

(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 1	
C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N 15/00
A 61 K 31/7088	(2006.01)	A 61 K 31/7088
A 61 K 31/7125	(2006.01)	A 61 K 31/7125
A 61 P 3/06	(2006.01)	A 61 P 3/06
A 61 P 9/00	(2006.01)	A 61 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)	(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
(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) 國際出願番号	PCT/US2001/028235	
(87) 國際公開番号	W02002/022635	
(87) 國際公開日	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 忠式

(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。

10

【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'-0-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】

20

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と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; Sillkensen et al., Biochem. Cell. Biol., 1994, 72, 483-488中にレビューされる)。

40

【0003】

クラスタリンタンパク質は、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. I

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)。

【0005】

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 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 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)。

10

20

【0006】

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 (Buttyan 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 (Buttyan et al., Mol. Cell. Biol., 1989, 9, 3473-3481; Connor et al., Kidney Int., 1991, 39, 1098-1103)。

30

【0007】

Sensibar は、腫瘍壞死因子 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)。

【0008】

Miyake 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 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。

40

【0009】

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 は、アンチ

50

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割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を向上させる際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。

【 0 0 1 0 】

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)。

【 0 0 1 1 】

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)。

【 0 0 1 2 】

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)。

【 0 0 1 3 】

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 (Silkens 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。

【 0 0 1 4 】

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。

【 0 0 1 5 】

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、そして今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ストラテジーには、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。

【 0 0 1 6 】

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。

10

20

30

40

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疑われる動物、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、を結果として生じるようにすることを含む。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、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るかわらず、*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することも、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と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、のことをいうと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、のことをいうと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、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、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という。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。これら的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

10

20

30

40

50

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。ペントフラノシリ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'ヒドロキシリ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。

【 0 0 3 5 】

上記のオリゴヌクレオシ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を本明細書中に援用する。

【 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。

【 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シドであり、特に上述の米国特許5,489,677の-CH₂-NH-0-CH₂-、-CH₂-N(CH₃)-0-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-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-0-P-0-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。

【 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

10

20

30

40

50

H_3)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: $C_1 \sim C_{10}$ 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、 SCH_3 、OCN、Cl、Br、CN、 CF_3 、 OCF_3 、 $SOCH_3$ 、 SO_2CH_3 、 ONO_2 、 NO_2 、 N_3 、 NH_2 、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリール、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、RNA切断基、リポーター基、インターラーカー、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- $CH_2CH_2OCH_3$ 、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(CH_2)₂ON(CH_3)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'-DMAOE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- $CH_2-0-CH_2-N(CH_2)_2$ とも記載される、が含まれる。
10

【0039】

その他の好ましい修飾には、2'-メトキシ(2'-O- CH_3)、2'-アミノプロポキシ(2'-OCH₂C $H_2CH_2NH_2$)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、ペントフラノシリ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。
20

【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”としても呼ばれる)修飾または置換も含まれる。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、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、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの6-メチルおよび他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの2-プロピルおよび他のアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミンおよび2-チオシトシン、5-ハロウラシルおよびシトシン、5-プロピニル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他の8-置換アデニンおよびグアニン、5-ハロ、特に5-ブロモ、5-トリフルオロメチルおよび他の5-置換ウラシルおよびシトシン、7-メチルグアニンおよび7-メチルアデニン、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
30
40
50

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. 27 6-278) 、そして現在は好ましい塩基置換であり、2'-0-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。

【 0 0 4 1 】

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。

【 0 0 4 2 】

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-0-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。

【 0 0 4 3 】

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。

【 0 0 4 4 】

10

20

30

40

50

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は必要とはされず、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。

10

20

【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、そしてそのそれは全体として参考文献として本明細書中に援用される。

30

【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。

40

【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、リポソーム、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

50

; 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、Gossein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）ホスフエート] 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 -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-ホスフエート、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、スペルミンおよびスペルミジ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。

【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を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しまたは遅延させるためにも有用である場合がある。

【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。

【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'-0-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。

【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。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 8 】

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。

【 0 0 5 9 】

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。

【 0 0 6 0 】

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。

【 0 0 6 1 】

単位用量剤形中に容易に提供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。

10

20

【 0 0 6 2 】

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。

【 0 0 6 3 】

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。

30

【 0 0 6 4 】**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 $0.1\text{ }\mu\text{m}$ 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 Bunker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199; Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Bunker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Volume 1, p. 245; Block in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Bunker (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

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。

【 0 0 6 5 】

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、半固体または個体であってもよい。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 Bunker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199)。

【 0 0 6 6 】

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 Bunker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Bunker (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 Bunker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285)。

【 0 0 6 7 】

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。

【 0 0 6 8 】

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

10

20

30

40

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ー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、非常に幅広く使用してきた (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 (Roshoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Bunker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Block, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Bunker (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 (M0310)、ヘキサグリセロールモノオレエート (P0310)、ヘキサグリセロールペンタオレエート (P0500)、デカグリセロールモノカブレート (MCAT750)、デカグリセロールモノオレエート (M0750)、デカグリセロールセクイオレエート (sequi oleate) (S0750)、デカグリセロールデカオレエート (DA0750)、が、単独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うるが、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と、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。

【0076】

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。

10

【0077】

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。

20

【0078】

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。

【0079】

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。

30

【0080】

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りポソームは、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 (Roso ff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Bunker (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。

40

【0081】

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。

【0082】

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

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。

【 0 0 8 3 】

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。

【 0 0 8 4 】

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)。

10

【 0 0 8 5 】

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)。

20

【 0 0 8 6 】

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、ジミリストイルホスファチジルコリン (DMPC) またはジパルミトイー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、ジミリストイ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エニックな (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。

30

【 0 0 8 7 】

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)。

40

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。NovosomeTM 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NovosomeTM 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、シクロスボリン-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、シクロスボリン-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)。

50

【0088】

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分が、(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

【0089】

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}、硫酸ガラクトセレブ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レブロシドエステル、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-ジミリストイ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

【0090】

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、2C₁₂15G、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(Tagawaら)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

【0091】

40

50

核酸を含む限定的な数のリポ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ポ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-結合リポソームを開示し、そしてそのようなリポ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ポ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ポソームを開示する。

【 0 0 9 2 】

トランスファーソーム (transfersome) は、リポ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、標準的なリポ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。

【 0 0 9 3 】

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) およびリポ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)。

【 0 0 9 4 】

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。

【 0 0 9 5 】

サーファクタント分子が、水中に溶解したまま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

10

20

30

40

50

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-アルキルベ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。

【0102】

40

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、ジカブレート、トリカブレート、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、カブリル酸、アラキドン酸、グリセロール-1-モノカブレート、1-ドデシルアザシクロヘプタン-2-オン、アシルカルニチン、アシルコリン、それらのC₁₋₁₀アルキルエステル（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、カブレート、ミリスティート、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)。

【0103】

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 (glucholic acid) (グルココール酸 (glucho-late) 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)。

【0104】

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)。

【0105】

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。

【0106】

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

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し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)。

10

20

【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、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、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、スターク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。

30

【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。

40

【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、バッファー、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

50

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、たとえば鎮痙薬、収斂剤、局所麻酔薬または抗炎症剤などの追加的で適合性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、ドキソルビシン、ブレオマイシン、マイトイマイシン、ナイトロジエンマスター、クロラムブシル、メルファラン、シクロホスファミド、6-メルカプトブリン、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)、メトトレキセート(MTX)、コルヒチン、ビンクリスチン、ビンプラスチニン、エトポシド、テニポシド、シスプラチニ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

10

20

30

40

50

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、あるいは治癒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EC₅₀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 ug ~ 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 ug ~ 100 g/kg体重の範囲で、維持用量で投与する。

【 0 1 1 8 】

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。

【 0 1 1 9 】

【 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'-0-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。

【 0 1 2 0 】

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。

【 0 1 2 1 】

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- -D-アラビノフラノシリ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- -D-アラビノフラノシリ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。

【 0 1 2 2 】

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9-¹³-D-アラビノフラノシリ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リグアノシ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リグアニンを得た。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-1-¹³-D-アラビノフラノシリウラシルを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'-0-(2-メトキシエチル)修飾アミダイト

2'-0-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-(-D-アラビノフラノシリル)-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、リボシリチミン (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、低圧下、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)、得られた固体を碎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 の白色の固体を得ることができる)。

30

【0127】

2'-0-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) 中で磨碎した。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'-0-メトキシエチル-5'-0-ジメトキシトリチル-5-メチルウリジン

50

2'-0-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) 中で磨碎した。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。 10

【0129】

3'-0-アセチル-2'-0-メトキシエチル-5'-0-ジメトキシトリチル-5-メチルウリジン
2'-0-メトキシエチル-5'-0-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。 20

【0130】

3'-0-アセチル-2'-0-メトキシエチル-5'-0-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'-0-アセチル-2'-0-メトキシエチル-5'-0-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中で磨碎し、表題の化合物を得た。 30

【0131】

2'-0-メトキシエチル-5'-0-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'-0-アセチル-2'-0-メトキシエチル-5'-0-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) と共に沸させた。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。 40

【0132】

10

20

30

40

50

N4-ベンゾイル-2'-0-メトキシエチル-5'-0-ジメトキシトリチル-5-メチルシチジン
2'-0-メトキシエチル-5'-0-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) と共に沸させた。残渣をCHCl₃ (700 mL) に溶解し、飽和NaHCO₃ (2 × 30
0 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。

【0133】

10

N4-ベンゾイル-2'-0-メトキシエチル-5'-0-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'-0-メトキシエチル-5'-0-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) を窒素氣
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 × 3
00 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、M
gSO₄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。

【0134】

20

2'-0- (アミノオキシエチル) ヌクレオシドアミダイト及び2'-0- (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
'-0- (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

【0135】

5'-0-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, 0.41
6 mmol)、ジメチルアミノピリジン (0.66 g, 0.013 eq, 0.0054 mmol) を、アルゴン氣
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

【0136】

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

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、手動で攪拌しながらエチレングリコール (35
0 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'-0-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で分配し得る。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、純粹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。

【0137】

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。ジエチルー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。

【0138】

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。

【0139】

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 (CH₂Cl₂中5%MeOH)。NaHCO₃水溶液(5%、10mL)を加え、そして、酢酸エチルで抽出した(2×20mL)。酢酸エチル相を無水Na₂SO₄で乾燥させ、蒸発させて乾燥状態にした。残渣を、MeOH(30.6mL)中の1M PPTS溶液に溶解した。ホルムアルデヒド(20%w/w、30mL、3.37mmol)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℃に冷却し、シアノホウ化水素ナトリウム(0.39g、6.13mmol)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%NaHCO₃(25mL)溶液を加え、そして、酢酸エチル(2×25mL)で抽出した。酢酸エチル層を無水Na₂SO₄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、CH₂Cl₂中5%MeOHで溶出し、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-メチルウリジンを白色の泡状物(14.6g、80%)として得た。
10

【0140】

2'-0-(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(3.91mL、24.0mmol)を無水THF及びトリエチルアミン(1.67mL、12mmol、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'-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(1.40g、2.4mmol)に加えて、そして、室温で24時間攪拌した。反応をTLC(CH₂Cl₂中5%MeOH)によりモニターした。溶媒を減圧下、取り除き、そして、残渣をフラッシュカラムにのせ、そして、CH₂Cl₂中10%MeOHで溶出して、2'-0-(ジメチルアミノオキシエチル)-5-メチルウリジン(766mg、92.5%)を得た。
20

【0141】

5'-0-DMT-2'-0-(ジメチルアミノオキシエチル)-5-メチルウリジン
2'-0-(ジメチルアミノオキシエチル)-5-メチルウリジン(750mg、2.17mmol)を、強い減圧条件下、40℃で一晩、P₂O₅で乾燥させた。その後、無水ピリジン(20mL)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(11mL)に溶解した。4-ジメチルアミノピリジン(26.5mg、2.60mmol)、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド(880mg、2.60mmol)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、CH₂Cl₂中10%MeOH(ピリジンを数滴含む)で溶出し、5'-0-DMT-2'-0-(ジメチルアミノ-オキシエチル)-5-メチルウリジン(1.13g、80%)を得た。
30

【0142】

5'-0-DMT-2'-0-(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'-0-DMT-2'-0-(ジメチルアミノオキシエチル)-5-メチルウリジン(1.08g、1.67mmol)をトルエン(20mL)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(0.29g、1.67mmol)を加えて、次に、強い減圧条件下、40℃で一晩、P₂O₅で乾燥させた。その後、反応混合物を無水アセトニトリル(8.4mL)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(2.12mL、6.08mmol)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(70mL)に溶解し、そして、5%NaHCO₃水溶液(40mL)で洗浄した。酢酸エチル層を無水Na₂SO₄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'-0-DMT-2'-0-(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](1.04g、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'-0-(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。

【 0 1 4 4 】

N2-イソブチリル-6-0-ジフェニルカルバモイル-2'-0- (2-エチルアセチル) -5'-0- (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'-0-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'-0-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'-0- (2-エチルアセチル) ジアミノプリンリボシドを、少量の3'-0-異性体と共に提供する。2'-0- (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'-0- (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., Guinossos, C. J., WO 94/02501 A1 940203.)。標準的な保護の手法は2'-0- (2-エチルアセチル) -5'-0- (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-6-0-ジフェニルカルバモイル-2'-0- (2-エチルアセチル) -5'-0- (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-6-0-ジフェニルカルバモイル-2'-0- (2-エチルアセチル) -5'-0- (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-6-0-ジフェニルカルバモイル-2'-0- (2-エチルアセチル) -5'-0- (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。

【 0 1 4 5 】

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'-0-ジメチルアミノエトキシエチル、即ち、2'-0-CH₂-0-CH₂-N(CH₃)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。

【 0 1 4 6 】

2'-0- [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- (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る。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。

【 0 1 4 7 】

5'-0-ジメトキシトリチル-2'-0- [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'-0- [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

10

20

50

30

40

50

させる。溶媒の蒸発に続いて、MeOH:CH₂Cl₂:Et₃N (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'-0-ジメトキシトリチル-2'-0- [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'-0- (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、CH₂Cl₂ (20 mL) に溶
解した5'-0-ジメトキシトリチル-2'-0- [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=0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'“ウイング”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“ウイングマー”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'ウイングには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ー後の待機段階を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、G2 5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'-0- (2-メトキシエチル)] -- [2'-デオキシ] -- [2'-0- (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'-0- (2-メトキシエチル)] -- [2'-デオキシ] -- [2'-0- (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'-0- (メトキシエチル) アミダイトを2'-0-メチルアミダイトに置き換えた2'-0-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'-0- (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'-0- (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'-0- (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'-0- (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'-0- (メトキシエチル) アミダイトを2'-0-メチルアミダイトに置き換えた、2'-0-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、キメラ構造のウイ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、脱プロック化した後、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

【0167】

オリゴヌクレオチドを支持体から解離し、そして、高温度（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。

【0168】

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

【0169】

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

【0170】

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

【0171】

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

【0172】

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。

【0173】

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 繼代まで維持した。

【 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 繼代まで維持した。

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-MEMTM-1 減少血清培地 (Gibco BRL) で一度洗浄し、 次に 3.75 μ g/mL LIPOFECTINTM (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-MEMTM-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、 細胞株ごとに変化させる。 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'-0- メトキシエチルギャップマー (2'-0- メトキシエチルは太字で示した) である、 ISIS 13920 。

20

【 0177 】

【 化 1 】

TCCGTACATCGCTCCTCAGGG, 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-ras およびラット c-ras 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'-0- メトキシエチルギャップマー (2'-0- メトキシエチルは太字で示した) である、 ISIS 15770 。

30

【 0179 】

【 化 2 】

ATGCATTCTGCCCAAGGA, SEQ ID NO: 2

【 0180 】

である。 c-Ha-ras (ISIS 13920) mRNA または c-ras (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-ras 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增幅反応とともに“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のみ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。
10

【0182】

クラスタリンタンパク質レベルは、免疫沈降、ウエスタンプロット分析(イムノプロット)、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。
20

【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。ウェスタンプロット(イムノプロット)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。
40

【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 Protocols in Molecular Biology, Volume 2, pp. 10.16.1-10.16.11, John Wiley & Sons, Inc., 1998) に記載される。
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 μL冷PBSで洗浄した。60 μL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振り動かし、そして次に、室温で5分間インキュベートした。溶解物55 μL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 μL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 10 に前もって熱した、溶出バッファー(5 mM Tris-HCl pH 7.6)60 μL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。

【0185】

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 μL冷PBSで洗浄した。100 μLのバッファーRLTを各ウェルに加え、そして、プレートを20秒間激しく振り動かした。70%エタノール100 μLを次に各ウェルに加え、内容物を3回上下にピペッ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マニホールドに取り付け、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マニホールドから取り外し、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マニホールドにもう一度取り付けた。RNAを次に各ウェル中の60 μLの水をピペッ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 μLの水を用いて、溶出段階を繰り返した。 20 30

【0186】

繰り返しのピペッ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、ピペッティング、DNase処理、及び、溶出段階が実行される。

【0187】

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、增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 40 50

ンチャ-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-色素の近接により消失される。增幅の間、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-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。

【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-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）。

【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アクセシション番号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：TCCGTACGAGCCCCCTGAA (SEQ ID NO: 4)、

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

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-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：GGCAACAATATCCACTTACCAAGGT (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-色素である。

【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 RAZOL™ (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、一晩キャピラリートランスファーすること

10

20

30

40

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、ストリンジエントな条件についての製造者の推奨を用いて、プロープ化した。

【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、ヒトグリセラルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ (GAPDH) RNA (Clontech, Palo Alto, CA) についてプロープ化した。

【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

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。ヌクレオシド間 (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。

【0196】

【表1】

10

20

30

30

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	gtctttgcacgcctcggtca	64	14
129046	5' UTR	3	26	attctggagtcgtttcacgc	64	15
129047	開始コドン	3	44	gtcttcatcatgcctccaat	68	16
129048	コーティング	3	82	tctcccaggtagcagcagcgc	67	17
129049	コーティング	3	106	tctggtcccccaggacactgc	46	18
129050	コーティング	3	127	ggagctcattgtctgagacc	59	19
129052	コーティング	3	154	acttacttccctgattggac	77	20
129053	コーティング	3	171	aattttcttatttgacgtact	68	21
129054	コーティング	3	206	gtctttatctgtttcacccc	85	22
129055	コーティング	3	286	gggcattccttttttttttc	64	23
129056	コーティング	3	291	attttagggcatccttttct	31	24
129057	コーティング	3	303	ttccccgtgtcatttaggg	68	25
129058	コーティング	3	312	tgtctctgatccctggtct	79	26
129059	コーティング	3	329	gggagctccttcagcttgt	49	27
129060	コーティング	3	364	cccagaggccatcatggtc	45	28
129061	コーティング	3	369	ctctttccagaggccatca	36	29
129062	コーティング	3	385	tcaggcagggtttacactct	70	30
129063	コーティング	3	412	gtgcgttagaacttcatgcag	60	31
129064	コーティング	3	448	ggcgcccaaccaggcctgag	42	32
129065	コーティング	3	449	tggcgcccaaccaggcctga	32	33
129066	コーティング	3	460	actccctcaagctggcgccca	67	34
129067	コーティング	3	487	agttagaaggggcgagctctgg	63	35
129068	コーティング	3	497	ttcatccagaagtagaagggg	41	36
129069	コーティング	3	522	cagcaggagtcgtcgatgcgg	60	37
129070	コーティング	3	538	gctgccggtcgttccagc	51	38
129071	コーティング	3	556	catccagcatgtgcgtctgc	69	39
129072	コーティング	3	558	gacatccagcatgtgcgtct	55	40
129073	コーティング	3	570	gtggccctgcatgacatcca	62	41
129074	コーティング	3	572	aagtggccctgcatgacatc	41	42
129075	コーティング	3	609	ctggaaagagctgtctaiga	67	43
129076	コーティング	3	613	tgtccctggaaagagctgtgt	69	44
129077	コーティング	3	618	gaacctgtcctggaaagagct	68	45
129078	コーティング	3	695	ggaaagaagaagtggaggct	44	46
129079	コーティング	3	726	gggcatcaagctgccccacga	65	47
129080	コーティング	3	780	ctcaaggaaaggcgttggaaaca	81	48
129081	コーティング	3	781	tctcaaggaaaggcgttggaaac	81	49
129082	コーティング	3	788	tgtatcatctcaaggaaagg	38	50
129083	コーティング	3	825	gctgtggaaagtggatgtcca	48	51
129084	コーティング	3	853	attctgttggcggtgtgg	50	52
129085	コーティング	3	858	tatgaattctgttggcggt	36	53
129086	コーティング	3	898	ggatctcccgacacagtc	68	54
129087	コーティング	3	899	cggatctcccgacacagt	70	55

【 0 1 9 7 】

129088	コ-テ' イング'	3	911	gtggagttgtggcggtatctc	69	56
129089	コ-テ' イング'	3	933	gtccttcatccgcaggcagc	56	57
129090	コ-テ' イング'	3	972	acagttccacagacaagatct	49	58
129092	コ-テ' イング'	3	1014	gagctccgcgcagcttag	22	59
129093	コ-テ' イング'	3	1027	ggagggttgcgtcgagctcc	55	60
129094	コ-テ' イング'	3	1088	atcttccactggtaggactt	50	61
129095	コ-テ' イング'	3	1096	tgttgagcatcttccactgg	62	62
129096	コ-テ' イング'	3	1118	agctgctccagcaaggagga	46	63
129097	コ-テ' イング'	3	1126	gctcggttcagctgtccagc	43	64
129098	コ-テ' イング'	3	1153	ttgccagccgggacacccag	72	65
129099	コ-テ' イング'	3	1187	cgcagatgtactgggttcc	61	66
129100	コ-テ' イング'	3	1199	accgtggtgacccgcagata	73	67
129101	コ-テ' イング'	3	1221	cggatcagaatgtggaaag	24	68
129102	コ-テ' イング'	3	1280	gtgaaggatcagagtcaaa	38	69
129103	コ-テ' イング'	3	1305	ggagacttctacagggaccg	63	70
129104	コ-テ' イング'	3	1337	gccacgggtctccataaattt	70	71
129106	3'UTR	3	1403	gc当地agcaacatccacatc	74	72
129107	3'UTR	3	1550	tagatgtcaggatccagac	71	73
129108	3'UTR	3	1605	attatgtcatgcaggagca	71	74
129109	3'UTR	3	1620	agacagttttatttgaattt	11	75
129118	イントロン	10	2819	cggatcagatgtggaaag	44	76
129119	イントロン	10	4646	tgc当地accacccgggtgat	13	77
129091	イントロン-エクソン 結合部	10	5849	gttgttggtgaaacagtcca	40	78
129120	イントロン-エクソン 結合部	10	7384	tgc当地accgggtgc当地tgc	46	79
129105	イントロン-エクソン 結合部	10	7600	acatctcactcccccgtg	70	80
129121	3'UTR	10	7855	gaccctccaaggcgtcagct	20	81
129122	3'UTR	10	7863	aaaaagaggacccctccaagc	39	82
129115	イントロン-エクソン 結合部	11	322	tgtgtccctttcacctgg	54	83
129116	イントロン	11	445	attaccaatggaggatggca	43	84
129117	イントロン	11	810	caacatggccaaacccatg	55	85
129112	イントロン	12	1766	gc当地cagggtctccaggatctc	43	86
129110	イントロン	12	4813	ttcccttcggagatgagata	44	87
129113	イントロン	12	5848	tgc当地ggaaatgc当地ca	34	88
129114	イントロン	12	6936	agctggatgccaggaaaggcc	40	89
129111	5'UTR	13	39	tggaaatgtggaaaggccagg	11	90

【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。

【0199】

実施例16

クラスタリンタンパク質レベルのウエスタンプロット分析

ウエスタンプロット（イムノプロット分析）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バッファー（100ul/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、150Vで泳動し、そして、ウエスタンプロットのために、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

10

20

30

40

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
cgccggacagg 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 aaa gag			298
Arg Lys Thr Leu Leu Ser Asn Leu Glu Glu Ala 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 Phe Leu Asn Gln			
135	140	145	
agc tcg ccc ttc tac ttc tgg atg aat ggt 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	
tcc 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

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 ccg act gtg tgc ccg gag atc cgc cac		922
Ile Arg Glu Gly Asp Asp Arg Thr Val Cys Arg Glu Ile Arg His		
275	280	285
aac tcc acg ggc tgc ctg ccg atg aag gac cag tgt gac aag tgc ccg		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 ccg ccg 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 ccg 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 ggt 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 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 gtc		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 ccg gag gag tga		1402
Ala Glu Lys Ala Leu Gln Glu Tyr Arg Lys Lys His Arg Glu Glu		
435	440	445
gatgtggatg ttgctttgc accttacggg ggcatttga gtccagctcc ccccaagatg	1462	

agctgcagcc ccccagagag agctctgcac gtcaccaagt aaccaggccc cagcctccag 1522
gcccccaact ccgcccagcc tctcccccgt ctggatcctg cactctaaca ctcgactctg 1582
ctgctcatgg gaagaacaga attgctcctg catgcaacta attcaataaa actgtttgt 1642
gagctg 1648

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

<220>
<223> PCR Primer

<400> 4
tccgtacgag cccctgaa 18

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

<220>
<223> PCR Primer

<400> 5
tgagcctcggtatcatctc aag 23

10

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

<220>
<223> PCR Probe

<400> 6
tccacgccccat gttccagccc t 21

21

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

30

<220>
<223> PCR Primer

<400> 7
caacggattt ggtcgatattg g 21

21

<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		10
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> PCR Probe		
<400> 9		
cgcctggtca ccagggctgc t	21	
<210> 10		
<211> 8133		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 10		20
gccccatgttc ccaggctggc ctcaaaactcc taagctcaag taatcctcct accttggcct	60	
ccccaaattgtt tgggattata gatgtgtgcc actatgccca gccaatgtaa gattttgttag	120	
tatatttagtg ttgctcctgt cctctgtgc agggctttt tgattgggac tcagtgaatt	180	
gctccaaatcc ctgaagtcac atcagttggc ccttagccga gccccgggtgg atatcattgg	240	
tggccaaaga tgacagtgaa tgaacctgaa atgttggcc ttgtgacttt tgggcctcca	300	
ggtgtctcaa aactgtcccc catggaggga gataaaagga aagagcatgg acctgacaga	360	
tgggggtgctg ggggctggc ccagctgggc tggctgtcac ttgctgtgtg actgttacag	420	
ccatgggcag ggcctggcct ggctcaccag ggggtggag gcccaggaggc cgtggccttg	480	30
gtgagcttct cctaactgtg cccatgtgg ctgtcccagc ttgaggagtt cctgaaccag	540	
agctcgccct tctacttctg gatgaatggt gaccgcacg actccctgct ggagaacgac	600	
cggcagcaga cgcacatgtt ggtatgtcatg caggaccact tcagccgcgc gtccagcatc	660	
atagacgagc tcttccagga caggttcttc acccgggagc cccaggatac ctaccactac	720	

ctgcccttca	gcctgccccca	ccggaggcct	cacttcttct	ttcccaagtc	ccgcatacgtc	780	
cggagttga	tgcccttctc	tccgtacgag	ccctgaaact	tccacgccc	gttccagccc	840	
ttccttggaa	tgatacacgaa	ggctcagcag	gccatggaca	tccacttcca	cagccggcc	900	
ttccagcacc	cgcacaaacaga	attcatacga	ggtgagaagg	ggtgaaagct	catggcctt	960	
tgagcaactc	gttagatgct	gagaaccatg	ccgagggtctc	agcgggtgtc	atctcgattt	1020	
ttctccagca	atatcacaag	ggtgatattt	tccttatttta	aagaggaaaa	aaactgagct	1080	
gggcatggtg	gctcatgcct	gtgatgccag	cactttgaga	ggccaaggcg	ggaggatcat	1140	
ttgaggccag	gagtttgaga	ccagcctggc	caagatagtg	agaccctgtc	tctacaaaaaa	1200	10
taaaaaacttta	aaaaatttgc	cgggtgttgt	ggtgcacacc	tgttagtctca	gctactcggg	1260	
aggctgaggc	aagagagtca	cctgagcctg	gaagttggag	gctgcagtga	gctatgattt	1320	
caccattgca	ttccagcctg	ggcaacagag	tgagaccctg	tctctaaattt	aaaaaataaa	1380	
taaaaaataaac	aataggaatc	agtggagtcc	atctctgcatt	ggctggatga	ctgactcttc	1440	
ttccctcggt	tgtccccaga	aggcgacat	gaccggactg	tgtgcgggaa	gatccggcac	1500	
aactccacgg	gctgcctgcg	gatgaaggac	cagtgtgaca	agtgcgggaa	gatcttgcct	1560	
gtgggtgagt	cgggggtccag	accacaagcc	gtccccctg	atcccttgcgt	tctggggtc	1620	
actggggcct	cactggtgct	gcctttatgg	agtcagacag	ataagcgttt	ggattccagc	1680	20
tctgcagccct	ttgagctgtg	tcccgccccca	ggtcctgagc	ctcatgcagc	ttcggttctt	1740	
catcttagaa	tgagatgtat	atgcgaggct	gtccctgaag	tcggtgagat	gtcggttagag	1800	
atgcaaaaagt	gccctccacc	ttgtcgcccc	catgttgaaa	aaagcttgtt	gaaaaaaagtc	1860	
atccccctgg	gactccccgg	tgattctgtt	cccaagcgcc	aagcagttagg	catcttcatt	1920	
ttccctctgca	gattatgaca	ttgcagacag	tatgtgtttt	gtttaacaaa	actgaccaga	1980	
ggccaggcac	tgttctaaac	actcgacata	catttctca	tttcctcaga	atgaccctct	2040	
gaggaaactg	agccacagaa	aggtaataa	cttatccaag	attgaccccg	acatgggcga	2100	
gctgggcttc	aatccctaggg	cgctgtgttc	tctccctgggg	cccctcgca	ccatctgcccac	2160	30
agaagtcacg	ggtctcagta	cctgggcata	caagcaatag	tcccttttgt	cggttggttg	2220	
gtccccctagg	caaaggaaat	atccctttt	aactgtcccc	ctccgtttca	ccagctctgg	2280	
ttatgggtta	acttctttcc	acttagagat	aacagctgtg	acagtatttt	gacttagttcc	2340	
tggtacacag	cagttcatac	tcacaaagag	ttaattgttt	ccccttgc	aacagcttat	2400	

cgatctggtg gctttgctct tacttaatgc tttagtttgag tttgccatgg caggccgcca 2460
 gggcttagtt aaacattcct agcctcaactc ctataatttt agaagccact gcaaaataaa 2520
 cagttgtgct ttaacagggct gaagtataag ttgctgtaga tgagtgcaca accaggcctt 2580
 gggctttttt ctataaaaaaa tatcatagag tggcatcaat tacatggtac ctcaccacaa 2640
 gaaagtcatg tttagggctcg agaaaagatg tcagatgcct gtgcccagat tggacccttt 2700
 atagctgatt tttagtctgt tgcccaggct gggtcaggctc tggcccaatc ttaacagtca 2760
 ttgattacag ttgagagtc agccagcgcc agtcttatca gtcattgatt atagctggcg 2820
 tacagtggct ctatctcggc tcactgcgac ctccgcctcc tgggttcaag tgattctcct 2880 10
 gcctcagcct cccaaatgtgc tgggagtgca ggtgtgcacc accacaccca gctaatttt 2940
 gtattttttag tagagacagc atttcaactat gttggccagg ctggtcttga actcctgacc 3000
 tcaagtaatc tccccgcctc ggcctccaa agttctggga ttacagggtgt gagccactgt 3060
 gcctgacctg agatagattc tttagagaatt attggtaaga ataattctct aagctgagct 3120
 aaatagtcta cactgaagag gactgcctac tggattttaa ggtgcttgc accatataag 3180
 catgtactgc ctgggaactc tagatgagga tttctcaatt tcagcgctgt tgatttttt 3240
 tttttttttt gagacagggt ctctcttat cacccagcct ggagtgcagt ggcaccattta 3300
 cagctcaactg cagcctagac ctcttggct gaagtcatcc tcctgcctca gcctcctgag 3360 20
 taacagacta caggtgtgct ccaccatgct tggctattt tttttttttt agtagagatg 3420
 gggcttgc acattgcca agctggctc taactcctgg gctcaagtga tcctccttacc 3480
 tcagcctccc agagtgtctgg gattacaggt gtgagcagtg ctgacatttt ggaccaggct 3540
 attctttgtc gttggggct gtcctgagca gttcagggtg tttggcagca ttctggcct 3600
 ctgcccacta gaggtcagca gtccttcc ctttggctgt acaaccagct tcagaacttg 3660
 ctaaatctcc ctgggtgaca gcgtccacag tagagaacct ctattctaga ctaagcctca 3720
 gctcttaagg attttctta ttttattattt attttttaa gacagggtct cgctctatca 3780
 cccaggctgg agcgttagtgg cgcaatcttt gctcaactgca acctctgctt cctgggttca 3840 30
 agcgatttct cctgccccag cctcctgagt agctggattt acaggcgtgc accggccacgc 3900
 ctggctattttt tttatatttt tagtagagac agggtttcaacatattggcc aggctggct 3960
 ccaaactcttg acctcaagtg atcagccctgc ctcaaggctcc caaagtgcgt ggattacagg 4020
 tggtagccag caccgcctggc tagttttct tatttttaaa ttttttttg gtaaaataat 4080

gatgtttatt tattacataat ttatttcaa actggcatct tgtagtaat tctgtttctt 4140
 tccccaccta acatttgtt tactataat gatttcagtc atcatcctaa agcatatgca 4200
 aaatctccct tccctgact cacgttgat gtacctgcct ctggatattt ttgaaatacc 4260
 ttagggggag aaaaacagta gtttaagag ctagtggaca gtttccaggt cttaatgaat 4320
 ctgacaacct gcagcccagg gccaagagga atgaattctc tttccctgc tctctgtatg 4380
 aactcaactga ccagccatgg gcggcaggtg ggcaggcaag gaccctggc caccaggtgc 4440
 cagtgcataca gctgcataa ctcctggcac cagaactgcc acctctacag acatgctcaa 4500
 aagacaagtt tggaccgggt gcattggctc acacctgtaa tcccaagcacc ttgagaggcc 4560 10
 gaggtgggtg gaccctgag gtcaggagtt tgagaccagc ctagccaaca tggtaaaacc 4620
 ctgtctctcc taaaaataca aaaaaatcac ccgggggtgg tggcaggcac ctgtaatccc 4680
 aactactctg gaggctgagg caggagaatt gcttgaaccc gggaggtgga gttgcagtg 4740
 agctgagctc ggcocattgc actccagctt gggaaacaag agcggaaattc tgtctcaaaa 4800
 aaaagacaag cttggaggat tgtccagaac cacagatcca gggtagggaa agcccaagct 4860
 taggagctga agaccctggc tcaatcccg gcccagagat catttattct atggctttag 4920
 gtaagctatt tattgataact tctgtggcc tcaagttcat tattggtaaa aattatttca 4980
 ttattggtaa aattaggact taagtcctaa tccttaagtc agaacagatc caattcttag 5040 20
 agaaaaagga tatccagaga gaacttctg cgggtctgg gacgcaggca gtgccacacg 5100
 aatggcagct gtgagtaata ttccctctt ctggaaatga ttcccccggag gactaggcga 5160
 acgagagcca ctccaggtct gagaacatgg agaacttgag atcagtgcct ttggaagtgt 5220
 ggtcaacaca gtttgcacc aaagagataa gggctggca cccaaagata aatgaatgat 5280
 gttacgaagc acactgttta ggtcagttgg cgtattttc cagagcaagg cttctcaggc 5340
 tggcgtgggt ggctcacacc agtaatccca gcactttttg ggcagatggg ttgagcccag 5400
 gagttcgaga ccagcctgga caacacagag aaacccctgt tctacaaaaa atacaaaaat 5460
 tagctggca tggtagcatg tgcctatagt cccagctact caggaggctg aggttggagg 5520 30
 acagcctgag cctggaaagt caaggctgca gtgagccgag atctcaccac tgtattccag 5580
 cctaggcaac agagcaaaaac tctgtctcaa aaaaacaaaa acaaaaaacaa aaaacccaaa 5640
 agactttctg gatgaoggaa gcagtgtcta gattcacatt ctgaggcaaa acctttattt 5700
 tgcgtggac aattccagtt tggccctt cccttaggga agcactgcct ttgttccgc 5760

tgcatgtgct aacttccatt cattcatggt tctatccctt ttagccctc cttcacact	5820	
tctcaattgc gtttcttcca tctctggca gactgttcca ccaacaaccc ctcccaggct	5880	
aagctgcggc gggagctcga cgaatccctc caggtcgctg agaggttgac caggaatac	5940	
aacgagctgc taaagtccta ccagtggaaag atgctcaaca cctctccctt gctggagcag	6000	
ctgaacgagc agtttaactg ggtgtcccg ctggcaaacc tcacgcaagg cgaagaccag	6060	
tactatctgc gggtcaccac ggtgagctgt gtcccgccca catgtgtgg ctccggagcc	6120	
gagctgtgat cgggagcagg ggcattgtgt cttttactg agcatttatac acacggcaga	6180	
aaatagaaaa cttaggcgc ccctgtgcc ttgaagcctc atcaccact cagggaaaat	6240	10
ataaccctgc ttacaaagg agcaaagtaa gagaggttcc acagcttggc caaggtgtga	6300	
tagctgacag atgacttggc cgggtatttg aacctgactg cctggctgcc aagcctgtat	6360	
tttgttggc ttgtttttgt ttgggtgcac aaatctgtga ataaaccaga agcctgttt	6420	
ctttctcaa agctacaagg ctgcctctg gcatgtaaaa tggcttatga attagtacat	6480	
cactctctgc cagtataaaa aacttctctc taggcagac atgggtggc atgcctgtaa	6540	
tcccagcaact ttgggaggca gaggcaagag gattgttga ggccaggaat ttgagaccag	6600	
cctgggcaac acagcaagat tccctctcta caaaaaatac aaaaatcagt caggtgttgt	6660	
ggcacacact ttagtccca gctattcagg aggctgaggt gggaggattt cctgagccct	6720	20
gaagtggagg ctgcagttag ctgtgtatcac gccactgcac tccagctgg gtgacagagt	6780	
gagactctgt ctctaaaaat atatataatataatataataaaataataaaataatca	6840	
aataaaaactt atttcttagta ctggaaactc ttcttttct tttctttctt ccctccaggc	6900	
cctctggatt cttttctac cctactctga ccaaggctg cctaaagcaa atgtttggaa	6960	
accactttta ttctttgggg tgctccctgg ctggtcattt gcagatgaca tttgccccaa	7020	
cacatgagtg tctgtgaacc aggtccgttc tggccactga gctgtactta cgtctagatg	7080	
tataagaagc atggggtcag ctctcttagt ttcttgagg agcaggagga ctctcttatac	7140	
agaagcctga ctctgttgc agagegcatg cattttgacc acagtgttcc agctcttccc	7200	30
ttttctcttg ttccatttag gtggctccc acacttctga ctggacgtt cttccgggt	7260	
tcactgaggt ggtcgtaag ctcttgcact ctgatcccat cactgtgacg gtccctgttag	7320	
aagtctccag gaagaaccct aaatttatgg agaccgtggc ggagaaagcg ctgcaggaat	7380	
accgcaaaaaa gcaccggtaa gcaggcgggc cttaggcgc gcctgcaggg cccagtgagt	7440	

ctctgggagc caaaaaaaaa caaacaaagt gcagactcta tagcctggtg ggaacgactc 7500
 cgccgggagc cagagcccaa gaacaaagcc aggaagttac gggggaaattt tattttcct 7560
 ttggaggatg ttttactttg gaggataact gtttttattt tcagggagga gtgagatgtg 7620
 gatgttgctt ttgcacctac gggggatct gaggccatct ccccccaga tgagctgcag 7680
 ccccccagag agagctctgc acgtcaccaa gtaaaccagg ccccaaccc caggccccca 7740
 actccgccccca gcctctcccc gctctggatc ctgcactcta acactcgact ctgctgctca 7800
 tggagaagaac agaattgctc ctgcattgcaaa ctaattcaat aaaactgtct tgtgagctga 7860
 tcgcctggag ggtcctcttt ttatgtttag ttgcgtcttc ccggcatgccc ttcattttgc 7920 10
 tatggggggc aggcaggggg gatggaaaat aagtagaaac aaaaaagcag tggctaagat 7980
 ggtataggga ctgtcataacc agtgaagaat aaaagggtga agaataaaag ggatatgtat 8040
 acaaggttga tccacttcaa gaattgttgc cttcaggaa gagagatgtg tttcaacaag 8100
 ccaactaaaa tatattgctg caaatggaag ctt 8133

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

20

<400> 11
 aagcttgaac tggagcaagg gtaggcactt gcatgctggg tggccagccat atgggaaggc 60
 tcgcctggg gcagaggccc tggcacccag cagctctttg agtgcattgag cctgtgtct 120
 ctgtgtgctc agccagccctt gtgttccctt gtaggatgcc ctaaatgaga ccaggaaatc 180
 agagacaaag ctgaaggagc tcccaggagt gtgcattgag accatgttgc ccctctggg 240
 agagtgttaag ccctgcctga aacagacccg catgaatttc tacgcacgcg tctgcagaag 300
 tggctcaggc ctgggtggcc gccagggtgaa aaggggacac atgagtggcc aaggctctga 360
 gtggggagg aggaggagccct agtgaaatat gcttcattcc gcatgccaga tgcaattgtat 420
 tagcattggc tggcttgccc agagtgcatt gctccattgg taatgtctgg catgagtaga 480 30
 gagagtgtag gcatcaaaaag gatgttagcc aggtatctgc cttctcttag aaaactctatg 540
 cagcagtgt tagctggatg acataataaa ctgcttcgtg ggatgcagag ccctgtgtca 600
 cttatgtgga aggatctaag aatttttttt ttttttttag acagggtctc actctgtcac 660
 ccaggctgga gtacagtgtat gtgatcatgt ttcaactgcag cttcgacccctc ctgggttcag 720

gtgatcctcc cacctcagcc tcccaagtag ctgggactac aggcacgtac caccacaccc 780
 agctaatttt ttttgtaaac atgggtttt gccatgtgc ccaggcttgt 840
 ctc当地actcc taagctcaag taatcctcc accttggcct cccaaattgt tgggattata 900
 gatgtgtgcc actagtccca gccaatgtaa gatttttag 940

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

<220> 10
 <221> unsure
 <222> 5461
 <223> unknown

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

<400> 12
 gacctgcagg tcaacggatc cattcccgat tcctcatcgt ccagatggaa gaaaactgagg 60
 cccaaaggca aagtgattag tccgagggtca cccagtgtct aggggcacac ctaggactgt 120
 aatcagactt tcatggacct ggtctgggtt ctcccactta gtcatgggcc ttgaagattc 180
 cccgaggctg cctcctgaaa aggactgggg tctagtgccc cctggacgtt gggcaagcaa 240
 gggactgggc ctccatgttg tgccatccata gtcctgatcc tgaactggaa aactcagccc 300
 ctgaccacgc agctctccctt taagccccctt tgttcacat ggtttcaaa gtctgccacc 360
 cacagtgggg ctgcctgtac ccgcctgtc caccattgc cccagctgtc agcccccttga 420
 ctttctctctt ggggcttaaa catccctggc tccaaaatgg gcagctcaact ttcttccccca 480
 agaagtagct gcacccctccag ggttccataga tttgccttc tttgcctgggg ggaggggtgg 540
 ctgcgcacagg agattctccc tgctctcgc agaaggaact ccagcagttt gagaccagca 600
 aacccctctg gacacagatc tgatttccta actgggaagg ctcagggcaa aataaaaatt 660
 caggtttactt ggttcaaaaaa ctatgaagaa tttcaagacc gtcacagtag cccattaaac 720
 caaacgtgga tctgcaaggg tcccacagcc atgaagccca ccctgcttgg ttgggttcca 780
 aaaagatggg gacagtgatt gcttaagctc tttggatcaa ggaccccgga gaggcccttct 840
 ggctctccac atatctgctc tgatcactcc taaacacaat tctgtttccct ccaggctgg 900

20

30

tctccatgg aagaagcaga taggagccgg ggctttggga ttgaaaccct caccatctgt	2640	
gtgcctctt cactgtcttc ccatctccca cacggctccc tggtcacagt cattgatttt	2700	
ctttctttct tttctctttt tttttttttt tcctgagacc aagtctcaact ctgttgcaca	2760	
ggctggagta gagtagcgcc atctcggtc actgcaacct ccggccatccg ggttcaagca	2820	
gttctcatgc ctcagcctct gagtagctgg gactacagcc gcatgctgct acatccggct	2880	
aattttgtt ttttttagtag agacatggtt tcaccacctt ggccaggctg gtctcgaact	2940	
cctgatctca agtaatccag cctgtcttgg cctcccaaag tgctgggtg acaggtgtga	3000	
atcaatgcgt ccctgccagg tcattgattt tcttaagcct ctagccctgc cctgcttgg	3060	10
aacgttttgg gaagctgctc agttcaaagt tcccaggagg gtgtgcctgg aggggagttg	3120	
ctcccaaagt ctgcctgctc ccccccggcc ccctgcccccc caccggccgc catcttctcc	3180	
tcctcctctt cccctgagca gcccccttgc ccacagaacc ggccttttgc ggtagaagga	3240	
gcaaggccaa gtggtttaag ccttcttagg gagaatgagg ctgtgtggta gtgctggga	3300	
ctcgaggggcc ttgcgttggc atggctcttc caccagggc agctggcagc caggctccca	3360	
ggaggcagag gagatgaggg gggaggtgag tccgagcaaa ggaaaggagg tcggctgtgc	3420	
agtcacggtt cttagaacatt cattggatca gcagcatcca tatcacctgc agactggctg	3480	
gaaaagcagt ctcagaacca acattataac cagccctgca gtgattcata agtactttaa	3540	20
aaagtggtca atcatttcag caaagcagag ccacacagtc cgggggacca caggtggcct	3600	
ctgtgtgtt gtctcggttt tcctgcctt ctccagacat gttgattaga cactgcata	3660	
gccccagcctc agacctcagt ctaatttggaa agtagtcaga atttactatg attacataag	3720	
accctcgtgt ttacagaaca cattccctc tctgaggctt ggatttagatc cattttacag	3780	
atgaagaaaac tgaggctcag atattaagt gacttggaaat caaggaaaga atactggaca	3840	
tggggctggg agggctgggc tctcatccca gggttaccat gagcatgtg tggactctag	3900	
ggagtccatg ccctctctgg cgttcagctc accgcttaggt agagaggttg ggtgagagaa	3960	
cgacctctt cccaggtctg agctggatgg ttccaccaggcc acccccaggctt ccctggacga	4020	30
gactctgtgc ccgctgtga gtctggaaatt ccttcctgt atcttgcctt tgctgcccc	4080	
attcttcatg gcccagcacc ctgttcttg gtcaaacctt agttctgaat gggttttcc	4140	
agaagttgtt gctttcaggg gcccctggca gagaggtgtt tctggctggc tttgtctctc	4200	
tggcatgaca aaggctctgtt tcctgtggaa ggcatcttccag ggctcagtggtt gcaagctgggg	4260	

cagacgctga gaccacagcc ttccctggtga gcccggtctc cgccccctac cccatctctg	4320	
ggaaggcgct gaccccatct ctctccac gctgctccct ggctctttgc gcctgattac	4380	
ttctcatgag aggcaactcct tgtaatgtg ctactgagtg tccagatggg cctgctggc	4440	
tgagcgggct ttggatgtga accatttcag gaagggaaac ccatacgctc gttggttctg	4500	
tgatggcaaa tgggtgagct cagataacga gttcttggga ggggcatggt ggggggtggag	4560	
tgcaggggga ggggtttctg ttttattgac aacagcctca gcttctggga aagggtccat	4620	
tgtgtaagac cggggctatg gctgtgcccc gtggctcagg gcagccagcc agtggtggca	4680	
ggaacactgg cagggcagcc tcgtgtcgcc ttagagggga tgggcagtgt ggagggcctg	4740	10
gcagagcaag aggactcatac ctcccaaagg gactttctct gggaaagcctg ctccctggc	4800	
cactgcgaac cctctctact ctccgaagga attgtccttc ctggcttcca ctacttccac	4860	
ccctgaatgc acaggcagcc cggcccaagt ctcccactag gatgcagatg gattcggtgt	4920	
gaagggctgg ctgctgttgc ctccgcgtct tgaaagtcaa gttcaggtgg tgctgagact	4980	
ccctgggggc tgcagcgcctg tggtaatgg ggagcgtctg ctgggggtgaa ggtttaggtg	5040	
cacattgcag aggacgtggc tggctctgg gatcagtc ctctgtggag gtggcatgg	5100	
gagggacgga tgcacatgaccc aagggtggta ttttcagtgt ctgacatgat cgataccact	5160	
ctggacaagg aggccaggat gcagaaagcc tggctgcctc gctgattgtc ggggaggatg	5220	20
tggcttggac aagagcttgg ttccctccat gccagggttc ttgtttcttc cactcaacat	5280	
tgtgttctg cagtccttcc ctccctgcac ctctgcctt cgctttcatt cgaggtgtcc	5340	
atggcaagtc tggtcatttc cccccatttc ctcaaggaata aaagttgcag cagtgcctgc	5400	
tgtggggaca gctgaggggca gtgaggctgg ggagctgctg cagggcggag tggcgggac	5460	
nnnacaggct gtctagctgt tcccatgat gtctcctgtt ctctgcagag gcgtgaaaag	5520	
actccagaat tggaggcatg atgaagactc tgctgctgtt tggggggctg ctgctgaccc	5580	
ggggaggtgg gcaggtcctg ggggaccaga cggctcaga caatgagctc cagggtgagt	5640	
agaccaagca tgcgttccct ctggccacag ggtgatgagg tcagagggca gggtagctaa	5700	30
ttctgctcag tgcctctata tcaggccccca gtgttacaga ccgttttat ctgtgcact	5760	
gggtctgggt gcctgtgtct gggccactc tgagcctcag ctcccaggcc cctggttcag	5820	
gctctgcgtg catcagactg cggcatttg caggcatttc ccaagcactt tggctgtttg	5880	
catttcatttc agctcttccc ctcccaggcc ccttagccca gctcccaggc ctactccaca	5940	

aagctgtgtc tggaccacccg gagctcttat ccctctcccc tttggagtgc ccagagctta 6000
tccctctgt gagctgacgg ttctgcagg atattgtta aaaacccaga tcagacatgg 6060
gtgtgagtct gttcacccctc ttctcagctg ggtgacttgc ggccactatc ttgatctcat 6120
gacactcccc ccacccccc ttttatttagat atataattaa caaataaaaaa ttgtgtat 6180
ttaaggata tgacgtgatg tttgaaatgc cacatacatt gaaatgatga ccagttttta 6240
tggggacgc gtggaaagac ttaaaatcta ctttcttagc aaatttccag ttatgatatg 6300
gtgttattaa ctataagcac cacctgtatg tttagacctcc agaacatact cctcctac 6360
gatgaacact ttgacccttt atcatatcac acttcccatg tctccctctg cgaagtggc 6420
acggcgaaaa gctggagcat tacgtaaact gcacatgaag tggggcgc agtgcggc 6480
atgggataaa caccagtgaa gtagactta ggtgacacag tggggcgc catttgcac 6540
cagtgcatac cttactcatt tactcatctt cttattctg tggccggca ctgcattgg 6600
acaaagaaa acacatatct gttaaactg aactctagaa agattgtgt caaaaataac 6660
aatattttat attttgcattt tgcaaacgtg acacttctgg gttttttttt tttccttgc 6720
aagtttcttc tgcacccagc tcattctcca ggggcacatg gcagttggcgc ggcataactc 6780
tgggtgtgcc ggctccatg gtcatttcattt ctaaggatg ggggcacatg agcaaggagc 6840
ctgtgtatggg agcctgtgcc agggcaaggc tggggcatgc tgctgcctgc tggcaggat 6900
gggggtccca gccttgacag cccctgaact gaacgggcct ttctggcattc cagctcatc 6960
cagggtcctg aggcacccctc ttctctcgc ctcatctgc ctcttgcact tctcttgcag 7020
aaatgtccaa tcagggaaatg aagtacgtca ataaggaaat taaaaatgtt gtcaacgggg 7080
tgaaacagat aaagactctc atagaaaaaa caaacgaaga ggcacacaca ctgctcagca 7140
accttagaaga agccaagaag aagaaagagg tcaggaggag cggctaccgc ctccctgcct 7200
tgaccatccc actggggggg aggggggggg tcactgcgcg gtggccctgc ggttgcattg 7260
gtgacccca gtcctccca gctgtgtcag ctgtatgc ggtgcagtt aagaaggcagg 7320
gaagggtcat ttgcttcattt aagcatcagg gagtgatgc ttggatctgg ttttggat 7380
agcctggccc agggctaatg ccagattcat ttcaatagat gtttctaagc cctgatc 7440
tgcttagttcc aagcaggctc tgggtgggtt ggccggcagg ggcacacagg cgtggcgtcc 7500
aaccttcagg aagcttcttag gagtttagggc acagttggat cttgaaggat gagtgggttc 7560
tttaagccag gtggggaaagggtt gggcgaatga gggggaaagctt 7610

<210> 13
 <211> 1651
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (199) ... (1545)

<400> 13
 ctgcgaaccc tctctactct ccgaagggaa ttgtccttcc tggcttccac tacttccacc 60
 cctgaatgca caggcagccc ggcccaagtc tcccaactagg gatgcagatg gattcggtgt 120
 gaaggcgtgg ctgctgttgc ctccggctct tgaaagtcaa gttcagaggc gtgcaaagac 180 10
 tccagaattt gaggcatg atg aag act ctg ctg ttt gtg ggg ctg ctg
 Met Lys Thr Leu Leu Leu Phe Val Gly Leu Leu
 1 5 10

ctg acc tgg gag agt ggg cag gtc ctg ggg gac cag acg gtc tca gac 279
 Leu Thr Trp Glu Ser Gly Gln Val Leu Gly Asp Gln Thr Val Ser Asp
 15 20 25

aat gag ctc cag gaa atg tcc aat cag gga agt aag tac gtc aat aag 327
 Asn Glu Leu Gln Glu Met Ser Asn Gln Gly Ser Lys Tyr Val Asn Lys
 30 35 40

gaa att caa aat gct gtc aac ggg gtg aaa cag ata aag act ctc ata 375
 Glu Ile Gln Asn Ala Val Asn Gly Val Lys Gln Ile Lys Thr Leu Ile
 45 50 55 20

gaa aaa aca aac gaa gag cgc aag aca ctg ctc agc aac cta gaa gaa 423
 Glu Lys Thr Asn Glu Glu Arg Lys Thr Leu Leu Ser Asn Leu Glu Glu
 60 65 70 75

gcc aag aag aag aaa gag gat gcc cta aat gag acc agg gaa tca gag 471
 Ala Lys Lys Lys Glu Asp Ala Leu Asn Glu Thr Arg Glu Ser Glu
 80 85 90

aca aag ctg aag gag ctc cca gga gtg tgc aat gag acc atg atg gcc 519
 Thr Lys Leu Lys Glu Leu Pro Gly Val Cys Asn Glu Thr Met Met Ala
 95 100 105

ctc tgg gaa gag tgt aag ccc tgc ctg aaa cag acc tgc atg aag ttc 567
 Leu Trp Glu Glu Cys Lys Pro Cys Leu Lys Gln Thr Cys Met Lys Phe
 110 115 120 30

tac gca cgc gtc tgc aga agt ggc tca ggc ctg gtt ggc cgc cag ctt 615
 Tyr Ala Arg Val Cys Arg Ser Gly Ser Gly Leu Val Gly Arg Gln Leu
 125 130 135

gag gag ttc ctg aac cag agc tcg ccc ttc tac ttc tgg atg aat ggt 663
 Glu Glu Phe Leu Asn Gln Ser Ser Pro Phe Tyr Phe Trp Met Asn Gly
 140 145 150 155

gac cgc atc gac tcc ctg ctg gag aac gac cgg cag cag acg cac atg Asp Arg Ile Asp Ser Leu Leu Glu Asn Asp Arg Gln Gln Thr His Met 160 165 170	711	
ctg gat gtc atg cag gac cac ttc agc cgc gcg tcc agc atc ata gac Leu Asp Val Met Gln Asp His Phe Ser Arg Ala Ser Ser Ile Ile Asp 175 180 185	759	
gag ctc ttc cag gac agg ttc ttc acc cgg gag ccc cag gat acc tac Glu Leu Phe Gln Asp Arg Phe Phe Thr Arg Glu Pro Gln Asp Thr Tyr 190 195 200	807	
cac tac ctg ccc ttc agc ctg ccc cac cgg agg cct cac ttc ttc ttt His Tyr Leu Pro Phe Ser Leu Pro His Arg Arg Pro His Phe Phe Phe 205 210 215	855	10
ccc aag tcc cgc atc gtc cgc agc ttg atg ccc ttc tct ccg tac gag Pro Lys Ser Arg Ile Val Arg Ser Leu Met Pro Phe Ser Pro Tyr Glu 220 225 230 235	903	
ccc ctg aac ttc cac gcc atg ttc cag ccc ttc ctt gag atg ata cac Pro Leu Asn Phe His Ala Met Phe Gln Pro Phe Leu Glu Met Ile His 240 245 250	951	
gag gct cag cag gcc atg gac atc cac ttc cac agc ccg gcc ttc cag Glu Ala Gln Ala Met Asp Ile His Phe His Ser Pro Ala Phe Gln 255 260 265	999	
cac ccg cca aca gaa ttc ata cga gaa ggc gac gat gac ccg act gtg His Pro Pro Thr Glu Phe Ile Arg Glu Gly Asp Asp Asp Arg Thr Val 270 275 280	1047	20
tgc cgg gag atc cgc cac aac tcc acg ggc tgc ctg cgg atg aag gac Cys Arg Glu Ile Arg His Asn Ser Thr Gly Cys Leu Arg Met Lys Asp 285 290 295	1095	
cag tgt gac aag tgc cgg gag atc ttg tct gtg gac tgt tcc acc aac Gln Cys Asp Cys Arg Glu Ile Leu Ser Val Asp Cys Ser Thr Asn 300 305 310 315	1143	
aac ccc tcc cag gct aag ctg cgg cgg gag ctc gac gaa tcc ctc cag Asn Pro Ser Gln Ala Lys Leu Arg Arg Glu Leu Asp Glu Ser Leu Gln 320 325 330	1191	
gtc gct gag agg ttg acc agg aaa tat aac gag ctg cta aag tcc tac Val Ala Glu Arg Leu Thr Arg Lys Tyr Asn Glu Leu Leu Lys Ser Tyr 335 340 345	1239	30
cag tgg aag atg ctc aac acc tcc tcc ttg ctg gag cag ctg aac gag Gln Trp Lys Met Leu Asn Thr Ser Ser Leu Leu Glu Gln Leu Asn Glu 350 355 360	1287	
cag ttt aac tgg gtg tcc cgg ctg gca aac ctc acg caa ggc gaa gac Gln Phe Asn Trp Val Ser Arg Leu Ala Asn Leu Thr Gln Gly Glu Asp 365 370 375	1335	

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 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	
aag cac cgg gag gag tga gatgtggatg ttgctttgc acctacgggg gcatctgagt	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	
<220>	20
<223> Antisense Oligonucleotide	
<400> 14	
gtctttgcac gcctcggtca	20
<210> 15	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Antisense Oligonucleotide	
<400> 15	30
attctggagt ctttgcacgc	20
<210> 16	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 16

gtcttcatca tgccctccaaat

20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 17

tctcccaagggt cagcagcagc

10

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 18

tctggtcccc caggacctgc

20

20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 19

ggagctcatt gtctgagacc

20

30

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 20

acttacttcc ctgattggac

20

<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
gggcatttcctc tttcttcttc 20

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

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 24
attttagggca 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
gggagtcct tcagctttgt

20

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

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

20

<400> 28
cccaaggggc catcatggtc

20

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

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 29
ctcttcccaag 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

gtgcgttagaa cttcatgcag

10

20

<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

tggcgccaa ccaggcctga

20

30

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 34

actcctcaag ctggcgccca

20

<210> 35

<211> 20

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 35
agtagaaggg cgagctctgg 20

<210> 36
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence 10

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 36
ttcatccaga agtagaaggg 20

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

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 37
cagcagggag tcgatgcggg 20

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

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 38
gctgccggtc gttctccagc 20

<210> 39
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence 30

<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

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 41
gtggtcctgc atgacatcca

20

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

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<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 gagctcgct

20

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 45

gaacctgtcc tggaagagct

10

20

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 46

gaaaagaaga agtgaggcct

20

20

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 47

gggcatcaag ctgcggacga

20

30

<210> 48

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 48

ctcaaggaag ggctggaaca

20

<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 caagGAAGGG 20

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

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 51
gctgtggAAAG tggatgtCCA 20

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

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 52
attctgttgg CGGGTGTGG 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
cgatctcccc 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
gtcccttcatac cgcaaggcagc 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

gagctcccgcc cgccagcttag

10

<210> 60

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 60

ggaggaggattc gtcgagctcc

20

<210> 61

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 61

atcttccact ggttaggactt

20

<210> 62

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 62

tgttgagcat cttccactgg

20

<210> 63

<211> 20

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 63
agctgtccca gcaaggaggaa 20

<210> 64
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence 10

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 64
gctcggttcag ctgctccagc 20

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

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 65
ttgccagcccg ggacaccccaag 20

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

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 66
cgcagatagt actggcttc 20

<210> 67
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence 30

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 67
accgtggta cccgcagata 20

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

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 68
cgagtcagaa gtgtggaaag 20

<210> 69
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence 10

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 69
gtgatggat 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 catccacacatc

20

<210> 73

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 73

tagagtgcag gatccagagc

10

<210> 74

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 74

attagttgca tgcaggagca

20

20

<210> 75

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 75

agacagtttt attgaattag

20

30

<210> 76

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 76

cgagatagag ccactgtacg

20

<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
gttgttgttg gaacagtcca 20

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

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 79
tgcttaccgg tgcttttgc 20

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

<220>
<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 80
acatctcaact cctcccggtg 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
tgtgtccct tttcacctgg 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

gccccaggta tccaggtctc

20

<210> 87

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 87

tcccccggg agagtagaga

10

<210> 88

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 88

tgcttggaa atgcctgcaa

20

20

<210> 89

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 89

agctggatgc cagaaaggcc

20

<210> 90

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Antisense Oligonucleotide

<400> 90

tggaaatgtt ggaaggccagg

20

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 61 P 35/00 (2006.01) A 61 P 35/00
A 61 P 13/00 (2006.01) A 61 P 13/00
A 61 P 25/28 (2006.01) A 61 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, ブレット・ピー
アメリカ合衆国カリフォルニア州 92009, ラ・コスタ, ヌエバ・カスティーリヤ・ウェイ 7
605
(72)発明者 フレイア, スーザン・エム
アメリカ合衆国カリフォルニア州 92122, サンディエゴ, ルノー・ストリート 2946

審査官 松田 芳子

(56)参考文献 特開平07-250684 (JP, A)
国際公開第00/049937 (WO, A1)
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., 1997, Vol.330, No.1, p.87-92

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/09