



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 699 34 998 T2 2007.12.06

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 123 414 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 699 34 998.2

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US99/18796

(96) Europäisches Aktenzeichen: 99 942 290.0

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2000/020635

(86) PCT-Anmeldetag: 19.08.1999

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 13.04.2000

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 16.08.2001

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 24.01.2007

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 06.12.2007

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

166203 05.10.1998 US

(73) Patentinhaber:

Isis Pharmaceuticals, Inc., Carlsbad, Calif., US

(74) Vertreter:

Maiwald Patentanwaltsgesellschaft mbH, 80335  
München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LI, LU, MC, NL, PT, SE

(72) Erfinder:

BENNETT, Frank, C., Carlsbad, CA 92009, US;  
CONDON, P., Thomas, Carlsbad, CA 92008, US;  
COWSERT, M., Lex, San Mateo, CA 94402, US

(54) Bezeichnung: ANTISENSE MODULATION DER EXPRESSION VON INTEGRIN ALPHA 4

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung****GEBIET DER ERFINDUNG**

**[0001]** Die vorliegende Erfindung stellt Zusammensetzungen und Methoden zur Modulation der Expression von Integrin α4 zur Verfügung. Diese Erfindung betrifft vornehmlich Antisense-Verbindungen, insbesondere Oligonukleotide, die spezifisch mit für humanes Integrin α4 kodierenden Nukleinsäuren hybridisierbar sind. Für solche Oligonukleotide wurde gezeigt, dass sie die Expression von humanem Integrin α4 modulieren.

**HINTERGRUND DER ERFINDUNG**

**[0002]** Eine Entzündung ist eine örtlich begrenzte Schutzantwort, die von Gewebe als Antwort auf Verletzung, Infektion oder Gewebezerstörung ausgelöst wird und zur Zerstörung des infektiösen oder verletzenden Agens und der Isolierung des verletzten Gewebes führt. Eine typische Entzündungsantwort läuft wie folgt ab: Erkennung eines Antigens als fremdartig oder Erkennung eines Gewebeschadens, Synthese und Ausschüttung von löslichen Entzündungsbetonstoffen, Rekrutierung von Zellen des Entzündungssystems zur Stelle der Infektion oder des Gewebeschadens, Zerstörung und Beseitigung des eindringenden Organismus oder beschädigten Gewebes, sowie Deaktivierung des Systems, sobald der eindringende Organismus oder Schaden beseitigt wurde. In vielen menschlichen Krankheiten mit Entzündungskomponente sind die normalen homöostatischen Mechanismen, die diese entzündlichen Antworten abschwächen, defekt, was zur Beschädigung und zur Zerstörung von normalem Gewebe führt.

**[0003]** Zell-Zell-Interaktionen sind in die Aktivierung der Immunantwort bei jedem der oben beschriebenen Schritte beteiligt. Einer der am frühesten zu detektierenden Abläufe in einer normalen Entzündungsantwort ist die Adhäsion von Leukozyten an das vaskuläre Endothelium, gefolgt von der Wanderung der Leukozyten aus dem Gefäßsystem heraus an die Stelle der Infektion oder Verletzung. Die Adhäsion dieser Leukozyten oder weißen Blutkörperchen an das vaskuläre Endothelium ist ein notwendiger Schritt bei der Wanderung aus dem Gefäßsystem heraus (Harlan, J. M., Blood 1985, 65, 513-525). Diese Antwort wird durch die Interaktion der auf der Zelloberfläche exprimierten Adhäsionsmoleküle von Leukozyten und von Zellen des vaskulären Endothels vermittelt. Das very late antigen-4 (auch genannt VLA-4, α4β1 oder CD49d/CD29) ist ein homodimerer Adhäsionsrezeptor, der aus nicht kovalent verbundenen α und β Einheiten zusammengesetzt ist und dazu dient, die leukozytische Adhäsion an das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül 1 (VCAM-1) zu vermitteln, dass auf Cytokin-stimulierenden Endothelzellen exprimiert ist. Diese Interaktion zwischen VCAM-1 und VLA-4 trägt zur leukozytischen Extravasation in akuten und chronisch entzündlichen Zuständen einschließlich multipler Sklerose (MS), rheumatoидischer Arthritis, Asthma, Psoriasis und Allergie bei.

**[0004]** Fibronectin ist ebenso ein Ligand für VLA-4. Fibronectin spielt eine wichtige Rolle in vielen Prozessen einschließlich der embryonalen Entwicklung, der Wundheilung und der Metastasierung von Tumorzellen (Guan, J.-L. and Hynes, R.O., Cell 1990, 60, 53-61).

**[0005]** VLA-4 ist ein Heterodimer aus einem α4 Integrin und einem β1 Integrin. Das α4 Integrin kann auch mit einer β7 Integrin-Kette heterodimerisieren, um Integrin α4β7 zu bilden, das als mukosaler Homing-Rezeptor bekannt ist, weil sein Hauptligand das mukosal-vaskulär ansprechende MadCAM-1 ist. Durch das Integrin α4β7 lässt sich eine Teilmenge von T-Gedächtniszellen mit einem Tropismus für den Verdauungstrakt identifizieren, wohingegen α4β1 (VLA-4) konstitutiv auf den meisten mononukleären Leukozyten, aber nicht auf zirkulierenden Neutrophilen exprimiert wird. Die Interaktion von VCAM-1 mit VLA-4 legt nahe, dass VLA-4 ein potenzielles therapeutisches Ziel für entzündliche Krankheiten einschließlich der Arteriosklerose, Allergie und Asthma, Arthrose und der Metastasierung von Tumorzellen darstellt (Kassner, P.D., et al., Adv. Exp. Med. Biol. 1992, 323, 163-170). Für VLA-4 wurde auch eine Rolle in der Begünstigung der Adhäsion (d. h. dem Zurückhalten) von hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark gefunden (Papayannopoulou and Nakamoto, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993, 90, 9374-9378).

**[0006]** Bei Asthma handelt es sich um eine Entzündungskrankheit, die mit der eosinophilen Infiltration in die Lunge assoziiert ist. VLA-4 wird auf Eosinophilen exprimiert. Metzger, W.J. (Springer Semin. Immunopathol. 1995, 16, 467-478) verwendete ein Kaninchenmodell von Asthma, um zu demonstrieren, dass sowohl ein anti-VLA-4 Antikörper als auch ein CS-1 Peptid die eosinophile Infiltration in die Lunge verringern und die Entwicklung von Asthma reduzieren.

**[0007]** Die rheumatoide Arthritis ist eine weitere entzündungassoziierte Krankheit. Müller-Ladner, U., et al., (J. Rheumatology 1997, 24, 1873-1880) fanden heraus, dass die alternativ gesplicte Form von Fibronectin, die

CS-1 enthält, im rheumatoïdischen Synovium exprimiert wird. Zusätzlich fanden sie heraus, dass nicht nur die Expression von Fibronektin zur Rekrutierung von VLA-4 exprimierenden Zellen führte, sondern dass Fibroblasten im rheumatoïdischen Synovium VLA-4 exprimierten. Seiffge, D. (J. Rheumatology 1996, 23, 2086-2091) verwendete ein Rattenmodell der Arthritis um zu zeigen, dass ein monoklonaler Antikörper gegen die α4-Kette von VLA-4 zu einer Verbesserung der Symptome führte.

**[0008]** VLA-4 spielt auch eine Rolle bei einer Reihe von Autoimmunerkrankungen. Marazuela, M., et al., (Eur. J. Immunol. 1994, 24, 2483-2490) fanden eine erhöhte Expression von beiden, sowohl des VLA-4/VCAM-1 als auch des LFA-1/ICAM-1,3 Signalweges, in der Graves-Krankheit und der Hashimoto Thyroiditis, was nahe legt, dass beide eine Rolle bei diesen Krankheiten spielen. VLA-4 könnte auch eine Rolle bei der Multiplen Sklerose spielen. Für Antikörper gegen VLA-4 wurde herausgefunden, dass sie die experimentelle autoimmune Encephalomyelitis (EAE), eine experimentell induzierte Krankheit mit Ähnlichkeiten zur Multiplen Sklerose, verhindern (Yednock, T.A., et al., Nature 1992, 356, 63-66). Erhöhte Expressionslevel von VLA-4 wurden in einem Patienten mit systemischer Lupus-Erythematosus detektiert (Takeuchi, T., et al., Clin. Rheumatology 1995, 14, 370-374). VLA-4 ist an zellulären Antworten auf zwei operative Verfahren, nämlich die Transplantation und vaskuläre Wiederherstellungsverfahren, beteiligt. Die Abstoßung von artgleichem Transplantat ist eine übliche Antwort auf die Transplantation von fremdem Gewebe. Für CS-1 Peptide wurde herausgefunden, dass sie sowohl die akute Abstoßung (Coito, A.J., et al., Transplantation 1998, 65, 699-706) als auch die chronische Abstoßung (Korom, S., et al., Transplantation 1998, 65, 854-859) dadurch verhindern, dass sie die VLA-4 Bindung an Fibronektin blockieren. Während der vaskulären Wiederherstellungschirurgie ist eine bekannte Fehlerursache die intime Hyperplasia, die aus der Akkumulation von Monozyten und Lymphozyten resultiert. In einem Pavianmodell demonstrierten Lumsden, A.B., et al., (J. Vasc. Surg. 1997, 26, 87-93), dass ein Anti-VLA-4-Antikörper die intime Hyperplasia reduzierte.

**[0009]** VLA-4 spielt auch eine Rolle in der Metastasierung von Tumorzellen. Tumorzellen müssen bei der Metastasierung die extrazelluläre Matrix überwinden, das zirkulierende System erreichen und in neues Gewebe vordringen. Bao, L. et al., (Differentiation 1993, 52, 239-246) detektierten eine VLA-4 Expression von vielen menschlichen Tumorzelllinien einschließlich Brustkrebs, Melanomen sowie Nierenkrebs und fanden heraus, dass das Vorhandensein von VLA-4 gut mit dem metastasierenden Potential korrelierte. Kawaguchi, S. et al., (Jpn. J. Cancer Res. 1992, 83, 1304-1316) transfizierten eine für die α4 Untereinheit von VLA-4 kodierende cDNA in eine menschliche Fibrosarcoma-Zelllinie. Diese Zellen überexprimierten VLA-4 und zeigten eine erhöhte in vitro invasive Fähigkeit. Für die Zunahme der Metastasierung durch IL-1 (Garofalo, A., et al., Cancer Res. 1995, 55, 414-419) oder TNF-α (Okahara, H., et al., Cancer Res. 1994, 54, 3233-3236) wurde gezeigt, dass daran die Interaktion zwischen VLA-4 und VCAM-1 beteiligt ist. Die Autoren legen nahe, dass eine Therapie, die auf die Inhibition dieser Interaktion gerichtet ist, nützlich zur Reduktion des Risikos der Metastasierung wäre sowie bei Zuständen, die mit hohen Serumkonzentrationen von TNF-α assoziiert sind, einschließlich Cachexia, Sepsis, Operationsstress oder therapeutischen TNF-α-Anwendungen. Weil Tumorzellen oft IL-1 und TNF-α ausscheiden, könnte eine solche Therapie nützlich bei der Reduktion des Risikos der Metastasierung, die mit solchen Tumorzellen assoziiert ist, sein.

**[0010]** VLA-4 ist an der Förderung der Retention von hämatopoietischen Progenitorzellen im Knochenmark beteiligt. Für Antikörper gegen Integrin α4 (nicht aber gegen Integrin β2) wurde herausgefunden, dass sie selektiv Progenitor/Stammzellen in den Blutkreislauf mobilisieren (Papayannopoulou and Nakamoto, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993, 90, 9374-9378). Diese Mobilisierung ist auf dem Gebiet der Knochenmarkstransplantation von klinischer Bedeutung, da sie das Bedürfnis zur Knochenmarksernte durch das zur Verfügung stellen von hämatopoietischen Progenitorzellen im zirkulierenden Blut umgeht.

**[0011]** Obwohl Steroide und andere entzündungshemmende Wirkstoffe zur Behandlung entzündlicher Krankheiten und Zustände effektiv sind, führt die Langzeitverwendung oft zu Nebenwirkungen wie etwa einem erhöhten Infektionsrisiko, das durch die Schädigung der phagozytischen Leukozytenwanderung und Funktion verursacht wird. Es gibt Bedenken, dass die Inhibition der Funktion der β1 Integrin-Kette mit einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Infektionen assoziiert ist, wie es durch einen β1 (auch CD18 genannt) monoklonalen Antikörpern in Hasen demonstriert wurde (Foster, C.A., 1996, J. Allergy Clin. Immunol., 98, 270-277). Man glaubt, dass die selektive Inhibition der α4-Kette ein vielversprechender Ansatz sein könnte. Für die Inhibition der α4-Kette nimmt man an, dass sie wahrscheinlich die Levels des VLA-4 Heterodimers wie auch des α4β7 Heterodimers reduziert.

**[0012]** Potentielle therapeutische, auf VLA-4 gerichtete Eingriffe schliessen monoklonale Antikörper und Peptidantagonisten ein. Leger, O.J.P., et al. (Human Antibodies 1997, 8, 3-16) beschreiben einen monoklonalen Antikörper gegen VLA-4, der in klinischen Studien der Phase II zur Behandlung von Multipler Sklerose ist. CS-1

Peptidantagonisten wurden von Jackson, D.Y., et al. (J. Med. Chem. 1997, 40, 3359-3369) beschrieben.

**[0013]** Hayashi et al. (Cell Struct. Funct. 1991, 16, 241-249) verwendeten einen Vektor, der zu Hühnchen-Integrin  $\beta 1$  komplementäre RNA exprimierte, um die Integrin  $\beta 1$  Expression zu reduzieren, was zu einer geänderten Zellhaftung und Zellform führte.

**[0014]** Auf verschiedene Integrine gerichtete Antisense-Oligonukleotide wurden als Hilfsmittel benutzt, um die funktionalen Interaktionen von Integrinen in komplizierten Zusammenhängen aufzulösen. Lallier und Bronner-Fraser (Science, 1993, 259, 692-695) verwendeten Phosphorothioat-Oligonukleotide gerichtet auf konservierte und nicht-konservierte Regionen von Hühnchen  $\beta 1$ , humanen  $\alpha 4$ , Ratten- $\alpha 1$  und humanen  $\alpha 5$ -Integrinen, um die Effekte dieser Integrine auf die Zellhaftung zu bestimmen. Dieselben Oligonukleotide wurden auch in neurale Kammigrationswege des Herzens in Vogelembryos injiziert, und es wurde gezeigt, dass diese Oligonukleotide, die die Zellhaftung in vitro inhibierten, auch Abnormalitäten in vivo im neuralen Kamm und/oder im neuralen Kanal hervorriefen (Kil et al., Devel. Biol. 1996, 179, 91-101).

**[0015]** Die EP Patentanmeldung 688 748 (Carolan et al.) offenbart 3' derivatisierte Oligonukleotid-Analoga, einschliesslich einer auf die  $\beta 1$ -Untereinheit von VLA-4 gerichteten Sequenz.

**[0016]** Von Antisense-Oligonukleotiden wird angenommen, dass sie ein nützliche Mittel zur Modulation von Integrin  $\alpha 4$  und zur Behandlung von Krankheiten, die mit dessen Expression assoziiert sind, darstellen.

#### ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0017]** Die vorliegende Erfindung ist gerichtet auf Antisense-Verbindungen, insbesondere Oligonukleotide, die auf eine für Integrin  $\alpha 4$  kodierende Nukleinsäure gerichtet sind, und die die Expression von Integrin  $\alpha 4$  modulieren. Es werden auch pharmazeutische und andere Zusammensetzungen, die die Antisense-Verbindungen der Erfindung umfassen, zur Verfügung gestellt. Weiterhin werden Methoden zur Verfügung gestellt, um die Expression von Integrin  $\alpha 4$  in Zellen oder Geweben zu modulieren, wobei diese den Kontakt besagter Zellen oder Gewebe mit einer oder mehrerer der Antisense-Verbindungen oder Zusammensetzungen der Erfindung umfassen. Weiterhin werden Methoden zur Verfügung gestellt, um ein Tier, insbesondere einen Menschen, der im Verdacht steht, eine Krankheit oder eine Anfälligkeit für eine Krankheit oder einen Zustand zu haben, der mit der Expression von Integrin  $\alpha 4$  assoziiert ist, zu behandeln und zwar durch das Verabreichen einer therapeutisch oder prophylaktisch effektiven Menge einer oder mehrerer Antisense-Verbindungen oder Zusammensetzungen der Erfindung.

#### GENAUE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

**[0018]** Die vorliegende Erfindung verwendet oligomerische Antisense-Verbindungen, insbesondere Oligonukleotide, zur Modulation der Funktion von für Integrin  $\alpha 4$  kodierenden Nukleinsäuremolekülen und letztendlich zur Modulation der Menge des produzierten Integrin  $\alpha 4$ . Dies wird dadurch erreicht, dass Antisense-Verbindungen, die spezifisch mit einer oder mehrerer für Integrin  $\alpha 4$  kodierenden Nukleinsäure hybridisieren, zur Verfügung gestellt werden. Wie hier verwendet, umfassen die Begriffe „Ziel-Nukleinsäure“ und „für Integrin  $\alpha 4$  kodierende Nukleinsäure“ für Integrin  $\alpha 4$  kodierende DNA, von solcher DNA transkribierte RNA (einschliesslich pre-mRNA und mRNA) und auch von solcher RNA abstammende cDNA. Die spezifische Hybridisierung einer oligomerischen Verbindung mit ihrer Ziel-Nukleinsäure beeinträchtigt die normale Funktion dieser Nukleinsäure. Diese Modulation einer Funktion einer Ziel-Nukleinsäure durch Verbindungen, die spezifisch an sie hybridisieren, wird üblicherweise als „Antisense“ bezeichnet. Die DNA-Funktionen, die beeinträchtigt werden, schließen die Replikation und Transkription ein. Die RNA-Funktionen, die beeinträchtigt werden, schließen alle vitalen Funktionen sowie zum Beispiel die Translokation der RNA an die Proteintranslationsstelle, die Proteintranslation von der RNA, das Splicen der RNA, um eine oder mehrere mRNA Spezies zu erlangen und die katalytische Aktivität, die durch die RNA erlangt oder durch sie erleichtert wird, ein. Der Gesamteffekt einer solcher Interferenz mit der Ziel-Nukleinsäurefunktion besteht in der Modulation der Expression von Integrin  $\alpha 4$ . Im Zusammenhang der vorliegenden Erfindung beschreibt „Modulation“ entweder eine Erhöhung (Stimulation) oder eine Erniedrigung (Inhibition) der Expression eines Genes. Im Zusammenhang der vorliegenden Erfindung ist die Inhibition die bevorzugte Form der Modulation der Genexpression und mRNA ist ein bevorzugtes Ziel.

**[0019]** Es ist bevorzugt, bestimmte Nukleinsäuren als Ziel für Antisense zu verwenden. Eine Antisense-Verbindung auf eine bestimmte Nukleinsäure „auszurichten“ besteht im Zusammenhang der Erfindung aus einem mehrstufigen Prozess. Der Prozess beginnt üblicherweise mit der Identifizierung einer Nukleinsäuresequenz,

deren Funktion moduliert werden soll. Dies kann zum Beispiel ein zelluläres Gen (oder mRNA transkribiert von diesem Gen) sein, dessen Expression mit einer bestimmten Krankheit oder einem Krankheitszustand assoziiert ist, oder ein Nukleinsäuremolekül eines infektiösen Agens. In der vorliegenden Erfindung ist das Ziel ein für Integrin α4 kodierendes Nukleinsäuremolekül. Der Prozess des Ausrichtens schliesst auch die Bestimmung einer Stelle oder Stellen in diesem Gen zur Entstehung der Antisenseinteraktion in einer solchen Art ein, dass der gewünschte Effekt, zum Beispiel die Detektion oder Modulation der Expression des Proteins, daraus resultiert. Im Zusammenhang der vorliegenden Erfindung stellt eine bevorzugte Stelle innerhalb eines Gens die Region dar, die das Translationsinitiations- oder Terminationskodon des offenen Leserahmens (ORF) des Gens umfasst. Da das Translationsinitiations-Kodon, wie im Fachgebiet bekannt, üblicherweise 5'-AUG ist (in transkribierten mRNA-Molekülen; 5'-ATG im entsprechenden DNA-Molekül) bezeichnet man das Translationsinitiations-Kodon auch als das „AUG-Kodon“, das „Start-Kodon“ oder das „AUG-Start-Kodon“. Eine Minderheit von Genen besitzt ein Translationsinitiations-Kodon, das die RNA-Sequenz 5'-GUG, 5'-UUG oder 5'-CUG hat, und für 5'-AUA, 5'-ACG und 5'-CUG konnte gezeigt werden, dass sie *in vivo* funktionieren. Von daher können die Ausdrücke „Translationsinitiations-Kodon“ und „Start-Kodon“ viele Kodonsequenzen umfassen, auch wenn die Initiator-Aminosäure in jedem Fall üblicherweise Methionin (in Eukaryonten) oder Formyhethionin (in Prokaryonten) ist. Es ist im Fachgebiet auch bekannt, dass eukaryontische und prokaryontische Gene zwei oder mehrere alternative Start-Kodons haben können, von denen jede bevorzugt zur Translationsinitiation in einem bestimmten Zelltyp oder Gewebe oder einem bestimmten Set von Bedingungen verwendet werden kann. Im Zusammenhang der Erfindung beziehen sich „Start-Kodon“ und „Translationsinitiations-Kodon“ auf das Kodon oder die Kodons, die *in vivo* verwendet werden, um die Translation eines mRNA-Moleküls, das von einem für Integrin α4 kodierenden Gen transkribiert wurde, zu initiieren, ungeachtet der Sequenzen) solcher Kodons.

**[0020]** Es ist im Fachgebiet auch bekannt, dass ein Translationsterminations-Kodon (oder „Stop-Kodon“) eines Gens eine von drei Sequenzen, d. h. 5'-UAA, 5'-UAG und 5'-UGA (die entsprechenden DNA-Sequenzen sind 5'-TAA, 5'-TAG und 5'-TGA) haben kann. Die Ausdrücke „Start-Kodonregion“ und „Translationsinitiations-Kodonregion“ beziehen sich auf einen Teil einer solchen mRNA oder eines Gens, der ungefähr 25 bis ungefähr 50 angrenzende Nukleotide in jede Richtung (d. h. 5' oder 3') ausgehend von einem Translationsinitiations-Kodon umfasst. Ebenso beziehen sich die Ausdrücke „Stop-Kodonregion“ und „Translationsterminations-Kodonregion“ auf einen Teil einer solchen mRNA oder eines Gens, der ungefähr 25 bis ungefähr 50 benachbarte Nukleotide in jede Richtung (d. h. 5' oder 3') ausgehend von einem Translationsterminations-Kodon umfasst.

**[0021]** Der offene Leserahmen (ORF) oder die „kodierende Region“, die sich im Feld bekanntermaßen auf die Region zwischen dem Translationsinitiations-Kodon und dem Translationsterminations-Kodon bezieht, stellt auch eine Region dar, die effektiv als Ziel verwendet werden kann. Weitere Zielregionen schließen die 5' untranslatierte Region (5'UTR) ein, die sich im Fachgebiet bekanntermaßen auf den Anteil in 5' Richtung ausgehend vom Translationsinitiations-Kodon einer mRNA bezieht, und daher Nukleotide zwischen der 5' Cap Stelle und dem Translationsinitiations-Kodon einer mRNA oder entsprechende Nukleotide des Gens und die 3' untranslatierte Region (3'UTR) einschließt, die sich im Fachgebiet bekanntermaßen auf den Anteil in 3' Richtung ausgehend vom Translationsterminations-Kodon einer mRNA bezieht, und daher Nukleotide zwischen dem Translationsterminations-Kodon und dem 3' Ende einer mRNA oder entsprechende Nukleotide des Gens einschließt. Das 5' Cap einer mRNA umfasst einen N7-methylierten Guanosin-Rest, der mit dem letzten 5' Rest der mRNA über eine 5'-5' Triphosphat-Brücke verbunden ist. Von der 5' Cap Region einer mRNA wird angenommen, dass sie die 5' Cap Struktur selbst sowie die ersten 50 an das Cap anschliessenden Nukleotide umfasst. Die 5' Cap Region kann auch eine bevorzugte Zielregion sein.

**[0022]** Auch wenn einige eukaryontische mRNA-Transkripte direkt translatiert werden, so enthalten viele eine oder mehrere als „Introns“ bekannte Regionen die aus einem Transkript vor seiner Translation herausgeschnitten werden. Die verbleibenden (und daher translatierten) Regionen sind als „Exons“ bekannt und werden zusammengesplittet, um eine durchgehende mRNA-Sequenz zu bilden. mRNA-Splice-Stellen, d. h. Intron-Exon-Übergänge, können auch bevorzugte Zielregionen sein, und sind besonders hilfreich in Situationen, wo aberrantes Splicing in eine Krankheit impliziert ist, oder wo eine Überproduktion eines bestimmten mRNA-Spliceprodukts in eine Krankheit impliziert ist. Aberrante, durch Umlagerungen oder Deletionen entstandene Fusionsübergänge sind auch bevorzugte Ziele. Es wurde auch herausgefunden, dass auch Introns effektive und daher bevorzugte Zielregionen für Antisense-Verbindungen sind, wobei die Antisense-Verbindungen, die zum Beispiel auf DNA oder pre-mRNA gerichtet sind.

**[0023]** Nachdem eine oder mehrere Zielstellen identifiziert wurden, werden Oligonukleotide ausgesucht, die in ausreichender Form zum Ziel komplementär sind, d. h. ausreichend gut und mit ausreichender Spezifität hybridisieren, um den erwünschten Effekt zu ergeben.

**[0024]** Im Zusammenhang der Erfindung versteht man unter „Hybridisierung“ Wasserstoffbrückenbindungen, die Watson-Crick, Hoogsteen oder umgekehrte Hoogsteen-Wasserstoffbrückenbindungen sein können, zwischen komplementären Nukleotiden oder Nukleotid-Basen. Zum Beispiel sind Adenin und Thymin komplementäre Nukleobasen, die durch die Formation von Wasserstoffbrückenbindungen ein Basenpaar formen. So wie der Begriff „komplementär“ hier verwendet wird, bezieht er sich auf die Kapazität zur präzisen Paarung von zwei Nukleotiden. Wenn zum Beispiel ein Nukleotid an einer bestimmten Position eines Oligonukleotids in der Lage ist, mit einem Nukleotid an derselben Position eines DNA- oder RNA-Moleküls Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden, dann spricht man davon, dass das Oligonukleotid und die DNA oder RNA an dieser Position zueinander komplementär sind. Das Oligonukleotid und die DNA oder RNA sind zueinander komplementär, wenn eine ausreichende Anzahl von entsprechenden Positionen in jedem Molekül von Nukleotiden eingenommen werden, die miteinander Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden können. Daher sind „spezifisch hybridisierbar“ und „komplementär“ Ausdrücke, die verwendet werden, um ein ausreichendes Maß an Komplementarität oder an präziser Paarung anzuzeigen, sodass eine stabile und spezifische Bindung zwischen dem Oligonukleotid und dem DNA oder RNA-Ziel auftritt. Es ist im Fachgebiet bekannt, dass die Sequenz einer Antisense-Verbindung nicht 100% komplementär zu der seiner Zielnukleinsäure sein muss, um spezifisch hybridisierbar zu sein. Eine Antisense-Verbindung ist spezifisch hybridisierbar, wenn die Bindung der Verbindung an das DNA- oder RNA-Molekül die normale Funktion der Ziel-DNA oder RNA so stört, dass ein Verlust an Verwendbarkeit verursacht wird, und wenn ein ausreichendes Maß an Komplementarität vorhanden ist, um die nicht-spezifische Bindung der Antisense-Verbindung an Nicht-Zielsequenzen unter Bedingungen zu verhindern, unter welchen die spezifische Bindung erwünscht ist, d. h. unter physiologischen Bedingungen im Fall von in vivo-Versuchen oder der therapeutischen Behandlung, oder im Fall von in vitro-Versuchen, unter Bedingungen, bei welchen die Versuche durchgeführt werden.

**[0025]** Antisense-Verbindungen werden üblicherweise als Forschungs-Reagenzien und als diagnostische Agenzien eingesetzt. Zum Beispiel werden Antisense-Oligonukleotide, die in der Lage sind, die Genexpression mit exzellenter Spezifität zu inhibieren, oft von normal ausgebildeten Fachleuten verwendet, um die Funktion von bestimmten Genen aufzuklären. Antisense-Verbindungen werden zum Beispiel auch verwendet, um zwischen den Funktionen von verschiedenen Mitgliedern eines biologischen Ablaufs zu unterscheiden. Von daher ist die Antisense-Modulation für Forschungszwecke nutzbar gemacht worden.

**[0026]** Auch Fachleute haben sich die Spezifität und Sensitivität von Antisense für therapeutische Verwendungen zunutze gemacht. Antisense-Oligonukleotide wurden als therapeutische Moleküle zur Behandlung von Krankheitszuständen in Tieren und Menschen eingesetzt. Antisense-Oligonukleotide wurden Menschen sicher und zuverlässig verabreicht und zahlreiche klinische Studien sind derzeit auf dem Weg. Es ist daher etabliert, dass Oligonukleotide nützliche therapeutische Modalitäten sein können, die dazu konfiguriert werden können, um in Behandlungskuren zur Behandlung von Zellen, Gewebe und Tieren, insbesondere Menschen, nützlich zu sein.

**[0027]** Im Zusammenhang der Erfindung bezieht sich der Begriff „Oligonukleotid“ auf ein Oligomer oder Polymer einer Ribonukleinsäure (RNA) oder Deoxyribonukleinsäure (DNA) oder Nachahmermolekülen davon. Dieser Ausdruck schließt Oligonukleotide ein, die aus in der Natur vorkommenden Nukleobasen, Zuckern und kovalenten Internukleosid (Rückgrat) Bindungen wie auch aus Oligonukleotiden, die keine natürlich vorkommenden Anteile haben, aber ähnlich funktionieren, zusammengesetzt sind. Solche modifizierten oder substituierten Oligonukleotide sind oft gegenüber den nativen Formen wegen wünschenswerten Eigenschaften, sowie zum Beispiel erhöhter zellulären Aufnahme, erhöhte Affinität zum Nukleinsäureziel und erhöhte Stabilität in der Gegenwart von Nukleaseen, bevorzugt.

**[0028]** Obwohl Antisense-Oligonukleotide eine bevorzugte Form von Antisense-Verbindungen darstellen, bezieht sich die vorliegende Erfindung auch auf andere oligomere Antisense-Verbindungen einschließlich aber nicht limitiert auf Oligonukleotid-nachahmende Moleküle, so wie sie unten beschrieben sind. Die Antisense-Verbindungen gemäß der Erfindung umfassen bevorzugt ungefähr 8 bis ungefähr 30 Nukleobasen. Besonders bevorzugt sind Antisense-Oligonukleotide umfassend ungefähr 8 bis ungefähr 30 Nukleobasen (d. h. ungefähr 8 bis ungefähr 30 verbundene Nukleoside). Wie es im Feld bekannt ist, ist ein Nukleosid eine Basen-Zucker-Verbindung. Der Basenanteil des Nukleosids ist normalerweise eine heterozyklische Base. Die zwei gängigsten Klassen solcher heterozyklischer Basen sind die Purine und die Pyrimidine. Nukleotide sind Nukleoside, die ferner eine kovalent mit dem Zuckeranteil des Nukleosids verbundene Phosphatgruppe beinhalten. Für die Nukleoside, die einen Pentofuranosyl-Zucker beinhalten, kann die Phosphatgruppe entweder zum 2', 3' oder 5' Hydroxyl-Rest des Zuckers verbunden sein. Durch die Formation von Oligonukleotiden verbinden die Phosphatgruppen kovalent benachbarte Nukleoside miteinander, um so eine lineare polymere Verbindung zu bilden. Die entsprechenden Enden dieser linearen polymeren Struktur können wiederum weiter verknüpft sein,

um eine zirkuläre Struktur zu bilden, jedoch sind offene lineare Strukturen üblicherweise bevorzugt. Innerhalb der Oligonukleotid-Struktur werden die Phosphatgruppen üblicherweise als formende Elemente für das Internukleosid-Rückgrat des Oligonukleotids angesehen. Die normale Bindung oder das Rückgrat der RNA und DNA ist eine 3' zu 5' Phosphodiester-Bindung.

**[0029]** Spezifische Beispiele von bevorzugten, für diese Erfindung nützlichen Antisense-Verbindungen schließen Oligonukleotide ein, die modifizierte Rückgrate oder nicht-natürliche Internukleosid-Bindungen enthalten. Wie in dieser Beschreibung definiert, schließen Oligonukleotide mit modifizierte Rückgraten solche ein, die ein Phosphoratom im Rückgrat behalten sowie diese, die kein Phosphoratom im Rückgrat haben. Für die Zwecke dieser Beschreibung und so wie manchmal im Feld Bezug genommen wird, können modifizierte Oligonukleotide, die kein Phosphoratom in ihrem Internukleosid-Rückgrat haben, auch als Oligonukleoside angesehen werden.

**[0030]** Bevorzugte modifizierte Oligonukleotid-Rückgrate beinhalten zum Beispiel Phosphorothioate, chirale Phosphorothioate, Phosphordithioate, Phosphotriester, Aminoalkylphosphotriester, Methyl und andere Alkylphosphonate einschließlich 3'-Alkylenphosphonate und chirale Phosphonate, Phosphinate, Phosphoramidate einschließlich 3'-Aminophosphoramidate und Aminoalkylphosphoramidate, Thionophosphoramidate, Thionoalkylphosphonate, Thionoalkylphosphotriester und Boranophosphate, die normale 3'-5' Bindungen haben, 2'-5' verbundene Analoge von diesen und solche, die eine invertierte Polarität besitzen, worin die benachbarten Nukleosidpaar-Einheiten 3'-5' zu 5'-3' oder 2'-5' zu 5'-2' verbunden sind. Eingeschlossen sind auch verschiedene Salze, gemischte Salze und freie Säureformen.

**[0031]** Repräsentative US-Patente, die die Herstellung der obigen Phosphor-enthaltenden Bindungen lehren, schließen ein, sind aber nicht limitiert auf die US-Patente 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,196; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,966,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,591,306; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361 und 5,625,050.

**[0032]** Bevorzugte modifizierte Oligonukleotid-Rückgrate, die darin kein Phosphoratom einschließen, besitzen Rückgrate, die durch kurze Ketten von Alkyl- oder Cykloalkyl-internukleosidischen Bindungen oder von gemischten Heteroatom und Alkyl- oder Cykloalkyl-internukleosidischen Bindungen, oder durch eine oder mehrere kurze Ketten von heteroatomischen oder heterocyclischen internukleosidischen Bindungen gebildet werden. Diese schließen solche mit Morpholino-Bindungen ein (zum Teil durch den Zuckeranteil eines Nukleosids gebildet); Siloxan-Rückgraten; Sulfid-, Sulfoxid- und Sulfon-Rückgraten; Formacetyl- und Thioformacetyl-Rückgraten; Methylenformacetyl- und Thioformacetyl-Rückgraten; Alken-enthaltende Rückgrate; Sulfamat-Rückgrate; Methylenimino- und Methylenhydrazino-Rückgrate; Sulfonat- und Sulfonamid-Rückgrate, Amid-Rückgrate; und andere, die gemischte N, O, S und CH<sub>2</sub> Komponenten als Teile besitzen.

**[0033]** Repräsentative US-Patente, die die Herstellung der obigen Oligonukleoside lehren, schließen ein, sind aber nicht limitiert auf die US-Patente 5,034,506; 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,264,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240; 5,610,289; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070; 5,663,312; 5,633,360; 5,677,437 und 5,677,439.

**[0034]** In anderen bevorzugten Oligonukleotid-nachahmenden Verbindungen sind beide, sowohl der Zucker als auch die internukleosidische Bindung, d. h. das Rückgrat der Nukleotideinheit, durch neue Gruppen ersetzt. Die Basen-Einheiten werden zur Hybridisierung mit einer geeigneten Nukleinsäure-Zielverbindung beibehalten. Eine solche oligomerische Verbindung, eine Oligonukleotid-nachahmende Verbindung, von der gezeigt wurde, dass sie exzellente Hybridisierungseigenschaften besitzt, wird als Peptidnukleinsäure (PNA) bezeichnet. In PNA-Verbindungen ist das Zucker-Rückgrat eines Oligonukleotids durch ein Amid-enthaltendes Rückgrat ersetzt, insbesondere durch ein Aminoethylglycin-Rückgrat. Die Nukleobasen werden beibehalten und sind direkt oder indirekt an die Aza-Stickstoffatome des Amid-Anteils des Rückgrats gebunden. Repräsentative US-Patente, die die Herstellung von PNA-Verbindungen lehren, schließen ein, sind aber nicht limitiert auf die US-Patente: 5,539,082; 5,714,331; und 5,719,262. Eine weitere Lehre über PNA-Verbindungen kann in Nielsen et al. gefunden werden (Science, 1991, 254, 1497-1500).

**[0035]** Die am meisten bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung sind Oligonukleotide mit Phosphorothioat-Rückgraten und Oligonukleoside mit Heteroatom-Rückgraten, und im besonderen -CH<sub>2</sub>-NH-O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-O-CH<sub>2</sub>- [bekannt als Methylen (Methylimino) oder MMI-Rückgrat], -CH<sub>2</sub>-O-N-(CH<sub>2</sub>)-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>- und -O-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- [worin das native Phosphodiester-Rückgrat als

-O-F-O-CH<sub>2</sub>- dargestellt ist] des oben schon zitierten US-Patents 9,489,677 und die Amid-Rückgrate des oben schon zitierten US-Patents 5,602,240. Ebenfalls bevorzugt sind Oligonukleotide, die Morpholino-Rückgratstrukturen des oben schon zitierten US-Patents 5,034,506 besitzen.

**[0036]** Modifizierte Oligonukleotide können auch eine oder mehrere substituierte Zuckeranteile enthalten. Bevorzugte Oligonukleotide umfassen dabei eine der folgenden an der 2' Position: OH; F; O-, S-, oder N-Alkyl; O-, S-, oder N-Alkenyl; O-, S- oder N-Alkynyl oder O-Alkyl-O-Alkyl, wobei das Alkyl, Alkenyl und Alkynyl ein substituiertes oder ein nicht substituiertes C<sub>1</sub> bis C<sub>10</sub> Alkyl oder C<sub>2</sub> bis C<sub>10</sub> Alkynyl oder Alkynyl sein kann. Besonders bevorzugt sind O[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O]<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ONH<sub>2</sub> und O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ON[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>, worin n und m von 1 bis ungefähr 10 reichen. Andere bevorzugte Oligonukleotide umfassen eine der folgenden an der 2' Position ein: C<sub>1</sub> bis C<sub>10</sub> Niederalkyl, substituiertes Niederalkyl, Alkaryl, Aralkyl, O-Alkaryl oder O-Aralkyl, SH, SCH<sub>3</sub>, OCN, Cl, Br, CN, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, SOCH<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, ONO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, Heterozykloalkyl, Heterozykloalkaryl, Aminoalkylamino, Polyalkylamino, substituiertes Silyl, eine RNA-schneidende Gruppe, eine Reportergruppe, ein interkalierendes Agens, eine Gruppe zur Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften eines Oligonukleotids oder eine Gruppe zur Verbesserung der pharmakodynamischen Eigenschaften eines Oligonukleotids und andere Substituenten, die ähnliche Eigenschaften haben. Eine bevorzugte Modifikation schließt ein 2'-Methoxyethoxy (2'-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, auch bekannt als 2'-O-(2-Methoxyethyl) oder 2'-MOE) (Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504), d. h. eine Alkoxyalkoxy-Gruppe. Eine weitere bevorzugte Modifikation schließt ein 2'-Dimethylaminoxyethoxy, d. h. eine O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>ON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> Gruppe, auch bekannt als 2'-DMAOE, wie in der US-Patentanmeldung mit der Seriennummer 09/016,520 beschrieben, eingereicht am 30. Januar 1998, jetzt als US-Patent 6,127,533 erteilt, das der Anmelder zusammen mit der vorliegenden Anmeldung besitzt.

**[0037]** Andere bevorzugte Modifikationen schließen ein 2'-Methoxy (2'-O-CH<sub>3</sub>), 2'-Aminopropoxy (2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) und 2'-Fluoro (2'-F). Ähnliche Modifikationen können auch an anderen Positionen am Oligonukleotid gemacht werden, insbesondere an der 3' Position des Zuckers am 3' terminalen Nukleotid oder in 2'-5' verbundenen Oligonukleotiden und an der 5' Position des 5' terminalen Nukleotids. Oligonukleotide können auch Zucker-nachahmende Verbindungen sowie Cyklobutyl-Gruppen anstelle des Pentofuranosyl-Zuckers haben. Repräsentative US-Patente, die die Herstellung solcher modifizierter Zuckerstrukturen lehren, schließen ein, sind aber nicht limitiert auf die US-Patente 4,981,957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,658,873; 5,670,633 und 5,700,920 und die zugelassene US-Patentanmeldung 08/468,037, eingereicht am 6. Juni 1995 und erteilt als US-Patent 5,859,221, das der Anmelder zusammen mit der vorliegenden Anmeldung besitzt.

**[0038]** Oligonukleotide können auch Nukleobasen-(oft im Feld einfach als „Base“ bezeichnet) Modifikationen oder Austausche einschließen. Wie hier verwendet, schließen die „unmodifizierten“ oder „natürlichen“ Nukleobasen die Purinbasen Adenin (A) und Guanin (G) sowie die Pyrimidinbasen Thymin (T), Cytosin (C) und Uracil (U) ein. Modifizierte Nukleobasen schließen andere synthetische oder natürliche Nukleobasen ein, so wie 5-Methylcytosin (S-Me-C), 5-Hydroxymethylcytosin, Xanthin, Hypoxanthin, 2-Aminoadenin, 6-Methyl und andere Alkylderivate von Adenin und Guanin, 2-Propyl und andere Alkylderivate von Adenin und Guanin, 2-Thiouracil, 2-Thiothymin und 2-Thiocytosin, 5-Halo-Uracil und -Cytosin, 5-Propynyl-Uracil und -Cytosin, 6-Azo-Uracil, -Cytosin und -Thymin, 5-Uracil (Pseudouracil), 4-Thiouracil, 8-Halo, 8-Amino, 8-Thiol, 8-Thioalkyl, 8-Hydroxyl und andere 8-substituierte Adenine und Guanine, 5-Halo insbesondere 5-Bromo, 5-Trifluoromethyl und andere 5-substituierte Uracile und Cytosine, 7-Methylguanin und 7-Methyladenin, 8-Aza-Guanin und 8-Aza-Adenin, 7-Deaza-Guanin und 7-Deaza-Adenin und 3-Deaza-Guanin und 3-Deaza-Adenin. Weitere Nukleobasen schließen die in US-Patent Nr. 3,687,808 offenbarten, die in der The Concise Encyclopedia Of Polymer Science and Engineering, Kroschwitz J.I. ed. John Wiley & Sons, 1990, 858-859 offenbarten, die von Englisch et al., (Angewandte Chemie, IE, 1991, 30, 613) offenbarten und die von Sanghvi, Y.S. (Antisense Research and Applications, 15, 289-302) und Crooke, S.T. und Lebleu, B., ed., (CRC Press, 1993) offenbarten ein. Bestimmte dieser Nukleobasen sind besonders geeignet zur Erhöhung der Bindungsaffinität der oligomeren Verbindungen der Erfindung. Diese beinhalten 5-substituierte Pyrimidine, 6-Aza-Pyrimidine und N-2, N-6 und O-6 substituierte Purine einschließlich 2-Aminopropyladenin, 5-Propynyluracil und 5-Propynylcytosin. Für 5-Methylcytosin-Substitutionen wurde gezeigt, dass sie die Nukleinsäureduplex-Stabilität um 0,6-1,2°C erhöhen (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. and Lebleu, B., eds., Antisense Research and Application 1993, 276-278) und sie sind zur Zeit die bevorzugten Basensubstitutionen, insbesondere dann, wenn sie mit 2'-O-Methoxyethyl Zuckermodifikationen kombiniert werden.

**[0039]** Repräsentative US-Patente, die die Herstellung von bestimmten der oben genannten modifizierten Nukleobasen sowie anderer modifizierter Nukleobasen lehren, schließen ein, sind aber nicht limitiert auf das

oben genannte US-Patent 3,687,808 sowie die US-Patente: 4,845,205; 5,130,302; 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,594,121; 5,596,091; 5,624,617; 5,681,941 und 5,750,692.

**[0040]** Eine weitere Modifikation der Oligonukleotide der Erfindung bezieht das chemische Verknüpfen einer oder mehrerer Gruppen oder Konjugate, die die Aktivität, die zelluläre Verteilung oder die zelluläre Aufnahme des Oligonukleotids erhöhen, an das Oligonukleotid mit ein. Solche Gruppen schließen ein, sind aber nicht limitiert auf Lipid-Verbindungen sowie eine Cholesterin-Gruppe (Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556), cholische Säure (Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053-1060), einen Thioether, zum Beispiel Hexyl-S-Tritylthiol (Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309; Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765-2770), ein Thiocholesterin (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res. 1992, 20, 533-538), eine aliphatischen Kette, zum Beispiel Dodecandiol oder Undecyl-Reste (Saison-Behmoaras et al., EMBO J., 1991, 10, 1111-1118; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 59, 327-330; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49-54), ein Phospholipid, zum Beispiel di-Hexadecyl-Rac-Glycerin oder Triethylammonium 1,2-di-O-Hexadecyl-Rac-glycero-3-H-Phosphonat (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783), ein Polyamin- oder eine Polyethylenglycol-Kette (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973) oder Adamantan-Essigsäure (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654), eine Palmityl-Gruppe (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237) oder eine Octadecylamin- oder Hexylamino-Carbonyl-Oxycholesterin-Gruppe (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923-937).

**[0041]** Repräsentative US-Patente, die die Herstellung solcher Oligonukleotid-Konjugate lehren, schließen ein, sind aber nicht limitiert auf die US-Patente 4,828,979; 4,948,882; 5,218,105; 5,525,465; 5,541,313; 5,545,730; 5,552,538; 5,578,717; 5,580,731; 5,580,731; 5,591,584; 5,109,124; 5,118,802; 5,138,045; 5,419,077; 5,486,603; 5,512,439; 5,578,718; 5,608,046; 4,587,044; 9,605,735; 4,667,025; 4,762,779; 4,789,737; 4,824,941; 9,835,263; 4,876,335; 4,904,582; 4,958,013; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,245,022; 5,259,469; 5,258,506; 5,262,536; 5,272,250; 5,292,873; 5,317,098; 5,371,241; 5,391,723; 5,416,203; 5,451,463; 5,510,475; 5,512,667; 5,514,785; 5,565,552; 5,567,810; 5,574,142; 5,585,481; 5,587,371; 5,595,726; 5,597,696; 5,599,923; 5,599,928 und 5,688,941.

**[0042]** Es ist für alle Positionen in einer gegebenen Verbindung nicht notwendig einheitlich modifiziert zu sein und in der Tat können mehr als eine der zuvor genannten Modifikationen in eine einzelne Verbindung oder sogar bei einem einzelnen Nukleosid in einem Oligonukleotid eingebaut sein. Die vorliegende Erfindung schließt auch Antisense-Verbindungen ein, die chimäre Verbindungen sind. „Chimäre“ Antisense-Verbindungen oder „Chimeras“ im Zusammenhang der Erfindung sind Antisense-Verbindungen, bevorzugt Oligonukleotide, die zwei oder mehrere chemisch unterschiedliche Regionen enthalten, jede aufgebaut aus wenigstens einer monomeren Einheit, d. h. einem Nukleotid im Falle einer Oligonukleotid-Verbindung. Diese Oligonukleotide enthalten üblicherweise wenigstens eine Region, in der das Oligonukleotid so modifiziert ist, dass dies dem Oligonukleotid eine erhöhte Resistenz gegenüber Nukleaseabbau, erhöhte zellulärer Aufnahme und/oder erhöhte Bindungsaffinität für die Zielnukleinsäure verleiht. Eine zusätzliche Region des Oligonukleotids kann als Substrat für Enzyme dienen, die in der Lage sind, RNA:DNA oder RNA:RNA Hybride zu schneiden. Die RNase H ist zum Beispiel eine zelluläre Endonuklease, die den RNA-Strang eines RNA-DNA-Duplexes schneidet. Eine Aktivierung der RNase H führt daher zum Schneiden der Ziel-RNA, wodurch die Effizienz der Oligonukleotid-Inhibition der Genexpression stark erhöht wird. Folglich können vergleichbare Resultate oft mit kürzeren Oligonukleotiden erreicht werden, wenn chimäre Oligonukleotide verwendet werden im Vergleich zu Phosphorothioat Desoxyoligonukleotiden, die an dieselbe Zielregion hybridisieren. Das Schneiden der Ziel-RNA kann routinemäßig durch die Gelelektrophorese detektiert werden und es sind im Fachgebiet, falls notwendig, die dazugehörigen Nukleinsäure-Hybridisierungstechniken bekannt.

**[0043]** Chimäre Antisense-Verbindungen der Erfindung können als zusammengesetzte Strukturen aus zwei oder mehreren Oligonukleotiden, modifizierten Oligonukleotiden, Oligonukleosiden und/oder Oligonukleotid-nachahmenden Substanzen wie oben beschrieben gebildet werden. Solche Verbindungen sind im Feld auch als Hybride oder Gapmère bekannt. Repräsentative US-Patente, die die Herstellung solcher Hybridstrukturen lehren, schließen ein, sind aber nicht limitiert auf die US-Patente 5,013,830; 5,149,797; 5,220,007; 5,256,775; 5,366,878; 4,403,711; 5,491,133; 5,565,350; 5,623,065; 5,652,355; 5,652,356 und 5,700,922, wobei jedes von diesen hier durch Referenzverweis eingeschlossen wird sowie die zugelassene US-Patentanmeldung mit der Seriennummer 08/465,880, eingereicht am 6. Juni 1995, jetzt als US-Patent 5,955,589 erteilt, das der Anmelder zusammen mit der vorliegenden Anmeldung besitzt.

**[0044]** Die gemäß der Erfindung benutzten Antisense-Verbindungen können einfach und routinemäßig durch

die gut bekannte Technik der Festphasensynthese hergestellt werden. Die Ausrüstung für solch eine Synthese wird von mehreren Anbietern verkauft, einschließlich zum Beispiel Applied Biosystems (Foster City, CA). Es kann auch jede andere im Feld bekannte Maßnahme für eine solche Synthese zusätzlich oder alternativ angewendet werden. Es ist gut bekannt, ähnliche Techniken zur Herstellung von Oligonukleotiden wie den Phosphorothioaten und alkylierten Derivaten zu verwenden.

**[0045]** Die Antisense-Verbindungen der Erfindung werden *in vitro* synthetisiert und schließen keine Antisense-Zusammensetzung biologischen Ursprungs oder genetische Vektorkonstrukte ein, die hergestellt wurden, um die *in vivo* Synthese von Antisense-Molekülen anzutreiben.

**[0046]** Die Verbindungen der Erfindung können auch beigemischt, eingeschlossen, verbunden und sonstwie mit anderen Molekülen, Molekülstrukturen oder Mixturen von Verbindungen in Zusammenhang stehen, wie zum Beispiel Liposomen, Molekülen gerichtet auf Rezeptoren, oralen, rektalen, topikalnen oder anderen Zusammensetzungen, um bei der Aufnahme, der Verteilung und/oder der Absorption zu helfen. Repräsentative US-Patente, die die Herstellung von solchen Formulierungen lehren, die bei der Aufnahme, der Verteilung und/oder der Absorption helfen, schließen ein, sind aber nicht limitiert auf die US-Patente 5,108,921; 5,359,844; 5,416,016; 5,459,127; 5,521,291; 5,543,158; 5,597,932; 5,583,020; 5,591,721; 4,426,330; 4,534,899; 5,013,556; 5,108,921; 5,213,804; 5,227,170; 5,264,221; 5,356,633; 5,395,619; 5,416,016; 5,417,978; 5,462,854; 5,469,854; 5,512,295; 5,527,528; 5,534,259; 5,543,152; 5,556,948; 5,580,575 und 5,595,756.

**[0047]** Die Antisense-Verbindungen der Erfindung umfassen alle pharmazeutisch verträglichen Salze, Ester oder Salze von solchen Estern, oder jede andere Verbindung, die nach der Verabreichung an ein Tier einschließlich eines Menschen in der Lage ist (direkt oder indirekt) den biologisch aktiven Metaboliten oder Rest davon zur Verfügung zu stellen. Entsprechend wird die Offenbarung zum Beispiel auch auf Pro-Wirkstoffe und pharmazeutisch verträgliche Salze der Verbindungen der Erfindung, pharmazeutisch verträgliche Salze solcher Pro-Wirkstoffe und anderer Bioäquivalente ausgeweitet.

**[0048]** Der Ausdruck „Pro-Wirkstoff“ zeigt einen therapeutischen Wirkstoff an, der in einer inaktiven Form, die in eine aktive Form (d. h. einen Wirkstoff) im Körper oder Zellen davon durch die Wirkung von endogenen Enzymen oder anderer Chemikalien und/oder Bedingungen überführt wird, hergestellt ist. Insbesondere sind Pro-Wirkstoff-Versionen der Oligonukleotide der Erfindung als SATE [(S-Acetyl-2-Thioethyl) Phosphat] Derivate gemäß den Methoden offenbart in WO 93/24510 an Gosselin et al., veröffentlicht am 9. Dezember 1993 oder in WO 94/26764 an Imbach et al. hergestellt.

**[0049]** Der Ausdruck „pharmazeutisch verträgliche Salze“, bezieht sich auf physiologisch und pharmazeutisch verträgliche Salze der Verbindungen der Erfindung: d. h. Salze, die die gewünschte biologische Aktivität der Ausgangsverbindung behalten und keine unerwünschten toxischen Effekte dazu verleihen.

**[0050]** Pharmazeutisch verträgliche basische Additionssalze werden aus Metallen oder Aminen, wie etwa Alkali und alkalischen Erdmetallen oder organischen Aminen gebildet. Beispiele für als Kationen eingesetzte Metalle sind Natrium, Kalium, Magnesium, Kalzium und ähnliche. Beispiele für geeignete Amine sind N,N'-Dibenzylethylendiamin, Chlorprocain, Cholin, Diethanolamin, Dicyclohexylamin, Ethylendiamin, N-Methylglucamin und Procain (siehe zum Beispiel Berge et al. J. of Pharma Sci., 1977, 66, 1-19). Die basischen Additionssalze der genannten sauren Verbindungen werden durch den Kontakt der freien Säureform mit einer ausreichenden Menge der gewünschten Base hergestellt, um das Salz in einer herkömmlichen Art und Weise zu produzieren. Die freie Säureform kann durch den Kontakt der Salzform mit einer Säure und der Isolierung der freien Säure in einer herkömmlichen Art und Weise wiederhergestellt werden. Die freien Säureformen unterscheiden sich von ihren entsprechenden Salzformen etwas in bestimmten physikalischen Eigenschaften sowie der Löslichkeit in polaren Lösungsmitteln, ansonsten aber sind die Salze äquivalent zu ihrer entsprechenden freien Säure für die Zwecke der vorliegenden Erfindung. So wie hier benutzt, schließt ein „pharmazeutisch zugegebenes Salz“ ein pharmazeutisch verträgliches Salz einer Säureform von einer der Komponenten der Zusammensetzung der Erfindung ein. Diese beinhalten organische oder anorganische saure Salze der Amine. Bevorzugte saure Salze sind die Hydrochloride, Acetate, Salicylate, Nitrate und Phosphate. Andere passende pharmazeutisch verträgliche Salze sind den Fachmännern gut bekannt und schließen basische Salze einer Vielzahl von anorganischen und organischen Säuren ein, wie etwa zum Beispiel mit anorganischen Säuren, beispielsweise Hydrochlor-Säure, Hydrobrom-Säure, Schwefelsäure oder Phosphorsäure; mit organischen Carboxyl-, Schwefel-, Sulfo- oder Phosphorsäuren oder N-substituierten sulfamischen Säuren, beispielsweise Essigsäure, Propionsäure, Glykolsäure, Succinsäure, Maleinsäure, Hydroxymaleinsäure, Methylmaleinsäure, Fumarsäure, Malinsäure, Tartarsäure, Laktinsäure, Oxalsäure, Glukonsäure, Glukarsäure, Glukoronsäure, Zitratsäure,

re, Benzoësäure, Zimtsäure, Mandelsäure, Salicylsäure, 4-Aminosalicylsäure, 2-Phenoxybenzoësäure, 2-Acetoxybenzoësäure, Embonsäure, Nikotinsäure oder Isonikotinsäure; und mit Aminosäuren, so wie den 20 Alpha-Aminosäuren, die in der Proteinsynthese in der Natur beteiligt sind, zum Beispiel Glutaminsäure oder Asparaginsäure und auch mit Phenylsuccinsäure, Methansulfonsäure, Ethansulfonsäure, 2-Hydroxyethansulfonsäure, Ethan-1,2-Disulfonsäure, Benzensulfonsäure, 4-Methylbenzensulfonsäure, Naphtalen-2-sulfonsäure, Naphtalen-1,5-disulfonsäure, 2- oder 3-Phosphoglycerat, Glukose-6-Phosphat, N-Cyclohexylsulfamsäure (mit der Bildung von Cyclamaten) oder mit anderen sauren organischen Verbindungen, wie etwa Ascorbinsäure. Pharmazeutisch verträgliche Salze von Verbindungen können auch mit einem pharmazeutisch verträglichen Kation hergestellt werden. Pharmazeutisch geeignete verträgliche Kationen sind den Fachleuten gut bekannt und schließen ein Alkali, Alkalierde, Ammonium und quaternäre Ammoniumkationen. Carbonate oder Wasserstoffcarbonate sind auch möglich.

**[0051]** Bevorzugte Beispiele von pharmazeutisch verträglichen Salzen für Oligonukleotide schließen ein, sind aber nicht limitiert auf (a) Salze gebildet aus Kationen wie etwa Natrium, Kalium, Ammonium, Magnesium, Kalzium, Polyaminen wie Spermin und Spermidin, etc.; (b) saure Additionssalze gebildet aus anorganischen Säuren, zum Beispiel Hydrochlorsäure, Hydrobrosäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure, Nitratsäure, und ähnliche; (c) Salze gebildet aus organischen Säuren wie etwa beispielsweise Essigsäure, Oxalsäure, Tartrarsäure, Succinsäure, Maleinsäure, Fumarsäure, Glukonsäure, Zitratsäure, Malinsäure, Ascorbinsäure, Benzoësäure, Tanninsäure, Palmitinsäure, Algininsäure, Polyglutaminsäure, Naphtalensulfonischersäure, Methanosulfonsäure, p-Toluensulfonsäure, Napthalendisulfonsäure, Polygalacturonsäure und ähnliche; und (d) Salze gebildet aus elementaren Anionen wie etwa Chlor, Brom und Jod.

**[0052]** Die Antisense-Verbindungen der vorliegenden Erfindung können für Diagnosen, Therapien, Prophylaxen und als Forschungsreagenzien und Kits eingesetzt werden. Für Therapien wird ein Tier, bevorzugt ein Mensch, der im Verdacht steht, eine Krankheit oder Funktionsstörung, die durch die Modulation der Expression von Integrin  $\alpha 4$  behandelt werden kann, zu haben, durch die Verabreichung von Antisense-Verbindungen gemäß der Erfindung behandelt. Die Verbindungen der Erfindung können in pharmazeutischen Zusammensetzungen durch die Zugabe einer effektiven Menge einer Antisense-Verbindung zu einem geeigneten pharmazeutisch verträglichen Verdünnungsmittel oder Trägerstoff verwendet werden. Die Benutzung der Antisense-Verbindungen und Methoden der Erfindung können auch prophylaktisch eingesetzt werden, beispielsweise um eine Infektion, eine Entzündung oder Tumorentstehung zu verhindern oder zu verzögern.

**[0053]** Die Antisense-Verbindungen der Erfindung sind nützlich zu Forschungs- und Diagnosezwecken, weil diese Verbindungen mit für Integrin  $\alpha 4$  kodierenden Nukleinsäuren hybridisieren, was es erlaubt, Sandwich- und weitere Versuchansätze einfach aufzubauen, um diese Tatsache zu untersuchen. Die Hybridisierung der Antisense-Oligonukleotide der Erfindung mit einer für Integrin  $\alpha 4$  kodierenden Nukleinsäure kann durch im Feld bekannte Methoden detektiert werden. Solche Methoden können die Konjugation eines Enzyms an das Oligonukleotid, die radioaktive Markierung des Oligonukleotids oder jede andere geeignete Nachweismaßnahme einschließen. Auch können Kits, die solche Detektionsvorrichtungen zur Detektion des Integrin  $\alpha 4$  Levels in einer Probe verwenden, hergestellt werden.

**[0054]** Die vorliegende Erfindung schließt auch pharmazeutische Zusammensetzungen und Formulierungen ein, die die Antisense-Verbindungen der Erfindung einschließen. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können in einer Vielzahl von Möglichkeiten verabreicht werden, abhängig davon, ob eine lokale oder systemische Behandlung erwünscht ist und abhängig davon, welches Gebiet behandelt werden soll. Die Gabe kann topisch sein (einschließlich ophtalmologisch und auf Schleimhautmembranen gerichtet, einschließlich vaginaler und rektaler Gabe), pulmonar, zum Beispiel durch Inhalation oder Einblasen von Pulvern oder Aerosolen einschließlich durch Zerstäuber; intratracheal, intranasal, epidermal und transdermal, oral oder parenteral. Parenterale Verabreichung beinhaltet die intravenöse, intraarteriale, subkutane, intraperitoneale oder intramuskuläre Injektion oder Infusion; oder intrakraniell, zum Beispiel intrathekale oder intraventrikuläre Verabreichung. Für Oligonukleotide mit wenigstens einer 2'-O-Methoxyethyl-Modifikation wird angenommen, dass sie besonders zur oralen Verabreichung geeignet sind.

**[0055]** Pharmazeutische Zusammensetzungen und Formulierungen für die topische Gabe können transdermale Pflaster, Salben, Lotionen, Cremes, Gele, Drops, Zäpfchen, Sprays, Flüssigkeiten und Pulver einschließen. Konventionelle pharmazeutische Trägerstoffe, wässrige Lösungen, Pulver oder ölige Basen, Verstärker und Ähnliches können notwendig oder wünschenswert sein. Beschichtete Kondome, Handschuhe und ähnliches kann auch nützlich sein.

**[0056]** Zusammensetzungen und Formulierungen für die orale Gabe beinhalten Pulver oder Granulate, Sus-

pensionen oder Lösungen in wässrigen oder nicht-wässrigen Medien, Kapseln, Portionen oder Tabletten. Dickungsmittel, Duftstoffe, Verdünnungsmittel, Emulsionen, Dispersionshilfen oder Bindemittel können wünschenswert sein.

**[0057]** Zusammensetzungen und Formulierungen für die parenterale, intrathekale oder intraventrikuläre Gabe können sterile wässrige Lösungen einschließen, die auch Puffer, Verdünnungsmittel und weitere geeignete Hilfsmittel wie etwa, allerdings nicht limitiert darauf, Penetrationsverstärker, Trägerverbindungen und andere pharmazeutisch verträgliche Träger oder Hilfsstoffe enthalten können.

**[0058]** Pharmazeutische Zusammensetzungen und/oder Formulierungen umfassend die Oligonukleotide der vorliegenden Erfindung können auch Penetrationsverstärker einschließen, um die Nahrungsaufnahme der Oligonukleotide zu verstärken. Penetrationsverstärker können als Mitglieder zu einer der fünf breiten Kategorien klassifiziert werden, d. h. Fettsäuren, Gallensalze, chelatierende Wirkstoffe, Tenside und Nicht-Tenside (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, 8, 91-192; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33). Ein oder mehrere Penetrationsverstärker von einer oder mehreren dieser breiten Kategorien kann eingeschlossen sein. Penetrationsverstärker sind beschrieben in der anhängigen US-Patentanmeldung 08/886,829, eingereicht am 1. Juli 1997, jetzt erteilt als US-Patent 6,747,014 und anhängenden US-Patentanmeldung 08/961,469, eingereicht am 31. Oktober 1997, jetzt als US-Patent 6,083,923 erteilt, von denen der Anmelder beide zusammen mit der vorliegenden Anmeldung besitzt.

**[0059]** Verschiedene Fettsäuren und deren Derivate, die als Penetrationsverstärker wirken, schließen zum Beispiel ein Oleinsäure, Laurinsäure, Caprinsäure, Myristinsäure, Palmitinsäure, Stearinsäure, Linoleinsäure, Linoleninsäure, Dicaprat, Tricaprat, Recinleat, Monoolein (auch bekannt als 1-Monooleoyl-Rac-Glycerin), Di-laurin, Caprylinsäure, Arichidonsäure, Glycerin 1-Monocaprat, I-Dodecylaxacycloheptan-2-one, Acylcarnitine, Acylcholine, Mono- und Di-Glyceride und physiologisch verträgliche Salze davon (das heißt Oleat, Laurat, Caprat, Myristat, Palmitat, Stearat, Linoleat, etc.) (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, 8, 91-192; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; Elektrisch-Hairi et al., J. Pharm. Pharmacol., 1992, 44, 651-654). Beispiele von zurzeit bevorzugten Fettsäuren sind Natriumcaprat und Natriumlaurat, einzeln oder in Kombination bei Konzentrationen von 0,5 bis 5% verwendet.

**[0060]** Bevorzugte Penetrationsverstärker sind in der anhängigen US-Patentanmeldung 08/886,829, eingereicht am 1. Juli 1997, offenbart, die der Anmelder zusammen mit der vorliegenden Anmeldung besitzt.

**[0061]** Die physiologischen Rollen von Gallensäure schließen die Erleichterung der Dispersion und Absorption von Lipiden und fettlöslichen Vitaminen ein (Brunton, Chapter 38 in: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th Ed., Hardman et al., eds., McGraw-Hill, New York, NY 1996, pages 934-935). Verschiedene natürliche Gallensalze und deren synthetische Derivate wirken als Penetrationsverstärker. Von daher schließt der Begriff „Gallensalze“ jede der natürlich vorkommenden Verbindungen der Galle wie auch jede ihrer synthetischen Derivate ein. Bevorzugte Gallensalze sind in der anhängigen US-Patentanmeldung 08/886,829, eingereicht am 1. Juli 1997, beschrieben, die der Anmelder zusammen mit der vorliegenden Anmeldung besitzt und die hier durch einen Referenzverweis miteinbezogen wird. Ein zurzeit bevorzugtes Gallensalz ist die Chenodeoxycholische Säure (CDCA) (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO), üblicherweise bei Konzentrationen von 0,5 bis 2% benutzt.

**[0062]** Komplexe Formulierungen umfassend einen oder mehrere Penetrationsverstärker können verwendet werden. Zum Beispiel können Gallensalze in Verbindung mit Fettsäuren eingesetzt werden, um komplexe Formulierungen zu ergeben. Bevorzugte Kombinationen schließen CDCA in Kombination mit Natriumcaprat oder Natriumlaurat (üblicherweise 0,5 bis 5%) ein.

**[0063]** Chelat-bildende Wirkstoffe schließen ein, sind aber nicht limitiert auf Dinatrium-Ethyldiamintetraacetat (EDTA), Zitratsäure, Salicylate (zum Beispiel Natriumsalicylat, 5-Methoxysalicylat und Homovanillat), N-Acylderivate von Kollagen, Laureth-9 und N-Aminoacylderivate von Beta-Diketonen (Enamine) (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, 8, 92-192; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; Buur et al., J. Control Rel., 1990, 14, 43-51). Chelat-bildende Wirkstoffe haben den zusätzlichen Vorteil, dass sie auch als DNase-Inhibitoren fungieren.

**[0064]** Tenside schließen zum Beispiel Natriumlaurylsulfat, Polyoxyethylen-9-Laurylether und Polyoxyethylen-20-Cetylether (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, 8, 92-191); und Perfluor-chemische Emulsionen, so wie FC-43 ein (Takahashi et al., J. Pharm. Pharmacol., 1988, 40, 252-257).

**[0065]** Nicht-Tenside schließen zum Beispiel ungesättigte zyklische Harnstoffe, 1-Alkyl- und 1-Alkenylazacyclo-Alkanon Derivate (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, 8, 92-191); und nicht-steroidische entzündungshemmende Wirkstoffe wie etwa Diclofenac-Natrium, Indometacin und Phenylbutazon ein (Yamashita et al., J. Pharm. Pharmacol., 1987, 39, 621-626).

**[0066]** Wie hier benutzt, bezieht sich „Trägerverbindung“ auf eine Nukleinsäure oder ein Analog davon, das inert ist (d. h., keine biologische Aktivität per se besitzt), aber bei in vivo Prozessen als Nukleinsäure erkannt wird, die die Bioverfügbarkeit von Nukleinsäure mit biologischer Aktivität reduziert, zum Beispiel durch den Abbau der biologisch-aktiven Nukleinsäure oder deren verstärkter Entfernung aus dem Kreislauf. Die Gabe einer Nukleinsäure zusammen mit einer Trägerverbindung, üblicherweise mit einem Überschuss der letzteren Substanz, kann in einer substantiellen Reduktion der Menge der Nukleinsäure resultieren, die in der Leber, der Niere oder anderen extrazirkulatorischen Reservoirs aufgenommen wird, wahrscheinlich durch die Kompetition zwischen der Trägerverbindung und der Nukleinsäure um einen gemeinsamen Rezeptor. Zum Beispiel ist die Aufnahme eines partiell phosphorothioatischen Oligonukleotids im Lebergewebe reduziert, wenn es zusammen mit Polyinosinsäure, Dextransulfat, Polycytidinsäure oder 4-Acetoamid-4'-Isothiocyanostilben-2,2'-disulfonsäure verabreicht wird (Miyao et al., Antisense Res. Dev., 1995, 5, 115-121; Takakura et al., Antisense & Nucl. Acid Drug Dev., 1996, 6, 177-183).

**[0067]** Im Gegensatz zu einer Trägerverbindung ist ein „pharmazeutisch verträglicher Trägerstoff“ (Hilfsstoff) ein pharmazeutisch verträgliches Lösungsmittel, suspendierender Wirkstoff oder jedes andere pharmakologisch inerte Vehikel für die Gabe einer oder mehrerer Nukleinsäuren an ein Tier. Der pharmazeutisch verträgliche Trägerstoff kann flüssig oder fest sein und wird mit Blick auf die geplante Art der Verabreichung so ausgewählt, dass er die gewünschte Masse, Konsistenz, usw. zur Verfügung stellt, wenn er mit einer Nukleinsäure und den anderen Komponenten einer bestimmten pharmazeutischen Zusammensetzung kombiniert wird. Typische pharmazeutisch verträgliche Trägerstoffe schließen ein, sind aber nicht limitiert auf bindende Wirkstoffe (zum Beispiel pregelatinisierte Maisstärke, Polyvinylpyrrolidon oder Hydroxypropylmethylcellulose, etc.); Füllstoffe (zum Beispiel Laktose und andere Zucker, mikrokristalline Zellulose, Pektin, Gelatin, Kalziumsulfat, Ethylzellulose, Polyacrylate oder Kalziumhydrogenphosphat, etc.); Gleitmittel (zum Beispiel Magnesiumstearat, Talc, Silikat, kolloidale Silikondioxide, Stearinsäure, metallische Stearate, hydrogenisierte Gemüseöle, Getreidestärke, Polyethylenglykole, Natriumbenzoat, Natriumacetat, etc.); Sprengmittel (zum Beispiel Stärke, Natriumstärkeglycolat, etc.); oder Netzmittel (zum Beispiel Natriumlaurylsulfat, etc.). Orale Gabesysteme mit verlängerter Freisetzung und/oder enterische Schichten für oral verabreichte Dosierungsformen sind in den US-Patenten 4,704,295; 4,556,552; 4,309,406 und 4,309,404 beschrieben.

**[0068]** Die Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können zusätzlich andere Hilfskomponenten enthalten, die üblicherweise in pharmazeutischen Zusammensetzungen gefunden werden, zu ihren jeweiligen Zweckbestimmten Verwendungszwecken. Daher können die Zusammensetzungen zum Beispiel zusätzliche passende pharmazeutisch aktive Materialien enthalten, so wie zum Beispiel antijuckende, astringierende, lokalanästhetische oder antientzündliche Wirkstoffe, oder können zusätzliche Materialien enthalten, die nützlich zur Formulierung verschiedener Dosierungsformen der Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung sind, wie etwa Farbstoffe, Geschmacksstoffe, Präservative, Antioxidantien, Trübungsmittel, Verdickungsmittel und Stabilisatoren. Solche Materialien sollten allerdings, wenn zugegeben, nicht übermäßig die biologischen Aktivitäten der Komponenten der Zusammensetzung der Erfindung stören.

**[0069]** Unabhängig von der Methode, mit der die Antisense-Verbindungen der Erfindung in den Patienten eingeführt werden, können kolloidale Dispersionssysteme als Trägervehikel verwendet werden, um die in vivo Stabilität der Verbindungen zu erhöhen und/oder die Verbindungen zu einem bestimmten Organ, Gewebe oder Zelltyp abzurichten. Kolloidale Dispersionssysteme schließen ein, sind aber nicht limitiert auf Makromolekülkomplexe, Nanokapseln, Mikrokugeln, Kugelchen und auf Lipid-basierende Systeme einschließlich Öl-in-Wasser-Emulsionen, Mizellen, gemischte Mizellen, Liposomen und Lipid:Oligonukleotid-Komplexe von uncharakterisierter Struktur. Ein bevorzugtes kolloidales Dispersionssystem ist eine Vielzahl von Liposomen. Liposomen sind mikroskopische Kugeln, die einen wässrigen Kern umgeben von einer oder mehrerer äußerer Schichten bestehend aus Lipiden und angeordnet in einer zweilagigen Konfiguration besitzen (siehe allgemein Chonn et al., Current Op. Biotech., 1995, 6, 698-708).

**[0070]** Eine Liposomenpräparation ist in der anhängigen US-Patentanmeldung 08/961,469, eingereicht am 31. Oktober 1997 und jetzt als US-Patent 6,083,469 erteilt, beschrieben, das der Anmelder zusammen mit der vorliegenden Anmeldung besitzt.

**[0071]** Bestimmte Ausführungsformen der Erfindung stellen Liposomen und andere Zusammensetzungen

zur Verfügung, die beinhalten (a) eine oder mehrere Antisense-Verbindungen und (b) einen oder mehrere andere chemotherapeutische Wirkstoffe, die durch einen Nicht-Antisense-Mechanismus wirken. Beispiele solcher chemotherapeutischer Wirkstoffe schließen ein, sind aber nicht limitiert auf Antikrebswirkstoffe wie etwa Daunorubicin, Dactinomycin, Doxorubicin, Bleomycin, Mitomycin, Stickstoffsenf, Chlorambucil, Melphalan, Cyclophosphamid, 6-Mercaptopurin, 6-Thioguanin, Cytarabin (CA), 5-Fluorouracil (5-FU), Floxuridin (5-FudR), Methotrexat (MTX), Colchicin, Vincristin, Vinblastin, Etoposid, Teniposid, Cisplatin und Diethylstilbestrol (DES). Vergleiche allgemein The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 1987, Berkow et al., eds., Rahway, N.J., 1206-1228. Anti-entzündliche Wirkstoffe schließen ein, sind aber nicht limitiert auf nicht-steroide anti-entzündliche Wirkstoffe und Corticosteroide, und antivirale Wirkstoffe einschließlich aber nicht limitiert auf Ribavirin, Vidarabin, Acyclovir und Ganciclovir, können auch in Zusammensetzungen der Erfindung enthalten sein. Vergleiche allgemein The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 1987, Berkow et al., eds., Rahway, N.J., pages 2499-2506 und 46-49). Andere Nicht-Antisense chemotherapeutische Wirkstoffe liegen auch im Umfang der Erfindung. Zwei oder mehrere kombinierte Verbindungen können zusammen oder sequentiell benutzt werden.

**[0072]** In einer weiteren ähnlichen Ausführungsform können die Zusammensetzungen der Erfindung eine oder mehrere Antisense-Verbindungen, besonders Oligonukleotide, gerichtet auf eine erste Nukleinsäure sowie eine oder mehrere zusätzliche Antisense-Verbindungen, gerichtet auf ein zweites Nukleinsäureziel, enthalten. Zwei oder mehrere kombinierte Verbindungen können zusammen oder sequentiell verwendet werden.

**[0073]** Für die Formulierung der therapeutischen Zusammensetzungen und ihre nachfolgende Verabreichung wird angenommen, dass sie innerhalb des Wissensbereichs des Fachmanns liegt. Die Dosierung ist abhängig von der Schwere und der Fähigkeit zur Antwort des Krankheitszustandes, der behandelt wird, wobei der Verlauf der Behandlung von mehreren Tagen bis mehreren Monaten oder bis eine Heilung erreicht ist oder eine Verringerung des Krankheitszustandes gegeben ist, dauert. Optimale Dosierungsabläufe können aus den Messungen der Wirkstoffakkumulation im Körper des Patienten errechnet werden. Auch einfache geschulte Personen können die optimalen Dosierungen leicht bestimmen sowie die Dosierungsmethodologien und Wiederholungsraten. Optimale Dosierungen können in Abhängigkeit von der relativen Stärke der individuellen Oligonukleotide variieren und können üblicherweise auf Basis des EC<sub>50</sub>S, der in in vitro und in vivo Tiermodellen als effektiv herausgefunden wurde, bestimmt werden. Üblicherweise reicht die Dosierung von 0,01 µg bis 100 g pro kg Körpergewicht, und kann einmal oder mehrmals am Tag, in der Woche, im Monat oder im Jahr oder sogar jede zwei bis 20 Jahre gegeben werden. Fachleute mit normalem Kenntnisstand können leicht die Wiederholungsraten für die Dosierung berechnen, basierend auf gemessenen Verbleibzeiten und Konzentrationen des Wirkstoffes in Körperflüssigkeiten und Geweben. Nach erfolgreicher Behandlung kann es wünschenswert sein, den Patienten einer Nachsorgertherapie zu unterziehen, um dem Wiederauftreten des Krankheitszustandes vorzubeugen, wobei bei dieser Kur das Oligonukleotid in Nachsorgedosen verabreicht wird, die von 0,01 µg bis 100 g pro kg Körpergewicht, einmal oder mehrmals täglich bis einmal oder alle 20 Jahre reichen.

**[0074]** Obwohl die vorliegende Erfindung mit Spezifität im Einklang mit bestimmten ihrer bevorzugten Ausführungsformen beschrieben wurde, dienen die folgenden Beispiele dazu, die Erfindung zu illustrieren und sind nicht gedacht, die Erfindung zu limitieren.

## BEISPIELE

### Beispiel 1

#### Nucleosid-Phosphoramidite zur Oligonukleotid-Synthese Desoxy und 2'-Alkoxy-Amidite

**[0075]** 2'-Desoxy und 2'-Methoxy-Beta-Cyanoethylisopropyl-Phosphoramidite werden von gewerblichen Quellen gekauft (zum Beispiel Chemgenes, Needham MA oder Glen Research, Inc. Sterling VA). Andere 2'-O-Alkoxy-substituierte Nucleosid-Amidite werden wie im US-Patent 5,506,351, welches hiermit durch Referenzverweis einbezogen wird, beschrieben, hergestellt. Für Oligonukleotide, die unter der Verwendung von 2'-Alkoxy-Amiditen synthetisiert werden, wird der Standardzyklus für unmodifizierte Oligonukleotide verwendet, mit der Ausnahme, dass der Warteschritt nach der gepulsten Zugabe von Tetrazol und der Base auf 360 Sekunden erhöht wird.

**[0076]** 5-Methyl-2'-Desoxycytidin (S-Me-C) Nukleotide enthaltende Oligonukleotide werden gemäß den veröffentlichten Methoden synthetisiert (Sanghvi, et al., Nucleic Acids Research, 1993, 21, 3197-3203) unter der Verwendung von käuflich erhältlichen Phosphoramiditen (Glen Research, Sterling, VA oder ChemGenes, Needham, MA).

## 2'-Fluoramidite

## 2'-Fluorodesoxyadenosinamidite

**[0077]** 2'-Fluoro-Oligonukleotide werden wie früher (Kawasaki, et al., J. Med. Chem., 1993, 36, 831-841) und im US-Patent 5,670,633, welches hiermit durch Referenzverweis einbezogen wird, beschrieben, synthetisiert. Kurz zusammengefasst wird das geschützte Nukleosid N6-Benzoyl-2' Desoxy-2'-Fluoroadenosin unter der Verwendung von kommerziell erhältlichem 9-Beta-D-Arabinofuranosyladenin als Ausgangsmaterial und unter der Verwendung von modifizierten Literaturangaben, wobei das 2'-Alpha-Fluoratom durch einen S<sub>N</sub>2-Austausch einer 2'-Beta-Trityl-Gruppe eingeführt wird, synthetisiert. Daher ist das N6-Benzoyl-9-Beta-D-Arabinofuranosyladenin selektiv in einer moderate Ausbeute geschützt als das 3',5'-Ditetrahydropyranyl (THP) Intermediat. Die Entfernung des Schutzes der THP und N6-Benzoyl-Gruppen wird unter der Verwendung von Standardmethodologien erreicht und Standardmethoden werden dazu benutzt, die 5'-Dimethoxytrityl-(DMT) und 5'-DMT-3'-Phosphoramidit-Intermediate zu erhalten.

## 2'-Fluorodesoxyguanosin

**[0078]** Die Synthese von 2'-Desoxy-2'-Fluoroguanosin wird unter der Verwendung von Tetraisopropyldisiloxyanyl (TPDS) geschütztem 9-Beta-D-Arabinofuranosylguanin als Ausgangsmaterial erreicht, sowie durch das Überführen in das Intermediat Diisobutyryl-Arabinofuranosylguanosin. Dem Entfernen des Schutzes der TPDS Gruppe folgt der Schutz der Hydroxyl-Gruppe mit THP, um Diisobutyryl-di-THP geschütztes Arabinofuranosylguanin zu ergeben. Auf die selektive O-Deacylierung und Triflation folgt die Behandlung des Rohproduktes mit Fluorid, darauf die Entfernung des Schutzes von den THP-Gruppen. Standardmethodologien werden verwendet, um die 5'-DMT- und 5'-DMT-3'-Phosphoramidite zu erhalten.

## 2'-Fluorouridin

**[0079]** Die Synthese von 2'-Desoxy-2'-Fluorouridin wird erreicht durch die Modifizierung eines Literaturverfahrens, in welchem das 2,2'-Anhydro-1-Beta-D-Arabinofuranosyluracil mit 70%igem Wasserstoff Fluor-Pyridin behandelt wird. Standardverfahren werden verwendet, um die 5'-DMT und 5'-DMT-3'-Phosphoramidite zu erhalten.

## 2'-Fluorodesoxycytidin

**[0080]** 2'-Desoxy-2'-Fluorocytidin wird über die Aminierung von 2'-Desoxy-2'-Fluorouridin synthetisiert, gefolgt von einem selektiven Schutz um N4-Benzoyl-2'-Desoxy-2'-Fluorocytidin zu ergeben. Standardverfahren werden verwendet, um die 5'-DMT und 5'-DMT-3'-Phosphoramidite zu erhalten.

## 2'-O-(2-Methoxyethyl) modifizierte Amidite

**[0081]** 2'-O-Methoxyethyl-substituierte Nukleosidamidite wurden entweder wie folgt oder alternativ wie durch die Methode von Martin, P. (Helvetica Chimica Acta, 1995, 78, 486-504) hergestellt.

## 2,2'-Anhydro[1-(Beta-D-Arabinofuranosyl)-5-Methyluridin]

**[0082]** 5-Methyluridin (Ribosylthymin, kommerziell erhältlich von Yama, Choshi, Japan) (72,0 g, 0,279 M), Diphenylcarbonat (90,0 g, 0,420 M) und Natriumbicarbonat (2,0 g, 0,024 M) wurden zu DMF (300 ml) zugegeben. Die Mischung wurde unter Röhren zum Rückfluss erhitzt, wobei das entstehende Kohlenstoffdioxidgas in kontrollierter Art und Weise abgezogen werden konnte. Nach einer Stunde wurde die leicht dunkle Lösung unter reduziertem Druck aufkonzentriert. Der resultierende Sirup wurde unter Röhren in Diethylether (2,5 l) eingefüllt. Das Produkt formte einen Gummi. Der Ether wurde abdekantiert und der Rückstand wurde in einer minimalen Menge von Methanol (ca. 400 ml) gelöst. Die Lösung wurde im frischen Ether (2,5 l) eingebracht, um einen harten Gummi zu ergeben. Der Ether wurde abdekantiert und der Gummi wurde in einem Vakuumofen (60°C bei 1 mm HG für 24 h) getrocknet, um einen Feststoff zu ergeben, der in ein leichtes bräunliches Pulver (57 g, 85% Rohausbeute) zerdrückt wurde. Das NMR-Spektrum war mit der Struktur konsistent, kontaminiert mit Phenol als dessen Natriumsalz (ca. 5%). Das Material wurde in diesem Zustand für weitere Reaktionen so eingesetzt (oder es kann auch weiter durch Säulenchromatographie aufgereinigt werden unter der Verwendung eines Gradienten von Methanol in Ethylacetat (10-25%), um einen weißen Feststoff, Schmelzpunkt 222-4°C, zu ergeben).

## 2'-O-Methoxyethyl-5-Methyluridin

**[0083]** 2,2'-Anhydro-5-Methyluridin (195 g, 0,81 M), Tris(2-Methoxyethyl)Borat (231 g, 0,98 M) und 2-Methoxyethanol (1,2 l) wurden in einen 2 l Druckbehälter aus rostfreiem Stahl gegeben und in ein auf 160°C vorgeheiztes Ölbad überführt. Nach dem Erhitzen für 48 Stunden bei 155–160°C wurde das Gefäß geöffnet und die Lösung bis zur Trockenheit evaporiert und mit MeOH (200 ml) zerrieben. Der Rückstand wurde in heißem Aceton (1 l) suspendiert. Die unlöslichen Salze wurden filtriert, mit Aceton (150 ml) gewaschen und das Filtrat evaporiert. Der Rückstand (280 g) wurde in CH<sub>3</sub>CN (600 ml) gelöst und evaporiert. Eine Silicagelsäule (3 kg) wurde in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Aceton/MeOH (20:5:3) enthaltendem 0,5%igem Et<sub>3</sub>NH gepackt. Der Rückstand wurde in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (250 ml) gelöst und auf Silica (150 g) adsorbiert, bevor er auf die Säule geladen wurde. Das Produkt wurde mit dem Packungslösungsmittel eluiert, um 160 g (63%) des Produkts zu ergeben. Zusätzliches Material wurde durch das wiederholende Aufarbeiten von unreinen Fraktionen erhalten.

## 2'-O-Methoxyethyl-5'-O-Dimethoxytrityl-5-Methyluridin

**[0084]** 2'-O-Methoxyethyl-5-Methyluridin (160 g, 0,506 M) wurde mit Pyridin (250 ml) co-evaporiert und der getrocknete Rückstand in Pyridin (1,3 l) gelöst. Ein erstes Aliquot von Dimethoxytritylchlorid (94,3 g, 0,278 M) wurde zugegeben und die Mischung bei Raumtemperatur für eine Stunde gerührt. Ein zweites Aliquot von Dimethoxytritylchlorid (94,3 g, 0,278 M) wurde zugegeben und die Reaktion für eine weitere Stunde gerührt. Methanol (170 ml) wurde dann zugegeben, um die Reaktion abzustoppen. Die HPLC-Analyse ergab das Vorhandensein von ungefähr 70% Produkt. Das Lösungsmittel wurde evaporiert und mit CH<sub>3</sub>CN (200 ml) zerrieben. Der Rückstand wurde in CHCl<sub>3</sub> (1,5 l) gelöst und mit 2 × 500 ml gesättigtem NaHCO<sub>3</sub> und 2 × 500 ml von gesättigtem NaCl extrahiert. Die organische Phase wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und evaporiert. 275 g des Rückstands wurden erhalten. Der Rückstand wurde auf einer 3,5 kg Silicagelsäule aufgereinigt, die gepackt und mit EtOAc/Hexan/Aceton (5:5:1) enthaltendem 0,5% Et<sub>3</sub>NH eluiert wurde. Die reinen Fraktionen wurden evaporiert und ergaben 164 g des Produkts. Zusätzlich ungefähr 20 g wurden aus den unreinen Fraktionen erhalten, um eine Gesamtausbeute von 183 g (57%) zu ergeben.

## 3'-O-Acetyl-2'-O-Methoxyethyl-5'-O-Dimethoxytrityl-5-Methyluridin

**[0085]** 2'-O-Methoxyethyl-5'-O-Dimethoxytrityl-5-Methyluridin (106 g, 0,167 M), DMF/Pyridin (750 ml einer 3:1 Mischung, hergestellt aus 562 ml DMF und 188 ml Pyridin) und Essigsäureanhydrid (24,38 ml, 0,258 M) wurden vereinigt und bei Raumtemperatur für 24 Stunden gerührt. Die Reaktion wurde durch Dünnschichtchromatographie (TLC) überwacht, wobei die TLC-Probe zuerst durch die Zugabe von Methanol gequencht wurde. Nach der Vollständigkeit der Reaktion, beurteilt durch TLC, wurde MeOH (50 ml) zugegeben und die Mischung bei 35°C evaporiert. Der Rückstand wurde in CHCl<sub>3</sub> (800 ml) gelöst und mit 2 × 200 ml einer gesättigten Natriumbicarbonat und 2 × 200 ml von gesättigtem NaCl extrahiert. Die wässrigen Phasen wurden mit 200 ml CHCl<sub>3</sub> zurückextrahiert. Die kombinierten organischen Fraktionen wurden mit Natriumsulfat getrocknet und evaporiert, um 122 g Rückstand zu ergeben (ungefähr 90% Produkt). Der Rückstand wurde auf einer 3,5 kg Silicagelsäule aufgereinigt und unter der Verwendung von EtOAc/Hexan (9:1) eluiert. Reine Produktfraktionen wurden evaporiert, um 96 g (84%) zu ergeben. Zusätzlich wurden 1,5 g aus späteren Fraktionen erhalten.

## 3'-O-Acetyl-2'-O-Methoxyethyl-5'-O-Dimethoxytrityl-5-Methyl-4-Triazoluridin

**[0086]** Eine erste Lösung wurde durch das Auflösen von 3'-O-Acetyl-2'-O-Methoxyethyl-5'-O-Dimethoxytrityl-5-Methyluridin (96 g, 0,144 M) in CH<sub>3</sub>CN (700 ml) hergestellt und auf die Seite gelegt. Triethylamin (189 ml, 1,44 M) wurde zu einer Lösung von Triazol (90 g, 1,3 M) in CH<sub>3</sub>CN (1 l) zugegeben, auf –5°C gekühlt und für eine halbe Stunde unter der Verwendung eines Überkopfrührers gerührt. POCl<sub>3</sub> wurde tropfenweise über einen Zeitraum von 30 Minuten zu der gerührten Lösung, die bei 0–10°C gehalten wurde, zugegeben und die resultierende Mischung für weitere 2 Stunden gerührt. Die erste Lösung wurde tropfenweise über einen Zeitraum von 45 Minuten zur letzteren Lösung zugegeben. Die resultierende Reaktionsmischung wurde über Nacht in einem Kühlraum aufbewahrt. Salze wurden aus der Reaktionsmischung gefiltert und die Lösung wurde evaporiert. Der Rückstand wurde in EtOAc (1 l) gelöst und die unlöslichen festen Bestandteile wurden durch Filtration beseitigt. Das Filtrat wurde mit 1 × 300 ml NaHCO<sub>3</sub> und 2 × 300 ml einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und evaporiert. Der Rückstand wurde mit EtOAc zerrieben, um die im Titel genannte Verbindung zu ergeben.

## 2'-O-Methoxyethyl-5'-O-Dimethoxytrityl-5-Methylcytidin

**[0087]** Eine Lösung von 3'-O-Acetyl-2'-O-Methoxyethyl-5'-O-Dimethoxytrityl-5-Methyl-4-Triazoluridin (103 g,

0,141 M) in Dioxan (500 ml) und NH<sub>4</sub>OH (30 ml) wurde bei Raumtemperatur für 2 Stunden gerührt. Die Dioxan-Lösung wurde evaporiert und der Rückstand mit MeOH (2 × 200 ml) azeotropiert. Der Rückstand wurde in MeOH (300 ml) aufgelöst und in einen 2 l rostfreien Stahldruckbehälter überführt. Mit NH<sub>3</sub>-Gas gesättigter MeOH (400 ml) wurde zugegeben und das Reaktionsgefäß auf 100°C für zwei Stunden aufgeheizt (TLC zeigte eine komplette Umsetzung an). Die Reaktionsgefäßinhalte wurden zur Trockenheit evaporiert und der Rückstand wurde in EtOAc (500 ml) gelöst und einmal mit gesättigtem NaCl (200 ml) gewaschen. Die organischen Rückstände wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde evaporiert, um 85 g (95%) der im Titel genannten Verbindung zu ergeben.

#### N4-Benzoyl-2'-O-Methoxyethyl-5'-O-Dimethoxytrityl-5-Methylcytidin

**[0088]** 2'-O-Methoxyethyl-5'-O-Dimethoxytrityl-5-Methylcytidin (85 g, 0,134 M) wurde in DMF (800 ml) gelöst und Benzoeanhdydrid (37,2 g, 0,165 M) wurde unter Röhren zugegeben. Nach Röhren für 3 Stunden zeigte die TLC an, dass die Reaktion zu ungefähr 95% abgelaufen war. Das Lösungsmittel wurde evaporiert und der Rückstand mit MeOH (200 ml) acetotropiert. Der Rückstand wurde in CHCl<sub>3</sub> (700 ml) gelöst und mit gesättigtem NaHCO<sub>3</sub> (2 × 300 ml) und gesättigtem NaCl (2 × 300 ml) extrahiert, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und evaporiert, um einen Rückstand zu ergeben (96 g). Der Rückstand wurde auf einer 1,5 kg Silicasäule chromatographiert unter der Verwendung von EtOAc/Hexan (1:) enthaltenden 0,5% Et<sub>3</sub>NH als das eluierende Lösungsmittel. Die reinen Produktfraktionen wurden evaporiert, um 90 g (90%) der im Titel genannten Verbindung zu ergeben.

#### N4-Benzoyl-2'-O-Methoxyethyl-5'-O-Dimethoxytrityl-5-Methylcytidin-3'-Amidit

**[0089]** N4-Benzoyl-2'-O-Methoxyethyl-5'-O-Dimethoxytrityl-5-Methylcytidin (74 g, 0,10 M) wurde in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 l) gelöst. Tetrazol Diisopropylamin (7,1 g) und 2-Cyanoethoxy-Tetra-(isopropyl)Phosphit (40,5 ml, 0,123 M) wurden unter Röhren in einer Stickstoffatmosphäre zugegeben. Die resultierende Mischung wurde für 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt (TLC-Analyse ergab, dass die Reaktion zu 95% abgelaufen war). Die Reaktionsmischung wurde mit gesättigtem NaHCO<sub>3</sub> (1 × 300 ml) und gesättigtem NaCl (3 × 300 ml) extrahiert. Die wässrigen Waschschriften wurden mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>3</sub> (300 ml) zurückextrahiert und die Extrakte wurden kombiniert, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und aufkonzentriert. Der erhaltene Rückstand wurde an einer 1,5 kg Silicasäule unter der Verwendung von EtOAc/Hexan (3:1) als eluierendes Lösungsmittel chromatographiert. Die reinen Fraktionen wurden vereinigt, um 90,6 (87%) der im Titel genannten Verbindung zu ergeben.

#### 2'-(Aminooxyethyl) Nukleosidamidite und 2'-(Dimethylaminooxyethyl) Nukleosidamidite

**[0090]** Aminooxyethyl und Dimethylaminooxyethylamidite werden wie in den Methoden der US-Patentanmeldungen mit der Seriennummer 60/037, 143, eingereicht am 14. Februar 1998 und der Seriennummer 09/016,520, eingereicht am 30. Januar 1998, jetzt als US-Patent 6,127,533 zugeteilt, hergestellt, wobei jedes von diesen beiden der Anmelder zusammen mit der vorliegenden Anmeldung besitzt.

#### Beispiel 2

##### Oligonukleotid-Synthese

**[0091]** Unsubstituierte und substituierte Phosphodiester (P = O) Oligonukleotide wurden auf einem automatischen DNA-Synthesizer (Applied Biosystems Model 3808) unter der Verwendung von Standard-Phosphoramidit-Chemie mit einer Oxidation durch Jod synthetisiert.

**[0092]** Phosphorothioate (P = S) wurden wie die Phosphodiester-Oligonukleotide synthetisiert, mit der Ausnahme, dass die Standardoxidationsflasche durch eine 0,2 M Lösung von 3H-1,2-Benzodithiol-3-One 1,1-Dioxid in Acetonitril zur schrittweisen Thioatisierung der Phosphit-Bindungen ersetzt wurde. Dieser Warte-Thioatisierungsschritt wurde auf 68 Sekunden erhöht und es folgte der Capping-Schritt. Nach der Spaltung von der CPG-Säule und der Deblockierung in konzentrierter Ammoniumhydroxidlösung bei 55°C (18 Stunden) wurden die Oligonukleotide durch zweimalige Fällung mit 2-5 Volumina Ethanol aus einer 0,5 M NaCl-Lösung aufgereinigt.

**[0093]** Phosphinat-Oligonukleotide werden wie im US-Patent 5,508,270, das durch diesen Referenzverweis miteinbezogen wird, beschrieben, hergestellt.

**[0094]** Alkylphosphonat-Oligonukleotide werden wie beschrieben im US-Patent 4,469,863 hergestellt.

**[0095]** 3'-Desoxy-3'-Methylenphosphonat-Oligonukleotide werden wie im US-Patent 5,610,289 oder US-Patent 5,625,050 beschrieben hergestellt.

**[0096]** Phosphoramidit-Oligonukleotide werden wie im US-Patent 5,256,775 oder US-Patent 5,366,878 beschrieben hergestellt.

**[0097]** Alkylphosphonothioat-Oligonukleotide werden wie in den veröffentlichten PCT-Anmeldungen PCT/US94/009902 und PCT/US93/06976 (veröffentlicht als WO 94/17093 bzw. WO 94/02499) beschrieben hergestellt.

**[0098]** 3'-Desoxy-3'-Aminophosphoramidat-Oligonukleotide werden wie im US-Patent 5,476,925 beschrieben hergestellt.

**[0099]** Phosphotriester-Oligonukleotide werden wie im US-Patent 5,023,243 beschrieben hergestellt.

**[0100]** Boranphosphat-Oligonukleotide werden wie in den US-Patenten 5,130,302 und 5,177,198 beschrieben hergestellt.

### Beispiel 3

#### Oligonukleosid-Synthese

**[0101]** Methylenmethylenimino-verbundene Oligonukleoside, auch bezeichnet als MMI-verbundene Oligonukleoside, Methylendimethylhydrazo-verbundene Oligonukleoside, auch bezeichnet als MDH-verbundene Oligonukleoside und Methylencarbonylamino-verbundene Oligonukleoside, auch bezeichnet als Amid-3-verbundene Oligonukleoside und Methylenaminocarbonyl-verbundene Oligonukleoside, auch bezeichnet als Amid-4-verbundene Oligonukleoside, sowie auch Verbindungen mit gemischten Rückgraten, die zum Beispiel alternierende MMI und P = O oder P = S Bindungen aufweisen, werden wie in den US-Patenten 5,378,825, 5,386,023, 5,489,677, 5,602,240 und 5,610,289 beschrieben hergestellt.

**[0102]** Formacetal und Thioformacetal-verbundene Oligonukleoside werden wie in den US-Patenten 5,264,562 und 5,264,564 beschrieben hergestellt.

**[0103]** Ethylenoxid-verbundene Oligonukleoside werden wie im US-Patent 5,223,618 beschrieben hergestellt.

### Beispiel 4

#### PNA-Synthese

**[0104]** Peptidnukleinsäuren (PNAs) werden im Einklang mit jedem der zahlreichen Verfahren, auf die in Peptide Nucleic Acids (PNA):Synthesis, Properties and Potential Applications, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 1996, 4, 5-23, verwiesen wird, hergestellt. Sie können auch gemäß den US-Patenten 5,539,082, 5,700,922 und 5,719,262 hergestellt werden.

### Beispiel 5

#### Synthese von chimären Oligonukleotiden

**[0105]** Bei erfindungsgemäßen chimären Oligonukleotiden, Oligonukleosiden oder gemischten Oligonukleotiden/Oligonukleosiden kann es sich um mehrere verschiedene Arten handeln. Diese schließen eine erste Art, in der das „Gap“-Segment der verbundenen Nukleoside zwischen den 5' und 3', „Wing“-Segmenten der verbundenen Nukleoside positioniert ist und einen zweiten „Open end“ Typ ein, worin das „Gap“-Segment entweder am 3' oder am 5'-Ende der oligomeren Verbindung lokalisiert ist. Oligonukleotide des ersten Typs sind im Fachgebiet auch als „Gapmers“ oder gegappte Oligonukleotide bekannt. Oligonukleotide des zweiten Typs sind im Fachgebiet auch als „Hemimers“ oder „Wingmers“ bekannt.

[2'-O-Membran]--[2'-Desoxy]--[2'-O-Me] chimäre Phosphorothioat-Oligonukleotide

**[0106]** Chimäre Oligonukleotide, die 2'-O-Alkylphosphorothiat und 2'-Desoxyphosphorothioat-Oligonukleotid-

segmente besitzen, werden unter der Verwendung eines automatischen Applied Biosystems DNA-Synthesizer Modell 380B synthetisiert, wie oben beschrieben. Die Oligonukleotide werden synthetisiert unter der Verwendung des automatischen Synthesizers und 2'-Desoxy-5'-Dimethoxytrityl-3'-O-Phosphoramidit für den DNA-Anteil und 5'-Dimethoxytrityl-2'-O-Methyl-3',O-Phosphoramidit für die 5' und 3' Flügel. Der Standardsynthesezyklus wird durch das Erhöhen des Warteschritts nach der Zugabe von Tetrazol und einer Base auf 600 Sekunden abgeändert und viermal für RNA und zweimal für 2'-O-Methyl wiederholt. Das vollständig geschützte Oligonukleotid wird von der Matrix abgeschnitten und die Phosphatgruppe wird in 3:1 Ammonium/Ethanol bei Raumtemperatur über Nacht entschützt und dann zur Trockenheit lyophilisiert. Eine Behandlung in methanolischem Ammoniak für 24 Stunden bei Raumtemperatur folgt danach, um alle Basen von den Schutzgruppen zu befreien und die Probe wurde wiederum bis zur Trockenheit lyophilisiert. Das Pellet wird in 1 M TBAF in THF für 24 Stunden bei Raumtemperatur resuspendiert um die 2'-Positionen von den Schutzgruppen zu befreien. Die Reaktion wird dann mit 1 M TEAA gequencht und die Probe wird danach auf ein halbes Volumen durch einen Rotovac reduziert, bevor sie auf einer G25-Ausschlussgrößensäule entsalzt wird. Das erhaltene Oligo wird dann spektrophotometrisch zur Bestimmung der Ausbeute und durch Kapillarelektrophorese und durch Massenspektrometrie zur Bestimmung der Reinheit analysiert.

[2'-O-(2-Methoxyethyl)]-[2'-Desoxy]-[2'-O-(Methoxyethyl)] chimäre Phosphorothioat-Oligonukleotide

**[0107]** [2'-O-(2-Methoxyethyl)]-[2'-Desoxy]-[2'-O-(Methoxyethyl)] chimäre Phosphorothioat-Oligonukleotide wurden analog der obigen Prozedur für die 2'-O-Methyl chimären Oligonukleotide mit dem Austausch von 2'-O-(Methoxyethyl) Amiditen für die 2'-O-Methylamidite hergestellt.

[2'-O-(2-Methoxyethyl)Phosphodiester]-[2'-Desoxyphosphorothioat]-[2'-O-(2-Methoxyethyl)Phosphodiester] chimäre Oligonukleotide

**[0108]** [2'-O-(2-Methoxyethyl)Phosphodiester]-[2'-Desoxyphosphorothioat]-[2'-O-(2-Methoxyethyl)Phosphodiester] chimäre Oligonukleotide werden analog der obigen Prozedur für die 2'-O-Methyl chimären Oligonukleotide hergestellt, mit dem Austausch von 2'-O-(Methoxyethyl) Amiditen für die 2'-O-Methylamidite, der Oxidation mit Jod um die Phosphodiester-Internukleotiden-Verbindungen innerhalb der Flügelanteile der chimären Strukturen zu generieren und der Verschweifelung unter der Verwendung von 3,H-1,2 Benzodithiol-3-On 1,1 Dioxid (Beaucage Reagent) um die Phosphorothioat-Internukleotid-Verbindungen für den zentralen Gap-Anteil zu generieren.

**[0109]** Weitere chimäre Oligonukleotide, chimäre Oligonukleoside und gemischte chimäre Oligonukleotide/Oligonukleoside werden gemäß US-Patent 5,623,065 synthetisiert, das durch diesen Referenzverweis mit-einbezogen wird.

#### Beispiel 6

##### Oligonukleotid-Isolierung

**[0110]** Nach der Abspaltung von der kontrollierten Glasporenäsäule (Applied Biosystems) und der Entfernung der Schutzgruppen in konzentriertem Ammoniumhydroxid bei 55°C für 18 Stunden werden die Oligonukleotide oder Oligonukleoside durch zweimalige Fällung aus 0,5 M NaCl mit 2,5 Volumen Ethanol aufgereinigt. Die synthetisierten Oligonukleotide wurden durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf denaturierenden Gelen analysiert und als wenigstens 85% Vollängenmaterial beurteilt. Die in der Synthese erhaltenen relativen Mengen der Phosphorothioat- und Phosphodiester-Bindungen wurden periodisch durch  $^{31}\text{P}$  Kernspinresonanzspektroskopie kontrolliert, und für einige Studien wurden die Oligonukleotide durch HPLC wie bei Chiang et al. (J. Biol. Chem. 1991, 266, 18162-18171) beschrieben aufgereinigt. Die Ergebnisse, die mit dem durch HPLC aufgereinigten Material erhalten wurden, entsprechen denen, die mit nicht-HPLC aufgereinigten Material erhalten wurden.

#### Beispiel 7

##### Analyse der Oligonukleotid-Inhibierung der Expression von Integrin $\alpha 4$

**[0111]** Die Antisense-Modulation der Integrin  $\alpha 4$  Expression kann auf eine Vielzahl von im Feld bekannten Arten untersucht werden. Zum Beispiel kann der Integrin  $\alpha 4$  mRNA-Level quantifiziert werden, beispielsweise durch Northern Blot Analyse, kompetitive Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder Echtzeit-PCR (RT-PCR). Die quantitative Echtzeit-PCR ist derzeit bevorzugt. RNA-Analyse kann basierend auf gesamter zellulärer RNA

oder poly(A)+mRNA durchgeführt werden. Die Methoden zur RNA-Isolierung werden zum Beispiel in Ausubel, F.M. et al. Gelehrte (Current Protocols in Molecular Biology, 1993, 1, 4.1.1-4.2.9 und 4.5.1-4.5.3). Die Northern Blot Analyse ist eine Routinemethode im Feld und wird zum Beispiel in Ausubel, F.M. et al. (Current Protocols in Molecular Biology, 1996, 1, 4.2.1.-4.2.9) gelehrt. Die quantitative Echtzeit-PCR kann unter der Verwendung des käuflich erhältlichen ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System, erhältlich von PE-Applied Biosystems, Foster City, CA einfach durchgeführt werden und gemäß den Angaben des Herstellers verwendet werden. Andere PCR-Methoden sind im Feld auch bekannt.

**[0112]** Integrin α4 Proteinlevel können durch eine Vielzahl von im Feld sehr gut bekannten Arten quantifiziert werden, wie etwa der Immunpräzipitation, Western Blot Analyse (Immunoblotting), ELISA oder Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS). Gegen Integrin α4 gerichtete Antikörper können identifiziert werden und aus einer Vielzahl von Quellen erhalten werden, so wie zum Beispiel dem MSRS-Katalog von Antikörpern (Aerie Corporation, Birmingham, MI) oder können via konventionelle Antikörperherstellungsmethoden hergestellt werden. Methoden zur Herstellung von polyklonalen Antisera werden zum Beispiel in Ausubel, F.M. et al. (Current Protocols in Molecular Biology 1997, 2, 11.12.1-11.12.9) gelehrt. Die Herstellung von monoklonalen Antikörpern wird zum Beispiel in Ausubel, F.M. et al. (Current Protocols in Molecular Biology, 1997, 2, 11.4.1-11.11.5) gelehrt.

**[0113]** Immunpräzipitationsmethoden sind Standardmethoden im Feld und können zum Beispiel in Ausubel, F.M. et al. (Current Protocols in Molecular Biology, 1998, 2, 10.16.1-10.16.11) gefunden werden. Western Blot (Immunoblot) Analyse ist eine Standardmethode im Feld und kann zum Beispiel in Ausubel, F.M. et al. (Current Protocols in Molecular Biology, 1997, 2, 10.8.1-10.8.21) gefunden werden. Mit Enzymen verbundene Immuno-sorbent Versuchsanordnungen (ELISA) sind Standardmethoden im Feld und können zum Beispiel in Ausubel, F.M. et al. (Current Protocols in Molecular Biology, 1991, 2, 11.2.1-11.2.22) gefunden werden.

#### Beispiel 8

##### Antisense-Inhibierung der Expression von humanen Integrin α4

**[0114]** Im Einklang mit der vorliegenden Erfindung wurde eine Serie von Oligonukleotiden hergestellt, um auf verschiedene Regionen der humanen Integrin α4 RNA abzuzielen, unter der Verwendung von veröffentlichten Sequenzen (GenBank Accession Number L12002, hier als SEQ ID NO: 1 als Referenz miteinbezogen). Die Oligonukleotide sind in Tabelle 1 gezeigt. Die Zielstellen sind durch Nukleotidnummern angezeigt, wie sie auch in der Sequenzquellreferenz angegeben sind (GenBank Accession No. L12002), an welche das Oligonukleotid bindet. Alle Verbindungen in Tabelle 1 sind 18 Nukleotide lang, mit einem Phosphorothioat-Rückgrat und einem mittleren 10-Basen Desoxynukleotid-Gap, flankiert von 2'-Methoxyethoxy (2'MOE) Flügeln. Humane A375 Melanomazellen (American Type Culture Collection, Manassas, VA) wurden zwei Tage vor der Oligonukleotid-Behandlung mit einer Dichte von 2000 Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattiert. Die Zellen wurden mit den Oligonukleotiden bei einer Dosis von 200 nM Oligonukleotid und 6 µg/ml LIPOFECTIN für vier Stunden behandelt. Die Zellen wurden über Nacht inkubiert und mit 2 mM EDTA in PBS abgeerntet. Die Zellen wurden in 2% Rinderserumalbumin, 0,2% Natriumacid in D-PBS bei 4°C gewaschen. Die Zellen wurden bei 200 × g zentrifugiert und der Überstand wurde abgenommen. Die Proteinlevel wurden durch Flow Cytometry gemäß den veröffentlichten Methoden bestimmt (Condon and Bennett, J. Biol. Chem. 1996, 271, 30398-30403). Der spezifisch konjugierte Antikörper CD49d-FITC (Immunotech, Westbrook, Membran, Klon HP2/1) wurde mit 2 µl/Testvertiefung zugegeben und der Kontroll-IgG (Maus IgG1-FITC, PharMingen, San Diego, CA) wurde bei einer Konzentration von µg/ml zugegeben. Die Antikörper wurden mit den Zellen für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden wiederum wie oben gewaschen und dann in 0,3 ml FacsFlow Puffer mit 0,5% Formaldehyd resuspendiert. Die Zellen wurden auf einem Becton Dickinson FACScan analysiert. Die Ergebnisse sind als Prozent von Kontrollexpression basierend auf einer mittleren Fluoreszenzintensität angegeben.

**[0115]** Wie in Tabelle 1 gezeigt, ergaben die Oligonukleotide 24453, 24473, 24475, 24477 und 24451 mindestens eine 50%ige Inhibierung der Integrin α4 Proteinexpression und wurden weiteren Untersuchungen unterzogen.

#### Beispiel 9

##### Dosis-Wirkungskurven für Antisense-Oligonukleotide im Hinblick auf die Integrin α4 Proteinexpression

**[0116]** A375 Zellen wurden mit ISIS 2473, 24475, 24477 und 24451 bei Konzentrationen von 50, 100, 200

und 400 nM für 4 Stunden behandelt. Die Zellen wurden zu den Zeitpunkten 48 und 72 Stunden nach der Oligonukleotid-Behandlung mit Trypsin geerntet und mit 2 µg/ml CD49d-FITC wie im früheren Beispiel gefärbt. Die Resultate sind in Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle 1

Inhibierung der Proteinlevel von humanem Integrin α4 durch Antisense-Oligonukleotide						
ISIS #	Sequenz	Zielregion	Zielstelle	%Kontrolle	%Inhibierung	SEQID NO
24439	CTCCGTCTGCCACGC	5'-UTR	0087-0104	120	--	2
24440	CGGGTGCTCGCGCTGCTT	5'-UTR	0163-0180	101	--	3
24441	CCTGGATGCCGCGCACT	5'-UTR	0224-0241	112	--	4
24442	ATGAGGCAGCGTGTCC	5'-UTR	0315-0335	82	18	5
24443	CAAAGTTGCACGGGATGC	5'-UTR	0370-0387	63	37	6
24444	GGAACATTCAACACTAAG	AUG	0400-0417	68	32	7
24445	CCGGGTTCGCGCTCGC	coding	0443-0460	73	27	8
24446	GCGCGCTCTCAGTGTCCA	coding	0535-0552	58	42	9
24447	GTGGCTGTGCAGCACGAC	coding	0594-0611	76	24	10
24448	ACTGAAGCGTTGGCGAGC	coding	0656-0673	55	45	11
24449	GCACGTCTGGCCGGGATT	coding	0714-0731	61	39	12
24451	CCACTGATTGTCTCTCTC	coding	0789-0806	51	49	13
24452	GGATCCATTTCTCCTGG	coding	0831-0848	60	40	14
24453	GCTTATTTCATTCCTTAA	coding	0889-0906	47	53	15
24454	TTCTTTACTCAGTTCTG	coding	0949-0966	53	47	16
24455	TCACATAATCTTGATAAC	coding	0976-0993	81	19	17
24456	CCCATCACAATTAAATCC	coding	1052-1069	76	24	18
24457	TTATTTGTAGTTATATTG	coding	1112-1129	106	--	19
24458	CCTAAATAACTTCCAAAT	coding	1166-1183	88	12	20
24459	GAAAATGACCAGCTCCGA	coding	1192-1209	61	39	21
24460	TTTCATGTAAGATATTAA	coding	1300-1317	94	06	22
24461	CCACAGCACAGACAGAAC	coding	1351-1368	69	31	23
24462	TGGTGCTCTGCATGGGTG	coding	1408-1425	65	35	24
24463	TACACAAACACTCTTCCT	coding	1436-1453	101	--	25
24464	TTTGTTCATTGCATTTC	coding	1481-1498	62	38	26
24465	TGCAGCATATTTGTCACT	coding	1509-1526	63	37	27
24466	TTGTCATGTGCCAAGA	coding	1550-1567	64	36	28
24467	TCATCTTGTGGAGCT	coding	1595-1612	101	--	29
24468	CCATCTGCACGGCCATTG	coding	1637-1654	72	28	30
24469	GTCCAAACATACTTAACG	coding	1705-1722	68	32	31
24470	TATCTGCATCAATTGTC	coding	1735-1752	83	17	32
24471	ACCGAAAAGCACCAACTG	coding	1774-1791	80	20	33
24472	CTTGTCTTAGCAAGACA	coding	1802-1819	65	35	34
24473	TCAGGGTGGCTTAAAGAA	coding	1841-1858	53	47	35
24474	ATCCATTTCAACACAGT	coding	1882-1899	71	29	36
24475	GCCCTTATATGAGAAACA	coding	1929-1946	48	52	37
24476	CAATTTGAAAGAAGTCCT	stop	3527-3544	99	01	38
24477	TCCATTCTCTCAATTGAA	3'-UTR	3537-3554	43	57	39
24478	GGCGGGCTTTTCCATT	3'-UTR	3549-3566	115	--	40

Alle Oligonukleotide besitzen Phosphorothioat (P = S oder PS) Rückgrate und 2'-Methoxyethoxy (2'MOE) „Wings“, die die 2'-Desoxy Gap-Region flankieren. 2'MOE-Nukleotide sind fett gedruckt. Alle Cytosine sind 5-Methylcytosine (5meC). Die Zielstellen beziehen sich auf die Nukleotidnummern auf dem Ziel (Genbank Accession No. L12002; SEQ ID NO: 1).

Tabelle 2

Dosis-Wirkungseffekt von Antisense-Oligonukleotiden auf die Integrin $\alpha 4$ Proteinexpression							
ISIS #	Dosis (nM)	SEQID NO:	%Kontrolle	%Inhib	%Kontrolle	%Inhib	
			48 h	48 h	72h	72 h	
24451	50	13	63	37	ND	ND	
	100		44	56	ND	ND	
	200		34	66	ND	ND	
	400		44	56	ND	ND	
24453	50	15	79	21	78	22	
	100		95	05	93	07	
	200		38	62	64	36	
	400		41	59	58	42	
24473	50	35	77	23	85	35	
	100		49	51	77	23	
	200		39	61	61	39	
	400		42	58	56	44	
24475	50	37	60	40	69	31	
	100		31	69	44	56	
	200		30	70	ND	ND	
	400		39	61	52	48	
24477	50	39	56	44	72	28	
	100		47	53	67	33	
	200		34	66	44	56	
	400		35	65	53	47	

## Beispiel 10

Dosis-Wirkungskurven für den Effekt von Antisense-Oligonukleotiden auf die Integrin  $\alpha 4$  Proteinexpression

[0117] Eine zusätzliche Serie von Oligonukleotiden wurde auf Effekte auf die Integrin  $\alpha 4$  Proteinexpression getestet und mit den aktiven Verbindungen der vorherigen Reihenuntersuchung verglichen. Diese Oligonukleotide sind auf eine Integrin  $\alpha 4$  Promotorensequenz gerichtet (Rosen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 1991, 88, 4094-4098; GenBank Accession No. M62841, hier als SEQ ID NO: 41 angegeben). Diese Oligonukleotide sind in Tabelle 3 gezeigt und ihre Effekte auf die Integrin  $\alpha 4$  Proteinexpression sind in Tabelle 4 gezeigt. Wo Rückgrate gemischt sind, sind die Verbindungen als „s“ für Phosphorothioate (P = S oder PS) und „o“ für Phosphodiester (P = O oder PO) angegeben. Wo als Zielregion „M62841.“ angegeben ist, sind die Oligonukleotide auf die Promotor-Region, dessen Sequenz in GenBank Accession No. M62841 beschrieben ist, gerichtet. Die verbleibenden Oligonukleotide sind auf die in GenBank Accession No. L12002 beschriebene Sequenz gerichtet und ihre Zielstellen in der L12002-Sequenz sind angegeben.

[0118] Eine Maus-Sequenz (SEQ ID NO: 47) ist zum Vergleich eingefügt. Sie ist auf dieselbe mRNA-Region wie die humane Sequenz 27104 (die kodierende Region genau abwärts vom AUG-Kodon) gerichtet und enthält 3 nicht passende Basen mit der humanen Ziel-mRNA.

Tabelle 3

Zusätzliche auf humanes Integrin $\alpha 4$ gerichtete Oligonukleotide						
ISIS #	Sequenz	Chemie	Zielregion	Zielstelle	SEQ ID NO	
24475	GCCCTTATATGAGAAACA	PS; 2' MOE/ deoxy; All 2' MOE C's are 5 meC	coding	1929-1946	37	
24739	TTTAGTGACAAAGACGTTAT	PS; deoxy	M62841	0409-0428	42	
24740	GAAGGGCCCTGGGAAACATT	PS; deoxy	M62841	0428-0447	43	
24741	AGACGTTATGGCTATTCTCT	PS; deoxy	M62891	0398-0417	44	
24742	TTTAGTGACAAAGACGTTAT	PS; 2'MOE; all C = 5meC	M62841	0409-0428	42	
24743	GAAGGGCCCTGGGAAACATT	PS; 2'MOE; all C = 5meC	M62841	0428-0447	43	
24744	AGACGTTATGGCTATTCTCT	PS; 2'MOE; all C = 5 meC	M62841	0398-0417	44	
26643	TTGCCCTTATATGAGAAACA	PS; 2' MOE; all C = 5 meC	coding	1929-1948	45	
27104	CCCAAGCCATGCGCTCTCGG	PS/2'MOE; all C = 5 meC	human coding	0421-0440	46	
27108	CoCoCoAsAsGsCsCsAsTs GsCsGoCoToCoToCoGoG	PO/PS; 2' MOE/deoxy; All C= 5meC	human coding	0421-0440	46	
17044 mouse	CCGCAGCCATGCGCTCTTGG	PS; 2' MOE/ deoxy; All 2' MOE C's are 5 meC	mouse coding		47	
27109 mouse	CoCoGoCsAsGsCsCsAsTs GsCsGoCoToCoToToGoG	PO/PS; 2' MOE/deoxy;	All C= 5meC	mouse coding	47	

Tabelle 4

Dosis-Wirkungskurven für den Effekt von Antisense-Oligonukleotiden auf die Proteinexpression von humanem Integrin α4					
ISIS #	Oligo. Konzen- tration (nM)	%Kontrolle	%Inhibition	SEQ ID NO	
24475	10	97	03	37	
	30	73	27		
	100	84	16		
	300	55	45		
24739	10	69	31	42	
	30	67	33		
	100	121	--		
	300	107	--		
24740	10	122	--	43	
	30	119	--		
	100	106	--		
	300	88	12		
24741	10	109	--	44	
	30	113	--		
	100	125	--		
	300	127	--		
24742	10	112	--	42	
	30	107	--		
	100	123	--		
	300	128	--		
24743	10	96	04	43	
	30	121	--		
	100	117	--		
	300	105			
24744	10	121	--	44	
	30	110	--		
	100	118	--		
	300	118	--		
26643	10	90	10	45	
	30	95	05		
	100	93	07		
	300	66	34		
27104	10	69	31	46	
	30	64	36		
	100	49	51		
	300	39	61		
17044 mouse	10	86	14	47	
	30	73	27		
	100	60	40		
	300	58	42		
27108	10	69	31	46	
	30	95	05		
	100	64	36		
	300	49	51		
27109	10	109	--	47	
	30	114	--		
	100	77	23		
	300	55	45		

In diesem Versuch zeigten die Oligonukleotide 24475, 27104 und 27108 eine 40%ige oder größere Inhibition und sind bevorzugt. Die auf Maus-Integrin  $\alpha 4$  gerichtete Oligonukleotid-Sequenz (SEQ ID NO: 47), die nur drei nicht passende Basen mit dem humanen Zielgen hat, zeigte auch über 40%ige Inhibition bei der höchsten Dosis.

## Beispiel 11

Untersuchung auf die Inhibition von Integrin  $\alpha 4$  Proteinlevels

**[0119]** Die neuen Oligonukleotide 26640, 26641, 26642 und 26644 wurden synthetisiert und mit den früher getesteten Oligonukleotiden verglichen. Die Oligonukleotide sind in Tabelle 5 gezeigt und ihr Effekt auf die Integrin  $\alpha 4$  Proteinlevels ist in Tabelle 6 gezeigt. Die Zielstellen beziehen sich auf die Nukleotid-Nummern auf der Zielsequenz (GenBank Accession No. L12002), mit welcher die Oligonukleotide hybridisieren.

Tabelle 5

<b>Zusätzliche auf humanes Integrin <math>\alpha 4</math> gerichtete Oligonukleotide</b>					
<b>ISIS #</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Chemie</b>	<b>Zielregion</b>	<b>Zielstelle</b>	<b>SEQ ID NO</b>
26640	CCACTGATTGTCTCTCTCTT	PS; 2'MOE/deoxy; All C= 5meC	coding	0789-0806	13
26641	GAGCTTATTTCTATTCTTA	PS; 2'MOE/deoxy; All C= 5meC	coding	0889-0906	15
26642	TCAGGGTGGCTAAAGAAGC	PS; 2'MOE/deoxy; All C= 5meC	coding	1841-1858	35
26644	TTTCCATTCTCTCAATTGAA	PS; 2'MOE/deoxy; All C= 5meC	3'-UTR	3537-3554	37

Tabelle 6

Dosis-Wirkungskurven für den Effekt von Antisense-Oligonukleotiden auf die Proteinexpression von humanem Integrin $\alpha 4$					
ISIS #	Oligo. Konzentration (nM)	%Kontrolle	%Inhibition	SEQ ID NO	
27104	10	84	16	46	
	30	82	18		
	100	59	41		
	300	37	63		
17044	10	97	03	47	
	30	84	16		
	100	68	32		
	300	39	61		
24451	10	96	04	13	
	30	77	23		
	100	66	34		
	300	35	65		
26640	10	91	09	13	
	30	83	17		
	100	62	38		
	300	35	65		
24453	10	88	12	15	
	30	90	10		
	100	80	20		
	300	43	57		
26641	10	88	12	15	
	30	85	15		
	100	67	33		
	300	31	69		
24473	10	103	--	35	
	30	92	08		
	100	81	19		
	300	47	53		
26642	10	84	16	35	
	30	77	23		
	100	56	44		
	300	23	77		
24477	10	83	17	39	
	30	80	20		
	100	63	37		
	300	33	67		
26644	10	99	01	39	
	30	94	06		
	100	78	22		
	300	48	52		

In diesem Versuch zeigten die Oligonukleotide 27104, 24451, 26640, 24453, 26641, 24473, 26642, 2447 und 26644 eine 40%ige oder größere Inhibition und sind bevorzugt. Die auf Maus-Integrin  $\alpha 4$  gerichtete Oligonukleotid-Sequenz (SEQ ID NO: 47), die nur in drei Basen nicht mit dem humanen Zielgen übereinstimmt, zeigte auch eine über 40%ige Inhibition bei der höchsten Dosierung.

## Beispiel 12

Antisense-Inhibition von muriner Integrin  $\alpha 4$  mRNA-Expression in Maus P388D (IL-1) Zellen

**[0120]** Weil viele Zustände, von denen man glaubt, dass sie durch auf Integrin  $\alpha 4$  gerichtete Antisense-Oligonukleotide deutlich verbessert werden könnten, nicht zugänglich für Studien in Menschen sind, wurde eine Serie von Oligonukleotiden hergestellt, um auf das murine Integrin  $\alpha 4$  abzuzielen, unter Verwendung der veröffentlichten Sequenz von De Miersman et al., (DNA Cell Biol. 1994, 13: 743-754; GenBank Accession No: L20788, hier offenbart als SEQ ID NO: 48). Diese Oligonukleotide sind in Tabelle 7 gezeigt. Die fett gedruckten Nukleotid-Basen sind 2'-Methoxyethoxy (2'MOE); die verbleibenden Positionen sind 2'Desoxy. Die Zielstellen beziehen sich auf die erste Nukleotid-Position auf dem Ziel (GenBank Accession No. L20788), an welches das Oligonukleotid bindet.

**[0121]** Die Oligonukleotide wurden ursprünglich in murinen P388D (IL-1) makrophagischen Zellen (American Type Culture Collection, Manassas VA) für 4 Stunden bei einer Oligonukleotid-Konzentration von 100 nM in 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Lipofectin untersucht. Die Zellen wurden geerntet und die RNA wurde durch zelluläre Lyse unter der Verwendung von Catrimox-14 Lösung (Iowa Biotechnology Corp., Oakdale IA. Dahle, C.E. and Macfarlane, D.E., Bio Techniques 1993, 15, 1-4) aufgereinigt. Die RNA wurde elektrophoretisch auf einem 1%igen Agarose/1,1%igen Formaldehydgel mit 18  $\mu\text{g}$  RNA pro Spur geladen aufgereinigt. Die Integrin  $\alpha 4$  Sonde war ein PCR-gelabeltes 1025-Basen Integrin  $\alpha 4$  Fragment (Positionen 3681-4706), das durch RT-PCR gemäß der Methode von Bednarczuk et al. (Biotechniques 1991 10, 478) hergestellt worden war. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Tabelle 8 gezeigt.

Tabelle 7

Auf murines Integrin $\alpha 4$ gerichtete Antisense-Oligonukleotide					
ISIS #	Sequenz	Chemie	Zielregion	Zielstelle	SEQ ID NO
15600	CACGCCCGTTCTGTGGCC	PS; 2'-MOE, All C = 5meC	5' cap	0952-0971	49
15601	CACGCCCGTTCTGTGGCC	PO; 2'-MOE, All C = 5meC	5' cap	0952-0971	49
15602	CACGCCCGTTCTGTGGCC	PS; DNA	5' cap	0952-0971	49
15603	GGATGCTTCAGGCTCTGGCC	PS; DNA	5' UTR	0972-0991	50
15604	GGAGCGATCGTAGTGGCCAG	PS; DNA	5' UTR	0992-1011	51
15605	CCGGTGCTGGCAGGCGACAG	PS; DNA	5' UTR	1061-1080	52
15606	GATGAAGTGCAGCAGCGTGT	PS; DNA	5' UTR	1081-1100	53
15607	GGCCACTGACCAGAGTTGCA	PS; DNA	5' UTR	1141-1160	54
15608	CCGCAGCCATGCGCTTTGG	PS; DNA	AUG	1183-1202	47
15609	CACCTCGCTTCCGCAGCCAT	PS; DNA	AUG	1193-1212	55

Tabelle 8

Antisense Inhibition von muriner Integrin $\alpha 4$ mRNA Expression				
ISIS No.	%Kontrolle	%Inhibierung	SEQ ID NO	
15600	93	07	49	
15601	60	40	49	
15602	48	52	49	
15603	38	62	50	
15604	134	--	51	
15605	84	16	52	
15606	72	28	53	
15607	26	74	54	
15608	16	84	47	
15609	07	93	55	

Wie in Tabelle 8 gezeigt waren das auf den 5'UTR gerichtete ISIS 15607 und ISIS 15608 und 15609, die beide auf das Translationsinitiations-Kodon gerichtete sind, am aktivsten in diesem Versuch. Dosis-Wirkungskurven für ISIS 15607, 15608 und 15609 sind in Tabelle 9 gezeigt. Die Ergebnisse sind Durchschnittswerte von Proben in Duplikaten.

Tabelle 9

Antisense Inhibition von muriner Integrin $\alpha 4$ mRNA Expression – Dosis-Wirkungen				
ISIS No.	Oligo Konzentr.(nM)	%Kontrolle	%Inhibierung	SEQ ID NO
15607	12.5	78	22	54
	25	67	33	
	50	50	50	
	100	55	45	
15608	12.5	59	41	47
	25	29	71	
	50	23	77	
	100	39	61	
15609	12.5	54	46	55
	25	24	76	
	50	28	72	
	100	57	43	

Beispiel 13

#### Antisense-Inhibition von muriner Integrin $\alpha 4$ Proteinexpression

**[0122]** Murine IC-21 makrophagische Zellen (American Type Culture Collection, Manassas, VA) wurden für weitere Studien benutzt. Zusätzliche Oligonukleotide wurden hergestellt, um auf das Maus-Integrin  $\alpha 4$  abzutunen. Diese sind in Tabelle 10 gezeigt; alle 2'MOE Nukleotide sind in fett gedruckter Schrift gezeigt und die verbleibenden Positionen sind 2'Deoxy. Alle 2'-MOE-Cytosine in diesen Verbindungen sind 5'Methylcytosine. IC-21 Zellen wurden mit einer Dichte von  $5 \times 10^4$  Zellen/Vertiefung in Schalen mit 24 Vertiefungen zwei Tage vor dem Versuch ausgesät. Die Zellen wurden mit 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  LIPOFECTIN für 4 Stunden mit 25 nM Oligonukleotid behandelt. Die Vertiefungen wurden pro Versuch in Triplikaten benutzt. Die Zellen wurden mit 2 mM EDTA nach 20 Stunden geerntet und durch Flow Cytometry wie in Beispiel 8 beschrieben analysiert, unter der Verwendung von CD49d-Phycoerythrin (CD49d-PE) Antikörperkonjugat (Klon R1-2) und Ratten IgG2B-PE als Kontrolle. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 gezeigt.

Tabelle 10

Antisense Oligonukleotide gerichtet auf murines Integrin α4					
ISIS #	Sequenz	Chemie	Zielregion	Zielstelle	SEQ ID NO
15607	GGCCACTGACCAGAGTTGCA	PS; 2' deoxy	5' UTR	1141-1160	54
16477	CGGACCACTGACCAGAGTTGCA	PS; 2' deoxy	scrambled		56
16428	GGCCACTGACCAGAGTTGCA	PS; 2' MOE/deoxy	5' UTR	1141-1160	54
16429	GGCCACTGACCAGAGTTGCA	PS; 2' MOE/deoxy	5' UTR	1141-1160	54
16930	GGCCACTGACCAGAGTTGCA	PS; 2' MOE/deoxy	5' UTR	1141-1160	54
15608	CCGCAGCCATGCGCTTCTGG	PS; DNA	AUG	1183-1202	47
16478	GCCGACACCCGTTGCGCTTGG	PS; DNA	scrambled		57
16431	CCGCAGCCATGCGCTTCTGG	PS; 2' MOE/deoxy	AUG	1183-1202	47
16432	CCGCAGCCATGCGCTTCTGG	PS; 2' MOE/deoxy	AUG	1183-1202	47
16433	CCGCAGCCATGCGCTTCTGG	PS; 2' MOE/deoxy	AUG	1183-1202	47
15609	CACCTCGCTTCCGCAGCCAT	PS; DNA	AUG	1193-1212	55
16479	ACCTCCTCGCTCACGCGCTA	PS; DNA	Scrambled		58
16434	CACCTCGCTTCCGCAGCCAT	PS; 2' MOE/deoxy	AUG	1183-1202	47
16435	CACCTCGCTTCCGCAGCCAT	PS; 2' MOE/deoxy	AUG	1183-1202	47
16436	CACCTCGCTTCCGCAGCCAT	PS; 2' MOE/deoxy	AUG	1183-1202	47
16437	CGCTTCCGCAGCCATGCGCT	PS; 2 MOE/deoxy	AUG	1188-1207	59

Alle 2'MOE-Cytosine in Tabelle 10 sind 5-Methylcytosine.

Tabelle 11

Inhibition der Integrin α4 Proteinexpression durch Antisense Oligonukleotide			
ISIS No.	%Kontrolle	%Inhibierung	SEQ ID NO
15607	82	18	54
16477	96	04	56
16428	67	33	54
16429	60	40	54
16430	50	50	54
15608	63	37	47
16478	92	08	57
16431	35	65	47
16432	53	47	47
16433	23	77	47
15609	57	43	55
16479	96	04	58
16434	33	67	47
16435	30	70	47
16436	47	53	47
16437	36	64	59

**[0123]** ISIS 16430, 16431, 16433, 16434, 16435, 16436 und 16437 ergaben eine besser als 50%ige Inhibition in diesem Versuch und sind bevorzugt.

**[0124]** Die Dosis-Wirkungen für den Effekt von ISIS 16431 und 16433 auf die Integrin α4 Proteinlevel sind in Tabelle 12 gezeigt. Die Zellen (in Triplikaten) wurden mit einer Dichte von  $2,5 \times 10^4$  Zellen/Vertiefung in 24-Vertiefungs-Platten einen Tag vor der Behandlung ausgesät. Die Oligonukleotid-Konzentrationen lagen bei 0,2, 1, 5, 25 und 50 nM in 3 µg/ml LIP OFECTIN. Die Zellen wurden durch die Behandlung mit 2 mM EDTA für 4 Minuten geerntet, danach wurde 1 ml einer 2%igen BSA, 0,2%igen Azid-Lösung pro Inhalt jeder Vertiefung zugegeben. Die Proteinlevel wurden durch Flow Cytometry wie in Beispiel 8 beschrieben analysiert, unter der

Verwendung von CD49d-PE-Antikörperkonjugat mit 2 µg/ml und Ratten IgG2B mit 2 µg/ml als Kontrolle. Für ISIS 16431 und 16433 wurden IC50-Werte von ungefähr 1 nM für die Integrin α4 Proteininhibition gefunden.

Tabelle 12

<b>Dosis-Wirkungseffekt von 16431, 16433 auf Integrin α4 Proteinlevel</b>					
<b>ISIS #</b>	<b>Dosis (nM)</b>	<b>%Kontrolle</b>	<b>%Inhibierung</b>	<b>SEQ ID NO</b>	
16431	0.2	82	18	47	
	1	57	43		
	5	34	66		
	25	32	68		
	50	30	70		
16433	0.2	85	15	47	
	1	62	38		
	5	37	63		
	25	20	80		
	50	30	70		
16478	5	95	05	57	
	25	87	13		
	50	84	16		

[0125] Ein weiteres Dosis-Wirkungsexperiment in Bezug auf ISIS 16433 wurde mit eingefügten Zufallskontrollen durchgeführt. IC-21 Zellen wurden mit 0,3, 1, 3, 10 und 30 nM Oligonukleotid mit 3 µg/ml LIPOFECTIN für 4 Stunden behandelt. Die Zellen wurden für 24 Stunden inkubiert, mit Trypsin geerntet, gefärbt mit 2 µg/ml CD49d-PE und Ratten IgG2B wie in den früheren Beispielen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 gezeigt. Für ISIS 16433 bei einer Konzentration von 30 nM wurde eine Inhibition des Proteinlevels bis unter die basalen Level gefunden.

Tabelle 13

<b>Dosis-Wirkungseffekt von 16431, 16433 auf Integrin α4 Proteinlevel</b>					
<b>ISIS No.</b>	<b>Oligo Konzentr.(nM)</b>	<b>%Kontrolle</b>	<b>%Inhibierung</b>	<b>SEQ ID NO</b>	
16433	0.3	89	11	47	
	1	68	32		
	3	25	75		
	10	03	97		
	30	-14	(100)		
16478	0.3	137	--	57	
	1	131	--		
	3	127	--		
	10	130	--		
	30	108	--		

[0126] Ein weiteres Dosis-Wirkungsexperiment wurde durchgeführt, um den IC50-Wert von ISIS 16433 für die Inhibition der Integrin α4 RNA zu bestimmen. IC-21-Zellen wurden in Duplikaten mit ISIS 16433 bei 6,25, 12,5, 25 oder 50 nM mit 3 µg/ml LIPOFECTIN behandelt.

[0127] RNA wurde mit dem Qiagen QiaShredder/RNEASY™ Kit gemäß den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Sonden wurden unter der Verwendung eines Prime-a-Gene Kits (Promega, Madison, WI) zufällig geprimed. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 gezeigt. Für ISIS 16433 konnte ein IC50-Wert von ungefähr 10 nM für die Integrin α4 RNA-Reduktion gezeigt werden.

Tabelle 14

<b>Dosis-Wirkungseffekt von ISIS 16433 auf Integrin α4 RNA-Level</b>					
<b>ISIS No.</b>	<b>Oligo Dosis (nM)</b>	<b>Prozent der Kontrolle</b>	<b>Prozent Inhib</b>	<b>SEQ ID NO</b>	
16433	6.25	59	41	47	
	12.5	46	44		
	25	28	72		
	50	43	57		
16478	6.25	75	25	57	
	12.5	60	40		
	25	24	76		
	50	26	74		

Beispiel 14

Zusätzliche Antisense-Oligonukleotide gerichtet auf murines Integrin α4-Optimierung

**[0128]** Zusätzliche Oligonukleotide mit der ISIS 16433 Sequenz (SEQ ID NO: 47, gerichtet auf das Translationsinitiations-Kodon) wurden synthetisiert, um die Rückgratchemie und die Stelle des 2'Methoxyethoxy-Gaps zu optimieren. Diese Verbindungen wurden auf ihre Fähigkeit getestet, die Integrin α4 Proteinexpression zu inhibieren. Verbindungen und Ergebnisse sind in Tabellen 15 und 16 gezeigt. Für ISIS 17044 wurde eine Reduktion der Integrin α4 Expression bis unterhalb der Ausgangslevel gefunden und dieses Oligonukleotid wurde für weitere Untersuchungen in Tiermodellen von Krankheiten ausgewählt.

Tabelle 15

<b>Optimierung der Oligonukleotide mit der SEQ ID NO: 47</b>		
<b>ISIS No.</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Chemie</b>
17044	CCGCAGCCATGCGCTTTGG	All PS; 2' MOE/deoxy; All 2' MOE C's are 5 meC
17045	CCGCAGCCATGCGCTTTGG	All PS; 2' MOE/deoxy; All 2' MOE C's are 5 meC
17046	CCGCAGCCATGCGCTTTGG	All PS; 2' MOE/deoxy; All 2' MOE C's are 5 meC
17047	CCGCAGCCATGCGCTTTGG	All PS; 2' MOE/deoxy; All 2' MOE C's are 5 meC
17160	CoCsGsCsAsGsCsCsAsTsGsCsGoCoToCoToToGoG	PO/PS; All 2'MOE; 5meC at positions 1,2,19,16
16433	CCGCAGCCATGCGCTTTGG	All PS; 2' MOE/deoxy; All 2' MOE C's are 5 meC
17048	GCCGACACCCGTTCGTCGG (scrambled control; SEQ ID NO: 57)	All PS; 2' MOE/deoxy; All 2' MOE C's are 5 meC

Internukleosid-Rückgrat. Bindungen sind einheitlich P = S außer für ISIS 17160. „o“ zeigt eine Phosphodiester (P = O) Bindung und „s“ zeigt eine Phosphorothioat (P = S) Bindung an.

Tabelle 16

Dosis-Wirkung für die Optimierung der Oligonukleotide mit SEQ ID NO: 47					
ISIS No.	Oligo Konz (nM)	% Kontrolle	%Inhibition	SEQ ID NO	
17044	0.3	100	0	47	
	1	81	19		
	3	32	68		
	10	-9	>100		
17045	0.3	109	--	47	
	1	65	35		
	3	34	66		
	10	12	88		
17046	0.3	161	--	47	
	1	123	--		
	3	125	--		
	10	75	25		
17047	0.3	132	--	47	
	1	107	--		
	3	77	23		
	10	36	67		
17160	0.3	165	--	47	
	1	140	--		
	3	144	--		
	10	160	--		
16433	0.3	146	--	47	
	1	94	06		
	3	64	36		
	10	02	98		
17048 (control)	0.3	159	--	57	
	1	159	--		
	3	150	--		
	10	119	--		

## Beispiel 15

Das experimentelle autoimmune Encephalomyelitis (EAE) Modell in Maus für die Multiple Sklerose

**[0129]** Die experimentelle autoimmune Encephalomyelitis (EA) ist eine entzündliche, demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems, die häufig als Tiermodell für die Multiple Sklerose benutzt wird. Sie ist in genetisch empfänglichen Tieren induzierbar durch die Immunisierung mit Homogenisat des gesamten Rückenmarks oder Proteinkomponenten der Myelinscheide so wie dem Myelin-basischen Protein (MBP) oder dem Proteolipid-Protein (PLP) oder durch den Transfer von MBP- oder PLP-spezifischen T-Zellen. Myers et al., J. Immunol. 1993, 151, 2252-2260.

**[0130]** CSJLF-1 Mäuse (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) wurden mit dem p13 Peptid (HS-LGKWLGH-PDKF-Amid, synthetisiert durch Research Genetics, Huntsville, AL, SEQ ID NO: 60) immunisiert, das den Resten 139-151 von PLP entspricht und in diesen Mäusen encephalitogenisch ist. Die Mäuse wurden im Wesentlichen wie in Myers et al. (J. Neuroimmunology 1992, 41, 1-8) beschrieben immunisiert. Kurz zusammengefasst wurde den Mäusen in die Hinterpfoten und den Steg des Schwanzes 50-100 µg des p13 Peptids als Emulsion in CFA (Difco, Detroit, MI), verstärkt mit 4 mg/ml von Hitze-abgetötetem H37Ra Mycobacterium tuberculosis Bakterien (Difco), injiziert. Zum Zeitpunkt der Pfoteninjektionen und wiederum 2 Tage danach wurde den Mäuse auch intravenös 500 ng des Pertussis Toxins injiziert (Sigma, St. Louis, MO).

**[0131]** Die Mäuse wurden mit dem Antisense-Oligonukleotid ISIS 17044 bei verschiedenen Dosen beginnend

einen Tag vor der p13-Immunisierung behandelt, außer wo es anders angezeigt ist. Das Oligonukleotid war in einer 0,9%igen Salzlösung formuliert und wurde täglich durch subkutane Injektion verabreicht, wobei die Dosierungen solange anhielten, bis mehr als 50% der p13-immunisierten Gruppe, aber nicht der Salzlösung-behandelten Gruppe, Anzeichen von Krankheit zu zeigen begannen. Die Dosierung wurde dann beendet und die Mäuse wurden auf Effekte der Behandlung während des Krankheitsverlaufs hin beobachtet. Die Schwere der Krankheit wurde auf einer Skala von 0 bis 5 aufgezeichnet, mit 0 = keine Symptome, 1 = schlaffer Schwanz, 2 = Schwäche in den hinteren Gliedmaßen, 3 = Paralyse der hinteren Gliedmaßen, 4 = Paralyse der hinteren und vorderen Gliedmaßen und 5 = sterbend oder tod. Die Zeit bis zum Krankheitsausbruch wurde auch gemessen und mit den p13-immunisierten Kontrollmäusen verglichen, die eine Salzlösung anstelle des Oligonukleotids erhalten hatten.

#### Beispiel 16

##### EAE Experiment 1

**[0132]** Die Mäuse wurden mit ISIS 17044 wie in Beispiel 15 beschrieben behandelt, mit täglichen Dosen, die von 1 mg/kg bis 20 mg/kg reichten, injiziert subkutan (SC). Der mittlere Höchststand der Schwere der Krankheit und die durchschnittliche Anzahl von Tagen bis zum Krankheitsausbruch wurden gemessen und sind in Tabelle 17 gezeigt.

Tabelle 17

<b>EAE Experiment 1 – Effekte von ISIS 17044 auf EAE</b>			
<b>Gruppe</b>	<b>Krankheitsvorfall</b>	<b>Höchststand der Krankheit</b>	<b>Tage zum Ausbruch</b>
Saline	6/7	1.57	14.5
17044 20mg/kg	5/7	1.43	15
17044 10mg/kg	4/7	2.0	12.75
17044 5mg/kg	6/7	1.86	17
17044 1mg/kg	4/7	0.29	17,25

Wie gezeigt, reduzierte 17044 die Schwere der Krankheit oder verzögerte den Ausbruch der Krankheit.

#### Beispiel 17

##### EAE Experiment 2

**[0133]** Die Mäuse wurden mit ISIS 17044 wie in Beispiel 15 beschrieben behandelt, mit täglichen Dosierungen, die von 0,3 mg/kg bis 3 mg/kg reichten, subkutan injiziert und 1 mg/kg zu Vergleichszwecken intravenös injiziert. Der mittlere Höchstwert der Schwere der Krankheit und die durchschnittliche Anzahl von Tagen bis zum Ausbruch der Krankheit wurden gemessen und sind in Tabelle 18 gezeigt.

Tabelle 18

<b>EAE Experiment 2 – Effekte von ISIS 17044 auf EAE</b>				
<b>Gruppe</b>	<b>Krankheitsvorfall</b>	<b>Höchststand der Krankheit</b>	<b>Tage zum Ausbruch</b>	
Saline	7/7	2/43	13.7	
17044 3mg/kg SC	7/7	2.29	16.4	
17044 1mg/kg SC	4/7	1.0	18.25	
17044 0.3mg/kg SC	7/7	2.14	16.57	
17044 1mg/kg IV	5/7	1.42	17,2	

Wie gezeigt, reduzierte 17044 die Schwere der Krankheit und verzögerte den Ausbruch der Krankheit bei allen Konzentrationen.

Beispiel 18

## EAE Experiment 3

[0134] Die Mäuse wurden mit ISIS 17044 wie in Beispiel 15 beschrieben behandelt, mit täglichen Dosierungen, die von 0,5 mg/kg bis 2,0 mg/kg reichten, subkutan injiziert (SC). Eine dreiwöchige Dosierungskur wurde auch getestet und eine Zufallskontrolle (ISIS 17614, GCCGACACCGTTCTCGGG, 2'MOE/Desoxy; P = S; SEQ ID NO: 57) wurde auch getestet. Die Schwere der Krankheit und die Zeit bis zum Ausbruch der Krankheit wurden gemessen und sind in Tabelle 19 gezeigt.

Tabelle 19

<b>EAE Experiment 3 – Effekte von ISIS 17044 auf EAE</b>				
<b>Gruppe</b>	<b>Krankheitsvorfall</b>	<b>Höchststand der Krankheit</b>	<b>Tage zum Ausbruch</b>	
Saline	7/7	2.29	15.14	
17044 2 mg/kg	2/6	0.83	20	
17044 1,5 mg/kg	4/7	1.5	17.5	
17044 1.0 mg/kg	4/5	1.5	19.25	
17099 0.5 mg/kg	5/6	1.5	21.4	
17044 1mg/kg 3Xwöchent.	6/7	1.0	20.3	
17614 1 mg/kg	7/7	2.14	16.86	

Wie gezeigt, reduzierte 17044 die Schwere der Krankheit oder verlangsamte den Anfang der Krankheit.

Beispiel 19

## EAE Experiment 4-prophylaktische vs. therapeutische Dosierung

[0135] Die Mäuse wurden mit ISIS 17044 wie in Beispiel 15 beschrieben behandelt, mit täglichen Dosierungen von 0,01 mg/kg bis 2,0 mg/kg, subkutan injiziert (SC). Das zufällige Kontroll-Oligonukleotid, ISIS 17614, wurde auch mit 2 mg/kg getestet. Eine 1 mg/kg tägliche Dosis, therapeutisch gegeben, wurde auch getestet. Bei diesem Behandlungsschema begann die Oligonukleotid-Behandlung am Tag 18, nachdem die Tiere Symptome von Paralyse zu zeigen begonnen hatten und wurde fortgesetzt bis Tag 31. Die Schwere der Krankheit und die Zeit bis zum Ausbruch der Krankheit wurden gemessen und sind in Tabelle 20 gezeigt.

Tabelle 20

<b>EAE Experiment 4 – Effekte von ISIS 17044 auf EAE – therapeutische (T) vs. prophylaktische (P) Kur</b>			
<b>Gruppe</b>	<b>Krankheitsvorfall</b>	<b>Höchststand der Krankheit</b>	<b>Tage zum Ausbruch</b>
Saline	6/7	3.29	16
17044 2.0mg/kg SC(P)	7/7	2.29	16.71
17044 1.0mg/kg SC(P)	5/5	2.2	15
17044 0.1mg/kg SC(P)	7/7	1.57	16.29
17044 0.01mg/kg(P)	6/7	1.86	13.83
17044 1 mg/kg (T)	6/6	1.83	13.3
17614 2 mg/kg SC(control)	7/7	1.86	14.14

Wie gezeigt, reduzierte 17044 die Schwere der Krankheit, wenn es therapeutisch gegeben wurde (für die Zeit bis zum Ausbruch der Krankheit wird nicht erwartet, dass sie erhöht ist, da die Dosierung erst nach dem Ausbruch der Krankheit beginnt).

Beispiel 20

#### EAE Experiment 5-prophylaktische vs. therapeutischer Dosierung

**[0136]** Die Mäuse wurden mit ISIS 17044 wie in Beispiel 15 beschrieben behandelt, mit täglichen Dosierungen von 0,01/kg bis 2,0 mg/kg, subkutan injiziert (SC). Das zufällige Kontroll-Oligonukleotid, ISIS 17614, wurde auch bei 2 mg/kg getestet. Eine 1 mg/kg tägliche, therapeutisch gegebene Dosierung wurde auch getestet. Bei dieser Kur begann die Oligonukleotid-Behandlung am Tag 11, nachdem die Tiere Symptome von Paralyse zu zeigen begonnen hatten und hielt an bis Tag 27. Die Schwere der Krankheit und die Zeit bis zum Ausbruch der Krankheit wurden gemessen und sind in Tabelle 21 gezeigt.

Tabelle 21

<b>EAE Experiment 5 – Effekte von ISIS 17044 auf EAE – therapeutische (T) vs. prophylaktische (P) Kur</b>			
<b>Gruppe</b>	<b>Krankheitsvorfall</b>	<b>Höchststand der Krankheit</b>	<b>Tage zum Ausbruch</b>
Saline	6/7	1.86	10.83
17044 2.0mg/kg SC(P)	7/7	1.86	12
17044 1.0mg/kg SC(P)	6/7	1.86	11.33
17044 0.1mg/kg SC(P)	6/7	1.14	12.67
17044 0.01mg/kg(P)	7/7	1.57	11.57
17044 1 mg/kg (T)	7/7	1.42	12.71
17614 2 mg/kg SC(control)	6/7	1.71	9

Wie gezeigt, reduzierte 17044 die Schwere der Krankheit, wenn es therapeutisch gegeben wurde (für die Zeit bis zum Beginn der Krankheit wird nicht erwartet, dass sie erhöht ist, weil die Dosierung erst nach dem Beginn der Krankheit beginnt).

## Beispiel 21

## Das Kollagen-induzierte Arthritis (CIA) Modell in Maus für die rheumatoide Arthritis

**[0137]** Ein Modell für die humane rheumatoide Arthritis wurde entwickelt, bei dem Mäuse mit dem Rind Typ II Kollagen immunisiert werden. Anderson et al., J. Immunol. 1991, 147, 1189-1193, zitierend Trentham et al., J. Exp. Med 1977, 146, 857. Ein Anschwellen und eine Entzündung der Gelenke folgt nach ungefähr 3 Wochen, verbunden mit Gelenkverformung und Ankylose, typisch für rheumatoide Arthritis. Dieses Modell wurde benutzt, um die Effekte des auf murines Integrin α4 gerichteten Antisense-Oligonukleotids 17044 in Bezug auf die Arthritis in Mäusen zu studieren.

**[0138]** DBA/1LacJ Mäuse wurden erhalten von Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME. Weibliche Mäuse im Alter von 6 bis 8 Wochen wurden verwendet und Gruppen zugeteilt, zehn Mäuse pro Gruppe. Am Tag 0 wurden die Mäuse am Steg des Schwanzes mit 100 µg von Rinder Typ II Kollagen immunisiert, das als Emulsion in Complete Freund's Adjuvant (CFA) vorlag. Am Tag 7 wurde auf dieselbe Art und Weise eine verstärkende Dosis von Kollagen verabreicht. Am Tag 14 wurden den Mäusen subkutan 100 µg von Lipopolysaccharid (LPS) injiziert. Die Gewichte wurden wöchentlich aufgezeichnet. Die Mäuse wurden täglich für einen Ausbruch von CIA inspiziert, wobei der Ausbruch charakterisiert ist durch Erythema und Ödeme. Bis zum Ausbruch der Krankheit wurden die Pfotenweiten und die hinteren Fußknöchelweiten von betroffenen und nicht betroffenen Gelenken dreimal pro Woche gemessen, unter der Verwendung eines Greifzirkels mit konstanter Zugspannung. Zusätzlich wurden die Gliedmaßen klinisch untersucht und in 0-4 beurteilt, wobei 0 = normal; 1 = eine Anzahl geschwollen; 2 = Entzündung vorhanden in mehr als einer Anzahl; 3 = Gelenkverformung mit oder ohne Entzündung; und 4 = Gelenkversteifung, detektiert durch Gelenkmanipulation. Das Fortschreiten aller Messungen wurde bis zum Tag 50 aufgezeichnet. Am Ende des Beobachtungszeitraums für jede Maus wurden alle Pfoten entfernt und histologisch untersucht.

**[0139]** Das Oligonukleotid, die positive Kontrollsubstanz (Cyclophosphamid, 5 mg/kg) und der Trägerstoff wurden jeder Maus täglich intraperitoneal (IP) verabreicht, angefangen von Tag 3 und weitergeführt für die Dauer der Untersuchung. Jedes Tier erhielt 10 mg/kg als tägliche Pillendosis.

## Beispiel 22

## Effekt des auf Integrin α4 gerichteten Antisense-Oligonukleotids bei der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA)

**[0140]** In einer vorläufigen Studie wurde eine einzige 10 mg/kg tägliche Dosis von ISPH 17044 vom Zeitpunkt der Induktion der Krankheit an bis zum Abschluss der Studie 50 Tage später verabreicht. Das Auftreten von Arthritis war von 70 auf 30% in der ISIS 17044-behandelten Gruppe reduziert. Eine Zusammenfassung der klinischen Parameter ist in Tabelle 22 gezeigt.

Tabelle 22

## Effekt von ISIS 17044 auf Kollagen-induzierte Arthritis

Behandlung	Schweregrad	Mittlerer Ausbruchstag	# Pfoten/ Maus	Spitzen-Tag der Entzündung
Trägerstoff	3.2 ± 1.1	19.7 ± 1.1	1.2 ± 0.4	16.7 ± 2.9
17044 10 mg/kg	2.1 ± 1.1	20.3 ± 1.9	0.7 ± 0.4	1.6 ± 0.8
Cyclophosphamid 5 mg/kg	0 ± 0	--	0 ± 0	--

Schweregrad = gesamte klinische Anzahl/gesamte Anzahl von Mäusen in der Gruppe.

# Pfoten/Maus = mittlere Anzahl von betroffenen Pfoten bei Beendigung/gesamte Anzahl von Mäusen in der Gruppe.

Spitzen-Tag der Entzündung = Tag vom Ausbruch bis zur Zeit der maximalen Schwellung, gemessen für jedes Gelenk.

**[0141]** Die Mäuse, die in den verschiedenen Behandlungsgruppen Arthritis entwickelten, wurden verglichen und die Ergebnisse sind in Tabelle 23 gezeigt.

Tabelle 23

## Vergleich der Mäuse mit Arthritis

<b>Behandlung</b>	<b>Mittlere # von betroffenen Pfoten</b>	<b>Mittlere klinische Anzahl</b>
Trägerstoff	1.7 ± 0.4	4.6 ± 0.4
17044 10 mg/kg	2.3 ± 0.3	7.0 ± 1.0
Cyclophosphamid 5 mg/kg	--	--

Mittlere # von betroffenen Pfoten = Anzahl der Pfoten bei Beendigung in den betroffenen Mäusen/Anzahl von betroffenen Mäusen in der Gruppe.

Mittlere klinische Anzahl = gesamte klinische Anzahl von betroffenen Mäusen/gesamte Anzahl von betroffenen Mäusen in der Gruppe.

## Beispiel 23

Reduktion der Leukozytensteuerung in das zentrale Nervensystem von EAE-Mäusen durch ein auf Integrin α4 gerichtete Antisense-Oligonukleotid

**[0142]** Mäuse aus dem EAE Experiment 3 (Beispiel 18 oben) wurden mit CO<sub>2</sub> getötet und das Rückenmark wurde entfernt und in 0,5 cm große Stücke durch die lumbischen und niedrigen thorakischen Regionen geschnitten. Die Stücke wurden in O.C.T. Gewebe-Einfriermedium (Ted Pella Inc., Redding, CA) auf Trockeneis und Methylbutan eingebettet. Vier-Micron dicke gefrorene Sektionen wurden geschnitten und über Nacht luftgetrocknet. Die Sektionen wurden für drei Minuten in eiskaltem Aceton fixiert und dann auf einen Dako Autostainer (Dako Corporation, Carpinteria, CA) platziert und nach den folgenden Schritten behandelt: 5 Minuten in 0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 5 Minuten in 5%igem in PBS verdünnten Affenserum, 45 Minuten in passendem verdünnten ersten Antikörper, 30 Minuten in Meerrettich-Peroxidase-gelabeltem Anti-Ratten zweiten Antikörper aus Affen (Jackson Laboratory, Bar Harbor, Me). Die Sektionen wurden zwischen den Behandlungsschritten mit PBS gewaschen. Alle verwendeten Antikörper waren Anti-Maus-Antikörper von PharMingen (San Diego, CA), außer BM-8, der von Bachem Bioscience Inc. war (King of Prussia, PA). Die Immunfärbung wurde mit DAB (Dako Corporation) entwickelt und mit Hematoxylin gegengefärbt.

**[0143]** Für die Behandlung mit 1 mg/kg ISIS 17044 konnte eine Reduktion der Leukozytensteuerung in die Rückenmarksregionen und Gehirne der CSJLF1 Mäuse, die zur Entwicklung von EAE direkt immunisiert worden waren, gezeigt werden. In vorläufigen Experimenten war die Leukozytensteuerung signifikant reduziert, wobei die Wanderung anhand der Expression von VLA-4, von welchem Integrin α4 eine der zwei Untereinheiten ist, CD4 (einem T-Zellen-Marker), BM-8 (einem Makrophagen-Marker) und CD18 (enthalten in den LFA-1 und MAC-1 Adhäsionsmolekülen, die auf Leukozyten gefunden werden) gemessen wurde. CD4+ T-Zellen waren in einem Experiment nahezu aus dem zentralen Nervensystem von ISIS 17044-behandelten Mäusen eliminiert. Für diese Zellen wurde gezeigt, dass sie kritisch für die Induktion von EAE sind. In einem zweiten Experiment (EAE Experiment 4, obiges Beispiel 19) wurden diese Ergebnisse bestätigt und es schien einen Dosis-abhängigen Effekt mit 1,0 mg/kg von 17044 zu geben, das eine größere Reduktion des Leukozyteninfluxes in das zentrale Nervensystem als 0,1 mg/kg 17044 ergab. Das zufällige Kontroll-Oligonukleotid ISIS 17614 war bei der Reduktion des zellulären Influxes in diesem Experiment nicht effektiv.

## Beispiel 24

Effekt von auf Integrin α4 gerichteten Antisense-Oligonukleotiden bei entzündlichen Darmerkrankungen

**[0144]** Ein Modell für entzündliche Darmerkrankungen (IBD) in Maus wurde kürzlich von Okayasu et al. entwickelt (Gastroenterology 1990, 98, 694-702). Die Gabe von Dextransulfat an Mäuse induziert eine Kolitis, die

die humane IBD in fast jedem Detail nachahmt. Dextransulfat-induzierte IBD und humane IBD wurden im folgenden auf dem histologischen Level in einer engen Art und Weise verglichen und für das Mausmodell wurde herausgefunden, dass es ein extrem reproduzierbares und verlässliches Modell ist. Es wird hier verwendet, um den Effekt von ISIS 17044 auf entzündliche Darmkrankheiten zu untersuchen.

**[0145]** Weibliche Swiss Webster Mäuse (8 Wochen alt) mit einem ungefährten Gewicht von 25 bis 30 g werden unter Standardbedingungen gehalten. Den Mäusen wird es gestattet, sich für mindestens 5 Tage zu akklimatisieren, bevor die experimentellen Vorgänge gestartet werden. Den Mäusen werden in ihrem Trinkwasser 5% Dextransulfatnatrium (verfügbar wie gewünscht) 5 Tage lang gegeben. Begleitend wird das ISIS 17044 Oligonukleotid in einem pharmazeutischen Trägerstoff, der Trägerstoff alleine (negative Kontrolle) oder TGF- $\beta$  (von dem bekannt ist, dass er vor Dextransulfat-vermittelter Kolitis in Mäusen schützt) verabreicht. ISIS 17044 wird als tägliche subkutane Injektion von 1 mg/kg bis 5 mg/kg für 5 Tage gegeben. TGF- $\beta$  wird bei 1  $\mu$ g/Maus intrakolonikal gegeben.

**[0146]** Die Mäuse werden am Tag 6 getötet und die Kolons werden histopathologischen Untersuchungen unterzogen. Bis zur Tötung wird die Aktivität der Krankheit durch das Beobachten der Mäuse im Hinblick auf Gewichtsänderungen und durch Beobachten des Stuhls im Hinblick auf das Auftreten von Kolitis überwacht. Die Mäuse werden täglich gewogen. Der Stuhl wird täglich auf Änderungen in der Konsistenz und auf das Vorhandensein von verborgenem oder rohem Blut untersucht. Ein Bewertungssystem wird verwendet, um einen Krankheitsaktivitätsindex zu entwickeln, durch welchen Gewichtsverlust, Stuhlkonsistenz und Vorhandensein von Blut auf einer Skala von 0 bis 3 bewertet werden (0 als normal und 3 als sehr ernsthaft betroffen) und es wird ein Index berechnet. Wirkstoff-induzierte Veränderungen im Krankheitsaktivitätsindex werden statistisch ausgewertet. Für den Krankheitsaktivitätsindex wurde allgemein gezeigt, dass er extrem gut mit IBD korreliert.

#### Beispiel 25

Effekt von auf Integrin  $\alpha 4$  gerichteten Antisense-Oligonukleotid auf das Überleben im heterotropen murinen Herztransplantationsmodell

**[0147]** Um die therapeutischen Effekte eines Integrin  $\alpha 4$  Antisense-Oligonukleotids bei der Verhinderung der artgleichen Zurückweisung zu untersuchen, wird das Maus-Integrin  $\alpha 4$  spezifische Oligonukleotid ISIS 17044 auf seine Aktivität in einem vaskularisierten heterotropen Herztransplantationsmodell in Maus getestet. Herze von Balb/c-Mäusen werden in die Unterleibshöhle von C3H-Mäusen als primäre vaskularisierte Ppropfen transplantiert, im Wesentlichen wie von Isobe et al. beschrieben (Circulation 1991, 84, 1246-1255). Das Oligonukleotid wird durch kontinuierliche intravenöse Verabreichung durch eine 7 Tage ALZET-Pumpe verabreicht. Die mittlere Überlebensdauer für unbehandelte Mäuse ist gewöhnlicherweise ungefähr 9-10 Tage. Von der Behandlung der Mäuse für 7 Tage mit 1 mg/kg bis 5 mg/kg ISIS 17044 wird erwartet, dass sie die mittlere Überlebenszeit erhöht.

#### Beispiel 26

Effekt von auf Integrin  $\alpha 4$  gerichteten Antisense Oligonukleotid auf die Leukozytenwanderung

**[0148]** Die Leukozyteninfiltration von Geweben und Organen ist ein Hauptaspekt des Entzündungsprozesses und trägt zu Gewebeschaden resultierend aus Entzündung bei. Der Effekt von ISIS 17044 auf die Leukozytenwanderung wird unter der Verwendung eines Mausmodells untersucht, in welchem Carrageenan-getränktes Schwämme subkutan implantiert werden. Carrageenan stimuliert die Leukozytenwanderung und Ödeme. Der Effekt vom Oligonukleotid auf die Leukozytenwanderung bei entzündlichen Exudaten wird durch die Quantifizierung von Leukozyten, die die implantierten Schwämme infiltrieren, evaluiert. Nach einer vierstündigen Fasstenzeit werden 40 Mäuse zufällig in acht Gruppen mit jeweils 5 Mäusen eingeteilt. Jede Maus wird mit METOFANE betäubt und es wird ein Polyesterschwamm, imprägniert mit 1 ml einer 20 mg/ml Lösung von Carrageenan, subkutan implantiert. Gruppe 1 wird intravenös eine Salzlösung mit 10 ml/kg vier Stunden vor der Schwammimplantation verabreicht und dies dient als Kontrolle für den Trägerstoff. Indomethacin (Positivkontrolle) wird der Gruppe 2 oral täglich mit 3 mg/kg bei einem Volumen von 20 ml/kg verabreicht, unmittelbar auf die Operation folgend, wieder 6-8 Stunden später und wiederum 21 Stunden nach der Implantation. ISIS 17044 wird der Gruppe 3 intravenös mit einer Dosis von 1 mg/kg bis 5 mg/kg vier Stunden vor der Schwammimplantation verabreicht. ISIS 17044 wird intravenös bei einer Dosis von 1 mg/kg bis 5 mg/kg zur Gruppe 4 unmittelbar folgend auf die Schwammimplantation verabreicht. ISIS 17044 wird den Gruppen 5, 6, 7 und 8 intravenös mit 1 mg/kg bis 5 mg/kg bei 2, 4, 8 bzw. 18 Stunden auf die Schwammimplantation folgend verabreicht. Vierundzwanzig Stunden nach der Implantation werden die Schwämme entfernt, in EDTA und Salzlösung (5 ml)

eingelegt und trockengepresst. Die Gesamtzahl von Leukozyten in den Schwammexudatmischungen wird bestimmt. Die orale Gabe von Indomethacin mit 3 mg/kg führt üblicherweise zu einer 75-80%ige Reduktion in der mittleren Leukozytenanzahl, verglichen zur Trägerstoffkontrollgruppe.

#### Beispiel 27

##### Experimenteller Metastasierungsversuch

**[0149]** Um die Rolle von Integrin α4 auf die Metastasierung zu untersuchen werden experimentelle Metastasierungsversuche durch die Injektion von  $1 \times 10^5$  C8161-Zellen in die laterale Schwanzvene von athymischen Nacktmäusen durchgeführt. C8161 ist eine humane Melanom-Zelllinie. Für die Behandlung von C8161-Zellen mit dem Cytokin TNF-α und Interferon γ wurde kürzlich gezeigt, dass sie in einer erhöhten Anzahl von Lungenmetastasen resultiert, wenn die Zellen in Nacktmäuse injiziert wurden (Miller, D.E. and Welch, D.R., Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 1990, 13, 353). Vier Wochen alte weibliche athymische Nacktmäuse (Harlan Sprague Dawley) werden benutzt. Die Tiere werden nach den Richtlinien des NIH gehalten. Gruppen von jeweils 4-8 Mäusen werden in experimentellen Metastasierungsversuchen getestet.

**[0150]** Die Behandlung von C8161-Zellen mit dem Antisense-Oligonukleotid ISIS 27104, komplementär zum humanen Integrin α4, wird unter dem Vorhandensein des kationischen Lipids LIPOFECTIN (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD) durchgeführt. Die Zellen werden in 60 mm Gewebezellschalen mit einer Dichte von  $10^6$  Zellen/ml ausgesät und bei 37°C für 3 Tage inkubiert, 3 Mal mit Opti-MEM (Gibco/BRL) gewaschen und 100 µl von Opti-MEM-Medium wird zu jeder Vertiefung zugegeben. 0,5 µM Oligonukleotid und 15 µg/ml LIPOFECTIN werden bei Raumtemperatur für 15 Minuten gemischt. 25 µl der Oligonukleotid-LIPOFECTIN-Mischung wird auf die entsprechenden Schalen zugegeben und bei 37°C für 4 Stunden inkubiert. Die Oligonukleotid-LIPOFECTIN-Mischung wird entfernt und durch DME-F12 Medium ersetzt, das 10% fötales Kälberserum enthält. Nach 4 Stunden werden 500 U/ml TNF-α zu den entsprechenden Vertiefungen zugegeben und für 18 Stunden inkubiert, zu diesem Zeitpunkt werden die Zellen von den Platten entfernt, gezählt und in die athymischen Nacktmäuse injiziert. Alternativ werden Tumorzellen (nicht mit Oligonukleotid behandelt) wie oben in die athymischen Nacktmäuse implantiert und die Tumor-enthaltenden Mäuse werden jeden zweiten Tag mit Antisense-Oligonukleotid bei Dosen von 1 mg/kg bis 5 mg/kg behandelt.

**[0151]** Nach 4 Wochen werden die Mäuse getötet, die Organe in Bouin's Fixative fixiert und die metastasierenden Läsionen in den Lungen werden mit Hilfe eines Anatomiemikroskops gezählt.

**[0152]** Die Behandlung von C8161-Zellen mit ISIS 27104 erniedrigt das metastasierende Potential dieser Zellen und eliminiert die erhöhte metastasierende Fähigkeit von C8161, das aus der TNF-α Behandlung resultiert.

#### BEISPIEL 28

##### Effekt von Integrin α4 Antisense-Oligonukleotid in einem Mausmodell der Crohn's Krankheit

**[0153]** SJL/J und IL10-/Mäuse werden in einem TNBS (2,4,5-Trinitrobenzen Sulfonsäure) induzierten Kolitis-Modell für die Crohn's Krankheit verwendet (Neurath, M.F., et al., J. Exp. Med., 1995, 182, 1281-1290). Mäuse innerhalb der Altersgrenzen von 6 Wochen und 3 Monaten werden verwendet, um die Aktivität von TNF-α Antisense-Oligonukleotiden herauszufinden.

**[0154]** C3H/HeJ, SJL/JK und IL10-/Mäuse werden vor der Gabe von TNBS über Nacht einer Fastenkur unterzogen. Ein dünner, flexibler Polyethylen-Schlauch wird langsam in das Kolon der Mäuse inseriert, sodass die Spitze ungefähr 4 cm proximal zum Anus zum Liegen kommt. 0,5 mg der TNBS in 50% Ethanol werden langsam aus einem Katheter injiziert, der auf eine 1 ml Spritze aufgesetzt ist. Die Tiere werden umgedreht in einer vertikalen Position für ungefähr 30 Sekunden gehalten. Das Oligonukleotid ISIS 17044 wird entweder beim ersten Anzeichen von Symptomen oder gleichzeitig mit der Induktion der Krankheit verabreicht. In den meisten Fällen werden die Tiere täglich dosiert. Die Verabreichung erfolgt i.v., i.p., s.q., durch Minipumpen oder intrakolonische Injektion. Experimentelle Gewebe werden am Ende der Behandlungskur für eine histochemische Evaluierung gesammelt.

## BEISPIEL 29

Effekt von auf Integrin α4 gerichtetem Antisense-Oligonukleotid in einem Mausmodell für Hepatitis

**[0155]** Concanavalin A-induzierte Hepatitis wird als Mausmodell für Hepatitis verwendet (Mizuhara, H., et al., J. Exp. Med., 1994, 179, 1529-1537). Weibliche Balblc und C57BL/6-Mäuse innerhalb der Altersgrenzen von 6 Wochen und 3 Monaten werden verwendet, um die Aktivität des Antisense-Oligonukleotids ISIS 17044 zu untersuchen.

**[0156]** Den Mäusen wird das Oligonukleotid intravenös injiziert. Den vorbehandelten Mäusen werden dann intravenös 0,3 mg Concanavalin A (Con A) injiziert, um eine Leberverletzung zu induzieren. Innerhalb von 24 Stunden nach der Con A Injektion werden die Lebern aus den Tieren entfernt und auf Zelltod (Apoptose) durch *in vitro* Methoden analysiert. Bei einigen Experimenten wird Blut aus der retro-orbitalen Vene gesammelt.

## BEISPIEL 30

Effekt von auf Integrin α4 gerichtetem Antisense-Oligonukleotid in einem Mausmodell für Asthma

**[0157]** Eine Luftwegsentzündung wird in Patienten mit allergischem Asthma beobachtet. Ein Mausmodell für allergisches Asthma wurde entwickelt (Hessel et al. J. Immunol. 1998, 160, 2998-3005). Die Sensibilisierung von BALB/c-Mäusen mit Ovalbumin induziert einen hohen Level von Ovalbumin-spezifischen IgEs im Serum. Die Inhalation von Ovalbumin in sensitiven Mäusen verursacht eine sofortige bronchokonstriktive Antwort. Die wiederholte Inhalation von Ovalbumin in sensitiven Tieren induziert eine nichtspezifische Atemwegs-Hyperreaktion *in vivo* sowie das Einwandern von Leukozyten in das Luftwegsgewebe.

**[0158]** Pathogen-freie männliche BALB/c-Mäuse (6-8 Wochen) werden von Jackson Laboratories beschafft. Eine aktive Sensibilisierung wird mittels sieben IP-Injektionen von 10 µg Ovalbumin (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, grade II) in 0,5 ml einer Pyrogen-freien Salzlösung an alternierenden Tagen, mit einer Injektion pro Tag, durchgeführt. Dies führt zu hohen Titern von totalem IgE im Mausserum, von dem 80% aus Ovalbumin-spezifischer IgE besteht (Hessel et al., 1998, J. Immunol. 160: 2998-3005). Vier Wochen nach der letzten Injektion werden die Mäuse einmal pro Tag für acht Tage entweder Ovalbumin-Aerosolen (2 mg/ml) oder Salzlösungs-Aerosolen ausgesetzt. Das Aerosol wird mit einem Nebulizer wie etwa einem Medix 8001 (Sussex, UK) hergestellt. Die Tiere wurden der Aerosol-Behandlung für 5 Minuten ausgesetzt.

**[0159]** Das Antisense-Oligonukleotid 17044 wird den Mäusen während der Behandlungsperiode gegeben. Drei Minuten vor der ersten und fünften Inhalationsgabe wurde den sensitiven Mäusen intravenös eine 1 mg/kg bis 5 mg/kg Dosis von ISIS 17044 in PBS injiziert.

**[0160]** Die Reaktion der Luftwege auf Methacholin wird *in vivo* 24 Stunden nach der letzten Aerosol-Exposition unter der Verwendung der Luftüberdruckmethode gemessen, in welcher die bronchiale Resistenz gegenüber der Inflation bestimmt wird. Die Mäuse werden durch IP-Injektion von Urethan 2 g/kg betäubt und auf eine beheizte Decke gelegt. Eine Kanüle wird in die Trachea gelegt und ein kleiner Polyethylen-Katheter wird für IV-Gaben in die Jugularvene platziert. Spontane Atmung ist unterdrückt durch die IV-Injektion von Tubocurarin-Chlorid (3,3 mg/kg). Wenn diese beendet ist, wird die tracheale Kanüle an eine Atmungspumpe geschlossen. Zu Intervallen wurden ansteigende Dosen von Methacholin im Bereich von 40 bis 1280 µg/kg gegeben. Der Anstieg in Luft-Überdruck (verursacht durch die Reduktion des Luftflusses in den Lungen als ein Resultat des erhöhten Luftwegtonus) wird an seinem höchsten Punkt gemessen und als Prozentanstieg ausgedrückt.

**[0161]** Eine bronchoalveolare Spülung wird verwendet, um die Leukozyteneinwanderung des Luftwegsgewebes zu messen. Drei und 24 Stunden nach dem letzten Aerosol werden die Mäuse durch IP-Injektion von 0,25 ml Natriumpentobarbiton (60 mg/ml) betäubt. Der Unterleib und die Brust werden geöffnet und die Unterleibsarteria wird herausgeschnitten. Unterhalb der Larynx wird ein kleiner Schnitt gemacht, und eine flexible Polyethylen-Kanüle wird in die Trachea inseriert und mit einer Ligatur befestigt. Die Mäuse werden fünfmal gewaschen mit 1 ml Aliquots von Pyrogen-freier Salzlösung auf 37°C erwärmt. Die Zellen aus jedem Waschschritt wurden vereinigt, einmal mit kaltem PBS gewaschen und in 200 µl kaltem PBS resuspendiert. Die Gesamtanzahlen der Zellen wurden gezählt und kategorisiert.

## Beispiel 31

Effekt von Antisense auf Integrin α4 in Bezug auf die Peripheralisation von hämatopoetischen Progenitorzellen

**[0162]** Die Mobilisierung (Peripheralisierung) von hämatopoetischen Progenitorzellen aus dem Knochenmark in die Blutzirkulation ist klinisch bei der Stammzelltransplantation nützlich. Ein Mausmodell wurde entwickelt, um die Effekte von Wirkstoffverbindungen bei diesem Prozess zu evaluieren (und beim gegenteiligen Prozess, dem selektiven Haftenbleiben oder Homing von transplantierten Stammzellen zum Empfängerknochenmark) (Papayannopoulou et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 1995, 92, 9647-9651). Kurz zusammengefasst werden pathogenfreie, 3-6 Monate alte Mäuse verwendet und diese werden in einem Luftzirkulations-gefiliterten Behälter für die Dauer des Experiments gehalten. Die Mäuse, die als erste oder zweite Empfänger im Homingversuch verwendet werden, werden 1150-cGy Bestrahlungseinheiten ausgesetzt, die von einer Cs-Quelle stammen.

**[0163]** Einzelzellsuspensionen werden aus dem peripheralen Blut, dem Knochenmark und der Milz präpariert. Peripherales Blut wird durch Herzpunktur in Konservierungsmittel-freiem Heparin erhalten und nukläre Zellen werden unter der Verwendung eines NH<sub>4</sub>Cl hämolytischen Puffers aufgefangen. Knochenmarkszellen werden durch das Auswaschen von Oberschenkelmark unter sterilen Bedingungen mit Iscove's modifiziertem Dulbecco-Medium (IMDM) erhalten, das 10% v/v fötales Rinderserum und Streptomycin (50 µg/ml) und Penicillin (50 U/ml) enthält. Milzzellsuspensionen werden durch die längsgerichtete Dissektion der Milz mit einem Skalpell und dem Abschaben von zellulären Materialien von der Kapsel erhalten, gefolgt von starkem Pipettieren. Alle Zellsuspensionen werden zweimal in IMDM mit 10% fötalem Kälberserum gewaschen. Die Zellzahlen werden durch die Verwendung eines Hämocytometers bestimmt.

**[0164]** Versuche zu Kolonie-formenden Einheiten in Kultur (CFU-C) und Kolonie-formierenden Einheiten in der Milz (CFU-S) werden durchgeführt, wie bei Papayannopoulou et al., beschrieben (Proc. Natl. Acad. Sci. 1995, 92, 9647-9651).

**[0165]** Um die hämatopoetische Progenitormobilisierung in normalen Tieren zu untersuchen, wird das Oligonukleotid durch tägliche IV-Injektion für drei Tage verabreicht (bei Dosierungsrahmen von 1 mg/kg bis 5 mg/kg). Die Mäuse werden am vierten Tag getötet. In 0,25-0,5 ml peripheralem Blut enthaltene Zellen mit Zellkern werden in klonogenischen Progenitorzulturen ausplatiert, um den CFU-C-Gehalt wie in Papayannopoulou et al. beschrieben, zu bestimmen, (Proc. Natl. Acad. Sci. 1995, 92, 9647-9651).

## Beispiel 32

Das Untersuchen von zusätzlichen auf humanes Integrin α4 gerichteten Oligonukleotiden

**[0166]** Ein zusätzliches Set von Antisense-Oligonukleotiden wurde hergestellt, um auf humanes Integrin α4 abzuzielen (GenBank Accession no. L12002, hier als SEQ ID NO: 1 einbezogen). Die Oligonukleotide sind in Tabelle 24 gezeigt. Die Oligonukleotide wurden als „Gapmers“ bestehend aus einer 9-Nukleotidregion von Desoxynukleotiden flankiert von drei 2'-O-Methoxyethyl (2'-MOE) Nukleotiden am 5'-Ende und acht 2'-MOE-Nukleotiden am 3'-Ende synthetisiert. 2'-MOE-Nukleotide sind in der Tabelle fettgedruckt gezeigt. Die Oligonukleotide wurden durchgehend mit Phosphorothioat-Rückgraten synthetisiert und alle Cytosine sind 5-Methylcytosine. Die Oligonukleotide wurden zusammen mit Lipofectin in A375 humanen Melanomazellen untersucht, wie in Beispiel 8 hier im Text oben beschrieben. Die Ergebnisse sind auch in Tabelle 24 gezeigt. Wie in der Tabelle gezeigt, ergaben die Oligonukleotide 107234, 107235, 107236, 107237, 107238, 107239, 107240, 107241, 107242, 107243, 107244, 107245, 107246, 107248, 107249, 107251, 107252, 107253, 107254, 107255, 107256, 107257, 107258, 107254 und 107260 (SEQ ID NO: 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 81, 82, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92 bzw. 93) mindestens eine 50%ige Inhibition der Integrin α4 Proteinexpression und sind bevorzugt. Von diesen wurden ISIS 107245, 107248, 107252, 107255 und 107259 (SEQ ID NO: 78, 81, 85, 88 und 92) für weitere Untersuchung ausgewählt.

Tabelle 24

Zusätzliche auf humanes Integrin α4 gerichtete Oligonukleotide

ISIS #	Sequenz	Ziel-region	Ziel-stelle	%Kontrolle	%Inhibi-tion	SEQ ID NO
107229	AGTC CGCAGAGCGCGGGATG	5'-UTR	4	104	--	61
107230	AGACTCGCGTCTGGCCCCG	5'-UTR	31	73	27	62
107231	GTC GGGAGGCGCAGGGCCGG	5'-UTR	106	115	--	63
107232	CCGGTTTCTGCCGCCGAGCC	5'-UTR	189	83	17	64
107233	ATGCGACGGTTGGCCAACGG	5'-UTR	354	57	43	65
27104	CCCAAGCCATGCGCTCTCGG	Coding	421	69	31	46
100025	CCCAGCACATCGGCTCTCGG	Control	421 5-mismatch	97	3	66
107234	CTTCCCAAGCCATGCGCTCT	Coding	424	47	53	67
107235	TCGCTTCCCAGCCATGCGC	Coding	427	36	64	68
107236	GCCTCGCTTCCCAGCCATG	Coding	430	43	57	69
107237	CGCGCCTCGCTTCCCAGCC	Coding	433	46	54	70
26642	TCAGGGTGGCTAAAGAAC	Coding	1839	67	33	35
107238	TCC TTGCCCTTATATGAGAA	Coding	1932	49	51	71
107239	ACTTCCTTGCCCTTATATGA	Coding	1935	29	71	72
107240	AGAGTTATCTGTGACTTCAC	Coding	2521	40	60	73
107291	GATACTGAGGT CCTCTTCCG	Coding	2641	36	64	74
107242	TGAGATCAACAGAACAA	Coding	3397	44	56	75
107243	CCAGCCTTCCACATAACATA	Coding	3417	39	6.1	76
107244	AGGATAGATTGTATTGTCT	Coding	3997	37	63	77
107245	GTTGATATAACTCCA ACTGT	Coding	3487	35	65	78
107246	TAATCATCATTGCTTTACT	STOP	3507	42	58	79
107297	AAGAAGTCCTTAATCATCAT	3'-UTR	3131	65	35	80
107298	CTGAGTCTGTTTCCATTCT	3'-UTR	3161	34	66	81
107299	CTTGAAACAGTGTCTTTA	3'-UTR	3198	38	62	82
107250	GAGTAAAAGAACAGTCCAAACA	3'-UTR	3231	57	43	83
107251	CCTTGCATGAAGACATAATA	3'-UTR	3265	40	60	84
107252	AAGAGTAATCATTGCTGAGA	3'-UTR	3291	35	65	85
107253	TCTTGGCTGTATTATTACC	3'-UTR	3331	29	71	86
107254	TGCTTTAGTGTCTCTACC	3'-UTR	3372	33	67	87
107255	AAGTCTAAGACTCTCCAGT	3'-UTR	3461	36	64	88
107256	GAGGCAAGCACATATGGTAA	3'-UTR	3491	45	55	89
107257	TGAAATGAACCTCTGCCAC	3'-UTR	3531	44	56	90
107258	TTAAAGTGATAATGGTCCAC	3'-UTR	3631	39	61	91
107259	GGAACACAGCCCGTAGGAAA	3'-UTR	3671	37	63	92
107260	TTGCCAGTTGGCCTATAA	3'-UTR	3731	50	50	93

## Beispiel 33

Dosis-Wirkungskurven für den Effekt von Antisense-Oligonukleotiden auf die Integrin α4 Proteinexpression

[0167] A375-Zellen wurden mit ISIS 107245, 107248, 107252, 107255 und 107259 durch Elektroporation bei

175 V, r = 1, c = 1000, 0,2 ml Opti-MEM,  $1 \times 10^6$  Zellen/ml, 2 mm Gap-Elektrode unter der Verwendung eines BTX Electro Cell Manipulators 600 (Genetronics, San Diego CA) behandelt. Die Oligonukleotid-Konzentrationen lagen bei 1, 3, 10 und 30  $\mu\text{M}$ . Die Zellen wurden 24 Stunden nach der Oligonukleotid-Behandlung geerntet und mit 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  CD49d-FITC für die Flow Cytometry wie in den vorherigen Beispielen gefärbt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 25 gezeigt.

Tabelle 25

Dosis-Wirkungskurven für zusätzliche auf humanes Integrin  $\alpha 4$  gerichtete Oligonukleotide

ISIS #	Oligo-Konzentration (nM)	%Kontrolle	%Inhibition	SEQ ID NO
27104	1	86.2	13.8	46
	10	63.2	36.8	
	30	35.3	64.7	
107245	1	27.1	72.9	78
	10	64.4	35.6	
	30	30.3	69.7	
107248	1	9.1	90.9	81
	10	23.2	76.8	
	30	52.1	47.9	
107252	1	17.4	82.6	85
	10	7.9	92.1	
	30	2.9	97.1	
107255	1	50.6	49.4	88
	10	22.9	77.1	
	30	19.4	80.6	
107259	1	17.7	82.3	92
	10	42.9	57.1	
	30	19.4	80.6	

[0168] ISIS 107248 wurde direkt mit ISIS 27104 auf die Fähigkeit zur Inhibition der Integrin  $\alpha 4$  Expression in A375 Melanomazellen hin verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 26 gezeigt. Die Oligonukleotide wurden wie in dem früheren Beispiel in die Zellen elektroporiert.

Tabelle 26

Vergleich von ISIS 27104 und ISIS 107248				
Oligo-Konzentr. ( $\mu\text{M}$ )	ISIS 27014		ISIS 107248	
	%Kontrolle	%Inhibition	%Kontrolle	%Inhibition
1	86.2	13.8	52.1	47.9
3	63.2	36.8	17.4	82.6
10	35.3	64.7	7.9	92.1
30	27.1	72.9	2.9	97.1

## Beispiel 34

## Antisense-Inhibition der Integrin α4 Proteinexpression in Jurkat T-Zellen

**[0169]** ISIS 107248 wurde bei Dosen von 1, 3, 10, 20 und 30 µM auf die Fähigkeit, die Integrin α4 Expression in Jurkat T-Lymphozytzen zu inhibieren getestet, im Einklang mit den früheren Beispielen. Die Integrin α4 Proteinexpression war 24 Stunden nach der Oligonukleotid-Behandlung um ungefähr 65-72% bei Oligonukleotid-Dosen von 3-30 µM reduziert. 48 Stunden nach der Behandlung war die Integrin α4 Proteinexpression um 60% bei 3 µM und um 90% bei 10, 20 und 30 µM Oligonukleotid-Konzentration reduziert.

## Beispiel 35

## Antisense-Inhibition der Integrin α4 RNA Expression in Jurkat T-Zellen

**[0170]** Die Quantifizierung der Integrin α4 mRNA Levels wurde durchgeführt durch quantitative Echtzeit-PCR unter der Verwendung des ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection Systems (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) gemäß den Angaben des Herstellers. Dabei handelt es sich um ein System mit geschlossenem Gefäß, nicht auf einem Gel basierend, und Fluoreszenz zur Detektion verwendend, das hohe Durchsatzquantifizierung von Polymerase-Kettenreaktions (PCR) Produkten in Echtzeit erlaubt. Im Gegensatz zur Standard-PCR, bei welcher die Amplifikationsprodukte nach dem Ablauf der PCR quantifiziert werden, werden die Produkte in der quantitativen Echtzeit-PCR während der Akkumulation quantifiziert. Dies wird durch den Zusatz einer Oligonukleotid-Sonde zur PCR-Reaktion erreicht, die spezifisch zwischen den Forward- und Reverse-PCR-Primern annealt, und zwei fluoreszierende Farbstoffe enthält. Ein Reporterfarbstoff (zum Beispiel JOE oder FAM, erhalten von entweder Operon Technologies Inc., Alameda, CA oder PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) wird an das 5'-Ende der Sonde angehängt und ein Quencher-Farbstoff (zum Beispiel TAMRA, erhalten von entweder Operon Technologies Inc., Alameda, CA oder PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) wird an das 3'-Ende der Sonde angehängt. Wenn die Sonde und Farbstoffe intakt sind, wird die Reporterfarbstoffemission durch die Nähe des 3'-Quencher-Farbstoffes gequenched. Während der Amplifikation entsteht durch das Annealen der Sonde an die Zielsequenz ein Substrat, das durch die 5'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase geschnitten werden kann. Während der Extensionsphase des PCR-Amplifikationszyklus, entlässt der Schnitt der Sonde durch die Taq-Polymerase den Reporterfarbstoff von der verbleibenden Sonde (und damit von dem Quencher-Bestandteil) und ein Sequenz-spezifisches Fluoreszenzsignal wird generiert. Mit jedem Zyklus werden zusätzliche Reporterfarbstoffmoleküle von ihren entsprechenden Sonden abgeschnitten und die Fluoreszenzintensität wird bei regulären Intervallen mittels in das ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System eingebaute Laseroptiken aufgezeichnet. In jedem Versuch generiert eine Serie von Parallelreaktionen, die serielle Verdünnungen von mRNA aus unbehandelten Kontrollproben enthalten, eine Standardkurve, die verwendet wird, um die Prozent der Inhibition nach der Antisense Oligonukleotid-Behandlung der Testproben zu quantifizieren.

**[0171]** PCR-Reagenzien wurden von PE-Applied Biosystems, Foster City, CA erhalten. Die RT-PCR-Reaktionen wurden ausgeführt unter der Zugabe von 20 µl PCR-Cocktail (1 × TAQMANTM Puffer A, 5,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 300 µM von jedem dATP, dCTP und dGTP, 600 µM von dUTP) 400 nM jedes des Forward- und Reverse-Primers oder 100 nM im Falle der G3PDH, 100 nM Sonde, 20 Einheiten RNase Inhibitor, 1,25 Einheiten AMPLITAQ GOLD™ und 12,5 Einheiten MuLV Reverse Transcriptase bis 5 µl (100 ng) Gesamt-mRNA-Lösung, aufgereinigt unter der Verwendung des RNEasy™ Kits (Qiagen, Valencia CA). Die RT-Reaktionen wurden durch Inkubation für 30 Minuten bei 48°C durchgeführt. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei 95°C zur Aktivierung der AMPLITAQ GOLD™ wurden 40 Zyklen eines Zweischritt-PCR-Protokolls ausgeführt: 95°C für 15 Sekunden (Denaturierung) gefolgt von 60°C für 1,5 Minuten (Annealing/Extension). Die Integrin α4 Sonden und Primer wurden hergestellt, um an die humane Integrin α4 Sequenz zu hybridisieren, unter der Verwendung von veröffentlichten Sequenzinformationen (GenBank Accession Number L12002, hier als SEQ ID NO: 1 mit aufgenommen).

**[0172]** Für Integrin α4 handelte es sich um folgende PCR-Primer:

Forward Primer: GACACGCTGCGCCTCAT (SEQ ID NO: 94, hybridisiert bei Position 319-335 der Genbank Accession No. L 12002)

Reverse Primer: ATTCAACACTAAGCGGCCACTG (SEQ ID NO: 95, hybridisiert an Position 391-412 der Genbank Accession No. L12002) und die PCR-Sonde war:

FAM-CCAACCGTCGATCCGTGCAA-TAMRA

(Die Sonde ist SEQ ID NO: 96, hybridisiert an Position 361-382 der Genbank Accession No. L12002) worin FAM (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) der fluoreszierende Reporterfarbstoff ist und TAMRA (PE-Ap-

plied Biosystems, Foster City, CA) der Quencher-Farbstoff ist.

**[0173]** Für GAPDH handelte es sich um folgende PCR-Primer:

Forward Primer: GAAGGTGAAGGTCGGAGTC (SEQ ID NO: 97)

Reverse Primer: GAAGATGGTGATGGGATTTC (SEQ ID NO: 98) und die PCR-Sonde war: 5' JOE-CAAGCTT-CCCGTTCTCAGCC-TAMRA 3' (die Sonde ist SEQ ID NO: 99), worin JOE (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) der fluoreszierende Reporterfarbstoff ist und TAMRA (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) der Quencher-Farbstoff ist.

**[0174]** 24 Stunden nach Behandlung der A375 Melanomazellen mit ISIS 107248 durch Elektroporation (Oligonukleotid-Konzentrationen von 0,3, 1, 3, 10 und 30  $\mu$ M) wurde die gesamte RNA unter der Verwendung des RNEasy<sup>TM</sup> Kits (Qiagen, Valencia CA) isoliert und eine RT-PCR durchgeführt. Die Integrin  $\alpha$ 4 mRNA-Levels waren um ungefähr 23%, 38%, 70%, 80% und 85% im Vergleich zu einer Kontrolle bei Oligonukleotid-Dosen von 0,3, 1, 3, 10 bzw. 30  $\mu$ M reduziert.

#### Beispiel 36

##### Effekt der Antisense-Inhibierung von Integrin $\alpha$ 4 in Bezug auf die Zelladhäsion

**[0175]** Humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVEC) (Clonetics, San Diego CA) wurden in EGM-UV-Medium (Clonetics) kultiviert und mit TNF- $\alpha$  für 20 Stunden behandelt, um die VCAM-Expression zu induzieren. A375-Melanomazellen wurden mit ISIS 107248 wie oben beschrieben elektroporiert. Unter der Verwendung eines Antikörpers gegen PECAM, eines spezifischen Markers für Endothelzellen, wurde die Flow Cytometry benutzt, um die Inhibition der Adhärenz von A375-Melanomazellen an HUVECs zu quantifizieren. Im Vergleich zu einer Kontrolle (TNF behandelt, keine Oligonukleotide) inhibierte ISIS 107248 (10  $\mu$ M) die A375-Melanomazelladhärenz an HUVEC um ungefähr 85%. Ein Antikörper gerichtet auf Integrin  $\alpha$ 4 inhibierte die Adhärenz um ungefähr 72%. Melanomazellen stellen ein klinisch relevantes Modell dar, weil eine statistisch signifikante Korrelation zwischen einer erhöhten Expression der VLA-4 Expression (von welchem Integrin  $\alpha$ 4 ein Mitglied ist) und der Zeit zum Fortschreiten und der gesamten Überlebenszeit von Patienten mit Melanomen gezeigt wurde. Schadendorf et al., J. Natl. Cancer Inst., 1995, 87, 366-371.

**[0176]** Ein ähnlicher Adhäsierungsversuch wurde unter der Verwendung von Jurkat T-Zellen anstelle von Melanomazellen durchgeführt, wiederum zur Detektion der Adhärenz an HUVECs. Weil Jurkat-Zellen kleiner und weniger komplex sind, können sie von den HUVECs durch das Gaten auf der Basis des Unterschieds im Vorwärts- und Seitwärtslichteinfall abgetrennt werden. Für 5000 HUVEC-Ereignisse wurden die adhärenten Jurkat-Zellen quantifiziert. Bei Oligonukleotid-Konzentrationen von 1, 3, 10 und 30  $\mu$ M ISIS 107248 betrug die Adhärenz von Jurkat-Zellen an HUVEC 0, 12%, 32% bzw. 63%. Ein Antikörper gegen Integrin  $\alpha$ 4 ergab eine 96%ige Inhibition, ein Antikörper gegen VCAM-1 ergab 67%ige Inhibition und eine Kombination von ISIS 107248 und einem VCAM-1 Antikörper ergab 78%ige Inhibition.

#### SEQUENZ-PROTOKOLL

**[0176]**

<110> Bennett, C. Frank  
Condon, Tom P.  
Cowser, Lex M.

<120> ANTISENSE MODULATION OF INTEGRIN  $\alpha$ 4 EXPRESSION

<130> ISPH-0391

<140>  
<141>

## DE 699 34 998 T2 2007.12.06

<150> 09/166,203  
 <151> October 5, 1998

<160> 60

<210> 1  
 <211> 3567  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (411)..(3527)

<300>  
 <308> L12002 Genbank  
 <309> 1996-02-15

<400> 1

cgccatcccg cgctctgcgg actgggaggc ccgggccagg acgcgagtct ggcagccga 60  
 gttccccag cgccttcgt agccgcgcgt aggcaagac ggagccggc cctgcgcctc 120  
 cgcaccacgc ccgggacccc acccagcggc ccgtacccgg agaagcagcg cgagcacccg 180  
 aagctcccg ctcggcggca gaaaccggga gtggggccgg gcgagtgcgc ggcatccag 240  
 gccggcccgca acgtccgccc gcggtgggcc gacttccct cctcttcct ctctcattcc 300  
 tttagccgc tggcgccggaa cacgctgcgc ctcatctttt gggcgttct tccccgttgg 360  
 ccaaccgtcg catccgtgc aactttgggg tagtggccgc ttagtgttga atg ttc 416  
 Met Phe  
 1

ccc acc gag agc gca tgg ctt ggg aag cga ggc gcg aac ccg ggc ccc 464  
 Pro Thr Glu Ser Ala Trp Leu Gly Lys Arg Gly Ala Asn Pro Gly Pro  
 5 10 15

gaa gcc gcc gtc cgg gag acg gtg atg ctg ttg ctg tgc ctg ggg gtc 512  
 Glu Ala Ala Val Arg Glu Thr Val Met Leu Leu Leu Cys Leu Gly Val  
 20 25 30

ccg acc ggc cgc ccc tac aac gtg gac act gag agc ggc ctg ctt tac 560  
 Pro Thr Gly Arg Pro Tyr Asn Val Asp Thr Glu Ser Ala Leu Leu Tyr  
 35 40 45 50

cag ggc ccc cac aac acg ctg ttc ggc tac tcg gtc gtg ctg cac agc 608  
 Gln Gly Pro His Asn Thr Leu Phe Gly Tyr Ser Val Val Leu His Ser

## DE 699 34 998 T2 2007.12.06

55	60	65	
cac ggg gcg aac cga tgg ctc cta gtg ggt ggc ccc act gcc aac tgg His Gly Ala Asn Arg Trp Leu Leu Val Gly Ala Pro Thr Ala Asn Trp	70	75	656
70	75	80	
ctc gcc aac gct tca gtg atc aat ccc ggg gcg att tac aga tgc agg Leu Ala Asn Ala Ser Val Ile Asn Pro Gly Ala Ile Tyr Arg Cys Arg	85	90	704
85	90	95	
atc gga aag aat ccc ggc cag acg tgc gaa cag ctc cag ctg ggt agc Ile Gly Lys Asn Pro Gly Gln Thr Cys Glu Gln Leu Gln Leu Gly Ser	100	105	752
100	105	110	
cct aat gga gaa cct tgt gga aag act tgt ttg gaa gag aga gac aat Pro Asn Gly Glu Pro Cys Gly Lys Thr Cys Leu Glu Glu Arg Asp Asn	115	120	800
115	120	125	
cag tgg ttg ggg gtc aca ctt tcc aga cag cca gga gaa aat gga tcc Gln Trp Leu Gly Val Thr Leu Ser Arg Gln Pro Gly Glu Asn Gly Ser	135	140	848
135	140	145	
atc gtg act tgt ggg cat aga tgg aaa aat ata ttt tac ata aag aat Ile Val Thr Cys Gly His Arg Trp Lys Asn Ile Phe Tyr Ile Lys Asn	150	155	896
150	155	160	
gaa aat aag ctc ccc act ggt ggt tgc tat gga gtg ccc cct gat tta Glu Asn Lys Leu Pro Thr Gly Gly Cys Tyr Gly Val Pro Pro Asp Leu	165	170	944
165	170	175	
cga aca gaa ctg agt aaa aga ata gct ccg tgt tat caa gat tat gtg Arg Thr Glu Leu Ser Lys Arg Ile Ala Pro Cys Tyr Gln Asp Tyr Val	180	185	992
180	185	190	
aaa aaa ttt gga gaa aat ttt gca tca tgt caa gct gga ata tcc agt Lys Lys Phe Gly Glu Asn Phe Ala Ser Cys Gln Ala Gly Ile Ser Ser	195	200	1040
195	200	205	
ttt tac aca aag gat tta att gtg atg ggg gcc cca gga tca tct tac Phe Tyr Thr Lys Asp Leu Ile Val Met Gly Ala Pro Gly Ser Ser Tyr	215	220	1088
215	220	225	
tgg act ggc tct ctt ttt gtc tac aat ata act aca aat aaa tac aag Trp Thr Gly Ser Leu Phe Val Tyr Asn Ile Thr Thr Asn Lys Tyr Lys	230	235	1136
230	235	240	
gct ttt tta gac aaa caa aat caa gta aaa ttt gga agt tat tta gga Ala Phe Leu Asp Lys Gln Asn Gln Val Lys Phe Gly Ser Tyr Leu Gly	245	250	1184
245	250	255	
tat tca gtc gga gct ggt cat ttt cggt agc cag cat act acc gaa gta Tyr Ser Val Gly Ala Gly His Phe Arg Ser Gln His Thr Thr Glu Val	260	265	1232
260	265	270	
gtc gga gga gct cct caa cat gag cag att ggt aag gca tat ata ttc Val Gly Gly Ala Pro Gln His Glu Gln Ile Gly Lys Ala Tyr Ile Phe	275	280	1280
275	280	285	
agc att gat gaa aaa gaa cta aat atc tta cat gaa atg aaa ggt aaa Ser Ile Asp Glu Lys Glu Leu Asn Ile Leu His Glu Met Lys Gly Lys	295	300	1328
295	300	305	
aag ctt gga tcg tac ttt gga gct tct gtc tgt gct gtg gac ctc aat			1376

## DE 699 34 998 T2 2007.12.06

Lys Leu Gly Ser Tyr Phe Gly Ala Ser Val Cys Ala Val Asp Leu Asn		
310	315	320
gca gat ggc ttc tca gat ctg ctc gtg gga gca ccc atg cag agc acc		1424
Ala Asp Gly Phe Ser Asp Leu Leu Val Gly Ala Pro Met Gln Ser Thr		
325	330	335
atc aga gag gaa gga aga gtg ttt gtg tac atc aac tct ggc tcg gga		1472
Ile Arg Glu Glu Gly Arg Val Phe Val Tyr Ile Asn Ser Gly Ser Gly		
340	345	350
gca gta atg aat gca atg gaa aca aac ctc gtt gga agt gac aaa tat		1520
Ala Val Met Asn Ala Met Glu Thr Asn Leu Val Gly Ser Asp Lys Tyr		
355	360	365
370		
gct gca aga ttt ggg gaa tct ata gtt aat ctt ggc gac att gac aat		1568
Ala Ala Arg Phe Gly Glu Ser Ile Val Asn Leu Gly Asp Ile Asp Asn		
375	380	385
gat ggc ttt gaa gat gtt gct atc gga gct cca caa gaa gat gac ttg		1616
Asp Gly Phe Glu Asp Val Ala Ile Gly Ala Pro Gln Glu Asp Asp Leu		
390	395	400
caa ggt gct att tat att tac aat ggc cgt gca gat ggg atc tcg tca		1664
Gln Gly Ala Ile Tyr Ile Tyr Asn Gly Arg Ala Asp Gly Ile Ser Ser		
405	410	415
acc ttc tca cag aga att gaa gga ctt cag atc agc aaa tcg tta agt		1712
Thr Phe Ser Gln Arg Ile Glu Gly Leu Gln Ile Ser Lys Ser Leu Ser		
420	425	430
atg ttt gga cag tct ata tca gga caa att gat gca gat aat aat ggc		1760
Met Phe Gly Gln Ser Ile Ser Gly Gln Ile Asp Ala Asp Asn Asn Gly		
435	440	445
450		
tat gta gat gta gca gtt ggt gct ttt cgg tct gat tct gct gtc ttg		1808
Tyr Val Asp Val Ala Val Gly Ala Phe Arg Ser Asp Ser Ala Val Leu		
455	460	465
cta agg aca aga cct gta gta att gtt gac gct tct tta agc cac cct		1856
Leu Arg Thr Arg Pro Val Val Ile Val Asp Ala Ser Leu Ser His Pro		
470	475	480
gag tca gta aat aga acg aaa ttt gac tgt gtt gaa aat gga tgg cct		1904
Glu Ser Val Asn Arg Thr Lys Phe Asp Cys Val Glu Asn Gly Trp Pro		
485	490	495
tct gtg tgc ata gat cta aca ctt tgt ttc tca tat aag ggc aag gaa		1952
Ser Val Cys Ile Asp Leu Thr Leu Cys Phe Ser Tyr Lys Gly Lys Glu		
500	505	510
gtt cca ggt tac att gtt ttg ttt tat aac atg agt ttg gat gtg aac		2000
Val Pro Gly Tyr Ile Val Leu Phe Tyr Asn Met Ser Leu Asp Val Asn		
515	520	525
530		
aga aag gca gag tct cca cca aga ttc tat ttc tct tct aat gga act		2048
Arg Lys Ala Glu Ser Pro Pro Arg Phe Tyr Phe Ser Ser Asn Gly Thr		
535	540	545
tct gac gtg att aca gga agc ata cag gtg tcc agc aga gaa gct aac		2096
Ser Asp Val Ile Thr Gly Ser Ile Gln Val Ser Ser Arg Glu Ala Asn		
550	555	560

## DE 699 34 998 T2 2007.12.06

tgt aga aca cat caa gca ttt atg cg <sup>g</sup> aaa gat gtg cg <sup>g</sup> gac atc ctc	2144
Cys Arg Thr His Gln Ala Phe Met Arg Lys Asp Val Arg Asp Ile Leu	
565 570 575	
acc cca att cag att gaa gct gct tac cac ctt ggt cct cat gtc atc	2192
Thr Pro Ile Gln Ile Glu Ala Ala Tyr His Leu Gly Pro His Val Ile	
580 585 590	
agt aaa cga agt aca gag gaa ttc cca cca ctt cag cca att ctt cag	2240
Ser Lys Arg Ser Thr Glu Glu Phe Pro Pro Leu Gln Pro Ile Leu Gln	
595 600 605 610	
cag aag aaa gaa aaa gac ata atg aaa aaa aca ata aac ttt gca agg	2288
Gln Lys Lys Glu Lys Asp Ile Met Lys Lys Thr Ile Asn Phe Ala Arg	
615 620 625	
ttt tgt gcc cat gaa aat tgt tct gct gat tta cag gtt tct gca aag	2336
Phe Cys Ala His Glu Asn Cys Ser Ala Asp Leu Gln Val Ser Ala Lys	
630 635 640	
att ggg ttt ttg aag ccc cat gaa aat aaa aca tat ctt gct gtt ggg	2384
Ile Gly Phe Leu Lys Pro His Glu Asn Lys Thr Tyr Leu Ala Val Gly	
645 650 655	
agt atg aag aca ttg atg ttg aat gtg tcc ttg ttt aat gct gga gat	2432
Ser Met Lys Thr Leu Met Leu Asn Val Ser Leu Phe Asn Ala Gly Asp	
660 665 670	
gat gca tat gaa acg act cta cat gtc aaa cta ccc gtg ggt ctt tat	2480
Asp Ala Tyr Glu Thr Leu His Val Lys Leu Pro Val Gly Leu Tyr	
675 680 685 690	
ttc att aag att tta gag ctg gaa gag aag caa ata aac tgt gaa gtc	2528
Phe Ile Lys Ile Leu Glu Leu Glu Lys Gln Ile Asn Cys Glu Val	
695 700 705	
aca gat aac tct ggc gtg gta caa ctt gac tgc agt att ggc tat ata	2576
Thr Asp Asn Ser Gly Val Val Gln Leu Asp Cys Ser Ile Gly Tyr Ile	
710 715 720	
tat gta gat cat ctc tca agg ata gat att agc ttt ctc ctg gat gtg	2624
Tyr Val Asp His Leu Ser Arg Ile Asp Ile Ser Phe Leu Leu Asp Val	
725 730 735	
agc tca ctc agc aga gc <sup>g</sup> gaa gag gac ctc agt atc aca gtg cat gct	2672
Ser Ser Leu Ser Arg Ala Glu Glu Asp Leu Ser Ile Thr Val His Ala	
740 745 750	
acc tgt gaa aat gaa gag gaa atg gac aat cta aag cac agc aga gtg	2720
Thr Cys Glu Asn Glu Glu Met Asp Asn Leu Lys His Ser Arg Val	
755 760 765 770	
act gta gca ata cct tta aaa tat gag gtt aag ctg act gtt cat ggg	2768
Thr Val Ala Ile Pro Leu Lys Tyr Glu Val Lys Leu Thr Val His Gly	
775 780 785	
ttt gta aac cca act tca ttt gtg tat gga tca aat gat gaa aat gag	2816
Phe Val Asn Pro Thr Ser Phe Val Tyr Gly Ser Asn Asp Glu Asn Glu	
790 795 800	
cct gaa acg tgc atg gtg gag aaa atg aac tta act ttc cat gtt atc	2864
Pro Glu Thr Cys Met Val Glu Lys Met Asn Leu Thr Phe His Val Ile	
805 810 815	

## DE 699 34 998 T2 2007.12.06

aac act ggc aat agt atg gct ccc aat gtt agt gtg gaa ata atg gta Asn Thr Gly Asn Ser Met Ala Pro Asn Val Ser Val Glu Ile Met Val 820 825 830	2912
cca aat tct ttt agc ccc caa act gat aag ctg ttc aac att ttg gat Pro Asn Ser Phe Ser Pro Gln Thr Asp Lys Leu Phe Asn Ile Leu Asp 835 840 845 850	2960
gtc cag act act gga gaa tgc cac ttt gaa aat tat caa aga gtg Val Gln Thr Thr Gly Glu Cys His Phe Glu Asn Tyr Gln Arg Val 855 860 865	3008
tgt gca tta gag cag caa aag agt gca atg cag acc ttg aaa ggc ata Cys Ala Leu Glu Gln Gln Lys Ser Ala Met Gln Thr Leu Lys Gly Ile 870 875 880	3056
gtc cag ttc ttg tcc aag act gat aag agg cta ttg tac tgc ata aaa Val Gln Phe Leu Ser Lys Thr Asp Lys Arg Leu Leu Tyr Cys Ile Lys 885 890 895	3104
gct gat cca cat tgt tta aat ttc ttg tgt aat ttt ggg aaa atg gaa Ala Asp Pro His Cys Leu Asn Phe Leu Cys Asn Phe Gly Lys Met Glu 900 905 910	3152
agt gga aaa gaa gcc agt gtt cat atc caa ctg gaa ggc cg <sup>g</sup> cca tcc Ser Gly Lys Glu Ala Ser Val His Ile Gln Leu Glu Gly Arg Pro Ser 915 920 925 930	3200
att tta gaa atg gat gag act tca gca ctc aag ttt gaa ata aga gca Ile Leu Glu Met Asp Glu Thr Ser Ala Leu Lys Phe Glu Ile Arg Ala 935 940 945	3248
aca ggt ttt cca gag cca aat cca aga gta att gaa cta aac aag gat Thr Gly Phe Pro Glu Pro Asn Pro Arg Val Ile Glu Leu Asn Lys Asp 950 955 960	3296
gag aat gtt gcg cat gtt cta ctg gaa gga cta cat cat caa aga ccc Glu Asn Val Ala His Val Leu Leu Glu Gly Leu His His Gln Arg Pro 965 970 975	3344
aaa cgt tat ttc acc ata gtg att att tca agt agc ttg cta ott gga Lys Arg Tyr Phe Thr Ile Val Ile Ile Ser Ser Ser Leu Leu Leu Gly 980 985 990	3392
ctt att gta ctt ctg ttg atc tca tat gtt atg tgg aag gct ggc ttc Leu Ile Val Leu Leu Ile Ser Tyr Val Met Trp Lys Ala Gly Phe 995 1000 1005 1010	3440
ttt aaa aga caa tac aaa tct atc cta caa gaa gaa aac aga aga gac Phe Lys Arg Gln Tyr Lys Ser Ile Leu Gln Glu Asn Arg Arg Asp 1015 1020 1025	3488
agt tgg agt tat atc aac agt aaa agc aat gat gat taa ggacttcttt Ser Trp Ser Tyr Ile Asn Ser Lys Ser Asn Asp Asp 1030 1035	3537
caaattgaga gaatggaaaa cagcccgccc	3567

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; antisense sequence

&lt;400&gt; 2

ctccgcgtct gcctacgc 18

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; antisense sequence

&lt;400&gt; 3

cgggigctcg cgctgctt 18

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; antisense sequence

&lt;400&gt; 4

cctggatgc cgcgcacl 18

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; antisense sequence

&lt;400&gt; 5

atgaggcgca gcgtgtcc 18

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; antisense sequence

&lt;400&gt; 6

caaagtgcgca cgggatgc 18

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; antisense sequence

&lt;400&gt; 7

ggaacatca acactaag 18

<210> 8  
<211> 18

<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 8  
cccggttcg cgcttcgc 18

<210> 9  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 9  
gcccccttc agtgtcca 18

<210> 10  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 10  
gtggcttgc agcacac 18

<210> 11  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 11  
actgaagggt tggcgagc 18

<210> 12  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 12  
gcacgtctgg ccgggatt 18

<210> 13  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 13  
ccactgattt tctctctc 18

<210> 14  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 14  
ggatccattt tctccctgg 18

<210> 15  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 15  
gcttattttc attctta 18

<210> 16  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 16  
ttctttact cagttctg 18

<210> 17  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 17  
tcacataaalc ttgataac 18

<210> 18  
<211> 18  
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 18

cccatcacaa ttaaatcc 18

<210> 19

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 19

tatattgtat ttatattg 18

<210> 20

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 20

cctaaataac ttccaaat 18

<210> 21

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 21

gaaaatgacc agctccga 18

<210> 22

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 22

tttcatgtaa gatattta 18

<210> 23

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 23

ccacagcaca gacagaag 18

<210> 24

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 24

tggtgctc tg catgggtg 18

<210> 25

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 25

tacacaaaca ctcltcct 18

<210> 26

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 26

tttgttcca ttgcattc 18

<210> 27

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 27

tgcagcatat ttgtcact 18

<210> 28

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 28

tgtcaatgt cgccaaga 18

<210> 29

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 29

tcatcttctt gtggagct 18

<210> 30

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 30

ccatctgcac ggccattg 18

<210> 31

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 31

gtccaaacat acttaacg 18

<210> 32

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 32

tatctgcatac aatttgc 18

<210> 33

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 33

accgaaaaggc accaactg 18

<210> 34

<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 34  
cttgcctta gcaagaca 18

<210> 35  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 35  
tcagggtggc ttaaagaa 18

<210> 36  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 36  
atccatttc aacacagt 18

<210> 37  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 37  
gccctataal gagaaaca 18

<210> 38  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 38  
caatttggaaa gaagtccct 18

<210> 39  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; antisense sequence

&lt;400&gt; 39

tccattctct caatttga 18

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; antisense sequence

&lt;400&gt; 40

ggcgggctgt ttccatt 18

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 1300

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1152)..(1283)

&lt;300&gt;

&lt;308&gt; M62841 genbank

&lt;309&gt; 1994-10-30

&lt;400&gt; 41

ggcagggcac acctggattg cattagaatg agactcacta cccagttcag gtgtgttgcg 60

tttgtgggtct ccggcacatt tcagaggctg attaggaccc tgaccccaca ctggggttta 120

caccctaaa agcaggtgtg tcccgtaaa actgagtgaa tgctgtaaaa gggggatca 180  
tcaattacca gctggagcaa tcgaatcggt taaatgtgaa tcaagtcaca gtgcttcctt 240  
aacccaacct ctctgttggg gtcagccaca gcctaaaccg cctgccgttc agcctgagag 300  
gctgctgcta gcctgctcac qcatgcagcc cggctgcag aggaagtgtg gggaggaagg 360  
aagtgggtat agaagggtgc tgagatgtgg gtcttgaaga gaatagccat aacgtcttg 420  
tcactaaat gttccccagg ggccttcggc gagtctttt gttggttt ttgttttaa 480  
tctgtggctc ttgataattt atctagtggt tgcctacacc taaaaacaa gacacagtgt 540  
ttaactatca acgaaagaac tggacggctc cccgcccag tcccaactccc cgagttgtg 600  
gctggcattt gggccacgccc gggctggcg gctcacagcg aggggcgcgc agtttgggt 660  
cacacagctc cgcttcttagg ccccaaccac cgtaaaagg ggaagccgt gccccatcag 720  
gtccgcttt gctgagccca gagccatccc ggcgtctgcg ggctggagg cccggccag 780  
acgcgagtcc tgcgcagccg agttccca ggcgtccctg cagccgcgcg taggcagaga 840  
cgagcccg ccctgcgcct cccgaccacg cccgggaccc cacccagcgg cccgtacccg 900  
gagaagcagc gcgagcaccc gaagctcccg gtcggccgc agaaaccggg agtggggccg 960  
ggcagtgcg cggcatccca ggcggcccg aacgtccgc cgcgtggc cgacttcccc 1020  
tcctttccc tcttccttc ctttagcccg ctggcccg acacgctgcg ctcatctct 1080  
tggccgttc ttccccgtt gccaaccgtc gcatccctg caactttggg gtagtggccg 1140  
cttagtgtt a atg ttc ccc acc gag agc gca tgg ctt ggg aag cga ggc 1190  
Met Phe Pro Thr Glu Ser Ala Trp Leu Gly Lys Arg Gly  
1 5 10

---

gcg aac ccg ggc ccc gaa gcc gtc cgg gag ggc ccc cac aac acg 1238  
Ala Asn Pro Gly Pro Glu Ala Ala Val Arg Glu Gly Pro His Asn Thr  
15 20 25

ctg ttc ggc tac tcg gtc gtg ctg cac agc cac ggg gcg aac cga 1283  
Leu Phe Gly Tyr Ser Val Val Leu His Ser His Gly Ala Asn Arg  
30 35 40

tggtagtag agttgga 1300

<210> 42  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 42  
tttagtgaca aagacgttat 20

<210> 43  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; antisense sequence

&lt;400&gt; 43

gaaggcccct gggaaacatt 20

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; antisense sequence

&lt;400&gt; 44

agacgttag gctattctct 20

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; antisense sequence

&lt;400&gt; 45

ttgccctat atgagaaaaca 20

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; antisense sequence

&lt;400&gt; 46

cccaagccat gcgcctcg 20

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; antisense sequence

&lt;400&gt; 47

ccgcagccat gcgcctcg 20

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 1771

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1193)..(1387)

<220>  
<221> CDS  
<222> (1709)..(1771)  
<300>  
<308> L20788 Genbank

<309> 1996-04-18

<400> 48

ccagcacttg cctcctgctc cagcgtgaaa agcaggaaat ggaatatgga gtgtaagaca 60  
taaattaaaa ataaaataaa attaaaaaaaa aaaaaagaaa agcagcacac aaggagtatg 120  
ttcagcagag gcccatctcc tggcttaggt gtgctgtgac tctgatctct ggtggcttt 180  
tagaagcctg ttatgacctt gtcttaggct gtgtctacac atctggtggt aggtatgtcc 240  
tggggtaact gagtgtgtac atggggacta gttatgaaga agtgagcaag gggtggagtc 300  
tgctaagtga ggcaagtac agaatttcct tagctgcct gggtttctg tgtaggcta 360  
ttgcctggct tgctcatgcg tatagactct atttaagagg aagtgtataag agaggaagga 420  
agcctgcata aaaggctgca ggcctggag ttttgaagag actagccata tactttgtc 480  
accaaattgct ccaatagggc tggggcgaaa gggggggggg cagcagttt ggcttcttc 540  
aaactgtgta atttctgtat gctacacagc acataagtga cagaggaagt tctggaaggt 600  
tctccacagt cttagttccc aaattattgg ccactggac tggccctgga ggccagtcac 660  
ttggtgaagt cccgcaaggc atcaagcctt agccaacttt caaaaggaa tcccctgatc 720  
tgggggtgt tcccccaagg gttattttgc ctggggccca gaagccagag ccactgtgt 780  
tgatgtctgc cagggtgtga gtccatgcaa cctaggtccc ctacgccttc ctacagctgc 840  
tgcggggcgg gnatgggat cgggtgggg agagggagc caggtgtga gccactgcac 900  
cacacccagg accccaccca gatcctagga gcacccggcc cctggctccg gggccacaga 960  
aacggggcgt gggccagagc ctgaagcatc cctggccact acgatcgctc cgcctgtggc 1020  
caccaattcc cctcctcttc tggcgtccct ctctccgccc ctgtgcctg ccagcaccgg 1080  
acacgctgct gcacttcata tcttggggcg ctcttctctt tggccaaaccg tcgcatacctg 1140  
tgcaactctg gtcagtggcc gttttgtgtt gaatgttctc caccaagagc gc atg gct 1198  
Met Ala  
1  
gct gaa gct agg tgc aga ccg agg tcc cga ggg atc gcc ctc ccg gaa 1246  
Ala Glu Ala Arg Cys Arg Pro Arg Ser Arg Gly Ile Ala Leu Arg Glu  
5 10 15  
gct gtg atg ctg ttg tac ttc ggg gtg cca acc ggg cac tcc tac 1294  
Ala Val Met Leu Leu Tyr Phe Gly Val Pro Thr Gly His Ser Tyr  
20 25 30  
aac ctg gac ccg gag aat gca ctg ctg tac cag ggc ccc tcc ggc acg 1342  
Asn Leu Asp Pro Glu Asn Ala Leu Leu Tyr Gln Gly Pro Ser Gly Thr  
35 40 45 50  
ctg ttt ggc tac tcg gtg ctg cac agc cac ggg tcg aag cgc 1387  
Leu Phe Gly Tyr Ser Val Val Leu His Ser His Gly Ser Lys Arg  
55 60 65  
tggtagtgc gccctccca agaggcatgt cacagcgctt ccgcctctgg gattccttgt 1447  
atgaatcaaa cttccgcctt tcctggagg tcagagaaag acctggcttc agccagctgc 1507

DE 699 34 998 T2 2007.12.06

ctcactggag agccttggaa ctaacttata ttgggatggc agccccagg gtgctcctga 1567  
gtcctgggtc tccagtcatg ggaagaggag gtgggtgcga cttcccttgc tgaccactgc 1627  
acagctgtca caagccaaca cggggcagag tgggtggca gactggttca cgtctgagcg 1687  
aacttgcattt gttcttgctt t agg ctc atc gtg ggg gct ccc act gcc agc 1738  
Trp Leu Ile Val Gly Ala Pro Thr Ala Ser  
70 75  
tgg ctc tct aat gcc tca gtg gtc aat cct ggg 1771  
Trp Leu Ser Asn Ala Ser Val Val Asn Pro Gly  
80 85

<210> 49  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 49  
cacccccgttctgtggcc 20

<210> 50  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 50  
ggatctca ggctctggcc 20

<210> 51  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 51  
ggagcgatcg tagtggccag 20

<210> 52  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 52  
ccggtgctgg caggcgacag 20

<210> 53  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 53  
gatgaagtgc agcagcggtg 20

<210> 54  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 54  
ggccactgac cagagtgc 20

<210> 55  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 55  
cacctcgctt ccgcagccat 20

<210> 56  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> control sequence

<400> 56  
cggaccaggta ccagggttac 20

<210> 57  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> control sequence

<400> 57  
gccgacacccc gttcggttcgg 20

<210> 58  
<211> 20  
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> control sequence

<400> 58

acctcctcgccacgcgcta 20

<210> 59

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 59

cgttccgca gccatgcgt 20

<210> 60

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide sequence

<400> 60

His Ser Leu Gly Lys Trp Leu Gly His Pro Asp Lys Phe  
1 . . . . . 5 . . . . . 10

## SEQUENCE LISTING

### [0177]

<110> Isis Pharmaceuticals, Inc.

<120> ANTISENSE MODULATION OF INTEGRIN  $\alpha 4$  EXPRESSION

<130> P026838EP:HGH

<140> EP 99942290.0

<141> 1999-08-19

<150> PCT/US99/18796

<151> 1999-08-19

<150> US 09/266,203

<151> 1998-10-05

<160> 99

<210> 1

<211> 3567

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (411)..(3527)

<300>  
 <308> L12002 Genbank  
 <309> 1996-02-15

&lt;400&gt; 1

```

cgccatcccg cgctctgcgg actgggaggc ccggggccagg acgcgagtct ggcagccga 60
ggttccccag cgccccctgc agccgcgcgt aggcagagac ggagccggc cctgcgcctc 120
cgcaccacgc ccgggacccc acccagcggc ccgtacccgg agaagcagcg cgagcacccg 180
aagctcccg gtcggcgca gaaaccggga gtggggccgg gcgagtgcgc ggcatcccg 240
gccggcccga acgtccgccc gcgggtggcc gacttccct cctctccct ctctcattcc 300
tttagccccgc tggcgccgga cacgctgcgc ctcatcttt gggcgttct tccccgttgg 360
ccaaccgtcg catcccggtc aactttgggg tagtggccgc ttagtgttga atg ttc      416
                                         Met Phe
                                         1

ccc acc gag agc gca tgg ctt ggg aag cga ggc gcg aac ccg ggc ccc      464
Pro Thr Glu Ser Ala Trp Leu Gly Lys Arg Gly Ala Asn Pro Gly Pro
      5           10          15

gaa gcc gcc gtc cgg gag acg gtg atg ctg ttg ctg tgc ctg ggg gtc      512
Glu Ala Ala Val Arg Glu Thr Val Met Leu Leu Leu Cys Leu Gly Val
      20          25          30

```

## DE 699 34 998 T2 2007.12.06

ccg acc ggc cgc ccc tac aac gtg gac act gag agc gcg ctg ctt tac Pro Thr Gly Arg Pro Tyr Asn Val Asp Thr Glu Ser Ala Leu Leu Tyr 35 40 45 50	560
cag ggc ccc cac aac acg ctg ttc ggc tac tcg gtc gtg ctg cac agc Gln Gly Pro His Asn Thr Leu Phe Gly Tyr Ser Val Val Leu His Ser 55 60 65	608
cac ggg gcg aac cga tgg ctc cta gtg ggt gcg ccc act gcc aac tgg His Gly Ala Asn Arg Trp Leu Leu Val Gly Ala Pro Thr Ala Asn Trp 70 75 80	656
ctc gcc aac gct tca gtg atc aat ccc ggg gcg att tac aga tgc agg Leu Ala Asn Ala Ser Val Ile Asn Pro Gly Ala Ile Tyr Arg Cys Arg 85 90 95	704
atc gga aag aat ccc ggc cag acg tgc gaa cag ctc cag ctg ggt agc Ile Gly Lys Asn Pro Gly Gln Thr Cys Glu Gln Leu Gln Leu Gly Ser 100 105 110	752
cct aat gga gaa cct tgt gga aag act tgt ttg gaa gag aga gac aat Pro Asn Gly Glu Pro Cys Gly Thr Cys Leu Glu Glu Arg Asp Asn 115 120 125 130	800
cag tgg ttg ggg gtc aca ctt tcc aga cag cca gga gaa aat gga tcc Gln Trp Leu Gly Val Thr Leu Ser Arg Gln Pro Gly Glu Asn Gly Ser 135 140 145	848
atc gtg act tgt ggg cat aga tgg aaa aat ata ttt tac ata aag aat Ile Val Thr Cys Gly His Arg Trp Lys Asn Ile Phe Tyr Ile Lys Asn 150 155 160	896
gaa aat aag ctc ccc act ggt ggt tgc tat gga gtg ccc cct gat tta Glu Asn Lys Leu Pro Thr Gly Gly Cys Tyr Gly Val Pro Pro Asp Leu 165 170 175	944
cga aca gaa ctg agt aaa aga ata gct ccg tgt tat caa gat tat gtg Arg Thr Glu Leu Ser Lys Arg Ile Ala Pro Cys Tyr Gln Asp Tyr Val 180 185 190	992
aaa aaa ttt gga gaa aat ttt gca tca tgt caa gct gga ata tcc agt Lys Lys Phe Gly Glu Asn Phe Ala Ser Cys Gln Ala Gly Ile Ser Ser 195 200 205 210	1040
ttt tac aca aag gat tta att gtg atg ggg gcc cca gga tca tct tac Phe Tyr Thr Lys Asp Leu Ile Val Met Gly Ala Pro Gly Ser Ser Tyr 215 220 225	1088
tgg act ggc tct ctt ttt gtc tac aat ata act aca aat aaa tac aag Trp Thr Gly Ser Leu Phe Val Tyr Asn Ile Thr Thr Asn Lys Tyr Lys 230 235 240	1136
gct ttt tta gac aaa caa aat caa gta aaa ttt gga agt tat tta gga Ala Phe Leu Asp Lys Gln Asn Gln Val Lys Phe Gly Ser Tyr Leu Gly 245 250 255	1184

## DE 699 34 998 T2 2007.12.06

tat tca gtc gga gct ggt cat ttt cgg agc cag cat act acc gaa gta	1232
Tyr Ser Val Gly Ala Gly His Phe Arg Ser Gln His Thr Thr Glu Val	.
260 265 270	
gtc gga gga gct cct caa cat gag cag att ggt aag gca tat ata ttc	1280
Val Gly Gly Ala Pro Gln His Glu Gln Ile Gly Lys Ala Tyr Ile Phe	
275 280 285 290	
agc att gat gaa aaa gaa cta aat atc tta cat gaa atg aaa ggt aaa	1328
Ser Ile Asp Glu Lys Glu Leu Asn Ile Leu His Glu Met Lys Gly Lys	
295 300 305	
aag ctt gga tcg tac ttt gga gct tct gtc tgt gct gtg gac ctc aat	1376
Lys Leu Gly Ser Tyr Phe Gly Ala Ser Val Cys Ala Val Asp Leu Asn	
310 315 320	
gca gat ggc ttc tca gat ctg ctc gtg gga gca ccc atg cag agc acc	1424
Ala Asp Gly Phe Ser Asp Leu Leu Val Gly Ala Pro Met Gln Ser Thr	
325 330 335	
atc aga gag gaa gga aga gtg ttt gtg tac atc aac tct ggc tcg gga	1472
Ile Arg Glu Glu Gly Arg Val Phe Val Tyr Ile Asn Ser Gly Ser Gly	
340 345 350	
gca gta atg aat gca atg gaa aca aac ctc gtt gga agt gac aaa tat	1520
Ala Val Met Asn Ala Met Glu Thr Asn Leu Val Gly Ser Asp Lys Tyr	
355 360 365 370	
gct gca aga ttt ggg gaa tct ata gtt aat ctt ggc gac att gac aat	1568
Ala Ala Arg Phe Gly Glu Ser Ile Val Asn Leu Gly Asp Ile Asp Asn	
375 380 385	
gat ggc ttt gaa gat gtt gct atc gga gct cca caa gaa gat gac ttg	1616
Asp Gly Phe Glu Asp Val Ala Ile Gly Ala Pro Gln Glu Asp Asp Leu	
390 395 400	
caa ggt gct att tat att tac aat ggc cgt gca gat ggg atc tcg tca	1664
Gln Gly Ala Ile Tyr Ile Tyr Asn Gly Arg Ala Asp Gly Ile Ser Ser	
405 410 415	
acc ttc tca cag aga att gaa gga ctt cag atc agc aaa tcg tta agt	1712
Thr Phe Ser Gln Arg Ile Glu Gly Leu Gln Ile Ser Lys Ser Leu Ser	
420 425 430	
atg ttt gga cag tct ata tca gga caa att gat gca gat aat aat ggc	1760
Met Phe Gly Gln Ser Ile Ser Gly Gln Ile Asp Ala Asp Asn Asn Gly	
435 440 445 450	
tat gta gat gta gca gtt ggt gct ttt cgg tct gat tct gct gtc ttg	1808
Tyr Val Asp Val Ala Val Gly Ala Phe Arg Ser Asp Ser Ala Val Leu	
455 460 465	
cta agg aca aga cct gta gta att gtt gac gct tct tta agc cac cct	1856
Leu Arg Thr Arg Pro Val Val Ile Val Asp Ala Ser Leu Ser His Pro	
470 475 480	
gag tca gta aat aga acg aaa ttt gac tgt gtt gaa aat gga tgg cct	1904

## DE 699 34 998 T2 2007.12.06

Glu Ser Val Asn Arg Thr Lys Phe Asp Cys Val Glu Asn Gly Trp Pro			
485	490	495	
tct gtg tgc ata gat cta aca ctt tgt ttc tca tat aag ggc aag gaa			1952
Ser Val Cys Ile Asp Leu Thr Leu Cys Phe Ser Tyr Lys Gly Lys Glu			
500	505	510	
gtt cca ggt tac att gtt ttg ttt tat aac atg agt ttg gat gtg aac			2000
Val Pro Gly Tyr Ile Val Leu Phe Tyr Asn Met Ser Leu Asp Val Asn			
515	520	525	530
aga aag gca gag tct cca cca aga ttc tat ttc tct tct aat gga act			2048
Arg Lys Ala Glu Ser Pro Pro Arg Phe Tyr Phe Ser Ser Asn Gly Thr			
535	540	545	
tct gac gtg att aca gga agc ata cag gtg tcc agc aga gaa gct aac			2096
Ser Asp Val Ile Thr Gly Ser Ile Gln Val Ser Ser Arg Glu Ala Asn			
550	555	560	
tgt aga aca cat caa gca ttt atg cgg aaa gat gtg cgg gac atc ctc			2144
Cys Arg Thr His Gln Ala Phe Met Arg Lys Asp Val Arg Asp Ile Leu			
565	570	575	
acc cca att cag att gaa gct gct tac cac ctt ggt cct cat gtc atc			2192
Thr Pro Ile Gln Ile Glu Ala Ala Tyr His Leu Gly Pro His Val Ile			
580	585	590	
agt aaa cga agt aca gag gaa ttc cca cca ctt cag cca att ctt cag			2240
Ser Lys Arg Ser Thr Glu Glu Phe Pro Pro Leu Gln Pro Ile Leu Gln			
595	600	605	610
cag aag aaa gaa aaa gac ata atg aaa aaa aca ata aac ttt gca agg			2288
Gln Lys Lys Glu Lys Asp Ile Met Lys Lys Thr Ile Asn Phe Ala Arg			
615	620	625	
ttt tgt gcc cat gaa aat tgt tct gct gat tta cag gtt tct gca aag			2336
Phe Cys Ala His Glu Asn Cys Ser Ala Asp Leu Gln Val Ser Ala Lys			
630	635	640	
att ggg ttt ttg aag ccc cat gaa aat aaa aca tat ctt gct gtt ggg			2384
Ile Gly Phe Leu Lys Pro His Glu Asn Lys Thr Tyr Leu Ala Val Gly			
645	650	655	
agt atg aag aca ttg atg ttg aat gtg tcc ttg ttt aat gct gga gat			2432
Ser Met Lys Thr Leu Met Leu Asn Val Ser Leu Phe Asn Ala Gly Asp			
660	665	670	
gat gca tat gaa acg act cta cat gtc aaa cta ccc gtg ggt ctt tat			2480
Asp Ala Tyr Glu Thr Thr Leu His Val Lys Leu Pro Val Gly Leu Tyr			
675	680	685	690
ttc att aag att tta gag ctg gaa gag aag caa ata aac tgt gaa gtc			2528
Phe Ile Lys Ile Leu Glu Leu Glu Lys Gln Ile Asn Cys Glu Val			
695	700	705	
aca gat aac tct ggc gtg gta caa ctt gac tgc agt att ggc tat ata			2576
Thr Asn Ser Gly Val Val Gln Leu Asp Cys Ser Ile Gly Tyr Ile			

## DE 699 34 998 T2 2007.12.06

710	715	720	
tat gta gat cat ctc tca agg ata gat att agc ttt ctc ctg gat gtg Tyr Val Asp His Leu Ser Arg Ile Asp Ile Ser Phe Leu Leu Asp Val 725	730	735	2624
agc tca ctc agc aga gcg gaa gag gac ctc agt atc aca gtg cat gct Ser Ser Leu Ser Arg Ala Glu Glu Asp Leu Ser Ile Thr Val His Ala 740	745	750	2672
acc tgt gaa aat gaa gag gaa atg gac aat cta aag cac agc aga gtg Thr Cys Glu Asn Glu Glu Met Asp Asn Leu Lys His Ser Arg Val 755	760	765	2720
act gta gca ata cct tta aaa tat gag gtt aag ctg act gtt cat ggg Thr Val Ala Ile Pro Leu Lys Tyr Glu Val Lys Leu Thr Val His Gly 775	780	785	2768
ttt gta aac cca act tca ttt gtg tat gga tca aat gat gaa aat gag Phe Val Asn Pro Thr Ser Phe Val Tyr Gly Ser Asn Asp Glu Asn Glu 790	795	800	2816
cct gaa acg tgc atg gtg gag aaa atg aac tta act ttc cat gtt atc Pro Glu Thr Cys Met Val Glu Lys Met Asn Leu Thr Phe His Val Ile 805	810	815	2864
aac act ggc aat agt atg gct ccc aat gtt agt gtg gaa ata atg gta Asn Thr Gly Asn Ser Met Ala Pro Asn Val Ser Val Glu Ile Met Val 820	825	830	2912
cca aat tct ttt agc ccc caa act gat aag ctg ttc aac att ttg gat Pro Asn Ser Phe Ser Pro Gln Thr Asp Lys Leu Phe Asn Ile Leu Asp 835	840	845	2960
gtc cag act act gga gaa tgc cac ttt gaa aat tat caa aga gtg Val Gln Thr Thr Gly Glu Cys His Phe Glu Asn Tyr Gln Arg Val 855	860	865	3008
tgt gca tta gag cag caa aag agt gca atg cag acc ttg aaa ggc ata Cys Ala Leu Glu Gln Gln Lys Ser Ala Met Gln Thr Leu Lys Gly Ile 870	875	880	3056
gtc cag ttc ttg tcc aag act gat aag agg cta ttg tac tgc ata aaa Val Gln Phe Leu Ser Lys Thr Asp Lys Arg Leu Leu Tyr Cys Ile Lys 885	890	895	3104
gct gat cca cat tgt tta aat ttc ttg tgt aat ttt ggg aaa atg gaa Ala Asp Pro His Cys Leu Asn Phe Leu Cys Asn Phe Gly Lys Met Glu 900	905	910	3152
agt gga aaa gaa gcc agt gtt cat atc caa ctg gaa ggc cggttcc Ser Gly Lys Glu Ala Ser Val His Ile Gln Leu Glu Gly Arg Pro Ser 915	920	925	3200
att tta gaa atg gat gag act tca gca ctc aag ttt gaa ata aga gca Ile Leu Glu Met Asp Glu Thr Ser Ala Leu Lys Phe Glu Ile Arg Ala 935	940	945	3248

DE 699 34 998 T2 2007.12.06

aca ggt ttt cca gag cca aat cca aga gta att gaa cta aac aag gat..	3296
Thr Gly Phe Pro Glu Pro Asn Pro Arg Val Ile Glu Leu Asn Lys Asp	
950 955 960	
gag aat gtt gcg cat gtt cta ctg gaa gga cta cat cat caa aga ccc	3344
Glu Asn Val Ala His Val Leu Leu Glu Gly Leu His His Gln Arg Pro	
965 970 975	
aaa cgt tat ttc acc ata gtg att att tca agt agc ttg cta ctt gga	3392
Lys Arg Tyr Phe Thr Ile Val Ile Ser Ser Ser Leu Leu Leu Gly	
980 985 990	
ctt att gta ctt ctg ttg atc tca tat gtt atg tgg aag gct ggc ttc	3440
Leu Ile Val Leu Leu Ile Ser Tyr Val Met Trp Lys Ala Gly Phe	
995 1000 1005 1010	
ttt aaa aga caa tac aaa tct atc cta caa gaa gaa aac aga aga gac	3488
Phe Lys Arg Gln Tyr Lys Ser Ile Leu Gln Glu Glu Asn Arg Arg Asp	
1015 1020 1025	
agt tgg agt tat atc aac agt aaa agc aat gat gat taa ggacttcttt	3537
Ser Trp Ser Tyr Ile Asn Ser Lys Ser Asn Asn Asp Asp	
1030 1035	
caaattgaga gaatggaaaa cagccccccc	3567

<210> 2  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 2  
ctccgtctct gcctacgc 18

<210> 3  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> antisense sequence

<400> 3  
cgggtgtcg cgctgctt 18

<210> 4  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 4

cctggatgc cgcgact 18

<210> 5  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 5  
atgaggcgca gcgtgtcc 18

<210> 6  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 6  
caaagtgcg cggatgc 18

<210> 7  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 7  
ggaacattca acactaag 18

<210> 8  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 8  
cccggttcg cgcctcg 18

<210> 9  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 9  
gcgcgtcgc agtgtcca 18

<210> 10

<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 10  
gtggctgtgc agcacacac 18

<210> 11  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 11  
actgaaggcgt tggcgagc 18

<210> 12  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 12  
gcacgtctgg ccgggatt 18

<210> 13  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 13  
ccactgattg tctctctc 18

<210> 14  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 14  
ggatccattt tctccctgg 18

<210> 15  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; antisense sequence

&lt;400&gt; 15

gctttattttc attcttta 18

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; antisense sequence

&lt;400&gt; 16

ttcgtttact cagttctg 18

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; antisense sequence

&lt;400&gt; 17

tcacataatc ttgataac 18

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; antisense sequence

&lt;400&gt; 18

cccatcacaa ttaaatcc 18

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; antisense sequence

&lt;400&gt; 19

ttatgttag ttatattg 18

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; antisense sequence

<400> 20  
cctaaataac ttccaaat 18

<210> 21  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 21  
gaaaatgacc agctccga 18

<210> 22  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 22  
tttcatgtaa gatattta 18

<210> 23  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 23  
ccacagcaca gacagaag 18

<210> 24  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 24  
tggtgctctg catgggtg 18

<210> 25  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 25  
lacacaaaca ctcttcct 18

<210> 26  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 26  
tttgtttcca ttgcattc 18

<210> 27  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 27  
tgcagcatat ttgtcact 18

<210> 28  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 28  
ttgtcaatgt cgccaaga 18

<210> 29  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 29  
tcatcttcgt gtggagct 18

<210> 30  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 30  
ccatclgcac ggccatcg 18

<210> 31  
<211> 18  
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 31

gtccaaacat acttaacg 18

<210> 32

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 32

tatctgcata aatttgc 18

<210> 33

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 33

accgaaaagc accaactg 18

<210> 34

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 34

cttgcctta gcaagaca 18

<210> 35

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 35

tcaagggtggc ttaaagaa 18

<210> 36

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 36  
atccatttc aacacagt 18

<210> 37  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 37  
gcccttata gagaaaca 18

<210> 38  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 38  
caatttggaaa gaagtcc 18

<210> 39  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 39  
tccattctct caatttga 18

<210> 40  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 40  
ggcgccgtt tttccatt 18

<210> 41  
<211> 1300  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
<220>  
<221> CDS  
<222> (1152)..(1283)  
<300>  
<308> M62841 genbank

&lt;309&gt; 1994-10-30

&lt;400&gt; 41

ggcagggcac acctggattg cattagaatg agactcacta cccagttcag gtgtgttgcg 60  
 ttgtgggtct ccggcacatt tcagaggctg attaggaccc tgaccccaca ctggggttta 120  
 caccctaaa agcaggtgtg tcccgtggca actgagtgaa tgctgtaaaa ggggggatca 180  
 tcaattacca gctggagcaa tcgaatcggt taaatgtgaa tcaagtacaca gtgcttcctt 240  
 aacccaacct ctctgttggg gtcagccaca gcctaaaccg cctgcgttc agcctgagag 300  
 gctgctgcta gcctgctcac gcatgcagcc cgggctgcag aggaagtgtg gggaggaagg 360  
 aagtgggtat agaagggtgc tgagatgtgg gtcttgaaga gaatagccat aacgtctttg 420  
 tcactaaaat gttccccagg ggccttcggc gagtcctttt gtttggtttt ttgtttttaa 480  
 tctgtggctc ttgataattt atctagtggt tgcttacacc tgaaaaacaa gacacagtgt 540  
 ttaactatca acgaaagaac tggacggctc cccgcccgcag tcccaactccc cgagtttgt 600  
 gctggcattt gggccacgcc gggctggcg gctcacagcg aggggcccgc agtttggggt 660  
 cacacagctc cgcttctagg ccccaaccac cgtaaaagg ggaagcccgt gccccatcag 720  
 gtccgctctt gctgagccca gagccatccc gcgctctgcg ggctgggagg cccggccag 780  
 acgcgagtcc tgcgcagccg aggttccca gcgccccctg cagccgcgc taggcagaga 840  
 cggagcccg ccctgcgcct ccgcaccacg cccgggaccc caccagcgg cccgtacccg 900  
 gagaagcagc gcgagcaccc gaagctcccg gctcggccgc agaaaccggg agtggggccg 960  
 ggcgagtgcg cggcatccca ggcggcccg aacgtccgcg cgcggtggc cgacttcccc 1020  
 tccttttccc tctctcttc ctttagcccg ctggcgccgg acacgctgcg cctcatct 1080  
 tggggcgttc ttccccgttgc gccaaccgtc gcatcccgta caactttggg gtatgtggccg 1140  
 cttagtgttg a atg ttc ccc acc gag agc gca tgg ctt ggg aag cga ggc 1190  
     Met Phe Pro Thr Glu Ser Ala Trp Leu Gly Lys Arg Gly  
     1                 5                 10

gcg aac ccg ggc ccc gaa gcc gcc gtc cggtt ggg ggc ccc cac aac acg 1238  
 Ala Asn Pro Gly Pro Glu Ala Ala Val Arg Glu Gly Pro His Asn Thr  
     15                 20                 25

ctg ttc ggc tac tgc gtc gtg ctg cac agc cac ggg ggc aac cga          1283  
  Leu Phe Gly Tyr Ser Val Val Leu His Ser His Gly Ala Asn Arg  
   30                 35                 40  
 tggtagtag agtttgg 1300

<210> 42  
 <211> 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; antisense sequence

&lt;400&gt; 42

tttagtgaca aagacgttat 20

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; antisense sequence

&lt;400&gt; 43

gaaggcccct gggaaacatt 20

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; antisense sequence

&lt;400&gt; 44

agacgtttagt gctatattct 20

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; antisense sequence

&lt;400&gt; 45

ttgcccttat atgagaaaaca 20

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; antisense sequence

&lt;400&gt; 46

cccaagccat gcgccttcgg 20

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; antisense sequence

&lt;400&gt; 47

ccgcagccat ggcgtcttgg 20

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 1771

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1193)..(1387)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1709)..(1771)

&lt;300&gt;

&lt;308&gt; L20788 Genbank

&lt;309&gt; 1996-04-18

&lt;400&gt; 48

ccagcacattg ctccttgctc cagcgtgaaa agcaggaaat ggaatatgga gtgttaagaca	60
taaattaaaa ataaaataaa attaaaaaaaa aaaaaagaaaa agcagcacac aaggagtatg	120
ttcagcagag gcccatctcc tggcttaggt gtgtgtgac tctgatctct ggtggctttt	180
tagaacctg ttatgacctt gtcttaggct gtgtctacac atctgggtt aggtatgtcc	240
tgggttaact gagtgtgtac atggggacta gttatgaaga agtgagcaag gggtgagtc	300
tgcttaagtga ggcaagtcac agaatttcct tagcttgccc gggtttctg tggtaggcta	360
ttgcctggct tgctcatgct tataactctt atttaagagg aagtgtatag agaggaagga	420
agcctgcata aaaggctgca ggcctggag ttttgaagag actagccata tactttgtc	480
accaaattgtc ccaatagggc tggggcgaaa gggggggggg cagcagttt ggcttcttgc	540
aaactgtgtat atttctgtat gctacacagc acataagtga cagaggaagt tctggaaagg	600
tctccacagt cttagttccc aaattattgg ccactggac tggccctggaa ggccagtcac	660
ttgggtgaagt cccgcaaggc atcaagcattt agccaacttt caaaaggaa tccccctgate	720
tgttttgtgt tcccccaagg gttatTTTg ctggggccca gaagccagag ccactgtgtg	780
tgtatgtctgc cagggtgtga gtccatgcaa cctaggccc ctagcgtcccc ctacagctgc	840

DE 699 34 998 T2 2007.12.06

tgcggggcgg ggatggggat cgggttgggg agagggaggc caggctgtga gccactgcac ..	900
cacaccagg accccaccca gatccttagga gcacccggcc cctggctccg gggccacaga	960
aacggggcgt gggccagagc ctgaagcatc cctggccact acgatcgctc cgcctgtggc	1020
ccaattcc cctcccttc tggcgccct ctctccgccc ctgtcgccctg ccagcacccg	1080
acacgctgct gcaacttcatac tcttggggcg ctcttctttt tggccaacccg tccatcctg	1140
tgcaactctg gtcagtggcc gttttgtgtt gaatgttctc caccaagagc gc atg gct Met Ala	1198
	1
gcg gaa gcg agg tgc aga ccg agg tcc cga ggg atc gcc ctc cgg gaa 1246	
Ala Glu Ala Arg Cys Arg Pro Arg Ser Arg Gly Ile Ala Leu Arg Glu	
5 10 15	
gcg gtg atg ctg ttg ttg tac ttc ggg gtg cca acc ggg cac tcc tac 1294	
Ala Val Met Leu Leu Tyr Phe Gly Val Pro Thr Gly His Ser Tyr	
20 25 30	
aac ctg gac ccg gag aat gca ctg ctg tac cag ggc ccc tcc ggc acg 1342	
Asn Leu Asp Pro Glu Asn Ala Leu Leu Tyr Gln Gly Pro Ser Gly Thr	
35 40 45 50	
ctg ttt ggc tac tcg gtg ctg cac agc cac ggg tcg aag cgc 1387	
Leu Phe Gly Tyr Ser Val Val Leu His Ser His Gly Ser Lys Arg	
55 60 65	
tggtgagtgc gccctccccca agaggcatgt cacagcgcct cgcgcctctgg gattccttgt	1447
atgaatcaaa cttccggccc tccctggagg tcagagaaaag acctggcttc agccagctgc	1507
ctcactggag agccttgaa ctaacttatac ttggatggc agccccagg gtgcctctga	1567
gtcctgggtc tccagtcatac ggaagaggag gtgggtgcca cttcccttgc tgaccactgc	1627
acagctgtca caagccaca cggggcagag tgggtggca gactgggtca cgtctgagcg	1687
aacttgcatac gttcttgctt t agg ctc atc gtg ggg gct ccc act gcc agc 1738	
Trp Leu Ile Val Gly Ala Pro Thr Ala Ser	
70 75	
tgg ctc tct aat gcc tca gtg gtc aat cct ggg 1771	
Trp Leu Ser Asn Ala Ser Val Val Asn Pro Gly	
80 85	

<210> 49  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 49  
cacgccccgt ttcgtggcc 20

<210> 50  
<211> 20  
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 50

ggatgcgtca ggctctggcc 20

<210> 51

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 51

ggagcgatcg tagtgccag 20

<210> 52

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 52

ccgggtgtgg caggcgacag 20

<210> 53

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 53

gatgaaglgc agcagcgtgt 20

<210> 54

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 54

ggccactgac cagagtgc 20

<210> 55

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 55

cacctcgctt ccgcagccat 20

<210> 56

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> control sequence

<400> 56

cggaccaggta ccagggttac 20

<210> 57

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> control sequence

<400> 57

gccgacaccc gttcggttcgg 20

<210> 58

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>.

<223> control sequence

<400> 58

acccctcgcc tcacgcgcta 20

<210> 59

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 59

cgcttccgca gccatgcgt 20

<210> 60

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide sequence

<400> 60

His Ser Leu Gly Lys Trp Leu Gly His Pro Asp Lys Phe  
1 5 10

<210> 61

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 61

agtccgcaga gcgcggatg 20

<210> 62

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 62

agactcgcg tcctggcccg 20

<210> 63

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 63

gtgcggaggc gcagggccgg 20

<210> 64

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 64

ccggttctcg ccgcccgg 20

<210> 65

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 65

atgcgacggt tggccaacgg 20

<210> 66  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 66  
cccagcacat cggctctcg 20

<210> 67  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 67  
cttcccaagg catgcgtct 20

<210> 68  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 68  
tcgcttccca agccatgcgc 20

<210> 69  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 69  
gcctcgcttc ccaaggcatg 20

<210> 70  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 70  
cgcgcctcgc ttcccaagcc 20

<210> 71  
<211> 20  
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 71

tccttgccct tatacgaaa 20

<210> 72

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 72

acttccctgc ccttatatga 20

<210> 73

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 73

agagttatct gtgacttcac 20

<210> 74

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 74

gatactgagg tcctcttccg 20

<210> 75

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 75

tggatcaac agaagtacaa 20

<210> 76

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 76

ccagccttcc acataacata 20

<210> 77

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 77

aggatagatt tgttgtgtct 20

<210> 78

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 78

gttgatataa ctccaactgt 20

<210> 79

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 79

taatcatcat tgctttact 20

<210> 80

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 80

aagaagtcct taatcatcat 20

<210> 81

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 81

ctgagtctgt tttccatctc 20

<210> 82

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 82

cttgtaaaca gtgtcttta 20

<210> 83

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 83

gagtaaaaga agtccaaaca 20

<210> 84

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 84

ccttgcatga agacataata 20

<210> 85

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 85

aagagtaatc attgctgaga 20

<210> 86

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 86

tctttggctg tattattacc 20

<210> 87

<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 87  
tgcttttagtg ttctcttacc 20

<210> 88  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 88  
aaglctaaga ctltccagt 20

<210> 89  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 89  
gaggcaagca catalggtaa 20

<210> 90  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 90  
tcaaatgaac ctctgccccac 20

<210> 91  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 91  
ttaaaggat aatggtccac 20

<210> 92  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; antisense sequence

&lt;400&gt; 92

ggaacacagc ccgttagaaa 20

&lt;210&gt; 93

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; antisense sequence

&lt;400&gt; 93

tttgcagg tggctataa 20

&lt;210&gt; 94

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer sequence

&lt;400&gt; 94

gacacgtgc gcctca 17

&lt;210&gt; 95

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer sequence

&lt;400&gt; 95

attcaacact aagcgccac tg 22

&lt;210&gt; 96

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; probe sequence

&lt;400&gt; 96

ccaaaccgtcg catccgtgc aa 22

&lt;210&gt; 97

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer sequence

<400> 97  
gaaggtgaag gtcggagtc 19

<210> 98  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> primer sequence

<400> 98  
gaagatggtg atgggatllc 20

<210> 99  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 99  
caagcttccc gttctcagcc 20

## SEQUENCE LISTING

## [0178]

<110> Isis Pharmaceuticals, Inc.

<120> ANTISENSE MODULATION OF INTEGRIN  $\alpha$ 4 EXPRESSION

<130> P026838EP:HGH

<140> EP 99942290.0  
<141> 1999-08-19

<150> PCT/US99/18796  
<151> 1999-08-19

<150> US 09/166,203  
<151> 1998-10-05

<160> 99

<210> 1  
<211> 3567  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CDS  
<222> (411)..(3527)

<300>  
<308> L12002 Genbank  
<309> 1996-02-15

&lt;400&gt; 1

cgccatcccc cgctctgcgg actgggaggc ccgggccagg acgcgagtct gcgcagccga 60  
ggttccccag cgccccatgc agccgcgcgt aggcaagagac ggagccggc cctgcgcctc 120  
cgcaccacgc ccgggacccc acccagcggc ccgtacccgg agaagcagcg cgagcacccg 180  
aagctcccg ctcggcggca gaaaccggga gtggggccgg gcgagtgcgc ggcatccag 240  
gccggcccg aegtccgccc gcggtgtggcc gacttccct cctctccat ctctcattcc 300  
tttagccccgc tggcgccggaa cacgctgcgc ctcatcttt gggcgttct tccccgttgg 360  
ccaaccgtcg catcccgatgc aactttgggg tagtgccgc tttagtgttga atg ttc 416  
Met Phe  
1  
ccc acc gag agc gca tgg ctt ggg aag cga ggc gcg aac ccg ggc ccc 464  
Pro Thr Glu Ser Ala Trp Leu Gly Lys Arg Gly Ala Asn Pro Gly Pro  
5 10 15  
gaa gcc gcc gtc cgg gag acg gtg atg ctg ttg ctg tgc ctg ggg gtc 512  
Glu Ala Ala Val Arg Glu Thr Val Met Leu Leu Leu Cys Leu Gly Val  
20 25 30

## DE 699 34 998 T2 2007.12.06

ccg acc ggc cgc ccc tac aac gtg gac act gag agc gcg ctg ctt tac Pro Thr Gly Arg Pro Tyr Asn Val Asp Thr Glu Ser Ala Leu Leu Tyr 35 40 45 50	560
cag ggc ccc cac aac acg ctg ttc ggc tac tcg gtc gtg ctg cac agc Gln Gly Pro His Asn Thr Leu Phe Gly Tyr Ser Val Val Leu His Ser 55 60 65	608
cac ggg gcg aac cga tgg ctc cta gtg ggt gcg ccc act gcc aac tgg His Gly Ala Asn Arg Trp Leu Leu Val Gly Ala Pro Thr Ala Asn Trp 70 75 80	656
ctc gcc aac gct tca gtg atc aat ccc ggg gcg att tac aga tgc agg Leu Ala Asn Ala Ser Val Ile Asn Pro Gly Ala Ile Tyr Arg Cys Arg 85 90 95	704
atc gga aag aat ccc ggc cag acg tgc gaa cag ctc cag ctg ggt agc Ile Gly Lys Asn Pro Gly Gln Thr Cys Glu Gln Leu Gln Leu Gly Ser 100 105 110	752
cct aat gga gaa cct tgt gga aag act tgt ttg gaa gag aga gac aat Pro Asn Gly Glu Pro Cys Gly Lys Thr Cys Leu Glu Glu Arg Asp Asn 115 120 125 130	800
cag tgg ttg ggg gtc aca ctt tcc aga cag cca gga gaa aat gga tcc Gln Trp Leu Gly Val Thr Leu Ser Arg Gln Pro Gly Glu Asn Gly Ser 135 140 145	848
atc gtg act tgt ggg cat aga tgg aaa aat ata ttt tac ata aag aat Ile Val Thr Cys Gly His Arg Trp Lys Asn Ile Phe Tyr Ile Lys Asn 150 155 160	896
gaa aat aag ctc ccc act ggt ggt tgc tat gga gtg ccc cct gat tta Glu Asn Lys Leu Pro Thr Gly Gly Cys Tyr Gly Val Pro Pro Asp Leu 165 170 175	944
cga aca gaa ctg agt aaa aga ata gct ccg tgt tat caa gat tat gtg Arg Thr Glu Leu Ser Lys Arg Ile Ala Pro Cys Tyr Gln Asp Tyr Val 180 185 190	992
aaa aaa ttt gga gaa aat ttt gca tca tgt caa gct gga ata tcc agt Lys Lys Phe Gly Glu Asn Phe Ala Ser Cys Gln Ala Gly Ile Ser Ser 195 200 205 210	1040
ttt tac aca aag gat tta att gtg atg ggg gcc cca gga tca tct tac Phe Tyr Thr Lys Asp Leu Ile Val Met Gly Ala Pro Gly Ser Ser Tyr 215 220 225	1088
tgg act ggc tct ctt gtc tac aat ata act aca aat aaa tac aag Trp Thr Gly Ser Leu Phe Val Tyr Asn Ile Thr Thr Asn Lys Tyr Lys 230 235 240	1136
gct ttt tta gac aaa caa aat caa gta aaa ttt gga agt tat tta gga Ala Phe Leu Asp Lys Gln Asn Gln Val Lys Phe Gly Ser Tyr Leu Gly 245 250 255	1184

## DE 699 34 998 T2 2007.12.06

tat tca gtc gga gct ggt cat ttt cgg agc cag cat act acc gaa gta Tyr Ser Val Gly Ala Gly His Phe Arg Ser Gln His Thr Thr Glu Val 260 265 270	1232
gtc gga gga gct cct caa cat gag cag att ggt aag gca tat ata ttc Val Gly Gly Ala Pro Gln His Glu Gln Ile Gly Lys Ala Tyr Ile Phe 275 280 285 290	1280
agc att gat gaa aaa gaa cta aat atc tta cat gaa atg aaa ggt aaa Ser Ile Asp Glu Lys Glu Leu Asn Ile Leu His Glu Met Lys Gly Lys 295 300 305	1328
aag ctt gga tcg tac ttt gga gct tct gtc tgt gct gtg gac ctc aat Lys Leu Gly Ser Tyr Phe Gly Ala Ser Val Cys Ala Val Asp Leu Asn 310 315 320	1376
gca gat ggc ttc tca gat ctg ctc gtg gga gca ccc atg cag agc acc Ala Asp Gly Phe Ser Asp Leu Leu Val Gly Ala Pro Met Gln Ser Thr 325 330 335	1424
atc aga gag gaa gga aga gtg ttt gtg tac atc aac tct ggc tcg gga Ile Arg Glu Glu Gly Arg Val Phe Val Tyr Ile Asn Ser Gly Ser Gly 340 345 350	1472
gca gta atg aat gca atg gaa aca aac ctc gtt gga agt gac aaa tat Ala Val Met Asn Ala Met Glu Thr Asn Leu Val Gly Ser Asp Lys Tyr 355 360 365 370	1520
gct gca aga ttt ggg gaa tct ata gtt aat ctt ggc gac att gac aat Ala Ala Arg Phe Gly Glu Ser Ile Val Asn Leu Gly Asp Ile Asp Asn 375 380 385	1568
gat ggc ttt gaa gat gtt gct atc gga gct cca caa gaa gat gac ttg Asp Gly Phe Glu Asp Val Ala Ile Gly Ala Pro Gln Glu Asp Asp Leu 390 395 400	1616
caa ggt gct att tat att tac aat ggc cgt gca gat ggg atc tcg tca Gln Gly Ala Ile Tyr Ile Tyr Asn Gly Arg Ala Asp Gly Ile Ser Ser 405 410 415	1664
acc ttc tca cag aga att gaa gga ctt cag atc agc aaa tcg tta agt Thr Phe Ser Gln Arg Ile Glu Gly Leu Gln Ile Ser Lys Ser Leu Ser 420 425 430	1712
atg ttt gga cag tct ata tca gga caa att gat gca gat aat aat ggc Met Phe Gly Gln Ser Ile Ser Gly Gln Ile Asp Ala Asp Asn Asn Gly 435 440 445 450	1760
tat gta gat gta gca gtt ggt gct ttt cgg tct gat tct gct gtc ttg Tyr Val Asp Val Ala Val Gly Ala Phe Arg Ser Asp Ser Ala Val Leu 455 460 465	1808
cta agg aca aga cct gta gta att gtt gac gct tct tta agc cac cct Leu Arg Thr Arg Pro Val Val Ile Val Asp Ala Ser Leu Ser His Pro 470 475 480	1856
gag tca gta aat aga acg aaa ttt gac tgt gtt gaa aat gga tgg cct	1904

## DE 699 34 998 T2 2007.12.06

Glu Ser Val Asn Arg Thr Lys Phe Asp Cys Val Glu Asn Gly Trp Pro			
485	490	495	
tct gtg tgc ata gat cta aca ctt tgt ttc tca tat aag ggc aag gaa		1952	
Ser Val Cys Ile Asp Leu Thr Leu Cys Phe Ser Tyr Lys Gly Lys Glu			
500	505	510	
gtt cca ggt tac att gtt ttg ttt tat aac atg agt ttg gat gtg aac		2000	
Val Pro Gly Tyr Ile Val Leu Phe Tyr Asn Met Ser Leu Asp Val Asn			
515	520	525	530
aga aag gca gag tct cca cca aga ttc tat ttc tct aat gga act		2048	
Arg Lys Ala Glu Ser Pro Pro Arg Phe Tyr Phe Ser Ser Asn Gly Thr			
535	540	545	
tct gac gtg att aca gga agc ata cag gtg tcc agc aga gaa gct aac		2096	
Ser Asp Val Ile Thr Gly Ser Ile Gln Val Ser Ser Arg Glu Ala Asn			
550	555	560	
tgt aga aca catcaa gca ttt atg cgg aaa gat gtg cgg gac atc ctc		2144	
Cys Arg Thr His Gln Ala Phe Met Arg Lys Asp Val Arg Asp Ile Leu			
565	570	575	
acc cca att cag att gaa gct gct tac cac ctt ggt cct cat gtc atc		2192	
Thr Pro Ile Gln Ile Glu Ala Ala Tyr His Leu Gly Pro His Val Ile			
580	585	590	
agt aaa cga agt aca gag gaa ttc cca cca ctt cag cca att ctt cag		2240	
Ser Lys Arg Ser Thr Glu Glu Phe Pro Pro Leu Gln Pro Ile Leu Gln			
595	600	605	610
cag aag aaa gaa aaa gac ata atg aaa aaa aca ata aac ttt gca agg		2288	
Gln Lys Lys Glu Lys Asp Ile Met Lys Lys Thr Ile Asn Phe Ala Arg			
615	620	625	
ttt tgt gcc cat gaa aat tgt tct gct gat tta cag gtt tct gca aag		2336	
Phe Cys Ala His Glu Asn Cys Ser Ala Asp Leu Gln Val Ser Ala Lys			
630	635	640	
att ggg ttt ttg aag ccc cat gaa aat aaa aca tat ctt gct gtt ggg		2384	
Ile Gly Phe Leu Lys Pro His Glu Asn Lys Thr Tyr Leu Ala Val Gly			
645	650	655	
agt atg aag aca ttg atg ttg aat gtg tcc ttg ttt aat gct gga gat		2432	
Ser Met Lys Thr Leu Met Leu Asn Val Ser Leu Phe Asn Ala Gly Asp			
660	665	670	
gat gca tat gaa acg act cta cat gtc aaa cta ccc gtg ggt ctt tat		2480	
Asp Ala Tyr Glu Thr Thr Leu His Val Lys Leu Pro Val Gly Leu Tyr			
675	680	685	690
ttc att aag att tta gag ctg gaa gag aag caa ata aac tgt gaa gtc		2528	
Phe Ile Lys Ile Leu Glu Leu Glu Lys Gln Ile Asn Cys Glu Val			
695	700	705	
aca gat aac tct ggc gtg gta caa ctt gac tgc agt att ggc tat ata		2576	
Thr Asp Asn Ser Gly Val Val Gln Leu Asp Cys Ser Ile Gly Tyr Ile			

## DE 699 34 998 T2 2007.12.06

710

715

720

tat gta gat cat ctc tca agg ata gat att agc ttt ctc ctg gat gtg Tyr Val Asp His Leu Ser Arg Ile Asp Ile Ser Phe Leu Leu Asp Val 725	730	735	2624
agc tca ctc agc aga gcg gaa gag gac ctc agt atc aca gtg cat gct Ser Ser Leu Ser Arg Ala Glu Glu Asp Leu Ser Ile Thr Val His Ala 740	745	750	2672
acc tgt gaa aat gaa gag gaa atg gac aat cta aag cac agc aga gtg Thr Cys Glu Asn Glu Glu Met Asp Asn Leu Lys His Ser Arg Val 755	760	765	2720
act gta gca ata cct tta aaa tat gag gtt aag ctg act gtt cat ggg Thr Val Ala Ile Pro Leu Lys Tyr Glu Val Lys Leu Thr Val His Gly 775	780	785	2768
ttt gta aac cca act tca ttt gtg tat gga tca aat gat gaa aat gag Phe Val Asn Pro Thr Ser Phe Val Tyr Gly Ser Asn Asp Glu Asn Glu 790	795	800	2816
cct gaa acg tgc atg gtg gag aaa atg aac tta act ttc cat gtt atc Pro Glu Thr Cys Met Val Glu Lys Met Asn Leu Thr Phe His Val Ile 805	810	815	2864
aac act ggc aat agt atg gct ccc aat gtt agt gtg gaa ata atg gta Asn Thr Gly Asn Ser Met Ala Pro Asn Val Ser Val Glu Ile Met Val 820	825	830	2912
cca aat tct ttt agc ccc caa act gat aag ctg ttc aac att ttg gat Pro Asn Ser Phe Ser Pro Gln Thr Asp Lys Leu Phe Asn Ile Leu Asp 835	840	845	2960
gtc cag act act gga gaa tgc cac ttt gaa aat tat caa aga gtg Val Gln Thr Thr Gly Glu Cys His Phe Glu Asn Tyr Gln Arg Val 855	860	865	3008
tgt gca tta gag cag caa aag agt gca atg cag acc ttg aaa ggc ata Cys Ala Leu Glu Gln Gln Lys Ser Ala Met Gln Thr Leu Lys Gly Ile 870	875	880	3056
gtc cag ttc ttg tcc aag act gat aag agg cta ttg tac tgc ata aaa Val Gln Phe Leu Ser Lys Thr Asp Lys Arg Leu Leu Tyr Cys Ile Lys 885	890	895	3104
gct gat cca cat tgt tta aat ttc ttg tgt aat ttt ggg aaa atg gaa Ala Asp Pro His Cys Leu Asn Phe Leu Cys Asn Phe Gly Lys Met Glu 900	905	910	3152
agt gga aaa gaa gcc agt gtt cat atc caa ctg gaa ggc cgg cca tcc Ser Gly Lys Glu Ala Ser Val His Ile Gln Leu Glu Gly Arg Pro Ser 915	920	925	3200
att tta gaa atg gat gag act tca gca ctc aag ttt gaa ata aga gca Ile Leu Glu Met Asp Glu Thr Ser Ala Leu Lys Phe Glu Ile Arg Ala 935	940	945	3248

## DE 699 34 998 T2 2007.12.06

aca ggt ttt cca gag cca aat cca aga gta att gaa cta aac aag gat		3296
Thr Gly Phe Pro Glu Pro Asn Pro Arg Val Ile Glu Leu Asn Lys Asp		
950	955	960
gag aat gtt gcg cat gtt cta ctg gaa gga cta cat cat caa aga ccc		3344
Glu Asn Val Ala His Val Leu Leu Glu Gly Leu His His Gln Arg Pro		
965	970	975
aaa cgt tat ttc acc ata gtg att att tca agt agc ttg cta ctt gga		3392
Lys Arg Tyr Phe Thr Ile Val Ile Ile Ser Ser Ser Leu Leu Leu Gly		
980	985	990
ctt att gta ctt ctg ttg atc tca tat gtt atg tgg aag gct ggc ttc		3440
Leu Ile Val Leu Leu Ile Ser Tyr Val Met Trp Lys Ala Gly Phe		
995	1000	1005
ttt aaa aga caa tac aaa tct atc cta caa gaa gaa aac aga aga gac		3488
Phe Lys Arg Gln Tyr Lys Ser Ile Leu Gln Glu Glu Asn Arg Arg Asp		
1015	1020	1025
agt tgg agt tat atc aac agt aaa agc aat gat gat taa ggacttcttt		3537
Ser Trp Ser Tyr Ile Asn Ser Lys Ser Asn Asp Asp		
1030	1035	
caaattgaga gaatggaaaa cagccccccc		3567

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; antisense sequence

&lt;400&gt; 2

ctccgtctct gcctacgc 18

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; antisense sequence

&lt;400&gt; 3

cggtgtctcg cgctgctt 18

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; antisense sequence

&lt;400&gt; 4

cctggatgc cgcgact 18

<210> 5  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 5  
atgaggcgca gcgtgtcc 18

<210> 6  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 6  
caaagtgcga cggatgc 18

<210> 7  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 7  
ggaacattca acactaag 18

<210> 8  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 8  
cccggttcg cgccctcgc 18

<210> 9  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 9  
gcgcgcgtc agtgtcca 18

<210> 10  
<211> 18  
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 10

gtggctgtgc agcacgac 18

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 11

actgaagcgt tggcgagc 18

<210> 12

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 12

gcacgtctgg ccgggatt 18

<210> 13

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 13

ccactgtatg tctctctc 18

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 14

ggatccattt tctccctgg 18

<210> 15

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 15

gcttattttc attcttta 18

<210> 16

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 16

ttcctttact cagttctg 18

<210> 17

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 17

tacacataatc ttgataac 18

<210> 18

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 18

cccatcacaa ttaaatcc 18

<210> 19

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 19

ttatttgtat ttatattg 18

<210> 20

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 20

cctaaataaac ttccaaat 18

<210> 21

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 21

gaaaatgacc agctccga 18

<210> 22

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 22

tttcatgtaa gatattta 18

<210> 23

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 23

ccacagcaca gacagaag 18

<210> 24

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 24

lggtgctctg catgggtg 18

<210> 25

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 25

tacacaaaaca ctcttcct 18

<210> 26

<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 26  
tttgttccca ttgcattc 18

<210> 27  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 27  
tgcagcatat ttgtcact 18

<210> 28  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 28  
ttgtcaatgt cgccaaga 18

<210> 29  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 29  
tcatcttctt gtggagct 18

<210> 30  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 30  
ccatctgcac ggccatg 18

<210> 31  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; antisense sequence

&lt;400&gt; 31

gtccaaacat acttaacg 18

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; antisense sequence

&lt;400&gt; 32

tatctgcata aatttgtc 18

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; antisense sequence

&lt;400&gt; 33

accgaaaagc accaactg 18

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; antisense sequence

&lt;400&gt; 34

cttgcctta gcaagaca 18

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; antisense sequence

&lt;400&gt; 35

tcagggtggc ttaaagaa 18

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; antisense sequence

<400> 36  
atccalttc aacacagt 18

<210> 37  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 37  
gcccttatat gagaaaca 18

<210> 38  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 38  
caatttggaaa gaagtcct 18

<210> 39  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 39  
tccattctct caatttga 18

<210> 40  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 40  
ggcgggctgt ttccatt 18

<210> 41  
<211> 1300  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
<220>  
<221> CDS  
<222> (1152)..(1283)  
<300>  
<308> M62841 genbank  
<309> 1994-10-30

&lt;400&gt; 41

ggcagggcac acctggattt cattagaatg agactcacta cccagttcag gtgtgttgcg 60  
 ttgtgggtct ccggcacatt tcagaggctg attaggaccc tgaccccaca ctggggttta 120  
 caccctaaa agcaggtgtg tcccgtggca actgagtggg tgctgaaaa ggggggatca 180  
 tcaattacca gctggagcaa tcgaatcggt taaatgtcaa tcaagtcaca gtgcttcctt 240  
 aacccaacct ctctgttggg gtcagccaca gcctaaaccg cctgccgttc agcctgagag 300  
 gctgctgcta gcctgctcac gcatgcagcc cgggctgcag aggaagtgtg gggaggaagg 360  
 aagtgggtat agaagggtgc tgagatgtgg gtcttgaaga gaatagccat aacgtcttg 420  
 tcactaaaat gttccccagg ggccttcggc gagtctttt gtttggttt ttgttttaa 480  
 tctgtggctc ttgataattt atctagtggt tgcctacacc tgaaaaacaa gacacagtgt 540  
 ttaactatca acgaaagaac tggacggctc cccgcccag tcccactccc cgagttgtg 600  
 gctggcattt gggccacgccc gggctggcg gctcacagcg aggggcgcgc agtttgggt 660  
 cacacagctc cgcttcttagg ccccaaccac cgtaaaaagg ggaagccgt gccccatcag 720  
 gtccgctctt gctgagccca gagccatccc ggcgtctgcg ggctggagg cccggccag 780  
 acgcgagtcc tgcgcagccg aggttccccca ggcgccttc cagccgcgc taggcagaga 840  
 cggagccgg ccctgcgcct ccgcaccacg cccgggaccc caccagcgg cccgtacccg 900  
 gagaagcagc gcgagcaccc gaagctcccc gctcggcgcc agaaaccggg agtggggccg 960  
 ggcgagtgcg cggcatccca ggcggcccg aacgtccgc cgcgtggc cgacttcccc 1020  
 tccttttccc tcttccttc ctttagcccc ctggcgccgg acacgctgcg cctcatctt 1080  
 tggggcggttc ttccccgttg gccaaccgtc gcatcccgta caactttggg gtagtggccg 1140  
 cttagtgtt a atg ttc ccc acc gag agc gca tgg ctt ggg aag cga ggc 1190  
     Met Phe Pro Thr Glu Ser Ala Trp Leu Gly Lys Arg Gly  
     1               5               10

gcg aac ccg ggc ccc gaa gcc gtc cgg gag ggc ccc cac aac acg 1238  
 Ala Asn Pro Gly Pro Glu Ala Ala Val Arg Glu Gly Pro His Asn Thr  
     15               20               25

ctg ttc ggc tac tcg gtc gtg ctg cac agc cac ggg ggc aac cga          1283  
  Leu Phe Gly Tyr Ser Val Val Leu His Ser His Gly Ala Asn Arg  
   30               35               40  
 tggtgatgatg agttggaa   1300

<210> 42  
 <211> 20  
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 42

ttagtgaca aagacgttat 20

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 43

gaaggccctt gggaaacatt 20

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 44

agacgttatg gctattctct 20

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 45

ttgccttat atgagaaaca 20

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 46

cccaagccat gcgcctcgg 20

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

&lt;223&gt; antisense sequence

&lt;400&gt; 47

ccgcagccat gcgctctgg 20

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 1771

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1193)..(1387)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1709)..(1771)

&lt;300&gt;

&lt;308&gt; L20788 Genbank

&lt;309&gt; 1996-04-18

&lt;400&gt; 48

ccagcacttg cctcctgctc cagcgtaaaa agcaggaaat ggaatatgga gtgtaagaca	60
taaattaaaa ataaaataaa attaaaaaaaa aaaaaagaaa agcagcacac aaggagtatg	120
ttcagcagag gcccatctcc tggcttaggt gtgctgtgac tctgatctct ggtggcttt	180
tagaagcctg ttatgacctt gtcttaggt gtgtctacac atctggtgtt aggtatgtcc	240
tggggtaact gagtgtgtac atqqqacta qtatqaaga agtgagcaag gggtggagtc	300
tgctaagtga ggcaagtac agaatttcct tagctgcct gggtttctg tgttaggcta	360
ttgcctggct tgctcatgcg tatagactct atttaagagg aagtgtatag agaggaagga	420
agcctgcata aaaggctgca ggcctggag tttgaagag actagccata tactttgtc	480
accaaatgct ccaatagggc tggggcggga gggggggggg cagcagttt ggcttcttgc	540
aaactgtgtat atttctgtat gctacacagc acataagtga cagaggaagt tctggaaagg	600
tctccacagt cttagttccc aaattattgg ccactggac tggccctgga ggccagtcac	660
ttggtaagt cccgcaaggc atcaagcctt agccaacttt caaaaggaa tcccctgatc	720
tgtttgtgt tcccccaagg gttatttttctggccca gaagccagag ccactgtgt	780
tgtatctgc cagggtgtga gtccatgcaa ccttaggtccc ctacggcccc ctacagctgc	840

# DE 699 34 998 T2 2007.12.06

tgcggggcgg ggatggggat cgggttgggg agagggaggc caggctgtga gccactgcac	900		
cacaccagg acccccaccca gatcctagga gcacccggcc cctggctccg gggccacaga	960		
aacggggcgt gggccagagc ctgaagcatc cctggccact acgatcgctc cgcctgtggc	1020		
caccaattcc cctctcttc tggcgtccct ctctccgccc ctgtcgctg ccagcacccq	1080		
acacgctgt gcacttcatac tcttggggcg ctcttcttt tggccaaccc tcgcatactg	1140		
tgcaactctg gtcagtggcc gttttgtgtt gaatgttctc caccaagagc gc atg qct	1198		
Met Ala			
1			
gcg gaa gcg agg tgc aga ccg agg tcc cga ggg atc gcc ctc cgg gaa	1246		
Ala Glu Ala Arg Cys Arg Pro Arg Ser Arg Gly Ile Ala Leu Arg Glu			
5	10	15	
gcg gtg atg ctg ttg tac ttc ggg gtg cca acc ggg cac tcc tac	1294		
Ala Val Met Leu Leu Tyr Phe Gly Val Pro Thr Gly His Ser Tyr			
20	25	30	
aac ctg gac ccg gag aat gca ctg ctg tac cag ggc ccc tcc ggc acg	1342		
Asn Leu Asp Pro Glu Asn Ala Leu Leu Tyr Gln Gly Pro Ser Gly Thr			
35	40	45	50
ctg ttt ggc tac tcg gtg gtg ctg cac agc cac ggg tcg aag cgc	1387		
Leu Phe Gly Tyr Ser Val Val Leu His Ser His Gly Ser Lys Arg			
55	60	65	
tggtagtgtc gcccctccccca agaggcatgt cacagcgctt ccgcctctgg gattccttgt	1447		
atgaatcaaa ctttccggccc tcctgggagg tcagagaaaag acctggcttc agccagctgc	1507		
ctcactggag agccttggaa ctaacttatac ttggatggc agccccagg gtgcctctga	1567		
gtcctgggtc tccagtcatg ggaagaggag gtgggtgcca cttcccttgc tgaccactgc	1627		
acagctgtca caagccaaca cggggcagag tgggtggca gactggttca cgtctgagcg	1687		
aacttgcattt gttcttgctt t agg ctc atc gtg ggg gct ccc act gcc agc	1738		
Trp Leu Ile Val Gly Ala Pro Thr Ala Ser			
70	75		
tgg ctc tct aat gcc tca gtg gtc aat cct ggg	1771		
Trp Leu Ser Asn Ala Ser Val Val Asn Pro Gly			
80	85		

<210> 49  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> antisense sequence

<400> 49  
 cacgccccgt ttclgtggcc 20

<210> 50

<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 50  
ggatgc~~tca~~ ggctc~~tggcc~~ 20

<210> 51  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 51  
ggagcgatcg tagtggcc~~ag~~ 20

<210> 52  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 52  
ccgg~~tgc~~ caggc~~ac~~ 20

<210> 53  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 53  
ga~~ta~~agg~~tgc~~ agc~~ac~~ 20

<210> 54  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 54  
ggccactgac cagagt~~tgca~~ 20

<210> 55  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; antisense sequence

&lt;400&gt; 55

cacctcgctt ccgcagccat 20

&lt;210&gt; 56

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; control sequence

&lt;400&gt; 56

cggaccaggta ccagggttac 20

&lt;210&gt; 57

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; control sequence

&lt;400&gt; 57

gccgacacccc gttcgltcgg 20

&lt;210&gt; 58

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; control sequence

&lt;400&gt; 58

acctccctcgcc tcacgcgcta 20

&lt;210&gt; 59

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; antisense sequence

&lt;400&gt; 59

cgcttccgca gccatgcgt 20

&lt;210&gt; 60

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; peptide sequence

&lt;400&gt; 60

His	Ser	Leu	Gly	Lys	Trp	Leu	Gly	His	Pro	Asp	Lys	Phe
1				5				10				

&lt;210&gt; 61

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; antisense sequence

&lt;400&gt; 61

agtccgcaga gcgcggatg 20

&lt;210&gt; 62

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; antisense sequence

&lt;400&gt; 62

agactcgcg tcctggcccg 20

&lt;210&gt; 63

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; antisense sequence

&lt;400&gt; 63

gtgcggaggc gcagggccgg 20

&lt;210&gt; 64

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; antisense sequence

&lt;400&gt; 64

ccggtttctg ccggcgagcc 20

&lt;210&gt; 65

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; antisense sequence

<400> 65  
atgcgacggt tggccaacgg 20

<210> 66  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 66  
cccagcacat cggctctcg 20

<210> 67  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 67  
cttcccaaggc catgcgtct 20

<210> 68  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 68  
tcgcttccca agccatgcgc 20

<210> 69  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 69  
gcctcgcttc ccaaggcatg 20

<210> 70  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 70  
cgcgccctcg ttcccaagcc 20

<210> 71  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 71  
tcctgcct tatacgaa 20

<210> 72  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 72  
acttccttgc ccttatacgaa 20

<210> 73  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 73  
agagttatct gtgacttcac 20

<210> 74  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 74  
gatactgagg tcctctccg 20

<210> 75  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 75  
tgagatcaac agaagtlacaa 20

<210> 76  
<211> 20  
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 76

ccagccttcc acataacata 20

<210> 77

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 77

aggatagatt tgtattgtct 20

<210> 78

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 78

gttgatataa ctccaactgt 20

<210> 79

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 79

taatcatcat tgctttact 20

<210> 80

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 80

aagaagtcc taaatcatcat 20

<210> 81

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 81

ctgagtcgtt tttccatctc 20

<210> 82

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 82

cttgtaaaca gtttgtttta 20

<210> 83

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 83

gagtaaaaga agtccaaaca 20

<210> 84

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 84

ccttgcata agacataata 20

<210> 85

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 85

aagagtaatc attgctgaga 20

<210> 86

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 86

tctttggctg tattattacc 20

<210> 87

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 87

tgctttagtg ttctctacc 20

<210> 88

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 88

aagtctaaga ctctccagt 20

<210> 89

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 89

gaggcaagca catatggtaa 20

<210> 90

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 90

tgaaatgaac ctctgcccac 20

<210> 91

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense sequence

<400> 91

ttaaagtgtat aatggtccac 20

<210> 92

<211>: 20  
<212>: DNA  
<213>: Artificial Sequence

<220>:  
<223>: antisense sequence

<400>: 92  
ggaa acagc ccgtaggaaa 20

<210>: 93  
<211>: 20  
<212>: DNA  
<213>: Artificial Sequence

<220>:  
<223>: antisense sequence

<400>: 93  
tttgcc agtt tggctataa 20

<210>: 94  
<211>: 17  
<212>: DNA  
<213>: Artificial Sequence

<220>:  
<223>: primer sequence

<400>: 94  
gacat cgtgc gctcat 17

<210>: 95  
<211>: 22  
<212>: DNA  
<213>: Artificial Sequence

<220>:  
<223>: primer sequence

<400>: 95  
attca cact aagcgccac tg 22

<210>: 96  
<211>: 22  
<212>: DNA  
<213>: Artificial Sequence

<220>:  
<223>: probe sequence

<400>: 96  
ccaac cgtcg catccgtgc aa 22

<210>: 97  
<211>: 19  
<212>: DNA  
<213>: Artificial Sequence

<220>  
<223> primer sequence

<400> 97  
gaaggtaagaatcgaggatc 19

<210> 98  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> primer sequence

<400> 98  
gaagatggtg atgggatttc 20

<210> 99  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> antisense sequence

<400> 99  
caagctcccc gttctcagcc 20

### Patentansprüche

1. Antisense-Oligonukleotid mit einer Länge von bis zu 30 Nukleotiden, umfassend SEQ ID NO: 81, wobei das Antisense-Oligonukleotid auf ein Nukleinsäuremolekül, welches humanes Integrin α4 kodiert, gerichtet ist und die Expression von humanem Integrin α4 verhindert.
2. Antisense-Oligonukleotid nach Anspruch 1, welches mindestens eine modifizierte Internukleosidbindung umfasst.
3. Antisense-Oligonukleotid nach Anspruch 2, wobei die modifizierte Internukleosidbindung einer Phosphothioatbindung ist.
4. Antisense-Oligonukleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 3, welches mindestens eine modifizierte Zuckereinheit umfasst.
5. Antisense-Oligonukleotid nach Anspruch 4, wobei die modifizierte Zuckereinheit eine 2'-O-methoxyethyl-Zuckereinheit ist.
6. Antisense-Oligonukleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 5, welches mindestens eine modifizierte Nukleobase umfasst.
7. Antisense-Oligonukleotid nach Anspruch 6, wobei die modifizierte Nukleobase ein 5-Methylcytosin ist.
8. Antisense-Oligonukleotid nach Anspruch 1, welches ein chimäres Oligonukleotid ist.
9. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend ein Antisense-Oligonukleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 8 und einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel.
10. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 9, weiter umfassend ein kolloidales Dispersionsystem.
11. Antisense-Oligonukleotid nach Anspruch 1 zur Verwendung in der Therapie.
12. In vitro-Verfahren zum Verhindern der Expression von Integrin α4 in humanen Zellen oder Geweben,

umfassend das Kontaktieren der Zellen oder Gewebe mit dem Antisense-Oligonukleotid nach Anspruch 1, so dass die Expression von Integrin  $\alpha 4$  verhindert wird.

13. Verwendung einer therapeutisch oder prophylaktisch wirksamen Menge des Antisense-Oligonukleotids nach Anspruch 1 in der Herstellung eines Medikaments zum Verabreichen an einen Menschen, der eine Erkrankung oder einen Zustand, die/der mit Integrin  $\alpha 4$  in Zusammenhang steht, aufweist, so dass die Expression von Integrin  $\alpha 4$  verhindert wird, wobei die Erkrankung oder der Zustand eine/n Entzündungskrankheit oder -zustand oder eine/n Autoimmunerkrankung oder -zustand oder ein/e metastasierende/r Erkrankung oder Zustand ist.

14. Verwendung einer therapeutisch oder prophylaktisch wirksamen Menge eines Antisense-Oligonukleotids nach Anspruch 1 in der Herstellung eines Medikaments zur Verabreichung an einen Menschen, um die Niveaus von VLA-4 in Zellen und Geweben zu reduzieren, wobei die Reduzierung von VLA-4 in Zellen und Geweben eine/n Entzündungserkrankung oder -zustand, eine/n Autoimmunerkrankung oder -zustand oder eine/n metastasierende/n Erkrankung oder Zustand behandelt oder verhindert.

15. Verwendung nach Anspruch 13 oder Anspruch 14, wobei die Erkrankung oder der Zustand rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerose, Asthma, eine entzündliche Darmerkrankung, Diabetes, Hepatitis, eine Abstoßung eines Allotransplantats oder eine Tumormetastase ist.

16. Verwendung nach Anspruch 14, wobei die Erkrankung oder der Zustand meumatoide Arthritis, Multiple Sklerose, Asthma oder eine Tumormetastase ist.

17. Verwendung nach Anspruch 13 oder 14, wobei die Erkrankung oder der Zustand Multiple Sklerose ist.

18. Verwendung nach Anspruch 13 oder Anspruch 14, wobei die Erkrankung oder der Zustand ein/e metastasierende/r Erkrankheit oder Zustand ist.

19. Verwendung nach Anspruch 18, wobei die Erkrankung oder der Zustand ein Melanom ist.

20. In vitro Verfahren zum Reduzieren der Niveaus von VLA-4 in humanen Zellen oder Geweben, umfassend das Kontaktieren der Zellen oder Gewebe mit einem Antisense-Oligonukleotid nach Anspruch 1, so dass die Niveaus von VLA-4 reduziert sind.

21. In vitro Verfahren zum Reduzieren der Niveaus von  $\alpha 4\beta 7$  in humanen Zellen oder Geweben, umfassend das Kontaktieren der Zellen oder Gewebe mit dem Antisense-Oligonukleotid nach Anspruch 1, so dass die Niveaus von  $\alpha 4\beta 7$  reduziert sind.

22. Verwendung einer therapeutisch oder prophylaktisch wirksamen Menge des Antisense-Oligonukleotids nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Medikaments für das Verabreichen an einen Menschen zum Erhöhen der Mobilisierung von hämopoetischen Vorläuferzellen im Kreislauf des Menschen.

23. In vitro Verfahren zum Verringern der Adhärenz von Zellen eines ersten Zelltyps an einen zweiten Typ, umfassend das Kontaktieren von mindestens einem der Zelltypen mit einem Antisense-Oligonukleotid nach Anspruch 1.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen