

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-505741

(P2010-505741A)

(43) 公表日 平成22年2月25日(2010.2.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 F 9/6558 (2006.01)	C 0 7 F 9/6558 Z N A	4 B 0 2 4
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/664 (2006.01)	A 6 1 K 31/664	4 C 0 8 6
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 H 0 5 0

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 132 頁)

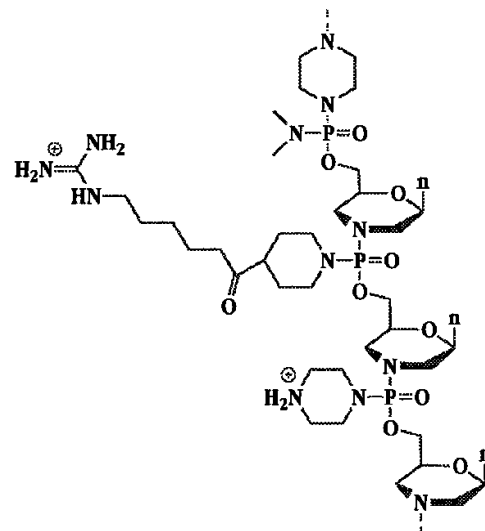
(21) 出願番号	特願2009-509880 (P2009-509880)	(71) 出願人	501237039
(86) (22) 出願日	平成19年5月10日 (2007.5.10)		エイブアイ バイオファーマ, インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成21年1月9日 (2009.1.9)		アメリカ合衆国 オレゴン 97333,
(86) 国際出願番号	PCT/US2007/011435		コーバリス, エス. ダブリュー. リ
(87) 国際公開番号	W02008/036127		サーチ ウェイ 4575, スイート
(87) 国際公開日	平成20年3月27日 (2008.3.27)		200
(31) 優先権主張番号	11/432, 216	(74) 代理人	110000855
(32) 優先日	平成18年5月10日 (2006.5.10)		特許業務法人浅村特許事務所
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100066692
(31) 優先権主張番号	11/432, 031		弁理士 浅村 皓
(32) 優先日	平成18年5月10日 (2006.5.10)	(74) 代理人	100072040
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 浅村 肇
(31) 優先権主張番号	11/432, 155	(74) 代理人	100102897
(32) 優先日	平成18年5月10日 (2006.5.10)		弁理士 池田 幸弘
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 カチオン性のサブユニット間結合を有するオリゴヌクレオチドアナログ

(57) 【要約】

無電荷およびカチオン性の両方のサブユニット間結合を含むホルノオリゴマーが提供される。このオリゴマーは、塩基対形成部分の所定の配列を含むオリゴヌクレオチドアナログである。オリゴマーにおけるカチオン性サブユニット間結合の存在（代表的に、総結合の約10～50%のレベルである）は、種々のアンチセンスの用途において、対応する無電荷のオリゴマーと比べて、向上したアンチセンス活性を提供する。また、ペプチド輸送体部分に結合されたこのようなオリゴマーも提供され、この場合、この輸送体は、好ましくは、天然アミノ酸サブユニットと交互になったアルギニンサブユニットまたはアルギニン二量体から構成される。



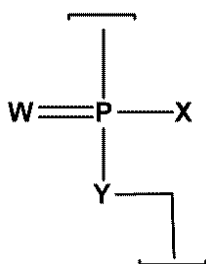
【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的核酸に対し配列特異的な様式で結合し得るようにモルホリノサブユニットの配列を含むオリゴマーであって、該モルホリノサブユニットの各々は、塩基対形成部分を支持しており、

ここで、該サブユニットは、以下の構造：

【化 1 1】



10

を持つ、リン含有サブユニット間結合によって接合され、
該式において、

WはSまたはOであり、

Xは、 NR^1R^2 または OR^6 であり、

Yは、Oまたは NR^7 であり、

20

そして、該結合の各々は、以下：

(a) 無電荷結合 (a) であって、ここで、 R^1 、 R^2 、 R^6 および R^7 の各々は、独立して、水素および低級アルキルから選択される、無電荷結合 (a)；

(b1) カチオン性結合 (b1) であって、ここで、Xは NR^1R^2 であり、かつYはOであり、そして、 NR^1R^2 は、 R^1R^2 が $-\text{CHRC}(\text{HRN}(\text{R}^3))(\text{R}^4)\text{CHR}-$ となるように必要に応じて置換されたピペラジノ基を表し、ここで、

各Rは、独立してHまたは CH_3 であり、

R^4 は、H、 CH_3 または電子対であり、そして

R^3 は、H、低級アルキル、 $\text{C}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $\text{Z}-\text{L}-\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ および $[\text{C}(\text{O})\text{CHR}'\text{NH}]_m\text{H}$ から選択され、ここで、Zは、カルボニル($\text{C}(\text{O})$)または直接結合であり、Lは、アルキル、アルコキシおよびアルキルアミノから選択される結合を有する長さ18原子までの任意のリンカーであり、 R' は、天然に存在するアミノ酸またはその一炭素もしくは二炭素のホモログの側鎖であり、そして、mは1~6である、

30

カチオン性結合 (b1)；

(b2) カチオン性結合 (b2) であって、ここで、Xは NR^1R^2 であり、かつYはOであり、 R^1 はHまたは CH_3 であり、そして、 R^2 は $\text{LNR}^3\text{R}^4\text{R}^5$ であり、ここで、L、 R^3 および R^4 は、上に定義したとおりであり、そして、 R^5 は、H、低級アルキルまたは低級(アルコキシ)アルキルである、カチオン性結合 (b2)；ならびに

(b3) カチオン性結合 (b3) であって、ここで、Yは NR^7 であり、かつXは OR^6 であり、そして、 R^7 は $\text{LNR}^3\text{R}^4\text{R}^5$ であり、ここで、L、 R^3 、 R^4 および R^5 は、上に定義したとおりであり、そして、 R^6 はHまたは低級アルキルである、カチオン性結合 (b3)；

40

から選択され、そして、

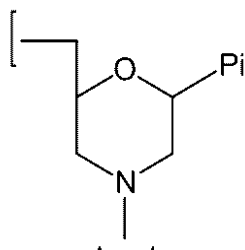
該サブユニット間結合のうち少なくとも1つは、カチオン性結合 (b1)、(b2)および(b3)から選択される、

オリゴマー。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のオリゴマーであって、前記モルホリノサブユニットが以下の構造：

【化 1 2】



(i)

10

を有し、該式において、 Pi は、塩基対形成部分であり、そして、前記サブユニット間結合が、(i)の窒素原子を隣接するサブユニットの5'炭素に連結する、オリゴマー。

【請求項 3】

請求項 1 に記載のオリゴマーであって、該オリゴマーにおける前記カチオン性結合は全て同じタイプのものである、オリゴマー。

【請求項 4】

請求項 3 に記載のオリゴマーであって、該オリゴマーにおける前記カチオン性結合は全てタイプ(b 1)のものである、オリゴマー。

【請求項 5】

請求項 3 に記載のオリゴマーであって、該オリゴマーにおける前記カチオン性結合は全てタイプ(b 2)のものである、オリゴマー。

20

【請求項 6】

請求項 4 に記載のオリゴマーであって、該オリゴマーにおける前記カチオン性結合は全てタイプ(b 3)のものである、オリゴマー。

【請求項 7】

請求項 1 に記載のオリゴマーであって、該オリゴマーにおける前記結合の5%~50%がカチオン性結合である、オリゴマー。

【請求項 8】

請求項 7 に記載のオリゴマーであって、該オリゴマーにおける前記結合の10%~35%がカチオン性結合である、オリゴマー。

30

【請求項 9】

請求項 1 に記載のオリゴマーであって、タイプ(a)の結合における R^1 および R^2 の各々がメチルである、オリゴマー。

【請求項 10】

請求項 1 に記載のオリゴマーであって、該オリゴマーは、少なくとも2個の連続するタイプ(a)の結合を含む、オリゴマー。

【請求項 11】

約10個~40個のサブユニットの長さを持つ、請求項 1 に記載のオリゴマー。

【請求項 12】

約15個~25個のサブユニットの長さを持つ、請求項 1 に記載のオリゴマー。

40

【請求項 13】

請求項 1 に記載のオリゴマーであって、前記カチオン性結合が、各 R が H であり、 R^4 が H 、 CH_3 または電子対であり、かつ、 R^3 が、 H 、 CH_3 、 $C(=NH)NH_2$ および $C(O)-L-NHC(=NH)NH_2$ から選択される場合のタイプ(b 1)のものである、オリゴマー。

【請求項 14】

請求項 13 に記載のオリゴマーであって、前記カチオン性結合が、各 R が H であり、 R^4 が電子対であり、かつ、 R^3 が、 $C(=NH)NH_2$ および $C(O)-L-NHC(=NH)NH_2$ から選択される場合のタイプ(b 1)のものである、オリゴマー。

【請求項 15】

50

請求項 14 に記載のオリゴマーであって、 R^3 が $C(O) - L - NHC(=NH)NH_2$ であり、かつ L が炭化水素である、オリゴマー。

【請求項 16】

請求項 15 に記載のオリゴマーであって、 L が構造 $-(CH_2)_n-$ を有し、ここで、 n が 1 ~ 12 である、オリゴマー。

【請求項 17】

n が 1 ~ 6 である、請求項 16 に記載のオリゴマー。

【請求項 18】

請求項 1 に記載のオリゴマーであって、前記カチオン性結合が、各 R が H であり、かつ、 R^3 および R^4 の各々が独立して H または CH_3 である場合のタイプ (b1) のものである、オリゴマー。

10

【請求項 19】

請求項 18 に記載のオリゴマーであって、 R^3 および R^4 の各々が H である、オリゴマー。

【請求項 20】

請求項 1 に記載のオリゴマーであって、前記カチオン性結合が、 L がアルキルおよびアルキルアミノから選択される結合を有する長さ 12 原子までのリンカーである場合のタイプ (b2) のものである、オリゴマー。

【請求項 21】

請求項 1 に記載のオリゴマーであって、該オリゴマーは、 R 、 R^3 および R^4 の各々が H である場合のタイプ (b1) の結合を含まない、オリゴマー。

20

【請求項 22】

請求項 1 に記載のオリゴマーであって、該オリゴマーの末端に結合されたペプチド輸送部分をさらに含み、該ペプチド輸送部分は、6 個 ~ 16 個のアミノ酸を含み、かつ $(X'Y'X')$ 、 $(X'Y'Z')$ 、 $(X'Z'Z')$ および $(X'Z'Z'Z')$ からなる群より選択される部分配列からなり、

ここで

(a) X' サブユニットの各々は、独立して、アルギニンまたはアルギニンアナログを表し、該アナログは、構造 $R^1N=C(NH_2)R^2$ の側鎖を含むカチオン性 - アミノ酸であり、ここで、 R^1 は H または R であり； R^2 は R 、 NH_2 、 NHR または NR_2 であり、ここで R は低級アルキルまたは低級アルケニルであり、そして、さらに、酸素または窒素を含み得； R^1 および R^2 は、一緒になって環を形成し得；そして、該側鎖は、 R^1 または R^2 を介して該アミノ酸に連結される；

30

(b) Y' サブユニットの各々は、独立して、中性の直鎖状アミノ酸 $-C(O)-(CHR)_n-NH-$ を表し、ここで、 n は 1 ~ 7 であり、かつ、各 R は、独立して、 H またはメチルである；そして

(c) Z' サブユニットの各々は、独立して、中性のアラルキル側鎖を持つ - アミノ酸を表す、オリゴマー。

40

【請求項 23】

請求項 22 に記載のオリゴマーであって、前記ペプチドが、 $(X'Y'X')$ 、 $(X'Y'Y')$ 、 $(X'Z'Z')$ および $(X'Z'Z'Z')$ から選択される単一の部分配列の少なくとも 2 回の繰り返しからなる配列を含む、オリゴマー。

【請求項 24】

請求項 23 に記載のオリゴマーであって、前記ペプチドが、 $(X'Y'X')$ 、 $(X'Y'Y')$ 、 $(X'Z'Z')$ および $(X'Z'Z'Z')$ から選択される単一の部分配列の少なくとも 3 回の繰り返しからなる配列を含む、オリゴマー。

【請求項 25】

請求項 23 に記載のオリゴマーであって、前記ペプチドが、 $(X'Y'X')_p$ 、 $(X'Y'Y')_m$ および $(X'Z'Z'Z')_p$ のうち 1 つによって表される配列を含み、ここで、 p

50

は 2 ~ 5 でありかつ m は 2 ~ 8 である、オリゴマー。

【請求項 26】

請求項 22 に記載のオリゴマーであって、X' の各々について、前記側鎖部分がグアニジルである、オリゴマー。

【請求項 27】

請求項 22 に記載のオリゴマーであって、Y' の各々が、 $-CO-(CH_2)_n-NH-$ であり、ここで、n は 1 ~ 7 である、オリゴマー。

【請求項 28】

請求項 27 に記載のオリゴマーであって、Y' が、 $-$ アラニンサブユニットおよび 6 - アミノヘキサン酸サブユニットから選択されるように、n が 2 および 5 から選択される、オリゴマー。

10

【請求項 29】

請求項 22 に記載のオリゴマーであって、Z' の各々がフェニルアラニンである、オリゴマー。

【請求項 30】

請求項 22 に記載のオリゴマーであって、前記結合されたペプチドは、リンカー Ahx - B を介して該オリゴマーの末端に連結され、ここで、Ahx は 6 - アミノヘキサン酸サブユニットであり、かつ、B は $-$ アラニンサブユニットである、オリゴマー。

【請求項 31】

モルホリノサブユニットの配列を有するオリゴマー性核酸アナログのアンチセンス活性を増強する方法であって、該モルホリノサブユニットの各々は、塩基対形成部分を支持し、そして、サブユニット間結合によって連結されており、該方法は、

20

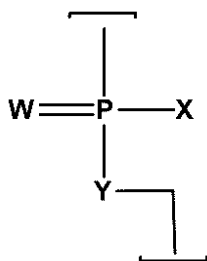
少なくとも 1 個のサブユニット間結合をカチオン性のペンダント基を含むように修飾する工程であって、該カチオン性のペンダント基は、生理学的 pH において正電荷を有し得る窒素原子を含む、工程を包含する、方法。

【請求項 32】

請求項 31 に記載の方法であって、前記サブユニット間結合が、リン含有サブユニット間結合であり、そして、前記修飾する工程が、以下の構造：

【化 13】

30



を持つ少なくとも 1 個のサブユニット間結合を提供する工程を包含し、ここで、

(a) W は S または O であり、そして

40

(b1) X は NR^1R^2 であり、かつ Y は O であり、そして、 NR^1R^2 が、 R^1R^2 が $-CH(R)CH(R)N(R^3)(R^4)CH(R)CH(R)-$ となるように必要に応じて置換されたピペラジノ基を表し、ここで：各 R は、独立して H または CH_3 であり； R^4 は、H、 CH_3 または電子対であり；そして、 R^3 は、H、低級アルキル、 $C(=NH)NH_2$ 、 $Z-L-NHC(=NH)NH_2$ および $[C(O)CH(R')NH]_mH$ から選択され、ここで、Z は、カルボニル ($C(O)$) または直接結合であり、L は、アルキル、アルコキシおよびアルキルアミノから選択される結合を有する長さ 18 原子までの任意のリンカーであり、R' は、天然に存在するアミノ酸またはその一炭素もしくは二炭素のホモログの側鎖であり、そして、m は 1 ~ 6 であるか；あるいは

(b2) X は NR^1R^2 であり、かつ Y は O であり、 R^1 は H または CH_3 であり、そ

50

して R^2 は、 $LNR^3R^4R^5$ であり、ここで、 L 、 R^3 および R^4 は、上に定義したとおりであり、そして、 R^5 は、 H 、低級アルキルまたは低級（アルコキシ）アルキルであるか；あるいは

（b3） Y は NR^7 であり、かつ X は OR^6 であり、そして、 R^7 は $LNR^3R^4R^5$ であり、ここで、 L 、 R^3 および R^4 は、上に定義したとおりであり、そして、 R^6 は H または低級アルキルである、

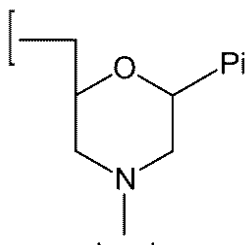
方法。

【請求項 33】

請求項 32 に記載の方法であって、前記モルホリノサブユニットが、以下の構造：

【化 14】

10



(i)

を有し、ここで、 Pi は、塩基対形成部分であり、そして、前記サブユニット間結合が、（i）の窒素原子を隣接するサブユニットの 5' 炭素に連結する、方法。

20

【請求項 34】

請求項 33 に記載の方法であって、前記オリゴマーにおける前記カチオン性結合は全て同じタイプのものである、方法。

【請求項 35】

請求項 31 に記載の方法であって、前記サブユニット間結合の 5% ~ 50% がこのように修飾される、方法。

【請求項 36】

請求項 34 に記載の方法であって、前記修飾結合はタイプ（b1）のものである、方法。

【請求項 37】

30

請求項 34 に記載の方法であって、前記修飾結合はタイプ（b2）のものである、方法。

【請求項 38】

請求項 34 に記載の方法であって、前記修飾結合はタイプ（b3）のものである、方法。

【請求項 39】

請求項 36 に記載の方法であって、前記修飾結合が、各 R が H であり、 R^4 が電子対であり、かつ、 R^3 が $C(O) - L - NHC(=NH)NH_2$ である場合のタイプ（b1）のものである、方法。

【請求項 40】

請求項 36 に記載の方法であって、前記修飾結合が、 R 、 R^3 および R^4 の各々が H である場合のタイプ（b1）のものである、方法。

40

【請求項 41】

請求項 37 に記載の方法であって、前記カチオン性結合が、 L がアルキルおよびアルキルアミノから選択される結合を有する長さ 12 原子までのリンカーである場合のタイプ（b2）のものである、方法。

【請求項 42】

請求項 31 に記載の方法であって、前記オリゴマーが、 R 、 R^3 および R^4 の各々が H である場合のタイプ（b1）の結合を含まない、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【 0 0 0 1 】

(発 明 の 分 野)

本発明は、アンチセンス化合物として有用なオリゴヌクレオチドアナログ（オリゴマー）に関し、より具体的には、カチオン性結合を含むオリゴマーおよびこのようなオリゴマーのアンチセンスの用途における使用に関する。特に好ましいのは、無電荷結合およびカチオン性結合の両方を含むモルホリノオリゴマーであり、ここで、これらの両方は、ホスホロジアミデート結合であり得、そして、例示的なカチオン性結合としては、（１ - ピペラジノ）ホスフィニルインデンオキシ結合および（１ - （４ - （ - グアニジノ - アルカノイル）） - ピペラジノ）ホスフィニルインデンオキシ結合が挙げられる。

【 0 0 0 2 】

10

参考文献

Arya, D. P. および T. C. Bruice (1999). 「Triple-helix formation of DNA oligomers with methylthiourea-linked nucleosides (DNmt): a kinetic and thermodynamic analysis.」 *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (8): 4384 - 9.

Bailey, C. P., J. M. Dagle, (1998). 「Cationic oligonucleotides can mediate specific inhibition of gene expression in *Xenopus* oocytes.」 *Nucleic Acids Res* 26 (21): 4860 - 7

20

Barawkar, D. A. および T. C. Bruice (1998). 「Synthesis, biophysical properties, and nuclease resistance properties of mixed backbone oligodeoxynucleotides containing cationic internucleoside guanidinium linkages: deoxynucleic guanidine/DNA chimeras.」 *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (19): 11047 - 52.

Bray, M., K. Davis, (1998). 「A mouse model for evaluation of prophylaxis and therapy of Ebola hemorrhagic fever.」 *J Infect Dis* 178 (3): 651 - 61.

30

Connolly, B. M., K. E. Steele, (1999). 「Pathogenesis of experimental Ebola virus infection in guinea pigs.」 *J Infect Dis* 179 Suppl 1: S203 - 17.

Crooke, S. T. (2001). *Antisense Drug Technology: Principles, Strategies, and Applications*. New York, Marcel Dekker.

Dempcy, R. O., O. Almarsson, (1994). 「Design and synthesis of deoxynucleic guanidine: a polycation analogue of DNA.」 *Proc Natl Acad Sci USA* 91 (17): 7864 - 8.

40

Dempcy, R. O., J. Luo, (1996). 「Design and synthesis of ribonucleic guanidine: a polycationic analog of RNA.」 *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (9): 4326 - 30.

Egli, M., G. Minasov, (2005). 「Probing the influence of stereoelectronic effects on the biophysical properties of oligonucleotides.」 *J Am Chem Soc* 127 (12): 3540 - 50.

50

eotides: comprehensive analysis of the RNA affinity, nuclease resistance, and crystal structure of ten 2'-O-ribonucleic acid modifications.」Biochemistry 44(25):9045-57.

Linkletter, B. A. および Bruice, T. C. (2000). 「Solid-phase synthesis of positively charged deoxynucleic guanidine (DNG) modified oligonucleotides containing neutral urea linkages: Effect of charge deletions on binding and fidelity.」Bioorg. Med. Chem. 8(11):1893-1901.

10

Linkletter, B. A., I. E. Szaboら、(2001). 「Solid-phase synthesis of oligopurine deoxynucleic guanidine (DNG) and analysis of binding with DNA oligomers.」Nucleic Acids Res 29(11):2370-6.

Micklefield, J. (2001). 「Backbone modification of nucleic acids: synthesis, structure and therapeutic applications.」Curr Med Chem 8(10):1157-79.

20

Moulton, H. M., M. H. Nelsonら、(2004). 「Cellular uptake of antisense morpholino oligomers conjugated to arginine-rich peptides.」Bioconjug Chem 15(2):290-9.

Nelson, M. H., D. A. Steinら、(2005). 「Arginine-rich peptide conjugation to morpholino oligomers: effects on antisense activity and specificity.」Bioconjug Chem 16(4):959-66.

30

Summerton, J. および D. Weller (1997). 「Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties.」Antisense Nucleic Acid Drug Dev 7(3):187-95.

Warfield, K. L., D. L. Swenson, et al. (2006). 「Gene-Specific Countermeasures against Ebola Virus Based on Antisense Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers.」PLoS Pathog 2(1):e1.

40

【背景技術】

【0003】

(発明の背景)

疾患の原因となるタンパク質の産生を防止するために、一般には、このようなタンパク質のDNAもしくはRNAに結合するように設計されるアンチセンス治療分子の首尾よい実施のための要件としては、(a)インビボでの安定性、(b)十分な膜透過性および細胞への取り込み、ならびに、(c)結合親和性と配列特異性との良好なバランスが挙げられる。多くのオリゴヌクレオチドアナログが開発されており、ここでは、ネイティブなDNAのホスホジエステル結合が、ヌクレアーゼ消化に対し抵抗性である他の結合により置き換えられる(例えば、非特許文献1;非特許文献2;非特許文献3を参照のこと)。ヌクレオシド間結合に対するもの以外で種々の骨格修飾を持つアンチセンスオリゴヌクレオ

50

チドもまた調製されている（非特許文献 4；非特許文献 3）。さらに、オリゴヌクレオチドは、細胞への取り込みを増強するためにペプチド結合体により修飾されている（非特許文献 5；非特許文献 6）。

【0004】

このような核酸アナログのアンチセンス薬物またはアンチジーン（*antigene*）薬物としての性能は、種々のアナログの特定の特徴によって妨害される。例えば、ホスホロチオエート結合したアナログを含めて、負に荷電した結合を伴うアナログは、オリゴマーの負電荷と DNA もしくは RNA 標的との間のかかなりの静電性の反発を被る。ホスホロチオエートはまた、タンパク質のような他の細胞の成分に対する非特異的な結合を示す。これらは、ネイティブな RNA、ネイティブな DNA および負に荷電したアナログから構成されるアンチセンスオリゴマーの、治療剤としての有用性を制限することに起因するものと考えられる（非特許文献 4）。非イオン性のメチルホスホネート結合オリゴヌクレオチドアナログは、受動拡散および／または流動相エンドサイトーシスによって細胞内に輸送され得るが、これらの使用は、立体異性体の複雑さと乏しい溶解性によって妨害される（非特許文献 4；非特許文献 3）。

10

【0005】

いくつかのグループが、正に荷電したオリゴヌクレオチドの合成を報告している（非特許文献 7；非特許文献 3；非特許文献 8）。例えば、DNA および RNA 中のリン酸結合をアキラルなグアニジノ基で置き換えることによって形成されるグアニジニウム結合ヌクレオシド（DNG と称される）のクラスが報告されている（非特許文献 9；非特許文献 10；非特許文献 1；非特許文献 2）。正に荷電したメチル化チオウレア結合で連結されたオリゴマーもまた、報告されている（非特許文献 11）。これらの結合のいくつかの、中性の尿素結合での置き換えは、このような正に荷電したオリゴマーが、非配列特異的な結合に向かう傾向を低下させることが報告される（非特許文献 2）。

20

【0006】

しかしながら、特に、DNA および RNA に対する親和性がより強い場において、配列選択性を損ねることなく、アンチセンスまたはアンチジーンのパフォーマンスが改善されたオリゴヌクレオチドに対する必要性が依然として存在する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

30

【0007】

【非特許文献 1】Barawkar, D. A. および T. C. Bruice (1998). 「Synthesis, biophysical properties, and nuclease resistance properties of mixed backbone oligodeoxynucleotides containing cationic internucleoside guanidinium linkages: deoxynucleic guanidine / DNA chimeras.」 *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (19): 11047-52.

【非特許文献 2】Linkletter, B. A., I. E. Szabo, (2001). 「Solid-phase synthesis of oligopurine deoxynucleic guanidine (DNG) and analysis of binding with DNA oligomers.」 *Nucleic Acids Res* 29 (11): 2370-6.

40

【非特許文献 3】Micklefield, J. (2001). 「Backbone modification of nucleic acids: synthesis, structure and therapeutic applications.」 *Curr Med Chem* 8 (10): 1157-79.

【非特許文献 4】Crooke, S. T. (2001). *Antisense Drug Technology: Principles, Strategies, and Ap*

50

plications. New York, Marcel Dekker.

【非特許文献5】Moulton, H. M., M. H. Nelson, (2004).
「Cellular uptake of antisense morpholino
oligomers conjugated to arginine-rich p
eptides.」Bioconjug Chem 15(2):290-9.

【非特許文献6】Nelson, M. H., D. A. Stein, (2005). 「A
rginine-rich peptide conjugation to morp
holino oligomers: effects on antisense ac
tivity and specificity.」Bioconjug Chem 1
6(4):959-66.

【非特許文献7】Bailey, C. P., J. M. Dagle, (1998). 「C
ationic oligonucleotides can mediate spe
cific inhibition of gene expression in X
enopus oocytes.」Nucleic Acids Res 26(21)
:4860-7.

【非特許文献8】Egli, M., G. Minasov, (2005). 「Probi
ng the influence of stereoelectronic eff
ects on the biophysical properties of ol
igonucleotides: comprehensive analysis of
the RNA affinity, nuclease resistance, an
d crystal structure of ten 2'-O-ribonuc
leic acid modifications.」Biochemistry 44(
25):9045-57.

【非特許文献9】Dempsy, R. O., O. Almarsson, (1994).
「Design and synthesis of deoxynucleic gu
anidine: a polycation analogue of DNA.」Pr
oc Natl Acad Sci USA 91(17):7864-8.

【非特許文献10】Dempsy, R. O., J. Luo, (1996). 「Desi
gn and synthesis of ribonucleic guanidin
e: a polycationic analog of RNA.」Proc Nat
l Acad Sci USA 93(9):4326-30.

【非特許文献11】Arya, D. P. および T. C. Bruice (1999). 「T
riple-helix formation of DNA oligomers w
ith methylthiourea-linked nucleosides (D
Nmt): a kinetic and thermodynamic analysi
s.」Proc Natl Acad Sci USA 96(8):4384-9.

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

(要旨)

本発明は、一局面では、サブユニット間結合により接合されたモルホリノ環構造の配列からなる骨格を含むオリゴマーを提供し、ここで、このような環構造の各々は塩基対形成部分を支持し、その結果、上記オリゴマーは、標的核酸に対し配列特異的な様式で結合し得、そして、2個の連続するこのような環構造間の少なくとも1個のサブユニット間結合は、カチオン性のペンダント基を含む。このペンダント基は、中性またはほぼ中性（例えば、生理学的）pHにおいて正電荷を有する遠位の窒素原子を有する。

【0009】

サブユニット間結合は、好ましくは、以下の構造：

【0010】

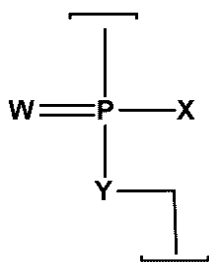
10

20

30

40

【化 1】



を有するリン含有結合であり、上記式において、
 WはSまたはOであり、そして、好ましくはOであり、
 Xは NR^1R^2 または OR^6 であり、
 YはOまたは NR^7 であり、

そして、オリゴマーにおける上記ヌクレオチド間結合の各々は、以下の無電荷結合 (a)、ならびにカチオン性結合 (b 1)、(b 2) および (b 3) から選択され、サブユニット間結合のうち少なくとも1つは、カチオン性結合 (b 1)、(b 2) および (b 3) から選択される：

(a) 無電荷結合 (a) であって、ここで、 R^1 、 R^2 、 R^6 および R^7 の各々は、独立して、水素および低級アルキルから選択される、無電荷結合 (a) ；

(b 1) カチオン性結合 (b 1) であって、ここで、Xは NR^1R^2 であり、かつYはOであり、そして、 NR^1R^2 は、 R^1R^2 が $-\text{CHRCHR N}(\text{R}^3)(\text{R}^4)\text{CHRCHR}-$ となるように必要に応じて置換されたピペラジノ基を表し、ここで、

各Rは、独立してHまたは CH_3 であり、

R^4 は、H、 CH_3 または電子対であり、そして

R^3 は、H、低級アルキル、 $\text{C}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $\text{Z-L-NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ および $[\text{C}(\text{O})\text{CHR}'\text{NH}]_m\text{H}$ から選択され、ここで、ZはC(O)または直接結合であり、Lは、アルキル、アルコキシおよびアルキルアミノから選択される結合を有する長さ18原子まで、好ましくは12原子まで、より好ましくは8原子までの任意のリンカーであり、 R' は、天然に存在するアミノ酸またはその一炭素もしくは二炭素のホモログの側鎖であり、そして、mは1~6、好ましくは1~4である、

カチオン性結合 (b 1) ；

(b 2) カチオン性結合 (b 2) であって、ここで、Xは NR^1R^2 であり、かつYはOであり、 R^1 はHまたは CH_3 であり、そして、 R^2 は $\text{LNR}^3\text{R}^4\text{R}^5$ であり、ここで、L、 R^3 および R^4 は、上に定義したとおりであり、そして、 R^5 は、H、低級アルキルまたは低級(アルコキシ)アルキルである、カチオン性結合 (b 2) ；ならびに

(b 3) カチオン性結合 (b 3) であって、ここで、Yは NR^7 であり、かつXは OR^6 であり、そして、 R^7 は $\text{LNR}^3\text{R}^4\text{R}^5$ であり、ここで、L、 R^3 、 R^4 および R^5 は、上に定義したとおりであり、そして、 R^6 はHまたは低級アルキルである、カチオン性結合 (b 3) 。

【0011】

好ましくは、オリゴマーは、少なくとも2個の連続したタイプ(a)の結合(すなわち、無電荷結合)を含む。さらなる実施形態では、オリゴマーにおけるヌクレオチド間結合の少なくとも5%は、カチオン性結合(すなわち、タイプ(b 1)、(b 2)または(b 3))である；例えば、ヌクレオチド間結合の10%~80%、10%~50%または10%~35%がカチオン性結合であり得る。

【0012】

好ましくは、オリゴマーにおけるカチオン性結合は全て同じタイプのものである；すなわち、全てタイプ(b 1)のものであるか、全てタイプ(b 2)のものであるか、または、全てタイプ(b 3)のものである。

【0013】

10

20

30

40

50

一実施形態では、少なくとも1つのヌクレオチド間結合は、タイプ(b1)のものであり、ここで、好ましくは、各RがHであり、 R^4 がH、 CH_3 または電子対であり、かつ、 R^3 が、H、低級アルキル(例えば、 CH_3)、 $C(=NH)NH_2$ および $C(O)-L-NHC(=NH)NH_2$ から選択される。 R^3 の后者2つの実施形態は、それぞれ、ピペラジン環に直接結合されるか、または、リンカー基Lへのペンダントのいずれかで、グアニジノ部分を提供する。合成を容易にするために、 R^3 における変数Zは、好ましくは、示されるように $C(O)$ (カルボニル)である。

【0014】

リンカー基Lは、上述のように、その骨格中にアルキル(例えば、 $-CH_2-CH_2-$)、アルコキシ($-C-O-$)およびアルキルアミノ(例えば、 $-CH_2-NH-$)から選択される結合を含むが、但し、Lにおける末端の原子(例えば、カルボニルまたは窒素に隣接する原子)は、炭素原子である。分枝状の結合(例えば、 $-CH_2-CHCH_3-$)も可能であるが、リンカーは、好ましくは直鎖状である。一実施形態では、リンカーは、炭化水素リンカーである。このようなリンカーは、構造 $-(CH_2)_n-$ を有し得、ここで、nは1~12、好ましくは2~8、より好ましくは2~6である。

10

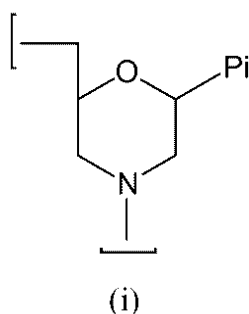
【0015】

モルホリノサブユニットは、以下の構造：

【0016】

【化2】

20



を有し、上記式において、Piは、塩基対形成部分であり、そして、前記されるサブユニット間結合が、(i)の窒素原子を隣接するサブユニットの5'炭素に連結する。塩基対形成部分Piは、同じであっても異なってもよく、そして一般には、標的核酸に結合する配列を提供するように設計される。

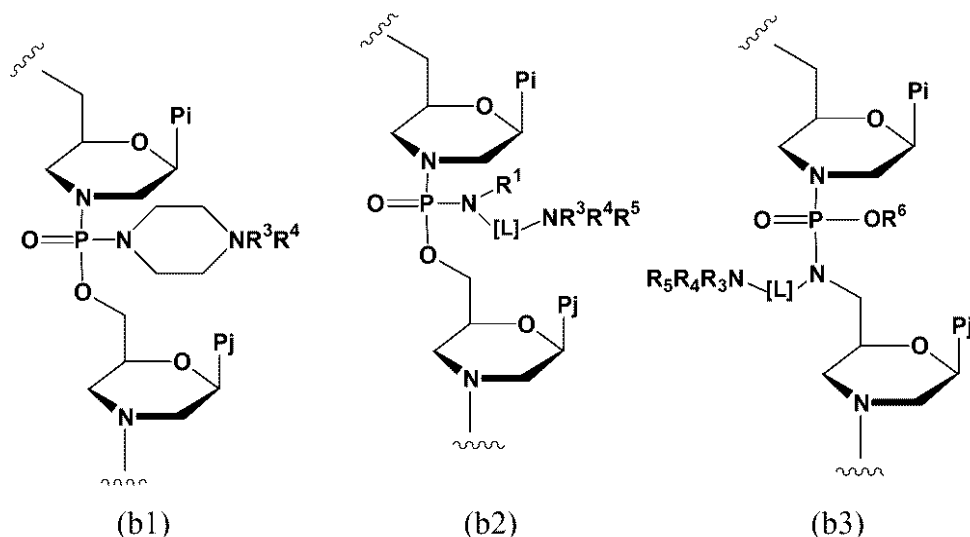
30

【0017】

上記結合のタイプ(b1)、(b2)および(b3)の実施形態の、モルホリノサブユニットを連結するための使用は、以下のように概略的に例示され得る：

【0018】

【化 3】



10

20

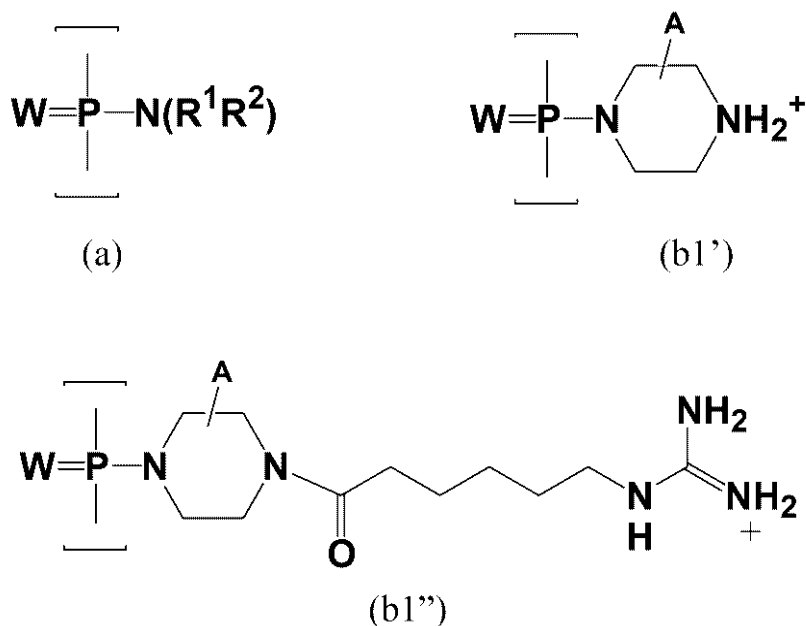
好ましくは、オリゴマーにおけるヌクレオチド間結合の少なくとも5%は、カチオン性結合(b1)、(b2)および(b3)から選択され；さらなる実施形態では、ヌクレオチド間結合の10%~35%は、カチオン性結合(b1)、(b2)および(b3)から選択される。上述のように、オリゴマーにおけるカチオン性結合は全て、好ましくは、同じタイプまたは同じ構造のものである。上述のように、オリゴマーにおけるカチオン性結合は全て、好ましくは、同じタイプまたは同じ構造のものである。

【0019】

さらなる実施形態では、カチオン性結合は、以下に示されるような結合(b1')および(b1'')から選択され、ここで、(b1')は、本明細書中で「Pip」結合と呼ばれ、そして、(b1'')は、本明細書中で、「GuX」結合と呼ばれる：

【0020】

【化 4】



30

40

上記構造において、WはSまたはOであり、そして好ましくはOであり；R¹およびR²の各々は、独立して、水素および低級アルキルから選択され、そして好ましくはメチルであり；そして、Aは水素または(b1')および(b1'')における1以上の炭素原子上の非干渉性置換基を表す。好ましくは、各Aは水素である；すなわち、窒素複素環は好ましくは置換されない。さらなる実施形態では、ヌクレオチド間結合の少なくとも10%

50

は、タイプ (b 1') または (b 1'') のものである；例えば、ヌクレオチド間結合の 20% ~ 80%、20% ~ 50% または 20% ~ 30% が、タイプ (b 1') または (b 1'') のものであり得る。

【0021】

他の実施形態では、オリゴマーは、タイプ (b 1') の結合を含まない。あるいは、オリゴマーは、各 R が H であり、R³ が H または CH₃ であり、かつ R⁴ が H、CH₃ または電子対である場合のタイプ (b 1) の結合を含まない。

【0022】

なおさらなる実施形態では、カチオン性結合は、L が、アルキル（例えば、-CH₂-CH₂-）、アルコキシ（-C-O-）およびアルキルアミノ（例えば、-CH₂-NH-）から選択される結合を含む長さ 12 原子までのリンカーであるが、但し、L における末端の原子（例えば、カルボニルまたは窒素に隣接する原子）は、炭素原子である場合のタイプ (b 2) のものである。

【0023】

モルホリノサブユニットはまた、以下にさらに記載されるような非リンベースのサブユニット間結合によって連結され得、ここで、少なくとも 1 個のサブユニット間結合は、上述のようなカチオン性のペンダント基で修飾される。例えば、モルホリノ環上の 5' 窒素原子は、スルファミド結合（例えば、図 2 G を参照のこと）、または尿素結合（この場合、リンが、それぞれ、炭素または硫黄で置換される）において用いられ得、そして、上記の構造 (b3) 中の 5' 窒素原子と同様の様式で修飾され得る。

【0024】

本発明のオリゴマーはまた、細胞内へのオリゴマーの輸送を増強するのに有効なペプチド輸送部分に結合され得る。輸送部分は、好ましくは、例えば図 1 D ならびに図 2 P ~ 2 Q に示されるように、オリゴマーの末端に結合される。

【0025】

好ましくは、輸送部分は、6 個 ~ 16 個のアミノ酸を含み、かつ、(X'Y'X')、(X'Y')、(X'Z') および (X'Z'Z') からなる群より選択される部分配列からなり、

ここで、

(a) X' サブユニットの各々は、独立して、アルギニンまたはアルギニンアナログを表し、該アナログは、構造 R¹N=C(NH₂)R² の側鎖を含むカチオン性 - アミノ酸であり、ここで、R¹ は H または R であり；R² は R、NH₂、NHR または NR₂ であり、ここで R は低級アルキルまたは低級アルケニルであり、そして、さらに、酸素または窒素を含み得；R¹ および R² は、一緒になって環を形成し得；そして、この側鎖は、R¹ または R² を介して該アミノ酸に連結される；

(b) Y' サブユニットの各々は、独立して、中性の直鎖状アミノ酸 - C(O) - (CHR)_n - NH - を表し、ここで、n は 1 ~ 7 であり、かつ、各 R は、独立して、H またはメチルである；そして

(c) Z' サブユニットの各々は、独立して、中性のアラルキル側鎖を持つ - アミノ酸を表す。

【0026】

選択した実施形態では、ペプチドは、(X'Y'X')、(X'Y')、(X'Z') および (X'Z'Z') から選択される単一の部分配列の少なくとも 2 回または少なくとも 3 回の繰り返しからなる配列を含む。例えば、ペプチドは、(X'Y'X')_p、(X'Y')_m および (X'Z'Z')_p のうち 1 つによって表される配列を含み得、ここで、p は 2 ~ 5 でありかつ m は 2 ~ 8 である。

【0027】

好ましくは、各 X' について、側鎖部分はグアニジルであり；各 Y' は、-CO-(CH₂)_n-NH- であり、ここで、n は 1 ~ 7 であり；そして、各 Z' は、フェニルアラニンである。Y' の好ましい実施形態では、n は 2 または 5 であり、その結果、Y' は、

- アラニンサブユニットおよび 6 - アミノヘキサン酸サブユニットから選択される。

【0028】

このタイプの好ましいペプチドとしては、単一の Y' サブユニットと交互になったアルギニン二量体を含むものが挙げられ、ここで、Y' は好ましくは Ahx である。例としては、式 (RY'R)₄ または式 (RRY')₄ を有するペプチドが挙げられる。一実施形態では、Y' は、6 - アミノヘキサン酸サブユニットであり、かつ p は 4 である。さらなる実施形態では、各 Z' はフェニルアラニンであり、かつ m は 3 または 4 である。

【0029】

結合されたペプチドは、好ましくは、例えば図 1 D に示されるように、リンカー Ahx - B を介してオリゴマーの末端に連結され、ここで、Ahx は 6 - アミノヘキサン酸サブユニットであり、かつ、B は - アラニンサブユニットである。

10

【0030】

関連する局面では、本発明は、モルホリノサブユニットの配列を有するオリゴマーのアンチセンス活性を、本明細書中に開示されるような少なくとも 1 個のカチオン性のサブユニット間結合を含むようにオリゴマーを修飾することによって増強する方法を提供し、モルホリノサブユニットの各々はサブユニット間結合により接合されており、そして、塩基対形成部分を支持する。一実施形態では、上記カチオン性のサブユニット間結合は、上記のようなタイプ (b1') の結合を含まない。アンチセンス活性の増強は、以下によって実証され得る：

(i) 対応する非修飾のオリゴマーにより提供される発現と比較した、コードタンパク質の発現の低下 (アンチセンスオリゴマーのその標的配列への結合が、上記コードタンパク質についての翻訳開始コドンブロックするのに有効である場合)、または

20

(ii) 対応する非修飾のオリゴマーにより提供される発現と比較した、コードタンパク質の発現の増加 (アンチセンスオリゴマーのその標的配列への結合が、正確にスプライシングを受けたときに上記タンパク質をコードするプレ mRNA 内の異常なスプライシング部位をブロックするのに有効である場合)。これらの影響の測定に適したアッセイは、以下にさらに記載される。一実施形態では、修飾は、本明細書中に記載されるような、細胞を含まない翻訳アッセイ、または、細胞培養におけるスプライシング補正・翻訳アッセイにおけるこの活性を提供する。好ましくは、活性は、少なくとも 2 個の因子、より好ましくは、少なくとも 5 個の因子、最も好ましくは、少なくとも 10 個の因子によって増強される。

30

【0031】

本明細書中に記載される化合物は、タンパク質の産生を阻害する方法において使用され得る。したがって、このようなタンパク質をコードする核酸は、本明細書中に開示されるように、少なくとも 1 個のカチオン性のサブユニット間結合を含む (好ましくは、20% ~ 50% のこのようなカチオン性結合を含む)、アンチセンスオリゴマーに対して暴露され、ここで、塩基対形成部分 Pi は、タンパク質の産生を阻害するのに有効な場所で核酸の一部とハイブリダイズするのに有効な配列を形成する。この場所は、例えば、mRNA の ATG 開始コドン、プレ mRNA のスプライシング部位、または、以下に記載されるようなウイルスの標的配列であり得る。

40

【0032】

好ましくは、オリゴマーは、標的配列への結合に関し、約 50 より高い T_m を有し、そして、これは、哺乳動物細胞によって能動的に取り込まれる。オリゴマーは、このような取り込みを促進するために、本明細書中に記載されるような輸送部分に結合され得る。

【0033】

一実施形態では、オリゴマーは、患者の冠状動脈の一領域における再狭窄のリスクを低下させる方法において使用され得、この領域は、遠位端に拡張可能なバルーンを備えるカテーテルを用いた冠状動脈血管形成術によって処置されたか、または、冠状動脈バイパス手術において形成された接合部にある。この方法は、損傷の血管部位への局所的な直接投与により、少なくとも 1 個のカチオン性のサブユニット間結合 (好ましくは、20% ~ 5

50

0 % のこのようなカチオン性結合) を含み、12 個 ~ 40 個のサブユニットを有し、かつ配列番号 59 により規定されるヒト c - m y c m R N A の A U G 開始部位領域内の少なくとも 12 個の連続する塩基の標的配列に対して相補的な塩基化配列を含む、本明細書中に記載されるようなオリゴマーを、患者における再狭窄のリスクを低下させるのに有効な量で、患者に投与する工程を包含する。化合物は、以下のうちの 1 つにより投与される：

(a) 血管の領域をアンチセンス化合物を含むレザバに接触させ、そして、イオン浸透療法またはエレクトロポレーションによって、レザバから血管内へと化合物を導入すること；

(b) カテーテルバルーンの表面上に含まれる注入器を介して、圧力下で、血管の領域内に直接カテーテルから化合物を注入すること、ここで、上記注入器は、血管内の中膜を貫通し得る；

(c) 被包された (e n t r a p p e d) 形態のアンチセンス化合物を含むマイクロ粒子を、血管の領域に注入するか、または、血管の領域に接触させること；

(d) カテーテルバルーンの表面上に含まれ、アンチセンス化合物を拡散可能な形態で含むヒドロゲルに、血管の領域を接触させること；

(e) 拡散可能な形態のアンチセンス化合物を含む外側表面層を有するステントに、血管の領域を接触させること；および

(f) 血管内投与によって化合物を注入し、血管組織への全身送達をもたらすこと。

【 0 0 3 4 】

アンチセンス化合物は、配列番号 43 により同定される配列に対し少なくとも 90 % の相同性を有するか、あるいは、配列番号 60 および 61 から選択される配列に対し少なくとも 90 % の相同性を有する標的化配列を有し得る。

【 0 0 3 5 】

別の実施形態では、オリゴマーは、プロセッシングを受ける前の m R N A における通常のスプライスアクセプター接合部の 5 ' 側の 1 ~ 約 25 塩基対下流を有する m R N A 配列に対して標的化され得る。このような標的化は、自然な m R N A のスプライシングが進行することを防止し、そして、スプライス改変体 m R N A を生じるのに有効である。

【 0 0 3 6 】

適切な標的タンパク質としては、例えば、転写因子、特に、癌遺伝子または癌原遺伝子のタンパク質 (例えば、m y c、m y b、r e l、f o s、j u n、a b l、b c l および p 53) ；マトリクスタンパク質 (例えば、インテグリンおよびカテドリン (c a t h e d r i n)) ；他の腫瘍発現タンパク質 (例えば、h C G) ；テロメラゼ；レセプタータンパク質；ウイルスタンパク質 (例えば、H I V、ヒトパピローマウイルスおよびヒトパルボウイルス B 19 のサブゲノムの (s u b g e n o m i c) スプライシングを受けた m R N A から発現されるタンパク質) ；および免疫調節性タンパク質 (例えば、C T L A - 4、B 7 - 2、P D - 1、F o x p 3、T G F および T N F レセプター) が挙げられる。

【 0 0 3 7 】

別の実施形態では、オリゴマーは、一本鎖で、ポジティブセンスゲノムが 12 k b 未満であり、かつ、複数の機能を持つタンパク質を含むポリタンパク質をコードする最初のオープンリーディングフレームを持つ、ピコルナウイルス属、カリシウイルス属、トガウイルス属またはフラビウイルス属からの R N A ウイルスの複製を阻害するために使用され得る。したがって、ウイルス、または、代表的にはウイルスに感染した細胞は、本明細書中に開示される、少なくとも 1 個のカチオン性のサブユニット間結合 (好ましくは、20 % ~ 50 % のこのようなカチオン性結合) を含み、かつ、最初のオープンリーディングフレームの翻訳開始領域にわたるウイルス標的配列に対し実質的に相補的な標的化塩基配列を支持するサブユニットの配列を有するオリゴマーに対して曝露される。

【 0 0 3 8 】

例示的な標的化配列は、以下からなる群より選択される配列に対し、少なくとも 90 % の相同性を有する：

10

20

30

40

50

(i) M a h o n e y 株および S a b i n 株のポリオウイルスについての配列番号 6 2

、

(i i) A 型肝炎ウイルスについての配列番号 6 3、

(i i i) ライノウイルス 1 4 についての配列番号 6 4、

(i v) ライノウイルス 1 6 についての配列番号 6 5、

(v) ライノウイルス 1 B についての配列番号 6 6。

【 0 0 3 9 】

カルシウイルスに対して指向される、他の例示的な標的化配列は、以下からなる群より選択される配列に対し、少なくとも 9 0 % の相同性を有する：

(i) 血清型 P a n - 1 ベシウイルス (v e s i v i r u s) についての配列番号 6 7
、 6 8 および 6 9、

(i i) ブタカリシウイルスについての配列番号 7 0、

(i i i) ノーウォークウイルスについての配列番号 7 1 ならびに

(i v) ネコカリシウイルスについての配列番号 7 2。

【 0 0 4 0 】

E 型肝炎ウイルスの阻害における使用については、標的化配列は、配列番号 7 3 および 7 4 からなる群より選択される配列に対し、少なくとも 9 0 % の相同性を有する。C 型肝炎フラビウイルスの阻害における使用については、標的化配列は、配列番号 7 5 により同定される H C V A U G 開始部位領域の少なくとも 1 2 個の連続する塩基配列に対して相補的である。例示的な標的化配列としては、配列番号 1 8 および 7 6 に対して少なくとも 9 0 % の相同性を有する配列が挙げられる。

【 0 0 4 1 】

さらなる実施形態では、オリゴマーは、一本鎖で、ポジティブセンスゲノムを持ち、かつ、F l a v i v i r i d a e 科、P i c o r n o v i r i d a e 科、C a l i c i v i r i d a e 科、T o g a v i r i d a e 科、A r t e r i v i r i d a e 科、C o r o n a v i r i d a e 科、A s t r o v i r i d a e 科または H e p e v i r i d a e 科のうちの 1 つから選択される R N A ウイルスの宿主細胞内での複製の阻害に使用され得る。

【 0 0 4 2 】

この方法は、ウイルスの標的配列として、その配列が内部にステム - ループの二次構造を形成し得る感染性ウイルスのポジティブ鎖の 5 ' 末端の 4 0 塩基以内にある領域を最初に同定する工程を包含する。次いで、段階的な固相合成によって、本明細書中に記載されるような少なくとも 1 つのカチオン性のサブユニット間結合を有し、好ましくは 2 0 % ~ 5 0 % のこのようなカチオン性結合を含み、かつ、内部で二重鎖構造を形成し得るウイルスのゲノム領域に相補的な少なくとも 1 2 のサブユニットの標的化配列を有するオリゴマーが構築され、ここで、このオリゴマーは、ウイルスの標的配列と共に、ウイルスのポジティブセンス鎖とオリゴヌクレオチド化合物とから構成されるヘテロ二重鎖構造を形成し得、そして、少なくとも 4 5 の解離の T_m と、このようなステム - ループ構造の崩壊とによって特徴付けられる。

【 0 0 4 3 】

標的配列は、入力 R N A (i n p u t R N A) 配列の最小自由エネルギー状態についての検索に基づいて二次構造の予測を行うことができるコンピュータプログラムによって、5 ' 末端配列、例えば、5 ' 末端の 4 0 塩基を解析することにより同定され得る。

【 0 0 4 4 】

関連する局面において、オリゴマーは、哺乳動物宿主細胞において、一本鎖のポジティブセンスゲノムを有する感染 R N A ウイルスであって、F l a v i v i r i d a e 科、P i c o r n o v i r i d a e 科、C a l i c i v i r i d a e 科、T o g a v i r i d a e 科、A r t e r i v i r i d a e 科、C o r o n a v i r i d a e 科、A s t r o v i r i d a e 科または H e p e v i r i d a e 科のうちの 1 つから選択される R N A ウイルスの複製を阻害する方法において使用され得る。この方法は、感染した宿主細胞に、本明細書中に記載されるような、内部でステム - ループ二次構造を形成し得るポジティブスト

10

20

30

40

50

ランドのウイルスゲノムの 5' 末端の 40 塩基以内の領域に対して相補的な少なくとも 12 のサブユニットの標的化配列を持つオリゴマーのウイルス阻害量を投与する工程を包含する。この化合物は、宿主細胞に投与されたときに、(i) ウイルスのポジティブセンス鎖とオリゴヌクレオチド化合物とから構成され、そして(ii) 少なくとも 45 の解離の T_m とこのようなステム・ループ構造の崩壊とによって特徴付けられる、ヘテロ二重鎖構造を形成させるのに有効である。この化合物は、ウイルスに感染したか、またはウイルス感染の危険性のある哺乳動物被験体に対して投与され得る。

【0045】

フラビウイルスまたはヘパシウイルス(Hepacivirus)の処置について、標的化配列は、以下の配列のうちの 1 つ内にあるステム・ループの二次構造に関連する領域に対して相補的である：

10

- (i) St Louis 脳炎ウイルスについての配列番号 77；
- (ii) 日本脳炎ウイルスについての配列番号 78；
- (iii) マリーバレー脳炎ウイルスについての配列番号 79；
- (iv) 西ナイル熱ウイルスについての配列番号 80；
- (v) 黄熱病ウイルスについての配列番号 81；
- (vi) デング熱ウイルス 2 型についての配列番号 82；
- (vii) C 型肝炎ウイルスについての配列番号 83；
- (viii) ダニ媒介ウイルスについての配列番号 84；
- (ix) オムスク出血性熱ウイルスについての配列番号 85；および
- (x) ポーワッサンウイルスについての配列番号 86。

20

【0046】

これらのウイルスについての例示的な標的化配列としては、以下の配列、または、関連する標的配列における二重鎖二次構造の 1 以上の領域と重なるこれらの配列の部分が挙げられる：

- (i) St Louis 脳炎ウイルスについての配列番号 87 および 88；
- (ii) 日本脳炎ウイルスについての配列番号 89 および 90；
- (iii) マリーバレー脳炎ウイルスについての配列番号 91 および 92；
- (iv) 西ナイル熱ウイルスについての配列番号 93 および 94；
- (v) 黄熱病ウイルスについての配列番号 95 および 96；
- (vi) デング熱ウイルスについての配列番号 97、98；
- (vii) C 型肝炎ウイルスについての配列番号 99 および 100；
- (viii) ダニ媒介ウイルスについての配列番号 101 および 102；
- (ix) オムスク出血性熱ウイルスについての配列番号 103 および 104；ならびに
- (x) ポーワッサンウイルスについての配列番号 105 および 106。

30

【0047】

エンテロウイルス、ライノウイルス、ヘパトウイルス(Hepatovirus)またはアフトウイルス(Aphthovirus)の処置について、標的化配列は、以下の配列のうちの 1 つ内にあるステム・ループの二次構造に関連する領域に対して相補的である：

40

- (i) Mahoney 株および Sabín 株のポリオウイルスについての配列番号 107；
- (ii) ヒトエンテロウイルス A についての配列番号 108；
- (iii) ヒトエンテロウイルス B についての配列番号 109；
- (iv) ヒトエンテロウイルス C についての配列番号 110；
- (v) ヒトエンテロウイルス D についての配列番号 111；
- (vi) ヒトエンテロウイルス E についての配列番号 112；
- (vii) ウシエンテロウイルスについての配列番号 113；
- (viii) ヒトライノウイルス 89 についての配列番号 114；
- (ix) ヒトライノウイルス B についての配列番号 115；

50

(x) 口蹄疫ウイルスについての配列番号 1 1 6 ; および

(x i) A 型肝炎ウイルスについての配列番号 1 1 7 。

【 0 0 4 8 】

これらのウイルスについての例示的な標的化配列としては、以下の配列、または、関連する標的配列における二重鎖二次構造の 1 以上の領域と重なるこれらの配列の部分が挙げられる：

(i) M a h o n e y 株および S a b i n 株のポリオウイルスについての配列番号 1 1 8 および 1 1 9 ;

(i i) ヒトエンテロウイルス A についての配列番号 1 2 0 および 1 2 1 ;

(i i i) ヒトエンテロウイルス B についての配列番号 1 2 2 および 1 2 3 ;

(i v) ヒトエンテロウイルス C についての配列番号 1 2 4 および 1 2 5 ;

(v) ヒトエンテロウイルス D についての配列番号 1 2 6 および 1 2 7 ;

(v i) ヒトエンテロウイルス E についての配列番号 1 2 8 および 1 2 9 ;

(v i i) ウシエンテロウイルスについての配列番号 1 3 0 および 1 3 1 ;

(v i i i) ヒトライノウイルス 8 9 についての配列番号 1 3 2 および 1 3 3 ;

(i x) ヒトライノウイルス B についての配列番号 1 3 4 および 1 3 5 ;

(x) 口蹄疫ウイルスについての配列番号 1 3 6 および 1 3 7 ; ならびに

(x i) A 型肝炎ウイルスについての配列番号 1 3 8 および 1 3 9 。

【 0 0 4 9 】

カリシウイルスまたはノロウイルスの処置について、標的化配列は、以下の配列のうちの 1 つ内にあるステム - ループの二次構造に関連する領域に対して相補的である：

(i) ネコカリシウイルスについての配列番号 1 4 0 ;

(i i) イヌカリシウイルスについての配列番号 1 4 1 ;

(i i i) ブタ腸ウイルスについての配列番号 1 4 2 ;

(i v) カリシウイルス株 N B についての配列番号 1 4 3 ; および

(v) ノーウォークウイルスについての配列番号 1 4 4 。

【 0 0 5 0 】

これらのウイルスについての例示的な標的化配列としては、以下の配列、または、関連する標的配列における二重鎖二次構造の 1 以上の領域と重なるこれらの配列の部分が挙げられる：

(i) ネコカリシウイルスについての配列番号 1 4 5 および 1 4 6 ;

(i i) イヌカリシウイルスについての配列番号 1 4 7 および 1 4 8 ;

(i i i) ブタ腸ウイルスについての配列番号 1 4 9 および 1 5 0 ;

(i v) カリシウイルス株 N B についての配列番号 1 5 1 および 1 5 2 ; ならびに

(v) ノーウォークウイルスについての配列番号 1 5 3 および 1 5 4 。

【 0 0 5 1 】

ヘペウイルス (H e p e v i r u s) 、 E 型肝炎ウイルスの処置について、標的化配列は、配列番号 1 5 5 として同定される配列内にあるステム - ループの二次構造と関連する領域に対して相補的である。例示的な標的配列としては、配列番号 1 5 6 および 1 5 7 、または、関連する標的配列における二次構造の 1 以上の領域と重なるこれらの配列の部分が挙げられる。

【 0 0 5 2 】

ルビウイルスまたはアルファウイルスの処置について、標的配列は、以下の配列のうちの 1 つ内にあるステム - ループの二次構造に関連する領域に対して相補的である：

(i) 風疹ウイルスについての配列番号 1 5 8 ;

(i i) 東部ウマ脳脊髄炎ウイルスについての配列番号 1 5 9 ;

(i i i) 西部ウマ脳脊髄炎ウイルスについての配列番号 1 6 0 ; および

(i v) ベネズエラウマ脳脊髄炎ウイルスについての配列番号 1 6 1 。

【 0 0 5 3 】

これらのウイルスの各々についての例示的な標的配列は、以下の配列番号によって同定

10

20

30

40

50

されるか、または、関連する標的配列における二重鎖二次構造の１以上の領域と重なるこれらの配列の部分である：

- (i) 風疹ウイルスについての配列番号 1 6 2 および 1 6 3 ；
- (i i) 東部ウマ脳脊髄炎ウイルスについての配列番号 1 6 4 および 1 6 5 ；
- (i i i) 西部ウマ脳脊髄炎ウイルスについての配列番号 1 6 6 および 1 6 7 ；ならびに
- (i v) ベネズエラウマ脳脊髄炎ウイルスについての配列番号 1 6 8 および 1 6 9 。

【 0 0 5 4 】

コロナウイルスまたはアルテリウイルス (A r t e r i v i r u s) の処置について、標的配列は、以下の配列のうちの１つ内にあるステム - ループの二次構造に関連する領域に対して相補的である：

- (i) S A R S コロナウイルス T O R 2 についての配列番号 1 7 0 ；
- (i i) ブタ流行性下痢ウイルスについての配列番号 1 7 1 ；
- (i i i) 伝染性胃腸炎ウイルスについての配列番号 1 7 2 ；
- (i v) ウシコロナウイルスについての配列番号 1 7 3 ；
- (v) ヒトコロナウイルス 2 2 9 E についての配列番号 1 7 4 ；
- (v i) マウス肝炎ウイルスについての配列番号 1 7 5 ；ならびに
- (v i i) ブタ生殖器系および呼吸器系症候群ウイルスについての配列番号 1 7 6 。

【 0 0 5 5 】

これらのウイルスの各々についての例示的な標的配列は、以下の配列番号によって同定されるか、または、関連する標的配列における二重鎖二次構造の１以上の領域と重なるこれらの配列の部分である：

- (i) S A R S コロナウイルス T O R 2 についての配列番号 1 7 7 および 1 7 8 ；
- (i i) ブタ流行性下痢ウイルスについての配列番号 1 7 9 および 1 8 0 ；
- (i i i) 伝染性胃腸炎ウイルスについての配列番号 1 8 1 および 1 8 2 ；
- (i v) ウシコロナウイルスについての配列番号 1 8 3 および 1 8 4 ；
- (v) ヒトコロナウイルス 2 2 9 E についての配列番号 1 8 5 および 1 8 6 ；
- (v i) マウス肝炎ウイルスについての配列番号 1 8 7 および 1 8 8 ；ならびに
- (v i i) ブタ生殖器系および呼吸器系症候群ウイルスについての配列番号 1 8 9 および 1 9 0 。

【 0 0 5 6 】

マラストロウイルス (M a m a s t r o v i r u s) 、ヒトアストロウイルスの処置について、標的配列 1 9 1 は、配列番号として同定される配列内にあるステム - ループの二次構造と関連する領域に対して相補的である。例示的な標的配列は、配列番号 1 9 3 および 1 9 4 、または、関連する標的配列における二重鎖二次構造の１以上の領域と重なるこれらの配列の部分である。

【 0 0 5 7 】

ウマ動脈炎ウイルスの処置について、標的配列は、配列番号 1 9 2 として同定される配列内にあるステム - ループの二次構造と関連する領域に対して相補的である。例示的な標的配列は、配列番号 1 9 5 、 1 9 6 、または、関連する標的配列における二重鎖二次構造の１以上の領域と重なるこれらの配列の部分である。

【 0 0 5 8 】

活性化された H I V 感染ヒト造血細胞 (例えば、マクロファージまたは T リンパ球) において H I V - 1 の複製を選択的に阻害するための方法において、このような活性化された H I V - 1 感染細胞は、本明細書中に記載されるような、少なくとも１つのカチオン性のサブユニット間結合を有し、好ましくは、 2 0 % ~ 5 0 % のこのようなカチオン性結合を有し、好ましくは配列番号 1 9 7 ~ 1 9 9 からなる群より選択される配列のうちの１つにより同定される H I V - 1 のポジティブ鎖 R N A の領域にある少なくとも 1 2 の連続する塩基から構成されるウイルス標的配列に対して実質的に相補的な塩基配列を持つ、アンチセンスオリゴマーに対して曝露される。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 9 】

一実施形態では、オリゴマーは、配列番号 1 9 7 の一領域とハイブリダイズして、感染細胞における HIV V i f タンパク質の合成を阻害し得る。この実施形態における化合物は、配列番号 2 0 0 ~ 2 0 3 からなる群より選択される配列のうち 1 つからの少なくとも 1 2 の連続する塩基を有し得る。

【 0 0 6 0 】

別の実施形態では、オリゴマーは、配列番号 1 8 の一領域とハイブリダイズして、H I V m R N A 転写物の転写を阻害し得る。この実施形態の化合物は、配列番号 2 0 4 および 2 0 5 として同定される配列からの少なくとも 1 2 の連続する塩基を有し得る。

【 0 0 6 1 】

別の実施形態では、オリゴマーは、配列番号 1 9 の一領域とハイブリダイズして、マイナス鎖の転移段階をブロックすることによってウイルス R N A の逆転写を阻害し得る。この実施形態における化合物は、配列番号 2 0 6 として同定される配列からの少なくとも 1 2 の連続する塩基を有し得る。

【 0 0 6 2 】

別の実施形態では、オリゴマーは、本明細書中に記載され、少なくとも 1 つのカチオン性のサブユニット間結合を含み、好ましくは 2 0 % ~ 5 0 % のこのようなカチオン性結合を含む、ウイルス感染細胞におけるニドウイルス (n i d o v i r u s) の複製を阻害するのに十分な量のオリゴマーに対してヒト細胞を曝露することによって、ヒト細胞においてニドウイルスの感染を阻害する方法において使用され得る。オリゴマーは、配列番号 2 0 7 ~ 2 0 9 の群からのニドウイルスのポジティブ鎖のゲノム R N A の 5 ' リーダー配列内の配列に含まれる少なくとも 8 塩基に対して相補的な配列を有し、この配列の各々は、内部リーダー転写調節配列を含む；そして

オリゴマーは、ニドウイルスのポジティブ鎖ゲノム R N A と共に、少なくとも 4 5 の解離の T_m と、(2) ポジティブ鎖ウイルスゲノムの 5 ' リーダー領域における転写調節配列とネガティブ鎖の 3 ' 部分ゲノム領域における転写調節配列との間の塩基対形成の崩壊とによって特徴付けられる二重鎖構造を形成し得る。

【 0 0 6 3 】

化合物の配列は、配列番号 2 0 7 ~ 2 0 9 の配列のうち 1 つに含まれる転写調節配列の少なくとも一部分に対して相補的であり得る。この実施形態における例示的な化合物の配列としては、配列番号 2 1 0 ~ 2 1 4 が挙げられる。

【 0 0 6 4 】

ヒト S A R S ウイルスの複製の阻害における使用について、化合物は、配列番号 2 1 3 および 2 1 4 の配列のうち 1 つを含み得る。ヒトコロナウイルス 2 2 9 E またはヒトコロナウイルス O C 4 3 の複製の阻害における使用について、化合物は、コロナウイルス 2 2 9 E については配列番号 2 1 0 または 2 1 1 の配列のうちの 1 つを含み得、そして、コロナウイルス O C 4 3 については、配列番号 2 1 2 の配列を含み得る。

【 0 0 6 5 】

ヒト被験体におけるニドウイルス感染の処置における使用について、化合物が、被験体に経口的に、または、肺送達によって投与されて、化合物をウイルス感染細胞と接触させ得る。

【 0 0 6 6 】

別の実施形態では、オリゴマーは、ヒト樹状細胞を T 細胞の抗原特異的な活性化の能力が低下した状態へと、そして、細胞外 I L - 1 0 の産生が増加した成熟な樹状細胞に誘導する方法において使用され得る。この方法は、本明細書中に記載されるような、少なくとも 1 つのカチオン性のサブユニット間結合を含み、好ましくは 2 0 % ~ 5 0 % のこのようなカチオン性結合を含み、かつ、そのプロセッシングされた形態において、配列番号 2 1 5 によって同定されるプロセッシングを受ける前かまたはプロセッシングを受けた後のヒト C D - 8 6 転写物の発現感受性領域に対してハイブリダイズし、この化合物と転写物との間で、少なくとも 4 5 の T_m を有するヘテロ二重鎖構造を形成するのに有効な塩基配列を含

10

20

30

40

50

むオリゴマーに対して、ヒト樹状細胞の集団を曝露する工程を包含する。ヘテロ二重鎖の形成は、この細胞における全長CD86の発現をブロックし、次いで、樹状細胞の表面上での全長CD86の発現の阻害をもたらす、そして、成熟な樹状細胞による細胞外IL-10の発現の増強をもたらす。

【0067】

プロセッシングを受けたヒトCD86転写物の開始部位に近い発現感受性標的領域にハイブリダイズするのにアンチセンスオリゴマーが有効である場合、このオリゴマーは、配列番号216によって同定される、プロセッシングを受けたヒトCD86転写物における少なくとも12の連続する塩基を含む標的領域に対して相補的な塩基配列を有し得、ここで、この化合物は、プロセッシングを受けた転写物の翻訳をブロックするのに有効である。アンチセンス化合物は、例えば、配列番号48～50によって同定される塩基配列のうち1つを有し得る。

10

【0068】

アンチセンスオリゴマーが、プロセッシングを受ける前のヒトCD86のスプライシング部位にハイブリダイズするのに有効である場合、化合物は、プロセッシングを受ける前のヒトCD86転写物におけるスプライシング部位の少なくとも12の連続する塩基に対して相補的な塩基配列を有し得、ここで、この化合物は、プロセッシングを受ける前のCD86転写物のプロセッシングをブロックし、全長のプロセッシングを受けたCD86転写物をもたらすのに有効である。プロセッシングを受ける前のCD86転写物におけるスプライシング部位は、配列番号217～220により同定される配列のうち1つを有し得る。アンチセンス化合物は、例えば、配列51～54により同定される塩基配列のうち1つを有し得る。

20

【0069】

同種の組織または器官の移植を受けたヒト被験体における移植拒絶の阻害における使用について、オリゴマーは、移植拒絶の進度および程度を阻害するのに有効な量で被験体に対し投与される。化合物は、被験体における同種の組織または器官の移植の前および後の両方に投与され得、そして、化合物の投与は、1週間～3週間の選択された期間にわたって行われ得る。化合物は、必要に応じて、被験体における移植拒絶の程度を制御するために被験体に対してさらに投与され得る。

【0070】

30

ヒト被験体における自己免疫状態の処置における使用について、オリゴマーは、自己免疫状態の重篤度を低下させるのに有効な量で被験体に対して投与され得る。化合物は、必要に応じて、被験体における自己免疫状態の重篤度を制御するために、長期間にわたって投与され得る。

【0071】

別の実施形態では、オリゴマーは、一本鎖のネガティブセンスゲノムを持ち、そして、インフルエンザウイルスA属、インフルエンザウイルスB属およびインフルエンザウイルスC属を含むOrthomyxoviridae属から選択されるRNAウイルスの宿主細胞内での複製を阻害する方法において使用され得る。宿主細胞は、本明細書中に記載されるような、少なくとも1つのカチオン性のサブユニット間結合を含み、好ましくは20%～50%のこのようなカチオン性結合を含み、かつ、以下：i) インフルエンザウイルスA、インフルエンザウイルスBおよびインフルエンザウイルスCのネガティブセンスRNAセグメントの5'末端または3'末端の25塩基、ii) インフルエンザウイルスA、インフルエンザウイルスBおよびインフルエンザウイルスCのポジティブセンスcRNAの3'末端の末端30塩基、ならびに、iii) インフルエンザウイルスmRNAのAUG開始コドン周辺50塩基から選択される標的領域にハイブリダイズするのに有効な塩基配列を含む、オリゴマーと接触させられる。

40

【0072】

このオリゴマーは、インフルエンザウイルスに感染したか、または、インフルエンザウイルス感染の危険性のある哺乳動物被験体に投与され得る。

50

【 0 0 7 3 】

インフルエンザ A ウイルスの処置について、標的配列は、配列番号 2 2 1 および 2 2 2 として同定される配列の群のうちの 1 つと関連する領域に対してハイブリダイズする。好ましい標的配列は、配列番号 2 2 2 のマイナス鎖標的または配列番号 2 2 1 のポジティブ鎖標的のいずれかに対して相補的なものである。これらの 2 つの領域を標的とする例示的なアンチセンスオリゴマーは、それぞれ、配列番号 2 2 3 および 2 2 4 として列挙される。

【 0 0 7 4 】

別の実施形態では、本明細書中に記載されるような 1 以上のオリゴマーは、本明細書中に記載され、少なくとも 1 つのカチオン性のサブユニット間結合を含み、好ましくは 2 0 % ~ 5 0 % のこのようなカチオン性結合を含み、かつ、配列番号 2 5 0 ~ 2 5 5 からなる群より選択されるフィロウイルス m R N A のうちの 1 つによって同定されるポジティブ鎖 m R N A の A U G 開始部位領域内の少なくとも 1 2 の連続する塩基から構成される標的配列に対して相補的な標的塩基配列を持つ、オリゴマーに細胞を接触させることによって、エボラウイルスまたはマルブルクウイルスの宿主細胞内での複製を阻害する方法において使用され得る。

10

【 0 0 7 5 】

エボラウイルス感染の処置について、化合物は、配列番号 2 5 0 からなる群より選択される標的配列により同定される V P 3 5 A U G 開始部位領域内の少なくとも 1 2 の連続する塩基から構成される標的配列に対して相補的な標的化配列を有し得る。例示的な標的化配列番号は、配列番号 1 により同定される。

20

【 0 0 7 6 】

エボラウイルス感染の処置についての別の実施形態では、化合物は、それぞれ配列番号 2 5 1 および 2 5 2 からなる群より選択される標的配列によって同定される、V P 2 4 A U G または L A U G の開始部位領域内の少なくとも 1 2 の連続する塩基から構成される標的配列に対して相補的な標的化配列を有し得る。例示的な標的化配列としては、それぞれ、配列番号 5 および 1 1 が挙げられる。

【 0 0 7 7 】

マルブルクウイルス感染の処置について、化合物は、配列番号 2 5 3 によって同定される標的配列により同定される V P 3 5 A U G 開始部位領域内の少なくとも 1 2 の連続する塩基から構成される標的配列に対して相補的な標的化配列を有し得る。例示的な標的化配列は、配列番号 2 5 6 および 2 5 7 からなる群より選択される。

30

【 0 0 7 8 】

マルブルクウイルス感染の処置についての別の実施形態では、化合物は、それぞれ配列番号 2 5 4 および 2 5 5 からなる群より選択される標的配列によって同定される、V P 2 4 A U G または L A U G の開始部位領域内の少なくとも 1 2 の連続する塩基から構成される標的配列に対して相補的な標的化配列を有し得る。例示的な標的化配列は、配列番号 2 5 8 ~ 2 6 0 によって同定される。

【 0 0 7 9 】

本明細書中に開示されるオリゴマーはまた、上記のような標的化配列を有するオリゴマーの治療上有効な量を被験体に投与することによって、被験体におけるエボラまたはマルブルクのフィロウイルス感染を処置する方法において、または、本明細書中に記載され、かつ、上記のような標的化配列を有するオリゴマーを用いて被験体を予め処置し、そして、その被験体をエボラウイルス（好ましくは、弱毒化された形態）に対して曝露することによって、エボラウイルスに対して哺乳動物被験体を予防接種する方法において使用され得る。

40

【 0 0 8 0 】

別の実施形態では、本明細書中に記載されるオリゴマーは、ヒト被験体における骨格筋重量の減少を処置するための方法において使用され得る。この方法における工程は、以下を伴う：

50

(a) 被験体におけるミオスタチンの血中レベルまたは組織レベルを測定する工程；

(b) 本明細書中に記載され、少なくとも1つのカチオン性のサブユニット間結合を含み、好ましくは、20%～50%のこのようなカチオン性結合を含み、かつ、そのプロセシングを受けた形態で配列番号225によって同定される、プロセシングを受けたかまたはプロセシングを受ける前のヒトミオスタチンRNA転写物の発現感受性領域にハイブリダイズするのに有効な塩基配列を有するオリゴマーのミオスタチンの発現を阻害する量を被験体に投与する工程；

(c) この投与によって、被験体の標的筋肉細胞内で、ヒトミオスタチンRNA転写物とアンチセンス化合物とから構成され、かつ、少なくとも45の解離の T_m を有する塩基対形成したヘテロ二重鎖構造を形成させ、それによって、上記細胞におけるミオスタチンの発現を阻害する工程；

(d) アンチセンス化合物の投与後の選択した時点で、被験体におけるミオスタチンの血中レベルまたは組織レベルを測定する工程；および

(e) 投与されるアンチセンス化合物の量の用量または投薬計画を必要に応じて調節するために(d)において測定したミオスタチンレベルを用いて投与を繰り返し、ミオスタチンの測定したレベルを最初に測定したレベルを上回って減少させ、工程(d)において測定したミオスタチンのこのようなレベルを正常な健康な個体について決定した範囲内に維持する工程。

【0081】

アンチセンスオリゴマーが、プロセシングを受ける前のヒトミオスタチン転写物のスプライシング部位にハイブリダイズするのに有効である場合、このオリゴマーは、プロセシングを受ける前のヒトミオスタチン転写物におけるスプライシング部位の少なくとも12の連続する塩基に対して相補的な塩基配列を有し、そして、工程(c)におけるヘテロ二重鎖の形成は、プロセシングを受ける前のミオスタチン転写物のプロセシングをブロックし、全長のプロセシングを受けたミオスタチン転写物をもたらすのに有効である。プロセシングを受ける前のミオスタチン転写物におけるスプライシング部位は、配列番号226～229として同定される配列のうちの1つを有し得る。例示的なアンチセンス配列は、配列番号230～233によって同定されるものである。

【0082】

別の実施形態では、本明細書中に記載されるようなオリゴマーは、Picornaviridae属におけるエンテロウイルスまたはライノウイルスによる哺乳動物細胞におけるウイルス感染を阻害するための方法において使用され得る。この方法は、本明細書中に記載され、少なくとも1つのカチオン性のサブユニット間結合を含み、好ましくは、20%～50%のこのようなカチオン性結合を含み、かつ、ウイルスのポジティブセンス鎖における配列番号55または配列番号56に対して相補的な少なくとも12のサブユニットの標的化配列を有するアンチセンスオリゴマーに対して細胞を曝露し、それによって、ウイルスのポジティブセンス鎖とオリゴマーとから構成され、少なくとも45の解離の T_m によって特徴付けられるヘテロ二重鎖構造を形成させる工程を包含する。

【0083】

オリゴマーは、配列番号235～237によって同定される配列のうちの1つのような、配列番号234内に含まれる配列を有し得る。あるいは、オリゴマーは、配列番号239～245によって同定される配列のうちの1つのような、配列番号238内に含まれる配列を有し得る。

【0084】

Picornaviridae属のエンテロウイルスまたはライノウイルスにより感染された哺乳動物被験体の処置における使用について、オリゴマーは、薬学的に有効な量で被験体に投与される。化合物の投与は、ウイルス感染またはその症状の有意な減少が認められるまで継続され得る。Picornaviridae属のエンテロウイルスまたはライノウイルスによる感染の危険性がある哺乳動物被験体の処置における使用について、オリゴマーは、ウイルスによる被験体宿主細胞の感染を阻害するのに有効な量で被験体に投

10

20

30

40

50

与される。

【0085】

別の実施形態では、本明細書中に記載されるオリゴマーは、本明細書中に記載され、少なくとも1つのカチオン性のサブユニット間結合を含み、20%～50%のこのようなカチオン性結合を含み、かつ、配列番号246により同定される標的配列の少なくとも12のサブユニットに対して相補的で、哺乳動物のプロセシングを受ける前のT細胞抗原-4 (CTLA-4) mRNAのイントロン1とエキソン2との間のスプライシング接合部にまたがる、少なくとも12のサブユニットの標的化配列を有するオリゴマーの薬学的に有効な量を被験体に投与することによって、哺乳動物被験体における免疫応答を抑制するための方法において、例えば、自己免疫状態または移植拒絶の処置または防止のために使用され得る。この化合物は、哺乳動物細胞においてプロセシングを受ける前のCTLA-4 mRNAと反応して、(i) 少なくとも45 の解離の T_m によって特徴付けられ、そして(ii) これらの細胞における、リガンド非依存性のCTLA-4をコードするプロセシングを受けたmRNAの、全長CTLA-4をコードするプロセシングを受けたmRNAに対する割合を高めるのに有効であるヘテロ二重鎖を形成し得る。

10

【0086】

同種の器官移植を受ける予定のヒト被験体における移植拒絶の予防について、化合物の投与は、予定された移植の少なくとも1週間前に開始され得る。自己免疫状態の処置について、化合物の投与は、自己免疫状態の所望される改善が観察されるまで継続され得る。

【図面の簡単な説明】

20

【0087】

【図1A】図1Aは、例示的な無電荷結合構造を示す。

【図1B】図1Bおよび1Cは、本発明の例示的なカチオン性結合構造を示し、各Bは、独立して、塩基対形成部分である。

【図1C】図1Bおよび1Cは、本発明の例示的なカチオン性結合構造を示し、各Bは、独立して、塩基対形成部分である。

【図1D】図1Dは、例示的なカチオン性のサブユニット間結合を含み、末端がアルギニンリッチなペプチド輸送部分に結合されたモルホリノオリゴマーを示す。(図1Cおよび1Dには複数のタイプのカチオン性結合が示されるが、オリゴマーは、代表的には、1つのタイプのカチオン性結合を含む)。

30

【図2A】図2Aは、A、C、G、TおよびIの保護された認識部分Piを持つ、代表的なモルホリノサブユニット1a～eを示す。

【図2B】図2Bは、対応するリボヌクレオシドから図2Aのサブユニットを調製するための合成スキームを示す。

【図2C】図2Cは、本明細書中で称されるような、結合タイプ(a)(無電荷)および結合タイプ(b1)および(b2)(荷電)を調製するための、活性化され、保護されたサブユニットの調製を示す。

【図2D】図2Dは、(1-ピペラジノ)ホスフィニルインデンオキシ(「Pip」)結合を含むモルホリノサブユニットを作製するために使用され得る合成経路の概略図である。

40

【図2E】図2Eおよび2Fは、本明細書中で称されるような、タイプ(b3)の結合(荷電)を調製するための、活性化され、保護されたサブユニットの調製を示す。

【図2F】図2Eおよび2Fは、本明細書中で称されるような、タイプ(b3)の結合(荷電)を調製するための、活性化され、保護されたサブユニットの調製を示す。

【図2G】図2Gは、タイプ(b3)に類似するが、非リン含有結合に基づく結合(荷電)(具体的には、スルホンアミド結合)を調製するために使用され得るサブユニットの調製を示す。

【図2H】図2Hは、モルホリノオリゴマーの段階的な調製のために使用される合成樹脂の修飾に使用するためのジスルフィドアンカーの調製を示し、これは、チオールでの処理によりオリゴマーの容易な放出を可能にする。

50

【図 2 I】図 2 I は、合成アンチセンスオリゴマーの水溶性を高めるトリエチレングリコール含有部分（「テイル」）の導入を示す。

【図 2 J】図 2 J は、モルホリノオリゴマーの固相合成に有用な樹脂の調製を示す。

【図 2 K】図 2 K は、大規模なオリゴマー合成のための N 2 , O 6 - 保護モルホリノ G サブユニットの調製を示す。

【図 2 L】図 2 L は、モルホリノオリゴマー上のアミンの直接的なグアニル化によるグアニジニウム基の導入を示す。

【図 2 M】図 2 M は、アミノ酸およびグアニジノ酸の組み込みによる、モルホリノオリゴマーへのグアニジニウム基の導入を示す。

【図 2 N】図 2 N は、骨格および末端位置におけるグアニジノ酸の組み込みによる、モルホリノオリゴマーへのグアニジニウム基の導入を示す。

【図 2 O】図 2 O は、骨格モルホリノオリゴマーへのペプチドの導入を示す。

【図 2 P】図 2 P は、骨格中に結合タイプ b 1 の荷電基を有するモルホリノオリゴマーの 3' 末端における輸送ペプチドの導入を示す。

【図 2 Q】図 2 Q は、骨格中に G u X 結合を有するモルホリノオリゴマーの 3' 末端における輸送ペプチドの導入を示す。

【図 2 R】図 2 R は、モルホリノオリゴマーのアミンの還元的アルキル化を示す。

【図 3】図 3 は、無細胞の翻訳アッセイにおいて、E B O V V P 2 4 m R N A を標的とするカチオン性結合を持つ + P M O のアンチセンス活性が、無電荷の P M O と比較して増加したことを示す。使用した + P M O は、それぞれ、8 および 6 のカチオン性結合を持つ V P 2 4 - 8 + (配列番号 1 0) および V P 2 4 5' t r m 6 + (配列番号 9) であり、その無電荷 P M O の相対物（それぞれ、配列番号 4 および 4 ）と比較した。

【図 4】図 4 は、無細胞の翻訳アッセイにおける L 遺伝子 m R N A を標的とする + P M O のアンチセンス活性が増加したことを示す。

【図 5】図 5 は、E B O V V P 3 5 : ルシフェラーゼ m R N A を用いてプログラムされた無細胞の翻訳アッセイにおいて使用される際に、E B O V L 遺伝子を標的とする + P M O の特異性を示す。グラフは、1 m M の + P M O 濃度まで、標的以外に対するアンチセンス活性がないことを示す。

【図 6】図 6 は、E B O V V P 2 4 遺伝子を標的とする 3 つの異なる + P M O (V P 2 4 - 2 + 、 V P 2 4 - 4 a + および V P 2 4 - 4 b + ; それぞれ、配列番号 6 ~ 8) についての、感染後 1 4 日間の期間にわたるマウスの生存率として表し、そして、無電荷 P M O コントロール (V P - 2 4 ; 配列番号 5) およびリン酸緩衝化生理食塩水のネガティブ処置コントロール (P B S) と比較した、処置の効力のプロットである。

【図 7】図 7 は、材料および方法に記載される細胞培養におけるスプライシング補正および翻訳のアッセイにおいて、カチオン性「P i p」結合の配置が異なる (P 8 - 中央 (c e n t a l i z e d) 、 P 8 - 分散 (d i s p e r s e d) 、 P 6 - 分散 (d i s p e r s e d) 、 P 4 - 分散 (d i s p e r s e d) および P 8 - 分極 (p o l a r i z e d)) + P M O のアンチセンス活性が、無電荷の P M O (「 7 0 5 」 ; 配列番号 2 8 6) に対して増加したことを示す。

【図 8】図 8 は、図 8 に記載されるような細胞培養におけるスプライシング補正・翻訳のアッセイにおいて、カチオン性「G u X」結合の配置が異なる (G 8 - 中央 (c e n t a l i z e d) 、 G 8 - 分散 (d i s p e r s e d) 、 G 6 - 分散 (d i s p e r s e d) 、 G 4 - 分散 (d i s p e r s e d) および G 8 - 分極 (p o l a r i z e d) ; 配列番号 4 8 ~ 5 2) + P M O - G u X のアンチセンス活性が、無電荷の P M O (配列番号 2 8 6) に対して増加したことを示す。

【図 9】図 9 は、図 8 に記載されるような細胞培養におけるスプライシング補正・翻訳のアッセイにおいて、スクランブルの配列対応物 (S C R) を持つ「P 8 - 中央 (c e n t a l i z e d) 」P i p 修飾 + P M O (図 7 を参照のこと) および「G 8 - 中央 (c e n t a l i z e d) 」G u X 修飾 + P M O - G u X (図 8 を参照のこと) ならびに無電荷の P M O のアンチセンス活性を比較する。

10

20

30

40

50

【図10】図10は、同じ配列の無電荷PMOと比較した、図7および8からの選択した+PMOおよび+PMO-GuXオリゴマーの結合親和性(T_m)を示す。

【図11A】図11A~Bは、図7について記載されるような細胞培養におけるスプライシング補正・翻訳アッセイにおいて、+PMO、+PMO-GuXおよびペプチド結合無電荷PMO(「PPMO」)の取り込み/アンチセンス活性が、非結合の無電荷PMO(配列番号286)に対して増加したことを示す。図11Aは、10 μ Mまでの濃度依存性の作用を示し、そして、図11Bは、100 μ Mまでの濃度依存性の作用を示す。

【図11B】図11A~Bは、図7について記載されるような細胞培養におけるスプライシング補正・翻訳アッセイにおいて、+PMO、+PMO-GuXおよびペプチド結合無電荷PMO(「PPMO」)の取り込み/アンチセンス活性が、非結合の無電荷PMO(配列番号286)に対して増加したことを示す。図11Aは、10 μ Mまでの濃度依存性の作用を示し、そして、図11Bは、100 μ Mまでの濃度依存性の作用を示す。

【図12】図12は、無電荷のCYP3A4 PMOと比較した、CYP3A2:ルシフェラーゼ融合遺伝子のmRNAの無細胞の翻訳の+PMOによる阻害のグラフである(配列番号35~42)。種々の+PMOおよびPMOについてのEC50の値もまた示す。

【発明を実施するための形態】

【0088】

詳細な説明

I. 定義

本明細書中に記載されるような以下の用語は、他にそうでないと示されない限り、以下の意味を有する:

用語「アンチセンスオリゴマー」または「アンチセンス化合物」は、交換可能に使用され、そして、各々が、リボースもしくは他のペントース糖もしくはモルホリノ基から構成される骨格サブユニット上に塩基が保持され、そして、骨格基が、サブユニット間結合により連結された一連のサブユニットを指し、このサブユニット間結合は、ワトソン-クリック塩基対形成により化合物中の塩基が核酸(代表的にはRNA)中の標的配列にハイブリダイズして、標的配列内に核酸:オリゴマーヘテロ二重鎖を形成することを可能にする。オリゴマーは、標的配列に対して完全に相補的な配列または、相補的に近い配列を有し得る。このようなアンチセンスオリゴマーは、標的配列を含むmRNAの翻訳をブロックまたは阻害するように設計され、そして、このアンチセンスオリゴマーがハイブリダイズする配列「に対して指向される」と言うことができ得る。

【0089】

「モルホリノオリゴマー」は、代表的なポリヌクレオチドに水素結合し得る塩基を支持する骨格を持つポリマー性分子を指し、ここで、このポリマーには、ヌクレオチドおよびヌクレオシドには典型的なホスホジエステル結合により連結されたペントース糖骨格部分(より具体的には、リボース骨格)はなく、代わりに、環窒素を含み、環窒素を介してカップリングする。好ましい「モルホリノ」オリゴマーは、1つのサブユニットのモルホリノ窒素を隣接するサブユニットの5'環外炭素に接合する(チオ)ホスホロアミデート結合または(チオ)ホスホロジアミデート結合によって一緒に連結されたモルホリノサブユニット構造から構成され、これらのサブユニットの各々は、塩基特異的な水素結合によって、ポリヌクレオチド中の塩基と結合するのに有効なプリン塩基対形成部分またはピリミジン塩基対形成部分を含む。モルホリノオリゴマー(アンチセンスオリゴマーを含む)は、例えば、共有に係る国特許第5,698,685号、同第5,217,866号、同第5,142,047号、同第5,034,506号、同第5,166,315号、同第5,185,444号、同第5,521,063号および同第5,506,337号(これらは全て、明示的に本明細書中に参考として援用される)において詳述される。

【0090】

「ホスホロアミデート」基は、3つの酸素原子が結合され、かつ、1つの窒素原子が結合されたリンを含み、一方、「ホスホロジアミデート」基(例えば、図1A~Bを参照のこと)は、2つの酸素原子が結合され、かつ2つの窒素原子が結合されたリンを含む。本

10

20

30

40

50

明細書中に記載されるオリゴマーの無電荷もしくはカチオン性のサブユニット間結合において、1つの窒素は、常に骨格鎖からぶら下がっている。ホスホロジアミデート結合において、第二の窒素は代表的に、モルホリノ環構造内の環窒素である（再度、図1A～Bを参照のこと）。

【0091】

チオホスホロアミデート結合またはチオホスホロジアミデート結合において、1つの酸素原子、代表的には本明細書中に記載されるオリゴマー中の骨格に対してぶら下がっている酸素は、硫黄で置き換えられる。

【0092】

用語「荷電」、「無電荷」、「カチオン性」および「アニオン性」は、本明細書中で使用される場合、中性付近のpH（例えば、6～8）における化学部分の主流を成す状態を指す。好ましくは、この用語は、生理学的pH、すなわち、約7.4における化学部分の主流を成す状態を指す。

10

【0093】

「低級アルキル」は、メチル、エチル、n-ブチル、i-ブチル、t-ブチル、イソアミル、n-ペンチルおよびイソペンチルにより代表されるような、1～6個の炭素原子のアルキル基を指す。選択した実施形態において、「低級アルキル」基は、1～4個の炭素原子、または1～2個の炭素原子を有する（すなわち、メチルまたはエチル）。同様に、「低級アルケニル」は、アリルおよびブテニルにより代表されるような、2～6個、好ましくは、3個または4個の炭素原子のアルケニル基を指す。

20

【0094】

「非干渉性」置換基は、本明細書中に記載されるようなアンチセンスオリゴマーがその意図する標的に結合する能力に有害な影響を与えない置換基である。このような置換基としては、メチル、エチル、メトキシ、エトキシ、ヒドロキシまたはフルオロのような、小さく、好ましくは、非極性の基が挙げられる。

【0095】

オリゴヌクレオチドまたはアンチセンスオリゴマーは、そのオリゴマーが、生理学的条件下で37より高い T_m で標的にハイブリダイズする場合に、標的ポリヌクレオチドに対して「特異的にハイブリダイズする」。オリゴマーの「 T_m 」は、50%が相補的なポリヌクレオチドにハイブリダイズする温度である。 T_m は、例えば、Miyadaira, Methods Enzymol. 154:94-107 (1987)に記載されるように、生理食塩水中で標準的な条件の下で決定される。

30

【0096】

ポリヌクレオチドは、ハイブリダイゼーションが2つの一本鎖ポリヌクレオチド間でアンチパラレルの立体配置で生じる場合、互いに「相補的である」として記載される。相補性（1つのポリヌクレオチドが別のポリヌクレオチドと相補的である程度）は、一般に容認される塩基対形成の規則に従って互いに水素結合を形成することが予測される対向する鎖中の塩基の比率の点から定量化可能である。

【0097】

第一の配列は、その配列が第一の配列であるポリヌクレオチドが、生理学的な条件下で、第二のポリヌクレオチド配列に特異的に結合するか、または、第二のポリヌクレオチド配列と特異的にハイブリダイズする場合に、第二の配列に関して「アンチセンス配列」である。

40

【0098】

用語「標的化配列」は、RNAゲノム中の標的配列に対して相補的な（加えて、実質的に相補的であることも意味する）オリゴヌクレオチドアナログ内の配列である。このアナログ化合物の全配列または一部のみが、標的配列に対して相補的であり得る。例えば、20塩基を有するアナログにおいて、12～14のみが標的化配列であり得る。代表的には、標的化配列は、アナログにおいて連続塩基の形態をとるが、代替的には、例えば、アナログの反対側から一緒に並べられるときに、標的配列にまたがる配列を構成する、非連続

50

配列の形態をとり得る。

【 0 0 9 9 】

標的および標的化配列は、ハイブリダイゼーションがアンチパラレルな立体配置で生じる場合に、互いに対して「相補的である」として記載される。標的化配列は、標的配列に対して「近い」または「実質的な」相補性を有し得、そしてなおも、本明細書中に記載される方法の目的のために機能し得る、すなわち、なおも「相補的で」あり得る。好ましくは、本明細書中に記載される方法において用いられるオリゴヌクレオチドアナログ化合物は、標的配列に対して、せいぜい 10 ヌクレオチドのうち 1 個のミスマッチ、好ましくは、せいぜい 20 ヌクレオチドのうち 1 個のミスマッチを有する。あるいは、用いられるアンチセンスオリゴマーは、本明細書中で指定される例示的な標的化配列に対し、少なくとも 90 % の配列相同性、好ましくは、少なくとも 95 % の配列相同性を有する。RNA 標的への相補性結合の目的について、そして、以下に考察されるように、グアニン塩基は、シトシン塩基またはウラシル RNA 塩基のいずれかに対し相補的であり得る。

10

20

【 0 1 0 0 】

オリゴヌクレオチドアナログは、そのオリゴマーが、生理学的条件下で実質的に 45 より高い、好ましくは少なくとも 50 、代表的には、60 ~ 80 またはそれ以上の T_m で標的にハイブリダイズする場合に、標的ポリヌクレオチドに対して「特異的にハイブリダイズする」。このようなハイブリダイゼーションは、好ましくは、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件に対応する。所与のイオン強度および pH において、 T_m は、標的配列の 50 % が相補的なポリヌクレオチドに対してハイブリダイズする温度である。再度、このようなハイブリダイゼーションは、アンチセンスオリゴマーの標的配列に対する「近い」もしくは「実質的な」相補性、ならびに、完全な相補性で生じ得る。

【 0 1 0 1 】

「ヘテロ二重鎖」は、オリゴヌクレオチドアナログと、標的 RNA の相補的な部分との間の二重鎖を指す。「ヌクレアーゼ抵抗性のヘテロ二重鎖」は、アンチセンスオリゴマーのその相補的な標的への結合により形成されるヘテロ二重鎖を指し、このヘテロ二重鎖は、二重鎖 RNA / RNA 複合体または RNA / DNA 複合体を切断し得る RNAses のような細胞内および細胞外のヌクレアーゼによるインビボ分解に対して実質的に抵抗性である。

30

【 0 1 0 2 】

因子は、その因子が、細胞膜を横切る受動拡散以外の機構によって細胞に侵入し得る場合に、「哺乳動物細胞によって能動的に取り込まれる」。因子は、例えば、「能動輸送」（例えば、ATP 依存性の輸送機構によって哺乳動物の細胞膜を横切る因子の輸送を指す）によって、または、「促進輸送」（因子が輸送タンパク質に結合する（この結合が次いで、結合した因子が膜を横切る通過を促進する）ことを必要とする輸送機構により細胞膜を横切るアンチセンス因子の輸送を指す）によって輸送され得る。

【 0 1 0 3 】

用語「調節性の発現」および/または「アンチセンス活性」は、RNA の発現または翻訳と干渉することによって、所与のタンパク質の発現を増強するか、または、より代表的には減少させるかのいずれかの、アンチセンスオリゴマーの能力を指す。タンパク質の発現が減少される場合、アンチセンスオリゴマーは、所与の遺伝子の発現を直接ブロックしても、その遺伝子から転写された RNA の崩壊の加速に寄与してもよい。本明細書中に記載されるようなモルホリノオリゴマーは、前者（立体的なブロック）機構によって作用するものと考えられる。他の領域が、モルホリノオリゴマーを用いて首尾よく標的化されているが、立体的にブロックするオリゴマーにとって好ましいアンチセンス標的としては、ATG 開始コドン領域、スプライシング部位、スプライシング部位に近接する領域、および、mRNA の 5' 非翻訳領域が挙げられる。

40

【 0 1 0 4 】

「アミノ酸サブユニット」は、好ましくは、 $- \text{アミノ酸残基} (- \text{CO} - \text{CHR} - \text{NH} -)$ であり；これはまた、 $- \text{アミノ酸残基}$ または他のアミノ酸残基（例えば、 $- \text{CO} -$

50

$\text{CH}_2\text{CHR}-\text{NH}-$) であり得、ここで、R は側鎖である。

【0105】

用語「天然に存在するアミノ酸」は、天然に見られるタンパク質中に存在するアミノ酸を指す。用語「天然に存在しないアミノ酸」は、天然に見られるタンパク質中には存在しないアミノ酸を指す；例としては、 α -アラニン (α -Ala) および 6-アミノヘキサン酸 (Ahx) が挙げられる。

【0106】

「有効量」または「治療上有効な量」は、代表的には、選択された標的核酸配列の翻訳を阻害することによって所望の治療効果をもたらすのに有効な、単一用量としてまたは一連の用量の一部としてのいずれかで哺乳動物被験体に投与されるアンチセンスオリゴマーの量を指す。

10

【0107】

個体（例えば、ヒトのような哺乳動物）または細胞の「処置」は、個体または細胞の自然な経過を変更することを企図して使用されるあらゆるタイプのインターベンションである。処置としては、薬学的組成物の投与が挙げられるがこれに限定されず、そして、予防的に、または、病理学的事象の開始もしくは病因因子との接触の後に、のいずれかに行われ得る。

【0108】

II. 本発明のオリゴマーの構造的特徴

A. カチオン性のサブユニット間結合を持つオリゴマー

20

本発明は、一局面では、サブユニット間結合により接合された一連のモルホリノ環構造から構成される骨格を含むオリゴマーを提供し、ここで、このような環構造の各々は、塩基対形成部分を支持し、その結果、上記オリゴマーは、配列特異的な様式で標的核酸に結合し得、そして、このような2つの連続する環構造間のサブユニット間結合のうち少なくとも1つは、カチオン性のペンダント基を含む。ペンダント基は遠位の窒素原子を有し、この窒素原子は、中性または中性付近の（例えば、生理学的）pHにおいて、正の電荷を有し得る。

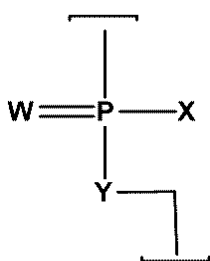
【0109】

サブユニット間結合は、好ましくは、以下の構造：

【0110】

30

【化5】



を有するリン含有結合であり、上記式において、

W は S または O であり、好ましくは、O であり、

40

X は、 NR^1R^2 または OR^6 であり、

Y は、O または NR^7 であり、

そして、オリゴマーにおける前記結合の各々は、以下：

(a) 無電荷結合 (a) であって、ここで、 R^1 、 R^2 、 R^6 および R^7 の各々は、独立して、水素および低級アルキルから選択される、無電荷結合 (a)；

(b1) カチオン性結合 (b1) であって、ここで、X は NR^1R^2 であり、かつ Y は O であり、そして、 NR^1R^2 は、 R^1R^2 が $-\text{CHRCHRN}(\text{R}^3)(\text{R}^4)\text{CHRCHR}-$ となるように必要に応じて置換されたピペラジノ基を表し、ここで、

各 R は、独立して H または CH_3 であり、

R^4 は、H、 CH_3 または電子対であり、そして

50

R^3 は、H、低級アルキル（例えば、 CH_3 ）、 $C(=NH)NH_2$ 、 $Z-L-NH$
 $C(=NH)NH_2$ および $[C(O)CHR'NH]_mH$ から選択され、ここで、Z は、
 $C(O)$ または直接結合であり、L は、アルキル、アルコキシおよびアルキルアミノから
 選択される結合を有する長さ 18 原子まで、好ましくは長さ 12 原子まで、より好ましく
 は長さ 8 原子までの任意のリンカーであり、 R' は、天然に存在するアミノ酸またはその
 一炭素もしくは二炭素のホモログの側鎖であり、そして、m は 1 ~ 6、好ましくは 1 ~ 4
 である、

カチオン性結合 (b 1) ;

(b 2) カチオン性結合 (b 2) であって、ここで、X は NR^1R^2 であり、かつ Y は
 O であり、 R^1 は H または CH_3 であり、そして、 R^2 は $LN R^3 R^4 R^5$ であり、ここ
 で、L、 R^3 および R^4 は、上に定義したとおりであり、そして、 R^5 は、H、低級アル
 キルまたは低級（アルコキシ）アルキルである、カチオン性結合 (b 2) ; ならびに

(b 3) カチオン性結合 (b 3) であって、ここで、Y は NR^7 であり、かつ X は OR^6
 であり、そして、 R^7 は $LN R^3 R^4 R^5$ であり、ここで、L、 R^3 、 R^4 および R^5
 は、上に定義したとおりであり、そして、 R^6 は H または低級アルキルである、カチオン
 性結合 (b 3) ;

から選択され、そして、

上記サブユニット間結合のうち少なくとも 1 つは、カチオン性結合 (b 1)、(b 2)
 および (b 3) から選択される。

【0111】

好ましくは、オリゴマーは、少なくとも 2 つの連続するタイプ (a) の結合（すなわち
 、無電荷結合）を含む。さらなる実施形態では、オリゴマー中の結合の少なくとも 5 % は
 、カチオン性結合（すなわち、タイプ (b 1)、(b 2) または (b 3)）である；例え
 ば、結合の 10 % ~ 80 %、10 % ~ 50 %、または 10 % ~ 35 % がカチオン性結合で
 あり得る。

【0112】

一実施形態では、少なくとも 1 つの結合がタイプ (b 1) の結合であり、ここで、好ま
 しくは、各 R は H であり、 R^4 は H、 CH_3 または電子対であり、かつ、 R^3 は、H、低
 級アルキル、例えば、 CH_3 、 $C(=NH)NH_2$ および $C(O)-L-NHC(=NH)$
 NH_2 から選択される。 R^3 の後者 2 つの実施形態は、それぞれ、ピペラジン環に直接
 結合されるか、または、リンカー基 L に対してペンダントであるかのいずれかのグアニジ
 ノ部分を提供する。合成を容易にするために、 R^3 内の変数 Z は、好ましくは、示される
 ように、 $C(O)$ （カルボニル）である。

【0113】

リンカー基 L は、上述のように、その骨格中に、アルキル（例えば、 $-CH_2-CH_2-$
 $-$ ）、アルコキシ（ $-C-O-$ ）およびアルキルアミノ（例えば、 $-CH_2-NH-$ ）か
 ら選択される結合を含むが、但し、L の末端の原子（例えば、カルボニルまたは窒素に隣
 接する原子）は炭素原子である。分枝した結合（例えば、 $-CH_2-CHCH_3-$ ）も可
 能であるが、リンカーは好ましくは直鎖状である。一実施形態では、リンカーは、炭化水
 素リンカーである。このようなリンカーは、構造 $-(CH_2)_n-$ を有し得、ここで、n
 は 1 ~ 12、好ましくは、2 ~ 8、より好ましくは 2 ~ 6 である。

【0114】

モルホリノサブユニットは、以下の構造：

【0115】

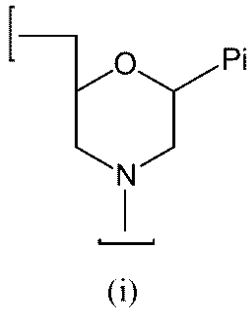
10

20

30

40

【化 6】



10

を有し、上記式において、 Pi は、塩基対形成部分であり、そして、上記結合が、(i)の窒素原子を隣接するサブユニットの5'炭素に連結する塩基対形成部分 Pi は、同じであっても異なっても良く、そして、一般には、標的核酸に結合する配列を提供するように設計される。

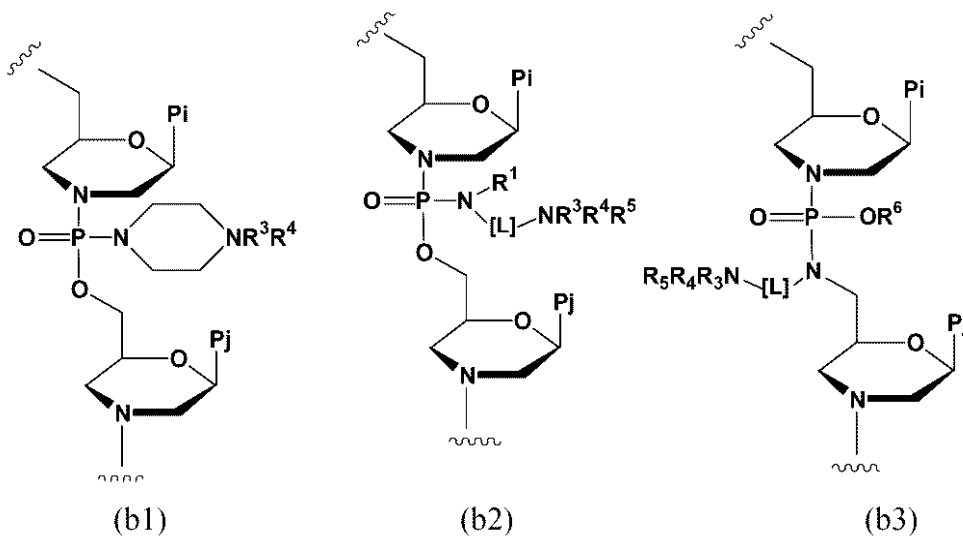
【0116】

モルホリノサブユニットを連結するための上記結合タイプ(b1)、(b2)および(b3)の実施形態の使用は、以下に図式的に示され得る：

【0117】

【化 7】

20



30

好ましくは、オリゴマー中の全てのカチオン性結合は、同じタイプのものである；すなわち、全てタイプ(b1)であるか、全てタイプ(b2)であるか、または、全てタイプ(b3)である。

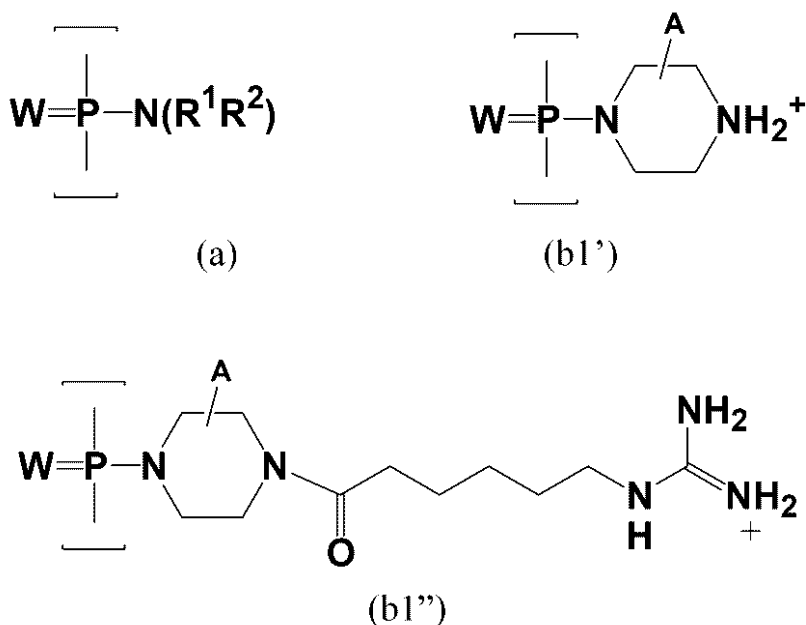
【0118】

さらなる実施形態では、カチオン性結合は、以下に示されるような結合(b1')および(b1'')から選択され、ここで、(b1')は、本明細書において「 Pip 」結合と称され、そして、(b1'')は、本明細書において、「 Gux 」結合と称される：

40

【0119】

【化 8】



10

20

【 0 1 2 0 】

上記の構造において、WはSまたはOであり、好ましくはOであり；R¹およびR²の各々は、独立して、水素および低級アルキルから選択され、好ましくはメチルであり；そして、Aは、(b1')および(b1'')中の1個以上の炭素原子上の水素または非干渉性置換基を表す。好ましくは、ピペラジン環中の環炭素は非置換であるが；これらは、メチルまたはフッ素のような非干渉性の置換基を含み得る。好ましくは、せいぜい1個または2個の炭素原子がこのように置換される。

30

【 0 1 2 1 】

さらなる実施形態において、結合の少なくとも10%がタイプ(b1')または(b1'')のものである；例えば、結合の20%~80%、20%~50%または20%~30%が、タイプ(b1')または(b1'')のものであり得る。

【 0 1 2 2 】

他の実施形態では、オリゴマーは、上記タイプ(b1')の結合を含まない。あるいは、オリゴマーは、各RがHであり、R³がHまたはCH₃であり、かつ、R⁴がH、CH₃または電子対である場合のタイプ(b1)の結合を含まない。

【 0 1 2 3 】

モルホリノ置換基はまた、以下にさらに記載されるような、非リンベースのサブユニット間結合によっても連結され得、この場合、少なくとも1つの結合が、上記のように、カチオン性のペンダント基で修飾される。

【 0 1 2 4 】

その非修飾状態では無電荷であるが、ペンダントのアミン置換基もまた有し得る、他のオリゴヌクレオチドアナログ結合が使用され得る。例えば、モルホリノ環上の5'窒素原子は、スルファミド結合（例えば、図2Gを参照のこと）または尿素結合（この場合、リンが、それぞれ、炭素または硫黄で置換される）において用いられ得、そして、上記構造(b3)中の5'窒素原子と同様の様式で修飾され得る。

40

【 0 1 2 5 】

任意の数のカチオン性結合を有するオリゴマーが提供され、これには、完全にカチオン性結合されたオリゴマーが含まれる。しかし、好ましくは、オリゴマーは、部分的に荷電されており、例えば、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%または90%のカチオン性結合を有する。選択された実施形態では、約10~8

50

0 %、約 20 ~ 80 %、約 20 ~ 60 %、約 20 ~ 50 %、約 20 ~ 40 % または約 20 ~ 35 % の結合がカチオン性である。

【0126】

一実施形態では、カチオン性結合は、骨格に沿って点在する。部分的に荷電したオリゴマーは、好ましくは、少なくとも2つの連続した無電荷結合を含む；すなわち、オリゴマーは、好ましくは、その全長に沿って厳密に交互になる様式は有さない。

【0127】

また、カチオン性結合のブロックと、無電荷結合のブロックとを有するオリゴマーが考慮される；例えば、無電荷結合の中央のブロックがカチオン性結合のブロックで挟まれ得、また、逆の場合もあり得る。一実施形態では、オリゴマーは、およそ等しい長さの5"領域、3"領域および中央領域を有し、そして、中央領域におけるカチオン性結合の割合は、約50%より大きく、好ましくは、約70%よりも大きい。

【0128】

アンチセンスの用途において使用するためのオリゴマーは、一般に、長さが約10~約40サブユニット、より好ましくは、約15~25サブユニットの範囲である。例えば、アンチセンスオリゴマーにとって有用な長さである19~20サブユニットを有する本発明のオリゴマーは、理論上、2~7個、例えば、4~6個または3~5個のカチオン性結合を有し得、残りは無電荷結合である。14~15サブユニットを有するオリゴマーは、理論上、2~5個、例えば、3個または4個のカチオン性結合を有し得、残りは無電荷結合である。

【0129】

モルホリノ環構造の各々が塩基対形成部分を支持し、一連の塩基対形成部分を形成する。この塩基対形成部分は、代表的には、細胞または処置されるべき被験体内の選択されるアンチセンス標的にハイブリダイズするように設計される。塩基対形成部分は、ネイティブなDNAまたはRNA(A、G、C、TまたはU)に見られるプリンもしくはピリミジン、またはヒポキサンチン(ヌクレオシドイノシンの塩基成分)または5-メチルシトシンのようなアナログであり得る。

【0130】

上述のように、実質的に無電荷のオリゴヌクレオチドは、1以上の荷電した結合を含むように(例えば、2~5個の無電荷結合につき約1個まで、代表的には、10個の無電荷結合につき3~5個)、本発明の局面に従って修飾され得る。アンチセンス活性における最適な改善は、骨格の結合のおよそ半分までがカチオン性である場合に見られる。少数、例えば、10~20%のカチオン性結合を有する場合、代表的に、幾分ではあるが、最大ではない増強が見られる；この場合、カチオン性結合の数は、50~60%を超えており、そして、アンチセンスのその標的に対する結合の配列特異性が弱まっているか、または、失われている場合がある。

【0131】

本発明の確証において行われた追加の実験は、カチオン性骨格の電荷の追加により見られる増強は、いくつかの場合、電荷の大部分をアンチセンスオリゴヌクレオチドの「中央領域」骨格近くに割り当てる(例えば、8つのカチオン性骨格結合を持つ20マーのオリゴヌクレオチドの場合、これらの荷電した結合のうち70%~100%を中央の10の結合に局在化させる)ことによってさらに増強され得ることを示す。

【0132】

B. ペプチド輸送体

本発明のオリゴマーはまた、細胞内へのオリゴマーの輸送を増強するのに有効なペプチド輸送部分に結合され得る。輸送部分は、好ましくは、例えば図1Dならびに図2P~2Qに示されるように、オリゴマーの末端に結合される。

【0133】

好ましくは、輸送部分は、6個~16個のアミノ酸を含み、かつ、(X'Y'X')、(X'Y')、(X'Z')および(X'Z'Z')からなる群より選択される部分配列

からなり、
ここで、

(a) X' サブユニットの各々は、独立して、アルギニンまたはアルギニンアナログを表し、上記アナログは、構造 $R^1 N = C(NH_2) R^2$ の側鎖を含むカチオン性 - アミノ酸であり、ここで、 R^1 は H または R であり； R^2 は R、 NH_2 、 NHR または NR_2 であり、ここで R は低級アルキルまたは低級アルケニルであり、そして、さらに、酸素または窒素を含み得； R^1 および R^2 は、一緒になって環を形成し得；そして、この側鎖は、 R^1 または R^2 を介して上記アミノ酸に連結される；

(b) Y' サブユニットの各々は、独立して、中性の直鎖状アミノ酸 - $C(O) - (CHR)_n - NH -$ を表し、ここで、n は 1 ~ 7 であり、かつ、各 R は、独立して、H またはメチルである；そして

(c) Z' サブユニットの各々は、独立して、中性のアラルキル側鎖を持つ - アミノ酸を表す。

【0134】

本明細書中で使用される場合、キャリアタンパク質は、そのアミノ酸の実質的に全てが重ならない一連の部分配列またはその位置変形、例えば、 $(X'X'Y')_n$ 、 $(X'Y'X')_n$ 、 $(Y'X'X')_n$ 、 $(Y'X')_n$ 、 $(X'Y')_n$ 、 $(X'X'Y')(X'X'Y')(X'Y')(X'X'Y')$ 、 $(X'Y')(X'X'Y')_m$ 、 $(X'FF)_n$ または $(FFX')_n$ で表され得る場合、「X' Y' X'、X' Y'、X' Z' Z' および X' Z' で表される基から選択される部分配列から構成される」。タンパク質は、少数、例えば、1 ~ 3 個の Y' 以外の天然のアミノ酸を持ち得る。

【0135】

選択した実施形態では、ペプチドは、 $(X'Y'X')$ 、 $(X'Y')$ 、 $(X'Z')$ および $(X'Z'Z')$ から選択される単一の部分配列の少なくとも 2 回または少なくとも 3 回の繰り返しからなる配列を含む。例えば、ペプチドは、 $(X'Y'X')_p$ 、 $(X'Y')_m$ および $(X'Z'Z')_p$ のうち 1 つによって表される配列を含み得、ここで、p は 2 ~ 5 でありかつ m は 2 ~ 8 である。

【0136】

選択した実施形態では、各 X' について、側鎖部分は、グアニジル ($HN = C(NH_2)NH -$)、アミジニル ($HN = C(NH_2)C <$)、2 - アミノジヒドロピリミジル、2 - アミノテトラヒドロピリミジル、2 - アミノピリジニルおよび 2 - アミノピリミドニルからなる群より独立して選択され、そして、好ましくは、グアニジルおよびアミジニルから選択される。

【0137】

好ましい実施形態では、各 X' について、側鎖部分は、アミノ酸サブユニットアルギニン (Arg) と同様グアニジルである。さらなる実施形態では、各 Y' は、 $-CO - (CH_2)_n - NH -$ であり、ここで、n は 1 ~ 7 であり、かつ R は H である。例えば、n が 5 でありかつ R が H である場合、Y' は 6 - アミノヘキサン酸サブユニット (本明細書中では Ahx と短縮される) であり；n が 2 でありかつ R が H である場合、Y' は - アラニンサブユニットである。

【0138】

Z' サブユニットのアラルキル側鎖は、好ましくは、ベンジル ($-CH_2C_6H_5$) またはフェネチル ($-CH_2CH_2C_6H_5$) であり、これらは、好ましくは、さらには置換されていないが、本明細書中に規定されるような非干渉性の置換基を含んでいてもよい。好ましくは、側鎖はベンジル ($-CH_2C_6H_5$) であり、その結果、各 Z' は、フェニルアラニン (F) となる。

【0139】

このタイプの好ましいペプチドとしては、1 つの Y' サブユニットと交互になったアルギニン二量体を含むものが挙げられ、ここで、Y' は好ましくは Ahx である。例としては、式 $(RY'R)_4$ または式 $(RRY')_4$ を有するペプチドが挙げられ、ここで、Y

10

20

30

40

50

’は好ましくはA h xである。一実施形態では、Y ’は、6 - アミノヘキサン酸サブユニットであり、Rはアルギニンであり、かつpは4である。さらなる実施形態では、ペプチドは、 $(X'Z'Z')_p$ により表される配列を含み、ここで、Rはアルギニンであり、各Z ’はフェニルアラニンであり、かつpは3または4である。

【0140】

結合されたペプチドは、好ましくは、リンカーA h x - Bを介してオリゴマーの末端へと連結され、ここで、例えば、図1Dに示されるように、A h xは6 - アミノヘキサン酸サブユニットであり、かつ、Bは - アラニンサブユニットである。

【0141】

Y ’サブユニットは、Y ’サブユニット間にX ’サブユニットが入らない連続したものか、または、X ’サブユニット間に1つ点在するかのいずれかである。しかし、連結するサブユニットが、Y ’サブユニット間にあり得る。一実施形態では、Y ’サブユニットは、輸送体の末端にあり；他の実施形態では、Y ’サブユニットは、X ’サブユニットに挟まれる。

【0142】

さらなる好ましい実施形態では、各Y ’は $-CO-(CH_2)_n-CH(R)-NH-$ であり、ここで、nは1～7でありかつRはHである。例えば、nが5でありかつRがHである場合、Y ’は、6アミノヘキサン酸サブユニット（本明細書においてA h xと短縮される）である。この群の選択された実施形態において、各X ’は、アルギニンサブユニットにおいてと同様に、グアニジル側鎖部分を含む。このタイプの好ましいペプチドとしては、1つのY ’サブユニットと交互になったアルギニン二量体を含むものが挙げられ、ここで、Y ’は好ましくはA h xである。例としては、式 $(RY'R)_4$ または式 $(RRY')_4$ を有するペプチドが挙げられ、ここで、Y ’は好ましくはA h xである。

【0143】

別の好ましい実施形態としては、1つのY ’サブユニットと交互になったアルギニンサブユニット $(RY')_m$ が挙げられ、ここで、Y ’は、 - アラニンおよびA h xから選択される；例は、配列番号285として以下に与えられる。

【0144】

核酸アナログは、好ましくは、例えば図1Dに示されるように、C末端において輸送体ペプチドに連結される。好ましいリンカーは、構造A h x Bのものであり、ここで、A h xは、6 - アミノヘキサン酸サブユニットであり、そして、Bは - アラニンサブユニットである。

【0145】

上述のような輸送部分は、輸送部分を付着させない場合のオリゴマーの取り込みに対して、そして、疎水性サブユニットY ’のない輸送部分を付着させることによる取り込みに対して、付着したオリゴマーの細胞への進入を大いに増強することが示されている。このような増強された取り込みは、好ましくは、疎水性サブユニットY ’のない輸送部分を付着させることによる因子の取り込みに対する、哺乳動物細胞内への化合物の取り込みの少なくとも2倍の増加、そして好ましくは、4倍の増加によって実証される。取り込みは、好ましくは、非結合化合物に対し、少なくとも20倍、より好ましくは40倍増強される。

【0146】

輸送部分のさらなる利点は、おそらくは、正に荷電した輸送部分と負に荷電した核酸との間の静電相互作用によって、アンチセンスオリゴマーとその標的核酸配列との間の二重鎖を安定化させるというその予測される能力である。輸送体内の荷電したサブユニットの数は、上述のように14未満であり、好ましくは、8と11との間である。というのも、荷電したサブユニットの数が多過ぎると、配列特異性の低下につながり得るからである。

【0147】

リンカー（BまたはA h x B）を含む例示的なペプチド輸送体が以下に与えられる：

【0148】

10

20

30

40

50

【化 9】

ペプチド	配列(N末端～C末端)	配列番号
(RAhx) ₄ B	RAhxRAhxRAhxRAhxB	278
(RAhxR) ₄ AhxB	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	279
(AhxRR) ₄ AhxB	AhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	280
(RAhx) ₆ B	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	281
(RAhx) ₈ B	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	282
(RAhxR) ₃ AhxB	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	283
(RAhxRRBR) ₂ AhxB	RAhxRRBRRAhxRRBRRAhxB	284
((RB)3RAhx)2B	RBRBRBRAhxRBRBRBRAhxB	285

10

I I I . 本発明のオリゴマーのアンチセンス活性

本明細書中に示されるように、+PMOのような部分的にカチオン性のオリゴマーは、DNAおよびRNAに対して、対応する中性化合物よりも高い親和性を有し、これは、インビトロおよびインビボにおけるアンチセンス活性の増強により実証される。

【0149】

A . 無細胞アッセイにおけるインビトロ活性

本発明のオリゴマーは、種々の異なる標的に対して指向されるとき、完全に無電荷のオリゴマーに優れたアンチセンス活性を与えることが示された。第一シリーズの実験において、材料および方法に記載するように、EBOV（エボラウイルス）mRNAの異なる領域（VP35 遺伝子mRNAおよびL 遺伝子mRNA、ならびに、VP24 mRNAの2つの異なる領域を含む）を標的とする種々のPMO（無電荷）および+PMO（部分的にカチオン性）を調製した。配列は、以下の配列表において配列番号1～15として示され、各位置のカチオン性の（1-ピペラジノ）ホスフィニルインデンオキシ結合（図1Bに示されるようなもの）は、配列表において「+」で示されている。

20

【0150】

材料および方法に記載されるようにして調製した適切なEBOV：ルシフェラーゼmRNAを入力RNAとして用いて、無細胞翻訳アッセイを行った。PMOおよび+PMOを、ルシフェラーゼの発光に基づき、ルシフェラーゼ発現を阻害する能力について評価した（PMO濃度ごとにn=3）。

【0151】

VP24：ルシフェラーゼmRNAを標的とするオリゴマー（配列番号9および10）についての結果を図3に示す。同じ塩基配列を持つ無電荷PMO（それぞれ、配列番号15および5）と比較すると、6～8個のカチオン性結合を持つ+PMOは、10倍～100倍増加したアンチセンス活性を示した。

30

【0152】

EBOVのVP35 遺伝子mRNA、VP24 遺伝子mRNAおよびL 遺伝子mRNAを標的とするPMOおよび+PMO（それぞれ、配列番号2～3、6～8および12～14、配列表に示されるように、可変の総電荷および電荷密度を持つ）を用いた同様のアッセイについての結果を図4に示す。以下の表1は、決定したEC₅₀値を列挙する。全ての場合において、これらのオリゴマーの骨格中に2～4個のカチオン性結合を組み込むと、アンチセンス活性がおよそ2～30倍増加した。

40

【0153】

【表 1】

表 1.

EBOV mRNA に対して標的化された+PMO を用いた、無細胞翻訳の特異的な阻害

名称	配列番号	正電荷	EC ₅₀ (nM)
VP35-AUG	1	0	84.8
VP35-2+	2	2	23.0
VP35-4a+	3	4	18.7
VP35-4b+	4	4	18.4
VP24-AUG	5	0	223.2
VP24-2+	6	2	109.4
VP24-4a+	7	4	47.6
VP24-4b+	8	4	62.5
L-AUG	11	0	203.6
L-2+	12	2	76.6
L-4a+	13	4	21.7
L-4b+	14	4	7.1

10

20

さらなるシリーズのアッセイは、CYP3A2：ルシフェラーゼ融合遺伝子mRNA転写物の翻訳を阻害するために、ラットCYP3A2遺伝子開始コドン領域を標的とするPMOおよび+PMO（配列番号35～42）を用いた。CYP3A2 + PMOシリーズにおけるカチオン性結合の電荷の数は、+3～+6の範囲にわたった。3つのカチオン性電荷を持つ5つの+PMOは、カチオン性結合のオリゴマー内での位置が異なった。無細胞翻訳アッセイの結果を、決定したEC₅₀値と共に図12に示す。全+PMOシリーズは、無電荷のPMOコントロール（配列番号35）と比較したときに、EC₅₀における11倍程度の減少を伴って、増強されたアンチセンス活性を示したことが見られ得る。

30

【0154】

さらなる実験において、C型肝炎ウイルスの開始コドン領域を標的とする一連の+PMO（HCV；配列番号19～35）を、HCV：ルシフェラーゼ融合遺伝子転写物の翻訳を阻害する能力について、対応する無電荷PMO（AVI-4065と命名）と比較した。以下の配列表に示すように、HCV + PMOシリーズにおけるカチオン性結合の数は、+2～+7の範囲であった。HCV：ルシフェラーゼmRNAを入力RNAとして用いて無細胞翻訳アッセイを行い、そして、観察されたEC₅₀値を以下の表2に与える。全の場合において、無電荷のAVI-4065 PMOに対し、カチオン性結合を加えると、観察されるEC₅₀が有意に減少された。

40

【0155】

【表 2】

表 2. HCV mRNA に対して標的化された+PMO を用いた無細胞翻訳の特異的阻害

名称	配列番号	正電荷	説明	EC ₅₀ (nM)
AVI-4065	18	0	*****	850.8
HCV-2a+	19	+2	+**+*****	471.0
HCV-2b+	20	2	*****+**+**	724.4
HCV-2c+	21	2	+*****+**	231.4
HCV-2d+	22	2	*****+*****	326.3
HCV-2e+	23	2	*****+**+*****	430.6
HCV-2f+	24	2	*****++*****	656.3
HCV-3g+	25	3	*****+**+**+**	228.9
HCV-3h+	26	3	*****+*****+**+**	583.5
HCV-3i+	27	3	+*****+*****+**	427.7
HCV-4j+	28	4	*****+**+**+**+**	315.3
HCV-4k+	29	4	+*****+**+*****+**	193.1
HCV-4l+	30	4	+*****+*****+**+**	314.5
HCV-5m+	31	5	+**+**+**+*****+**	146.0
HCV-5n+	32	5	+*****+**+**+**+**	212.0
HCV-6o+	33	6	+**+**+**+**+**+**	161.7
HCV-7p+	34	7	+**+**+**+**+**+**	50.98

10

20

30

40

50

+PMOの増加したアンチセンス活性の配列特異性を評価するために、+PMOをまた、入力mRNAが+PMOにとっての標的をコードしなかった無細胞翻訳アッセイにおいて使用した。この場合、EBOV VP24遺伝子を標的とする+PMOを、EBOV L遺伝子：ルシフェラーゼmRNAを用いるアッセイにおいて使用した。図5に示される結果は、+PMOに対する高い程度の特異性を実証する。有意な非特異的阻害が観察されるまでに、30 μMより高い+PMOの濃度が必要であった。

【0156】

B. 細胞培養におけるインビトロ活性

上述のデータが示すように、PMO+オリゴマーは、無細胞アッセイにおいて、無電荷PMOオリゴマーを数倍上回るアンチセンス活性の増強をもたらした。細胞培養における輸送およびアンチセンス活性の評価のために一般に使用されるアッセイにおいて、HeLa細胞が、プラスミドpLuc/705で安定にトランスフェクトされ、このプラスミドは、ヌクレオチド705において変異されたヒト-グロブリンイントロンで中断されたルシフェラーゼ遺伝子を有し、したがって、不正確なスプライシングを起こす。誤ったスプライシングを受けた転写物は機能的なレポータータンパク質をもたらさないため、野生型のスプライシングが、スプライシングを補正するアンチセンスオリゴマーで誘導されない限り、レポーターシグナルは観察されない。有効に送達される場合、705スプライシング部位を標的とするアンチセンスオリゴマー（配列番号286を持つ）は、スプライシングを補正し、そして、ルシフェラーゼの発現を可能にする。このアッセイは、オリゴマーが細胞および核に入り、その後、プレmRNAの不正確なスプライシングをブロックし、レポーター遺伝子の発現をもたらす能力を測定する。このアッセイにおいて、オリゴマーは、細胞および細胞の核に入ってからシグナルを生じなければならないため、このアッセイは、取り込みおよび送達部分の有効性（存在する場合）、ならびに、結合オリゴマーのアンチセンス活性を測定するために有用である。

【0157】

異なる量および分布の、本明細書中で「GuX」結合または「Pip」結合と指定され

るカチオン性結合を持つモルホリノオリゴマー（図1を参照のこと）を、このようなアッセイにおいて評価した。後者のオリゴマー（「Pip」結合を持つもの）はまた、PMO+またはPMOプラスとも呼ばれ、一方で、前者のオリゴマー（「GuX」結合を持つもの）は、PMO GuXと呼ばれる。

【 0 1 5 8 】

オリゴマー内の電荷の分布は、以下に示されるとおりであった：

【 0 1 5 9 】

【化 1 0】

C C T C T T A C C T C A G T T A C A	705	コントロール PMO
+ + + + + + +	8+-	Centralized (中央)
+ + + + + + + +	8+-	Polarized (分極)
+ + + + + + + +	8+-	Dispersed (分散)
+ + + + + +	6+-	Dispersed (分散)
+ + + +	4+-	Dispersed (分散)

10

図 7 および 8 におけるデータに示されるように、18 マーにおいて、電荷の数を 8 つまで増加させると、このアッセイにおけるアンチセンス活性を無電荷の PMO に比して増加させた。データはまた、「中央」位置の電荷が、「分極」および「分散」の分布に比してアンチセンス活性を増加させたこと、そして、「GuX」結合が、「Pip」結合よりもかなり効率的であったことを示唆する。荷電した PMO は全て、無電荷の PMO よりも高い T_m を有したが、 T_m に基づく結合親和性の比較は、このパターンが単に結合親和性に基づくわけではないことを示す (図 10)。

20

【 0 1 6 0 】

図 9 におけるデータは、図 7 ~ 8 のアッセイ中にスクランブル状のコントロールを組み込む。示されるように、スクランブル状のコントロール (S C R - G₈ - C e n t および S C R - P₈ - C e n t) は、アッセイにおいては本質的にアンチセンス活性を示さなかった。

【 0 1 6 1 】

30

図 11 A ~ B におけるデータは、「G₈ - 中央 (Centralized)」および「P₈ - 中央 (Centralized)」の荷電したオリゴマーを、式 (RXR)₄ を持つ輸送ペプチドに結合させた 705 コントロール PMO と比較するものであり、ここで、R はアルギニンであり、そして、X は、6 - アミノヘキサン酸である (例えば、図 1 D を参照のこと)。この結合は、アンチセンス活性に対し劇的な作用を有し、これは、大部分が、細胞内への輸送の増強に起因するものであると考えられる。

【 0 1 6 2 】

C. インピボ活性：げっ歯類におけるエボラウイルス特異的 + P M O の増加した抗ウイルス活性

エボラウイルス特異的 + P M O のインビボでの効能を決定するために、1 0 0 0 プラーク形成単位 (p f u) のマウスに順応させたエボラウイルスを用いたチャレンジの 2 4 時間前および 4 時間前に、マウスを、V P 2 4 遺伝子 m R N A を標的とする 3 種の個別の + P M O および 1 種の無電荷 P M O (V P 2 4 - A U G 、 V P 2 4 - 2 + 、 V P 2 4 - 4 a + および V P 2 4 - 4 b + ; それぞれ、配列番号 5 ~ 8) の 5 0 μ g 用量で 2 回処置した。各処置群につき 1 0 匹のマウスで、1 4 日の期間にわたり生存を決定した。

40

【 0 1 6 3 】

V P 2 4 + P M O は、致死的な E B O V 感染に対し広範囲の効能を示し、図 6 に示されるように、4 つの正電荷を含む + P M O が、最大の保護を提供した（70 % の生存）。2 つの正電荷を持つ 2 種の + P M O は、中程度の作用（50 ~ 60 % の生存）を示し、そして、無電荷の P M O は、最小の保護を提供した（わずか 10 % の生存）。ネガティブコ

50

ントロールの群には、PBSを与え、そして、生存者は観察されなかった。同様の有益な作用が、VP35 mRNAを標的とする+PMOでも見られた。

【0164】

+PMOは、Hartleyモルモットモデルの系における致死的なエボラウイルスチャレンジに対しても改善された保護を提供した。3種の無電荷PMOの薬物の組み合わせ（配列番号1、5および11）、またはこれらと同じ3種のPMOのペプチド結合バージョンは、モルモットモデルの系における致死的なエボラウイルスチャレンジに対して保護を提供しなかった。+PMO形態の同じ3種の薬物の組み合わせ（配列番号247、248および249）は、チャレンジを受けたモルモットの75%に対し保護を提供した。さらに、PMO+の使用は、2種の薬物の組み合わせ治療（配列番号248および249）が、エボラウイルスのチャレンジを受けたモルモットの80%に対し保護を提供することを可能にした。

10

【0165】

以前に記載されたもの（Warfield、Swensonら、2006）と同様の非ヒト霊長類（rhesus macaques）における実験を、2種の薬物の組み合わせ形態の+PMO化合物（配列番号248および249）を用いて行った。エボラウイルスを感染させた動物を、感染後10日間にわたり毎日20mg/kgの+PMOで処置した。この処置は、全て、1000pfuのエボラウイルスでのチャレンジを受けた動物の75%に対し保護を提供した。

20

【0166】

IV. カチオン性のサブユニット間結合を有するオリゴマーの調製

図2A~2Rは、塩基対形成基が安定に保護されたモルホリノサブユニットの調製と、これらのサブユニットの、カチオン性結合を持つモルホリノオリゴマーへの変換とを示す。さらなる実験の詳細は、材料および方法において以下に提供される。荷電した結合のサブユニットは、米国特許第5,185,444号において、または、Summer-tonおよびWeller, 1997（上で援用された）においてモルホリノオリゴマーについて記載されるように、標準的な段階的なオリゴマー合成において使用され得る。

【0167】

図2Aは、A、G、C、TおよびIの塩基対形成部分Piを持つ代表的なモルホリノサブユニット1a-eを示す。これらのサブユニットは、図2Bに示され、そして、実施例1に記載されるように、対応するリボヌクレオチドから調製され得る。必要な場合、ヌクレオシド塩基について適切な保護基が使用される；たとえば、アデニンおよびシトシンについてはベンゾイル、グアニンについてはフェニルアセチル、そして、ヒポキサンチン（I）についてはピバロイルオキシメチル。ピバロイルオキシメチル基は、図2Bに示されるように、ヒポキサンチンの複素環塩基のN1位上に導入され得る。1fにおいてのような保護されていないヒポキサンチンサブユニットも用いられ得るが、活性化反応における収量は、塩基が保護された場合、かなり多くなる。

30

【0168】

5'-ヒドロキシ（1）の、N,N-ジメチルホスホラミドジクロリデートのような反応性酸塩化物（4）での処理は、図2Cに示され、そして、実施例2に記載されるように、タイプ（a）（無電荷結合）で活性化されたサブユニット5a-eをもたらす。1fにおいてのような保護されていないヒポキサンチン含有サブユニットも用いられ得るが、活性化反応における収量は、塩基が保護された場合、かなり多くなる。

40

【0169】

図2Cはまた、5'-ヒドロキシサブユニット1a-eをタイプ（b1）（荷電した結合）で活性化されたサブユニット7a-eへと変換するための、6aのような代替的な反応性酸塩化物の使用を示す。

【0170】

同様に、8aのような非環式の反応性酸塩化物が、5'-ヒドロキシサブユニット1a-eをタイプ（b2）（荷電した結合）で活性化されたサブユニット9a-eへと変換す

50

るために使用され得る。これらの荷電した結合のサブユニットは、ホスホロジアミデート結合したモルホリノオリゴマー内に組み込まれ得、そして、塩基保護基を除去する有用な試薬（好ましくはアンモニア）で処理すると、タイプ（b 1）および（b 2）のカチオン性ホスホロジアミデート結合を含むオリゴマーをもたらし得る。

【0171】

（1 - ピペラジノ）ホスフィニルインデンオキシ結合（タイプ b 1' ; 「P i p」）を含むモルホリノサブユニットを作製するために使用され得る合成経路の概略は、図 2 D に示され、そして、実施例 3 に記載される。ピペラジンと塩化トリチル 10 との反応は、トリチルピペラジンを生じ、このトリチルピペラジンは、コハク酸塩 11 として単離され得る。弱塩基（例えば、ジイソプロピルエチルアミン）の存在下でのトリフルオロ酢酸エチル 13 a との反応は、1 - トリフルオロアセチル - 4 - トリチルピペラジン 14 をもたらし、これは、HCl で処理すると、良好な収量で脱トリチル化塩 15 をもたらす。空いている窒素上へのジクロロホスホリル部分の導入は、トルエン中でオキシ塩化リンを用いて行い、ピペラジン - P (O) Cl₂ 部分 6 a をもたらした。この試薬は、保護された（1 - ピペラジノ）ホスフィニルインデンオキシ結合を含む活性化されたサブユニットをもたらすために、5' - ヒドロキシモルホリノサブユニットと反応され得、この結合は、以下のオリゴマー合成プロトコルを用いて、オリゴマー中に組み込まれ得る。

【0172】

タイプ（b 2）のカチオン性結合の調製のためにモルホリノサブユニット中に組み込むのに適した、選択的に保護された非環式アミンは、環式アミンについて記載および例示されるものと同様の方法により調製され得る；実施例 4 を参照のこと。あるいは、ジアミンの溶液を、1.6 当量の反応性エステル 13 a - d で処理すると、< 5 % のフリーなジアミノ種を含む溶液をもたらす。この溶液を、POCl₃ での活性化およびモルホリノサブユニット 1 a - e の活性化のために直接使用した。当業者は、上記方法を用いて、より複雑なカチオン性側鎖を持つオリゴマーを調製することが可能であることが分かる。

【0173】

オリゴマー中にタイプ（b 3）のカチオン性結合（すなわち、5' 位に窒素を有するもの）を導入するためのサブユニットは、図 2 E に示され、そして、実施例 5 に記載されるように、モルホリノサブユニットの対応するアルデヒド（16 a - e）への酸化と、適切に保護されたジアミンでの還元的アミノ化とにより調製され得、代表的な 5' - アミノモルホリノサブユニット 20 a - e を生じる。しばしば、FMOC 塩化物での処理の後、アミンを、9 - フルオレニルメチルオキシカルボニル（FMOC）誘導体 21 a - e として単離することが好ましい。フリーなアミンは、必要な際に、トリエチルアミンまたは 1, 8 - ジアザビシクロ[5.4.0]ウンデカ - 7 - エン（DBU）での処理によって、容易に再生され得る。アミンのエチルホスホロジクロリデートでの活性化は、タイプ（b 3）の活性化されたサブユニット 22 a - e を生じ、これらは、タイプ（a）、（b 1）および（b 2）のサブユニットと同じ様式で、オリゴマー中に組み込まれ得る。

【0174】

5' 窒素上に種々の側鎖を含む 22 a - e の改変体を調製するための方法は、活性化された 5' - モルホリノサブユニットの、適切に保護されたアミンでのアルキル化を必要とする。図 2 F において 2 つの例について示され、そして、実施例 6 に記載されるように、ヘキサメチレンジアミンは、最初に保護され、次いで、5' - O - p - トルエンスルホン化サブユニット 23 a - e と反応させられる。図 2 E および 2 F、ならびに対応する実施例における方法を用いて、当業者は、カチオン性モルホリノオリゴマー中に組み込むのに適した広範囲な 5' - アミノ置換サブユニットを調製し得る。

【0175】

上述のように、カチオン性結合はまた、非リン含有結合からも調製され得る。例えば、図 2 G に示され、そして、実施例 7 に記載されるように、カチオン性のペンダント基を持つスルホンアミド結合を提供し得るサブユニットが、（b 3）タイプの結合において使用されるアミンから導入され得る。トリエチルアミンを含む N, N - ジメチルホルムアミド

10

20

30

40

50

中での、アミノ化したサブユニットの三酸化硫黄ノピリジンとの反応は、スルファミン酸をもたらし、これは、ピリジンを含むジクロロメタン中でホスゲンで処理され、活性化された塩化スルファモイル含有サブユニットを生じる。

【0176】

モルホリノオリゴマーは、固体支持体上、好ましくは、例えば、米国特許第5,185,444号またはSummertonおよびWeller, 1997(上で援用された)に記載されるようなアミノメチルポリスチレン固体支持体上で、段階的な様式でこのようなサブユニットから調製され得る。この樹脂は、好ましくは、図2Hに示され、そして、実施例8に記載されるように、ジスルフィド「アンカー」との反応により修飾されており、このジスルフィドアンカーは、支持体上でのモルホリノオリゴマーの生産を可能にし、そして、チオールでの処理の際の放出を容易にする。

10

【0177】

いくつかの場合、モルホリノオリゴマーの水溶性を増すトリエチレングリコール含有部分(「テイル」)を導入することが有益である。これを達成するための1つの方法は、図2Iに示され、そして、実施例9に記載される。

【0178】

代表的な合成において、ジスルフィドアンカー34は、図2Jに示されるように、1-メチル-2-ピロリジノン(NMP)中でアミノメチルポリスチレン樹脂と反応させられて、活性化されたサブユニットの組み込みに適した樹脂-アンカー39を生じる。必要に応じて、このテイル部分は、ジスルフィドアンカー-樹脂の38との反応によりオリゴマーの5'末端上に導入されて、テイル-樹脂40をもたらす。樹脂40の使用は、 $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OC(O)}$ 基(=EG3)をもたらす、これは、オリゴマーの5'末端に付着される。

20

【0179】

適切なサブユニット間結合タイプを含む活性化されたサブユニットは、アンカーを含む樹脂39上、または、必要に応じて、テイル-樹脂40上での固相合成により段階的に導入される。自動合成装置を用いて行われる固相合成のサイクルは、NMPもしくはジクロロメタン(DCM)を用いた樹脂の洗浄と、その後の、20%アセトニトリル/DCM中11%シアノ酢酸(v/v)での処理とから構成される。20%イソプロパノール/DCM中5%のジイソプロピルエチルアミン(DIEA)溶液で中和した後、この樹脂を、0.4Mの4-エチルモルホリンを含有する1,3-ジメチル-2-イミダゾリジノン(DMI)中の0.2Mの活性化されたサブユニット(または、NMP中のテイル)の溶液と反応させる。中和溶液で洗浄した後、このサイクルを繰り返して、次のサブユニットを導入し得る。必要に応じて、最後のサブユニットを加えた後、樹脂の末端にあるトリチル基は除去され、そして、3'-メトキシトリチル化オリゴマーを調製するために塩化メトキシトリチルが導入される。より不安定なメトキシトリチル種は、水性の脱トリチル化工程と、その後の、粗オリゴマーの「トリチル-ON/トリチル-OFF」精製において利益を提供する。

30

【0180】

かさ高い樹脂39および40を調製するために使用されるリアクタの設計は、モルホリノオリゴマーの大規模合成のために用いた。大規模の場合、ホスホロジアミデート結合が樹脂上に導入されるときに行われる脱トリチル化の工程は、20%トリフルオロエタノール/DCM中の4-シアノピリジニウムトリフルオロ酢酸の溶液を使用した。これは、幾分酸不安定なホスホロジアミデート結合の、カルボン酸ベースの脱トリチル化試薬よりも少ない加水分解をもたらした。さらに、二重に保護したGサブユニットの使用が有益であることが分かった。図2Kは、使用したN2,O6-保護G種46の合成を例示する。

40

【0181】

合成されたオリゴマーは、NMP中の1,4-ジチオスレイトールおよびトリエチルアミンの溶液での処理により、固体支持体から放出される。この溶液は、濃アンモニアで処理し、そして、45に保持した。この混合物を、加圧容器中に密封し、そして、16~

50

24時間、45℃に加熱した。この溶液を、0.28%アンモニア水溶液で希釈し、そして、イオン交換樹脂を通過させて、粗メトキシトリチル化オリゴマーを捕捉した。この生成物を塩勾配で溶出し、後期に溶出したメトキシトリチルまたはトリチルを含む生成物を回収し、そして、この生成物を含む画分をプールした。さらなる修飾を必要としない3'-非置換(3'-H)オリゴマーの調製について、この溶液を酸を用いてpH2.5まで処理し、オリゴマーを脱メトキシトリチレートした。この脱メトキシトリチル化した混合物を、濃アンモニアで直ぐに中和し、そして、この溶液を、逆相樹脂を通した。この生成物を45%アセトニトリル/0.28%アンモニア水溶液の溶出により回収し、そして、凍結乾燥の後、白色の粉末として単離した。この生成物のさらなる精製は、方法の節において記載されるように、カチオン交換樹脂上で行われ得る。あるいは、以下に記載されるように、オリゴマーの3'末端とは無関係に骨格のアミン部分の修飾を行うためには、3'-メトキシトリチル/トリチル基を保持することが有益であった。この場合、酸水溶液処理を省略した以外は、上記手順に従った。

10

【0182】

カチオン性結合の一部としてモルホリノオリゴマー中に導入されたアミン基は、さらに修飾され得る。このコンセプトは、オリゴマーが比較的単純に修飾されてはいるが、モルホリノオリゴマーの骨格に沿ったあらゆる位置における複雑な部分の導入を可能にするには十分な官能性を持つサブユニットから構築されることを可能にする。

【0183】

(合成上の理由から、オリゴマーの5'末端結合は、代表的には、本明細書中に記載されるタイプ(b1)の結合を含むことに注意されたい。例えば、図2P~2Qに示されるように、オリゴマーの好ましい段階式の樹脂支持型合成は、5'末端のリン原子上にピペラジン環をもたらし、このリン上の第二のピペラジン環の存在は、立体的な理由から束縛される。)

20

重要な修飾は、オリゴマー中へのグアニジニウム基の組み込みである。これは、2つの方法でなされ得る。第一に、オリゴマーの骨格上のアミン部分を、図2L(これはまた、5'末端にEG3テイルも示す)においてのように、炭酸ナトリウム緩衝化水溶液中での1H-ピラゾール-1-カルボキサミジン塩酸塩との反応により直接グアニジニウム種へと変換した(M. S. Bernatowicz, Y. Wu, G. R. Matsueda, J. Org. Chem., 1992, 57(8), 2497-2502)。第二に、カルボキシル基およびグアニジニウム基の両方を含む物質(例えば、6-グアニジノヘキサン酸)を、2-(1-H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルアミニウムヘキサフルオロホスフェート(HBTU)で活性化させ、そして、アミン含有オリゴマーと反応させた(図2M)。同様の様式で、4-グアニジノブタン酸、3-グアニジノプロパン酸およびグアニジノ酢酸が導入され得る。これらのアプローチの混成物において、アミン部分を保護されたFMOCアミノ酸(例えば、FMOC-6-アミノヘキサン酸)と反応させて、保護された一級アミン含有側鎖を導入し、これを、アンモニア処理によりFMOC基を除いた後、上述のようにグアニル化した。完全にグアニル化された種を、適切なpHでのカチオンクロマトグラフィーによって、部分的にグアニル化されたオリゴマーから分離した。

30

40

【0184】

オリゴマーの末端もまた、PEGテイルを加えることなく、図2N(また、樹脂39からもたらされる代表的なオリゴマーも示す)に示されるように、これらの方法によってグアニジニウム部分で置換され得る。

【0185】

注目すべき別の修飾は、骨格に沿ったペプチドの組み込みである。小さなペプチドは、商業的な供給源(例えば、Bachem California, Inc., 3132 Kashiwa Street Torrance, CA 90505 USAおよびAnaSpec, Inc., 2149 O'Toole Ave., San Jose, CA 95131)から容易に入手可能である。ペプチドの組み込みは、図2Oに示される典型

50

的な 2 - (1 - H - ベンゾトリアゾール - 1 - イル) - 1 , 1 , 3 , 3 - テトラメチルアミニウムヘキサフルオロホスフェート (H B T U) 化学に従った。オリゴマーまたはペプチド上のグアニジニウム基は干渉しない。

【 0 1 8 6 】

オリゴマーはまた、3' 末端において、細胞内への生成物の送達を増強するのに有用なアルギニンリッチなペプチドに結合され得る。この場合、3' - メトキシトリチル化 / トリチル化オリゴマーの骨格に沿った一級および二級のアミン部分の保護は、図 2 P に示されるように、トリフルオロアセチル化によって行った。末端のメトキシトリチル基を除去し、そして、H B T U を用いてペプチドを結合させた。この結合反応を、アンモニアでの処理によりワークアップし、そして、トリフルオロアセチル基を除去した。この結合体を、カチオン交換クロマトグラフィーにより精製した。骨格のアミン官能基が完全にグアニル化されると、ペプチドは、図 2 Q に示されるように、これらの側鎖から干渉を受けることなく導入され得る。

10

【 0 1 8 7 】

b 1 結合シリーズのピペラジンのメチル化は、図 2 R に示されるように、水溶液中のホルムアルデヒドおよびホウ化水素ナトリウムを用いてモルホリノオリゴマーを処理することによって達成され得る。代替的な基を組み込むためには、他のアルデヒドが使用され得る。

【 0 1 8 8 】

V . カチオン性結合を含有するモルホリノオリゴマーの用途

20

本明細書中に記載される化合物は、タンパク質生成を阻害する方法において使用され得る。したがって、このようなタンパク質をコードする核酸は、本明細書中に開示されるように、少なくとも 1 つのカチオン性のサブユニット間結合を含み、好ましくは、20% ~ 50% のこのようなカチオン性結合を含むアンチセンスオリゴマーに対して曝露され、このアンチセンスオリゴマーにおいて、塩基対形成部分 P i は、タンパク質生成を阻害するのに有効な位置にある核酸の一部に対してハイブリダイズするのに有効な配列を形成する。この位置は、例えば、m R N A の A T G 開始コドン、プレ m R N A のスプライシング部位、または、以下に記載されるようなウイルスの標的配列であり得る。

【 0 1 8 9 】

一般に、アンチセンスの用途について、オリゴマーは、核酸標的配列に対して 100% 相補的であっても、オリゴマーと核酸標的配列との間に形成されるヘテロ二重鎖が細胞のヌクレアーゼの作用およびインビボで生じ得る他の分解様式を絶えるに十分安定である限りは、例えば、変種に適合するようにミスマッチを含んでいてもよい。ミスマッチは、存在する場合、ハイブリッド二重鎖の中央よりも、ハイブリッド二重鎖の末端領域に向かって、不安定さが少なくなる。許容されるミスマッチの数は、二重鎖の安定性の周知の原理によれば、オリゴマーの長さ、二重鎖中の G : C 塩基対の割合、および、二重鎖中のミスマッチの位置に依存する。このようなアンチセンスオリゴマーは、必ずしも核酸標的配列に対して 100% 相補的ではないが、標的配列に対し安定かつ特異的に結合し、その結果、核酸標的の生物学的活性 (例えば、コードされるタンパク質の発現) が調節されるのに有効である。

30

40

【 0 1 9 0 】

オリゴマーと標的配列との間に形成される二重鎖の安定性は、結合 T_m と、二重鎖の細胞の酵素的切断に対する感受性との関数である。相補的な配列 R N A に対するアンチセンス化合物の T_m は、H a m e s ら、N u c l e i c A c i d H y b r i d i z a t i o n , I R L P r e s s , 1 9 8 5 , p p . 1 0 7 - 1 0 8 により記載されるようなもの、または、M i y a d a C . G . a n d W a l l a c e R . B . , 1 9 8 7 , O l i g o n u c l e o t i d e h y b r i d i z a t i o n t e c h n i q u e s , M e t h o d s E n z y m o l . V o l . 1 5 4 p p . 9 4 - 1 0 7 に記載されるようなもののような従来の方法により測定され得る。

【 0 1 9 1 】

50

各アンチセンスオリゴマーは、相補的な配列RNAに対して、体温よりも高い、そして好ましくは、50 より高い結合 T_m を有するべきである。60 ~ 80 の範囲またはそれより高い T_m が好ましい。周知の原理によれば、相補性ベースのRNAハイブリッドに対するオリゴマー化合物の T_m は、二重鎖におけるC:G対形成する塩基の割合を高めることによって、そして/または、ヘテロ二重鎖の長さ(塩基対)を増やすことによって、高くされ得る。同時に、細胞への取り込みを最適化するために、オリゴマーのサイズを制限することが有益であり得る。この理由から、長さ20塩基以下で高い T_m (50以上)を示す化合物は、一般に、高い T_m 値のために20より多くの塩基を必要とする化合物よりも好ましい。

【0192】

好ましくは、オリゴマーは、哺乳動物の細胞により能動的に取り込まれる。オリゴマーは、このような取り込みを促進するために、本明細書中に記載されるような輸送部分に結合され得る。

【0193】

標的核酸へのアンチセンスオリゴマーの効率的な送達は、処置の重要な局面である。アンチセンスオリゴマーの送達経路としては、経口および非経口の経路を含めた種々の全身経路(例えば、静脈内、皮下、腹腔内および筋肉内)ならびに、吸入、経皮および局所送達が挙げられるがこれらに限定されない。適切な経路は、処置される被験体の状態に適切であるように、当業者により決定され得る。たとえば、皮膚のウイルス感染の処置におけるアンチセンスオリゴマーの送達のための適切な経路は局所送達であり、一方、ウイルスの呼吸器感染の処置のためのアンチセンスオリゴマーの送達は、吸入によるものである。オリゴマーはまた、ウイルス感染の部位に直接、または、血流へと送達され得る。

【0194】

アンチセンスオリゴマーは、生理学的に受容可能な任意の従来のビヒクル中で投与され得る。このような組成物は、当業者により採用される任意の種々の標準的な薬学的に受容可能なキャリアを含み得る。例としては、生理食塩水、リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)、水、水性エタノール、エマルジョン(例えば、油/水エマルジョンまたはトリグリセリドエマルジョン)、錠剤およびカプセル剤が挙げられるがこれらに限定されない。適切な生理学的に受容可能なキャリアの選択は、選択される投与様式に依存して変化する。

【0195】

いくつかの場合、アンチセンスオリゴヌクレオチドの細胞内への取り込みを促進するためにリポソームが採用され得る(例えば、Williams, S. A., Leukemia 10(12): 1980-1989, 1996; Lappalainenら, Antiviral Res. 23: 119, 1994; Uhlmannら, Antisense Oligonucleotides: A New Therapeutic Principle, Chemical Reviews, Volume 90, No. 4, pages 544-584, 1990; Gregoriadis, G., Chapter 14, Liposomes, Drug Carriers in Biology and Medicine, pp. 287-341, Academic Press, 1979を参照のこと)。例えば、WO 93/01286に記載されるように、ヒドロゲルもまた、アンチセンスオリゴマーの投与のためのビヒクルとして使用され得る。あるいは、オリゴヌクレオチドは、ミクロスフェアまたは微粒子中で投与され得る(例えば、Wu, G. Y. および Wu, C. H., J. Biol. Chem. 262: 4429-4432, 1987を参照のこと)。あるいは、米国特許第6,245,747号に記載されるように、アンチセンスオリゴマーと複合体を形成されたガスを充填したマイクロバブル(gas-filled microbubble)の使用は、標的組織への送達を増強し得る。

【0196】

持続放出組成物もまた使用され得る。これらとしては、フィルムまたはマイクロカプセルのような成形された物品の形状の半透性ポリマーマトリクスが挙げられ得る。

10

20

30

40

50

【 0 1 9 7 】

A . 再狭窄を処置するためのアンチセンス化合物

本発明の化合物は、再狭窄のような血管増殖性障害の処置において有用である。血管の損傷した領域としては、例えば、再狭窄 (r e s t e n o s i s)、血管インターベンション (例えば、ステントの挿入を伴うかまたは伴わない、冠状動脈バルーン血管形成術) 後の血管管腔の再狭窄 (r e n a r r o w i n g) が挙げられる。再狭窄は、血管形成術により処置される病巣の約 30% ~ 60% において、そして、処置後 3 ~ 6 ヶ月以内にステントで処置された病巣の約 20% において生じると考えられる (例えば、D e v i , N . B . ら , C a t h e t C a r d i o v a s c D i a g n 45 (3) : 337 - 45 , 1998 を参照のこと)。狭窄はまた、詰った動脈の周辺の血液の経路を変更する、すなわち、「バイパスし」、心臓への血液および酸素の供給を改善するために心臓外科手術がなされる、冠状動脈バイパス手術後にも生じ得る。このような場合、狭窄は、移植された血管セグメントにおいて、特に、交換した血管の接合部において生じ得る。狭窄はまた、透析のためにつくった吻合接合部においても生じ得る。

10

【 0 1 9 8 】

本発明のオリゴマーは、したがって、再狭窄を処置するための組成物および方法において使用され得る。具体的には、c - m y c に対して指向されたアンチセンスモルホリノオリゴマー組成物中に含まれるカチオン性結合は、経皮的冠動脈形成術 (P T C A) (例えば、P C T 公開番号 W O / 2000 / 044897 を参照のこと) のような経管血管形成術における再狭窄のリスクを軽減する。無電荷結合のみを有するモルホリノオリゴマーと比較すると、アンチセンス c - m y c 化合物の全体に点在するカチオン性結合を含むオリゴマーは、再狭窄の処置においてより低い用量でより多くの効能を提供することが予測される。

20

【 0 1 9 9 】

したがって、この方法は、血管の損傷部位に対し直接局所投与することによって、または、血管内投与による全身投与によって、本明細書中に記載されるような、少なくとも 1 つのカチオン性のサブユニット間結合を含み、好ましくは、20% ~ 50% のこのようなカチオン性結合を含み、配列番号 59 (ヒト c - m y c 、 A T G に関して - 100 ~ + 25 : C G C C G C T G C C A G G A C C C G C T T C T C T G A A A G G C T C T C C T T G C A G C T G C T T A G A C G C T G G A T T T T T T T C G G G T A G T G G A A A A C C A G C A G C C T C C C G C G A C G A T G C C C C T C A A C G T T A G C T T C A C C A A) により規定されるヒト c - m y c m R N A の A U G 開始部位領域内の少なくとも 12 の連続する塩基の標的配列に対して相補的な標的化塩基配列を含む 12 ~ 40 のサブユニットを有するオリゴマーを、患者における再狭窄のリスクを軽減するのに有効な量で、患者に対して投与する工程を包含する。この化合物は、以下のうちの 1 つによって投与される：

30

(a) 血管の領域をアンチセンス化合物を含むレザバに接触させ、そして、イオン浸透療法またはエレクトロポレーションによって、レザバから血管内へと化合物を導入すること；

(b) カテーテルバルーンの表面上に含まれる注入器を介して、圧力下で、血管の領域内に直接カテーテルから化合物を注入すること、ここで、上記注入器は、血管内の中膜を貫通し得る；

40

(c) 被包された形態のアンチセンス化合物を含むマイクロ粒子を、血管の領域に注入するか、または、血管の領域に接触させること；

(d) カテーテルバルーンの表面上に含まれ、アンチセンス化合物を拡散可能な形態で含むヒドロゲルに、血管の領域を接触させること；

(e) 拡散可能な形態のアンチセンス化合物を含む外側表面層を有するステントに、血管の領域を接触させること；および

(f) 血管内投与によって化合物を注入し、血管組織への全身送達をもたらすこと。

【 0 2 0 0 】

50

アンチセンス化合物は、配列番号 43 (A C G T T G A G G G G C A T C G T C G C) により同定される配列に対し少なくとも 90 % の相同性を有するか、あるいは、配列番号 60 (G G A G G C T G C T G G T T T T C C A C) および 61 (G G C A T C G T C G C G G G A G G C T C) から選択される配列に対し少なくとも 90 % の相同性を有する標的化配列を有し得る。

【0201】

投与されるアンチセンス化合物の量は、約 0.5 mg ~ 約 30 mg の間であり得る。化合物は、水性媒体中の化合物の溶解性を増強する部分で誘導体化され得、そして、この化合物は、少なくとも約 30 mg / ml のアンチセンス化合物を含む溶液から投与される。

【0202】

化合物は、生理学的条件下で、実質的に 37 よりも高い T_m (例えば、少なくとも 50、好ましくは 60 ~ 80) で c-myc mRNA に対してハイブリダイズするように設計される。化合物は、好ましくは、AUG 部位に対して相補的な内部の 3 塩基トリプレットと、この開始部位から 5' 側および 3' 側の 1 以上の塩基に対して相補的な塩基を含む。1 つの好ましい化合物の配列は、配列番号 43 により同定される 20 マーであり、ここで、この配列における CAT トリプレットは AUG 開始部位に結合し、CAT 配列から 3' 側の 6 塩基は、標的に対して上流 (5') 方向に延び、そして、CAT 配列から 5' 側の 11 塩基は、標的に対して下流に延びる。この化合物は、自己アニーリング領域を有さないことにより、溶解性が増強されている。

【0203】

このオリゴマーは、例えば、コーティングされたステントにおいて、または、伏在静脈の処置のためのエキソビボ浸漬用溶液によって用いられるか、または、他の方法で、血管の損傷部位へと送達される。別の実施形態では、アンチセンス化合物は、再狭窄の処置において使用するための粒子状組成物の一部を形成する。1 つのこのような粒子は、被包されたアンチセンス化合物を含む生分解性粒子 (例えば、ポリ乳酸粒子またはポリグリコール酸粒子) である。これらの粒子は、好ましくは、1 ~ 5 ミクロンの範囲であり、そして、以下に記載されるように、壁に対するバルーンからの圧力により血管壁内に押し付けられるか、または、ステントのような粒子のキャリアからの放出によってのいずれかで、血管形成術の血管部位へと粒子を直接送達することにより送達するのに有用である。

【0204】

オリゴマーはまた、血管内注射により血管の損傷部位へと全身送達を介して投与することによって用いられ得る。

【0205】

あるいは、粒子は、被包された形態の化合物を含むマイクロバブルであり得る。この粒子は、血管の部位へと直接、すなわち、粒子の懸濁物に直接、または粒子から放出される化合物に血管壁を接触させることによって、送達され得、これは、血管の領域を超音波エネルギーに曝露することによって促進され得る。マイクロバブル組成物は、オリゴヌクレオチドのような結合させた分子の、血栓または血管の損傷の領域 (例えば、損傷を受けた内皮)、ならびに、肝臓および腎臓のような選択した器官への送達において特に有用であることが見出されている。例えば、PCT 公開番号 WO 2000/02588、米国特許第 6,245,247 号および同第 7,094,765 号、ならびに、米国出願公開第 20030207907 号 (これらは、本明細書中に参考として援用される) を参照のこと。

【0206】

なお別の実施形態では、粒子は、被包されたアンチセンス化合物を含むリボソームである。リボソーム粒子は血管の部位へと直接適用されるので、このリボソームは、長い循環時間を達成するために必要とされる表面の修飾なしの従来のリボソームであり得る。

【0207】

B. 抗ウイルスの用途

別の実施形態では、本発明のオリゴマーは、一本鎖のポジティブセンスゲノムを持ち、

10

20

30

40

50

かつ、Flaviviridae、Picornoviridae、Caliciviridae、Togaviridae、Arteriviridae、Coronaviridae、AstroviridaeおよびHepeviridaeのウイルス科のうちの1つから選択されるRNAウイルスの複製を阻害するために使用され得る。

【0208】

B1. ssRNAウイルスの標的化ステム-ループ二次構造

例示的なアンチセンスの抗ウイルス化合物の1つの分類は、本発明において記載されるようなカチオン性結合を持ち、12~40のサブユニットの配列と、標的とされるウイルスのポジティブセンスRNAの5'末端の40塩基以内のステム-ループ二次構造に関連する領域に対して相補的な標的化配列とを持つ、モルホリノオリゴマーである。(例えば、PCT公開番号WO/2006/033933または米国出願公開第20060269911号および同第20050096291号(これらは、本明細書中に参考として援用される)を参照のこと)。

10

【0209】

この方法は、ウイルスの標的配列として、その配列が内部にステム-ループの二次構造を形成し得る感染性ウイルスのポジティブ鎖の5'末端の40塩基以内にある領域を最初に同定する工程を包含する。次いで、段階的な固相合成によって、本明細書中に記載されるような少なくとも1つのカチオン性のサブユニット間結合を有し、好ましくは20%~50%のこのようなカチオン性結合を含み、かつ、内部で二重鎖構造を形成し得るウイルスのゲノム領域に相補的な少なくとも12のサブユニットの標的化配列を有するオリゴマーが構築され、ここで、このオリゴマーは、ウイルスの標的配列と共に、ウイルスのポジティブセンス鎖とオリゴヌクレオチド化合物とから構成されるヘテロ二重鎖構造を形成し得、そして、少なくとも45の解離の T_m と、このようなステム-ループ構造の崩壊とによって特徴付けられる。

20

【0210】

標的配列は、入力RNA配列の最小自由エネルギー状態についての検索に基づいて二次構造の予測を行うことができるコンピュータプログラムによって、5'末端配列、例えば、5'末端の40塩基を解析することにより同定され得る。

【0211】

関連する局面において、オリゴマーは、哺乳動物宿主細胞において、一本鎖のポジティブセンスゲノムを有する感染RNAウイルスであって、Flaviviridae科、Picornoviridae科、Caliciviridae科、Togaviridae科、Arteriviridae科、Coronaviridae科、Astroviridae科またはHepeviridae科のうちの1つから選択されるRNAウイルスの複製を阻害する方法において使用され得る。この方法は、感染した宿主細胞に、本明細書中に記載されるような、内部でステム-ループ二次構造を形成し得るポジティブストランドのウイルスゲノムの5'末端の40塩基以内の領域に対して相補的な少なくとも12のサブユニットの標的化配列を持つオリゴマーのウイルス阻害量を投与する工程を包含する。この化合物は、宿主細胞に投与されたときに、(i)ウイルスのポジティブセンス鎖とオリゴヌクレオチド化合物とから構成され、そして(ii)少なくとも45の解離の T_m とこのようなステム-ループ構造の崩壊とによって特徴付けられる、ヘテロ二重鎖構造を形成させるのに有効である。この化合物は、ウイルスに感染したか、またはウイルス感染の危険性のある哺乳動物被験体に対して投与され得る。

30

40

【0212】

フラビウイルスまたはヘパシウイルスの処置について、標的配列は、以下の配列のうちの1つ内にあるステム-ループの二次構造に関連する領域に対して相補的である：

- (i) St Louis 脳炎ウイルスについての配列番号77；
- (ii) 日本脳炎ウイルスについての配列番号78；
- (iii) マリーバレー脳炎ウイルスについての配列番号79；
- (iv) 西ナイル熱ウイルスについての配列番号80；

50

- (v) 黄熱病ウイルスについての配列番号 8 1 ;
- (v i) デング熱ウイルス 2 型についての配列番号 8 2 ;
- (v i i) C 型肝炎ウイルスについての配列番号 8 3 ;
- (v i i i) ダニ媒介ウイルスについての配列番号 8 4 ;
- (i x) オムスク出血性熱ウイルスについての配列番号 8 5 ; および
- (x) ポーワッサンウイルスについての配列番号 8 6 。

【0213】

これらのウイルスについての例示的な標的配列としては、以下の配列、または、関連する標的配列における二重鎖二次構造の 1 以上の領域と重なるこれらの配列の部分が挙げられる：

- (i) S t L o u i s 脳炎ウイルスについての配列番号 8 7 および 8 8 ;
- (i i) 日本脳炎ウイルスについての配列番号 8 9 および 9 0 ;
- (i i i) マリーバレー脳炎ウイルスについての配列番号 9 1 および 9 2 ;
- (i v) 西ナイル熱ウイルスについての配列番号 9 3 および 9 4 ;
- (v) 黄熱病ウイルスについての配列番号 9 5 および 9 6 ;
- (v i) デング熱ウイルスについての配列番号 9 7 , 9 8 ;
- (v i i) C 型肝炎ウイルスについての配列番号 9 9 および 1 0 0 ;
- (v i i i) ダニ媒介ウイルスについての配列番号 1 0 1 および 1 0 2 ;
- (i x) オムスク出血性熱ウイルスについての配列番号 1 0 3 および 1 0 4 ; ならびに
- (x) ポーワッサンウイルスについての配列番号 1 0 5 および 1 0 6 。

10

20

【0214】

エンテロウイルス、ライノウイルス、ヘパトウイルスまたはアフトウイルスの処置について、標的配列は、以下の配列のうちの 1 つ内にあるステム - ループの二次構造に関連する領域に対して相補的である：

- (i) M a h o n e y 株および S a b i n 株のポリオウイルスについての配列番号 1 0 7 ;
- (i i) ヒトエンテロウイルス A についての配列番号 1 0 8 ;
- (i i i) ヒトエンテロウイルス B についての配列番号 1 0 9 ;
- (i v) ヒトエンテロウイルス C についての配列番号 1 1 0 ;
- (v) ヒトエンテロウイルス D についての配列番号 1 1 1 ;
- (v i) ヒトエンテロウイルス E についての配列番号 1 1 2 ;
- (v i i) ウシエンテロウイルスについての配列番号 1 1 3 ;
- (v i i i) ヒトライノウイルス 8 9 についての配列番号 1 1 4 ;
- (i x) ヒトライノウイルス B についての配列番号 1 1 5 ;
- (x) 口蹄疫ウイルスについての配列番号 1 1 6 ; および
- (x i) A 型肝炎ウイルスについての配列番号 1 1 7 。

30

【0215】

これらのウイルスについての例示的な標的配列としては、以下の配列、または、関連する標的配列における二重鎖二次構造の 1 以上の領域と重なるこれらの配列の部分が挙げられる：

- (i) M a h o n e y 株および S a b i n 株のポリオウイルスについての配列番号 1 1 8 および 1 1 9 ;
- (i i) ヒトエンテロウイルス A についての配列番号 1 2 0 および 1 2 1 ;
- (i i i) ヒトエンテロウイルス B についての配列番号 1 2 2 および 1 2 3 ;
- (i v) ヒトエンテロウイルス C についての配列番号 1 2 4 および 1 2 5 ;
- (v) ヒトエンテロウイルス D についての配列番号 1 2 6 および 1 2 7 ;
- (v i) ヒトエンテロウイルス E についての配列番号 1 2 8 および 1 2 9 ;
- (v i i) ウシエンテロウイルスについての配列番号 1 3 0 および 1 3 1 ;
- (v i i i) ヒトライノウイルス 8 9 についての配列番号 1 3 2 および 1 3 3 ;
- (i x) ヒトライノウイルス B についての配列番号 1 3 4 および 1 3 5 ;

40

50

- (x) 口蹄疫ウイルスについての配列番号 1 3 6 および 1 3 7 ; ならびに
- (x i) A 型肝炎ウイルスについての配列番号 1 3 8 および 1 3 9 。

【 0 2 1 6 】

カリシウイルスまたはノロウイルスの処置について、標的配列は、以下の配列のうちの 1 つ内にあるステム - ループの二次構造に関連する領域に対して相補的である :

- (i) ネコカリシウイルスについての配列番号 1 4 0 ;
- (i i) イヌカリシウイルスについての配列番号 1 4 1 ;
- (i i i) ブタ腸ウイルスについての配列番号 1 4 2 ;
- (i v) カリシウイルス株 N B についての配列番号 1 4 3 ; および
- (v) ノーウォークウイルスについての配列番号 1 4 4 。

10

【 0 2 1 7 】

これらのウイルスについての例示的な標的配列としては、以下の配列、または、関連する標的配列における二重鎖二次構造の 1 以上の領域と重なるこれらの配列の部分が挙げられる :

- (i) ネコカリシウイルスについての配列番号 1 4 5 および 1 4 6 ;
- (i i) イヌカリシウイルスについての配列番号 1 4 7 および 1 4 8 ;
- (i i i) ブタ腸ウイルスについての配列番号 1 4 9 および 1 5 0 ;
- (i v) カリシウイルス株 N B についての配列番号 1 5 1 および 1 5 2 ; ならびに
- (v) ノーウォークウイルスについての配列番号 1 5 3 および 1 5 4 。

20

【 0 2 1 8 】

ヘペウイルス、E 型肝炎ウイルスの処置について、標的配列は、配列番号 1 5 5 として同定される配列内にあるステム - ループの二次構造と関連する領域に対して相補的である。例示的な標的化配列としては、配列番号 1 5 6 および 1 5 7、または、関連する標的配列における二次構造の 1 以上の領域と重なるこれらの配列の部分が挙げられる。

【 0 2 1 9 】

ルビウイルスまたはアルファウイルスの処置について、標的配列は、以下の配列のうちの 1 つ内にあるステム - ループの二次構造に関連する領域に対して相補的である :

- (i) 風疹ウイルスについての配列番号 1 5 8
- (i i) 東部ウマ脳脊髄炎ウイルスについての配列番号 1 5 9 ;
- (i i i) 西部ウマ脳脊髄炎ウイルスについての配列番号 1 6 0 ; および
- (i v) ベネズエラウマ脳脊髄炎ウイルスについての配列番号 1 6 1 。

30

【 0 2 2 0 】

これらのウイルスの各々についての例示的な標的配列は、以下の配列番号によって同定されるか、または、関連する標的配列における二重鎖二次構造の 1 以上の領域と重なるこれらの配列の部分である :

- (i) 風疹ウイルスについての配列番号 1 6 2 および 1 6 3
- (i i) 東部ウマ脳脊髄炎ウイルスについての配列番号 1 6 4 および 1 6 5 ;
- (i i i) 西部ウマ脳脊髄炎ウイルスについての配列番号 1 6 6 および 1 6 7 ; ならびに
- (i v) ベネズエラウマ脳脊髄炎ウイルスについての配列番号 1 6 8 および 1 6 9 。

40

【 0 2 2 1 】

コロナウイルスまたはアルテリウイルスの処置について、標的配列は、以下の配列のうちの 1 つ内にあるステム - ループの二次構造に関連する領域に対して相補的である :

- (i) S A R S コロナウイルス T O R 2 についての配列番号 1 7 0 ;
- (i i) ブタ流行性下痢ウイルスについての配列番号 1 7 1 ;
- (i i i) 伝染性胃腸炎ウイルスについての配列番号 1 7 2 ;
- (i v) ウシコロナウイルスについての配列番号 1 7 3 ;
- (v) ヒトコロナウイルス 2 2 9 E についての配列番号 1 7 4 ;
- (v i) マウス肝炎ウイルスについての配列番号 1 7 5 ; および
- (v i i) ブタ生殖器系および呼吸器系症候群ウイルスについての配列番号 1 7 6 。

50

【0222】

これらのウイルスの各々についての例示的な標的配列は、以下の配列番号によって同定されるか、または、関連する標的配列における二重鎖二次構造の1以上の領域と重なるこれらの配列の部分である：

- (i) SARSコロナウイルスTOR2についての配列番号177および178；
- (ii) ブタ流行性下痢ウイルスについての配列番号179および180；
- (iii) 伝染性胃腸炎ウイルスについての配列番号181および182；
- (iv) ウシコロナウイルスについての配列番号183および184；
- (v) ヒトコロナウイルス229Eについての配列番号185および186；
- (vi) マウス肝炎ウイルスについての配列番号187および188；ならびに
- (vii) ブタ生殖器系および呼吸器系症候群ウイルスについての配列番号189および190。

10

【0223】

ママステロウイルス、ヒトアストロウイルスの処置について、標的配列は、配列番号191として同定される配列内にあるステム-ループの二次構造と関連する領域に対して相補的である。例示的な標的化配列は、配列番号193および194、または、関連する標的配列における二重鎖二次構造の1以上の領域と重なるこれらの配列の部分である。

【0224】

ウマ動脈炎ウイルスの処置について、標的配列は、配列番号192として同定される配列内にあるステム-ループの二次構造と関連する領域に対して相補的である。例示的な標的化配列は、配列番号195、196、または、関連する標的配列における二重鎖二次構造の1以上の領域と重なるこれらの配列の部分である。

20

【0225】

B2. ssRNAウイルスの最初のORFの標的化

ピコルナウイルス科、カリシウイルス科、トガウイルス科、コロナウイルス科およびフラビウイルス科のウイルスの増殖の阻害において使用するための例示的なアンチセンス抗ウイルス化合物の第二の分類は、12kb未満の一本鎖のポジティブセンスゲノムと、複数の機能性タンパク質を含むポリタンパク質をコードする最初のオープンリーディングフレームとを持つ。特定の実施形態では、ウイルスは、コロナウイルス科のRNAウイルス、または、フラビウイルス科の西ナイル熱ウイルス、黄熱病ウイルスもしくはデング熱ウイルスである。阻害性の化合物は、本明細書中に記載されるような、ウイルスゲノムの最初のオープンリーディングフレームのAUG開始部位にまたがるウイルス標的配列に対して実質的に相補的な標的化塩基配列を持つ、カチオン性結合が点在したアンチセンスオリゴマーから構成される。この方法の1つの実施形態では、オリゴマーは、ウイルスに感染した哺乳動物被験体に投与される。例えば、PCT公開番号WO/2005/007805および米国出願公開第2003224353号（これらは、本明細書中に参考として援用される）を参照のこと。

30

【0226】

ピコルナウイルスに対して指向される例示的な抗ウイルス化合物としては、以下：(i) Mahoney株およびSabín株のポリオウイルスについての配列番号62、(ii) A型肝炎ウイルスについての配列番号63、(iii) ライノウイルス14についての配列番号64、(iv) ライノウイルス16についての配列番号65、および(v) ライノウイルス1Bについての配列番号66からなる群より選択される配列に対して少なくとも90%の相同性を有する標的化配列を持つものが挙げられる。

40

【0227】

カリシウイルスに対して指向される例示的な抗ウイルス化合物としては、以下：(i) 血清型Pan-1ベシウイルスについての配列番号67、68および69、(ii) ブタカリシウイルスについての配列番号70、(iii) ノーウォークウイルスについての配列番号71ならびに(iv) ネコカリシウイルスについての配列番号72からなる群より選択される配列に対して少なくとも90%の相同性を有する標的化配列を持つものが挙げ

50

られる。

【0228】

C型肝炎フラビウウイルスの阻害における使用について、標的化配列は、配列番号75により同定されるHCVのAUG開始部位領域の少なくとも12の連続する塩基の配列に対して相補的である。例示的な標的化配列としては、配列番号18または76に対して少なくとも90%の相同性を有するものが挙げられる。

【0229】

トガウイルスに対して指向される例示的な抗ウイルス化合物としては、E型肝炎ウイルスについて、配列番号73および74からなる群より選択される配列に対して少なくとも90%の相同性を有する標的化配列を持つものが挙げられる。

10

【0230】

好ましい標的配列は、ウイルスゲノムの最初のオープンリーディングフレーム(ORF1)のAUG開始部位にまたがる領域である。最初のORFは一般に、ポリメラーゼ、ヘリカーゼおよびプロテアーゼのような非構造タンパク質を含むポリタンパク質をコードする。「AUG開始部位にまたがる」とは、標的配列が、AUG開始部位の片側の少なくとも3塩基と、反対側の少なくとも2塩基(合計少なくとも8塩基)を含むことを意味する。好ましくは、標的配列は、開始部位の両側の少なくとも4塩基(合計少なくとも11塩基)を含む。

【0231】

より一般に、好ましい標的部位としては、種々のウイルス単離体間で保存されている標的が挙げられる。他の望ましい部位としては、IRES(内部リボソーム進入部位)、トランス転写活性促進タンパク質結合部位、および複製開始部位が挙げられる。複数の冗長な遺伝子を提供し得る複雑でかつ大きなウイルスゲノムは、ウイルスの進入と、ウイルスの存在に対する宿主の応答とをコードする宿主の細胞内遺伝子を標的とすることによって、効率的に標的化され得る。

20

【0232】

種々のウイルスゲノム配列は、NCBI Genbankデータベースのような周知の情報源から入手可能である。ORF1のAUG開始部位もまた、信頼のおける遺伝子データベースまたは参考文献において同定されていても、予測されるORF1開始部位の領域におけるAUGコドンについての配列を走査することによって得られてもよい。

30

【0233】

4つのウイルス科の各々の一般的なゲノムの系統化を以下に示し、各科内の選択したメンバー(属、種または株)について得た例示的な標的配列をこれに続ける。

【0234】

ピコルナウイルス。ピコルナウイルスの代表として、ライノウイルスゲノムは、約7.5 kbの、一本鎖でポジティブセンスのポリアデニル化RNAの単一の分子である。このゲノムは、最初のポリタンパク質の上流に位置する長いUTRと、その末端にVPg(ウイルスゲノムを連結する)タンパク質が共有結合された単一のオープンリーディングフレーム(ORF)とを含む。ORFは、2つのセグメントに分割され、この各々がポリタンパク質をコードする。第一のセグメントは、その後切断されてウイルスタンパク質VP1~VP4を形成するポリタンパク質をコードし、そして、第二のセグメントは、Cis-pro、プロテアーゼおよびポリメラーゼを含むウイルスタンパク質の前駆体であるポリタンパク質をコードする。ORFは、ポリA末端配列で終結する。

40

【0235】

標的の最初のAUG開始部位は、塩基位置615~640の間に位置する；この領域を標的とすることは、両方のポリタンパク質セグメントの翻訳を阻害するのに有効である。

【0236】

カリシウイルス。カリシウイルス科のベシウイルスのゲノムは、約7.5 kbの、感染性で一本鎖のポジティブセンスRNAの単一の分子である。このゲノムは、非修飾の最初のオープンリーディングフレーム(ORF1)の上流のUTRを含む。このゲノムの3'

50

末端はポリアデニル化されている。このゲノムは、3つのオープンリーディングフレームを含む。第一のオープンリーディングフレームは、その後切断されて、ヘリカーゼ、プロテアーゼ、RNA依存性RNAポリメラーゼおよび「VPg」（ウイルスゲノムRNAの5'末端に結合されることになるタンパク質）を含むウイルスの非構造タンパク質を形成するポリタンパク質をコードする。第二のオープンリーディングフレームは、単一のカプシドタンパク質をコードし、そして、第三のオープンリーディングフレームは、天然では塩基性であり、おそらくは、RNAと会合し得る構造タンパク質であると報告されているものをコードする。

【0237】

標的の最初のAUG開始部位は、塩基位置7～35の間に位置する；この領域を標的とすることは、最初のリーディングフレームの翻訳を阻害するのに有効である。

10

【0238】

トガウイルス。トガウイルス科の風疹ウイルスのゲノムは、感染性で、約11.7kbの、一本鎖のポジティブセンスRNAの単一の直鎖状分子である。5'末端は7-メチルG分子でキャッピングされ、そして、3'末端はポリアデニル化されている。全長および部分ゲノムのメッセンジャーRNAが示されており、そして、ポリタンパク質の翻訳後の切断は、RNA複製の間に起こる。このゲノムは、2つのオープンリーディングフレームを含む。第一のオープンリーディングフレームは、その後4つの機能的タンパク質nsP1～nsP4へと切断されるポリタンパク質をコードする。第二のオープンリーディングフレームは、ウイルスのカプシドタンパク質と3つの他のウイルスタンパク質PE2、6

20

【0239】

最初のオープンリーディングフレームについてのAUG開始部位は、塩基位置10～40の間に位置する；この領域を標的とすることは、最初のオープンリーディングフレームの翻訳を阻害するのに有効である。

【0240】

フラビウイルス。C型肝炎ウイルスゲノムは、約11kbの、一本鎖のポジティブセンスRNAの単一の直鎖状分子である。5'末端はm⁷GpppAmp分子でキャッピングされ、そして、3'末端はポリアデニル化されていない。ゲノムは、ただ1つのオープンリーディングフレームのみを含み、このオープンリーディングフレームは、6つの構造的かつ機能的なタンパク質へと分離可能な前駆体ポリタンパク質をコードする。最初のAUG開始部位は、塩基位置343に位置する。

30

【0241】

対応するウイルスゲノム中のORF1開始部位を含む例示的なウイルス核酸配列についてのGenBankの参照番号を、以下の表3に列挙する。文献または特許の情報源の利用可能な遺伝子配列データベースから入手可能であり得るように、これらの配列は、4つのウイルス科のメンバーのORF1開始部位領域内の他の配列を代表するのみであることが理解される。

【0242】

最初のオープンリーディングフレーム（ORF1）の翻訳開始部位にまたがる標的領域に対して指向される標的化配列は、これらの標的領域内のAUG部位にまたがる1以上の配列に対して相補的な配列を構築することによって選択される；以下の表3を参照のこと。

40

【0243】

【表 3】

表 3. ORF1 翻訳開始領域を標的とする例示的なアンチセンス配列

ウイルス	GenBank アクセシ ョン番号	標的化さ れる領域	アンチセンスオリゴマー (5'→3)	配列 番号
Picornaviridae				
ポリオウイルス Mahoney 株 Sabin 株	NC002058 V01150	735-755 735-755	CCTGAGCACCCATTATGATAC	62
A 型肝炎	M14707	731-754	CCTTGTCTAGACATGTTTCATTATT	63
ライノウイルス 14	NC001490	621-640	CTGAGCGCCCATGATCACAG	64
ライノウイルス 16	NC001752	618-637	TTGAGCGCCCATGATAACAA	65
ライノウイルス 1B	D00239	615-634	CTGGGCACCCATGATGCCAA	66
Caliciviridae				
ベシウイルス (Pan-1)	AF091736	7-26	GAGCCATAGCTCAAATTCTC	67
		1-21	TAGCTCAAATTCTCATTTAC	68
		15-34	GAGCGTTTGAGCCATAGCTC	69
ブタ	AF182760	6-25	GACGGCAATTAGCCATCACG	70
ノーウォーク	AF093797	1-19	CGACGCCATCATCATTCAC	71
ネコ	AF479590	14-34	CAGAGTTTGAGACATTGTCTC	72
Togaviridae				
E 型肝炎	NC001434	6-28	CCTTAATAAACTGATGGGCCTCC	73
		1-18	CTGATGGGCCTCCATGGC	74
Flaviviridae				
C 型肝炎	AF169005	348-330	GTGCTCATGGTGCACGGTC-3	18
			GGCCTTTCGCGACCCAACAC	76

10

20

30

40

50

。

【 0 2 4 4 】

B 3 . インフルエンザウイルスの標的化

例示的なアンチセンス抗ウイルス化合物の第三の分類は、*Orthomyxoviridae* 科のウイルスの増殖の阻害、および、ウイルス感染の処置において使用される。宿主細胞は、本明細書中に記載されるような、少なくとも 1 つのカチオン性のサブユニット間結合を含み、好ましくは、20% ~ 50% のこのようなカチオン性結合を含み、そして、以下から選択される標的領域にハイブリダイズするのに有効な塩基配列を含むオリゴマーと接触させられる：i) インフルエンザウイルス A、インフルエンザウイルス B およびインフルエンザウイルス C のネガティブセンスのウイルス RNA セグメントの 5' 末端または 3' 末端の 25 塩基、ii) インフルエンザウイルス A、インフルエンザウイルス B およびインフルエンザウイルス C のポジティブセンス cRNA の 3' 末端の末端 30 塩基

、ならびに i i i) インフルエンザウイルス m R N A の A U G 開始コドン周辺の 50 塩基。(例えば、P C T 公開番号 W O / 2 0 0 6 / 0 4 7 6 8 3 または米国出願公開第 2 0 0 7 0 0 0 4 6 6 1 号(これらは、本明細書中に参考として援用される)を参照のこと)。

【0245】

この化合物は、哺乳動物におけるインフルエンザウイルス感染の処置において特に有用である。オリゴマーは、インフルエンザウイルスに感染したか、または、インフルエンザウイルス感染の危険性のある哺乳動物被験体に投与され得る。

【0246】

インフルエンザ A ウイルスの処置について、標的化配列は、配列番号 2 2 1 ~ 2 2 2 として同定される配列の群のうちの 1 つに関連する領域にハイブリダイズする。好ましい標的化配列は、配列番号 2 2 2 のマイナス鎖標的または、配列番号 2 2 1 のポジティブ鎖標的のいずれかに対して相補的なものである。これら 2 つの領域を標的とする例示的なアンチセンスオリゴマーは、それぞれ、配列番号 2 2 3 および 2 2 4 として列挙される。

【0247】

これらの配列は、そのそれぞれの標的における株間の高い程度の相同性に起因して、全てではないにしても、多くのインフルエンザ A ウイルス株を標的とする。

【0248】

以下の表 4 は、インフルエンザ A ウイルスに対して相補的な例示的な標的化配列を、5' → 3' の方向で示す。列挙される配列は、標的化配列のコレクションを提供し、ここから、上述のような一般的な分類の規則に従って標的化配列が選択され得る。

【0249】

【表 4】

表 4. インフルエンザ A を標的とする例示的なアンチセンスオリゴマー配列

PMO	標的ヌクレオチド	GenBank アクセッション 番号	標的化アンチセンス オリゴマー (5'→3')	配列 番号
PB1-AUG	13-33	J02151	GACATCCATTCAAATGGTTTG	224
(-)NP-3'trm	1-22	J02147	AGCAAAAGCAGGGTAGATAATC	223

。

【0250】

B 4 . P i c o r n a v i r i d a e 科のウイルスの標的化

例示的なアンチセンス抗ウイルス化合物の第四の分類は、P i c o r n a v i r i d a e 科のウイルスの増殖の阻害、およびウイルス感染の処置において使用される。この化合物は、哺乳動物におけるエンテロウイルスおよび/またはライノウイルスの感染の処置において特に有用である。このアンチセンス抗ウイルス化合物は、配列番号 5 5 および 5 6 によって同定されるウイルスの 5' 非翻訳領域の 2 つの 3 2 個の保存されたヌクレオチドの領域のうちの 1 つにおける、ウイルス R N A 配列に関連する領域に対して相補的な標的化配列を持つ少なくとも 1 2 のサブユニットを含めて、1 2 ~ 4 0 サブユニットの配列を有する、部分的に正に荷電したモルホリノオリゴマーである。(例えば、P C T 公開番号 W O / 2 0 0 7 / 0 3 0 5 7 6 および同 W O / 2 0 0 7 / 0 3 0 6 9 1 ならびに同時係属中でかつ共有に係る仮出願番号 6 0 / 8 0 0 , 1 2 0 および同 6 0 / 8 0 0 , 1 4 5 (これらは、本明細書中に参考として援用される)を参照のこと)。

【0251】

ピコルナウイルスのゲノム R N A を表す例示的なウイルス核酸配列についての G e n B a n k 参照登録番号を、以下の表 5 に列挙する。この表は、ポリオウイルス参照配列 (N C 0 0 2 0 5 8) のヌクレオチド 4 4 3 ~ 4 7 4 に対応し、かついくつものピコリウイルス (p i c o r i v i r u s) の 5' U T R 領域内に含まれる、3 2 塩基の配列に対す

る標的領域を列挙する。表 2 に列挙されるウイルスは全て、ヒト単離株であり、International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) により提供される取り決めに従って、ヒトエンテロウイルス A ~ D、ポリオウイルス、ライノウイルス A およびライノウイルス B のように、エンテロウイルス属およびライノウイルス属に系統化される。

【 0 2 5 2 】

エンテロウイルス属およびライノウイルス属の 2 つの属におけるウイルス間では、高い程度で配列が保存される。配列番号 5 6 (T C C T C C G G C C C C T G A A T G Y G G C T A A Y C Y Y A A C) として同定される標的配列は、組み合わせの標的配列を表し、ここで、配列中の文字「Y」は、ピリミジン塩基を表し、すなわち、C または T のいずれかであり得る。

10

【 0 2 5 3 】

【 表 5 】

表 5. 例示的なヒトピコルナウイルス核酸標的配列; 5'-領域

ウイルス	参照番号	GB 番号	領域
ポリオウイルス-Mahoney 株	NC 002058	V01149	443-474
エンテロウイルス A (CV-A16)	NC 001612	U05876	452-483
エンテロウイルス 71 (HEV-71)		U22521	448-479
エンテロウイルス B (CV-B1)	NC 001472	M16560	446-477
コクサッキーウイルス B3 (CV-B3)		M88483	447-478
コクサッキーウイルス B2 (CV-B2)		AF081485	448-479
コクサッキーウイルス B4 (CV-B4)		X05690	448-479
コクサッキーウイルス B5 (CV-B5)		X67706	448-479
コクサッキーウイルス A9 (CV-A9)		D00627	448-479
エコーウイルス 4 (EV-4)		X89534	331-362
エコーウイルス 6 (EV-6)		U16283	446-477
エコーウイルス 11 (EV-11)		X80059	449-480
エコーウイルス 13 (EV-13)		AF412361	259-290
エコーウイルス 18 (EV-18)		AF412366	259-290
エコーウイルス 25 (EV-25)		AY302549	466-477
エンテロウイルス C (CV-A21)	NC 001428	D00538	441-472
エンテロウイルス D (HEV-70)	NC 001430	D00820	446-477
ライノウイルス A (HRV-89)	NC 001617	M16248	442-473
ライノウイルス B (HRV-14)	NC 001490	K02121	453-484

20

30

40

以下の表 6 は、ピコルナウイルス、具体的には、エンテロウイルス属およびライノウイルス属のメンバーの広域スペクトルに対して相補的な例示的な標的化配列を示す。

【 0 2 5 4 】

【表 6】

表 6. 例示的なアンチセンスオリゴマー標的化配列

名称	標的ヌクレオチド	GenBank アクセッション 番号	標的化アンチセンス オリゴマー (5'→3')	配列 番号
5'-32	443-474		GTTGGGRTRTGCCGCATTCAGGGGCCG GAGGA	234
PV444	444-463	V00149	CCGCATTCAGGGGCCGGAGG	235
PV449	449-470	V00149	GGATTAGCCGCATTCAGGGGCC	236
PV454	454-474	V00149	GTTGGGATTAGCCGCATTCAG	237

10

表 7 は、ポリオウイルス参照配列 (NC 002058) に由来し、かついくつかのピコリウイルスの 5' UTR 領域内に含まれる、第二の 32 塩基の配列に対する標的領域を列挙する。配列番号 55 (RYGGGRACCRACCTACTTTGGGTGTCCGTGTTTC) として同定される標的配列は、組み合わせの標的配列を表し、ここで、これらの標的領域において、文字「R」により示される位置は A または G のいずれかであり得、そして、文字「Y」により示される位置は C または T のいずれかであり得る。

【0255】

20

【表 7】

表 7. 例示的なヒトピコルナウイルス核酸標的配列; 3'-領域

ウイルス	参照番号	GB No.	領域
ポリオウイルス-Mahoney 株	NC 002058	V01149	531-562
エンテロウイルス A (CV-A16)	NC 001612	U05876	540-571
エンテロウイルス 71 (HEV-71)		U22521	536-567
エンテロウイルス B (CV-B1)	NC 001472	M16560	534-565
コクサッキーウイルス B3 (CV-B3)		M88483	535-566
コクサッキーウイルス B2 (CV-B2)		AF081485	536-567
コクサッキーウイルス B4 (CV-B4)		AF311939	537-568
コクサッキーウイルス B5 (CV-B5)		X67706	536-567
コクサッキーウイルス A9 (CV-A9)		D00627	536-567
エコーウイルス 4 (EV-4)		X89534	419-450
エコーウイルス 6 (EV-6)		U16283	534-565
エコーウイルス 9 (EV-9)		X92886	533-564
エコーウイルス 11 (EV-11)		X80059	537-568
エコーウイルス 13 (EV-13)		AY302539	535-566
エコーウイルス 18 (EV-18)		AF521513	94-125
エコーウイルス 25 (EV-25)		X90722	534-565
エコーウイルス 30 (EV-30)		AF311938	537-568
エンテロウイルス C (CV-A21)	NC 001428	D00538	529-560
エンテロウイルス D (HEV-70)	NC 001430	D00820	534-565
ライノウイルス A (HRV-89)	NC 001617	M16248	530-561
ライノウイルス B (HRV-14)	NC 001490	K02121	541-572

30

40

これらの標的領域にハイブリダイズするように設計された標的化配列を、表 8 に列挙す

50

る。

【 0 2 5 6 】

【 表 8 】

表 8. 例示的なアンチセンスオリゴマー標的化配列

名称	標的ヌクレオチド	GenBank アクセッション 番号	標的化アンチセンス オリゴマー (5'→3')	配列番号
3'-37	526-562	V00149	AAAANGAAACACGGACACCCAAAG TAGTCGGTTCCGC	238
PV533	533-552	V00149	CACCCAAAGTAGTCGGTTCC	239
PV539	539-558	V00149	CACGGACACCCAAAGTAGTC	240
PV544	544-562	V00149	GGAAACACGGACACCCAAAG	241
PV548	548-567	V00149	AAAAGGAAACACGGACACCC	242
CVB3-548	548-568	M88483	ATGAAACACGGACACCCAAAG	243
Enterovirus	541-562	V00149	GAAACACGGACACCCAAAGTAG	244
HRV14- IRES	551-574	K02121	GAGAAACACGGACACCCAAAGTAG	245

10

20

。

【 0 2 5 7 】

B 5 . フラビウイルス科のウイルスの標的化

例示的なアンチセンス抗ウイルス化合物の第五の分類は、動物細胞におけるフラビウイルスの複製の阻害において使用される。この分類の例示的なアンチセンスオリゴマーは、本発明において記載されるような、カチオン性結合を持ち、長さ 8 ~ 40 ヌクレオチド塩基の間で、かつ、配列番号 57 の少なくとも一部分を含むウイルスのポジティブ鎖 RNA ゲノムの一領域に対して相補的な少なくとも 8 塩基の配列を持つ、モルホリノオリゴマーである。例えば、米国出願公開第 20050096291 号（これは、本明細書中に参考として援用される）を参照のこと。

30

【 0 2 5 8 】

標的配列は、ポジティブ鎖のフラビウイルス RNA の 5' 環化配列 (5' - CS) または 3' - CS 配列に隣接し、かつ、これら 5' - CS または 3' - CS の少なくとも一部分（例えば、少なくとも 2 ~ 8 塩基）を含むものである。大いに好ましい標的は、3' - CS である。対応するウイルスゲノム中の 5' - CS および 3' - CS の末端配列を含む例示的なウイルス核酸配列についての GenBank の参照番号を、以下の表 1 に列挙する。5' - CS および 3' - CS の保存された領域を、表 9 において太字で示す。例示的な標的配列の別の群は、配列番号 267 ~ 277 の相補体である。

40

【 0 2 5 9 】

フラビウイルス属の選択されたウイルスについての 5' - CS および 3' - CS に対して指向された標的化配列は、以下の配列番号 267 ~ 277 として同定される配列に対し相補的でありかつアンチパラレルな配列から誘導される。

【 0 2 6 0 】

【表 9】

表 9. 例示的な 5'-CS および 3'-CS 標的配列

ウイルス	GenBank アクセシ ン番号	5'-CS 標的 ヌクレオチド	配列 番号	標的配列 (5'→3')
St. Louis 脳脊髄炎 マリーバレー脳脊髄炎 西ナイル熱 Kunjin	M16614 AF161266 M12294 D00246	138 - 157 135 - 154 136 - 155 115 - 134	267	GUCAAUAUGCUA AAACGCGG
日本脳炎	M18370	135 - 154	268	AUCAAUAUGCUG AAACGCGG
黄熱病	X03700	155 - 174	269	GUCAAUAUGGUA CGACGAGG
デング熱1型 デング熱2型 デング熱4型	M87512 M19197 M14931	115 - 135 131 - 151 133 - 153	270	CUUUCAAUAUGC UGAAACGCG
デング熱3型	M93130	129 - 149	271	CUAUCAAUAUGC UGAAACGCG
ダニ媒介脳脊髄炎 ポーワッサン 跳躍病 キャサヌール森林病 Alkhurma	U27495 L06436 Y07863 X74111 AF331718	108 - 129 81 - 102 105 - 126 94 - 115 90 - 111	272	CAGCUUAGGAGA ACAAGAGCUG
西ナイル熱	M12294	132 - 151	273	GGCUGUCAUAU GCUAAAAC
St. Louis 脳脊髄炎 日本脳炎 マリーバレー脳脊髄炎 西ナイル熱 Kunjin	M18370 AF161266 M12294 AY274505	10861-10882 10899-10920 10853-10874 10914-10934	274	AACAGCAUAUUG ACACCUGGGA
黄熱病	X03700	10745-10767	275	UGGGACCAUAUU GACGCCAGGGA
デング熱1型 デング熱2型 デング熱3型 デング熱4型	M87512 M19197 M93130 M14931	10609-10630 10595-10616 10588-10609 10540-10561	276	AAACAGCAUAUU GACGCUGGGA
ダニ媒介脳脊髄炎 ポーワッサン 跳躍病	U27495 L06436 Y07863	11057-11078 10755-10776 10787-10808	277	CGGUUCUUGUUC UCCCUGAGCC

10

20

30

40

【 0 2 6 1 】

B 6 . ニドウイルス科のウイルスの標的化

例示的なアンチセンス抗ウイルス化合物の第六の分類は、ウイルス感染した動物細胞におけるニドウイルスの複製の阻害において使用される。この分類の例示的なアンチセンスオリゴマーは、本発明に記載されるような、カチオン性結合を持つモルホリノオリゴマーであり、8～25ヌクレオチド塩基を含み、かつ、ポジティブ鎖ウイルスゲノムの5'リーダー領域における翻訳調節配列と、ネガティブ鎖の3'部分ゲノム領域との間の塩基対形成を破壊し得る配列を有する（例えば、PCT公開番号WO/2005/065268または米国出願公開第20070037763号（これらは、本明細書中に参考として援用される）を参照のこと）。

50

【0262】

代表的なニドウイルスを以下の表10に列挙する。この用語「ニドウイルス(nidovirus)」は、Coronaviridae科およびArteriviridae科を含むNidovirales目のウイルスを指す。用語「コロナウイルス」は、本明細書において、コロナウイルス属およびトロウイルス属のウイルスを含むCoronaviridae科の全てのメンバーを含むように使用される。用語「アルテリウイルス(arterivirus)」は、Arterivirus属を含むArteriviridae科のメンバーを含む。

【0263】

【表10】

10

表 10. 代表的なニドウイルス

ウイルスの名称	略称
イヌコロナウイルス	CCoV
ネココロナウイルス	FCoV
ヒトコロナウイルス 229E	HCoV-229E
ブタ流行性下痢ウイルス	PEDV
伝染性胃腸炎ウイルス	TGEV
ブタ呼吸器コロナウイルス	PRCV
ウシコロナウイルス	BCoV
ヒトコロナウイルス OC43	HCoV-OC43
マウス肝炎ウイルス	MHV
ラットコロナウイルス	RCV
感染性気管支炎ウイルス	IBV
シチメンチョウコロナウイルス	TCoV
ウサギコロナウイルス	RbCoV
SARS コロナウイルス	SARS-CoV
ヒトロウイルス	HuTV
ウマ動脈炎ウイルス	EAV
ブタ生殖器系および呼吸器系症候群ウイルス	PRRSV
ブタ凝集性脳脊髄炎ウイルス	PHEV
サル出血熱ウイルス	SHFV

20

30

好ましい標的配列は、ニドウイルス RNA のポジティブ RNA のリーダー TRS、または、マイナス鎖の TRS 本体に隣接し、かつ、これらの少なくとも一部分（例えば、少なくとも 2 ～ 8 塩基）を含むものである。種々のニドウイルスゲノム配列が、NCBI Genbank データベースのような周知の情報源から入手可能である。対応するウイルスゲノム中のリーダー TRS を含む例示的なウイルス核酸配列についての GenBank 参照番号を、以下の表 11 に列挙する；太字のヌクレオチドは、コアリーダー TRS を識別する。

【0264】

【表11】

表 11. 例示的な TRS 標的配列

40

ウイルス	GenBank アクセッション 番号	リーダー TRS	配列 番号	標的配列 (5'→3')
HCoV-229E	AF304460	55-78	207	CUACUUUUCUCAACUAAACGAAAU
HCoV-OC43	AY391777	51-74	208	GAUCUUUUUGUAAUCUAAACUUUA
SARS-CoV	AY274119	53-76	209	GAUCUGUUCUCUAAACGAACUUUA

選択されたニドウイルスについてのリーダー TRS に対して指向された例示的な標的化配列としては、配列番号 210 ～ 214 が挙げられる。

【0265】

50

より一般には、例示的な標的化配列としては、ウイルスのネガティブ鎖の一領域、あるいは、ポジティブ鎖RNAゲノムの一領域（それぞれ、ゲノムのネガティブ鎖のリーダーTRSの少なくとも一部分、または、ポジティブ鎖のリーダーTRSの少なくとも一部分を含む）に対して相補的な少なくとも8塩基の配列が挙げられる。標的化配列は、ウイルスのリーダーTRS配列とTRS本体の配列との間の塩基対形成を破壊するために、TRSのいずれかにおける十分な数の塩基を含む。この構造を破壊するために必要とされる標的化配列の数は、好ましくは、コアリーダーTRSまたはTRS本体（表2において太字で示される）に対して相補的な少なくとも2～4塩基+隣接する標的配列塩基に対して相補的な塩基である。

【0266】

10

B7. HIV-1の標的化

活性化されたHIV感染ヒト造血細胞（例えば、マクロファージまたはTリンパ球）においてHIV-1の複製を選択的に阻害するための方法において、このような活性化されたHIV-1感染細胞は、本明細書中に記載されるような、少なくとも1つのカチオン性のサブユニット間結合を有し、好ましくは、20%～50%のこのようなカチオン性結合を含み、かつ、配列番号197～199からなる群より選択される配列のうちの1つにより同定されるHIV-1のポジティブ鎖RNAの一領域における少なくとも12の連続する塩基から構成されるウイルスの標的配列に対して実質的に相補的な塩基配列を有する、アンチセンスオリゴマーに対して曝露される。

【0267】

20

一実施形態では、オリゴマーは、配列番号17の領域とハイブリダイズして、感染細胞におけるHIV-1タンパク質の合成を阻害し得る。この実施形態における化合物は、配列番号200～203からなる群より選択される配列のうちの1つからの、少なくとも12の連続する塩基を有し得る。

【0268】

別の実施形態では、オリゴマーは、配列番号198の領域とハイブリダイズして、HIV-1mRNA転写物の転写を阻害し得る。この実施形態における化合物は、配列番号204および205として同定される配列からの少なくとも12の連続する塩基を有し得る。

【0269】

別の実施形態では、オリゴマーは、配列番号199の領域とハイブリダイズして、マイナス鎖の転移段階をブロックすることにより、ウイルスRNAの逆転写を阻害し得る。この実施形態における化合物は、配列番号206として同定される配列からの少なくとも12の連続する塩基を有し得る。

30

【0270】

B8. フィロウイルスの標的化

別の実施形態では、本明細書中に記載されるような1以上のオリゴマーは、本明細書中に記載されるような、少なくとも1つのカチオン性のサブユニット間結合を含み、好ましくは、20%～50%のこのようなカチオン性結合を含み、かつ、以下にさらに記載されるように、ポジティブ鎖mRNAのAUG開始部位領域内の少なくとも12の連続する塩基から構成される標的配列に対して相補的な標的化塩基配列を有する、オリゴマーに、細胞を接触させることによって、エボラウイルスまたはマルブルクウイルスの宿主細胞内での複製を阻害する方法において使用され得る。

40

【0271】

フィロウイルスのウイルスゲノムは、セグメント化されておらず、かつアンチセンスの配向の、約19000塩基の一本鎖RNAである。ゲノムは、vRNAに対して相補的なモノシストロニックmRNAから7つのタンパク質をコードする。

【0272】

標的配列は、選択したエボラウイルスタンパク質のAUG開始コドンにまたがるか、または、開始コドンのすぐ下流（25塩基以内）もしくは上流（100塩基以内）にあるポジティブ鎖（センス）RNA配列、または、マイナス鎖のウイルスRNAの3'末端の3

50

0塩基である。L、核蛋白NPおよびVP30もまた企図されるが、好ましいタンパク質標的は、ウイルスのポリメラーゼサブユニットVP35およびVP24である。これらの中でも、早期タンパク質が望ましい。例えば、VP35は、後期に発現されるLポリメラーゼよりも望ましい。

【0273】

別の実施形態では、本明細書中に記載される1以上のオリゴマーは、本明細書中に記載されるような、少なくとも1つのカチオン性のサブユニット間結合を含み、好ましくは、20%～50%のこのようなカチオン性結合を含み、かつ、配列番号250～255からなる群より選択されるフィロウイルスmRNA配列のうちの1つにより同定されるポジティブ鎖mRNAのAUG開始部位領域内の少なくとも12の連続する塩基から構成される標的配列に対して相補的な標的化塩基配列を有する、オリゴマーに、細胞を接触させることによって、エボラウイルスまたはマルブルクウイルスの宿主細胞内での複製を阻害する方法において使用され得る。

10

【0274】

エボラウイルス感染の処置について、化合物は、配列番号250からなる群より選択される標的配列により同定されるVP35 AUG開始部位領域内の少なくとも12の連続する塩基から構成される標的配列に対して相補的な標的化配列を有し得る。例示的な標的化配列は、配列番号1により同定される。

【0275】

エボラウイルス感染の処置についての別の実施形態では、化合物は、それぞれ、配列番号251および252からなる群より選択される標的配列により同定されるVP24 AUG開始部位またはL AUG開始部位領域内の少なくとも12の連続する塩基から構成される標的配列に対して相補的な標的化配列を有し得る。例示的な標的化配列としては、それぞれ、配列番号5および11が挙げられる。

20

【0276】

マルブルクウイルス感染の処置について、化合物は、それぞれ、配列番号253により選択される標的配列により同定されるVP35 AUG開始部位内の少なくとも12の連続する塩基から構成される標的配列に対して相補的な標的化塩基配列を有し得る。例示的な標的化配列は、配列番号256および257からなる群より選択される。

【0277】

マルブルクウイルス感染の処置についての別の実施形態では、化合物は、それぞれ、配列番号254および255により同定される群から選択される標的配列により同定されるVP24 AUG開始部位またはL AUG開始部位領域内の少なくとも12の連続する塩基から構成される標的配列に対して相補的な標的化配列を有し得る。例示的な標的化配列は、それぞれ、配列番号258～260により同定される。

30

【0278】

本明細書中に開示されるオリゴマーはまた、上記のような標的化配列を有するオリゴマーの治療上有効な量を被験体に投与することによって、被験体におけるエボラまたはマルブルクのフィロウイルス感染を処置する方法；あるいは、本明細書中に記載され、かつ、上記のような標的化配列を有するオリゴマーを用いて被験体を事前の処置し、そして、エボラウイルス（好ましくは、弱毒化形態のもの）に対して被験体を曝露することによって、哺乳動物被験体をエボラウイルスに対してワクチン接種する方法においても使用され得る。

40

【0279】

エボラウイルスRNAの配列（Zaire Ebolaウイルス，Mayinga株）は、GenBankアクセッション番号AF086833から得られ得る。以下に示される特定の標的化配列は、Ebola Zaireウイルス株に対する特異性について選択された。Ebola Ivory Coast、Ebola SudanおよびEbola Reston（GenBankアクセッション番号AF522874）についての対応する配列は、これらのウイルスについての既知のGenBankの登録番号から容易に

50

決定される。好ましくは、ウイルス株（特に、Zaire株、Ivory Coast株およびSudan株）間の最大のコンセンサス、または、周知の塩基対形成の規則に従って、アンチセンス配列における多義的な塩基によって適合され得る塩基のミスマッチを与える標的化配列が選択される。

【0280】

フィロウィルスのゲノムセグメントを表す例示的なウイルス核酸配列についてのGenBank参照番号を、以下の表12に列挙する。表12におけるヌクレオチド配列の数は、Ebola Zaire (AF086833) およびマルブルクウイルス (Z29337) のポジティブ鎖RNAについてのGenBank参照番号から誘導される。表12は、例示的なエボラウイルス遺伝子VP35、VP24およびLについての標的を列挙する。これらの遺伝子のAUG開始コドンについての標的配列は、配列番号250～252として表される。マルブルクウイルスについての標的配列の対応するセットは、配列番号253～255として示される。

【0281】

【表12】

表 12. 例示的なフィロウィルス核酸標的配列

名称	GenBank 番号	ヌクレオチド 領域	配列 (5'→3')	配列 番号
VP35-AUG	AF086833	3029-3153	AAUGAUGAAGAUUAAAACCUUCAUC AUCCUUACGUCAAUUGAAUUCUCUA GCACUCGAAGCUUAUUGUCUUCAAU GUAAAAGAAAAGCUGGUCUAACAAG AUGACAACUAGAACAAGGGCAGGG	250
VP24-AUG	AF086833	10245-10369	CGUCCCAACAAUCGAGCGCAAGGUU UCAAGGUUGAACUGAGAGUGUCUAG ACAACAAAAUAUUGAUACUCCAGAC ACCAAGCAAGACCUGAGAAAAAACC AUGGCUAAAGCUACGGGACGAUACA	251
L-AUG	AF086833	11481-11605	GUAGAUUAAGAAAAAAGCCUGAGGA AGAUUAAGAAAAACUGCUUAUUGGG UCUUUCCGUGUUUUAGAUGAAGCAG UUGAAAUUCUUCUUCUUGAUUAUAA AUGGCUACACAACAUACCCAAUAC	252
VP35-AUG	Z29337	2844-2968	CUAAAAUUCGAAGAAUAUUAAGGU UUUCUUUAUAUUCAGAAAAGGUUU UUUAUUCUCUUCUUCUUUUUUGCAA ACAUUAUGAAAUAUAUUUUUCACA AUGUGGGACUCAUCAUAUAUGCAAC	253
VP24-AUG	Z29337	10105-10229	UUCAUUCAAACACCCCAAUUUUC AUCAUACACAUAAUAACCAUUUUAG UAGCGUUACCUUUCAAUACAAUCUA GGUGAUUGUGAAAAGACUUCCAAAC AUGGCAGAAUUAUCAACGCGUUACA	254
L-AUG	Z29337	11379-11503	UCAUUCUCUUCGAUACACGUUAUAU CUUUAGCAAAGUAAUGAAAAUAGCC UUGUCAUGUUAGACGCCAGUUAUCC AUCUUAAGUGAAUCCUUUCUUCAAU AUGCAGCAUCCAACUCAUAUCCUG	255

標的化配列は、表13に列挙されるような標的配列の一領域に対してハイブリダイズするように設計される。選択された標的化配列は、例えばより短く（例えば、12塩基）ま

たはより長く（例えば、40塩基）され得、そして、その配列が、標的とのハイブリダイゼーションが可能であり、そして、ウイルスのポジティブ鎖もしくはマイナス鎖のいずれかと、45以上の T_m を有するヘテロ二重鎖を形成するのに十分に相補的である限り、少数のミスマッチを含み得る。

【0282】

以下の表13は、上記のガイドラインに従って、Ebola Zaireウイルス（GenBankアクセッション番号AF086833）を標的とする例示的な標的化配列を、5' 3'の方向で示す。さらなる標的化配列が、上述のような一般的な分類の規則に従って選択され得る。

【0283】

【表13】

表 13. Ebola Zaire を標的とする例示的なアンチセンスオリゴマー配列

名称	標的の GenBank 番号 AF086833	配列 5'-3'	配列 番号
VP35'-AUG	3133-3152	CCTGCCCTTTGTTCTAGTTG	1
VP24-AUG	10331-10349	GCCATGGTTTTTCTCAGG	5
VP24-5'trm	10261-10280	TTCAACCTTGAAACCTTGCG	15

以下の表14は、上記のガイドラインに従って、マルブルクウイルス（GenBankアクセッション番号Z29337）を標的とする例示的な標的化配列を、5' 3'の方向で示す。さらなる標的化配列が、上述のような一般的な分類の規則に従って選択され得る。

【0284】

【表14】

表 14. マルブルクウイルスを標的とする例示的なアンチセンスオリゴマー配列

名称	標的の GenBank 番号 Z29337	配列 5'-3'	配列 番号
L-AUG	11467-11485	GCTGCATATTGAAGAAAGG	259
L+7-AUG	11485-11506	CATCAGGATATTGAGTTGGATG	260
VP35-AUG	2932-2952	GTCCCACATTGTGAAAATTAT	256
VP35+7-AUG	2950-2971	CTTGTTGCATATATGATGAGTC	257
VP24+5-AUG	10209-10231	GTTGTAACGCGTTGATAATTCTG	258

。

【0285】

B9. アレナウイルスの標的化

別の実施形態では、本明細書中に記載されるようなオリゴマーは、Arenaviridae科における種による哺乳動物細胞におけるウイルス感染を阻害するための方法において使用され得る。一局面では、オリゴマーは、ウイルスに感染した哺乳動物被験体の処置において使用され得る。

【0286】

表15は、その旧世界または新世界のアレナウイルスの分類により系統化された、本発明により標的とされる被標的化ウイルスの例示的なリストである。

【0287】

10

20

30

40

【表 15】

表 15. 標的とされるアレナウイルス

科	属	ウイルス
Arenaviridae	アレナウイルス	旧世界アレナウイルス
		ラッサ熱ウイルス(LASV)
		リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV)
		Mopeia ウイルス (MOPV)
		新世界アレナウイルス
		Guanarito ウイルス (GTOV)
		Junín ウイルス (JUNV)
		Machupo ウイルス (MACV)
		Pichinide ウイルス (PICV)
		Piritai ウイルス (PIRV)
		Sabiá ウイルス (SABV)
		Tacaribe ウイルス (TCRV)
		Whitewater Arroyo ウイルス (WWAV)

10

アレナウイルスのゲノムは、S（小）およびL（大）と呼ばれる2つの一本鎖RNAセグメントから構成される。ピリオンでは、S - セグメントRNAのL - セグメントRNAに対するモル比は、およそ2 : 1である。完全なS - セグメントRNAの配列は、数種のアレナウイルスについて決定され、そして、3366 ~ 3535ヌクレオチドの範囲である。完全なL - セグメントRNAの配列もまた、数種のアレナウイルスについて決定され、そして、7102 ~ 7279ヌクレオチドの範囲である。S RNAセグメントおよびL RNAセグメントの3'末端配列は、最後の19ヌクレオチドのうちの17個と同一である。これらの末端配列は、全ての公知のアレナウイルスの間で保存されている。各ゲノムRNAの開始地点にある、5'末端の19もしくは20ヌクレオチドは、各々の対応する3'末端とは完全には相補的ではない。この相補性に起因して、3'末端および5'末端は、塩基対形成して、フライパンの柄の構造を形成するものと考えられる。

20

【0288】

抗原性のウイルスの相補的なRNA（v c RNA）鎖を形成するための、感染性のピリオンもしくはウイルスRNA（v RNA）の複製は、感染細胞において生じる。v RNAおよびv c RNAは共に、相補的なmRNAをコードする；したがって、アレナウイルスは、ネガティブセンスRNAウイルスでもポジティブセンスRNAウイルスでもなく、アンビセンスRNAウイルスとして分類される。ウイルス遺伝子のアンビセンス配向は、L - セグメントおよびS - セグメントの両方においてである。NP遺伝子およびポリメラーゼ遺伝子は、それぞれ、S v RNAセグメントおよびL v RNAセグメントの3'末端に存在し、そして、従来のネガティブセンスでコードされる（すなわち、これらは、v RNAまたはゲノムに相補的なmRNAの転写により発現される）。S v RNAセグメントおよびL v RNAセグメントの5'末端に位置する遺伝子（それぞれ、GPCおよびZ）は、mRNAセンスでコードされるが、ゲノムv RNAから直接翻訳されるという証拠はない。これらの遺伝子は、代わりに、アンチゲノム（すなわち、v c RNA）、複製中間体として機能するゲノムv RNAの全長の相補的なコピーからのゲノムのセンスmRNAの転写によって発現される。

30

40

【0289】

アレナウイルスv RNAを表す例示的なウイルス核酸配列についてのGenBank参照登録番号を、以下の表2に列挙する。表2は、ヌクレオチド1 ~ 19または2 ~ 20に対応し、列挙されるアレナウイルスのS - セグメントおよびL - セグメントの両方の5'末端領域に含まれる、19塩基の配列についてのアンチセンス標的を列挙する。表2に列挙されるウイルスは全て、ヒト単離株である。標的配列（配列番号261）は、5' - C G C A C M G D G G A T C C T A G G C - 3'であり、ここで、不完全に特定された塩

50

基についての International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) の命名法が、配列の説明において使用される (すなわち、「M」は、C または A のいずれかであり、そして、「D」は A、G または T のいずれかである)。

【0290】

vRNA と vcRNA の 5' 末端において、アレナウイルスの間では、高い程度で配列が保存されている。アンチセンス標的としては、S - セグメントもしくは L - セグメントの vRNA 鎖もしくは vcRNA 鎖のいずれかの 5' 末端、または、4 種のウイルス mRNA のいずれかの 5' 末端が挙げられる。したがって、オリゴマーは、潜在的に、ウイルス RNA 種の複製、転写または翻訳を中断させる。

10

【0291】

Arenaviridae 科の典型的なメンバーは、リンパ球脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) である。表 16 は、多数の臨床的に関連のあるアレナウイルスにおける対応する標的領域および NCBI 参照配列データベース中に存在するものを列挙する。配列番号 261 として同定される標的配列は、これらの領域の各々についての組み合わせられた標的配列を表し、ここで、太字の「M」により示される位置は、C または A のいずれかであり得、そして、「D」は、A、G または T のいずれかである。

【0292】

【表 16】

表 16. 例示的なヒトアレナウイルス核酸標的領域

20

ウイルス	参照番号	GB 番号	セグメント	領域
LASV	NC_004296	J04324	S	1-19
LASV	NC_004297	U73034	L	1-19
LCMV	NC_004294	M20869	S	1-19
LCMV	NC_004291	J04331	L	1-19
MOPV	NC_006575	AY772170	S	1-19
MOPV	NC_006574	AY772169	L	1-19
GTOV	NC_005077	AY129247	S	1-19
GTOV	NC_005082	AY358024	L	1-19
JUNV	NC_005081	AY358023	S	1-19
JUNV	NC_005080	AY358022	L	1-19
MACV	NC_005078	AY129248	S	1-19
MACV	NC_005079	AY358021	L	1-19
PICV	NC_006447	K02734	S	1-19
PICV	NC_006439	AF427517	L	1-19
PIRV	NC_005894	AF485262	S	1-19
PIRV	NC_005897	AY494081	L	1-19
SABV	NC_006317	U41071	S	1-19
SABV	NC_006313	AY358026	L	1-19
TCRV	NC_004293	M20304	S	1-19
TCRV	NC_004292	J04340	L	1-19

30

以下の表 17 は、アレナウイルスの広域スペクトルに対して相補的である例示的な標的化配列を、5' → 3' の方向で示す。CL - trm 標的化オリゴマー、LS - trm 標的化オリゴマーおよび SS - trm 標的化オリゴマー (それぞれ、配列番号 262 ~ 264) を、Junin - Candid - 1 を特異的に標的とするように設計した。以下に示すように、配列番号 265 および 266 によって表される標的化配列は、広範囲のアレナウイルス種にわたって配列が多様性に富んでいる 2 つの位置にイノシン (「I」) を組み込む。

40

【0293】

【表 17】

表 17. 例示的なアンチセンスオリゴマー標的化配列

名称	標的ヌクレオチド	GenBank アクセッション番号	標的化アンチセンス オリゴマー (5'→3')	配列 番号
CL-trm	1-20	NC_005080	CGC CTA GGA TCC CCG GTG CG	262
LS-trm	1-21	NC_005080	CGC CTA GGA TCC CCG GTG CGC	263
SS-trm	1-20	NC_005081	GCC TAG GAT CCA CTG TGC GC	264
PanCL	1-19	N/A	GCC TAG GAT CCI CIG TGC G	265
PanLS	1-20	N/A	CGC CTA GGA TCC ICI GTG CG	266

10

。

【0294】

B 9 . 抗ウイルス用途の一般的な局面

B 9 (a) . 塩基のバリエーション

標的化配列の塩基は、標的配列のRNA塩基とワトソン - クリック塩基対形成し得る、通常のDNA塩基またはそのアナログ（例えば、ウラシルおよびイノシン）であり得る。

【0295】

20

オリゴマーはまた、標的ヌクレオチドがウラシル残基である場合、アデニンの代わりにグアニン塩基を組み込み得る。これは、標的配列が異なるウイルス種にまたがって変化し、そして、その任意の所定のヌクレオチド残基におけるバリエーションが、シトシンまたはウラシルのいずれかである場合に有用である。多様性に富んでいる位置のオリゴマーを標的とする際にグアニンを利用することによって、ウラシルと塩基対形成するというグアニンの周知の能力（C/U：G塩基対形成と呼ばれる）が利用され得る。これらの位置にグアニンを組み込むことによって、単一のオリゴマーが、より広範囲のRNA標的の多様性を効率的に標的とすることが可能となる。

【0296】

B 9 (b) . ウイルス複製の阻害

30

一実施形態では、アンチセンス阻害は、ウイルスに感染した細胞を、特定のウイルスの複製を阻害するのに有効なアンチセンス因子に接触させることによって、ウイルスによる宿主動物の感染を処置するのに有効である。アンチセンス因子は、適切な薬学的に受容可能なキャリア中で、所与のウイルスに感染した哺乳動物被験体（例えば、ヒトまたは家畜動物）に対して投与される。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、宿主におけるRNAウイルスの増殖を停止することが企図される。RNAウイルスは、数が減少され得るか、または、宿主の正常な成長もしくは発育に対して有害な影響をほとんど有さないか、もしくは全く有さない程度に排除され得る。

【0297】

B 9 (c) . 投与方法

40

この方法の一局面では、被験体は、ヒト被験体（例えば、局所的もしくは全身性のウイルス完成を有すると診断された患者）である。例えば、（1）免疫無防備状態である患者；（2）熱傷の犠牲者；（3）留置カテーテルを有する患者；または（4）外科手術を受けようとしているかもしくは最近外科手術を受けた患者の場合、患者の状態はまた、本発明のアンチセンスオリゴマーの予防的投与を指示し得る。1つの好ましい実施形態では、オリゴマーは、薬学的に受容可能なキャリア中に含まれるホスホロジアミデートモルホリノオリゴマーであり、経口的に送達される。別の好ましい実施形態では、オリゴマーは、薬学的に受容可能なキャリア中に含まれるホスホロジアミデートモルホリノオリゴマーであり、静脈内（i.v.）送達される。

【0298】

50

この方法の別の用途では、被験体は、家畜類の動物（例えば、ニワトリ、シチメンチョウ、ブタ、ウシもしくはヤギなど）であり、そして、処置は、予防的もしくは治療的のいずれかである。本発明はまた、上述のタイプの抗ウイルスアンチセンス化合物の治療的な量以下の量が補充された穀粒を含む、家畜類および家禽類の食用組成物を包含する。また、抗ウイルスアンチセンス化合物の治療的な量以下の量が補充された穀粒を、家畜類および家禽類に供給する方法において、上記の抗ウイルスオリゴヌクレオチド組成物の治療的な量以下の量が穀粒に補充されるという改善も企図される。

【0299】

アンチセンス化合物は、一般に、少なくとも200～400 nMのアンチセンスオリゴマーのピーク血中濃度をもたらすのに有効な量および様式で投与される。代表的には、1以上の用量のアンチセンスオリゴマーが、一般に、約1～2週間の期間にわたり、定期的な間隔で投与される。経口投与に好ましい用量は、体重70 kgあたり約1～100 mgのオリゴマーである。いくつかの場合では、患者あたり100 mgより多くの用量が必要とされ得る。i.v.投与については、好ましい用量は、体重70 kgあたり約0.5 mg～100 mgである。アンチセンスオリゴマーは、短期間にわたり、定期的な間隔で投与され得る（例えば、2週間以内で毎日）。しかし、いくつかの場合において、オリゴマーは、より長い期間にわたって断続的に投与される。投与は、抗生物質もしくは他の治療的処置の投与の後もしくはこれらと同時であり得る。処置レジメンは、処置中の被験体のイムノアッセイ、他の生化学検査および生理学的試験の結果に基づき、示されるように調節され得る（用量、頻度、経路など）。

【0300】

B9(d) . 処置の監視

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いる有効なインビボ処置レジメンは、投与の期間、用量、頻度および経路、ならびに、処置中の被験体の状態（すなわち、予防的投与に対し、局所性または全身性の感染に応じた投与）によって変化し得る。したがって、このようなインビボ治療は、しばしば、最適な治療結果を達成するために、処置中の特定のタイプのウイルス感染に適切な検査による監視と、そして、用量または処置レジメンの対応する調節を必要とする。処置は、例えば、感染の一般的な徴候（例えば、全血球数（CBC）、核酸検出法、免疫診断検査、ウイルス培養またはヘテロ二重鎖の検出）によって監視され得る。

【0301】

1以上のタイプのRNAウイルスの増殖の阻害または排除における、インビボ投与された本発明のアンチセンスオリゴマーの効能は、アンチセンスオリゴマー投与の前、間および後に、被験体から採った生物学的サンプル（組織、血液、尿など）から決定され得る。このようなサンプルのアッセイとしては、以下が挙げられる：（1）当業者に公知の手順（例えば、電気泳動ゲル移動度アッセイ）を用いた、標的および非標的配列とのヘテロ二重鎖形成の存在もしくは非存在の監視；（2）標準的な技術（例えば、ELISAまたはウェスタンブロッティング）により決定されるウイルスタンパク質生成量の監視；または、（3）例えば、Spearman-Kärberの方法によるウイルス力価に対する影響の測定（例えば、Pari, G.S.ら, Antimicrob. Agents and Chemotherapy 39(5): 1157-1161, 1995; Anderson, K.P.ら, Antimicrob. Agents and Chemotherapy 40(9): 2004-2011, 1996, Cottrel, G.E. (編): Manual of Standard Methods for Veterinary Microbiology, pp. 60-93, 1978を参照のこと）。

【0302】

アンチセンスオリゴマー処置の効能を監視する好ましい方法は、アンチセンス-RNAヘテロ二重鎖の検出によるものである。アンチセンスオリゴマー投与後の選択した時点で、散布油中のヘテロ二重鎖の存在を検出するか、そして/または、レベルを測定するために、体液が収集される。代表的には、体液サンプルは、投与から3～24時間後に、好ま

しくは、投与から約 6 ~ 24 時間後に収集される。上に示されるように、体液サンプルは、尿、唾液、血漿、血液、脳脊髄液、または、生物起源の他の液体サンプルであり得、そして、その中に懸濁される細胞もしくは細胞断片、または、液体媒体およびその溶質を含み得る。収集されるサンプルの量は、代表的には、0.1 ~ 10 ml の範囲、好ましくは、約 1 ml 以下である。

【0303】

サンプルは、サンプル中の望ましくない成分を除去するため、そして/または、サンプル中のヘテロ二重鎖種を処理して、望ましくない ssRNA オーバーハング領域を除去するために、例えば、RNase を用いた処理により処理され得る。当然のことながら、ヘテロ二重鎖の検出が、サイズ分離に依存する場合（例えば、質量分光器の電気泳動）、オーバーハングを除くことは特に重要である。

10

【0304】

種々の方法が、サンプルから望ましくない成分を除去するために利用可能である。例えば、ヘテロ二重鎖は正味の負電荷を有するので、電気泳動またはイオン交換の技術が、中性もしくは正に荷電した物質からヘテロ二重鎖を分離するために使用され得る。サンプルはまた、表面に抗体が結合されたか、または、ヘテロ二重鎖に特異的に結合し得る他の因子を持つ、固体支持体と接触させられ得る。支持体を洗浄して、非結合の物質を除去した後、ヘテロ二重鎖は、例えば、電気泳動、質量分光器またはイムノアッセイによるさらなる解析のために、実質的に純粋な形態に放出され得る。

【0305】

20

B9(e)、感染性因子の同定

感染を引き起こす特定のウイルスは、当該分野で公知の方法、例えば、血清学的方法もしくは培養の方法によって、または、本発明のアンチセンスオリゴマーを用いる方法によって決定され得る。

【0306】

血清学的同定は、被験体の生物学的生検（例えば、便、尿、脳脊髄液、血液など）から単離したウイルスサンプルまたは培養物を用いる。ウイルスの検出のためのイムノアッセイは、一般に、当業者により慣用的に用いられる方法（例えば、ELISA またはウェスタンブロット）によって行われる。さらに、特定のウイルスの株または種に対して特異的なモノクローナル抗体も、しばしば、市販されている。

30

【0307】

培養の方法は、種々の培養条件下での増殖速度および形態のような特徴の比較を含むがこれに限定されない技術を用いることによって、特定のタイプのウイルスを単離および同定するために使用され得る。

【0308】

感染した被験体におけるウイルス感染性因子を同定するための別の方法は、ウイルスの広範囲の科および/または属を標的とする 1 以上のアンチセンスオリゴマーを用いる。任意の特徴的なウイルス RNA を標的とする配列が使用され得る。所望される標的配列は、好ましくは、(i) 広範囲のウイルス科/属に共通し、そして、(ii) ヒトにおいては見出されない。多数の感染性ウイルスについて特徴的な核酸配列は、公的データベースにおいて利用可能であり。そして、特定のオリゴマーの設計の基礎としてはたらき得る。

40

【0309】

複数のオリゴマーの各々について、以下の工程が行われる：(a) オリゴマーを、被験体に投与する；(b) 上記投与後の選択した時点で、被験体から体液サンプルを得る；および(c) サンプルを、アンチセンスオリゴマーと、ウイルスゲノムの相補的な部分とを含むヌクレアーゼ抵抗性ヘテロ二重鎖の存在についてアッセイする。工程(a) ~ (c) は、少なくとも 1 つのこのようなオリゴマーについて行われるか、または、ウイルスもしくはウイルスの科を同定するために必要な限り多くについて行われる。オリゴマーは、投与され、そして、その後、またはより簡便には同時にアッセイされ得る。ウイルスは、アンチセンスオリゴマーと、所与の公知のウイルスもしくはウイルスの科のウイルスゲノム

50

の相補的な部分とを含むヘテロ二重鎖の存在（または非存在）に基づいて同定される。

【0310】

好ましくは、広範な科を標的とするオリゴマーの第一の群が最初に利用され、その後、それにより同定された広範な科／属内の特定の属および／もしくは種および／もしくは株に対して相補的な選択されたオリゴマーが利用される。このオリゴマーの第二の群は、広範な科／属内の特定の属および／もしくは種および／もしくは株に対して指向された標的化配列を含む。一般に、いくつかの異なる第二のオリゴマーコレクション（すなわち、第一段階において試験された広範なウイルス科／属の各々についてのもの）が提供される。配列は、（i）試験される個々の属／種／株に特異的であり、かつ（ii）ヒトにおいて見出されないものが選択される。

10

【0311】

C、TGF- β を標的とするアンチセンスオリゴマーを用いた処置後の、造血幹細胞の増殖および移植の改善

別の実施形態では、本発明は、造血系の迅速なインビボ再構築（repopulation）を可能にする造血幹細胞（HSC）の処置のための、改善されたオリゴマーを提供する。さらに、近年の研究は、心臓血管および末梢血管の疾患のための治療としてのHSCの利用を支持している。しかし、これらの研究は、注射されたHSC集団の品質およびその増殖能の重要性について強調している。TGF- β に対するアンチセンスオリゴマーを用いるHSC操作は、循環中のHSC前駆体の数を増加させ、そして、これらの細胞の回復能を増強する。HSCが損傷部位に向かいそして付着する能力における改善を、HSCの生存および増殖の改善と組み合わせることで、心臓血管および末梢血管の疾患を持つ患者の治療にとって、重要な治療上の戦略が提示される。

20

【0312】

本発明の組成物は、本発明において記載されるように、カチオン性結合が点在したTGF- β アンチセンスオリゴマーを含み、このオリゴマーは、TGF- β 遺伝子のプロセッシングを受ける前のRNAのスプライシング部位、または、mRNAのAUG開始コドンのいずれかを標的とする。例示的な好ましいアンチセンスオリゴマーは、配列番号247（GAGGGCGGCA TGGGGGAGGC）、配列番号248（GACCCCATGGC AGCCCCCGTC G）または配列番号249（GCAGCAGTTTC TTC TCCGTGG）として示される配列を有する。このようなアンチセンス因子を用いたCD34⁺ HSCの処理は、機能的なTGF- β の発現をブロックし、それゆえに、幹細胞の複製および／または分化に対するTGF- β の作用をブロックするのに有効な培養条件下で行われる（例えば、PCT公開番号WO/2002/004479または米国出願公開第20030109465号（これらは、本明細書中に参考として援用される）を参照のこと）。

30

【0313】

関連する方法において、培養におけるヒト幹細胞の生存時間は、幹細胞の生存性および分化状態を維持するのに有効な培養条件下で、ある期間にわたってこれらの細胞をエキソビボにてTGF- β ブロッキング剤に曝露することによって延長される。これらの細胞は、延長された期間にわたり、インビトロで維持され得、そして、造血系の再構成を必要とする被験体中にインビボで転移させるために使用され得るか、または、TGF- β ブロッキング剤で処理した幹細胞が、これらの細胞の迅速な増殖と系統が拘束された先祖細胞およびその子孫への分化をもたらすのに有効な条件下で培養され得る。

40

【0314】

D．免疫応答の調節

本明細書中に記載されるオリゴマーはまた、自己免疫状態または移植拒絶の処置または予防のために、哺乳動物被験体における免疫応答を操作するために使用され得る。自己抗原に対する免疫耐性を生成するための免疫系の正常な機能を操作することによって、この方法は、移植拒絶または自己免疫障害（例えば、多発性硬化症、狼瘡（lupus）、重症筋無力症（myasthenia gravis）、炎症性腸疾患および慢性関節リウマ

50

チ)の処置において有益な方法でT細胞の機能および活性を変更するのに有用である。本明細書中に記載されるような、CTL A - 4に対して指向されたカチオン性結合を持つアンチセンスオリゴマーの使用は、成熟な樹状細胞により提示される抗原に応答したT細胞の活性化を変更するための改善された手段を提供する。このことは、自己免疫状態においてのように、または、免疫原性治療用タンパク質によって慢性的に活性化されている場合に、移植された組織に対して応答する、耐性のあるT細胞集団の生成を可能にする。

【0315】

自家臓器移植を受けることが予定されているヒト被験体における移植拒絶の予防について、化合物の投与は、予定される移植の少なくとも1週間前に開始され得る。投与は、1日あたり約5mg ~ 200mgの化合物の間に対応する用量レベルにおいて、非経口投与によりなされ得る。

10

【0316】

自己免疫状態の処置について、化合物の投与は、自己免疫状態における所望の改善が観察されるまで継続され得る。投与は、1日あたり約5mg ~ 200mgの化合物の間の対応する用量レベルにおいて、非経口投与によりなされ得る。

【0317】

この方法の好ましい用途において、被験体はヒト被験体であり、そして、本発明の方法は、免疫学的耐性の促進または免疫活性化の増強のいずれかが、処置中の被験体に対する治療結果の改善をもたらすのに有効である任意の状態の処置に適用可能である。

【0318】

CTL A 遺伝子は、エキソン1 ~ 4と名付けられる4つのエキソンと、各エキソン対を分離するイントロンとを有する。イントロンは、1 ~ 3と名付けられ、イントロン - 1は、エキソン1とエキソン2との間に介在する配列であり、イントロン - 2は、エキソン2とエキソン3との間に介在する配列であり、そして、イントロン - 3は、エキソン3とエキソン4との間に介在する配列である。全長CTL A アイソフォームは、4つ全てのエキソンによってコードされ、3つ全てのイントロンの除去と、4つ全てのエキソンの維持とを必要とする。CTL A - 4のリガンド非依存性の形態は、エキソン1、3および4から形成され、イントロン1と隣接するエキソン2、ならびにイントロン3および4の除去を必要とする。CTL A - 4の分泌形態は、エキソン1、2および4から形成され、イントロン1と、イントロン2、エキソン3およびイントロン3を含むプロセッシングを受ける前のmRNAの連続した部分との除去を必要とする。

20

30

【0319】

オリゴマーの標的化配列は、好ましくは、配列番号246によって同定される標的配列の少なくとも12のサブユニットに対して相補的であり、被験体のプロセッシングを受ける前のT細胞抗原 - 4 (CTL A - 4) mRNAのイントロン1とエキソン2との間のスプライシング接合部にまたがる。

【0320】

現在のアンチセンス法は、CTL A - 4 遺伝子の特定のスプライシングを受けたmRNA アイソフォームの相対比を操作して、免疫抑制および免疫学的耐性を高めることによって、CTL A - 4 活性がナイーブなT細胞および活性化されたT細胞において調節され得るという知見に基づく。より具体的には、イントロン - 1とエキソン - 2との間のスプライシング領域を標的とするアンチセンス化合物の投与が、CTL A - 4 mRNAおよびCTL A - 4 タンパク質の割合を全長からリガンド非依存性の形態へとシフトさせること、そして、このシフトが、移植手術前の被験体の前処理に関して、自己免疫状態もしくは移植拒絶を処置することにおいて、および、移植拒絶の危険性を低下させることにおいて、有効であることが発見された。

40

【0321】

別の実施形態では、本発明のオリゴマーは、樹状細胞がT細胞から抗原特異的な免疫応答を誘発する様式を、正確かつ特異的に変更させるために使用され得る。具体的には、CD86 (B7 - 2) タンパク質レベルの減少は、樹状細胞を標的とするアンチセンス阻害

50

によって達成される。研究は、DCの成熟が、CD86発現の消失の結果として、IL-10の量の増加をもたらすことを示している。さらに、マウスホモログにおいて、エキソン10によりコードされる細胞質領域が、このサイトカインの調節と機能的に結び付けられることが決定された。本発明において記載されるような、カチオン性結合を含み、CD86開始コドンまたはCD86エキソンスプライシングアクセプター領域に対し標的化されたアンチセンスオリゴマーを用いることで、成熟な樹状細胞により提示される抗原に対するT細胞の活性化を正確かつ特異的にブロックするための改善された手段が提供される（例えば、PCT公開番号WO/2005/072527を参照のこと）。このことは、自己免疫状態においてのように、または、免疫原性治療用タンパク質によって慢性的に活性化されている場合に、移植された組織に対して応答する、耐性のあるT細胞および樹状細胞の集団の生成を可能にする。

10

【0322】

自己抗原に対する免疫耐性の生成のための免疫系の通常の機構を操作することによって、本発明の方法は、移植拒絶または自己免疫障害（例えば、多発性硬化症、狼瘡（lupus）、重症筋無力症（myasthenia gravis）、炎症性腸疾患および慢性関節リウマチ）の処置において有益な方法で成熟な樹状細胞の機能および活性を変更する。

【0323】

アンチセンス化合物は、プロセッシングを受けたか、またはプロセッシングを受ける前のCD転写物の発現感受性領域、すなわち、アンチセンス化合物に結合したときに、樹状細胞における全長CD86の発現を阻害するのに有効な領域に対して標的化される。1つの一般的な実施形態において、発現感受性領域は、プロセッシングを受けた転写物のAUG開始部位を含むか、または、この開始部位に隣接する領域であり、ここで、アンチセンス-転写物のヘテロ二重鎖の形成は、転写物の翻訳を阻害するのに有効である。ここでは、アンチセンス化合物は、位置1にあるAUG開始部位のAヌクレオチドに関して約-20~+30塩基の標的領域において、プロセッシングを受けたヒトCD86転写物（そのプロセッシングを受けた形態において、配列番号215により同定される）における少なくとも12の連続する塩基を含む標的に対して相補的な塩基配列を有し、そしてこれは、配列番号216により同定される配列の少なくとも6つの連続する塩基を含む。例示的なアンチセンス配列としては、配列番号48~50として同定されるものが挙げられる。

20

30

【0324】

より具体的な実施形態では、アンチセンス化合物は、3塩基+12塩基~14塩基にまたがるか、または、これに及ぶように設計される（ここで、AUG開始部位のAヌクレオチドは、+1を表す）。この実施形態では、アンチセンス化合物は、これらの塩基にまたがる領域にハイブリダイズし得るか（例えば、3塩基が、標的領域の中央にある場合）、または、3塩基の主に上流の領域または3塩基を含む領域にハイブリダイズし得る（例えば、標的塩基は、-2~+19に及ぶ（以下の配列番号50））。

【0325】

別の一般的な実施形態では、発現感受性領域は、(i)スプライシング部位のドナーもしくはアクセプター接合部に隣接する（例えば、5塩基以内の）イントロン領域、(ii)ドナーもしくはアクセプターのスプライシング部位接合部にまたがる領域、または、(iii)スプライシング部位のドナーもしくはアクセプター接合部に隣接する（例えば、5塩基以内の）エキソン領域を含み得る、スプライシング部位の標的領域である。標的領域は、好ましくは、プロセッシングを受ける前のヒトCD86転写物における少なくとも12の連続する塩基を含み、そして、例示的な実施形態では、配列番号217~220によって同定される配列のうちの1つの少なくとも6つの連続する塩基を含む。例示的なアンチセンス配列としては、配列番号51~54として同定されるものが挙げられる。

40

【0326】

CD86(B7-2)遺伝子についての例示的な標的配列を、以下の表18に列挙する。ヒトCD86 AUG標的および標的化配列は、Genbankアクセッション番号N

50

M 0 0 6 8 8 9 から誘導される。ヒトエキソン 6 および 7 のスプライシングドナー (s d) およびスプライシングアクセプター (s a) 標的および標的化配列は、それぞれ、G e n b a n k アクセス番号 U 1 7 7 2 0 および U 1 7 7 2 1 から誘導される。

【 0 3 2 7 】

【表 1 8 】

表 18. 例示的な CD86 標的配列

オリゴマー 標的	配列 (5'→3')	ヌクレオチド の範囲	配列番号
CD86 AUG	CATTTGTGACAGCACTATG GG ACT GAGTAA C ATTCTCTTTGTGATG	132-177	216
CD86Ex6sa	AGCTTGAGGACCCCTCAGCCTC	170-190	217
CD86Ex6sd	GCCTCGCAACTCTTATAAATGTG	291-313	218
CD86Ex7sa	GAACCAACACAATGGAGAGGGA	274-295	219
CD86Ex7sd	GAGTGAACAGACCAAGAAAAG	298-319	220

10

【 0 3 2 8 】

【表 1 9 】

表 19. 例示的な CD86 標的化配列

オリゴマー標的	配列 (5'→3')	配列番号
CD86 AUG1	GTTACTCAGTCCCATAGTGCTG	48
CD86 AUG2	CCATAGTGCTGTCA CAA ATG	49
CD86 AUG3	GAATGTTACTCAGTCCCATAG	50
CD86Ex6sa	GAGGCTGAGGGTCCTCAAGCT	51
CD86Ex6sd	CACATTTATAAGAGTTGCGAGGC	52
CD86Ex7sa	TCCCTCTCCATTGTGTTGGTTC	53
CD86Ex7sd	CTTTTCTTGGTCTGTTCACTC	54

30

患者においてインビボで免疫学的耐性を誘導する方法において、患者は、本明細書中に記載される C D 8 6 アンチセンスオリゴマーの治療上有効な量を投与される。オリゴマーは、自家移植に対する免疫学的応答を調節することによって、または、自己免疫疾患の場合には、慢性的に活性化される T 細胞を排除することによって、患者の処置において有効であり得る。

40

【 0 3 2 9 】

自家移植において、患者は、代表的には、移植を受ける直前（例えば、数日前）に結合体で処置され、次いで、免疫学的耐性が確立されるまで、定期的に（例えば、14日ごとに1回）処置される。免疫学的耐性は、以下に詳述されるような標準的なインビトロ検査において、ドナー M H C 抗原との反応性について患者の T 細胞を検査することによって、処置の間に監視され得る。

【 0 3 3 0 】

自己免疫障害（例えば、多発性硬化症、狼瘡 (l u p i s)、重症筋無力症 (m y a t h e n i a g r a v i s)、炎症性腸疾患および慢性関節リウマチ)の処置について、患者は、最初の単回用量の C D 8 6 アンチセンス結合体を与えられ、次いで、障害の改善

50

が観察されるまで、定期ベースで（例えば、3～14日ごと）追加の用量が与えられる。上述のように、免疫学的耐性の発生は、インビトロで選択された関連する抗原に対して反応する能力について、血液サンプルからのT細胞を検査することによって、処置の間に監視され得る。

【0331】

アンチセンスオリゴマーの送達経路としては、吸入；経皮送達；経口および非経口経路を含む種々の全身性経路（例えば、静脈内、皮下、腹腔内または筋肉内の送達）が挙げられるがこれらに限定されない。この方法の好ましい用途において、被験体はヒト被験体であり、そして、本発明の方法は、免疫学的耐性の促進が、処置中の被験体に対する治療結果の改善をもたらすのに有効である任意の状態の処置に適用可能である。

10

【0332】

この方法の別の好ましい用途において、ヒト被験体から単離した自家樹状細胞は、選択された関連する抗原の存在下で、CD86アンチセンス化合物を用いてエキソビポで処理され得る。この方法のこの用途は、免疫系が、特定の抗原に対し不適切に反応するような自己免疫障害の処置において特に有用であり、そして、これらの抗原が、樹状細胞を調整するために使用され得る。例は、多発性硬化症（MS）におけるミエリンの免疫媒介性の破壊である。ミエリン塩基性タンパク質（MBP）およびタンパクリビドタンパク質（PLP）は、この自己免疫疾患の病因における重要な抗原であると考えられるホストタンパク質（host protein）である（Shevach 2002）。

20

【0333】

免疫応答の調節における別の実施形態では、本発明の化合物は、中枢性および末梢性の免疫応答のダウンレギュレーションを抑制するために使用され得る。プログラムされた死1（Programmed Death 1）（PD-1）タンパク質は、HCVおよびHIVの感染を含む多くの慢性ウイルス感染において、消耗されたウイルス特異的CD8+ T細胞の表面上で顕著にアップレギュレートされる。本発明において記載されるようなカチオン性結合を含むアンチセンスオリゴマーを用いて、PD-1のプロセッシングを受ける前のRNAのスプライシング接合領域を標的とすることで、多くの慢性ウイルス感染および癌に関連する細胞傷害性T細胞の応答の抑制を逆行させるための新規の免疫治療的アプローチが提供される。

30

【0334】

別の実施形態では、TNFレセプター（TNFR2）の発現が、本発明において記載されるようなカチオン性結合を含むアンチセンスオリゴマーを用いて変更され、選択的スプライシングを受けた可溶性のTNF-レセプター2アイソフォーム（sTNFR2）の発現を誘導し得る。この天然に存在する選択的スプライシングを受けたTNFR2遺伝子のアイソフォームは、抗炎症特性を提供する。というのも、これは、TNF-の生物学的活性と拮抗するからである。本発明において記載されるようなアンチセンスオリゴマーを用いてヒトTNFR2遺伝子のエキソン7スプライシングアクセプター領域に対して標的化されたアンチセンスオリゴマーを用いたsTNFR2アイソフォームの過剰発現は、炎症性関節炎、具体的には、TNF-により誘導される関節炎を阻害するための免疫治療的アプローチを提供する。

40

【0335】

E. 筋萎縮症の処置

別の実施形態では、本明細書中に記載されるようなオリゴマーは、ヒト被験体における骨格筋重量の減損を処置するための方法において使用され得る。この方法における工程は、以下を伴う：

（a）被験体におけるミオスタチンの血中レベルまたは組織レベルを測定する工程；

（b）本明細書中に記載され、少なくとも1つのカチオン性のサブユニット間結合を含み、好ましくは、20%～50%のこのようなカチオン性結合を含み、かつ、そのプロセッシングを受けた形態で配列番号225によって同定される、プロセッシングを受けたかまたはプロセッシングを受ける前のヒトミオスタチンRNA転写物の発現感受性領域にハイブリ

50

ダイズするのに有効な塩基配列を有するオリゴマーのミオスタチンの発現を阻害する量を被験体に投与する工程；

(c) この投与によって、被験体の標的筋肉細胞内で、ヒトミオスタチンRNA転写物とアンチセンス化合物とから構成され、かつ、少なくとも45の解離の T_m を有する塩基対形成したヘテロ二重鎖構造を形成させ、それによって、上記細胞におけるミオスタチンの発現を阻害する工程；

(d) アンチセンス化合物の投与後の選択した時点で、被験体におけるミオスタチンの血中レベルまたは組織レベルを測定する工程；および

(e) 投与されるアンチセンス化合物の量の用量または投薬計画を必要に応じて調節するために(d)において測定したミオスタチンレベルを用いて投与を繰り返し、ミオスタチンの測定したレベルを最初に測定したレベルを上回って減少させ、工程(d)において測定したミオスタチンのこのようなレベルを正常な健康な個体について決定した範囲内に維持する工程。

【0336】

アンチセンスオリゴマーが、プロセッシングを受ける前のヒトミオスタチン転写物のスプライシング部位にハイブリダイズするのに有効である場合、このオリゴマーは、プロセッシングを受ける前のヒトミオスタチン転写物におけるスプライシング部位の少なくとも12の連続する塩基に対して相補的な塩基配列を有し、そして、工程(c)におけるヘテロ二重鎖の形成は、プロセッシングを受ける前のミオスタチン転写物のプロセッシングをブロックし、全長のプロセッシングを受けたミオスタチン転写物をもたらすのに有効である。プロセッシングを受ける前のミオスタチン転写物におけるスプライシング部位は、配列番号226~229として同定される配列のうちの1つを有し得る。例示的なアンチセンス配列は、配列番号230~233によって同定されるものである。

【0337】

F. スプライシング領域のアンチセンス標的化のさらなる用途

本発明のオリゴマーは、細胞における全長タンパク質の発現を阻害するための治療用組成物および方法において、そして、具体的には、プロセッシングを受ける前のmRNAにおける通常のスプライシングアクセプター接合部の下流にある5'末端の1~約25塩基対を有するmRNA配列に対して標的化されたアンチセンス組成物に使用され得る。このような標的化は、自然なmRNAスプライシングの進行の阻害と、スプライシング改変体mRNAの生成とに有効である(例えば、PCT公開番号WO/2001/083740または米国出願公開第20060287268号(これらは、本明細書中に参考として援用される)を参照のこと)。

【0338】

適切な標的タンパク質としては、例えば、転写因子、特に、癌遺伝子または癌原遺伝子のタンパク質(例えば、myc、myb、rel、fos、jun、abl、bclおよびp53)；マトリクスタンパク質(例えば、インテグリンおよびカテドリン)；他の腫瘍発現タンパク質(例えば、hCG)；テロメラーゼ；レセプタータンパク質；ウイルスタンパク質(例えば、HIV、ヒトパピローマウイルスおよびヒトパルボウイルスB19のサブゲノムの(subgenomic)スプライシングを受けたmRNAから発現されるタンパク質)；および免疫調節性タンパク質(例えば、CTLA-4、B7-2、PD-1、Foxp3、TGF-およびTNFレセプター)が挙げられる。このようなタンパク質の修飾された形態の阻害または発現は、多数の治療上の用途を有することが理解される。これらの用途としては、例えば、細胞分裂および細胞周期の調節の種々の局面に關与する転写因子のようなタンパク質を標的化することによる抗腫瘍治療；感染性因子の複製または他の不可欠な機能に必須のタンパク質を標的化することによる抗ウイルス治療；その部位における細胞増殖を支えるタンパク質を疎外することによる、再狭窄または他の増殖性障害の阻害；ならびに、種々の自己免疫疾患に関連する免疫応答を抑制するか、または、慢性のウイルス感染の場合のように、免疫応答を増強するかのいずれかの免疫調節、が挙げられるがこれらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0339】

転写因子は、代表的には、DNA結合領域とタンパク質-タンパク質結合領域とを有するマルチドメインタンパク質である。これらの領域のうちの1つと干渉することで、ドミナントネガティブなタンパク質を生成し得、これは、1つの活性（例えば、タンパク質結合）を維持する一方で、そのタンパク質の適切な機能にとって決定的な別の活性（例えば、DNA結合および転写活性；また、逆も同じ）を阻害することによって、ネイティブなタンパク質の活性に対抗する。

【0340】

上述のように、上記標的タンパク質の多くの機能的ドメインは、広く研究されており、そして、文献において報告されている。イントロン、エキソンおよびAUG開始コドンの位置を含めた、プレmRNAの配列は、GenBank配列データベースまたは当業者が容易に利用可能な他の公的な情報源において見出され得る。

【0341】

スプライシングアクセプタードメインの下流を標的とするアンチセンスの例は、例えば、哺乳動物被験体における免疫応答を操作する方法（すなわち、CTLA-4またはCD86の発現を標的化することによる）について、上に示される。

【0342】

別の実施形態では、本発明の化合物は、中枢性および末梢性の免疫応答のダウンレギュレーションを抑制するために使用され得る。プログラムされた死1（PD-1）タンパク質は、HCVおよびHIVの感染を含む多くの慢性ウイルス感染において、消耗されたウイルス特異的CD8⁺ T細胞の表面上で顕著にアップレギュレートされる。本発明において記載されるようなカチオン性結合を含むアンチセンスオリゴマーを用いて、PD-1のプロセッシングを受ける前のRNAのスプライシング接合領域を標的とすることで、多くの慢性ウイルス感染および癌に関連する細胞傷害性T細胞の応答の抑制を逆行させるための新規の免疫治療的アプローチが提供される。

【0343】

別の実施形態では、TNFレセプター（TNFR2）の発現が、本発明において記載されるようなカチオン性結合を含むアンチセンスオリゴマーを用いて変更され、選択的スプライシングを受けた可溶性のTNF-レセプター2アイソフォーム（sTNFR2）の発現を誘導し得る。この天然に存在する選択的スプライシングを受けたTNFR2遺伝子のアイソフォームは、抗炎症特性を提供する。というのも、これは、TNF-の生物学的活性と拮抗するからである。本発明において記載されるようなアンチセンスオリゴマーを用いてヒトTNFR2遺伝子のエキソン7スプライシングアクセプター領域に対して標的化されたアンチセンスオリゴマーを用いたsTNFR2アイソフォームの過剰発現は、炎症性関節炎、具体的には、TNF-により誘導される関節炎を阻害するための免疫治療的アプローチを提供する。

【0344】

G、CYP3A4を標的とするアンチセンスオリゴマーを用いた処置後の種々の薬物の薬物動態の改善

別の実施形態では、本発明のオリゴマーは、薬物の半減期を短縮する薬物代謝酵素をコードする遺伝子であるCYP3A4に対して標的化されたアンチセンスオリゴマーを投与することによって、患者における種々の薬物の薬物動態を改善するために使用され得る。アンチセンスオリゴマーは、被験体におけるCYP3A4酵素の生成を低減させて、薬物の半減期および有効性を延長し、そして、薬物の毒性を減らすのに有効である（例えば、PCT公開番号WO/2001/087286または米国出願公開第20040229829号（これらは、本明細書中に参考として援用される）を参照のこと）。

【0345】

本発明の組成物は、本発明において記載されるような、カチオン性結合が点在したCYP3A4アンチセンスオリゴマーを含み、このオリゴマーは、mRNAにおけるAUG開始コドン領域またはCYP3A4遺伝子のプロセッシングを受ける前のRNAにおけるスプラ

10

20

30

40

50

イシング部位を標的とする。例示的な好ましいアンチセンスオリゴマーは、配列番号 290 ~ 292 からなる群として示される配列を有する。

【実施例】

【0346】

実験

材料および方法（サブユニット）

そうでないと記されない限り、全ての化学物質は、Sigma - Aldrich - Fluka から入手した。ベンゾイルアデノシン、ベンゾイルシチジンおよびフェニルアセチルグアノシンは、Carbosynth Limited, UK から入手した。

【0347】

そうでないと示されない限り、溶媒の混合は、容量対容量 (v/v) である。光学密度は、水中で、260 nm にて測定する。この節におけるオリゴマー物質の命名法は、以下の形式を用いる。ここで、+ は、b1 (ピペラジン) 結合を示し；GuX は、6 - グアニジノヘキサノイルピペラジンのタイプ b1 結合を示し；R はアルギニンであり；B は - アラニンであり；Ahx は 6 - アミノヘキサノイルであり；GuAhx は、6 - グアニジノヘキサノイルであり；Ahxpip は、6 - アミノヘキサノイルピペラジンのタイプ b1 結合であり；EG3 はテイル (Tail) であり；GuBu は、4 - グアニジノブタノイルであり；GuBupip は、4 - グアニジノブタノイルピペラジンのタイプ b1 結合であり；Ac はアセチルであり；TFAppip は、トリフルオロアセチルピペラジンのタイプ b1 結合であり；Gupip は、グアニルピペラジンのタイプ b1 結合であり；Gu は、グアニル (-C(NH)NH₂) 基であり；Mepip は、4 - メチルピペラジンのタイプ b1 結合である。ペプチドは N - C で書かれるが、その C 末端は、オリゴマーの 3' 末端に連結される。例として：

5' - (基) - NNNNNNNNNNNNNN - 3' - (基) : タイプ a の結合を持つ無電荷骨格

5' - (EG₃) - NN + NNN + N + NNNNNNNN - 3' - (H) : b1 (ピペラジン) 結合、5' - テイル部分を持ち、3' において置換されていない荷電された骨格

5' - (EG₃) - NN + NNN + N + NNNNNNNN - 3' - (Ac(RAhxR)₄ AhxB-) : b1 (ピペラジン) 結合、5' - テイル部分およびペプチドを持ち、3' において - アラニン部分に連結された荷電された骨格

5' - (GuAhx) - NN (GuX) NNN (GuX) N (GuX) NNNNNNNN - 3' - (GuAhx) : 両方の末端に b1 (6 - グアニジノヘキサノイルピペラジン) 結合および GuAhx 基を持つ荷電された骨格。異なるように書かれているが、全ての荷電された位置は、6 - グアニジノヘキサノイル部分を含む。

【0348】

実施例 1 : モルホリノサブユニット (図 2 B を参照のこと)

モルホリノ塩 3a ~ d、f の一般的な調製：メタノールの冷やした混合物 (1 g のリボヌクレオシド 2 につき 5 ~ 10 mL) に、メタ - 過ヨウ素酸ナトリウムの温水溶液 (1.05 当量) を加えた。この段階で、反応混合物の組成は、15 ~ 40 % 水 / メタノール (v : v) である。この混合物に、固体の 1a ~ d、f を分けて加えた。反応が完了すると (1 ~ 2 時間)、副産物であるヨウ素酸ナトリウムケーキを濾過により除き、そして、水 / メタノールで再度スラリーにして、あらゆる生成物中間体を回収した。プールした濾液に、ホウ酸アンモニウム (1.4 ~ 2.0 当量) を加えた。20 分にて 45 ~ 120 分撹拌した後、この混合物を冷却し、そして、ボラン - トリチルアミン (1.5 ~ 2.0 当量) を加えた。この混合物を、p - トルエンスルホン酸 (3b、c、d、f) または塩酸 (3a) のいずれかのメタノール溶液 (4 ~ 5 当量) を用いて、pH 3.5 ~ 4.0 に調節した。混合物を、< 10 分にて 7 ~ 14 時間、pH 3.5 ~ 4.0 に保持した。3b、c、d、f の p - トルエンスルホン酸塩を濾過により単離し、そして、再結晶 / 再スラリーにより精製した。

【0349】

3 aを含む混合物をpH 7に中和した。この溶液を蒸留により濃縮してメタノールを除き、そして、この生成物を1-ブタノール中に抽出させた。この溶液を、シュウ酸のメタノール溶液(0.5当量)を用いてpH 4に調節した。3 aのシュウ酸塩を濾過により単離し、そして、再スラリーにより精製した。3 a~d、fについての収率は、30~75%であった。

【0350】

1 a~d、fの一般的な調製：化合物3 a~d、fを、N,N-ジメチルホルムアミド(1 gの3につき4~6 mL)中に溶解/懸濁した。この混合物に、トリエチルアミン(2.7~3.5当量)およびトリフェニルメチル(トリチル)塩化物(1.1~1.5当量)を加えた。反応が完了すると、過剰なトリチル塩化物をジエチルアミン(0.5当量)を用いてクエンチした。粗生成物を、酢酸エチルおよび水からの直接的な沈殿、または、抽出性のワークアップ(水、次いで、酢酸エチルまたはジクロロメタン)および沈殿のいずれかによって単離した。生成物を、トルエンからの結晶化により精製した。収率は75~90%であった。

10

【0351】

1 eの調製：化合物1 fを、ジクロロメタン(1 gの1 fにつき8 mL)中に懸濁した。この懸濁液に、イミダゾール(1.3当量)およびt-ブチルジメチルクロロシラン(1.2当量)を加えた。反応が完了すると(1~2時間)、この溶液を、pH 3のクエン酸緩衝液および水で連続して洗浄した。得られた溶液を濃縮して泡状物を生じ、これを、テトラヒドロフラン(1 gの1 fにつき8 mL)中に溶解した。この溶液に、炭酸カルシウム(2.0当量)およびクロロメチルピバレート(1.5当量)を加え、この混合物を加熱して還流させた。反応が完了すると(16時間)、この混合物を冷却して、ジクロロメタンで希釈した。この混合物を、KH₂PO₄溶液(pH 4.5)および水で連続して洗浄した。得られた溶液を濃縮して泡状物を生じた。この泡状物をテトラヒドロフラン(1 gの1 fにつき4 mL)中に溶解し、そして、三フッ化水素トリエチルアミン(2.0当量)を加えた。反応が完了すると(16時間)、この溶液を飽和NaHCO₃水溶液および水で連続して洗浄した。溶媒をトルエンに交換し、ヘプタン中に沈殿させることでこの生成物を単離した。収率は、80%の1 eであった。

20

【0352】

実施例2：結合タイプ(a)を持つモルホリノサブユニット(図2Cを参照のこと)

30

5 a~eの一般的な調製：化合物1 a~eを、ジクロロメタン(1 gの1につき6 mL)中に溶解し、<5℃まで冷却した。この溶液に、2,6-ルチジン(1.6当量)、N-メチルイミダゾール(0.3当量)およびN,N-ジメチルホスホロアミドジクロリデート4(1.6当量)を加えた。反応が完了すると(6~12時間)、この混合物をpH 3のクエン酸緩衝液で洗浄した。この粗生成物を、ヘプタン中への沈殿により単離した。この最終生成物を、シリカゲルクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘプタンの勾配)により精製した。生成物を含むプールした画分を合わせ、より少ない容量までエバポレートし、そして、ヘプタンからの沈殿により単離した。収率は、40~60%であった。サブユニット5 e、ならびに、この複素環式塩基から誘導した他のサブユニットのクロマトグラフィーの間、非極性不純物を酢酸エチル/ヘプタンで溶離させた後、ジクロロメタン中(5%イソプロパノール/酢酸エチル)の勾配を用いて、生成物を溶出した。

40

【0353】

実施例3：プロカチオン性結合タイプ(b1)を持つモルホリノサブユニット(図Dを参照のこと)

N-トリチルピペラジニコハク酸塩(11)の調製：トルエン/メタノール(5:1トルエン/メタノール(v:v))；1 gのピペラジンにつき5 mL)中のピペラジン(10当量)の冷溶液に、トルエン(1 gのトリチル塩化物につき5 mL)中のトリチル塩化物10(1.0当量)の溶液をゆっくりと加えた。反応が完了すると(1~2時間)、この溶液を、水で4回洗浄した。得られた有機溶液に、コハク酸水溶液(1.1当量；1 gのコハク酸につき13 mLの水)を加えた。この混合物を90分間攪拌し、そして、濾過

50

により固体の生成物を回収した。この粗製の固体を、アセトン中で2回の再度スラリーにすることにより精製した。収率は、70%であった。

【0354】

1-トリフルオロアセチル-4-トリチルピペラジン(14)の調製：18 Lのメタノール(1 gの11につき6 mL)中3.0 kgの11のスラリーに、3.51 Lのジイソプロピルエチルアミン(3.0当量)および1.038 Lのトリフルオロ酢酸エチル13a(1.3当量)を加えた。一晚撹拌した後、有機混合物を乾燥状態まで蒸留した。得られた油状物を、15 Lのジクロロメタン(1 gの11につき5 mL)中に溶解し、そして、15 Lの1 M KH_2PO_4 で2回、そして、15 Lの脱イオン水で2回洗浄した。この溶液を、3.0 kgのシリカプラグ(1:1 シリカ:11)に通し、そして、9 Lのジクロロメタン(1 gの11につき3 mL)で洗浄し、次いで、濃縮して白色の泡状物を生じた。14aについて：収量は2.9964 kg、105%であった。 ^{19}F NMR(CDCl_3) -68.7(s)。

10

【0355】

2,2-ジフルオロプロピニルおよびヘキサフルオロイソブチリルアミドの調製について、ジクロロメタン中のコハク酸トリチルピペラジン11を、炭酸カリウムの水溶液と反応させて、コハク酸を除去した。ジクロロメタンをエバポレートし、そして、トリチルピペラジン遊離塩基12を、ジイソプロピルエチルアミン(1.0当量)の存在下、溶媒なしで、2当量のエステル13cまたは13d(共に、Synquest, Alachua, FL, USAから入手)で処理した。混合物を、完了するまで40 に加熱した。この混合物を、ジクロロメタン中に溶解し、そして、シリカゲルのプラグを通過させ、酢酸エチルおよびヘプタンの混合物で溶出して、純粋なトリチルピペラジンアミドを得た。

20

【0356】

N-トリフルオロアセチルピペラジン、HCl塩(15)の調製：7.16 Lのジクロロメタン(1 gの14につき5 mL)中の1.431 kgの14の溶液に、3.37 Lの2.0 M $\text{HCl}/\text{Et}_2\text{O}$ (2.0当量)の溶液を滴下した。この反応混合物を1時間撹拌し、そして、生成物を濾過により回収した。濾紙上のケーキを2.0 Lのジクロロメタンで洗浄した。この固体を、真空オープン中40 にて24時間乾燥させた。15aについて：収量は、724.2 g、98.3%であった。 ^{19}F NMR(CDCl_3) -68.2(s)；融点は140 であった。エタノールからの少量のサンプルの再結晶化により、融点は154~156 まで上がった。

30

【0357】

活性化因子(6)の調製：トルエン(1 gの15につき10 mL)中の15(1.0当量)の冷懸濁液に、ジイソプロピルエチルアミン(4.0当量)を加えた。この混合物を、氷浴中で1時間撹拌し、そして、濾過により塩を除いた。濾紙上のケーキをトルエン(1.5 mL/g)で2回洗浄した。15の遊離塩基のトルエン溶液(13 mL/g)を、トルエン中の POCl_3 (1.2当量)の氷冷溶液にゆっくりと加えた。この反応混合物を、氷浴中で1時間撹拌し、次いで、1 M KH_2PO_4 (13 mL/g)で2回、そして、脱イオン水(13 mL/g)で1回洗浄した。この溶液を、 Na_2SO_4 で乾燥させ、そして、乾燥状態まで蒸留した。得られた非晶質の固体を、ジクロロメタン(1 gの15につき2 mL)中に溶解し、再度、乾燥状態まで蒸留した。15aの200 g バッチにつき、6aの収率は、226.9 g、75%であった。 ^{19}F NMR(CDCl_3) -68.85(s)； ^{31}P NMR(CDCl_3) 15.4(s)。

40

【0358】

活性化されたサブユニット(7)の調製(図2Cを参照のこと)：ジクロロメタン(1 gのサブユニットにつき5 mL)中のモルホリノサブユニット1a~e(1.0当量)の冷やした溶液/スラリーに、2,6-ルチジン(1.6当量)、N-メチルイミダゾール(0.3当量)、およびジクロロメタン(1 gの6につき2 mL)中の6a~d(1.6当量)を連続的に加えた。この溶液を、室温まで温めた。3時間後、この溶液を、1 M クエン酸(pH 3)で洗浄した。有機層を Na_2SO_4 で乾燥させ、そして、蒸留により溶

50

媒を除去し、そして、トルエン（5 mL / g）を加えた。この溶液をヘプタン（1 g のサブユニットにつき 20 mL）中に滴下することによって生成物を沈殿させ、次いで、濾過により回収した。この粗生成物を、シリカゲルクロマトグラフィー（酢酸エチル / ヘプタンの勾配）により精製した。溶媒を濃縮し、そして、トルエンまたはエチルベンゼン（1 g のサブユニットにつき 5 mL）で置き換えた。非晶質の生成物を、ヘプタン（1 g のサブユニットにつき 20 mL）中に沈殿させ、次いで、濾過により回収した。収率は、50 ~ 70 % であった。 ^{19}F NMR (CDCl_3) は、約 - 68 . 8 に、化学シフトを伴う 1 または 2 のピークを示す； ^{31}P NMR (CDCl_3) は、代表的には、13 . 0 ~ 13 . 4 に、化学シフトを伴う 2 つの一重項のピークを示す。

【0359】

実施例 4：プロカチオン性結合タイプ（b 2）を持つモルホリノサブユニット（図 2 C を参照のこと）

側鎖を含む一級アミン：

ヘキサメチレンジアミン（100 g、1 当量）を、メタノール（1 L）中に溶解し、そして、150 mL のメタノール中のトリフルオロ酢酸エチル（103 mL、1 当量）の溶液を滴下した。ごくわずかにこの溶液が暖かくなった。この反応を、加えた後、室温にて 30 分間撹拌した。クロロホルム / メタノール / 濃アンモニア（8 : 3 : 1）を用いた TLC は、アミンの存在を示す。溶媒をロータリーエバポレーターで除去し、そして、残留物をトルエン / 酢酸エチル（1 : 3、1 L）中に溶解し、次いで、10 % 飽和塩化ナトリウム水溶液で 4 回洗浄して、過剰のジアミンを完全に除去した。エバポレーションにより、117 g の粗製アミンが得られ、これを、上述のピペラジンの例のような活性化反応において使用した。粗製物 8 a を、上記の条件を用いて 1 a と反応させて 9 a を生じた。他のサブユニットとの対応する反応は、9 b ~ e を生じる。アミンの純粋な（neat）エステルとの反応により形成されるエステル 13 c、d からのアミドを用いて代替的なアミド保護アミンを調製し、そして、先の実施例と同じ様式で用いた。

【0360】

側鎖を含む二級アミン：

N, N' - ジメチルエチレンジアミン（36 . 3 mL、3 当量）をジクロロメタン（300 mL）中のトリチル塩化物（31 . 8 g、1 当量）と混合した。30 分後、エバポレーションにより溶媒を除去し、そして、300 mL のトルエンを加えた。この溶液を、300 mL の水で 3 回、そして最終的には、等容量の飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄した。エバポレーションにより形成された泡状物を、精製することなく使用した。

【0361】

泡状物を、400 mL のメタノールおよび 100 mL のジクロロメタン中に溶解した。トリフルオロ酢酸エチル（17 . 5 mL）を加えた。30 分後、この混合物を乾燥状態までエバポレートし、300 mL のジクロロメタンを加え、そして、等容量の水で 3 回、次いで、飽和塩化ナトリウム水溶液で 1 回洗浄した。硫酸ナトリウムで乾燥させた後、有機層を乾燥状態までエバポレートした。生成物を、1 % ルチジンを含む 10 % 酢酸エチルヘプタンを用いたシリカクロマトグラフィーにより精製して、24 . 8 g の純粋なトリチルアミドを得た。

【0362】

このトリチルアミドをジクロロメタン（180 mL）中に溶解し、そして、エーテル中 2 M HCl （85 mL）を滴下し、そして、室温にて 3 時間撹拌した。沈殿した固体を濾過し、そして、高減圧下で一晩乾燥させた。回収した生成物（10 . 06 g）を、100 mL ジクロロメタン中に再懸濁し、そして、溶液が形成された時点で、ジイソビルエチルアミン（25 . 0 mL）で処理した。この混合物を、氷浴中 0 にて撹拌しながら、トルエン（100 mL）中のオキシ塩化リン（4 . 6 mL）に加えた。この反応物を、12 時間、室温に維持した。この時点で、反応物を 1 M KH_2PO_4 （100 mL）で 2 回洗浄し、そして、硫酸ナトリウムで乾燥させた。濾過およびエバポレーションの後、褐色の固体が得られ、これを直接使用した。

10

20

30

40

50

【0363】

この褐色の固体を、20 mL ジクロロメタン中に溶解し、そして、2, 6 - ルチジン (5.24 mL) および N - メチルイミダゾール (0.672 mL) を含むジクロロメタン (40 mL) 中の 1 d (13.6 g) の溶液に加えた。室温にて4時間後、この反応物を、1 M クエン酸緩衝液 (pH 3) で2回洗浄した。この溶液を乾燥状態までエバポレートして、そして、生成物を、酢酸エチル / ヘプタン勾配を用いるシリカ上のクロマトグラフィーにより精製した。同様の反応により、対応する保護 N - メチル - N - メチルアミノエチル置換した活性化されたサブユニットを得る。

【0364】

実施例 5 : プロカチオン性結合タイプ (b3) を持つモルホリノサブユニット (図 2 E を参照のこと)

1 の酸化 : 全てのガラス器具をオープンにて一晩乾燥させ、そして、減圧下で冷却させるか、または、N₂ 気流で乾燥させた。全ての溶液は、N₂ 下で調製および移動した。出発物質のアルコール (1) を、使用の 24 時間前に、減圧下、50 °C にて乾燥させた。

【0365】

DMSO / ジクロロメタン (1 : 2 DMSO / ジクロロメタン (v : v) ; 1 g の 1 につき 5 mL) 中の 1 (1 当量 ; 25 mmol) の溶液を、15 分かけて、Swern 試薬 (-60 °C にて、ジクロロメタン (21 mL / g) 中の塩化オキサリル (1.1 当量) の溶液に DMSO (2.2 当量) を加え、10 分間搅拌することによって調製した) に滴下した。-60 °C にて25分間搅拌した後、トリエチルアミン (5 当量) を10分かけて加え、この間に、白色の沈殿が形成した。追加のジクロロメタン (1 g の 1 につき 5 mL) を加え、そして、反応混合物を、水浴中で25分間搅拌した。

【0366】

この反応混合物を、イソプロパノール / ジクロロメタン (1 : 15 イソプロパノール / ジクロロメタン (v : v) ; 1 g の 1 につき 15 mL) で希釈し、そして、1 : 1 (v : v) の水 / ブライン (1 g の 1 につき 20 mL) で2回洗浄した。この溶液を、Na₂SO₄ で乾燥させ、そして、濃縮して、淡黄色の泡状物としてアルデヒド 16a ~ e を生じ、これらを、さらに精製することなく用いた。収率は > 100 % であった。

【0367】

16 の還元的アミノ化 :

酢酸メチルアミンの溶液 (10 当量 ; メタノール中 1.16 M の溶液) を、メタノール (1 mmol の 16 につき 8 mL) 中の 16a ~ e (1 当量 ; 25 mmol) の溶液に加えた。氷酢酸で pH 8 に調整した後、反応混合物を室温にて1時間搅拌し、BH₃・ピリジン (2 当量) を加えた。さらに1時間搅拌した後、反応混合物を粘性のある油状物まで濃縮した。

【0368】

ジクロロメタン (1 mmol の 16 につき 10 mL) 中に溶解した粗生成物に、9 - フルオレニルメチルククロホルムート (FMOC 塩化物) (1.5 当量)、その後、ジイソプロピルエチルアミン (2.5 当量) を加え、この溶液を室温にて30分間搅拌した。反応混合物をジクロロメタン (8 mL / mmol) で希釈し、そして、1 : 1 (v : v) 水 / ブライン (1 mmol の 16 につき 20 mL) で2回洗浄した。この溶液を Na₂SO₄ で乾燥させ、溶媒を除去し、そして、粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー (アセトン / ククロホルムの勾配) により精製した。収率は、40 ~ 60 % の 18a ~ e であった。

【0369】

1 % 1, 8 - ジアザビシクロ [5.4.0] ウンデカ - 7 - エン (DBU) / N, N - ジメチルホルムアミド (1 g の 18 につき 5 mL) 中の 18 (1 当量 ; 2.8 mmol) の溶液を、室温にて30分間搅拌した。反応混合物をクロクロホルム (1 g の 18 につき 15 mL) で希釈し、そして、1 : 1 (v : v) 水 / ブライン (1 g の 18 につき 10 mL) で洗浄した。水相をクロクロホルム (1 g の 18 につき 10 mL) で1回再抽出し、

10

20

30

40

50

そして、合わせた有機溶液を Na_2SO_4 で乾燥させて、溶媒を除去した。残留物を N , N - ジメチルホルムアミド (1 g の 18 につき 15 mL) 中に溶解し、ヘキサン (1 g の 18 につき 15 mL) で 6 回洗浄して、ジベンゾフルベン副産物を除去 / 減少させ、そして、溶媒を除去して、オフホワイトの固体として生成物 17 a ~ e を生じた。収率は 85 % であった。

【 0370 】

新たに蒸留したエチルホスホロジクロリデート (3 当量) を、 N_2 下 0 ° にて 3 分間かけて、乾燥ジクロロメタン (1 g の 17 につき 40 mL) 中の 17 (1 当量 ; 2.3 mmol) およびジイソプロピルエチルアミン (3 当量) の溶液に滴下した。冷却浴を除き、そして、TLC により完了が確認されるまで (30 分) 、反応混合物を室温にて攪拌した。溶媒を除去した後、粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル / ヘキサン 勾配) により直接精製した。収率は 50 ~ 60 % であった。このサブユニットは、タイプ (a) の無電荷結合の導入に有用である。この一般的な方法は、以下で、タイプ (b3) の荷電結合の導入に適用した。

10

【 0371 】

T サブユニットを持つ長鎖エーテルジアミンを用いた還元的アミノ化 :

4 - メトキシトリフェニルメチル塩化物 (15.4 g、50 mmol) を、トルエン中に溶解し、そして、50 mmol のトリエチルアミンを含むジクロロメタン中の 4 , 7 , 10 - トリオキサ - 1 , 13 - トリデカンアミン (150 mmol) の攪拌溶液に滴下した。反応の完了は、エタノール / 濃アンモニア (4 : 1、v / v) で溶離する TLC によって簡便に追跡し、そして、ニンヒドリンまたは UV によって可視化した。反応が終わると、溶液を水で洗浄して、遊離アミンを除いた。エバポレーションにより溶媒を除去し、そして、粗生成物を精製することなく次の工程において用いた。

20

【 0372 】

トリフルオロ酢酸エチル (1.5 当量) を、0 ° にて、ジクロロメタン (1 g のアミンにつき 12 mL) 中のメトキシトリチル化アミン (1 当量 ; 25 mmol) およびトリエチルアミン (1.5 当量) の溶液に加え、冷却浴を除き、そして、反応混合物を室温にて 4 時間攪拌した。反応が完了すると (TLC) 、反応混合物をジクロロメタン (1 g のアミンにつき 12 mL) で希釈し、1 : 1 (v : v) 水 / ブライン (1 g の 1 につき 20 mL) で 2 回洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させて、粘性の淡黄色の油状物まで濃縮した。粗メトキシトリチル化アミド生成物を、シリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル / クロロホルムの勾配) により精製した。収率は、60 ~ 70 % であった。

30

【 0373 】

p - トルエンスルホン酸 (1.5 当量) を、メタノール / トリフルオロエタノール / ジクロロメタン (1 : 10 : 89 (v : v : v) ; 1 g の 2 につき 5 mL) 中のメトキシトリチル化アミド (3 当量 ; 7.5 mmol) の溶液に加え、そして、黄橙色の溶液を室温にて 30 分間攪拌し、この時点で反応が完了した (TLC) 。反応混合物を、トリエチルアミンで pH 7 に中和し、そして、エバポレートした。粗生成物をメタノール (1 g のメトキシトリチル化アミドにつき 5 mL) 中に再溶解し、そして、必要に応じて pH を pH 7 に調整し、再度エバポレートした。メタノールの添加とエバポレーションを 1 回以上繰り返し、そして、この粗アミンをさらに精製することなく使用した。

40

【 0374 】

メタノール (1 g の粗アミンにつき 5 mL ; 1 g の 16 d につき 12.5 mL) 中の粗アミンの溶液にアルデヒド 16 d (1 当量 ; 2.5 mmol) を加え、そして、酢酸を用いて pH を pH 8 に調節した。反応混合物を室温にて 1 時間攪拌し、そして、ボラン - ビリジン (2 当量) を加えた。必要に応じて開始時の pH を維持するために pH を調節し、反応混合物を 1 時間、または、TLC により反応の完了が観察されるまで攪拌した。反応混合物をエバポレートし、残留物をジクロロメタン (1 g の 16 d につき 12.5 mL) および 9 - フルオレニルメチルクロロホルメート (2 当量) 中に溶解し、そして、ジイソプロピルエチルアミン (3 当量) を加え、この反応混合物を室温にて 45 分間攪拌した。

50

この反応混合物を、ジクロロメタンと1:1(v:v)水/ブライン(1gの16dにつき各々12.5mL)との間で分配させ、そして、水性の相を、ジクロロメタン(1gの16dにつき12.5mL)で再抽出した。合わせた有機物を飽和塩化ナトリウム水溶液(1gの16dにつき25mL)で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させ、そして、溶媒を除去した。この粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー(メタノール/クロロホルムの勾配)により精製して、白色の泡状物として生成物21dを生じた。収率は、40%であった。

【0375】

脱保護:

20% トリエチルアミン/N,N-ジメチルホルムアミド(1mmolの21dにつき15mL)中の粗21d(1当量; 0.9mmol)の溶液を、50℃にて30分間加熱し、この時点で、TLCでは21dが残存していることは確認されなかった。冷やした反応混合物を、ヘキサン(1mmolの21dにつき30mL)で4回抽出し、ジベンゾフルベン副産物を除去し、そして、溶媒を除去した。残留物をイソプロパノール(1mmolの21dにつき15mL)中に溶解し、泡状物になるまでエバポレートし、次いで、最小容量のジクロロメタンに溶解し、ヘキサン(1gの21dにつき150mL)から沈殿させて、オフホワイトの固体として生成物20dを生じた。収率は90%であった。

10

【0376】

活性化:

20d(1当量; 0.78mmol)およびジイソプロピルエチルアミン(3当量)の溶液を、窒素下で乾燥ジクロロメタン(1gの20dにつき20mL)中に調製し、そして、 N_2 下0℃にて、乾燥ジクロロメタン(1gの20dにつき20mL)中のエチルホスホジクロリデート(3当量)の溶液に、約3分間かけて滴下した。冷却浴を除き、そして、TLCにより反応の完了が確認されるまで(20分)、反応混合物を室温にて撹拌した。この溶液を約半分の容量まで濃縮し、そして、シリカゲルクロマトグラフィー(アセトン/クロロホルム勾配)により直接精製した。収率は、40~50%の22dであった。

20

【0377】

Cサブユニットを持つ長鎖エーテルジアミンを用いた還元的アミノ化:

サブユニット1bを、代替的な方法により酸化した。ピリジン(9.15当量)を加え、次いで、トリフルオロ酢酸(4.58当量)を加えることによって形成した溶液に、サブユニット(5g、1当量)を加えた。溶液が透明になると、ジイソプロピルカルボジイミド(7.23当量)をゆっくりと加えた。2時間後、この溶液を800mLの飽和塩化ナトリウム水溶液に加えた。20分間撹拌した後、この混合物を濾過した。生成物をアセトン中に溶解させ、そして、脱イオン水中に沈殿させた。この濾過した生成物を減圧下で乾燥させた。収率は70~80%であった。酸化したサブユニットは、このままで使用され得るが、酢酸エチル/ジクロロメタン混合物を用いたシリカ上のクロマトグラフィーにより精製してもよい。

30

【0378】

ジアミン4,7,10-トリオキサ-1,13-トリデカンアミン(33g、1当量)を、150mLのジエチルエーテル中に溶解し、0℃まで冷却し、そして、この溶液を、50mLのエーテル中のトリフルオロ酢酸エチル(32g、1.5当量)の溶液でゆっくり処理した。TLCは、ごく微量のジアミンの残留と共に、反応の完了を示す。

40

【0379】

この溶液の一部(45mL、アルデヒドに対して3当量のアミン)を、20mLのメタノール中の3.42gの16bの撹拌溶液に加えた。5分後に、p-ニトロフェノール(2.52g)を加え、そして、20分後に、シアノホウ化水素ナトリウム(3.2g、8当量)を加えた。室温にて160分後、さらなるシアノホウ化水素ナトリウム(1.2g)およびニトロフェノール(0.8g)を加えた。この溶液を、800mLの室温の水に注ぎ、固体と粘性の油状物との懸濁物を生じた。デカンテーションにより水を除き、そし

50

て、生成物を真空にて乾燥させた。全生成物を酢酸エチル中に溶解し、そして、同じ溶媒中に充填した250 mLのシリカゲルにアプライした。カラムを、2%トリエチルアミン/酢酸エチルで洗浄し、そして、生成物を、6:1~10:1の酢酸エチル:エタノール混合物中の1%トリエチルアミン溶液で溶出した。生成物を含む画分をエバポレートして、真空にて乾燥させ、1.95 g、37%のアミン20bを生じた。

【0380】

長鎖エーテル側鎖アミンを持つ活性化された5'-アミノCサブユニットを、T化合物について上述したようにして調製した。

【0381】

実施例6:アルキル化による、タイプ(b3)のプロカチオン性結合を持つモルホリノサブユニット(図2Fを参照のこと):

ヘキサメチレンジアミン(100 g)をメタノール(1 L)中に溶解し、そして、150 mLのメタノール中のトリフルオロ酢酸エチル(103 mL)の溶液を滴下して処理した。ごくわずかにこの溶液が暖かくなった。この反応を、加えた後、室温にて30分間撹拌した。クロロホルム/メタノール/濃アンモニア(8:3:1)を用いたTLCは、アミンの存在を示す。溶媒をロータリーエバポレーターで除去し、そして、残留物をトルエン/酢酸エチル(1:3、1 L)中に溶解し、次いで、10%飽和塩化ナトリウム水溶液で4回洗浄して、過剰のジアミンを完全に除去した。エバポレーションにより、117 gの粗製アミンが得られ、これを、以下で形成するトシル化サブユニットと共に直接使用した。

【0382】

ジクロロメタン(200 mL)中に溶解したサブユニット1b(20 g)を、N-メチルイミダゾール(11 mL)で処理し、そして、この混合物を氷浴中で冷却した。p-トルエンスルホン塩化物(8 g)を1段階で加え、この溶液を10分間撹拌し、そして、フラスコを4に16時間置いた。TLC(ジクロロメタン中2%メタノール)は、反応の完了を示す。300 mLのジクロロメタンを加えて反応をワークアップし、300 mLの10%飽和塩化ナトリウム水溶液で3回洗浄し、そして、エバポレートして、泡状物として23bを生じた。

【0383】

トシレート23b(17 g)および一保護アミン(46.5 g、いくつかのビスアクリル化ジアミンを含む)を、トリエチルアミン(15 mL)と共にアセトニトリル(200 mL)中で混合した。45にて16時間置いた後、混合物をエバポレートし、そして、残留物を、N,N-ジメチルホルムアミド(200 mL)中に再懸濁した。混合物は、45において均質となった。溶液を5日間加熱し、この時点で、周囲温度まで冷却させ、そして、1 Lの10%飽和塩化ナトリウム水溶液および800 mLの酢酸エチルと混合した。有機層を1 Lの20%飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄し、硫酸ナトリウムと共に撹拌し、濾過し、そして、エバポレートして48 gのアルキル化生成物を生じた。この生成物は、ベンゾイル化複素環式塩基と脱ベンゾイル化複素環式塩基の混合物を含む。

【0384】

上記粗生成物の一部(9 g)を、ジクロロメタン中に再懸濁し、0まで冷却し、そして、40 mLのジクロロメタン中のN-(9-フルオレニルメトキシカルボニルオキシ)スクシンイミド(FMOC-OSu)(Chemical Abstracts番号82911-69-1)の溶液で処理した。反応は、20分後に完了した。この溶液に、3.3 mLのN-メチルイミダゾールを加え、次いで、1.9 mLの塩化ベンゾイルを加えて、脱ベンゾイル化種を再度保護した。0にて10分以上置いた後、反応物を室温まで温めた。この反応物を150 mLのジクロロメタンで希釈し、250 mLのリン酸緩衝液(pH 7)で洗浄し、250 mLの10%飽和塩化ナトリウム水溶液で2回洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させ、そして、エバポレートさせた。残留物を、ジクロロメタン(3 L)を用いる500 mLのシリカ上に充填し、そして、ジクロロメタン中の酢酸エチルの混合物(5%、10%、15%を各1 L、20%を2 L、40%を2 L)で溶出した。最後の

溶離液は、2.9 gの純粋なベンゾイル化FMO C保護5'-アミノサブユニット24bをもたらしした。カラムを2 Lの5%メタノール/ジクロロメタンで洗浄すると、5.4 gのベンゾイル化FMO C保護5'-アミノサブユニットが回収できた。

【0385】

DMF (140 mL)中のピペリジン(28 mL)での処理により、上記生成物(7.1 g)からFMO C基を除去した。室温にて5分置いた後、反応物を、ジクロロメタン(400 mL)と水(30 mL)との間で分配させた。有機層を、400 mLの10%飽和塩化ナトリウム水溶液で3回洗浄した。エバポレーションにより、8.8 gの粗遊離アミンが得られ、これを、ジクロロメタン(1 L)、30%酢酸エチル/ジクロロメタン(2 L)、および5%メタノール/ジクロロメタン(3 L)を用いるシリカ(360 mL)上のクロマトグラフィーにより精製し、2.5 gのアミン生成物を得た。

10

【0386】

1 gのこのアミンを、0 にてジクロロメタン(10 mL)中に溶解させ、そして、N-エチルモルホリン(500 mL)で、次いで、エチルホスホロジクロリデート(230 mL)で連続して処理した。トリエチルアミン(227 mL)を加えると、この混合物が均質となった。反応は、4時間後に完了した。通常の水性ワークアップの後、生成物を10~50%の酢酸エチル/ヘプタン混合物を用いるシリカクロマトグラフィー(60 mL)により精製して、800 mgの活性化されたサブユニット25bを生じた。

【0387】

同じプロセスを用いて、5'-位に保護されたヘキサメチレンジアミン側鎖を持つ活性化されたTサブユニットを作製した。サブユニット1d(50 g)を、ジクロロメタン(500 mL)およびN-メチルイミダゾール(16.5 mL)中のp-トルエンスルホン塩化物(23.7 g)と反応させた。0 にて1時間、そして、室温にて4時間置いた後、反応物を、400 mLのジクロロメタンで希釈し、そして、1 Lの10%飽和塩化ナトリウム水溶液で3回洗浄した。硫酸ナトリウムで乾燥させ、エバポレーションを行った後、残留物の重量は57 gであった。残留物(15 g)および40 gの粗モノ(トリフルオロアセチル化)ヘキサメチレンジアミンを、100 mLのアセトニトリル中で還流にて反応させた。エバポレーションの後、残留物を2%メタノール/ジクロロメタン中に溶解させ、シリカにアプライした。カラムを、ジクロロメタン、50% 酢酸エチル/ジクロロメタン、酢酸エチル、80% 酢酸エチル/ジクロロメタンで、そして最後に、5% 30

20

30

【0388】

同様の様式で、1a~eを、3,3'-ジアミノ-N-メチルジプロピルアミン26と反応させ、27a~eのような2つのカチオン性部分を持つ側鎖を得た。

【0389】

実施例7：プロカチオン性スルファミド結合を持つモルホリノサブユニット(図2Gを参照のこと)

ジメチルホルムアミド(10 mL/g)中の5'-メチルアミノサブユニット17a~e(1当量)を、三酸化硫黄/ピリジン(4当量)、ピリジン(8当量)の後、トリエチルアミン(6当量)で処理した。16時間後、反応物を、過剰の飽和塩化ナトリウム水溶液に加え、そして、乾燥させた沈殿物を、5%メタノール/クロロホルムを用い、2%のトリエチルアミンを含むシリカ上のクロマトグラフィーに供した。こうして単離したスルファミン酸28a~eのトリエチルアンモニウム塩を、ジクロロメタン(20 mL/g)中に溶解させた。ピリジン(3.2当量)を加え、そして、この混合物を、窒素下にてドライアイスアセトン浴中で冷却した。この溶液を、トルエン溶液中の1.1当量のホスゲンを滴下して処理した。25分後、20分かけて溶液を室温まで温めた。この溶液を油状物までロータリーエバポレーターにかけ、この油状物をクロロホルム中に溶解させて、そして、40%酢酸エチルおよびヘキサンを用いるシリカ上で直接クロマトグラフィーに供

40

50

した。50%の収率で得た生成物29a~eを、タイプ(a)のスルファミド結合の導入に使用した。ヘキサメチレンジアミン(24a~e)からの5'-アミノサブユニットを、同様の様式で脱保護し、硫化し、そして、活性化して、30a~eを得た。

【0390】

実施例8：ジスルフィドアンカーの調製(図2Hを参照のこと)

左右対称なジスルフィド32の調製：1, 1'-カルボニルジイミダゾール(CDI)(12.402g; 2.2当量)を、ジクロロメタン(5.25mL/g)中に懸濁し、そして、氷浴上で冷却させた。ヒドロキシエチルジスルフィド31(5.36g; 1当量)を、ジクロロメタン(10mL/g)およびテトラヒドロフラン(1mL/g)中に溶解した。このジオール溶液を、混合物の温度が反応の間中4を下げたままとなるよう、CDIにゆっくりと加えた。反応が完了すると(一度添加が完了すると)、脱イオン水(93.8μL、0.15当量)を加えて反応をクエンチした。また別に、11(32.59g; 2.1当量)をトルエン(1gの11につき8mL)、ジクロロメタン(1gの11につき2mL)およびメタノール(1gの11につき2mL)中に溶解させた。K₂CO₃(22.09g; 4.6当量)を、脱イオン水(10mL/g)に溶解させた。このK₂CO₃溶液を11の溶液に加えた; この混合物を撹拌し、次いで、2層に分離させた。曇った有機層を蒸留して、90gを除いた; 得られた水滴を分離し、そして、アセトン(1gの11につき8mL)を有機層に加えた。CDIで活性化したジスルフィドジオールの溶液を、遊離塩基12の溶液に加え、そして、225mLまで濃縮した。アセトン(1gの11につき10mL)を加え、そして、この混合物を225mLまで濃縮した。混合物を加熱して還流させると、固体が、溶液から結晶化し始めた。完了すると、反応混合物を冷却し、そして、固体(32)を濾過により単離した。収量: 27.92g; 93.1%(重量ベースのアッセイに基づく)。

【0391】

ジスルフィドアルコール33の調製：32(36.00g; 32.1mmol; 1当量)を、アセトン(1gの32につき2.8mL)中に懸濁させた。ヒドロキシエチルジスルフィド(78.51mL; 20当量)を加え、その後、アセトン(1gの32につき1.7mL)を加えた。5%のNaOH/メタノール(2.85mL; 0.1当量)を加えた; 混合物のpHは、pH紙によると10であった。トリフェニルホスフィン(8.42g; 1当量)を加え、その後、アセトン(1gの32につき1.1mL)を加えた。全ての固体は溶液となり、次いで、生成物が結晶化して析出し始めた。16時間後、反応混合物を酢酸(2.4g; 0.2当量)で中和した。粗生成物を濾過により単離した。粗製の固体33を、還流下で、2回アセトン(5mL/g)で再度スラリーにした。

【0392】

濾過した後、粗生成物をジクロロメタン(1gの32につき7.25mL)中に再懸濁した。この混合物を、透明な溶液が形成されるまで(35)加熱した。この溶液を、等容量の脱イオン水で5回抽出し、そして、最終的な有機層を155mLまで濃縮した。ジクロロメタンを加え(1gの32につき4.3mL)、そして、この溶液を再度155mLまで濃縮した。CDI(9.17g; 1.1当量)を加え、そして、この混合物を室温にて撹拌した。反応が完了すると(約20分)、この反応混合物を等容量の脱イオン水で2回洗浄し、次いで、エチルベンゼン(1gの32につき2.1mL)を加えた。この溶液を65.2gまで濃縮して、溶液中のジクロロメタンを0.17%まで減らし、そして、氷浴上で撹拌して、生成物を結晶化させた。生成物34を濾過により単離した。収率: 44%。

【0393】

実施例9：トリエチレングリコールテイル(図2Iを参照のこと)

トリチルピペラジンフェニルカルバメート35の調製：ジクロロメタン(1gの11につき6mL)中の化合物11の冷懸濁液に、水(1gの炭酸カルシウムにつき4mL)中の炭酸カルシウム(3.2当量)の溶液を加えた。この2相の混合物に、ジクロロメタン(1gのフェニルクロロホルメートにつき2g)中のフェニルクロロホルメート(1.0

3 当量) の溶液をゆっくりと加えた。この反応混合物を 20℃ まで温めた。反応が完了すると (1 ~ 2 時間)、層を分離させた。有機層を水で洗浄し、無水炭酸カリウムで乾燥させた。生成物 35 を、アセトニトリルからの結晶化により単離した。収率は 80 % であった。

【0394】

カルバメートアルコール 36 の調製：水素化ナトリウム (1.2 当量) を、1 - メチル - 2 - ピロリジノン (1 g の水素化ナトリウムにつき 32 mL) 中に懸濁させた。この懸濁液に、トリエチレングリコール (10.0 当量) および化合物 35 (1.0 当量) を加えた。得られたスラリーを、95℃ まで加熱した。反応が完了すると (1 ~ 2 時間)、この混合物を 20℃ まで冷却した。この混合物に、30 % ジクロロメタン / メチル tert - ブチルエーテル (v : v) および水を加えた。生成物を含む有機層を NaOH 水溶液、コハク酸水溶液および飽和塩化ナトリウム水溶液で連続して洗浄した。生成物 36 を、ジクロロメタン / メチル tert - ブチルエーテル / ヘプタンからの結晶化により単離した。収率は 90 % であった。

10

【0395】

テイル酸 37 の調製：テトラヒドロフラン (1 g の 36 につき 7 mL) 中の化合物 36 の溶液に、無水コハク酸 (2.0 当量) および DMA P (0.5 当量) を加えた。この混合物を 50℃ まで加熱した。反応が完了すると (5 時間)、この混合物を 20℃ まで冷却し、そして、NaHCO₃ 水溶液を用いて pH 8.5 に調節した。メチル tert - ブチルエーテルを加え、そして、生成物を、水層中に抽出した。ジクロロメタンを加え、そして、混合物を、クエン酸水溶液を用いて pH 3 に調節した。生成物を含む有機層を、pH 3 のクエン酸緩衝液と飽和塩化ナトリウム水溶液の混合物で洗浄した。この 37 のジクロロメタン溶液を、単離することなく、化合物 38 の調製に用いた。

20

【0396】

38 の調製：化合物 37 の溶液に、N - ヒドロキシ - 5 - ノルボルネン - 2, 3 - ジカルボン酸イミド (HONB) (1.02 当量)、4 - ジメチルアミノピリジン (DMA P) (0.34 当量)、次いで、1 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - N' - エチルカルボジイミド塩酸塩 (EDC) (1.1 当量) を加えた。この混合物を 55℃ まで加熱した。反応が完了すると (4 ~ 5 時間)、混合物を 20℃ まで冷却し、そして、1 : 1 の 0.2 M クエン酸 / ブラインおよびブラインで連続して洗浄した。ジクロロメタン溶液を、アセトンへ、次いで、N, N - ジメチルホルムアミドへの溶媒交換に供し、そして、生成物を、アセトン / N, N - ジメチルホルムアミドから飽和塩化ナトリウム水溶液中への沈殿によって単離した。粗生成物を、水中で数回再度スラリーにして、残留した N, N - ジメチルホルムアミドおよび塩を除いた。化合物 36 からの収率は 70 % の 38 であった。活性化された「テイル」のジスルフィドアンカー - 樹脂上への導入を、固相合成中のサブユニットの組み込みに使用した手順により、NMP 中で行った。

30

【0397】

実施例 10：モルホリノオリゴマーの合成のための固体支持体の調製

実施例 10a：アミノメチルポリスチレン - ジスルフィド樹脂の調製

この手順を、粗多孔度の (40 ~ 60 μm) ガラスフリットと、オーバーヘッド攪拌子と、3 方向の Teflon (登録商標) コックとを備える、シラン化した被覆物を備えるペプチド容器 (Chem Glass, NJ, USA による注文生産) において行い、N₂ をフリットを通して泡となって表面に浮かばせるか、または、減圧下で抽出することを可能にした。反応容器における温度の制御は、循環水浴によって達成した。

40

【0398】

以下の手順における樹脂の処理 / 洗浄の工程は、以下の 2 つの基本操作から構成される：樹脂の流動化および溶媒 / 溶液の抽出。樹脂の流動化について、コックを、N₂ がフリットを通して上方に流れることを可能にするように位置決めし、そして、リアクタに特定の樹脂の処理 / 洗浄を加えて、樹脂を透過し、そして、樹脂を完全に湿らせることを可能にした。次いで、混合を開始し、樹脂のスラリーを、特定の時間にわたり混合した。溶媒

50

／溶液の抽出については、混合および N_2 の流れを停止し、そして、減圧ポンプを開始し、次いで、コックを、樹脂の処理／洗浄物を廃棄物へと排出することを可能にするように位置決めした。全ての樹脂の処理／洗浄の容量は、他に特定されない限り、樹脂 1 g につき 15 mL であった。

【0399】

シラン化した被覆物を備えるペプチド容器中の、アミノメチルポリスチレン樹脂 (100 ~ 200 メッシュ; 約 1.0 mmol / g N_2 置換; 75 g、1 当量、Polymer Labs, UK, part # 1464 - X799) に、1 - メチル - 2 - ピロリジノン (NMP; 1 g の樹脂につき 20 mL) を加え、そして、この樹脂を、1 ~ 2 時間混合しながら、浸潤させた。浸潤溶媒の排出の後、樹脂を、ジクロロメタン (1 ~ 2 分を 2 回)、25 % イソプロパノール / ジクロロメタン中の 5 % ジイソプロピルエチルアミン (3 ~ 4 分を 2 回) およびジクロロメタン (1 ~ 2 分を 2 回) で洗浄した。最後の洗浄物を排出した後、樹脂を、1 - メチル - 2 - ピロリジノン (0.17 M; 1 g の樹脂につき 15 mL、約 2.5 当量) 中のジスルフィドアンカー 34 の溶液で流動化し、そして、この樹脂 / 試薬混合物を 45 °C にて 60 時間加熱した。反応が完了すると、加熱をやめ、そして、アンカー溶液を排出して、樹脂を、1 - メチル - 2 - ピロリジノン (3 ~ 4 分を 4 回) およびジクロロメタン (1 ~ 2 分を 6 回) で洗浄した。樹脂を、ジクロロメタン中の 10 % (v/v) 二炭酸ジエチル (16 mL / g; 5 ~ 6 分を 2 回) の溶液で処理し、次いで、ジクロロメタン (1 ~ 2 分を 6 回) で洗浄した。樹脂 39 を N_2 流下で 1 ~ 3 時間乾燥させ、次いで、減圧下で一定の重さまで乾燥させた ($\pm 2\%$)。収率: 元々の樹脂の重量の 110 ~ 150 %。

10

20

【0400】

実施例 10b: アミノメチルポリスチレン - ジスルフィド樹脂の負荷の決定

樹脂の負荷 (潜在的に利用可能な反応性部位の数) は、樹脂 1 g あたりのトリフェニルメチル (トリチル) 基の数についての分光アッセイにより決定される。

【0401】

既知重量の乾燥樹脂 (25 \pm 3 mg) を、シラン化した 25 mL 容量測定用フラスコに移し、そして、約 5 mL のジクロロメタン中の 2 % (v/v) トリフルオロ酢酸を加える。この内容物をおだやかにかき混ぜて混合し、次いで、30 分間静置させた。ジクロロメタン中の 2 % (v/v) トリフルオロ酢酸を追加して、容量を 25 mL にし、そして、内容物をおおまかに混合する。容積移送式ピペット (positive displacement pipette) を用いて、トリチルを含む溶液のアリコート (500 μ L) を、10 mL の容量測定用フラスコに移し、そして、メタンスルホン酸を用いて容量を 10 mL にする。

30

【0402】

最終溶液におけるトリチルカチオン含量を、431.7 nm における UV 吸光度により測定し、そして、適切な容量、希釈、消光係数 (ϵ : 41 μ mol $^{-1}$ cm $^{-1}$) および樹脂の重量を用いて、樹脂の負荷を、樹脂 1 g あたりのトリチル基 (μ mol / g) で算出する。このアッセイは、三連で行い、そして、平均の負荷を算出する。

40

【0403】

この実施例における樹脂の負荷の手順は、約 500 μ mol / g の負荷を持つ樹脂を提供する。ジスルフィドアンカーの組み込みの工程を、室温にて 24 時間行った場合、300 ~ 400 μ mol / g の負荷が得られた。

【0404】

実施例 10c: テイルの負荷

アミノメチルポリスチレン - ジスルフィド樹脂の調製と同じ設定および容量を用いて、テイルを分子に導入し得る。カップリングの工程については、ジスルフィドアンカー溶液の代わりに、4 - エチルモルホリン (NEM、0.4 M) を含む NMP 中の 38 (0.2 M) の溶液を用いた。45 °C にて 2 時間置いた後、樹脂 39 を 25 % イソプロパノール / ジクロロメタン中の 5 % ジイソプロピルエチルアミンで 2 回、そして、DCM で 1 回洗浄

50

した。この樹脂に、無水安息香酸（0.4 M）およびNEM（0.4 M）の溶液を加えた。25分後、リアクタの被覆物を室温まで冷却し、そして、樹脂を、25%イソプロパノール/ジクロロメタン中の5%ジイソプロピルエチルアミンで2回、そして、DCMで8回洗浄した。樹脂40をフィルターに通し、高減圧下で乾燥させた。樹脂40の負荷は、テイルの負荷において使用した、元々のアミノメチルポリスチレン-ジスルフィド樹脂39の負荷であると規定する。

【0405】

実施例11：自動合成装置におけるモルホリノオリゴマーの調製

実施例11a：固相合成

モルホリノオリゴマーを、2 mLのGilsonポリプロピレン反応カラム（Part # 3980270）中、Gilson AMS-422自動ペプチド合成装置にて調製した。水を流すためのチャンネルを備えるアルミニウムブロックを、合成装置に据えたカラムの周りに配置した。AMS-422は、あるいは、試薬/洗浄溶液を加え、特定の時間にわたり保持し、そして、真空を用いてカラムから排出させる。

10

【0406】

長さ約25サブユニットまでの範囲のオリゴマーについて、樹脂1 gあたり500 μmol 付近の負荷を持つアミノメチルポリスチレン-ジスルフィド樹脂が好ましい。より大きなオリゴマーについては、樹脂1 gあたり300~400 μmol の負荷を持つアミノメチルポリスチレン-ジスルフィド樹脂が好ましい。5'-テイルを持つ分子が所望される場合、テイルを負荷された樹脂は、同じ負荷ガイドラインを用いて選択される。

20

【0407】

以下の試薬溶液を調製した：

脱トリチル化溶液：4：1 ジクロロメタン/アセトニトリル中10%のシアノ酢酸（w/v）；中和溶液：3：1 ジクロロメタン/イソプロパノール中5%のジイソプロピルエチルアミン；カップリング溶液：1，3-ジメチルイミダゾリジノン中の、所望の塩基および結合のタイプの0.18 M（または、20サブユニットより長く増やすオリゴマーについては0.24 M）の活性化したモルホリノサブユニットおよび0.4 MのN-エチルモルホリン。異なる試薬溶液の洗浄を分離する移行用の洗浄として、ジクロロメタン（DCM）を用いた。

【0408】

30

ブロックを42に設定した合成装置において、30 mgのアミノメチルポリスチレン-ジスルフィド樹脂（またはテイル樹脂）を含む各カラムに、2 mLの1-メチル-2-ピロリジノンを加え、そして、室温にて30分間静置させた。2 mLのジクロロメタンで2回洗浄した後、以下の合成サイクルを用いた：

【0409】

【表 2 0】

工程	容量	送達	保持時間
脱トリチル化	1.5 mL	マニホールド	15 秒
脱トリチル化	1.5 mL	マニホールド	15 秒
脱トリチル化	1.5 mL	マニホールド	15 秒
脱トリチル化	1.5 mL	マニホールド	15 秒
脱トリチル化	1.5 mL	マニホールド	15 秒
脱トリチル化	1.5 mL	マニホールド	15 秒
脱トリチル化	1.5 mL	マニホールド	15 秒
DCM	1.5 mL	マニホールド	30 秒
中和	1.5 mL	マニホールド	30 秒
中和	1.5 mL	マニホールド	30 秒
中和	1.5 mL	マニホールド	30 秒
中和	1.5 mL	マニホールド	30 秒
中和	1.5 mL	マニホールド	30 秒
中和	1.5 mL	マニホールド	30 秒
DCM	1.5 mL	マニホールド	30 秒
カップリング	350 μ L – 500 μ L	シリンジ	40 分
DCM	1.5 mL	マニホールド	30 秒
中和	1.5 mL	マニホールド	30 秒
中和	1.5 mL	マニホールド	30 秒
DCM	1.5 mL	マニホールド	30 秒
DCM	1.5 mL	マニホールド	30 秒
DCM	1.5 mL	マニホールド	30 秒

10

20

30

40

50

各カラムが、適切なカップリング溶液（A、C、G、T、I）を適切な順序で受けるように、個々のオリゴマーの順序を、合成装置にプログラムした。カラム内のオリゴマーがその最後のサブユニットの組み込みを完了すると、カラムをブロックから外し、そして、0.89 M の 4 - エチルモルホリンを含む 4 - メトキシトリフェニルメチル塩化物（DMI 中 0.32 M）から構成されるカップリング溶液を用いて、手動で最後のサイクルを行った。

【0410】

実施例 11b：樹脂からの切断と、塩基および骨格保護基の除去

メトキシトリチル化の後、樹脂を、2 mL の 1 - メチル - 2 - ピロリジノンで 8 回洗浄した。1 - メチル - 2 - ピロリジノン中の 0.1 M の 1, 4 - ジチオスレイトール（DTT）および 0.73 M のトリエチルアミンから構成される 1 mL の切断溶液を加え、カラムに蓋をし、そして、室温にて 30 分間静置させた。この後、この溶液を、12 mL の W h e a t o n バイアル中に廃液した。大いに縮んだ樹脂を、300 μ L の切断溶液で 2 回洗浄した。この溶液に、4.0 mL の濃アンモニア水溶液（-20 にて保存）を加え、（Teflon（登録商標）を裏打ちしたスクリュキャップを用いて）バイアルにしっかりと蓋をし、そして、混合物をかき混ぜて、溶液を混合した。バイアルを、45 のオープン中に 16 ~ 24 時間置いて、塩基および骨格保護基の切断を達成した。

【0411】

実施例 11c：最初のオリゴマーの単離

バイアル中の加安分解溶液をオープンから取り出し、そして、室温まで冷却させた。この溶液を、20 mL の 0.28 % アンモニア水溶液で希釈し、そして、Macroprep HQ 樹脂（BioRad）を含む 2.5 x 10 cm のカラムに通した。塩勾配（A：

0.28%アンモニア + B : 0.28%アンモニア中 1 M の塩化ナトリウム ; 60 分で 0 ~ 100 % の B) を用いて、メトキシトリチルを含むピークを溶出した。合わせた画分をプールし、そしてさらに、所望される生成物に依存して処理した。

【0412】

実施例 11 d : モルホリノオリゴマーの脱メトキシトリチル化 : メトキシトリチルを持たないオリゴマー

Macroprep 精製からのプールした画分を、1 M H_3PO_4 で処理して、pH を 2.5 まで下げた。最初の混合の後に、サンプルを、室温に 4 分間静置し、この時点で、2.8%アンモニア / 水を用いてこれらを pH 10 ~ 11 に中和する。この生成物を、固相抽出 (SPE) により精製した。

10

【0413】

Amberchrome CG-300M (Rohm and Haas; Philadelphia, PA) (3 mL) を 20 mL のフリット状カラム (BioRad Econo-Pack クロマトグラフィーカラム (732-1011)) 中に充填し、そして、樹脂を、以下のもの 3 mL でリンスした : 0.28% NH_4OH / 80% アセトニトリル ; 0.5 M NaOH / 20% エタノール ; 水 ; 50 mM H_3PO_4 / 80% アセトニトリル ; 水 ; 0.5 NaOH / 20% エタノール ; 水 ; 0.28% NH_4OH 。

【0414】

脱メトキシトリチル化からの溶液を、カラム上にロードし、そして、樹脂を、3 ~ 6 mL の 0.28%アンモニア水溶液で 3 回リンスした。Wheaton バイアル (12 mL) をカラムの下に置き、そして、0.28%アンモニア水溶液中 45% のアセトニトリル 2 mL で 2 回洗浄することにより、生成物を溶出させた。この溶液をドライアイス中で凍結し、そして、バイアルを、凍結乾燥装置中に置いて、綿毛のような白色の粉末を生じた。これらのサンプルを水中に溶解し、シリンジを用いて 0.22 ミクロンフィルター (Pall Life Sciences, Acrodisc 25 mm シリンジフィルター + 0.2 ミクロンの HT Tuffryn メンブラン) を通してフィルター処理し、そして、UV 分光光度計にて光学密度 (OD) を、測定して、存在するオリゴマーの OD 単位を決定し、同様に、解析のためにサンプルを分配した。次いで、この溶液を、凍結乾燥のために、Wheaton バイアルに戻した。

20

30

【0415】

実施例 11 e : モルホリノオリゴマーの解析 :

MALDI-TOF 質量分析を用いて、精製物における画分の組成を決定し、同様に、オリゴマーを識別する証拠 (分子量) を提供した。希釈の後、サンプルを、マトリクスとして、3, 5 - ジメトキシ - 4 - ヒドロキシ桂皮酸 (シナピン酸 (sinapinic acid))、3, 4, 5 - トリヒドロキシアセトフェノン (THAP) または - シアノ - 4 - ヒドロキシ桂皮酸 (HCCA) の溶液を用いて泳動させた。

【0416】

25 mM (pH 5) 酢酸ナトリウム 25% アセトニトリル (緩衝液 A) および 25 mM (pH 5) 酢酸ナトリウム 25% アセトニトリル 1.5 M 塩化カリウム (緩衝液 B) (15 分で 10 ~ 100 % の B の勾配)、または、25 mM KH_2PO_4 25% アセトニトリル (pH = 3.5) (緩衝液 A) および 25 mM KH_2PO_4 25% アセトニトリル (pH 3.5) および 1.5 M 塩化カリウム (緩衝液 B) (15 分で 0 ~ 35 % の B の勾配) を用いて、Dionex Propac SCX-10, 4 x 250 mm 絡む (Dionex Corporation; Sunnyvale, CA) を用い、カチオン交換 (SCX) HPLC を行った。前者の系は、ペプチドが結合していない正に荷電したオリゴマーに用い、一方で、後者は、ペプチド結合物について用いた。

40

【0417】

実施例 11 f : カチオン交換クロマトグラフィーによるモルホリノオリゴマーの精製

サンプルを、20 mM の酢酸ナトリウム、pH 4.5 (緩衝液 A) に溶解して、Sou

50

rice 30 カチオン交換樹脂のカラム (GE Healthcare) にアブライシ、そして、20 mM 酢酸ナトリウムおよび 40 % アセトニトリル (pH 4.5) 中 0.5 M の塩化ナトリウムの勾配 (緩衝液 B) を用いて溶出させた。生成物を含むプールした画分を、濃アンモニア水溶液で中和し、そして、Amberchrome SPE カラムにアブライした。生成物を、上述のようにして、溶出、凍結および凍結乾燥した。

【0418】

以下のオリゴマーが、この方法の例である：

5' - (EG3) - G + TGC + TCA + TGG + TGCACGG + TC - 3' - (H)、 $[M+H]^+$ の計算値 = 6860.9 ダルトン、 $[M+H]^+$ の実測値 = 6861.7 ダルトン、HCV に有用

10

5' - (EG3) - GCC + ATGGT + TTT + TTC + TC + AGG - 3' - (H)、 $[M+H]^+$ の計算値 = 6825.9 ダルトン、 $[M+H]^+$ の実測値 = 6827.1 ダルトン、エボラに有用

5' - (EG3) - + TGGGT + ATG + TTGT + AGCC + AT - 3' - (H)、 $[M+H]^+$ の計算値 = 7245.2 ダルトン、 $[M+H]^+$ の実測値 = 7246.8 ダルトン、エボラに有用

5' - (EG3) - CC + TGCCC + TTTGT + TCT + AGT + TG - 3' - (H)、 $[M+H]^+$ の計算値 = 7092.2 ダルトン、 $[M+H]^+$ の実測値 = 7093.8 ダルトン、エボラに有用

実施例 11 g : 3' - メトキシトリチルおよび 3' - トリチルモルホリノオリゴマー

20

Macroprep 精製したオリゴマーを、固相抽出カラムに直接アブライし、そして、3' - メトキシトリチル化オリゴマーを、脱メトキシトリチル化種と同様の様式で単離および精製した。

【0419】

実施例 12 : 大規模オリゴマー合成のための N2, O6 - 保護モルホリノ G (DPG) の合成

41 の調製 : ジクロロメタン (1 g の 1 につき 8 mL) 中の 1c およびイミダゾール (1.3 当量) の冷溶液に、ジクロロメタン中の tert - ブチルジメチルククロシラン (1.2 当量) の溶液を加えた。添加した後、溶液を 20 °C まで温めた。反応が完了すると (1 ~ 3 時間)、この溶液を、1 M クエン酸緩衝液 (NaOH で pH 3 に調節) および水で連続的に洗浄した。得られた有機溶液を蒸留して、水を共沸させて除き、そして、これを次の工程に直接使用した。

30

【0420】

42 の調製 : ジクロロメタン中の 41 の 0 の冷溶液に、トリエチルアミン (1.2 当量)、4 - ジメチルアミノピリジン (0.1 当量)、およびトリイソプロピルベンゼンホルニルククロリド (1.1 当量) を連続的に加えた。この溶液を 20 °C まで温めた。反応が完了すると (3 ~ 9 時間)、この溶液を、1 M KH_2PO_4 および水で連続的に洗浄した。得られた有機溶液を蒸留して、水を共沸させて除き、これを、化合物 44 の調製に直接使用した。

40

【0421】

43 の調製 : トルエン中の 4 - ヒドロキシベンズアルデヒド (1.0 当量) および N - メチルイミダゾール (0.2 当量) の溶液に、水中の $KHCO_3$ (2.0 当量) 溶液を加えた。得られた 2 相の混合物に、トリメチルアセチルククロリド (1.4 当量) を加えた。反応が完了すると (1 ~ 2 時間)、メタノール (1.0 当量) を加え、そして、この混合物を 1 時間攪拌した。層を分離させた後、有機層を、1 M KH_2PO_4 および水で連続的に洗浄した。得られた有機溶液を蒸留して、水を共沸させて除き、THF で希釈した。この溶液に、5 % Pd/C 触媒 (0.004 当量、Johnson Matthey, West Deptford, NJ, USA) を加え、そして、この混合物を、5 ~ 30 psi の H_2 下で、水素化した。反応が完了すると (4 ~ 8 時間)、この混合物を、Cellite パッドを通してフィルター処理し、そして、pH 6.5 のリン酸緩衝液で洗浄し

50

た。生成物を、トルエン / ヘプタンから結晶化させた。収率は、80%であった。

【0422】

44の調製：ジクロロメタン中の3の冷溶液に、N-メチルピロリジン(2.0当量)を加えた。10分後、3a(1.2当量)を加え、その後、DBU(1.2当量)を加えた。試薬を添加した後、溶液を20℃まで温めた。反応が完了すると(1~9時間)、この溶液を、1M KH_2PO_4 および水で連続的に洗浄した。得られた有機溶液を蒸留して、水を共沸させて除き、これを次の工程に直接使用した。

【0423】

45の調製：ジクロロメタン中の44の溶液に、三フッ化水素トリエチルアミン(2.0当量)を加えた。反応が完了すると(4~20時間)、この溶液を、二炭酸ナトリウム溶液、pH 6.5のリン酸緩衝液および水で連続的に洗浄した。得られた溶液を蒸留してジクロロメタンを除き、そして、生成物を、THF / 水から結晶化させた。収率は、1cからの70%であった。

10

【0424】

46の調製：化合物45を、ジクロロメタン(1gの45につき6mL)中に溶解し、そして、<5℃まで冷却させた。この溶液に、2,6-ルチジン(1.6当量)、N-メチルイミダゾール(0.3当量)およびN,N-ジメチルホスホロアミドジクロリデート(1.6当量)を加えた。この溶液を20℃まで温めた。反応が完了すると(6~12時間)、この混合物をpH 3のクエン酸緩衝液で洗浄した。粗生成物を沈殿 / 再スラリーにより単離した。二重に保護された(DPG)生成物46を、シリカゲルクロマトグラフィー(酢酸エチル / ヘプタンの勾配)により精製し、そして、ヘプタン中に沈殿させることにより単離した。収率は、40~60%であった。

20

【0425】

実施例13：モルホリノオリゴマーの大規模合成

アミノメチルポリスチレン樹脂へのアンカーおよびテイルの負荷のためのリアクタの設計を、モルホリノオリゴマーの大規模合成に使用する。樹脂負荷のガイドラインは、小規模合成についてのもと同じである。

【0426】

実施例13a：固相合成

保護したオリゴマーを、10g規模(開始時の樹脂重量)のアミノメチルポリスチレン-ジスルフィド樹脂(1gの充填につき約500 μmol)に対する固相オリゴマー合成により手動で調製した。使用した溶液は以下のとおりであった：脱トリチル化溶液：1%エタノールを含む20%トリフルオロエタノール / ジクロロメタン中、2% 4-シアノピリジニウムトリフルオロ酢酸(CYTF A)(w/v)；中和溶液：25%イソプロパノール / ジクロロメタン中の5%ジイソプロピルエチルアミン；カップリング溶液：1,3-ジメチルイミダゾリジノン(DMI)中の0.165M(46(DPG)および5dまたは他のTサブユニットについて)または0.18M(5aおよび5bまたは他のA/Cサブユニットについて)の活性化されたモルホリノサブユニットおよび0.4MのN-エチルモルホリン。

30

【0427】

樹脂を合成リアクタに移した後でかつ、合成サイクルを開始する前に、1-メチル-2-ピロリジノン(NMP、1gの樹脂につき20mL)を加え、そして、1~2時間静置させた。ジクロロメタン(1gの樹脂につき10mL)で2回洗浄した後、各サイクルにおいて所望の塩基および所望の結合のタイプの活性化されたモルホリノサブユニットの適切なカップリング溶液を加えて、以下の合成サイクルを用い、適切な配列を生じた。

40

【0428】

【表 2 1】

工程	容量 (mL/開始樹脂の g)*	時間 (分)
DCM	10-30	1-2
DCM	10-30	1-2
脱トリチル化 A	10-30	2-3
脱トリチル化 A	10-30	2-3
脱トリチル化 A	10-30	2-3
脱トリチル化 A	10-30	2-3
脱トリチル化 A	10-30	2-3
中和 A	10-30	3-4
中和 A	10-30	3-4
中和 A	10-30	3-4
中和 A	10-30	3-4
DCM	10-30	1-2
DCM	10-30	1-2
カップリング	7-12 ^{**}	90
中和 A	10-30	1-2
中和 A	10-30	1-2
中和 A	10-30	1-2
中和 A	10-30	1-2
DCM	10-30	1-2
* 洗浄容量は樹脂の浸潤を考慮して増やされる; 容量は、各サイクルにおける実際の樹脂の容量 1 g あたり 10 mL である		
** カップリング容量は、良好な混合を維持するのに十分であり、そして、樹脂の浸潤を考慮して増やされる		

10

20

最後のサブユニットを組み込んだ後、DMI 中の 0.32 M の 4 - メトキシトリフェニルメチルクロリドおよび 0.4 M の N - エチルモルホリンを用いて最後のサイクル（メトキシトリチル化）を行った。メトキシトリチル化の後、樹脂を、NMP で 8 回洗浄し、次いで、NMP（開始時の樹脂 1 g につき 27 mL）中の 0.1 M 1, 4 - ジチオスレイトール（DTT）および 0.73 M トリエチルアミンから構成される切断溶液で 30 分間処理した。保護したオリゴマー溶液を回収した後、樹脂（容量がかなり減っている）を、さらに 2 回、切断溶液（各々 15 分間、開始時の樹脂 1 g につき 13 mL）で洗浄し、そして、この洗浄液をバルク溶液と合わせた。Teflon（登録商標）プラグを備える適切なサイズの圧力ボトル（Ace Glass, NJ, USA）中の保護されたオリゴマー溶液に、濃アンモニア水溶液（開始時の樹脂 1 g につき 106 mL、前もって - 20 に冷却）を加え、ボトルを密封し、そして、かき混ぜて内容物を混合した。このボトルを 45 のオープン中に 16 ~ 20 時間置いて、塩基および骨格保護基を除去した。

30

40

【0429】

加安分解の後、粗オリゴマー溶液を室温まで冷却し、次いで、PLBC 3kd 再生セルロースメンブレン（Millipore）を用いて、0.28% アンモニア水溶液に対してダイアフィルトレーションして、イオン交換クロマトグラフィーの前に、溶媒および小さな分子を除いた。

【0430】

実施例 13b：アニオン交換クロマトグラフィーによるモルホリノオリゴマーの精製
ダイアフィルトレーションから得られた粗オリゴマー溶液を、pH 11 ~ 11.5 に調節し、そして、Toyo Pearl Super-Q 650S アニオン交換樹脂（Tosoh Bioscience）のカラム上にロードする。メトキシトリチル化オリゴマ

50

ーを、17カラム容量にわたり、5～35%のBの勾配（緩衝液A：10mM水酸化ナトリウム；緩衝液B：10mM水酸化ナトリウム中1Mの塩化ナトリウム）を用いて溶出し、そして、容認可能な純度（アニオン交換HPLCおよび質量分析）の画分をプールした。

【0431】

実施例13c：モルホリノオリゴマーの脱メトキシトリチル化

アニオン交換クロマトグラフィーからのプールした画分に、アセトニトリル（10容量%）を加え、その後、2M H_3PO_4 を加えて、pHを3に調節した。この溶液を、45分間混合し、次いで、濃アンモニア水溶液でpH7に中和した。オリゴマー溶液を、PLBC 3kd再生セルロースメンブレン（Millipore）を用いて、20mM酢酸ナトリウムに対してダイアフィルトレーションして、カチオン交換クロマトグラフィーの前に、緩衝液を交換した。

10

【0432】

実施例13d：カチオン交換クロマトグラフィーによるモルホリノオリゴマーの精製

オリゴマー溶液を、酢酸を用いてpH4.5に調節し、そして、Source 30カチオン交換樹脂のカラム（GE Healthcare）のカラムにロードした。オリゴマーを、17カラム容量にわたり、0～35%のBの勾配（緩衝液A：20mM酢酸ナトリウム、25%アセトニトリル、pH4.5；緩衝液B：0.5M塩化ナトリウム、20mM酢酸ナトリウム、25%アセトニトリル、pH4.5）を用いて溶出し、そして、容認可能な純度（カチオン交換HPLCおよび質量分析）の画分をプールした。

20

【0433】

実施例13e：モルホリノオリゴマーの単離

精製したオリゴマー溶液を、PLBC 3kd再生セルロースメンブレン（Millipore）を用いて0.028%アンモニア水溶液に対してダイアフィルトレーションして塩を除き、そして、オリゴマーの遊離塩基を生じた。次いで、脱塩されたオリゴマー溶液を凍結および凍結乾燥して、白色の綿毛のような粉末（約12%の水分含量）としてオリゴマーを得た。この方法により、エボラの処置に有用な化合物を調製した：

5' - (EG3) - GCC + ATGGT + TTT + TTC + TC + AGG - 3' - (H)、8.4g

5' - (EG3) - CC + TGCCC + TTTGT + TCT + AGT + TG - 3' - (H)、10.0g

30

小規模で作製した化合物と同一。

【0434】

実施例13f：アニオン交換HPLCによるモルホリノオリゴマーの解析：

20mM塩化ナトリウム、10mmol水酸化ナトリウム（緩衝液A）および1M塩化ナトリウム、10mmol水酸化ナトリウム（緩衝液B）、（20分間で10～53%のBの勾配）を用いる、Dionex DNAPac, 4x250mmカラム（Dionex Corporation; Sunnyvale, CA）を用いて、アニオン交換（SAX）HPLCを行った。

【0435】

40

実施例14：モルホリノオリゴマーへのグアニジニウム基の導入

実施例14a：アミンの直接的なグアニル化による

その骨格に3つのピペラジン二級アミンを含む10 μmol のモルホリノオリゴマーを、75mg/mLで0.5M Na_2CO_3 に溶解させた。700 μmol の1-H-ピラゾール-1-カルボキサミジンHClをこのモルホリノオリゴマー溶液に加え、そして、この反応物を、室温で撹拌した。3時間経過後、この反応物を水で希釈し、そして、Amberchrom CG300M（Rohm and Haas; Philadelphia, PA）カラムを用いた固相抽出（SPE）により精製した。SPE精製は、20mg/mLでのサンプルのカラムへのロードと、4カラム容量の1M NaClでのカラムの洗浄と、次いで、3カラム容量の水でのカラムの洗浄とを伴った。3カラム容量のア

50

セトニトリル/水(1:1 v/v)を用いてカラムを洗浄することにより、生成物を溶出した。このHCl塩としての生成物を、次いで、凍結乾燥した。

【0436】

グアニジン骨格部分を含むモルホリノオリゴマーの、pH9における強力なカチオン交換(SCX)精製は、オリゴマーは、骨格および/または末端に少なくとも3つのグアニジン基を含む場合に達成され得る。凍結乾燥の前に、先の工程からの脱塩した溶液を、pH9におけるSCXにより精製して、あらゆる残存する非誘導体化ビペラジン前駆体から、グアニジン修飾された生成物を分離した。液体クロマトグラフィーカラムは、10×62mm(Bio-Chem Valve/Omnifit, Cambridge, United Kingdom)の寸法を有し、そして、Source 15S強力カチオン交換媒体(GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ)を含んだ。移動相の組成は、以下のとおりであった：A)25mM Tris HCl、25%アセトニトリル(v/v)；pH9.0およびB)1.0M塩化ナトリウム、25mM Tris HCl、25%アセトニトリル(v/v)；pH9.0。342cm/時の線形速度を用いた。4カラム容量の移動相Aを用いたカラムの平衡化の後、オリゴマーサンプルを、約5mg/mLの濃度で移動相Aにロードした。次いで、カラムを、移動相Aで2分間洗浄し、その後、22分にわたる0~20%の移動相Bの線形勾配と同時に、画分の回収を開始した。画分は、MALDI-TOF MSにより個々に解析した。選択した画分をプールし、そして、固相抽出により脱塩した。画分のプールを水で5倍に希釈し、そして、Amberchrom CG300Mカラム上にロードした。SPE脱塩は、20mg/mLでのサンプルのカラムへのロードと、3カラム容量の水でのカラムの洗浄とを伴った。次いで、3カラム容量のアセトニトリル/水(1:1 v/v)でカラムを洗浄することにより、生成物を溶出させた。生成物を凍結乾燥し、そして、MALDI-TOF MSおよびSCX HPLCにより解析した。

【0437】

以下のオリゴマーがこの方法の例である：

テイルを持つ樹脂を用いて、5'-(EG3)-CTGGG+ATG+AG+ATCC+ATC+ACT-3'-(H)を調製した。サンプル(1000OD)を、上記の方法により以下に変換した：

5'-(EG3)-CTGGG(Gupip)ATG(Gupip)AG(Gupip)ATCC(Gupip)ATC(Gupip)ACT-3'-(Gu) [M+H]⁺の計算値=7421.5ダルトン。SPEの後に回収した粗生成物(907OD)([M+H]⁺の実測値=7422.6ダルトン)を、pH9のSCXイオン交換により精製して、378ODの生成物を得た([M+H]⁺の実測値=7420.9)。

【0438】

実施例14b：グアニジノアミノ酸トリフルオロ酢酸塩との反応によるグアニジニウム基の導入

グアニジノ酸トリフルオロ酢酸塩の調製

グアニジノ酸を、330mg/mLの濃度で、穏やかに加熱および攪拌しながら、トリフルオロ酢酸中に溶解した。一度完全に溶解すると、溶液を、10倍容量過剰なジエチルエーテルに滴下して、グアニジノ酸のトリフルオロ酢酸塩を沈殿させた。懸濁液を遠心分離し、上清をデカントして捨て、そして、固体を、新しいジエチルエーテル中にトリチュレートした。懸濁液を再度遠心分離し、上清をデカントして捨て、そして、固体を減圧下で乾燥させた。

【0439】

グアニジノ酸(一般的なもの)のモルホリノオリゴマーのアミンへの結合

骨格および/または末端に遊離アミノ基を含むモルホリノオリゴマーを、75mg/mLでDMSO中に溶解させた。別に、100mg/mL(グアニジノ酸に関して)のNMP中に、グアニジノ酸のトリフルオロ酢酸塩または塩酸塩(モルホリノオリゴマーアミンに関して2当量)およびHBTU(アミンに関して1.95当量)を溶解させることによ

って、活性化されたグアニジノ酸溶液を調製した。次いで、DIEA（グアニジノ酸に関して3当量）をグアニジノ酸溶液に加えた。活性化されたグアニジノ酸溶液を簡単に混合して、そして、直ちに、モルホリノオリゴマー溶液に加えた。室温で3時間攪拌した後、この反応物を、冷やした濃水酸化アンモニアで2.33倍に希釈した。必要に応じて、穏やかに加熱および混合しながら、TFEをゆっくりと加え、沈殿した固体を再溶解させた。次いで、反応物を密封した容器において45℃にて18時間加熱し、その後、水で15倍に希釈し、Amberchrom CG300M（Rohm and Haas；Philadelphia，PA）カラムを用いるSPEにより精製した。SPE精製は、20mg/mLでのサンプルのカラムへのロードと、4カラム容量の1M NaClでのカラムの洗浄と、次いで、3カラム容量の水でのカラムの洗浄とを伴った。3カラム容量のアセトニトリル/水（1：1 v/v）を用いてカラムを洗浄することにより、生成物を溶出した。この結合物を凍結乾燥し、MALDI-TOF MSおよびSCX HPLCにより解析した。

10

20

30

40

50

【0440】

以下のオリゴマーが、この方法の例である：

テイルを持たない樹脂を用いて、5'-(H)-C+TTCTGA+TAG+TG-3'-(H)を調製した。サンプル（970OD）を、上記の方法により4-グアニジノブタン酸を用いて以下に変換した：5'-(GuBu)-C(GuBupip)TTCTGA(GuBupip)TAG(GuBupip)TG-3'-(GuBu)、 $[M+H]^+$ の計算値=4541.2ダルトン。SPEの後に回収した粗生成物（820OD）（ $[M+H]^+$ の実測値=4541.9ダルトン）を、pH9のSCXイオン交換により精製して、356ODの生成物を得た（ $[M+H]^+$ の実測値=4542.1）。

【0441】

6-グアニジノヘキサン酸の、モルホリノオリゴマーの二級アミンへの結合

6-グアニジノヘキサン酸は、AlzChem；Trostberg，Germanyから入手した。骨格中に8つの二級アミンを組み込んだ18マーのモルホリノオリゴマー（20μmol、160μmolのアミン基）を、75mg/mLでジメチルスルホキシド（DMSO）中に溶解させた。別に、920μLの1-メチル-2-ピロリジノン（NMP）中に、320μmol（アミンに関して2モル当量）の6-グアニジノヘキサン酸のトリフルオロ酢酸塩および312μmolの2-(1-H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルアンモニウムヘキサフルオロホスフェート（HBUTU）を溶解することによって、活性化された6-グアニジノヘキサン酸溶液を調製した。DIEAを添加した直後に、活性化されたグアニジノ酸溶液をモルホリノオリゴマー溶液に加えた。窒素下、室温にて3時間攪拌した後、4mLの濃水酸化アンモニウムをこの反応物に加えた。穏やかに加熱および混合しながら7mLの2,2,2-トリフルオロエタノール（TFE）を加え、沈殿した固体を再溶解させ、そして、溶液を45℃にて18時間加熱した。次いで、この溶液を、水で200mLに希釈し、そして、上に詳述されるようにAmberchrom CG300M（Rohm and Haas；Philadelphia，PA）カラムを用いる固相抽出（SPE）により精製した。この結合物を凍結乾燥し、MALDI-TOF MSおよびSCX HPLCにより解析した。

【0442】

以下のオリゴマーが、この方法の例である：

テイルを持たない樹脂を用いて、5'-(H)-C+TTCTGA+TAG+TG-3'-(H)を調製した。サンプル（635OD）を、上記の方法により以下に変換した：5'-(GuAhx)-C(GuX)TTCTGA(GuX)TAG(GuX)TG-3'-(GuAhx)、 $[M+H]^+$ の計算値=4681.4ダルトン。SPEの後に回収した粗生成物（563OD）（ $[M+H]^+$ の実測値=4681.2ダルトン）を、pH6.5のSCXイオン交換により精製して、SCX HPLCにより93.3%純度の427ODの生成物を得た（ $[M+H]^+$ の実測値=4682.4）。

【0443】

テイルを持つ樹脂を用いて、5' - (EG3) - CTGGG + ATG + AG + ATCC + ATC + ACT - 3' - (H) を調製した。サンプル (1500OD) を、上記の方法により以下に変換した：

5' - (EG3) - CTGGG (GuX) ATG (GuX) AG (GuX) ATCC (GuX) ATC (GuX) ACT - 3' - (GuAhx)、 $[M+H]^+$ の計算値 = 8100.5 ダルトン。SPE の後に回収した粗生成物 (1486OD) ($[M+H]^+$ の実測値 = 8100.4 ダルトン) を、pH 9 の SCX イオン交換により精製して、700OD の生成物を得た ($[M+H]^+$ の実測値 = 8100.6)。

【0444】

この方法をまた、AcRAhxRAhxB (図20においてAcNH-RAhxRAhx B-OHとより明確に記載される) のようなペプチド酸を骨格アミンに加えるために使用した。

【0445】

実施例 14c：アミノアルカノン酸 (alkanoic acid) の、モルホリノオリゴマーのアミンへの結合と、その後のグアニル化による：

骨格および/または末端に遊離アミノ基を含むモルホリノオリゴマーを、75mg/mL で DMSO 中に溶解させた。別に、100mg/mL (アミノ酸に関して) の NMP 中に、Fmoc-保護アミノ酸 (モルホリノオリゴマーアミンに関して2当量) および HBTU (アミンに関して1.95当量) を溶解させることによって、活性化した Fmoc-アミノアルカノン酸溶液を調製した。次いで、DIEA (アミノ酸に関して3当量) をアミノ酸溶液に加えた。活性化されたアミノ酸溶液を簡単に混合して、そして、直ちに、モルホリノオリゴマー溶液に加えた。室温で3時間撹拌した後、この反応物を、冷やした濃水酸化アンモニアで2.33倍に希釈した。次いで、反応物を密封した容器において45

にて18時間加熱し、その後、水で15倍に希釈し、Amberchrom CG300M (Rohm and Haas; Philadelphia, PA) カラムを用いる SPE により精製した。SPE 精製は、20mg/mL でのサンプルのカラムへのロードと、4カラム容量の1M NaCl でのカラムの洗浄と、次いで、3カラム容量の水でのカラムの洗浄とを伴った。3カラム容量のアセトニトリル/水 (1:1 v/v) を用いてカラムを洗浄することにより、生成物を溶出した。この結合物を凍結乾燥し、MALDI-TOF MS および SCX HPLC により解析した。この生成物は先の実施例と同じようにグアニル化および精製し得る。

【0446】

以下のオリゴマーが、この方法の例である：

テイルを持つ樹脂を用いて、5' - (EG3) - CTGGG + ATG + AG + ATCC + ATC + ACT - 3' - (H) を調製した。サンプル (2000OD) を、上記の方法により以下に変換した：

5' - (EG3) - CTGGG (Ahxpip) ATG (Ahxpip) AG (Ahxpip) ATCC (G) ATC (Ahxpip) ACT - 3' - (Ahx)、 $[M+H]^+$ の計算値 = 7848.3 ダルトン。SPE の後に回収した粗生成物 (1672OD) ($[M+H]^+$ の実測値 = 7847.7 ダルトン)。この物質の一部 (800OD) を、グアニル化により、さらに以下に変換した：

5' - (EG3) - CTGGG (GuX) ATG (GuX) AG (GuX) ATCC (GuX) ATC (GuX) ACT - 3' - (GuAhx)、 $[M+H]^+$ の計算値 = 8100.5 ダルトン。SPE の後に回収した粗生成物 ($[M+H]^+$ の実測値 = 8101.4 ダルトン) を、SCX クロマトグラフィーにより精製して、320OD の最終生成物を生じた。

【0447】

実施例 15：モルホリノオリゴマーへのアルギニンリッチペプチドの導入

骨格および/または末端に遊離アミノ基を含むモルホリノオリゴマーを、75mg/mL で DMSO 中に溶解させた。別に、活性化されたペプチド溶液 (このペプチドは、長さ

10

20

30

40

50

1 ~ 25 アミノ酸残基であり、N末端ブロッキング基（好ましくはアセチル）を含み、そして、グアニジニウム、炭化水素または他の非求核性側鎖を持つアミノ酸から構成された）を調製した。100 mg/mL（アミノ酸に関して）のNMP中に、ペプチド（モルホリノオリゴマーに関して2当量）およびHBTU（アミンに関して1.95当量）を溶解させた。次いで、DIEA（ペプチドに関して2当量）をペプチド溶液に加えた。活性化されたペプチド溶液を簡単に混合して、そして、直ちに、モルホリノオリゴマー溶液に加えた。室温で3時間攪拌した後、この反応物を、冷やした濃水酸化アンモニアで2.33倍に希釈した。必要に応じて、穏やかに加熱および混合しながら、TFEをゆっくりと加え、沈殿した固体を再溶解させた。次いで、反応物を密封した容器において45にて18時間加熱し、その後、水で15倍に希釈し、Amberchrom CG300M（Rohm and Haas; Philadelphia, PA）カラムを用いるSPEにより精製した。SPE精製は、20 mg/mLでのサンプルのカラムへのロードと、4カラム容量の1M NaClでのカラムの洗浄と、次いで、3カラム容量の水でのカラムの洗浄とを伴った。3カラム容量のアセトニトリル/水（1:1 v/v）を用いてカラムを洗浄することにより、生成物を溶出した。この結合物を凍結乾燥し、MALDI-TOF MSおよびSCX HPLCにより解析した。この生成物は先の実施例と同じように精製し得る。

【0448】

実施例16：アルギニンリッチなペプチドおよび骨格のグアニジニウム基を持つモルホリノオリゴマーの調製

実施例14において調製した骨格のグアニジニウム基を持つモルホリノオリゴマーを、実施例15において調製したアルギニンリッチなペプチドと反応させた。この生成物を、実施例13において記載されるように、Source 15S SCXカチオン交換樹脂上で精製した。

【0449】

実施例17：アルギニンリッチなペプチドおよび骨格のアミン基を持つモルホリノオリゴマーの調製

実施例17a：トリフルオロアセタミドとしてのモルホリノオリゴマー二級アミンの保護

3つの骨格中の二級アミンと、3'-トリチルまたはメトキシトリチルを持つ11マーの41 mgのモルホリノオリゴマーを、0.500 mLのジメチルスルホキシド（DMSO）中に溶解させた。このオリゴマー溶液に、8.2 μL（5当量）のN,N-ジイソプロピルエチルアミン（DIEA）を加え、その後、44 μL（5当量）のN-メチルピロリジノン（NMP）中250 mg/mLの4-ニトロフェニルトリフルオロ酢酸溶液を加えた。DIEAおよび4-ニトロフェニルトリフルオロ酢酸の添加を、90分間隔で4回以上繰り返し、次いで、この反応物を、室温で15時間攪拌した。次いで、2,2,2-トリフルオロエタノール（TFE）中50 mMの4-シアノピリジニウムトリフルオロ酢酸の溶液（3.76 mL、20当量）を加え、40分間攪拌することにより、3'-トリチルまたはメトキシトリチル基を除去した。次いで、この反応物を、水で40 mLに希釈し、そして、0.5 mMリン酸ナトリウム緩衝液pH 7.5を滴下することによりpHを7.5に調節した。この生成物を、2 mL Amberchrom CG300Mカラムを用いる固相抽出により単離した。粗反応混合物をカラム上にロードした後、カラムを2カラム容量の水、4カラム容量の15%アセトニトリル/水（v/v）および4カラム容量の20%アセトニトリル/水（v/v）でリンスした。遊離の3'-モルホリンアミンを持つ骨格が保護された生成物を、次いで、3カラム容量の1:1 アセトニトリル/水（v/v）で溶出して、凍結乾燥した。

【0450】

実施例17b：アルギニンリッチなペプチドのモルホリノオリゴマーへの結合と、その後、のオリゴマー骨格アミンの脱保護：

300 μLのNMP中にペプチド酸（22.6 μmol）およびHBTU（22.3 μ

mol) を溶解し、DIEA (40.8 μmol) を加えることにより、活性化されたペプチド溶液を調製した。DIEAを加えた直後に、ペプチド溶液を、0.550 mLのDMSO中の遊離の3'-モルホリンアミンを持つ骨格が保護されたモルホリノオリゴマーの溶液に加えた。室温にて180分置いた後、2 mLの濃水酸化アンモニウムをこの反応物に加えた。4 mLのTFEを加えて得られた沈殿を再溶解させ、そして、おだやかに加熱および混合した。反応物を、45 のオープン中に15時間置いた。次いで、水を加え、反応物を40 mLに希釈した。次いで、この溶液に、2 Mのリン酸を滴下してかき混ぜることにより中和した。この生成物を、2 mL Amberchrom CG300 Mカラムを用いる固相抽出により単離した。粗反応混合物をカラム上にロードした後、カラムを4カラム容量の水でリンスした。生成物を、次いで、3カラム容量の1:1 アセトニトリル/水(v/v)で溶出して、凍結乾燥した。

10

【0451】

以下のオリゴマーが、この方法の例である：

5' - (EG3) - G + TGC + TCA + TGG + TGCACGG + TC - 3' - (Ac(RAhxR)₄AhxB-)、[M+H]⁺の計算値 = 8789.3ダルトン、[M+H]⁺の実測値 = 8789.9ダルトン、エボラに有用

テイルを持つ樹脂を用いて、5' - (EG3) - C + TTCGA + TAG + TG - 3' - (トリチル)を調製した。サンプル(9940D)を、上記の方法により以下に変換した：

20

5' - (EG3) - C(TFApip)TTCGA(TFApip)TAG(TFApip)TG - 3' - (H)、[M+H]⁺の計算値 = 4368.6ダルトン。SPEの後に回収した粗生成物([M+H]⁺の実測値 = 4371.1ダルトン)。このサンプルを、Ac(RAhxR)₄AhxBを用いたアクリル化によりさらに変換して、以下を生じた：

5' - (EG3) - C + TTCGA + TAG + TG - 3' - (Ac(RAhxR)₄AhxB-)、[M+H]⁺の計算値 = 6010.0ダルトン。SPEの後に回収した粗生成物(7700D)([M+H]⁺の実測値 = 6011.6ダルトン)。これを、pH 6.5のSCXイオン交換により精製して、4780Dの生成物を得た([M+H]⁺の実測値 = 6010.7ダルトン、84.7%のSCX HPLC純度)。

30

【0452】

実施例18：モルホリノオリゴマーアミンの還元的メチル化

17 mLの200 mMホウ素酸ナトリウム緩衝液(pH 8.5)中に0.52 gのパラホルムアルデヒドを溶解し、加熱および攪拌することにより、ホルムアルデヒド溶液を調製した。この溶液を、還流コンデンサーを取り付けて、おだやかに沸騰するまで1時間加熱した。この溶液を、次いで、加熱をやめ、反応混合物を室温まで冷却し、そして、メチル化反応の間中、溶液を攪拌し続けた。

【0453】

氷浴上で、10 mLの200 mMホウ素酸ナトリウム緩衝液を冷却し、次いで、その中に0.378 gのホウ化水素ナトリウムを溶解させることによって、1 Mのホウ化水素ナトリウム溶液を調製した。この溶液は、メチル化反応の間中、氷上で冷たく維持した。

40

【0454】

骨格中に5つの二級アミンを組み込み、3'末端に遊離モルホリン二級アミンを組み込んだ33 mg(4.6 μmol)の20マーのモルホリノオリゴマーを、ガラスバイアル中で秤量した。次いで、オリゴマーを、1 mLの200 mMホウ素酸ナトリウム緩衝液(pH 8.5)中に溶解させ、そして、攪拌しながら、氷浴上で0 まで冷却した。上で調製した200 μLのホルムアルデヒド溶液(約43当量)を、モルホリノオリゴマーの攪拌溶液に加えた。ホルムアルデヒドを添加した直後に、40 μLの1 Mホウ化水素ナトリウム溶液(8.7当量)を加えた。ホルムアルデヒドおよびホウ化水素ナトリウムの添加を、30分間隔で5回繰り返した。最後の添加の後、反応物を30分間攪拌し、次いで、4 mgのホウ化水素ナトリウムを加えた。次いで、反応物をさらに2時間攪拌した。水を

50

加えて反応物を 5 mL まで希釈し、そして、1 M リン酸を滴下して、pH を 6.5 に調節した。

【0455】

生成物を、2 mL Amberchrom CG300M カラムを用いる固相抽出により単離した。粗反応混合物をカラム上にロードした後、カラムを 4 カラム容量の水でリンスした。生成物を、次いで、3 カラム容量の 1:1 アセトニトリル/水 (v/v) で溶出して、凍結乾燥した。

【0456】

以下のオリゴマーが、この方法の例である：

テイルを持つ樹脂を用いて、5' - (EG3) - CTGGG + ATG + AG + ATCC + ATC + ACT - 3' - (H) を調製した。サンプル (885OD) を、上記の方法により以下に変換した：

5' - (EG3) - CTGGG (Mepip) ATG (Mepip) AG (Mepip) ATCC (Mepip) ATC (Mepip) ACT - 3' - (メチル)、 $[M+H]^+$ の計算値 = 7253.5 ダルトン。SPE の後に回収した粗生成物 (625OD) ($[M+H]^+$ の実測値 = 7250.5 ダルトン)。

【0457】

実施例 19：無細胞のインビトロ翻訳アッセイ（一般的な方法）

開始 Met コドンである ATG を含まないホタルルシフェラーゼについてのタンパク質コード配列を、プラスミド pCineo (Promega) のマルチブルクローニングサイトにサブクローニングした。その後、エボラウイルス (GenBank アクセション番号 AF086833) の VP35 (-98 ~ +39、塩基 3020 ~ 3157)、エボラウイルス VP24 (-84 ~ +43、すなわち塩基 10261 ~ 10390) またはエボラウイルス L (-80 ~ +49、すなわち、塩基 11501 ~ 11632) の開始コドン領域についての相補的なオリゴヌクレオチドを二連にして、NheI 部位および SalI 部位にサブクローニングした。RNA は、T7 Megascript (Ambion, Inc., Austin, TX) を用いて、T7 プロモーターから生成した。

【0458】

CYP3A2 遺伝子 mRNA を標的とする実験について、ラットの CYP3A2 遺伝子開始コドン領域についてのオリゴヌクレオチドを調製し (GenBank アクセション番号 U09742; -25 ~ +22、すなわち塩基 44 ~ 90)、そして、上述のように pCineo 中にクローニングした。C 型肝炎ウイルスの開始コドン領域の標的とする実験については、HCV の開始コドン領域をコードするオリゴヌクレオチドを調製し (GenBank アクセション番号 AF009606; -20 ~ +31、すなわち塩基 322 ~ 372)、そして、上述のように、pCineo 中にクローニングした。

【0459】

異なる濃度の PMO を 6 nM の RNA と混合することにより、無細胞のインビトロ翻訳アッセイを行った。次いで、この混合物を、ウサギの網状赤血球翻訳系 (Promega, Inc.) に加え、生成されるルシフェラーゼタンパク質の量を、ルミノメーターにおいて測定される発光により決定した。EC₅₀ 値を決定するためのシグモイド曲線を、例えば、図 4 に示されるように、観察されたルシフェラーゼ発光 (PMO の濃度ごとに n = 3) を、PMO に対してプロットして生成した。

【0460】

実施例 20：細胞培養におけるスプライシング補正・翻訳アッセイ（一般的な方法）

HeLa 細胞を、プラスミド pLuc/705 (このプラスミドは、ヌクレオチド 705 において変異されたヒト - グロブリンイントロンで中断されたルシフェラーゼ遺伝子を有し、したがって、不正確なスプライシングを起こす) で安定にトランスフェクトした。誤ったスプライシングを受けた転写物は機能的なレポータータンパク質をもたらさない。野生型のスプライシングが、スプライシングを補正するアンチセンスオリゴマーで誘導されない限り、レポーターシグナルは観察されない。有効に送達される場合、705

10

20

30

40

50

スプライシング部位を標的とするアンチセンスオリゴマー（配列番号 286 を持つ）は、スプライシングを補正し、そして、ルシフェラーゼの発現を可能にする。

【0461】

このアッセイは、オリゴマーが細胞および核に入り、その後、プレmRNAの不正確なスプライシングをブロックし、したがって、レポーター遺伝子の発現をもたらす能力を測定する。このアッセイにおいて、オリゴマーは、細胞および細胞の核に入ってシグナルを生じなければならないので、このアッセイは、取り込みおよび送達部分の有効性、ならびに、結合オリゴマーのアンチセンス活性を測定するために有用である。

【0462】

HeLa pLuc705細胞における、上記のような種々のオリゴマーおよび輸送体 - オリゴマー結合体の取り込みおよび活性を、蛍光分光法により研究した。実験は、一般に三連で行った。一般的な手順によれば、特定の濃度の試験物質を含む培養培地を、48ウェルプレートにプレーティングしたHeLa pLuc705細胞に加えた。インキュベーションした後、これらの細胞をPBSで3回洗浄し、そして、細胞溶解物を回収した。30μlの細胞溶解物と50μlのルシフェラーゼアッセイ試薬(LAR)(Promega, WI)とを混合し、そして、Flx 800マイクロプレート蛍光/発光リーダー(Bio-tek, Vermont)を用いて発光を測定することにより、生成される機能的なルシフェラーゼの量を決定した。相対的な光単位(relative light unit)を、製造業者の手順(Pierce, IL)に従うニシンコニン酸(BCA)法(bicinchoninic acid method)により決定したタンパク質のμgに対して標準化した。

10

20

【0463】

実施例21. カチオン性結合を持つPMOを用いたアンチセンス活性の増加

配列番号9(+T+TCAACC+T+TG AAACC+T+TGC G)および配列番号10(GCCA+TGG+T+T+T+T+T+TC+TCAGG)について配列表に示されるようなオリゴマー結合のサブセットのためのカチオン性結合を用いて、2種のPMOを合成した。これらのオリゴマーは、図1Bに示されるようなカチオン性結合(1-ピペラジノホスホロアミデート)を、「+」で示される位置に組み込んだ。これらの2種のPMOは、EBOV VP24 mRNAを標的とする。無細胞翻訳アッセイは、入力RNAとしてVP24:ルシフェラーゼmRNAを用いて行った。カチオン性結合を持つPMOおよびカチオン性結合を持たないPMOを、ルシフェラーゼ発現を阻害する能力について比較し、結果を図3に示した。同じ塩基配列を持つ無電荷PMOと比較すると、6~8の間のカチオン性結合を持つPMOは、このアッセイにおいて10倍~100倍の間の増加したアンチセンス活性を示した。

30

【0464】

実施例22. オリゴマーで処理した動物のエボラウイルス感染

8~10週齢の両方の性別のC57Bl/6マウスを、National Cancer Institute, Frederick Cancer Research and Development Center(Frederick, MD)から入手した。マウスを、小型隔離ケージで飼育し、オートクレーブした水と飼料を自由に与えた。マウスを、リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)中に希釈した約1000pfuのマウスに適合させたエボラウイルス(Bray, Davisら、1998)の腹腔内注射によりチャレンジした。マウスを、エボラウイルスチャレンジの24時間前および4時間前の、2回の等容量に分けた、合計100μgのPMOまたは+PMOのいずれかで処置した。C57Bl/6マウスを、マウスに適合させたエボラウイルス(Bray, Davisら、1998)の1000プラーク形成単位で腹腔内にチャレンジした。結果は、上記のとおりであり、そして、図6において図式的に示す。

40

【0465】

Hartleyのモルモットを、1000pfuのモルモットに適合させたエボラウイルス(Connolly, Steeleら、1999)での皮下チャレンジの24時間前

50

または24時間後もしくは96時間後に、20mg/kgまでの、VP24-AUG、L-AUGおよびVP35のPMOまたは+PMO（それぞれ、配列番号1、5および11または287、288および289）の各々で腹腔内処置した。

【0466】

致死的なエボラウイルスチャレンジのための非ヒト霊長類モデルには、PMO処置の前に1000pfuのEBOV-Zaire（1995株）で筋肉内注射によりチャレンジした、体重3～4kgの雌性のrhesus macaquesを用いた。これらのサルを、1日目～10日目に、非経口経路で処置した。PMOの用量は、2つの薬物の組み合わせにおける2種のPMO（配列番号288および289）の各々について20mg/kgであった。

10

【0467】

【表 2 2 - 1】

配列表

AVI 参照番号	名称	配列 (5'→3')	配列番号
エボラウイルス標的化配列			
4539	VP35-AUG	CCTGCCCTTTGTTCTAGTTG	1
06-131	VP35-2+	CCTGCCCTTTGTTCTAG+T+TG	2
06-132	VP35-4a+	CCTGCCCTTTG+T+TCTAG+T+TG	3
06-133	VP35-4b+	CC+TGCCC+TTTGT+TCTAGT+TG	4
537	VP24-AUG	GCCATGGTTTTTCTCAGG	5
06-125	VP24-2+	GCCATGGTTTTT+TC+TCAGG	6
06-126	VP24-4a+	GCCA+TGGT+TTT+TTC+TCAGG	7
06-127	VP24-4b+	GCCATGGT+TT+TT+TC+TCAGG	8
05-166	VP24 5'trm6+	+T+TCAACC+T+TGAAACC+T+TGCG	9
05-164	VP24-8+	GCCA+TGG+T+T+T+T+T+TC+TCAGG	10
4538	L-AUG	TGGGTATGTTGTGTAGCCAT	11
06-125	L-2+	TGGGTATGTTGTG+TAGCCA+T	12
06-126	L-4a+	+TGGGTA+TGTTGTG+TAGCCA+T	13
06-127	L-4b+	TGGGTATG+TTG+TG+TAGCCA+T	14
05-165	VP24 5'trm	TTCAACCTTGAAACCTTGCG	15
コントロール配列			
183	DSscr	AGTCTCGACTTGCTACCTCA	16
542	Scr	TGTGCTTACTGTTATACTACTC	17
C 型肝炎ウイルス標的化配列			
4065	HCV-AUG	GTGCTCATGGTGCACGGTC	18
06-0143	HCV-2a+	G+TGC+TCATGGTGCACGGTC	19
06-0144	HCV-2b+	GTGCTCATGGTGC+ACGG+TC	20
06-0145	HCV-2c+	G+TGCTCATGGTGCACGG+TC	21
06-0146	HCV-2d+	GTGCTC+ATGGTGC+ACGGTC	22
06-0147	HCV-2e+	GTGCTCA+TGG+TGCACGGTC	23
06-0148	HCV-2f+	GTGCTC+A+TGGTGCACGGTC	24
06-0149	HCV-3g+	GTGCTCATGG+TGC+ACGG+TC	25
06-0150	HCV-3h+	GTGCTC+ATGGTGC+ACGG+TC	26
06-0151	HCV-3i+	G+TGCTCATGG+TGCACGG+TC	27
06-0152	HCV-4j+	GTGCTCA+TGG+TGC+ACGG+TC	28
06-0153	HCV-4k+	G+TGCTCA+TGG+TGCACGG+TC	29
06-0154	HCV-4l+	G+TGCTC+ATGGTGC+ACGG+TC	30
06-0155	HCV-5m+	G+TGC+TCA+TGG+TGCACGG+TC	31
06-0156	HCV-5n+	G+TGCTC+ATGG+TGC+ACGG+TC	32
06-0157	HCV-6o+	G+TGC+TCA+TGG+TGC+ACGG+TC	33
06-0158	HCV-7p+	G+TGC+TC+A+TGG+TGC+ACGG+TC	34
CYP3A2 標的化配列			
4472	CYP3A2	GAGCTGAAAGCAGGTCCATCCC	35
06-0136	CYP3A2-3a+	GAGCTGAAAGCAGG+TCC+A+TCCC	36
06-0137	CYP3A2-3b+	G+AGC+TG+AAAGCAGGTCCATCCC	37
06-0138	CYP3A2-3c+	GAGCTG+AAAGC+AGGTCC+ATCCC	38

【表 2 2 - 2】

06-0139	CYP3A2-3d+	GAGC+TGAAAGCAGG+TCCA+TCCC	39
06-0140	CYP3A2-3e+	GAGCTG+A+A+AGCAGGTCCATCCC	40
06-0141	CYP3A2-4f+	G+AGCTGA+AAGC+AGGTCC+ATCC C	41
06-0142	CYP3A2-6g+	G+AGCTG+A+A+AGC+AGGTCC+ATC CC	42
4126	c-Myc	ACGTTGAGGGGCATCGTCGC	43
4SA2ex	huCTLA	GCAGGCTGGGCCACGTGCATTG	44
4SA2sj	huCTLA	CACGTGCATTGCTAGCATGG	45
4SA2bp	huCTLA	CTAGCATGGAAAAGCCAAAG	46
4SA2in	huCTLA	GGAAGTCAGTGAAGTCATGC	47
AUG1	huCD86	GTTACTCAGTCCCATAGTGCTG	48
AUG2	huCD86	CCATAGTGCTGTCACAAATG	49
AUG3	huCD86	GAATGTTACTCAGTCCCATAG	50
Ex6sa	huCD86	GAGGCTGAGGGTCCTCAAGCT	51
Ex6sd	huCD86	CACATTTATAAGAGTTGCGAGGC	52
Ex7sa	huCD86	TCCCTCTCCATTGTGTTGGTTC	53
Ex7sd	huCD86	CTTTTCTTGGTCTGTTCACTC	54
3'32	Picornaviridae	RYGGRACCRACCTACTTTGGGTGTCC GTGTTTC	55
5'32	Picornaviridae	TCCTCCGGCCCCCTGAATGYGGCTAA YCYAAC	56
3'-CS	Flaviviridae	CATATTGA	57
mFlav	Flaviviridae	TCCCAGGTGTCAATATGCTGTT	58
c-Myc 標的	ヒト c-Myc	CGCCGCTGCCAGGACCCGCTTCTCT GAAAGGCTCTCCTTGCACTGCTTA GACGCTGGATTTTTTTCGGGTAGTG <u>GAAAACCAGCAGCCTCCCGCGACG</u> <u>ATGCCCCCTCAACGTTAGCTTCACCA</u> A	59
c-MycB	hu-c-Myc	GGAGGCTGCTGGTTTTCCAC	60
c-MycC	hu-c-Myc	GGCATCGTCGCGGGAGGCTC	61
PV	ポリオウイルス	CCTGAGCACCCATTATGATAC	62
HAV	A 型肝炎	CCTTGTCTAGACATGTTCAATTATT	63
HRV-14	ライノウイルス 14	TTGAGCGCCCATGATAACAA	64
HRV-16	ライノウイルス 16	TTGAGCGCCCATGATAACAA	65
HRV-1B	ライノウイルス 1B	CTGGGCACCCATGATGCCAA	66
Pan-1a	ベシウイルス	GAGCCATAGCTCAAATTCTC	67
Pan-1b	ベシウイルス	TAGCTCAAATTCTCATTAC	68
Pan-1b	ベシウイルス	GAGCGTTTGAGCCATAGCTC	69
PEC	ブタカリシウイルス	GACGGCAATTAGCCATCACG	70
NV	ノロウイルス	CGACGCCATCATCATTCAC	71
FCV	ネコカリシウイルス	CAGAGTTTGAGACATTGTCTC	72
HEVa	C 型肝炎ウイルス	CCTTAATAAACTGATGGGCCTCC	73
HEVb	C 型肝炎ウイルス	CTGATGGGCCTCCATGGC	74

【表 2 2 - 3】

HCV	HCV 標的	AAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTTGG GTCGCGAAAAGGCCTTGTGGTACTGC CTGATAGGGTGCTTGCAGGTGCCCC GGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCA TGAGCACGAATCCTAAACCTCAAAG	75
HCV-IRES	HCV	GGCCTTTCGCGACCCAACAC	76
8070			
SLEV	St. Louis 脳脊髄炎 ウイルス	AGATGTTTCGCGTCGGTGAGCGGAGA GGAAACAGATTTCT	77
JEV	日本脳炎ウイルス	AGAAGTTTATCTGTGTGAACCTCTT GGCTTAGTATCGTTG	78
MVEV	マリーバレー脳脊 髄炎ウイルス	AGACGTTTCATCTGCGTGAGCTTCCG ATCTCAGTATTGTTT	79
WNV	西ナイル熱ウイル ス	AGTAGTTCGCCTGTGTGAGCTGACA AACTTAGTAGTGTTT	80
YFV	黄熱病ウイルス	AGTAAATCCTGTGTGCTAATTGAGG TGCATTGGTCTGCAA	81
DEN2	デング熱2型	AGTTGTTAGTCTACGTGGACCGACA AAGACAGATTCTTTG	82
HCV	C 型肝炎ウイルス	GCCAGCCCCCTGATGGGGGCGACAC TCCACCATGAATCAC	83
TVEV	ダニ媒介脳脊髄炎 ウイルス	AGATTTTCTTGACGTGCATGCGTTT GCTTCGGACAGCAT	84
OHFV	オムスク出血性熱 ウイルス	AGATTTTCTTGACGTGCGTGCGCT TGCTTCAGACAGCAA	85
POW	ポーワッサンウイ ルス	AGATTTTCTTGACGTGTGTGCGGG TGCTTTAGTCAGTGT	86
SLEV _a	St. Louis 脳脊髄炎 ウイルス	ACCGACGCGAACATCNC	87
SLEV _b	St. Louis 脳脊髄炎 ウイルス	TCCTCTCCGCTCACCGACGC	88
JEV _a	日本脳炎ウイルス	TCACACAGATAAACTTCT	89
JEV _b	日本脳炎ウイルス	AAGCCAAGAAGTTCACACAG	90
MVEV _a	マリーバレー脳脊 髄炎ウイルス	TCACGCAGATGAACGTCT	91
MVEV _b	マリーバレー脳脊 髄炎ウイルス	GAGATCGGAAGCTCACGCAG	92
WNV _a	西ナイル熱ウイル ス	GCTCACACAGGCGAACTACT	93
WNV _b	西ナイル熱ウイル ス	TAAGTTTGTGAGCTCACACAG	94
YFV _a	黄熱病ウイルス	CAATTAGCACACAGGATTTACT	95
YFV _b	黄熱病ウイルス	TTGCAGACCAATGCACCTCA	96
DEN2 _a	デング熱2型	GTCCACGTAGACTAACAAC	97
DEN2 _b	デング熱2型	GTCTTTGTGCGTCCACGTAG	98
HCV _a	C 型肝炎ウイルス	CCCATCAGGGGGCTGGC	99

【表 2 2 - 4】

HCVb	C型肝炎ウイルス	TGGAGTGTGCGCCCCATCAG	100
TVEVa	ダニ媒介脳脊髄炎ウイルス	ATGCACGTGCAAGAAAATCT	101
TBEVb	ダニ媒介脳脊髄炎ウイルス	ATGCTGTCCGAAGCAAACGC	102
OHFVa	オムスク出血性熱ウイルス	CACGCACGTGCAAGAAAATCT	103
OHFVb	オムスク出血性熱ウイルス	TGAAGCAAGCGCACGCACGT	104
POWa	ポーワッサンウイルス	ACACACGTGCAAGAAAATCT	105
POWb	ポーワッサンウイルス	ACACTGACTAAAGCACCCGC	106
PV	ポリオウイルス	TTAAAACAGCTCTGGGGTTGTACCC ACCCACAGAGGCCAC	107
HEV-A	ヒトエンテロウイルス A	TTAAAACAGCCTGTGGGTGTACCC ACCCACAGAGGCCAC	108
HEV-B	ヒトエンテロウイルス B	TTAAAACAGCCTGTGGGTGTTCCT ACCCACAGAGGCCATT	109
HEV-C	ヒトエンテロウイルス C	TTAAAACAGCTCTGGGGTTGCTCCC ACCCACAGAGGCCAC	110
HEV-D	ヒトエンテロウイルス D	TTAAAACAGCTCTGGGGTTGTTCCT ACCCACAGAGGCCAC	111
HEV-E	ヒトエンテロウイルス E	GAGTGTTCACCAACAGGCCAC TGGGTGTGTACTCT	112
BEV	ウシエンテロウイルス	TTAAAACAGCCTGGGGGTGTACCC ACCCCTGGGGGCCAC	113
HRV-89	ヒトラノウイルス 89	TTAAAACAGCCTGGGGGTGTTCCT ACTCACTCCACCCAT	114
HRV-B	ヒトラノウイルス B	TTAAAACAGCGGATGGGTATCCAC CATTCGACCCATTGG	115
FMDV	口蹄疫ウイルス	TTGAAAGGGGGCGCTAGGGTTTCAC CCCTAGCATGCCAAC	116
HAV	A型肝炎	TTCAAGAGGGGTCTCCGGGAATTC CGGAGTCCCTCTTGG	117
PVa	ポリオウイルス	GGTACAACCCACAGAGCTGTTTAA	118
PVb	ポリオウイルス	GTGGGCCTCTGGGGTGGGTA	119
HEV-A1	ヒトエンテロウイルス A	CAACCCACAGGCTGTTTAA	120
HEV-A2	ヒトエンテロウイルス A	GTGGGCCCTGTGGGTGGGTA	121
HEV-B1	ヒトエンテロウイルス B	CAACCCACAGGCTGTTTAA	122
HEV-B2	ヒトエンテロウイルス B	AATGGGCCTGTGGGTGGGAA	123
HEV-C1	ヒトエンテロウイルス	CAACCCACAGAGCTGTTTAA	124

【表 2 2 - 5】

	ス C		
HEV-C2	ヒトエンテロウイルス C	GTGGGCCTCTGGGGTGGGAG	125
HEV-D1	ヒトエンテロウイルス D	CAACCCCAGAGCTGTTTTAA	126
HEV-D2	ヒトエンテロウイルス D	GTGGGCCTCTGGGGTGGGAA	127
HEV-E	ヒトエンテロウイルス E	CCTGTTGGGTGGGAACACTC	128
HEV-E	ヒトエンテロウイルス E	AGAGTACAACACCCAGTGGG	129
BEVa	ウシエンテロウイルス	CAACCCCCAGGCTGTTTTAA	130
BEVb	ウシエンテロウイルス	GTGGGCCCCAGGGGTGGGTA	131
HRV-89a	ヒトラノウイルス 89	CAACCCACTCCCAGTTTTAA	132
HRV-89b	ヒトラノウイルス 89	ATGGGTGGAGTGAGTGGGAA	133
HRV-B1	ヒトラノウイルス B	ATACCCATCCGCTGTTTTAA	134
HRV-B2	ヒトラノウイルス B	CCAATGGGTCTGAATGGTGGG	135
FMDVa	口蹄疫ウイルス	AACCCTAGCGCCCCCTTTCAA	136
FMDVb	口蹄疫ウイルス	GTTGGCATGCTAGGGGTGAA	137
HAVa	A 型肝炎	TCCCGGAGACCCCTCTTGAA	138
HAVb	A 型肝炎	CCAAGAGGGACTCCGGAAAT	139
FCV	ネコカリシウイルス	GTAAAAGAAATTTGAGACAATGTCT CAAACCTCTGAGCTTC	140
CaCV	イヌカリシウイルス	GTAAATGAGAAATGGCTTCTGCCAT CGCTCTCTCGAGCTC	141
PoCV	ブタ腸カリシウイルス	GTGATCGTGATGGCTAATTGCCGTC CGTTGCCTATTGGGC	142
CVNB	カリシウイルス株 NB	GTGATTTAATTATAGAGAGATAGTG ACTTTCACCTTTTCTT	143
NV	ノーウォークウイルス	GTGAATGATGATGGCGTCAAAGA CGTCGTTCCCTACTGCT	144
FCVa	ネコカリシウイルス	TTGTCTCAAATTTCTTTTAC	145
FCVb	ネコカリシウイルス	GAAGCTCAGAGTTTGAGACA	146
CaCVa	イヌカリシウイルス	AGAAGCCATTTCTCATTAAC	147
CaCVb	イヌカリシウイルス	GAGCTCGAGAGAGCGATGGC	148
PoCVa	ブタ腸カリシウイルス	CAATTAGCCATCACGATCAC	149
PoCVb	ブタ腸カリシウイルス	GGCAACGGACGGCAATTAGC	150

【表 2 2 - 6】

CVNBa	カリシウイルス株 NB	TCTCTCTATAATTAAATCAC	151
CVNBb	カリシウイルス株 NB	AAAGTCACTATCTCTCTATA	152
NVa	ノーウオークウイル ス	TTGACGCCATCATCATTAC	153
NVb	ノーウオークウイル ス	AGCAGTAGGAACGACGTCTT	154
HEV	E 型肝炎ウイルス	GCCATGGAGGCCCATCAGTTTATTA AGGCTCCTGGCATCA	155
HEVa	E 型肝炎ウイルス	AACTGATGGGCTCCATGGC	156
HEVb	E 型肝炎ウイルス	TGATGCCAGGAGCCTTAATA	157
RUBV	風疹ウイルス	ATGGAAGCTATCGGACCTCGCTTAG GACTCCCATTCCCAT	158
EEEV	東部ウマ脳脊髄炎	ATAGGGTACGGTGTAGAGGCAACC ACCCTATTTCCACCTA	159
WEEV	西部ウマ脳脊髄炎	ACCCTACAACTAATCGATCCAATA TGAAAGAATTACAG	160
VEEV	ベネズエラウマ脳 脊髄炎	ATGGGCGGCGCAAGAGAGAAGCCC AAACCAATTACCTACC	161
RUBVa	風疹ウイルス	CGAGGTCCGATAGCTTCCAT	162
RUBVb	風疹ウイルス	ATGGGAATGGGAGTCCTAAG	163
EEEVa	東部ウマ脳脊髄炎	GCCTCTACACCGTACCCTAT	164
EEEVb	東部ウマ脳脊髄炎	TAGGTGGAAATAGGGTGGTT	165
WEEVa	西部ウマ脳脊髄炎	GATCGATTAGTTTGTAGGGT	166
WEEVb	西部ウマ脳脊髄炎	CGTGAATTCTTTCCATATTG	167
VEEVa	ベネズエラウマ脳 脊髄炎	TTCTCTCTTGCGCCGCCCAT	168
VEEVb	ベネズエラウマ脳 脊髄炎	GGTAGGTAATTGGTTTGGGC	169
SARS-CoV	SARS コロナウイル ス	ATATTAGGTTTTTACCTACCCAGGA AAAGCCAACCAACCT	170
PEDV	ブタ流行性下痢ウ イルス	ACTTAAAAAGATTTTCTATCTACGG ATAGTTAGCTCTTTT	171
TGEV	伝染性胃腸炎ウイル ス	ACTTTTAAAGTAAAGTGAGTGTAGC GTGGCTATATCTCTT	172
BCoV	ウシコロナウイル ス	GATTGCGAGCGATTTGCGTGCGTGC ATCCCGCTTCACTGA	173
HCoV-229E	ヒトコロナウイルス 229E	ACTTAAGTACCTTATCTATCTACAG ATAGAAAAGTTGCTT	174
MHV	マウス肝炎	TATAAGAGTGATTGGCGTCCGTACG TACCCTCTCAACTCT	175
PRRSV	ブタ生殖器系およ び呼吸器系症候群 ウイルス	ATGACGTATAGGTGTTGGCTCTATG CCTTGGCATTGTAT	176
SARS-CoVa	SARS コロナウイル	GGTAGGTAACCACTAATAT	177

【表 2 2 - 7】

	ス		
SARS-CoVb	SARS コロナウイルス	AGGTTGGTTGGCTTTTCCTG	178
PEDVa	ブタ流行性下痢ウイルス	GATAGAAAATCTTTTAAAGT	179
PEDVb	ブタ流行性下痢ウイルス	AAAAGAGCTAACTATCCGTA	180
TGEVa	伝染性胃腸炎ウイルス	ACTCACTTTACTTTAAAAGT	181
TGEVb	伝染性胃腸炎ウイルス	GCCACGCTACACTCACTTTA	182
BCoVa	ウシコロナウイルス	CACGCAAATCGCTCGCAATC	183
BCoVb	ウシコロナウイルス	TCAGTGAAGCGGGATGCACG	184
HCoV-229Ea	ヒトコロナウイルス 229E	GATAGATAAGGTACTTAAGT	185
HCoV-229Eb	ヒトコロナウイルス 229E	AAGCAACTTTTCTATCTGTA	186
MHVa	マウス肝炎	CGGACGCCAATCACTCTTATA	187
MHVb	マウス肝炎	GAGTTGAGAGGGTACGTACGGA	188
PRRSVa	ブタ生殖器系および呼吸器系症候群ウイルス	CATAGAGCCAACACCTATACG	189
PRRSVb	ブタ生殖器系および呼吸器系症候群ウイルス	ATACAAATGCCAAGGCATAG	190
HAsTV	ヒトアストロウイルス	CCAAGAGGGGGGTGGTGATTGGCCTTTGGCTTATCAGTGT	191
EAV	ウマ動脈炎	GCTCGAAGTGTGTATGGTGCCATATACGGCTCACCACCAT	192
HAsTVa	ヒトアストロウイルス	AATCACCACCCCCCTCTTGG	193
HAsTVb	ヒトアストロウイルス	GCCAAAGGCCAATCACCACC	194
EAVa	ウマ動脈炎	GCACCATACACACTTCGAGC	195
EAVb	ウマ動脈炎	ATGGTGGTGAGCCGTATATG	196
8063			
Vif-AUGc	HIV-1 Vif 標的	GACTATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGTTGT	197
TARc	HIV-1 TAR 標的	GACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCGGCTAAC	198
U3Rc	HIV-1 U3R 標的	CCTGTACTGGGTCTCTCTGG	199
Vif-AUG4	HIV-1	CCTGCCATCTGTTTTCCATAATC	200
Vif-AUG56	HIV-1	CACCTGCCATCTGTTTTCCATA	201
Vif-AUG4+	HIV-1	CCTGCC+ATC+TGT+TTTCC+ATA+ATC	202

【表 2 2 - 8】

Vif-AUG56+	HIV-1	CACCTGCCATCTGT+T+TTCC+A+TA	203
Tar1	HIV-1	GCTCCCAGGCTCAGATCTGGTC	204
Tar2	HIV-1	GTTAGCCAGAGAGCTCCCAGGC	205
U3R	HIV-1	CCAGAGAGACCCAGTACAGG	206
8064			
HCoV-229Ec	HCoV-229E 標的	CUACUUUUCUCAACUAAACGAAAU	207
HCoV-OC43c	HCoV-OC43 標的	GAUCUUUUUGUAAUCUAAACUUUA	208
SARS-CoVc	SARS-CoV 標的	GAUCUGUUCUCUAAACGAACUUUA	209
HCoV-229Ea	HCoV-229E TRS	ATTTCTGTTTAGTTGAGAAAAG	210
HCoV-229Eb	HCoV-229E TRS	GTTTAGTTGAGAAAAGTAG	211
HCoV-OC43	HCoV-OC43 TRS	TAAAGTTTAGATTACAAAAAG	212
SARS-CoVa	SARS-CoV TRS	TAAAGTTCGTTTAGAGAACAG	213
SARS-CoVb	SARS-CoVTRS	GTTCGTTTAGAGAACAGATC	214
8065			
CD86 mRNA	ヒト CD86	AGGAGCCTTAGGAGGTACGGGGAG CTCGCAAATACTCCTTTTGGTTTATT CTTACCACCTTGCTTCTGTGTTCCCT GGGAAATGCTGCTGTGCTTATGCATC TGGTCTCTTTTGGAGCTACAGTGG ACAGGCATTTGTGACAGCACTATGG GACTGAGTAACATTCTCTTTGTGAT GGCCTTCCTGCTCTCTGGTGCTGCTC CTCTGAAGATTCAAGCTTATTTCAA TGAGACTGCAGACCTGCCATGCCAA TTTGCAAACCTCTCAAAACCAAAGCC TGAGTGAGCTAGTAGTATTTTGGCA GGACCAGGAAAACCTGGTTCTGAAT GAGGTATACTTAGGCAAAGAGAAA TTTGACAGTGTTCAATCCAAGTATA TGGGCCGCACAAGTTTGTATTCGGA CAGTTGGACCCTGAGACTTCACAAT CTTGAGATCAAGGACAAGGGCTTGT ATCAATGTATCATCCATCACAAAAA GCCCACAGGAATGATTTCGCATCCAC CAGATGAATTCTGAACTGTCAGTGC TTGCTAACTTCAGTCAACCTGAAAT AGTACCAATTTCTAATATAACAGAA AATGTGTACATAAATTTGACCTGCT CATCTATACACGGTTACCCAGAACC TAAGAAGATGAGTGTTTTGCTAAGA ACCAAGAATTCAACTATCGAGTATG ATGGTATTATGCAGAAATCTCAAGA TAATGTACAGAACTGTACGACGTT TCCATCAGCTTGTCTGTTTCATTCCC TGATGTTACGAGCAATATGACCATC TTCTGTATTCTGGAAACTGACAAGA CGCGGCTTTTATCTTCACCTTTCTCT ATAGAGCTTGAGGACCCTCAGCCTC CCCCAGACCACATTCTTGATTAC AGCTGTACTTCCAACAGTTATTATA TGTGTGATGGTTTTCTGTCTAATTCT	215

10

20

30

40

【表 2 2 - 1 0】

		ACAGATCACCCGGGGCTTACTTAGC CTACAGATGTCCTACGGGAACGTGG GCTGGCCCAGCATAGGGCTAGCAA ATTTGAGTTGGATGATTGTTTTGCT CAAGGCAACCAGAGGAACTTGCA TACAGAGACAGATATACTGGGAGA AATGACTTTGAAAACCTGGCTCTAA GGTGGGATCACTAAGGGATGGGGC AGTCTCTGCCCCAACATAAAGAGAA CTCTGGGGAGCCTGAGCCACAAAA ATGTTCTTTTATTTTATGTAAACCCT CAAGGGTTATAGACTGCCATGCTAG ACAAGCTTGTCCATGTAATATTCCC ATGTTTTTACCCTGCCCTGCCTTGA TTAGACTCCTAGCACCTGGCTAGTT TCTAACATGTTTTGTGCAGCACAGT TTTAATAAATGCTTGTTACATTC	
CD86 AUG	ヒト CD86 AUG 標的	CATTTGTGACAGCACTATGGGACTG AGTAACATTCTCTTTGTGATG	216
Ex6sa	huCD86 Ex6 標的	AGCTTGAGGACCCTCAGCCTC	217
Ex6sd	huCD86 Ex6 標的	GCCTCGCAACTCTTATAAATGTG	218
Ex7sa	huCD86 Ex7 標的	GAACCAACACAATGGAGAGGGA	219
Ex7sd	huCD86 Ex7 標的	GAGTGAACAGACCAAGAAAAG	220
8071			
PB1-AUG	FluA PB1-AUG 標的	AGCGAAAGCAGGCAAACCAUUUGA AUGGAUGUCAAUCCGACCUUACUU UU	221
NP-v3'	FluA NP-3'term 標的	AGTGATTATCTACCCTGCTTTTGCT	222
AVI-4164	NP-3'-Term	AGCAAAAGCAGGGTAGATAATC	223
AVI-4235	PB1-AUG	GACATCCATTCAAATGGTTTG	224
8073			
ミオスタチン mRNA	ヒトミオスタチン mRNA	AGATTCACTGGTGTGGCAAGTTGTC TCTCAGACTGTACATGCATTAAAAT TTTGCTTGGCATTACTCAAAAGCAA AAGAAAAGTAAAAGGAAGAAACAA GAACAAGAAAAAGATTATATTGA TTTTAAAATCATGCAAAAAGTCAA CTCTGTGTTTATATTTACCTGTTTAT GCTGATTGTTGCTGGTCCAGTGGAT CTAAATGAGAACAGTGAGCAAAAA GAAAATGTGGAAAAAGAGGGGCTG TGTAATGCATGTACTTGGAGACAAA ACACTAAATCTTCAAGAATAGAAGC CATTAAAGATACAAATCCTCAGTAAA CTTCGTCTGGAAACAGCTCCTAACA TCAGCAAAGATGTTATAAGACAAC TTTACCCAAAGCTCCTCCACTCCGG GAACTGATTGATCAGTATGATGTCC AGAGGGATGACAGCAGCGATGGCT CTTTGGAAGATGACGATTATCACGC	225

【表 2 2 - 1 1】

	<p> TACAACGGAAACAATCATTACCATG CCTACAGAGTCTGATTTTCTAATGC AAGTGGATGGAAAACCCAAATGTT GCTTCTTTAAATTTAGCTCTAAAAT ACAATACAATAAAGTAGTAAAGGC CCAACATATGGATATATTTGAGACCC GTCGAGACTCCTACAACAGTGTTTG TGCAAATCCTGAGACTCATCAAACC TATGAAAGACGGTACAAGGTATACT GGAATCCGATCTCTGAAACTTGACA TGAACCCAGGCACTGGTATTTGGCA GAGCATTGATGTGAAGACAGTGTTG CAAAATTGGCTCAAACAACCTGAAT CCAACCTAGGCATTGAAATAAAAGC TTTAGATGAGAATGGTCATGATCTT GCTGTAACCTTCCCAGGACCAGGAG AAGATGGGCTGAATCCGTTTTTAGA GGTCAAGGTAACAGACACACCAAAA AAGATCCAGAAGGGATTTTGGTCTT GACTGTGATGAGCACTCAACAGAAT CACGATGCTGTCGTTACCCTCTAAC TGTGGATTTTGAAGCTTTTGGATGG GATTGGATTATCGCTCCTAAAAGAT ATAAGGCCAATTACTGCTCTGGAGA GTGTGAATTTGTATTTTTACAAAAA TATCCTCATACTCATCTGGTACACC AAGCAAACCCAGAGGTTTCAGCAG GCCCTTGCTGTACTCCCACAAAGAT GTCTCCAATTAATATGCTATATTTTA ATGGCAAAGAACAATAATATATG GGAAAATTCCAGCGATGGTAGTAG ACCGCTGTGGGTGCTCATGAGATTT ATATTAAGCGTTCATAACTTCCTAA AACATGGAAGGTTTTCCCCTCAACA ATTTTGAAGCTGTGAAATTAAGTAC CACAGGCTATAGGCCTAGAGTATGC TACAGTCACTTAAGCATAAGCTACA GTATGTAAACTAAAAGGGGGAATA TATGCAATGGTTGGCATTTAACCAT CCAAACAAATCATACAAGAAAGTTT TATGATTTCCAGAGTTTTTGGAGCTA GAAGGAGATCAAATTACATTTATGT TCCTATATATTACAACATCGGCGAG GAAATGAAAGCGATTCTCCTTGAGT TCTGATGAATTAAAGGAGTATGCTT TAAAGTCTATTTCTTTAAAGTTTGT TTAATATTTACAGAAAAATCCACAT ACAGTATTGGTAAAATGCAGGATTG TTATATAACCATCATTCGAATCATCCT TAAACACTTGAATTTATATTGTATG GTAGTATACTTGGTAAGATAAAATT CCACAAAAATAGGGATGGTGCAGC ATATGCAATTTCCATTCCATTATATAA TTGACACAGTACATTAACAATCCAT GCCAACGGTGCTAATACGATAGGCT </p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
--	---	---

【表 2 2 - 1 2】

		GAATGTCTGAGGCTACCAGGTTTAT CACATAAAAAACATTTCAGTAAAATA GTAAGTTTCTCTTTTCTTCAGGGGCA TTTTCTACACCTCCAAATGAGGAA TGGATTTTCTTTAATGTAAGAAGAA TCATTTTCTAGAGGTGGCTTTCAA TTCTGTAGCATACTTGGAGAACTG CATTATCTTAAAAGGCAGTCAAATG GTGTTTGTGTTTTATCAAAATGTCAA AATAACATACTTGGAGAAGTATGTA ATTTTGTCTTTGGAAAATTACAACA CTGCCTTTGCAACACTGCAGTTTTTA TGGTAAAATAATAGAAATGATCGAC TCTATCAATATTGTATAAAAAGACT GAAACAATGCATTTATATAATATGT ATACAATATTGTTTTGTAAATAAGT GTCTCCTTTTTTATTTACTTTGGTAT ATTTTACACTAAGGACATTTCAAA TTAAGTACTAAGGCACAAAGACATG TCATGCATCACAGAAAAGCAACTAC TTATATTTTCAAGCAAATTAGCAGA TTAAATAGTGGTCTTAAACTCCAT ATGTTAATGATTAGATGGTTATATT ACAATCATTTTATATTTTTTTACATG ATTAACATTCACCTTATGGATTCATG ATGGCTGTATAAAGTGAATTTGAAA TTTCAATGGTTTACTGTCATTGTGTT TAAATCTCAACGTTCCATTATTTTAA TACTTGCAAAAACATTACTAAGTAT ACCAAATAATTGACTCTATTATCT GAAATGAAGAATAAACTGATGCTAT CTCAACAATAACTGTTACTTTTATTT TATAATTTGATAATGAATATATTTCT GCATTTATTTACTTCTGTTTTGTAAA TTGGGATTTTGTAAATCAAATTTATT GACTATGACTAAATGAAATTATTT CTTACATCTAATTTGTAGAAACAGT ATAAGTTATATTAAGTGTTTTTAC ATTTTTTTGAAAGACAAAAA		10
MSTN-SD1 trgt	ヒトミオスタチン SD1 標的	ACAATCATTACCATGCCTACAGAGT/ GTAAGTAGTCCTATTAGTGTATATC	226	
MSTN-SD2 trgt	ヒトミオスタチン SD2 標的	CTTTTCTTTTCTTATTCATTTATAG/C TGATTTTCTAATGCAAGTGGATGG	227	
MSTN-SA2 trgt	ヒトミオスタチン SA2 標的	CCCAGGACCAGGAGAAGATGGGCT G/GTAAGTGATAACTGAAAATAACA TT	228	
MSTN-SA3 trgt	ヒトミオスタチン SA3	TGATTGTTCTTTCTTTTCAAACAG/ AATCCGTTTTTAGAGGTCAAGGTAA	229	
MSTN-SD1	ヒトミオスタチン SD1	ACTCTGTAGGCATGGTAATG	230	
MSTN-SD2	ヒトミオスタチン SD2	CAGCCCATCTTCTCCTGG	231	

【表 2 2 - 1 3】

MSTN-SA2	ヒトミオスタチン SA2	CACTTGCATTAGAAAATCAG	232
MSTN-SA3	ヒトミオスタチン SA3	CTTGACCTCTAAAAACGGATT	233
<u>8077 & 8078</u>			
5'-32	5' 32 IRES 標的	GTTGGGRTRTGCCGCATTCAGGGGC CGGAGGA	234
PV444	5'-32 IRES PMO	CCGCATTCAGGGGCCGGAGG	235
PV449	5'-32 IRES PMO	GGATTAGCCGCATTCAGGGGCC	236
PV454	5'-32 IRES PMO	GTTGGGATTAGCCGCATTCAG	237
3'-37	3' 37 IRES 標的	AAAANGAAACACGGACACCCAAAG TAGTCGGTTCCGC	238
PV533	5' 37 IRES PMO	CACCCAAAGTAGTCGGTTCC	239
PV539	5' 37 IRES PMO	CACGGACACCCAAAGTAGTC	240
PV544	5' 37 IRES PMO	GGAAACACGGACACCCAAAG	241
PV548	5' 37 IRES PMO	AAAAGGAAACACGGACACCC	242
CVB3-548	5' 37 IRES PMO	ATGAAACACGGACACCCAAAG	243
EnteroX	5' 37 IRES PMO	GAAACACGGACACCCAAAGTAG	244
HRV14-IRES	5' 37 IRES PMO	GAGAAACACGGACACCCAAAGTAG	245
<u>8079</u>			
huCTLA- 4SA2sj	ヒト CTLA-4 スプ ライニング境界標的 領域	GCATGAGTTCACTGAGTTCCCTTTG GCTTTTCCATGCTAGCAATGCACGT GGCCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCC AGCAGCCGAGGCATCGCCAGCTTTG	246
TGF-β [8039]			
		GAGGGCGGCA TGGGGGAGGC	247
		GACCCATGGC AGCCCCCGTC G	248
		GCAGCAGTTC TTCTCCGTGG	249
<u>8072</u>			
EBOV VP35- AUG	VP35-AUG 標的	AAUGAUGAAGAUUAAAACCUUCAU CAUCCUUACGUCAAUUGAAUUCUC UAGCACUCGAAGCUUAUUGUCUUC AAUGUAAAAGAAAAGCUGGUCUAA CAAGAUGACAACUAGAACAAGGG CAGGG	250
EBOV VP24- AUG	VP24-AUG 標的	CGUCCAACAACGAGCGCAAGGU UUCAAGGUUGAACUGAGAGUGUCU AGACAACAAAAUUAUUGAUACUCCA GACACCAAGCAAGACCUGAGAAAA AACCAUGGCUAAAGCUACGGGACG AUACA	251
EBOV L-AUG	L-AUG 標的	GUAGAUUAAGAAAAAGCCUGAGG AAGAUUAAGAAAAACUGCUUAUUG GGUCUUUCCGUGUUUUAGAUGAAG CAGUUGAAAUUCUCCUCUUGAUA UUAUAUGGCUACACAACAUACCCA AUAC	252
MARV VP35- AUG	VP35-AUG 標的	CUAAAAAUCGAAGAAUUAUAAAGG UUUUCUUAAUAUUCAGAAAAGGU	253

【表 2 2 - 1 4】

		UUUUUAUUCUCUUCUUCUUUUUUUG CAAACAUAUUGAAAUAUAAUUUU CACA <u>AUG</u> UGGGACUCAUCAUAUAU GCAAC	
MARV VP24- AUG	VP24-AUG 標的	UUCAUUCAAACACCCCAAUUUUUC AAUCAUACACAUAUAACCAUUUU AGUAGCGUUACCUUUCAAUACAAU CUAGGUGAUUGUGAAAAGACUCC AAACA <u>AUG</u> GCAGAAUUAUCAACGCG UUACA	254
MARV L-AUG	L-AUG 標的	UCAUUCUCUUCGAUACACGUUAUA UCUUUAGCAAAGUAAUGAAAAUAG CCUUGUCAUGUUAGACGCCAGUUA UCCAUCUUAAGUGAAUCCUUUCUU CAAUAUGCAGCAUCCAACUCAUA UCCUG	255
VP35-AUG	MARV 2932-2952	GTCCACATTGTGAAAATTAT	256
VP35+7-AUG	MARV 2950-2971	CTTGTTGCATATATGATGAGTC	257
VP24+5-AUG	MARV 10209- 10231	GTTGTAACGCGTTGATAATTCTG	258
L-AUG	11467-11485	GCTGCATATTGAAGAAAGG	259
L+7-AUG	11485-11506	CATCAGGATATTGAGTTGGATG	260
アレナウイルス (8080)			
アレナウイルス vRNA		CGC ACM GDG GAT CCT AGG C	261
CL-trm	NC_005080	CGC CTA GGA TCC CCG GTG CG	262
LS-trm	NC_005080	CGC CTA GGA TCC CCG GTG CGC	263
SS-trm	NC_005081	GCC TAG GAT CCA CTG TGC GC	264
PanCL	N/A	GCC TAG GAT CCI CIG TGC G	265
PanLS	N/A	CGC CTA GGA TCC ICI GTG CG	266
フラビウイルス (8059)	5'CS および 3'CS		
St. Louis 脳脊 髄炎； マリーバレー脳 脊髄炎； 西ナイル熱； Kunjin		GUCAAUAUGCUGAAAACGCGG	267
日本脳炎		AUCAUAUGCUGAAACGCGG	268
黄熱病		GUCAAUAUGGUACGACGAGG	269
デング熱1型 デング熱2型 デング熱4型		CUUUCAAUAUGCUGAAACGCG	270
デング熱3型		CUAUCAAUAUGCUGAAACGCG	271
ダニ媒介脳脊 髄炎		CAGCUUAGGAGAACAAGAGCUG	272

【表 2 2 - 1 5】

西ナイル熱		GGCUGUCAAUUUGCUAAAAC	273
St. Louis 脳脊 髄炎； 日本脳炎； マリーバレー脳 脊髄炎； 西ナイル熱； Kunjin		AACAGCAUAUUGACACCUGGGA	274
黄熱病		UGGGACCAUAUUGACGCCAGGGA	275
デング熱1型 デング熱2型 デング熱3型 デング熱4型		AAACAGCAUAUUGACGCUGGGA	276
ダニ媒介脳脊 髄炎		CGGUUCUUGUUCUCCCUGAGCC	277
ペプチド 輸送体			
	(RAhx) ₄ B	RAhxRAhxRAhxRAhxRB	278
	(RAhxR) ₄ AhxB	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRB	279
	(AhxRR) ₄ AhxB	AhxRAhxRAhxRAhxRAhxRB	280
	(RAhx) ₆ B	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRB	281
	(RAhx) ₈ B	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRB	282
	(RAhxR) ₃ AhxB	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRB	283
	(RAhxRRBR) ₂ Ahx B	RAhxRRBRRAhxRRBRRAhxRB	284
	((RB) ₃ RAhx) ₂ XB	RBRBRBRAhxRBRBRBRAhxRB	285
スプライシング 補正アッセイ配 列	705	CCTCTTACCTCAGTTACA	286
06-0648	EBOV-L(+5)	+TGGGT+ATG+TTGTGT+AGCC+AT	287
06-0649	EBOV-VP35'(+5)	CC+TGCCC+TTTGT+TCT+AGT+TG	288
06-0647	EBOV-VP24(+5)	GCC+ATGGT+TTT+TTC+TC+AGG	289
	CYP3A4	GTCTGGGATGAGAGCCATCAC	290
	CYP3A4	CTGGGATGAGAGCCATCAC	291
	CYP3A4	CTGGGATGAGAGCCATCACT	292

10

20

30

40

【図 1 A】

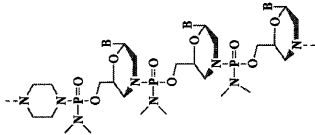


Fig. 1A

【図 1 B】

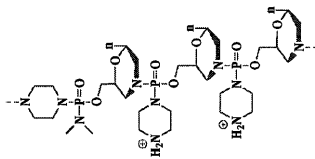


Fig. 1B

【図 1 C】

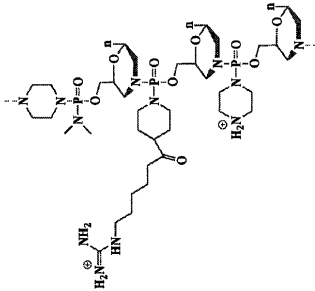


Fig. 1C

【図 1 D】

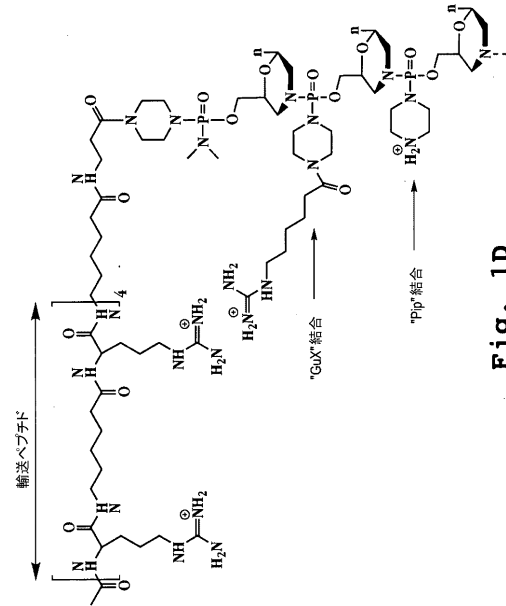


Fig. 1D

【図 2 A】

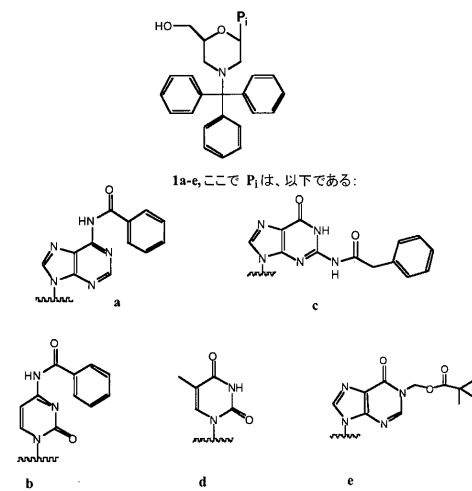


Fig. 2A

【図 2 B】

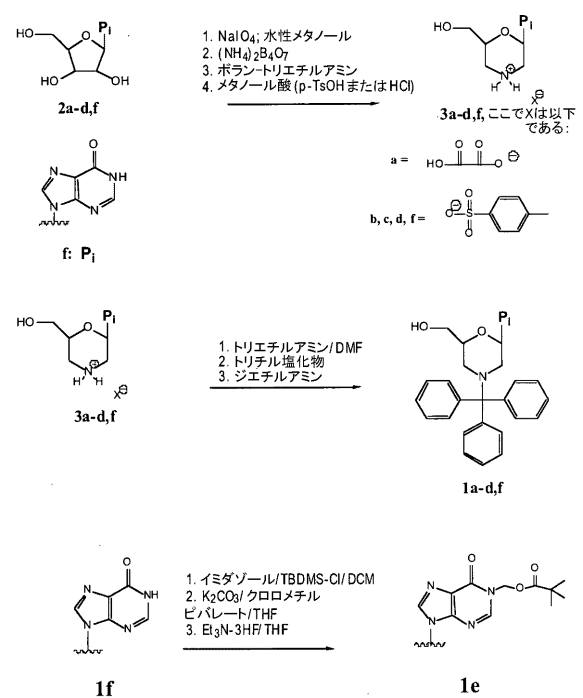


Fig. 2B

【 図 2 C 】

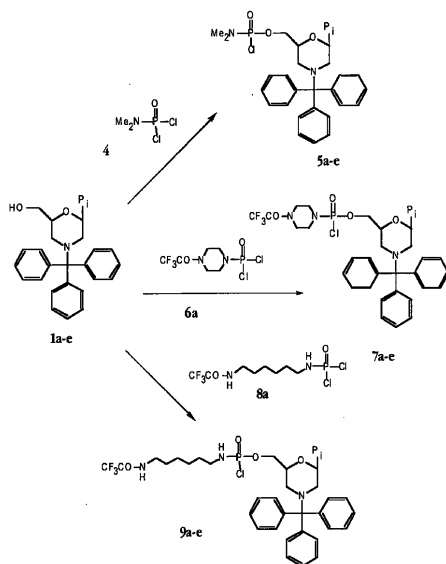


Fig. 2C

【 図 2 D 】

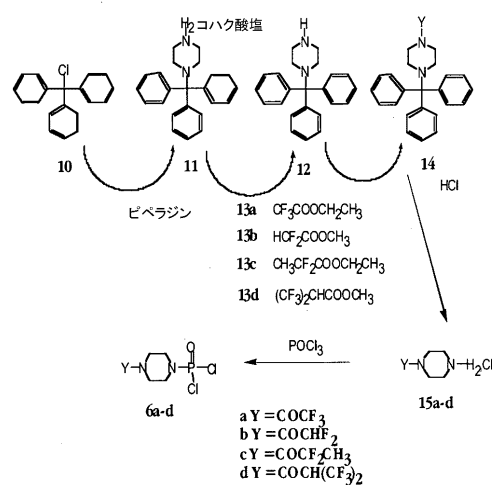


Fig. 2D

【 図 2 E 】

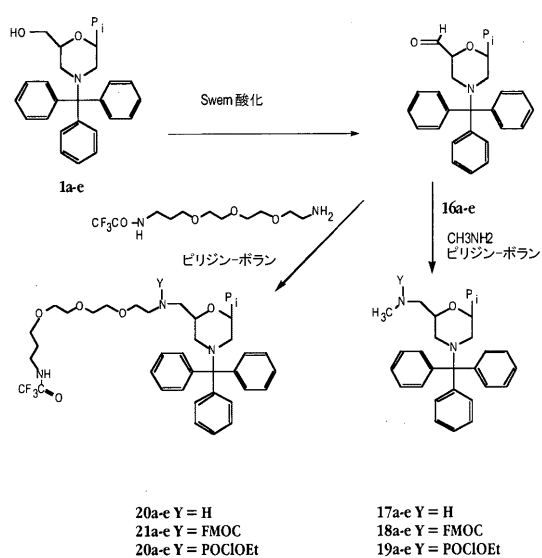


Fig. 2E

【 図 2 F 】

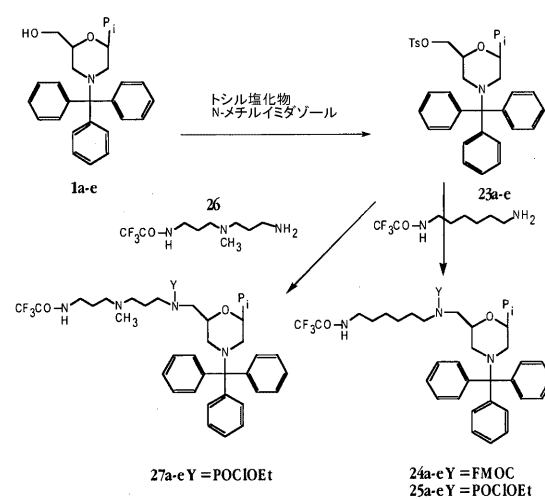


Fig. 2F

【図 2 G】

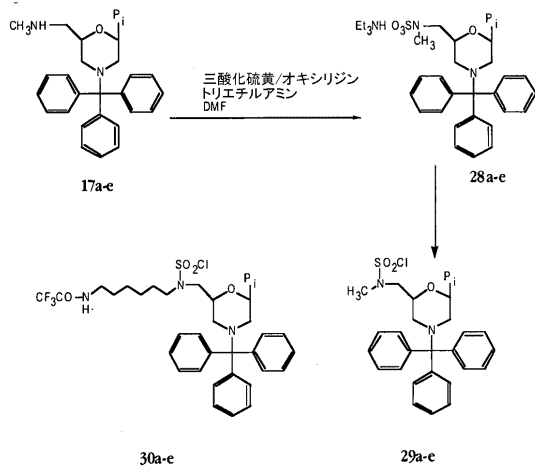


Fig. 2G

【図 2 H】

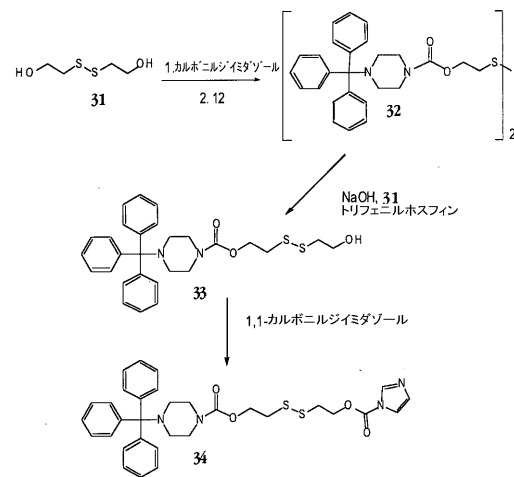


Fig. 2H

【図 2 I】

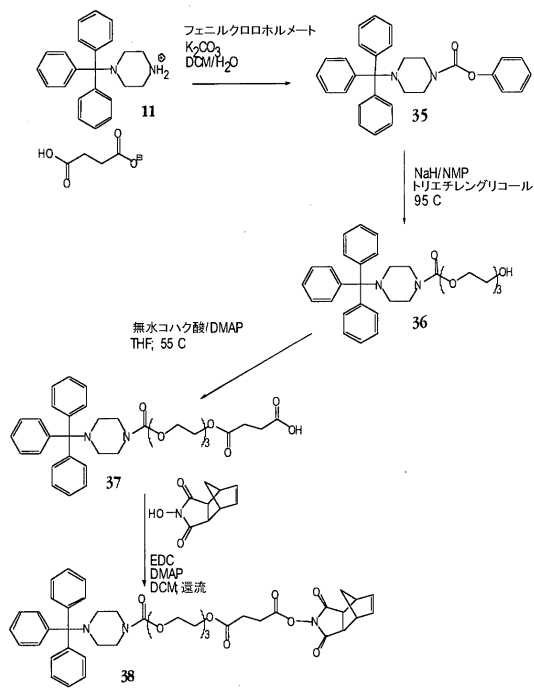


Fig. 2I

【図 2 J】

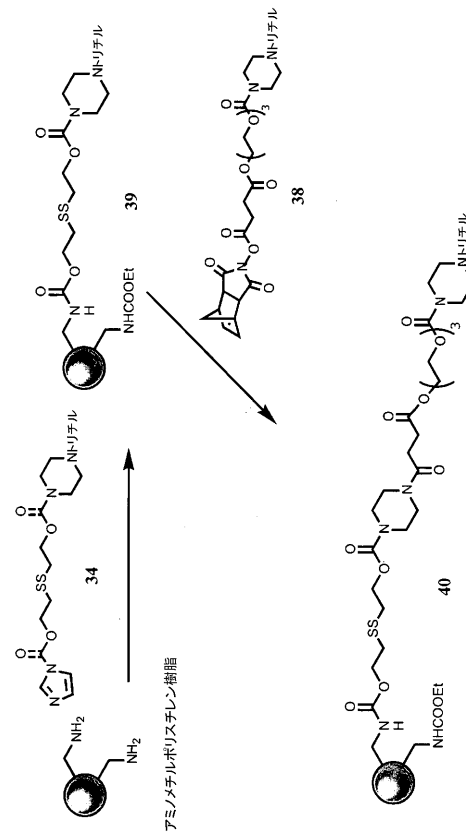


Fig. 2J

【図 2 K】

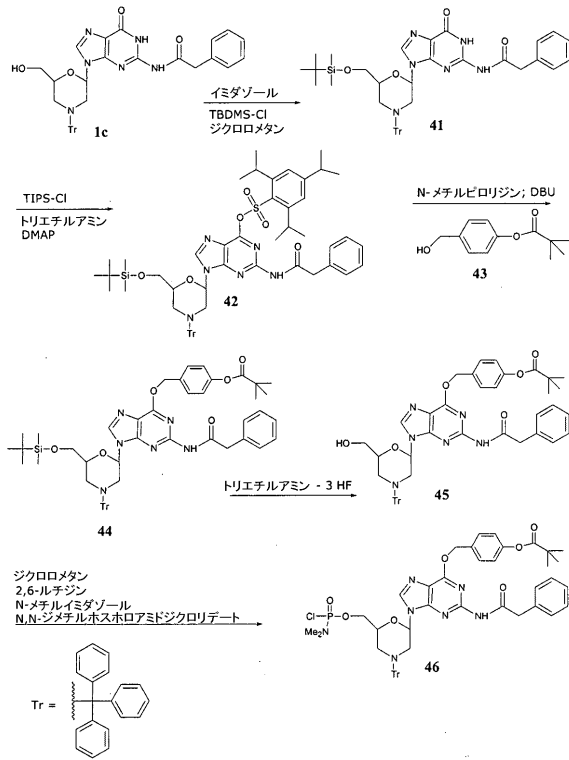


Fig. 2K

【図 2 M】

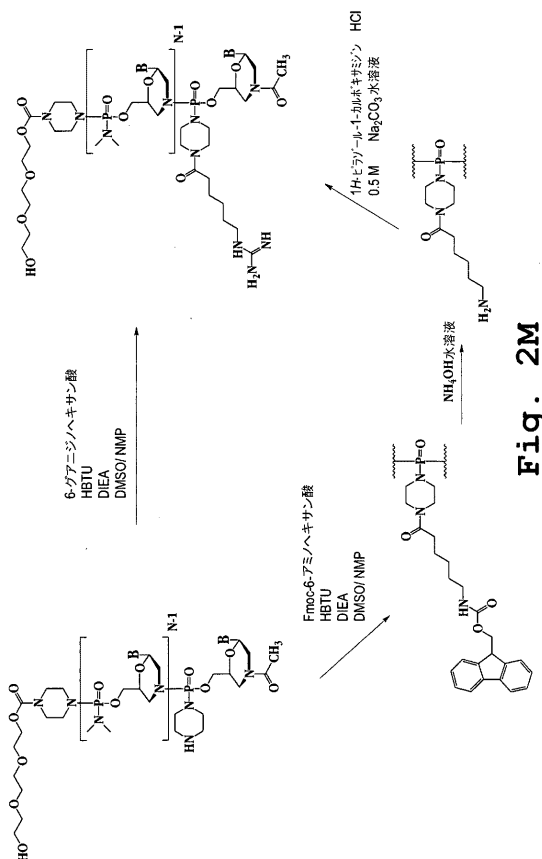


Fig. 2M

【図 2 L】

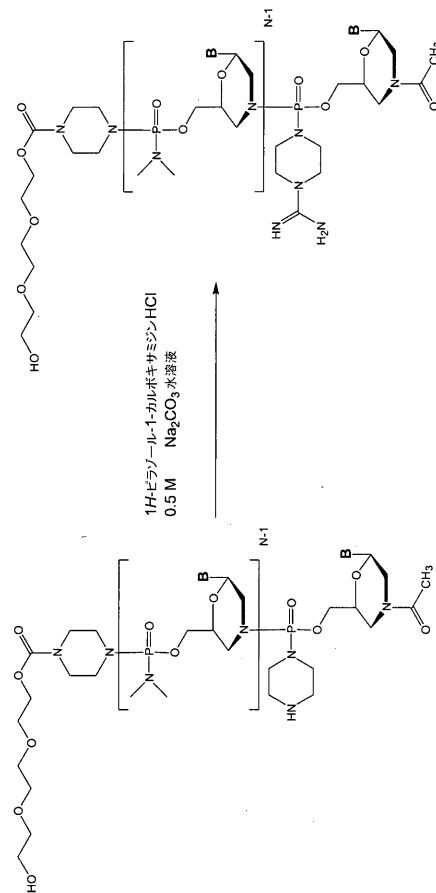


Fig. 2L

【図 2 N】

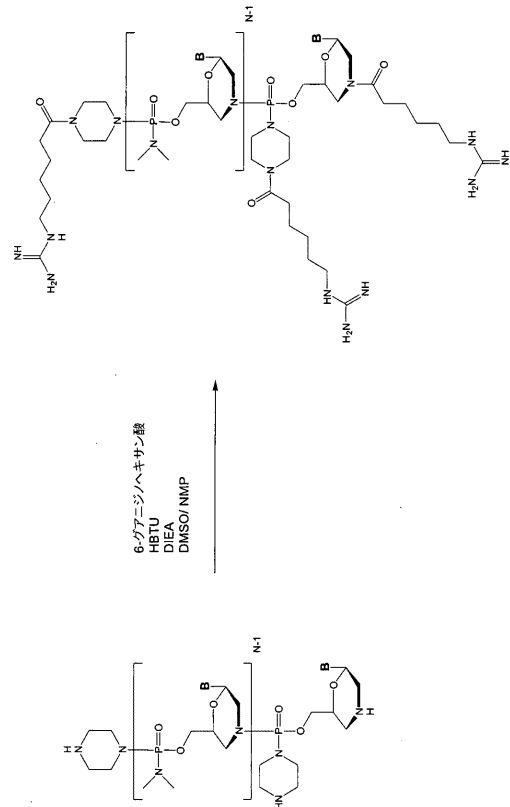


Fig. 2N

【図 2 O】

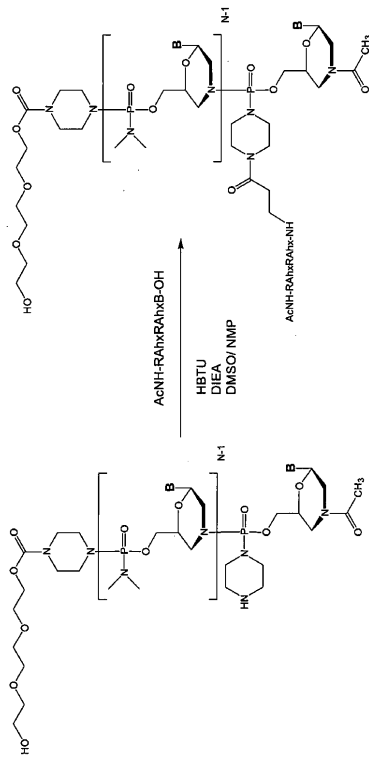


Fig. 2O

【図 2 Q】

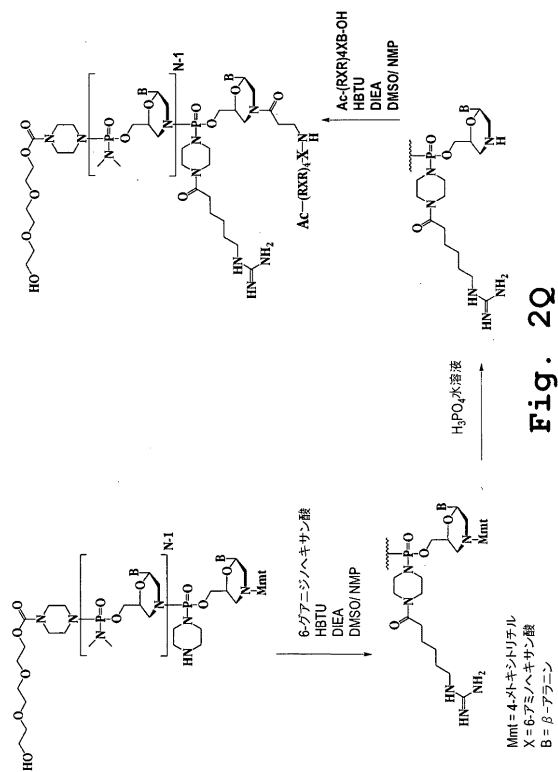


Fig. 2Q

【図 2 P】

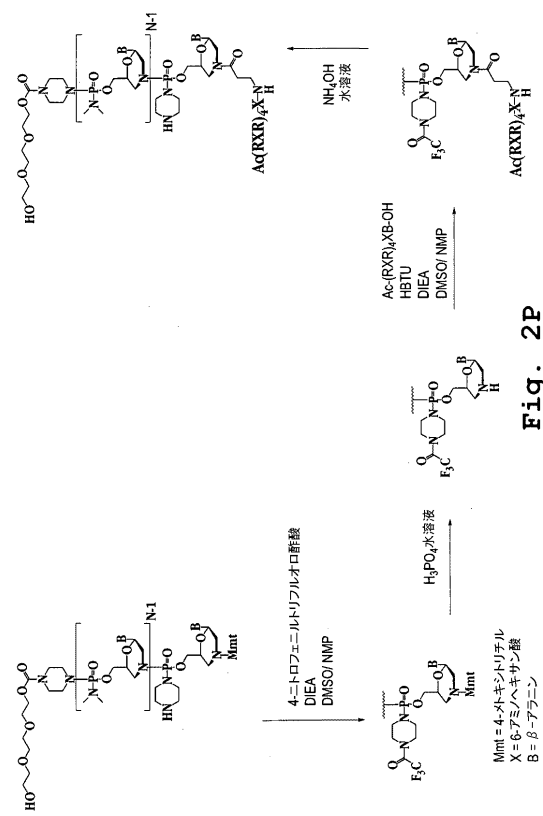


Fig. 2P

【図 2 R】

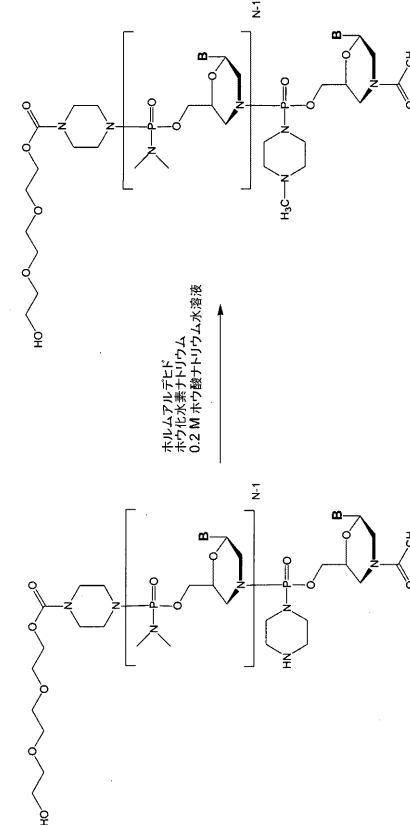


Fig. 2R

【 図 3 】

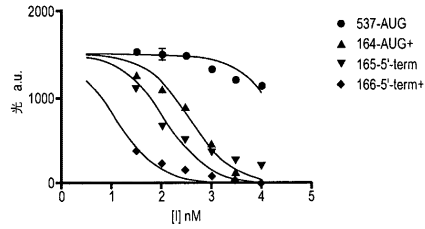


Fig. 3

【 図 4 】

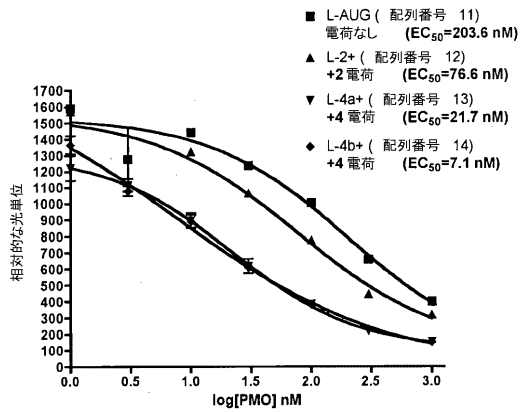


Fig. 4

【 図 5 】

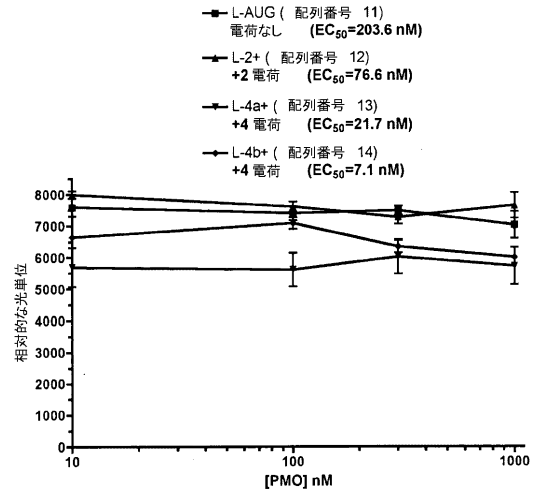


Fig. 5

【 図 6 】

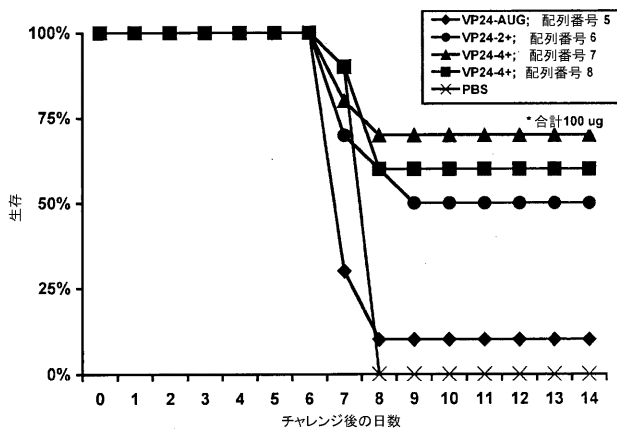


Fig. 6

【 図 7 】

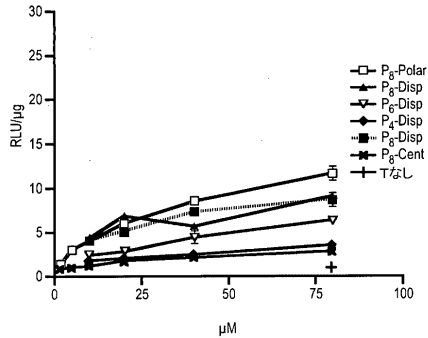


Fig. 7

【 図 8 】

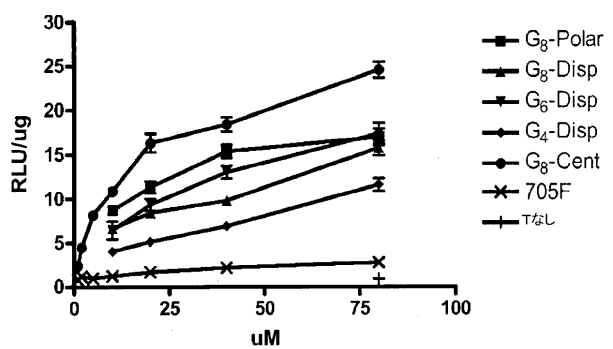


Fig. 8

【 図 9 】

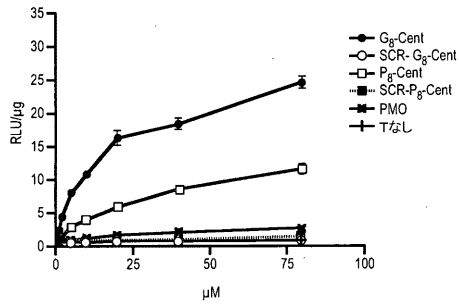


Fig. 9

【 図 1 1 A 】

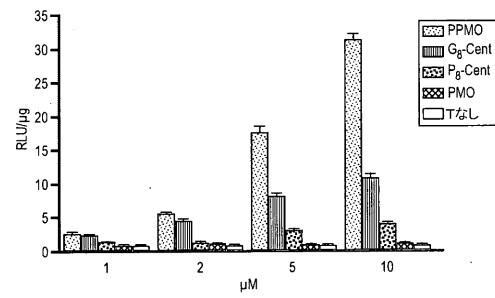


Fig. 11A

【 図 1 0 】

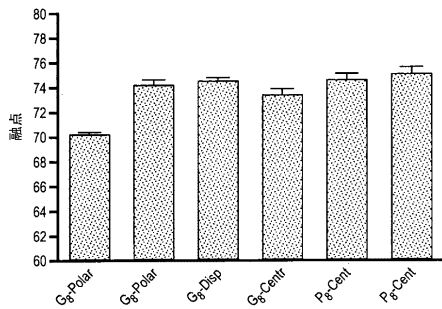


Fig. 10

【 図 1 1 B 】

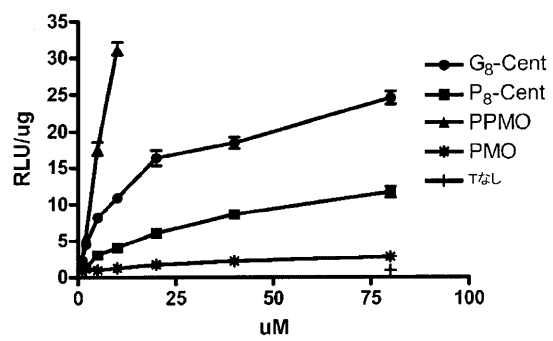


Fig. 11B

【 図 1 2 】

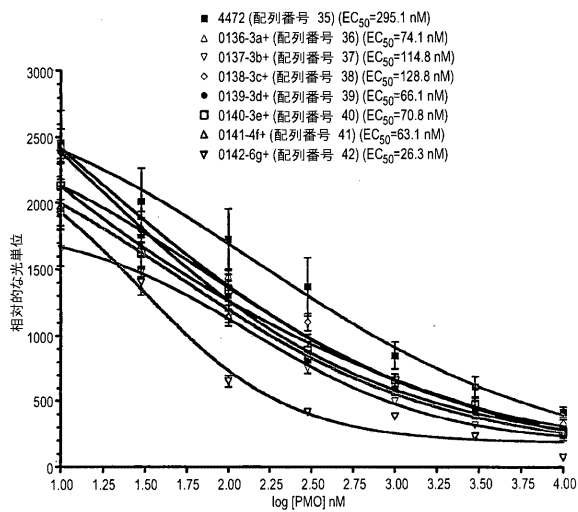


Fig. 12

【配列表】

2010505741000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2007/011435

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07H21/00 C12N15/11

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)

C07H C12N

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

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

EPO-Internal, WPI Data, BEILSTEIN Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/047683 A (AVI BIOPHARMA INC [US]; STEIN DAVID A [US]; GE QING [US]; CHEN JIANZHU) 4 May 2006 (2006-05-04) Figure 2H the whole document	1-42
A	US 5 185 444 A (SUMMERTON JAMES E [US] ET AL) 9 February 1993 (1993-02-09) the whole document	1
	-/-	

☒ 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 document 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.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 September 2008

Date of mailing of the international search report

29/09/2008

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

de Nooy, Arjan

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2007/011435

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SUMMERTON ET AL: "Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties" SENSE & NUCLEIC ACID DRUG DEVELOPMENT, MARY ANN LIEBERT, INC., NEW YORK, US, vol. 7, 1 January 1997 (1997-01-01), pages 187-195, XP002136176 ISSN: 1087-2906 Figure 4 the whole document	1
A	MOULTON H M ET AL: "CELLULAR UPTAKE OF ANTISENSE MORPHOLINO OLIGOMERS CONJUGATED TO ARGININE-RICH PEPTIDES" BIOCONJUGATE CHEMISTRY, ACS, WASHINGTON, DC, US, vol. 15, no. 2, 1 January 2004 (2004-01-01), pages 290-299, XP002999956 ISSN: 1043-1802 the whole document	22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2007/011435

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006047683	A	04-05-2006	AU 2005299306 A1	04-05-2006
			CA 2584599 A1	04-05-2006
			EP 1814898 A2	08-08-2007
			US 2006148747 A1	06-07-2006
			US 2007004661 A1	04-01-2007
US 5185444	A	09-02-1993	NONE	

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 11/431,968
(32)優先日 平成18年5月10日(2006.5.10)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 11/433,257
(32)優先日 平成18年5月11日(2006.5.11)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/799,976
(32)優先日 平成18年5月11日(2006.5.11)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/800,145
(32)優先日 平成18年5月11日(2006.5.11)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 11/433,213
(32)優先日 平成18年5月11日(2006.5.11)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 11/433,214
(32)優先日 平成18年5月11日(2006.5.11)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 11/433,033
(32)優先日 平成18年5月11日(2006.5.11)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 11/433,840
(32)優先日 平成18年5月11日(2006.5.11)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 11/433,724
(32)優先日 平成18年5月11日(2006.5.11)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/800,076
(32)優先日 平成18年5月11日(2006.5.11)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/800,120
(32)優先日 平成18年5月11日(2006.5.11)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 11/518,058
(32)優先日 平成18年9月8日(2006.9.8)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 11/517,757
(32)優先日 平成18年9月8日(2006.9.8)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 11/595,161
(32)優先日 平成18年11月8日(2006.11.8)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 11/715,572
(32)優先日 平成19年3月7日(2007.3.7)
(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(

BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,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,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100088926

弁理士 長沼 暉夫

(74)代理人 100097870

弁理士 梶原 斎子

(74)代理人 100140556

弁理士 新村 守男

(74)代理人 100114719

弁理士 金森 久司

(74)代理人 100143258

弁理士 長瀬 裕子

(74)代理人 100124969

弁理士 井上 洋一

(74)代理人 100132492

弁理士 弓削 麻理

(72)発明者 ウェラー , ドワイト ディー .

アメリカ合衆国 オレゴン 9 7 3 3 0 , コーパリス , エヌ . ダブリュー . エルムウッド
ドライブ 3 3 2 3

(72)発明者 ハッシンガー , ジェド エヌ .

アメリカ合衆国 オレゴン 9 7 3 7 0 , フィロマス , プライス クリーク ロード 2 4 3
1 9

F ターム(参考) 4B024 AA01 CA01 HA17

4C084 AA13

4C086 AA01 AA10 DA34

4H050 AA01 AA03 AB20 AB81