

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-541729

(P2008-541729A)

(43) 公表日 平成20年11月27日 (2008. 11. 27)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
A 6 1 K 48/00 (2006. 01)	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 4
A 6 1 K 31/7088 (2006. 01)	A 6 1 K 31/7088	4 C O 8 6
A 6 1 P 3/10 (2006. 01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 3/04 (2006. 01)	A 6 1 P 3/04	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 55 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2008-513714 (P2008-513714)	(71) 出願人	595104323
(86) (22) 出願日	平成18年5月24日 (2006. 5. 24)		アイシス ファーマシューティカルズ、
(85) 翻訳文提出日	平成20年1月11日 (2008. 1. 11)		インコーポレーテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/020272		アメリカ合衆国カリフォルニア州9200
(87) 国際公開番号	W02006/127913		8, カールズバッド, ラザフォード・ロー
(87) 国際公開日	平成18年11月30日 (2006. 11. 30)		ド 1 8 9 6
(31) 優先権主張番号	60/684, 400	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成17年5月24日 (2005. 5. 24)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100062409
(31) 優先権主張番号	60/742, 207		弁理士 安村 高明
(32) 優先日	平成17年12月1日 (2005. 12. 1)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 LMW-P T P a s e 発現の調節

(57) 【要約】

細胞、組織、または動物の中での LMW - P T P a s e の発現を調節するための化合物、組成物、および方法が、本明細書中で開示される。標的の検証方法もまた提供される。疾患および障害の処置のための医薬品の製造における、開示される化合物および組成物の使用もまた提供される。糖尿病、インシュリン耐性、インシュリン欠乏、高コレステロール血症、高血糖症、異常脂質血症、脂質異常症、高トリグリセリド血症、および高脂肪酸血症の予防、緩和、および/または処置のための方法もまた提供される。いくつかの実施形態においては、糖尿病は LMW - P T P a s e に対して標的化させられたアンチセンス化合物の投与による、I I 型糖尿病である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも 2 つの化学修飾を含み、配列番号 5 の活性のある標的セグメントの少なくとも 12ヌクレオ塩基部分に対して標的化させられた、15 から 35ヌクレオ塩基のキメラアンチセンス化合物であって、ここで、該活性のある標的セグメントは、領域 B A、領域 B B、領域 B C、領域 B D、領域 B E、領域 B F、領域 B G、領域 B H、領域 B I、領域 B J、および領域 B K からなる群より選択される、キメラアンチセンス化合物。

【請求項 2】

前記化合物が、配列番号 5 の活性のある標的セグメントの少なくとも 20ヌクレオ塩基部分に対して標的化されており、ここで、該活性のある標的セグメントは、領域 B A、領域 B B、領域 B C、領域 B D、領域 B E、領域 B F、領域 B G、領域 B H、領域 B I、領域 B J、および領域 B K からなる群より選択される、請求項 1 に記載の化合物。

10

【請求項 3】

15 から 30ヌクレオ塩基長を含む、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 4】

18 から 22ヌクレオ塩基長を含む、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 5】

標的核酸に対して 4 個未満の不適合を含む、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 6】

前記化学修飾が、少なくとも 1 つの修飾されたヌクレオシド間結合、少なくとも 1 つの修飾されたヌクレオ塩基、少なくとも 1 つの修飾された糖、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項 1 に記載の化合物。

20

【請求項 7】

前記修飾されたヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合を含む、請求項 6 に記載の化合物。

【請求項 8】

前記修飾された糖部分は、2'-O-(2-メトキシエチル)、2-O-メチル、LNA、ENA、またはそれらの組み合わせを含む高親和性修飾を含む、請求項 6 に記載の化合物。

【請求項 9】

前記キメラアンチセンス化合物は、第 1 の領域の中のデオキシヌクレオチド、それぞれ 5'末端と 3'末端で該第 1 の領域と隣接している第 2 の領域と第 3 の領域のそれぞれの中に少なくとも 1 つの高親和性修飾された糖、ならびに、少なくとも 1 つの修飾されたホスホロチオエート修飾されたヌクレオシド間結合を含む、請求項 1 に記載の化合物。

30

【請求項 10】

前記第 1 の領域は 10 デオキシヌクレオチド長であり、前記第 2 の領域および前記第 3 の領域はそれぞれ 5ヌクレオチド長であり、5 個の 2'-O-(2-メトキシエチル)ヌクレオチドを含み、そして前記キメラオリゴヌクレオチドの中の個々のヌクレオシド間結合がホスホロチオエートである、請求項 9 に記載の化合物。

【請求項 11】

請求項 1 に記載の化合物と、薬学的に許容される浸透促進剤、担体、または希釈剤を含む、薬学的組成物。

40

【請求項 12】

請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載のオリゴマー化合物を投与する工程を含む、動物のトリグリセリド濃度を低下させる方法。

【請求項 13】

前記トリグリセリド濃度が、血中トリグリセリド濃度、血漿トリグリセリド濃度、または血清トリグリセリド濃度である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載のオリゴマー化合物を投与する工程を含む、動物の

50

インシュリン感受性を改善する方法。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載のオリゴマー化合物を投与する工程を含む、動物のインシュリン感受性を改善する方法であって、前記インシュリン感受性の改善がインシュリン濃度の低下として測定される、方法。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載のオリゴマー化合物を投与する工程を含む、動物の血中グルコース濃度を低下させる方法。

【請求項 17】

請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載のオリゴマー化合物を投与する工程を含む、動物のコレステロール濃度を低下させる方法。

10

【請求項 18】

前記コレステロールが LDL コレステロールである、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記コレステロールが VLDL コレステロールである、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 20】

請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載のオリゴマー化合物を投与する工程を含む、動物の耐糖能を改善する方法。

【請求項 21】

動物の症状を緩和するかまたは症状の重篤度を低下させる方法であって、該動物を、有効量の請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の化合物と接触させる工程を含み、その結果、LMW - PTPase の発現が阻害され、該症状の 1 つ以上の物理的指標の測定が該症状の重篤度の低下を示す、方法。

20

【請求項 22】

前記症状が糖尿病である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記糖尿病が II 型糖尿病である、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記症状が肥満である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 25】

前記肥満が食事によって誘導される、請求項 24 に記載の方法。

30

【請求項 26】

前記症状が肥満であり、そして前記物理的指標が体脂肪の減少である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 27】

前記症状がインシュリン耐性である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 28】

前記症状がインシュリン欠乏である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 29】

前記症状が高コレステロール血症である、請求項 21 に記載の方法。

40

【請求項 30】

インシュリン感受性の低下に関係している疾患または症状の予防、緩和、または処置のための方法であって、請求項 1 ~ 11 のいずれかの化合物をそのような介入が必要な個体に投与する工程を含む、方法。

【請求項 31】

LMW - PTPase をコードする核酸分子を阻害するためのアンチセンス化合物を設計および合成するための方法であって；

(a) アンチセンス化合物がそれに対して標的化させられる活性のある標的領域の中のヌクレオチド配列を同定する工程、および

(b) 該同定されたヌクレオチド配列に対して相補的なヌクレオチド配列を有しており、

50

不適合が 4 個未満であるヌクレオ塩基を有しているアンチセンス化合物を合成する工程を含む、方法。

【請求項 3 2】

前記活性のある標的セグメントが、配列番号 5 の領域 B A、領域 B B、領域 B C、領域 B D、領域 B E、領域 B F、領域 B G、領域 B H、領域 B I、領域 B J、および領域 B K からなる群より選択される、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記活性のある標的セグメントが、配列番号 4 の領域 A A、領域 A B、領域 A C、領域 A D、領域 A E、領域 A F、領域 A G、領域 A H、領域 A I、領域 A J、および領域 A K からなる群より選択される、請求項 3 1 に記載の方法。

10

【請求項 3 4】

前記活性のある標的セグメントが、配列番号 3 の領域 A、領域 B、領域 C、領域 D、領域 E、領域 F、領域 G、領域 H、領域 I、領域 J、および領域 K からなる群より選択される、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記アンチセンス化合物が、15 から 35 ヌクレオ塩基長のキメラ化合物であり、そして少なくとも 1 つの化学修飾を含む、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記化学修飾は、少なくとも 1 つの修飾されたヌクレオシド間結合、少なくとも 1 つの修飾されたヌクレオ塩基、少なくとも 1 つの修飾された糖、またはそれらの組み合わせを含む、請求項 3 5 に記載の方法。

20

【請求項 3 7】

前記修飾されたヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合を含む、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記修飾された糖部分に、2' - O - (2 - メトキシエチル)、2 - O - メチル、L N A、E N A、またはそれらの組み合わせを含む高親和性修飾を含む、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記修飾されたヌクレオ塩基が 5 - メチルシトシンを含む、請求項 3 6 に記載の方法。

30

【請求項 4 0】

前記キメラアンチセンス化合物が、第 1 の領域の中のデオキシヌクレオチド、それぞれ 5' 末端と 3' 末端で該第 1 の領域と隣接している第 2 の領域と第 3 の領域のそれぞれの中に少なくとも 1 つの高親和性修飾された糖、ならびに、少なくとも 1 つの修飾されたホスホロチオエート修飾されたヌクレオシド間結合が含まれている、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記第 1 の領域は 10 デオキシヌクレオチド長であり、前記第 2 の領域および前記第 3 の領域はそれぞれ 5 ヌクレオチド長であり、5 個の 2' - O - (2 - メトキシエチル)ヌクレオチドを含み、そして前記キメラオリゴヌクレオチドの中の個々のヌクレオシド間結合がホスホロチオエートである、請求項 4 0 に記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

細胞、組織または動物における L M W - P T P a s e を調節するための化合物、組成物および方法が、本明細書中に開示される。

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

50

チロシンキナーゼとチロシンホスファターゼの特性決定および疾患状態とそれらの関与にかなりの注目が集まっている (Zhang, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 1998, 33, 1-52)。LMW-PTPase (ACP1としても知られている; 酸性ホスファターゼ1、可溶性; Bf イソ型; Bs イソ型; HAAP; HCPTP; 細胞質ホスホチロシルプロテインホスファターゼ; MGC3499; RCAP; 赤血球酸性ホスファターゼ1、イソ酵素F; 赤血球酸性ホスファターゼ1イソ酵素S; 赤血球の酸性ホスファターゼ; 含脂肪細胞の酸性ホスファターゼ; 低分子量のホスホチロシルプロテインホスファターゼ; 赤血球酸性ホスファターゼ1) は、赤血球から酸性ホスファターゼとして最初に単離され、その後、多くの別の組織 (胎盤、脳、腎臓、肝臓、および白血球が含まれる) の中でも発現されていることが明らかにされた (Bryson et al., Genomics, 1995, 30, 133-140; Dissing and Svensmark, Biochim. Biophys. Acta., 1990, 1041, 232-242; Hopkinson et al., Nature, 1963, 199, 969-971; Wo et al., J. Biol. Chem. 1992, 267, 10856-10865)。LMW-PTPase 遺伝子座は、2番染色体の2p23~p25にマップされ (Bryson et al., Genomics, 1995, 30, 133-140; Magenis et al., Birth Defects Orig. Artic. Ser., 1976, 12, 326-327; Wakita et al., Hum. Genet., 1985, 71, 259-260)、そしてこれには、18キロベースにまたがる7個のエキソンが含まれていることが明らかにされた (Emanuel et al., Am. J. Med. Genet., 1979, 4, 167-172; Junien et al., Hum. Genet., 1979, 48, 17-21)。

10

20

30

40

50

【0003】

LMW-PTPase は、インシュリンによって刺激されるインシュリン受容体と直接相互作用し、代謝性の、および分裂促進性のインシュリンシグナルの伝達をネガティブに調節する (Chiarugi et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1997, 238, 676-682)。1つのLMW-PTPase イソ型の組み換え型であるHAAP は、インシュリン受容体キナーゼの基質であり得る含脂肪細胞の脂質結合タンパク質 (ALBP) を脱リン酸化する (Shekels et al., Protein Sci., 1992, 1, 710-721)。まとめると、これらの知見は、インシュリンシグナルの伝達の調節におけるLMW-PTPase の役割を示唆している。LMW-PTPase はまた、フラビンモノヌクレオチド (FMN) のレベルも調節し、そして、赤血球の陰イオントランスポーターであるBand3の脱リン酸化もまた行う。これらの機能によって赤血球の代謝と完全性が調節され、LMW-PTPase と疾患 (例えば、溶血性ソラマメ中毒症 (ソラマメに由来する分子に対する急性の特有の溶血性反応を特徴とする疾患)) との間の関係が説明される (Bottini et al., Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz), 2002, 50, 95-104)。

【0004】

LMW-PTPase (ACP1としても知られている) の最も一般的な遺伝的多形性の結果として、3種類の対立遺伝子 (ACP1* A、ACP1* B、およびACP1* C) の存在が生じ、そして6種類の遺伝子型の原因となる。これらのそれぞれは、酵素活性全体において強さのバリエーションを示す (Golden and Sensabaugh, Hum. Genet., 1986, 72, 340-343; Hopkinson et al., Nature, 1963, 199, 969-971)。多数の珍しい対立遺伝子が報告されており、これらには、ACP1* D、E、F、G、H、I、K、M、R、TIC1、GUA、およびサイレントな対立遺伝子ACP1* Q0が含まれる (Miller et al., Hum. Hered., 1987, 37, 371-375)。別のスプリングは2つのイソ型の原因となり、これらは、それらの電気泳動の移動度に基づい

てfast (F)およびslow (S)と標示されている (Dissing, Biochem. Genet. 1987, 25, 901-918)。Fイソ型およびSイソ型は異なる触媒特性を示し、これは、これらのイソ型の割合の差に関係している。結果として、活性の調節にバリエーションが生じる (Bottini et al., Hum. Genet. 1995, 96, 629-637)。

【0005】

プロテインチロシンホスファターゼは、様々な細胞性のプロセス (細胞増殖および分化、細胞周期の進行、ならびに増殖因子のシグナル伝達が含まれる) を調節するシグナル伝達分子である。例えば、多数のプロテインチロシンホスファターゼが、インシュリンシグナルの伝達のネガティブな調節因子として関係しているとされている (Zhang, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., 1998, 33, 1-52)。LMW-PTPaseは、複数のシグナル伝達経路に関係しているホスチロシンホスファターゼである。例えば、LMW-PTPaseはインシュリンによって刺激されるインシュリン受容体と直接相互作用し、そして代謝性および分裂促進性のインシュリンシグナルの伝達をネガティブに調節する (Chiarugi et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1997, 238, 676-682)。1つのLMW-PTPaseイソ型の組み換え型であるHAAPは、インシュリン受容体キナーゼの基質であり得る含脂肪細胞の脂質結合タンパク質 (ALBP) を脱リン酸化する (Shekels et al., Protein Sci., 1992, 1, 710-721)。まとめると、これらの知見は、インシュリンシグナルの伝達におけるLMW-PTPaseの役割を示唆している。LMW-PTPaseはまた、フラビンモノヌクレオチド (FMN) のレベルも調節し、そして、赤血球の陰イオントランスポーターであるBand 3の脱リン酸化もまた行う。これらの機能によって赤血球の代謝と完全性が調節され、LMW-PTPaseと疾患 (例えば、溶血性ソラマメ中毒症 (ソラマメに由来する分子に対する急性の特有の溶血性反応を特徴とする疾患)) との間の関係が説明される (Bottini et al., Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz), 2002, 50, 95-104)。

【0006】

LMW-PTPase (ACP1としても知られている) の最も一般的な遺伝的多形性の結果として、3種類の対立遺伝子 (ACP1* A、ACP1* B、およびACP1* C) の存在が生じ、そして6種類の遺伝子型の原因となる。これらのそれぞれは、酵素活性全体において強さのバリエーションを示す (非特許文献1; 非特許文献2)。多数の珍しい対立遺伝子が報告されており、これらには、ACP1* D、E、F、G、H、I、K、M、R、TIC1、GUA、およびサイレントな対立遺伝子ACP1* Q0が含まれる (非特許文献3)。別のスプラッシングは2つのイソ型の原因となり、これらは、それらの電気泳動の移動度に基づいてfast (F) およびslow (S) と標示されている (非特許文献4)。Fイソ型およびSイソ型は異なる触媒特性を示し、これは、これらのイソ型の割合の差に関係している。結果として、活性の調節にバリエーションが生じる (非特許文献5)。LMW-PTPaseの遺伝子型、および結果として、イソ型のレベルと酵素活性全体は、多数の疾患状態と関係性を示す。(例えば、非特許文献6を参照のこと)。これらの知見は、LMW-PTPaseがインシュリンシグナルの伝達に関与していることの証拠とあわせて、代謝性疾患 (例えば、糖尿病) におけるLMW-PTPaseについての役割をサポートしている。

【0007】

ヒトの疾患におけるLMW-PTPaseの関与についての遺伝的証拠を既定の事実とすると、LMW-PTPaseの活性および/または発現の薬物動態的調節は、これらおよび他の病理学的状態への治療的介入の適切なポイントである。現在、LMW-PTPaseの合成を効率よく阻害する治療薬は知られていない。結果として、LMW-PTPase機能を効率よく阻害することができる薬剤の必要性は長く残されたままである。

【0008】

10

20

30

40

50

アンチセンス技術は、LMW-PTPaseの発現を低下させるための有効な手段であり、多数の治療適用、診断適用、および研究適用において他に類を見ないほど有用である。一般的には、アンチセンス技術の背後にある原理は、アンチセンス化合物が標的核酸にハイブリダイズし、そして遺伝子の発現、活性、または機能（例えば、転写または翻訳）の調節に影響を与えることである。遺伝子発現の調節は、例えば、標的RNAの変性または占有に基づく阻害によって行われ得る。変性による標的RNA機能の調節の一例は、DNA様のアンチセンス化合物とハイブリダイゼーションした際の、標的RNAのRNAse Hに基づく変性である。標的の変性による遺伝子発現の調節の別の例は、小さい干渉RNA (siRNA) を使用するRNA干渉 (RNAi) である。RNAiは二本鎖の(ds) RNA様オリゴヌクレオチドの導入が含まれている、アンチセンスによって媒介される遺伝子のサイレンシングの1つの形態であり、これによっては、標的化された内因性mRNAのレベルの配列特異的低下が導かれる。この配列特異性は、標的の検証および遺伝子の機能化のためのツールとして、さらには、疾患に関係している遺伝子の発現を選択的に調節するための治療薬として、アンチセンス化合物を極めて魅力的なものとしている。

【非特許文献1】Golden and Sensabaugh, Hum. Genet., 1986, 72, 340-343

【非特許文献2】Hopkinson et al., Nature, 1963, 199, 969-971

【非特許文献3】Miller et al., Hum. Hered., 1987, 37, 371-375

【非特許文献4】Dissing, Biochem. Genet., 1987, 25, 901-918

【非特許文献5】Bottini et al., Hum. Genet., 1995, 96, 629-637

【非特許文献6】Bottini et al., Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz), 2002, 50, 95-104

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0009】

LMW-PTPaseをコードする核酸分子に対して標的化させられ、それとハイブリダイズすることができ、そしてMLV-PTPaseの発現を調節するアンチセンス化合物が、本明細書中に開示される。好ましい実施形態においては、LMW-PTPaseをコードする核酸分子は、以下の表1に示され、そして引用により本明細書中に組み入れられるGenBank登録番号：NM_004300.2、NM_007099.2、NM_177554.1、およびNT_022327.13（それぞれ、配列番号3～6）の1つ以上に対して実質的に類似しているヌクレオチド配列を有している。さらなる態様においては、アンチセンス化合物は、LMW-PTPaseをコードする核酸分子の1つの領域に対して標的化させられ、そしてその領域にハイブリダイズすることができる。なおさらに、アンチセンス化合物は、LMW-PTPaseをコードする核酸分子のセグメントに対して標的化させられ、そしてそれとハイブリダイズすることができる。なおさらに、アンチセンス化合物は、LMW-PTPaseをコードする核酸分子の1つの部位に対して標的化させられ、そしてそれとハイブリダイズすることができる。

【0010】

LMW-PTPaseをコードする核酸分子のセグメントが含まれている活性のある標的セグメントが、本明細書中でさらに開示される。活性のある標的セグメントは、アンチセンスハイブリダイゼーションに利用することができ、結果として、アンチセンスの調節に適している。1つの実施形態においては、活性のある標的セグメントが、以下に示される経験によるデータを使用して本明細書中で発見されている。ここで、少なくとも2つのキメラオリゴヌクレオチドが、活性のある標的セグメントの中にハイブリダイズし、そして標的核酸の発現を低下させることが示される（本明細書中以後、「活性のあるアンチセ

10

20

30

40

50

ンス化合物」)。少なくとも2つの活性のあるアンチセンス化合物は、好ましくは、LMW-PTPaseをコードする核酸分子上で約60ヌクレオ塩基離れている。別の実施形態においては、アンチセンス化合物は、活性のある標的セグメントを標的化し、そしてLMW-PTPaseをコードする核酸分子の発現を調節するように設計される。

【0011】

1つの態様においては、12から35ヌクレオチドの長さの配列が含まれているアンチセンス化合物が本明細書中で提供され、これには修飾されたヌクレオシド間結合、修飾されたヌクレオ塩基または修飾された糖から選択される少なくとも2種類の化学的修飾が含まれている。羽領域(wing region)がそれぞれ5'末端および3'末端で隣接しているデオキシヌクレオチド中心(mid)領域が含まれているキメラオリゴヌクレオチドが本明細書中で提供される。それぞれの羽領域には、少なくとも1つの高親和性ヌクレオチドが含まれている。

10

【0012】

1つの実施形態においては、羽領域がそれぞれ5'末端および3'末端で隣接している10個のデオキシヌクレオチドの中心領域が含まれているキメラオリゴヌクレオチドが、本明細書中で提供され、これには、5個の2'-O-(2-メトキシエチル)ヌクレオチドが含まれている。ここで、キメラオリゴヌクレオチドの個々のヌクレオシド間結合はホスホロチオエートである。別の実施形態においては、羽領域がそれぞれ5'末端および3'末端で隣接している14個のデオキシヌクレオチドの中心領域が含まれているキメラオリゴヌクレオチドが、本明細書中で提供され、これには、3つのロックされた核酸ヌクレオチドが含まれている。ここで、キメラオリゴヌクレオチドの個々のヌクレオシド間結合はホスホロチオエートである。さらなる実施形態においては、羽領域がそれぞれ5'末端および3'末端で隣接している14個のデオキシヌクレオチドの中心領域が含まれているキメラオリゴヌクレオチドが、本明細書中で提供され、これには、2つの2'-O-(2-メトキシエチル)ヌクレオチドが含まれている。ここで、キメラオリゴヌクレオチドの個々のヌクレオシド間結合はホスホロチオエートである。さらなる実施形態においては、アンチセンス化合物には、少なくとも1つの5-メチルシトシンが含まれ得る。

20

【0013】

さらに、細胞、組織、または動物の中でのLMW-PTPaseの発現を調節する方法が提供される。この方法には、上記細胞、組織、または動物を、本発明の化合物または組成物の1つ以上と接触させる工程が含まれる。例えば、1つの実施形態においては、化合物は、細胞、組織、または動物の中でのLMW-PTPaseの発現を阻害するために使用することができる。本発明のこの態様においては、細胞は、mRNAおよび/またはタンパク質レベルの直接の測定によってLMW-PTPase mRNAおよび/またはタンパク質の発現の低下の指標について、ならびに/あるいは、疾患または症状の指標(例えば、グルコース濃度、脂質濃度、体重、またはそれらの組み合わせ)について、分析される。

30

【0014】

1つの実施形態によっては、グルコース濃度およびトリグリセリド濃度を低下させる方法が提供される。グルコースは、血液、血漿、または血清グルコースであり得る。トリグリセリドは、血液、血漿、または血清トリグリセリドであり得る。別の実施形態によっては、インシュリン感受性を改善する方法が提供される。別の実施形態では、コレステロール濃度を低下させる方法が提供される。いくつかの実施形態においては、コレステロールは、LDLまたはVLDLコレステロールである。1つの実施形態では、耐糖能を改善する方法が提供される。

40

【0015】

他の実施形態は、動物の症状を緩和する、またはその重篤度を低下させる方法に関する。これには、上記動物を有効量のアンチセンス化合物と接触させる工程が含まれる。その結果、LMW-PTPaseの発現が阻害され、そして、上記の症状の1つ以上の物理的指標の測定が、上記の症状の重篤度の低下を示す。いくつかの実施形態においては、症状

50

としては、糖尿病、インシュリン耐性、インシュリン欠乏、高コレステロール血症、高血糖症、異常脂質血症、脂質異常症、高トリグリセリド血症、および高脂肪酸血症 (hyperfattyacidemia) が挙げられるが、これらに限定はされない。いくつかの実施形態においては、糖尿病はⅠⅠ型糖尿病である。別の実施形態においては、症状はメタボリック症候群である。別の実施形態においては、症状は前糖尿病である。別の実施形態においては、症状は脂肪症である。1つの実施形態においては、脂肪症は脂肪性肝炎である。別の実施形態においては、脂肪症はNASHである。別の実施形態においては、症状は心臓血管疾患である。別の実施形態においては、心臓血管疾患は冠動脈性心臓病である。別の実施形態においては、症状は心血管系危険因子である。

【0016】

10

別の実施形態においては、動物において肝臓でのグルコース生産を減少させる方法が提供される。この方法には、本発明のオリゴマー化合物を投与する工程が含まれる。1つの実施形態においては、本発明により、肝臓でのグルコース-6-ホスファターゼの発現を低下させる方法が提供される。この方法には、本発明のオリゴマー化合物を投与する工程が含まれる。本発明の別の態様は、肝臓、脂肪、または両方の組織の中でのLMW-PTPaseの発現を低下させる方法である。

【0017】

動物の症状を緩和する、またはその重篤度を低下させる方法もまた提供される。この方法には、上記の動物を、付加的な治療効果を得るためにグルコース濃度を低下させる薬剤、脂質濃度を低下させる薬剤、または抗肥満薬と組み合わせられた本発明のオリゴマー化合物と接触させる工程が含まれる。

20

【0018】

糖尿病、ⅠⅠ型糖尿病、前糖尿病、インシュリン耐性、インシュリン欠乏、高コレステロール血症、高血糖症、異常脂質血症、脂質異常症、高トリグリセリド血症、メタボリック症候群、および高脂肪酸血症、脂肪症、脂肪性肝炎、NASH、心臓血管疾患、冠動脈性心臓病、心血管系危険因子、またはそれらの組み合わせを予防、緩和、および/または処置するための方法もまた提供される。これらの方法には、本発明の少なくとも1つの化合物を、そのような介入が必要な個体に投与する工程が含まれる。

【0019】

本発明によってはまた、疾患 (具体的には、糖尿病、ⅠⅠ型糖尿病、前糖尿病、インシュリン耐性、インシュリン欠乏、高コレステロール血症、高血糖症、異常脂質血症、脂質異常症、高トリグリセリド血症、メタボリック症候群、および高脂肪酸血症、脂肪症、脂肪性肝炎、NASH、心臓血管疾患、冠動脈性心臓病、心血管系危険因子、またはそれらの組み合わせに関係している疾患、ならびにそれらの少なくとも1つの指標を含む疾患) 予防、緩和、および/または処置のための医薬品の調製に本発明の組成物を使用する方法も提供される。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

LMW-PTPaseは、インビボでグルコース濃度、トリグリセリド濃度、コレステロール濃度、インシュリン感受性、および耐糖能に影響を与えることが示されており、したがって、LMW-PTPaseは、それが関係している疾患および症状に適用される。これらの疾患および症状としては、糖尿病、ⅠⅠ型糖尿病、前糖尿病、肥満、インシュリン耐性、インシュリン欠乏、高コレステロール血症、高血糖症、異常脂質血症、高トリグリセリド血症、高脂肪酸血症、肝臓脂肪症、脂肪性肝炎、非アルコール性脂肪性肝炎、メタボリック症候群、心臓血管疾患、および冠動脈性心臓病が挙げられるが、これらに限定はされない。LMW-PTPase機能に関係している疾患および症状の予防、緩和、および/または処置のためのアンチセンス化合物が、本明細書中で提供される。本明細書中で使用される場合は、用語「予防」は、症状もしくは疾患の発症または進行を、数時間から数日間、好ましくは、数週間から数ヶ月間の期間にわたって、遅らせるあるいは未然に防ぐことを意味する。本明細書中で使用される場合は、用語「緩和」は、症状または疾

40

50

患の重篤度の少なくとも1つの指標の低下を意味する。指標の重篤度は、当業者に公知の主観的測定によって決定される場合も、また、客観的測定によって決定される場合もある。本明細書中で使用される場合は、「処置」は、疾患もしくは症状を変化させるまたは改善するために、本発明の組成物を投与することを意味する。予防、緩和、および/または処置には、一定の間隔での、または症状もしくは疾患の経過を変化させるための薬剤への暴露の前の、複数回の用量の投与が必要である場合がある。

【0021】

LMW-PTPaseをコードする核酸分子の発現の調節に使用されるアンチセンスオリゴヌクレオシドおよび他のアンチセンス化合物が含まれているアンチセンス化合物が、本明細書中で開示される。これは、LMW-PTPaseをコードする1つ以上の標的核酸分子と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って達成することができる。本明細書中で使用される場合は、用語「標的核酸」および「LMW-PTPaseをコードする核酸分子」は、便宜上、LMW-PTPaseをコードするDNAから転写されたRNA（プレ-mRNAおよびmRNAまたはその一部が含まれる）、ならびに、そのようなRNAに由来するcDNAをもまた含むように使用される。好ましい実施形態においては、標的核酸は、LMW-PTPaseをコードするmRNAである。

10

【0022】

標的核酸

特定の標的核酸分子に対してアンチセンス化合物を「標的化」させることは、多段階のプロセスであり得る。このプロセスは通常、その発現が調節される標的核酸の同定で始まる。例えば、標的核酸は、その発現が特定の障害または疾患状態に関係している細胞性の遺伝子（またはその遺伝子から転写されたmRNA）、あるいは感染性病原体に由来する核酸分子であり得る。本明細書中で開示される場合は、標的核酸はLMW-PTPaseをコードし、そして配列番号1～4の1つ以上に実質的に類似しているポリヌクレオチド配列を有している。

20

【0023】

別のRNA転写物がDNAの同じゲノム領域から生産され得ることもまた、当該分野で公知である。これらの別の転写物は、一般的には、「変異体」として知られている。より具体的には、「プレ-mRNA変異体」は、それらの開始部位または終結部位のいずれかが、同じゲノムDNAから生産された他の転写物とは異なる、同じゲノムDNAから生産された転写物であり、これにはイントロン配列とエキソン配列の両方が含まれる。変異体は、mRNA変異体を生じ得、これには、別のスプライシング連結点、または別の開始コドンおよび終結コドンを有しているものが含まれるが、これらに限定はされない。ゲノム配列およびmRNA配列における変異体が、疾患を生じ得る。このような変異体に対して標的化させられたアンチセンス化合物は、本発明の範囲に含まれる。

30

【0024】

LMW-PTPaseの発現を調節するための組成物および方法は、本発明にしたがう。表1には、LMW-PTPaseをコードする核酸分子に対応する配列のGenBank登録番号（nt = ヌクレオチド）、GenBankに登録された配列のバージョンの日付、および割り当てられた本出願における対応する配列番号が列挙される（これらはそれぞれ、引用により本明細書中に組み入れられる）。

40

【0025】

【表 1 - 1】

表 1
遺伝子標的

種	Genbank #	Genbank 登録日	配列番号
ヒト	M83653.1	Apr 27 1993	1
ヒト	M83654.1	Apr 27 1993	2
ヒト	NM_004300.2	Apr 24 2003	3
ヒト	NM_007099.2	Apr 24 2003	4
ヒト	NM_177554.1	Apr 24 2003*	5
ヒト	NT_022327.13のヌクレオチド254496から268683	Oct 7 2003	6
ヒト	U25847.1	Jan 5 1996	7
ヒト	U25848.1	Jan 5 1996	8
ヒト	U25849.1	Jan 5 1996	9
ヒト	Y16846.1	Jun 16 1998	10
マウス	BF167197.1	Oct 27 2000	11
マウス	NM_021330.1	Oct 23 2000	12
マウス	NT_039548.2のヌクレオチド6757610から6776640の相補体	Oct 30 2003	13
マウス	Y17343.1	Jul 8 1998	14
マウス	Y17344.1	Jul 8 1998	355
マウス	Y17345.1	Jul 8 1998	15

10

【 0 0 2 6 】

【表 1 - 2】

20

種	Genbank #	Genbank 登録日	配列番号
ラット	NM_021262.2	Jan 1 2004	16
ラット	NW_047759.1のヌクレオチド905000から921000の相補体	Sep 22 2003	17
ラット	XM_343044.1	Sep 22 2003	18

*NM_177554.1は、それがナンセンスによって媒介されるmRNA崩壊(NMD)候補であるので、恒常的に抑制された。

標的の発現の調節

標的核酸の発現の調節は、多数の核酸(DNAまたはRNA)機能の変更によって行うことができる。「調節」は、機能の摂動、例えば、発現の増大(刺激もしくは誘導)または減少(阻害もしくは低下)のいずれかを意味する。別の例においては、発現の調節には、プレ-mRNAプロセシングのスプライシング部位の選択の摂動が含まれ得る。「発現」には、それによって遺伝子のコードされる情報が、細胞内に存在しており、そして細胞内で動作する構造へと変換される全ての機能が含まれる。これらの構造には、転写産物および翻訳産物が含まれる。「発現の調節」は、このような機能の摂動を意味する。調節されるRNAの機能には、転座機能(これには、RNAのタンパク質の翻訳部位への転座、RNAのRNA合成の部位とは異なる細胞内の部位への転座が含まれるが、これらに限定はされない)およびRNAからのタンパク質の翻訳が含まれ得る。調節することができるRNAプロセシング機能としては、1つ以上のRNA種を生じるためのRNAのスプライシング、RNAのキャッピング、RNAの3'成熟、および触媒活性、または、RNAが関与し得るかもしくはRNAによって促進され得るRNAを含む複合体の形成が挙げられるが、これらに限定はされない。発現の調節によっては、1つ以上の核酸種のレベルの増大、または1つ以上の核酸種のレベルの低下が、一時的または最終的な一定のレベルのいずれかで、得られ得る。標的核酸機能とのこのような干渉の1つの結果は、LMW-PT Paseの発現の調節である。したがって、1つの実施形態においては、発現の調節は、標的RNAまたはタンパク質のレベルの増加または低下を意味し得る。別の実施形態においては、発現の調節は、1つ以上のRNAスプライシング産物の増加または減少、あるいは、2つ以上のスプライシング産物の割合の変化を意味し得る。

30

40

【 0 0 2 7 】

標的核酸の発現に対する本発明のアンチセンス化合物の効果は、標的核酸が測定可能な

50

レベルで存在するという条件で、任意の様々な細胞のタイプにおいて試験することができる。標的核酸の発現に対する本発明のアンチセンス化合物の効果は、例えば、PCRまたはノーザンブロット分析を使用して、日常的に行われているように決定することができる。複数の細胞株が、正常な組織および細胞のタイプの両方から、さらには、様々な疾患（例えば、過剰増殖性疾患）に罹患している細胞から導かれる。複数の組織および種に由来する細胞株は、アメリカンタイプカルチャーコレクション（ATCC, Manassas, VA）および他の公的な供給源から得ることができ、そして当業者に周知である。初代細胞、すなわち、動物から単離され、そして連続培養が行われていないそのような細胞は、当該分野で公知の方法にしたがって調製することができ、また、様々な商業的な供給業者から得ることもできる。加えて、初代細胞には、薬が使用される状況にあるドナーであるヒト被験体（すなわち、血液のドナー、外科手術を受ける患者）から得られたものが含まれる。初代細胞は当該分野で公知の方法によって調製される。

10

20

30

40

50

【0028】

発現の調節についてのアッセイ

LMW-PTPaseの発現の調節は、当該分野で公知の様々な方法でアッセイすることができる。LMW-PTPase mRNAのレベルは、例えば、ノーザンブロット分析、競合ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、またはリアルタイムPCRによって定量することができる。RNA分析は、当該分野で公知の方法によって、細胞性RNA全部について、またはポリ（A）+mRNAについて行うことができる。RNAの単離方法は、例えば、Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, 第1巻、pp. 4.1.1 - 4.2.9および4.5.1 - 4.5.3, John Wiley & Sons, Inc., 1993に教示されている。

【0029】

ノーザンブロット分析は当該分野で日常的に行われており、例えば、例えば、Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, 第1巻、pp. 4.1.1 - 4.2.9, John Wiley & Sons, Inc., 1996に教示されている。リアルタイム定量的（PCR）は、通常、市販されているABI PRISM（登録商標）7700 Sequence Detection System（PE-Applied Biosystems, Foster City, CAから入手することができる）を使用し、そして製造業者による説明書にしたがって行うことができる。RNAレベルの調節の分析方法は、本発明に限定されない。

【0030】

LMW-PTPaseによってコードされるタンパク質のレベルは、当該分野で周知の様々な方法（例えば、免疫沈降、ウェスタンブロット分析（イムノブロットティング）、ELISA、または蛍光活性化細胞選別法（FACS））で定量することができる。LMW-PTPaseによってコードされるタンパク質に対する抗体は、様々な供給源（例えば、抗体のMSRSカタログ（Aerie Corporation, Birmingham, MI）から同定し、得ることができ、また、従来の抗体作成方法によって調製することもできる。ポリクローナル抗血清の調製のための方法は、例えば、Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, 第2巻、pp. 11.12.1 - 11.12.9, John Wiley & Sons, Inc., 1997に教示されている。モノクローナル抗体の調製は、例えば、Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, 第2巻、pp. 11.4.1 - 11.11.5, John Wiley & Sons, Inc., 1997に教示されている。

【0031】

免疫沈降方法は当該分野で標準的であり、例えば、Ausubel, F.M. et a

l., Current Protocols in Molecular Biology, 第2巻、pp. 10.16.1 - 10.16.11, John Wiley & Sons, Inc., 1998に見ることができる。ウェスタンブロット(イムノブロット)分析は当該分野で標準的であり、例えば、Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, 第2巻、pp. 10.8.1 - 10.8.21, John Wiley & Sons, Inc., 1997に見ることができる。

【0032】

活性のある標的セグメント

それに対して標的化させられた少なくとも2つの活性のあるアンチセンス化合物を有していることによって定義される標的核酸上の位置は、「活性のある標的セグメント」と呼ばれる。活性のある標的セグメントは、少なくとも2つの活性のあるアンチセンス化合物のうちの1つによって定義される。これらは、一方は、活性のある標的セグメントの5'末端にハイブリダイズし、他方は、活性のある標的セグメントの3'末端にハイブリダイズする。さらに別の活性のあるアンチセンス化合物は、この定義された活性のある標的セグメントの内部にハイブリダイゼーションすることができる。化合物は、好ましくは、標的配列上ではわずかに約60ヌクレオチドしか離れておらず、より好ましくは、標的配列上では約30ヌクレオチドしか離れておらず、なおさらに好ましくは、化合物は連続しており、最も好ましくは、化合物は重複している。活性のある標的セグメントの内部のアンチセンス化合物の活性(例えば、阻害率(%))として定義される)には、実質的なバリエーションが存在し得る。活性のあるアンチセンス化合物は、それらの標的RNAの発現を調節する化合物である。本明細書中で提供されるアッセイの1つにおいては、活性のあるアンチセンス化合物は、それらの標的RNAの発現を少なくとも10%、好ましくは20%阻害する。好ましい実施形態においては、活性のある標的セグメントに対して標的化させられたオリゴヌクレオチドの少なくとも約50%、好ましくは約70%が、それらの標的RNAの発現を少なくとも40%調節する。より好ましい実施形態においては、活性のあるアンチセンス化合物を定義するために必要な阻害のレベルは、活性のある標的セグメントを定義するために使用されたスクリーニングによる結果に基づいて定義される。当業者は、任意の1回のアッセイによって得られた値は、他の同様のアッセイと比較すると、アッセイ間での条件の理由から異なるであろうことを容易に理解するであろう。

【0033】

ハイブリダイゼーション

本明細書中で使用される場合は、「ハイブリダイゼーション」は、それらの標的配列に対するアンチセンス化合物の相補鎖の対合を意味する。特定の機構には限定はされないが、最も一般的な対合の機構には、水素結合が含まれ、これは、相補的なヌクレオシド塩基またはヌクレオチド塩基(ヌクレオ塩基)間での、ワトソン-クリック(Watson-Crick)塩基対合、Hoogsteen塩基対合、または逆Hoogsteen水素結合であり得る。例えば、自然界に存在している塩基であるアデニンは、自然界に存在しているヌクレオ塩基であるチミジンおよびウラシルと相補的であり、これらは水素結合の形成によって対合する。自然界に存在している塩基であるグアニンは、自然界に存在している塩基である5-メチルシトシンと、G-clampとして知られている人工の塩基に相補的である。ハイブリダイゼーションは、様々な状況下で起こり得る。

【0034】

アンチセンス化合物は、特異的な結合が所望される条件下(すなわち、インビボでのアッセイまたは治療的処置の場合には生理学的条件下、そしてインビトロでのアッセイの場合にはアッセイが行われる条件下)で標的以外の核酸配列に対するアンチセンス化合物の非特異的結合を回避するために、十分な程度の相補性が存在する場合には、特異的にハイブリダイズすることができる。

【0035】

本明細書中で使用される場合は、「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」

または「ストリンジェントな条件」は、アンチセンス化合物がその標的配列にハイブリダイズするであろうが、他の配列には最小限にしかハイブリダイズしないであろう条件を意味する。ストリンジェントな条件は配列依存性であり、状況により異なるであろう。アンチセンス化合物が標的配列にハイブリダイズする「ストリンジェントな条件」は、アンチセンス化合物の性質および組成、ならびに、それらが研究されるアッセイによって決定される。

【0036】

相補性

「相補性」は、本明細書中で使用される場合は、2つのオリゴマー化合物鎖上のいずれかの2つのヌクレオ塩基の間で、または、その標的核酸とアンチセンス化合物が正確に対合する能力を意味する。例えば、アンチセンス化合物の特定の位置のヌクレオ塩基が、標的核酸の特定の位置のヌクレオ塩基と水素結合することができる場合には、オリゴヌクレオチドと標的核酸との間での水素結合の位置は相補的な位置であると考えられる。アンチセンス化合物、およびさらにDNAまたはRNAは、それぞれの分子の中の十分な数の相補性位置が、互いに水素結合することができるヌクレオ塩基によって占有されている場合には、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することができる」および「相補的である」は、アンチセンス化合物と標的核酸との間で安定であり特異的な結合が起こるためのヌクレオ塩基の十分な数を上回る、正確な対合または相補性の十分な程度を示すように使用される用語である。

10

20

【0037】

当業者には、アンチセンス化合物が活性であるためには、それがハイブリダイズする標的核酸部位に対する100%の相補性は必ずしも必要ではないことが理解される。多くの場合は、一旦アンチセンス化合物が活性のあるアンチセンス化合物として同定されると、化合物は、標的核酸部位の配列と比較して不適合であるヌクレオ塩基を含むように、日常的に行われている方法によって修飾される。当該分野では、その活性を実質的に変化させてしまうことなく、アンチセンス化合物の中に不適合を導入するための方法が教示されている。アンチセンス化合物は、（特に、高い親和性の修飾に不適合が付随する場合には）活性の有意な変化を伴うことなく、約20%までの不適合を寛容化することができる。

【0038】

同一性

アンチセンス化合物またはその一部は、1つの配列番号に対して、または特異的な化合物の番号を有している化合物に対して、定義された同一性の割合(%)を有し得る。本明細書中で使用される場合は、配列は、それが同じヌクレオ塩基対合能力を有している場合には、本明細書中に開示される配列と同一である。例えば、本発明の開示される配列の中のチミジンの代わりにウラシルが含まれているRNAは、これらがいずれもアデニンと対合するので、同一と考えられる。同様に、G-clampによって修飾された複素環塩基は、本出願の配列の中のシトシンまたは5-Meと同一であると考えられる。なぜなら、これはグアニンと対合するからである。この同一性は、オリゴマー化合物の全長にわたっている場合があり、またアンチセンス化合物の一部である場合もある（例えば、27マーのヌクレオ塩基1~20が、その配列番号のオリゴマー化合物の同一性の割合(%)を決定するために20マーに対して比較され得る）。当業者は、アンチセンス化合物には、本明細書中に記載されるアンチセンス化合物と同様の機能するためには、本明細書中に記載される化合物と同じ配列を有している必要は無いことが理解される。本明細書中で教示されるアンチセンス化合物の短縮型バージョン、または本明細書中に教示されるアンチセンス化合物の同一ではないバージョンが、本発明の範囲に含まれる。同一ではないバージョンは、個々の塩基が本明細書中に開示されるアンチセンス化合物と同じ対合活性を有していないバージョンである。塩基は、短縮されることによって、または少なくとも1つの脱塩基部位を有することによって、同じ対合活性を有していない。あるいは、同一ではないバージョンには、様々な対合活性を有している異なる塩基で置き換えられた少なくとも1つの塩基が含まれ得る（例えば、Gは、C、A、またはTで置き換えることができる）。

30

40

50

同一性の割合(%)は、比較される配列番号またはアンチセンス化合物に対応している同一である塩基の対合を有している塩基の数にしたがって計算される。同一ではない塩基は互いに隣接している場合があり、オリゴヌクレオチド全体に分散している場合も、また、両方である場合もある。

【0039】

例えば、20マーのうちのヌクレオ塩基2～17と同じ配列を有している16マーは、その20マーに対して80%同一である。あるいは、20マーに対して同一ではない4個のヌクレオ塩基が含まれている20マーも、その20マーに対して80%同一である。18マーのうちのヌクレオ塩基1～14と同じ配列を有している14マーは、18マーに対して78%同一である。このような計算は十分に当業者の能力の範囲内である。

10

【0040】

パーセント同一性は、修飾された配列の一部の中に存在しているもとの配列のヌクレオ塩基の割合に基づく。したがって、20ヌクレオ塩基の活性のある標的セグメントの相補鎖の配列全てを含む30マーのヌクレオ塩基であるアンチセンス化合物は、その20ヌクレオ塩基の活性のある標的セグメントの相補鎖と100%同一である部分を有しており、一方ではさらに、別の10ヌクレオ塩基の部分も含まれている。本発明の状況においては、活性のある標的セグメントの相補鎖は1つの部分を構成する場合がある。好ましい実施形態においては、本発明のオリゴヌクレオチドは、本明細書中に示される活性のある標的セグメントの相補鎖の少なくとも一部に対して、少なくとも約80%、より好ましくは少なくとも約85%、なおさらに好ましくは少なくとも約90%、最も好ましくは少なくとも約95%同一である。

20

【0041】

アンチセンス化合物の長さを長くするまたは短くすること、および/あるいは、活性を損なうことなく不適合である塩基を導入することが可能であることは、当業者には周知である。例えば、Woolf et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:7305-7309, 1992、引用により本明細書中に組み入れられる)においては、13～25ヌクレオ塩基長の一連のASOが、卵母細胞の注射モデルにおいて標的RNAの切断を導入するそれらの能力について試験された。ASOの末端付近に8個または11個の不適合である塩基を有している25ヌクレオ塩基長のASOは、標的mRNAの特異的切断を支持することができ、不適合が含まれていないASOよりも弱い程度に作用することができる。同様に、標的特異的切断は、1個または3個の不適合を有しているものを含む13ヌクレオ塩基のASOを使用して行うことができた。Maher and Dolnick (Nuc. Acid. Res. 16:3341-3358, 1988、引用により本明細書中に組み入れられる)では、タンデムな14ヌクレオ塩基のASO、ならびに、2つまたは3つのタンデムなASOの配列から構成されている28ヌクレオ塩基のASOと42ヌクレオ塩基のASOのシリーズが、ウサギの網状赤血球アッセイにおいてヒトDHFRの翻訳を停止させるそれらの能力について、それぞれ、試験された。3種類の14ヌクレオ塩基のASOはそれぞれ、単独で翻訳を阻害することができ、28ヌクレオ塩基のASOまたは42ヌクレオ塩基のASOよりも低いレベルで作用した。

30

40

【0042】

治療薬

本発明のアンチセンス化合物は、動物(例えば、ヒト)の中でのLMW-PTPaseの発現を調節するために使用することができる。1つの限定ではない実施形態においては、この方法には、LMW-PTPaseが関係している疾患または症状についての治療が必要な上記の動物に対して、LMW-PTPaseの発現を阻害する有効量のアンチセンス化合物を投与する工程が含まれる。LMW-PTPaseが関係している疾患または症状としては、糖尿病、II型糖尿病、肥満、インシュリン耐性、インシュリン欠乏、高コレステロール血症、高血糖症、異常脂質血症、高トリグリセリド血症、高脂肪酸血症、肝臓脂肪症、脂肪性肝炎、非アルコール性脂肪性肝炎、メタボリック症候群、心臓血管疾患

50

、および冠状動脈性心臓病が挙げられるが、これらに限定はされない。臨床的な指標が関係している疾患または症状としては、血中グルコース濃度、血中脂質濃度、肝臓での脂質濃度、インシュリン濃度、コレステロール濃度、トランスアミナーゼ濃度、心電図、グルコースの取り込み、糖新生、インシュリン感受性、体重、およびそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定はされない。1つの実施形態においては、本発明のアンチセンス化合物は、LMW-PTPase RNAのレベルおよび機能を効率よく阻害する。LMW-PTPaseのmRNAレベルの低下によっては、LMW-PTPaseのタンパク質発現産物に変化が導かれ得、さらには、そのような得られた変化を測定することもできる。LMW-PTPase RNAまたはタンパク質発現産物のレベルまたは機能を効率よく阻害する本発明のアンチセンス化合物は、活性のあるアンチセンス化合物であると
10
考えられる。1つの実施形態においては、本発明のアンチセンス化合物は、LMW-PTPaseの発現を阻害して、RNAの、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の減少を引き起こす。

【0043】

例えば、LMW-PTPaseの発現の低下は、動物の体液、組織、または臓器の中で測定することができる。分析用の試料（例えば、体液（例えば、血液）、組織（例えば、生検）、または臓器）を得るための方法、および分析できる試料の調製方法は、当業者に周知である。RNAおよびタンパク質レベルの分析のための方法は上記で議論されており、
20
当業者に周知である。処置の効果は、当該分野で公知の日常的に行われている臨床的方法によって、本発明の1つ以上の化合物と接触させられた動物から回収された上記の体液、組織、または臓器の中でのLMW-PTPaseの発現に関係している生体マーカーを測定することによって、評価することができる。これらの生体マーカーとしては、肝臓のトランスアミナーゼ、ビリルビン、アルブミン、血中尿素窒素、クレアチン、ならびに、腎機能および肝機能の他のマーカー；グルコース濃度、トリグリセリド濃度、インシュリン濃度、脂肪酸濃度、コレステロール濃度、心電図、グルコース摂取、糖新生、インシュリン感受性、および体重、ならびに、糖尿病、II型糖尿病、肥満、インシュリン耐性、インシュリン欠乏、高コレステロール血症、高血糖症、異常脂質血症、高トリグリセリド血症、高脂肪酸血症、肝臓脂肪症、脂肪性肝炎、非アルコール性脂肪性肝炎、メタボリック
30
症候群、心臓血管疾患、および冠状動脈性心臓病の他のマーカーが挙げられるが、これらに限定はされない。加えて、処置の効果は、改善された疾患状態または症状の侵襲的ではない指標（例えば、心電図、体重など）を使用して評価することができる。

【0044】

本発明のアンチセンス化合物は、適切な薬学的に許容される希釈物または担体に対して有効量の化合物を添加することによって、薬学的組成物の中で利用することができる。許容される担体および希釈剤は当業者に周知である。希釈剤または担体の選択は、多数の要因に基づき、これには、化合物の溶解度および投与経路が含まれるが、これらに限定はされない。このような考慮は、当業者に十分に理解されている。1つの態様においては、本発明の化合物は、LMW-PTPaseの発現を阻害する。本発明の化合物はまた、グル
40
コース濃度、トリグリセリド濃度、インシュリン濃度、脂肪酸濃度、コレステロール濃度、グルコース濃度、グルコース摂取、糖新生、およびインシュリン感受性を疾患ではない状態のプロフィールにまで回復させることによる、LMW-PTPaseの発現が関係している疾患および障害の処置のための医薬品の製造にも使用することができる。

【0045】

体液、臓器、または組織が有効量の本発明のアンチセンス化合物または組成物の1つ以上の有効量と接触させられる方法もまた意図される。体液、臓器、または組織は、本発明の化合物の1つ以上と接触させることができ、それによって、体液、臓器、または組織の細胞の中でのLMW-PTPaseの発現が調節される。

【0046】

10

20

30

40

50

キット、研究用試薬、および診断薬

本発明のアンチセンス化合物は、診断薬に、そして研究用試薬およびキットとして利用することができる。さらに、特異性を有している遺伝子発現を阻害することができるアンチセンス化合物は、多くの場合は、特定の遺伝子の機能を解明するために、または生物学的経路の様々なメンバーの機能を識別するために、当業者によって使用される。

【0047】

キットおよび診断薬において使用するためには、本発明のアンチセンス化合物は、単独で、または他の化合物もしくは治療薬と組み合わせてのいずれかで、細胞および組織の中で発現される遺伝子の相補体の一部または全体の発現パターンを解明するための、ディフアレンシャル分析および/または組み合わせ分析においてツールとして使用することができる。遺伝子の発現の分析方法は当業者に周知である。

10

【0048】

アンチセンス化合物

用語「アンチセンス化合物」は、核酸分子の1つの領域にハイブリダイズすることができるポリマー構造をいう。本明細書中で使用される場合は、「活性のあるアンチセンス化合物」は、標的核酸とハイブリダイズし、そしてその発現を調節することが示されているアンチセンス化合物である。一般的には、アンチセンス化合物には、ヌクレオシド間結合基および/またはヌクレオチド結合模倣物によって互いに連結させられた複数のモノマーサブユニットが含まれる。個々のモノマーサブユニットには、糖、脱塩基糖、修飾された糖、または糖模倣物が含まれ、脱塩基糖を除いて、ヌクレオ塩基、修飾されたヌクレオ塩基、またはヌクレオ塩基模倣物が含まれる。好ましいモノマーサブユニットにはヌクレオシドと修飾されたヌクレオシドが含まれる。アンチセンス化合物は、それがハイブリダイズし、その発現を調節する(増大させるまたは低下させる)標的核酸分子の領域に対して少なくとも一部相補的である。この用語には、オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシド、オリゴヌクレオチドアナログ、オリゴヌクレオチド模倣物、アンチセンス化合物、アンチセンスオリゴマー化合物、およびこれらのキメラ結合体が含まれる。「アンチセンスオリゴヌクレオチド」は、核酸をベースとするオリゴマーであるアンチセンス化合物である。アンチセンスオリゴヌクレオチドには、いくつかの場合には、糖、塩基、および/またはヌクレオシド間結合に対する1つ以上の化学的修飾が含まれ得る。アンチセンス化合物の限定ではない例としては、アンチセンス化合物、アンチセンスオリゴヌクレオチド、外部ガイド配列(EGS)オリゴヌクレオシド、オルタナティブスプライサー、およびsiRNAが挙げられる。このように、これらの化合物は、一本鎖、二本鎖、環状、分岐した、またはヘアピンの形態で導入することができ、そしてこれらの化合物には、構造エレメント(例えば、内部もしくは末端のブリッジまたはループ)が含まれ得る。いくつかの実施形態においては、別のアンチセンス機構(例えば、RNAi)を利用することが望ましい。これらの別の機構を使用するアンチセンス化合物には、状況に応じて、アンチセンス化合物に相補的である第2の化合物が含まれる場合がある。言い換えると、アンチセンスである二本鎖の化合物は、二本鎖の化合物を形成するようにハイブリダイズした2つの鎖である場合も、また、完全なもしくは部分的な二本鎖の化合物のハイブリダイゼーションおよび形成を可能にするために十分な自己相補性を有している一本鎖である場合もある。本発明の化合物は、自己触媒性ではない。本明細書中で使用される場合は、「自己触媒性」は、アクセサリ因子(例えば、タンパク質)が存在しない条件で標的RNAの切断を促進する能力を有している化合物を意味する。

20

30

40

【0049】

本発明の1つの実施形態においては、二本鎖のアンチセンス化合物には、短い干渉RNA(sRNA)が含まれる。本明細書中で使用される場合は、用語「sRNA」は、第1の鎖と第2の鎖を有している二本鎖の化合物として定義される。それぞれの鎖は、中心部分と、2つの独立した末端部分を有している。第1の鎖の中心部分は第2の鎖の中心部分に相補的であり、これによってこれらの鎖のハイブリダイゼーションが可能である。末端部分は、独立して、状況に応じて、相補鎖の対応する末端部分に相補的である。鎖の

50

末端は、突出を形成するように１つ以上の自然界に存在しているヌクレオ塩基または修飾されたヌクレオ塩基の付加によって修飾される場合がある。

【００５０】

s i R N A二本鎖のそれぞれの鎖は、約１２ヌクレオ塩基から約３５ヌクレオ塩基であり得る。好ましい実施形態においては、s i R N A二本鎖のそれぞれの鎖は、約１７ヌクレオ塩基から約２５ヌクレオ塩基である。２つの鎖は完全に相補的である（すなわち、平滑末端の化合物を形成する）場合も、また、２つの鎖の一方もしくは両方に５'または３'突出が含まれる場合もある。二本鎖の化合物には、本明細書中で議論されるように、化学修飾を含めることができる。

【００５１】

本発明の１つの実施形態においては、アンチセンス化合物には、一本鎖のオリゴヌクレオチドが含まれる。本発明のいくつかの実施形態においては、アンチセンス化合物には化学修飾が含まれる。好ましい実施形態においては、アンチセンス化合物は一本鎖のキメラオリゴヌクレオチドであり、この場合、糖、塩基、およびヌクレオシド間結合の修飾は別々に選択される。

【００５２】

アンチセンス化合物には、約１２ヌクレオ塩基から約３５ヌクレオ塩基までの長さ（すなわち、約１２個から約３５個の連結されたヌクレオシド）が含まれ得る。言い換えると、本発明の一本鎖の化合物には、約１２ヌクレオ塩基から約３５ヌクレオ塩基が含まれ、そして本発明の二本鎖のアンチセンス化合物（例えば、s i R N A）には、それぞれが独立して約１２個から約３５個のヌクレオ塩基である、２つの鎖が含まれる。これには１５から３５、および１６から３６ヌクレオ塩基長のオリゴヌクレオチドが含まれる。本発明のアンチセンス化合物には、（一本鎖であるか二本鎖であるかは問わず、そして少なくとも一方の鎖の上に）アンチセンス部分が含まれる。「アンチセンス部分」は、上記のアンチセンス機構の１つによって作用するように設計されたアンチセンス化合物の一部である。当業者は、約１２ヌクレオ塩基から約３５ヌクレオ塩基に、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、または３５ヌクレオ塩基が含まれることを理解するであろう。便宜上、本発明者らはアンチセンス化合物と記載するが、当業者であれば、アナログおよび模倣物がこの同じ範囲の長さを有し得ることを理解するであろう。

【００５３】

活性のある標的領域の中から選択された少なくとも８個、好ましくは少なくとも１２個、より好ましくは少なくとも１５個の連続しているヌクレオ塩基のストレッチが含まれている、約１２ヌクレオ塩基から３５ヌクレオ塩基長、好ましくは、約１５ヌクレオ塩基から約３５ヌクレオ塩基長のアンチセンス化合物が、さらに、適しているアンチセンス化合物であると考えられる。

【００５４】

本発明のアンチセンス化合物に対して修飾を行うことができ、そして修飾には、末端の一方、選択されたヌクレオ塩基部分、糖部分、またはヌクレオシド間結合の１つに結合させられた結合基が含まれ得る。可能な修飾としては、２'-フルオロ（２'-F）、２'-オメチル（２'-OMe）、２'-メトキシエトキシ（２'-MOE）糖修飾、反転した脱塩基キャップ、デオキシヌクレオ塩基、および二環式のヌクレオ塩基アナログ（例えば、ロクト核酸（LNA（登録商標））およびENA）が挙げられるが、これらに限定はされない。

【００５５】

化学修飾

当該分野で公知であるように、ヌクレオシドは塩基-糖結合体である。ヌクレオシドの塩基部分は、通常は複素環塩基（「ヌクレオ塩基」または単純に「塩基」と呼ばれる場合もある）である。このような複素環塩基の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させられたリン酸基がさ

10

20

30

40

50

らに含まれているヌクレオシドである。ペントフラノシル糖が含まれているこれらのヌクレオシドについては、リン酸基は、糖の2'、3'、または5'ヒドロキシル部分に結合させられ得る。オリゴヌクレオチドの形成においては、リン酸基は、直鎖状のポリマー化合物を形成するように互いに隣接するヌクレオシドを共有結合する。オリゴヌクレオチドにおいては、リン酸基は一般的に、オリゴヌクレオチドのヌクレオシド間骨格を形成すると見なされている。RNAおよびDNAの通常の結合または骨格は3'から5'方向のホスホジエステル結合である。多くの場合には、それらの活性を変化させるためにオリゴヌクレオチドの中に化学修飾が含まれることが好ましい。化学修飾によっては、オリゴヌクレオチドの活性は、例えば、その標的RNAに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの親和性を増大させること、ヌクレアーゼ耐性を増大させること、および/またはオリゴヌクレオチドの薬物動態を変化させることによって変化させることができる。その標的に対するオリゴヌクレオチドの親和性を増大させる化学反応の使用によっては、より短いオリゴヌクレオチド化合物の使用が可能となる。

10

20

30

40

50

【0056】

用語「ヌクレオ塩基」または「複素環塩基部分」は、本明細書中で使用される場合は、ヌクレオシドの複素環塩基部分を意味する。一般的に、ヌクレオ塩基は、1つ以上の原子が含まれている任意のグループ、または別の核酸の塩基に対して水素結合することができる原子のグループである。加えて、「修飾されていない」または「自然界に存在している」ヌクレオ塩基（例えば、プリンヌクレオ塩基であるアデニン（A）およびグアニン（G）、ならびにピリミジンヌクレオ塩基であるチミン（T）、シトシン（C）、およびウラシル（U））、当業者に公知である多くの修飾されたヌクレオ塩基またはヌクレオ塩基模倣物は、本発明に適している。用語「修飾されたヌクレオ塩基」および「ヌクレオ塩基模倣物」は重複している場合があるが、一般的には、「修飾されたヌクレオ塩基」はもとのヌクレオ塩基と構造がかなり類似しているヌクレオ塩基（例えば、7-デアザプリンまたは5-メチルシトシン）を意味し、一方、ヌクレオ塩基模倣物には、より複雑な構造（例えば、三環式フェノキサジンヌクレオ塩基模倣物）が含まれる。上記の修飾されたヌクレオ塩基の調製のための方法は当業者に周知である。

【0057】

アンチセンス化合物にはまた、修飾された糖部分を有している1つ以上のヌクレオシドが含まれる場合がある。ヌクレオシドのフラノシル糖環は、多数の方法で修飾することができる。これには、置換基の付加、二環式核酸（BNA）を形成するような一つの原子に同種原子が二つ結合した（geminal）2つの環原子の架橋、および原子または基（例えば、-S-、-N(R)-、または-C(R₁)(R₂))の4'位の環酸素についての置換が含まれるが、これらに限定はされない。修飾された糖部分は周知であり、その標的に対するアンチセンス化合物の親和性を変化させる（通常は、増大させる）ために、および/またはヌクレアーゼ耐性を高めるために使用することができる。好ましい修飾された糖の代表的なリストとしては、二環式の修飾された糖（BNA）（LNAおよびENA（4'-(CH₂)₂-O-2'架橋が含まれる）；および置換された糖（特に、2'-F、2'-OCH₂、または2'-O(CH₂)₂-OCH₃置換基を有している2'置換糖）が挙げられるが、これらに限定はされない。糖はまた、何よりも糖模倣物基で置き換えることもできる。修飾された糖の調製のための方法は当業者に周知である。

【0058】

ヌクレオシド間結合基によって、ヌクレオシドまたはそれ以外の修飾されたモノマー単位が互いに連結され、それによってアンチセンス化合物が形成される。ヌクレオシド間結合基の2つの主要なクラスは、リン原子の存在、またはそれが存在しないことによって定義される。代表的なリンが含まれているヌクレオシド間結合としては、ホスホジエステル、ホスホトリエステル、メチルホスホネート、ホスホルアミデート、およびホスホロチオエートが挙げられるが、これらに限定はされない。代表的なリンが含まれていないヌクレオシド間結合基としては、メチレンメチルイミノ（-CH₂-N(CH₃)-O-CH₂-）、チオジエステル（-O-C(O)-S-）、チオノカルバメート（-O-C(O)-

(NH) - S -) ; シロキサン (- O - Si (H)₂ - O -) ; および N , N' - ジメチルヒドラジン (- CH₂ - N (CH₃) - N (CH₃) -) が挙げられるが、これらに限定はされない。リンが含まれていないヌクレオシド間結合基を有しているアンチセンス化合物は、オリゴヌクレオシドと呼ばれる。修飾されたヌクレオシド間結合は、自然界に存在しているホスホジエステル結合と比較して、アンチセンス化合物のヌクレアーゼ耐性を変化させる (通常は、高める) ために使用することができる。キラル原子を有しているヌクレオシド間結合は、ラセミ化合物、キラル化合物、または混合物として調製することができる。代表的なヌクレオシド間結合としては、アルキルホスホネートおよびホスホロチオエートが挙げられるが、これらに限定はされない。リンが含まれている結合およびリンが含まれていない結合の調製方法は当業者に周知である。

10

【0059】

本明細書中で使用される場合は、用語「模倣物」は、糖、ヌクレオ塩基、および/またはヌクレオシド間結合について置換されている基を意味する。一般的には模倣物は、糖または糖ヌクレオシド間結合の組み合わせの代わりに使用され、そしてヌクレオ塩基は、選択された標的に対するハイブリダイゼーションについては維持される。糖模倣物の代表的な例としては、シクロヘキセニルまたはモルホリノが挙げられるが、これらに限定はされない。糖 - ヌクレオシド間結合の組み合わせについての模倣物の代表的な例としては、ペプチド核酸 (PNA) および電荷を有していないアキラル結合によって連結させられたモルホリノ基が挙げられるが、これらに限定はされない。いくつかの例においては、模倣物はヌクレオ塩基の代わりに使用される。代表的なヌクレオ塩基模倣物は当該分野で周知であり、これには、三環式フェノキサジンアナログ、およびユニバーサル塩基が含まれるが、これらに限定はされない (Berger et al., Nuc Acid Res., 2000, 28: 2911 - 14、引用により本明細書中に組み入れられる)。糖、ヌクレオシド、およびヌクレオ塩基の模倣物の合成方法は当業者に周知である。

20

【0060】

本明細書中で使用される場合は、用語「ヌクレオシド」には、ヌクレオシド、脱塩基ヌクレオシド、修飾されたヌクレオシド、ならびに、模倣物である塩基および/または糖基を有しているヌクレオシドが含まれる。

【0061】

本開示の状況においては、用語「オリゴヌクレオチド」は、リボ核酸 (RNA) もしくはデオキシリボ核酸 (DNA) のオリゴマーまたはポリマーであるオリゴマー化合物を意味する。この用語には、自然界に存在しているヌクレオ塩基、糖、およびヌクレオシド間共有結合、ならびに自然界には存在しないヌクレオ塩基、糖、およびヌクレオシド間共有結合から構成されているオリゴヌクレオチドが含まれ、おそらくは、非核酸結合体もさらに含まれる。

30

【0062】

ヌクレオシド間結合 (例えば、ヌクレオシド間ホスホジエステル結合およびヌクレオシド間ホスホロチオエート結合が含まれる) を形成するために有用な反応性リン酸基を有している化合物が提供される。本発明の前駆体またはアンチセンス化合物の調製および/または精製方法は、本発明の組成物または方法の限定ではない。DNA、RNA、およびアンチセンス化合物の合成および精製のための方法は、当業者に周知である。

40

【0063】

本明細書中で使用される場合は、用語「キメラアンチセンス化合物」は、同じオリゴマー化合物の中の他の糖、ヌクレオ塩基、およびヌクレオシド間結合と比較した場合に異なるように修飾されている、少なくとも1つの糖、ヌクレオ塩基、および/またはヌクレオシド間結合を有しているアンチセンス化合物を意味する。残りの糖、ヌクレオ塩基、およびヌクレオシド間結合は、別々に修飾されている場合も、また、修飾されていない場合もある。一般的には、キメラオリゴマー化合物は、単離された位置に存在し得るか、または特定のモチーフを定義するであろう領域の中に一緒にグループ分けされ得る、修飾されたヌクレオシドを有しているであろう。修飾および模倣物基のあらゆる組み合わせが、キメ

50

ラオリゴマー化合物に含まれる。

【0064】

キメラアンチセンス化合物には、通常、少なくとも1つの修飾された領域が含まれており、その結果、ヌクレアーゼでの消化に対する高い耐性、細胞により取り込みの増加、および/または標的核酸に対する結合親和性の増大がもたらされる。オリゴマー化合物のさらなる領域が、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の基質としての役割を担っている場合がある。例えば、RNase Hは細胞性のエンドヌクレアーゼであり、これはRNA:DNA二本鎖のRNA鎖を切断する。したがって、RNase Hの活性化によってRNA標的の切断が生じ、それによって遺伝子発現の阻害の効率が大幅に高められる。結果として、例えば、同じ標的領域にハイブリダイズするホスホロチオエートデオキシオリゴヌクレオチドと比較して同等の結果を、多くの場合には、キメラが使用して、より短いアンチセンス化合物を用いて得ることができる。RNA標的の切断は、ゲル電気泳動によって、および必要に応じて、当該分野で公知の核酸ハイブリダイゼーション技術と組み合わせて、日常的に行われているように検出することができる。

10

【0065】

特定のキメラ、さらには、キメラではないアンチセンス化合物は、特定のモチーフを有しているとしてさらに記載することができる。本明細書中で使用される場合は、用語「モチーフ」は、同様にもしくは異なるように修飾されたか、または修飾されていないヌクレオチドと比較した、アンチセンス化合物の中の修飾された糖部分および/または糖模倣物基の方向(orientation)を意味する。本明細書中で使用される場合は、用語「糖」、「糖部分」、および「糖模倣物基」は同義的に使用される。このようなモチーフとしては、ギャップが含まれているモチーフ(gapped motif)、オルタナティブモチーフ、完全に修飾されたモチーフ、ヘミマーモチーフ(hemimer motif)、ブロックマーモチーフ(blockmer motif)、および位置修飾されたモチーフ(positionally modified motif)が挙げられるが、これらに限定はされない、ヌクレオ塩基の配列および構造、ならびにヌクレオチド間結合のタイプは、アンチセンス化合物のモチーフを決定する要因ではない。

20

【0066】

本明細書中で使用される場合は、用語「ギャップが含まれているモチーフ」は、3つの領域(2つの外部領域(羽)が隣接している内部領域(gap))に分けられるヌクレオチドの連続している配列が含まれているアンチセンス化合物を意味する。これらの領域は、互いに、ヌクレオチドが含まれている異なるように修飾された糖基を有していることによって、少なくとも互いに異なる。いくつかの実施形態においては、個々の修飾された領域は一樣に修飾されている(例えば、所定の領域の中の複数の修飾された糖基が同じである);しかし、他のモチーフをこの領域に適用することができる。例えば、ギャップマー(gapmer)の中の羽は別のオルタナティブモチーフを有し得る。ギャップが含まれているアンチセンス化合物のギャップの中に存在しているヌクレオチドは、個々の羽の中に修飾された糖部分とは異なる糖部分を有している。

30

【0067】

本明細書中で使用される場合は、用語「オルタナティブモチーフ」は、原則としてアンチセンス化合物の配列全体わたって交互である、または、原則としてアンチセンス化合物の1つの領域の配列全体にわたって交互である、2つの異なるように糖が修飾されたヌクレオチドが含まれているヌクレオチドの連続している配列が含まれているアンチセンス化合物を意味する。

40

【0068】

本明細書中で使用される場合は、用語「完全に修飾されたモチーフ」は、原則としてそれぞれのヌクレオチドが一樣な修飾を有している糖が修飾されたヌクレオチドである、ヌクレオチドの連続する配列が含まれているアンチセンス化合物を意味する

本明細書中で使用される場合は、用語「ヘミマーモチーフ」は、一樣な糖部分(同じ、

50

修飾された糖または修飾されていない糖)を有しているヌクレオシドの配列を意味し、この場合、5'末端または3'末端の一方には、ヘミマーが修飾されたアンチセンス化合物中の他のヌクレオシドとは異なる、糖が修飾されたヌクレオシドである、2個から12個のヌクレオシドの配列を有している。

【0069】

本明細書中で使用される場合は、用語「ブロックマーモチーフ」は、一様に修飾された糖が修飾されたヌクレオシドのブロックが間に挟まれている、一様な糖(同じ、修飾された糖または修飾されていない糖)を有しているヌクレオシドの配列を意味する。この場合、修飾は、他のヌクレオシドとは異なる。キメラオリゴヌクレオチド化合物の調製方法は当業者に周知である。

10

【0070】

本明細書中で使用される場合は、「位置修飾されたモチーフ」には、全ての他のモチーフが含まれる。位置修飾されたオリゴヌクレオチド化合物の調製方法は当業者に周知である。

【0071】

本明細書中に記載される化合物には、1つ以上の非対称中心が含まれ、したがって、エナンチオマー、ジアステレオマー、および他の立体異性体立体配置が生じる。これらは、絶対立体化学の観点で、アミノ酸らについて(R)または(S)、.、または.、あるいは、(D)または(L)として定義することができる。これは、全てのこのような可能な異性体、さらには、それらのラセミ形態および光学的に純粋な形態が含まれるように意味される。

20

【0072】

1つの態様においては、アンチセンス化合物は、1つ以上の結合基の共有結合によって修飾される。結合基は、可逆的結合によって結合させることも、または不可逆的結合によって結合させることもできる。結合基は、アンチセンス化合物に直接結合させることも、またはリンカーの使用によって結合させることもできる。リンカーは、単官能性リンカーである場合も、また、二官能性リンカーである場合もある。このような結合方法およびリンカーは当業者に周知である。一般的には、結合基は、1つ以上の特性を修飾するためにアンチセンス化合物に結合させられる。このような考えは当業者には周知である。

30

【0073】

オリゴマーの合成

修飾されたヌクレオシドのオリゴマー化、および修飾されていないヌクレオシドのオリゴマー化は、DNAについての文献に記載されている手順(Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Agrawal 編(1993), Humana Press)および/またはRNAについての文献に記載されている手順(Scaringe, Methods(2001), 23, 206-217. Gait et al., Applications of Chemically synthesized RNA in RNA: Protein Interactions, Smith 編(1998), 1-36., Gallo et al., Tetrahedron(2001), 57, 5707-5713)にしたがって、日常的に行われているように行うことができる。

40

【0074】

アンチセンス化合物は、通常は、周知の固相合成技術によって、日常的に行われているように行うことができる。このような合成のための装置は、いくつかの供給メーカー(例えば、Applied Biosystems(Foster City, CA))から販売されている。当該分野で公知のこのような合成のための任意の他の手段がさらに使用される場合も、または代わりに使用される場合もある。ホスホロチオエートおよびアルキル化誘導体のようなオリゴヌクレオチドを調製するための同様の技術を使用することは周知である。本発明は、アンチセンス化合物の合成方法によっては限定されない。

【0075】

50

オリゴマーの精製および分析

オリゴヌクレオチドの精製および分析の方法は当業者に公知である。分析方法としては、キャピラリー電気泳動（CE）およびエレクトロスプレー - 質量スペクトル分析が挙げられる。このような合成および分析方法は、マルチウェルプレートにおいて行うことができる。本明細書中に開示される組成物および方法は、オリゴマーの精製方法によっては限定されない。

【0076】

塩、プロドラッグ、および生物学的等価物

アンチセンス化合物には、任意の薬学的に許容される塩、エステル、もしくはそのようなエステルの塩、または、任意の他の機能性である化学的等価物が含まれ得る。これらは、動物（ヒトが含まれる）に投与されると、生物学的活性のある代謝物質またはその残留物を提供する（直接または間接的に）ことができる。したがって、例えば、開示にはまた、アンチセンス化合物のプロドラッグおよび薬学的に許容される塩、そのようなプロドラッグの薬学的に許容される塩、ならびに、他の生物学的等価物が含まれる。

10

【0077】

用語「プロドラッグ」は、体内またはその細胞内で、内因性の酵素、化合物、および/または症状の作用によって活性な形態（すなわち、薬物）に変換される、不活性な形態または活性の低い形態で調製された治療薬を示す。具体的には、本発明のオリゴヌクレオチドのプロドラッグバージョンが、WO 93 / 24510またはWO 94 / 26764に開示されている方法にしたがって、SATE（（S - アセチル - 2 - チオエチル）ホスフェート）誘導体として調製される。プロドラッグにはまた、一方の末端または両方の末端に、切断されて小さい活性のある化合物を生じるヌクレオ塩基（例えば、ホスホジエステル骨格結合）が含まれている、アンチセンス化合物も含まれ得る。

20

【0078】

用語「薬学的に許容される塩」は、アンチセンス化合物の生理学的に、および薬学的に許容される塩、すなわち、もとの化合物の所望される生物学的活性を保持しているが、それに対して望ましくない毒物学的作用を与えることのない塩を意味する。アンチセンスオリゴヌクレオチドのナトリウム塩が有用であり、ヒトへの治療的投与に十分に適している。別の実施形態においては、dsRNA化合物のナトリウム塩もまた提供される。

30

【0079】

処方物

アンチセンス化合物はまた、他の分子、分子構造、または化合物の混合物と一緒に投与することができ、それらでカプセル化することができ、それらと結合させることができ、また、別の方法でそれらと会合させることができる。

【0080】

アンチセンス化合物にはまた、薬学的組成物および処方物も含まれる場合がある。本発明の薬学的組成物は、局所処置または全身的処置が所望されるかどうか、および処置される領域に応じて、多数の方法で投与することができる。

【0081】

通常は単位投与量形態で提示され得る薬学的処方物は、薬学的産業で周知の従来技術にしたがって調製することができる。このような技術としては、有効成分を薬学的担体（単数または複数）または賦形剤（単数または複数）と会合させる工程が含まれる。一般的には、処方物は、有効成分と液体担体、微粉化された固体担体、またはそれらの両方とを均一に、そして密接に会合させ、その後、必要に応じて、生成物を成型する（例えば、送達のための特異的な粒子の大きさになるように）ことによって調製される。

40

【0082】

「薬学的担体」または「賦形剤」は、1つ以上の核酸を動物に送達するための薬学的に許容される溶媒、懸濁剤、または任意の他の薬理学的に不活性な媒体であり得、そして当該分野で公知である。賦形剤は液体である場合も、また、固体である場合もあり、核酸および所定の薬学的組成物の他の成分と混合した場合に、所望される容積、稠度などが得ら

50

れるように考慮して計画された投与様式と共に、選択される。

【0083】

組み合わせ

本明細書中に提供される組成物には、2つ以上のアンチセンス化合物が含まれ得る。別の関連する実施形態においては、組成物には、1つ以上のアンチセンス化合物（具体的には、第1の核酸に対して標的化させられたオリゴヌクレオチドと、第2の核酸標的に対して標的化させられた1つ以上のさらなるアンチセンス化合物が含まれ得る。あるいは、組成物には、同じ核酸標的の異なる領域に対して標的化させられた2つ以上のアンチセンス化合物が含まれ得る。2つ以上の混合された化合物は、一緒に使用される場合も、また、連続して使用される場合もある。本発明の組成物はまた、他のアンチセンス以外の化合物である治療薬と混合することもできる。

10

【0084】

限定ではない開示および引用による組み入れ

特定の化合物、組成物、および方法が特定の実施形態にしたがって特異的に記載されているが、以下の実施例は、化合物および方法の例示として提供されるにすぎず、本発明の特許請求の範囲を限定するようには意図されない。本出願に記載される参考文献、GenBank登録番号などのそれぞれは、それらの全体が引用により本明細書中に組み入れられる。

【実施例】

【0085】

20

実施例1

細胞のタイプおよびトランスフェクション方法

細胞のタイプ - 標的核酸の発現に対するオリゴマー化合物の効果を、以下の細胞のタイプの1つ以上において試験した。

【0086】

A549：ヒトの肺ガン細胞株A549をアメリカンタイプカルチャーコレクション（Manassas, VA）から入手した。A549細胞は、10%のウシ胎児血清、1mlあたり100単位のペニシリン、および1mlあたり100マイクログラムのストレプトマイシン（Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA）を補充したDMEM、高グルコース（Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA）の中で、日常的に行っているように培養した。細胞は、それらがおよそ90%のコンフルエンスに達した時点で、日常的に行っているトリプシン化および希釈によって継代した。細胞を、96ウェルプレート（Falcon - Primaria #3872）に、オリゴマー化合物のトランスフェクション実験において使用するために、およそ5000細胞/ウェルの密度で播種した。

30

【0087】

b. END：マウスの脳の内皮細胞株b. ENDは、Max Planck Institute（Bad Nauheim, Germany）のWerner Risau博士から入手した。b. END細胞を、10%のウシ胎児血清（Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA）を補充したDMEM、高グルコース（Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA）の中で、日常的に行っているように培養した。細胞は、それらがおよそ90%のコンフルエンスに達した時点で、日常的に行っているトリプシン化および希釈によって継代した。細胞を、96ウェルプレート（Falcon - Primaria #353872, BD Biosciences, Bedford, MA）に、オリゴマー化合物のトランスフェクション実験において使用するために、およそ3000細胞/ウェルの密度で播種した。

40

【0088】

A. 10：ラットの大動脈平滑筋細胞株A10は、アメリカンタイプカルチャーコレクション（Manassas, VA）から入手した。A10細胞を、10%のウシ胎児血清

50

(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)を補充したDMEM、高グルコース(アメリカンタイプカルチャーコレクション、Manassas, VA)の中で、日常的に行っているように培養した。細胞は、それらがおよそ80%のコンフルエンスに達した時点で、日常的に行っているトリプシン化および希釈によって継代した。細胞を、96ウェルプレート(Falcon-Primaria #3872)に、オリゴマー化合物のトランスフェクション実験において使用するために、およそ2500細胞/ウェルの密度で播種した。

【0089】

初代マウス肝細胞：初代マウス肝細胞は、Charles River Labsから購入したCD-1から調製した。初代マウス肝細胞は、10%のウシ胎児血清、1%のペニシリン/ストレプトマイシン、1%の抗生物質-抗有糸分裂薬(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)と、10nMのウシインシュリン(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を補充した肝細胞接着培地(Hepatocyte Attachment Media)の中で、日常的に行っているように培養した。細胞を、0.1mg/mlのコラーゲンでコーティングした96ウェルプレート(Falcon-Primaria #353872, BD Biosciences, Bedford, MA)に、オリゴマー化合物のトランスフェクション実験において使用するために、およそ10,000細胞/ウェルの密度で播種した。

10

【0090】

初代ラット肝細胞：初代ラット肝細胞は、Charles River Labs(Wilmington, MA)から購入したSprague-Dawleyラットから調製し、そして初代マウス肝細胞は、10%のウシ胎児血清(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)、1mlあたり100単位のパニシリン、および100μg/mlのストレプトマイシン(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)を補充したDMEM、高グルコース(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)の中で、日常的に行っているように培養した。細胞を、96ウェルプレート(Falcon-Primaria #353872, BD Biosciences, Bedford, MA)に、本発明のオリゴマー化合物での処理のために、4000~6000細胞/ウェルの密度で播種した。

20

30

【0091】

ノーザンブロッティングまたは他の分析のためには、細胞を、100mmまたは他の標準的な組織培養プレートに播種し、適切な容量の培地およびオリゴヌクレオチドを使用して同様に処理することができる。

【0092】

オリゴマー化合物での処理：細胞がほぼコンフルエントに達した時点で、これらを、記載するトランスフェクション方法を使用してオリゴヌクレオチドで処理した。

【0093】

リポフェクチン(Lipofectin)(登録商標)：細胞が65~75%のコンフルエンスに達した時点で、これらをオリゴヌクレオチドで処理した。オリゴヌクレオチドは、LIPOFECTIN(登録商標)(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)と共にOpti-MEM(登録商標)-1還元血清培地(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)の中で混合して、所望されるオリゴヌクレオチド濃度、および100nMのオリゴヌクレオチドあたり2.5または3μg/mlのLIPOFECTIN(登録商標)濃度とした。このトランスフェクション混合物を室温でおよそ0.5時間インキュベートした。96ウェルプレート中で細胞を増殖させるために、ウェルを100μLのOPTI-MEM(登録商標)-1で一旦洗浄し、その後、130μLのトランスフェクション混合物で処理した。細胞は、24ウェルプレートの中で増殖させたか、または、他の標

40

50

準的な組織培養プレートを用いて、適切な容量の培地およびオリゴヌクレオチドを使用して同様に処理した。細胞を処理し、そしてデータを2連または3連で得た。37 °Cでのおよそ4 ~ 7時間の処理の後、トランスフェクション混合物が含まれている培地を新しい培養培地と交換した。細胞を、オリゴヌクレオチドでの処理の16 ~ 24時間後に回収した。

【0094】

サイトフェクチン (CYTOFECTIN) (登録商標) : 細胞が65 ~ 75 %のコンフルエンスに達した時点で、これらをオリゴヌクレオチドで処理した。オリゴヌクレオチドは、CYTOFECTIN (登録商標) (Gene Therapy Systems, San Diego, CA) と共にOPTI-MEM-1 (登録商標) 還元血清培地 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) の中で混合して、所望されるオリゴヌクレオチド濃度、および100 nMのオリゴヌクレオチドあたり2または4 µg / mLのCYTOFECTIN (登録商標) 濃度とした。このトランスフェクション混合物を室温でおよそ0.5時間インキュベートした。96ウェルプレート中で細胞を増殖させるために、ウェルを100 µLのOPTI-MEM-1, sup. TMで一旦洗浄し、その後、130 µLのトランスフェクション混合物で処理した。細胞は、24ウェルプレートの中で増殖させたか、または、他の標準的な組織培養プレートを用いて、適切な容量の培地およびオリゴヌクレオチドを使用して同様に処理した。細胞を処理し、そしてデータを2連または3連で得た。37 °Cでのおよそ4 ~ 7時間の処理の後、トランスフェクション混合物が含まれている培地を新しい培養培地と交換した。細胞を、オリゴヌクレオチドでの処理の16 ~ 24時間後に回収した。

10

20

【0095】

対照のオリゴヌクレオチド

対照のオリゴヌクレオチドを、特定の細胞株についての最適なオリゴマー化合物濃度を決定するために使用した。さらに、本発明のオリゴマー化合物を、オリゴマー化合物のスクリーニング実験、または表現形のアッセイにおいて使用した場合には、対照のオリゴヌクレオチドは、本発明の化合物と平行して試験した。

【0096】

【表 2】

表2

細胞株の試験、オリゴマー化合物のスクリーニング、および表現形のアッセイのための
対照オリゴヌクレオチド

化合物番号	標的の名称	標的の種	配列 (5' から3' 方向)	モチーフ	配列番号
113131	CD86	ヒト	CGTGTGTCTGTGCTAGTCCC	5-10-5	19
289865	フォークヘッド型 ボックス01A(横 紋筋肉腫)	ヒト	GGCAACGTGAACAGGTCCAA	5-10-5	20
25237	インテグリンβ3	ヒト	GCCCCATTGCTGGACATGC	4-10-4	21
196103	インテグリンβ3	ヒト	AGCCCCATTGCTGGACATGCA	5-10-5	22
148715	Jagged 2	ヒト; マウス; ラット	TTGTCCCAGTCCCAGGCCTC	5-10-5	23
18076	Jun N- 末端キナーゼ - 1	ヒト	CTTTC ^u CGTTGGA ^c C ^u CCCTGGG	5-9-6	24
18078	Jun N- 末端キナーゼ - 2	ヒト	GTGCG ^u CG ^u CGAG ^c C ^u C ^u CGAAATC	5-9-6	25
183881	カイネシン様1	ヒト	ATCCAAGTGCTACTGTAGTA	5-10-5	26
29848	なし	なし	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN	5-10-5	27
226844	Notch (ショウジョウバ エ)ホモログ1	ヒト; マウス	GCCCTCCATGCTGGCACAGG	5-10-5	28
105990	ペルオキシソー ム増殖または活 性化受容体γ	ヒト	AGCAAAAGATCAATCCGTTA	5-10-5	29
336806	Raf キナーゼ C	ヒト	TACAGAAGGCTGGGCCTTGA	5-10-5	30
15770	Raf キナーゼ C	マウス; マウス肉腫ウ イルス; ラット	ATGCATT ^u CTG ^u C ^u C ^u C ^u CAAGGA	5-10-5	31

使用したオリゴヌクレオチドの濃度は、細胞株ごとに異なる。特定の細胞株についての最適なオリゴヌクレオチド濃度を決定するために、細胞を、1つの範囲の濃度でポジティブ対照であるオリゴヌクレオチドで処理した。ポジティブ対照を表2に示す。ヒト細胞およびヒト以外の霊長類の細胞については、ポジティブ対照であるオリゴヌクレオチドは、化合物番号13650、化合物番号336806、または化合物番号18078から選択した。マウスまたはラットの細胞については、ポジティブ対照であるオリゴヌクレオチドは、化合物番号15770または化合物番号15346である。その後、標的mRNA（例えば、化合物13650についてはヒトRafキナーゼC）の80%の阻害を生じるポジティブ対照であるオリゴヌクレオチドの濃度を、その細胞株についてのその後の実験において、新しいオリゴヌクレオチドについてスクリーニング濃度として利用した。80%の阻害が得られない場合には、標的mRNAの60%の阻害を生じるポジティブ対照であるオリゴヌクレオチドの最も低い濃度を、その細胞株についてのその後の実験においてオリゴヌクレオチドのスクリーニング濃度として利用した。60%の阻害が得られない場合には、特定の細胞株は、オリゴヌクレオチドでのトランスフェクション実験には適していないと考えた。本明細書中で使用したアンチセンスオリゴヌクレオチドの濃度は、アンチ

センスオリゴヌクレオチドをリボソーム試薬を使用してトランスフェクトした場合には50 nMから300 nM、そして、アンチセンスオリゴヌクレオチドをエレクトロポレーションによってトランスフェクトした場合には1 μ Mから40 μ Mである。

【0097】

実施例2

LMW - PTPase mRNAレベルのリアルタイム定量的PCR分析

LMW - PTPase mRNAレベルの定量は、ABI PRISM (登録商標) 7600、7700、または7900 Sequence Detection System (PE - Applied Biosystems, Foster City, CA) を使用して、製造業者による説明書にしたがってリアルタイム定量的PCRによって行った。

10

【0098】

定量的PCR分析の前に、測定するLMW - PTPaseに特異的なプライマー - プロブのセットを、GAPDF増幅反応によって「多重化させられる」それらの能力について評価した。単離後に、RNAについて、連続して逆転写(RT)反応とリアルタイムPCRを行った。これらはいずれも、同じウェルの中で行った。RTおよびPCR試薬は、Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA) から入手した。RT、リアルタイムPCRは、20 μ LのPCR混合液(MgCl₂が加えられていない2.5 \times PCR緩衝液、6.6 mMのMgCl₂、375 μ Mの各dATP、dCTP、dGTP、およびdGTP、375 nMのそれぞれ順方向プライマーおよび逆方向プライマー、125 nMのプロブ、4単位のRNAse阻害剤、1.25単位のPLATINUM (登録商標) Taq、5単位のMuLV逆転写酵素、および2.5 \times ROX色素)を、30 μ Lの全RNA溶液(20 ~ 200 ng)が含まれている96ウェルプレートに添加することによって、同時に行った。RT反応は、48 $^{\circ}$ Cで30分間のインキュベーションによって行った。PLATINUM (登録商標) Taqを活性化させるための95 $^{\circ}$ Cで10分間のインキュベーション後、40サイクルの2工程のPCRプロトコルを行った: 95 $^{\circ}$ Cで15秒間(変性)、続いて、60 $^{\circ}$ Cで1.5分間(アニーリング/伸張)。

20

【0099】

RT、リアルタイムPCRによって得られた遺伝子標的の量を、その発現が一定である遺伝子GAPDHの発現レベル、またはRiboGreen (登録商標) (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) を使用して全RNAを定量することのいずれかを使用して正規化した。GAPDHの発現は、標的と同時に、複数回、または別々に行うことによって、RT、リアルタイムPCRによって定量した。全RNAは、RiboGreen (登録商標) RNA定量試薬(Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) を使用して定量した。

30

【0100】

170 μ LのRiboGreen (登録商標) 作業試薬(10 mMのTris - HCl、1 mMのEDTA, pH 7.5の中に1:350に希釈したRiboGreen (登録商標) 試薬)を、30 μ Lの精製した細胞性RNAが含まれている96ウェルプレートにピペティングした。プレートを、CytoFluor 4000 (PE Applied Biosystems) において、485 nmの励起および530 nmの放射で読み取った。

40

【0101】

GAPDH PCRプロブは、5'末端に共有結合させられたJOEと、3'末端に共有結合させられたTAMRAまたはMGBを有している。この場合、JOEは蛍光レポーター色素であり、TAMRAまたはMGBは消光色素である。いくつかの細胞のタイプにおいては、様々な種に由来するGAPDH配列に対して設計されたプライマーとプロブを使用して、GAPDHの発現を測定した。例えば、ヒトGAPDHプライマーとプロブのセットを使用して、サルに由来する細胞および細胞株の中でのGAPDHの発現を

50

測定した。

【0102】

リアルタイムPCRで使用したプローブおよびプライマーは、標的特異的配列にハイブリダイズするように設計した。プライマーとプローブ、およびそれらがハイブリダイズする標的核酸配列を、表3に示す。標的特異的PCRプローブは、5'末端に共有結合させられたFAMと、3'末端に共有結合させられたTAMRAまたはMGBを有している。この場合、FAMは蛍光色素であり、TAMRAまたはMGBは消光色素である。

【0103】

【表3】

表3

リアルタイムPCRで使用したLMW-PTPase特異的プライマーおよびプローブ

標的の名称	種	配列の説明	配列(5'から3'方向)	配列番号
GAPDH	ヒト	順方向プライマー	CAACGGATTGCGTCGTATTGG	32
GAPDH	ヒト	逆方向プライマー	GGCAACAATATCCACTTTACCAGAGT	33
GAPDH	ヒト	プローブ	CGCCTGGTCACCAGGGCTGCT	34
GAPDH	ヒト	順方向プライマー	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	35
GAPDH	ヒト	逆方向プライマー	GAAGATGGTGATGGGATTTC	36
GAPDH	ヒト	プローブ	CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC	37
GAPDH	ヒト	順方向プライマー	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	35
GAPDH	ヒト	逆方向プライマー	GAAGATGGTGATGGGATTTC	36
GAPDH	ヒト	プローブ	TGGAATCATATTGGAACATG	38
GAPDH	マウス	順方向プライマー	GGCAAATCAACGGCACAGT	39
GAPDH	マウス	逆方向プライマー	GGGTCTCGCTCCTGGAAGAT	40
GAPDH	マウス	プローブ	AAGGCCGAGAAATGGGAAGCTTGTCATC	41
GAPDH	ラット	順方向プライマー	TGTTCTAGAGACAGCCGCATCTT	42
GAPDH	ラット	逆方向プライマー	CACCGACCTTCACCATCTTGT	43
GAPDH	ラット	プローブ	TTGTGCAGTGCCAGCCTCGTCTCA	44

実施例3

オリゴマー化合物によるヒトLMW-PTPaseの発現のアンチセンス阻害

公開されている配列、または表1に記載した公開されている配列の一部を使用して、ヒトLMW-PTPase RNAの様々な領域を標的化するアンチセンス化合物のシリーズを設計した。設計したアンチセンス化合物は、表1の標的核酸の1つ以上に相補的である。それぞれのアンチセンス化合物についての標的核酸上の開始部位および終結部位を、表4a、b、c、およびdに示す。

【0104】

【表4-1】

表 4a

配列番号 3

化合物番号	開始部位	終結部位
356739	65	84
356740	73	92
356741	78	97
356742	87	106
356743	103	122
356744	117	136
288247	127	146
356745	132	151

表 4b

配列番号 4

化合物番号	開始部位	終結部位
356739	65	84
356740	73	92
356741	78	97
356742	87	106
356743	103	122
356744	117	136
288247	127	146
356745	132	151

【0105】

【表 4 - 2】

356746	148	167
356747	170	189
356748	190	209
356801	291	310
356755	312	331
288270	328	347
288271	333	352
288273	338	357
288274	340	359
288275	343	362
288276	345	364
356756	353	372
356757	381	400
356758	415	434
356759	441	460
356760	451	470
356761	459	478
356762	464	483
356763	473	492
356764	489	508
356765	524	543
356766	536	555
356767	547	566
356768	567	586
356769	591	610
356770	601	620
356771	619	638
356772	637	656
356773	668	687
356774	727	746
356775	746	765
356776	751	770
356777	757	776
356778	840	859
356779	860	879
356780	873	892
356781	888	907
356782	905	924
356783	961	980
356784	1022	1041
356785	1030	1049
356786	1050	1069
356787	1058	1077
356788	1093	1112
356789	1111	1130
356790	1118	1137
356791	1125	1144
356792	1170	1189
356793	1184	1203
356794	1227	1246
356795	1259	1278
356796	1288	1307
356797	1387	1406

356746	148	167
356747	170	189
356800	177	196
356750	201	220
356751	242	261
356752	253	272
356753	272	291
356754	277	296
356755	312	331
288270	328	347
288271	333	352
288273	338	357
288274	340	359
288275	343	362
288276	345	364
356756	353	372
356757	381	400
356758	415	434
356759	441	460
356760	451	470
356761	459	478
356762	464	483
356763	473	492
356764	489	508
356765	524	543
356766	536	555
356767	547	566
356768	567	586
356769	591	610
356770	601	620
356771	619	638
356772	637	656
356773	668	687
356774	727	746
356775	746	765
356776	751	770
356777	757	776
356778	840	859
356779	860	879
356780	873	892
356781	888	907
356782	905	924
356783	961	980
356784	1022	1041
356785	1030	1049
356786	1050	1069
356787	1058	1077
356788	1093	1112
356789	1111	1130
356790	1118	1137
356791	1125	1144
356792	1170	1189
356793	1184	1203

10

20

30

40

【 0 1 0 6 】

【表 4 - 3】

356798	1414	1433
356799	1478	1497

356794	1227	1246
356795	1259	1278
356796	1288	1307
356797	1387	1406
356798	1414	1433
356799	1478	1497

表 4c

配列番号 5

化合物番号	開始部位	終結部位
356739	65	84
356740	73	92
356741	78	97
356742	87	106
356743	103	122
356744	117	136
288247	127	146
356745	132	151
356746	148	167
356747	170	189
356748	190	209
356749	204	223
356750	230	249
356751	271	290
356752	282	301
356753	301	320
356754	306	325
356755	341	360
288270	357	376
288271	362	381
288273	367	386
288274	369	388
288275	372	391
288276	374	393
356756	382	401
356757	410	429
356758	444	463
356759	470	489
356760	480	499
356761	488	507
356762	493	512
356763	502	521
356764	518	537
356765	553	572
356766	565	584
356767	576	595
356768	596	615
356769	620	639
356770	630	649
356771	648	667
356772	666	685

表 4d

配列番号 6

化合物番号	開始部位	終結部位
356739	465	484
356740	473	492
356741	478	497
356742	487	506
356731	1499	1518
356732	2753	2772
356733	7057	7076
356744	7375	7394
288247	7385	7404
356745	7390	7409
356746	7406	7425
356734	7435	7454
356748	7545	7564
356750	7711	7730
356751	7752	7771
356752	7763	7782
356753	7782	7801
356754	7787	7806
356735	10635	10654
356755	10656	10675
288270	10672	10691
288271	10677	10696
288273	10682	10701
288274	10684	10703
288275	10687	10706
356736	10697	10716
356737	10721	10740
356738	12475	12494
356757	12503	12522
356758	12537	12556
356759	12563	12582
356763	12736	12755
356764	12752	12771
356765	12787	12806
356766	12799	12818
356767	12810	12829
356768	12830	12849
356769	12854	12873
356770	12864	12883
356771	12882	12901
356772	12900	12919

【 0 1 0 7 】

10

20

30

40

【表 4 - 4】

356773	697	716
356774	756	775
356775	775	794
356776	780	799
356777	786	805
356778	869	888
356779	889	908
356780	902	921
356781	917	936
356782	934	953
356783	990	1009
356784	1051	1070
356785	1059	1078
356786	1079	1098
356787	1087	1106
356788	1122	1141
356789	1140	1159
356790	1147	1166
356791	1154	1173
356792	1199	1218
356793	1213	1232
356794	1256	1275
356795	1288	1307
356796	1317	1336
356797	1416	1435
356798	1443	1462
356799	1507	1526

356773	12931	12960
356774	12990	13009
356775	13009	13028
356776	13014	13033
356777	13020	13039
356778	13103	13122
356779	13123	13142
356780	13136	13155
356781	13151	13170
356782	13168	13187
356783	13224	13243
356784	13285	13304
356785	13293	13312
356786	13313	13332
356787	13321	13340
356788	13356	13375
356789	13374	13393
356790	13381	13400
356791	13388	13407
356792	13433	13452
356793	13447	13466
356794	13490	13509
356795	13522	13541
356796	13551	13570
356797	13650	13669
356798	13677	13696
356799	13741	13760

10

20

上記のように、標的に対して、またはより好ましくは、活性のある標的セグメントに対して向けられたアンチセンスオリゴヌクレオチドは、約 13 個から約 80 個の結合させられたヌクレオ塩基であり得る。以下の表 4 e に、配列番号 1 を標的化するそのようなアンチセンスオリゴヌクレオチドの限定ではない例を提供する。

【0108】

【表 4 - 5】

表 4e

約13個から約35個のヌクレオ塩基までを有しているアンチセンスオリゴヌクレオチド

配列	長さ
CCATGATTTCTTAGGCAGCT	20ヌクレオ塩基(配列番号 76)
AATGCCATGATTTCT	15ヌクレオ塩基(配列番号 356)
GCCATGATTTCTTAG	15ヌクレオ塩基(配列番号 357)
ATGCCATGATTTCT	13ヌクレオ塩基(配列番号 358)
AATGCCATGATTTCTTAGGCAGCTC	24ヌクレオ塩基(配列番号 359)
TTTCTTAGGCAGCT	14ヌクレオ塩基(配列番号 360)
TGTCGAATGCCATGATTTCTTAGGCAGCTCACAGCT	35ヌクレオ塩基(配列番号 361)
CCATGATTTCTTAGGCAGCTCACAGCT	27ヌクレオ塩基(配列番号 362)
GATTTCTTAGGCAGCTCACAGCT	22ヌクレオ塩基(配列番号 363)

30

40

標的に対して、またはより好ましくは、活性のある標的セグメントに対して向けられたアンチセンスオリゴヌクレオチドにはまた、標的配列と比較した場合に不適合であるヌクレオ塩基をも含めることができる。以下の表 4 f には、配列番号 5 のヌクレオ塩基 282 から 301 を標的化するそのようなアンチセンスオリゴヌクレオチドの限定ではない例を提供する。不適合であるヌクレオ塩基には下線が付けた。当業者は、アンチセンス化合物が不適合を寛容することができるが、なおも標的部位とハイブリダイズするそれらの能力を保持しており、アンチセンス機構を通じて標的核酸を調節することを理解している。

【0109】

50

【表 4 - 6】

表4f

標的配列とは適合しない約1個から3個のヌクレオ塩基を有しているアンチセンスオリゴヌクレオチド

配列	配列番号5に対する不適合の数
CCATGATTTCTTAGGCAGCT (配列番号 76)	なし
CCATGATTTCTTAGGCATCT (配列番号 364)	1個の不適合
CCATGATCTCTTAGGCAGCT (配列番号 365)	1個の不適合
CCATGATTTCTTAGGCACAT (配列番号 366)	2個の不適合
GCATGATTTCTTAGGCCGCT (配列番号 367)	2個の不適合
CCTTGATACCTTAGGCAGCT (配列番号 368)	3個の不適合

10

20

30

アンチセンス化合物は、表 1 に公開されたヒト LMW - PTPase 標的核酸配列の 1 つ以上に対して設計し、そして LMW - PTPase をコードする標的核酸の発現を調節する化合物の能力を決定するためにインビトロでスクリーニングした。表 5 に示す化合物は全て、20ヌクレオチドの長さのキメラオリゴヌクレオチド（ギャップマー）であり、5 個のヌクレオチドの「羽」が両側（5' および 3'）に隣接している、10 個の 2' - デオキシヌクレオチドから構成される中心の「ギャップ」領域から構成されている。羽は、2' - O - (2 - メトキシエチル)ヌクレオチド（これは、2' - MOEヌクレオチドとしても知られている）から構成されている。ヌクレオチド間（骨格）結合は、オリゴヌクレオチドの始めから終わりまで完全にホスホロチオエートである。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、遺伝子標的の 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したような定量的リアルタイム PCR によって、ヒト LMW - PTPase にハイブリダイズするように設計したプライマー - プロブのセット（表 2）を使用して分析した。データは、LIPOFECTIN（登録商標）を使用して 65 nM の開示したオリゴマー化合物で A549 細胞を処理した 2 回の実験による平均である。発現の低下を、阻害率（%）として表 5 に表した。存在する場合には、「N.D.」は「決定しなかった」を示す。使用した対照のオリゴマー化合物は、配列番号 25 であった。

【0 1 1 0】

【表 5 - 1】

表5

2' - MOE羽とデオキシギャップを有しているキメラオリゴヌクレオチドによる
ヒトLMW-PTPase mRNAレベルの阻害

化合物番号	標的の配列番号	標的部位	配列(5' から3' の方向)	阻害率 (%)	配列番号
356801	3	291	CTTTGGTAATCTGCCGGGCA	36	54
288247	4	127	ACTGCTTCTGCAATGGGTGA	67	55
356800	4	177	CAATGACCCAATTCTCTGAG	16	56
288270	4	328	TCCATACATAGTATATAATC	39	57

40

【0 1 1 1】

【表 5 - 2】

化合物番号	標的の配列番号	標的部位	配列(5' から3' の方向)	阻害率 (%)	配列番号
288271	4	333	TTTCATCCATACATAGTATA	29	58
288273	4	338	ATTGCTTTCATCCATACATA	54	59
288274	4	340	AGATTGCTTTCATCCATACA	51	60
288275	4	343	CTCAGATTGCTTTCATCCAT	63	61
288276	4	345	CTCTCAGATTGCTTTCATCC	56	62
356739	5	65	AGCCTGTTCCGCCATCTCC	74	63
356740	5	73	GACTTGGTAGCCTGTCCGC	67	64
356741	5	78	GCACGGACTTGGTAGCCTGT	68	65
356742	5	87	ACACAAACAGCACGGACTTG	35	66
356743	5	103	CAAATGTTACCCAGACACAC	33	67
356744	5	117	CAATGGGTGATCGACAAATG	55	68
356745	5	132	TGAAAACCTGCTTCTGCAATG	54	69
356746	5	148	TCGGTTACAAGTTTCCTGAA	64	70
356747	5	170	CCAATTCTCTGAGATGTTTT	68	71
356748	5	190	GTTGCCGCGCTGTCTACCCCT	70	72
356749	5	204	ATGACCCACCGGAAGTTGCC	22	73
356750	5	230	TCCAGTCAGAAACAGCACCG	50	74
356751	5	271	TAGGCAGCTCACAGCTCTTG	59	75
356752	5	282	CCATGATTTCTTAGGCAGCT	76	76
356753	5	301	TTTATGGGCTGTGTGAATGC	56	77
356754	5	306	CTTGCTTTATGGGCTGTGTG	70	78
356755	5	341	AATCAAATGTGGCAAATCT	51	79
356756	5	382	ATTCAAATCTCTCAGATTGC	52	80
356757	5	410	TGCAGGTTTTAACTTGATTA	57	81
356758	5	444	GGATCATAGCTCCCAAGTAG	57	82
356759	5	470	GATCTTCAATAATAAGTTGT	55	83
356760	5	480	CCATAATAGGGATCTTCAAT	26	84
356761	5	488	AGTCATTCCCATAATAGGGA	52	85
356762	5	493	GTCAGAGTCATTCCCATAAT	60	86
356763	5	502	CGTCTCAAAGTCAGAGTCAT	62	87
356764	5	518	CACACTGCTGGTACACCGTC	74	88
356765	5	553	GTGGGCCTTCTCCAAGAACG	43	89
356766	5	565	GAACCTGCCTCAGTGGGCCT	74	90
356767	5	576	CAGCAGGGCACGAACCTGCC	38	91
356768	5	596	GGGTCTAGTCAGGCTGGCCG	67	92
356769	5	620	TGAGAAATGCAGGACCTCAG	80	93
356770	5	630	ACACACCGACTGAGAAATGC	64	94
356771	5	648	GGGCCCTGGAACGTGATTAC	55	95
356772	5	666	AACAAAGAGCTGGGCTTTGG	71	96
356773	5	697	CTTTTAAAGGTAAGAAACAG	25	97
356774	5	756	TGAATCAAAGATTTTATTG	15	98
356775	5	775	AAATACCCATAAGCTGTCT	45	99
356776	5	780	GCTTAAATACCCATAAGC	61	100
356777	5	786	AAGAATGCTTAAATACCCC	27	101
356778	5	869	CAAGTGAGGTTTTCTTCAT	67	102
356779	5	889	TAGATGTTGACCTGGGCCTT	61	103
356780	5	902	GTCTCAACAGGCTTAGATGT	53	104
356781	5	917	GACTCGATTATCTAAGTCTC	57	105
356782	5	934	AACCTACTGAAGAGGTAGAC	76	106
356783	5	990	AAGAGAGAGGTAGCACTGGG	45	107
356784	5	1051	CTAATCTAGACTGTGAGCTC	79	108

【 0 1 1 2 】

10

20

30

40

【表 5 - 3】

化合物番号	標的の 配列番 号	標的部位	配列(5'から3'の方向)	阻害率 (%)	配列番号
356785	5	1059	AAACACTICTAATCTAGACT	21	109
356786	5	1079	CTATGGGTGTGTAGAAATTA	67	110
356787	5	1087	AGTGTGCACTATGGGTGTGT	51	111
356788	5	1122	AAATGTTTCTCTCTCCCTA	31	112
356789	5	1140	GCCAACGACTGATTCCATAA	87	113
356790	5	1147	TGAAGGTGCCAACGACTGAT	79	114
356791	5	1154	GAAGTATTGAAGGTGCCAAC	80	115
356792	5	1199	GCCAATGGGCTGACCTCCTC	77	116
356793	5	1213	TGGTTCAGATGGGAGCCAAT	66	117
356794	5	1256	AAGTGTCCTTCTTCTGGAT	67	118
356795	5	1288	CATATTCCTCAACTGACCAT	31	119
356796	5	1317	TTGGGTTACATGTGCATAT	73	120
356797	5	1416	TGATGAAGAATACTTATTCA	49	121
356798	5	1443	ACATCTGCCTATACATTTAT	24	122
356799	5	1507	TCCCCAGTTTATTTTGAAT	37	123
356731	6	1499	GGAAGCAACTCATGATCTGG	63	124
356732	6	2753	AAATGATGCCATATAGTAGA	43	125
356733	6	7057	CTAATGATCCAGGAGTGAAT	39	126
356734	6	7435	TGGTACTTACATTCTCTGAG	23	127
356735	6	10635	CTTTGGTAATCTAAAATTGA	15	128
356736	6	10697	ACAGGATTACCTCAGATTGC	53	129
356737	6	10721	GTTGAACAGAAATATTCTTC	13	130
356738	6	12475	ATTCAAATCTCTGTAAATT	14	131

10

20

スクリーニングによって、ヒトLMW-PTPaseのmRNA配列の中の活性のある標的セグメント(特に、配列番号3、4、および5)を同定した。個々の活性のある標的セグメントは、少なくとも1つの活性のあるアンチセンスオリゴヌクレオチドによって標的化した。配列番号3について同定したこれらの活性のある領域には、80.5%の平均阻害率を有しているヌクレオチド1111から1189(領域A)、62.8%の平均阻害率を有しているヌクレオチド489から656(領域B)、64.1%の平均阻害率を有しているヌクレオチド536から656(領域C)、62.6%の平均阻害率を有しているヌクレオチド489から610(領域D)、77.6%の平均阻害率を有しているヌクレオチド1111から1203(領域E)、62.8%の平均阻害率を有しているヌクレオチド840から924(領域F)、55.6%の平均阻害率を有しているヌクレオチド1022から1069(領域G)、59.5%の平均阻害率を有しているヌクレオチド65から209(領域H)、55.2%の平均阻害率を有しているヌクレオチド65から136(領域I)、63.0%の平均阻害率を有しているヌクレオチド117から209(領域J)、および55.6%の平均阻害率を有しているヌクレオチド338から460(領域K)が含まれる。この領域の中で試験したオリゴヌクレオチドの半分以上が63%より大きく発現を阻害した。これらの領域の同定により、LMW-PTPaseの発現を調節するアンチセンスオリゴヌクレオチドを設計することが可能となる。

30

40

【0113】

配列番号4について同定した活性のある標的領域には、58.4%の平均阻害率を有しているヌクレオチド65から189(領域AA)、56.8%の平均阻害率を有しているヌクレオチド65から146(領域AB)、63.2%の平均阻害率を有しているヌクレオチド127から189(領域AC)、55.6%の平均阻害率を有しているヌクレオチド338から460(領域AD)、62.6%の平均阻害率を有しているヌクレオチド489から610(領域AE)、64.1%の平均阻害率を有しているヌクレオチド536から656(領域AF)、62.8%の平均阻害率を有しているヌクレオチド489から656(領域AG)、62.8%の平均阻害率を有しているヌクレオチド840から924(領域AH)、55.6%の平均阻害率を有しているヌクレオチド1022から1069(領域AI)、80.5%の平均阻害率を有しているヌクレオチド1111から118

50

9 (領域 A J)、および 77.6% の平均阻害率を有しているヌクレオチド 1111 から 1203 (領域 A K) が含まれる。

【0114】

配列番号 5 についての活性のある標的領域もまた同定した。これらの活性のある標的領域には、55.2% の平均阻害率を有しているヌクレオチド 65 から 136 (領域 B A)、63.0% の平均阻害率を有しているヌクレオチド 117 から 209 (領域 B B)、59.5% の平均阻害率を有しているヌクレオチド 65 から 209 (領域 B C)、55.6% の平均阻害率を有しているヌクレオチド 367 から 489 (領域 B D)、62.6% の平均阻害率を有しているヌクレオチド 518 から 639 (領域 B E)、64.1% の平均阻害率を有しているヌクレオチド 565 から 685 (領域 B F)、62.8% の平均阻害率を有しているヌクレオチド 518 から 685 (領域 B G)、62.8% の平均阻害率を有しているヌクレオチド 689 から 953 (領域 B H)、55.6% の平均阻害率を有しているヌクレオチド 1051 から 1098 (領域 B I)、80.53% の平均阻害率を有しているヌクレオチド 1140 から 1218 (領域 B J)、および 77.6% の平均阻害率を有しているヌクレオチド 1140 から 1232 (領域 B K) が含まれる。

10

【0115】

実施例 4

オリゴマー化合物によるマウス LMW-PTPase の発現のアンチセンス阻害

アンチセンス化合物を、表 1 に記載したマウスの LMW-PTPase 標的核酸配列の 1 つ以上に対して設計し、そして LMW-PTPase をコードする標的核酸の発現を調節する化合物の能力を決定するために、インビトロでスクリーニングした。表 6 に示す化合物は、全てキメラである、20 ヌクレオチドの長さのオリゴヌクレオチド(「ギャップマー」)であり、5 個のヌクレオチドの「羽」が両側(5' および 3')に隣接している、10 個の 2'-デオキシヌクレオチドから構成される中心の「ギャップ」領域から構成されている。羽は、2'-O-(2-メトキシエチル)ヌクレオチド(これは、2'-MOE ヌクレオチドとしても知られている)から構成されている。ヌクレオシド間(骨格)結合は、オリゴヌクレオチドの始めから終わりまで完全にホスホロチオエートである。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、遺伝子標的の 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したような定量的リアルタイム PCR によって、マウス LMW-PTPase にハイブリダイズするように設計したプライマー-プローブのセット(表 2)を使用して分析した。データは、LIPOFECTIN(登録商標)を使用して 75 nM の開示したオリゴマー化合物で b.END 細胞を処理した 2 回の実験による平均である。発現の低下を、阻害率(%)として表 6 に表した。使用した対照のオリゴマー化合物は、配列番号 25 であった。存在する場合には、「N.D.」は「決定しなかった」を示す。

20

30

【0116】

【表 6 - 1】

表 6

2'-MOE 羽とデオキシギャップを有しているキメラオリゴヌクレオチドによる
マウス LMW-PTPase mRNA レベルの阻害

40

化合物番号	標的の配列番号	標的部位	配列(5' から 3' の方向)	阻害率 (%)	配列番号
288290	11	207	CTGTCTGACTCAAATGCTTT	69	132
288291	11	252	GGTCAGAGGTTTAGTTAGTC	80	133
288292	11	493	TCCGTCTGCGGTTTTATGTA	4	134
288293	11	982	GTGGTGCTCTGTTGAGGTGT	0	135
288216	12	3	TTGCTTAGTCTATAACTGAC	0	136

【0117】

【表 6 - 2】

化合物番号	標的の配列番号	標的部位	配列(5' から3' の方向)	阻害率 (%)	配列番号
288217	12	13	ATGATGGAGATTGCTTAGTC	0	137
288218	12	24	AAATATGCTAAATGATGGAG	0	138
288219	12	40	GCTTCCTGTGCACCAGAAAT	64	139
288220	12	48	CTCACGTTGCTTCCTGTGCA	0	140
288221	12	79	ACTTTGTAATGGGAGTAGAT	3	141
288222	12	90	TATAATGGTAGACTTTGTAA	0	142
288223	12	114	TAGAGAATGCAAGCATATCA	0	143
288224	12	123	TTCAATTAATAGAGAATGCA	0	144
288225	12	149	ACATATACACATGAGTTGTA	0	145
288226	12	159	CTTTGTAATGACATATACAC	0	146
288227	12	164	AAACTCTTTGTAATGACATA	0	147
288228	12	179	TGCTTCCATGAAGCAAACT	0	148
288229	12	189	GATACTTTCATGCTTCCATG	0	149
288230	12	196	AATATGTGATACTTTCATGC	0	150
288231	12	202	GCCATAAATATGTGATACIT	0	151
288232	12	232	AGACCCCTCAATTTCTCTAAT	14	152
288233	12	248	TGCCATGTTTCGGTGCAGAC	75	153
288234	12	253	ACCTCTGCCATGTTTCGGTG	64	154
288235	12	266	TGACTTGGACCCAACCTCTG	59	155
288236	12	273	ACAGCACTGACTTGGACCCA	75	156
288237	12	277	ACGAACAGCACTGACTTGGGA	61	157
288238	12	281	ACACACGAACAGCACTGACT	62	158
288239	12	289	TTACCGAGACACACGAACAG	52	159
288240	12	293	AATGTTACCGAGACACACGA	53	160
288241	12	296	GCAAATGTTACCGAGACACA	56	161
288242	12	304	GGTGACCGGCAAATGTTACC	68	162
288243	12	306	TGGGTGACCGGCAAATGTTA	61	163
288244	12	309	CAATGGGTGACCGGCAAATG	62	164
288245	12	310	GCAATGGGTGACCGGCAAAT	81	165
288246	12	317	TGCTTCTGCAATGGGTGACC	77	166
288247	12	319	ACTGCTTCTGCAATGGGTGA	83	55
288248	12	321	ATACTGCTTCTGCAATGGGT	73	167
288249	12	323	GAATACTGCTTCTGCAATGG	76	168
288250	12	325	CTGAATACTGCTTCTGCAAT	59	169
288251	12	328	TTCTGAATACTGCTTCTGCA	73	170
288252	12	334	ACCAGTTTCTGAATACTGC	79	171
288253	12	338	AGTTACCAGTTTCTGAATA	63	172
288254	12	343	TCATCAGTTACCAGTTTCT	57	173
288255	12	347	CTTTTCATCAGTTACCAGTT	63	174
288256	12	350	AACCTTTTCATCAGTTACCA	67	175
288257	12	358	TTATCTGAAACCTTTTCATC	48	176
288258	12	360	AATTATCTGAAACCTTTTCA	49	177
288259	12	365	GGCCCAATTATCTGAAACCT	57	178
288260	12	367	ATGGCCCAATTATCTGAAAC	43	179
288261	12	375	TGCTGTCAATGGCCCAATTA	62	180
288262	12	379	GCGCTGCTGTCAATGGCCCA	61	181
288263	12	406	GGCCGGCCACGTTCCAGTC	65	182
288264	12	493	GCAAAGTCTTCTTTGTAAAT	57	183
288265	12	499	AATGTGGCAAAGTCTTCTTT	54	184
288266	12	505	TAATCGAATGTGGCAAAGTC	59	185
288267	12	510	GTATATAATCGAATGTGGCA	80	186

10

20

30

40

【表 6 - 3】

化合物番号	標的の配列番号	標的部位	配列(5' から3' の方向)	阻害率 (%)	配列番号
288268	12	511	AGTATATAATCGAATGTGGC	76	187
288269	12	518	CATACATAGTATATAATCGA	52	188
288270	12	520	TCCATACATAGTATATAATC	60	57
288271	12	525	TTTCATCCATACATAGTATA	57	58
288272	12	526	CTTTCATCCATACATAGTAT	57	189
288273	12	530	ATTGCTTTCATCCATACATA	71	59
288274	12	532	AGATTGCTTTCATCCATACA	70	60
288275	12	535	CTCAGATTGCTTTCATCCAT	73	61
288276	12	537	CTCTCAGATTGCTTTCATCC	78	62
288277	12	538	TCTCTCAGATTGCTTTCATC	66	190
288278	12	540	GATCTCTCAGATTGCTTTC	70	191
288279	12	545	ATTGAGATCTCTCAGATTGC	61	192
288280	12	549	TTCTATTGAGATCTCTCAGA	65	193
288281	12	572	GCAGTTTTTAACTTGATTAC	61	194
288282	12	626	AATGATGAGCTGTTTCTGTG	53	195
288283	12	636	AGGGATCTTCAATGATGAGC	59	196
288284	12	639	AATAGGGATCTTCAATGATG	48	197
288285	12	663	CCTCGAAGTCAGAGTCATTG	82	198
288286	12	668	CACCACCTCGAAGTCAGAGT	81	199
288287	12	673	TGGTACACCACCTCGAAGTC	74	200
288288	12	678	ATTGCTGGTACACCACCTCG	75	201

実施例 5

オリゴマー化合物によるラット LMW - PTPase の発現のアンチセンス阻害

アンチセンス化合物を、表 1 に記載したラットの LMW - PTPase 標的核酸配列の 1 つ以上に対して設計し、そして LMW - PTPase をコードする標的核酸の発現を調節する化合物の能力を決定するために、インビトロでスクリーニングした。表 7 に示す化合物は、全てキメラである、20ヌクレオチドの長さのオリゴヌクレオチド(「ギャップマー」)であり、5 個のヌクレオチドの「羽」が両側(5' および 3')に隣接している、10 個の 2'-デオキシヌクレオチドから構成される中心の「ギャップ」領域から構成されている。羽は、2'-O-(2-メトキシエチル)ヌクレオチド(これは、2'-MOEヌクレオチドとしても知られている)から構成されている。ヌクレオチド間(骨格)結合は、オリゴヌクレオチドの始めから終わりまで完全にホスホロチオエートである。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、遺伝子標的の 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したような定量的リアルタイム PCR によって、ラット LMW - PTPase にハイブリダイズするように設計したプライマー-プローブのセット(表 2)を使用して分析した。データは、LIPOFECTIN(登録商標)を使用して 50 nM の開示したオリゴマー化合物で A10 細胞を処理した 2 回の実験による平均である。発現の低下を、阻害率(%)として表 7 に表した。使用した対照のオリゴマー化合物は、配列番号 25 であった。存在する場合には、「N.D.」は「決定しなかった」を示す。

【0119】

【表 7 - 1】

表 7

2'-MOE羽とデオキシギャップを有しているキメラオリゴヌクレオチドによる
ラット LMW-PTPase の mRNA レベルの阻害

化合物番号	標的の配列番号	標的部位	配列(5' から3' の方向)	阻害率 (%)	配列番号
288289	15	403	ACCTCGAAGTCAGAGTCATT	70	202

10

20

30

40

50

【 0 1 2 0 】

【 表 7 - 2 】

化合物番号	標的の配列番号	標的部位	配列(5' から3' の方向)	阻害率 (%)	配列番号
288233	16	24	TGCCATGTTTCGGTGCAGAC	74	153
288234	16	29	ACCTCTGCCATGTTTCGGTG	83	154
355621	16	36	GGACCCAACCTCTGCCATGT	89	203
288235	16	42	TGACTTGGACCCAACCTCTG	73	155
288238	16	57	ACACACGAACAGCACTGACT	29	158
288239	16	65	TTACCGAGACACACGAACAG	34	159
288241	16	72	GCAAATGTTACCGAGACACA	50	161
288274	16	308	AGATTGCTTTCATCCATACA	54	60
288286	16	444	CACCACCTCGAAGTCAGAGT	69	199
288287	16	449	TGGTACACCACCTCGAAGTC	81	200
288288	16	454	ATTGCTGGTACACCACCTCG	69	201
355622	16	461	CTAAGGCATTGCTGGTACAC	72	204
355623	16	466	AGCACCTAAGGCATTGCTGG	74	205
355624	16	471	CTTGCAGCACCTAAGGCATT	74	206
355625	16	476	AAGGCCTTGCAGCACCTAAG	83	207
355626	16	481	CCAGGAAGGCCTTGCAGCAC	86	208
355627	16	486	CTTCTCCAGGAAGGCCTTGC	79	209
355628	16	492	GTGAGTCTTCTCCAGGAAGG	82	210
355629	16	504	TAGGACCAGCTAGTGAGTCT	74	211
355630	16	519	CTCAGTGGTGGTGGTTAGGA	55	212
355631	16	556	GCCACCACCCTTGGGCACAG	78	213
355632	16	567	GGCTAAGGACTGCCACCACC	78	214
355633	16	607	GATATACAGTAAGTCAGCTG	80	215
355634	16	625	ACCTACAATTATTTAAAGA	15	216
355635	16	633	TGATTTCCACCTACAATTAT	52	217
355636	16	638	ATGCCTGATTTCCACCTACA	91	218
355637	16	647	TCTGAACAAATGCCTGATT	82	219
355638	16	674	AATGTCTGCCTCAAATGTTT	73	220
355639	16	680	ACCTCAAATGTCTGCCTCAA	78	221
355640	16	687	GAGCCACACCTCAAATGTCT	89	222
355641	16	700	GTCTAAGAATACTGAGCCAC	87	223
355642	16	706	TTGTTAGTCTAAGAATACTG	52	224
355643	16	725	TATGGCGAGGCCAGAGCTTT	77	225
355644	16	735	ATTTTGTAATTATGGCGAGG	60	226
355645	16	753	ACAGTTGCTCGTTCCTACTAT	92	227
355646	16	759	TGTTCCACAGTTGCTCGTTC	95	228
355647	16	795	CCTTGTGGGTCACTTCTTACT	71	229
355648	16	819	GCTGGGCTCAAAGGCTGATC	67	230
355649	16	841	TTAGACCAGACTACCCAGGC	80	231
355650	16	853	CTCACACTCCAGTTAGACCA	63	232
355651	16	871	CACTGGGTGCTGGCCATGCT	70	233
355652	16	890	GTAAGGCAAGCAAACAGCAC	40	234
355653	16	924	TTGTCACAATAAGAGACAAT	55	235
355654	16	931	GGAGATATGTTCACAATAAG	85	236
355655	16	939	CCATGGATGGAGATATTGTC	82	237
355656	16	944	GGCTGCCATGGATGGAGATA	79	238
355657	16	952	AAATGGAAGGCTGCCATGGA	80	239
355658	16	958	AGTGTTAAATGGAAGGCTGC	59	240
355659	16	970	TTAAACTCTCCAGTGTTAA	76	241
355660	16	976	CTGGGTTTAAACTCTCCAG	80	242
355661	16	1013	GGTCTCCTCTCTCAAATAT	82	243

10

20

30

40

【 0 1 2 1 】

【表 7 - 3】

化合物番号	標的の配列番号	標的部位	配列 (5' から3' の方向)	阻害率 (%)	配列番号
355662	16	1038	AGTTCCAGGCCCATCATCAC	61	244
355663	16	1050	ATGGCCTGCTGGAGTTCCAG	67	245
355664	16	1089	TTTTATCTTTTCAGACAGGG	19	246
355665	16	1103	CCCATCTGTTAGCATTTTA	73	247
355666	16	1111	CTGTTGCTCCCATCTGTTAG	80	248
355667	16	1125	TTAACTTCACCAACCTGTTG	85	249
355668	16	1169	CCAAGCTCAAGAACTACAC	69	250
355669	16	1187	AAGTGGCTCAAATAGGAACC	31	251
355670	16	1206	CTTTCTCTTAAAGAAGCAA	24	252
355671	16	1215	GCACACTTACTTTCTCTTA	84	253
355672	16	1228	CACCACTATTTAAGCACACT	28	254
355673	16	1237	ACAAACGCACACCACTATTT	62	255
355674	16	1255	GTTGATGAGAGAACTTAC	79	256
355675	16	1270	GTAACCTTTGTAATGTTGA	46	257
355676	16	1286	TACTCATGCTTGCCGTAA	90	258
355677	16	1312	GTCCCTTTTCTGAAAATACA	78	259
355678	16	1323	ATAAATTTGAGGTCCCTTT	66	260
355679	16	1331	ATATCCACATAAATTGAGG	68	261
355680	16	1345	ATCTTTTCTGACATATATCC	64	262
355613	17	3444	TCTCCAGTGGCAAAGACAAA	30	263
355614	17	5834	AAGCAAGAAACTATGCGGGA	45	264
355615	17	8275	CATACGGTACCTGCCGTGCA	53	265
355616	17	8312	CAATGGCCCACTGTAACACA	70	266
355617	17	13156	GAGTACATTTGAAGTTAAAA	45	267
355618	17	13309	CTCTTGTAATCTACAATTAA	3	268
355619	17	13459	TATACCTGAGTTCAAGGTCA	57	269
355620	18	204	CTCTTGTAATCTGTCTTGCC	27	270

実施例 6

2' - MOE 羽とデオキシギャップを有してい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マウス LMW - PTPase の mRNA レベルの阻害：用量応答試験

さらなる実施形態において、6 種類のオリゴヌクレオチドを、用量応答試験のために選択した：化合物番号 288285、化合物番号 288276、化合物番号 288268、化合物番号 288286、化合物番号 288267、および化合物番号 288291。化合物番号 129689 (GAGGTCTCGACTTACCCGCT、配列番号 271 として本明細書中に組み入れられる) および化合物番号 129695 (TCTTACCTCGCGCGATTAC、配列番号 272 として本明細書中に組み入れられる) は、LMW - PTPase に対しては標的化されておらず、ネガティブ対照として使用した。化合物番号 129689 と化合物番号 129695 は、20 ヌクレオチドの長さのキメラオリゴヌクレオチド (「ギャップマー」) であり、5 個のヌクレオチドの「羽」が両側 (5' および 3' 方向) に隣接している、10 個の 2' - デオキシヌクレオチドから構成される中心の「ギャップ」領域から構成されている。羽は、2' - O - (2 - メトキシエチル) (2' - MOE) ヌクレオチドから構成されている。ヌクレオチド間 (骨格) 結合は、オリゴヌクレオチドの始めから終わりまで完全に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。

【0122】

オリゴヌクレオチドを、CYTOFECTIN (登録商標) 試薬 (Gene Therapy Systems, San Diego, CA) を使用して細胞にトランスフェクトした。b. END 細胞を、12.5 nM、25 nM、50 nM、または 100 nM のオリゴヌクレオチドで処理した。処理しなかった対照細胞を対照とし、データはこれに対して正規化した。LMW - PTPase レベルを測定するための定量的リアルタイム PCR を本明細書中に記載したように行った。

【0123】

10

20

30

40

50

データは3回の実験による平均であり、そして結果を、処理しなかった対照と比較した阻害率(%)として表8に示す。いずれの対照オリゴヌクレオチド(化合物番号129689または化合物番号129695)も、この実験ではLMW-PTPaseのmRNAの発現を阻害しなかった。

【0124】

【表8】

表8

マウスb. END細胞中でのマウスLMW-PTPaseのmRNA発現の阻害：用量応答試験

化合物番号	配列番号	阻害率(%)			
		オリゴヌクレオチドの用量 (nM)			
		12.5	25	50	100
288267	186	60	74	88	93
288268	187	54	72	80	93
288276	62	23	47	68	85
288285	198	11	41	67	86
288286	199	50	69	86	96
288291	133	72	82	90	92

10

表8に示したように、化合物番号288267、化合物番号288268、化合物番号288276、化合物番号288285、化合物番号288286、および化合物番号288291は、用量依存性の様式でマウスLMW-PTPaseのmRNAの発現を阻害した。

20

【0125】

実施例7

2'-MOE羽とデオキシギャップを有してい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ラットLMW-PTPaseのmRNAレベルの阻害：用量応答試験

さらなる実施形態において、7種類のオリゴヌクレオチドを、用量応答試験のために選択した：化合物番号355621、化合物番号355636、化合物番号355676、化合物番号355626、化合物番号355654、化合物番号355640、および化合物番号355641。化合物番号15770、化合物番号129690(TTAGAATACGTCGCGTTATG、配列番号273として本明細書中に組み入れられる)および化合物番号141923(CCTTCCTGAAAGGTTCTCC、配列番号274として本明細書中に組み入れられる)は、LMW-PTPaseに対しては標的化されておらず、ネガティブ対照として使用した。化合物番号129690と化合物番号141923は、20ヌクレオチドの長さのキメラオリゴヌクレオチド(「ギャップマー」)であり、5個のヌクレオチドの「羽」が両側(5'および3'方向)に隣接している、10個の2'-デオキシヌクレオチドから構成される中心の「ギャップ」領域から構成されている。羽は、2'-O-メトキシエチル(2'-MOE)ヌクレオチドから構成されている。ヌクレオチド間(骨格)結合は、オリゴヌクレオチドの始めから終わりまで完全に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。

30

40

【0126】

ラットの初代肝細胞を、オリゴヌクレオチドを、本明細書中に記載したLIPOFECTIN(登録商標)を使用して、12.5nM、25nM、50nM、100nM、または200nMのオリゴヌクレオチドで処理した。処理しなかった対照細胞を対照とし、データはこれに対して正規化した。ラットのLMW-PTPaseレベルを測定するためのトランスフェクション混合物での処理と、定量的リアルタイムPCRはいずれも、本明細書中に記載したように行った。

【0127】

これらの実験の結果を表9に示す。データは、4回の実験による平均であり、そして処理しなかった対照と比較した阻害率(%)として示す。試験したいずれの対照オリゴヌク

50

レオチド（化合物番号 1 4 1 9 2 3、化合物番号 1 5 7 7 0 または化合物番号 1 2 9 6 9 0）も、4%を超えるラットの LMW-PTPase の阻害は生じなかった。化合物番号 1 5 7 7 0 で処理した細胞によるデータを表 8 に示し、これは、対照のオリゴヌクレオチドでの処理の典型である。

【0128】

【表 9】

表9

ラットの初代肝細胞の中でのラットLMW-PTPaseのmRNA発現の阻害：用量応答

化合物番号	配列番号	阻害率(%)				
		オリゴヌクレオチドの用量 (nM)				
		12.5	25	50	100	200
355621	203	17	29	52	70	82
355626	208	6	17	33	48	70
355636	218	17	27	43	64	80
355640	222	19	31	55	73	84
355641	223	14	31	46	65	80
355654	236	18	25	42	66	81
355676	258	15	24	49	62	77
15770	31	0	1	0	4	0

10

表 9 に示したように、化合物番号 3 5 5 6 2 1、化合物番号 3 5 5 6 2 6、化合物番号 3 5 5 6 3 6、化合物番号 3 5 5 6 4 0、化合物番号 3 5 5 6 4 1、化合物番号 3 5 5 6 5 4、および化合物番号 3 5 5 6 7 6 は、用量依存性の様式で LMW-PTPase の mRNA 発現を阻害した。

20

【0129】

実施例 8

インビボでの LMW-PTPase の発現のアンチセンス阻害：ob/ob マウス

レプチンは、食欲を調節する、脂質によって生産されるホルモンである。このホルモンの不足は、ヒトおよびヒト以外の動物のいずれにおいても、肥満を導く。ob/ob マウスは、肥満および高血糖を生じるレプチン遺伝子の中に変異を有している。このように、これらのマウスは、肥満および糖尿病の研究、ならびに、これらの症状を処置するために設計された処置の有用なモデルである。ob/ob マウスは、インシュリンの高い循環レベルを有しており、そしてレプチン受容体の中に変異を有している db/db マウスよりも高血糖性は低い。本発明にしたがい、本発明のオリゴマー化合物を、肥満および糖尿病の ob/ob モデルにおいて試験した。

30

【0130】

C57B1/6J-Lep ob/ob マウス (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) に、25 mg/kg の用量で、1 週間に 2 回、4 週間の間、化合物番号 2 8 8 2 6 7 (配列番号 1 8 6) を皮下注射した (n = 5)。生理食塩水を注射した動物を対照とした (n = 4)。処置期間の後、マウスを屠殺し、そして標的レベルを肝臓および脂肪の中で評価した。RNA の単離と標的 mRNA の発現レベルの定量を、本明細書中の他の実施例によって記載したように行った。化合物 2 8 8 2 6 7 で処置した動物は、平均すると、生理食塩水で処置した対照の動物と比較して、肝臓の LMW-PTPase レベルの 90% の低下を示した。副睾丸脂肪の中の LMW-PTPase mRNA レベルは、化合物番号 2 8 8 2 6 7 で処置した動物においては、平均すると 70% 低下した。

40

【0131】

標的 mRNA の阻害によって生じる生理学的効果を評価するために、ob/ob マウスを、血清トリグリセリド濃度および血清グルコース濃度について処置期間 (28 日間) の終わりに評価した。これらのパラメーターは、日常的に使用している臨床分析装置 (例えば、Olympus Clinical Analyzer, Melville, NY)

50

によって測定した。28日目の、生理食塩水で処置した対照動物について測定した平均のトリグリセリド濃度は、168 mg / d Lであったが、化合物番号288267で処置した動物についての平均は75 mg / d Lであった。28日目の、生理食塩水だけで処置した動物についてのグルコース濃度は491 mg / d Lであり、そして化合物番号288267で処置した動物については258 mg / d Lであった。したがって、化合物番号288267での処置によって、グルコース濃度およびトリグリセリド濃度を実質的な低下が生じた。したがって、本発明の1つの実施形態は、本発明のオリゴマー化合物を投与することによりグルコース濃度を低下させる方法であり、そして本発明の別の実施形態は、本発明のオリゴマー化合物を投与することによりトリグリセリド濃度を低下させる方法である。1つの実施形態においては、トリグリセリド濃度は、血液、血漿、または血清トリグリセリド濃度である。本発明の別の実施形態は、動物の症状を緩和するまたは症状の重篤度を低下させる方法である。いくつかの実施形態においては、症状は糖尿病である。いくつかの実施形態においては、糖尿病はI I型糖尿病である。他の実施形態においては、症状は、メタボリック症候群である。

10

20

30

40

50

【0132】

グルコースの代謝に対する標的mRNAの阻害の効果をさらに評価するために、空腹時血清グルコース濃度を、日常的に行っている臨床的分析によって測定した。化合物番号288267で処置した動物についての平均の空腹時血清グルコース濃度は194 mg / d Lであり、一方、生理食塩水だけで処置した動物について測定した平均の空腹時濃度は330 mg / d Lであった。したがって、本発明の別の実施形態は、血清グルコース濃度を低下させる方法である。

【0133】

インシュリン濃度もまた、市販されているキット（例えば、Alpcoインシュリン特異的ELISAキット、Windham, NH）を使用して処置の4週間後に測定した。化合物番号288267での処置によっては、循環している血漿インシュリン濃度の約45%の低下が生じた。インシュリン濃度の低下は、インシュリン感受性の改善を示すことができる。1つの実施形態においては、本発明により、インシュリン感受性を改善する方法が提供される。さらなる実施形態においては、低いインシュリン濃度がインシュリン感受性の改善の指標である。

【0134】

実験の終了時点でマウスを屠殺し、そして組織の重量を測定した。平均の肝臓および脾臓の重量は、生理食塩水で処置した対照と比較すると、化合物番号288267での処置によっては実質的には変化しなかった。精巣上体の白色脂肪組織の重量は、化合物288267で処置した動物においては約10%低下した。したがって、本発明の別の実施形態は、本発明のオリゴマー化合物を投与することによる動物の脂肪過多症を軽減する方法である。

【0135】

実施例9

ob / obマウスのインシュリン受容体のリン酸化に対するLMW - PTPaseのアンチセンス阻害の効果

受容体のリン酸化に対するLMW - PTPaseの阻害の効果を評価するために、インシュリンのポーラス(2 U / kg)を、実施例8に記載したように化合物番号288267(配列番号186)または生理食塩水で処置したob / obマウスのグループに投与し、約8から9分後に屠殺した。肝臓試料をプールし、標準的な免疫沈降とウェスタンブロットの手順および分析を行った。簡単に説明すると、組織を溶解緩衝液(150 mMのNaCl、50 mMのTris、pH 7.5、1%のTriton X - 100、0.5%のNP - 40、0.25%のNa deoxycholate、1 mMのEDTA、1 mMのEGTA、1 mMのNaOAc、1 mMのNaF、およびプロテアーゼ阻害剤混合液I(Calbiochem)の中に溶解させた。溶解物を12000 gで15分間の遠心分離によって明澄化させた。明澄化させた溶解物を、最初に、プロテインアガロースA / Gビ

ーズ（１：１の割合）とともに４でさらに３～４時間インキュベートし、その後、抗ホスホチロシン抗体とともに４で３～４時間インキュベーションした。その後、免疫複合体を溶解緩衝液で洗浄し、Laemmli's 試料緩衝液中でボイルし、そしてウェスタンブロットによって分析した。メンブレンを市販されている抗インシュリン受容体（IR-）サブユニット抗体（Santa Cruz, CA）でブロットした。シグナルを、市販されているHRP結合ヤギ抗ウサギIgG抗体とECLを使用することによって検出した。

【0136】

得られるビーズの定量は、生理食塩水で処置した対照について測定したものに対して比較した、化合物番号288267で処置した動物に由来する試料中でインシュリン刺激した場合に、インシュリン受容体のリン酸化がおよそ４から６倍増加することを示していた。これらのデータは、LMW-PTPaseに対して標的化させたアンチセンスオリゴヌクレオチドで処置すると、インシュリン感受性が改善されることを示唆している。

10

【0137】

実施例10

ob/obマウスのPI3-K活性に対するLMW-PTPaseのアンチセンス阻害の効果

インシュリン受容体によるシグナル伝達経路におけるLMW-PTPaseの役割をさらに評価するため、およびインシュリンの作用に対するLMW-PTPaseのアンチセンス阻害の効果を評価するために、明澄化した溶解物を、実施例8および実施例9に記載したように処置したob/obマウスの肝臓または脂肪組織から実施例11に記載したように調製し、そしてさらなる分析を行った。

20

【0138】

ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ（PI3-K）は、インシュリン受容体での刺激の下流で活性化される酵素である。PI3-K活性を当該分野で公知の方法を使用して測定した（Pandey et al., Biochemistry, 1998, 37, 7006-7014）。簡単に説明すると、明澄化した溶解物を、４で２時間、IRS-1/2抗体（1μg）で免疫沈降させ、その後、プロテインA/Gセファローズと共にさらに２時間インキュベーションした。免疫複合体を洗浄し、インビトロでPI3-Kアッセイを、外因性の基質としてL- -ホスファチジルイノシトール（PI）を使用して行った。リン酸化された脂質を単離し、そして薄層クロマトグラフィー（TLC）によって分離した。TLCプレートをKodakフィルムに感光させ、そしてPI3-K活性の産物（PIP2）が結合した放射活性のあるスポットを、TLCプレートから引っ掻いて取り、そしてシンチレーションカウンターでカウントした。シンチレーションカウントによる結果の平均を、インシュリンで処置したグループ、またはインシュリンで処置しなかったグループのそれぞれに由来する肝臓について、恣意的単位で表10に示す。免疫沈降に使用した抗体を、「IP」と標示した列に示す（IRS-1またはIRS-2）。

30

【0139】

【表 10】

表10
ob/obマウスの肝臓の中のPI3-K活性に対するLMW-PTPaseのアンチセンス阻害
の効果

処置グループ	IP	PI3-K 活性 (恣意的単位)	
		-インシュリン	+インシュリン
生理食塩水	IRS-1	260853	257907
化合物番号 288267	IRS-1	291982	674202
生理食塩水	IRS-2	596	677
化合物番号 288267	IRS-2	679	1092

10

表 10 に示したように、化合物番号 288267 (配列番号 186) は、生理食塩水で処置した動物について観察された増大を上回る、インシュリンで刺激された PI3-K 活性の増大を生じた。

【0140】

シンチレーションカウントによるおよその結果を、インシュリンで処置したグループ、またはインシュリンで処置しなかったグループのそれぞれに由来する脂肪組織について、恣意的単位での平均として表 11 に示す。免疫沈降に使用した抗体は IRS-1 である。

20

【0141】

【表 11】

表11
ob/obマウスの脂肪組織中でのPI3-K活性に対する
LMW-PTPaseのアンチセンス阻害の効果

処置グループ		PI3-K 活性 (恣意的単位)	
		-インシュリン	+インシュリン
生理食塩水		319	365
化合物番号 288267		438	725

30

表 11 に示したように、化合物番号 288267 は、生理食塩水で処置した動物について観察された増大を上回る、インシュリンで刺激された PI3-K 活性の増大を生じた。まとめると、これらの結果は、インシュリン作用における LMW-PTPase の新規の役割を明らかにしており、そして、LMW-PTPase のアンチセンス阻害によって、ob/ob マウスにおけるインシュリンシグナル伝達が改善されることを示している。したがって、本発明の別の実施形態は、本発明のオリゴマー化合物を投与することにより動物でのインシュリンシグナルの伝達を改善する方法である。

40

【0142】

実施例 11

インシュリンシグナル伝達に対する LMW-PTPase のアンチセンス阻害の効果：インビトロでの実験

本発明にしたがうと、インシュリンシグナル伝達に対する LMW-PTPase に対して標的化させられたアンチセンスオリゴの効果、本明細書中に記載した方法を使用して、ob/ob マウスから培養した初代肝細胞中で研究した。ob/ob 初代肝細胞を、化合物番号 288267 (配列番号 186) または対照のオリゴヌクレオチドである化合物番号 141923 (配列番号 274) で、本明細書中に記載したトランスフェクション方法によって処置した。処置した細胞を、インシュリンが存在しない条件で、または 100 nM のインシュリンの存在下で 10 分間インキュベートした。トランスフェリン試薬だけ

50

で処理した細胞を対照とした。

【0143】

細胞溶解物を調製し、そして、抗ホスホチロシン抗体で免疫沈降させ、続いて、抗IR-抗体(Santa Cruz, CA)を使用して、標準的な方法によってウェスタンブロット分析を行った。化合物番号288267で処置した細胞は、対照細胞または化合物番号141923で処置した細胞について観察されたよりも、インシュリンで刺激したIR-のリン酸化の大幅な増加を示した。

【0144】

リン酸化Aktを認識する市販されている抗体(Cell Signaling, Boston, MA)を使用した同様の実験において、化合物番号288267で処理した細胞は、対照細胞または化合物番号141923で処置した細胞について観察されたよりも、インシュリンで刺激したAktのリン酸化の大幅な増加を示した。これらのデータは、LMW-PTPaseがインシュリンシグナル伝達経路において役割を担っていることを示している。

【0145】

LMW-PTPaseの発現レベルのアンチセンス化合物による調節を、初代マウス肝細胞を使用して、上記で記載したように100ngの化合物288267または媒体で細胞を処理することによって決定した。インキュベーション後、細胞をRTL緩衝液中で溶解させ、全RNAをQIAGEN RNA easyキット(Qiagen, Valencia, CA)を使用して単離した。RT-PCRを上記のように行った。これらのデータは、対照と比較するとLMW-PTPaseのmRNAレベルにおけるおよそ90%の低下を示した。LMW-PTPaseのタンパク質レベルにおける対応する低下が、LMW-PTPaseタンパク質のウェスタンブロット分析によって見られた。興味深いことに、対照細胞(Upsstate Cell Signaling Solutionsから入手できる抗体)と比較すると、化合物288267の存在下でのPTP1bレベルには有意な低下はなかった。

【0146】

インシュリンシグナル伝達経路に対するLMW-PTPaseアンチセンス化合物の作用をさらに決定するために、初代マウス肝細胞が含まれている2連の細胞培養ウェルを、化合物番号288267、化合物番号288291、対照の化合物番号141923、PTP1bのアンチセンス阻害剤、または対照番号288291とPTP1bのアンチセンス阻害剤との組み合わせのいずれかの100ngで処理した。さらに、生理食塩水で処理した細胞を使用した。それぞれの処置グループについて、ウェルの1つを5nMのインシュリンとともに10分間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を、リン酸化IR-、ホスホAkt、リン酸化されていないAkt、PTP1b、またはLMW-PTPaseのレベルについて、ウェスタンブロット技術を使用して分析した。これらのデータは、IR-がLMW-PTPaseアンチセンス化合物の存在下ではリン酸化されるが、PTP-1bアンチセンス化合物が単独で存在する条件、またはLMW-PTPaseアンチセンス化合物と組み合わせてPTP-abアンチセンス化合物が存在する条件のいずれにおいてもリン酸化されないことを示している。ウェスタンブロット技術は当業者に周知であり、抗体は多数の市販の供給業者(例えば、Upsstate Cell Signaling Solutions, Charlottesville, VA)から容易に入手することができる。(Haelelow, E and Lane, D., Antibodies: A Laboratory Manual, (1988) Cold Spring Harbor Press)。

【0147】

実施例12

ヒトLMW-PTPaseを標的化するオリゴマー化合物の設計

ヒトLMW-PTPaseの様々な領域を標的化するように、表1に記載した公開されている配列を使用して、オリゴマー化合物のシリーズを設計した。化合物を表12に示す

。表 1 2 の化合物は全て、20ヌクレオチドの長さのキメラオリゴヌクレオチド（「ギャップマー」）であり、5個のヌクレオチドの「羽」が両側（5'および3'）に隣接している、10個の2'-デオキシヌクレオチドから構成される中心の「ギャップ」領域から構成されている。羽は、2'-O-（2-メトキシエチル）ヌクレオチド（2'-MOEヌクレオチドとしても知られている）から構成されている。ヌクレオシド間（骨格）結合は、オリゴヌクレオチドの始めから終わりまで完全にホスホロチオエートである。全てのシチジン残基は5-メチルシチジンである。

【0148】

【表 1 2 - 1】

表12
ヒトLMW-PTPaseを標的化する、2'-MOE羽とデオキシギャップを有している
キメラオリゴヌクレオチド

化合物番号	標的の配列番号	標的部位	配列(5'から3'方向)	配列番号
105809	1	1	ACCCCGTTCCGCACGCCCCC	279
105811	1	41	TAGCCTGTTCCGCCATCTTC	280
105812	1	241	GCTCATGGGAATGCCGTGCC	281
105813	1	271	ATCTTCTTTGGTAATCTGCC	282
105814	1	421	ATAGGGATCTTCAATAATAA	283

10

【表 1 2 - 2】

化合物番号	標的の配列番号	標的部位	配列(5'から3'方向)	配列番号
105815	1	451	CACCGTCTCAAAGTCAGAGT	284
105816	1	571	CCGACTGAGAAATGCAGGAC	285
105817	1	611	AACAAAGAGCTGGCTTTGGG	286
105818	1	671	CAACACAACTGATTTCAT	287
105819	1	701	TGAATCAAACATTTTATTG	288
105820	1	781	TTGTTCTACTATTTTGTA	289
105821	1	811	GTGAGGTTTTCCTTCATTGT	290
105822	1	961	ACTACTGTCAATCCACAAAA	291
105823	1	1051	TCTTCCCTATCTTTTCAATA	292
105824	1	1091	GTATTGAAGGTGCCAACGAC	293
105825	1	1171	TAAGTTTCAGAGGCAAAGTG	294
105826	1	1201	CATACAAGTGTCTTCTTTC	295
105827	1	1291	TTATTTTAAAAAATAAGCCA	296
105828	1	1321	AAATAATAACACTTTTCCA	297

20

30

実施例 1 3

マウスLMW-PTPaseを標的化するオリゴマー化合物の設計

マウスLMW-PTPaseの様々な領域を標的化するように、表 1 に記載した公開されている配列を使用して、オリゴマー化合物のシリーズを設計した。化合物を表 1 3 に示す。表 1 3 の化合物は全て、20ヌクレオチドの長さのキメラオリゴヌクレオチド（「ギャップマー」）であり、5個のヌクレオチドの「羽」が両側（5'および3'）に隣接している、10個の2'-デオキシヌクレオチドから構成される中心の「ギャップ」領域から構成されている。羽は、2'-O-（2-メトキシエチル）ヌクレオチド（2'-MOEヌクレオチドとしても知られている）から構成されている。ヌクレオシド間（骨格）結合は、オリゴヌクレオチドの始めから終わりまで完全にホスホロチオエートである。全てのシチジン残基は5-メチルシチジンである。

40

【0149】

【表 13 - 1】

表13
マウスLMW-PTPaseを標的化する、2'-MOE羽とデオキシギャップを有している
キメラオリゴヌクレオチド

化合物番号	標的の配 列番号	標的部位	配列(5' から3' の方向)	配列番号
349037	11	246	AGGTTTAGTTAGTCTAAGAA	298
349038	11	248	AGAGGTTTAGTTAGTCTAAG	299
349039	11	250	TCAGAGGTTTAGTTAGTCTA	300
349040	11	254	AAGGTCAGAGGTTTAGTTAG	301
349041	11	256	GCAAGGTCAGAGGTTTAGTT	302
349042	11	258	CCGCAAGGTCAGAGGTTTAG	303
349043	11	296	TTTGTTCCATATTTGCTTGT	304
349044	12	307	ATGGGTGACCGGCAAATGTT	305
349045	12	308	AATGGGTGACCGGCAAATGT	306
349046	12	311	TGCAATGGGTGACCGGCAAA	307
349047	12	312	CTGCAATGGGTGACCGGCAA	308
349048	12	313	TCTGCAATGGGTGACCGGCA	309
349049	12	314	TTCTGCAATGGGTGACCGGC	310
349050	12	315	CTTCTGCAATGGGTGACCGG	311
349051	12	316	GCTTCTGCAATGGGTGACCG	312
349052	12	318	CTGCTTCTGCAATGGGTGAC	313
349053	12	320	TACTGCTTCTGCAATGGGTG	314

10

20

【 0 1 5 0 】

【表 1 3 - 2】

化合物番号	標的の配 列番号	標的部位	配列(5' から3' の方向)	配列番号
349054	12	322	AATACTGCTTCTGCAATGGG	315
349055	12	327	TCCTGAATACTGCTTCTGCA	316
349056	12	330	GTTTCCTGAATACTGCTTCT	317
349057	12	332	CAGTTTCCTGAATACTGCTT	318
349058	12	335	TACCAGTTTCCTGAATACTG	319
349059	12	337	GTTACCAGTTTCCTGAATAC	320
349060	12	339	CAGTTACCAGTTTCCTGAAT	321
349061	11	477	TGTATGCTCGCTCCTCCTCT	322
349062	12	503	ATCGAATGTGGCAAAGTCTT	323
349063	11	506	CCGGCGCGCTCGCTCCGTCT	324
349064	12	507	TATAATCGAATGTGGCAAAG	325
349065	12	509	TATATAATCGAATGTGGCAA	326
349066	12	512	TAGTATATAATCGAATGTGG	327
349067	12	513	ATAGTATATAATCGAATGTG	328
349068	12	515	ACATAGTATATAATCGAATG	329
349069	12	517	ATACATAGTATATAATCGAA	330
349070	12	531	GATTGCTTTCATCCATACAT	331
349071	12	533	CAGATTGCTTTCATCCATAC	332
349072	12	536	TCTCAGATTGCTTTCATCCA	333
349073	11	537	TTGTCGCCCTCCCGCGTCGIG	334
349074	12	539	ATCTCTCAGATTGCTTTCAT	335
349075	12	541	AGATCTCTCAGATTGCTTTC	336
349076	12	543	TGAGATCTCTCAGATTGCTT	337
349077	11	574	CTCCTGCCACATGTAGTCCG	338
349078	11	643	CTGCTCGGGCCCTTATTTTC	339
349079	12	665	CACCTCGAAGTCAGAGTCAT	340
349080	12	667	ACCACCTCGAAGTCAGAGTC	341
349081	12	669	ACACCACCTCGAAGTCAGAG	342
349082	12	670	TACACCACCTCGAAGTCAGA	343
349083	12	671	GTACACCACCTCGAAGTCAG	344
349084	12	672	GGTACACCACCTCGAAGTCA	345
349085	12	674	CTGGTACACCACCTCGAAGT	346
349086	12	675	GCTGGTACACCACCTCGAAG	347
349087	12	676	TGCTGGTACACCACCTCGAA	348
349088	11	676	TACGACCGCGACGGCCGCGT	349
349089	12	677	TTGCTGGTACACCACCTCGA	350
349090	11	745	CGAAGGTGTTTCGTGTTACTC	351
349091	11	824	GCGTTGGCGCGTCGTCGCTG	352
349092	11	876	GGGTGGTAGTGGCGGGTGGG	353
349093	11	931	GTGGCTGGGTGGTGTCTGTGT	354

実施例 1 4

インビボでの L M W - P T P a s e の発現のアンチセンス阻害：食事によって誘導した肥満のマウスモデル

C 5 7 B L / 6 マウス株は、異常脂質症によって誘導されるアテローム斑の形成にかかりやすいことが報告されている。これらのマウスに高脂肪の餌を与えた場合には、食事によって誘導される肥満を発症する。したがって、これらのマウスは、肥満、およびこの症状を処置するために設計された処置の研究のための有用なモデルである。本発明のさらなる実施形態においては、本発明のオリゴマー化合物を、食事によって誘導した肥満のモデルにおいて試験した。

【 0 1 5 1 】

雄の C 5 7 B L / 6 マウスに、約 1 2 ~ 1 3 週間の間、6 0 % の脂肪を含む餌を与え、その後、マウスに化合物番号 2 8 8 2 6 7 (配列番号 1 8 6) (L M W - P T P a s e に対して標的化させられたアンチセンスオリゴヌクレオチド)、または対照化合物である化合物番号 1 4 1 9 2 3 (配列番号 2 7 4) を、2 5 m g / k g の用量で 1 週間に 2 回、6

週間の間、皮下注射した。それぞれの処置グループを、約 8 匹から 10 匹の動物とした。生理食塩水を注射した高脂肪の餌を与えた動物を対照とした。さらなる対照として、通常の餌を与えたマウスを、生理食塩水だけで処置した。

【0152】

体重と累積の餌の摂取量を、それぞれの処置グループについて実験の間中、測定した。累積の餌の摂取量についての有意な変化は、高脂肪の餌を与えた動物については、処置とは無関係に観察されなかった。実験の終了時点で、体格の比較をMRIによって評価した。化合物番号288267での処置によっては、処置期間全体を通じて、高脂肪の餌を与えたマウスの脂肪含有量において約12%の低下が生じた。生理食塩水だけで、または対照化合物である化合物番号141923で処置した、高脂肪の餌を与えた動物の脂肪含有量は、実験の経過全体を通じて低下することはなかった。したがって、本発明の別の実施形態は、LMW-PTPaseに対して標的化させられたオリゴマー化合物を投与することによる、動物の脂肪過多症を軽減する方法である。

【0153】

標的mRNAの阻害によって生じる生理学的効果を評価するために、処置を行った、食事によって誘導した肥満のマウスを、さらに、血漿トリグリセリド濃度および血漿コレステロール濃度について、実験の開始時点(0週)、3週目の処置の間(3.5週)、および処置期間の終わり(6週)で評価した。トリグリセリド濃度とコレステロール濃度は、日常的に使用している臨床分析装置(例えば、Olympus Clinical Analyzer、Melville, NY)によって測定した。それぞれの処置グループについての結果の平均を、表14にmg/dLで示す。

【0154】

【表14】

表14

血漿脂質濃度に対するLMW-PTPaseのアンチセンス阻害の効果

処置	コレステロール			トリグリセリド		
	0週	3.5週	6週	0週	3.5週	6週
生理食塩水、高脂肪の餌	176	175	184	83	65	76
化合物番号 141923	182	174	181	78	70	59
化合物番号 288267	176	157	136	79	60	56
生理食塩水、通常の餌	82	68	68	74	76	61

表14に示したように、化合物番号288267での処置は、食事によって誘導した肥満のマウスにおいて血漿コレステロール濃度の低下が生じた。したがって、本発明の複数の実施形態には、本発明のオリゴマー化合物を投与することにより動物においてコレステロール濃度を低下させる方法が含まれる。

【0155】

グルコースおよびインシュリンの代謝に対する標的阻害の効果もまた、本発明のオリゴマー化合物で処置した、食事によって誘導した肥満のマウスにおいて評価した。血漿グルコース濃度を、実験の開始時点(0週)、3週目の処置の間(3.5週)、および処置期間の終わり(6週)で、同様に測定した。血漿インシュリン濃度を、同様に、実験の開始時点(0週)、3週目の処置の間(3.5週)、および処置期間の終わり(6週)で測定した。コレステロール濃度は、標準的な方法(例えば、YSIグルコース分析装置、YSI Scientific, Yellow Springs, OH)を使用して測定し、そしてインシュリン濃度は、市販されているキット(例えば、Alpcoインシュリン特異的ELISAキット、Windham, NH)を使用して測定した。低血糖は、化合物番号288267で処置した動物においては観察されなかった。インシュリン濃度を、生理食塩水だけで処置した高脂肪の餌を与えた動物について測定したインシュリン濃度の割合として、表15に示す。

【 0 1 5 6 】

【 表 1 5 】

表15
血中グルコース濃度および血中インシュリン濃度に対する
LMW-PTPaseのアンチセンス阻害の効果

処置	インシュリン		
	0週	3.5週	6週
生理食塩水、高脂肪の餌	100	114	179
化合物番号 141923	100	107	164
化合物番号 288267	100	86	100
生理食塩水、通常の餌	21	86	79

10

表 1 5 に示したように、化合物番号 2 8 8 1 6 7 での処置によって、生理食塩水で、または対照化合物である化合物番号 1 4 1 9 2 3 で処置した、高脂肪の餌を与えた動物で観察した実験の経過全体にわたり、インシュリンレベルの増加が妨げられた。したがって、本発明の別の実施形態は、LMW-PTPase に対して標的化させられたオリゴマー化合物を投与することにより、動物のインシュリン感受性を改善する方法である。1つの実施形態においては、インシュリン感受性の改善は、循環しているインシュリンレベルの低下によって示される。

20

【 0 1 5 7 】

耐糖能試験もまた、空腹時のマウスについて行った。処置の 5 週目の間に、マウスに一晚絶食させ、その後、1 g / k g の用量でグルコースの腹腔内注射を投与した。血中グルコース濃度を、グルコースでのチャレンジの前、および 3 0 分の間隔で 2 時間まで測定した。結果を、それぞれの処置グループについて表 1 6 に示す。

【 0 1 5 8 】

【 表 1 6 】

表16

耐糖能に対するLMW-PTPaseのアンチセンス阻害の効果

30

処置	グルコース (mg/dL)				
	0分	30分	60分	90分	120分
生理食塩水、高脂肪の餌	110	346	264	219	194
化合物番号 141923	112	317	243	210	185
化合物番号 288267	118	277	210	188	168
生理食塩水、通常の餌	100	249	184	151	133

時間の関数としてのグルコース濃度として表 1 6 に示したデータのプロットにより、それぞれの処置グループについての曲線下面積の比較ができる。これらのデータは、化合物番号 2 8 8 2 6 7 で処置した高脂肪の餌を与えた動物における耐糖能の改善を明らかにしている。したがって、本発明の別の態様は、本発明のオリゴマー化合物を投与することによる、動物の耐糖能を改善する方法である。

40

【 0 1 5 9 】

インシュリン耐性試験もまた、空腹時のマウスについて行った。処置の 4 週目の間に、マウスをおよそ 4 から 5 時間絶食させ、その後、0 . 5 U / k g の用量でインシュリンの腹腔内注射を投与した。グルコース濃度を、インシュリンでのチャレンジの前、および 3 0 分の間隔で 2 時間まで測定した。結果を表 1 7 に示す。

【 0 1 6 0 】

50

【表 17】

表17

耐糖能に対するLMW-PTPaseのアンチセンス阻害の効果

処置	グルコース (mg/dL)				
	0分	30分	60分	90分	120分
生理食塩水、高脂肪の餌	218	122	123	129	154
化合物番号141923	208	127	108	116	145
化合物番号288267	172	104	87	88	117

10

時間の関数としてのグルコース濃度として表 17 に示したデータのプロットにより、それぞれの処置グループについての曲線下面積の比較ができる。これらのデータは、化合物番号 288267 で処置した高脂肪の餌を与えた動物におけるインシュリン耐性の改善を明らかにしている。したがって、本発明の別の態様は、本発明のオリゴマー化合物を投与することによる、動物のインシュリン耐性を改善する方法である。

【0161】

実施例 15

食事によって誘導した肥満のマウスモデルにおける LMW - PTPase の発現のアンチセンス阻害

20

高脂肪の餌を与え、実施例 14 に記載したように処置した C57BL/6 マウスに由来する肝臓および脂肪組織を、さらに、標的の減少について、実験の終了時に評価した。組織中の標的の減少についての分析は、本明細書中に記載したように行った。化合物番号 288267 での処置によっては、LMW - PTPase 遺伝子の発現は肝臓の中では約 90%、そして脂肪（白色脂肪組織）の中では約 75% 低下したが、化合物番号 141923 での処置によっては、いずれの組織においても LMW - PTPase の発現は低下しなかった。化合物番号 288167 での処置によっては、肝臓でのグルコース - 6 - ホスファターゼの発現の有意な低下も起こり、このことは、肝臓でのグルコース生産の抑制を示唆している。化合物番号 288267 での処置は、SHP2、SHP2P2、または PTEN の発現に対しては、効果はなかった。同様の結果が、ob/ob マウスについても見られた。したがって、本発明の別の実施形態は、本発明のオリゴマー化合物を投与することによる、動物の肝臓でのグルコース生産を低下させる方法である。本発明の別の実施形態は、本発明のオリゴマー化合物を投与することによる、グルコースの代謝に関係している遺伝子を調節する方法である。1つの実施形態においては、調節される遺伝子は、グルコース - 6 - ホスファターゼである。

30

【0162】

肝臓でのトリグリセリド濃度もまた、市販されているキット（例えば、Roche Diagnostics, Indianapolis, IN による Triglyceride GPO Assay を使用して）評価した。肝臓のトリグリセリド含有量は、化合物番号 141923 での処置と比較すると、化合物番号 288267 での処置によって低下した（それぞれ、約 56 mg/g 組織に対して、約 35 mg/g 組織）。

40

【0163】

肝臓脂肪症もまた、オイルレッド O 染色で染色した凍結させた肝臓の組織切片の日常的に行っている組織学的分析によって評価した。これは、通常、脂質沈着を視覚化するために使用され、そして核と細胞質をそれぞれ視覚化するために、ヘマトキシリンおよびエオシンで対比染色される。

【0164】

したがって、本発明の別の実施形態は、本発明のオリゴマー化合物を投与することによる、動物の肝臓でのトリグリセリドの蓄積を減少させる方法である。本発明の別の実施形態は、本発明のオリゴマー化合物を投与することによる、動物の脂肪症を処置する方法で

50

ある。１つの実施形態においては、脂肪症は脂肪性肝炎である。１つの実施形態においては、脂肪症はNASHである。

【 0 1 6 5 】

本発明の別の実施形態は、糖尿病またはメタボリック症候群を処置する方法であり、この方法には、本発明のオリゴマー化合物を投与する工程が含まれる。いくつかの実施形態においては、オリゴマー化合物は、肝臓、脂肪、またはそれらの両方の組織の中で、L M W - P T P a s e の発現を阻害する。

【 配 列 表 】

2008541729000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 06/20272

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
USPC - 514/44, 435/25.6, 435/183, 536/23.1
IPC(8) - A61K 31/70 (2006.01)

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
USPC - 514/44, 435/183, 455 and 536/23.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
KULAS et al., Insulin Receptor Signaling Is Augmented by Antisense Inhibition of the Protein Tyrosine Phosphatase LAR, J. Biological Chemistry, 10 Feb 1995 (10.02.1995), 270,(6), p. 2435-8.

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WEST - USPAT, PGPUB, EPAB, JPAB: antisense, modulat\$, lmw-ptase, acp1, acid phosphatase, inhibit\$, downregulat\$, hybrid\$
DIALOG: antisense, protein tyrosine phosphatase, acp-1, inhibit?, hybrid?, modul?, regulat?
EBI (European Bioinformatics Institute): Emboss-Align performed on SEQ ID 3,4,5 against primers 1,2 US 6,869,768

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6,869,768 B2 (COMINGS et al.) 22 March 2005 (22.03.2005) Col. 15, in. 45; Col. 10, Ins. 30-35; Col. 15, in. 48; Col. 10, in. 38; Col. 10, in. 41; Col. 10, in. 36; Col. 13, in. 52-55; Col. 5, Ins. 43-44.	1-11 and 31-41
X	US 2005/0056732 A1 (COMINGS et al.) 10 Mar 2005 (10.03.2005) Pars. 3 and 9, Fig. 1.	12-30

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

01 December 2006 (01.12.2006)

Date of mailing of the international search report

05 JAN 2007

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:
Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 P 3/06 (2006.01)		A 6 1 P 3/06		
A 6 1 P 43/00 (2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 1 1	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 バンデイ , サンジェイ ケー .
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 2 4 , エンシニタス , エンシニタス ブールバード
 1 1 9 0 , アパートメント 2 4 3 - ジェイ

(72) 発明者 マッケイ , ロバート
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 6 4 , ポーウェイ , ゴールデン アイ レーン 1
 2 4 6 7

(72) 発明者 バノット , サンジェイ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 0 9 , カールズバッド , パセオ アラヤン 8 0 9
 4

(72) 発明者 ユー , シン - シアン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 3 0 , サン ディエゴ , エル カミーノ リアル
 1 2 6 0 5 - エフ

F ターム(参考) 4B024 AA01 CA01 CA11 HA17
 4C084 AA13 MA55 NA14 ZA702 ZC202 ZC332 ZC352
 4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA70 ZC20
 ZC33 ZC35