

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-520489**(P2005-520489A)**

(43) 公表日 平成17年7月14日(2005.7.14)

(51) Int.Cl.⁷

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00 Z N A A

4 B O 2 4

A 6 1 K 31/7088

A 6 1 K 31/7088

4 C O 8 4

A 6 1 K 31/7115

A 6 1 K 31/7115

4 C O 8 6

A 6 1 K 31/712

A 6 1 K 31/712

A 6 1 K 31/7125

A 6 1 K 31/7125

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 86 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-519238 (P2003-519238)

(86) (22) 出願日 平成14年8月5日 (2002.8.5)

(85) 翻訳文提出日 平成16年2月2日 (2004.2.2)

(86) 国際出願番号 PCT/US2002/024920

(87) 国際公開番号 W02003/014307

(87) 国際公開日 平成15年2月20日 (2003.2.20)

(31) 優先権主張番号 09/923,515

(32) 優先日 平成13年8月7日 (2001.8.7)

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 502254408

イシス・フアーマシユーチカルズ・インコーポレーテッド

アメリカ合衆国カリフォルニア州92008
カールスバッド・フアラディアベニュー2292

(74) 代理人 100060782

弁理士 小田島 平吉

(72) 発明者 クルーク, ロザン・エム

アメリカ合衆国カリフォルニア州92009
カールスバッド・ピラクストリート3211

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アポリポタンパク質 (a) 発現のアンチセンス調節

(57) 【要約】

アポリポタンパク質 (a) の発現を調節するためのアンチセンス化合物、組成物および方法が提供される。該組成物は、アポリポタンパク質 (a) をコードする核酸に標的を定められたアンチセンス化合物、とりわけアンチセンスオリゴヌクレオチドを含んで成る。アポリポタンパク質 (a) の発現を調節するためおよびアポリポタンパク質 (a) の発現に関連する疾患の治療のためのこれらの化合物の使用方法が提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトアポリポタンパク質 (a) をコードする核酸分子と特異的にハイブリダイズしかつヒトアポリポタンパク質 (a) の発現を阻害する、ヒトアポリポタンパク質 (a) をコードする核酸分子に標的を定められた長さ 8 ないし 50 核酸塩基の化合物。

【請求項 2】

アンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項 1 記載の化合物。

【請求項 3】

アンチセンスヌクレオチドが、配列番号 7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40 もしくは 41 を含んで成る配列を有する、請求項 2 記載の化合物。 10

【請求項 4】

アンチセンスオリゴヌクレオチドが最低 1 個の修飾ヌクレオシド間結合を含んで成る、請求項 2 記載の化合物。

【請求項 5】

修飾ヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合である、請求項 4 記載の化合物。

【請求項 6】

アンチセンスオリゴヌクレオチドが最低 1 個の修飾糖部分を含んで成る、請求項 2 記載の化合物。 20

【請求項 7】

修飾糖部分が 2' - O - メトキシエチル糖部分である、請求項 6 記載の化合物。

【請求項 8】

アンチセンスオリゴヌクレオチドが最低 1 個の修飾核酸塩基を含んで成る、請求項 2 記載の化合物。

【請求項 9】

修飾核酸塩基が 5 - メチルシトシンである、請求項 8 記載の化合物。

【請求項 10】

アンチセンスオリゴヌクレオチドがキメラオリゴヌクレオチドである、請求項 2 記載の化合物。 30

【請求項 11】

ヒトアポリポタンパク質 (a) をコードする核酸分子上の活性部位の最低 8 核酸塩基部分と特異的にハイブリダイズする、長さ 8 ないし 50 核酸塩基の化合物。

【請求項 12】

請求項 1 記載の化合物および製薬学的に許容できる担体もしくは希釈剤を含んで成る組成物。

【請求項 13】

コロイド分散系をさらに含んで成る、請求項 12 記載の組成物。

【請求項 14】

化合物がアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項 12 記載の組成物。 40

【請求項 15】

ヒトアポリポタンパク質 (a) の発現が阻害されるように、細胞もしくは組織を請求項 1 記載の化合物と接触させることを含んで成る、前記細胞もしくは組織中でのヒトアポリポタンパク質 (a) の発現の阻害方法。

【請求項 16】

ヒトアポリポタンパク質 (a) の発現が阻害されるように、ヒトアポリポタンパク質 (a) に関連する疾患もしくは状態を有するヒトに、治療上もしくは予防上有効な量の請求項 1 記載の化合物を投与することを含んで成る、前記ヒトの治療方法。

【請求項 17】

状態が異常な脂質代謝を伴う、請求項 16 記載の方法。 50

【請求項 18】

状態が異常なコレステロール代謝を伴う、請求項 16 記載の方法。

【請求項 19】

状態がアテローム硬化症である、請求項 16 記載の方法。

【請求項 20】

疾患が心血管系疾患である、請求項 16 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アポリポタンパク質 (a) の発現を調節するための組成物および方法を提供する。とりわけ、本発明は、アポリポタンパク質 (a) をコードする核酸と特異的にハイブリダイズ可能な化合物、とりわけオリゴヌクレオチドに関する。こうした化合物はアポリポタンパク質 (a) の発現を調節することが示されている。

【背景技術】

【0002】

リポタンパク質は、タンパク質、リン脂質およびコレステロールよりなる両親媒性コーティングにより取り巻かれる、アシルグリセロールおよびコレステリルエステルの非極性コアよりなる球状のミセル様粒子である。リポタンパク質はそれらの機能および物理特性に基づき、5つの広範な範疇、すなわち、カイロミクロン (食物脂質を腸から組織へ輸送する)、超低密度リポタンパク質 (VLDL)、中密度リポタンパク質 (IDL)、低密度リポタンパク質 (LDL)、(これらはすべて、トリアシルグリセロールおよびコレステロールを肝から組織に輸送する)、ならびに高密度リポタンパク質 (HDL) (内因性コレステロールを組織から肝に輸送する) に分類されている。

【0003】

リポタンパク質粒子は継続的代謝プロセッシングを受け、また、変動可能な特性および組成を有する。リポタンパク質の密度は、それらの外側のコーティングの密度が内部コアのものより小さいため、粒子径の減少を伴わずに増大する。リポタンパク質のタンパク質成分はアポリポタンパク質として知られる。最低9種のアポリポタンパク質が、多様なヒトリポタンパク質のなかになんかの量で分布している。

【0004】

リポタンパク質 (a) (Lp(a)としてもまた知られる) は、前粥腫形成性 LDL クラスのコレステロール豊富な粒子である。Lp(a) は旧世界霊長類およびヨーロッパハリネズミ中でのみ見出されるため、それは脂質およびリポタンパク質の代謝において不可欠の役割を演じていないことが示唆されている。大部分の研究は、高濃度の Lp(a) が心血管系疾患のリスク増大と強く関連することを示している (非特許文献 1)。これらの観察結果は、Lp(a) の濃度および生理学的特性を制御する因子を検討するためのヒトおよび他の霊長類における多数の研究を刺激した (非特許文献 1)。

【0005】

Lp(a) は2種のジスルフィド結合された別個のタンパク質すなわちアポリポタンパク質 (a) (もしくは ApoA) およびアポリポタンパク質 B (もしくは ApoB) を含有する (非特許文献 1)。アポリポタンパク質 (a) は、Lp(a) の生理学的濃度を独占的に制御することが示された LPA 遺伝子によりコードされる唯一のアポリポタンパク質である (非特許文献 1)。それは LPA 遺伝子中の Kringle 4 をコードする 5.5 kb の配列のタンデムリピートの数における対立遺伝子間の差異により、大きさが変動する (非特許文献 1)。

【0006】

1987年のヒトアポリポタンパク質 (a) のクローニングはヒトプラスミノーゲンに対する相同性を示した (非特許文献 2)。アポリポタンパク質 (a) をコードする遺伝子座 LPA は、プラスミノーゲンの相同な遺伝子に対しすぐ近接の染色体 6p26-27 に限局化された (非特許文献 3)。

10

20

30

40

50

【0007】

ヒトアポリポタンパク質(a)を発現するトランスジェニックマウスは、大動脈中の脂質を染色する傷害の発生に対し対照マウスより感受性が高いことが見出され、そして、結果として、アポリポタンパク質(a)は動脈壁中の脂質沈着と共局在化している(非特許文献4)。これらの研究の拡大として、アポリポタンパク質(a)の主要な*in vivo*作用が、潜在性トランスフォーミング増殖因子- の低下された活性化を引き起こすプラスミノゲンのプラスミンへの転換の阻害であることが確立された。トランスフォーミング増殖因子- は平滑筋細胞の移動および増殖の負の調節物質であるため、プラスミノゲン活性化の阻害は、アテローム硬化性傷害のアポリポタンパク質(a)誘導の可能な機構を示す(非特許文献5)。

10

【0008】

アポリポタンパク質(a)の発現増加により引き起こされるLp(a)の血漿レベル上昇は、アテローム硬化症のリスク増大、ならびに高コレステロール血症(非特許文献6)、心筋梗塞(非特許文献7)および血栓症(非特許文献8)を包含するその症状発現と関連する。

【0009】

さらに、Lp(a)の血漿濃度は遺伝的因子により強く影響され、そして大部分の薬物および食餌の操作に対し難治性である(非特許文献9;非特許文献10)。上昇したLp(a)レベルの薬理的治療はささやかにのみ成功裏であり、そして、血漿交換が最も有効な治療様式のままである(非特許文献11)。

20

【0010】

Morishitaらは、HepG2細胞におけるアポリポタンパク質(a)発現の阻害のための、アポリポタンパク質(a)に対するリボザイムオリゴヌクレオチドの使用を報告した(非特許文献12)。

【0011】

ヒトアポリポタンパク質(a)遺伝子の5'調節領域をコードするヌクレオチド配列、および、ヌクレオチド位置-208から-1448までのヒトアポリポタンパク質(a)からの最低30の連続する相補ヌクレオチドを含んで成る単離されたヌクレオチド配列が、特許文献1に開示かつ特許請求されている(Lawn、1998)。

【0012】

今日まで、アポリポタンパク質(a)の機能を阻害することに向けられた研究および治療戦略は、Lp(a)血漿交換およびリボザイムオリゴヌクレオチドの以前に引用された使用に関するものであった。結果として、アポリポタンパク質(a)の機能を効果的に阻害することが可能な付加的な作用物質に対する長い間感じられた必要性が存続している。

30

【0013】

アンチセンス技術は特異的遺伝子産物の発現を低下させる有効な手段として出現しており、そして、従って、アポリポタンパク質(a)の発現の調節を伴う多数の治療的、診断的および研究の応用において、独特に有用であることが判明するかもしれない。

【0014】

本発明は、アポリポタンパク質(a)の発現を調節するための組成物および方法を提供する。

40

【特許文献1】米国特許第5,721,138号明細書

【非特許文献1】RainwaterとKammerer、J. Exp. Zool.、1998、282、54-61

【非特許文献2】McLeanら、Nature、1987、330、132-137

【非特許文献3】Frankら、Hum. Genet.、1988、79、352-356

【非特許文献4】Lawnら、Nature、1992、360、670-672

【非特許文献5】Graingerら、Nature、1994、370、460-462

【非特許文献6】Seedら、N. Engl. J. Med. 1990、322、1494 - 1499

【非特許文献7】Sandkampら、Clin. Chem.、1990、36、20 - 23

【非特許文献8】Nowak - Gottlら、Pediatrics、1997、99、E11

【非特許文献9】KatanaとBeynen、Am. J. Epidemiol.、1987、125、387 - 399

【非特許文献10】Vessbyら、Atherosclerosis、1982、44、61 - 71

【非特許文献11】HajjarとNachman、Annu. Rev. Med.、1996、47、423 - 442

【非特許文献12】Morishitaら、Circulation、1998、98、1898 - 1904

【発明の開示】

【0015】

本発明は、アポリポタンパク質(a)をコードする核酸に標的を定められかつアポリポタンパク質(a)の発現を調節する化合物、とりわけアンチセンスオリゴヌクレオチドに向けられる。本発明の化合物を含んで成る製薬学のおよび他の組成物もまた提供される。細胞もしくは組織を、本発明のアンチセンス化合物もしくは組成物の1種もしくはそれ以上と接触させることを含んで成る、前記細胞もしくは組織中でのアポリポタンパク質(a)の発現の調節方法がさらに提供される。治療上もしくは予防上有効な量の本発明のアンチセンス化合物もしくは組成物の1種もしくはそれ以上を投与することによる、アポリポタンパク質(a)の発現と関連する疾患もしくは状態を有するもしくはそれに罹りやすいと疑われる動物、とりわけヒトの治療方法がさらに提供される。

【発明の詳細な記述】

【0016】

本発明は、アポリポタンパク質(a)をコードする核酸分子の機能の調節、最終的には産生されるアポリポタンパク質(a)の量の調節における使用のためのオリゴマー化合物、とりわけアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用する。これは、アポリポタンパク質(a)をコードする1種もしくはそれ以上の核酸と特異的にハイブリダイズするアンチセンス化合物を提供することにより達成される。本明細書で使用されるところの「標的核酸」および「アポリポタンパク質(a)をコードする核酸」という用語は、アポリポタンパク質(a)をコードするDNA、こうしたDNAから転写されたRNA(mRNA前駆体(pre-mRNA)およびmRNAを包含する)、ならびにこうしたRNA由来のcDNAもまた包含する。その標的核酸とオリゴマー化合物の特異的ハイブリダイゼーションは、該核酸の正常の機能を妨害する。それに特異的にハイブリダイズする化合物による標的核酸の機能のこの調節は、一般に「アンチセンス」と称される。妨害されるべきDNAの機能は複製および転写を包含する。妨害されるべきRNAの機能は、例えば、タンパク質翻訳の部位へのRNAの移行、RNAからのタンパク質の翻訳、1種もしくはそれ以上のmRNA種を生じさせるRNAのスプライシング、およびRNAにかかわるもしくはそれにより助長されるかもしれない触媒活性のような、全部の重要な機能を包含する。標的核酸の機能のこうした妨害の全体的効果は、アポリポタンパク質(a)の発現の調節である。本発明の状況において、「調節」は遺伝子の発現の増大(刺激)もしくは減少(阻害)のいずれかを意味する。本発明の状況において、阻害は、好ましい形態の遺伝子発現の調節であり、かつ、mRNAが好ましい標的である。

【0017】

アンチセンスに対する特異的な核酸を標的とすることが好ましい。特定の核酸へのアンチセンス化合物の「ターゲティング」は、本発明の状況において、多段階の過程である。該過程は通常、その機能が調節されるべきである核酸配列の同定で開始する。これは、

10

20

30

40

50

例えば、その発現が特定の障害もしくは疾患状態と関連する細胞遺伝子（もしくは該遺伝子から転写された mRNA）、または感染性病原体からの核酸分子であってよい。本発明において、標的はアポリタンパク質（a）をコードする核酸分子である。ターゲッティング過程はまた、所望の効果、例えばタンパク質の発現の検出もしくは調節が生じることができるようなものを発生させるアンチセンス相互作用のための、この遺伝子内の部位（1個もしくは複数）の決定も包含する。本発明の状況内で、好ましい遺伝子内（intragenic）部位は、該遺伝子の読取り枠（ORF）の翻訳開始もしくは終止コドンを包含する領域である。当該技術分野で既知であるとおり、翻訳開始コドンは典型的に 5' - AUG（転写された mRNA 分子において；対応する DNA 分子中では 5' - ATG）であるため、翻訳開始コドンはまた「AUG コドン」、「開始コドン」もしくは「AUG 開始コドン」とも称される。少数の遺伝子は、RNA 配列 5' - GUG、5' - UUG もしくは 5' - CUG を有する翻訳開始コドンを有し、そして、5' - AUA、5' - ACG および 5' - CUG が *in vivo* で機能することが示されている。従って、「翻訳開始コドン」および「開始コドン」という用語は、各例におけるイニシエーターアミノ酸が典型的にメチオニン（真核生物において）もしくはホルミルメチオニン（原核生物において）であっても、多くのコドン配列を包含する可能性がある。真核生物および原核生物の遺伝子が 2 種もしくはそれ以上の代替の開始コドンを有してよく、そのいずれか 1 つが特定の細胞型もしくは組織中、または特定の組の条件下で翻訳開始に優先的に利用されるかもしれないこともまた、当該技術分野で既知である。本発明の状況において、「開始コドン」および「翻訳開始コドン」は、こうしたコドンの配列（1 種もしくは複数）に関係なく、アポリタンパク質（a）をコードする遺伝子から転写された mRNA 分子の翻訳を開始するのに *in vivo* で使用されるコドン（1 個もしくは複数）を指す。

【0018】

遺伝子の翻訳終止コドン（もしくは「終止コドン」）は 3 種の配列、すなわち 5' - UAA、5' - UAG および 5' - UGA（対応する DNA 配列はそれぞれ 5' - TAA、5' - TAG および 5' - TGA である）の 1 つを有するかもしれないこともまた当該技術分野で既知である。「開始コドン領域」および「翻訳開始コドン領域」という用語は、翻訳開始コドンからいずれかの方向（すなわち 5' もしくは 3'）に約 25 から約 50 までの連続するヌクレオチドを包含する mRNA もしくは遺伝子のような一部分を指す。同様に、「終止コドン領域」および「翻訳終止コドン領域」という用語は、翻訳終止コドンからいずれかの方向（すなわち 5' もしくは 3'）に約 25 から約 50 までの連続するヌクレオチドを包含するこうした mRNA もしくは遺伝子的一部分を指す。

【0019】

翻訳開始コドンと翻訳終止コドンとの間の領域を指すことが当該技術分野で既知である読取り枠（ORF）もしくは「コーディング領域」もまた、効果的に標的を定められるかもしれない領域である。他の標的領域は、翻訳開始コドンから 5' の方向の mRNA の一部分を指すことが当該技術分野で既知でありかつ従って mRNA もしくは該遺伝子上の対応するヌクレオチドの 5' cap 部位と翻訳開始コドンとの間のヌクレオチドを包含する 5' 非翻訳領域（5' UTR）、および、翻訳終止コドンから 3' の方向の mRNA の該部分を指すことが当該技術分野で既知でありかつ従って翻訳終止コドンと mRNA もしくは該遺伝子上の対応するヌクレオチドの 3' 端との間のヌクレオチドを包含する 3' 非翻訳領域（3' UTR）を包含する。mRNA の 5' cap は、5' - 5' 三リン酸結合を介して mRNA の最も 5' の残基に結合された N⁷-メチル化グアノシン残基を含んで成る。mRNA の 5' cap 領域は、5' cap 構造それ自身、ならびに cap に隣接する最初の 50 ヌクレオチドを包含するとみなされる。5' cap 領域もまた好ましい標的領域であるかもしれない。

【0020】

いくつかの真核生物 mRNA 転写物は直接翻訳されるとは言え、多くは、それが翻訳される前に転写物から摘出される、「イントロン」として知られる 1 個もしくはそれ以上の領域を含有する。残存する（そして従って翻訳される）領域は「エキソン」として知られ

、そして、一緒にスプライスされて連続するmRNA配列を形成する。mRNAのスプライス部位、すなわちイントロン-エキソン接合部もまた好ましい標的領域であるかもしれない。そして、異常なスプライシングが疾患に関与する、もしくは特定のmRNAスプライス産物の過剰産生が疾患に関与する状況でとりわけ有用である。再配列もしくは欠失による異常な融合結合物もまた好ましい標的である。イントロンもまた、例えばDNAもしくは前mRNAに標的を定められたアンチセンス化合物の有効かつ従って好ましい標的領域でもある可能性があることもまた見出されている。

【0021】

1個もしくはそれ以上の標的部位が一旦同定されれば、標的に十分相補的である、すなわち十分に良好にかつ十分な特異性を伴ってハイブリダイズして所望の効果を生じさせるオリゴヌクレオチドが選ばれる。

10

【0022】

本発明の状況において、「ハイブリダイゼーション」は、相補的ヌクレオチドもしくはヌクレオチド塩基間のワトソン-クリック型、フーグスティーンもしくは逆フーグスティーン水素結合であってよい水素結合を意味する。例えば、アデニンおよびチミンは、水素結合の形成により対形成する相補的核酸塩基である。本明細書で使用される場所の「相補的」は、2種のヌクレオチド間の正確な対形成の能力を指す。例えば、オリゴヌクレオチドのある位置のヌクレオチドが、あるDNAもしくはRNA分子の同一の位置のヌクレオチドと水素結合することが可能である場合には、該オリゴヌクレオチドおよび該DNAもしくはRNAはその位置で相互と相補的であるとみなされる。該オリゴヌクレオチドおよび該DNAもしくはRNAは、各分子の十分な数の対応する位置が相互と水素結合することができるヌクレオチドにより占有される場合に、相互に対し相補的である。従って、「特異的にハイブリダイズ可能」および「相補的」は、オリゴヌクレオチドとDNAもしくはRNA標的との間で安定かつ特異的な結合が存在するような、十分な程度の相補性もしくは正確な対形成を示すのに使用される用語である。アンチセンス化合物の配列は、特異的にハイブリダイズ可能であるべきその標的核酸のものに100%相補的である必要はないことが当該技術分野で理解されている。アンチセンス化合物は、標的DNAもしくはRNA分子への該化合物の結合が標的DNAもしくはRNAの正常の機能を妨害して有用性の喪失を引き起こし、かつ、特異的結合が望ましい条件下、すなわち、*in vivo*アッセイもしくは治療の場合に生理学的条件下で、および、*in vitro*アッセイの場合には該アッセイが実施される条件下で、非標的配列への該アンチセンス化合物の非特異的結合を回避するのに十分な程度の相補性が存在する場合に、特異的にハイブリダイズ可能である。

20

30

【0023】

標的にハイブリダイズしかつ標的の発現を阻害する本発明のアンチセンスおよび他の化合物は実験により同定され、そして、これらの化合物の配列は本発明の好ましい態様として下で同定される。これらの好ましい配列がそれに対して相補的である標的部位は、下で「活性部位」と称され、そして従ってターゲッティングのための好ましい部位である。従って、本発明の別の態様は、これらの活性部位にハイブリダイズする化合物を包含する。

【0024】

40

アンチセンス化合物は研究試薬および診断薬として普遍的に使用される。例えば、極めて鋭敏な特異性を伴い遺伝子発現を阻害することが可能であるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、特定の遺伝子の機能を解明するために当業者によりしばしば使用される。アンチセンス化合物はまた、例えば、生物学的経路の多様なメンバーの機能を識別するのに使用される。アンチセンス調節は、従って、研究の使用に利用されている。

【0025】

キットおよび診断薬における使用のため、本発明のアンチセンス化合物は、単独でまたは他のアンチセンス化合物もしくは治療薬と組合せて、細胞および組織内で発現される遺伝子の一部分もしくは全体の発現パターンを解明するためのディファレンシャルおよび/もしくはコンビナトリアル分析における手段として使用することができる。

50

【0026】

1種もしくはそれ以上のアンチセンス化合物で処理された細胞もしくは組織内の発現パターンを、アンチセンス化合物で処理されない対照細胞もしくは組織と比較し、そして、生じられたパターンを遺伝子発現の差示的レベルについて分析する。それらが、例えば検査された遺伝子の疾患との関連、シグナル伝達経路、細胞局在化、発現レベル、大きさ、構造もしくは機能に関するためである。これらの分析は、刺激されたもしくは未刺激の細胞で、また、発現パターンに影響を及ぼす他の化合物の存在もしくは非存在下で実施することができる。

【0027】

当該技術分野で既知の遺伝子発現分析方法の例は、DNAアレイもしくはマイクロアレイ (BrazmaとViljo、FEBS Lett.、2000、480、17-24; Celisら、FEBS Lett.、2000、480、2-16)、SAGE (遺伝子発現の連続分析) (Maddenら、Drug Discov. Today、2000、5、415-425)、READS (消化されたcDNAの制限酵素増幅) (Pras harとWeissman、Methods Enzymol.、1999、303、258-72)、TOGA (全遺伝子発現分析) (Sutcliffeら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.、2000、97、1976-81)、タンパク質アレイおよびプロテオミクス (Celisら、FEBS Lett.、2000、480、2-16; Jungblutら、Electrophoresis、1999、20、2100-10)、発現配列タグ (expressed sequence tag) (EST) 配列決定 (Celisら、FEBS Lett.、2000、480、2-16; Larssonら、J. Biotechnol.、2000、80、143-57)、サブトラクション (subtractive) RNAフィンガープリント法 (SuRF) (Fuchsら、Anal. Biochem.、2000、286、91-98; Larsonら、Cytometry、2000、41、203-208)、サブトラクション (subtractive) クローニング、ディファレンシャルディスプレイ (DD) (JurecicとBelmont、Curr. Opin. Microbiol.、2000、3、316-21)、CGH法 (Carulliら、J. Cell Biochem. Suppl.、1998、31、286-96)、FISH (蛍光in situハイブリダイゼーション) 技術 (GoingとGusterson、Eur. J. Cancer、1999、35、1895-904) および質量分析法 ((To、Comb. Chem. High Throughput Screen、2000、3、235-41に総説される) を包含する。

【0028】

アンチセンスの特異性および感受性もまた、治療的用途に、当業者により利用される。アンチセンスオリゴヌクレオチドは動物およびヒトにおける疾患状態の治療において治療的部分として使用されている。リボザイムを包含するアンチセンスオリゴヌクレオチド薬物はヒトに安全かつ効果的に投与されており、また、多数の臨床試験が現在進行中である。従って、オリゴヌクレオチドは、細胞、組織および動物、とりわけヒトの治療のための治療レジメンで有用であるように設計されることができる有用な治療のモダリティーである可能性があることが確立されている。

【0029】

本発明の状況において、「オリゴヌクレオチド」という用語は、リボ核酸 (RNA) もしくはデオキシリボ核酸 (DNA) またはそれらの模倣物のオリゴマーもしくはポリマーを指す。本用語は、天然に存在する核酸塩基、糖および共有ヌクレオシド間 (バックボーン) 結合から構成されるオリゴヌクレオチド、ならびに、同様に機能する天然に存在しない部分を有するオリゴヌクレオチドを包含する。こうした修飾もしくは置換オリゴヌクレオチドは、しばしば、例えば、高められた細胞の取込み、核酸標的に対する高められた親和性、およびヌクレアーゼの存在下での増大された安定性のような所望の特性のために、天然の形態を上回って好ましい。

【0030】

アンチセンスオリゴヌクレオチドはアンチセンス化合物の好ましい一形態である一方、本発明は、限定されるものでないが下述されるもののようなオリゴヌクレオチド模倣物を挙げることができる他のオリゴマーアンチセンス化合物を包含する。本発明のアンチセンス化合物は、好ましくは約8から約50までの核酸塩基（すなわち約8から約50までの結合されたヌクレオシド）を含んで成る。とりわけ好ましいアンチセンス化合物はアンチセンスオリゴヌクレオチド、なおより好ましくは約12から約30までの核酸塩基を含んで成るものである。アンチセンス化合物は、リボザイム、外部ガイド配列（external guide sequence）（EGS）オリゴヌクレオチド（オリゴザイム（oligozyme））、および標的核酸にハイブリダイズしかつその発現を調節する他の短い触媒的RNAもしくは触媒的オリゴヌクレオチドを包含する。

10

【0031】

当該技術分野で既知であるとおり、ヌクレオシドは塩基と糖の組合せである。ヌクレオシドの塩基部分は通常複素環塩基である。こうした複素環塩基の2種の最も普遍的な分類はプリンおよびピリミジンである。ヌクレオチドは、ヌクレオシドの糖部分に共有結合されるリン酸基をさらに包含するヌクレオシドである。ペントフラノシル糖を包含するヌクレオシドについて、リン酸基は糖の2'、3'もしくは5'いずれかのヒドロキシル部分に連結されることができる。オリゴヌクレオチドの形成において、リン酸基は隣接するヌクレオシドを相互に共有結合して直鎖状ポリマー化合物を形成する。順に、この直鎖状ポリマー構造のそれぞれの端は、さらに結合されて環状構造を形成する可能性があるが、しかしながら、開放の直鎖状構造が一般に好ましい。オリゴヌクレオチド構造内で、リン酸基はオリゴヌクレオチドのヌクレオシド間バックボーンを形成すると普遍的に称される。RNAおよびDNAの通常の結合もしくはバックボーンは3'から5'のホスホジエステル結合である。

20

【0032】

本発明で有用な好ましいアンチセンス化合物の特定の例は、修飾されたバックボーンもしくは非天然のヌクレオシド間結合を含有するオリゴヌクレオチドを包含する。本明細で定義されるところの、修飾されたバックボーンを有するオリゴヌクレオチドは、バックボーン中にリン原子を保持するものおよびバックボーン中にリン原子を有しないものを包含する。本明細の目的上、およびときに当該技術分野で言及されたとおり、それらのヌクレオシド間バックボーン中にリン原子を有しない修飾オリゴヌクレオチドもまたオリゴヌクレオシドであることとみなすことができる。

30

【0033】

好ましい修飾オリゴヌクレオチドバックボーンは、例えば、ホスホロチオエート、キラルなホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、メチルならびに3'-アルキレンホスホネート、5'-アルキレンホスホネートおよびキラルなホスホネートを包含する他のアルキルホスホネート、ホスフィネート、3'-アミノホスホルアミデートおよびアミノアルキルホスホルアミデートを包含するホスホルアミデート、チオノホスホルアミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、通常の3'-5'結合を有するセレノホスフェートおよびボラノホスフェート、これらの2'-5'結合類似物、ならびに1個もしくはそれ以上のヌクレオチド間結合が3'から3'、5'から5'もしくは2'から2'結合である逆転された極性を有するものを包含する。逆転された極性を有する好ましいオリゴヌクレオチドは、最も3'のヌクレオチド間結合に単一の3'から3'結合、すなわち無塩基（abasic）であってもよい（核酸塩基が欠けているかもしくはその代わりにヒドロキシル基を有する）単一の逆転されたヌクレオシド残基を含んで成る。多様な塩、混合塩および遊離酸の形態もまた包含される。

40

【0034】

上のリン含有結合の製造法を教示する代表的な米国特許は、限定されるものでないが、米国特許第3,687,808号；同第4,469,863号；同第4,476,301

50

号；同第5，023，243号；同第5，177，196号；同第5，188，897号；同第5，264，423号；同第5，276，019号；同第5，278，302号；同第5，286，717号；同第5，321，131号；同第5，399，676号；同第5，405，939号；同第5，453，496号；同第5，455，233号；同第5，466，677号；同第5，476，925号；同第5，519，126号；同第5，536，821号；同第5，541，306号；同第5，550，111号；同第5，563，253号；同第5，571，799号；同第5，587，361号；同第5，194，599号；同第5，565，555号；同第5，527，899号；同第5，721，218号；同第5，672，697号および同第5，625，050号明細書を挙げることができ、そのあるものは本出願と共通に所有され、また、そのそれぞれは引用することにより本明細書に組み込まれる。

10

【0035】

その中にリン原子を包含しない好ましい修飾オリゴヌクレオチドバックボーンは、短鎖アルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド間結合、混合されたヘテロ原子およびアルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド間結合、または1個もしくはそれ以上の短鎖ヘテロ原子もしくは複素環ヌクレオシド間結合により形成されるバックボーンを有する。これらは、モルホリノ結合（部分的にヌクレオシドの糖部分から形成される）；シロキサンのバックボーン；スルフィド、スルホキシドおよびスルホンバックボーン；ホルムアセチルおよびチオホルムアセチルバックボーン；メチレンホルムアセチルおよびチオホルムアセチルバックボーン；リボアセチルバックボーン；アルケン含有バックボーン；スルファメートバックボーン；メチレンイミノおよびメチレンヒドラジノバックボーン；スルホネートおよびスルホンアミドバックボーン；アミドバックボーンを有するもの；ならびに混合されたN、O、SおよびCH₂成分の部分を含む他者を包含する。

20

【0036】

上のオリゴヌクレオシドの製造法を教示する代表的な米国特許は、限定されるものでないが、米国特許第5，034，506号；同第5，166，315号；同第5，185，444号；同第5，214，134号；同第5，216，141号；同第5，235，033号；同第5，264，562号；同第5，264，564号；同第5，405，938号；同第5，434，257号；同第5，466，677号；同第5，470，967号；同第5，489，677号；同第5，541，307号；同第5，561，225号；同第5，596，086号；同第5，602，240号；同第5，610，289号；同第5，602，240号；同第5，608，046号；同第5，610，289号；同第5，618，704号；同第5，623，070号；同第5，663，312号；同第5，633，360号；同第5，677，437号；同第5，792，608号；同第5，646，269号および同第5，677，439号明細書を挙げることができ、そのあるものは本明細と共通に所有され、かつ、そのそれぞれは引用することにより本明細書に組み込まれる。

30

【0037】

他の好ましいオリゴヌクレオチド模倣物においては、ヌクレオチド単位の糖およびヌクレオシド間結合すなわちバックボーン双方が新規基で置き換えられる。塩基単位は適切な核酸標的化合物とのハイブリダイゼーションのために維持される。1つのこうしたオリゴマー化合物、すなわち優れたハイブリダイゼーション特性を有することが示されているオリゴヌクレオチド模倣物はペプチド核酸（PNA）と称される。PNA化合物においては、オリゴヌクレオチドの糖-バックボーンが、アミド含有バックボーン、とりわけアミノエチルグリシンバックボーンで置き換えられる。該核酸塩基は保持されかつバックボーンのアミド部分のアザ窒素原子に直接もしくは間接的に結合される。PNA化合物の製造法を教示する代表的米国特許は、限定されるものでないが米国特許第5，539，082号；同第5，714，331号；および同第5，719，262号明細書を挙げることができ、そのそれぞれは引用することにより本明細書に組み込まれる。PNA化合物のさらなる教示はNielsenら、Science、1991、254、1497-1500に

40

50

見出すことができる。

【0038】

本発明の最も好ましい態様は、ホスホロチオエートバックボーンをもつオリゴヌクレオチドおよびヘテロ原子バックボーンをもつオリゴヌクレオシド、ならびに、とりわけ、上に言及される米国特許第5,489,677号明細書の $-CH_2-NH-OH-CH_2-$ 、 $-CH_2-N(CH_3)-O-CH_2-$ [メチレン(メチルイミノ)もしくはMMIバックボーンとして知られる]、 $-CH_2-O-N(CH_3)-CH_2-$ 、 $-CH_2-N(CH_3)-N(CH_3)-CH_2-$ および $-O-N(CH_3)-CH_2-CH_2-$ [式中、天然のホスホジエステルバックボーンが $-O-P-O-CH_2-$ として表される]、ならびに上に言及される米国特許第5,602,240号明細書のアミドバックボーンである。上に言及される米国特許第5,034,506号明細書のモルホリノバックボーン構造を有するオリゴヌクレオチドもまた好ましい。

10

【0039】

修飾オリゴヌクレオチドはまた1個もしくはそれ以上の置換糖部分も含有してよい。好ましいオリゴヌクレオチドは、2'位に、以下、すなわち、 OH ; F ; $O-$ 、 $S-$ もしくは $N-$ アルキル; $O-$ 、 $S-$ もしくは $N-$ アルケニル; $O-$ 、 $S-$ もしくは $N-$ アルキニル; または $O-$ アルキル- $O-$ アルキルの1つを含んで成り、式中、アルキル、アルケニルおよびアルキニルは置換もしくは未置換の C_1 ないし C_{10} アルキルもしくは C_2 ないし C_{10} アルケニルおよびアルキニルであってよい。 $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$ 、 $O(CH_2)_nOCH_3$ 、 $O(CH_2)_nNH_2$ 、 $O(CH_2)_nCH_3$ 、 $O(CH_2)_nONH_2$ および $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$ がとりわけ好ましく、式中、 n および m は1から約10までである。他の好ましいオリゴヌクレオチドは、2'位に、以下、すなわち、 C_1 ないし C_{10} 低級アルキル、置換低級アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリール、アラルキル、 $O-$ アルカリールもしくは $O-$ アラルキル、 SH 、 SCH_3 、 OCN 、 Cl 、 Br 、 CN 、 CF_3 、 OCF_3 、 $SOCH_3$ 、 SO_2CH_3 、 ONO_2 、 NO_2 、 N_3 、 NH_2 、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリール、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、RNA切断基、レポーター基、インターカレーター、オリゴヌクレオチドの薬物動態特性を改良するための基、またはオリゴヌクレオチドの薬動力学特性を改良するための基、および類似の特性を有する他の置換基の1つを含んで成る。好ましい修飾は、2'-メトキシエトキシ(2'- $O-CH_2CH_2OCH_3$ 、2'- $O-(2-メトキシエチル)$ もしくは2'-MOEとしてもまた知られる)(Martínら、Helv.Chim.Acta、1995、78、486-504)、すなわちアルコキシアルコキシ基を包含する。さらなる好ましい修飾は、2'-ジメチルアミノオキシエトキシ、すなわち下の実施例に記述されるところの、2'-DMAOEとしてもまた知られる $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$ 基、および2'-ジメチルアミノエトキシエトキシ(2'- $O-ジメチルアミノエトキシエチル$ もしくは2'-DMAEOEとしてもまた当該技術分野で知られる)、すなわち下の実施例にもまた記述される2'- $O-CH_2-O-CH_2-N(CH_2)_2$ を包含する。

20

30

【0040】

さらなる好ましい修飾は、2'-ヒドロキシル基が糖環の3'もしくは4'炭素原子に結合されそれにより二環糖部分を形成するロック核酸(Locked Nucleic Acid)(LNA)を包含する。該結合は、好ましくは、2'酸素原子および4'炭素原子を架橋するメチレン($-CH_2-$) $_n$ 基であり、式中 n は1もしくは2である。LNAおよびその製造法は第WO 98/39352号および同第WO 99/14226号明細書に記述される。

40

【0041】

他の好ましい修飾は、2'-メトキシ(2'- $O-CH_3$)、2'-アミノプロポキシ(2'- $OCH_2CH_2CH_2NH_2$)、2'-アリル(2'- $CH_2-CH=CH_2$)、2'- $O-$ アリル(2'- $O-CH_2-CH=CH_2$)および2'-フルオロ(2'- F)を包含する。2'-修飾はアラビノ(上)位置もしくはリボ(下)位置であってよい

50

。好ましい2' - アラビノ修飾は2' - Fである。類似の修飾を、オリゴヌクレオチドの他の位置、とりわけ、3' 末端ヌクレオチドもしくは2' - 5' 結合オリゴヌクレオチド中の糖の3' 位、および5' 末端ヌクレオチドの5' 位でもまた行ってもよい。オリゴヌクレオチドはまた、ペントフラノシル糖の代わりにシクロブチル部分のような糖模倣物を有してもよい。こうした修飾糖構造の製造法を教示する代表的な米国特許は、限定されるものでないが、米国特許第4, 981, 957号；同第5, 118, 800号；同第5, 319, 080号；同第5, 359, 044号；同第5, 393, 878号、同第5, 446, 137号；同第5, 466, 786号；同第5, 514, 785号；同第5, 519, 134号；同第5, 567, 811号；同第5, 576, 427号；同第5, 591, 722号；同第5, 597, 909号；同第5, 610, 300号；同第5, 627, 053号；同第5, 639, 873号；同第5, 646, 265号；同第5, 658, 873号；同第5, 670, 633号；同第5, 792, 747号；および同第5, 700, 920号明細書を挙げることができ、そのあるものは本出願と共通に所有され、かつ、そのそれぞれはそっくりそのまま引用することにより本明細書に組み込まれる。

【0042】

オリゴヌクレオチドはまた、核酸塩基（単純に「塩基」と当該技術分野でしばしば称される）の修飾もしくは置換も包含してよい。本明細書で使用されるところの「未修飾」もしくは「天然の」核酸塩基は、プリン塩基アデニン（A）およびグアニン（G）、ならびにピリミジン塩基チミン（T）、シトシン（C）およびウラシル（U）を包含する。修飾核酸塩基は、5 - メチルシトシン（5 - me - C）、5 - ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2 - アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの6 - メチルおよび他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの2 - プロピルおよび他のアルキル誘導体、2 - チオウラシル、2 - チオチミンおよび2 - チオシトシン、5 - ハロウラシルおよびシトシン、5 - プロピニル（- C ≡ C - CH₃）ウラシルおよびシトシン、ならびにピリミジン塩基の他のアルキル誘導体、6 - アゾウラシル、シトシンおよびチミン、5 - ウラシル（ブソイドウラシル）、4 - チオウラシル、8 - ハロ、8 - アミノ、8 - チオール、8 - チオアルキル、8 - ヒドロキシおよび他の8 - 置換アデニンおよびグアニン、5 - ハロ、とりわけ5 - プロモ、5 - トリフルオロメチルおよび他の5 - 置換ウラシルおよびシトシン、7 - メチルグアニンおよび7 - メチルアデニン、2 - F - アデニン、2 - アミノアデニン、8 - アザグアニンおよび8 - アザアデニン、7 - デアザグアニンおよび7 - デアザアデニン、ならびに3 - デアザグアニンおよび3 - デアザアデニンのような他の合成および天然の核酸塩基を包含する。さらなる修飾核酸塩基は、フェノキサジンシチジン（1H - ピリミド[5, 4 - b][1, 4]ベンゾキサジン - 2(3H) - オン）、フェノチアジンシチジン（1H - ピリミド[5, 4 - b][1, 4]ベンゾチアジン - 2(3H) - オン）、置換フェノキサジンシチジン（例えば9 - (2 - アミノエトキシ) - H - ピリミド[5, 4 - b][1, 4]ベンゾキサジン - 2(3H) - オン）のようなG - クランプ（G - clamps）、カルバゾールシチジン（2H - ピリミド[4, 5 - b]インドール - 2 - オン）、ピリドインドールシチジン（H - ピリド[3', 2': 4, 5]ピロロ[2, 3 - d]ピリミジン - 2 - オン）のような三環性ピリミジンを包含する。修飾核酸塩基はまた、プリンもしくはピリミジン塩基が他の複素環で置き換えられるもの、例えば、7 - デアザアデニン、7 - デアザグアニン、2 - アミノピリジン、および2 - ピリドンも包含してもよい。さらなる核酸塩基は、米国特許第3, 687, 808号明細書に開示されるもの、The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering、858 - 859ページ、Kroschwitz, J. I. 編 ジョン ワイリー アンド サンズ（John Wiley & Sons）、1990に開示されるもの、Englischら、Angewandte Chemie, International Edition、1991、30、613に開示されるもの、およびSanghvi, Y. S.、第15章、Antisense Research and Applications、289 - 302ページ、Crooke, S. T. と Lebleu, B. 編、CRC プレス（CR

C Press)、1993に開示されるものを包含する。これらの核酸塩基のあるものは本発明のオリゴマー化合物の結合親和性を増大させるのにとりわけ有用である。これらは、5 - 置換ピリミジン、6 - アザピリミジン、ならびに、2 - アミノプロピルアデニン、5 - プロピニルウラシルおよび5 - プロピニルシトシンを包含するN - 2、N - 6およびO - 6置換プリンを包含する。5 - メチルシトシン置換は核酸二重鎖の安定性を0.6 ~ 1.2 だけ増大させることが示されており(S S a n g h v i, Y. S., C r o o k e, S. T. と L e b l e u, B. 編、Antisense Research and Applications、CRC プレス(CRC Press)、ボカレイトン、1993、pp. 276 - 278)、そして、現在、なおよりとりわけ2' - O - メトキシエチル糖修飾と組合せられる場合に、好ましい塩基置換である。

10

【0043】

上に示された修飾核酸塩基のあるもの、ならびに他の修飾核酸塩基の製造法を教示する代表的米国特許は、限定されるものでないが、上に示された米国特許第3,687,808号明細書；ならびに米国特許第4,845,205号；同第5,130,302号；同第5,134,066号；同第5,175,273号；同第5,367,066号；同第5,432,272号；同第5,457,187号；同第5,459,255号；同第5,484,908号；同第5,502,177号；同第5,525,711号；同第5,552,540号；同第5,587,469号；同第5,594,121号、同第5,596,091号；同第5,614,617号；同第5,645,985号；同第5,830,653号；同第5,763,588号；同第6,005,096号；および同第5,681,941号明細書(そのあるものは本出願と共通に所有され、かつ、そのそれぞれは引用することにより本明細書に組み込まれる)、ならびに米国特許第5,750,692号明細書(本出願と共通に所有されかつまた引用することにより本明細書に組み込まれる)を挙げることができる。

20

【0044】

本発明のオリゴヌクレオチドの別の修飾は、該オリゴヌクレオチドの活性、細胞分布もしくは細胞の取込みを高める1種もしくはそれ以上の部分もしくは複合物(c o n j u g a t e)を該オリゴヌクレオチドに化学的に結合することを伴う。本発明の化合物は、一級もしくは二級ヒドロキシル基のような官能基に共有結合された複合基を包含することができる。本発明の複合基は、インターカレーター、レポーター分子、ポリアミン、ポリアミド、ポリエチレングリコール、ポリエーテル、オリゴマーの薬動力学特性を高める基、およびオリゴマーの薬物動態特性を高める基を包含する。典型的な複合基は、コレステロール、脂質、リン脂質、ビオチン、フェナジン、葉酸、フェナントリジン、アントラキノン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、クマリンおよび色素を包含する。本発明の状況において薬動力学特性を高める基は、オリゴマーの取込みを向上させ、分解に対するオリゴマーの抵抗性を高め、かつ/もしくはRNAとの配列特異的ハイブリダイゼーションを強化する基を包含する。本発明の状況において、薬物動態特性を高める基は、オリゴマーの取込み、分布、代謝もしくは排泄を改良する基を包含する。代表的複合基は、1992年10月23日出願の国際特許出願第PCT/US92/09196号明細書(その開示全体は引用することにより本明細書に組み込まれる)に開示される。複合部分は、限定されるものでないが、コレステロール部分(L e t s i n g e r ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、1989、86、6553 - 6556)のような脂質部分、コール酸(M a n o h a r a n ら、Bioorg. Med. Chem. Lett.、1994、4、1053 - 1060)、チオエーテル、例えばヘキシル - S - トリチルチオール(M a n o h a r a n ら、Ann. N. Y. Acad. Sci.、1992、660、306 - 309；M a n o h a r a n ら、Bioorg. Med. Chem. Lett.、1993、3、2765 - 2770)、チオコレステロール(O b e r h a u s e r ら、Nuc l. A c i d s R e s.、1992、20、533 - 538)、脂肪族鎖、例えばドデカンジオールもしくはウンデシル残基(S a i s o n - B e h m o a r a s ら、EMBO J.、1991、10、1111 - 1118；K a b a n o v ら、FEBS

30

40

50

L e t t .、1990、259、327-330; S v i n a r c h u k ら、B i o c h i m i e、1993、75、49-54)、リン脂質、例えばジヘキサデシル - r a c - グリセロールもしくはトリエチルアンモニウム1, 2 - ジ - O - ヘキサデシル - r a c - グリセロ - 3 - H - ホスホネート (M a n o h a r a n ら、T e t r a h e d r o n L e t t .、1995、36、3651-3654; S h e a ら、N u c l . A c i d s R e s .、1990、18、3777-3783)、ポリアミンもしくはポリエチレングリコール鎖 (M a n o h a r a n ら、N u c l e o s i d e s & N u c l e o t i d e s、1995、14、969-973)、もしくはアダマンタン酢酸 (M a n o h a r a n ら、T e t r a h e d r o n L e t t .、1995、36、3651-3654)、パルミチル部分 (M i s h r a ら、B i o c h i m . B i o p h y s . A c t a、1995、1264、229-237)、またはオクタデシルアミンもしくはヘキシルアミノカルボニルオキシコレステロール部分 (C r o o k e ら、J . P h a r m a c o l . E x p . T h e r .、1996、277、923-937)を挙げることができる。本発明のオリゴヌクレオチドはまた、活性の薬物物質、例えば、アスピリン、ワルファリン、フェニルブタゾン、イブプロフェン、スプロフェン、フェンブフェン、ケトプロフェン、(S) - (+) - プラノプロフェン、カルプロフェン、ダンシルサルコシン、2, 3, 5 - 三ヨウ化安息香酸、フルフェナム酸、フォルイン酸、ベンゾチアジアジド、クロロチアジド、ジアゼピン、インドメチシン、パルピツール酸、セファロスポリン、サルファ剤、抗糖尿病薬、抗菌薬もしくは抗生物質に複合させてもよい。オリゴヌクレオチド - 薬物複合物およびそれらの製造法は、米国特許出願第09/334, 130号明細書(1999年6月15日出願)(そっくりそのまま引用することにより本明細書に組み込まれる)に記述される。

【0045】

こうしたオリゴヌクレオチド複合物の製造法を教示する代表的な米国特許は、限定されるものでないが、米国特許第4, 828, 979号; 同第4, 948, 882号; 同第5, 218, 105号; 同第5, 525, 465号; 同第5, 541, 313号; 同第5, 545, 730号; 同第5, 552, 538号; 同第5, 578, 717号; 同第5, 580, 731号; 同第5, 580, 731号; 同第5, 591, 584号; 同第5, 109, 124号; 同第5, 118, 802号; 同第5, 138, 045号; 同第5, 414, 077号; 同第5, 486, 603号; 同第5, 512, 439号; 同第5, 578, 718号; 同第5, 608, 046号; 同第4, 587, 044号; 同第4, 605, 735号; 同第4, 667, 025号; 同第4, 762, 779号; 同第4, 789, 737号; 同第4, 824, 941号; 同第4, 835, 263号; 同第4, 876, 335号; 同第4, 904, 582号; 同第4, 958, 013号; 同第5, 082, 830号; 同第5, 112, 963号; 同第5, 214, 136号; 同第5, 082, 830号; 同第5, 112, 963号; 同第5, 214, 136号; 同第5, 245, 022号; 同第5, 254, 469号; 同第5, 258, 506号; 同第5, 262, 536号; 同第5, 272, 250号; 同第5, 292, 873号; 同第5, 317, 098号; 同第5, 371, 241号; 同第5, 391, 723号; 同第5, 416, 203号; 同第5, 451, 463号; 同第5, 510, 475号; 同第5, 512, 667号; 同第5, 514, 785号; 同第5, 565, 552号; 同第5, 567, 810号; 同第5, 574, 142号; 同第5, 585, 481号; 同第5, 587, 371号; 同第5, 595, 726号; 同第5, 597, 696号; 同第5, 599, 923号; 同第5, 599, 928号および同第5, 688, 941号明細書を挙げることができ、そのあるものは本出願と共通に所有され、かつ、そのそれぞれは引用することにより本明細書に組み込まれる。

【0046】

所定の化合物中の全部の位置が均一に修飾される必要はなく、そして、実際に、前述の修飾の1個以上が、単一の化合物もしくはオリゴヌクレオチド内の単一のヌクレオチドにさえ組み込まれてよい。本発明はまた、キメラ化合物であるアンチセンス化合物も包含す

る。本発明の状況における「キメラの (chimeric)」アンチセンス化合物もしくは「キメラ (chimeric)」は、それぞれが最低1個の単量体単位、すなわちオリゴヌクレオチド化合物の場合はヌクレオチドで構成される、2種もしくはそれ以上の化学的に別個の領域を含有するアンチセンス化合物、とりわけオリゴヌクレオチドである。これらのオリゴヌクレオチドは、典型的には、ヌクレアーゼ分解に対する増大された抵抗性、増大された細胞の取込み、および/もしくは標的核酸に対する増大された結合親和性をオリゴヌクレオチドに賦与するように該オリゴヌクレオチドが修飾されている最低1個の領域を含有する。オリゴヌクレオチドの付加的な一領域は、RNA:DNAもしくはRNA:RNAハイブリッドを切断することが可能な酵素の基質としてはたらくかもしれない。例として、RNAアーゼHは、RNA:DNA二重鎖のRNA鎖を切断する細胞のエンドヌクレアーゼである。従って、RNAアーゼHの活性化はRNA標的の切断をもたらし、それにより遺伝子発現のオリゴヌクレオチド阻害の効率を大きく高める。結果として、同一の標的領域にハイブリダイズするホスホロチオエートデオキシオリゴヌクレオチドと比較して、キメラオリゴヌクレオチドを使用する場合に、より短いオリゴヌクレオチドを用いて匹敵する結果をしばしば得ることができる。RNA標的の切断は、ゲル電気泳動、および、必要な場合は当該技術分野で既知の関連する核酸ハイブリダイゼーション技術により慣例に検出することができる。

10

【0047】

本発明のキメラアンチセンス化合物は、2種もしくはそれ以上のオリゴヌクレオチド、修飾オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシド、および/もしくは上述されたところのオリゴヌクレオチド模倣物の混成構造として形成させてよい。こうした化合物はまた、当該技術分野でハイブリッドもしくはギャップマー (gapmer) とも称される。こうしたハイブリッド構造の製造法を教示する代表的な米国特許は、限定されるものでないが、米国特許第5,013,830号;同第5,149,797号;同第5,220,007号;同第5,256,775号;同第5,366,878号;同第5,403,711号;同第5,491,133号;同第5,565,350号;同第5,623,065号;同第5,652,355号;同第5,652,356号;および同第5,700,922号明細書を挙げることができ、そのあるものは本出願と共通に所有され、かつ、そのそれぞれはそっくりそのまま引用することにより本明細書に組み込まれる。

20

【0048】

本発明により使用されるアンチセンス化合物は、固相合成の公知の技術により便宜的にかつ慣例に作成してよい。こうした合成のための装置は、例えばアプライド バイオシステムズ (Applied Biosystems) (カリフォルニア州フォスターシティ) を包含するいくつかの供給元により販売されている。当該技術分野で既知のこうした合成のためのいずれの他の手段も付加的にもしくは代替的に使用してよい。ホスホロチオエートおよびアルキル化誘導体のようなオリゴヌクレオチドを製造するための類似の技術を使用することが公知である。

30

【0049】

本発明のアンチセンス化合物は *in vitro* で合成され、そして生物学的起源のアンチセンス組成物、もしくはアンチセンス分子の *in vivo* 合成を指図するよう設計された遺伝子ベクター構築物を包含しない。

40

【0050】

本発明の化合物はまた、例えば、取込み、分布および/もしくは吸収において補助するためのリポソーム、受容体に標的を定められた分子、経口、直腸、局所もしくは他の製剤として他の分子、分子構造もしくは化合物の混合物と混合、被包化、複合体形成 (conjugated) もしくは別の方法で連合させてもよい。こうした取込み、分布および/もしくは吸収を補助する製剤の製造法を教示する代表的米国特許は、限定されるものでないが、米国特許第5,108,921号;同第5,354,844号;同第5,416,016号;同第5,459,127号;同第5,521,291号;同第5,543,158号;同第5,547,932号;同第5,583,020号;同第5,591,72

50

1号；同第4，426，330号；同第4，534，899号；同第5，013，556号；同第5，108，921号；同第5，213，804号；同第5，227，170号；同第5，264，221号；同第5，356，633号；同第5，395，619号；同第5，416，016号；同第5，417，978号；同第5，462，854号；同第5，469，854号；同第5，512，295号；同第5，527，528号；同第5，534，259号；同第5，543，152号；同第5，556，948号；同第5，580，575号；および同第5，595，756号明細書を挙げることができ、そのそれぞれは引用することにより本明細書に組み込まれる。

【0051】

本発明のアンチセンス化合物は、ヒトを包含する動物への投与に際してその生物学的に活性の代謝物もしくは残基を（直接もしくは間接的に）提供することが可能である、いずれかの製薬学的に許容できる塩、エステル、もしくはこうしたエステルの塩、またはいずれかの他の化合物を包含する。従って、例えば、本発明の化合物のプロドラッグおよび製薬学的に許容できる塩、こうしたプロドラッグの製薬学的に許容できる塩、および他の生物学的同等物（bioequivalent）に対する開示もまた引き出される。

10

【0052】

「プロドラッグ」という用語は、内因性の酵素の作用または他の化学物質および/もしくは条件により身体もしくはその細胞内で活性の形態（すなわち薬物）に転化される不活性の形態で製造される治療薬を示す。とりわけ、本発明のオリゴヌクレオチドのプロドラッグのバージョンは、1993年12月9日公開のGosseilnらへの第WO 93 / 24510号もしくはImbachらへの第WO 94 / 26764号明細書および米国特許第5，770，713号明細書に開示される方法により、SATE[（S - アセチル - 2 - チオエチル）ホスフェート]誘導体として製造される。

20

【0053】

「製薬学的に許容できる塩」という用語は、本発明の化合物の生理学的および製薬学的に許容できる塩、すなわち、特許化合物の所望の生物学的活性を保持しかつ望ましくない毒物学的影響をそれに与えない塩を指す。

【0054】

製薬学的に許容できる塩基付加塩は、アルカリおよびアルカリ土類金属もしくは有機アミンのような金属もしくはアミンと形成される。陽イオンとして使用される金属の例は、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなどである。適するアミンの例は、N，N' - ジベンジルエチレンジアミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、ジシクロヘキシルアミン、エチレンジアミン、N - メチルグルカミンおよびプロカインである（例えば、Bergerら、"Pharmaceutical Salts," J. of Pharma. Sci., 1977, 66, 1-19を参照されたい）。前記酸性化合物の塩基付加塩は、遊離酸の形態を十分な量の所望の塩基と接触させて慣習的様式で塩を生じさせることにより製造する。遊離酸の形態は、慣習的様式で、塩の形態を酸と接触させることおよび遊離酸を単離することにより再生してもよい。遊離酸の形態は、極性溶媒中の溶解性のようなある種の物理特性がそれらのそれぞれの塩の形態といくぶん異なるが、しかし、それ以外は、該塩は本発明の目的上それらのそれぞれの遊離酸に同等である。本明細書で使用されるところの「製薬学的付加塩」は、本発明の組成物の成分の1つの酸の形態の製薬学的に許容できる塩を包含する。これらはアミンの有機もしくは無機酸塩を包含する。好ましい酸塩は、塩酸塩、酢酸塩、サリチル酸塩、硝酸塩およびリン酸塩である。他の適する製薬学的に許容できる塩は当業者に公知であり、そして、例えば、例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸もしくはリン酸のような無機酸と；有機カルボン酸、スルホン酸、スルホもしくはホスホ酸またはN - 置換スルファミン酸、例えば酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、コハク酸、マレイン酸、ヒドロキシマレイン酸、メチルマレイン酸、フマル酸、リンゴ酸、酒石酸、乳酸、シュウ酸、グルコン酸、グルカル酸、グルクロン酸、クエン酸、安息香酸、ケイヒ酸、マンデル酸、サリチル酸、4 - アミノサリチル酸、2 - フェノキシ安息香酸、2 - アセトキシ安息香酸、エムボン酸（embonic acid）

30

40

50

d)、ニコチン酸もしくはイソニコチン酸と；および、天然のタンパク質合成に關与する20種の α -アミノ酸のようなアミノ酸、例えばグルタミン酸もしくはアスパラギン酸と、ならびにまた、フェニル酢酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、2-ヒドロキシエタンスルホン酸、エタン-1,2-ジスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、4-メチルベンゼンスルホン酸、ナフタレン-2-スルホン酸、ナフタレン-1,5-ジスルホン酸、2-もしくは3-ホスホグリセリン酸、グルコース-6-リン酸、N-シクロヘキシルスルファミン酸と（シクラメートの形成を伴う）、またはアスコルビン酸のような他の酸性有機化合物とのような、多様な無機および有機酸の塩基性塩を包含する。化合物の製薬学的に許容できる塩はまた、製薬学的に許容できる陽イオンを用いて製造してもよい。適する製薬学的に許容できる陽イオンは当業者に公知であり、そして、アルカリ、アルカリ土

10

【0055】

オリゴヌクレオチドについて、製薬学的に許容できる塩の好ましい例は、限定されるものでないが、(a)ナトリウム、カリウム、アンモニウム、マグネシウム、カルシウムのような陽イオン、スペルミンおよびスペルミジンのようなポリアミンなどと形成される塩；(b)無機酸、例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、硝酸などと形成される酸付加塩；(c)例えば酢酸、シュウ酸、酒石酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、グルコン酸、クエン酸、リンゴ酸、アスコルビン酸、安息香酸、タンニン酸、パルミチン酸、アルギン酸、ポリグルタミン酸、ナフタレンスルホン酸、メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、ナフタレンジスルホン酸、ポリガラクトロン酸などのような有機酸と形成される塩；ならびに(d)塩素、臭素およびヨウ素のような元素陰イオンから形成される塩を挙げることができる。

20

【0056】

本発明のアンチセンス化合物は、診断薬、治療薬、予防薬に、ならびに研究試薬およびキットとして利用することができる。治療薬に関しては、アポリポタンパク質(a)の発現を調節することにより治療することができる疾患もしくは障害を有すると疑われる動物、好ましくはヒトを、本発明のアンチセンス化合物を投与することにより治療する。本発明の化合物は、有効量の該アンチセンス化合物を適する製薬学的に許容できる希釈剤もしくは担体に添加することにより、製薬学的組成物中で利用することができる。本発明のアンチセンス化合物および方法の使用はまた、予防的に、例えば、例えば感染症、炎症もしくは腫瘍形成を予防するもしくは遅らせるためにも有用であるかもしれない。

30

【0057】

本発明のアンチセンス化合物は、これらの化合物がアポリポタンパク質(a)をコードする核酸にハイブリダイズしてこの事実を探究するためにサンドイッチおよび他のアッセイが容易に構築されることを可能にするために、研究および診断に有用である。アポリポタンパク質(a)をコードする核酸との本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションは当該技術分野で既知の手段により検出することができる。こうした手段は、オリゴヌクレオチドへの酵素の複合、オリゴヌクレオチドの放射標識、もしくはいずれかの他の適する検出手段を包含してよい。サンプル中のアポリポタンパク質(a)のレベルを検出するためのこうした検出手段を使用するキットもまた製造されるかもしれない。

40

【0058】

本発明はまた、本発明のアンチセンス化合物を包含する製薬学的組成物および製剤も包含する。本発明の製薬学的組成物は、局所もしくは全身治療が望ましいかどうか、および治療されるべき領域に依存して、多数の方法で投与してよい。投与は、局所（眼、ならびに膣および直腸送達を包含する粘膜へを包含する）、肺、例えばネブライザーによるを包含する粉末もしくはエアゾル剤の吸入(inhalation)もしくは吸入(insufflation)による；気管内、鼻内、表皮および経皮)、経口または非経口であってよい。非経口投与は、静脈内、動脈内、皮下、腹腔内もしくは筋肉内注入(injection)

50

c t i o n) もしくは注入 (i n f u s i o n) ; または頭蓋内、例えばクモ膜下もしくは脳室内投与を包含する。最低 1 個の 2' - O - メトキシエチル修飾を伴うオリゴヌクレオチドが経口投与にとりわけ有用であると考えられる。

【 0 0 5 9 】

局所投与のための製薬学的組成物および製剤は、経皮貼付剤、軟膏剤、ローション剤、クリーム剤、ゲル剤、滴剤、坐剤、スプレー剤、液体および散剤を包含してよい。慣習的な製薬学的担体、水性、粉末もしくは油性の基剤、増粘剤などが必要もしくは望ましいかもしれない。被覆されたコンドーム、手袋などもまた有用かもしれない。好ましい局所製剤は、本発明のオリゴヌクレオチドが、脂質、リポソーム、脂肪酸、脂肪酸エステル、ステロイド、キレート剤および界面活性剤のような局所送達剤と混合状態にあるものを包含する。好ましい脂質およびリポソームは、中性（例えばジオレオイルホスファチジル D O P E エタノールアミン、ジミリストイルホスファチジルコリン D M P C、ジステアロリホスファチジルコリン）陰イオン性（例えばジミリストイルホスファチジルグリセロール D M P G）ならびに陽イオン性（例えばジオレオイルテトラメチルアミノプロピル D O T A P およびジオレオイルホスファチジルエタノールアミン D O T M A）を包含する。本発明のオリゴヌクレオチドはリポソーム内に被包化してよい、もしくはそれと、とりわけ陽イオン性リポソームと複合体形成してよい。あるいは、オリゴヌクレオチドは脂質、とりわけ陽イオン性脂質と複合体形成してよい。好ましい脂肪酸およびエステルは、限定されるものでないが、アラキドン酸、オレイン酸、エイコサン酸、ラウリン酸、カプリル酸、カプリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、ジカプレート、トリカプレート、モノオレイン、ジラウリン、グリセリル 1 - モノカプレート、1 - ドデシルアザシクロヘプタン - 2 - オン、アシルカルニチン、アシルコリン、もしくは C₁ - C₁₀ アルキルエステル（例えばイソプロピルミリステート I P M）、モノグリセリド、ジグリセリド、またはそれらの製薬学的に許容できる塩を挙げることができる。局所製剤は、1999年5月20日出願の米国特許出願第09/315,298号明細書（そっくりそのまま引用することにより本明細書に組み込まれる）に詳細に記述される。

【 0 0 6 0 】

経口投与のための組成物および製剤は、散剤もしくは顆粒剤、微粒子、ナノ粒子、水もしくは非水性媒体中の懸濁剤もしくは溶液、カプセル剤、ゲルカプセル剤、カシェ剤、錠剤もしくはミニ錠剤 (m i n i t a b l e t) を包含する。増粘剤、着色料、希釈剤、乳化剤、分散助剤もしくは結合剤が望ましいかもしれない。好ましい経口製剤は、本発明のオリゴヌクレオチドが 1 種もしくはそれ以上の浸透増強剤界面活性剤およびキレート剤とともに投与されるものである。好ましい界面活性剤は、脂肪酸および/またはそのエステルもしくは塩、胆汁酸および/もしくはその塩を包含する。好ましい胆汁酸/塩は、ケノデオキシコール酸 (C D C A) およびウルソデオキシケノデオキシコール酸 (U D C A)、コール酸、デヒドロコール酸、デオキシコール酸、グルコール酸、グリコール酸、グリコデオキシコール酸、タウロコール酸、タウロデオキシコール酸、タウロ - 24, 25 - ジヒドロフシジン酸ナトリウム、グリコジヒドロフシジン酸ナトリウム、を包含する。好ましい脂肪酸は、アラキドン酸、ウンデカン酸、オレイン酸、ラウリル酸、カプリル酸、カプリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、ジカプレート、トリカプレート、モノオレイン、ジラウリン、グリセリル 1 - モノカプレート、1 - ドデシルアザシクロヘプタン - 2 - オン、アシルカルニチン、アシルコリン、もしくはモノグリセリド、ジグリセリド、またはそれらの製薬学的に許容できる塩（例えばナトリウム）を包含する。浸透増強剤の組合せ、例えば胆汁酸/塩と組合せの脂肪酸/塩もまた好ましい。とりわけ好ましい組合せはラウリン酸、カプリン酸および U D C A のナトリウム塩である。さらなる浸透増強剤は、ポリオキシエチレン - 9 - ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン - 20 - セチルエーテルを包含する。本発明のオリゴヌクレオチドは、噴霧乾燥された粒子を包含するかまたは微粒子もしくはナノ粒子を形成するよう複合体形成された顆粒の形態にて経口で送達させてもよい。オリゴヌクレオチド複合体形成剤

は、ポリアミノ酸；ポリイミン；ポリアクリレート；ポリアルキルアクリレート、ポリオキセタン、ポリアルキルシアノアクリレート；陽イオン化ゼラチン、アルブミン、デンプン、アクリレート、ポリエチレングリコール（PEG）およびデンプン；ポリアルキルシアノアクリレート；DEAE-誘導体化ポリイミン、ポルラン、セルロースおよびデンプンを包含する。とりわけ好ましい複合体形成剤は、キトサン、N-トリメチルキトサン、ポリ-L-リシン、ポリヒスチジン、ポリオルニチン、ポリスペルミン、プロタミン、ポリビニルピリドン、ポリチオジエチルアミノメチルエチレン P(TDAE)、ポリアミノスチレン（例えばp-アミノ）、ポリ（メチルシアノアクリレート）、ポリ（エチルシアノアクリレート）、ポリ（ブチルシアノアクリレート）、ポリ（イソブチルシアノアクリレート）、ポリ（イソヘキシルシアノアクリレート）、DEAE-メタクリレート、DEAE-ヘキシルアクリレート、DEAE-アクリルアミド、DEAE-アルブミンおよびDEAE-デキストラン、ポリメチルアクリレート、ポリヘキシルアクリレート、ポリ（D，L-乳酸）、ポリ（DL-乳酸-コ-グリコール酸（PLGA））、アルギン酸塩、ならびにポリエチレングリコール（PEG）を包含する。オリゴヌクレオチドの経口製剤およびそれらの製造法は、米国特許出願第08/886,829号（1997年7月1日出願）、同第09/108,673号（1998年7月1日出願）、同第09/256,515号（1999年2月23日出願）、同第09/082,624号（1998年5月21日出願）および同第09/315,298号明細書（1999年5月20日出願）（そのそれぞれはそっくりそのまま引用することにより本明細書に組み込まれる）に詳細に記述される。

10

20

【0061】

非経口、クモ膜下もしくは脳室内投与のための組成物および製剤は、緩衝剤、希釈剤、ならびに限定されるものでないが浸透増強剤、担体化合物および他の製薬学的に許容できる担体もしくは賦形剤を挙げることができる他の適する添加物もまた含有してもよい滅菌の水性溶液を包含してよい。

【0062】

本発明の製薬学的組成物は、限定されるものでないが溶液、乳剤、およびリポソーム含有製剤を挙げることができる。これらの組成物は、限定されるものでないが予め形成された液体、自己乳化する固形物、および自己乳化する半固形物を挙げることができる多様な成分から生成させてよい。

30

【0063】

単位投与剤形で便宜的に提示されるかもしれない本発明の製薬学的製剤は、製薬業界で公知の慣習的技術に従って製造してよい。こうした技術は、有効成分を製薬学的担体（1種もしくは複数）または賦形剤（1種もしくは複数）との連合にもたらすことの段階を包含する。一般に、製剤は、有効成分を液体担体もしくは微細に分割された固体担体または双方との連合に均一にかつ緊密にもたらすこと、およびその後、必要な場合は生成物を造形することにより製造する。

【0064】

本発明の組成物は、限定されるものでないが錠剤、カプセル剤、ゲルカプセル剤、液体シロップ剤、軟ゲル剤、坐剤および浣腸剤を挙げることができる多くの可能な投薬形態のいずれに処方してもよい。本発明の組成物は水性、非水性もしくは混合媒体中の懸濁剤として処方してもまたよい。水性懸濁剤は、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトールおよび/もしくはデキストランを包含する、懸濁剤の粘度を増大させる物質をさらに含有してもよい。懸濁剤はまた安定剤も含有してよい。

40

【0065】

本発明の一態様において、製薬学的組成物は泡沫剤として処方かつ使用してよい。製薬学的泡沫剤は、限定されるものでないが乳剤、マイクロエマルジョン、クリーム剤、ゼリー剤およびリポソームを挙げることができる製剤を包含する。性質が基本的に類似である一方、これらの製剤は最終生成物の成分および粘稠度が変動する。こうした組成物および製剤の製造法は、製薬学的および製剤の技術分野の当業者に公知であり、そして、本発明

50

の組成物の製剤に適用してよい。

乳剤

本発明の組成物は乳剤として製造かつ処方してよい。乳剤は、典型的には、直径が通常 $0.1\mu\text{m}$ を超える液滴の形態で別のものの中に分散された一方の液体の不均質な系である。(Idson、Pharmaceutical Dosage Forms、Lieberman、RiegerとBanker(編)、1988、マルセル デッカー インク (Marcel Dekker, Inc.)、ニューヨーク州ニューヨーク、第1巻中、p.199; Rosoff、Pharmaceutical Dosage Forms、Lieberman、RiegerとBanker(編)、1988、マルセル デッカー インク (Marcel Dekker, Inc.)、ニューヨーク州ニューヨーク、第1巻中、p.245; Block、Pharmaceutical Dosage Forms、Lieberman、RiegerとBanker(編)、1988、マルセル デッカー インク (Marcel Dekker, Inc.)、ニューヨーク州ニューヨーク、第2巻中、p.335; Higuchiら、Remington's Pharmaceutical Sciences、マック パブリッシング カンパニー (MacK Publishing Co.)、フィラデルフィア州イーストン、1985中、p.301)。乳剤は、しばしば、相互と緊密に混合かつ分散された2種の混合不可能な液相で構成する二相系である。一般に、乳剤は油中水型(w/o)もしくは水中油型(o/w)の異種のいずれかであってよい。水相を微小な液滴に微細に分割しかつ大量の油相中にそれとして分散させる場合、生じる組成物は油中水型(w/o)乳剤と呼ばれる。あるいは、油相を微小な液滴に微細に分割しかつ大量の水相中にそれとして分散させる場合、生じる組成物は水中油型(o/w)乳剤と呼ばれる。乳剤は、水相、油相のいずれか中に溶液として、もしくはそれ自身別個の相として存在してよい、分散された相および有効成分に加えて付加的な成分を含有してもよい。乳化剤、安定剤、色素および抗酸化剤のような製薬学的賦形剤もまた、必要とされるように乳剤中に存在してもよい。製薬学的乳剤はまた、例えば油中水中油(o/w/o)および水中油中水型(w/o/w)乳剤の場合のように、2種以上の相から構成される多相乳剤(multiple emulsion)であってよい。こうした複雑な製剤は、しばしば、単純な二相乳剤が提供しないある種の利点を提供する。o/w乳剤の個々の油滴が小さな水滴を囲む多相乳剤はw/o/w乳剤を構成する。同様に、油連続相中で安定化された水の球体に囲まれる油滴の系はo/w/o乳剤を提供する。

【0066】

乳剤は熱力学的安定性がほとんどもしくは全くないことを特徴とする。しばしば、乳剤の分散されたもしくは不連続な相は、外的なもしくは連続する相中に良好に分散され、そして乳化剤もしくは該乳剤の粘度の手段によってこの形態で維持される。乳剤の相のいずれも、乳剤型の軟膏基剤およびクリーム剤の場合がそうであるように、半固形もしくは固形であってよい。乳剤を安定化する他の手段は乳化剤の使用を必要とし、これは乳剤のいずれかの相中に組み込まれてよい。乳化剤は、4つの範疇、すなわち、合成界面活性剤、天然に存在する乳化剤、吸収基剤、および微細に分散された固体に広範に分類されてよい(Idson、Pharmaceutical Dosage Forms、Lieberman、RiegerとBanker(編)、1988、マルセル デッカー インク (Marcel Dekker, Inc.)、ニューヨーク州ニューヨーク、第1巻中、p.199)。

【0067】

界面活性剤(surface active agents)としてもまた知られる合成の界面活性剤(surfactants)は、乳剤の製剤において広範な応用性を見出しており、そして文献中で総説されている(Rieger、Pharmaceutical Dosage Forms、Lieberman、RiegerとBanker(編)、1988、マルセル デッカー インク (Marcel Dekker, Inc.)、ニューヨーク州ニューヨーク、第1巻中、p.285; Idson、Pharmaceu

t i c a l D o s a g e F o r m s、L i b e r m a n、R i e g e r と B a n k e r (編)、マルセル デッカー インク (M a r c e l D e k k e r , I n c .)、ニューヨーク州ニューヨーク、1988、第1巻中、p. 199)。界面活性剤は典型的には両親媒性であり、そして親水性および疎水性部分を含んで成る。界面活性剤の疎水性の性質に対する親水性の比は親水/親油バランス (H L B) と命名され、そして、製剤の製造における界面活性剤の分類および選択において価値のある手段である。界面活性剤は、親水性基の性質に基づいて多様な分類、すなわち非イオン性、陰イオン性、陽イオン性および両性に分類してよい (R i e g e r、P h a r m a c e u t i c a l D o s a g e F o r m s、L i b e r m a n、R i e g e r と B a n k e r (編)、1988、マルセル デッカー インク (M a r c e l D e k k e r , I n c .)、ニューヨーク州ニ 10
ューヨーク、第1巻中、p. 285)。

【0068】

乳剤製剤で使用される天然に存在する乳化剤は、ラノリン、ミツロウ、ホスファチド、レシチンおよびアラビアゴムを包含する。無水ラノリンおよび親水性ワセリンのような吸収基剤は、それらが水を吸い込んでw/o乳剤を形成することができるがなおそれらの半固形の粘稠度を保持するような親水性の特性を有する。微細に分割された固体もまた、とりわけ界面活性剤と組合せでおよび粘性の製剤において良好な乳化剤として使用されている。これらは、重金属水酸化物のような極性の無機固体、ペントナイト、アッタパルジャイト、ヘクトナイト、カオリン、モントモリロナイト、コロイド状ケイ酸アルミニウムおよびコロイド状ケイ酸アルミニウムマグネシウムのような非膨潤性粘土、色素、ならびに 20
炭素もしくは三ステアリン酸グリセリルのような非極性固体を包含する。

【0069】

多様な非乳化物質もまた乳剤の製剤に包含され、そして乳剤の特性に寄与する。これらは、脂肪、油、蠟、脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪エステル、緩和剤、親水コロイド、保存剤および抗酸化剤を包含する (B l o c k、P h a r m a c e u t i c a l D o s a g e F o r m s、L i b e r m a n、R i e g e r と B a n k e r (編)、1988、マルセル デッカー インク (M a r c e l D e k k e r , I n c .)、ニューヨーク州ニューヨーク、第1巻中、p. 335; I d s o n、P h a r m a c e u t i c a l D o s a g e F o r m s、L i b e r m a n、R i e g e r と B a n k e r (編)、1988、マルセル デッカー インク (M a r c e l D e k k e r , I n c .)、ニ 30
ューヨーク州ニューヨーク、第1巻中、p. 199)。

【0070】

親水コロイド (h y d r o p h i l l i c c o l l o i d) またはハイドロコロイド (h y d r o c o l l o i d) は、多糖 (例えば、アラビアゴム、寒天、アルギン酸、カラギーナン、グアールガム、カラヤゴムおよびトラガカント)、セルロース誘導体 (例えばカルボキシメチルセルロースおよびカルボキシプロピルセルロース) のような天然に存在するガムおよび合成ポリマー、ならびに合成ポリマー (例えばカーボマー、セルロースエーテルおよびカルボキシビニルポリマー) を包含する。これらは水中で分散もしくは膨潤してコロイド溶液を形成し、それが分散された相の液滴の周囲に強い界面間薄膜を形成しかつ外側相の粘度を増大させることにより乳剤を安定化する。 40

【0071】

乳剤はしばしば、微生物の成長を容易に支援するかもしれない炭水化物、タンパク質、ステロールおよびホスファチドのような多数の成分を含有するため、これらの製剤はしばしば保存剤を組み込む。乳剤の製剤中に包含される普遍的に使用される保存剤は、メチルパラベン、プロピルパラベン、四級アンモニウム塩、塩化ベンザルコニウム、p-ヒドロキシ安息香酸のエステルおよびホウ酸を包含する。製剤の劣化を予防するために、抗酸化剤もまた乳剤の製剤に普遍的に添加される。使用される抗酸化剤は、トコフェロール、没食子酸アルキル、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエンのようなフリーラジカル捕捉剤、もしくはアスコルビン酸およびメタ重亜硫酸ナトリウムのような還元剤、ならびにクエン酸、酒石酸およびレシチンのような抗酸化剤の共力剤であってよ 50

い。

【0072】

皮膚科学的、経口および非経口の経路を介する乳剤の製剤の適用、ならびにそれらの製造方法は文献に総説されている (Idson, Pharmaceutical Dosage Forms, Liberman, Rieger と Banker (編)、1988、マルセル デッカー インク (Marcel Dekker, Inc.)、ニューヨーク州ニューヨーク、第1巻中、p. 199)。経口送達のための乳剤の製剤は、処方の容易さ、吸収および生物学的利用性の見地からの効率の理由のため、非常に広範に使用されている。(Rosoff, Pharmaceutical Dosage Forms, Liberman, Rieger と Banker (編)、1988、マルセル デッカー
10 インク (Marcel Dekker, Inc.)、ニューヨーク州ニューヨーク、第1巻中、p. 245; Idson, Pharmaceutical Dosage Forms, Liberman, Rieger と Banker (編)、1988、マルセル デッカー インク (Marcel Dekker, Inc.)、ニューヨーク州ニューヨーク、第1巻中、p. 199)。鉱物油基剤の緩下剤、油溶性ビタミンおよび高脂肪栄養製剤は、o/w 乳剤として経口で普遍的に投与されている物質である。

【0073】

本発明の一態様において、オリゴヌクレオチドおよび核酸の組成物はマイクロエマルジョンとして処方される。マイクロエマルジョンは、単一の光学的に等方性かつ熱力学的に安定な液体の溶液である、水、油、および両親媒性物質の系と定義してよい (Rosoff
20 ff, Pharmaceutical Dosage Forms, Liberman, Rieger と Banker (編)、1988、マルセル デッカー インク (Marcel Dekker, Inc.)、ニューヨーク州ニューヨーク、第1巻中、p. 245)。典型的には、マイクロエマルジョンは、最初に水性界面活性剤溶液中に油を分散させること、およびその後十分な量の第四の成分、一般には中鎖長のアルコールを添加して透明な系を形成させることにより製造される系である。従って、マイクロエマルジョンはまた、界面活性の分子の界面間薄膜により安定化される2種の混合不可能な液体の熱力学的に安定な等方性に澄明な分散剤としても記述されている (Leung と Shan, Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems, Rosoff, M. 編、1989、VCH パブリッ
30 ヶーズ (VCH Publishers)、ニューヨーク中、185 - 215 ページ)。マイクロエマルジョンは、普遍的に、油、水、界面活性剤、補助界面活性剤 (cosurfactant) および電解質を包含する3ないし5成分の組合せを介して製造する。マイクロエマルジョンが油中水型 (w/o) のものであるかもしくは水中油型 (o/w) のものであるかは、使用される油および界面活性剤の特性、ならびに界面活性剤分子の極性頭部および炭化水素尾部の構造および幾何学的充填に依存する (Schott, Remington's Pharmaceutical Sciences, マック パブリッ
40 シング カンパニー (Mack Publishing Co.)、フィラデルフィア州イーストン、1985中、p. 271)。

【0074】

相図を利用する現象学的アプローチが広範囲に研究されており、そして、マイクロエマルジョンの処方方法の当業者への包括的知識を生じた (Rosoff, Pharmaceutical Dosage Forms, Liberman, Rieger と Banker (編)、1988、マルセル デッカー インク (Marcel Dekker, Inc.)、ニューヨーク州ニューヨーク、第1巻中、p. 245; Block, Pharmaceutical Dosage Forms, Liberman, Rieger と Banker (編)、1988、マルセル デッカー インク (Marcel Dekker, Inc.)、ニューヨーク州ニューヨーク、第1巻中、p. 335)。慣習的乳剤に比較して、マイクロエマルジョンは、自発的に形成される熱力学的に安定な液滴の製剤中に水に不溶性の薬物を可溶化するという利点を提供する。

【 0 0 7 5 】

マイクロエマルションの製造で使用する界面活性剤は、限定されるものでないが、単独でもしくは補助界面活性剤と組合せの、イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、ブリッジ (B r i j) 9 6、ポリオキシエチレンオレイルエーテル、ポリグリセロール脂肪酸エステル、テトラグリセロールモノラウレート (M L 3 1 0)、テトラグリセロールモノオレエート (M O 3 1 0)、ヘキサグリセロールモノオレエート (P O 3 1 0)、ヘキサグリセロールペンタオレエート (P O 5 0 0)、デカグリセロールモノカプレート (M C A 7 5 0)、デカグリセロールモノオレエート (M O 7 5 0)、デカグリセロールセキオレエート (S O 7 5 0)、デカグリセロールデカオレエート (D A O 7 5 0) を挙げることができる。補助界面活性剤、通常はエタノール、1 - プロパノールおよび1 - ブタノールのような短鎖アルコールは、界面活性剤の薄膜中に浸透すること、および結果として界面活性剤分子間に生成される空隙により乱雑な薄膜を創製することにより、二面間の流動性を増大させるようはたらく。マイクロエマルションは、しかしながら、補助界面活性剤の使用を伴わずに製造してもよく、そして、アルコールを含まない自己乳化するマイクロエマルション系が当該技術分野で既知である。水相は、典型的には、限定されるものでないが水、薬物の水性溶液、グリセロール、P E G 3 0 0、P E G 4 0 0、ポリグリセロール、プロピレングリコール、およびエチレングリコールの誘導体を挙げることができる。油相は、限定されるものでないが、カプテックス (C a p t e x) 3 0 0、カプテックス (C a p t e x) 3 5 5、カプマル (C a p m u l) M C M、脂肪酸エステル、中鎖 (C 8 - C 1 2) モノ、ジおよびトリグリセリド、ポリオキシエチル化グリセリル脂肪酸エステル、脂肪アルコール、ポリグリコール化グリセリド、飽和ポリグリコール化合物 C 8 - C 1 0 グリセリド、植物油およびシリコン油のような物質を挙げることができる。

【 0 0 7 6 】

マイクロエマルションは、薬物の可溶化および薬物の高められた吸収の見地からとりわけ興味深い。脂質に基づくマイクロエマルション (o / w および w / o 双方) が、ペプチドを包含する薬物の経口の生物学的利用性を高めることが示唆されている (C o n s t a n t i n i d e s ら、P h a r m a c e u t i c a l R e s e a r c h、1994、11、1385 - 1390 ; R i t s c h e l、M e t h . F i n d . E x p . C l i n . P h a r m a c o l .、1993、13、205)。マイクロエマルションは、改良された薬物の可溶化、酵素的加水分解からの薬物の保護、膜の流動性および浸透性の界面活性剤に誘発される変化による薬物吸収の可能な増強、製造の容易さ、固体の投薬形態を上回る経口投与の容易さ、改良された臨床的効力、ならびに低下された毒性という利点を提供する (C o n s t a n t i n i d e s ら、P h a r m a c e u t i c a l R e s e a r c h、1994、11、1385 ; H o ら、J . P h a r m . S c i .、1996、85、138 - 143)。しばしば、マイクロエマルションは、それらの成分が周囲温度に一緒にもたらされる場合に自発的に生じるかもしれない。これは、熱不安定性な薬物、ペプチドもしくはオリゴヌクレオチドを処方する場合にとりわけ有利であるかもしれない。マイクロエマルションはまた、化粧品および製薬学的双方の応用における有効成分の経皮送達でも有効である。本発明のマイクロエマルション組成物および製剤は、消化管からのオリゴヌクレオチドおよび核酸の増大された全身吸収を助長し、ならびに、消化管、膈、胸腔および他の投与領域内のオリゴヌクレオチドおよび核酸の局所の細胞取込みを向上させることができることが期待される。

【 0 0 7 7 】

本発明のマイクロエマルションはまた、ソルビタンモノオレエート (グリル (G r i l l) 3)、ラブラソール (L a b r a s o l)、ならびに該製剤の特性を改良しかつ本発明のオリゴヌクレオチドおよび核酸の吸収を高めるための浸透増強剤のような、付加的な成分および添加物も含有してよい。本発明のマイクロエマルションで使用する浸透増強剤は、5つの広範な範疇、すなわち、界面活性剤、脂肪酸、胆汁塩、キレート剤、およびキレート形成しない非界面活性剤の1つに属すると分類してよい (L e e ら、C r i t i c a l R e v i e w s i n T h e r a p e u t i c D r u g C a r r i e r S

y s t e m s、1991、p. 92)。これらの分類のそれぞれは上で論考した。

リボソーム

薬物の製剤について研究かつ使用されている、マイクロエマルション以外の多くの組織化された界面活性剤構造が存在する。これらは、単層、ミセル、二重層および小胞を包含する。リボソームのような小胞は、それらの特異性、およびそれらが薬物送達の見地から提供する作用の持続期間のため、大きな興味を引いてきた。本発明で使用されるところの「リボソーム」という用語は、球形の二重層（1個もしくは複数）中に配置される両親媒性脂質から構成される小胞を意味する。

【0078】

リボソームは、親油性物質および水性の内側から形成される膜を有する単層もしくは多層小胞である。水性部分は送達されるべき組成物を含有する。陽イオン性リボソームは細胞壁に融合することが可能であるという利点を有する。非陽イオン性リボソームは、細胞壁と効果的にのように融合することが可能でないとは言え、*in vivo*でマクロファージにより取込まれる。

【0079】

無傷の哺乳動物皮膚を横断するためには、脂質小胞は、適する経皮勾配の影響下で、それぞれが50nm未満の直径をもつ一連の微細な孔を通過しなければならない。従って、高度に変形可能でありかつこうした微細な孔を通過することが可能であるリボソームを使用することが望ましい。

【0080】

リボソームのさらなる利点は；天然のリン脂質から得られるリボソームは生物適合性かつ生物分解性である；リボソームは広範な水および脂質溶解性薬物を組み込むことができる；リボソームはそれらの内部区画中の被包化された薬物を代謝および分解から保護することができる、を包含する（Rosoff、Pharmaceutical Dosage Forms、Lieberman、RiegerとBanker（編）、1988、マルセル デッカー インク（Marcel Dekker, Inc.）、ニューヨーク州ニューヨーク、第1巻中、p. 245）。リボソーム製剤の製造における重要な考慮は、脂質表面電荷、小胞の大きさ、およびリボソームの水性容量である。

【0081】

リボソームは作用部位への有効成分の移動および送達に有用である。リボソーム膜は生物学的膜に構造的に類似であるため、リボソームが組織に適用される場合に、リボソームは細胞膜に溶け込み始める。リボソームおよび細胞の合併が進行する際に、リボソームの内容物が細胞中に出され、そこで有効成分が作用するかもしれない。

【0082】

リボソーム製剤は、多くの薬物の送達様式として広範な検討の焦点であった。局所投与に関して、リボソームが他の製剤を上回るいくつかの利点を提示することの増大する証拠が存在する。こうした利点は、投与された薬物の高全身吸収に関して低下された副作用、所望の標的での投与された薬物の増大された蓄積、ならびに皮膚中に親水性および疎水性双方の多様な薬物を投与する能力を包含する。

【0083】

いくつかの報告が、皮膚中に高分子量DNAを包含する作用物質を送達するリボソームの能力を詳述している。鎮痛薬、抗体、ホルモンおよび高分子量DNAを包含する化合物が皮膚に投与されている。大多数の適用は表皮上部のターゲティングをもたらした。

【0084】

リボソームは2つの広範な分類にある。陽イオン性リボソームは正に荷電したリボソームであり、負に荷電したDNA分子と相互作用して安定な複合体を形成する。正に荷電したDNA/リボソーム複合体が負に荷電した細胞表面に結合し、そしてエンドソーム中にインターナリゼーションされる。エンドソーム内の酸性のpHによりリボソームが破裂されて、それらの内容物を細胞の細胞質中に放出する（Wangら、Biochem. Biophys. Res. Commun.、1987、147、980-985）。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 5 】

pH感受性もしくは負に荷電したリポソームは、それと複合体形成するよりもむしろDNAを捕捉する。DNAおよび脂質双方が同様に荷電しているため、複合体形成よりもむしろ反発が起こる。にもかかわらず、若干のDNAはこれらのリポソームの水性内部内に捕捉される。pH感受性のリポソームは、チミジンキナーゼ遺伝子をコードするDNAを培養物中の細胞単層に送達させるのに使用されている。外因性遺伝子の発現が標的細胞中で検出された(Zhouら、Journal of Controlled Release、1992、19、269-274)。

【 0 0 8 6 】

リポソーム組成物の1つの主要な型は、天然に生じるホスファチジルコリン以外のリン脂質を包含する。中性のリポソーム組成物は、例えば、ジミリスチルホスファチジルコリン(DMPC)もしくはジパルミチルホスファチジルコリン(DPPC)から形成させることができる。陰イオン性リポソーム組成物は、一般にジミリスチルホスファチジルグリセロールから形成される一方、陰イオン性の融合発生性(fusogenic)リポソームは主としてジオレイルホスファチジエタノールアミン(DOPE)から形成される。別の型のリポソーム組成物は、例えばダイズPCおよび卵PCのようなホスファチジルコリン(PC)から形成される。別の型は、リン脂質および/もしくはホスファチジルコリンおよび/もしくはコレステロールの混合物から形成される。

【 0 0 8 7 】

いくつかの研究が皮膚へのリポソーム薬物製剤の局所送達を評価している。インターフェロンを含有するリポソームのモルモット皮膚への適用は、皮膚ヘルペス潰瘍の低減をもたらした一方、他の手段(例えば溶液としてもしくは乳剤として)を介するインターフェロンの送達は無効であった(Weinerら、Journal of Drug Targeting、1992、2、405-410)。さらに、付加的な研究は、水性系を使用するインターフェロンの投与に対するリポソーム製剤の一部として投与されたインターフェロンの有効性を試験し、そして、リポソーム製剤が水性投与より優れていたと結論した(du Plessisら、Antiviral Research、1992、18、259-265)。

【 0 0 8 8 】

非イオン性リポソーム系、とりわけ非イオン性界面活性剤およびコレステロールを含んで成る系もまた、皮膚への薬物の送達におけるそれらの有用性を決定するために検査されている。ノヴァサム[Novasome]TMI(グリセリルジラウレート/コレステロール/ポリオキシエチレン-10-ステアリルエーテル)およびノヴァサム[Novasome]TMII(グリセリルジステアレート/コレステロール/ポリオキシエチレン-10-ステアリルエーテル)を含んで成る非イオン性リポソーム製剤を使用して、マウス皮膚の真皮中にシクロスポリン-Aを送達させた。結果は、こうした非イオン性リポソーム系が皮膚の多様な層へのシクロスポリン-Aの沈着の助長において有効であったことを示した(HuらS.T.P. Pharma. Sci.、1994、4、6、466)。

【 0 0 8 9 】

リポソームはまた、「静電的に安定化された」リポソーム(本明細書で使用されるものの、リポソーム中に組み込まれる場合にこうした特化された(specialized)脂質を欠くリポソームに関して高められた循環寿命をもたらす1種もしくはそれ以上の特化された脂質を含んで成るリポソームを指す用語)も包含する。静電的に安定化されたリポソームの例は、リポソームの小胞を形成する脂質部分の一部が(A)モノシアログングリオシドG_{M1}のような1種もしくはそれ以上の糖脂質を含んで成るか、または(B)ポリエチレングリコール(PEG)部分のような1種もしくはそれ以上の親水性ポリマーで誘導体化されるものである。いずれかの特定の論理により拘束されることを願わないとは言え、少なくとも、グングリオシド、スフィンゴミエリンもしくはPEG誘導体化脂質を含有する静電的に安定化されたリポソームに関しては、これらの静電的に安定化されたリポソームの高められた循環半減期が、細網内皮系(RES)の細胞中への低下された

10

20

30

40

50

取込みに由来すると、当該技術分野で考えられている (Allenら、FEBS Letters、1987、223、42; Wuら、Cancer Research、1993、53、3765)。1種もしくはそれ以上の糖脂質を含んで成る多様なリポソームが当該技術分野で既知である。Papahadjopoulosら (Ann. N. Y. Acad. Sci.、1987、507、64) は、リポソームの血中半減期を向上させるモノシアロガングリオシド G_{M1} 、ガラクトセレブロシド硫酸およびホスファチジルイノシトールの能力を報告した。これらの知見は Gabizonら (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.、1988、85、6949) により詳述された。双方とも Allenらへの米国特許第4,837,028号明細書および第WO 88/04924号明細書は、(1) スフィンゴミエリンおよび(2) ガングリオシド G_{M1} もしくはガラクトセレブロシド硫酸エステルを含んで成るリポソームを開示する。米国特許第5,543,152号明細書 (Webbら) はスフィンゴミエリンを含んで成るリポソームを開示する。1,2-sn-ジミリスチルホスファチジルコリンを含んで成るリポソームが第WO 97/13499号明細書 (Limら) に開示される。

10

20

30

40

50

【0090】

1種もしくはそれ以上の親水性ポリマーで誘導体化された脂質を含んで成る多くのリポソーム、およびそれらの製造方法が当該技術分野で既知である。Sunamotoら (Bull. Chem. Soc. Jpn.、1980、53、2778) はPEG部分を含む非イオン性洗剤、 $2C_{12}15G$ を含んで成るリポソームを記述した。Illumら (FEBS Lett.、1984、167、79) は、ポリマー性グリコールを含むポリスチレン粒子の親水性コーティングが、有意に高められた血中半減期をもたらしたことを示した。ポリアルキレングリコール (例えばPEG) のカルボン酸基の結合により修飾された合成リン脂質が Searsにより記述されている (米国特許第4,426,330号および同第4,534,899号明細書)。Klibanovら (FEBS Lett.、1990、268、235) は、PEGもしくはPEGステアレートで誘導体化されたホスファチジルエタノールアミン (PE) を含んで成るリポソームが血液循環半減期の有意の増大を有することを立証する実験を記述した。Blumeら (Biochimica et Biophysica Acta、1990、1029、91) は、こうした観察結果を、他のPEG誘導体化されたリン脂質、例えば、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン (DSPE) およびPEGの組合せから形成されるDSPE-PEGに拡大した。それらの外表面上に共有結合されたPEG部分を有するリポソームは、Fisherへの欧州特許第EP 0 445 131 B1号および第WO 90/04384号明細書に記述される。1~20モルパーセントのPEG誘導体化PEを含むリポソーム組成物、およびそれらの使用方法が、Woodleeら (米国特許第5,013,556号および同第5,356,633号明細書) ならびにMartinら (米国特許第5,213,804号明細書および欧州特許第EP 0 496 813 B1号明細書) により記述されている。多数の他の脂質-ポリマー複合物を含んで成るリポソームは、第WO 91/05545号明細書および米国特許第5,225,212号明細書 (双方ともMartinらへ) ならびに第WO 94/20073号明細書 (Zalipskyら) に開示される。PEGで修飾されたセラミド脂質を含んで成るリポソームは第WO 96/10391号明細書 (Choiら) に記述される。米国特許第5,540,935号明細書 (Miyazakiら) および同第5,556,948号明細書 (Tagawaら) は、それらの表面上の官能性部分でさらに誘導体化される可能性があるPEG含有リポソームを記述する。

【0091】

核酸を含んで成る、制限された数のリポソームが当該技術分野で既知である。Thierryらへの第WO 96/40062号明細書はリポソーム中への高分子量核酸の被包化方法を開示する。Tagawaらへの米国特許第5,264,221号明細書はタンパク質に結合されたリポソームを開示し、そして、こうしたリポソームの内容物がアンチセンスRNAを包含してよいことを強く主張する。Rahmanらへの米国特許第5,66

5, 710号明細書は、リボソーム中へのオリゴヌクレオチドのある被包化方法を記述する。Loveらへの第WO 97/04787号明細書は、raf遺伝子に標的を定められたアンチセンスオリゴヌクレオチドを含んで成るリボソームを開示する。

【0092】

トランスファーソーム (transferosome) はなお別の型のリボソームであり、そして、薬物送達ベヒクルの魅力的な候補である高度に変形可能な脂質凝集物である。トランスファーソームは、それらが液滴より小さい孔を通して浸透することが容易に可能であるくらい高度に変形可能である脂質液滴として記述されてもよい。トランスファーソームは、それらが使用される環境に適合可能であり、例えば、それらは自己至適化し (皮膚の孔の形状に適合する)、自己修復性であり、断片化することを伴わずにそれらの標的に頻繁に到達し、そしてしばしば自己負荷性である。トランスファーソームを作成するためには、表面縁活性化物質 (surface edge-activator)、通常は界面活性剤を標準的リボソーム組成物に添加することが可能である。トランスファーソームは血清アルブミンを皮膚に送達するのに使用されている。血清アルブミンの、トランスファーソームに媒介される送達は、血清アルブミンを含有する溶液の皮下注入と同じくらい効果的であることが示されている。

10

【0093】

界面活性剤は、乳剤 (マイクロエマルジョンを包含する) およびリボソームのような製剤における広範な応用を見出している。天然および合成双方の多くの異なる型の界面活性剤の特性の最も普遍的な分類および等級付け方法は、親水/親油バランス (HLB) の使用による。親水性基 (「頭部」としてもまた知られる) の性質は、製剤中で使用される多様な界面活性剤を分類するための最も有用な手段を提供する (Rieger, Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, Inc.), ニューヨーク州ニューヨーク, 1988, p. 285)。

20

【0094】

界面活性剤分子がイオン化されない場合、それは非イオン性界面活性剤として分類される。非イオン性界面活性剤は、製薬学および化粧品製品において広範な応用を見出しており、そして、広範なpH値にわたって使用可能である。一般に、それらのHLB値は、それらの構造に依存して2から約18までの範囲にわたる。非イオン性界面活性剤は、エチレングリコールエステル、プロピレングリコールエステル、グリセリルエステル、ポリグリセリルエステル、ソルビタンエステル、ショ糖エステルおよびエトキシ化エステルのような非イオン性エステルを包含する。非イオン性アルカノールアミド、および脂肪アルコールエトキシレートのようなエーテル、プロポキシ化アルコール、ならびにエトキシ化/プロポキシ化ブロックポリマーもまたこの分類に包含される。ポリオキシエチレン界面活性剤は、非イオン性界面活性剤の分類の最も普及しているメンバーである。

30

【0095】

界面活性剤分子が、それが水中に溶解もしくは分散される場合に負の電荷を運搬する場合は、該界面活性剤は陰イオン性として分類される。陰イオン性界面活性剤は、石鹸のようなカルボン酸塩、アシラクトン酸塩 (acyl lactylate)、アミノ酸のアシルアミド、アルキル硫酸塩およびエトキシ化アルキル硫酸塩のような硫酸のエステル、アルキルベンゼンスルホン酸塩のようなスルホン酸塩、アシルイセチオン酸塩、アシルタウリンおよびスルホコハク酸塩、ならびにリン酸塩を包含する。陰イオン性界面活性剤の分類の最も重要なメンバーはアルキル硫酸塩および石鹸である。

40

【0096】

界面活性剤分子が、それが水中に溶解もしくは分散される場合に正の電荷を運搬する場合は、該界面活性剤は陽イオン性として分類される。陽イオン性界面活性剤は四級アンモニウム塩およびエトキシ化アミンを包含する。四級アンモニウム塩はこの分類の最も使用されるメンバーである。

【0097】

50

界面活性剤分子が正もしくは負いずれかの電荷を運搬する能力を有する場合は、該界面活性剤は両性として分類される。両性界面活性剤は、アクリル酸誘導体、置換アルキルアミド、N-アルキルペタインおよびホスファチドを包含する。

【0098】

薬物生成物、製剤および乳剤における界面活性剤の使用は総説されている (Rieger, Pharmaceutical Dosage Forms, マルセル デッカー インク (Marcel Dekker, Inc.), ニューヨーク州ニューヨーク, 1988, p. 285)。

浸透増強剤

一態様において、本発明は、動物の皮膚への核酸、とりわけオリゴヌクレオチドの効率的送達を遂げるために多様な浸透増強剤を使用する。大部分の薬物は、イオン化および非イオン化双方の形態で溶液中に存在する。しかしながら、通常、脂質溶解性もしくは親油性の薬物のみが細胞膜を容易に横断する。非親油性薬物でさえ、横断されるべき膜を浸透増強剤で処理する場合に細胞膜を横断するかもしれないことが発見された。細胞膜を横切る非親油性薬物の拡散を補助することに加えて、浸透増強剤はまた、親油性薬物の浸透性も高める。

【0099】

浸透増強剤は、5つの広範な範疇、すなわち、界面活性剤、脂肪酸、胆汁塩、キレート剤およびキレート形成しない非界面活性剤の1つに属するとして分類してよい (Leeら、Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92)。上に挙げられた分類の浸透増強剤のそれぞれを下により詳細に記述する。

【0100】

界面活性剤：本発明に関して、界面活性剤 (surfactant) (もしくは「界面活性剤 (surface-active agent)») は、水性溶液に溶解される場合に、粘膜を通るオリゴヌクレオチドの吸収が高められるという結果を伴い、溶液の表面張力もしくは水性溶液と別の液体との間の界面間張力を低下させる化学的実体である。胆汁塩および脂肪酸に加えて、これらの浸透増強剤は、例えば、ラウリル硫酸ナトリウム、ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテルおよびポリオキシエチレン-20-セチルエーテル (Leeら、Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92)；ならびにFC-43のようなパーフルオロケミカル乳剤を包含する。Takanashiら、J. Pharm. Pharmacol., 1988, 40, 252)。

【0101】

脂肪酸：浸透増強剤として作用する多様な脂肪酸およびそれらの誘導体は、例えば、オレイン酸、ラウリン酸、カプリン酸 (n-デカン酸)、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、ジカプレート、トリカプレート、モノオレイン (1-モノオレオイル-rac-グリセロール)、ジラウリン、カプリル酸、アラキドン酸、グリセロール1-モノカプレート、1-ドデシルアザシクロヘプタン-2-オン、アシルカルニチン、アシルコリン、それらの C_{1-10} アルキルエステル (例えばメチル、イソプロピルおよびt-ブチル)、ならびにそれらのモノおよびジグリセリド (すなわちオレート、ラウレート、カプレート、ミリステート、パルミテート、ステアレート、リノレエートなど) を包含する (Leeら、Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; El Haririら、J. Pharm. Pharmacol., 1992, 44, 651-654)。

【0102】

胆汁塩：胆汁の生理学的役割は、脂質および脂肪溶解性ビタミンの分散および吸収の助

10

20

30

40

50

長を包含する (Brunton、第38章、Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics、第9版、Hardmanら編、マグロー・ヒル (McGraw-Hill)、ニューヨーク、1996中、pp. 934 - 935)。多様な天然の胆汁塩およびそれらの合成誘導体が浸透増強剤として作用する。従って、「胆汁塩」という用語は、胆汁の天然に存在する成分のいずれか、ならびにそれらの合成誘導体のいずれかを包含する。本発明の胆汁塩は、例えば、コール酸 (もしくはその製薬学的に許容できるナトリウム塩すなわちコール酸ナトリウム)、デヒドロコール酸 (デヒドロコール酸ナトリウム)、デオキシコール酸 (デオキシコール酸ナトリウム)、グルコール酸 (グルコール酸ナトリウム)、グリコール酸 (グリコール酸ナトリウム)、グリコデオキシコール酸 (グリコデオキシコール酸ナトリウム)、タウロコール酸 (タウロコール酸ナトリウム)、タウロデオキシコール酸 (タウロデオキシコール酸ナトリウム)、ケノデオキシコール酸 (ケノデオキシコール酸ナトリウム)、ウルソデオキシコール酸 (UDCA)、タウロ-24, 25-ジヒドロフシジン酸ナトリウム (STDHF)、グリコジヒドロフシジン酸ナトリウムおよびポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル (POE) を包含する (Leeら、Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems、1991、92ページ; Swinyard、第39章、Remington's Pharmaceutical Sciences、第18版、Gennaro編、マックパブリッシングカンパニー (Mack Publishing Co.)、フィラデルフィア州イーストン、1990中、782 - 783ページ; Muranishi、Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems、1990、7、1 - 33; Yamamotoら、J. Pharm. Exp. Ther.、1992、263、25; Yamashitaら、J. Pharm. Sci.、1990、79、579 - 583)。

【0103】

キレート剤：本発明に関連して使用されるところのキレート剤は、粘膜を通るオリゴヌクレオチドの吸収が高められるという結果を伴い、それと錯体を形成することにより溶液から金属イオンを除去する化合物と定義することができる。本発明において浸透増強剤としてのそれらの使用に関して、キレート剤は、DNアーゼ阻害剤としてもまた作用することという付加された利点を有する。大部分の特徴づけられたDNAヌクレアーゼは触媒作用に二価金属イオンを必要とし、そして従ってキレート剤により阻害されるからである (Jarrett、J. Chromatogr.、1993、618、315 - 339)。本発明のキレート剤は、限定されるものでないが、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA)、クエン酸、サリチル酸塩 (例えばサリチル酸ナトリウム、5-メトキシサリチル酸塩およびホモパニル酸塩)、コラーゲンのN-アシル誘導体、ラウレス (laureth)-9、および -ジケトンのN-アミノアシル誘導体 (エナミン) を挙げることができる (Leeら、Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems、1991、92ページ; Muranishi、Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems、1990、7、1 - 33; Buurら、J. Control Rel.、1990、14、43 - 51)。

【0104】

キレート形成しない非界面活性剤：本明細書で使用されるところの、キレート形成しない非界面活性剤の浸透増強化合物は、キレート剤もしくは界面活性剤としてわずかな活性を示すがしかしにもかかわらず栄養粘膜を通るオリゴヌクレオチドの吸収を高める化合物と定義することができる (Muranishi、Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems、1990、7、1 - 33)。この分類の浸透増強剤は、例えば、不飽和環状尿素、1-アルキル-および1-アルケニルアザシクロアルカノン誘導体 (Leeら、Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems

、1991、92ページ)；ならびに、ジクロフェナクナトリウム、インドメタシンおよびフェニルブタゾンのような非ステロイド性抗炎症薬(Yamashitaら、J. Pharm. Pharmacol.、1987、39、621-626)を包含する。

【0105】

細胞レベルでのオリゴヌクレオチドの取込みを高める作用物質はまた、本発明の製薬学のおよび他の組成物に添加してもよい。例えば、リポフェクチン(Junichiら、米国特許第5,705,188号明細書)のような陽イオン性脂質、陽イオン性グリセロール誘導体、およびポリリシン(Lo110ら、PCT出願第WO 97/30731号明細書)のようなポリカチオン型分子もまた、オリゴヌクレオチドの細胞の取込みを高めることが知られている。

10

【0106】

エチレングリコールおよびプロピレングリコールのようなグリコール、2-ピロールのようなピロール、アゾン、ならびにリモネンおよびメントンのようなテルペンを包含する他の作用物質を、投与される核酸の浸透を高めるのに利用してもよい。

担体

本発明のある種の組成物は製剤中に担体化合物もまた組み込む。本明細書で使用されるところの「担体化合物」もしくは「担体」は、不活性である(すなわちそれ自身生物学的活性を有しない)がしかし例えば生物学的に活性の核酸を分解することもしくは循環からのその除去を促進することにより生物学的活性を有する核酸の生物学的利用性を低下させるin vivo過程により核酸として認識される、核酸もしくはその類似物を指すことができる。核酸および担体化合物の、典型的には過剰の後者の物質を伴う共投与は、おそらく共通の受容体に対する担体化合物と核酸との間の競争により、肝、腎もしくは他の循環外の貯蔵所(reservoir)にて回収される核酸の量の実質的低減をもたらす可能性がある。例えば、肝組織における部分的にホスホロチオエートのオリゴヌクレオチドの回収は、それがポリイノシン酸、デキストラン硫酸、ポリシチジン酸もしくは4-アセトアミド-4'イソチオシアノ-スチルベン-2,2'-ジスルホン酸と共投与される場合に低下される可能性がある(Miyaoら、Antisense Res. Dev.、1995、5、115-121; Takakuraら、Antisense & Nucleic Acid Drug Dev.、1996、6、177-183)。

20

賦形剤

担体化合物と対照的に、「製薬学的担体」もしくは「賦形剤」は、1種もしくはそれ以上の核酸を動物に送達するための製薬学的に許容できる溶媒、懸濁化剤もしくはいずれかの他の薬理学的に不活性のベヒクルである。賦形剤は液体もしくは固体であってよく、そして、所定の製薬学的組成物の核酸および他の成分と組合せられる場合に所望の容積、粘稠度などを提供するように、計画された投与様式を念頭におき選択される。典型的な製薬学的担体は、限定されるものでないが、結合剤(例えば糊化済トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドンもしくはヒドロキシプロピルメチルセルロースなど)；増量剤(例えば乳糖および他の糖、微晶質セルロース、ベクチン、ゼラチン、硫酸カルシウム、エチルセルロース、ポリアクリレートもしくはリン酸水素カルシウムなど)；滑沢剤(例えばステアリン酸マグネシウム、タルク、シリカ、コロイド状二酸化ケイ素、ステアリン酸、金属ステアリン酸塩、硬化植物油、トウモロコシデンプン、ポリエチレングリコール、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウムなど)；崩壊剤(例えばデンプン、デンプングリコール酸ナトリウムなど)；ならびに湿潤剤(例えばラウリル硫酸ナトリウムなど)を挙げることができる。

30

40

【0107】

核酸と有害に反応しない、非経口投与に適する製薬学的に許容できる有機もしくは無機賦形剤もまた、本発明の組成物を処方するのに使用することができる。適する製薬学的に許容できる担体は、限定されるものでないが、水、塩溶液、アルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、乳糖、アミロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘性パラフィン、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどを挙げるこ

50

ができる。

【0108】

核酸の局所投与のための製剤は、滅菌および非滅菌の水溶性、アルコールのような普遍的溶媒中の非水性溶液、または液体もしくは固体の油基剤中の核酸の溶液を包含してよい。溶液はまた、緩衝剤、希釈剤および他の適する添加物も含有してもよい。核酸と有害に反応しない、非経口投与に適する製薬学的に許容できる有機もしくは無機賦形剤を使用することができる。

【0109】

適する製薬学的に許容できる賦形剤は、限定されるものでないが、水、塩溶液、アルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、乳糖、アミロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘性パラフィン、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどを挙げることができる。

他成分

本発明の組成物は、それらの技術で確立された使用レベルの、製薬学的組成物中で慣習的に見出される他の付属成分を付加的に含有してもよい。従って、例えば、組成物は、例えば鎮痒薬、収れん剤、局所麻酔薬もしくは抗炎症薬のような付加的な適合性の製薬学的有効成分を含有してもよい、または、色素、着色料、保存剤、抗酸化剤、乳白剤、増粘剤および安定剤のような、本発明の組成物の多様な投薬形態を物理的に処方することにおいて有用な付加的物質を含有してもよい。しかしながら、こうした物質は、添加される場合に、本発明の組成物の成分の生物学的活性をむやみに妨害すべきでない。製剤は滅菌することができ、そして、所望の場合は、製剤の核酸（1種もしくは複数）と有害に相互作用しない補助作用物質、例えば滑沢剤、保存剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧に影響するための塩、緩衝剤、着色料、着色料および/もしくは芳香物質などと混合することができる。

【0110】

水性懸濁剤は、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトールおよび/もしくはデキストランを包含する、懸濁剤の粘度を増大させる物質を含有してよい。懸濁剤はまた安定剤も含有してもよい。

【0111】

本発明のある態様は、(a) 1種もしくはそれ以上のアンチセンス化合物、および(b) 非アンチセンス機構により機能する1種もしくはそれ以上の他の化学療法剤、を含有する製薬学的組成物を提供する。こうした化学療法剤の例は、限定されるものでないが、ダウノルビシン、ダウノマイシン、ダクチノマイシン、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、エソルビシン、ブレオマイシン、マホスファミド、イホスファミド、シトシンアラビノシド、ビスクロロエチルニトロソウレア、ブスルファン、マイトマイシンC、アクチノマイシンD、ミトラマイシン、プレドニゾン、ヒドロキシプロゲステロン、テストステロン、タモキシフェン、ダカルバジン、プロカルバジン、ヘキサメチルメラミン、ペンタメチルメラニン、マイトキサントロン、アムサクリン、クロラムブシル、メチルシクロヘキシルニトロソウレア、ナイトロジェンマスタード、メルファラン、シクロホスファミド、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-アザシチジン、ヒドロキシウレア、デオキシコホルマイシン、4-ヒドロキシペルオキシシクロホスホルアミド、5-フルオロウラシル(5-FU)、5-フルオロデオキシウリジン(5-FUR)、メトトレキセート(MTX)、コルヒチン、タキソール、ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトポシド(VP-16)、トリメトトレキセート、イリノテカン、トポテカン、ゲムシタビン、テニポシド、シスプラチンおよびジエチルスチルベストロール(DES)を挙げることができる。全般として、The Merck Manual of Diagnosis and Therapy、第15版、1987、pp. 1206-1228、Berkowら編、ニュージャージー州ローウェイを参照されたい。本発明の化合物とともに使用される場合、こうした化学療法剤は、個別に(例えば5-FUおよびオリゴヌクレオチド)、連続して(例えば、ある時間の期間の間、5-FUおよびオリゴヌク

レオチド、次いでMTXおよびオリゴヌクレオチド)、または1種もしくはそれ以上の他のこうした化学療法剤と併用で(例えば、5-FU、MTXおよびオリゴヌクレオチド、もしくは5-FU、放射線治療およびオリゴヌクレオチド)使用してよい。限定されるものでないが非ステロイド性抗炎症薬およびコルチコステロイドを挙げることができる抗炎症薬、ならびに限定されるものでないがリビリン、ピダラピン、アシクロビルおよびガンシクロビルを挙げることができる抗ウイルス薬もまた、本発明の組成物に組合せてもよい。全般として、The Merck Manual of Diagnosis and Therapy、第15版、Berkowら編、1987、ニュージャージー州ローウェイ、それぞれ2499-2506および46-49ページを参照されたい)。他の非アンチセンス化学療法剤もまた本発明の範囲内にある。2種もしくはそれ以上の組合せられた化合物を一緒にもしくは連続して使用してよい。

10

【0112】

別の関係する態様において、本発明の組成物は、第一の核酸に標的を定められた1種もしくはそれ以上のアンチセンス化合物、とりわけオリゴヌクレオチド、および第二の核酸標的に標的を定められた1種もしくはそれ以上の付加的なアンチセンス化合物を含有してよい。アンチセンス化合物の多数の例が当該技術分野で既知である。2種もしくはそれ以上の組合せられた化合物を一緒にもしくは連続して使用してよい。

【0113】

治療的組成物の製剤、およびそれらのその後の投与は当業者の熟練内にあると考えられる。投与は治療されるべき疾患状態の重症度および応答性に依存し、治療の経過は数日から数ヶ月まで、または治癒が遂げられるかもしくは疾患状態の軽減が達成されるまで持続する。至適の投与計画は患者の体内の薬物蓄積の測定値から計算することができる。当業者は、至適投薬量、投与の方法論および反復速度を容易に決定することができる。至適投薬量は個々のオリゴヌクレオチドの相対的効力に依存して変動するかもしれず、かつ、一般に、*in vitro*および*in vivo*の動物モデルで有効であることが見出されるEC₅₀に基づいて推定することができる。一般に、投薬量は体重1kgあたり0.01μgから100gまでであり、そして、毎日、毎週、毎月もしくは毎年1回もしくはそれ以上、または2ないし20年ごとに1回さえ投与してよい。当業者は、体液もしくは組織中の該薬物の測定された滞留時間および濃度に基づいて、投与のための反復速度を容易に推定することができる。成功裏の治療後に、患者に維持療法を受けさせて該疾患状態の再発を予防することが望ましいかもしれず、ここで、オリゴヌクレオチドは、毎日1回もしくはそれ以上ないし20年ごとに1回、体重1kgあたり0.01μgから100gまでの範囲にわたる維持用量で投与する。

20

30

【0114】

本発明はその好ましい態様のあるものに従った特異性を伴い記述された一方、以下の実施例は本発明を具体的に説明するためにのみはたらき、そして、それを制限することを意図していない。

実施例

実施例 1

オリゴヌクレオチド合成のためのヌクレオシドホスホルアミダイト

40

デオキシおよび2'-アルコキシアミダイト

2'-デオキシおよび2'-メトキシ-シアノエチルジイソプロピルホスホルアミダイトは商業的供給源(例えばケムジェーンズ(Chemgenes)、マサチューセッツ州ニーダムもしくはグレン・リサーチ・インク(Glen Research, Inc.)バーモント州スターリング)から購入した。他の2'-O-アルコキシ置換ヌクレオシドアミダイトは、米国特許第5,506,351号明細書(引用することにより本明細書に組み込まれる)に記述されるとおり製造する。2'-アルコキシアミダイトを使用して合成されるオリゴヌクレオチドについて、テトラゾールおよび塩基の拍動送達後の待機段階を360秒に増大させたことを除き、未修飾オリゴヌクレオチドについての標準的周期を利用した。

50

【0115】

5 - メチル - 2' - デオキシシチジン (5 - Me - C) ヌクレオチドを含有するオリゴヌクレオチドは、商業的に入手可能なホスホルアミダイト (グレン リサーチ (Glen Research)、バーモント州スターリングもしくはケムジェーンズ (Chemgenes)、マサチューセッツ州ニーダム) を使用して、公表された方法 (Sanghvi ら、Nucleic Acids Research、1993、21、3197 - 3203) に従って合成した。

2' - フルオロアミダイト

2' - フルオロデオキシアデノシンアミダイト

2' - フルオロオリゴヌクレオチドは以前に (Kawasaki ら、J. Med. Chem.、1993、36、831 - 841) かつ米国特許第 5,670,633 号明細書 (引用することにより本明細書に組み込まれる) 記述されたとおり合成した。簡潔には、保護されたヌクレオシド N6 - ベンゾイル - 2' - デオキシ - 2' - フルオロアデノシンを、商業的に入手可能な 9 - D - アラビノフラノシルアデニンを出発原料として利用し、かつ、文献の手順を改変してそれにより 2' - フルオロ原子が 2' - トリチル基の S_N2 - 置換により導入されることにより合成した。従って、N6 - ベンゾイル - 9 - D - アラビノフラノシルアデニンが、3', 5' - ジテトラヒドロピラニル (THP) 中間体として中程度の収量で選択的に保護された。THP および N6 - ベンゾイル基の脱保護を、標準的方法論を使用して達成し、また、標準的方法を使用して、5' - ジメトキシトリチル - (DMT) および 5' - DMT - 3' - ホスホルアミダイト中間体を得た。

【0116】

2' - フルオロデオキシグアノシン

2' - デオキシ - 2' - フルオログアノシンの合成は、出発原料としてのテトライソプロピルジシロキサニル (TPDS) 保護された 9 - D - アラビノフラノシルグアニン、および、中間体ジイソブチリルアラビノフラノシルグアノシンへの転化を使用して達成した。TPDS 基の脱保護、次いで THP でのヒドロキシル基を保護し、ジイソブチリルジ - THP 保護アラビノフラノシルグアニンを生じた。選択的 O - 脱アシル化およびトリフラート化、次いでフッ化物で粗生成物を処理し、その後 THP 基を脱保護した。標準的方法論を使用して、5' - DMT - および 5' - DMT - 3' - ホスホルアミダイトを得た。

【0117】

2' - フルオロウリジン

2' - デオキシ - 2' - フルオロウリジンの合成は、2, 2' - アンヒドロ - 1 - D - アラビノフラノシルウラシルを 70% フッ化水素 - ピリジンで処理した、文献の手順の変法により達成した。標準的手順を使用して、5' - DMT および 5' - DMT - 3' - ホスホルアミダイトを得た。

【0118】

2' - フルオロデオキシシチジン

2' - デオキシ - 2' - フルオロシチジンは、2' - デオキシ - 2' - フルオロウリジンのアミノ化、次いで N4 - ベンゾイル - 2' - デオキシ - 2' - フルオロシチジンを生じる選択的保護を介して合成した。標準的手順を使用して、5' - DMT および 5' - DMT - 3' - ホスホルアミダイトを得た。

【0119】

2' - O - (2 - メトキシエチル) 修飾アミダイト

2' - O - メトキシエチル置換ヌクレオシドアミダイトは、以下のとおり、あるいは、Martin, P., Helvetica Chimica Acta、1995、78、486 - 504 の方法に従って製造する。

【0120】

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

5 - メチルウリジン (リボシルチミン、ヤマサ、銚子市により商業的に入手可能) (72.0 g、0.279 M)、炭酸ジフェニル (90.0 g、0.420 M) および重炭酸ナトリウム (2.0 g、0.024 M) を DMF (300 mL) に添加した。混合物を攪拌しながら還流に加熱して、発生された二酸化炭素ガスを制御された様式で放出させた。1 時間後に、わずかに黒ずんだ溶液を減圧下に濃縮した。生じるシロップを攪拌しながらジエチルエーテル (2.5 L) 中に注いだ。生成物はガム状物を形成した。エーテルをデカンテーションし、そして残渣を最少量のメタノール (約 400 mL) に溶解した。溶液を新鮮なエーテル (2.5 L) 中に注いで比較的堅いガム状物を生じた。エーテルをデカンテーションし、そしてガム状物を真空オーブン (1 mmHg で 60 ~ 24 時間) 中で乾燥して固形物を生じ、これを淡黄褐色粉末に粉碎した (57 g、85 % 粗収率)。NMR スペクトルは、そのナトリウム塩としてのフェノールで汚染された (約 5 %) 該構造に一致した。物質を、さらなる反応についてそうであるように使用した (もしくは、酢酸エチル中メタノールの勾配 (10 ~ 25 %) を使用するカラムクロマトグラフィーによりそれをさらに生成して白色固形物、mp 222 - 4 を生じることができる)。

10

【 0 1 2 1 】

2' - O - メトキシエチル - 5 - メチルウリジン

2, 2' - アンヒドロ - 5 - メチルウリジン (195 g、0.81 M)、トリス (2 - メトキシエチル) ホウ酸塩 (231 g、0.98 M) および 2 - メトキシエタノール (1.2 L) を 2 L のステンレス鋼圧容器に添加し、そして 160 ° で予め加熱された油浴中に入れた。155 ~ 160 ° で 48 時間加熱した後に、容器を開放し、そして溶液を乾固まで蒸発させかつ MeOH (200 mL) とともに摩砕した。残渣を熱アセトン (1 L) に懸濁した。不溶性の塩を濾過し、アセトン (150 mL) で洗浄し、そして濾液を蒸発させた。残渣 (280 g) を CH₃CN (600 mL) に溶解しかつ蒸発させた。シリカゲルカラム (3 kg) を、0.5 % Et₃NH を含有する CH₂Cl₂ / アセトン / メタノール (20 : 5 : 3) で充填した。残渣を CH₂Cl₂ (250 mL) に溶解し、そして、カラムに負荷する前にシリカ (150 g) に吸着させた。生成物を充填溶媒で溶出して 160 g (63 %) の生成物を生じた。付加的な物質を、不純な画分で再作業することにより得た。

20

【 0 1 2 2 】

2' - O - メトキシエチル - 5' - O - ジメトキシトリチル - 5 - メチルウリジン

2' - O - メトキシエチル - 5 - メチルウリジン (160 g、0.506 M) をピリジン (250 mL) と共蒸発させ、そして乾燥された残渣をピリジン (1.3 L) に溶解した。塩化ジメトキシトリチルの第一のアリコート (94.3 g、0.278 M) を添加し、そして混合物を室温で 1 時間攪拌した。塩化ジメトキシトリチルの第二のアリコート (94.3 g、0.278 M) を添加し、そして反応を追加の 1 時間攪拌した。メタノール (170 mL) をその後添加して反応を停止した。HPLC はおよそ 70 % の生成物の存在を示した。溶媒を蒸発させ、そして CH₃CN (200 mL) とともに摩砕した。残渣を CHCl₃ (1.5 L) に溶解し、そして 2 x 500 mL の飽和 NaHCO₃ および 2 x 500 mL の飽和 NaCl で抽出した。有機層を Na₂SO₄ で乾燥し、濾過しかつ蒸発させた。275 g の残渣を得た。残渣を、0.5 % Et₃NH を含有する EtOAc / ヘキサン / アセトン (5 : 5 : 1) で充填かつ溶出される 3.5 kg のシリカゲルカラムで精製した。純粋な画分を蒸発させて 164 g の生成物を生じた。付加的なおよそ 20 g を不純な画分から得て、183 g (57 %) の合計収量を生じた。

30

40

【 0 1 2 3 】

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

2' - O - メトキシエチル - 5' - O - ジメトキシトリチル - 5 - メチルウリジン (106 g、0.167 M)、DMF / ピリジン (562 mL の DMF および 188 mL のピリジンから調製された 3 : 1 混合物の 750 mL)、ならびに無水酢酸 (24.38 mL、0.258 M) を合わせそして室温で 24 時間攪拌した。反応を、TLC サンプルを M

50

e O H の添加で最初にクエンチすることにより T L C によりモニターした。T L C により判断されるところの反応の完了に際して M e O H (5 0 m L) を添加し、そして混合物を 3 5 で蒸発させた。残渣を C H C l ₃ (8 0 0 m L) に溶解し、そして 2 × 2 0 0 m L の飽和重炭酸ナトリウムおよび 2 × 2 0 0 m L の飽和 N a C l で抽出した。水層を 2 0 0 m L の C H C l ₃ で戻し抽出した (b a c k e x t r a c t e d) 。合わせられた有機物を硫酸ナトリウムで乾燥しかつ蒸発させて 1 2 2 g の残渣 (およそ 9 0 % の生成物) を生じた。残渣を 3 . 5 k g のシリカゲルカラム上で精製し、そして E t O A c / ヘキサン (4 : 1) を使用して溶出した。純粋な生成物画分を蒸発させて 9 6 g (8 4 %) を生じた。追加の 1 . 5 g を後の画分から回収した。

【 0 1 2 4 】

10

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

第一の溶液を、3 ' - O - アセチル - 2 ' - O - メトキシエチル - 5 ' - O - ジメトキシトリチル - 5 - メチルウリジン (9 6 g 、 0 . 1 4 4 M) を C H ₃ C N (7 0 0 m L) に溶解することにより調製し、そしてわきに置いた。トリエチルアミン (1 8 9 m L 、 1 . 4 4 M) を C H ₃ C N (1 L) 中のトリアゾール (9 0 g 、 1 . 3 M) の溶液に添加し、- 5 に冷却し、そして頭上攪拌機を使用して 0 . 5 時間攪拌した。P O C l ₃ を、- 1 0 で維持された攪拌された溶液に 3 0 分の期間にわたって一滴ずつ添加し、そして生じる混合物を追加の 2 時間攪拌した。第一の溶液を、後者の溶液に 4 5 分の期間にわたって一滴ずつ添加した。生じる反応混合物を低温室に一夜保存した。塩を反応混合物から濾過し、そして溶液を蒸発させた。残渣を E t O A c (1 L) に溶解し、そして不溶性固形物を濾過により除去した。濾液を 1 × 3 0 0 m L の N a H C O ₃ および 2 × 3 0 0 m L の飽和 N a C l で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥しかつ蒸発させた。残渣を E t O A c とともに摩砕して表題化合物を生じた。

20

【 0 1 2 5 】

2 ' - O - メトキシエチル - 5 ' - O - ジメトキシトリチル - 5 - メチルシチジン

ジオキサン (5 0 0 m L) および N H ₄ O H (3 0 m L) 中の 3 ' - O - アセチル - 2 ' - O - メトキシエチル - 5 ' - O - ジメトキシトリチル - 5 - メチル - 4 - トリアゾールウリジン (1 0 3 g 、 0 . 1 4 1 M) の溶液を室温で 2 時間攪拌した。ジオキサン溶液を蒸発させ、そして残渣を M e O H (2 × 2 0 0 m L) と共沸させた。残渣を M e O H (3 0 0 m L) に溶解し、そして 2 リットルのステンレス鋼圧容器に移した。N H ₃ ガスで飽和された M e O H (4 0 0 m L) を添加し、そして容器を 1 0 0 に 2 時間加熱した (T L C は完全な転化を示した) 。容器の内容物を乾固まで蒸発させ、そして残渣を E t O A c (5 0 0 m L) に溶解しかつ飽和 N a C l (2 0 0 m L) で 1 回洗浄した。有機物を硫酸ナトリウムで乾燥し、そして溶媒を蒸発させて 8 5 g (9 5 %) の表題化合物を生じた。

30

【 0 1 2 6 】

N 4 - ベンゾイル - 2 ' - O - メトキシエチル - 5 ' - O - ジメトキシトリチル - 5 - メチルシチジン

2 ' - O - メトキシエチル - 5 ' - O - ジメトキシトリチル - 5 - メチルシチジン (8 5 g 、 0 . 1 3 4 M) を D M F (8 0 0 m L) に溶解し、そして無水安息香酸 (3 7 . 2 g 、 0 . 1 6 5 M) を攪拌しながら添加した。3 時間攪拌した後、T L C は反応がおおよそ 9 5 % 完了であることを示した。溶媒を蒸発させ、そして残渣を M e O H (2 0 0 m L) と共沸させた。残渣を C H C l ₃ (7 0 0 m L) に溶解し、そして飽和 N a H C O ₃ (2 × 3 0 0 m L) および飽和 N a C l (2 × 3 0 0 m L) で抽出し、M g S O ₄ で乾燥しかつ蒸発させて残渣 (9 6 g) を生じた。残渣を、溶出溶媒として 0 . 5 % E t ₃ N H を含有する E t O A c / ヘキサン (1 : 1) を使用する 1 . 5 k g のシリカカラムでクロマトグラフィー分離した。純粋な生成物の画分を蒸発させて 9 0 g (9 0 %) の表題化合物を生じた。

40

【 0 1 2 7 】

50

N 4 - ベンゾイル - 2' - O - メトキシエチル - 5' - O - ジメトキシトリチル - 5 - メチルシチジン - 3' - アミダイト

N 4 - ベンゾイル - 2' - O - メトキシエチル - 5' - O - ジメトキシトリチル - 5 - メチルシチジン (74 g、0.10 M) を CH_2Cl_2 (1 L) に溶解した。テトラゾールジイソプロピルアミン (7.1 g) および 2 - シアノエトキシテトラ (イソプロピル) ホスファイト (40.5 mL、0.123 M) を窒素雰囲気下で攪拌しながら添加した。生じる混合物を室温で 20 時間攪拌した (TLC は反応が 95% 完了であることを示した)。反応混合物を飽和 NaHCO_3 (1 x 300 mL) および飽和 NaCl (3 x 300 mL) で抽出した。水性洗浄液を CH_2Cl_2 (300 mL) で戻し抽出し、そして抽出物を合わせ、 MgSO_4 で乾燥しかつ濃縮した。得られた残渣を、溶出溶媒として EtOAc / ヘキサン (3 : 1) を使用する 1.5 kg のシリカカラムでクロマトグラフィー分離した。純粋な画分を合わせて 90.6 g (87%) の表題化合物を生じた。

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

2' - (ジメチルアミノオキシエトキシ)ヌクレオシドアミダイト

2' - (ジメチルアミノオキシエトキシ)ヌクレオシドアミダイト (2' - O - (ジメチルアミノオキシエチル)ヌクレオシドアミダイトとしてもまた当該技術分野で知られる) は以下の段落に記述されるとおり製造する。アデノシン、シチジンおよびグアノシンヌクレオシドアミダイトは、環外アミンをアデノシンおよびシチジンの場合にベンゾイル部分で、ならびにグアノシンの場合にイソブチリルで保護することを除き、チミジン (5 -

10

20

【0128】

5' - O - tert - ブチルジフェニルシリル - O^2 - 2' - アンヒドロ - 5 - メチルウリジン

O^2 - 2' - アンヒドロ - 5 - メチルウリジン (Pro. Bio. Sint., イタリア・パレーゼ、100.0 g、0.416 mmol)、ジメチルアミノピリジン (0.66 g、0.013 等量、0.0054 mmol) を、アルゴン雰囲気下かつ機械的攪拌を伴い周囲温度で無水ピリジン (500 mL) に溶解した。tert - ブチルジフェニルクロロシラン (125.8 g、119.0 mL、1.1 等量、0.458 mmol) を一部分で添加した。反応を周囲温度で 16 時間攪拌した。TLC (Rf 0.22、酢酸エチル) は完了した反応を示した。溶液を減圧下に濃厚な油状物まで濃縮した。これを、ジクロロメタン (1 L) と飽和重炭酸ナトリウム (2 x 1 L) および塩水 (1 L) との間で分配した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥しかつ濃厚な油状物まで減圧下に濃縮した。油状物を酢酸エチルおよびエチルエーテルの 1 : 1 混合物 (600 mL) に溶解し、そして溶液を -10 に冷却した。生じる結晶生成物を濾過により収集し、エチルエーテル (3 x 200 mL) で洗浄し、そして 149 g (74.8%) の白色固形物まで乾燥 (40、1 mmHg、24 時間) した。TLC および NMR は純粋な生成物と一致した。

30

【0129】

5' - O - tert - ブチルジフェニルシリル - 2' - O - (2 - ヒドロキシエチル) - 5 - メチルウリジン

40

2 L のステンレス鋼の攪拌されない圧反応器中にテトラヒドロフラン中ボラン (1.0 M、2.0 等量、622 mL) を添加した。ヒュームフード中かつ人的攪拌を伴い、エチレングリコール (350 mL、過剰) を、水素ガスの発生が止むまで最初に慎重に添加した。5' - O - tert - ブチルジフェニルシリル - O^2 - 2' - アンヒドロ - 5 - メチルウリジン (149 g、0.311 mol) および重炭酸ナトリウム (0.074 g、0.003 等量) を、人的攪拌を伴い添加した。反応器を封止し、そして 160 の内部温度が達成されるまで油浴中で加熱し、そしてその後 16 時間維持した (圧 < 100 psig)。反応容器を周囲まで冷却しかつ開放した。TLC (所望の生成物について Rf 0.67 および ara - T 副生成物について Rf 0.82、酢酸エチル) は生成物への約 70% の転化を示した。付加的な副生成物形成を回避するため、反応を停止し、温水浴 (

50

40 ~ 100) 中減圧 (10 ないし 1 mmHg) 下で濃縮し、より極端な条件を使用してエチレングリコールを除去した。[あるいは、一旦低沸点溶媒がなくなれば、残存する溶液を酢酸エチルと水との間で分配することができる。] 残渣をカラムクロマトグラフィー (2 kg シリカゲル、酢酸エチル - ヘキサン勾配 1 : 1 ないし 4 : 1) により精製した。適切な画分を合わせ、ストリップし、そして出発原料 (17.4 g) で汚染された白色の砕けやすい泡状物としての生成物 (84 g、50 %) および純粋な再使用可能な出発原料 20 g まで乾燥した。出発原料より少なく純粋な回収された出発原料に基づく収率は 58 % であった。TLC および NMR は 99 % 純粋な生成物と一致した。

【0130】

10

2' - O - ([2 - フタルイミドキシ) エチル] - 5' - t - ブチルジフェニルシリル - 5 - メチルウリジン

5' - O - tert - ブチルジフェニルシリル - 2' - O - (2 - ヒドロキシエチル) - 5 - メチルウリジン (20 g、36.98 mmol) をトリフェニルホスフィン (11.63 g、44.36 mmol) および N - ヒドロキシフタルイミド (7.24 g、44.36 mmol) と混合した。その後、それを高真空下で 40 で 2 日間 P₂O₅ で乾燥した。反応混合物をアルゴンで洗い流し、そして無水 THF (369.8 mL、アルドリッチ (Aldrich)、sure seal ボトル) を添加して澄明な溶液を得た。アゾジカルボン酸ジエチル (6.98 mL、44.36 mmol) を反応混合物に一滴ずつ添加した。生じる濃赤色の着色が次の滴を添加する前にちょうど脱色されるような添加の速度を維持する。添加が完了した後に反応を 4 時間攪拌した。その時点までに TLC は反応の完了を示した (酢酸エチル : ヘキサン、60 : 40)。溶媒を真空中で蒸発させた。得られた残渣をフラッシュカラム上に置き、そして酢酸エチル : ヘキサン (60 : 40) で溶出して 2' - O - ([2 - フタルイミドキシ) エチル] - 5' - t - ブチルジフェニルシリル - 5 - メチルウリジンを白色泡状物 (21.819 g、86 %) として得た。

20

【0131】

5' - O - tert - ブチルジフェニルシリル - 2' - O - [(2 - ホルムアドキシミノオキシ) エチル] - 5 - メチルウリジン

2' - O - ([2 - フタルイミドキシ) エチル] - 5' - t - ブチルジフェニルシリル - 5 - メチルウリジン (3.1 g、4.5 mmol) を無水 CH₂Cl₂ (4.5 mL) に溶解し、そしてメチルヒドラジン (300 mL、4.64 mmol) を - 10 ないし 0 で一滴ずつ添加した。1 時間後に混合物を濾過し、濾液を氷冷 CH₂Cl₂ で洗浄し、そして合わせられた有機層を水、塩水で洗浄しかつ無水 Na₂SO₄ で乾燥した。溶液を濃縮して 2' - O - (アミノオキシエチル) チミジンを得、これをその後 MeOH (67.5 mL) に溶解した。これにホルムアルデヒド (20 % 水性溶液、w/w、1.1 等量) を添加し、そして生じる混合物を 1 時間攪拌した。溶媒を真空下に除去し；残渣をクロマトグラフィー分離して、5' - O - tert - ブチルジフェニルシリル - 2' - O - [(2 - ホルムアドキシミノオキシ) エチル] - 5 - メチルウリジンを白色泡状物 (1.95 g、78 %) として得た。

30

【0132】

40

5' - O - tert - ブチルジフェニルシリル - 2' - O - [N, N - ジメチルアミノオキシエチル] - 5 - メチルウリジン

5' - O - tert - ブチルジフェニルシリル - 2' - O - [(2 - ホルムアドキシミノオキシ) エチル] - 5 - メチルウリジン (1.77 g、3.12 mmol) を無水 MeOH 中の 1 M p - トルエンスルホン酸ピリジニウム (PPTS) の溶液 (30.6 mL) に溶解した。シアノホウ水素化ナトリウム (0.39 g、6.13 mmol) を不活性雰囲気下 10 でこの溶液に添加した。反応混合物を 10 で 10 分間攪拌した。その後、反応容器を氷浴から取り出しかつ室温で 2 時間攪拌し、反応を TLC (CH₂Cl₂ 中 5 % MeOH) によりモニターした。水性 NaHCO₃ 溶液 (5 %、10 mL) を添加しそして酢酸エチル (2 x 20 mL) で抽出した。酢酸エチル層を無水 Na₂SO₄ で乾燥

50

し、乾固まで蒸発させた。残渣をMeOH中の1M PPTSの溶液(30.6 mL)に溶解した。ホルムアルデヒド(20% w/w、30 mL、3.37 mmol)を添加し、そして反応混合物を室温で10分間攪拌した。反応混合物を氷浴中で10に冷却し、シアノホウ水素化ナトリウム(0.39 g、6.13 mmol)を添加し、そして反応混合物を10で10分間攪拌した。10分後に反応混合物を氷浴から取り出しかつ室温で2時間攪拌した。反応混合物に5% NaHCO₃(25 mL)溶液を添加し、そして酢酸エチル(2 × 25 mL)で抽出した。酢酸エチル層を無水Na₂SO₄で乾燥しかつ乾固まで蒸発させた。得られた残渣をフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製し、そしてCH₂Cl₂中5% MeOHで溶出して、5'-O-tert-ブチルジフェニルシリル-2'-O-[N,N-ジメチルアミノオキシエチル]-5-メチルウリジン白色泡状物(14.6 g、80%)として得た。 10

【0133】

2'-O-(ジメチルアミノオキシエチル)-5-メチルウリジン

トリエチルアミントリヒドロフルオリド(3.91 mL、24.0 mmol)を無水THFおよびトリエチルアミン(1.67 mL、12 mmol、無水、KOH上に保管)に溶解した。その後、トリエチルアミン-2HFのこの混合物を5'-O-tert-ブチルジフェニルシリル-2'-O-[N,N-ジメチルアミノオキシエチル]-5-メチルウリジン(1.40 g、2.4 mmol)に添加しかつ室温で24時間攪拌した。反応をTLC(CH₂Cl₂中5% MeOH)によりモニターした。溶媒を真空下に除去し、そして残渣をフラッシュカラム上に置きかつCH₂Cl₂中10% MeOHで溶出して、2'-O-(ジメチルアミノオキシエチル)-5-メチルウリジン(766 mg、92.5%)を得た。 20

【0134】

5'-O-DMT-2'-O-(ジメチルアミノオキシエチル)-5-メチルウリジン

2'-O-(ジメチルアミノオキシエチル)-5-メチルウリジン(750 mg、2.17 mmol)を40で高真空下にP₂O₅で一夜乾燥した。その後、それを無水ピリジン(20 mL)と共蒸発させた。得られた残渣をアルゴン雰囲気下でピリジン(11 mL)に溶解した。4-ジメチルアミノピリジン(26.5 mg、2.60 mmol)、塩化4,4'-ジメトキシトリチル(880 mg、2.60 mmol)を混合物に添加し、そして反応混合物を、出発原料の全部が消失するまで室温で攪拌した。ピリジンを真空下に除去し、そして残渣をクロマトグラフィー分離しかつCH₂Cl₂中10% MeOHで溶出して、5'-O-DMT-2'-O-(ジメチルアミノオキシエチル)-5-メチルウリジン(1.13 g、80%)を得た。 30

【0135】

5'-O-DMT-2'-O-(2-N,N-ジメチルアミノオキシエチル)-5-メチルウリジン-3'-[(2-シアノエチル)-N,N-ジイソプロピルホスホルアミダイト]

5'-O-DMT-2'-O-(ジメチルアミノオキシエチル)-5-メチルウリジン(1.08 g、1.67 mmol)をトルエン(20 mL)と共蒸発させた。残渣にN,N-ジイソプロピルアミンテトラゾニド(0.29 g、1.67 mmol)を添加し、そして高真空下40で一夜P₂O₅で乾燥した。その後、反応混合物を無水アセトニトリル(8.4 mL)に溶解し、そして2-シアノエチル-N,N,N¹,N¹-テトライソプロピルホスホルアミダイト(2.12 mL、6.08 mmol)を添加した。反応混合物を不活性雰囲気下周囲温度で4時間攪拌した。反応の進行をTLC(ヘキサン:酢酸エチル 1:1)によりモニターした。溶媒を蒸発させ、その後残渣を酢酸エチル(70 mL)に溶解しかつ5%水性NaHCO₃(40 mL)で洗浄した。酢酸エチル層を無水Na₂SO₄で乾燥しかつ濃縮した。得られた残渣をクロマトグラフィー分離して(溶離液として酢酸エチル)、5'-O-DMT-2'-O-(2-N,N-ジメチルアミノオキシエチル)-5-メチルウリジン-3'-[(2-シアノエチル)-N,N-ジイソプロピルホスホルアミダイト]を泡状物(1.04 g、74.9%)として得た。 40

【0136】

2' - (アミノオキシエトキシ)ヌクレオシドアミダイト

2' - (アミノオキシエトキシ)ヌクレオシドアミダイト(2' - O - (アミノオキシエチル)ヌクレオシドアミダイトとしてもまた当該技術分野で知られる)は以下の段落に記述されるとおり製造する。アデノシン、シチジンおよびチミジンヌクレオシドアミダイトは同様に製造する。

【0137】

N2 - イソブチリル - 6 - O - ジフェニルカルバモイル - 2' - O - (2 - エチルアセチル) - 5' - O - (4, 4' - ジメトキシトリチル)グアノシン - 3' - [(2 - シアノエチル) - N, N - ジイソプロピルホスホルアミダイト]

2' - O - アミノオキシエチルグアノシン類似物は、ジアミノプリンリボシドの選択的2' - O - アルキル化により得てよい。少量の3' - O - 異性体と一緒に2' - O - (2 - エチルアセチル)ジアミノプリンリボシドを提供するために、複数グラム(multigram)量のジアミノプリンリボシドをシェーリング AG (Schering AG) (ベルリン)から購入してよい。2' - O - (2 - エチルアセチル)ジアミノプリンリボシドを分割し、そしてアデノシンデアミナーゼでの処理により2' - O - (2 - エチルアセチル)グアノシンに転化してよい。(McGee, D. P. C., Cook, P. D., Guinasso, C. J., 第WO 94/02501 A1号明細書 940203。)標準的保護手順が2' - O - (2 - エチルアセチル) - 5' - O - (4, 4' - ジメトキシトリチル)グアノシン、および還元されて2 - N - イソブチリル - 6 - O - ジフェニルカルバモイル - 2' - O - (2 - ヒドロキシエチル) - 5' - O - (4, 4' - ジメトキシトリチル)グアノシンを提供するかもしれない2 - N - イソブチリル - 6 - O - ジフェニルカルバモイル - 2' - O - (2 - エチルアセチル) - 5' - O - (4, 4' - ジメトキシトリチル)グアノシンを提供するはずである。前のとおり、ヒドロキシル基をミツノブ反応を介してN - ヒドロキシフタルイミドにより置換してよく、そして、保護されたヌクレオシドを通常どおりホスフィチル化して、2 - N - イソブチリル - 6 - O - ジフェニルカルバモイル - 2' - O - ([2 - フタルミドキシ]エチル) - 5' - O - (4, 4' - ジメトキシトリチル)グアノシン - 3' - [(2 - シアノエチル) - N, N - ジイソプロピルホスホルアミダイト]を生じる。

2' - ジメチルアミノエトキシエトキシ(2' - DMAEOE)ヌクレオシドアミダイト

2' - ジメチルアミノエトキシエトキシヌクレオシドアミダイト(2' - O - ジメチルアミノエトキシエチル、すなわち2' - O - CH₂ - O - CH₂ - N(CH₂)₂もしくは2' - DMAEOEヌクレオシドアミダイトとしてもまた当該技術分野で知られる)は以下のとおり製造する。他のヌクレオシドアミダイトは同様に製造する。

【0138】

2' - O - [2(2 - N, N - ジメチルアミノエトキシ)エチル] - 5 - メチルウリジン

2[2 - (ジメチルアミノ)エトキシ]エタノール(アルドリッチ(Aldrich)、6.66g、50mmol)を、100mLボンベ(bomb)中で攪拌しながらテトラヒドロフラン中のボランの溶液(1M、10mL、10mmol)にゆっくりと添加する。固体が溶解する際に水素ガスが発生する。O² -, 2' - アンヒドロ - 5 - メチルウリジン(1.2g、5mmol)および重炭酸ナトリウム(2.5mg)を添加しかつボンベを封止し、油浴中に入れかつ155 に26時間加熱する。ボンベを室温に冷却しかつ開放する。粗溶液を濃縮し、そして残渣を水(200mL)とヘキサン(200mL)との間で分配する。過剰のフェノールがヘキサン層に抽出される。水層を酢酸エチル(3x200mL)で抽出し、そして合わせられた有機層を水で1回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥しかつ濃縮する。残渣を、溶離液としてメタノール/ジクロロメタン 1:20(2%トリエチルアミンを有する)を使用してシリカゲル上でカラム分離する(columned)。カラム画分を濃縮する際に無色固形物が生じ、これを収集して、表題化合物を白色固形物として生じる。

10

20

30

40

50

5' - O - ジメトキシトリチル - 2' - O - [2 (2 - N , N - ジメチルアミノエトキシ) エチル]] - 5 - メチルウリジン

無水ピリジン (8 mL) 中の 0.5 g (1.3 mmol) の 2' - O - [2 (2 - N , N - ジメチルアミノエトキシ) エチル]] - 5 - メチルウリジンに、トリエチルアミン (0.36 mL) および塩化ジメトキシトリチル (DMT - Cl、0.87 g、2 等量) を添加しかつ 1 時間攪拌する。反応混合物を水 (200 mL) 中に注ぎかつ CH_2Cl_2 ($2 \times 200 \text{ mL}$) で抽出する。合わせられた CH_2Cl_2 層を飽和 NaHCO_3 溶液、次いで飽和 NaCl 溶液で洗浄し、そして無水硫酸ナトリウムで乾燥する。溶媒の蒸発、次いで $\text{MeOH} : \text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{Et}_3\text{N}$ (20 : 1、v/v、1% トリエチルアミンを含む) を使用するシリカゲルクロマトグラフィーは表題化合物を生じる。

10

【 0 1 3 9 】

5' - O - ジメトキシトリチル - 2' - O - [2 (2 - N , N - ジメチルアミノエトキシ) エチル]] - 5 - メチルウリジン - 3' - O - (シアノエチル - N , N - ジイソプロピル) ホスホルアミダイト

ジイソプロピルアミノテトラゾリド (0.6 g) および 2 - シアノエトキシ - N , N - ジイソプロピルホスホルアミダイト (1.1 mL、2 等量) を、アルゴンの雰囲気下で、 CH_2Cl_2 (20 mL) に溶解された 5' - O - ジメトキシトリチル - 2' - O - [2 (2 - N , N - ジメチルアミノエトキシ) エチル]] - 5 - メチルウリジン (2.17 g、3 mmol) の溶液に添加する。反応混合物を一夜攪拌しそして溶媒を蒸発させる。生じる残渣を、溶離液として酢酸エチルを用いるシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製して、表題化合物を生じる。

20

実施例 2

オリゴヌクレオチド合成

未置換および置換ホスホジエステル ($\text{P} = \text{O}$) オリゴヌクレオチドは、ヨウ素による酸化を伴う標準的ホスホルアミダイトの化学を使用し、自動化 DNA 合成機 (アプライド バイオシステムズ (Applied Biosystems) モデル 380B) で合成する。

【 0 1 4 0 】

ホスホロチオエート ($\text{P} = \text{S}$) は、標準酸化ボトルを、ホスファイト結合の段階的イオウ化 (thiation) のためにアセトニトリル中の 3 H - 1 , 2 - ベンゾジチオール - 3 - オン 1 , 1 - ジオキシドの 0.2 M 溶液により置き換えた以外は、ホスホジエステルオリゴヌクレオチドについてのとおりに合成する。イオウ化待機段階を 68 秒に増大させ、次いでキャッピング段階を行った。C P G カラムからの切断および 55 (18 時間) で濃水酸化アンモニウム中で脱保護 (deblock) した後に、2.5 容量のエタノールを用いて 0.5 M NaCl 溶液から 2 回沈殿させることによりオリゴヌクレオチドを精製した。ホスフィネートオリゴヌクレオチドは米国特許第 5 , 508 , 270 号明細書 (引用することにより本明細書に組み込まれる) に記述されるとおり製造する。

30

【 0 1 4 1 】

アルキルホスホネートオリゴヌクレオチドは米国特許第 4 , 469 , 863 号明細書 (引用することにより本明細書に組み込まれる) に記述されるとおり製造する。

40

【 0 1 4 2 】

3' - デオキシ - 3' - メチレンホスホネートオリゴヌクレオチドは、米国特許第 5 , 610 , 289 号もしくは同第 5 , 625 , 050 号明細書 (引用することにより本明細書に組み込まれる) に記述されるとおり製造する。

【 0 1 4 3 】

ホスホルアミダイトオリゴヌクレオチドは米国特許第 5 , 256 , 775 号明細書もしくは米国特許第 5 , 366 , 878 号明細書 (引用することにより本明細書に組み込まれる) に記述されるとおり製造する。

【 0 1 4 4 】

アルキルホスホノチオエートオリゴヌクレオチドは、公開 P C T 出願第 P C T / U S 9

50

4 / 0 0 9 0 2 号および同第 P C T / U S 9 3 / 0 6 9 7 6 号明細書（それぞれ第 W O 9 4 / 1 7 0 9 3 号および同第 W O 9 4 / 0 2 4 9 9 号明細書として公開される）（引用することにより本明細書に組み込まれる）に記述されるとおり製造する。

【 0 1 4 5 】

3' - デオキシ - 3' - アミノホスホルアミデートオリゴヌクレオチドは、米国特許第 5, 4 7 6, 9 2 5 号明細書（引用することにより本明細書に組み込まれる）に記述されるとおり製造する。

【 0 1 4 6 】

ホスホトリエステルオリゴヌクレオチドは米国特許第 5, 0 2 3, 2 4 3 号明細書（引用することにより本明細書に組み込まれる）に記述されるとおり製造する。

10

【 0 1 4 7 】

ボラノホスフェートオリゴヌクレオチドは、米国特許第 5, 1 3 0, 3 0 2 号および同第 5, 1 7 7, 1 9 8 号明細書（双方とも引用することにより本明細書に組み込まれる）に記述されるとおり製造する。

実施例 3

オリゴヌクレオシド合成

MMI 結合オリゴヌクレオシドとしてもまた同定されるメチレンメチルイミノ結合オリゴヌクレオシド、MDH 結合オリゴヌクレオシドとしてもまた同定されるメチレンジメチルヒドラゾ結合オリゴヌクレオシド、およびアミド - 3 結合オリゴヌクレオシドとしてもまた同定されるメチレンカルボニルアミノ結合オリゴヌクレオシド、ならびに、アミド - 4 結合オリゴヌクレオシドとしてもまた同定されるメチレンアミノカルボニル結合オリゴヌクレオシド、ならびに、例えば交互に並ぶ MMI および P = O もしくは P = S 結合を有する混合バックボーン化合物は、米国特許第 5, 3 7 8, 8 2 5 号、同第 5, 3 8 6, 0 2 3 号、同第 5, 4 8 9, 6 7 7 号、同第 5, 6 0 2, 2 4 0 号および同第 5, 6 1 0, 2 8 9 号明細書（その全部は引用することにより本明細書に組み込まれる）に記述されるとおり製造する。

20

【 0 1 4 8 】

ホルムアセタールおよびチオホルムアセタール結合オリゴヌクレオシドは、米国特許第 5, 2 6 4, 5 6 2 号および同第 5, 2 6 4, 5 6 4 号明細書（引用することにより本明細書に組み込まれる）に記述されるとおり製造する。

30

【 0 1 4 9 】

エチレンオキシド結合オリゴヌクレオシドは、米国特許第 5, 2 2 3, 6 1 8 号明細書（引用することにより本明細書に組み込まれる）に記述されるとおり製造する。

実施例 4

PNA 合成

ペプチド核酸 (PNA) は、Peptide Nucleic Acids (PNA) : Synthesis, Properties and Potential Applications、Bioorganic & Medicinal Chemistry、1996、4、5 - 23 に言及される多様な手順のいずれかに従って製造する。それらはまた、米国特許第 5, 5 3 9, 0 8 2 号、同第 5, 7 0 0, 9 2 2 号および同第 5, 7 1 9, 2 6 2 号明細書（引用することにより本明細書に組み込まれる）に従って製造してもよい。

40

実施例 5

キメラオリゴヌクレオチドの合成

本発明のキメラオリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシドもしくは混合オリゴヌクレオチド/オリゴヌクレオシドはいくつかの異なる型のものであることができる。これらは、結合されるヌクレオシドの「ギャップ」セグメントが、結合されるヌクレオシドの 5' と 3' の「ウイング (wing)」セグメントの間に位置される第一の型、および、「ギャップ」セグメントがオリゴマー化合物の 3' もしくは 5' いずれかの末端に配置される第二の「開放端」型を包含する。第一の型のオリゴヌクレオチドは「ギャップマー (gap

50

mer)」もしくはギャップトオリゴヌクレオチド(gapped oligonucleotide)としてもまた当該技術分野で既知である。第二の型のオリゴヌクレオチドは「ヘミマー(hemimer)」もしくは「ウィングマー(wingmer)」としてもまた当該技術分野で既知である。

【0150】

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

2'-O-アルキルホスホロチオエートおよび2'-デオキシホスホロチオエートオリゴヌクレオチドセグメントを有するキメラオリゴヌクレオチドは、上のとおり、アプライド バイオシステムズ(Applied Biosystems)の自動化DNA合成機 10
モデル380Bを使用して合成する。オリゴヌクレオチドは、自動化合成機、ならびにDNA部分について2'-デオキシ-5'-ジメトキシトリチル-3'-O-ホスホルアミダイト、ならびに5'および3'ウィングについて5'-ジメトキシトリチル-2'-O-メチル-3'-O-ホスホルアミダイトを使用して合成する。標準的合成周期は、RNAについて4回および2'-O-メチルについて2回反復される、テトラゾールおよび塩基の供給後の待機段階を600秒に増大させることにより改変する。完全に保護されたオリゴヌクレオチドを支持体から切断し、そしてリン酸基を3:1アンモニア/エタノール中で室温で一夜脱保護し、その後乾固まで凍結乾燥する。その後、室温で24時間のメタノール性アンモニア中での処理を行って全部の塩基を脱保護し、そしてサンプルを再度乾固まで凍結乾燥する。ペレットをTHF中1M TBAFに室温で24時間再懸濁して2 20
'位を脱保護する。その後、反応を1M TEAAでクエンチし、そしてその後、サンプルを、G25サイズ排除カラム上で脱塩される前にロトバック(rotovac)により1/2容量に減量する。その後、回収されたオリゴを、収量について分光測光的に、ならびに純度についてキャピラリー電気泳動および質量分析により分析する。

【0151】

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

[2'-O-(2-メトキシエチル)]-[2'-デオキシ]-[2'-O-(メトキシエチル)]キメラホスホロチオエートオリゴヌクレオチドは、2'-O-メチルアミダイトについての2'-O-(メトキシエチル)アミダイトの置換を伴い、2'-O- 30
メチルキメラオリゴヌクレオチドについての上の手順に従って製造した。

【0152】

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

[2'-O-(2-メトキシエチル)ホスホジエステル]-[2'-デオキシホスホロチオエート]-[2'-O-(メトキシエチル)ホスホジエステル]キメラオリゴヌクレオチドは、2'-O-メチルアミダイトについての2'-O-(メトキシメチル)アミダイトの置換、キメラ構造のウィング部分内のホスホジエステルヌクレオチド間結合を生成させるためのヨウ素での酸化、および、中央のギャップのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を生成させるための3, H-1, 2ペンゾジチオール-3-オン1, 1ジオキシド(ビューゲージ(Beaueage)試薬)を利用する硫化を伴い、2'-O-メチルキメラオリゴヌクレオチドについての上の手順に従って製造する。 40

【0153】

他のキメラオリゴヌクレオチド、キメラオリゴヌクレオシドおよび混合キメラオリゴヌクレオチド/オリゴヌクレオシドは、米国特許第5,623,065号明細書(引用することにより本明細書に組み込まれる)に従って合成する。

実施例6

オリゴヌクレオチドの単離

細孔性ガラス(controlled pore glass)カラム(アプライド 50

バイオシステムズ (Applied Biosystems) からの切断、および濃水酸化アンモニウム中 55 で 18 時間脱保護した後に、オリゴヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチドを、2.5 容量のエタノールを用いる 0.5 M NaCl からの 2 回の沈殿により精製する。合成されたオリゴヌクレオチドは、変性ゲル上でのポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析し、そして最低 85 % の完全長物質であることを判断した。合成で得られたホスホロチオエートおよびホスホジエステル結合の相対量を、³¹P 核磁気共鳴分光法により定期的に確認し、また、いくつかの研究については、オリゴヌクレオチドを Chiangら、J. Biol. Chem. 1991、266、18162-18171 により記述されるとおり HPLC により精製した。HPLC 精製された物質で得られた結果は、HPLC 精製されない物質で得られたものに類似であった。

10

実施例 7

オリゴヌクレオチド合成 - 96 穴プレート形式

オリゴヌクレオチドを、標準的な 96 穴形式で同時に 96 種の配列を集成することが可能な自動化合成機上で固相 P (III) ホスホルアミダイト化学を介して合成した。ホスホジエステルヌクレオチド間結合は水性ヨウ素を用いる酸化により提供された。ホスホロチオエートヌクレオチド間結合は、水性アセトニトリル中で 3, H-1, 2 ベンゾジチオール-3-オン 1, 1, ジオキシド (ビューケージ (Beaucage) 試薬) を利用する硫化により生成させた。標準的な塩基保護された - シアノエチルジイソプロピルホスホルアミダイトは、商業的供給元 (例えば PE-アプライド バイオシステムズ (PE-Applied Biosystems)、カリフォルニア州フォスターシティ、もしくは

20

【0154】

オリゴヌクレオチドを支持体から切断し、そして上昇された温度 (55 ~ 60) で 12 ~ 16 時間、濃 NH₄ OH で脱保護し、そしてその後遊離された生成物を真空中で乾燥した。乾燥された生成物をその後、滅菌水に再懸濁してマスタープレートを提供し、これから、全部の分析および試験プレートサンプルをその後、ロボット式ピペッターを利用して希釈する。

30

実施例 8

オリゴヌクレオチド分析 - 96 穴プレート形式

各ウェル中のオリゴヌクレオチドの濃度は、サンプルの希釈および UV 吸収分光法により評価した。個々の生成物の完全長の完全性は、96 穴形式 (ベックマン (Beckman) P / ACETM MDQ)、もしくは個別に調製されたサンプルについては商業的 CE 装置 (例えばベックマン (Beckman) P / ACETM 5000、ABI 270) のいずれかでのキャピラリー電気泳動 (CE) により評価した。塩基およびバックボーン組成は電子スプレー質量分析法を利用する化合物の質量分析により確認した。全部のアッセイ試験プレートは、単一および複数チャンネルのロボット式ピペッターを使用してマスタープレートから希釈した。プレートは、プレート上の化合物の最低 85 % が最低 8

40

実施例 9

細胞培養およびオリゴヌクレオチド処理

標的核酸発現に対するアンチセンス化合物の影響は、標的核酸が測定可能なレベルで存在することを条件に、多様な細胞型のいずれでも試験することができる。これは、例えば PCR もしくはノーザンブロット分析を使用して慣例に測定することができる。以下の 7 細胞型を具体的説明の目的上提供するが、しかし、標的が選ばれた細胞型で発現されることを条件に、他の細胞型を慣例に使用することができる。これは、当該技術分野で慣例の方法、例えばノーザンブロット分析、リボヌクレアーゼ保護アッセイもしくは RT-PCR により容易に測定することができる。

50

T - 2 4 細胞 :

ヒト移行上皮細胞膀胱癌細胞系 T - 2 4 はアメリカン タイプ カルチャー コレクション (American Type Culture Collection) (ATCC) (バージニア州マナサス) から得た。T - 2 4 細胞は、10 % ウシ胎児血清 (ギブコ / ライフ テクノロジーズ (Gibco / Life Technologies)、メリーランド州ゲイタースバーグ)、ペニシリン 1 mL あたり 100 単位、およびストレプトマイシン 1 mL あたり 100 マイクログラム (ギブコ / ライフ テクノロジーズ (Gibco / Life Technologies)、メリーランド州ゲイタースバーグ) を補充された完全マッコイ 5 A 基礎培地 (ギブコ / ライフ テクノロジーズ (Gibco / Life Technologies)、メリーランド州ゲイタースバーグ) 中で慣例に培養した。細胞は、それらが 90 % コンフルエンスに達した場合に、トリプシン処理および希釈により慣例に継代した。細胞を、RT - PCR 分析での使用のために 7000 細胞 / ウェルの密度で 96 穴プレート (ファルコン - プライマリア (Falcon - Primaria) # 3872) に接種した。

10

【 0 1 5 5 】

ノーザンブロッティングもしくは他の分析のためには、細胞を 100 mm もしくは他の標準的組織培養プレート上に接種し、そして適切な容量の培地およびオリゴヌクレオチドを使用して同様に処理してもよい。

A 5 4 9 細胞 :

ヒト肺癌細胞系 A 5 4 9 はアメリカン タイプ カルチャー コレクション (American Type Culture Collection) (ATCC) (バージニア州マナサス) から得た。A 5 4 9 細胞は、10 % ウシ胎児血清 (ギブコ / ライフ テクノロジーズ (Gibco / Life Technologies)、メリーランド州ゲイタースバーグ)、ペニシリン 1 mL あたり 100 単位、およびストレプトマイシン 1 mL あたり 100 マイクログラム (ギブコ / ライフ テクノロジーズ (Gibco / Life Technologies)、メリーランド州ゲイタースバーグ) を補充された DME M 基礎培地 (ギブコ / ライフ テクノロジーズ (Gibco / Life Technologies)、メリーランド州ゲイタースバーグ) 中で慣例に培養した。細胞は、それらが 90 % コンフルエンスに達した場合にトリプシン処理および希釈により慣例に継代した。

20

30

N H D F 細胞 :

ヒト新生児皮膚線維芽細胞 (N H D F) はクローンティックス コーポレーション (Clonetics Corporation) (メリーランド州ウォークーズビル) から得た。N H D F は、供給元により推奨されたとおり補充された線維芽細胞成長培地 (クローンティックス コーポレーション (Clonetics Corporation)、メリーランド州ウォークーズビル) 中で慣例に維持した。細胞は、供給元により推奨されたとおり 10 継代までの間維持した。

H E K 細胞 :

ヒト胎児ケラチノサイト (H E K) はクローンティックス コーポレーション (Clonetics Corporation) (メリーランド州ウォークーズビル) から得た。H E K は、供給元により推奨されたとおり処方されたケラチノサイト成長培地 (クローンティックス コーポレーション (Clonetics Corporation)、メリーランド州ウォークーズビル) 中で慣例に維持した。細胞は、供給元により推奨されたとおり 10 継代までの間慣例に維持した。

40

H e p G 2 細胞 :

ヒト肝芽細胞腫細胞系 H e p G 2 はアメリカン タイプ カルチャー コレクション (American Type Culture Collection) (ATCC) (バージニア州マナサス) から得た。H e p G 2 細胞は、10 % ウシ胎児血清、非必須アミノ酸および 1 mM ピルビン酸ナトリウム (ギブコ / ライフ テクノロジーズ (Gibco / Life Technologies)、メリーランド州ゲイタースバーグ) を補充さ

50

れたイーグルMEM中で慣例に培養した。細胞は、それらが90%コンフルエンスに達した場合にトリプシン処理および希釈により慣例に継代した。細胞を、RT-PCR分析での使用のために7000細胞/ウェルの密度で96穴プレート(ファルコン・プライマリア(Falco n - P r i m a r i a) # 3 8 7 2) に接種した。

【0156】

ノーザンブロッティングもしくは他の分析のためには、細胞を100mmもしくは他の標準的組織培養プレート上に接種し、そして適切な容量の培地およびオリゴヌクレオチドを使用して同様に処理してもよい。

AML12細胞:

AML12(マウス肝12)細胞系は、ヒトTGFについてトランスジェニックのマウス(CD1血統、系統MT42)からの肝細胞から樹立した。細胞は、0.005mg/mlインスリン、0.005mg/mlトランスフェリン、5ng/mlセレンおよび40ng/mlデキサメサゾン、ならびに90%;10%ウシ胎児血清を含むダルベッコの改変イーグル培地およびハムF12培地の1:1混合物中で培養する。継代培養のためには、消費された培地を除去し、そして0.25%トリプシン、0.03%EDTA溶液の新鮮培地を添加する。新鮮トリプシン溶液(1ないし2ml)を添加し、そして、細胞がはがれるまで培養物を室温でそのまま放置する。

10

【0157】

細胞は、それらが90%コンフルエンスに達した場合にトリプシン処理および希釈により慣例に継代した。細胞を、RT-PCR分析での使用のために7000細胞/ウェルの密度で96穴プレート(ファルコン・プライマリア(Falco n - P r i m a r i a) # 3 8 7 2) に接種した。

20

【0158】

ノーザンブロッティングもしくは他の分析のためには、細胞を100mmもしくは他の標準的組織培養プレート上に接種し、そして適切な容量の培地およびオリゴヌクレオチドを使用して同様に処理してもよい。

初代マウス肝細胞:

初代マウス肝細胞は、チャールズ リバー ラブス(Charles River Labs)(マサチューセッツ州ウィルミントン)から購入されたCD-1マウスから調製し、そして、10%ウシ胎児血清(ギブコ/ライフ テクノロジーズ(Gibco/Life Technologies)、メリーランド州ゲイタースバーグ)、250nMデキサメサゾン(シグマ(Sigma))および10nMウシインスリン(シグマ(Sigma))を補充された肝細胞接着培地(Hepatocyte Attachment Media)(ギブコ(Gibco))中で慣例に培養した。細胞を、RT-PCR分析での使用のために10000細胞/ウェルの密度で96穴プレート(ファルコン・プライマリア(Falco n - P r i m a r i a) # 3 8 7 2) に接種した。

30

【0159】

ノーザンブロッティングもしくは他の分析のためには、細胞を、ラット尾コラーゲン(200μg/ml)(ベクトン ディッキンソン(Becton Dickinson))で被覆された100mmもしくは他の標準的組織培養プレート上に接種し、そして適切な容量の培地およびオリゴヌクレオチドを使用して同様に処理する。

40

アンチセンス化合物での処理:

細胞が80%コンフルエンスに達した場合にそれらをオリゴヌクレオチドで処理する。96穴プレート中で成長された細胞については、ウェルを200μLのOPTI-MEMTM-1血清使用量低減培地(ギブコ BRL(Gibco BRL))で1回洗浄し、そしてその後、3.75μg/mlのリポフェクチン[LIPOFECTIN]TM(ギブコ BRL(Gibco BRL))および所望の濃度のオリゴヌクレオチドを含有する130μLのOPTI-MEMTM-1で処理する。4~7時間の処理後に培地を新鮮培地と交換する。細胞はオリゴヌクレオチド処理16~24時間後に収集する。

【0160】

50

使用されるオリゴヌクレオチドの濃度は細胞系ごとに変動する。特定の細胞系について至適のオリゴヌクレオチド濃度を決定するためには、細胞をある範囲の濃度の陽性対照オリゴヌクレオチドで処理する。ヒト細胞について、陽性対照オリゴヌクレオチドは、ヒト H - r a s に標的を定められるホスホロチオエートバックボーンをもつ 2' - O - メトキシエチルギャップマー (2' - O - メトキシエチルが下線で示される)、I S I S 13920、T C C G T C A T C G C T C C T C A G G G、配列番号 1 である。マウスもしくはラット細胞について、陽性対照オリゴヌクレオチドは、マウスおよびラット双方の c - r a f に標的を定められるホスホロチオエートバックボーンをもつ 2' - O - メトキシエチルギャップマー (2' - O - メトキシエチルが太字で示される)、I S I S 15770、A T G C A T T C T G C C C C C A A G G A、配列番号 2 である。その後、c - H a - r a s (I S I S 13920 について) もしくは c - r a f (I S I S 15770 について) の m R N A の 80 % 阻害をもたらす陽性対照オリゴヌクレオチドの濃度を、その細胞系についてのその後の実験での新たなオリゴヌクレオチドのスクリーニング濃度として利用する。80 % 阻害が達成されない場合には、H - r a s もしくは c - r a f の m R N A の 60 % 阻害をもたらす陽性対照オリゴヌクレオチドの最低濃度を、その細胞系についてのその後の実験でのオリゴヌクレオチドスクリーニング濃度として利用する。60 % 阻害が達成されない場合は、その特定の細胞系は、オリゴヌクレオチドトランスフェクション実験に不適とみなす。

実施例 10

アポリボタンパク質 (a) 発現のオリゴヌクレオチド阻害の分析

アポリボタンパク質 (a) 発現のアンチセンス調節は当該技術分野で既知の多様な方法にてアッセイすることができる。例えば、アポリボタンパク質 (a) の m R N A レベルは、例えばノーザンブロット分析、競争的ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) もしくは実時間 P C R (R T - P C R) により定量することができる。実時間定量的 P C R が現在好ましい。RNA 分析は全細胞 RNA もしくはポリ (A) + m R N A で実施することができる。RNA の単離方法は、例えば Ausubel, F. M. ら、Current Protocols in Molecular Biology、第 1 巻、pp. 4.1.1 - 4.2.9 および 4.5.1 - 4.5.3、ジョン Wiley アンド サンズ インク (John Wiley & Sons, Inc.)、1993 に教示される。ノーザンブロット分析は当該技術分野で慣例であり、かつ、例えば Ausubel, F. M. ら、Current Protocols in Molecular Biology、第 1 巻、pp. 4.2.1 - 4.2.9、ジョン Wiley アンド サンズ インク (John Wiley & Sons, Inc.)、1996 に教示される。実時間定量的 (P C R) は、PE - アプライド バイオシステムズ (PE - Applied Biosystems)、カリフォルニア州フォスターシティから入手可能かつ製造元の説明書に従って使用される、商業的に入手可能な ABI プリズム [P R I S M] ^{T M} 7700 配列検出装置を使用して、便宜的に達成することができる。

【 0161 】

アポリボタンパク質 (a) のタンパク質レベルは、免疫沈降法、ウェスタンブロット分析 (イムノブロッティング)、E L I S A もしくは蛍光標示式細胞分取 (F A C S) のような当該技術分野で公知の多様な方法で定量することができる。アポリボタンパク質 (a) に向けられる抗体は、抗体の M S R S カタログ (エアリー コーポレーション (Aerie Corporation)、ミシガン州バーミングハム) のような多様な供給源から同定かつ得ることができるか、もしくは、慣習的抗体生成法を介して調製することができる。ポリクローナル抗血清の調製方法は、例えば Ausubel, F. M. ら、Current Protocols in Molecular Biology、第 2 巻、pp. 11.12.1 - 11.12.9、ジョン Wiley アンド サンズ インク (John Wiley & Sons, Inc.)、1997 に教示される。モノクローナル抗体の調製法は、例えば Ausubel, F. M. ら、Current Protocols in Molecular Biology、第 2 巻、pp. 11.4.1 -

11.11.5、ジョン ワイリー アンド サンズ インク (John Wiley & Sons, Inc.)、1997に教示される。

【0162】

免疫沈降法は当該技術分野で標準的であり、そして、例えば Ausubel, F. M. ら、Current Protocols in Molecular Biology、第2巻、pp. 10.16.1-10.16.11、ジョン ワイリー アンド サンズ インク (John Wiley & Sons, Inc.)、1998に見出すことができる。ウェスタンブロット (イムノブロット) 分析は当該技術分野で標準的であり、そして、例えば Ausubel, F. M. ら、Current Protocols in Molecular Biology、第2巻、pp. 10.8.1-10.8.21、ジョン ワイリー アンド サンズ インク (John Wiley & Sons, Inc.)、1997に見出すことができる。酵素免疫測定法 (ELISA) は当該技術分野で標準的であり、そして、例えば Ausubel, F. M. ら、Current Protocols in Molecular Biology、第2巻、pp. 11.2.1-11.2.22、ジョン ワイリー アンド サンズ インク (John Wiley & Sons, Inc.)、1991に見出すことができる。

実施例 11

ポリ (A) + mRNA の単離

ポリ (A) + mRNA は Miura ら、Clin. Chem.、1996、42、1758-1764 に従って単離することができる。他のポリ (A) + mRNA 単離方法は、例えば Ausubel, F. M. ら、Current Protocols in Molecular Biology、第1巻、pp. 4.5.1-4.5.3、ジョン ワイリー アンド サンズ インク (John Wiley & Sons, Inc.)、1993に教示される。簡潔には、96穴プレート上で成長される細胞については、成長培地を細胞から除去し、そして各ウェルを200 μ L の冷PBSで洗浄する。60 μ L の溶解緩衝液 (10 mM トリス-HCl、pH 7.6、1 mM EDTA、0.5 M NaCl、0.5% NP-40、20 mM バナジル-リボヌクレオシド錯体) を各ウェルに添加し、プレートを穏やかに攪拌し、そしてその後室温で5分間インキュベートする。55 μ L のライセートをオリゴd (T) 被覆96穴プレート (AGCT インク (AGCT Inc.)、カリフォルニア州アーヴァイン) に移す。プレートを室温で60分間インキュベートし、200 μ L の洗浄緩衝液 (10 mM トリス-HCl、pH 7.6、1 mM EDTA、0.3 M NaCl) で3回洗浄する。最後の洗浄後に、プレートをペーパータオル上で吸い取って過剰の洗浄緩衝液を除去し、そしてその後5分間風乾する。70 に予め加熱された60 μ L の溶出緩衝液 (5 mM トリス-HCl pH 7.6) を各ウェルに添加し、プレートを90 のホットプレート上で5分間インキュベートし、そしてその後、溶出物を新しい96穴プレートに移す。

【0163】

100 mm もしくは他の標準的プレート上で成長された細胞は、適切な容量の全部の溶液を使用して同様に処理してよい。

実施例 12

全RNAの単離

全RNAは、製造元の推奨される手順に従って、キアゲン インク (Qiagen Inc.) (カリフォルニア州バレンシア) から購入されるRNイーザー 96 [RNEASY 96]TM キットおよび緩衝液を使用して単離することができる。簡潔には、96穴プレート上で成長される細胞について、成長培地を細胞から除去し、そして各ウェルを200 μ L の冷PBSで洗浄する。100 μ L の緩衝液RLTを各ウェルに添加し、そしてプレートを20秒間活発に攪拌する。その後、100 μ L の70%エタノールを各ウェルに添加し、そしてピペットで3回出し入れすることにより内容物を混合する。その後、サンプルを、廃棄物収集トレイを備え付けられたキアバック [QIAVAC]TM マニホールドに接続されかつ真空源に接続されたRNイーザー 96 [RNEASY 96]^T

^M 穴プレートに移す。真空を15秒間適用する。1 mLの緩衝液RW1をRNイーザー 96 [RNEASY 96]^{T M} プレートの各ウェルに添加し、そして真空を再度15秒間適用した。その後、1 mLの緩衝液RPEをRNイーザー 96 [RNEASY 96]^{T M} プレートの各ウェルに添加し、そして真空を15秒の期間、適用する。その後、緩衝液RPE洗浄を反復し、そして真空を追加の10分間適用する。その後、プレートをキアバック [QIAVAC]^{T M} マニホールドから取り外し、そしてペーパータオル上で吸い取る。その後、プレートを、1.2 mLの収集管を含有する収集管ラックを備え付けられたキアバック [QIAVAC]^{T M} マニホールドに再接続する。その後、RNAを、各ウェルに60 µLの水をピペットで入れること、1分インキュベートすること、およびその後30秒間真空を適用することにより溶出する。溶出段階を、追加の60 µLの水で反復する。 10

【0164】

反復するピペット操作および溶出の段階を、キアゲン (QIAGEN) バイオ - ロボット (Bio - Robot) 9604 (キアゲン インク (Qiagen, Inc.)、カリフォルニア州バレンシア) を使用して自動化してもよい。本質的に、培養プレート上の細胞の溶解後に、プレートをロボットのデッキに移し、そこでピペット操作、DNアーゼ処理および溶出段階を実施する。

実施例 13

アポリボタンパク質 (a) の mRNA レベルの実時間定量的 PCR 分析

アポリボタンパク質 (a) の mRNA レベルの定量は、製造元の説明書に従って ABI プリズム [PRISM]^{T M} 7700 配列検出装置 (PE - アプライド バイオシステムズ (PE - Applied Biosystems)、カリフォルニア州フォスターシティ) を使用する実時間定量的 PCR により測定することができる。これは、実時間でのポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 生成物の高スループット定量を可能にする、閉鎖管のゲルに基づかない蛍光検出系である。PCR が完了した後に増幅生成物が定量される標準的 PCR と対照的に、実時間定量的 PCR での生成物は、それらが蓄積する際に定量される。これは、順および逆 PCR プライマー間で特異的にアニーリングしかつ2種の蛍光色素を含有するオリゴヌクレオチドプローブを PCR 反応に包含することにより達成される。レポーター色素 (例えば、JOE、FAM もしくは VIC、オペロン テクノロジーズ インク (Operon Technologies Inc.)、カリフォルニア州アルメダ もしくは PE - アプライド バイオシステムズ (PE - Applied Biosystems)、カリフォルニア州フォスターシティのいずれかから得られる) をプローブの 5' 端に結合し、そしてクエンチャー色素 (例えば TAMRA、オペロン テクノロジーズ インク (Operon Technologies Inc.)、カリフォルニア州アルメダ もしくは PE - アプライド バイオシステムズ (PE - Applied Biosystems)、カリフォルニア州フォスターシティのいずれかから得られる) をプローブの 3' 端に結合する。プローブおよび色素が無傷である場合、レポーター色素の発光は 3' のクエンチャー色素の近接により消光される。増幅の間、標的配列へのプローブのアニーリングが、Taq ポリメラーゼの 5' - エンドヌクレアーゼ活性により切断されることができ基質を創製する。PCR 増幅周期の伸長期の間に、Taq ポリメラーゼによるプローブの切断がプローブの残部から (およびこれゆえにクエンチャー部分から) レポーター色素を遊離し、そして配列特異的な蛍光シグナルを生成させる。各周期で、付加的なレポーター色素分子がそれらのそれぞれのプローブから切断され、そして、蛍光強度を、ABI プリズム [PRISM]^{T M} 7700 配列検出装置に作り付けられたレーザー光学系により一定の間隔でモニターする。各アッセイにおいて、未処理の対照サンプルからの mRNA の連続希釈物を含む一連の同時反応が標準曲線を生成させ、それを使用して、試験サンプルのアンチセンスオリゴヌクレオチド処理後の阻害パーセントを定量する。 40

【0165】

定量的 PCR 分析の前に、測定されている標的遺伝子に特異的なプライマー - プローブ 50

の組を、GAPDH増幅反応で「多重化(multiplexed)」されるそれらの能力について評価する。多重化において、標的遺伝子および内的標準遺伝子GAPDH双方が単一サンプル中で同時発生的に増幅される。この分析において、未処理の細胞から単離されたmRNAを連続的に希釈する。各希釈物を、GAPDHのみ、標的遺伝子のみ(「一重化(single-plexing)」)もしくは双方(多重化)に特異的なプライマー-プローブの組の存在下で増幅する。PCR増幅後に、希釈の関数としてのGAPDHおよび標的mRNAのシグナルの標準曲線を、一重化されたおよび多重化された双方のサンプルから生成させる。多重化されたサンプルから生成されるGAPDHおよび標的のシグナルの傾きおよび相関係数双方が、一重化されたサンプルから生成されるそれらの対応する値の10%以内にある場合は、その標的に特異的なプライマー-プローブの組を多重化可能(multiplexable)とみなす。他のPCR方法もまた当該技術分野で既知である。

10

【0166】

PCR試薬は、PE-アプライド バイオシステムズ(PE-Applied Biosystems)、カリフォルニア州フォスターシティから得る。RT-PCR反応は、25 μ Lの全RNA溶液を含有する96穴プレートに、25 μ LのPCRカクテル(1 \times タクマン[TaqMan]TM 緩衝液A、5.5 mM MgCl₂、300 μ MのdATP、dCTPおよびdGTPのそれぞれ、600 μ MのdUTP、100 nMの順プライマー、逆プライマーおよびプローブのそれぞれ、20単位のRNアーゼ阻害剤、1.25単位のアンプリタック ゴールド[AMPLITAQ GOLD]TM、ならびに12.5単位のMuLV逆転写酵素)を添加することにより実施する。RT反応は48で30分間のインキュベーションにより実施する。アンプリタック ゴールド[AMPLITAQ GOLD]TMを活性化するための95での10分のインキュベーション後に、40周期の2段階PCRプロトコルを実施する。すなわち、95 15秒間(変性)、次いで60 1.5分間(アニーリング/伸長)。

20

【0167】

実時間RT-PCRにより得られる遺伝子標的の量は、GAPDH(その発現が一定である遺伝子)の発現レベルを使用して、もしくはリボグリーン[Ribogreen]TM (モレキュラー プローブス インク(Molecular Probes, Inc.) オレゴン州ユージーン)を使用して全RNAを定量することによるかのいずれかで、正規化することができる。GAPDH発現は、実時間RT-PCRにより、標的と同時に、もしくは別個に多重化を実施することにより定量する。全RNAは、モレキュラー プローブス(Molecular Probes)(オレゴン州ユージーン)からのリボグリーン[Ribogreen]TM RNA定量試薬を使用して定量する。リボグリーン[Ribogreen]TM によるRNA定量方法は、Jones, L. J.ら、Analytical Biochemistry、1998、265、368-374に教示される。

30

【0168】

本アッセイにおいて、175 μ Lのリボグリーン[Ribogreen]TM 作業試薬(10 mM トリス-HCl、1 mM EDTA、pH 7.5で2865倍に希釈されたリボグリーン[Ribogreen]TM 試薬)を、25 μ Lの精製された細胞RNAを含有する96穴プレートにピペットで入れる。プレートを、480 nmでの励起および520 nmでの発光を用いてサイトフルオル(CytoFluor) 4000(PE アプライド バイオシステムズ(PE Applied Biosystems))で読み取る。

40

【0169】

ヒトアポリポタンパク質(a)に対するプローブおよびプライマーは、公表された配列情報(ジェンバンク(GenBank) 受託番号NM_005577、配列番号3として本明細書に組み込まれる)を使用して、ヒトアポリポタンパク質(a)配列にハイブリダイズするよう設計する。

50

【0170】

ヒトGAPDHについて、標準的PCRプライマーは：順プライマー：GAAGGTGAAGGTCGGAGTC（配列番号4）逆プライマー：GAAGATGGTGATGGGATTTTC（配列番号5）であり、そして、PCRプローブは：5'JOE-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC-TAMRA3'（配列番号6）であり、ここでJOE（PE-アプライド バイオシステムズ（PE-Applied Biosystems）、カリフォルニア州フォスターシティ）は蛍光レポーター色素であり、そしてTAMRA（PE-アプライド バイオシステムズ（PE-Applied Biosystems）、カリフォルニア州フォスターシティ）はクエンチャー色素である。

実施例14

アポリポタンパク質（a）のmRNAレベルのノーザンブロット分析

アンチセンス処理18時間後に、細胞単層を冷PBSで2回洗浄し、そして1mLのRNAゾール[RNAZOL]TM（テル-テスト「B」インク（TEL-TEST「B」Inc.）、テキサス州フレンズウッド）中で溶解する。全RNAは製造元の推奨されるプロトコルに従って調製する。20マイクログラムの全RNAを、MOPSS緩衝系（アムレスコ インク（AMRESCO, Inc.）オハイオ州ソロン）を使用する1.1%ホルムアルデヒドを含有する1.2%アガロースゲルを通る電気泳動により分画する。RNAを、ノーザン/サザン転写緩衝系（テル-テスト「B」インク（TEL-TEST「B」Inc.）、テキサス州フレンズウッド）を使用する一夜キャピラリー転写により、ゲルからハイボンド[HYBOND]TM-N+ナイロンメンブレン（アマーシャム ファルマシア バイオテック（Amersham Pharmacia Biotech）、ニュージャージー州ピスカタウェイ）に転写する。RNAの転写をUV可視化により確認する。メンブレンを、ストラタリンカー[STRATALINKER]TMUVクロスリンカー（Crosslinker）2400（ストラタジーン インク（Stratagene, Inc.）、カリフォルニア州ラホヤ）を使用してUV架橋することにより固定し、そしてその後、ストリンジェントな条件についての製造元の推奨を使用して、クイックハイブ[QUICKHYB]TMハイブリダイゼーション溶液（ストラタジーン（Stratagene）、カリフォルニア州ラホヤ）を使用してプロービングする。

【0171】

ヒトアポリポタンパク質（a）を検出するために、ヒトアポリポタンパク質（a）特異的プローブを、順および逆プライマーを使用するPCRにより調製する。負荷および転写効率における変動を正規化するために、メンブレンを細片に切り、そしてヒトグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素（GAPDH）RNA（クロンテック（Clontech）、カリフォルニア州パロアルト）についてプロービングする。

【0172】

ハイブリダイズされたメンブレンは、ホスホルイメジャー[PHOSPHORIMAGER]TMおよびIMAGEQUANTTMソフトウェアV3.3（モレキュラー ダイナミックス（Molecular Dynamics）、カリフォルニア州サニーベール）を使用して可視化かつ定量する。データを、未処理の対照中のGAPDHレベルに対し正規化する。

実施例15

ヒトアポリポタンパク質（a）に標的を定める、2'-MOEウイングおよびデオキシギャップを有するキメラホスホロチオエートオリゴヌクレオチド

本発明により、一連のオリゴヌクレオチドを、公表された配列（ジェンバンク（GenBank）受託番号NM_005577、配列番号3として本明細書に組み込まれる）を使用して、ヒトアポリポタンパク質（a）RNAの多様な領域に標的を定めるよう設計した。該オリゴヌクレオチドを表1に示す。「標的部位」はオリゴヌクレオチドが結合する特定の標的配列の最初の（最も5'の）ヌクレオチド番号を示す。表1中の全化合物は、双方の側（5'および3'の方向）で5ヌクレオチドの「ウイング」により隣接される10の2'-デオキシヌクレオチドよりなる中央「ギャップ」領域から構成される長さ20

10

20

30

40

50

ヌクレオチドのキメラオリゴヌクレオチド(「ギャップマー」)である。該ウイングは 2'-メトキシエチル(2'-MOE)ヌクレオチドから構成される。ヌクレオチド間(バックボーン)結合は該オリゴヌクレオチド全体でホスホロチオエート(P=S)である。全シチジン残基は 5-メチルシチジンである。

【0173】

【表1】

表1

ヒアポリボタンパク質(a)に標的を定める2'-MOEウイングおよびデオキシギャップを有するキメラホスホロチオエートオリゴヌクレオチド

ISIS#	領域	標的配列番号	標的部位	配列	配列番号
144367	コーディング	3	174	GGCAGGTCCTTCCTGTGACA	7
144368	コーディング	3	352	TCTGCGTCTGAGCATTGCGT	8
144369	コーディング	3	522	AAGCTTGGCAGGTTCTTCCT	9
144370	コーディング	3	1743	TCGGAGGCGCGACGGCAGTC	10
144371	コーディング	3	2768	CGGAGGCGCGACGGCAGTCC	11
144372	コーディング	3	2910	GGCAGGTTCTTCCTGTGACA	12
144373	コーディング	3	3371	ATAACAATAAGGAGCTGCCA	13
144374	コーディング	3	4972	GACCAAGCTTGGCAGGTTCT	14
144375	コーディング	3	5080	TAACAATAAGGAGCTGCCAC	15
144376	コーディング	3	5315	TGACCAAGCTTGGCAGGTTCT	16
144377	コーディング	3	5825	TTCTGCGTCTGAGCATTGCG	17
144378	コーディング	3	6447	AACAATAAGGAGCTGCCACA	18
144379	コーディング	3	7155	ACCTGACACCGGGATCCCTC	19
144380	コーディング	3	7185	CTGAGCATTGCGTCAGGTTG	20
144381	コーディング	3	8463	AGTAGTTCATGATCAAGCCA	21
144382	コーディング	3	8915	GACGGCAGTCCCTTCTGCGT	22
144383	コーディング	3	9066	GGCAGGTTCTTCCAGTGACA	23
144384	コーディング	3	10787	TGACCAAGCTTGGCAAGTTC	24
144385	コーディング	3	11238	TATAACACCAAGGACTAATC	25
144386	コーディング	3	11261	CCATCTGACATTGGGATCCA	26
144387	コーディング	3	11461	TGTGGTGTGCATAGAGGACCA	27
144388	コーディング	3	11823	ATGGGATCCTCCGATGCCAA	28
144389	コーディング	3	11894	ACACCAAGGGCGAATCTCAG	29
144390	コーディング	3	11957	TTCTGTCACTGGACATCGTG	30
144391	コーディング	3	12255	CACACGGATCGGTTGTGTAA	31
144392	コーディング	3	12461	ACATGTCCTTCCTGTGACAG	32
144393	コーディング	3	12699	CAGAAGGAGGCCCTAGGCTT	33
144394	コーディング	3	13354	CTGGCGGTGACCATGTAGTC	34
144395	3'UTR	3	13711	TCTAAGTAGGTTGATGCTTC	35
144396	3'UTR	3	13731	TCCTTACCCACGTTTCAGCT	36
144397	3'UTR	3	13780	GGAACAGTGTCTTCGTTTGA	37
144398	3'UTR	3	13801	GTTTGGCATAGCTGGTAGCT	38
144399	3'UTR	3	13841	ACCTTAAAAGCTTATACACA	39
144400	3'UTR	3	13861	ATACAGAAATTTGTGAGTCAG	40
144401	3'UTR	3	13881	GTCATAGCTATGACACCTTA	41

【0174】

実施例 16

アポリボタンパク質(a)のタンパク質レベルのウェスタンブロット分析

ウェスタンブロット分析(イムノブロット分析)は標準的方法を使用して実施する。細胞をオリゴヌクレオチド処理16~20時間後に収集し、PBSで1回洗浄し、レムリ(Laemmli)緩衝液(100μl/ウェル)に懸濁し、5分間沸騰させそして16% SDS-PAGEゲルに負荷する。ゲルを150Vで1.5時間泳動し、そしてウェスタンブロッティングのためメンブレンに転写する。一次抗体種に対し向けられた放射標識も

10

20

30

40

50

しくは蛍光で標識された二次抗体とともに、アポリポタンパク質 (a) に向けられた適切な一次抗体を使用する。バンドを、ホスホルイメジャー [P H O S P H R I M A G E R]^{T M} (モレキュラー ダイナミックス (M o l e c u l a r D y n a m i c s) 、カリフォルニア州サニーベール) を使用して可視化する。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

```

<110> Isis Pharmaceuticals, Inc.
      Rosanne M. Crooke
      Mark J. Graham

<120> ANTISENSE MODULATION OF APOLIPOPROTEIN(A) EXPRESSION 10

<130> ISPH-0690

<150> 09/923,515
<151> 2001-08-07

<160> 41

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide 20

<400> 1
tccgtcatcg ctctcaggg 20

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 2
atgcattctg cccccaagga 20

<210> 3
<211> 13938
<212> DNA
<213> Homo sapiens 30

<220>
<221> CDS
<222> {46}...{13692}

<400> 3
ctgggattgg gacacacttt ctggacactg ctggccagtc ccaaa atg gaa cat aag 57
                                     Met Glu His Lys
                                     1

gaa gtg gtt ctt cta ctt ctt tta ttt ctg aaa tca gca gca cct gag 105
Glu Val Val Leu Leu Leu Leu Phe Leu Lys Ser Ala Ala Pro Glu
5          10          15          20

```

caa agc cat gtg gtc cag gat tgc tac cat ggt gat gga cag agt tat	153
Gln Ser His Val Val Gln Asp Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser Tyr	
25 30 35	
cga ggc acg tac tcc acc act gtc aca gga agg acc tgc caa gct tgg	201
Arg Gly Thr Tyr Ser Thr Thr Val Thr Gly Arg Thr Cys Gln Ala Trp	
40 45 50	
tca tct atg aca cca cat caa cat aat agg acc aca gaa aac tac cca	249
Ser Ser Met Thr Pro His Gln His Asn Arg Thr Thr Glu Asn Tyr Pro	
55 60 65	
aat gct ggc ttg atc atg aac tac tgc agg aat cca gat gct gtg gca	297
Asn Ala Gly Leu Ile Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Val Ala	
70 75 80	
gct cct tat tgt tat acg agg gat ccc ggt gtc agg tgg gag tac tgc	345
Ala Pro Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Pro Gly Val Arg Trp Glu Tyr Cys	
85 90 95 100	
aac ctg acg caa tgc tca gac gca gaa ggg act gcc gtc gcg cct ccg	393
Asn Leu Thr Gln Cys Ser Asp Ala Glu Gly Thr Ala Val Ala Pro Pro	
105 110 115	
act gtt acc ccg gtt cca agc cta gag gct cct tcc gaa caa gca ccg	441
Thr Val Thr Pro Val Pro Ser Leu Glu Ala Pro Ser Glu Gln Ala Pro	
120 125 130	
act gag caa agg cct ggg gtg cag gag tgc tac cat ggt aat gga cag	489
Thr Glu Gln Arg Pro Gly Val Gln Glu Cys Tyr His Gly Asn Gly Gln	
135 140 145	
agt tat cga ggc aca tac tcc acc act gtc aca gga aga acc tgc caa	537
Ser Tyr Arg Gly Thr Tyr Ser Thr Thr Val Thr Gly Arg Thr Cys Gln	
150 155 160	
gct tgg tca tct atg aca cca cac tcg cat agt cgg acc cca gaa tac	585
Ala Trp Ser Ser Met Thr Pro His Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Tyr	
165 170 175 180	
tac cca aat gct ggc ttg atc atg aac tac tgc agg aat cca gat gct	633
Tyr Pro Asn Ala Gly Leu Ile Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala	
185 190 195	
gtg gca gct cct tat tgt tat acg agg gat ccc ggt gtc agg tgg gag	681
Val Ala Ala Pro Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Pro Gly Val Arg Trp Glu	
200 205 210	
tac tgc aac ctg acg caa tgc tca gac gca gaa ggg act gcc gtc gcg	729
Tyr Cys Asn Leu Thr Gln Cys Ser Asp Ala Glu Gly Thr Ala Val Ala	
215 220 225	
cct ccg act gtt acc ccg gtt cca agc cta gag gct cct tcc gaa caa	777
Pro Pro Thr Val Thr Pro Val Pro Ser Leu Glu Ala Pro Ser Glu Gln	
230 235 240	

10

20

30

gca ccg act gag caa agg cct ggg gtg cag gag tgc tac cat ggt aat	825
Ala Pro Thr Glu Gln Arg Pro Gly Val Gln Glu Cys Tyr His Gly Asn	
245 250 255 260	
gga cag agt tat cga ggc aca tac tcc acc act gtc aca gga aga acc	873
Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Tyr Ser Thr Thr Val Thr Gly Arg Thr	
265 270 275	
tgc caa gct tgg tca tct atg aca cca cac tcg cat agt cgg acc cca	921
Cys Gln Ala Trp Ser Ser Met Thr Pro His Ser His Ser Arg Thr Pro	
280 285 290	
gaa tac tac cca aat gct ggc ttg atc atg aac tac tgc agg aat cca	969
Glu Tyr Tyr Pro Asn Ala Gly Leu Ile Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro	
295 300 305	
gat gct gtg gca gct cct tat tgt tat acg agg gat ccc ggt gtc agg	1017
Asp Ala Val Ala Ala Pro Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Pro Gly Val Arg	
310 315 320	
tgg gag tac tgc aac ctg acg caa tgc tca gac gca gaa ggg act gcc	1065
Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Thr Gln Cys Ser Asp Ala Glu Gly Thr Ala	
325 330 335 340	
gtc gcg cct ccg act gtt acc ccg gtt cca agc cta gag gct cct tcc	1113
Val Ala Pro Pro Thr Val Thr Pro Val Pro Ser Leu Glu Ala Pro Ser	
345 350 355	
gaa caa gca ccg act gag caa agg cct ggg gtg cag gag tgc tac cat	1161
Glu Gln Ala Pro Thr Glu Gln Arg Pro Gly Val Gln Glu Cys Tyr His	
360 365 370	
ggt aat gga cag agt tat cga ggc aca tac tcc acc act gtc aca gga	1209
Gly Asn Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Tyr Ser Thr Thr Val Thr Gly	
375 380 385	
aga acc tgc caa gct tgg tca tct atg aca cca cac tcg cat agt cgg	1257
Arg Thr Cys Gln Ala Trp Ser Ser Met Thr Pro His Ser His Ser Arg	
390 395 400	
acc cca gaa tac tac cca aat gct ggc ttg atc atg aac tac tgc agg	1305
Thr Pro Glu Tyr Tyr Pro Asn Ala Gly Leu Ile Met Asn Tyr Cys Arg	
405 410 415 420	
aat cca gat gct gtg gca gct cct tat tgt tat acg agg gat ccc ggt	1353
Asn Pro Asp Ala Val Ala Ala Pro Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Pro Gly	
425 430 435	
gtc agg tgg gag tac tgc aac ctg acg caa tgc tca gac gca gaa ggg	1401
Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Thr Gln Cys Ser Asp Ala Glu Gly	
440 445 450	
act gcc gtc gcg cct ccg act gtt acc ccg gtt cca agc cta gag gct	1449
Thr Ala Val Ala Pro Pro Thr Val Thr Pro Val Pro Ser Leu Glu Ala	
455 460 465	
cct tcc gaa caa gca ccg act gag caa agg cct ggg gtg cag gag tgc	1497

10

20

30

Pro	Ser	Glu	Gln	Ala	Pro	Thr	Glu	Gln	Arg	Pro	Gly	Val	Gln	Glu	Cys		
470					475					480							
tac	cat	ggg	aat	gga	cag	agt	tat	cga	ggc	aca	tac	tcc	acc	act	gtc	1545	
Tyr	His	Gly	Asn	Gly	Gln	Ser	Tyr	Arg	Gly	Thr	Tyr	Ser	Thr	Thr	Val		
485					490				495						500		
aca	gga	aga	acc	tgc	caa	gct	tgg	tca	tct	atg	aca	cca	cac	tgc	cat	1593	
Thr	Gly	Arg	Thr	Cys	Gln	Ala	Trp	Ser	Ser	Met	Thr	Pro	His	Ser	His		
				505					510					515			
agt	cgg	acc	cca	gaa	tac	tac	cca	aat	gct	ggc	ttg	atc	atg	aac	tac	1641	
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Tyr	Tyr	Pro	Asn	Ala	Gly	Leu	Ile	Met	Asn	Tyr		
			520					525					530				
tgc	agg	aat	cca	gat	gct	gtg	gca	gct	cct	tat	tgt	tat	acg	agg	gat	1689	
Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Ala	Val	Ala	Ala	Pro	Tyr	Cys	Tyr	Thr	Arg	Asp		
			535				540						545				
ccc	ggg	gtc	agg	tgg	gag	tac	tgc	aac	ctg	acg	caa	tgc	tca	gac	gca	1737	
Pro	Gly	Val	Arg	Trp	Glu	Tyr	Cys	Asn	Leu	Thr	Gln	Cys	Ser	Asp	Ala		
			550				555										
gaa	ggg	act	gcc	gtc	gag	cct	cgg	act	gtt	acc	cgg	gtt	cca	agc	cta	1785	
Glu	Gly	Thr	Ala	Val	Ala	Pro	Pro	Thr	Val	Thr	Pro	Val	Pro	Ser	Leu		
			565			570			575						580		
gag	gct	cct	tcc	gaa	caa	gca	cgg	act	gag	caa	agg	cct	ggg	gtg	cag	1833	
Glu	Ala	Pro	Ser	Glu	Gln	Ala	Pro	Thr	Glu	Gln	Arg	Pro	Gly	Val	Gln		
				585					590						595		
gag	tgc	tac	cat	ggg	aat	gga	cag	agt	tat	cga	ggc	aca	tac	tcc	acc	1881	
Glu	Cys	Tyr	His	Gly	Asn	Gly	Gln	Ser	Tyr	Arg	Gly	Thr	Tyr	Ser	Thr		
			600					605							610		
act	gtc	aca	gga	aga	acc	tgc	caa	gct	tgg	tca	tct	atg	aca	cca	cac	1929	
Thr	Val	Thr	Gly	Arg	Thr	Cys	Gln	Ala	Trp	Ser	Ser	Met	Thr	Pro	His		
			615					620					625				
tgc	cat	agt	cgg	acc	cca	gaa	tac	tac	cca	aat	gct	ggc	ttg	atc	atg	1977	
Ser	His	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Tyr	Tyr	Pro	Asn	Ala	Gly	Leu	Ile	Met		
			630					635					640				
aac	tac	tgc	agg	aat	cca	gat	gct	gtg	gca	gct	cct	tat	tgt	tat	acg	2025	
Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Ala	Val	Ala	Ala	Pro	Tyr	Cys	Tyr	Thr		
			645					650							660		
agg	gat	ccc	ggg	gtc	agg	tgg	gag	tac	tgc	aac	ctg	acg	caa	tgc	tca	2073	
Arg	Asp	Pro	Gly	Val	Arg	Trp	Glu	Tyr	Cys	Asn	Leu	Thr	Gln	Cys	Ser		
				665					670						675		
gac	gca	gaa	ggg	act	gcc	gtc	gag	cct	cgg	act	gtt	acc	cgg	gtt	cca	2121	
Asp	Ala	Glu	Gly	Thr	Ala	Val	Ala	Pro	Pro	Thr	Val	Thr	Pro	Val	Pro		
			680					685							690		
agc	cta	gag	gct	cct	tcc	gaa	caa	gca	cgg	act	gag	caa	agg	cct	ggg	2169	
Ser	Leu	Glu	Ala	Pro	Ser	Glu	Gln	Ala	Pro	Thr	Glu	Gln	Arg	Pro	Gly		

10

20

30

695					700					705						
gtg	cag	gag	tgc	tac	cat	ggg	aat	gga	cag	agt	tat	cga	ggc	aca	tac	2217
Val	Gln	Glu	Cys	Tyr	His	Gly	Asn	Gly	Gln	Ser	Tyr	Arg	Gly	Thr	Tyr	
710						715					720					
tcc	acc	act	gtc	aca	gga	aga	acc	tgc	caa	gct	tgg	tca	tct	atg	aca	2265
Ser	Thr	Thr	Val	Thr	Gly	Arg	Thr	Cys	Gln	Ala	Trp	Ser	Ser	Met	Thr	
725					730					735					740	
cca	cac	tcg	cat	agt	cgg	acc	cca	gaa	tac	tac	cca	aat	gct	ggc	ttg	2313
Pro	His	Ser	His	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Tyr	Tyr	Pro	Asn	Ala	Gly	Leu	
				745						750				755		
atc	atg	aac	tac	tgc	agg	aat	cca	gat	gct	gtg	gca	gct	cct	tat	tgt	2361
Ile	Met	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Ala	Val	Ala	Ala	Pro	Tyr	Cys	
			760					765						770		
tat	acg	agg	gat	ccc	ggg	gtc	agg	tgg	gag	tac	tgc	aac	ctg	acg	caa	2409
Tyr	Thr	Arg	Asp	Pro	Gly	Val	Arg	Trp	Glu	Tyr	Cys	Asn	Leu	Thr	Gln	
			775				780						785			
tgc	tca	gac	gca	gaa	ggg	act	gcc	gtc	gcg	cct	ccg	act	gtt	acc	ccg	2457
Cys	Ser	Asp	Ala	Glu	Gly	Thr	Ala	Val	Ala	Pro	Pro	Thr	Val	Thr	Pro	
			790			795					800					
gtt	cca	agc	cta	gag	gct	cct	tcc	gaa	caa	gca	ccg	act	gag	caa	agg	2505
Val	Pro	Ser	Leu	Glu	Ala	Pro	Ser	Glu	Gln	Ala	Pro	Thr	Glu	Gln	Arg	
					810					815					820	
cct	ggg	gtg	cag	gag	tgc	tac	cat	ggg	aat	gga	cag	agt	tat	cga	ggc	2553
Pro	Gly	Val	Gln	Glu	Cys	Tyr	His	Gly	Asn	Gly	Gln	Ser	Tyr	Arg	Gly	
				825					830					835		
aca	tac	tcc	acc	act	gtc	aca	gga	aga	acc	tgc	caa	gct	tgg	tca	tct	2601
Thr	Tyr	Ser	Thr	Thr	Val	Thr	Gly	Arg	Thr	Cys	Gln	Ala	Trp	Ser	Ser	
				840				845					850			
atg	aca	cca	cac	tcg	cat	agt	cgg	acc	cca	gaa	tac	tac	cca	aat	gct	2649
Met	Thr	Pro	His	Ser	His	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Tyr	Tyr	Pro	Asn	Ala	
				855			860					865				
ggc	ttg	atc	atg	aac	tac	tgc	agg	aat	cca	gat	gct	gtg	gca	gct	cct	2697
Gly	Leu	Ile	Met	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Ala	Val	Ala	Ala	Pro	
					875						880					
tat	tgt	tat	acg	agg	gat	ccc	ggg	gtc	agg	tgg	gag	tac	tgc	aac	ctg	2745
Tyr	Cys	Tyr	Thr	Arg	Asp	Pro	Gly	Val	Arg	Trp	Glu	Tyr	Cys	Asn	Leu	
					890					895					900	
acg	caa	tgc	tca	gac	gca	gaa	ggg	act	gcc	gtc	gcg	cct	ccg	act	gtt	2793
Thr	Gln	Cys	Ser	Asp	Ala	Glu	Gly	Thr	Ala	Val	Ala	Pro	Pro	Thr	Val	
				905					910					915		
acc	ccg	gtt	cca	agc	cta	gag	gct	cct	tcc	gaa	caa	gca	ccg	act	gag	2841
Thr	Pro	Val	Pro	Ser	Leu	Glu	Ala	Pro	Ser	Glu	Gln	Ala	Pro	Thr	Glu	
			920					925						930		

10

20

30

caa agg cct ggg gtg cag gag tgc tac cat ggt aat gga cag agt tat	2889
Gln Arg Pro Gly Val Gln Glu Cys Tyr His Gly Asn Gly Gln Ser Tyr	
935 940 945	
cga ggc aca tac tcc acc act gtc aca gga aga acc tgc caa gct tgg	2937
Arg Gly Thr Tyr Ser Thr Thr Val Thr Gly Arg Thr Cys Gln Ala Trp	
950 955 960	
tca tct atg aca cca cac tgc cat agt cgg acc cca gaa tac tac cca	2985
Ser Ser Met Thr Pro His Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Tyr Tyr Pro	
965 970 975 980	
aat gct ggc ttg atc atg aac tac tgc agg aat cca gat gct gtg gca	3033
Asn Ala Gly Leu Ile Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Val Ala	
985 990 995	
gct cct tat tgt tat acg agg gat ccc ggt gtc agg tgg gag tac tgc	3081
Ala Pro Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Pro Gly Val Arg Trp Glu Tyr Cys	
1000 1005 1010	
aac ctg acg caa tgc tca gac gca gaa ggg act gcc gtc gcg cct ccg	3129
Asn Leu Thr Gln Cys Ser Asp Ala Glu Gly Thr Ala Val Ala Pro Pro	
1015 1020 1025	
act gtt acc ccg gtt cca agc cta gag gct cct tcc gaa caa gca ccg	3177
Thr Val Thr Pro Val Pro Ser Leu Glu Ala Pro Ser Glu Gln Ala Pro	
1030 1035 1040	
act gag caa agg cct ggg gtg cag gag tgc tac cat ggt aat gga cag	3225
Thr Glu Gln Arg Pro Gly Val Gln Glu Cys Tyr His Gly Asn Gly Gln	
1045 1050 1055 1060	
agt tat cga ggc aca tac tcc acc act gtc aca gga aga acc tgc caa	3273
Ser Tyr Arg Gly Thr Tyr Ser Thr Thr Val Thr Gly Arg Thr Cys Gln	
1065 1070 1075	
gct tgg tca tct atg aca cca cac tgc cat agt cgg acc cca gaa tac	3321
Ala Trp Ser Ser Met Thr Pro His Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Tyr	
1080 1085 1090	
tac cca aat gct ggc ttg atc atg aac tac tgc agg aat cca gat gct	3369
Tyr Pro Asn Ala Gly Leu Ile Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala	
1095 1100 1105	
gtg gca gct cct tat tgt tat acg agg gat ccc ggt gtc agg tgg gag	3417
Val Ala Ala Pro Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Pro Gly Val Arg Trp Glu	
1110 1115 1120	
tac tgc aac ctg acg caa tgc tca gac gca gaa ggg act gcc gtc gcg	3465
Tyr Cys Asn Leu Thr Gln Cys Ser Asp Ala Glu Gly Thr Ala Val Ala	
1125 1130 1135 1140	
cct ccg act gtt acc ccg gtt cca agc cta gag gct cct tcc gaa caa	3513
Pro Pro Thr Val Thr Pro Val Pro Ser Leu Glu Ala Pro Ser Glu Gln	
1145 1150 1155	

10

20

30

gca ccg act gag caa agg cct ggg gtg cag gag tgc tac cat ggt aat 3561
 Ala Pro Thr Glu Gln Arg Pro Gly Val Gln Glu Cys Tyr His Gly Asn
 1160 1165 1170

gga cag agt tat cga ggc aca tac tcc acc act gtc aca gga aga acc 3609
 Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Tyr Ser Thr Thr Val Thr Gly Arg Thr
 1175 1180 1185

tgc caa gct tgg tca tct atg aca cca cac tcg cat agt cgg acc cca 3657
 Cys Gln Ala Trp Ser Ser Met Thr Pro His Ser His Ser Arg Thr Pro
 1190 1195 1200

gaa tac tac cca aat gct ggc ttg atc atg aac tac tgc agg aat cca 3705
 Glu Tyr Tyr Pro Asn Ala Gly Leu Ile Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro
 1205 1210 1215 1220

gat gct gtg gca gct cct tat tgt tat acg agg gat ccc ggt gtc agg 3753
 Asp Ala Val Ala Ala Pro Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Pro Gly Val Arg
 1225 1230 1235

tgg gag tac tgc aac ctg acg caa tgc tca gac gca gaa ggg act gcc 3801
 Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Thr Gln Cys Ser Asp Ala Glu Gly Thr Ala
 1240 1245 1250

gtc gcg cct ccg act gtt acc ccg gtt cca agc cta gag gct cct tcc 3849
 Val Ala Pro Pro Thr Val Thr Pro Val Pro Ser Leu Glu Ala Pro Ser
 1255 1260 1265

gaa caa gca ccg act gag caa agg cct ggg gtg cag gag tgc tac cat 3897
 Glu Gln Ala Pro Thr Glu Gln Arg Pro Gly Val Gln Glu Cys Tyr His
 1270 1275 1280

ggt aat gga cag agt tat cga ggc aca tac tcc acc act gtc aca gga 3945
 Gly Asn Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Tyr Ser Thr Thr Val Thr Gly
 1285 1290 1295 1300

aga acc tgc caa gct tgg tca tct atg aca cca cac tcg cat agt cgg 3993
 Arg Thr Cys Gln Ala Trp Ser Ser Met Thr Pro His Ser His Ser Arg
 1305 1310 1315

acc cca gaa tac tac cca aat gct ggc ttg atc atg aac tac tgc agg 4041
 Thr Pro Glu Tyr Tyr Pro Asn Ala Gly Leu Ile Met Asn Tyr Cys Arg
 1320 1325 1330

aat cca gat gct gtg gca gct cct tat tgt tat acg agg gat ccc ggt 4089
 Asn Pro Asp Ala Val Ala Ala Pro Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Pro Gly
 1335 1340 1345

gtc agg tgg gag tac tgc aac ctg acg caa tgc tca gac gca gaa ggg 4137
 Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Thr Gln Cys Ser Asp Ala Glu Gly
 1350 1355 1360

act gcc gtc gcg cct ccg act gtt acc ccg gtt cca agc cta gag gct 4185
 Thr Ala Val Ala Pro Pro Thr Val Thr Pro Val Pro Ser Leu Glu Ala
 1365 1370 1375 1380

cct tcc gaa caa gca ccg act gag caa agg cct ggg gtg cag gag tgc 4233

10

20

30

Pro	Ser	Glu	Gln	Ala	Pro	Thr	Glu	Gln	Arg	Pro	Gly	Val	Gln	Glu	Cys	
				1385					1390					1395		
tac	cat	ggt	aat	gga	cag	agt	tat	cga	ggc	aca	tac	tcc	acc	act	gtc	4281
Tyr	His	Gly	Asn	Gly	Gln	Ser	Tyr	Arg	Gly	Thr	Tyr	Ser	Thr	Thr	Val	
			1400					1405					1410			
aca	gga	aga	acc	tgc	caa	gct	tgg	tca	tct	atg	aca	cca	cac	tgc	cat	4329
Thr	Gly	Arg	Thr	Cys	Gln	Ala	Trp	Ser	Ser	Met	Thr	Pro	His	Ser	His	
		1415					1420					1425				
agt	cgg	acc	cca	gaa	tac	tac	cca	aat	gct	ggc	ttg	atc	atg	aac	tac	4377
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Tyr	Tyr	Pro	Asn	Ala	Gly	Leu	Ile	Met	Asn	Tyr	
	1430					1435					1440					
tgc	agg	aat	cca	gat	gct	gtg	gca	gct	cct	tat	tgt	tat	acg	agg	gat	4425
Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Ala	Val	Ala	Ala	Pro	Tyr	Cys	Tyr	Thr	Arg	Asp	
1445				1450					1455						1460	
ccc	ggt	gtc	agg	tgg	gag	tac	tgc	aac	ctg	acg	caa	tgc	tca	gac	gca	4473
Pro	Gly	Val	Arg	Trp	Glu	Tyr	Cys	Asn	Leu	Thr	Gln	Cys	Ser	Asp	Ala	
			1465					1470						1475		
gaa	ggg	act	gcc	gtc	gcg	cct	ccg	act	gtt	acc	ccg	gtt	cca	agc	cta	4521
Glu	Gly	Thr	Ala	Val	Ala	Pro	Pro	Thr	Val	Thr	Pro	Val	Pro	Ser	Leu	
			1480				1485					1490				
gag	gct	cct	tcc	gaa	caa	gca	ccg	act	gag	caa	agg	cct	ggg	gtg	cag	4569
Glu	Ala	Pro	Ser	Glu	Gln	Ala	Pro	Thr	Glu	Gln	Arg	Pro	Gly	Val	Gln	
	1495					1500					1505					
gag	tgc	tac	cat	ggt	aat	gga	cag	agt	tat	cga	ggc	aca	tac	tcc	acc	4617
Glu	Cys	Tyr	His	Gly	Asn	Gly	Gln	Ser	Tyr	Arg	Gly	Thr	Tyr	Ser	Thr	
	1510				1515				1520							
act	gtc	aca	gga	aga	acc	tgc	caa	gct	tgg	tca	tct	atg	aca	cca	cac	4665
Thr	Val	Thr	Gly	Arg	Thr	Cys	Gln	Ala	Trp	Ser	Ser	Met	Thr	Pro	His	
	1525				1530				1535					1540		
tgc	cat	agt	cgg	acc	cca	gaa	tac	tac	cca	aat	gct	ggc	ttg	atc	atg	4713
Ser	His	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Tyr	Tyr	Pro	Asn	Ala	Gly	Leu	Ile	Met	
			1545						1550					1555		
aac	tac	tgc	agg	aat	cca	gat	gct	gtg	gca	gct	cct	tat	tgt	tat	acg	4761
Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Ala	Val	Ala	Ala	Pro	Tyr	Cys	Tyr	Thr	
			1560				1565					1570				
agg	gat	ccc	ggt	gtc	agg	tgg	gag	tac	tgc	aac	ctg	acg	caa	tgc	tca	4809
Arg	Asp	Pro	Gly	Val	Arg	Trp	Glu	Tyr	Cys	Asn	Leu	Thr	Gln	Cys	Ser	
	1575					1580					1585					
gac	gca	gaa	ggg	act	gcc	gtc	gcg	cct	ccg	act	gtt	acc	ccg	gtt	cca	4857
Asp	Ala	Glu	Gly	Thr	Ala	Val	Ala	Pro	Pro	Thr	Val	Thr	Pro	Val	Pro	
	1590					1595					1600					
agc	cta	gag	gct	cct	tcc	gaa	caa	gca	ccg	act	gag	caa	agg	cct	ggg	4905
Ser	Leu	Glu	Ala	Pro	Ser	Glu	Gln	Ala	Pro	Thr	Glu	Gln	Arg	Pro	Gly	

10

20

30

1605	1610	1615	1620	
gtg cag gag tgc tac cat ggt aat gga cag agt tat cga ggc aca tac				4953
Val Gln Glu Cys Tyr His Gly Asn Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Tyr	1625	1630	1635	
tcc acc act gtc aca gga aga acc tgc caa gct tgg tca tct atg aca				5001
Ser Thr Thr Val Thr Gly Arg Thr Cys Gln Ala Trp Ser Ser Met Thr	1640	1645	1650	
cca cac tcg cat agt cgg acc cca gaa tac tac cca aat gct ggc ttg				5049
Pro His Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Tyr Tyr Pro Asn Ala Gly Leu	1655	1660	1665	
atc atg aac tac tgc agg aat cca gat gct gtg gca gct cct tat tgt				5097
Ile Met Asn Tyr Cys Arg Thr Asp Ala Val Ala Pro Tyr Cys	1670	1675	1680	
tat acg agg gat ccc ggt gtc agg tgg gag tac tgc aac ctg acg caa				5145
Tyr Thr Arg Asp Pro Gly Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Thr Gln	1685	1690	1695	1700
tgc tca gac gca gaa ggg act gcc gtc gcg cct ccg act gtt acc ccg				5193
Cys Ser Asp Ala Glu Gly Thr Ala Val Ala Pro Pro Thr Val Thr Pro	1705	1710	1715	
gtt cca agc cta gag gct cct tcc gaa caa gca ccg act gag caa agg				5241
Val Pro Ser Leu Glu Ala Pro Ser Glu Gln Ala Pro Thr Glu Gln Arg	1720	1725	1730	
cct ggg gtg cag gag tgc tac cat ggt aat gga cag agt tat cga ggc				5289
Pro Gly Val Gln Glu Cys Tyr His Gly Asn Gly Gln Ser Tyr Arg Gly	1735	1740	1745	
aca tac tcc acc act gtc aca gga aga acc tgc caa gct tgg tca tct				5337
Thr Tyr Ser Thr Thr Val Thr Gly Arg Thr Cys Gln Ala Trp Ser Ser	1750	1755	1760	
atg aca cca cac tcg cat agt cgg acc cca gaa tac tac cca aat gct				5385
Met Thr Pro His Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Tyr Tyr Pro Asn Ala	1765	1770	1775	1780
ggc ttg atc atg aac tac tgc agg aat cca gat gct gtg gca gct cct				5433
Gly Leu Ile Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Val Ala Ala Pro	1785	1790	1795	
tat tgt tat acg agg gat ccc ggt gtc agg tgg gag tac tgc aac ctg				5481
Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Pro Gly Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu	1800	1805	1810	
acg caa tgc tca gac gca gaa ggg act gcc gtc gcg cct ccg act gtt				5529
Thr Gln Cys Ser Asp Ala Glu Gly Thr Ala Val Ala Pro Pro Thr Val	1815	1820	1825	
acc ccg gtt cca agc cta gag gct cct tcc gaa caa gca ccg act gag				5577
Thr Pro Val Pro Ser Leu Glu Ala Pro Ser Glu Gln Ala Pro Thr Glu	1830	1835	1840	

10

20

30

caa agg cct ggg gtg cag gag tgc tac cat ggt aat gga cag agt tat	5625
Gln Arg Pro Gly Val Gln Glu Cys Tyr His Gly Asn Gly Gln Ser Tyr	
1845 1850 1855 1860	
cga ggc aca tac tcc acc act gtc aca gga aga acc tgc caa gct tgg	5673
Arg Gly Thr Tyr Ser Thr Thr Val Thr Gly Arg Thr Cys Gln Ala Trp	
1865 1870 1875	
tca tct atg aca cca cac tcg cat agt cgg acc cca gaa tac tac cca	5721
Ser Ser Met Thr Pro His Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Tyr Tyr Pro	
1880 1885 1890	
aat gct ggc ttg atc atg aac tac tgc agg aat cca gat gct gtg gca	5769
Asn Ala Gly Leu Ile Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Val Ala	
1895 1900 1905	
gct cct tat tgt tat acg agg gat ccc ggt gtc agg tgg gag tac tgc	5817
Ala Pro Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Pro Gly Val Arg Trp Glu Tyr Cys	
1910 1915 1920	
aac ctg acg caa tgc tca gac gca gaa ggg act gcc gtc gcg cct ccg	5865
Asn Leu Thr Gln Cys Ser Asp Ala Glu Gly Thr Ala Val Ala Pro Pro	
1925 1930 1935 1940	
act gtt acc ccg gtt cca agc cta gag gct cct tcc gaa caa gca ccg	5913
Thr Val Thr Pro Val Pro Ser Leu Glu Ala Pro Ser Glu Gln Ala Pro	
1945 1950 1955	
act gag caa agg cct ggg gtg cag gag tgc tac cat ggt aat gga cag	5961
Thr Glu Gln Arg Pro Gly Val Gln Glu Cys Tyr His Gly Asn Gly Gln	
1960 1965 1970	
agt tat cga ggc aca tac tcc acc act gtc aca gga aga acc tgc caa	6009
Ser Tyr Arg Gly Thr Tyr Ser Thr Thr Val Thr Gly Arg Thr Cys Gln	
1975 1980 1985	
gct tgg tca tct atg aca cca cac tcg cat agt cgg acc cca gaa tac	6057
Ala Trp Ser Ser Met Thr Pro His Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Tyr	
1990 1995 2000	
tac cca aat gct ggc ttg atc atg aac tac tgc agg aat cca gat gct	6105
Tyr Pro Asn Ala Gly Leu Ile Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala	
2005 2010 2015 2020	
gtg gca gct cct tat tgt tat acg agg gat ccc ggt gtc agg tgg gag	6153
Val Ala Ala Pro Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Pro Gly Val Arg Trp Glu	
2025 2030 2035	
tac tgc aac ctg acg caa tgc tca gac gca gaa ggg act gcc gtc gcg	6201
Tyr Cys Asn Leu Thr Gln Cys Ser Asp Ala Glu Gly Thr Ala Val Ala	
2040 2045 2050	
cct ccg act gtt acc ccg gtt cca agc cta gag gct cct tcc gaa caa	6249
Pro Pro Thr Val Thr Pro Val Pro Ser Leu Glu Ala Pro Ser Glu Gln	
2055 2060 2065	

10

20

30

gca ccg act gag caa agg cct ggg gtg cag gag tgc tac cat ggt aat 6297
 Ala Pro Thr Glu Gln Arg Pro Gly Val Gln Glu Cys Tyr His Gly Asn
 2070 2075 2080

gga cag agt tat cga ggc aca tac tcc acc act gtc aca gga aga acc 6345
 Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Tyr Ser Thr Thr Val Thr Gly Arg Thr
 2085 2090 2095 2100

tgc caa gct tgg tca tct atg aca cca cac tcg cat agt cgg acc cca 6393
 Cys Gln Ala Trp Ser Ser Met Thr Pro His Ser His Ser Arg Thr Pro
 2105 2110 2115

gaa tac tac cca aat gct ggc ttg atc atg aac tac tgc agg aat cca 6441
 Glu Tyr Tyr Pro Asn Ala Gly Leu Ile Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro
 2120 2125 2130

gat gct gtg gca gct cct tat tgt tat acg agg gat ccc ggt gtc agg 6489
 Asp Ala Val Ala Ala Pro Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Pro Gly Val Arg
 2135 2140 2145

tgg gag tac tgc aac ctg acg caa tgc tca gac gca gaa ggg act gcc 6537
 Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Thr Gln Cys Ser Asp Ala Glu Gly Thr Ala
 2150 2155 2160

gtc gcg cct ccg act gtt acc ccg gtt cca agc cta gag gct cct tcc 6585
 Val Ala Pro Pro Thr Val Thr Pro Val Pro Ser Leu Glu Ala Pro Ser
 2165 2170 2175 2180

gaa caa gca ccg act gag caa agg cct ggg gtg cag gag tgc tac cat 6633
 Glu Gln Ala Pro Thr Glu Gln Arg Pro Gly Val Gln Glu Cys Tyr His
 2185 2190 2195

ggt aat gga cag agt tat cga ggc aca tac tcc acc act gtc aca gga 6681
 Gly Asn Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Tyr Ser Thr Thr Val Thr Gly
 2200 2205 2210

aga acc tgc caa gct tgg tca tct atg aca cca cac tcg cat agt cgg 6729
 Arg Thr Cys Gln Ala Trp Ser Ser Met Thr Pro His Ser His Ser Arg
 2215 2220 2225

acc cca gaa tac tac cca aat gct ggc ttg atc atg aac tac tgc agg 6777
 Thr Pro Glu Tyr Tyr Pro Asn Ala Gly Leu Ile Met Asn Tyr Cys Arg
 2230 2235 2240

aat cca gat gct gtg gca gct cct tat tgt tat acg agg gat ccc ggt 6825
 Asn Pro Asp Ala Val Ala Ala Pro Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Pro Gly
 2245 2250 2255 2260

gtc agg tgg gag tac tgc aac ctg acg caa tgc tca gac gca gaa ggg 6873
 Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Thr Gln Cys Ser Asp Ala Glu Gly
 2265 2270 2275

act gcc gtc gcg cct ccg act gtt acc ccg gtt cca agc cta gag gct 6921
 Thr Ala Val Ala Pro Pro Thr Val Thr Pro Val Pro Ser Leu Glu Ala
 2280 2285 2290

cct tcc gaa caa gca ccg act gag caa agg cct ggg gtg cag gag tgc 6969

10

20

30

Pro Ser Glu Gln Ala Pro Thr Glu Gln Arg Pro Gly Val Gln Glu Cys	
2295 2300 2305	
tac cat ggt aat gga cag agt tat cga ggc aca tac tcc acc act gtc	7017
Tyr His Gly Asn Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Tyr Ser Thr Thr Val	
2310 2315 2320	
aca gga aga acc tgc caa gct tgg tca tct atg aca cca cac tcg cat	7065
Thr Gly Arg Thr Cys Gln Ala Trp Ser Ser Met Thr Pro His Ser His	
2325 2330 2335 2340	
agt cgg acc cca gaa tac tac cca aat gct ggc ttg atc atg aac tac	7113
Ser Arg Thr Pro Glu Tyr Tyr Pro Asn Ala Gly Leu Ile Met Asn Tyr	
2345 2350 2355	
tgc agg aat cca gat gct gtg gca gct cct tat tgt tat acg agg gat	7161
Cys Arg Asn Pro Asp Ala Val Ala Ala Pro Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp	
2360 2365 2370	
ccc ggt gtc agg tgg gag tac tgc aac ctg acg caa tgc tca gac gca	7209
Pro Gly Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Thr Gln Cys Ser Asp Ala	
2375 2380 2385	
gaa ggg act gcc gtc gcg cct ccg act gtt acc ccg gtt cca agc cta	7257
Glu Gly Thr Ala Val Ala Pro Pro Thr Val Thr Pro Val Pro Ser Leu	
2390 2395 2400	
gag gct cct tcc gaa caa gca ccg act gag caa agg cct ggg gtg cag	7305
Glu Ala Pro Ser Glu Gln Ala Pro Thr Glu Gln Arg Pro Gly Val Gln	
2405 2410 2415 2420	
gag tgc tac cat ggt aat gga cag agt tat cga ggc aca tac tcc acc	7353
Glu Cys Tyr His Gly Asn Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Tyr Ser Thr	
2425 2430 2435	
act gtc aca gga aga acc tgc caa gct tgg tca tct atg aca cca cac	7401
Thr Val Thr Gly Arg Thr Cys Gln Ala Trp Ser Ser Met Thr Pro His	
2440 2445 2450	
tcg cat agt cgg acc cca gaa tac tac cca aat gct ggc ttg atc atg	7449
Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Tyr Tyr Pro Asn Ala Gly Leu Ile Met	
2455 2460 2465	
aac tac tgc agg aat cca gat gct gtg gca gct cct tat tgt tat acg	7497
Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Val Ala Ala Pro Tyr Cys Tyr Thr	
2470 2475 2480	
agg gat ccc ggt gtc agg tgg gag tac tgc aac ctg acg caa tgc tca	7545
Arg Asp Pro Gly Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Thr Gln Cys Ser	
2485 2490 2495 2500	
gac gca gaa ggg act gcc gtc gcg cct ccg act gtt acc ccg gtt cca	7593
Asp Ala Glu Gly Thr Ala Val Ala Pro Pro Thr Val Thr Pro Val Pro	
2505 2510 2515	
agc cta gag gct cct tcc gaa caa gca ccg act gag caa agg cct ggg	7641
Ser Leu Glu Ala Pro Ser Glu Gln Ala Pro Thr Glu Gln Arg Pro Gly	

10

20

30

2520	2525	2530		
gtg cag gag tgc tac cat ggt aat gga cag agt tat cga ggc aca tac			7689	
Val Gln Glu Cys Tyr His Gly Asn Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Tyr				
2535	2540	2545		
tcc acc act gtc aca gga aga acc tgc caa gct tgg tca tct atg aca			7737	
Ser Thr Thr Val Thr Gly Arg Thr Cys Gln Ala Trp Ser Ser Met Thr				
2550	2555	2560		
cca cac tcg cat agt cgg acc cca gaa tac tac cca aat gct ggc ttg			7785	
Pro His Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Tyr Tyr Pro Asn Ala Gly Leu				
2565	2570	2575	2580	
atc atg aac tac tgc agg aat cca gat gct gtg gca gct cct tat tgt			7833	10
Ile Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Val Ala Ala Pro Tyr Cys				
2585	2590	2595		
tat acg agg gat ccc ggt gtc agg tgg gag tac tgc aac ctg acg caa			7881	
Tyr Thr Arg Asp Pro Gly Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Thr Gln				
2600	2605	2610		
tgc tca gac gca gaa ggg act gcc gtc gcg cct ccg act gtt acc ccg			7929	
Cys Ser Asp Ala Glu Gly Thr Ala Val Ala Pro Pro Thr Val Thr Pro				
2615	2620	2625		
gtt cca agc cta gag gct cct tcc gaa caa gca ccg act gag cag agg			7977	
Val Pro Ser Leu Glu Ala Pro Ser Glu Gln Ala Pro Thr Glu Gln Arg				
2630	2635	2640		
cct ggg gtg cag gag tgc tac cac ggt aat gga cag agt tat cga ggc			8025	20
Pro Gly Val Gln Glu Cys Tyr His Gly Asn Gly Gln Ser Tyr Arg Gly				
2645	2650	2655	2660	
aca tac tcc acc act gtc act gga aga acc tgc caa gct tgg tca tct			8073	
Thr Tyr Ser Thr Thr Val Thr Gly Arg Thr Cys Gln Ala Trp Ser Ser				
2665	2670	2675		
atg aca cca cac tcg cat agt cgg acc cca gaa tac tac cca aat gct			8121	
Met Thr Pro His Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Tyr Tyr Pro Asn Ala				
2680	2685	2690		
ggc ttg atc atg aac tac tgc agg aat cca gat gct gtg gca gct cct			8169	
Gly Leu Ile Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Val Ala Ala Pro				
2695	2700	2705		
tat tgt tat acg agg gat ccc ggt gtc agg tgg gag tac tgc aac ctg			8217	30
Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Pro Gly Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu				
2710	2715	2720		
acg caa tgc tca gac gca gaa ggg act gcc gtc gcg cct ccg act gtt			8265	
Thr Gln Cys Ser Asp Ala Glu Gly Thr Ala Val Ala Pro Pro Thr Val				
2725	2730	2735	2740	
acc ccg gtt cca agc cta gag gct cct tcc gaa caa gca ccg act gag			8313	
Thr Pro Val Pro Ser Leu Glu Ala Pro Ser Glu Gln Ala Pro Thr Glu				
2745	2750	2755		

caa agg cct ggg gtg cag gag tgc tac cat ggt aat gga cag agt tat	8361
Gln Arg Pro Gly Val Gln Glu Cys Tyr His Gly Asn Gly Gln Ser Tyr	
2760 2765 2770	
cga ggc aca tac tcc acc act gtc aca gga aga acc tgc caa gct tgg	8409
Arg Gly Thr Tyr Ser Thr Thr Val Thr Gly Arg Thr Cys Gln Ala Trp	
2775 2780 2785	
tca tct atg aca cca cac tcg cat agt cgg acc cca gaa tac tac cca	8457
Ser Ser Met Thr Pro His Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Tyr Tyr Pro	
2790 2795 2800	
aat gct ggc ttg atc atg aac tac tgc agg aat cca gat gct gtg gca	8505
Asn Ala Gly Leu Ile Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Val Ala	
2805 2810 2815 2820	
gct cct tat tgt tat acg agg gat ccc ggt gtc agg tgg gag tac tgc	8553
Ala Pro Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Pro Gly Val Arg Trp Glu Tyr Cys	
2825 2830 2835	
aac ctg acg caa tgc tca gac gca gaa ggg act gcc gtc gcg cct ccg	8601
Asn Leu Thr Gln Cys Ser Asp Ala Glu Gly Thr Ala Val Ala Pro Pro	
2840 2845 2850	
act gtt acc ccg gtt cca agc cta gag gct cct tcc gaa caa gca ccg	8649
Thr Val Thr Pro Val Pro Ser Leu Glu Ala Pro Ser Glu Gln Ala Pro	
2855 2860 2865	
act gag caa agg cct ggg gtg cag gag tgc tac cat ggt aat gga cag	8697
Thr Glu Gln Arg Pro Gly Val Gln Glu Cys Tyr His Gly Asn Gly Gln	
2870 2875 2880	
agt tat cga ggc aca tac tcc acc act gtc aca gga aga acc tgc caa	8745
Ser Tyr Arg Gly Thr Tyr Ser Thr Thr Val Thr Gly Arg Thr Cys Gln	
2885 2890 2895 2900	
gct tgg tca tct atg aca cca cac tcg cat agt cgg acc cca gaa tac	8793
Ala Trp Ser Ser Met Thr Pro His Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Tyr	
2905 2910 2915	
tac cca aat gct ggc ttg atc atg aac tac tgc agg aat cca gat gct	8841
Tyr Pro Asn Ala Gly Leu Ile Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala	
2920 2925 2930	
gtg gca gct cct tat tgt tat acg agg gat ccc ggt gtc agg tgg gag	8889
Val Ala Ala Pro Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Pro Gly Val Arg Trp Glu	
2935 2940 2945	
tac tgc aac ctg acg caa tgc tca gac gca gaa ggg act gcc gtc gcg	8937
Tyr Cys Asn Leu Thr Gln Cys Ser Asp Ala Glu Gly Thr Ala Val Ala	
2950 2955 2960	
cct ccg act gtt acc ccg gtt cca agc cta gag gct cct tcc gaa caa	8985
Pro Pro Thr Val Thr Pro Val Pro Ser Leu Glu Ala Pro Ser Glu Gln	
2965 2970 2975 2980	

10

20

30

gca ccg act gag cag agg cct ggg gtg cag gag tgc tac cac ggt aat 9033
Ala Pro Thr Glu Gln Arg Pro Gly Val Gln Glu Cys Tyr His Gly Asn
2985 2990 2995

gga cag agt tat cga ggc aca tac tcc acc act gtc act gga aga acc 9081
Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Tyr Ser Thr Thr Val Thr Gly Arg Thr
3000 3005 3010

tgc caa gct tgg tca tct atg aca cca cac tcg cat agt cgg acc cca 9129
Cys Gln Ala Trp Ser Ser Met Thr Pro His Ser His Ser Arg Thr Pro
3015 3020 3025

gaa tac tac cca aat gct ggc ttg atc atg aac tac tgc agg aat cca 9177
Glu Tyr Tyr Pro Asn Ala Gly Leu Ile Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro
3030 3035 3040

gat gct gtg gca gct cct tat tgt tat acg agg gat ccc ggt gtc agg 9225
Asp Ala Val Ala Ala Pro Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Pro Gly Val Arg
3045 3050 3055 3060

tgg gag tac tgc aac ctg acg caa tgc tca gac gca gaa ggg act gcc 9273
Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Thr Gln Cys Ser Asp Ala Glu Gly Thr Ala
3065 3070 3075

gtc gcg cct ccg act gtt acc ccg gtt cca agc cta gag gct cct tcc 9321
Val Ala Pro Thr Thr Val Thr Pro Val Pro Ser Leu Glu Ala Pro Ser
3080 3085 3090

gaa caa gca ccg act gag cag agg cct ggg gtg cag gag tgc tac cac 9369
Glu Gln Ala Pro Thr Glu Gln Arg Pro Gly Val Gln Glu Cys Tyr His
3095 3100 3105

ggt aat gga cag agt tat cga ggc aca tac tcc acc act gtc act gga 9417
Gly Asn Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Tyr Ser Thr Thr Val Thr Gly
3110 3115 3120

aga acc tgc caa gct tgg tca tct atg aca cca cac tcg cat agt cgg 9465
Arg Thr Cys Gln Ala Trp Ser Ser Met Thr Pro His Ser His Ser Arg
3125 3130 3135 3140

acc cca gaa tac tac cca aat gct ggc ttg atc atg aac tac tgc agg 9513
Thr Pro Glu Tyr Tyr Pro Asn Ala Gly Leu Ile Met Asn Tyr Cys Arg
3145 3150 3155

aat cca gat gct gtg gca gct cct tat tgt tat acg agg gat ccc ggt 9561
Asn Pro Asp Ala Val Ala Ala Pro Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Pro Gly
3160 3165 3170

gtc agg tgg gag tac tgc aac ctg acg caa tgc tca gac gca gaa ggg 9609
Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Thr Gln Cys Ser Asp Ala Glu Gly
3175 3180 3185

act gcc gtc gcg cct ccg act gtt acc ccg gtt cca agc cta gag gct 9657
Thr Ala Val Ala Pro Pro Thr Val Thr Pro Val Pro Ser Leu Glu Ala
3190 3195 3200

cct tcc gaa caa gca ccg act gag cag agg cct ggg gtg cag gag tgc 9705

10

20

30

Pro Ser Glu Gln Ala	Pro Thr Glu Gln Arg	Pro Gly Val Gln Glu Cys	
3205	3210	3215	3220
tac cac ggt aat gga cag agt tat cga ggc aca tac tcc acc act gtc			9753
Tyr His Gly Asn Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Tyr Ser Thr Thr Val			
	3225	3230	3235
act gga aga acc tgc caa gct tgg tca tct atg aca cca cac tcg cat			9801
Thr Gly Arg Thr Cys Gln Ala Trp Ser Ser Met Thr Pro His Ser His			
	3240	3245	3250
agt cgg acc cca gaa tac tac cca aat gct ggc ttg atc atg aac tac			9849
Ser Arg Thr Pro Glu Tyr Tyr Pro Asn Ala Gly Leu Ile Met Asn Tyr			
	3255	3260	3265
tgc agg aat cca gat gct gtg gca gct cct tat tgt tat acg agg gat			9897
Cys Arg Asn Pro Asp Ala Val Ala Ala Pro Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp			
	3270	3275	3280
ccc ggt gtc agg tgg gag tac tgc aac ctg acg caa tgc tca gac gca			9945
Pro Gly Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Thr Gln Cys Ser Asp Ala			
	3285	3290	3300
gaa ggg act gcc gtc gcg cct ccg act gtt acc ccg gtt cca agc cta			9993
Glu Gly Thr Ala Val Ala Pro Pro Thr Val Thr Pro Val Pro Ser Leu			
	3305	3310	3315
gag gct cct tcc gaa caa gca ccg act gag cag agg cct ggg gtg cag			10041
Glu Ala Pro Ser Glu Gln Ala Pro Thr Glu Gln Arg Pro Gly Val Gln			
	3320	3325	3330
gag tgc tac cac ggt aat gga cag agt tat cga ggc aca tac tcc acc			10089
Glu Cys Tyr His Gly Asn Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Tyr Ser Thr			
	3335	3340	3345
act gtc act gga aga acc tgc caa gct tgg tca tct atg aca cca cac			10137
Thr Val Thr Gly Arg Thr Cys Gln Ala Trp Ser Ser Met Thr Pro His			
	3350	3355	3360
tcg cat agt cgg acc cca gaa tac tac cca aat gct ggc ttg atc atg			10185
Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Tyr Tyr Pro Asn Ala Gly Leu Ile Met			
	3365	3370	3375
aac tac tgc agg aat cca gat cct gtg gca gcc cct tat tgt tat acg			10233
Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Pro Val Ala Ala Pro Tyr Cys Tyr Thr			
	3385	3390	3395
agg gat ccc agt gtc agg tgg gag tac tgc aac ctg aca caa tgc tca			10281
Arg Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Thr Gln Cys Ser			
	3400	3405	3410
gac gca gaa ggg act gcc gtc gcg cct cca act att acc ccg att cca			10329
Asp Ala Glu Gly Thr Ala Val Ala Pro Pro Thr Ile Thr Pro Ile Pro			
	3415	3420	3425
agc cta gag gct cct tct gaa caa gca cca act gag caa agg cct ggg			10377
Ser Leu Glu Ala Pro Ser Glu Gln Ala Pro Thr Glu Gln Arg Pro Gly			

10

20

30

3430	3435	3440	
gtg cag gag tgc tac cac gga aat gga cag agt tat caa ggc aca tac			10425
Val Gln Glu Cys Tyr His Gly Asn Gly Gln Ser Tyr Gln Gly Thr Tyr			
3445	3450	3455	3460
ttc att act gtc aca gga aga acc tgc caa gct tgg tca tct atg aca			10473
Phe Ile Thr Val Thr Gly Arg Thr Cys Gln Ala Trp Ser Ser Met Thr			
3465	3470		3475
cca cac tgc cat agt cgg acc cca gca tac tac cca aat gct ggc ttg			10521
Pro His Ser His Ser Arg Thr Pro Ala Tyr Tyr Pro Asn Ala Gly Leu			
3480	3485		3490
atc aag aac tac tgc cga aat cca gat cct gtg gca gcc cct tgg tgt			10569
Ile Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Pro Val Ala Ala Pro Trp Cys			
3495	3500		3505
tat aca aca gat ccc agt gtc agg tgg gag tac tgc aac ctg aca cga			10617
Tyr Thr Thr Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Thr Arg			
3510	3515		3520
tgc tca gat gca gaa tgg act gcc ttc gtc cct ccg aat gtt att ctg			10665
Cys Ser Asp Ala Glu Trp Thr Ala Phe Val Pro Pro Asn Val Ile Leu			
3525	3530		3535
gct cca agc cta gag gct ttt ttt gaa caa gca ctg act gag gaa acc			10713
Ala Pro Ser Leu Glu Ala Phe Phe Glu Gln Ala Leu Thr Glu Glu Thr			
3545	3550		3555
ccc ggg gta cag gac tgc tac tac cat tat gga cag agt tac cga ggc			10761
Pro Gly Val Gln Asp Cys Tyr Tyr His Tyr Gly Gln Ser Tyr Arg Gly			
3560	3565		3570
aca tac tcc acc act gtc aca gga aga act tgc caa gct tgg tca tct			10809
Thr Tyr Ser Thr Thr Val Thr Gly Arg Thr Cys Gln Ala Trp Ser Ser			
3575	3580		3585
atg aca cca cac cag cat agt cgg acc cca gaa aac tac cca aat gct			10857
Met Thr Pro His Gln His Ser Arg Thr Pro Glu Asn Tyr Pro Asn Ala			
3590	3595		3600
ggc ctg acc agg aac tac tgc agg aat cca gat gct gag att cgc cct			10905
Gly Leu Thr Arg Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Glu Ile Arg Pro			
3605	3610		3615
tgg tgt tac acc atg gat ccc agt gtc agg tgg gag tac tgc aac ctg			10953
Trp Cys Tyr Thr Met Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu			
3625	3630		3635
aca caa tgc ctg gtg aca gaa tca agt gtc ctt gca act ctc acg gtg			11001
Thr Gln Cys Leu Val Thr Glu Ser Ser Val Leu Ala Thr Leu Thr Val			
3640	3645		3650
gtc cca gat cca agc aca gag gct tct tct gaa gaa gca cca acg gag			11049
Val Pro Asp Pro Ser Thr Glu Ala Ser Ser Glu Glu Ala Pro Thr Glu			
3655	3660		3665

10

20

30

caa agc ccc ggg gtc cag gat tgc tac cat ggt gat gga cag agt tat	11097
Gln Ser Pro Gly Val Gln Asp Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser Tyr	
3670 3675 3680	
cga ggc tca ttc tct acc act gtc aca gga agg aca tgt cag tct tgg	11145
Arg Gly Ser Phe Ser Thr Thr Val Thr Gly Arg Thr Cys Gln Ser Trp	
3685 3690 3695 3700	
tcc tct atg aca cca cac tgg cat cag agg aca aca gaa tat tat cca	11193
Ser Ser Met Thr Pro His Trp His Gln Arg Thr Thr Glu Tyr Tyr Pro	
3705 3710 3715	
aat ggt ggc ctg acc agg aac tac tgc agg aat cca gat gct gag att	11241
Asn Gly Gly Leu Thr Arg Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Glu Ile	
3720 3725 3730	
agt cct tgg tgt tat acc atg gat ccc aat gtc aga tgg gag tac tgc	11289
Ser Pro Trp Cys Tyr Thr Met Asp Pro Asn Val Arg Trp Glu Tyr Cys	
3735 3740 3745	
aac ctg aca caa tgt cca gtg aca gaa tca agt gtc ctt gcg acg tcc	11337
Asn Leu Thr Gln Cys Pro Val Thr Glu Ser Ser Val Leu Ala Thr Ser	
3750 3755 3760	
acg gct gtt tct gaa caa gca cca acg gag caa agc ccc aca gtc cag	11385
Thr Ala Val Ser Glu Gln Ala Pro Thr Glu Gln Ser Pro Thr Val Gln	
3765 3770 3775 3780	
gac tgc tac cat ggt gat gga cag agt tat cga ggc tca ttc tcc acc	11433
Asp Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Ser Phe Ser Thr	
3785 3790 3795	
act gtt aca gga agg aca tgt cag tct tgg tcc tct atg aca cca cac	11481
Thr Val Thr Gly Arg Thr Cys Gln Ser Trp Ser Ser Met Thr Pro His	
3800 3805 3810	
tgg cat cag aga acc aca gaa tac tac cca aat ggt ggc ctg acc agg	11529
Trp His Gln Arg Thr Thr Glu Tyr Tyr Pro Asn Gly Gly Leu Thr Arg	
3815 3820 3825	
aac tac tgc agg aat cca gat gct gag att cgc cct tgg tgt tat acc	11577
Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Glu Ile Arg Pro Trp Cys Tyr Thr	
3830 3835 3840	
atg gat ccc agt gtc aga tgg gag tac tgc aac ctg acg caa tgt cca	11625
Met Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Thr Gln Cys Pro	
3845 3850 3855 3860	
gtg atg gaa tca act ctc ctc aca act ccc acg gtg gtc cca gtt cca	11673
Val Met Glu Ser Thr Leu Leu Thr Thr Pro Thr Val Val Pro Val Pro	
3865 3870 3875	
agc aca gag ctt cct tct gaa gaa gca cca act gaa aac agc act ggg	11721
Ser Thr Glu Leu Pro Ser Glu Glu Ala Pro Thr Glu Asn Ser Thr Gly	
3880 3885 3890	

10

20

30

gtc cag gac tgc tac cga ggt gat gga cag agt tat cga ggc aca ctc Val Gln Asp Cys Tyr Arg Gly Asp Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Leu 3895 3900 3905	11769
tcc acc act atc aca gga aga aca tgt cag tct tgg tgc tct atg aca Ser Thr Thr Ile Thr Gly Arg Thr Cys Gln Ser Trp Ser Ser Met Thr 3910 3915 3920	11817
cca cat tgg cat cgg agg atc cca tta tac tat cca aat gct ggc ctg Pro His Trp His Arg Arg Ile Pro Leu Tyr Tyr Pro Asn Ala Gly Leu 3925 3930 3935 3940	11865
acc agg aac tac tgc agg aat cca gat gct gag att cgc cct tgg tgt Thr Arg Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Glu Ile Arg Pro Trp Cys 3945 3950 3955	11913
tac acc atg gat ccc agt gtc agg tgg gag tac tgc aac ctg aca cga Tyr Thr Met Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Thr Arg 3960 3965 3970	11961
tgt cca gtg aca gaa tgc agt gtc ctc aca act ccc aca gtg gcc ccg Cys Pro Val Thr Glu Ser Ser Val Leu Thr Thr Pro Thr Val Ala Pro 3975 3980 3985	12009
gtt cca agc aca gag gct cct tct gaa caa gca cca cct gag aaa agc Val Pro Ser Thr Glu Ala Pro Ser Glu Gln Ala Pro Pro Glu Lys Ser 3990 3995 4000	12057
cct gtg gtc cag gat tgc tac cat ggt gat gga cgg agt tat cga ggc Pro Val Val Gln Asp Cys Tyr His Gly Asp Gly Arg Ser Tyr Arg Gly 4005 4010 4015 4020	12105
ata tcc tcc acc act gtc aca gga agg acc tgt caa tct tgg tca tct Ile Ser Ser Thr Thr Val Thr Gly Arg Thr Cys Gln Ser Trp Ser Ser 4025 4030 4035	12153
atg ata cca cac tgg cat cag agg acc cca gaa aac tac cca aat gct Met Ile Pro His Trp His Gln Arg Thr Pro Glu Asn Tyr Pro Asn Ala 4040 4045 4050	12201
ggc ctg acc gag aac tac tgc agg aat cca gat tct ggg aaa caa ccc Gly Leu Thr Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ser Gly Lys Gln Pro 4055 4060 4065	12249
tgg tgt tac aca acc gat ccg tgt gtg agg tgg gag tac tgc aat ctg Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Cys Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu 4070 4075 4080	12297
aca caa tgc tca gaa aca gaa tca ggt gtc cta gag act ccc act gtt Thr Gln Cys Ser Glu Thr Glu Ser Gly Val Leu Glu Thr Pro Thr Val 4085 4090 4095 4100	12345
gtt cca gtt cca agc atg gag gct cat tct gaa gca gca cca act gag Val Pro Val Pro Ser Met Glu Ala His Ser Glu Ala Ala Pro Thr Glu 4105 4110 4115	12393
caa acc cct gtg gtc cgg cag tgc tac cat ggt aat ggc cag agt tat	12441

10

20

30

Gln Thr Pro Val Val Arg Gln Cys Tyr His Gly Asn Gly Gln Ser Tyr	
4120 4125 4130	
cga ggc aca ttc tcc acc act gtc aca gga agg aca tgt caa tct tgg	12489
Arg Gly Thr Phe Ser Thr Thr Val Thr Gly Arg Thr Cys Gln Ser Trp	
4135 4140 4145	
tca tcc atg aca cca cac cgg cat cag agg acc cca gaa aac tac cca	12537
Ser Ser Met Thr Pro His Arg His Gln Arg Thr Pro Glu Asn Tyr Pro	
4150 4155 4160	
aat gat ggc ctg aca atg aac tac tgc agg aat cca gat gcc gat aca	12585
Asn Asp Gly Leu Thr Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp Thr	
4165 4170 4175 4180	
ggc cct tgg tgt ttt acc atg gac ccc agc atc agg tgg gag tac tgc	12633
Gly Pro Trp Cys Phe Thr Met Asp Pro Ser Ile Arg Trp Glu Tyr Cys	
4185 4190 4195	
aac ctg acg cga tgc tca gac aca gaa ggg act gtg gtc gct cct ccg	12681
Asn Leu Thr Arg Cys Ser Asp Thr Glu Gly Thr Val Val Ala Pro Pro	
4200 4205 4210	
act gtc atc cag gtt cca agc cta ggg cct cct tct gaa caa gac tgt	12729
Thr Val Ile Gln Val Pro Ser Leu Gly Pro Pro Ser Glu Gln Asp Cys	
4215 4220 4225	
atg ttt ggg aat ggg aaa gga tac cgg ggc aag aag gca acc act gtt	12777
Met Phe Gly Asn Gly Lys Gly Tyr Arg Gly Lys Lys Ala Thr Thr Val	
4230 4235 4240	
act ggg acg cca tgc cag gaa tgg gct gcc cag gag ccc cat aga cac	12825
Thr Gly Thr Pro Cys Gln Glu Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg His	
4245 4250 4255 4260	
agc acg ttc att cca ggg aca aat aaa tgg gca ggt ctg gaa aaa aat	12873
Ser Thr Phe Ile Pro Gly Thr Asn Lys Trp Ala Gly Leu Glu Lys Asn	
4265 4270 4275	
tac tgc cgt aac cct gat ggt gac atc aat ggt ccc tgg tgc tac aca	12921
Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Ile Asn Gly Pro Trp Cys Tyr Thr	
4280 4285 4290	
atg aat cca aga aaa ctt ttt gac tac tgt gat atc cct ctc tgt gca	12969
Met Asn Pro Arg Lys Leu Phe Asp Tyr Cys Asp Ile Pro Leu Cys Ala	
4295 4300 4305	
tcc tct tca ttt gat tgt ggg aag cct caa gtg gag ccg aag aaa tgt	13017
Ser Ser Ser Phe Asp Cys Gly Lys Pro Gln Val Glu Pro Lys Lys Cys	
4310 4315 4320	
cct gga agc att gta ggg ggg tgt gtg gcc cac cca cat tcc tgg ccc	13065
Pro Gly Ser Ile Val Gly Gly Cys Val Ala His Pro His Ser Trp Pro	
4325 4330 4335 4340	
tgg caa gtc agt ctc aga aca agg ttt gga aag cac ttc tgt gga ggc	13113
Trp Gln Val Ser Leu Arg Thr Arg Phe Gly Lys His Phe Cys Gly Gly	

10

20

30

4345	4350	4355	
acc tta ata tcc cca gag tgg gtg ctg act gct gct cac tgc ttg aag			13161
Thr Leu Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Lys			
4360	4365	4370	
aag tcc tca agg cct tca tcc tac aag gtc atc ctg ggt gca cac caa			13209
Lys Ser Ser Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val Ile Leu Gly Ala His Gln			
4375	4380	4385	
gaa gtg aac ctc gaa tct cat gtt cag gaa ata gaa gtg tct agg ctg			13257
Glu Val Asn Leu Glu Ser His Val Gln Glu Ile Glu Val Ser Arg Leu			
4390	4395	4400	
ttc ttg gag ccc aca caa gca gat att gcc ttg cta aag cta agc agg			13305
Phe Leu Glu Pro Thr Gln Ala Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Ser Arg			
4405	4410	4415	4420
cct gcc gtc atc act gac aaa gta atg cca gct tgt ctg cca tcc cca			13353
Pro Ala Val Ile Thr Asp Lys Val Met Pro Ala Cys Leu Pro Ser Pro			
4425	4430	4435	
gac tac atg gtc acc gcc agg act gaa tgt tac atc act gcc tgg gga			13401
Asp Tyr Met Val Thr Ala Arg Thr Glu Cys Tyr Ile Thr Gly Trp Gly			
4440	4445	4450	
gaa acc caa ggt acc ttt ggg act gcc ctt ctc aag gaa gcc cag ctc			13449
Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Thr Gly Leu Leu Lys Glu Ala Gln Leu			
4455	4460	4465	
ctt gtt att gag aat gaa gtg tgc aat cac tat aag tat att tgt gct			13497
Leu Val Ile Glu Asn Glu Val Cys Asn His Tyr Lys Tyr Ile Cys Ala			
4470	4475	4480	
gag cat ttg gcc aga gcc act gac agt tgc cag ggt gac agt gga ggg			13545
Glu His Leu Ala Arg Gly Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly			
4485	4490	4495	4500
cct ctg gtt tgc ttc gag aag gac aaa tac att tta caa gga gtc act			13593
Pro Leu Val Cys Phe Glu Lys Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr			
4505	4510	4515	
tct tgg ggt ctt gcc tgt gca cgc ccc aat aag cct ggt gtc tat gct			13641
Ser Trp Gly Leu Gly Cys Ala Arg Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Ala			
4520	4525	4530	
cgt gtt tca agg ttt gtt act tgg att gag gga atg atg aga aat aat			13689
Arg Val Ser Arg Phe Val Thr Trp Ile Glu Gly Met Met Arg Asn Asn			
4535	4540	4545	
taa ttggacggga gacagagtga agcatcaacc tacttagaag ctgaaacgtg			13742
ggtaaggatt tagcatgctg gaaataatag acagcaatca aacgaagaca ctgttcccag			13802
ctaccagcta tgccaaacct tggcattttt ggtatttttg tgtataagct ttttaaggct			13862
gactgacaaa ttctgtatta aggtgtcata gctatgacat ttgttaaaaa taaactctgc			13922
acttattttg atttga			13938

10

20

30

<210> 4
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR Primer

<400> 4
 gaaggtgaag gtcggagtc 19

<210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

10

<220>
 <223> PCR Primer

<400> 5
 gaagatggtg atgggatttc 20

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR Probe

<400> 6
 caagcttccc gttctcagcc 20

20

<210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Antisense Oligonucleotide

<400> 7
 ggcaggtcct tcctgtgaca 20

<210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

30

<220>
 <223> Antisense Oligonucleotide

<400> 8
 tctgcgtctg agcattgcgt 20

<210> 9
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Antisense Oligonucleotide

<400> 9
 aagcttggca ggttcttcct 20

<210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Antisense Oligonucleotide 10

<400> 10
 tcggaggcgc gacggcagtc 20

<210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Antisense Oligonucleotide

<400> 11
 cggaggcgcg acggcagtc 20

<210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 20

<220>
 <223> Antisense Oligonucleotide

<400> 12
 ggcaggttct tcctgtgaca 20

<210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Antisense Oligonucleotide 30

<400> 13
 ataacaataa ggagctgcca 20

<210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>		
<223> Antisense Oligonucleotide		
<400> 14		
gaccaagctt ggcaggttct	20	
<210> 15		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Antisense Oligonucleotide		
<400> 15		
taacaataag gagctgccac	20	10
<210> 16		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Antisense Oligonucleotide		
<400> 16		
tgaccaagct tggcaggttc	20	
<210> 17		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
		20
<220>		
<223> Antisense Oligonucleotide		
<400> 17		
ttctgcgtct gagcattgcg	20	
<210> 18		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Antisense Oligonucleotide		
<400> 18		
aacaataagg agctgccaca	20	30
<210> 19		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Antisense Oligonucleotide		

<400> 19 acctgacacc gggatccctc	20	
<210> 20 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> Antisense Oligonucleotide		
<400> 20 ctgagcattg cgtcagggtg	20	
<210> 21 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence		10
<220> <223> Antisense Oligonucleotide		
<400> 21 agtagttcat gatcaagcca	20	
<210> 22 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> Antisense Oligonucleotide		20
<400> 22 gacggcagtc ccttctgctg	20	
<210> 23 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> Antisense Oligonucleotide		
<400> 23 ggcaggttct tccagtgaca	20	
<210> 24 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence		30
<220> <223> Antisense Oligonucleotide		
<400> 24 tgaccaagct tggcaagttc	20	

<210> 25
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 25
tataacacca aggactaatc 20

<210> 26
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence 10

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 26
ccatctgaca ttgggatcca 20

<210> 27
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 27
tgtggtgtca tagaggacca 20 20

<210> 28
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 28
atgggatcct ccgatgccaa 20

<210> 29
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence 30

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 29
acaccaaggg cgaatctcag 20

<210> 30
<211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Antisense Oligonucleotide

<400> 30
 ttctgtcact ggacatcgtg 20

<210> 31
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Antisense Oligonucleotide 10

<400> 31
 cacacggatc ggttgtgtaa 20

<210> 32
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Antisense Oligonucleotide

<400> 32
 acatgtcctt cctgtgacag 20

<210> 33 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Antisense Oligonucleotide

<400> 33
 cagaaggagg cctaggctt 20

<210> 34
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Antisense Oligonucleotide 30

<400> 34
 ctggcgggtga ccatgtagtc 20

<210> 35
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>		
<223> Antisense Oligonucleotide		
<400> 35		
tctaagtagg ttgatgcttc	20	
<210> 36		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Antisense Oligonucleotide		
<400> 36		
tccttaccga cgtttcagct	20	10
<210> 37		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Antisense Oligonucleotide		
<400> 37		
ggaacagtgt cttcgtttga	20	
<210> 38		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Antisense Oligonucleotide		
<400> 38		
gtttggcata gctggtagct	20	
<210> 39		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Antisense Oligonucleotide		
<400> 39		
accttaaaag cttatacaca	20	30
<210> 40		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Antisense Oligonucleotide		

<400> 40
atacagaatt tgtcagtcag

20

<210> 41
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 41
gtcatagcta tgacaccta

20

1

10

1

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/24920

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) : C12Q 1/68; A01N 43/04; C07H 21/04, A61K 31/07

US CL : 435/6, 325, 91.1, 375; 536/24.5, 23.1, 24.3, 24.1; 514/44

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 435/6, 325, 91.1, 375; 536/24.5, 23.1, 24.3, 24.1; 514/44

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Biosis, Medline, CaPlus, Embase, Cancerlit

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KOSTNER et al. Lipoprotein (a): Still an enigma? Current Opinion in Lipidology. 2002, Vol. 13, pages 391-396.	15-20
A	JEN ET AL. Suppression of Gene Expression by Targeted Disruption of Messenger RNA: Available Options and Current Strategies. Stem Cells, 2000 Vol. 18, pages 307-317.	15-20
A	BRANCH, A. A Good Antisense Molecule is Hard to Find. TIBS. February 1998, Vol. 23, pages 45-50.	15-20
Y	McLEAN et al. cDNA sequence of human apolipoprotein (a) is homologous to plasminogen. Nature. 1987, Vol. 330, pages 132-137.	1-15
Y	WEINTRAUB, H.M. Antisense RNA and DNA. Scientific American. January 1990, pages 40-46, see entire article.	1-15
Y	MILLIGAN et al. Current Concepts in Antisense Drug Design. Medicinal Chemistry. 1993, Vol. 36, pages 1923-1937.	1-15
Y	US 5,801,154 A (BARACCHINI et al) 01 September 1998, see column 7 lines 6 and 22 and column 8 line 12; column 6 lines 12-17 and (column 4 lines 26-30).	1-15
Y	FRITZ et al. Cationic Polystyrene Nanoparticles: Preparation and Characterization of a Model Drug Carrier System for Antisense Oligonucleotides. Journal of Colloid and Interface Science. 1997, Vol. 195, pages 272-288.	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

03 February 2003 (03.02.2003)

Date of mailing of the international search report

16 JUL 2003

Name and mailing address of the ISA/US

Commissioner of Patents and Trademarks
Box PCT
Washington, D.C. 20231

Facsimile No. (703)305-3230

Authorized officer

Terra C. Gibbs

Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/24920

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FRANK et al. Adenovirus-mediated apo(a) antisense RNA expression efficiently inhibits apo(a) synthesis in vitro and in vivo. Gene Therapy. 2001, Vol. 8, pages 425-430.	1-15
X	MORISHITA et al. Novel Therapeutic Strategy for Atherosclerosis: Ribozyme Oligonucleotides against apo(a) selectively inhibit apo(a) but not plasminogen gene expression. Circulation. 1998, vol. 98, pages 1898-1904.	1-15
X	WO 96/009392 A1 (RIBOZYME PHARMACEUTICALS, INC.) 28 March 1996.	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/24920

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: Claims 1-20, SEQ ID NOS 7, 8, 19 and 36
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
☐
☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/24920

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claims 1-20, SEQ ID NO: 7

Group II, claims 1-20, SEQ ID NO: 8

Group III, claims 1-20, SEQ ID NO: 9

Group IV, claims 1-20, SEQ ID NO: 10

Group V, claims 1-20, SEQ ID NO: 11

Group VI, claims 1-20, SEQ ID NO: 12

Group VII, claims 1-20, SEQ ID NO: 13

Group VIII, claims 1-20, SEQ ID NO: 14

Group IX, claims 1-20, SEQ ID NO: 15

Group X, claims 1-20, SEQ ID NO: 16

Group XI, claims 1-20, SEQ ID NO: 17

Group XII, claims 1-20, SEQ ID NO: 18

Group XIII, claims 1-20, SEQ ID NO: 19

Group XIV, claims 1-20, SEQ ID NO: 20

Group XV, claims 1-20, SEQ ID NO: 21

Group XVI, claims 1-20, SEQ ID NO: 22

Group XVII, claims 1-20, SEQ ID NO: 23

Group XVIII, claims 1-20, SEQ ID NO: 24

Group XIX, claims 1-20, SEQ ID NO: 25

Group XX, claims 1-20, SEQ ID NO: 26

Group XXI, claims 1-20, SEQ ID NO: 27

Group XXII, claims 1-20, SEQ ID NO: 28

Group XXIII, claims 1-20, SEQ ID NO: 29

Group XXIV, claims 1-20, SEQ ID NO: 30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/24920

Group XXV, claims 1-20, SEQ ID NO: 31

Group XXVI, claims 1-20, SEQ ID NO: 32

Group XXVII, claims 1-20, SEQ ID NO: 33

Group XXVIII, claims 1-20, SEQ ID NO: 34

Group XXIX, claims 1-20, SEQ ID NO: 35

Group XXX, claims 1-20, SEQ ID NO: 36

Group XXXI, claims 1-20, SEQ ID NO: 37

Group XXXII, claims 1-20, SEQ ID NO: 38

Group XXXIII, claims 1-20, SEQ ID NO: 39

Group XXXIV, claims 1-20, SEQ ID NO: 40

Group XXXV, claims 1-20, SEQ ID NO: 41

As outlined above, this international searching authority has found 35 inventions claimed in the International Application covered by the claims indicated: Claims 1-20 which specifically claim sequences listed as SEQ ID NOs 7-41, which are intended to modulate the function and/or expression of human apolipoprotein a.

This international searching authority considers that the international application does not comply with the requirements of unity of invention (Rules 13.1, 13.2 and 13.3) for the reasons indicated below:

The inventions listed as Groups 1-XXXV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

According to the guidelines in Section (f)(i)(a) of Annex B of the PCT Administrative Instructions, the special technical feature as defined by PCT Rule 13.2 shall be considered to be met when all the alternatives of a Markush-group are of similar nature. For chemical alternatives, such as the claimed antisense sequences, the Markush group shall be regarded as being of similar nature when

(A) all alternatives have a common property or activity and

(B)(1) a common structure is present, i.e., a significant structure is shared by all of the alternatives or

(B)(2) in cases where the common structure cannot be the unifying criteria, all alternatives belong to an art recognized class of compounds in the art to which the invention pertains.

The instant antisense sequences are considered to be each separate inventions for the following reasons:

The sequences do not meet the criteria of (A), common property or activity or (B)(2), art recognized class of compounds. Although the sequence target and modulate expression of the same gene, each antisense sequence behaves in a different way in the context of the claimed invention. Each sequence targets a different and specific region of gene Y and each sequence modifies (either increases or decreases) the expression of the gene to varying degrees (per Applicants' Table I in the specification). Each member of the class cannot be substituted, one for the other, with the expectation that the same intended result would be achieved.

Further, although the sequence target the same gene, the sequences do not meet the criteria of (B)(1), as they do not share, one with another, a common core structure. Accordingly, unity of invention between the antisense sequences is lacking and each antisense sequence claimed is considered to constitute a special technical feature.

Applicants will obtain a search of the first sequence listed in the first invention. For every other sequence applicants wish to have searched, applicants need to elect the sequence and pay an additional fee.

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 3/06	A 6 1 P 3/06	
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 9/10	1 0 1

(81) 指定国 AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, N O, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 グラハム, マーク・ジェイ

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 6 7 2 サンクレメント・サウスオラピスタ 2 3 0 5

F ターム (参考) 4B024 AA01 BA80 CA01 CA11 DA02 GA11 HA17

4C084 AA13 NA14 ZA362 ZA452 ZC332

4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA36 ZA45 ZC33