

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2002 - 537792

(P2002 - 537792A)

(43)公表日 平成14年11月12日(2002.11.12)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ド [*] (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/53	M 4 B 0 6 3
G 0 1 N 33/53		33/566	
33/566		C 1 2 N 15/00	ZNA A

審査請求 未請求 予備審査請求 (全104数)

(21)出願番号 特願2000 - 602288(P2000 - 602288)

(86) (22)出願日 平成12年3月2日(2000.3.2)

(85)翻訳文提出日 平成13年9月4日(2001.9.4)

(86)国際出願番号 PCT/US00/05643

(87)国際公開番号 W000/51621

(87)国際公開日 平成12年9月8日(2000.9.8)

(31)優先権主張番号 60/122,950

(32)優先日 平成11年3月5日(1999.3.5)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 エピジェネシス ファ-マシューティカルズ, アイエヌシー

米国 ニュージャ-ージー州 08512,7 クラーク ドライブ, クランプリ

(72)発明者 ニ-ス, ジョナサン, ダブリュ

アメリカ合衆国 ニューヨーク 08540 プリンストン, セイルドライブ 59

(74)代理人 弁理士 庄司 隆

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 標的および経路をバリデート/インバリデートする方法

(57)【要約】

疾患または症状の機能と疾患または症状に関連していると推定される標的ペプチドをコードする遺伝子または mRNA との相関関係の存在を決定する方法であって、標的遺伝子、その対応する mRNAs、3'および5'イントロン-エクソン接合部位およびコーディングおよび非コーディング領域間の近傍部分からなる群から選択されたゲノムおよび mRNA フランキング領域、および前もって選択した疾患または症状に関連するポリペプチドをコードする全ての mRNA セグメントからなる群から選択された標的に対してアンチセンスである、約 15% 以下のアデノシン (A) からなるオリゴヌクレオチド、好ましくはアデノシンを含有しないオリゴヌクレオチドを得；そのオリゴの中から標的 mRNA とのインビトロハイブリダイゼーションにおいて、mRNA がコードするポリペプチドの発現を有意に阻止または切除する 1つを選択し；標的 mRNA とのインビボハイブリダイゼーションに有効な量の選択オリゴを被検者に投与し；かつ、該オリゴの投与前後の疾患または症状に関連する被検者の機能を評価し；その際、約 70% 以上の機能値の変化は積極的な相関関係を示し、約 40% ~ 約 70% の変化は可能性ある相関関係を示し、かつ、約 30% 以下は相関関係の欠如を示すとする方法である。本方法は、標的

【特許請求の範囲】

【請求項1】 標的遺伝子およびその対応するmRNA、3'および5'イントロン-エクソン接合部位およびコーディング領域と非コーディング領域間の近傍部分からなる群から選択されるゲノムおよびmRNAフランキング領域、および前以て選択した疾患または症状に関連するペプチドをコードする全mRNAからなる群から選択された標的に対してアンチセンスである、約15%以下のアデノシン(A)からなるオリゴヌクレオチド(オリゴ)を得て；

該オリゴの中から標的mRNAとのインビトロハイブリダイゼーションにおいて、mRNAがコードするポリペプチドの発現を有意に阻止または切除する1つを選択し；

標的mRNAとのインビボハイブリダイゼーションに有効な量の選択オリゴを被検者に投与し；かつ、

該オリゴの投与前後の疾患または症状に関連する被検者の機能を評価し；
その際、約70%以上の機能値の変化は積極的な相関関係を示し、約40~約70%は可能性ある相関関係を示し、かつ、約30%以下は相関関係の欠如を示すことを含む、疾患および症状の機能と疾患および症状に関連していると推定される標的ポリペプチドをコードする遺伝子またはmRNAの相関関係の存在を決定する方法。

【請求項2】 前記アンチセンスオリゴは、GおよびCからなる群から選択された少なくとも4つの隣接する核酸を有する標的断片を選択し、かつ、該選択断片を含み、約15%以下のCおよびG含量を有し、および/または所望のタイプおよび/または活性範囲を有する長さ4~60ヌクレオチドである第1オリゴヌクレオチドを得ることによって構築される、請求項1記載の方法。

【請求項3】 さらに、前記アンチセンス断片が少なくとも1つのAを含む場合、チミジン(T)と結合するが、Aのアデノシン A_{1} 、 A_{2a} 、 A_{2b} および A_{3} 受容体のアゴニストまたはアンタゴニスト活性の約0.3以下を有する複素環式芳香族塩基からなる群から選択される別な塩基(B)で、少なくとも1つのAを置換することを含む、請求項1記載の方法。

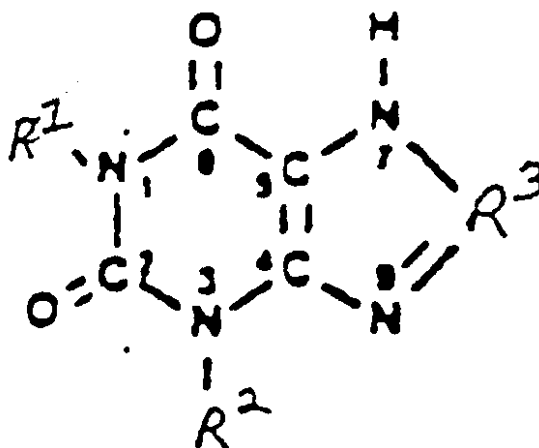
【請求項4】 前記複素環式芳香族塩基は、O、ハロゲン、 NH_2 、SH、

SO₂、SO₃、COOH、および分岐および融合1級および2級アミノ、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリーール、ヘテロアリーール、アルコキシ、アルケノキシ、アシル、シクロアシル、アリーールアシル、アルキノキシ、シクロアキコキシ、アロイル、アリーールチオ、アリーールスルホキシル、ハロシクロアルキル、アルキルシクロアルキル、アルケニルシクロアルキル、アルキニルシクロアルキル、ハロアリーール、アルキルアリーール、アルケニルアリーール、アルキニルアリーール、アリーールアルキル、アリーールアルケニル、アリーールアルキニル、アリーールシクロアルキルで置換されるか、さらに、O、ハロゲン、NH₂、2級および3級アミン、SH、SO、SO₂、SO₃、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキルおよびヘテロアリーールで置換されていてもよい、ピリミジンおよびプリンからなる群から選択される、請求項3記載の方法。

【請求項5】 前記ピリミジンおよびプリンは1、2、3、4、7および8位で置換されている、請求項4記載の方法。

【請求項6】 前記ピリミジンおよびプリンはテオフィリン、カフェイン、ダイフィリン、エトフィリン、アセフィリン、ピペラジン、バミフィリン、エンプロフィリン、および下記化学式を有するキサンチンからなる群から選択される、請求項4記載の方法。

【化1】



(式中、 R^1 および R^2 は独立して、H、アルキル、アルケニル、またはアルキニルであり、 R^3 はH、アリール、ジシクロアルキル、ジシクロアルケニル、ジシクロアルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、O-シクロアルキル、O-シクロアルケニル、O-シクロアルキニル、 NH_2 -アルキルアミノ-ケトキシアルキルオキシ-アリールおよびモノおよびジアルキルアミノアルキル-N-アルキルアミノ- SO_2 アリールである)

【請求項7】 前記アンチセンスオリゴは、アデノシン含量約0～約12%を有する、請求項1記載の方法。

【請求項8】 前記オリゴは約5%以下のAからなる、請求項7記載の方法。

【請求項9】 前記オリゴはAを含まない、請求項8記載の方法。

【請求項10】 前記1つのAが、チミジン塩基と結合するが、アデノシン A_{1} 、 A_{2a} 、 A_{2b} および A_3 受容体にてアデノシン塩基アゴニストまたはアンタゴニスト活性の約0.5以下のアンタゴニストまたはアゴニスト活性を有する複素環式芳香族塩基からなる群から選択される別な塩基で置換される、請求項1記載の方法。

【請求項11】 前記Aのすべてが、チミジン塩基と結合するが、アデノシン A_{1} 、 A_{2a} 、 A_{2b} および A_3 受容体にてアデノシン塩基アゴニストまたはアンタゴニスト活性の約0.3以下を有する複素環式芳香族塩基からなる群から選択される別な塩基で置換される、請求項10記載の方法。

【請求項12】 前記一般的塩基は、3-ニトロピロール-2'-デオキシヌクレオシド、5-ニトロ-インドール、2-デオキシリボシル-(5-ニトロインドール)、2-デオキシリボフラノシル-(5-ニトロインドール)、2'-デオキシイノシン、2'-デオキシネブラリン、6H, 8H-3, 4-ジヒドロピリミド[4, 5-c]オキサジン-7-オンまたは2-アミノ-6-メトキシアミノプリンからなる群から選択される、請求項6記載の方法。

【請求項13】 メチル化シトシン(mC)は、もしもオリゴ中に存在すれば、少なくとも1つのCpGジヌクレオチドにおいて、Cの代わりに置換される、請求項1記載の方法。

【請求項14】 前記アンチセンスオリゴヌクレオチドの少なくとも1つのヌクレオチド残基は、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ボラノホスフェート、ホルムアセタール、チオホルムアセタール、チオエーテル、カーボネート、カルバメート、スルフェート、スルフォネート、スルファメート、スルホンアミド、スルホン、スルファイト、スルホキシド、スルファイド、ヒドロキシルアミン、メチレン(メチルイミノ)(MMI)、メトキシメチル(MOM)、メトキシエチル(MOE)、メチレンオキシ(メチルイミノ)(MOMA)、メトキシメチル(MOM)、2'-O-メチル、ホスホルアミデート、およびC-5置換残基、およびこれらの組み合わせからなる群から選択された残基である、請求項1記載の方法。

【請求項15】 全ヌクレオチド結合残基が置換される、請求項14記載の方法。

【請求項16】 前記アンチセンスオリゴは、約7~60モノヌクレオチドを含む、請求項1記載の方法。

【請求項17】 前記アンチセンスオリゴは、細胞内面化剤または吸収剤および細胞目標化剤からなる群から選択される薬剤と結合している、請求項1記載の方法。

【請求項18】 前記細胞内面化剤または吸収剤は、トランスフェリン、アシアログリコプロテインおよびストレプトアビジンからなる群から選択される、請求項17記載の方法。

【請求項19】 前記核酸はベクターに結合している、請求項18記載の方法。

【請求項20】 前記ベクターは、原核性または真核性ベクターを含む、請求項19記載の方法。

【請求項21】 前記アンチセンスオリゴは、肺、脳、心臓、腎臓、腫瘍、血液、皮膚、目、頭皮、鼻通路、睪丸、頸部、口腔、咽頭、食道、小腸または大腸、滑膜組織、筋肉組織、卵巣、外耳道またはインビトロへ投与される、請求項1記載の方法。

【請求項22】 前記疾患または症状は、肺、脳、心臓、腎臓、腫瘍、血液

、免疫系、皮膚、目、頭皮、鼻通路、睾丸、頸部、口腔、咽頭、食道、小腸または大腸、滑膜組織、筋肉組織、卵巣または外耳道を患う疾患または症状である、請求項1記載の方法。

【請求項23】 前記疾患または症状は肺を患う疾患または症状である、請求項22記載の方法。

【請求項24】 前記疾患または症状は、気管支収縮、肺炎および/またはアレルギー反応に関与する、請求項22記載の方法。

【請求項25】 前記疾患または症状は、脳を患う疾患または症状または脳活性に関与する疾患または症状である、請求項22記載の方法。

【請求項26】 前記疾患または症状は、免疫機能障害に関与する、請求項22記載の方法。

【請求項27】 前記標的は、免疫グロブリン、抗体受容体、サイトカイン、サイトカイン受容体、これらをコードする遺伝子および対応mRNA、遺伝子およびmRNAのフランキング領域およびイントロンおよびエクソン接合部位からなる群から選択される、請求項26記載の方法。

【請求項28】 前記疾患または症状は、心臓血管系を患う疾患または症状である、請求項22記載の方法。

【請求項29】 前記疾患または症状は、胃腸系に関する疾患または症状である、請求項22記載の方法。

【請求項30】 前記疾患または症状は、悪性腫瘍または癌に関連する、請求項22記載の方法。

【請求項31】 前記標的は、免疫グロブリンおよび抗体受容体、これらをコードする遺伝子およびmRNA、癌遺伝子に関連する遺伝子およびmRNA、およびゲノムおよびmRNAのフランキング領域およびエクソンおよびイントロン接合部位からなる群から選択される、請求項30記載の方法。

【請求項32】 前記組成物は、インビトロで、経口内、腔内、鼻腔内、肛門内、膈内、子宮内、頭蓋内、肺内、腎内、結節内、関節内、眼内、リンパ管内、経皮、経頬、静脈内、皮下、筋肉内、腫瘍内、腺内、眼球内、頭蓋内、器官内、血管内、髄腔内、移植、吸入、皮内、肺内、耳内、心臓内、低放出、持続性放

出およびポンプにより投与する、請求項1記載の方法。

【請求項33】 前記標的は、転写因子、刺激および活性化因子、サイトカインおよびその受容体、インターロイキン、インターロイキン受容体、ケモカイン、ケモカイン受容体、内因性生成特異的および非特異的酵素、免疫グロブリン、抗体受容体、中枢神経系(CNS)および末梢神経系および非神経系受容体、CNSおよび末梢神経系および非神経系ペプチド伝達体、接着分子、デフェンシン、成長因子、血管作動ペプチド、ペプチド受容体および結合タンパク、および癌遺伝子に対応する遺伝子およびmRNAからなる群から選択されるポリペプチドをコードする遺伝子またはmRNAからなる群から選択される、請求項1記載の方法。

【請求項34】 前記アンチセンスオリゴは、肺気道を患う疾患または症状の関連するポリペプチド、それらをコードする遺伝子およびRNA、およびゲノムまたはmRNAのフランキング領域および遺伝子およびmRNAのイントロンおよびエクソン接合部位からなる群から標的を選択し、

標的遺伝子に対応するmRNA、標的ポリペプチドをコードするmRNA、ゲノムおよびmRNAのフランキング領域および遺伝子またはmRNAのイントロンおよびエクソン接合部位からなる群から選択されるmRNAの配列を得て、

mRNAの少なくとも1種のセグメントを選択し、

選択mRNAセグメントに対してアンチセンスである1つ以上のオリゴを合成し、かつ、

必要により、全ヌクレオチドの約15%以下のオリゴ中に存在するA含量を低下させるために、1つ以上のAを別な塩基で置換することによって製造される、請求項1記載の方法。

【請求項35】 前記標的遺伝子は、転写因子、刺激および活性化因子、インターロイキン、インターロイキン受容体、ケモカイン、ケモカイン受容体、内因性生成特異的および非特異的酵素、免疫グロブリン、抗体受容体、中枢神経系(CNS)および末梢神経系および非神経系受容体、CNSおよび末梢神経系および非神経系ペプチド伝達体およびその受容体、および接着分子、デフェンシン、成長因子、血管作動ペプチドおよびその受容体、および結合タンパク、および

癌遺伝子に対応する標的遺伝子およびmRNA、およびそれらのフランキング領域およびイントロンおよびエクソン接合部位からなる群から選択される、請求項1記載の方法。

【請求項36】 前記コードするポリペプチドは、NfκB転写因子、インターロイキン-8受容体(IL-8R)、インターロイキン5受容体(IL-5R)、インターロイキン-4受容体(IL-4R)、インターロイキン3受容体(IL-3R)、インターロイキン-1(IL-1)、インターロイキン1受容体(IL-1R)、エオタキシン、トリプターゼ、主要塩基性タンパク、2-アドレナリン様受容体キナーゼ、エンドセリン受容体A、エンドセリン受容体B、プレプロエンドセリン、ブラジキニンB2受容体、IgE高親和性受容体、インターロイキン1(IL-1)、インターロイキン1受容体(IL-1R)、インターロイキン9(IL-9)、インターロイキン-9受容体(IL-9R)、インターロイキン11(IL-11)、インターロイキン11受容体(IL-11R)、誘導性一酸化窒素シンセターゼ、シクロオキシゲナーゼ(COX)、細胞内接着分子(ICAM-1)、血管細胞接着分子(VCAM)、ランテス(血小板・T細胞由来好酸化球走行性物質)、血管内皮白血球接着分子(ELAM-1)、単球活性化因子、好中球走化性因子、好中球エラスターゼ、デフェンシン1、2および3、ムスカリン性アセチルコリン受容体、血小板活性因子、腫瘍神経因子、5-リポキシゲナーゼ、ホスホジエステラーゼIV、サブスタンスP、サブスタンスP受容体、ヒスタミン受容体、チマーゼ、CCR-1CCケモカイン受容体、CCR-2CCケモカイン受容体、CCR-3CCケモカイン受容体、CCR-4CCケモカイン受容体、CCR-5CCケモカイン受容体、プロスタノイド受容体、GATA-3転写因子、好中球付着性因子、MAPキナーゼ、インターロイキン-9(IL-9)、NFAT転写因子、STAT4、MIP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、シクロフィリン、ホスホリパーゼA2、塩基性線維芽細胞成長因子、メタロプロテナーゼ、CSBP/p38MAPキナーゼ、トリプトース受容体、PDG2、インターロイキン-3(IL-3)、インターロイキン-1(IL-1)、シクロスポリンA-結合タン

パク、FK5 - 結合タンパク、41セレクトイン、フィブロネクチン、47セレクトイン、MadCAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、PECAM-1、LFA-1セレクトイン、C3bi、PSGL-1、E-セレクトイン、P-セレクトイン、CD-34、L-セレクトイン、p150,95、Mac-1(CD11b/CD18)、フコシルトランスフェラーゼ、VLA-4、CD-18/CD11a、CD11b/CD18、ICAM2およびICAM3、C5a、CCR3(エオタキシン受容体)、CCR1、CCR2、CCR4、CCR5、LTB-4、AP-1転写因子、プロテインキナーゼC、システニルロイコトリエン受容体、タチキニン受容体(tachR)、IκBキナーゼ1および2、STAT6、c-masおよびNF-インターロイキン-6(NF-IL-6)、およびそれらのフランキング領域およびイントロンおよびエクソンボーターからなる群から選択される、請求項1記載の方法。

【請求項37】 前記標的遺伝子は、G-タンパクまたはG-タンパク結合受容体をコードする、請求項1記載の方法。

【請求項38】 前記標的遺伝子は、カルシウムチャネルタンパクまたは受容体、ナトリウムチャネルタンパクまたは受容体、カリウムチャネルタンパクまたは受容体、塩素チャネルタンパクまたは受容体をコードする、請求項1記載の方法。

【請求項39】 前記標的遺伝子は、神経伝達物質受容体または神経ホルモン受容体をコードする、請求項1記載の方法。

【請求項40】 前記標的遺伝子は、神経ペプチドまたは神経ペプチド受容体をコードする、請求項1記載の方法。

【請求項41】 さらに、その機能が最初の標的と関連すると推定される別な標的に対するアンチセンスである別なオリゴを別個に投与する全工程を繰り返し；最初の標的と別な標的を標的とする共投与オリゴによる投与と評価の工程を繰り返し；かつ、得られた結果を各標的において別々に得た結果と比較することを含み、その際、組み合わせたオリゴの効果が各オリゴの効果よりも約20%以上である場合には、最初のオリゴと別なオリゴとの間には、積極的な関係が存在し、前記結果が1つのオリゴの結果よりも約20%以内である場合には、関連性

が存在しない、また、前記結果が個々のオリゴに比べて約20%以下である場合には、これらの間には消極的な関係が存在すると決定する、請求項1記載の方法

。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明が属する技術分野】**

本発明は、低アデノシン（低A）またはアデノシン非含量（des A）のアンチセンスオリゴヌクレオチド（オリゴ）を使用する標的遺伝子、例えば中枢神経（CNS）遺伝子をバリデートする（validate）方法に関する。この方法は、その生産物の標的遺伝子の生成を阻害することによって、標的遺伝子およびその機能をスクリーニングすることができる。この方法は、特に被検者の機能の多くがアデノシンに敏感であり、アデノシンの効果が特定の標的遺伝子の検出可能な機能を覆い隠すことから、インビボでの応用に特に適している。

【0002】**【従来の技術】**

全てのヒトの遺伝子配列、約100,000個がここ1～3年以内に公知になると期待されている。この情報は過去または現在、人類を苦しめる疾患全ての実際の治療に、新しい医薬を設計する機会を与えるであろう。しかしながら、この巨大な配列の蓄積は、それ自体では、この技術がこれらの遺伝子の機能、特に潜在的効果、例えば治療効果またはその機能を弱化する毒物学的効果を識別するために入手可能となるまで、新しい医薬の開発において有用とはならないであろう。例えば、その機能、したがって、薬品発見プロセスの「標的」として、新規に見出された遺伝子産物の有用性を急速にかつ正確に試験するために、新規な方法が設計されることが不可避である。薬品発見の源を保護するために、このような「標的」を、薬品発見プロセスにおいてできるだけ早くバリデートまたはインバリデートにしなければならない。それでも、このような方法の実行は、機能ではなく、配列が公知である一連の遺伝子への薬品発見プロセスの巨大な実行を必要とするであろう。薬品発見プロセスのための焦点として、新規に発見された遺伝子産物の有用性を評価するためのかなり潜在性ある方法の1つは、インビトロまたはインビボにて標的遺伝子の機能を切除するアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用することである。この方法は大きな理論的重要性を有するが、1つの問題はアンチセンスオリゴヌクレオチドがインビトロまたはインビボで分解する構成

ヌクレオチドを放出する潜在性を有することにある。オリゴヌクレオチド分解産物の1つ、アデノシンはある組織では高度に生理活性を有する。アデノシンは、神経伝達の抑制、視床紡錘リズムの維持、睡眠導入、D1およびD2ドーパミン受容体の拮抗作用、抗痛覚、運動性調和不能を含むエタノールの種々の効果の仲介、心臓機能の自律性コントロール、気管支収縮、ネガティブな変時、変圧、および変伝導、抗 - アドレナリン作用、および腎臓ナトリウム保持を含む多面的効果を仲介する。明らかに、ある組織、中でも、例えば、CNS、高反応性喘息性肺、心臓、および腎臓における微小な量のアデノシンの遊離は、アデノシン受容体を局所的に活性化するであろう。これは信頼性ある明白な方法で標的バリデーションデータを解釈することを不可能とするであろう。すなわち、アデノシンを含むアンチセンスオリゴヌクレオチドは、その分解が多面的アデノシン仲介効果を生じるから、明らかな標的バリデーションデータを提供するには最適ではない。

【0003】

過去数年間の基礎的神経科学は、グルタミン酸およびアスパラギン酸などの興奮性アミノ酸(EAA)中枢神経系(CNS)伝達体と種々の病理学的状態、例えば脳卒中およびCNS外傷との関係を確認している。例えば、脳虚血、脳卒中または外傷に続く神経組織の分解の主な機構は、脳のEAA系の過敏性、すなわちグルタミン酸塩およびアスパラギン酸塩の過剰放出に關与しているようである。この方法は遅延興奮性毒性と呼ばれ、ある神経細胞集団が選択的に興奮性毒性に対する感受性を有している。

【0004】

他の活性の中でも、アデノシンはEAA放出を接合部前部で阻害し、この興奮性毒性を弱化させ、その放出がこの系のバリデーション研究を大きく妨害するであろう。アデノシンの効果は一般的に細胞外受容体によって仲介されるから、したがって、薬理的に關連するアデノシンのプールは細胞の外側に存在する。アデノシンはまた、神経行動学的効果を有し、CNS抑制剤として作用する、すなわち、神経活性を阻害する。これはまた、天然抗痙攣剤および鎮痛剤である。新しい研究では、正常な環境下にはアデノシンが睡眠を促進し、したがって、無呼

吸などの睡眠関連応答に關与する経路を妨害することが明らかになっている。いまや、アデノシンは重要な「疲労因子」であり、睡眠サイクルの分子的支持体についてのバリデーション研究を妨げるであろう。例えば、脳の研究は、重要な受容体は脳覚醒ネットワークの神経細胞にあることが示されている。何人かの科学者は、アデノシンはコリン作用システムなど、コリン作用性基礎前脳および昏睡状態を刺激するメソポンチンコリン作用性核などの脳中の覚醒ネットワークを標的として睡眠を促進すると考えている。アデノシンのこれらの効果は、それが作用するシステムや経路において標的のバリデーション研究を阻害する。

【0005】

したがって、それらの機能を決定する多くの遺伝子およびその発現生産物をスクリーニングする急速でかつ効果的な方法、すなわち、該標的遺伝子および/またはその発現生産物に關連した疾病や症状を治療するための治療薬の設計において、その有用性が確かに求められている。さらに、その結果の解釈をあいまいにする他の遺伝子の機能を誘発することを避けながら、個々の遺伝子機能を試験する適当な方法が必要である。

【0006】

【課題を解決しようとする手段】

本発明は、疾患または症状の機能と該疾患または症状に關与すると推定される標的ポリペプチドをコードする遺伝子またはmRNAとの相関関係をバリデート/インバリデートする、または決定する方法に關する。この方法は、一般的に、標的遺伝子およびその対応するmRNA、3'および5'イントロン-エクソン接合部位およびコーディング領域および非コーディング領域間の近接部分からなる群から選択されるゲノムおよびmRNAフラッキング領域、および前以て選択された疾患または症状に關連するポリペプチドをコードする全てのmRNAセグメントからなる群から選択される標的に対してアンチセンスである、約15%以下のアデノシン(A)からなるオリゴヌクレオチド(オリゴ)を得て;該オリゴの中から、標的mRNAとのインビトロハイブリダイゼーションにおいて、mRNAがコードするポリペプチドの発現を有意に阻害または切除する1つを選択し;標的mRNAへのインビボハイブリダイゼーションに有効である量の選択オリゴを

被験者に投与し；そして、オリゴの投与前後の疾患または症状に關与する被検者の機能を評価することを含む。その際、約70%以上の機能値における変化は積極的相関關係を示し、約40～70%は可能性ある相関關係を示し、かつ約30%以下は相関關係の欠如を示す。本發明は、とりわけ、肺、腦、心臓、腎臓、腫瘍、血液、免疫系、皮膚、眼、鼻通路、頭皮、睾丸、頸部、口腔、咽頭、食道、腸（小および大）、滑膜組織、筋肉、子宮および外耳道を患う疾患および症状に關与するであろう遺伝子または遺伝子のネットワークの中で好適に應用され、また一般的には、標的部位を含むか、または該部位を起源とする細胞の中で好適に應用される。

本發明は、特定の図面を参考にして説明される。本發明の他の主題、利点および態様は、この明細書の記載から当業者には明白となるであろう。

【0007】

図1は、生理食塩水（コントロール）、アデノシン（o）、およびdAMP（P）を別個にウサギへ投与した実験を示す。生理食塩水は効果がなく、また、アデノシンとdAMPの双方は、用量依存法では同様な低下コンプライアンスを生じた。これらの結果は、dAMPなどのヌクレオシドが直接に、あるいはアデノシンへの分解および/代謝に続いて、アデノシン受容体にてアデノシンの生理学的効果を有することを示す。

【0008】

本特許に添付する図2は、アデノシン（A）を含むオリゴヌクレオチド（オリゴ）は生理活性アデノシンを放出するが、アデノシンを有しないもの（des A）はそうではなかったことを示す。放出されたアデノシンはアデノシン受容体を活性化し、バリデーション研究中に觀察されるべきシグナルを妨害する生物学的応答を引き起こす。ここで、2種の21merランダムマーホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド（オリゴ）であって、アデノシンを含むもの（ ）およびdes Aオリゴ（ ）を喘息ウサギへ投与した。アデノシン含有オリゴヌクレオチドは、A受容体活性を反映する気道コンプライアンスの有意な損失を引き起こしたが、des Aランダムマーオリゴは起こさなかった。

【0009】

図3および4は、アンチセンスオリゴヌクレオチドが肺または気道疾患に関連する標的バリデーションにおいて有効な薬剤として利用されることを示す。図3はアデノシンA₁受容体に対してアンチセンスであるオリゴヌクレオチドの効果およびウサギモデルでの気管支気道の動的コンプライアンスへのミスマッチコントロールアンチセンスオリゴヌクレオチドの効果を示す。図3はA₁アデノシン受容体アンチセンスオリゴヌクレオチドで処置した気道組織に存在するA₁およびA₂アデノシン受容体数で示されるように、A₁アデノシン受容体に対してアンチセンスであるオリゴヌクレオチドの特異性を示す。

本発明は、好ましい態様の下記説明を参考にしてよりよく理解されるであろう。

【0010】

【発明の実施の態様】

本発明は、標的遺伝子およびその生産物の機能および有用性を速やかにかつ効果的に発見する新規な技術を提供しようとする発明者の要望から生じた。本発明者は、低アデノシンアンチセンスオリゴヌクレオチド(オリゴ)を被験者にインビボ投与すると、アデノシン受容体が仲介する望ましくない副作用を誘発しないとの先の発見を応用して、これを首尾よく行えると推測した。本発明方法はインビトロおよび/またはインビボでのその機能を切除するアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用して、薬剤発見プロセスへの焦点となる新規に発見した遺伝子および遺伝子産物の価値を評価することができる。遺伝子発現を切除するアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用は、過去には理論的に重要であったが、本発明者がアンチセンスオリゴヌクレオチドはインビトロおよびインビボで分解し、その構成ヌクレオチドおよびヌクレオシドを放出すると発見したことが、その応用の成功を妨げ、その無効性を説明する。本発明者はオリゴヌクレオチド分解産物、アデノシンモノホスフェートはアデノシン自体として、種々の組織で高い生物活性を有するとの証拠を有する。アデノシン自体は、とりわけ神経伝達、睡眠誘導、D1およびD2ドーパミン受容体のアンタゴニズム、抗侵害受容、運動性調和不能を含むエタノールの様々な効果の仲介、心臓機能の自律神経コントロール、気管支収縮、ネガティブな変周期、変力および変伝導、抗 - アドレナリン作

用、および腎ナトリウム停滞を含む多面的効果を仲介することが知られている。明らかに、極微量のアデノシンの放出、および本実施例に示されるように、ある組織、とりわけ、例えば、CNS、肺、心臓および腎臓で、アデノシンヌクレオシドは局部環境にてアデノシン受容体を活性化することができた。これは信頼性ある明白な方法で標的バリデーションデータを解釈することを不可能とするであろう。実施例30および31および本特許に添付する図1および2は、生物活性アデノシンヌクレオシドを放出するアデノシン含有オリゴヌクレオチドの分解を証明する。これらの図はアデノシ(A)含有オリゴヌクレオチド(オリゴ)は生物活性アデノシンを放出するが、アデノシンを含まないもの(des A)は放出しないことを示す。実施例では、21merのランダムホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド(オリゴ)であって、アデノシンを含むもの(>)、およびdes Aオリゴ(o)を喘息ウサギへ投与した。その結果は、アデノシン含有オリゴヌクレオチドはアデノシン受容体活性を反映する気道コンプライアンスの有意な損失を生じるが、des Aランダムオリゴはそうではないことを示した。下記実施例31参照。さらに、アデノシンヌクレオシド(dAMP)はアデノシン受容体においてアデノシンと同様な効果を有することを示した。下記実施例30参照。

【0011】

ここに記載する研究ならびに本特許に添付する実施例にて考察する結果は、明らかに、発見された新規な標的および/またはその機能に関連していることが公知である標的に本発明方法を適用して、標的バリデーションが首尾よく達成されることを示す。さらに、実験的研究は、特異的に標的化される非ホスホジエステルアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用した場合、標的タンパクなどが仲介する効果を計数するかあるいは換算した場合、本発明方法は標的をバリデート/インバリデートすることにおいて非常に選択的かつ効果的であると判断されることを示す。これはアデノシンA₁受容体mRNAを標的とする全てのアンチセンスオリゴ、アデノシンA_{2b}受容体mRNAを標的にする1つのアンチセンスオリゴ、アデノシンA₃受容体mRNAを標的にする2つのアンチセンスオリゴ、およびブラジキニン受容体を標的にする1つのアンチセンスオリゴにおいて示され

、これらは外部から投与されたアデノシンによって誘発される特異的アデノシン受容体が仲介する効果を計数して示される。さらに、本発明方法は特別的に選択した標的をバリデート/インバリデートすることにおいて特異的であり、アデノシンA₁およびブラジキニンおよびmRNAを標的とするアンチセンスオリゴで示されるように、他の標的を阻害することができない。さらに、その結果は低アデノシン含有またはアデノシン非含有オリゴを使用する本発明方法が極めて低い有害な副作用または毒性を有するか、あるいは有さないことを示す。これは呼吸器系においてここに示されるように、標的バリデーションに非常に有効かつ特異的な方法を提供することにおける100%の成功を示す。本発明は、気道疾患に関与または関連する呼吸器/肺系統のタンパクをコードする全ての遺伝子および対応するmRNA、ならびに特定の機能または終点(end point)に関連するであろう特定の疾患や症状に関連する他の系統、例えばCNSの標的にも同じ方法を広く応用できる。ホスホジエステルオリゴ、およびホスホジエステル結合がホスホチオエート結合で置換される同じオリゴヌクレオチドの変形を使用して、本発明方法の完成が比較された。本発明方法の応用結果は、置換体においてホスホジエステルオリゴヌクレオチド以上の予期せぬ優位性を証明した。高含量のアデノシン(33%)を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、その分解が多面的アデノシン仲介効果を生じるから、したがって明白な標的バリデーションデータを得るには適していない。本発明方法が使用する低アデノシンオリゴマーは、明らかにそのような副作用がない。本特許は、アデノシンの遊離が多面的効果を生じる場合、例えば、呼吸管または肺系、CNS、および他の器官または系において可能性ある、明白な「標的バリデーション」を達成するために使用する方法を記載する。この方法は低AまたはdesAアンチセンスオリゴ、すなわち、低A含量またはアデノシンを全く欠くオリゴの使用に関し、したがって、これは分解時に多量の有意な生物活性アデノシンを遊離しない。本技術は実質的にいかなる遺伝子を用いる実施に対しても可能性があるが、下記遺伝子集合体：G-タンパク関連受容体、神経ホルモン受容体、神経ペプチド受容体、神経伝達体受容体、G-タンパク、カルシウムチャンネルタンパク、ナトリウムチャンネルタンパク、カリウムチャンネル受容体、塩素チャンネル受容体、すなわち本質的に、正

常または疾患であるCNS、心臓、肺、腎臓、血液、免疫系、および以下に列挙されるものに加えて、より多くのものにおける特別な適用を有する。すなわち、この特許に記載されるバリデーション方法は、ここに言及する遺伝子および系のみならず、遺伝子の他の属および亜属および遺伝子ネットワークにも適用される。

【0012】

成功する薬剤発見プロセスは、薬剤設計標的として候補遺伝子産物の適切さを早急かつ正確に評価することに依存する。伝統的には、この方法は過度な量の時間、人間および経済的資源を消費していた。本発明は、独自の低またはアデノシン非含有 (des A) アンチセンスオリゴヌクレオチド (ここでは、まとめてdes A - ASONと呼ぶ) を使用する種々の生物系における標的バリデーション/インバリデーションの急速で信頼性ある方法を提供する。des A - ASONを使用して、本方法はこれまで伝統的技術を使用して不可能であった速度と正確性の程度でもって、潜在的遺伝子をバリデート/インバリデートする。des A - ASONは古典的方法に対してより大きな程度の正確性と速度をもたらす。des A - ASONはアデノシン誘導副作用を生じることにより標的バリデーションを混乱させる生物活性アデノシンを分解または放出することができない。ASONの中には、RASONと称する呼吸器系投与を意図するサブグループが存在する。アデノシンA₁、A₂およびA₃標的をバリデートする本発明方法を実施するに際して、本発明者はdes A - RASONを使用している。本技術は、脳生理学の主要な修飾物質、アデノシンを放出するように分解できないdes A - BASON、脳アンチセンスオリゴヌクレオチド (脳中にインサイチュで投与) を使用して、脳の全ての領域での部位特異的機能遺伝子切除に続いての生化学、行動学、生理学的評価に関するCNS標的にも適用され得る。肺標的の実施例によるバリデーションに加えて、本発明方法は、CNS関連標的について以下に説明され、また、一般的にはdes A アンチセンスオリゴヌクレオチドを使用する標的バリデーションにおける下記数工程を実施することを含む。

【0013】

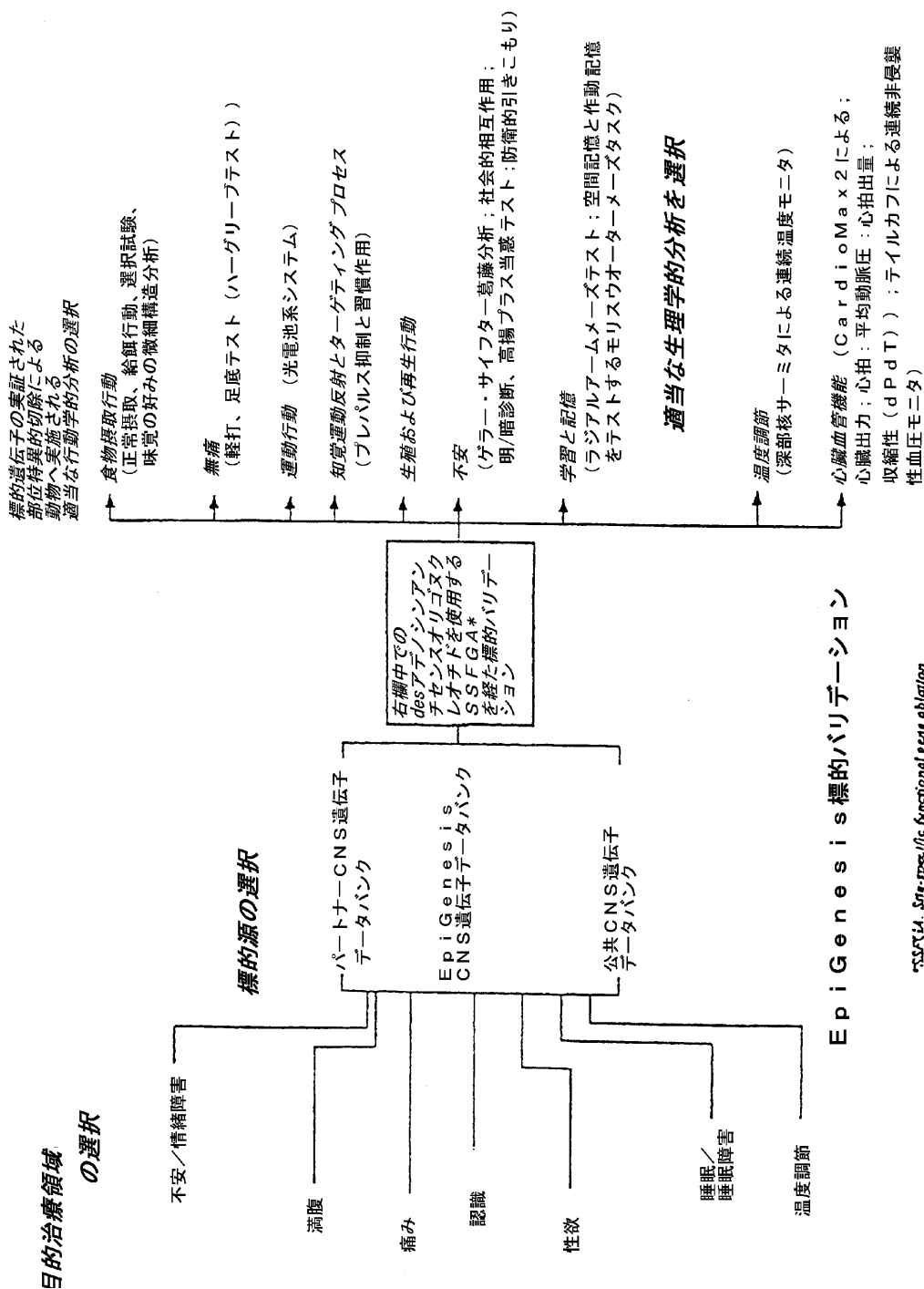
第1工程は標的バリデーションの一般的な系または領域、例えば、CNS、呼

吸、腎臓、心臓領域などの確認を必要とする。次いで、本方法はGenBankなどの公共ライブラリーまたは公有地にある他のライブラリーまたは特定の企業に属するプライベートなライブラリーを利用して調査する。例えば、公共およびプライベートのデータベースに見出される全てのG-タンパク結合受容体(GPCR)を包含するものなど特定のライブラリーがある。目下、約250GPCRが存在している。すなわち、本発明の標的バリデーション方法は、選択された標的群、例えば、GPCRが適当なdesAアンチセンスオリゴを使用して個々に弱化される場合に、いかなる生理学、生物物理学、生物学、行動学的などの事象が生じるかを試験することに適している。これには、desAアンチセンスオリゴは以下に記載されるように設計され、前もって選択された標的遺伝子、例えば、前記のGPCRを合成する。次いで、desAアンチセンスオリゴを、まずインビトロで、例えば、適当なセルライン、初代細胞培養または他の細胞組織を使用して試験する。このようなインビトロ試験は、アンチセンス薬剤として「最も活性」である特定の標的に対して設計された、いくつかのdesAアンチセンスオリゴのうちのいずれかを決定するために適用してもよい。すなわち、いずれかがもっともよく遺伝子発現を下流制御するかあるいは切除する。これは、生物物理学、生物学、生理学、または細胞の特異的活性に関連する他の分析を利用して実施してもよい。他の場合では、インビトロ系で標的遺伝子をロックアウトすることは、それ自体で有用な標的バリデーション情報をもたらす。次いで、もっとも活性なdesAアンチセンスオリゴが選択され、例えば、CNS研究におけるいかなる脳領域中へも直接に点滴注入して、あるいはインビボで呼吸器系に関連する肺標的中へ投与するなどして適用される。これは、脳標的にはカニューレを定位固定移植して、呼吸器系標的は吸入して、血液標的には全身から、器官および他の局在する系および腎実質性細胞と血管性心臓細胞の両方にはインサイチュ投与して、腎臓標的には吸入して、あるいは直接に点滴注入して全身からなど、当該技術分野で公知である方法によって行ってもよい。行動学、生物物理学、生理学、生化学、免疫学および他の試験を適用して、1種以上の標的遺伝子を除去する適当なアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与し、個々の動物からデータを得た。食物消化、不安、性欲、認識などの行動学的機能または終点(end point)、あるいは温度

、脳波図（ECG）、心電図（EKG）、糸球体濾過容積および含量、イオン保持、タンパク損失などの生理学的終点は、当該技術分野で公知である方法で評価してもよい。これらの工程は、以下に示される図でCNSについて説明される。

【0014】

【化2】



【0015】

本方法は、有意な活性量のアデノシンを放出することなく、呼吸器 (des A - R A S O N s)、C N S (des A - B A O N s)、腎臓 (des A - K A S O N s)、心臓 (des A - C A S O N s)、血液 (des A - S A S O N s)、免疫系 (des A - L A S O N s)、腫瘍組織 (des A - M A S O N s) および他の機能への応用における低 A または des A - A S O N s に依拠する。この態様では、本発明方法は肺、C N S、腎臓、心臓、血液、免疫系、腫瘍細胞集合体などのアデノシン受容体の望ましくない活性を阻止する。目下、入手可能な方法で得た結果は、標準的なアンチセンス構築物が約 25% のアデノシンである正常な (高い) 濃度を含み、かつアデノシン受容体を活性化するから、ほとんど判断されない。この効果は、その結果を不明瞭とし、機能性の解釈を混乱させる。肺では、例えば、オリゴ放出アデノシンは、気道直径の変化 (気管支収縮)、炎症および表面活性物質の分泌、異なった標的のバリデーションに無関係である本発明の全ての効果を生じるであろう。このような「副作用」は、その主題に関してオリゴヌクレオチドまたはリボザイムから得たデータを判断不能とする。同様に、A 含有アンチセンスオリゴが脳で使用される場合、その効果は標的をバリデートする終点として使用される複数の機能を曖昧にする。例えば、アデノシンは神経伝達の抑制、睡眠誘導、抗痛を生じ、運動調和の欠如を含むエタノールの種々の効果、心臓機能の自律調整、ドーパミン D 1 および D 2 受容体のアンタゴニズム、C N S 血流の変化、および多数の他の効果を仲介する。有意な量のアデノシンの存在は、明らかに、アンチセンスオリゴが過剰応答肺、C N S、およびアデノシン受容体を含むか、またはアデノシンに応答する他の系における標的バリデーション研究に使用される場合には禁忌を示す。これらの理由から、本方法は優れた標的バリデーションツールを提供する。特に、本方法の有用な適用とは、呼吸管、C N S、血液、腫瘍および未制御成長細胞、および多くの他の系に関連する治療領域を調査することであり、これは別個に標的化され、標的に関連する 1 種以上の機能は、別個に測定される。

【0016】

本方法は生物科学の歴史の中で単時間に (at a singular time) 発明されたの

で、ヒトゲノムの配列から得た情報をより速やかに、かつ、より有効に利用することができる。ヒトゲノムの各遺伝子の配列を知ることは、現代医学の聖杯である。この業績は特異的な遺伝子とその機能に関連付け、その後、心臓疾患により緊密に効果を示し、かつ、目下、入手可能な薬剤の副作用を欠く全く新規なタイプの医薬の創製を可能とする。現在、バンクに蓄積されている配列の洪水は、重要な標的となる。本方法は人体機能、すなわち疾患において重要である遺伝子を確認し、その機能の阻止が治療上有用であるかどうかを決定するために計り知れない道具となる。遺伝子の機能が治療的であるかどうかを決定する方法は、「ターゲットバリデーション」と呼ばれる。これは薬剤発見プロセスでの重要な初期ステップであり、また、臨界的資源を標的遺伝子の機能を阻止する新規な薬剤を開発するために費やすべきかどうかを決定することに役立つ。このような関係において、その機能を阻止することが機能上（治療上）の効果がないことを示して標的をバリデートすることは標的をインバリデートするように重要である。薬剤発見プロセスにおける初期の標的バリデーションは、無益な薬剤発見キャンペーンでの資源の浪費を阻止する。これは、より多くの生産性ある標的のより急速でかつ集中的な検討を可能とする。この急速でかつ正確な標的バリデーション方法は、例えば、ヒトゲノムプロジェクトから得た大量の情報の治療上の応用における成功と失敗の間の違いとなる。本発明方法のアンチセンスオリゴのインビボテストは、例えば、CNS、腎臓、心臓、血液疾患などの疾患を含む、喘息などの呼吸器系疾患、ホルモン系疾患、遺伝的疾患、肥満症などのモデルを含む、重要な疾患のためのインビトロおよび動物モデルにおいて実施される。当該技術分野で公知である分析、すなわち意識的無制限のゲッ歯類、ウサギまたは霊長類、例えば、TruePrimateJ、あるいは本発明を実施するために適用される他の種における全人体プレチスモグラフ技術などを使用してもよい。すなわち、本方法は疾患または症状の機能とそれに関連すると推測される標的ポリペプチドをコードする遺伝子またはmRNAとの相関関係の存在を決定することに役立つ。一般的にこの方法自体は、標的遺伝子およびその対応するmRNA、3'および5'イントロン-エクソン接合部位およびコーディングおよび非コーディング領域間の近傍部分から選択されるゲノムおよびmRNAフランキング領域、および前もって選択

された疾患または症状と関連するポリペプチドをコードする全てのmRNAからなる群から選択される標的に対してアンチセンスである、約15%以下のアデノシン(A)からなるオリゴヌクレオチド(オリゴ)を得;これらのオリゴの中から標的mRNAとのインビトロハイブリダイゼーションにおいてmRNAがコードするポリペプチドの発現を有意に阻止または切除するものを1つ選択し;標的mRNAとインビボハイブリダイゼーションにおいて有効な量の選択されたオリゴを被検者に投与し;かつ、オリゴの投与前後の疾患または症状に関連する被検者の機能を評価することを含み;約70%以上の機能値の変化は積極的相関関係を示し、約40から約70%は可能性ある相関関係を示し、かつ約30%以下は相関関係の欠如を示すことからなる。

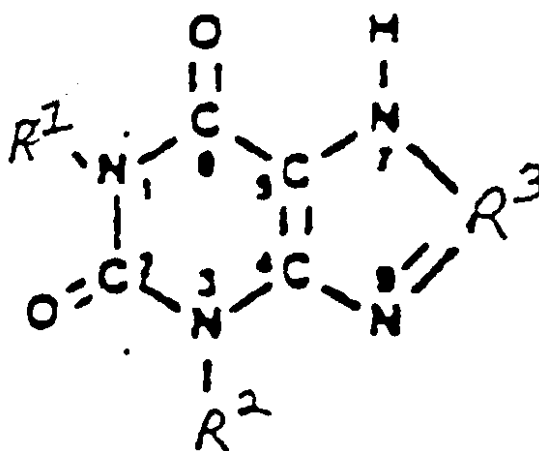
【0017】

アンチセンスオリゴは、GおよびCからなる群から選択される少なくとも4つの隣接した核酸を有する標的の断片を選択し、該選択断片を含み、かつ、CおよびG含量が約0%、約3%、約5%、約10%、約12%、約15%以下を有する長さ約4、6、8、10から約15、25、45、60ヌクレオチドである第1オリゴヌクレオチドを得ることによって構築される。また、標的断片はそのタイプおよび/または活性の程度によって選択してもよい。これは特定の目的に応じて異なるであろう。いかなる数のアデノシンも、もし存在するなら、チミジン塩基と結合するが、アデノシン A_{1} 、 A_{2a} 、 A_{2b} および A_{3} 受容体においてアデノシン塩基アゴニスト活性の約0.3以下である複素環式芳香族塩基、およびアデノシン A_{2a} 受容体にて活性を有しない複素環式芳香族塩基などの「一般的(universal)」または別な塩基で、1つから全てを置換してもよい。複素環式芳香族塩基は、例えば、O、ハロゲン、 NH_2 、SH、SO、 SO_2 、 SO_3 、COOH、および分岐および融合した第1級および第2級アミノ基、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、アルコキシ、アルケノキシ、アシル、シクロアシル、アルールアシル、アルキノキシ、シクロアルコキシ、アロキシ、アルールチオ、アリールスルフォキシ、ハロシクロアルキル、アルキルシクロアルキル、アルケニルシクロアルキル、アルキニルシクロアルキル、ハロアリール、アルキルアリール、ア

ルケニルアリール、アルキニルアリール、アリールアルキル、アリールアルケニル、アルールアキニル、アリールシクロアルキルで置換されていてもよく、さらに、O、ハロゲン、NH₂、第1、第2および第3級アミン、SH、SO、SO₂、SO₃、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、およびヘテロアリールで置換されていてもよいピリミジンまたはプリンであってもよい。しかしながら、他の化合物および他の置換体もまた、本方法で使用するのに適している。通常、ピリミジンおよびプリンは1、2、3、4、7および8位で置換されるが、他の置換体もまた包含される。ピリミジンおよびプリンの例としては、テオフィリン、カフェイン、ダイフィリン、エトフィリン、アセフィリン、ピペラジン、バミフィリン、エンプロフィリンおよび下記化学式を有するキサンチン

【0018】

【化3】



【0019】

(式中、R¹およびR²は独立して、H、アルキル、アルケニルまたはアルキニルおよびR³はH、アリール、ジシクロアルキル、ジシクロアルケニル、ジシクロアルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、O-シクロアルキル、O-シクロアルケニル、O-シクロアルキニル、NH₂-アルキルアミノ-ケトオキシアルキルオキシアリールおよびモノおよびジアルキルアミノアルキル-N-アルキルアミノ-SO₂アリールである。)

【0020】

一般的または別な塩基の具体例としては、3 - ニトロピロール - 2' - デオキシヌクレオシド、5 - ニトロ - インドール、2 - デオキシリボシル - (5 - ニトロインドール)、2 - デオキシリボフラノシル - (5 - ニトロインドール)、2' - デオキシイノシン、2' - デオキシネブラリン、6H, 8H - 3, 4 - ジヒドロピリミド [4, 5 - c] オキサジン - 7 - オンまたは2 - アミノ - 6 - メトキシアミノプリンがあるが、他のものも好適である。もっとも好ましいものは、アデノシン受容体に活性を有しないアデノシンアナログ、すなわち、いかなるアデノシン受容体にもアゴニストまたはアンタゴニスト特性のいずれも有していない。この方法は、他の好ましい態様では、オリゴ中にもし存在するなら、CpGジヌクレオチド中に少なくとも1つの未メチル化Cを置換したメチル化シトシン (^mC) を使用してもよいが、多数あるいは全てもまた置換してもよい。ピリミジンの他のC - 5変性、例えば、とりわけC - 5プロピンもまた有用性がある。この方法を実施するには、アンチセンスオリゴヌクレオチドの1つ以上または全ての結合領域は、メチルホスホネート、ホスフォトリエステル、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ボラノホスフェート、フォルムアセタール、チオフォルムアセタール、チオエーテル、カーボネート、カルバメート、スルフェート、スルフォネート、スルファメート、スルフォンアミド、スルフォン、スルファイト、スルフォキシド、スルファイド、ヒドロキシアミン、2' - メチレン (メチルイミノ) (MMI)、2' - メトキシメチル (MOM)、2' - メトキシエチル (MOE)、2' - メチレンオキシ (メチルイミノ) (MOMA)、2 - メトキシメチル (MOM)、2' - O - メチル、ホスホルアミデート、およびC - 5置換 (例、C - 5プロピン) 残基およびその組合せからなる群から選択される残基で置換または修飾されている。この方法を実施するのに適したアンチセンスオリゴは、長さ約7、約9、約11、約13、約15、約18、約21~約25、約28、約30、約35、約40、約45、約50、約55、約60モノヌクレオチドであり、他の長さもまた好適である。

【0021】

本発明の方法は、細胞ならびに細胞標的剤が吸収または摂取する薬剤、すなわ

ち、当該技術分野でとりわけ公知であるトランスフェリン、アシアログリコプロテインおよびストレプトアビジンなどに結合されるアンチセンスオリゴの使用を含む。1つの態様では、このオリゴは真核性または原核性ベクターに結合される。ベクターの例は、当該技術分野で公知であり、この特許でさらに記載する必要はない。投与されるアンチセンスオリゴの量は、一般的にはmRNAの生産性または有効性を低下させるか、分解を増加させるか、またはインサイチュで存在するポリペプチドの量を減少させるに有効な量である。例えば、バリデートされる遺伝子が呼吸機能に関する場合には、アンチセンスオリゴは肺に直接に投与すればよい。遺伝子およびその機能が他の系に関連する場合には、核酸は、好ましくは影響を与える領域、例えば脳、心臓、腎臓、膀胱、性腺、一般的な生殖系、呼吸および肺系、癌の場合の腫瘍、血液、免疫系、肺、皮膚、目、鼻通路、頭皮、精巣、頸部、口腔、咽頭、食道、小および大腸、滑膜組織、筋肉、子宮、外耳道、および選択標的部位を起源とする全ての細胞などの多くへインサイチュで投与される。多くの場合、疾患または症状は上記したものなど、ある系または系のある領域を冒す。例えば、呼吸器の病気は気管支収縮、炎症、IgE媒介アレルギー、表面活性物質生産、および喘息、アレルギー性鼻炎、COPD、肺腫瘍、ARDSなどの他の徴候の増加に関連している。疾患または症状が免疫機能障害に関連する場合には、標的は、とりわけ免疫グロブリンおよび抗体受容体、サイトカインおよびサイトカイン受容体、遺伝子および他の遺伝子産物、およびこれらをコードする対応mRNA、遺伝子およびmRNAのフランキング領域およびイントロンおよびエクソン接合部位の中から選択してもよい。疾患または症状が悪性腫瘍または癌に関連する場合には、標的は癌関連遺伝子産物、これらをコードする遺伝子およびmRNA、癌遺伝子に関連する遺伝子およびmRNA、ゲノムおよびmRNAのフランキング領域およびエクソンおよびイントロン接合部位などから選択してもよい。

【0022】

本発明方法で使用するアンチセンスオリゴは、肺気道を冒す疾患および/または症状に関連するポリペプチド、それらをコードする遺伝子およびRNA、ゲノムおよびmRNAのフランキング領域および遺伝子およびmRNAのイントロン

およびエクソン接合部位からなる群から標的を選択し；次いで、標的遺伝子に対応するmRNAセグメントおよび標的ポリペプチドをコードするmRNA、ゲノムおよびmRNAのフランキング領域および遺伝子およびmRNAのイントロンおよびエクソン接合部位からなる群から選択されたmRNA配列を得て；少なくとも1つのmRNAセグメントを選択し、選択mRNAに対する1種以上のアンチセンスオリゴを合成し；かつ、もし必要なら、オリゴ中に存在するAの含量を全ヌクレオチドの約10%以下に低下させるために、1つ以上のAを一般的または別な塩基に置換して生産してもよい。肺系に関連してコード化されるポリペプチドの特別な例としては、Nf_kB転写因子、インターロイキン-8受容体(IL-8R)、インターロイキン5受容体(IL-5R)、インターロイキン4受容体(IL-4R)、インターロイキン3受容体(IL-3R)、インターロイキン-1(IL-1)、インターロイキン1受容体(IL-1R)、エオタキシン、トリプターゼ、主要塩基性タンパク、 β_2 -アドレナリン受容体キナーゼ、エンドセリン受容体A、エンドセリン受容体B、プレプロセンドセリン、ブラジキニンB2受容体、IgE高親和性受容体、インターロイキン1(IL-1)、インターロイキン1受容体(IL-1R)、インターロイキン9(IL-9)、インターロイキン9受容体(IL-9R)、インターロイキン11(IL-11)、インターロイキン11受容体(IL-11R)、誘導性一酸化窒素シンセターゼ、シクロオキシゲナーゼ(COX)、細胞内接着分子1(ICAM-1)、血管性細胞接着分子(VCAM)、ランテス(Rantes)、内皮白血球接着分子(ELAM-1)、単球活性化因子、好中球走行性因子、好中球エラスターゼ、デフェンシン1、2および3、ムスカリン性アセチルコリン受容体、血小板活性化因子、腫瘍神経因子、5-リポキシゲナーゼ、ホスホジエステラーゼIV、サブスタンスP、サブスタンスP受容体、ヒスタミン受容体、チマーゼ、CCR-1CCケモカイン受容体、CCR-2CCケモカイン受容体、CCR-3CCケモカイン受容体、CCR-4CCケモカイン受容体、CCR-5CCケモカイン受容体、プロスタノイド受容体、GATA-3転写因子、好中球接着受容体、MAPキナーゼ、インターロイキン-9(IL-9)、NFAT転写因子、STAT4、MIP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、シクロフ

ィリン、ホスホリパーゼA2、塩基性線維芽細胞成長因子、メタロプロテナーゼ、CSBP/p38MAPキナーゼ、トリプトース受容体、PDG2、インターロイキン-3(IL-3)、インターロイキン-1(IL-1)、シクリスポリンA結合タンパク、FK5結合タンパク、41セレクチン、フィブロネクチン、47セレクチン、MadCAM-1、LFA-1(CD-11a/CD18)、PECAM-1、LFA-1セレクチン、C3bi、PSGL-1、E-セレクチン、P-セレクチン、CD-34、L-セレクチン、p150,95、Mac-1(CD11b/CD18)、フコシルトランスフェラーゼ、VLA-4、CD-18/CD11a、CD11b/CD18、ICAM2およびICAM3、C5a、CCR3(エオタキシン受容体)、CCR1、CCR2、CCR4、CCR5、LTB-4、AP-1転写因子、プロテインキナーゼC、システニルロイコトリエン受容体、タキチネン受容体(tachR)、I_κBキナーゼ1および2、STAT6、c-masおよびNF-インターロイキン-6(NF-IL-6)がある。

【0023】

CNS、眼、心臓血管および心肺系に関連するポリペプチドまたは遺伝子の例としては、G-タンパク結合受容体(約250が公知、および750~1,000がより仮定されるが配列決定されていない)、神経ペプチド遺伝子、神経ペプチド受容体遺伝子、刺激性アミノ酸受容体遺伝子、塩素チャネル遺伝子、カルシウムチャネル遺伝子、プリン作動性受容体遺伝子、アドレナリン受容体遺伝子、セロトニン受容体遺伝子、セロトニン輸送体遺伝子、刺激性アミノ酸輸送体遺伝子、カルシウムチャネル遺伝子、チロシンキナーゼ、ホスホリラーゼ、アセチルコリン受容体、コレシトキニン受容体、一酸化窒素シンセターゼ、ドーパミン受容体、コリン作動性受容体、アンジオテンシン、アンジオテンシン受容体、カルシウムチャネルを含むイオンチャンネル、髄鞘形成/脱髄および軸索および樹状構造に関連するものを含む構造タンパク、神経伝達体放出メディエーターおよび構造、眼科障害、特に網膜および関連構造の障害、カルシトニンおよびその受容体、カルシニューリンおよびその受容体、CGRPおよびその受容体、心房ナトリウム排泄増加ペプチドおよびその受容体、脳ナトリウム排泄増加ペプチドおよび

その受容体、ブラジキニンおよびその受容体、圧受容器、GABA/GABA受容体、ベンゾジアゼピン受容体、コリンエステラーゼ、カナビノイド受容体、カルモジュリンおよびその受容体、カルシウム/ナトリウム交換ポンプ、カルボン酸脱水酵素、カテコールアミンおよびそれらの受容体、ヒスタミン受容体、ムスカリン受容体、オピオイド受容体、ケモカイン、コリンアセチルトランスフェラーゼ、コレカルシフェロール、サイトカイン、インターロイキン、インターフェロンを含む炎症のメディエーターおよびそれらの受容体、リポキシゲナーゼ経路の酵素、プロテアーゼ、DP(PGD₂)受容体、イノシトールホスフェート関連酵素、エンドセリンおよびその受容体、エンケファリナーゼ、エンケファリン、ベンゾジアゼピン受容体、GABAトランスアミナーゼ、ガラニンおよびその受容体、ガストリン放出因子、成長因子、成長因子阻害剤、サイクリン、ヌクレオシドキナーゼ、ヌクレオチドキナーゼ、癌遺伝子受容体、5-ヒドロキシトリプタミン(5HT)受容体、ADH、IGF、インシュリン受容体、ラクタマーゼ、カイニン酸受容体、カリクレインおよびその受容体、ロイコトリエン関連酵素、リポコルチン、L-NMMAおよび受容体、マレノサイト刺激ホルモン、ステロイド輸送体および代謝酵素およびシンセターゼ、NMDAおよび受容体、モルフィリン受容体、MPTP、ニューロキニンおよびその受容体、ニコチン受容体、ホスホリパーゼ、血小板活性化因子、シグナル伝達タンパク、PDGF、ダイノルフィン、プロスタサイクリン、プロラクチンおよびその受容体、プロラクチン放出阻害因子、プロホルモン、プロスタノイド、プロスタグランジンおよびその受容体、スロンピン、プロスロンピン、プテロイルグルタミン酸およびその受容体、リゼルギン酸受容体、ヘビおよびサソリ毒液受容体、レニンアンジオテンシン系化合物、逆転写酵素、二次メッセンジャーおよび関連酵素、ナトリウムチャンネル、ソマトスタチンおよびその受容体、ソマトロピンおよびその受容体、サブスタンスP、サブスタンスk、シナトピック伝達体、タチキニン、テトロドトキシン受容体、トロンボキサンおよびその受容体、チロイドホルモン、ホルモン、チロトロピンと受容体、プロチレリン、T₄、T₃トポイソメラーゼ、腫瘍神経因子およびその受容体、TGFおよびその受容体、キサンチンオキシダーゼ、ウイルス性メッセンジャーRNA、細菌mRNA、オキシトシンおよびその受

容体、クレシストキニンおよびその受容体、血管作動性腸ペプチドおよびその受容体、モノアミンオキシダーゼ、チロシンキナーゼ結合受容体、および多くのものがある。他の特異的な標的遺伝子、例えばG - タンパクおよびG - タンパク結合受容体、カルシウムチャンネルタンパクおよび関連タンパク受容体、ナトリウムチャンネルタンパクおよび関連タンパク受容体、カリウムチャンネルタンパクおよび関連タンパク受容体、および塩素チャンネルタンパクおよび関連タンパク受容体、神経伝達体および神経伝達体受容体、神経ホルモンおよび神経ホルモン受容体、神経ペプチドおよび神経ペプチド受容体、および本特許中に列記されるものを含む他のおおくのものがある。他の標的遺伝子は、例えば、G - タンパクおよびG - タンパク結合受容体、カルシウムチャンネルタンパクおよび関連タンパク受容体、ナトリウムチャンネルタンパクおよび関連タンパク受容体、カリウムチャンネルタンパクおよび関連タンパク受容体、および塩素チャンネルタンパクおよび関連タンパク受容体、神経伝達体および神経伝達体受容体、神経ホルモンおよび神経ホルモン受容体、神経ペプチドおよび神経ペプチド受容体、および他の多くのものがある。

【0024】

本方法では、その組成物をインビトロ、経口内、腔内、鼻内、肛門内、腔内、子宮内、頭蓋内、肺内、腎臓内、結節内、関節内、耳内、リンパ管内、経皮、頬内、静脈内、皮下、筋肉内、腫瘍内、眼内、頭蓋内、器官内、血管内、くも膜下腔内、移植、吸入、皮内、肺内、耳内へ、皮膚上、または頭皮または頸部（例えば、局所的に）、心臓中、低放出、徐放、およびポンプにより投与してもよい。異なった系および疾患に関連する標的遺伝子およびmRNAの例としては、転写因子、刺激および活性化因子、サイトカインおよびその受容体、インターロイキン、インターロイキン受容体、ケモカイン、ケモカイン受容体、内因性産生特異的および非特異的酵素、免疫グロブリン、抗体受容体、中枢神経系（CNS）および末梢神経および非神経系受容体、CNSおよび末梢神経および非神経系ペプチド伝達体、接着分子、デフェンシン、成長因子、血管活性ペプチド、ペプチド受容体および結合タンパクなどのタンパクをコードする遺伝子およびmRNA、および癌遺伝子に対応する遺伝子およびmRNAがある。このオリゴの投与は、

溶液、懸濁液、および水中油および油中水乳化液などの液体担体を有する経口処方剤を用いて実施してもよく、および/または粉末、糖衣錠、錠剤、カプセル、スプレー、エアロゾル、溶液、懸濁液および乳化液として投与してもよい。局所処方剤として投与する場合、担体はクリーム、ゲル、軟膏、スプレー、エアロゾル、パッチ、溶液、懸濁液および乳化液から選択してもよい。処方剤が注射可能である場合には、担体はとりわけ水溶液およびアルコール溶液および懸濁液、油性溶液および懸濁液および水中油および油中水乳化液から選択してもよいが、直腸処方剤としては座薬が使用され、経皮処方剤としては担体が水溶性およびアルコール性溶液、油性溶液および懸濁液および水中油および油中水乳化液から選択されるが、他のものも好適である。経皮処方剤は、担体が水溶液およびアルコール性溶液、油性溶液および懸濁液および水中油および油中水懸濁液から選れる場合には、イオン泳動的経皮処方剤であってもよく、また、該処方剤は経皮輸送促進剤を含んでいてもよいが、その多くは当該技術分野で公知である。該処方剤を含む移植可能なカプセルまたはカートリッジも長期投与には好適である。この場合、担体は水溶液、アルコール性溶液および懸濁液、油性溶液および懸濁液および水中油および油中水乳化液から選択してもよく、脂質小胞または粒子、例えば、N - (1 - [2 , 3 - ジオレオキシシルオキシ] プロピル - N , N , N - トリメチル - アンモニウムメチルスルフェートから製造されたりポゾームおよび/または他の脂質、および微結晶などの疎水性担体であってもよい。肺への用途には、該処方剤は、好ましくは呼吸可能または吸入可能な処方剤、例えばエアロゾルの形態である。標的領域の長期露呈には、オリゴは局部移植、座薬、舌下処方剤などを通じて輸送してもよい。これらの全ては当該技術分野で公知である。

【0025】

この方法が他の技術より優れることを証明する要素は、より大きな信頼性および正確性を有するデータを得る能力である。アンチセンスリボザイム技術はインピボ環境では不安定ではなく、リボザイム中にアデノシンと他のオリゴヌクレオチドが存在すると、例えば、機能亢進性呼吸管および相当数のアデノシン受容体を有する他の系では、信頼性あるデータの取得を阻止する。現在までに、A含有系、例えば、呼吸管で明白に標的を弱力化させる能力を有し、一方、正確な相関

関係を提供する他の方法は判明していない。さらに、本方法は遺伝子ネットワーク、例えば、神経系遺伝子ネットワークの解明に使用してもよい。それはそのより広い面での単離において、1つの遺伝子を確認する以上の大きな飛躍である。これは代謝経路に結合する1つ以上の標的を選択し、それらを別々におよび他のものと関連して試験し、すなわち、1つのアンチセンスオリゴを1回、2回、3回などにわけて投与して、かつ関連性が存在するか否か、それらは連続して作用するかなどを確認するために、その結果を比較することによって行われる。本発明は、CNSに関して、とりわけ認識、記憶、痛み、不安、行動障害、摂食行動、空腹および飽満および神経疾患、などの領域における臨界的な医薬の要求を満足する、より精巧な薬剤誘引発見プロセスを補充するに適した遺伝子ネットワークデータベースの創製を可能とする。本技術は4つの基本的領域：新薬発見に関連する神経遺伝子ネットワークの識別に適用する機能的ゲノミクス、脳内でのこれらのネットワークの分布を理解するインサイチュハイブリダイゼーション、ネットワーク内での個々の遺伝子の機能を決定する部位特異的機能性遺伝子除去(SSFGA)、医学関連の種々の行動における遺伝子および遺伝子ネットワークの関与を定性および定量的に分析する多因子行動分析、および心臓血管性および肺系などの錐体外路系上の遺伝子および遺伝子ネットワークの効果を識別する生理学、生物物理、生化学などの分析を包含する。

【0026】

本方法のCNSへの応用は、とりわけ、痛み、飽満、不安/情緒障害、性欲、認識/認識障害および睡眠/睡眠障害などの領域を包含する。確認された新規な遺伝子および遺伝子ネットワークの機能的意義を識別する能力は、その空間的再現の評価に依拠する。インサイチュハイブリダイゼーションは、例えば、脳内の選択された遺伝子および遺伝子ネットワークの正確な3次元(3-D)配置を決定し、薬剤発見プログラムの候補としてその有意性を評価する遺伝子除去研究のための正確な標的化を可能とするために使用してもよい。部位特異的機能性遺伝子除去(SSFGA)はある系の所望の領域、例えば脳での標的遺伝子の発現を選択的に弱める方法を提供する。CNS標的バリデーシヨンのためのSSFGAは、以下に記載されるように設計された低AまたはdesAアンチセンスオリゴヌ

クレオチドを使用して達成される。アンチセンスオリゴヌクレオチドを使用する他の研究は、使用するオリゴヌクレオチドが、例えばCNSおよびアデノシン受容体を含む他の標的系でもっとも生物活性なオータコイドの1つ、アデノシンを分解して放出するから、明白なデータを提供する。オリゴヌクレオチドの分解時のアデノシン放出は、その系およびそれが放出される特定の領域、例えば脳領域に依存して、神経伝達体を抑制または促進し、睡眠を誘導し、侵害受容に作用し、視床紡錘リズムを変化させ、無数の薬剤効果を緩和または可能にし、心臓血管機能および呼吸の自己制御に作用し、Ca⁺流およびGABAのシナプス機能を阻害し、自発的および誘発的神経発射を抑制し、神経伝達体の放出を阻害し、シナプス後の興奮性を減少させ、学習および記憶の根本的できごとと仮定する長期間の相乗作用を阻害し、かつ、頭部の気管支拡張を引き起こして多面的効果を誘導する。明らかに、実験動物の脳または他の箇所でもオリゴヌクレオチド分解を経て、有意な量のアデノシンを放出することは、ターゲットバリデーション研究では禁忌を示す。CNSターゲットバリデーションにおける終点との応用に適した神経および行動試験は、当該技術分野では公知である。例えば、記憶、三次元または空間的能力、認識、運動制御、外因性トリガーへの感受性と応答、視力、目の協調、皮膚知覚能力、味覚および嗅覚の認識および多くのものなどがある。生理学的パラメータの試験もまた当該技術分野で公知であり、EKGsおよびEEGなどの電気伝導度、あるいは心拍数および律動性、排尿、睡眠パターンなどの他の人的機能を測定する。多くの場合、特に心肺、腎臓の副作用および他の副作用がCNS標的の潜在的薬剤発見を不相当と判定する大きな理由となる。また、逆に、CNS副作用はしばしば他の適切な治療上の心肺、腎臓および他の薬剤を不相当とする。CNS標的の弱化によって生じる心肺効果の証拠を、薬剤の開発ではできるだけ早く得ることが有益であろう。このような効果が開発計画の中で遅く発見される場合には、もっと遅い段階で計画を取り消すこととなる。本方法は、極限技術の分析、すなわち有意な外科的、電気生理学および他の試験を使用して、有害な作用、例えば呼吸標的を弱化する心臓血管作用および逆にCNSまたは心臓血管系における呼吸標的を弱化するいかなる有害な作用をも評価する。例えば、意識ある無制限動物で行う肺機能研究および心臓機能研究は、さ

らに、CNS標的候補を弱化させる潜在的効果への洞察をもたらす。

【0027】

ターゲットバリデーションは、ヒト病理の推定機能を有する種々の公知受容体、例えば神経ペプチドY (NPY) / レプチン受容体および摂取行動を標的とする低AまたはdesAアンチセンスオリゴヌクレオチド、ならびにCNS遺伝子ライブラリーから見出された新規な標的を使用して、上記したようにSSFGAを経由して進めてもよい。動物モデルは特定の受容体を標的とするSSFGAに処し、次いで、とりわけ摂取行動、痛覚脱失、運動行動、感覚運動反射、通門プロセス、性および生殖行動、不安、学習と記憶などの種々の行動における変化を評価する。この広い基礎的行動系列の試験は、特定のCNS標的を弱化する効果の感度よい測定尺度、および薬剤開発決定プロセスの初期段階での臨界的知識をもたらす。この方法は生理学 / 生物物理 / 生化学分析と組み合わせて、別な薬剤発見の努力への価値ある焦点として、標的候補の潜在性の急速かつ集中的決定をもたらす。本方法は異なった系に関連する遺伝子を標的とするdesアデノシンアンチセンスオリゴを使用して、遺伝子産物の発現を阻止し、かつその効果と症候を試験することにおいて、遺伝子およびタンパクの標的バリデーションに関する公知方法を改良し、そしてこれらの手法を変える。本発明は、オリゴヌクレオチドがインピボで、そのモノヌクレオチドに代謝されたとき、生物活性アデノシン代謝産物が放出されるという本発明者の最近の発見を前提とする。アデノシン(A)含有オリゴヌクレオチドは分解して、アデノシン代謝産物を放出し、例えば肺の中で気管支収縮、炎症などを生じるアデノシン受容体を順に活性化する。本技術は異なった機能、配置、および病理に関与する系に関連する遺伝子およびmRNAを標的とするアンチセンスオリゴの設計に依拠する。このオリゴはアデノシン含量を減少させるように修飾して、分解時の放出によって生じる望ましくない副作用の発生を最小限にする。そのようにして、特にアデノシン受容体が同様な作用、あるいは観察されるものとは逆な作用に関与するか、あるいは観察される系の実験的モデルの恒常性に変化を間接的に生じさせることによって関与する場合には、観察結果の統計的有意性を改良する。このようにして、本発明者は特定遺伝子を標的として、対応するmRNAに選択的に結合し、必要により一般的ま

たは別な塩基、あるいはアデノシン A_{1} 、 A_{2a} 、 A_{2b} または A_{3} 受容体を活性化できないアデノシン類似体と置換してアデノシン含量を減少した1種以上のアンチセンスオリゴヌクレオチド(オリゴ)を設計する。この分野での先の経験に基づき、本発明者は「受容体減少作用」または特定遺伝子の除去に加えて、チミジン(T)を欠くかあるいは低含量であるRNAセグメントを選択して、あるいはチミジンと結合するがアデノシン受容体を活性化する能力を欠き、他方、肺の中でアデノシンの作用に影響を及ぼす他のヌクレオチド塩基、いわゆる一般的または別な塩基でもって、設計オリゴヌクレオチドに存在する1種以上のアデノシンを置換して、その結果の正確性を増加させることができた。アデノシン(A)はチミジン(T)に相補的なヌクレオチド塩基であるから、TがRNAに現れた場合、アンチセンスオリゴは同じ位置にAを有するであろう。一貫性のために、本特許では全てのRNAおよびオリゴヌクレオチドはその相補配列もまた、本発明の4つのコーナー内に包含されるけれども、左から右へ読解する5'方向から3'方向への1本鎖として表現する。さらに、ヌクレオチド塩基およびアミノ酸は全てIUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commissionの勧告または公知3文字コード(アミノ酸)を使用して表現した。

【0028】

本発明の方法は、いかなる数の標的遺伝子、すなわち、ひとりの被検者の1つの機能に関連する1つの遺伝子から、1つの系内のネットワークあるいは経路に関連する多数の遺伝子までをバリデートまたはインバリデートするために使用してもよい。バリデーション/インバリデーションによって、これは特定遺伝子が多くの生物物理学、生化学、生理学、行動学などの機能のうちの1つに関与するか否かを実験的証拠を通して証明することを意味する。たとえ、遺伝子が最初に作用を有しないように見えても、作用を観察するとその発現を同時に消滅する前提条件も存在するから、他の遺伝子標的と組み合わせて試験してもよい。本発明のアンチセンス薬のアデノシン含量は、薬剤のインビボでの分解時にその遊離を阻止するような減少したA含量である。例えば、もしも系が肺または呼吸器系であるなら、多くの遺伝子は下記表に列記されるものを含む異なった機能に関与している。

【0029】

表1：肺疾患または肺症状および炎症性標的

Nf _κ B転写因子	インターロイキン - 8 受容体(IL-8R)
インターロイキン - 5 受容体(IL-5R)	インターロイキン - 4 受容体(IL-4R)
インターロイキン - 3 受容体(IL-3R)	インターロイキン - 1 (IL-1)
インターロイキン - 1 受容体(IL-1 R)	エトタキシン
トリプターゼ	主要塩基性タンパク
2 - アドレナリン様受容体キナーゼ	エンドセリン受容体A
エンドセリン受容体B	プレプロエンドセリン
ブラジキニンB2受容体(B2BR)	I g E (高親和性受容体)
インターロイキン - 1 (IL-1)	インターロイキン1受容体(IL-1R)
インターロイキン - 9 (IL-9)	インターロイキン9受容体(IL-9R)
インターロイキン - 11 (IL-11)	インターロイキン11受容体(IL-11R)
誘導性一酸化窒素シンセターゼ	シクロオキシゲナーゼ (COX)
細胞内接着分子1 (ICAM-1)	血管内細胞接着分子、Subst.P (VCAM)
ランテス	内皮白血球接着分子
内皮ET A受容体	(ELAM-1)
シクロオキシゲナーゼ - 2 (COX-2)	GM-CSF、エンドセリン - 1
単球活性化因子	好中球走行性因子
好中球エラスターゼ	デフェンシン1、2、3
ムスカリン性アセチルコリン受容体	血小板活性化因子
腫瘍神経因子	5 - リポキシゲナーゼ
ホスホジエステラーゼIV	サブスタンスP
サブスタンスP受容体	ヒスタミン受容体
キマーゼ	CCR-1 CCRケモカイン受容体
インターロイキン - 2 (IL-2)	インターロイキン - 4 (IL-4)
インターロイキン - 12 (IL-12)	インターロイキン - 5 (IL-5)

インターロイキン - 6 (IL-6)	インターロイキン - 7 (IL-7)
インターロイキン - 8 (IL-8)	インターロイキン - 12 受容体 (IL-12R)
インターロイキン - 7 受容体 (IL-7R)	インターロイキン - 1 (IL-1)
インターロイキン - 14 受容体 (IL-14R)	インターロイキン - 14 (IL-14)
CCR - 2 CCR ケモカイン受容体	CCR - 3 CCR ケモカイン受容体
CCR - 4 CCR ケモカイン受容体	CCR - 5 CCR ケモカイン受容体
プロスタノイド受容体	GATA - 3 転写因子
好中球接着受容体	MAPキナーゼ
インターロイキン - 15 (IL-15)	インターロイキン - 15 受容体 (IL-15R)
インターロイキン - 11 (IL-11)	インターロイキン - 11 受容体 (IL-11R)
NFAT 転写因子	STAT4
MIP - 1	MCP - 2
MCP - 3	MCP - 4
シクロフィリン (A、B など)	ホスホリパーゼ A2
塩基性線維芽細胞成長因子	メタロプロテアーゼ
CSBP / p38 MAPキナーゼ	トリプターゼ受容体
PDG2	インターロイキン - 3 (IL-3)
インターロイキン - 10 (IL-10)	シクロスポリン A 結合タンパク
FK506 結合タンパク	4-1 セレクチン
フィブロネクチン	4-7 セレクチン
cMadCAM - 1	LFA - 1 (CD11a/CD18)
PECAM - 1	LFA - 1 セレクチン
C3bi	PSGL - 1
E - セレクチン	P - セレクチン
CD - 34	L - セレクチン
p150, 95	Mac - 1 (CD11b/CD18)
フコシルトランスフェラーゼ	VLA - 4
STAT - 1	STAT - 2
CD - 18 / CD11a	CD11b / CD18

ICAM2およびICAM3	C5a
CCR3(エオタキシン受容体)	CCR1、CCR2、CCR4、CCR5
LTB-4	AP-転写因子
プロテインキナーゼC	システニルロイコトリエン受容体
タチキニン受容体(tachR)	I _κ Bキナーゼ1および2
インターロイキン-2受容体(IL-2R)	
(例、サブスタンスP、NK-1およびNK-3受容体)	
STAT6	c-mas
NF-インターロイキン-6(NF-IL-6)	インターロイキン-10受容体(IL-10R)
インターロイキン-3(IL-3)	インターロイキン-2受容体(IL-2R)
インターロイキン-13(IL-13)	インターロイキン-12受容体(IL-12R)
インターロイキン-14(IL-14)	インターロイキン-6受容体(IL-6R)
インターロイキン-16(IL-16)	インターロイキン-13受容体(IL-13R)
メジュラシン	インターロイキン-16受容体(IL-16R)
アデノシンA ₁ 受容体(A ₁ R)	トリプターゼ-1
アデノシンA _{2b} 受容体(A _{2b} R)	アデノシンA ₃ 受容体(A ₃ R)
トリプターゼ	STAT-3
アデノシンA _{2a} 受容体(A _{2a} R)	IgE受容体サブユニット(IgER)
Fc-イプシロン受容体CD23抗原	IgE受容体サブユニット(IgER)
IgE受容体Fcイプシロン受容体(IgERFcR)	サブスタンスP受容体
ヒスチジンデカルボキシラーゼ	トリプターゼ-1
プロスタグランジンDシンセターゼ	好酸球カチオン性タンパク
好酸球誘導神経毒	好酸球パーオキシダーゼ
内皮一酸化窒素シンセターゼ	内皮単球活性化因子
好中球酸化酵素因子	カテプシンG
マクロファージ炎症性タンパク-1- /ランテス受容体	インターロイキン-8受容体サブユニ ット(IL-8R)
	エンドセリン受容体ET-B

【0030】

これらの遺伝子および他のものは、呼吸の正常機能、ならびに嚢胞性線維症、喘息、肺高血圧症および血管収縮、慢性閉鎖性肺疾患（COPD）、慢性気管支炎、呼吸窮迫症候群（ARDS）、アレルギー性鼻炎、肺癌および肺転移性癌、および炎症性反応をともなうものを含む他の気道疾患になどの呼吸病理に関連する疾患に關与する。とりわけアデノシン A_{1} 、 A_{2a} 、 A_{2b} 、および A_{3} 受容体、CCR3（ケモカイン受容体）、ブラジキニン2B、VCAM（血管内細胞接着分子）、および好酸球受容体に対するアンチセンスオリゴは、これら遺伝子発現の減少作用において有効であることが示されている。これらのいくつかは、例えば、アデノシン A_{1} 、 A_{2a} 、 A_{2b} 、および A_{3} 受容体およびCCR3、ブラジキニン2B、VCAM（血管内細胞接着分子）、および好酸球受容体の減少作用によって、症候を緩和し、呼吸の病気および/または炎症を減少させるように作用する。これらの薬剤は、本発明方法のみによって、あるいはそれらが關与する経路および/またはネットワークをバリデートする他の遺伝子を標的とするアンチセンスオリゴと組み合わせて使用してもよい。よい結果を得るには、オリゴは実験動物の呼吸器系へ、好ましくは、直接に、例えば吸入または他の手段によって投与される。その結果、それらは広く全身的に分散することなく、肺へ到達するであろう。これは全身に投与されたもの、あるいは他の一般的な経路によるものに比べて、薬剤低用量の使用が可能となり、その結果、体内での薬剤の広い分布から生じる望ましくない副作用の数および程度を減少させる。本発明の薬剤は、組織が発現する受容体タンパクの量を減少させることが示されている。すなわち、これらの薬剤は単にそれらの標的、例えば受容体と相互作用するよりも、むしろ他の薬剤が相互に作用する標的タンパクの数を減少させる。このように、本薬剤は低毒性で極めて高い効果を与える。

【0031】

上記した受容体は、本技術の高いパワーの単なる実施例である。事実、本発明方法を実施して、多数の遺伝子が同様な方法で標的化され、タンパク発現を有意に減少あるいは完全に消滅させて、ある系、例えば呼吸、CNS、心臓血管、腎臓および他の系内で1つ以上の機能に作用するいかなる変化をも觀察する。例え

ば呼吸器系で試験される機能とは、呼吸の容易さ、気管支収縮、炎症、慢性気管支炎、界面活性物質生成など、およびこのような慢性閉鎖性肺疾患（COPD）、吸入性熱傷、急性呼吸窮迫性症候群（ARDS）、嚢胞性線維症、肺線維症、放射線肺炎、扁桃腺炎、気腫、歯通、口内炎、関節痛、食道炎、肺癌および食道癌などの疾患および炎症にとりわけ関連するものである。これらの機能は、呼吸機能障害に関連するから大きな興味がある。喘息、アレルギー、アレルギー性鼻炎、肺気管支収縮および高血圧、慢性閉鎖性肺疾患（COPD）、アレルギー、喘息、嚢胞性線維症、急性呼吸窮迫症候群（ARDS）、直接にあるいは転移によって肺を患う癌では、とりわけ上記した表1に列記される標的を含む、潜在的標的mRNAへ本発明を適用すればよい。CNS系では、選択された機能は食品摂取/飽満、情緒変化、不安、性欲/性的障害、認識、性機能/障害、脳外傷、アルツハイマーメディエーター、動脈瘤などがある。

【0032】

本発明のオリゴは、GおよびCからなる群から選択された少なくとも4つの連続した核酸を有し、特定の型および/または範囲を有する標的核酸の断片をまず、選択し、次いで、該選択断片を含み、チミジン（T）核酸含量が約15%以下、好ましくは約12%、約10%、約7%、約5%、約3%、約1%を含み、さらに好ましくはチミジンを含まない長さ4~60ヌクレオチドである第1オリゴヌクレオチドを得ることによって生成する。後者の工程は、選択断片に対するアンチセンスである配列を含む、長さ4~60ヌクレオチドである第2オリゴヌクレオチドであって、約15%以下、好ましくは約12%、約10%、約7%、約5%、約3%、約1%のアデノシン塩基含量を有し、より好ましくはアデノシンを含まない第2オリゴヌクレオチドを得ることによって行ってもよい。選択断片が少なくとも1つのチミジン塩基を含む場合、アデノシン塩基は、対応するアンチセンスヌクレオチド断片を、チミジンと結合するが、呼吸器系でのバリテーションにおいてアデノシンA₁、A_{2a}、A_{2b}、およびA₃受容体にて約10%以下、好ましくは1%以下、より好ましくは約0.3%以下のアデノシン塩基アゴニスト活性を有する複素環式芳香族塩基、およびA_{2a}受容体にて活性を有しない複素環式芳香族塩基からなる群から選択される一般的または別な塩基で置換

してもよい。他の系での他のアデノシン活性は他の系において適当に決定される

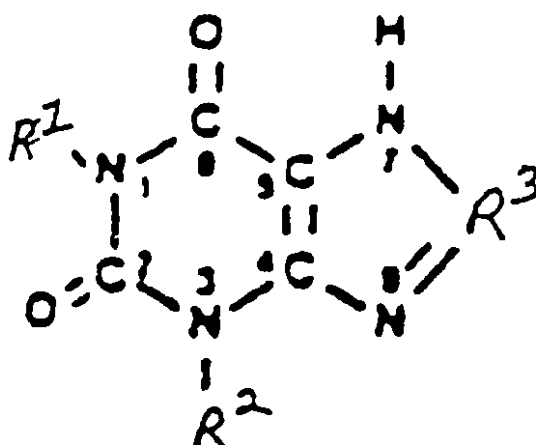
。

【0033】

複素環式芳香族塩基類似体は、O、ハロゲン、NH₂、SH、SO、SO₂、SO₃、COOH、および分岐および融合第1級および第2級アミノ、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、アルコキシ、アルケノキシ、アシル、シクロアシル、アルールアシル、アルキノキシ、シクロアルコキシ、アロイル、アルールチオ、アルールスルホニル、ハロシクロアルキル、アルキルシクロアルキル、アルケニルシクロアルキル、アルキニルシクロアルキル、ハロアリール、アルキルアリール、アルケニルアリール、アルキニルアリール、アルールアルキル、アリールアルケニル、アルールアルキニル、アルールシクロアルキルで置換され、さらに、O、ハロゲン、NH₂、第1級、第2級および第3級アミン、SH、SO、SO₂、SO₃、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキルおよびヘテロアリールで置換されていてもよい、全てのピリミジンおよびプリンから選択される。ピリミジンおよびプリンは当該技術分野で公知である全ての位置で置換されるが、1、2、3、4、7および/または8位置で置換されるものが好ましい。テオフィリン、カフェイン、ダイフィリン、エトフィリン、アセフィリ、ンピペラジン、バミフィリン、エンプロフィリンおよび下記化学式を有するキサンチンなどのピリミジンおよびプリンがより好ましい。

【0034】

【化4】



【0035】

(式中、 R^1 および R^2 は独立して、H、アルキル、アルケニルまたはアルキニル、および R^3 はH、アリール、ジシクロアルキル、ジシクロアルケニル、ジシクロアルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、O-シクロアルキル、O-シクロアルケニル、O-シクロアルキニル、 NH_2 -アキルキルアミノ-ケトオキシアルキルオキシ-アリール、モノおよびジアルキルアミノアルキル-N-アルキルアミノ- SO_2 アリールである。)糖における同様な修飾もまた本発明の態様である。標的RNAに存在するチミジン(T)に対応するアンチセンスオリゴの低アデノシン含量は、ある系、例えば肺、脳、心臓、腎臓など、組織環境の中へアデノシンを遊離する産物へのオリゴの分解を阻止し、それによる望ましくない効果を阻止するために使われる。

【0036】

1例として、 Nf_k B転写因子は標的として選択され、低チミジン(T)またはデスチミジン(desT)断片を求めて、そのmRNAまたはDNAが探索される。mRNAまたはDNAのdesT断片のみが選択され、これは代わって、その相補鎖としてdesAアンチセンスを生成するであろう。多くのRNA desTセグメントが見出された場合、アンチセンスセグメントの配列は演繹される。通常、約10~30およびより多数のdesAアンチセンセグメントの配列が得られる。これらのアンチセンス配列は、上記表1、下記表2に示されるもののいずれか、および脳、心臓血管および腎臓および他の多くのものの機能に関連する標的のmR

NAのdesTセグメントに対応するdesAアンチセンスオリゴヌクレオチド配列のいくつかあるいは全てを含む。これが生じる場合、見出されるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、Aを100%含まないと言われている。標的遺伝子に対応する元のdesAアンチセンスオリゴヌクレオチド配列のそれぞれ、例えばNf_kB転写因子では、通常、約10~30配列が標的遺伝子または低含量のチミジン(RNA)を有するRNA内に見出されるであろう。本発明では、選択断片配列は第2次、第3次または第4次配列内の少数のチミジン(RNA)ヌクレオチドを含むであろう。ある場合には、大きなアデノシン含量はアンチセンスオリゴヌクレオチドを標的に対して低活性とするか、あるいは不活性とするに充分である。本発明では、「非完全desA」配列と呼ばれるものは、好ましくは約15%以下、約12%、約10%、約7%、約5%および約2%のアデノシン含量を有する。最も好ましいものは、アデノシンを含まない(0%)。ある例では、しかしながら、より高い含量のアデノシンでも許容され、オリゴヌクレオチドはなおも有害な「アデノシン活性」を示さない。特に重要な態様とは、アデノシンヌクレオチドが「固定化」されるか、あるいは天然DNAに存在する4種のヌクレオチド：A、G、CおよびTのうち2種以上へ同様なまたは等しい親和性を有する塩基対となる「一般的または別な」塩基で置換される場合である。

【0037】

本特許では一般的または別な塩基とは、チミジンとハイブリダイズする実質的な能力を有し、アデノシンが実験動物または細胞系において望ましくない副作用を発揮するアデノシン受容体または他の分子に結合する能力を実質的に欠く、いかなる化合物、より一般的にはアデノシン類似体であると定義される。また、アデノシンA₁、A_{2a}、A_{2b}および/またはA₃受容体、最も好ましくはA₁受容体などのアデノシン受容体を活性化することが完全にできないアデノシン類似体を使用される。一般的または別な塩基の1つの例としては、-デオキシリボフラノシル-(5-ニトロインドール)があるが、専門家は他のものを選択する方法を知っているであろう。この「固定」工程は、天然に見出されたものに対するアンチセンスと異なった別な新規な配列を生じて、標的RNAと好ましくは同等に結合するアンチセンスオリゴヌクレオチドを生じる。他の一般的または別

な塩基としては、2 - デオキシリボシル - (5 - ニトロインドール)がある。他の一般的または別な塩基としては、3 - (ニトロピロール - 2' - デオキシヌクレオシド、5 - ニトロインドール、2 - デオキシリボシル - (5 - ニトロインドール)、2 - デオキシリボフラノシル - (5 - ニトロインドール)、2' - デオキシネブラリン、6H, 8H - 3, 4 - ジヒドロピリミド[4, 5 - c] - オキサジン - 7 - オンおよび2 - アミノ - 6 - メトキシアミノプリンがある。上記したものに加えて、幾分ハイブリダイゼーション性は減少するけれども、他の塩基を置換してもよい一般的または別な塩基としては、3 - ニトロピロール2' - デオキシヌクレオシド、2 - デオキシリボフラノシル - (5 - ニトロインドール)、2' - デオキシイノシン、2' - デオキシイノシンおよび2' - デオキシネブラリン (Gen Research, Sterling, VA) が挙げられる。より特異的ミスマッチペアは、とりわけ「P」ヌクレオチド、すなわち、その塩基がグアニジン (G) またはアデノシン (A) のいずれかと対を作る6H, 8H - 3, 4 - ジヒドロピリミド[4, 5 - c][1, 2]オキサジン - 7 - オンおよび「K」ヌクレオチド、すなわち、その塩基がシチジン (C) またはチミジン (T) のいずれかと対を作る2 - アミノ - 6 - メトキシアミノプリンを使用して行う。当該技術分野で公知であるか、あるいは入手可能となる他のものもまた好適である。例えば、Loakes, D. とBrown, D. M., Nucl. Acids Res. 22:4039-4043 (1994)、Ohtsuka, E.ら、J. Biol. Chem. 260(5): 2605-2608(1985); Lin, P. K. T. とBrown, D. M., Nucleic Acids Res. 20(19): 5149-5152(1992); Nichols, R. ら、Nature 369(6480): 492-493 (1994); Rahmon, M. S. とHumayun, N. Z., Mutation Research 377 (2): 263-8 (1997); Amosova, O., ら、Nucleic Acids Res. 25(10): 1930-1934 (1997); Loakes D. & Brown, D. M., Nucleic Acids Res. 22 (20): 4039-4043 (1994)参照。一般的または別な塩基およびその調製および核酸結合での使用に関する全箇所は、本明細書中に参考として援用する。

【0038】

完全にdes T配列でない配列が天然に存在する標的に見出された場合、それらは通常、選択され、それゆえ、約1~3の一般的または別な塩基で置換するだけで100%「des A」アンチセンスオリゴヌクレオチドを得るには十分である。

すなわち、本方法はA含量が低いかあるいは欠ける異なった標的に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドか、あるいは1種以上のアデノシンヌクレオチド、例えば約1～3またはそれ以上が「一般的または別な」塩基による置換で「固定化」されていてもよいアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。一般的または別な塩基は当該技術分野で公知であり、ここに列挙する必要はない。専門家はどの塩基が一般的または別な塩基として作用するか、またAに代えてそれらで置換することを知っている。

【0039】

本明細書で使用するように、呼吸器、炎症、CNS、心肺、腎免疫、および他の系などのある系内で、標的を「バリデートする」または「バリデーティング」との語は、該系中で、例えばCNSまたは心臓血管または心肺系中で治療領域を選択して始まるプロセスを呼ぶ。これらの系中で研究のために選択される領域としては、不安、情緒障害、飽満と食欲抑制、痛み、認識、睡眠誘導および障害、温度制御、および脳によって支配されるか、脳中で制御される他の多くのもの、および下記表2に例示される他のものがある。

【0040】

次工程は、適当な系、例えば、CNS、肺、心臓系、腎臓/腎系、血液、免疫系、肺および呼吸器系、性機能/障害、皮膚、眼、鼻通路、頭皮、睾丸、頸部、口腔、咽頭、食道、小および大腸、滑膜組織、子宮、外耳道、および他の系に対応する遺伝子配列データベースを選択することである。標的遺伝子はCNS、あるいはCNSのある領域に関連することが公知であるもの、あるいは機能が未知であるものの中から選択される。その機能が公知であり、その系で生じるであろう遺伝子もまた選択される。次いでアンチセンスオリゴがこれらの標的遺伝子またはここに記載したようなmRNA断片に対して設計される。最後に、オリゴは細胞および組織DNAおよびRNAへのインビトロハリブリダイゼーションによって、標的遺伝子の発現を除去するかあるいは有意に低下させる能力について選択される。高いインビトロ減少作用、除去、または発現阻害を示すオリゴは、次いでインビボ試験で、好ましくは部位特異的投与、例えば、脳、心臓、腎臓、肺などへ適用し、行動学、生物物理学、生化学、認識、行動、知覚、生理学および

他の機能を前以て決定し、標的と機能に相関関係が存在するか否かを確定するように評価する。例えば、相関関係が示される呼吸器系では、このような治療を受けた被検者は呼吸または炎症肺疾患または他の症状、悪性腫瘍などの徴候が現れる可能性が減少する。ここで使用するように、「減少作用」との語は、完全な除去を含む標的細胞内タンパクの生成、分泌または有効性の減少（および濃度の減少）の誘導をいう。

【0041】

表2：標的およびネットワークに関連する疾患および症状の例

痴呆	心拍	不安抗侵害受容	痛覚脱失
心肺機能	行動	外傷性	器質性脳
自律制御	障害	脳損傷	疾患
変性脳症	発達薬剤感度		
CNS障害	異常と変形		視力
(ウイルス性など)	(合法的と非合法的)		
認識	飽満食事	アルコール性敏感	心臓発作
学習	抑鬱	摂取	脳炎症
感覚消失	聴覚嗅覚	低酸素症	精神分裂症
脳悪性腫瘍	脳欠陥記憶	神経障害	神経性疼痛
歯痛	頭痛	興奮	行動協調
行動障害	気分高揚	双極性障害	摂食障害
悪液質	心臓および 血管動脈瘤	心臓および 血管鬱血	
心臓および 血管滲出	心臓疾患	疼痛	
炎症	発作	狭心症	心臓麻痺
虚血	プラーク形成 再発狭窄症		ウイルス感染
不整脈	血管性浸透	動脈変性	性欲

, C.とToulme, J. Biochem. Biophys. Acta 1049, 99-125 (1990); Cohen, J, S . D., Ed., Oligonucleotides as Anti-sense Inhibitors of Gene Expression; CRC Press: Boca Raton, FL (1987)参照。これらの関連箇所はその全体を本明細書中に参考として援用する。本明細書中に使用するように、「アンチセンスオリゴヌクレオチド」は、(1) 適当なハイブリダイゼーション条件下に、標的タンパクをコードするmRNAのいずれかのセグメントとハイブリダイズし、および(2) ハイブリダイゼーションにおいて標的タンパクの遺伝子発現を減少させる、一般的に短い配列の合成オリゴヌクレオチドである。「desアデノシン」(des A)および「desチミジン」(des T)との語はアデノシン(des A)またはチミジン(des T)のいずれかを実質的に欠くオリゴヌクレオチドをいう。ある場合には、des T配列は天然に存在するが、他の場合にはそれらはその望ましくない活性を欠くもので、望ましくないヌクレオチド(A)を置換して得られる。本明細書では、置換は一般的には当該技術分野で公知であるように、「一般的または別な塩基」でAを置換して達成される。

【0044】

標的タンパクのmRNA配列は、このタンパクの発現遺伝子のヌクレオチド配列であって、既存標的または将来見出されるもののいずれかから誘導される。異なった系の多くの標的遺伝子の配列は現在では公知である。GenBank データベース、NIH参照。これらの配列の全てを本明細書中に参考として援用する。これらの遺伝子配列がいま入手不能であっても、当該技術分野で公知である技術を適用することにより標的セグメントを単離して得られる。遺伝子、そのRNAおよび/またはタンパクの配列が一度公知になると、アンチセンスオリゴヌクレオチドは上記したように製造され、標準的技術に従って標的タンパクの生産低下および特定機能の低下のために、インビボで投与および試験して、標的をバリデートするために使用される。本発明の1つの態様では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、特定の系、例えばCNS、呼吸器、肺、行動、知覚、ホルモン制御、心臓、腎臓、免疫、血液、癌遺伝子などの疾患または症状に関連するタンパクをコードするmRNA分子の1部分またはセグメントに特異的に結合する配列を有する。この結合性の1つの効果は、対応するmRNAの転写を低下または阻止し、

それによって被検者の肺の標的タンパクの有効量を減少させる。

【0045】

本発明の1つの好ましい態様では、アンチセンスオリゴヌクレオチドの1つ以上のホスホジエステル残基を修飾または置換する。ホスホジエステル残基を例えばメチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、またはホスホルアミデートへ修飾または置換した、オリゴヌクレオチドのインビボ安定性を増加させるオリゴヌクレオチドの化学的類似体が特に好ましい。天然に存在するオリゴヌクレオチドのホスホジエステル結合は、細胞性ヌクレアーゼによりある程度の分解を受けやすい。反対に、ここで提案する残基の多くは、ヌクレアーゼ分解に対して大きな抵抗性を有する。Milligan ら、およびCohen, J. S. D., 上掲参照。本発明の他の好ましい態様では、オリゴヌクレオチドは「3'末端キャップ」を添加して分解から保護する。これによって、該オリゴヌクレオチドの3'末端でホスホジエステル結合に代えてヌクレアーゼ抵抗性結合に置換する。Tidd, D. N.とWarenius, H. M., *Be. J. Cancer* 60: 343-350 (1989); Shaw, J. P.ら、*Nucleic Acids Res.*, 19: 747-750 (1991)参照。これらの関連箇所はその全体を本明細書中に参考として援用する。ホスホルアミデート、ホスホロチオエート、およびメチルホスホネート結合の全ては、本発明の目的ではこのようにして十分に機能する。ホスホジエステル骨格の修飾が大きいほど、得られる薬剤はより安定化され、多くの場合、RNA親和性および細胞透過性がより大きくなる。Milliganら、上掲参照。すなわち、修飾または置換される残基数は必要性、標的および投与経路により変化し、1つから全ての残基、またはその間の数になるであろう。全ホスホジエステル骨格を新規な結合で置換する多くの異なった方法は公知である。Millikanら、上掲参照。塩基、ヌクレオチド間結合または糖のための好ましい類似体残基は、ホスホチオエート、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、チオホルムアセタール、ホスホロジチオエート、ホスホルアミデート、ホルムアセタールボラノホスフェート、3'-チオホルムアセテート、5'-チオエーテル、カーボネート、5'-N-カルバメート、スルフェート、スルホネート、スルファメート、スルホンアミド、スルホン、スルファイト、2''-O-メチル、スルフォキシド、スルファイド、ヒドロキシ

アミン、メトキシメチル(MOM)、メトキシエチル(MOE)、メチレン(メチルイミノ)(MMI)、およびメチレンオキシ(メチルイミノ)(MOMI)残基が挙げられる。ホスホロチオエートおよびメチルホスホネート修飾オリゴヌクレオチドが、自動化オリゴヌクレオチド合成法により入手可能であるから、特に好ましい。Millikanら、上掲参照。本発明の薬剤は薬学的に許容される塩の形で、またはアンチセンスオリゴヌクレオチドと塩との混合物として投与してもよい。本発明の他の態様では、異なったアンチセンスまたはその薬学的に許容される塩の混合物を投与する。本発明の薬剤は1つの標的mRNAの発現を弱化させる能力および/または1つの経路の活性を増大または弱化させる能力を有する。例えば、本方法は、標的mRNA又は遺伝子それぞれにチミジン(T)が低い全ての可能性あるデオキシリボヌクレオチドセグメント、またはアデノシン(A)が約7以上のモノヌクレオチド、好ましくは約60以下のモノヌクレオチド、より好ましくは約10~約36モノヌクレオチド、さらに好ましくは約12~約21モノヌクレオチドであるアデノシン(A)低セグメントのデオキシヌクレオチドを確認することによって実施される。これはアデノシンに対応するヌクレオチド、チミジン(RNA)が低いか、あるいは欠き、またはアデノシン(遺伝子)が低く、ヌクレオチドの長さ7以上である標的配列内のモノヌクレオチドセグメントを調査して行われる。ほとんどの場合、この調査は通常、約10~30の配列、すなわち、天然ではアデノシンを欠くかあるいは約40%以下であって、平均の長さ、すなわち約1800ヌクレオチド長の通常の標的mRNAに対して長さを変えたアンチセンスオリゴヌクレオチドとなる。TまたはAの含量が高いものは、それぞれ、1つ以上のAに代える一般的または別な塩基の置換によって固定化されてもよい。

【0046】

本発明の薬剤は、特定の標的および投与形態によって、長さ約7~約60ヌクレオチド、好ましくは約12~約45、より好ましくは長さ約30ヌクレオチド以下、なお、好ましくは約21以下を含む適当な長さを有するが、それらは他の長さでも充分であってよく、限定されない。本発明の薬剤は標的RNAのいかなるセグメントおよび全てのセグメントに対して向けられていてもよい。1つの

好ましい薬剤群としては、イントロンとエクソン間の結合を含むmRNA領域に向けられたものが挙げられる。該薬剤がイントロン/エクソン結合に向けられる場合には、該結合を完全に覆うか、あるいは前駆体mRNAから成熟mRNAへのプロセッシング中に介在するエクソンのスプライシングアウトを阻止するように、該結合に十分に近接していてもよい。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドの3'または5'末端は、イントロン/エクソン結合の約2~10、好ましくは約3~5ヌクレオチド内に位置する。また、開始コドンと重複するアンチセンスオリゴヌクレオチド、およびコーディング領域の5'および3'末端近辺のものも好ましい。アンチセンスオリゴはアデノシン含量約0、約3%、約5%、約7%~約8%、約10%、約12%、約15%、およびいかなる中間値および範囲のアデノシン含量であってもよい。本方法では、1種以上または全てのAがチミジンと結合するが、アデノシンA₁、A_{2a}、A_{2b}およびA₃受容体にてアデノシンのアゴニストまたはアンタゴニスト活性の約0.5以下、約0.3、約0.1を示す複素環式芳香族塩基、およびアデノシンA_{2a}受容体にて活性を示さない複素環式芳香族塩基などの一般的なまたは別な塩基で置換されていてもよい。別な塩基は、とりわけ、3-ニトロピロール-2'-デオキシヌクレオシド、5-ニトロインドール、2-デオキシリボシル-(5-ニトロインドール)、2-デオキシリボフラノシル-(5-ニトロインドール)、2'-デオキシイノシン、2'-デオキシネブラリン、6H, 8H-3, 4-ジヒドロピリミド[4, 5-c]オキサジン-7-オンまたは2-アミノ-6-メトキシアミノプリンであってもよい。オリゴは、もしも該オリゴ中にCpGジヌクレオチドが存在すれば、このCpGジヌクレオチドの非メチル化Cの1つ以上または全てを置換したメチル化シトシン(^mC)を有していてもよい。ピリミジンの他のC₅修飾、例えばC₅プロピンなどもまた本発明の実施態様である。本方法での使用に適したオリゴの1つ以上または全てのヌクレオチド結合残基は、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ボラノホスフェート、フォルムアセタール、チオフォルムアセタール、チオエーテル、カーボネート、カルバメート、スルフェート、スルフォネート、スルファメート、スルフォンアミド、スルフォン、スルファイト、スルフォキシド、スルファイド、

ヒドロキシルアミン、メチレン(メチルイミノ)(MMI)、メトキシメチル(MOM)、メトキシエチル(MOE)、メチレンオキシ(メチルイミノ)(MO MA)、メトキシメチル(MOM)、2'-O-メチル、ホソホルアミデート、およびC-5置換(C-5プロピン)残基およびこれらの組み合わせであってもよい。本方法に使用するオリゴはその多くが当該技術分野で公知である原核性または真核性ベクターなどのベクターに結合しても良い。本発明方法は、生産または入手可能性を低下させるか、mRNAの分解を増加させるか、肺に存在するペプチド量を減少させるに有効な量のアンチセンスオリゴ投与を処方する。該投与は呼吸標的および肺標的中に直接に、好ましくはインシチュ、例えば、直接に呼吸器系または鼻通路へ、例えば吸入によって行うか、あるいは被検者の肺へ投与する。アンチセンスオリゴは脳、心臓、腫瘍、睾丸、眼、外耳道、頸部、鼻通路、頭皮、口腔、筋肉、咽頭、食道、腸、直腸、滑膜組織、子宮および他の局部組織に、他の多くの方法の中でも、注射によって、定位挿入によって、またはインビトロで直接に投与してもよい。さらに、オリゴは標的が循環系および免疫系の部分および小胞である場合には、血液中に投与してもよい。後者の場合、疾患または症状が免疫系障害に関連する場合には、標的はとりわけ、免疫グロブリン、抗体受容体、サイトカイン、サイトカイン受容体、これらをコードする遺伝子および対応mRNA、遺伝子およびmRNAのフランキング領域およびイントロンおよびエクソン接合部位であってもよい。疾患および症状が悪性腫瘍または癌に関連する場合には、標的は成長制御関連酵素および他のタンパク、免疫グロブリンおよび抗体受容体、これらをコードする遺伝子およびmRNA、癌遺伝子に関連する遺伝子およびmRNAs、およびゲノムおよびmRNAのフランキング領域およびエクソンおよびイントロン接合部位から選択してもよい。さらに、転移などに関与する血管形成因子、接着分子およびプロテアーゼ酵素など、癌プロセスに関与する正常細胞のある遺伝子も本発明の一部である。この方法は、例えば、組成物をインビトロ、経口、口腔内、鼻腔内、腔内、子宮内、頭蓋内、肺、腎臓内、結節内、関節内、耳内、リンパ系内、経皮、頬内、静脈内、皮下、筋肉内、腫瘍内、腺内、眼球内、頭蓋内、器官内、血管内、鞘内、移植、吸入、皮内、肺内、耳内、心臓内、低放出、持続放出、およびポンプにより投与して実施

してもよい。標的の他の例としては、転写因子、刺激および活性因子、サイトカインおよびその受容体、インターロイキン、インターロイキン受容体、ケモカイン、ケモカイン受容体、内生特異的および非特異的酵素、免疫グロブリン、抗体受容体、中枢神経系（CNS）および末梢神経系および非神経系受容体、CNSおよび末梢神経系および非末梢神経系ペプチド伝達体、接着分子、デフェンシン、成長因子、血管作動性ペプチド、ペプチド受容体および結合タンパク、および癌遺伝子に対応する遺伝子およびmRNA、Gタンパク結合受容体などがある。

アンチセンスオリゴは、呼吸作用困難および腫瘍、界面活性物質分泌の増加または減少、および他の多くのものなどの肺気道を患う疾患および症状に関連するポリペプチド、これらをコードする遺伝子およびRNA、ゲノムmRNAのフランキング領域および遺伝子およびmRNAのイントロンおよびエクソン接合部位から標的を選択し；標的遺伝子に対応するmRNAおよび標的ペプチドをコードするmRNA、ゲノムおよびmRNAのフランキング領域およびゲノムおよびmRNAのイントロンおよびエクソン接合部位からなる群から選択されるmRNA配列を得；mRNAの少なくとも1つのセグメントを選択し；選択mRNAセグメントに対する1つ以上のアンチセンスオリゴを合成し；もし必要なら、1つ以上のAをチミジン（T）とハイブリダイスするが、アデノシン受容体にてアゴニスト能力を低下または全く有しない別な塩基で置換して、オリゴ中に存在するA含量を全ヌクレオチドの約15%以下まで低下させることによって生産する。既に示したように、好適な標的としては、転写因子、刺激および活性化因子、インターロイキン、インターロイキン受容体、ケモカイン、ケモカイン受容体、内生特異的および非特異的酵素、免疫グロブリン、抗体受容体、中枢神経系（CNS）および末梢神経系および非神経系受容体、CNSおよび末梢神経系および非神経系ペプチド伝達体およびその受容体、接着分子、デフェンシン、成長因子、血管作動性ペプチドおよびその受容体、および結合タンパク、および癌遺伝子に対する標的遺伝子およびmRNA、およびそのフランキング領域およびイントロンおよびエクソン接合部位がある。コードするポリペプチドは、Nf_κB転写因子、インターロイキン-8受容体（IL-8R）、インターロイキン5受容体（IL-5R）、インターロイキン-4受容体（IL-4R）、インターロイキン3

受容体 (IL-3R)、インターロイキン-1 (IL-1)、インターロイキン1 受容体 (IL-1R)、エオタキシン、トリプターゼ、主要塩基性タンパク、 β 2-アドレナリン様受容体キナーゼ、エンドセリン受容体A、エンドセリン受容体B、プレプロエンドセリン、ブラジキニンB2受容体、IgE高親和性受容体、インターロイキン1 (IL-1)、インターロイキン1受容体 (IL-1R)、インターロイキン9 (IL-9)、インターロイキン9受容体 (IL-9R)、インターロイキン11 (IL-11)、インターロイキン11受容体 (IL-11R)、誘導性一酸化窒素シンセターゼ、シクロオキシゲナーゼ (COX)、細胞内接着分子1 (ELAM-1)、血管細胞接着分子 (VCAM)、ランテス (血小板・T細胞由来好酸化球走行性物質)、エンドセリン白血球接着分子 (ELAM-1)、単球活性化因子、好中球走化性因子、好中球エラスターゼ、デフェンシン1、2および3、ムスカリン性アセチルコリン受容体、血小板活性因子、腫瘍神経因子、5-リポキシゲナーゼ、ホスホジエステラーゼIV、サブスタンスP、サブスタンスP受容体、ヒスタミン受容体、チマーゼ、CCR-1 CCRケモカイン受容体、CCR-2 CCRケモカイン受容体、CCR-3 CCRケモカイン受容体、CCR-4 CCRケモカイン受容体、CCR-5 CCRケモカイン受容体、プロスタノイド受容体、GATA-3転写因子、好中球付着性因子、MAPキナーゼ、インターロイキン-9 (IL-9)、NFAT転写因子、STAT4、MIP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、シクロフィリン、ホスホリパーゼA2、塩基性線維芽細胞成長因子、メタロプロテナーゼ、CSBP/p38MAPキナーゼ、トリプトース受容体、PDG2、インターロイキン-3 (IL-3)、インターロイキン-1 (IL-1)、シクロスポリンA-結合タンパク、FK5-結合タンパク、 β 4 β 1セレクチン、フィブロネクチン、 β 4 β 7セレクチン、MadCAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、PECAM-1、LFA-1セレクチン、C3bi、PSGL-1、CD-18/CD11a、CD11b/CD18、ICAM2およびICAM3、C5a、CCR3 (エオタキシン受容体)、CCR1、CCR2、CCR4、CCR5、LTB-4、AP-1転写因子、プロテインキナーゼC、システニルロイコトリエン受容体、tachR)、I κ Bキナーゼ

1および2、STAT6、c-massおよびNF-インターロイキン-6(NF-IL-6)、およびそれらのフランキング領域およびイントロンおよびエクソン接合部位からなる選択される標的タンパク、ポリペチドをコードする遺伝子およびmRNAである。しかし、本発明は基本的には公共のデータベースで入手可能でない新規に発見される遺伝子の応用を意図する。この遺伝子群にとって標的バリデーションが最も重要である。それがなければ、疾患でのその役割は未知のままである。

【0047】

下記表3は、本発明の薬剤を効果的に適用する少数の標的のリストである。これらは単に実施例に過ぎない。該方法は、標的バリデーションがオリゴヌクレオチド分解時の生物活性アデノシン放出から議論される、いかなる系にも適用可能である。これは、アデノシンが抗炎症性であり、かつ、その放出が癌の標的バリデーションの結果を不明確にする故に重要である。

【0048】

表3： 癌標的

形質転換癌遺伝子	治療標的
ras	チミジレートシンセターゼ
src	チミジレートシンセターゼ
myc	ジヒドロフォレートレダクターゼ
bcl-2	チミジンキナーゼ
	デオキシシチジンキナーゼ
	リボヌクレオチドレダクターゼ
脈管形成因子	接着分子
癌遺伝子	葉酸経路酵素
DNA修復遺伝子	(1つの炭素プール)
	テロメラーゼ
	HMG CoAレダクターゼ

ファルネシルトランスフェラーゼ

グルコース - 6 - リン酸トランスフェラーゼ

【0049】

癌標的バリデーシンの好ましい標的群は、それらが調節性であるか、あるいはRNAおよび/またはタンパクの生産に関与するかにかかわらず、異なったタイプの癌に関連した遺伝子であるか、または悪性腫瘍に関連することが一般的に公知であるものである。その例としては、とりわけ、上記表3に示される標的である形質転換癌遺伝子がある。この癌標的バリデーション薬剤が向けられる他の標的とは、基本的には種々の酵素であり、チミジレートシンターゼ、ジヒドロフォレートレダクターゼ、チミジンキナーゼ、デオキシチジンキナーゼ、リボヌクレオチドレダクターゼ、正常細胞よりも癌細胞中でより豊富に生産される他の遺伝子産物などであり、これらに限られない。伝統的癌治療は化学療法、放射線療法などの治療の破壊的效果から正常な細胞を守りつつ、癌細胞を選択的に殺すのに効果的でないから、本技術は、特に癌標的遺伝子のバリデーション/インバリデーションにおいて有用である。すなわち、本癌治療は腫瘍細胞を選択的に標的とすることができない。本方法によりバリデートされるいかなる標的も、所望遺伝子産物を選択的に減少させ、かつ、機能およびその経路を弱体化または増大させる能力を有する。この方法は、系の選択、および系内で複数の標的、例えば、一般的には正常細胞中で同時に発現しないが、それらを別々におよび一緒にバリデートする1次、2次および可能性ある3次標的を含む経路の選択が可能であるから、標準的な癌治療以上の有意な利点をもたらす。すなわち、本方法は治療への標的をもたらす。標的が本方法で一旦、バリデートされると、標的に作用する選択薬剤は被検者に投与されて、例えば、3つの標的を発現する腫瘍細胞内で毒性が選択的に増加され、その間、標的のうちたった1つまたは2つを発現する正常細胞は有意に影響を受けないか、あるいは残される。本方法は、好ましくは投与されるべき種の起源に関連した標的遺伝子および/またはmRNAに対してアンチセンスであるように設計された薬剤を投与する。ヒトで標的をバリデートする場合には、薬剤は好ましくはヒト遺伝子またはRNAに対してアンチセ

ンスであるように設計される。本発明の薬剤は天然に存在するDNAおよび/またはRNA配列に対してアンチセンスであるオリゴヌクレオチドであって、標的配列より1塩基小さい、好ましくは長さ少なくとも約7ヌクレオチドの断片であり、たった約0.1%以上、約1%、約4%、約5%まで、約10%、約15%、約30%のアデノシンを有するか、あるいはアデノシンとともに欠くオリゴ、およびその中で1つ以上のアデノシンヌクレオチドがチミジンヌクレオチドと対を形成するが、実質的にアデノシン受容体活性を引き起こすことができない、いわゆる一般的または別な塩基で置換されているオリゴヌクレオチドを包含する。本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドのうち、ヒトの配列および断片の例としては、各配列において、好ましくは、7、10、15、18~21、24、27、30、n-1個のヌクレオチドを包含する(ここでnはヌクレオチド配列の全数である)下記断片ならびに該断片および完全遺伝子またはmRNAコード配列のより短いセグメント、エクソンおよびイントロン-エクソン結合であるが、これらに限定されない。これらの断片はより長いオリゴの部分、例えば、もとの配列の中間、5'末端、3'末端または他の部位の開始点から選択してもよい。低アデノシンヌクレオチド含量の断片、すなわち、本発明に従い選択、あるいは一般的または別な塩基で置換したアデノシンヌクレオチドが約30%以下、好ましくは約15%以下、より好ましくは約10%以下、さらに好ましくは約5%以下、もっと好ましくはアデノシンヌクレオチドを欠く断片が特に重要である。本発明の薬剤は配列中に存在する1つ以上のアデノシンがここで例示したように、一般的または別な塩基(B)で置換されている配列およびその断片をもっとも好ましい群として含む。同様に、上記したように配列、その断片またはそのセグメントに含まれるアデノシン(A)を(B)で置換して設計したB含有断片の短い断片すべても包含する。

【0050】

本方法は薬剤それ自体、あるいは標的タンパクの発現を低下させる上記した効果を有するある量のアンチセンスオリゴを含む薬学的組成物の形態で使用する。アンチセンスオリゴはまず、細胞膜を通過し、細胞内のタンパクをコードするmRNAと特異的に結合し、その翻訳を阻止しなければならない。このような組成

物は適当な薬学的に許容される担体、例えば滅菌された発熱物質不含生理食塩水中で調製される。本発明の薬剤は細胞膜を通過する能力を有する疎水性担体、例えばリポゾーム中で、また所望によりかつ別途に界面活性剤または脂質とともに薬学的に許容される水溶性担体中に担持されるリポゾーム中で処方してもよい。さらにオリゴヌクレオチドはmRNAを不活性化する薬剤、より完全な翻訳阻止を達成するリポゾームなどと結合させてもよい。薬学的処方剤は、細胞が吸収することが公知である分子にアンチセンスオリゴが結合するキメラ分子を含んでいてもよい。これらのオリゴヌクレオチド結合体はオリゴヌクレオチドの細胞内濃度を増加させる細胞摂取経路を利用する。この方法に使用する分子の例としては、当該技術分野で公知であるものの中で、トランスフェリン、アシアログリコプロテイン（ポリリジンによってオリゴヌクレオチドに結合）およびストレプトアビジンを含む巨大分子がある。本方法はまた薬学的処方剤、例えばリポゾームまたは微結晶などの脂質粒子または小胞内の中のアンチセンス化合物も使用する。該粒子は単層または多層などの適当な構造を有していてもよい。好ましい実施態様では、アンチセンスオリゴヌクレオチドはリポゾーム内に含まれる。このような粒子および小胞として、N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムメチルスルフェートまたは「DOTAP」などの陽電荷脂質が特に好ましい。しかし、他のものも好適であり、場合によってはさらに好適である。このような脂質粒子の調製は周知である。例えば、Janoff et al., の米国特許第4,880,635号、Kurono et al., の米国特許第4,906,477号、Wallach, の米国特許第4,911,928号、Wallach, の米国特許第4,917,951号、Allen et al., の米国特許第4,920,016号、Wheatley et al. の, 米国特許第4,921,757号を参照。これらの関連箇所の全てを本明細書中に参考として援用する。本発明方法は、アンチセンスオリゴを投与するためにいかなる方法にても、好ましくは、例えば脳、肺、腎臓、心臓、睾丸などへ最小輸送、例えばインサイチュにて供される。

【0051】

肺への薬剤投与は、適当な手段で行うが、好ましくは呼吸可能な処方剤、好ましくは被検者による呼吸または吸入のための薬剤を含む呼吸可能な粒子からなる

エアロゾルとして呼吸器系を通じて行う。呼吸可能な粒子はガス状または固体状であり、それらは所望により他の治療成分および処方成分を含んでもよい。本発明の粒子は、好ましくは、呼吸可能な大きさ、好ましくは、吸入によって口および咽頭の中を気管支および肺の肺胞へ通る十分に小さな大きさの粒子である。一般的には、直径約0.5～10ミクロンの範囲の粒子が呼吸可能である。しかし、他の大きさもまた適している。呼吸可能な処方剤中に含まれるかなり大きな直径を有する呼吸可能でない大きさの粒子は、咽頭に堆積する傾向にあるが、嚥下されるであろう。したがって、エアロゾル中で呼吸可能でない粒子量は最小限とすることが望ましい。鼻からの投与では、鼻腔内に確実に保持するには、10～500 μmの範囲の粒子サイズが好ましい。薬剤を含む液状粒子のエアロゾルは、吸引器またはネブライザーなどの適当な手段によって製造してもよい。例えば、米国特許第4,501,729号参照。適当な噴霧剤は、あるクロロフルオロカーボン化合物、例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタンおよび/またはそれらの混合物などの溶媒を含む。他の噴霧剤も好適であり、特別な用途により適するものが好ましい。処方剤はさらに、1種以上の共溶媒、例えば、エタノール、オレイン酸またはソルビタントリオレートなどの界面活性剤、抗酸化剤および適当な香味剤を含む。アンチセンスオリゴは定位固定法によって脳へ、または注射によってCNSの標的単離領域へ、当該技術分野で公知である方法全てによって投与してもよい。また、オリゴは当該技術分野で公知である血液脳関門を越える処方剤として投与してもよい。例えば、トランスフェリン受容体へ向けられたストレプトアビジンとモノクロナル抗体とのコンジュゲートは、モノビオチン化ペプチド、アンチセンスオリゴ(ホスホジエステルまたは他の誘導体の3'-ビオチン化)およびペプチドオリゴの脳への輸送のための一般的担体として使用してもよい。例えば、Levy, R.M.ら、J. Neuroviral 3 Suppl: 574-75 (1998); Wu-PongとGewirtz, BioPharm, pp. 32-38 (Jan. 1999); Boado, R. J.,ら、J. Pharm. Sci. 87(11): 1308-1315 (1998) 参照。心臓、肝臓および腎臓ならびに他の器官への投与は、カテーテル処置、注射および局所拡散などのインサイチュ投与技術で行ってもよい。これら全ては当該技術分野で公知である。例えば、Lewis, K.J.ら、J. Drug Target, 5(4):

291(1998); Ayrün, M.A.ら、Cathet. Cardiovasc. Diagn, 41(3): 232-240 (1997); Luft, F. C., J. Molec. Med. 76(2): 75(1998)参照。これらの投与は、通常、滅菌パイロジェンフリー水、脂質および/または他の公知薬学または獣医学で許容される担体などの適当な媒体または担体とアンチセンスオリゴを組み合わせて調製される液体、固体、または気体状の薬剤組成物を使用して行う。他の治療化合物は当該技術分野で公知である他の処方成分も含んでいてもよい。乾燥粒子、例えば本発明の微粉化薬剤を含む固体粒子状組成物は、モルタルまたは乳鉢で乾燥アンチセンス化合物を粉碎し、次いで粉碎された、例えば微粉化された組成物をスクリーン、例えば400メッシュスクリーン中を通過させ、大きな塊の粒子を粉碎し、分離して調製する。アンチセンスオリゴを含む固体粒子状組成物はまた、所望により分散剤または他の公知薬剤を含む。それらは容易に霧またはエアロゾルを形成する。適当な分散剤はラクトースであり、これは適当な割合、約1:1(w/w)で、アンチセンス化合物と混合される。他の割合も充分に使用してもよいが、他の治療および処方薬剤もまた含めてもよい。この特許に引用する参考文献の関連箇所は本明細書中に参考として援用する。特に、これらの刊行物および特許は、本発明の種々の態様の実施可能性および記述を容易にする。

【0052】

投与されるアンチセンス化合物の用量は、一般的に、標的、その機能、およびその増幅、研究される疾患、被験者の症状、特別な処方剤、投与の経路および部位、投与の時間などによって異なる。一般的には、オリゴヌクレオチドの細胞内濃度0.05~50 μ M、またはより特別に0.2~5 μ Mを達成することが望ましい。しかしながら、用量反応曲線は、明瞭な反応を観察する適当な用量を確定するために適当に測定される。使用する用量は変化し、例えば、約0.001、約1 mg/kg~約50、約100、および約150 mg/kgまでが通常、使用される。専門家が特定用途において適当である判断するなら、高および低容量を投与してもよい。これらの量は、他の療法もまた好適であろうが、1回で、または一定時間を超えて、例えば、必要なら24時間毎に投与される。下記実施例は本発明を説明するために提供され、これらに限定されるように解釈されるべきではない。これらの実施例では、 μ Mはマイクロモルを意味し、mlはミリリ

ットルを意味し、 μm はマイクロメートルを意味し、 mm はミリメートルを意味し、 cm はセンチメートルを意味し、 EC は摂氏度を示し、 μg はマイクログラムを意味し、 mg はミリグラムを意味し、 g はグラムを意味し、 kg はキログラムを意味し、 M はモルを意味し、 hrs. は時間を意味する。

【0053】

【実施例】

実施例1：アンチセンスオリゴヌクレオチドの設計と合成

標的受容体に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計は、標的受容体 mRNA の複雑な 2 次構造の解決を必要とする。この構造を形成した後、mRNA に対する機能的活性と安定性を与えるように構築され、所望により開始コドンと重複する mRNA 領域を標的とするアンチセンスヌクレオチドが設計される。他の標的部位は容易に使用可能である。アンチセンス効果の特異性の実証として、標的 mRNA に全体的に相補的でないが、重量比 (w/w) で同じヌクレオチド組成物を含む他のオリゴヌクレオチドがアンチセンス実験のコントロールとして含まれる。例えば、アデノシン A₁ 受容体 mRNA の 2 次構造は解析され、上記したようにホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチドを設計するように使用される。合成されるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、HAdA1AS と記され、次の配列：5'-GAT GGA GGG CGG CAT GGC GGG-3' (配列番号 1) を有する。コントロールとして、HAdA1MM1 と記載されるミスマッチホスホロチオエートアンチセンスヌクレオチドは、次の配列：5'-GTA GCA GGC GGG GAT GGG GGC-3' (配列番号 2) を有するように合成された。各オリゴヌクレオチドは同じ塩基含量および一般的な配列構造を有する。GENBANK (リリース 85.0) および EMBL (リリース 40.0) における相同性調査は、アンチセンスオリゴヌクレオチドがヒトおよびウサギアデノシン A₁ 受容体遺伝子に特異的であること、およびミスマッチコントロールはいかなる公知遺伝子配列ともハイブリダイズする候補ではないことを示した。アデノシン A₃ 受容体 mRNA の 2 次構造は同様に解析され、上記したように 2 つのホスホロチオエートアンチオリゴヌクレオチドを設計するために使用された。合成された第 1 アンチセンスオリゴヌクレオチド (HAdA3AS1) は次の配列：5'-GTT GTT GGC CAT CTT G

CC-3' (配列番号3)を有していた。コントロールとして、次の配列:5'-GTA CT T GCG GAT CTA GGC-3' (配列番号4)を有するミスマッチホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド(HAdA3MM1)を合成した。次の配列:5'-GTG GGC CTA GCT CTC GCC-3' (配列番号5)を有する第2ホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド(HAdA3AS2)もまた設計され、合成された。そのコントロールオリゴヌクレオチド(HAdA3MM2)は配列:5'-GTC GGG GTA CCT GTC GGC-3' (配列番号6)を有していた。ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドは、Applied Biosystems Model 396 Oligonucleotide Synthesizerで合成し、かつ、NENSORBクロマトグラフィー(DuPont, MD)を使用して精製した。

【0054】

実施例2: アデノシンA₁受容体アンチセンスオリゴのインビボ試験

上記したヒトA₁受容体に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド(配列番号1)について、肺腺癌細胞HTB-54を使用するインビトロモデルでの効果を試験した。HTB-54肺腺癌細胞は、標準的ノザンプロット法および研究室で設計され、合成された受容体プローブを用いて、A₁アデノシン受容体を発現することを立証した。HTB-54ヒト肺腺癌細胞(106/100mm組織培養皿)は、5.0 μM HAdA1ASまたはHAdA1MM1に、12時間の培養後に培地とオリゴヌクレオチドを新鮮に交換して、24時間露呈した。オリゴヌクレオチドへ露呈した24時間後に細胞を採取し、そのRNAを標準的手法により抽出した。アンチセンスによって標的化されたmRNA領域に対応する21merプローブ(したがって、アンチセンスと同じ配列を有するが、ホスホロチオエート化されていない)を合成し、HAdA1AS処理、HAdA1MM1処理および未処理HTB-54細胞から調製したRNAのノザンプロットをプローブするために使用した。これらのプロットは、明らかにHAdA1MM1ではなく、HAdA1ASが効果的にヒトアデノシン受容体mRNAを50%以上低下させた。この結果は、HAdA1ASは喘息に關与するアデノシンA₁受容体に対する細胞内mRNAを欠乏するから、これは抗喘息薬として良好な候補であることを示した。

【0055】

実施例3：アデノシンA₁受容体アンチセンスオリゴのインビボ効果

開始コドンが重複するアデノシンA₁遺伝子内のウサギとヒトDNA配列間の偶然の相同性は、ウサギモデル中でヒトアデノシンA₁受容体に対して使用するために当初設計されたホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用を可能とした。パスツレラに感染していないニュージーランド白色ウサギの新生児を10%カオリンを混合した312抗原単位/mlの家塵埃ダニ(D. farinae)の抽出物(Berkeley Biologicals, Berkeley, CA)を生後、24時間以内に腹腔内から免疫した。該免疫は最初の1ヶ月は1週間毎に、次の2ヶ月間は2週間毎に繰り返した。3~4ヶ月齢の感作させたウサギ8匹には麻酔をかけて、ケタミン塩酸塩(44mg/kg)およびマレイン酸アセプロマジン(0.4mg/kg)の混合物を筋肉注射して弛緩させた。次いで、このウサギを小さく型取ったパッドを敷き詰めた動物用板上に楽な姿勢で仰臥位に置き、4.0mm気管内チューブ(Mallinkrodt, Inc., Glens falls, NY)を挿管した。ラッテクスバルーンを備えた外径が2.4mmであるポリエチレン製カテーテルを食道内に挿入し、この実験中、口から等距離(約16cm)を保った。気管内チューブは加熱したフライシュ呼吸気流量計(大きさ00; DOM Medical, Richmond, VA)に連結し、ゴウルド・キャリア・アンプリファイアー(Model 1104113; Gould Electronics, Cleaveland, OH)によって駆動するバリディン差動圧力変換器(Model DP-45161927; Validyne Engineering Corp. Northridge, CA)で気流を測定した。食道バルーンは差動圧力変換器の片側に取りつけられ、また気管内チューブの気流は該差動圧力変換器の反対側に連結され、肺内外圧差を記録することができる。気流は合体されて、連続一回呼吸量となり、全肺抵抗値(RL)および動的コンプライアンス(Cdyn)の測定は、自動呼吸分析計(Model 6; Buxco, Sharon, CT)を使用して、それぞれ、等容点および流量ゼロ点で計算された。動物は無作為抽出し、1日目にアエロゾル化アデノシンにおいてPC50の前処理値が得られた。アンチセンス(HAdA1AS)またはミスマッチコントロール(HAdA1MM)オリゴヌクレオチドは、滅菌生理食塩水中に、1.0ml当たり5000μg(5mg)の濃度で溶解した。動物は続いて、アエロゾル化アン

チセンスまたはミスマッチオリゴヌクレオチドを2日間、1日当り2回、気管内チューブを通して投与した(1.0ml容積中、約5000 μ g)。食塩水、アデノシン、またはアンチセンスまたはミスマッチオリゴヌクレオチドのいずれのアエロゾルも、その80%が直径5 μ mより小さなアエロゾル小滴を生成する超音波ネブライザー(DeVilbiss, Somerset, PA)によって生成した。本実験の第1部門では、4匹のランダムに選択されたアレルギーウサギにアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与し、4匹にはミスマッチコントロールオリゴヌクレオチドを投与した。3日目の朝、PC50値(気管支気道の動的コンプライアンスを基線値から50%低下させるに必要なアエロゾルアデノシンの濃度、mg/ml)を求め、オリゴヌクレオチドに露呈する前にこれらの動物において得られたPC50値と比較した。1週間の間隔において、先にミスマッチコントロールオリゴヌクレオチドを投与した動物にはアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与し、また先にアンチセンスオリゴヌクレオチドで処理した動物にはミスマッチコントロールオリゴヌクレオチドを投与して、動物をクロスオーバーさせた。処置法および測定法は実験の第1部門で使用したものと同一の方法を用いた。アンチセンスオリゴヌクレオチドで処置した8匹の動物のうち、6匹には、アデノシン媒介気管支収縮がアデノシンの溶解度限界20mg/mlまで見られなかったことに注目すべきである。計算のために、これらの動物に対するPC50値を20mg/mlにセットした。したがって、得られた値は、アンチセンス効果の最小値を示す。実際の効果はもっと高いものであった。この実験の結果は下記表4に示される。

【0056】

表4: 喘息ウサギのPC50値に基づく

アデノシンA₁受容体アンチセンスオリゴの効果

ミスマッチコントロール

A₁受容体アンチセンスオリゴ

オリゴヌクレオチド

オリゴヌクレオチド

オリゴヌクレオチド

オリゴヌクレオチド

による処置前

による処置後

による処置前

による処置後

3.56 ± 1.02 5.16 ± 1.03 2.36 ± 0.68 > 19.5 ± 0.34**

その結果は、平均 (n = 8) ± S E Mで示す。

有意差は、繰り返し測定した分散分析 (A N O V A) およびチューキー t 検定によって求めた。

**他の全ての群と p < 0 . 0 1 で有意に異なる。

【 0 0 5 7 】

実験の両部門では、アンチセンスオリゴヌクレオチドを与えられた動物では、肺の動的コンプライアンスを50%まで低下させるに必要なエアロゾル化アデノシン用量が1桁増加することを示した。PC50の下ではミスマッチオリゴヌクレオチドの効果は全く見られなかった。アンチセンスまたはコントロールオリゴヌクレオチドを吸入させたいずれの動物にも毒性が全く見られなかった。これらの結果は、肺疾患へアンチセンスオリゴヌクレオチドを使う治療介入において、肺がその標的として例外的な可能性を有するものであることを明らかに示した。さらに、これらの結果はヒト喘息によく似たモデル系においては、アデノシンA₁受容体の抑制的制御により喘息性気道のアデノシン仲介気管支収縮を大きく消失させることを示した。ヒト喘息のアレルギーウサギモデルでの気管支応答性亢進は、この応答性に関与する組織がエアロゾル化オリゴヌクレオチドとの接触点の近くにあり、また、このモデルが重要なヒト疾患によくシミュレートしているから、アンチセンス介入における優れた指標となる。

【 0 0 5 8 】

実施例4：A₁アデノシン受容体アンチセンスオリゴヌクレオチドの特異性

上記実施例3のクロスオーバー実験の結果に基づき、全てのウサギの気道平滑筋をアデノシンA₁受容体数について定量的に分析した。アンチセンスオリゴヌクレオチド特性のコントロールとして、何ら影響されるべきでないアデノシンA₂受容体もまた数量化した。気道平滑筋組織は各ウサギから切り取られ、膜画分はKleinstei n らの方法 (Kleinstei n, J. および Glossmann, H., Naunty-Schmied eberg's Arch, Pharmacol. 305: 191-200(1987)) に従って調製された。この文

献の関連部分はその全体を本明細書中に参考として援用する。粗製血漿膜調製物は、分析時まで70EC(-70)で貯蔵した。タンパク含量はBradfordの方法(M. Bradford, Anal. Biochem. 72, 240-254 (1976)、その関連部分は全体として本明細書中に援用する。)によって測定した。凍結血漿膜は室温で解凍し、内因性アデノシンを除去するために、37EC(30)で30分間、0.2U/mlアデノシンデアミナーゼとともにインキュベートした。 $[^3\text{H}]$ DPCPX(A_1 受容体特異的)または $[^3\text{H}]$ CGS-21680(A_2 受容体-特異的)の結合性は先に記載したように、Aliら(Ali, S.ら、J. Pharmacol. Exp. Ther. 268, Am. J. Physiol. 266, L271-277 (1994)、この関連部分は全体として本明細書中に参考として援用する。)によって測定した。クロスオーバー試験でアデノシン A_1 アンチセンスオリゴヌクレオチドで処置した動物は、 A_1 特異的アンタゴニストDPCPXの特異的結合性のように、コントロールに比べて、 A_1 受容体数をほぼ75%減少した。 A_2 受容体特異的アゴニストである2-[p-(2-カルボキシエチル)-フェネチルアミノ]-5'-(N-エチルカルボキシアミド)アデノシン(CGS-21680)の特異的結合性によって分析したように、アデノシン A_2 受容体数には変化がなかった。これは下記表5に示される。以下の結果は気道疾患を治療するアンチセンスオリゴヌクレオチドの有効性を示す。上記したアンチセンスオリゴはアデノシン仲介気管支収縮に原因がある受容体系を除去するから、それらからアデノシンを除去することが不可避ではない。しかしながら、同様な効果を達成するために必要である用量を減少させるためには、これらのオリゴヌクレオチドからアデノシンを除去することが好ましい。炎症に関与するタンパクのmRNAを標的とする他のアンチセンスオリゴヌクレオチドは上記される。アデノシンは分解中の遊離を阻止するために、そのヌクレオチドの中から除去されている。

【0059】

表5：アデノシン A_1 受容体アンチセンスオリゴヌクレオチドの特異性

ミスマッチコントロール	A_1 受容体アンチセンス
オリゴヌクレオチド	オリゴヌクレオチド

A ₁ 特異的結合	1 1 0 5 ± 4 8 **	2 9 3 ± 1 8
A ₂ 特異的結合	3 0 2 ± 2 2	4 4 2 ± 1 7 1

その結果は、平均 (n = 8) ± S E Mで示す。

有意差は、繰り返し測定した分散分析 (A N O V A) およびチューキー t 検定で求めた。

**他の全ての群と p < 0 . 0 1 で有意に異なる。

【 0 0 6 0 】

実施例 5 : 他の標的核酸に対するアンチセンスオリゴ

この研究は、本発明が広く核酸標的に特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチド (「オリゴ」) に適用できることを証明するために行われた。下記実験研究は、本明細書が教示するように設計して、アデノシン受容体 m R N A のいずれかおよび全てを標的とするアンチセンスオリゴを広く使用するのに本発明法が適していることを示すために行われた。この目的では、種々のアンチセンスオリゴがアデノシン A₁、A_{2b} および A₃ 受容体 m R N A によって例示されるアデノシン受容体 m R N A に対して調製された。アンチセンスオリゴ I は上記される (配列番号 1) 。 5 つの別なアンチセンスホスホロチオエートオリゴが、上記したように設計され、合成された。

- 1 . アデノシン A₁ 受容体を標的とするが、オリゴ I と異なる領域も標的とするオリゴ II (配列番号 7)
- 2 . アデノシン A_{2b} 受容体を標的とするオリゴ V (配列番号 1 0)
- 3 . アデノシン A₃ 受容体の異なった領域を標的とするオリゴ III (配列番号 8) と IV (配列番号 9)
- 4 . オリゴ I - P D (配列番号 1 1) (オリゴ I と同じ配列のホスホジエステルオリゴ)

【 0 0 6 1 】

これらのアンチセンスオリゴは、他の種の標的 m R N A のセグメントが同様な配列を含まないなら、上記したように選択種の治療のために設計され、一般的に

その種に対して特異的である。全てのアンチセンスオリゴは以下のように調製され、気管支収縮、炎症およびアレルギーのウサギモデルでインビボで試験した。これらは上記した明細書中に記載したように、喘息などの病気の場合のように、呼吸困難を伴い、肺気道を妨害する。

【0062】

実施例6：他のアンチセンスオリゴの設計と配列

6つのオリゴとそのウサギモデルでの効果を研究し、これらの研究結果を下記に報告し、検討した。これらのオリゴのうち、5つは上記実施例1～4において提供されたオリゴI（配列番号1）についてのデータを補充するために、この研究で選ばれた。このオリゴはアデノシンA₁受容体mRNAの1つの領域に対してアンチセンスである。試験したオリゴは、アデノシンA₁受容体mRNAの異なった領域を標的とするアンチセンスオリゴI（配列番号1）およびII（配列番号7）、アデノシンA_{2b}受容体mRNAを標的とするオリゴV（配列番号8）、アデノシンA₃受容体mRNAの2つの異なった領域を標的とするオリゴIIIとIV（配列番号9と10）として確認される。6番目のオリゴ（オリゴI - PD）はオリゴI（配列番号1）のホスホジエステルである。これらのアンチセンスオリゴの設計と合成は上記実施例1に従って実施した。

【0063】

(I) アンチセンスオリゴI

上記実施例1～4でいうアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒトA₁アデノシン受容体mRNA（EPI2010）を標的とする。アンチセンスオリゴIは開始コドン重複する21ヌクレオチドの長さであり、下記配列：5'-GAT GGA GGG CGG CAT GGC GGG-3'（配列番号1）を有する。オリゴIは、上記したように、また、Nyce, J. W. & Metger, W. J., Nature, 385:721 (1977)（この文献の関連箇所は全体を本明細書中に参考として援用する。）によって示されるように、アレルギーウサギにおいてアデノシン誘発気管支収縮を抑制し、アレルギー誘発気道閉塞や気管支応答性亢進（BHR）を低下させることが既に示されている。

【0064】

(II) アンチセンスオリゴII

ホスホロチオエートアンチセンスオリゴ(配列番号7)は開始コドン(開始部位)に関連するウサギアデノシンA₁受容体mRNA領域+936~+956を標的とするように、本発明に従って設計した。このアンチセンスオリゴIIは長さ21ヌクレオチドであり、次の配列:5'-CTC GTC GCC GTC GCC GGC GGG-3'(配列番号7)を有していた。

【0065】

(III) アンチセンスオリゴIII

上記実施例1で提供されたもの以外のホスホロチオエートアンチセンスオリゴ(配列番号8)は開始コドンの開始部位に関連するアンチセンスA₃受容体mRNA領域+3~+22を標的とするように、本発明に従って設計した。このアンチセンスオリゴIIIは、長さ20ヌクレオチドであり、次の配列:5'-GGG TGG TGC TAT TGT CGG GC-3'(配列番号8)を有していた。

【0066】

(IV) アンチセンスオリゴIV

他のホスホロチオエートアンチセンスオリゴ(配列番号9)は開始コドン(開始部位)に関連するアンチセンスA₃受容体mRNA領域+386~+401を標的とするように、本発明に従って設計した。このアンチセンスオリゴIVは、長さ15ヌクレオチドであり、次の配列:5'-GGC CCA GGC CCA GCC-3'(配列番号9)を有していた。

【0067】

(V) アンチセンスオリゴV

ホスホロチオエートアンチセンスオリゴ(配列番号10)は開始コドン(開始部位)に関連するアンチセンスA_{2b}受容体mRNA領域-21~-1を標的とするように、本発明に従って設計した。このアンチセンスオリゴVは、長さ21ヌクレオチドであり、次の配列:5'-GGC CGG GCC AGC CGG GCC CGG-3'(配列番号10)を有していた。

【0068】

(VI) A₁ミスマッチオリゴ

次の配列を有する2種の異なったミスマッチオリゴヌクレオチドを上記実施例5に記載したアンチセンスオリゴI（配列番号1）に対するコントロールとして使用した。

A₁MM2 5'-GTA GGT GGC GGG CAA GGC GGG-3'（配列番号12）

A₁MM3 5'-GAT GGA GGC GGG CAT GGC GGG-3'（配列番号13）

アンチセンスオリゴIと2つのミスマッチアンチセンスオリゴは、同じ塩基含量と一般的な配列構造を有していた。GENBANK（リリース85.0）およびEMBL（リリース40.0）の相同性調査では、アンチセンスオリゴIはヒトのみならず、ウサギのアデノシンA₁受容体遺伝子にも特異的であること、およびミスマッチコントロールはいかなる公知ヒトまたは動物遺伝子配列とのハイブリダイゼーションの候補ではないことを示した。

【0069】

(VII) アンチセンスオリゴA₁-PD（オリゴVI）

オリゴIと同じヌクレオチド配列を有するホスホロジエスエルアンチセンスオリゴ（オリゴVI；配列番号11）を上記明細書中に記載したようにして設計した。アンチセンスオリゴI-PDは長さ21ヌクレオチドであり、開始コドンと重複し、次の配列：5'-GAT GGA GGG CGG CAT GGC GGG-3'（配列番号11）を有していた。

【0070】

(VIII) コントロール

上記した(II)、(III)および(IV)のアンチセンスオリゴに対するものとして、5.0mlのアエロゾル化滅菌食塩水を、同じスケジュールで各ウサギに投与した。上記したものは、G-タンパク結合受容体の例として示した。しかしながら、アデノシン含量を低下させる方法は、一般的には、生物活性アデノシンの放出がアデノシン受容体を実現化するための実験データをあいまいにする、いかなる遺伝子および標的バリダーション系にも適用できる。

【0071】

実施例7：アンチセンスオリゴの合成

上記した配列を有するホスホロチオエートアンチセンスオリゴは、Applied Bi

osystems Model 396 オリゴヌクレオチド合成機で合成し、NENSORBクロカトグラフィー(DuPont, DE)を使用して精製した。TED(テトラエチルチウラムジスルフィド)を合成中に硫化剤として使用した。アンチセンスオリゴII(配列番号7)、アンチセンスオリゴヌクレオチドIII(配列番号8)およびアンチセンスオリゴヌクレオチドIV(配列番号9)をそれぞれ合成し、このような方法で精製した。

【0072】

実施例8：アレルギーウサギの準備

誕生から24時間以内のパスツレラに感染していないニュージーランド白色ウサギの新生児を先に記載したように、10%カオリンと混合した312抗原単位/mlの塵埃ダニ(*D. farinae*)抽出物(Berkeley Biologicals, Berkeley, CA)0.5mlを使用して腹腔から免疫した(Metzger, W. J., in Late Phase Allergic Reactions, Dorsch, W., Ed., CRC Handbook, pp. 347-362, CRC Press, Boca Raton (1990); Ali, S., Metzger, W. J. and Mustafa, S. J., Am. J. Resp. Crit. Care Med. 149:908 (1994)、これらの関連箇所はその全体を本明細書中に参考として援用する)。免疫は4ヶ月齢まで最初の1月間は1週間毎、次いで2週間毎に繰り返した。これらのウサギはアレルギー特異的IgE抗体を産生し、通常、初期および初期相および遅延相喘息反応の双方での空気アレルギー性免疫に応答し、気管支過剰応答(BHR)を優先的に示す。アレルギーを月毎に腹腔投与すると(上記した塵埃ダニアレルギー312単位)、アレルギー特異的IgE抗体およびBHRを刺激し、保持し続ける。年齢4ヶ月の感作したウサギをAliら(Ali, S., Metzger, W. J. とMustafa, S. J., Am. J. Resp. Crit. Care Med 149 (1994))に記載したようにアエロゾル投与のために準備した。これらの関連箇所はその全体を本明細書中に参考として援用する。

【0073】

用量反応曲線

実施例9：実験セットアップ

アデノシン(0~20mg/ml)、またはアンチセンスまたは2つのミスマッチオリゴヌクレオチドのうち、一方のアエロゾルは超音波ネブライザー(Mode

I 646, DeVilbiss, Somerset, PA) を使用して別個に調製した。これはその80%が直径5 μ mより小さいアエロゾル小滴を産生した。等量のアエロゾルを気管内チューブを通して肺へ直接に投与した。動物を無作為抽出し、アエロゾル化したアデノシンを投与した。アデノシン感作に対する1日目の前処置値を、コンプライアンス50%損失を生じるアデノシン用量として計算した(PC₅₀アデノシン)。次いで、動物にアエロゾル化アデノシンまたはミスマッチアンチセンスオリゴの1つ(5mg/0.1ml)を2日間、1日2回、2分間、気管内チューブを経て投与した(全用量20mg)。前処置PC₅₀値を第3日目の朝に記録した(後処置免疫)。これらの研究結果は以下の実施例21に提供される。

【0074】

実施例10：クロスオーバー実験

2週間の間隔をおいたアンチセンスオリゴI(配列番号1)と対応するミスマッチコントロールオリゴヌクレオチドA₁MM2を使用するいくつかの実験では、ミスマッチコントロールA₁MM2を先に投与した動物にアンチセンスオリゴIを投与し、またアンチセンスオリゴIで先に処理した動物にミスマッチコントロールA₁MM2を投与して、動物をクロスオーバーさせた。群当たりの動物数は以下の通りである。1匹の動物が技術的困難性から実験の第2コントロール部門で失われたので、ミスマッチA₁MM2(コントロール1)は、n=7であり、ミスマッチA₁MM3(コントロール2)は、n=4であり、A₁ASアンチセンスオリゴIでは、n=8であった。A₁MM3オリゴ処理動物は別個に解析され、クロスオーバー実験の部分ではなかった。この処理方法とクロスオーバーに続いて使用した測定法は、実験の第1部門で使用したものと同一であった。アンチセンスオリゴI(配列番号1)で処理した8匹の動物のうち、6匹では、アデノシンの溶解限度である20mg/mlまでのアデノシン用量において、PC₅₀値が得られなかった。したがって、これらの動物のPC₅₀値は計算上、20mg/mlであると仮定した。したがって、所与の値は本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドの効力の最小値を示す。アレルギーウサギの他の群(各群はn=4)にアンチセンスオリゴI(配列番号1)またはA₁MM2オリゴ0.5または0.05mg用量を上記した方法およびスケジュールに従い投与した(全用

量は2.0または0.2mg)。これらの研究結果は下記実施例22に提供される。

【0075】

実施例11：アンチセンスオリゴ処方剤

アンチセンスオリゴのそれぞれ1つを別個に水溶性溶液に溶解し、上記したようにネブライザーを使用し、気管内チューブを経由して4種の5mg部分標本(20mg全用量)中に、アンチセンスオリゴI(配列番号1)について上記したように(e)投与した。アンチセンスオリゴIおよびそのミスマッチコントロールは、以下の実施例19およびNyce & Metzger, Nature 385, 721-725 (1997)に記載されるように、ミスマッチコントロールが食塩水と同等であることを確認した。これらの内容は本明細書中に参考として援用する。この発見から、食塩水はアンチセンスオリゴII、IIIおよびIV(配列番号7、8および9)を使用する肺機能研究のコントロールとして使用した。

【0076】

実施例12：アデノシンA₁受容体のオリゴIの特異性(受容体結合研究)

気道平滑筋から得た組織は、上記したように、48時間にわたって、4回に分割して2.0mgのオリゴI(配列番号1)を投与されたウサギから、1次、2次および3次気管支へと切り裂いた。膜画分をAiらの方法(Ali, S., ら, Am. J. Crit. Care Med. 149:908 (1994)、膜画分調製に関する箇所はその全体を参考として本明細書中で援用する。)に従って準備した。タンパク含量はBradfordの方法によって測定し、血漿膜は内因性アデノシンを除去するために37EC(37)で30分間、0.2U/mlのアデノシンデアミナーゼとインキュベートした。Bradford, M. M. Anal. Biochem. 72, 240-254 (1976)参照。これらの関連箇所はその全体を本明細書中に参考として援用する。[³H] DPCPX、または[³H] NPC17731、[³H] CGS-21680の結合は、Jarvis らに記載されるように測定した。Jarvis, M.F., ら, Pharmacol. Exptl. Ther. 251, 888-893 (1989)参照。この関連箇所は全てを本明細書中に参考として援用する。ブラジキン受容体を標的とする同量のオリゴ、5'-GGTGATGTTGAGCATTTCCGGC-3'(配列番号14)を他の群の動物へ投与した。この研究の結果は表6に示され、下

記実施例20で考察される。

【0077】

実施例13：肺機能測定（コンプライアンス c_{DYN} と抵抗性）

4ヶ月齢で免疫された動物に麻酔をかけ、ケタミンHCl（35mg/kg）とアセプロマジンマレエート（1.5mg/kg）の混合物1.5mlを筋肉注射して弛緩させた。麻酔誘発後、アレルギーウサギを柔らかく型とった動物用板上に楽な姿勢で仰臥させた。乾燥を阻止するために目に軟膏(salve)を適用して、それらを閉じた。次いで動物に、ZavalaとRhodesが先に記載したように、4.0mmの中間高低カフ・マフィI気管内チューブ(Mallinckrodt, Glen Falls, NY)を使用して挿管した。ZavalaとRhodes, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 144: 509-512 (1973)参照。この関連箇所はその全体を本明細書中に参考として援用する。薄壁ラテックスバルーンを備えたOD 2.4mmのポリエチレンカテーテル(Becton Dickinson, Clay Adams, Parsippany NJ)を食道中に通過させ、実験中、口から等距離(約16cm)に維持した。気管内チューブを加熱フライシユ(Fleische)呼吸流量計(大きさ00; DEM Medical, Richmond, VA)に接続し、バリディン(Validyne)差圧トランスデューサー(Model DP-45-16-1927, Validyne Engineering, Northridge, CA)を使用し、ゴウルト担体増幅器(Model 11-4113, Gould Electronics, Cleaveland)を駆動して、気流(v)を測定した。食道バルーンをバリディン差動圧カトランスデューサーの一方に接続し、他方を肺内圧(P_{tp})を得るために気管内チューブの流出口に連結した。気流を合体して連続1回呼吸量を得、全肺抵抗(R_t)および動的コンプライアンス(C_{dyn})を等容積測定点およびゼロ流量点で得た。気流、容積および圧力を8チャンネルゴウルト(Gould)2000W高周波記録計に記録して、 C_{dyn} を全容量およびゼロ流量での P_{tp} の差から計算し、 R_t は P_{tp} と半呼吸肺量(midtidal lung volume)の V との比として計算した。これらの計算は、既にGilesらが記載したように、自動的にBuxco自動化肺力学呼吸分析器(Model 6, Buxco Electronics, Sharon, CT)で行った。Gilesら、Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 194: 213-232 (1971)を参照。これらの計算について記載する関連箇所はその全体を本明細書中に参考として援用する。アレルギーウサギにオリゴIIを投与

して得られた結果は、下記実施例26に示され、考察される。

【0078】

実施例14：気管支反応性亢進（BHR）の測定

各アレルギーウサギにアエロゾルでヒスタミンを投与して、その基線反応性亢進を測定した。食塩水またはヒスタミンのいずれのアエロゾルも、使用した各用量をDeVilbissネブライザー（DeVilbiss, Somerset, PA）を使用して、30秒間、次いで2分間、発生させた。超音波ネブライザーはその80%が直径5ミクロン以下のアエロゾル小滴を生成した。ヒスタミンアエロゾルは濃度を増加させて投与し（0.156～80mg/ml）、肺機能の測定を各用量後、行った。次いで、B4Rを基線（ $PC_{50\text{Histamine}}$ ）から C_{dyn} を50%低下させるに必要なヒスタミン濃度（mg/ml）を計算して測定した。

【0079】

実施例15：アンチセンスオリゴIの心血管性効果

CardiomaxJを使用する心拍出量および他の心血管性パラメーターの測定は、公知用量の冷生理食塩水の静脈注射後、心臓に存在する血液の温度変化をモニターする熱的希釈の原理を利用する。冷生理食塩水の1回急速注射は右頸静脈のカニキュラ挿入を経て右心房中へ行い、大動脈弓中の注射剤と血液混合物の対応温度変化を頸動脈のカニキュラ挿入を経て温度検出ミニプローブによって記録した。アレルギーウサギが上記（d）に記載したように、オリゴI（EPI2010；配列番号1）のアエロゾルで処置した後、24時間後に、これらの動物に0.3ml/kgの80%ケタミンと20%キシラジンで麻酔をかけた。この時間は上掲のNyceとMetzger, (1997)が明白に示したように、配列番号1の効果を示す先のデータと一致する。関連する記載はその全体を本明細書中に参考として援用する。次いで、熱電対を各ウサギの左頸動脈中に挿入して、次いで6.5cm進め、絹結紮糸で固定した。次いで、右頸静脈にカニキュラを挿入して、ある長さのポリエチレンチューブを固定した。次いで熱電対プローブの位置の正確さを決定するために、20EC（20）で滅菌生理食塩水を注射して、CardiomaxJ II（Columbus Instruments, Ohio）上に熱希釈曲線を定めた。熱電対の位置の正確さを確定した後、大腿部動脈および静脈を単離した。大腿部静脈は薬剤注射口として使用

し、大腿部動脈は血圧および心拍数測定のために使用した。一旦、一定な基線心血管パラメーターが確定すると、血圧、心拍数、心拍出量、全末梢抵抗、および心臓収縮性のCardiomaxJによる測定が行われた。

【0080】

実施例16：オリゴI（配列番号1）の作用の持続

8匹のアレルギーウサギは、コンプライアンスが基線を確定する50%（ $PC_{50Adenosine}$ ）に低下されるまで、上記（f）に記載したように、気管内チューブを経たネブライザーを使用して、0.15 mg/mlから始まる増加対数用量のアデノシンをまず与えた。次いで、ウサギのうち6匹は上記した5 mgのアエロゾル化用量（配列番号1）を4回与えた。2匹はコントロールとして等量の生理食塩水担体を与えた。最後の処置後、18時間で、 $PC_{50Adenosine}$ 値を再び試験した。この時点から、測定を毎日、10日まで全動物に対して続けた。この研究の結果は下記実施例25に考察される。

【0081】

実施例17：アンチセンスオリゴVによるアデノシン A_{2b} 受容体数の低下

スプラーグドローラットに上記したように吸入室を使用して、2日にわたって3回、2.0 mgの呼吸可能なアンチセンスオリゴV（配列番号10）を投与した。最後の投与から12時間で肺腎実質性組織を切開し、上掲Nyce & Metzger (1997)に記載されるように、[311]-NECAを使用してアデノシン A_{2b} 受容体に対して解析した。コントロールは等量の生理食塩水を投与して行った。その結果はスチューデントペアードt検定を使用して、 $p < 0.05$ の有意差であり、下記実施例28で考察する。

【0082】

実施例18：オリゴIと対応ホスホジステルオリゴVI（配列番号11）との比較

オリゴI（配列番号1）はアデノシンの効果に逆らい、20 mg アデノシン / 5.0 ml（アデノシンの溶解限界）までのアデノシン量において、それに対する感受性を取り除いた。このオリゴヌクレオチド配列のホスホジエステル形であるオリゴVI（配列番号11）は、同じ方法で試験した場合、完全に効果がなか

った。両化合物は同じ配列を有し、オリゴI（配列番号1）にホスホロジエステル残基が存在することのみ相違し、上掲Nyce & Metzger (1997)に記載されるように、アエロゾルとして輸送された。スチューデントペアードt検定で、 $p < 0.05$ の有意差を示す。この結果は下記実施例29で考察される。

【0083】

アンチセンスオリゴI（配列番号1）に対して得られた結果

実施例19：先の研究結果

アデノシンA₁受容体に特異的であるアンチセンスオリゴI（配列番号1）におけるヌクレオチド配列および他のデータは上記に示される。受容体数および活性を減少制御するオリゴIの効果を示す実験データもまた、上記に示される。アンチセンスオリゴIの特性および活性の更なる情報は、Nyce, J. W. and Metzger, W. J., Nature 385-721 (1997)に示されている。下記結果に関する関連部分はその全体を本明細書中に参考として援用する。刊行物NyceとMetzger (1997)は、アンチセンスオリゴI（配列番号1）が次の通りであることを示すデータを提供していた。

(1) アンチセンスオリゴI（配列番号1）は、下記表6に見られるように、用量依存法においてアレルギーウサギの気管支平滑筋のアデノシンA₁受容体数を低下させる。

(2) アンチセンスオリゴIはアデノシン誘発気管支収縮およびアレルギー誘導気管支収縮を弱化させる。

(3) オリゴIは、気管支反応性亢進を評価する標準測定法であるPC₅₀ヒスタミンにより測定した気管支反応性亢進を弱化させる。この結果は、明らかに表4、5および6に示されるように、アンチセンスオリゴIの抗炎症活性を証明する。

(4) アンチセンスオリゴIはアデノシンA₁受容体を標的とするように設計されているから、予期されるように、アンチセンスオリゴIは全体としてアデノシンA₁受容体に対して特異的であり、非常に近接して関連するアデノシンA₂受容体または関連するブラジキニンB₂受容体のいずれに対してもいかなる用量でも効果を示さなかった。これは下記表6に見られる。

(5) ミスマッチコントロール分子、MM2およびMM3(配列番号12および配列番号13)は、同じ基本的組成と分子量を有するが、アンチセンスオリゴI(配列番号1)とはそれぞれ6および2ミスマッチによって異なる。同一基本組成を残しながら、最小限、可能性を有するこれらのミスマッチは、オリゴIの上記効果と矛盾して、標的受容体(A₁、A₂、またはB₂)のいずれにも完全に効果を示さなかった。

これらの結果は、アデノシンA₁受容体を標的とするオリゴIなどのアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用に関する先行技術では完全に欠けているから、予期できない結果である。この特許に示された成果は、気道閉塞、気管支収縮、肺炎症およびアレルギーなどの肺機能などに関連する機能または終点に関連する遺伝子またはmRNAを標的とした薬剤を使用するバリデーション方法の効果に明らかに可能性を与え、そしてこれを証明する。

【0084】

実施例20： オリゴIはアデノシン感作に対して応答を減ずる。

受容体結合実験は上記実施例12に記載され、その結果は下記表6に示される。表6は、A₁アデノシン受容体およびB₂ブラジキニン受容体およびミスマッチ処理アレルギーウサギの気道平滑筋から単離された膜中のアデノシンA₁選択リガンド[3H]DPCPXおよびブラジキニンB₂選択リガンド[3H]NPC17731の結合特性を示す。

【0085】

【表6】

表 6 3つのアンチセンスオリゴの結合特性

処置 ¹	A ₁ 受容体		B ₂ 受容体	
	K _d	B _{max}	K _d	B _{max}
アダノシン A ₁ 受容体				
20mg	0.36 ± 0.029nM	19 ± 1.52fmoles*	0.39 ± 0.031nM	14.8 ± 0.99fmoles
2mg	0.38 ± 0.030nM	32 ± 2.56fmoles*	0.41 ± 0.028nM	15.5 ± 1.08fmoles
0.2mg	0.37 ± 0.030nM	49 ± 3.43fmoles	0.34 ± 0.024nM	15.0 ± 1.06fmoles
A ₁ MM1 (コントロール)				
20mg	0.34 ± 0.027nM	52.0 ± 3.64fmoles	0.35 ± 0.024nM	14.0 ± 1.0fmoles
2mg	0.37 ± 0.033nM	51.8 ± 3.88fmoles	0.38 ± 0.028nM	14.6 ± 1.02fmoles
B ₂ A (ブラジキニン受容体)				
20mg	0.36 ± 0.028nM	45.0 ± 3.15fmoles	0.38 ± 0.027nM	8.7 ± 0.62fmoles**
2mg	0.39 ± 0.035nM	44.3 ± 2.90fmoles	0.34 ± 0.024nM	11.9 ± 0.76fmoles**
0.2mg	0.40 ± 0.028nM	47.0 ± 3.76fmoles	0.35 ± 0.028nM	15.1 ± 1.05fmoles
B ₂ MM (コントロール)				
20mg	0.39 ± 0.031nM	42.0 ± 2.94fmoles	0.41 ± 0.029nM	14.0 ± 0.98fmoles
2mg	0.41 ± 0.035nM	40.0 ± 3.20fmoles	0.37 ± 0.030nM	14.8 ± 0.99fmoles
0.2mg	0.37 ± 0.029nM	43.0 ± 3.14fmoles	0.36 ± 0.025nM	15.1 ± 1.35fmoles
生理食塩水コントロール	0.37 ± 0.041	46.0 ± 5.21	0.39 ± 0.047nM	14.2 ± 1.35fmoles

【0086】

¹ 48時間にわたって等分割された用量を4回投与したオリゴヌクレオチド全体をいう。処置と分析は方法の欄に記載したようにして行った。有意差は分散分析 (ANOVA) とチューキー t 検定を繰り返して測定して求めた。全群において

、 n = 4 ~ 6

* ミスマッチコントロール群と生理食塩水処置群からの有意差、 $p < 0.001$

** ミスマッチコントロール群と生理食塩水処置群からの有意差、 $p < 0.05$

【0087】

実施例2.1：オリゴIの用量反応効果

アンチセンスオリゴI（配列番号1）は、下記表7に示されるように、用量範囲以上に用量依存方法において動物へのアデノシン投与効果を低下させると判断された。

【0088】

表7：アンチセンスオリゴIの用量反応効果

全用量 (mg)	PC _{50Adenosine} (mg アデノシン)
アンチセンスオリゴI	
0.2	8.32' '7.2
2.0	14.0' '7.2
20	19.5' '0.34
A ₁ MM2オリゴ(コントロール)	
0.2	2.51 ± 0.46
2.0	3.13 ± 0.71
20	3.25 ± 0.34

上記結果はスチューデントペアードt検定で検討され、統計的差、 $p = 0.05$ であると判断された。

【0089】

アンチアデノシンA₁受容体オリゴであるオリゴI（配列番号1）は、アデノシンA₁受容体に特異的に作用するが、アデノシンA₂受容体には作用しない。これらの結果は、上記実施例9と上掲NyceとMetzger (1997)（気管内チューブを経てネブライザーから、8～12時間の間隔を置いて5mgを4用量）に記載さ

れるように、アンチセンスオリゴI（配列番号1）またはミスマッチコントロールオリゴ（配列番号12、A₁MM2）によるウサギの処置、切り取られた気管支平滑筋組織および上掲Nyce Metzger (1997)で報告されたようにして測定されたアデノシンA₁およびアデノシンA₂受容体の数から生じた。

【0090】

実施例22：標的遺伝子産物におけるオリゴI（配列番号1）の特異性

オリゴI（配列番号1）はアデノシンA₁受容体に対して特異的であるが、そのミスマッチコントロールは活性を有していなかった。図1は上記実施例10および上掲NyceとMetzger (1997)に記載されるようにクロスオーバー実験から得た結果を示す。2つのミスマッチコントロール（配列番号12および配列番号13）はPC_{50Adenosine}値に効果を示さなかった。反対に、アンチセンスオリゴIの投与はPC_{50Adenosine}値において7倍の増加を示した。その結果は、アンチセンスオリゴI（配列番号1）が生理食塩水コントロールと比較した場合、外因性投与アデノシンに対する応答を低下させる（感受性を弱化させる）ことを明らかに示す。上記表6に示された結果は、アンチセンスオリゴIの効果は用量依存性（表6の3欄参照）であることを明らかに確認する。オリゴIは、またアデノシンA₁受容体に全体的に特異的であり（表6の上部3列）、近接して関連するアデノシンA₂受容体またはブラジキニンB₂受容体のいずれにも活性を示さない（上記表6の8～10行）。さらに、表6に示される結果からアンチセンスオリゴI（配列番号1）が用量依存法でアデノシンに対する感受性を減少させ、アンチセンスオリゴ依存法でもこれを行うことを確認する。2つのミスマッチコントロールオリゴヌクレオチド（A₁MM2：配列番号12およびA₁MM3：配列番号13）はPC_{50Adenosine}値またはアデノシンA₁受容体数の減少において、いかなる効果も示さない。

【0091】

実施例23：アエロゾル誘発気管支収縮および炎症への効果

オリゴI（配列番号1）は、ミスマッチオリゴと比べた場合、ウサギモデルでヒスタミン誘発効果を有意に低下させることを示した。アレルギー誘発気道閉塞および気管支反応性亢進へ及ぼすアンチセンスオリゴI（配列番号1）とミスマ

ッチオリゴ (A_1 MM2 : 配列番号12および A_1 MM3 : 配列番号13) の効果は、アレルギーウサギで評価した。アレルギー誘発気道閉塞におけるアンチセンスオリゴI (配列番号1) の効果も評価した。プロットされた曲線下の面積を計算して、アンチセンスオリゴIはミスマッチコントロールに比べて、アレルギー誘発気道閉塞を有意に阻害した (55%、 $p < 0.05$; ANOVAおよびチューキー t 検定で繰り返し測定)。アレルギー誘発気道閉塞にはミスマッチオリゴ A_1 MM2 (コントロール) によって全く効果が誘発されなかった。アレルギー誘発BHRへのアンチセンスオリゴI (配列番号1) の効果は上記のようにして測定した。 $PC_{50Histamine}$ から計算して、アンチセンスオリゴI (配列番号1) はミスマッチコントロールに比べて、アレルギーウサギでアレルギー誘発BHRを有意に阻害した (61%、 $p < 0.05$; ANOVA、チューキー t 検定で繰り返し測定)。アレルギー誘発BHRにおける A_1 MMミスマッチコントロールの効果は全く観察されなかった。この結果はアンチセンスオリゴI (配列番号1) がアエロアレルギー (家塵埃ダニ) 誘発気管支収縮を防御するには効果的であることを示した。さらに、アンチセンスオリゴI (配列番号1) はまた、アンチセンスオリゴI (配列番号1) における抗炎症活性を示すヒスタミン感受性への影響によって示されるように、塵埃ダニ誘発気管支反応性亢進のタンパク阻害剤であると判断された。

【0092】

実施例24 : 低A含量アンチセンスオリゴIは有害な副作用がない。

オリゴI (配列番号1) は受容者にとって毒性である副作用を有しないことが示された。動脈血圧、心拍出量、1回拍出量、心拍数、全末梢抵抗、または心臓収縮性 (d T d P) における変化は、2.0または20mgのオリゴI (配列番号1) の投与後には観察されなかった。さらに、CardiomaxJ装置 (Columbus Instruments, Ohio) を使用した心拍出量 (CO)、1回拍出量 (SV)、平均動脈圧 (MAP)、心拍数 (HR)、全末梢抵抗 (TPR) および収縮性 (d P d T) の測定結果が評価された。これらの結果は、オリゴI (配列番号1) が臨界的な心血管パラメーターに有害な効果を及ぼさないことを証拠づけた。特に、このオリゴは低血圧を生じない。この発見は、他のホスホロチオエートアンチセンスオ

リゴヌクレオチドがいくつかのモデル系で低血圧を誘発することが過去に示されているから特に重要である。さらに、アデノシンA₁受容体は心臓内の洞房伝導において重要な役割を果たす。アンチセンスオリゴI（配列番号1）によるアデノシンA₁受容体レセプターの弱化は、したがって、受容体の下流制御に应答して、有害な肺外活性となると予想されるであろう。これは事実ではない。アンチセンスオリゴI（配列番号1）はいかなる有害な肺内効果をもたらさず、本発明アンチセンスオリゴの低用量投与に予期せぬ好ましくない副作用を与えない。これは、オリゴI（配列番号1）が肺へ直接に投与された場合、有害な影響を生じる有意な量で心臓へ到達しないことを証明する。肺を避け、肺の外から有害、かつ生命を脅かす効果を生じる得るテオフィリンなどの従来のアデノシン受容体アンタゴニストと対照的である。

【0093】

実施例25：オリゴIの長期継続効果

オリゴI（配列番号1）はアデノシン感作に先立って、それを投与したときに得られたPC₅₀および抵抗値によって証拠つけられたように、長期継続効果を示した。効果の持続は、上記したように、気管内チューブを経てネブライザーを使用し、それぞれ等用量5mgを4回投与した場合のアデノシンアンチセンスオリゴIのPC₅₀について測定した。薬剤の効果は、投与後、1～8日に有意である。アンチセンスオリゴI（配列番号1）の効果が消失した場合、動物には生理食塩水アエロゾル（コントロール）を投与し、全ての動物のPC_{50Adenosin}値を再び測定した。生理食塩水処置動物は基線PC₅₀アデノシン値（n=6）を示した。効果の持続（抵抗について）は、上記したように測定した気道抵抗について、上記したように20mgのアンチセンスオリゴI（配列番号1）を投与した6匹のアレルギーウサギについて測定した。効果の平均計算持続時間は、PC₅₀アデノシン（p<0.05）および抵抗（p<0.05）の双方で8.3日であった。これらの結果は、アンチセンスオリゴI（配列番号1）が全く予期しない作用の極めて長期持続を有することを示す。

【0094】

実施例26：アンチセンスオリゴIより良好なアデノシン非含有アンチセンスオ

リゴII

アデノシンA₁受容体mRNAの異なった領域を標的とするアンチセンスオリゴIIをアデノシンA₁仲介効果に対して高い活性を有すると判断された。この実験では、20mgのアンチセンスオリゴIIまたは生理食塩水（コントロール）を上記したように、アレルギーウサギの2つの群へ投与した際のコンプライアンスおよび抵抗値に及ぼすアンチセンスオリゴII（配列番号7）の投与効果を測定した。コンプライアンスと抵抗値は上記実施例13で記載したようにアデノシンまたは食塩水の投与に続いて測定した。本発明のアンチセンスオリゴの効果は、コントロールとは統計的に有意な方法で異なっていた。ペアードt検定を使用してコンプライアンスは $p < 0.05$ 、抵抗は $p < 0.01$ であった。その結果はアデノシンA₁受容体を標的とし、アデノシンを含まないアンチセンスオリゴII（配列番号7）はアデノシン感作において、コンプライアンスを効果的に維持し、抵抗を低下させる。事実、アデノシン非含有アンチセンスオリゴIIは、低アデノシンアンチセンスオリゴI（配列番号1）より、より潜在性を有する。それはアデノシンを含有しないから、分解中にアデノシンを遊離しないし、またアデノシン受容体の活性化に寄与しないであろう。

【0095】

実施例27：アンチセンスオリゴIIIおよびIV

オリゴIII（配列番号8）およびIV（配列番号9）は、20mgのアンチセンスオリゴIII（配列番号8）およびIV（配列番号9）を上記したようにアレルギーウサギに別個に投与した際に存在する炎症と炎症細胞の数を低下させるその効果によって、実際にアデノシンA₃受容体を特異的に標的とすることが示されている。炎症細胞の数は3時間後の気管支洗浄液中を測定し、1回洗浄するに当たり、少なくとも100個の生細胞を計数した。顆粒球および気管支洗浄中の全細胞に及ぼすアンチセンスオリゴIII（配列番号8）およびIV（配列番号9）の効果は、塵埃ダニアレルゲンへ露呈した後に評価した。その結果は、アンチセンスオリゴIV（配列番号9）とアンチセンスオリゴIII（配列番号8）が塵埃ダニアレルゲンに露呈した後の喘息肺の非常に潜在的な抗炎症性薬剤であることを示した。当該技術分野で公知であるように、顆粒球、特に好酸球が喘息の1次炎症細胞

であり、アンチセンスオリゴIII（配列番号8）およびIV（配列番号9）の投与は、それぞれ、その数を40%および66%に減少した。さらに、アンチセンスオリゴIV（配列番号9）およびIII（配列番号8）もまた、それぞれ気管支洗浄液中の全細胞数を40%および80%に低下させた。これはまた、本発明のアンチアデノシンA₃薬剤による抗炎症活性の重要な指標である。炎症は喘息の気管支反応性亢進およびアレルギー誘発気管支収縮の基礎となることが公知である。アデノシンA₃受容体を標的とするアンチセンスオリゴIII（配列番号8）およびIV（配列番号9）は、各種のアデノシン肺受容体を特異的に標的とするように設計された抗炎症薬剤の重要な新規クラスの代表例である。

【0096】

実施例28：アンチセンスオリゴV

アデノシンA_{2b}アデノシン受容体mRNAを標的とするアンチセンスオリゴV（配列番号10）は、アデノシンA_{2b}仲介効果を計数し、アデノシンA_{2b}受容体数を半分以下に低下させることに非常に効果的であることが示されている。

【0097】

実施例29：ホスホジエステル残基で置換したオリゴI-D S（配列番号11）の予期されない優位性

オリゴI（配列番号1）およびI-D S（配列番号11）は上記したようにアレルギーウサギに別個に投与し、次いでウサギをアデノシンで感作した。ホスホジエステルオリゴI-D S（配列番号11）は統計的に有意に効果的ではなかったが、オリゴI（配列番号1）は20mgのPC_{50Adenosine}を証明する高い有効性を示した。

【0098】

実施例30：アデノシン受容体活性を有するアデノシン含有モノヌクレオチド

この実施例は、リボヌクレオシドモノホスフェート、例えばAMPなどのアンチセンスオリゴヌクレオチドのインビボ分解産物がアデノシン受容体として作用することを証明する。アデノシンおよびアデノシンモノホスフェート（dAMP）を10mg/ml以下の異なった用量で実験動物へ別個に投与した場合、両化

化合物を図1に示されるようにコンプライアンス%を低下させる同様な効果を有している。両ケースの効果は、用量に従い増加するが、生理食塩水コントロールは効果を示さない。これらの結果は、アデノシンヌクレオシドならびにアデノシン自体がアデノシン受容体と相互作用することを示す。

【0099】

実施例31：アデノシン含有核酸の分解はアデノシン受容体活性を生じる。

別な試験として、ランダムホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチドはインピボで分解され、アデノシン受容体と相互作用することができるアデノシンヌクレオシドを放出するかどうかを決定するために、これらをウサギに投与した。喘息ウサギには生理食塩水(コントロール)、アデノシン含有ランダムおよびdesAアデノシンランダム(C)を別個に投与された。使用したランダムはグアニン、シトシンおよびチミジンのランダム配列からなるdesAアデノシンランダムであり、アデノシン含有ランダムはグアニン、シトシンおよびアデノシンからなる。図2に示された結果は、アデノシン含有オリゴヌクレオチドが分解時にアデノシンおよび/またはアデノシンヌクレオシドを放出し、アデノシン化合物がアデノシン受容体と相互作用し、一方、desアデノシンオリゴヌクレオチドはそうではないことを明らかに示す。アンチセンスオリゴヌクレオチドの分解産物としてアデノシンヌクレオシドの放出は、したがって、標的バリデーションのためのアンチセンスロックアウト実験効果を評価する場合に、実験結果を混乱させるであろう。この実験は標的バリデーション研究のdesアデノシンアンチセンス(A非含有または低A)オリゴヌクレオチドを使用する必要性を示す。

先の実施例は本発明の説明であり、これを限定するように解釈されるべきものでない。本発明は上記請求項によって定義され、請求項の均等物もここに含まれる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

生理食塩水(コントロール)、アデノシン(o)、およびdAMP(P)を別個にウサギへ投与した実験を示す図である。

【図2】

アデノシン（A）を含むオリゴヌクレオチド（オリゴ）およびアデノシンを有しないもの（desA）ものの効果を示す図である。

【図3】

アンチセンスオリゴヌクレオチドが肺または気道疾患に関連する標的バリデーションにおいて有効な薬剤として利用されることを示す図である。

【図4】

アンチセンスオリゴヌクレオチドが肺または気道疾患に関連する標的バリデーションにおいて有効な薬剤として利用されることを示す図である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> EPIGENESIS PHARMACEUTICALS, INC.
 <120> Method For Validating/Invalidating Target(s) and
 Pathways
 <130> NP01-1058
 <150> US 60/122,950
 <151> 1999-03-05
 <160> 14
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 gatggagggc ggcatggcgg g
 <210> 2

<211> 21	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 2	
gtagcagggcg gggatggggg c	21
<210> 3	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 3	
gttggtgggc atcttgcc	18
<210> 4	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 4	
gtacttgccg atctaggc	18
<210> 5	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 5	
gtgggcctag ctctcgcc	18
<210> 6	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 6	
gtcggggtac ctgtcgcc	18

<210> 7	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 7	
ctcgtcgcgcg tcgccggcgg g	21
<210> 8	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 8	
gggtggtgct attgtcgggc	20
<210> 9	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 9	
ggcccagggc cagcc	15
<210> 10	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 10	
ggccggggcca gccgggcccg g	21
<210> 11	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 11	

gatggagggc ggcatggcgg g

21

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

gtaggtggcg ggcaaggcgg g

21

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

gatggagggc ggcatggcgg g

21

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

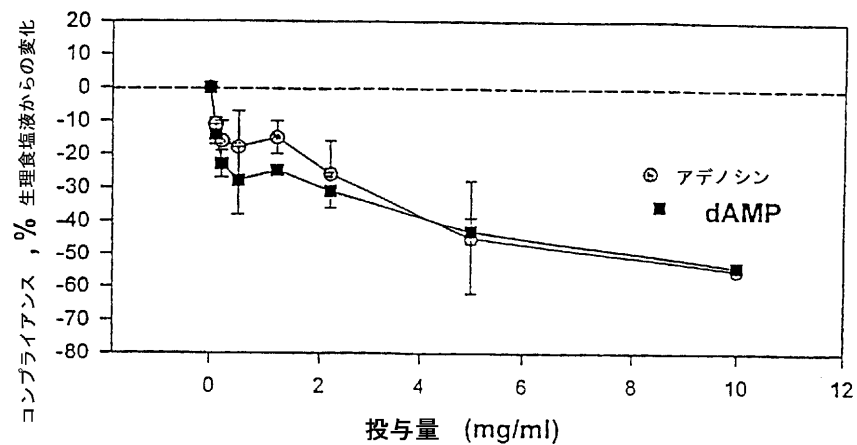
<213> Homo sapiens

<400> 14

ggtgatgttg agcatttcgg c

21

【図1】



【図2】

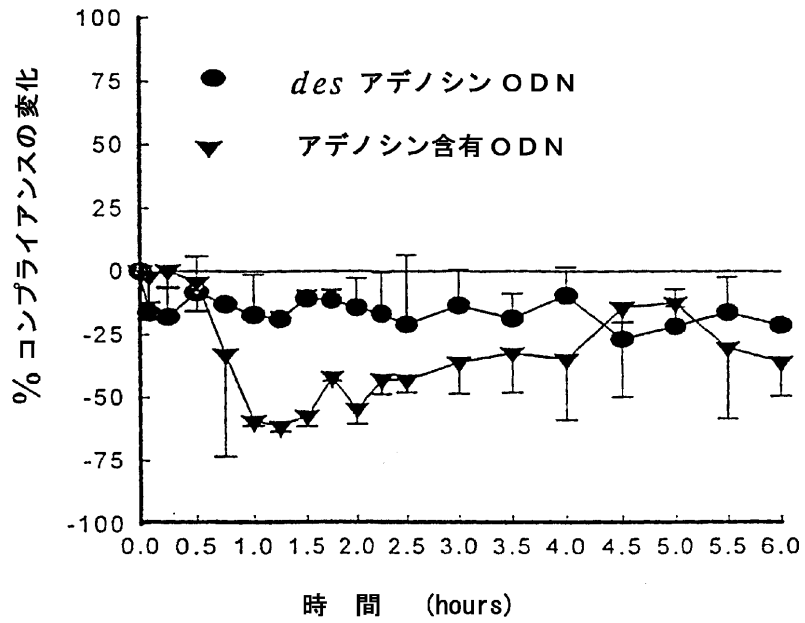


Figure 2

【図3】

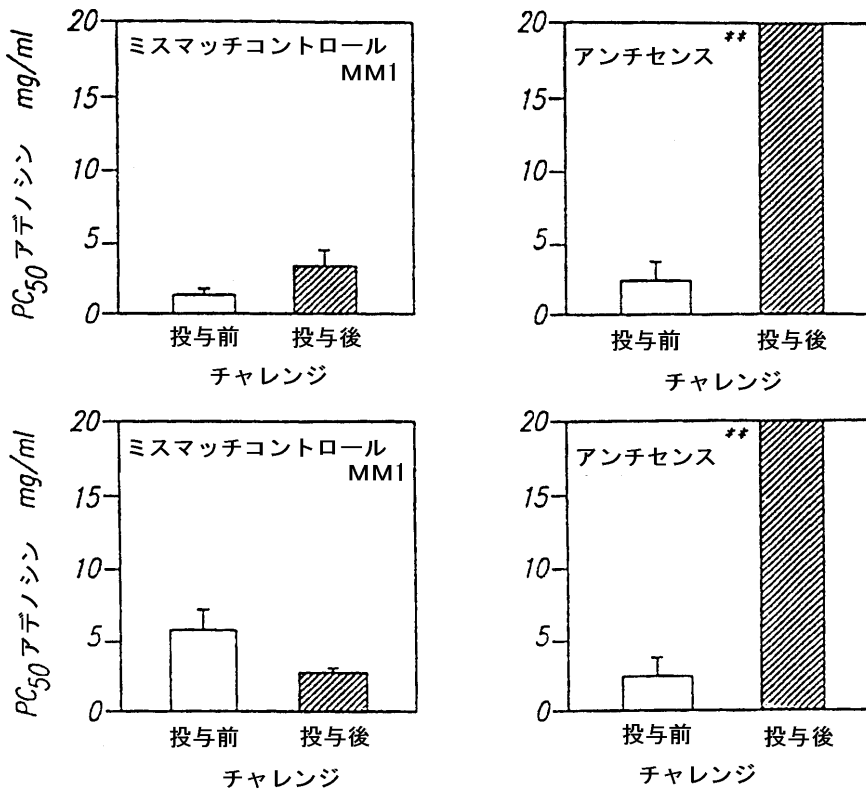
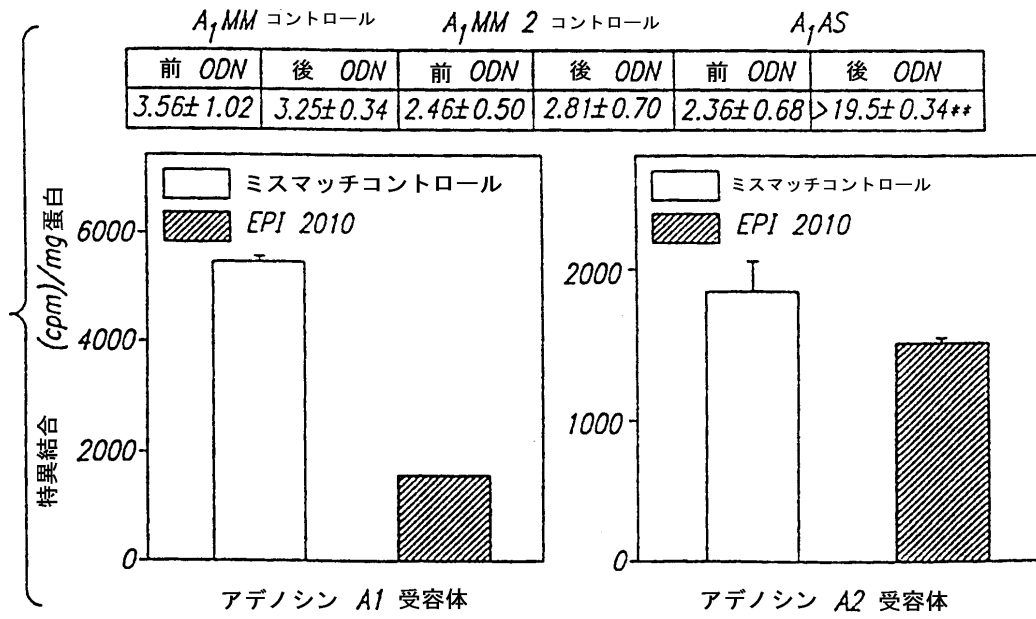


Figure 3

【図4】



【**手続補正書**】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【**提出日**】平成13年5月18日(2001.5.18)

【**手続補正1**】

【**補正対象書類名**】明細書

【**補正対象項目名**】特許請求の範囲

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【**特許請求の範囲**】

【**請求項1**】 前以て選択した疾患または症状に関連すると推定されるポリペプチドをコードする遺伝子またはその対応するmRNA、3'および5'イントロン-エクソン接合部位またはコーディング領域と非コーディング領域間の近傍部分から選択されるゲノムまたはmRNAフランキング領域、または全mRNAセグメントから選択された標的を選択し；

該標的に対してアンチセンスである、約15%以下のアデノシン(A)からなるオリゴヌクレオチド(オリゴ)を設計し；

mRNAがコードするポリペプチドのインビトロ発現を有意に阻止または切除する1つ以上のオリゴを選択し；

該標的mRNAとのインビボハイブリダイゼーションに有効な量の選択オリゴを被験者に投与し；かつ、

該疾患または症状に関連する被験者の機能において検出可能な変化が生じたか否かを、該オリゴの投与前後の疾患または症状に関連する機能の値と比較して、評価し；

その際、約70%以上の機能値の変化は積極的な相関関係を示し、約40~約70%は可能性ある相関関係を示し、かつ、約30%以下は相関関係の欠如を示すことからなる、疾患または症状の機能と疾患または症状に関連していると推定される標的ポリペプチドをコードする遺伝子またはmRNAとの相関関係の存在をバリデート/インバリデートするか、あるいは決定する方法。

【**請求項2**】 前記アンチセンスオリゴは、G、Uおよび/またはCからなる群から選択される少なくとも4つの隣接する核酸を有する標的断片を選択し、

かつ、該選択断片を含み、約15%以下のC、Uおよび/またはG含量を有し、および/または所望のタイプおよび/または活性範囲を有する長さ4~60ヌクレオチドである第1オリゴヌクレオチドを得ることによって構築される、請求項1記載の方法。

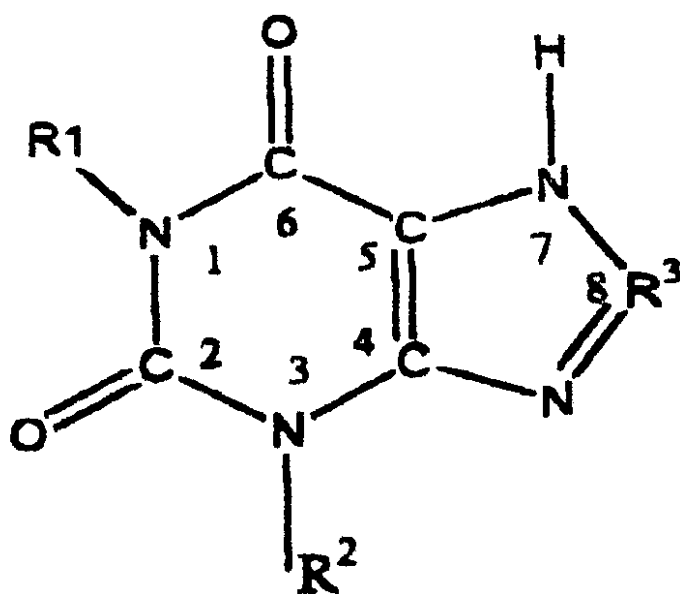
【請求項3】 さらに、前記アンチセンス断片が少なくとも1つのAからなる場合、チミジン(T)またはウリジン(U)と結合するが、AのアデノシンA₁、A_{2a}、A_{2b}およびA₃受容体アゴニストまたはアンタゴニスト活性の約0.3以下を示す複素環式芳香族塩基から選択される別な塩基(B)で、少なくとも1つのAを置換することを含む、請求項1記載の方法。

【請求項4】 前記複素環式芳香族塩基は、O、ハロゲン、NH₂、SH、SO₂、SO₃、COOH、または分岐または融合1級または2級アミノ、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリーール、ヘテロアリーール、アルコキシ、アルケノキシ、アシル、シクロアシル、アリーールアシル、アルキノキシ、シクロアキコキシ、アロイル、アリーールチオ、アリーールスルホキシル、ハロシクロアルキル、アルキルシクロアルキル、アルケニルシクロアルキル、アルキニルシクロアルキル、ハロアリーール、アルキルアリーール、アルケニルアリーール、アルキニルアリーール、アリーールアルキル、アリーールアルケニル、アリーールアルキニル、アリーールシクロアルキルで置換されるか、さらに、O、ハロゲン、NH₂、1級、2級または3級アミン、SH、SO、SO₂、SO₃、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキルまたはヘテロアリーールで置換されていてもよい、ピリミジンまたはプリンである、請求項3記載の方法。

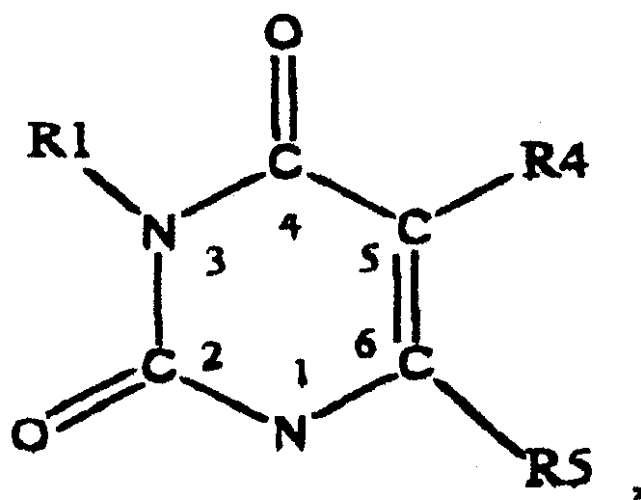
【請求項5】 前記プリンは1、2、3、6および/または8位で置換され、かつ、前記ピリミジンは2、3、4、5および/または6位で置換される、請求項4記載の方法。

【請求項6】 前記ピリミジンおよびプリンは、テオフィリン、カフェイン、ダイフィリン、エトフィリン、アセフィリン、ピペラジン、バミフィリン、エンプロフィリンまたはキサントシンであり、下記化学式を有する、請求項4記載の方法。

【化1】



プリン
 または
 【化2】



ピリミジン

(式中、R¹およびR²は独立して、H、アルキル、アルケニル、またはアルキニルであり、かつ、R³はH、アリール、ジシクロアルキル、ジシクロアルケニル、ジシクロアルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル

ル、O - シクロアルキル、O - シクロアルケニル、O - シクロアルキニル、NH₂ - アルキルアミノ - ケトキシアルキルオキシ - アリールまたはモノまたはジア
ルキルアミノアルキル - N - アルキルアミノ - SO₂アリールであり、R₄また
はR₅は独立してR₁であり、また共にR₃である。)

【請求項7】 前記アンチセンスオリゴは、約0～約12%のアデノシン含
量を有する、請求項1記載の方法。

【請求項8】 前記オリゴは約5%以下のAからなる、請求項7記載の方法
。

【請求項9】 前記オリゴはAを含まない、請求項8記載の方法。

【請求項10】 前記1つのAが、チミジンまたはウリジンと結合するが、
アデノシンA₁、A_{2a}、A_{2b}またはA₃受容体にてアデノシンアゴニストま
たはアンタゴニスト活性の約0.3以下を示す複素環式芳香族塩基から選択され
る別な塩基で置換される、請求項1記載の方法。

【請求項11】 前記Aのすべてが、チミジンまたはウラシルと結合するが
、アデノシンA₁、A_{2a}、A_{2b}およびA₃受容体にてアデノシンアゴニスト
またはアンタゴニスト活性の約0.3以下を示す複素環式芳香族塩基から選択さ
れる別な塩基で置換される、請求項10記載の方法。

【請求項12】 前記一般的塩基は、3 - ニトロピロール - 2' - デオキシ
ヌクレオシド、5 - ニトロ - インドール、2 - デオキシリボシル - (5 - ニトロ
インドール)、2 - デオキシリボフラノシル - (5 - ニトロインドール)、2'
- デオキシイノシン、2' - デオキシネブラリン、6H, 8H - 3, 4 - ジヒド
ロピリミド[4, 5 - c]オキサジン - 7 - オンまたは2 - アミノ - 6 - メトキ
シアミノプリンである、請求項6記載の方法。

【請求項13】 メチル化シトシン (^mC) は、もしもオリゴ中に存在すれ
ば、少なくとも1つのCpGジヌクレオチド中のCに代わって置換される、請求
項1記載の方法。

【請求項14】 前記オリゴの少なくとも1つのヌクレオチド残基または置
換体は、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホロチオエート、ホス
ホロジチオエート、ボラノホスフェート、ホルムアセタール、チオホルムアセタ

ール、チオエーテル、カーボネート、カルバメート、スルフェート、スルフォネート、スルファメート、スルホンアミド、スルホン、スルファイト、スルホキシド、スルファイド、ヒドロキシルアミン、メチレン(メチルイミノ)(MMI)、メトキシメチル(MOM)、メトキシエチル(MOE)、メチレンオキシ(メチルイミノ)(MOMA)、メトキシメチル(MOM)、2'-O-メチル、ホスホルアミデート、C-5置換残基、またはこれらの組み合わせである、請求項1記載の方法。

【請求項15】 全ヌクレオチド結合残基が置換される、請求項14記載の方法。

【請求項16】 前記アンチセンスオリゴは、約7~60モノヌクレオチドからなる、請求項1記載の方法。

【請求項17】 前記アンチセンスオリゴは、細胞内面化剤または吸収剤または細胞目標化剤を含む薬剤と結合している、請求項1記載の方法。

【請求項18】 前記細胞内面化剤または吸収剤は、トランスフェリン、アシアログリコプロテインまたはストレプトアビジンを含む、請求項17記載の方法。

【請求項19】 前記核酸はベクターに結合している、請求項18記載の方法。

【請求項20】 前記ベクターは、原核性または真核性ベクターを含む、請求項19記載の方法。

【請求項21】 前記アンチセンスオリゴは、肺、脳、心臓、腎臓、腫瘍、血液、皮膚、目、頭皮、鼻通路、睾丸、頸部、口腔、咽頭、食道、小腸または大腸、滑膜組織、筋肉組織、卵巣、外耳道へ投与されるか、またはインビトロで使用される、請求項1記載の方法。

【請求項22】 前記疾患または症状は、肺、脳、心臓、腎臓、腫瘍、血液、免疫系、皮膚、目、頭皮、鼻通路、睾丸、頸部、口腔、咽頭、食道、小腸または大腸、滑膜組織、筋肉組織、卵巣または外耳道を患う、請求項1記載の方法。

【請求項23】 前記疾患または症状は肺を患う、請求項22記載の方法。

【請求項24】 前記疾患または症状は、気管支収縮、肺炎および/または

アレルギーに関連する、請求項22記載の方法。

【請求項25】 前記疾患または症状は、脳を患うか、または脳活性に関与する、請求項22記載の方法。

【請求項26】 前記疾患または症状は、免疫機能または障害に関連する、請求項22記載の方法。

【請求項27】 前記標的は、免疫グロブリン、抗体受容体、サイトカイン、サイトカイン受容体、これらをコードする遺伝子または対応mRNA、遺伝子およびmRNAのフランキング領域またはイントロンまたはエクソン接合部位を含む、請求項26記載の方法。

【請求項28】 前記疾患または症状は、心臓血管系を患う、請求項22記載の方法。

【請求項29】 前記疾患または症状は、胃腸系に関連する、請求項22記載の方法。

【請求項30】 前記疾患または症状は、悪性腫瘍または癌に関連する、請求項22記載の方法。

【請求項31】 前記標的は、免疫グロブリンまたは抗体受容体、これらをコードする遺伝子またはmRNA、癌遺伝子に関連する遺伝子またはmRNA、またはゲノムまたはmRNAのフランキング領域またはエクソンまたはイントロン接合部位を含む、請求項30記載の方法。

【請求項32】 前記組成物は、インビトロで使用されるか、または経口内、腔内、鼻腔内、肛門内、膈内、子宮内、頭蓋内、肺内、腎内、結節内、関節内、眼内、リンパ管内、経皮、経頬、静脈内、皮下、筋肉内、腫瘍内、腺内、眼球内、頭蓋内、器官内、血管内、髄腔内、移植、吸入、皮内、肺内、耳内、心臓内、低放出、持続性放出またはポンプにより投与する、請求項1記載の方法。

【請求項33】 前記標的は、転写因子、刺激または活性化因子、サイトカインまたはその受容体、インターロイキン、インターロイキン受容体、ケモカイン、ケモカイン受容体、内因性生成特異的または非特異的酵素、免疫グロブリン、抗体受容体、中枢神経系(CNS)または末梢神経系および非神経系受容体、CNSまたは末梢神経または非神経系ペプチド伝達体、接着分子、デフェンシン

、成長因子、血管作動ペプチド、ペプチド受容体または結合タンパクを含むポリペプチドをコードする遺伝子またはmRNA、または癌遺伝子に対応する遺伝子またはmRNAを含む、請求項1記載の方法。

【請求項34】 前記アンチセンスオリゴは、肺気道を患う疾患および/または症状に関連するポリペプチド、それらをコードする遺伝子またはRNA、ゲノムまたはmRNAのフランキング領域または遺伝子およびmRNAのイントロンおよびエクソン接合部位から標的を選択し、

標的遺伝子に対応するmRNAまたは標的ポリペプチドをコードするmRNA、ゲノムまたはmRNAのフランキング領域または遺伝子またはmRNAのイントロンまたはエクソン接合部位の配列を得て、

mRNAの少なくとも1つのセグメントを選択し、

選択mRNAセグメントに対してアンチセンスである1つ以上のオリゴを合成し、かつ、

もしも必要なら、全ヌクレオチドの約15%以下までにオリゴ中に存在するA含量を低下させるために、1つ以上のAを別な塩基で置換することによって製造される、請求項1記載の方法。

【請求項35】 前記標的遺伝子は、転写因子、刺激または活性化因子、インターロイキン、インターロイキン受容体、ケモカイン、ケモカイン受容体、内因性生成特異的または非特異的酵素、免疫グロブリン、抗体受容体、中枢神経系(CNS)または末梢神経系または非神経系受容体、CNSまたは末梢神経系または非神経系ペプチド伝達体またはその受容体、接着分子、デフェンシン、成長因子、血管作動ペプチドまたはその受容体、または結合タンパクから選択されるポリペプチドをコードする標的遺伝子またはmRNA、または癌遺伝子に対応する標的遺伝子またはmRNA、またはそれらのフランキング領域またはイントロンまたはエクソン接合部位からなる、請求項1記載の方法。

【請求項36】 前記コードするポリペプチドは、 $Nf_{\kappa}B$ 転写因子、インターロイキン-8受容体(IL-8R)、インターロイキン5受容体(IL-5R)、インターロイキン-4受容体(IL-4R)、インターロイキン3受容体(IL-3R)、インターロイキン-1 (IL-1)、インターロイキン1

受容体 (IL-1R)、エオタキシン、トリプターゼ、主要塩基性タンパク、
 2-アドレナリン様受容体キナーゼ、エンドセリン受容体A、エンドセリン
 受容体B、プレプロエンドセリン、ブラジキニンB2受容体、IgE高親和性受
 容体、インターロイキン1(IL-1)、インターロイキン1受容体(IL-1
 R)、インターロイキン9(IL-9)、インターロイキン-9受容体(IL-
 9R)、インターロイキン11(IL-11)、インターロイキン11受容体(
 IL-11R)、誘導性一酸化窒素シンセターゼ、シクロオキシゲナーゼ(CO
 X)、細胞内接着分子(ICAM-1)、血管細胞接着分子(VCAM)、ラン
 テス(血小板・T細胞由来好酸化球走行性物質)、血管内皮白血球接着分子(E
 LAM-1)、単球活性化因子、好中球走化性因子、好中球エラスターゼ、デフ
 フェンシン1、2および3、ムスカリン性アセチルコリン受容体、血小板活性因子
 、腫瘍神経因子(TNF)、5-リポキシゲナーゼ、ホスホジエステラーゼ
 IV、サブスタンスP、サブスタンスP受容体、ヒスタミン受容体、チマーゼ、
 CCR-1CCケモカイン受容体、CCR-2CCケモカイン受容体、CCR-
 3CCケモカイン受容体、CCR-4CCケモカイン受容体、CCR-5CCケ
 モカイン受容体、プロスタノイド受容体、GATA-3転写因子、好中球付着性
 受容体、MAPキナーゼ、インターロイキン-9(IL-9)、NFAT転写因
 子、STAT4、MIP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、シクロ
 フィリン、ホスホリパーゼA2、塩基性線維芽細胞成長因子、メタロプロテナー
 ゼ、CSBP/p38MAPキナーゼ、トリプトース受容体、PDG2、インタ
 ーロイキン-3(IL-3)、インターロイキン-1(IL-1)、シクロ
 スポリンA-結合タンパク、FK5-結合タンパク、4-1セレクチン、フィ
 ブロネクチン、4-7セレクチン、MadCAM-1、LFA-1(CD11
 a/CD18)、PECAM-1、LFA-1セレクチン、C3bi、PSGL
 -1、E-セレクチン、P-セレクチン、CD-34、L-セレクチン、p15
 0,95、Mac-1(CD11b/CD18)、フコシルトランスフェラーゼ
 、VLA-4、CD-18/CD11a、CD11b/CD18、ICAM2お
 よびICAM3、C5a、CCR3(エオタキシン受容体)、CCR1、CCR
 2、CCR4、CCR5、LTB-4、AP-1転写因子、プロテインキナーゼ

C、システニルロイコトリエン受容体、タチキネン受容体 (T a c h R)、I k Bキナーゼ1および2、S T A T 6、c - m a s およびNF - インターロイキン - 6 (N F - I L - 6)、およびそれらのフランキング領域およびイントロンおよびエクソン接合部位からなる群から選択される、請求項35記載の方法。

【請求項37】 前記標的遺伝子は、G - タンパクまたはG - タンパク結合受容体をコードする、請求項1記載の方法。

【請求項38】 前記標的遺伝子は、カルシウムチャンネルタンパクまたは受容体、ナトリウムチャンネルタンパクまたは受容体、カリウムチャンネルタンパクまたは受容体、または塩素チャンネルタンパクまたは受容体をコードする、請求項1記載の方法。

【請求項39】 前記標的遺伝子は、神経伝達物質受容体または神経ホルモン受容体をコードする、請求項1記載の方法。

【請求項40】 前記標的遺伝子は、神経ペプチドまたは神経ペプチド受容体をコードする、請求項1記載の方法。

【請求項41】 さらに、その機能が最初の標的と関連すると推定される別な標的に対してアンチセンスである別なオリゴを別個に投与する全工程を繰り返す；

最初の標的と別な標的を標的とする共投与オリゴによる投与と評価の工程を繰り返す；かつ、

得られた結果を各標的において別々に得た結果と比較することを含み、

その際、組み合わせたオリゴの効果が各オリゴの効果よりも約20%以上である場合には、最初のオリゴと別なオリゴとの間には、積極的な関係が存在し、前記結果が1つのオリゴの結果よりも約20%以内である場合には、関連性が存在しないと、また、前記結果が個々のオリゴに比べて約20%以下である場合には、これらの間には消極的な関係が存在すると決定する、請求項1記載の方法。

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/05643												
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A61K 31/70, 48/00, 49/00; C07H 21/00; C12N 15/63 US CL : 514/44; 424/9.2; 536/22.1; 435/320.1, 375 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC														
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 514/44; 424/9.2; 536/22.1; 435/320.1, 375 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Extra Sheet.														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT														
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
Y	NYCE, J.W. Insight into adenosine receptor function using antisense and gene-knockout approaches. Tips. February 1999, Vol. 20, No. 2, pages 79-83, see entire document.	1-41												
Y	WO 96/40162 A1 (EAST CAROLINA UNIVERSITY) 19 December 1996, see entire document.	1-41												
Y,P	US 5,994,315 A (NYCE ET AL) 30 November 1999, see entire document.	1-41												
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.														
<table border="0"> <tr> <td>* Special categories of cited documents:</td> <td>*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</td> </tr> <tr> <td>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>*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</td> </tr> <tr> <td>*E* earlier document published on or after the international filing date</td> <td>*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</td> </tr> <tr> <td>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>*A* document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td></td> </tr> <tr> <td>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents:	*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	*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*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	*E* earlier document published on or after the international filing date	*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	*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*A* document member of the same patent family	*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	
* Special categories of cited documents:	*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													
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*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													
E earlier document published on or after the international filing date	*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													
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*A* document member of the same patent family													
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														
Date of the actual completion of the international search 15 MAY 2000		Date of mailing of the international search report 11 JUL 2000												
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer <i>Peter Brunovskis</i> PETER BRUNOVSKIS, PH.D. Telephone No. (703) 308-0196												

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/05643

B. FIELDS SEARCHED

Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

STN, MEDLINE, CAPLUS, BIOSIS, EMBASE, BIOSIS, SCISEARCH, WEST, USPT

search terms: antisense(s)oligonucleotide, adenosine(3w)15% or 12% or low, low adenosine or few adenosine and oligonucleotide, nyce

フロントページの続き

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

专利名称(译)	验证/使目标和路线无效的方法		
公开(公告)号	JP2002537792A	公开(公告)日	2002-11-12
申请号	JP2000602288	申请日	2000-03-02
申请(专利权)人(译)	外延创世纪制药, 眼Enushi		
[标]发明人	ニースジョナサンダブリュ		
发明人	ニース、ジョナサン、ダブリュ		
IPC分类号	A61K38/00 C12N15/113 C12Q1/68 C12Q1/6883 C12N15/09 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	C12N15/113 A61K38/00 A61K2123/00 C12N15/1138 C12N2310/315 C12N2310/33 C12N2310/3341 C12Q1/6883		
FI分类号	C12Q1/68.A G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/CA01 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/DA03 4B024/GA11 4B024/HA11 4B024/HA20 4B063/QA08 4B063/QQ02 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR56 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS38 4B063/QX02 4B063/QX10		
代理人(译)	庄司隆		
优先权	60/122950 1999-03-05 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种确定疾病或病症的功能与推测与该疾病或病症相关的编码靶肽的基因或mRNA之间相关性的方法，该方法包括靶基因，其相应的mRNA，3'端；并且基因组和mRNA侧翼区域选自5'端；内含子-外显子连接和编码和非编码区域之间的侧翼区域，以及编码与疾病或病症相关的预选多肽的所有mRNA。对选自区段的靶标进行反义，获得由约15%或更少的腺苷(A)组成的寡核苷酸，优选无腺苷的寡核苷酸；以及寡核苷酸中的靶标mRNA mRNA编码多肽的体外杂交 选择能显著阻滞或消除表达的寡核苷酸；对受试者施用一定量的所选寡核苷酸，该寡核苷酸可有效地与靶mRNA进行体内杂交；并与该寡核苷酸的施用前后的疾病或病症相关 评价对象的功能；在这种情况下，功能值的变化约70%或更高表示正相关，而变化约40%至约70%表示可能的相关，并且30%以下是指示缺乏相关性的方法。当验证原位定位的靶标例如肿瘤以及其他与肺和呼吸功能相关的靶标时，该方法施用于受试者的呼吸器官，导致药物直接递送至肺部。要做。或者，可以使用已知的递送制剂将这样的脱腺苷寡核苷酸直接递送至CNS或其他器官，组织和器官系统。

