(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第3958362号

(P3958362)

(45)発行日　平成19年8月15日(2007.8.15)　(24)登録日　平成19年5月18日(2007.5.18)

(51)Int.Cl.		F I		
A61K 48/00	(2006.01)	A61K	48/00	
A61K 31/7088	(2006.01)	A61K	31/7088	
A61P 9/00	(2006.01)	A61P	9/00	
A61L 27/00	(2006.01)	A61L	27/00	Q
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA

請求項の数 8　(全 49 頁)

(21)出願番号	特願平8-531889
(86)(22)出願日	平成8年4月19日(1996.4.19)
(65)公表番号	特表平11-503911
(43)公表日	平成11年4月6日(1999.4.6)
(86)国際出願番号	PCT/US1996/005334
(87)国際公開番号	WO1996/032966
(87)国際公開日	平成8年10月24日(1996.10.24)
審査請求日	平成15年3月31日(2003.3.31)
(31)優先権主張番号	08/424,991
(32)優先日	平成7年4月19日(1995.4.19)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者
トーマス　ジェファーソン　ユニバーシティ
アメリカ合衆国，ペンシルバニア　１９１０７，フィラデルフィア，ロカスト　ストリート　１０２０
(74)代理人
弁理士　石田　敬
(74)代理人
弁理士　吉田　維夫
(74)代理人
弁理士　戸田　利雄
(74)代理人
弁理士　西山　雅也

最終頁に続く

(54)【発明の名称】動静脈及び静脈の移殖治療：方法及び組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

c-myc又はc-mybポリヌクレオチドに特異的なオリゴヌクレオチドを含む、脈管移植物の治療用医薬組成物。

【請求項２】

前記オリゴヌクレオチドが、c-myc mRNA又はc-myb mRNAに相補性である、請求項１に記載の医薬組成物。

【請求項３】

前記オリゴヌクレオチドが、前記c-myc mRNA又は前記c-myb mRNAの翻訳開始領域中の部位にハイブリダイズする、請求項２に記載の医薬組成物。

【請求項４】

前記オリゴヌクレオチドが、前記翻訳開始コドンの上流に２５個の連続ヌクレオチド、及び前記翻訳開始コドンの下流に２５個の連続ヌクレオチドを含む、c-myc mRNA又はc-myb mRNAのセグメント中の部位にハイブリダイズする、請求項２に記載の医薬組成物。

【請求項５】

前記オリゴヌクレオチドが、前記翻訳開始コドンにハイブリダイズする、請求項４に記載の医薬組成物。

【請求項６】

前記ヌクレオチドが、配列番号１、配列番号６又は配列番号７のヌクレオチド配列を有する、請求項２に記載の医薬組成物。

【請求項７】
前記脈管移植物が、血液透析アクセス部位を提供する、請求項１～６のいずれか１項に記載の医薬組成物。
【請求項８】
単離された脈管移植物、及び前記脈管移植物の少なくとも１の層内に位置するオリゴヌクレオチドを含む組成物であって、前記オリゴヌクレオチドが、c-myc又はc-mybポリヌクレオチドに特異的である、前記組成物。
【発明の詳細な説明】
発明の分野
本発明は、広くは、オリゴヌクレオチド及び治療剤としてのそれらの使用に関し、更に詳しくは、特に繊維芽細胞及び平滑筋細胞からの細胞外マトリックス蛋白質の合成を阻害するためのオリゴヌクレオチドアンチセンス及び抗遺伝子化合物の使用に関する。
序　文
動静脈シャント及びフィステルは、血液透析患者のための循環系に血液透析アクセス部位を供する。不運なことに、動静脈シャント及びフィステルは長期にわたって失敗しており、300,000超の世界中の血液透析患者について深刻な医学的合併症を形成し得る（Newman, G. E., in Vascular Disease：Surgical and Interventional Therapy, E. Strandness, Ed.（1994））。研究によれば、動静脈シャント及びフィステルの12～45％は初年度に失敗する（本明細書に記載されるNewman, G. E.,（1994））。アクセス部位の失敗についての主な理由は、進行性の静脈狭窄である（Sedbergら、Circulation 80：1726～1736（1989））。血液透析アクセス部位の失敗又は機能不全は、動静脈シャントを置換するために外科的に、又はシャント又はフィステルが存在する静脈を広げるためのカテーテルを通しての介入（例えばバルーン血管形成又はステント）のいずれかでの医学的治療を要求する（本明細書に記載されるNewman, G. E.,（1994））。結果として、動静脈シャント及びフィステル合併症を有する慢性血液透析患者は、彼らのアクセス部位の開存性を維持するために１年当り約30日を病院で過ごす。
これにより、動静脈シャント及びフィステルの形成が便利な血液透析のために必要であるが、血液透析アクセス部位は、血液透析患者の“アキレス腱”として知られている。動静脈シャント及びフィステルは、通常、ブレーシャーチミーノ動静脈フィステル又はポリテトラフルオロエチレン（PTFE, Gor－Tex^{TM}）移植片として作製される。ほとんどの例では、静脈は前腕領域、肩領域又は大腿領域においてPTFE移植片で直接又は間接的のいずれかで静脈に外科的に連結される。
しかし動静脈フィステルは長期にわたって段々と妥協されるに至る動静脈移植片の一例である。治療を必要とする医学的状態を引きおこす他のタイプの移植（即ち静移植片）は、大動脈冠動脈のバイパス移植、頸動脈の移植、腸骨大腿骨の移植及び大腿膝窩の移植を含む。これらの移植において、静脈のセグメントは動脈系にある。全てのタイプの動静脈の移植又は動脈系にある静脈移植に影響を与える主な医学的状態の１つは長期にわたる脈管の内径の減少である。これは通常、（本明細書に移植片の“静脈部分”として言及される）移植片に存在し又はそれらの体の一部を形成する静脈内でおこる。高い動脈圧への静脈の露出が静脈の形態を変化させ、特に移植片の静脈部分の内径が減少することが確信される。移植片は、血栓病及び感染のような他の医学的な疾患もこうむる。
本発明以前には、動静脈及び静脈移植のための治療は、限られた効果のものであり、通常、侵入的な治療を要求した。失敗した血液透析アクセス部位におけるような厚くなった脈管壁のセクションにおける移植片の内径を機械的に増加させることに努力が集中している。他の方法は、単に動静脈シャント置換におけるような失敗した移植部位の外科的修正による。これらのタイプの先行技術治療は、かなりの医師の監督を必要とし、しばしば入院を必要とし、そして特定の血液透析アクセス部位の場合、本明細書に議論されるように最後に適切な血液透析アクセス部位を見つけることができなくなり得る。
動静脈移植及び静脈移植（例えば大動脈冠動脈バイパス）のような失敗した移植における静脈の形態に焦点を当てたいくつかの研究は、これらの疾患の病理機構に情報を与えた。

薄い壁の静脈は、動脈の血流及び圧力への露出に対して早く応答する。その静脈はネオインチマ（neointima）を発達し始める。高い動脈圧及び流れに対する応答は、最後にルーメンを大きくせばめ、静脈の開存性を減少させる。脈管平滑筋細胞は、中膜及びネオインチマで主に見い出される。繊維芽細胞は、外膜及び脈管周囲の組織で見い出される。繊維芽細胞は、静脈の創傷修復の間、脈管周囲組織の肉芽化に寄与する。創傷に応答して、平滑筋細胞と繊維芽細胞との両方は、脈管壁及び脈管周囲組織においてマトリックス蛋白質合成を増加させる。結果として、静脈は、脈壁厚の増加及び脈管周囲組織における瘢痕形成の増加のためせまく堅くなり、それは動静脈フィステル又は静脈移植の場合のような移植の回復不能な失敗を導く。

細胞外マトリックス蛋白質の不適切な合成及び／又はこのような蛋白質の異常型の合成は、多くの遺伝病及びより一般的な後天性疾患、例えば動静脈及び静脈移植開存性の喪失（Sedbergら、Circulation 80：1726～1736（1989））、繊維性皮膚病、肺の繊維症、及び変形性関節症等（例えばWeiss and Jayson, Editors, Collagen in Health and Disease（Churchill Living stone, Edinburgh, 1982）；Gardner, Editor, Pathological Basis ot the Connective Tissue Disease（Lea & Febiger, Philadelphia, 1992）。細胞外マトリックスは主にコラーゲン、プロテオグリカン、エラスチン、及びフィブロネクチンからなる。

これらの状態の多くは、物理的、化学的、及び／又は生物学的傷害に対する極めて複雑な生物応答に関連している。このような応答は、種々の細胞型の増殖及びマイグレーション並びにその応答に寄与し又はそれを変える成長因子の合成を含む。例えば、アテローム性動脈硬化症及び脈管再狭窄のような脈管異常は、局部的な細胞増殖及びマイグレーション、並びにいくつかのクラスの構造蛋白質及び多くの成長因子、例えば血小板由来成長因子（PDGF）、基底繊維芽細胞成長因子、腫瘍壊死因子α、インターロイキン－１、プロスタグランジン、及び種々のプロトオンコジーンの産生に関連する（例えばRoss, Nature, 362：801～809（1993）；及びMorishitaら、Proc. Natl. Acad. Sci., 90：8474～8478（1993））。不運なことに、種々の病気の過程におけるこれらの因子の正確な役割は十分に理解されていない。

細胞外マトリックス蛋白質の不適切な産生に関連する疾患、特に脈管異常の巨大な経済上の影響は、それらの衰弱効果を治療又は改善するための薬剤又は他の治療方法を開発するための強い刺激として役立つ。このクラスの病気、及び病状が内因性遺伝子の見掛けの異常な発現に関連する他のものにおいては、いわゆるアンチセンス化合物の使用が多くの利点を供する（例えばMilliganら、J. Med. Chem., 361：1923～1937（1993）；Uhlmann and Peyman, Chemical Reviews, 90：543～584（1990）；Goodchild, Bioconjugate Chemistry, 1：165～187（1990）；Crooke, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 32：329～376（1992）：Steinら、Science, 261：1004～1012（1993）等）。

アンチセンスの試みの特に注目される利点は、治療標的に結合することができる候補化合物を同定するための１又は複数の最初のスクリーニングステップを行う必要がないことである。遺伝子の異常な発現が薬剤を要求する病気を引きおこすことが知られているなら、候補のアンチセンス薬剤の構造は異常に発現される遺伝子のヌクレオチド配列から自動的に決められる。各々ワトソン・クリック又はHoogsteen結合に基づいてこのような遺伝子又は関連する標的ポリヌクレオチドとの安定な二本鎖又は三本鎖を形成することができるオリゴヌクレオチド又はそのアナログを供することだけが必要とされる。本発明はその作用の特定のメカニズムに限定されないことが認められよう。このような化合物は、これらに限定されないがアプタメリックアフェクト（aptameric affect）のような他のメカニズムによる付加的な非アンチセンス配列特異的アフェクトを有し得る。次に特異的に結合したアンチセンス化合物は、各々の標的を酵素デグラデーションにより感受性を大きくし、翻訳もしくはプロセッシングをブロックし、又はさもなければ標的ポリヌクレオチドの機能をブロックもしくは阻害する。

その発現が病状に関与するコラーゲンのような構造蛋白質の合成に原因となって関連する特定の遺伝子が同定されるなら極めて有利であろう。このような同定は、アンチセンスの

試みによる上述の蛋白質の過剰な合成に関連したいくつかの疾患の治療を直ちに期待させよう。

発明の概要

本発明は、細胞外マトリックス蛋白質、特にコラーゲンの不適切な合成に関連する疾患を治療する方法を提供する。本方法は、核プロトオンコジーンに特異的な１又は複数のアンチセンスオリゴヌクレオチドの有効量を治療の必要な個体に投与するステップを含む。以下により詳細に規定されるように、“核プロトオンコジーンに特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチド”は、（ｉ）核のプロトオンコジーンもしくは細胞循環遺伝子のmRNA転写物の一部分と安定な二本鎖を形成することができ、又は（ii）核プロトオンコジーンもしくは細胞周期遺伝子の一部分と安定な三本鎖を形成することができる配列を有するオリゴヌクレオチドである。好ましくは、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、核プロトオンコジーンのmRNA転写物の部分と安定な二本鎖を形成する。より好ましくは、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドはｃ－myc又はｃ－mybプロトオンコジーンのmRNA転写物に特異的である。最も好ましくは、本発明のオリゴヌクレオチドはｃ－mycプロトオンコジーンのmRNA転写物に特異的である。

好ましくは、ｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチドは、細胞マトリックス蛋白質の不適切な合成がおこる部位に局所的に投与される。

本発明は、ヒトにおいて、生体外又は生体内で核プロトオンコジーンmRNAに相補的なオリゴヌクレオチドに血液透析アクセス部位又は脈管移植片を接触させることにより、血液透析アクセス部位及び脈管移植物の失敗を防ぐための方法を含む。更に、本発明は、血液透析アクセス部位、脈管移植物もしくは切除したヒト適合性静脈から構成される、このような構造の構成物又は組織内に本発明のオリゴヌクレオチドを含む組成物を含む。

本発明は、治療に有効な量のプロトオンコジーンアンチセンスオリゴヌクレオチドを組織に投与することにより、ヒト組織内の瘢痕形成を削減する方法を更に含む。

本発明は、治療に有効な量のプロトオンコジーンアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与することにより、ヒトの組織状結合組織の形成を阻害する方法も含む。

図面の簡単な記載

図１は、動脈化の前及び後の動静脈移植の例、及び移植物の静脈部分の開存性の損失を示す。

図２ａは、ヴァーヘフ（Verhoff）染色で染色した通常のブタ静脈の断面の写真である（倍率×10）。

図２ｂは、ヴァーヘフ染色で染色した動脈化ブタ静脈の断面である（倍率×５）。

図３ａは、シリウス（Sirrius）レッドで染色した通常のブタ静脈の断面の写真である（倍率×５）。

図３ｂは、シリウスレッドで染色した動脈ブタ静脈の断面の写真である（倍率×５）。

図４ａは、α－アクチンのための抗体で染色した通常のブタ静脈の断面の写真である（倍率×10）。

図４ｂは、α－アクチンのための抗体で染色した動脈化ブタ静脈の断面の写真である（倍率×５）。

図４ｃは、デスミンのための抗体で染色した通常のブタ静脈の断面の写真である（倍率×10）。

図５ａは、増殖性細胞核抗原（PCNA）のための抗体で染色した動脈化ブタ静脈の断面の写真である（倍率×25）。

図５ｂは、ヴァーヘフ染色で染色した動脈化ブタ静脈の断面の写真である（倍率×25）。

図５ｃは、シリウスレッドで染色した動脈化ブタ静脈の断面の写真である（倍率×25）。

図６ａは、ヴァーヘフ染色で染色した大動脈冠動脈移植物からのヒト静脈の断面の写真である（倍率×５）。

図６ｂは、シリウスレッドで染色した大動脈冠動脈移植物からのヒト静脈の断面の写真である（倍率×５）。

図６ｃは、α－アクチンのための抗体で染色した大動脈冠動脈移植物からのヒト静脈の断

面の写真である（倍率×５）。
図６ｄは、PCNAに対する抗体で染色した大動脈冠動脈移植物からのヒト静脈の断面の写真である（倍率×50）。
図７ａは、PDG（血小板由来成長因子）で処理し、PCNA（増殖性細胞核抗原）のための抗体で染色し、そしてヘマトキシリン及びエオシンで対比染色したブタ静脈器官培養物の断面の写真である（倍率×50）。
図７ｂは、PCNAのための抗体で染色し、ヘマトキシリン及びエオシン染色で対比染色したPDGF処理なしのブタ静脈器官培養物の断面の写真である（倍率×25）。
図７ｃは、PDGF及びオリゴヌクレオチド（配列番号：１）で処理し、PCNAでの抗体で染色し、ヘマトキシリン及びエオシン染色で対比染色したブタ動脈化静脈の断面の写真である（倍率×50）。
図８ａは、２秒間、フルオレセイン末端標識したオリゴヌクレオチド（配列番号：１）に露出したヒト静脈器官培養物の断面の写真である（倍率×25）。
図８ｂは、30分間、フルオレセイン末端標識したオリゴヌクレオチド（配列番号：１）に露出したヒト静脈器官培養物の断面の写真である（倍率×25）。
図８ｃは、１時間、フルオレセイン末端標識したオリゴヌクレオチド（配列番号：１）と共にインキュベートしたヒト静脈器官培養物の断面の写真である（倍率×25）。
図８ｄは、２時間、フルオレセイン末端標識したオリゴヌクレオチド（配列番号：１）と共にインキュベートしたヒト静脈器官培養物の断面の写真である。
図９ａは、２時間、フルオレセイン末端標識オリゴヌクレオチド（配列番号：１）を脈管周辺に注入したブタ静脈の断面の写真である（倍率×50）。
図９ｂは、30分間、フルオレセイン末端標識したオリゴヌクレオチド（配列番号：１）を経皮的に注入したブタ静脈の断面の写真である（倍率×50）。
図９ｃは、注入後２時間、フルオレセイン及び標識オリゴヌクレオチド（配列番号：１）を経皮的に投与したブタ静脈の断面の写真である。
図10は、創傷後１ヶ月の典型的な対照（即ちセンスオリゴマー注入した）ブタ冠状動脈の断面の写真である。
図11は、典型的なアンチセンス処理したブタ冠状動脈の断面の写真である。
図12は、創傷の範囲の関数として最大ネオインチマル（neointimal）領域を示す。
図13は、融合後ヒト平滑筋細胞におけるプロコラーゲンＩ、プロコラーゲンIII及びフィブロネクチンの細胞外レベルへの、ｃ－myc mRNAの翻訳開始領域を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドの効果を示す。ならし培地中のプロコラーゲンＩ及びプロコラーゲンIIIをウエスタン・ブロットにより決定し、他方フィブロネクチンを免疫沈降により測定した。
図14は、Ｉ型コラーゲンへのｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチドの配列特異的効果を示す。ヒト平滑筋細胞を、センスを含む異なる対照オリゴヌクレオチド（16μＭ）、４bp不適正及びスクランブル配列並びにｃ－myc mRNAの種々の領域を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチド（16μＭ）と共に、24時間、インキュベートした。培地中のＩ型コラーゲンのレベルを、ウエスタン・ブロットを用いて、条件的ペプシン消化の後に測定した。上部パネル・ブロットはコラーゲンα鎖を示す。レーンにオリゴヌクレオチドなし；レーン２：センスオリゴヌクレオチド；レーン３：４bp不適正ODN（“オリゴヌクレオチド”として言及される）；レーン４：スクランブルオリゴヌクレオチド；レーン５：ｃ－myc mRNAの翻訳開始領域（位置559～573，AS１）を標的とするアンチセンス；レーン６：エキソン１（位置400～419，AS２）を標的とするアンチセンス及びレーン７：エキソン３（位置1264～1283，AS３）における翻訳された領域を標的とするアンチセンス。下部パネル：３の別個の実験の比重測定から得られた対照値（オリゴヌクレオチドなし）の変化の割合（％）（平均±SEM）を示すヒストグラム。Mis：４bp不適正オリゴヌクレオチド；Scr：スクランブルオリゴヌクレオチド。
図15は、アンチセンスオリゴヌクレオチド（AS１）によるｃ－myc蛋白質の阻害を示す。融合後平滑筋細胞を、24時間、アンチセンスオリゴヌクレオチドあり又はなしでインキュ

ベートした。ｐ62ｃ－mycを、〔^{35}Ｓ〕メチオニン標識核抽出液の免疫沈降により決定した。それはSDS－ポリアクリルアミドゲルのオートラジオグラムに示す。

図16は、オリゴヌクレオチド後の平滑筋細胞の代謝状態を記載する。細胞を、４時間、オリゴヌクレオチド（16μＭ）あり又はなしでプレインキュベートし、16時間、〔^{35}Ｓ〕メチオニンで標識した。放射能標識蛋白質を、TCA沈降後に測定した。アンチセンスオリゴヌクレオチドは平滑筋細胞の通常の代謝活性を示す蛋白質へのメチオニン組込みに効果を示さなかった。データは、10^5細胞当りのdpm（平均±２の別個の実験のSEM）、Ｓ：センス；MIS：不適正；SCR；スクランブル；AS１：ｃ－myc mRNAの翻訳開始領域を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチド。

図17は、ｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチド（AS１）の除去後のＩ型コラーゲンの回収を示す。平滑筋細胞を24時間、オリゴヌクレオチド（16μＭ）あり又はなしでインキュベートした。３回洗った後、オリゴヌクレオチドを含まない培地を加え、その後、24時間、収集した。Ｉ型コラーゲンを、ペプシン消化の後のウエスタン・ブロットにより決定した。Ｉ型コラーゲンの完全な回収は、ｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチドの除去後に見られた。

図18は、プロα_1（Ｉ）及びプロα_2（Ｉ）mRNAレベルへのｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチドの効果を示す。全RNAを、24時間オリゴヌクレオチド（16μＭ）あり又はなしでインキュベートした平滑筋細胞から単離し、ノーザンブロットにより分析した（10μｇ／レーン）。アンチセンスオリゴヌクレオチド（AS１）は、プロコラーゲンα_1（Ｉ）及びプロコラーゲンα_2（Ｉ）mRNAレベルへの効果を有さなかった。アンチセンス処理後６時間行った実験は同様の結果を生じた。７Ｓ RNAは変化を示さなかった。

図19は、細胞外及び細胞内〔^{14}Ｃ〕プロリン標識タンパク質を示す。ヒト平滑筋細胞を16時間、オリゴヌクレオチドあり又はなしでインキュベートした後、更に４時間、無血清培地中で〔^{14}Ｃ〕プロリンで標識した。〔^{14}Ｃ〕プロリン標識タンパク質を、ポリアクリルアミドSDSゲルで分析した。ｃ－mycアンチセンス処理後の細胞内プロコラーゲンα_1（Ｉ）及びα_2（Ｉ）のレベルの増加により達成されたならし培地中の放射能標識タンパク質の阻害が見られた。

図20は、アンチセンス処理した及び対照のヒト平滑筋細胞中のヒドロキシプロリン成分を示す。

図21は、ヒト皮膚繊維芽細胞における細胞外Ｉ型コラーゲンレベルへのｃ－mycアンチセンス処理の効果を示す。

図22は、ｃ－mycアンチセンス処理した及び対照のヒト皮膚繊維芽細胞に関連する細胞内及び細胞外プロコラーゲンレベルを示す。

図23は、ヒト皮膚繊維芽細胞における細胞内プロコラーゲンの熱安定性を示す。オリゴヌクレオチドあり又はなしで処理した細胞からのペプシン精製したプロコラーゲンを、２分間、示される温度でトリプシン及びキモトリプシンと共にインキュベートし、ポリアクリルアミドSDSゲルで電気泳動した。処理にかかわらず、同様の融点（即ち約41℃）が見られたことは、ｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチド後のプロコラーゲンα鎖の通常の三重らせん構造を示唆する。

図24は、ｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチド処理した及び対照のヒト皮膚繊維芽細胞におけるプロコラーゲンα_1（Ｉ）mRNAレベルを示す。

図25は、オリゴヌクレオチドで処理し、オリゴヌクレオチドなしで新鮮な培地に露出した後、24時間のｃ－mycアンチセンス処理及び対照ヒト皮膚繊維芽細胞におけるＩ型コラーゲンの回収を示す。

図26は、ブタ冠状動脈及び脈管周辺組織の断面図を示す。ｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチド（配列番号：１）の分布を、脈管壁内及び隣接した脈管周辺組織内で評価した（倍率×20）。

図27Ａ－Ｆは、カテーテルを通しての投与後30分における冠状動脈におけるｃ－mycアンチセンス（配列番号：１）ODN分布のパターンを示す。パネルＡ及びＢ：フルオレセイン標識オリゴヌクレオチドの経壁局在化を示す同じセクションの位相差及び蛍光顕微鏡写真

。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、中膜、外膜及び脈管周囲の組織に存在する。パネルＣ及びＤ：内膜下の非経壁ODN分布を示す位相差及び蛍光顕微鏡写真。オリゴヌクレオチドは中膜のみで検出可能である。パネルＥ及びＦ：中壁、非経壁ODNの存在を示す位相差及び蛍光顕微鏡写真（倍率×62.5）。

図28Ａ及びＢは、カテーテルでの投与後３日の動脈壁内のｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチドの持続性を示す。パネルＡ及びＢ：各々同じセクションの位相差及び蛍光顕微鏡写真。

図29は、^{35}Ｓ－標識ホスホロチオエートｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチドの壁内投与後の脈管関連及び脈管周囲放射能を示す棒グラフを示す。類似した全ODN成分は、脈管周囲空間から脈管壁を通行するODNのため、それらの輸送後30分（中抜き棒；ｎ＝６）及び３日（黒ぬり棒；ｎ＝４）で見られた。結果は平均±SEMとして供する。

図30Ａ－Ｄは、ｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチドのカテーテルでの投与後の脈管構造の保存を示す。パネルＡ：蛍光標識オリゴヌクレオチドは注入後30分に冠状動脈壁内で明らかに見える。パネルＢ：隣接セクションは、破裂のない内部弾性膚及び弾性組織の通常の方向の保存を示す（ヴァーヘフ染色）。パネルＣ：ODN保持部位において、細胞質染色の及び核濃縮緩やかな減少が見られた（ヘマトキシリン及びエオシン染色）。パネルＤ：オリゴヌクレオチドの輸送後３日の上述の変化の分析を示す図19に示すセクションに隣接するセクション（ヘマトキシリン及びエオシン染色、倍率×50）。

図31は、試験管内における脈管平滑筋の共焦顕微鏡により評価したフルオレセイン標識ｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチドの細胞内局在化を示す。

図32は、生体内のオリゴヌクレオチドの壁内輸送後30分のフルオレセイン標識ｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチドの細胞内局在化を示す。核局在化が中央の平滑筋細胞で見られる。

図33は、生体内のオリゴヌクレオチドの壁内輸送後30分のフルオレセイン標識ｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチドの細胞内局在化を示す。核局在化が外膜の細胞で見られる。

定　義

本明細書に用いられる“コラーゲン”という用語は、プロコラーゲンから合成された分子のクラスをいう。コラーゲンは、細胞外側のＮ－及びＣ－末端の開裂により、細胞外でプロコラーゲンから合成される。コラーゲンの三重らせん領域に対する抗体は、なおプロコラーゲン中の三重らせん領域を認識し得る。本明細書に用いられる抗体は、コラーゲンＩ及びプロコラーゲンＩに特異的であるが、又はコラーゲンIII及びプロコラーゲンIIIに特異的であるかのいずれかである。コラーゲンは、ペプシン消化によりプロコラーゲンから試験管内で合成することもできる。

本明細書に用いられる“移植物”という用語は、動静脈又は静脈移植物のような脈管移植物をいう。

本明細書に用いられる“ヌクレオシド”という用語は、例えばKornberg及びBaker（DNA Replication, 2nd Ed.（Freeman, San Francisco, 1992））に記載されるような２’－デオキシ及び２’－ヒドロキシ形態を含む天然のヌクレオシドを含む。ヌクレオシドに引用される“アナログ”には、例えばScheit（Nucleotide Analog（John Wiley, New York, 1980））に広く記載される修飾塩基成分及び／又は修飾糖成分を有する合成ヌクレオチドを含む。このようなアナログには、結合特性、例えば二本鎖もしくは三本鎖安定性又は特異性等を増強するようデザインされた合成ヌクレオシドを含む。

本明細書に用いられる“オリゴヌクレオチド”という用語は、ワトソン・クリック型の塩基対又はHoogsteenもしくは逆Hoogsteen型の塩基対等のようなモノマー間相互作用の規則的なパターンにより標的ポリヌクレオチドに特異的に結合することができるデオキシリボヌクレオシド、リボヌクレオシド、そのα－アノマー形態及びポリアミド核酸等を含む天然又は修飾モノマー又は結合の直鎖オリゴマーを含む。通常、モノマーは、数モノマー単位、例えば３～４から数百モノマー単位の範囲の大きさのオリゴヌクレオチドを形成するためにホスホジエステル結合又はアナログにより連結される。オリゴヌクレオチドが“AT

GCCTG”のように文字の配列により表される場合は常に、ヌクレオチドは左から右に５’→３’であり、そして他に示さなければ、“Ａ”はデオキシアデノシンをいい、“Ｃ”はデオキシシチジンをいい、“Ｇ”はデオキシグアノシンをいい、そして“Ｔ”はチミジンをいう。ホスホジエステル結合のアナログには、以下により詳細に記載されるように、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホルアニリデート、ホスホルアミデート、３’→５’ホスホルアミデート等を含む。

二本鎖又は三本鎖形成に引用する“安定性”とはおおよそ、アンチセンスオリゴヌクレオチドがそれが意図する標的配列にいかに親密に結合するかを意味し；更に正確には、それは生理条件下での二本鎖又は三本鎖の自由エネルギーを意味する。例えば以下に記載されるような、標準条件のセット下の融点は、二本鎖及び／又は三本鎖安定性の便利な基準である。好ましくは、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、以下に示される標準条件下で少くとも50℃の融点を有するものが選択され；これにより、生理条件及び好ましい濃度下においては、アンチセンスオリゴヌクレオチド及びその標的が解離する状態にわたって、二本鎖又は三本鎖形成が実質的に好まれる。安定な二本鎖又は三本鎖は、特定の実施形態において、塩基対間及び／又は三本鎖の場合塩基トリプレットの間で不適正なものを含む。これは、対応するブタ配列に対して最後のヌクレオチドに１つの塩基不適正物を有するヒト配列である配列番号：１の場合のような時である。好ましくは、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、その標的ポリヌクレオチドにと完全に適正な二本鎖及び／又は三本鎖を形成する。

生物に関する文脈において本明細書に用いられる“合成”という用語は、生物分子、特に細胞外マトリックス分子及び細胞外マトリックスタンパク質の産生に関連する過程をいう。“合成”という用語は、生物分子を生ずる細胞内及び細胞外の両方の過程、例えばこれらに限定されないが、mRNA転写、mRNA翻訳、翻訳後タンパク質修飾、グリコシル化、ペプチダーゼ開裂、細胞外ペプチダーゼ開裂、細胞内ペプチダーゼ開裂、タンパク質輸送、タンパク質分泌及びタンパク質リン酸化を含む。好ましくは、本発明は、細胞外マトリックス分子のタンパク質翻訳、翻訳後タンパク質プロセッシング、タンパク質分泌又は細胞内ペプチダーゼ開裂を阻害する。

発明の詳細な記載

本発明は、細胞外マトリックスタンパク質、特にコラーゲン、更に好ましくはＩ型及びIII型コラーゲンの組織における不適切な合成を阻害するための特定のアンチセンス化合物の使用に関する。細胞外マトリックスタンパク質の不適切及び／又は過剰な合成は、例えば望まれない繊維状結合組織の形成を示す医学的状態を引きおこし得る。このような医学的状態には、ヒト患者に一般に見られる硬化性障害、脈管再狭窄、アテローム硬化症、アテローム発生、ケロイド病、肝硬変、関節のリウマチ疾患、動静脈及び静脈移植物開存性の喪失、術後の瘢痕形成及び再形成手術等を含む。組織型の範囲は、例えばケロイド症又は外傷後もしくは術後の瘢痕形成における脈管の平滑筋細胞、内皮細胞、皮膚及び器官繊維芽細胞、並びに滑膜細胞及び他の関節構成物を含む上述の不適切な合成の部位であり得る。本発明の一実施形態は、特に動静脈及び静脈移植物の開存性の失敗又は喪失を防ぐのに役立つ。本発明の他の実施形態は、典型的にはヒト患者の血管形成術後の再狭窄、急性脈管傷害の治療に特に役立つ。再狭窄は、脈管インチマ（intima）への平滑筋細胞マイグレーション、増殖、及び細胞外マトリックス構成物の合成に関連する（例えばHolmesら、Chapter 12 in Vlietstraら、Editors, PTCA（Davis Company, Philadelphia, 1987）。治療に有効な量のアンチセンス化合物を標的ポリヌクレオチドを有する組織に投与することにより、不適切な（即ち過剰な）細胞外タンパク質の合成が阻害される。標的ポリヌクレオチドは一本鎖又は二本鎖DNA又はRNAであり得る；しかしながら一本鎖DNA又はRNA標的が好ましい。本発明の核オンコジーンのゲノムヌクレオチド配列及びmRNA転写物は当該技術で周知であり、ｃ－myc, ｃ－myb, ｃ－fos, Ｎ－myc, Ｌ－myc, ｐ53, ｃ－rel, ｃ－ski, ｃ－ets－１、及びｃ－ets－２等を含む（例えばGlover, editor, Oncogenes（IRL Rress, Oxford, 1989））。更に詳しくは、ｃ－myc及びｃ－myb配列は次の参照文献に記

載される：ｃ－mycプロトオンコジーン配列は、Marcuら（Ann. Rev. Biochem., 61：809～860（1992））；Wattら（Nature, 303：725～728（1983）；Batteyら（Cell, 34：779～787（1983））；及びEpsteinら（NTIS publication PB93-100576）に記載され；ｃ－mybプロトオンコジーンは、Gewirtzら（米国特許5,098,890）及びMayelloら（Proc. Natl. Acad. Sci. 79：9636～9640（1986））に記載される。更に、増殖中の細胞核抗原、サイクリン（D_1及びB_1）、cdc２キナーゼ、cdkキナーゼ及びE2Fが標的とされ得る（本明細書に“細胞周期遺伝子”として呼ばれる）。好ましくは、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドにより標的とされる核プロトオンコジーンはｃ－myc及び／又はｃ－mybである。

本発明のｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチドが方向づけられる標的にはプロトオンコジーンの対立遺伝子形態を含むことが理解される。標的ポリヌクレオチドの配列の知識を供するアンチセンスオリゴヌクレオチドについて特定の配列を選択するための文献において実質的な案内がある（例えばUlmannら（上述）；Crooke（上述）；並びにZamecnik及びStephenson（Proc. Natl. Acad. Sci., 75：280～284（1974））。好ましくは、ｃ－mycアンチセンス化合物は、Ｇ－Ｃ含有量が少くとも60%であるよう選択される。好ましくは、オリゴヌクレオチドの配列は、配列番号：１，５～７、又は８～11の12～15の隣接する塩基から選択される。好ましくは、mRNA標的は、５’キャップ部位、tRNAプライマー結合部位、開始コドン部位、mRNAドナースプライス部位、及びmRNAアクセプタースプライス部位等を含む（例えばGoodchildら、米国特許4,806,463号）。

第２エキソン内のヒトｃ－mycのATG開始部位を標的とするようアンチセンスオリゴヌクレオチドを選択する場合、連続配列のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、長さ12，13，14，15，16，17，18，19，20，21，22，23，24，25，26，27，28，29，30，31，32，33，34、又は35塩基対のオリゴヌクレオチドを用いて投与され得、ATG部位の両側の25塩基領域から選択され得る（Gazinら、E. M. B. O. Journal ３：２：383～387（1984）からのヒト配列、その配列は引用により本明細書に組み込まれる）：

5’ cccgc tccagcagcc tcccgcgacg ATG cccctcaacg ttagcttcac caaca 3’

好ましくはアンチセンスオリゴヌクレオチドはATG部位を含むであろう。配列番号：６及び７の両側の25塩基も、本節に議論される大きさのオリゴヌクレオチドを選択するのに用いることができる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ワトソン・クリック型の塩基対、フーグスティーン又は逆フーグスティーン型の塩基対等のようなモノマー－ヌクレオシド間相互作用の規則的なパターンにより、標的ポリヌクレオチドに特異的に結合することができるいずれかのポリマー化合物を含む。本発明のアンチセンス化合物は、特異性、ヌクレアーゼ耐性、輸送、効能に関連した他の特性、例えばコレステロール成分、二本鎖インターカレーター、例えばアクリジン、ポリ－Ｌ－リシン、ホスホロチオエートのような１又は複数のヌクレアーゼ耐性結合基との“エンドキャッピング”を増強するために、ポリマーの塩基の繰り返し単位の一部として又はそれと別個の不完全（pendent）基又は成分も含み得る。本発明に役立つ特定の代表的オリゴヌクレオチドの配列を本明細書に含まれる配列表に示す。

本発明のアンチセンス化合物は、アルカリ土類のものを含むその医薬として許容される塩、例えばナトリウム又はマグネシウム、アンモニウム又はNX_4^+（式中、ＸはC_1～C_4アルキルである）を含む。他の医薬として許容される塩は、有機カルボン酸、例えば酢酸、乳酸：酒石酸、リンゴ酸、イセチオン酸、ラクトビオン酸、及びコハク酸；有機スルホン酸、例えばメタンスルホン酸、エタンスルホン酸、及びベンゼンスルホン酸；並びに無機酸例えば塩酸、硫酸、リン酸及びスルファミン酸を含む。水酸基を有する化合物の医薬として許容される塩は、Na^+又はNH_4^+等のような適切な陽イオンと組み合わせた上述の化合物の陰イオンを含む。

好ましくは、ヌクレアーゼ耐性ヌクレオシド間結合を供することにより、本発明のアンチセンス化合物にヌクレアーゼ耐性が供される。多くのこのような結合は当該技術で周知で

ある。例えばホスホロチオエート：Zon及びGeiser（Anti-Cancer Drug Design，６：539～568（1991））；Stecら（米国特許5,151,510）；Hirschbein（米国特許5,166,387）；Bergot（米国特許5,183,885）；ホスホロジチオエート：Marshallら（Science，259：1564～1570（1993））；Caurathers及びNielsen（国際出願PCT/US89/02293；ホスホルアミデート、例えば－OP（＝O）（NR^1IR^2）－O－C　R^1及びR^2が水素又はC_1～C_3アルキルである）：Jagerら（Biochemistry，27：7237～7246（1988））；Froehlerら（国際出願PCT/US90/03138；３’→５’ホスホルアミデート（GryaznovらPCT/US95/03585のPCT出願に記載、化合物及び方法は引用により本明細書に組み込まれる）；ペプチド核酸：Nielsenら（Anti-cancer Drug Design，８：53～63（1993））、国際出願PCT/EP92/01220；メチルホスホネート：Millerら（米国特許4,507,433）、Ts'oら（米国特許4,469,863）、Millerら、米国特許4,757,055；並びに種々の型のＰ－キラル結合、特にホスホロチオエート、Stecら、欧州特許出願92301950.9及びLesnikowski（Bioorganic Chemistry，21：127～155（1993））。更なるヌクレアーゼ結合は、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホラニリデート、アルキルホスホトリエステル、例えばメチル－及びエチルホスホトリエステル、カルボネート、例えばカルボキシメチルエステル、カルバメート、モルホリノカルボメート、３’－チオホルマセタール、シリン、例えばジアルキル（C_1～C_6）－又はジフェニルシリル、及びスルファメートエステル等を含む。これらをオリゴヌクレオチドに導入するための結合及び方法は多くの参照文献に記載される。例えば一般的には、Peyman及びUlmann（上述）；Milliganら（上述）；Matteucciら（国際出願PCT/US91/06855）に報告される。好ましくは、ホスホジエステル結合のリンアナログ、例えばホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホルアミデート、又はメチルホスホネートが本発明の化合物に用いられる。更に好ましくは、ホスホロチオエートはヌクレアーゼ耐性結合として用いられる。好ましい結合基に加えて、本発明の化合物は、更なる修飾、例えばホウ素化塩基（Spielvogelら、5,130,302；コレステロール成分（Sheaら、Nucleic Acids Research，18：3777～3783（1990）又はLetsingerら、Proc. Natl. Acad. Sci.，86：6553～6556（1989）；ピリミジンの５－プロペニル修飾（Froehlerら、Tetrohedron Lett.，33：5307～5310（1992）等を含み得る。

好ましくは、本発明のアンチセンス化合物は、市販の自動DNA合成機、例えばApplied Biosystems（Foster City，CA）モデル380Ｂ，392又は394 DNA／RNAシンセサイザーで慣用的手段により合成される。好ましくは、例えば次の文献：Beaucage及びIyer（Tetrahedron，48：2223～2311（1992））；Molkoら（米国特許4,980,460）；Kosterら（米国特許4,725,677）；Carutherら、（米国特許4,415,732；4,458,066；及び4,973,679）等に開示されるようにホウホルアミジト化学が用いられる。

三本鎖形成が要求される実施形態において、標的配列の選択には制限がある。一般に、このフーグスティーン型の結合による第三の鎖の会合は、二本鎖標的におけるホモピリミジン－ホモプリントラックに沿って最も安定である。通常、塩基トリプレットはＴ－A^*Ｔ又はＣ－G^*Ｃモチーフを形成する（ここで“－”はワトソンクリック対を示し、“*”はフーグスティーン型の結合を示す）。しかしながら、他のモチーフも可能である。例えばフーグスティーン塩基対は、鎖の条件及び組成により、第３の鎖（フーグスティーン鎖）と該第３の鎖が結合する二本鎖のプリンの豊富な鎖との間の平行及び逆平行方向を許容する。特定の実施形態に要求される三本鎖安定性を最大にし又は制御するために、適切な方向、条件、ヌクレオシド型（例えばリボース又はデオキシリボースヌクレオシドのいずれが用いられるか）、塩基修飾（例えばメチル化シトシン、等）を選択することについて文献に更なる案内がある。例えば、Robertsら（Proc. Natl. Acad. Sci.，88：9397～9401（1991））；Robertsら（Science，258：1463～1466（1992））；Distefanoら（Proc. Natl. Acad. Sci.，90：1179～1183（1993））；Mergnyら（Biochemistry，30：9791～9798（1991））；Chengら（I. Am. Chem. Soc.，114：4465～4474（1992））；Beal及びDervan（Nucleic Acids Research，20：2773～2776（1992））；Beal及びDervan（I. Am. Chem. Soc.，114：4976～4982（1992））；Giovannangeliら（Proc. Natl. Acad. Sci.，89：8631～8635（1992））；Moser及びDervan（Science，238：645～650（1987））；MsShan

ら（J. Biol. Chem., 267：5712～5721（1992））；Yoonら（Proc. Natl. Acad. Sci., 89：3840～3844（1992））；Blumeら（Nucleic Acids Research, 20：1777～1784（1992）等。

オリゴヌクレオチド成分の長さは、特異的結合が多くの参照文献、例えばRosenbergら（国際出願PCT/US92/05305）又はSzostakら（Meth. Enzymol. 65：419～429（1979））に説明されるように、要求される標的ポリヌクレオチドでのみおこり、他の偶然の部位ではおこらないであろうことを確実にするのに十分に大きい。その長さの上部の範囲は、約30～40ヌクレオチド長を超えるオリゴマーを合成及び精製する不便さ及び高価さ、短いオリゴヌクレオチドより不適正についてのより長いオリゴヌクレオチドのより大きな許容性、結合又は特異性を増強するための修飾が存在するか否か、二本鎖又は三本鎖結合が要求されるか否か等を含むいくつかの因子により決定される。通常、本発明のアンチセンス化合物は、約12～60ヌクレオチドの範囲の長さを有する。更に好ましくは、本発明のアンチセンス化合物は、約15～40ヌクレオチドの範囲の長さを有し；最も好ましくは約18～30ヌクレオチドの範囲の長さを有する。

好ましくは、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドの熱安定性は、融解又は鎖の解離曲線により決定される。50％の鎖の解離の温度を安定性の便利な示標を供する融点T_mとした。T_m測定は、典型的には、約1.0～2.0μMの間のアンチセンスオリゴヌクレオチド濃度で中性pHで塩類溶液中で行われる。典型的な条件は次の通りである：10mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）又は10mM Tris－HCl緩衝液（pH7.0）中150mM NaCl及び10mM $MgCl_2$の条件。融解曲線についてのデータは、アンチセンスオリゴヌクレオチド／標的ポリヌクレオチド複合体のサンプルを、室温から約85～90℃に加熱することにより蓄えられる。サンプルの温度の増加に伴って、例えばCary（Australia）モデル１Ｅ又はHewlett－Packard（Palo Alto, CA）モデルHP8459UV／VIS分光光度計及びモデルHP89100A温度コントローラー、又は同様の装置を用いて、１℃間隔で260nm光の吸光度をモニターする。この技術は、異なる長さ及び組成のアンチセンスオリゴヌクレオチドの結合長を測定及び比較するための便利な手段を供する。

本発明の他の態様は、医薬として許容される賦形剤及び必要な患者に投与した時に細胞外マトリックスタンパク質の合成を阻害するのに十分な量存在する核プロトオンコジーンに特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む細胞外マトリックスタンパク質の合成を阻害するのに役立つ医薬組成物である。これにより、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、上述の組成物の１又は複数の構成物として用いられる。本発明の医薬組成物の構成物は、治療されるべき病気又は状態の性質、病気の障害の位置、薬剤送出の態様及び／又は考えられる投与により、その後者は、標的障害又は器官へのカテーテルによる生体内投与、局所的適用、鼻内投与、移植又は経皮的持続性放出システムによる投与等による生体内投与を含み得る。

本発明の医薬組成物は、薬剤濃度の制御、溶解度の制御、化学的安定性、粘度の制御、吸収の増強、pHの制御等を含む種々の機能を供する種々の構成物を含み得る医薬担体を含む。例えば、水溶性製剤において、医薬組成物は好ましくは、リン酸緩衝液のような緩衝液、又は他の有機酸塩を、好ましくは約７～８の間のpHで含む。少ししか溶けないアンチセンス化合物を含む製剤のために、例えば溶解度を増加させるために0.04～0.05％（ｗ／ｖ）の量でTween 80のような非イオン性界面活性剤を用いることにより、マイクロエマルションを用いることができる。他の構成物は、酸化防止剤、例えばアスコルビン酸、親水性ポリマー、例えばモノサッカリド、ジサッカリド、及び化の炭水化物、例えばセルロース又はその誘導体、デキストリン、キレート化剤、例えばEDTA、及び医薬の科学、例えばRemington's Pharmaceutical Science、最新版（Mack Publishing Company, Easton, PA）で公知である同様の構成物を含み得る。

本発明の医薬組成物と共に用いるのに適した時効性システムは、ポリラクチド、Ｌ－グルタミン酸及びγ－エチル－Ｌ－グルタメートのコポリマー、ポリ（２－ヒドロキシエチルメタクリレート）及び同様の材料を含むフィルム又はマイクロカプセル等の形態における半透過性ポリマーマトリックスを含む（例えばRosenbergら、国際出願PCT/US92/05305）

。時効性システムは、例えばLiposome Technology, Vol. II, Incorporation of Drugs, Proteins and Genetrc Material（CRC Press）に記載されるようなリポソームに捕えられたアンチセンス化合物も含む。
特定の適用のためのｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチドの有効量は、アンチセンスオリゴヌクレオチドの化学的性質、治療されるべき病気及び投与の方法等を含むいくつかの因子による。好ましくは、有効量は、標的ポリヌクレオチドに約１～100μＭの間のｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチドの濃度を供するであろう；更に好ましくは、有効量は、標的ポリヌクレオチドに約１～10μＭの間のアンチセンスオリゴヌクレオチドの濃度を供するだろう。
再狭窄のような脈管病のために、核プロトオンコジーンに特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチドは、好ましくはカテーテルにより傷ついた動脈に局所的に投与される。好ましくは、再狭窄障害に送り出されるアンチセンスオリゴヌクレオチドはｃ－myc及び／又はｃ－mybに特異的であり；更に好ましくは、ｃ－myc及びｃ－mybの両方に特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチドの組み合わせが、再狭窄に関連した細胞外マトリックスタンパク質合成を減少させるのに用いられる。典型的には、再狭窄は、動脈壁への局所的破壊又は障害を引きおこす皮下の管腔を通した冠状脈脈管形成（PTCA）のような手順の後におこる。このような傷害に応じて、閉塞障害は、次の現象：傷害部位における動脈の炎症、血栓症、マイグレーション及び増殖による平滑筋の蓄積、並びに細胞外マトリックスの平滑筋細胞及び繊維芽細胞合成から生ずる。
脈管移植物疾患のために、オリゴヌクレオチドは、好ましくは移植の失敗を防止するために移植物周囲の結合組織に送り出される。一般に、移植の失敗は、開存性の喪失が50％又はそれ以上の場合におこる。本明細書の技術により記載されるようなオリゴヌクレオチド送出が、これらに限定されないが（PTFE（Gortey又はImpra）、ポリ－（エーテル－ウレタン）、ダクロン、ヒト臍帯、遺伝子操作された静脈及び免疫抑制ウシ又はブタ脈管を含む）プロテアーゼフィステル、動静脈シャント、（橈骨動脈－橈側皮静脈しBrescia－Cimmo）、尺骨又は橈骨動脈－尺側皮静脈、上腕動脈－橈側皮又は尺側皮静脈及び大腿動脈－伏在移植物を含む）天然静脈フィステルのような動静脈移植、並びにこれらに限定されないが、免疫抑制伏在静脈同種移植片、免疫抑制臍静脈同種移植片、遺伝子操作された静脈、免疫抑制異種移植片、及び静脈の自己移植片並びにヒトに適合可能な他のいずれかの静脈、即ちヒト組織に移植することができる移植組織及び材料を用いる静脈移植のような静脈移植を目的とすることができる。
脈管移植の失敗、特に動静脈移植の失敗を防ぐためのオリゴヌクレオチドの脈管周囲投与のために、本発明のオリゴヌクレオチドは意図した適用の部位周辺の脈管周囲組織に一般に注入される。例としては動静脈移植開存性の激しく迅速な喪失の知られている歴史を有する患者におけるようなオリゴヌクレオチドの連続的注入があり、他のタイプの送出システム、例えば皮下注入ポンプ、移植片上に型とられ、好ましくは、オリゴヌクレオチドタンパク質の１：10～１：100の比のヒト血清アルブミンと混合されたゲル及び生分解性マトリックス、（プルロニック、Hydron又はエチレンビニル酢酸ゲルのような）ゲル、（Edelmanら、Circulation Research 76：176～182（1995）及びEdelmanら、Proc. Natl. Acad. Sci. 87：3773～3777（1990）（その方法は引用により本明細書に組み込まれる）に記載されるような）ゲル、（Broviacカテーテル又はPolettiら、J. Neurosurg. 50：581～584（その方法は引用により組み込まれる）に記載されるような完全に留置のカテーテルのような）留置カテーテルシステム、浸透性PTFEチュービング、他の浸透性生物適合性材料又は他の薬剤送出組成物並びに本明細書に記載されるシステムを用いることができる。オリゴヌクレオチドの投与の持続性を伸ばすために、リザーバーが部位すぐ近くオリゴヌクレオチドを放出するよう作られ得ることが認められよう。リザーバーは、手術中又は手術後ばかりでなく創傷が閉じる前にも脈管周囲組織にオリゴヌクレオチドを注入することにより、又は例えば動静脈フィステルの場合動静脈移植物を触診した後経皮注入することにより、又は当該技術で周知である方法、例えばソノグラムで注入を誘導することにより作られる。注入は、例えば血液透析部位において更なる治療をくり返すことができる。脈管

周囲組織は比較的ゆっくりとした拡散速度を有するオリゴヌクレオチドの貯蔵所又はリザーバーとして作用することができるので、脈管から外膜を除去することは必要でないし要求もされない。リザーバー中のオリゴヌクレオチドは管腔内カテーテルにより投与した場合より循環系によりゆっくりと運ばれる。皮下又は脈管周囲投与のために、投与量は単位投与当り脈管当り0.1mg～100mg、好ましくは0.25mg～50mg、更に好ましくは0.5mg～10mgの範囲である。

移植物の失敗を防ぐためのオリゴヌクレオチドの脈管周囲組織投与に加えて、内皮層、中膜及び外膜のような他の解剖学的構造を、特にオリゴヌクレオチドが脈管のルーメンから適用されない場合にリザーバーとして用いることができる。脈管周囲組織を含むこのような天然のリザーバー部位は、外傷にかかわらず、中膜又は弾性層が完全であり切り裂かれていない場合、特に動静脈移植、更には動静脈シャントを処理するために役立つ。動静脈移植物の静脈部分、更には動静脈フィステル又はシャントの静脈部分近くの部位を用いることが特に有利である。動静脈フィステルの静脈部分は図１に矢印で例示されるように、フィステルの静脈部分を形成する。天然でないリザーバーも、その例が本明細書で議論される図１のグレー領域に示されるように、オリゴヌクレオチドを失敗した移植片に供することができる。天然でないリザーバーが用いられる場合、それらは生分解性又は補充可能のいずれかであることが好ましい。補充可能なリザーバーは、好ましくは２つのタイプのもの、即ち１）動静脈移植片の静脈部分の上流に固定され、動静脈移植物を形成するのに用いられるPTFEチュービング又は他の生物適合性材料内又はそれに沿った補充リザーバー及び２）好ましくは動静脈移植物の静脈部分の５cm、更に好ましくは２cm内に動静脈移植物周囲の脈管周囲組織に固定され、皮下注入により針で補充できるリザーバーである。このような非天然の脈管周囲リザーバーは、動静脈移植物を構成するために手術中に移植され得る。補充可能な脈管周囲リザーバーは、胸のインプラントに用いられる材料から作られ得、脈管周囲組織内へのオリゴヌクレオチドの拡散を許容する半透膜と組み合わせて好ましくは用いられる。

特にバイパス手順のために静脈に作られた脈管移植物の失敗を防ぐためのオリゴヌクレオチドの生体外適用のために、静脈は、核プロトオンコジーンmRNAに相補的なオリゴヌクレオチドに生体外で接触される。一般に、静脈は、滅菌及び生理的に許容される緩衝液中で20～37℃の間の温度で少くとも10分間、インキュベートされる。特に高濃度ではより短い時間が許容される。30～90分の間のより長いインキュベーションも適しており、このような手順で行われた静脈除去と移植との間の遅延時間に適合する。４℃のようなより低いインキュベーション温度も、特に一般により高い濃度のオリゴヌクレオチドと組み合わせて静脈が遠いドナー部位から輸送されなければならない場合に用いられ得る。一般に、濃度は、インキュベーションの長さ、オリゴヌクレオチドの型及び温度により５～500μＭで種々であろう。好ましくは、インキュベーション時間は22～37℃の範囲の温度で30～60分であろう。好ましいオリゴヌクレオチド濃度は、10～100μＭの範囲、更に好ましくは25～100μＭの範囲であろう。多くのタイプの緩衝液を、それらが生理的に許容される限り用いることができることが認められよう。例えば0.9%塩類溶液（NaCl）又はリン酸緩衝液、並びに本明細書に記載される他の緩衝液及び塩である。非ヒトからの静脈、遺伝的に操作された動物、特にブタからの静脈、並びに同種移植物及び自己移植物類似物（例えば伏在静脈、橈側静脈、尺側皮静脈、上腕静脈及び大腿静脈）からの多くのヒト静脈を含む多くのタイプの静脈を本発明に用いることができる。

（例えば脈管形成後の再狭窄を防ぐための）脈管内の適用のために、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、好ましくはルーメン内からカテーテルを通して障害の近辺に、又はアンチセンス化合物のゆっくりとした放出を助ける材料、例えばSimonsら（Nature, 359：69～70（1992））により記載されるようなフルロニックゲルシステムもしくはFernandez－Ortiz, A.ら（Circwlation, 89：1518～1522（1994）、その方法は引用により本明細書に組み込まれる）により記載されるような多孔質バルーンもしくはイオン導入バルーンで外膜（即ち管壁の最外層）を通して投与される。局所的な送出のための他のゆっくりと放出する技術は、例えばWilenskyら（Trends in Cardiovascular Med., ３：163～170（1993

））に記載されるバインダー又はゲルを用いるアンチセンス化合物で被覆されたステントを含む。標的病変に送り出される投与量は医薬組成物中に用いられるアンチセンス組成物の各々又は両方について１μｇ～10mgの範囲である。好ましくは、投与量範囲は、１μｇ～10mgの間であり；更に好ましくは投与量範囲は、１μｇ～10mgの間である。好ましくは、送出時間は約30秒～60分の範囲であり、更に好ましくは約30秒～約１～２分の範囲である（例えばZalewskiら、ページ79～87，Goldberg，editor，Coronary Angioplasty（Davis，Philadelphia，1988））。

カテーテル投与のために、動脈当り0.1mg～10mg、好ましくは動脈当り0.25mg～４mg、更に好ましくは動脈当り0.5mg～２mgの範囲である。投与量は、“標的病変に送り出された投与量”が組織へ送り出した後の組織内の薬剤の量であるような場合の組織に適用された薬剤量である。

冠状脈管形成の技術は当業者に公知であり、Clark，Coronary Angioplasty（Liss，New York，1987）及びVlietstraら（上述）等のような包括的な論文に詳細に記載される。

過剰の皮膚の瘢痕形成、例えば術後の瘢痕又はケロイド病等のために、皮膚繊維芽細胞による細胞外マトリックスタンパク質合成、特にコラーゲン合成を阻害するために局所的又は皮内の適用が好ましい。

局所的適用のために、投与量（組織に適用される薬剤の量）は、一般に、cm^2当り0.0lμｇ～10mgの薬剤、好ましくはcm^2当り0.2μｇ～７mgの薬剤、更に好ましくはcm^2当り0.5～４mgの薬剤の範囲であろう。術後の包帯と共に用いるための投与量は好ましくはcm^2当り0.2mg～４mgの薬剤である。皮膚擦過傷、皮膚傷害、座瘡及び術後処置のための局部用クリームと共に用いるための投与量は好ましくはcm^2当り0.05mg～３mgの薬剤である。

尿道、尿管、又は膀胱の瘢痕形成又は幅が狭くなることを生ずる泌尿器の異常のために、アンチセンスオリゴヌクレオチドで被覆されたカテーテル又はインプラントでの局所的投与が好ましい。

胃腸器官、胆管、肺、及び肝臓のような平滑筋細胞及び繊維芽細胞を含む内部器官の過剰な瘢痕形成のために、アンチセンス化合物の投与は全身般又は局部的であり得る。局部的投与は、標的器官へのアンチセンスオリゴヌクレオチドの直接の注入、埋め込まれたゲルもしくはポリマーでの送出、もしくは被覆されたステントからのゆっくりとした放出又は他のプロテアーゼ材料を含む。

上述の疾患の各々のために、治療のための患者及び治療の終了点を評価するための手段を選択するための基準は特定の疾患に関する技術において公知である。例えば、脈管再狭窄に関して、その状態に対する感受性に関連する因子は、男性、バイパス移植物の狭窄のための拡大、ベースラインにおけるCanadian Heartクラス３又は４、及び心筋梗塞の歴史を含む（Holmesら、Chapter 12，Vlietstraら、editors，PTCA（Davis Company，Philadelphia，1987））。治療の効能はPTCA技術と同様に評価される。通常、結果は視覚的に評価されるが、他の技術も利用できる。血液透析アクセス部位の失敗の評価は、カラードップラー超音波、対比血管造影及び超音波（例えばDoussetら、Radiology 181：89（1991），Nonnast－Danielら、Lancet 339（8786）：143（1992）、及びDavidsonら、Kidney International 40：91～95（1991））、引用により組み込まれる方法、並びに（アクセス部位にわたるハイ・ピッチな雑音又は水撃パルスのような）物理的な発見を含む。（PTCAの候補又はPTCAの結果を決定するための）狭窄又は再狭窄の激しさの評価は、病変の視覚的観察から問題の動脈の寸法の複雑なコンピューターベースの分析までの範囲である。それは例えば断層写真データ、遠位の脈管床の流れ、狭窄の密度測定特性、病変のゾーンにおける領域の壁の動きの変化からのものである（例えばBove，Chapter 9，Vlietstraら（上述））。

実施例１

動脈化ブタ静脈のリモデリング－動静脈移植物の開存性の喪失のための生体内モデル

動静脈移植物の静脈部分における細胞外マトリックスタンパク質産生を減少させる本発明のオリゴヌクレオチドの効能を証明するために、ブタにおいて生体内モデルを最初に開発した。このモデルは、移植物の静脈部分を含む動静脈移植物の開存性をモニターすること

を許容する。
ブタ動脈化静脈モデルにおいて、伏在静脈を切除して、次に端と端とを頸動脈に吻合した。手術を終えた後、動脈の血流を通常の動脈の圧力に再開させた（Violarisら、Ann. Thorac. Surg., 53：667～71（1995）及びAngeliniら、J. Thorac. Cardiovas. Surg, 99：433～９（1990）、その方法は引用により本明細書に組み込まれる）。端と端との伏在静脈移植物における高い動脈圧は、動静脈移植又は静脈移植において高い動脈圧への静脈の露出を刺激する。静脈移植物（ｎ＝７）の静脈部分を移植物作製後８日目に除去し、他に示さなければ組織分析のために切断した。動脈圧に露出されず、移植されていない通常の冠静脈を比較のために用いた。
動脈圧にさらされておらず、移植されていない通常の静脈は、図２に示されるように、脈管周囲組織が厚くなることがなく、少量の結合組織及びルーズな脂肪組織での脈管周囲空間、並びに薄く破れていない中膜を示した（ヴァーヘフ染色）。移植物の静脈部分は、大量の顆粒組織と共にカラーとして中膜のまわりを画する脈管周囲組織の増加を示した。これは、図２ｂに示されるようなヴァーヘフ染色により示される。同じセクションは、完全な壊れていない中膜を欠く解離も示した。特定のセクションにおいて、手術後８及び14日にネオインチマが観察された。
動脈圧にさらされず、移植されていない通常の静脈は、図３ａに示すようにシリウスレッドで染色された少量のルーズな脈管周囲及び中膜を示した。対照的に、移植物の静脈部分は、８日目程度の早さで脈管周辺組織にコラーゲンの析出の増加を示した。（図３ｂに示すように）大量の濃密な脈管周囲コラーゲンがシリウスレッドで染色され、（Ｉ型及びIII型を含む）繊維状コラーゲンについて特異的に染色された。中膜は、脈管周囲組織より染色されなかった。ネオインチマのセクションにおいてはコラーゲンが明らかに存在した。
動脈圧にさらされておらず、移植されていない通常の静脈は、α－アクチン抗体を用いて脈管周囲及び外膜層にα－アクチンを示さなかった。中膜内の平滑筋細胞のみが図４ａに示すようにα－アクチンについて陽性に染色された。対照的に、移植物の静脈部分は中膜及び外膜においてα－アクチン合成の増加を示した。中膜内の大量のα－アクチンが、図４ｂに示されるようにα－アクチンについて特異的な抗体で染色された。中膜内の染色は、中膜内でα－アクチンを合成する平滑筋細胞の存在を示す。外膜もα－アクチン染色を示し、これはα－アクチンの筋繊維芽細胞合成を示す。脈管周囲組織も更にいくらかのα－アクチン染色を示した。
静脈は、抗デスミン抗体を用いて脈管平滑筋細胞により発現されるデスミンについても染色された。静脈圧にさらされず、移植されていない通常の静脈は、図４ｃに示すように、中膜のみ染色するデスミンを示した。同様に、静脈移植物の静脈部分は、中膜のみにおいて平滑筋細胞のデスミン染色を示した。中膜中の大数の平滑筋細胞は、デスミンについての抗体で陽性に染色された（データは示さない）。脈管周囲組織又は外膜中でデスミン染色が観察されなかったことは、α－アクチン合成細胞の２つの集団：中膜内に位置した１つの集団（平滑筋細胞；デスミン陽性、α－アクチン陽性）及び外膜内に位置した１つの集団（繊維芽細胞及び筋繊維芽細胞；デスミン陰性、α－アクチン陽性）を示す。
移植物の静脈部分は、中膜及び脈管周囲組織における細胞増殖の増加を示した。中膜及び脈管周囲組織中の多数の増殖中の細胞が、図５ａに示されるように細胞増殖のマーカーである増殖細胞核抗原（PCNA）に特異的な抗体で染色された。比較のため、同様のセクションをヴァーヘフ染色（図５ｂ）及びシリウスレッド染色（図５ｃ）で染色した。このセクションにおいて、早期のネオインチマ形成は、移植した静脈のルーメンから、いくつかの細胞で薄い暗い層として図５ｂに観察され得た。通常、ネオインチマは静脈から欠如している。中膜と比較した脈管周囲組織におけるコラーゲンについてのより多くの染色は、図５ｃに示されるようにより高い倍率でより明らかである。PCNA染色も定量した：移植した静脈の細胞の30％がPCNAについて陽性に染色され、他方非移植静脈中の細胞の１％未満がPCNAについて陽性に染色された。
これらの結果は、高動脈圧に応答する移植された静脈の結合組織及び脈管壁における繊維

芽細胞、筋繊維芽細胞及び平滑筋細胞による細胞外マトリックス産生の比較的早期の増加を確認した。脈管周囲空間における結合組織を含む静脈の周りの組織厚及び細胞増殖の増加（瘢痕形成）は動脈血圧に応じた静脈の好ましい拡大を供し得る。
脈管細胞（例えば平滑筋細胞及び繊維芽細胞）中の細胞外マトリックス産生、例えばコラーゲン合成の阻害も実施例６，９及び13に特に示される。
実施例２
ヒト動脈化静脈－動静脈移植物の開存性の喪失のためのモデル
ヒトにおける静脈の動脈化の結果として細胞外マトリックス産生の増加を証明するために、バイパス手術から動脈化されたヒト静脈を研究した。ヒトでの結果は注目すべきものである。なぜなら本質的に細胞増殖は検出されなかったが、著しいコラーゲン染色が脈管壁中に存在したからである。
除去された大動脈冠動脈バイパス移植物として供されたヒト伏在静脈を閉塞が診断された後約２年に患者から除去した。動脈血流は静脈を通常の動脈圧にさらす。組織分析のために大動脈冠動脈の静脈部分を切断した。
ヒトの大動脈冠動脈移植物の静脈部分は脈管周囲組織及びネオインチマ厚の増加を示した。これは、図６ａでヴァーヘフ染色により示した。厚くなったネオインチマが中膜に置きかわったこと及び静脈の開存性の喪失に注意のこと。この特定の静脈は静脈の内径の喪失により部分的に閉塞される。対照的に、動脈圧にさらされず、移植されていない通常のヒト伏在静脈は、厚い脈管周囲組織を示さず、薄い傷のない消滅していない中膜を示した（データは示さない）。
ヒトの大動脈冠動脈移植物の静脈部分も脈管周囲組織及び中膜中に大量のコラーゲンを示した。大量のコラーゲンがシリウスレッドで陽性染色され、図６ｂに示すように、脈管周囲組織及び中膜において（Ｉ型及びIII型を含む）繊維状コラーゲンについて特異的に染色された。
ヒトの移植物の静脈部分は、図６ｃに示すように、α－アクチンに特異的な抗体で、脈管の脈管の陽性染色を除いて、ネオインチマで少量のアクチンを示し、脈管周囲組織ではα－アクチンを示さなかった。培地及び脈管周囲組織における染色の欠如は、α－アクチンを産生する細胞がほとんどないことを示した。α－アクチンについての陽性染色のかわりに、図６ｂに示すようなこれらの断面がコラーゲンについてより濃く染色されたことは、瘢痕組織が脈管周囲及び脈管壁の両方において満たされていることを示す。
ヒトの動静脈移植物の静脈部分は、中膜及び脈管周囲組織で細胞増殖を示さなかった。図６ｄに示すように、細胞増殖のマーカーである増殖細胞核抗原（PCNA）に特異的な抗体で染色された中膜及び脈管周囲組織中の細胞はなかった。×25の倍率でさえ陽性染色された細胞はほとんど見い出されなかった。PCNA染色も定量し、PCNAについて陽性染色された移植ヒト静脈中の細胞の１％未満であった。
実施例３
ヒト及びブタ血管器官培養物－オリゴヌクレオチドの非管腔輸送の有効性及び傷害に対する脈管応答
動静脈シャント又はバイパス手順の後の細胞外マトリックスタンパク質産生を削減すること及び脈管の妥協性における本発明のオリゴヌクレオチドの有効性を証明するために、最初に器官培養モデルを開発した。このモデルは、オリゴヌクレオチドの取込み、（本明細書に“PDGF”として言及される）血小板由来成長因子Ｂ鎖による脈管細胞の刺激及び本発明のオリゴヌクレオチドによる脈管細胞のPDGF刺激の阻害をモニターすることを許容する。
ブタ血管器官培養のために、乳房内又は頸動脈を切除し（ｎ＝３）、厚さ約５～15㎜の環に切断した。その環を以下に示されるように種々の時間で器官培養条件下でインキュベートした。ヒト血管培養モデルのために、伏在静脈をバイパス手術を受けた患者から切除した。切除した後、使用していない静脈断片を約５～15㎜厚の環に切断した。
細胞増殖へのｃ－mycオリゴヌクレオチドの影響を評価するために、ブタ脈管の環を、他に示さなければml当り100ngのPDGFあり又はなしで４日間、無血清培地（抗生物質及び１

% Neutrodomaを含むDMEM（Dulbecco's Moditied Eagle's Medium）中で37℃でインキュベートした。PDGFは通常、脈管細胞、例えば平滑筋細胞及び繊維芽細胞を刺激して増殖させ、創傷の治癒を促進するために組織創傷後に血小板により放出されることが知られている。PDGFで誘導された細胞増殖を本明細書で議論されるようなPCNA染色により測定した。４日目でさえ、その環はそれらの形態性を維持した。

器官培養物中のブタ血管はPDGF刺激に応答した。器官培養物中のブタ血管は、図７ａに示すように外膜及び中膜においてPCNAについて陽性に染色された細胞を示した。茶色の核染色はPCNA染色された細胞を表し、染色に染色された細胞は対比染色としてヘマトキシリン及びエオシンで染色される。PCNAに陽性染色された細胞の割合は15±５％（ｎ＝３）であった。PDGFなしで無血清培地中でのみインキュベートされた対照血管は、大きなPCNA染色を示さなかった。図７ｂに示すように、PCNAについて陽性染色された細胞は１％未満であった。

本発明のオリゴヌクレオチドはブタ血管器官培養物のPDGF誘導の刺激を阻害した。図７ｃに示すように、16μＭのオリゴヌクレオチド（配列番号：１）の添加は、図７ｃに示すように細胞増殖を誘導した。オリゴヌクレオチドとのインキュベーションの４日後、PCNA染色は細胞の２±0.2%（ｎ＝３；ｐ＜0.001対PDGFのみ）であった。

ヒト静脈の脈管壁内へのオリゴヌクレオチド拡散にアクセスするために、ヒト伏在静脈をオリゴヌクレオチドとインキュベートした。本発明のオリゴヌクレオチドはヒト静脈器官培養物中に迅速に拡散した。器官培養培地への100μＭのフルオレセイン末端標識オリゴヌクレオチド（配列番号：１）の添加は、各々図８ａ～８ｄに示すように、２秒（室温）、30分（37℃）、１時間（37℃）及び３時間（37℃）のインキュベーション時間においてヒト静脈内への標識オリゴヌクレオチドの迅速な時間依存の拡散を形成した。標識オリゴヌクレオチドは、静脈の管腔表面及び静脈の脈管周囲の両方を横切って拡散した。オリゴヌクレオチドは、最後には細胞及び細胞核中に局所化した。オリゴヌクレオチドなしでインキュベートされた対照のヒト静脈は、オリゴヌクレオチドとインキュベートされた静脈についてのシャッター時間より２～３倍長いシャッター露出時間でさえほとんど自己蛍光を示さなかった。

このデータは脈管壁中の脈管細胞のPDGF誘導の刺激を阻害する本発明のオリゴヌクレオチドで一貫している。このデータは、オリゴヌクレオチドの管腔輸送を用いるかわりの血管の脈管周囲組織からのオリゴヌクレオチド輸送の有効性も証明する。特に、脈管周囲組織オリゴヌクレオチド輸送は、静脈移植物及び他の型の脈管移植物に用いた切除した静脈又は動脈にオリゴヌクレオチドを送出するために生体外で用いることができる。更に、脈管周囲組織は、脈管壁及び脈管周囲組織が厚くなるのを防ぐために、脈管壁へのオリゴヌクレオチド転移を許容する本発明のオリゴヌクレオチドで生体内で処理することができる。

実施例４

２つの生体内ブタモデルは脈管周囲オリゴヌクレオチド送出を証明する。

本発明のオリゴヌクレオチドの脈管周囲送出の有効性を証明するために、２つの生体内ブタモデルをテストした。第１のモデルにおいては、ブタ大腿静脈を外科的に切除し、脈管周囲組織の結合組織内でその周りにオリゴヌクレオチドを注入した。第２のモデルにおいては、手術を行わず、ブタ静脈周囲の結合組織にオリゴヌクレオチドを経皮的に注入した。これらのモデルは１）動静脈移植物の形成前、又はその後であるか手術部位を閉じる前での脈管周囲注入、又は２）手術後に繰り返しの投与が要求されるなら脈管周囲組織への経皮注入のいずれかによる投与の後にオリゴヌクレオチドの取込みをモニターすることを許容した。フルオレセイン末端標識オリゴヌクレオチド（配列番号：１）を、２コラーゲン針を用いて両方のモデルに100μＭの濃度（10mg）で注入した。

外科的に露出された静脈へのオリゴヌクレオチドの直接の脈管周囲の適用後、生体内のオリゴヌクレオチドの取込みは迅速であった。30分以内（データ不図示）及び２時間（図９ａ）において脈管及び脈管周囲組織内に位置した細胞の核内で蛍光を観察することができたことは、オリゴヌクレオチドが脈管壁及び脈管周囲組織の拡散障壁を横切って拡散したことを示す。

経皮注入後の生体内オリゴヌクレオチド取込みも迅速であった。30分（図９ｂ）及び３時間（図９ｃ）以内に脈管及び脈管周囲組織内に位置した細胞の核内で蛍光が観察されたことは、オリゴヌクレオチドが脈管壁及び脈管周囲組織の拡散障壁を横切って拡散したことを示す。

これらの結果は、本発明のオリゴヌクレオチドを移植物に投与する方法としての脈管周囲送出、特に動静脈及び静脈移植物へのオリゴヌクレオチドの脈管周囲送出を確立する。一般に、オリゴヌクレオチドは本明細書に示されるように注入することができるか、又はオリゴヌクレオチド移植可能リザーバー、時間放出ゲルもしくはマトリックス、オリゴヌクレオチド含浸組織、又はPTFEチュービングのような装置のような脈管周囲組織へのオリゴヌクレオチドの送出を許容する他の手段により送り出すことができる。これらのタイプの脈管周囲送出方法は、動静脈移植物、特に血液透析患者により用いられる血液透析アクセス部位の静脈部分における脈管周囲組織又は脈管壁が厚くなるのを防ぐために本発明のオリゴヌクレオチドを送出するのに用いることができる。経皮注入の成功は、動静脈移植物、特に血液透析患者により用いられる血液透析アクセス部位へのオリゴヌクレオチドの繰り返しの送出の有効性も示す。静脈の脈管周囲側へのオリゴヌクレオチド送出の成功に加えて、動脈への管腔での送出も実施例８，18及び19に示される。

実施例５

血液透析アクセス部位臨床プロトコル

最初の血液透析アクセス部位又は失敗した部位の置換を要求する患者は、本発明のオリゴヌクレオチドで治療されるであろう。PTFE型のフィステル又はBrescia-Ciminoフィステルのいずれかが治療されよう。

患者は、配列番号：１，５又は６の配列を受容するだろう。オリゴヌクレオチドはホスホロチオエート結合又はアミデート結合を含むであろう。凍結乾燥したホスホロチオエート結合を有するオリゴヌクレオチドを本明細書に記載されるような緩衝液中に懸濁する。ホスホロチオエート又はアミデート結合を有するオリゴヌクレオチドを本明細書に記載される手順に従って合成し、滅菌条件下に維持した。異なる配列のオリゴヌクレオチドは、別個に投与され、患者は処理の間、１つのみの配列を受容するであろう。

患者に、血液透析アクセス部位の手術の時に１～10mgのオリゴヌクレオチドを投与する。標準22ゲージ又はより小さいゲージを用いて、動静脈シャントの静脈側の脈管周囲組織にオリゴヌクレオチドを注入する。注入後手術を終える。６ヶ月間、週間隔での経皮注入を用いて１～10mgのオリゴヌクレオチドをくり返し患者に投与する。静脈を触診するのか困難である患者の経皮注入はソノグラムを用いて誘導されよう。さもなければ注入は、動静脈シャント領域、特にシャントの静脈部分の触診により誘導されよう。

初年度に血液透析アクセス部位の機能的開存性について患者をモニターする。１週目並びに３，６、及び12ヶ月間目に、その部位のソノグラム又は血管写像をとる。流速は本明細書に議論されるドップラー及び超音波技術を用いて決定されよう。

投与のために用いたオリゴヌクレオチドを選択し、本明細書で議論され、及び当該技術で周知であるものとして合成した。この例及び他の例で議論される配列及び方法は、本発明の範囲を限定するものとしてでなく本発明の特定の実施形態として解釈されるべきである。更にオリゴヌクレオチドは本明細書で提起される構造と一致することだけを必要とする。オリゴヌクレオチドテストで本明細書に用いられる試験管内及び生体内モデルで好ましい限り、本明細書に提起される作用の特定の機構によりオリゴヌクレオチドが動作する必要はない。

実施例６

ヒト平滑筋細胞におけるコラーゲン合成の阻害

本実施例において、コラーゲン合成に付される移植されたヒト平滑筋細胞を、ｃ－mycおよびｃ－mybアンチセンスオリゴヌクレオチドで処理し、未処理の及び／又は“センス”処理した対照と比較した。

ヒト平滑筋細胞（SMCs）は、慣用的バイパス手術を受けた患者の伏在静脈から得た。その細胞を移植法により単離した。その移植物を、20％心臓不活性化胎児ウシ血清（FBS）、1

00IU／mlのペニシリン、100μｇ／mlのストレプトマイシン、及び２mM／mlのグルタミン（CM－20）が補給されたDulbecco's moditied Eagle's培地（DMEM）を含む組織培養皿に入れた。その培養物を５％CO_2で加湿インキュベーター内に37℃に維持した。その細胞は、脈管平滑筋細胞の典型的な形態学的特徴、即ちスピンドル形状及びヒルアンドバレーパターンを示した。脈管平滑筋細胞の同定を、その場での平滑筋α－アクチン染色により更に確認した。細胞を集密になるまで培養し、７日間、サブクローンした。第３又は第４継代ヒト平滑筋細胞を実験に用いた。

サブコンフルエント及びポストコンフルエントヒト平滑筋細胞で実験を行った。細胞を、CM－20が補給された10,000／cm^2（サブコンフルエント）又は25,000／cm^2（ポストコンフルエント）でプレートした。プレート後３日目に、アスコルビン酸（50μｇ／ml）を含む新鮮なCM－20を加えた。次のオリゴヌクレオチド：アンチセンス（5'-AACGTTGAGG GGCAT）（配列番号：１）；センスオリゴマー（5'-ATGCCCCTCA ACGTT）（配列番号：２）；４bp不適正オリゴマー（5' AACGTGGATT GGCAG）（配列番号：３）；スクランブルオリゴマー（5'-GAACGGAGAC GGTTT）（配列番号：４）；又はｃ－mybアンチセンス（5'-TATGCTGTGC CGGGGTCTTC GGGC）（配列番号：５）を種々の実験の培養に加えた（16μＭ）。

24時間後、培養培地をウエスタンブロットのために収集し、RNA分析のために細胞を収集した。各々の実験でトリパンブルー排除アッセイを行った。

コラーゲンを次の通り測定した：ペプシン処理したサンプル（Ｉ型コラーゲンの三重らせん部分）又は非ペプシン処理のサンプルをコラーゲン測定のためのウエスタンブロットにかけた。要約すると、サンプルをペプシン（１mg／ml）及び酢酸（0.5mol）中で４℃で一晩、インキュベートした。次に等量のアリコートのサンプルを速度真空遠心分離機で濃縮し、その後サンプルをSDSゲル充填緩衝液（50mM tris・HCl pH6.8, 100nMジチオトレイトール；２% SDS, 0.1%ブロモフェノールブルー及び10%グリセロール）中に溶かし、10分間、ボイルした。10分間、11,000ｇで遠心した後、サンプルを7.5% SDS－ポリアクリルアミドゲルで電気泳動してニトロセルロースフィルターに移した。ブロッキング溶液中でのインキュベーションの後、サンプル含有フィルターを室温で１時間、ヒトＩ及びIII型コラーゲン（Southern Biotech SC.）に対するビオチン標識第１抗体と共にインキュベートした。フィルターを洗浄し、次に西洋ワサビペルオキシダーゼで標識したストレプトアビジンと共にインキュベートした。反応基質を加えた後、そのフィルターをＸ線フィルムに露出した。実験を少くとも２回、別個に繰り返した。

全ての実験で用いたヒト平滑筋細胞は３～４継代を経ている。これらの細胞の表現型は、不可逆的に合成されると考えられ、種々の病状に関連する。脈管壁中の異常なコラーゲン蓄積がこれらの合成細胞により主に産生されることが証明されている。サブコンフルエント及びポストコンフルエント平滑筋細胞は血清刺激下でＩ型及びIII型コラーゲンを産生した。

サブコンフルエント平滑筋細胞において、対照（添加オリゴヌクレオチドなし）及びｃ－mycセンスオリゴヌクレオチド処理細胞と比較して、ｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチド処理後Ｉ型コラーゲン合成が80%削減された。コンフルエント平滑筋細胞において、クールターカウンターで計数した細胞数は、対照、アンチセンス－及びセンス－処理した細胞について同様であった。細胞の生存度はトリパンブルー排除アッセイを用いて対照、アンチセンス－及びセンス－処理細胞で97%, 96%及び95%であった。Ｉ型コラーゲンは、ｃ－mycアンチセンス処理細胞で検出できなかった。ｃ－mycセンスオリゴマーで処理した細胞は、対照と比較してＩ型コラーゲンタンパク質のレベルで差を示さなかった。三重らせんＩ型コラーゲンを、消化した後に測定した。結果は非ペプシン処理サンプルと同じ傾向を示した。

サブコンフルエント平滑筋細胞においては、対照（添加オリゴマーなし）及びｃ－mycセンスオリゴマー処理と比較して、ｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチド（16μＭ）処理後のＩ型プロコラーゲン合成が80%削減された。ポストコンフルエント平滑筋細胞においては、ｃ－mycアンチセンス処理細胞においてＩ型コラーゲンは検出できなかった。センスｃ－mycオリゴヌクレオチド及び４bp不適正オリゴヌクレオチドで処理した細胞は、

対照（添加オリゴヌクレオチドなし）と比較してＩ型コラーゲンタンパク質のレベルの減少を示さなかった。増殖中及びポストコンフルエント平滑筋細胞におけるＩ型コラーゲンの減少は、コラーゲン合成の阻害がアンチセンス化合物による細胞増殖の阻害に依存することを示唆する。アンチセンスオリゴヌクレオチドの異なる投与量（４，８、及び16μＭ）は、Ｉ型プロコラーゲン合成の投与量依存の削減を示した。異なるオリゴヌクレオチド処理後の細胞生存度は、トリパンブルー排除アッセイにより分析してかなりのものであった。全てのグループにおいて90％超の細胞が生存していた。

ポストコンフルエントヒト平滑筋細胞において、Ｉ型コラーゲンの合成は、16μＭの濃度のｃ－mybオリゴヌクレオチドにより止められた。対照（オリゴヌクレオチドなし）及びスクランブル配列オリゴヌクレオチドで処理した細胞においては、Ｉ型コラーゲンのレベルは同様であった。

これらの結果は実施例９，13及び17でも更に確認される。

実施例７

ヒト皮膚繊維芽細胞におけるコラーゲン合成の阻害

本実施例において、移植したヒト皮膚繊維芽細胞（ヒトFBCs）をｃ－myc又はｃ－mybアンチセンスオリゴヌクレオチドで処理し、未処理及び／又は“センス”処理対照と比較した。ヒトFBCを皮膚移植を受けた患者から得て、移植法により単離した。移植されたFBCをヒト平滑筋細胞について上述のように培養し、アンチセンス及び対照オリゴヌクレオチドを同様に適用した。第３～第10継代培養物からのヒトFBCを本実験に用いた。コラーゲン合成を実施例６に記載されるように測定した。

コンフルエントヒトFBCにおいて、ｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチド（８及び16μＭ）は投与量依存様式でＩ型プロコラーゲンを減少させた。ｃ－mycセンス、４bp不適正、又はスクランブルオリゴヌクレオチドで処理した細胞は、対照細胞（添加オリゴヌクレオチドなし）と比較して同様のレベルのＩ型コラーゲンタンパク質を示した。

これらの結果は実施例13でも更に確認される。

実施例８

冠状脈露出のブタモデルにおけるネオインチマ形成の削減

ネオインチマ形成を阻害するｃ－mycアンチセンス化合物の有効性を、慣用的プロトコル（例えばKarasら、J. Am. Coll. Card., 20：467～474（1992）；及びSchwartzら、Circulation, 82：2190～2200（1990）を参照のこと）を用いて標準ブタモデルにおける冠状脈形成の部位に、ｃ－myc特異的アンチセンス（配列番号：１）及びプラシーボ（配列番号：21）オリゴヌクレオチドホスホロチオエートを投与することによりテストした。家畜用雑種のブタ（Susscrota）を、研究の前に経口用アスピリン（650mg）で予め処理した。一般的な麻酔はケタミン（12mg／kg）及びキシラジン（８mg／kg）の筋内注入からなる。麻酔剤の更なる投与を本実験を全体を通して静脈内に行った。右外側の頸動脈を外科的に露出させた後、ヘパリン（10,000Ｕ）をブタの静脈内に投与し、ニフェジピン（10mg）を頬に供した。８French SAL１誘導カテーテル（Medtronic Interventional Vascular, Inc., Darvers, MA）を用いて、透視誘導装置下で冠状脈口にカニューレを挿入した。ニトログリセリン（100μｇ）の冠状脈内注入の後、ｃ－mycアンチセンス及びプラシーボの送出の前に、過剰な大きさの脈管形成バルーンを用いて、2.0～3.5mmに変化する動脈の大きさに従って６～10atmでふくらませ、成功するまで３回、30秒間、保持することにより動脈壁の内膜及び中膜層を傷つけた。脈管形成バルーンを除去した後すぐに、冠状動脈への壁内注入（１mg／管）を、別個の多孔質バルーンを用いて行った。注入圧が４atmを超えず、灌流液の容量が２mlで、そしてバルーン動脈比が約1.4～１である場合に壁内薬剤送出が安全であることを予め決定した。ｃ－mycアンチセンス（13複製）又はプラシーボ（12複製）オリゴマーを４atmの圧力下で注入し、平均27秒で送出を完了した。オリゴマーの投与量は傷ついた冠状動脈当り１mgであった。オリゴマーの送出に関連した悪影響はなかった。送出後１ヶ月に、動物を殺して、傷害部位における最大ネオインチマ領域（NAmax）、ネオインチマ厚（NTmax）、及び残ったルーメン（RL）を体型測定により決定した。結果（平均±SEM）を以下の表１に示す。

表 1

オリゴマー（％）	複製数	NA max（mm²）	NT max（mm）	RL
プラシーボ±6	12	0.80±0.17	0.48±0.09	64
アンチセンス±5	13	0.24±0.06	0.20±0.04	81
p＜0.05		＜0.01	＜0.01	

図10は、傷つけた後１ヶ月の典型的な対照（即ちセンスオリゴマー注入を受けたもの）の冠状動脈の断面の写真である。大きなネオインチマの厚さが注目される（矢印）。図11は、典型的なアンチセンス処理した冠状動脈の断面の写真である。ネオインチマの大きな減少が注目される。最大ネオインチマ領域を傷害の程度の関数として分析すると（図12）、ネオインチマと傷害スコアー（即ち傷害の激しさ）との間の関係を示す回帰線は傾斜の大きな差（ｐ＜0.01）を示した。図12に示すように、アンチセンスオリゴマーは、特に進行した傷害でネオインチマの形成を大きく減少させた。

実施例９

Ｃ－MYCアンチセンスオリゴヌクレオチド処理によるヒト平滑筋細胞の細胞外マトリックス産生の阻害

本実施例は、ヒト平滑筋細胞による細胞外マトリックスタンパク質、特にＩ型及びIII型プロコラーゲンの合成を阻害するためのｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチド処理の有効性を更に証明する。本実施例は、実施例６の発見も更に確認する。アンチセンス処理は（20% FBSで処理された）刺激されたヒト平滑筋細胞の細胞外プロコラーゲンレベルを大きく減少させた。

Ａ．ウエスタン・ブロットによるＩ型プロコラーゲン及びIII型プロコラーゲンの測定

ｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチドが細胞外マトリックスタンパク質の合成を阻害することを更に決定するために、ヒト平滑筋細胞からのＩ型及びIII型プロコラーゲンを測定した。

細胞内及び細胞外プロコラーゲン（両方Ｉ型及びIII型）の両方を、ウエスタン・ブロットを用いて測定した。残りのヒト平滑筋細胞を0.5% FBS（胎児ウシ結成）が補給された培地DMEM（Dulbecco's Modified Eagle's Medium）内に維持した。ヒト平滑筋細胞を20% FBS及びアスコルビン酸（50μｇ／ml）を含む培地中でオリゴヌクレオチドあり又はなしで刺激した。FBCはヒト平滑筋細胞においてプロコラーゲン合成を刺激することが知られている。オリゴヌクレオチドの添加後20時間に、細胞をリン酸緩衝塩類溶液（PBS）で３回洗い、0.1% BSA、アスコルビン酸及びオリゴヌクレオチドを含む無血清培地を更に４時間、培養物に加えた。ならし培地（細胞及びオリゴヌクレオチドに露出した培地）を収集して、フェニルメチルスルホニルフルオリド（PMSF, 0.5mM）、ペプスタチン（１μｇ／ml）及びロイペプチン（１μｇ／ml）を含むプロテアーゼインヒビターを加えた。対応する細胞層を冷えたPBSで３回洗浄し、62.5mM Tris－HCl, pH6.8, 20%グリセロール、２% SDS, ５% β－メルカプトエタノールを含むSDS－PAGE緩衝液中に、４℃で30分、溶解

させた。次に、細胞ライゼートを５分間、煮沸してプロティナーゼを不活性化し、４℃で10分間の10,000rpmでの遠心後にその上清を収集した。選択した実験において、細胞を24時間、20% FBS－DMEM中でオリゴヌクレオチドと共に連続的にインキュベートし、次に培養培地のサンプルを４℃で一晩、0.5M酢酸中でのペプシン消化（0.1mg／ml）にかけた。Microcon－30カラム（Amicon, Beverly, MA）での遠心により個々のサンプルを10倍濃縮し、－20℃に保存した。アリコートを４％スタッキング領域の65（ｗ／ｖ）ポリアクリルアミド－SDSゲルで電気泳動した。次に分画したタンパク質を195mMグリシン、25mM Tris, 0.01% SDS、及び20%メタノールを含む転移緩衝液中でPoly Screen PVDF膜（DuPont NEN, MA）上に電気転移させた。そのブロットを５％非脂肪ミルク中でブロックし、2.5% BSA中でＩ型コラーゲンに対する抗体（ビオチン標識ポリクローナル抗体、Southern Biotechnology Associate, Inc. AL）及びIII型コラーゲンに対する抗体（Gibco BRL, Gaithersburg, MD）と共にインキュベートした。その膜をPBST（0.1% Tween 20を含むPBS）で３回洗い、（III型のための）ビオチン化第２抗体と共にインキュベートした。そのブロットを洗い、次に30分間、ストレプトアビジン－ペルオキシダーゼコンジュゲート（Boehringer Manheim, Germany）と共にインキュベートした。洗浄した後、そのブロットを10秒間、ルネサンス化学発光試薬（DuPont NEN, MA）と共にインキュベートし、30秒～２分間、Kodak Ｘ－Omatフィルムに露出した。生じたフルオグラフをレーザー濃度計（Pharmacia LKB Biotechnology, Inc., Piscataway, NJ）により分析した。

配列番号：１に相当するｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチドを他に示さなければ全ての実施例に用いた。

Ｂ．ｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチドによる細胞外Ｉ型プロコラーゲン及びIII型プロコラーゲン分泌の阻害

実験のサブグループ間での種々の増殖速度の影響を最小化するために、ポストコンフルエント、即ち密度停止平滑筋細胞中で決定した。ウエスタンブロット（図13）により示されるように、ならし培地中の細胞外Ｉ型プロコラーゲン及び細胞外III型プロコラーゲンの著しい減少がｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチド処理後に観察された。この効果は４～16μＭの範囲で濃度依存性であり、ｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチドとの平滑筋細胞のインキュベーション後３時間程度の早さでおこった（データは示さない）。アンチセンスオリゴヌクレオチド後の細胞外Ｉ型プロコラーゲンの減少が、β－アミノプロピオニトリルの添加により影響を受けないことは、アンチセンスがコラーゲンの架橋を促進する可能性を排除する（データは示さない）。

Ｃ．エキソン１，２及び３に対するｃ－mycアンチセンスホスホロチオエートオリゴヌクレオチドは細胞外マトリックスタンパク質の合成の有効なインヒビターである。

ｃ－mycアンチセンスホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの配列特異的作用を更に確認するために、平滑筋細胞をセンス、４bp不適正及びスクランブルオリゴヌクレオチド（他に示さなければホスホロチオエートオリゴヌクレオチドを用いる）を含むいくつかの対照配列で処理した。ならし培地中のＩ型プロコラーゲンレベルへのそれらの効果を、３つのアンチセンス配列をｃ－myc mRNAの異なる領域に対して行った後のものと比較した。図14に示すように、細胞外Ｉ型プロコラーゲンの一貫した削減が異なるアンチセンスオリゴヌクレオチドでの処理後に観察され、他方対照配列はそのような効果はなかった。

表　3

配列番号	オリゴヌクレオチド配列（5’→3’）	ヒトc－myc ヌクレオチド位置；オリゴヌクレオチド位置
1	AACGTTGAGG GGCAT	559－573 ；アンチセンス
2	ATGCCCCTCA ACGTT	559－573 ；センス
3	AACGTGGATT GGCAG	559－573 ；4塩基不適正
4	GAACGGAGAC GGTTT	スクランブル
5	TATGCTGTGC CGGGGTCTTC GGGC	c－myb ；アンチセンス
6	GGGAGAGTCG CGTCCTTGCT	400－419 ；アンチセンス
7	TCATGGAGCA CCAGGGGCTC	1264－2383；アンチセンス

D．細胞外フィブロネクチン及び核c－mycタンパク質の免疫沈降

細胞外フィブロネクチン及びc－mycタンパク質のタンパク質合成へのオリゴヌクレオチド配列の効果を決定するために、ポストコンフルエント平滑筋細胞を、４時間、メチオニン無含有培地中でオリゴヌクレオチドあり又はなしでインキュベートした。その後〔^{35}S〕メチオニン（25μCl／ml，DuPont NEN，MA）を16時間、加え、クールターカウンターで細胞数を数えた。ならし培地中の細胞外フィブロネクチン及び細胞核抽出液中のc－mycタンパク質を、代謝標識後の免疫沈降により測定した。

プロティナーゼインヒビターの添加後ならし培地を収集し、等しい数を含むアリコートを４時間、フィブロネクチンに対する抗体（Becton Dickinson，Bedford，MA）と共にインキュベートした後、更に２時間、スタフィロコッカス（Staphylococcus）タンパクＡアクリルアミドビーズとインキュベートした。遠心した後、ペレットを３回洗浄し、SDS-PAGEサンプル緩衝液中で５分煮沸して、６％ポリアクリルアミド－SDSゲル上で電気泳動した。標識した細胞層を、標識後に冷PBSで３回、洗って0.1% NP－40，10mM Tris（pH7.9），10mM $MgCl_2$，15mM NaCl，5mM EDTA，１mM PMSF，１μｇ／mlロイペプチン及び１μｇ／mlペプスタチン中に溶解した。

細胞外フィブロネクチンアッセイと平行して、細胞核を、当該技術で知られていない手順による遠心で抽出した。核抽出液中のタンパク質濃度を測定し、500μｇのタンパク質を含むアリコートを抗c－myc抗体、pan－myc（G．I．Evanからの贈り物）と共に12時間、ストレプトコッカスタンパクＡアクリルアミドビーズと共に更に90分、インキュベートした。洗浄後、ビーズを収集し、SDS－PAGEサンプル緩衝液中で煮沸してその可溶画分をSDS－PAGEで電気泳動した。そのゲルを乾燥させ、５～７日間、－70℃でKodak－Omatフィルムに露出した。

E．細胞外フィブロネクチンのレベルはc－mycアンチセンスオリゴヌクレオチドにより変化せず、他方c－mycタンパクレベルは減少した。

細胞外プロコラーゲンの大きな削減と対照的に、ならし培地中の細胞外フィブロネクチンがあまり影響を受けなかった（図13）ことは、アンチセンスオリゴヌクレオチドの選択的効果を示す。c－mycアンチセンスオリゴヌクレオチド（16μM）とのポストコンフルエント平滑筋細胞のインキュベーションは、核抽出液においてc－mycタンパク質の下降制御を生じた（図15）。

実施例10

C－MYCアンチセンスオリゴヌクレオチドはヒト平滑筋細胞全体の代謝を変えない。

オリゴヌクレオチドが平滑筋細胞の機能の他の変化をおこさないのを更に確実にするために、細胞膜一体性、細胞代謝及びコラーゲン合成又はデグラデーション経路に関連する遺伝子の誘導のアッセイを行った。

ヒト平滑筋細胞をトリパンブルーを用いて細胞膜一体性についてアッセイした。95%超の細胞が、トリパンブルー排除により評価して、種々のオリゴヌクレオチド（16μＭ）での処理後に生存し続けた。

ならし培地の全タンパク質合成アリコートを決定するために、ならし培地を４℃で30分間、冷やした10%トリクロロ酢酸（TCA）中で沈殿させ、ペレットを５%TCA中で２回、洗浄した。次にそのペレットをSolvable™（DuPont NEN, MA）中に溶かし、その組み込まれた放射能を、シンチレーションカウンター（Pharmacia LKB Biotechnology Inc. Piscataway, NJ）で測定した。本明細書で議論されるように〔^{35}Ｓ〕メチオニン組み込みにより測定される全タンパク質は、アンチセンス（配列番号：１）オリゴヌクレオチドあり又はなしでインキュベートした平滑筋細胞で同等であった（図16）。20% FBSで刺激された細胞が、0.5%のみのFBSで処理された刺激されていない細胞と比較してタンパク質合成の増加を示したことに注意のこと。ｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチド処理はセンス、不適正及びオリゴヌクレオチド処理のない対照と比較してタンパク質合成を減少させなかった。

更に、ならし培地中のＩ型プロコラーゲンＩのレベルは、ｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチドの除去後24時間に対照レベルに回復した（図17）。これらの結果は、アンチセンス（配列番号：１）オリゴヌクレオチドが、脈管平滑筋細胞の通常の代謝活性を保つ細胞外プロコラーゲンを選択的であるが可逆的に減少させた。

アンチセンスオリゴヌクレオチドは非標的遺伝子の発現を誘導し得るので、ｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチドでの処理後のコラーゲン分解活性及びインターフェロン－γレベルは、これらの非特異的効果を排除するように決定した。

ポストコンフルエント平滑筋細胞をオリゴヌクレオチドあり又はなしの無血清培地と共にインキュベートした。培地のアリコートをその後24時間、収集した。ジチオトレイトール及びイオドアセトアミドによるメタロプロティナーゼの組織インヒビターの選択的破壊の後にマトリックスメタロプロティナーゼ活性を決定した。ヒト平滑筋細胞により産生された潜在的コラゲナーゼをアミノフェニルマーキュリックアセテートで活性化し、次にＩ型コラーゲン又はゼラチンと共にインキュベートし、開裂産物をSDS－PAGEにより評価した（D. D. Deanら、J. Clin. Invest., 84：678～685（1989）及びP. E. Desrochersら、J. Biol. Chem 267：5005～5012（1992）の方法は引用により本明細書に組み込まれる）。

メタロプロティナーゼを、基質としてβ－カゼイン又はゼラチンを用いて、非変性条件下でのSDS－基質ゲル電気泳動（即ちチモグラフィー）によりキャラクタライズした。対照、センス－及びアンチセンス－（配列番号：１）処理した平滑筋細胞（データは示さない）と同様のＩ型コラーゲン及びゼラチンに対するコラーゲン分解活性がならし培地中で示されたことは、ｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチドが内因性コラーゲン分解活性を増加させないことを示唆する。

Ｉ型コラーゲン合成の潜在的インヒビターであるｃ－mycインターフェロン－γが偶然に誘導されるか否かを決定するために、培養培地及びヒト平滑筋細胞中でインターフェロン－γをアッセイした。インターフェロン－γは、ELISA法を用いて、ｃ－mycアンチセンス（配列番号：１）オリゴヌクレオチドとのインキュベーション後のならし培養培地及び細胞ライゼート中で検出できなかった。

実施例11

ヒト平滑筋細胞におけるプロコラーゲンA_1（Ｉ），A_2（Ｉ）及びA_1（III）mRNAへのＣ－MYCアンチセンスオリゴヌクレオチドの無効性

本実施例は、ｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチド処理がヒト平滑筋細胞におけるプロコラーゲンのmRNAを減少させないことを証明する。

プロコラーゲンからのmRNAを測定するために、ポストコンフルエント平滑筋細胞を24時間、オリゴヌクレオチドあり又はなしでインキュベートし、冷やしたPBSで３回洗って、４

Mグアニジウムイソチオシアネート中に溶かした。フェノール－クロロホルム抽出後のイソプロパノール沈殿により、全RNAを単離した。全RNAを260nmの分光光度計の吸光度で定量した。等量のRNAサンプル（10μｇ）を変性（0.8%アガロース／ホルムアルデヒドゲルで分離してニトロセルロース膜上にブロットした。RNAをUV架橋剤（Stratagene, CA）を用いてニトロセルロース膜に架橋した。そのブロットをヒトプロコラーゲンα_1（Ｉ）（ATCC）及びヒトプロコラーゲンα_2（Ｉ）（H. Kuivaniemiからの贈り物）cDNAプローブと42℃で24時間、ハイブリダイズした。７ＳリボソームRNAのためのプローブを対照として用いた。そのプローブを、10^8cpm／μｇ DNA超の特異活性までニックトランスレーションにより^{32}Ｐ－CTPで標識した。そのブロットを15分、２×，１×，0.5×及び0.1×SSC－0.1%SDSで42℃で２回、連続的に洗浄した。各々の洗浄を２回、くり返した。ブロットを、６時間～３回、増感紙で－70℃でKodak－Omatフィルムに露出した。

アンチセンス処理後のｃ－mycタンパク質の下降制御は、コラーゲン発現の転写制御の可能性を生じさせる。従って、プロコラーゲンα_1（Ｉ）及びプロコラーゲンα_2（Ｉ）mRNAレベルを、ノーザンブロット分析を用いてオリゴヌクレオチドあり又はなしでのインキュベーションの後に平滑筋細胞において分析した。図18に示すように、アンチセンスオリゴヌクレオチドはプロコラーゲンα_1（Ｉ）及びプロコラーゲンα_2（Ｉ）mRNAレベルに影響を与えなかった。同様に、ｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチドあり又はなしで、同様のレベルのプロコラーゲンα_1（III）mRNAが見られた（データは示さない）。７Ｓ RNAは、全ての３つの実験条件で不変であった。

実施例12

Ｃ－MYCアンチセンスオリゴヌクレオチドで処理したヒト平滑筋細胞におけるプロコラーゲンの細胞内蓄積

本実施例は、ｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチド処理がヒト平滑筋細胞内のプロコラーゲンを増加させることを証明する。これらの結果は、ｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチドの存在下での細胞外マトリックスプロコラーゲン合成の減少で一貫している。

Ａ．細胞内プロコラーゲンレベルはｃ－mycアンチセンス処理により増加する。

ｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチドによる細胞外プロコラーゲンの減少に関連するメカニズムを検査するために、〔^{14}Ｃ〕プロリン標識の４時間後に分泌及び細胞内プロコラーゲンを測定した。

ｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチド処理の後の細胞内プロコラーゲンを測定するために、細胞を20% FBS－DMEM中で20時間オリゴヌクレオチドあり又はなしでインキュベートした。アスコルビン酸（50μｇ／ml）、〔^{14}Ｃ〕プロリン（2.5μCI／ml, DuPont NEN, MA）及びオリゴヌクレオチドを含む無血清培地を更に４時間、細胞に加えた。その培養培地を収集してプロテアーゼインヒビターを加えた。培地のアリコートを、組み込まれていないラジオアイソトープを除去し、電気泳動のためにサンプルを濃縮するために、Microcon－30カラムを通して遠心した。次に対応する細胞層を冷PBSで３回洗い、PAGE－SDSサンプル緩衝液中に溶解し、そして５分間、煮沸してプロティナーゼを不活性化した。ヒト繊維芽細胞（W. Arnldからの贈り物）から選択された（等しい細胞数からの）細胞ライゼート及びＩ型プロコラーゲンを３%スタッキング領域を有する６%ポリアクリルアミド－SDSゲルで電気泳動した。ゲルを10%酢酸、20%メタノールで30分、固定し、乾燥させて７日間、－70℃でフィルムに露出した。

ｃ－mycアンチセンス処理は分泌された〔^{14}Ｃ〕プロリン標識プロコラーゲンを減少させ、ウエスタンブロットDNAと同様であった。ｃ－mycアンチセンス処理は、未処理の細胞及びスクランブルオリゴヌクレオチドで処理した細胞と比較して、Ｉ型プロコラーゲンの細胞内濃度を大きく増加させた。

Ｂ．細胞内プロコラーゲンレベルの増加は、ヒト平滑筋細胞がｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチド処理後にプロリンを加水分解する能力がないためではない。

プロコラーゲンの細胞内蓄積は、プロコラーゲンα鎖の三重らせん構造へのアセンブリーのために要求される転写後修飾の阻害を反映し得る。それゆえ、この可能性を除外するために、プロリル４－ヒドロキシラーゼ活性及びヒドロキシプロリン成分のｃ－mycアンチ

センス処理の影響を測定した。
ポストコンフルエント平滑筋細胞を、上述のように、20% FBS－DMEM中でオリゴヌクレオチドあり又はなしでインキュベートした。細胞層を冷PBSで３回洗い、0.2M NaCl, 20mM Tris－HCl, pH7.4, 0.1% Triton X－100, 0.1Mグリシン及び10μM DTT（K. J. Kivirikkoら、Methodsin Enzymology, 82：241～364（1982）の方法は本明細書に引用により組み込まれる）。次にそのライゼートを氷上で30秒間、音波処理してタンパク質濃度を測定した。残りの細胞ライゼートを13,000rpmで20分、遠心した。
上清のアリコートを、基質として〔^{14}C〕プロリン標識Ｉ型プロコラーゲンを用いて放射性４－ヒドロキシプロリンの形成を測定することにより、プロリル４－ヒドロキシラーゼ活性についてアッセイした。（K. J. Kivirikkoら、Anal. Biochem., 19：249～255（1967）の方法は引用により本明細書に組み込まれる）。細胞ライゼートのアリコートを加水分解し、ヒドロキシプロリンを、特定の化学的方法によりアッセイした。
三重らせん形成を制御する中枢の酵素であるプロリン４－ヒドロキシラーゼ活性は実験サブグループの中で同様であった。それは、オリゴヌクレオチドなしで処理された対照平滑筋細胞で11.7±0.1（dpm １μｇタンパク質２の別個の実験の平均±SD）、スクランブルオリゴヌクレオチド（16μＭ）とインキュベートされた細胞で12±2.3、そしてｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチド（16μＭ）での処理後10.5±2.0であった。
ヒドロキシプロリン成分は、未処理又はスクランブルオリゴヌクレオチド処理細胞のものよりｃ－mycアンチセンス（配列番号：１）細胞のものの方が大きかった。ヒドロキシプロリン成分の増加は、プロリン４－ヒドロキシラーゼの基質であるプロコラーゲンレベルの増加を反映する。
実施例13
Ｃ－MYCアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いるヒト繊維芽細胞ヒト皮膚繊維芽細胞における細胞外マトリックス産生の阻害
本実施例は、ヒト皮膚繊維芽細胞、特にＩ型及びIII型プロコラーゲンによる細胞外マトリックスタンパク質の合成を阻害するためのｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチド処理の有効性を更に証明する。アンチセンス処理は、（20% PBSで処理された）刺激されたヒト皮膚繊維芽細胞の細胞外プロコラーゲンレベルを大きく減少させる。本実施例は、実施例７の発見も更に確認する。
Ａ．ウエスタン・ブロットを用いる細胞外及び細胞内Ｉ型及びIII型コラーゲンのアッセイ
ｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチドがヒト皮膚繊維芽細胞における細胞外及び細胞内プロコラーゲンＩ及びIIIの合成を阻害するか否かを更に決定するために、実施例９及び12においてヒト平滑筋細胞について議論されるように、プロコラーゲンレベルを決定した。ヒト皮膚繊維芽細胞実験に用いたヒト皮膚繊維芽細胞は融合性であった。実施例７のように、及び当該技術で周知である方法により細胞を得て培養した。
Ｂ．ｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチド処理による細胞外Ｉ型及びIII型コラーゲン分泌の迅速な阻害
これらの実験は、ｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチドが投与量依存、アンチセンス配列依存様式で、及び迅速な阻害でのヒト皮膚繊維芽細胞による細胞外Ｉ型及びIII型コラーゲンの分泌を阻害することを示す。
細胞外マトリックス産生の阻害のためのｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチドの投与量応答及びアンチセンス特異性を更に決定するために、異なる処理にかけられたヒト繊維芽細胞から単離されたヒト繊維芽細胞タンパク質のウエスタン・ブロットを用いて、細胞外コラーゲンＩを測定した。ヒト繊維芽細胞を、スクランブルオリゴヌクレオチド（配列番号：４；16μＭ）、不適正オリゴヌクレオチド（配列番号：３；16μＭ）、アンチセンスオリゴヌクレオチド（配列番号：１，４，８及び16μＭ）又はオリゴヌクレオチドがないものに本明細書に議論されるように、24時間、さらし、これらの細胞のタンパク質を各々図21のレーン１～５に示されるウエスタンブロットにおいてＩ型コラーゲンについてアッセイした。二重結合は、コラーゲンα_1（Ｉ）及びα_2（Ｉ）鎖を各々上部及び下部バン

ドに反映した。アンチセンス処理した細胞は、ｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチドのレベルの増加と共にＩ型コラーゲンの量の割合の減少を示し、他方対照処理（非処理、スクランブル及び不適正）は、用いたｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチドの最も近い濃度より多い量のコラーゲンを示した。オリゴヌクレオチド（配列番号：１；16μＭ）も新しくプレートされた繊維芽細胞における細胞増殖も阻害し；20% FBS及びセンス対照と比較して、細胞増殖は４日後に各々約25及び50%阻害された。本明細書に示される他の結果と組み合わせたこれらの結果、特にｃ－mycアンチセンス処理によるコラーゲン及びプロコラーゲンデグラデーション経路の制御の欠如は、細胞外マトリックス産生、特にＩ型プロコラーゲン分泌がｃ－mycアンチセンス処理により阻害されることを示す。

ヒト皮膚繊維芽細胞コラーゲンＩ分泌のｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチド処理の時間経過は、新たに合成されたＩ型コラーゲンの分泌の迅速な阻害を示した。時間０において、ヒト皮膚繊維芽細胞を、オリゴヌクレオチドなし、スクランブルオリゴヌクレオチド、又はアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む新鮮な培地（本明細書に用いる新鮮な培地は、20% FBS及びアスコルビン酸50μｇ／ml並びに示されるような他の構成物を含む培地である）に24時間さらした（オリゴヌクレオチドの濃度は16μＭであった；配列番号：１及び３）。３，６及び24時間において、各々の細胞培地のアリコートをとり、本明細書に記載されるように、ウエスタン・ブロットによりＩ型コラーゲンの存在についてアッセイした。Ｉ型コラーゲンの減少が、対照細胞（未処理及びスクランブル処理）と比較してアンチセンス処理細胞で３時間程早く観察された。24時間において、アンチセンス処理した細胞は、対照細胞より少くとも５～10倍少く分泌されたＩ型コラーゲンを示した。６時間での値は中間の結果となった。

ヒト繊維芽細胞によるIII型コラーゲンの分泌もｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチドにより阻害された。ヒト繊維芽細胞を、24時間、オリゴヌクレオチドなし、16μＭスクランブルオリゴヌクレオチド又は16μＭ ｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチドのいずれかを含む新鮮な培地で処理し、その培地をその24時間の最後での細胞外III型コラーゲンの存在についてアッセイした。アンチセンス処理した細胞においては細胞外III型コラーゲンは観察されなかったが、対照細胞（未処理及びスクランブル処理）は、（アンチセンス処理細胞と比べて少くとも10～100倍高いIII型コラーゲンのレベルでの）細胞外III型コラーゲンの存在を示した。

これにより、本明細書に示される他の結果と合わせたこれらの結果は、細胞外マトリックス産生、特にＩ型及びIII型プロコラーゲン分泌がｃ－mycアンチセンス処理により阻害されることを示す。

Ｃ．細胞内プロコラーゲンＩの蓄積及びｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチド処理による細胞外プロコラーゲンの同時の減少

ヒト繊維芽細胞のｃ－mycアンチセンス処理によるプロコラーゲン分泌の阻害は、細胞内プロコラーゲンＩの蓄積に関連した。ヒト繊維芽細胞を、オリゴヌクレオチドなし、16μＭスクランブルオリゴヌクレオチド又は16μＭ ｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチドのいずれかを含む新鮮な培地で24時間、処理し、その培地及び対応するヒト繊維芽細胞を、本明細書で議論されるように分離した^{14}Ｃプロリン標識タンパク質合成産物を用いて細胞外Ｉ型プロコラーゲン及び細胞内Ｉ型プロコラーゲンの存在についてアッセイした。図22において、レーン１～３の主なバンドは、プロコラーゲンα_1（Ｉ，III）及びα_2（Ｉ）鎖を示した。分泌されたＩ型プロコラーゲンの量は対照細胞（未処理、スクランブル処理、各々レーン１及び２）と比較してアンチセンス処理細胞で少くとも10～20倍削減された。レーン１～３の上部バンドはプロコラーゲンα_1（Ｉ，III）に相当する約116kd（“上部バンド”）であり；（左から右への）レーン１～３の下部バンドは、α_2（Ｉ）に相当する約100kdであった。図22においては、レーン４～６は、細胞内Ｉ型プロコラーゲンが対照細胞（レーン４及び５）よりアンチセンス処理細胞（レーン６）において少くとも５倍大きいことを示す。図22において、レーン７は分子量マーカーを示す。

これにより、これらの結果は、ｃ－mycアンチセンス処理がヒト繊維芽細胞により分泌されたプロコラーゲンの量を減少させ、細胞内のプロコラーゲンの量を増加させることを証

明する。
実施例14
Ｃ－MYCアンチセンスオリゴヌクレオチドはヒト皮膚繊維芽細胞における細胞内プロコラーゲンの熱安定性を変化させなかった。
細胞内プロコラーゲンの４次構造はｃ－mycアンチセンス処理により変化されなかった。ヒト繊維芽細胞をオリゴヌクレオチドなし、16μＭスクランブルオリゴヌクレオチド、又は16μＭｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチドのいずれかを含む新鮮な培地で、24時間処理した。各々の実験条件からのプロコラーゲンの融点を、本明細書で議論され、当該技術で周知である方法で測定した。図23は、対照細胞（未処理及びスクランブル処理）及びアンチセンス処理についての融解プロファイルが同様であることを示す。これらの結果は、アンチセンス処理細胞の内側に存在するプロコラーゲンが、対照処理細胞と同じである通常の三重らせん構造を維持していることを証明する。
これにより、ｃ－mycアンチセンス処理は、細胞内デグラデーションの増加又は細胞からのタンパク質輸出を導き得るプロコラーゲン構造の検出可能な変化を導かない。
実施例15
Ｃ－MYCアンチセンスオリゴヌクレオチド処理はヒト皮膚繊維芽細胞中のプロコラーゲンA_1（Ｉ）mRNAレベルを変化させなかった。
本実施例は、ｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチド処理がヒト皮膚繊維芽細胞、特にプロコラーゲンＩによる細胞外マトリックスタンパク質の合成を、プロコラーゲンのmRNAレベルを減少させることにより阻害するわけではないことを証明する。アンチセンス処理は、（20% FBSで処理された）刺激されたヒト皮膚繊維芽細胞のmRNAプロコラーゲンレベルを減少させなかった。
Ａ．プロコラーゲンα_1（Ｉ）mRNAの測定
次のようにRNAを単離して、ノーザン分析を行った。細胞を冷やしたPBS緩衝液で３回、洗浄して４Ｍグアニジウムイソチオシアネート中に溶解した。RNAをフェノール／クロロホルムにより抽出し、260／280nmの分光光度測定の吸光度により定量した。RNAサンプル（20μｇ）を0.8%アガロース－ホルムアルデヒドゲルでの電気泳動により分離した。そのRNAをニトロセルロースフィルターに移した後、ブロットを紫外線照射により固定した。そのブロットを、65℃で少くとも４時間、２×Denhardt's溶液、0.1% SDS及び0.2mg／mlの変性サケ精子DNA中でプレハイブリダイズした。約108～109cpm／μｇの特異活性へのニックトランスレーションにより^{32}ＰDCTPで放射能標識されたcDNAを含む同緩衝液を用いて、一晩、ハイブリダイゼーションを行った。ブロットを、0.5×標準塩類クエン酸溶液及び0.1% SDS中65℃で洗浄した。そのフィルターを１～５日間、増感紙と共に－70℃でKodak－Omatフィルムに露出した。結果として生じたノーザンブロットのオートラジオグラフィーを、スキャニングデンシトメトリー及びピーク領域の一体化により定量した。この研究に用いたプローブは次の通りであった：COOH末端プロペプチドに相当する1.8kbプロ－α１（１）（HF－677）cDNA及びＩ型プロコラーゲンのヒトプロα11（１）鎖の三重らせん領域のカルボキシ末端部分（Chuら、Nucleic Acids Res. 10：5925～5934, 1982）。
Ｂ．プロコラーゲンα_1（Ｉ）mRNAレベルはｃ－mycアンチセンス処理により検出されない。
ヒト繊維芽細胞中のプロコラーゲンαＩのmRNAレベルはｃ－mycアンチセンス処理によって影響を受けなかった。ヒト繊維芽細胞を、24時間、オリゴヌクレオチドなし、16μＭスクランブルオリゴヌクレオチド、又は16μＭ ｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチドのいずれかを含む新鮮な培地で処理した。本明細書に記載され、当該技術で周知であるように、mRNAを各々の実験条件から精製し、プロコラーゲンαＩmRNAの存在について分析した。図24は、対照細胞プロコラーゲンＩmRNA（未処理及びスクランブル処理；各々レーン１及び２）レベルは、アンチセンス処理細胞プロコラーゲンαＩmRNAレベル（レーン３）と同様である。これらの結果は、ヒト繊維芽細胞のｃ－mycアンチセンス処理がプロコラーゲンαＩ遺伝子のmRNA転写を下降制御しないことを証明する。
これにより、本明細書で議論される他の結果と組み合わせて、mRNAの結果は、ｃ－mycア

ンチセンス処理が、細胞外マトリックスにおけるコラーゲンの合成を導くタンパク質であるプロコラーゲンＩ及びIIIの分泌を減少させることを示す。

実施例16

Ｃ－MYCアンチセンスオリゴヌクレオチドはヒト皮膚繊維芽細胞のＣ－MYCアンチセンスオリゴヌクレオチド処理の停止後に、細胞外マトリックスタンパク質の回収を変化させなかった。

ｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチド処理の除去後にＩ型コラーゲンを合成するヒト繊維芽細胞の能力は損なわれなかった。ヒト繊維芽細胞を、24時間、オリゴヌクレオチドなし、16μＭスクランブルオリゴヌクレオチド、又は16μＭ ｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチドのいずれかを含む新鮮な培地で処理した。次に各々の実験条件からのヒト繊維芽細胞をいずれのオリゴヌクレオチドの添加もない新鮮な培地にさらし、本明細書に記載されるように、細胞外Ｉ型コラーゲンの存在についてアッセイした。図25は、対照細胞（未処理及びスクランブルプレ処理）及びアンチセンス処理した細胞が処理の中止後24時間に同様の細胞外Ｉ型コラーゲンのレベルを形成したことを示す。これらの結果は、24時間後に、ｃ－mycアンチセンス処理したヒト繊維芽細胞におけるコラーゲン産生の十分な回収があったことを証明する。

これにより、ｃ－mycアンチセンス処理は、プロコラーゲンの処理前分泌レベルに戻る細胞の能力の欠如をおこすいずれの細胞毒性効果も作り出さなかった。

実施例17

ブタ冠状動脈中の細胞外マトリックスの合成の阻害

本実施例は、組織外傷後の細胞外マトリックス合成の進行を減少させるための局所化したｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチド処理の生体内有効性を更に証明する。本実施例は、内部器官瘢痕形成の進行を減少させ、並びにコラーゲンのような細胞外マトリックス分子の合成に関連する組織瘢痕形成の進行を減少することにおけるｃ－mycアンチセンス処理の生体内有効性も更に証明する。

Ａ．ｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチド処理による細胞外マトリックスフィブリル材料の産生の阻害

細胞外傷後の細胞外マトリックス合成の進展へのｃ－mycアンチセンス処理の効果を決定するために、ブタ心臓を生体内で注入し、（他に示さなければ）実施例８に記載されるようにオリゴヌクレオチドで処理し、オリゴヌクレオチドを送った後３日目、７日目、及び28日目に殺した。実施例８と同じｃ－mycアンチセンス及びセンスオリゴヌクレオチド（配列番号：１及び２）及び投与量（動脈当り１mg）を用いた。

アンチセンス処理したブタからの外傷を与えられた（傷つけられた）冠状脈の断面は、センス処理した外傷を与えられた冠状脈と比較して、微視的細胞外構造に差を示した。各々の実験グループからの外傷を与えた冠状脈を光学顕微鏡で倍率20～62×でブラインドサンプルとして検査した。組織を当該技術で周知であるようにVerhoff－Van－Gieson染色で最重要細胞及び細胞外マトリックスを、当該技術で周知であるように、シリウスレッド染色で最重要コラーゲンを染色した。対照管と比較してより小さなネオインチマ領域を示すｃ－mycアンチセンス処理管も対照管（センス処理）より少い赤色染色を示した。アンチセンス処理した冠状脈は、センス処理した冠状脈に比べてより少い細胞外フィブリル材料を示し；そしてアンチセンス処理した冠状脈はより少い細胞間の細胞外空間を示した。ネオインチマ平滑筋細胞増殖も、バルーン裸化及びブタ冠状動脈内へのｃ－mycセンス（Ｓ）又はアンチセンス（AS）オリゴヌクレオチド（１mg）のカテーテルでの送出後に、PCNA（Proliferating Cell Nuclear Antigen）について免疫染色することを用いて評価した（表４を参照のこと）。冠状脈のアンチセンス処理は、冠状脈のセンス処理と比較して、組織外傷により引きおこされる平滑筋細胞増殖の進行を阻害した。PCNA染色は所定のネオインチマ断面における増殖中の細胞の数の測定を許容した。一般に200～1,000細胞が数えられ、そして増殖中の平滑筋細胞の割合を決定して増殖示数として表した。増殖示数（PI）、ネオインチマ／中膜（Ｉ／Ｍ）比及びＩ／Ｍ比の減少（ΔＩ／Ｍ）は次の通りであった。

表 4

日数	R_x	n	P* (%)	I／M比	ΔI／M (%)
3	S	4	5 ± 2	0.09±0.03	
	AS	8	3 ± 5	0.05±0.02	↓44
7	S	4	47±13	0.28±0.04	
	AS	8	11±13**	0.12±0.05**	↓57
28	S	6	N／A	1.19±0.51	
	AS	4	N／A	0.47±0.30*	↓61

P* －増殖中細胞／細胞総数×100, *p＜0.05, **p＜0.01

Ｉ／Ｍ比の減少を伴う冠状脈は、管腔径が改良された。これらの結果は、局在化したｃ－mycアンチセンス処理が平滑筋細胞増殖及び細胞外マトリックス形成を阻害することを証明する。

これにより、局在化したｃ－mycアンチセンス処理は、平滑筋細胞増殖及び細胞外マトリックス形成により引きおこされるバルーン脈管形成外傷後における冠状脈の瘢痕形成のような外傷組織における瘢痕形成の進行を阻害する。

実施例18

ブタ冠状動脈におけるＣ－MYCアンチセンスオリゴヌクレオチドの迅速な局在化

本実施例は、局部的送出装置を用いて脈管及び結合組織に浸透するｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチドの生体内有効性を証明する。本明細書に議論される他の結果と組み合わせて、これらの結果は、ｃ－mycアンチセンス処理が（３～４時間にわたっておこる）ｃ－myc誘導の始まりから30分以内及びその前に細胞核内に局在化する能力を証明する。冠状動脈の脈管壁への局所的投与後のｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチドの局所的分布は、バルーン脈管形成後の疲痕形成を減少させる。

Ａ．カルボキシフルオレセイン又は^{35}Ｓホスホチオエートのいずれかで標識されたｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチドの局所的送出

本実施例に用いたｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチドを本明細書で議論されるように調製した。ホスホチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド（配列番号：１）は、その方法が引用により本明細書に組み込まれるInversonら、Antisense Res. Dev. ２：211～222（1992）に先に記載されるように、カルボキシフルオロセイン（480nm励起、520nm放射、Molecular Probes, Inc.）で標識された分布の研究に用いたヒトｃ－myc遺伝子の翻訳開始領域に対してのものである。定量的研究のために、オリゴヌクレオチドを1.8×10^8cpm／μmolの特異活性で各々のヌクレオチド間結合において^{35}Ｓ標識した。

家畜の雑種のブタ（Sus scrofa）を用いて、本明細書に記載されるような実験のために調製した。冠状脈口を透視誘導下でFrench SAL１誘導カテーテル（Cordis Corp., Miami, FL）を用いてカニューレを挿入した。ニトログリセリン（100μｇ）の冠状脈内注入の後、ベースラインの冠状脈の血管造影を得た。次に冠状動脈の選択された部分を30秒間、３回（６atm）ふくらませた過剰な大きさのバルーンで裸出（外傷形成）させた。次に、デリバリー装置であるKaplan－Simpson Infusasleeve（Local Med, Palo Alto, CAのもの）を関心の領域への標準脈管形成バルーン（“支持”バルーン）上に進めた。この装置は支持バルーンをふくらませることにより脈管壁に対して並置される複数の側面穴（40μｍ）を含む多ルーメン注入領域（18mm）からなる。研究に用いた装置は剛性の非折りたたみ式チャンネルを用いて溶液を注入する。このデザインは下流への薬剤損失を最小にして薬剤注入及び脈管中の薬剤デリバリー装置の位置の別個の制御を許容する。内部のバルーンカテ

ーテルの完全な膨張の後、注入部分を透視により確実にし、ｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与した。100PSIの外圧下で管腔内注入を行った。注入物の全量は５～６mlであり、40ml／分の外部ポンプにより送り出した。投与量は動脈当り１mgであった。注入を完了した後、装置を除去し、最終的な血管造影図を記録した。オリゴヌクレオチドの送出の正確な条件を確かめるために、選択された冠状動脈の最初の管腔径、オリゴヌクレオチドの送出前（即ち裸化傷害後）及びオリゴヌクレオチド送出後の管腔径を測定するために連続定量的冠状脈アンジオグラフィーを用いた。更に、裸化及び支持バルーンの径をその場で測定した。全ての血管造影測定のための計量装置として誘導カテーテルを用いた。示される時間において、動物にナトリウムペントバルビタール（100mg／kg、静脈内）の致死的投与を行った。

表５に示すように、平均管腔径はベースラインにおいて2.5±0.1mmであった。（裸化としても知られる）過剰サイズのバルーンで冠状動脈傷害を形成した（平均バルーン：動脈比1.1）。バルーンで過剰に引っ張った後、全ての脈管は2.6±0.1mmの平均管腔径を維持した。ｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチドを、管腔内表面又は脈管に直接接触する膨張デリバリー装置で投与した（平均バルーン：動脈比1.0）。

表　5

定量的冠状脈血管造影に基づく脈管造影特性（ｎ＝14）

最初の管腔径（mm）	2.5±0.1
裸化バルーン／動脈比	1.1±0.0
裸化後管腔径（mm）	2.6±0.1
デリバリーバルーン／動脈比	1.0±0.0
デリバリー後の管腔径（mm）	2.6±0.1

Ｂ．オリゴヌクレオチドの送出の量的評価

カテーテルでの送出後の蛍光標識オリゴヌクレオチドの分布を測定するために、冠状動脈を隣接する組織から切除した。脈管腔をPBSで洗った後、その動脈を10％緩衝ホルマリンで６時間、固定してパラフィンに浸漬した。その動脈を連続的４μm厚セクション（18mm注入部分を含む脈管当り50mm）に切断した。注入の部位並びに脈管の近位及び遠位部分の検査は、縦方向のオリゴヌクレオチド分布に関する情報を供した。更に、同じ動物からの非注入冠状動脈を更なる対照とした。そのセクションからパラフィンをとり、SlowFade－Lightアンチフェード試薬（Molecular Probes, Inc. Eugene, OR）で覆った。各々のスライドは、オリゴヌクレオチドの浸透の深さの測定を許容する脈管、外膜周囲組織及び隣接する心筋を含んでいる（図17）。蛍光標識アンチセンスオリゴヌクレオチドを、XF－22フィルターをエピフルオレセンスについて備えたNikon Optiphot顕微鏡下で視覚化した。Kodak Ektachrome P1600フィルムに写真をとった。

試験管内及び生体内の蛍光標識オリゴヌクレオチドの細胞内局在化を分析するために、MRC－600クリプトン－アルゴンレーザー（Bio－Rad）を備えたレーザー走査共焦顕微鏡（モデルZeiss Axiovert 100）を用いた。クリプトン－アルゴンレーザーは励起波長488nmのレーザー線を放射する。誘導された蛍光は、63×対物レンズを通して走査され、コンピュータースクリーン上のディスプレイのためのビデオシグナルに転換される。その像はKodak Ektachrome 100フィルム上のコンピュータースクリーンに写真をとられる。試験管内研究のために、脈管平滑筋細胞によるオリゴヌクレオチドの時間経過を測定するために、10％胎児ウシ血清を含む培地中でチャンバースライド上で２日間、細胞を増殖させ、蛍光標

識オリゴヌクレオチドを２，30分及び２時間加えた（８μｍ）。次に細胞をPBSで３回洗浄し、50%アセトン及び50%メタノール中に固定した。生体内研究のために、上述のように得られた冠状動脈のセクションを、0.4～0.5μｍ光学厚の共焦顕微鏡により分析した。

Ｃ．脈管壁におけるアンチセンスオリゴヌクレオチドの分布

動脈壁におけるオリゴヌクレオチド分布を測定するために、冠状動脈中の局在化を壁内投与後30分及び３日に検査した（ｎ＝４）。蛍光標識オリゴヌクレオチドを注入の領域のみで検出され、遠位セグメント又は非注入冠状動脈においては検出されなかった。30分において、先に行われたバルーン裸化を有する注入されたセグメント内に３つの明らかなオリゴヌクレオチドの焦点パターンが見られた。中膜の全厚に関連する濃密な経壁局在化はよりまばらな外膜及び脈管周囲分布に関連していた。（図27Ａ及び27Ｂ）。各々のセクションにおいて、オリゴヌクレオチドは動脈周辺の部分のみを占めた。サブインチマル（Subintimal）非経壁（nontransmural）パターンが共通であり；それは壁を通しての局在化の間又は注入したセグメントの端のいずれかに散在していた（図27Ｃ及び27Ｄ）。中壁非経壁パターンが少くとも共通しており、経壁局在化に際接して見い出された（図27Ｅ及び27Ｆ）。脈管外膜には、非経壁分布を示すセクション内にアンチセンスオリゴヌクレオチドが全くなかった。

動脈壁における<u>ｃ－myc</u>アンチセンスオリゴヌクレオチド分布における先の脈管損傷の役割も検査した。連続的なスライドの分析は、経壁分布がすぐ隣接したセクションに広がるオリゴヌクレオチド局在化の切断の領域で最も共通していた。サブインチマル非経壁パターンは、脈管の一体性の保護に通常関連していた。３日目において、オリゴヌクレオチドは経壁局在化において明らかに目に見えた（図28Ａ及び28Ｂ）。サブインチマル非経壁分布はオリゴヌクレオチドの洗い落としの結果としてであるようにほとんど明らかでない。30分又は３日のいずれかにある直線的“ジェット様（jet－like）”局在化についての証拠はない。

これらのデータは、圧力誘導のカテーテルの投与後のオリゴヌクレオチドの壁内分布の焦点パターンを集合的に示す。先のバルーン裸化による冠状動脈切断は、オリゴヌクレオチドのエントリー及び経壁分布を容易にするようであった。非経壁パターンはしばしば完全な内部弾性層に関連していた。

Ｄ．冠状動脈内のオリゴヌクレオチドの壁内通行

アンチセンス処理がオリゴヌクレオチド保持を導くか否かを決定するためにその場でのオリゴヌクレオチドの滞留時間を測定した。従って、このことに定量的にとりかかるために、^{35}Ｓ標識<u>ｃ－myc</u>アンチセンスオリゴヌクレオチドをブタ冠状動脈中にカテーテルを通して送り出した。図29に示すように、部位特異的な投与後30分に、組織放射を測定し、それは、17±４cpmの組織バックグラウンドに対して、脈管壁中に2510±1436cpm（ｎ＝６）及び脈管周囲組織中に2163±966cpm（ｎ＝６）のオリゴヌクレオチド成分となった。迅速な血奨クリアランス（$t_{1/2}$15±２㎜）にかかわらず、上述のオリゴヌクレオチドの保持レベルが達成された。30分及び３日の両方における検出されたオリゴヌクレオチドの量は全投与量の約0.1%に相当した。これらの結果は、圧力誘導トランスカテーテルデリバリーが、中膜及び外膜組織、並びに脈管周囲組織におけるアンチセンスオリゴヌクレオチド沈着を導くことを示す。

Ｅ．オリゴヌクレオチドの壁内投与後の脈管一体性

動脈壁へのいずれかの治療剤の圧力誘導トランスカテーテル注入が脈管損傷を誘導し得るので、損傷の程度を測定した。最初に、定量的冠状脈血管造影を用いて、過剰サイズのバルーンでの先の傷害に抵抗しないブタ冠状動脈における14の壁内注入のうち１つにおいて非流動制限冠状脈切断面を観察した。第２に、我々は、壁内オリゴヌクレオチドデリバリー後の管腔径を測定するために、定量的冠状脈血管造影を利用した。トランスカテーテルオリゴヌクレオチド投与後の管腔径に大きな変化はなかった（表５）。第３に、我々は光学顕微鏡を用いてトランスカテーテルオリゴヌクレオチド注入の効果を測定した。これにより、脈管壁の細胞及び細胞外マトリックス構成物の敏感な変化を測定するために、オリゴヌクレオチドの経壁分布での冠状動脈のセクション及び目に見えない切断面を評価した

。図30に示すように、オリゴヌクレオチドの経壁分布（図30Ａ）は完全な内部弾性層及び弾性組織と脈管壁全体を通して関連していた（図30Ｂ）。細胞質染色及び核パイコノシス（pykonosis）のゆるやかな減少が、30分のオリゴヌクレオチド保持の部位で時折注目された（図30Ｃ）。これらの変化はデリバリー後３日では見い出されなかった（図30Ｄ）。

実施例19

試験管内ヒト平滑筋細胞及び生体内ブタ平滑筋細胞におけるＣ－MYCアンチセンスオリゴヌクレオチドの迅速な核局在化

本実施例は、試験管内（ヒト）又は生体内（ブタ）の両方において平滑筋細胞の核におけるｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチドの迅速な局在化を示すことにより、生体内ｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチド処理の有効性を更に証明する。この迅速な時間経過は、時間のオーダー（３～４時間）に基づいて先に確立されたｃ－myc遺伝子活性化の阻害を許容する。

Ａ．カルボキシフルオレセイン標識ｃ－mycアンチセンスオリゴヌクレオチドの細胞内局在化

試験管内での蛍光標識オリゴヌクレオチドの細胞内局在化を分析するために、MRC－600クリプトン－アルゴンレーザー（Bio－Rad）を備えたレーザー走査共焦顕微鏡（モデルZeiss Axiovert 100）を用いた。クリプトン－アルゴンレーザーは、励起波長488nmのレーザー線を放射する。誘導された蛍光は63×対物レンズを通してスキャンされ、コンピュータースクリーン上の表示のための映像シグナルに変換される。その像をKodak Ektachrome 100フィルム上のコンピュータースクリーンが写真をとった。試験管内研究のために、脈管平滑筋細胞によるオリゴヌクレオチド捕集の時間経過を測定するために、２日間、10％胎児ウシ血清を含む培地中でチャンバースライド上で細胞を増殖させ、２，30分及び２時間についてフルオレセイン標識オリゴヌクレオチドを加えた（８μＭ）。次に細胞をPBSで３回、洗浄し、50％アセトン及び50％メタノール中で固定した。

Ｂ．アンチセンスオリゴヌクレオチドの細胞捕集

標的遺伝子、この場合ｃ－mycの発現の阻害を許容するために、アンチセンスオリゴヌクレオチドの壁内デリバリーの後にオリゴヌクレオチドの迅速な細胞の捕集があるはずである。図31に示すように、脈管平滑筋細胞は、フルオレセイン標識オリゴヌクレオチドとのインキュベーションの始まりの後30分に、蛍光の試験管内の選択的核局在化を示す。同様に、ブタへの生体内トランスカテーテル投与後30分に、オリゴヌクレオチドの核局在化が中膜（図32）及び外膜（図33）内に示され、それは生体内でのアンチセンスオリゴヌクレオチドのかなり迅速な捕集を証明する。従って、試験管内及び生体内での脈管平滑筋細胞によるアンチセンスオリゴヌクレオチドの細胞内捕集は、ｃ－mycプロトオンコジーンの調整に利用できる重大な時間窓の間におこり、ここで重要な誘導可能な遺伝子は脈管壁傷害の後の平滑筋細胞増殖を調節する。

配列表

（２）配列番号：１の情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）配列の長さ：15ヌクレオチド

（Ｂ）配列の型：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（xi）配列の記載：配列番号：１：

AACGTTGAGG GGCAT 15

（２）配列番号：２の情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）配列の長さ：15ヌクレオチド

（Ｂ）配列の型：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（xi）配列の記載：配列番号：２：
ATGCCCCTCA ACGTT 15

（２）配列番号：３の情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ：15ヌクレオチド
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（xi）配列の記載：配列番号：３：
AACGTGGATT GGCAG 15

（２）配列番号：４の情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ：15ヌクレオチド
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（xi）配列の記載：配列番号：４：
GAACGGAGAC GGTTT 15

（２）配列番号：５の情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ：24ヌクレオチド
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（xi）配列の記載：配列番号：５：
TATGCTGTGC CGGGGTCTTC GGGC 24

（２）配列番号：６の情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ：19ヌクレオチド
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（xi）配列の記載：配列番号：６：
GGGAGAGTCG CGTCCTTGCT 20

（２）配列番号：７の情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ：20ヌクレオチド
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（xi）配列の記載：配列番号：７：
TCATGGAGCA CCAGGGGCTC 20

（２）配列番号：８の情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ：20ヌクレオチド
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（xi）配列の記載：配列番号：８：

TCATGGAGCA CCAGGGGCTC 20

（２）配列番号：９の情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ：20ヌクレオチド
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（xi）配列の記載：配列番号：９：
GGCCTTTTCA TTGTTTTCCA 20

（２）配列番号：10の情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ：17ヌクレオチド
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（xi）配列の記載：配列番号：10：
CATTGTTTTC CAACTCC 17

（２）配列番号：11の情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ：17ヌクレオチド
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（xi）配列の記載：配列番号：11：
TTCATTGTTT TCCAATT 17

【図１】

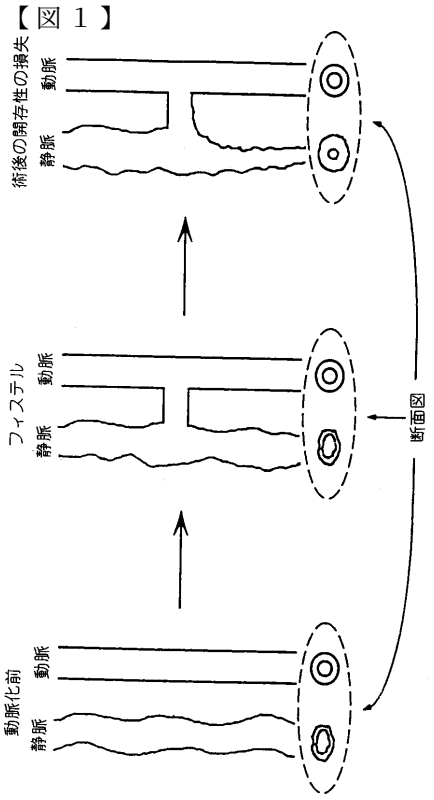


FIG. 1

【図２ａ】

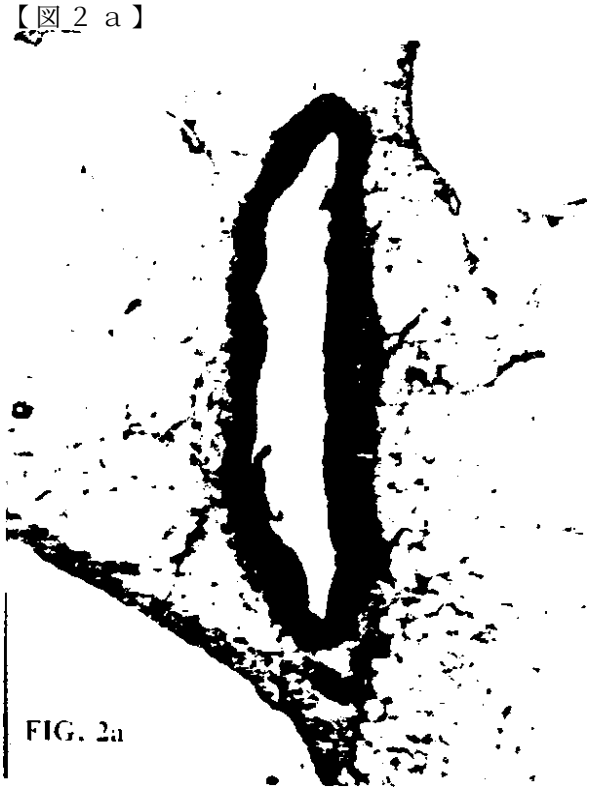


FIG. 2a

【図２ｂ】

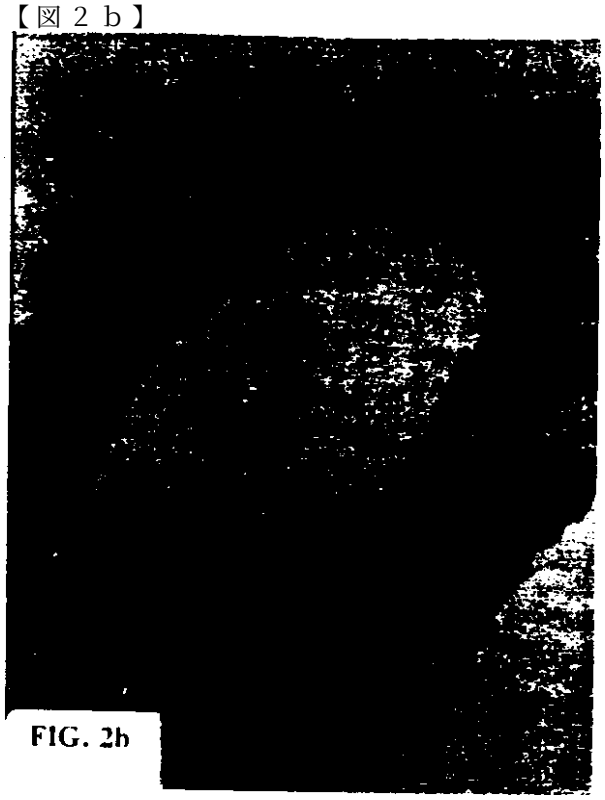


FIG. 2b

【図３ａ】



FIG. 3a

【図３ｂ】



FIG. 3b

【図４ａ】



FIG. 4a

【図４ｂ】

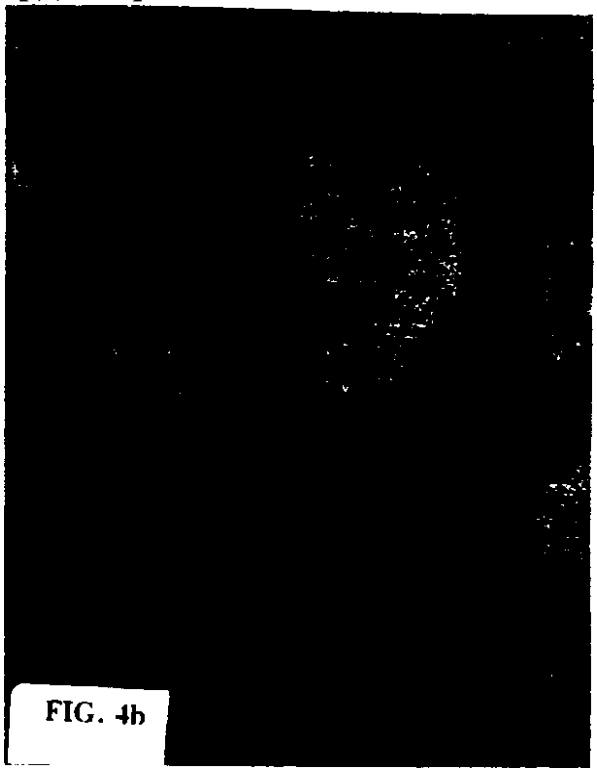


FIG. 4b

【図４ｃ】



FIG. 4c

【図５ａ】

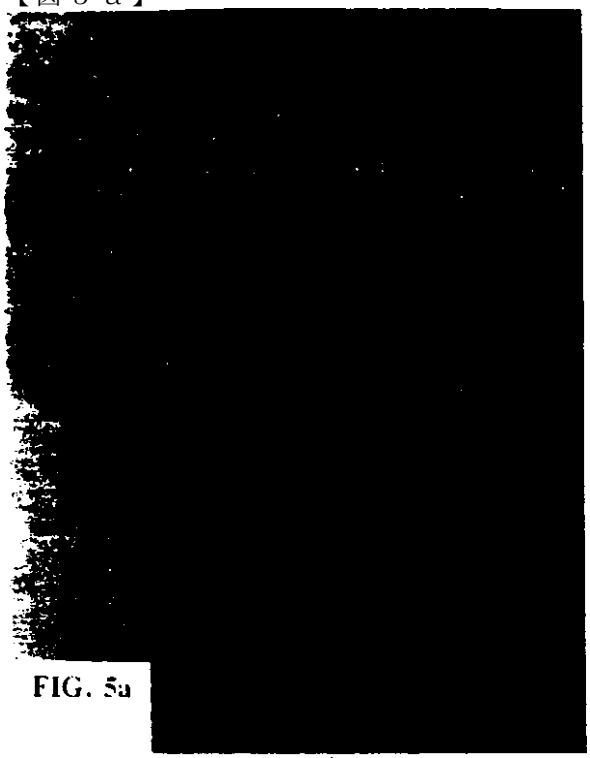


FIG. 5a

【図５ｂ】



FIG. 5b

【図５ｃ】



FIG. 5c

【図６ａ】



FIG. 6a

【図６ｂ】



FIG. 6b

【図６ｃ】

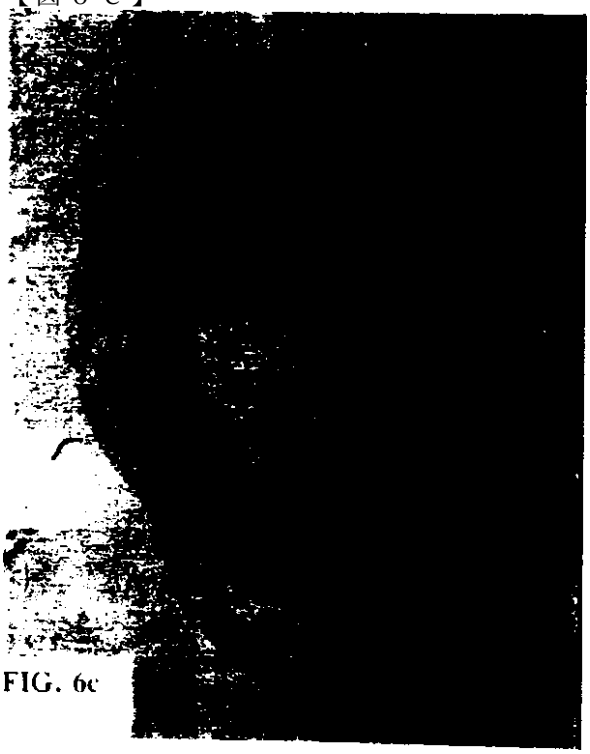


FIG. 6c

【図６ｄ】

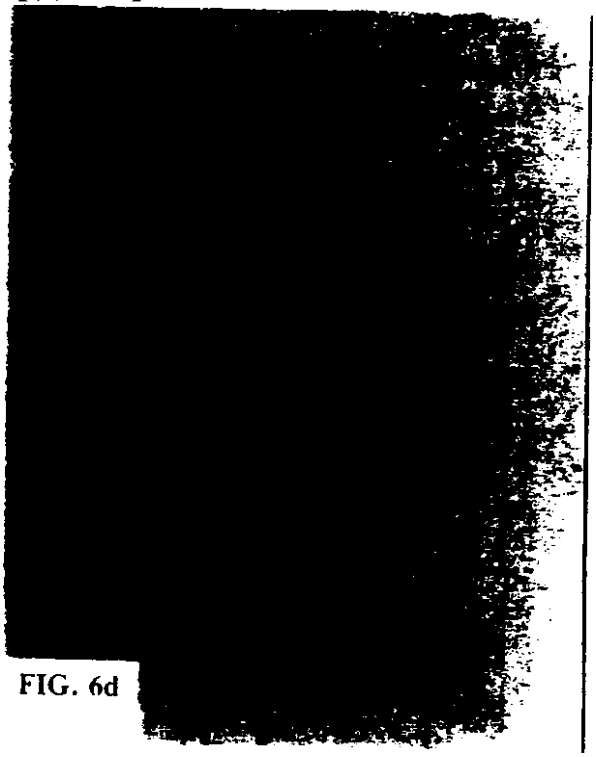


FIG. 6d

【図７ａ】

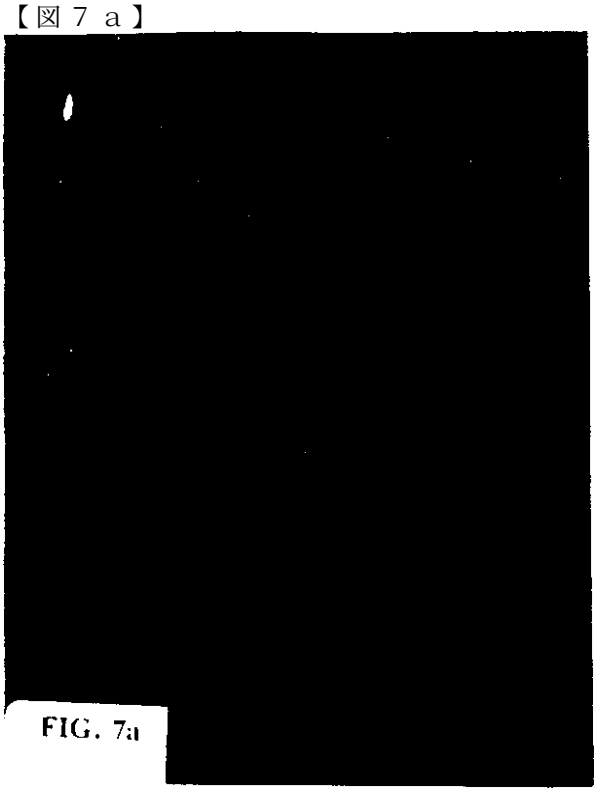


FIG. 7a

【図７ｂ】



FIG. 7b

【図７ｃ】



FIG. 7c

【図８ａ】

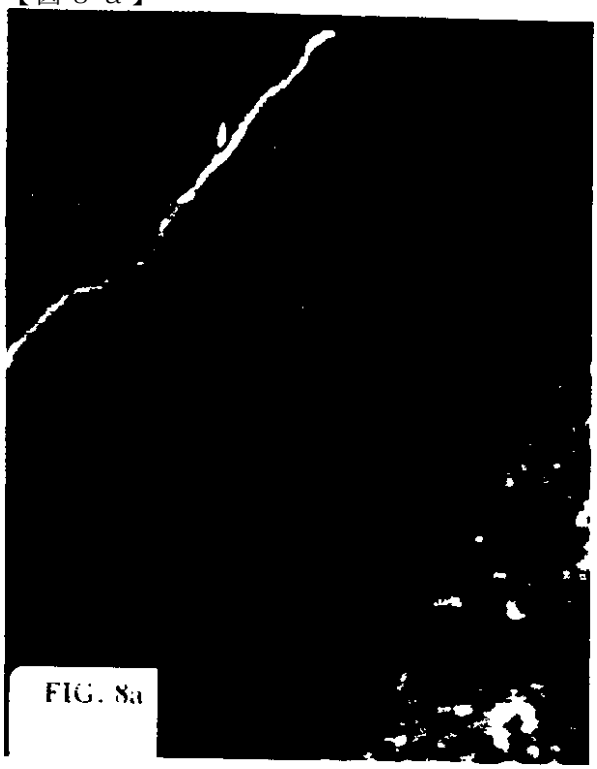


FIG. 8a

【図８ｂ】

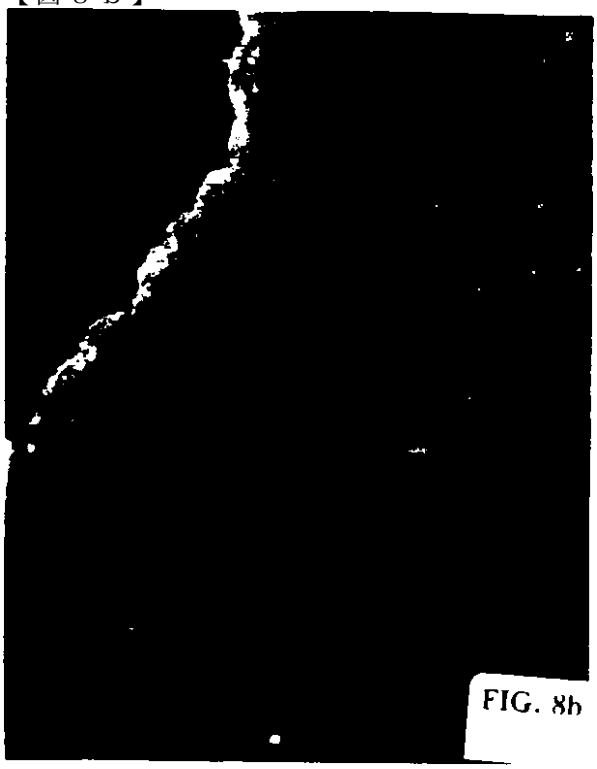


FIG. 8b

【図８ｃ】



FIG. 8c

【図８ｄ】

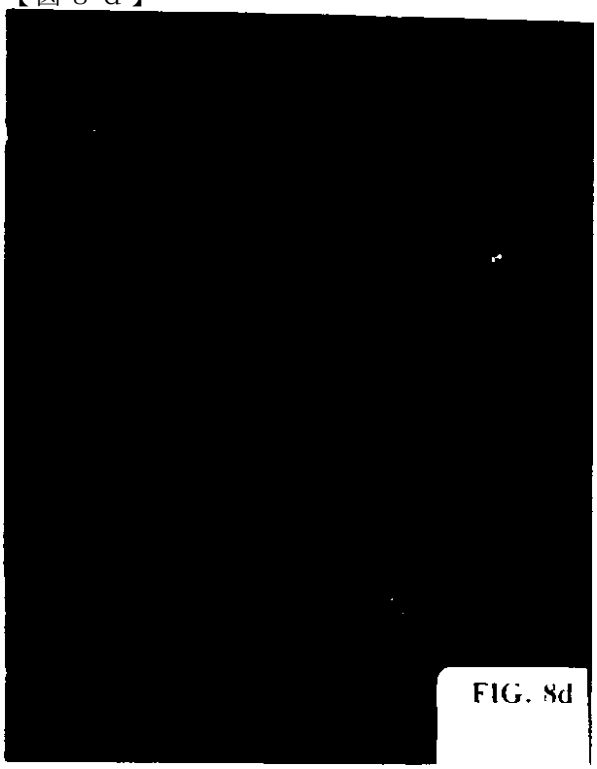


FIG. 8d

【図９ａ】

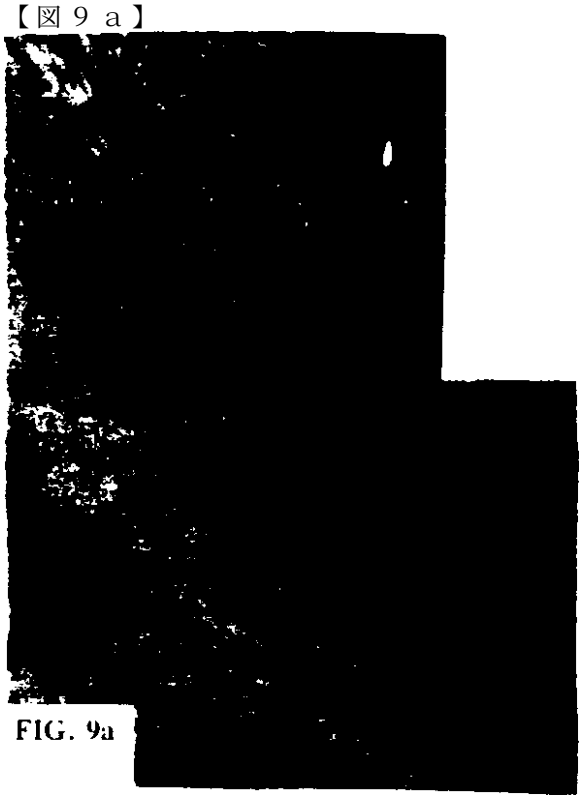


FIG. 9a

【図９ｂ】



FIG. 9b

【図９ｃ】

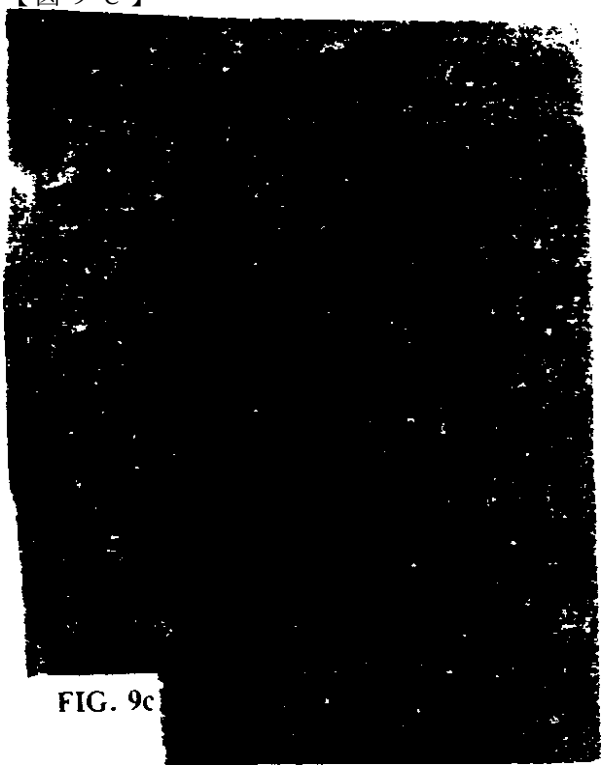


FIG. 9c

【図１０】

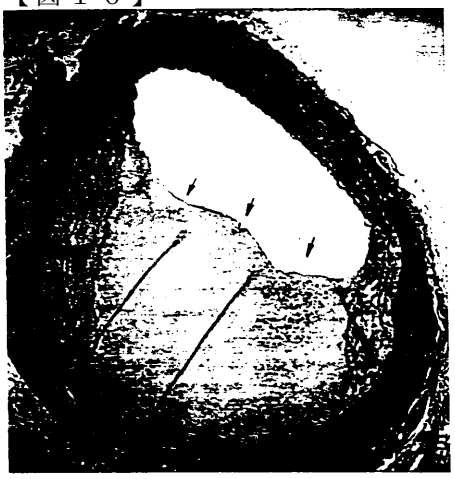


FIG. 10

【図１１】

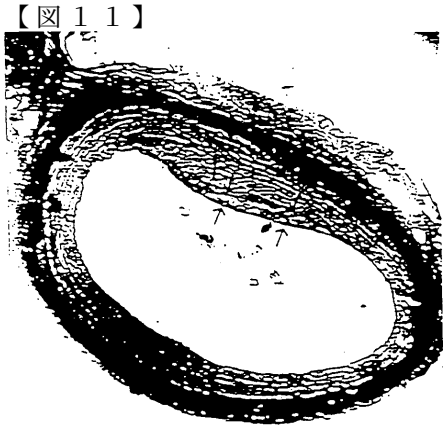


FIG. 11

【図１２】

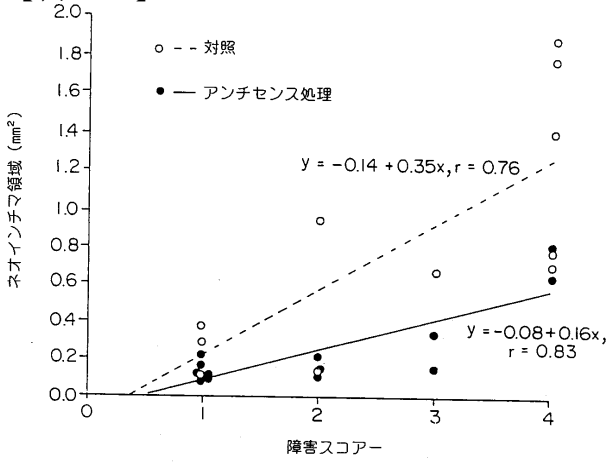


FIG. 12

【図１３】

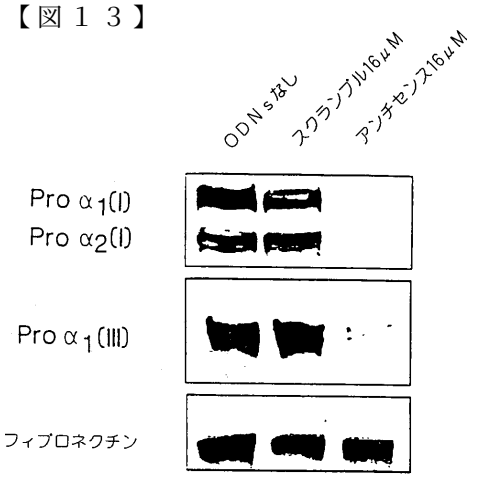


FIG. 13

【図１４】

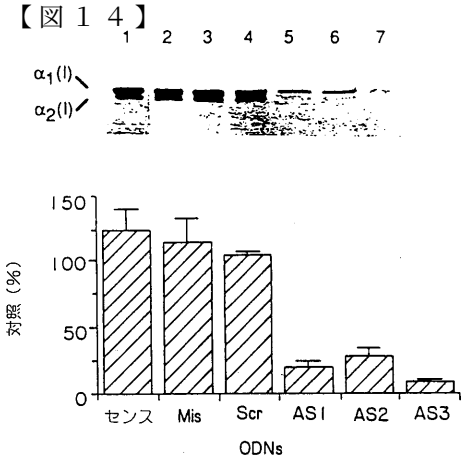


FIG. 14

【図１５】

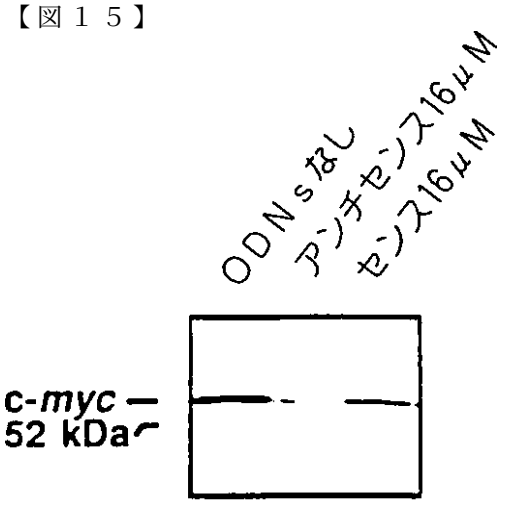


FIG. 15

【図１７】

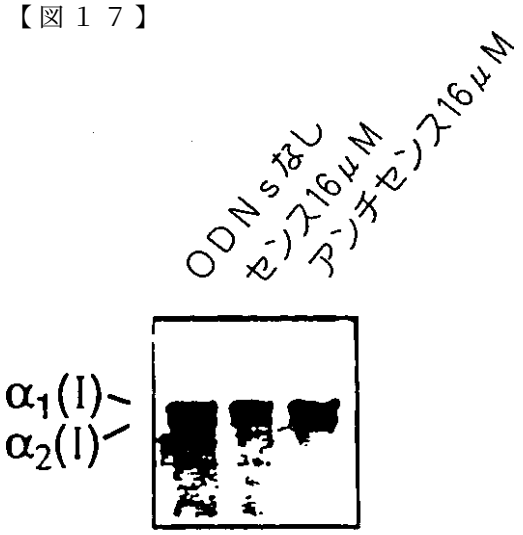


FIG. 17

【図１６】

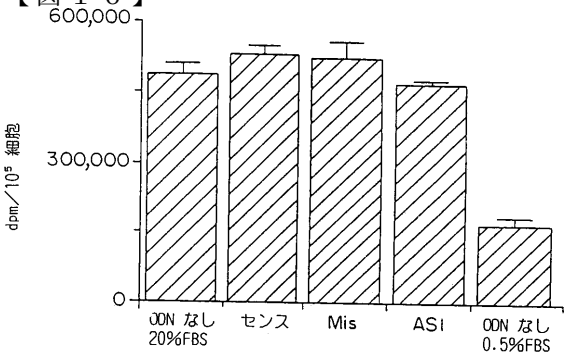


FIG. 16

【図１８】

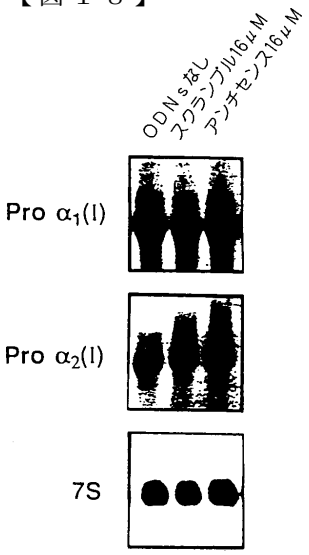


FIG. 18

【図１９】

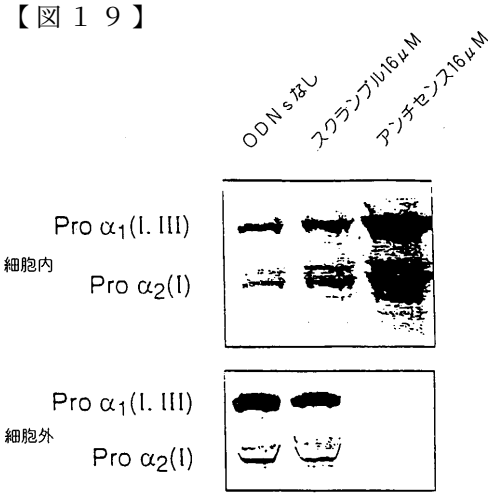


FIG. 19

【図２０】

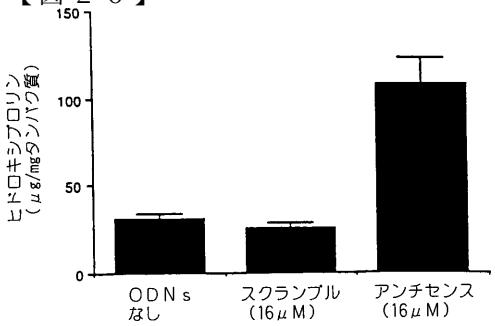


FIG. 20

【図２１】

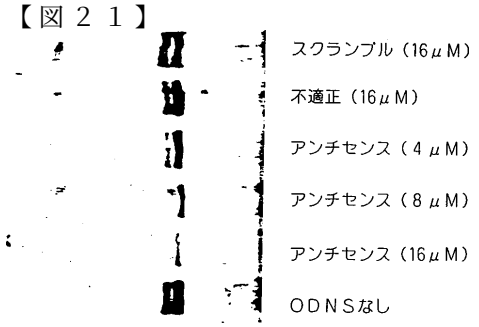


FIG. 21

【図２２】

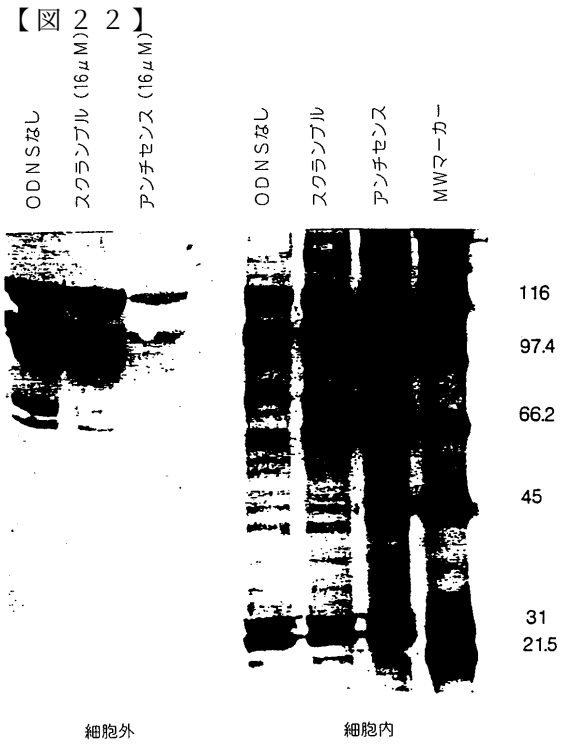


FIG. 22

【図２３】

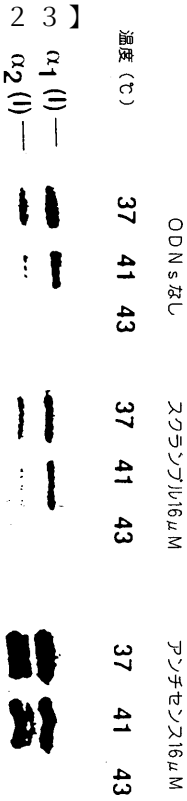


FIG. 23

【図２４】

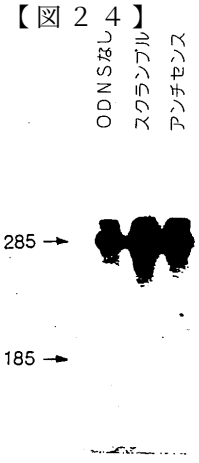


FIG. 24

【図２５】

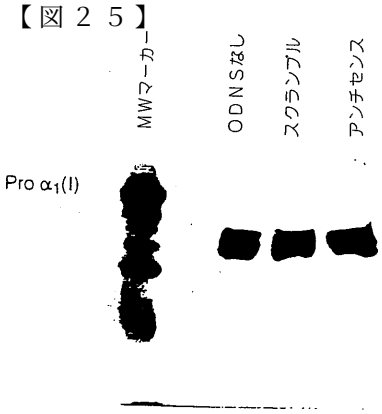


FIG. 25

【図２６】

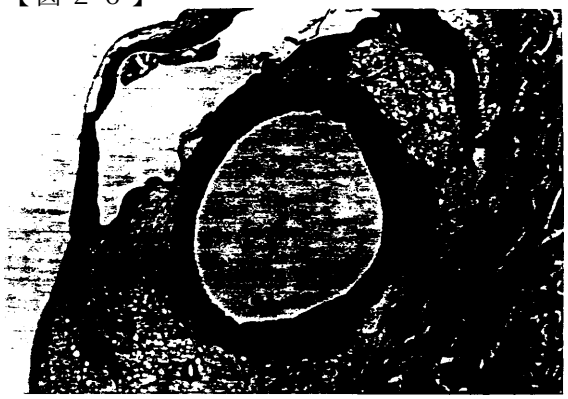


FIG. 26

【図２７Ａ】

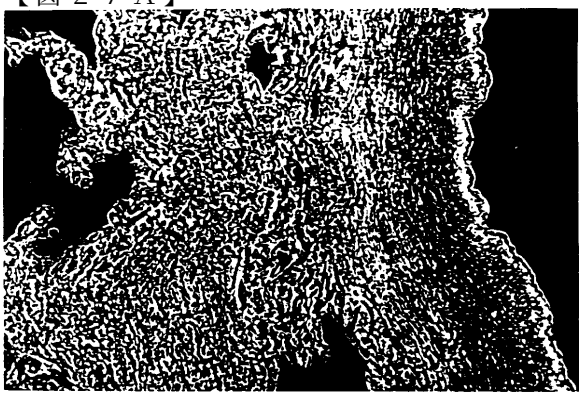


FIG. 27 A

【図２７Ｂ】

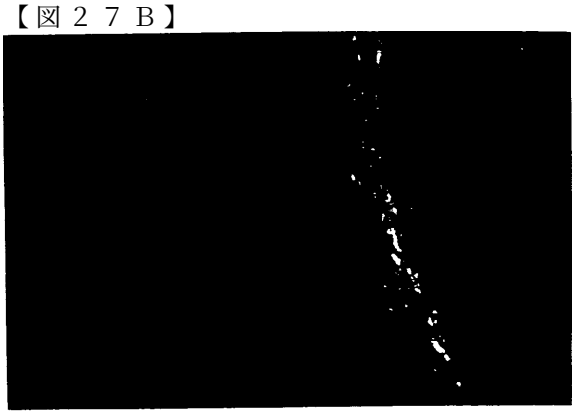


FIG. 27 B

【図２７Ｃ】

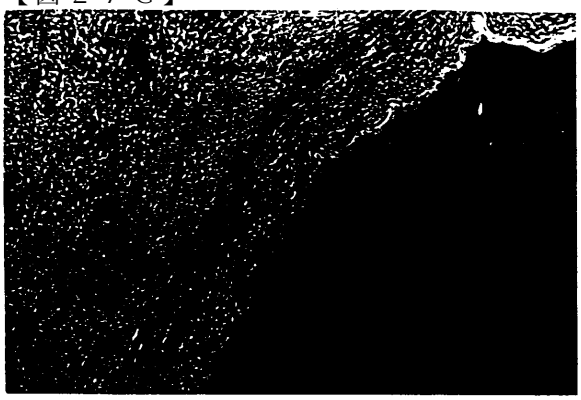


FIG. 27 C

【図２７Ｄ】

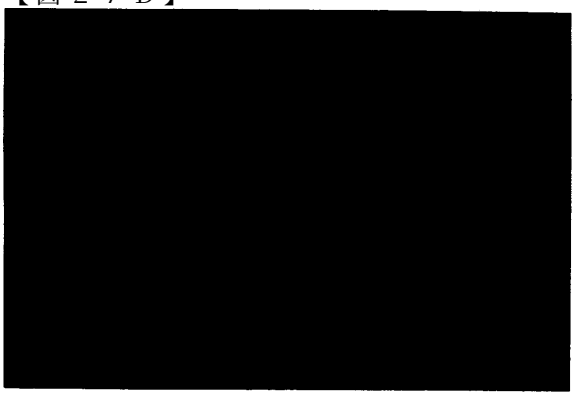


FIG. 27 D

【図２７Ｅ】

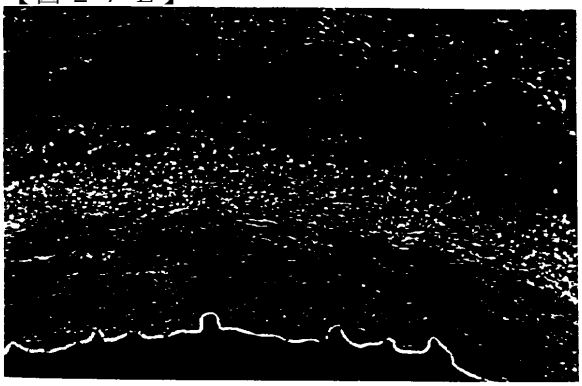


FIG. 27 E

【図２７Ｆ】

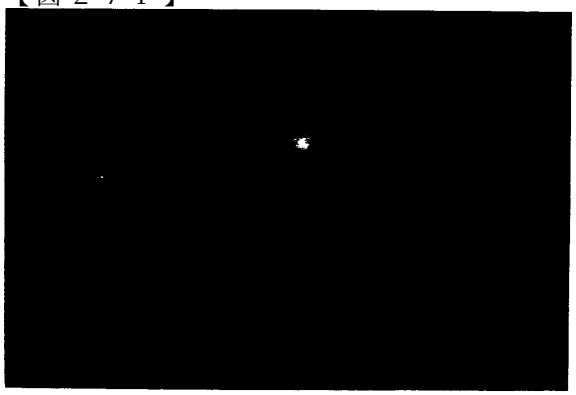


FIG. 27 F

【図２８Ｂ】

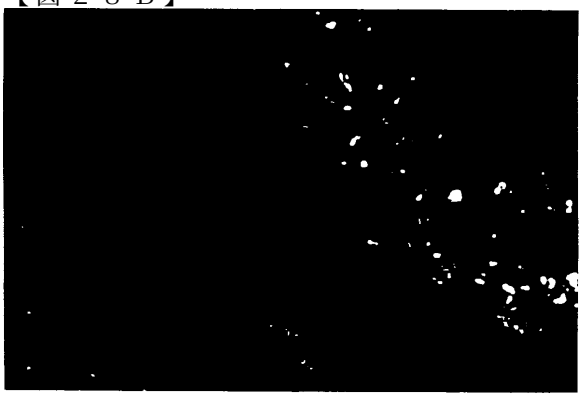


FIG. 28 B

【図２８Ａ】

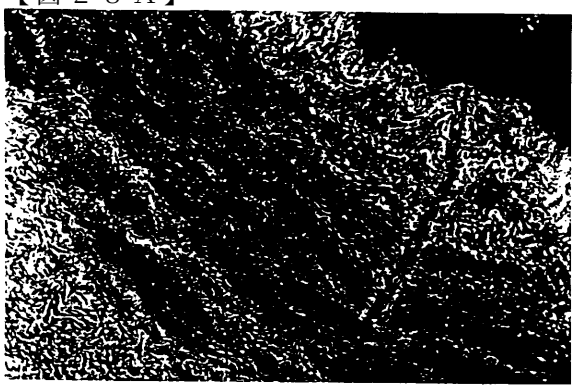


FIG. 28 A

【図２９】

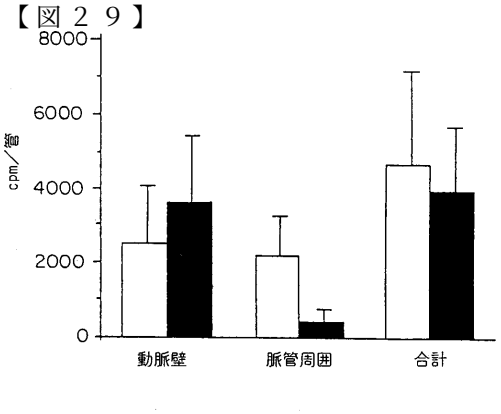


FIG. 29

【図３０Ａ】

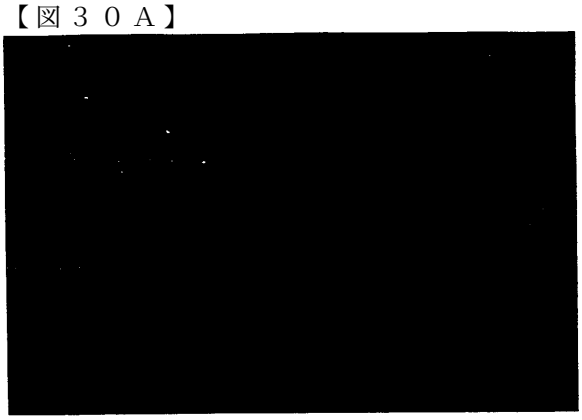


FIG. 30 A

【図３０Ｂ】

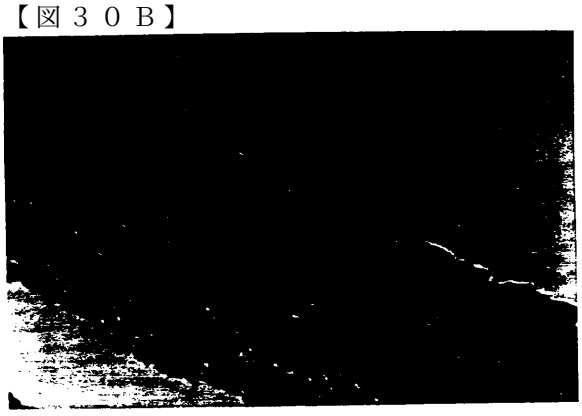


FIG. 30 B

【図３０Ｃ】

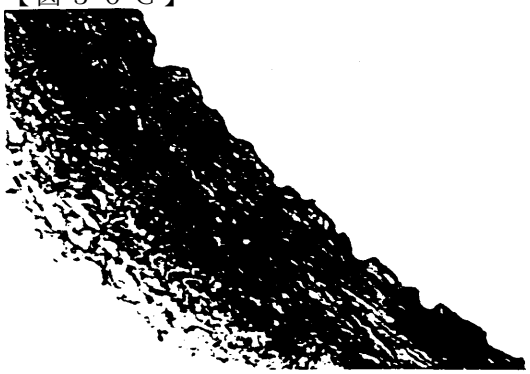


FIG. 30 C

【図３０Ｄ】

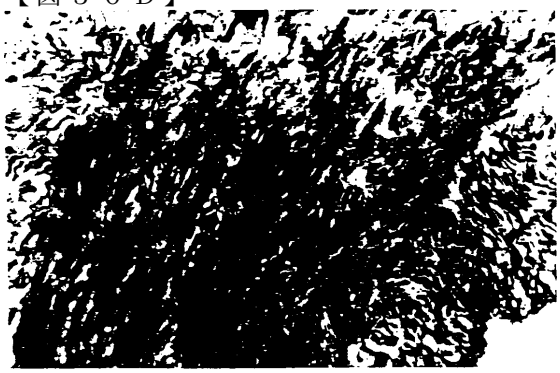


FIG. 30 D

【図３１】



FIG. 31

【図３２】

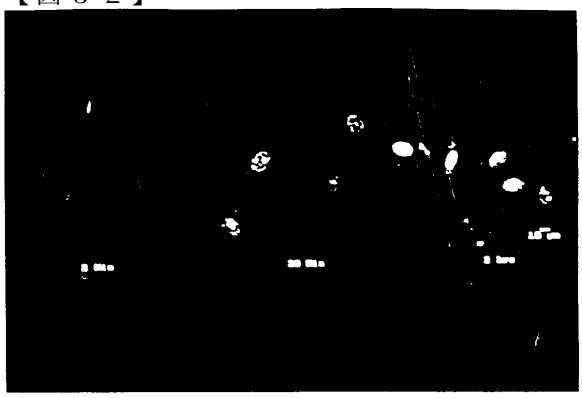


FIG. 32

【図３３】



FIG. 33

フロントページの続き

(72)発明者 ザレスキー，アンドリュー
アメリカ合衆国，ペンシルバニア ２９１１７，エルキンス パーク，エルキンス アベニュ ６１９
(72)発明者 シ，イ
アメリカ合衆国，ペンシルバニア １９０１２，シェルテンハム，ジェンキンタウン ロード ８０３６

審査官 瀬下 浩一

(56)参考文献 国際公開第９４／０１５６４６（WO，Ａ１）
国際公開第９３／００１２８６（WO，Ａ１）
国際公開第９３／００８８４５（WO，Ａ１）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
A61K 48/00
A61K 31/7088
A61L 27/00
A61P 9/00
C12N 15/09
BIOSIS(STN)
CAplus(STN)
EMBASE(STN)
MEDLINE(STN)