

(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2010-207232

(P2010-207232A)

(43) 公開日 平成22年9月24日(2010.9.24)

(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	4 B O 2 4
C O 7 K 14/72 (2006.01)	C O 7 K 14/72	4 H O 4 5

審査請求 有 請求項の数 4 O L (全 75 頁)

(21) 出願番号	特願2010-100138 (P2010-100138)	(71) 出願人	505422028
(22) 出願日	平成22年4月23日 (2010.4.23)		アイシス ファーマシューティカルズ インコーポレイティッド
(62) 分割の表示	特願2006-551429 (P2006-551429) の分割		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 カールズバッド ラザーフォード ロード 1 8 9 6
原出願日	平成17年1月20日 (2005.1.20)	(74) 代理人	100095832
(31) 優先権主張番号	60/538, 173		弁理士 細田 芳徳
(32) 優先日	平成16年1月20日 (2004.1.20)	(72) 発明者	バノット, サンジェイ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 0 9 カールズバッド, パセオ アリソ 7 9 7 5
(31) 優先権主張番号	60/550, 191		
(32) 優先日	平成16年3月3日 (2004.3.3)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(特許庁注: 以下のものは登録商標)			
1. U N I X			
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 グルココルチコイドレセプター発現の調節

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】肝臓のグルココルチコイドレセプターを効果的に阻害し得る薬剤を提供すること。

【解決手段】グルココルチコイドレセプターをコードする核酸分子を標的とする8~80核酸塩基長のアンチセンス化合物であって、前記化合物がグルココルチコイドレセプターをコードする前記核酸分子に相補的であり、前記化合物がグルココルチコイドレセプターmRNAの発現を阻害し、前記アンチセンス化合物が特定の配列を含む、アンチセンス化合物。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

グルココルチコイドレセプターをコードする核酸分子を標的とする8~80核酸塩基長のアンチセンス化合物であって、前記化合物がグルココルチコイドレセプターをコードする前記核酸分子に相補的であり、前記化合物がグルココルチコイドレセプターmRNAの発現を阻害し、前記アンチセンス化合物が配列番号32、33、34、36、37、39、40、43、44、46、48、50、51、52、53、54、55、57、58、59、60、61、62、63、65、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、179、182、183、185、186、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、202、203、204、206、208、209、210、211、212、213、214、216、221、222、223、224、225、226、227、228、232、233、234、236、237、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、280、281、282、283、284、285、286、287、291、292、293、294、295、298、299、306、307、308、309または310の少なくとも8核酸塩基部分を含む、アンチセンス化合物。

10

20

【請求項 2】

グルココルチコイドレセプターをコードする核酸分子を標的とする8~80核酸塩基長のアンチセンス化合物であって、前記化合物がグルココルチコイドレセプターをコードする前記核酸分子に相補的であり、前記化合物がグルココルチコイドレセプターmRNAの発現を阻害し、前記アンチセンス化合物が配列番号32、33、34、36、37、39、40、43、44、46、48、50、51、52、53、54、55、57、58、59、60、61、62、63、65、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、179、182、183、185、186、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、202、203、204、206、208、209、210、211、212、213、214、216、221、222、223、224、225、226、227、228、232、233、234、236、237、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、25

30

40

50

3、254、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、280、281、282、283、284、285、286、287、291、292、293、294、295、298、299、306、307、308、309および310からなる群より選択される配列を有する、アンチセンス化合物。

【請求項3】

配列番号36、50、60、71、72、73、78、100、306、307、308、309または310の核酸塩基配列を有する、アンチセンス化合物。

【請求項4】

配列番号4の全ての5' UTRのヌクレオチド13~119、開始コドン領域のヌクレオチド114~151、コード領域のヌクレオチド351~533、667~845、877~1243、1356~1488、1552~1756、1819~1999、2008~2139、2146~2194、2201~2301、もしくは2386~2416、または3' UTRのヌクレオチド2488~2685、2723~3435、3499~3789、3826~3860、3886~3905、3918~3937、4031~4072、4082~4193もしくは4244~4758；または配列番号25の3' UTRのヌクレオチド104562~104648を標的とする、ヒトグルココルチコイドレセプターをコードする核酸分子を標的とする8~80核酸塩基長のアンチセンス化合物。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

本発明は、グルココルチコイドレセプターの発現を調節する組成物および方法を提供する。特に、本発明はアンチセンス化合物、特にオリゴヌクレオチド化合物に関し、好ましい態様においてグルココルチコイドレセプターをコードする核酸分子とハイブリダイズする。かかる化合物は本明細書中に示され、グルココルチコイドレセプターの発現を調節する。

【背景技術】

【0002】

(背景)

グルココルチコイドは同定された第一のステロイドホルモンの一つであって、糖新生の刺激、グルコースの取り込みの減少および末梢組織での利用、グリコーゲンの沈着の増大、免疫および炎症反応の抑制、サイトカイン合成の阻害ならびに種々の発生における事象の促進が挙げられる多様な生理的機能の原因である。グルココルチコイドはまた、ストレス応答に特に重要である。ストレス誘導性のグルココルチコイド合成および放出の増加により、他の反応の中でも消化器官の作業量の増大、炎症性メディエーターの阻害、サイトカイン合成の阻害、およびグルコース産生の増大がもたらされる(非特許文献1)。

30

【0003】

天然のグルココルチコイドおよびその合成誘導体は共に、遍在的に発現する細胞質要員の核ホルモンスーパーファミリーのレセプターであるグルココルチコイドレセプターを介してその機能を発揮する。ヒトグルココルチコイドレセプターをコードする相補的なDNAクローン(核レセプターサブファミリー3、グループC、メンバー1；NR3C1；GCCR；GCR；GRL；グルココルチコイドレセプター、リンパ球としても公知)は、1985年に初めて単離された(非特許文献2；非特許文献3)。該遺伝子はヒト染色体5q11-q13に位置し、9個のエクソンからなる(非特許文献4；非特許文献5)。ヒトグルココルチコイドレセプターmRNAの多様な形態には：エクソン1~8およびエクソン9 α を含有する5.5 kbヒトグルココルチコイドレセプター α cDNA；エクソン1~8およびエクソン9 β を含有する4.3 kbヒトグルココルチコイドレセプター β cDNA；ならびにエクソン1~8および完全なエクソン9を含有する7.0 kbヒトグルココルチコイドレセプター α cDNAが存在し、これはエクソン9 α 、エクソン9 β ならびにエクソン9 α および9 β を両側に配置する「J領域」を含む(非特許文献2；非特許文献6)。ヒトグルココルチコイドレセプター α は、レセプターの優性なアイソフォームであり、ステロイド結合活性を示す(非特許文献2)。さらに、三つの異なるブ

40

50

ロモーターにより、三つの異なるエクソン1が転写され得、あるエクソン1のバリエーションの選択的スプライシングにより、このエクソンの三つの異なる翻訳産物が生じ得る。このように、ヒトグルココルチコイドレセプター-mRNAは、エクソン1の五つの異なる翻訳産物を含有し得る（非特許文献7）。

【0004】

ヒトグルココルチコイドレセプター-mRNAの α および β アイソフォームの発現パターンの検査により、 α アイソフォームがより豊富に発現することが実証される。両アイソフォームは、肺、腎臓、心臓、肝臓、骨格筋、マクロファージ、好中球および末梢血単核細胞が含まれる、同様の組織ならびに細胞の種類で発現する。ヒトグルココルチコイドレセプター α のみが結腸に発現する。タンパク質のレベルについて、 α アイソフォームは検査される全ての組織に検出されるが、 β アイソフォームは検出されず、生理的条件下でデフォルトスプライシング経路が α アイソフォームを産生することが示唆される（非特許文献8）。グルココルチコイドレセプターの β アイソフォームは、グルココルチコイドアゴニストまたはアンタゴニストのいずれにも結合しない。さらに β アイソフォームは、ホルモン刺激に関係なく、まずトランスフェクションされた細胞の核に局在する。両アイソフォームが同一の細胞に発現した際に、グルココルチコイドレセプター β は、ホルモン誘導性のグルココルチコイドレセプター α を介した遺伝子発現の刺激を阻害し、このことは β アイソフォームがグルココルチコイドレセプター α 活性の阻害剤として機能することを示唆する（非特許文献6）。他の方法で示されなければ、本明細書中に記載されるヒトグルココルチコイドレセプターは染色体5q11-q13に位置する遺伝子の偏在的な産物として規定される。

10

20

【0005】

ヒトグルココルチコイドレセプターは三つの主要なドメイン、N末端の活性化ドメイン、中央のDNA結合ドメインおよびC末端のリガンド結合ドメインより構成される（非特許文献9）。リガンド非存在下では、グルココルチコイドレセプターは、数個の他のタンパク質と共に巨大なヘテロマー複合体を形成し、リガンドと結合する際には解離する。この複合体中で熱ショックタンパク質90（hsp90）は重要な役割を担い、レセプターをステロイドに結合できるコンフォメーション中に保持し転写を活性化できなくする（非特許文献10）。グルココルチコイドレセプターはリガンドの非存在下でリン酸化され、アンチグルココルチコイド化合物RU-486等のアンタゴニストではなく、ステロイド等のアゴニストとの結合後に過リン酸化される（非特許文献11）。

30

【0006】

リン酸化グルココルチコイドレセプターは次いで、核局在に関係のある二つのドメイン（DNA結合ドメインおよびリガンド結合ドメインを架橋する領域に局在するNL1、ならびに完全にリガンド結合ドメイン中に局在するNL2）の機能を介して核に移行する。NL1の機能はリガンド結合ドメインにより阻害され、この阻害はリガンドの結合により排除され得る（非特許文献12）。核移行はホルモン依存的な様式で起こる。

【0007】

一度活性化されると、グルココルチコイドレセプターはホモダイマーを形成する。精製された活性化グルココルチコイドレセプターの研究により、DNAの存在下および非存在下でホモダイマーとして存在することが明らかとなり、このことからDNA結合以前に二量体化が起こることが示唆される（非特許文献13）。二量体化されたグルココルチコイドレセプターは、ターゲット配列中のグルココルチコイド反応エレメント（GRE）と名付けられた特異的なパ lindロームDNA配列に結合し、結果的に転写に影響する（非特許文献14）。特にチロシンアミノトランスフェラーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼおよびフォスフォエノールピルベートカルボキシナーゼ（PEPCK）遺伝子の調節領域は、転写の促進に寄与するポジティブGREを含有する。ポジティブGREへの結合後の転写の活性化に加えて、グルココルチコイドレセプターはまた、転写を抑制するネガティブGREへの結合を介するかまたはグルココルチコイドレセプターと他の転写因子との相互作用による転写の干渉を介して転写の抑制もし得る（非特許文献1）。後者はDNAへの結合に関係しない

40

50

活性である。従って、グルココルチコイドレセプターは、DNA非依存的およびDNA依存的なメカニズムの両方を介して転写に影響し得る。グルココルチコイドレセプターの欠損マウスにおける生存能力の欠如により説明されるように、グルココルチコイドレセプター遺伝子それ自体は、生存に必要不可欠であるが、グルココルチコイドレセプターのDNA結合活性は生存に必要不可欠ではない。二量体化を損ない、結果的にGRE依存的トランスアクチベーションを損なうような、グルココルチコイドレセプターの点変異を有するマウスは生存可能であり、このことからインビボにおけるグルココルチコイドレセプターのDNA結合非依存的活性の関連性が明らかとなる（非特許文献15）。

【0008】

グルココルチコイドレセプターの偏在的な発現、ならびに転写を活性化および抑制するその能力のために、グルココルチコイドレセプターはしばしば転写の特異性に寄与するコファクターを必要とする。あるコファクターは、基礎的な転写機構の会合またはクロマチンのリモデリングを介して転写を促進する。CREB結合タンパク質（CBP）およびその相同体p300は、グルココルチコイドレセプターのコアアクチベーターとして機能し、グルココルチコイドレセプター反応遺伝子の転写を促進する（非特許文献16）。コアアクチベーターの別のクラスには、ビタミンDレセプター相互作用タンパク質（DRIP）DRIP150およびDRIP205が含まれ、その両方はグルココルチコイドレセプターの転写活性化を促進する（非特許文献17）。ヒトグルココルチコイドレセプターもまた、クロマチンからヒストンH1を除去し一般的な転写因子の結合部位への接触を可能にするクロマチンリモデリング複合体BRGに関連する（非特許文献18）。この場合、グルココルチコイドレセプターは、BRG複合体のサブユニットであるBRG関連因子BAF250との相互作用を介して、BRG複合体をプロモーターに会合させる。一度プロモーターに付随すると、BRGはクロマチンのリモデリングを誘導し、転写が促進する（非特許文献19；非特許文献20）。その活性がグルココルチコイドレセプターによりネガティブに制御される転写因子はNF- κ Bである。グルココルチコイドレセプターのリガンドであるデキサメタゾンは、グルココルチコイドレセプターのNF- κ B p65サブユニット（インターロイキン6プロモーターの活性を阻害する）への結合を促進する（非特許文献21）。

【0009】

相補的なグルココルチコイドレセプターのアンチセンスRNA鎖をトランスフェクションされた細胞株は、グルココルチコイドレセプターmRNAレベルの減少を示し、グルココルチコイドレセプターアゴニストのデキサメタゾンに対する反応を減少させた（非特許文献22）。アンチセンスグルココルチコイドレセプター遺伝子コンストラクトを有するトランスジェニックマウスを用いて、視床下部-下垂体-腎臓の軸におけるグルココルチコイドフィードバック効果が研究された（非特許文献23）。同様に遺伝的に改変されたマウスの別の研究において、エネルギーの取り込みおよび消費、心臓および外側広筋のリボタンパク質リパーゼ活性、ならびに心臓および褐色脂肪組織のノルエピネフリンは対照動物よりも低かった。逆に、脂肪含量および全体エネルギーは対照動物よりも有意に高かった。これらの結果により、グルココルチコイドレセプター系の欠損がエネルギー効率の増加を介してエネルギーバランスに影響し得ることが示唆され、筋肉リボタンパク質リパーゼにおける視床下部-下垂体-腎臓の軸の変化の調節効果を強調する（非特許文献24）。

【0010】

不安、学習および記憶の評価のためにデザインされた動物モデルにおいて、グルココルチコイドレセプターアンタゴニストの行動上の効果を測定する。グルココルチコイドレセプターmRNAを標的とするアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドを長期間、脳室内に浸出させたラットにおける、グルココルチコイドレセプターの発現の減少により、Morris水迷路試験における空間認識（spatial navigation）は妨害されなかった（非特許文献25）。グルココルチコイドレセプターmRNAを標的とするアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドのラット海馬の歯状回への左右対称注入によりPorsolt強制水泳試験におけるラットの不動性（immobility）が減少した（非特許文献26）。

【0011】

10

20

30

40

50

グルココルチコイドは、アレルギー、喘息（asthma）、慢性関節リウマチ、エイズ、全身性エリマトーデスおよび変形性関節症等の疾患の処置における抗炎症効果の免疫抑制剤として頻繁に使用される。グルココルチコイドレセプターとNF- κ Bとの相互作用により引き起こされるような遺伝子発現の負の制御は、少なくとも部分的に、インビボにおけるグルココルチコイドの抗炎症性作用が原因であると考えられている。インターロイキン6、腫瘍壊死因子 α およびインターロイキン1は、炎症性のストレスの際の視床下部-下垂体-腎臓（HPA）の軸の刺激のほとんどの原因である三つのサイトカインである。HPA軸ならびに全身性の交感神経系および副腎髄質系は、ストレス系の末梢構成物であり、基本的なホメオスタシスおよびストレス関連性ホメオスタシスの原因である。HPA軸の最終産物であるグルココルチコイドは、三つの炎症性サイトカイン全ての産生を阻害し、グルココルチコイドと共に急性期反応物の産生を相乗的に刺激するインターロイキン6以外の、標的組織におけるサイトカインの作用もまた阻害する。グルココルチコイド処理により、HPA軸の活性が減少する（非特許文献27）。

【0012】

いくつかの場合において、患者はグルココルチコイド処理に対して抵抗力がある。ステロイドに対するこの抵抗性については、グルココルチコイドレセプター遺伝子中に変異または多型が存在するためである。グルココルチコイド抵抗性に関連のあるNR3C1遺伝子中に、15個のミスセンス、3個のナンセンス、3個のフレームシフト、1個のスプライス部位および2個の選択的スプライス変異、ならびに16個の多型が報告されている（非特許文献28）。ヒトにおけるさらなる研究により、グルココルチコイドレセプター（GR）遺伝子の対立遺伝子を伴う代謝症候群の発病と進行との明確な関係が示唆されている（非特許文献29）。

【0013】

グルココルチコイド無反応性の他の場合は、グルココルチコイドレセプターアイソフォームの選択的な発現に関係している。グルココルチコイド抵抗性を有する潰瘍性大腸炎の患者におけるヒトグルココルチコイドレセプター β 同位体mRNA発現の研究により、グルココルチコイド感受性の患者よりも有意に高いこのmRNAの存在が明らかとなり、末梢血液単核細胞におけるヒトグルココルチコイドレセプター β mRNAの発現が潰瘍性大腸炎におけるグルココルチコイドの反応の予測を提供し得ることが示唆される（非特許文献30）。グルココルチコイド無反応性喘息の有意に多数において、グルココルチコイドレセプター β の増大した発現もまた観察された。また、グルココルチコイドレセプターのDNA結合能におけるサイトカイン誘導性の異常が、グルココルチコイド無反応性の患者のトランスフェクション由来の末梢血単核細胞およびグルココルチコイドレセプター α DNA結合能の有意な減少を生じるグルココルチコイドレセプター β 遺伝子を有するHepG2細胞において見られる（非特許文献31）。デキサメタゾン結合試験により、ヒトグルココルチコイドレセプター β はホルモン性のリガンドに対するグルココルチコイドレセプター α の親和性を変化させずに、むしろGREに対する結合能を変化させることが示される（非特許文献32）。それと共に、これらの結果により、GRE標的部位に対するグルココルチコイドレセプター α との競合を通じてグルココルチコイドレセプター β が、生理学および異常生理学に関連のあるグルココルチコイド作用の内在性阻害剤として機能し得ることが説明される。

【0014】

肝臓において、グルココルチコイドアゴニストは、グルココルチコイドレセプターを活性化することにより肝臓でのグルコースの産生を増大させ、これは続いて糖新生の酵素、ホスホエノールピルベートカルボキシキナーゼ（PEPCK）およびグルコース6ホスファターゼの発現の増加を引き起こす。糖新生を通じて、ラクテート、ピルベートおよびアラニン等の非六炭糖型の前駆物質を通じてグルコースが形成される（非特許文献33）。RU486等のステロイド性のグルココルチコイドレセプターアンタゴニストが、糖尿病のげっ歯類モデルにおいて試験されている。db/dbマウスと称されるレプチンレセプター遺伝子欠損マウスは遺伝的に肥満であり、糖尿病であり、インスリン過剰である。RU486による高血

10

20

30

40

50

糖症db/dbマウスの処置により、血漿インスリンレベルに影響することなく、血中グルコースレベルがおよそ49%減少した。また、RU486処置により、db/dbマウスでは未処理動物と比較して、グルココルチコイドレセプター反応性遺伝子PEPCK、グルコース6ホスファターゼ、グルコーストランスポーター2型およびチロシンアミノトランスフェラーゼの発現が減少した（非特許文献34）。血清インスリンおよび血中グルコースの減少により、糖尿病、肥満および高インスリン血症のob/obマウスモデルにおいて、RU486も糖尿病を改善する（非特許文献35）。

【0015】

糖新生の増大が糖尿病におけるグルコース産生の増大の主要な原因であると考えられるので、肝臓のグルコース産生の阻害についての多くの治療の標的が調査されている。動物モデルにおける糖尿病を改善するグルココルチコイドレセプターのアンタゴニストの能力のために、かかる化合物が、診査されている潜在的な治療の一つである。しかしながら、グルココルチコイドレセプターアンタゴニストには、HPA軸の活性化が含まれるような有害な全身性の効果がある（非特許文献33）。HPA軸活性の増大は免疫関連の炎症性作用の抑制に関連しており、これは感染因子および新生物に対する感受性を増加し得る。HPA軸、またはその標的組織の欠損による免疫媒介性の炎症の抑制に関連する病状としては、クッシング氏症候群、慢性ストレス、慢性アルコール中毒および鬱病による落ち込みが挙げられる（非特許文献27）。従って、肝臓特異的なグルココルチコイドレセプターアンタゴニストを開発する大きな価値がある。ステロイド性のグルココルチコイドレセプターアンタゴニストが肝臓を標的とするために、胆汁酸への結合がなされている（Apelqvistら、2000）。現在、望ましくない周辺への効果を有さないような、グルココルチコイドレセプターを標的とする公知の治療剤は存在しない（非特許文献33）。結果として、肝臓のグルココルチコイドレセプターを効果的に阻害し得る薬剤の必要性が切望されている。

【0016】

ヒトグルココルチコイドレセプター1Ap/e転写産物を含むヌクレオチド配列を標的とするアンチセンスプライマー、ならびにヒトグルココルチコイドレセプターエクソン1A転写産物に対するアンチセンストランスジーンの開示により、神経におけるアポトーシスを阻害する方法が、特許文献1に開示されている（VedeckisおよびBreslin、2003）。

【0017】

特許文献2および特許文献3に、ヒトグルココルチコイドレセプターをコードするヌクレオチド配列、ならびに前記ポリヌクレオチドに相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチド、前記ポリヌクレオチドを含むRNAを分解することによりSTAT6活性化を阻害するリボザイム、ならびにアレルギー性疾患、炎症、自己免疫疾患、糖尿病、高脂血症、感染性疾患および癌からなる群より選択される疾患の処置のためにアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムの有効量の被験体への投与を含む疾患の処置方法が開示されている（Hondaら、2002）。

【0018】

特許文献4に、ヒトグルココルチコイドレセプターをコードする核酸配列を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドが開示されている。

【0019】

特許文献5に、ヒトグルココルチコイドレセプターをコードする核酸配列を標的とする複数のアンチセンスオリゴヌクレオチドが開示されている。

【0020】

特許文献6に、ヒトグルココルチコイドレセプターをコードする核酸配列を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドが開示されている。

【0021】

特許文献7に、ヒトグルココルチコイドレセプターをコードする核酸配列が挙げられる、悪性腫瘍癌分子に対する標的mRNA（センス）またはDNA（アンチセンス）配列と結合し得る一本鎖核酸配列（RNAまたはDNAのいずれか）を含むアンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドを含むアンチセンス分子である、悪性腫瘍癌阻害剤が開示されている（Morr

10

20

30

40

50

isおよびEngelhard, 2003)。

【0022】

アンチセンス技術は特異的な遺伝子産物の発現を減少させる有効な手段であり、よって多くのグルココルチコイドレセプター発現の変更についての治療的、診断的、研究的応用に比類なく有用である。さらに、肝臓は以下の投与において最高濃度のアンチセンスオリゴヌクレオチドが見られる組織の一つである(非特許文献36)。従って、アンチセンス技術は、肝臓特異的なグルココルチコイドレセプターの阻害について魅力的な方法を提示する。糖尿病、具体的に2型糖尿病に加えて、グルココルチコイドレセプターモジュレーターは肥満、代謝症候群X、クッシング氏症候群、アディソン氏病、炎症性疾患としての喘息および鼻炎および関節炎、アレルギー、自己免疫疾患、免疫不全、食欲不振、悪液質、骨欠損または骨脆弱性、ならびに傷の治癒等の疾患の治療に有用である。代謝症候群、代謝症候群Xまたは単純に症候群Xは、肥満、具体的に高血中トリグリセリドである脂血症異常、グルコース不耐性、高血糖症および高血圧を含む危険要素のかたまりに関する。非特許文献37。本明細書中に記載される化合物等のグルココルチコイドレセプター阻害剤はまた、全身性のステロイド性治療によりもたらされる高脂血症の改善にも有用であると考えられている。

10

【0023】

さらに、アンチセンス技術は、グルココルチコイド処置の効果を示さない患者で過剰発現するといわれている、グルココルチコイドレセプターβアイソフォームの発現を阻害する手段を提供する。

20

【0024】

本発明は、グルココルチコイドレセプター発現を阻害する組成物および方法を提供する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0025】

【特許文献1】米国特許第6,649,341号

【特許文献2】米国特許前公報20030092616号

【特許文献3】PCT公開公報WO 02/096943号

【特許文献4】PCT公開公報WO 88/00975号

【特許文献5】PCT公開公報WO 01/42307号

【特許文献6】PCT公開公報WO 01/77344号

【特許文献7】PCT公開公報WO 03/008583号

【非特許文献】

【0026】

【非特許文献1】Karin, Cell, 1998, 93,487-490

【非特許文献2】Hollenbergら, Nature, 1985, 318,635-641

【非特許文献3】Weinbergerら, Science, 1985, 228,740-742

【非特許文献4】EncioおよびDetera-Wadleigh, J Biol Chem, 1991, 266,7182-7188

【非特許文献5】Gehringら, Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82,3751-3755

【非特許文献6】Oakleyら, J Biol Chem, 1996, 271,9550-9559

【非特許文献7】Breslinら, Mol Endocrinol, 2001, 15,1381-1395

【非特許文献8】Pujolsら, Am J Physiol Cell Physiol, 2002, 283,C1324-1331

【非特許文献9】Giguereら, Cell, 1986, 46,645-652

【非特許文献10】Cadepondら, J Biol Chem, 1991, 266,5834-5841

【非特許文献11】Ortiら, J Biol Chem, 1989, 264,9728-9731

【非特許文献12】PicardおよびYamamoto, Embo J, 1987, 6,3333-3340

【非特許文献13】Wrangeら, J Biol Chem, 1989, 264,5253-5259

【非特許文献14】SchaafおよびCidlowski, J Steroid Biochem Mol Biol, 2002, 83,37

30

40

- 【非特許文献 1 5】Reichardtら, Cell, 1998, 93,531-541
 【非特許文献 1 6】Chakravartiら, Nature, 1996, 383,99-103
 【非特許文献 1 7】Hittelmanら, Embo J, 1999, 18,5380-5388
 【非特許文献 1 8】FryerおよびArcher, Nature, 1998, 393,88-91
 【非特許文献 1 9】DerooおよびArcher, Oncogene, 2001, 20,3039-3046
 【非特許文献 2 0】Nieら, Mol Cell Biol, 2000, 20,8879-8888
 【非特許文献 2 1】RayおよびPrefontain, Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91,752-756
 【非特許文献 2 2】PepinおよびBarden, Mol Cell Biol, 1991, 11,1647-1653
 【非特許文献 2 3】Pepinら, Nature, 1992, 355,725-728
 【非特許文献 2 4】Richardら, Am J Physiol, 1993, 265,R146-150
 【非特許文献 2 5】Engelmannら, Eur J Pharmacol, 1998, 361,17-26
 【非特許文献 2 6】Korteら, Eur J Pharmacol, 1996, 301,19-25
 【非特許文献 2 7】Chrousos, N Engl J Med, 1995, 332,1351-1362
 【非特許文献 2 8】BrayおよびCotton, Hum Mutat, 2003, 21,557-568
 【非特許文献 2 9】Rosmond, Obes Res, 2002, 10,1078-1086
 【非特許文献 3 0】Hondaら, Gastroenterology, 2000, 118,859-866
 【非特許文献 3 1】Leungら, J Exp Med, 1997, 186,1576-1574
 【非特許文献 3 2】Bambergerら, J Clin Invest, 1995, 95, 2435-2441
 【非特許文献 3 3】Link, Curr Opin Investig Drugs, 2003, 4,421-429
 【非特許文献 3 4】Friedmanら, J Biol Chem, 1997, 272,31475-31481
 【非特許文献 3 5】Gettysら, Int J Obes Relat Metab Disord, 1997, 21, 865-873
 【非特許文献 3 6】Gearyら, Curr. Opin Investig. Drugs, 2001, 2,562-573
 【非特許文献 3 7】Scott, C.L., Am J Cardiol. 2003 Jul 3;92(1A):35i-42i

10

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0027】

本発明の課題は、肝臓のグルココルチコイドレセプターを効果的に阻害し得る薬剤を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0028】

30

即ち、本発明の要旨は、

〔1〕グルココルチコイドレセプターをコードする核酸分子を標的とする8～80核酸塩基長のアンチセンス化合物であって、前記化合物がグルココルチコイドレセプターをコードする前記核酸分子に相補的であり、前記化合物がグルココルチコイドレセプターmRNAの発現を阻害し、前記アンチセンス化合物が配列番号32、33、34、36、37、39、40、43、44、46、48、50、51、52、53、54、55、57、58、59、60、61、62、63、65、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、179、182、183、185、186、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、202、203、204、206、208、209、210、211、212、213、214、216、221、222、223、224、225、226、227、

40

50

228、232、233、234、236、237、239、240、241、242、
243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、
253、254、257、258、259、260、261、262、263、264、
265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、
275、276、280、281、282、283、284、285、286、287、
291、292、293、294、295、298、299、306、307、308、
309または310の少なくとも8核酸塩基部分を含む、アンチセンス化合物、

〔2〕グルココルチコイドレセプターをコードする核酸分子を標的とする8~80核酸塩基長のアンチセンス化合物であって、前記化合物がグルココルチコイドレセプターをコードする前記核酸分子に相補的であり、前記化合物がグルココルチコイドレセプター-mRNAの発現を阻害し、前記アンチセンス化合物が配列番号32、33、34、36、37、39、40、43、44、46、48、50、51、52、53、54、55、57、58、59、60、61、62、63、65、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、179、182、183、185、186、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、202、203、204、206、208、209、210、211、212、213、214、216、221、222、223、224、225、226、227、228、232、233、234、236、237、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、280、281、282、283、284、285、286、287、291、292、293、294、295、298、299、306、307、308、309および310からなる群より選択される配列を有する、アンチセンス化合物、

〔3〕配列番号36、50、60、71、72、73、78、100、306、307、308、309または310の核酸塩基配列を有する、アンチセンス化合物、

〔4〕配列番号4の全ての5'UTRのヌクレオチド13~119、開始コドン領域のヌクレオチド114~151、コード領域のヌクレオチド351~533、667~845、877~1243、1356~1488、1552~1756、1819~1999、2008~2139、2146~2194、2201~2301、もしくは2386~2416、または3'UTRのヌクレオチド2488~2685、2723~3435、3499~3789、3826~3860、3886~3905、3918~3937、4031~4072、4082~4193もしくは4244~4758；または配列番号25の3'UTRのヌクレオチド104562~104648を標的とする、ヒトグルココルチコイドレセプターをコードする核酸分子を標的とする8~80核酸塩基長のアンチセンス化合物に関する。

【発明の効果】

【0029】

本発明により、肝臓のグルココルチコイドレセプターを効果的に阻害し得る薬剤が提供される。

【発明を実施するための形態】

【0030】

(発明の概要)

10

20

30

40

50

本発明は、グルココルチコイドレセプターをコードする核酸を標的とし、かつ、グルココルチコイドレセプター発現を調節するアンチセンス化合物、特に核酸および核酸様オリゴマーに関する。本発明の化合物を含む医薬および他の組成物もまた提供される。さらに、グルココルチコイドレセプターの調節剤のスクリーニング方法、および細胞、組織または動物においてグルココルチコイドレセプター発現を調節する方法であって、前記細胞、組織または動物を、一つ以上の本発明の化合物または組成物と接触させることを含む方法も提供される。グルココルチコイドレセプター発現に関連する疾患または症状を有する疑いがあるか、または罹患し易い動物、特にヒトの処置方法もまた本明細書中に記載する。かかる方法は、治療的または予防的有効量の一つ以上の本発明の化合物または組成物を、処置を必要とする人に投与することを含む。

10

【0031】

(発明の詳細な説明)

A. 発明の概観

本発明は、アンチセンス化合物、好ましくは、オリゴヌクレオチド、およびグルココルチコイドレセプターをコードする核酸分子の機能または作用を調節するのに用いるために、同様の種を用いる。これは、グルココルチコイドレセプターをコードする一つ以上の核酸分子と、特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを提供することにより達成される。本明細書中で用いる用語「標的核酸」および「グルココルチコイドレセプターをコードする核酸分子」は、グルココルチコイドレセプターをコードするDNA、かかるDNAから転写されたRNA（プレmRNAおよびmRNAまたはその部分を含む）、およびかかるRNAから誘導されたcDNAを含めて簡便に用いられている。本発明の化合物のその標的核酸とのハイブリダイゼーションは、一般的に「アンチセンス」と呼ばれる。結果として、本発明のいくつかの好ましい態様の実施に含まれると考えられる好ましいメカニズムを、本明細書中で「アンチセンス阻害」という。このようなアンチセンス阻害は、代表的には、オリゴヌクレオチド鎖またはセグメントの水素結合に基づくハイブリダイゼーションに基づき、その結果、少なくとも一つの鎖またはセグメントは、切断されるか、分解されるか、または作動不可能になる。これに関し、このようなアンチセンス阻害のための特異的核酸分子およびその機能を標的とすることが現在では好ましい。

20

【0032】

妨害すべきDNAの機能には複製および転写を挙げることができる。複製および転写は、例えば、内因性細胞テンプレート、ベクター、プラスミド構築物またはその他に由来し得る。妨害すべきRNAの機能には、例えば、タンパク質翻訳の部位へのRNAの転座、細胞内のRNA合成部位から離れた部位へのRNAの転座、RNA由来のタンパク質の翻訳、一つ以上のRNA種を得るためのRNAのスプライシング、およびRNAに従事し得るかまたはRNAにより促進され得るRNAに関する触媒活性または複合体形成、等の機能が挙げられ得る。標的核酸機能のこのような妨害の一つの好ましい結果は、グルココルチコイドレセプター発現の調節である。本発明の文脈において、「調節」および「発現の調節」は、遺伝子をコードする、例えばDNAまたはRNAのような核酸分子の量またはレベルの増加（刺激）または減少（阻害）のいずれかを意味する。mRNAはしばしば、好ましい標的核酸である。阻害はしばしば、発現の調節の好ましい形態であり、「阻害」は絶対的な阻害である必要はないが、標的発現の減少または縮小を意味するであろうことが理解される。

30

40

【0033】

本発明の文脈において、「ハイブリダイゼーション」は、オリゴマー化合物の相補鎖の対形成を意味する。本発明において、対形成の好ましいメカニズムには、水素結合が挙げられ、これはオリゴマー化合物の鎖の相補ヌクレオシドまたはヌクレオチド塩基（核酸塩基）の間のWatson-Crick、Hoogsteenまたは逆Hoogsteen水素結合であり得る。例えば、アデニンおよびチミンは水素結合の形成により対を形成する相補的核酸塩基である。ハイブリダイゼーションは種々の環境下で起こり得る。

【0034】

アンチセンス化合物は、化合物の標的核酸への結合が標的核酸の正常な機能を妨害して

50

活性の損失を引き起こし、かつ、特異的結合が望まれる条件下、すなわちインビボアッセイまたは治療的処理における生理学的条件下、およびインビトロアッセイでアッセイが行われる条件下でアンチセンス化合物の非標的核酸配列へ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る場合に、特異的にハイブリダイズ可能である。

【0035】

本発明において、語句「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」または「ストリンジェントな条件」は、本発明の化合物がその標的配列にハイブリダイズするが、他の配列へのハイブリダイズは最小数となるような条件を意味する。ストリンジェントな条件は、配列依存的であり、異なる環境下で異なり、また本発明の文脈において、オリゴマー化合物が標的配列にハイブリダイズする「ストリンジェントな条件」は、オリゴマー化合物の性質および組成、ならびに研究されているアッセイによって決定される。

10

【0036】

本明細書中で用いる「相補的」は、オリゴマー化合物の2核酸塩基間の正確な対形成に対する能力を意味する。例えば、オリゴヌクレオチド（オリゴマー化合物）のある位置における核酸塩基が、標的核酸のある位置における核酸塩基と水素結合し得る場合（前記標的核酸はDNA、RNAまたはオリゴヌクレオチド分子である）オリゴヌクレオチドと標的核酸との間の水素結合の位置が相補的位置であると考えられる。オリゴヌクレオチドおよびさらなるDNA、RNAまたはオリゴヌクレオチド分子は、各分子中で、十分な数の相補的位置が、互いに水素結合し得る核酸塩基に占有される場合、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な」および「相補的」は、オリゴヌクレオチドと標的核酸との間で安定かつ特異的な結合が起こるように、十分な数の核酸塩基に対して十分な程度の正確な対または相補性があることを示すのに用いられる用語である。

20

【0037】

アンチセンス化合物の配列は、特異的にハイブリダイズ可能となるその標的核酸の配列に100%相補的である必要はないことが当該分野で理解されている。さらに、介在または隣接するセグメントはハイブリダイゼーション事象に関与しないために、オリゴヌクレオチドは一つ以上のセグメントにハイブリダイズし得る（例えば、ループ構造またはヘアピン構造）。本発明のアンチセンス化合物は、標的核酸配列内の標的領域に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%の配列相補性を含むことが好ましく、より好ましくは、それらが標的とされる標的核酸配列内の標的領域に対して少なくとも90%の配列相補性を含み、さらに好ましくは少なくとも95%または99%の配列相補性を含むことが好ましい。例えば、アンチセンス化合物の20核酸塩基のうち18が標的領域に相補的であり、それ故特異的にハイブリダイズするアンチセンス化合物は、90%の相補性を示すであろう。この例では、残りの非相補的核酸塩基は、クラスター化され得るかまたは相補的核酸塩基と共に散在し得、互いにまたは相補的核酸塩基に対して接触している必要はない。従って、標的核酸と完全に相補的な2つの領域と隣接している、4つの非相補的核酸塩基を有する18核酸塩基長のアンチセンス化合物は、標的核酸と77.8%の全相補性を有するので、本発明の範囲内に入るであろう。標的核酸の領域を有するアンチセンス化合物の相補性百分率は、当該分野で公知のBLAST (basic local alignment search tools) プログラムおよびPowerBLASTプログラムを用いて常套的に決定することができる (Altschulら, J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; Zhangおよび Madden, Genome Res., 1997, 7, 649-656)。

30

40

【0038】

相同性百分率、配列同一性または相補性は、例えば、Gapプログラム (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison WI) により、SmithおよびWatermanのアルゴリズム (Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489) を用いる初期設定を用いて、決定され得る。いくつかの好ましい態様では、オリゴマーと標的との間の相同性、配列同一性または相補性は、約50%~約60%である。いくつかの態様では、相同性、配列同一性または相補性は、約60%~約70%である。好ましい態様では、相同性、配列同一性または相補性は、約70%~約80%である

50

。より好ましい態様では、相同性、配列同一性または相補性は、約80%～約90%である。いくつかの好ましい態様では、相同性、配列同一性または相補性は、約90%、約92%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または約100%である。

【0039】

B. 本発明の化合物

本発明によれば、アンチセンス化合物には、アンチセンスオリゴマー化合物、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、外部ガイド配列(EGS)オリゴヌクレオチド、選択的スプライサー(alternate splicer)、および標的核酸の少なくとも一部にハイブリダイズし、その発現を調節する、他のオリゴマー化合物が挙げられる。従って、これらの化合物は、一本鎖、二本鎖、環状またはヘアピンオリゴマー化合物の形態で導入され得、かつ、内部または末端突出物またはループのような構造的要素を含み得る。本発明の化合物は、一旦システム内に導入されると、一つ以上の酵素または構成タンパク質の作用を惹起して、標的核酸の修飾を起し得る。

【0040】

このような酵素の非限定的な一つの例はRNアーゼH(RNaseH)であり、これは、RNA:DNA二本鎖のRNA鎖を切断する細胞エンドヌクレアーゼである。「DNA様」の一本鎖アンチセンス化合物がRNアーゼH(RNaseH)を惹起することは、当該分野で公知である。それ故に、RNアーゼHの活性化は、RNA標的の切断をもたらし、それによって、遺伝子発現のオリゴヌクレオチド媒介阻害効率を非常に高める。同様の役割は、酵素のRNアーゼIIIおよびリボヌクレアーゼLFファミリーにおけるリボヌクレアーゼのような他のリボヌクレアーゼにおいても仮定されている。

【0041】

アンチセンス化合物の好ましい形態は、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドであるが、多くの種では、二本鎖RNA(dsRNA)分子のような二本鎖構造の導入は、遺伝子またはその関連遺伝子産物の機能の強力かつ特異的なアンチセンス媒介的減少を引き起こすことが示されている。この現象は、植物および動物の両方で起こり、ウイルス防御およびトランスポゾンサイレンシングに進化的な関係を有すると考えられている。

【0042】

動物においてdsRNAが遺伝子サイレンシングをもたらしたことの第1の証拠は、1995年に、線虫(Caenorhabditis elegans)の研究から得られた(GuoおよびKempheus, Cell, 1995, 81, 611-620)。Montgomeryらは、dsRNAの主な阻害効果は転写後であることを示した(Montgomeryら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95, 15502-15507)。二本鎖RNA(dsRNA)への曝露により得られた、線虫において定義された転写後アンチセンスメカニズムは、当時からRNA干渉(RNAi)を示してきた。この用語は、内因性標的mRNAレベルの配列特異的減少をもたらすdsRNAの導入に関与するアンチセンス媒介遺伝子サイレンシングを意味するのに一般化されてきた(Fireら, Nature, 1998, 391, 806-811)。最近、実際、RNAiの強力な導入因子であるdsRNAのアンチセンス極性の一本鎖RNAオリゴマーが示されている(Tijstermanら, Science, 2002, 295, 694-697)。

【0043】

本発明のアンチセンス化合物はまた、異なる塩基が化合物中の一つ以上のヌクレオチド位置に存在する修飾化合物も含む。例えば、第1のヌクレオチドがアデノシンである場合、チミジン、グアノシンまたはシチジンをこの位置に含む修飾化合物が調製され得る。これは、アンチセンス化合物の任意の位置でも起こり得る。次いで、これらの化合物は、本明細書中に記載の方法で試験され、グルココルチコイドレセプターmRNAの発現を阻害する能力を測定する。

【0044】

本発明の文脈において、用語「オリゴマー化合物」は、複数のモノマー単位を含むポリマーまたはオリゴマーを意味する。本発明の文脈において、用語「オリゴヌクレオチド」は、リボ核酸(RNA)もしくはデオキシリボ核酸(DNA)またはそれらの模倣剤(mimetics)、キメラ、アナログおよびホモログのオリゴマーもしくはポリマーを意味する。この用

語は、天然に存在する核酸塩基、糖および共有ヌクレオシド（主鎖）間結合から構成されるオリゴヌクレオチド、ならびに同様に機能する天然に存在しない部分を有するオリゴヌクレオチドを含む。このような修飾または置換オリゴヌクレオチドは、ネイティブ型に対してしばしば好ましい。なぜなら、例えば、細胞取り込みの増強、標的核酸への親和性の増強およびヌクレアーゼの存在下での安定性の増加のような望ましい特性を有するからである。

【 0 0 4 5 】

オリゴヌクレオチドは本発明のアンチセンス化合物の好ましい形態であるが、本発明はアンチセンス化合物の他のファミリー、ならびに本明細書中に記載のオリゴヌクレオチドアナログおよび模倣剤（しかし、これらに限定されない）を含む。

10

【 0 0 4 6 】

好ましくは、本発明に従うアンチセンス化合物は約8～約80核酸塩基（すなわち、約8～約80の結合ヌクレオシド）を含み得る。当業者は本発明が、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79または80核酸塩基の長さの化合物を包含することを理解するであろう。

【 0 0 4 7 】

一つの好ましい態様においては、本発明のアンチセンス化合物は12～50核酸塩基長である。当業者は本発明が、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49または50核酸塩基の長さの化合物を包含することを理解するであろう。

20

【 0 0 4 8 】

別の好ましい態様においては、本発明のアンチセンス化合物は15～30核酸塩基長である。当業者は本発明が、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30核酸塩基の長さの化合物を包含することを理解するであろう。

【 0 0 4 9 】

特に好ましい化合物は約12～約50核酸塩基のオリゴヌクレオチドであり、さらに好ましくは、約15～約30核酸塩基を含むものである。

30

【 0 0 5 0 】

例示したアンチセンス化合物の範囲内から選ばれる、少なくとも8個の連続した核酸塩基のストレッチを含む8～80核酸塩基長のアンチセンス化合物もまた、同様に適切なアンチセンス化合物であると考えられる。具体例としての好ましいアンチセンス化合物は、例示した好ましいアンチセンス化合物の一つの5'末端から少なくとも8個の連続する核酸塩基を含むオリゴヌクレオチド配列（残りの核酸塩基は、標的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の5'末端のすぐ上流から開始し、オリゴヌクレオチドが約8～約80核酸塩基を含むまで連続する、同じオリゴヌクレオチドの連続するストレッチである）を含む。同様に好ましいアンチセンス化合物は、例示した好ましいアンチセンス化合物の一つの3'末端から少なくとも8個の連続する核酸塩基を含むオリゴヌクレオチド配列（残りの核酸塩基は、標的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の3'末端のすぐ下流から開始し、オリゴヌクレオチドが約8～約80核酸塩基を含むまで連続する、同じオリゴヌクレオチドの連続するストレッチである）により表される。好ましいアンチセンス化合物は、例示した好ましいアンチセンス化合物の配列の内部からの少なくとも8個の連続する核酸塩基を含むオリゴヌクレオチド配列により表され得、かつオリゴヌクレオチドが約8～約80核酸塩基を含むまで、いずれかまたは両方の方向に延長され得ることもまた理解される。本明細書中で例示された好ましいアンチセンス化合物の経験を積んだ当業者は、過度の実験を行うことなく、さらに好ましいアンチセンス化合物を同定することができるであろう。

40

【 0 0 5 1 】

50

C. 本発明の標的

アンチセンス化合物の特定の核酸分子に対する「ターゲッティング」は、本発明の文脈において複数工程のプロセスであり得る。該プロセスは、通常、機能を調節すべき標的核酸を同定することから始まる。この標的核酸は、例えば、その発現が特定の障害または疾患状態に関連する細胞遺伝子（または遺伝子から転写されたmRNA）、あるいは感染性因子由来の核酸分子であり得る。本発明において、標的核酸はグルココルチコイドレセプターをコードする。

【0052】

また、このターゲッティングプロセスは、通常、所望の効果（例えば、発現の調節）が生じるように、アンチセンス相互作用を起こすための標的核酸内の標的領域、セグメントまたは部位のうち少なくとも一つを決定することを含む。本発明の文脈において、用語「領域」とは、同定可能な構造、機能または特性の少なくとも一つを有する標的核酸の部分であると定義される。標的核酸の領域内は、セグメントである。「セグメント」とは、標的核酸内の領域のより小さなまたは下位の部分であると定義される。本発明で用いられる「部位」は、標的核酸内の位置であると定義される。

【0053】

当該分野で公知のように、翻訳開始コドンは、代表的には5'-AUG（転写mRNA分子内；対応するDNA分子内の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」とも呼ばれる。RNA配列5'-GUG、5'-UUGまたは5'-CUG、ならびに5'-AUA、5'-ACGおよび5'-CUGを有する翻訳開始コドンを有する遺伝子のうち少数は、インビボ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、それぞれの場合における開始アミノ酸が代表的にメチオニン（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）である場合でさえも、多くのコドン配列を包含し得る。真核生物遺伝子および原核生物遺伝子が2つ以上の代替の開始コドンを有し得、そのいずれか一つが、特定の細胞型または組織で、あるいは特定の一連の条件下で、翻訳開始のために優先的に用いられ得ることもまた当該分野で公知である。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」は、グルココルチコイドレセプターをコードする遺伝子から転写されたmRNAの翻訳を開始するためにインビボで用いられるコドン（単数または複数）を意味し、当該コドンの配列にはかわらない。遺伝子の翻訳終止コドン（または「停止コドン」）は、3つの配列、すなわち5'-UAA、5'-UAGおよび5'-UGA（対応するDNA配列は、それぞれ5'-TAA、5'-TAGおよび5'-TGAである）のうちの一つを有し得ることもまた当該分野で公知である。

【0054】

用語「開始コドン領域」および「翻訳開始コドン領域」は、約25～約50の連続するヌクレオチドを、翻訳開始コドンの部分からのいずれかの方向（すなわち、5'または3'）に含む、mRNAまたは遺伝子の翻訳開始コドンの部分を意味する。同様に、用語「停止コドン領域」および「翻訳終止コドン領域」は、約25～約50の連続するヌクレオチドを、翻訳終止コドンの部分からのいずれかの方向（すなわち、5'または3'）に含む、mRNAまたは遺伝子の翻訳終止コドンの部分を意味する。結果として、「開始コドン領域」（または「翻訳開始コドン領域」）および「停止コドン領域」（または「翻訳終止コドン領域」）は、本発明のアンチセンス化合物で効果的に標的化され得る全ての領域である。

【0055】

翻訳開始コドンと翻訳終止コドンとの間の領域を意味することが当該分野で公知であるオープンリーディングフレーム（ORF）または「コード領域」もまた、効果的に標的化され得る領域である。本発明の文脈において、好ましい領域は、遺伝子のオープンリーディングフレーム（ORF）の翻訳開始コドンまたは終止コドンを包含する遺伝子間領域である。

【0056】

他の標的領域は、翻訳開始コドンからの5'方向のmRNAの部分の意味することが当該分野で公知であり、従って、mRNAの5'キャップ部位と翻訳開始コドンとの間にヌクレオチド（

10

20

30

40

50

または遺伝子上の対応するヌクレオチド)を含む5'非翻訳領域(5'UTR)を含み;かつ、翻訳終止コドンからの3'方向のmRNAの部分を意味することが当該分野で公知であり、従って、mRNAの3'末端部位と翻訳終止コドンとの間にヌクレオチド(または遺伝子上の対応するヌクレオチド)を含む3'非翻訳領域(3'UTR)を含む。mRNAの5'キャップ部位は、5'-5'三リン酸結合を介してmRNAの5'最末端残基に結合したN7-メチル化グアノシン残基を含む。mRNAの5'キャップ領域は、5'キャップ構造それ自体およびキャップ部位に隣接する始めの50ヌクレオチドを含むと考えられている。5'キャップ領域を標的化することもまた好ましい。

【0057】

いくつかの真核生物mRNA転写物は直接翻訳されるが、多くのものは、翻訳される前に転写物から切除される「イントロン」として知られる一つ以上の領域を含む。残りの(すなわち、翻訳された)領域は、「エクソン」として知られ、共にスプライシングされて連続的mRNA配列を形成する。標的スプライス部位、すなわち、イントロン-エクソン接合またはエクソン-イントロン接合はまた、異常なスプライシングが疾患に関連する状況で、または特定のスプライス産物の過産生が疾患に関連する状況でも有用であり得る。再組換えまたは欠失による異常な融合接合もまた好ましい標的部位である。異なる遺伝子源からの2つの(またはそれ以上の)mRNAのスプライシングのプロセスを介して生じたmRNA転写物は、「融合転写物」として公知である。イントロンは、例えば、DNAまたはプレmRNAを標的としたアンチセンス化合物を用いて効果的に標的化され得ることもまた知られている。

【0058】

選択的RNA転写物が、DNAの同じゲノム領域から生じ得ることもまた当該分野で公知である。これらの代替の転写物は、一般的に「バリエーション」として知られる。より詳細には、「プレmRNAバリエーション」は、その開始または停止位置のいずれかにおいて、同じゲノムDNAから生じた他の転写物とは異なる同じゲノムDNAから生じる転写物であり、イントロンおよびエクソン配列の両方を含む。

【0059】

スプライシングの際に、一つ以上のエクソンまたはイントロン領域あるいはその部分の切除において、プレmRNAバリエーションは、より小さい「mRNAバリエーション」を産生する。結果として、mRNAバリエーションは、加工されたプレmRNAバリエーションであり、スプライシングの結果、各独自のプレmRNAバリエーションは常に、独自のmRNAバリエーションを生じるはずである。これらのmRNAバリエーションはまた、「選択的スプライスバリエーション」としても知られる。プレmRNAバリエーションのスプライシングが起こらない場合、プレmRNAバリエーションは、mRNAバリエーションと同一である。

【0060】

バリエーションは、転写を開始または停止するための代替シグナルの使用により産生され得ること、また、プレmRNAおよびmRNAは、一つ以上の開始コドンまたは停止コドンを有し得ることが当該分野で公知である。代替の開始コドンを用いる、プレmRNAまたはmRNAを起源とするバリエーションは、当該プレmRNAまたはmRNAの「代替の開始バリエーション」として公知である。代替停止コドンを用いるこれらの転写は、当該プレ-mRNAまたはmRNAの「代替停止バリエーション」として公知である。代替停止バリエーションの一つの特異的な型は、転写機構による「ポリA停止シグナル」の一つの代替の選択の結果から、複数の転写が生じ、それによって独自のポリA部位で終止する転写を生じる。本発明の文脈の範囲内で、本明細書中に記載の変異体の型もまた好ましい標的核酸である。

【0061】

好ましいアンチセンス化合物がハイブリダイズする標的核酸上の位置は、本明細書中の以下で「好ましい標的セグメント」と呼ぶ。本明細書中で用いる用語「好ましい標的セグメント」は、活性なアンチセンス化合物が標的化される標的領域の少なくとも8核酸塩基部分であると定義される。理論に束縛されることは望まないが、現在、これらの標的セグメントは、ハイブリダイゼーションのためにアクセス可能な標的核酸の部分を表すと考えられている。当業者は、活性アンチセンス化合物配列およびその標的セグメント(「好ま

10

20

30

40

50

しい標的セグメント」)が本発明の範囲内の特定の態様を例示および記載する働きをすることを理解するであろう。さらなる活性アンチセンス化合物および好ましい標的セグメントは、当業者により同定され得る。

【0062】

一旦、一つ以上の標的領域、セグメントまたは部位が同定されると、アンチセンス化合物は、所望の効果を与えるように標的に対して十分に相補的であるように(すなわち、十分な特異性で十分に効率的にハイブリダイズするように)選択される。

【0063】

オリゴマーアンチセンス化合物もまた、配列番号4の1~80、81~160、161~240、241~320、321~400、401~480、481~560、561~640、641~720、721~800、801~880、881~960、961~1040、1041~1120、1121~1200、1201~1280、1281~1360、1361~1440、1441~1520、1521~1600、1601~1680、1681~1760、1761~1840、1841~1920、1921~2000、2001~2080、2081~2160、2161~2240、2241~2320、2321~2400、2401~2480、2481~2560、2561~2640、2641~2720、2721~2800、2801~2880、2881~2960、2961~3040、3041~3120、3121~3200、3201~3280、3281~3360、3361~3440、3441~3520、3521~3600、3601~3680、3681~3760、3761~3840、3841~3920、3921~4000、4001~4080、4081~4160、4161~4240、4241~4320、4321~4400、4401~4480、4481~4560、4561~4640、4641~4720、もしくは4721~4788の核酸塩基、またはその任意の組み合わせを含む標的核酸塩基配列(例えば、本明細書中の実施例13および他の実施例において開示されるもの等)の領域に対して標的化され得る。

【0064】

本発明の一つの態様において、アンチセンス化合物は、配列番号4の全ての5' UTRのヌクレオチド13~119、開始コドン領域のヌクレオチド114~151、コード領域のヌクレオチド351~533、667~845、877~1243、1356~1488、1552~1756、1819~1999、2008~2139、2146~2194、2201~2301もしくは2386~2416、または3' UTRのヌクレオチド2488~2685、2723~3435、3499~3789、3826~3860、3886~3905、3918~3937、4031~4072、4082~4193もしくは4244~4758;または配列番号25の3' UTRのヌクレオチド104562~104648を標的とする。

【0065】

本発明の別の態様において、アンチセンス化合物は、配列番号11の全ての開始コドン領域のヌクレオチド2~20、コード領域のヌクレオチド301~1405、1459~2043、もしくは2050~2309、3' UTRのヌクレオチド2376~2433もしくは2521~2546;配列番号219の5' UTRのヌクレオチド227~297;または配列番号220の3' UTRのヌクレオチド14909~18389を標的とする。

【0066】

本発明のさらなる態様において、アンチセンス化合物は、配列番号18の全てのコード領域のヌクレオチド150~2129もしくは2136~2395、または3' UTRのヌクレオチド2472~3705、4576~4867、5039~5293、5680~5877もしくは6214~6263;または配列番号256のコード領域のヌクレオチド278~304を標的とする。

【0067】

D. スクリーニングおよび標的の確認

さらなる態様では、本明細書中で同定される「好ましい標的セグメント」は、グルココルチコイドレセプター発現を調節するさらなる化合物のスクリーニングにおいて用いられ得る。「調節剤」は、グルココルチコイドレセプターをコードする核酸分子の発現を減少または増加し、好ましい標的セグメントに相補的な少なくとも8核酸塩基部分を含む化合物である。スクリーニング方法は、グルココルチコイドレセプターをコードする核酸分子の好ましい標的セグメントを、一つ以上の候補調節剤と接触させる工程、およびグルココルチコイドレセプターをコードする核酸分子の発現を減少または増加する一つ以上の候補の調節剤を選択する工程を含む。一旦、候補の調節剤または調節剤がグルココルチコイドレセプターをコードする核酸分子の発現を調節(例えば、減少するかまたは増加するかの

いずれか)可能であることが示されると、調節剤は、グルココルチコイドレセプターの機能のさらなる調査的研究に、あるいは本発明に従って研究薬、診断薬または治療剤として用いられ得る。

【0068】

本発明の好ましい標的セグメントはまた、各々の本発明の相補的アンチセンス化合物と組み合わされて、安定な(二本鎖)二重鎖オリゴヌクレオチドを形成し得る。このような二本鎖オリゴヌクレオチド部位は、アンチセンスメカニズムによって、標的の発現を調節し、かつ翻訳およびRNAプロセッシングを調節することが当該分野で示されている。さらに、二本鎖部位は化学修飾に供してもよい(Fireら, Nature, 1998, 391, 806-811; TimmonsおよびFire, Nature 1998, 395, 854; Timmonsら, Gene, 2001, 263, 103-112; Tabaraら, Science, 1998, 282, 430-431; Montgomeryら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95, 15502-15507; Tuschlら, Genes Dev., 1999, 13, 3191-3197; Elbashirら, Nature, 2001, 411, 494-498; Elbashirら, Gene Dev. 2001, 15, 188-200)。例えば、このような二本鎖部位は、標的に対する二本鎖アンチセンス鎖の標準的なハイブリダイゼーションにより、標的を阻害し、それによって標的の酵素分解を引き起こすことが示される(Tijstermanら, Science, 2002, 295, 694-697)。

【0069】

本発明のアンチセンス化合物はまた、薬物の発見および標的の評価の分野に応用され得る。本発明は、グルココルチコイドレセプターと、疾患状態、表現型または症状との間に存在する関係を解明するために薬物を発見する試みにおいて、本明細書中で同定された化合物および好ましい標的セグメントを使用することを包含する。これらの方法は、グルココルチコイドレセプターを検出または調節することを含み、試料、組織、細胞または生体を、本発明の化合物と接触させること、グルココルチコイドレセプターの核酸またはタンパク質のレベルおよび/または処理後所定時間経過後の関連形質または化学的終点を測定すること、および、必要に応じて、測定した値を、非処理試料または追加の本発明の化合物で処理した試料と比較することを含む。これらの方法はまた、他の実験と並行してまたは組み合わせて行うことにより、標的の妥当性評価のプロセスのための未知の遺伝子の機能を決定するか、または特定の疾患、症状または表現型の処置または予防のための標的としての特定の遺伝子産物の妥当性を決定することができる。

【0070】

E. キット、研究試薬、診断および治療

本発明のアンチセンス化合物は、診断、治療、および予防のために、ならびに研究試薬、およびキットとして利用され得る。さらに、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、優れた特異性で遺伝子発現を阻害し得るが、特定の遺伝子の機能を解明するために、または生物学的経路の種々の要素の機能を識別するために、当業者にしばしば用いられる。

【0071】

キットおよび診断に係る使用においては、本発明の化合物は、単独で、または他の化合物、もしくは治療と組み合わせて、細胞および組織内で発現された遺伝子の一部または全部の相補体の発現パターンを解明するための識別解析および/または組合せ解析におけるツールとして用いられ得る。

【0072】

一つの制限のない例として、一つ以上のアンチセンス化合物で処理された細胞または組織内の発現パターンは、アンチセンス化合物で処理されていない対照細胞または組織と比較され、生成されたパターンは、例えば、検査された遺伝子の、疾患との係り、シグナル経路、細胞局在、発現レベル、大きさ、構造または機能と関連するので、遺伝子発現の識別レベルについて解析される。かかる解析は、刺激された、または刺激されていない細胞について、および発現パターンに影響を及ぼす他の化合物の存在または非存在のもとで、なされ得る。

【0073】

当該分野で公知の遺伝子発現解析方法の例としては、DNAアレイまたはマイクロアレイ

10

20

30

40

50

(BrazmaおよびVilo, FEBS Lett., 2000, 480, 17-24; Celisら, FEBS Lett., 2000, 480, 2-16)、SAGE(遺伝子発現の連続解析)(Maddenら, Drug Discov. Today, 2000, 5, 415-425)、READS(消化cDNAの制限酵素増幅)(PrasharおよびWeissman, Methods Enzymol., 1999, 303, 258-72)、TOGA(総合的遺伝子発現解析)(Sutcliffeら, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2000, 97, 1976-81)、プロテインアレイおよびプロテオミクス(Celisら, FEBS Lett., 2000, 480, 2-16; Jungblutら, Electrophoresis, 1999, 20, 2100-10)、発現配列タグ(EST)塩基配列決定法(Celisら, FEBS Lett., 2000, 480, 2-16; Larssonら, J. Biotechnol., 2000, 80, 143-57)、サブトラクティブRNAフィンガープリント(SuRF)(Fuchsら, Anal. Biochem., 2000, 286, 91-98; Larsonら, Cytometry, 2000, 41, 203-208)、サブトラクティブクローニング、ディファレンシャルディスプレイ(DD)(JurecicおよびBelmont, Curr. Opin. Microbiol., 2000, 3, 316-21)、比較ゲノムハイブリダイゼーション(Carulliら, J. Cell Biochem. Suppl., 1998, 31, 286-96)、FTSH(蛍光インサイチュハイブリダイゼーション)法(GoingおよびGustersonら, Eur. J. Cancer, 1999, 35, 1895-904)ならびに質量分析法(To, Comb. Chem. High Throughput Screen, 2000, 3, 235-41)が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0074】

本発明のアンチセンス化合物は、グルココルチコイドレセプターをコードする核酸にハイブリダイズし、グルココルチコイドレセプターの発現を調節するため、研究および診断に有用である。アンチセンスの特異性および感受性はまた、治療上の使用のために当業者により利用されている。アンチセンス化合物は、ヒトを含め、動物の疾患状態の処置において、治療法の一部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薬は、リボザイムを含め、安全におよび有効に、ヒトに投与されており、多数の臨床試験が現在進行中である。したがって、アンチセンス化合物は、細胞、組織、および動物、特にヒトの処置のための処置養生において有用であるよう設計され得る有用な治療様式であり得ることが確立されている。

【0075】

治療のために、グルココルチコイドレセプターの発現を調節することにより処置され得る疾患または障害を有する疑いのある動物、好ましくはヒト、が、本発明に従って、アンチセンス化合物を投与することにより、治療される。例えば、ある制限のない態様では、該方法は、処置を必要とする動物に治療上有効な量のグルココルチコイドレセプター阻害剤を投与する工程を含む。本発明のグルココルチコイドレセプター阻害剤は、グルココルチコイドレセプタータンパク質の活性を有効に阻害するか、またはグルココルチコイドレセプタータンパク質の発現を阻害する。ある態様では、動物におけるグルココルチコイドレセプターの活性または発現は、約10%阻害される。好ましくは、動物におけるグルココルチコイドレセプターの活性または発現は、約30%阻害される。さらに好ましくは、動物におけるグルココルチコイドレセプターの活性または発現は、約50%阻害される。従って、オリゴマーアンチセンス化合物はグルココルチコイドレセプターmRNAの発現を少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または100%阻害する。

【0076】

例えば、グルココルチコイドレセプターの発現の減少は、動物の、血清、脂肪組織、肝臓または任意の他の体液、組織または器官の中で、測定され得る。好ましくは、分析される前記体液、組織または器官の中に含まれる細胞は、グルココルチコイドレセプタータンパク質をコードする核酸分子、および/またはグルココルチコイドレセプタータンパク質自体を含む。

【0077】

本発明のアンチセンス化合物は、適当な、薬学的に許容され得る希釈剤または担体に、有効な量の化合物を添加することにより、医薬組成物において、利用され得る。本発明の

化合物および方法の使用はまた、予防上有用であり得る。

【0078】

本発明の化合物はグルココルチコイドレセプター発現の阻害剤である。従って、本発明の化合物は代謝性の疾患および症状、具体的には糖尿病、全身性ステロイド治療により誘導される高血糖症、肥満、高脂血症または代謝症候群Xを処置するのに有用であると思われる。本発明の化合物はまた、クッシング氏症候群、アディソン氏病、アレルギー、自己免疫疾患、免疫不全、食欲不振、悪液質、骨欠損もしくは骨脆弱性の処置、喘息、鼻炎および関節炎等の炎症性疾患の処置、ならびに創傷治癒の促進に有用であり得る。本発明の該化合物はまた、代謝性の疾患および症状、具体的には糖尿病、肥満、高脂血症または代謝症候群Xの開始の阻害または遅延、ならびにクッシング氏症候群、アディソン氏病、ア

10

【0079】

本発明の化合物は、血漿グルコースを含む血中グルコースの低下、ならびに血清脂肪、具体的には血清コレステロールおよび血清トリグリセリドを含む血脂の低下に効果的であると見なされている。故に、本発明の化合物は、2型糖尿病、高血糖症および高脂血症の開始の処置、阻害および遅延に特に有用である。驚くべきことに、本発明の化合物は、グルココルチコイドレセプターシグナリングの全身性の阻害に関連するような、例えば、コルチコステロンレベルの増加またはリンパ球減少等の副作用がなくこれらの治療効果を有すると見なされている。

20

【0080】

F. 修飾

当該分野で公知であるように、ヌクレオシドは塩基と糖の組合せである。ヌクレオシドの塩基部分は、通常は、時々「核酸塩基」または単に「塩基」と呼ばれるヘテロ環塩基である。かかるヘテロ環塩基の2つの最も一般的な種類は、プリンとピリミジンである。ヌクレオチドは、ヌクレオシドの糖部分に共有結合したリン酸基をさらに含むヌクレオシドである。ペントフラノース糖を含むかかるヌクレオシドは、リン酸基が、該糖の2'、3'、または5'ヒドロキシル部のどちらかに結合され得る。オリゴヌクレオチドの形成においては、該リン酸基は、隣接するヌクレオシドを互いに共有結合させ、線状高分子化合物を形成する。次に、かかる線状高分子化合物の各末端がさらに結合し、環状化合物を形成し得るが、線状化合物が一般に好ましい。さらに、線状化合物は、内部核酸塩基相補性を有し得るため、完全に、または部分的に、二本鎖化合物を生じるように、折りたたまれ得る。オリゴヌクレオチド内において、リン酸基は、オリゴヌクレオチドのヌクレオシド間主鎖を形成するものと一般に称されている。RNAおよびDNAの通常の結合または主鎖は、3'から5'へのリン酸ジエステル結合である。

30

【0081】

修飾されたヌクレオシド間結合（主鎖）

本発明において好ましいアンチセンス化合物の具体的な例としては、修飾された主鎖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挙げられる。本明細書中に定義される場合、修飾された主鎖を有するオリゴヌクレオチドとしては、主鎖中にリン原子を保持するもの、および主鎖中にリン原子を有さないものが挙げられる。本明細書の目的のために、かつ当該分野で時々引用されるように、これらのヌクレオシド間主鎖にリン原子を有さない修飾されたオリゴヌクレオチドもまた、オリゴヌクレオシドであるとみなされ得る。

40

【0082】

リン原子をその中に含む好ましい修飾されたオリゴヌクレオチド主鎖としては、例えば、通常の3'-5'結合を有する、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アミノアルキルホスホトリエステル（aminoalkylphosphotriaminoalkylphosphotriester）、3'-アルキレンホスホネート、5'-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メチルおよ

50

び他のアルキルホスホネート、ホスフィネート、3'-アミノホスホラミデートおよびアミノアルキルホスホラミデートを含むホスホラミデート、チオノホスホラミデート、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、セレノホスフェートおよびボラノホスフェート、これらの2'-5'結合された類似体、ならびにその中の一つ以上のヌクレオチド間結合が3'から3'、5'から5'、または2'から2'への結合である、逆の極性を有するものが挙げられる。逆の極性を有する好ましいオリゴヌクレオチドは、3'最末端ヌクレオチド間結合において、単一の、3'から3'への結合、すなわち、無塩基であり得る単一の逆のヌクレオシド残基（核酸塩基が、欠失しているか、またはその代わりにヒドロキシル基を有する）を含む。種々の塩、混合塩、および遊離酸の形もまた、含まれる。

10

【0083】

上記リン含有結合の調製法を教示する代表的な米国特許としては、限定されないが、米国特許第：3,687,808号；

4,469,863号；4,476,301号；5,023,243号；5,177,196号；5,188,897号；

5,264,423号；5,276,019号；5,278,302号；5,286,717号；5,321,131号；

5,399,676号；5,405,939号；5,453,496号；5,455,233号；5,466,677号；

5,476,925号；5,519,126号；5,536,821号；5,541,306号；5,550,111号；

5,563,253号；5,571,799号；5,587,361号；5,194,599号；5,565,555号；

5,527,899号；5,721,218号；5,672,697号および5,625,050号が挙げられ、いくつかは一般に本願の所有するところであり、その各々が本明細書中に参照によって援用される。

20

【0084】

リン原子をその中に含有しない好ましい修飾されたオリゴヌクレオチド主鎖は、短鎖アルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド間結合、ヘテロ原子およびアルキルもしくはシクロアルキルが混合されたヌクレオシド間結合、または一つ以上の、短鎖ヘテロ原子の、もしくはヘテロ環式の、ヌクレオシド間結合により形成される主鎖を有する。これらとしては、（一部はヌクレオシドの糖部分から形成された）モルホリノ結合を有するもの；シロキサン主鎖；スルフィド、スルホキシドおよびスルホン主鎖；ホルムアセチルおよびチオホルムアセチル主鎖；メチレンホルムアセチルおよびチオホルムアセチル主鎖；リボアセチル（riboacetyl）主鎖；アルケン含有主鎖；スルファメート主鎖；メチレンイミノおよびメチレンヒドラジノ主鎖；スルホネートおよびスルホンアミド主鎖；アミド主鎖；

30

【0085】

上記オリゴヌクレオシドの調製法を教示する代表的な米国特許としては、限定されないが、米国特許第：5,034,506号；5,166,315号；

5,185,444号；5,214,134号；5,216,141号；5,235,033号；5,264,562号；

5,264,564号；5,405,938号；5,434,257号；5,466,677号；5,470,967号；

5,489,677号；5,541,307号；5,561,225号；5,596,086号；5,602,240号；

5,610,289号；5,602,240号；5,608,046号；5,610,289号；5,618,704号；

5,623,070号；5,663,312号；5,633,360号；5,677,437号；5,792,608号；

5,646,269号および5,677,439号が挙げられ、いくつかは一般に本願の所有するところであり、その各々が本明細書中に参照によって援用される。

40

【0086】

修飾された糖およびヌクレオシド間結合 - 模倣剤

他の好ましいアンチセンス化合物、例えばオリゴヌクレオチド模倣剤においては、該ヌクレオチド単位の糖およびヌクレオシド間結合の両方（すなわち主鎖）が、新規な基により置換される。該核酸塩基単位は、適当な標的核酸とのハイブリダイゼーションのために維持される。優れたハイブリダイゼーション特性を有することが示されてきた、あるかある化合物、オリゴヌクレオチド模倣剤は、ペプチド核酸（PNA）と称される。PNA化合物においては、オリゴヌクレオチドの糖主鎖は、特にアミノエチルグリシン主鎖であるアミド含有主鎖で置換される。該核酸塩基は、保持され、該主鎖のアミド部分のアザ窒素原子に

50

、直接、または間接的に、結合する。PNA化合物の調製法を教示する代表的な米国特許としては、限定されないが、米国特許第：5,539,082号；5,714,331号および5,719,262号が挙げられ、それぞれは参照として本明細書に援用される。PNA化合物のさらなる教示は、Nielsenら、Science, 1991, 254, 1497-1500に見出し得る。

【0087】

本発明の好ましい態様は、ホスホロチオエート主鎖を有するオリゴヌクレオチド、およびヘテロ原子主鎖を有するオリゴヌクレオシド、ならびに特に、上記引用された米国特許第5,489,677号の、 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{O}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{O}-\text{CH}_2-$ （メチレン（メチルイミノ）またはMMI主鎖として公知の）、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ 、および $-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ （ここで、ネイティブのホスホジエステル主鎖は $-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-$ と表される）、ならびに上記引用された米国特許第5,602,240号のアミド主鎖である。上記引用された米国特許第5,034,506号のモルホリノ主鎖構造を有するオリゴヌクレオチドもまた好ましい。

【0088】

修飾された糖

修飾されたアンチセンス化合物はまた、一つ以上の置換された糖部分を含有し得る。アンチセンス化合物、好ましくはアンチセンスオリゴヌクレオチドが好ましく、2'位で、次のもの： OH ； F ； $\text{O}-$ 、 $\text{S}-$ 、もしくは $\text{N}-$ アルキル； $\text{O}-$ 、 $\text{S}-$ 、もしくは $\text{N}-$ アルケニル； $\text{O}-$ 、 $\text{S}-$ もしくは $\text{N}-$ アルキニル；または $\text{O}-$ アルキル- $\text{O}-$ アルキルの一つを含み、ここでアルキル、アルケニル、およびアルキニルは、置換された、または置換されていない C_1 から C_{10} のアルキル、または C_2 から C_{10} のアルケニルおよびアルキニルであり得る。 $\text{O}((\text{CH}_2)_n\text{O})_m\text{CH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ONH}_2$ 、および $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ON}((\text{CH}_2)_n\text{CH}_3)_2$ が特に好ましく、ここで、 n および m は、1から約10である。他の好ましいオリゴヌクレオチドは、2'位に次のもの： C_1 から C_{10} の低級アルキル、置換された低級の、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリル、アラキル、 $\text{O}-$ アルカリル、もしくは $\text{O}-$ アラキル、 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ル、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換されたシリル、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学的性質を向上するための基、またはオリゴヌクレオチドの薬力学的性質を向上するための基、および類似の性質を有する他の置換基、の一つを含む。好ましい修飾としては、2'-メトキシエトキシ（2'- $\text{O}-$ （2-メトキシエチル）または2'-MOEとしてもまた公知の2'- $\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ）（Martinら、Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504）すなわち、アルコキシアルコキシ基、が挙げられる。さらに好ましい修飾としては、本明細書中以下の実施例に記載されるように、2'-DMAOEとしてもまた公知の2'-ジメチルアミノオキシエトキシ、すなわち、 $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{ON}(\text{CH}_3)_2$ 基、およびまた本明細書中以下の実施例に記載されるように、（当該分野でまた2'- $\text{O}-$ ジメチル-アミノ-エトキシ-エチルまたは2'-DMAEOEとして公知の）2'-ジメチルアミノエトキシエトキシ、すなわち、2'- $\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ が挙げられる。

【0089】

他の好ましい修飾としては、2'-メトキシ（2'- $\text{O}-\text{CH}_3$ ）、2'-アミノプロポキシ（2'- $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ）、2'-アリル（2'- $\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$ ）、2'- $\text{O}-$ アリル（2'- $\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$ ）および2'-フルオロ（2'- F ）が挙げられる。該2'-修飾は、アラビノ（上）位またはリボ（下）位に存在し得る。好ましい2'-アラビノ修飾は、2'- F である。類似の修飾もまた、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における糖の3'位、および5'末端ヌクレオチドの5'位になされ得る。アンチセンス化合物はまた、ペントフラノース糖の代わりにシクロブチル部分等の糖の模倣剤を有し得る。かかる修飾された糖構造の調製法を教示する代表的な米国特許としては、限定されないが、米国特許第：4,981,957号；5,118,800号；

5,319,080号；5,359,044号；5,393,878号；5,446,137号；5,466,786号；

5,514,785号；5,519,134号；5,567,811号；5,576,427号；5,591,722号；

50

5,597,909号; 5,610,300号; 5,627,053号; 5,639,873号; 5,646,265号;

5,658,873号; 5,670,633号; 5,792,747号; および5,700,920号が挙げられ、いくつかは本出願に共通して所有され、並びにそれぞれはその全体の中で参照として本明細書に援用される。

【0090】

糖のさらに好ましい修飾としては、その2'-ヒドロキシル基が、糖の環の3'または4'炭素原子に結合し、それにより、二環式糖部分を形成するロックド核酸(LNA)が挙げられる。該結合は、2'酸素原子および4'炭素原子を架橋する、メチレン(-CH₂-)_n基であり得、用語LNAは二環式部分として使用される。LNAおよびその調製法は、WO 98/39352号、およびWO 99/14226号に記載されている。この位置におけるエチレン基の場合、用語ENAを用いる(Singhら、Chem. Commun., 1998, 4, 455-456; ENATM: Moritaら、Bioorganic Medicinal Chemistry, 2003, 11, 2211-2226)。

10

【0091】

天然の、及び修飾された核酸塩基

アンチセンス化合物はまた、核酸塩基(当該分野でヘテロ環式塩基、または単に「塩基」としばしば称される)修飾または置換を含み得る。本明細書中で使用される場合、「非修飾」または「天然」核酸塩基としては、プリン塩基であるアデニン(A)及びグアニン(G)、ならびにピリミジン塩基であるチミン(T)、シトシン(C)及びウラシル(U)が挙げられる。修飾された核酸塩基としては、5-メチルシトシン(5-me-C)、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、アデニン及びグアニンの6-メチル及び他のアルキル誘導体、アデニン及びグアニンの2-プロピル及び他のアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミン及び2-チオシトシン、5-ハロウラシル及びシトシン、5-プロピニル(-C≡C-CH₃)ウラシル及びシトシン、ならびにピリミジン塩基の他のアルキニル誘導体、6-アゾウラシル、シトシン及びチミン、5-ウラシル(偽ウラシル)、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、及び他の8-置換アデニン及びグアニン、5-ハロ、特に5-プロモ、5-トリフルオロメチル、及び他の5-置換ウラシル及びシトシン、7-メチルグアニン及び7-メチルアデニン、2-F-アデニン、2-アミノ-アデニン、8-アザグアニン及び8-アザアデニン、7-デアザグアニン及び7-デアザアデニン、及び3-デアザグアニン及び3-デアザアデニンなどの他の合成、及び天然核酸塩基が挙げられる。さらなる修飾された核酸塩基としては、フェノキサジンシチジン(1H-ピリミド(5,4-b)(1,4)ベンゾキサジン-2(3H)-オン)、フェノチアジンシチジン(1H-ピリミド(5,4-b)(1,4)ベンゾチアジン-2(3H)-オン)、置換されたフェノキサジンシチジン(例えば、9-(2-アミノエトキシ)-H-ピリミド(5,4-b)(1,4)ベンゾキサジン-2(3H)-オン)などのGクランプ、カルバゾールシチジン(2H-ピリミド(4,5-b)インドール-2-オン)、ピリドインドールシチジン(H-ピリド(3',2':4,5)ピロロ(2,3-d)ピリミジン-2-オン)などの三環式ピリミジンが挙げられる。修飾された核酸塩基としてはまた、該プリンまたはピリミジン塩基が、他のヘテロ環、例えば7-デアザ-アデニン、7-デアザグアニン、2-アミノピリジン、及び2-ピリドンで置換されたものが挙げられ得る。さらなる核酸塩基としては、米国特許第3,687,808号に開示されたもの、The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, 858-859ページ, Kroschwitz, J.I., 編John Wiley & Sons, 1990に開示されたもの、Englischら, Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613により開示されたもの、及びSanghvi, Y.S., 15章, Antisense Research and Applications, 289-302ページ, Crooke, S.T.及びLebleu, B., 編, CRC Press, 1993により開示されたものが挙げられる。かかる核酸塩基のいくつかは、本発明の化合物の結合親和性を増大させるのに、特に有用である。これらとしては、2-アミノプロピルアデニン、5-プロピニルウラシル、及び5-プロピニルシトシンを含む5-置換ピリミジン、6-アザピリミジン、ならびにN-2、N-6、及びO-6置換プリンが挙げられる。5-メチルシトシン置換は、核酸二本鎖安定性を0.6~1.2 増大させることが示され、より詳しくは2'-O-メトキシエチル糖修飾と組み合わせられた場合、現在好ましい塩基置換である。

20

30

40

50

【0092】

上記修飾された核酸塩基のいくつかならびに他の修飾された核酸塩基の調製法も教示する代表的な米国特許としては、限定されないが、上記米国特許第3,687,808号ならびに米国特許第：4,845,205号；5,130,302号；5,134,066号；5,175,273号；5,367,066号；5,432,272号；5,457,187号；5,459,255号；5,484,908号；5,502,177号；5,525,711号；5,552,540号；5,587,469号；5,594,121号；5,596,091号；5,614,617号；5,645,985号；5,830,653号；5,763,588号；6,005,096号；及び5,681,941号（いくつかは本出願に共通して所有され、それぞれは参照として本明細書に援用される）、及び米国特許第5,750,692号（本出願に共通して所有され、また参照として本明細書に援用される）が挙げられる。

【0093】

結合体

本発明のアンチセンス化合物の別の修飾としては、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高める一つ以上の部分または結合体をアンチセンス化合物に化学的に連結することが挙げられる。かかる部分または結合体としては、第一級または二級ヒドロキシル基などの官能基に共有結合した結合体群が挙げられ得る。本発明の結合体群としては、インターカレーター、レポーター分子、ポリアミン、ポリアミド、ポリエチレングリコール、ポリエーテル、オリゴマーの薬力学的性質を高める群、及びオリゴマーの薬動力学的性質を高める群が挙げられる。典型的な結合体群としては、コレステロール、脂質、リン脂質、ビオチン、フェナジン、葉酸、フェナントリジン、アントラキノン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、クマリン、及び染料が挙げられる。薬力学的性質を高める群としては、本発明の関係においては、取り込みを向上させ、分解耐性を高め、及び/または標的核酸との配列特異的ハイブリダイゼーションを強化する群が挙げられる。薬動力学的性質を高める群としては、本発明の関係においては、本発明の化合物の取り込み、分布、代謝、または排出を向上させる群が挙げられる。代表的な結合体群は、1992年10月23日に出願された国際特許出願第PCT/US92/09196号、及び米国特許第6,287,860号に開示されて、全開示は参照として本明細書に援用される。結合体部分としては、限定されないが、コレステロール部分、コール酸、チオエーテル、例えば、ヘキシル-S-トリチルチオール、チオコレステロール、脂肪鎖、例えば、ドデカンジオール、もしくはウンデシル残基、リン脂質、例えば、ジ-ヘキサデシル-rac-グリセロール、もしくはトリエチルアンモニウム1,2-ジ-O-ヘキサデシル-rac-グリセロ-3-H-ホスホネート、ポリアミン、もしくはポリエチレングリコール鎖、または、アダマンタン酢酸、バルミチル部分、または、オクタデシルアミン、もしくはヘキシルアミノ-カルボニル-オキシコレステロール部分などの脂質部分が挙げられる。本発明のアンチセンス化合物はまた、活性のある製剤原料、例えば、アスピリン、ワルファリン、フェニルブタゾン、イブプロフェン、スプロフェン、フェンブフェン、ケトプロフェン、(S)-(+)-プラノプロフェン、カルプロフェン、ダンシルサルコシン、2,3,5-トリヨード安息香酸、フルフェナム酸、ホリニン酸、ベンゾサイアジアザイド、クロロサイアザイド、ジアゼピン、インドメチシン（indomethicin）、バルビツレート、セファロスポリン、サルファ剤、抗糖尿病薬、抗菌物質、または抗生物質に結合され得る。オリゴヌクレオチド-薬物結合体及びその調製法は、米国特許出願第09/334,130号（1999年6月15日に出願）に記載され、その全体の中で本明細書に参照として援用される。

【0094】

かかるオリゴヌクレオチド結合体の調製法を教示する代表的な米国特許としては、限定されないが、米国特許第：4,828,979号；4,948,882号；5,218,105号；5,525,465号；5,541,313号；5,545,730号；5,552,538号；5,578,717号；5,580,731号；5,580,731号；5,591,584号；5,109,124号；5,118,802号；5,138,045号；5,414,077号；5,486,603号；5,512,439号；5,578,718号；5,608,046号；4,587,044号；4,605,735号；4,667,025号；4,762,779号；4,789,737号；4,824,941号；4,835,263号；4,876,335号；4,904,582号；4,958,013号；5,082,830号；5,112,963号；5,214,136号；5,082,830号；5,112,963号；5,214,136号；5,245,022号；5,254,469号；5,258,506号；5,262,536号；5,272,250号；5,292,873号；5,317,098号

;5,371,241号; 5,391,723号; 5,416,203号; 5,451,463号; 5,510,475号;5,512,667号; 5,514,785号; 5,565,552号; 5,567,810号; 5,574,142号;5,585,481号; 5,587,371号; 5,595,726号; 5,597,696号; 5,599,923号;5,599,928号及び5,688,941号、が挙げられ、いくつかは本出願に共通して所有され、それぞれは本明細書に参照として援用される。

【0095】

キメラ化合物

所定の化合物のすべての位置が均一に修飾される必要はなく、実際には前記修飾の一つ以上が、単一の化合物に、またはオリゴヌクレオチド内の単一のヌクレオシドにさえ、組み込まれ得る。

【0096】

本発明はまた、キメラ化合物であるアンチセンス化合物を含む。「キメラ」アンチセンス化合物、または「キメラ」は、本発明の関係においては、アンチセンス化合物、特にオリゴヌクレオチドであり、これは、各々少なくとも一つのモノマー単位からなる、二つ以上の化学的に異なる領域、すなわちオリゴヌクレオチド化合物の場合におけるヌクレオチド、を含有する。

キメラアンチセンスオリゴヌクレオチドは、従って、アンチセンス化合物の形態である。かかるオリゴヌクレオチドは、ヌクレアーゼ分解への増大した耐性、増大した細胞取り込み、増大した安定性、及び/または標的核酸に対する増大した結合親和性をオリゴヌクレオチドに付与するようにオリゴヌクレオチドが修飾された、少なくとも一つの領域を典型的には含有する。オリゴヌクレオチドのさらなる領域は、RNA:DNAまたはRNA:RNAハイブリッドを切断し得る酵素の基質としてはたらき得る。例として、RNアーゼ(RNase) Hは、RNA:DNA二本鎖のRNA鎖を切断する細胞エンドヌクレアーゼである。RNアーゼ Hの活性化は、したがって、RNA標的の切断を生じ、その結果オリゴヌクレオチドに媒介された遺伝子発現の阻害の有効性を大いに高める。RNA:RNAハイブリッドの切断は、同様に、細胞及びウイルスのRNAの両方を切断するRNアーゼL(RNaseL)などのエンドリボヌクレアーゼの作用を通じて達成され得る。RNA標的の切断は、通常通り、ゲル電気泳動、及び必要に応じて、当該分野で公知の、関連する核酸ハイブリダイゼーション法によって、検出され得る。

【0097】

本発明のキメラアンチセンス化合物は、二つ以上の、上記のようなオリゴヌクレオチド、修飾されたオリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシド、及び/またはオリゴヌクレオチド模倣剤の複合構造として形成され得る。かかる化合物はまた、当該分野でハイブリッドまたはギャップマーと呼ばれてきた。かかるハイブリッド構造の調製法を教示する代表的な米国特許としては、限定されないが、米国特許第:5,013,830号; 5,149,797号; 5,220,007号;5,256,775号; 5,366,878号; 5,403,711号; 5,491,133号; 5,565,350号;5,623,065号; 5,652,355号; 5,652,356号; 及び5,700,922号が挙げられ、いくつかは本出願に共通して所有され、それぞれはその全体の中で参照として本明細書に援用される。

【0098】

G. 製剤

本発明の化合物はまた、取り込み、分布及び/または吸収を助けるために、混合され、カプセルに入れられ、例えばリポソーム、受容体標的分子、経口、直腸、局所、もしくは他の製剤などの他の分子、分子構造もしくは化合物の混合物と結合され、または他の場合には会合され得る。かかる取り込み、分布及び/または吸収を助ける製剤の調製法を教示する代表的な米国特許としては、限定されないが、米国特許第:5,108,921号;5,354,844号; 5,416,016号; 5,459,127号; 5,521,291号; 5,543,158号;5,547,932号; 5,583,020号; 5,591,721号; 4,426,330号; 4,534,899号;5,013,556号; 5,108,921号; 5,213,804号; 5,227,170号; 5,264,221号;5,356,633号; 5,395,619号; 5,416,016号; 5,417,978号; 5,462,854号;5,469,854号; 5,512,295号; 5,527,528号; 5,534,259号; 5,543,152号;5,556,948号; 5,580,575号; 及び5,595,756号が挙げられ、それぞれは参照として本明細書に援用される。

【0099】

本発明のアンチセンス化合物は、任意の薬学的に許容され得る塩、エステル、もしくはかかるエステルの塩、またはヒトを含む動物に投与すると、その生物学的に活性のある代謝産物もしくは残留物を（直接もしくは間接的に）提供し得る任意の他の化合物を含む。

【0100】

用語「薬学的に許容され得る塩」は、本発明の化合物の生理学的に及び薬学的に許容され得る塩、すなわち親化合物の所望の生物学的活性を保持し、望まれない毒物学的効果をそれに付与しない塩のことを言う。オリゴヌクレオチドについての、薬学的に許容され得る塩及びその使用の好ましい例は、さらに米国特許第6,287,860号に記載され、その全体の中で本明細書に援用される。オリゴヌクレオチドについての、薬学的に許容され得る塩の現在好ましい例としては、限定されないが、（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、スペルミン及びスペルミジン等のポリアミン等のカチオンで形成された塩等；（b）例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、硝酸等の無機酸で形成された酸付加塩；（c）例えば、酢酸、蔞酸、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、等の有機酸で形成された塩等；並びに（d）塩素、臭素、及びヨウ素等のアニオン元素から形成される塩が挙げられる。ナトリウム塩は現在より好ましいと考えられている。

10

【0101】

本発明はまた、本発明のアンチセンス化合物を含有する医薬組成物及び製剤を含む。本発明の医薬組成物は、局所または全身治療が望まれるかどうか、及び治療される部分により、いくつかの方法で投与され得る。投与は、局所的（眼、ならびに膣及び直腸送達を含む粘膜へを含む）、例えば噴霧器によることを含む粉末もしくはエアロゾルの吸入もしくは通気により肺に、気管内、鼻腔内、表皮に、ならびに経皮的）、経口または非経口であり得る。非経口投与としては、静脈内、動脈内、皮下、腹腔内もしくは筋肉内注射もしくは点滴、または頭蓋内、例えば髄腔内もしくは脳室内投与が挙げられる。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、特に経口投与に有用であると考えられている。局所投与用医薬組成物及び製剤としては、経皮貼付剤、軟膏、ローション剤、クリーム、ゲル、ドロップ、坐剤、噴霧剤、液体、及び粉末が挙げられ得る。従来の医薬担体、水性の、粉末または油性の基剤、増粘剤などが必要であり得るかまたは望まれ得る。コーティングされたコンドーム、手袋などもまた有用であり得る。

20

30

【0102】

本発明の医薬製剤は、従来単位投薬形態でもたらされ得るが、製薬産業で周知の従来技術にしたがって調製され得る。かかる技術としては、活性成分を薬学的担体または賦形剤と関連させる工程が挙げられる。一般的に製剤は、活性成分を液体担体もしくは微粉化した固体担体または両方と一様にかつ緻密に関連させ、次いで必要に応じて生成物を形作ることによって調製される。

【0103】

本発明の組成物は、錠剤、カプセル、ゲルカプセル、液体シロップ剤、ソフトゲル、坐薬および浣腸等の、しかしこれらに限定されない任意の可能性のある多くの投薬形態へと製剤化され得る。本発明の組成物はまた、水性媒体、非水性媒体または混合媒体における懸濁液として製剤化され得る。水性懸濁液はさらに、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトールおよび/またはデキストランを含む懸濁液の粘性を増大させる物質を含み得る。懸濁液はまた安定剤を含み得る。

40

【0104】

本発明の医薬組成物としては、溶液、乳状液、泡およびリボソーム含有製剤が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の医薬組成物および製剤は、1つ以上の浸透促進剤、担体、賦形剤、または他の活性もしくは不活性成分を含み得る。

【0105】

乳状液は、通常直径0.1 μmを超える小滴の形で別の液体の中に分散しているある液体の

50

一般的に不均一な系である。水相、油性相もしくは分離相それ自体のいずれかの溶液として存在し得る分散相および活性薬物に加え、乳状液はさらなる構成要素を含み得る。マイクロエマルジョンは、本発明の態様として含まれる。乳状液およびその使用は、当該分野にて周知であり、さらに米国特許第6,287,860号に記載されて、その全体の中で本明細書に援用される。

【0106】

本発明の製剤としては、リボソーム製剤が挙げられる。本発明で使用する場合、用語「リボソーム」は、球状の二分子層または複数の二分子層に配置された両親媒性脂質から構成される小胞を意味する。リボソームは、脂肪親和物質から形成される膜および送達される組成物を含有する水性の内部を有する単層状または多層状の小胞である。陽イオン性リボソームは、負電荷を有するDNA分子と相互作用して安定した複合体を形成すると考えられる、正電荷を有するリボソームである。pH感受性または負電荷を有するリボソームは、DNAと複合体を形成するよりもDNAを取り込むと考えられる。陽イオン性および非陽イオン性リボソームのどちらも、DNAを細胞へ送達するのに使用されている。

10

【0107】

本明細書中で用いられる場合、リボソームはまた、リボソームに取り込まれる場合に特殊化した脂質を欠くリボソームに関連して増大した循環寿命を生じる一つ以上の特殊化した脂質を含むリボソームを指す用語「立体的に安定した」リボソームを含む。立体的に安定したリボソームの例は、リボソームの小胞を形成する脂質部分の一部が1つ以上の糖脂質を含有するもの、またはポリエチレングリコール(PEG)部分等の1つ以上の親水性ポリマーで誘導されているものである。リボソームおよびその使用は、さらに米国特許第6,287,860号に記載され、その全体の中で本明細書に援用される。

20

【0108】

本発明の医薬製剤および医薬組成物はまた界面活性剤を含有し得る。薬物製品、製剤および乳状液中の界面活性剤の使用は、当該分野において周知である。界面活性剤およびその使用は、米国特許第6,287,860号にさらに記載され、その全体の中で本明細書に援用される。

【0109】

ある態様において、本発明は核酸、特にオリゴヌクレオチドの、効率的な送達を実施するために、様々な浸透促進剤を使用する。非脂肪親和性薬物の細胞膜を横切る拡散を促進するのに加え、浸透促進剤はまた、脂肪親和性薬物の浸透性を高める。浸透促進剤は5つの大きなカテゴリー、すなわち、界面活性剤、脂肪酸、胆汁酸塩、キレート剤および非キレート非界面活性剤の1つに属するものとして分類され得る。浸透促進剤およびその使用は、米国特許第6,287,860号にさらに記載され、その全体の中で本明細書に援用される。

30

【0110】

当業者は、製剤がそれらの意図された使用、すなわち、投与の経路に応じて決まりきった手順で設計されることを認めるだろう。

【0111】

局所投与のための好ましい製剤としては、本発明のオリゴヌクレオチドが脂質、リボソーム、脂肪酸、脂肪酸エステル、ステロイド、キレート剤および界面活性剤等の局所送達薬剤と混合されているものが挙げられる。好ましい脂質およびリボソームとしては、中性(例えば、ジオレオイルホスファチジルDOPEエタノールアミン、ジミリス ToilホスファチジルコリンDMPC、ジステアロイルホスファチジルコリン)陰性(例えば、ジミリス ToilホスファチジルグリセリンDMPG)および陽イオン性(例えば、ジオレオイルテトラメチルアミノプロピルDOTAPおよびジオレオイルホスファチジルエタノールアミンDOTMA)が挙げられる。

40

【0112】

局所または他の投与のために、本発明のオリゴヌクレオチドはリボソーム内に封入され得るか、またはそれとの複合体、特に陽イオン性リボソームとの複合体を形成し得る。あるいは、オリゴヌクレオチドは脂質、特に陽イオン性脂質と錯体を形成し得る。好ましい脂

50

脂肪酸およびエステル、その薬学的に許容され得る塩、ならびにその使用は米国特許第6,287,860号にさらに記載され、その全体の中で本明細書に援用される。局所製剤は、1999年5月20日に出願された米国特許出願第09/315,298号に詳細に記載され、その全体の中で参照として本明細書に援用される。

【0113】

経口投与のための組成物および製剤としては、散剤または顆粒剤、マイクロ微粒子、ナノ微粒子、水または非水性媒体中の懸濁液または溶液、カプセル、ゲルカプセル、サシェ、錠剤または小型錠剤が挙げられる。増粘剤、矯味矯臭剤、希釈剤、乳化剤、分散補助剤または接合剤が望ましくあり得る。好ましい経口製剤は、本発明のオリゴヌクレオチドが1つ以上の浸透促進剤、界面活性剤およびキレート剤とともに投与されるものである。好ましい界面活性剤としては、脂肪酸および/もしくはエステルまたはその塩、胆汁酸および/またはその塩が挙げられる。好ましい胆汁酸/塩および脂肪酸ならびにその使用は、米国特許第6,287,860号にさらに記載され、その全体の中で本明細書に援用される。浸透促進剤の組み合わせ、例えば胆汁酸/塩と組み合わせた脂肪酸/塩もまた好ましい。特に好ましい組み合わせは、ラウリン酸、カプリン酸およびUDCAのナトリウム塩である。さらに浸透促進剤としては、ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン-20-セチルエーテルが挙げられる。本発明のオリゴヌクレオチドは、噴霧乾燥粒子を含む顆粒状態またはマイクロもしくはナノ粒子を形成する錯体形態で、経口的に送達され得る。オリゴヌクレオチド錯化剤およびその使用は、米国特許第6,287,860号にさらに記載され、その全体の中で本明細書に援用される。オリゴヌクレオチドの経口製剤およびその調製は、米国特許出願第09/108,673号（1998年7月1日出願）、第09/315,298号（1999年5月20日出願）および第10/071,822号（2002年2月8日出願）に詳細に記載され、それぞれはその全体の中で参照として本明細書に援用される。

【0114】

非経口、髄膜下または脳室内投与のための組成物および製剤としては、緩衝剤、希釈剤ならびに浸透促進剤、担体化合物および他の薬学的に許容され得る担体または賦形剤等で、しかしこれらに限定されない他の適切な添加剤をまた含み得る滅菌水溶液が挙げられ得る。

【0115】

本発明のある態様は、1つ以上のオリゴマー化合物および非アンチセンス機構により機能する1つ以上の他の化学療法薬剤を含む医薬組成物を提供する。かかる化学療法薬剤の例としては、ダウノルビシン、ダウノマイシン、ダクチノマイシン、ドキシルビシン、エピルビシン、イダルビシン、エソルビシン、ブレオマイシン、マホスファミド、イホスファミド、シトシンアラビノシド、ビスクロロエチルニトロソ尿素、ブスルファン、マイトマイシンC、アクチノマイシンD、ミトラマイシン、プレドニゾン、ヒドロキシprogesteron、テストステロン、タモキシフェン、ダカルバジン、プロカルバジン、ヘキサメチルメラミン、ペンタメチルメラミン、ミトザントロン、アムサクリン、クロラムブシル、メチルシクロヘキシルニトロソ尿素、ナイトロジェンマスタード、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、シタラビン、5-アザシチジン、ヒドロキシ尿素、デオキシコホルマイシン、4-ヒドロキシペルオキシシクロホスホラミド、5-フルオロウラシル（5-FU）、5-フルオロデオキシウリジン（5-FUdR）、メトトレキサート（MTX）、コルヒチン、タキソール、ピンクリスチン、ピンブラスチン、エトポシド（VP-16）、トリメトトレキサート、イリノテカン、トポテカン、ゲムシタビン、テニボシド、シスプラチンおよびジエチルスチルベストロール（DES）等の癌化学療法薬物が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の化合物とともに使用される場合、かかる化学療法薬剤は、個々に（例えば、5-FUおよびオリゴヌクレオチド）、連続的に（例えば、5-FUおよびオリゴヌクレオチドのある期間の後にMTXおよびオリゴヌクレオチドが続く）、または1つ以上の他のかかる化学療法薬剤（例えば5-FU、MTXおよびオリゴヌクレオチド、または5-FU、放射線療法およびオリゴヌクレオチド）と組み合わせて使用され得る。非ステロイド性抗炎症薬物およびコルチコステロイドを含むがこれらに限定されない抗炎症薬物、な

らびにリビリン、ピダラビン、アシクロビルおよびガンシクロビルを含むがこれらに限定されない抗ウイルス性薬物はまた、本発明の組成物に組み込まれ得る。アンチセンス化合物および他の非アンチセンス薬物の組み合わせはまた、本発明の範囲内である。2つ以上の結合した化合物は、一緒にまたは連続して使用され得る。

【0116】

別の関連ある態様において、本発明の組成物は、第1の核酸を標的にする1つ以上のアンチセンス化合物、特にオリゴヌクレオチド、および第2の核酸標的を標的にする1つ以上のさらなるアンチセンス化合物を含み得る。あるいは、本発明の組成物は、同じ核酸標的の異なる領域を標的にした2つ以上のアンチセンス化合物を含み得る。アンチセンス化合物の多数の例が当該分野において公知である。2つ以上の結合した化合物が、一緒にまたは連続して使用され得る。

10

【0117】

H. 投与

治療用組成物の製剤化およびその引き続く投与(administration)(投与(dosing))は、当業者の技術の範囲内であると考えられる。投与は、数日~数ヶ月続く治療の過程内で、または治療が達成されたもしくは疾患状態の減少が達成されるまで、治療すべき疾患状態の重篤度および反応性に依存する。最適な投与スケジュールは、患者の身体内での薬物の蓄積を測定することにより計算され得る。当業者は、最適な投薬量、投与方法および頻度を容易に決定し得る。最適な投薬量は、個々のオリゴヌクレオチドの相対効能に依存して変動し得、一般的には、インビトロおよびインビボ動物モデルにおいて効果的であることが見出されているEC₅₀に基づいて評価され得る。一般的に、投薬量は、体重1kg当たり0.0001μg~100gであり、1日毎に、1週間毎に、1ヶ月毎にもしくは1年毎に1回以上、または2~20年毎に1回でも投与され得る。当業者は、投与の頻度を、体液または組織中での測定された薬物の滞留時間および濃度に基づいて容易に評価し得る。首尾良い治療の後、患者に、疾患状態の再発を予防するための維持療法を受けさせることが望ましくあり得るが、この場合、オリゴヌクレオチドを、体重1kg当たり0.0001μg~100gの範囲内で、1日毎に1回以上~20年毎に1回、維持投薬量で投与する。

20

【0118】

本発明をいくつかのその好ましい態様に従って、具体的に記載してきたが、以下の実施例は本発明を例証するのみであり、同様なものに限定されることを意図しない。本出願で引用されるそれぞれの参照、GenBank accession numbers等はその全体の中で参照として本明細書に援用される。

30

【実施例1】

【0119】

ヌクレオシドホスホルアミダイトの合成

アミダイトおよびその中間体を含む以下の化合物は、米国特許第6,426,220号およびPCT公開第WO 02/36743号に記載のように調製された；5-メチル dC アミダイトの5'-O-ジメトキシトリチル-チミジン中間体、5-メチル-dCアミダイトの5'-O-ジメトキシトリチル-2'-デオキシ-5-メチルシチジン中間体、5-メチルdCアミダイトの5'-O-ジメトキシトリチル-2'-デオキシ-N⁴-ベンゾイル-5-メチルシチジンの最後から2番目の中間体、(5'-O-(4,4'-ジメトキシトリフェニルメチル)-2'-デオキシ-N⁴-ベンゾイル-5-メチルシチジン-3'-O-イル)-2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピルホスホルアミダイト(5-メチルdCアミダイト)、2'-フルオロデオキシアデノシン、2'-フルオロデオキシグアノシン、2'-フルオロウリジン、2'-フルオロデオキシシチジン、2'-O-(2-メトキシエチル)修飾アミダイト、2'-O-(2-メトキシエチル)-5-メチルウリジン中間体、5'-O-DMT-2'-O-(2-メトキシエチル)-5-メチルウリジンの最後から2番目の中間体、(5'-O-(4,4'-ジメトキシトリフェニルメチル)-2'-O-(2-メトキシエチル)-5-メチルウリジン-3'-O-イル)-2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピルホスホルアミダイト(MOE Tアミダイト)、5'-O-ジメトキシトリチル-2'-O-(2-メトキシエチル)-5-メチルシチジン中間体、5'-O-ジメトキシトリチル-2'-O-(2-メトキシエチル)-N⁴-ベンゾイル-5-メチル-シチジンの最後から2番目の中間体、(5'

40

50

-O- (4,4'-ジメトキシトリフェニルメチル) -2'-O- (2-メトキシエチル) -N⁴-ベンゾイル
 -5-メチルシチジン-3'-O-イル)-2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピルホスホルアミダイト
 (MOE 5-Me-Cアミダイト)、(5'-O- (4,4'-ジメトキシトリフェニルメチル) -2'-O- (2-
 メトキシエチル) -N⁶-ベンゾイルアデノシン-3'-O-イル) -2-シアノエチル-N,N-ジイソ
 プロピルホスホルアミダイト (MOE Aアミダイト)、(5'-O- (4,4'-ジメトキシトリフェニ
 ルメチル) -2'-O- (2-メトキシエチル) -N⁴-イソブチリルグアノシン-3'-O-イル) -2-シ
 アノエチル-N,N-ジイソプロピルホスホルアミダイト (MOE Gアミダイト)、2'-O- (アミ
 ノオキシエチル) ヌクレオシドアミダイトおよび2'-O- (ジメチルアミノ-オキシエチル)
 ヌクレオシドアミダイト、2'- (ジメチルアミノオキシエトキシ) ヌクレオシドアミダイ
 ト、5'-O-tert-ブチルジフェニルシリル-O²-2'-アンヒドロ-5-メチルウリジン、5'-O-ter
 t-ブチルジフェニルシリル-2'-O- (2-ヒドロキシエチル) -5-メチルウリジン、2'-O- ((2-
 フタルイミドキシ) エチル) -5'-t-ブチルジフェニルシリル-5-メチルウリジン、5'-O-
 tert-ブチルジフェニルシリル-2'-O- ((2-ホルムアドキシイミノオキシ) エチル) -5-メ
 チルウリジン、5'-O-tert-ブチルジフェニルシリル-2'-O- (N,Nジメチルアミノオキシエ
 チル) -5-メチルウリジン、2'-O- (ジメチルアミノオキシエチル) -5-メチルウリジン、5'-
 O-DMT-2'-O- (ジメチルアミノオキシエチル) -5-メチルウリジン、5'-O-DMT-2'-O- (2-N,N-
 ジメチルアミノオキシエチル) -5-メチルウリジン-3'- ((2-シアノエチル) -N,N-ジイソ
 プロピルホスホルアミダイト)、2'- (アミノオキシエトキシ) ヌクレオシドアミダイト
 、N²-イソブチリル-6-O-ジフェニルカルバモイル-2'-O- (2-エチルアセチル) -5'-O- (4,
 4'-ジメトキシトリチル) グアノシン-3'- ((2-シアノエチル) -N,N-ジイソプロピルホス
 ホルアミダイト)、2'-ジメチルアミノエトキシエトキシ (2'-DMAEOE) ヌクレオシドアミ
 ダイト、2'-O- (2 (2-N,N-ジメチルアミノエトキシ) エチル) -5-メチルウリジン、5'-O-
 ジメトキシトリチル-2'-O- (2 (2-N,N-ジメチルアミノエトキシ) -エチル) -5-メチルウ
 リジンおよび5'-O-ジメトキシトリチル-2'-O- (2 (2-N,N-ジメチルアミノエトキシ) -エ
 チル) -5-メチルウリジン-3'-O- (シアノエチル-N,N-ジイソプロピル) ホスホルアミダ
 イト。

【実施例 2】

【0120】

オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオシドの合成

本発明に従って用いられるアンチセンス化合物は、固相合成の周知の技術により、簡便
 かつ決まりきった手順で調製され得る。かかる合成のための装置は、例えば、Applied Bi
 osystems (Foster City, CA) を含むいくつかの販売業社により販売されている。当該分
 野で公知のかかる合成の任意の他の手段が、さらにまたは代替的に使用され得る。同様の
 技術を使用して、ホスホロチオエートおよびアルキル化誘導体等のオリゴヌクレオチドを
 調製することが周知である。

【0121】

オリゴヌクレオチド：

未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、ヨウ素で酸化する標
 準的なホスホルアミダイト化学を用いる自動化DNA合成機 (Applied Biosystemsモデル39
 4) で合成される。

【0122】

ホスホロチオエート (P=S) は、ホスファイト結合を酸化するための3,H-1,2-ベンゾジ
 チオール-3-オン 1,1-ジオキシドの10% w/vアセトニトリル溶液を利用してチオ化を行
 うこと以外、ホスホジエステルオリゴヌクレオチドと同様に合成される。チオ化反応工程
 の時間は、180秒まで延長し、通常のキャッピング工程を先に行った。CPGカラムからの切
 断および55% での濃縮水酸化アンモニウム中での脱保護 (12~16時間) の後、オリゴヌク
 レオチドを、3容積より多いエタノールを用いて、1 M NH₄OAc溶液から沈殿させることに
 より回収した。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号に記載の
 ように調製され、参照として本明細書に援用される。

【0123】

10

20

30

40

50

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号に記載のように調製され、参照として本明細書に援用される。

【0124】

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号または同第5,625,050号に記載のように調製され、参照として本明細書に援用される。

【0125】

ホスホルアミダイトオリゴヌクレオチドは、米国特許第5,256,775号または同第5,366,878号に記載のように調製され、参照として本明細書に援用される。

【0126】

アルキルホスホノチオエートオリゴヌクレオチドは、PCT特許公開第PCT/US94/00902号および同第PCT/US93/06976号（それぞれ第WO 94/17093号および第WO 94/02499号として公開されている）に記載のように調製され、参照として本明細書に援用される。

【0127】

3'-デオキシ-3'-アミノホスホルアミデートオリゴヌクレオチドは、米国特許第5,476,925号に記載のように調製され、参照として本明細書に援用される。

【0128】

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号に記載のように調製され、参照として本明細書に援用される。

【0129】

ボラノリン酸オリゴヌクレオチドは、米国特許第5,130,302号および同第5,177,198号に記載のように調製され、両方が参照として本明細書に援用される。

【0130】

オリゴヌクレオシド：

MMI結合オリゴヌクレオシドとしても特定されるメチレンメチルイミノ結合オリゴヌクレオシド、MDH結合オリゴヌクレオシドとしても特定されるメチレンジメチルヒドラゾ結合オリゴヌクレオシド、およびアミド-3結合オリゴヌクレオシドとしても特定されるメチレンカルボニルアミノ結合オリゴヌクレオシド、およびアミド-4結合オリゴヌクレオシドとしても特定されるメチレンアミノカルボニル結合オリゴヌクレオシド、ならびに、例えば、交互にMMIおよびP=OまたはP=S結合を有する混合骨格化合物は、米国特許第5,378,825号、同第5,386,023号、同第5,489,677号、同第5,602,240号および同第5,610,289号に記載のように調製され、全ては参照として本明細書に援用される。

【0131】

ホルムアセタールおよびチオホルムアセタール結合オリゴヌクレオシドは、米国特許第5,264,562号および同第5,264,564号に記載のように調製され、参照として本明細書に援用される。

【0132】

エチレンオキシド結合オリゴヌクレオシドは、米国特許第5,223,618号に記載のように調製され、参照として本明細書に援用される。

【実施例3】

【0133】

RNA合成

一般的に、RNA合成化学は、戦略的な中間体反応における種々の保護基の選択的組み込みに基づく。当業者は、有機合成における保護基の使用を理解するであろうが、有用な保護基の種類には、シリルエーテルが含まれる。特定のかさ高いシリルエーテルは、2'-ヒドロキシル上の酸に不安定なオルトエステル保護基と組み合わせて、5'-ヒドロキシルを保護するのに用いられる。次いで、この保護基の組は、標準的な固相合成技術により使用される。全ての他の合成工程後、酸に不安定なオルトエステル保護基を最後に除去することが重要である。さらに、必要に応じて、合成の間に早期にシリル保護基を使用することにより、2'-ヒドロキシルの望まない脱保護が起こることなく、容易な除去が確実になる。

。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 4 】

異なるように除去されかつ異なるように化学的に不安定な保護基での2'-ヒドロキシルの保護と組み合わせた5'-ヒドロキシルの連続的保護のためのこの手順に従って、RNAオリゴヌクレオチドを合成した。

【 0 1 3 5 】

RNAオリゴヌクレオチドは、段階的な様式で合成される。それぞれのヌクレオチドを、(3'-から5'-の方向に)順に、固相支持体に結合させたオリゴヌクレオチドに添加する。鎖の3'末端における第1のヌクレオシドを、固相支持体に共有結合させる。ヌクレオチド前駆体、リボヌクレオシドホスホルアミダイトおよび活性化剤を添加し、第2の塩基を、第1のヌクレオシドの5'末端にカップリングさせる。支持体を洗浄し、任意の未反応の5'-ヒドロキシル基を無水酢酸でキャップして、5'-アセチル部分を得る。次いで、結合を、より安定で、かつ最終的に所望されるP(V)結合に酸化する。ヌクレオチド付加サイクルの最後に、5'-シリル基をフッ化物で切断する。該サイクルを、それぞれの次のヌクレオチドについて繰り返す。

【 0 1 3 6 】

合成後、リン酸塩上のメチル保護基を、DMF中の1 M ジナトリウム-2-カルバモイル-2-シアノエチレン-1,1-ジチオレート三水和物(S_2Na_2)を利用して、30分間で切断する。脱保護溶液を、水を使用して、固相支持体に結合したオリゴヌクレオチドから洗い流す。次いで、支持体を、水中の40%メチルアミンで10分間、55℃にて処理する。これによりRNAオリゴヌクレオチドが溶液中に遊離し、環外アミンを脱保護し、かつ2'-基を修飾する。オリゴヌクレオチドを、この段階で、陰イオン交換HPLCにより分析し得る。

【 0 1 3 7 】

2'-オルトエステル基は、除去すべき最後の保護基である。Dharmacon Research, Inc. (Lafayette, CO)が開発したエチレングリコールモノ酢酸オルトエステル保護基は、有用なオルトエステル保護基の一例であり、以下の重要な特性を有する。これはヌクレオシドホスホルアミダイト合成およびオリゴヌクレオチド合成の条件に安定である。しかしながら、オリゴヌクレオチド合成後、オリゴヌクレオチドはメチルアミンで処理されるが、該メチルアミンはオリゴヌクレオチドを固相支持体から切断するのみならず、オルトエステルからアセチル基を除去する。得られるオルトエステル上の2-エチルヒドロキシル置換基は、アセチル化前駆体よりも電子吸引力が低い。結果として、修飾オルトエステルは、酸触媒加水分解に対してより不安定になる。詳細には、アセチル基が除去された後、切断速度はおよそ10倍速くなる。従って、このオルトエステルは、オリゴヌクレオチド合成に適合するための十分な安定性を有し、さらに引き続いて修飾される場合、最終的なRNAオリゴヌクレオチド産物と適合する比較的穏やかな水性条件下で脱保護を行うことを可能にする。

【 0 1 3 8 】

さらに、RNA合成の方法は、当該分野で周知である(Scaringe, S. A. 博士論文, University of Colorado, 1996; Scaringe, S. A. ら, J. Am. Chem. Soc., 1998, 120, 11820-11821; Matteucci, M. D. および Caruthers, M. H. J. Am. Chem. Soc., 1981, 103, 3185-3191; Beaucage, S. L. および Caruthers, M. H. Tetrahedron Lett., 1981, 22, 1859-1862; Dahl, B. J. ら, Acta Chem. Scand., 1990, 44, 639-641; Reddy, M. P. ら, Tetrahedron Lett., 1994, 25, 4311-4314; Wincott, F. ら, Nucleic Acids Res., 1995, 23, 2677-2684; Griffin, B. E. ら, Tetrahedron, 1967, 23, 2301-2313; Griffin, B. E. ら, Tetrahedron, 1967, 23, 2315-2331)。

【 0 1 3 9 】

本発明のRNAアンチセンス化合物(RNAオリゴヌクレオチド)は、本明細書中に記載の方法により合成され得るか、またはDharmacon Research, Inc (Lafayette, CO)から購入し得る。合成されると、相補的RNAアンチセンス化合物を合成し、次いで、当該分野で公知の方法によりアニーリングして、二重鎖(二本鎖)アンチセンス化合物を形成し得る。例えば、二本鎖は、30 μ lのRNAオリゴヌクレオチドの各相補的鎖(50 μ M RNAオリゴヌク

レオチド溶液)および15 μ lの5X アニーリング緩衝液(100 mMの酢酸カリウム、30 mMのH EPES-KOH (pH 7.4)、2 mMの酢酸マグネシウム)を組み合わせ、次いで、90 で1分、次いで37 で1時間加熱することにより、形成され得る。得られる二本鎖アンチセンス化合物は、標的核酸の役割を研究するためのキット、分析、スクリーニングもしくは他の方法に、または診断目的もしくは治療目的のために使用され得る。

【実施例4】

【0140】

キメラ化合物の合成

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は、いくつかの異なる型のものであり得る。これらには、結合ヌクレオシドの「ギャップ」部分が結合ヌクレオシドの5'と3'の「ウイング」部分の間に位置する第1の型、および「ギャップ」部分がオリゴマー化合物の3'または5'末端のいずれかに位置する第2の「開放末端」型が挙げられる。第1の型のオリゴヌクレオチドはまた、「ギャップマー (gapmer)」またはギャップトオリゴヌクレオチドとしても当該分野で公知である。第2の型のオリゴヌクレオチドは、「ヘミマー (hemimer)」または「ウイングマー (wingmer)」としても当該分野で公知である。

【0141】

(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

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部分を有するキメラオリゴヌクレオチドは、上述のApplied Biosystems自動化DNA合成機モデル394を用いて合成される。オリゴヌクレオチドは、自動化合成機ならびにDNA部分用の2'-デオキシ-5'-ジメトキシトリチル-3'-O-ホスホルアミダイトおよび5'と3'ウイング用の5'-ジメトキシトリチル-2'-O-メチル-3'-O-ホスホルアミダイトを使用して合成される。標準的な合成サイクルを、5'-ジメトキシトリチル-2'-O-メチル-3'-O-ホスホルアミダイト用に反応時間を長くしたカップリング工程を導入することにより変更する。完全に保護したオリゴヌクレオチドを支持体から切断し、濃縮アンモニア (NH₄OH) 中で12~16時間、55 で脱保護する。次いで、脱保護オリゴを、適切な方法(沈殿、カラムクロマトグラフィー、真空中での容積減少、ならびにキャピラリー電気泳動および質量分析法による収率および純度の分光学的分析)で回収する。

【0142】

(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、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、2'-O-メチルキメラオリゴヌクレオチドについて上述した手順により調製された。

【0143】

(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-(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は、2'-O-メチルキメラオリゴヌクレオチドについて上述した手順により、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、ヨウ素で酸化してキメラ構造のウイング部内でホスホジエステルヌクレオチド間結合を形成し、3,4,5-トリベンゾジチオール-3'-オン1,1'-ジオキシド (Beaucage試薬) を利用して硫化することによりセンターギャップにホスホロチオエートヌクレオチド間結合を形成することによって、調製される。

【0144】

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、本明細書中で参照として援用される米国特許第5,62

10

20

30

40

50

3,065号に従って合成される。

【実施例 5】

【0145】

グルココルチコイドレセプターを標的とする二本鎖アンチセンス化合物の設計およびスクリーニング

本発明によれば、一連の核酸二本鎖は、本発明のアンチセンス化合物およびその相補物を含み、グルココルチコイドレセプターを標的とするように設計され得る。二本鎖のアンチセンス鎖の核酸塩基配列は、表1のオリゴヌクレオチドの少なくとも8核酸塩基部分を含む。鎖の末端は、1つ以上の天然または修飾された核酸塩基の付加により修飾されて、突出を形成し得る。次いで、dsRNAのセンス鎖を、アンチセンス鎖の相補物として設計および合成するが、これもまたいずれかの末端に修飾または付加を含み得る。例えば、ある態様において、dsRNA二本鎖の鎖は両方とも、中央の核酸塩基に対して相補的であり、各々が一方または両方の末端に突出を有するであろう。

10

【0146】

例えば、配列CGAGAGGCGGACGGGACCGおよびデオキシチミジン (dT) の2つの核酸塩基突出を有するアンチセンス鎖を含む二本鎖は、以下の構造を有する：

```

cgagagggcggacgggaccgTT      アンチセンス鎖
|||||
TTgctctccgcctgccctggc      相補物

```

20

【0147】

別の態様において、同じ配列CGAGAGGCGGACGGGACCGを有するアンチセンス鎖を含む二本鎖は、平滑末端（一本鎖突出を有しない）を用いて、以下のように調製され得る：

```

cgagagggcggacgggaccg      アンチセンス鎖
|||||
gctctccgcctgccctggc      相補物

```

【0148】

二本鎖のRNA鎖は、本明細書中で開示される方法により合成され得るか、またはDharmacon Research Inc., (Lafayette, CO) から購入され得る。相補鎖は合成されると、アニーリングする。一本鎖を等分し、50 μ Mの濃度に希釈する。希釈すると、各鎖の30 μ Lを、15 μ Lのアニ - リング緩衝液の5x溶液と合わせる。当該緩衝液の最終濃度は、100 mM酢酸カリウム、30 mM HEPES-KOH (pH 7.4) および2 mM酢酸マグネシウムである。最終容積は、75 μ Lである。この溶液を、90 °で1分インキュベートし、次いで、15秒間遠心分離する。管を37 °で1時間静置するが、このときにdsRNA二本鎖を実験に用いる。dsRNA二本鎖の最終濃度は20 μ Mである。この溶液は、冷凍 (-20 °C) 保存し得、5回まで凍結融解することができる。

30

【0149】

一度調製されると、二本鎖アンチセンス化合物は、グルココルチコイドレセプター発現を調節する能力について評価される。細胞が80%のコンフルエンスに達したとき、本発明の二本鎖アンチセンス化合物で処理する。96ウェルプレートで生育させた細胞について、ウェルを200 μ LのOPTI-MEM-1血清減少培地 (GibcoBRL) で1回洗浄し、次いで、12 μ g/mLのLIPOFECTIN (Gibco BRL) を含む130 μ LのOPTI-MEM-1、所望の二本鎖アンチセンス化合物を最終濃度200 nMで処理する。処理の5時間後、培地を新鮮な培地で置き換える。処理の16時間後に細胞を採取し、このときにRNAを単離して、標的の減少をRT-PCRにより測定する。

40

【実施例 6】

【0150】

50

オリゴヌクレオチドの単離

制御された多孔質ガラス固相支持体からの切断および濃水酸化アンモニウム中で、55で12-16時間脱ブロック化した後、オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオシドを、3容積未満のエタノールを用いて、1 M NH_4OAc から沈殿によって回収する。合成したオリゴヌクレオチドを、電子スプレー質量分析法（分子量測定）およびキャピラリーゲル電気泳動により分析し、全長の少なくとも70%の物質であると決定した。この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を、-16 amu産物（+/- 32 +/- 48）に対する正確な分子量の比により測定した。いくつかの研究については、オリゴヌクレオチドを、Chiangら、J. Biol. Chem. 1991, 266, 18162-18171に記載のように、HPLCにより精製した。HPLCで精製した物質について得られた結果は、HPLCで精製しなかった物質について得られた結果と同様であった。

【実施例 7】

【0151】

オリゴヌクレオチド合成-96ウェルプレート形式

オリゴヌクレオチドは、固相P(III)ホスホルアミダイト化学により、96ウェル形式で同時に96配列を集めることができる自動化合成機で合成した。ホスホジエステルヌクレオチド間結合は、水性ヨウ素での酸化により得た。ホスホロチオエートヌクレオチド間結合は、無水アセトニトリル中の3,4-二ベンゾジチオール-3-オン1,1 ジオキシド（Beaucage試薬）を利用した硫化により生じさせた。標準的な塩基保護β-シアノエチルジイソプロピルホスホルアミダイトは、商業販売業者（例えば、PE-Applied Biosystems, Foster City, CAまたはPharmacia, Piscataway, NJ）から購入した。非標準的ヌクレオシドは、標準的なまたは特許された方法のように合成される。これらは、塩基保護β-シアノエチルジイソプロピルホスホルアミダイトとして利用される。

【0152】

オリゴヌクレオチドを支持体から切断し、濃 NH_4OH を用いて高温（55～60℃）で12-16時間脱保護し、次いで、遊離した産物を減圧乾燥した。次いで、乾燥した産物を、滅菌水中に再懸濁してマスタープレートを得たが、ここから、全ての分析および試験プレート試料を、ロボットピペッターを利用して希釈する。

【実施例 8】

【0153】

オリゴヌクレオチド分析-96ウェルプレート形式

各ウェルのオリゴヌクレオチドの濃度を、試料の希釈およびUV吸収スペクトル測定により評価した。個々の産物の全長完全性は、96ウェル形式（Beckman P/ACETMMDQ）のそれぞれにおけるキャピラリー電気泳動（CE）により評価したか、または個々に調製した試料については、市販のCE装置（例えば、Beckman P/ACETM5000, ABI 270）により評価した。基本および骨格の組成を、電子スプレー質量分析法を利用した化合物の質量分析により確認した。全てのアッセイ試験プレートを、単チャンネルまたは多チャンネルロボットピペッターを用いて、マスタープレートから希釈した。プレートは、プレート上の少なくとも85%の化合物が全長の少なくとも85%であった場合、許容可能であると判定した。

【実施例 9】

【0154】

細胞培養およびオリゴヌクレオチド処理

アンチセンス化合物が標的核酸の発現に与える影響は、標的核酸が測定可能なレベルで存在する限り、多様な細胞型のいずれかで試験することができる。これは、例えば、PCRまたはノーザンブロット分析を用いて、常套的に測定することができる。以下の細胞型は、例示の目的のために提供されるが、標的が選択された細胞型中で発現する限り、他の細胞型も常套的に用いることができる。これは、例えば、ノーザンブロット分析、リボヌクレアーゼ保護アッセイまたはRT-PCRのような、当該分野で常套的な方法により容易に測定することができる。

【0155】

10

20

30

40

50

T-24細胞：

ヒト移行細胞膀胱癌細胞株T-24は、American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA) から入手した。T-24細胞を、10%子ウシ胎児血清 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA)、ペニシリン (1mL当たり100単位) およびストレプトマイシン (1mL当たり100 μ g) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) を添加した完全McCoy5A基礎培地 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) 中で常套的に培養した。細胞を、90%コンフルエンスに達したときにトリプシン処理および希釈により常套的に継代培養した。RT-PCR分析で用いるため、細胞を、96ウェルプレート (Falcon-Primaria #353872) に、7000細胞/ウェルの密度で播種した。

【0156】

10

ノーザンブロット分析又は他の解析のために、細胞を適切な容積の培地及びオリゴヌクレオチドを用いて、100mm又は他の標準組織培養プレートに播種し、同様に処理し得る。

【0157】

A549細胞：

ヒト肺癌細胞株A549は、American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA) から入手した。A549細胞を、10%子ウシ胎児血清 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA)、ペニシリン (1mL当たり100単位) およびストレプトマイシン (1mL当たり100 μ g) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) を添加したDMEM基礎培地 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) 中で常套的に培養した。細胞を、90%コンフルエンスに達したときにトリプシン処理および希釈により常套的に継代培養した。

20

【0158】

NHDF細胞：

ヒト新生児皮膚線維芽細胞 (NHDF) は、Clonetics Corporation (Walkersville, MD) から入手した。NHDFは、供給業者により推奨されるように添加された線維芽細胞増殖培地 (Clonetics Corporation, Walkersville, MD) 中で常套的に維持した。細胞を、供給業者により推奨されるように、10回の継代培養まで維持した。

【0159】

HEK細胞：

ヒト胚ケラチノサイト (HEK) は、Clonetics Corporation (Walkersville, MD) から入手した。HEKは、供給業者により推奨されるように処方されたケラチノサイト増殖培地 (Clonetics Corporation, Walkersville, MD) 中で常套的に維持した。細胞を、供給業者により推奨されるように、10回の継代培養まで常套的に維持した。

30

【0160】

HepG2細胞：

ヒト胚芽細胞腫細胞株HepG2は、American Type Culture Collection (Manassas, VA) から入手した。HepG2細胞を、10%子ウシ胎児血清、非必須アミノ酸、及び1mMビルビン酸ナトリウム (Gibco/Life Technologies, Gaithersburg, MD) を添加したイーグルMEM中で常套的に培養した。細胞を、90%コンフルエンスに達したときにトリプシン処理および希釈により常套的に継代培養した。細胞を、RT-PCR分析での使用のために、96ウェルプレート (Falcon-Primaria #3872) に、7,000細胞/ウェルの密度で播種した。

40

【0161】

ノーザンブロット分析又は他の解析のために、細胞を適切な容積の培地及びオリゴヌクレオチドを用いて、100mm又は他の標準組織培養プレートに播種し、同様に処理し得る。

【0162】

b.END細胞：

マウス脳内皮細胞株b.ENDは、Max Plank Institute (Bad Nauheim, Germany) のWerner Risau博士から入手した。b.END細胞を、10%子ウシ胎児血清 (Gibco/Life Technologies, Gaithersburg, MD) を添加した高グルコースDMEM (Gibco/Life Technologies, Gaithersburg, MD) で常套的に培養した。細胞を、90%コンフルエンスに達したときに、トリプシン処理および希釈により常套的に継代培養した。RT-PCR分析で用いるため、細胞を、96

50

ウェルプレート (Falcon-Primaria #3872) に、3000細胞 / ウェルの密度で播種した。

【 0 1 6 3 】

ノーザンブロット分析又は他の解析のために、細胞を適切な容積の培地及びオリゴヌクレオチドを用いて、100mm又は他の標準組織培養プレートに播種し、同様に処理し得る。

【 0 1 6 4 】

NRK細胞：

正常ラット腎臓(NRK)細胞は、American Type Culture Collection (Manassas, VA)から入手した。それらを、37℃、90%空気 - 10%CO₂の加湿雰囲気下、10%子ウシ胎児血清 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)、100ug/mlペニシリンおよび100ug/mlストレプトマイシン及び0.1mM非必須アミノ酸 (すべてInvitrogen Life Technologies, Carlsbad, CAからのサプリメント) を添加した最小必須培地 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) で連続単層培養として成長させた。細胞を、85%-90%コンフルエンスに達したときにトリプシン処理および希釈により常套的に継代培養した。細胞を、アンチセンスオリゴヌクレオチドトランスフェクションでの使用のために、96ウェルプレート (Falcon-Primaria #353872, BD Biosciences, Bedford, MA) に、6,000細胞 / ウェルの密度で播種した。

10

【 0 1 6 5 】

一次マウス肝細胞

一次マウス肝細胞はCharles River Labsから入手されるCD-1マウスから調整される。一次マウス肝細胞を10%子ウシ胎児血清 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)、250nMデキサメタゾン (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO)、10nMウシインシュリン (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO) を添加した肝細胞付着培地 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) で常套的に培養した。細胞を、本発明のオリゴマー化合物での処理のために、96ウェルプレート (Falcon-Primaria #353872, BD Biosciences, Bedford, MA) に、4,000-6,000細胞 / ウェルの密度で播種した。

20

【 0 1 6 6 】

アンチセンス化合物での処理：

細胞が65-75%コンフルエンスに達したとき、それらをオリゴヌクレオチドで処理する。96ウェルプレートで増殖した細胞について、ウェルを、100μLのOPTI-MEM™-1血清使用量低減培地 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) で1回洗浄し、次いで、3.75μg/mLのLIPOFECTIN™ (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) および所望の濃度のオリゴヌクレオチドを含む130μLのOPTI-MEM™-1で処理した。細胞を処理し、データを3連で得た。37℃での4-7時間の処理後、培地を新鮮な培地と交換した。オリゴヌクレオチド処理の16-24時間後、細胞を採集した。

30

【 0 1 6 7 】

用いたオリゴヌクレオチドの濃度は、細胞株によって変動する。特定の細胞株について最適なオリゴヌクレオチド濃度を決定するために、細胞を、一定範囲の濃度で、陽性対照オリゴヌクレオチドで処理する。ヒト細胞について、陽性対照オリゴヌクレオチドは、ヒトH-rasに標的化したISIS 13920

40

(
TCCGTCATCGCTCCTCAGGG

、配列番号：1)、

またはヒトJun-N末端キナーゼ-2 (JNK2) に標的化したISIS 18078

(
GTGCGCGGAGCCCGAAATC

、配列番号：2) のいずれかから選択される。両方の対照は、ホスホロチオエート骨格を有する2'-O-メトキシエチルギャップマー (太字で示す2'-O-メトキシエチル) である。マウスまたはラット細胞については、陽性対照オリゴヌクレオチドは、マウスおよびラット

50

c-rafの両方に標的化したISIS 15770、

ATGCATTCTGCCCCCAAGGA

、配列番号：3、ホスホロチオエート骨格を有する2'-O-メトキシエチルギャップマー（太字で示す2'-O-メトキシエチル）である。次いで、c-H-ras（ISIS 13920に対して）、JNK2（ISIS 18078に対して）またはc-raf（ISIS 15770に対して）mRNAについて80%阻害を生じる陽性対照オリゴヌクレオチドの濃度を、当該細胞株の引き続く実験における新しいオリゴヌクレオチドのスクリーニング濃度として利用する。80%阻害が達成できない場合、c-H-ras、JNK2またはc-raf mRNAの60%阻害を生じる陽性対照オリゴヌクレオチドの最低濃度を、該細胞株の引き続く実験におけるオリゴヌクレオチドのスクリーニング濃度として用いる。60%阻害が達成されない場合、当該特定の細胞株は、オリゴヌクレオチドトランスフェクション実験に不適切であるとみなす。本明細書中で用いるアンチセンスオリゴヌクレオチドの濃度は、50 nM～300 nMである。

【実施例10】

【0168】

グルココルチコイドレセプター発現のオリゴヌクレオチド阻害の分析

グルココルチコイドレセプター発現のアンチセンス調節は、当該分野で公知の種々の方法でアッセイすることができる。例えば、グルココルチコイドレセプター mRNAレベルは、例えば、ノーザンブロット分析、競合ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）またはリアルタイムPCR（RT-PCR）により定量することができる。リアルタイム定量PCRが現在のところ好ましい。RNA分析は、全細胞RNAまたはポリ（A）+ mRNA上で行うことができる。本発明のRNA分析の好ましい方法は、本明細書中の他の実施例に記載の全細胞RNAの使用である。RNAの単離の方法は当該分野で周知である。ノーザンブロット分析もまた当該分野で常套的である。リアルタイム定量（PCR）は、PE-Applied Biosystems, Foster City, CAから市販されている市販のABI PRISM™7600、7700または7900 Sequence Detection Systemを用い、製造業者の使用説明書に従って簡便に達成することができる。

【0169】

グルココルチコイドレセプターのタンパク質レベルは、免疫沈降、ウエスタンブロット分析（免疫ブロッティング）、酵素結合イムノソルベント検定法（ELISA）または蛍光活性化細胞選別機（FACS）等の当該分野で周知の種々の方法で定量することができる。グルココルチコイドレセプターに指向した抗体は、抗体のMSRSカタログ（Aerie Corporation, Birmingham, MI）等の種々の供給源から同定されかつ得ることができるか、あるいは、当該分野で周知の従来のモノクローナルまたはポリクローナル抗体産生方法により調製することができる。

【実施例11】

【0170】

グルココルチコイドレセプター阻害剤を使用するための表現型アッセイの設計
表現型アッセイ

グルココルチコイドレセプター阻害剤を、本明細書中で開示された方法により同定し、該化合物を、特定の疾患状態または状態の治療の効率を予測できる測定可能な終点をそれぞれ有する1つまたはそれ以上の表現型アッセイでさらに研究する。表現型アッセイ、それらの使用のためのキットおよび試薬は当業者に周知であり、健康および疾患におけるグルココルチコイドレセプターの役割および/または関連を研究するために、本明細書中で用いられる。いくつかの商業用の供給業者のいずれかが1つから購入できる代表的な表現型アッセイには、細胞生存率、細胞毒性、増殖または細胞生存を測定するもの（Molecular Probes, Eugene, OR; PerkinElmer, Boston, MA）、酵素アッセイを含むタンパク質ベースのアッセイ（Panvera, LLC, Madison, WI; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ; Oncogene Research Products, San Diego, CA）、細胞調節、シグナル伝達、炎症、酸化プロセスおよびアポトーシス（Assay Designs Inc., Ann Arbor, MI）、トリグリセリド蓄積（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO）、血管新生アッセイ、管形成アッセイ、サイト

カインおよびホルモンアッセイならびに代謝アッセイ (Chemicon International Inc., Temecula, CA; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) が挙げられる。

【0171】

ある非限定的実施例では、特定の表現型アッセイに適切であると決定された細胞 (すなわち、乳癌の研究のために選択されたMCF-7細胞; 肥満の研究のための脂肪細胞) を、インビトロの研究から同定されたグルコシルコイドレセプター阻害剤ならびに上述の方法で測定された最適濃度の対照化合物で処理する。処理期間の最後に、処理および未処理細胞を、アッセイに特有の1つ以上の方法で分析して、形質の結果および終点を決定する。

【0172】

形質終点としては、時間または処理用量に対する細胞形態の変化、ならびにタンパク質、脂質、核酸、ホルモン、糖類または金属のような細胞成分のレベルの変化が挙げられる。pH、細胞周期の段階、細胞による生物学的指標の摂取または排出を含む細胞状態の測定もまた、目的の終点である。

【0173】

処理後の細胞の遺伝子型の分析 (細胞の1つ以上の遺伝子の発現の測定) もまた、グルコシルコイドレセプター阻害剤の効率または効力の指標として用いられる。目印 (Hall mark) 遺伝子、あるいは特定の疾患状態、状態または表現型に関連することが疑われる遺伝子は、処理および未処理細胞の両方において測定される。

【実施例12】

【0174】

RNA単離

ポリ(A) + mRNA単離

ポリ(A) + mRNAを、Miuraら (Clin. Chem., 1996, 42, 1758-1764) に従って単離した。ポリ(A) + mRNAを単離する他の方法は、当該分野で常套的である。簡潔には、96ウェルプレート上で増殖した細胞について、増殖培地を細胞から除去し、各ウェルを200 μ Lの冷PBSで洗浄した。60 μ L溶解緩衝液 (10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM EDTA, 0.5 M NaCl、0.5% NP-40、20 mM パナジル-リボヌクレオシド複合体) を各ウェルに添加し、プレートを穏やかに攪拌し、次いで、室温で5分インキュベートした。55 μ Lの溶解物を、オリゴd(T) 被覆96ウェルプレート (AGCT Inc., Irvine CA) に移した。プレートを室温で60分インキュベートし、200 μ Lの洗浄緩衝液 (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM EDTA, 0.3 M NaCl) で3回洗浄した。最後の洗浄後、プレートをペーパータオル上にプロットして過剰な洗浄緩衝液を除去し、次いで5分間風乾した。70 $^{\circ}$ Cに予熱した60 μ Lの溶出緩衝液 (5 mM Tris-HCl pH 7.6) を各ウェルに添加し、プレートを90 $^{\circ}$ Cのホットプレート上で5分間インキュベートし、次いで、溶出液を新鮮な96ウェルプレートに移した。

【0175】

100 mmまたは他の標準的なプレートで増殖した細胞は、適当な容積の全ての溶液を用いて同様に処理することができる。

【0176】

全RNA単離

Qiagen, Inc. (Valencia, CA) から購入したRNEASY 96TMキットおよび緩衝液を用い、製造業者が推奨する手順に従って、全RNAを単離した。手短に言えば、96ウェルプレート上で増殖した細胞について、増殖培地を細胞から除去し、各ウェルを200 μ Lの冷PBSを用いて洗浄した。150 μ Lの緩衝液RLTを各ウェルに添加し、プレートを20秒間激しく振とうした。次いで、150 μ Lの70%エタノールを各ウェルに添加し、内容物を、3回上下にピペティングすることにより混合した。次いで、試料を、廃液回収トレイを備え、かつ減圧源に取り付けられたQIAVACTMマニホールドに取り付けられた、RNEASY 96TMウェルプレートに移した。1分間減圧した。500 μ Lの緩衝液RW1を、RNEASY 96TMプレートの各ウェルに添加し、15分インキュベートし、再び1分間減圧した。追加の500 μ Lの緩衝液RW1を、RNEASY 96TMプレートの各ウェルに添加し、2分間減圧した。次いで、1 mLの緩衝液RPEをRNEASY 96TMプレートの各ウェルに添加し、90秒間減圧した。次いで、緩衝液RPEでの洗浄を繰り返す。

返し、さらに3分間減圧した。次いで、プレートをQIAVACTMマニホルドから取り外し、ペーパータオルにプロットし、乾燥させた。次いで、プレートを、1.2 mL回収管を含む回収管ラックを備えたQIAVACTMマニホルドに再び取り付け付けた。次いで、140 μ LのRNアーゼ (RNase) を含まない水を各ウェルにピペティングし、1分間インキュベートし、次いで3分間減圧することにより、RNAを溶出させた。

【0177】

繰り返しのピペティングおよび溶出工程は、QIAGEN Bio-Robot9604 (Qiagen, Inc., Valencia CA) を用いて自動化され得る。基本的に、培養プレート上で細胞を溶解した後、プレートをロボットデッキに移し、ここでピペティング、DNase処理および溶出工程を行う。

10

【実施例13】

【0178】

グルココルチコイドレセプター-mRNAレベルのリアルタイム定量PCR分析

グルココルチコイドレセプター-mRNAレベルの定量は、ABI PRISMTM7600、7700または7900 Sequence Detection System (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) を用い、製造業者の使用説明書に従って、リアルタイム定量PCRにより達成した。これは、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 産物のリアルタイムでの高スループット定量を可能にする、閉鎖した管の非ゲルベースの蛍光検出システムである。PCRが完了した後に増幅産物を定量する標準的なPCRとは対照的に、リアルタイム定量PCRの産物は、それらが蓄積されるにつれて定量される。これは、フォワードおよびリバースPCRプライマーの間で特異的にアニーリングし、かつ2つの蛍光色素を含むオリゴヌクレオチドプローブを、PCR反応に含むことにより達成される。レポーター色素 (例えば、PE-Applied Biosystems, Foster City, CA, Operon Technologies Inc., Alameda, CAまたはIntegrated DNA Technologies Inc., Coralville, IAのいずれかから入手したFAMまたはJOE) をプローブの5'末端に付加させ、クエンチャー色素 (例えば、PE-Applied Biosystems, Foster City, CA, Operon Technologies Inc., Alameda, CAまたはIntegrated DNA Technologies Inc., Coralville, IAのいずれかから入手したTAMRA) をプローブの3'末端に付加させる。プローブおよび色素がインタクトである場合、レポーター色素発光を、3'クエンチャー色素の近傍でクエンチングする。増幅の間、プローブの標的配列へのアニーリングにより、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され得る基質を生じる。PCR増幅サイクルの伸長期の間、プローブのTaqポリメラーゼによる切断により、プローブの残りから (すなわち、クエンチャー部分から) レポーター色素が放出され、配列特異的蛍光シグナルが生じる。各サイクルについて、さらなるレポーター色素分子を、それらの各々のプローブから切断し、蛍光強度を、通常の間隔で、ABI PRISMTM Sequence Detection System内に配置したレーザー光学機械によりモニタリングする。各アッセイにおいて、未処理対照試料からのmRNAの連続的希釈を含む一連の平行反応により、標準曲線が得られ、これを、試験試料のアンチセンスオリゴヌクレオチド処理後の阻害率を定量するのに用いる。

20

30

【0179】

定量PCR分析に先立ち、測定される標的遺伝子に特異的なプライマー-プローブセットがGAPDH増幅反応で「マルチプレックス化 (multiplexed)」される能力を評価する。重複化の際、標的遺伝子および内部標準遺伝子GAPDHを、単一の試料中で同時に増幅する。この分析において、未処理細胞から単離したmRNAを連続的に希釈する。各希釈物を、GAPDHのみ、標的遺伝子のみ (「シングルプレックス化 (single-plexing)」) または両方 (マルチプレックス化) に特異的なプライマー-プローブセットの存在下で増幅する。PCR増幅後、希釈の機能としてのGAPDHおよび標的mRNAシグナルの標準曲線を、シングルプレックス化およびマルチプレックス化試料の両方から得る。マルチプレックス化試料から得たGAPDHおよび標的シグナルの勾配および相関係数の両方が、シングルプレックス化試料から得た対応する値の10%の範囲内であれば、該標的に特異的なプライマー-プローブセットは、マルチプレックス化可能であるとみなす。PCRの他の方法もまた当該分野で公知である。

40

50

【 0 1 8 0 】

PCR試薬は、Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA) から入手した。RT-PCR反応は、20 μ LのPCRカクテル (2.5x PCR緩衝液 - $MgCl_2$ 、6.6 mMの $MgCl_2$ 、それぞれ375 μ MのdATP、dCTP、dCTPおよびdGTP、それぞれ375 nMのフォワードプライマーおよびリバースプライマー、125 nMのプロブ、4単位のRNアーゼ (RNase) 阻害剤、1.25単位のPLATINUM (登録商標) Taq、5単位のMuLV逆転写酵素、ならびに2.5x ROX色素) を30 μ Lの全RNA溶液 (20-200 ng) を含む96-ウェルプレートに添加することにより行った。RT反応は、30分間48 でインキュベーションすることにより行った。10分間95 でインキュベーションすることによりPLATINUM (登録商標) Taqを活性化した後、40サイクルの2工程PCRプロトコルを95 で15秒間 (変性)、次いで60 で1.5分 (アニーリング/伸長) で行った。

10

【 0 1 8 1 】

リアルタイムRT-PCRにより得られた遺伝子標的の量を、GAPDH (発現が一定である遺伝子) の発現レベルのいずれかを用いて、あるいはRiboGreenTM (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) を用いて全RNAを定量することによって標準化する。GAPDH発現は、リアルタイムRT-PCRにより、標的と同時に、マルチプレックス化によりまたは別々に作動させてリアルタイムに定量する。全RNAは、RiboGreenTM RNA定量試薬 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) を用いて定量する。RiboGreenTMによるRNA定量方法は、Jones, L. J., ら, (Analytical Biochemistry, 1998, 265, 368-374) に教示される。

【 0 1 8 2 】

このアッセイにおいて、170 μ LのRiboGreenTM作動薬 (10mM Tris-HCl中で1:350に希釈されたRiboGreenTM試薬、1 mM EDTA, pH 7.5) を、30 μ Lの精製した細胞RNAを含む96ウェルプレート中にピペティングする。プレートを、CytoFluor 4000 (PE Applied Biosystems) 中で、485 nmでの励起および530 nmでの発光を用いて読み取る。

20

【 0 1 8 3 】

ヒトグルココルチコイドレセプターに対するプロブおよびプライマーは、公開された配列情報 (本明細書中で配列番号: 4として援用されるGenBank受託番号NM_000176.1) を用いて、ヒトグルココルチコイドレセプター配列にハイブリダイズするように設計した。ヒトグルココルチコイドレセプターについて、PCRプライマーは:

フォワードプライマー: AGGTTGTGCAAATTAACAGTCCTAACT (配列番号: 5)

リバースプライマー: TAGTCTTTTGCAACCATCATCCA (配列番号: 6)

30

であり、PCRプロブは:

FAM-AGCACCTAGTCCAGTGACCTGCTGGGTAAA-TAMRA (配列番号: 7)

であった (FAMは蛍光色素であり、TAMRAはクエンチャー色素である)。ヒトGAPDHについて、PCRプライマーは:

フォワードプライマー: GAAGGTGAAGGTCGGAGTC (配列番号: 8)

リバースプライマー: GAAGATGGTGATGGGATTTC (配列番号: 9)

であり、PCRプロブは:

5' JOE-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC-TAMRA3' (配列番号: 10)

(JOEは蛍光レポーター色素であり、TAMRAはクエンチャー色素) であった。

【 0 1 8 4 】

40

マウスグルココルチコイドレセプターに対するプロブおよびプライマーは、公開された配列情報 (本明細書中で配列番号: 11として援用されるGenBank受託番号NM_008173.1) を用いて、マウスグルココルチコイドレセプター配列にハイブリダイズするように設計された。マウスグルココルチコイドレセプターについて、PCRプライマーは:

フォワードプライマー: GACATCTTGCAGGATTTGGAGTT (配列番号: 12)

リバースプライマー: AACAGGTCTGACCTCCAAGGACT (配列番号: 13)

であり、PCRプロブは:

FAM-CGGGTCCCCAGGTAAAGAGACAAACGA-TAMRA (配列番号: 14)

であった (FAMは蛍光レポーター色素であり、TAMRAはクエンチャー色素である)。マウスGAPDHについて、PCR プライマーは:

50

フォワードプライマー:GGCAAATTCAACGGCACAGT (配列番号:15)

リバースプライマー:GGGTCTCGCTCCTGGAAGAT (配列番号:16)

であり、PCRプローブは:

5' JOE-AAGGCCGAGAATGGGAAGCTTGTGTCATC-TAMRA3' (配列番号:17)

(JOEは蛍光レポーター色素であり、TAMRAはクエンチャー色素)であった。

【0185】

ラットグルココルチコイドレセプターに対するプローブおよびプライマーは、公開された配列情報(本明細書中で配列番号:18として援用されるGenBank受託番号NM_012576.1)を用いて、ラットグルココルチコイドレセプター配列にハイブリダイズするように設計された。ラットグルココルチコイドレセプターについて、PCRプライマーは:

フォワードプライマー:AAACAATAGTTCCTGCAGCATTACC (配列番号:19)

リバースプライマー:CATACAACACCTCGGGTTCAATC (配列番号:20)

であり、PCRプローブは:

FAM-ACCCCTACCTTGGTGTCACTGCT-TAMRA (配列番号:21)

であった(FAMは蛍光レポーター色素であり、TAMRAはクエンチャー色素である)。ラットGAPDHについて、PCRプライマーは:

フォワードプライマー:TGTTCTAGAGACAGCCGCATCTT (配列番号:22)

リバースプライマー:CACCGACCTTCACCATCTTGT (配列番号:23)

であり、PCRプローブは:

5' JOE-TTGTGTCAGTGCCAGCCTCGTCTCA-TAMRA3' (配列番号:24)

(JOEは蛍光レポーター色素であり、TAMRAはクエンチャー色素)であった。

【実施例14】

【0186】

グルココルチコイドレセプター mRNAレベルのノーザンブロット分析

アンチセンス処理の18時間後、細胞単層を冷PBSで2回洗浄し、1 mLのRNAzol™ (TEL-TEST “B” Inc., Friendswood, TX) 中で溶解した。全RNAを、製造業者が推奨するプロトコールに従って調製した。20 µgの全RNAを、MOPS緩衝液システム(AMRESCO, Inc. Solon, OH)を用いて、1.1%のホルムアルデヒドを含む1.2%アガロースゲルを通して電気泳動することにより分画した。RNAを、Northern/Southern Transfer buffer system (TEL-TEST “B” Inc., Friendswood, TX)を用いる一晩の毛細管移動により、ゲルからHYBOND™ -N+ ナイロン膜(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)に移した。RNAの移動は、UV可視化により確認した。STRATALINKER™ UV Crosslinker 2400 (Stratagene, Inc., La Jolla, CA)を用いるUV架橋により膜を固定化し、次いで、QUICKHYB™ ハイブリダイゼーション溶液(Stratagene, La Jolla, CA)を用い、ストリンジェントな条件についての製造業者の推奨を用いてプローブした。

【0187】

ヒトグルココルチコイドレセプターを検出するため、フォワードプライマーAGGTTGTGCA AATTAACAGTCCTAACT (配列番号:5) およびリバースプライマーTAGTCTTTTGAACCATCATCCA (配列番号:6)を用いるPCRにより、ヒトグルココルチコイドレセプター特異的プローブを調製した。負荷および移動効率の変動について標準化するため、膜をストリッピングし、ヒトグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH) RNA (Clontech, Palo Alto, CA)についてプローブした。

【0188】

マウスグルココルチコイドレセプターを検出するため、フォワードプライマーGACATCTT GCAGGATTTGGAGTT (配列番号:12) およびリバースプライマーAACAGGTCTGACCTCCAAGGACT (配列番号:13)を用いるPCRにより、マウスグルココルチコイドレセプター特異的プローブを調製した。負荷および移動効率の変動について標準化するため、膜をストリッピングし、マウスグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH) RNA (Clontech, Palo Alto, CA)についてプローブした。

【0189】

10

20

30

40

50

ラットグルココルチコイドレセプターを検出するため、フォワードプライマー-AAACAATAGTTCCTGCAGCATTACC（配列番号：19）およびリバースプライマー-CATACAACACCTCGGGTTCAATC（配列番号：20）を用いるPCRにより、ラットグルココルチコイドレセプター特異的プローブを調製した。負荷および移動効率の変動について標準化するため、膜をストリッピングし、ラットグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH）RNA（Clontech, Palo Alto, CA）についてプローブした。

【0190】

ハイブリダイズした膜を、PHOSPHORIMAGERTMおよびIMAGEQUANTTMソフトウェアV3.3（Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA）を用いて視覚化し、定量した。データを、未処理対照のGAPDHレベルに対して標準化した。

10

【実施例15】

【0191】

2'-MOEウイングおよびデオキシギャップを有するキメラホスホロチオエートオリゴヌクレオチドによるヒトグルココルチコイドレセプター発現のアンチセンス阻害

本発明に従い、一連のアンチセンス化合物を、公開された配列（本明細書中で配列番号：4として援用されるGenBank受託番号NM_000176.1、本明細書中で配列番号：25として援用されるGenBank受託番号AC012634のヌクレオチド1～106000の配列、本明細書中で配列番号：26として援用されるGenBank受託番号X03348.1、および本明細書中で配列番号：27として援用されるGenBank受託番号U01351.1）を用いて、ヒトグルココルチコイドレセプターRNAの異なる領域を標的化するように設計した。化合物を表1および表2に示す。「標的部位」は、化合物が結合する特定の標的配列上の第1の（5'最末端）ヌクレオチド番号を示す。表1および表2中の全ての化合物は、両側（5'および3'方向）に5ヌクレオチドの「ウイング」が隣接する10の2'-デオキシヌクレオチドからなる中央の「ギャップ」領域から構成される20ヌクレオチド長のキメラオリゴヌクレオチド（「ギャップマー」）である。ウイングは2'-メトキシエチル（2'-MOE）ヌクレオチドから構成される。ヌクレオシド間（主鎖）結合は、オリゴヌクレオチド全体にわたってホスホロチオエート（P=S）である。全てのシトシン残基は、5-メチルシトシンである。

20

【0192】

表1の化合物をT-24細胞中のヒトグルココルチコイドレセプター mRNAレベルに与える影響について、本明細書中の他の実施例に記載した定量リアルタイムPCRにより分析した。表1に示されるデータは、T-24細胞を本発明の100nMのアンチセンスオリゴヌクレオチドで処理した2回の実験の平均である。各データポイントの陽性対照は表中にて配列番号により特定している。「N.D.」は、存在する場合、「データがない」ことを示す。

30

【0193】

【表 1】

表1
2'-MOEウイングおよびデオキシギャップを有するキメラホスホロチオエートオリゴヌクレオチド
によるヒトグルコシルコイドレセプター mRNAレベルの阻害

ISIS #	領域	標的 配列 番号	標的 部位	配列	阻害率	配列 番号	対照 配列番号
153080	コード	4	2197	ttgatgtaggctattctaat	28	30	2
153081	3'UTR	4	3875	tggcttagtaaatatgttaa	21	31	2
153082	3'UTR	4	4031	cttccttcccagattagtg	39	32	2
153083	3'UTR	4	3336	aaccatcatccacagtttac	57	33	2
153084	3'UTR	4	3838	agttggttaagggtcacacag	54	34	2
153085	コード	4	1865	gaaacctggtatgaccttg	24	35	2
153086	3'UTR	4	2965	accagacagtaaatagctata	78	36	2
153087	5'UTR	4	35	tagctgtgaacgcagaagg	61	37	2
153088	コード	4	851	cttcagtcctctattcgagt	31	38	2
153089	3'UTR	4	4289	ttcactgcacacaggaccag	58	39	2
153090	5'UTR	4	38	acttagcttgtgaacgcaga	68	40	2
153091	コード	4	2286	tagaatccaagagttttgtc	19	41	2
153092	3'UTR	4	4020	agattagtgtaataccaatat	32	42	2
153093	コード	4	1822	tgccgcctcctaacaatgtt	66	43	2
153094	コード	4	275	tgattgagaagcgacagcca	65	44	2
153095	3'UTR	4	2828	gaaaatttcatccagccaac	19	45	2
153096	3'UTR	4	3549	gtgagaggaaattactttgtc	67	46	2
153097	3'UTR	4	2635	cgactcaactgcttctgttg	7	47	2
153098	3'UTR	4	3291	ctataccagttaggactgtt	90	48	2
153099	3'UTR	4	3787	aataattttcaacagtgaag	19	49	2
153100	コード	4	1662	taccaggattttcagaggtt	76	50	2
153101	3'UTR	4	3826	gcacacagaagggtctacta	66	51	2
153102	コード	4	1946	tctccaccccagagcaaatg	44	52	2
153103	コード	4	1675	actattgtttttgtaccagg	66	53	2
153104	コード	4	2018	agtcattctctgctcattaa	51	54	2
153105	コード	4	2338	tccaaaatgttttgaagca	48	55	2
153106	コード	4	631	tggcccttcaaatgttctg	1	56	2
153107	3'UTR	4	2829	agaaaatttcatccagccaa	70	57	2
153108	3'UTR	4	3515	tcagctgtgttacagctggt	46	58	2
153109	コード	4	351	tggacagatctgctgctgc	73	59	2
153110	3'UTR	4	3252	attctccactgaagcagata	81	60	2
153111	3'UTR	4	4253	ccctagagcaactgtttg	70	61	2
153112	3'UTR	4	4581	attgctgtgtacctctatgca	72	62	2
153113	開始コドン	4	114	tcagtgaatatcaactctgg	54	63	2
153114	3'UTR	4	2716	cacatattaaggtttctaat	34	64	2
153115	3'UTR	4	4142	atataaacatgtcatgata	38	65	2
153116	コード	4	1744	aacacttcaggttcaataac	3	66	2

【0194】

表1に示すように、配列番号：32、33、34、36、37、39、40、43、44、46、48、50、51、52、53、54、55、57、58、59、60、61、62、63、および65は、本アッセイにおいてヒトグルコシルコイドレセプター発現の少なくとも38%阻害を示し、それ故に好適である。これらの好適な配列が相補的である標的領域は、本明細書中で「好適な標的セグメント」と呼ばれ、それ故に本発明の化合物による標的化に好適である。配列番号：55は、マウスグルコシルコイド核酸標的に対してまた相補的である、異種間ヌクレオチドである。

【0195】

表2の化合物をヒトグルコシルコイドレセプター mRNAレベルに及ぼす影響について、本明細書中の他の実施例に記載した定量リアルタイムPCRにより分析した。データは、表2に示されており、HepG2細胞を150 nMの本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドで処理した2回の実験の平均である。各データポイントの陽性対照は表中にて配列番号により特定している。「N.D.」は、存在する場合は、「データがない」ことを示す。

【0196】

10

20

30

40

【表 2】

表2

2'-MOEウイングおよびデオキシギャップを有するキメラホスホロチオエートオリゴヌクレオチド
によるヒトグルコシルコリドレセプターmRNAレベルの阻害

ISIS #	領域	標的 配列 番号	標的部位	配列	阻害率	配列 番号	対照 配列番号
180270	コード	4	251	gggtgaagacgcagaaacct	47	67	2
180271	コード	4	388	tctccatatacagtcocat	70	68	2
180272	コード	4	497	gtttgcaatgctttctcca	45	69	2
180273	コード	4	507	acctatgaggtttgcaatg	69	70	2
180274	コード	4	514	ctggtcgacctatgaggtt	67	71	2
180275	コード	4	672	ctgtgtatatacaattcaca	94	72	2
180276	コード	4	679	ctttggtctgtgtatataca	90	73	2
180277	コード	4	687	caaaggtgctttggtctgtg	89	74	2
180278	コード	4	712	gaaaactccaatcctgcaa	64	75	2
180279	コード	4	877	ggtttagtgctccgtaaaat	45	76	2
180280	コード	4	1000	tctcttgccttaattacccc	69	77	2
180281	コード	4	1007	gccagtttctctgtcttaa	76	78	2
180282	コード	4	1072	gaaatggcagacattttatt	67	79	2
180283	コード	4	1081	ccatgaacagaaatggcaga	92	80	2
180284	コード	4	1102	tgtctccagaggtactcac	87	81	2
180285	コード	4	1112	gtgtgacatctgtctccag	56	82	2
180286	コード	4	1122	tcatgtcatagtggtacatc	82	83	2
180287	コード	4	1132	gatgctgtattcatgtcata	21	84	2
180288	コード	4	1141	tgagaaggatgctgtatt	78	85	2
180289	コード	4	1181	tgtgtgaatgacattaaaaa	81	86	2
180290	コード	4	1186	ggaattggtggaatgacatt	50	87	2
180291	コード	4	1387	gagcacaccaggcagagttt	47	88	2
180292	コード	4	1469	ctgtcttccactgctcttt	61	89	2
180293	コード	4	1479	ggtaattgtgtgtctctcc	21	90	2
180294	コード	4	1552	tttcgatagcgcatgctgg	78	91	2
180295	コード	4	1561	tgaagacatttccatagcg	63	92	2
180296	コード	4	1591	gtttttcagcttccaggtt	55	93	2
180297	コード	4	1680	cagggaactattgtttgtta	73	94	2
180298	コード	4	1852	gcctttgccatttcactgc	53	95	2
180300	コード	4	2001	taataatcagatcaggagca	34	96	2
180301	コード	4	2008	tgctcattaataatcagatc	73	97	2
180302	コード	4	2015	cattctctgtctcattaataa	42	98	2
180303	コード	4	2026	cagggtgaggtcattctctg	82	99	2
180304	コード	4	2053	agcatgtgtttacattggtc	63	100	2
180305	コード	4	2110	atacagagatactcttcata	59	101	2
180306	コード	4	2120	taagggtttcatacagagat	68	102	2

10

20

30

180307	コード	4	2131	gagagaagcagtaagggttt	22	103	2
180309	コード	4	2213	ggcttttctagctcttga	41	104	2
180310	コード	4	2221	ttgacaatggcttttctag	76	105	2
180311	コード	4	2386	gtgatgatttcagtaacat	57	106	2
180315	3'UTR	4	2617	tgccaagtcttgccctcta	80	107	2
180316	3'UTR	4	2627	ctgcttctgttgccaagtct	75	108	2
305186	5'UTR	4	13	caggagggaatatatttt	48	109	2
305187	5'UTR	4	41	acaacttagcttggaacgc	54	110	2
305188	5'UTR	4	100	ctctggcagaggagccgctc	77	111	2
305189	開始コード	4	118	tccatcagtgaaatcaact	58	112	2
305190	開始コード	4	125	tttgagtcctcagtgaaat	72	113	2
305191	開始コード	4	132	atgattcttgagtcacac	76	114	2
305192	コード	4	205	ttatagaagtcacacac	55	115	2
305193	コード	4	243	acgcagaaaccttcacagta	67	116	2
305194	コード	4	358	actgctttgacagatctgg	60	117	2
305195	コード	4	667	gtatacaatttcacattgcc	79	118	2
305196	コード	4	695	caaaatgtcaaaagtgctt	81	119	2
305197	コード	4	763	aggtctgatctccaaggact	77	120	2
305198	コード	4	826	tccaaaagggaatgaatcgtc	85	121	2
305199	コード	4	1067	ggcagacattttattacca	68	122	2
305200	コード	4	1150	tcctgctgttgagaaaggga	85	123	2
305201	コード	4	1224	cagatccttgccacctattc	89	124	2
305202	コード	4	1250	ccccagagaagtcaagttgt	0	125	2
305203	コード	4	1356	ctgttctgtctgttgaggag	72	126	2
305204	コード	4	1737	caggttcaataacctccaac	71	127	2
305205	コード	4	1819	cgccctcctaacatgttgag	60	128	2
305206	コード	4	1870	ttcctgaacctggtattgc	45	129	2
305207	コード	4	1980	aacacagcaggttgacatt	69	130	2
305208	コード	4	2146	tccttaggaactgaagagag	67	131	2
305209	コード	4	2175	catcaaatagctcttgctc	56	132	2
305210	コード	4	2201	ctcttgatgtaggtcattc	62	133	2
305211	コード	4	2282	atccaagagttttgtcagtt	39	134	2
305212	コード	4	2304	tttcaaccttcacgcata	71	135	2
305213	コード	4	2397	gtatctgattgtgatgatt	75	136	2
305214	終止コード	4	2455	taaggcagtcacttttgatg	74	137	2
305215	3'UTR	4	2488	taattcgacttctttaagg	64	138	2
305216	3'UTR	4	2519	acaaactgatagtttataca	41	139	2
305217	3'UTR	4	2584	gtgcgtattttaaacaac	56	140	2
305218	3'UTR	4	4739	taatttctccaaatactga	53	141	2
305219	3'UTR	4	2646	aaaagtgatgacgactcaac	55	142	2
305220	3'UTR	4	2723	ttacgtccacataattaaggt	67	143	2
305221	3'UTR	4	2753	ttaggtgccatccttcttg	87	144	2
305222	3'UTR	4	2764	gcactggtggttagtgcc	77	145	2
305223	3'UTR	4	2769	ttgggcactggtggttag	82	146	2
305224	3'UTR	4	2824	atttcatccagccaactgtg	82	147	2
305225	3'UTR	4	2850	ggataccaacagaaagtc	62	148	2
305226	3'UTR	4	2939	acaactcccttttctgata	62	149	2
305227	3'UTR	4	2959	cagtaatagctataaaaggc	77	150	2
305228	3'UTR	4	3004	agcaagcgtagttcactaaa	88	151	2
305229	3'UTR	4	3063	gctgccatcttaaacagct	61	152	2
305230	3'UTR	4	3132	aagcaccaaccatttcac	63	153	2
305231	3'UTR	4	3144	ccatcagggtagaagcacca	72	154	2
305232	3'UTR	4	3160	ttctgatagctaagtccat	80	155	2

10

20

30

305233	3'UTR	4	3195	aagaatactggagatttgag	75	156	2
305234	3'UTR	4	3294	gctctataccaggttaggact	94	157	2
305235	3'UTR	4	3320	ttaccagcaggtcactgga	92	158	2
305236	3'UTR	4	3330	catccacaggtttaccagca	86	159	2
305237	3'UTR	4	3347	tagtctttgcaaccatcat	89	160	2
305238	3'UTR	4	3375	agggcctcttgtagttatt	83	161	2
305239	3'UTR	4	3409	tagccattgcaaaaataggg	71	162	2
305240	3'UTR	4	3416	tgccatagccattgcaaaa	89	163	2
305241	3'UTR	4	3445	ctgaaagacaaatagttac	29	164	2
305242	3'UTR	4	3484	acaacttttaagaagttata	32	165	2
305243	3'UTR	4	3499	tggtatctggaatcacaaac	82	166	2
305244	3'UTR	4	3504	acagctggttatctggaatc	81	167	2
305245	3'UTR	4	3521	agtctctcagctgtgtaca	81	168	2
305246	3'UTR	4	3610	gtgaaatgggtgtctagcc	51	169	2
305247	3'UTR	4	3624	tgacagatgggaatgtaaa	67	170	2
305248	3'UTR	4	3641	aaagattaaccaattggtga	80	171	2
305249	3'UTR	4	3658	tttctgtaccatcaggaaa	83	172	2
305250	3'UTR	4	3743	tctatggcacacattaggga	67	173	2
305251	3'UTR	4	3754	ttgtgttaaaccttatggca	74	174	2
305252	3'UTR	4	3770	aagaaattcacaggacttgt	76	175	2
305253	3'UTR	4	3841	gaaagttgtaagggtgcaca	84	176	2
305254	3'UTR	4	3886	caaatcttctgtgcttagt	69	177	2
305255	3'UTR	4	3898	ttgaatagaatacaatttc	0	178	2
305256	3'UTR	4	3918	acacaataatttggccacc	58	179	2
305257	3'UTR	4	3923	ctattacacaaataatttg	22	180	2
305258	3'UTR	4	4038	agtagcccttccctcccag	33	181	2
305259	3'UTR	4	4046	aaagctgcagtagcccttc	56	182	2
305260	3'UTR	4	4053	tgcatgtaaagctgcagtag	77	183	2
305261	3'UTR	4	4065	attttaataaattgcatgta	24	184	2
305262	3'UTR	4	4082	caagctattttacaatcatt	57	185	2
305263	3'UTR	4	4174	atccatcagcatttcttga	74	186	2
305264	3'UTR	4	4191	tataaatcatataggttatc	26	187	2
305265	3'UTR	4	4244	caaaactgtttgtttctgag	77	188	2
305266	3'UTR	4	4311	ctgggtcagagcctcagcaa	84	189	2
305267	3'UTR	4	4319	taatctcactgggtcagagc	79	190	2
305268	3'UTR	4	4365	aatgagaagggtgtcagaa	77	191	2
305269	3'UTR	4	4376	ctcactgttggaatgagaag	82	192	2
305270	3'UTR	4	4401	agtaactaaacctgcgctg	74	193	2
305271	3'UTR	4	4442	ctgtttacatactttacata	68	194	2
305272	3'UTR	4	4483	agatgggtgcctttaaggatg	70	195	2
305273	3'UTR	4	4504	atgtgaaagttaaccgctat	74	196	2
305274	3'UTR	4	4547	ttctgaagcttctgtgtca	93	197	2
305275	3'UTR	4	4577	ctggtacctctatgcaaaact	90	198	2
305276	3'UTR	4	4602	gagattctgcactatttaca	81	199	2
305277	3'UTR	4	4624	tagtgtattattggaacct	79	200	2
305278	3'UTR	4	4664	ttatttggaataaactctt	27	201	2
305279	3'UTR	4	4680	aaaacatgtcctcattttat	62	202	2
305280	イントロン	25	103636	gaagctcttttgaaactta	83	203	2
305281	コード	26	2315	tggttttaaccacataacat	79	204	2
305282	コード	26	2304	acataacattttcatgcata	33	205	2
305283	3'UTR	25	104039	tttgtgtgagtaaccaact	78	206	2
305284	3'UTR	25	104061	acactaaaaatactttcag	24	207	2
305285	3'UTR	25	104562	aactccaccacaaagggttta	71	208	2

305286	3'UTR	25	104629	ttcctgaaaacctggtcact	54	209	2
305287	イントロン	25	24125	attaatctgcataggaagca	73	210	2
305288	エキソン7: イントロン8 結合部	25	87671	ttctaccaacctgaagagag	54	211	2
305289	イントロン	25	89336	agaagaactcgtgatattat	77	212	2
305290	イントロン7: エキソン8 結合部	25	100360	tccttaggaactaaaaggtt	43	213	2
305291	イントロン8: エキソン9 結合部	25	101044	tttcaaccacctgaagaga	68	214	2
305292	イントロン	27	196	gggtccagctgcttcggccg	36	215	2
305293	イントロン	27	304	ggagagcccctatttaagaa	47	216	2

【 0 1 9 7 】

表2に示すように、配列番号67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、85、86、87、88、89、91、92、93、94、95、97、98、99、100、101、102、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、179、182、183、185、186、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、202、203、204、206、208、209、210、211、212、213、214および216は、本アッセイにおいてヒトグルコシルコイドレセプター発現の少なくとも39%阻害を示し、それ故に好適である。これらの好適な配列が相補的である標的領域は、本明細書中で「好適な標的セグメント」と呼ばれ、それ故に本発明の化合物による標的化に好適である。

10

【 0 1 9 8 】

配列番号67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107および108は、マウスグルコシルコイドレセプター核酸標的に対してまた相補的である、異種間オリゴヌクレオチドである。

【 実施例 1 6 】

【 0 1 9 9 】

20

2'-MOEウイングおよびデオキシギャップを有するキメラホスホロチオエートオリゴヌクレオチドによるマウスグルコシルコイドレセプター発現のアンチセンス阻害

本発明に従い、第2の一連のアンチセンス化合物を、公開された配列（本明細書中で配列番号：11として援用されるGenBank受託番号NM_008173.1、本明細書中で配列番号：217として援用されるGenBank受託番号X66367.1、本明細書中で配列番号：218として援用されるGenBank受託番号BF181849.1、本明細書中で配列番号：219として援用されるGenBank受託番号BE373661.1、および本明細書中で配列番号：220として援用されるGenBank受託番号AC007995.19のヌクレオチド145001～164000の配列の相補鎖）を用いて、マウスグルコシルコイドレセプター RNAの異なる領域を標的化するように設計した。化合物を表3に示す。「標的部位」は、化合物が結合する特定の標的配列上の第1の（5'最末端）ヌクレオチド番号を示す。表3中の全ての化合物は、両側（5'および3'方向）に5ヌクレオチドの「ウイング」が隣接する10の2'-デオキシヌクレオチドからなる中央の「ギャップ」領域から構成される20ヌクレオチド長のキメラオリゴヌクレオチド（「ギャップマー」）である。ウイングは2'-メトキシエチル（2'-MOE）ヌクレオチドから構成される。ヌクレオシド間（主鎖）結合は、オリゴヌクレオチド全体にわたってホスホロチオエート（P=S）である。全てのシトシン残基は、5-メチルシトシンである。化合物をマウスグルコシルコイドレセプター mRNAレベルに与える影響について、本明細書中の他の実施例に記載した定量リアルタイムPCRにより分析した。データは、b.END細胞を本発明の150nMのアンチセンスオリゴヌクレオチドで処理した2回の実験の平均である。各データポイントの陽性対照は表中にて配列番号により特定している。「N.D.」は、存在する場合、「データがない」ことを示す。

30

40

【 0 2 0 0 】

【表 3】

表3

2'-MOEウイングおよびデオキシギャップを有するキメラホスホロチオエートオリゴヌクレオチド
によるマウスグルコシルコリドレセプター mRNAレベルの阻害

ISIS #	領域	標的 配列 番号	標的部位	配列	阻害率	配列 番号	対照 配列番号
153105	コード	11	2242	tccaaaaatgtttgaagca	64	55	2
180268	開始コドン	11	2	cattggcaaatattaactc	53	221	2
180269	開始コドン	11	11	tttggagtccattggcaaat	70	222	2
180270	コード	11	140	gggtgaagacgcagaaacct	58	67	2
180271	コード	11	301	tctccatatacagtcccat	86	68	2
180272	コード	11	410	gtttgcaatgctttctcca	86	69	2
180273	コード	11	420	acctattgaggtttgcaatg	65	70	2
180274	コード	11	427	ctggtcgacctattgaggtt	69	71	2
180275	コード	11	585	ctgtgtatatacaattcaca	84	72	2
180276	コード	11	592	ctttggtctgtgtatataca	84	73	2
180277	コード	11	600	caaagggtgtttgtgtgtg	82	74	2
180278	コード	11	625	gaaaactccaaatctgcaa	93	75	2
180279	コード	11	787	ggtttagtgtccggtaaaat	75	76	2
180280	コード	11	910	ttctctgtcttaattacccc	87	77	2
180281	コード	11	917	gcccagtttctctgtcttaa	84	78	2
180282	コード	11	982	gaaatggcagacattttatt	72	79	2
180283	コード	11	991	ccatgaacagaaatggcaga	74	80	2
180284	コード	11	1012	tgctctcagaggtactcac	82	81	2
180285	コード	11	1022	gtgtacatctgtctccag	66	82	2
180286	コード	11	1032	tcatgtcatagtgtacatc	69	83	2
180287	コード	11	1042	gatgctgtattcatgtcata	70	84	2
180288	コード	11	1051	tgagaaagggtgtgtatt	62	85	2
180289	コード	11	1091	tggtggaatgacattaaaaa	71	86	2
180290	コード	11	1096	ggaattgtggaatgacatt	63	87	2
180291	コード	11	1294	gagcacaccaggcagagttt	54	88	2
180292	コード	11	1376	ctgtcctccactgctcttt	63	89	2
180293	コード	11	1386	ggttaattgtgtgtctctcc	57	90	2
180294	コード	11	1459	tttcgatagcggcatgctgg	55	91	2

10

20

180295	コード	11	1468	tgaagacatttcgatagcg	57	92	2
180296	コード	11	1498	gttttcgagcttcagggt	59	93	2
180297	コード	11	1584	caggaaactattgtttgta	41	94	2
180298	コード	11	1756	gcctttgccatttcactgc	41	95	2
180299	コード	11	1774	tttctgaatcctggtatcgc	48	223	2
180300	コード	11	1905	taataatcagatcaggagca	43	96	2
180301	コード	11	1912	tgctcattaataatcagatc	62	97	2
180302	コード	11	1919	cattctctgctcattaataa	50	98	2
180303	コード	11	1930	cagggtagagtcattctctg	63	99	2
180304	コード	11	1957	agcatgtgtttacattgtc	71	100	2
180305	コード	11	2014	atacagagatactcttcata	49	101	2
180306	コード	11	2024	taaggttttcatacagagat	47	102	2
180307	コード	11	2035	gagagaagcagtaagggttt	26	103	2
180308	コード	11	2050	tccttaggaactgaggagag	46	224	2
180309	コード	11	2117	ggcttttctagctcttga	69	104	2
180310	コード	11	2125	ttgacaatggctttcctag	65	105	2
180311	コード	11	2290	gtgatgatttcagtaacat	59	106	2
180312	終止コドン	11	2359	taaggcagtcattctctgatg	58	225	2
180313	3'UTR	11	2376	aaggcagcctttcttagtaa	51	226	2
180314	3'UTR	11	2414	aagttgtacagtaaaagct	85	227	2
180315	3'UTR	11	2511	tgccaagtcttggccctcta	13	107	2
180316	3'UTR	11	2521	ctgcttctgttgccaagtct	52	108	2
180317	3'UTR	11	2527	gctcatctgcttctgttgcc	68	228	2
180318	5'UTR	217	1386	gcatacatactgtgagcccg	0	229	2
180319	5'UTR	218	37	ctggcgccgcccgtctgag	14	230	2
180320	5'UTR	218	104	ttggcaaatattaatgtgag	20	231	2
180321	5'UTR	219	227	agccagataaacaagtcggc	64	232	2
180322	5'UTR	219	278	atattaactcagcacccggcg	37	233	2
180323	イントロン	220	4092	agaatcttagctatagggt	35	234	2
180324	エキソン 5: イントロン5 結合部	220	7968	catgccttacctggtatcgc	8	235	2
180325	エキソン 6: イントロン6 結合部	220	9049	tgtaacttactcattaataa	32	236	2
180326	イントロン	220	13238	tcacatagctcgcgattgtt	63	237	2
180327	イントロン7: エキソン 8 結合部	220	14602	tccttaggaactaaaaggta	13	238	2
180328	3' UTR	220	14909	tatctctgactgtcctggca	59	239	2
180329	3' UTR	220	15984	agcctttcttagtaaggcag	36	240	2
180330	3' UTR	220	16177	acatcactgtctgttctct	59	241	2
180331	3' UTR	220	16227	ggacatgtctccactaactg	65	242	2
180332	3' UTR	220	16268	tttgggcactgtgtgttcag	63	243	2
180333	3' UTR	220	16548	catcttaaacagctatacaa	64	244	2
180334	3' UTR	220	16639	ctgatagctgagtgccatca	55	245	2
180335	3' UTR	220	16868	agagatgtgtcattgggtgc	48	246	2
180336	3' UTR	220	17166	cctgacattcagttctaat	70	247	2
180337	3' UTR	220	17178	caaacatggatgcctgacat	70	248	2
180338	3' UTR	220	17215	ttagattctatggcacatgt	52	249	2
180339	3' UTR	220	17327	gttaagcttttgagtcacaga	64	250	2
180340	3' UTR	220	17729	ctctccctagcttagagcaa	71	251	2
180341	3' UTR	220	17909	tggacgtgtcctctaagtac	65	252	2

180342	3' UTR	220	18076	gaaatggactctttaggat	65	253	2
180343	3' UTR	220	18283	ataaattcacatccagctg	62	254	2
180344	3' UTR	220	18370	taaagtacaataatctatt	14	255	2

【 0 2 0 1 】

表3に示すように、配列番号55、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、104、105、106、108、221、222、223、224、225、226、227、228、232、233、234、236、237、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253および254は、本アッセイにおいてマウスグルココルチコイドレセプター発現の少なくとも32%阻害を示し、それ故に好適である。これらの好適な配列が相補的である標的領域は、本明細書中で「好適な標的セグメント」と呼ばれ、それ故に本発明の

10

20

30

40

50

化合物による標的化に好適である。

【 0 2 0 2 】

配列番号69、70、71、74、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、89、90、94、95、96、97、98、100、101、102、103、104、106、222、224、227、231、254および255は、ラットグルココルチコイドレセプター核酸標的に対してまた相補的である、異種間オリゴヌクレオチドである。

【 実施例 1 7 】

【 0 2 0 3 】

2'-MOEウイングおよびデオキシギャップを有するキメラホスホロチオエートオリゴヌクレオチドによるラットグルココルチコイドレセプター発現のアンチセンス阻害

10

本発明に従い、第3の一連のアンチセンス化合物を、公開された配列（本明細書中で配列番号：18として援用されるGenBank受託番号NM_012576.1、および本明細書中で配列番号：256として援用されるGenBank受託番号Y00489.1）を用いて、ラットグルココルチコイドレセプター RNAの異なる領域を標的化するように設計した。化合物を表4に示す。「標的部位」は、化合物が結合する特定の標的配列上の第1の（5'最末端）ヌクレオチド番号を示す。表4中の全ての化合物は、両側（5'および3'方向）に5ヌクレオチドの「ウイング」が隣接する10の2'-デオキシヌクレオチドからなる中央の「ギャップ」領域から構成される20ヌクレオチド長のキメラオリゴヌクレオチド（「ギャップマー」）である。ウイングは2'-メトキシエチル（2'-MOE）ヌクレオチドから構成される。ヌクレオシド間（主鎖）結合は、オリゴヌクレオチド全体にわたってホスホロチオエート（P=S）である。全てのシトシン残基は、5-メチルシトシンである。化合物をラットグルココルチコイドレセプター mRNAレベルに与える影響について、本明細書中の他の実施例に記載した定量リアルタイムPCRにより分析した。データは、NRK細胞を本発明の150nMのアンチセンスオリゴヌクレオチドで処理した2回の実験の平均である。各データポイントの陽性対照は表中にて配列番号により特定している。「N.D.」は、存在する場合、「データがない」ことを示す。

20

【 0 2 0 4 】

【 表 4 】

表 4

2'-MOEウイングおよびデオキシギャップを有するキメラホスホロチオエートオリゴヌクレオチドによるラットグルココルチコイドレセプター mRNAレベルの阻害

30

ISIS #	領域	標的 配列番号	標的部位	配列	阻害 率	配列 番号	対照 配列番号
180269	開始 コドン	18	61	tttgagtcattggcaaat	42	222	2
180272	コード	18	496	gtttgcaatgctttctcca	60	69	2
180273	コード	18	506	acctattgaggtttgcaatg	59	70	2
180274	コード	18	513	ctggtcgacctattgaggtt	49	71	2
180277	コード	18	686	caaaggtgctttgctctgtg	68	74	2
180279	コード	18	873	ggtttagtgctccgtaaaat	58	76	2
180280	コード	18	996	ttctctgcttaattacccc	56	77	2
180281	コード	18	1003	gccagtttctctgtttaa	74	78	2
180282	コード	18	1068	gaaatggcagacattttatt	28	79	2
180283	コード	18	1077	ccatgaacagaaatggcaga	52	80	2
180284	コード	18	1098	tgctctccagaggtactcac	54	81	2
180285	コード	18	1108	gtggtacatctgtctccag	58	82	2
180286	コード	18	1118	tcatgtcatatgtgtacatc	46	83	2
180287	コード	18	1128	gatgctgtattcatgtcata	27	84	2
180288	コード	18	1137	tgagaaaggagctgtatt	64	85	2
180289	コード	18	1177	tggtggaatgacattaaaa	47	86	2
180290	コード	18	1182	ggaattggtggaatgacatt	53	87	2
180292	コード	18	1462	ctgtcttccactgctcttt	37	89	2
180293	コード	18	1472	ggtaattgtgtgtctcttc	30	90	2
180297	コード	18	1670	caggaaactattgtttgtta	56	94	2
180298	コード	18	1842	gcctttgccatttactgc	44	95	2
180300	コード	18	1991	taataatcagatcaggagca	26	96	2
180301	コード	18	1998	tgctcattataatcagatc	38	97	2
180302	コード	18	2005	cattctctgctcattataa	10	98	2
180304	コード	18	2043	agcatgtgtttacattggtc	57	100	2
180305	コード	18	2100	atacagagataacttcata	31	101	2
180306	コード	18	2110	taagggtttcatacagagat	47	102	2
180307	コード	18	2121	gagagaagcagtaagggttt	16	103	2
180308	コード	18	2136	tccttaggaactgaggagag	58	224	2
180309	コード	18	2203	ggcttttctagctctttga	54	104	2
180311	コード	18	2376	gtgatgtttcagctaacat	41	106	2
180314	3'UTR	18	2500	aagttgtacagtaaaagct	39	227	2
180320	5' UTR	18	50	ttggcaaatattatgtgag	3	231	2
180343	3' UTR	18	4773	ataaatttcacatccagctg	48	254	2
180344	3' UTR	18	4859	taaatgtacaataatctatt	0	255	2
223308	コード	256	278	taagtctggctgctgctgct	41	257	2
223309	コード	256	285	ctttggataagctggtgctgc	48	258	2
223310	コード	18	150	aggctttataaaagtccat	48	259	2
223311	コード	18	244	atcaaggagaaatcctctgct	49	260	2
223312	コード	18	1248	gcccccaaggagtcaggct	48	261	2
223313	コード	18	1407	ccgtaatgacatcctgaagc	41	262	2
223314	コード	18	2156	actcttgctcttcagacct	44	263	2
223315	終止 コドン	18	2445	taaggcagtcattttgatg	53	264	2
223316	3'UTR	18	2472	aactttctttaaggcaacct	44	265	2
223317	3'UTR	18	2586	cctctataaaccacatgtac	52	266	2
223318	3'UTR	18	2637	tgatcatcctcagagtggtt	30	267	2
223319	3'UTR	18	2685	aactgttagtttctgtgata	52	268	2
223320	3'UTR	18	2799	tagaaagttttaccagcca	58	269	2
223321	3'UTR	18	3202	ctatgtaattctccatggaa	50	270	2

10

20

30

223322	3'UTR	18	3266	ctggactaggtgctctacac	44	271	2
223323	3'UTR	18	3366	attgaagagatggtgcatta	55	272	2
223324	3'UTR	18	3473	ggctttatcagagctggcta	62	273	2
223325	3'UTR	18	3542	ctgtattagcgatttagttg	53	274	2
223326	3'UTR	18	3604	accatgagagctagaccaat	35	275	2
223327	3'UTR	18	3686	gcacatgtaggatgtgtag	46	276	2
223328	3'UTR	18	3880	agtttttattacacaaat	21	277	2
223329	3'UTR	18	3992	cagtagccctttcccttcc	11	278	2
223330	3'UTR	18	4117	catcaatatttcttgaccc	23	279	2
223331	3'UTR	18	4576	aatggactattgaagggtgg	44	280	2
223332	3'UTR	18	4609	agaaaacataagcatgtcct	33	281	2
223333	3'UTR	18	4702	gaacaatcccttttagagag	49	282	2
223334	3'UTR	18	4848	taatctatttttgagaagct	52	283	2
223335	3'UTR	18	5039	tacgcttcaaggaaagcttc	59	284	2
223336	3'UTR	18	5183	ccgagctcactgaagtatt	55	285	2
223337	3'UTR	18	5220	tctttcaagatcggtcatga	36	286	2
223338	3'UTR	18	5274	ccaaggcctaaataaccag	44	287	2
223339	3'UTR	18	5390	ctttgggtactctcacttat	15	288	2
223340	3'UTR	18	5430	cctgactcatccttagaccc	23	289	2
223341	3'UTR	18	5606	tctcaagctccatgatcctt	4	290	2
223342	3'UTR	18	5680	cgcttctaactgaacc	27	291	2
223343	3'UTR	18	5686	ctgttcgcttctaact	45	292	2
223344	3'UTR	18	5740	gtttgggaatgagaagactt	44	293	2
223345	3'UTR	18	5785	tagcagctggtcaccagtcc	27	294	2
223346	3'UTR	18	5858	atttcatacagccatttat	38	295	2
223347	3'UTR	18	5908	tattgacacactgaaatctc	16	296	2
223348	3'UTR	18	6119	tagaaagacggatttttaa	0	297	2
223349	3'UTR	18	6214	tgtggtttgtaataccaag	56	298	2
223350	3'UTR	18	6244	actaacatttactgccaatt	28	299	2

10

20

30

40

50

【 0 2 0 5 】

表4に示すように、配列番号69、70、71、74、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、89、90、94、95、96、97、100、101、102、104、106、222、224、227、254、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、280、281、282、283、284、285、286、287、291、292、293、294、295、298および299は、本アッセイにおいてラットグルココルチコイドレセプター発現の少なくとも26%阻害を示し、それ故に好適である。これらの「好適な標的セグメント」は、実験により、本発明のアンチセンス化合物とのハイブリダイゼーションに対して開放しており、かつ接近可能なことが見出されたので、当業者は、これらの好適な標的セグメントに特異的にハイブリダイズし、かつ結果としてグルココルチコイドレセプター発現を阻害する他の化合物を包含する本発明のさらなる態様を、常套的な実験だけを用いて、理解するかまたは確認することができるであろう。

【 0 2 0 6 】

本発明によれば、アンチセンス化合物は、アンチセンスオリゴマー化合物、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、外部ガイド配列（EGS）オリゴヌクレオチド、選択的スプライサー（alternate splicers）、プライマー、プローブ、および標的核酸の少なくとも一部にハイブリダイズする他の短いオリゴマー化合物を含む。

【 実施例 1 8 】

【 0 2 0 7 】

グルココルチコイドレセプタータンパク質レベルのウエスタンブロット分析

ウエスタンブロット分析（免疫ブロット分析）は、標準的な方法を用いて行う。細胞を、オリゴヌクレオチド処理の16～20時間後に採取し、PBSで1回洗浄し、Laemmli緩衝液（100 μl / ウェル）中に懸濁し、5分間煮沸し、16% SDS-PAGEゲル上に装填する。ゲルを、1.5時間、150Vで作動させ、ウエスタンブロッティング用の膜に移す。グルココルチコイドレセプターに指向した適切な一次抗体を、一次抗体種に対して指向した、放射標識または蛍光標識した二次抗体と共に用いる。バンドをPHOSPHORIMAGERTM（Molecular Dynamics, Sunnyvale CA）を用いて可視化する。

【実施例 19】

【0208】

マウスグルココルチコイドレセプターのアンチセンス阻害：b.END細胞での用量応答研究

本発明のさらなる態様において、ISIS 180271、ISIS 180272、ISIS 180277、ISIS 180280、ISIS 180281およびISIS 180314を用量応答実験にて試験した。ISIS 118920 (GTTCATTCTAAAGTGGTCAC、配列番号：300) は、タンパク質ホスファターゼ触媒サブユニット2αを標的とし、対照として使用した。b.END細胞を24ウェルプレート中、1ウェルあたり40,000細胞の密度で平板培養した。次いで細胞を、1、5、10、25、50、100または200nMのアンチセンスオリゴヌクレオチドで処理し、本明細書中の他の実施例に記載したように、1mlの培養液につき100nMオリゴヌクレオチドあたり3μlのLIPOFECTIN (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) と混合した。マウスグルココルチコイドレセプターの発現を本明細書中の他の実施例に記載したようにリアルタイムPCRにより測定した。データをマウスグルココルチコイドレセプター-mRNAの阻害率として表し、データを未処理の対照細胞に対して標準化した。結果は3回の実験の平均であり、表5に示す。対照オリゴヌクレオチドで処理された結果において、数字の前に付く「+」は、遺伝子発現が増加することを示す。

【0209】

【表5】

表 5

マウスグルココルチコイドレセプターのアンチセンス阻害：b.END細胞での用量応答

ISIS #	配列番号	マウスグルココルチコイドレセプターの阻害率 %						
		オリゴヌクレオチドの用量						
		1 nM	5 nM	10 nM	25 nM	50 nM	100 nM	200 nM
180271	68	11	39	50	71	79	80	81
180272	69	7	33	50	71	77	80	78
180277	74	17	51	56	78	88	82	71
180280	77	12	60	64	84	86	85	86
180281	78	23	72	73	82	89	83	84
180314	227	12	24	36	67	74	77	79
118920	300	2	1	+36	+11	+20	+15	4

【0210】

表5で実証されたように、本実験で試験されたアンチセンス化合物は、用量依存様式により、b.END細胞中のマウスグルココルチコイドレセプター-mRNA発現を阻害した。

【実施例 20】

【0211】

マウスグルココルチコイドレセプターのアンチセンス阻害：一次マウス肝細胞での用量応答研究

本発明にしたがって、ISIS 180271、ISIS 180272およびISIS 180280を一次マウス肝細胞での用量応答実験にて試験し、50、100、200または400nMのアンチセンスオリゴヌクレオチドで処理した。ISIS 129685 (AATATTCGCACCCCACTGGT、配列番号：301)、ISIS 129686 (CGTTATTAACCTCCGTTGAA、配列番号：302) およびISIS 129695 (TTCTACCTCGCGGATTAC、配列番号：303) は、タンパク質ホスファターゼ2Aを標的とし、対照オリゴヌクレオチドとして使用されたオリゴヌクレオチドである。細胞を処理し、mRNA発現レベルを本明細書中の他の実施例に記載したように測定した。データを未処理の対照細胞に対して標準化し、マウスグルココルチコイドレセプター中の変化率として表した。ここで、「-」とは発現の減少を示し、「+」とは発現の増加を示す。結果は3回の実験の平均であり、表6にて示す。

【0212】

【表 6】

表 6
マウスグルコルチコイドレセプターのアンチセンス阻害：
一次マウス肝細胞での用量応答実験

ISIS #	配列番号	マウスグルコルチコイドレセプター 発現の変化率 %			
		オリゴヌクレオチドの用量			
		50 nM	100 nM	200 nM	400 nM
180271	68	-42	-68	-77	-86
180272	69	-49	-66	-73	-84
180280	77	-55	-64	-74	-84
129685	301	+6	+12	+3	-31
129686	302	+14	+12	+5	+1
129695	303	-6	-19	-10	-21

10

【0213】

これらのデータは、一次マウス肝細胞において、ISIS 180271、ISIS 180272およびISIS 180280が、対照オリゴヌクレオチドと異なり、用量依存様式によりマウスグルコルチコイドレセプター発現を阻害したことを実証する。

【実施例 21】

【0214】

20

やせたマウス (db/db +/- マウス) におけるグルコルチコイドレセプターのアンチセンス阻害剤の効果

db/db +/- マウスはdb/dbマウスの異型接合の同腹子であり、しばしばリーン同腹子と言われるが、それらはdb (肥満症および高血糖症) 表現型を示さないからである。6週齢のdb/db +/- 雄マウスに、50mg/kgのアンチセンスオリゴヌクレオチドを週2回、皮下投与した。合計で5回投与した。使用されたグルコルチコイドアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ISIS 180272 (配列番号: 69) およびISIS 180280 (配列番号: 77) であった。マウスPTENに対して標的化されたISIS 116847 (CTGCTAGCCTCTGGATTTGA、配列番号: 304) を、陽性対照として使用した。アンチセンス化合物を緩衝食塩水で調製し、0.2ミクロンフィルターで濾過することで滅菌した。血液試料を、マウスおよびラットから尾を切り取ることで得た。血漿グルコース値を、最初の投与前 (-6日目) およびマウスを屠殺する前日 (15日目) に測定した。屠殺後、血清脂質を測定し、肝臓での標的減少もまた測定した。

30

【0215】

グルコルチコイドレセプターのアンチセンス阻害剤である、ISIS 180272 (配列番号: 69) で処置したやせたマウスにおいて、血漿グルコース値は、-6日目にておよそ220mg/dL、および15日目にておよそ170mg/dLであった。グルコルチコイドレセプターの別のアンチセンス阻害剤である、ISIS 180280 (配列番号: 77) で処置したやせたマウスにおいて、血漿グルコース値は、-6日目にておよそ230mg/dL、および15日目にておよそ160mg/dLであった。食塩水単独で処置したやせたマウスは、-6日目にておよそ240mg/dL、および15日目にておよそ180mg/dLの満腹時の血漿グルコース値を有した。血漿グルコース値はわずかに減少したが、マウスは低血糖症にはならなかった。

40

【0216】

血清脂質をまた、研究の最後に測定した。コレステロール値は、食塩水で処置したやせたマウスでおよそ90mg/dL、ISIS 180272で処置したやせたマウスでおよそ115mg/dL、およびISIS 180280で処置したやせたマウスでおよそ100mg/dLであった。トリグリセリドは、食塩水で処置したやせたマウスでおよそ155mg/dLであり、ISIS 180272で処置したやせたマウスで100mg/dLに、およびISIS 180280で処置したやせたマウスで90mg/dLにかなり減少した。

【0217】

50

肝臓でのグルコシルコイドレセプター-mRNAレベルを、RiboGreen™ RNA定量試薬 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) を用いて、上記の先の実施例で教示したように、研究の最後で測定した。グルコシルコイドレセプター-mRNAレベルは、食塩水での処置と比較した場合、ISIS 180272で処置したやせたマウスでおよそ45%、ISIS 180280で処置したやせたマウスでおよそ25%減少した。

【実施例 2 2】

【0 2 1 8】

ob/obマウスにおけるグルコシルコイドレセプターのアンチセンス阻害剤の効果

Ob/obマウスは、結果的に肥満症および高血糖症となる変異を、レプチン遺伝子中に有する。したがってこれらのマウスは、肥満症および糖尿病の調査、ならびにこれらの症状を処置するために設計された処置法のための有用なモデルである。本発明にしたがって、グルコシルコイドレセプターに対して標的化された化合物を、肥満症および高血糖症のob/obモデルにて試験する。

10

【0 2 1 9】

7 週齢のC57B1/6J-Lep ob/ob雄マウス (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) に脂肪を10~15%含有する食事を与え、週2回で5週間、25mg/kgの用量でオリゴヌクレオチドを皮下注射する。使用されたグルコシルコイドアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ISIS 180272 (配列番号: 69) およびISIS 180280 (配列番号: 77) であった。マウスPTENに対して標的化された、ISIS 116847 (CTGCTAGCCTCTGGATTTGA、配列番号: 304) を陽性対照として使用し、関連の無いオリゴヌクレオチドであるISIS 141923 (CCTTCCCTGAAGGTTCTCC、配列番号: 305) を陰性オリゴヌクレオチド対照として使用した。食塩水を注射した動物もまた対照として供する。

20

【0 2 2 0】

標的mRNAのアンチセンス阻害から生じる生理的效果を評価するために、アンチセンスオリゴヌクレオチド処置を受けるob/obマウスを、血清脂質、血清遊離脂肪酸、血清コレステロール、肝臓トリグリセリド、脂肪組織トリグリセリド、および肝臓酵素レベルについて処置期間の最後にさらに評価する。肝臓脂肪症、または肝臓からの脂肪除去を、肝臓トリグリセリド含有量を測定することによって評価する。肝臓脂肪症を、オイルレッドO染色 (一般に脂肪沈着物を視覚化するために使用され、細胞核および細胞質をそれぞれ視覚化するために、ヘマトキシリンおよびエオシンで対比染色される) によって染色された冷凍肝臓組織切片の常套的組織分析によって評価する。

30

【0 2 2 1】

ブドウ糖およびインスリン代謝における標的阻害の効果、アンチセンスオリゴヌクレオチドで処置したob/obマウス中で評価する。アンチセンスオリゴヌクレオチド処置の前 (-1日目) に血漿グルコースを測定し、その後処置の2週間目および4週間目 (それぞれ12日目および27日目) で測定する。満腹時の血漿グルコース値、および空腹時の血漿グルコース値の両方を測定する。血漿インスリンもまた、処置の初め、およびその後処置の2週間目および4週間目で測定する。ブドウ糖負荷試験およびインスリン負荷試験もまた、満腹時のマウス、および空腹時のマウスで行う。マウスにブドウ糖またはインスリンのどちらかを腹腔内注射し、血中ブドウ糖値および血中インスリン値を、インスリンまたはブドウ糖負荷の前に測定し、15、20または30分の間隔で3時間まで測定する。

40

【0 2 2 2】

グルコシルコイドレセプターのアンチセンス阻害剤である、ISIS 180272 (配列番号: 69) で処置したob/obマウスにおいて、満腹時の血漿グルコース値は、-1日目にておよそ345mg/dL、12日目にておよそ350mg/dLおよび27日目にておよそ245mg/dLであった。グルコシルコイドレセプターの別のアンチセンス阻害剤である、ISIS 180280 (配列番号: 77) で処置したマウスにおいて、満腹時の血漿グルコース値は、-1日目にておよそ350mg/dL、12日目にておよそ340mg/dLおよび27日目にておよそ255mg/dLであった。対照的に、食塩水単独で処置したマウスは、満腹時の血漿グルコース値の-1日目にておよそ350mg/dL、12日目にておよそ420mg/dLおよび27日目にておよそ400mg/dLを有した。

50

PTENに対して標的化された、陽性対照オリゴヌクレオチドであるISIS 116847（配列番号：304）で処置したマウスは、満腹時の血漿グルコース値の-1日目にておよそ340mg/dL、12日目にておよそ230mg/dLおよび27日目にておよそ200mg/dLを有した。陰性対照オリゴヌクレオチドであるISIS 141923で処置したマウスは、満腹時の血漿グルコース値の-1日目にておよそ360mg/dL、12日目にておよそ480mg/dLおよび27日目にておよそ430mg/dLを有した。かくして、満腹時の血漿グルコース値は、グルココルチコイドレセプターのアンチセンス阻害剤による処置後に減少した。低血糖症は見られなかった。

【0223】

空腹時のob/obマウスにおいて、血漿グルコース値を19日目（16時間の空腹後）および29日目（12時間の空腹後）に測定した。グルココルチコイドレセプターのアンチセンス阻害剤である、ISIS 180272（配列番号：69）で処置したob/obマウスにおいて、空腹時の血漿グルコース値は、19日目にておよそ190mg/dL、および29日目にておよそ220mg/dLであった。グルココルチコイドレセプターの別のアンチセンス阻害剤である、ISIS 180280（配列番号：77）で処置したマウスにおいて、空腹時の血漿グルコース値は、19日目にておよそ195mg/dL、および29日目にておよそ270mg/dLであった。対照的に、食塩水単独で処置したマウスは、空腹時の血漿グルコース値の19日目にておよそ320mg/dL、および29日目にておよそ320mg/dLを有した。PTENに対して標的化された、陽性対照オリゴヌクレオチドであるISIS 116847（配列番号：304）で処置したマウスは、空腹時の血漿グルコース値の19日目にておよそ170mg/dL、および29日目にておよそ190mg/dLを有した。陰性対照オリゴヌクレオチドであるISIS 141923で処置したマウスは、空腹時の血漿グルコース値の19日目にておよそ245mg/dL、および29日目にておよそ340mg/dLを有した。かくして、空腹時の血漿グルコース値もまた、グルココルチコイドレセプターのアンチセンス阻害剤による処置後に減少した。低血糖症は観察されなかった。

【0224】

ob/obマウス中の血清脂質もまた、研究の最後に測定した。コレステロール値は、食塩水で処置したマウスでおよそ270mg/dL、ISIS 180272で処置したマウスでおよそ305mg/dL、ISIS 180280で処置したマウスでおよそ250mg/dL、ISIS 116847で処置したマウスでおよそ285mg/dL、およびISIS 141923で処置したマウスでおよそ265mg/dLであった。トリグリセリドは、食塩水で処置したマウスでおよそ120mg/dL、ISIS 180272で処置したマウスでおよそ115mg/dL、ISIS 180280で処置したマウスでおよそ105mg/dL、ISIS 116847で処置したマウスでおよそ95mg/dL、およびISIS 141923で処置したマウスでおよそ95mg/dLであった。

【0225】

ob/obマウス肝臓でのグルココルチコイドレセプターmRNAレベルを、RiboGreenTM RNA定量試薬（Molecular Probes, Inc. Eugene, OR）を用いて、上記の先の実施例で教示したように、研究の最後で測定した。グルココルチコイドレセプターmRNAレベルは、食塩水での処置と比較した場合、ISIS 180272で処置したマウスでおよそ80%減少し、ISIS 180280で処置したマウスでおよそ70%減少した。グルココルチコイドレセプターmRNAレベルは、陽性対照オリゴヌクレオチドであるISIS 116847で処置したマウスにて有意に減少しなかった。陰性対照オリゴヌクレオチドであるISIS 141923で処置したマウスにて、グルココルチコイドレセプターmRNAレベルはわずかに上昇した（対照の120%）。

【0226】

ob/obマウスの白色脂肪組織でのグルココルチコイドレセプターmRNAレベルを、RiboGreenTM RNA定量試薬（Molecular Probes, Inc. Eugene, OR）を用いて、上記の先の実施例で教示したように、研究の最後で測定した。脂肪におけるグルココルチコイドレセプターmRNAレベルは、食塩水での処置と比較した場合、ISIS 180272で処置したマウスでおよそ40%減少し、ISIS 180280で処置したマウスでおよそ52%減少した。脂肪におけるグルココルチコイドレセプターmRNAレベルは、陽性対照オリゴヌクレオチドであるISIS 116847で処置したマウスにてわずかに減少した（およそ13%）。陰性対照オリゴヌクレオチドであるISIS 141923で処置したマウスにて、グルココルチコイドレセプターmRNAレベルはわずかに

上昇した（対照の120％）。

【実施例 23】

【0227】

レプチンレセプター欠損マウス（db/dbマウス）におけるグルココルチコイドレセプターのアンチセンス阻害剤の効果

レプチンは食欲を制御する、脂肪組織によって産生されるホルモンである。ヒトおよび非ヒト動物の双方においてこのホルモンの欠乏は、肥満をもたらす。db/dbマウスは、肥満および高血糖をもたらすレプチンレセプター遺伝子における変異を有する。したがって、かかるマウスは肥満および糖尿病の研究、ならびにかかる症状を処置するように設計される処置方法のための有用なモデルである。レプチン遺伝子において変異を有するob/obマウスよりもインスリンの低循環レベルを有し、高血糖であるdb/dbマウスは、2型糖尿病を有するげっ歯類のモデルとしてしばしば使用される。本発明に従って、本発明のオリゴマー化合物を、肥満および糖尿病を有するdb/dbモデルにおいて試験した。

10

【0228】

生後7週間の雄のC57B1/6J-Lepr db/dbマウス(Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)に、15～20%の脂肪含有量を有する食餌を与えた。そして1種類以上の本発明のオリゴマー化合物または対照化合物を25 mg/kgの用量で週に2回、5週間、皮下注射する。用いたグルココルチコイドアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ISIS 180272（配列番号：69）およびISIS 180280（配列番号：77）であった。マウスPTENを標的とするISIS 116847（配列番号：304）を陽性対照として用い、関連のないオリゴヌクレオチドであるISIS 141923（配列番号：305）を陰性オリゴヌクレオチド対照として用いた。オリゴヌクレオチドは緩衝生理食塩水で調製し、0.2ミクロンのフィルターを通す濾過により滅菌した。標準的なげっ歯類の食餌を与えた生理食塩水を注射した動物、レプチンレセプター野生型同腹子（すなわちやせた同腹子）およびdb/dbマウスを対照とする。処置期間の後、マウスを屠殺し、標的レベルを肝臓、褐色脂肪組織(BAT)、および白色脂肪組織(WAT)において評価する。RNAの単離および標的mRNA発現レベルの定量は、本明細書中の他の実施例に記載したように行う。

20

【0229】

標的mRNAの阻害の結果として生じる生理学的効果を評価するために、db/dbマウスを処置期間の終了時に、血清トリグリセリド、血清リポタンパク質、血清遊離脂肪酸、血清コレステロール、血清アポリポタンパク質、肝臓組織トリグリセリド、脂肪組織トリグリセリド、および血清トランスアミナーゼのレベルについてさらに評価する。トリグリセリド、リポタンパク質、コレステロール、およびトランスアミナーゼは、普通の臨床分析機器装置（例えばOlympus Clinical Analyzer, Melville, NY）によって測定する。血清遊離脂肪酸は、Wako Chemicalsの非エステル化遊離脂肪酸用キット(Richmond, VA)を用いて測定する。組織のトリグリセリドレベルは、Roche Diagnostics (Indianapolis, IN)のTriglyceride GPO Assayを用いて測定する。肝臓トリグリセリドレベルは、肝脂肪変性、または肝臓からの脂質の除去を評価するために用いる。肝脂肪変性はまた、一般に脂質沈着物を可視化するのに用いられるオイルレッドO染色剤で染色された、ならびにそれぞれ細胞核および細胞質を可視化するためのヘマトキシリンおよびエオシンにより対比染色された凍結肝臓組織切片の通常の組織学的分析により評価する。

30

40

【0230】

本発明のオリゴマー化合物で処置されたdb/dbマウスにおいて、グルコースおよびインスリンの代謝に対する標的阻害の効果を評価する。血漿グルコース（給餌時および絶食時）を処置の開始時に、および処置期間に毎週測定する。血漿インスリンを同様に測定する。グルコースおよびインスリン負荷試験もまた、給餌したマウスおよび絶食させたマウスにおいて行う。マウスは、グルコースまたはインスリンのいずれかの腹腔内注射を受け、血中グルコースおよびインスリンレベルをインスリンまたはグルコースの負荷（challenge）の前に、15、20、または30分の間隔で3時間まで測定する。グルコースレベルをYSIグルコースアナライザー(YSI Scientific, Yellow Springs, OH)を用いて測定し、インスリ

50

ンレベルをAlpco インスリン特異的ELISA キット (Windham, NH)を用いて測定する (are measure)。

【 0 2 3 1 】

グルココルチコイドレセプターのアンチセンス阻害剤であるISIS 180272(配列番号: 69)で処置したdb/dbマウスにおいて、給餌時血漿グルコースレベルは、-1日目で約300 mg/dL、5日目で約445 mg/dL、12日目で約450 mg/dL、および 26日目で約450 mg/dLであった。グルココルチコイドレセプターの別のアンチセンス阻害剤であるISIS 180280(配列番号: 77)で処置したマウスにおいて、給餌時血漿グルコースレベルは、-1日目で約300 mg/dL、5日目で約480 mg/dL、12日目で約440 mg/dL、および26日目で約480 mg/dLであった。生理食塩水だけで処置したマウスは、-1日目で約300 mg/dL、5日目で約470 mg/dL、12日目で約510 mg/dL、および26日目で約500 mg/dLの給餌時血漿グルコースレベルを有した。PTENを標的とする陽性対照オリゴヌクレオチドISIS 116847(配列番号: 304)で処置したdb/dbマウスは、-1日目で約300 mg/dL、5日目で約405 mg/dL、12日目で約300 mg/dL、および26日目で約350 mg/dLの給餌時血漿グルコースレベルを有した。陰性対照オリゴヌクレオチドISIS 141923で処置したマウスは、-1日目で約300 mg/dL、5日目で約405 mg/dL、12日目で約425 mg/dL、および26日目で約500 mg/dLの給餌時血漿グルコースレベルを有した。

【 0 2 3 2 】

絶食させたdb/dbマウスにおいて、血漿グルコースレベルを19日目(16時間の絶食後)および29日目(12時間の絶食後)に測定した。グルココルチコイドレセプターのアンチセンス阻害剤であるISIS 180272(配列番号: 69)で処置したdb/dbマウスにおいて、絶食時血漿グルコースレベルは、19日目で約200 mg/dL、および29日目で約210 mg/dLであった。グルココルチコイドレセプターの別のアンチセンス阻害剤であるISIS 180280(配列番号: 77)で処置したマウスにおいて、絶食時血漿グルコースレベルは、19日目で約260 mg/dL、および29日目で約235 mg/dLであった。対照的に、生理食塩水だけで処置したマウスは、19日目で約320 mg/dL、および29日目で約300 mg/dLの絶食時血漿グルコースレベルを有した。PTENを標的とする陽性対照オリゴヌクレオチドISIS 116847(配列番号: 304)で処置したマウスは、19日目で約320 mg/dL、および29日目で約195 mg/dLの絶食時血漿グルコースレベルを有した。陰性対照オリゴヌクレオチドISIS 141923で処置したマウスは、19日目で約300 mg/dL、および29日目で約260 mg/dLの絶食時血漿グルコースレベルを有した。したがって、絶食時血漿グルコースレベルは、グルココルチコイドレセプターのアンチセンス阻害剤での処置の後、減少し、低血糖は見られなかった。

【 0 2 3 3 】

db/dbマウスにおける血清脂質もまた、研究の終りに測定した。コレステロールレベルは、生理食塩水処置したマウスについて約170 mg/dL、ISIS 180272処置したマウスについて約125 mg/dL、ISIS 180280処置したマウスについて約120 mg/dL、ISIS 116847処置したマウスについて約150 mg/dL、およびISIS 141923処置したマウスについて約195 mg/dLであった。トリグリセリドは、生理食塩水処置したマウスについて約220 mg/dL、ISIS 180272処置したマウスについて約95 mg/dL、ISIS 180280処置したマウスについて約105 mg/dL、ISIS 116847処置したマウスについて約105 mg/dL、およびISIS 141923処置したマウスについて約245 mg/dLであった。したがって、血清脂質、特にトリグリセリドは、グルココルチコイドレセプターのアンチセンス阻害剤で処置したdb/dbマウスにおいて、減少した。

【 0 2 3 4 】

もう一つの実験を、この実施例において前記した、-1、6、13および26日目に行う給餌時血漿グルコース測定を有する実験と同様に行った。グルココルチコイドレセプターのアンチセンス阻害剤であるISIS 180272 (週に25 mg/kg x 2回皮下; 配列番号: 69)で処置したかかるdb/dbマウスにおいて、給餌時血漿グルコースレベルは、-1日目で約260 mg/dL、6日目で約290 mg/dL、13日目で約405 mg/dL、および26日目で約305 mg/dLであった。グルココルチコイドレセプターの別のアンチセンス阻害剤であるISIS 180280 (週に25 mg/kg x 2回皮下; 配列番号: 77)で処置したマウスにおいて、給餌時血漿グルコースレベルは、

-1日目で約260 mg/dL、6日目で約375 mg/dL、13日目で約345 mg/dL、および26日目で約355 mg/dLであった。生理食塩水だけで処置したマウスは、-1日目で約260 mg/dL、6日目で約465 mg/dL、13日目で約480 mg/dL、および26日目で約510 mg/dLの給餌時血漿グルコースレベルを有した。PTENを標的とする陽性対照オリゴヌクレオチドISIS 116847(配列番号: 304)で処置したdb/dbマウスは、-1日目で約250 mg/dL、6日目で約355 mg/dL、13日目で約325 mg/dL、および26日目で約225 mg/dLの給餌時血漿グルコースレベルを有した。陰性対照オリゴヌクレオチドISIS 141923で処置したマウスは、-1日目で約260 mg/dL、6日目で約430 mg/dL、13日目で約402 mg/dL、および26日目で約480 mg/dLの給餌時血漿グルコースレベルを有した。

【0235】

10

db/dbマウスにおける血清脂質もまた、研究の終りに測定した。コレステロールレベルは、生理食塩水処置したマウスについて約170 mg/dL、ISIS 180272処置したマウスについて約190 mg/dL、ISIS 180280処置したマウスについて約155 mg/dL、ISIS 116847処置したマウスについて約180 mg/dL、およびISIS 141923処置したマウスについて約185 mg/dLであった。トリグリセリドは、生理食塩水処置したマウスについて約220 mg/dL、ISIS 180272処置したマウスについて約120 mg/dL、ISIS 180280処置したマウスについて約115 mg/dL、ISIS 116847処置したマウスについて約190 mg/dL、およびISIS 141923処置したマウスについて約180 mg/dLであった。したがって、血清トリグリセリドは、グルココルチコイドレセプターのアンチセンス阻害剤で処置したdb/dbマウスにおいて減少した。

【0236】

20

db/dbマウス肝臓におけるグルココルチコイドレセプターmRNAレベルを上記のように、RiboGreen™ RNA定量試薬(Molecular Probes, Inc. Eugene, OR)を用いて、研究の終わりに測定した。グルココルチコイドレセプターmRNAレベルは、生理食塩水処置と比較したとき、ISIS 180272で処置したマウスにおいて約53%、ISIS 180280で処置したマウスにおいて約65%減少した。グルココルチコイドレセプターmRNAレベルは、陽性対照オリゴヌクレオチドISIS 116847または陰性対照オリゴヌクレオチドISIS 141923で処置したマウスにおいて減少しなかった。

【0237】

血漿コルチコステロンレベルを、視床下部下垂体軸の刺激に対する指標として、かかるマウスにおいて測定した。コルチコステロンレベル(製造業者の指示に従い、ELISA kit, ALPCO, Windham NHにより測定した)は、生理食塩水で処置したマウスにおいては180 ng/ml; PTEN阻害剤ISIS 116847で処置したマウスにおいては225 ng/ml、グルココルチコイドレセプター阻害剤ISIS 180272で処置したマウスにおいては175 ng/ml、グルココルチコイドレセプター阻害剤ISIS 180280で処置したマウスにおいては170 ng/ml、および対照オリゴヌクレオチドISIS 141923で処置したマウスにおいては220 ng/mlであった。

【実施例24】

【0238】

グルココルチコイドレセプターのアンチセンス阻害剤のやせた(ZDF +/-)ラットに対する効果

ZDF +/-ラットは、Zucker Diabetic Fattyラットのヘテロ接合同腹子であり、これはホモ接合ZDF fa/faラットの損なわれたインスリン感受性の表現型を表さないため、やせた同腹子としばしば称される。ホモ接合ZDFラットは、レプチンレセプターにおける変異を有し、損なわれたインスリン感受性を有する有用な動物モデルとなる。

【0239】

生後6週間のZDF +/- (やせた)雄ラットに、週に2回、37.5 mg/kgのアンチセンスオリゴヌクレオチドを、皮下で与え、投与した。オリゴヌクレオチドを緩衝食塩水で調製し、濾過滅菌した。合計5つの投与量を与えた。用いたグルココルチコイドアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ラットグルココルチコイドレセプターを標的とするISIS 180277 (配列番号: 74)およびISIS 180281 (配列番号: 78)であった。血漿グルコースレベルは、1週目の最初の投与の前および3週目のラットを屠殺する前の日に測定した。屠殺後、血清脂

50

質を測定し、肝臓における標的減少もまた測定した。

【0240】

ラットグルココルチコイドレセプターのアンチセンス阻害剤であるISIS 180277 (配列番号: 74)で処置したやせたZDF +/-ラットにおいて、血漿グルコースレベルは、1週目で約170 mg/dLであり、3週目で約120 mg/dLであった。グルココルチコイドレセプターの別のアンチセンス阻害剤であるISIS 180281 (配列番号: 78)で処置したやせたZDF +/-ラットにおいて、血漿グルコースレベルは、1週目で約140 mg/dLであり、3週目で約140 mg/dLであった。生理食塩水だけで処置したやせたラットは、1週目で約142 mg/dL、および3週目で約135 mg/dLの給餌時血漿グルコースレベルを有した。血漿グルコースレベルは、180277処置で減少したが、ラットは低血糖にならなかった。

10

【0241】

血清脂質もまた、研究の終りに測定した。コレステロールレベルは、生理食塩水処置したやせたラットについて約110 mg/dL、ISIS 180277処置したやせたラットについて約70 mg/dL、およびISIS 180281処置したやせたラットについて約25 mg/dLであった。トリグリセリドは、生理食塩水処置したやせたラットについて約115 mg/dLであり、ISIS 180277処置したやせたラットについて約15 mg/dL、およびISIS 180281処置したやせたラットについて約20 mg/dLに十分に減少した。

【0242】

やせたZDF +/-ラットの肝臓におけるグルココルチコイドレセプターmRNAレベルを上記の先の実施例にて教示したように、RiboGreen™ RNA定量試薬(Molecular Probes, Inc. Eugene, OR)を用いて、研究の終わりに測定した。グルココルチコイドレセプターmRNAレベルは、生理食塩水処置と比較したとき、ISIS 180277で処置したラットにおいて約59%、およびISIS 180281で処置したラットにおいて約65%減少した。

20

【実施例25】

【0243】

グルココルチコイドレセプターのアンチセンス阻害剤のZucker Diabetic Fatty (ZDF)ラットに対する効果

レプチンレセプター欠損(fa/fa)Zucker diabetic fatty (ZDF)ラットは、2型糖尿病の研究のための別の有用なモデルである。糖尿病はかかる8~10週の年齢の雄ラットにおいて自然発生的に発症し、過食症、多尿症、煩渴多飲症、および損なわれた体重増加、すなわち糖尿病の臨床症状と並行して起こる症状と関連する。Phillips MS, Liu Q, Hammond HA, Dugan V, Hey PJ, Caskey CJ, Hess JF, 1996, Nat Genet 13, 18-19。

30

【0244】

生後6週間のZDF雄ラットに、週に2回、7週間、37.5 mg/kgの用量で、オリゴヌクレオチドを皮下注射した。用いたグルココルチコイドアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ISIS 180277 (配列番号: 74)およびISIS 180281 (配列番号: 78)であった。ラット、マウス、およびヒトのPTENを標的とするISIS 116847 (GCGACAGCTGCTCCACCTTC; 配列番号: 304)を陽性対照として用い、関連のないオリゴヌクレオチドであるISIS 141923 (CCTTCCCTGAAGG TTCCTCC; 配列番号: 305)を陰性オリゴヌクレオチド対照として用いた。生理食塩水を注射した動物もまた対照とする。オリゴヌクレオチドを緩衝食塩水で調製し、濾過滅菌した。

40

【0245】

グルココルチコイドレセプターのアンチセンス阻害剤であるISIS 180277 (配列番号: 74)で処置したZDFラットにおいて、給餌時血漿グルコースレベルは、-1日目で約210 mg/dL、6日目で約280 mg/dL、13日目で約390 mg/dL、26日目で約395 mg/dL、および40日目で約420 mg/dLであった。グルココルチコイドレセプターの別のアンチセンス阻害剤であるISIS 180281 (配列番号: 78)で処置したラットにおいて、給餌時血漿グルコースレベルは、-1日目で約210 mg/dL、6日目で約290 mg/dL、13日目で約395 mg/dL、26日目で約410 mg/dL、および40日目で約435 mg/dLであった。対照的に、生理食塩水だけで処置したラットは、-1日目で約210 mg/dL、6日目で約260 mg/dL、13日目で約405 mg/dL、26日目で約410 mg

50

/dL、および40日目で約445 mg/dLの給餌時血漿グルコースレベルを有した。PTENを標的とする陽性対照オリゴヌクレオチドISIS 116847(配列番号: 304)で処置したラットは、-1日目で約210 mg/dL、6日目で約190 mg/dL、13日目で約150 mg/dL、26日目で約110 mg/dL、および40日目で約130 mg/dLの給餌時血漿グルコースレベルを有した。

【0246】

絶食させたZDFラットにおいて、血漿グルコースレベルを21日目(16時間の絶食後)および33日目(12時間の絶食後)に測定した。グルコシルコイドレセプターのアンチセンス阻害剤であるISIS 180277(配列番号: 74)で処置したラットにおいて、絶食時血漿グルコースレベルは、21日目で約145 mg/dL、および33日目で約130 mg/dLであった。グルコシルコイドレセプターの別のアンチセンス阻害剤であるISIS 180281(配列番号: 78)で処置したマウスにおいて、絶食時血漿グルコースレベルは、19日目で約170 mg/dL、および29日目で約140 mg/dLであった。対照的に、生理食塩水だけで処置したラットは、19日目で約270 mg/dL、および29日目で約255 mg/dLの絶食時血漿グルコースレベルを有した。PTENを標的とする陽性対照オリゴヌクレオチドISIS 116847(配列番号: 304)で処置したラットは、19日目で約115 mg/dL、および29日目で約120 mg/dLの絶食時血漿グルコースレベルを有した。したがって、絶食時血漿グルコースレベルは、グルコシルコイドレセプターのアンチセンス阻害剤での処置の後、減少した。低血糖は観察されなかった。

【0247】

ZDF fa/faラットにおける血清脂質もまた、研究の終りに測定した。コレステロールレベルは、生理食塩水処置したラットについて約190 mg/dL、ISIS 180277処置したラットについて約130 mg/dL、ISIS 180281処置したラットについて約70 mg/dL、およびISIS 116847処置したラットについて約140 mg/dLであった。トリグリセリドは、生理食塩水処置したラットについて約520 mg/dL、ISIS 180277処置したラットについて約360 mg/dL、ISIS 180281処置したラットについて約125 mg/dL、およびISIS 116847処置したラットについて約910 mg/dLであった。したがって、グルコシルコイドレセプターの双方のアンチセンス阻害剤が脂質を低下させる効果を有した。

【0248】

アンチセンス処置の後、ZDFラットにおける血清遊離脂肪酸もまた測定した。遊離脂肪酸は、生理食塩水処置したラットについて約0.68 mEq/l、ISIS 180277処置したラットについて約0.48 mEq/l、およびISIS 180281処置したラットについて約0.31 mEq/lであった。

【0249】

グルコシルコイドレセプターアンチセンスオリゴヌクレオチドによる精巣上体の脂肪パッド重量の減少もまた、ZDFラットにおいて観測した(生理食塩水 3.8 ± 0.07 グラムに対してアンチセンス 2.6 ± 0.06 グラム $p < 0.05$)。グルコシルコイドレセプターアンチセンス阻害の効果は、かかる動物において食物摂取量または体重におけるいかなる変化も伴わなかった。グルコシルコイドレセプターアンチセンスオリゴヌクレオチドの脂質を低下させる効果の根底にある機構を理解するために、かかるモデルにおいて、いくつかの脂質生成遺伝子の発現を研究した。グルコシルコイドレセプターアンチセンス処置は、コレステロールの生合成における律速酵素である3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル補酵素A(HMG-CoA) レダクターゼの発現の減少を引き起こし、かくしてグルコシルコイドレセプターアンチセンス化合物のコレステロールレベルに対する効果を一部説明した。スクワレンシンターゼ、ステロール調節因子結合タンパク質-1c(SREBP-1c)、HMGCoAシンターゼを含むいくつかの他の脂質生成遺伝子の発現は変わっていなかった。

【0250】

肝臓酵素(AST/ALT)もまた、かかるラットにおいて肝臓毒性の指標として測定した。肝臓酵素は、アンチセンス処置により増加せず、生理食塩水処置した動物と比較して実際に減少した。

【0251】

ZDF fa/faラットの肝臓および白色脂肪組織におけるグルコシルコイドレセプターmRN

Aレベルを上記の先の実施例にて教示したように、RiboGreenTM RNA定量試薬 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) を用いて、研究の終わりに測定した。グルココルチコイドレセプター-mRNAレベルは、生理食塩水処置と比較したとき、ISIS 180277で処置したラットの肝臓において約60%、およびISIS 180281で処置したラットにおいて約63%減少した。グルココルチコイドレセプター-mRNAレベルはまた、ISIS 180281で処置したラットの脂肪組織において約60%減少した。

【実施例 26】

【0252】

グルココルチコイドレセプターのアンチセンス阻害剤のHigh Fat Diet/Streptozotocin (HFD/STZ) ラットモデルにおける効果

10

HFD/STZラットモデル (Reedら, 2000, Metabolism, 49, 1390-1394に基づく) は、食餌的要素に関して高脂肪の食餌により誘発される、ヒト2型糖尿病 (DIOすなわち食餌誘発性肥満としても公知) およびストレプトゾトシンにより誘発される高血糖をよく模倣する。ob/obおよびdb/dbモデルとは異なり、該糖尿病表現型は、レプチン遺伝子またはレプチンレセプター遺伝子のいずれかの変異によってもたらされていない。

【0253】

生後7週間の雄のSprague Dawleyラット (160~180グラムの体重) に、2週間、40%の脂肪、41%の炭水化物、および18%のタンパク質からなる高脂肪の食餌(Harlan Teklad Adjusted Fat Diet 96132, Harlan Teklad, Madison WI)を与えた。この給餌スケジュールの間、動物を、尾の採血により得た血漿試料のグルコース、インスリン、トリグリセリド、および遊離脂肪酸についてモニターした。標準食餌の処置と比較した場合、HFD処置は、インスリン、トリグリセリド、および遊離脂肪酸の有意な上昇をもたらしたが、血漿グルコースの増大をもたらさず、動物がインスリン抵抗性表現型を獲得したことを示し、これをさらに経口的ブドウ糖負荷試験によって確証した。高血糖を誘発するために、ラットに、50 mg/kgの新たに調製したSTZを腹腔内注射した。かかる用量で、STZは、膵臓においてインスリン産生β細胞の穏やかな破壊を引き起こし、結果として3日後に測定した高血糖を生じた。350~450 mg/dLの範囲にわたる血漿グルコース値を有する動物を選択し、アンチセンス薬剤の治療効果を試験した。最初の研究において、PTENおよびグルココルチコイドレセプターのアンチセンスオリゴヌクレオチド阻害剤にかかるモデルで試験した。かかる化合物は、4週間、週に2回、25 mg/kgの用量で、皮下経路にて投与した。オリゴヌクレオチドは、緩衝食塩水で調製し、濾過滅菌した。血漿グルコースおよびトリグリセリドは毎週測定した。

20

30

【0254】

グルココルチコイドレセプターのアンチセンス阻害剤であるISIS 180281 (配列番号: 78)で処置したHFD/STZラットにおいて、給餌時血漿グルコースレベルは、1週目で450 mg/dL、2週目で487 mg/dL、および4週目で446 mg/dLであった。生理食塩水だけで処置したラットは、1週目で約432 mg/dL、2週目で約470 mg/dL、および4週目で約487 mg/dLの給餌時血漿グルコースレベルを有した。PTENを標的とする陽性対照オリゴヌクレオチドISIS 116847(配列番号: 304)で処置したラットは、1週目で446 mg/dL、2週目で552 mg/dL、および4週目で398 mg/dLの給餌時血漿グルコースレベルを有した。陰性対照オリゴヌクレオチドISIS 141923で処置したラットは、1週目で約443 mg/dL、2週目で約525 mg/dL、および4週目で約398 mg/dLの給餌時血漿グルコースレベルを有した。

40

【0255】

絶食させたHFD/STZラットにおいて、血漿グルコースレベルは、グルココルチコイドレセプターのアンチセンス阻害剤であるISIS 180281 (配列番号: 78)で処置したラットにおいて100 mg/dL、生理食塩水だけで処置したラットにおいて320 mg/dL、PTENを標的とする陽性対照オリゴヌクレオチドISIS 116847(配列番号: 304)で処置したラットにおいて155 mg/dL、および陰性対照オリゴヌクレオチドISIS 141923で処置したラットにおいて225 mg/dLであった。したがって、絶食時血漿グルコースレベルは、グルココルチコイドレセプターのアンチセンス阻害剤での処置の後減少した。

50

【0256】

HFD/STZラットにおける血清脂質もまた、研究の終りに測定した。コレステロールレベルは、生理食塩水処置したラットについて約100 mg/dL、ISIS 180281処置したラットについて約50 mg/dL、ISIS 116847処置したラットについて約75 mg/dL、およびISIS 141923処置したラットについて約95 mg/dLであった。トリグリセリドは、生理食塩水処置したラットについて約230 mg/dL、ISIS 180281処置したラットについて約30 mg/dL、ISIS 116847処置したラットについて約125 mg/dL、およびISIS 141923処置したラットについて約175 mg/dLであった。したがって、グルコシルコイドレセプターのアンチセンス阻害剤は、脂質を低下させる効果を有した。グルコシルコイドレセプターアンチセンスはまた、HFD-STZラットにおいて血漿遊離脂肪酸を有意に減少させた（生理食塩水 0.93 ± 0.12 mEQ/Lに対してアンチセンス 0.52 ± 0.04 mEQ/L, $p < 0.05$ ）。 10

【0257】

かかるSTZ-HFDラットにおいて、血漿コルチコステロンレベルを測定したところ、生理食塩水処置と比較して、グルコシルコイドレセプターのアンチセンス阻害剤での処置により変化しなかった。

【0258】

グルコシルコイドレセプターアンチセンスオリゴヌクレオチドによる精巣上体の脂肪パッド重量の減少もまた、HFD-STZラットにおいて観測した（生理食塩水 2.41 ± 0.23 グラムに対してアンチセンス 1.8 ± 0.63 グラム）。グルコシルコイドレセプターアンチセンス阻害の効果は、かかる動物において食物摂取量または体重におけるいかなる変化も伴わなかった。グルコシルコイドレセプターアンチセンスオリゴヌクレオチドの脂質を低下させる効果の根底にある機構を理解するために、我々はかかるモデルにおいて、いくつかの脂質生成遺伝子の発現を研究した。グルコシルコイドレセプターアンチセンス処置は、コレステロールの生合成における律速酵素である3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル補酵素A (HMG-CoA) レダクターゼの発現の減少を引き起こし、かくしてグルコシルコイドレセプターアンチセンス化合物のコレステロールレベルに対する効果を一部説明した。スクワレンシンターゼ、ステロール調節因子結合タンパク質-1c (SREBP-1c)、HMGCoAシンターゼを含むいくつかの他の脂質生成遺伝子の発現は変わっていなかった。 20

【0259】

処置の後、肝臓におけるグルコシルコイドレセプターレベルもまた測定した。生理食塩水対照と比較した場合、グルコシルコイドmRNAレベルは、ISIS 180281（配列番号：78）により50%減少し、ISIS 141923により全く減少しなかった。PTENアンチセンスオリゴヌクレオチドISIS 116847は、グルコシルコイドレセプターmRNAレベルにおいて、阻害をもたらさず、実際にわずかな増加を引き起こした（生理食塩水対照の121%）。 30

【0260】

したがって、グルコシルコイドレセプターに対するアンチセンスによる処置は、肝臓におけるグルコシルコイドレセプターの発現の50%の減少、絶食時グルコースにおける約50%の減少、および血漿グルコースにおける約68%の減少をもたらした。かかる結果は、Zucker Diabetic Fatty (ZDF)ラットモデルにおいて得られたデータと一致する。

【実施例27】 40

【0261】

グルコシルコイドレセプターのアンチセンス阻害が肝臓および全身のグルコシルコイドに対する応答に及ぼす効果

全身的阻害効果を有するグルコシルコイドレセプターアンタゴニストは、視床下部下垂体軸の刺激などの望ましくない副作用をもたらし得る。アンチセンス阻害剤の重要な利点は、アンチセンスオリゴヌクレオチドによるグルコシルコイドレセプターの発現の減少は、大部分が、グルコシルコイドレセプターの阻害についての望ましい標的組織である肝臓および脂肪組織において観察されるが、少数が全身で観察されることである。したがって、この標的の他の種類の阻害剤と比較して、オリゴヌクレオチド阻害剤により望ましくない全身的副作用（主として視床下部下垂体軸の刺激）の可能性が減少することが考 50

えられる。

【0262】

グルココルチコイドレセプターの発現が、下垂体において調節されることなく、肝臓において調節され得ることを確認するために、ZDFラットをグルココルチコイドレセプターのアンチセンス阻害剤 (ISIS 180281) で、5週間、週に2回、皮下投与する37.5 mg/kgにて処置した。RNAを下垂体から単離し、グルココルチコイドレセプターレベルを先の実施例に記載されたように、RibogreenTM分析により測定した。グルココルチコイドレセプターに対するアンチセンスで処置したラットにおいて、下垂体におけるグルココルチコイドレセプターのレベルは、生理食塩水処置したラットにおけるレベルと同じであった。したがって、この標的のアンチセンス阻害は、この標的に対する阻害の望ましくない部位 (例えば下垂体) における阻害なしに、所望の効果をもたらすであろう特定の器官 (例えば肝臓) において達成され得ることが示され得る。下垂体のプロオピオメラノコルチン (POMC-1) RNA発現はまた、RT-PCRにより測定され、グルココルチコイドレセプター発現のアンチセンス阻害剤により有意に影響されなかった。

10

【0263】

コルチコステロンレベルもまた、視床下部下垂体軸の刺激に対する指標として測定した。コルチコステロンレベルにおける有意な変化は見られなかった (グルココルチコイドレセプターに対するアンチセンスで処置したZDFラットについての35 ng/mlに対し、生理食塩水処置したラットについての45 ng/ml、および対照オリゴヌクレオチド処置したラットについての30 ng/ml)。コルチコステロンレベルは、同様に、グルココルチコイドレセプターのアンチセンス阻害剤で処置したマウスにおいて変化しないことがわかった。

20

【0264】

この仮説をさらに検証するために、普通の雄のSprague Dawleyラットをグルココルチコイドレセプターのアンチセンス阻害剤 (ISIS 180281; 配列番号: 78) または対照オリゴヌクレオチド (ISIS 141923; 配列番号: 305) で、週に2回、4週間、50 mg/kgの用量で処置した。その後、該動物を一晩絶食させ、生理食塩水またはデキサメタゾンを注射した (4 mg/kg 腹腔内)。注射の4時間後、動物を屠殺し、肝臓組織を収集し、チロシンアミノトランスフェラーゼ/TAT mRNAの発現 (肝臓ステロイド活性の指標として用いたステロイド反応性遺伝子) における変化をRT-PCRにより調べた。加えて、全身的なグルココルチコイドの効果の指標である循環リンパ球の測定のために血液の試料を採った。予期したようにデキサメタゾンは、TAT発現における有意な増大、および循環リンパ球における減少 (すなわちリンパ球減少) をもたらした。グルココルチコイドレセプターのアンチセンス阻害剤での処置は、肝臓のグルココルチコイドレセプターの発現において約75%の減少をもたらした。これはデキサメタゾンに誘発されるTAT発現における増大を予防することを伴った。しかし、デキサメタゾンに誘発される循環リンパ球における減少に対する効果は観察されなかった (すなわちリンパ球減少なし)。

30

【0265】

かかる結果は、先の実施例におけるコルチコステロンレベルに対する効果の欠如とともに、グルココルチコイドレセプターの発現のアンチセンス阻害は、全身的なグルココルチコイドの効果を変えることなく、肝臓におけるグルココルチコイドの効果の機能的な拮抗作用をもたらすことを示す。

40

【0266】

血漿副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) のレベルもまた、デキサメタゾンの負荷 (challenge) の後に調べた。ACTHレベルは、製造業者の指示に従い、ELISA kit (ALPCO, Windham NH) を用いて測定した。グルココルチコイドアンチセンスオリゴヌクレオチド (ISIS 180281) は基礎的ACTHレベルに影響を及ぼさなかった (生理食塩水9.79 pg/mlに対してASO 9.96 pg/ml)。ISIS 180281はまた、肝臓におけるデキサメタゾンに誘発されるPEPCKの発現を減少させた。デキサメタゾンの負荷後の肝臓グリコーゲンもまた、ISIS 180281でのアンチセンス処置により変化した。ISIS 180281で処置したマウスにおいて、肝臓グリコーゲンレベルは、デキサメタゾンの代わりに生理食塩水を与えた動物における約1 mg/gに対し、

50

デキサメタゾン負荷を与えた動物において約1.5 mg/gであった。対照オリゴヌクレオチド ISIS 141923で処置したマウスにおいて、肝臓グリコーゲンレベルは、デキサメタゾンの代わりに生理食塩水を与えた動物における約4 mg/gに対し、デキサメタゾン負荷を与えた動物において約13.5 mg/gであった。生理食塩水で処置したマウスにおいて（オリゴヌクレオチドなし）、肝臓グリコーゲンレベルは、デキサメタゾンの代わりに生理食塩水を与えた動物における約3 mg/gに対し、デキサメタゾン負荷を与えた動物において約9 mg/gであった。

【実施例 28】

【0267】

グルココルチコイドレセプターのアンチセンス阻害剤のラットにおける食餌誘発性肥満に対する効果

10

グルココルチコイドレセプター発現のアンチセンス阻害剤は、肥満または体重増加を減少させることが期待される。これを、DIO（食餌誘発性肥満）モデルとしても公知の高脂肪食餌（HFD）モデルにおいて検証した。

【0268】

生後7週間の雄のSprague Dawleyラット（160～180グラムの体重）に40%の脂肪、41%の炭水化物、および18%のタンパク質からなる高脂肪食餌（Harlan Teklad Adjusted Fat Diet 96132）を2週間与えた。この給餌スケジュールの間、一定の間隔で動物の体重を量る。

【0269】

グルココルチコイドレセプターのアンチセンス阻害剤で処置したマウスは、生理食塩水で処置した動物よりも、高脂肪食餌による体重増加が少なかった。したがって、アンチセンスで処置したマウスは、より肥満になりにくい。

20

【実施例 29】

【0270】

グルココルチコイドレセプターのアンチセンス阻害は、肝臓のグルコース産生および糖新生を減少させる

エキソピボ肝臓グルコース産生量を、グルココルチコイドレセプターアンチセンスオリゴヌクレオチド（ISIS 180281）で処置したSprague Dawleyラットの肝臓切片において測定した。対照ラットおよびアンチセンスで処置したラットを24時間絶食させ、12.5 mg/kgの用量でビヒクルまたはデキサメタゾン（Bausch & Lomb, Tampa, FL）のいずれかを投与した。処置の6時間後、Krumdieck Tissue Slicer（Alabama Research and Development, Munford, AL）を用いて、精密切断した肝臓切片を調製し、0.1% BSA、10 mM乳酸塩、1 mMピルビン酸ナトリウム、10 mMアラニン、および10 mMグリセロール（NGS培養液）を補給したグルコースなしのDMEM（Invitrogen, Carlsbad, CA）中でインキュベートした。1時間の前保温の後、個々の切片を0.5 mlのNGS培養液を含む24ウェルプレートの個々のウェルに移し、1.5時間後に培養液に放出されたグルコースをHitachi 912 臨床化学分析装置（clinical chemistry analyzer）により測定した。肝臓切片を秤量し、肝臓組織の1ミリグラム当たりのグルコース産生量を測定した。

30

【0271】

グルココルチコイドレセプター（ISIS 180281）に対するアンチセンスで処置したラットは、基礎グルコース産生量において有意な減少を示した（対照アンチセンス化合物 0.86 ± 0.16 グルコース(g)/時/肝臓切片(mg)に対して 0.35 ± 0.01 グルコース(g)/時/肝臓切片(mg)、 $p < 0.05$ ）。アンチセンス化合物のグルココルチコイドに媒介されるグルコース産生に対する効果を直接評価するために、死体解剖の6時間前にデキサメタゾンを注射した、アンチセンスで処置したラットにおいてアッセイを行った。グルココルチコイドレセプターアンチセンス化合物は、デキサメタゾンに誘発されるグルコースの産生を劇的に阻害した（対照アンチセンス + デキサメタゾン 5.61 ± 0.68 グルコース(g)/時/肝臓切片(mg)に対してグルココルチコイドレセプターアンチセンス + デキサメタゾン 0.61 ± 0.04 グルコース(g)/時/肝臓切片(mg)、 $p < 0.05$ ）。

40

【実施例 30】

50

【 0 2 7 2 】

さらなる異種間のグルココルチコイドレセプターアンチセンスオリゴヌクレオチド

さらなる候補のマウスグルココルチコイドレセプターのアンチセンス阻害剤を、種々の種におけるインビボのグルココルチコイドレセプター-mRNAの発現を減少させる能力について、先にスクリーニングしたオリゴヌクレオチドと比較して評価した。これを表7に示す。示されているのは、オリゴヌクレオチド配列、および配列番号：4（ヒトグルココルチコイドレセプター-mRNA、GenBank受託番号NM_000176.1）における位置（5'末端核酸塩基の位置）である。さらに、示されているのは、ヒト、カニクイザル、ラットおよびマウスのグルココルチコイドレセプター-mRNAに対する相補性である（「yes」は完全な相補性を意味し、「1 mm」は完全な相補性からの1つのミスマッチを意味する）。

10

【 0 2 7 3 】

示されるすべての化合物は、5ヌクレオチドの「ウイング」が両側（5'方向および3'方向）に隣接する、10個の2'-デオキシヌクレオチドからなる中央の「ギャップ」領域からなる、20ヌクレオチド長のキメラオリゴヌクレオチド（「ギャップマー」）である。ウイングは2'-メトキシメチル（2'-MOE）ヌクレオチドからなる。ヌクレオチド間（主鎖）結合は、オリゴヌクレオチド全体にわたってホスホロチオエート（P=S）である。すべてのシトシン残基は5-メチルシトシンである。

【 0 2 7 4 】

【表 7】

表 7

グルココルチコイドレセプター異種間オリゴヌクレオチド

20

ISIS #	配列番号	配列	配列番号：4 における位置	に対して完全な相補体：			
				ヒト	サル	ラット	マウス
361137	306	cgacctattgaggtttgcaa	509	yes	yes	yes	yes
180276	73	ctttggtctgtgtatacaa	679	yes	1 mm	1 mm	yes
345198	307	gtcaaaggtgcttggtctg	689	yes	yes	yes	yes
180304	100	agcatgtgtttacattggtc	2053	yes	yes	yes	yes
180275	72	ctgtgtatacaatttcaca	672	yes	1 mm	1 mm	yes

361141	308	gcagacattttattaccaat	1066	yes	yes	yes	1 mm
180281	78	gccagtttctcttgcttaa	1007	yes	yes	yes	yes
361151	309	gtacatctgtcctccagagg	1109	yes	yes	yes	yes
180274	71	ctggtcgacctattgaggtt	514	yes	yes	yes	yes
361156	310	gctgtattcatgtcatagtg	1129	yes	yes	yes	yes

30

【 0 2 7 5 】

かかる化合物を、グルココルチコイドレセプター発現の阻害について、カニクイザル、およびラットの初代肝細胞ならびにヒト細胞において、一連の用量で試験した。実験は2回行った。IC50を計算し、表8に示す。

【 0 2 7 6 】

【表 8】

表 8

グルココルチコイドレセプター異種間オリゴヌクレオチド IC50 (nM)

ISIS #	配列番号	ラット 実験 1 IC50	ラット 実験 2 IC50	サル 実験 1 IC50	サル 実験 2 IC50	ヒト 実験 1 IC50	ヒト 実験 2 IC50
361137	306	19	26	12	11	5	9
180276	73	29	38	27	24	5	6
345198	307	22	25	35	31	6	11
180304	100	32	39	29	28	7	6
180275	72	32	41	35	41	9	12
361141	308	21	26	15	12	11	15
180281	78	21	28	24	22	11	14
361151	309	37	51	135	128	12	11
180274	71	24	34	105	115	22	24
361156	310	22	25	169	158	36	31

10

【 0 2 7 7 】

かかる化合物の5つ (ISIS 180281、ISIS 180304、ISIS 345198、ISIS 361137、および ISIS 361141) を、肝臓におけるグルココルチコイドレセプターRNAレベルを減少させるその能力について、やせた (非糖尿病) ラットにおいて、種々の用量でさらに試験した。結果を表9aおよび表9b (別々の実験) に示す。肝臓酵素 (AST/ALT) レベルもまた、オリゴヌクレオチドの肝毒性の尺度として、かかるラットにおいて測定した。ISIS 180281の50 mg/kgの用量を例外として、かかる化合物のどれもが、試験した任意の用量で、ASTまたはALTレベルにおける有意な増加を引き起こさなかった。50 mg/kgの用量のISIS 180281を与えたラットは、対照処置したラットのレベルのほぼ2倍のASTおよびALTの両レベルを有した。

20

【 0 2 7 8 】

【表 9】

表 9a やせたラットのグルココルチコイドレセプター
を遮る (screen- glucocorticoid receptor) アンチセンスオリゴヌクレオチド

化合物	示される容量でのアンチセンス処置後のラット肝臓における グルココルチコイドレセプター mRNA の減少% (生理食塩水に対して)		
	50 mg/kg	25 mg/kg	12.5 mg/kg
ISIS 180281	68	65	48
ISIS 180304	52	34	0
ISIS 345198	63	58	52

30

表 9b やせたラットグルココルチコイドレセプター
を遮る (screen- glucocorticoid receptor) アンチセンスオリゴヌクレオチド

化合物	示される容量でのアンチセンス処置後のラット肝臓における グルココルチコイドレセプター mRNA の減少% (生理食塩水に対して)		
	50 mg/kg	25 mg/kg	12.5 mg/kg
ISIS 180281	62	62	59
ISIS 361137	59	47	32
ISIS 361141	61	49	22

40

【 0 2 7 9 】

ISIS 345198 (GTCAAAGGTGCTTTGGTCTG; 配列番号: 307) を糖尿病のマウスモデルにおけるさらなる評価のために選択した。この化合物は、完全にマウス、ラット、ヒト、サル、ウサギ、およびモルモットのグルココルチコイドレセプターRNAに対して相補的である。

【実施例 3 1】

【 0 2 8 0 】

50

グルココルチコイドレセプターアンチセンス処置がインビボのグルココルチコイドレセプター発現を減少させることを示すさらなる研究

主要な (lead) マウスグルココルチコイドレセプターアンチセンスオリゴヌクレオチドの2型糖尿病のマウスモデルにおけるグルココルチコイドレセプターmRNAレベルに対する効果を調べた。グルココルチコイドレセプターアンチセンスオリゴヌクレオチド (ISIS 345198) のob/obマウスへの全身投与の4週間後、肝臓グルココルチコイドレセプターmRNA発現の用量に依存した減少が観察された。オリゴヌクレオチドは、6.25 mg/kg、12.5 mg/kg、または25 mg/kgの用量で、週に2回、4週間、皮下投与した。グルココルチコイドレセプターmRNAレベルは、かかる用量で、それぞれ54%、67%および72%減少し、グルココルチコイドレセプター発現の用量に依存した阻害を示した。対照オリゴヌクレオチドは、グルココルチコイドレセプター発現に対する効果を有さなかった。

10

【実施例 3 2】

【0 2 8 1】

ISIS 345198でのグルココルチコイドレセプターアンチセンス処置はob/obマウスにおける血漿グルコースレベルを低下させる

グルココルチコイドレセプターmRNAのレベルを減少させるに加え、グルココルチコイドレセプターアンチセンスオリゴヌクレオチド処置は、糖尿病モデルにおいて、血漿グルコースレベルおよび循環脂質レベルを減少させた。生理食塩水および対照アンチセンス化合物処置したob/obマウスにおいて、研究期間の全体にわたって、高血糖は悪化し続けたが、ISIS 345198処置した動物は、血漿グルコースレベルにおいて、有意な用量に依存する減少を示した。処置の4週間後、血漿グルコースレベルは、それぞれ、25 mg/kg、12.5 mg/kg、および6.25 mg/kgで、ISIS 345198で処置したマウスについて、約225 mg/dL、約250 mg/dL、および約300 mg/dLであった。生理食塩水処置の4週間後、マウスは約600 mg/dLの血漿グルコースレベルを有し、対照オリゴヌクレオチドで処置したマウスは、約490 mg/dLの血漿グルコースレベルを有した。

20

【0 2 8 2】

糖新生の制御におけるグルココルチコイドレセプターの役割により、グルココルチコイドレセプターアンチセンス化合物の絶食時グルコースレベルに対する効果を調べた。ob/obマウス (生理食塩水 321 ± 16.2 mg/dLに対してISIS 345198処置 220 ± 8.3 mg/dL、 $p < 0.05$) およびdb/dbマウス (生理食塩水 320 ± 26.9 mg/dLに対してISIS 180272処置 204 ± 24.6 mg/dL、 $p < 0.05$) において絶食時グルコースレベルの有意な減少を観察した。両方のモデルにおいて、対照アンチセンス化合物は、絶食時グルコースレベルに対する有意な効果を示さなかった。グルココルチコイドレセプターアンチセンス阻害の効果は、食物摂取、体重、またはDesaiら, 2001, Diabetes, 50, 2287-2295 (手短に言えば、肝臓試料を0.03 N HCl中でホモジナイズして0.5 g/mlの最終濃度にした。ホモジェネート (100 μ l) を400 μ lの1.25 N HClと混合し、1時間、100 で加熱した。試料を14,000 rpmで遠心分離し、100 μ lの上清を1 mlのグルコースオキシダーゼ試薬(Sigma)と混合した。37 での10分間のインキュベーションの後、吸光度を505 nmで読んだ)に記載されるように測定した肝臓グリコーゲンレベルにおける変化を伴わなかった。

30

【実施例 3 3】

【0 2 8 3】

グルココルチコイドレセプターアンチセンスオリゴヌクレオチドの、ISIS 345198で処置したob/obマウスにおける身体組成、血漿レジスチン、アディポネクチン、TNF α 、インスリン、およびIL-6レベルに対する効果

体重における変化は観察されなかったが、身体成分の濃度分析を行い、身体脂肪質量における変化を精密に測定した。身体成分分析は、グルココルチコイドレセプターアンチセンスオリゴヌクレオチド (ISIS 345198) 25 mg/kgで、週に2回、4週間処置したob/obマウスにおいて、Lunar X線濃度計 (GE Medical Systems, Madison, WI53717) を用いて行った。グルココルチコイドレセプターアンチセンス化合物は、4週間の処置期間の後、身体の脂質質量を有意に減少させた (生理食塩水 50.7 ± 0.4 に対してグルココルチコイドレセ

40

50

ブターアンチセンス 45.7 ± 0.5 、 $p < 0.05$ ）。この減少はまた、精巢上体脂肪パッド重量における減少として反映された（生理食塩水 5.09 ± 0.10 グラムに対してグルココルチコイドレセプターアンチセンス 4.3 ± 0.12 グラム、 $p < 0.05$ ）。血漿アディポネクチン、レジスチン、TNF α およびインスリンのレベルをLinco Researchのキット（St. Charles, MOおよびALPCO, Windham, NH）を用いてELISAにより測定した；血漿インターロイキン-6（IL-6）レベルをELISA（R&D Systems, Minneapolis, MN）により測定した。

【0284】

肥満の減少は、血漿レジスチンレベルにおける20%の減少を伴ったが（生理食塩水 22 ± 1.4 ng/mlに対してグルココルチコイドレセプターアンチセンス 18 ± 0.94 ng/ml）、アディポネクチンレベルは変化していなかった（生理食塩水 8.73 ± 0.14 μ g/mlに対して 8.72 ± 0.35 μ g/ml）。グルココルチコイドレセプターアンチセンス処置したマウスにおいて、TNF α レベルの低下（生理食塩水 42 ± 2.29 pg/mlに対してグルココルチコイドレセプターアンチセンス 27 ± 0.86 pg/ml、 $p < 0.05$ ）、およびインスリンレベルの低下（生理食塩水 43 ± 5.95 ng/mlに対してグルココルチコイドレセプターアンチセンス 16 ± 1.43 ng/ml、 $p < 0.05$ ）に対するより強い効果を観察した。グルココルチコイドレセプターアンチセンス化合物処置は、循環IL-6レベルにおいて、いかなる有意な変化ももたらさなかった（生理食塩水 6.27 ± 0.74 pg/mlに対してグルココルチコイドレセプターアンチセンス処置 5.37 ± 1.22 pg/ml）。

【0285】

別の研究において、やせた正常血糖のマウスは、グルココルチコイドレセプターアンチセンス化合物（ISIS 345198）を50 mg/kg/週で、6週間受けた。グルココルチコイドレセプターの阻害は、低血糖を引き起こすことなく（24時間絶食時のレベル、生理食塩水 147 ± 8 mg/dLに対してグルココルチコイドレセプターアンチセンス 112 ± 5 mg/dL）、肝臓（生理食塩水 100 ± 5.98 に対してグルココルチコイドレセプターアンチセンス処置 24.4 ± 2 、 $p < 0.05$ ）および白色脂肪組織（生理食塩水 100 ± 4 に対してグルココルチコイドレセプターアンチセンス 31 ± 6 、 $p < 0.05$ ）におけるグルココルチコイドレセプターmRNA発現の有意な減少をもたらした。

【0286】

本発明の態様として、以下のものが挙げられる。

[1] グルココルチコイドレセプターをコードする核酸分子を標的とする8~80核酸塩基長のアンチセンス化合物であり、前記化合物がグルココルチコイドレセプターをコードする前記核酸分子に相補的であり、前記化合物がグルココルチコイドレセプターmRNAの発現を阻害する、アンチセンス化合物。

[2] 13~50核酸塩基長である、[1]記載のアンチセンス化合物。

[3] 15~30核酸塩基長である、[1]記載のアンチセンス化合物。

[4] オリゴヌクレオチドを含む、[1]記載のアンチセンス化合物。

[5] DNAオリゴヌクレオチドを含む、[1]記載のアンチセンス化合物。

[6] RNAオリゴヌクレオチドを含む、[1]記載のアンチセンス化合物。

[7] 二本鎖RNAオリゴヌクレオチドを含む、[1]記載のアンチセンス化合物。

[8] キメラオリゴヌクレオチドを含む、[1]記載のアンチセンス化合物。

[9] 前記化合物の少なくとも一部がオリゴヌクレオチド-RNA二重鎖を形成するRNAとハイブリダイズする、[1]記載のアンチセンス化合物。

[10] グルココルチコイドレセプターをコードする前記核酸分子と少なくとも90%の相補性を有する、[1]記載のアンチセンス化合物。

[11] グルココルチコイドレセプターをコードする前記核酸分子と少なくとも95%の相補性を有する、[1]記載のアンチセンス化合物。

[12] グルココルチコイドレセプターをコードする前記核酸分子と少なくとも99%の相補性を有する、[1]記載のアンチセンス化合物。

[13] 少なくとも一つの修飾されたヌクレオシド間結合、糖部分または核酸塩基を有する、[1]記載のアンチセンス化合物。

[1 4] 少なくとも1つの2'-O-メトキシエチル糖部分を有する、[1] 記載のアンチセンス化合物。

[1 5] 少なくとも1つのホスホロチオエートヌクレオシド間結合を有する、[1] 記載のアンチセンス化合物。

[1 6] 少なくとも1つのシトシンが、5-メチルシトシンである、[1] 記載のアンチセンス化合物。

[1 7] 少なくとも一つのロックド核酸(LNA)糖部分、ENAまたはPNAを有する、[1] 記載のアンチセンス化合物。

[1 8] 前記アンチセンス化合物が配列番号 3 2、3 3、3 4、3 6、3 7、3 9、4 0

、4 3、4 4、4 6、4 8、5 0、5 1、5 2、5 3、5 4、5 5、5 7、5 8、5 9、

6 0、6 1、6 2、6 3、6 5、6 7、6 8、6 9、7 0、7 1、7 2、7 3、7 4、7

5、7 6、7 7、7 8、7 9、8 0、8 1、8 2、8 3、8 4、8 5、8 6、8 7、8 8

、8 9、9 0、9 1、9 2、9 3、9 4、9 5、9 6、9 7、9 8、9 9、1 0 0、1 0

1、1 0 2、1 0 4、1 0 5、1 0 6、1 0 7、1 0 8、1 0 9、1 1 0、1 1 1、1 1

2、1 1 3、1 1 4、1 1 5、1 1 6、1 1 7、1 1 8、1 1 9、1 2 0、1 2 1、1 2

2、1 2 3、1 2 4、1 2 6、1 2 7、1 2 8、1 2 9、1 3 0、1 3 1、1 3 2、1 3

3、1 3 4、1 3 5、1 3 6、1 3 7、1 3 8、1 3 9、1 4 0、1 4 1、1 4 2、1 4

3、1 4 4、1 4 5、1 4 6、1 4 7、1 4 8、1 4 9、1 5 0、1 5 1、1 5 2、1 5

3、1 5 4、1 5 5、1 5 6、1 5 7、1 5 8、1 5 9、1 6 0、1 6 1、1 6 2、1 6

3、1 6 6、1 6 7、1 6 8、1 6 9、1 7 0、1 7 1、1 7 2、1 7 3、1 7 4、1 7

5、1 7 6、1 7 7、1 7 9、1 8 2、1 8 3、1 8 5、1 8 6、1 8 8、1 8 9、1 9

0、1 9 1、1 9 2、1 9 3、1 9 4、1 9 5、1 9 6、1 9 7、1 9 8、1 9 9、2 0

0、2 0 2、2 0 3、2 0 4、2 0 6、2 0 8、2 0 9、2 1 0、2 1 1、2 1 2、2 1

3、2 1 4、2 1 6、2 2 1、2 2 2、2 2 3、2 2 4、2 2 5、2 2 6、2 2 7、2 2

8、2 3 2、2 3 3、2 3 4、2 3 6、2 3 7、2 3 9、2 4 0、2 4 1、2 4 2、2 4

3、2 4 4、2 4 5、2 4 6、2 4 7、2 4 8、2 4 9、2 5 0、2 5 1、2 5 2、2 5

3、2 5 4、2 5 7、2 5 8、2 5 9、2 6 0、2 6 1、2 6 2、2 6 3、2 6 4、2 6

5、2 6 6、2 6 7、2 6 8、2 6 9、2 7 0、2 7 1、2 7 2、2 7 3、2 7 4、2 7

5、2 7 6、2 8 0、2 8 1、2 8 2、2 8 3、2 8 4、2 8 5、2 8 6、2 8 7、2 9

1、2 9 2、2 9 3、2 9 4、2 9 5、2 9 8、2 9 9、3 0 6、3 0 7、3 0 8、3 0

9 または 3 1 0 の少なくとも8核酸塩基部分を含む、[1] 記載のアンチセンス化合物。

[1 9] 前記アンチセンス化合物が配列番号 3 2、3 3、3 4、3 6、3 7、3 9、4 0

、4 3、4 4、4 6、4 8、5 0、5 1、5 2、5 3、5 4、5 5、5 7、5 8、5 9、

6 0、6 1、6 2、6 3、6 5、6 7、6 8、6 9、7 0、7 1、7 2、7 3、7 4、7

5、7 6、7 7、7 8、7 9、8 0、8 1、8 2、8 3、8 4、8 5、8 6、8 7、8 8

、8 9、9 0、9 1、9 2、9 3、9 4、9 5、9 6、9 7、9 8、9 9、1 0 0、1 0

1、1 0 2、1 0 4、1 0 5、1 0 6、1 0 7、1 0 8、1 0 9、1 1 0、1 1 1、1 1

2、1 1 3、1 1 4、1 1 5、1 1 6、1 1 7、1 1 8、1 1 9、1 2 0、1 2 1、1 2

2、1 2 3、1 2 4、1 2 6、1 2 7、1 2 8、1 2 9、1 3 0、1 3 1、1 3 2、1 3

3、1 3 4、1 3 5、1 3 6、1 3 7、1 3 8、1 3 9、1 4 0、1 4 1、1 4 2、1 4

3、1 4 4、1 4 5、1 4 6、1 4 7、1 4 8、1 4 9、1 5 0、1 5 1、1 5 2、1 5

3、1 5 4、1 5 5、1 5 6、1 5 7、1 5 8、1 5 9、1 6 0、1 6 1、1 6 2、1 6

3、1 6 6、1 6 7、1 6 8、1 6 9、1 7 0、1 7 1、1 7 2、1 7 3、1 7 4、1 7

5、1 7 6、1 7 7、1 7 9、1 8 2、1 8 3、1 8 5、1 8 6、1 8 8、1 8 9、1 9

0、1 9 1、1 9 2、1 9 3、1 9 4、1 9 5、1 9 6、1 9 7、1 9 8、1 9 9、2 0

0、2 0 2、2 0 3、2 0 4、2 0 6、2 0 8、2 0 9、2 1 0、2 1 1、2 1 2、2 1

3、2 1 4、2 1 6、2 2 1、2 2 2、2 2 3、2 2 4、2 2 5、2 2 6、2 2 7、2 2

8、2 3 2、2 3 3、2 3 4、2 3 6、2 3 7、2 3 9、2 4 0、2 4 1、2 4 2、2 4

3、2 4 4、2 4 5、2 4 6、2 4 7、2 4 8、2 4 9、2 5 0、2 5 1、2 5 2、2 5

3、2 5 4、2 5 7、2 5 8、2 5 9、2 6 0、2 6 1、2 6 2、2 6 3、2 6 4、2 6

5

10

20

30

40

50

5、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、280、281、282、283、284、285、286、287、291、292、293、294、295、298、299、306、307、308、309および310からなる群より選択される配列を有する、[1]記載のアンチセンス化合物。

[20] 配列番号36、50、60、71、72、73、78、100、306、307、308、309または310の核酸塩基配列を有する、アンチセンス化合物。

[21] 前記化合物が配列番号4の全ての5' UTRのヌクレオチド13~119、開始コドン領域のヌクレオチド114~151、コード領域のヌクレオチド351~533、667~845、877~1243、1356~1488、1552~1756、1819~1999、2008~2139、2146~2194、2201~2301、もしくは2386~2416、または3' UTRのヌクレオチド2488~2685、2723~3435、3499~3789、3826~3860、3886~3905、3918~3937、4031~4072、4082~4193もしくは4244~4758；または配列番号25の3' UTRのヌクレオチド104562~104648を標的とする、ヒトグルココルチコイドレセプターをコードする核酸分子を標的とする8~80核酸塩基長のアンチセンス化合物。 10

[22] 化合物が配列番号11の開始コドン領域のヌクレオチド2~20、コード領域のヌクレオチド301~1405、1459~2043もしくは2050~2309、3' UTRのヌクレオチド2376~2433もしくは2521~2546、全て；配列番号219の5' UTRのヌクレオチド227~297；または配列番号220の3' UTRのヌクレオチド14909~18389を標的とする、マウスグルココルチコイドレセプターをコードする核酸分子を標的とする8~80核酸塩基長のアンチセンス化合物。

[23] 化合物が配列番号18のコード領域のヌクレオチド150~2129もしくは2136~2395、または3' UTRのヌクレオチド2472~3705、4576~4867、5039~5293、5680~5877もしくは6214~6263、全て；または配列番号256のコード領域のヌクレオチド278~304を標的とする、ラットグルココルチコイドレセプターをコードする核酸分子を標的とする8~80核酸塩基長のアンチセンス化合物。 20

[24] グルココルチコイドレセプターの発現を阻害するように、細胞または組織を[1]のアンチセンス化合物と接触させることを含む、細胞または組織においてグルココルチコイドレセプターの発現を阻害する方法。

[25] グルココルチコイドレセプターに関連のある疾患または症状を有する動物を処置する方法であって、グルココルチコイドレセプター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有効量の[1]のアンチセンス化合物を投与することを含む、方法。 30

[26] 疾患または症状が糖尿病、肥満、代謝症候群X、高血糖症または高脂血症である、[25]記載の方法。

[27] 糖尿病が2型糖尿病である、[26]記載の方法。

[28] 前記高脂血症が高血中コレステロールレベルまたは高血中トリグリセリドレベルである、[26]記載の方法。

[29] 前記グルココルチコイドレセプターの発現の阻害が肝臓または脂肪内で生じる、[26]記載の方法。

[30] 下垂体におけるグルココルチコイドレセプターの発現が阻害されない、[25]記載の方法。

[31] 動物中の血漿コルチコステロンおよび血漿ACTHの基本レベルがアンチセンス処理により影響を受けない、[25]記載の方法。 40

[32] 動物において血中グルコースレベルを減少させる方法であって、前記動物に治療的または予防的有効量の、グルココルチコイドレセプターをコードする核酸分子を標的とする、8~80核酸塩基長のアンチセンス化合物を投与することを含み、前記アンチセンス化合物グルココルチコイドレセプターの発現を阻害する、動物において血中グルコースレベルを減少させる、方法。

[33] 動物がヒトまたはげっ歯類である、[32]記載の方法。

[34] 血中グルコースレベルが血漿グルコースレベルまたは血清グルコースレベルである、[32]記載の方法。

[35] 動物が糖尿病の動物である、[32]記載の方法。 50

[3 6] 血中グルコースレベルがリンパ球減少を伴わずに減少する、[3 2] 記載の方法。

[3 7] 動物中の血漿コルチコステロンおよび血漿ACTHの基本レベルがアンチセンス処理により影響を受けない、[3 2] 記載の方法。

[3 8] 動物におけるグルココルチコイドレセプターに関連のある疾患または症状の開始を予防または遅延させる方法であって、該動物に治療的または予防的有効量の8~80核酸塩基長の、グルココルチコイドレセプターをコードする核酸分子を標的とするアンチセンス化合物を投与することを含み、前記アンチセンス化合物がグルココルチコイドレセプターの発現を阻害する、方法。

[3 9] 該動物がヒトまたはげっ歯類である、[3 8] 記載の方法。

[4 0] 疾患または症状が代謝性の疾患または症状である、[3 8] 記載の方法。

[4 1] 代謝性疾患または症状が糖尿病、肥満、高脂血症、高血糖症または代謝症候群Xである、[4 0] 記載の方法。

[4 2] 前記糖尿病が2型糖尿病である、[4 1] 記載の方法。

[4 3] 前記高脂血症が高血中コレステロールまたは高血中トリグリセリドレベルである、[4 1] 記載の方法。

[4 4] 前記疾患または症状の開始がリンパ球減少を伴わずに予防されるかまたは遅延される、[3 8] 記載の方法。

[4 5] 動物中の血漿コルチコステロンおよび血漿ACTHの基本レベルがアンチセンス処理により影響を受けない、[3 8] 記載の方法。

[4 6] 動物において血中グルコースレベルの増加を阻害するかまたは遅延する方法であって、該動物に治療的または予防的有効量の8~80核酸塩基長の、グルココルチコイドレセプターをコードする核酸分子を標的とするアンチセンス化合物を投与することを含み、前記アンチセンス化合物がグルココルチコイドレセプターの発現を阻害する、動物において血中グルコースレベルの増加を予防するかまたは遅延する、方法。

[4 7] 該動物がヒトまたはげっ歯類である、[4 6] 記載の方法。

[4 8] 動物が肥満である、[4 6] 記載の方法。

[4 9] 正常動物と比較した際に動物がインスリン抵抗性である、[4 6] 記載の方法。

[5 0] 血中グルコースレベルが血漿グルコースレベルまたは血清グルコースレベルである、[4 6] 記載の方法。

[5 1] 動物が糖尿病の動物である、[4 6] 記載の方法。

[5 2] 前記血中グルコースレベルの増加の開始がリンパ球減少を伴うことなく予防されるかまたは遅延される、[4 6] 記載の方法。

[5 3] 動物中の血漿コルチコステロンおよび血漿ACTHの基本レベルがアンチセンス処理により影響を受けない、[4 6] 記載の方法。

[5 4] 動物において血中脂肪レベルを減少させる方法であって、該動物に治療的または予防的有効量の8~80核酸塩基長の、グルココルチコイドレセプターをコードする核酸分子を標的とするアンチセンス化合物を投与することを含み、前記アンチセンス化合物がグルココルチコイドレセプターの発現を阻害する、動物において血中脂肪レベルを減少させる、方法。

[5 5] 動物がヒトまたはげっ歯類である、[5 4] 記載の方法。

[5 6] 血中脂肪レベルが血中コレステロールレベルまたは血中トリグリセリドレベルである、[5 4] 記載の方法。

[5 7] 動物が糖尿病の動物である、[5 4] 記載の方法。

[5 8] 前記血中脂肪レベルがリンパ球減少を伴うことなく減少する、[5 4] 記載の方法。

[5 9] 動物における血漿コルチコステロンおよび血漿ACTHの基本レベルがアンチセンス処理により影響を受けない、[5 4] 記載の方法。

[6 0] 動物において血中脂肪レベルの増加の開始を阻害または遅延する方法であって、前記動物に治療的または予防的有効量の8~80核酸塩基長の、グルココルチコイドレセブ

10

20

30

40

50

ターをコードする核酸分子を標的とするアンチセンス化合物を投与することを含み、前記アンチセンス化合物がグルココルチコイドレセプターの発現を阻害する、方法。

[6 1] 動物がヒトまたはげっ歯類である、[6 0] 記載の方法。

[6 2] 動物が肥満である、[6 0] 記載の方法。

[6 3] 正常動物と比較した際に動物がインスリン抵抗性である、[6 0] 記載の方法。

[6 4] 血中脂肪レベルが血中コレステロールレベルまたは血中トリグリセリドレベルである、[6 0] 記載の方法。

[6 5] 動物が糖尿病の動物である、[6 0] 記載の方法。

[6 6] 前記血中脂肪レベルの増加の開始がリンパ球減少を伴うことなく阻害されるかまたは遅延される、[6 0] 記載の方法。

10

[6 7] 該動物における血漿コルチコステロンおよび血漿ACTHの基本レベルがアンチセンス処理により影響を受けない、[6 0] 記載の方法。

[6 8] 動物の下垂体ではなく肝臓または脂肪においてグルココルチコイドレセプター発現を減少させる方法であって、前記動物に治療的または予防的有効量の化合物を投与することを含み、下垂体ではなく肝臓または脂肪においてグルココルチコイドレセプターの発現を阻害する、方法。

[6 9] 前記化合物がグルココルチコイドレセプターをコードする核酸分子を標的とする8~80核酸塩基長のアンチセンス化合物である、[6 8] 記載の方法。

[7 0] 動物における血漿コルチコステロンおよび血漿ACTHの基本レベルがアンチセンス処理により影響を受けない、[6 8] 記載の方法。

20

[7 1] 動物において体脂肪量を減少させる方法であって、前記動物に治療的または予防的有効量の8~80核酸塩基長の、グルココルチコイドレセプターをコードする核酸分子を標的とするアンチセンス化合物を投与することを含み、前記アンチセンス化合物がグルココルチコイドレセプターの発現を阻害する、方法。

[7 2] 動物がヒトまたはげっ歯類である、[7 1] 記載の方法。

[7 3] 前記体脂肪量がリンパ球減少を伴うことなく減少する、[7 1] 記載の方法。

[7 4] 該動物における血漿コルチコステロンおよび血漿ACTHの基本レベルがアンチセンス処理により影響を受けない、[7 1] 記載の方法。

[7 5] 動物において体脂肪量の増加の開始を阻害または遅延する方法であって、前記動物に治療的または予防的有効量の8~80核酸塩基長の、グルココルチコイドレセプターをコードする核酸分子を標的とするアンチセンス化合物を投与することを含み、前記アンチセンス化合物がグルココルチコイドレセプターの発現を阻害する、方法。

30

[7 6] 動物がヒトまたはげっ歯類である、[7 5] 記載の方法。

[7 7] 前記体脂肪量の増加の開始がリンパ球減少を伴うことなく阻害されるかまたは遅延される、[7 5] 記載の方法。

[7 8] 血漿コルチコステロンおよび血漿ACTHの基本レベルがアンチセンス処理により影響を受けない、[7 5] 記載の方法。

【配列表】

2010207232000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 ドビー，ケネス，ダブリュ．
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 1 4 デル マー，ストラトフォード シーティー．ナ
ンバー 4 7 0 3
- (72)発明者 フレイヤー，スーザン，エム．
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 2 2 サン ディエゴ，ルノー ストリート 2 9 4 6
- (72)発明者 ディーン，ニコラス，エム．
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 2 4 オリベンハイン，ウisperウィンド レーン
2 1 1 0
- (72)発明者 ベネット，シー．，フランク
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 0 9 カールズバッド，カシンズ ストリート 1 3 4
7

F ターム(参考) 4B024 AA01 CA04 CA11 DA02 GA11 HA17
4H045 AA10 AA30 CA40 DA50 EA27 EA28