンリーディングフレーム（ORF）または“コード領域”とは翻訳開始コドンおよび翻訳終結コドン間の領域を意味していることが本分野では知られており、有効に標的化されるであろう領域である。他の標的領域には、翻訳開始コドンから5'の方向のmRNA部分を意味するとして本分野で知られ、従って、mRNAの5'キャップ部位および翻訳開始コドン間のヌクレオチドまたは対応する遺伝子上のヌクレオチドを含む5'非翻訳領域（5'UTR）、および本分野で翻訳終結コドンから3'方向のmRNA部分を意味するとして知られ、従ってmRNAの翻訳終結コドンおよび3'末端間のヌクレオチドまたは対応する遺伝子のヌクレオチドを含む3'非翻訳領域（3'UTR）が含まれる。mRNAの5'キャップは5'-5'三リン酸結合を通してmRNAの最も5'側の残基へ連結されたN7-メチル化グアノシン残基を含む。mRNAの5'キャップ領域には5'キャップ構造自体ならびにキャップに隣接する最初の50ヌクレオチドが含まれると考えられる。5'キャップ領域はまた好適な標的領域であろう。

30

【0021】

いくつかの真核生物mRNA転写物は直接的に翻訳されるが、多くは翻訳される前に転写物から切り出される、“イントロン”として知られている一つまたはそれ以上の領域を含有する。残りの（従って翻訳される）領域は“エキソン”として知られており、一緒にスプライスされて連続的なmRNA配列を形成する。mRNAスプライス部位、即ち、イントロン-エキソン結合部もまた好適な標的領域であり、異常なスプライシングが疾患に関係があるとされている場合、または疾患で特定のmRNAスプライス生成物の過剰生成が関係があるとされている場合の状況で特に有用である。再構成または欠失による異常融合結合部もまた好適な標的である。例えば、DNAまたはプレmRNAを標的とするアンチセンス化合物ではイントロンもまた有効な、およびそれゆえ好適な標的領域であろう。

40

【0022】

一度、一つまたはそれ以上の標的部位が同定されたら、標的と十分に相補的な、即ち、十分によくハイブリダイズしそして十分な特異性で所望の効果を与えるオリゴヌクレオチ

50

ドが選択される。

【0023】

本発明の文脈において、“ハイブリダイゼーション”とは相補的ヌクレオシドまたはヌクレオチド塩基間の、ワトソン-クリック水素結合、フーグスティーン水素結合または逆フーグスティーン水素結合であろう水素結合を意味している。例えば、アデニンおよびチミンは水素結合の形成を通して対形成する相補的ヌクレオ塩基である。本明細書で使用される場合、“相補的”とは二つのヌクレオチド間の正確な対形成の能力を意味している。例えば、オリゴヌクレオチドのある位置のヌクレオチドがDNAまたはRNA分子の同一の位置でヌクレオチドと水素結合できるとしたら、オリゴヌクレオチドおよびDNAまたはRNAはその位置でお互いに相補的であると考えられる。お互いに水素結合できるヌクレオチドにより、各々の分子中の十分な数の対応する位置が占められている場合、オリゴヌクレオチドおよびDNAまたはRNAはお互いに相補的である。従って、“特異的にハイブリダイズ可能”および“相補的”とは、オリゴヌクレオチドおよびDNAまたはRNA標的間に、安定で特異的な結合が生じるような十分な程度の相補性または正確な対形成を指すために使用される用語である。特異的にハイブリダイズ可能であるためには、アンチセンス化合物の配列はその標的核酸の配列と100%相補的である必要はないと本分野では理解されている。標的DNAまたはRNAへの化合物の結合が、標的DNAまたはRNAの正常な機能を妨害し、効用の損失を起こす場合、および特異的な結合が望まれる条件下（即ち、*in vivo*アッセイまたは治療的処置の場合は生理学的条件下、または*in vitro*アッセイの場合はアッセイが実施される条件下）で非標的配列へのアンチセンス化合物の非特異的結合を避けるのに十分な程度の相補性が存在すれば、アンチセンス化合物は特異的にハイブリダイズ可能である。

10

20

【0024】

アンチセンス化合物はよく研究試薬および診断薬として使用される。例えば、精巧な特異性で遺伝子発現を阻害できるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、しばしば特定の遺伝子の機能を評価するために当業者により使用される。例えば、アンチセンス化合物はまた、生物学的経路の種々のメンバーの機能を区別するためにも使用される。従って、アンチセンス調節は研究的使用で利用されてきた。

【0025】

アンチセンスの特異性および感度もまた当業者により治療的使用で利用されている。アンチセンスオリゴヌクレオチドは動物およびヒトにおける疾患状態治療の治療的部分として用いられてきた。アンチセンスオリゴヌクレオチドは安全におよび効果的にヒトに投与されてきており、多くの臨床試験が現在進行中である。それゆえ、オリゴヌクレオチドは、細胞、組織および動物（特にヒト）治療のための治療計画において有用であるように形造ることができる、有用な治療様式であることが確立されている。

30

【0026】

本発明の文脈において、用語“オリゴヌクレオチド”とはリボ核酸（RNA）またはデオキシリボ核酸（DNA）またはその模倣物のオリゴマーまたはポリマーを意味している。この用語は、天然に存在するヌクレオ塩基、糖および共有結合のヌクレオシド間（バックボーン）結合から成るオリゴヌクレオチド、ならびに、機能的に同様であるが天然には存在しない部分を有するオリゴヌクレオチドを含む。そのような修飾されたまたは置換されたオリゴヌクレオチドは、例えば促進された細胞取り込み、核酸標的に対する促進された親和性およびヌクレアーゼ存在下での高められた安定性のような望ましい特性のため、天然形よりもしばしば好適である。

40

【0027】

アンチセンスオリゴヌクレオチドがアンチセンス化合物の好適な形であるが、本発明は以下に説明されるようなオリゴヌクレオチド模倣物（これらに限定されるわけではない）を含む他のオリゴマーアンチセンス化合物も包含している。本発明に従ったアンチセンス化合物は好適には約8から約30のヌクレオ塩基を含む。特に好適であるのは、約8から約30のヌクレオ塩基（即ち、約8から約30の連結されたヌクレオシド）を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドである。本分野では知られているように、ヌクレオシドは塩基-糖の組

50

み合わせである。ヌクレオシドの塩基部分は通常ヘテロ環式塩基である。そのようなヘテロ環式塩基の二つの最も普通の種類はプリンおよびピリミジンである。ヌクレオチドとは、ヌクレオシドの糖部分へ共有結合で結合されたリン酸基をさらに含んだヌクレオシドである。ペントフラノシル糖を含むヌクレオシドでは、リン酸基は糖の2'、3'または5'ヒドロキシル基のいずれかに連結することができる。オリゴヌクレオチドの形成において、リン酸基は隣接するヌクレオシドをお互いに共有結合で連結し、直線状のポリマー化合物を形成させる。順に、この直線状のポリマー構造のそれぞれの末端をさらに結合して、環状構造を形成できるが、開環の直線状構造が一般的に好適である。オリゴヌクレオチド構造内において、リン酸基はオリゴヌクレオチドのヌクレオシド間バックボーンを形成していると一般にいわれる。RNAおよびDNAバックボーンの正常の結合は3'から5'へのホスホジエステル結合である。 10

【0028】

本発明において有用で好適なアンチセンス化合物の特別の例には修飾バックボーンまたは非天然ヌクレオシド間結合を含むオリゴヌクレオチドが含まれる。本明細書において定義したように、修飾バックボーンを持っているオリゴヌクレオチドには、バックボーン中にリン原子を保持しているもの、およびバックボーン中にリン原子を有しないものが含まれる。本明細書の目的には、および本分野で時々言及されるように、ヌクレオシド間バックボーンにリン原子を有しない修飾オリゴヌクレオチドはオリゴヌクレオシドであると考えられることもできる。

【0029】

好適な修飾オリゴヌクレオチドバックボーンには、例えば、正常3'-5'結合を持っている、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、メチルおよび他のアルキルホスホネート（3'-アルキレンホスホネートおよびキラルホスホネートを含む）、ホスフィネート、ホスホロアミデート（3'-アミノホスホロアミデートおよびアミノアルキルホスホロアミデートを含む）、チオノホスホロアミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステルおよびボラノホスフェート、これらの2'-5'結合類似体、および逆の極性を持っているもの（ヌクレオシド単位の隣接する対が3'-5'から5'-3'で、または2'-5'から5'-2'で連結されている）が含まれる。種々の塩、混合塩および遊離酸形もまた含まれる。 20 30

【0030】

前記のリン含有結合の製造を教えている代表的米国特許には米国特許第3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,196; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,306; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; および5,625,050号（これらの各々は本明細書において援用される）が含まれるがこれらに限定されるわけではない。

【0031】

その中にリン原子を含まない好適な修飾オリゴヌクレオチドバックボーンは、短鎖アルキルまたはシクロアルキルヌクレオシド間結合、混合ヘテロ原子およびアルキルまたはシクロアルキルヌクレオシド間結合、または一つまたはそれ以上の短鎖ヘテロ原子またはヘテロ環式ヌクレオシド間結合により形成されているバックボーンを有する。これらにはモルホリノ結合（ヌクレオシドの糖部分から一部形成される）を持っているもの；シロキサンバックボーン；スルフィド、スルホキシドおよびスルホンバックボーン；ホルムアセチルおよびチオホルムアセチルバックボーン；メチレンホルムアセチルおよびチオホルムアセチルバックボーン；アルケン含有バックボーン；スルファメートバックボーン；メチレンイミノおよびメチレンヒドラジノバックボーン；スルホネートおよびスルホンアミドバックボーン；アミドバックボーン；および混合N、O、SおよびCH₂成分構成物を有するその他のものが含まれる。 40

【0032】

前記オリゴヌクレオシドの製造を教えている代表的米国特許には米国特許第5,034,506 ; 5,166,315 ; 5,185,444 ; 5,214,134 ; 5,216,141 ; 5,235,033 ; 5,264,562 ; 5,264,564 ; 5,405,938 ; 5,434,257 ; 5,466,677 ; 5,470,967 ; 5,489,677 ; 5,541,307 ; 5,561,225 ; 5,596,086 ; 5,602,240 ; 5,610,289 ; 5,602,240 ; 5,608,046 ; 5,610,289 ; 5,618,704 ; 5,623,070 ; 5,663,312 ; 5,633,360 ; 5,677,437 ; および5,677,439号（これらの各々は本明細書において援用される）が含まれるがこれらに限定されるわけではない。

【0033】

別の好適なオリゴヌクレオチド模倣体においては、ヌクレオチド単位の糖およびヌクレオシド間結合（即ち、バックボーン）は新しい基で置き換えられる。塩基単位は適切な核酸標的化合物とのハイブリダイゼーションのために維持されている。そのようなオリゴマー化合物の一つであるオリゴヌクレオチド模倣体は、優れたハイブリダイゼーション特性を持っていることが示されているが、ペプチド核酸（PNA）と称される。PNA化合物において、オリゴヌクレオチドの糖-バックボーンはアミド含有バックボーン、特にアミノエチルグリシンバックボーンで置き換えられている。ヌクレオ塩基は保持されており、バックボーンのアミド部分のアザ窒素原子へ直接または間接的に結合される。PNA化合物の製造を教えている代表的米国特許には米国特許第5,539,082 ; 5,714,331 ; および5,719,262号（これらの各々は本明細書において援用される）が含まれるがこれらに限定されるわけではない。PNA化合物についてのさらなる教示はNielsen et al., (*Science*, 1991, 254, 1497-1500) にみることができる。

【0034】

本発明の最も好適な態様はホスホロチオエートバックボーンを持つオリゴヌクレオシドおよびヘテロ原子バックボーンを有するオリゴヌクレオチド、特に上で参照した米国特許第5,489,677号の $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{O}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{O}-\text{CH}_2-$ 、 $[\text{メチレン}(\text{メチルイミノ})\text{またはMMIバックボーンとして知られている}]$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ および $-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $[\text{天然のホスホジエステルバックボーンは}-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{として表される}]$ 、および上で参照した米国特許第5,602,240号のアミドバックボーンを持つオリゴヌクレオチドである。また、上で参照した米国特許第5,034,506号のモルホリノバックボーン構造を持っているオリゴヌクレオチドも好適である。

【0035】

修飾オリゴヌクレオチドはまた一つまたはそれ以上の置換糖部分を含んでいてもよい。好適なオリゴヌクレオチドは2'位に以下の基の一つを含む： OH ； F ； $\text{O}-$ 、 $\text{S}-$ または $\text{N}-$ アルキル； $\text{O}-$ 、 $\text{S}-$ または $\text{N}-$ アルケニル； $\text{O}-$ 、 $\text{S}-$ または $\text{N}-$ アルキニル；または $\text{O}-$ アルキル- $\text{O}-$ アルキル、ここでアルキル、アルケニルおよびアルキニルは置換または非置換 C_1 から C_{10} アルキルまたは C_2 から C_{10} アルケニルおよびアルキニルである。特に好適であるのは $\text{O}[(\text{CH}_2)_n]_m\text{CH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ONH}_2$ および $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ON}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$ 、式中、 n および m は1から約10である。他の好適なオリゴヌクレオチドは2'位に以下の基の一つを含む： C_1 から C_{10} 低級アルキル、置換低級アルキル、アルカリール（alkaryl）、アラルキル、 $\text{O}-$ アルカリールまたは $\text{O}-$ アラルキル、 SH 、 SCH_3 、 OCN 、 Cl 、 Br 、 CN 、 CF_3 、 OCF_3 、 SOCH_3 、 SO_2CH_3 、 ONO_2 、 NO_2 、 N_3 、 NH_2 、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリール、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、RNA切断基、レポーター基、インターカレーター、オリゴヌクレオチドの薬物動態特性を改良するための基、オリゴヌクレオチドの薬力学特性を改良するための基、および同様の特性を持っている他の置換基。好適な修飾には、2'-メトキシエトキシ（2'- $\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ 、2'- $\text{O}-(2\text{-メトキシエチル})$ または2'-MOEとしても知られている）（Martin et al., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78, 486-504）、即ちアルコキシアルコキシ基が含まれる。さらに好適な修飾には、1998年1月30日に出願された米国特許出願第09/016,520号（本出願と共通して所有され、その内容は本明細書において援用される）に記載されているような2'-ジメチルアミノオキシエトキシ、即ち、 $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{ON}(\text{CH}_3)_2$ 基（2-DMAOEとしても知られている）が含まれる。

【0036】

他の好適な修飾には2'-メトキシ(2'-O-CH₃)、2'-アミノプロポキシ(2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂)および2'-フルオロ(2'-F)が含まれる。同様な修飾がオリゴヌクレオチドの他の位置、特に、3'末端ヌクレオチドまたは2'-5'結合オリゴヌクレオチドの糖の3'位、および5'末端ヌクレオチドの5'位で行われるであろう。オリゴヌクレオチドはまた、ペントフラノシル糖の代わりにシクロブチル部分のような糖模倣体を持っていてもよい。そのような修飾糖構造の製造を教えている代表的米国特許には米国特許第4,981,957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,658,873; 5,670,633; および5,700,920号(これらの各々は本明細書において援用される)および1995年6月5日に出願され、許可された米国特許出願第08/468,037号(本出願と共通して所有され、これも本明細書において援用される)が含まれるがこれらに限定されるわけではない。

10

【0037】

オリゴヌクレオチドはまた、ヌクレオ塩基(しばしば本分野では単に“塩基”と称される)修飾または置換も含むであろう。本明細書で使用される場合、“非修飾”または“天然の”ヌクレオ塩基にはプリン塩基アデニン(A)およびグアニン(G)、およびピリミジン塩基チミン(T)、シトシン(C)およびウラシル(U)が含まれる。修飾ヌクレオ塩基には、5-メチルシトシン(5-me-C)、5-ヒドロキシルメチルシトシン、キサントシン、ヒポキサントシン、2-アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの6-メチルおよび他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの2-プロピルおよび他のアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミンおよび2-チオシトシン、5-ハロウラシルおよびシトシン、5-プロピニルウラシルおよびシトシン、6-アゾウラシル、シトシンおよびチミン、5-ウラシル(プソイドウラシル)、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシルおよび他の8-置換アデニンおよびグアニン、5-ハロ(特に5-プロモ)、5-トリフルオロメチルおよび他の5-置換ウラシルおよびシトシン、7-メチルグアニンおよび7-メチルアデニン、8-アザグアニンおよび8-アザアデニン、7-デアザグアニンおよび7-デアザアデニン、および3-デアザグアニンおよび3-デアザアデニンのような他の合成および天然のヌクレオ塩基が含まれる。さらに別のヌクレオ塩基には米国特許第3,687,808号に開示されているもの、The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, Kroschwitz, J.I., ed. John Wiley & Sons, 1990, 858-859に記載されているもの、Englischら(Angewandte Chemie, IE, 1991, 30, 613)に記載されているもの、およびSanghvi, Y.S., (Antisense Research and Applications, 15, 289-302)およびCrooke, S.T. and Lebleu, B., ed., (CRC Press, 1993)に記載されているものが含まれる。これらのヌクレオ塩基のあるものは、本発明のオリゴマー化合物の結合親和性を増加させるために特に有用である。これらには5-置換ピリミジン、6-アザピリミジンおよびN-2、N-6および0-6置換プリンが挙げられ、2-アミノプロピルアデニン、5-プロピルウラシルおよび5-プロピニルシトシンが含まれる。5-メチルシトシン置換は核酸二重鎖安定性を0.6-1.2増加させることが示されており(Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. and Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications 1993, 276-278)、現在のところ好適な塩基置換であり、2'-O-メトキシエチル糖修飾と組み合わせた場合さらにより特別に好適である。

20

30

40

【0038】

ある種の上に示した修飾ヌクレオ塩基ならびに他の修飾ヌクレオ塩基の製造を教えている代表的米国特許には前に示した米国特許第3,687,808号ならびに米国特許第4,845,205; 5,130,302; 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,594,121; 5,596,091; 5,614,617; 5,681,941; および5,750,692号(これらの各々は本明細書において援用される)が含まれるがこれらに限定されるわけではない。

【0039】

本発明の別のオリゴヌクレオチドの修飾にはオリゴヌクレオチドに化学的に結合された、オリゴヌクレオチドの活性、細胞分布または細胞取り込みを促進する一つまたはそれ以

50

上の部分またはコンジュゲートが含まれる。そのような残基にはコレステロール部分 (Le tsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556)、コール酸 (Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053-1060)、チオエーテル、例えば、ヘキシル-S-トリチルチオール (Manoharan et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309; Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765-2770)、チオコレステロール (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res. 1992, 20, 533-538)、脂肪族鎖、例えば、ドデカンジオールまたはウンデシル残基 (Saison-Behmoaras et al., E MBO J., 1991, 10, 1111-1118; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 59, 327-330; Svin archuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49-54)、リン脂質、例えば、ジ-ヘキサデシル-r ac-グリセロールまたはトリエチル-アンモニウム 1,2-ジ-0-ヘキサデシル-rac-グリセロ- 3-H-ホスホネート (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783)、ポリアミンまたはポリエチレング リコール鎖 (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973)、またはアダマンタン酢酸 (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654)、パルミチル部分 (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237)、またはオクタデシルアミンまたはヘキシルアミノ-カルボニル-オキシコレステロール部 分 (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923-937) のような脂質部 分が含まれるがこれらに限定されるわけではない。

10

【0040】

そのようなオリゴヌクレオチドコンジュゲートの製造を教えている代表的米国特許には 米国特許第4,828,979; 4,948,882; 5,218,105; 5,525,465; 5,541,313; 5,545,730; 5,55 2,538; 5,578,717; 5,580,731; 5,580,731; 5,591,584; 5,109,124; 5,118,802; 5,138,0 45; 5,414,077; 5,486,603; 5,512,439; 5,578,718; 5,608,046; 4,587,044; 4,605,735 ; 4,667,025; 4,762,779; 4,789,737; 4,824,941; 4,835,263; 4,876,335; 4,904,582; 4 ,958,013; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,24 5,022; 5,254,469; 5,258,506; 5,262,536; 5,272,250; 5,292,873; 5,317,098; 5,371,2 41,5,391,723; 5,416,203; 5,451,463; 5,510,475; 5,512,667; 5,514,785; 5,565,552; 5,567,810; 5,574,142; 5,585,481; 5,587,371; 5,595,726; 5,597,696; 5,599,923; 5,5 99,928; および5,688,941号 (これらの各々は本明細書において援用される) が含まれる がこれらに限定されるわけではない。

20

30

【0041】

与えられた化合物のすべての位置が一様に修飾されている必要はなく、実際、前述の修 飾の一つ以上が単一の化合物に取り込まれていてもよく、オリゴヌクレオチド内の単一の ヌクレオチドでさえもよい。本発明はまた、キメラ化合物であるアンチセンス化合物も含 む。本発明の文脈において、“キメラの”アンチセンス化合物または“キメラ”とは、各 々少なくとも一つのモノマー単位 (即ち、オリゴヌクレオチド化合物の場合はヌクレオチ ド) からそれぞれ作製された二つまたはそれ以上の化学的に異なる領域を含有するアンチ センス化合物 (特にオリゴヌクレオチド) である。これらのオリゴヌクレオチドは典型的 には少なくとも一つの領域を含有し、ここでオリゴヌクレオチドにヌクレアーゼ分解への 増強された抵抗性、促進された細胞取り込みおよび/または標的核酸に対する高められた 結合親和性を与えるようにオリゴヌクレオチドは修飾される。オリゴヌクレオチドの追加 の領域はRNA:DNAまたはRNA:RNAハイブリッドを切断できる酵素のための基質として働く ことができる。例を挙げると、RNase HはRNA:DNA二重鎖のRNA鎖を切断する細胞性エンド ヌクレアーゼである。従って、RNase Hの活性化はRNA標的の切断を生じ、それにより遺伝 子発現のオリゴヌクレオチド阻害効率を非常に高める。その結果、キメラオリゴヌクレオ チドが使用された場合、同一の標的領域へハイブリダイズするホスホロチオエートデオキ シオリゴヌクレオチドと比較して、より短いオリゴヌクレオチドで同等の結果をしばしば 得ることができる。RNA標的の切断はゲル電気泳動により、必要に応じて本分野で知られ ている関連する核酸ハイブリダイゼーション技術により、ルーチン的に検出できる。

40

【0042】

50

本発明のキメラアンチセンス化合物は、前記のような二つまたはそれ以上のオリゴヌクレオチド、修飾オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシドおよび／またはオリゴヌクレオチド模倣体の混成構造として形成されるであろう。そのような化合物はまた本分野ではハイブリッドまたはギャップマーと称されている。そのようなハイブリッド構造の製造を教えている代表的米国特許には米国特許第5,013,830；5,149,797；5,220,007；5,256,775；5,366,878；5,403,711；5,491,133；5,565,350；5,623,065；5,652,355；5,652,356；および5,700,922号（これらの各々は本明細書において援用される）および1995年6月6日出願され、許可された米国特許出願第08/468,880号（本出願と共通して所有され、これも本明細書において援用される）が含まれるがこれらに限定されるわけではない。

【0043】

10

本発明に従って使用されるアンチセンス化合物は、固相合成のよく知られた技術を通じて都合よくおよびルーチン的に作製することができる。そのような合成のための装置は、例えば、Applied Biosystems (Foster City, CA) を含むいくつかの製造元から販売されている。本分野で知られているそのような合成のためのいずれか他の手段を追加的にまたは代替的に用いてもよい。ホスホロチオエートおよびアルキル化誘導体のようなオリゴヌクレオチドを製造するために、類似の技術を使用することもよく知られている。

【0044】

本発明のアンチセンス化合物は *in vitro* で合成され、生物起源のアンチセンス成分、またはアンチセンス分子の *in vivo* 合成を指示するために設計された遺伝子ベクター構築物を含まない。

20

【0045】

本発明の化合物はまた、取り込み、分布および／または吸収を助けるために、例えば、リポソーム、レセプター標的化分子、経口、直腸、局所または他の製剤のような他の分子、分子構造または化合物の混合物と混合、カプセル化、複合体形成またはそうでなければ会合させてもよい。そのような取り込み、分布および／または吸収補助製剤の製造を教えている代表的米国特許には米国特許第5,108,921；5,354,844；5,416,016；5,459,127；5,521,291；5,543,158；5,547,932；5,583,020；5,591,721；4,426,330；4,534,899；5,013,556；5,108,921；5,213,804；5,227,170；5,264,221；5,356,633；5,395,619；5,416,016；5,417,978；5,462,854；5,469,854；5,512,295；5,527,528；5,534,259；5,543,152；5,556,948；5,580,575；および5,595,756号（これらの各々は本明細書において援用される）が含まれるがこれらに限定されるわけではない。

30

【0046】

本発明のアンチセンス化合物はいずれかの医薬的に許容可能な塩、エステルまたはそのようなエステルの塩、または、ヒトを含む動物への投与により、生物学的に活性な代謝物またはその残留物を提供できる（直接的または間接的）その他の化合物を包含する。従って、例えば、本開示はまた本発明の化合物のプロドラッグおよび医薬的に許容可能な塩、そのようなプロドラッグの医薬的に許容可能な塩、およびその他の生物学的等価物にも関する。

【0047】

用語“プロドラッグ”とは、不活性な形で製造され、内在性酵素または他の化学化合物および／または条件の作用により体内またはその細胞内で活性な形（即ち、薬剤）に変換される治療薬を指している。特に、本発明のオリゴヌクレオチドのプロドラッグ版は、1993年12月9日に公開されたGosselinらによるW093/24510またはImbachによるW094/26764に開示されている方法に従って、SATE [(S-アセチル-2-チオエチル) ホスフェート] 誘導体として製造される。

40

【0048】

用語“医薬的に許容可能な塩”とは本発明の化合物の生理学的におよび医薬的に許容可能な塩を意味する：即ち、親化合物の望まれる生物学的活性を保持し、望まれない毒性的効果を与えない塩。

【0049】

50

医薬的に許容可能な塩基付加塩は、アルカリおよびアルカリ土類金属または有機アミンのような金属またはアミンと形成される。カチオンとして使用される金属の例はナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなどである。適したアミンの例はN,N-ジベンジルエチレンジアミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、ジシクロヘキシルアミン、エチレンジアミン、N-メチルグルカミン、およびプロカインがsる（例えば、Berge et al. J. of Pharma Sci., 1977, 66, 1-19を参照されたい）。該酸性化合物の塩基付加塩は、遊離酸形を十分量の所望の塩基と接触させ、通常の様式で塩を生成させることにより製造される。遊離酸形は、塩形と酸を接触させ、通常の様式で遊離酸を単離することにより再生される。遊離酸形は、極性溶媒への溶解度のようなある種の物理学的特性がその各々の塩形といくぶん異なっているが、本発明の目的のためには塩はその各々の遊離酸と等価である。本明細書で使用される場合、“医薬付加塩”とは本発明の組成物の成分の一つの酸形の医薬的に許容可能な塩を含む。これらにはアミンの有機または無機塩が含まれる。好適な酸塩は塩酸塩、酢酸塩、サリチル酸塩、硝酸塩およびリン酸塩である。他の適した医薬的に許容可能な塩は当業者にはよく知られており、例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸またはリン酸のような無機酸との；例えば、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、コハク酸、マレイン酸、ヒドロキシマレイン酸、メチルマレイン酸、フマル酸、リンゴ酸、酒石酸、乳酸、シュウ酸、グルコン酸、グルカル酸、グルクロン酸、クエン酸、安息香酸、ケイ皮酸、マンデル酸、サリチル酸、4-アミノサリチル酸、2-フェノキシ安息香酸、2-アセトキシ安息香酸、エンボン酸、ニコチン酸またはイソニコチン酸のような有機カルボン酸、スルホン酸、スルホまたはホスホ酸またはN-置換スルファミン酸；および、天然のタンパク質の合成に含まれている20のアルファ-アミノ酸のようなアミノ酸（例えば、グルタミン酸またはアスパラギン酸）、および同様にフェニル酢酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、2-ヒドロキシエタンスルホン酸、エタン-1,2-ジスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、4-メチルベンゼンスルホン酸、ナフタレン-2-スルホン酸、ナフタレン-1,5-ジスルホン酸、2-または3-ホスホグリセレート、グルコース-6-リン酸、N-シクロヘキシルスルファミン酸（シクラメートの形成で）との、またはアスコルビン酸のようなその他の酸性有機化合物とのような、種々の無機および有機酸の塩基性塩が含まれる。化合物の医薬的に許容可能な塩もまた医薬的に許容可能なカチオンにより製造されるであろう。適した医薬的に許容可能なカチオンは当業者にはよく知られており、アルカリ、アルカリ土類、アンモニウムおよび四級アンモニウムカチオンが含まれる。炭酸塩または炭酸水素塩もまた可能である。

【0050】

オリゴヌクレオチドに対し、医薬的に許容可能な塩の好適な例には（a）ナトリウム、カリウム、アンモニウム、マグネシウム、カルシウム、ポリアミン（スペルミンおよびスペルミジンのような）その他のようなカチオンと形成された塩；（b）例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、硝酸などの無機酸と形成された酸付加塩；（c）例えば、酢酸、シュウ酸、酒石酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、グルコン酸、クエン酸、リンゴ酸、アスコルビン酸、安息香酸、タンニン酸、パルミチン酸、アルギン酸、ポリグルタミン酸、ナフタレンスルホン酸、メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、ナフタレンジスルホン酸、ポリガラクトロン酸などのような有機酸と形成された塩；および（d）塩素、臭素およびヨウ素のような元素アニオンから形成された塩が含まれるが、これらに限定されるわけではない。

【0051】

本発明のアンチセンス化合物は、診断に、治療に、予防におよび研究用試薬およびキットとして利用できる。治療のためには、インテグリン $\alpha 4$ の発現を調節することにより治療できる疾患または障害を有すると疑われる動物（好適にはヒト）は本発明に従うアンチセンス化合物を投与することにより治療される。有効量のアンチセンス化合物を、適した医薬的に許容可能な希釈剤または担体へ加えることにより、本発明の化合物を医薬組成物の形で利用できる。本発明のアンチセンス化合物および方法の使用はまた、予防的にも有用であろう（例えば、感染、炎症または腫瘍形成を防止または遅延させるための）。

【0052】

本発明の化合物はインテグリン α 4をコード化する核酸にハイブリダイズし、このことを利用するサンドイッチおよびその他のアッセイの構築を容易に可能にするので本発明のアンチセンス化合物は研究および診断でも有用である。本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドとインテグリン α 4をコード化する核酸のハイブリダイゼーションは本分野で既知の手段により検出できる。そのような手段には、オリゴヌクレオチドへの酵素の複合体化、オリゴヌクレオチドの放射性標識または他の適した検出手段が含まれる。試料中のインテグリン α 4レベルを検出するためにそのような検出手段を使用するキットもまた製造することができる。

【0053】

本発明はまた、本発明のアンチセンス化合物を含む医薬組成物および製剤も含む。本発明の医薬組成物は、局所または全身的治療が望まれているかどうかに依存して、および処置されるべき領域に依存して、多くの方法で投与することができる。投与は、局所（眼、および膣および直腸送達を含む粘膜へも含む）、肺（例えば、ネブライザーによるものを含む、粉末またはエアロゾルの吸入または吹送により；気管内、鼻孔内、表皮および経皮）、経口または非経口であってよい。非経口投与には静脈内、動脈内、皮下、腹腔内または筋肉内注射または注入；または頭蓋内（例えば、クモ膜下または脳室内投与）が含まれる。少なくとも一つの2'-O-メトキシエチル修飾を有するオリゴヌクレオチドは経口投与に特に有用であると信じられている。

【0054】

局所投与のための医薬組成物および製剤には、経皮パッチ、軟膏剤、ローション剤、クリーム剤、ゲル剤、滴剤、座剤、スプレー剤、液剤および散剤が含まれる。通常の医薬担体、水性、粉末または油性基剤、増粘剤などが必要でありまたは望まれる場合がある。被覆コンドーム、グローブなどもまた有用であろう。

【0055】

経口投与のための組成物および製剤には散剤または顆粒剤、水または非水性媒質での懸濁剤または液剤、カプセル剤、サシェ剤または錠剤が含まれる。増粘剤、着香剤、希釈剤、乳化剤、分散補助剤または結合剤が望まれるであろう。

【0056】

非経口、クモ膜下または脳室内投与のための組成物および製剤には、緩衝剤、希釈剤および浸透促進剤、担体化合物およびその他の医薬的に許容可能な担体または賦形剤など（これらには限定されない）をさらに含有する滅菌水性溶液が含まれるであろう。

【0057】

本発明のオリゴヌクレオチドを含む医薬組成物および/または製剤はまた、オリゴヌクレオチドの食餌性送達を促進するために浸透促進剤も含んでもよい。浸透促進剤は五つの大きなカテゴリーの一つに属するように分類される、即ち、脂肪酸、胆汁酸塩、キレート剤、表面活性剤および非表面活性剤（Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, 8, 91-192; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33）。これらの大きなカテゴリーの一つまたはそれ以上に由来する一つまたはそれ以上の浸透促進剤が含まれてよい。浸透促進剤は1997年7月1日に出願され、係属中の米国特許出願第08/886,829号および1997年10月31日に出願され、係属中の米国特許出願第08/961,469号（両方とも本出願と共通して所有され、両方とも本明細書において援用される）に記載されている。

【0058】

浸透促進剤として働く種々の脂肪酸およびその誘導体には、オレイン酸、ラウリン酸、カプリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、ジカプレート、トリカプレート、レシンレアート（recinleate）、モノオレイン（1-モノオレイル-rac-グリセロールとしても知られる）、ジラウリン、カプリル酸、アラキドン酸、グリセリル-1-モノカプレート、1-ドデシルアザシクロヘプタン-2-オン、アシルカルニチン、アシルコリン、モノ-およびジ-グリセリドおよびそれらの生理学的に許容可能な塩

10

20

30

40

50

(即ち、オレイン酸塩、ラウリン酸塩、カプリン酸塩、ミリスチン酸塩、パルミチン酸塩、ステアリン酸塩、リノール酸塩など)が含まれる(Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, 8, 91-192; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; El-Hariri et al., J. Pharm. Pharmacol., 1992, 44, 651-654)。いくつかの現在好適な脂肪酸の例は、0.5%から5%の濃度で、単独でまたは組み合わせて使用されるカプリン酸ナトリウムおよびラウリン酸ナトリウムである。

【0059】

好適な浸透促進剤は1997年7月1日に出願され、係属中の米国特許出願第08/886,829号(本出願と共通して所有され、本明細書において援用される)に開示されている。

10

【0060】

胆汁酸の生理学的学役割には脂質および脂溶性ビタミンの分散および吸収を容易にすることが含まれている(Brunton, 38章: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 第9版, Hardman et al., 編, McGraw-Hill, New York, NY 1996, 934-935ページ)。種々の天然胆汁酸塩およびその合成誘導体が浸透促進剤として働く。従って、用語“胆汁酸塩”とは天然に存在する胆汁成分ならびにそのいずれかの合成誘導体を含む。好適な胆汁酸塩は1997年7月1日に出願され、係属中の米国特許出願第08/886,829号(本出願と共通して所有され、本明細書において援用される)に開示されている。現在のところ好適な胆汁酸塩はケノデオキシコール酸(CDCA)(Sigma Chemical Company, St. Louis, MO)であり、一般的には0.5%から2%の濃度で使用される。

20

【0061】

一つまたはそれ以上の浸透促進剤を含む複合製剤を使用することができる。例えば、胆汁酸塩は脂肪酸と組み合わせて使用して、複合製剤を作製することができる。好適な組み合わせには、カプリン酸ナトリウムまたはラウリン酸ナトリウムと組み合わされたCDCAが挙げられる(一般的に0.5%から5%)。

【0062】

キレート剤には、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA)、クエン酸、サリチル酸類(例えば、サリチル酸ナトリウム、5-メトキシサリチル酸およびホモバニリン酸)、コラーゲンのN-アシル誘導体、ラウレス-9およびベータ-ジケトンのN-アミノアシル誘導体(エナミン)が含まれるが、これらに制限されるわけではない(Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, 8, 92-192; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; Buur et al., J. Control Rel., 1990, 14, 43-51)。キレート剤はDNase阻害剤として働くという利点も与える。

30

【0063】

表面活性剤としては例えば、ラウリル硫酸ナトリウム、ポリオキシエチレン-9-ラウリン酸エーテルおよびポリオキシエチレン-20-セチルエーテル(Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, 8, 92-191); およびFC-43(Takahashi et al., J. Pharm. Pharmacol., 1988, 40, 252-257)のようなパーフルオロ化学エマルジョンが挙げられる。

40

【0064】

非表面活性剤としては例えば、不飽和環式尿素、1-アルキル-および1-アルケニルアザシクロ-アルカノン誘導体(Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, 8, 92-191); およびジクロフェナックナトリウム、インドメタシンおよびフェニルブタゾンのような非ステロイド性抗炎症剤(Yamashita et al., J. Pharm. Pharmacol., 1987, 39, 621-626)が挙げられる。

【0065】

本明細書で使用する場合、“担体化合物”とは、不活性である(それ自体は生物学的活性を持っていない)が、例えば、生物学的に活性な核酸を分解することにより、または循環系からのその除去を促進することにより生物学的活性を有する核酸の生物利用能減少さ

50

せる in vivo 過程によって核酸と認識される核酸またはその類似体を意味している。核酸および担体化合物の同時投与（典型的には後者の物質を過剰に）は、多分共通のレセプターに対する担体化合物と核酸の競合のため、肝臓、腎臓または他の循環外貯蔵器中に回収される核酸量の実質的な減少を生じさせることができる。例えば、肝臓組織における部分的ホスホロチオエート化オリゴヌクレオチドの回収は、ポリイノシン酸、硫酸デキストラン、ポリシチジン酸または4-アセトアミド-4'-イソチオシアノ-スチルベン-2,2'-ジスルホン酸を同時投与した場合に減少する（Miyao et al., *Antisense Res. Dev.*, 1995, 5, 115-121; Takakura et al., *Antisense & Nucl. Acid Drug Dev.*, 1996, 6, 177-183）。

【0066】

担体化合物と対照的に、“医薬的に許容可能な担体”（賦形剤）とは、動物へ一つまたはそれ以上の核酸を送達するための、医薬的に許容可能な液体、懸濁剤または他の薬学的に不活性な担体である。医薬的に許容可能な担体は液体でも固形物でもよく、与えられた医薬組成物の核酸および他の成分と組み合わせられた場合、望まれるかさ高さ、硬さなどを提供することを考えて、計画された投与様式に合わせて選択される。典型的な医薬的に許容可能な担体には、結合剤（例えば、 α 化トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロースなど）；充填剤（例えば、ラクトースおよび他の糖、微晶性セルロース、ペクチン、ゼラチン、硫酸カルシウム、エチルセルロース、ポリアクリレートまたはリン酸水素カルシウムなど）；滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク、シリカ、コロイド性二酸化ケイ素、ステアリン酸、ステアリン酸金属塩、水素化植物油、コーンスターチ、ポリエチレングリコール、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウムなど）；崩壊剤（例えば、デンプン、デンプングリコール酸ナトリウムなど）；または湿潤剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウムなど）が含まれるが、これらに限定されるわけではない。徐放性経口送達系および/または経口投与剤形の腸溶コーティングは米国特許第4,704,295；4,556,552；4,309,406；および4,309,404号に記載されている。

【0067】

本発明の組成物は、医薬組成物に普通にみられる他の補助剤成分を、本分野で確立された用量レベルでさらに含んでいてもよい。従って、例えば、本組成物は、例えば、鎮痒薬、収斂剤、局所麻酔薬または抗炎症剤のような追加の適合性の薬学的に活性な物質を含んでいてもよく、または、色素、着香剤、保存剤、抗酸化剤、乳白剤、濃厚化剤および安定剤のような、本発明の組成物の種々の剤形の物理的形成に有用な追加の物質を含んでいてもよい。しかしながら、そのような物質は添加された場合、本発明の組成物成分の生物学的活性を過度に妨害してはならない。

【0068】

本発明のアンチセンス化合物が患者に導入される方法に関わらず、化合物の in vivo 安定性を促進させるためおよび/または化合物を特定の器官、組織または細胞型へ標的化するために、送達担体としてコロイド分散系を使用することができる。コロイド分散系には巨大分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、ビーズおよび水中油エマルジョン、ミセル、混合ミセル、リポソームおよび未同定構造の脂質-オリゴヌクレオチド複合体を含む脂質に基づいた系が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。好適なコロイド分散系は複数のリポソームである。リポソームは二重層構造に配置された脂質から造られている一つまたはそれ以上の外層に囲まれた水性コアを有する微小の球形物である（一般的には、Chonn et al., *Current Op. Biotech.*, 1995, 6, 698-708を参照されたい）。

【0069】

リポソーム製造は1997年10月31日に出願され、係属中の米国特許出願第08/961,469号（本出願と共通して所有され、本明細書において援用される）に記載されている。

【0070】

本発明のある態様は（a）一つまたはそれ以上のアンチセンス化合物および（b）非アンチセンス機構で機能する一つまたはそれ以上の他の化学治療薬、を含有するリポソームお

10

20

30

40

50

よび他の組成物を提供する。そのような化学治療薬の例としては、ダウノルビシン、ダクチノマイシン、ドキソルビシン、ブレオマイシン、マイトマイシン、ナイトロジェンマスタード、クロラムブシル、メルファラン、シクロホスファミド、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラピン(CA)、5-フルオロウラシル(5-FU)、フロックスウイジン(5-FUdR)、メトトレキセート(MTX)、コルヒシン、ピンクリスチン、ピンブラスチン、エトポシド、テニポシド、シスプラチンおよびジエチルスチルベストロール(DES)のような抗癌剤が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。一般的にはThe Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 1987, Berkow et al., eds., Rahway, N.J., 1206-1228を参照されたい。抗炎症剤(非ステロイド性抗炎症剤およびコルチコステロイドおよび抗ウイルス剤を含むが、それらに限定されるわけではない)には、リビビリン、ピダラビン、アシクリビルおよびガンシクロビルが含まれ(それらに限定されるわけではない)、本発明の組成物と組み合わせてもよい。一般的には、The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 1987, Berkow et al., 編, Rahway, N.J., ページ2499-2506および46-49、を参照されたい。他の非アンチセンス化学治療薬もまた本発明の範囲内である。二つまたはそれ以上を組み合わせた化合物を一緒にまたは連続的に使用することができる。

10

20

30

【0071】

別の関連する態様において、本発明の組成物は一つまたはそれ以上のアンチセンス化合物、特に、第一の核酸を標的とするオリゴヌクレオチド、および第二の核酸標的を標的とする一つまたはそれ以上の追加のオリゴヌクレオチドを含んでいてもよい。二つまたはそれ以上を組み合わせた化合物を一緒にまたは連続的に使用することができる。

【0072】

治療的組成物の製剤およびそれらの続いての投与は当業者にはよく知られている。用量は処置されるべき疾患状態の重度および応答性に依存しており、処置期間は数日から数ヶ月、または治療が達成されるまでまたは疾患状態の減退が達成されるまで続く。最適投与スケジュールは患者体内での薬剤蓄積の測定から計算できる。当業者は容易に至適用量、投与方法および反復率を決定できる。至適用量は個々のオリゴヌクレオチドの相対的効力に依存して変化するであろうが、一般的に、in vitroおよびin vivo動物モデルで有効であると見出されたEC₅₀に基づいて見積もることができる。一般に、投与量は体重kg当たり0.01μgから100gであり、1日、週、月または年に1回またはそれ以上で、または2から20年ごとに1回でさえ与えられるであろう。当業者は体液または組織中の薬剤の残留時間および濃度の測定に基づいて投与の反復率を容易に決定できる。治療が成功したら、疾患状態の再発を防止するため患者に維持療法を行うのが望ましく、ここで体重kg当たり0.01μgから100gの範囲で、1日1回から数回から20年に1回、維持用量でオリゴヌクレオチドが投与される。

【0073】

本発明はある種の好適な態様に従って特別に説明されてきたが、以下の実施例は本発明の例示のみに示されるものであり、本発明を制限することを意図しているものではない。

【0074】

実施例

実施例1

オリゴヌクレオチド合成のためのヌクレオシドホスホロアミダイト

デオキシおよび2'-アルコキシアミダイト

2'-デオキシおよび2'-メトキシ・ベータ-シアノエチルジイソプロピル・ホスホロアミダイトは市販品(例えば、Chemgenes, Needham MAまたはGlen Research, Inc. Sterling VA)が購入された。他の2'-O-アルコキシ置換ヌクレオシドアミダイトは米国特許第5,506,351号(本明細書において援用される)に記載されているように製造された。2'-アルコキシアミダイトを使用するオリゴヌクレオチド合成のためには、非修飾オリゴヌクレオチドのための標準サイクルが利用されたが、ただし、テトラゾールおよび塩基のパルス送達後の待ち工程を360秒に延長した。

【0075】

40

50

5-メチル-2'-デオキシシチジン (5-Me-C) ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドは、市販品として入手可能なホスホロアミダイト (Glen Research, Sterling, VA or ChemGenes, Needham, MA) を使用し、報告されている方法 (Sanghvi, et al., Nucleic Acids Research, 1993, 21, 3197-3203) に従って合成した。

【 0 0 7 6 】

2'-フルオロアミダイト

2'-フルオロデオキシアデノシンアミダイト

2'-フルオロオリゴヌクレオチドは以前に記載されているように (Kawasaki, et al., J. Med. Chem., 1993, 36, 831-841および米国特許第5,670,633号、本明細書において援用される) 合成された。簡単には、出発物質として入手可能な9-ベータ-D-アラビノフラノシルアデニンを利用しおよび文献の方法を改良することにより、保護化ヌクレオシドN6-ベンゾイル-2'-デオキシ-2'-フルオロアデノシンが合成された (それにより2'-アルファ-フルオロ原子が2'-ベータ-トリチル基のS_N2-置換により導入された)。従って、N6-ベンゾイル-9-ベータ-D-アラビノフラノシルアデニンが3',5'-ジテトラヒドロピラニル (THP) 中間体として中程度の収率で選択的に保護化された。THPおよびN6-ベンゾイル基の脱保護化は標準的方法論を使用して達成され、および標準法を使用して、5'-ジメトキシトリチル- (DMT) および5'-DMT-3'-ホスホロアミダイト中間体を得る。

10

【 0 0 7 7 】

2'-フルオロデオキシグアノシン

2'-デオキシ-2'-フルオログアノシンの合成は、出発物質としてテトライソプロピルジシロキサニル (TPDS) 保護化9-ベータ-D-アラビノフラノシルグアニンを使用し、中間体ジイソブチリル-アラビノフラノシルグアノシンへの変換により達成された。TPDS基の脱保護化に続いて、ヒドロキシル基をTHPで保護化してジイソブチリルジ-THP保護化アラビノフラノシルグアニンが得られた。粗生成物のフッ素による処理に続いて選択的O-脱アシル化およびトリフレート化を行い、THP基を脱保護化した。標準法を使用して、5'-DMT-および5'-DMT-3'-ホスホロアミダイトを得る。

20

【 0 0 7 8 】

2'-フルオロウリジン

2'-デオキシ-2'-フルオロウリジンの合成は文献の方法を変形することにより達成され、その方法においては2,2'-アンヒドロ-1-ベータ-D-アラビノフラノシルウラシルが70% フッ化水素-ピリジンで処理された。標準法を使用して、5'-DMT-および5'-DMT-3'-ホスホロアミダイトを得る。

30

【 0 0 7 9 】

2'-フルオロデオキシシチジン

2'-デオキシ-2'-フルオロシチジンは2'-デオキシ-2'-フルオロウリジンのアミノ化、続いての選択的保護化により合成され、N4-ベンゾイル-2'-デオキシ-2'-フルオロシチジンを得た。標準法を使用して、5'-DMT-および5'-DMT-3'-ホスホロアミダイトを得る。

【 0 0 8 0 】

2'-O-(2-メトキシエチル) 修飾アミダイト

2'-O-メトキシエチル-置換ヌクレオシドアミダイトは以下のように、またはMartin, P., (Helvetica Chimica Acta, 1995, 78, 486-504) の方法に従って製造された。

40

【 0 0 8 1 】

2,2'-アンヒドロ [1-(ベータ-D-アラビノフラノシル)-5-メチルウリジン]

5-メチルウリジン (リボシルチミン、Yamasa, Choshi, Japanから市販品として入手可能) (72.0 g、0.279 M)、炭酸ジフェニル (90.0 g、0.420 M) および炭酸水素ナトリウム (2.0 g、0.024 M) をDMF (300 mL) に加えた。混合物は攪拌しながら加熱環流して、発生する二酸化炭素を制御して放出させた。1時間後、わずかに黒くなった溶液を減圧下で濃縮した。得られたシロップ状物は攪拌しながらジエチルエーテル (2.5 L) に注いだ。生成物がゴム状物として生成された。エーテルをデカントし、残渣を最少量のメタノール (約400 mL) に溶解した。この溶液を新しいジエチルエーテル (2.5 L) に注ぎ、硬い

50

ゴム状物を得た。。エーテルをデカントし、ゴム状物を真空オーブンで乾燥させると(60、1 mmHgで24時間)、固形物が得られ、それを砕くと薄い黄褐色粉末となった(57 g、粗収率85%)。NMRスペクトルは構造と一致し、フェノールがナトリウム塩として夾雑していた(約5%)。この物質は続いての反応にそのまま使用された(または、酢酸エチル中のメタノール濃度勾配(10-25%)を使用するカラムクロマトグラフィーによりさらに精製でき、白色固形物が得られた、mp222-4)。

【0082】

2'-0-メトキシエチル-5-メチルウリジン

2,2'-アンヒドロ-5-メチルウリジン(195 g、0.81 M)、トリス(2-メトキシエチル)ホウ酸(231 g、0.98 M)および2-メトキシエタノール(1.2 L)を2 Lのステンレス圧力容器に加え、160 に前もって暖めておいた油浴中に置いた。155-160 で48時間加熱後、容器を開き、溶液を蒸発乾固させ、MeOH(200 mL)で磨砕した。残渣は熱アセトン(1 L)に懸濁した。不溶性塩を濾過し、アセトン(150 mL)で洗浄し、濾液を蒸発させた。残渣(280 g)はCH₃CN(600 mL)に溶解し、蒸発させた。シリカゲルカラム(3 kg)を0.5% Et₃NH含有CH₂Cl₂/アセトン/MeOH(20:5:3)で充填した。残渣はCH₂Cl₂(250 mL)に溶解し、カラムへ加える前にシリカ(150 g)に吸着させた。生成物を充填溶液で溶出させると、160 g(63%)の生成物が得られた。追加の生成物が不純な分画を再処理することで得られた。

10

【0083】

2'-0-メトキシエチル-5'-0-ジメトキシトリチル-5-メチルウリジン

2'-0-メトキシエチル-メチルウリジン(160 g、0.506 M)をピリジン(250 mL)と共蒸留し、乾燥残渣をピリジン(1.3 L)に溶解した。塩化ジメトキシトリチルの最初のアリコート(94.3 g、0.278 M)を加え、混合物は室温で1時間撹拌した。第二のジメトキシトリチルのアリコート(94.3 g、0.278 M)を加え、反応液をさらに1時間撹拌した。次に、メタノール(170 mL)を加えて、反応を停止させた。HPLCは約70%の生成物の存在を示した。溶媒を蒸発させ、CH₃CN(200 mL)で磨砕した。残渣をCHCl₃(1.5 L)に溶解し、2×500 mLの飽和NaHCO₃および2×500 mLの飽和NaClで抽出した。有機層をNa₂SO₄で乾燥させ、濾過および蒸発させた。275 gの残渣が得られた。残渣は0.5% Et₃NH含有EtOAc/ヘキサン/アセトン(5:5:1)で充填および溶出する3.5 kgのシリカゲルカラムで精製した。純粋な分画を蒸発させると164 gの生成物が得られた。不純な分画から約20 gの追加の生成物が得られ、総収量は183 g(57%)であった。

20

30

【0084】

3'-0-アセチル-2'-0-メトキシエチル-5'-0-ジメトキシトリチル-5-メチルウリジン

2'-0-メトキシエチル-5'-0-ジメトキシエチル(106 g、0.167 M)、DMF/ピリジン(562 mLのDMFおよび188 mLのピリジンから調製された750 mLの3:1混合物)および無水酢酸(24.38 mL、0.258 M)を混合し、室温で24時間撹拌した。最初にtlc試料をMeOHを加えて反応停止させることにより、tlcで反応をモニターした。tlcで判断することで反応が完了した後、MeOH(50 mL)を加え、混合物は35 で蒸発させた。残渣をCHCl₃(800 mL)に溶解し、2×200 mLの飽和炭酸水素ナトリウムおよび2×200 mLの飽和NaClで抽出した。水層は200 mLのCHCl₃で逆抽出した。合わせた有機層は硫酸ナトリウムで乾燥させ、蒸発させると122 gの残渣(約90%の生成物)が得られた。残渣は3.5 kgのシリカゲルカラムを用いて精製し、EtOAc/ヘキサン(4:1)で溶出した。純粋な生成物分画を蒸発させると96 g(84%)が得られた。後者の分画からさらに1.5 gが回収された。

40

【0085】

3'-0-アセチル-2'-0-メトキシエチル-5'-0-ジメトキシトリチル-5-メチル-4-トリアゾールウリジン

第一の溶液は3'-0-アセチル-2'-0-メトキシエチル-5'-0-ジメトキシトリチル-5-メチルウリジン(96 g、0.144 M)をCH₃CN(700 mL)に溶解することにより調製し、そして放置した。トリエチルアミン(189 mL、1.44 M)をトリアゾール(90 g、1.3 M)のCH₃CN(1 L)溶液に加え、-5 に冷却し、オーバーヘッド撹拌機を使用して0.5時間撹拌した。POCl

50

3を攪拌溶液を0-10 に保つように、30分かけて滴加し、生じた混合物はさらに2時間攪拌した。後者の溶液に、45分かけて第一の溶液を滴加した。得られた反応混合物は低温で一晩保存した。反応混合物から塩を濾去し、濾液を蒸発させた。残渣をEtOAc (1 L) に溶解し、不溶性固形物を濾過した。濾液は1×300 mLのNaHCO₃および2×300 mLの飽和NaClで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させ、蒸発させた。残渣をEtOAcと磨砕すると表題化合物が得られた。

【0086】

2'-0-メトキシエチル-5'-0-ジメトキシトリチル-5-メチルシチジン

3'-0-アセチル-2'-0-メトキシエチル-5'-0-ジメトキシトリチル-5-メチル-4-トリアゾールウリジン (103 g, 0.141 M) のジオキサン (500 mL) およびNH₄OH (30 mL) 溶液を室温で2時間攪拌した。ジオキサン溶液を蒸発させ、MeOH (2×200 mL) と共沸させた。残渣をMeOH (300 mL) に溶解し、2リットルのステンレス圧力容器に移した。NH₃ガスで飽和したMeOH (400 mL) を加え、容器を100 で2時間加熱した (tlcは完全な変換を示した)。容器内容物は蒸発乾固させ、残渣をEtOAc (500 mL) に溶解し、飽和NaCl (200 mL) で1回洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を留去すると85 g (95%) の表題化合物が得られた。

10

【0087】

N4-ベンゾイル-2'-0-メトキシエチル-5'-0-ジメトキシトリチル-5-メチルシチジン

2'-0-メトキシエチル-5'-ジメトキシトリチル-5-メチルシチジン (85 g, 0.134 M) をDMF (800 mL) に溶解し、攪拌しながら無水安息香酸 (37.2 g, 0.165 M) を加えた。3時間攪拌後、tlcは反応が約95%完了していることを示した。溶媒を蒸発させ、残渣をMeOH (200 mL) と共沸させた。残渣をCHCl₃ (700 mL) に溶解し、飽和NaHCO₃ (2×300 mL) および飽和NaCl (2×300 mL) で抽出し、MgSO₄で乾燥し、蒸発させると残渣 (96 g) が得られた。残渣は1.5 kgのシリカカラム上で、溶出溶媒として0.5% Et₃NH含有EtOAc / ヘキサン (1:1) を使用するクロマトグラフィーを行った。純粋な生成物分画を蒸発させると90 g (90%) の表題化合物が得られた。

20

【0088】

N4-ベンゾイル-2'-0-メトキシエチル-5'-0-ジメトキシトリチル-5-メチルシチジン-3'-

アミダイト

N4-ベンゾイル-2'-0-メトキシエチル-5'-0-ジメトキシトリチル-5-メチルシチジン (74 g, 0.10 M) をCH₂Cl₂ (1 L) に溶解した。テトラゾールジイソプロピルアミン (7.1 g) および2-シアノエトキシ-テトラ- (イソプロピル) ホスファイト (40.5 mL, 0.123 M) を窒素雰囲気下、攪拌しながら加えた。得られた混合物は室温で20時間攪拌した (tlcは反応が約95%完了していることを示した)。反応混合物は飽和NaHCO₃ (1×300 mL) および飽和NaCl (3×300 mL) で抽出した。水相洗浄物はCH₂Cl₂ (300 mL) で逆抽出し、抽出液を合わせ、MgSO₄で乾燥して濃縮した。得られた残渣は1.5 kgのシリカカラム上で、溶出溶媒としてEtOAc / ヘキサン (3:1) を使用するクロマトグラフィーを行った。純粋な生成物分画を合わせると90.6 g (87%) の表題化合物が得られた。

30

【0089】

2'- (アミノオキシエチル) ヌクレオシドアミダイトおよび2'- (ジメチルアミノオキシエチル) ヌクレオシドアミダイト

40

アミノオキシエチルおよびジメチルアミノオキシエチルアミダイトは1998年2月14日に出願された米国特許出願第10/037,143号、および1998年1月30日に提出された第09/016,520号 (両方とも本出願と共通して所有され、本明細書において援用される) の方法に従って製造された。

【0090】

実施例2

オリゴヌクレオチド合成

非置換および置換ホスホジエステル (P=O) オリゴヌクレオチドはヨウ素による酸化の標準ホスホロアミダイト化学を用いる自動化DNA合成機 (Applied Biosystemsモデル380B

50

）で合成された。

【0091】

ホスホロチオエート (P=S) はホスホジエステルオリゴヌクレオチドのように、ただし、ホスファイト結合の段階的チア化のために標準酸化ボトルを3H-1,2-ベンゾジチオール-3-オン1,1-ジオキシドのアセトニトリル中0.2 M溶液に置き換えた。チア化待ち工程は68秒に延長させ、キャッピング工程を続けた。CPGカラムから切断し、濃水酸化アンモニウム中、55 で脱保護後 (18時間)、オリゴヌクレオチドは0.5 M NaCl溶液から、2.5容量のエタノールで2回沈殿させることにより精製した。

【0092】

ホスフィネートオリゴヌクレオチドは米国特許第5,508,270号 (本明細書において援用される) に記載されているように製造された。 10

アルキルホスホネートオリゴヌクレオチドは米国特許第4,469,863号 (本明細書において援用される) に記載されているように製造された。

【0093】

3'-デオキシ-3'-メチレンホスホネートオリゴヌクレオチドは米国特許第5,610,289または5,625,050号 (本明細書において援用される) に記載されているように製造された。

【0094】

ホスホロアミダイトオリゴヌクレオチドは米国特許第5,256,775号または米国特許第5,366,878号 (本明細書において援用される) に記載されているように製造された。

【0095】

アルキルホスホロチオエートオリゴヌクレオチドは公開されたPCT/US94/00902およびPCT/US93/06976 (各々W094/17093およびW094/02499として公開され、本明細書において援用される) に記載されているように製造された。 20

【0096】

3'-デオキシ-3'-アミノホスホロアミダイトオリゴヌクレオチドは米国特許第5,476,925号 (本明細書において援用される) に記載されているように製造された。

【0097】

ホスホトリエステルオリゴヌクレオチドは米国特許第5,023,243号 (本明細書において援用される) に記載されているように製造された。

ボラノホスフェートオリゴヌクレオチドは米国特許第5,130,302および5,177,198号 (両方とも本明細書において援用される) に記載されているように製造された。 30

【0098】

実施例3

オリゴヌクレオシド合成

メチレンメチルイミノ連結オリゴヌクレオシド (MMI連結オリゴヌクレオシドとも称される)、メチレンジメチルヒドラゾ連結オリゴヌクレオシド (MDH連結オリゴヌクレオシドとも称される)、およびメチレンカルボニルアミノ連結オリゴヌクレオシド (アミド-3連結オリゴヌクレオシドとも称される)、およびメチレンアミノカルボニル連結オリゴヌクレオシド (アミド-4連結オリゴヌクレオシドとも称される)、ならびに、例えば、交互的にMMIおよびP=OまたはP=S結合を有する混合バックボーン化合物は米国特許第5,378,825、5,386,023、5,489,677、5,602,240および5,610,289号 (すべて本明細書において援用される) に記載されているように製造された。 40

【0099】

ホルムアセチルおよびチオホルムアセチル結合オリゴヌクレオチドは米国特許第5,264,562および5,264,564号 (本明細書において援用される) に記載されているように製造された。

【0100】

エチレンオキシド結合オリゴヌクレオチドは米国特許5,223,618号 (本明細書において援用される) に記載されているように製造された。

実施例4

PNA合成

ペプチド核酸 (PNA) は Peptide Nucleic Acids (PNA) : Synthesis, Properties and Potential Applications, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 1996, 4, 5-23 に示された種々の方法のいずれかに従って製造される。また、米国特許第 5,539,082、5,700,922 および 5,719,262 号 (本明細書において援用される) に記載されているようにも製造されるであろう。

【0101】

実施例5キメラオリゴヌクレオチドの合成

本発明のキメラオリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシドまたは混合オリゴヌクレオチド / オリゴヌクレオシドにはいくつかの異なった型がありうる。これらには連結されたヌクレオシドの “ギャップ” セグメントが、連結されたヌクレオシドの 5' および 3' “ウィング” セグメント間に位置している第一の型、および “ギャップ” セグメントがオリゴマー化合物の 3' 末端または 5' 末端に位置している第二の “オープンエンド” 型が含まれる。第一の型のオリゴヌクレオチドはまた、“ギャップマー” またはギャップ化オリゴヌクレオチドとして本分野では知られている。第二の型のオリゴヌクレオチドは “ヘミマー” または “ウィングマー” として本分野では知られている。

【0102】

[2'-O-Me] -- [2'-デオキシ] -- [2'-O-Me] キメラ ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド 20

2'-O-アルキルホスホロチオエートおよび 2'-デオキシホスホロチオエートオリゴヌクレオチドセグメントを有するキメラオリゴヌクレオチドは前記のように、Applied Biosystems 自動化 DNA 合成機モデル 380B を使用して合成される。オリゴヌクレオチドは自動化合成機および DNA 部分のための 2'-デオキシ-5'-ジメトキシトリチル-3'-O-ホスホロアミダイト、および 5' および 3' ウィングのための 5'-ジメトキシトリチル-2'-O-メチル-3'-O-ホスホロアミダイトを使用して合成される。標準合成サイクルは、テトラゾールおよび塩基送達後の待ち工程を 600 s に延長し、RNA について 4 回および 2'-O-メチルについて 2 回繰り返すように変更した。十分に保護化されたオリゴヌクレオチドは支持体から切断され、リン酸基は 3:1 アンモニア / エタノール中、室温で一夜脱保護化され、凍結乾燥された。メタノール性アンモニア中、室温で 24 時間の処理を行ってすべての塩基を脱保護化し、再び凍結乾燥された。2' 位を脱保護化するためにベレットを 1 M TBAF の THF に 24 時間、室温で再懸濁した。反応物は 1 M TEAA で停止させ、試料は G25 サイズ排除カラムで脱塩する前に、rotovac で 1/2 容量に減量された。回収されたオリゴについて次に、収量を分光学的に、および純度をキャピラリー電気泳動法および質量分光学的に分析した。

【0103】

[2'-O-(2-メトキシエチル)] -- [2'-デオキシ] -- [2'-O-(メトキシエチル)] キメラホスホロチオエートオリゴヌクレオチド

[2'-O-(2-メトキシエチル)] -- [2'-デオキシ] -- [2'-O-(メトキシエチル)] キメラホスホロチオエートオリゴヌクレオチドは前記 2'-O-メチルキメラオリゴヌクレオチドのための方法に従って、ただし 2'-O-メチルアミダイトを 2'-O-(メトキシエチル) アミダイトに置換して製造された。

【0104】

[2'-O-(2-メトキシエチル) ホスホジエステル] -- [2'-デオキシホスホロチオエート] -- [2'-O-(2-メトキシエチル) ホスホジエステル] キメラオリゴヌクレオチド

[2'-O-(2-メトキシエチル) ホスホジエステル] -- [2'-デオキシホスホロチオエート] -- [2'-O-(メトキシエチル) ホスホジエステル] キメラオリゴヌクレオチドは前記 2'-O-メチルキメラオリゴヌクレオチドのための方法に従って、ただし 2'-O-メチルアミダイトを 2'-O-(メトキシエチル) アミダイトに置換し、キメラ構造のウィング部分内のホスホジエステルヌクレオチド間結合を発生させるのにヨウ素による酸化、および中心ギャップのためのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を発生させるために 3,4-1,2-ベンゾジ 50

チオール-3-オン1,1-ジオキシド (Beaucage試薬) を利用する硫黄化で製造された。

【0105】

他のキメラオリゴヌクレオチド、キメラオリゴヌクレオシドおよび混合キメラオリゴヌクレオチド/オリゴヌクレオシドは米国特許第5,623,065号 (本明細書において援用される) に従って合成された。

【0106】

実施例6

オリゴヌクレオチド単離

制御孔ガラスカラム (Applied Biosystems) から切断し、濃水酸化アンモニウム中で18時間、55℃で脱保護化した後、オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオシドは0.5 M NaClから2.5容量のエタノールで2回沈殿させることにより精製した。合成されたオリゴヌクレオチドは変性ゲル上、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析され、少なくとも85%が完全長物質であると判断された。合成で得られたホスホロチオエートおよびホスホジエステル結合の相対量は定期的に³¹P核磁気共鳴分光法により検査され、いくつかの研究においてはChiangら (J. Biol. Chem. 1991, 266, 18162-18171) により記載されているようにHPLCによりオリゴヌクレオチドが精製された。HPLC精製物質で得られた結果は非HPLC精製物質で得られた結果と同様であった。

【0107】

実施例7

インテグリンα4発現のオリゴヌクレオチド阻害の分析

インテグリンα4発現のアンチセンス調節は本分野では既知の種々の方法でアッセイできる。例えば、インテグリンα4 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 (RT-PCR) により定量できる。リアルタイム定量PCRが現在のところ好適である。RNA分析は全細胞RNAまたはポリ (A) + mRNAに対して実施できる。RNA単離の方法は、例えば、Ausubel, F.M.ら (Current Protocols in Molecular Biology, 1993., 1, 4.1.1-4.2.9および4.5.1-4.5.3) による教えがある。ノーザンブロット分析は本分野では日常的なことであり、例えば、Ausubel, F.M.ら (Current Protocols in Molecular Biology 1996, 1, 4.2.1-4.2.9) による教えがある。リアルタイム定量 (PCR) はPE-Applied Biosystems, Foster City, CA、から市販品として入手可能なABI PRISM 7700 Sequence Detection System、を使用して (使用説明書に従って使用される) 都合よく達成できる。PCRの他の方法も本分野で知られている。

【0108】

インテグリンα4タンパク質レベルは、免疫沈降、ウェスタンブロット分析 (免疫ブロッティング)、ELISAまたは蛍光活性化細胞選別 (FACS) のような、本分野でよく知られている種々の方法で定量できる。インテグリンα4に対する抗体が同定でき、MSRS抗体カタログ (Aerie Corporation, Birmingham, MI) の様な種々の供給源から得られ、または通常の抗体発生法により調製できる。ポリクローナル抗血清の調製法は、例えば、Ausubel, F.M.ら (Current Protocols in Molecular Biology 1997, 2, 11.12.1-11.12.9) による教えがある。モノクローナル抗体の調製は、例えば、Ausubel, F.M.ら (Current Protocols in Molecular Biology 1997, 2, 11.4.1-11.11.5) で教えられている。

【0109】

免疫沈降法は本分野で標準的であり、例えば、Ausubel, F.M.ら (Current Protocols in Molecular Biology 1998, 2, 10.16.1-10.16.11)、に見ることができる。ウェスタンブロット (免疫ブロット) 分析は本分野で標準的であり、例えば、Ausubel, F.M.ら (Current Protocols in Molecular Biology 1997, 2, 10.8.1-10.8.21)、に見ることができる。

【0110】

酵素-結合免疫吸着アッセイ (ELISA) は本分野で標準的であり、例えば、Ausubel, F.M.ら (Current Protocols in Molecular Biology 1991, 2, 11.2.1-11.2.22) に見ることができる。

【0111】

実施例8

ヒトインテグリン α 4発現のアンチセンス阻害

本発明に従うと、公開された配列（GenBank寄託番号L12002、SEQ ID NO: 1として本明細書において援用される）を使用して、ヒトインテグリン α 4 RNAの異なった領域を標的とする一連のオリゴヌクレオチドが設計された。標的部位はオリゴヌクレオチドが結合するヌクレオチド番号（配列起源参照物、GenBank寄託番号L12002に与えられているように）により示されている。表1のすべての化合物は18ヌクレオチドの長さであり、ホスホロチオエートバックボーンを持ち、中心にある10塩基デオキシヌクレオチドギャップに2'-メトキシエトキシ（2'MOE）ウィングが隣接している。オリゴヌクレオチド処理2日前に、ヒトA375メラノーマ細胞（American Type Culture Collection, Manassas, VA）を2000細胞/cm²で播種した。細胞は、200 nMオリゴヌクレオチドおよび6 μ g/ml LIPOFECTINで4時間処理した。細胞は一夜インキュベートし、2 mM EDTAのPBS溶液で採取した。細胞を2%ウシ血清アルブミン、0.2%アジ化ナトリウムのD-PBSを用いて4 で洗浄した。細胞は200 $\times$ gで遠心分離し、上清はデカントして捨てた。タンパク質レベルは報告されている方法（Condon and Bennett, *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 30398-30403）に従って、フローサイトメトリーにより決定した。特異的に結合された抗体CD49d-FITC（Immunotech, Westbrook, ME, クローンHP2/1）を2 μ L/試験ウェルに加え、対照IgG（マウスIgG1-FITC, Pharmingen, San Diego, CA）は μ g/mLの濃度で加えられた。抗体は暗所、4 で、穏やかにかき混ぜながら30分間、細胞とインキュベートした。細胞を前記のように洗浄し、0.5%ホルムアルデヒドを含む0.3 mlのFacsFlow緩衝液に再懸濁した。細胞はBecton Dickinson FACScanで分析した。結果は平均蛍光強度に基づいて、対照発現のパーセントで表現されている。

10

20

【0112】

表1に示されているように、オリゴヌクレオチド24453、24473、24475、24477および24451がインテグリン α 4タンパク質発現を少なくとも50%阻害し、さらなる研究対象にされた。

【0113】

実施例9

インテグリン α 4タンパク質発現に対する、アンチセンスオリゴヌクレオチドの影響についての用量反応曲線

30

A375細胞を50、100、200および400 nMの濃度の、ISIS 24473、24475、24477および24451で4時間処理した。細胞はオリゴヌクレオチド処理48および72時間後にトリプシンで採取し、前の実施例のように2 μ g/mlのCD49d-FITCで染色した。結果は表2に示されている。

【0114】

表1

アンチセンスオリゴヌクレオチドによるヒトインテグリン α 4タンパク質レベルの阻害

【0115】

【表 1】

ISIS#	配列	標的領域	標的部位	%対照	%阻害	配列ID番号:
24439	CTCCGTCCTCGCTACGC	5'-UTR	0087-0104	120	--	2
24440	CGGGTGCTCGCGCTGCTT	5'-UTR	0163-0180	101	--	3
24441	CCTGGGATGCCGCGCACT	5'-UTR	0224-0241	112	--	4
24442	ATGAGGCCAGCGGTGTCC	5'-UTR	0318-0335	82	18	5
24443	CAAAGTTGCACGGGATGC	5'-UTR	0370-0387	63	37	6
24444	GGACATTCAACACTAAG	AUG	0400-0417	68	32	7
24445	CCCGGGTTCGGCCCTCGC	コーダ	0443-0460	73	27	8
24446	GCGCGCTCTCAGTGTCCA	コーダ	0535-0552	58	42	9
24447	GTGGCTGTGCAGCAGCAG	コーダ	0594-0611	76	24	10
24448	ACTGAAGGTTGGCGAGC	コーダ	0656-0673	55	45	11
24449	GCACGTCGGCCGGGATT	コーダ	0714-0731	61	39	12
24451	CCACTGATTGTCTCTCTC	コーダ	0789-0806	51	49	13
24452	GGATCCATTTTCTCCTGG	コーダ	0831-0848	60	40	14

【0 1 1 6】

【 0 1 1 7 】

24453	GCCTATTTTCATTCTTTA	コーノ	0889-0906	47	53	15
24454	TTCTTTTACTCAGTTCTG	コーノ	0949-0966	53	47	16
24455	TCACATAATCTTGATAAC	コーノ	0976-0993	81	19	17
24456	CCCATCACAAATTAAATCC	コーノ	1052-1069	76	24	18
24457	TTATTTGTAGTTATATTG	コーノ	1112-1129	106	---	19
24458	CCTAAATAACTTCCAAAT	コーノ	1166-1183	88	12	20
24459	GAATAATGACCAGCTCCGA	コーノ	1192-1209	61	39	21
24460	TTTCATGTAAGATATTTA	コーノ	1300-1317	94	06	22
24461	CCACAGCACAGACAGAAG	コーノ	1351-1368	69	31	23
24462	TGCTGCTCTGCATGGGTG	コーノ	1408-1425	65	35	24
24463	TACACAAACACTCTTCCCT	コーノ	1436-1453	101	---	25
24464	TTTGTTTCCATTGCATTTC	コーノ	1481-1498	62	38	26
24465	TGCAGCATATTGTCACT	コーノ	1509-1526	63	37	27
24466	TTGTCAATGTCGCCAAGA	コーノ	1550-1567	64	36	28

10

20

30

24467	TCATCTTCTTGTGAGCT	コ	1595-1612	101	--	29
24468	CCATCTGCACGGCCATTG	コ	1637-1654	72	28	30
24469	GTCCAAACATACCTTAACG	コ	1705-1722	68	32	31
24470	TATCTGCATCAATTTGTC	コ	1735-1752	83	17	32
24471	ACCGAAAAGCACCAACTG	コ	1774-1791	80	20	33
24472	CTTGTCTCTTAGCAAGACA	コ	1802-1819	65	35	34
24473	TCAGGGTGGCTTAAAGAA	コ	1841-1858	53	47	35
24474	ATCCATTTTCAACACAGT	コ	1882-1899	71	29	36
24475	GCCCTTATATGAGAAACA	コ	1929-1946	48	52	37
24476	CAATTTGAAAGAAGTCCT	終結	3527-3544	99	01	38
24477	TCCATTCTCTCAATTTGA	3'-UTR	3537-3554	43	57	39
24478	GGCGGGCTGTTTTCATT	3'-UTR	3549-3566	115	--	40

10

20

30

【 0 1 1 8 】

すべてのオリゴヌクレオチドはホスホロチオエート (P=SまたはPS) バックボーンおよび2'デオキシギャップに隣接する2'-メトキシエトキシ (2'MOE) “ ウィング ” を有する。2'MOEヌクレオチドはボールド体で示されている。すべてのシトシンは5-メチルシトシン (5 meC) である。標的部位は標的のヌクレオチド番号を意味している (GenBank寄託番号 L12002 ; SEQ ID NO: 1)。

【 0 1 1 9 】

表 2

インテグリン α 4タンパク質発現に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの用量反応効果

【 0 1 2 0 】

40

【 表 2 】

ISIS #	用量 (nM)	配列 I D 番号 :	%対照 4 8 時間	%阻害 4 8 時間	%対照 7 2 時間	%阻害 7 2 時間
24451	50	13	63	37	ND	ND
	100		44	56	ND	ND
	200		34	66	ND	ND
	400		44	56	ND	ND
24453	50	15	79	21	78	22
	100		95	05	93	07
	200		38	62	64	36
	400		41	59	58	42
24473	50	35	77	23	85	35
	100		49	51	77	23
	200		39	61	61	39
	400		42	58	56	44
24475	50	37	60	40	69	31
	100		31	69	44	56

【 0 1 2 1 】

10

20

30

200	30	70	ND	ND
400	39	61	52	48
50	56	44	72	28
100	47	53	67	33
200	34	66	44	56
400	35	65	53	47

10

20

30

【 0 1 2 2 】

実施例 10

インテグリン $\alpha 4$ タンパク質発現に対する、アンチセンスオリゴヌクレオチドの効果についての用量反応曲線

追加の一連のオリゴヌクレオチドがインテグリン $\alpha 4$ タンパク質発現に対する効果について試験され、前のスクリーニングからの活性化合物と比較された。これらのオリゴヌクレオチドはインテグリン $\alpha 4$ プロモーター配列 (Rosen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991, 88, 4094-4098; GenBank 寄託番号 M62841、本明細書では SEQ ID NO: 41 として提供される) を標的とする。これらのオリゴヌクレオチドは表 3 に示されており、インテグリン $\alpha 4$ タンパク質発現に対する効果は表 4 に示される。バックボーンは混合のものである場合、結合はホスホロチオエート (P = S または PS) については “s”、およびホスホジエステル (P = O または PO) については “o” で示されている。標的領域が “M62841” と示されている場合、オリゴヌクレオチドはプロモーター領域を標的としており、その配列は GenBank 寄託番号 M62841 で説明されている。残りのオリゴヌクレオチドは Genbank 寄託番号 L12002 に記載されている配列を標的としており、L12002 配列上のそれらの標的部位が示されている。

40

【 0 1 2 3 】

マウス配列 (SEQ ID NO: 47) が比較のために含まれている。それはヒト配列 27104 (AU

50

Gコドンからすぐ下流のコード領域)と同一のmRNA領域を標的としており、ヒトmRNA標的とは3つのミスマッチを含む。

【0124】

表3

ヒトインテグリン α 4を標的とする追加のオリゴヌクレオチド

【0125】

【表3】

ISIS #	配列	化学	標的領域	標的部位	配列ID 番号
24475	GCCCTTATATGAGAAACA	PS; 2' MOE/デオキシ; すべての2' MOE Cは5meCである	コード	1929-1946	37
24739	TTTAGTGACAAAGACGTTAT	PS; デオキシ	M62841	0409-0428	42
24740	GAAGCCCCCTGGGAAACATT	PS; デオキシ	M62841	0428-0447	43
24741	AGACGTTATGGCTATTCTCT	PS; デオキシ	M62841	0398-0417	44
24742	TTTAGTGACAAAGACGTTAT	PS; 2' MOE; すべてのC = 5meC	M62841	0409-0428	42
24743	GAAGCCCCCTGGGAAACATT	PS; 2' MOE; すべてのC = 5meC	M62841	0428-0447	43
24744	AGACGTTATGGCTATTCTCT	PS; 2' MOE; すべてのC = 5meC	M62841	0398-0417	44
26643	TTGCCCTTATATGAGAAACA	PS; 2' MOE; すべてのC = 5meC	コード	1929-1948	45
27104	CCCAAGCCATGCGCTCTCGG	PS/2' MOE; すべてのC = 5meC	ヒトコード	0421-0440	46
27108	CoCoCoAsAsGsCsAsTs GsCsGoCoToCoToGoG	PO/PS; 2' MOE/デオキシ; すべてのC = 5meC	ヒトコード	0421-0440	46
17044	CCGCAGCCATGCGCTCTTGG	PS; 2' MOE/デオキシ; すべての2' MOE Cは5meCである	マウス コード		47
27109	CoCoGoCsAsGsCsCsAsTs	PO/PS; 2' MOE/デオキシ; すべてのC = 5meC	マウスコード		47
マウス	GsCsGoCoToCoToGoG				

10

20

30

40

【0126】

表4

ヒトインテグリン α 4タンパク質発現に対する、アンチセンスオリゴヌクレオチドの効果についての用量反応曲線

【0127】

【表 4】

ISIS #	オリゴ 濃度 (nM)	%対照	%阻害	配列 I D 番号 :
24475	10	97	03	37
	30	73	27	
	100	84	16	
	300	55	45	
24739	10	69	31	42
	30	67	33	
	100	121	--	
	300	107	--	
24740	10	122	--	43
	30	119	--	
	100	106	--	
	300	88	12	
24741	10	109	--	44
	30	113	--	
	100	125	--	
	300	127	--	
24742	10	112	--	42
	30	107	--	
	100	123	--	
	300	128	--	
24743	10	96	04	43
	30	121	--	
	100	117	--	
	300	105	--	

10

20

30

【 0 1 2 8 】

24744	10	121	--	44
	30	110	--	
	100	118	--	
	300	118	--	
26643	10	90	10	45
	30	95	05	
	100	93	07	
	300	66	34	
27104	10	69	31	46
	30	64	36	
	100	49	51	
	300	39	61	
17044	10	86	14	47
マウス				
	30	73	27	
	100	60	40	
	300	58	42	
27108	10	69	31	46
	30	95	05	
	100	64	36	
	300	49	51	
27109	10	109	--	47
	30	114	--	
	100	77	23	
	300	55	45	

10

20

【 0 1 2 9 】

30

このアッセイにおいて、オリゴヌクレオチド24475、27104および27108は40%またはそれ以上の阻害を示しており、好適である。ヒト遺伝子標的と3つのみのミスマッチを有する、マウスインテグリン α 4を標的とする配列 (SEQ ID NO: 47) もまた、最も高い用量で > 40% の阻害を示した。

【 0 1 3 0 】

実施例 11インテグリン α 4タンパク質レベルの阻害に対する、追加のオリゴヌクレオチドのスクリーニング

新規オリゴヌクレオチド26640、26641、26642および26644が合成され、前に試験したオリゴヌクレオチドと比較された。オリゴヌクレオチドは表5に示されており、インテグリン α 4タンパク質レベルに対するそれらの効果は表6に示されている。標的部位は、オリゴヌクレオチドがハイブリダイズする標的配列 (GenBank寄託番号L12002) のヌクレオチド番号で示されている。

40

【 0 1 3 1 】

表 5

ヒトインテグリン α 4を標的とする追加のオリゴヌクレオチド

【 0 1 3 2 】

【表 5】

ISIS #	配列	化学	標的領域	標的部位	配列 I D 番号:
26640	CCACTGATTGCTCTCTCTT	PS; 2'MOE/デオキシ; すべて C= 5meC	コード	0789-0806	13
26641	GAGCTTATTTTCATTCTTA	PS; 2'MOE/デオキシ; すべて C= 5meC	コード	0889-0906	15
26642	TCAGGGTGGCTTAAGAAGC	PS; 2'MOE/デオキシ; すべて C= 5meC	コード	1841-1858	35
26644	TTTCCATTCTCTCAATTGA	PS; 2'MOE/デオキシ; すべて C= 5meC	3'-UTR	3537-3554	37

10

20

30

【0 1 3 3】

表 6

ヒトインテグリン α 4タンパク質発現に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの効果
についての用量反応曲線

【0 1 3 4】

40

【表 6】

ISIS #	オリゴ 濃度 (nM)	%対照	%阻害	配列 I D 番号 :
27104	10	84	16	46
	30	82	18	
	100	59	41	
	300	37	63	
17044	10	97	03	47
	30	84	16	
	100	68	32	
	300	39	61	
24451	10	96	04	13
	30	77	23	
	100	66	34	
	300	35	65	
26640	10	91	09	13
	30	83	17	
	100	62	38	
	300	35	65	
24453	10	88	12	15
	30	90	10	
	100	80	20	
	300	43	57	
26641	10	88	12	15
	30	85	15	
	100	67	33	
	300	31	69	
24473	10	103	--	35

10

20

30

【 0 1 3 5 】

	30	92	08	
	100	81	19	
	300	47	53	
26642	10	84	16	35
	30	77	23	
	100	56	44	
	300	23	77	
24477	10	83	17	39
	30	80	20	
	100	63	37	
	300	33	67	
26644	10	99	01	39
	30	94	06	
	100	78	22	
	300	48	52	

10

【0136】

このアッセイにおいて、オリゴヌクレオチド27104、24451、26640、24453、26641、24473、26642、24477および26644は40%またはそれ以上の阻害を示しており、好適である。ヒト遺伝子標的と3つのみのミスマッチを有する、マウスインテグリン α 4を標的とするオリゴヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 47) もまた、最も高い用量で > 40% の阻害を示した。

20

【0137】

実施例12

マウスP388D (IL-1) 細胞におけるマウスインテグリン α 4 mRNA発現の、アンチセンス阻害

インテグリン α 4を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドにより改善できると信じられている多くの状態は、ヒトでは検査して研究できないので、De Miersmanらにより報告されている配列 (DNA Cell Biol. 1994, 13: 743-754; GenBank寄託番号L20788、本明細書ではSEQ ID NO: 48として提供される) を使用し、マウスインテグリン α 4を標的とする一連のオリゴヌクレオチドが設計された。これらのオリゴヌクレオチドは表7に示されている。ボールド体で示された塩基は2'-メトキシエトキシ (2'MOE) であり; 残りの位置は2'-デオキシである。標的部位は、オリゴヌクレオチドが結合する標的 (GenBank寄託番号L20788) における最初のヌクレオチド位を示している。

30

【0138】

オリゴヌクレオチドは最初にマウスP388D (IL-1) マクロファージ細胞 (American Type Culture Collection, Manassas VA) を用い、3 μ g/mlリポフェクチン中、100 nMのオリゴヌクレオチド濃度で4時間スクリーニングされた。細胞を採取し、RNAはCatrimox-14溶液 (Iowa Biotechnology Corp, Oakdale IA. Dahle, C.E.およびMacfarlane, D.E., BioTechniques 1993, 15, 1-4) を使用する細胞溶解物により精製された。RNAは1% アガロース / 1.1% ホルムアルデヒドゲル上、各々のレーンに18 μ gのRNAを加えて電気泳動した。インテグリン α 4プローブはBednarczukら (BioTechniques 1991 10, 478) の方法に従ってRT-PCRにより作製されたPCR標識1025塩基インテグリン α 4断片 (3681-4706位) であった。スクリーニングの結果は表8に示されている。

40

【0139】

表7

マウスインテグリン α 4を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチド

【0140】

50

【表 7】

ISIS #	配列	化学	標的領域	標的部位	配列 I D 番号:
15600	CACGCCCCGTTTCTGTGGCC	PS; 2'-MOE, すべてC = 5meC	5' キャップ	0952-0971	49
15601	CACGCCCCGTTTCTGTGGCC	PO; 2'-MOE, すべてC = 5meC	5' キャップ	0952-0971	49
15602	CACGCCCCGTTTCTGTGGCC	PS; DNA	5' キャップ	0952-0971	49
15603	GGATGCTTCAGGCTCTGGCC	PS; DNA	5' UTR	0972-0991	50
15604	GGAGCGATCGTAGTGGCCAG	PS; DNA	5' UTR	0992-1011	51
15605	CCGGTGCTGGCAGGCGACAG	PS; DNA	5' UTR	1061-1080	52
15606	GATGAAGTGCAGCAGCGTGT	PS; DNA	5' UTR	1081-1100	53
15607	GGCCACTGACCAGAGTTGCA	PS; DNA	5' UTR	1141-1160	54
15608	CCGCAGCCATGCGCTCTTGG	PS; DNA	AUG	1183-1202	47
15609	CACCTCGCTTCCGCAGCCAT	PS; DNA	AUG	1193-1212	55

10

20

30

【 0 1 4 1 】

表 8

マウスインテグリン $\alpha 4$ mRNA発現のアンチセンス阻害

40

【 0 1 4 2 】

【表 8】

ISIS No.	%対照	%阻害	配列 I D 番号 :
15600	93	07	49
15601	60	40	49
15602	48	52	49
15603	38	62	50
15604	134	--	51
15605	84	16	52
15606	72	28	53
15607	26	74	54
15608	16	84	47
15609	07	93	55

10

【 0 1 4 3 】

表8に示したように、ISIS 15607 (5'UTRを標的とする)、およびISIS 15608および15609 (両方とも翻訳開始コドンを標的とする)がこのアッセイで最も活性であった。ISIS 15607、15608および15609の用量反応曲線が表9に示されている。結果は二重の試料の平均である。

20

【 0 1 4 4 】

表 9

マウスインテグリン $\alpha 4$ mRNA発現のアンチセンス阻害-用量反応

【 0 1 4 5 】

【表 9】

ISIS No.	オリゴ 濃度(nM)	%対照	%阻害	配列 I D 番号 :
15607	12.5	78	22	54
	25	67	33	
	50	50	50	
	100	55	45	
15608	12.5	59	41	47
	25	29	71	
	50	23	77	
	100	39	61	
15609	12.5	54	46	55
	25	24	76	
	50	28	72	
	100	57	43	

30

40

【 0 1 4 6 】

実施例 13マウスインテグリン $\alpha 4$ タンパク質発現のアンチセンス阻害

マウス IC-21マクロファージ細胞 (American Type Culture Collection, Manassas, VA) がさらなる研究に使用された。追加のオリゴヌクレオチドがマウスインテグリン $\alpha 4$ を標的化するために設計された。これらは表10に示されており ; すべての2'MOEヌクレオチ

50

ドはボールド体で示されており、残りの位置は2'-デオキシである。これらの化合物中のすべての2'-MOEシトシンはすべての5'-メチルシトシンである。IC-21細胞はアッセイの2日前に 5×10^4 細胞/ウェルで24ウェルプレートに播種された。細胞は25 nMのオリゴヌクレオチドを含む $3 \mu\text{g/ml}$ LIPOFECTINで4時間処理された。ウェルは三重にされた。20時間後、細胞を2 mM EDTAで採取し、CD49d-フィコエリスリン (CD49d-PE) 抗体複合体 (クローンR1-2) および対照としてラットIgG2B-PEを用いて、実施例8に説明したようにフローサイトメトリーにより分析した。結果は表11に示されている。

【0147】

表10

マウスインテグリン $\alpha 4$ を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチド

10

【0148】

【表10】

ISIS #	配列	化学	標的領域	標的部位	配列ID番号
15607	GGCCACTGACCAGAGTTGCA	PS; 2' デオキシ	5' UTR	1141-1160	54
16477	CGGACCACTACACAGGTTAC	PS; 2' デオキシ	スクランブル化		56
16428	GGCCACTGACCAGAGTTGCA	PS; 2' MOE/デオキシ	5' UTR	1141-1160	54
16429	GGCCACTGACCAGAGTTGCA	PS; 2' MOE/デオキシ	5' UTR	1141-1160	54
16430	GGCCACTGACCAGAGTTGCA	PS; 2' MOE/デオキシ	5' UTR	1141-1160	54
15608	CCGCAGCCATGCGCTCTTGG	PS; DNA	AUG	1183-1202	47
16478	GCCGACACCCGTTCTGTCGG	PS; DNA	スクランブル化		57
16431	CCGCAGCCATGCGCTCTTGG	PS; 2' MOE/デオキシ	AUG	1183-1202	47
16432	CCGCAGCCATGCGCTCTTGG	PS; 2' MOE/デオキシ	AUG	1183-1202	47
16433	CCGCAGCCATGCGCTCTTGG	PS; 2' MOE/デオキシ	AUG	1183-1202	47
15609	CACCTCGCTTCCGCAGCCAT	PS; DNA	AUG	1193-1212	55

20

30

40

【0149】

16479	ACCTCCTCGCTCACCGGCTA	PS; DNA	スクランブル化	58
16434	CACCTCGCTTCCGCAGCCAT	PS; 2' MOE/デオキシ	AUG	47
16435	CACCTCGCTTCCGCAGCCAT	PS; 2' MOE/デオキシ	AUG	47
16436	CACCTCGCTTCCGCAGCCAT	PS; 2' MOE/デオキシ	AUG	47
16437	CGCTCCCGCAGCCATGCGCT	PS; 2' MOE/デオキシ	AUG	59

10

20

30

【 0 1 5 0 】

表10中のすべての2'MOEシトシンは5-メチルシトシンである。

表 1 1

アンチセンスオリゴヌクレオチドによるインテグリン α 4タンパク質発現の阻害

【 0 1 5 1 】

40

【表 1 1】

ISIS No.	%対照	%阻害	配列 I D 番号 :
15607	82	18	54
16477	96	04	56
16428	67	33	54
16429	60	40	54
16430	50	50	54
15608	63	37	47
16478	92	08	57
16431	35	65	47
16432	53	47	47
16433	23	77	47
15609	57	43	55
16479	96	04	58
16434	33	67	47
16435	30	70	47
16436	47	53	47
16437	36	64	59

10

20

【 0 1 5 2 】

ISIS 16430、16431、16433、16434、16434、16435、16436および16437はこのアッセイにおいて50%以上の阻害をし、従って好適である。

インテグリン $\alpha 4$ タンパク質レベルに対する ISIS 16431および16433も効果についての用量反応が表12に示されている。細胞は(三重)処理1日前に 2.5×10^4 細胞 / ウェルで24ウェルプレートに播種された。オリゴヌクレオチド濃度は $3 \mu\text{g} / \text{ml}$ LIPOFECTIN中、0.2、1、5、25および50 nMであった。細胞は2 mM EDTAで4分処理することにより採取し、次に各々のウェルの内容物当たり1 mlの2% BSA、0.2% アジドが加えられた。タンパク質レベルはCD49d-PE抗体複合体を $2 \mu\text{g} / \text{ml}$ で、および対照としてラット IgG2Bを $2 \mu\text{g} / \text{ml}$ で使用し、実施例8に説明したようにフローサイトメトリーにより分析した。ISIS 16431および16433はインテグリン $\alpha 4$ タンパク質阻害に対し、約1 nMのIC50を持っていることが観察された。

30

【 0 1 5 3 】

表 1 2

インテグリン $\alpha 4$ タンパク質レベルに対する、16431、16433の用量反応効果

【 0 1 5 4 】

【表 1 2】

ISIS No.	用量(nM)	%対照	%阻害	配列 I D 番号 :
16431	0.2	82	18	47
	1	57	43	
	5	34	66	
	25	32	68	
	50	30	70	
16433	0.2	85	15	47
	1	62	38	
	5	37	63	
	25	20	80	
	50	30	70	
16478	5	95	05	57
	25	87	13	
	50	84	16	

10

【 0 1 5 5 】

20

ISIS 16433についての別の用量反応実験がスクランブル化対照を含めて行われた。IC-21細胞は3 μ g/ml LIFOECTINを含む0.3、1、3、10および30 nMのオリゴヌクレオチドで4時間処理した。細胞は24時間インキュベートし、トリプシンで採取し、前記の実施例のように2 μ g/mlのCD49d-PEおよびラットIgG2Bで染色した。結果は表13に示されている。30 nMのISIS 16433がタンパク質レベルを基礎レベル以下に阻害することが観察された。

【 0 1 5 6 】

表 1 3

インテグリン α 4タンパク質レベルに対する16431、16433の用量反応効果

【 0 1 5 7 】

【表 1 3】

30

ISIS No.	オリゴ濃度(nM)	%対照	%阻害	配列 I D 番号 :
16433	0.3	89	11	47
	1	68	32	
	3	25	75	
	10	03	97	
	30	-14	(100)	
16478	0.3	137	--	57
	1	131	--	
	3	127	--	
	10	130	--	
	30	108	--	

40

【 0 1 5 8 】

別の用量反応実験が実施され、インテグリン α 4 RNAの阻害に対するISIS 16433のIC50が決定された。IC-21細胞が、3 μ g/ml LIFOECTINを含む6.25、12.5、25または50 nMのISIS 16433で二重に処理された。

50

【 0 1 5 9 】

RNAはQiagen Qiashtredder / RNEASYTM キットを用い、使用説明書に従って精製された。プローブはPrime-a-Geneキット (Promega, Madison, WI) を使用してランダムプライミングされた。結果は表14に示されている。ISIS 16433はインテグリン $\alpha 4$ RNA減少に対して約10 nMのIC50を持つことが示された。

【 0 1 6 0 】

表 1 4

インテグリン $\alpha 4$ RNAレベルに対する ISIS 16433の用量反応効果

【 0 1 6 1 】

【 表 1 4 】

10

ISIS No.	オリゴ用量(nM)	%対照	%阻害	配列 I D 番号:
16433	6.25	59	41	47
	12.5	46	44	
	25	28	72	
	50	43	57	
16478	6.25	75	25	57
	12.5	60	40	
	25	24	76	
	50	26	74	

20

【 0 1 6 2 】

実施例 14

マウスインテグリン $\alpha 4$ を標的とする追加のアンチセンスオリゴヌクレオチド-最適化

バックボーン化学および2'-メトキシエトキシギャップ配置を最適化するために、ISIS 16433配列 (SEQ ID NO: 47、翻訳開始コドンを標的とする) を持つ追加のオリゴヌクレオチドが合成された。これらの化合物はインテグリン $\alpha 4$ タンパク質発現を阻害する能力について試験された。化合物および結果は表15および16に示されている。ISIS 17044がインテグリン $\alpha 4$ 発現を開始レベル以下に減少させることが観察され、疾患の動物モデルでの続いての研究のために選択された。

30

【 0 1 6 3 】

表 1 5

SEQ ID NO: 47を有するオリゴヌクレオチドの最適化

【 0 1 6 4 】

【表 1 5】

ISIS No.	配列	化学
17044	CCGCAGCCCATGCGCTCTTGG	すべてPS; 2' MOE/デオキシ; すべての2' MOE Cは5 me Cである
17045	CCGCAGCCCATGCGCTCTTGG	すべてPS; 2' MOE/デオキシ; すべての2' MOE Cは5 me Cである
17046	CCGCAGCCCATGCGCTCTTGG	すべてPS; 2' MOE/デオキシ; すべての2' MOE Cは5 me Cである
17047	CCGCAGCCCATGCGCTCTTGG	すべてPS; 2' MOE/デオキシ; すべての2' MOE Cは5 me Cである
17160	CoCsGsCsAsGsCsCsAsTsGsCsGoCoToCoToGoG	PO/PS; すべて2' MOE; 1, 2, 14, 16位は5 me C
16433	CCGCAGCCCATGCGCTCTTGG	すべてPS; 2' MOE/デオキシ; すべての2' MOE Cは5 me Cである
17048	GCCGACACCCGTTTCGTTTCGG (スクランブル化対照; 配列ID番号: 57)	すべてPS; 2' MOE/デオキシ; すべての2' MOE Cは5 me Cである

10

20

30

【0 1 6 5】

ISIS 17160を除いてヌクレオシド間バックボーン結合は均一なP=Sである。“o”はホスホジエステル(P=O)結合を示し、および“s”はホスホロチオエート(P=S)結合を示している。

【0 1 6 6】

表 1 6

SEQ ID NO: 47を持つオリゴヌクレオチドの最適化のための用量反応

【0 1 6 7】

40

【表 1 6】

ISIS No.	オリゴ 濃度(nM)	%対照	%阻害	配列 I D 番号:
17044	0.3	100	0	47
	1	81	19	
	3	32	68	
	10	-9	>100	
17045	0.3	109	--	47
	1	65	35	
	3	34	66	
	10	12	88	
17046	0.3	161	--	47
	1	123	--	
	3	125	--	
	10	75	25	
17047	0.3	132	--	47
	1	107	--	
	3	77	23	
	10	36	67	
17160	0.3	165	--	47
	1	140	--	
	3	144	--	
	10	160	--	
16433	0.3	146	--	47
	1	94	06	

10

20

30

【0 1 6 8】

	3	64	36	
	10	02	98	
17048	0.3	159	--	57
(対照)				
	1	159	--	
	3	150	--	
	10	119	--	

40

【0 1 6 9】

実施例 15

多発性硬化症のマウス実験的自己免疫脳脊髄炎 (EAE) モデル

実験的自己免疫脳脊髄炎 (EAE) は多発性硬化症の動物実験モデルとしてしばしば使用される、炎症性、脱髄性中枢神経系疾患である。それは、全脊髄ホモジネートまたはミエリン塩基性タンパク質 (MBP) またはプロテオリピドタンパク質 (PLP) のようなミエリン鞘のタンパク質成分で免疫することにより、または MBP-または PLP-特異的 T 細胞を移入することにより、遺伝的に感受性のある動物で誘導することができる。Myers et al., J. I

50

mmunol. 1993, 151, 2252-2260.

【0170】

CSJLF-1マウス (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) を、PLPの残基139-151に対応し、これらのマウスに対して脳脊髄炎を起こすp13ペプチド (HSLGKWLGHDPKF-アミド、Research Genetics, Huntsville, ALにより合成されたもの、SEQ ID NO: 60) で免疫した。マウスは本質的にMyersら (J. Neuroimmunology 1992, 41, 1-8) により記載されているように免疫された。簡単には、マウスの後足パッドおよび尾基部に、CFA (Difco, Detroit, MI) で乳化し、4 mg/mlの熱殺菌H37Ra結核菌 (Mycobacterium tuberculosis) (Difco) で強化した50-100 µgのp13ペプチドを注射した。足パッド注射時および2日後に再び、マウスにはまた500 ngの百日咳毒素 (Sigma, St. Louis, MO) を静脈内に注射した。

10

【0171】

マウスは、特に指示した場合をのぞいて、p13免疫化1日前から種々の用量でアンチセンスオリゴヌクレオチドISIS 17044による処置した。オリゴヌクレオチドは0.9%食塩水中に製剤化され、毎日皮下で注射され、p13免疫群では50%以上、食塩水処理対照マウスでは疾患の徴候を示し始めるまで投与が続けられた。その後投与を中止し、疾患の経過に対する処置の影響についてマウスを観察した。疾患重度は0から5の尺度で記録した；0=徴候なし、1=弛緩性の尾、2=後脚衰弱、3=後脚麻痺、4=後および前脚麻痺、および5=瀕死または死亡。発症までの時間もまた測定され、オリゴヌクレオチドの代わりに食塩水を注射したp13免疫対照マウスと比較した。

20

【0172】

実施例16

EAE実験1

マウスを実施例15で説明したように、日用量1 mg/kgから20 mg/kgの範囲、皮下注射 (SC) によりISIS 17044で処置した。平均ピーク疾患重度および発症までの平均日数が測定され、それらは表17に示されている。

【0173】

表17

EAE実験1-EAEに対するISIS 17044の影響

【0174】

【表17】

30

群	疾患 発症率	ピーク 重度	発症まで の日数
食塩水	6/7	1.57	14.5
17044 20mg/kg	5/7	1.43	15
17044 10mg/kg	4/7	2.0	12.75
17044 5 mg/kg	6/7	1.86	17
17044 1 mg/kg	4/7	0.29	17.25

40

【0175】

示されているように、17044は疾患重度を低下させ、発症を遅延させた。

実施例17

EAE実験2

マウスを実施例15で説明したように、日用量0.3 mg/kgから3 mg/kgの範囲、皮下注射によりISIS 17044で処置し、および比較のため1 mg/mlが静脈内へ注射された。平均ピーク疾患重度および発症までの平均日数が測定され、それらは表18に示されている。

【0176】

表18

EAE実験2-EAEに対するISIS 17044の影響

50

【 0 1 7 7 】

【 表 1 8 】

群	疾患 発症率	ピーク 重度	発症まで の日数
食塩水	7/7	2/43	13.7
17044 3 mg/kg SC	7/7	2.29	16.4
17044 1 mg/kg SC	4/7	1.0	18.25
17044 0.3 mg/kg SC	7/7	2.14	16.57
17044 1 mg/kg IV	5/7	1.42	17.2

10

【 0 1 7 8 】

示されているように、すべての濃度で17044は疾患重度を低下させ、発症を遅延させた。

実施例 18

EAE実験3

マウスを実施例15で説明したように、日用量0.5 mg/kgから2.0 mg/kgの範囲、皮下注射（SC）によりISIS 17044で処置した。週3回投与計画も試験され、およびスクランブル化対照（ISIS 17614、GCCGACACCCGTTTCGTTTCGG、2'MOE/デオキシ；P=S；SEQ ID NO: 57）もまた試験された。疾患重度および疾患発症までの時間が測定され、それらは表19に示されている。

20

【 0 1 7 9 】

表 1 9

EAE実験3-EAEに対するISIS 17044の影響

【 0 1 8 0 】

【 表 1 9 】

群	疾患 発症率	ピーク 重度	発症まで の日数
食塩水	7/7	2.29	15.14
17044 2 mg/kg	2/6	0.83	20
17044 1.5 mg/kg	4/7	1.5	17.5
17044 1.0 mg/kg	4/5	1.5	19.25
17044 0.5 mg/kg	5/6	1.5	21.4
17044 1 mg/kg	6/7	1.0	20.3
3X 週毎			
17614 1 mg/kg	7/7	2.14	16.86

30

40

【 0 1 8 1 】

示されているように、17044は疾患重度を低下させ、発症を遅延させた。

実施例 19

EAE実験4-予防的vs.治療的投与

マウスを実施例15で説明したように、0.01 mg/kgから2.0 mg/kgの日用量、皮下注射（SC）によりISIS 17044で処置した。スクランブル化対照オリゴヌクレオチド、ISIS 176

50

14もまた2 mg/kgで試験された。治療的に1 mg/kg日用量もまた試験された。この投与計画においては、オリゴヌクレオチド処置は18日目（動物が麻痺の徴候を示し始めた後）に開始され、31日目まで続けられた。疾患重度および疾患発症までの時間が測定され、それらは表20に示されている。

【0182】

表20

EAE実験4-EAEに対するISIS 17044の影響-治療的(T) vs. 予防的(P) 投与計画

【0183】

【表20】

群	疾患 発症率	ピーク 重度	発症まで の日数
食塩水	6/7	3.29	16
17044 2.0 mg/kg SC (P)	7/7	2.29	16.71
17044 1.0 mg/kg SC (P)	5/5	2.2	15
17044 0.1 mg/kg SC (P)	7/7	1.57	16.29
17044 0.01 mg/kg (P)	6/7	1.86	13.83
17044 1 mg/kg (T)	6/6	1.83	13.3
17614 2 mg/kg SC (対照)	7/7	1.86	14.14

10

20

【0184】

示されているように、治療的に投与された場合、17044は疾患重度を低下させた（投与は発症後に始められたので、発症までの時間が長くなるのは予想されない）。

30

【0185】

実施例20

EAE実験5-予防的vs.治療的投与

マウスを実施例15で説明したように、0.01 mg/kgから2.0 mg/kgの日用量、皮下注射(SC)によりISIS 17044で処置した。スクランブル化対照オリゴヌクレオチド、ISIS 17614もまた2 mg/kgで試験された。治療的に1 mg/kg日用量もまた試験された。この投与計画においては、オリゴヌクレオチド処置は11日目（動物が麻痺の徴候を示し始めた後）に開始され、27日目まで続けられた。疾患重度および疾患発症までの時間が測定され、それらは表21に示されている。

【0186】

表21

EAE実験5-EAEに対するISIS 17044の影響-治療的(T) vs. 予防的(P) 投与計画

【0187】

40

【表 2 1】

群	疾患 発症率	ピーク 重度	発症まで の日数
食塩水	6/7	1.86	10.83
17044 2.0 mg/kg SC (P)	7/7	1.86	12
17044 1.0 mg/kg SC (P)	6/7	1.86	11.33
17044 0.1 mg/kg SC (P)	6/7	1.14	12.67
17044 0.01 mg/kg (P)	7/7	1.57	11.57
17044 1 mg/kg (T)	7/7	1.42	12.71
17614 2 mg/kg SC (対照)	6/7	1.71	9

10

【0 1 8 8】

20

示されているように、治療的に投与された場合、17044は疾患重度を低下させた（投与は発症後に始められたので、疾患発症までの時間が長くなるのは予想されない）。

【0 1 8 9】

実施例 21

慢性関節リュウマチのためのマウスコラーゲン誘導関節炎（CIA）モデル

ヒト慢性関節リュウマチのためのモデルが開発され、ここでマウスがウシタイプIIコラーゲンで免疫された（Anderson et al., J. Immunol. 1991 147, 1189-1193、Trentham et al., J. Exp. Med 1977, 146, 857を引用）。関節の膨潤および炎症の後、約3週間内に、慢性関節リュウマチに典型的である関節のゆがみおよび関節硬直が伴う。このモデルは、マウス関節炎に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド17044（マウスインテグリン $\alpha 4$ を標的としている）の影響を研究するために使用された。

30

【0 1 9 0】

DBA/1LacJマウスはJackson Laboratory, Bar Harbor, MEから入手した。6から8週齢のメスマウスが使用され、群当たり10匹のマウス群に分けられた。0日目、完全フロイントアジュバント（CFA）に乳化された100 μ gのウシタイプIIコラーゲンをを用いて尾の基部にてマウスを免疫した。7日目、同一の経路で第二のブースター量のコラーゲンが投与された。14日目、マウスに100 μ gのリポポリサッカライド（LPS）を皮下に注射した。体重を毎週記録した。CIAの発症（紅斑および浮腫により特徴づけられる）を確認するため毎日マウスを視診した。疾患を発症したら、冒されたおよび冒されていない関節の脚幅および後脚関節幅を一定張力カリパスを用いて週3回測定した。加えて、脚を臨床的に評価し、0-4に等級化した：ここで0 = 正常；1 = 一つの指の膨潤；2 = 一つ以上の指に炎症が存在；3 = 炎症ありまたは無しの関節ゆがみ；および4 = 硬直、関節操作で検出される。すべての測定値の進行は50日目まで記録された。各々のマウスに対して観察期間の終了時、すべての脚を回収して組織学的に試験した。

40

【0 1 9 1】

オリゴヌクレオチド、陽性対照薬剤（シクロホスファミド、5 mg/kg）および担体は、各々のマウスの腹腔内（IP）に毎日投与し、-3日目から開始して研究持続期間は継続する。各々の動物はボーラス日用量として10 mg/kgを受容した。

【0 1 9 2】

実施例 22

50

コラーゲン誘導関節炎 (CIA) に対する、インテグリン $\alpha 4$ を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドの影響

予備的研究において、ISPH 17044の単一日用量10 mg/kgが、疾患誘導時から50日後の研究終了まで投与された。関節炎発症はISIS 17044処置群において70から30%へ低下した。臨床パラメーターの要約は表22に示されている。

【0193】

表22

コラーゲン誘導関節炎に対するISIS17044の影響

【0194】

【表22】

処置	重度	発症開始の 平均日数	#脚/ マウス	炎症の ピーク日
担体	3.2 ± 1.1	19.7 ± 1.1	1.2 ± 0.4	6.7 ± 2.9
17044	2.1 ± 1.1	20.3 ± 1.9	0.7 ± 0.4	1.6 ± 0.8
10 mg/kg				
シクロホス	0 ± 0	--	0 ± 0	--
ファミド				
5 mg/kg				

10

20

【0195】

重度 = 臨床スコアの総計 / 群のマウス総数

#脚 / マウス = 終了時の冒された脚の平均数 / 群のマウス総数

炎症のピーク日数 = 測定された各々の関節に対する、発症から最大腫脹時までの日数。

【0196】

表23

種々の処置群において関節炎を発症したマウスが比較され、結果が表23に示されている。

【0197】

関節炎を持つマウスの比較

【0198】

【表23】

処置	影響があった 脚の平均#	平均臨床スコア
担体	1.7 ± 0.4	4.6 ± 0.4
17044 10 mg/kg	2.3 ± 0.3	7.0 ± 1.0
シクロホスファミド	---	---
5 mg/kg		

30

40

【0199】

影響があった脚の平均# = 冒されたマウスにおける終了時の脚数 / 群において冒されたマウス数

平均臨床スコア = 冒されたマウスの総臨床スコア / 群において冒されたマウス総数

実施例23

インテグリン $\alpha 4$ を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドによるEAEマウスの中樞神経系内への白血球移動の減少

EAE実験3 (前記実施例18) のマウスをCO₂で殺して脊髄を取り出し、腰部から低位胸部領域まで0.5 cm片に切断した。小片はドライアイスおよびメチルブタン上、O.C.T.組織凍

50

結媒質 (Ted Pella Inc., Redding, CA) 中に包埋した。4ミクロン凍結切片を切り出し、一夜風乾した。切片は氷冷アセトンで3分間固定し、Dako Autostainer (Dako Corporation, Carpinteria, CA) 上に設置し、以下の工程で処理した: 0.03% H_2O_2 に5分、PBSで希釈した5% ロバ血清に5分、適切に希釈された一次抗体と45分、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ロバ抗ラット二次抗体 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) と30分。切片は処理の間にPBSで洗浄された。使用されたすべての抗体はBM-8 (Bachem Bioscience Inc. (King of Prussia, PA) から) を除いて、PharMingen (San Diego, CA) からのラット抗マウスであった。免疫染色はDAB (Dako Corporation) で発色させ、ヘマトキシリンで対比染色された。

【0200】

1 mg/kg ISIS 17044による処置は、EAEを発症するように直接的に免疫されたCSJLF1マウスの脊髄および脳への白血球の移動を減少させることが示された。予備的実験において、VLA-4 (インテグリン $\alpha 4$ は二つのサブユニットの一つである)、CD4 (T細胞マーカー)、BM-8 (マクロファージマーカー) およびCD18 (白血球に観察されるLFA-1およびMAC-1接着分子に含有される) の発現により測定されるような白血球移動は著しく減少した。一つの実験において、CD4+ T細胞はISIS 17044処理マウスの中樞神経系からは実際的に取り除かれていた。これらの細胞はEAEの誘導に決定的であることが示されている。第二の実験において (EAE実験4、前記実施例19)、これらの結果が確認され、それらは用量反応的影響であるようであり、0.1 mg/kg 17044よりも1.0 mg/kgの17044は中樞神経系内への白血球流入をより多く減少させていた。スクランブル化対照オリゴヌクレオチド、ISIS 17614はこの実験の細胞流入の減少において、効果的ではなかった。

【0201】

実施例24

炎症性腸疾患に対する、インテグリン $\alpha 4$ を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドの影響

炎症性腸疾患 (IBD) のマウスモデルは最近Okayasuら (*Gastroenterology* 1990, 98, 694-702) により開発された。マウスへの硫酸デキストランの投与は、ほとんどすべての詳細な点までヒトIBDを模倣する大腸炎を誘導する。硫酸デキストラン誘導IBDおよびヒトIBDは続いて組織学的レベルで密に比較され、マウスモデルが非常に再現性があり、および信頼できるモデルであることが見いだされている。このモデルは炎症性腸疾患に対するISIS 17044の効果を試験するために使用される。

【0202】

約25から30グラムのメスSwiss Websterマウス (8週齢) を標準状態で飼育する。実験を開始する前に少なくとも5日間、マウスを順応させる。マウスに5日間5% 硫酸デキストランナトリウムを飲料水に混ぜて与える (自由に飲ませる)。同時に、医薬的な担体中に加えたISIS 17044オリゴヌクレオチド、担体単独 (陰性対照) またはTGF- β (マウスにおいて硫酸デキストラン誘発大腸炎に対して保護することが知られている) を投与する。ISIS 17044は5日間、1 mg/kgから5 mg/kgを毎日皮下注射することにより与える。TGF- β は1 μ g/マウスで結腸内に投与する。

【0203】

6日目にマウスを殺し、結腸を組織病理学的に評価する。殺すまでは、疾患活性は体重変化についてマウスを観察することにより、および大腸炎の証拠として糞を観察することによりモニターする。マウスは毎日秤量する。糞は硬さの変化および潜在的または明白な出血の存在を毎日観察する。評点システムを使用して、疾患活性指標を開発し、それにより体重損失、糞の硬さおよび出血の存在が0から3のスケール (0は正常であり、3は最も重度で冒されている) で等級分けされ、指標が計算される。疾患活性指標における薬剤誘導変化は統計的に分析された。疾患活性指標は一般にIBDと非常によく相関することが示されている。

【0204】

実施例25

10

20

30

40

50

マウス異所性心臓移植モデルでの生存に対する、インテグリン α 4を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドの影響

異種移植片拒絶反応の防止におけるインテグリン α 4アンチセンスオリゴヌクレオチドの治療的効果を決定するため、マウス血管新生異所性心臓移植モデルにおける活性についてマウスインテグリン α 4特異的オリゴヌクレオチドISIS 17044が試験された。Balb/cマウスからの心臓が、本質的にIsobeら (Circulation 1991, 84, 1246-1255) により記載されているような一次血管新生移植片としてC3Hマウスの腹部腔内へ移植された。オリゴヌクレオチドは7日ALZETポンプを通した連続的静脈内投与により投与された。非処置マウスの平均生存時間は通常約9-10日である。1 mg/kgから5 mg/kgのISIS 17044による7日間のマウス処置は平均生存時間を延長させることが予想される。

10

【0205】

実施例26

白血球移動に対する、インテグリン α 4を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドの影響

組織および器官の白血球浸潤は炎症性過程の主な特色であり、炎症により生じる組織損傷に寄与している。白血球移動に対するISIS 17044の影響が、カラゲナン浸漬スポンジが皮下に移植されたマウスモデルを使用して試験された。カラゲナンは白血球移動および浮腫を刺激する。炎症性滲出液における白血球移動に対するオリゴヌクレオチドの効果は移植されたスポンジに浸潤する白血球の定量により評価された。4時間絶食後、40匹のマウスは各々が5匹のマウスを含む8つの群に無作為に割り振られた。各々のマウスはMETOFANEで麻酔され、1 mlの20 mg/mlのカラゲナン溶液を浸透させたポリエステルスポンジを皮下に移植した。スポンジ移植4時間前に群1に10 ml/kgの食塩水が静脈内へ投与され、担体対照として働いた。インドメタシン (陽性対照) は手術直後、6-8時間後に再び、および移植後21時間後に群2に20 ml/kgの量で3 mg/kgが経口で再び投与された。ISIS 17044は、スポンジ移植3時間前に群3に1 mg/kgから5 mg/kgの用量で皮下投与された。ISIS 17044は、スポンジ移植直後に群4に1 mg/kgから5 mg/kgの用量で静脈内投与された。ISIS 17044は、スポンジ移植2、4、8および18時間後に群5、6、7および8に1 mg/kgから5 mg/kgの用量で静脈内投与された。移植24時間後、スポンジを取りだし、EDTAおよび食塩水 (5 ml) に浸し、搾って乾燥させた。スポンジ滲出液混合物中の白血球の総数が決定された。3 mg/kgでのインドメタシンの経口投与は、担体対照群と比較した場合、一般に平均白血球数の75-80%の減少を生じる。

20

30

【0206】

実施例27

実験的転移アッセイ

転移におけるインテグリン α 4の役割を評価するため、 1×10^5 のC8161細胞を無胸腺ヌードマウスの側方尾静脈内へ注射することにより実験的転移アッセイが実施された。C8161はヒトメラノーマ細胞株である。C8161細胞のサイトカインTNF- α およびインターフェロン γ による処理により、細胞がヌードマウス内へ注射された場合に肺転移の数を増加させることが以前に示されている (Miller, D.E. and Welch, D.R., Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 1990, 13, 353)。4週齢メス無胸腺ヌードマウス (Harlan Sprague Dawley) を使用する。動物はNIHのガイドラインに従って維持された。各々4-8匹のマウスの群が実験的転移アッセイで試験された。

40

【0207】

C8161細胞のアンチセンスオリゴヌクレオチドISIS 27104 (ヒトインテグリン α 4と相補的) による処理は、カチオン性脂質、LIPOFECTIN (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD) の存在下で実施された。細胞を60 mm組織培養皿に 10^6 細胞/mlで播種し、3日間37℃でインキュベートし、Opti-MEM (Gibco/BRL) で3回洗浄して100 μ lのOpti-MEM培地を各々のウェルに加えた。0.5 μ Mオリゴヌクレオチドおよび15 μ g/mlのLIPOFECTINを室温で15分間混合した。25 μ lのオリゴヌクレオチド-LIPOFECTIN混合物を適切な皿に加え、37℃で4時間インキュベートした。オリゴヌクレオチド-LIPOFECTIN混合物を除去し、10% ウシ胎児血

50

清を含むDME-F12培地と置き換えた。4時間後、500 U/mlのTNF- α を適切なウェルに加えて18時間インキュベートし、その時点で細胞をプレートから取り出し、計数して無胸腺ヌードマウスに注射した。もしくは、腫瘍細胞（オリゴヌクレオチドで処理されていない）を前記のように無胸腺ヌードマウス内に移植し、腫瘍を持っているマウスを1日おきに、1 mg/kgから5 mg/kgの用量でアンチセンスオリゴヌクレオチドで処置する。

【0208】

4週間後、マウスを殺し、器官をブアン固定液中で固定し、肺の転移性病変を解剖顕微鏡の助けをかりて評点した。

ISIS 27104によるC8161細胞の処理はこれらの細胞の転移能力を減少させ、TNF- α 処理により生じたC8161の促進された転移能を除去した。

10

【0209】

実施例28

クローン病のマウスモデルにおけるインテグリン α 4アンチセンスオリゴヌクレオチドの効果

SJL/JおよびIL10-/-マウスがクローン病のTNBS(2,4,5,-トリニトロベンゼンスルホン酸)誘導大腸炎モデル(Neurath, M.F., et al., J. Exp. Med., 1995, 182, 1281-1290)に使用された。6週齢から3ヶ月齢の間のマウスを使用して、TNF- α アンチセンスオリゴヌクレオチドの活性を評価する。

【0210】

C3H/HeJ、SJL/JKおよびIL10-/-マウスはTNBS投与に先立って一夜絶食させた。チップが肛門から約4 cmの所に留まるように、薄い、可撓性のポリエチレン管をマウスの結腸内へゆっくりと挿入する。0.5 mgのTNBSの50%エタノール溶液を1 mlの注射筒に固定したカテーテルから徐々に注入した。動物は約30秒間垂直の位置に逆さにした。オリゴヌクレオチドISIS 17044は症状の最初の徴候が現れたときかまたは疾患の誘導と同時に投与された。ほとんどの場合、動物には毎日投与された。投与はi.v.、i.p.、s.p.ミニポンプまたは結腸内注入によるものである。実験組織は処置計画終了時に組織化学的評価のために集めた。

20

【0211】

実施例29

肝炎のマウスモデルにおける、インテグリン α 4を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドの効果

30

コンカナバリンA誘発肝炎が肝炎のマウスモデルとして使用された(Mizuhara, H., et al., J. Exp. Med., 1994, 179, 1529-1537)。6週齢から3ヶ月齢の間のメスBalb/cおよびC57BL/6マウスを使用して、アンチセンスオリゴヌクレオチドISIS 17044の活性を評価する。

【0212】

マウスの静脈内にオリゴヌクレオチドが注射された。前処置されたマウスに次に、0.3 mgのコンカナバリンA(ConA)を静脈内注射し、肝臓損傷を誘導する。ConA注射24時間以内に肝臓を動物から除去し、in vitro法により細胞死(アポトーシス)が分析された。いくつかの実験において、血液が眼窩後の静脈から集められた。

40

【0213】

実施例30

喘息のマウスモデルにおける、インテグリン α 4を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドの効果

気道炎症がアレルギー性喘息の患者で観察されている。アレルギー性喘息のマウスモデルが開発されている(Hessel et al. J. Immunol. 1998, 160, 2998-3005)。オボアルブミンによるBALB/cマウスの感作は高レベルのオボアルブミン特異的IgGを血清中に誘導する。感作マウスにおけるオボアルブミン吸入は即時型気管支収縮応答を起こす。感作動物におけるオボアルブミンの反復吸入はin vivoで非特異的気道過応答性、および気道組織への白血球の浸潤を誘導する。

50

【0214】

病原体を持たないオスBALB/cマウス(6-8週)はJackson Laboratoriesから入手した。能動的感作は0.5 mlの発熱物質を含まない食塩水中の10 µgのオボアルブミン(Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, グレードII)を1日おきに7回、IP注射(1日1回)することによりが実施された。この方法はマウス血清に高力価の総IgGを産生し、その80%はオボアルブミン特異的IgGである(Hessel et al., 1998, *J. Immunol.* 160: 2998-3005)。最後の注射から4週間後、マウスはオボアルブミンエアロゾル(2 mg/ml)または食塩水エアロゾルに1日1回、8日間にわたって暴露される。エアロゾルはMedix 8001(Sussex, UK)のようなネブライザーで発生させる。動物はエアロゾルのチャレンジに5分間暴露された。

10

【0215】

アンチセンスオリゴヌクレオチド17044はチャレンジの間にマウスに投与された。第一および第五の吸入チャレンジ30分前に、感作マウスには、1 mg/kgから5 mg/kgの投与量でPBS中ISIS 17044が静脈内に注射された。

【0216】

メタコリンへの気道応答性は、吸入に対する気道抵抗性が測定される空気オーバーフロー圧力法を使用して、最後のエアロゾル暴露の24時間後にin vivoで測定される。マウスは2 g/kgのウレタンのIP注射により麻酔し、加熱したプランケット上に置いた。気管にカニューレを挿入し、小さなポリエチレンカテーテルをIV投与のために頸静脈に置いた。自発的呼吸はツボクラリンクロリド(3.3 mg/kg)のIV注射により抑制された。それが停止した時、気管カニューレを呼吸ポンプに連結する。間隔をおいて、40から1280 µg/kgの範囲のメタコリンの投与量を増加させながら与えた。空気オーバーフロー圧力の増加(気道緊張の増加の結果としての肺への空気流入の減少により起こされる)がそのピークで測定され、パーセント増加として表現されている。

20

【0217】

気管支肺胞洗浄を使用して、気道組織の白血球浸潤を測定する。最後のエアロゾルから3および24時間後、0.25 mlのペントバルビトンナトリウム(60 mg/ml)のIP注射によりマウスを麻酔する。腹部および胸を開き、腹部動脈を切りだした。喉頭の下で小さな切開を行い、可撓性のポリエチレンカニューレを気管内へ挿入し、結紮糸で固定した。37℃に温めた、の発熱物質を含まない1 mlの食塩水でマウスを5回洗浄した。各々の洗浄に由来する細胞を集め、冷PBSで洗浄して200 µlの冷PBSに再懸濁した。細胞の総数を計数し、および分類した。

30

【0218】

実施例31

造血前駆細胞の末梢化に対するインテグリンα4のアンチセンスの効果

骨髄から血液循環系への造血前駆細胞の移動(末梢化)は幹細胞移植において臨床的に有用である。この過程に対する薬物化合物の効果(および、患者の骨髄への移植された幹細胞の逆向きで選択的な堆積またはホーミング)を評価するためのマウスモデルが確立されている(Papayannopoulou et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995, 92, 9647-9651)。簡潔には、3-6ヶ月齢の病原体を持たないマウスが使用され、実験の期間中、通気をフィルター濾過したハウジングユニット内で飼った。ホーミングアッセイにおいて一次的または二次的レシピエントとして使用されたマウスはCs源からの1150 cGyの照射に暴露される。

40

【0219】

単一細胞懸濁液は末梢血、骨髄および脾臓から調製された。末梢血は心臓穿刺により保存剤を含まないヘパリン中に得られ、有核細胞はNH₄Cl溶血緩衝液を使用して回収された。骨髄細胞は、無菌状態下、10% v/vウシ胎児血清およびストレプトマイシン(50 µg/ml)およびペニシリン(50 U/ml)を含むIscoveの改良ダルベッコ培地(IMDM)で大腿骨髄を洗い流すことにより得られる。脾臓細胞懸濁液は外科用メスで脾臓を縦に切開し、被膜から細胞性内容物を掻き取り、続く激しいピペッティングにより得られる。すべての細

50

胞懸濁液は10% ウシ胎児血清を含むIMDMで2回洗浄する。細胞数は血球計数器を使用して得られる。

【0220】

培養コロニー形成単位 (CFU-C) および脾臓コロニー形成単位 (CFU-S) アッセイはPapayannopoulouら (Proc. Natl. Acad. Sci. 1995, 92, 9647-9651) により記載されているように実施された。

【0221】

正常動物での造血前駆細胞移動を評価するため、オリゴヌクレオチドが3日間、毎日IV注射することにより投与された (1 mg/kg から 5 mg/kg の用量範囲)。4日目にマウスを殺した。0.25-0.5 ml の末梢血中に存在する有核細胞をコロニー形成性前駆細胞培地に置き、Papayannopoulouら (Proc. Natl. Acad. Sci. 1995, 92, 9647-9651) により説明されているようにCFU-Cを評価した。

10

【0222】

実施例32

ヒトインテグリン $\alpha 4$ を標的とする追加のオリゴヌクレオチドのスクリーニング

ヒトインテグリン $\alpha 4$ (Genbank寄託番号L12002、本明細書においてSEQ ID NO: 1として援用される) を標的とする追加のセットのアンチセンスオリゴヌクレオチドが設計された。オリゴヌクレオチドは表24に示されている。オリゴヌクレオチドは5'末端上の3つの2'-O-メトキシエチル (2'-MOE) ヌクレオチドおよび3'末端上の8つの2'-MOEヌクレオチドが隣接するデオキシヌクレオチドの9-ヌクレオチド領域から成る“ギャップマー”として合成された。2'-MOEヌクレオチドは表中ではボールド体で示されている。オリゴヌクレオチドは全体がホスホロチオエートバックボーンを持つように合成され、すべてのシトシンは5-メチルシトシンである。オリゴヌクレオチドは前記実施例8で説明したように、リポフェクチン存在下、A375ヒトメラノーマ細胞でスクリーニングされた。結果はまた表24に示されている。表に示したように、オリゴヌクレオチド107234、107235、107236、107237、107238、107239、107240、107241、107242、107243、107244、107245、107246、107248、107249、107251、107252、107253、107254、107255、107256、107257、107258、107259および107260 (各々SEQ ID NO: 67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、81、82、84、85、86、87、88、89、90、91、92および93) はインテグリン $\alpha 4$ タンパク質発現の少なくとも約50%阻害を与え、好適である。これらの中でも、ISIS 107245、107248、107252、107255および107259 (各々SEQ ID NO: 78、81、85、88および92) がさらなる研究のために選択された。

20

30

【0223】

表24

ヒトインテグリン $\alpha 4$ を標的とする追加のアンチセンスオリゴヌクレオチド

【0224】

【表 2 4】

ISIS #	配列	標的領域	標的部位	%対照	%阻害	配列 I D 番号:
107229	AGTCCGCAGAGCGGGGATG	5'-UTR	4	104	--	61
107230	AGACTCGGTCCTGGCCCCGG	5'-UTR	31	73	27	62
107231	GTGCGGAGGCGCAGGCGCGG	5'-UTR	106	115	--	63
107232	CCGGTTTCTGCCGCCGAGCC	5'-UTR	189	83	17	64
107233	ATGCGACGGTTGGCCACGCG	5'-UTR	354	57	43	65
27104	CCCAAGCCATGCGCTCTCGG	コード	421	69	31	46
100025	CCCAGCACATCGGCTCTCGG	対照	421 5-不適正	97	3	66
107234	CTTCCCAAGCCATGCGCTCT	コード	424	47	53	67
107235	TCGCTTCCCAAGCCATGCGC	コード	427	36	64	68
107236	GCCTCGCTTCCCCAAGCCATG	コード	430	43	57	69
107237	CGCGCCTCGCTTCCCCAAGCC	コード	433	46	54	70
26642	TCAGGGTGGCTTAAGAAGC	コード	1839	67	33	35
107238	TCCTTGCCCTTATATGAGAA	コード	1932	49	51	71
107239	ACTTCCTTGCCCTTATATGA	コード	1935	29	71	72
107240	AGAGTTATCTGTGACTTCAC	コード	2521	40	60	73

【 0 2 2 5 】

10

20

30

ISIS #	配列	標的領域	標的部位	%対照	%阻害	配列ID 番号
107241	GATACTGAGGTCCTCTTCCG	コード	2641	36	64	74
107242	TGAGATCAACAGAGTACAA	コード	3397	44	56	75
107243	CCAGCCTTCCACATAACATA	コード	3417	39	61	76
107244	AGGATAGATTTGATTTGTCT	コード	3447	37	63	77
107245	GTTGATATAACTCCAACTGT	コード	3487	35	65	78
107246	TAATCATCATTTGCTTTTACT	終結	3507	42	58	79
107247	AAGAAGTCCTTAATCATCAT	3'-UTR	3131	65	35	80
107248	CTGAGTCTGTTTTCCTTCT	3'-UTR	3161	34	66	81
107249	CTTGTAACAGTGTCTTTTA	3'-UTR	3198	38	62	82
107250	GAGTAAAGAAGTCCAAACA	3'-UTR	3231	57	43	83
107251	CCTTGCATGAAGACATAATA	3'-UTR	3265	40	60	84
107252	AAGAGTAATCATTTGCTGAGA	3'-UTR	3291	35	65	85
107253	TCTTTGGCTGTATTATTACC	3'-UTR	3331	29	71	86
107254	TGCTTTAGTGTCTCTCTACC	3'-UTR	3372	33	67	87
107255	AAGTCTAAGACTTCTCCAGT	3'-UTR	3461	36	64	88
107256	GAGGCAAGCACATATGGTAA	3'-UTR	3491	45	55	89
107257	TGAAATGAACCTCTGCCAC	3'-UTR	3531	44	56	90
107258	TTAAAGTGATAATGGTCCAC	3'-UTR	3631	39	61	91

10

20

30

【 0 2 2 6 】

ISIS #	配列	標的領域	標的部位	%対照	%阻害	配列ID 番号:
107259	GGAACACAGCCCGTAGGAAA	3'-UTR	3671	37	63	92
107260	TTTGCCAGTTGGCCTATAA	3'-UTR	3731	50	50	93

10

20

30

【0227】

実施例33

インテグリン α 4タンパク質発現に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの効果につ
いての用量反応曲線

A375細胞は、BTX Electro Cell Manipulator 600 (Genetronics, San Diego CA) を用い、175ボルト、 $r = 1$ 、 $c = 1000$ 、0.2 ml Opti-MEM、 1×10^6 細胞/ml、2 mm間隔の電極でのエレクトロポレーションにより ISIS 107245、107248、107252、107255および107259で処理された。オリゴヌクレオチド濃度は1、3、10および30 μ Mであった。オリゴヌクレオチド処理24時間後に細胞を採取し、前記の実施例のようにフローサイトメトリーのために2 μ g/ml CD49d-FITCで染色した。結果は表25に示されている。

40

【0228】

表25

ヒトインテグリン α 4を標的とする追加のアンチセンスオリゴヌクレオチドの用量反応

【0229】

【表 2 5】

ISIS #	オリゴ 濃度(nM)	%対照	%阻害	配列ID番号:
27104	1	86.2	13.8	46
	10	63.2	36.8	
	30	35.3	64.7	
107245	1	27.1	72.9	78
	10	64.4	35.6	
	30	30.3	69.7	
107248	1	9.1	90.9	81
	10	23.2	76.8	
	30	52.1	47.9	
107252	1	17.4	82.6	85
	10	7.9	92.1	
	30	2.9	97.1	
107255	1	50.6	49.4	88
	10	22.9	77.1	
	30	19.4	80.6	
107259	1	17.7	82.3	92
	10	42.9	57.1	
	30	19.4	80.6	

10

20

【0 2 3 0】

ISIS 107248はA375メラノーマ細胞中でのインテグリン α 4発現を阻害する能力について ISIS 27104と直接的に比較された。結果は表26に示されている。オリゴヌクレオチドは前の実施例のように細胞内へエレクトロポレーションされた。

【0 2 3 1】

表 2 6

ISIS 27104および ISIS 107248の比較

30

【0 2 3 2】

【表 2 6】

オリゴ 濃度(μ M)	ISIS 27104		ISIS 107248	
	%対照	%阻害	%対照	%阻害
1	86.2	13.8	52.1	47.9
3	63.2	36.8	17.4	82.6
10	35.3	64.7	7.9	92.1
30	27.1	72.9	2.9	97.1

40

【0 2 3 3】

実施例 34

Jurkat T細胞におけるインテグリン α 4タンパク質発現のアンチセンス阻害

ISIS 107248は1、3、10、20および30 μ Mの用量で、前記の実施例に従って、Jurkat Tリンパ球細胞でのインテグリン α 4発現を阻害する能力について試験された。インテグリン α 4タンパク質発現は、オリゴヌクレオチド処理24時間後に、3-30 μ Mのオリゴヌクレオチド用量で約65-72%減少していた。処理48時間後、インテグリン α 4タンパク質発現は3 μ Mのオリゴヌクレオチド濃度で60%、10、20および30 μ Mの濃度で90%減少していた。

【0 2 3 4】

実施例 35

50

Jurkat T細胞におけるインテグリン α 4 RNA発現のアンチセンス阻害

インテグリン α 4 mRNAレベルの定量はABI PRISMTM 7700 Sequence Detection System (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) を製造者の使用説明書に従って使用するリアルタイム定量的PCRにより実施された。これは、リアルタイムでポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 生成物のハイスループット定量を可能にする、閉鎖チューブ性で、ゲルに基づかない、蛍光検出システムである。PCR完了後に増幅生成物が定量される標準PCRとは対照的に、リアルタイム定量PCRの生成物はそれらが蓄積されるにしたがって定量される。このことはPCR反応中に、フォワードおよびリバースPCRプライマー間を特異的にアニールし、二つの蛍光色素を含有するオリゴヌクレオチドプローブを含ませることにより達成される。レポーター色素 (例えば、JOEまたはFAM、Operon Technologies Inc., Alameda, CAまたはPE-Applied Biosystems, Foster City, CAから入手できる) はプローブの5'末端に結合され、およびクエンチャー色素 (例えば、TAMRA、Operon Technologies Inc., Alameda, CAまたはPE-Applied Biosystems, Foster City, CAから入手できる) はプローブの3'末端に結合される。プローブおよび色素が無傷である場合、レポーター色素放射を3'-クエンチャー色素が近接することにより停止する。増幅の間、標的配列へのプローブのアニールリングは、Taqポリメラーゼの5'-エキソヌクレアーゼ活性により切断できる基質を作り出す。PCR増幅サイクルの伸張期の間、Taqポリメラーゼによるプローブの切断は、プローブの残りの部分 (それ故にクエンチャー部分から) からレポーター色素を放出させ、配列特異的蛍光シグナルが発生される。各々のサイクルについて、追加のレポーター色素分子がそれらのそれぞれのプローブから切断され、ABI PRISMTM 7700 Sequence Detection System内に組み込まれているレーザー光学系により蛍光強度が一定の間隔でモニターされる。各々のアッセイにおいて、非処理対照試料からのmRNAの連続希釈を含む一連の平行反応から、試験試料のアンチセンスオリゴヌクレオチド処理後のパーセント阻害を定量するために使用される標準曲線が作製される。

【0235】

PCR試薬はPE-Applied Biosystems, Foster City, CAから得られた。RT-PCR反応は20 μ LのPCRカクテル (1 $\times$ TAQMANTM 緩衝液A、5.5 mM MgCl₂、各々300 μ MのdATP、dCTPおよびdGTP、600 μ MのdUTP、各々400 nMのフォワード・プライマーおよびリバース・プライマー (または、G3PDHの場合100 nM)、100 nMプローブ、20単位のRNAse阻害剤、1.25単位のAMPLITAQ GOLDTM、および12.5単位MuLV逆転写酵素) を、RNEasyTM キット (Qiagen, Valencia CA) を使用して精製された5 μ L (100 ng) の総mRNA溶液に加えることにより実施された。RT反応は48 $^{\circ}$ Cで30分間のインキュベーションにより実行された。AMPLITAQ GOLDTM を活性化するための95 $^{\circ}$ Cで10分間のインキュベーションに続いて、40サイクルの2工程PCRプロトコルが実行された: 95 $^{\circ}$ Cで15秒 (変性)、続いて60 $^{\circ}$ Cで1.5分 (アニールリング/伸張)。インテグリン α 4プローブおよびプライマーは、公開された配列情報 (GenBank寄託番号L12002、本明細書ではSEQ ID NO: 1として援用される) を使用し、ヒトインテグリン α 4配列にハイブリダイズするように設計された。

【0236】

インテグリン α 4に対して、PCRプライマーは:

フォワード・プライマー: GACACGCTGCGCCTCAT (SEQ ID NO: 94、Genbank寄託番号L12002の319-335位でハイブリダイズ) 40

リバース・プライマー: ATTCAACACTAAGCGGCCACTG (SEQ ID NO: 95、Genbank寄託番号L12002の391-412位でハイブリダイズ) であり、PCRプローブは:

FAM-CCAACCGTCGCATCCCGTGCAA-TAMRA

(プローブはSEQ ID NO: 96; Genbank寄託番号L12002の361-382位でハイブリダイズ) であり、ここでFAM (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) は蛍光性レポーター色素であり、TAMRA (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) はクエンチャー色素である。

【0237】

GAPDHに対して、PCRプライマーは:

50

フォワード・プライマー : GAAGGTGAAGGTCGGAGTC (SEQ ID NO: 97)

リバース・プライマー : GAAGATGGTGATGGGATTTC (SEQ ID NO: 98) であり、およびPCRプローブは : 5' JOE-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC-TAMRA 3' (プローブはSEQ ID NO: 99である) であり、ここで、JOE (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) は蛍光性レポーター色素であり、TAMRA (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) はクエンチャー色素である。

【0238】

エレクトロポレーションにより ISIS 107248 (0.3、1、3、10および30 μ M のオリゴヌクレオチド濃度) で A375メラノーマ細胞を処理して24時間後、RNeasyTM キット (Qiagen, Valencia CA) を使用して総RNAを単離し、RT-PCRが実施された。インテグリン α 4 mRNAレベルは、0.3、1、3、10および30 μ M のオリゴヌクレオチド用量の場合、各々対照と比較して約23%、38%、70%、80%および85%減少していた。

10

【0239】

実施例36

細胞接着に対するインテグリン α 4のアンチセンス阻害効果

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) (Clonetics, San Diego CA) を EGM-UV培地 (Clonetics) で培養し、TNF- α で20時間処理してVCAM発現を誘導した。A375メラノーマ細胞は前記のように ISIS 107248でエレクトロポレーションを行った。内皮細胞に対する特異的マーカーであるPECAMに対する抗体を使用し、フローサイトメトリーを使用して、HUVECへのA375メラノーマ細胞の接着阻害を定量した。対照 (TNF処理、オリゴヌクレオチドなし) と比較し、ISIS 107248 (10 μ M) はHUVECへのA375メラノーマ細胞接着を約85%阻害した。インテグリン α 4に対する抗体は、接着を約72%阻害した。増加したVLA-4発現 (インテグリン α 4は一つの構成物である) とメラノーマ患者の悪化時間および総生存時間との間に統計的に有意な相関が示されているので、メラノーマ細胞は臨床的に適切なモデルである。Schadendorf et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 1995, 87, 366-371。

20

【0240】

類似の接着アッセイがメラノーマ細胞の代わりにJurkat T細胞を使用して、再び、HUVECへの接着を検出して実施された。Jurkat細胞はより小さく、より簡素であるので、それらは前方光散乱および側方散乱の相違に基づいたゲート分けによりHUVECから分離できる。5000のHUVECの事例について、接着Jurkat細胞が定量された。1、3、10および30 μ M のオリゴヌクレオチド濃度で (ISIS 107248)、HUVECへのJurkat細胞の接着は各々0、12%、32%および63%であった。インテグリン α 4の抗体は96%阻害を与え、VCAM-1の抗体は67%阻害を与え、ISIS 107248およびVCAM-1抗体の組み合わせは78%阻害を与えた。

30

【配列表】

2006141402000001.app

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	1 0 1
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
	A 6 1 P 35/04	

F ターム(参考)	4B024	AA01	CA04	CA05	CA06	CA11	GA11	GA18	HA14	HA17	
	4C084	AA13	NA14	ZA022	ZA752	ZB082	ZB112	ZB132	ZB152	ZB262	ZC352
	4C086	AA01	AA02	EA16	NA14	ZA75	ZB08	ZB11	ZB13	ZB15	ZB26
			ZC35								