

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4397585号
(P4397585)

(45) 発行日 平成22年1月13日 (2010. 1. 13)

(24) 登録日 平成21年10月30日 (2009. 10. 30)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 6 1 K 31/7088 (2006. 01)

A 6 1 K 31/7088

A 6 1 K 31/7125 (2006. 01)

A 6 1 K 31/7125

A 6 1 P 3/06 (2006. 01)

A 6 1 P 3/06

A 6 1 P 9/00 (2006. 01)

A 6 1 P 9/00

請求項の数 13 (全 79 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-526886 (P2002-526886)
 (86) (22) 出願日 平成13年9月10日 (2001. 9. 10)
 (65) 公表番号 特表2004-513626 (P2004-513626A)
 (43) 公表日 平成16年5月13日 (2004. 5. 13)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2001/028235
 (87) 国際公開番号 W02002/022635
 (87) 国際公開日 平成14年3月21日 (2002. 3. 21)
 審査請求日 平成15年4月18日 (2003. 4. 18)
 (31) 優先権主張番号 09/659, 791
 (32) 優先日 平成12年9月11日 (2000. 9. 11)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 595104323
 アイシス ファーマシューティカルズ、
 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, カールズバッド, ラザフォード・ロー
 ド 1896
 (74) 代理人 100089705
 弁理士 社本 一夫
 (74) 代理人 100076691
 弁理士 増井 忠次
 (74) 代理人 100075270
 弁理士 小林 泰
 (74) 代理人 100080137
 弁理士 千葉 昭男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 クラスタリン発現のアンチセンスモジュレーション

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

クラスタリンをコードする核酸分子の3' UTR、イントロン、イントロン-エクソン接合部、またはコード領域の核酸塩基106-1402を標的とする長さ30までの核酸塩基のアンチセンスオリゴヌクレオチドであって、クラスタリンに特異的にハイブリダイズし、そしてその発現を少なくとも70%阻害する、SEQ ID NO: 20、22、26、30、48、49、55、65、67、71、72、73、74、または80を含む配列を有する、前記アンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 2】

少なくとも一つの修飾ヌクレオシド間結合を含む、請求項1に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 3】

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2に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 4】

少なくとも一つの修飾糖部分を含む、請求項1に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 5】

修飾糖部分が2'-O-メトキシエチル糖部分である、請求項4に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 6】

少なくとも一つの修飾核酸塩基を含む、請求項1に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 7】

修飾核酸塩基が5-メチルシトシンである、請求項6に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 8】

キメラオリゴヌクレオチドである、請求項1に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 9】

請求項1に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドおよび医薬的に許容可能な担体または希釈剤を含む、医薬組成物。

10

【請求項 10】

コロイド分散システムをさらに含む、請求項9に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

細胞または組織においてクラスタリンの発現をin vitroで阻害する方法であって、前記細胞または組織と請求項1に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドとを接触させ、それによりクラスタリンの発現をin vitroで阻害することを含む、前記方法。

【請求項 12】

クラスタリンの発現を阻害することにより、アルツハイマー病、神経変性性障害、神経膠腫、色素性網膜炎、腎損傷または疾患、尿管閉塞症、虚血/再灌流、そしてアテローム性動脈硬化からなる群から選択されるクラスタリンに関連する疾患または症状を有する動物を治療するための、治療的または予防的有効量の請求項1に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む医薬組成物。

20

【請求項 13】

疾患または症状が過剰増殖性障害である、請求項12に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の属する分野

本発明はクラスタリン発現をモジュレートするための組成物と方法を提供する。特に、本発明はヒトクラスタリンをコードする核酸と特異的にハイブリダイズ可能なアンチセンス化合物、特にオリゴヌクレオチドに関する。そのようなオリゴヌクレオチドは、クラスタリンの発現をモジュレートすることが示された。

30

【0002】

発明の背景

クラスタリンは、オスの生殖系から最初に単離された両親媒性糖タンパク質である (Bettuzzi et al., Biochem. J., 1989, 257, 293-296; O'Bryan et al., J. Clin. Invest., 1990, 85, 1477-1486)。その後、クラスタリンは、組織間で偏在的に分布し、幅広い生物学的特性を有するすることが示された。そのため、いくつかの研究分野の研究者たちは、10種以上の異なる名前で、クラスタリンホモログを単離した (Bailey and Griswold, Mol. Cell. Endocrinol., 1999, 151, 17-23; Koch-Brandt and Morgans, Prog. Mol. Subcell. Biol., 1996, 16, 130-149; Meri and Jarva, Vox. Sang., 1998, 74, 291-302; Silken et al., Biochem. Cell. Biol., 1994, 72, 483-488中にレビューされる)。

40

【0003】

クラスタリタンパク質は、それぞれ34 kDaおよび47 kDaの2種の同一ではないサブユニットからなる。クラスタリン発現は、細胞損傷、細胞死、または病理の結果として、ほとんど特異的に誘導される。

【0004】

その多数の役割の中でも、クラスタリンは、補体カスケードの活性化の際に、血漿中で集合される可溶性SCb-5補体複合体の構成要素である (Choi et al., Mol. Immunol., 1989, 26, 835-840; Kirsbaum et al., Embo J., 1989, 8, 711-718; Murphy et al., Int. J

50

mmunol., 1989, 1, 551-554; Tschopp and French, Clin. Exp. Immunol., 1994, 97 Suppl 2, 11-14)。クラスタリンの結合により、補体複合体の膜溶解性潜在力が破壊され、そしてそのため、それは補体溶解阻害剤 (CLI) と呼ばれた (Jenne and Tschopp, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1989, 86, 7123-7127)。

【 0 0 0 5 】

さらに、クラスタリンの研究者たちは、それが、溶解性補体カスケードの阻害剤として機能するのみでなく脂質輸送および局所的脂質再配分の調節物質としても機能する高密度リポタンパク質 (HDL) 複合体として、血漿中を循環することを示した (Jenne et al., J. Biol. Chem., 1991, 266, 11030-11036)。この能力において、de Silvaらにより単離されそして特徴を調べられたクラスタリンは、アポリポタンパク質J (ApoJ) という名前を付けられた (de Silva et al., Biochemistry, 1990, 29, 5380-5389; de Silva et al., J. Biol. Chem., 1990, 265, 13240-13247; de Silva et al., J. Biol. Chem., 1990, 265, 14292-14297)。これらの研究において、クラスタリン (ApoJ) は、肝臓におけるコレステロールコレステロール輸送および血管平滑筋細胞分化の調節において、役割を果たすことが示された (de Silva et al., J. Biol. Chem., 1990, 265, 13240-13247; Moulson and Millis, J. Cell. Physiol., 1999, 180, 355-364)。HDLのモジュレーションと補体活性との間の連関は、Jamesらによる研究により提供される。高密度リポタンパク質、NA1/NA2、とアポリポタンパク質A-I (ApoA-I) の結合を特徴づける。この新規タンパク質NA1/NA2はその後、クラスタリンであることが示された (James et al., Arterioscler. Thromb., 1991, 11, 645-652)。

【 0 0 0 6 】

クラスタリンは、プログラム細胞死またはアポトーシスの細胞プロセスに参加していることが示された。クラスタリン発現はアポトーシスを起こしている細胞をはっきりと区別し (Buttayan et al., Mol. Cell. Biol., 1989, 9, 3473-3481) そして腎臓の研究では、片側性閉塞の後の水腎症の発症はクラスタリン遺伝子によりコードされるタンパク質の発現の増加と関連している (Connor et al., Kidney Int., 1991, 39, 1098-1103)。これらの研究の両方で、クラスタリンは2種の他の異名、硫酸化糖タンパク-2遺伝子 (SGP-2) およびテストステロン-抑制前立腺メッセージ-2 (TRPM-2)、と呼ばれる (Buttayan et al., Mol. Cell. Biol., 1989, 9, 3473-3481; Connor et al., Kidney Int., 1991, 39, 1098-1103)。

【 0 0 0 7 】

Sensibarらは、腫瘍壊死因子 により誘導される前立腺中の細胞死をクラスタリンの過剰発現により阻害することができることを示した。これらの研究において、クラスタリンコード領域を標的とする4種の21-merアンチセンスホスホロチオエートオリゴヌクレオチドのいずれかによるLNCaP細胞のトランスフェクションにより、結果として細胞死の増加が引き起こされた (Sensibar et al., Cancer Res., 1995, 55, 2431-2437)。

【 0 0 0 8 】

Miyakeらはさらに、去勢-誘導性アポトーシスの研究のために使用されるモデルであるShionogi腫瘍モデルにおける抗-アポトーシス遺伝子としてのクラスタリンの役割を示した (Miyake et al., Cancer Res., 2000, 60, 170-176)。このモデルにおいて、オスマウスにおけるアンドロゲン-依存性乳癌異種移植片腫瘍は去勢後に退行するが、しかしアポトーシス-誘導性腫瘍が1ヶ月後に再発する。翻訳開始部位を標的とするマウスクラスタリン遺伝子に対するホスホロチオエート21-merアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用して、Miyakeらは、Shionogi腫瘍を有するマウスをクラスタリンアンチセンスオリゴヌクレオチドにより処理すると、結果としてアポトーシスのより迅速な開始と完全な退行への時間が引き起こされるということを示すことができた。対照オリゴヌクレオチド処理対照と比較して、アンドロゲン-非依存性再発腫瘍の発生に有意な遅れも存在した。

【 0 0 0 9 】

パクリタキセルと組み合わせた場合のオリゴヌクレオチドの効果を試験するために設計された実験において同一のオリゴヌクレオチドを使用することにより、Miyakeらは、アンチ

センスオリゴヌクレオチドとパクリタキセルとの組み合わせにより、Shionogi腫瘍におけるアポトーシスがいずれかの剤単独の場合よりもよく誘導されることを示した。これらの研究により、アンチセンスオリゴヌクレオチドがホルモン-治療抵抗性前立腺癌における細胞傷害性化学療法の効果向上に有用である可能性があることが示唆される (Miyake et al., Cancer Res., 2000, 60, 2547-2554)。ヒトTRPM-2 (クラスタリン) を標的とする10種のアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドがMiyakeらにより設計され (Clin. Cancer Res., 2000, 6, 1655-1663)、ヒトアンドロゲン-非依存性前立腺癌PC-2細胞におけるTRPM-2発現を特異的に阻害する強力なオリゴヌクレオチドを同定した。10種のオリゴヌクレオチドのうちの7種は、TRPM-2 mRNA発現に対してほとんどまたはまったく効果がなかった。他の3種のオリゴヌクレオチドは、適度の効果を有するものとして著者らにより記載された。最も活性なオリゴヌクレオチドは、PC-3細胞のタキソールまたはミトキサントロンに対する応答を向上させる能力についても試験した。

10

【0010】

クラスタリンのAUG開始コドン を標的とする別のアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用して、内皮細胞活性化におけるクラスタリンの役割を調べた。これらの研究において、クラスタリン発現がラミナ剪断ストレス (laminar shear stress) の際に亢進調節され、そしてアンチセンス処置を介するクラスタリンレベルの減少により内皮細胞活性化が増加することが示された (Urbich et al., Circulation, 2000, 101, 352-355)。

【0011】

クラスタリンのレベルは、アルツハイマー病患者の脳の海馬および前頭皮質において増加する。クラスタリンは、これらの患者の脳内で凝集することが知られるタンパク質であるベータ-アミロイドに対する結合により、この疾患の悪化を補体システムに対して連関させるために作用すると、現在は考えられている (Choi-Miura and Oda, Neurobiol. Aging, 1996, 17, 717-722)。

20

【0012】

最も最近には、クラスタリンは、KU70結合タンパク質として単離された。KU結合タンパク質 (KUBs) は、DNA修復経路に関与する。クラスタリン (KUB1) は、強皮症-多発性筋炎症候群を有する患者の血清における自己抗原として同定され、そしてKUP80と二量体化し、ATP依存性ヘリカーゼと、二重鎖切断修復とV(D)J組換えとに関与するDNA依存性タンパク質キナーゼ (PRKDC) の調節構成要素とを形成することが示された (Yang et al., Nucleic Acids Res., 1999, 27, 2165-2174)。

30

【0013】

クラスタリンは、神経変性性障害、神経膠腫、色素性網膜炎を含む多数の疾患状態において過剰発現され、そして発現は腎損傷および疾患の急性モデルおよび慢性モデルにおいて誘導され、その後、尿管閉塞症、虚血/再灌流、そしてアテローム性動脈硬化において誘導される (Silkensen et al., Biochem. Cell. Biol., 1994, 72, 483-488にレビューされる)。クラスタリン活性および/または発現の医薬的モジュレーションはしたがって、病理学的症状における治療的介入の適切な点でありうる。

【0014】

クラスタリンまたはその変異体の発現を、雄性不妊の研究において正常細胞と異常細胞とを差別化する手段として使用した。精子サンプルを、クラスタリンの一形態と結合するが別のものとは結合しない免疫学的反応性分子と接触させることを含む、精子形態の先体状態を評価する方法は、WO 95/16916に開示される。

40

【0015】

現在のところ、クラスタリンの合成を効果的に阻害する既知の治療剤は存在せず、そして現在までクラスタリン機能をモジュレートすることを目的とした研究戦略には、抗体、アンチセンスオリゴヌクレオチド、および化学的阻害剤の使用に関する。

【0016】

しかしながら、クラスタリン機能を効果的に阻害することができるさらなる剤を求める必要性は長い間感じられ続けている。

50

アンチセンス技術は、特異的遺伝子産物の発現を減少させるための効果的な手段として出現しており、そしてしたがって、クラスタリン発現のモジュレーションを目的として、多数の治療的用途、診断的用途、および研究用途において独自に有用であることが証明される可能性がある。

【0017】

本発明は、 および/または サブユニットをモジュレートすることを含む、クラスタリン発現をモジュレートするための組成物および方法を提供する。

発明の概要

本発明は、クラスタリンをコードする核酸を標的とし、そしてクラスタリンの発現をモジュレートする化合物、特にアンチセンスオリゴヌクレオチドに関する。本発明のアンチセンス化合物を含む医薬組成物およびその他の組成物もまた、提供する。さらに、細胞または組織中でクラスタリンの発現をモジュレートする方法であって、前記細胞または組織を、1またはそれ以上の本発明のアンチセンス化合物または組成物と接触させることを含む、前記方法を提供する。さらに、治療的または予防的有効量の1またはそれ以上の本発明のアンチセンス化合物または組成物を投与することにより、クラスタリンの発現と関連する疾患または症状を有するか、またはかかっている可能性があると思われる動物、特にヒトを治療する方法を提供する。

【0018】

発明の詳細な説明

本発明は、クラスタリンをコードする核酸分子の機能をモジュレートする際に使用するための、究極的には産生されるクラスタリンの量をモジュレートする際に使用するための、オリゴマー化合物、とくにアンチセンスオリゴヌクレオチドを利用する。これは、クラスタリンをコードする1また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。本明細書中で使用する場合、用語“標的核酸”および“クラスタリンをコードする核酸”は、クラスタリンをコードするDNA、このようなDNAから転写されるRNA（プレ-mRNAおよびmRNAを含む）、およびこのようなRNAに由来するcDNAも含む。オリゴマー化合物のその標的核酸との特異的ハイブリダイゼーションは、核酸の正常な機能を妨害する。標的核酸の機能のそれに特異的にハイブリダイズする化合物によるこのモジュレーションは、一般的に“アンチセンス”といわれる。妨害すべきDNAの機能には、複製および転写が含まれる。妨害されるべきRNAの機能には、すべての生存に必要な機能、たとえばRNAのタンパク質翻訳部位への転移（translocation）、RNAからタンパク質への翻訳、1またはそれ以上のmRNA種を得るためのRNAのスプライシング、およびRNAに含まれる触媒活性またはRNAにより促進される触媒活性、が含まれる。標的核酸機能によるこのような妨害の全体的な効果は、クラスタリンの発現のモジュレーションである。本発明の文脈において、“モジュレーション”とは、遺伝子の発現における増加（刺激）または減少（阻害）のいずれかを意味する。本発明の文脈において、阻害は遺伝子発現のモジュレーションの好ましい形態であり、そしてmRNAは好ましい標的である。

【0019】

アンチセンスに対する特異的核酸を標的とすることが好ましい。特定の核酸に対してアンチセンス化合物を“標的化する”とは、本発明の文脈において、複数工程のプロセスである。プロセスは通常、その機能をモジュレートすべき核酸配列の同定からはじめる。たとえば、このことは、その発現が特定の症状または疾患状態と関連する細胞の遺伝子（あるいはその遺伝子から転写されるmRNA）、または感染性病原体に由来する核酸分子でありうる。本発明において、標的はクラスタリンをコードする核酸分子である。標的化のプロセスにはまた、アンチセンス相互作用のためにこの遺伝子内部に1または複数の部位を決定し、所望の効果、たとえばタンパク質の発現の検出またはモジュレーション、を結果として生じようとするを含む。本発明の文脈において、好ましい遺伝子内部部位は、遺伝子のオープンリーディングフレーム（ORF）の翻訳開始コドンあるいは終止コドンを含む領域である。当該技術分野において既知であるように、翻訳開始コドンは、典型的には5'-AUG（転写されたmRNA分子において；対応するDNA分子においては5'-ATG）であるので

10

20

30

40

50

、翻訳開始コドンはまた、“AUGコドン”、“スタートコドン”または“AUGスタートコドン”とも呼ばれる。少数の遺伝子は、RNA配列5'-GUG、5'-UUGまたは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た。このように、それぞれの事例における開始アミノ酸は典型的にはメチオニン（真核細胞において）またはホルミルメチオニン（原核細胞において）であるにもかかわらず、用語“翻訳開始コドン”および“スタートコドン”は、多くのコドン配列を含むことができる。真核細胞の遺伝子および原核細胞の遺伝子は、2またはそれ以上の代わりのスタートコドンを有する場合があります、そのいずれもが好ましくは特定の細胞型または組織においてまたは特定の条件のセットのもとにおいて、翻訳開始のために利用することができる、ということも、当該技術分野において既知である。本発明の文脈において、“スタートコドン”および“翻訳開始コドン”は、そのようなコドンの1またはそれ以上の配列にかかわらず、*in vivo*で使用して、クラスタリンをコードする遺伝子から転写されるmRNA分子の翻訳を開始する、1またはそれ以上のコドンのことをいう。

10

【0020】

遺伝子の翻訳終止コドン（または“停止コドン”）は、3つの配列、すなわち、5'-UAA、5'-UAGおよび5'-UGA（対応するDNA配列は、それぞれ、5'-TAA、5'-TAGおよび5'-TGA）のうちの一つを有しうることも、当該技術分野において既知である。用語“スタートコドン領域”および“翻訳開始コドン領域”は、翻訳開始コドンからいずれかの方向（すなわち、5'または3'）に約25から約50の連続するヌクレオチドを含む、mRNAあるいは遺伝子の部分のことを言う。同様に、用語“停止コドン領域”および“翻訳終止コドン領域”は、翻訳終止コドンからいずれかの方向（すなわち、5'または3'）に約25から約50の連続するヌクレオチドを含む、mRNAまたは遺伝子の部分のことを言う。

20

【0021】

翻訳開始コドンと翻訳終止コドンとのあいだの領域のことを言う。当該技術分野において知られているオープンリーディングフレーム（ORF）または“コード領域”はまた、効果的に標的化されうる領域でもある。その他の標的領域には、翻訳開始コドンから5'方向におけるmRNAの部分、そしてしたがってmRNAの5'キャップ部位と翻訳開始コドンとのあいだのヌクレオチドまたは遺伝子上の対応するヌクレオチドを含むもの、のことをいう。当該技術分野において知られている5'非翻訳領域（5'UTR）、そして翻訳終止コドンから3'方向におけるmRNAの部分、そしてしたがってmRNAの翻訳終止コドンと3'末端とのあいだのヌクレオチドまたは遺伝子上の対応するヌクレオチドを含むもの、のことをいう。当該技術分野において知られている3'非翻訳領域（3'UTR）、が含まれる。mRNAの5'キャップには5'-5'三リン酸結合を介して、mRNAの最も5'側の残基と結合するN7-メチル化グアノシン残基を含む。mRNAの5'キャップ領域は、5'キャップ構造それ自体だけでなく、キャップに隣接する最初の50ヌクレオチドも含むと考えられている。5'キャップ領域もまた、好ましい標的領域でありうる。

30

【0022】

いくつかの真核細胞mRNA転写物は直接的に翻訳されるが、多くは1またはそれ以上の“イントロン”として知られる領域を含有し、それらは翻訳される前に転写物から切り出される。残りの（そしてしたがって翻訳される）領域は、“エクソン”として知られ、そして一緒にスプライシングされて連続的なmRNA配列を形成する。mRNAスプライス部位、すなわち、イントロン-エクソン結合もまた、好ましい標的領域である場合があります、そして特に異常なスプライシングが疾患に関与しているか、あるいは特定のmRNAスプライス産物の過剰産生が疾患に関与している状況において、特に有用である。再構成または欠損による異常な融合結合もまた、好ましい標的である。イントロンも有効である場合があります、そしてしたがって、たとえばDNAまたはプレ-mRNAを標的とするアンチセンス化合物のための標的領域が好ましい場合があることもまた、見出した。

40

【0023】

いったん1またはそれ以上の標的部位を同定したら、標的に対して十分に相補的な、すなわち、十分によくそして十分に特異的にハイブリダイズする、オリゴヌクレオチドを選択

50

し、所望の効果を得る。

【0024】

本発明の文脈において、“ハイブリダイゼーション”とは、相補的ヌクレオシドまたはヌクレオチド塩基間のワトソン-クリック水素結合、フーグスティーン水素結合または逆フーグスティーン水素結合でありうる、水素結合を意味する。たとえば、アデニンおよびチミンは相補的な核塩基であり、水素結合を形成することを通じて対合する。本明細書中で使用する場合、“相補的”とは、2つのヌクレオチド間で正確に対合するための能力のことをいう。たとえば、オリゴヌクレオチドの特定の位置のヌクレオチドがDNAまたはRNA分子の同一の位置でヌクレオチドと水素結合することができる場合、オリゴヌクレオチドおよびDNAまたはRNAは、その位置において互いに相補的であると考えられる。オリゴヌクレオチドおよびDNAまたはRNAは、それぞれの分子中での十分な数の対応する位置が、互いに水素結合することができるヌクレオチドにより占められている場合、互いに相補的である。したがって、“特異的にハイブリダイズ可能”および“相補的”は、安定でそして特異的な結合がオリゴヌクレオチドとDNAまたはRNA標的とのあいだで生じるような、十分な程度の相補性または正確な対合を示すため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ために、その標的核酸の配列と100%の相同性がある必要はないことは、当該技術分野において理解されている。アンチセンス化合物は、標的DNAまたはRNA分子に対する化合物の結合が標的DNAまたはRNAの正常な機能を妨害して利用できないようにし、そして特異的な結合が所望される条件下、すなわち、*in vivo*アッセイまたは治療の場合には生理学的条件下、そして*in vitro*アッセイの場合には、アッセイを行う条件下にて、非-標的配列に対するアンチセンス化合物の非-特異的結合を妨害するための十分な程度の相補性が存在する場合、特異的にハイブリダイズ可能である。

【0025】

標的にハイブリダイズしそして標的の発現を阻害する本発明のアンチセンス化合物およびその他の化合物を実験を通じて同定し、そしてこれらの化合物の配列を本発明の好ましい態様として以下において同定する。これらの好ましい配列が相補的である標的部位は、以下において“活性部位”と呼ばれ、そしてしたがって、標的化のために好ましい。したがって、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。

【0026】

アンチセンス化合物は、一般的に、研究用試薬および診断薬として使用される。たとえば、当業者はしばしば、正確な特異性により遺伝子発現を阻害することができるアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用して、特定遺伝子の機能を解明する。たとえば、アンチセンス化合物を使用して、生物学的経路の様々なメンバーの機能どうしを区別することもある。アンチセンスモジュレーションは、したがって、研究用途として使用された。

【0027】

アンチセンスの特異性および感受性も、治療用途として当業者に利用される。アンチセンスオリゴヌクレオチドを、動物およびヒトにおける疾患状態を治療する際の治療部分として使用した。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒトに対して安全にそして効果的に投与され、そして多くの臨床試験が現在進行中である。したがって、オリゴヌクレオチドは、細胞、組織および動物、特にヒトの治療のための治療計画において有用なものとして形成することができる、有用な治療様式でありうることが確立される。

【0028】

本発明の文脈において、用語“オリゴヌクレオチド”とは、リボ核酸(RNA)またはデオキシリボ核酸(DNA)のオリゴマーまたはポリマー、またはそれらの模倣体のことをいう。この用語には、天然に存在する核塩基、糖および共有ヌクレオシド間(バックボーン)結合、および同様に機能する非-天然に存在する部分を有するオリゴヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドが含まれる。このような修飾されたまたは置換されたオリゴヌクレオチドは、たとえば、細胞取り込みの亢進、核酸標的に対する親和性の亢進、そしてヌクレアーゼの存在下における安定性の増加などの望ましい特性のため、しばしば天然の型よ

り好ましい。

【0029】

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形態である一方、本発明は、以下に記載するようなオリゴヌクレオチド模倣体（しかし、これらのものには限定されない）を含む、その他のオリゴマーアンチセンス化合物を包含する。本発明に従うアンチセンス化合物は、好ましくは、約8～約50核塩基（すなわち、約8～約50の連結したヌクレオシド）を含む。具体的な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、さらに好ましくは約12～約30核塩基を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドである。アンチセンス化合物には、リボザイム、外部ガイド配列（EGS）オリゴヌクレオチド（オリゴザイム）、そしてその他の短い触媒性RNAまたは標的核酸にハイブリダイズしそしてその発現をモジュレートする触媒性オリゴヌクレオチド、が含まれる。

10

【0030】

当該技術分野において知られているように、ヌクレオシドは塩基-糖の組み合わせである。ヌクレオシドの塩基部分は、通常はヘテロ環式塩基である。このようなヘテロ環式塩基の2つの最も一般的なクラスは、プリンとピリミジンである。ヌクレオチドは、ヌクレオシドの糖部分に共有結合したリン酸基をさらに含む、ヌクレオシドである。ペントフラノシル糖を含むそれらのヌクレオシドに対して、リン酸基は、糖の2'、3'または5'ヒドロキシル部分のいずれかに結合することができる。オリゴヌクレオチドを形成する際に、リン酸基が隣接するヌクレオシドと互いに共有結合し、直鎖ポリマー化合物を形成する。引き続いて、この直鎖ポリマー化合物のそれぞれの末端がさらに一緒になって、環状構造を形成することができるが、しかしながら、開環直鎖構造が一般的には好ましい。オリゴヌクレオチド構造中において、リン酸基とは、一般的には、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ものと言われる。RNAおよびDNAの正常な結合またはバックボーンは、3'から5'のホスホジエステル結合である。

20

【0031】

本発明において有用な好ましいアンチセンス化合物の具体的な例には、修飾バックボーンまたは非-天然ヌクレオシド間結合を含有するオリゴヌクレオチドが含まれる。本明細書中で定義する場合、修飾バックボーンを有するオリゴヌクレオチドには、バックボーン中にリン原子を保持するものや、バックボーン中にリン原子を有さないものが含まれる。本明細書の目的のため、そして当該技術分野において時々参照される場合、そのヌクレオシド間バックボーン中にリン原子を有さ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考えることができる。

30

【0032】

好ましい修飾オリゴヌクレオチドバックボーンには、たとえば、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、3'-アルキレンホスホネートおよびキラルホスホネートを含むメチルおよびその他のアルキルホスホネート、ホスフィネート、3'-アミノホスホールアミデートおよびアミノアルキルホスホールアミデートを含むホスホールアミデート、チオノホスホールアミデート、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、および正常な3'-5'結合を有するボラノホスホネート、2'-5'結合したこれらの類似体、そしてヌクレオシドユニットの隣接する塩基対が、5'-3'に対して3'-5'または5'-2'に対して2'-5'に結合する、逆向きの極性を有するもの、が含まれる。様々な塩、混合塩、そして遊離酸型も含まれる。

40

【0033】

上述したリン-含有結合の調製を教示する代表的な米国特許には、U.S.: 3,687,808 ; 4,469,863 ; 4,476,301 ; 5,023,243 ; 5,177,196 ; 5,188,897 ; 5,264,423 ; 5,276,019 ; 5,278,302 ; 5,286,717 ; 5,321,131 ; 5,399,676 ; 5,405,939 ; 5,453,496 ; 5,455,233 ; 5,466,677 ; 5,476,925 ; 5,519,126 ; 5,536,821 ; 5,541,306 ; 5,550,111 ; 5,563,253 ; 5,571,799 ; 5,587,361 ; および5,625,050が含まれるが、これらには限定されず、それらの特定のものは、本出願により一般に所有されるものであり、そして参考文献としてそのそれぞれを本

50

明細書中に援用する。

【 0 0 3 4 】

リン原子を含まない好ましい修飾オリゴヌクレオチドバックボーンは、短鎖アルキルあるいはシクロアルキルヌクレオシド間結合、混合ヘテロ原子そしてアルキルまたはシクロアルキルヌクレオシド間結合、または1またはそれ以上の短鎖ヘテロ原子またはヘテロ環式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。これらには、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；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；および混合N、O、SおよびCH₂構成要素部分を有するその他のもの、を有するものが含まれる。

10

【 0 0 3 5 】

上記のオリゴヌクレオチドの調製を教示する代表的な米国特許には、U.S.: 5,034,506 ; 5,166,315 ; 5,185,444 ; 5,214,134 ; 5,216,141 ; 5,235,033 ; 5,264,562 ; 5,264,564 ; 5,405,938 ; 5,434,257 ; 5,466,677 ; 5,470,967 ; 5,489,677 ; 5,541,307 ; 5,561,225 ; 5,596,086 ; 5,602,240 ; 5,610,289 ; 5,602,240 ; 5,608,046 ; 5,610,289 ; 5,618,704 ; 5,623,070 ; 5,663,312 ; 5,633,360 ; 5,677,437 ; および5,677,439が含まれるが、これらには限定されず、それらの特定のもは、本出願により一般に所有されるものであり、そして参考文献としてそのそれぞれを本明細書中に援用する。

20

【 0 0 3 6 】

その他の好ましいオリゴヌクレオチド模倣体において、ヌクレオチドユニットの糖およびヌクレオシド間結合の両方、すなわち、バックボーンを、新規の基により置換する。塩基ユニットは、適した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。優れたハイブリダイゼーション特性を有すると示されたそのようなオリゴマー化合物の一つであるオリゴヌクレオチド模倣体は、ペプチド核酸（PNA）とも呼ばれている。PNA化合物において、オリゴヌクレオチドの糖-バックボーンは、アミド含有バックボーン、特にアミノエチルグリシンバックボーンにより置換される。核塩基を保持し、そしてバックボーンのアミド部分のアザ窒素原子に直接的または間接的に結合する。PNA化合物の調製を教示する代表的な米国特許には、U.S.: 5,539,082 ; 5,714,331 ; および5,719,262が含まれるが、これらだけには限定されず、そのそれぞれを本明細書中に参考文献として援用する。PNA化合物のさらなる教示は、Nielsenら（Science, 1991, 254, 1497-1500）中に見出すことができる。

30

【 0 0 3 7 】

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有するオリゴヌクレオチドおよびヘテロ原子バックボーンを有するオリゴヌクレオチドであり、特に上述の米国特許5,489,677の-CH₂-NH-O-CH₂-、-CH₂-N(CH₃)-O-CH₂-〔メチレン（メチルイミノ）またはMMIバックボーン〕、-CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-、-CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-CH₂-および-O-N(CH₃)-CH₂-CH₂-〔ここで、天然のホスホジエステルバックボーンは-O-P-O-CH₂-として示される〕そして上述の米国特許5,602,240のアミドバックボーンである。上述した米国特許5,034,506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。

40

【 0 0 3 8 】

修飾オリゴヌクレオチドは、1またはそれ以上の置換糖部分も含有する。好ましいオリゴヌクレオチドは、2'位で以下のものの一つを含む：OH；F；O-、S-、またはN-アルキル；O-、S-、またはN-アルケニル；O-、S-またはN-アルキニル；またはO-アルキル-O-アルキル、ここでアルキル、アルケニルおよびアルキニルは、置換または非置換のC₁~C₁₀アルキルまたはC₂~C₁₀アルケニルおよびアルキニルでありうる。O〔(CH₂)_nO〕_mCH₃、O(CH₂)_nOCH₃、O(CH₂)_nNH₂、O(CH₂)_nCH₃、O(CH₂)_nONH₂、およびO(CH₂)_nON〔(CH₂)_nC

50

H₃)]₂、ここでnおよびmは1から約10である、が特に好ましい。その他の好ましいオリゴヌクレオチドは、2'位に以下のものの一つを含む:C₁~C₁₀の低級アルキル、置換低級アルキル、アルカリール、アラルキル、O-アルカリールまたは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、リポーター基、インターカレーター、オリゴヌクレオチドの薬物動態特性を向上するための基、またはオリゴヌクレオチドの薬理特性を向上するための基、そして同様の特性を有するその他の置換基を含む。好ましい修飾には、2'-メトキシエトキシ(2'-O-CH₂CH₂OCH₃、2'-O-(2-メトキシエチル)または2'-MOEとしても知られる)(Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504)、すなわち、アルコキシアルコキシ基が含まれる。さらに好ましい修飾には、2'-ジメチルアミノオキシエトキシ、すなわち、本明細書の以下の実施例に記載する場合、2'-DMAOEとしても知られるO(CH₂)₂ON(CH₃)₂基、そして2'-ジメチルアミノエトキシエトキシ(当該技術分野において2'-O-ジメチルアミノエトキシエチルまたは2'-DMAEOEとしても知られる)、すなわち、本明細書中の以下の実施例において2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₂)₂とも記載される、が含まれる。

【0039】

その他の好ましい修飾には、2'-メトキシ(2'-O-CH₃)、2'-アミノプロポキシ(2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂)および2'-フルオロ(2'-F)が含まれる。同様の修飾もまた、オリゴヌクレオチドのその他の位、特に3'末端ヌクレオチドまたは2'-5'結合オリゴヌクレオチド中の糖の3'位および5'末端ヌクレオチドの5'位において作製することもできる。オリゴヌクレオチドは、ペントフラノシル糖の代わりにシクロブチル部分などの糖模倣体を有する場合もある。このような修飾糖構造の調製を教示する代表的な米国特許には、U.S.: 4,981,957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,658,873; 5,670,633; および5,700,920が含まれるが、これらには限定されず、それらの特定のものは、本出願により一般に所有されるものであり、そしてそのそれぞれはその全体を参考文献として本明細書中に援用する。

【0040】

オリゴヌクレオチドには、核塩基(しばしば当該技術分野において単に“塩基”とも呼ばれる)修飾または置換も含まれうる。本明細書中に使用される場合、“非修飾”または“天然”核塩基には、プリン塩基、アデニン(A)およびグアニン(G)、そしてピリミジン塩基、チミン(T)、シトシン(C)およびウラシル(U)が含まれる。修飾核塩基には、その他の合成および天然核塩基、たとえば5-メチルシトシン(5-me-C)、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサントシン、ヒポキサントシン、2-アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの6-メチルおよびその他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの2-プロピルおよびその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-プロピニルウラシルおよびシトシン、6-アゾのウラシル、シトシンおよびチミン、5-ウラシル(シュードウラシル)、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-ヒドロキシルおよびその他の8-置換アデニンおよびグアニン、5-ハロ、特に5-プロモ、5-トリフルオロメチルおよびその他の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、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-デアザアデニンおよび3-デアザグアニンおよび3-デアザアデニンが含まれる。さらなる核塩基には、米国特許No. 3,687,808に開示されたもの、Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859、Kroschwitz, J.I., ed. John Wiley & Sons, 1990に開示されたもの、Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613に開示されたもの、そしてSanghvi, Y.S., Chapter 15, Antisense Research and Applications, pages 289-302, Crooke, S.T. and Lebleu, B., ed., CRC Press, 1993により開示されたもの、が含まれる。これらの核塩基の特定のものは、本発明のオリゴマー化合物の結合親和性を増加させるために特に有用である。これらには、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含む、5-置換ピリミジン、6-アザピリミジンおよびN-2、N-6および0-6置換プリンが含まれる。5-メチルシトシン置換は、核酸二重鎖安定性を0.6~1.2 増加させることが示され (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. and Lebleu, B., eds., *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278)、そして現在は好ましい塩基置換であり、2'-O-メトキシエチル糖修飾と組み合わせた場合にさらにより特に好ましい。

【0041】

上述した修飾核塩基の特定のものおよびその他の修飾核塩基の調製を教示する代表的な米国特許には、上述したU.S. 3,687,808、およびU.S.: 4,845,205 ; 5,130,302 ; 5,134,066 ; 5,175,273 ; 5,367,066 ; 5,432,272 ; 5,457,187 ; 5,459,255 ; 5,484,908 ; 5,502,177 ; 5,525,711 ; 5,552,540 ; 5,587,469 ; 5,594,121 ; 5,596,091 ; 5,614,617 ; および5,681,941 が含まれるが、これらには限定されず、それらの特定のものは、本出願により一般に所有されるものであり、そしてそのそれぞれは参考文献として本明細書中に援用し、そして米国特許5,750,692が含まれ、これは本出願により一般に所有されるものであり、そして参考文献として本明細書中に援用する。

【0042】

本発明のオリゴヌクレオチドのその他の修飾には、オリゴヌクレオチドの活性、細胞分布、または細胞取り込みを向上する、化学的にオリゴヌクレオチドに結合する1またはそれ以上の部分または複合体が含まれる。そのような部分には、脂質部分、たとえばコレステロール部分 (Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86, 6553-6556)、コール酸 (Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4, 1053-1060)、チオエーテル、たとえば、ヘキシル-S-トリチルチオール (Manoharan et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660, 306-309; Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3, 2765-2770)、チオコレステロール (Oberhauser et al., *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20, 533-538)、脂肪族鎖、たとえば、ドデカンジオールまたはウンデシル残基 (Saison-Behmoaras et al., *EMBO J.*, 1991, 10, 1111-1118; Kabanov et al., *FEBS Lett.*, 1990, 259, 327-330; Svinarchuk et al., *Biochimie*, 1993, 75, 49-54)、リン脂質、たとえば、ジ-ヘキサデシル-rac-グリセロールまた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 et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36, 3651-3654; Shea et al., *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18, 3777-3783)、ポリアミンまたはポリエチレングリコール鎖 (Manoharan et al., *Nucleosides & Nucleoside*, 1995, 14, 969-973)、またはアダマンタン酢酸 (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36, 3651-3654)、パルミチル部分 (Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264, 229-237)、またはオクタデシルアミンまたはヘキシルアミノ-カルボニル-オキシコレステロール部分 (Crooke et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277, 923-937) が含まれるが、これらには限定されない。

【0043】

この様なオリゴヌクレオチド複合体の調製を教示する代表的な米国特許には、U.S.: 4,828,979 ; 4,948,882 ; 5,218,105 ; 5,525,465 ; 5,541,313 ; 5,545,730 ; 5,552,538 ; 5,578,717 ; 5,580,731 ; 5,580,731 ; 5,591,584 ; 5,109,124 ; 5,118,802 ; 5,138,045 ; 5,414,077 ; 5,486,603 ; 5,512,439 ; 5,578,718 ; 5,608,046 ; 4,587,044 ; 4,605,735 ; 4,667,025 ; 4,762,779 ; 4,789,737 ; 4,824,941 ; 4,835,263 ; 4,876,335 ; 4,904,582 ; 4,958,013 ; 5,082,830 ; 5,112,963 ; 5,214,136 ; 5,082,830 ; 5,112,963 ; 5,214,136 ; 5,245,022 ; 5,254,469 ; 5,258,506 ; 5,262,536 ; 5,272,250 ; 5,292,873 ; 5,317,098 ; 5,371,241 ; 5,391,723 ; 5,416,203 ; 5,451,463 ; 5,510,475 ; 5,512,667 ; 5,514,785 ; 5,565,552 ; 5,567,810 ; 5,574,142 ; 5,585,481 ; 5,587,371 ; 5,595,726 ; 5,597,696 ; 5,599,923 ; 5,599,928 および 5,688,941 が含まれるが、これらには限定されず、それらの特定のものは、本出願により一般に所有されるものであり、そしてそのそれぞれは参考文献として本明細書中に援用される。

【0044】

所定の化合物中のすべての位置を均一に修飾されることが必要とはされず、そして実際に、一つ以上の上述した修飾を、単一の化合物中あるいはオリゴヌクレオチド中の単一のヌクレオシドにおいても組み込むことができる。本発明には、キメラ化合物であるアンチセンス化合物も含まれる。本発明の文脈において、“キメラ”アンチセンス化合物または“キメラ”は、2つまたはそれ以上の化学的に特徴的な領域を含有するアンチセンス化合物、特にオリゴヌクレオチドであり、それぞれが少なくとも一つのモノマーユニット、すなわち、オリゴヌクレオチド化合物の場合にヌクレオチドから形成される。これらのオリゴヌクレオチドは、典型的には少なくとも一つの領域を含有し、ここでオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドに対して、増加したヌクレアーゼ分解耐性、増加した細胞取り込みおよび/または標的核酸に対する増加した結合親和性を付与するように、修飾される。オリゴヌクレオチドの追加の領域は、RNA:DNAまたはRNA:RNAハイブリッドを切断することができる酵素に対する基質として働くことができる。例を挙げると、RNase Hは、RNA:DNA二重鎖のRNA鎖を切断する、細胞性のエンドヌクレアーゼである。RNase Hの活性化により、したがって、結果としてRNA標的の切断を引き起こし、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非常に向上させる。結果として、キメラオリゴヌクレオチドを使用する場合に、同一の標的領域に対して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の場合と比較して、しばしばより短いオリゴヌクレオチドにより匹敵する結果を得ることができる。RNA標的の切断は、ゲル電気泳動により、そして必要な場合には当該技術分野において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、日常的に検出することができる。

【0045】

本発明のキメラアンチセンス化合物は、2つまた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/または上述したオリゴヌクレオチド模倣体の混成の構造として形成することができる。このような化合物は、当該技術分野においてハイブリッドまたはギャップマーとも呼ばれている。このようなハイブリッド構造の調製を教示する代表的な米国特許には、U.S.: 5,013,830; 5,149,797; 5,220,007; 5,256,775; 5,366,878; 5,403,711; 5,491,133; 5,565,350; 5,623,065; 5,652,355; 5,652,356; および5,700,922が含まれるが、これらには限定されず、それらの特定のものは、本出願により一般に所有されるものであり、そしてそのそれぞれは全体として参考文献として本明細書中に援用される。

【0046】

本発明に従って使用されるアンチセンス化合物は、周知の固相合成技術を介して、容易にそして日常的に作製することができる。このような合成のための装置は、たとえばApplied Biosystems (Foster City, CA) を含むいくつかの供給者により販売されている。このような合成のための当該技術分野において既知のいずれかその他の手段を、追加的にまたは代替的に使用することができる。同様な技術を使用してホスホロチオエートおよびアルキル化誘導体などのオリゴヌクレオチドを調製することは周知である。

【0047】

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またはアンチセンス分子の*in vivo*合成を指向するように設計された遺伝子ベクター構築物を含まない。

【0048】

本発明の化合物を、取り込み、分布および/または吸収を助けるために、たとえば、リボソーム、受容体標的化分子、経口、直腸、局所またはその他の製剤として、混合し、カプセル化し、複合体化することができ、またはそうでなければ、その他の分子、分子構造、または化合物の混合物と結合させてもよい。そのような取り込み、分布および/または吸収を助ける製剤の調製を教示する代表的な米国特許には、U.S.: 5,108,921; 5,354,844; 5,416,016; 5,459,127; 5,521,291; 5,543,158; 5,547,932; 5,583,020; 5,591,721; 4,426,330; 4,534,899; 5,013,556; 5,108,921; 5,213,804; 5,227,170; 5,264,221; 5,356,633; 5,395,619; 5,416,016; 5,417,978; 5,462,854; 5,469,854; 5,512,295; 5,527,528

; 5,534,259 ; 5,543,152 ; 5,556,948 ; 5,580,575 ; および5,595,756が含まれるが、それらには限定されず、そのそれぞれを参考文献として本明細書中に援用する。

【 0 0 4 9 】

本発明のアンチセンス化合物は、いずれかの医薬的に許容可能な塩、エステル、またはそのようなエステルの塩、またはヒトを含む動物に投与する際にその生物学的に活性な代謝物または残留物を（直接的にまたは間接的に）提供することができるいずれか他の化合物を包含する。したがって、たとえば、開示から、プロドラッグおよび医薬的に許容可能な本発明の化合物の塩、そのプロドラッグの医薬的に許容可能な塩、およびその他の生物学的等価物も導き出される。

【 0 0 5 0 】

用語“プロドラッグ”は、内在性の酵素またはその他の化学物質および/または条件の作用により、その体内または細胞内で活性化型（すなわち、薬物）に変換される、不活性型で調製される治療剤のことを示す。特に、本発明のオリゴヌクレオチドのプロドラッグ版は、GosselinらのWO 93/24510（1993年12月9日に発行）またはImbachらのWO 94/26764およびU.S. 5,770,713に開示された方法に従うSATE〔（S-アセチル-2-チオエチル）ホスフェート〕誘導体として調製される。

【 0 0 5 1 】

用語“医薬的に許容可能な塩”とは、生理学的または医薬的に許容可能な本発明の化合物の塩：すなわち、親化合物の所望の生物学的活性を保持し、そしてそれについての所望しない毒性効果を与えない塩のことをいう。

【 0 0 5 2 】

医薬的に許容可能な塩基付加塩は、金属またはアミン、たとえばアルカリおよびアルカリ土類金属または有機アミンなどにより形成される。カチ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。適したアミンの例は、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（たとえば、Berge et al., “Pharmaceutical Salts,” J. of Pharma Sci., 1977, 66, 1-19を参照）である。前記酸性化合物の塩基付加塩は、遊離酸型を十分な量の所望の塩基と接触させて、共有結合様式で塩を生成することにより、調製する。遊離酸型は、塩型を酸と接触させることにより、そして遊離酸を従来の様式で単離することにより、再生することができる。遊離酸型は、そのそれぞれの塩型とは、極性溶媒中への溶解性などの特定の生理学的特性においていくらか異なっているが、しかしそれ以外は、本発明の目的のためには、塩はそれらそれぞれの遊離酸と等価である。本明細書中で使用される場合、“医薬的な付加塩”には、本発明の組成物の構成要素の一つの酸型の医薬的に許容可能な塩が含まれる。これらには、アミンの有機酸塩または無機酸塩が含まれる。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。その他の適した医薬的に許容可能な塩は、当業者に周知であり、そして様々な無機酸および有機酸の塩基性塩が含まれ、たとえば、無機酸を有するものとしては、たとえば塩酸、臭化水素酸、硫酸またはリン酸など；有機酸を有するものとしてはカルボン酸、スルホン酸、スルホ酸またはリン酸またはN-置換スルファミン酸、たとえば酢酸、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、ケイ皮酸、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、エンボン酸（embonic acid）、ニコチン酸またはイソニコチン酸；そしてアミノ酸を有するものとしては、本来はタンパク質の合成に関連する20個のα-アミノ酸、たとえばグルタミン酸、またはアスパラギン酸など、そしてまた、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-または3-ホスホグリセリン酸、グルコース-6-ホスフェート、N-シクロヘキシルスルファミン酸（シクラメートの形成を伴う）を有するもの、

10

20

30

40

50

またはその他の酸有機化合物、たとえば、アスコルビン酸などを有するものが含まれる。化合物の医薬的に許容可能な塩もまた、医薬的に許容可能なカチオンにより調製することができる。適した医薬的に許容可能なカチオンは、当業者に周知であり、そしてアルカリ、アルカリ土類、アンモニウムおよび第四アンモニウムカチオンが含まれる。炭酸塩または炭酸水素塩もまた可能である。

【0053】

オリゴヌクレオチドについて、医薬的に許容可能な塩の好ましい例には、(a) ナトリウム、カリウム、アンモニウム、マグネシウム、カルシウム、スベルミンおよびスベルミンなどのポリアミンなどのカチオンにより形成される塩；(b) 無機酸、たとえば塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、硝酸などにより形成される酸付加塩；(c) 有機酸、たとえば酢酸、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により形成される塩；そして(d) 塩素、臭素、およびヨウ素などの元素アニオンから形成される塩；が含まれるが、これらには限定されない。

10

【0054】

本発明のアンチセンス化合物は、診断薬、治療薬、予防薬、そして研究用試薬およびキットとして使用することができる。治療薬として、クラスタリンの発現をモジュレートすることにより治療することができる疾患または症状を有することが疑われる動物、好ましくはヒトを、本発明に従うアンチセンス化合物を投与することにより治療する。本発明の化合物を、有効量のアンチセンス化合物に適した医薬的に許容可能な希釈剤または担体に添加することにより、医薬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、たとえば、感染、炎症または腫瘍形成を予防または遅延させるためにも有用である場合がある。

20

【0055】

これらの化合物がクラスタリンをコードする核酸に対してハイブリダイズし、この事実を探求するためにサンドイッチアッセイおよびその他のアッセイを容易に構築することができるため、本発明のアンチセンス化合物は、研究用としてそして診断薬として有用である。本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドのクラスタリンをコードする核酸とのハイブリダイゼーションは、当該技術分野において既知の手段により検出することができる。このような手段には、オリゴヌクレオチドに対する酵素の複合化、オリゴヌクレオチドの放射標識またはいずれかその他の適した検出手段を含むことができる。サンプル中のクラスタリンのレベルを検出するためのこの様な検出手段を使用するキットもまた、調製することができる。

30

【0056】

本発明にはまた、本発明のアンチセンス化合物を含む医薬組成物および製剤が含まれる。本発明の医薬組成物は、局所治療または全身治療が所望されるかどうか、そして治療すべき領域に依存して、多数の方法により投与することができる。投与は、局所（眼を含み、および膣および直腸送達を含む粘膜に対するものを含む）、肺、たとえば、ネブライザーによるものを含む、粉末またはエアロゾルの吸入または吹き込みによるもの；気管内、鼻内、表皮、および経皮）、経口または非経口により行うことができる。非経口投与には、静脈内、動脈内、皮下、腹腔内または筋肉内の注射または注入；または頭蓋内、たとえば、くも膜下投与または脳室内投与が含まれる。少なくとも一つの2'-O-メトキシエチル修飾を有するオリゴヌクレオチドは、経口投与のために特に有用であると考えられている。

40

【0057】

局所投与のための医薬組成物および製剤には、経皮パッチ、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、ドロップ、滴剤、坐剤、スプレー剤、液剤、および粉剤が含まれる。従来からの医薬的な担体、液体、粉末または油状基材、増粘剤などは、必要とされるかまたは所望される場合がある。コートしたコンドーム、手袋などもまた有用である。

50

【0058】

経口投与のための組成物および製剤には、粉末または顆粒、懸濁剤または水溶液または非水性媒体中溶液、カプセル、サシェ、または錠剤などが含まれる。増粘剤、着香剤、希釈剤、乳化剤、分散助剤または結合剤が好ましい場合がある。

【0059】

非経口投与、くも膜下投与または脳室内投与のための組成物および製剤には、バッファー、希釈剤およびその他の適した添加物、たとえば浸透亢進剤、担体化合物、およびその他の医薬的に許容可能な担体または賦形剤もまた含有しうる、滅菌水溶液が含まれうる。

【0060】

本発明の医薬組成物には、溶液、エマルジョン、およびリポソーム含有製剤が含まれるが、これらには限定されない。これらの組成物は、既成液体、自己乳化性固体そして自己乳化性半固体が含まれる、様々な構成要素から生成することができるが、これらには限定されない。

【0061】

単位用量剤形中に容易に提供ことができる本発明の医薬製剤は、医薬業界において周知の従来技術にしたがって調製することができる。このような技術には、活性有効成分と1または複数の医薬的担体または1または複数の医薬的賦形剤とを組み合わせる工程が含まれる。一般的には、均質にそして緊密に、活性有効成分と液体担体または正確に分割した固体担体またはその両方と組み合わせ、その後必要とされる場合には生成物を成型することにより、製剤を調製する。

【0062】

本発明の組成物は、たとえば錠剤、カプセル、液体シロップ、軟ゲル、坐剤、および浣腸剤などの、しかしこれらには限定されない、多くの可能性のある用量剤形のいずれか中に製剤化することができる。本発明の組成物はまた、水性媒体、非水性媒体または混合媒体中の懸濁剤として製剤化することもできる。水性懸濁剤はさらに、たとえば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトールおよび/またはデキストランを含む懸濁剤の粘度を上昇させる物質を含有してもよい。懸濁剤はまた、安定化剤を含有していてもよい。

【0063】

本発明の一態様において、医薬組成物を製剤化し、そして泡状物として使用することができる。医薬的な泡状物には、エマルジョン、マイクロエマルジョン、クリーム剤、ジェリー剤、およびリポソーム剤などの製剤を含むが、これらのものには限定されない。その性質において基本的に同様である一方、これらの製剤は、最終生成物の構成要素および密度において変化する。このような組成物および製剤の調製は、一般的に医薬および製剤の分野における当業者に知られており、そして本発明の組成物の製剤に対して適用することができる。

【0064】

エマルジョン

本発明の組成物は、エマルジョンとして調製しそして製剤化することができる。エマルジョンは、通常は直径0.1 μm を超える液滴の形状で、一つの液体を別の液体中に分散させた典型的には不均質の系である (Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199; Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Volume 1, p. 245; Block in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 2, p. 335; Higuchi et al., in *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1985, p. 301)。エマルジョンは、しばしば、互いに十分に混合され分散された2種の不混和性の液体相を含む二相システムである。一般的には、エマルジョンは、油中水型の種 (w/o) または水中油型の種 (o/w) のいずれかでありうる。液体相がバルクな油相中によく分離され微小滴として分散さ

10

20

30

40

50

れている場合、得られた組成物を油中水型 (w/o) エマルジョンと呼ぶ。あるいは、油相がバルクな液体相中によく分離され微小滴として分散されている場合、得られた組成物を水中油型 (o/w) エマルジョンと呼ぶ。エマルジョンは、分散相と、液体相、油相のいずれか中に溶液としてあるいは別々の相としてそれ自体として存在していてもよい活性な薬物と、に加えて、さらに要素を包含していてもよい。乳化剤、安定化剤、色素、および抗酸化剤などの医薬的な賦形剤が、必要に応じてエマルジョン中に存在していてもよい。医薬的なエマルジョンは、たとえば、油中水中油型 (o/w/o) および水中油中水型 (w/o/w) エマルジョンの場合のような、2種以上の相を含む、マルチエマルジョンであってもよい。このような複合製剤は、しばしば、単なる2成分のエマルジョンでは得られない、特定の利点を提供する。o/wエマルジョンの個々の油滴が小さな水滴を含むマルチエマルジョンは、w/o/wエマルジョンを構成する。同様に、油性の連続相中に安定化された水の小球中に含まれる油滴のシステムは、o/w/oエマルジョンを提供する。

10

【0065】

エマルジョンは、熱力学的安定性をほとんど有さないかまたはまったく有さないことにより特徴付けられる。しばしば、エマルジョンの分散相または不連続相が、外部相または連続相中に十分に分散され、そして乳化剤の手段または製剤の粘性を介してこの形態に維持される。エマルジョンの相のいずれかは、エマルジョン-型軟膏基材およびクリームの場合の様に、半固体または固体であってもよい。エマルジョンを安定化するその他の手段には、エマルジョンのいずれかの相中に含まれてもよい、乳化剤を使用することが含まれる。乳化剤は、大きく4つのカテゴリーに分類される場合がある：合成サーファクタント、天然に存在する乳化剤、吸着基材、そして精密に分散された固体、である (Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199)。

20

【0066】

合成サーファクタントは、界面活性剤としても知られているが、エマルジョンの製剤化において幅広い有用性が見出されており、そして文献においてもレビューされている (Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, volume 1, p. 199)。サーファクタントは、典型的には、両親媒性であり、そして親水性部分と疎水性部分とを含む。サーファクタントの疎水性の性質に対する親水性の性質の比率は、親水性/親油性バランス (HLB) と呼ばれ、そして製剤の調製においてサーファクタントを分類しそして選択する際の貴重なツールである。サーファクタントは、親水性基の性質に基づいて別のクラスに分類される場合がある：非イオン性、アニオン性、カチオン性、および両性 (Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285)。

30

【0067】

エマルジョン製剤中で使用される天然に存在する乳化剤には、ラノリン、密ロウ、ホスファチド類、レシチンおよびアカシアが含まれる。吸着基材は、水を吸収して、w/oエマルジョンを形成するが、それでもそれらの半固体の硬さを維持するような、親水性特性を有し、たとえば無水ラノリンおよび親水性ワセリンがある。精密に分散された固体もまた、よい乳化剤として、特にサーファクタントと組み合わせて、そして粘着性の調製物中で使用された。これらには、重金属水酸化物；ペントナイト、アタパルガイト、ヘクトライト (hectorite)、カオリン、モンモリロン石、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などの非膨張性クレー；色素；および炭素またはトリステアリン酸グリセリンなどの非極性固体；などの極性の無機固体が含まれる。

40

【0068】

非常に様々な非-乳化性物質もまた、エマルジョン製剤中に含まれ、そしてエマルジョンの特性に寄与する。これらには、脂質、油、ロウ、脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪エステ

50

ル、保水剤 (humectants)、親水性コロイド、保存剤および抗酸化剤が含まれる (Block, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199)。

【0069】

親水性コロイドまたは親水コロイドには、多糖類 (たとえば、アカシア、寒天、アルギン酸、カラギーナン、グアルガム (guar gum)、インドゴム (karaya gum)、そしてトラガカント)、セルロース誘導体 (たとえば、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)、そして合成ポリマー (たとえば、カルボマー (carbomers)、セルロースエーテル、およびカルボキシビニルポリマー) などの、天然に存在するガムおよび合成のポリマーが含まれる。これらは、水中で分散しあるいは膨張して、強力な界面フィルムを分散相の滴の周囲に形成し、そして外部相の粘性を増大させることにより、エマルジョンを安定化させるコロイド溶液を形成する。

10

【0070】

エマルジョンはしばしば、微生物の増殖をすぐにサポートすることができる、炭水化物、タンパク質、ステロール、およびホスファチドなどの多数の活性物質を含有するため、これらの製剤はしばしば保存剤を含む。エマルジョン製剤中に含まれる一般的に使用される保存剤には、メチルパラベン、プロピルパラベン、第4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、そしてホウ酸が含まれる。抗酸化剤もまた、一般的にエマルジョン製剤に添加して、製剤の変質を防止する。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 (alkyl gallates)、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、またはアスコルビン酸およびメタ重亜硫酸ナトリウムなどの還元剤などのフリーラジカルスカベンジャー、およびクエン酸、酒石酸、およびレシチンなどの抗酸化剤シナジストであってもよい。

20

【0071】

外皮経路、経口経路、および非経口経路を介するエマルジョン製剤の使用およびそれらの製造のための方法は、文献中でレビューされてきた (Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199)。経口送達のためのエマルジョン製剤は、製剤化が容易であり吸収および生物学的適合性の観点から効率的であるため、非常に幅広く使用されてきた (Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199)。ミネラル油-ベースの緩下剤、油溶性ビタミンおよび高脂肪栄養調製物は、一般的に、o/wエマルジョンとして経口的に投与される物質に含まれる。

30

【0072】

本発明の一態様において、オリゴヌクレオチドと核酸の組成物は、マイクロエマルジョンとして製剤化される。マイクロエマルジョンは、水、油および単一の、光学的に等方性な、そして熱力学的に安定な液体溶液である両親媒性物質、のシステムとして定義されうる (Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245)。典型的には、マイクロエマルジョンは、まず油を水溶性サーファクタント溶液中に分散させ、そしてついで一般的には中間鎖長アルコールである十分量の第4の構成要素を添加して、透明なシステムを形成することにより、調製されるシステムである。したがって、マイクロエマルジョンは、界面活性分子の界面フィルムにより安定化される2種の不混和性の液体の、熱力学的に安定で、等方性な、透明の分散物質としても記載された (Leung and Shah, in: *Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems*, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, pages 185-215)。マイクロエマルジョンは、一般的には、

40

50

油、水、サーファクタント、コサーファクタントおよび電解質を含む、3～5種の構成要素を組み合わせることにより調製される。マイクロエマルジョンが油中水型(w/o)であるかあるいは水中油型(o/w)であるかは、使用される油およびサーファクタントの特性に依存し、そしてサーファクタント分子の構造のその極性頭部と炭化水素尾部の幾何学的な畳み込みに依存する(Schott, in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1985, p. 271)。

【0073】

相ダイアグラムを使用した現象学的アプローチが広く研究され、そしてマイクロエマルジョンを製剤化するための方法についての、当業者に対する、包括的な知識が得られた(Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Block, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335)。従来のエマルジョンと比較して、マイクロエマルジョンは、自発的に形成される熱力学的に安定な小滴の製剤において、水-不溶性薬物を可溶化するという利点を提供する。

【0074】

マイクロエマルジョンの調製に使用されるサーファクタントには、イオン性サーファクタント、非-イオン性サーファクタント、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プレート(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クイオレエート(sequi oleate)(SO750)、デカグリセロールデカオレエート(DA0750)、が、単独であるいはコサーファクタントと組み合わせて含まれるが、これらには限定されない。コサーファクタントは、通常はエタノール、1-プロパノール、および1-ブタノールなどの短鎖アルコールであるが、サーファクタントフィルム中に浸透し、そして結果的にはサーファクタント分子のあいだで生成される空隙スペースのために不規則なフィルムを作製することにより、界面流動度を増大させるために働く。しかしながら、マイクロエマルジョンは、コサーファクタントを使用することなく調製することができ、そしてアルコールフリーの自己乳化マイクロエマルジョンシステムが当該技術分野において知られている。水相は、典型的には、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であってもよいが、これらのものには限定されない。油相には、Captex 300、Captex 355、Capmul MCM、脂肪酸エステル、中間鎖(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、ポリ糖化(glycolized)グリセリド、飽和ポリ糖化(glycolized)C8-C10グリセリド、植物油およびシリコーン油などの物質が含まれるが、これらのものには限定されない。

【0075】

マイクロエマルジョンは、薬物溶解性および薬物の吸収亢進の観点から、特に興味深いものである。脂質ベースのマイクロエマルジョン(o/wおよびw/oの両方)は、ペプチドを含む薬物の経口生物学的適合性を亢進させると提唱された(Constantinides et al., Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol., 1993, 13, 205)。マイクロエマルジョンは、薬物溶解性の向上、酵素的加水分解からの薬物の保護、膜流動度および膜透過性におけるサーファクタント-誘導性変化による薬物吸収の亢進の可能性、調製の容易性、固体用量剤形を超える経口投与の容易性、臨床的可能性の向上、および毒性の低減といった利点を提供する(Constantinides et al., Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385; Ho et al., J. Pharm. Sci., 1996, 85, 138-143)。それらの構成要素を周囲温度において一緒にしておく、しばしば、マイクロエマルジョンが自発的に形成される場合がある。このことは、易熱性(熱不安定性)薬物、ペプチドまたはオリゴヌクレオチドを製剤化する際に、特に利点でありうる。マイクロ

10

20

30

40

50

エマルジョンは、美容用途および医薬用との両方において、活性構成要素の経皮的送達においても有効であった。本発明のマイクロエマルジョン組成物および製剤は、胃腸管からのオリゴヌクレオチドおよび核酸の全身性吸収の増加を促進し、および胃腸管、膣、口腔 (buccal cavity) およびその他の投与領域中で、オリゴヌクレオチドおよび核酸の局所的細胞取り込みを向上させることができる。

【 0 0 7 6 】

本発明のマイクロエマルジョンはまた、ソルビタンモノステアレート (Grill 3)、ラブラゾル (Labrasol)、および浸透亢進剤などの追加の構成要素および添加剤を含有して、製剤の特性を向上させ、そして本発明のオリゴヌクレオチドおよび核酸の吸収を亢進させることもできる。本発明のマイクロエマルジョン中で使用される浸透亢進剤は、5つの幅広いカテゴリーのうちの一つに属するものとして分類することができる：サーファクタント、脂肪酸、胆汁酸、キレート剤、および非-キレート非-サーファクタント (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92)。これらのクラスのそれぞれは、上述した。

【 0 0 7 7 】

リポソーム

マイクロエマルジョン以外に、薬物の製剤化のために研究されそして使用された、多くの有機 (organized) サーファクタント構造が存在する。これらには、単層、ミセル、二重層および小胞が含まれる。小胞、たとえばリポソーム、は、薬物送達の観点からそれらが提供する、その特異性および作用期間により、大きな興味をひきつけた。本明細書中で使用される場合、“リポソーム”という用語は、球状の1または複数の二重層中に配置された、両親媒性脂質からなる小胞を意味する。

【 0 0 7 8 】

リポソームは、親油性物質から形成される膜および水性の内部を有する、単一ラメラ小胞またはマルチラメラ小胞である。水性部分には、送達すべき組成物が含有される。カチオン性リポソームは、細胞壁と融合することができるという利点を有する。非-カチオン性リポソームは、細胞壁とは効率的に融合することができないものの、マクロファージにより *in vivo* において取り込まれる。

【 0 0 7 9 】

無傷のほ乳動物皮膚を通過するために、脂質小胞は、適切な経皮的勾配の影響のもと、それぞれが直径50 nm未満であるような一連の微細な孔を通過しなければならない。したがって、高度に変形しやすくそしてそのような微細な孔を通過することができるリポソームを使用することが好ましい。

【 0 0 8 0 】

リポソームのさらなる利点には、以下のものが含まれる；天然のリン脂質から得られたリポソームは、生物学的適合性であり、そして生体分解性なものである；リポソームは、幅広い水溶性薬物および脂質可溶性薬物を含むことができる；リポソームは、その内部コンパートメント中のカプセル化した薬物を代謝および分解から保護することができる (Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245)。リポソーム製剤の調製において考慮すべき重要事項は、脂質表面荷電、小胞サイズ、そしてリポソームの水容積である。

【 0 0 8 1 】

リポソームは、活性成分を作用部位に移送および送達するために有用である。リポソーム膜は、構造的に生体膜と類似しているため、リポソームを組織に使用する場合には、リポソームを細胞膜に溶け込ませるようにはじめる。リポソームと細胞の溶融が進行するにつれて、リポソーム内容物は、活性剤が作用することができる細胞中へ移る。

【 0 0 8 2 】

リポソーム製剤は、多くの薬物についての送達様式として、幅広い研究の焦点である。局所投与のために、リポソームは、他の製剤を超えるいくつかの利点を提供するという証拠

10

20

30

40

50

がますます多くなっている。このような利点には、投与された薬物の高い全身性吸収に関連した副作用の減少、所望される標的での投与された薬物の蓄積の増加、そして親水性および疎水性の両方の様々な薬物を皮膚中に投与する能力、が含まれる。

【0083】

いくつかの報告は、リポソームが高分子量DNAを含む薬剤を皮膚中に送達する能力について詳細に説明した。鎮痛剤、抗体、ホルモンおよび高分子量DNAを含む化合物を、皮膚に投与した。投与の多くは、結果として外皮の上部を標的とした。

【0084】

リポソームは、2つの幅広いクラスに分けられる。カチオン性リポソームは、マイナス(-)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、プラス(+)に荷電したリポソームである。プラスに荷電したDNA/リポソーム複合体は、マイナスに荷電した細胞表面に結合し、そしてエンドソーム中に内部化される。エンドソーム中の酸性pHにより、リポソームは破裂し、その内容物を細胞質中に放出する(Wang et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1987, 147, 980-985)。

【0085】

pH-感受性あるいはマイナスに荷電したリポソームは、DNAと複合体を形成するというよりは、DNAを捕捉する。DNAおよび脂質の両方が同様に荷電するため、複合体の形成ではなく反発(repulsion)が生じる。それにもかかわらず、いくつかのDNAは、これらのリポソームの水性内部中に捕捉される。pH-感受性リポソームを使用して、チミジンキナーゼ遺伝子をコードするDNAを培養中の細胞単層に送達させた。外来性遺伝子の発現が、標的細胞中で検出された(Zhou et al., Journal of Controlled Release, 1992, 19, 269-274)。

【0086】

リポソーム組成物の1つの主要な型には、天然由来のホスファチジルコリン以外のリン脂質が含まれる。天然のリポソーム組成物は、たとえば、ジミリスチルホスファチジルコリン(DMPC)またはジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)から形成することができる。アニオン性リポソーム組成物は、一般的に、ジミリスチルホスファチジルグリセロールから形成されるが、一方でアニオン性フソジェニックな(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。リポソーム組成物の別の型は、たとえば、ダイズホスファチジルコリン(PC)、およびタマゴPCなどのPCから形成される。別の型は、リン脂質および/またはホスファチジルコリンおよび/またはコレステロールの混合物から形成される。

【0087】

いくつかの研究では、皮膚へのリポソーム薬剤製剤の局所投与が評価された。インターフェロンを含有するリポソームをモルモット皮膚に対して使用すると、結果として皮膚のヘルペス潰瘍が減少したが、その他の手段(たとえば溶液またはエマルジョン)を介してインターフェロンの送達をしても有効ではなかった(Weiner et al., Journal of Drug Targeting, 1992, 2, 405-410)。さらに、別の研究は、水性システムを用いた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したインターフェロンの効率を試験し、そしてリポソーム製剤は水性投与よりも優れていると結論付けた(du Plessis et al., Antiviral Research, 1992, 18, 259-265)。

薬物の皮膚への送達におけるその有用性を決定するために、非-イオン性リポソームシステム、特に、非-イオン性サーファクタントおよびコレステロールを含むシステムを調べた。Novasome™ 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Novasome™ 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)を含む非-イオン性リポソーム製剤を使用して、シクロスポリン-Aをマウス皮膚の真皮中に送達した。結果から、このような非-イオン性リポソームシステムは、シクロスポリン-Aが皮膚の別の層中に沈着することを促進する際に効果的であることが示された(Hu et al. S.T.P. Pharma. Sci., 1994, 4, 6, 466)。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 8 】

リポソームには、“立体化学的に安定な”リポソームも含まれるが、この用語は本明細書中で使用される場合、1またはそれ以上の特殊な(specialized)脂質であって、リポソーム中に取り込まれた場合、そのような特殊な脂質を含まないリポソームと比較して、循環血中での寿命が長くなる脂質、を含むリポソームのことをいう。立体化学的に安定なリポソームの例は、リポソームの小胞-形成性脂質部分の一部が、(A)モノシアロガングリオシド G_{M1} などの1またはそれ以上の糖脂質を含むか、または(B)ポリエチレングリコール(PEG)部分などの1またはそれ以上の親水性ポリマーにより誘導体化されている、ものがある。いずれかの具体的な理論に縛られることを望むわけではないが、当該技術分野においては、ガングリオシド、スフィンゴミエリン、またはPEG-誘導体化脂質を含有する少なくとも立体化学的に安定なリポソームについて、これらの立体化学的に安定なリポソームの循環系での半減期が増加しているのは、細網内皮系(RES)の細胞中への取り込みが減少したことに由来すると考えられている(Allen et al., FEBS Letters, 1987, 223, 42; Wu et al., Cancer Research, 1993, 53, 3765)。

10

【 0 0 8 9 】

1またはそれ以上の糖脂質を含む様々なリポソームが、当該技術分野において既知である。Papahadjopoulosら(Ann. N.Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64)は、モノシアロガングリオシド G_{M1} 、硫酸ガラクトセブレロシドおよびホスファチジルイノシトールがリポソームの血中半減期を向上させる能力を報告した。これらの知見は、Gabizonら(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, 85, 6949)により述べられた。米国特許No. 4,837,028およびWO 88/04924は、両方ともAllenらによるものであるが、(1)スフィンゴミエリンおよび(2)ガングリオシド G_{M1} または硫酸ガラクトセブレロシドエステル、を含むリポソームを開示する。米国特許No. 5,543,152(Webbら)は、スフィンゴミエリンを含むリポソームを開示する。1,2-sn-ジミリスチルホスファチジルコリンを含むリポソームは、WO 97/13499(Limら)中に開示されている。

20

【 0 0 9 0 】

1またはそれ以上の親水性ポリマーにより誘導体化された脂質を含む多くのリポソーム、およびその製造方法は、当該技術分野において既知である。Sunamotoら(Bull. Chem. Soc. Jpn., 1980, 53, 2778)は、PEG部分を含有する非イオン性界面活性剤、 $2C_{12}15G$ 、を含むリポソームを記載した。Illumら(FEBS Lett., 1984, 167, 79)は、ポリスチレン粒子のポリマーグリコールによる親水性コーティングが、血中半減期の顕著な増加を引き起こすことに注目した。ポリアルキレングリコール(たとえば、PEG)のカルボン酸(carboxylic)基の結合により修飾された合成リン脂質は、Searsにより記載されている(米国特許Nos. 4,426,330および4,534,899)。Klibanovら(FEBS Lett., 1990, 268, 235)は、PEGまたはステアリン酸PEGにより誘導体化されたホスファチジルエタノールアミン(PE)を含むリポソームは、血液循環中での半減期が顕著に増加することを示す実験を記載した。Blumeら(Biochimica et Biophysica Acta, 1990, 1029, 91)は、そのような知見をその他のPEG-誘導体化リン脂質、たとえば、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン(DSPE)およびPEGの組み合わせから形成されるDSPE-PEG、に拡張した。共有結合したPEG部分をその外側表面に有するリポソームは、Fisherに対する欧州特許No. EP 0 445 131 B1およびWO 90/04384中に記載される。PEGにより誘導体化された1~20モル%のPEを含有するリポソーム組成物、およびその使用方法は、Woodleら(米国特許Nos. 5,013,556および5,356,633)およびMartinら(米国特許No. 5,213,804および欧州特許No. EP 0 496 813 B1)により記載される。多数のその他の脂質-ポリマー複合体を含むリポソームは、WO 91/05545および米国特許No. 5,225,212(両方ともMartinら)およびWO 94/20073(Zalipskyら)において記載される。PEG-修飾セラミド脂質を含むリポソームは、WO 96/10391(Choiら)に記載される。米国特許Nos. 5,540,935(Miyazakiら)および5,556,948(Tagawara)は、その表面に対して官能基部分をさらに誘導体化することができる、PEG-含有リポソームを記載する。

30

40

【 0 0 9 1 】

50

核酸を含む限定的な数のリボソームが当該技術分野において既知である。Thierryらに対するWO 96/40062は、高分子量の核酸をリボソーム中にカプセル化するための方法を開示する。Tagawaらに対する米国特許No. 5,264,221は、タンパク質-結合リボソームを開示し、そしてそのようなリボソームの内容物にはアンチセンスRNAが含まれうることを明らかにしている。Rahmanらに対する米国特許No. 5,665,710は、オリゴデオキシヌクレオチドをリボソーム中にカプセル化する特定の方法を記載する。Loveらに対するWO 97/04787は、raf遺伝子を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドを含むリボソームを開示する。

【0092】

トランスファーソーム (transfersome) は、リボソームのさらに別の型であり、そして非常に変形可能な脂質集合物であり、薬物送達ビヒクルの魅力的な候補物である。トランスファーソームは、非常に変形可能であるため、小滴よりも小さな孔を介して容易に浸透することができる、脂質小滴として記載することができる。トランスファーソームは、それらを使用する環境に適応することができ、たとえばそれらは、自己-最適性 (皮膚の孔の形状に適応する) であり、自己-修復性であり、しばしば断片化されることなくそれらの標的に到達し、そしてしばしば自己-負荷性 (self-loading) である。トランスファーソームを作製するため、標準的なリボソーム組成物に対して、表面強力アクチベーター (edge-activators)、通常はサーファクタント、を添加することができる。トランスファーソームを使用して、皮膚に対して血清アルブミンを送達した。血清アルブミンのトランスファーソーム-媒介性送達は、血清アルブミンを含有する溶液を皮下に注入する方法と同様に効率的であることが示された。

【0093】

サーファクタントは、エマルジョン (マイクロエマルジョンを含む) およびリボソームなどの製剤において、幅広い用途が見いだされる。多くの様々なタイプのサーファクタントの特性を、天然のサーファクタントおよび合成のサーファクタントの両方ともについて分類しそしてランク付けする最も一般的な方法は、親水性/親油性バランス (HLB) の使用によるものである。親水性基 ("ヘッド" としても知られる) の性質は、製剤に使用する様々なサーファクタントをカテゴリー化に対して最も有用な手段を提供する (Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1988, p. 285)。

【0094】

サーファクタント分子がイオン化されていない場合、非イオン性サーファクタントとして分類される。非イオン性サーファクタントは、医薬生成物および化粧用生成物において幅広い用途を見いだされ、そして幅広いpH値にわたって使用することができる。一般的には、それらのHLB値は、その構造に依存して、2~約18の範囲にわたる。非イオン性サーファクタントには、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、スクロースエステル、そしてエトキシ化 (ethoxylated) エステルなどの非イオン性エステルが含まれる。脂肪アルコールエトキシ化物 (ethoxylates)、プロポキシ化 (propoxylated) アルコール、およびエトキシ化/プロポキシ化ブロックポリマーなどの非イオン性アルカノールアミドおよびエーテルもまた、このクラスに含まれる。ポリオキシエチレンサーファクタントは、非イオン性サーファクタントのクラスの最も一般的な構成物質である。

【0095】

サーファクタント分子が、水中に溶解しまたは分散させる場合に負 (-) の荷電を有する場合、サーファクタントはアニオン性と分類される。アニオン性サーファクタントには、石けんなどのカルボン酸エステル、アシルラクチレート (lactylates)、アミノ酸のアシルアミド、アルキル硫酸塩およびエトキシ化アルキル硫酸塩などの硫酸のエステル、アルキルベンゼンスルホン酸エステル、アシルイセチオネート (isethionates)、アシルタウレート (taurates) およびスルホコハク酸塩などのスルホン酸エステル、およびホスフェートが含まれる。アニオン性サーファクタントのクラスの最も重要な構成物質は、アルキ

ル硫酸塩および石けんである。

【0096】

サーファクタント分子が、水中に溶解されまたは分散される場合に正(+)の荷電を有する場合、サーファクタントはカチオン性と分類される。カチオン性サーファクタントには、第四アンモニウム塩およびエトキシ化アミンが含まれる。第四アンモニウム塩は、このクラスの最も使用される構成物質である。

【0097】

サーファクタント分子が正(+)の荷電または負(-)の荷電のいずれをも有する能力を有する場合、サーファクタントは両性として分類される。両性サーファクタントには、アクリル酸誘導体、置換アルキルアミド類、N-アルキルペタイン類およびホスファチド類が含まれる。

10

【0098】

薬剤生成物、製剤およびエマルジョン中でのサーファクタントの使用は、以下にレビューされている(Rieger, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1988, p. 285)。

【0099】

浸透亢進剤

一態様において、本発明は、様々な浸透亢進剤を使用して、核酸、特にオリゴヌクレオチドの、動物の皮膚に対する効率的な送達を達成する。ほとんどの薬剤は、イオン化型および非イオン化型の両方において溶液中に存在する。しかしながら、通常は、脂質可溶性あるいは親油性薬物のみが容易に細胞膜を通過する。非-親油性薬物でさえも、通過すべき膜を浸透亢進剤により処理される場合には、細胞膜を通過することができることを見出した。非-親油性薬物の細胞膜を通じた拡散を補助することに加えて、浸透亢進剤はまた、親油性薬物の透過性も向上させる。

20

【0100】

浸透亢進剤は、5つの幅広いカテゴリー、すなわち、サーファクタント、脂肪酸、胆汁酸塩、キレート剤、そして非-キレート非-サーファクタント、の一つに属するものとして分類することができる(Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92)。浸透亢進剤の上述したクラスのそれぞれは、以下にさらに詳細に記載される。

30

【0101】

サーファクタント：本発明に関連して、サーファクタント(あるいは“表面-活性剤”)は、水溶液中に溶解した場合に、溶液の表面張力または水溶液と別の液体とのあいだの界面張力を減少する化学的単位であり、粘膜を介するオリゴヌクレオチドの吸収が亢進されるという結果を伴う。胆汁酸塩および脂肪酸に加えて、これらの浸透亢進剤には、たとえば、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 et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92)；およびFC-43などのパーフルオロ化学物質エマルジョン(Takahashi et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1988, 40, 252)が含まれる。

40

【0102】

脂肪酸：浸透亢進剤として機能する様々な脂肪酸およびその誘導体には、たとえば、オレイン酸、ラウリン酸、カプリン酸(n-デカン酸)、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、ジカプレート、トリカプレート、モノオレイン(1-モノオレイル-rac-グリセロール)、ジラウリン、カプリル酸、アラキドン酸、グリセロール1-モノカプレート、1-ドデシルアザシクロヘプタン-2-オン、アシルカルニチン、アシルコリン、それらのC₁₋₁₀アルキルエステル(たとえば、メチル、イソプロピルおよびt-ブチル)、およびそれらのモノ-およびジ-グリセリド(すなわち、オレエート、ラウレート、カプレート、ミリステート、パルミテート、ステアレート、リノレエートなど)が含まれる(Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7,

50

1-33 ; El Hariri et al., J. Pharm. Pharmacol., 1992, 44, 651-654)。

【 0 1 0 3 】

胆汁酸塩：胆汁の生理学的役割には、脂質および脂肪可溶性ビタミンの分散および吸収を促進することが含まれる (Brunton, Chapter 38 in: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th Ed., Hardman et al. Eds., McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 934-935)。様々な天然の胆汁酸塩、およびその合成誘導体は、浸透亢進剤として機能する。このように、用語“胆汁酸塩”には、胆汁の天然に存在する構成成分のいずれかだけでなく、それらの合成誘導体のいずれかが含まれる。本発明の胆汁酸塩には、たとえば、コール酸（あるいはその医薬的に許容可能なナトリウム塩、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）、グルココール酸 (glucolic acid) (グルココール酸 (glucolate) ナトリウム)、グリココール酸 (グリコ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) が含まれる (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92 ; Swinyard, Chapter 39 In: Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990, pages 782-783 ; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33 ; Yamamoto et al., J. Pharm. Exp. Ther., 1992, 263, 25 ; Yamashita et al., J. Pharm. Sci., 1990, 79, 579-583)。

【 0 1 0 4 】

キレート剤：本発明と関連して使用される場合、キレート剤は、それとともに複合体を形成することにより、金属イオンを溶液から取り除く化合物として定義することができ、粘膜を介したオリゴヌクレオチドの吸収を向上させるという結果を伴う。本発明における浸透亢進剤としてのその使用に関して、キレート剤は、最も特性決定されたDNAヌクレアーゼがその触媒のために二価の金属イオンを必要としそしてしたがってキレート剤により阻害されることから、DNase阻害剤としても機能するという追加の利点を有する (Jarrett, J. Chromatogr., 1993, 618, 315-339)。本発明のキレート剤には、エチレンジアミンテトラ酢酸ジナトリウム (EDTA)、クエン酸、サリチル酸塩（たとえば、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リン酸塩）、コラーゲンのN-アシル誘導体、ラウレス-9および -ジケトンのN-アミノアシル誘導体 (エナミン) が含まれるが、これらには限定されない (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92 ; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33 ; Buur et al., J. Control Rel., 1990, 14, 43-51)。

【 0 1 0 5 】

非-キレート非-サーファクタント：本明細書中で使用する場合、非-キレート非-サーファクタント浸透亢進性化合物は、キレート剤としてあるいはサーファクタントとしてわずかな活性しか示さないが、それにもかかわらず栄養粘膜を介してオリゴヌクレオチドの吸収を亢進する、化合物として定義することができる (Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33)。浸透亢進剤のこのクラスには、たとえば、不飽和環状ウレア、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 et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92) ; および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などの非-ステロイド性抗炎症性薬剤 (Yamashita et al., J. Pharm. Pharmacol., 1987, 39, 621-626) が含まれる。

【 0 1 0 6 】

細胞レベルでオリゴヌクレオチドの取り込みを亢進する薬剤を、本発明の医薬組成物およびその他の組成物に添加することもできる。たとえば、リポフェクチンなどのカチオン性

10

20

30

40

50

脂質 (Junichi et al, 米国特許No. 5,705,188)、カチオン性グリセロール誘導体、およびポリリジンなどのポリカチオン性分子 (Lollo et al., PCT Application WO 97/30731) も、オリゴヌクレオチドの細胞性取り込みを亢進することが知られている。

【0107】

エチレングリコールおよびプロピレングリコールなどのグリコール、2-ピロールなどのピロール、アゾン (azone)、およびリモネンおよびメントンなどのテルペンを含むその他の薬剤を使用して、投与される核酸の浸透を亢進することができる。

【0108】

担体

本発明の特定の組成物は、製剤中に担体化合物も組み込む。本明細書中で使用する場合、“担体化合物”または“担体”は、不活性である（すなわち、それ自体生物学的活性を有さない）が、しかし、たとえば、生物学的に活性な核酸を分解しまたはその循環から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減少する *in vivo* プロセスにより、核酸として認識される、核酸、またはその類似体のことをいうことができる。核酸と担体化合物（典型的には担体化合物を過剰量）の共投与により、おそらくは担体化合物と核酸との、一般的な受容体に対する競合により、結果として、肝臓、腎臓、またはその他の循環外レゼルボア中で回収される核酸の量の実質的な減少が引き起こされる。たとえば、ポリイノシン酸、硫酸デキストラン、ポリシチジン酸あるいは4-アセトアミド-4'-イソチオシアノ-スチルベン-2,2'-ジスルホン酸とともに共投与する場合、肝臓組織中での部分的ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの回収を減少することができる (Miyao et al., Antisense Res. Dev., 1995, 5, 115-121; Takakura et al., Antisense & Nucl. Acid Drug Dev., 1996, 6, 177-183)。

【0109】

賦形剤

担体化合物と対照的に、“医薬的な担体”または“賦形剤”は、医薬的に許容可能な溶媒、懸濁剤または動物に対して1またはそれ以上の核酸を送達するためのいずれかその他の医薬的に不活性なビヒクルである。賦形剤は液体であってもあるいは固体であってもよく、そして、想定した計画された様式の投与により、所定の医薬組成物の核酸およびその他の構成要素と組み合わせた場合、所望のバルク、粘度などを提供するように選択される。典型的な医薬的な担体には、結合剤（たとえば、化コーンスターチ、ポリビニルピロリドンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロースなど）；充填剤（たとえば、ラクトースおよびその他の糖、微結晶セルロース、ペクチン、ゼラチン、硫酸カルシウム、エチルセルロース、ポリアクリル酸またはリン酸水素カルシウムなど）；潤滑剤（たとえば、ステアリン酸マグネシウム、タルク、シリカ、コロイド状シリコンジオキシド、ステアリン酸、金属性ステアリン酸、硬化植物油、コーンスターチ、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（たとえば、スターチ、スターチグリコール酸ナトリウムなど）；および湿潤剤（たとえば、ラウリル硫酸ナトリウムなど）が含まれるが、これらには限定されない。

【0110】

核酸と心身に有害には反応しない非-非経口性投与に適した医薬的に許容可能な有機賦形剤または無機賦形剤を使用して、本発明の組成物を製剤化することもできる。適した医薬的に許容可能な担体には、水、塩溶液、アルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、ラクトース、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が含まれるが、これらには限定されない。

【0111】

核酸の局所投与のための製剤には、滅菌水溶液および非-滅菌水溶液、アルコールなどの一般的溶媒中での非-水溶液、または液体または固体油状基剤中の核酸の溶液が含まれてもよい。溶液には、バッファ、希釈剤およびその他の適した添加剤を含有してもよい。核酸と心身に有害には反応しない非-非経口性投与に適した医薬的に許容可能な有機賦形

剤あるいは無機賦形剤を使用することができる。

【0112】

適した医薬的に許容可能な賦形剤には、水、塩溶液、アルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、ラクトース、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が含まれるが、これらには限定されない。

【0113】

その他の構成要素

本発明の組成物にはさらに、医薬組成物中に従来から見出されるその他の補助剤構成要素を、当該技術分野で確立した使用レベルで含有することができる。このように、たとえば、組成物には、たとえば鎮痒薬、収斂剤、局所麻酔薬または抗炎症剤などの追加的で適合的な医薬的に活性な物質を含有することができ、または本発明の組成物の様々な用量剤形を物理的に製剤化する際に有用な追加の物質、たとえば色素、着香剤、保存剤、抗酸化剤、乳白剤、増粘剤および安定化剤など、を含有することができる。しかしながら、このような物質は、添加される場合、本発明の組成物の構成要素の生物学的活性を過度に妨害すべきではない。製剤を滅菌することができ、そして所望の場合には、製剤の（1またはそれ以上の）核酸と心身に有害に相互作用しない補助剤、たとえば、潤滑剤、保存剤、安定化剤、湿潤剤、乳化剤、オスモル圧に影響を与える塩、バッファー、着色剤、着香料および/または芳香性物質などと混合することができる。

【0114】

水性懸濁液には、たとえば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトールおよび/またはデキストランを含む、懸濁液の粘度を増加する物質を含有することができる。懸濁液には、安定化剤を含有してもよい。

【0115】

本発明の特定の態様は、(a) 1またはそれ以上のアンチセンス化合物、および(b) 非-アンチセンスメカニズムにより機能する1またはそれ以上のその他の化学療法剤、を含有する医薬組成物を提供する。このような化学療法剤の例には、ダウノルビシン、ダクチノマイシン、ドキシソルピシン、プレオマイシン、マイトマイシン、ナイトロジェンマスタード、クロラムブシル、メルファラン、シクロホスファミド、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン(CA)、5-フルオロウラシル(5-FU)、フロキシウリジン(5-FUdR)、メトトレキサート(MTX)、コルヒチン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトポシド、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)などの抗ガン薬物を含むが、これらには限定されない(一般的には、The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 15th Ed., Berkow et al., eds., 1987, Rahway, N.J., pages 1206-1228を参照)。非ステロイド性抗炎症性薬物およびコルチコステロイドを含む抗炎症性薬物(しかしこれらには限定されない)、およびリビビリン(ribivirin)、ビダラビン(vidarabine)、アシクロビルおよびガンシクロバーを含む抗ウィルス性薬物(しかしこれらには限定されない)を、本発明の組成物中に組み合わせることができる(一般的には、The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 15th Ed., Berkow et al., eds., 1987, Rahway, N.J., pages 2499-2506 and 46-49, respectivelyを参照)。その他の非-アンチセンス化学療法剤も、本発明の範囲に含まれる。2つまたはそれ以上の組み合わせ化合物を、一緒にあるいは連続的に使用することができる。

【0116】

別の関連する態様において、本発明の組成物には第一の核酸を標的とする、1またはそれ以上のアンチセンス化合物、特にオリゴヌクレオチド、および第二の核酸標的を標的とする1またはそれ以上の追加のアンチセンス化合物、特にオリゴヌクレオチドを含有することができる。数多くのアンチセンス化合物の例が当該技術分野で知られている。2つまたはそれ以上の組み合わせ化合物を、一緒にあるいは連続的に使用することができる。

【0117】

治療用組成物の製剤化およびそれに引き続く投与は、当該技術分野の範囲内のものである

と考えられる。用量は、治療すべき疾患状態の重症度および反応性に依存し、数日間から数ヶ月間持続する治療経過、あるいは治療が得られるかまたは疾患の減退が得られるまでの治療経過を伴う。最適な用量スケジュールは、患者体内での薬物の蓄積を測定することから算出することができる。当業者であれば、最適用量、投与方法、および反復頻度を容易に決定することができる。最適な用量は、個々のオリゴヌクレオチドの比効力に依存して変更することができ、そして一般的には、*in vitro*および*in vivo*動物モデルにおいて効果的であることが見いだされる EC_{50} に基づいて見積もることができる。一般的には、用量は、0.01 μg ~ 100 g/kg体重であり、そして1日、1週間、1ヶ月、あるいは1年に一度またはそれ以上与えることができ、あるいは2~20年ごとに1度であってもよい。当業者は、体液あるいは組織における薬物の滞留時間および濃度に基づいて、投与のための反復頻度を容易に見積もることができる。継続的な治療により、患者に維持療法を受けさせて、疾患状態の再発を防止することが好ましく、ここでオリゴヌクレオチドは、1日に1回またはそれ以上~20年間ごとに1回で、0.01 μg ~ 100 g/kg体重の範囲で、維持用量で投与する。

【0118】

本発明特定のその好ましい態様にしたがって、具体的に記載されるが、以下の実施例は、本発明の説明のためにのみ提供し、そして本発明を限定することを意図するものではない。

【0119】

【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ールアミダイト
デオキシ及び2'-アルコキシアミダイト

2'-デオキシ及び2'-メトキシ -シアノエチルジイソプロピルホスホールアミダイトを販売元（例えば、Chemgenes, Needham MA またはGlen Research, Inc. Sterling VA）より購入した。他の2'-O-アルコキシ置換ヌクレオシドアミダイトは、本明細書中で参考文献として援用される、アメリカ合衆国特許5,506,351に記載の通り調製する。2'-アルコキシアミダイトを用いてオリゴヌクレオチドを合成するために、テトラゾール及び塩基のパルスデリバリー後の待機段階を360秒に増加した以外は、非修飾オリゴヌクレオチドのための標準サイクルを使用した。

【0120】

5-メチル-2'-デオキシシチジン（5-Me-C）ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドは、市販のホスホールアミダイト（Glen Research, Sterling VAまたはChemGenes, Needham MA）を用いて公表された方法〔Sanghvi ら、Nucleic Acids Research, 1993, 21, 3197-3203〕に従って合成した。

【0121】

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、本明細書中で参考文献として援用される以前に記載の通り〔Kawasaki ら、J. Med. Chem., 1993, 36, 831-841〕、及び、アメリカ合衆国特許5,670,633に記載の通り合成した。簡潔には、保護されたヌクレオシドであるN6-ベンゾイル-2'-デオキシ-2'-フルオロアデノシンは、市販の9- β -D-アラビノフラノシルアデニンを出発物質として使用し、そして文献手法を修正して、2'-フルオロ原子を2'-トリチル基の S_N2 -置換により導入することより、合成した。このようにN6-ベンゾイル-9- β -D-アラビノフラノシルアデニンは中程度の収量で3',5'-ジテトラヒドロピラニル（THP）中間体として選択的に保護した。THP及びN6-ベンゾイル基の脱保護は標準的な手法論を用いて成され、そして標準手法を用いて5'-ジメトキシトリチル-（DMT）及び5'-DMT-3'-ホスホールアミダイト中間体を得た。

【0122】

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テトライソプロピルジシロキサニル（TPDS

10

20

30

40

50

）で保護した9-β-D-アラビノフラノシルグアニンを出発物質として用い、そして、中間体であるジイソブチリルアラビノフラノシルグアニンへの変換により成された。TPDS基の脱保護に続いて水酸基のTHPによる保護によりジイソブチリルジ-THP保護アラビノフラノシルグアニンを得た。選択的なO-脱アシル化及びトリフラート化に続き、フルオリドによる粗生成物の処理をし、その後THP基の脱保護をした。標準的な方法論を使用し、5'-DMT-及び5'-DMT-3'-ホスホールアミダイトを得た。

【0123】

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-β-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 (hydrogen fluoride-pyridine) で処理する、文献手法の修正により成された。標準的な手法を用いて5'-DMT及び5'-DMT-3'ホスホールアミダイトを得た。

10

【0124】

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を介して合成され、次に選択的な保護によりN4-ベンゾイル-2'-デオキシ-2'-フルオロシチジンを得た。標準的な手法を用いて、5'-DMT及び5'-DMT-3'ホスホールアミダイトを得た。

【0125】

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、次の通り、あるいは、Martin, P. (Helvetica Chimica Acta, 1995, 78, 486-504)の方法に従って調製した。

20

【0126】

2,2'-アンヒドロ〔1-(β-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 (Yamasa, Choshi, Japanにより市販され入手可能な、リボシルチミン) (72.0 g, 0.279 M)、ジフェニルカーボネート (90.0 g, 0.420 M) 及び炭酸水素ナトリウム (2.0 g, 0.024 M) をDMF (300 mL) に加えた。混合物を熱して攪拌しながら還流し、発生する二酸化炭素ガスを制御された方法で放出させた。1時間後、わずかに黒ずんだ溶液を、低下下、濃縮した。得られた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。産物はガム状物を形成した。エーテルをデカントし、そして、残渣を最小量のメタノール (約400 mL) に溶解した。溶液をフレッシュなエーテル (2.5 L) に注ぎ入れ、硬いガム状物を得た。エーテルをデカントし、ガム状物を減圧オーブンで乾燥させ (60 °C、1 mm Hgで24時間)、得られた固体を砕いて淡い黄褐色の粉末にした (57 g、85%粗収率)。NMRスペクトルは、そのナトリウム塩としてフェノールが混じった (約5%) 構造と一致した。その物質はさらに続く反応に用いられた (あるいはに酢酸エチル中のメタノールの勾配 (10-25%) を利用したカラムクロマトグラフィーにより、さらに精製して融点222-4 °Cの白色の固体を得ることができる)。

30

【0127】

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 (231 g, 0.98 M) 及び2-メトキシエタノール (1.2 L) を、2 Lステンレススチール圧力容器に加え、160 °Cに予熱した油浴中に設置した。155-160 °Cで48時間熱した後、容器を開き、そして、溶液を蒸発させて乾燥させ、次にメタノール (200 mL) 中で磨砕した。残渣を熱したアセトン (1 L) 中に懸濁した。不溶の塩を濾過し、アセトン (150 mL) で洗浄し、そして、濾過物を蒸発させた。残渣を (280 g) をCH₃CN (600 mL) に溶解させ、次に、蒸発させた。シリカゲルカラム (3 kg) を0.5% Et₃NHを含むCH₂Cl₂/アセトン/MeOH (20:5:3) 中に充填した。残渣をCH₂Cl₂ (250 mL) 中に溶解し、そして、シリカ (150 g) に吸着させた後、カラムにロードした。生成物は充填溶媒とともに溶出され、160 g (63%) の産物を得た。不純な分画をやり直すことにより、追加の物質を得た。

40

【0128】

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-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、次に、乾燥させた残渣をピリジン (1.3 L) に溶解した。ジメトキシトリチルクロリドの一番目のアリコート (94.3 g、0.278 M) を加え、そして、混合液を室温で1時間攪拌した。ジメトキシトリチルクロリドの二番目のアリコート (94.3 g、0.278 M) を加え、そして、反応液をさらに1時間攪拌した。メタノール (170 mL) を次に加え、反応を停止した。HPLCにより、約70%の産物の存在が示された。溶媒を蒸発させ、そして、CH₃CN (200 mL) 中で磨砕した。残渣をCHCl₃ (1.5 L) に溶解し、次に、2×500 mLの飽和NaHCO₃及び2×500 mLの飽和NaClにより抽出した。有機層をNa₂SO₄上で乾燥させ、濾過し、そして、蒸発させた。275 gの残渣が得られた。残渣を3.5 kgシリカゲルカラムで精製し、充填し、そして、0.5%Et₃NHを含むEtOAc/ヘキサン/アセトン (5:5:1) で溶出した。純粋な分画を蒸発させ、164 gの生成物を得た。さらに約20 gが不純な分画より得られ、全収量183 g (57%) を得た。

【 0 1 2 9 】

3'-O-アセチル-2'-O-メトキシエチル-5'-O-ジメトキシトリチル-5-メチルウリジン
2'-O-メトキシエチル-5'-O-ジメトキシトリチル-5-メチルウリジン (106 g、0.167 M)、DMF/ピリジン (562 mLのDMFと188 mLのピリジンから調製された3:1の混合液750 mL)、及び、無水酢酸 (24.38 mL、0.258 M) を混合し、そして、室温で24時間攪拌した。反応は、TLC試料にMeOHを添加し初めに急冷すること (quenching) によりTLCによりモニターした。TLCにより判断した反応の終了時に、MeOH (50 mL) を加え、混合物を35 で蒸発させた。残渣をCHCl₃ (800 mL) に溶解し、次に、2×200 mLの飽和炭酸水素ナトリウム及び2×200 mLの飽和NaClにより抽出した。水層を200 mLのCHCl₃で逆抽出した。合わせた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、そして、蒸発させ、122 g (約90%生成物) の残渣を得た。残渣を3.5 kgシリカゲルカラムで精製し、そして、EtOAc/ヘキサン (4:1) で溶出した。純粋な生成物分画を蒸発させ、96 g (84%) を得た。後の分画より追加の1.5 gを回収した。

【 0 1 3 0 】

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
はじめの溶液は、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 (96 g、0.144 M) をCH₃CN (700 mL) に溶かすことにより調製し、そして、とり置いた。トリエチルアミン (189 mL、1.44 M) をCH₃CN (1 L) 中トリアゾール (90 g、1.3 M) 溶液に加えて、-5 に冷却し、そして、オーバーヘッドスターラーを使用して0.5時間攪拌した。0-10 に維持した攪拌溶液に、30分間、POCl₃を滴下して加え、そして得られた混合液をさらに2時間攪拌した。はじめの溶液を後者の溶液に、45分間をかけて滴下して加えた。得られた反応混合物をコールドルームに一晩保存した。反応混合物から塩を濾過し、そして、溶液を蒸発させた。残渣をEtOAc (1 L) に溶解し、次に、不溶の固体を濾過により除去した。濾過物を1×300 mLのNaHCO₃及び2×300 mLの飽和NaClで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させ、そして、蒸発させた。残渣をEtOAc中で磨砕し、表題の化合物を得た。

【 0 1 3 1 】

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 (500 mL) 及びNH₄OH (30 mL) 中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 (103 g、0.141 M) 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、残渣をMeOH (2×200 mL) と共沸させた。残渣をMeOH (300 mL) に溶解し、2リットルステンレススチール圧力容器に移した。NH₃ガスで飽和させたMeOH (400 mL) を加え、その容器を100 、2時間熱した (完全な変換がTLCにより示された)。容器の内容物を蒸発させて乾燥し、そして、残渣をEtOAc (500 mL) に溶解し、次に、飽和NaCl (200 mL) で1回洗浄した。有機物を硫酸ナトリウムで乾燥させ、そして、溶媒を蒸発させて85 g (95%) の表題の化合物を得た。

【 0 1 3 2 】

N4-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 (85 g, 0.134 M) を DMF (800 mL) に溶解し、次に、無水安息香酸 (37.2 g, 0.165 M) を攪拌しながら加えた。3時間攪拌後、反応が約95%終了したことをTLCが示した。溶媒を蒸発させ、そして、残渣をMeOH (200 mL) と共沸させた。残渣をCHCl₃ (700 mL) に溶解し、飽和NaHCO₃ (2×300 mL) 及び飽和NaCl (2×300 mL) で抽出し、MgSO₄で乾燥させ、次に、蒸発させて残渣 (96 g) を得た。残渣を、溶出溶媒として0.5%Et₃NHを含むEtOAc/ヘキサン (1:1) を使用して、1.5 kgシリカカラムでクロマトグラフィーにより分離した。純粋な生成物画分を蒸発させて、90 g (90%) の表題化合物を得た。

【 0 1 3 3 】

10

N4-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

N4-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CH₂Cl₂ (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) 及び2-シアノエトキシ-テトラ- (イソプロピル) 亜リン酸塩 (40.5 mL, 0.123 M) を窒素気体条件下、攪拌しながら加えた。得られた混合物は室温で20時間攪拌した (反応が95%終了したことをTLCが示した)。反応混合物を飽和NaHCO₃ (1×300 mL) 及び飽和NaCl (3×300 mL) で抽出した。水層洗浄液をCH₂Cl₂ (300 mL) で逆抽出し、次に抽出物を合わせ、MgSO₄で乾燥させそして濃縮した。得られた残渣は、溶出溶媒としてEtOAc/ヘキサン (3:1) を使用して、1.5 kgシリカカラムでクロマトグラフィーにより分離した。純粋な分画を合わせて、90.6 g (87%) の表題化合物を得た。

20

【 0 1 3 4 】

2'-O- (アミノオキシエチル) ヌクレオシドアミダイト及び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 [当該技術分野において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知られる] は次の段落で記載される通り、調製される。アデノシン、シチジン及びグアノシンヌクレオシドアミダイトは、環外のアミンがアデノシン及びシチジンの場合はベンゾイル基により保護され、また、グアノシンの場合はイソブチリルにより保護されることを除いては、チミジン (5-メチルウリジン) と同様に調製される。

30

【 0 1 3 5 】

5'-O-tert-ブチルジフェニルシリル-0²-2'-アンヒドロ-5-メチルウリジン

0²-2'-アンヒドロ-5-メチルウリジン (Pro. Bio. Sint., Varese, Italy, 100.0 g, 0.416 mmol)、ジメチルアミノピリジン (0.66 g, 0.013 eq, 0.0054 mmol) を、アルゴン気体条件下、周囲温度で、また、機械的に攪拌しながら、無水ピリジン (500 mL) に溶解した。tert-ブチルジフェニルクロロシラン (125.8 g, 119.0 mL, 1.1 eq, 0.458 mmol) を一度に加えた。反応物は周囲温度で16時間攪拌した。TLC (R_f 0.22、酢酸エチル) により反応が終了したことが示された。溶液を減圧下、濃縮して濃厚な油状物にした。これを、ジクロロメタン (1 L)、及び、飽和炭酸水素ナトリウム (2×1 L) 及びブライン (1 L) 間で分配させた。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、そして、減圧下、濃縮して濃厚な油状物にした。油を酢酸エチルとエチルエーテルの1:1の混合液 (600 mL) に溶解し、次に、溶液を-10 °C に冷却した。得られた結晶生成物は、濾過により集めて、エチルエーテル (3×200 mL) で洗浄し、さらに、乾燥して (40 °C、1 mm Hg、24 時間)、149 g (74.8%) の白色の固体にした。TLC及びNMRは純粋な生成物と一致した。

40

【 0 1 3 6 】

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

2 Lステンレススチール、非攪拌圧力反応器にテトラヒドロフラン中のボラン (1.0 M, 2.0 eq, 622 mL) を加えた。換気フード内で、手で攪拌しながらエチレングリコール (350 mL、過剰量) を、水素ガスの発生がおさまるまで、はじめは注意深く加えた。5'-O-ter

50

t-ブチルジフェニルシリル-0²-2'-アンヒドロ-5-メチルウリジン (149 g、0.311 mol) 及び炭酸水素ナトリウム (0.074 g、0.003 eq) を手動で攪拌しながら加えた。反応器を密閉し、そして、内部温度が160 に達するまで油浴中で熱し、そして次に16時間維持した (圧力< 100 psig)。反応容器を周囲温度まで冷却し、そして、開けた。TLC (望ましい生成物はRf 0.67 及びara-T副生成物はRf 0.82、酢酸エチル) は約70%が生成物に変換したことを示した。さらに副生成物ができるのを避けるため、反応を停止し、減圧下 (10から1 mm Hg)、湯浴中 (40-100) で、エチレングリコールを除くために使われるより極度の条件で、濃縮した。[あるいは、一度低沸点溶媒がなくなったら、残りの溶液を酢酸エチルと水の間に分配し得る。生成物は有機相にあるだろう。] 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から4:1) により精製した。適切な分画を合わせ、除き、そして、乾燥させて、白色のカリカリ (crisp) した泡状物 (84 g、50%)、混在した出発物質 (17.4 g)、及び、純粋な再利用できる出発物質20 gを得た。出発物質、純度の低い回収した出発物質をもとにした収率は58%だった。TLC及びNMRは、99%の純度の生成物と一致した。

【 0 1 3 7 】

2'-0- (〔2-フタルイミドオキシ) 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'-0-tert-ブチルジフェニルシリル-2'-0- (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) 及びN-ヒドロキシフタルイミド (7.24 g、44.36 mmol) と混ぜた。その後、強い減圧条件下、40 、2日間、P₂O₅で乾燥させた。反応混合液をアルゴンをフラッシュし (flushed) そして、無水T HF (369.8 mL、Aldrich、確実に密閉させた瓶) を加えて、透明な液体を得た。ジエチル-アゾジカルボン酸塩 (6.98 mL、44.36 mmol) を反応混合液に滴下して加えた。添加する速度は、生じる深い赤い色が次の滴を加える前にちょうど消えるように維持した。添加が終了した後、反応物を4時間攪拌した。その頃までに、TLCにより反応の終了が示された (酢酸エチル:ヘキサン、60:40)。減圧下、溶媒を蒸発させた。得られた残渣をフラッシュカラムにのせ、そして、酢酸エチル:ヘキサン (60:40) で溶出し、2'-0- (〔2-フタルイミドオキシ) 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の泡状物 (21.819 g、86%) として得た。

【 0 1 3 8 】

5'-0-tert-ブチルジフェニルシリル-2'-0-〔 (2-ホルムアドキシイミノオキシ) エチル) -5-メチルウリジン

2'-0- (〔2-フタルイミドオキシ) エチル) -5'-t-ブチルジフェニルシリル-5-メチルウリジン (3.1 g、4.5 mmol) を無水CH₂Cl₂ (4.5 mL) に溶解し、そして、メチルヒドラジン (300 mL、4.64 mmol) を-10 から0 において滴下して加えた。1時間後、混合物を濾過し、濾過物を氷冷CH₂Cl₂で洗浄し、そして、合わせた有機相を水、ブラインで洗浄して、次に、無水Na₂SO₄で乾燥させた。溶液を濃縮して2'-0- (アミノオキシエチル) チミジンを得て、それを次にMeOH (67.5 mL) に溶解した。これにホルムアルデヒド (20%水溶液、w/w、1.1 eq.) を加え、そして、得られた混合物を1時間攪拌した。溶媒を減圧下で除き; 残渣をクロマトグラフィーで分離して、5'-0-tert-ブチルジフェニルシリル-2'-0-〔 (2-ホルムアドキシイミノオキシ) エチル) -5-メチルウリジンを白色の泡 (1.95 g、78%) として得た。

【 0 1 3 9 】

5'-0-tert-ブチルジフェニルシリル-2'-0-〔N,N-ジメチルアミノオキシエチル) -5-メチルウリジン

5'-0-tert-ブチルジフェニルシリル-2'-0-〔 (2-ホルムアドキシイミノオキシ) エチル) -5-メチルウリジン (1.77 g、3.12 mmol) を1 M p-トルエンスルホン酸ピリジニウム (PP TS) の溶液に溶解した。シアノホウ化水素ナトリウム (Sodium cyanoborohydride) (0.39 g、6.13 mmol) を、10 、不活性気体条件下で、この溶液に加えた。反応混合物を10、10分間攪拌した。その後、反応容器を氷浴から取り出し、室温で2時間攪拌し、反応をT

10

20

30

40

50

LCでモニターした (CH_2Cl_2 中 5% MeOH)。 NaHCO_3 水溶液 (5%、10 mL) を加え、そして、酢酸エチルで抽出した (2×20 mL)。酢酸エチル相を無水 Na_2SO_4 で乾燥させ、蒸発させて乾燥状態にした。残渣を、MeOH (30.6 mL) 中の 1 M PPTS 溶液に溶解した。ホルムアルデヒド (20% w/w、30 mL、3.37 mmol) を加え、反応混合物を室温で 10 分間攪拌した。反応混合液を氷浴中で 10 分に冷却し、シアノホウ化水素ナトリウム (0.39 g、6.13 mmol) を加え、そして、反応混合物を 10 、10 分間攪拌した。10 分後、反応混合液を氷浴から取り出し、そして、室温で 2 時間攪拌した。反応混合液に 5% NaHCO_3 (25 mL) 溶液を加え、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 で乾燥させ、次に、蒸発させて乾燥状態にした。得られた残渣をフラッシュカラムクロマトグラフィーで精製し、そして、 CH_2Cl_2 中 5% MeOH で溶出し、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の泡状物 (14.6 g、80%) として得た。

10

【0140】

2'-O-(ジメチルアミノオキシエチル)-5-メチルウリジン

トリエチルアミントリヒドロフルオリド (3.91 mL、24.0 mmol) を無水 THF 及び トリエチルアミン (1.67 mL、12 mmol、無水 KOH で維持) に溶解した。このトリエチルアミン-2HF の混合物を、次に、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) に加えて、そして、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。溶媒を減圧下、取り除き、そして、残渣をフラッシュカラムにのせ、そして、 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。

20

【0141】

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、強い減圧条件下、40 で一晩、 P_2O_5 で乾燥させた。その後、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気体条件下、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)、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (880 mg、2.60 mmol) を混合液に加え、そして、反応混合物を室温で、出発物質の全量がなくなるまで攪拌した。ピリジンを減圧下取り除き、次に、残渣をクロマトグラフィーで分離し、そして、 CH_2Cl_2 中 10% MeOH (ピリジンを数滴含む) で溶出し、5'-O-DMT-2'-O-(ジメチルアミノ-オキシエチル)-5-メチルウリジン (1.13 g、80%) を得た。

30

【0142】

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ールアミダイト]

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) と共に蒸発させる。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) を加えて、次に、強い減圧条件下、40 で一晩、 P_2O_5 で乾燥させた。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ールアミダイト (2.12 mL、6.08 mmol) を加えた。反応混合物を周囲温度で 4 時間、不活性気体条件下で攪拌した。反応の進行を、TLC (ヘキサン:酢酸エチル 1:1) でモニターした。溶媒を蒸発させ、次に、残渣を酢酸エチル (70 mL) に溶解し、そして、5% NaHCO_3 水溶液 (40 mL) で洗浄した。酢酸エチル層を無水 Na_2SO_4 で乾燥させ、また、濃縮した。得られた残渣をクロマトグラフィーにより分離し (溶出溶媒としては酢酸エチル)、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ールアミダイト] (1.04 g、74.9%) を泡状物として得た。

40

【0143】

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 [当該技術分野において、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知られる] は、次の段落で記載さ

50

れる通り、調製する。アデノシン、シチジン及びチミジンヌクレオシドアミダイトは同様に調製する。

【0144】

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

2'-O-アミノオキシエチルグアノシン類似体は、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ることができる。多様な重量のジアミノプリンリボシドは、Schering AG (Berlin) から購入することが可能であり、2'-O-(2-エチルアセチル)ジアミノプリンリボシドを、少量の3'-O-異性体と共に提供する。2'-O-(2-エチルアセチル)ジアミノプリンリボシドは、アデノシンデアミナーゼ処理により分解され、そして、2'-O-(2-エチルアセチル)グアノシンに変換され得る (McGee, D. P. C., Cook, P. D., Guinosso, C. J., WO 94/02501 A1 940203.)。標準的な保護の手法は2'-O-(2-エチルアセチル)-5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)グアノシン及び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)グアノシンを与えるに違いなく、それは、還元され、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)グアノシンを提供し得る。前のように、水酸基はMitsunobu反応によってN-ヒドロキシフタルイミドにより置換することができ、そして、保護されたヌクレオシドは通常通り、ホスフィチル (phosphityl) 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-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ールアミダイト]を得ることができる。

【0145】

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

2'-ジメチルアミノエトキシエトキシヌクレオシドアミダイト(当該技術分野において2'-O-ジメチルアミノエトキシエチル、即ち、2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₂)₂、あるいは2'-DMAEOEヌクレオシドアミダイトとしても知られる)は、以下のように調製される。他のヌクレオシドアミダイトは同様に調製される。

【0146】

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

100 mLボンベ中で、テトラヒドロフラン中のボラン(1 M、10 mL、10 mmol)の溶液に、2-[2-(ジメチルアミノ)エトキシ]エタノール(Aldrich、6.66 g、50 mmol)を攪拌しながらゆっくりと加える。固体が溶解するにつれて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)、及び、炭酸水素ナトリウム(2.5 mg)を加え、そして、ボンベを密閉し、油浴中に入れ、そして、155 °Cにて、26時間加熱する。ボンベは室温まで冷却し、そして、開封する。粗溶液を濃縮し、そして、残渣を水(200 mL)およびヘキサン(200 mL)の間で分配した。過剰量のフェノールを、ヘキサン層中で抽出した。水層を酢酸エチル(3×200 mL)により抽出し、そして合わせた有機層を水で1回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、そして、濃縮する。残渣を、溶出溶媒としてメタノール/塩化メチレン1:20(2%トリエチルアミンを含む)を使用したシリカゲルカラムにかけ、カラム分画が濃縮されるにつれて、無色の固体が形成され、集められて、表題の化合物を白色の固体として得る。

【0147】

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-メチルウリジン溶液に、トリエチルアミン(0.36 mL)及びジメトキシトリチルクロリド(DMT-Cl、0.87 g、2 eq.)を加えて、そして、1時間攪拌する。反応混合物を水(200 mL)に注ぎ入れ、そして、CH₂Cl₂(2×200 mL)で抽出する。合わせたCH₂Cl₂層を飽和NaHCO₃溶液、続いて飽和NaCl溶液で洗浄し、次に、無水硫酸ナトリウムで乾燥

させる。溶媒の蒸発に続いて、 $\text{MeOH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{Et}_3\text{N}$ (20:1、v/v、1%トリエチルアミンを含む)を用いるシリカゲルクロマトグラフィーにより、表題化合物を得る。

【0148】

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)ホスホー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)及び2-シアノエトキシ-N,N-ジイソプロピルホスホールアミダイト(1.1 mL、2 eq.)を、アルゴン気体条件下、 CH_2Cl_2 (20 mL)に溶解した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)に加える。反応混合液を一晩攪拌し、そして、溶媒を蒸発させる。得られた残渣を、酢酸エチルを溶出溶媒として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、表題の化合物を得る。

10

【0149】

実施例2

オリゴヌクレオチド合成

未置換及び置換ホスホジエステル(P=O)オリゴヌクレオチドを、自動DNAシンセサイザー(Applied Biosystems model 380B)で、ヨウ素による酸化を用いる標準的なホスホールアミダイト化学を使用して、合成する。

【0150】

亜リン酸塩結合の段階的チア化のため、標準的な酸化瓶を、アセトニトリル中0.2 M 3H-1,2-ベンゾジチオール-3-オン1,1-ジオキシド溶液に置き換えた以外は、ホスホロチオエート(P=S)は、ホスホジエステルオリゴヌクレオチドのためと同様に合成される。チア化待機段階を68秒に増加し、そして、引き続いてキャッピング段階を行った。CPGカラムからの分離、及び、55 で(18時間)濃縮された水酸化アンモニウム中の脱ブロック化した後、2.5倍量のエタノールで2回沈殿することにより、オリゴヌクレオチドを0.5 M NaCl溶液から精製した。

20

【0151】

ホスフィネートオリゴヌクレオチドを、本明細書中で参考文献として援用される、アメリカ合衆国特許5,508,270に記載の通り、調製する。

アルキルホスホネートオリゴヌクレオチドは、本明細書中で参考文献として援用される、アメリカ合衆国特許4,469,863に記載の通り、調製する。

30

【0152】

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、本明細書中で参考文献として援用される、アメリカ合衆国特許5,610,289あるいは5,625,050に記載の通り、調製する。

【0153】

ホスホールアミダイトオリゴヌクレオチドは、本明細書中で参考文献として援用される、アメリカ合衆国特許5,256,775あるいはアメリカ合衆国特許5,366,878に記載の通り、調製する。

【0154】

アルキルホスホノチオエートオリゴヌクレオチドは、本明細書中で参考文献として援用される、公開されたPCT出願PCT/US94/00902及びPCT/US93/06976(それぞれWO 94/17093及びWO 94/02499として公開)に記載の通り、調製する。

40

【0155】

3'-デオキシ-3'-アミノホスホールアミデートオリゴヌクレオチドは、本明細書中で参考文献として援用される、アメリカ合衆国特許5,023,243に記載の通り、調製する。

【0156】

ホスホトリエステルオリゴヌクレオチドは、本明細書中に参考文献として援用されるアメリカ合衆国特許5,023,234に記載の通り、調製する。

ボランリン酸オリゴヌクレオチドは、共に本明細書中で参考文献として援用される、アメリカ合衆国特許5,130,302及び5,177,198に記載の通り、調製する。

50

【0157】

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も同一であ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も同一であるメチレンジメチルヒドラゾ結合オリゴヌクレオシド、及び、アミド-3結合オリゴヌクレオシドとも同一であるメチレンカルボニルアミノ結合オリゴヌクレオシド、及び、アミド-4結合オリゴヌクレオシドとも同一であるメチレンアミノカルボニル結合オリゴヌクレオシド、そして、例えば、MMIとP=OあるいはP=S結合とを換えたものを有する混合バックボーン化合物は、そのすべてが本明細書中で参考文献として援用される、アメリカ合衆国特許5,378,825、5,386,023、5,489,677、5,602,240及び5,610,289、に記載の通り、調製する。

10

【0158】

ホルムアセタール及びチオホルムアセタール結合オリゴヌクレオシドは、本明細書中で参考文献として援用される、アメリカ合衆国特許5,264,562及び5,264,564に記載の通り、調製する。

【0159】

エチレンオキシド結合オリゴヌクレオシドは、本明細書中で参考文献として援用される、アメリカ合衆国特許5,223,618に記載の通り、調製する。

実施例4

PNA合成

20

ペプチド核酸 (PNAs) は、ペプチド核酸 (PNA) に関する様々な方法: Synthesis, Properties and Potential Applications, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 1996, 4, 5-23 のいずれかに従って、調製される。それらはまた、本明細書中で参考文献として援用される、アメリカ合衆国特許5,539,082、5,700,922、及び、5,719,262に従ってもまた、調製され得る。

【0160】

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、または、混合オリゴヌクレオチド/オリゴヌクレオシドは、いくつかの異なる型でありうる。これらは、結合ヌクレオシドの“ギャップ”セグメントが結合ヌクレオシドの5'あるいは3' “ウィング”セグメントの間に位置する第一の型、及び、“ギャップ”セグメントがオリゴマー化合物の3'あるいは5'端のどちらかに位置する、第二の“オープンエンド”型を含む。第一の型のオリゴヌクレオチドは、当該技術分野において、“ギャップマー”あるいはギャップ化オリゴヌクレオチドとしても知られる。第二の型のオリゴヌクレオチドは、当該技術分野において、“ヘミマー”あるいは“ウィングマー”としても知られる。

30

【0161】

[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を有するキメラオリゴヌクレオチド及び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、上記の通り、Applied Biosystems自動DNAシンセサイザーModel 380Bを使用して合成する。オリゴヌクレオチドは、自動シンセサイザーを用い、及び、DNA部分には2'-デオキシ-5'-ジメトキシトリチル-3'-O-ホスホールアミダイトを、そして、5'及び3'ウィングには5'-ジメトキシトリチル-2'-O-メチル-3'-O-ホスホールアミダイトを使用して、合成する。標準的な合成サイクルを、テトラゾール及び塩基のデリバリ後待機段階を600秒に増加することにより修正し、RNAについては4回、2'-O-メチルについては2回繰り返した。完全に保護されたオリゴヌクレオチドを支持体から解離し、そして、室温で一晩、3:1アンモニア/エタノール中で、リン酸基を脱保護し、その後、凍結乾燥により乾燥させる。その後、室温で24時間、メタノールアンモニア中で処理することによりすべての塩基を脱保護し、そして、試料を再び凍結乾燥に

40

50

より乾燥させる。ペレットをTHF中1 M TBAFに、室温で24時間懸濁し、2'位を脱保護する。次に、反応を1 M TEAAで停止し、そして次に試料をrotovacにより1/2量に減少させ、G25サイズ排除カラムにより脱塩する。回収したオリゴは次に、キャピラリー電気泳動により、また、質量分析により、収量について、また、純度について、分光光度的に分析される。

【0162】

〔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-(メトキシエチル)アミダイトを2'-O-メチルアミダイトに置き換えた2'-O-メチルキメラオリゴヌクレオチドのための上記の方法に従って、調製した。

10

【0163】

〔2'-O-(2-メトキシエチル)ホスホジエステル〕--〔2'-デオキシホスホロチオエート〕--〔2'-O-(2-メトキシエチル)ホスホジエステル〕キメラオリゴヌクレオチド
〔2'-O-(2-メトキシエチル)ホスホジエステル〕--〔2'-デオキシホスホロチオエート〕--〔2'-O-(2-メトキシエチル)ホスホジエステル〕キメラオリゴヌクレオチドは、2'-O-(メトキシエチル)アミダイトを2'-O-メチルアミダイトに置き換えた、2'-O-メチルキメラオリゴヌクレオチドについての上記の方法、キメラ構造のウィング部分中のホスホジエステルヌクレオチド間結合を作るためのヨウ素を用いる酸化、中央ギャップのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を作るための3, H-1, 2ベンゾジチオール-3-オン1, 1ジオキシド (Beaucage Reagent) を使用する硫化に従って、調製する。

20

【0164】

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及び混合キメラオリゴヌクレオチド/オリゴヌクレオシドは、本明細書中で参考文献として援用される、アメリカ合衆国特許5,623,065に従って合成される。

【0165】

実施例6

オリゴヌクレオチドの単離

制御孔ガラスカラム (Applied Biosystems) から分離し、そして、濃縮された水酸化アンモニウム中、55℃、18時間、脱ブロック化した後、オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオシドは、0.5 M NaClから2.5倍量のエタノールを用いた2回の沈殿により精製する。合成されたオリゴヌクレオチドは、変性ゲル上でのポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析され、そして、少なくとも85%の全長物質であると判断された。合成により得られたホスホロチオエート及びホスホジエステル結合の相対的な量は、定期的に³¹P核磁気共鳴分光器により検査され、そして、いくつかの研究のため、オリゴヌクレオチドをChiangら (J. Biol. Chem. 1991, 266, 18162-18171) により記載の通り、HPLCで精製した。HPLC精製産物を用いて得られた結果は、非HPLC精製産物から得られたものと同様だった。

30

【0166】

実施例7

オリゴヌクレオチド合成 - 96ウェルプレート型

オリゴヌクレオチドを、固相P (III) ホスホールアミダイト化学により、標準的な96ウェル型に同時に96配列を構築することができる自動シンセサイザーで合成した。ホスホロジエステルヌクレオチド間結合はヨウ素水溶液を用いる酸化によって得られた。ホスホロチオエートヌクレオチド間結合は、無水アセトニトリル中3, H-1, 2ベンゾジチオール-3-オン1, 1ジオキシド (Beaucage Reagent) を使用した硫化により、生成した。標準的な塩基保護 - シアノエチルジイソプロピルホスホールアミダイトは、商業販売者 (例えば、PE-Applied Biosystems, Foster City, CAまたはPharmacia, Piscataway, NJ) から購入した。非標準ヌクレオシドは、既知の文献、あるいは、特許の方法の通り、合成する。それらは、塩基保護 - シアノエチルジイソプロピルホスホールアミダイトとして使用される。

40

50

【 0 1 6 7 】

オリゴヌクレオチドを支持体から解離し、そして、高温（55-60℃）にて、12 - 16時間、濃縮NH₄OHにより脱保護し、そして放出された生成物を次に減圧下で乾燥した。乾燥した生成物を次に滅菌水に再懸濁して、マスタープレートを得て、そこからすべての分析及び試験プレート試料をロボットピペッターを使用して希釈する。

【 0 1 6 8 】

実施例8

オリゴヌクレオチド分析 - 96ウェルプレート型

各ウェルのオリゴヌクレオチドの濃度を、試料の希釈及びUV吸収分光器により調査した。個々の生成物の全長の完全性を、キャピラリー電気泳動（CE）により、96ウェル型（Beckman P/ACETM MDQ）で、あるいは、個々に調製した試料については、市販のCE器具（例えば、Beckman P/ACETM 5000, ABI 270）で、評価した。塩基及びバックボーン構成は、エレクトロスプレー質量分光計を使用する化合物の質量分析により、確かめられた。すべてのアッセイ検査プレートは、マスタープレートから、シングルあるいはマルチチャンネルのロボットピペッターを使用して希釈した。プレートは、プレート上の化合物の少なくとも85%が、少なくとも全長の85%であれば、許容可能であると判断した。

10

【 0 1 6 9 】

実施例9

細胞培養及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効果は、測定可能なレベルで標的核酸が存在する場合、様々な細胞タイプのいずれにおいても、試験することができる。これは、例えば、PCRあるいはノザンプロット分析を使って日常的に決定され得る。以下の4つの細胞タイプは説明するために提供されるが、標的が選択された細胞タイプ中において発現される場合には、他の細胞タイプを日常的に使用することができる。これは、当該技術分野において日常的な方法、たとえばノザンプロット解析、リボヌクレアーゼ保護アッセイ、あるいはRT-PCR、により容易に確認することができる。

20

【 0 1 7 0 】

T-24細胞：

ヒト移行上皮細胞（transitional cell）膀胱癌細胞株T-24細胞はAmerican Type Culture Collection（ATCC）（Manassas, VA）より入手した。T-24細胞は、日常的に、10%ウシ胎児血清（Gibco/Life Technologies, Gaithersburg, MD）、100 u/mlペニシリン、100 µg/mlストレプトマイシン（Gibco/Life Technologies, Gaithersburg, MD）を加えた、完全McCoy's 5A基本培地（Gibco/Life Technologies, Gaithersburg, MD）で、培養した。細胞は、日常的に、それが90%コンフルエンスに達したら、トリプシン処理及び希釈により継代した。RT-PCR分析において使用するため、細胞を96ウェルプレート（Falcon-Primaria #3872）に7000細胞/ウェルの濃度でまいた。

30

【 0 1 7 1 】

ノザンプロットあるいは他の分析のため、細胞を100 mmあるいは他の標準的な組織培養プレートにまき、そして、適切な量の培地及びオリゴヌクレオチドを使用して、同様の処理をすることができる。

40

【 0 1 7 2 】

A549細胞：

ヒト肺癌細胞株A549は、American Type Culture Collection（ATCC）（Manassas, VA）より入手した。A549は、日常的に、10%ウシ胎児血清（Gibco/Life Technologies, Gaithersburg, MD）、100 u/mlペニシリン、100 µg/mlストレプトマイシン（Gibco/Life Technologies, Gaithersburg, MD）を加えた、DMEM基本培地（Gibco/Life Technologies, Gaithersburg, MD）で培養した。細胞は、日常的に、それが90%コンフルエンスに達したら、トリプシン処理及び希釈により継代した。

【 0 1 7 3 】

NHDF細胞：

50

ヒト新生児皮膚線維芽細胞 (NHDF) は、Clonetics Corporation (Walkersville MD) より入手した。NHDFは日常的に、提供者により推奨される通り添加した線維芽細胞成長培地 (Clonetics Corporation, Walkersville MD) で維持した。細胞は提供者により推奨される通り、10継代まで維持した。

【0174】

HEK細胞：

ヒト胎児ケラチノサイト (HEK) はClonetics Corporation (Walkersville MD) より入手した。HEK細胞は、日常的に、提供者により推奨される通り製剤化されたケラチノサイト成長培地 (Clonetics Corporation, Walkersville MD) で維持した。細胞は、日常的に、提供者により推奨される通り、10継代まで維持した。

10

【0175】

アンチセンス化合物の処理：

細胞が80%コンフルエンスに達したとき、オリゴヌクレオチドにより処理した。96ウェルプレートで生育した細胞について、ウェルを200 μ LのOPTI-MEM™-1減少血清培地 (Gibco BRL) で一度洗浄し、次に3.75 μ g/mL LIPOFECTIN™ (Gibco BRL) 及び望ましい濃度のオリゴヌクレオチドを含む、130 μ LのOPTI-MEM™-1で処理した。4~7時間処理後、培地をフレッシュな培地に交換した。オリゴヌクレオチド処理後16~24時間後に細胞を回収した。

【0176】

使用したオリゴヌクレオチドの濃度は、細胞株ごとに变化させる。特定の細胞株に対する最適オリゴヌクレオチド濃度を決定するため、細胞をある濃度範囲の陽性対照オリゴヌクレオチドにより処理する。ヒト細胞については、陽性対照オリゴヌクレオチドは、ヒトH-rasを標的とし、ホスホロチオエートバックボーンを有する2'-O-メトキシエチルギャップマー (2'-O-メトキシエチルは太字で示した) である、ISIS 13920、

20

【0177】

【化1】

TCCGTCATCGCTCCTCAGGG, SEQ ID NO: 1

【0178】

である。マウスまたはラット細胞については、陽性対照オリゴヌクレオチドは、マウスc-rafおよびラットc-rafの両方を標的とし、ホスホロチオエートバックボーンを有する2'-O-メトキシエチルギャップマー (2'-O-メトキシエチルは太字で示した) である、ISIS 15770、

30

【0179】

【化2】

ATGCATTCTGCCCCCAAGGA, SEQ ID NO: 2

【0180】

である。c-Ha-ras (ISIS 13920) mRNAまたはc-raf (ISIS 15770) mRNAの80%の阻害を引き起こす陽性対照オリゴヌクレオチドの濃度を、その細胞株について引き続いて実験する際に利用する。80%の阻害が達成されない場合、H-rasまたはc-raf mRNAの60%の阻害を引き起こす陽性対照オリゴヌクレオチドの最低濃度を、その細胞株について引き続いて実験する際に、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%の阻害が達成されない場合、その特定の細胞株はオリゴヌクレオチドトランスフェクション実験については適していないものと判断する。

40

【0181】

実施例10

クラスタリン発現のオリゴヌクレオチド阻害の分析

クラスタリン発現のアンチセンスモジュレーションは、当該技術分野において知られる様

50

々な方法でアッセイすることができる。例えば、クラスタリン mRNAレベルは、例えばノザンプロット分析、競合的ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、あるいは、リアルタイムPCR（RT-PCR）により、定量され得る。リアルタイム定量PCRが現在のところ好ましい。RNA分析は、全細胞内RNA、あるいは、ポリ（A）+ mRNAについて行うことができる。RNA単離の方法は、例えば、Ausubel, F.M. ら（Current Protocols in Molecular Biology, Volume 1, pp. 4.1.1-4.2.9 及び4.5.1-4.5.3, John Wiley & Sons, Inc., 1993）に教示される。ノザンプロット分析は、当該技術分野においては、日常的な方法であり、また、例えば、Ausubel, F.M. ら（Current Protocols in Molecular Biology, Volume 1, pp. 4.2.1-4.2.9, John Wiley & Sons, Inc., 1996）に教示される。リアルタイム定量（PCR）は、PE-Applied Biosystems（Foster City, CA）から入手可能な、市販のABI PRISM™ 7700 Sequence Detection Systemを使用することにより、都合よく成し遂げられ、そして、製造者の指示に従って使用される。定量的PCR解析の前に、測定される標的遺伝子に対して特異的なプライマー-プローブセットを、GAPDH増幅反応とともに“多重化される”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部標準遺伝子GAPDHの両方を、単一サンプル中で同時に増幅する。この解析において、非処理細胞から単離されるmRNAは、階段希釈される。それぞれの希釈物は、GAPDHのみまたは標的遺伝子だけに特異的なプライマー-プローブセットの存在下（“単一反応性（single-plexing）”）、もしくは両方に特異的なプライマー-プローブセットの存在下（多重性）において増幅させる。PCR増幅の後、GAPDHおよび標的mRNAシグナルの標準曲線を、希釈の関数として単一反応性サンプルおよび多重反応性サンプルの両方から作成する。多重反応性サンプルから作成されたGAPDHシグナルおよび標的シグナルの傾きおよび相関係数が、単一反応性サンプルから作成されたそれらの対応する値の10%以内に収まる場合には、その標的に対して特異的なプライマー-プローブセットは、多重性であるとみなされる。PCRの他の手法もまた、当該技術分野において、既知である。

【0182】

クラスタリンタンパク質レベルは、免疫沈降、ウエスタンブロット分析（イムノブロット）、ELISA、あるいは、蛍光活性化細胞分取器（FACS）といった、当該技術分野において既知である様々な手法により定量され得る。クラスタリンに対する抗体は同定され、そして、MSRSの抗体カタログ（Aerie Corporation, Birmingham, MI）といった、様々な供給者から入手することが可能であり、または、従来からの抗体作成方法により調製し得る。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, Volume 2, pp. 11.12.1-11.12.9, John Wiley & Sons, Inc., 1997）に教示される。モノ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, Volume 2, pp. 11.4.1-11.11.5, John Wiley & Sons, Inc., 1997）に教示される。

【0183】

免疫沈降方法は、当該技術分野において標準的であり、また、例えば、Ausubel, F.M. ら（Current Protocols in Molecular Biology, Volume 2, pp. 10.16.1-10.16.11, John Wiley & Sons, Inc., 1998）において見いだすことができる。ウエスタンブロット（イムノブロット）分析は、当該技術分野において標準的であり、例えば、Ausubel, F.M. ら（Current Protocols in Molecular Biology, Volume 2, pp. 10.8.1-10.8.21, John Wiley & Sons, Inc., 1998）において見いだすことができる。酵素免疫吸着測定法（ELISA）は、当該技術分野において標準的であり、また、例えば、Ausubel, F.M. ら（Current Protocols in Molecular Biology, Volume 2, pp. 11.2.1-11.2.22, John Wiley & Sons, Inc., 1991）において見つけることができる。

【0184】

実施例11

ポリ（A）+ mRNA単離

ポリ（A）+ mRNAは、Miuraら（Clin. Chem., 1996, 42, 1758-1764）に従って、単離された。ポリ（A）+ mRNA単離のための他の方法は、例えば、Ausubel, F.M. ら（Current Prot

10

20

30

40

50

ocols in Molecular Biology, Volume 1, pp. 4.5.1-4.5.3, John Wiley & Sons, Inc., 1993) に教示される。簡潔には、96ウェルプレート上で培養した細胞において、細胞から増殖培地を除き、そして、各ウェルを200 μ L冷PBSで洗浄した。60 μ L溶解バッファー (10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM EDTA, 0.5 M NaCl, 0.5% NP-40, 20 mM バナジル-リボヌクレオシド複合体) を各ウェルに加え、プレートをゆっくり揺り動かし、そして次に、室温で5分間インキュベートした。溶解物55 μ Lをオリゴd (T) をコートした96ウェルプレート (AGCT Inc., Irvine CA) に移した。プレートを、60分、室温でインキュベートし、洗浄バッファー (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM EDTA, 0.3 M NaCl) 200 μ Lで3回洗浄した。最後の洗浄の後、プレートをペーパータオルに当てて、余分な洗浄バッファーを取り除き、そしてその後、5分間風乾した。70 に前もって熱した、溶出バッファー (5 mM Tris-HCl pH 7.6) 60 μ Lを、各ウェルに加え、プレートを90 ホットプレートで5分間インキュベートし、そして、次に溶出物を新しい96ウェルプレートに移した。

【 0 1 8 5 】

100 mmあるいは他の標準的なプレートに培養した細胞は、適する容量のすべての溶液を用いて、同様に処理し得る。

実施例12

全RNA単離

全mRNAは、Qiagen Inc. (Valencia CA) より購入したRNEASY 96TMキット及びバッファーを用い、製造者の推薦する方法に従って単離した。簡潔には、96ウェルプレート上で培養した細胞において、増殖培地を細胞から除き、そして、各ウェルを200 μ L冷PBSで洗浄した。100 μ LのバッファーRLTを各ウェルに加え、そして、プレートを20秒間激しく揺り動かした。70%エタノール100 μ Lを次に各ウェルに加え、内容物を3回上下にピペティングして混ぜた。次に試料を排水回収トレイに合わせたQIAVACTMマニホルドに取り付け、そして減圧装置に取り付けた、RNEASY 96TMウェルプレートに移した。減圧は15秒間行われた。1 mLのバッファーRW1をRNEASY 96TMプレートの各ウェルに加え、そして、再び減圧を15秒間行った。その後、1 mLのバッファーRPEをRNEASY 96TMプレートの各ウェルの添加し、そして減圧を15秒間行った。バッファーRPE洗浄を次に繰り返し、さらに10分間減圧を行った。プレートをQIAVACTMマニホルドから取り外し、そしてペーパータオルにあてて乾燥させた。プレートを次に、1.2 mL回収チューブを含む、回収チューブラックに合わせたQIAVACTMマニホルドにもう一度取り付けた。RNAを次に各ウェル中の60 μ Lの水をピペティングすることにより溶出し、1分間インキュベートし、そして次に、30秒間減圧を行った。さらに60 μ Lの水を用いて、溶出段階を繰り返した。

【 0 1 8 6 】

繰り返しのピペティング及び溶出段階を、QIAGEN Bio-Robot 9604 (Qiagen, Inc., Valencia CA) を用いて、自動化することができる。本質的には、培養プレート上で細胞を溶解した後、プレートをロボットデッキに移し、そこで、ピペティング、DNase処理、及び、溶出段階が実行される。

【 0 1 8 7 】

実施例13

クラスタリン mRNAレベルのリアルタイム定量PCR分析

クラスタリン mRNAレベルの定量は、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) を製造者の指示に従って使用して、リアルタイム定量PCRにより決定された。これは、閉じられたチューブで、ゲルに基づいてなく、リアルタイムにポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 産物のハイスループット定量ができる蛍光検出システムである。PCRが終了した後に、増幅産物が定量される標準的なPCRとは対照的に、リアルタイム定量PCR産物はそれが蓄積するに従って定量される。これは、PCR反応にフォワード及びリバースPCRプライマーの間に特異的にアニールし、そして2つの蛍光色素を含むオリゴヌクレオチドを含むことにより達せられる。レポーター色素 (例えば、Operon Technologies Inc., Alameda, CA またはPE-Applied Biosystems, Foster City, CAのどちらかから入手可能なJOE、FAMあるいはVIC) は、プローブの5'端に結合し、そして、クエ

ンチャー色素（例えば、Operon Technologies Inc., Alameda, CAまたはPE-Applied Biosystems, Foster City, CAのどちらかから入手可能なTAMRA）は、プローブの3'端に結合する。プローブ及び色素が完全なとき、レポーター色素の発光は3'クエンチャー色素の近接により消失される。増幅の間、プローブの標的配列へのアニーリングはTaqポリメラーゼの5'-エキソヌクレアーゼ活性により切断されうる基質を作り出す。PCR増幅サイクルの伸長相の間、Taqポリメラーゼによるプローブの切断はプローブの残りから（そしてつまりクエンチャー部分から）レポーター色素を放出し、そして、配列特異的な蛍光シグナルが生み出される。各サイクルで、さらなるレポーター色素分子はその対応するプローブから解離され、そして、蛍光強度は、ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection Systemに組み込まれるレーザー光により、一定のインターバルでモニターされる。各アッセイにおいて、未処理の対照試料由来mRNAの希釈系列を含む、並行した一連の反応は、試験試料の、アンチセンスオリゴヌクレオチド処理後の阻害パーセントを定量するのに用いられる、標準曲線を生み出す。

10

【0188】

PCR試薬はPE-Applied Biosystems (Foster City, CA) より入手した。RT-PCR反応は、25 µLポリ(A)mRNA溶液を含む96ウェルプレートに、25 µL PCRカクテル（1×TAQMAN™ バッファーA、5.5 mM MgCl₂、各300 µMのdATP、dCTP及びdGTPを、600 µMのdUTP、フォワードプライマー、リバースプライマー、及び、プローブを各100 nM、20 U RNaseインヒビター、1.25 U AMPLITAQ GOLD™及び12.5 U MuLV逆転写酵素）を加えることにより実行した。RT反応は48 で30分のインキュベーションにより実行された。AMPLITAQ GOLD™を活性化するために95 にて10分間のインキュベーションした後、40サイクルの2段階PCRプロトコールを実行した：95 15秒間（変性）続いて60 1.5分間（アニーリング/伸長）。

20

【0189】

刊行物に記載された配列情報（本明細書中でSEQ ID NO:3として援用されるGenBankアクセス番号M64722）を使用して、ヒトクラスタリンに対するプローブおよびプライマーを、ヒトクラスタリン配列にハイブリダイズするように設計した。

【0190】

ヒトクラスタリンについて、PCRプライマーは：

フォワードプライマー：TCCGTACGAGCCCCTGAA（SEQ ID NO: 4）、

リバースプライマー：TGAGCCTCGTGTATCATCTCAAG（SEQ ID NO: 5）、および

30

PCRプローブ：FAM-TCCACGCCATGTTCCAGCCCT-TAMRA（SEQ ID NO: 6）、

であり、ここでFAM（PE-Applied Biosystems, Foster City, CA）は蛍光レポーター色素であり、そして、TAMRA（PE-Applied Biosystems, Foster City, CA）はクエンチャー色素である。

【0191】

ヒトGAPDH用のPCRプライマーは：

フォワードプライマー：CAACGGATTTGGTCGTATTGG（SEQ ID NO: 7）

リバースプライマー：GGCAACAATATCCACTTTACCAGAGT（SEQ ID NO: 8）であり、及び

PCRプローブは：5' JOE-CGCCTGGTCACCAGGGCTGCT-TAMRA 3'（SEQ ID NO: 9）であり、JOE（PE-Applied Biosystems, Foster City, CA）は蛍光レポーター色素であり、そして、TAMRA（PE-Applied Biosystems, Foster City, CA）はクエンチャー色素である。

40

【0192】

実施例14

クラスタリン mRNAレベルのノザンプロット分析

アンチセンス処理の18時間後、単層の細胞を冷PBSで2回洗浄し、そして、1 mL RNAZOL™（TEL-TEST “B” Inc., Friendswood, TX）に溶解した。全RNAは製造者が推薦するプロトコルに従って調製した。MOPSバッファーシステム（AMRESCO, Inc. Solon, OH）を用い、1.1%ホルムアルデヒドを含む1.2%アガロースゲルによる電気泳動により、20マイクログラムの全RNAを分離した。Northern/Southern Transferバッファーシステム（TEL-TEST “B” Inc., Friendswood, TX）を使用して、一晚キャピラリートランスファーすること

50

によって、RNAをゲルからHYBONDTM-N+ ナイロンメンブレン (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) に移した。RNAのトランスファーは、UV可視化により確認した。メンブレンをSTRATALINKERTM UV Crosslinker 2400 (Stratagene, Inc, La Jolla, CA) を使用して、UV架橋により固定し、次いでQUICKHYBTMハイブリダイゼーション溶液 (Stratagene, La Jolla, CA) を使用し、ストリンジェントな条件についての製造者の推奨を用いて、プローブ化した。

【0193】

ヒトクラスタリンを検出するため、ヒトクラスタリン特異的プローブを、フォワードプライマー-TCCGTACGAGCCCCTGAA (SEQ ID NO: 4) およびリバースプライマー-TGAGCCTCGTGTATCA TCTCAAG (SEQ ID NO: 5) を使用したPCRにより調製した。ロード効率及びトランスファー効率における多様性を標準化するため、メンブレンをストリップ化し、そして、ヒトグリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ (GAPDH) RNA (Clontech, Palo Alto, CA) についてプローブ化した。

10

【0194】

PHOSPHORIMAGERTMおよびIMAGEQUANTTM Software V3.3 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) を用いて、ハイブリダイズしたメンブレンを可視化し、そして、定量した。データは未処理対照におけるGAPDHレベルに標準化した。

【0195】

実施例15

2'-MOEウィングおよびデオキシギャップを有するキメラホスホロチオエートオリゴヌクレオチドによるヒトクラスタリン発現のアンチセンス阻害

20

本発明に従って、一連のオリゴヌクレオチドを、刊行物に記載された配列 (本明細書中でSEQ ID NO: 3として援用されるGenBankアクセッション番号M64722、本明細書中でSEQ ID NO: 10として援用されるGenBankアクセッション番号L00974、本明細書中でSEQ ID NO: 11として援用されるGenBankアクセッション番号M63377、本明細書中でSEQ ID NO: 12として援用されるGenBankアクセッション番号M63376、そして本明細書中でSEQ ID NO: 13として援用されるGenBankアクセッション番号M25915) を用いて、ヒトクラスタリン RNAの異なる領域を標的とするように設計した。オリゴヌクレオチドは表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上の最初 (最も5'-端) のヌクレオチド番号を示す。表1中のすべての化合物は、両方の端 (5'及び3'方向) を5'-ヌクレオチドの“ウィング”によって挟まれた、10個の2'-デオキシヌクレオチドからなる中央“ギャップ”領域から構成される、長さが20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。ウィングは、2'-メトキシエチル (2'-MOE) ヌクレオチドからなる。ヌクレオチド間 (バックボーン) 結合はオリゴヌクレオチド全体にわたりホスホロチオエート (P=S) である。全てのシチジン残基は5-メチルシチジンである。化合物を、ヒトクラスタリン mRNAレベルに対するそれらの効果について、本明細書中の他の実施例に記載の通り、定量的リアルタイムPCRにより分析した。データは2回の実験からの平均である。存在する場合、“N.D.”は“データなし”を示す。

30

【0196】

【表1】

40

表 1: 2'-MOE ウィングおよびデオキシギャップを有するキメラホスホロチオエート
オリゴヌクレオチドによる、ヒトクラスタリン mRNA レベルの阻害

ISIS #	領域	標的 SEQ ID NO	標的 部位	配列	%阻害	SEQ ID NO
129045	5' UTR	3	18	gtctttgcacgcctcgggtca	64	14
129046	5' UTR	3	26	attctggagtcctttgcacgc	64	15
129047	開始コドン	3	44	gtcttcatcatgcctccaat	68	16
129048	コーディング	3	82	tctcccaggctcagcagcagc	67	17
129049	コーディング	3	106	tctggctccccaggacctgc	46	18
129050	コーディング	3	127	ggagctcatgtgtcagagacc	59	19
129052	コーディング	3	154	acttacttccttgattggac	77	20
129053	コーディング	3	171	aatttccttattgacgtact	68	21
129054	コーディング	3	206	gtctttatctgtttcacccc	85	22
129055	コーディング	3	286	gggcatcctctttcttcttc	64	23
129056	コーディング	3	291	atttagggcatcctctttct	31	24
129057	コーディング	3	303	ttccctgggtctcatcttaggg	68	25
129058	コーディング	3	312	tgtctctgattccctgggtct	79	26
129059	コーディング	3	329	gggagctccttcagctttgt	49	27
129060	コーディング	3	364	cccagagggccatcatggtc	45	28
129061	コーディング	3	369	ctcttcccagagggccatca	36	29
129062	コーディング	3	385	tcaggcagggcttacactct	70	30
129063	コーディング	3	412	gtgcgtagaacttcatgcag	60	31
129064	コーディング	3	448	ggcggccaaccaggcctgag	42	32
129065	コーディング	3	449	tggcggccaaccaggcctga	32	33
129066	コーディング	3	460	actcctcaagctggcggcca	67	34
129067	コーディング	3	487	agtagaagggcgagctctgg	63	35
129068	コーディング	3	497	ttcatccagaagtagaagg	41	36
129069	コーディング	3	522	cagcagggagtcgatgcggt	60	37
129070	コーディング	3	538	gctgccggctcgttctccagc	51	38
129071	コーディング	3	556	catccagcatgtgcgtctgc	69	39
129072	コーディング	3	558	gacatccagcatgtgcgtct	55	40
129073	コーディング	3	570	gtggctcctgcatgacatcca	62	41
129074	コーディング	3	572	aagtggctcctgcatgacatc	41	42
129075	コーディング	3	609	ctggaagagctcgtctatga	67	43
129076	コーディング	3	613	tgtcctggaagagctcgtct	69	44
129077	コーディング	3	618	gaacctgtcctggaagagct	68	45
129078	コーディング	3	695	ggaaagaagaagtgaaggcct	44	46
129079	コーディング	3	726	gggcatcaagctgcggacga	65	47
129080	コーディング	3	780	ctcaaggaaggctggaaca	81	48
129081	コーディング	3	781	tctcaaggaaggctggaac	81	49
129082	コーディング	3	788	tgtatcatctcaaggaagg	38	50
129083	コーディング	3	825	gctgtggaagtgatgtcca	48	51
129084	コーディング	3	853	attctgttggcgggtgctgg	50	52
129085	コーディング	3	858	tatgaattctgttggcgggt	36	53
129086	コーディング	3	898	ggatctcccggcacacagtc	68	54
129087	コーディング	3	899	cggatctcccggcacacagt	70	55

【 0 1 9 7 】

129088	コーディング	3	911	gtggagttgtggcgatctc	69	56
129089	コーディング	3	933	gtccttcatccgcaggcagc	56	57
129090	コーディング	3	972	acagtcacagacaagatct	49	58
129092	コーディング	3	1014	gagctcccgcgcagcttag	22	59
129093	コーディング	3	1027	ggaggattctcgcagctcc	55	60
129094	コーディング	3	1088	atcttccactggttaggactt	50	61
129095	コーディング	3	1096	tgttgagcatcttccactgg	62	62
129096	コーディング	3	1118	agctgtccagcaaggagga	46	63
129097	コーディング	3	1126	gctcgttcagctgctccagc	43	64
129098	コーディング	3	1153	ttgccagccgggacacccag	72	65
129099	コーディング	3	1187	cgcagatagtagtggcttctc	61	66
129100	コーディング	3	1199	accgtgggtgacccgcagata	73	67
129101	コーディング	3	1221	cgagtcagaagtgtgggaag	24	68
129102	コーディング	3	1280	gtgatgggatcagagtcata	38	69
129103	コーディング	3	1305	ggagacttctacagggaccg	63	70
129104	コーディング	3	1337	gccacgggtctccataaattt	70	71
129106	3' UTR	3	1403	gcaaaagcaacatccacatc	74	72
129107	3' UTR	3	1550	tagagtgcaggatccagagc	71	73
129108	3' UTR	3	1605	attagttgcatgcaggagca	71	74
129109	3' UTR	3	1620	agacagttttattgaattag	11	75
129118	イントロン	10	2819	cgagatagagccactgtacg	44	76
129119	イントロン	10	4646	tgccaccacccccgggtgat	13	77
129091	イントロン-エクソン 結合部	10	5849	gttgttggtggaacagtcca	40	78
129120	イントロン-エクソン 結合部	10	7384	tgcttaccgggtgctttttgc	46	79
129105	イントロン-エクソン 結合部	10	7600	acatctcactcctcccggtg	70	80
129121	3' UTR	10	7855	gaccctccaagcgatcagct	20	81
129122	3' UTR	10	7863	aaaaagaggaccctccaagc	39	82
129115	イントロン-エクソン 結合部	11	322	tgtgtcccccttttcacctgg	54	83
129116	イントロン	11	445	attaccaatggagcatggca	43	84
129117	イントロン	11	810	caacatggccaaaccccatg	55	85
129112	イントロン	12	1766	gcggcaggtctccaggtctc	43	86
129110	イントロン	12	4813	ttcccttcggagagtagaga	44	87
129113	イントロン	12	5848	tgcttgggaaatgcctgcaa	34	88
129114	イントロン	12	6936	agctggatgccagaaaggcc	40	89
129111	5' UTR	13	39	tggaagtagtggagccagg	11	90

10

20

30

【0198】

表1に示されるように、SEQ ID NO: 14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、60、61、62、63、64、65、66、67、69、70、71、72、73、74、76、78、79、80、82、83、84、85、86、87、88および89は、このアッセイにおいて、少なくとも30%のヒトクラスタリンの発現の阻害が証明され、そして、それゆえ好ましい。これらの好ましい配列が相補的である標的部位は、本明細書中で“活性部位”と呼ばれ、そしてしたがって本発明の化合物により標的化するためには好ましい部位である。

40

【0199】

実施例16

クラスタリントタンパク質レベルのウエスタンブロット分析

ウエスタンブロット（イムノブロット分析）は標準的な方法を用いて行われる。細胞をオリゴヌクレオチド処理の16-20時間後に回収し、PBSで1回洗浄し、Laemmliバッファ（100 μl/well）に懸濁し、5分間煮沸し、そして、16%SDS-PAGEゲルにロードする。ゲルを1.5時間、150 Vで泳動し、そして、ウエスタンブロットのために、メンブレンにトランスファーする。クラスタリンに対する適する第一抗体を、第一抗体の種に対する放射ラベルし

50

た、あるいは、蛍光ラベルした第二抗体とともに使用する。バンドをPHOSPHORIMAGER™ (Molecular Dynamics, Sunnyvale CA) を使用して、可視化する。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Isis Pharmaceuticals, Inc.
Brett P. Monia
Susan M. Freier

<120> ANTISENSE MODULATION OF CLUSTERIN EXPRESSION

<130> RTSP-0177

<150> 09/659,791
<151> 2000-09-11

10

<160> 90

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

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 1
tccgtcatcg ctcctcaggg

20

20

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

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 2
atgcattctg cccccaagga

20

<210> 3
<211> 1648
<212> DNA
<213> Homo sapiens

30

<220>
<221> CDS
<222> (53)...(1402)

<400> 3
cgcggacagg gtgccgctga ccgaggcgtg caaagactcc agaattggag gc atg atg 58
Met Met
1

aag act ctg ctg ctg ttt gtg ggg ctg ctg ctg acc tgg gag agt ggg 106

Lys	Thr	Leu	Leu	Leu	Phe	Val	Gly	Leu	Leu	Leu	Thr	Trp	Glu	Ser	Gly		
		5					10					15					
cag	gtc	ctg	ggg	gac	cag	acg	gtc	tca	gac	aat	gag	ctc	cag	gaa	atg	154	
Gln	Val	Leu	Gly	Asp	Gln	Thr	Val	Ser	Asp	Asn	Glu	Leu	Gln	Glu	Met		
	20					25				30							
tcc	aat	cag	gga	agt	aag	tac	gtc	aat	aag	gaa	att	caa	aat	gct	gtc	202	
Ser	Asn	Gln	Gly	Ser	Lys	Tyr	Val	Asn	Lys	Glu	Ile	Gln	Asn	Ala	Val		
	35				40				45						50		
aac	ggg	gtg	aaa	cag	ata	aag	act	ctc	ata	gaa	aaa	aca	aac	gaa	gag	250	
Asn	Gly	Val	Lys	Gln	Ile	Lys	Thr	Leu	Ile	Glu	Lys	Thr	Asn	Glu	Glu		
			55					60						65			
cgc	aag	aca	ctg	ctc	agc	aac	cta	gaa	gaa	gcc	aag	aag	aag	aaa	gag	298	
Arg	Lys	Thr	Leu	Ser	Asn	Leu	Glu	Ala	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Glu		
		70				75					80						
gat	gcc	cta	aat	gag	acc	agg	gaa	tca	gag	aca	aag	ctg	aag	gag	ctc	346	
Asp	Ala	Leu	Asn	Glu	Thr	Arg	Glu	Ser	Glu	Thr	Lys	Leu	Lys	Glu	Leu		
	85					90					95						
cca	gga	gtg	tgc	aat	gag	acc	atg	atg	gcc	ctc	tgg	gaa	gag	tgt	aag	394	
Pro	Gly	Val	Cys	Asn	Glu	Thr	Met	Met	Ala	Leu	Trp	Glu	Glu	Cys	Lys		
	100				105					110							
ccc	tgc	ctg	aaa	cag	acc	tgc	atg	aag	ttc	tac	gca	cgc	gtc	tgc	aga	442	
Pro	Cys	Leu	Lys	Gln	Thr	Cys	Met	Lys	Phe	Tyr	Ala	Arg	Val	Cys	Arg		
	115			120					125					130			
agt	ggc	tca	ggc	ctg	gtt	ggc	cgc	cag	ctt	gag	gag	ttc	ctg	aac	cag	490	
Ser	Gly	Ser	Gly	Leu	Val	Gly	Arg	Gln	Leu	Glu	Glu	Phe	Leu	Asn	Gln		
			135					140						145			
agc	tgc	ccc	ttc	tac	ttc	tgg	atg	aat	ggg	gac	cgc	atc	gac	tcc	ctg	538	
Ser	Ser	Pro	Phe	Tyr	Phe	Trp	Met	Asn	Gly	Asp	Arg	Ile	Asp	Ser	Leu		
		150					155						160				
ctg	gag	aac	gac	cgg	cag	cag	acg	cac	atg	ctg	gat	gtc	atg	cag	gac	586	
Leu	Glu	Asn	Asp	Arg	Gln	Gln	Thr	His	Met	Leu	Asp	Val	Met	Gln	Asp		
		165				170					175						
cac	ttc	agc	cgc	gcg	tcc	agc	atc	ata	gac	gag	ctc	ttc	cag	gac	agg	634	
His	Phe	Ser	Arg	Ala	Ser	Ser	Ile	Ile	Asp	Glu	Leu	Phe	Gln	Asp	Arg		
	180				185						190						
ttc	ttc	acc	cgg	gag	ccc	cag	gat	acc	tac	cac	tac	ctg	ccc	ttc	agc	682	
Phe	Phe	Thr	Arg	Glu	Pro	Gln	Asp	Thr	Tyr	His	Tyr	Leu	Pro	Phe	Ser		
	195				200				205					210			
ctg	ccc	cac	cgg	agg	cct	cac	ttc	ttc	ttt	ccc	aag	tcc	cgc	atc	gtc	730	
Leu	Pro	His	Arg	Arg	Pro	His	Phe	Phe	Phe	Pro	Lys	Ser	Arg	Ile	Val		
			215					220						225			
cgc	agc	ttg	atg	ccc	ttc	tct	ccg	tac	gag	ccc	ctg	aac	ttc	cac	gcc	778	

10

20

30

Arg	Ser	Leu	Met	Pro	Phe	Ser	Pro	Tyr	Glu	Pro	Leu	Asn	Phe	His	Ala		
			230					235					240				
atg	ttc	cag	ccc	ttc	ctt	gag	atg	ata	cac	gag	gct	cag	cag	gcc	atg	826	
Met	Phe	Gln	Pro	Phe	Leu	Glu	Met	Ile	His	Glu	Ala	Gln	Gln	Ala	Met		
		245					250					255					
gac	atc	cac	ttc	cac	agc	ccg	gcc	ttc	cag	cac	ccg	cca	aca	gaa	ttc	874	
Asp	Ile	His	Phe	His	Ser	Pro	Ala	Phe	Gln	His	Pro	Pro	Thr	Glu	Phe		
	260					265					270						
ata	cga	gaa	ggc	gac	gat	gac	cgg	act	gtg	tgc	cgg	gag	atc	cgc	cac	922	
Ile	Arg	Glu	Gly	Asp	Asp	Asp	Arg	Thr	Val	Cys	Arg	Glu	Ile	Arg	His		
275					280					285					290		
aac	tcc	acg	ggc	tgc	ctg	cgg	atg	aag	gac	cag	tgt	gac	aag	tgc	cgg	970	
Asn	Ser	Thr	Gly	Cys	Leu	Arg	Met	Lys	Asp	Gln	Cys	Asp	Lys	Cys	Arg		
			295					300					305				
gag	atc	ttg	tct	gtg	gac	tgt	tcc	acc	aac	aac	ccc	tcc	cag	gct	aag	1018	
Glu	Ile	Leu	Ser	Val	Asp	Cys	Ser	Thr	Asn	Asn	Pro	Ser	Gln	Ala	Lys		
		310						315					320				
ctg	cgg	cgg	gag	ctc	gac	gaa	tcc	ctc	cag	gtc	gct	gag	agg	ttg	acc	1066	
Leu	Arg	Arg	Glu	Leu	Asp	Glu	Ser	Leu	Gln	Val	Ala	Glu	Arg	Leu	Thr		
		325					330					335					
agg	aaa	tac	aac	gag	ctg	cta	aag	tcc	tac	cag	tgg	aag	atg	ctc	aac	1114	
Arg	Lys	Tyr	Asn	Glu	Leu	Leu	Lys	Ser	Tyr	Gln	Trp	Lys	Met	Leu	Asn		
	340					345					350						
acc	tcc	tcc	ttg	ctg	gag	cag	ctg	aac	gag	cag	ttt	aac	tgg	gtg	tcc	1162	
Thr	Ser	Ser	Leu	Leu	Glu	Gln	Leu	Asn	Glu	Gln	Phe	Asn	Trp	Val	Ser		
355					360					365					370		
cgg	ctg	gca	aac	ctc	acg	caa	ggc	gaa	gac	cag	tac	tat	ctg	cgg	gtc	1210	
Arg	Leu	Ala	Asn	Leu	Thr	Gln	Gly	Glu	Asp	Gln	Tyr	Tyr	Leu	Arg	Val		
			375					380						385			
acc	acg	gtg	gct	tcc	cac	act	tct	gac	tcg	gac	gtt	cct	tcc	ggg	gtc	1258	
Thr	Thr	Val	Ala	Ser	His	Thr	Ser	Asp	Ser	Asp	Val	Pro	Ser	Gly	Val		
		390						395					400				
act	gag	gtg	gtc	gtg	aag	ctc	ttt	gac	tct	gat	ccc	atc	act	gtg	acg	1306	
Thr	Glu	Val	Val	Val	Lys	Leu	Phe	Asp	Ser	Asp	Pro	Ile	Thr	Val	Thr		
		405					410					415					
gtc	cct	gta	gaa	gtc	tcc	agg	aag	aac	cct	aaa	ttt	atg	gag	acc	gtg	1354	
Val	Pro	Val	Glu	Val	Ser	Arg	Lys	Asn	Pro	Lys	Phe	Met	Glu	Thr	Val		
	420					425					430						
gcg	gag	aaa	gcg	ctg	cag	gaa	tac	cgc	aaa	aag	cac	cgg	gag	gag	tga	1402	
Ala	Glu	Lys	Ala	Leu	Gln	Glu	Tyr	Arg	Lys	Lys	His	Arg	Glu	Glu			
435					440					445							
gatgtggatg	ttgcttttgc	accttacggg	ggcatcttga	gtccagctcc	ccccaagatg											1462	

10

20

30

agctgcagcc cccagagag agctctgcac gtcaccaagt aaccaggccc cagcctccag 1522
 gcccccaact ccgcccagcc tctcccgcgt ctggatcctg cactctaaca ctgactctg 1582
 ctgctcatgg gaagaacaga attgctcctg catgcaacta attcaataaa actgtcttgt 1642
 gagctg 1648

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

<220>
 <223> PCR Primer

10

<400> 4
 tccgtacgag cccctgaa 18

<210> 5
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR Primer

<400> 5
 tgagcctcgt gtatcatctc aag 23

20

<210> 6
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR Probe

<400> 6
 tccacgccat gttccagccc t 21

<210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR Primer

<400> 7
 caacggattt ggtcgtattg g 21

30

<210> 8
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR Primer

<400> 8
 ggcaacaata tccactttac cagagt 26

<210> 9
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

10

<220>
 <223> PCR Probe

<400> 9
 cgcttggtca ccagggctgc t 21

<210> 10
 <211> 8133
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

20

<400> 10
 gccatgttgc ccaggttggc ctcaaaactcc taagctcaag taatcctcct accttggcct 60
 cccaaattgt tgggattata gatgtgtgcc actatgcca gccaatgtaa gattttgtag 120
 tatattagtg ttgctcctgt cctctgctgc agggcttttt tgattgggac tcagtgaatt 180
 gctccaatcc ctgaagtcac atcagttggc ccttagccga gcgggggtgg atatcattgg 240
 tggccaaaga tgacagtga tgaacctgaa atgttgggco ttgtgacttt tgggcctcca 300
 ggtgtctcaa aactgtcccc catggaggga gataaaagga aagagcatgg acctgacaga 360
 tggggtgctg ggggctggc ccagctgggc tgttggtcac ttgctgtgtg actgttacag 420
 ccatgggcag ggctggcct ggctcaccag ggggtgggag gccaggaggc cgtggccttg 480
 gtgagcttct cctaactgtg cccatgctgg ctgtcccagc ttgaggagtt cctgaaccag 540
 agctgcacct tctaacttctg gatgaatggg gaccgcatcg actccctgct ggagaacgac 600
 cggcagcaga cgcacatgct ggatgtcatg caggaccact tcagccgcgc gtccagcatc 660
 atagacgagc tcttccagga caggttcttc acccgggagc ccaggatac ctaccactac 720

30

ctgcccttca gcctgcccc cgggaggcct cactttctct ttcccaagtc ccgcatcgtc 780
 cgcagcttga tgcccttctc tccgtacgag cccctgaact tccacgccat gttccagccc 840
 ttcccttgaga tgatacacga ggctcagcag gccatggaca tccacttoca cagcccgcc 900
 ttccagcacc cgccaacaga attcatacga ggtgagaagg ggtggaagct catggccttt 960
 tgagcaactc gttagatgct gagaaccatg ccgagggctc agcgggtgtc atctcgattt 1020
 ttctccagca atatcacaag ggtgatatta tctttattta aagaggaaaa aaactgagct 1080
 gggcatggtg gctcatgcct gtgatgccag cactttgaga ggccaaggcg ggaggatcat 1140
 ttgaggccag gagtttgaga ccagcctggc caagatagtg agaccctgtc tctacaaaaa 1200
 taaaaactta aaaaattagc cgggtgtggt ggtgcacacc tgtagtctca gctactcggg 1260
 aggctgaggc aagagagtca cctgagcctg gaagttggag gctgcagtga gctatgattg 1320
 caccattgca ttccagcctg ggcaacagag tgagaccctg tctctaaatt aaaaaataaa 1380
 taaaaataac aataggaatc agtggagtcc atctctgcat ggctggatga ctgactcttc 1440
 ttccctcgty tgtccccaga aggcgacgat gaccggactg tgtgccggga gatccgccac 1500
 aactccacgg gctgcctgcy gatgaaggac cagtgtgaca agtgccggga gatcttgtct 1560
 gtgggtgagt cggggtccag accacaagcc gtccccctg atcccttgty tccgtgggtc 1620
 actggggcct cactggtgct gcctttatgg agtcagacag ataagcgttt ggattccagc 1680
 tctgcagcct ttgagctgtg tcccggggca ggtcctgagc ctcatgcagc ttcggttcc 1740
 catcttagaa tgagatgatg atgcgaggct gtccctgaag tcggtgagat gtcgttagag 1800
 atgcaaaagt gccctccacc tggctcgccc catggtgaaa aaagcttgtt gaaaaaagtc 1860
 atccccctgg gactccccgg tgattctgtt cccaagcgc aagcagtagg catcttcatt 1920
 ttccctctgca gattatgaca ttgcagacag tatgtgtttt gtttaacaaa actgaccaga 1980
 ggccaggcac tgttctaaac actcgacata catttcctca ttccctcaga atgacctct 2040
 gaggaaactg agccacagaa aggttaataa cttatccaag attgaccccg acatggggca 2100
 gctgggcttc aatcctaggg cgctgtgttc tctcctgggg cccctcgag cctctgccac 2160
 agaagtcacg ggtctcagta cctgggcac caagcaatag tccctttggt cggttggttg 2220
 gtccccctag caaagggaat atttccttt aactgtcccc ctccgtttca ccagctctgg 2280
 ttatgggtta acttctttcc acttagagat aacagctgtg acagtatttg gactagttcc 2340
 tggtagacag cagttcatat tcacaaagag ttaattgttt cccctgttc aacagcttat 2400

10

20

30

cgatctggtg gctttgctct tacttaatgc ttagtttgag tttgccatgg caggccgcca 2460
 gggcttagtt aaacattcct agcctcactc ctataatttt agaagccact gcaaaataaa 2520
 cagtttgctt ttaacaggct gaagtataag ttgctgtaga tgagtgcaca accaggcctt 2580
 ggggcttttt ctataaaaaa tatcatagag tggcatcaat tacatggtac ctcaccacaa 2640
 gaaagtcatt ttagggctct agaaaagatg tcagatgcct gtgccagat tggacctctt 2700
 atagctgatt tttactctgt tgcccaggct gggtcaggct tggccaatc ttaacagtca 2760
 ttgattacag ttgagagtgc agccagcgcc agtcttatca gtcattgatt atagctggcg 2820
 tacagtggct ctatctcgcc tcaactgcgc ctccgcctcc tgggttcaag tgattctcct 2880
 gcctcagcct cccaagtagc tgggagtgcg ggtgtgcacc accacaccca gctaattttt 2940
 gtatttttag tagagacagc atttcactat gttggccagg ctggtcttga actcctgacc 3000
 tcaagtaatc tccccgcctc ggctcccaa agttctggga ttacagggtg gagccactgt 3060
 gcctgacctg agatagattc ttagagaatt attggttaaga ataattctct aagctgagct 3120
 aaatagtcta cactgaagag gactgcctac tgttatttaa ggtgcttgca accatataag 3180
 catgtactgc ctgggaactc tagatgagga tttctcaatt tcagcgctgt tgattttttt 3240
 tttttttttt gagacagggt ctctctctat caccagcct ggagtgcagt ggcaccatta 3300
 cagctcactg cagcctagac ctcttgggct gaagtcaccc tcctgcctca gcctcctgag 3360
 taacagacta cagggtgtgt ccaccatgct tggctaattt ttttattttt agtagagatg 3420
 gggctcttgc acattgccc agctggtctc taactcctgg gctcaagtga tcctcctacc 3480
 tcagcctccc agagtgtctg gattacaggt gtgagcagtg ctgacatttt ggaccaggct 3540
 attctttgtc gttgggggct gtcctgagca gttcagggtg tttggcagca ttcttggcct 3600
 ctgcccacta gaggtcagca gctcccttcc ctttgtgtg acaaccagct tcagaacttg 3660
 ctaaatctcc ctgggtgaca gcgtccacag tagagaacct ctattctaga ctaagcctca 3720
 gctcttaagg atttttctta ttttattatt atttttttaa gacagggtct cgctctatca 3780
 ccaggctgg agcgtagtgg cgcaatcttt gctcactgca acctctgctt cctgggttca 3840
 agcgatttct cctgcccag cctcctgagt agctgggatt acaggcgtgc accgccacgc 3900
 ctggctaatt tttatatatt tagtagagac agggtttca catattggcc aggtggtct 3960
 caaactcttg acctcaagt atcagcctgc ctcagcctcc caaagtgtg ggattacagg 4020
 tgtgagccag cagcctggc tagtttttct tttttttaa ttttttttg gtaaaataat 4080

10

20

30

gatgtttatt tattacatat ttattttcaa actggcatct tgtagtaat tctgtttctt 4140
tccccaccta acattttggt tactataaat gatttcagtc atcatcctaa agcatatgca 4200
aaatctccct tcccctgact cacgtttgat gtacctgct ctggatattt ttgaaatacc 4260
ttagggggag aaaaacagta gttttaagag ctagtggaca gtttccaggt cttaatgaat 4320
ctgacaacct gcagcccagg gccaaagaga atgaattctc ttttccctgc tctcttgatg 4380
aactcactga ccagccatgg gcggcaggtg ggcaggcaag gacccctggc caccaggtgc 4440
cagtgcacga gctgcatgaa ctcttggtac cagaactgcc acctctacag acatgctcaa 4500
aagacaagtt tggaccgggt gcattggctc acacctgtaa tcccagcacc ttgagaggcc 4560
gaggtgggtg gacccctgag gtcaggagtt tgagaccagc ctagccaaca tggtgaaacc 4620
ctgtctctcc taaaaataca aaaaaatcac cggggggtgg tggcaggcac ctgtaatccc 4680
aactactctg gaggtctgag caggagaatt gcttgaaccc gggaggtgga ggttgcagtg 4740
agctgagctc gcgccattgc actccagcct gggaaacaag agcgaaattc tgtctcaaaa 4800
aaaagacaag cttggaggat tgtccagaac cacagatcca gggtaggaaa agcccaagct 4860
taggagctga agaccctggt tcaatcccgg gccagagat catttattct atggctttag 4920
gtaagctatt tattgatact tctgtgggct tcagtttcat tatttgtaaa aattatttca 4980
ttatttgtaa aattaggact taagtcccaa tccctaagtc agaacagatc caattcttag 5040
agaaaaagga tatccagaga gaactttctg cgggtgtctgg gacgcaggca gtgccacacg 5100
aatggcagct gtgagtaata ttctctctct ctggaaatga ttcccgggag gactagggca 5160
acgagagcca ctccaggtct gagaacatgg agaacttgag atcagtgtt ttggaagtgt 5220
ggtcaacaca gtttgtcacc aaagagataa gggctctggca cccaaagata aatgaatgat 5280
gttacgaagc aactgttta ggtcagttgg cgtatttttc cagagcaagg cttctcaggc 5340
tgggggtggt ggctcacacc agtaatccca gcactttttg ggcagatggg ttgagcccag 5400
gagttcgaga ccagcctgga caacacagag aaacccctg tctacaaaa atacaaaaat 5460
tagctgggca tggtagcatg tgcctatagt ccagctact caggaggctg aggttggagg 5520
acagcctgag cctgggaagt caaggctgca gtgagccgag atctcaccac tgtattccag 5580
cctaggcaac agagcaaac tctgtctcaa aaaaacaaaa acaaaaacaa aaaacccaaa 5640
agactttctg gatgacggaa gcagtgtcta gattcacatt ctgaggcaaa acctttattt 5700
tgtcgtggac aattccagtt tgtggccctt cccttaggga agcactgctt ttgttcccgc 5760

10

20

30

tgcattgtgct aacttccatt cattcatggt tctatccctt tgtagccttc ccttcacact 5820
 tctcacttgc gtttcttcca tctctgggca gactgttcca ccaacaaccc ctcccaggct 5880
 aagctgcggc gggagctcga cgaatccctc caggctcgtg agagggtgac caggaaatac 5940
 aacgagctgc taaagtccca ccagtggag atgctcaaca cctcctcctt gctggagcag 6000
 ctgaacgagc agtttaactg ggtgtcccg ctggcaaac tcacgcaagg cgaagaccag 6060
 tactatctgc gggtcaccac ggtgagctgt gtcccgcca catgctgtgg ctgggagcc 6120
 gagctgtgat cgggagcagg ggcatgtgtg cttttgactg agcatttatc acacggcaga 6180
 aaatagaaaa ctttaggcgc ccctgttgcc ttgaagctc atcaccact cagggaatat 6240
 ataaccctgc tttaaaaagg agcaaagtaa gagagggtcc acagcttggc caaggtgtga 6300
 tagctgacag atgacttga cgggtatttg aacctgactg cctggctgcc aagcctgtat 6360
 tttgtgttg ttgtttttgt tttggtgcac aaatctgtga ataaaccaga agcctctgtt 6420
 cttttctcaa agctacaagg ctgccctctg gcattgtaaa tggcttatga attagtagat 6480
 cactctctgc cagtataaaa aacttctctc taggccagac atgggtggctc atgcctgtaa 6540
 tcccagcact ttgggaggca gaggcaagag gattgcttga ggccaggaat ttgagaccag 6600
 cctgggcaac acagcaagat tccctctcta caaaaaatac aaaaatcagt cagggtgtgt 6660
 ggcacacact tgtagtccca gctattcagg aggctgaggt gggaggattg cctgagccct 6720
 gaagtggagg ctgcagtgag ctgtgatcac gccactgcac tccagcctgg gtgacagagt 6780
 gagactctgt ctcttaaaaa atatatatat ataaaataat aaaataaagt taaaaaatca 6840
 aataaaactt atttctagta ctgggaactc ttctttttct tttctttctt cctccaggc 6900
 cctctggatt cttttctac cctactctga ccaagggtg cctaaagcaa atgtttggaa 6960
 accactttta ttctttgggg tgctccctgg ctggctcatt gcagatgaca tttgccccaa 7020
 cacatgagtg tctgtgaacc aggtccgttc tgtccactga gctgtactta cgtctagatg 7080
 tataagaagc atggggtcag ctctctaggt tccttgagg agcaggagga cttccttato 7140
 agaagcctga cttctgttgc agagcgcatg catcttgacc acagtgttcc agctcttccc 7200
 tttctcttg ttccatttag gtggcttccc acacttctga ctgggacgtt cctccgggtg 7260
 tctactgagg ggtctgaag ctctttgact ctgatcccat cactgtgacg gtcctgtag 7320
 aagtctccag gaagaacct aaatttatgg agaccgtggc ggagaaagcg ctgcaggaat 7380
 accgcaaaaa gcaccggtaa gcaggcgggc ctttctctgc gcctgcaggg ccagtgagt 7440

10

20

30

ctctgggagc cacaaaaaaa caaacaaggt gcagactcta tagcctggtg ggaacgactc 7500
 cgcccgagc cagagcccaa gaacaaagcc aggaagtac gggggaattt tatttttcct 7560
 ttggaggatg ttttactttg gaggataact gttttttatt tcagggagga gtgagatgtg 7620
 gatgttgctt ttgcacctac gggggcatct gagtccagct cccccaaga tgagctgcag 7680
 ccccccagag agagctctgc acgtcaccaa gtaaaccagg cccagcctc caggcccca 7740
 actccgcca gcctctccc gctctggatc ctgcactcta acactcgact ctgctgctca 7800
 tgggaagaac agaattgctc ctgcatgcaa ctaattcaat aaaactgtct tgtgagctga 7860
 tcgcttgag ggtcctcttt ttatgttgag ttgctgctc ccggcatgcc ttcattttgc 7920
 tatggggggc aggcaggggg gatggaaaat aagtagaac aaaaaagcag tggctaagat 7980
 ggtatagga ctgtcatacc agtgaagaat aaaagggga agaataaag ggatatgatg 8040
 acaaggttga tccacttcaa gaattgctg ctttcaggaa gagagatgtg tttcaacaag 8100
 ccaactaaaa tatattgctg caaatggaag ctt 8133

<210> 11
 <211> 940
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

10

<400> 11
 aagcttgaac tggagcaagg gtaggcactt gcatgctggg tggccagcct atgggaaggc 60
 tcgccctggg gcagagggcc tggcaccag cagctctttg agtgcagag cctgtggtct 120
 ctgtgtgctc agccagcctt gtgtcttcct gtaggatgcc ctaaagaga ccagggaatc 180
 agagacaaag ctgaaggagc tcccaggagt gtgcaatgag accatgatgg ccctctggga 240
 agagtgtgta ccctgcctga aacagacctg catgaagttc tacgcacgcg tctgcagaag 300
 tggctcagga ctggttgcc gccagggtgaa aaggggacac atgagtgagg aaggctctga 360
 gtggggaagg aggggagcct agtgaaatat gcttcattcc gcatgccaga tgcaattgat 420
 tagcattggc tggcttgccc agagtgccat gctccattgg taatgtctgg catgagtaga 480
 gagagtggag tcatcaaaag gatgtaggcc aggtatctgc cttctcttag aaaactcatg 540
 cagcagtgtc tagctggatg acataataaa ctgcttcgtg ggatgcagag ccctgtgtca 600
 cttatgtgga aggatttaag aatttttttt tttttttgag acagggctc actctgtcac 660
 ccaggctgga gtacagtgat gtgatcatgt ttcactgcag ctccgacctc ctgggttcag 720

20

30

gtgatcctcc cacctcagcc tcccaagtag ctgggactac aggcacgtac caccacaccc 780
 agctaatttt tgtatttttt ttttgtaaac atgggggttg gccatgttgc ccaggctggc 840
 ctcaaactcc taagctcaag taatcctcct accttgacct cccaaattgt tgggattata 900
 gatgtgtgcc actagtccca gccaatgtaa gatattgtag 940

<210> 12
 <211> 7610
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> unsure
 <222> 5461
 <223> unknown

10

<220>
 <221> unsure
 <222> 5462
 <223> unknown

<400> 12
 gacctgcagg tcaacggatc cattcccgat tctcatcgt ccagatggaa gaaactgagg 60
 cccaaggcca aagtgattag tccgaggcca ccagtgctc aggggcacac ctaggactgt 120
 aatcagactt tcatggacct ggtctgggtt ctccactta gtcattgggc ttgaagattc 180
 cccgaggctg cctcctgaaa aggactgggg tctagtggcc cctggacgtt gggcaagcaa 240
 gggactgggc ctccatgttg tgctccata gtctgatcc tgaactggaa aactcagccc 300
 ctgaccacgc agctctcctt taagccctt tgtttcacat ggttttcaaa gtctgccacc 360
 cacagtgggg ctgcctgtac ccgccctgtc caccattgc ccagctgtc agcccttga 420
 cttctctcct ggggcttaaa catccctggc tccaaaatgg gcagctcact ttcttcccca 480
 agaagtagct gcacctccag ggttcctaga tttgcccctc cttgccaggg ggagggggtg 540
 ctgcgacagg agattctccc tgctctcagc agaaggaact ccagcagtg gagaccagca 600
 aaccctctg gacacagatc tgatttccta actgggaagg ctcagggcaa aataaaaatt 660
 caggctccact ggttcaaaaa ctatgaagaa tttcaagacc gtcacagtag ccattaaac 720
 caaacgtgga tctgcaaggg tccacagcc atgaagccca ccctgcttgg ttgggttcca 780
 aaaagatggg gacagtgatt gcttaagctc tgtggatcaa ggaccccgga gaggccttct 840
 ggctctccac atatctgctc tgatcactcc taaacacaat tctgtttcct ccaggcctgg 900

20

30

cgggtcagtc cagggacccc catcagtgtg atgtttccag gagtaggcgt ttcaatactt 960
 cctgtgctct tttctccagc acaaggcccc tctccatccc accctcatta tgtctgactc 1020
 tttactatth aaatgggtca agagaagtgg cgcttgtgta atgtgaagggt taagggtcagt 1080
 agggccaggg aactgtgaga ttgtgtcttg gactgggaca gacagccggg ctaaccgggt 1140
 gagagggctc ccagatggca cgcgagttca ggctcttccc tactggaagc gccagcgccg 1200
 cacctcaggg tctctcctgg agccagcaca gctattcgtg gtgatgatgc gccccccgc 1260
 gcccagccc ggtgctgcac cggcccccac ctcccggctt ccagaaagct ccccttgctt 1320
 tccgcggcat tctttgggag tgagtcagtc aggtttgcag ccagcccaa aggtgtgtgc 1380
 gcgaacggag cgctataaat acggcgctc ccagtgccca caacggcgcg tcgccaggag 1440
 cagcagcatg ggcacagggg ccgtagccgg tgagatgtcc cgtcttccc tacccttgag 1500
 cagagccaca ccaggacgga tgggcgggca ggggatggca gccaggcaga gagggatgac 1560
 acagctcgca gtcacaaccc ctgctcttcc gacggagccc aggaagccag ggaggggagg 1620
 tgcgggagcc ccataccag gcagctgagc caggggccc gcaaccggc cctgatgagc 1680
 acgagcttca cgcaaccaca attctgtggt gggggggtaa atagaacaga tataatgatc 1740
 atcctttcgc aaagatgggg aaactgagac ctggagacct gccgcgttgg cagaccagg 1800
 ctgacaggtg acagagctgg cctgcaccga gctccttcc gcagcatatc ctctgcgaag 1860
 atgcggatct ctcagttgtg gctttcggct tgcagcatg agtcattctag ttttcttcta 1920
 aattctctag ctctctggac actgttgcct gtaagtatga ggctgcggat ttcagtatat 1980
 ctgcaaccac cgaaatccga ctttttctgc ctccaatgc atctgaggtg catcagagaa 2040
 aagtcacaca agatccacca ggctcagac ctctgattcc acagtctcat tttacagatg 2100
 ataactctgag gcctggagag gtttaggact ggtgccaaca ctaaacagca aataagtatc 2160
 agaattggga ttcgagccaa agcctcttga ccttccagaa tttctggacc tagttaaaaa 2220
 aaatatgatt tttattatta ttttttaaac ggagagggtta ggaattttaa ggaaagtaca 2280
 gatactatat aaaaaagat gcccatgaaa atgttaagtt ataataatag tggagcattg 2340
 ggcacaactg aaatggccaa tcttgtgaga atggtaaaat aaacttaggt cgtgagtaa 2400
 gtggagtatt acatagccat aaaagtatgc ccttaaagaa tatttgaaga tggatgaatgt 2460
 gaagaatctt gtataaactg catggaagac agaaggaaat ataccacagt gctaaccctt 2520
 gcctctgggt gatatgaatt accggtgatt atttttctta ttttctttt ggttagttt 2580

10

20

30

tctccatttg aagaagcaga taggagccgg ggctttggga ttgaaaccct caccatctgt 2640
 gtgccctctt cactgtcttc ccctcctccc caccgctccc tgttcacagt cattgatttt 2700
 ctttctttct tttctctttt tttttttttt tcttgagacc aagtctcact ctgttgccca 2760
 ggctggagta gagtagcgcc atctcggtc actgcaacct ccgccatccg ggttcaagca 2820
 gttctcatgc ctcagcctct gagtagctgg gactacagcc gcatgctgct acatccggct 2880
 aatttttgta ttttagtag agacatgggt tcaccacctt ggccaggctg gtctcgaact 2940
 cctgatctca agtaatccag cctgtcttgg cctcccaaag tgctggggtg acaggtgtga 3000
 atcaatgcgt ccctgccagg tcattgattt tcttaagcct ctagccctgc cctgcttgga 3060
 aacgttttgg gaagctgctc agttcaaagt tccaggagg gtgtgcctgg aggggagttg 3120
 ctcccaaagt ctgctgctc ccccccgc cctgcccc cccccccgc catcttctcc 3180
 tctcctctt cccctgagca gccctttgt ccacagaacc ggcttttct ggtagaagga 3240
 gcaaggccaa gtggtttaag cttcttagg gagaatgagg ctgtgtggtg gtgctgggga 3300
 ctgaggggcc ttgcgttggc atggctcttc caccagggc agctggcagc caggctccca 3360
 ggaggcagag gagatgaggg gggaggtagg tccgagcaa ggaaaggagg tcggctgtgc 3420
 agtcacgggt ctagaacatt cattggatca gcagcatcca tatcacctgc agactggctg 3480
 gaaaagcagt ctcagaacca acattataac cagccctgca gtgattcata agtacttta 3540
 aaagtgttca atcatctcag caaagcagag ccacacagtc cgggggacca cagggtggct 3600
 ctgtgtgctt gtctcggtt tctgcccct ctccagacat gttgattaga cactgccaat 3660
 gccagcctc agacctcagt ctaatttga agtagtcaga atttactatg attacataag 3720
 accctcgtgt ttacagaaca cattccccct tctgaggtct ggattagatc cattttacag 3780
 atgaagaaac tgaggctcag atatttaagt gacttggaat caaggaaaga atactggaca 3840
 tggggctggg agggctgggc tctcatccca gggttaccat gagcatgctg tggactctag 3900
 ggagtccatg ccctctctgg cgttcagctc accgctaggt agagagggtg ggtgagagaa 3960
 cgacctcctt cccaggctct agctggatgg ttcaccaggg accccaggct ccctggacga 4020
 gactctgtgc ccgctgctga gtctggaatt ctttctctgt atcttgctt tgcgtgcccc 4080
 attcttcatt gccagcacc ctgtctctct gtcagaacct agttctgaat gggtttttcc 4140
 agaagttgtt gctttcaggg gccctggca gagagggtt tctggctggc tttgtctctc 4200
 tggcatgaca aaggctctgt tctgctgga ggcatttcag ggctcagtgg gcagctgggg 4260

10

20

30

cagacgctga gaccacagcc ttcttggtga gcccggtctc cgcacctac cccatctctg 4320
 ggaaggogct gaccccatct ctctccac gctgctccct ggctctttgc gcctgattac 4380
 ttctcatgag aggcactcct tgttaatgtg ctactgagtg tccagatggg cctgctgggc 4440
 tgagcgggct ttggatgtga accatttcag gaaggggaac ccatcgctct gttggttctg 4500
 tgatggcaaa tgggtgagct cagataacga gttcttgga ggggcatggt gggggggag 4560
 tgcaggggga ggggtttctg ttttattgac aacagcctca gcttctggga aagggtccat 4620
 tgtgtaagac cggggtatg gctgtgcccc gtggctcagg gcagccagcc agtggtgga 4680
 ggaacactgg cagggcagcc tcgtgtcggc ttagagggga tgggcagtgt ggagggcctg 4740
 gcagagcaag aggactcact ctccaaagg gactttctct gggaagcctg ctctcgggc 4800
 cactgcgaac cctctctact ctccgaagg attgtccttc ctggcttcca ctacttccac 4860
 ccctgaatgc acaggcagcc cggcccaagt ctccactag gatgcagatg gattcgggtg 4920
 gaagggctgg ctgctgttgc ctccgctct tgaagtcaa gttcaggtgg tgctgagact 4980
 ccctgggggc tgcagcgtg tggatgaatg ggagcgtctg ctgggggtgaa ggtttagggtg 5040
 cacattgcag aggacgtggc tggctcttgg gatgcagtc ctctgtggag gtggcatggg 5100
 gagggacgga tgcattgacct aagggtggt ttttcagtgt ctgacatgat cgataccact 5160
 ctggacaagg aggcaggat gcagaaagc tgtgtgcctc gctgattgtc ggggaggatg 5220
 tggcttgga aagagcctg ttctccgat gccagggttc ttgtttcttc cactcaacat 5280
 tgctgtcctg cagtcctctc ctccctgcac ctctgcctt cgctttcatt cgaggtgtcc 5340
 atggcaagtc tggtcatttc ccccatctc ctccaggaata aaagttgcag cagtgcctgc 5400
 tgtggggaca gctgagggca gtgaggtgg ggagctgctg cagggcggag tgggcgggac 5460
 nnagcaggct gtctagctgt tcccatgat gtctcctgtt ctctgcagag gcgtgcaaag 5520
 actccagaat tggaggcatg atgaagactc tgctgtgtt tgtggggctg ctgctgacct 5580
 gggagagtgg gcaggtcctg ggggaccaga cggctcaga caatgagctc cagggtgagt 5640
 agaccaagca tgatgttct ctggccacag ggtgatgagg tcagagggca gggtagctaa 5700
 ttctgctcag tgcctctcta tcaggcccca gtgttacaga ccgtttttat cttgtgact 5760
 gggcttggt gcctgtgtct gggccactc tgagcctcag ctccaggcc cctggttcag 5820
 gctctgcgt catcagactg cggcatttg caggcatttc ccaagcactt tcggctgttg 5880
 catcttctc agctcttccc ctccaggcc ccttagccca gctccaggc ctctccaca 5940

10

20

30

aagctgtgtc tggaccaccg gagctcttat cccctctccc ttgggagtgc ccagagctta 6000
 tccctcctgt gagctgacgg tttctgcagg atcattgtta aaaaccaga tcagacatgg 6060
 gtgtgagtct gtttcacctc ttctcagctg ggtgactttg ggccactatc ttgatctcat 6120
 gacactcccc ccacccccca ttttattgag atataattaa caaataaaaa ttgtgtatat 6180
 ttaaggtata tgacgtgatg ttttgaaatg cacatacatt gaaatgatga ccagttttta 6240
 tgggtgggacg gtggaagac ttaaaatcta ctttcttagc aaatttccag ttaigatatg 6300
 gtgttattaa ctataagcac cacctgtatg ttagacctcc agaacatact cctcctacct 6360
 gatgaacact ttgacccttt atcatatcac acttcccatg tctccctctg cgaagtgggc 6420
 acggcggggg gctggagcat tacgtaaact gcacatgaag tgtttggcgc agtgcttggc 6480
 atgggataaa caccagtga gtagcactta ggtgacacag tgtttcgctg catttgtcac 6540
 cagtgtatc cttactcatt tactcatctt cttattcctg tcgctggca ctgcattgga 6600
 acaagaaat acacatatct gtttaaaactg aactctaga agatttgtgt ccaaataac 6660
 aatattttat attttgatgc tgcaaacgtg acacttctgg gttttttttt tttccttgcc 6720
 aagtttcttc tgcaccagc tcattctcca ggggcacatg gcagtggctg ggcataactc 6780
 tgggtgtgcc ggctcccatg gtctgcattt ctaagcagta ggtgacagtc agcaaggagc 6840
 ctgtgatggg agcctgtgcc agggcaaggc tggggcatgc tgctgcctgc tggcaggagt 6900
 ggggttccca gccttgacag cccctgaact gaacgggcct ttctggcatc cagctcattc 6960
 cagggtcctg aggcacctc ttcctctcgc ctcatctgc ctcttgact tctcttgag 7020
 aaatgtcaa tcagggaagt aagtacgtca ataaggaaat tcaaatgct gtcaacgggg 7080
 tgaaacagat aaagactctc atagaaaaa caaacgaaga gcgaagaca ctgctcagca 7140
 acctagaaga agccaagaag aagaaaggg tcaggaggag ccgctaccgc ctccctgcct 7200
 tgaccatccc actggagggg agggagggg tcaactgcgc gtgcctgct ggttgccatg 7260
 gtgaccgca gtccctccag gctgtgtcag ctgatgctga ggtgacagt aagaagcagg 7320
 gaaggttcat ttgcttctga aagcatcagg gagtgagatc ttggatctgg tttgttatg 7380
 agcctggccc agggctaagt ccagattcat tcaatagat gtttctaagc cctgatcacg 7440
 tgctagtacc aagcaggctc tgggtgggt ggccgaggg gccagacagg cgtggcgctc 7500
 aacctcagg aagcttctag gagttagga acagttggat cttgaaggat gagtgggttc 7560
 ttaagccag gtggaaggg gattccaggt gggcgaatga ggggaagctt 7610

10

20

30

30

gac cgc atc gac tcc ctg ctg gag aac gac cgg cag cag acg cac atg	711
Asp Arg Ile Asp Ser Leu Leu Glu Asn Asp Arg Gln Gln Thr His Met	
160 165 170	
ctg gat gtc atg cag gac cac ttc agc cgc gcg tcc agc atc ata gac	759
Leu Asp Val Met Gln Asp His Phe Ser Arg Ala Ser Ser Ile Ile Asp	
175 180 185	
gag ctc ttc cag gac agg ttc ttc acc cgg gag ccc cag gat acc tac	807
Glu Leu Phe Gln Asp Arg Phe Phe Thr Arg Glu Pro Gln Asp Thr Tyr	
190 195 200	
cac tac ctg ccc ttc agc ctg ccc cac cgg agg cct cac ttc ttc ttt	855
His Tyr Leu Pro Phe Ser Leu Pro His Arg Arg Pro His Phe Phe Phe	
205 210 215	
ccc aag tcc cgc atc gtc cgc agc ttg atg ccc ttc tct ccg tac gag	903
Pro Lys Ser Arg Ile Val Arg Ser Leu Met Pro Phe Ser Pro Tyr Glu	
220 225 230 235	
ccc ctg aac ttc cac gcc atg ttc cag ccc ttc ctt gag atg ata cac	951
Pro Leu Asn Phe His Ala Met Phe Gln Pro Phe Leu Glu Met Ile His	
240 245 250	
gag gct cag cag gcc atg gac atc cac ttc cac agc cgc gcc ttc cag	999
Glu Ala Gln Gln Ala Met Asp Ile His Phe His Ser Pro Ala Phe Gln	
255 260 265	
cac ccg cca aca gaa ttc ata cga gaa ggc gac gat gac cgg act gtg	1047
His Pro Pro Thr Glu Phe Ile Arg Glu Gly Asp Asp Asp Arg Thr Val	
270 275 280	
tgc cgg gag atc cgc cac aac tcc acg ggc tgc ctg cgg atg aag gac	1095
Cys Arg Glu Ile Arg His Asn Ser Thr Gly Cys Leu Arg Met Lys Asp	
285 290 295	
cag tgt gac aag tgc cgg gag atc ttg tct gtg gac tgt tcc acc aac	1143
Gln Cys Asp Lys Cys Arg Glu Ile Leu Ser Val Asp Cys Ser Thr Asn	
300 305 310 315	
aac ccc tcc cag gct aag ctg cgg cgg gag ctc gac gaa tcc ctc cag	1191
Asn Pro Ser Gln Ala Lys Leu Arg Arg Glu Leu Asp Glu Ser Leu Gln	
320 325 330	
gtc gct gag agg ttg acc agg aaa tat aac gag ctg cta aag tcc tac	1239
Val Ala Glu Arg Leu Thr Arg Lys Tyr Asn Glu Leu Leu Lys Ser Tyr	
335 340 345	
cag tgg aag atg ctc aac acc tcc tcc ttg ctg gag cag ctg aac gag	1287
Gln Trp Lys Met Leu Asn Thr Ser Ser Leu Leu Glu Gln Leu Asn Glu	
350 355 360	
cag ttt aac tgg gtg tcc cgg ctg gca aac ctc acg caa ggc gaa gac	1335
Gln Phe Asn Trp Val Ser Arg Leu Ala Asn Leu Thr Gln Gly Glu Asp	
365 370 375	

10

20

30

cag tac tat ctg cgg gtc acc acg gtg gct tcc cac act tct gac tcg 1383
 Gln Tyr Tyr Leu Arg Val Thr Thr Val Ala Ser His Thr Ser Asp Ser
 380 385 390 395

gac gtt cct tcc ggt gtc act gag gtg gtc gtg aag ctc ttt gac tct 1431
 Asp Val Pro Ser Gly Val Thr Glu Val Val Lys Leu Phe Asp Ser
 400 405 410

gat ccc atc act gtg acg gtc cct gta gaa gtc tcc agg aag aac cct 1479
 Asp Pro Ile Thr Val Thr Val Pro Val Glu Val Ser Arg Lys Asn Pro
 415 420 425

aaa ttt atg gag acc gtg gcg gag aaa gcg ctg cag gaa tac cgc aaa 1527
 Lys Phe Met Glu Thr Val Ala Glu Lys Ala Leu Gln Glu Tyr Arg Lys
 430 435 440

10

aag cac cgg gag gag tga gatgtggatg ttgcttttgc acctacgggg gcattctgagt 1585
 Lys His Arg Glu Glu
 445

ccagctcccc ccaagatgag ctgcagcccc ccagagagag ctctgcacgt caccaagtaa 1645

ccaggc 1651

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

20

<220>
 <223> Antisense Oligonucleotide

<400> 14
 gtctttgcac gcctcgggtca 20

<210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Antisense Oligonucleotide

<400> 15
 attctggagt ctttgcacgc 20

30

<210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 16

gttttcatca tgcctccaat

20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 17

tctcccaggt cagcagcagc

20

10

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 18

tctggtcccc caggacctgc

20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 19

ggagctcatt gtctgagacc

20

20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 20

acttacttcc ctgattggac

20

30

<210> 21

<211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Antisense Oligonucleotide

<400> 21
 aatttcctta ttgacgtact 20

<210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

10

<220>
 <223> Antisense Oligonucleotide

<400> 22
 gtctttatct gtttcacccc 20

<210> 23
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Antisense Oligonucleotide

<400> 23
 gggcatcctc tttctttctc 20 20

<210> 24
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Antisense Oligonucleotide

<400> 24
 atttagggca tcctctttct 20

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

30

<220>
 <223> Antisense Oligonucleotide

<400> 25
 ttccctggtc tcatttaggg 20

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

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 26
tgtctctgat tccctggtct 20

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

10

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 27
gggagctcct tcagctttgt 20

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

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

20

<400> 28
cccagagggc catcatggtc 20

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

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 29
ctcttcccag agggccatca 20

30

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

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 30

tcaggcaggg cttacactct

20

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 31

gtgcgtagaa cttcatgcag

20

10

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 32

ggcggccaac caggcctgag

20

20

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 33

tggcggccaa ccaggcctga

20

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 34

actcctcaag ctggcggcca

20

<210> 35

<211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Antisense Oligonucleotide

<400> 35
 agtagaaggcg cgagctctgg 20

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

10

<220>
 <223> Antisense Oligonucleotide

<400> 36
 ttcatccaga agtagaaggcg 20

<210> 37
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Antisense Oligonucleotide

<400> 37
 cagcagggag tcgatgcggt 20 20

<210> 38
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Antisense Oligonucleotide

<400> 38
 gctgccgggc gttctccagc 20

30

<210> 39
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Antisense Oligonucleotide

<400> 39
 catccagcat gtgcgtctgc 20

<210> 40
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Antisense Oligonucleotide

<400> 40
 gacatccagc atgtgcgtct 20

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

10

<220>
 <223> Antisense Oligonucleotide

<400> 41
 gtggtcctgc atgacatcca 20

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

<220>
 <223> Antisense Oligonucleotide

20

<400> 42
 aagtggtcct gcatgacatc 20

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

<220>
 <223> Antisense Oligonucleotide

<400> 43
 ctggaagagc tcgtctatga 20

30

<210> 44
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 44

tgtcctggaa gagctcgtct

20

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 45

gaacctgtcc tggaagagct

20

10

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 46

ggaaagaaga agtgaggcct

20

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 47

gggcatcaag ctgcggacga

20

20

<210> 48

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 48

ctcaaggaag ggctggaaca

20

30

<210> 49

<211> 20

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 49
tctcaaggaa gggctggaac 20

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

10

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 50
tgtatcatct caaggaagg 20

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

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 51
gctgtggaag tggatgtcca 20 20

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

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 52
attctgttgg cgggtgctgg 20

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

30

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 53
tatgaattct gttggcgggt 20

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

<220>
 <223> Antisense Oligonucleotide

<400> 54
 ggatctcccg gcacacagtc 20

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

10

<220>
 <223> Antisense Oligonucleotide

<400> 55
 cggatctccc ggcacacagt 20

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

<220>
 <223> Antisense Oligonucleotide

20

<400> 56
 gtggagttgt ggcggatctc 20

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

<220>
 <223> Antisense Oligonucleotide

<400> 57
 gtccttcac cgcaggcagc 20

30

<210> 58
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 58

acagtccaca gacaagatct

20

<210> 59

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 59

gagctcccg cgcagcttag

20

10

<210> 60

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 60

ggagggattc gtcgagctcc

20

<210> 61

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 61

atcttcact ggtaggactt

20

20

<210> 62

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 62

tgttgagcat cttccactgg

20

30

<210> 63

<211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Antisense Oligonucleotide

<400> 63
 agctgctcca gcaaggagga 20

<210> 64
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

10

<220>
 <223> Antisense Oligonucleotide

<400> 64
 gctcggttcag ctgctccagg 20

<210> 65
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Antisense Oligonucleotide

<400> 65
 ttgccagccg ggacacccag 20 20

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

<220>
 <223> Antisense Oligonucleotide

<400> 66
 cgcagatagt actggtcttc 20

30

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

<220>
 <223> Antisense Oligonucleotide

<400> 67
 accgtggtga cccgcagata 20

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

<220>
 <223> Antisense Oligonucleotide

<400> 68
 cgagtcagaa gtgtgggaag 20

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

10

<220>
 <223> Antisense Oligonucleotide

<400> 69
 gtgatgggat cagagtcaaa 20

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

<220>
 <223> Antisense Oligonucleotide

20

<400> 70
 ggagacttct acagggaccg 20

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

<220>
 <223> Antisense Oligonucleotide

<400> 71
 gccacggtct ccataaattt 20

30

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

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 72

gcaaaaagcaa catccacatc

20

<210> 73

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 73

tagagtgcag gatccagagc

20

10

<210> 74

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 74

attagttgca tgcaggagca

20

<210> 75

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 75

agacagtttt attgaattag

20

20

<210> 76

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 76

cgagatagag ccactgtacg

20

30

<210> 77

<211> 20

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 77
tgccaccacc cccgggtgat 20

<210> 78
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

10

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 78
gttgttggtg gaacagtcca 20

<210> 79
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 79
tgcttaccgg tgctttttgc 20 20

<210> 80
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 80
acatctcact cctcccgtg 20

<210> 81
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

30

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 81
gaccctccaa gcgatcagct 20

<210> 82
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 82
aaaaagagga ccctccaagc 20

<210> 83
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

10

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 83
tgtgtcccct ttccacctgg 20

<210> 84
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

20

<400> 84
attaccaatg gagcatggca 20

<210> 85
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 85
caacatggcc aaaccccatg 20

30

<210> 86
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 86

gcggcaggtc tccaggtctc

20

<210> 87

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 87

ttcccttcgg agagtagaga

20

10

<210> 88

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 88

tgcttgggaa atgcctgcaa

20

<210> 89

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 89

agctggatgc cagaaaggcc

20

20

<210> 90

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 90

tggaagtagt ggaagccagg

20

30

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 13/00	(2006.01)	A 6 1 P 13/00
A 6 1 P 25/28	(2006.01)	A 6 1 P 25/28

(74)代理人 100096013
弁理士 富田 博行

(74)代理人 100117813
弁理士 深澤 憲広

(72)発明者 モニア, プレット・ピー
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 0 0 9 , ラ・コスタ, ヌエバ・カスティーリャ・ウェイ 7
6 0 5

(72)発明者 フレイアー, スーザン・エム
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 1 2 2 , サンディエゴ, ルノー・ストリート 2 9 4 6

審査官 松田 芳子

(56)参考文献 特開平 0 7 - 2 5 0 6 8 4 (J P , A)
国際公開第 0 0 / 0 4 9 9 3 7 (W O , A 1)
Plant Mol. Biol., 1998, Vol.37, No.3, p.535-47
Exp. Cell Res., 1998, Vol.239, No.1, p.40-9
Lancet, 1990, Vol.335, No.8693, p.808-11
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1991, Vol.179, No.3, p.1600-5
Somat. Cell Mol. Genet., 1990, Vol.16, No.4, p.369-82
J. Virol., 1995, Vol.69, No.3, p.1925-31
Antimicrob. Agents Chemother., 1995, Vol.39, No.5, p.1157-61
Clin. Cancer Res., 2000, Vol.6, pages 1655-63
Cancer Res., 2000, Vol.60, pages 170-6
Cancer Res., 2000, Vol.60, pages 2547-54
Exp. Cell Res., 2000, Vol.257, pages 101-10
Cancer Res., 1995, Vol.55, pages 2431-7
Mol. Cells, 2000, Vol.10, pages 193-8
Circulation, 2000, Vol.101, pages 352-5
Eur. J. Pharmacol., 1 9 9 7 年, Vol.330, No.1, p.87-92

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)
C12N 15/09