

(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.C1.⁷

C12N 15/09
A61K 31/7088
A61K 31/7115
A61K 31/712
A61K 31/7125

F 1

C 12 N 15/00
A 61 K 31/7088
A 61 K 31/7115
A 61 K 31/712
A 61 K 31/7125

Z N A A
A 61 K 31/7115
A 61 K 31/712
A 61 K 31/7125

テーマコード(参考)

4 B 02 4
4 C 08 4
4 C 08 6

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)	(71) 出願人	502254408 イシス・ファーマシューチカルズ・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9200 8カールスバド・ファラ黛イアベニュー2 292
(86) (22) 出願日	平成14年8月5日(2002.8.5)	(74) 代理人	100060782 弁理士 小田島 平吉
(85) 翻訳文提出日	平成16年2月2日(2004.2.2)	(72) 発明者	クルーケ, ロザン・エム アメリカ合衆国カリフォルニア州9200 9カールスバド・ピラクストリート321 1
(86) 國際出願番号	PCT/US2002/024920		
(87) 國際公開番号	W02003/014307		
(87) 國際公開日	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)		

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。

【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。

【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。

【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。

【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。

10

20

30

40

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。

10

【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。

20

【0003】

リポタンパク質粒子は継続的代謝プロセシングを受け、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かなりの量で分布している。

30

【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)は旧世界靈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靈長類における多数の研究を刺激した(非特許文献1)。

30

【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Kringle4をコードする5.5kb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)。

40

【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的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)。

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ー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、プラスミノー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。

20

【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) レベルの薬理学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）。

30

【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。

【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、獨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、460-466

【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】Katani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的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、最終的には產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。本発明の情況において、「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。本発明の情況において、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「ターゲッティング」は、本発明の情況において、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、

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、標的はアポリポタンパク質（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にものを発生させるアンチセンス相互作用のため、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。本発明の情況内で、好ましい遺伝子内（intron agenetic）部位は、該遺伝子の読み取り枠（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。本発明の情況において、「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、アポリポタンパク質（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。
10

【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もしくは遺伝子の一部分を指す。
20

【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み取り枠（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。
30

【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
40

、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ません、そして、異常なスプライシングが疾患に関する、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】

本発明の情況において、「ハイブリダイゼーション」は、相補的ヌクレオシドもしくはヌクレオチド塩基間のワトソン-クリック型、フーブスティーンもしくは逆フーブ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ところの「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的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

【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。

30

【0024】

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も使用される。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。

40

【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Vilo、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)(Prashar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；Larsson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)を包括する。

【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】

本発明の情況において、「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。

10

20

30

40

50

【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、なにより好ましくは約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あ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。ペントフラノシリ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リ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るとおり、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单一の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リル基を有する）单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成分の部分を有する他者を包含する。
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-CH₂-NH-OH-CH₂-、-CH₂-N(CH₃)-O-CH₂-[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]、-CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-、-CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-CH₂-および-O-N(CH₃)-CH₂-CH₂-[式中、天然のホスホジエステルバックボーンが-O-P-O-CH₂-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。

【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C₁ないしC₁₀アルキルもしくはC₂ないしC₁₀アルケニルおよびアルキニルであってよい。O[(CH₂)_nO]_mCH₃、O(CH₂)_nOCH₃、O(CH₂)_nNH₂、O(CH₂)_nCH₃、O(CH₂)_nONH₂およびO(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]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、C₁ないしC₁₀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、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、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、インターラーテー、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'-(2'-O-CH₂CH₂OCH₃、2'-(2'-メトキシエトキシ)もしくは2'-(2'-MOE)としてもまた知られる)(Martin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(CH₂)₂ON(CH₃)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-CH₂-O-CH₂-N(CH₂)₂を包含する。

【0040】

さらなる好ましい修飾は、2'-(ヒドロキシリル基が糖環の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(-CH₂-)_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。

【0041】

他の好ましい修飾は、2'-(メトキシ(2'-(O-CH₃))、2'-(アミノプロポキシ(2'-(OCH₂CH₂CH₂NH₂))、2'-(アリル(2'-(CH₂-CH=CH₂))、2'-(O-アリル(2'-(O-CH₂-CH=CH₂))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

10

20

30

40

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、ペントフラノシリ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。
10

【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-methyl-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ニル誘導体、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-ブロモ、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-デアザグアノシン、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、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（CRC 20
30
40
50

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(Sanghvi, Y. S.、Crooke, S. T.とLebleu, B.編、Antisense Research and Applications、CRC Press(CRC Press)、ボカレイトン、1993、pp. 276-278)、そして、現在、なによりとりわけ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(conjugate)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、インターラーカー、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。本発明の情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。本発明の情況において、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(Letsingerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、1989、86、6553-6556)のような脂質部分、コール酸(Manoharanら、Bioorg. Med. Chem. Lett.、1994、4、1053-1060)、チオエーテル、例えばヘキシリ-S-トリチルチオール(Manoharanら、Ann. N. Y. Acad. Sci.、1992、660、306-309；Manoharanら、Bioorg. Med. Chem. Lett.、1993、3、2765-2770)、チオコレステロール(Oberhauserら、Nucl. Acids Res.、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(Saison-Behmoarasら、EMBO J.、1991、10、1111-1118；Kabanovら、FEBS

30

40

50

Lett.、1990、259、327-330; Svinarchukら、Bioc
himie、1993、75、49-54)、リン脂質、例えばジヘキサデシル-
rac
-グリセロールもしくはトリエチルアンモニウム1,2-ジ-O-ヘキサデシル-
rac
-グリセロ-3-H-ホスホネート(Manoharanら、Tetrahedron
Lett.、1995、36、3651-3654; Sheaら、Nucl. Acids
Res.、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(Manoharanら、Nucleosides & Nucleotides、1995、14、969-973)、もしくはアダマンタン酢酸(Manoharanら、Tetrahedron Lett.、1995、36、3651-3654)、パルミチル部分(Mishraら、Biochim. Biophys. Acta、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(Crookeら、J. Pharmacol. Expt. Ther.、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、フォリン酸、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、バルビツール酸、セファロスボリン、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。
10
20
20

【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
40
40

【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シ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
50

る。本発明の情況における「キメラの(chimeric)」アンチセンス化合物もしくは「キメラ(chimera)」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、RN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、RNアーゼHの活性化はRNA標的の切断をもたらし、それによ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に比較して、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。

【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。

【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。

【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。

【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)もしくは別のある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5,591,725号。

10

20

30

40

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。

【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Gosselin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。

【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つ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、Bergeland, "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）

10

20

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関与する20種の-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、アルカリ土類、アンモニウムおよび四級アンモニウム陽イオンを包含する。炭酸塩もしくは炭酸水素塩もまた可能である。

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に、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(inj e

50

ction) もしくは注入 (infusion) ; 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。

【0059】

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か、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、ジカブレート、トリカブレート、モノオレイン、ジラウリン、グリセリル 1 - モノカブレート、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 - 1₀ アルキルエステル (例えばイソプロピルミリストート 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。

【0060】

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 (minitablet) を包含する。増粘剤、着香料、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、ジカブレート、トリカブレート、モノオレイン、ジラウリン、グリセリル 1 - モノカブレート、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

10

20

30

40

50

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

30

【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。

40

【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gel剤、坐剤および浣腸剤を挙げ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沢剤として処方かつ使用してよい。製薬学的泡沢剤は、限定されるものでないが乳剤、マイクロエマルション、クリーム剤、ゼリー剤およびリポソームを挙げ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 $0.1\text{ }\mu\text{m}$ を超える液滴の形態で別のも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, 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; 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) であってもよい。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 乳剤を構成する。

【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、半固体もしくは固体であってよい。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, Liberman, RiegerとBanker (編)、1988、マルセル デッcker 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, Liberman, RiegerとBanker (編)、1988、マルセル デッcker 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

10

20

30

40

50

tical Dosage Forms、Lieberman、RiegerとBanker(編)、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、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(HLB)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(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)。

【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体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、ベントナイト、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、蠅、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(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1巻中、p. 335; Idson、Pharmaceutical Dosage Forms、Lieberman、RiegerとBanker(編)、1988、マルセル デッcker 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)。

【0070】

親水コロイド(hydrophilic colloid)またはハイドロコロイド(hydrocolloid)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つ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。

【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

10

20

30

40

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 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ションとして処方される。マイクロエマルションは、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, 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、マイクロエマルションは、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、マイクロエマルションはまた、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透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 パブリッシャーズ (VCH Publishers)、ニューヨーク中、185-215ページ)。マイクロエマルションは、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。マイクロエマルションが油中水型 (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, 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、マイクロエマルシ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cker 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cker 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、マイクロエマルションは、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。

【0075】

マイクロエマルションの製造で使用される界面活性剤は、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 (Brij) 96、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 (ML310)、テトラグリセロールモノオレエート (MO310)、ヘキサグリセロールモノオレエート (PO310)、ヘキサグリセロールペンタオレエート (PO500)、デカグリセロールモノカブレート (MCA750)、デカグリセロールモノオレエート (MO750)、デカグリセロールセキオレエート (SO750)、デカグリセロールデカオレエート (DAO750) 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、PEG300、PEG400、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ができる。油相は、限定されるものでないが、カブテックス (Captex) 300、カブテックス (Captex) 355、カブマル (Capmul) MCM、脂肪酸エステル、中鎖 (C8-C12) 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 C8-C10グリセリド、植物油およびシリコーン油のような物質を挙げができる。

【0076】

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 (Constantinidesら、Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel、Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.、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 (Constantinidesら、Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385; Hoら、J. Pharm. Sci.、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と一緒に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、腔、頬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。

【0077】

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 (Gril 1) 3)、ラブラソール (Labrasol)、ならびに該製剤の特性を改良しつ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。本発明のマクロエマルションで使用される浸透増強剤は、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 (Leeら、Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier S

10

20

30

40

50

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

リポソーム

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。リポ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「リポソーム」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】

リポソームは、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。陽イオン性リポ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。非陽イオン性リポソームは、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ポソームを使用することが望ましい。

【0080】

リポ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ポソームは生物適合性かつ生物分解性である；リポ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；リポ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、Liberman、RiegerとBunker(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)。リポ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、およびリポソームの水性容量である。

【0081】

リポ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。リポソーム膜は生物学的膜に構造的に類似であるため、リポソームが組織に適用される場合に、リポソームは細胞膜に溶け込み始める。リポソームおよび細胞の合併が進行する際に、リポ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】

リポソーム製剤は、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、リポ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ポ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ッティングをもたらした。

【0084】

リポソームは2つの広範な分類にある。陽イオン性リポソームは正に荷電したリポソームであり、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/リポ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によりリポ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

【0085】

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)。

【0086】

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、ジミリストイルホスファチジルコリン (DMPC) もしくはジパルミトイ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、一般にジミリストイ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オイルホスファチジルエタノールアミン (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。

【0087】

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)。

【0088】

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]TM I (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]TM II (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ボリン-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ボリン-Aの沈着の助長において有効であったことを示した (Hul S.T.P. Pharma. Sci.、1994、4、6、466)。

【0089】

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ところの、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) モノシアロガングリオシド 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、ガングリオシド、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 (Allenn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Allenn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-ジミリストイ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 (Limmら) に開示される。

【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部分を含有する非イオン性洗剤、2C₁₂15G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見た。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 (DSP-E) およびPEGの組合せから形成されるDSP-E-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を含有するリポソーム組成物、およびそれらの使用方法が、Woodle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

10

20

30

40

50

5,710号明細書は、リポ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ポソームを開示する。

【0092】

トランスファーソーム (transferosome) はなお別の型のリポソームであり、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っ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ポ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。

【0093】

界面活性剤は、乳剤(マイクロエマルションを包含する)およびリポ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)。

【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、製薬学的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ル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、プロポキシル化アルコール、ならびにエトキシル化/プロポキシル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。

【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、石鹼のようなカルボン酸塩、アシルラクチル酸塩(acetyl 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ル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鹼である。

【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ル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】

10

20

30

40

50

界面活性剤分子が正もしくは負い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-アルキルベ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, Marcel Dekker, Inc., New York, New York, 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知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のようなパーカ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、ジカブレート、トリカブレート、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、カブリル酸、アラキドン酸、グリセロール1-モノカブレート、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C₁₋₁₀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、カブレート、ミリステート、パルミテート、ステアレート、リノレートなど) 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、マグロウ・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、DNA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バニル酸塩)、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 50

、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 (Yamashitara, 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、本発明の製薬学的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。

【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'-ジスルホン酸と共に投与される場合に低下される可能性がある (Miya0ら、Antisense Res. Dev., 1995, 5, 115-121; Takakuraら、Antisense & Nucleic Acid Drug Dev., 1996, 6, 177-183)。

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、ペクチン、ゼラチン、硫酸カルシウム、エチルセルロース、ポリアクリレート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、デンブ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。

【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と

10

20

30

40

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性溶液、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、例えば鎮痙薬、收れん剤、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か、または、色素、着香料、保存剤、抗酸化剤、乳化剤、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、着香料および／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もよい。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、ペントメチルメラニン、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、ナイトロジエンマスター、メルファラン、シクロホスファミド、6-メルカブトブリニン、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-FUDR)、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

10

20

30

40

50

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ビリン、ビダラビン、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と一緒にもしくは連続して使用してよい。

20

【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ない、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ない、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。

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 (Sanghvila, 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, 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ブ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 D M F (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) 中で乾燥して固体物を生じ、これを淡黄褐色粉末に粉碎した (57 g、85% 粗収率)。N M R 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体物、mp 222 - 4 を生じることができる)。

10

【0121】

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 M e O H (200 mL) とともに摩碎した。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 C H ₃ C N (600 mL) に溶解しあつ蒸発させた。シリカゲルカラム (3 kg) を、0.5% E t ₃ N H を含有する C H ₂ C l ₂ / アセトン / メタノール (20 : 5 : 3) で充填した。残渣を C H ₂ C l ₂ (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

【0122】

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

30

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) と共に蒸発させ、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。H P L C 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 C H ₃ C N (200 mL) とともに摩碎した。残渣を C H C l ₃ (1.5 L) に溶解し、そして 2 × 500 mL の飽和 N a H C O ₃ および 2 × 500 mL の飽和 N a C l で抽出した。有機層を N a ₂ S O ₄ で乾燥し、濾過しあつ蒸発させた。275 g の残渣を得た。残渣を、0.5% E t ₃ N H を含有する E t O A c / 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。

40

【0123】

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

50

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)、D M F / ピリジン (562 mL の D M F 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、T L C サンプルを M

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つつ蒸発させて 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 】

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つつ蒸発させた。残渣を E t O A c とともに摩碎して表題化合物を生じた。

【 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) と共に沸させた。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) に溶解しつつ飽和 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。

【 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) と共に沸させた。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 で乾燥しつつ蒸発させて残渣 (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。

【 0 1 2 7 】

10

20

30

40

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 C H₂ C l₂ (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 (T L C は反応が 95 % 完了であることを示した)。反応混合物を飽和 N a H C O₃ (1 × 300 mL) および飽和 N a C l (3 × 300 mL) で抽出した。水性洗浄液を C H₂ C l₂ (300 mL) で戻し抽出し、そして抽出物を合わせ、M g S O₄ で乾燥しつつ濃縮した。得られた残渣を、溶出溶媒として E t O A c / 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 - メチルウリジン) に類似に製造する。

【 0128 】

5 ' - O - t e r t - ブチルジフェニルシリル - O² - 2 ' - アンヒドロ - 5 - メチルウリジン

O² - 2 ' - アンヒドロ - 5 - メチルウリジン (P r o . B i o . S i n t . 、 イタリア・バレーゼ、 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。 t e r t - 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。 T L C (R f 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 × 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つ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 × 200 mL) で洗浄し、そして 149 g (74.8 %) の白色固体まで乾燥 (40 、 1 mmHg 、 24 時間) した。 T L C および N M R は純粋な生成物と一致した。

【 0129 】

5 ' - O - t e r t - ブチルジフェニルシリル - 2 ' - O - (2 - ヒドロキシエチル) - 5 - メチルウリジン

2 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 - t e r t - ブチルジフェニルシリル - O² - 2 ' - アンヒドロ - 5 - メチルウリジン (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 psi)。反応容器を周囲まで冷却しつつ開放した。 T L C (所望の生成物について R f 0.67 および a r a - T 副生成物について R f 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 (

10

20

30

40

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。生成物は有機層中にあることができる。] 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碎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】

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 - t e r t - ブチルジフェニルシリル - 2' - O - (2 - ヒドロキシエチル) - 5 - メチルウリジン (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、それを高真空中で 40 で 2 日間 P_2O_5 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, アルドリッヂ (Aldrich)、sure seal ボトル) を添加して透明な溶液を得た。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。

【0131】

5' - O - t e r t - 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 CH_2Cl_2 (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 CH_2Cl_2 で洗浄し、そして合わせられた有機層を水、塩水で洗浄しあつ無水 Na_2SO_4 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。溶媒を真空中に除去し；残渣をクロマトグラフィー分離して、5' - O - t e r t - 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。

【0132】

5' - O - t e r t - 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 - t e r t - 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あつ室温で 2 時間攪拌し、反応を TLC (CH_2Cl_2 中 5 % MeOH) によりモニターした。水性 $NaHCO_3$ 溶液 (5 %, 10 mL) を添加しそして酢酸エチル (2 × 20 mL) で抽出した。酢酸エチル層を無水 Na_2SO_4 で乾燥

10

20

30

40

50

し、乾固まで蒸発させた。残渣を MeOH 中の 1 M 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 分に冷却し、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 分で 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つつ室温で 2 時間攪拌した。反応混合物に 5% NaHCO_3 (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 Na_2SO_4 で乾燥しつ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 CH_2Cl_2 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-メチルウリジンを白色泡状物 (14.6 g, 80%) として得た。

【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 HF 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) に添加しつつ室温で 24 時間攪拌した。反応を TLC (CH_2Cl_2 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 CH_2Cl_2 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。

【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 P_2O_5 で一夜乾燥した。その後、それを無水ピリジン (20 mL) と共に蒸発させた。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つつ CH_2Cl_2 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。

【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) と共に蒸発させた。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 P_2O_5 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) に溶解しつつ 5% 水性 NaHCO_3 (40 mL) で洗浄した。酢酸エチル層を無水 Na_2SO_4 で乾燥しつつ濃縮した。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。

10

20

30

40

50

【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】

N 2 - 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 (m u l t i g r a m) 量のジアミノプリンリボシドをシェーリング A G (S c h e r i n g A G) (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。(Mc Gee, D. P. C., Cook, P. D. 、Guinossso, 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' - DMAE O E) 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' - DMAE O E 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 (A l d r i c h) 、6.66 g、50 mmol) を、100 mLボンベ (b o m b) 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 (1 M、10 mL、10 mmol) 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 (1.2 g、5 mmol) および重炭酸ナトリウム (2.5 mg) を添加しつボンベを封止し、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つ開放する。粗溶液を濃縮し、そして残渣を水 (200 mL) とヘキサン (200 mL)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 (3 × 200 mL) 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 : 2 0 (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 (c o l u m n e d)。カラム画分を濃縮する際に無色固体が生じ、これを収集して、表題化合物を白色固体として生じる。

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 - C1, 0.87 g, 2 等量) を添加しあつ 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 × 200 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。

【 0139 】

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。

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 (P = 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 (Applied Biosystems) モデル 380B) で合成する。

【 0140 】

ホスホロチオエート (P = 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 3H - 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。CPG 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 (deblocking) 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。

【 0141 】

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。

【 0142 】

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。

【 0143 】

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。

【 0144 】

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 PCT 出願第 PCT/US9

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ド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ロ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。

30

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「ウイングマー(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' ウイングについて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' 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(rotatevac)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 - 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、キメラ構造のウイ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ベンゾジチオール-3 - オン1, 1ジオキシド(ビューケージ(Beauge)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。

【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

10

20

20

30

40

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 度 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シドを、2.5 容量のエタノールを用いる 0.5M 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、もしくはファルマシア (Pharmacia)、ニュージャージー州ピスカタウェイ) から購入した。非標準的ヌクレオシドは既知の文献もしくは特許を与えられた方法に従って合成する。それらは、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として利用する。

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) 度で 12 ~ 16 時間、濃 NH₄OH 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 85% の完全長であった場合に許容できると判断した。

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 もしくはノーザンプ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、例えばノーザンプロット分析、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 - 24 細胞：

ヒト移行上皮細胞膀胱癌細胞系 T - 24 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 - 24 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。

【0155】

ノーザンプ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 549 細胞：

ヒト肺癌細胞系 A 549 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 549 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 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。

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カーズビル) 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カーズビル) 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 繼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カーズビル) 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カーズビル) 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 繼代までの間慣例に維持した。

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

10

20

30

40

50

れたイーグル M E M 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、R T - P C R 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 (F a l c o n - P r i m a r i a) # 3872) に接種した。

【 0156 】

ノーザンプ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 M L 1 2 細胞 :

A M L 1 2 (マウス肝 1 2) 細胞系は、ヒト T G F についてトランスジェニックのマウス (C D 1 血統、系統 M T 4 2) からの肝細胞から樹立した。細胞は、0.005 mg / ml インスリン、0.005 mg / ml トランスフェリン、5 ng / ml セレンおよび 40 ng / 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 F 1 2 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 % E D T A 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 2 ml) 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。

【 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、R T - P C R 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 (F a l c o n - P r i m a r i a) # 3872) に接種した。

【 0158 】

ノーザンプ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。

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 (C h a r l e s R i v e r L a b s) (マサチューセッツ州 ウィルミントン) から購入された C D - 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 (G i b c o / L i f e T e c h n o l o g i e s) 、メリーランド州 ゲイタースバーグ) 、250 nM デキサメサゾン (シグマ (S i g m a)) および 10 nM ウシインスリン (シグマ (S i g m a)) を補充された肝細胞接着培地 (H e p a t o y t e A t t a c h m e n t M e d i a) (ギブコ (G i b c o)) 中で慣例に培養した。細胞を、R T - P C R 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 (F a l c o n - P r i m a r i a) # 3872) に接種した。

【 0159 】

ノーザンプ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 (200 μ g / mL) (ベクトン ディッキンソン (B e c t o n D i c k i n s o n)) で被覆された 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する。

アンチセンス化合物での処理 :

細胞が 80 % コンフルエンシー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 200 μ L の O P T I - M E M ^{T M} - 1 血清使用量低減培地 (ギブコ B R L (G i b c o B R L)) で 1 回洗浄し、そしてその後、3.75 μ g / mL のリポフェクチン [L I P O F E C T I N] ^{T M} (ギブコ B R L (G i b c o B R L)) および所望の濃度のオリゴヌクレオチドを含有する 130 μ L の O P T I - M E M ^{T M} - 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 】

10

20

30

40

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、細胞を有す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-ras 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)、ISIS 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-ras 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)、ISIS 15770、A T G C A T T C T G C C C C A A G G A、配列番号 2 である。その後、c-Ha-ras (ISIS 13920 について) もしくは c-ras (ISIS 15770 について) の mRNA 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-ras もしくは c-ras の mRNA 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

アポリポタンパク質 (a) 発現のオリゴヌクレオチド阻害の分析

アポリポタンパク質 (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、アポリポタンパク質 (a) の mRNA レベルは、例えばノーザンプロット分析、競争的ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) もしくは実時間 PCR (RT-PCR) により定量することができる。実時間定量的 PCR が現在好ましい。RNA 分析は全細胞 RNA もしくはポリ (A) + mRNA 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 ウィリー アンド サンズ インク (John Wiley & Sons, Inc.)、1993 に教示される。ノーザンプ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 ウィリー 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 (PCR) 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 [PRISM]™ 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】

アポリポタンパク質 (a) のタンパク質レベルは、免疫沈降法、ウェスタンプロット分析 (イムノプロットティング)、ELISA もしくは蛍光標示式細胞分取 (FACS) 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。アポリポタンパク質 (a) に向けられる抗体は、抗体の MRS 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 ウィリー 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. 11.4.1-50

11.11.5、ジョン ウィリー 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 ウィリー アンド サンズ インク(John Wiley & Sons, Inc.)、1998に見出すことができる。ウェスタンプロット(イムノプロット)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. 10.8.1-10.8.2 10 1、ジョン ウィリー 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 ウィリー 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、1 758-1764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 ウィリー 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200μLの冷PBSで洗浄する。60μLの溶解緩衝液(10mMトリス-HCl、pH7.6、1mM EDTA、0.5M NaCl、0.5%NP-40、20mM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。55μLのライセートをオリゴdT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、200μLの洗浄緩衝液(10mMトリス-HCl、pH7.6、1mM EDTA、0.3M 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60μLの溶出緩衝液(5mMトリス-HCl pH7.6)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。 30

【0163】

100mm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イージー 96 [RNEASY 96]™ 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200μLの冷PBSで洗浄する。100μL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、100μL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]™ マニホールドに接続されかつ真空源に接続されたRNイージー 96 [RNEASY 96]™ 50

^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 R W 1 を R N イージー 96 [R N E A S Y 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 R P E を R N イージー 96 [R N E A S Y 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 R P E 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 [Q I A V A C] ^{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 [Q I A V A C] ^{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 μ L 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 μ L の水で反復する。
10

【 0 1 6 4 】

反復するピペット操作および溶出の段階を、キアゲン (Q I A G E N) バイオ - ロボット (B i o - R o b o t) 9604 (キアゲン インク (Q i a g e n , I n c .) 、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 1 3

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

アポリポタンパク質 (a) の mRNA レベルの定量は、製造元の説明書に従って A B I プリズム [P R I S M] ^{T M} 7700 配列検出装置 (P E - アプライド バイオシステムズ (P E - A p p l i e d B i o s y s t e m s) 、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 (例えは、JOE 、 F A M もしくは V I C 、オペロン テクノロジーズ インク (O p e r o n T e c h n o l o g i e s I n c .) 、カリフォルニア州アルメダもしくは P E - アプライド バイオシステムズ (P E - A p p l i e d B i o s y s t e m s) 、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カラム (例えは T A M R A 、オペロン テクノロジーズ インク (O p e r o n T e c h n o l o g i e s I n c .) 、カリフォルニア州アルメダもしくは P E - アプライド バイオシステムズ (P E - A p p l i e d B i o s y s t e m s) 、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' のクエンチャーカラム (例えは T a q 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る基質を創製する。PCR 増幅周期の伸長期の間に、 T a q 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カラムから) 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、 A B I プリズム [P R I S M] ^{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 の連続希釈物を含有する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。
20
30
40

【 0 1 6 5 】

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

の組を、GAPDH増幅反応で「多重化(multiple x ed)」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

20

30

【0166】

PCR試薬は、PE-アプライドバイオシステムズ(PE-Applied Bio systems)、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、25μLの全RNA溶液を含有する96穴プレートに、25μLのPCRカクテル(1×タックマン[TaqMan]TM緩衝液A、5.5mM MgCl₂、300μMのdATP、dCTPおよびdGTPのそれぞれ、600μMのdUTP、100nM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

30

【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]TMRNA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

40

【0168】

本アッセイにおいて、175μLのリボグリーン[Ribogreen]TM作業試薬(10mMトリス-HCl、1mM EDTA、pH 7.5で2865倍に希釈されたリボグリーン[Ribogreen]TM試薬)を、25μL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、480nmでの励起および520nm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

50

【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。

【0170】

ヒトGAPDHについて、標準的PCRプライマーは：順プライマー：G A A G G T G A A G G T C G G A G T C (配列番号4) 逆プライマー：G A A G A T G G T G A T G G G A T T T C (配列番号5) であり、そして、PCRプローブは：5' JOE - C A A G C T T C C C G T T C T C A G C C - T A M R A 3' (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T AMRA (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) はクエンチャーカラムである。

実施例14

10

アポリポタンパク質(a)のmRNAレベルのノーザンプロット分析

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、MOPS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、ストラタリンク [STRATALINKER]TM UVクロスリンクバー (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、ストリングエ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】

20

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】

30

ハイブリダイズされたメンブレンは、ホスホリメジャー [PHOSPHRIMAGE R]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ンベール) 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。

40

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ヤ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

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。ヌクレオシド間（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

ヒトアボリポタンパク質(a)に標的を定める2'-MOEウイングおよびテ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

10

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

20

30

40

【0174】

実施例16

アボリポタンパク質(a)のタンパク質レベルのウェスタンプロット分析

ウェスタンプロット分析（イムノプロット分析）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（Lemmli）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、そしてウェスタンプロット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毛

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 [PHOSPHORIMAGER]TM（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> 20
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 1
tccgtcatcg ctccctcaggg 20

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

<220> 20
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 2
atgcattctg cccccaagga 20

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

<220> 30
<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 40

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

10

20

30

gca ccg act gag caa agg cct ggg gtg cag gag tgc tac cat ggt aat Ala Pro Thr Glu Gln Arg Pro Gly Val Gln Glu Cys Tyr His Gly Asn 245 250 255 260	825
gga cag agt tat cga ggc aca tac tcc acc act gtc aca gga aga acc Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Ser Thr Thr Val Thr Gly Arg Thr 265 270 275	873
tgc caa gct tgg tca tct atg aca cca cac tcg cat agt cgg acc cca Cys Gln Ala Trp Ser Ser Met Thr Pro His Ser His Ser Arg Thr Pro 280 285 290	921
gaa tac tac cca aat gct ggc ttg atc atg aac tac tgc agg aat cca Glu Tyr Pro Asn Ala Gly Leu Ile Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro 295 300 305	969
gat gct gtg gca gct cct tat tgt tat acg agg gat ccc ggt gtc agg Asp Ala Val Ala Ala Pro Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Pro Gly Val Arg 310 315 320	1017
tgg gag tac tgc aac ctg acg caa tgc tca gac gca gaa ggg act gcc Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Thr Gln Cys Ser Asp Ala Glu Gly Thr Ala 325 330 335 340	1065
gtc gcg cct ccg act gtt acc ccg gtt cca agc cta gag gct cct tcc Val Ala Pro Pro Thr Val Pro Ser Leu Glu Ala Pro Ser 345 350 355	1113
gaa caa gca ccg act gag caa agg cct ggg gtg cag gag tgc tac cat Glu Gln Ala Pro Thr Glu Gln Arg Pro Gly Val Gln Glu Cys Tyr His 360 365 370	1161
ggt aat gga cag agt tat cga ggc aca tac tcc acc act gtc aca gga Gly Asn Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Tyr Ser Thr Thr Val Thr Gly 375 380 385	1209
aga acc tgc caa gct tgg tca tct atg aca cca cac tcg cat agt cgg Arg Thr Cys Gln Ala Trp Ser Ser Met Thr Pro His Ser His Ser Arg 390 395 400	1257
acc cca gaa tac tac cca aat gct ggc ttg atc atg aac tac tgc agg Thr Pro Glu Tyr Tyr Pro Asn Ala Gly Leu Ile Met Asn Tyr Cys Arg 405 410 415 420	1305
aat cca gat gct gtg gca gct cct tat tgt tat acg agg gat ccc ggt Asn Pro Asp Ala Val Ala Ala Pro Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Pro Gly 425 430 435	1353
gtc agg tgg gag tac tgc aac ctg acg caa tgc tca gac gca gaa ggg Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Thr Gln Cys Ser Asp Ala Glu Gly 440 445 450	1401
act gcc gtc gcg cct ccg act gtt acc ccg gtt cca agc cta gag gct Thr Ala Val Ala Pro Pro Thr Val Thr Pro Val Pro Ser Leu Glu Ala 455 460 465	1449
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 ggt aat gga cag agt tat cga ggc aca tac tcc acc act gtc			1545	
Tyr His 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 tcg 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 Pro Asn Ala Gly Leu Ile Met Asn Tyr				
520	525	530		
tgc agg aat cca gat gct gtg gca gct cct tat tgc 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 ggt 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	560		
gaa ggg act gcc gtc gcg cct ccg act gtt acc ccg gtt cca agc cta			1785	
Glu Gly Thr Ala Val Ala Pro Pro Thr Val Thr Pro Val Pro Ser Ileu				
565	570	575	580	
gag gct cct tcc gaa caa gca ccg 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 ggt 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 gat 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		
tcg 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 tgc tat acg			2025	
Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Val Ala Ala Pro Tyr Cys Tyr Thr				
645	650	655	660	
agg gat ccc ggt 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 gcg cct ccg act gtt acc ccg 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 ccg act gag caa agg cct ggg			2169	
Ser Leu Glu Ala Pro Ser Glu Gln Ala Pro Thr Glu Gln Arg Pro Gly				

695	700	705	
gtg cag gag tgc tac cat ggt aat gga cag agt tat cga ggc aca tac Val Gln Glu Cys Tyr His Gly Asn Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Tyr 710 715 720			2217
tcc acc act gtc aca gga aga acc tgc caa gct tgg tca tct atg aca Ser Thr Thr Val Thr Gly Arg Thr Cys Gln Ala Trp Ser Ser Met Thr 725 730 735 740			2265
cca cac tcg cat agt cgg acc cca gaa tac tac cca aat gct ggc ttg Pro His Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Tyr Tyr Pro Asn Ala Gly Leu 745 750 755			2313
atc atg aac tac tgc agg aat cca gat gct gtc gca gct cct tat tgt Ile Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Val Ala Ala Pro Tyr Cys 760 765 770			2361
tat acg agg gat ccc ggt gtc agg tgg gag tac tgc aac ctg acg caa Tyr Thr Arg Asp Pro Gly Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Thr Gln 775 780 785			2409
tgc tca gac gca gaa ggg act gcc gtc gcg cct ccg act gtt acc ccg Cys Ser Asp Ala Glu Gly Thr Ala Val Ala Pro Pro Thr Val Thr Pro 790 795 800			2457
gtt cca agc cta gag gct cct tcc gaa caa gca ccg act gag caa agg Val Pro Ser Leu Glu Ala Pro Ser Glu Gln Ala Pro Thr Glu Gln Arg 805 810 815 820			2505
cct ggg ggt cag gag tgc tac cat ggt aat gga cag agt tat cga ggc Pro Gly Val Gln Glu Cys Tyr His Gly Asn Gly Gln Ser Tyr Arg Gly 825 830 835			2553
aca tac tcc acc act gtc aca gga aga acc tgc caa gct tgg tca tct Thr Tyr Ser Thr Val Thr Gly Arg Thr Cys Gln Ala Trp Ser Ser 840 845 850			2601
atg aca cca cac tcg cat agt cgg acc cca gaa tac tac cca aat gct Met Thr Pro His Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Tyr Tyr Pro Asn Ala 855 860 865			2649
ggc ttg atc atg aac tac tgc agg aat cca gat gct gtc gca gct cct Gly Leu Ile Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Val Ala Ala Pro 870 875 880			2697
tat tgt tat acg agg gat ccc ggt gtc agg tgg gag tac tgc aac ctg Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Pro Gly Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu 885 890 895 900			2745
acg caa tgc tca gac gca gaa ggg act gcc gtc gcg cct ccg act gtt Thr Gln Cys Ser Asp Ala Glu Gly Thr Ala Val Ala Pro Pro Thr Val 905 910 915			2793
acc ccg gtt cca agc cta gag gct cct tcc gaa caa gca ccg act gag Thr Pro Val Pro Ser Leu Glu Ala Pro Ser Glu Gln Ala Pro Thr Glu 920 925 930			2841

caa agg cct ggg gtg cag gag tgc tac cat ggt aat gga cag agt tat Gln Arg Pro Gly Val Gln Glu Cys Tyr His Gly Asn Gln Ser Tyr 935 940 945	2889	
cga ggc aca tac tcc acc act gtc aca gga aga acc tgc caa gct tgg Arg Gly Thr Tyr Ser Thr Val Thr Gly Arg Thr Cys Gln Ala Trp 950 955 960	2937	
tca tct atg aca cca cac tcg cat agt cgg acc cca gaa tac tac cca Ser Ser Met Thr Pro His Ser His Arg Thr Pro Glu Tyr Tyr Pro 965 970 975 980	2985	
aat gct ggc ttg atc atg aac tac tgc agg aat cca gat gct gtg gca Asn Ala Gly Leu Ile Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Val Ala 985 990 995	3033	
gct cct tat tgt tat acg agg gat ccc ggt gtc agg tgg gag tac tgc Ala Pro Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Pro Gly Val Arg Trp Glu Tyr Cys 1000 1005 1010	3081	10
aac ctg acg caa tgc tca gac gca gaa ggg act gcc gtc gcg cct ccc Asn Leu Thr Gln Cys Ser Asp Ala Glu Gly Thr Ala Val Ala Pro Pro 1015 1020 1025	3129	
act gtt acc ccg gtt cca agc cta gag gct cct tcc gaa caa gca ccg Thr Val Thr Pro Val Pro Ser Leu Glu Ala Pro Ser Glu Gln Ala Pro 1030 1035 1040	3177	
act gag caa agg cct ggg gtg cag gag tgc tac cat ggt aat gga cag Thr Glu Gln Arg Pro Gly Val Gln Glu Cys Tyr His Asn Gly Gln 1045 1050 1055 1060	3225	
agt tat cga ggc aca tac tcc acc act gtc aca gga aga acc tgc caa Ser Tyr Arg Gly Thr Tyr Ser Thr Val Thr Gly Arg Thr Cys Gln 1065 1070 1075	3273	20
gct tgg tca tct atg aca cca cac tcg cat agt cgg acc cca gaa tac Ala Trp Ser Ser Met Thr Pro His Ser His Arg Thr Pro Glu Tyr 1080 1085 1090	3321	
tac cca aat gct ggc ttg atc atg aac tac tgc agg aat cca gat gct Tyr Pro Asn Ala Gly Leu Ile Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala 1095 1100 1105	3369	
gtg gca gct cct tat tgt tat acg agg gat ccc ggt gtc agg tgg gag Val Ala Ala Pro Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Pro Gly Val Arg Trp Glu 1110 1115 1120	3417	
tac tgc aac ctg acg caa tgc tca gac gca gaa ggg act gcc gtc gcg Tyr Cys Asn Leu Thr Gln Cys Ser Asp Ala Glu Gly Thr Ala Val Ala 1125 1130 1135 1140	3465	30
cct ccg act gtt acc ccg gtt cca agc cta gag gct cct tcc gaa caa Pro Pro Thr Val Thr Pro Val Pro Ser Leu Glu Ala Pro Ser Glu Gln 1145 1150 1155	3513	

gca ccg act gag caa agg cct ggg gtg cag gag tgc tac cat ggt aat Ala Pro Thr Glu Gln Arg Pro Gly Val Gln Glu Cys Tyr His Gly Asn 1160 1165 1170	3561
gga cag agt tat cga ggc aca tac tcc acc act gtc aca gga aga acc Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Tyr Ser Thr Thr Val Thr Gly Arg Thr 1175 1180 1185	3609
tgc caa gct tgg tca tct atg aca cca cac tcc cat agt cgg acc cca Cys Gln Ala Trp Ser Ser Met Thr Pro His Ser His Ser Arg Thr Pro 1190 1195 1200	3657
gaa tac tac cca aat gct ggc ttg atc atg aac tac tgc agg aat cca Glu Tyr Tyr Pro Asn Ala Gly Leu Ile Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro 1205 1210 1215 1220	3705
gat gct gtg gca gct cct tat tgt tat acg agg gat ccc ggt gtc agg Asp Ala Val Ala Ala Pro Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Pro Gly Val Arg 1225 1230 1235	3753
tgg gag tac tgc aac ctg acg caa tgc tca gac gca gaa ggg act gcc Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Thr Gln Cys Ser Asp Ala Glu Gly Thr Ala 1240 1245 1250	3801
gtc gcg cct ccg act gtt acc ccg gtt cca agc cta gag gct cct tcc Val Ala Pro Pro Thr Val Thr Pro Val Pro Ser Leu Glu Ala Pro Ser 1255 1260 1265	3849
gaa caa gca ccg act gag caa agg cct ggg gtg cag gag tgc tac cat Glu Gln Ala Pro Thr Glu Gln Arg Pro Gly Val Gln Glu Cys Tyr His 1270 1275 1280	3897
ggt aat gga cag agt tat cga ggc aca tac tcc acc act gtc aca gga Gly Asn Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Tyr Ser Thr Thr Val Thr Gly 1285 1290 1295 1300	3945
aga acc tgc caa gct tgg tca tct atg aca cca cac tcc cat agt cgg Arg Thr Cys Gln Ala Trp Ser Ser Met Thr Pro His Ser His Ser Arg 1305 1310 1315	3993
acc cca gaa tac tac cca aat gct ggc ttg atc atg aac tac tgc agg Thr Pro Glu Tyr Tyr Pro Asn Ala Gly Leu Ile Met Asn Tyr Cys Arg 1320 1325 1330	4041
aat cca gat gct gtg gca gct cct tat tgt tat acg agg gat ccc ggt Asn Pro Asp Ala Val Ala Ala Pro Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Pro Gly 1335 1340 1345	4089
gtc agg tgg gag tac tgc aac ctg acg caa tgc tca gac gca gaa ggg Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Thr Gln Cys Ser Asp Ala Glu Gly 1350 1355 1360	4137
act gcc gtc gcg cct ccg act gtt acc ccg gtt cca agc cta gag gct Thr Ala Val Ala Pro Pro Thr Val Thr Pro Val Pro Ser Leu Glu Ala 1365 1370 1375 1380	4185
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
 Tyr His Gly Asn Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Tyr Ser Thr Thr Val
 1400 1405 1410 4281

aca gga aga acc tgc caa gct tgg tca tct atg aca cca cac tcg cat
 Thr Gly Arg Thr Cys Gln Ala Trp Ser Ser Met Thr Pro His Ser His
 1415 1420 1425 4329

agt cgg acc cca gaa tac tac cca aat gct ggc ttg atc atg aac tac
 Ser Arg Thr Pro Glu Tyr Tyr Pro Asn Ala Gly Leu Ile Met Asn Tyr
 1430 1435 1440 4377

tgc agg aat cca gat gct gtg gca gct cct tat tgt tat acg agg gat
 Cys Arg Asn Pro Asp Ala Val Ala Ala Pro Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp
 1445 1450 1455 1460 4425

ccc ggt gtc agg tgg gag tac tgc aac ctg acg caa tgc tca gac gca
 Pro Gly Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Thr Gln Cys Ser Asp Ala
 1465 1470 1475 4473

gaa ggg act gcc gtc gcg cct ccg act gtt acc ccg gtt cca agc cta
 Glu Gly Thr Ala Val Ala Pro Pro Thr Val Thr Pro Val Pro Ser Leu
 1480 1485 1490 4521

gag gct cct tcc gaa caa gca ccg act gag caa agg cct ggg gtg cag
 Glu Ala Pro Ser Glu Gln Ala Pro Thr Glu Gln Arg Pro Gly Val Gln
 1495 1500 1505 4569

gag tgc tac cat ggt aat gga cag agt tat cga ggc aca tac tcc acc
 Glu Cys Tyr His Gly Asn Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Tyr Ser Thr
 1510 1515 1520 4617

act gtc aca gga aga acc tgc caa gct tgg tca tct atg aca cca cac
 Thr Val Thr Gly Arg Thr Cys Gln Ala Trp Ser Ser Met Thr Pro His
 1525 1530 1535 1540 4665

tcg cat agt cgg acc cca gaa tac tac cca aat gct ggc ttg atc atg
 Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Tyr Tyr Pro Asn Ala Gly Leu Ile Met
 1545 1550 1555 4713

aac tac tgc agg aat cca gat gct gtg gca gct cct tat tgt tat acg
 Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Val Ala Ala Pro Tyr Cys Tyr Thr
 1560 1565 1570 4761

agg gat ccc ggt gtc agg tgg gag tac tgc aac ctg acg caa tgc tca
 Arg Asp Pro Gly Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Thr Gln Cys Ser
 1575 1580 1585 4809

gac gca gaa ggg act gcc gtc gcg cct ccg act gtt acc ccg gtt cca
 Asp Ala Glu Gly Thr Ala Val Ala Pro Pro Thr Val Thr Pro Val Pro
 1590 1595 1600 4857

agc cta gag gct cct tcc gaa caa gca ccg act gag caa agg cct ggg
 Ser Leu Glu Ala Pro Ser Glu Gln Ala Pro Thr Glu Gln Arg Pro Gly
 4905

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

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 gtc 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	10
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 Ile 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	20
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	30
Tyr Cys Asn Ile 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		

gca ccg act gag caa agg cct ggg gtg cag gag tgc tac cat ggt aat Ala Pro Thr Glu Gln Arg Pro Gly Val Gln Glu Cys Tyr His Gly Asn 2070 2075 2080	6297
gga cag agt tat cga ggc aca tac tcc acc act gtc aca gga aga acc Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Tyr Ser Thr Thr Val Thr Gly Arg Thr 2085 2090 2095 2100	6345
tgc caa gct tgg tca tct atg aca cca cac tcg cat agt cgg acc cca Cys Gln Ala Trp Ser Ser Met Thr Pro His Ser His Ser Arg Thr Pro 2105 2110 2115	6393
gaa tac tac cca aat gct ggc ttg atc atg aac tac tgc agg aat cca Glu Tyr Tyr Pro Asn Ala Gly Leu Ile Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro 2120 2125 2130	6441
gat gct gtg gca gct cct tat tgt tat acg agg gat ccc ggt gtc agg Asp Ala Val Ala Ala Pro Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Pro Gly Val Arg 2135 2140 2145	6489
tgg gag tac tgc aac ctg acg caa tgc tca gac gca gaa ggg act gcc Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Thr Gln Cys Ser Asp Ala Glu Gly Thr Ala 2150 2155 2160	6537
gtc gcg cct ccg act gtt acc ccg gtt cca agc cta gag gct cct tcc Val Ala Pro Pro Thr Val Thr Pro Val Pro Ser Leu Glu Ala Pro Ser 2165 2170 2175 2180	6585
gaa caa gca ccg act gag caa agg cct ggg gtg cag gag tgc tac cat Glu Gln Ala Pro Thr Glu Gln Arg Pro Gly Val Gln Glu Cys Tyr His 2185 2190 2195	6633
ggt aat gga cag agt tat cga ggc aca tac tcc acc act gtc aca gga Gly Asn Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Tyr Ser Thr Thr Val Thr Gly 2200 2205 2210	6681
aga acc tgc caa gct tgg tca tct atg aca cca cac tcg cat agt cgg Arg Thr Cys Gln Ala Trp Ser Ser Met Thr Pro His Ser His Ser Arg 2215 2220 2225	6729
acc cca gaa tac tac cca aat gct ggc ttg atc atg aac tac tgc agg Thr Pro Glu Tyr Tyr Pro Asn Ala Gly Leu Ile Met Asn Tyr Cys Arg 2230 2235 2240	6777
aat cca gat gct gtg gca gct cct tat tgt tat acg agg gat ccc ggt Asn Pro Asp Ala Val Ala Ala Pro Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Pro Gly 2245 2250 2255 2260	6825
gtc agg tgg gag tac tgc aac ctg acg caa tgc tca gac gca gaa ggg Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Thr Gln Cys Ser Asp Ala Glu Gly 2265 2270 2275	6873
act gcc gtc gcg cct ccg act gtt acc ccg gtt cca agc cta gag gct Thr Ala Val Ala Pro Pro Thr Val Thr Pro Val Pro Ser Leu Glu Ala 2280 2285 2290	6921
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 Ser Thr Thr Val		
2310 2315 2320		
aca gga aga acc tgc caa got 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 Val Gln Glu Cys Tyr His Gly Asn Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Tyr 2535 2540 2545			7689
tcc acc act gtc aca gga aga acc tgc caa gct tgg tca tct atg aca Ser Thr Thr Val Thr Gly Arg Thr Cys Gln Ala Trp Ser Ser Met Thr 2550 2555 2560			7737
cca cac tcg cat agt cgg acc cca gaa tac tac cca aat gct ggc ttg Pro His Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Tyr Tyr Pro Asn Ala Gly Leu 2565 2570 2575 2580			7785
atc atg aac tac tgc agg aat cca gat gct gtc gca gct cct tat tgt Ile Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Val Ala Ala Pro Tyr Cys 2585 2590 2595			7833
tat acg agg gat ccc ggt gtc agg tgg gag tac tgc aac ctg acg caa Tyr Thr Arg Asp Pro Gly Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Thr Gln 2600 2605 2610			7881
tgc tca gac gca gaa ggg act gcc gtc gcg cct ccg act gtt acc ccg Cys Ser Asp Ala Glu Gly Thr Ala Val Ala Pro Pro Thr Val Thr Pro 2615 2620 2625			7929
gtt cca agc cta gag gct cct tcc gaa caa gca ccg act gag cag agg Val Pro Ser Leu Glu Ala Pro Ser Glu Gln Ala Pro Thr Glu Gln Arg 2630 2635 2640			7977
cct ggg gtg cag gag tgc tac cac ggt aat gga cag agt tat cga ggc Pro Gly Val Gln Glu Cys Tyr His Gly Asn Gly Gln Ser Tyr Arg Gly 2645 2650 2655 2660			8025
aca tac tcc acc act gtc act gga aga acc tgc caa gct tgg tca tct Thr Tyr Ser Thr Thr Val Thr Gly Arg Thr Cys Gln Ala Trp Ser Ser 2665 2670 2675			8073
atg aca cca cac tcg cat agt cgg acc cca gaa tac tac cca aat gct Met Thr Pro His Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Tyr Tyr Pro Asn Ala 2680 2685 2690			8121
ggc ttg atc atg aac tac tgc agg aat cca gat gct gtc gca gct cct Gly Leu Ile Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Val Ala Ala Pro 2695 2700 2705			8169
tat tgt tat acg agg gat ccc ggt gtc agg tgg gag tac tgc aac ctg Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Pro Gly Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu 2710 2715 2720			8217
acg caa tgc tca gac gca gaa ggg act gcc gtc gcg cct ccg act gtt Thr Gln Cys Ser Asp Ala Glu Gly Thr Ala Val Ala Pro Pro Thr Val 2725 2730 2735 2740			8265
acc ccg gtt cca agc cta gag gct cct tcc gaa caa gca ccg act gag Thr Pro Val Pro Ser Leu Glu Ala Pro Ser Glu Gln Ala Pro Thr Glu 2745 2750 2755			8313

10

20

30

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 Arg Thr Pro Glu Tyr Tyr Pro	
2790	2795
2800	
aat gct ggc ttg atc atg aac tac tgc agg aat cca gat gct gtc gca	8505
Asn Ala Gly Leu 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 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 Ala Pro Thr Glu Gln Arg Pro Gly Val Gln Glu Cys Tyr His Gly Asn 2985 2990 2995	9033
gga cag agt tat cga ggc aca tac tcc acc act gtc act gga aga acc Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Tyr Ser Thr Thr Val Thr Gly Arg Thr 3000 3005 3010	9081
tgc caa gct tgg tca tct atg aca cca cac tcg cat agt cgg acc cca Cys Gln Ala Trp Ser Ser Met Thr Pro His Ser His Arg Thr Pro 3015 3020 3025	9129
gaa tac tac cca aat gct ggc ttg atc atg aac tac tgc agg aat cca Glu Tyr Pro Asn Ala Gly Leu Ile Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro 3030 3035 3040	9177
gat gct gtg gca gct cct tat tgt tat acg agg gat ccc ggt gtc agg Asp Ala Val Ala Ala Pro Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Pro Gly Val Arg 3045 3050 3055 3060	9225
tgg gag tac tgc aac ctg acg caa tgc tca gac gca gaa ggg act gcc Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Thr Gln Cys Ser Asp Ala Glu Gly Thr Ala 3065 3070 3075	9273
gtc gcg cct ccg act gtt acc ccg gtt cca agc cta gag gct cct tcc Val Ala Pro Pro Thr Val Thr Pro Val Pro Ser Leu Glu Ala Pro Ser 3080 3085 3090	9321
gaa caa gca ccg act gag cag agg cct ggg gtg cag gag tgc tac cac Glu Gln Ala Pro Thr Glu Gln Arg Pro Gly Val Gln Glu Cys Tyr His 3095 3100 3105	9369
ggt aat gga cag agt tat cga ggc aca tac tcc acc act gtc act gga Gly Asn Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Tyr Ser Thr Thr Val Thr Gly 3110 3115 3120	9417
aga acc tgc caa gct tgg tca tct atg aca cca cac tcg cat agt cgg Arg Thr Cys Gln Ala Trp Ser Ser Met Thr Pro His Ser His Ser Arg 3125 3130 3135 3140	9465
acc cca gaa tac tac cca aat gct ggc ttg atc atg aac tac tgc agg Thr Pro Glu Tyr Pro Asn Ala Gly Leu Ile Met Asn Tyr Cys Arg 3145 3150 3155	9513
aat cca gat gct gtg gca gct cct tat tgt tat acg agg gat ccc ggt Asn Pro Asp Ala Val Ala Ala Pro Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Pro Gly 3160 3165 3170	9561
gtc agg tgg gag tac tgc aac ctg acg caa tgc tca gac gca gaa ggg Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Thr Gln Cys Ser Asp Ala Glu Gly 3175 3180 3185	9609
act gcc gtc gcg cct ccg act gtt acc ccg gtt cca agc cta gag gct Thr Ala Val Ala Pro Pro Thr Val Thr Pro Val Pro Ser Leu Glu Ala 3190 3195 3200	9657
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 Tyr His Gly Asn Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Tyr Ser Thr Thr Val 3225 3230 3235	9753
act gga aga acc tgc caa gct tgg tca tct atg aca cca cac tcg cat Thr Gly Arg Thr Cys Gln Ala Trp Ser Ser Met Thr Pro His Ser His 3240 3245 3250	9801
agt cgg acc cca gaa tac tac cca aat gct ggc ttg atc atg aac tac Ser Arg Thr Pro Glu Tyr Tyr Pro Asn Ala Gly Leu Ile Met Asn Tyr 3255 3260 3265	9849
tgc agg aat cca gat gct gtg gca gct cct tat tgt tat acg agg gat Cys Arg Asn Pro Asp Ala Val Ala Ala Pro Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp 3270 3275 3280	9897
ccc ggt gtc agg tgg gag tac tgc aac ctg acg caa tgc tca gac gca Pro Gly Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Thr Gln Cys Ser Asp Ala 3285 3290 3295 3300	9945
gaa ggg act gcc gtc gcg cct ccg act gtt acc ccg gtt cca agc cta Glu Gly Thr Ala Val Ala Pro Pro Thr Val Thr Pro Val Pro Ser Leu 3305 3310 3315	9993
gag gct cct tcc gaa caa gca ccg act gag cag agg cct ggg gtg cag Glu Ala Pro Ser Glu Gln Ala Pro Thr Glu Gln Arg Pro Gly Val Gln 3320 3325 3330	10041
gag tgc tac cac ggt aat gga cag agt tat cga ggc aca tac tcc acc Glu Cys Tyr His Gly Asn Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Tyr Ser Thr 3335 3340 3345	10089
act gtc act gga aga acc tgc caa gct tgg tca tct atg aca cca cac Thr Val Thr Gly Arg Thr Cys Gln Ala Trp Ser Ser Met Thr Pro His 3350 3355 3360	10137
tcg cat agt ccg acc cca gaa tac tac cca aat gct ggc ttg atc atg Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Tyr Tyr Pro Asn Ala Gly Leu Ile Met 3365 3370 3375 3380	10185
aac tac tgc agg aat cca gat cct gtg gca gcc cct tat tgt tat acg Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Pro Val Ala Ala Pro Tyr Cys Tyr Thr 3385 3390 3395	10233
agg gat ccc agt gtc agg tgg gag tac tgc aac ctg acg caa tgc tca Arg Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Thr Gln Cys Ser 3400 3405 3410	10281
gac gca gaa ggg act gcc gtc gcg cct cca act att acc ccg att cca Asp Ala Glu Gly Thr Ala Val Ala Pro Pro Thr Ile Thr Pro Ile Pro 3415 3420 3425	10329
agc cta gag gct cct tct gaa caa gca cca act gag caa agg cct ggg Ser Leu Glu Ala Pro Ser Glu Gln Ala Pro Thr Glu Gln Arg Pro Gly	10377

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 tcg 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 gtc 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 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	3540
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 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	3620
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 Ieu 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 Ieu 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 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	11769
Val Gln Asp Cys Tyr Arg Gly Asp Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Leu	
3895 3900 3905	
tcc acc act atc aca gga aga aca tgc tct tgg tcc tct atg aca	11817
Ser Thr Thr Ile Thr Gly Arg Thr Cys Gln Ser Trp Ser Ser Met Thr	
3910 3915 3920	
cca cat tgg cat cgg agg atc cta tac tat cca aat gct ggc ctg	11865
Pro His Trp His Arg Arg Ile Pro Leu Tyr Tyr Pro Asn Ala Gly Leu	
3925 3930 3935 3940	
acc agg aac tac tgc agg aat cca gat gct gag att cgc cct tgg tgt	11913
Thr Arg Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Glu Ile Arg Pro Trp Cys	
3945 3950 3955	
tac acc atg gat ccc agt gtc agg tgg gag tac tgc aac ctg aca cga	11961
Tyr Thr Met Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Thr Arg	
3960 3965 3970	
tgt cca gtg aca gaa tcg agt gtc ctc aca act ccc aca gtg gcc ccg	12009
Cys Pro Val Thr Glu Ser Ser Val Leu Thr Thr Pro Thr Val Ala Pro	
3975 3980 3985	
gtt cca agc aca gag gct cct tct gaa caa gca cca cct gag aaa agc	12057
Val Pro Ser Thr Glu Ala Pro Ser Glu Gln Ala Pro Pro Glu Lys Ser	
3990 3995 4000	
cct gtg gtc cag gat tgc tac cat ggt gat gga cgg agt tat cga ggc	12105
Pro Val Val Gln Asp Cys Tyr His Gly Asp Gly Arg Ser Tyr Arg Gly	
4005 4010 4015 4020	
ata tcc tcc acc act gtc aca gga agg acc tgc aat tct tgg tca tct	12153
Ile Ser Ser Thr Thr Val Thr Gly Arg Thr Cys Gln Ser Trp Ser Ser	
4025 4030 4035	
atg ata cca cac tgg cat cag agg acc cca gaa aac tac cca aat gct	12201
Met Ile Pro His Trp His Gln Arg Thr Pro Glu Asn Tyr Pro Asn Ala	
4040 4045 4050	
ggc ctg acc gag aac tac tgc agg aat cca gat tct ggg aaa caa ccc	12249
Gly Leu Thr Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ser Gly Lys Gln Pro	
4055 4060 4065	
tgg tgt tac aca acc gat ccc tgt gtg agg tgg gag tac tgc aat ctg	12297
Trp Cys Tyr Thr Asp Pro Cys Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu	
4070 4075 4080	
aca caa tgc tca gaa aca gaa tca ggt gtc cta gag act ccc act gtt	12345
Thr Gln Cys Ser Glu Thr Glu Ser Gly Val Leu Glu Thr Pro Thr Val	
4085 4090 4095 4100	
gtt cca gtt cca agc atg gag gct cat tct gaa gca gca cca act gag	12393
Val Pro Val Pro Ser Met Glu Ala His Ser Glu Ala Ala Pro Thr Glu	
4105 4110 4115	
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 oct 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 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

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

10

20

30

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

<220>
<223> PCR Primer

<400> 4
gaaggtaag 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 gttcteagcc 20 20

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

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 7
ggcagggtcct 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 acggcagtcc 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 ggagctgcc 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 cgtcaggttg 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 cttttagtgcgt 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 tggcaagtcc 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
tgtgggtgtca 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
acaccaagggg cgaatctcag 20

<210> 30
<211> 20

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 30
ttctgtcaact ggacatcg 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
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence 20

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 33
cagaaggagg cccttaggtt 20

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

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide 30

<400> 34
ctggcggtga ccatgttagtc 20

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

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 35
tctaaatggg ttgtatgttc 20

<210> 36
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 36
tccttaccca cgttttagct 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 20

<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
gtcatagctt tgacacctta

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 <i>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</i>																													
B. FIELDS SEARCHED <i>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)</i> U.S. : 435/6, 325, 91.1, 375; 536/24.5, 23.1, 24.3, 24.1; 514/44																													
<i>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</i>																													
<i>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)</i> Biosis, Medline, CaPlus, Embase, Cancerlit																													
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category *</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">A</td> <td style="padding: 2px;">KOSTNER et al. Lipoprotein (a): Still an enigma? Current Opinion in Lipidology. 2002, Vol. 13, pages 391-396.</td> <td style="padding: 2px;">15-20</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">A</td> <td style="padding: 2px;">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-</td> <td style="padding: 2px;">15-20</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">A</td> <td style="padding: 2px;">BRANCH, A. A Good Antisense Molecule is Hard to Find. TIBS. February 1998, Vol. 23, pages 45-50.</td> <td style="padding: 2px;">1-15</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">MCLEAN et al. cDNA sequence of human apolipoprotein (a) is homologous to plasminogen. Nature. 1987, Vol. 330, pages 132-137.</td> <td style="padding: 2px;">1-15</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">WEINTRAUB, H.M. Antisense RNA and DNA. Scientific American. January 1990, pages 40-46, see entire article.</td> <td style="padding: 2px;">1-15</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">MILLIGAN et al. Current Concepts in Antisense Drug Design. Medicinal Chemistry. 1993, Vol. 36, pages 1923-1937.</td> <td style="padding: 2px;">1-15</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">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).</td> <td style="padding: 2px;">1-15</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">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.</td> <td style="padding: 2px;">1-15</td> </tr> </tbody> </table>			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-	15-20	A	BRANCH, A. A Good Antisense Molecule is Hard to Find. TIBS. February 1998, Vol. 23, pages 45-50.	1-15	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
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-	15-20																											
A	BRANCH, A. A Good Antisense Molecule is Hard to Find. TIBS. February 1998, Vol. 23, pages 45-50.	1-15																											
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																											
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.																													
* Special categories of cited documents: <table border="0" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 15%; padding: 2px;">"A"</td> <td style="width: 15%; padding: 2px;">document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td style="width: 15%; padding: 2px;">"T"</td> <td style="width: 55%; padding: 2px;">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</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">"E"</td> <td style="padding: 2px;">earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td style="padding: 2px;">"X"</td> <td style="padding: 2px;">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</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">"L"</td> <td style="padding: 2px;">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)</td> <td style="padding: 2px;">"Y"</td> <td style="padding: 2px;">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</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">"O"</td> <td style="padding: 2px;">document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td style="padding: 2px;">"Z"</td> <td style="padding: 2px;">document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">"P"</td> <td style="padding: 2px;">document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td colspan="2" style="padding: 2px;"></td> </tr> </table>			"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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	"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)	"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	"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z"	document member of the same patent family	"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed									
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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																										
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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																										
"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)	"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																										
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z"	document member of the same patent family																										
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																												
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 <i>Janeel Forel</i> Telephone No. (703) 308-0196																												

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

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

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 0,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・ジエイ

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・サウスオラビスタ 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