(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第4637972号
(P4637972)
(45)発行日　平成23年2月23日(2011.2.23)　(24)登録日　平成22年12月3日(2010.12.3)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
A61K 31/70	(2006.01)	A61K	31/70	
A61K 48/00	(2006.01)	A61K	48/00	
A61P 31/14	(2006.01)	A61P	31/14	
C07H 21/04	(2006.01)	C07H	21/04	B

請求項の数 5　(全 24 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号	特願平6-509245
(86)(22)出願日	平成5年9月28日(1993.9.28)
(65)公表番号	特表平8-502167
(43)公表日	平成8年3月12日(1996.3.12)
(86)国際出願番号	PCT/US1993/009200
(87)国際公開番号	WO1994/008002
(87)国際公開日	平成6年4月14日(1994.4.14)
審査請求日	平成12年9月27日(2000.9.27)
審判番号	不服2008-3740(P2008-3740/J1)
審判請求日	平成20年2月15日(2008.2.15)
(31)優先権主張番号	07/952,799
(32)優先日	平成4年9月28日(1992.9.28)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者　591076811
ノバルティス　バクシンズ　アンド　ダイアグノスティックス，インコーポレーテッド
アメリカ合衆国，カリフォルニア　９４６０８，エミリービル，ホートン　ストリート　４５６０
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＨＣＶタンパク質の翻訳を制御するための方法および組成物

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）核酸からのＨＣＶタンパク質の翻訳を阻害するインビトロ方法であって、以下の工程：
配列番号２に記載される配列を含む、天然に存在しない第１の核酸を提供する工程；および
該ＨＣＶ核酸と該第１の核酸とを、該第１の核酸およびＨＣＶ核酸がハイブリダイズする条件下で接触させる工程
を包含し、
ここで、該第１の核酸は、ＨＣＶ核酸と接触すると、該ＨＣＶ核酸の翻訳を阻害するものであり、
ただし、該第１の核酸は、その３’末端に結合したコレステロール部分を含まない、
方法。
【請求項２】
前記第１の核酸に相補的な配列に作動可能に連結したプロモーターを含有する、天然に存在しない第２の核酸を転写する工程をさらに包含する、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記第１の核酸がホスホロチオエート核酸アナログである、請求項１～２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４】

Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）核酸からのＨＣＶタンパク質の翻訳を阻害するための組成物であって、配列番号２に記載される配列を有する天然に存在しない第１の核酸を含有する、組成物。
【請求項５】
前記第１の核酸がホスホロチオエート核酸アナログである、請求項４に記載の組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）タンパク質の翻訳を制御するための方法および組成物に関する。ＨＣＶは血液由来（ｂｌｏｏｄ－ｂｏｒｎｅ）の非Ａ非Ｂ型肝炎ウイルス（ＮＡＮＢＶ）感染症に言及されてきた。さらに詳細には、本発明の実施態様は、インビボでのＨＣＶ翻訳の制御および調節のための方法および組成物を特徴とする。この組成物および方法は、ＨＣＶ複製を低減または増加するために、ならびにＨＣＶタンパク質の発現を減少または増加するために適用される。
【背景技術】
【０００２】
ＨＣＶのプロトタイプの分離株はＥＰＯ公開公報第３１８，２１６号；第３８８，２３２号において特徴付けられた。本明細書に用いられるように、用語「ＨＣＶ」は同じウイルス種の新しい群、遺伝子型、および分離株を包含する。用語「ＨＣＶ－１」は、ＥＰＯ公開公報第３１８，２１６号中と同じ意味で用いる。
【０００３】
ＨＣＶは、既知の肝炎ウイルス（例えばＡ型肝炎ウイルス（ＨＡＶ）、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、およびデルタ型肝炎ウイルス（ＨＤＶ））により引き起こされる疾患、ならびにサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）またはエプスタイン－バーウイルス（ＥＢＶ）により誘発される肝炎を包含する他の形態のウイルス関連肝疾患から区別し得る伝染性疾患である。ＨＣＶは輸血された個体で最初に同定された。輸血後肝炎（ＰＴＨ）は、輸血患者の約１０％で起こり、そしてＨＣＶはこれらのケースの９０％にまで数えられる。この疾患はしばしば慢性の肝障害（２５～５５％）に進行する。
【０００４】
現在、ウイルス核酸に関する翻訳プロセスの制御が大いに必要とされている。翻訳プロセスの制御は、効果的なウイルス疾患の治療を制定する。例えば限定はしないが、ウイルスタンパク質の発現を低減する能力は疾患、を制限し得る。インビボでウイルスタンパク質の発現を増加する能力は、強い免疫刺激を誘発し得る。ウイルスタンパク質の発現を増加する能力はまた、より容易に精製し得る大量のウイルスタンパク質を産生し得る。
【０００５】
ＨＣＶゲノムは一本のＲＮＡポジティブ鎖から構成される。ＨＣＶゲノムの概略を図１に示す。ＨＣＶゲノムは約３，０００のアミノ酸から成るポリタンパク質をコードする、連続して翻訳されるオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）を有する。ＯＲＦ中で、構造タンパク質はＮ－末端領域の最初の約４分の１にコードされているようであり、残りのポリタンパク質は非構造タンパク質をコードするのに関する。
【０００６】
ＨＣＶゲノムは、５’末端にいかなるタンパク質またはポリタンパク質を翻訳するのか知られていない領域を有する。この領域は、５’非翻訳領域（５’ＵＴ領域または５’ＵＴＲという）あるいは５’リーダー領域と呼ばれる。
【０００７】
５’ＵＴ領域は５つの上流のＯＲＦまで包含し、最初の４つはＨＣＶ－１（プロトタイプのＨＣＶ分離株）に重複する（Ｃｈｏｏら、「Ｃ型肝炎ウイルスの遺伝子構成および変化」Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９９１）８８：２４５１－２４５５；Ｈａｎら、「Ｃ型肝炎ウイルスＲＮＡの末端領域の特徴：５’非翻訳領域および３’末端のポリ（Ａ）部における保存配列の同定」Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．

ＵＳＡ（１９９１）８８：１７１１－１７１５）。５’ＵＴ領域はヌクレオチド配列においてペスチウイルスと相同性がある（Ｈａｎら）。

【０００８】

プライマー伸長分析で、ＨＣＶ　ＲＮＡの２つの顕著な種が感染患者由来のサンプル中に存在することが明らかにされた（Ｈａｎら）。１つの種はより長い完全長のゲノムＲＮＡであると仮定される。より長い完全長のゲノムＲＮＡは、ヘアピン構造を形成することが予測される５’末端を有する（Ｈａｎら；Ｉｎｃｈａｕｓｐｅら、抜粋、ＨＣＶについての第３回国際シンポジウム、Ｖ．１９、ストラスブルグ、フランス、１９９１；Ｏｋａｍｏｔｏら、「ヒトキャリアから単離されたＣ型肝炎ウイルスのゲノムＲＮＡのヌクレオチド配列：報告された分離株との保存領域および可変領域についての比較」、Ｊ．Ｇｅｎ　Ｖｉｒｏｌ．（１９９１）７２：２６９７－２７０４）。もう一方の種は短い、おそらく５’サブゲノムＲＮＡであり、その５’末端は、より長いＲＮＡの５’末端から１４５番目のヌクレオチドから始まる（Ｈａｎら）。

【０００９】

ＨＣＶのアンチセンスポリヌクレオチド分子は、一般的にはＥＰ公開公報第３８８，２３２号に開示されている。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【００１０】

本発明は、ＨＣＶ核酸からのＨＣＶタンパク質の翻訳を制御する組成物および方法を特徴とする。本発明は、ＨＣＶ　ＲＮＡの５’末端由来の小領域に相補的な核酸の利用に基づく。本発明の１つの実施態様は、ハイブリダイズする条件下で天然に存在しない第１の核酸とＨＣＶ核酸とを接触させる工程を包含するＨＣＶ核酸からのＨＣＶタンパク質の翻訳を制御する方法を特徴とする。第１の核酸はアンチセンス核酸であってＨＣＶ核酸の５’ＵＴ領域内にあるセンス鎖の配列と実質的に相補的な配列を有する。センス鎖は、翻訳プロセスに関与するゲノムまたはメッセンジャーＲＮＡの鎖である。第１の核酸が、２つの核酸がハイブリダイゼーション産物を形成し得る条件下でＨＣＶ核酸に配置され、このハイブリダイゼーション産物がＨＣＶ核酸の翻訳レベルを変える。

【００１１】

本方法はＨＣＶで感染した被験体内で行われ得る。この方法はまた、インビトロで細胞内に用いて目的のウイルスタンパク質を生じさせ得る。この方法はＨＣＶ感染の治療として用いられ得る。

【００１２】

従って、本発明の１つの局面では、ＨＣＶ核酸からのＣ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）タンパク質の翻訳を制御する方法は、以下の工程を包含して提供される：（ａ）天然に存在しない第１の核酸であって、ＨＣＶ核酸の５’ＵＴ領域内にあるセンス鎖に相補的な配列を含有する、第１の核酸を提供する工程；および、（ｂ）上記ＨＣＶ核酸と上記第１の核酸とを、上記第１の核酸および上記ＨＣＶ核酸がハイブリダイゼーション産物を形成し得る条件下で接触させる工程、ここで上記ハイブリダイゼーション産物は、上記ＨＣＶ核酸の翻訳レベルを変え得る。

【００１３】

本発明の他局面では、ＨＣＶ核酸からのＨＣＶタンパク質の翻訳を制御する組成物が提供される。この組成物は第１の核酸、またはＨＣＶ核酸の５’ＵＴ領域内にセンス鎖の配列に相補的な配列を有する第１の核酸を作製する手段を包含する。好ましくは、第１の核酸の配列は配列番号１の中から選択される配列に相補的である。

【００１４】

本発明のさらなる局面では、ＨＣＶを制御する方法は以下の工程を包含して提供される：（ａ）プロモーターに作動可能に連結した第２の核酸の転写産物として第１の核酸を生じさせる工程；（ｂ）ＨＣＶで感染した細胞に第２の核酸およびプロモーターを配置する工程、ここで該細胞は、第２の核酸を転写して第１の核酸を産生し得る。この方法はまた、

ＨＣＶに感染していないが将来感染し得る細胞（「易感染」細胞という）内でのＨＣＶタンパク質の発現を予防するために用いられ得る。

【００１５】

本発明のさらに他の局面では、５’ＵＴヘアピンのヌクレオチドを介してＨＣＶタンパク質の翻訳を制御する方法が提供される。この方法では、２つの位置の１つにヘアピン配列を配置して保持する工程を包含し、ここで上記の位置の少なくとも１つはヘアピン状立体配置である。

【００１６】

本発明のさらに他の局面では、ＨＣＶ感染の治療および制御のためのキットが提供される。このキットは本発明の組成物を製造品目として含有する。好ましくは、このキットはその使用についての指示書を含有し、細胞または個体に核酸を配置するためのベクターおよび他の媒体を必要に応じて含み得る。

【００１７】

本発明の他の局面では、第１の核酸の翻訳を増大させる方法が提供される。この方法はＨＣＶのペスチウイルスホモロジーボックスＩＶ内の配列と相補的な配列を有する天然に存在しない第２の核酸と第１の核酸とを作動可能に連結する工程を包含する。第１の核酸の翻訳を増大させる組成物もまた提供される。この組成物はＨＣＶのペスチウイルスホモロジーボックスＩＶ内の配列に対応する配列を有する天然に存在しない第２の核酸を含有し、この配列は第１の核酸に作動可能に連結され得る。

【発明を実施するための最良の形態】

【００１８】

本発明を、ＨＣＶ核酸の翻訳を制御するための方法および組成物として詳述する。この組成物および方法をＨＣＶ核酸に関して詳述する。しかし、ＨＣＶ核酸に関する記載は、本発明の特性を例示するためにのみ用いられ、本発明をＨＣＶに限定する意図はない。

【００１９】

本発明の実施は、他に記載がない限り、化学、分子生物学、微生物学、組換えＤＮＡ、および免疫学の従来技法を用い、これらは当該分野の範囲内にある。このような技法は文献に十分記載されている。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ、Ｆｉｔｓｃｈ&Ｍａｎｉａｔｉｓ、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ；Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（１９８９）；ＤＮＡ Ｃｌｏｎｉｎｇ、Ｉ巻およびＩＩ巻（Ｄ．Ｎ Ｇｌｏｖｅｒ編、１９８５）；Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ（Ｍ．Ｊ．Ｇａｉｔ編、１９８４）；Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ（Ｂ．Ｄ．Ｈａｍｅｓ&Ｓ．Ｊ．Ｈｉｇｇｉｎｓ編、１９８４）；シリーズＭｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．）、特に１５４巻および１５５巻（ＷｕおよびＧｒｏｓｓｍａｎ編）を参照のこと。

【００２０】

定義：

本明細書中に選択され用いられた用語の定義を、本発明の理解を速めるために以下に示す。用語「対応する」は、特定の核酸配列に相同的である、または相補的であることを意味する。核酸とペプチドとの間に関して、対応するとは、ある核酸またはその相補体の配列に由来する順序にあるペプチドのアミノ酸をいう。

【００２１】

用語「天然に存在しない核酸」は、ゲノム核酸の一部、ｃＤＮＡ、半合成核酸、または合成由来の核酸をいい、その起源またはその操作により、（１）自然界において関連のある全ての核酸に関連がない、（２）自然界において連結している核酸以外の核酸または他の化学物質に連結している、あるいは（３）自然界に存在しないものをいう。

【００２２】

本明細書に用いられるように、用語「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、および「核酸」は、ポリデオキシリボヌクレオチド（２－デオキシ－Ｄ－リボースを含有する）、ポリリボヌクレオチド（Ｄ－リボースを含有する）、プリンまたはピリミジン塩基

のＮ－グリコシドである他のあらゆるタイプのポリヌクレオチド、ならびに非ヌクレオチド骨格（例えば、タンパク質核酸、およびＮｅｕｇｅｎｅＴＭポリマーとしてＡｎｔｉ－Ｇｅｎｅ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ Ｇｒｏｕｐ，Ｃｏｒｖａｌｌｉｓ，Ｏｒｅｇｏｎから市販されている合成の配列特異的核酸ポリマー）または一般的ではない連結を含む他のポリマーの総称であるべきであり、このポリマーは、ＤＮＡおよびＲＮＡに見出されるような塩基のペアまたは塩基の積み重ねを可能にする形状で塩基の核を含むものと規定する。用語「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」の間で長さを区別することは意図せず、これらの用語は交換して用いられる。これらの用語は分子の一次構造のみを言及する。従って、これらの用語は、二本鎖および一本鎖のＤＮＡならびに二本鎖および一本鎖のＲＮＡ、ならびにＤＮＡ：ＲＮＡハイブリッドを包含し、そして既知のタイプの改変物、例えば当該分野で公知の標識、メチル化、１つまたはそれ以上の天然に存在するヌクレオチドのアナログでの「キャップ」置換、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート（ｍｅｔｈｙｌ ｐｈｏｓｐｈｏｎａｔｅ）、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）、および荷電結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を用いる改変のようなヌクレオチド間改変物、例えばタンパク質（ヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、ポリ－Ｌ－リジンなど）のようなペンダント分子を含有するもの、挿入物（例えば、アクリジン、ソラレン（ｐｓｏｒａｌｅｎ）など）を含有するもの、キレート（例えば、金属、放射活性金属、ボロン、酸化金属など）を含有するもの、アルキレーターを含有するもの、改変された結合をもつもの（例えば、αアノメリック核酸など）ならびにポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの改変していないものもまた包含する。

【００２３】

本明細書中に用いられる用語「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」、および「核酸」は、既知のプリンおよびピリミジン塩基だけではなく、改変された他の複素環式塩基を包含する部分を含むことが認識される。このような改変は、メチル化プリンまたはメチル化ピリミジン、アシル化プリンまたはアシル化ピリミジン、あるいは他の複素環を包含する。改変ヌクレオシドまたは改変ヌクレオチドは、例えば１つまたはそれ以上の水酸基が、ハロゲン、脂肪族に置換されて、エーテル、アミンなどとして機能する糖部分の改変も包含する。

【００２４】

ＨＣＶゲノムの構成：

ＨＣＶのｃＤＮＡライブラリーはＨＣＶ感染チンパンジーまたはヒトの血漿中に存在する核酸配列に由来する。これらのライブラリーの１つの構築物である「ｃ」ライブラリー（ＡＴＣＣ番号４０３９４）がＰＣＴ公開公報第ＷＯ９０／１４４３６号に記載されている。本発明に関連のある対応するＤＮＡ配列を、本明細書中では配列番号１として示した。

【００２５】

これまで報告された少なくとも５つの推定の完全長ＨＣＶクローンに基づけば、５’ＵＴ領域は約３４１ヌクレオチド長である（Ｈａｎら、Ｉｎｃｈａｕｓｐｅら、Ｏｋａｍｏｔｏら）。ポリタンパク質領域とは異なり、ＨＣＶ分離株の５’ＵＴ領域は非常によく保存されている。図２に示すように、この５’ＵＴ領域は５つの上流のＯＲＦまで包含し、最初の４つは、プロトタイプのＨＣＶ分離株であるＨＣＶ－１に重複する（Ｃｈｏｏら；Ｈａｎら）。この５’ＵＴ領域は、ヌクレオチド配列でペスチウイルスと実質的に相同である（Ｈａｎら）。従って、ＨＣＶ核酸の翻訳の調節に関する考察は他のペスチウイルスに適用し得る。

【００２６】

プライマー伸長分析で、２つの顕著な種のＨＣＶ ＲＮＡが見出された（Ｈａｎら）。１つの種のものはより長く、完全長のゲノムＲＮＡと推測される。その５’末端はヘアピン構造を形成していると予測される（Ｈａｎら；Ｉｎｃｈａｕｓｐｅら；Ｏｋａｍｏｔｏら）。より短い５’サブゲノムＲＮＡの５’末端は、より長いＲＮＡの５’末端から１４５番目のヌクレオチドから始まる（Ｈａｎら）。

【００２７】
核酸：
本発明の実施態様は、異なるシスに作用するＨＣＶの制御エレメントと相互作用し得る核酸を特徴とし、従ってＨＣＶ核酸の翻訳をブロック、抑制、または増大し得る。
【００２８】
本発明の１つの実施態様は、天然に存在しない第１の核酸をＨＣＶ核酸に配置する工程を包含し、ＨＣＶ核酸からのＨＣＶタンパク質の翻訳を制御する方法を特徴とする。この第１の核酸は、ＨＣＶ核酸の５’ＵＴ領域内のセンス鎖の配列と相補的な配列を有する。この第１の核酸は、第１の核酸がハイブリダイゼーション産物を形成し得、そしてＨＣＶ核酸の翻訳レベルを変え得る条件下でＨＣＶ核酸に配置される。
【００２９】
好ましくは、本発明のアンチセンス核酸は、ＲＮＡ、ＤＮＡ、または改変された核酸である。改変された核酸の例は、分解抵抗性の硫化誘導体、チオホスフェート誘導体、ならびにポリヌクレオシドアミドであるがそれらに限定されない（ＳｔｅｃらのＰＣＴ公開公報第ＷＯ９１／１６３３１号；ＺｏｎらのＰＣＴ公開公報第ＷＯ８８／０７５４４号；Ｐ．Ｅ．Ｎｅｌｓｅｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９９１）２５４：１４９７－１５００；Ｍ．Ｅｇｈｏｌｍ，ＪＡＣＳ，（１９９２）１１４；１８９５－１８９７）。本発明のアンチセンス核酸の特に好ましい設計改変は、（１）該核酸の細胞内安定性を増加するように、（２）該核酸の細胞透過性を増加するように、（３）センス鎖への該核酸の親和性を増加するように、または（４）該核酸の毒性（もしあれば）を低減するように設計される改変である。多くのこのような改変は、ＡＮＴＩＳＥＮＳＥ　ＲＥＳＥＡＲＣＨ　ＡＮＤ　ＡＰＰＬＩＣＡＴＩＯＮＳ（Ｓ．Ｔ．Ｃｒｏｏｋｅおよび Ｂ．Ｌｅｂｌｅｕ編、ＣＲＣ　Ｐｒｅｓｓ，１９９３）に記載されるように当該分野で公知である。従って、核酸は変更されたまたは改変された塩基、糖、または結合を含み得、リポソームまたは遺伝子治療によるような特殊なシステムで送達され、あるいは付着分子を有し得る。このような付着分子は、細胞膜との相互作用を増強する脂質のような疎水性分子、またはリン酸骨格の電荷中和剤として作用するポリリジンのようなポリカチオニック分子を含有する。付着し得る特に好ましい脂質はコレステロールである。この分子は核酸の３’末端または５’末端で付着し得、そしてまた塩基、糖、またはヌクレオシド間リンケージを介して付着し得る。
【００３０】
他の分子はこの核酸の３’末端または５’末端に特異的に配置され、エキソヌクレアーゼ切断を防ぐキャッピング基であり得る。このようなキャッピング基は、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのようなグリコールを含む当該分野で公知のヒドロキシル保護基が包含されるがこれに限定されない。
【００３１】
好ましくは、第１の核酸はＨＣＶの５’ＵＴ領域内のセンス鎖の配列に実質的に相補的な配列中の少なくとも１０ヌクレオチドを有する。さらに好ましくは、第１の核酸は、このような相補的な配列中の少なくとも１２ヌクレオチド、さらに好ましくは１５ヌクレオチド、そしてさらに好ましくは２０ヌクレオチドを有する。好ましくは、第１の核酸は、このような相補的な配列中の１００ヌクレオチドより少なく、さらに好ましくは５０ヌクレオチドより少ない。最も好ましくは、この核酸はＨＣＶの５’ＵＴ領域のセンス配列と安定なハイブリダイゼーション産物を形成し得る約２０～３０ヌクレオチドを有する。
【００３２】
ＨＣＶウイルスの５’ＵＴ領域を配列番号１に示す。本発明の１つの好ましい核酸は、５’ヘアピン構造の約２３ヌクレオチドを結合し得る。この２３ヌクレオチドは配列番号１の１～２３の位置にある。好ましくは、この核酸はヘアピンに関連する配列と３重らせんを形成し、メッセンジャーＲＮＡの残りの部分からの切断を阻害する。
【００３３】
本発明の他の好ましい核酸は、ペスチウイルスホモロジーボックスＩＶとして知られている２８ヌクレオチド領域に結合し得る。このペスチウイルスホモロジーボックスＩＶ領域

は配列番号１の２９１～３１８塩基にわたる。
【００３４】
本発明のさらに好ましい核酸は、上記長い完全長のゲノムＲＮＡが切断されて短いサブゲノムＲＮＡが形成される部位で規定される領域に結合し得る。この切断領域は、配列番号１の１４５位の上流および下流の約５０ヌクレオチド領域にわたる。
【００３５】
さらに他の好ましい核酸は、配列番号１の２７７～３００塩基にわたるペスチウイルスホモロジーボックスＩＶに重複する領域に結合し得る「ＡＳ５」をいう。本発明の好ましい実施態様では、このＡＳ５核酸は完全にホスホロチオエート化されている。すなわち、天然のホスホジエステル結合に代わりホスホロチオエート結合のみを含有する。本発明の他の好ましい実施態様では、このＡＳ５核酸はコレステロール分子に、（好ましくはヌクレオシドの３’末端を介して）共有結合している。
【００３６】
核酸の送達：
上記核酸は、当該分野で公知のいくつもの方法を介して細胞内に配置し得る。細胞は、転写産物として第１の核酸が得られ得る第２の核酸でトランスフェクトし得る；例えばＤｕｌｂｅｃｃｏの米国特許第４，５９３，００２号に示されるようなウイルス性キャリア中に第２の核酸を含むことにより；あるいはレトロウイルスベクター中の第２の核酸を含むような遺伝子治療の方法による。アンチセンス遺伝子治療の１つの例は、Ｍｕｋｈｏｐａｄｈｙａｙら「アンチセンスＲＮＡによるＫ－ＲＡＳ発現および肺癌細胞の腫瘍形成の特異的阻害」、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，５１：１７４４－１７４８（１９９１）による記事に記載されている。
【００３７】
本発明はまた、ＨＣＶ感染細胞またはＨＣＶ感染から予防すべき細胞内に、第１の核酸または第２の核酸を配置するための媒体を意図する。このような媒体の例には、ベクター、リポソーム、および、Ｎ－（１－（２，３－ジオレオイルオキシ）プロピル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルアンモニウムメチルスルフェート（ＤＯＴＡＰ）、Ｎ－［１－（２，３－ジオレイルオキシ）プロピル］－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＭＡ）などのような脂質懸濁液が包含される。あるいは、この脂質は第１の核酸に直接共有結合され得る。
【００３８】
アンチセンス核酸はまた、該核酸の細胞取り込みを増加する分子と連結され得る。これらの分子は、リン脂質またはステロイド（例えば、コレステロール）のような脂質のごとき疎水性であり得るか、またはポリカチオニック（例えば、ポリリジン）であり得る。疎水性またはポリカチオニックな分子は、アンチセンス核酸のあらゆる所（３’末端および５’末端を含むアンチセンス核酸、塩基、糖ヒドロキシル、およびヌクレオチド間結合を包含する）で付着する。
【００３９】
取り込みを増加する特に好ましい分子は、コレステリル基である。コレステリル様基は、例えば、活性化コレステリルクロロホルメート（ｃｈｏｌｅｓｔｅｒｙｌ　ｃｈｌｏｒｏｆｏｒｍａｔｅ）またはコール酸を介してＡＮＴＩＳＥＮＳＥ　ＲＥＳＥＡＲＣＨ　ＡＮＤ　ＡＰＰＬＩＣＡＴＩＯＮＳ（前出）に反映されるような当該分野で公知の手段により、付着され得る。１つの例（３１８頁）では、コレステロール分子は、アミノリンカーおよびアミンと反応するコレステロール上の官能基を用いて２’ヒドロキシル基にコンジュゲートされ得る。他の方法では、コレステリル基は、Ｒ．Ｌ．Ｌｅｔｓｉｎｇｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９８９）８６：６５５３－６５５６に記載されるように、ＣＣｌ４およびコレステリルオキシカルボニルアミノエチルアミンを用いて３’ホスフェートに連結される。
【００４０】
５’ヘアピンの使用：

翻訳の増大は、免疫応答を増強し得る。ウイルス核酸の翻訳のブロックまたは低減が、ウイルス感染の病因を低減し得る。本発明の１つの局面では、ヌクレオチド１～２３位でのヘアピンの中のヌクレオチドを介してＨＣＶタンパク質の翻訳を制御する方法を提供する。この方法は２つの位置の１つにヘアピン配列を配置および維持する工程を包含し、ここで該位置の少なくとも１つはヘアピン状立体配置である。ヘアピン状立体配置において、インビボでのウイルス核酸の翻訳はブロックされるかまたは実質的に低減される。上記位置の少なくとも１つには、ヘアピンではない直線状立体配置またはヘアピンと関連するヌクレオチドの完全な除去が包含される。直線状立体配置により、ウイルス核酸が翻訳される。上記ヘアピンヌクレオチドの除去により、ウイルス核酸の翻訳が増大される。好ましくは、ヘアピン構造は、天然に存在しない第１の核酸がヘアピン構造と共に３重らせんを形成する条件下で、該第１の核酸をＨＣＶ核酸に配置することにより安定化される。

【００４１】

ヘアピンに関連する配列は翻訳を阻害する。本発明の１つの実施態様は、ヘアピン状立体配置を形成し得る第１の配列およびｍＲＮＡに結合し得る第２の配列を有する第１の核酸を特徴とする。好ましくは、第１の配列は配列番号１の１～２３塩基に対応する配列を有する。好ましくは、第２の配列は上記のより短いサブゲノムＲＮＡにハイブリダイズする。

【００４２】

薬学的処方物：

本発明の組成物は、薬学的投与のために調製され得る。注射用調製物および坐薬は通常、１～１０ｍｇ／アンプルまたはカプセルの上記核酸または核酸アナログを含む。ヒトの患者に対して、一日投与量は約０．１～１，０００ｍｇであり、好ましくは１～１００ｍｇである（１０～２０ｍｇ／ｋｇ体重から１０００～２０００ｍｇ／ｋｇ体重）。しかし、各患者に応じた投与量は、広範囲の因子、例えば使用する特定の核酸または核酸アナログの有効性、年齢、体重、一般的な健康状態、性別、食事、投与の時点および形態、排出速度、一緒に用いられる他の薬剤との組合せ、治療が施される所定の疾患の重篤さに依存する。

【００４３】

本発明の範囲内にある薬学的製造品は、その意図した目的を達成するために有効な量の活性成分を含んでいる製造品を包含する。好ましい範囲は上述した通りであり、各々のＨＣＶ感染症の治療用の最も有効な量の決定は当該分野に公知である。

【００４４】

本発明の核酸ならびにそれらの硫化およびホスホロチオエートアナログに加えて、薬学的調製物には適切な賦形剤および活性化合物のプロセスが促進される補助物質を含み得る。この調製物、錠剤、糖衣錠、およびカプセルのような、特に経口投与され得るおよび好ましいタイプの投与に用いられ得る調製物、および坐薬のような直腸に投与し得る調製物、ならびに非経口または経口投与に適する溶液、および口腔内投与または舌下投与し得る組成物には、０．１％から９９％重量の活性成分を賦形剤とともに含み得る。好ましい投与方法は非経口投与、特に静脈内投与である。

【００４５】

非経口投与に適切な処方物には、水溶性のまたは水懸濁性の形態での活性化合物の水溶液が含まれる。さらに、適切な油性の注射用懸濁液として活性化合物の懸濁液が投与され得る。適切な親油性溶媒または媒体には、脂肪油（例えば、ゴマ油）あるいは合成脂肪酸エステル（例えば、エチルオレエートまたはトリグリセリド）が包含される。水性注射用懸濁液には、懸濁液の粘度を増加する物質（例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、および／またはデキストラン）が含まれ得る。必要に応じて、この懸濁液はさらに安定剤を含み得る。

【００４６】

さらに、本発明の化合物はリポソームにカプセル化された薬学的組成物に処理され得、ここで活性成分は分散されるかまたは脂質層に付着する水性の同心性の層からなる顆粒小体

中に種々存在するかのいずれかで含まれる。活性成分は、その溶解性に依存して水層中および脂質層中の両方に、あるいは一般的にリポソーム懸濁液と呼ばれる液中に存在し得る。疎水性層には、一般的にしかし排他的ではなく、レシチンおよびスフィンゴミエリンのようなリン脂質、コレステロールのようなステロイド、ジセチルホスフェート、ステアリルアミン、またはホスファチジン酸のような多少のイオン性界面活性剤、および／または疎水性の他の物質が包含される。リポソームの直径は一般的に約１５ｎｍ～５ミクロンの範囲にわたる。リポソーム調製液および／または脂質懸濁液のための特に好ましい脂質は、ＤＯＴＭＡおよびＤＯＴＡＰである。

【００４７】

ＤＯＴＡＰは、Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ　Ｍａｎｎｈｅｉｍから購入するか、あるいはＬ．Ｓｔａｍａｔａｔｏｓら、Ｂｉｏｃｈｅｍ，２７：３９１７－２５（１９８８）；Ｈ．Ｅｉｂｌら、Ｂｉｏｐｈｙｓ　Ｃｈｅｍ，１０：２６１－７１（１９７９）に記載された以下の方法で調製し得る。ＤＯＴＭＡは、Ｌｉｐｏｆｅｃｔｉｎ＊の名で市販されている（ＢＲＬ，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤから入手可能）、そしてＰ．Ｌ．Ｆｅｌｇｎｅｒら、Ｐｒｏｃ　Ｎａｔ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ８４：７４１３－１７（１９８７）に記載されている。

【００４８】

本発明は、特に有利な実施態様を示す以下の実施例を参照として例示する。しかし、これらの実施態様は例示であり、本発明はいかなる様にも制限されるように解釈されないことに気を付けるべきである。

【実施例】

【００４９】

（Ｉ．材料と方法）

（Ａ．細胞、細菌株、およびプラスミド）

ＨＵＨ７、ＨｅＬａ、およびＨｅｐＧ２細胞を、１０％ウシ胎児血清（Ｇｉｂｃｏ－ＢＲＬ，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤ）を補足したダルベッコの改変イーグル培地中で増殖させた。これらの細胞は７％ＣＯ２の存在下で増殖させた。全てのプラスミドは、Ｇｉｂｃｏ－ＢＲＬから購入したＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ＨＢ１０１中で増殖させた。

【００５０】

（Ｂ．酵素）

制限酵素およびＴ４　ＤＮＡリガーゼをＢｏｅｈｒｉｎｇｅｒ　Ｍａｎｎｈｅｉｍ（Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ，ＩＮ）から、ＴａｑポリメラーゼをＰｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ（Ｎｏｒｗａｌｋ，ＣＴ）から、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼおよびＲＮａｓｉｎをＰｒｏｍｅｇａ（Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）から購入した。

【００５１】

（Ｃ．発現プラスミドの構築）

プラスミドｐＴ７ＥＭＣＡＴおよびｐＳＶ２ＣＡＴの構築は記載されている（Ｅｌｒｏｙ－Ｓｔｅｉｎら、「脳心筋炎ウイルス５’配列により与えられたｍＲＮＡのキャップ依存性翻訳が、ワクシニアウイルス／バクテリオファージＴ７ハイブリッド発現システムの作用を改善する」Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（ＵＳＡ）（１９８９）８６：６１２６－６１３０；Ｇｏｒｍａｎら、「哺乳類細胞中でクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼを発現する組換えゲノム」Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．（１９８９）２：１０４４－１０５１）。ＰＣＲ（Ｓａｉｋｉら、「熱安定ＤＮＡポリメラーゼを用いるプライマーによる酵素的ＤＮＡ増幅」Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９８８）２３０：１３５０－１３５４）によりＨＣＶ　ｃＤＮＡ（Ｈａｎら）の５’ＵＴ領域の両末端にＨｉｎｄＩＩＩ部位を付着することにより、およびｐＳＶ２ＣＡＴのＨｉｎｄＩＩＩ部位に得られた断片をクローニングすることにより、プラスミドｐＨＣＶＣＡＴを構築した。

【００５２】

プラスミドｐＥＱ３５５を、βガラクトシダーゼ（βｇａｌ）発現プラスミドのｐＥＱ１

７６（Ｓｃｈｌｅｉｓｓら、「ヒトサイトメガロウイルスｇｐ４８発現における翻訳の制御」Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．（１９９１）６５：６７８２－６７８９）のマルチプルクローニングサイトに固有のＨｉｎｄＩＩＩ／Ａｓｐ７１８部位に、３４１ｂｐのＨＣＶ－１の５’領域を挿入することにより構築した。ＨＣＶ－１　５’ＵＴ領域を、テンプレートとしてラムダベクター由来ＥｃｏＲ１断片であるＢ１１４を用いてＨｉｎｄＩＩＩ／Ａｓｐ７１８　ＰＣＲ断片として得た。

【００５３】

プラスミドｐＥＱ３９１［ｐＣＭＶ（ＣＡＴ／ＨＣＶ／ＬａｃＺ）］を、プラスミドｐＳＶ２ＣＡＴ（Ｇｏｒｍａｎら）から単離されたＣＡＴ遺伝子をコードする７１６ｂｐのＨｉｎｄＩＩＩ／ＢａｎＩ断片を、プラスミドｐＥＱ３５５中のＨｉｎｄＩＩＩ部位で連結することにより得た。上記ＨｉｎｄＩＩＩ部位を連結し、そしてＢａｎＩ部位およびｐＥＱ３５５中の連結されていないＨｉｎｄＩＩＩ部位をクレノウで平滑末端化し、再連結した。

【００５４】

プラスミドｐＥＱ４１６［ｐＣＭＶ／（ＣＡＴ／ポリオ／ＬａｃＺ）］を、ｐＳＶ２ＣＡＴをテンプレートとして用いて得られた７１６ｂｐのＨｉｎｄＩＩＩ／ＢａｍＨＩ　ＣＡＴ遺伝子をコードするＰＣＲ断片、およびポリオウイルス５’ＵＴ領域をコードする９９５ｂｐのＢａｍＨＩ／ＸｈｏＩ断片を、ポリリンカー中のＨｉｎｄＩＩＩ／ＸｈｏＩ部位で切断したβｇａｌ発現プラスミドｐＥＱ１７６に連結することにより構築した。

【００５５】

ｐＥＱ３９６は、ｐＬＮＰＯＺ（Ａｄａｍら、「ピコルナウイルス５’非翻訳領域を有するレトロウイルスベクターにおける翻訳の内部開始」Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．（１９９１）６５：４９８５－４９９０）から得られた５’ＵＴ領域ポリオウイルス配列を、クレノウを用いて平滑末端化したＸｈｏＩ／ＰｓｔＩ断片として、ポリリンカー中のＸｂａＩ／ＳｎａＢＩ部位で切断したｐＥＱ３７７中へクローニングすることにより構築されたβｇａｌ発現プラスミドである。上記ＸｂａＩ部位もまた平滑末端を作製するためにクレノウで埋められた。ｐＥＱ３７７中のβｇａｌの転写はＴ７バクテリオファージプロモーターにより進行する。

【００５６】

プラスミドｐ（ＣＡＴ／ＳＶ４０／ＬａｃＺ）を、７１６ｂｐのＨｉｎｄＩＩＩ／ＢａｍＨＩ　ＣＡＴ遺伝子をコードする上記ＰＣＲ断片を、ＳＶ４０ポリアデニル化シグナル、およびＨｉｎｄＩＩＩ／ＢｇｌＩＩで切断したβｇａｌ発現プラスミドｐＥＱ１７６とともに連結することにより構築した。全てのＰＣＲ産物の確実性を、プラスミド中の得られた各セグメントの配列決定をすることにより確認した（ＣｈｅｎおよびＳｅｅｂｕｒｇ、「スーパーコイル配列決定：プラスミドＤＮＡを配列決定する迅速で簡易な方法」ＤＮＡ（１９８５）４：１６５－１７０）。

【００５７】

（Ｄ．ハイブリッドＣＡＴ　ＲＮＡの構築）

ｐＳＶ２ＣＡＴベクターの各セグメントを、Ｓａｉｋｉら；ＳｈｙａｍａｌａおよびＡｍｅｓ、「インビトロでの変異に基づく迅速なポリメラーゼ連鎖反応のためのエキソヌクレアーゼの使用」Ｇｅｎｅ（１９９１）９７：１－６に記載のようにＰＣＲで増幅した。各セグメントを図２および３に示す。各センスプライマー（ＰＳＶまたはＰ１～Ｐ９）を、５’末端にバクテリオファージＴ７プロモーター（ＴＡＡＴＡＣＧＡＣＴＣＡＣＴＡＴＡＧ）、および３’末端に１６～１８塩基のＳＶ４０またはＨＣＶ配列を有するように設計した。アンチセンスプライマーは、５’末端に４０個のＴの長鎖、および３’末端に相補的なＳＶ４０配列（ＧＧＡＧＧＡＧＴＡＧ）を有していた。この配列は、ＣＡＴ遺伝子の停止コドンの３５０ｂｐ後で、テンプレートＤＮＡに存在する１０個のヌクレオチドおよび付加ポリＡトラックの完全な合致によりベクターに結合する。ｐＴ７ＥＭＣＡＴのセグメントをプライマーＴ７およびＴ３０により増幅した。

【００５８】

各ＰＣＲ産物を、キャップアナログ（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｐ２０１０）を有するまたは有さないＴ７ポリメラーゼにより転写し、ＤＮアーゼで処理し、フェノール－クロロホルムで抽出し、そして２．５Ｍの酢酸アンモニウムの存在下でエタノールにより２回沈澱させた。各ポリ（Ａ）＋ＲＮＡの濃度はＵＶ吸収により見積もり、そしてＨａｎら、「胎児の分化期間でのラット膵臓遺伝子の選択発現」Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（ＵＳＡ）（１９８６）８３：１１０－１１４に記載されるように、ＪＨＣ２７１をプローブとして用いたノーザンおよびドットブロットハイブリダイゼーションにより確認した。ＳＶ＊ＣＡＴ、Ｒ１１、Ｒ１３、およびＲ１４において、配列を重複ＰＣＲ法により内部挿入または削除した（ＳｈｙａｍａｌａおよびＡｍｅｓ）。上記ＰＣＲ産物は配列決定により正確であることが確認された。

【００５９】

（Ｅ．インビトロでのハイブリッドＣＡＴ　ＲＮＡの翻訳）

合成ＲＮＡを、製造業者により指示されるように、１４０ｍＭの酢酸カリウムの存在下でヌクレアーゼ処理されたウサギ網状赤血球溶解物（Ｇｉｂｃｏ－ＢＲＬ）中で翻訳した。キャップ依存性におけるＫ＋イオン濃度の影響を試験する付随研究を、５０、１００、１５０、および２００ｍＭの酢酸カリウムの存在下で行った。［３５Ｓ］メチオニンで標識した翻訳産物のアリコートを、以前に記載されているように（Ｌａｅｍｍｌｉ、「バクテリオファージＴ４のヘッドのアセンブリ期間中の構造タンパク質の切断」Ｎａｔｕｒｅ（１９７０）２２７：６８０－６８５）、１２％のポリアクリルアミドゲルで電気泳動することにより分析した。

【００６０】

（Ｆ．ＣＡＴアッセイのための哺乳類細胞中へのハイブリッドＣＡＴ　ＲＮＡのトランスフェクション）

各２マイクログラムの合成ＲＮＡを、製造業者により改変されたＦｅｌｇｎｅｒら（「リポフェクション：高率の脂質媒介ＤＮＡトランスフェクション手法」Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（ＵＳＡ）（１９８７）８４：７４１３－７４１７）の手法に従って、１５ｍｇのリポフェクチン（ｌｉｐｏｆｅｃｔｉｎ）（Ｇｉｂｃｏ－ＢＲＬ）を用いて３．５ｃｍのＣｏｓｔａｒプレート（Ｔｈｏｍａｓ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｓｗｅｄｅｓｂｏｒｏ，ＮＪ）中の１×１０６細胞にトランスフェクトした。その細胞を、以前に記載されたように（Ｇｏｒｍａｎら）一晩インキュベートし、ＣＡＴアッセイのために回収した。ＣＡＴの相対活性は、トランスフェクトされたＲＮＡが０．５ｍｇと５ｍｇとの間で直線関係を示した。６時間と一晩との間のトランスフェクション後のインキュベーションはＣＡＴ活性にあまり影響しなかった。

【００６１】

ポリオウイルス感染細胞におけるＲＮＡの翻訳のために、ＨＵＨ７細胞を１００の感染多重度（ＭＯＩ）でポリオウイルス（Ｍａｈｏｎｅｙ株、ＡＴＣＣ　ＶＲ－５９）に感染させた。細胞は感染後２時間でＲＮＡでトランスフェクトし、トランスフェクション後４時間で回収した。感染６時間、細胞は通常の形態を維持し、その後、それらは形態を変え、培養ディッシュから剥がれた。

【００６２】

（Ｇ．ジシストロン性ＤＮＡ構築物の細胞へのトランスフェクション）

ＣｓＣｌグラジエントでの分画により精製された各プラスミドＤＮＡ２０マイクログラムを、リン酸カルシウム法（Ｇｏｒｍａｎら）により２×１０６個のＨＵＨ７細胞にトランスフェクトした。その細胞をトランスフェクション後４８時間で回収し、そして凍結融解を繰り返すことにより細胞抽出液を調製した。ＣＡＴアッセイは、Ｇｏｒｍａｎらに記載されたように行った。ＬａｃＺアッセイはＭｉｌｌｅｒに従った（Ｍｉｌｌｅｒ，βガラクトシダーゼアッセイ「分子遺伝子学の実験」３５２－３５５頁、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｕｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｕｒ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，１９７２）。

【００６３】

（実施例１）
（ＨＣＶゲノムの５’ＵＴ領域に欠失を有するＲＮＡの構築およびこの方法に関する合理性）
ＨＣＶゲノム中で翻訳を制御する、シスに作用するエレメントの正確な位置を示すために、ＨＣＶ－１　ＲＮＡの５’ＵＴ領域の完全長のもの（ヌクレオチド１～３４１）または欠失したものを、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）ｍＲＮＡのコーディング領域に連結した。この構築物を図３に例示し、そして以下の表１に記載する。
【００６４】
【表１】

構築ＩＤ	5'UT領域の配列	欠失または他の特徴
R1	1-341	
R2	23-341	1-22 欠失
R3	35-341	1-34 欠失
R4	83-341	1-82 欠失
R5	99-341	1-98 欠失
R6	145-341	1-144 欠失
R6.hp	145-341	1-144 欠失 5'末端に 1-23 塩基を追加したヘアピンを有する
R7	218-341	1-217 欠失
R8	255-341	1-254 欠失
R8.hp	255-341	1-254 欠失 5'末端に 1-23 塩基を追加したヘアピンを有する
R9	322-341	1-321 欠失
R11	1-322	323-341 欠失
R13	1-205	206-341 欠失
R14	1-145	146-341 欠失
R17	145-322	1-144 および 323-341 欠失
R18	145-294	1-144 および 295-341 欠失

【００６５】
Ｔ７ポリメラーゼでＤＮＡ断片を転写することにより各ＲＮＡを合成し、特定の５’または３’欠失を含むようにまずＰＣＲにより増幅した。各ＲＮＡを、細胞中での安定性を増強するために、５’末端でのキャップおよび３’末端でのポリＡテール（Ａ４０）を有するように設計した。このアプローチで、単一に規定された５’および３’末端を有する大量のＲＮＡの効果的な生産を可能にした。従来のＤＮＡトランスフェクション戦略とは異なり、このアプローチを用いる細胞のＲＮＡトランスフェクションは、特定のＲＮＡ分子が核内で直面する、起こり得るスプライシングおよび輸送上の問題を回避する。
【００６６】

同じ方法により２つの追加のＲＮＡを合成した：１）従来のキャップ依存性翻訳（Ｋｏｚａｋ、「翻訳のスキャニングモデル：最新版」Ｊ．Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．（１９８９）１０８：２２９－２４１）の陽性コントロールとして作用する、ＳＶ４０の初期ｍＲＮＡの５’リーダーを有するＳＶＣＡＴ、およびキャップ非依存性内部開始（Ｊａｎｇら、「インビボでの脳心筋炎ウイルスＲＮＡの５’非翻訳領域へのリボソームの内部エントリーによるタンパク質合成の開始」Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．（１９８９）６３：１６５１－１６６０）の陽性コントロールとして作用するＥＭＣＶの５’リーダーを有するＥＭＣＶＣＡＴ。

【００６７】

（実施例２）

（インビトロでのハイブリッドＣＡＴ　ＲＮＡの翻訳）

合成ＲＮＡが生物学的に活性であることを確認するために、およびインビトロでの翻訳特性を決定するために、実施例１のＲＮＡをウサギ網状赤血球溶解物中で翻訳した。ＳＶＣＡＴを含有する全てのＲＮＡが、期待したサイズのＣＡＴタンパク質を生じた。

【００６８】

インビトロの結果は以下のようにまとめ得る：１）ＨＣＶＣＡＴ構築物では、Ｒ１～Ｒ５はＣＡＴタンパク質を産生するが、わずかに検出可能なレベルでのみであった。このレベルの翻訳は、Ｒ６およびＲ７で徐々に増加し、Ｒ８では最大１２倍の増加に達する。２）１４０ｍＭのＫＣｌ濃度では、キャッピングＳＶＣＡＴおよびＨＣＶＣＡＴ　ＲＮＡ（Ｒ７，Ｒ８）のインビトロでの翻訳は、キャッピングされていないＲＮＡの翻訳より平均２０倍効果的であった。３）低ＫＣｌ濃度（５０～１００ｍＭ）では、キャッピングされていないＲ１テンプレートの翻訳で、キャッピングＲ１テンプレートの翻訳と同レベルのＣＡＴタンパク質が得られ、これはおそらく弱い内部開始の発生を示す。

【００６９】

驚くべきことにそして予期されないことに、これらの結果は、ウサギ網状赤血球溶解物およびＨｅＬａ細胞抽出物を用いてＨＣＶ　ＲＮＡの５’ＵＴ領域にある内部リボソームエントリー部位の検出を報告しているＴｓｕｋｉｙａｍａ－Ｋｏｈａｒａら（「Ｃ型肝炎ウイルスのＲＮＡにある内部リボソームエントリー部位」Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．（１９９２）６６：１４７６－１４８３）による最近のデータと対照的である。細胞溶解物を用いるインビトロでのタンパク質合成は常にインビボでの翻訳条件を正確に再現するわけではない（Ｋｏｚａｋ、「原核生物、真核生物、およびオルガネラ中におけるタンパク質合成開始の比較」Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｒｅｖ．（１９８３）４７：１－４５）。代わりのアプローチが用いられた。

【００７０】

（実施例３）

（インビボでのハイブリッドＣＡＴ　ＲＮＡの翻訳および制御エレメントの同定）

インビボでの単シストロン性構築物の翻訳特性を決定するために、上記各ＲＮＡを、コントロールＲＮＡのＳＶＣＡＴも含めて、リポフェクチン（Ｆｅｌｇｎｅｒら）を用いてヒト肝癌細胞株（ＨＵＨ７）中にトランスフェクトした（Ｒ１～Ｒ１８）。ＣＡＴ活性をモニターし、そして得られたデータを表２にまとめた。

【００７１】

【表２】

構築ＩＤ	5'UT領域の配列	欠失または他の特徴	CAT活性
R1	1-341		検出せず
R2	23-341	1-22 欠失	0.5
R3	35-341	1-34 欠失	2.0
R4	83-341	1-82 欠失	2.1
R5	99-341	1-98 欠失	2.5
R6	145-341	1-144欠失	2.1
R6.hp	145-341	1-144欠失 5'末端に 1-23塩基を 追加した ヘアピンを 有する	0.1
R7	218-341	1-217欠失	5.2
R8	255-341	1-254欠失	7.9
R8.hp	255-341	1-254欠失 5'末端に 1-23塩基を 追加した ヘアピンを 有する	0.1
R9	322-341	1-321欠失	0.6
R11	1-322	323-341欠失	検出せず
R13	1-205	206-341欠失	検出せず
R14	1-145	146-341欠失	検出せず
R17	145-322	1-144および 323-341欠失	1.5
R18	145-294	1-144および 295-341欠失	0.6

【００７２】
完全長の構築物Ｒ１ではＲＮＡの量が１０倍に増加し、そしてより多い細胞抽出液を用いたにもかかわらず、ＣＡＴ活性は繰り返し検出されなかった。この結果は、完全長のＨＣＶ　ＲＮＡが、インビボでの有効な翻訳テンプレートであり得ないことを示唆している。
【００７３】
実施例１に記載されるような、一連の５’欠失構築物を分析した。ＣＡＴ活性は、２３個のヌクレオチドの５’末端ヘアピンが除去されたＲ２でまず検出された。この活性はＲ３で４倍に増加し、同レベルの活性を、Ｒ４、Ｒ５、およびＲ６で検出し、これはＯＲＦ１～４について規則的に欠失させたものである。
【００７４】
Ｒ６の５’ＵＴ配列は、インビボで検出された５’サブゲノムＲＮＡの配列に一致する（Ｈａｎら、１９９１）。ＣＡＴ活性は、ＯＲＦ５のＡＵＧコドンが除去されたＲ７で２倍

、および３’末端付近の配列の８６ヌクレオチドのみを維持したＲ８でさらに１．５倍増加した。構築物Ｒ８は最大のＣＡＴ活性を示す。これらのデータは、上記の小さい各ＯＲＦを含むヌクレオチド２５５から上流の配列が、ポリタンパク質の主要開始コドンからの翻訳を阻害することを示唆する。

【００７５】

Ｒ８で見られる最大のＣＡＴ活性は、Ｒ９構築物中の６７個のヌクレオチドをさらに欠失させると急激に低減した。この結果は、翻訳を刺激する効果的な正に制御するエレメントがヌクレオチド２５５から下流に存在し得ることを示唆する。この８６個のヌクレオチドからなる領域は、ペスチウイルスに対して９０％の一致率を有する２８個のヌクレオチドからなる配列を含み、そしてペスチウイルスホモロジーボックスＩＶと呼ばれ、図２および３にＰＥＳＴ－ＩＶとして示した（Ｈａｎら、１９９１）。ＰＥＳＴ－ＩＶエレメントが観察される翻訳刺激に単独で関連するのかどうかを決定するために、ＲＮＡ構築物Ｒ６を欠失分析に供した。

【００７６】

構築物Ｒ６は、不活性構築物に結合しているＨＣＶ　ＲＮＡの５’末端部分を除去した１－１４５配列を欠失した５’ＵＴ領域を有する。Ｒ６はＲ８までの欠失分析に好ましかった。Ｒ８における３’欠失は短い５’ＵＴ領域を有するＲＮＡを生じた。

【００７７】

トランスフェクションにおいて、Ｒ６で見られるＣＡＴ活性はＲ６の３’末端から２０個のヌクレオチドを欠失させた構築物Ｒ１７中で１．５倍、および２８個のヌクレオチドをさらに欠失させた構築物Ｒ１８中でさらに２．５倍低減した。

【００７８】

これらのデータは、ＰＥＳＴ－ＩＶの上流および下流の配列が最大の翻訳増大に必要であることを示した。ＰＥＳＴ－ＩＶ配列は、異種の５’リーダーに転移し得るポジティブシスエレメントの一部である。図４を見ると、この２８塩基からなる配列を上記ＳＶＣＡＴに挿入してＳＶ＊ＣＡＴを作製し、ＣＡＴ活性を３倍増加した。

【００７９】

３’欠失によりその他のＲＮＡ構築物を作製した。ＣＡＴ活性はＲ１１およびＲ１４、ならびにＲ１３では検出さなかった。これらは全て、上記５’ヘアピンを含んでいた。これらのデータは、上記５’ヘアピンがＨＣＶ　ＲＮＡの翻訳を阻害するという点からみて一貫している。

【００８０】

（実施例４）

（ＣＡＴ　ＲＮＡの翻訳におけるＨＣＶの５’ヘアピンの影響）

インタクトな５’末端を有するＲＮＡは、下流の配列に関わりなく全て不活性であったので、最も末端の２３個のヌクレオチドに内在する潜在的５’ヘアピン構造を、観察される翻訳阻害に関して評価した。すなわち、この５’ヘアピンを上記２つの活性ＲＮＡ（Ｒ６およびＲ８）の５’末端に連結した。これらのＲＮＡ（Ｒ６ｈｐ、Ｒ８ｈｐ）をＨＵＨ７細胞にトランスフェクトし、ＣＡＴ活性を測定した。

【００８１】

表２に、これらの構築物においてヘアピンを並置すると、ＣＡＴの相対活性により示されるように、翻訳はほとんど停止した。このデータは、完全な阻害には上記２３ヌクレオチドヘアピンのみより多いヌクレオチド部分を必要とするが、５’ヘアピンが潜在的な翻訳インヒビターであることを示唆している。

【００８２】

（実施例５）

（ポリオウイルス感染細胞におけるハイブリッドＣＡＴ　ＲＮＡの翻訳）

ポリオウイルス感染は細胞のｍＲＮＡのキャップ依存性翻訳を阻害し、それにより自身のＲＮＡまたは５’ＵＴ領域の内部リボソームエントリー部位（ＩＲＥＳ）を含む異種ＲＮＡの翻訳を促進することが知られている（Ｊａｎｇら、「インビボで脳心筋炎ウイルスＲ

ＮＡの５’非翻訳領域中へのリボソーム内部エントリーによるタンパク質合成の開始」Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．（１９８９）６３：１６５１－１６６０；ＭａｃｅｊａｋおよびＳａｒｎｏｗ、「細胞ｍＲＮＡの５’リーダーにより介される翻訳の内部開始」Ｎａｔｕｒｅ（１９９１）３５３：９０－９４；ＰｅｌｌｅｔｉｅｒおよびＳｏｎｅｎｂｅｒｇ、「ポリオウイルスＲＮＡ由来の配列による真核細胞ｍＲＮＡの翻訳の内部開始」Ｎａｔｕｒｅ（１９８８）３３４：３２０－３２５）。この阻害は、細胞のキャップ結合タンパク質複合体（ｅｌＦ－４Ｆ）の成分であるｐ２２０を順に切断する、同定されていない潜在性の細胞プロテアーゼの活性化により、プロテアーゼ２Ａをコードするポリオウイルスにより間接的に媒介されると考えられている（Ｓｏｎｅｎｅｂｅｒｇ、「真核細胞のｍＲＮＡのキャップ結合タンパク質：翻訳の開始および制御における機能」Ｐｒｏｇ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．Ｍｏｌｅｃ．Ｂｉｏｌ．（１９８８）３５：１７３－２９７）。

【００８３】

種々の５’ＵＴ領域を有するハイブリッドＣＡＴ ＲＮＡをポリオウイルスで感染したＨＵＨ７細胞にトランスフェクトした。この戦略は、各ＲＮＡのキャップ依存性を決定するように、およびＨＣＶ５’ＵＴ領域中に存在し得る弱い内部リボソームエントリー部位（ＩＲＥＳ）の潜在的な存在を検出するように設計された。

【００８４】

予測されるように、ポリオウイルス感染は、ＥＭＣＶＣＡＴでＣＡＴ活性を内部開始のための陽性コントロールＲＮＡの７倍増加した（Ｅｌｒｏｙ－Ｓｔｅｉｎら）。対照的に、上記ポリオ感染は、ＳＶＣＡＴならびに２つのＨＣＶ構築物（Ｒ６およびＲ８）におけるＣＡＴ活性を実質的に低減した。ポリオウイルス感染細胞に見られる低減されたＣＡＴ活性は、感染細胞がＲＮＡトランスフェクションに先立ってより長い時間（２．５時間）インキュベートされた場合にはさらに減少した。Ｒ１のＣＡＴ活性は、ポリオウイルス感染にかかわらず検出不可能のままであった。この結果は、ＩＲＥＳがＨＣＶ ＲＮＡの５’ＵＴ領域に存在しないことを強く示唆している。

【００８５】

Ｒ１構築物を除いて、上記の実験で試験した構築物は５’ＵＴ領域に大きな欠失を含んでいた。このような欠失は推定のＩＲＥＳ構造および／または機能に影響し得る。このような欠失の影響を評価するために、広範囲にわたらない欠失を有する構築物を、ポリオウイルス感染細胞中のＣＡＴタンパク質を翻訳する能力について試験した。以前の結果と一致して、Ｒ１構築物のＣＡＴ活性は、ポリオウイルス感染の存在または非存在において検出不可能なままであった。構築物Ｒ２～Ｒ５は、ポリオウイルス感染の非存在下で試験した場合に、以前に記載されたレベルと似ているＣＡＴ活性の相対レベルを示した。しかし、ＨＣＶリーダーテンプレートのＣＡＴ活性は、ポリオウイルス感染細胞で事実上停止された。

【００８６】

さらに、テンプレートＳＶＣＡＴおよびＲ１～Ｒ３について、非キャッピングメッセージを用いて同様のプロトコールで試験した。上記非キャッピングテンプレートは、細胞をポリオウイルスで連続的に感染してもしなくてもトランスフェクト細胞中で不活性であった。これらの結果は、ＨＣＶ５’ＵＴ領域由来のシス調節エレメントを有する単シストロン性メッセージがキャップ依存的に翻訳されることおよびＨＣＶの５’非コーディング領域がＩＲＥＳエレメントを有しないことを強く支持している。

【００８７】

（実施例６）

（ＨＵＨ７細胞中でのジシストロン性ｍＲＮＡの翻訳）

ＨＣＶの５’ＵＴ領域内のＩＲＥＳの潜在的な存在を、ジシストロン性のｍＲＮＡを転写するように設計されたＤＮＡ構築物でＨＵＨ７細胞をトランスフェクトすることによりさらに試験した。すなわち、ＨＣＶ ＲＮＡの５’ＵＴ領域を第１のシストロンとしてのＣＡＴと第２のシストロンとしてのＬａｃＺとの間のシストロン間スペーサーとして配置した。この連結したＤＮＡを、翻訳がサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）中の主要な初期遺伝

子の強力なエンハンサー／プロモーターにより支配される発現ベクター中にクローニングした。陽性および陰性コントロールとしてのジシストロン性ベクターは、ＨＣＶの５’ＵＴ領域とポリオウイルスの５’ＵＴ領域およびＳＶ４０初期遺伝子の３’ＵＴ領域とを置換して図５に示すように構築された。

【００８８】

ＨＵＨ７細胞へのトランスフェクションにおいては、３つ全ての構築物は、第１のＣＡＴシストロンの翻訳を同レベルで維持した。図６に、３つの構築物の酵素活性を棒グラフの形で示した。ＨＣＶリーダーを有するジシストロン性構築物は、第２のＬａｃＺシストロンの翻訳を、ポリオウイルスリーダーを用いている上記ジシストロン性コントロール構築物と同レベルでは維持しなかった。これらのデータは、単シストロン性の構築物を用いて得られたＨＣＶゲノムの完全長５’ＵＴ領域がＩＲＥＳを含まないことの先の証拠を支持するものである。

【００８９】

（実施例７）

（ＨｅＬａ細胞およびＨｅｐＧ２細胞におけるＨＣＶ　ＲＮＡ構築物の翻訳）

トランジェントトランスフェクションアッセイは、細胞株に依存する種々のリードアウト（ｒｅａｄｏｕｔ）を与え得る。得られた結果がＨＵＨ７細胞に限られないことを確認するために、Ｒ１、Ｒ７、およびＲ８構築物をＨｅＬａ細胞およびＨｅｐＧ２細胞にトランスフェクトした。得られたＣＡＴ活性パターンはＨＵＨ７細胞で観察されたものに質的に類似していた。

【００９０】

（実施例８）

（アンチセンス分子によるＨＣＶ　５’ＵＴ領域の制御エレメントの制御）

オリゴヌクレオチドアナログおよびその誘導体を作製する方法およびそれらの抗ウイルス剤としての使用は、特にＰＣＴ　ＷＯ８８／０７５４４号およびＰＣＴ　ＷＯ９１／１６３３１号に報告されている。

【００９１】

硫化オリゴヌクレオチドアナログを、ＰＣＴ　ＷＯ９１／１６３３１号の教示に従ってアンチセンス剤として用いるために調製する。配列番号１の１～２３塩基のアンチセンスに対応する２３塩基からなるホスホロチオエートオリゴヌクレオチドを、自動合成機（３８０Ｂ型　Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ，Ｆｏｓｔｅｒ　Ｃｉｔｙ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）でホスホルアミダイト法により合成する。酸化工程のかわりに硫化工程（硫化工程はキャッピング工程に先立つ）で置き換えられる以外は、標準合成プロトコールに従った。すなわち、この合成は、脱トリチル化、カップリング、硫化、およびキャッピングのサイクルの繰り返しからなる。合成カラムからの最終産物の分離および精製は標準の手段により完了する。

【００９２】

硫化工程は、０．２ＭのＯ，Ｏ－ジイソプロピルホスホロジチオ酸ジスルフィドのピリジン溶液に室温で１分間、伸長している鎖をさらすことにより行う。脱トリチル化工程の間に放出されたトリチルカチオンの収率は平均９９％と予測される。オリゴヌクレオチドにおける非硫化または酸化された３価のリン酸結合は、脱トリチル化期間に不安定化されて切断されるので、トリチル収率はカップリング効果および硫化測定の両方の尺度である。

【００９３】

配列番号１の１－２３塩基のアンチセンスに対応する２３ｍｅｒを、支持体から切断し、そして５５℃で６時間、濃水酸化アンモニウムで脱保護基する。トリチル化オリゴヌクレオチドはＨＰＬＣにより単離し、脱トリチル化し、そしてナトリウム塩として沈澱させる。ホスホロチオエートアナログは、通常細胞内に存在するヌクレアーゼに耐性である。

【００９４】

ホスホロチオエートオリゴマーの濃縮物とともに培養された細胞は、０．５ｍＭと同じくらい低い濃度でＨＣＶウイルス感染に耐性であることが予期される。

【００９５】
センスＲＮＡの１－２３配列に相補的な２３ｍｅｒのオリゴヌクレオチドアナログは、ヘアピン状立体配置に結合して安定化することによりＨＣＶメッセンジャーＲＮＡの翻訳を低減する。
【００９６】
（実施例９）
（抗ヘアピン分子を用いる５’ＵＴ領域の制御）
この実施例は、ペスチウイルスホモロジーボックスＩＶの配列に対応する２８個からなるヌクレオチド配列を用いる。国際特許出願番号ＰＣＴ　ＷＯ８８／０７５４４号に従って、配列番号１の２９１～３１８塩基に相補するホスホロチオエートオリゴヌクレオチドアナログを合成する。
【００９７】
本発明のホスホロチオエート物はＡｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　３８０－ＢＤＮＡ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｚｅｒで、Ｏ－メチルホスホルアミダイトを用いる通常のリン酸オリゴヌクレオチドの合成サイクルと同じように合成される。主な違いは酸化工程の間に用いられる試薬にある。
【００９８】
７．５グラムのＳ８分子の硫黄をまず７１ｍｌのピリジンおよび７．５ｍｌのトリエチルアミンとともに７１ｍｌの二硫化炭素に溶解した５％硫黄溶液を酸化試薬として用いる。得られた全量は３つのカラムでの３０ｍｅｒの合成に十分である。
【００９９】
上記酸化工程の前後に、カラムを二硫化炭素とピリジンとの１：１溶液で繰り返し洗浄してライン上に沈澱し得るあらゆる残留硫黄を除去する。３０ｍｅｒの３つのカラムでの合成には、総量３８０ｍｌのこの溶液で十分である。この溶液はできるだけ無水であるべきであり、各々新しい合成のために再調製するべきである。
【０１００】
硫黄酸化はヨウ素酸化ほどは速くなく、従って合成サイクル間でのヨウ素酸化の待ち時間３０秒に比べて、４５０秒の待ち時間が必要である。さらに最後の手順を、チオフェノールがカラムに送達された後、メタノール中に溶解している生じたあらゆる塩の除去を確実にするために、逆洗浄（ｒｅｖｅｒｓｅ　ｆｌｕｓｈ）を通常より５秒間長く、全部で１０秒行うように少し変える。
【０１０１】
２８個からなるヌクレオチドホスホロチオエート核酸アナログを、必要な時点で酸化サイクルを自動的に変化させることにより合成する。カラムから切断して、アンモニア水（６０°、１０時間）で脱保護した後、ホスホロチオエートオリゴマーおよびブロックコポリマーを逆相ＨＰＬＣ（ＰＲＰ－１カラム、１％酢酸トリエチルアンモニウム緩衝液（ｐＨ７）－アセトニトリル（２０分間で２０％から４０％に増加））を介して精製し、そしてこの溶液を２等量の酢酸エチルで抽出し、ドライアイスで凍結し、そして凍結乾燥する。
【０１０２】
この固形物を０．３ｍｌの１Ｍ　ＮａＣｌに溶解し、そして生成物を３．５倍容量の無水エタノールを添加して沈澱させる。ホスホロチオエートオリゴマーの酢酸塩（特にホモポリマーｄＣ２８）は、１Ｍ　ＮａＣｌにほとんど不溶性である。パスツールピペットによる少量のアンモニア蒸気（アンモニア水ではない）の導入は、全ての固形物を溶解する。
【０１０３】
０．５ｍＭ濃度の上記２８ヌクレオチドアナログを含む溶液と接触させた細胞は、ＨＣＶ感染またはＨＣＶのウイルスタンパク質の発現に耐性を示す。
【０１０４】
（実施例１０）
（ＡＳ５アンチセンス分子を用いる５’ＵＴ領域の制御）
ＡＳ５という２４ｍｅｒのアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ＨＣＶの５’ＵＴ領域の

ヌクレオチド２７７位～３００位に結合するが、以下の配列を有し上記のように合成された：

5’ＣＣＴＡＴＣＡＧＧＣＡＧＴＡＣＣＡＣＡＡＧＧＣＣ３’　（配列番号２）

ＡＳ５－ＰＯは通常のホスホジエステル結合を有するＡＳ５オリゴヌクレオチドを指す。ＡＳ５－ＰＳはＡＳ５オリゴヌクレオチドをいい、ここで全てのヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合であり、そして上記の実施例９のように合成される。ＡＳ５－３’ＣＨＯＬ－ＰＳおよびＡＳ５－３’ＣＨＯＬ－ＰＯはそれぞれＡＳ５－ＰＳおよびＡＳ５－ＰＯオリゴヌクレオチドを指し、コレステリル基がこの分子の３’末端に付加され、そして「Ｌｙｎｘ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ（Ｆｏｓｔｅｒ　Ｃｉｔｙ，ＣＡ）」により合成された。コレステリル基はまた、本明細書中に記載された方法によっても３’末端に付着し得る。

【０１０５】

上記各アンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＳＯ）を以下のアッセイで試験し、ＨＣＶの５’ＵＴ領域により制御される翻訳を阻害する能力を測定した。ＨＵＨ７細胞を「材料と方法」に記載したように増殖させた。種々のアンチセンス分子（ＡＳ５－ＰＯ、ＡＳ５－ＰＳ、ＡＳ５－３’ＣＨＯＬ－ＰＳ、ならびに－ＰＯ、－ＰＳ、および３’－ＣＨＯＬの実施態様の単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）由来のコントロール２１ｍｅｒ配列）を、最終濃度を０．１～１．０μＭに変化させてＨＵＨ７細胞培地に補充し、１２～２４時間インキュベートした。

【０１０６】

上記ＡＳＯでのインキュベーション後、次いで細胞を試験ＲＮＡ（実施例５ならびに図２および３に記載のＲ６およびＳＶＣＡＴ　ＲＮＡ）で、以下のようにトランスフェクトした：２～４μｇの各ＲＮＡを、２００μｌのリン酸緩衝生理食塩水中の１５μｇのリポフェクチン（Ｇｉｂｃｏ－ＢＲＬ）と混合し、１５分間インキュベートし、そして上記の「材料と方法」の項目Ｆに記載のように細胞に添加した。ＣＡＴ活性を上記の項目Ｆにおけるようにアッセイした（Ｃ．Ｍ．Ｇｏｒｍａｎら、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．（１９８２）２：１０４４－１０５１）。図７に結果を示す。

【０１０７】

カラム２～８および１２～１４は、R6テンプレートRNAを含むが、他方、カラム９～１１は、SVCATテンプレートRNAを含む。カラム１～２および９は、上記ASOインキュベーションしていないコントロールである。残りのカラムは、示されるようにAS5またはHSVコントロールASOを含む。データは、AS5-3’CHOL-POおよびAS5-3’CHOL-PSのASOが、HCV５’UT領域の制御下においてCAT転写および翻訳を特異的に阻害し、SV40プロモーター領域の制御下ではこのような転写および翻訳を阻害しないことを示す。

【０１０８】

これまでの特定の実施態様の記載は本発明の一般的性質を十分に開示しており、第三者が一般概念から離れることなく現在の知識を適用することにより、このような特定の実施態様を種々の適用に容易に修正および／または改造し得、従ってこのような改造および修正は、開示された実施態様の均等の意味および範囲内に含まれることを意図する。

【０１０９】

（配列表）

【０１１０】

【表３】

(1)一般的情報：
(i)出願人：カイロン　コーポレイション
(ii)発明の名称：HCVタンパク質の翻訳を制御するための方法および組成物
(iii)配列数：２
(iv)連絡住所：
(A)住所人：カイロン　コーポレイション
(B)番地：4560　ホートン　ストリート
(C)市：エミリービル
(D)州：カリフォルニア
(E)国：アメリカ合衆国
(F)郵便番号：94608-2916
(v)コンピューター読み出し形態：
(A)媒体型：フロッピーディスク、5.25インチ
(B)コンピューター：IBM PC互換用
(C)操作システム：MS-DOS Ver.3.3
(D)ソフトウェア：ワードパーフェクト5.1
(vi)現在の出願データ：
(A)出願番号：入手していない
(B)出願日：入手していない
(C)分類：入手していない
(vii)先願データ：
(A)出願番号：07/952,799
(B)出願日：1992年９月28日
(viii)代理人／事務所情報：
(A)氏名：ゴールドマン，ケネス　エム.
(B)登録番号：34,174
(C)照会／記録番号：0044.002
(ix)電話回線情報：
(A)電話：(510) 601-2719
(B)テレファックス：(510) 655-3542
(C)テレックス：入手していない

【０１１１】
【表４】

(2)配列番号(SEQ ID NO):1の情報：
(i)配列の特色：
(A)長さ：341ヌクレオチド
(B)型：核酸
(C)鎖の数：一本鎖
(D)トポロジー：直鎖状
(ii)配列の種類：ＤＮＡ
(vi)起源：(ATCC番号 40394)
(C)固体・単離クローン名：ns5hcv1
(xi)配列の特徴：配列番号(SEQ ID NO):1

GCCAGCCCCC TGATGGGGGC GACACTCCAC CATGAATCAC 40
TCCCCTGTGA GGAACTACTG TCTTCACGCA GAAAGCGTCT 80
AGCCATGGCG TTAGTATGAG TGTCGTGCAG CCTCCAGGAC 120
CCCCCCTCCC GGGAGAGCCA TAGTGGTCTG CGGAACCGGT 160
GAGTACACCG GAATTGCCAG GACGACCGGG TCCTTTCTTG 200
GATCAACCCG CTCAATGCCT GGAGATTTGG GCGTGCCCCC 240
GCAAGACTGC TAGCCGAGTA GTGTTGGGTC GCGAAAGGCC 280
TTGTGGTACT GCCTGATAGG GTGCTTGCGA GTGCCCCGGG 320
AGGTCTCGTA GACCGTGCAC C 360

(2)配列番号(SEQ ID NO):2の情報：
(i)配列の特色：
(A)長さ：24ヌクレオチド
(B)型：核酸
(C)鎖の数：一本鎖
(D)トポロジー：直鎖状
(ii)配列の種類：ＤＮＡ
(xi)配列の特徴：配列番号(SEQ ID NO):2

CCTATCAGGCAGTACCACAAGGCC

【図１】

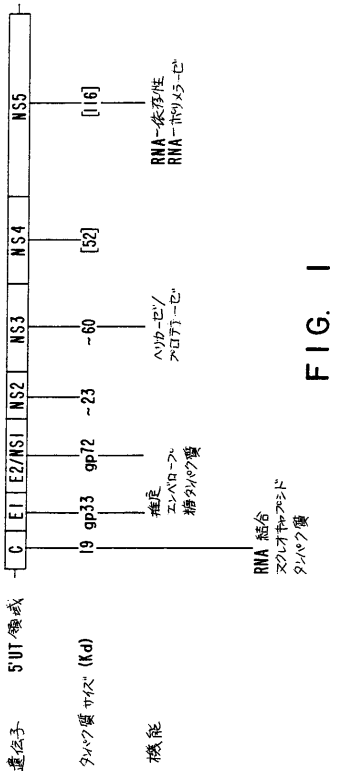


FIG. 1

【図２】

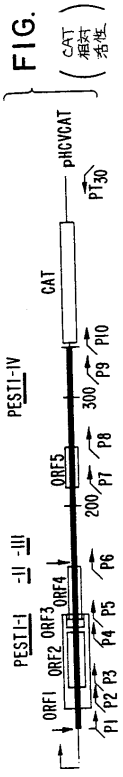


FIG. 2

【図３】

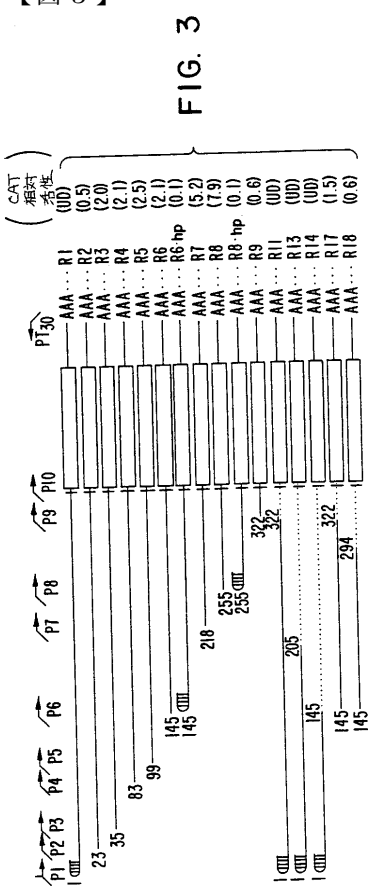


FIG. 3

【図４】

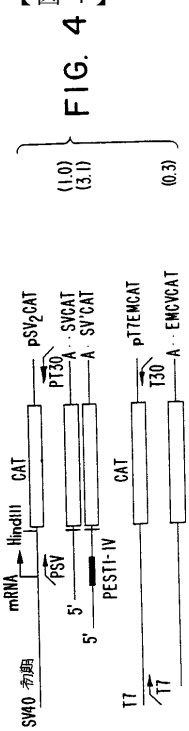


FIG. 4

【図５】

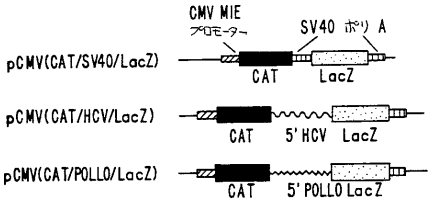


FIG. 5

【図６】

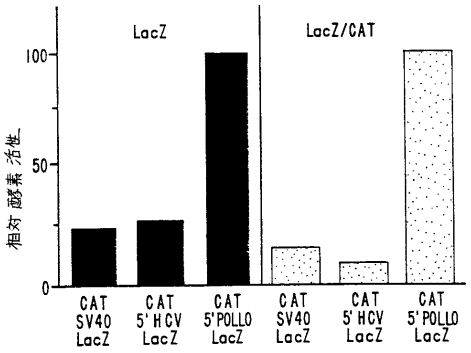


FIG. 6

【図７】

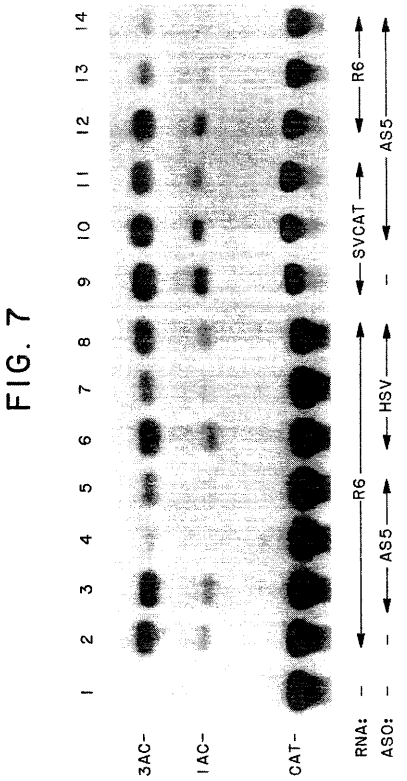


FIG. 7

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C07K 14/18 (2006.01) C07K 14/18

(72)発明者 ハング, ジャン エイチ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４５４９, ラファイエット, デル マール ドライブ ３２３８
(72)発明者 スペイト, リチャード アール.
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４００２, ベルモント, コルノネット ブールバード ２５０１
(72)発明者 ヨー, ビヤング ジェイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４５４９, ラファイエット, エヌオー. ２３, ブルック ストリート ３５２０
(72)発明者 スー, ビヨング エス.
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４５４９, ラファイエット, エヌオー. ２０７, イースト ストリート ９４９
(72)発明者 セルビー, マーク ジェイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４１３１, サンフランシスコ, ゲールウッド サークル １３６
(72)発明者 ホートン, マイケル
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４５２６, ダンビル, ローズミード コート ５３

合議体
審判長 鈴木 恵理子
審判官 深草 亜子
審判官 平田 和男

(56)参考文献 国際公開第９０／１１０８９（WO, A1）
国際公開第９１／１７７５５（WO, A1）
特表平４－５０４７１５（JP, A）
Ｐｒｏｃ. Ｎａｔｌ. Ａｃａｄ. Ｓｃｉ. USA, １９９１, Ｖｏｌ. ８８, p. １７１１－１７１５
Ｊ. Ｖｉｒｏｌ., １９９２ Ｍａｒ, Ｖｏｌ. ６６, p. １４７６－１４８３
Ｇｅｎｅ, １９８８, Ｖｏｌ. ７２, p. ２５－３４
Ｐｒｏｃ. Ｎａｔｌ. Ａｃａｄ. Ｓｃｉ. USA, １９８８, Ｖｏｌ. ８５, p. ５５０７－５５１１
Ｖｉｒｕｓ Ｇｅｎｅｓ, １９９２ Ｊａｎ, Ｖｏｌ. ６, p. ３３－４６

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C12N15/00-15/90