

(43) 国際公開日
2006 年 6 月 8 日 (08.06.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/059507 A1

(51) 国際特許分類:

C07H 21/00 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
 C12N 15/09 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)
 A61K 31/712 (2006.01) A61P 9/12 (2006.01)
 A61K 31/7125 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小泉 誠
 (KOIZUMI, Makoto) [JP/JP]; 〒1408710 東京都品川
 区広町 1 丁目 2 番 5 8 号 三共株式会社内 Tokyo (JP).
 阿部 学 (ABE, Manabu) [JP/JP]; 〒1408710 東京都品
 川区広町 1 丁目 2 番 5 8 号 三共株式会社内 Tokyo
 (JP). 荒木 一司 (ARAKI, Kazushi) [JP/JP]; 〒1408710
 東京都品川区広町 1 丁目 2 番 5 8 号 三共株式会
 社内 Tokyo (JP). 奥山 亮 (OKUYAMA, Ryo) [JP/JP]; 〒
 1408710 東京都品川区広町 1 丁目 2 番 5 8 号 三共株
 式会社内 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/021339

(22) 国際出願日: 2005 年 11 月 21 日 (21.11.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2004-345270

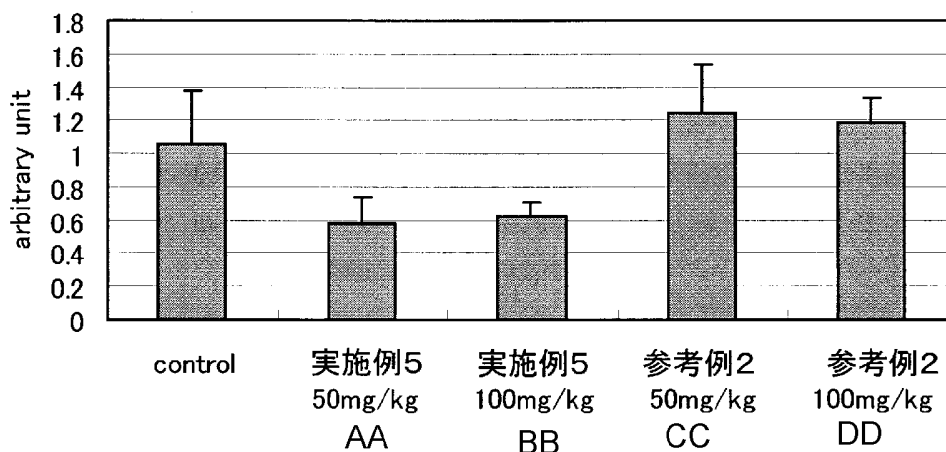
2004 年 11 月 30 日 (30.11.2004) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 三共
 株式会社 (SANKYO COMPANY, LIMITED) [JP/JP];
 〒1038426 東京都中央区日本橋本町 3 丁目 5 番 1 号
 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 間山 世津子, 外 (MAYAMA, Setsuko et al.);
 〒2210835 神奈川県横浜市神奈川区鶴屋町 3 丁目
 30 番の 1 農機舎 4 階 Kanagawa (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
 可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
 BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
 DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
 ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK,

[続葉有]

(54) Title: 11 β -HSD1 ANTISENSE COMPOUND(54) 発明の名称: 11 β -HSD1 アンチセンス化合物

AA EXAMPLE 5 50 mg/kg

BB EXAMPLE 5 100 mg/kg

CC REFERENTIAL EX. 2 50 mg/kg

DD REFERENTIAL EX. 2 100 mg/kg

(57) Abstract: An antisense oligonucleotide of 15 to 19 bases targeting a nucleic acid molecule coding for 11 β -hydroxylated steroid dehydrogenase type 1, wherein at least one of the sugars as constituents of the antisense oligonucleotide is 2' -O,4' -C-alkylenated, or 2' -O-alkylated, or 2' -O-alkenylated, or 2' -O-alkynylated; or a pharmacologically acceptable salt of the antisense oligonucleotide. Further, there is provided an inhibitor, or pharmaceutical composition, for expression of 11 β -hydroxylated steroid dehydrogenase type 1, comprising the above antisense oligonucleotide.

[続葉有]



WO 2006/059507 A1



LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約: 11 β -水酸化ステロイド脱水素酵素1型をコードする核酸分子を標的とする塩基数15～19個のアンチセンスオリゴヌクレオチドであって、該アンチセンスオリゴヌクレオチドを構成する糖の少なくとも1個が2'-O,4'-C-アルキレン化、2'-O-アルキル化、2'-O-アルケニル化又は2'-O-アルキニル化されている前記アンチセンスオリゴヌクレオチド又は薬理学上許容されるその塩。前記アンチセンスオリゴヌクレオチドを含有する11 β -水酸化ステロイド脱水素酵素1型発現の抑制剤及び医薬組成物。

明 細 書

11 β -HSD1アンチセンス化合物

技術分野

- [0001] 本発明は、その過剰な発現によりインスリン抵抗性、高血圧等が惹起される事が知られている11 β -HSD1の働きを抑制することにより、糖尿病、高血圧等の代謝性疾患の治療・予防に有効である新規11 β -HSD1アンチセンス化合物に関する。

背景技術

- [0002] グルココルチコイドは副腎皮質で合成、放出されるステロイドホルモン的一种で、細胞核内に存在する受容体タンパク質と結合しシグナルを伝達する事により糖・脂質代謝、血圧調節など多彩な機能を発揮する。副腎皮質に生じた腫瘍からグルココルチコイドが過剰産生される事により、内臓脂肪の過剰蓄積、糖尿病、高脂血症、高血圧等の症状を呈する事が知られている(非特許文献1)。一方、グルココルチコイドは副腎のみならず各組織の細胞内で局所的に活性化されており、この活性化に11 β -hydroxysteroid dehydrogenase1(11 β -水酸化ステロイド脱水素酵素1型、11 β -HSD1)が関与している。肥満に由来する代謝性疾患において、特に内臓脂肪組織中の11 β -HSD1活性が亢進しているという研究結果が報告されている(非特許文献2)。血中グルココルチコイド濃度が高値でありながら11 β -HSD1活性が低下しているために代謝性疾患様の徴候を示さない症例が報告されている事からも、11 β -HSD1活性による局所的なグルココルチコイドの活性化が代謝性疾患と密接に関連していると考えられる(非特許文献3)。脂肪組織特異的に11 β -HSD1を過剰発現させたマウスは内臓脂肪蓄積型の肥満を呈し、インスリン抵抗性を示した(非特許文献4)。また、11 β -HSD1を欠損したマウスは高脂肪食負荷時のインスリン抵抗性惹起に起因する血糖上昇が軽微であった(非特許文献5)。11 β -HSD1酵素活性を特異的に阻害する化合物(以下、「化合物A」とする)は、ob/ob、db/db、KK/A^yの各病態モデルマウスを用いた評価においてインスリン抵抗性の改善、高血糖の是正などの薬効を示した。また、化合物Aが糖尿病、X症候群、肥満、緑内障、高脂血症、高血糖症、過インシュリン血症、骨粗鬆症、結核、うつ病、ウイルス病及び炎症性疾患の治療又は予防に

有効であることが記載されている(特許文献1及び非特許文献6)。これらの知見より、 11β -HSD1の脂肪組織における活性亢進によってインスリン抵抗性を中心とした代謝性疾患が惹起され、その酵素活性を阻害する化合物は糖尿病におけるインスリン抵抗性の改善作用を有することが証明されている。

[0003] そのような化合物として、例えば下記の配列

5'-taccaccttctgtagagttt-3' (配列番号20)

を有し、各ヌクレオシド間がホスホロチオエートで結合し、一部のヌクレオシドの糖部分が2'-O-(2-メキシ)エチル(MOE)修飾されたアンチセンス分子(以下、「化合物B」とする。)が知られている(特許文献2)。

[0004] 特許文献1:国際特許公報 WO0190092

特許文献2:米国特許公報 US20030198965A1

非特許文献1:M. Boscaro et al. (2001) Lancet 357:783-791

非特許文献2:E. Rask et al. (2002) J. Clin. Endocrinol. Metab. 87: 3330-3336

非特許文献3:J. W. Tomlinson et al. (2002) J. Clin. Endocrinol. Metab. 87: 57-62

非特許文献4:H. Masuzaki et al. (2001) Science 294: 2166-2170

非特許文献5:Y. Kotelevtsev, et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 14924-14929

非特許文献6:P. Alberts et al. (2003) Endocrinology 144: 4755-4762

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0005] 11β -HSD1阻害剤として開発された化合物Aは全身性に作用する事から副作用を生じる危険性がある。また、これまでに知られている化合物Bは安定性が充分でなく、少量で長い作用を発揮しえる安定性の高い化合物が期待されていた。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、 11β -HSD1の働きを抑制する物質について検討した結果、糖の少なくとも1個が2'-O,4'-C-アルキレン化、2'-O-アルキル化、2'-O-アルケニル化又は2'-O-アルキニル化(好適には2'-O,4'-C-アルキレン化)されている 11β -HSD1アンチセンス化合物が 11β -HSD1の抑制活性を有し、 11β -HSD1活性亢進が関与

している代謝性疾患の治療に有用であることを見出し、本発明を完成した。

[0007] 本発明の要旨は以下の通りである。

[0008] (1) 11β -水酸化ステロイド脱水素酵素1型をコードする核酸分子を標的とする塩基数15～19個のアンチセンスオリゴヌクレオチドであって、該アンチセンスオリゴヌクレオチドを構成する糖の少なくとも1個が2'-O,4'-C-アルキレン化、2'-O-アルキル化、2'-O-アルケニル化又は2'-O-アルキニル化されている前記アンチセンスオリゴヌクレオチド又は薬理学上許容されるその塩。

[0009] (2) 前記 11β -水酸化ステロイド脱水素酵素1型をコードする核酸分子が配列番号1の塩基配列を有する(1)記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド又は薬理学上許容されるその塩。

[0010] (3) 前記 11β -水酸化ステロイド脱水素酵素1型が配列番号2のアミノ酸配列を有する(1)記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド又は薬理学上許容されるその塩。

[0011] (4) 配列番号3の塩基配列を有する(1)～(3)のいずれかに記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド又は薬理学上許容されるその塩。

[0012] (5) さらに、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドを構成する塩基の少なくとも1個が修飾されている(1)～(4)のいずれかに記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド又は薬理学上許容されるその塩。

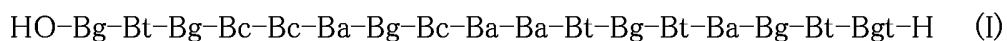
[0013] (6) 前記修飾塩基が5-メチルシトシンである(5)記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド又は薬理学上許容されるその塩。

[0014] (7) さらに、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドを構成するリン酸ジエステル結合の少なくとも1個が修飾されている(1)～(6)のいずれかに記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド又は薬理学上許容されるその塩。

[0015] (8) 前記修飾リン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合である(7)記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド又は薬理学上許容されるその塩。

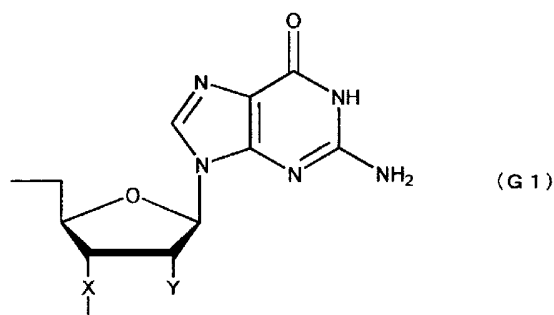
[0016] (9) 連続した少なくとも5個のヌクレオチドを構成する糖がすべてデオキシリボースである(1)～(8)のいずれかに記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド又は薬理学上許容されるその塩。

[0017] (10) 下記の一般式(I)で表される化合物又は薬理学上許容されるその塩。

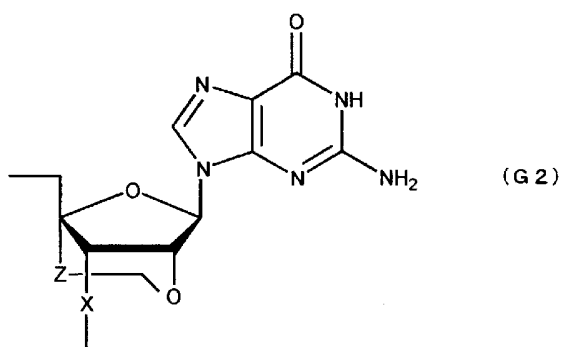


(式中、Bgは下記の式(G1)又は(G2)で表される基であり、Btは下記の式(T1)又は(T2)で表される基であり、Bcは下記の式(C1)、(C2)、(C3)又は(C4)で表される基であり、Baは下記の式(A1)又は(A2)で表される基であり、Bgtは下記の式(GT1)又は(GT2)で表される基であるが、ただし、一般式(I)で表される化合物を構成する糖のうち少なくとも1個は2'-O,4'-C-アルキレン化、2'-O-アルキル化、2'-O-アルケニル化又は2'-O-アルキニル化されている。)

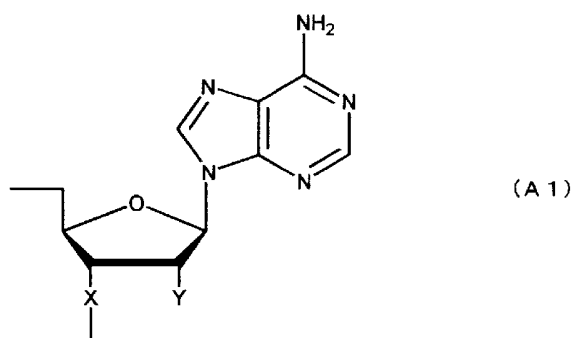
[0018] [化1]



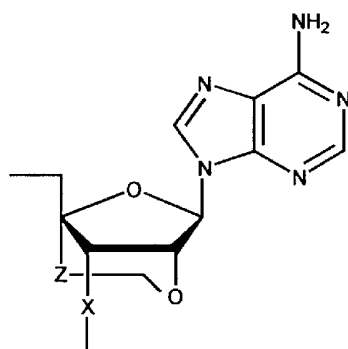
[0019] [化2]



[0020] [化3]

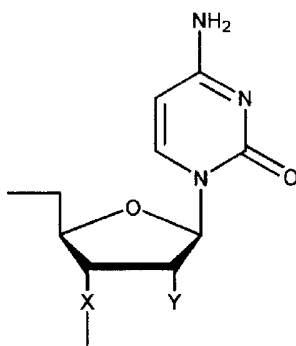


[0021] [化4]



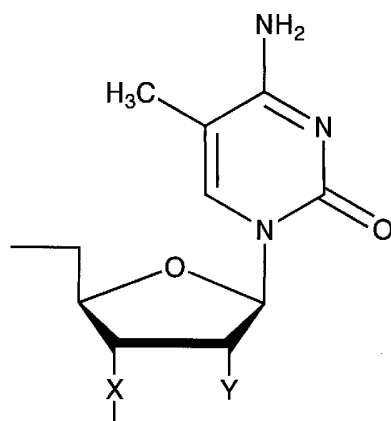
(A 2)

[0022] [化5]



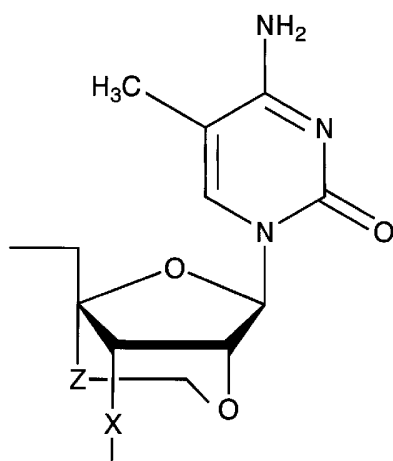
(C 1)

[0023] [化6]



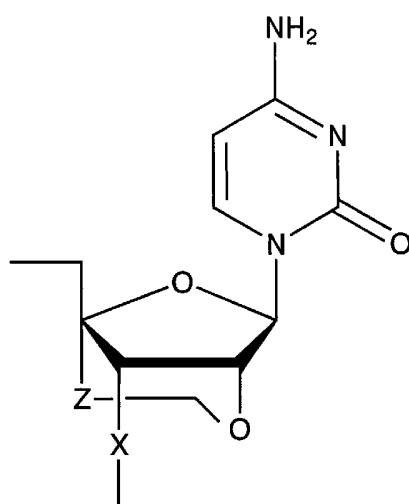
(C 2)

[0024] [化7]



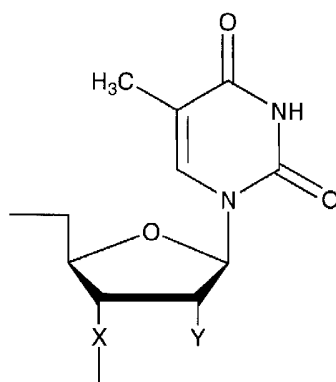
(C 3)

[0025] [化8]



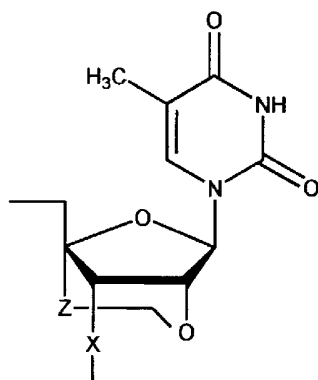
(C 4)

[0026] [化9]



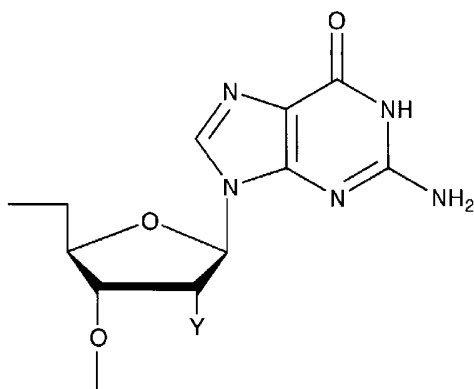
(T 1)

[0027] [化10]



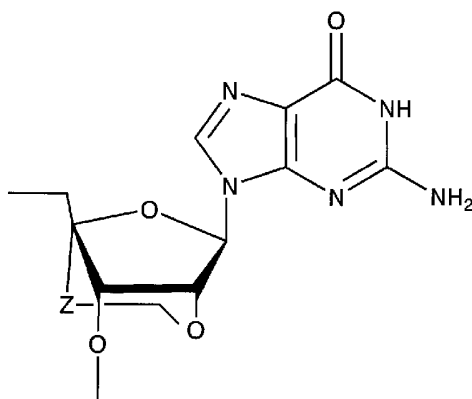
(T2)

[0028] [化11]



(GT1)

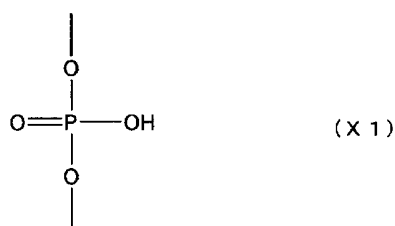
[0029] [化12]



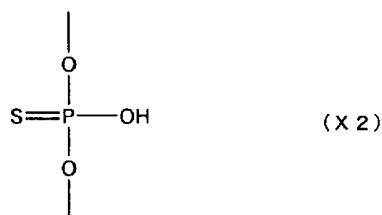
(GT2)

[0030] (式中、Xは、それぞれ、独立に、下記の式(X1)又は式(X2)で表される基であり、

[0031] [化13]



[0032] [化14]



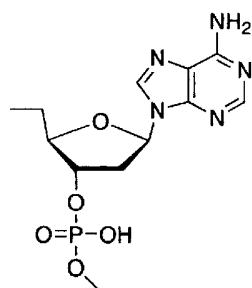
[0033] Yは、それぞれ、独立に、水素原子、水酸基又は炭素数1～6のアルコキシ、アルケニルオキシ若しくはアルキニルオキシ基であり、Zは、それぞれ、独立に、単結合又は炭素数1～5個のアルキレン基である。)

(11) 下記の式(I241-a)～(I244-a)又は(I274-a)のいずれかで表される(10)記載の化合物又は薬理学上許容されるその塩。

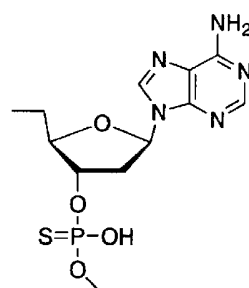
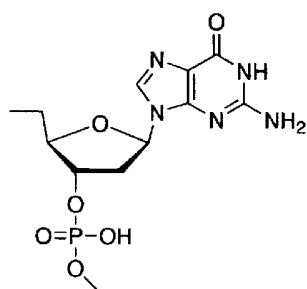
[0034] $\text{HO}-\text{G}^{\text{e}2}-\text{T}^{\text{e}2}-\text{G}^{\text{e}2}-\text{C}^{\text{e}2}-\text{C}-\text{A}-\text{G}-\text{C}-\text{A}-\text{A}-\text{T}-\text{G}-\text{T}-\text{A}^{\text{e}2}-\text{G}^{\text{e}2}-\text{T}^{\text{e}2}-\text{G}^{\text{e}2\text{t}}-\text{H}$ (I241-a)
 $\text{HO}-\text{G}^{\text{e}2}-\text{T}^{\text{e}2}-\text{G}^{\text{e}2}-\text{C}^{\text{e}2}-\text{C}^{\text{e}2}-\text{A}-\text{G}-\text{C}-\text{A}-\text{A}-\text{T}-\text{G}-\text{T}-\text{A}^{\text{e}2}-\text{G}^{\text{e}2}-\text{T}^{\text{e}2}-\text{G}^{\text{e}2\text{t}}-\text{H}$ (I242-a)
 $\text{HO}-\text{G}^{\text{e}2}-\text{T}^{\text{e}2}-\text{G}^{\text{e}2}-\text{C}^{\text{e}2}-\text{C}-\text{A}-\text{G}-\text{C}-\text{A}-\text{A}-\text{T}-\text{G}-\text{T}^{\text{e}2}-\text{A}^{\text{e}2}-\text{G}^{\text{e}2}-\text{T}^{\text{e}2}-\text{G}^{\text{e}2\text{t}}-\text{H}$ (I243-a)
 $\text{HO}-\text{G}^{\text{e}2}-\text{T}^{\text{e}2}-\text{G}^{\text{e}2}-\text{C}^{\text{e}2}-\text{C}^{\text{e}2}-\text{A}-\text{G}-\text{C}-\text{A}-\text{A}-\text{T}-\text{G}-\text{T}^{\text{e}2}-\text{A}^{\text{e}2}-\text{G}^{\text{e}2}-\text{T}^{\text{e}2}-\text{G}^{\text{e}2\text{t}}-\text{H}$ (I244-a)
 $\text{HO}-\text{G}^{\text{e}2\text{s}}-\text{T}^{\text{e}2\text{s}}-\text{G}^{\text{e}2\text{s}}-\text{C}^{\text{e}2\text{s}}-\text{C}^{\text{e}2\text{s}}-\text{A}^{\text{s}}-\text{G}^{\text{s}}-\text{C}^{\text{s}}-\text{A}^{\text{s}}-\text{A}^{\text{s}}-\text{T}^{\text{s}}-\text{G}^{\text{s}}-\text{T}^{\text{e}2\text{s}}-\text{A}^{\text{e}2\text{s}}-\text{G}^{\text{e}2\text{s}}-\text{T}^{\text{e}2\text{s}}-\text{G}^{\text{e}2\text{t}}-\text{H}$ (I274-a)

(式中、A、A^s、A^{e2}、A^{e2s}、G、G^s、G^{e2}、G^{e2s}、G^{e2t}、T、T^s、T^{e2}、T^{e2s}、C、C^s、C^{e2}及びC^{e2s}は、それぞれ、下記の式(A)、(A^s)、(A^{e2})、(A^{e2s})、(G)、(G^s)、(G^{e2})、(G^{e2s})、(G^{e2t})、(T)、(T^s)、(T^{e2})、(T^{e2s})、(C)、(C^s)、(C^{e2})及び(C^{e2s})で表される基である。)

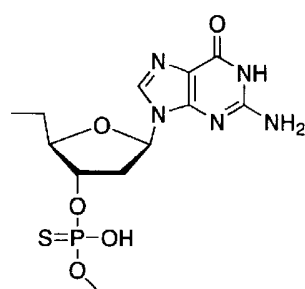
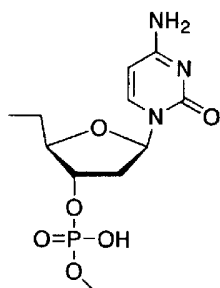
[0035] [化15]



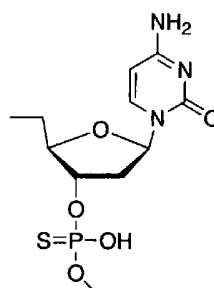
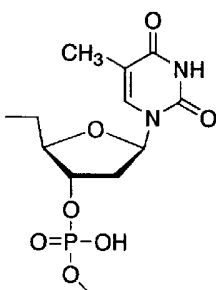
(A)

(A^S)

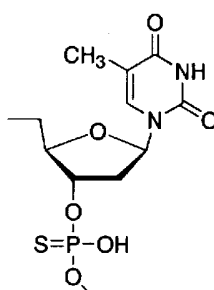
(G)

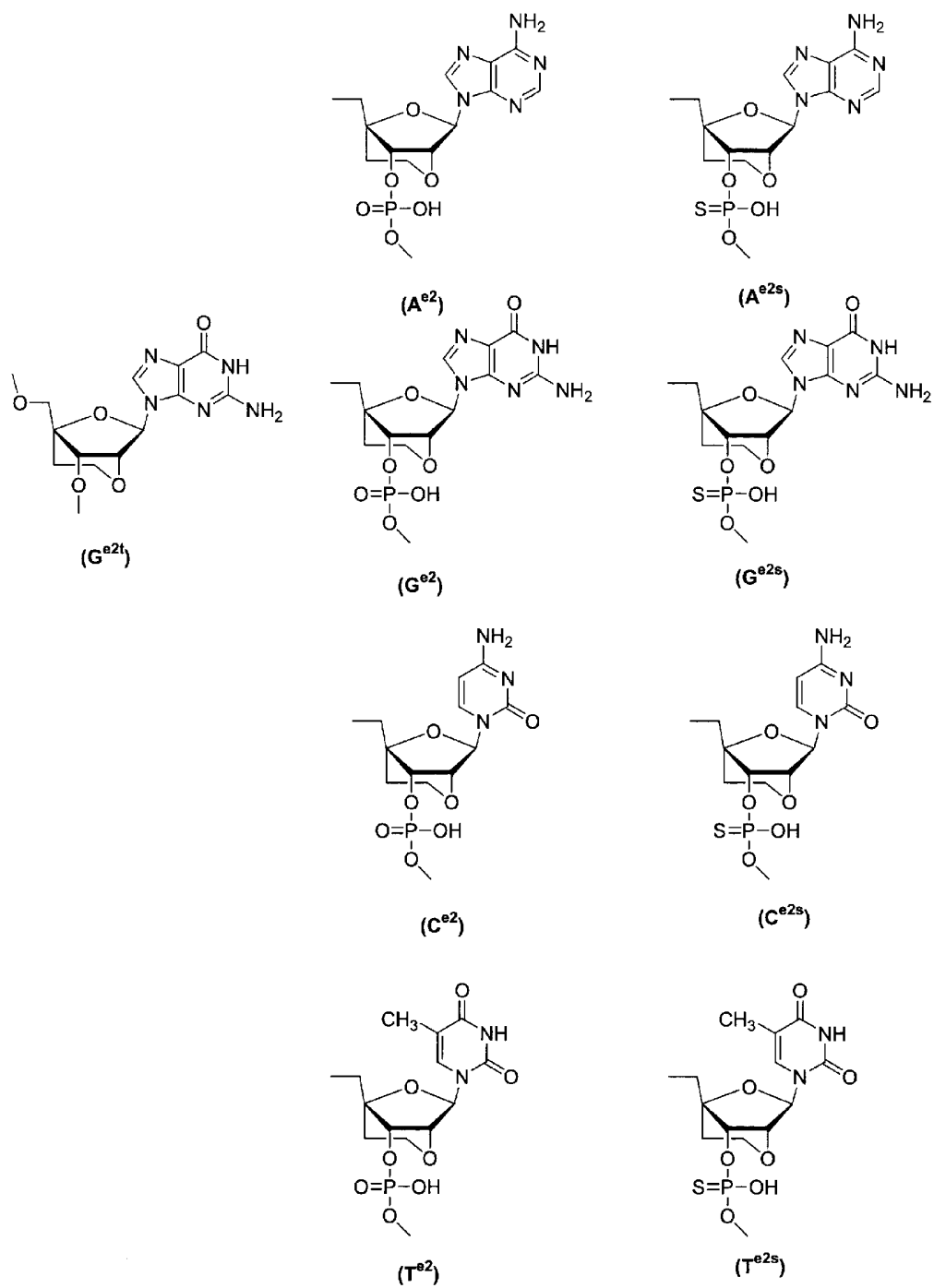
(G^S)

(C)

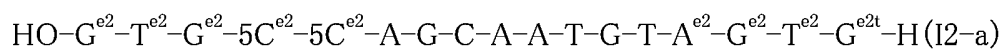
(C^S)

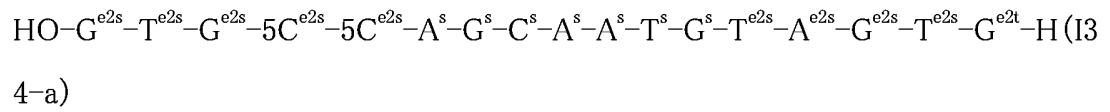
(T)

(T^S)



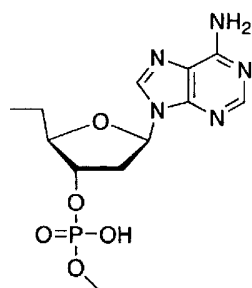
[0037] (12) 下記の式(I1-a)～(I4-a)又は(I34-a)のいずれかで表される(10)記載の化合物又は薬理学上許容されるその塩。



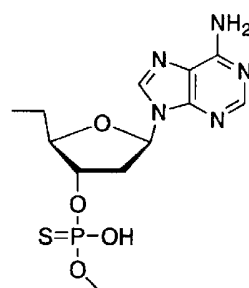
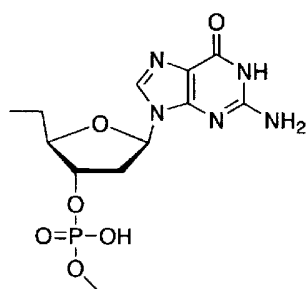


(式中、 A 、 A^s 、 A^{e2} 、 A^{e2s} 、 G 、 G^s 、 G^{e2} 、 G^{e2s} 、 G^{e2t} 、 T 、 T^s 、 T^{e2} 、 T^{e2s} 、 C 、 C^s 、 5C^{e2} 及び 5C^{e2s} は、それぞれ、下記の式(A)、(A^s)、(A^{e2})、(A^{e2s})、(G)、(G^s)、(G^{e2})、(G^{e2s})、(G^{e2t})、(T)、(T^s)、(T^{e2})、(T^{e2s})、(C)、(C^s)、(5C^{e2})及び(5C^{e2s})で表される基である。)

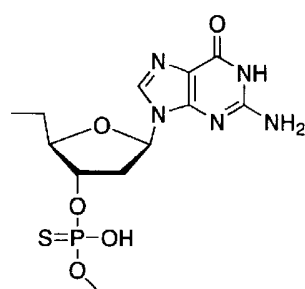
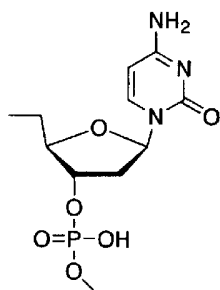
[0038] [化17]



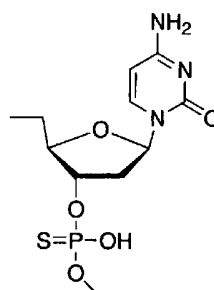
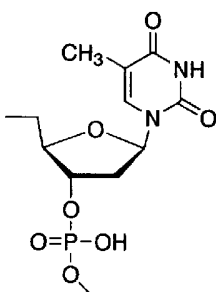
(A)

(A^S)

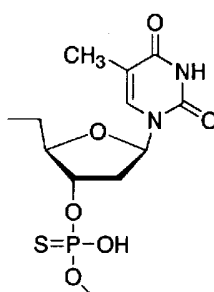
(G)

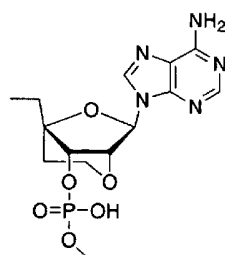
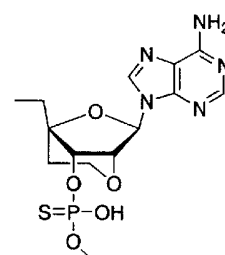
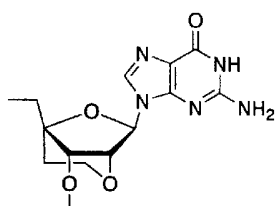
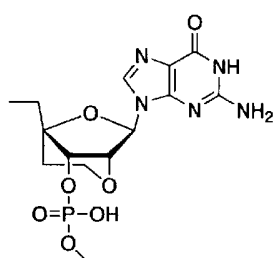
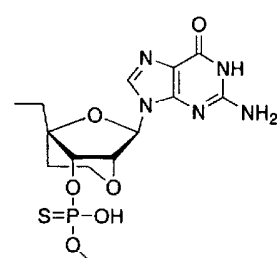
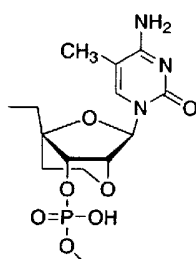
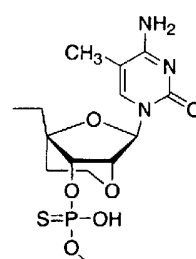
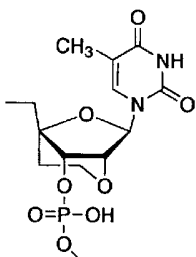
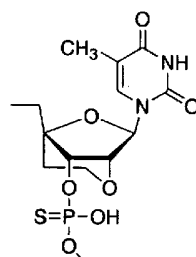
(G^S)

(C)

(C^S)

(T)

(T^S)

(A^{e2})(A^{e2s})(G^{e2t})(G^{e2})(G^{e2s})(5C^{e2})(5C^{e2s})(T^{e2})(T^{e2s})

[0040] (13) (1)記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド若しくは薬理学上許容されるその塩又は(10)記載の化合物若しくは薬理学上許容されるその塩を含有する、11β-水酸化ステロイド脱水素酵素1型発現の抑制剤。

[0041] (14) (1)記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド若しくは薬理学上許容されるその

塩又は(10)記載の化合物若しくは薬理学上許容されるその塩を含有する、医薬組成物。

- [0042] 本明細書において、「11 β -水酸化ステロイド脱水素酵素1型」とは、生体内糖質コルチコイドのうち不活性体とされるコルチゾン、あるいは11 β -脱水素型コルチコステロンの11位に存在するケトン基に水素原子を導入し、生理活性の高い糖質コルチコイドであるコルチゾールもしくはコルチコステロンを産生する反応、もしくは生理的条件下によってその逆反応を触媒する酵素をいう。
- [0043] 「11 β -水酸化ステロイド脱水素酵素1型をコードする核酸分子」とは、11 β -水酸化ステロイド脱水素酵素1型をコードする領域の遺伝子(DNA)、このDNAから転写されたRNA(mRNA前駆体、(成熟)mRNAを含む)、このRNAから逆転写されたcDNAを包含する概念である。
- [0044] 「オリゴヌクレオチド」とは、オリゴDNA、オリゴRNAのみならず、オリゴヌクレオチドを構成する少なくとも1個のD-リボフラノースが2'-O-アルキル化されたもの、オリゴヌクレオチドを構成する少なくとも1個のD-リボフラノースが2'-O-アルケニル化されたもの、オリゴヌクレオチドを構成する少なくとも1個のD-リボフラノースが2'-O-アルキニル化されたもの、オリゴヌクレオチドを構成する少なくとも1個のD-リボフラノースが2'-O, 4'-C-アルキレン化されたもの、オリゴヌクレオチドを構成する少なくとも1個のリン酸がチオエート化されたもの、オリゴヌクレオチドを構成する少なくとも1個の塩基が修飾されたもの、それらを組み合わせたものなども包含する。
- [0045] 「アンチセンスオリゴヌクレオチド」とは、標的とする特定の遺伝子の発現を調節(例えば、抑制、増強)することができるオリゴヌクレオチドをいい、標的とする核酸分子(センス鎖)に対して相補的な配列を有する。

発明の効果

- [0046] 本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド及び薬理学上許容されるその塩、並びに本発明の化合物及び薬理学上許容されるその塩は、11 β -HSD1の働きを抑制することができるので、糖尿病、高血圧等の代謝性疾患の治療・予防に有効である。

本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願、特願2004-345270号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

- [0047] [図1]アンチセンスオリゴヌクレオチドの作用機序を示す。
- [図2]DNA、RNA、PS ODNの構造とN、S型配座を示す。
- [図3]アンチセンス法で用いられているRNA型修飾ヌクレオチドの構造を示す。
- [図4]RNA型修飾ヌクレオチドを用いたアンチセンスのデザインを示す。
- [図5]アンチセンスオリゴヌクレオチドによる11 β -HSD1 mRNA抑制を示す。
- [図6]アンチセンスオリゴヌクレオチドによるマウス皮下脂肪組織中11 β -HSD1 mRNA抑制を示す。

発明を実施するための最良の形態

- [0048] 以下、本発明の実施の形態についてより詳細に説明する。
- [0049] 合成オリゴヌクレオチドを用いるアンチセンス法は、癌、ウイルスなどの疾患を対象とした医薬品としての利用が考えられているだけではなく、医薬品開発における標的遺伝子の評価のためにも応用されている(J. Kurreck, Eur. J. Biochem., 270, 1628 (2003).; R. S. Geary, S. P. Henry, L. R. Grillone., Clin. Pharmacokinet., 41, 255 (2002).; P. Kennewell, Curr. Opin. Mol. Ther., 5, 76 (2003).)。アンチセンス法で用いられているオリゴヌクレオチドの作用機構は、図1に示したように、生体内のRNAに結合し作用することを基本概念とし、(1)mRNAからたんぱく質が合成される翻訳の過程を阻害する、(2)mRNA前駆体(pre-mRNA)からmRNAが生成するスプライシングの過程を阻害する、(3)RNase HがアンチセンスオリゴヌクレオチドとmRNAとが形成する2本鎖を基質として認識し、RNase HがmRNAを分解しmRNAの機能を阻害する等が知られている(J. Kurreck, Eur. J. Biochem., 270, 1628 (2003).)。この3つの中で一般的に用いられているのは、(3)のRNase Hの作用を利用したものである。この場合に利用されるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、DNA型のオリゴヌクレオチドである。しかしながら、天然のリン酸ジエステル結合を有するDNAを用いた場合、生体内のヌクレアーゼの作用により速やかに分解されてしまう。そこで、細胞内でアンチセンス法を利用する場合、図2に示したようにDNA型であってリン酸基が修飾されたオリゴヌクレオチドが用いられている。特にホスホロチオエート型修飾オリゴヌクレオチド(3: PS ODN)は、ヌクレアーゼ耐性があり、RNAと2本鎖を形成した場合RNase Hの基質になり

、ある程度の細胞透過性を有することから最も一般的に用いられている(J. Kurreck, Eur. J. Biochem., 270, 1628 (2003).; R. S. Geary, S. P. Henry, L. R. Grillone., Clin. Pharmacokinet., 41, 255 (2002).; P. Kennewell, Curr. Opin. Mol. Ther., 5, 76 (2003).)。その反面、PS ODNは天然のDNAと比較して、RNAへの結合力が低下すること、非特異的なタンパク質への結合があること、in vivoでの適応において血液凝固系の阻害、補体系の活性等の欠点が報告されている。それらのPS ODNの欠点を克服するアンチセンスオリゴヌクレオチドとして、RNA骨格を利用してデザインされた人工核酸が数多く報告されている(J. Kurreck, Eur. J. Biochem., 270, 1628 (2003).; S. M. Freier, K. H. Altmann, Nucleic Acids Res., 25, 4429 (1997).)。

[0050] 核酸を構成する糖のフラノース環は、図2に示すように主に2つのパッキング様式、N型配座とS型配座を形成することが知られている(W. Saenger, Principles of nucleic acids structure, Springer-Verlag, New York. 1984.)。RNA骨格をもつヌクレオシドを構成するリボースの2'位に水酸基を有するものは、2'-OH基の酸素原子と4'位の酸素原子のゴーシュ効果によってリボースのフラノース環の立体配座としてN型配座の割合が多くなっていることが知られている。DNA骨格をもつヌクレオシドは、リボースの2'位が水素原子になっているため、RNA骨格でみられたゴーシュ効果がみられずS型配座を優先する。

[0051] また、天然の2本鎖RNAが形成するA型らせん中においても個々のヌクレオシドがN型配座として存在しており、実際に安定性を融解温度(T_m)により測定すると、RNAとRNAとが形成する2本鎖の安定性は、DNAとRNAとが形成する2本鎖の安定性よりも高いことが報告されている(W. Saenger, Principles of nucleic acids structure, Springer-Verlag, New York. 1984.)。これらのことより、RNAを標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドの利用を考えた場合、N型配座を優先するRNA骨格を利用するが有利であると考えられている。

[0052] 天然型RNAをアンチセンスオリゴヌクレオチドとしてそのまま細胞実験で使うことは、細胞培養に用いられる血清中や細胞内に存在するリボヌクレアーゼ(RNase)に感受性が高いために実用的ではない。そこでRNaseに耐性を示すRNA骨格をベースとした誘導体化がなされている。

[0053] RNAの2'-OH基はRNaseの分解反応に必須であるので、この2'-OH基をアルキル化しRNaseの基質にならない2'-O-アルキルヌクレオシド(4)とした数多くの誘導体が報告されている(図3)。中でも2'-O-メチル体はtRNAの中にも見られる修飾体で、アンチセンス研究の初期の頃から利用されよく研究されている(H. Inoue, Y. Hayase, A. Imura, S. Iwai, K. Miura, E. Ohtsuka. *Nucleic Acids Res.* 15, 6131 (1987).)。さらに2'-O-メチル体は相補鎖RNAとの親和性も向上させることができ($\Delta T_m/\text{mod.}$ (DNAの場合と比較し一残基あたりの T_m 値の変化を表し、+の場合RNAとの親和性が高いことを意味する) = +1.5°C)、RNase耐性も示す。アルキル基の炭素数を増加させるとともにRNAとの親和性が減少し、2'-O-プロピル体では、DNAと同様の $\Delta T_m/\text{mod.}$ 値を示し、それ以上では、 $\Delta T_m/\text{mod.}$ 値は低下する(E. A. Lesnik, C. J. Guinosso, A. M. Kawasaki, H. Sasmor, M. Zounes, L. L. Cummins, D. L. Ecker, P. Dan Cook, S. M. Freier, *Biochemistry* 32, 7832 (1993).)。炭素数を5つ以上のアルキル基を有するヌクレオシドにおいては、ヌクレアーゼに対して高い耐性を獲得している(E. A. Lesnik, C. J. Guinosso, A. M. Kawasaki, H. Sasmor, M. Zounes, L. L. Cummins, D. L. Ecker, P. Dan Cook, S. M. Freier, *Biochemistry* 32, 7832 (1993).; B. P. Monia, E. A. Lesnik, C. Gonzalez, W. F. Lima, D. McGee, C. J. Guinosso, A. M. Kawasaki, P. Dan Cook, S. M. Freier, *J. Biol. Chem.* 268, 14514 (1993).; B. P. Monia, J. K. Johnson, H. Sasmor, L. L. Cummins, *J. Biol. Chem.*, 271, 14533 (1996).)。また、アルキル基の末端に置換基を有するものとして、2'-O-(2-メキシエチル)基を有するヌクレオシド(5: 2'-MOE)は、メキシエチル基のゴーシュ効果によってRNAとの親和性($\Delta T_m/\text{mod.}$ = +2°C)を向上させ、ヌクレアーゼ耐性も有している(P. Martin, *Helv. Chim. Acta* 78, 486 (1995).; M. Teplova, G. Minasov, V. Tereshko, G. B. Inamati, P. Dan Cook, M. Manoharan, M. Egli, *Nature Struct. Biol.* 6, 535 (1999).)。2'-O-アミノプロピル基を有するヌクレオシド(6: AP)は、2'-O-プロピル体との同程度の親和性($\Delta T_m/\text{mod.}$ = 0°C)であって、PS-ODNよりも優れたヌクレアーゼ耐性が観察されている(R. H. Griffey, B. P. Monia, L. L. Cummins, S. Freier, M. J. Greig, C. J. Guinosso, E. Lesnik, S. M. Manalili, V. Mohan, S. Owens, B. R. Ross, H. Sasmor, E. Wancewicz, K. Weiler, P. D. Wheeler, P. Dan Cook, *J. Med. Chem.* 39, 5100 (1996).)。その理

由として、APの2'-O-アミノプロピル基のアミノ基が大腸菌由来のKlenow fragment 3'-5'エキソヌクレアーゼの金属イオンの結合部位に位置し、ヌクレアーゼの触媒反応を阻害していることが、X線結晶構造解析から明らかになっている(M. Teplova, S. T. Wallace, V. Tereshko, G. Minasov, A. M. Symons, P. Dan Cook, M. Manoharan, M. Egli, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 96, 14240 (1999).)。

[0054] 2'-OH基を2'-Fに置換したヌクレオシド(7: 2'-F)を有するオリゴヌクレオチドは、N型配座を優先して形成し、RNAとの親和性も高くなる($\Delta T_m/\text{mod.}=+2.5^\circ\text{C}$)(A. M. Kawasaki, M. D. Casper, S. M. Freier, E. A. Lesnik, M. C. Zounes, L. L. Cummins, C. Gonzalez, P. Dan Cook, J. Med. Chem. 36, 831 (1993).)。しかしながら、リン酸ジエステル結合からなるものはヌクレアーゼ抵抗性がないので、ホスホロチオエート結合とし、ヌクレアーゼ抵抗性を持たせている(A. M. Kawasaki, M. D. Casper, S. M. Freier, E. A. Lesnik, M. C. Zounes, L. L. Cummins, C. Gonzalez, P. Dan Cook, J. Med. Chem. 36, 831 (1993).)。

[0055] RNAのN型配座に完全に固定化した人工核酸として、糖部の2'-酸素原子と4'-炭素原子をメチレン鎖で架橋した2',4'-BNA/LNA(8: bridged nucleic acids/locked nucleic acids)が報告されている(S. Obika, D. Nanbu, Y. Hari, K. Morio, Y. In, T. Ishida, T. Imanishi, Tetrahedron Lett., 38, 8735 (1997).; S. Obika, D. Nanbu, Y. Hari, J. Andoh, K. Morio, T. Doi, T. Imanishi, Tetrahedron Lett., 39, 5401 (1998).; A. A. Koshkin, S. K. Singh, P. Nielsen, V. K. Rajwanshi, R. Kumar, M. Meldgaard, C. E. Olsen, J. Wengel, Tetrahedron, 54, 3607 (1998).; S. Obika, T. Uneda, T. Sugimoto, D. Nanbu, T. Minami, T. Doi, T. Imanishi, Bioorg. Med. Chem., 9, 1001 (2001).)。このように核酸の糖部をメチレン鎖で架橋すると立体配座の自由度が束縛され、2',4'-BNA/LNAを含むオリゴヌクレオチドは、 $\Delta T_m/\text{mod.}=+5\sim 8^\circ\text{C}$ と、驚異的な2本鎖の安定性を示す。また、2',4'-BNA/LNAを含むオリゴヌクレオチドは、DNAと比較し、ヌクレアーゼに対する安定性も向上している。さらに、2',4'-BNA/LNAのメチレン鎖を一炭素延ばしたエチレン鎖で架橋したENA(9: 2'-O,4'-C-ethylene-bridged nucleic acids)は、2',4'-BNA/LNAと同程度の $\Delta T_m/\text{mod.}=+5^\circ\text{C}$ を持ち、加えて2',4'-BNA/LNAよりも優れたヌクレアーゼに対する安定性を有している(K. Morita, C. Hasegaw

a, M. Kaneko, S. Tsutsumi, J. Sone, T. Ishikawa, T. Imanishi, M. Koizumi, Bioorg. Med. Chem. Lett., 12, 73 (2002).; K. Morita, M. Takagi, C. Hasegawa, M. Kaneko, S. Tsutsumi, J. Sone, T. Ishikawa, T. Imanishi, M. Koizumi, Bioorg. Med. Chem., 11, 2211 (2003).)。糖部の2'-酸素原子と4'-炭素原子の架橋をプロピレン鎖にした場合は、ヌクレアーゼ耐性は向上するが、 $\Delta T_m/\text{mod.}=+2^{\circ}\text{C}$ に低下してしまうことが報告されている(K. Morita, M. Takagi, C. Hasegawa, M. Kaneko, S. Tsutsumi, J. Sone, T. Ishikawa, T. Imanishi, M. Koizumi, Bioorg. Med. Chem., 11, 2211 (2003).)。

- [0056] RNA型修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドは、前述のように標的RNAと安定な2本鎖を形成する。すべてがRNA型修飾ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド「fully modified oligonucleotides」(以後「FMO」と略す)は、mRNAとの結合力が非常に強まることから、図1に示したように(1)mRNAからたんぱく質が合成される翻訳の過程の阻害、(2)mRNA前駆体からmRNAが生成するスプライシングの過程を阻害する目的には非常に有用である。しかしながら、FMOと標的RNAとの2本鎖は、RNase Hの基質にならない(H. Inoue, Y. Hayase, S. Iwai, E. Ohtsuka FEBS Lett. 215, 327 (1987).; W. F. Lima, S.T. Crooke, Biochemistry 36, 390 (1997).; H. Wu, W. F. Lima, S.T. Crooke, J. Biol. Chem. 274, 28270 (1999).)。そこで図4Aに示したように、RNA型修飾ヌクレオチドとDNAからなるキメラオリゴヌクレオチドがアンチセンス法で用いられている。そのデザインとして、wingと呼ばれるRNA型修飾ヌクレオチドをオリゴヌクレオチドの両側に配置し、windowと呼ばれる連続したDNAを中央部に持つ「gapmer」がある。すなわち、gapmerは、wing-window-wingといった構造を有することになる。例えば、RNA型修飾ヌクレオチドとして2'-O-メチルヌクレオチド(2'-OMe RNA)を用いた場合、2'-OMe RNA-DNA-2'-OMe RNAといったキメラオリゴヌクレオチドになる。gapmerは、中央部分に連続したDNA領域を持つために、gapmerと標的RNAとの2本鎖はRNase Hの基質になる。このwindowのDNAの長さは、用いるRNase Hによって異なり、wing部分に2'-OMe RNAを用いた場合、ヒトRNase H1では4ヌクレオチド以上(H. Wu, W. F. Lima, S.T. Crooke, J. Biol. Chem. 274, 28270 (1999).)、大腸菌RNase Hでは5ヌクレオチド以上(W. F. Lima, S.T. Crooke, Biochemistry 36, 390 (1997).)必要である。window部分のDNA領域が長いほどRNase Hの基質になりやすい。wing部分の修

飾ヌクレオチドは、標的RNAとの親和性を高める目的であり、その長さが長いほど標的RNAとの親和性が高くなる。アンチセンスとしての活性で見た場合、windowとwingの長さのバランスが必要になり、そのよいものが高活性になりうる(E. A. Lesnik, C. J. Guinasso, A. M. Kawasaki, H. Sasmor, M. Zounes, L. L. Cummins, D. L. Ecker, P. Dan Cook, S. M. Freier, *Biochemistry* 32, 7832 (1993).; B. P. Monia, E. A. Lesnik, C. Gonzalez, W. F. Lima, D. McGee, C. J. Guinasso, A. M. Kawasaki, P. Dan Cook, S. M. Freier, *J. Biol. Chem.* 268, 14514 (1993).; B. P. Monia, J. K. Johnson, H. Sasmor, L. L. Cummins, *J. Biol. Chem.*, 271, 14533 (1996).) (図4B)。

- [0057] 2'-OMe RNA は、前述のように古くからアンチセンス研究に用いられているが、最近gapmerを用いたPTEN遺伝子の機能解析の例が報告されている(M. Sternberger, A. Schmiedeknecht, A. Kretschmer, F. Gebhardt, F. Leenders, F. Czauderna, I. von Carlowitz, M. Engle, K. Giese, L. Beigelman, A. Klippel, *Antisense Nucleic Acids Drug Dev.* 12, 131 (2002).)。この場合、両wing部分に7ヌクレオチドからなる2'-OMe RNAを用い、window部分には9ヌクレオチドからなるPS ODNを用いて、鎖長23ヌクレオチドからなるアンチセンスを用いている。さらに、エキソヌクレアーゼに対する安定性を増すために、3',5'-両末端にテトラヒドロフラン誘導体を結合させている。
- [0058] 2'-MOEをwingとして含むgapmerの数多くのアンチセンスを用いた研究が報告されている(B. A. Zinker, C. M. Rondinone, J. M. Trevillyan, R. J. Gum, J. E. Clampitt, J. F. Waring, N. Xie, D. Wilcox, P. Jacobson, L. Frost, P. E. Kroeger, R. M. Reilly, S. Koterski, T. J. Opgenorth, R. G. Ulrich, S. Crosby, M. Butler, S. F. Murray, R. A. McKay, S. Bhanot, B. P. Monia, M. R. Jirousek, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 11357 (2002).; H. Zhang, J. Cook, J. Nickel, R. Yu, K. Stecker, K. Myers, N. M. Dean, *Nature Biotechnol.* 18, 862 (2000).; B. Z. Carter, R. Y. Wang, W. D. Schober, M. Milella, D. Chism, M. Andreeff, *Cell Cycle*. 2, 488 (2003).)。2'-MOEをアンチセンス法で用いる場合、そのリン酸基は、すべてホスホロチオエート結合のものが用いられている。ヌクレアーゼ耐性を獲得するためだけではなく、in vivoでの適応を考えた場合、ホスホロチオエート結合のものの方がアンチセンスの体内動態面で有利になることが報告されている(R. S. Geary, T. A. Watanabe, L. Truong, S. Freier, E. A.

Lesnik, N. B. Sioufi, H. Sasmor, M. Manoharan, A. A. Levin, J. Pharmacol. Exp. Ther. 296, 890 (2001).)。リン酸ジエステル結合からなる2'-MOE体は、尿中から速やかに排泄されてしまうのに対し、ホスホロチオエート結合からなる2'-MOE体は、高い血中安定性を示し、肝臓、腎臓、脾臓、骨髄等、脳以外のほとんどの組織への移行性を示す。分布量は、PS ODNよりも優れている。現在ホスホロチオエート結合からなる2'-MOE体は、抗腫瘍、抗炎症、抗糖尿病を目的としたアンチセンス薬としての臨床開発されている。

- [0059] 2',4'-BNA/LNAも2'-MOEと同様にwingに用い、gapmerとしてのアンチセンスがデザインされている。ラットdelta opioid receptor mRNAを標的とした2',4'-BNA/LNAを含むアンチセンスが設計され、ラット脳脊髄液中に注射することによってopioid receptor を介した痛覚応答の抑制が観察されている(C. Wahlestedt, P. Salmi, L. Good, J. Kela, T. Johnsson, T. Hokfelt, C. Broberger, F. Porreca, J. Lai, K. Ren, M. Ossipov, A. Koshkin, N. Jakobsen, J. Skouv, H. Oerum, M. H. Jacobsen, J. Wengel, Proc Natl Acad Sci U S A. 97, 5633 (2000).)。また、RNA polymerase II を標的とした2',4'-BNA/LNAからなるFMOアンチセンスがデザインされ、RNA polymerase II タンパク質の減少が観察され、さらに腫瘍移植モデルマウスを使ったin vivo系で腫瘍増殖抑制が認められている(K. Fluiter, A. L. ten Asbroek, M. B. de Wissel, M. E. Jakobs, M. Wissenbach, H. Olsson, O. Olsen, H. Oerum, F. Baas, Nucleic Acids Res. 31, 953 (2003).)。この場合リン酸基を修飾することなくリン酸ジエステル結合のままで用いられており、その体内動態は主に腎臓に分布し、尿中から排泄されることが示されている。またRNAに対して結合力が強い2',4'-BNA/LNAは、2'-OMe RNAとのmixmerを用いて、HIV-1 TAR RNAに結合しTatの機能を阻害できることが示されている。このmixmerは、12merと短鎖長にも関わらず、mixmer とTAR RNAはpseudoknot 構造を形成し安定な複合体になる(A. Arzumanov, A. P. Walsh, V. K. Rajwanshi, R. Kumar, J. Wengel, M. J. Gait, Biochemistry 40, 14645 (2001).)。

- [0060] ENAにおいても、薬物の輸送に関与する有機アニオンランスポーターに対するgapmerが、塩基配列がよく類似した3つのサブタイプに対して特異的に切断できうことが示された(M. Takagi, K. Morita, D. Nakai, R. Nakagomi, T. Tokui, M. Koizumi, Bi

ochemistry, 43, 4501 (2004).)。また、ENAと2'-OMe RNAからなるキメラオリゴヌクレオチドが筋ジストロフィーの原因遺伝子であるジストロフィン遺伝子のエキソンスキッピング反応を促進し、治療法としての可能性が示されている(M. Yagi, Y. Takeshima, A. Surono, M. Takagi, M. Koizumi, M. Matsuo, Oligonucleotides, 14, 33 (2004).; A. Surono, T. van Khanh, Y. Takeshima, H. Wada, M. Yagi, M. Takagi, M. Koizumi, M. Matsuo, Hum. Gene. Ther., 15, 749 (2004).)。

- [0061] 本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、11 β -水酸化ステロイド脱水素酵素1型をコードする核酸分子を標的とする塩基数15～19個のアンチセンスオリゴヌクレオチドである。11 β -水酸化ステロイド脱水素酵素1型をコードする核酸分子としては、配列番号1、16又は18のいずれかの塩基配列を有する成熟mRNA、成熟mRNAの前駆体、鋳型DNAなどを挙げることができる。11 β -水酸化ステロイド脱水素酵素1型としては、配列番号2、17又は19のいずれかのアミノ酸配列を有するものなどを挙げることができる。本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドの塩基配列の一例を配列番号3に示す。なお、配列番号3の塩基配列において、全てあるいは一部のTはUに置き換わってもよい。
- [0062] 本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドの塩基数は、15～19個であるが、好ましくは16～18個である。
- [0063] 本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、糖の少なくとも1個が2'-O,4'-C-アルキレン化、2'-O-アルキル化、2'-O-アルケニル化又は2'-O-アルキニル化されているものであるが、それ以外にも、糖、塩基、リン酸ジエステル結合の修飾がなされていてもよい。糖の修飾の例としては、D-リボフラノースの2'-O-アルキル化、2'-O-アルケニル化若しくは2'-O-アルキニル化(例えば、2'-O-メチル化、2'-O-アミノエチル化、2'-O-プロピル化、2'-O-アリル化、2'-O-(2-メトキシ)エチル化、2'-O-ブチル化、2'-O-ペンチル化、2'-O-プロパルギル化など)、D-リボフラノースの2'-O,4'-C-アルキレン化(例えば、2'-O,4'-C-エチレン化、2'-O,4'-C-メチレン化、2'-O,4'-C-プロピレン化、2'-O,4'-C-テトラメチレン化、2'-O,4'-C-ペンタメチレン化など)、3'-デオキシ-3'-アミノ-2'-デオキシ-D-リボフラノース、3'-デオキシ-3'-アミノ-2'-デオキシ-2'-フルオロ-D-リボフラノースなどを挙げることができる。塩基の修飾の例としては

、シトシンの5-メチル化、5-フルオロ化、5-ブロモ化、5-ヨード化、N4-メチル化、チミジンの5-デメチル化(ウラシル)、5-フルオロ化、5-ブロモ化、5-ヨード化、アデニンのN6-メチル化、8-ブロモ化、グアニンのN2-メチル化、8-ブロモ化などを挙げることができる。リン酸ジエステル結合の修飾の例としては、ホスホロチオエート結合、メチルホスホネート結合、メチルチオホスホネート結合、ホスホロジチオエート結合、ホスホロアミデート結合などを挙げることができる。

[0064] 本発明の化合物は、下記の一般式(I)で表される。

[0065] $\text{HO-Bg-Bt-Bg-Bc-Bc-Ba-Bg-Bc-Ba-Ba-Bt-Bg-Bt-Ba-Bg-Bt-Bgt-H}$ (I)

一般式(I)において、Bgは上記の式(G1)又は(G2)で表される基であり、Btは上記の式(T1)又は(T2)で表される基であり、Bcは上記の式(C1)、(C2)、(C3)又は(C4)で表される基であり、Baは上記の式(A1)又は(A2)で表される基であり、Bgtは上記の式(GT1)又は(GT2)で表される基であるが、ただし、一般式(I)で表される化合物を構成する糖のうち少なくとも1個は2'-O,4'-C-アルキレン化又は2'-O-アルキル化されている。

[0066] 式(G1)、(A1)、(C1)、(C2)、(T1)及び(GT1)中のYについて、炭素数1～6のアルコキシ、アルケニルオキシ又はアルキニルオキシ基の例としては、メキシ基、アミノエトキシ基、プロポキシ基、アリルオキシ基、メキシエトキシ基、ブトキシ基、ペンチルオキシ基、プロパルギルオキシ基などを挙げることができ、好適には炭素数1～3のアルコキシ基である。

[0067] 式(G2)、(A2)、(C3)、(C4)、(T2)及び(GT2)中のZについて、炭素数1～5のアルキレン基の例としては、メチレン基、エチレン基、プロピレン基、テトラメチレン基、ペンタメチレン基などを挙げることができる。好適なZは、単結合又はメチレン基であり、より好適にはメチレン基である。

[0068] 一般式(I)で表される化合物として好適なものを以下に例示する。

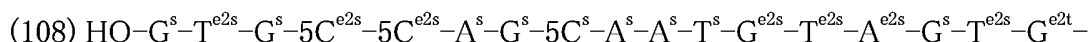
[0069] (1) $\text{HO-G}^{e2}\text{-T}^{e2}\text{-G}^{e2}\text{-5C}^{e2}\text{-C-A-G-C-A-A-T-G-T-A}^{e2}\text{-G}^{e2}\text{-T}^{e2}\text{-G}^{e2t}\text{-H}$
 (2) $\text{HO-G}^{e2}\text{-T}^{e2}\text{-G}^{e2}\text{-5C}^{e2}\text{-5C}^{e2}\text{-A-G-C-A-A-T-G-T-A}^{e2}\text{-G}^{e2}\text{-T}^{e2}\text{-G}^{e2t}\text{-H}$
 (3) $\text{HO-G}^{e2}\text{-T}^{e2}\text{-G}^{e2}\text{-5C}^{e2}\text{-C-A-G-C-A-A-T-G-T}^{e2}\text{-A}^{e2}\text{-G}^{e2}\text{-T}^{e2}\text{-G}^{e2t}\text{-H}$
 (4) $\text{HO-G}^{e2}\text{-T}^{e2}\text{-G}^{e2}\text{-5C}^{e2}\text{-5C}^{e2}\text{-A-G-C-A-A-T-G-T}^{e2}\text{-A}^{e2}\text{-G}^{e2}\text{-T}^{e2}\text{-G}^{e2t}\text{-H}$
 (5) $\text{HO-G}^{e2}\text{-T}^{e2}\text{-G}^{e2}\text{-5C}^{e2}\text{-5C}^{e2}\text{-A}^{e2}\text{-G-C-A-A-T-G-T}^{e2}\text{-A}^{e2}\text{-G}^{e2}\text{-T}^{e2}\text{-G}^{e2t}\text{-H}$

- (6) HO-G^{e2}-T^{e2}-G^{e2}-5C^{e2}-5C^{e2}-A-G-C-A-A-T-G^{e2}-T^{e2}-A^{e2}-G^{e2}-T^{e2}-G^{e2t}-H
- (7) HO-G^{e2}-T^{e2}-G-5C^{e2}-C-A-G-C-A-A-T-G-T-A^{e2}-G-T^{e2}-G^{e2t}-H
- (8) HO-G^{e2}-T^{e2}-G-5C^{e2}-5C^{e2}-A-G-C-A-A-T-G-T-A^{e2}-G-T^{e2}-G^{e2t}-H
- (9) HO-G^{e2}-T^{e2}-G-5C^{e2}-C-A-G-C-A-A-T-G-T^{e2}-A^{e2}-G-T^{e2}-G^{e2t}-H
- (10) HO-G^{e2}-T^{e2}-G-5C^{e2}-5C^{e2}-A-G-C-A-A-T-G-T^{e2}-A^{e2}-G-T^{e2}-G^{e2t}-H
- (11) HO-G^{e2}-T^{e2}-G-5C^{e2}-5C^{e2}-A^{e2}-G-C-A-A-T-G-T^{e2}-A^{e2}-G-T^{e2}-G^{e2t}-H
- (12) HO-G^{e2}-T^{e2}-G-5C^{e2}-5C^{e2}-A-G-C-A-A-T-G^{e2}-T^{e2}-A^{e2}-G-T^{e2}-G^{e2t}-H
- (13) HO-G-T^{e2}-G-5C^{e2}-C-A-G-C-A-A-T-G-T-A^{e2}-G-T^{e2}-G^{e2t}-H
- (14) HO-G-T^{e2}-G-5C^{e2}-5C^{e2}-A-G-C-A-A-T-G-T-A^{e2}-G-T^{e2}-G^{e2t}-H
- (15) HO-G-T^{e2}-G-5C^{e2}-C-A-G-C-A-A-T-G-T^{e2}-A^{e2}-G-T^{e2}-G^{e2t}-H
- (16) HO-G-T^{e2}-G-5C^{e2}-5C^{e2}-A-G-C-A-A-T-G-T^{e2}-A^{e2}-G-T^{e2}-G^{e2t}-H
- (17) HO-G-T^{e2}-G-5C^{e2}-5C^{e2}-A^{e2}-G-C-A-A-T-G-T^{e2}-A^{e2}-G-T^{e2}-G^{e2t}-H
- (18) HO-G-T^{e2}-G-5C^{e2}-5C^{e2}-A-G-C-A-A-T-G^{e2}-T^{e2}-A^{e2}-G-T^{e2}-G^{e2t}-H
- (19) HO-G-T^{e2}-G-5C^{e2}-C-A-G-C-A-A-T-G-T-A^{e2}-G-T^{e2}-G^t-H
- (20) HO-G-T^{e2}-G-5C^{e2}-5C^{e2}-A-G-C-A-A-T-G-T-A^{e2}-G-T^{e2}-G^t-H
- (21) HO-G-T^{e2}-G-5C^{e2}-C-A-G-C-A-A-T-G-T^{e2}-A^{e2}-G-T^{e2}-G^t-H
- (22) HO-G-T^{e2}-G-5C^{e2}-5C^{e2}-A-G-C-A-A-T-G-T^{e2}-A^{e2}-G-T^{e2}-G^t-H
- (23) HO-G-T^{e2}-G-5C^{e2}-5C^{e2}-A^{e2}-G-C-A-A-T-G-T^{e2}-A^{e2}-G-T^{e2}-G^t-H
- (24) HO-G-T^{e2}-G-5C^{e2}-5C^{e2}-A-G-C-A-A-T-G^{e2}-T^{e2}-A^{e2}-G-T^{e2}-G^t-H
- (25) HO-G-T^{e2}-G-5C^{e2}-C-A-G-C-A-A-T-G-T-A-G-T^{e2}-G^t-H
- (26) HO-G-T^{e2}-G-5C^{e2}-5C^{e2}-A-G-C-A-A-T-G-T-A-G-T^{e2}-G^t-H
- (27) HO-G-T^{e2}-G-5C^{e2}-C-A-G-C-A-A-T-G-T^{e2}-A-G-T^{e2}-G^t-H
- (28) HO-G-T^{e2}-G-5C^{e2}-5C^{e2}-A-G-C-A-A-T-G-T^{e2}-A-G-T^{e2}-G^t-H
- (29) HO-G-T^{e2}-G-5C^{e2}-5C^{e2}-A^{e2}-G-C-A-A-T-G-T^{e2}-A-G-T^{e2}-G^t-H
- (30) HO-G-T^{e2}-G-5C^{e2}-5C^{e2}-A-G-C-A-A-T-G^{e2}-T^{e2}-A-G-T^{e2}-G^t-H
- (31) HO-G^{e2s}-T^{e2s}-G^{e2s}-5C^{e2s}-C^s-A^s-G^s-C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^s-A^{e2s}-G^{e2s}-T^{e2s}-G^{e2t}-H
- (32) HO-G^{e2s}-T^{e2s}-G^{e2s}-5C^{e2s}-5C^{e2s}-A^s-G^s-C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^s-A^{e2s}-G^{e2s}-T^{e2s}-G^{e2t}-H
- (33) HO-G^{e2s}-T^{e2s}-G^{e2s}-5C^{e2s}-C^s-A^s-G^s-C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^{e2s}-A^{e2s}-G^{e2s}-T^{e2s}-G^{e2t}-H

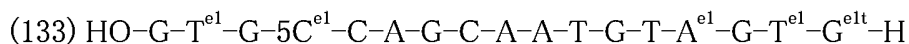
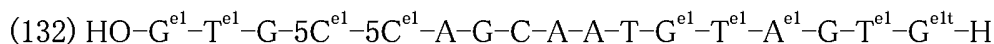
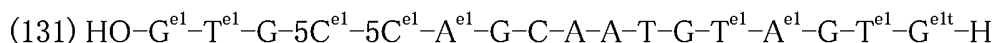
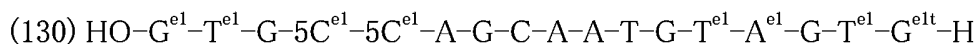
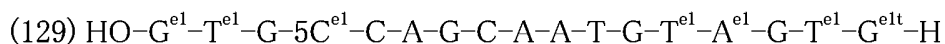
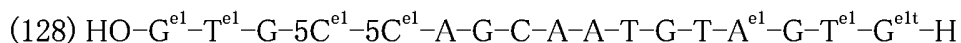
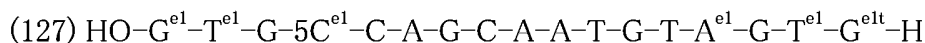
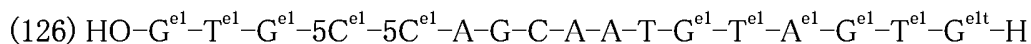
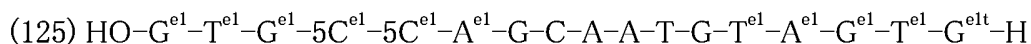
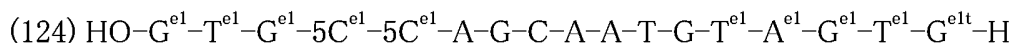
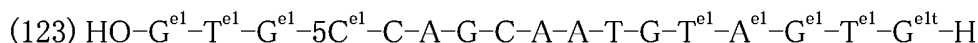
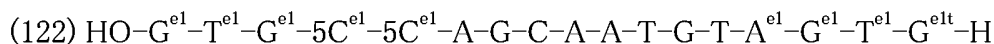
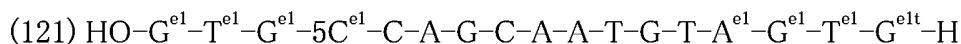
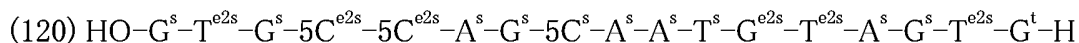
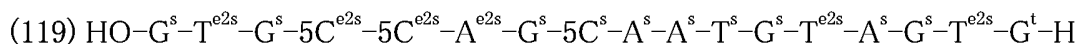
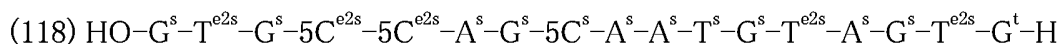
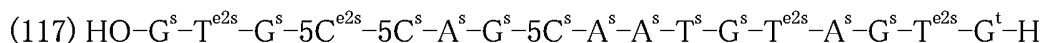
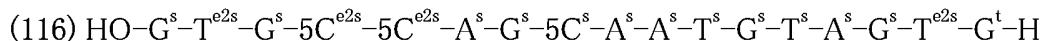
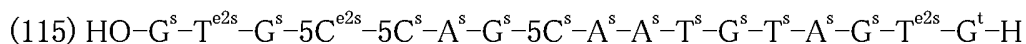
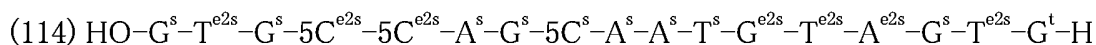
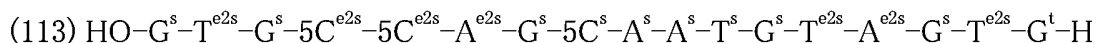
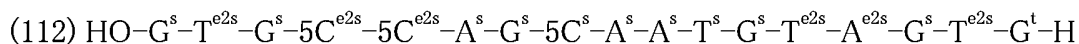
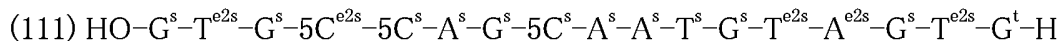
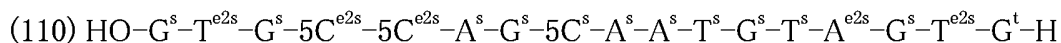
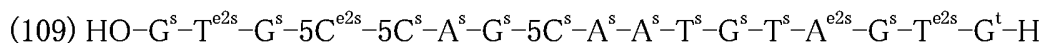
- (59) HO-G^s-T^{e2s}-G^s-5C^{e2s}-5C^{e2s}-A^{e2s}-G^s-C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^{e2s}-A^s-G^s-T^{e2s}-G^t-H
(60) HO-G^s-T^{e2s}-G^s-5C^{e2s}-5C^{e2s}-A^s-G^s-C^s-A^s-A^s-T^s-G^{e2s}-T^{e2s}-A^s-G^s-T^{e2s}-G^t-H
(61) HO-G^{e2}-T^{e2}-G^{e2}-5C^{e2}-5C-A-G-5C-A-A-T-G-T-A^{e2}-G^{e2}-T^{e2}-G^{e2t}-H
(62) HO-G^{e2}-T^{e2}-G^{e2}-5C^{e2}-5C^{e2}-A-G-5C-A-A-T-G-T-A^{e2}-G^{e2}-T^{e2}-G^{e2t}-H
(63) HO-G^{e2}-T^{e2}-G^{e2}-5C^{e2}-5C-A-G-5C-A-A-T-G-T^{e2}-A^{e2}-G^{e2}-T^{e2}-G^{e2t}-H
(64) HO-G^{e2}-T^{e2}-G^{e2}-5C^{e2}-5C^{e2}-A-G-5C-A-A-T-G-T^{e2}-A^{e2}-G^{e2}-T^{e2}-G^{e2t}-H
(65) HO-G^{e2}-T^{e2}-G^{e2}-5C^{e2}-5C^{e2}-A^{e2}-G-5C-A-A-T-G-T^{e2}-A^{e2}-G^{e2}-T^{e2}-G^{e2t}-H
(66) HO-G^{e2}-T^{e2}-G^{e2}-5C^{e2}-5C^{e2}-A-G-5C-A-A-T-G^{e2}-T^{e2}-A^{e2}-G^{e2}-T^{e2}-G^{e2t}-H
(67) HO-G^{e2}-T^{e2}-G-5C^{e2}-5C-A-G-5C-A-A-T-G-T-A^{e2}-G-T^{e2}-G^{e2t}-H
(68) HO-G^{e2}-T^{e2}-G-5C^{e2}-5C^{e2}-A-G-5C-A-A-T-G-T-A^{e2}-G-T^{e2}-G^{e2t}-H
(69) HO-G^{e2}-T^{e2}-G-5C^{e2}-5C-A-G-5C-A-A-T-G-T^{e2}-A^{e2}-G-T^{e2}-G^{e2t}-H
(70) HO-G^{e2}-T^{e2}-G-5C^{e2}-5C^{e2}-A-G-5C-A-A-T-G-T^{e2}-A^{e2}-G-T^{e2}-G^{e2t}-H
(71) HO-G^{e2}-T^{e2}-G-5C^{e2}-5C^{e2}-A^{e2}-G-5C-A-A-T-G-T^{e2}-A^{e2}-G-T^{e2}-G^{e2t}-H
(72) HO-G^{e2}-T^{e2}-G-5C^{e2}-5C^{e2}-A-G-5C-A-A-T-G^{e2}-T^{e2}-A^{e2}-G-T^{e2}-G^{e2t}-H
(73) HO-G-T^{e2}-G-5C^{e2}-5C-A-G-5C-A-A-T-G-T-A^{e2}-G-T^{e2}-G^{e2t}-H
(74) HO-G-T^{e2}-G-5C^{e2}-5C^{e2}-A-G-5C-A-A-T-G-T-A^{e2}-G-T^{e2}-G^{e2t}-H
(75) HO-G-T^{e2}-G-5C^{e2}-5C-A-G-5C-A-A-T-G-T^{e2}-A^{e2}-G-T^{e2}-G^{e2t}-H
(76) HO-G-T^{e2}-G-5C^{e2}-5C^{e2}-A-G-5C-A-A-T-G-T^{e2}-A^{e2}-G-T^{e2}-G^{e2t}-H
(77) HO-G-T^{e2}-G-5C^{e2}-5C^{e2}-A^{e2}-G-5C-A-A-T-G-T^{e2}-A^{e2}-G-T^{e2}-G^{e2t}-H
(78) HO-G-T^{e2}-G-5C^{e2}-5C^{e2}-A-G-5C-A-A-T-G^{e2}-T^{e2}-A^{e2}-G-T^{e2}-G^{e2t}-H
(79) HO-G-T^{e2}-G-5C^{e2}-5C-A-G-5C-A-A-T-G-T-A^{e2}-G-T^{e2}-G^t-H
(80) HO-G-T^{e2}-G-5C^{e2}-5C^{e2}-A-G-5C-A-A-T-G-T-A^{e2}-G-T^{e2}-G^t-H
(81) HO-G-T^{e2}-G-5C^{e2}-5C-A-G-5C-A-A-T-G-T^{e2}-A^{e2}-G-T^{e2}-G^t-H
(82) HO-G-T^{e2}-G-5C^{e2}-5C^{e2}-A-G-5C-A-A-T-G-T^{e2}-A^{e2}-G-T^{e2}-G^t-H
(83) HO-G-T^{e2}-G-5C^{e2}-5C^{e2}-A^{e2}-G-5C-A-A-T-G-T^{e2}-A^{e2}-G-T^{e2}-G^t-H
(84) HO-G-T^{e2}-G-5C^{e2}-5C^{e2}-A-G-5C-A-A-T-G^{e2}-T^{e2}-A^{e2}-G-T^{e2}-G^t-H
(85) HO-G-T^{e2}-G-5C^{e2}-5C-A-G-5C-A-A-T-G-T-A-G-T^{e2}-G^t-H
(86) HO-G-T^{e2}-G-5C^{e2}-5C^{e2}-A-G-5C-A-A-T-G-T-A-G-T^{e2}-G^t-H

- (87) HO-G-T^{e2}-G-5C^{e2}-5C-A-G-5C-A-A-T-G-T^{e2}-A-G-T^{e2}-G^t-H
- (88) HO-G-T^{e2}-G-5C^{e2}-5C^{e2}-A-G-5C-A-A-T-G-T^{e2}-A-G-T^{e2}-G^t-H
- (89) HO-G-T^{e2}-G-5C^{e2}-5C^{e2}-A^{e2}-G-5C-A-A-T-G-T^{e2}-A-G-T^{e2}-G^t-H
- (90) HO-G-T^{e2}-G-5C^{e2}-5C^{e2}-A-G-5C-A-A-T-G^{e2}-T^{e2}-A-G-T^{e2}-G^t-H
- (91) HO-G^{e2s}-T^{e2s}-G^{e2s}-5C^{e2s}-5C^s-A^s-G^s-5C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^s-A^{e2s}-G^{e2s}-T^{e2s}-G^{e2t}-H
- (92) HO-G^{e2s}-T^{e2s}-G^{e2s}-5C^{e2s}-5C^{e2s}-A^s-G^s-5C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^s-A^{e2s}-G^{e2s}-T^{e2s}-G^{e2t}-H
- (93) HO-G^{e2s}-T^{e2s}-G^{e2s}-5C^{e2s}-5C^s-A^s-G^s-5C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^{e2s}-A^{e2s}-G^{e2s}-T^{e2s}-G^{e2t}-H
- (94) HO-G^{e2s}-T^{e2s}-G^{e2s}-5C^{e2s}-5C^{e2s}-A-G-5C-A-A-T-G-T^{e2s}-A^{e2s}-G^{e2s}-T^{e2s}-G^{e2t}-H
- (95) HO-G^{e2s}-T^{e2s}-G^{e2s}-5C^{e2s}-5C^{e2s}-A^{e2s}-G^s-5C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^{e2s}-A^{e2s}-G^{e2s}-T^{e2s}-G^{e2t}-H
- (96) HO-G^{e2s}-T^{e2s}-G^{e2s}-5C^{e2s}-5C^{e2s}-A^s-G^s-5C^s-A^s-A^s-T^s-G^{e2s}-T^{e2s}-A^{e2s}-G^{e2s}-T^{e2s}-G^{e2t}-H
- (97) HO-G^{e2s}-T^{e2s}-G^s-5C^{e2s}-5C^s-A^s-G^s-5C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^s-A^{e2s}-G^s-T^{e2s}-G^{e2t}-H
- (98) HO-G^{e2s}-T^{e2s}-G^s-5C^{e2s}-5C^{e2s}-A^s-G^s-5C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^s-A^{e2s}-G^s-T^{e2s}-G^{e2t}-H
- (99) HO-G^{e2s}-T^{e2s}-G^s-5C^{e2s}-5C^s-A^s-G^s-5C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^{e2s}-A^{e2s}-G^s-T^{e2s}-G^{e2t}-H
- (100) HO-G^{e2s}-T^{e2s}-G^s-5C^{e2s}-5C^{e2s}-A^s-G^s-5C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^{e2s}-A^{e2s}-G^s-T^{e2s}-G^{e2t}-H
- (101) HO-G^{e2s}-T^{e2s}-G^s-5C^{e2s}-5C^{e2s}-A^{e2s}-G^s-5C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^{e2s}-A^{e2s}-G^s-T^{e2s}-G^{e2t}-H
- (102) HO-G^{e2s}-T^{e2s}-G^s-5C^{e2s}-5C^{e2s}-A^s-G^s-5C^s-A^s-A^s-T^s-G^{e2s}-T^{e2s}-A^{e2s}-G^s-T^{e2s}-G^{e2t}-H
- (103) HO-G^s-T^{e2s}-G^s-5C^{e2s}-5C^s-A^s-G^s-5C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^s-A^{e2s}-G^s-T^{e2s}-G^{e2t}-H
- (104) HO-G^s-T^{e2s}-G^s-5C^{e2s}-5C^{e2s}-A^s-G^s-5C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^s-A^{e2s}-G^s-T^{e2s}-G^{e2t}-H
- (105) HO-G^s-T^{e2s}-G^s-5C^{e2s}-5C^s-A^s-G^s-5C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^{e2s}-A^{e2s}-G^s-T^{e2s}-G^{e2t}-H
- (106) HO-G^s-T^{e2s}-G^s-5C^{e2s}-5C^{e2s}-A^s-G^s-5C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^{e2s}-A^{e2s}-G^s-T^{e2s}-G^{e2t}-H
- (107) HO-G^s-T^{e2s}-G^s-5C^{e2s}-5C^{e2s}-A^{e2s}-G^s-5C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^{e2s}-A^{e2s}-G^s-T^{e2s}-G^{e2t}-H

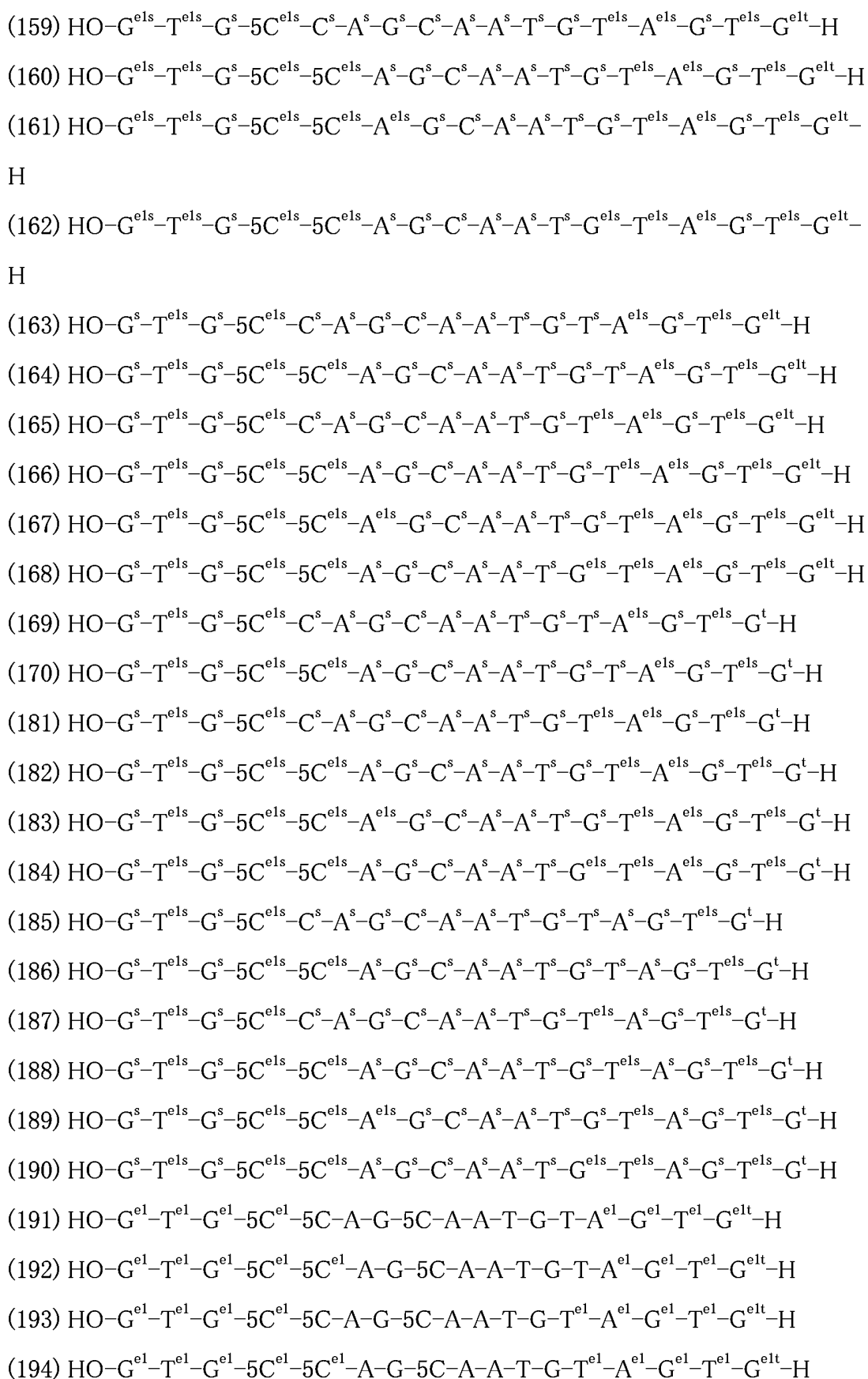
H



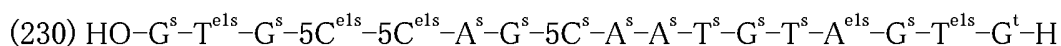
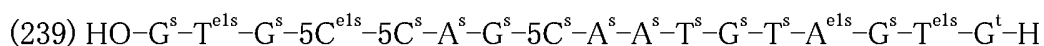
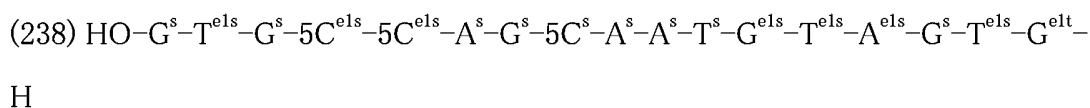
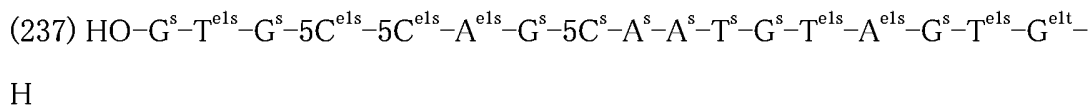
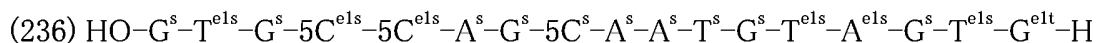
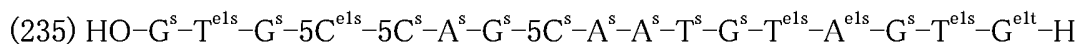
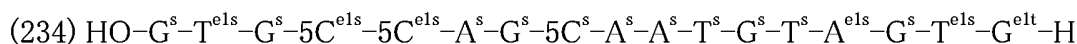
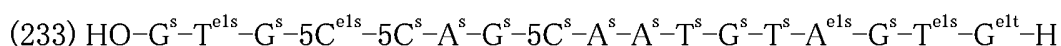
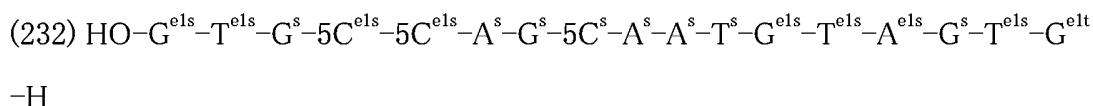
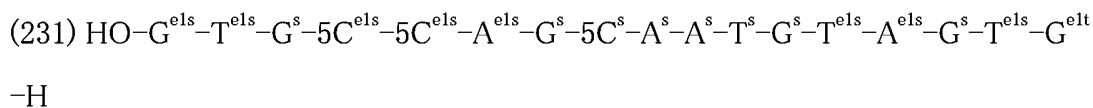
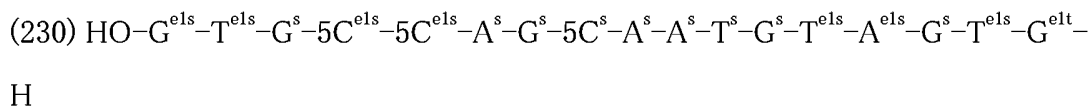
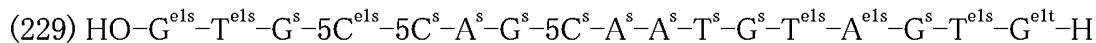
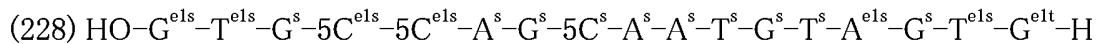
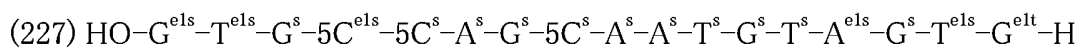
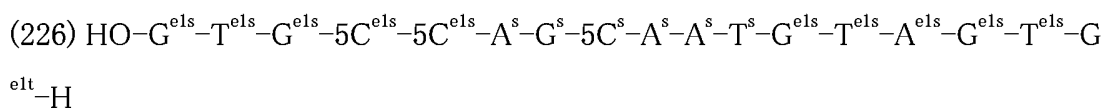
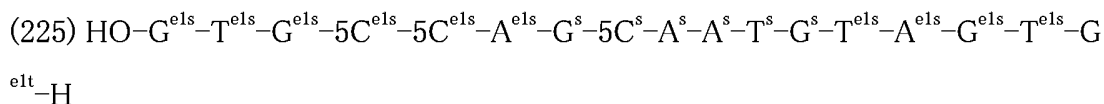
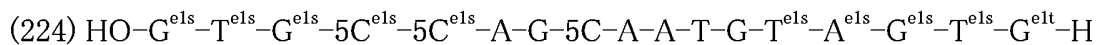
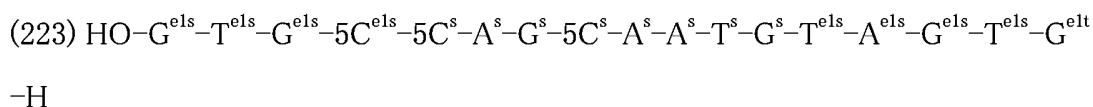
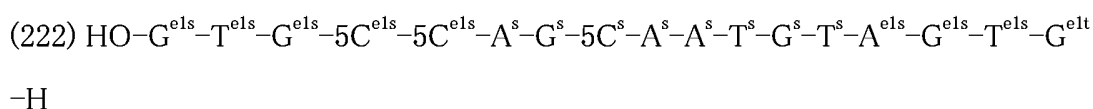
H

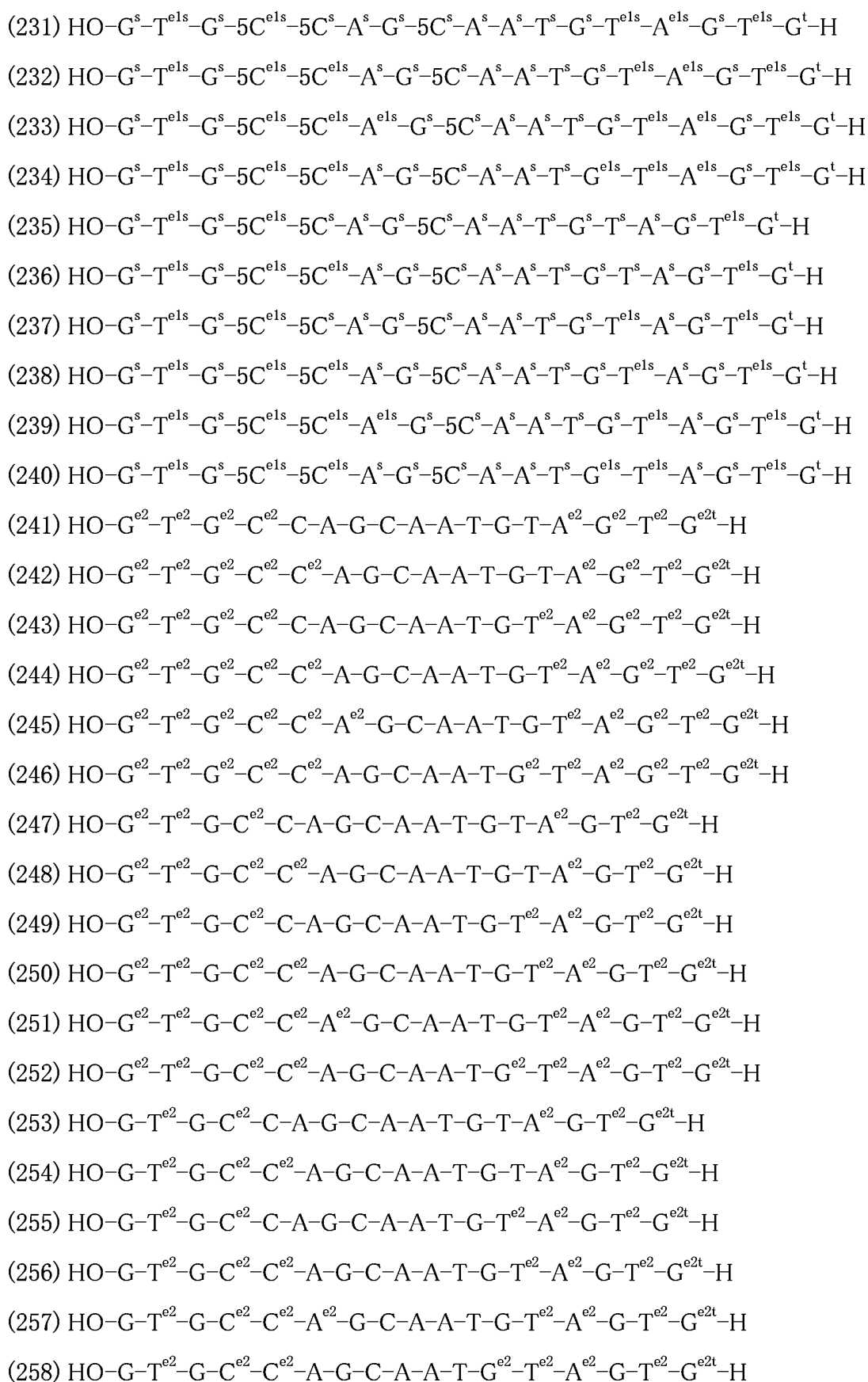


- (134) HO-G-T^{el}-G-5C^{el}-5C^{el}-A-G-C-A-A-T-G-T-A^{el}-G-T^{el}-G^{elt}-H
- (135) HO-G-T^{el}-G-5C^{el}-C-A-G-C-A-A-T-G-T^{el}-A^{el}-G-T^{el}-G^{elt}-H
- (136) HO-G-T^{el}-G-5C^{el}-5C^{el}-A-G-C-A-A-T-G-T^{el}-A^{el}-G-T^{el}-G^{elt}-H
- (137) HO-G-T^{el}-G-5C^{el}-5C^{el}-A^{el}-G-C-A-A-T-G-T^{el}-A^{el}-G-T^{el}-G^{elt}-H
- (138) HO-G-T^{el}-G-5C^{el}-5C^{el}-A-G-C-A-A-T-G^{el}-T^{el}-A^{el}-G-T^{el}-G^{elt}-H
- (139) HO-G-T^{el}-G-5C^{el}-C-A-G-C-A-A-T-G-T-A^{el}-G-T^{el}-G^t-H
- (140) HO-G-T^{el}-G-5C^{el}-5C^{el}-A-G-C-A-A-T-G-T-A^{el}-G-T^{el}-G^t-H
- (141) HO-G-T^{el}-G-5C^{el}-C-A-G-C-A-A-T-G-T^{el}-A^{el}-G-T^{el}-G^t-H
- (142) HO-G-T^{el}-G-5C^{el}-5C^{el}-A-G-C-A-A-T-G-T^{el}-A^{el}-G-T^{el}-G^t-H
- (143) HO-G-T^{el}-G-5C^{el}-5C^{el}-A^{el}-G-C-A-A-T-G-T^{el}-A^{el}-G-T^{el}-G^t-H
- (144) HO-G-T^{el}-G-5C^{el}-5C^{el}-A-G-C-A-A-T-G^{el}-T^{el}-A^{el}-G-T^{el}-G^t-H
- (145) HO-G-T^{el}-G-5C^{el}-C-A-G-C-A-A-T-G-T-A-G-T^{el}-G^t-H
- (146) HO-G-T^{el}-G-5C^{el}-5C^{el}-A-G-C-A-A-T-G-T-A-G-T^{el}-G^t-H
- (147) HO-G-T^{el}-G-5C^{el}-C-A-G-C-A-A-T-G-T^{el}-A-G-T^{el}-G^t-H
- (148) HO-G-T^{el}-G-5C^{el}-5C^{el}-A-G-C-A-A-T-G-T^{el}-A-G-T^{el}-G^t-H
- (149) HO-G-T^{el}-G-5C^{el}-5C^{el}-A^{el}-G-C-A-A-T-G-T^{el}-A-G-T^{el}-G^t-H
- (150) HO-G-T^{el}-G-5C^{el}-5C^{el}-A-G-C-A-A-T-G^{el}-T^{el}-A-G-T^{el}-G^t-H
- (151) HO-G^{els}-T^{els}-G^{els}-5C^{els}-C^s-A^s-G^s-C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^s-A^{els}-G^{els}-T^{els}-G^{elt}-H
- (152) HO-G^{els}-T^{els}-G^{els}-5C^{els}-5C^{els}-A^s-G^s-C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^s-A^{els}-G^{els}-T^{els}-G^{elt}-H
- (153) HO-G^{els}-T^{els}-G^{els}-5C^{els}-C^s-A^s-G^s-C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^{els}-A^{els}-G^{els}-T^{els}-G^{elt}-H
- (154) HO-G^{els}-T^{els}-G^{els}-5C^{els}-5C^{els}-A-G-C-A-A-T-G-T^{els}-A^{els}-G^{els}-T^{els}-G^{elt}-H
- (155) HO-G^{els}-T^{els}-G^{els}-5C^{els}-5C^{els}-A^{els}-G^s-C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^{els}-A^{els}-G^{els}-T^{els}-G^{elt}-H
- (156) HO-G^{els}-T^{els}-G^{els}-5C^{els}-5C^{els}-A^s-G^s-C^s-A^s-A^s-T^s-G^{els}-T^{els}-A^{els}-G^{els}-T^{els}-G^{elt}-H
- (157) HO-G^{els}-T^{els}-G^s-5C^{els}-C^s-A^s-G^s-C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^s-A^{els}-G^s-T^{els}-G^{elt}-H
- (158) HO-G^{els}-T^{els}-G^s-5C^{els}-5C^{els}-A^s-G^s-C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^s-A^{els}-G^s-T^{els}-G^{elt}-H

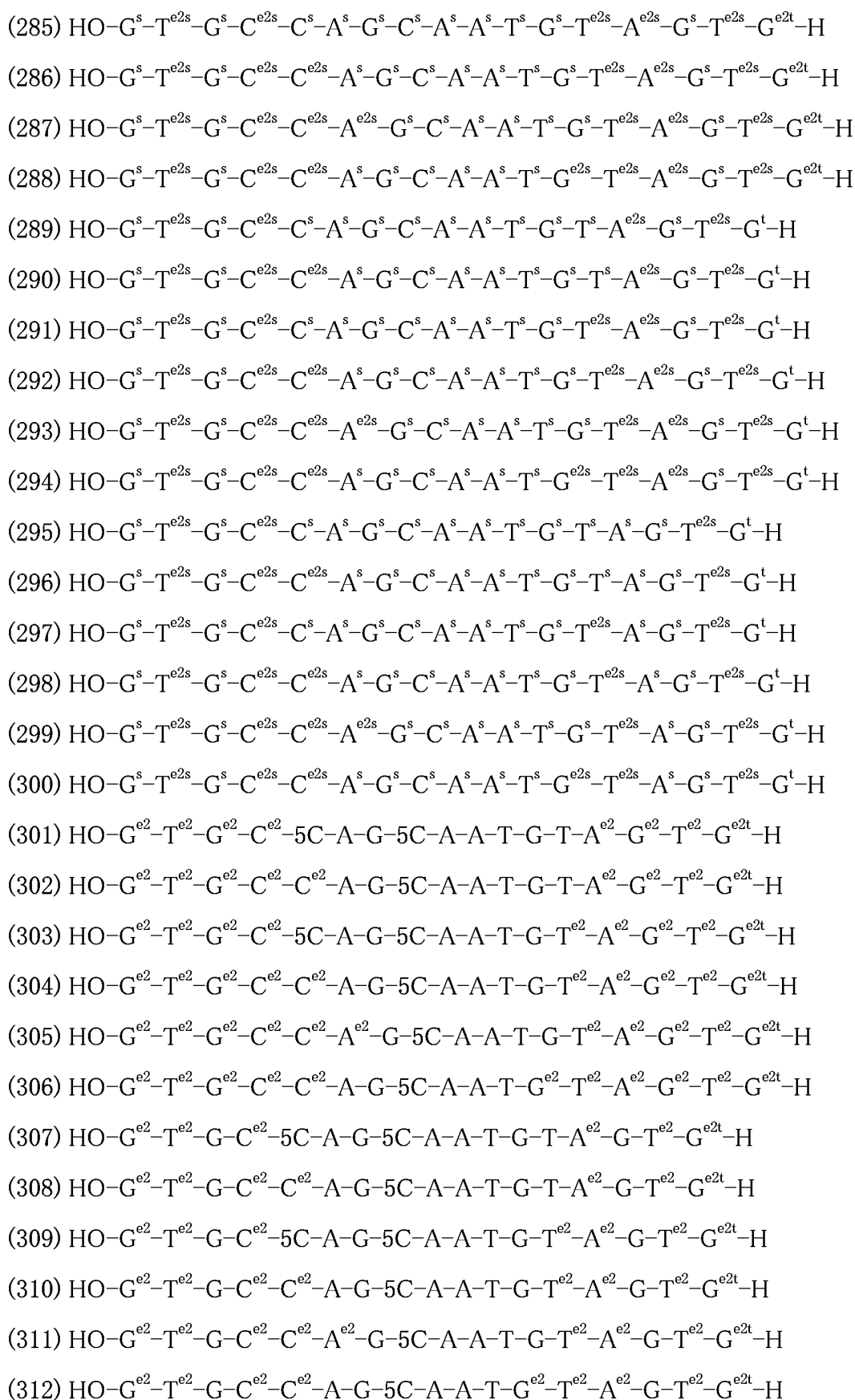


- (195) HO-G^{el}-T^{el}-G^{el}-5C^{el}-5C^{el}-A^{el}-G-5C-A-A-T-G-T^{el}-A^{el}-G^{el}-T^{el}-G^{elt}-H
- (196) HO-G^{el}-T^{el}-G^{el}-5C^{el}-5C^{el}-A-G-5C-A-A-T-G^{el}-T^{el}-A^{el}-G^{el}-T^{el}-G^{elt}-H
- (197) HO-G^{el}-T^{el}-G-5C^{el}-5C-A-G-5C-A-A-T-G-T-A^{el}-G-T^{el}-G^{elt}-H
- (198) HO-G^{el}-T^{el}-G-5C^{el}-5C^{el}-A-G-5C-A-A-T-G-T-A^{el}-G-T^{el}-G^{elt}-H
- (199) HO-G^{el}-T^{el}-G-5C^{el}-5C-A-G-5C-A-A-T-G-T^{el}-A^{el}-G-T^{el}-G^{elt}-H
- (200) HO-G^{el}-T^{el}-G-5C^{el}-5C^{el}-A-G-5C-A-A-T-G-T^{el}-A^{el}-G-T^{el}-G^{elt}-H
- (201) HO-G^{el}-T^{el}-G-5C^{el}-5C^{el}-A^{el}-G-5C-A-A-T-G-T^{el}-A^{el}-G-T^{el}-G^{elt}-H
- (202) HO-G^{el}-T^{el}-G-5C^{el}-5C^{el}-A-G-5C-A-A-T-G^{el}-T^{el}-A^{el}-G-T^{el}-G^{elt}-H
- (203) HO-G-T^{el}-G-5C^{el}-5C-A-G-5C-A-A-T-G-T-A^{el}-G-T^{el}-G^{elt}-H
- (204) HO-G-T^{el}-G-5C^{el}-5C^{el}-A-G-5C-A-A-T-G-T-A^{el}-G-T^{el}-G^{elt}-H
- (205) HO-G-T^{el}-G-5C^{el}-5C-A-G-5C-A-A-T-G-T^{el}-A^{el}-G-T^{el}-G^{elt}-H
- (206) HO-G-T^{el}-G-5C^{el}-5C^{el}-A-G-5C-A-A-T-G-T^{el}-A^{el}-G-T^{el}-G^{elt}-H
- (207) HO-G-T^{el}-G-5C^{el}-5C^{el}-A^{el}-G-5C-A-A-T-G-T^{el}-A^{el}-G-T^{el}-G^{elt}-H
- (208) HO-G-T^{el}-G-5C^{el}-5C^{el}-A-G-5C-A-A-T-G^{el}-T^{el}-A^{el}-G-T^{el}-G^{elt}-H
- (209) HO-G-T^{el}-G-5C^{el}-5C-A-G-5C-A-A-T-G-T-A^{el}-G-T^{el}-G^t-H
- (210) HO-G-T^{el}-G-5C^{el}-5C^{el}-A-G-5C-A-A-T-G-T-A^{el}-G-T^{el}-G^t-H
- (211) HO-G-T^{el}-G-5C^{el}-5C-A-G-5C-A-A-T-G-T^{el}-A^{el}-G-T^{el}-G^t-H
- (212) HO-G-T^{el}-G-5C^{el}-5C^{el}-A-G-5C-A-A-T-G-T^{el}-A^{el}-G-T^{el}-G^t-H
- (213) HO-G-T^{el}-G-5C^{el}-5C^{el}-A^{el}-G-5C-A-A-T-G-T^{el}-A^{el}-G-T^{el}-G^t-H
- (214) HO-G-T^{el}-G-5C^{el}-5C^{el}-A-G-5C-A-A-T-G^{el}-T^{el}-A^{el}-G-T^{el}-G^t-H
- (215) HO-G-T^{el}-G-5C^{el}-5C-A-G-5C-A-A-T-G-T-A-G-T^{el}-G^t-H
- (216) HO-G-T^{el}-G-5C^{el}-5C^{el}-A-G-5C-A-A-T-G-T-A-G-T^{el}-G^t-H
- (217) HO-G-T^{el}-G-5C^{el}-5C-A-G-5C-A-A-T-G-T^{el}-A-G-T^{el}-G^t-H
- (218) HO-G-T^{el}-G-5C^{el}-5C^{el}-A-G-5C-A-A-T-G-T^{el}-A-G-T^{el}-G^t-H
- (219) HO-G-T^{el}-G-5C^{el}-5C^{el}-A^{el}-G-5C-A-A-T-G-T^{el}-A-G-T^{el}-G^t-H
- (220) HO-G-T^{el}-G-5C^{el}-5C^{el}-A-G-5C-A-A-T-G^{el}-T^{el}-A-G-T^{el}-G^t-H
- (221) HO-G^{els}-T^{els}-G^{els}-5C^{els}-5C^s-A^s-G^s-5C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^s-A^{els}-G^{els}-T^{els}-G^{elt}-H

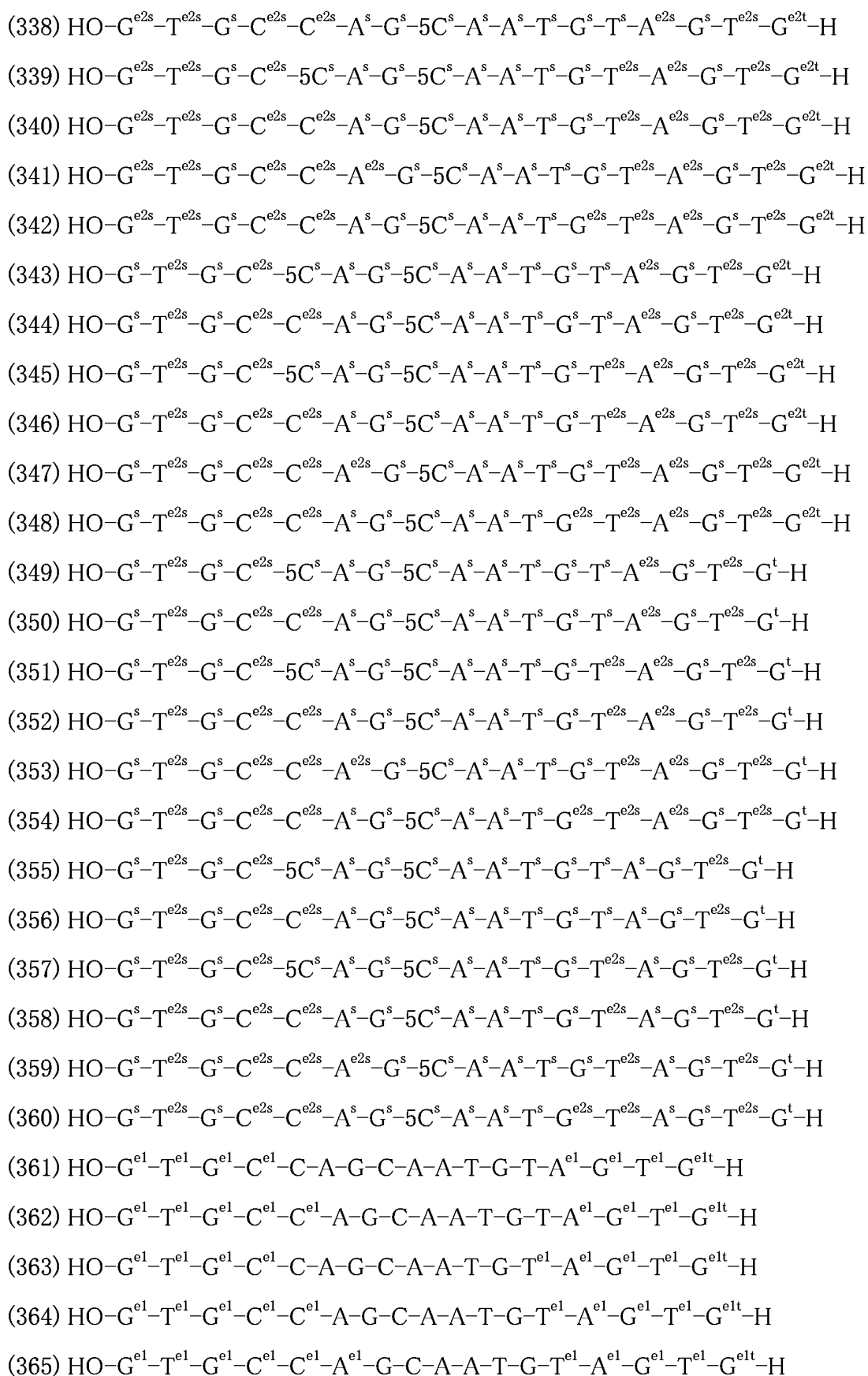


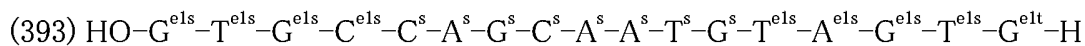
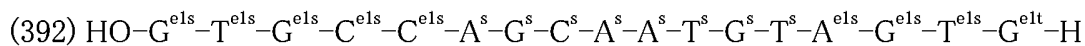
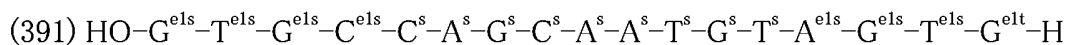
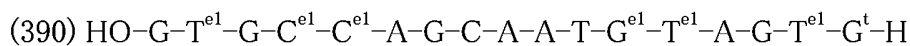
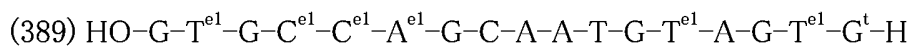
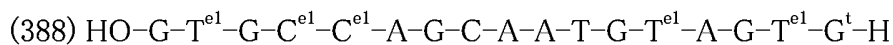
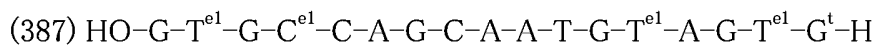
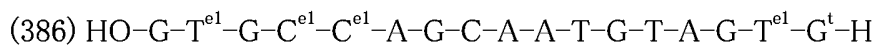
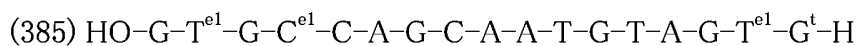
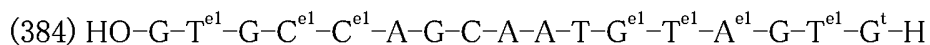
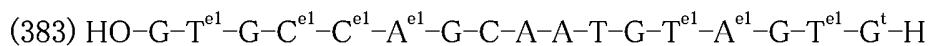
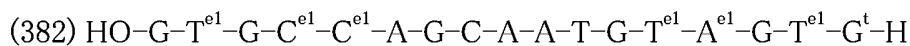
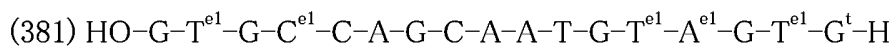
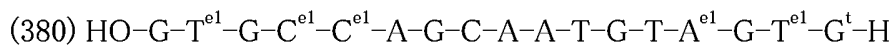
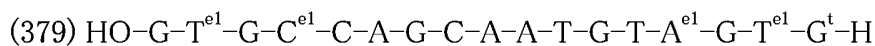
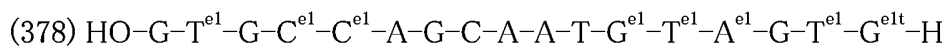
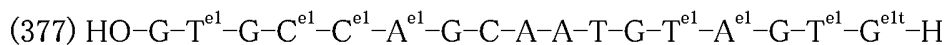
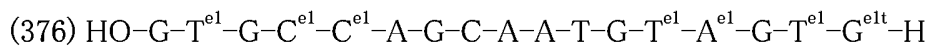
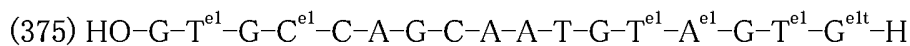
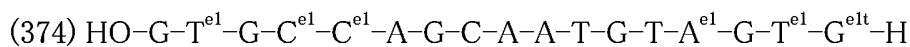
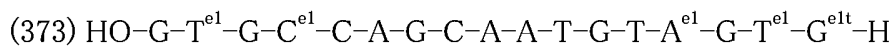
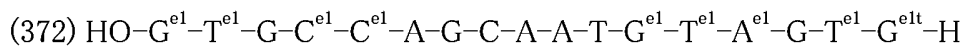
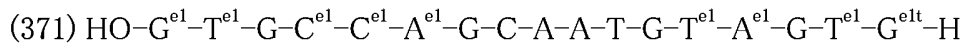
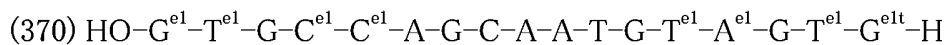
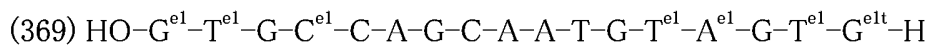
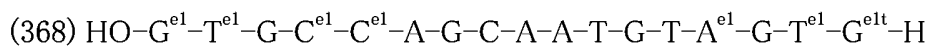
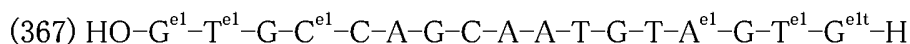
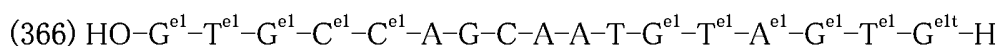


- (259) HO-G-T^{e2}-G-C^{e2}-C-A-G-C-A-A-T-G-T-A^{e2}-G-T^{e2}-G^t-H
- (260) HO-G-T^{e2}-G-C^{e2}-C^{e2}-A-G-C-A-A-T-G-T-A^{e2}-G-T^{e2}-G^t-H
- (261) HO-G-T^{e2}-G-C^{e2}-C-A-G-C-A-A-T-G-T^{e2}-A^{e2}-G-T^{e2}-G^t-H
- (262) HO-G-T^{e2}-G-C^{e2}-C^{e2}-A-G-C-A-A-T-G-T^{e2}-A^{e2}-G-T^{e2}-G^t-H
- (263) HO-G-T^{e2}-G-C^{e2}-C^{e2}-A^{e2}-G-C-A-A-T-G-T^{e2}-A^{e2}-G-T^{e2}-G^t-H
- (264) HO-G-T^{e2}-G-C^{e2}-C^{e2}-A-G-C-A-A-T-G^{e2}-T^{e2}-A^{e2}-G-T^{e2}-G^t-H
- (265) HO-G-T^{e2}-G-C^{e2}-C-A-G-C-A-A-T-G-T-A-G-T^{e2}-G^t-H
- (266) HO-G-T^{e2}-G-C^{e2}-C^{e2}-A-G-C-A-A-T-G-T-A-G-T^{e2}-G^t-H
- (267) HO-G-T^{e2}-G-C^{e2}-C-A-G-C-A-A-T-G-T^{e2}-A-G-T^{e2}-G^t-H
- (268) HO-G-T^{e2}-G-C^{e2}-C^{e2}-A-G-C-A-A-T-G-T^{e2}-A-G-T^{e2}-G^t-H
- (269) HO-G-T^{e2}-G-C^{e2}-C^{e2}-A^{e2}-G-C-A-A-T-G-T^{e2}-A-G-T^{e2}-G^t-H
- (270) HO-G-T^{e2}-G-C^{e2}-C^{e2}-A-G-C-A-A-T-G^{e2}-T^{e2}-A-G-T^{e2}-G^t-H
- (271) HO-G^{e2s}-T^{e2s}-G^{e2s}-C^{e2s}-C^s-A^s-G^s-C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^s-A^{e2s}-G^{e2s}-T^{e2s}-G^{e2t}-H
- (272) HO-G^{e2s}-T^{e2s}-G^{e2s}-C^{e2s}-C^{e2s}-A^s-G^s-C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^s-A^{e2s}-G^{e2s}-T^{e2s}-G^{e2t}-H
- (273) HO-G^{e2s}-T^{e2s}-G^{e2s}-C^{e2s}-C^s-A^s-G^s-C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^{e2s}-A^{e2s}-G^{e2s}-T^{e2s}-G^{e2t}-H
- (274) HO-G^{e2s}-T^{e2s}-G^{e2s}-C^{e2s}-C^{e2s}-A^s-G^s-C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^{e2s}-A^{e2s}-G^{e2s}-T^{e2s}-G^{e2t}-H
- (275) HO-G^{e2s}-T^{e2s}-G^{e2s}-C^{e2s}-C^{e2s}-A^{e2s}-G^s-C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^{e2s}-A^{e2s}-G^{e2s}-T^{e2s}-G^{e2t}-H
- (276) HO-G^{e2s}-T^{e2s}-G^{e2s}-C^{e2s}-C^{e2s}-A^s-G^s-C^s-A^s-A^s-T^s-G^{e2s}-T^{e2s}-A^{e2s}-G^{e2s}-T^{e2s}-G^{e2t}-H
- (277) HO-G^{e2s}-T^{e2s}-G^s-C^{e2s}-C^s-A^s-G^s-C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^s-A^{e2s}-G^s-T^{e2s}-G^{e2t}-H
- (278) HO-G^{e2s}-T^{e2s}-G^s-C^{e2s}-C^{e2s}-A^s-G^s-C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^s-A^{e2s}-G^s-T^{e2s}-G^{e2t}-H
- (279) HO-G^{e2s}-T^{e2s}-G^s-C^{e2s}-C^s-A^s-G^s-C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^{e2s}-A^{e2s}-G^s-T^{e2s}-G^{e2t}-H
- (280) HO-G^{e2s}-T^{e2s}-G^s-C^{e2s}-C^{e2s}-A^s-G^s-C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^{e2s}-A^{e2s}-G^s-T^{e2s}-G^{e2t}-H
- (281) HO-G^{e2s}-T^{e2s}-G^s-C^{e2s}-C^{e2s}-A^{e2s}-G^s-C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^{e2s}-A^{e2s}-G^s-T^{e2s}-G^{e2t}-H
- (282) HO-G^{e2s}-T^{e2s}-G^s-C^{e2s}-C^{e2s}-A^s-G^s-C^s-A^s-A^s-T^s-G^{e2s}-T^{e2s}-A^{e2s}-G^s-T^{e2s}-G^{e2t}-H
- (283) HO-G^s-T^{e2s}-G^s-C^{e2s}-C^s-A^s-G^s-C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^s-A^{e2s}-G^s-T^{e2s}-G^{e2t}-H
- (284) HO-G^s-T^{e2s}-G^s-C^{e2s}-C^{e2s}-A^s-G^s-C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^s-A^{e2s}-G^s-T^{e2s}-G^{e2t}-H



- (313) HO-G-T^{e2}-G-C^{e2}-5C-A-G-5C-A-A-T-G-T-A^{e2}-G-T^{e2}-G^{e2t}-H
- (314) HO-G-T^{e2}-G-C^{e2}-C^{e2}-A-G-5C-A-A-T-G-T-A^{e2}-G-T^{e2}-G^{e2t}-H
- (315) HO-G-T^{e2}-G-C^{e2}-5C-A-G-5C-A-A-T-G-T^{e2}-A^{e2}-G-T^{e2}-G^{e2t}-H
- (316) HO-G-T^{e2}-G-C^{e2}-C^{e2}-A-G-5C-A-A-T-G-T^{e2}-A^{e2}-G-T^{e2}-G^{e2t}-H
- (317) HO-G-T^{e2}-G-C^{e2}-C^{e2}-A^{e2}-G-5C-A-A-T-G-T^{e2}-A^{e2}-G-T^{e2}-G^{e2t}-H
- (318) HO-G-T^{e2}-G-C^{e2}-C^{e2}-A-G-5C-A-A-T-G^{e2}-T^{e2}-A^{e2}-G-T^{e2}-G^{e2t}-H
- (319) HO-G-T^{e2}-G-C^{e2}-5C-A-G-5C-A-A-T-G-T-A^{e2}-G-T^{e2}-G^t-H
- (320) HO-G-T^{e2}-G-C^{e2}-C^{e2}-A-G-5C-A-A-T-G-T-A^{e2}-G-T^{e2}-G^t-H
- (321) HO-G-T^{e2}-G-C^{e2}-5C-A-G-5C-A-A-T-G-T^{e2}-A^{e2}-G-T^{e2}-G^t-H
- (322) HO-G-T^{e2}-G-C^{e2}-C^{e2}-A-G-5C-A-A-T-G-T^{e2}-A^{e2}-G-T^{e2}-G^t-H
- (323) HO-G-T^{e2}-G-C^{e2}-C^{e2}-A^{e2}-G-5C-A-A-T-G-T^{e2}-A^{e2}-G-T^{e2}-G^t-H
- (324) HO-G-T^{e2}-G-C^{e2}-C^{e2}-A-G-5C-A-A-T-G^{e2}-T^{e2}-A^{e2}-G-T^{e2}-G^t-H
- (325) HO-G-T^{e2}-G-C^{e2}-5C-A-G-5C-A-A-T-G-T-A-G-T^{e2}-G^t-H
- (326) HO-G-T^{e2}-G-C^{e2}-C^{e2}-A-G-5C-A-A-T-G-T-A-G-T^{e2}-G^t-H
- (327) HO-G-T^{e2}-G-C^{e2}-5C-A-G-5C-A-A-T-G-T^{e2}-A-G-T^{e2}-G^t-H
- (328) HO-G-T^{e2}-G-C^{e2}-C^{e2}-A-G-5C-A-A-T-G-T^{e2}-A-G-T^{e2}-G^t-H
- (329) HO-G-T^{e2}-G-C^{e2}-C^{e2}-A^{e2}-G-5C-A-A-T-G-T^{e2}-A-G-T^{e2}-G^t-H
- (330) HO-G-T^{e2}-G-C^{e2}-C^{e2}-A-G-5C-A-A-T-G^{e2}-T^{e2}-A-G-T^{e2}-G^t-H
- (331) HO-G^{e2s}-T^{e2s}-G^{e2s}-C^{e2s}-5C^s-A^s-G^s-5C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^s-A^{e2s}-G^{e2s}-T^{e2s}-G^{e2t}-H
- (332) HO-G^{e2s}-T^{e2s}-G^{e2s}-C^{e2s}-C^{e2s}-A^s-G^s-5C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^s-A^{e2s}-G^{e2s}-T^{e2s}-G^{e2t}-H
- (333) HO-G^{e2s}-T^{e2s}-G^{e2s}-C^{e2s}-5C^s-A^s-G^s-5C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^{e2s}-A^{e2s}-G^{e2s}-T^{e2s}-G^{e2t}-H
- (334) HO-G^{e2s}-T^{e2s}-G^{e2s}-C^{e2s}-C^{e2s}-A-G-5C-A-A-T-G-T^{e2s}-A^{e2s}-G^{e2s}-T^{e2s}-G^{e2t}-H
- (335) HO-G^{e2s}-T^{e2s}-G^{e2s}-C^{e2s}-C^{e2s}-A^{e2s}-G^s-5C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^{e2s}-A^{e2s}-G^{e2s}-T^{e2s}-G^{e2t}-H
- (336) HO-G^{e2s}-T^{e2s}-G^{e2s}-C^{e2s}-C^{e2s}-A^s-G^s-5C^s-A^s-A^s-T^s-G^{e2s}-T^{e2s}-A^{e2s}-G^{e2s}-T^{e2s}-G^{e2t}-H
- (337) HO-G^{e2s}-T^{e2s}-G^s-C^{e2s}-5C^s-A^s-G^s-5C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^s-A^{e2s}-G^s-T^{e2s}-G^{e2t}-H





- (420) HO-G^s-T^{els}-G^s-C^{els}-C^{els}-A^s-G^s-C^s-A^s-A^s-T^s-G^{els}-T^{els}-A^s-G^s-T^{els}-G^t-H
- (421) HO-G^{el}-T^{el}-G^{el}-C^{el}-5C-A-G-5C-A-A-T-G-T-A^{el}-G^{el}-T^{el}-G^{elt}-H
- (422) HO-G^{el}-T^{el}-G^{el}-C^{el}-C^{el}-A-G-5C-A-A-T-G-T-A^{el}-G^{el}-T^{el}-G^{elt}-H
- (423) HO-G^{el}-T^{el}-G^{el}-C^{el}-5C-A-G-5C-A-A-T-G-T^{el}-A^{el}-G^{el}-T^{el}-G^{elt}-H
- (424) HO-G^{el}-T^{el}-G^{el}-C^{el}-C^{el}-A-G-5C-A-A-T-G-T^{el}-A^{el}-G^{el}-T^{el}-G^{elt}-H
- (425) HO-G^{el}-T^{el}-G^{el}-C^{el}-C^{el}-A^{el}-G-5C-A-A-T-G-T^{el}-A^{el}-G^{el}-T^{el}-G^{elt}-H
- (426) HO-G^{el}-T^{el}-G^{el}-C^{el}-C^{el}-A-G-5C-A-A-T-G^{el}-T^{el}-A^{el}-G^{el}-T^{el}-G^{elt}-H
- (427) HO-G^{el}-T^{el}-G-C^{el}-5C-A-G-5C-A-A-T-G-T-A^{el}-G-T^{el}-G^{elt}-H
- (428) HO-G^{el}-T^{el}-G-C^{el}-C^{el}-A-G-5C-A-A-T-G-T-A^{el}-G-T^{el}-G^{elt}-H
- (429) HO-G^{el}-T^{el}-G-C^{el}-5C-A-G-5C-A-A-T-G-T^{el}-A^{el}-G-T^{el}-G^{elt}-H
- (430) HO-G^{el}-T^{el}-G-C^{el}-C^{el}-A-G-5C-A-A-T-G-T^{el}-A^{el}-G-T^{el}-G^{elt}-H
- (431) HO-G^{el}-T^{el}-G-C^{el}-C^{el}-A^{el}-G-5C-A-A-T-G-T^{el}-A^{el}-G-T^{el}-G^{elt}-H
- (432) HO-G^{el}-T^{el}-G-C^{el}-C^{el}-A-G-5C-A-A-T-G^{el}-T^{el}-A^{el}-G-T^{el}-G^{elt}-H
- (433) HO-G-T^{el}-G-C^{el}-5C-A-G-5C-A-A-T-G-T-A^{el}-G-T^{el}-G^{elt}-H
- (434) HO-G-T^{el}-G-C^{el}-C^{el}-A-G-5C-A-A-T-G-T-A^{el}-G-T^{el}-G^{elt}-H
- (435) HO-G-T^{el}-G-C^{el}-5C-A-G-5C-A-A-T-G-T^{el}-A^{el}-G-T^{el}-G^{elt}-H
- (436) HO-G-T^{el}-G-C^{el}-C^{el}-A-G-5C-A-A-T-G-T^{el}-A^{el}-G-T^{el}-G^{elt}-H
- (437) HO-G-T^{el}-G-C^{el}-C^{el}-A^{el}-G-5C-A-A-T-G-T^{el}-A^{el}-G-T^{el}-G^{elt}-H
- (438) HO-G-T^{el}-G-C^{el}-C^{el}-A-G-5C-A-A-T-G^{el}-T^{el}-A^{el}-G-T^{el}-G^{elt}-H
- (439) HO-G-T^{el}-G-C^{el}-5C-A-G-5C-A-A-T-G-T-A^{el}-G-T^{el}-G^t-H
- (440) HO-G-T^{el}-G-C^{el}-C^{el}-A-G-5C-A-A-T-G-T-A^{el}-G-T^{el}-G^t-H
- (441) HO-G-T^{el}-G-C^{el}-5C-A-G-5C-A-A-T-G-T^{el}-A^{el}-G-T^{el}-G^t-H
- (442) HO-G-T^{el}-G-C^{el}-C^{el}-A-G-5C-A-A-T-G-T^{el}-A^{el}-G-T^{el}-G^t-H
- (443) HO-G-T^{el}-G-C^{el}-C^{el}-A^{el}-G-5C-A-A-T-G-T^{el}-A^{el}-G-T^{el}-G^t-H
- (444) HO-G-T^{el}-G-C^{el}-C^{el}-A-G-5C-A-A-T-G^{el}-T^{el}-A^{el}-G-T^{el}-G^t-H
- (445) HO-G-T^{el}-G-C^{el}-5C-A-G-5C-A-A-T-G-T-A-G-T^{el}-G^t-H
- (446) HO-G-T^{el}-G-C^{el}-C^{el}-A-G-5C-A-A-T-G-T-A-G-T^{el}-G^t-H
- (447) HO-G-T^{el}-G-C^{el}-5C-A-G-5C-A-A-T-G-T^{el}-A-G-T^{el}-G^t-H

- (448) HO-G-T^{el}-G-C^{el}-C^{el}-A-G-5C-A-A-T-G-T^{el}-A-G-T^{el}-G^t-H
- (449) HO-G-T^{el}-G-C^{el}-C^{el}-A^{el}-G-5C-A-A-T-G-T^{el}-A-G-T^{el}-G^t-H
- (450) HO-G-T^{el}-G-C^{el}-C^{el}-A-G-5C-A-A-T-G^{el}-T^{el}-A-G-T^{el}-G^t-H
- (451) HO-G^{els}-T^{els}-G^{els}-C^{els}-5C^s-A^s-G^s-5C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^s-A^{els}-G^{els}-T^{els}-G^{elt}-H
- (452) HO-G^{els}-T^{els}-G^{els}-C^{els}-C^{els}-A^s-G^s-5C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^s-A^{els}-G^{els}-T^{els}-G^{elt}-H
- (453) HO-G^{els}-T^{els}-G^{els}-C^{els}-5C^s-A^s-G^s-5C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^{els}-A^{els}-G^{els}-T^{els}-G^{elt}-H
- (454) HO-G^{els}-T^{els}-G^{els}-C^{els}-C^{els}-A-G-5C-A-A-T-G-T^{els}-A^{els}-G^{els}-T^{els}-G^{elt}-H
- (455) HO-G^{els}-T^{els}-G^{els}-C^{els}-C^{els}-A^{els}-G^s-5C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^{els}-A^{els}-G^{els}-T^{els}-G^{elt}-H
- (456) HO-G^{els}-T^{els}-G^{els}-C^{els}-C^{els}-A^s-G^s-5C^s-A^s-A^s-T^s-G^{els}-T^{els}-A^{els}-G^{els}-T^{els}-G^{elt}-H
- (457) HO-G^{els}-T^{els}-G^s-C^{els}-5C^s-A^s-G^s-5C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^s-A^{els}-G^s-T^{els}-G^{elt}-H
- (458) HO-G^{els}-T^{els}-G^s-C^{els}-C^{els}-A^s-G^s-5C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^s-A^{els}-G^s-T^{els}-G^{elt}-H
- (459) HO-G^{els}-T^{els}-G^s-C^{els}-C^s-A^s-G^s-5C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^{els}-A^{els}-G^s-T^{els}-G^{elt}-H
- (460) HO-G^{els}-T^{els}-G^s-C^{els}-C^{els}-A^s-G^s-5C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^{els}-A^{els}-G^s-T^{els}-G^{elt}-H
- (461) HO-G^{els}-T^{els}-G^s-C^{els}-C^{els}-A^{els}-G^s-5C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^{els}-A^{els}-G^s-T^{els}-G^{elt}-H
- (462) HO-G^{els}-T^{els}-G^s-C^{els}-C^{els}-A^s-G^s-5C^s-A^s-A^s-T^s-G^{els}-T^{els}-A^{els}-G^s-T^{els}-G^{elt}-H
- (463) HO-G^s-T^{els}-G^s-C^{els}-5C^s-A^s-G^s-5C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^s-A^{els}-G^s-T^{els}-G^{elt}-H
- (464) HO-G^s-T^{els}-G^s-C^{els}-C^{els}-A^s-G^s-5C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^s-A^{els}-G^s-T^{els}-G^{elt}-H
- (465) HO-G^s-T^{els}-G^s-C^{els}-5C^s-A^s-G^s-5C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^{els}-A^{els}-G^s-T^{els}-G^{elt}-H
- (466) HO-G^s-T^{els}-G^s-C^{els}-C^{els}-A^s-G^s-5C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^{els}-A^{els}-G^s-T^{els}-G^{elt}-H
- (467) HO-G^s-T^{els}-G^s-C^{els}-C^{els}-A^{els}-G^s-5C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^{els}-A^{els}-G^s-T^{els}-G^{elt}-H
- (468) HO-G^s-T^{els}-G^s-C^{els}-C^{els}-A^s-G^s-5C^s-A^s-A^s-T^s-G^{els}-T^{els}-A^{els}-G^s-T^{els}-G^{elt}-H
- (469) HO-G^s-T^{els}-G^s-C^{els}-5C^s-A^s-G^s-5C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^s-A^{els}-G^s-T^{els}-G^t-H
- (470) HO-G^s-T^{els}-G^s-C^{els}-C^{els}-A^s-G^s-5C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^s-A^{els}-G^s-T^{els}-G^t-H
- (471) HO-G^s-T^{els}-G^s-C^{els}-5C^s-A^s-G^s-5C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^{els}-A^{els}-G^s-T^{els}-G^t-H
- (472) HO-G^s-T^{els}-G^s-C^{els}-C^{els}-A^s-G^s-5C^s-A^s-A^s-T^s-G^s-T^{els}-A^{els}-G^s-T^{els}-G^t-H

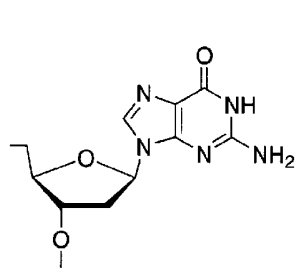
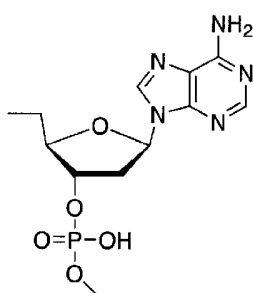
- (473) $\text{HO}-\text{G}^s-\text{T}^{\text{els}}-\text{G}^s-\text{C}^{\text{els}}-\text{C}^{\text{els}}-\text{A}^{\text{els}}-\text{G}^s-5\text{C}^s-\text{A}^s-\text{A}^s-\text{T}^s-\text{G}^s-\text{T}^{\text{els}}-\text{A}^{\text{els}}-\text{G}^s-\text{T}^{\text{els}}-\text{G}^t-\text{H}$
 (474) $\text{HO}-\text{G}^s-\text{T}^{\text{els}}-\text{G}^s-\text{C}^{\text{els}}-\text{C}^{\text{els}}-\text{A}^s-\text{G}^s-5\text{C}^s-\text{A}^s-\text{A}^s-\text{T}^s-\text{G}^{\text{els}}-\text{T}^{\text{els}}-\text{A}^{\text{els}}-\text{G}^s-\text{T}^{\text{els}}-\text{G}^t-\text{H}$
 (475) $\text{HO}-\text{G}^s-\text{T}^{\text{els}}-\text{G}^s-\text{C}^{\text{els}}-5\text{C}^s-\text{A}^s-\text{G}^s-5\text{C}^s-\text{A}^s-\text{A}^s-\text{T}^s-\text{G}^s-\text{T}^s-\text{A}^s-\text{G}^s-\text{T}^{\text{els}}-\text{G}^t-\text{H}$
 (476) $\text{HO}-\text{G}^s-\text{T}^{\text{els}}-\text{G}^s-\text{C}^{\text{els}}-\text{C}^{\text{els}}-\text{A}^s-\text{G}^s-5\text{C}^s-\text{A}^s-\text{A}^s-\text{T}^s-\text{G}^s-\text{T}^s-\text{A}^s-\text{G}^s-\text{T}^{\text{els}}-\text{G}^t-\text{H}$
 (477) $\text{HO}-\text{G}^s-\text{T}^{\text{els}}-\text{G}^s-\text{C}^{\text{els}}-5\text{C}^s-\text{A}^s-\text{G}^s-5\text{C}^s-\text{A}^s-\text{A}^s-\text{T}^s-\text{G}^s-\text{T}^{\text{els}}-\text{A}^s-\text{G}^s-\text{T}^{\text{els}}-\text{G}^t-\text{H}$
 (478) $\text{HO}-\text{G}^s-\text{T}^{\text{els}}-\text{G}^s-\text{C}^{\text{els}}-\text{C}^{\text{els}}-\text{A}^s-\text{G}^s-5\text{C}^s-\text{A}^s-\text{A}^s-\text{T}^s-\text{G}^s-\text{T}^{\text{els}}-\text{A}^s-\text{G}^s-\text{T}^{\text{els}}-\text{G}^t-\text{H}$
 (479) $\text{HO}-\text{G}^s-\text{T}^{\text{els}}-\text{G}^s-\text{C}^{\text{els}}-\text{C}^{\text{els}}-\text{A}^{\text{els}}-\text{G}^s-5\text{C}^s-\text{A}^s-\text{A}^s-\text{T}^s-\text{G}^s-\text{T}^{\text{els}}-\text{A}^s-\text{G}^s-\text{T}^{\text{els}}-\text{G}^t-\text{H}$
 (480) $\text{HO}-\text{G}^s-\text{T}^{\text{els}}-\text{G}^s-\text{C}^{\text{els}}-\text{C}^{\text{els}}-\text{A}^s-\text{G}^s-5\text{C}^s-\text{A}^s-\text{A}^s-\text{T}^s-\text{G}^{\text{els}}-\text{T}^{\text{els}}-\text{A}^s-\text{G}^s-\text{T}^{\text{els}}-\text{G}^t-\text{H}$

[0070] 上記の好適な化合物のうち、(1)-(6)は、2'-O,4'-C-エチレン化されたリボフラノースを両端に4ないし5個配置したものである。(7)-(12)は、(1)-(6)における2'-O,4'-C-エチレン化されたリボフラノース(グアニンが結合)のうちの2個をデオキシリボフラノース(グアニンが結合)に代えたものである。(13)-(18)は、(1)-(6)における2'-O,4'-C-エチレン化されたリボフラノース(グアニンが結合)のうちの3個をデオキシリボフラノース(グアニンが結合)に代えたものである。(19)-(24)は、(1)-(6)における2'-O,4'-C-エチレン化されたリボフラノース(グアニンが結合)のうちの4個をデオキシリボフラノース(グアニンが結合)に代えたものである。(25)-(30)は、(1)-(6)における2'-O,4'-C-エチレン化されたリボフラノース(グアニンが結合)のうちの4個をデオキシリボフラノース(グアニンが結合)に代え、2'-O,4'-C-エチレン化されたリボフラノース(アデニンが結合)のうちの1個をデオキシリボフラノース(アデニンが結合)に代えたものである。(31)-(60)は、それぞれ、(1)-(30)の化合物を構成するリン酸をすべてホスホロチオエートに代えたものである。(61)-(120)は、それぞれ、(1)-(60)の化合物を構成するシトシンをすべて5-メチルシトシンに代えたものである。(121)-(240)は、それぞれ、(1)-(120)における2'-O,4'-C-エチレン化されたリボフラノースをすべて2'-O,4'-C-メチレン化されたリボフラノースに代えたものである。(241)-(480)は、(1)-(240)における2'-O,4'-C-エチレン又は2'-O,4'-C-メチレン-5-メチルシトシンを2'-O,4'-C-エチレン又は2'-O,4'-C-メチレンシトシンに代えたものである。

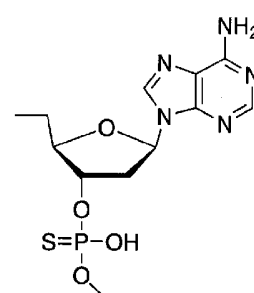
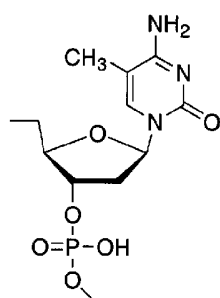
[0071] なお、本明細書において、A、G、G^t、C、5C、T、A^s、G^s、C^s、5C^s、T^s、A^{e2}、G^{e2}、G^{e2t}、5C^{e2}、C^{e2}、T^{e2}、A^{e2s}、G^{e2s}、5C^{e2s}、C^{e2s}、T^{e2s}、A^{e1}、G^{e1}、G^{e1t}、5C^{e1}、C^{e1}、T^{e1}、A^{e1s}、G^{e1s}、5

C^{e1s} 、 C^{e1s} 及び T^{e1s} は、それぞれ、下記の式(A)、(G)、(G^t)、(C)、(5C)、(T)、(A^s)、(G^s)、(C^s)、(5 C^s)、(T^s)、(A^{e2})、(G^{e2})、(G^{e2t})、(5 C^{e2})、(C^{e2})、(T^{e2})、(A^{e2s})、(G^{e2s})、(5 C^{e2s})、(C^{e2s})、(T^{e2s})、(A^{e1})、(G^{e1})、(G^{e1t})、(5 C^{e1})、(C^{e1})、(T^{e1})、(A^{e1s})、(G^{e1s})、(5 C^{e1s})、(C^{e1s})及び(T^{e1s})で表される基である。

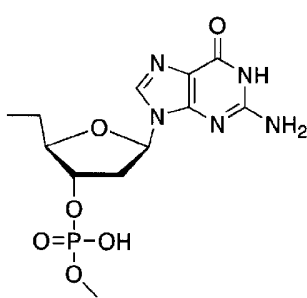
[0072] [化19]

(G¹)

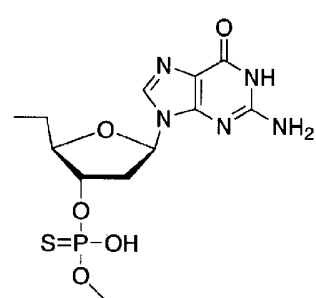
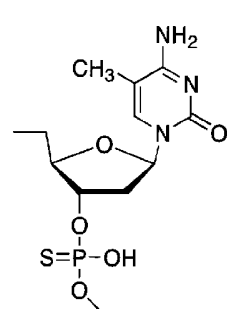
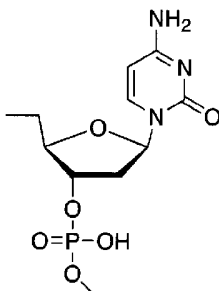
(A)

(A⁵)

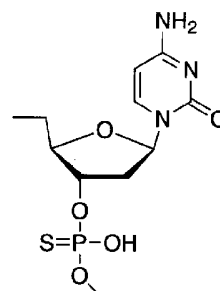
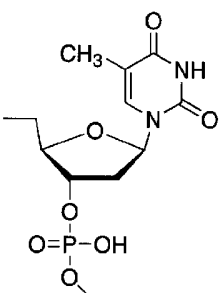
(5C)



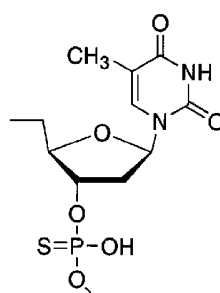
(G)

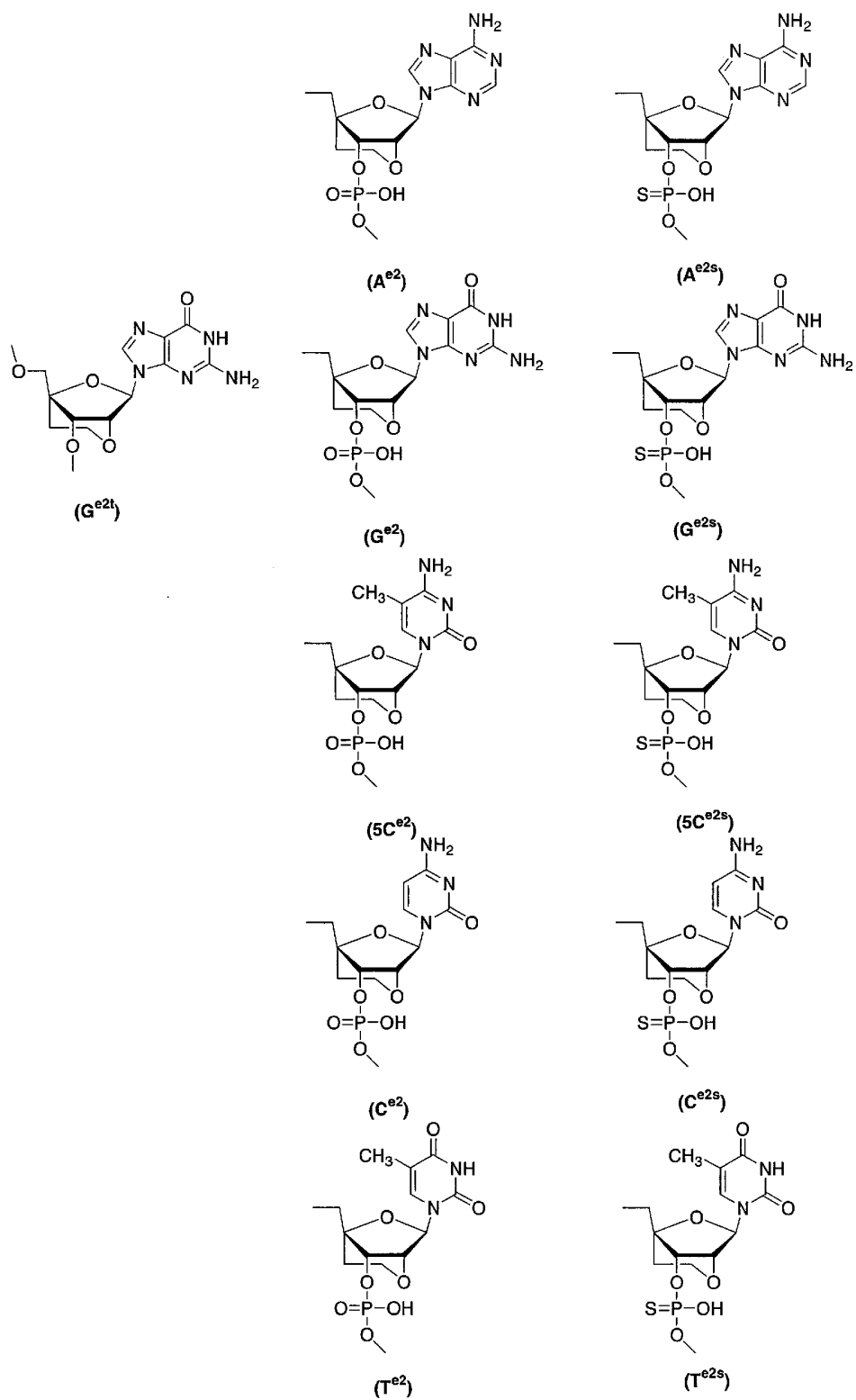
(G⁵)(5C⁵)

(C)

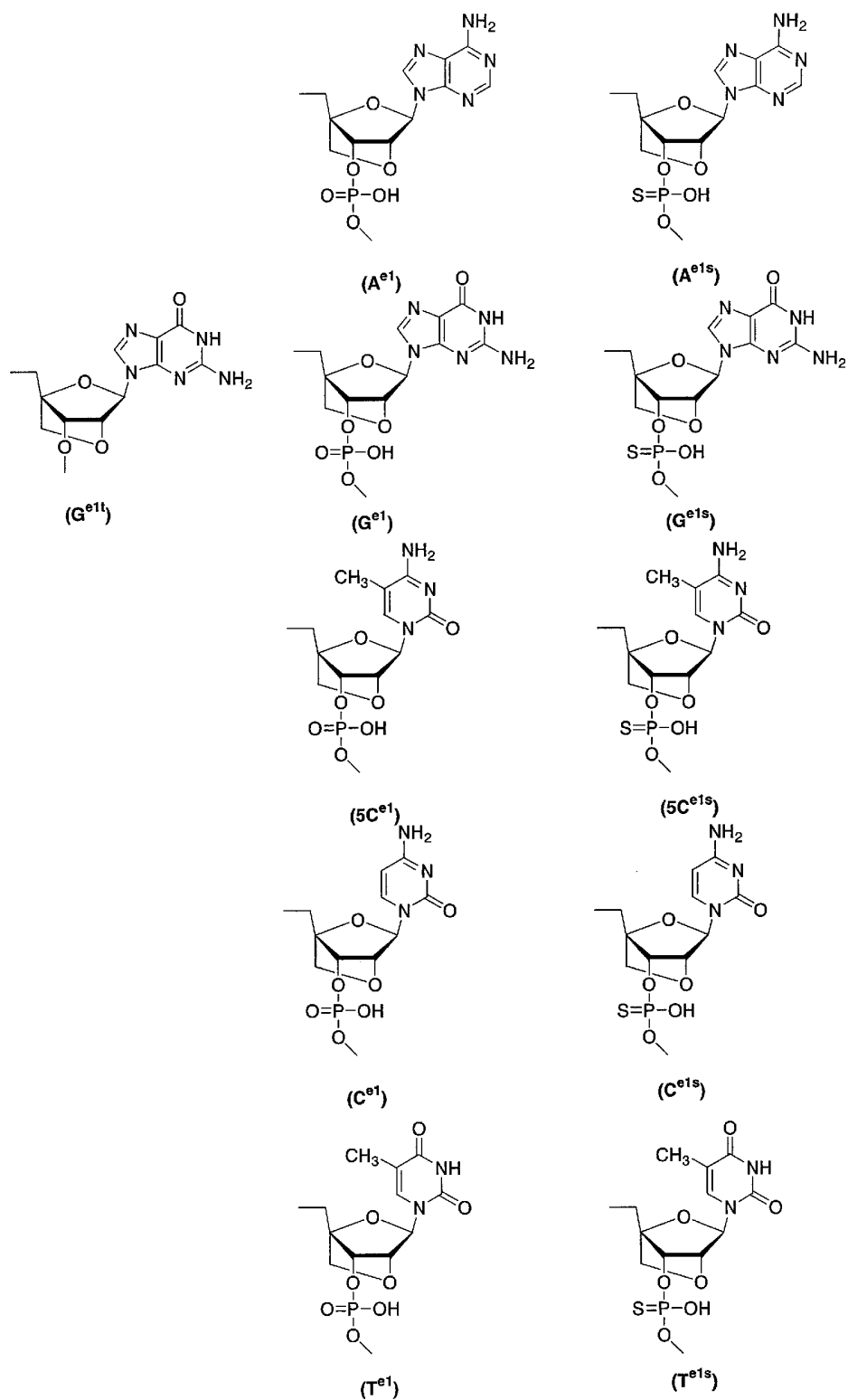
(C⁵)

(T)

(T⁵)



[0074] [化21]



[0075] 本明細書において、「薬理学上許容されるその塩」とは、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド(例えば、配列番号3の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド)または一

般式(I)で表される化合物の塩をいい、そのような塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩のようなアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩のようなアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、鉄塩、亜鉛塩、銅塩、ニッケル塩、コバルト塩などの金属塩；アンモニウム塩のような無機塩、*t*-オクチルアミン塩、ジベンジルアミン塩、モルホリン塩、グルコサミン塩、フェニルグリシナルキルエステル塩、エチレンジアミン塩、*N*-メチルグルカミン塩、グアニジン塩、ジエチルアミン塩、トリエチルアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、*N, N'*-ジベンジルエチレンジアミン塩、クロロプロカイン塩、プロカイン塩、ジエタノールアミン塩、*N*-ベンジル-フェネチルアミン塩、ピペラジン塩、テトラメチルアンモニウム塩、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン塩のような有機塩などのアミン塩；弗化水素酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、沃化水素酸塩のようなハロゲン原子化水素酸塩、硝酸塩、過塩素酸塩、硫酸塩、リン酸塩などの無機酸塩；メタンスルホン酸塩、トリフルオロメタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩のような低級アルカンルスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、*p*-トルエンスルホン酸塩のようなアリールスルホン酸塩、酢酸塩、りんご酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、蔞酸塩、マレイン酸塩などの有機酸塩；グリシン塩、リジン塩、アルギニン塩、オルニチン塩、グルタミン酸塩、アスパラギン酸塩のようなアミノ酸塩などを挙げる事ができる。これらの塩は、公知の方法で製造することができる。

[0076] なお、一般式(I)で表される化合物は、溶媒和物(好適には水和物)としても存在することができ、そのような溶媒和物も本発明に包含される。

[0077] 本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドおよび一般式(I)で表される化合物(以下、「本発明の化合物」という)、ならびに薬理学上許容されるそれらの塩は、11 β -水酸化ステロイド脱水素酵素1型発現を抑制するための実験試薬として、あるいは医薬として利用できる。

[0078] また、本発明の化合物は、糖尿病、高血圧等の代謝性疾患の治療・予防に用いる医薬として有効である。

[0079] 本発明の化合物は、市販の合成機(例えば、パーキンエルマー社のホスホロアミダイド法によるモデル392)などを用いて、文献(Nucleic Acids Research, 12, 4539 (1984))に記載の方法に準じて合成することができる。その際に用いられるホスホロアミダ

イト試薬は、天然型のヌクレオシド及び2'-O-メチルヌクレオシド(すなわち、2'-O-メチルグアノシン、2'-O-メチルアデノシン、2'-O-メチルシトシン、2'-O-メチルウリジン)については、市販の試薬を用いることができる。アルキル基の炭素数が2~6個の2'-O-アルキルグアノシン、アデノシン、シトシンおよびウリジンについては、以下の通りである。

2'-O-アミノエチルグアノシン、アデノシン、シトシン、ウリジンは、文献(Blommers et al. *Biochemistry* (1998), 37, 17714-17725.)に従って合成できる。

[0080] 2'-O-プロピルグアノシン、アデノシン、シトシン、ウリジンは、文献(Lesnik, E.A. et al. *Biochemistry* (1993), 32, 7832-7838.)に従って合成できる。

2'-O-アリルグアノシン、アデノシン、シトシン、ウリジンは、市販の試薬を用いることができる。

[0081] 2'-O-(2-メトキシ)エチルグアノシン、アデノシン、シトシン、ウリジンは、特許(US626 1840)または、文献(Martin, P. *Helv. Chim. Acta.* (1995) 78, 486-504.)に従って合成できる。

[0082] 2'-O-ブチルグアノシン、アデノシン、シトシン、ウリジンは、文献(Lesnik, E.A. et al. *Biochemistry* (1993), 32, 7832-7838.)に従って合成できる。

[0083] 2'-O-ペンチルグアノシン、アデノシン、シトシン、ウリジンは、文献(Lesnik, E.A. et al. *Biochemistry* (1993), 32, 7832-7838.)に従って合成できる。

2'-O-プロパルギルグアノシン、アデノシン、シトシン、ウリジンは、市販の試薬を用いることができる。

[0084] 2'-O-アリルグアノシン、アデノシン、シトシン、ウリジンは、市販の試薬を用いることができる。

[0085] 2'-O, 4'-C-メチレングアノシン、アデノシン、5-メチルシトシンおよびチミジンについては、WO99/14226に記載の方法に従って、アルキレン基の炭素数が2~5個の2'-O, 4'-C-アルキレングアノシン、アデノシン、5-メチルシトシン、シトシンおよびチミジンについては、WO00/47599に記載の方法に従って製造することができる。

[0086] ホスホロアミダイト試薬をカップリング後、硫黄、テトラエチルチウラムジスルフィド(TETD、アプライドバイオシステム社)、Beaucage試薬(Glen Research社)、または、キサ

ンタンヒドリドなどの試薬を反応させることにより、ホスホロチオエート結合を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドを合成することができる (Tetrahedron Letters, 32, 3005 (1991), J. Am. Chem. Soc. 112, 1253 (1990), PCT/WO98/54198)。

[0087] 合成機で用いるコントロールド ポア グラス (CPG) としては、2'-O-メチルヌクレオシドの結合したものは、市販のものを利用することができる。また、2'-O, 4'-C-メチレングアノシン、アデノシン、5-メチルシトシンおよびチミジンについては、WO99/14226 に記載の方法に従って、アルキレン基の炭素数が2~5個の2'-O, 4'-C-アルキレングアノシン、アデノシン、5-メチルシトシンおよびチミジンについては、WO00/47599 に記載の方法に従って製造したヌクレオシドを文献 (Oligonucleotide Synthesis, Edited by M.J.Gait, Oxford University Press, 1984) に従って、CPG に結合することができる。修飾された CPG (特開平7-87982 の実施例12b に記載) を用いることにより、3' 末端に2-ヒドロキシエチルリン酸基が結合したオリゴヌクレオチドを合成できる。また、3'-amino-Modifier C3 CPG, 3'-amino-Modifier C7 CPG, Glyceryl CPG, (Glen Research), 3'-specer C3 SynBase CPG 1000, 3'-specer C9 SynBase CPG 1000 (link technologies) を使えば、3' 末端にヒドロキシアシルリン酸基、または、アミノアシルリン酸基が結合したオリゴヌクレオチドを合成できる。

[0088] 本発明の化合物および薬理学上許容されるその塩は、11 β -HSD1 の働きを抑制することができる。特に、一般式(I) で表される化合物および薬理学上許容されるその塩は、RNA に対する結合力が高く、ヌクレアーゼに対する耐性が高い上に、RNase H による mRNA の分解作用を受けることができる。従って、本発明の化合物および薬理学上許容されるその塩は、糖尿病、高血圧等の代謝性疾患の治療・予防に有効である。

[0089] 本発明の化合物または薬理学上許容されるその塩を糖尿病、高血圧等の代謝性疾患の治療・予防剤として使用する場合には、本発明の化合物または薬理学上許容されるその塩若しくはエステルを、それ自体あるいは適宜の薬理学上許容される賦形剤、希釈剤などと混合し、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤若しくはシロップ剤などにより経口的に、あるいは、注射剤、坐剤、貼付剤若しくは外用剤などにより非経口的に投与することができる。

- [0090] これらの製剤は、賦形剤(例えば、乳糖、白糖、葡萄糖、マンニトール、ソルビトールのような糖誘導体;トウモロコシデンプン、バイレショデンプン、 α 澱粉、デキストリンのような澱粉誘導体;結晶セルロースのようなセルロース誘導体;アラビアゴム;デキストラン;プルランのような有機系賦形剤;軽質無水珪酸、合成珪酸アルミニウム、珪酸カルシウム、メタ珪酸アルミン酸マグネシウムのような珪酸塩誘導体;磷酸水素カルシウムのような磷酸塩;炭酸カルシウムのような炭酸塩;硫酸カルシウムのような硫酸塩などの無機系賦形剤など)、滑沢剤(例えば、ステアリン酸、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウムのようなステアリン酸金属塩;タルク;コロイドシリカ;ビーズワックス、ゲイ蠟のようなワックス類;硼酸;アジピン酸;硫酸ナトリウムのような硫酸塩;グリコール;フマル酸;安息香酸ナトリウム;DLロイシン;ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸マグネシウムのようなラウリル硫酸塩;無水珪酸、珪酸水和物のような珪酸類;上記澱粉誘導体など)、結合剤(例えば、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、マクロゴール、前記賦形剤と同様の化合物など)、崩壊剤(例えば、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、内部架橋カルボキシメチルセルロースナトリウムのようなセルロース誘導体;カルボキシメチルスターチ、カルボキシメチルスターチナトリウム、架橋ポリビニルピロリドンのような化学修飾されたデンプン・セルロース類など)、乳化剤(例えば、ベントナイト、ビーガムのようなコロイド性粘土;水酸化マグネシウム、水酸化アルミニウムのような金属水酸化物;ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸カルシウムのような陰イオン界面活性剤;塩化ベンザルコニウムのような陽イオン界面活性剤;ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステルのような非イオン界面活性剤など)、安定剤(メチルパラベン、プロピルパラベンのようなパラオキシ安息香酸エステル類;クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェニルエチルアルコールのようなアルコール類;塩化ベンザルコニウム;フェノール、クレゾールのようなフェノール類;チメロサル;デヒドロ酢酸;ソルビン酸など)、矯味矯臭剤(例えば、通常使用される甘味料、酸味料、香料など)、希釈剤などの添加剤を用いて周知の方法で製造される。
- [0091] 本発明の治療・予防剤は、好ましくは、 $0.05 \sim 5 \mu\text{ moles/ml}$ の本発明の化合物ま

たは薬理学上許容されるその塩、0.02～10 %w/vの炭水化物又は多価アルコール及び0.01～0.4 %w/vの薬理学上許容される界面活性剤を含有する。本発明の化合物または薬理学上許容されるその塩の含有量の更に好ましい範囲は、0.1～1 μ moles/mlである。

- [0092] 上記炭水化物としては、単糖類及び／又は2糖類が特に好ましい。これら炭水化物及び多価アルコールの例としては、グルコース、ガラクトース、マンノース、ラクトース、マルトース、マンニトール及びソルビトールが挙げられる。これらは、単独で用いても、併用してもよい。
- [0093] また、界面活性剤の好ましい例としては、ポリオキシエチレンソルビタンモノ～トリエステル、アルキルフェニルポリオキシエチレン、ナトリウムタウロコラート、ナトリウムコラート、及び多価アルコールエステルが挙げられる。このうち特に好ましいのは、ポリオキシエチレンソルビタンモノ～トリエステルであり、ここにおいてエステルとして特に好ましいのは、オレエート、ラウレート、ステアレート及びパルミテートである。これらは単独で用いても、併用してもよい。
- [0094] また、本発明の治療・予防剤は、更に好ましくは、0.03～0.09 Mの薬理学上許容される中性塩、例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム及び／又は塩化カルシウムを含有する。
- [0095] また、本発明の治療・予防剤は、更に好ましくは、0.002～0.05 Mの薬理学上許容される緩衝剤を含有することができる。好ましい緩衝剤の例としては、クエン酸ナトリウム、ナトリウムグリシネート、リン酸ナトリウム、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンが挙げられる。これらの緩衝剤は、単独で用いても、併用してもよい。
- [0096] さらに、本発明の治療・予防剤は、溶液状態で供給してもよい。しかし、ある期間保存する必要がある場合等のために、アンチセンスオリゴヌクレオチドを安定化して治療効果の低下を防止する目的で通常は凍結乾燥しておくことが好ましく、その場合は用時に溶解液(注射用蒸留水など)で再構成(reconstruction)して、即ち投与される液体状態にして用いればよい。従って、本発明の治療・予防剤は、各成分が所定の濃度範囲になるよう溶解液で再構成して使用するための、凍結乾燥された状態のものも包含する。凍結乾燥物の溶解性を促進する目的で、アルブミン、グリシン等の

アミノ酸を更に含有させておいてもよい。

[0097] 本発明の化合物または薬理学上許容されるその塩をヒトに投与する場合には、例えば、成人1日あたり約0.1～100 mg/kg(体重)、好ましくは1～50 mg/kg(体重)の投与量で、1回または数回に分けて経口投与または静注するとよいが、その投与量や投与回数は、疾患の種類、症状、年齢、投与方法などにより適宜変更しうる。

[0098] 糖尿病患者への本発明の化合物または薬理学上許容されるその塩の投与は、例えば、以下のようにして行うことができる。すなわち、本発明の化合物または薬理学上許容されるその塩を当業者に周知の方法で製造し、これを常法により滅菌処理し、例えば1200 μ g/mlの注射用溶液を調製する。この溶液を、患者静脈内にアンチセンスオリゴヌクレオチドの投与量が体重1kg当たり例えば20 mgとなるように、例えば輸液の形で点滴投与する。投与は、例えば1週間の間隔で4回繰り返し、その後も、皮下脂肪組織における11 β -HSD1の発現、血糖値、臨床症状を指標とした治療効果の確認をしながら、適宜この治療を繰り返す。治療効果があり明らかな副作用が見られない限り、治療を継続する。

[0099] 高血圧患者への本発明の化合物または薬理学上許容されるその塩の投与は、例えば、以下のようにして行うことができる。すなわち、本発明の化合物または薬理学上許容されるその塩を当業者に周知の方法で製造し、これを常法により滅菌処理し、例えば1200 μ g/mlの注射用溶液を調製する。この溶液を、患者静脈内にアンチセンスオリゴヌクレオチドの投与量が体重1kg当たり例えば20 mgとなるように、例えば輸液の形で点滴投与する。投与は、例えば1週間の間隔で4回繰り返し、その後も、皮下脂肪組織における11 β -HSD1の発現、血圧値、臨床症状を指標とした治療効果の確認をしながら、適宜この治療を繰り返す。治療効果があり明らかな副作用が見られない限り、治療を継続する。

実施例

[0100] 以下、本発明を実施例、参考例、試験例及び製剤例によって具体的に説明する。なお、これらの実施例等は、本発明を説明するためのものであつて、本発明の範囲を限定するものではない。

[0101] [実施例1]

HO-G^{e2}-T^{e2}-G^{e2}-5C^{e2}-C-A-G-C-A-A-T-G-T-A^{e2}-G^{e2}-T^{e2}-G^{e2t}-H (化合物(1))の合成

核酸自動合成機(パーキンエルマー社製 ABI model 394 DNA/RNA synthesizer)を用い、1 μ molスケールのプログラムに従って行った。各合成サイクルにおける溶媒、試薬は、ABI製またはプロリゴ製のものを用いた。ホスホロアミダイトの濃度は0.1 Mとした。非天然型のホスホロアミダイトは特許3420984号の実施例14(5'-O-ジメトキシトリチル-2'-O,4'-C-エチレン-6-N-ベンゾイルアデノシン-3'-O-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル)ホスホロアミダイト)、実施例27 (5'-O-ジメトキシトリチル-2'-O,4'-C-エチレン-2-N-イソブチリルグアノシン-3'-O-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル)ホスホロアミダイト)、実施例22 (5'-O-ジメトキシトリチル-2'-O,4'-C-エチレン-4-N-ベンゾイル-5-メチルシチジン-3'-O-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル)ホスホロアミダイト)、実施例9 (5'-O-ジメトキシトリチル-2'-O,4'-C-エチレン-5-メチルウリジン-3'-O-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル)ホスホロアミダイト)、の化合物を用いた。これらの非天然型のホスホロアミダイトの縮合時間は、15分とした。固相担体として、参考例1の化合物を1.2 μ mol用い、標記の化合物を合成した。

- [0102] 目的配列を有する保護されたオリゴヌクレオチド類縁体を濃アンモニア水で処理することによってオリゴマーを支持体から切り出すとともに、リン原子上の保護基シアノエチル基と核酸塩基上の保護基をはずした。溶媒を減圧下留去し、残った残渣を逆相HPLC(島津製作所製LC-10VP、カラム(Merck, Chromolith Performance RP-18e (4.6 \times 100mm))、A溶液:5%アセトニトリル、0.1M酢酸トリエチルアミン水溶液(TEAA), pH 7.0、B溶液:アセトニトリル、B%:10% \rightarrow 50%(10min, linear gradient);60 $^{\circ}$ C;2 ml/min;254 nm)にて精製し、ジメトキシトリチル基を有する目的物のピークを集めた。水を加え、減圧下留去することで、TEAAを除いた。80%酢酸水溶液(200 μ l)を加え、20分間放置することで、ジメトキシトリチル基の脱保護を行った。溶媒を留去したのち、残渣を1mlの水に溶解し、酢酸エチルで洗浄後、0.45 μ mのフィルター(MILLIPORE, Ultrafree-MC)でろ過し、目的とするオリゴヌクレオチドを得た。本化合物は、逆相HPLC(島津製作所製LC-10VP、カラム(Merck, Chromolith Performance RP-18e (4.6 \times 100mm))、A溶液:5%アセトニトリル、0.1M酢酸トリエチルアミン水溶液(TEAA), pH

7.0、B溶液:25%アセトニトリル、0.1M酢酸トリエチルアミン水溶液(TEAA), pH 7.0、B %:30%→80%(10min, linear gradient);60°C;2 ml/min;254 nm)で分析すると、5.96分に溶出された($26.2 A_{260}$ units) ($\lambda_{\max}(H_2O)=257\text{ nm}$)。また、化合物は、負イオンESI質量分析により同定した(計算値:5600.60、測定値:5600.95)。

[0103] 本化合物の塩基配列は、(Gene Bank accession No. NM_005525)のヌクレオチド番号 356-372に相補的な配列である。

[0104] [実施例2]

HO-G^{e2}-T^{e2}-G^{e2}-5C^{e2}-5C^{e2}-A-G-C-A-A-T-G-T-A^{e2}-G^{e2}-T^{e2}-G^{e2t}-H(化合物(2))
の合成

実施例1の化合物と同様に目的配列を有する実施例2の化合物を実施例1と同じC PG 1.2 μ molを用いて合成した。脱保護後、逆相HPLC(島津製作所製LC-10VP、カラム(Merck, Chromolith Performance RP-18e (4.6×100mm))、A溶液:5%アセトニトリル、0.1M酢酸トリエチルアミン水溶液(TEAA), pH 7.0、B溶液:アセトニトリル、B%:10%→50%(10min, linear gradient);60°C;2 ml/min;254 nm)にて精製し、ジメトキシトリチル基を有する目的物のピークを集めた。水を加え、減圧下留去することで、TEAAを除いた。80%酢酸水溶液(200 μ l)を加え、20分間放置することで、ジメトキシトリチル基の脱保護を行った。溶媒を留去したのち、残渣を1mlの水に溶解し、酢酸エチルで洗浄後、0.45 μ mのフィルター(MILLIPORE, Ultrafree-MC)でろ過し、目的とするオリゴヌクレオチドを得た。本化合物は、逆相HPLC(島津製作所製LC-10VP、カラム(Merck, Chromolith Performance RP-18e (4.6×100mm))、A溶液:5%アセトニトリル、0.1M酢酸トリエチルアミン水溶液(TEAA), pH 7.0、B溶液:25%アセトニトリル、0.1M酢酸トリエチルアミン水溶液(TEAA), pH 7.0、B%:30%→80%(10min, linear gradient);60°C;2 ml/min;254 nm)で分析すると、6.10分に溶出された($21.1 A_{260}$ units) ($\lambda_{\max}(H_2O)=257\text{ nm}$)。また、化合物は、負イオンESI質量分析により同定した(計算値:5656.85、測定値:5656.58)。

[0105] 本化合物の塩基配列は、(Gene Bank accession No. NM_005525)のヌクレオチド番号 356-372に相補的な配列である。

[0106] [実施例3]

$\text{HO-G}^{e2}-\text{T}^{e2}-\text{G}^{e2}-5\text{C}^{e2}-\text{C}-\text{A}-\text{G}-\text{C}-\text{A}-\text{A}-\text{T}-\text{G}-\text{T}^{e2}-\text{A}^{e2}-\text{G}^{e2}-\text{T}^{e2}-\text{G}^{e2t}-\text{H}$ (化合物(3))の合成

実施例1の化合物と同様に目的配列を有する実施例3の化合物を実施例1と同じC PG 1.2 μmol を用いて合成した。脱保護後、逆相HPLC (島津製作所製LC-10VP、カラム(Merck, Chromolith Performance RP-18e (4.6 \times 100mm))、A溶液:5%アセトニトリル、0.1M酢酸トリエチルアミン水溶液(TEAA), pH 7.0、B溶液:アセトニトリル、B%:10% \rightarrow 50%(10min, linear gradient)60 $^{\circ}\text{C}$; 2 ml/min; 254 nm)にて精製し、ジメキシトリチル基を有する目的物のピークを集めた。水を加え、減圧下留去することで、TEAAを除いた。80%酢酸水溶液(200 μl)を加え、20分間放置することで、ジメキシトリチル基の脱保護を行い、溶媒を留去したのち、残渣を1mlの水に溶解し、酢酸エチルで洗浄後、0.45 μm のフィルター(MILLIPORE, Ultrafree-MC)でろ過し、目的とするオリゴヌクレオチドを得た。逆相HPLC (島津製作所製LC-10VP、カラム(Merck, Chromolith Performance RP-18e (4.6 \times 100mm))、A溶液:5%アセトニトリル、0.1M酢酸トリエチルアミン水溶液(TEAA), pH 7.0、B溶液:25%アセトニトリル、0.1M酢酸トリエチルアミン水溶液(TEAA), pH 7.0、B%:30% \rightarrow 80%(10min, linear gradient); 60 $^{\circ}\text{C}$; 2 ml/min; 254 nm)で分析すると、5.79分に溶出された(64.4 A_{260} units) ($\lambda_{\text{max}}(\text{H}_2\text{O})=259\text{ nm}$)。また、本化合物は、負イオンESI質量分析により同定した(計算値:5642.83、測定値:5642.71)。

[0107] 本化合物の塩基配列は、(Gene Bank accession No. NM_005525)のヌクレオチド番号 356-372に相補的な配列である。

[0108] [実施例4]

$\text{HO-G}^{e2}-\text{T}^{e2}-\text{G}^{e2}-5\text{C}^{e2}-5\text{C}^{e2}-\text{A}-\text{G}-\text{C}-\text{A}-\text{A}-\text{T}-\text{G}-\text{T}^{e2}-\text{A}^{e2}-\text{G}^{e2}-\text{T}^{e2}-\text{G}^{e2t}-\text{H}$ (化合物(4))の合成

実施例1の化合物と同様に目的配列を有する実施例4の化合物を実施例1と同じC PG 1.2 μmol を用いて合成した。脱保護後、逆相HPLC (島津製作所製LC-10VP、カラム(Merck, Chromolith Performance RP-18e (4.6 \times 100mm))、A溶液:5%アセトニトリル、0.1M酢酸トリエチルアミン水溶液(TEAA), pH 7.0、B溶液:アセトニトリル、B%:10% \rightarrow 50%(10min, linear gradient)60 $^{\circ}\text{C}$; 2 ml/min; 254 nm)にて精製し、ジメキシトリ

チル基を有する目的物のピークを集めた。ジメトキシトリチル基の脱保護を行い、溶媒を留去したのち、残渣を1mlの水に溶解し、酢酸エチルで洗浄後、 $0.45\ \mu\text{m}$ のフィルター(MILLIPORE, Ultrafree-MC)でろ過し、目的とするオリゴヌクレオチドを得た。逆相HPLC(島津製作所製LC-10VP、カラム(Merck, Chromolith Performance RP-18e ($4.6 \times 100\text{mm}$))、A溶液:5%アセトニトリル、0.1M酢酸トリエチルアミン水溶液(TEA A), pH 7.0、B溶液:25%アセトニトリル、0.1M酢酸トリエチルアミン水溶液(TEAA), pH 7.0、B%:30%→80%(10min, linear gradient); 60°C ; 2 ml/min; 254 nm)で分析すると、5.82分に溶出された($58.6\ \text{A}_{260}\ \text{units}$) ($\lambda_{\text{max}}(\text{H}_2\text{O}) = 259\ \text{nm}$)。また、本化合物は、負イオンESI質量分析により同定した(計算値:5698.89、測定値:5698.78)。

[0109] 本化合物の塩基配列は、(Gene Bank accession No. NM_005525)のヌクレオチド番号 356-372に相補的な配列である。

[0110] [実施例5]

$\text{HO}-\text{G}^{\text{e2s}}-\text{T}^{\text{e2s}}-\text{G}^{\text{e2s}}-5\text{C}^{\text{e2s}}-5\text{C}^{\text{e2s}}-\text{A}^{\text{s}}-\text{G}^{\text{s}}-\text{C}^{\text{s}}-\text{A}^{\text{s}}-\text{A}^{\text{s}}-\text{T}^{\text{s}}-\text{G}^{\text{s}}-\text{T}^{\text{e2s}}-\text{A}^{\text{e2s}}-\text{G}^{\text{e2s}}-\text{T}^{\text{e2s}}-\text{G}^{\text{e2t}}-\text{H}$ (化合物(34))の合成

核酸自動合成機(パーキンエルマー社製 ABI model 394 DNA/RNA synthesizer)を用い、 $10\ \mu\text{mol}$ スケールのプログラムを用いて目的配列を有する実施例5の化合物を合成した。各合成サイクルにおける溶媒、試薬は、ABI製またはプロリゴ製のものを用いた。ホスホロアミダイトの濃度は0.1 Mとした。非天然型のホスホロアミダイトは、実施例1と同様に特許3420984号に記載のものを用いた。また、硫化反応は、キサントニド(東京化成)を0.02 Mピリジン/アセトニトリル(1/9)溶液として用いた。参考例1記載の化合物($31\ \mu\text{mol}$)を固相担体として用い、DMTr基をトリクロロ酢酸によって脱保護し、その5'-水酸基に天然型ホスホロアミダイトユニット及び非天然型ホスホロアミダイトユニットを用いて縮合反応を繰り返し行い、標記の化合物を合成した。

[0111] 合成サイクルは以下のとおりである。

[0112] 1) Detritylation; トリクロロ酢酸/ジクロロメタン; 180 sec。

[0113] 2) Coupling; ホスホロアミダイト/テトラゾール/アセトニトリル; A^{s} , G^{s} , C^{s} , T^{s} 部分を合成する際は、天然型DNAホスホロアミダイト(プロリゴ製)を用い、それらを縮合させる合成サイクル時、送液時間30 sec, 縮合時間40 secとした。また、 A^{e2s} , G^{e2s} , 5C^{e2s} , T^{e2s}

^{e2s}部分を合成する際は、実施例1に記載の非天然型のホスホロアミダイトを用い、それらを縮合させる合成サイクル時、送液時間20 sec, 縮合時間15 minとした。

[0114] 3) Capping; 1-メチルイミダゾール/テトラヒドロフラン、無水酢酸/ピリジン/テトラヒドロフラン; 65 sec。

[0115] 4) Sulfurization; キサンタンヒドリド/ピリジン/アセトニトリル; 15 min。

[0116] 目的配列を有する保護されたオリゴヌクレオチド類縁体を5'-DMTr基をつけたまま合成した後、濃アンモニア水で処理すること(60℃、約5時間)によってオリゴマーを支持体から切り出すとともに、リン原子上の保護基シアノエチル基と核酸塩基上の保護基をはずした。溶媒を減圧下留去し、残った残渣を逆相HPLC(島津製作所製LC-10VP、カラム(GL Science Inc., Inertsil PREP-ODS (30×250 mm))、A溶液:5%アセトニトリル、0.1M酢酸トリエチルアミン水溶液(TEAA), pH 7.0、B溶液:60%アセトニトリル、0.1M酢酸トリエチルアミン水溶液(TEAA)、B%:15%→60%(20 min, linear gradient); 40℃; 20 mL/min; 254 nm)にて精製し、18.04分に溶出する分画を集めた。溶媒を留去した後、80%酢酸水を加え20分間放置しDMTr基を除去した。溶媒を留去した後、水約30 mLを加え、水層を酢酸エチル約30 mLで3回洗浄し、水溶液留去した。凍結乾燥を2回繰り返し脱塩した。得られた脱塩物を、イオン交換樹脂ダウエックス(ザ・ダウ・ケミカル・カンパニー製, 50W-X8, 100-200 MESH)ピリジンフォームによりピリジン塩とした後、続いてダウエックスナトリウムフォームでナトリウム塩とし、溶媒留去後目的化合物を得た(48.7 mg) ($\lambda_{\max}(\text{H}_2\text{O})=258 \text{ nm}$)。

[0117] 本化合物はイオン交換HPLC(カラムTosoh TSK-gel DEAE-5PW(7.5×75 mm)); A液:20%アセトニトリル、B液:20%アセトニトリル、67mMリン酸バッファー(pH6.8), 1.5M KBr, gradient:B液30%→70%(10 min, linear gradient); 60℃; 2 mL/min)で分析すると5.40分に溶出された。本化合物は、負イオンESI質量分析により同定した(計算値:5955.96、測定値:5955.97)。

[0118] 本化合物の塩基配列は、(Gene Bank accession No. NM_005525)のヌクレオチド番号 356-372に相補的な配列である。

[0119] [参考例1]

2'-O,4'-C-エチレン-N-イソブチルグアノシン結合-CPGの合成

特許3420984号の実施例26の化合物5'-O-ジメキシトリチル-2'-O,4'-C-エチレン-N-イソブチルグアノシン(6.10 g, 8.93 mmol)を窒素気流下、無水ジクロロメタン(43 mL)に溶かし、この溶液に、コハク酸無水物(1.10 g, 11.0 mmol)、4-ジメチルアミノピリジン(1.35 mg, 11.0 mmol)を加え、室温で2時間攪拌した。反応液を0.5 M リン酸カリウム水溶液(pH 5.0)で洗浄した後、溶媒を減圧下留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて精製(ジクロロメタン:メタノール=9:1(V/V))し、無色アモルファス状化合物(7.05 g, quant.)を得た。このうち2.5 gを無水ジメチルホルムアミド(115 mL)に溶解し、この溶液に、O-(ベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェイト(1.23 g, 3.24 mmol)、イソプロピルメチルアミン705 μ L(4.05 mmol)、アミノプロピル-コントロールドポアグラス(558オングストローム、粒子サイズ:120/200メッシュ、CPG Inc製)10 gを加え、室温で15時間振盪した。CPGをろ過し、さらにメタノール及びジクロロメタンを用いて順に洗浄し、CPGにアプライドバイオシステムズ社DNA合成機ABI392用キャッピング試薬2種(無水酢酸/ピリジン/テトラヒドロフラン及び1-メチルイミダゾール/テトラヒドロフラン)をそれぞれ20 mL加え、5分間放置した。CPGをろ過し、メタノール及びジクロロメタンを用いて順に洗浄し、減圧乾燥し、目的物(約11 g、ジメキシトリチル基の導入量 85 μ mol/g)を得た。

[0120] [参考例2]

HO-T^{e2s}-G^{e2s}-5C^{e2s}-G^{e2s}-T^s-T^s-C^s-A^s-C^s-A^s-G^s-A^s-G^s-G^{e2s}-A^{e2s}-G^{e2s}-G^{e2t}-Hの合成

11 β -HSD1を標的としない非特異的配列を有する配列を有する参考例2の化合物を参考例1記載のCPG 31 μ molを用いて、実施例5の化合物と同様に合成した。脱保護後、逆相HPLC(島津製作所製LC-10VP、カラム(GL Science Inc., Inertsil PR EP-ODS (30 \times 250 mm))、A溶液:5%アセトニトリル、0.1M酢酸トリエチルアミン水溶液(TEAA), pH 7.0、B溶液:60%アセトニトリル、0.1M酢酸トリエチルアミン水溶液(TEAA)、B%:15% \rightarrow 60%(20 min, linear gradient);40 $^{\circ}$ C;20 mL/min;254 nm)にて精製し、ジメキシトリチル基の結合した化合物を含む分画を集めた。ジメキシトリチル基の脱保護を行い、分液し操作を行った。イオン交換樹脂ダウエックス(ザ・ダウ・ケミカル・カンパニー製, 50W-X8, 100-200 MESH)ピリジンフォームによりピリジン塩とした後、続

いてダウエックスナトリウムフォームでナトリウム塩とし、溶媒留去後目的化合物を得た (34.2 mg) ($\lambda_{\text{max}}(\text{H}_2\text{O})=259 \text{ nm}$)。また、最終的に精製した本化合物は、イオン交換HPLC(島津製作所製LC-10VP、カラム(東ソー株式会社, DEAE-5PW (10×50mm))、A溶液:20%アセトニトリル水溶液、B溶液:20%アセトニトリル 67mMリン酸バッファー 1.5M 臭化カリウム水溶液 pH6.8 B%:30%→70%(10min, linear gradient);60°C;2 ml/min;254 nm)で分析すると、5.21分に溶出された。また、本化合物は、負イオンESI質量分析により同定した(計算値:5882.87、測定値:5882.22)。

[0121] [試験例1] アンチセンスオリゴヌクレオチドによる11 β -HSD1 mRNA抑制の評価

ヒト腎臓由来の細胞株である293細胞(ATCC(American Type Culture Collection)から購入)に、ヒト11 β -HSD1タンパク質をコードする領域の遺伝子を、レトロウイルスシステム(Retro-X system、ベクトンディッキンソン社製)を用いて導入した。遺伝子導入した細胞をピューロマイシン(和光純薬工業社製)1 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で1週間処理し、導入遺伝子を安定に高発現する細胞株を選択した。得られた細胞株に11 β -HSD1に対する実施例のアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入し、その後細胞内11 β -HSD1mRNAを定量することにより、実施例の化合物によるmRNA抑制効果を評価した。

[0122] まず、11 β -HSD1mRNA配列に対し相補的な配列を持った実施例の化合物を、ヒト11 β -HSD1過剰発現細胞株に対して導入した。その際、担体としてEPEI(フナコシ社)を使用した。導入から48時間経過した細胞から全RNAの抽出を行った。具体的にはRNeasy mini(キアゲン社製)を使用し、添付プロトコールに従って細胞の溶解及び全RNAの精製を行った。得られた全RNAをDNAfree kit(アンピオン社製)を定法通り使用する事によって処理し、ゲノムDNAの消化を行った。この全RNA溶液を0.5 μl ずつサーマルサイクラー用マイクロチューブに分注し、TaqMan逆転写キット(アプライドバイオシステムズ社製)の10x反応バッファー2.5 μl 、10mM dNTP混合液5 μl 、25mM 硫酸マグネシウム溶液5.5 μl 、オリゴ-(dT)-プライマー0.5 μl 、RNase阻害剤0.5 μl 、逆転写酵素0.5 μl を加え、サーマルサイクラー(DNAエンジンPTC-200、MJリサーチ社製)を使用して25°Cで10分間、42°Cで30分間、95°Cで5分間保温し、一本鎖cDNAの合成を行った。反応終了後、100 μl のRNaseを含まない純水を加え、定量用一本鎖cDNA溶液とした。

[0123] 一方、ヒト11 β -HSD1定量TaqMan PCRの反応に用いるプライマーとして、下記の配列:

5'-CAGCCATGAAGGCAGTTTCTG-3' (配列番号4); 及び 5'-TCCCCCTTTGATGATCTCCAG-3' (配列番号5)

を有するオリゴヌクレオチド(インビトロジェン社製)を用いた。

[0124] また、TaqMan PCRの反応に用いるプローブとして、下記の配列:

5'-TGCAAGCAGCTCCAAAGGAGGAATG-3' (配列番号6)

を有し、その5'末端にレポーター色素Fam, 3'末端にレポーター消光体のTamraを結合したオリゴヌクレオチド(TaqMan Fluorescent Probe, アプライドバイオシステムズジャパン社製)を用いた。

[0125] また11 β -HSD1の発現量の標準化をはかる目的よりリボソームタンパク質、36B4のmRNA定量を行うこととし、ヒト36B4のプライマーとして下記の配列:

5'-TCATCCAGCAGGTGTTCTGA-3' (配列番号7); 及び5'-GCGAGAATGCAGAGTTTCCTC-3' (配列番号8)

を有するオリゴヌクレオチド(インビトロジェン社製)を用いた。また、ヒト36B4のプローブとして、下記の配列:5'-ATGGCAGCATCTACAACCCTGAAGTGCT-3' (配列番号9) を有し、その5'末端にレポーター色素Fam, 3'末端にレポーター消光体のTamraを結合したオリゴヌクレオチド(TaqMan Fluorescent Probe, アプライドバイオシステムズジャパン社製)を用いた。

[0126] これら調製した試料を用いてTaqMan PCR法による11 β -HSD1の発現量の定量を行った。

[0127] PCR反応はMicroAmp Optical 96-well Reaction Plate (アプライドバイオシステムズジャパン社製)上で行った。反応溶液の組成は1ウェル中、調製したTaqMan PCR用鋳型一本鎖cDNA溶液2.5 μ l, TaqManPCR用プライマー(50 pmol/ μ l)を正方向側、逆方向側ともに

0.1 μ l(最終濃度200 nM), TaqManPCR用プローブ (6.5 μ M) 0.75 μ l(最終濃度195 nM), PCR増幅用混合液(TaqMan universal PCR master mix: アプライドバイオシステムズジャパン社製) 13.75 μ l、超純水10.3 μ lとした。この際、検量線作成用一本

鎖cDNA溶液は原液濃度を便宜的に625とし、以降5倍希釈を繰り返して濃度625, 125, 25, 5, 1の5段階の希釈系列とした。PCR反応はTaqMan PCR専用サーマルサイクラー・検出器(ABI 7900: アプライドバイオシステムズジャパン社製)を用いて行った。反応は、50°Cで2分間、95°Cで10分間保温の後、95°Cで15秒間、60°Cで1分間の反応を40回繰り返し、1サイクル毎にレポーター色素の発光量を測定した。各サイクル毎のレポーター色素の発光量から36B4、11 β -HSD1の増幅曲線を作成した。検量線作成用一本鎖cDNA溶液の希釈系列の増幅曲線から横軸に濃度、縦軸にサイクル数をとった検量線を作成し、各発現定量用サンプルについてはその対数増幅期において任意に設定した一定の発光量を超えたサイクル数を検量線上にプロットし、相対的な発現量を算出した。11 β -HSD1の発現量は同一サンプルにおける36B4の発現量の値で補正を行った。その結果、図5に示したように11 β -HSD1の発現量は実施例1の化合物を用いた場合、実施例1の化合物を導入しなかったもの(図5中、mock)に比べ、30%程度のmRNA抑制効果を示した。

[0128] [試験例2] in vivoでの皮下脂肪の抑制評価

雄性db/dbマウス(日本クレアより購入)は、5週齢で購入し、2日間の馴化期間において実験に供した。馴化および試験期間にわたり1ケージあたり5匹で飼育され、飲水および摂餌(F2、船橋農場)は自由摂取とした。飼育および投与期間中の動物は、実験動物管理室により管理されている実験動物エリア内で管理された。各群n=5となるように動物を振り分け、11 β -HSD-1に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド(実施例5の化合物)又はスクランブル配列を有するオリゴヌクレオチド(参考例2の化合物)を腹腔内投与した。各オリゴヌクレオチドは、1ml / 100 g 体重となる投与量で最終投与用量を与えるように生理食塩水で所定濃度に溶解したストック溶液を投与直前に調製し、上記投与量で毎週2回計3週間腹腔に注射した。コントロール群は同投与量の生理食塩水を投与した。餌・一般行動は毎日最低1回チェックした。21日目に断頭によりマウスを屠殺して直ちに皮下脂肪組織を摘出し、液体窒素にて凍結した後-80°Cに保存した。mRNA発現抑制作用を評価する目的でこれら組織から全RNAの抽出を行った。具体的には、皮下脂肪組織1gにTRIzol溶液(インビトロジェン社製)5mlを加え、ポリロンホモジナイザー(キネマティカ社製)を用いて2万回転、1分間破碎し

た。破碎液を2500回転、5分間遠心分離して上清を分取し、クロロホルム(和光純薬工業製)1.5mlを添加して15秒間激しく混和、室温にて3分間静置の後2500回転、30分間の遠心分離を行い、粗精製全RNAをペレットの状態を得た。次に、RNeasy mini(キアゲン社製)を使用し、添付プロトコールに従って全RNAの精製を行った。得られた粗精製全RNAをbuffer RLT(キアゲン社製)に終濃度1%で2-メルカプトエタノール(シグマ社製)を添加した溶液350 μ lで溶解し、等量の70%EtOH(和光純薬工業製)を加え混和した。この溶液から、添付プロトコールに従って全RNAを精製した。得られた全RNA溶液をDNAfree kit(アンピオン社製)を定法通り使用する事によって処理し、ゲノムDNAの消化を行った。この全RNAを0.5 μ gずつサーマルサイクラー用マイクロチューブに分注し、TaqMan逆転写キット(アプライドバイオシステムズ社製)の10x反応バッファー2.5 μ l、10mM dNTP混合液5 μ l、25mM硫酸マグネシウム溶液5.5 μ l、オリゴ-(dT)-プライマー0.5 μ l、RNase阻害剤0.5 μ l、逆転写酵素0.5 μ lを加え、サーマルサイクラー(DNAエンジンPTC-200、MJリサーチ社製)を使用して25°Cで10分間、42°Cで30分間、95°Cで5分間保温し、一本鎖cDNAの合成を行った。反応終了後、100 μ lのRNaseを含まない純水を加え、定量用一本鎖cDNA溶液とした。

[0129] 一方、マウス11 β -HSD1定量TaqMan PCRの反応に用いるプライマーとして、下記の配列:

5'-CCTAGCTTCTCCCAAGGAGG-3' (配列番号10) ; 及び 5'-TCGCTTTTGCGTAGAGCTGT-3' (配列番号11)

を有するオリゴヌクレオチド(インビトロジェン社製)を用いた。また、TaqMan PCRの反応に用いるプローブとして、下記の配列:

5'-TGCGCCCTGGAGATCATCAAAGG-3' (配列番号12)

を有し、その5'末端にレポーター色素Fam, 3'末端にレポーター消光体のTamraを結合したオリゴヌクレオチド(TaqMan Fluorescent Probe, アプライドバイオシステムズジャパン社製)を用いた。

[0130] また11 β -HSD1の発現量の標準化をはかる目的よりボソームタンパク質、36B4のmRNA定量を行うこととし、マウス36B4のプライマーとして下記の配列:

5'-GCTCCAAGCAGATGCAGCA-3' (配列番号13) ; 及び5'-CCGGATGTGAGG

CAGCAG-3' (配列番号14)

を有するオリゴヌクレオチド(インビトロジェン社製)を用いた。また、マウス36B4のプロープとして、下記の配列:

5'-CAAGAACACCATGATGCGCAAGGC -3' (配列番号15)

を有し、その5'末端にレポーター色素Fam, 3'末端にレポーター消光体のTamraを結合したオリゴヌクレオチド(TaqMan Fluorescent Probe, アプライドバイオシステムズジャパン社製)を用いた。

[0131] これら調製した試料を用いてTaqMan PCR法による11 β -HSD1の発現量の定量を行った。

[0132] PCR反応はMicroAmp Optical 96-well Reaction Plate (アプライドバイオシステムズジャパン社製)上で行った。反応溶液の組成は1ウェル中、調製したTaqMan PCR用鋳型一本鎖cDNA溶液2.5 μ l, TaqManPCR用プライマー(50 pmol/ μ l)を正方向側、逆方向側ともに

0.1 μ l(最終濃度200 nM), TaqManPCR用プローブ (6.5 μ M) 0.75 μ l(最終濃度195 nM), PCR増幅用混合液(TaqMan universal PCR master mix : アプライドバイオシステムズジャパン社製) 13.75 μ l, 超純水10.3 μ lとした。この際、検量線作成用一本鎖cDNA溶液は原液濃度を便宜的に625とし、以降5倍希釈を繰り返して濃度625, 125, 25, 5, 1の5段階の希釈系列とした。PCR反応はTaqMan PCR専用サーマルサイクラー・検出器(ABI 7900 : アプライドバイオシステムズジャパン社製)を用いて行った。反応は、50°Cで2分間、95°Cで10分間保温の後、95°Cで15秒間、60°Cで1分間の反応を40回繰り返し、1サイクル毎にレポーター色素の発光量を測定した。各サイクル毎のレポーター色素の発光量から36B4、11 β -HSD1の増幅曲線を作成した。検量線作成用一本鎖cDNA溶液の希釈系列の増幅曲線から横軸に濃度、縦軸にサイクル数をとった検量線を作成し、各発現定量用サンプルについてはその対数増幅期において任意に設定した一定の発光量を超えたサイクル数を検量線上にプロットし、相対的な発現量を算出した。11 β -HSD1の発現量は同一サンプルにおける36B4の発現量の値で補正を行った。その結果、図6に示したように11 β -HSD1の発現量は実施例5の化合物を用いた場合、アンチセンスオリゴヌクレオチドを導入しなかったもの

(図6中、control)及び11 β -HSD1を標的としない非特異的配列を有するオリゴヌクレオチド(参考例2の化合物)を投与した群に比べ、40%程度のmRNA抑制効果を示した。

[0133] (製剤例1)

ソフトカプセル剤

消化性油状物、例えば、大豆油、綿実油又はオリーブ油中に入れた、実施例1の化合物の混合物を調製し、正置換ポンプでゼラチン中に注入して、100 mgの活性成分を含有するソフトカプセルを得、洗浄後、乾燥する。

[0134] (製剤例2)

錠剤

常法に従って、100 mgの実施例2の化合物、0.2 mgのコロイド性二酸化珪素、5 mgのステアリン酸マグネシウム、275 mgの微結晶性セルロース、11 mgのデンプン及び98.8 mgのラクトースを用いて製造する。

尚、所望により、剤皮を塗布する。

[0135] (製剤例3)

懸濁剤

5 mL中に、100 mgの実施例1の化合物、100 mgのナトリウムカルボキシ基メチルセルロース、5 mgの安息香酸ナトリウム、1.0 gのソルビトール溶液(日本薬局方)及び0.025 mLのバニリンを含有するように製造する。

[0136] (製剤例4)

注射剤

1.5重量%の実施例2の化合物を、10容量%のプロピレングリコール中で攪拌し、次いで、注射用水で一定容量にした後、滅菌して製造した。

[0137] (製剤例5)

注射剤

N-(α -トリメチルアンモニオアセチル)- γ -ジドデシル-D-グルタメート クロリド(最終濃度30 nmol/mL)、ジラウロイルホスファチジルコリン(最終濃度60 nmol/mL)、ジオレイルホスファチジルエタノールアミン(最終濃度60 nmol/mL)及び1.5重量%

の実施例2の化合物を、10容量%のプロピレングリコール中で攪拌し、次いで、注射用水を一定容量にした後、滅菌して製造した。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

産業上の利用可能性

- [0138] 本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド及び薬理学上許容されるその塩、並びに本発明の化合物及び薬理学上許容されるその塩は、11 β -HSD1の働きを抑制することができるので、糖尿病、高血圧等の代謝性疾患の治療・予防に有効である。

配列表フリーテキスト

- [0139] <配列番号1>

配列番号1は、ヒト11 β -HSD1の成熟mRNAの塩基配列(EMBL/GenBankに登録されているAccession No. NM_05525)を示す。

<配列番号2>

配列番号2は、ヒト11 β -HSD1のアミノ酸配列(配列番号1の塩基配列を有するmRNAがコードするもの)を示す。

<配列番号3>

配列番号3は、ヒト11 β -HSD1のDNA配列(EMBL/GenBankに登録されているAccession No. NM_005525)のヌクレオチド番号 356-372に相補的な配列である。

<配列番号4>

配列番号4は、試験例1で用いたヒト11 β -HSD1定量TaqMan PCRの反応に用いるプライマーの塩基配列を示す。

<配列番号5>

配列番号5は、試験例1で用いたヒト11 β -HSD1定量TaqMan PCRの反応に用いるプライマーの塩基配列を示す。

<配列番号6>

配列番号6は、試験例1で用いたヒト11 β -HSD1定量TaqMan PCRの反応に用いるプローブの塩基配列を示す。

<配列番号7>

配列番号7は、試験例1で用いたヒト36B4mRNA定量TaqMan PCRの反応に用いるプライマーの塩基配列を示す。

<配列番号8>

配列番号8は、試験例1で用いたヒト36B4mRNA定量TaqMan PCRの反応に用いるプライマーの塩基配列を示す。

<配列番号9>

配列番号9は、試験例1で用いたヒト36B4mRNA定量TaqMan PCRの反応に用いるプローブの塩基配列を示す。

<配列番号10>

配列番号10は、試験例2で用いたマウス11 β -HSD1定量TaqMan PCRの反応に用いるプライマーの塩基配列を示す。

<配列番号11>

配列番号11は、試験例2で用いたマウス11 β -HSD1定量TaqMan PCRの反応に用いるプライマーの塩基配列を示す。

<配列番号12>

配列番号12は、試験例2で用いたマウス11 β -HSD1定量TaqMan PCRの反応に用いるプローブの塩基配列を示す。

<配列番号13>

配列番号13は、試験例2で用いたマウス36B4mRNA定量TaqMan PCRの反応に用いるプライマーの塩基配列を示す。

<配列番号14>

配列番号14は、試験例2で用いたマウス36B4mRNA定量TaqMan PCRの反応に用いるプライマーの塩基配列を示す。

<配列番号15>

配列番号15は、試験例2で用いたマウス36B4mRNA定量TaqMan PCRの反応に用いるプローブの塩基配列を示す。

<配列番号16>

配列番号16は、ヒト11 β -HSD1の成熟mRNAの塩基配列(EMBL/GenBankに登録

されているAccession No. NM_181755)を示す。

<配列番号17>

配列番号17は、ヒト11 β -HSD1のアミノ酸配列(配列番号16の塩基配列を有するmRNAがコードするもの)を示す。

<配列番号18>

配列番号22は、マウス11 β -HSD1の成熟mRNAの塩基配列(EMBL/GenBankに登録されているAccession No. NM_008288)を示す。

<配列番号19>

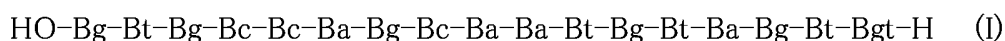
配列番号19は、マウス11 β -HSD1のアミノ酸配列(配列番号24の塩基配列を有するmRNAがコードするもの)を示す。

<配列番号20>

配列番号20は、US20030198965に開示されているアンチセンス分子の塩基配列を示す。

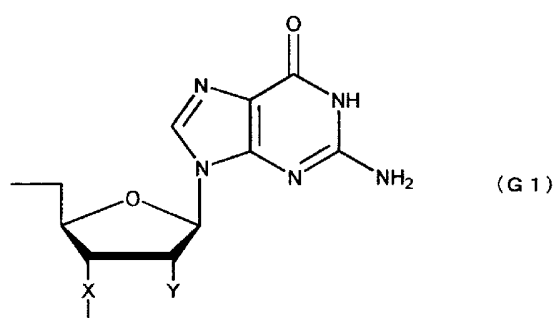
請求の範囲

- [1] 11 β -水酸化ステロイド脱水素酵素1型をコードする核酸分子を標的とする塩基数15～19個のアンチセンスオリゴヌクレオチドであって、該アンチセンスオリゴヌクレオチドを構成する糖の少なくとも1個が2'-O,4'-C-アルキレン化、2'-O-アルキル化、2'-O-アルケニル化又は2'-O-アルキニル化されている前記アンチセンスオリゴヌクレオチド又は薬理学上許容されるその塩。
- [2] 前記11 β -水酸化ステロイド脱水素酵素1型をコードする核酸分子が配列番号1の塩基配列を有する請求項1記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド又は薬理学上許容されるその塩。
- [3] 前記11 β -水酸化ステロイド脱水素酵素1型が配列番号2のアミノ酸配列を有する請求項1記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド又は薬理学上許容されるその塩。
- [4] 配列番号3の塩基配列を有する請求項1～3のいずれかに記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド又は薬理学上許容されるその塩。
- [5] さらに、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドを構成する塩基の少なくとも1個が修飾されている請求項1～4のいずれかに記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド又は薬理学上許容されるその塩。
- [6] 前記修飾塩基が5-メチルシトシンである請求項5記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド又は薬理学上許容されるその塩。
- [7] さらに、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドを構成するリン酸ジエステル結合の少なくとも1個が修飾されている請求項1～6のいずれかに記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド又は薬理学上許容されるその塩。
- [8] 前記修飾リン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合である請求項7記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド又は薬理学上許容されるその塩。
- [9] 連続した少なくとも5個のヌクレオチドを構成する糖がすべてデオキシリボースである請求項1～8のいずれかに記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド又は薬理学上許容されるその塩。
- [10] 下記の一般式(I)で表される化合物又は薬理学上許容されるその塩。

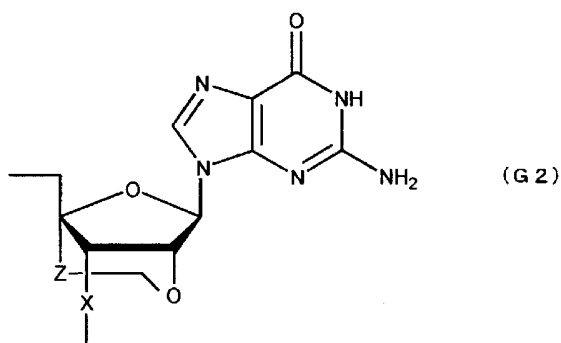


(式中、Bgは下記の式(G1)又は(G2)で表される基であり、Btは下記の式(T1)又は(T2)で表される基であり、Bcは下記の式(C1)、(C2)、(C3)又は(C4)で表される基であり、Baは下記の式(A1)又は(A2)で表される基であり、Bgtは下記の式(GT1)又は(GT2)で表される基であるが、ただし、一般式(I)で表される化合物を構成する糖のうち少なくとも1個は2'-O,4'-C-アルキレン化、2'-O-アルキル化、2'-O-アルケニル化又は2'-O-アルキニル化されている。)

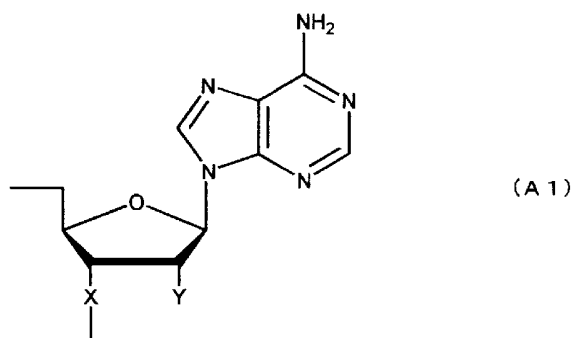
[化1]



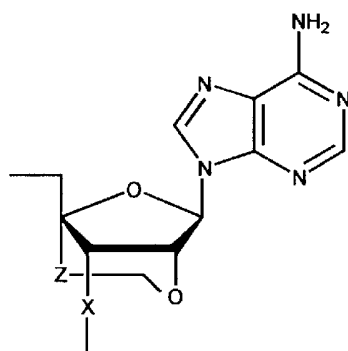
[化2]



[化3]

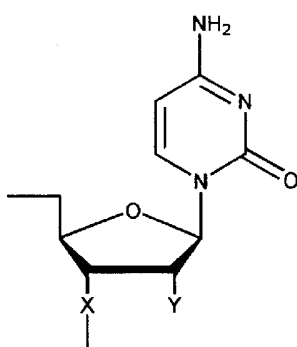


[化4]



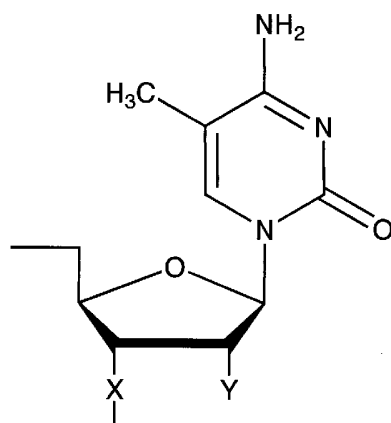
(A 2)

[化5]



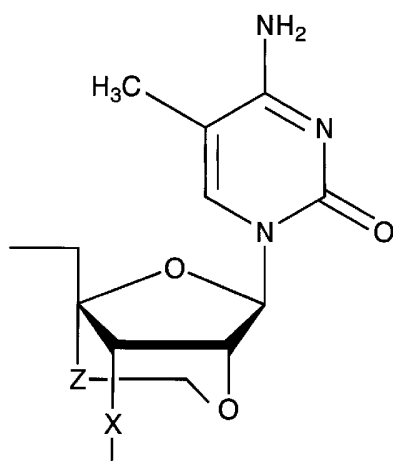
(C 1)

[化6]



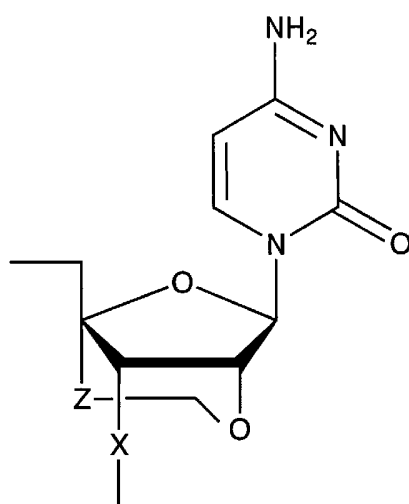
(C 2)

[化7]



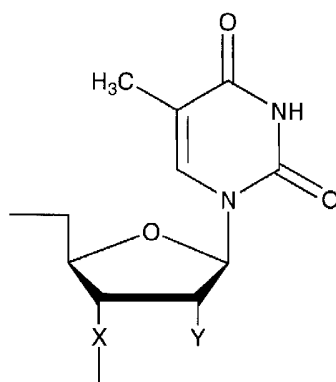
(C 3)

[化8]



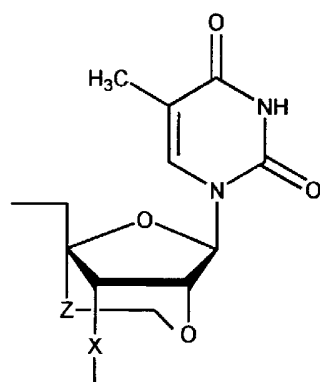
(C 4)

[化9]



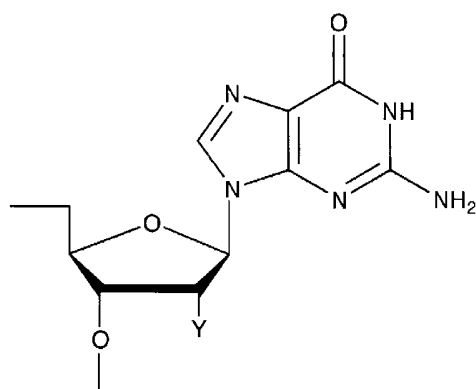
(T 1)

[化10]



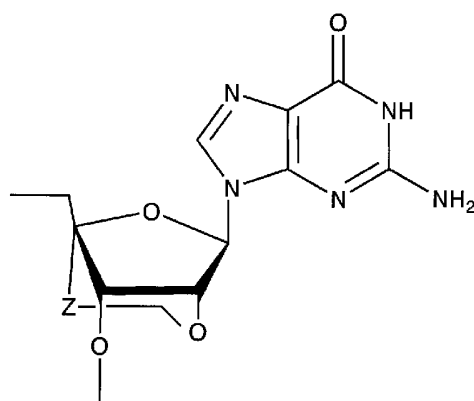
(T2)

[化11]



(GT1)

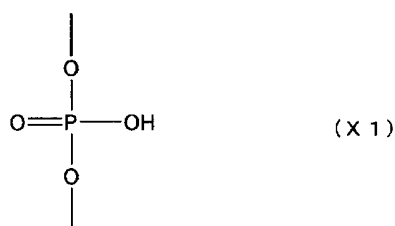
[化12]



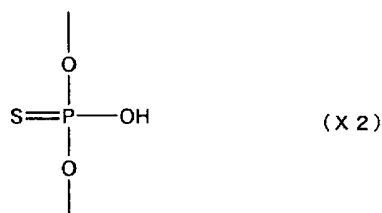
(GT2)

(式中、Xは、それぞれ、独立に、下記の式(X1)又は式(X2)で表される基であり、

[化13]

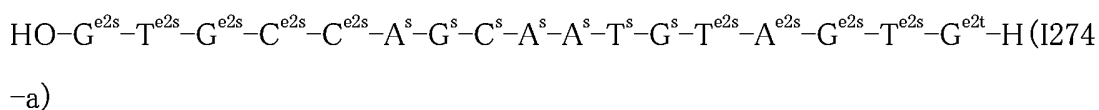
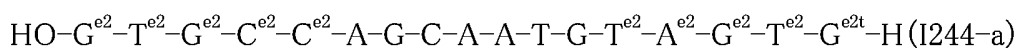
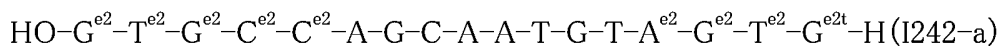
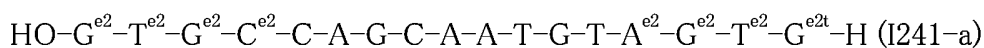


[化14]



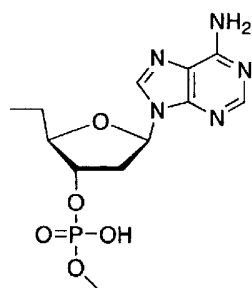
Yは、それぞれ、独立に、水素原子、水酸基又は炭素数1～6のアルコキシ、アルケニルオキシ若しくはアルキニルオキシ基であり、Zは、それぞれ、独立に、単結合又は炭素数1～5個のアルキレン基である。)

- [11] 下記の式(I241-a)～(I244-a)又は(I274-a)のいずれかで表される請求項10記載の化合物又は薬理学上許容されるその塩。

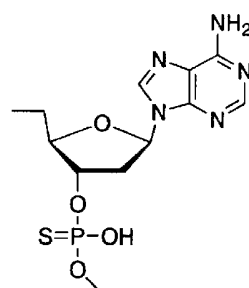
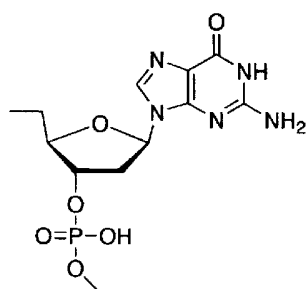


(式中、A、A^s、A^{e2}、A^{e2s}、G、G^s、G^{e2}、G^{e2s}、G^{e2t}、T、T^s、T^{e2}、T^{e2s}、C、C^s、C^{e2}及びC^{e2s}は、それぞれ、下記の式(A)、(A^s)、(A^{e2})、(A^{e2s})、(G)、(G^s)、(G^{e2})、(G^{e2s})、(G^{e2t})、(T)、(T^s)、(T^{e2})、(T^{e2s})、(C)、(C^s)、(C^{e2})及び(C^{e2s})で表される基である。)

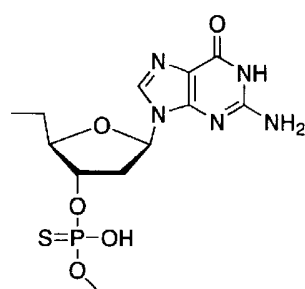
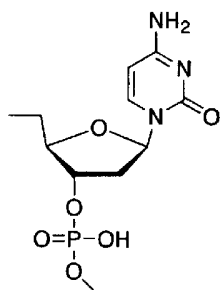
[化15]



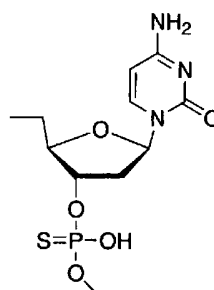
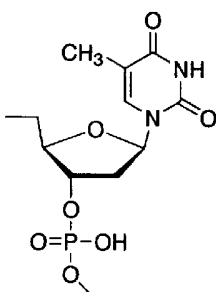
(A)

(A^S)

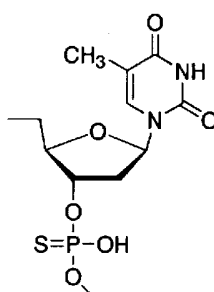
(G)

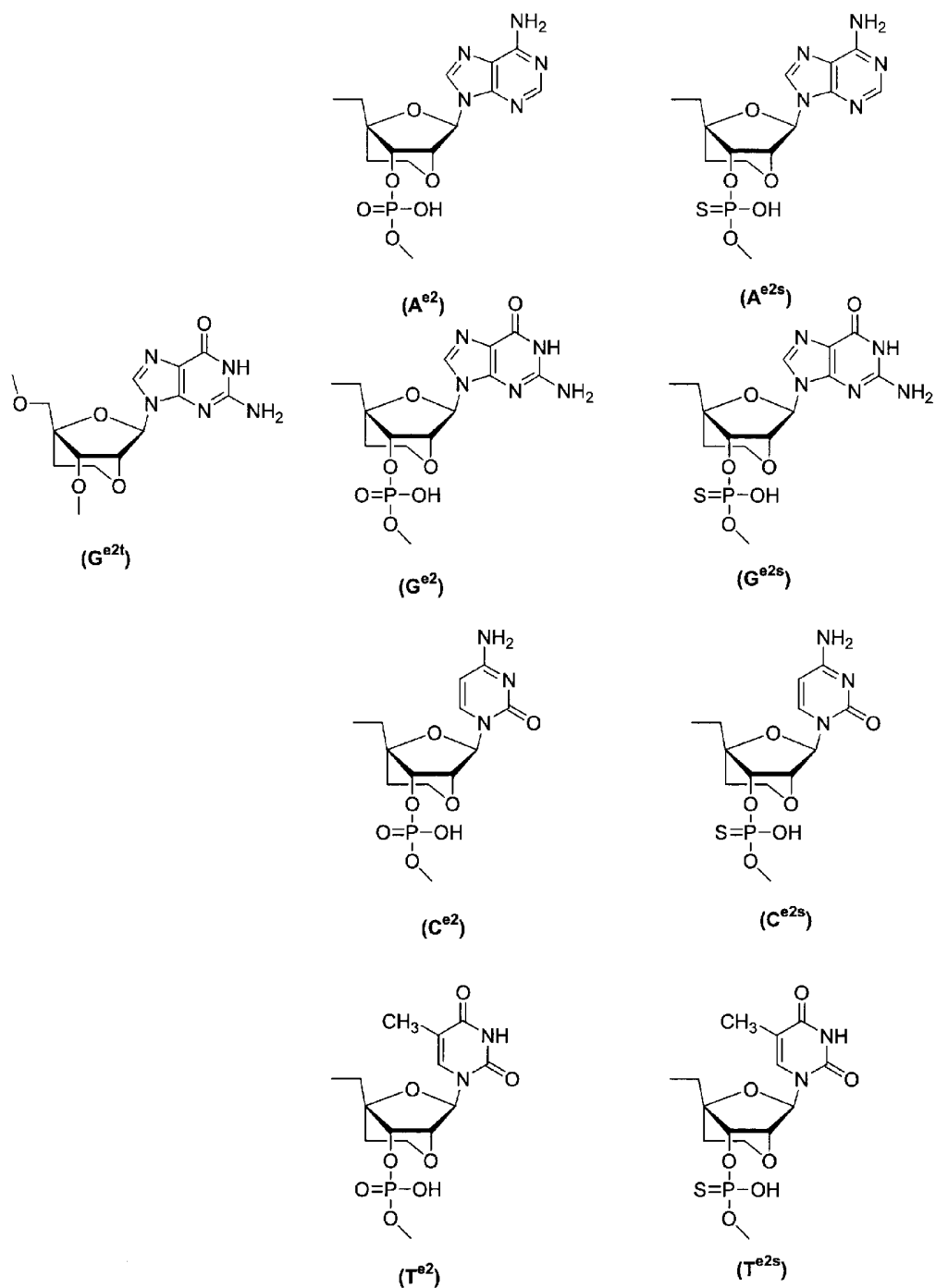
(G^S)

(C)

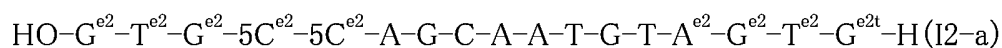
(C^S)

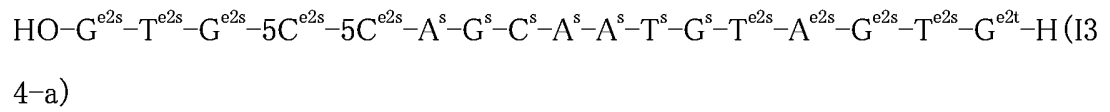
(T)

(T^S)



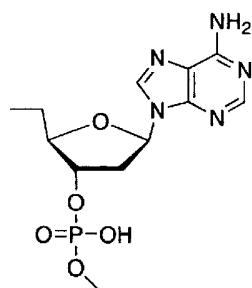
[12] 下記の式(I1-a)～(I4-a)又は(I34-a)のいずれかで表される請求項10記載の化合物又は薬理学上許容されるその塩。



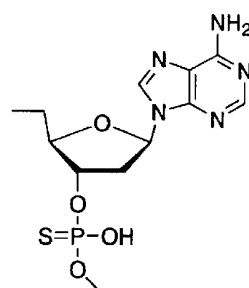
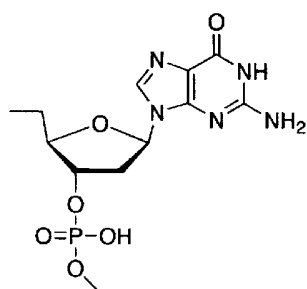


(式中、 A 、 A^s 、 A^{e2} 、 A^{e2s} 、 G 、 G^s 、 G^{e2} 、 G^{e2s} 、 G^{e2t} 、 T 、 T^s 、 T^{e2} 、 T^{e2s} 、 C 、 C^s 、 5C^{e2} 及び 5C^{e2s} は、それぞれ、下記の式(A)、 (A^s) 、 (A^{e2}) 、 (A^{e2s}) 、 (G) 、 (G^s) 、 (G^{e2}) 、 (G^{e2s}) 、 (G^{e2t}) 、 (T) 、 (T^s) 、 (T^{e2}) 、 (T^{e2s}) 、 (C) 、 (C^s) 、 (5C^{e2}) 及び (5C^{e2s}) で表される基である。)

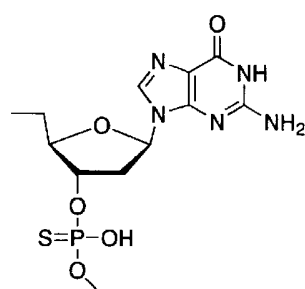
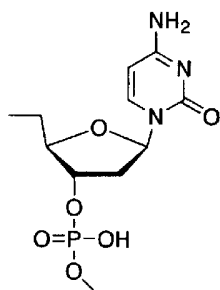
[化17]



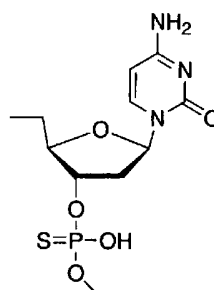
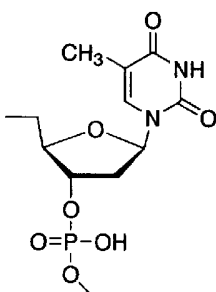
(A)

(A^S)

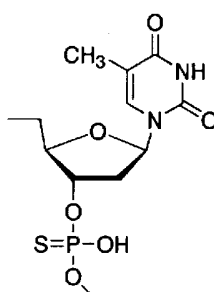
(G)

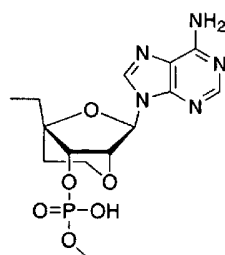
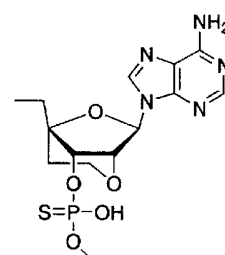
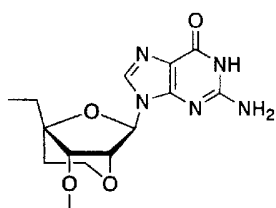
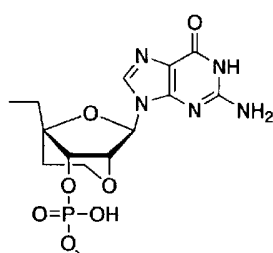
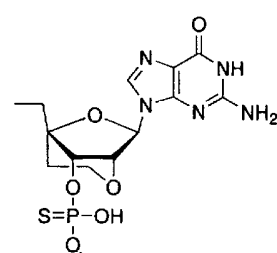
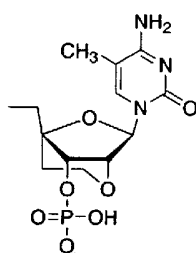
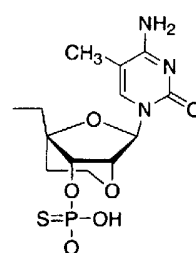
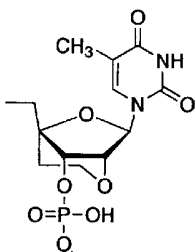
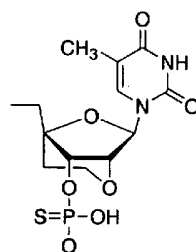
(G^S)

(C)

(C^S)

(T)

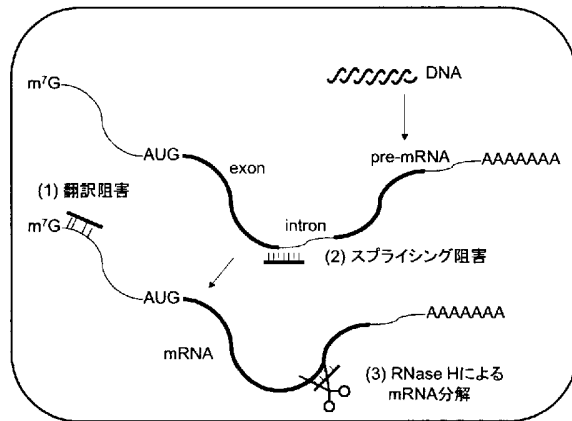
(T^S)

(A^{e2})(A^{e2s})(G^{e2t})(G^{e2})(G^{e2s})(5C^{e2})(5C^{e2s})(T^{e2})(T^{e2s})

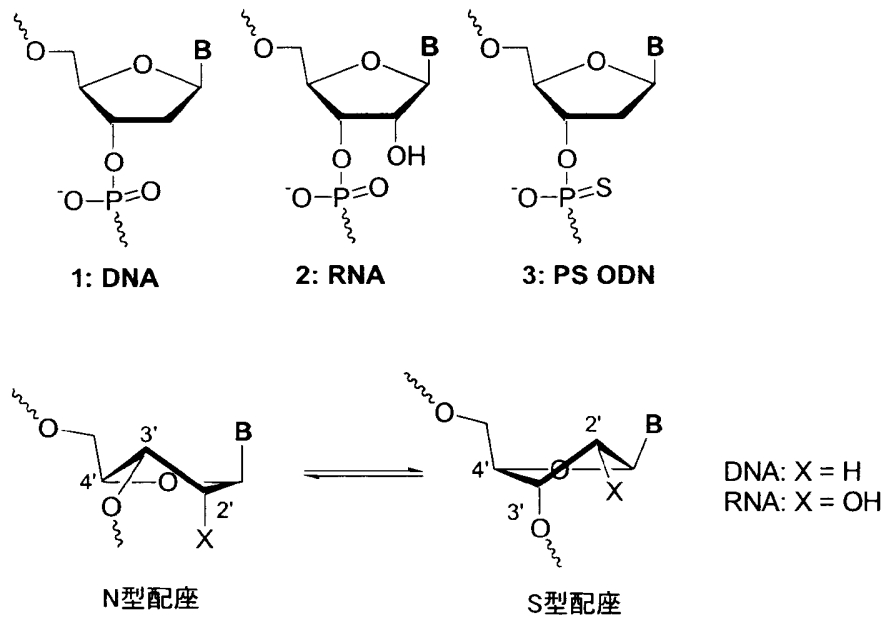
- [13] 請求項1記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド若しくは薬理学上許容されるその塩又は請求項10記載の化合物若しくは薬理学上許容されるその塩を含有する、11β-水酸化ステロイド脱水素酵素1型発現の抑制剤。
- [14] 請求項1記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド若しくは薬理学上許容されるその塩

又は請求項10記載の化合物若しくは薬理学上許容されるその塩を含有する、医薬組成物。

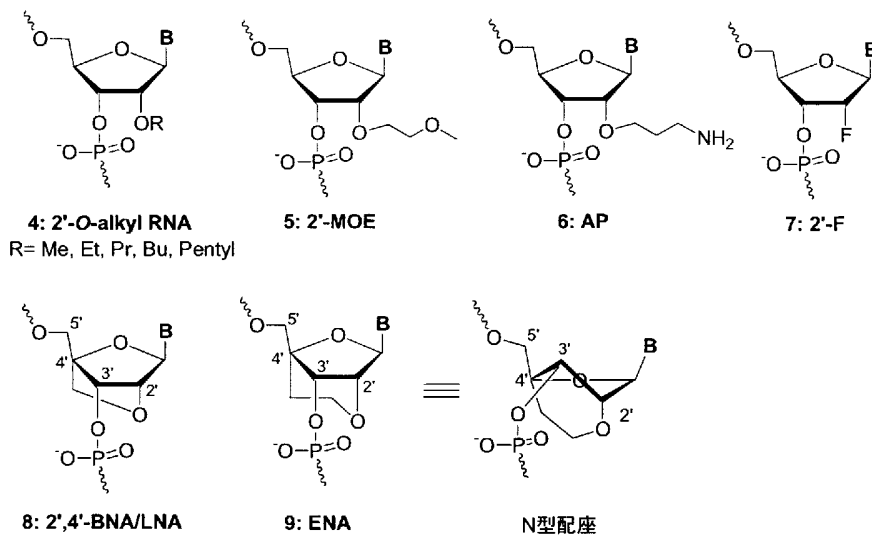
[図1]



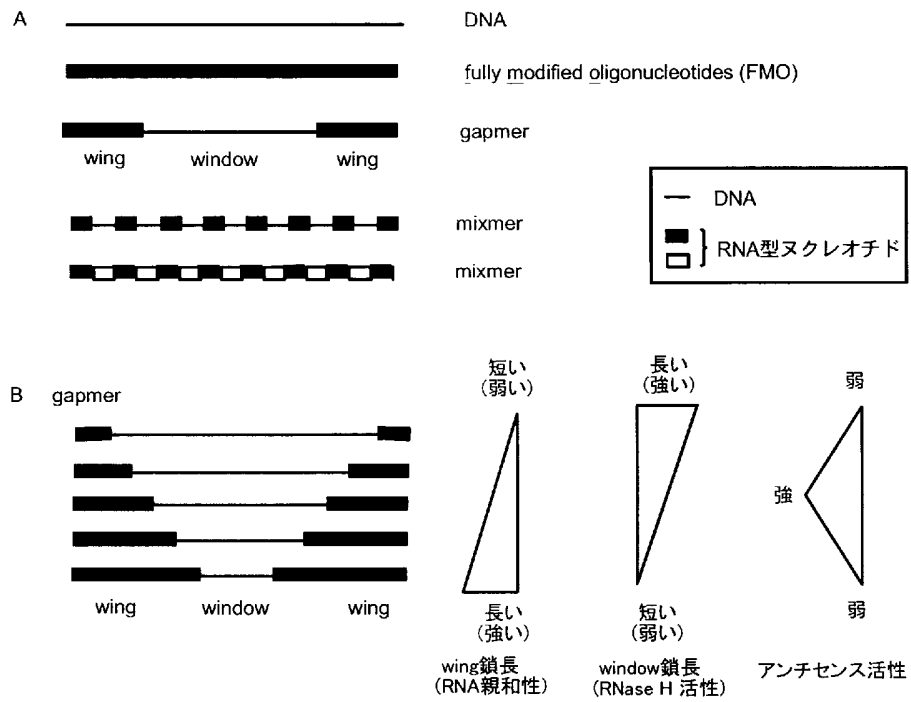
[図2]



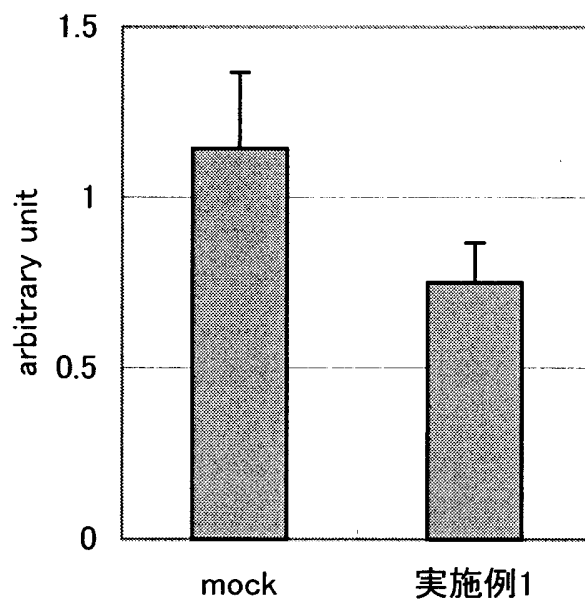
[図3]



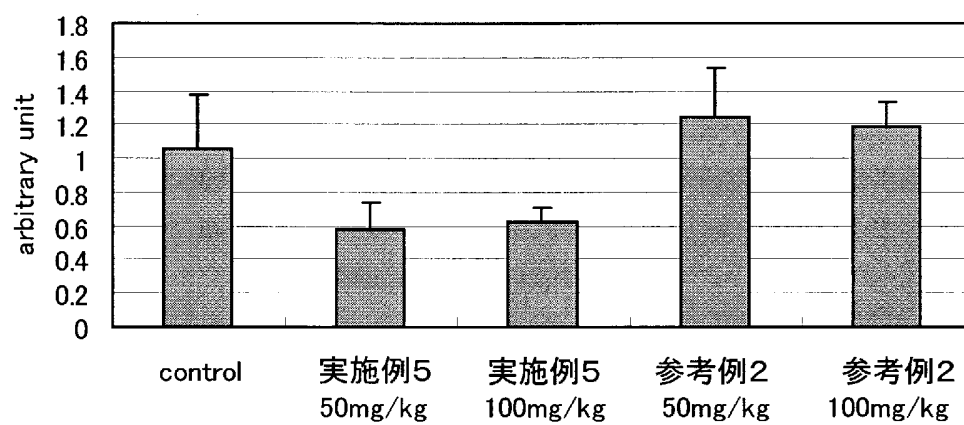
[図4]



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/021339

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07H21/00 (2006.01), **C12N15/09** (2006.01), **A61K31/712** (2006.01), **A61K31/7125** (2006.01), **A61K48/00** (2006.01), **A61P3/10** (2006.01), **A61P9/12** (2006.01), **A61P43/00** (2006.01)

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07H21/00, C12N15/09, A61K31/712, A61K31/7125, A61K48/00, A61P3/10, A61P9/12, A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2006
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2006	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2006

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2003/0198965 A1 (Isis Pharmaceuticals Inc.), 23 October, 2003 (23.10.03), Full text & WO 03/88921 A2	1-14
Y	JP 2004-502432 A (Bayer AG.), 29 January, 2004 (29.01.04), Full text & WO 02/2797 A2 & EP 1309697 A2 & US 2003/148349 A1	1-14
Y	JP 2003-512438 A (Bionetworks GmbH), 02 April, 2003 (02.04.03), Full text & WO 01/30383 A2 & EP 1223974 A2	1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "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)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
13 January, 2006 (13.01.06)

Date of mailing of the international search report
24 January, 2006 (24.01.06)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/021339

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2003-192692 A (Sankyo Co., Ltd.), 09 July, 2003 (09.07.03), Full text & WO 03/33696 A1	1-14
Y	JP 2004-129650 A (Sankyo Co., Ltd.), 30 April, 2004 (30.04.04), Full text (Family: none)	1-14
Y	JP 2004-187609 A (Sankyo Co., Ltd.), 08 July, 2004 (08.07.04), Full text (Family: none)	1-14
Y	JP 2004-315451 A (Sankyo Co., Ltd.), 11 November, 2004 (11.11.04), Full text (Family: none)	1-14
Y	JP 2000-297097 A (Sankyo Co., Ltd.), 24 October, 2000 (24.10.00), Full text & WO 00/47599 A1 & EP 1152009 A1 & US 2002/147332 A1 & US 2003/207841 A1	1-14
Y	JP 10-304889 A (Takeshi IMANISHI), 17 November, 1998 (17.11.98), Full text & WO 98/39352 A1 & EP 1013661 A1 & US 6268490 B1 & US 2003/105309 A1	1-14
A	WO 01/900921 A1 (BIOVITRUM AB.), 29 November, 2001 (29.11.01), Full text & EP 1283832 A1 & US 2003/166689 A1 & JP 2003-534338 A	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/021339

Only the antisense oligonucleotide having a 2'-O,4'-C-alkylenated sugar is disclosed within the meaning of PCT Article 5, and the antisense oligonucleotide having a 2'-O-alkylated, or 2'-O-alkenylated, or 2'-O-alkynylated sugar is not fully supported within the meaning of PCT Article 6.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C07H21/00 (2006.01), C12N15/09 (2006.01), A61K31/712 (2006.01), A61K31/7125 (2006.01),
A61K48/00 (2006.01), A61P3/10 (2006.01), A61P9/12 (2006.01), A61P43/00 (2006.01)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C07H21/00, C12N15/09, A61K31/712, A61K31/7125, A61K48/00, A61P3/10, A61P9/12, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2006年
日本国実用新案登録公報	1996-2006年
日本国登録実用新案公報	1994-2006年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	US 2003/0198965 A1 (Isis Pharmaceuticals Inc.) 2003.10.23, 全文 & WO 03/88921 A2	1-14
Y	JP 2004-502432 A (バイエル アクチェンゲゼルシャフト) 2004.01.29, 全文 & WO 02/2797 A2 & EP 1309697 A2 & US 2003/148349 A1	1-14

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13.01.2006

国際調査報告の発送日

24.01.2006

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

伊藤 幸司

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

4C

9450

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2003-512438 A (バイオネットワークス ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング) 2003.04.02, 全文 & WO 01/30383 A2 & EP 1223974 A2	1-14
Y	JP 2003-192692 A (三共株式会社) 2003.07.09, 全文 & WO 03/33696 A1	1-14
Y	JP 2004-129650 A (三共株式会社) 2004.04.30, 全文 (ファミリーなし)	1-14
Y	JP 2004-187609 A (三共株式会社) 2004.07.08, 全文 (ファミリーなし)	1-14
Y	JP 2004-315451 A (三共株式会社) 2004.11.11, 全文 (ファミリーなし)	1-14
Y	JP 2000-297097 A (三共株式会社) 2000.10.24, 全文 & WO 00/47599 A1 & EP 1152009 A1 & US 2002/147332 A1 & US 2003/207841 A1	1-14
Y	JP 10-304889 A (今西 武) 1998.11.17, 全文 & WO 98/39352 A1 & EP 1013661 A1 & US 6268490 B1 & US 2003/105309 A1	1-14
A	WO 01/90092 A1 (BIOVITRUM AB) 2001.11.29, 全文 & EP 1283832 A1 & US 2003/166689 A1 & JP 2003-534338 A	1-14

PCT 第 5 条の意味において開示されているのは、2' -O, 4' -C-アルキレン化された糖を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドのみであって、2' -O-アルキル化、2' -O-アルケニル化、又は 2' -O-アルキニル化された糖を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドについては、PCT6 条の意味で十分に裏付けされていない。