

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6687542号  
(P6687542)

(45) 発行日 令和2年4月22日(2020.4.22)

(24) 登録日 令和2年4月6日(2020.4.6)

(51) Int.Cl. F I  
**C 1 2 N 15/113 (2010.01)** C 1 2 N 15/113 Z N A Z  
**C O 7 K 7/06 (2006.01)** C O 7 K 7/06  
**C O 7 K 7/02 (2006.01)** C O 7 K 7/02  
**C O 7 K 7/08 (2006.01)** C O 7 K 7/08  
**A 6 1 K 47/64 (2017.01)** A 6 1 K 47/64

請求項の数 14 (全 112 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-568430 (P2016-568430)	(73) 特許権者	516341280
(86) (22) 出願日	平成27年5月15日 (2015.5.15)		オレゴン ステート ユニバーシティ
(65) 公表番号	特表2017-522004 (P2017-522004A)		アメリカ合衆国 オレゴン 97331-
(43) 公表日	平成29年8月10日 (2017.8.10)		3804, コーバリス, ナシュ ホー
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/031213		ル 220
(87) 国際公開番号	W02015/179249	(73) 特許権者	500039463
(87) 国際公開日	平成27年11月26日 (2015.11.26)		ボード・オブ・リージェンツ, ザ・ユニバ
審査請求日	平成30年5月14日 (2018.5.14)		ーシティ・オブ・テキサス・システム
(31) 優先権主張番号	62/000, 431		アメリカ合衆国 テキサス 78701,
(32) 優先日	平成26年5月19日 (2014.5.19)		オースティン, ウェスト 7ティーエイチ
(33) 優先権主張国・地域又は機関			ストリート 210
	米国 (US)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	62/129, 746		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成27年3月6日 (2015.3.6)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国・地域又は機関			弁理士 森下 夏樹
	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アンチセンス抗菌化合物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

モルホリノサブユニット、および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リン含有サブユニット間連結から構成され、かつ(a)約10~40個のヌクレオチド塩基、ならびに(b)生化学的経路および/もしくは細胞プロセスに関連するタンパク質、または抗生物質耐性に関連するタンパク質をコードする細菌mRNA標的配列と特異的にハイブリダイズするのに十分な長さおよび相補性の標的化配列を有し、細胞透過性ペプチド(CPP)にコンジュゲートされている、アンチセンスモルホリノオリゴマーであって、

前記標的化配列が、

- 1) 配列番号2 (A T A T C G C T C A C)
- 2) 配列番号3 (A T T C T C C T C A T)
- 3) 配列番号12 (A T C C A T T T A G T)
- 4) 配列番号16 (A C T C G G G A C A T)
- 5) 配列番号17 (C T A T T C T C C A A)
- 6) 配列番号19 (C T T A G A C A T G G)
- 7) 配列番号20 (A T G A T A C G C A T)
- 8) 配列番号21 (T C T T T G G C C A T)
- 9) 配列番号22 (T C A A A T G A G G C)
- 10) 配列番号23 (A A T G A G G C C A T)

10

20

1 1) 配列番号 27 (TTCCCTGCCAT)、および

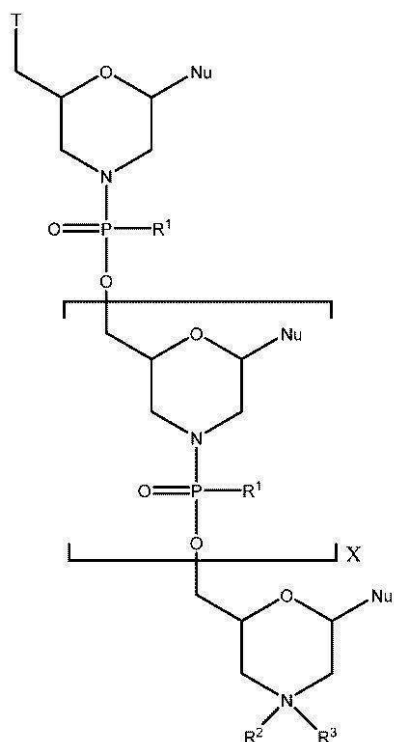
1 2) 配列番号 53 (GGTGCTCAAC)

から選択され、ここでチミン塩基 (T) はウラシル塩基 (U) であってもよい、  
アンチセンスモルホリノオリゴマー。

【請求項 2】

式 (I) :

【化 4 4】



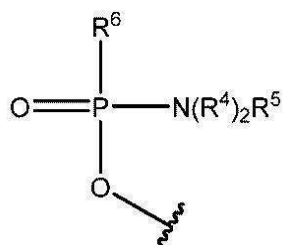
のアンチセンスモルホリノオリゴマーまたは薬学的に許容されるその塩であって、

式中、各 Nu は、一緒になって標的化配列を形成する核酸塩基であり、

X は、9 ~ 38 の整数であり、

T は、OH および式 :

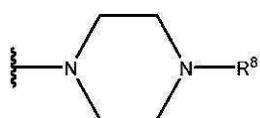
【化 4 5】



の部分から選択され、

式中、各 R<sup>4</sup> は、独立して C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキルであり、R<sup>5</sup> は、電子対および H から選択され、R<sup>6</sup> は、OH、-N(R<sup>7</sup>)CH<sub>2</sub>C(O)NH<sub>2</sub>、および式 :

【化 4 6】



の部分から選択され、

式中、

R<sup>7</sup> は、H および C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキルから選択され、

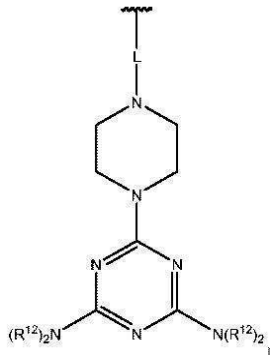
$R^8$  は、 $G$ 、 $-C(O)-R^9OH$ 、アシル、トリチルおよび 4 - メトキシトリチルから選択され、

$R^9$  は式  $-(O-アルキル)_y-$  のものであり、式中、 $y$  は、3 ~ 10 の整数であり、 $y$  個のアルキル基のそれぞれは、 $C_2 \sim C_6$  アルキルから独立して選択され、

$R^1$  の各々は、 $-N(R^{10})_2R^{11}$  であり、式中、各  $R^{10}$  は、独立して  $C_1 \sim C_6$  アルキルであり、 $R^{11}$  は、電子対および H から選択され、

$R^2$  は、H、 $G$ 、アシル、トリチル、4 - メトキシトリチル、ベンゾイル、ステアロイルおよび式：

【化 4 7】



10

の部分から選択され、

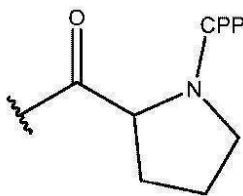
20

式中、 $L$  は、 $-C(O)(CH_2)_6C(O)-$  および  $-C(O)(CH_2)_2S_2(CH_2)_2C(O)-$  から選択され、各  $R^{12}$  は、式  $-(CH_2)_2OC(O)N(R^{14})_2$  のものであり、式中、各  $R^{14}$  は、式  $-(CH_2)_6NHC(=NH)NH_2$  のものであり、

$R^3$  は、電子対、H および  $C_1 \sim C_6$  アルキルから選択され、

$G$  は、細胞透過性ペプチド (「CPP」)、ならびに  $-C(O)(CH_2)_5NH-CPP$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NH-CPP$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NH-CPP$  および  $-C(O)CH_2NH-CPP$  から選択されるリンカー部分であるか、または  $G$  は、式：

【化 4 8】



30

のものであり、式中、前記 CPP は、前記 CPP のカルボキシ末端でアミド結合によって前記リンカー部分に付着しており、ただし、1 つの G のみが式 (I) のアンチセンスモルホリノオリゴマーに存在し、

前記標的化配列が、生化学的経路および / または細胞プロセスならびに抗生物質耐性に関連するタンパク質の少なくとも 1 つから選択されるタンパク質をコードする細菌 mRNA 標的配列と特異的にハイブリダイズし、

40

前記標的化配列が、

- 1) 配列番号 2 (A T A T C G C T C A C) (X は 9 である)
- 2) 配列番号 3 (A T T C T C C T C A T) (X は 9 である)
- 3) 配列番号 12 (A T C C A T T T A G T) (X は 9 である)
- 4) 配列番号 16 (A C T C G G G A C A T) (X は 9 である)
- 5) 配列番号 17 (C T A T T C T C C A A) (X は 9 である)
- 6) 配列番号 19 (C T T A G A C A T G G) (X は 9 である)
- 7) 配列番号 20 (A T G A T A C G C A T) (X は 9 である)

50

8) 配列番号 21 (TCTTTGGCCAT) (Xは9である)

9) 配列番号 22 (TCAATGAGGC) (Xは9である)

10) 配列番号 23 (AATGAGGCCAT) (Xは9である)

11) 配列番号 27 (TTCCTTGCCAT) (Xは9である)、および

12) 配列番号 53 (GGTGCTCAAC) (Xは9である)

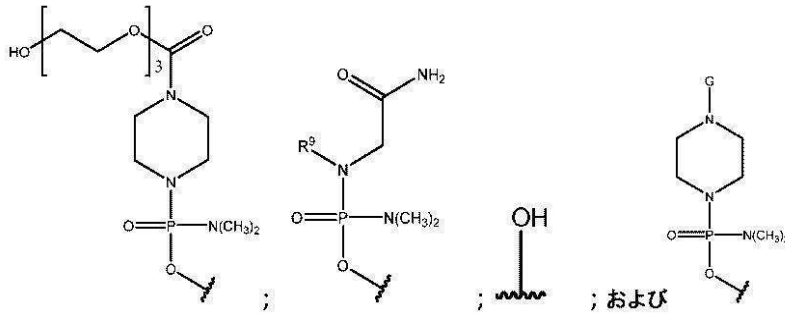
から選択され、ここでチミン塩基 (T) はウラシル塩基 (U) であってもよい、アンチセンスモルホリノオリゴマーまたは薬学的に許容されるその塩。

【請求項 3】

Tが、

【化 4 9】

10



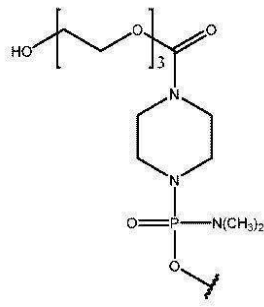
から選択される、請求項 2 に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

20

【請求項 4】

Tが、式：

【化 5 3】



30

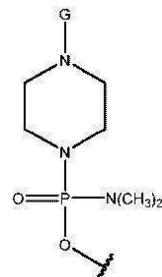
のものであり、

$R^2$  が、Gである、請求項 2 に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

【請求項 5】

Tが、式：

【化 5 4】



40

のものである、請求項 2 に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

【請求項 6】

$R^1$  の少なくとも 1 つが、 $-N(CH_3)_2$  である、請求項 2 から 5 のいずれか一項に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

【請求項 7】

50

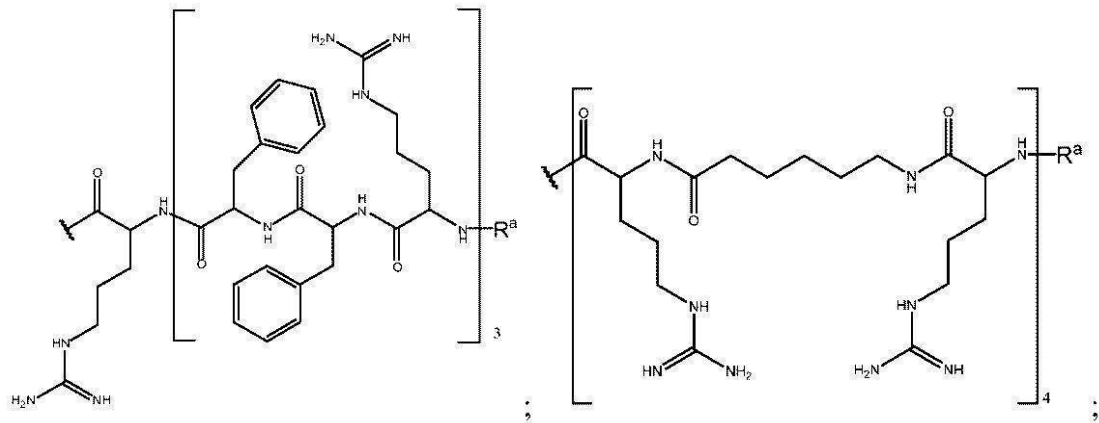


各  $R^1$  が、 $-N(CH_3)_2$  である、請求項 6 に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

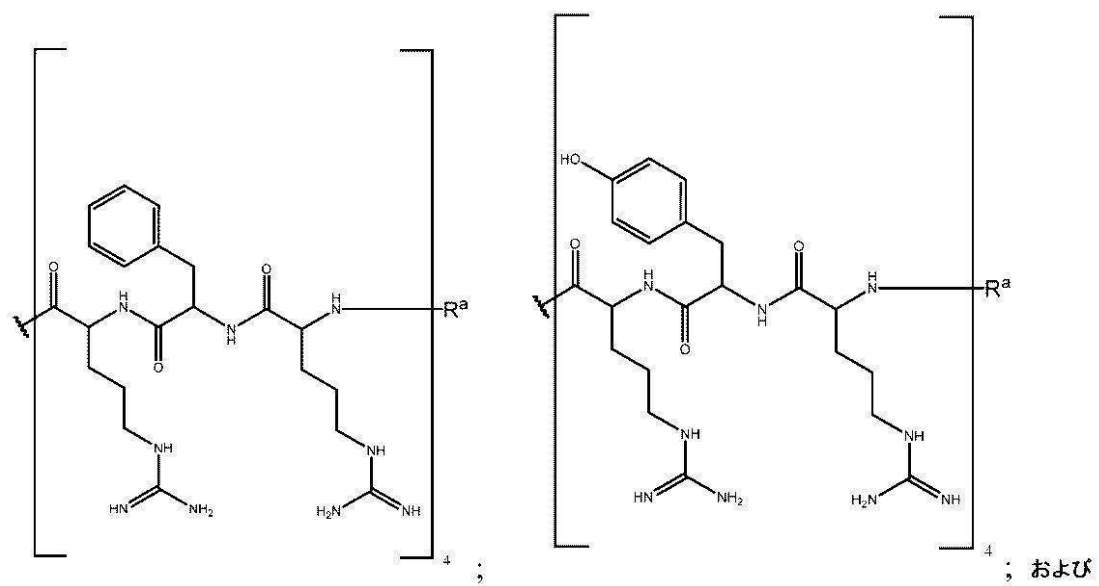
【請求項 8】

前記 CPP が、

【化 5 5】



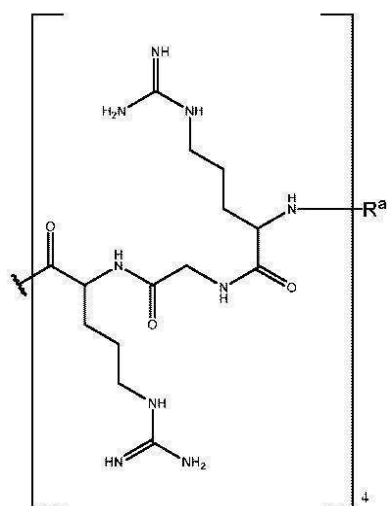
10



20

30

【化 5 6】



40

50

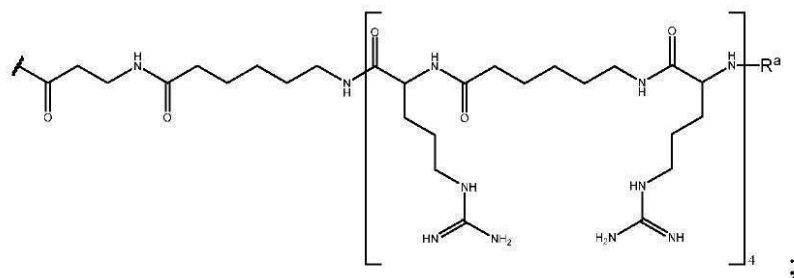
から選択され、

$R^a$  が、H、アセチル、ベンゾイルおよびステアロイルから選択される、  
請求項 2 ～ 7 のいずれか一項に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

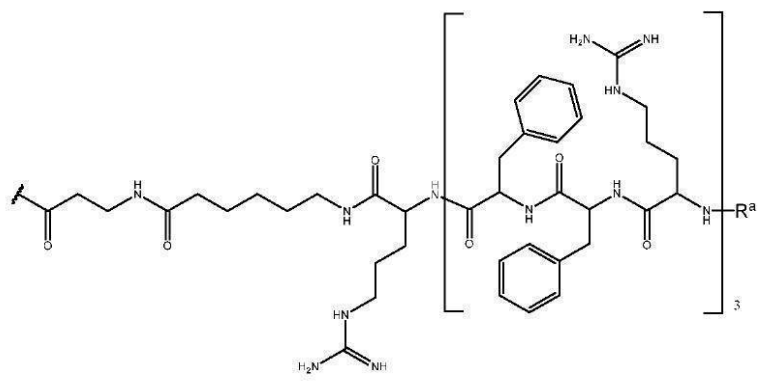
【請求項 9】

G が、

【化 57】

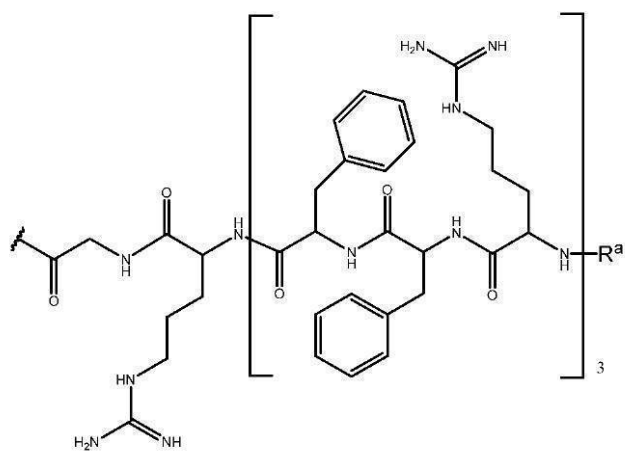


10

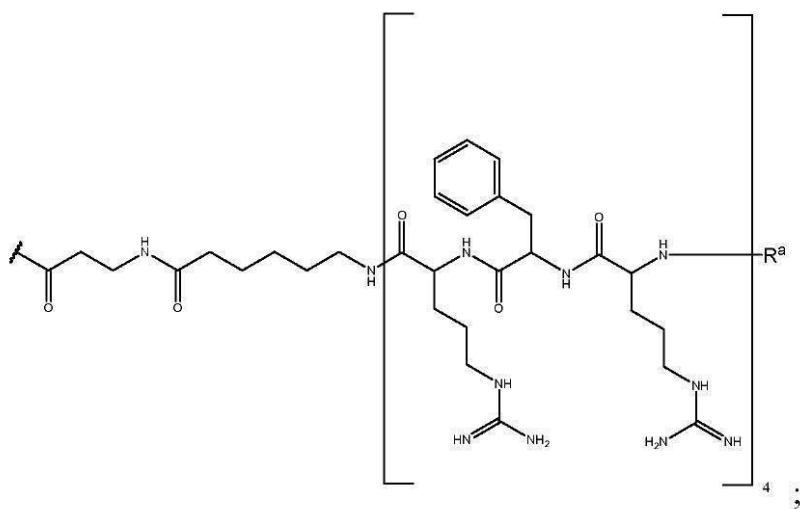


20

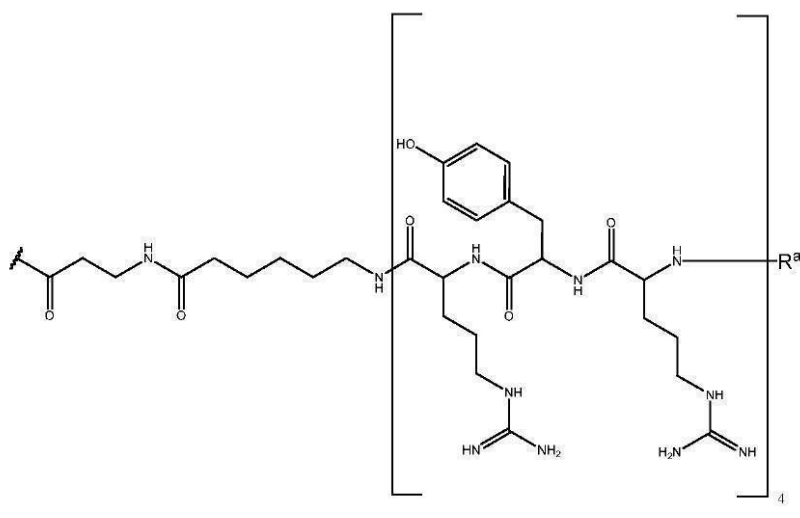
【化 5 8】



10



20

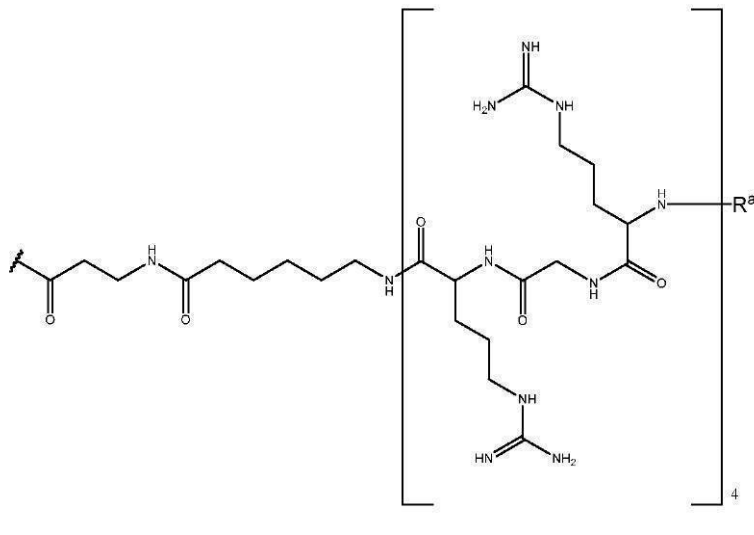


30

40

; および

【化 5 9】



10

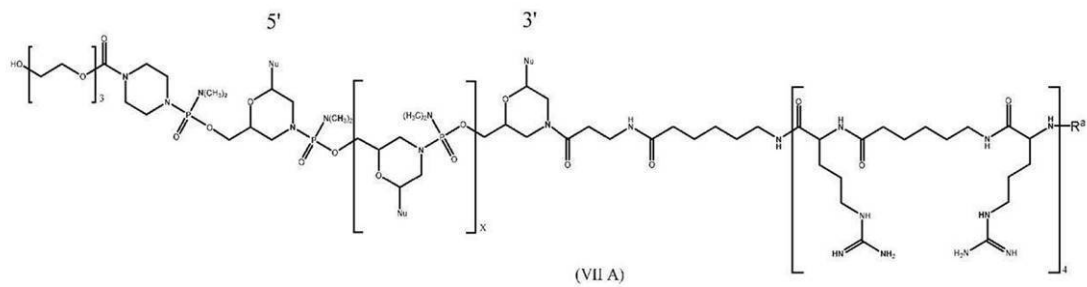
から選択され、

$R^a$  が、H、アセチル、ベンゾイルおよびステアロイルから選択される、  
請求項 2 から 7 のいずれか一項に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

【請求項 10】

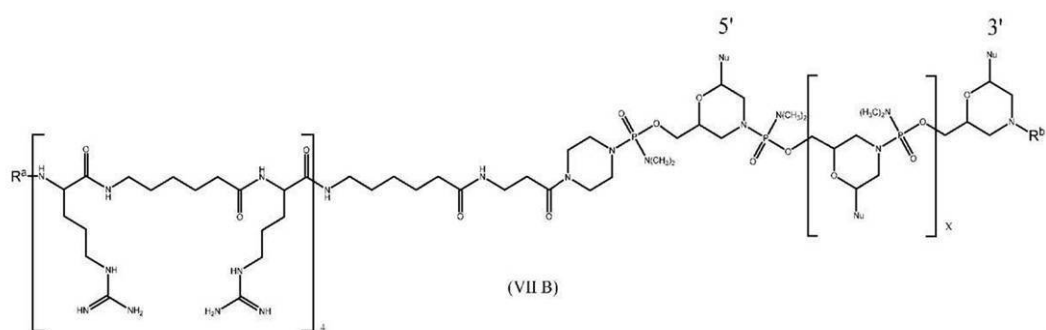
前記アンチセンスオリゴマーが、

【化 6 0】



(VII A)

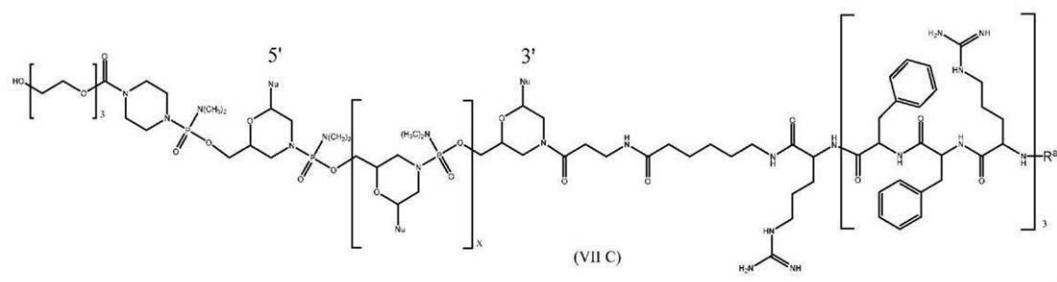
30



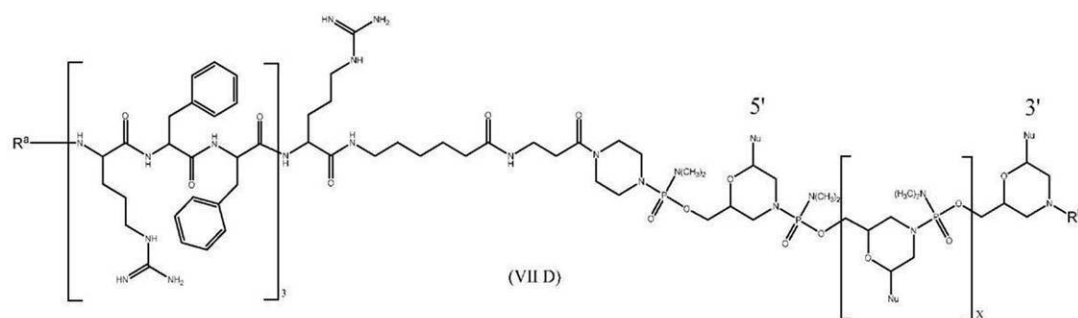
(VII B)

40

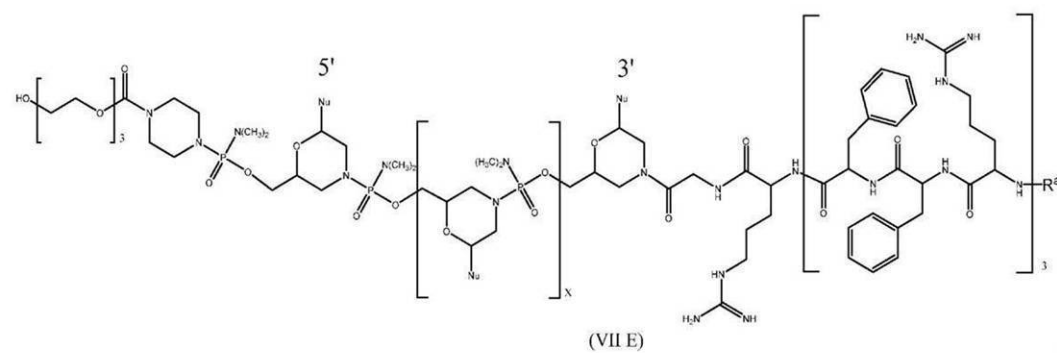
## 【化 6 1】



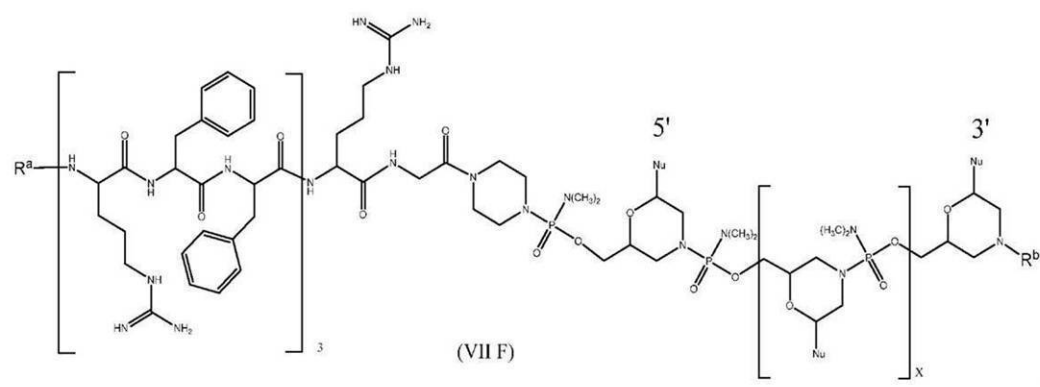
10



20

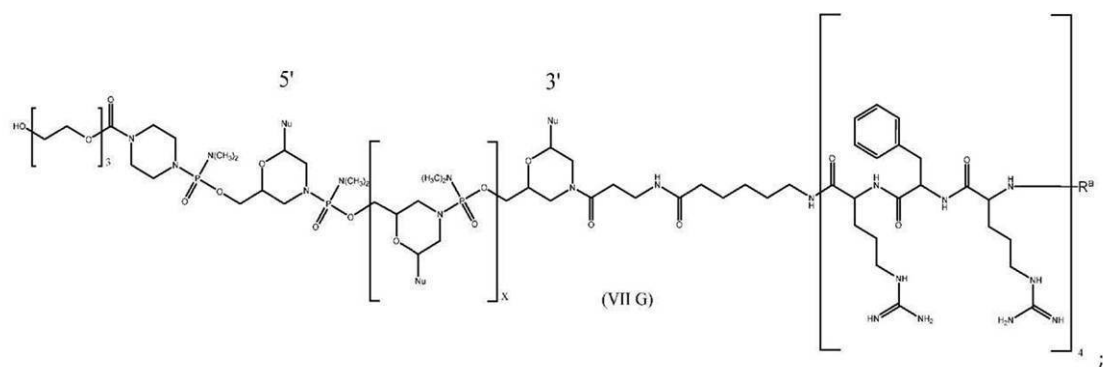


30

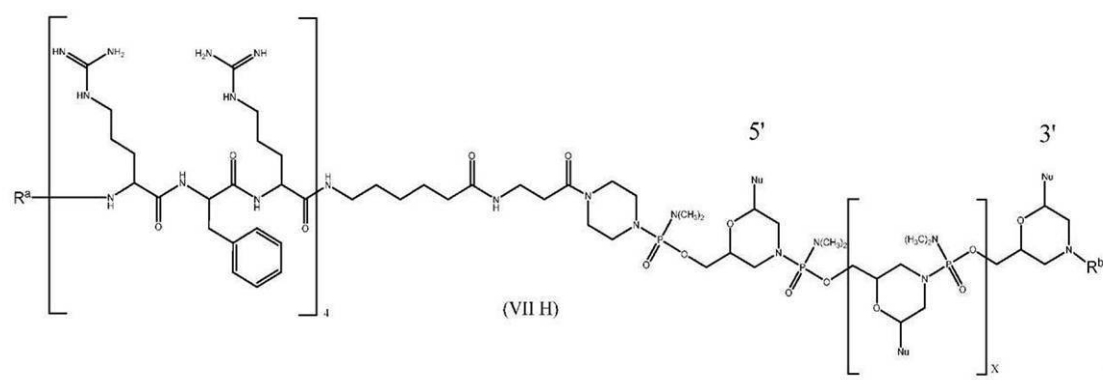


40

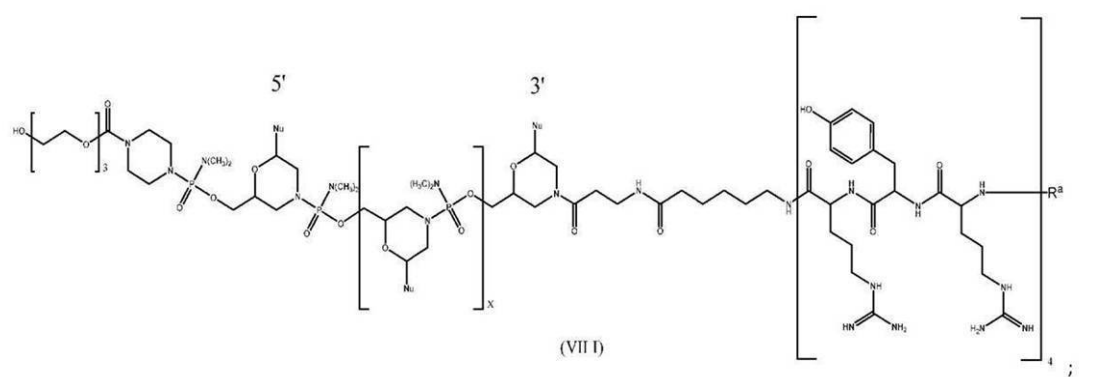
【化 6 2】



10

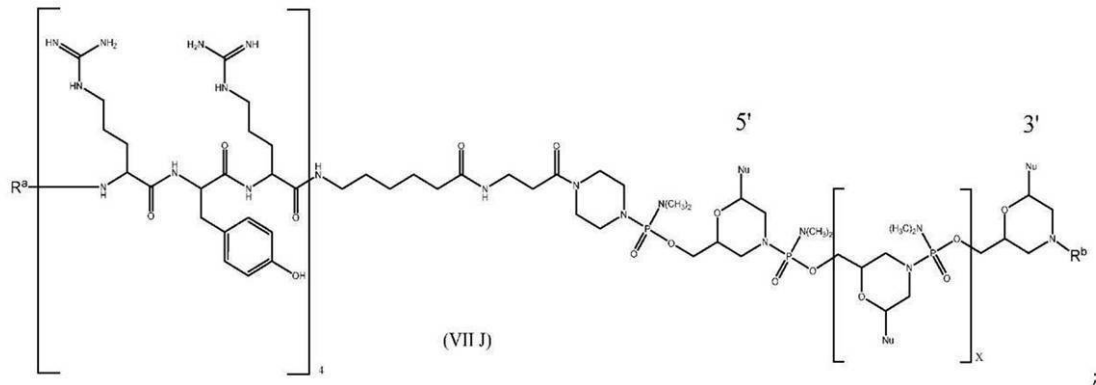


20

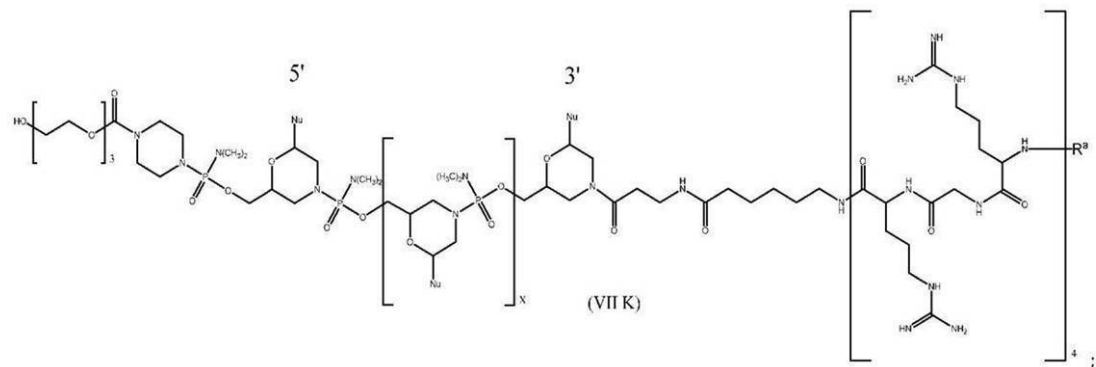


30

## 【化 6 3】

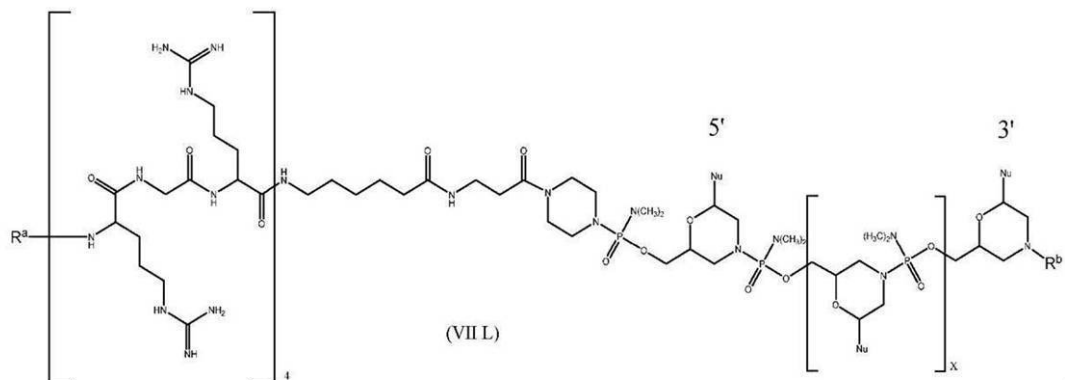


10



20

および



30

から選択される式 (VII) のもの、または上記のいずれかの薬学的に許容される塩であり、

式中、 $R^a$  は、H、アセチル、ベンゾイルおよびステアロイルから選択され、 $R^b$  は、H、アセチル、ベンゾイル、ステアロイル、トリチルおよび 4 - メトキシトリチルから選択され、 $X$  および  $Nu$  は、請求項 2 において定義した通りである、  
請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

40

## 【請求項 1 1】

前記標的化配列が、

配列番号 2 (A T A T C G C T C A C) (X は 9 である)、または

配列番号 3 (A T T C T C C T C A T) (X は 9 である)

であり、ここでチミン塩基 (T) はウラシル塩基 (U) であってもよい、

請求項 2 から 10 のいずれか一項に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

## 【請求項 1 2】

前記標的化配列が、

配列番号 1 2 (A T C C A T T T A G T) (X は 9 である)

50

であり、ここでチミン塩基（Ｔ）はウラシル塩基（Ｕ）であってもよい、請求項 2 から 10 のいずれか一項に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

【請求項 13】

薬学的に許容される担体およびアンチセンスモルホリノオリゴマーを含む医薬組成物であって、前記アンチセンスモルホリノオリゴマーは、請求項 2 において定義した通りである、医薬組成物。

【請求項 14】

細菌における、生化学的経路および／または細胞プロセスならびに抗生物質耐性に関連するタンパク質の少なくとも 1 つから選択されるタンパク質の発現および活性を低下させるのに使用するための、請求項 2 において定義した通りのアンチセンスモルホリノオリゴマーを含む組成物。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

この出願は、米国特許法 § 119 (e) の下、2014 年 5 月 19 日に出願された米国出願第 62 / 000,431 号および 2015 年 3 月 6 日に出願された米国出願第 62 / 129,746 号（これらの各々は、それらの全体が参考として援用される）に対する優先権を主張する。

【0002】

20

配列表に関する記述

本出願に関連する配列表は紙のコピーの代わりにテキスト形式で提供し、参照により本明細書に組み込まれている。配列表を含有するテキストファイルの名称は、SATH - 004\_\_01WO\_\_ST25.txt である。テキストファイルは約 15 KB であり、2015 年 5 月 15 日に作製され、EFS - ウェブによって電子的に提出されている。

【0003】

本開示は、生化学的経路および／または細胞プロセスに関与する細菌の遺伝子に対して標的化されるアンチセンスオリゴマー、および関連組成物、ならびに感染している哺乳動物被験体を処置するために、例えば一次抗微生物薬としてまたは古典的な抗微生物薬との補助療法としてオリゴマーおよび組成物を使用する方法を含む。

30

【背景技術】

【0004】

現在、細菌病原体に対する使用におけるいくつかのタイプの抗生物質化合物が存在し、これらの化合物は種々の抗細菌機序によって作用する。例えば、ベータ - ラクタム系抗生物質、例えば、ペニシリンおよびセファロsporin は、ペプチドグリカン合成における最終ステップを阻害するように作用する。バンコマイシンおよびテイコブラニン (teichoplanin) を含めたグリコペプチド系抗生物質は、ムラミル - ペンタペプチドのグリコシル基転移およびペプチド転移の両方を阻害し、ペプチドグリカン合成を再び妨げる。他の周知の抗生物質は、細菌 DNA 複製を阻害するキノロン、細菌 RNA ポリメラーゼの阻害剤、例えば、リファンピン、およびスルホンアミドを含めた、テトラヒドロフォ

40

【0005】

一部のクラスの抗生物質は、タンパク質合成のレベルにおいて作用する。これらの中で注目すべきであるのは、アミノグリコシド、例えば、カナマイシンおよびゲンタマイシンである。このクラスの化合物は、細菌 30S リボソームサブユニットを標的化し、50S サブユニットとの会合を防止し、機能的リボソームを形成する。別の重要なクラスの抗生物質であるテトラサイクリンはまた、30S リボソームサブユニットを標的化し、対応する mRNA コドンとのアミノアシル化した tRNA のアラインメントを防止することによって作用する。別のクラスの抗生物質であるマクロライドおよびリンコサミドは、50S リボソームサブユニットに結合し、ペプチド伸長を阻害するか、またはリボソームトラン

50



スロケーションを防止することによって、細菌合成を阻害する。

【0006】

抗生物質による細菌感染を制御または排除することにおける目覚ましい成功に関わらず、ヒトへの薬、ならびに家禽および家畜の生産における飼料の栄養補助剤としての両方における抗生物質の広範な使用は、多くの病原性細菌における薬物耐性をもたらしてきた。抗生物質耐性機序は、種々の形態をとることができる。特に、グラム陰性菌における、ペーラクタムに対する耐性の主要な機序の1つは、ラクタム環を切断することによって抗生物質を不活性とする酵素ペータ-ラクタマーゼである。同様に、アミノグリコシドに対する耐性は、この場合は、ホスホリル、アデニル、またはアセチル基を加えることによって、抗生物質を不活性化することができる酵素が関与することが多い。抗生物質の能動排出は、多くの細菌が耐性を発生させる別の方法である。テトラサイクリン排出について排出タンパク質をコードする遺伝子、例えば、*tetA*、*tetG*、*tetL*、および*tetK*遺伝子は同定されている。細菌標的は、薬物の標的を変化させることによって耐性を発生し得る。例えば、多くのペータ-ラクタム耐性菌におけるいわゆるペニシリン結合タンパク質(PBP)は、標的タンパク質への重大な抗生物質結合を阻害するように変化する。テトラサイクリンに対する耐性は、排出が増進されることに加えて、抗生物質への結合についてリボソームと競合することができる細胞質タンパク質の出現が関与し得る。細菌酵素を阻害することによって作用するこれらの抗生物質、例えばスルホンアミドについて、標的酵素における点変異は耐性を与え得る。

10

【0007】

*Escherichia coli*は、共生生物としてヒトの大腸に通常、生息している。しかし、*Escherichia coli*は、様々な臨床的感染を引き起こす恐れもあり、菌血症の主要原因である。院内菌血症および市中菌血症を有する患者から単離された*E. coli*の抗生物質耐性株の数が憂慮するほど増加している。複数の抗生物質に対して耐性である株は珍しくない。

20

【0008】

*Acinetobacter baumannii*は、長年にわたり出現している、院内感染の主な原因となっている、遍在する生物である。疫学のこの変化は、*A. baumannii*が、医学界が世界的に直面している最も抗生物質耐性のグラム陰性病原体の1つになったことを考慮すると、とりわけ、懸念されることである。*A. baumannii*における多剤耐性の急速な増加により、治療医師には、治療選択肢がほとんど残されていない。コリスチンなどの薬物が、現在、頻繁に使用されているが、コリスチン耐性株が出現している。*Acinetobacter baumannii*は、様々な臨床的感染を引き起こす恐れがあり、肺炎が最も頻繁なものの1つである。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

多剤耐性(MDR)が関与する場合を含めた多くの病原性細菌における抗生物質耐性の出現は、多くの細菌病原体が医学的介入によって単純に処置不能であった抗生物質後の時代の恐怖を増加させる。このように、(i)細菌感染の抗生物質処置を現在妨害している主要なタイプの抗生物質耐性に供されない、(ii)急速におよび標的細菌特異性に関して妥当な程度の予測性を伴って開発することができ、(iii)低用量において有効であり、かつ(iv)副作用をほとんど示さない抗微生物剤が必要とされている。

40

【課題を解決するための手段】

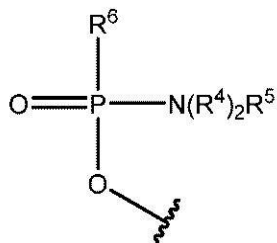
【0010】

本開示の実施形態は、一部には、生化学的経路、細胞プロセスおよび/または抗生物質耐性に関連する細菌の遺伝子のアンチセンス標的化が、普通なら抗生物質耐性がある病原性細菌の抗生物質への感受性を高めて、ある特定の病原性細菌の成長能力を低下させることができるという発見に関連している。例えば、RNA生合成、タンパク質生合成、脂肪酸生合成、ペプチドグリカン生合成、細胞エネルギーホメオスタシス、細胞分裂、芳香族

50



## 【化 2】

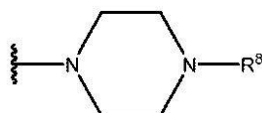


の部分から選択され、

式中、各  $R^4$  は、独立して  $C_1 \sim C_6$  アルキルであり、 $R^5$  は、電子対および H から選  
 択され、 $R^6$  は、OH、 $-N(R^7)CH_2C(O)NH_2$ 、および式：

10

## 【化 3】



の部分から選択され、

式中、

$R^7$  は、H および  $C_1 \sim C_6$  アルキルから選択され、

$R^8$  は、G、 $-C(O)-R^9OH$ 、アシル、トリチルおよび 4 - メトキシトリチル  
 から選択され、

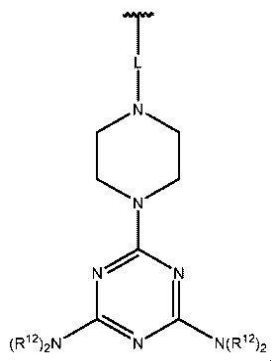
20

$R^9$  は式  $-(O-アルキル)_y-$  のものであり、式中、 $y$  は、3 ~ 10 の整数であ  
 り、 $y$  個のアルキル基のそれぞれは、 $C_2 \sim C_6$  アルキルから独立して選択され、

$R^1$  の各実例は、 $-N(R^{10})_2R^{11}$  であり、式中、各  $R^{10}$  は、独立して  $C_1$   
 $\sim C_6$  アルキルであり、 $R^{11}$  は、電子対および H から選択され、

$R^2$  は、H、G、アシル、トリチル、4 - メトキシトリチル、ベンゾイル、ステアロ  
 イルおよび式：

## 【化 4】



30

の部分から選択され、

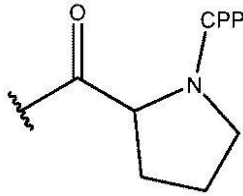
式中、L は、 $-C(O)(CH_2)_6C(O)-$  および  $-C(O)(CH_2)_2S_2(C$   
 $CH_2)_2C(O)-$  から選択され、各  $R^{12}$  は、式  $-(CH_2)_2OC(O)N(R^1$   
 $^4)_2$  のものであり、式中、各  $R^{14}$  は、式  $-(CH_2)_6NHC(=NH)NH_2$  のも  
 のであり、

40

$R^3$  は、電子対、H および  $C_1 \sim C_6$  アルキルから選択され、

G は、細胞透過性ペプチド (「CPP」)、ならびに  $-C(O)(CH_2)_5NH-C$   
 $PP$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NH-CPP$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(C$   
 $H_2)_5NH-CPP$  および  $-C(O)CH_2NH-CPP$  から選択されるリンカー部分  
 であるか、または G は式：

## 【化 5】



のものであり、式中、CPPは、CPPのカルボキシ末端でアミド結合によってリンカー部分に付着しているが、ただし、Gの1つのみの実例が存在し、

標的化配列が、本明細書に記載されている通り、生化学的経路および/もしくは細胞プロセスに関連するタンパク質、または抗生物質耐性に関連するタンパク質をコードする細菌mRNA標的配列と特異的にハイブリダイズする。

## 【0013】

一部の実施形態では、標的配列は、細菌mRNAの翻訳開始コドン、および/または細菌mRNAの翻訳開始コドンの上流または下流の約30塩基内の配列を含む。

## 【0014】

一部の実施形態では、生化学的経路および/または細胞プロセスに関連するタンパク質は、脂肪酸生合成タンパク質である。ある特定の実施形態では、脂肪酸生合成タンパク質は、アシルキャリアータンパク質である。ある特定の実施形態では、アシルキャリアータンパク質はAcPである。一部の実施形態では、標的配列は、チミン塩基(T)が任意選択でウラシル塩基(U)である、配列番号69または70である。ある特定の実施形態では、脂肪酸生合成タンパク質は、アセチル補酵素Aカルボキシラーゼのカルボキシルトランスフェラーゼアルファサブユニットである。ある特定の実施形態では、アセチル補酵素AカルボキシラーゼのカルボキシルトランスフェラーゼアルファサブユニットはAccAである。ある特定の実施形態では、標的化配列は、配列番号1~11で示されるか、配列番号1~11の少なくとも10の連続するヌクレオチドのフラグメントを含むか、または配列番号1~11に対して少なくとも80%の配列同一性を有する変異体を含み、チミン塩基(T)は任意選択でウラシル塩基(U)である。

## 【0015】

一部の実施形態では、生化学的経路および/または細胞プロセスに関連するタンパク質は、ペプチドグリカン生合成タンパク質である。ある特定の実施形態では、ペプチドグリカン生合成タンパク質は、UDP-N-アセチルグルコサミン1-カルボキシビニルトランスフェラーゼである。特定の実施形態では、UDP-N-アセチルグルコサミン1-カルボキシビニルトランスフェラーゼは、MurAである。

## 【0016】

ある特定の実施形態では、生化学的経路および/または細胞プロセスに関連するタンパク質は、リボソームタンパク質である。一部の実施形態では、リボソームタンパク質は、50Sリボソームタンパク質L28である。

## 【0017】

ある特定の実施形態では、50Sリボソームタンパク質L28はRpmBである。特定の実施形態では、生化学的経路および/または細胞プロセスに関連するタンパク質は、細胞エネルギーホメオスタシスタンパク質である。

## 【0018】

ある特定の実施形態では、細胞エネルギーホメオスタシスタンパク質は、アデニル酸キナーゼである。具体的な実施形態では、アデニル酸キナーゼはAdkである。

## 【0019】

ある特定の実施形態では、生化学的経路および/または細胞プロセスに関連するタンパク質は、タンパク質生合成タンパク質である。一部の実施形態では、タンパク質生合成タンパク質は、翻訳開始因子である。様々な実施形態では、翻訳開始因子はInfAである。

## 【0020】

ある特定の実施形態では、生化学的経路および/または細胞プロセスに関連するタンパク質は、細胞分裂タンパク質である。特定の実施形態では、細胞分裂タンパク質は、細菌の細胞分裂の隔壁の見込み部位 (future site) において環に集合するタンパク質である。

## 【0021】

一部の実施形態では、細菌の細胞分裂の隔壁の見込み部位において環に集合するタンパク質は、FtsZである。ある特定の実施形態では、生化学的経路および/または細胞プロセスに関連するタンパク質は、RNA合成タンパク質である。

## 【0022】

ある特定の実施形態では、RNA合成タンパク質はRNAポリメラーゼのシグマD因子である。特定の実施形態では、RNAポリメラーゼのシグマD因子はRpoDである。

## 【0023】

一部の実施形態では、生化学的経路および/または細胞プロセスに関連するタンパク質は、芳香族化合物の生合成タンパク質である。一部の実施形態では、芳香族化合物の生合成タンパク質は、コリスミ酸シンターゼ (5-エノールピルビルシキミ酸 (enolpyruvylshikimate) - 3-リン酸ホスホリアーゼ (phospholysase)) である。特定の実施形態では、このコリスミ酸シンターゼ (5-エノールピルビルシキミ酸 - 3-リン酸ホスホリアーゼ) は、AroCである。

## 【0024】

具体的な実施形態では、標的化配列は、配列番号12~53で示されるか、配列番号12~53の少なくとも10の連続するヌクレオチドのフラグメントを含むか、または配列番号12~53に対して少なくとも80%の配列同一性を有する変異体を含み、チミン塩基 (T) は任意選択でウラシル塩基 (U) である。

## 【0025】

ある特定の実施形態では、抗生物質耐性に関連するタンパク質は、TEMベータ-ラクタマーゼ (Blat)、クロラムフェニコール耐性遺伝子Cmlおよび耐性-小結節形成-細胞分裂 (RND) 型多剤排出ポンプサブユニットAdeA (adeA) の少なくとも1つから選択される。特定の実施形態では、標的化配列は、配列番号54~56で示されるか、配列番号54~56の少なくとも10の連続するヌクレオチドのフラグメントを含むか、または配列番号54~56に対して少なくとも80%の配列同一性を有する変異体を含み、チミン塩基 (T) は任意選択でウラシル塩基 (U) である。

## 【0026】

薬学的に許容される担体および本明細書に記載されているアンチセンスオリゴマーを含む、医薬組成物も含まれる。一部の医薬組成物は、トブラマイシン、メロペネムおよび/またはコリスチンの1つまたは複数などの、本明細書に記載されている抗微生物剤をさらに含む。

## 【0027】

一部の実施形態は、細菌における生化学的経路および/または細胞プロセスならびに抗生物質耐性に関連するタンパク質の少なくとも1つから選択されるタンパク質の発現および活性を低下させる方法であって、細菌を本明細書に記載されているアンチセンスオリゴマーおよび/または医薬組成物に接触させることを含む、方法を含む。

## 【0028】

ある特定の実施形態では、細菌は被験体内にあり、方法は、被験体にアンチセンスオリゴマーを投与することを含む。一部の実施形態では、細菌はEscherichiaおよびAcinetobacterの属から選択される。特定の実施形態では、細菌はEscherichiaまたはAcinetobacterの抗生物質耐性株である。一部の実施形態では、細菌はEscherichiaまたはAcinetobacterの多剤耐性 (MDR) 株である。具体的な実施形態では、細菌はEscherichia coliまたはAcinetobacter baumanniiである。

## 【0029】

ある特定の実施形態では、生化学的経路および/または細胞プロセスに関連するタンパク質は、アシルキャリアータンパク質である。一部の実施形態では、細菌は*Escherichia coli*であり、アシルキャリアータンパク質は、*acpP*によってコードされる*AcpP*タンパク質である。ある特定の実施形態では、細菌は、アシルキャリアータンパク質が*acpP*によってコードされる*AcpP*タンパク質である、*Acinetobacter baumannii*である。

## 【0030】

一部の実施形態では、細菌は*Acinetobacter spp.*であり、生化学的経路および/または細胞プロセスに関連するタンパク質は、*accA*によってコードされるアセチル補酵素Aカルボキシラーゼのカルボキシルトランスフェラーゼアルファサブユニットである。

10

## 【0031】

ある特定の実施形態では、細菌は*Escherichia coli*であり、生化学的経路および/または細胞プロセスに関連するタンパク質は、*murA*によってコードされるUDP-N-アセチルグルコサミン1-カルボキシビニルトランスフェラーゼである。

## 【0032】

一部の実施形態では、細菌は*Escherichia coli*であり、生化学的経路および/または細胞プロセスに関連するタンパク質は、*rpmB*によってコードされるリボソームタンパク質である。

20

## 【0033】

特定の実施形態では、細菌は*Escherichia coli*であり、生化学的経路および/または細胞プロセスに関連するタンパク質は、*adk*によってコードされるアデニル酸キナーゼである。

## 【0034】

一部の実施形態では、細菌は*Escherichia coli*であり、生化学的経路および/または細胞プロセスに関連するタンパク質は、*infA*によってコードされる翻訳開始因子である。

## 【0035】

ある特定の実施形態では、細菌は*Acinetobacter spp.*であり、生化学的経路および/または細胞プロセスに関連するタンパク質は、*ftsZ*によってコードされる細菌の細胞分裂の隔壁の見込み部位において環に集合するタンパク質である。

30

## 【0036】

一部の実施形態では、細菌は*Acinetobacter spp.*であり、生化学的経路および/または細胞プロセスに関連するタンパク質は、*rpoD*によってコードされるRNAポリメラーゼのシグマD因子である。

## 【0037】

一部の実施形態では、細菌は*Acinetobacter spp.*であり、生化学的経路および/または細胞プロセスに関連するタンパク質は、*aroC*によってコードされるコリスミ酸シンターゼ(5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸ホスホリアーゼ)である。

40

## 【0038】

特定の実施形態では、細菌は、*Escherichia coli*または*Acinetobacter baumannii*であり、抗生物質耐性に関連するタンパク質は、*BlaT*、*Cml*および*AdeA*の少なくとも1つから選択される。

## 【0039】

一部の方法は、オリゴマーと抗微生物剤とを個別にまたは同時に投与することを含み、場合により、本オリゴマーの投与により、抗微生物剤への細菌の感受性が向上する。

## 【0040】

ある特定の実施形態では、抗微生物剤は、  
- ラクタム系抗生物質、アミノグリコシド

50

系抗生物質およびポリミキシンの1つまたは複数から選択される。

【0041】

一部の実施形態では、 $\beta$ -ラクタム系抗生物質は、カルバペネム、ペニシリン誘導体（ペナム）、セファロsporin（セフェム）およびモノバクタムの少なくとも1つから選択される。

【0042】

特定の実施形態では、カルバペネムは、メロペネム、イミペネム、エルタペネム、ドリペネム、パニペネム、ピアペネム、ラズペネム、テビペネム、レナペネムおよびトモペネム（tomopenem）の1つまたは複数から選択される。具体的な実施形態では、カルバペネムはメロペネムである。

10

【0043】

ある特定の実施形態では、アミノグリコシド系抗生物質は、トブラマイシン、ゲンタマイシン、カナマイシンa、アミカシン、ジベカシン、シソマイシン、ネチルマイシン、ネオマイシンB、ネオマイシンC、ネオマイシンE（パロモマイシン）およびストレプトマイシンの1つまたは複数から選択される。具体的な実施形態では、アミノグリコシド系抗生物質はトブラマイシンである。

【0044】

ある特定の実施形態では、ポリミキシンは、コリスチン（ポリミキシンE）、ポリsporin（polysporin）、ネオsporin（neosporin）またはポリミキシンBの1つまたは複数から選択される。具体的な実施形態では、ポリミキシンはコリスチンである。

20

【0045】

ある特定の実施形態では、細菌は、BlaTを発現する*Escherichia coli*または*Acinetobacter* spp.であり、抗微生物剤は $\beta$ -ラクタム系抗生物質である。一部の実施形態では、 $\beta$ -ラクタム系抗生物質は、メロペネム、イミペネム、エルタペネム、ドリペネム、パニペネム、ピアペネム、ラズペネム、テビペネム、レナペネム、トモペネム、セファロsporin（セフェム）、ペニシリン、ペニシリン誘導体（ペナム）およびアンピシリンの少なくとも1つから選択される。

【0046】

特定の実施形態では、細菌は、cmlを発現する*Escherichia coli*または*Acinetobacter* spp.であり、抗微生物剤はクロラムフェニコールである。ある特定の実施形態では、細菌は、adeAを発現する*Escherichia coli*または*Acinetobacter* spp.であり、この場合、抗微生物剤は、アミノグリコシド系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質および $\beta$ -ラクタム系抗生物質の少なくとも1つから選択される。

30

【0047】

ある特定の実施形態では、アミノグリコシド系抗生物質は、トブラマイシン、ゲンタマイシン、カナマイシンa、アミカシン、ジベカシン、シソマイシン、ネチルマイシン、ネオマイシンB、ネオマイシンC、ネオマイシンE（パロモマイシン）およびストレプトマイシンの少なくとも1つから選択される。

40

【0048】

一部の実施形態では、テトラサイクリン系抗生物質は、テトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、デメクロサイクリン、リメサイクリン、メクロサイクリン、メタサイクリン、ミノサイクリン、ロリテトラサイクリンおよびドキシサイクリン（doxycycline）の少なくとも1つから選択される。

【0049】

特定の実施形態では、 $\beta$ -ラクタム系抗生物質は、カルバペネム、ペニシリン誘導体（ペナム）、セファロsporin（セフェム）およびモノバクタムの少なくとも1つから選択される。

【0050】

50

一部の実施形態では、細菌は *Acinetobacter* spp. であり、生化学的経路および/または細胞プロセスに関連するタンパク質は、*accA*によってコードされるアセチル補酵素Aカルボキシラーゼのカルボキシルトランスフェラーゼアルファサブユニットであり、抗微生物剤は、アミノグリコシド系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質および - ラクタム系抗生物質の少なくとも1つから選択される。

【0051】

一部の実施形態では、細菌は *Escherichia coli* であり、生化学的経路および/または細胞プロセスに関連するタンパク質は、*murA*によってコードされるUDP-N-アセチルグルコサミン1-カルボキシビニルトランスフェラーゼであり、抗微生物剤は、アミノグリコシド系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質および - ラクタム系抗生物質の少なくとも1つから選択される。

10

【0052】

特定の実施形態では、細菌は *Escherichia coli* または *Acinetobacter* spp. であり、生化学的経路および/または細胞プロセスに関連するタンパク質は、*rpmB*によってコードされるリボソームタンパク質であり、抗微生物剤は、アミノグリコシド系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質および - ラクタム系抗生物質の少なくとも1つから選択される。

【0053】

ある特定の実施形態では、細菌は *Escherichia coli* であり、生化学的経路および/または細胞プロセスに関連するタンパク質は、*adk*によってコードされるアデニル酸キナーゼであり、抗微生物剤は、アミノグリコシド系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質および - ラクタム系抗生物質の少なくとも1つから選択される。

20

【0054】

一部の実施形態では、細菌は *Escherichia coli* であり、生化学的経路および/または細胞プロセスに関連するタンパク質は、*infA*によってコードされる翻訳開始因子であり、抗微生物剤は、アミノグリコシド系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質および - ラクタム系抗生物質の少なくとも1つから選択される。

【0055】

一部の実施形態では、細菌は *Acinetobacter* spp. であり、生化学的経路および/または細胞プロセスに関連するタンパク質は、*ftsZ*によってコードされる細菌の細胞分裂の隔壁の見込み部位において環に集合するタンパク質であり、抗微生物剤は、アミノグリコシド系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質および - ラクタム系抗生物質の少なくとも1つから選択される。

30

【0056】

ある特定の実施形態では、細菌は *Acinetobacter* spp. であり、生化学的経路および/または細胞プロセスに関連するタンパク質は、*rpoD*によってコードされるRNAポリメラーゼのシグマD因子であり、抗微生物剤は、アミノグリコシド系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質および - ラクタム系抗生物質の少なくとも1つから選択される。

【0057】

特定の実施形態では、細菌は *Acinetobacter* spp. であり、生化学的経路および/または細胞プロセスに関連するタンパク質は、*aroC*によってコードされるコリスミ酸シンターゼ(5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸ホスホリアーゼ)であり、抗微生物剤は、アミノグリコシド系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質および - ラクタム系抗生物質の少なくとも1つから選択される。

40

【0058】

一部の実施形態では、オリゴマーは、抗微生物剤単独に比べて少なくとも約10%、細菌に対する抗微生物剤の最小発育阻止濃度(minimum inhibitory concentration)(MIC)を低下させる。

【0059】

50



一部の実施形態では、オリゴマーは、抗微生物剤単独に比べて少なくとも約10%、細菌の抗微生物剤への感受性を向上させる。

【0060】

ある特定の実施形態では、オリゴマーと抗微生物剤とを組み合わせると、オリゴマーおよび/または微生物剤単独に比べて、細菌の抗生物質への感受性が相乗的に向上する。特定の実施形態では、抗微生物剤は、コリスチン、メロペネムおよびトブラマイシンから選択される。

【0061】

ある特定の実施形態では、抗微生物剤およびアンチセンスオリゴマーは個別に投与される。様々な実施形態では、抗微生物剤およびアンチセンスオリゴマーは逐次的に投与される。一部の実施形態では、抗微生物剤およびアンチセンスオリゴマーは同時に投与される。

10

【0062】

被験体における、多剤耐性(MDR) *Acinetobacter baumannii* または *Escherichia coli* の細菌感染を処置する方法であって、被験体に、トブラマイシン、メロペネムおよびコリスチンの1つまたは複数から選択される抗生物質を本明細書に記載されているアンチセンスオリゴマーと組み合わせて投与することを含む、方法も含まれる。ある特定のアンチセンスオリゴマーは、アシルキャリアータンパク質(AcpP)をコードする細菌のacpP遺伝子のmRNA標的配列と特異的にハイブリダイズするのに十分な長さおよび相補性の標的化配列を含み、アンチセンスオリゴマーと抗生物質との組み合わせは、抗生物質単独に比べて、抗生物質に対してMDR *Acinetobacter* またはMDR *Escherichia coli* の感受性を相乗的に高める。

20

本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

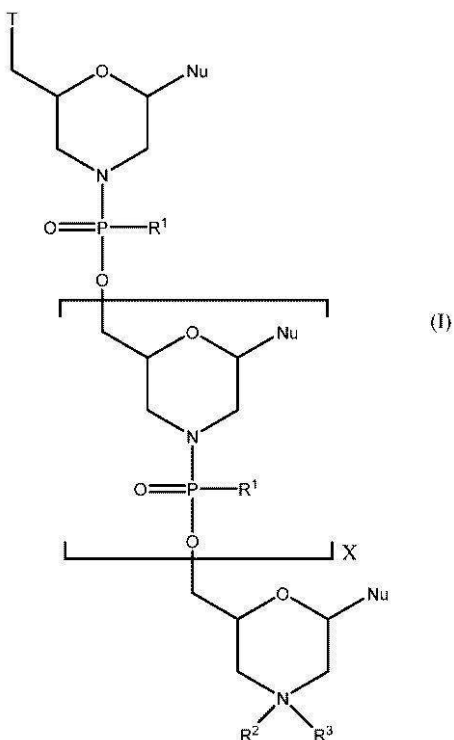
モルホリノサブユニット、および1つのサブユニットのモルホリノ窒素を隣接するサブユニットの5'環外炭素に接合するリン含有サブユニット間連結から構成され、かつ(a)約10~40個のヌクレオチド塩基、ならびに(b)生化学的経路および/もしくは細胞プロセスに関連するタンパク質、または抗生物質耐性に関連するタンパク質をコードする細菌mRNA標的配列と特異的にハイブリダイズするのに十分な長さおよび相補性の標的化配列を有し、細胞透過性ペプチド(CPP)にコンジュゲートされている、アンチセンスモルホリノオリゴマー。

30

(項目2)

式(I):

【化 4 4】



10

20

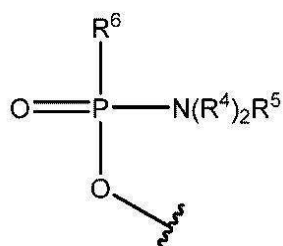
のアンチセンスモルホリノオリゴマーまたは薬学的に許容されるその塩であって、

式中、各  $N_u$  は、一緒になって標的化配列を形成する核酸塩基であり、

X は、 9 ~ 3 8 の整数であり、

T は、OH および式：

【化 4 5】

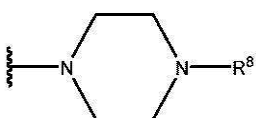


30

の部分から選択され、

式中、各  $R^4$  は、独立して  $C_1 \sim C_6$  アルキルであり、 $R^5$  は、電子対および H から選択され、 $R^6$  は、 $OH$ 、 $-N(R^7)CH_2C(O)NH_2$ 、および式：

【化 4 6】



40

の部分から選択され、

式中、

$R^7$  は、H および  $C_1 \sim C_6$  アルキルから選択され、

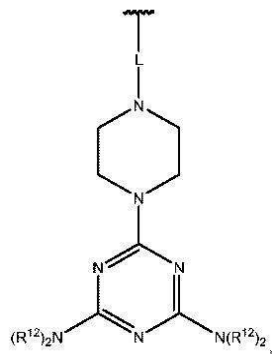
$R^8$  は、 $G$ 、 $-C(O)-R^9OH$ 、アシル、トリチルおよび 4 - メトキシトリチルから選択され、

$R^9$  は式 - (O - アルキル)<sub>y</sub> - のものであり、式中、y は、3 ~ 10 の整数であ

50

り、 $y$  個のアルキル基のそれぞれは、 $C_2 \sim C_6$  アルキルから独立して選択され、  
 $R^{10}$  の各実例は、 $-N(R^{10})_2R^{11}$  であり、式中、各  $R^{10}$  は、独立して  $C_1 \sim C_6$  アルキルであり、 $R^{11}$  は、電子対および H から選択され、  
 $R^2$  は、H、G、アシル、トリチル、4-メトキシトリチル、ベンゾイル、ステアロイルおよび式：

【化 47】



10

の部分から選択され、

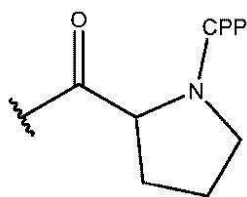
式中、L は、 $-C(O)(CH_2)_6C(O)-$  および  $-C(O)(CH_2)_2S_2(CH_2)_2C(O)-$  から選択され、各  $R^{12}$  は、式  $-(CH_2)_2OC(O)N(R^{14})_2$  のものであり、式中、各  $R^{14}$  は、式  $-(CH_2)_6NHC(=NH)NH_2$  のものであり、

20

$R^3$  は、電子対、H および  $C_1 \sim C_6$  アルキルから選択され、

G は、細胞透過性ペプチド (「CPP」)、ならびに  $-C(O)(CH_2)_5NH-CPP$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NH-CPP$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NH-CPP$  および  $-C(O)CH_2NH-CPP$  から選択されるリンカー部分であるか、または G は、式：

【化 48】



30

のものであり、式中、前記 CPP は、前記 CPP のカルボキシ末端でアミド結合によって前記リンカー部分に付着しており、ただし、G の 1 つのみの実例が存在し、

前記標的化配列が、生化学的経路および / または細胞プロセスならびに抗生物質耐性に関連するタンパク質の少なくとも 1 つから選択されるタンパク質をコードする細菌 mRNA 標的配列と特異的にハイブリダイズする、

40

アンチセンスモルホリノオリゴマーまたは薬学的に許容されるその塩。

(項目 3)

前記標的配列が、前記細菌 mRNA の翻訳開始コドン、および / または前記細菌 mRNA の前記翻訳開始コドンの上流または下流の約 30 塩基内の配列を含む、項目 1 または 2 に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

(項目 4)

生化学的経路および / または細胞プロセスに関連する前記タンパク質が、脂肪酸生合成タンパク質である、項目 1 から 3 のいずれか一項に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

(項目 5)

50

前記脂肪酸生合成タンパク質が、A c p Pによってコードされたアシルキャリアータンパク質である、項目4に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

(項目6)

前記標的配列が配列番号69または70であり、ここでチミン塩基(T)が任意選択でウラシル塩基(U)である、項目5に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

(項目7)

前記脂肪酸生合成タンパク質が、A c c Aによってコードされるアセチル補酵素Aカルボキシラーゼのカルボキシルトランスフェラーゼアルファサブユニットである、項目4に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

(項目8)

前記標的化配列が、配列番号1~11で示されるか、配列番号1~11の少なくとも10の連続するヌクレオチドのフラグメントを含むか、または配列番号1~11に対して少なくとも80%の配列同一性を有する変異体を含み、ここでチミン塩基(T)が任意選択でウラシル塩基(U)である、項目1から7のいずれか一項に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

(項目9)

生化学的経路および/または細胞プロセスに関連する前記タンパク質が、M u r AによってコードされるUDP-N-アセチルグルコサミン1-カルボキシビニルトランスフェラーゼであるペプチドグリカン生合成タンパク質である、項目1から3のいずれか一項に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

(項目10)

生化学的経路および/または細胞プロセスに関連する前記タンパク質が、リボソームタンパク質である、項目1から3のいずれか一項に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

(項目11)

前記リボソームタンパク質が、R p m Bによってコードされる50Sリボソームタンパク質L28である、項目10に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

(項目12)

生化学的経路および/または細胞プロセスに関連する前記タンパク質が、A d kによってコードされるアデニル酸キナーゼである細胞エネルギーホメオスタシスタンパク質である、項目1から3のいずれか一項に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

(項目13)

生化学的経路および/または細胞プロセスに関連する前記タンパク質が、I n f Aによりコードされる翻訳開始因子であるタンパク質生合成タンパク質である、項目1から3のいずれか一項に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

(項目14)

生化学的経路および/または細胞プロセスに関連する前記タンパク質が、F t s Zによりコードされる、細菌の細胞分裂の隔壁の見込み部位において環に集合する細胞分裂タンパク質である、項目1から3のいずれか一項に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

(項目15)

生化学的経路および/または細胞プロセスに関連する前記タンパク質が、R p o DによってコードされるRNAポリメラーゼであるRNA合成タンパク質のシグマD因子である、項目1から3のいずれか一項に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

(項目16)

生化学的経路および/または細胞プロセスに関連する前記タンパク質が、A r o Cによってコードされるコリスミ酸シンターゼ(5-エノールピルピルシキミ酸-3-リン酸ホスホリアーゼ)である芳香族化合物の生合成タンパク質である、項目1から3のいずれか一項に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

(項目17)

10

20

30

40

50

前記標的化配列が、配列番号 12 ~ 53 で示されるか、配列番号 12 ~ 53 の少なくとも 10 の連続するヌクレオチドのフラグメントを含むか、または配列番号 12 ~ 53 に対して少なくとも 80 % の配列同一性を有する変異体を含み、ここでチミン塩基 (T) が任意選択でウラシル塩基 (U) である、項目 1 から 3 または 9 から 16 のいずれか一項に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

(項目 18)

抗生物質耐性に関連する前記タンパク質が、TEM ベータ - ラクターゼ (Blat)、クロラムフェニコール耐性遺伝子 Cml および耐性 - 小結節形成 - 細胞分裂 (RND) 型多剤排出ポンプサブユニット AdeA (adeA) の少なくとも 1 つから選択される、項目 1 から 3 のいずれか一項に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

10

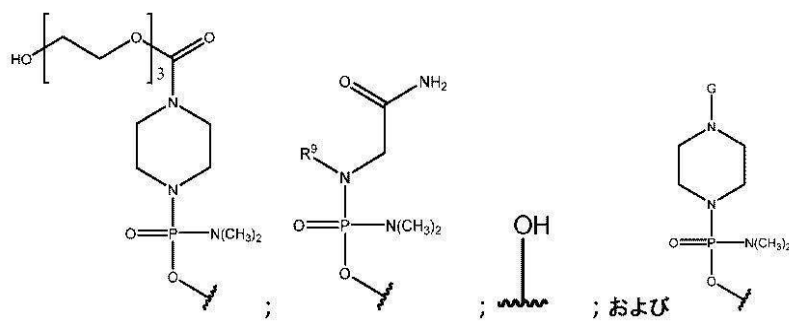
(項目 19)

前記標的化配列が、配列番号 54 ~ 56 で示されるか、配列番号 54 ~ 56 の少なくとも 10 の連続するヌクレオチドのフラグメントを含むか、または配列番号 54 ~ 56 に対して少なくとも 80 % の配列同一性を有する変異体を含み、ここでチミン塩基 (T) が任意選択でウラシル塩基 (U) である、項目 1 から 3 または 18 のいずれか一項に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

(項目 20)

T が、

【化 49】



20

から選択される、項目 2 に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

30

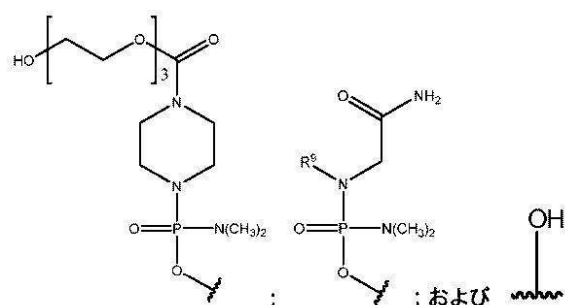
(項目 21)

R<sup>2</sup> が、H、G、アシル、トリチル、4 - メトキシトリチル、ベンゾイルおよびステアロイルから選択される、項目 2 または 20 に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

(項目 22)

T が、

【化 50】



40

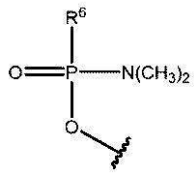
から選択され、

R<sup>2</sup> が、G である、項目 2、20 または 21 のいずれか一項に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

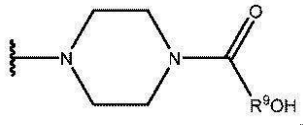
(項目 23)

50

T が、式：  
【化 5 1】



のものであり、  
R<sup>6</sup> が、式：  
【化 5 2】

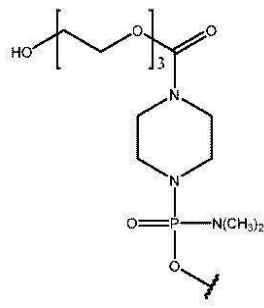


10

のものであり、  
R<sup>2</sup> が、G である、項目 2 に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

(項目 2 4)

T が、式：  
【化 5 3】



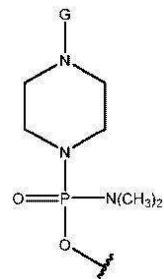
20

30

のものであり、  
R<sup>2</sup> が、G である、前出の項目 2 または 2 0 から 2 3 のいずれか一項に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

(項目 2 5)

T が、式：  
【化 5 4】



40

のものである、項目 2 に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

(項目 2 6)

R<sup>2</sup> が、H、アシル、トリチル、4 - メトキシトリチル、ベンゾイルおよびステアロイルから選択される、項目 2 5 に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

50

(項目 27)

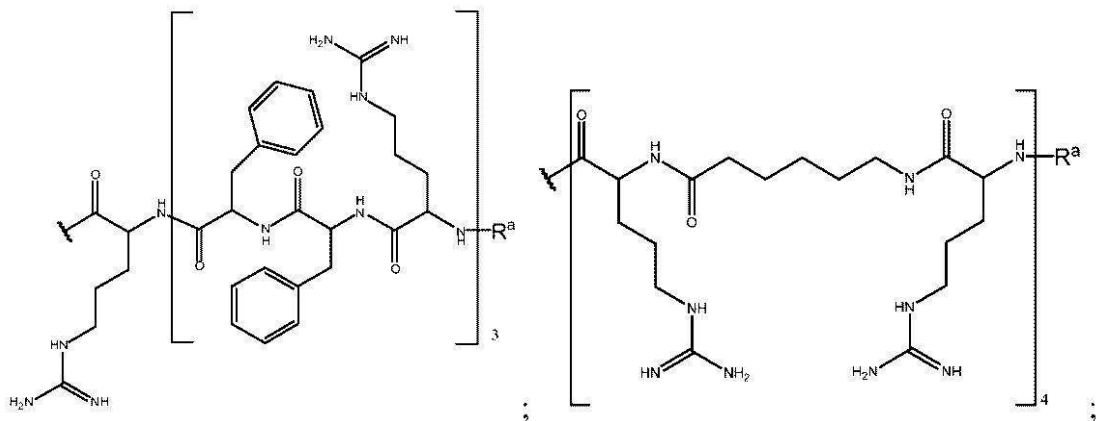
$R^1$  の少なくとも 1 つの実例が、 $-N(CH_3)_2$  である、項目 2 または 20 から 26 のいずれか一項に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

(項目 28)

各  $R^1$  が、 $-N(CH_3)_2$  である、項目 27 に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

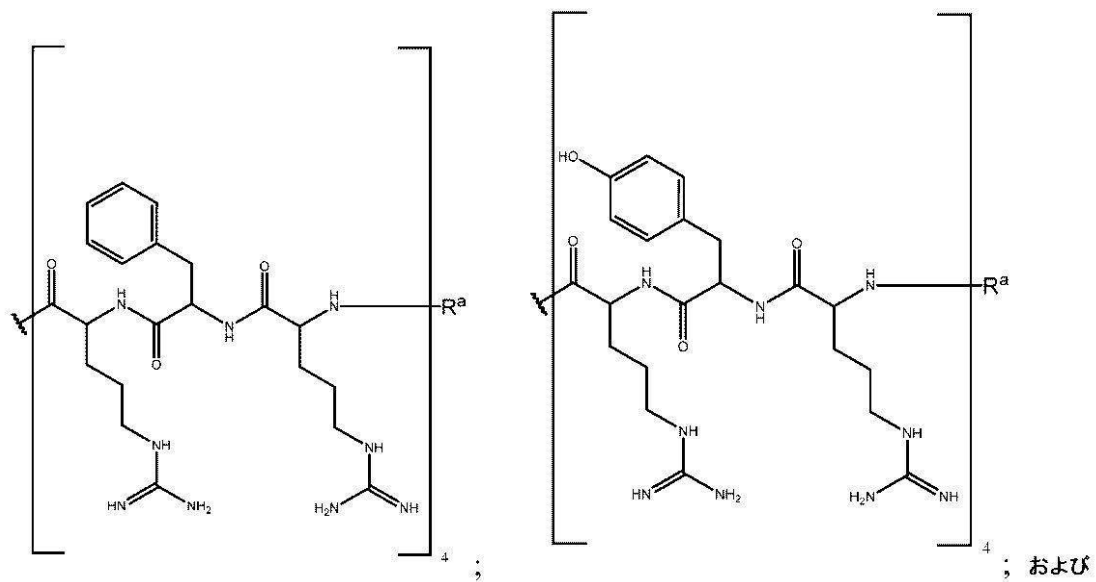
(項目 29)

前記 CPP が、  
【化 55】



10

20



30

40

4

から選択され、

( 項目 3 0 )

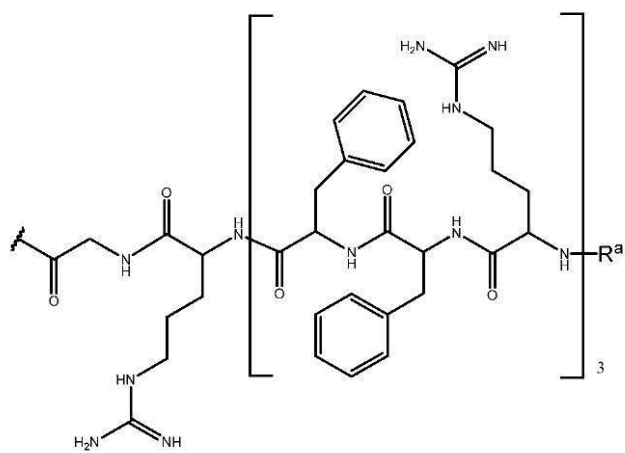
G が、

\*C(=O)CCNC(=O)CCCCNC(=O)[C@H](CCCNC(=N)N)[C@@H](CCCNC(=N)N)C(=O)N[C@H]([Rd])C(=O)NCCCCNC(=O)[C@H](CCCNC(=N)N)[C@@H](CCCNC(=N)N)C(=O)NNC(=N)NCCCCNC(=O)CCCCCCCNC(=O)CCCC(=O)N[C@@H](CCCCNC(=N)N)C(=O)N1C(=O)C2C(=O)N(CCC1C3=CC=CC=C3)C(=O)N(CCC2C4=CC=CC=C4)C(=O)N(CCCN5C(=N)N=C5)C(=O)N(CCCN6C(=N)N=C6)C(=O)N(CCCN7C(=N)N=C7)C(=O)N(CCCN8C(=N)N=C8)C(=O)N(CCCN9C(=N)N=C9)C(=O)N(CCCN10C(=N)N=C10)C(=O)N(CCCN11C(=N)N=C11)C(=O)N(CCCN12C(=N)N=C12)C(=O)N(CCCN13C(=N)N=C13)C(=O)N(CCCN14C(=N)N=C14)C(=O)N(CCCN15C(=N)N=C15)C(=O)N(CCCN16C(=N)N=C16)C(=O)N(CCCN17C(=N)N=C17)C(=O)N(CCCN18C(=N)N=C18)C(=O)N(CCCN19C(=N)N=C19)C(=O)N(CCCN20C(=N)N=C20)C(=O)N(CCCN21C(=N)N=C21)C(=O)N(CCCN22C(=N)N=C22)C(=O)N(CCCN23C(=N)N=C23)C(=O)N(CCCN24C(=N)N=C24)C(=O)N(CCCN25C(=N)N=C25)C(=O)N(CCCN26C(=N)N=C26)C(=O)N(CCCN27C(=N)N=C27)C(=O)N(CCCN28C(=N)N=C28)C(=O)N(CCCN29C(=N)N=C29)C(=O)N(CCCN30C(=N)N=C30)C(=O)N(CCCN31C(=N)N=C31)C(=O)N(CCCN32C(=N)N=C32)C(=O)N(CCCN33C(=N)N=C33)C(=O)N(CCCN34C(=N)N=C34)C(=O)N(CCCN35C(=N)N=C35)C(=O)N(CCCN36C(=N)N=C36)C(=O)N(CCCN37C(=N)N=C37)C(=O)N(CCCN38C(=N)N=C38)C(=O)N(CCCN39C(=N)N=C39)C(=O)N(CCCN40C(=N)N=C40)C(=O)N(CCCN41C(=N)N=C41)C(=O)N(CCCN42C(=N)N=C42)C(=O)N(CCCN43C(=N)N=C43)C(=O)N(CCCN44C(=N)N=C44)C(=O)N(CCCN45C(=N)N=C45)C(=O)N(CCCN46C(=N)N=C46)C(=O)N(CCCN47C(=N)N=C47)C(=O)N(CCCN48C(=N)N=C48)C(=O)N(CCCN49C(=N)N=C49)C(=O)N(CCCN50C(=N)N=C50)C(=O)N(CCCN51C(=N)N=C51)C(=O)N(CCCN52C(=N)N=C52)C(=O)N(CCCN53C(=N)N=C53)C(=O)N(CCCN54C(=N)N=C54)C(=O)N(CCCN55C(=N)N=C55)C(=O)N(CCCN56C(=N)N=C56)C(=O)N(CCCN57C(=N)N=C57)C(=O)N(CCCN58C(=N)N=C58)C(=O)N(CCCN59C(=N)N=C59)C(=O)N(CCCN60C(=N)N=C60)C(=O)N(CCCN61C(=N)N=C61)C(=O)N(CCCN62C(=N)N=C62)C(=O)N(CCCN63C(=N)N=C63)C(=O)N(CCCN64C(=N)N=C64)C(=O)N(CCCN65C(=N)N=C65)C(=O)N(CCCN66C(=N)N=C66)C(=O)N(CCCN67C(=N)N=C67)C(=O)N(CCCN68C(=N)N=C68)C(=O)N(CCCN69C(=N)N=C69)C(=O)N(CCCN70C(=N)N=C70)C(=O)N(CCCN71C(=N)N=C71)C(=O)N(CCCN72C(=N)N=C72)C(=O)N(CCCN73C(=N)N=C73)C(=O)N(CCCN74C(=N)N=C74)C(=O)N(CCCN75C(=N)N=C75)C(=O)N(CCCN76C(=N)N=C76)C(=O)N(CCCN77C(=N)N=C77)C(=O)N(CCCN78C(=N)N=C78)C(=O)N(CCCN79C(=N)N=C79)C(=O)N(CCCN80C(=N)N=C80)C(=O)N(CCCN81C(=N)N=C81)C(=O)N(CCCN82C(=N)N=C82)C(=O)N(CCCN83C(=N)N=C83)C(=O)N(CCCN84C(=N)N=C84)C(=O)N(CCCN85C(=N)N=C85)C(=O)N(CCCN86C(=N)N=C86)C(=O)N(CCCN87C(=N)N=C87)C(=O)N(CCCN88C(=N)N=C88)C(=O)N(CCCN89C(=N)N=C89)C(=O)N(CCCN90C(=N)N=C90)C(=O)N(CCCN91C(=N)N=C91)C(=O)N(CCCN92C(=N)N=C92)C(=O)N(CCCN93C(=N)N=C93)C(=O)N(CCCN94C(=N)N=C94)C(=O)N(CCCN95C(=N)N=C95)C(=O)N(CCCN96C(=N)N=C96)C(=O)N(CCCN97C(=N)N=C97)C(=O)N(CCCN98C(=N)N=C98)C(=O)N(CCCN99C(=N)N=C99)C(=O)N(CCCN100C(=N)N=C100)C(=O)N(CCCN101C(=N)N=C101)C(=O)N(CCCN102C(=N)N=C102)C(=O)N(CCCN103C(=N)N=C103)C(=O)N(CCCN104C(=N)N=C104)C(=O)N(CCCN105C(=N)N=C105)C(=O)N(CCCN106C(=N)N=C106)C(=O)N(CCCN107C(=N)N=C107)C(=O)N(CCCN108C(=N)N=C108)C(=O)N(CCCN109C(=N)N=C109)C(=O)N(CCCN110C(=N)N=C110)C(=O)N(CCCN111C(=N)N=C111)C(=O)N(CCCN112C(=N)N=C112)C(=O)N(CCCN113C(=N)N=C113)C(=O)N(CCCN114C(=N)N=C114)C(=O)N(CCCN115C(=N)N=C115)C(=O)N(CCCN116C(=N)N=C116)C(=O)N(CCCN117C(=N)N=C117)C(=O)N(CCCN118C(=N)N=C118)C(=O)N(CCCN119C(=N)N=C119)C(=O)N(CCCN120C(=N)N=C120)C(=O)N(CCCN121C(=N)N=C121)C(=O)N(CCCN122C(=N)N=C122)C(=O)N(CCCN123C(=N)N=C123)C(=O)N(CCCN124C(=N)N=C124)C(=O)N(CCCN125C(=N)N=C125)C(=O)N(CCCN126C(=N)N=C126)C(=O)N(CCCN127C(=N)N=C127)C(=O)N(CCCN128C(=N)N=C128)C(=O)N(CCCN129C(=N)N=C129)C(=O)N(CCCN130C(=N)N=C130)C(=O)N(CCCN131C(=N)N=C131)C(=O)N(CCCN132C(=N)N=C132)C(=O)N(CCCN133C(=N)N=C133)C(=O)N(CCCN134C(=N)N=C134)C(=O)N(CCCN135C(=N)N=C135)C(=O)N(CCCN136C(=N)N=C136)C(=O)N(CCCN137C(=N)N=C137)C(=O)N(CCCN138C(=N)N=C138)C(=O)N(CCCN139C(=N)N=C139)C(=O)N(CCCN140C(=N)N=C140)C(=O)N(CCCN141C(=N)N=C141)C(=O)N(CCCN142C(=N)N=C142)C(=O)N(CCCN143C(=N)N=C143)C(=O)N(CCCN144C(=N)N=C144)C(=O)N(CCCN145C(=N)N=C145)C(=O)N(CCCN146C(=N)N=C146)C(=O)N(CCCN147C(=N)N=C147)C(=O)N(CCCN148C(=N)N=C148)C(=O)N(CCCN149C(=N)N=C149)C(=O)N(CCCN150C(=N)N=C150)C(=O)N(CCCN151C(=N)N=C151)C(=O)N(CCCN152C(=N)N=C152)C(=O)N(CCCN153C(=N)N=C153)C(=O)N(CCCN154C(=N)N=C154)C(=O)N(CCCN155C(=N)N=C155)C(=O)N(CCCN156C(=N)N=C156)C(=O)N(CCCN157C(=N)N=C157)C(=O)N(CCCN158C(=N)N=C158)C(=O)N(CCCN159C(=N)N=C159)C(=O)N(CCCN160C(=N)N=C160)C(=O)N(CCCN161C(=N)N=C161)C(=O)N(CCCN162C(=N)N=C162)C(=O)N(CCCN163C(=N)N=C163)C(=O)N(CCCN164C(=N)N=C164)C(=O)N(CCCN165C(=N)N=C165)C(=O)N(CCCN166C(=N)N=C166)C(=O)N(CCCN167C(=N)N=C167)C(=O)N(CCCN168C(=N)N=C168)C(=O)N(CCCN169C(=N)N=C169)C(=O)N(CCCN170C(=N)N=C170)C(=O)N(CCCN171C(=N)N=C171)C(=O)N(CCCN172C(=N)N=C172)C(=O)N(CCCN173C(=N)N=C173)C(=O)N(CCCN174C(=N)N=C174)C(=O)N(CCCN175C(=N)N=C175)C(=O)N(CCCN176C(=N)N=C176)C(=O)N(CCCN177C(=N)N=C177)C(=O)N(CCCN178C(=N)N=C178)C(=O)N(CCCN179C(=N)N=C179)C(=O)N(CCCN180C(=N)N=C180)C(=O)N(CCCN181C(=N)N=C181)C(=O)N(CCCN182C(=N)N=C182)C(=O)N(CCCN183C(=N)N=C183)C(=O)N(CCCN184C(=N)N=C184)C(=O)N(CCCN185C(=N)N=C185)C(=O)N(CCCN186C(=N)N=C186)C(=O)N(CCCN187C(=N)N=C1

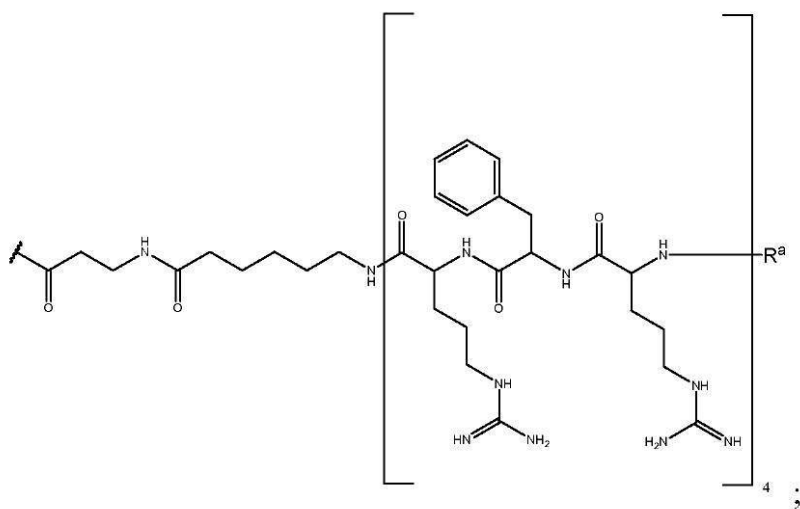
40



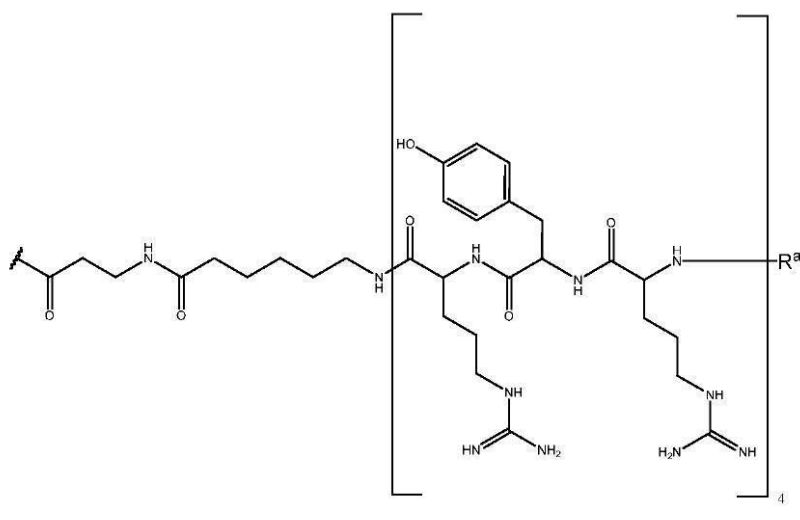
【化 5 8】



10



20

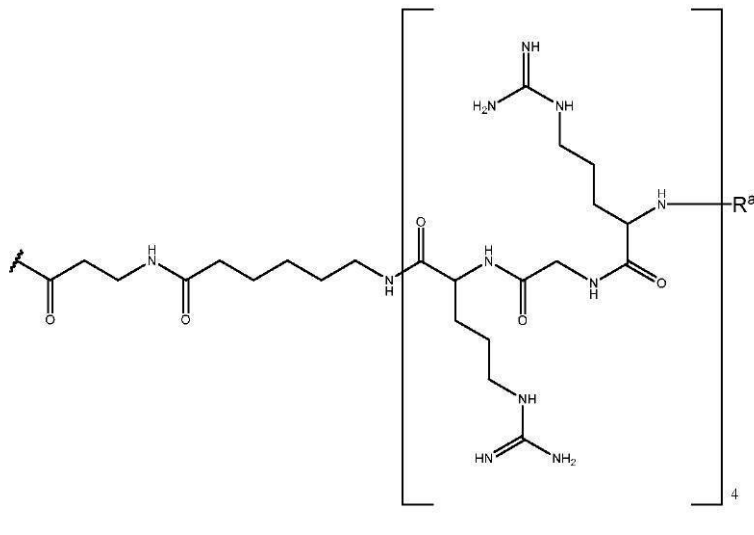


30

40

; および

## 【化 5 9】



10

から選択され、

$R^a$  が、H、アセチル、ベンゾイルおよびステアロイルから選択される、

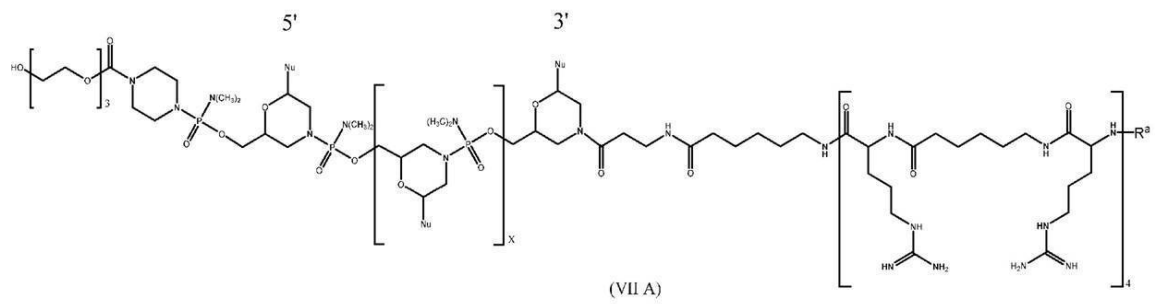
項目 2 または 20 から 28 のいずれか一項に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

20

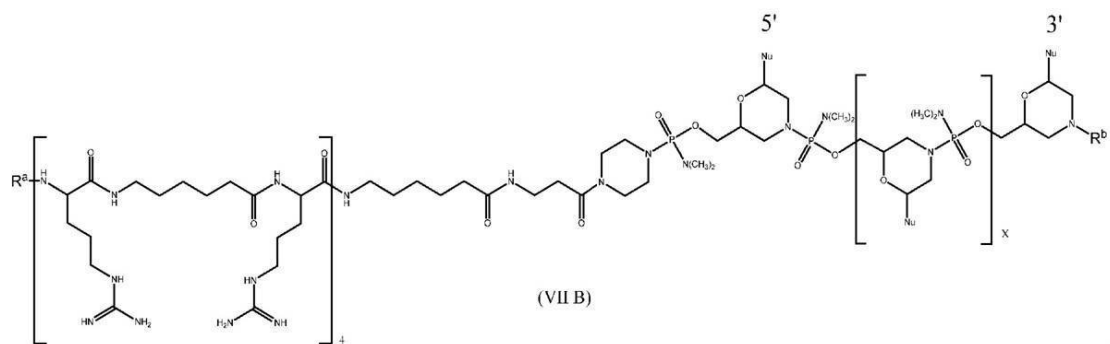
(項目 31)

前記アンチセンスオリゴマーが、

## 【化 6 0】

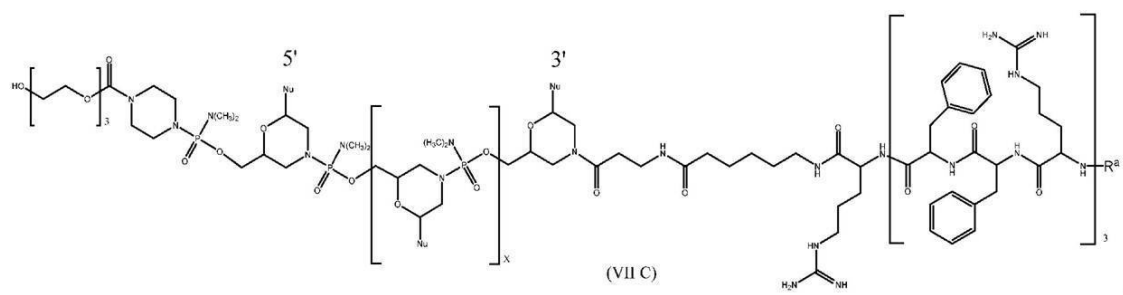


30

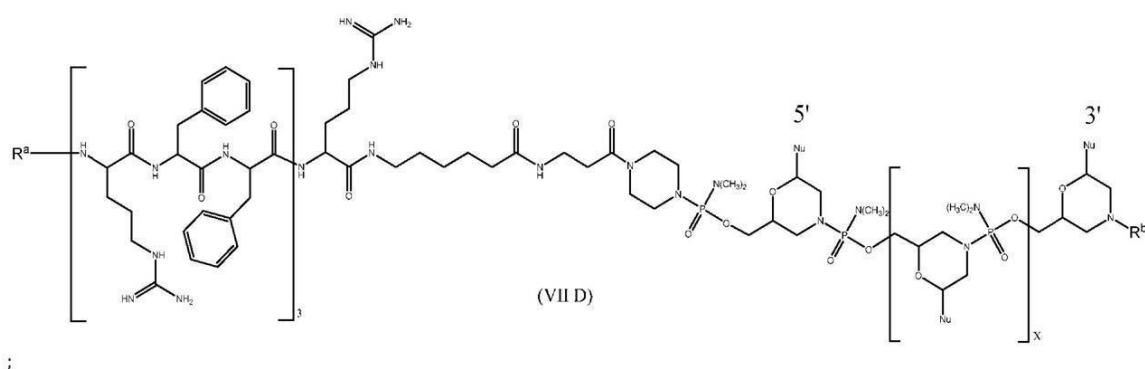


40

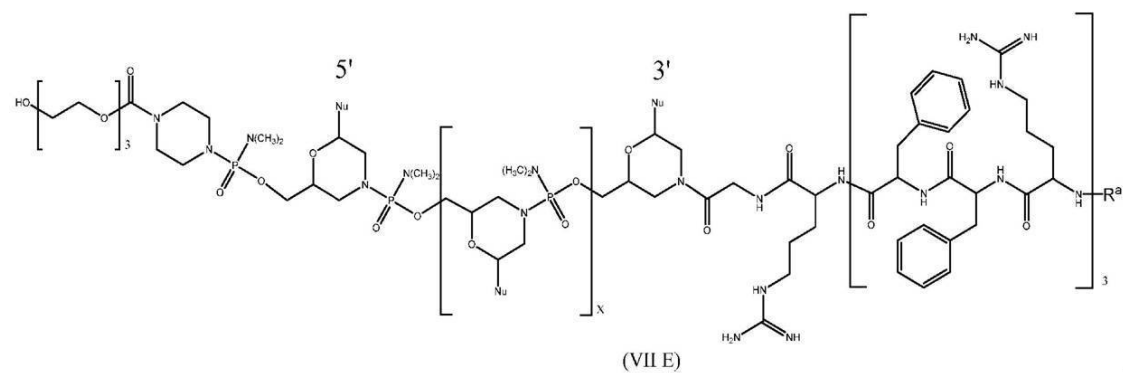
【化 6 1】



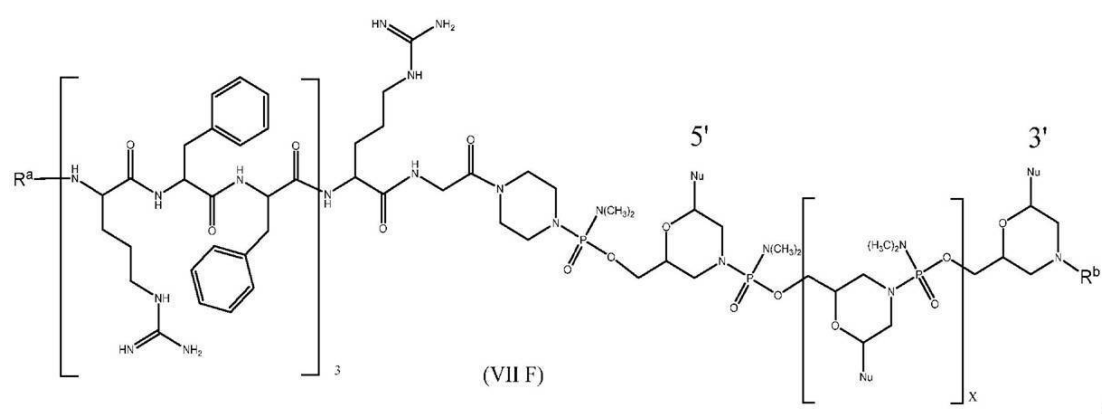
10



20



30

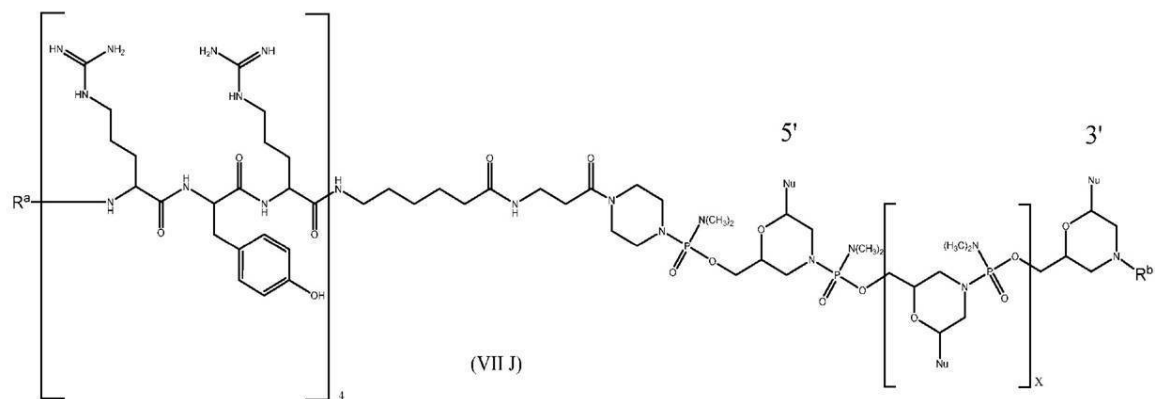


40

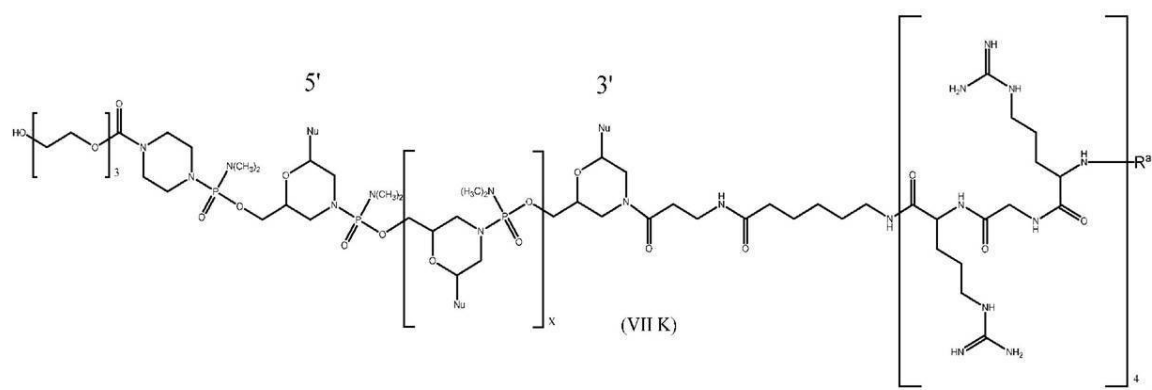
[illegible][illegible][illegible]

30

## 【化 6 3】

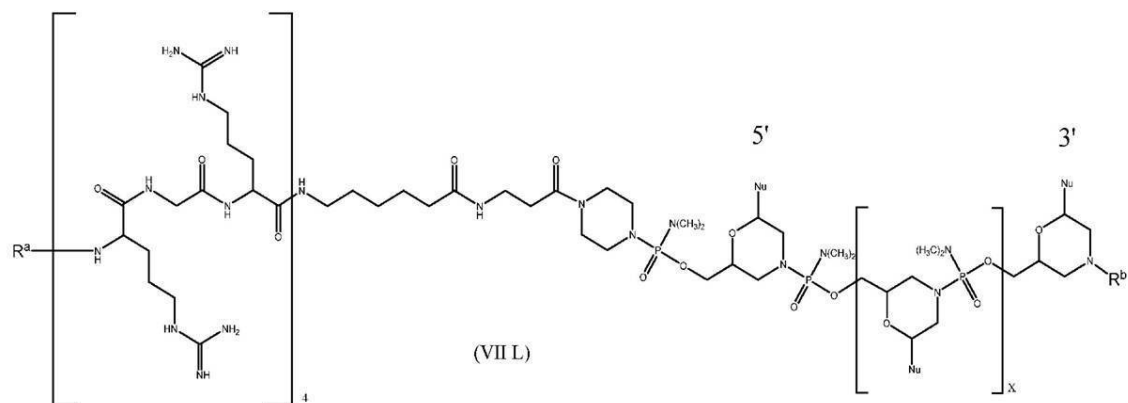


10



20

および



30

から選択される式 (VII) のもの、または上記のいずれかの薬学的に許容される塩であり、

40

式中、 $R^a$  は、H、アセチル、ベンゾイルおよびステアロイルから選択され、 $R^b$  は、H、アセチル、ベンゾイル、ステアロイル、トリチルおよび4-メトキシトリチルから選択され、XおよびNuは、項目1において定義した通りである、  
前出の項目のいずれか一項に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

(項目32)

$R^a$  がアセチルであり、 $R^b$  がHである、項目31に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

(項目33)

前記標的化配列が、

a) 配列番号1 (CTTCGATAGTG) (Xは9である)

50

- b) 配列番号 2 ( A T A T C G C T C A C ) ( X は 9 である )  
 c) 配列番号 3 ( A T T C T C C T C A T ) ( X は 9 である )  
 d) 配列番号 4 ( C A C A G G A A T T C ) ( X は 9 である )  
 e) 配列番号 5 ( T T G C C A T T A G C ) ( X は 9 である )  
 f) 配列番号 6 ( C T G T A G T G A T T T C A C C A ) ( X は 1 5 である )  
 g) 配列番号 7 ( T T A T C T A C C A T ) ( X は 9 である )  
 h) 配列番号 8 ( G C A C G T T T C A T ) ( X は 9 である )  
 i) 配列番号 9 ( A G A A A A C C C A T ) ( X は 9 である )  
 j) 配列番号 1 0 ( T T G A T A G T C A T ) ( X は 9 である )、および  
 k) 配列番号 1 1 ( G C T T T T T T C A T ) ( X は 9 である )
- から選択され、ここでチミン塩基 ( T ) はウラシル塩基 ( U ) であってもよい、  
 項目 2 から 3 または 2 0 から 3 2 のいずれか一項に記載のアンチセンスモルホリノオリゴ  
 マー。

10

( 項目 3 4 )

前記標的化配列が、

- a) 配列番号 1 2 ( A T C C A T T T A G T ) ( X は 9 である )  
 b) 配列番号 1 3 ( C A T T T A G T T T G ) ( X は 9 である )  
 c) 配列番号 1 4 ( A A T T T A T C C A T ) ( X は 9 である )  
 d) 配列番号 1 5 ( A A A T T T A T C C A ) ( X は 9 である )  
 e) 配列番号 1 6 ( A C T C G G G A C A T ) ( X は 9 である )  
 f) 配列番号 1 7 ( C T A T T C T C C A A ) ( X は 9 である )  
 g) 配列番号 1 8 ( G G C A G A C T C G G ) ( X は 9 である )  
 h) 配列番号 1 9 ( C T T A G A C A T G G ) ( X は 9 である )  
 i) 配列番号 2 0 ( A T G A T A C G C A T ) ( X は 9 である )  
 j) 配列番号 2 1 ( T C T T T G G C C A T ) ( X は 9 である )  
 k) 配列番号 2 2 ( T C A A A T G A G G C ) ( X は 9 である )  
 l) 配列番号 2 3 ( A A T G A G G C C A T ) ( X は 9 である )  
 m) 配列番号 2 4 ( A T A G T T T C T C T C C ) ( X は 1 1 である )  
 n) 配列番号 2 5 ( T C A T C T T T G C T ) ( X は 9 である )  
 o) 配列番号 2 6 ( T T T T G C T C C A T ) ( X は 9 である )  
 p) 配列番号 2 7 ( T T C C C T G C C A T ) ( X は 9 である )  
 q) 配列番号 2 8 ( T T T C C A G C C A T ) ( X は 9 である )  
 r) 配列番号 2 9 ( A C G C T A A T C A T ) ( X は 9 である )  
 s) 配列番号 3 0 ( T G T T T G A T C A T ) ( X は 9 である )  
 t) 配列番号 3 1 ( A A T T C G A G C A T ) ( X は 9 である )  
 u) 配列番号 3 2 ( T G T T A A A G A G C ) ( X は 9 である )  
 v) 配列番号 3 3 ( C T T G T A A C C A C A C C A ) ( X は 1 3 である )  
 w) 配列番号 3 4 ( G G T G C A G T C A T ) ( X は 9 である )  
 x) 配列番号 3 5 ( G A C T T A A T C A A ) ( X は 9 である )  
 y) 配列番号 3 6 ( C T A C T G G T C A T ) ( X は 9 である )  
 z) 配列番号 3 7 ( C A T T G A G A T T T ) ( X は 9 である )  
 a a) 配列番号 3 8 ( A C A T C T G T C A T ) ( X は 9 である )  
 b b) 配列番号 3 9 ( T T C T G A T T C A T ) ( X は 9 である )  
 c c) 配列番号 4 0 ( G T A T A T G C C A T ) ( X は 9 である )  
 d d) 配列番号 4 1 ( T C C T G C A T C A T ) ( X は 9 である )  
 e e) 配列番号 4 2 ( A T A T A C C T C A T ) ( X は 9 である )  
 f f) 配列番号 4 3 ( G T T A C C C T G A C C G A C C A ) ( X は 1 5 である )  
 g g) 配列番号 4 4 ( G T T A C C C T G A C C A C C A ) ( X は 1 4 である )  
 h h) 配列番号 4 5 ( T G T T T C A T A C G ) ( X は 9 である )  
 i i) 配列番号 4 6 ( G G T T T G C C A A G ) ( X は 9 である )

20

30

40

50

- j j) 配列番号 47 (T G T T T C A C C A T) (X は 9 である)
- k k) 配列番号 48 (I I I I T C G C C A A) (X は 9 である)
- l l) 配列番号 49 (C T C T T A A T G A T) (X は 9 である)
- m m) 配列番号 50 (A T C C A C A C A A G) (X は 9 である)
- n n) 配列番号 51 (T C C A C C A A G T C A C C A) (X は 13 である)
- o o) 配列番号 52 (A G A G T T C A A G G) (X は 9 である)
- p p) 配列番号 53 (G G T G C T C A A A C) (X は 9 である)

から選択され、ここでチミン塩基 (T) はウラシル塩基 (U) であってもよい、  
項目 2 から 3 または 20 から 32 のいずれか一項に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

10

(項目 35)

前記標的化配列が、

- a) 配列番号 54 (A T A C T G T C C A A)
- b) 配列番号 55 (C T C T T C C T T T T)、および
- c) 配列番号 56 (T C C T T C T G A T T)

から選択され、ここでチミン塩基 (T) はウラシル塩基 (U) であってもよい、  
項目 2 から 3 または 20 から 32 のいずれか一項に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

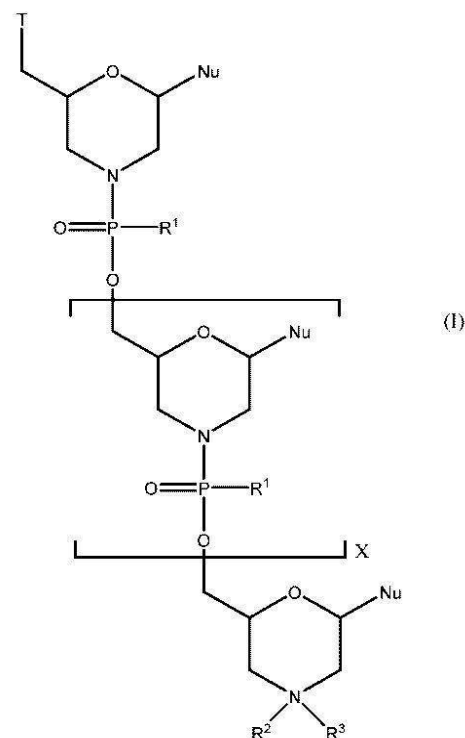
(項目 36)

薬学的に許容される担体およびアンチセンスモルホリノオリゴマーを含む医薬組成物であって、前記アンチセンスモルホリノオリゴマーは、モルホリノサブユニット、および 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リン含有サブユニット間連結から構成され、かつ (a) 約 10 ~ 40 個のヌクレオチド塩基、ならびに (b) 生化学的経路および/もしくは細胞プロセスに関連するタンパク質、または抗生物質耐性に関連するタンパク質をコードする細菌 mRNA 標的配列と特異的にハイブリダイズするのに十分な長さおよび相補性の標的化配列を有し、細胞透過性ペプチド (CPP) にコンジュゲートされている、医薬組成物。

20

(項目 37)

前記アンチセンスモルホリノオリゴマーが、式 (I) :



30

40

50

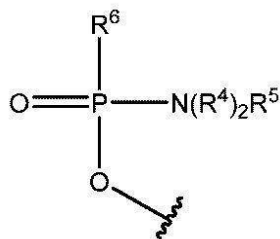
のもののまたは薬学的に許容されるその塩であり、

式中、各 Nu は、一緒になって標的化配列を形成する核酸塩基であり、

X は、9 ~ 38 の整数であり、

T は、OH および式：

【化 6 5】

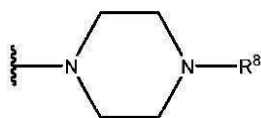


10

の部分から選択され、

式中、各 R<sup>4</sup> は、独立して C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキルであり、R<sup>5</sup> は、電子対および H から選択され、R<sup>6</sup> は、OH、-N(R<sup>7</sup>)CH<sub>2</sub>C(O)NH<sub>2</sub>、および式：

【化 6 6】



20

の部分から選択され、

式中、

R<sup>7</sup> は、H および C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキルから選択され、

R<sup>8</sup> は、G、-C(O)-R<sup>9</sup>OH、アシル、トリチルおよび 4 - メトキシトリチルから選択され、

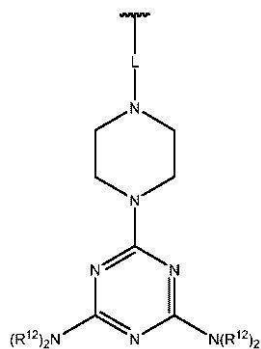
R<sup>9</sup> は式 - (O - アルキル)<sub>y</sub> - のものであり、式中、y は、3 ~ 10 の整数であり、y 個のアルキル基のそれぞれは、C<sub>2</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキルから独立して選択され、

30

R<sup>1</sup> の各実例は、-N(R<sup>10</sup>)<sub>2</sub>R<sup>11</sup> であり、式中、各 R<sup>10</sup> は、独立して C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキルであり、R<sup>11</sup> は、電子対および H から選択され、

R<sup>2</sup> は、H、G、アシル、トリチル、4 - メトキシトリチル、ベンゾイル、ステアロイルおよび式：

【化 6 7】



40

の部分から選択され、

式中、L は、-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>C(O)- および -C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C(O)- から選択され、各 R<sup>12</sup> は、式 - (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OC(O)N(R<sup>14</sup>)<sub>2</sub> のものであり、式中、各 R<sup>14</sup> は、式 - (CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub> のも

50

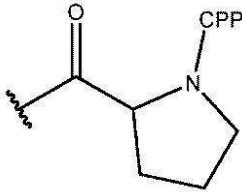


のであり、

$R^3$  は、電子対、Hおよび  $C_1 \sim C_6$  アルキルから選択され、

G は、細胞透過性ペプチド（「CPP」）、ならびに  $-C(O)(CH_2)_5NH-CPP$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NH-CPP$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NH-CPP$  および  $-C(O)CH_2NH-CPP$  から選択されるリンカー部分であるか、または G は、式：

【化 68】



10

のものであり、式中、前記 CPP は、前記 CPP のカルボキシ末端でアミド結合によって前記リンカー部分に付着しており、ただし、G の 1 つのみの実例が存在し、

前記標的化配列が、生化学的経路および / または細胞プロセスならびに抗生物質耐性に関連するタンパク質の少なくとも 1 つから選択されるタンパク質をコードする細菌 mRNA 標的配列と特異的にハイブリダイズする、

項目 36 に記載の医薬組成物。

20

（項目 38）

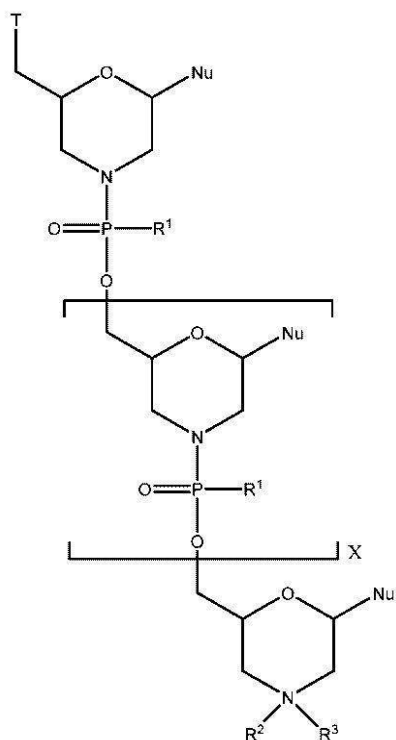
細菌における、生化学的経路および / または細胞プロセスならびに抗生物質耐性に関連するタンパク質の少なくとも 1 つから選択されるタンパク質の発現および活性を低下させる方法であって、前記細菌をアンチセンスモルホリノオリゴマーに接触させることを含み、前記アンチセンスモルホリノオリゴマーは、モルホリノサブユニット、および 1 つのサブユニットのモルホリノ窒素を隣接するサブユニットの 5' 環外炭素に接合するリン含有サブユニット間連結から構成され、かつ (a) 約 10 ~ 40 個のヌクレオチド塩基、ならびに (b) 生化学的経路および / もしくは細胞プロセスに関連するタンパク質、または抗生物質耐性に関連するタンパク質をコードする細菌 mRNA 標的配列と特異的にハイブリダイズするのに十分な長さおよび相補性の標的化配列を有し、前記オリゴマーは、細胞透過性ペプチド (CPP) にコンジュゲートされている、方法。

30

（項目 39）

前記アンチセンスモルホリノオリゴマーが、式 (I)：

## 【化 6 9】



10

20

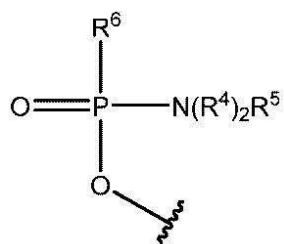
のものまたは薬学的に許容されるその塩であり、

式中、各 Nu は、一緒になって標的化配列を形成する核酸塩基であり、

X は、9 ~ 38 の整数であり、

T は、OH および式：

## 【化 7 0】

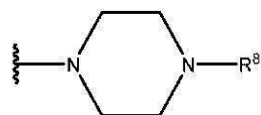


30

の部分から選択され、

式中、各 R<sup>4</sup> は、独立して C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキルであり、R<sup>5</sup> は、電子対および H から選択され、R<sup>6</sup> は、OH、-N(R<sup>7</sup>)CH<sub>2</sub>C(O)NH<sub>2</sub>、および式：

## 【化 7 1】



40

の部分から選択され、

式中、

R<sup>7</sup> は、H および C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキルから選択され、

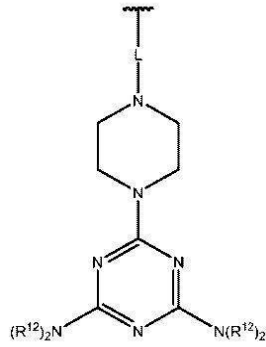
R<sup>8</sup> は、G、-C(O)-R<sup>9</sup>OH、アシル、トリチルおよび 4 - メトキシトリチルから選択され、

R<sup>9</sup> は式 - (O - アルキル)<sub>y</sub> - のものであり、式中、y は、3 ~ 10 の整数であ

50

り、 $y$  個のアルキル基のそれぞれは、 $C_2 \sim C_6$  アルキルから独立して選択され、  
 $R^{10}$  の各実例は、 $-N(R^{10})_2 R^{11}$  であり、式中、各  $R^{10}$  は、独立して  $C_1 \sim C_6$  アルキルであり、 $R^{11}$  は、電子対および H から選択され、  
 $R^2$  は、H、G、アシル、トリチル、4-メトキシトリチル、ベンゾイル、ステアロイルおよび式：

【化 7 2】



10

の部分から選択され、

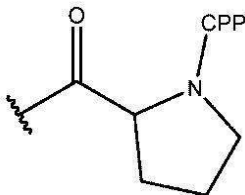
式中、L は、 $-C(O)(CH_2)_6C(O)-$  および  $-C(O)(CH_2)_2S_2(CH_2)_2C(O)-$  から選択され、各  $R^{12}$  は、式  $-(CH_2)_2OC(O)N(R^{14})_2$  のものであり、式中、各  $R^{14}$  は、式  $-(CH_2)_6NHC(=NH)NH_2$  のものであり、

20

$R^3$  は、電子対、H および  $C_1 \sim C_6$  アルキルから選択され、

G は、細胞透過性ペプチド (「CPP」)、ならびに  $-C(O)(CH_2)_5NH-CPP$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NH-CPP$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NH-CPP$  および  $-C(O)CH_2NH-CPP$  から選択されるリンカー部分であるか、または G は、式：

【化 7 3】



30

のものであり、

式中、前記 CPP は、前記 CPP のカルボキシ末端でアミド結合によって前記リンカー部分に付着しており、ただし、G の 1 つのみの実例が存在し、

前記標的化配列が、生化学的経路および / または細胞プロセスならびに抗生物質耐性に関連するタンパク質の少なくとも 1 つから選択されるタンパク質をコードする細菌 mRNA 標的配列と特異的にハイブリダイズする、

40

項目 38 に記載の方法。

(項目 40)

前記細菌が、被験体内にあり、前記方法は、前記被験体に前記アンチセンスオリゴマーを投与することを含む、項目 38 または 39 に記載の方法。

(項目 41)

前記細菌が、Escherichia および Acinetobacter の属から選択される、前出の項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 42)

前記細菌が、Escherichia または Acinetobacter の抗生物質耐

50

性株、および *Escherichia* または *Acinetobacter* の多剤耐性 (MDR) 株から選択される、前出の項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 43)

前記細菌が、*Escherichia coli* または *Acinetobacter baumannii* である、前出の項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 44)

前記オリゴマーと抗微生物剤とを個別にまたは同時に投与することを含み、場合により、前記オリゴマーの投与により前記抗微生物剤への前記細菌の感受性が向上する、前出の項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 45)

前記抗微生物剤が、 $\beta$ -ラクタム系抗生物質、アミノグリコシド系抗生物質およびポリミキシンの 1 つまたは複数から選択される、項目 44 に記載の方法。

(項目 46)

前記オリゴマーと前記抗微生物剤との組み合わせが、前記オリゴマーおよび/または前記微生物剤単独と比べて、前記細菌の前記抗生物質への感受性を相乗的に向上させる、項目 44 または 45 に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0063】

【図 1 - 1】図 1 A は、ホスホロジアミデート連結を有する例示的なモルホリノオリゴマー構造を示す。図 1 B ~ E は、B ~ E と示される例示的なモルホリノオリゴマーの繰返しサブユニットセグメントを示す。図 1 F ~ H は、例示的な PPMO において使用される例示的なペプチド PPMO コンジュゲート構造を示す。

【図 1 - 2】図 1 A は、ホスホロジアミデート連結を有する例示的なモルホリノオリゴマー構造を示す。図 1 B ~ E は、B ~ E と示される例示的なモルホリノオリゴマーの繰返しサブユニットセグメントを示す。図 1 F ~ H は、例示的な PPMO において使用される例示的なペプチド PPMO コンジュゲート構造を示す。

【0064】

【図 2 A】図 2 A は、acpP 標的化 PPMO # 2 により、スクランブル PPMO 対照に比べて、*E. coli* の多剤耐性株の細菌の成長 (コロニー形成単位; CFU) が約 1 log 低下しただけでなく、トブラマイシンと組み合わせると、対照に比べて、細菌の成長が 4 log を超えて相乗的に低下したことを示す。トブラマイシンおよび対照 PPMO (単独または組み合わせのどちらも) は、細菌の成長に対して有意な効果を有しなかった。図 2 B (線形目盛) および図 2 C (対数目盛) は、acpP 標的化 PPMO # 1 の量を増加させることにより、*E. coli* の多剤耐性株に対してトブラマイシンの最小発育阻止濃度 (MIC) が濃度依存的に有意に低下したことを示す。

【図 2 B】図 2 A は、acpP 標的化 PPMO # 2 により、スクランブル PPMO 対照に比べて、*E. coli* の多剤耐性株の細菌の成長 (コロニー形成単位; CFU) が約 1 log 低下しただけでなく、トブラマイシンと組み合わせると、対照に比べて、細菌の成長が 4 log を超えて相乗的に低下したことを示す。トブラマイシンおよび対照 PPMO (単独または組み合わせのどちらも) は、細菌の成長に対して有意な効果を有しなかった。図 2 B (線形目盛) および図 2 C (対数目盛) は、acpP 標的化 PPMO # 1 の量を増加させることにより、*E. coli* の多剤耐性株に対してトブラマイシンの最小発育阻止濃度 (MIC) が濃度依存的に有意に低下したことを示す。

【図 2 C】図 2 A は、acpP 標的化 PPMO # 2 により、スクランブル PPMO 対照に比べて、*E. coli* の多剤耐性株の細菌の成長 (コロニー形成単位; CFU) が約 1 log 低下しただけでなく、トブラマイシンと組み合わせると、対照に比べて、細菌の成長が 4 log を超えて相乗的に低下したことを示す。トブラマイシンおよび対照 PPMO (単独または組み合わせのどちらも) は、細菌の成長に対して有意な効果を有しなかった。図 2 B (線形目盛) および図 2 C (対数目盛) は、acpP 標的化 PPMO # 1 の量を増加させることにより、*E. coli* の多剤耐性株に対してトブラマイシンの最小発育阻止濃度 (MIC) が濃度依存的に有意に低下したことを示す。

10

20

30

40

50

止濃度 (MIC) が濃度依存的に有意に低下したことを示す。

【0065】

【図3】図3は、acpP標的化PPMO#7により、スクランブルPPMO対照に比べて、*Acinetobacter baumannii* (AYE) の多剤耐性株の細菌の成長 (コロニー形成単位; CFU) が約6 log 低下しただけではなく、コリスチンと組み合わせると、検出不能なレベル (acpP標的化PPMO単独と比べて、さらに約3 log) まで細菌の成長が相乗的に低下したことを示す。コリスチンおよび対照PPMO (単独または組み合わせのどちらも) は、細菌の成長に対するこの重要な効果を有していなかった。

【0066】

【図4】図4は、acpP標的化PPMO#7により、スクランブルPPMO対照に比べて、*Acinetobacter baumannii* (AYE) の多剤耐性株の細菌の成長 (コロニー形成単位; CFU) が約5 log 低下しただけではなく、メロペネムと組み合わせると、acpP標的化PPMO単独と比べて、細菌の成長がさらに約2 log 相乗的に低下したことを示す。メロペネムおよび対照PPMO (単独または組み合わせのどちらも) は、細菌の成長に対するこの有意な効果を有していなかった。

【0067】

【図5】図5は、acpP標的化PPMO#7により、スクランブルPPMO対照に比べて、*Acinetobacter baumannii* (AYE) の多剤耐性株の細菌の成長 (コロニー形成単位; CFU) が約6 log 低下しただけではなく、トブラマイシンと組み合わせると、acpP標的化PPMO単独と比べて、細菌がさらに約1 log 相乗的に低下したことを示す。トブラマイシンおよび対照PPMO (単独または組み合わせのどちらも) は、細菌の成長に対するこの有意な効果を有していなかった。

【0068】

【図6】図6は、acpP標的化PPMO#7の量を増加させることにより、*Acinetobacter baumannii* (AYE) の多剤耐性株に対してコリスチンの最小発育阻止濃度 (MIC) が濃度依存的に有意に低下したことを示す。

【0069】

【図7】図7は、acpP標的化PPMO#7の量を増加させることにより、*Acinetobacter baumannii* (AYE) の多剤耐性株に対してメロペネムの最小発育阻止濃度 (MIC) が濃度依存的に有意に低下したことを示す。

【0070】

【図8】図8は、acpP標的化PPMO#7の量を増加させることにより、*Acinetobacter baumannii* (AYE) の多剤耐性株に対してトブラマイシンの最小発育阻止濃度 (MIC) が濃度依存的に有意に低下したことを示す。

【0071】

【図9-1】図9A~9Cは、様々なPPMOおよびScr対照を用いた、富培地 (rich media) および最少培地での*E. coli* および*Acinetobacter* 株のMICの比較を示す。図9Aは、acpP (PPMO#1)、acpP (PPMO#2)、acpP (PPMO#3)、acpP (PPMO#4)、acpP (PPMO#5)、murA (PPMO#24)、およびスクランブル (Scr) 対照で攻撃した*E. coli* W3110の結果を示す。図9B~9Cは、acpP (PPMO#7)、acpP (PPMO#8)、acpP (PPMO#13)、acpP (PPMO#14)、ftsZ (PPMO#33)、ftsZ (PPMO#34)、rpmB (PPMO#29) およびスクランブル (Scr) 対照で攻撃した*A. baumannii* AYE (9B) ならびに*A. baumannii* 0057 (9C) の結果を示す。細菌は、MHII (黒色棒) またはAB最少培地 (灰色棒) のどちらかで攻撃した。

【図9-2】図9A~9Cは、様々なPPMOおよびScr対照を用いた、富培地および最少培地での*E. coli* および*Acinetobacter* 株のMICの比較を示す。

図9Aは、acpP (PPMO#1)、acpP (PPMO#2)、acpP (PPMO

10

20

30

40

50

# 3)、acpP (PPMO# 4)、acpP (PPMO# 5)、murA (PPMO# 24)、およびスクランブル (Scr) 対照で攻撃した *E. coli* W3110の結果を示す。図9B~9Cは、acpP (PPMO# 7)、acpP (PPMO# 8)、acpP (PPMO# 13)、acpP (PPMO# 14)、ftsZ (PPMO# 33)、ftsZ (PPMO# 34)、rpmB (PPMO# 29) およびスクランブル (Scr) 対照で攻撃した *A. baumannii* AYE (9B) ならびに *A. baumannii* 0057 (9C) の結果を示す。細菌は、MHII (黒色棒) またはAB最少培地 (灰色棒) のどちらかで攻撃した。

【図9-3】図9A~9Cは、様々なPPMOおよびScr対照を用いた、富培地および最少培地での *E. coli* および *Acinetobacter* 株のMICの比較を示す。図9Aは、acpP (PPMO# 1)、acpP (PPMO# 2)、acpP (PPMO# 3)、acpP (PPMO# 4)、acpP (PPMO# 5)、murA (PPMO# 24)、およびスクランブル (Scr) 対照で攻撃した *E. coli* W3110の結果を示す。図9B~9Cは、acpP (PPMO# 7)、acpP (PPMO# 8)、acpP (PPMO# 13)、acpP (PPMO# 14)、ftsZ (PPMO# 33)、ftsZ (PPMO# 34)、rpmB (PPMO# 29) およびスクランブル (Scr) 対照で攻撃した *A. baumannii* AYE (9B) ならびに *A. baumannii* 0057 (9C) の結果を示す。細菌は、MHII (黒色棒) またはAB最少培地 (灰色棒) のどちらかで攻撃した。

#### 【0072】

【図10】図10A~10Cは、acpPに対して標的化されるPPMOでの攻撃の際の、*E. coli* 1101851、*A. baumannii* AYEおよび0057の成長に及ぼす最小殺菌 (MBC) 生存度アッセイの動態を示す。培養物は、示されている通り、様々な濃度のPPMOを用いて、37℃で好氣的に成長させた。明記した時間に試料を採取し、150mM NaClに逆希釈 (back-dilute) し、血液寒天上で平板培養した。プレートを18時間、インキュベートし、得られたコロニー数を使用してCFU/mLを決定した。図10Aは、acpP PPMO (PPMO# 3) および (RFR) 4 - スクランブル (Scr) 対照で攻撃した *E. coli* 1101851の結果を示す。図10B~10Cは、acpP PPMO (PPMO# 7) および (RXR) 4 - スクランブル (Scr) 対照で攻撃した *A. baumannii* AYEおよびAB0057の結果をそれぞれ示す。

#### 【0073】

【図11】図11A~11Lは、薄切片化した *A. baumannii* AYEの透過型電子顕微鏡検査 (TEM) を示す。図11A~11Bは、PPMOによる処置前の *A. baumannii* AYEを示し、図11G~11Hは、単独で6時間、インキュベートした後を示す。図11C~11Dは、0時間における40μMのスクランブル対照の結果を示し、図11I~11Jは、6時間の処置時における、40μMのスクランブル対照の結果を示す。図11E~11Fは、0時間における40μMのacpPの結果を示し、図11K~11Lは、6時間の処置時における、40μMの結果を示す。CW: 細胞壁セクション、矢印は細胞壁の崩壊を指す。

#### 【0074】

【図12-1】図12A~12Fは、多剤耐性 *E. coli* 株AIS070834に対する、acpP標的化PPMOと3種の異なる抗生物質との間の相乗作用を示す。コリスチン、メロペナムおよびトブラマイシンのMICは、様々な濃度のacpP標的化PPMO (PPMO# 1) またはスクランブル (Scr) 対照PPMOを用いて測定した。生存細胞は、抗生物質単独、PPMO単独、またはそれらの組み合わせで24時間の培養後に計数した。図12A~12Bはコリスチンの結果を示し、図12C~12Dはメロペナムの結果を示し、図12E~12Fはトブラマイシンの結果を示す。すべての場合において、acpP標的化PPMOにより、試験した抗生物質のMICは有意に低下した。遊離ペプチド (RXR) 4XBも試験し、それ自体は、測定不能なMIC (データは図示せず) を

有した。エラーバーは、標準偏差（すべての実験についてN = 2）を示す。

【図12-2】図12A~12Fは、多剤耐性E. coli株AIS070834に対する、acpP標的化PPMOと3種の異なる抗生物質との間の相乗作用を示す。コリスチン、メロペナムおよびトブラマイシンのMICは、様々な濃度のacpP標的化PPMO（PPMO#1）またはスクランブル（Scr）対照PPMOを用いて測定した。生存細胞は、抗生物質単独、PPMO単独、またはそれらの組み合わせで24時間の培養後に計数した。図12A~12Bはコリスチンの結果を示し、図12C~12Dはメロペナムの結果を示し、図12E~12Fはトブラマイシンの結果を示す。すべての場合において、acpP標的化PPMOにより、試験した抗生物質のMICは有意に低下した。遊離ペプチド（RXR）4XBも試験し、それ自体は、測定不能なMIC（データは図示せず）を有した。エラーバーは、標準偏差（すべての実験についてN = 2）を示す。

10

【図12-3】図12A~12Fは、多剤耐性E. coli株AIS070834に対する、acpP標的化PPMOと3種の異なる抗生物質との間の相乗作用を示す。コリスチン、メロペナムおよびトブラマイシンのMICは、様々な濃度のacpP標的化PPMO（PPMO#1）またはスクランブル（Scr）対照PPMOを用いて測定した。生存細胞は、抗生物質単独、PPMO単独、またはそれらの組み合わせで24時間の培養後に計数した。図12A~12Bはコリスチンの結果を示し、図12C~12Dはメロペナムの結果を示し、図12E~12Fはトブラマイシンの結果を示す。すべての場合において、acpP標的化PPMOにより、試験した抗生物質のMICは有意に低下した。遊離ペプチド（RXR）4XBも試験し、それ自体は、測定不能なMIC（データは図示せず）を有した。エラーバーは、標準偏差（すべての実験についてN = 2）を示す。

20

【0075】

【図13A】図13A~13Dは、選択した細菌株における、様々な遺伝子に対して標的化されるPPMOのMICを示す。図13Aは、MHIIにおいて成長させたE. coli株の結果を示す。図13Bは、MOPS最少培地において成長させたE. coli株の結果を示す。図13Cは、MHIIにおいて成長させたAcinetobacter種の結果を示す。図13Dは、AB最少培地において成長させたAcinetobacter種の結果を示す。

【図13B】図13A~13Dは、選択した細菌株における、様々な遺伝子に対して標的化されるPPMOのMICを示す。図13Aは、MHIIにおいて成長させたE. coli株の結果を示す。図13Bは、MOPS最少培地において成長させたE. coli株の結果を示す。図13Cは、MHIIにおいて成長させたAcinetobacter種の結果を示す。図13Dは、AB最少培地において成長させたAcinetobacter種の結果を示す。

30

【図13C】図13A~13Dは、選択した細菌株における、様々な遺伝子に対して標的化されるPPMOのMICを示す。図13Aは、MHIIにおいて成長させたE. coli株の結果を示す。図13Bは、MOPS最少培地において成長させたE. coli株の結果を示す。図13Cは、MHIIにおいて成長させたAcinetobacter種の結果を示す。図13Dは、AB最少培地において成長させたAcinetobacter種の結果を示す。

40

【図13D】図13A~13Dは、選択した細菌株における、様々な遺伝子に対して標的化されるPPMOのMICを示す。図13Aは、MHIIにおいて成長させたE. coli株の結果を示す。図13Bは、MOPS最少培地において成長させたE. coli株の結果を示す。図13Cは、MHIIにおいて成長させたAcinetobacter種の結果を示す。図13Dは、AB最少培地において成長させたAcinetobacter種の結果を示す。

【0076】

【図14】図14A~14Fは、3種の抗生物質とのftsZ PPMOの相乗作用を示す。多剤耐性E. coli AIS070834を指標として使用し、様々な濃度のftsZ PPMO（PPMO#46）またはスクランブル（Scr）PPMO（Scr-1

50

を用いて、古典的な抗生物質のMIC (図14A、図14C、図14E)を測定した。抗生物質を用いて、またはPPMO単独で、および相乗作用が明白である組み合わせで、24時間培養後、生存細胞を計数した(図14B、図14D、図14F)。抗生物質との相乗作用について、遊離ペプチド(RXR)<sub>4</sub>XBも試験したが、それ自体は、測定不能なMIC(データは図示せず)を有した。エラーバーは標準偏差を示す。すべての実験について、N = 2。

【0077】

【図15】図15A~15Bは、E. coli SMS-3-5における、耐性遺伝子を標的化する、添加されたPPMOによる古典的な抗生物質の最小発育阻止濃度(MIC)を示す。(図15A) blaT - (RXR)<sub>4</sub>XB (PPMO#66)によるアンピシリンのMIC。(図15B) cmIA - (RXR)<sub>4</sub>XB (PPMO#67)によるクロラムフェニコール(chloramphenicol)のMIC。N = 3。

10

【0078】

【図16】図16A~16Bは、非必須耐性遺伝子のPPMO媒介性ノックダウンにより、古典的な抗生物質の効力が回復することを示すことを示す。グラフは、(図16A)富栄養培地と(図16B)最少培地の両方において、PPMO(a deA - (RXR)<sub>4</sub>XB (PPMO#65)、Scr - (RXR)<sub>4</sub>XB (Scr-2)、およびペプチド(RXR)<sub>4</sub>XB、図示せず)を独立して、およびトブラマイシンと共に、A. baumannii株のAYEに希釈することにより行ったMICを示す。N = 3。

【発明を実施するための形態】

20

【0079】

定義

他に定義しない限り、本明細書において使用するすべての技術用語および科学用語は、技術分野における当業者が一般に理解するのと同じ意味を有する。本明細書に記載されているものと同様または同等な任意の方法および材料を本開示の実施または試験において使用することができるが、好ましい方法および材料を記載する。本開示の目的のために、下記の用語を下で定義する。

【0080】

冠詞「a」および「an」は、本明細書において1つまたは1つ超(すなわち、少なくとも1つ)の、冠詞の文法上の目的を指すために使用される。例として、「要素(an element)」は、1つの要素または1つ超の要素を意味する。

30

【0081】

「約」は、参照の含量(quantity)、レベル、値、数、頻度、百分率、寸法、サイズ、量、重量、または長さ、30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2または1%ほど変化する、含量、レベル、値、数、頻度、百分率、寸法、サイズ、量、重量、または長さを意味する。

【0082】

「コード配列」は、遺伝子のポリペプチド産物のためのコードに寄与する任意の核酸配列を意味する。対照的に、用語「非コード配列」は、遺伝子のポリペプチド産物のためのコードに直接寄与しない任意の核酸配列を指す。

40

【0083】

本明細書を通じて、文脈上他に要求されない限り、単語「含む(comprise)」、「含む(comprises)」および「含むこと(comprising)」は、表示されたステップもしくは要素、またはステップもしくは要素の群を含むことを暗示するが、任意の他のステップもしくは要素、またはステップもしくは要素の群の除外することを暗示しないと理解される。

【0084】

「からなる」は、語句「からなる」に続くいかなるものを含み、これらに限定されることを意味する。このように、語句「からなる」は、列挙された要素が必要とされるか、または必須であり、他の要素が存在し得ないことを示す。「から本質的になる」は、語句の

50



後に列挙される任意の要素を含み、列挙された要素について本開示において特定される活性もしくは作用を妨げないか、またはこれの一因とならない他の要素に限定されることを意味する。このように、語句「から本質的になる」は、列挙された要素が必要とされるかまたは必須であるが、他の要素は任意選択であり、他の要素が列挙された要素の活性または作用に物質的に影響を与えるかどうかによって、存在してもしなくてもよいことを示す。

#### 【0085】

本明細書において使用する場合、用語「細胞を接触させること」、「導入すること」または「送達すること」は、当技術分野で通例の方法、例えば、トランスフェクション（例えば、リボソーム、リン酸カルシウム、ポリエチレンジイミン）、電気穿孔法（例えば、ヌクレオフェクション（*nucleofection*））、マイクロインジェクション、形質転換、および投与による細胞中への本明細書に記載のオリゴマーの送達を含む。

10

#### 【0086】

用語「細胞透過性ペプチド」（CPP）または「細胞の取込みを増進するペプチド部分」は互換的に使用され、「輸送ペプチド」、「担体ペプチド」、または「ペプチド形質導入ドメイン」とも称されるカチオン性細胞透過性ペプチドを指す。一部の態様では、ペプチドは、所与の集団の細胞の約または少なくとも約30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%以内の細胞透過を誘発する能力を有し、かつ/または全身的投与の際に*in vivo*での複数の組織への、または複数の組織内の巨大分子トランスロケーションを可能とする。CPPの特定の例は、「アルギニンに富んだペプチド」を含む。CPPは当技術分野において周知であり、例えば、参照によりそれら全ての全体が組み込まれている米国特許出願第2010/0016215号ならびに国際特許出願公開第WO2004/097017号、第WO2009/005793号、および第WO2012/150960号に開示されている。

20

#### 【0087】

「電子対」は、他の原子と結合または共有していない電子の原子価対を指す。

#### 【0088】

「相同性」は、同一であるか、または保存的置換を構成するアミノ酸の百分率数を指す。相同性は、配列比較プログラム、例えば、GAP（Deverauxら、1984年、*Nucleic Acids Research*、12巻、387～395頁）またはBLASTを使用して決定し得る。このように、本明細書において引用したものと同様または実質的に異なる長さの配列は、アラインメント中へのギャップの挿入によって比較することができたが、このようなギャップは、例えば、GAPによって使用される比較アルゴリズムによって決定される。

30

#### 【0089】

「単離した」は、その天然状態で材料に通常付随する構成成分を実質的または本質的に非含有である材料を意味する。例えば、「単離したポリヌクレオチド」または「単離したオリゴマー」は、本明細書において使用する場合、天然に存在する状態でポリヌクレオチドを挟む配列から精製または除去されているポリヌクレオチド、例えば、ゲノム中のフラグメントに隣接する配列から除去されたDNAフラグメントを指し得る。用語「単離すること」は、細胞に関与するときに、供給源の被験体（例えば、ポリヌクレオチド反復疾患を有する被験体）からの細胞（例えば、線維芽細胞、リンパ芽球）の精製を指す。mRNAまたはタンパク質との関連で、「単離すること」は、供給源、例えば、細胞からのmRNAまたはタンパク質の回収を指す。

40

#### 【0090】

用語「モジュレートする」は、任意選択で明確な量および/または統計的に有意な量だけ、1つまたは複数の定量化できるパラメータを「増加させる」か、または「減少させる」ことを含む。「増加する」もしくは「増加すること」、「増進する」もしくは「増進すること」または「刺激する」もしくは「刺激すること」は一般に、アンチセンス化合物なしまたは対照化合物のいずれかによってもたらされる応答に対して、1種または複数の

50

アンチセンス化合物または組成物が、細胞または被験体においてより大きな生理学的応答（すなわち、下流効果）を生じさせるか、または引き起こす能力を指す。関連性のある生理学的応答または細胞応答（*in vivo*または*in vitro*での）は、当業者には明らかである。「増加した」または「増進した」量は典型的には、「統計的に有意な」量であり、アンチセンス化合物なし（薬剤が存在しない）または対照化合物によって生成される量の1.1、1.2、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50倍もしくは50倍を超える（例えば、500倍、1000倍）（すべての整数、およびその間の範囲および1超を含めた、例えば、1.5、1.6、1.7、1.8）増加を含み得る。用語「低減させる」または「阻害する」は一般に、1種または複数のアンチセンス化合物または組成物が、診断の技術分野における通例の技術によって測定すると、関連性のある生理学的応答または細胞応答、例えば、本明細書に記載されている疾患または状態の症状を「減少させる」能力に関し得る。関連性のある生理学的応答または細胞応答（*in vivo*または*in vitro*での）は当業者には明らかであり、細菌細胞成長の低減、抗微生物剤の最小発育阻止濃度（MIC）の低減などを含み得る。応答における「減少」は、アンチセンス化合物なしまたは対照組成物によって生じた応答と比較して「統計的に有意」であってよく、すべての整数およびその間の範囲を含めた、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%の減少を含み得る。

10

20

**【0091】**

本明細書において使用する場合、「アンチセンスオリゴマー」、「オリゴマー」または「オリゴマー」は、ヌクレオチド、またはヌクレオチド類似体の直鎖状配列を指し、これは核酸塩基がワトソン-クリック塩基対合によってRNAにおける標的配列とハイブリダイズし、標的配列内でオリゴマー：RNAヘテロ二重鎖を形成することを可能にする。用語「アンチセンスオリゴマー」、「アンチセンスオリゴマー」、「オリゴマー」および「化合物」は、互換的に使用され、オリゴマーを指し得る。環状サブユニットは、リボースもしくは別のペントース糖、またはある特定の実施形態では、モルホリノ基（下記のモルホリノオリゴマーの記載を参照されたい）をベースとし得る。

**【0092】**

用語「オリゴマー」、「オリゴマー」または「アンチセンスオリゴマー」はまた、例えば、その3'末端または5'末端においてオリゴマーにコンジュゲートしている1つまたは複数のさらなる部分を有するオリゴマー、例えば、ポリエチレングリコール部分または他の親水性ポリマー、例えば、溶解度を増進することにおいて有用であり得る10~100個のモノマーサブユニットを有するもの、または標的細菌細胞中への化合物の取込みを増進し、かつ/もしくは細胞内の化合物の活性を増進し、例えば、標的ポリヌクレオチドへのその結合を増進するのに有効な部分、例えば、脂質もしくはペプチド部分を包含する。

30

**【0093】**

「ヌクレアーゼ耐性」オリゴマーは、体内または細菌細胞内の一般の細胞外および細胞内ヌクレアーゼ（例えば、エクソヌクレアーゼ、例えば、3'-エクソヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ、RNase Hによる）によって、非ハイブリダイズ形態またはハイブリダイズ形態で、その骨格がヌクレアーゼ切断に対して実質的に耐性であるものを指し、すなわち、オリゴマーは、オリゴマーが曝露される通常のヌクレアーゼ条件下でヌクレアーゼ切断をほとんど示さないか、ヌクレアーゼ切断を示さない。「ヌクレアーゼ耐性ヘテロ二重鎖」は、ヘテロ二重鎖が二本鎖RNA/RNAまたはRNA/DNA複合体を切断することができる細胞内および細胞外ヌクレアーゼによる*in vivo*での分解に対して実質的に耐性であるような、その相補的標的へのアンチセンスオリゴマーの結合によって形成されたヘテロ二重鎖を指す。「ヘテロ二重鎖」は、アンチセンスオリゴマー、および標的RNAの相補的部分の間の二重鎖を指す。

40

50

## 【0094】

本明細書において使用する場合、「核酸塩基」(Nu)、「塩基対合部分」または「塩基」は、互換的に使用され、天然DNAまたはRNAにおいて見出されるプリンまたはピリミジン塩基(ウラシル、チミン、アデニン、シトシン、およびグアニン)、ならびに改善された特性、例えば、オリゴマーへの結合親和性を付与する天然に存在するプリンおよびピリミジンの類似体を指す。例示的な類似体は、ヒポキサンチン(ヌクレオシドイノシンの塩基構成成分); 2, 6 - ジアミノプリン; 5 - メチルシトシン; C5 - プロピニル - 修飾ピリミジン; 9 - (アミノエトキシ)フェノキサジン(G - クランプ)などを含む。

## 【0095】

リボース、糖類似体またはモルホリノに共有結合的に連結している核酸塩基は、ヌクレオシドを含む。「ヌクレオチド」は、1個のリン酸基と一緒にヌクレオシドから構成される。リン酸基は、隣接するヌクレオチドを互いに共有結合的に連結し、オリゴマーを形成させる。

## 【0096】

オリゴマーが、生理学的条件下で、実質的に40 超または45 超、好ましくは、少なくとも50 、および典型的には、60 ~ 80 もしくはそれ超のT<sub>m</sub>で標的とハイブリダイズする場合、オリゴマーは、標的配列と「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で、T<sub>m</sub>は、標的配列の50%が相補的ポリヌクレオチドとハイブリダイズする温度である。このようなハイブリダイゼーションは、標的配列に対するアンチセンスオリゴマーの「ほとんど」または「実質的な」相補性、および正確な相補性を伴って起こり得る。

## 【0097】

本明細書において使用する場合、「十分な長さ」は、細菌mRNA標的配列の領域における、少なくとも約8、より典型的には、約8~10、8~11、8~12、8~13、8~14、8~15、8~16、8~17、8~18、8~19、8~20、8~30、8~40、または10~11、10~12、10~13、10~14、10~15、10~16、10~17、10~18、10~19、10~20、10~30、10~40(すべての整数およびその間の範囲を含めた)の連続しているかもしくは連続していない核酸塩基に対して相補的であるアンチセンスオリゴマーを含む。十分な長さのアンチセンスオリゴマーは、細菌mRNA標的の領域と特異的にハイブリダイズすることができる少なくとも最小数のヌクレオチドを有する。好ましくは、十分な長さのオリゴマーは、長さが8~30ヌクレオチド、例えば、長さが約10~20ヌクレオチドである。

## 【0098】

用語「配列同一性」または、例えば、「と50%同一の配列」を含むことは、本明細書において使用する場合、配列が、比較のウィンドウにわたり、ヌクレオチドごとにまたはアミノ酸ごとに同一である程度を指す。このように、「配列同一性の百分率」は、比較のウィンドウにわたり2つの最適に整列した配列を比較し、同一の核酸塩基(例えば、A、T、C、G、I)または同一のアミノ酸残基(例えば、Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、CysおよびMet)が両方の配列において存在する位置の数を決定して、マッチした位置の数を得て、マッチした位置の数を比較のウィンドウ(すなわち、ウィンドウサイズ)における位置の総数で除算し、結果を100で乗じて、配列同一性の百分率を得ることによって計算し得る。比較ウィンドウを整列させるための配列の最適なアラインメントは、アルゴリズムのコンピュータ化実装(Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0、Genetics Computer Group、575 Science Drive Madison, Wis., USAにおけるGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA)によって、または選択した様々な方法のいずれかによって生じさ

10

20

30

40

50

せた検査および最良のアラインメント（すなわち、比較ウィンドウにわたる最も高い百分率の相同性をもたらす）によって行い得る。例えば、A l t s c h u l ら、N u c l . A c i d s R e s .、25巻：3389頁、1997年によって開示されているようなB L A S Tファミリーのプログラムも参照し得る。

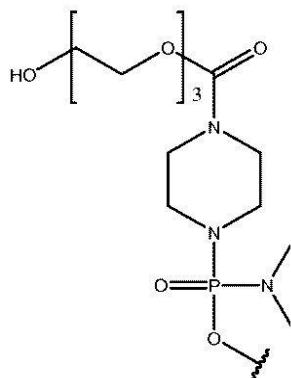
【0099】

「被験体」または「それを必要とする被験体」は、哺乳動物被験体、例えば、ヒト被験体を含む。

【0100】

用語「TEG」、「EG3」または「トリエチレングリコールテール」は、例えば、その3'末端または5'末端においてオリゴマーにコンジュゲートしているトリエチレングリコール部分を指す。例えば、一部の実施形態では、「TEG」は、例えば、式(I)、(II)、または(III)の化合物のTが、式：

【化6】

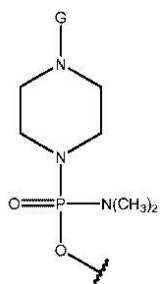


のものであることを含む。

【0101】

用語「pip-PDA」は、G基リンカーおよびピペラジニル窒素の間のアミド結合によって、G基（G基は、細胞透過性ペプチド（CPP）および下記でさらに考察するリンカー部分を含む）をオリゴマーの5'末端に接続する、5'末端ピペラジン-ホスホロジアミデート部分を指す。例えば、一部の実施形態では、「pip-PDA」は、式(I)または(II)の化合物のTが、式：

【化7】



のものであることを含む。

【0102】

用語「標的配列」は、それに対してアンチセンスオリゴマーが対象としている標的RNA、例えば、細菌mRNAの一部、すなわち、オリゴマーが相補的配列のワトソン-クリック塩基対合によってハイブリダイズする配列を指す。ある特定の実施形態では、標的配列は、細菌遺伝子の翻訳開始領域の連続する領域であり得る。

【0103】

用語「標的化配列」または「アンチセンス標的化配列」は、RNA、例えば、細菌mRNA中の標的配列に対して相補的または実質的に相補的であるオリゴマー中の配列を指す。アンチセンス化合物の全配列、または一部のみは、標的配列に対して相補的であり得る

。例えば、約10～30塩基のオリゴマーにおいて、その塩基のうち約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、または29個は、標的領域に対して相補的である標的化配列であり得る。典型的には、標的化配列は、連続する塩基で形成されるが、代わりに、例えば、オリゴマーの反対の末端から一緒に置かれたとき、標的配列にまたがる配列を構成する、連続していない配列から形成され得る。

#### 【0104】

「標的化配列」は、標的配列に対する「ほとんど」または「実質的な」相補性を有し、本開示の目的のために依然として機能し、すなわち、依然として「相補的」であり得る。好ましくは、本開示において用いられるオリゴマー類似体化合物は、10ヌクレオチドのうち標的配列と最大で1つのミスマッチ、好ましくは、20ヌクレオチドのうち最大で1つのミスマッチを有する。代わりに、用いられるアンチセンスオリゴマーは、本明細書において示すような例示的な標的化配列と、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。

#### 【0105】

本明細書において使用する場合、用語「定量化すること」、「定量化」または他の関連する単語は、核酸、ポリヌクレオチド、オリゴマー、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質の、単位体積における含量、質量、または濃度を決定することを指す。

#### 【0106】

本明細書において使用する場合、被験体（例えば、哺乳動物、例えば、ヒト）または細胞の「処置」は、個体または細胞の自然経過を変化させる試みにおいて使用される任意のタイプの介入である。処置には、これらに限定されないが、医薬組成物の投与が含まれ、予防的に、または病的事象の開始もしくは病原因子との接触の後に行われ得る。また含まれるのは、処置される疾患もしくは状態の進行の速度を低減させるか、その疾患もしくは状態の発生を遅延させるか、またはその発生の重症度を低減させることを対象とすることができる「予防的」処置である。「処置」または「予防法」は、疾患もしくは状態、またはその関連する症状の完全な根絶、治癒、または予防を必ずしも示さない。

#### 【0107】

##### II. 細菌の標的化配列

ある特定の実施形態は、生化学的経路および/または細胞プロセスにおける遺伝子をコードする細菌mRNA標的配列と特異的にハイブリダイズするのに十分な長さおよび相補性のものである、アンチセンスオリゴマー、ならびに関連する組成物および方法に関する。一般的な例は、細胞分裂、全体的な遺伝子調節機序、脂肪酸生合成、リボソームタンパク質、DNA複製、転写、翻訳開始、リボポリサッカライド生合成、ペプチドグリカン生合成、核酸生合成、中間代謝および抗生物質耐性を含む。生化学的経路および細胞プロセスにおける遺伝子の特定の例は、rpsJおよびrpmB（リボソームタンパク質）；lpxC、waaC、waaG、waaA、waaF、lpxAおよびlpxB（リボポリサッカライド生合成）；murA（以前はmurZとして公知）、mraY、murC、murB、murE、murFおよびmurG（ペプチドグリカン生合成）；fabG、acpP、accA、accBおよびfabZ（脂肪酸生合成）；adk（細胞エネルギーホメオスタシス）；infA（抗転写終結（transcription antitermination））および/またはタンパク質合成）；ftsZ（細胞分裂）；rpoD（RNA合成）；aroC（芳香族化合物の生合成）を含む。抗生物質耐性遺伝子の例には、blaT、cmIおよびadeAが含まれる。一部の実施形態では、遺伝子をコードするmRNA標的配列は、Acinetobacter、例えばAcinetobacter baumanniiに由来する。一部の実施形態では、遺伝子をコードするmRNA標的配列は、Escherichia、例えばE. coliに由来する。

#### 【0108】

一部の実施形態では、細菌標的は、脂肪酸の生合成と関連する遺伝子またはタンパク質である。脂肪酸生合成と関連するタンパク質の一般例は、中間の脂肪酸鎖の安定化、およ

び脂肪酸シンターゼ複合体中の酵素のそれぞれへの中間の脂肪酸鎖のシャトリングにおいて重要な役割を果たすアシルキャリアータンパク質 (ACP)、例えば、Ac p P ; 4' - ホスホパンテテイン補欠分子族を apo - ACP に移動して、機能的ホロ - ACP を形成させる酵素であるアシルキャリアータンパク質シンターゼ (Ac p S) ; 脂肪酸生合成の最初の方向決定ステップ (committed step) におけるマロニル - CoA へのアセチル - CoA の変換を触媒する4種のタンパク質から構成される酵素であるアセチル - CoA カルボキシラーゼ : Acc A (ビオチンからアセチル - CoA へのカルボキシル基の転移を触媒してマロニル - CoA を形成するカルボキシルトランスフェラーゼアルファサブユニット)、Acc B (カルボキシル末端の近傍のリシン残基に共有結合的に付着しているビオチン補欠分子族を運搬するビオチンカルボキシルキャリアータンパク質である BCCP)、Acc C (重炭酸塩によるタンパク質結合性ビオチンのカルボキシル化を触媒するビオチンカルボキシラーゼ)、Acc D (ビオチンからアセチル - CoA へのカルボキシル基の転移を触媒してマロニル - CoA を形成するカルボキシルトランスフェラーゼベータサブユニット) ; 成長している脂肪酸鎖上の伸長または適合ステップのいずれかをそれぞれ触媒する脂肪酸生合成 (Fab) 酵素、例えば、Fab A、Fab I、Fab F、Fab B、Fab D、Fab H、Fab G および Fab Z を含む。脂肪酸生合成と関連する遺伝子の特定の例は、ac p P およびカルボキシルトランスフェラーゼアルファサブユニット acc A を含む。アシルキャリアータンパク質 ac p P 遺伝子の例示的な翻訳開始コドン領域配列を、下記の表 1 において提供する。

【0109】

したがって、具体的な実施形態は、アシルキャリアータンパク質 (ACP) をコードする細菌の ac p P 遺伝子の mRNA 標的配列と特異的にハイブリダイズするのに十分な長さおよび相補性のものである、アンチセンスオリゴマー、ならびに関連組成物および方法に関する。一部の実施形態では、ac p P 遺伝子は、Acinetobacter、例えば Acinetobacter baumannii に由来する。一部の実施形態では、ac p P 遺伝子は、Escherichia、例えば E. coli に由来する。

【0110】

細菌の細胞壁であるペプチドグリカン、形状の維持および浸透圧性ショック溶解からの防御に参与する、必須の細胞構成成分である。Escherichia coli のペプチドグリカンは、ペンタペプチドが付着している N - アセチルグルコサミン (GlcNAc) および N - アセチルムラミン酸から構成される基本的な構成要素から組み立てられている。一部の実施形態では、細菌の標的は、ペプチドグリカン生合成に関連する遺伝子またはタンパク質である。ペプチドグリカン生合成に関連する遺伝子の特定の例には、murA (以前は murZ として公知) が含まれ、これは、ペプチドグリカン生合成の最初の方向決定ステップ (committed step) を触媒する、UDP - N - アセチルグルコサミン 1 - カルボキシビニルトランスフェラーゼをコードする。この酵素は、ホスホエノールピルベートから UDP - N - アセチルグルコサミンの 3 - OH へのエノールピルベートの転移を触媒する。

【0111】

リボソームは、mRNA 分子のタンパク質への翻訳に重要である極めて重要である。一部の実施形態では、細菌の標的は、リボソームタンパク質に関連する遺伝子またはタンパク質である。リボソームタンパク質に関連する遺伝子の特定の例には、rpmB、すなわち、リボソームの組立ておよび翻訳にとって不可欠な 50S リボソームタンパク質 L28 である。

【0112】

一部の実施形態では、細菌の標的は、細胞エネルギーホメオスタシスに関連する遺伝子またはタンパク質である。細胞エネルギーホメオスタシスに関連する遺伝子の特定の例には、アデニンヌクレオチドの相互変換 (interconversion) を触媒するホスホトランスフェラーゼ酵素をコードする、アデニル酸キナーゼ (adk) 遺伝子が含まれる。

## 【0113】

一部の実施形態では、細菌の標的は、抗転写終結および/またはタンパク質生合成に関連する遺伝子またはタンパク質である。抗転写終結および/またはタンパク質生合成に関連する遺伝子の特定の例には、翻訳開始因子IF1が含まれる。infAによってコードされるIF1は、核酸の二次構造の結合および融解、ならびに抗転写終結において役割を果たし得る、S1様ドメインを含有するタンパク質である。他の機能には、70Sリボソームの解離およびサブユニットの会合の速度の向上、ならびにIF2およびIF3などの他の翻訳開始因子の活性の刺激による翻訳開始の忠実性における関与も含まれ得る。

## 【0114】

一部の実施形態では、細菌の標的は、細胞分裂に関連する遺伝子またはタンパク質である。細胞分裂に関連する遺伝子の特定の例には、細菌の細胞分裂の隔壁の見込み部位において環に集合するタンパク質をコードする、ftsZ遺伝子が含まれる。これは、真核細胞タンパク質のチューブリンに対する原核生物のホモログである。

10

## 【0115】

一部の実施形態では、細菌の標的は、RNA合成に関連する遺伝子またはタンパク質である。RNA合成に関連する遺伝子の特定の例には、rpoD遺伝子が含まれ、この遺伝子は、ポリメラーゼの遺伝子プロモーターへの結合を可能にし、細胞成長において大部分の遺伝子を転写するために重要な、RNAポリメラーゼのシグマD（シグマ70）因子をコードする。このシグマ因子によって認識される遺伝子は、転写開始点より10ヌクレオチドおよび35ヌクレオチド前に中心を置くプロモーターコンセンサス配列を有する。

20

## 【0116】

芳香族化合物の生合成は、細菌細胞の成長および生存にとって重要である。シキミ酸経路は、他の芳香族化合物に対する中心的な前駆体である、コリスミ酸の合成をもたらす、微生物における生合成経路である。一部の実施形態では、細菌の標的は、芳香族化合物の生合成に関連する遺伝子またはタンパク質である。芳香族化合物の生合成に関連する遺伝子の特定の例には、aroC遺伝子が含まれ、この遺伝子は、コリスミ酸シンターゼ（5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸ホスホリアーゼ）、すなわち、5-エノールピルビルシキミ酸-3-ホスフェートのコリスミ酸への変換を触媒する、シキミ酸経路における最終酵素をコードする。

## 【0117】

一部の実施形態では、遺伝子またはタンパク質は、少なくとも1つの抗微生物剤に対する細菌の耐性に関連しており、すなわち抗生物質耐性遺伝子である。抗生物質耐性遺伝子の一般的な例には、ある特定の抗微生物剤を酵素的に非活性化することができるベータ-ラクタマーゼ、および抗微生物剤の透過性または能動排出（ポンプアウト）を増加させるタンパク質が含まれる。抗生物質耐性遺伝子の特定の例には、TEMベータ-ラクタマーゼ（blaT）、クロラムフェニコール耐性遺伝子（cm1）、および耐性-小結節形成-細胞分裂（RND）型多剤排出ポンプサブユニットAdeA（adeA）が含まれる。

30

## 【0118】

ある特定の実施形態では、標的配列は、細菌mRNAの翻訳開始コドンのすべてまたは一部分（例えば、1個または2個のヌクレオチド）を含有する。一部の実施形態では、標的配列は、共通開始コドンおよび選択的開始コドン（例えば、AUG、GUG、UUG、AUU、CUG）を含めた、細菌mRNA標的配列の翻訳開始コドンの上流または下流の、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30塩基である配列、またはそれ以内の配列を含有する。例えば、特定の実施形態では、細菌mRNAのAUG開始コドンにおいて、標的配列の5'末端は、アデニン、ウラシルまたはグアニンヌクレオチド（それぞれ）である。一部の実施形態では、細菌mRNAのGUG開始コドンにおいて、標的配列の5'末端は、グアニン、ウラシルまたはグアニンヌクレオチド（それぞれ）である。一部の実施形態では、細菌mRNAのUUG開始コドンにおいて、標的配列の5'末端は、ウラシル、ウラシルまたはグアニンヌクレオチド（

40

50

それぞれ)である。一部の実施形態では、標的配列の5'末端または3'末端は、細菌mRNAの翻訳開始コドンの最後(第3)のヌクレオチドの下流の、残基1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30で始まる。一部の実施形態では、標的配列の5'末端または3'末端は、細菌mRNAの翻訳開始コドンの最初のヌクレオチドの上流の、残基1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30で始まる。

#### 【0119】

*Acinetobacter baumannii*および*E. coli*に由来する例示的な標的遺伝子の標的配列は、以下の表1に提供されている。

#### 【表1】

表 1: 例示的な標的配列		
表 1A: 例示的な抗生物質耐性の標的配列		
説明	配列*	配列番号
E.coli の acpP アシルキヤリアータンパク質(ACP)	AAAGCGAGTTTTGATAGGAAATTTAAGAGTATGAGCACTATCGAAGAACGCGTTAAGAAA	69
A.baumannii の acpP アシルキヤリアータンパク質(ACP)	TTTTAAAAATTTTATATTCAATTAAGTGTGGCAAATCAAACGCCACAAGCAATGAGGAGAATTCCTGTGAGCGATATCGAACAACGC	70
*チミン(T)はウラシル(U)であり得、逆もまた同様である。		

#### 【0120】

このように、ある特定の実施形態では、アンチセンス標的化配列は、表1において列挙した標的配列または本明細書に記載されている標的遺伝子(例えば、配列番号69または70)の1つまたは複数の領域にハイブリダイズするように設計されている。選択されたアンチセンス標的化配列は、より短く、例えば、約8、9、10、11、12、13、14、もしくは15塩基、またはより長く、例えば、約20、30、もしくは40塩基に作製することができ、配列が、標的配列へのハイブリダイゼーションの際に転写または翻訳を低減させるのに十分に相補的であり、かつ任意選択でRNAと共に45もしくはそれ超のTmを有するヘテロ二重鎖を形成する限りは、少数のミスマッチを含む。

#### 【0121】

ある特定の実施形態では、標的配列およびアンチセンス標的化配列の間の相補性の程度は、安定的な二重鎖を形成するのに十分である。標的RNA配列とのアンチセンスオリゴマーの相補性の領域は、これらの範囲の間のすべての整数を含めた、8~9塩基、8~10塩基、8~11塩基、8~12塩基、10~11塩基、10~12塩基ほどの長さであり得るが、12~15塩基もしくはそれ超、例えば、10~40塩基、12~30塩基、12~25塩基、15~25塩基、12~20塩基、または15~20塩基であってよい。約10~15塩基のアンチセンスオリゴマーは一般に、特有の相補的配列を有するのに十分に長い。ある特定の実施形態では、本明細書において考察されているように、相補的塩基の最小の長さを、必要な結合Tmを達成するのに必要とし得る。

#### 【0122】

ある特定の実施形態では、40塩基ほども長いオリゴマーが適切であり得、ここで、少なくとも最小数の塩基、例えば、10~12塩基が、標的配列に対して相補的である。しかし、一般に、細胞における促進されたまたは能動取込みは、約30塩基未満または約20塩基未満のオリゴマー長さで最適化される。含まれるのは、約8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25



、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、または40塩基からなるアンチセンスオリゴマーであり、ここでは少なくとも約6、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、または40の連続しているかもしくは連続していない塩基は、本明細書に記載されている標的遺伝子、例えば、表1の標的配列（例えば、配列番号69または70）に対して相補的である。

#### 【0123】

ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、標的配列に対して100%相補的であり得るか、または、オリゴマーおよび標的配列の間に形成されるヘテロ二重鎖が、細胞ヌクレアーゼの作用、および*in vivo*で起こり得る分解の他のモードを耐え、かつ標的化されたmRNAの発現を低減させるのに十分に安定的である限り、例えば、変異体を収容するようにミスマッチを含み得る。したがって、ある特定のオリゴマーは、オリゴマーおよび標的配列の間に約または少なくとも約70%の配列相補性、例えば、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列相補性を有し得る。ヌクレアーゼによる切断に対して影響されにくいオリゴマー骨格が、本明細書において考察されている。ミスマッチは、存在する場合、典型的には、中間におけるよりもハイブリッド二重鎖の末端領域に向かってより不安定化していない。許容されるミスマッチの数は、二重鎖安定性のよく理解された原理によって、オリゴマーの長さ、二重鎖中のG:C塩基対の百分率、および二重鎖中のミスマッチ（複数可）の位置によって決まる。このようなアンチセンスオリゴマーは標的配列に対して必ずしも100%相補的でないが、例えば、標的RNAの翻訳が低減するように、標的配列に安定におよび特異的に結合することが有効である。

#### 【0124】

オリゴマーおよび標的配列の間に形成される二重鎖の安定性は、結合 $T_m$ 、および細胞の酵素的切断に対する二重鎖の感受性の関数である。相補的配列RNAに関するオリゴマーの $T_m$ は、例えば、Hamesら、*Nucleic Acid Hybridization*、IRL Press、1985年、107~108頁によって記載されているもの、またはMiyada C. G. およびWallace R. B.、1987年、*Oligomer Hybridization Techniques, Methods Enzymol.*、第154巻、94~107頁に記載されているように、従来の方法によって測定され得る。ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、相補的配列RNAに関して、体温より高い、好ましくは、約45 超または50 超の結合 $T_m$ を有し得る。60~80 の範囲またはそれ超の $T_m$ も含まれる。周知の原理によると、相補性をベースとするRNAハイブリッドに関してオリゴマーの $T_m$ は、二重鎖におけるC:G対合塩基の比を増加させることによって、および/またはヘテロ二重鎖の長さ（塩基対で）を増加させることによって、増加させることができる。同時に、細胞の取込みを最適化する目的のために、オリゴマーのサイズを限定することが有利であり得る。

#### 【0125】

以下の表2A~Bは、本明細書において記載されているアンチセンスオリゴマーの例示的な標的化配列（5'から3'の方向で）を示す。

【表 2 - 1】

表 2A: 例示的な脂肪酸生成関連標的化配列		
標的遺伝子	標的化配列(TS)*	TS 配列番号
acpP	CTTCGATAGTG	1
acpP	ATATCGCTCAC	2
acpP	ATTCTCCTCAT	3
acpP	CACAGGAATTC	4
acpS	TTGCCATTAGC	5
acp-E	CTGTAGTGATTTACCA	6
fabA	TTATCTACCAT	7
fabB	GCACGTTTCAT	8
fabI	AGAAAACCCAT	9
gapA	TTGATAGTCAT	10
accA	GCTTTTTTCAT	11
*チミン(T)はウラシル(U)であり得、逆もまた同様である。I はイノシンである。		

【表 2 - 2】

表 2B: 他の生化学的経路および/または細胞プロセスに関連する例示的な標的化配列		
標的遺伝子	標的化配列(TS)*	TS 配列番号
murA	ATCCATTTAGT	12
murA	CATTTAGTTTG	13
murA	AATTTATCCAT	14
murA	AAATTTATCCA	15
rpmB	ACTCGGGACAT	16
rpmB	CTATTCTCCAA	17
rpmB	GGCAGACTCGG	18
rpmB	CTTAGACATGG	19
adk	ATGATACGCAT	20
infA	TCTTTGGCCAT	21
ftsZ	TCAAATGAGGC	22
ftsZ	AATGAGGCCAT	23
ftsZ	ATAGTTTCTCTCC	24
rpoD	TCATCTTTGCT	25
rpoD	TTTTGCTCCAT	26
aroC	TTCCCTGCCAT	27
aroC	TTCCAGCCAT	28
murF	ACGCTAATCAT	29
lpxC	TGTTTGATCAT	30
kdtA	AATTCGAGCAT	31
boxA	TGTTAAAGAGC	32
rpoD-E	CTTGTAACCACACCA	33
pryC	GGTGCAATCAT	34
pryA	GACTTAATCAA	35
lgt	CTACTGGTCAT	36
folA	CATTGAGATTT	37
infB	ACATCTGTCAT	38
nrdA	TTCTGATTCAT	39
nrdB	GTATATGCCAT	40
zipA	TCCTGCATCAT	41
coaA	ATATACCTCAT	42
gyrA-E	GTTACCCTGACCGACCA	43
gyrA-E	GTTACCCTGACCACCA	44
mrdA	TGTTTCATACG	45
lpxB	GGTTTGCCAAG	46
lpxC	TGTTTCACCAT	47
kdtA	IIITCGCCAA	48
boxA	CTCTTAATGAT	49
boxC	ATCCACACAAG	50
rpoD-E	TCCACCAAGTCACCA	51
pryC	AGAGTTCAAGG	52
carA	GGTGCTCAAAC	53
adeA	ATACTGTCCAA	54
blaT	CTCTTCCTTTT	55
cml	TCCTTCTGATT	56

\*チミン(T)はウラシル(U)であり得、逆もまた同様である。Iはイノシンである。

【 0 1 2 6】

このように、ある特定のアンチセンスオリゴマーは、表 2 A ~ B における標的化配列（例えば、配列番号 1 ~ 56）またはその変異体、またはその連続しているかもしくは連続していない部分（複数可）を含むか、これらからなるか、またはこれらから本質的になる。例えば、ある特定のアンチセンスオリゴマーは、表 2 A ~ B における標的化配列（例えば、配列番号 1 ~ 56）のいずれかの約または少なくとも約 6、7、8、9、10、11

10

20

30

40

50

、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、もしくは27の連続しているかもしくは連続していないヌクレオチドを含む。連続していない部分について、介在するヌクレオチドを、欠失させるかもしくは異なるヌクレオチドで置換することができるか、または介在するヌクレオチドを加えることができる。変異体のさらなる例は、表2A～Bにおける標的化配列（例えば、配列番号1～56）のいずれかの全長にわたり、約または少なくとも約70%の配列同一性または相同性、例えば、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性または相同性を有するオリゴマーを含む。

10

#### 【0127】

アンチセンスオリゴマーおよびその変異体の活性は、当技術分野で通例の技術によってアッセイすることができる（例えば、実施例を参照されたい）。

#### 【0128】

##### III. アンチセンスオリゴマー化合物

アンチセンスオリゴマーは典型的には、生化学的経路および/または細胞プロセスに関連するタンパク質をコードする細菌mRNA標的配列と特異的にハイブリダイズし、それによってタンパク質の発現（例えば、翻訳）を低減させるのに十分な長さおよび相補性の塩基配列を含む。オリゴマー化合物が細菌細胞によって能動的に取り込まれる能力を有し、一度取り込まれると、任意選択で約40 超または45 超のT<sub>m</sub>を有する、標的mRNAと安定的な二重鎖（またはヘテロ二重鎖）を形成するとき、この必要条件を任意選択で満たす。

20

#### 【0129】

##### A. アンチセンスオリゴマーの化学的特色

ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴマーの骨格は実質的に非荷電であり、任意選択で細胞壁および/または細胞膜を横断する能動または促進輸送のための基質として認識される。標的RNAと安定的な二重鎖を形成するオリゴマーの能力はまた、標的に関するアンチセンスオリゴマーの長さおよび相補性の程度、G:CとA:T塩基マッチとの比、および任意のミスマッチした塩基の位置を含めた、骨格の他の特色に関し得る。アンチセンスオリゴマーが細胞ヌクレアーゼに耐える能力は、生存、および細胞への薬剤の最終送達を促進し得る。例示的なアンチセンスオリゴマー標的化配列を、表2A～B（上述）において列挙する。

30

#### 【0130】

ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、モルホリノをベースとするオリゴマー、例えば、ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー（PMO）である。モルホリノをベースとするオリゴマーは、核酸塩基を支持するモルホリノサブユニットを含み、リボースの代わりに、モルホリン環を含有するオリゴマーを指す。例示的なヌクレオシド間連結は、例えば、1つのモルホリノサブユニットのモルホリン環窒素を隣接するモルホリノサブユニットの4'環外炭素に接合するホスホリアミデートまたはホスホロジアミデートヌクレオシド間連結を含む。各モルホリノサブユニットは、塩基特異的水素結合によって、オリゴマー中の塩基に結合するのに有効なプリンまたはピリミジン核酸塩基を含む。

40

#### 【0131】

モルホリノをベースとするオリゴマー（アンチセンスオリゴマーを含めた）は、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれている、米国特許第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；同第5,506,337号ならびに係属中の米国特許出願第12/271,036号；同第12/271,040号；ならびにPCT特許出願公開第WO/2009/064471号および同第WO/2012/043730号ならびにSummer tonら、1997

50

年、Antisense and Nucleic Acid Drug Development、7巻、187～195頁において詳述されている。

【0132】

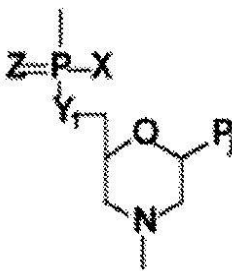
オリゴマー構造内で、リン酸基は一般に、オリゴマーの「ヌクレオシド間連結」を形成すると言及される。RNAおよびDNAの天然に存在するヌクレオシド間連結は、3'から5'のホスホジエステル連結である。「ホスホリアミデート」基は、3個の付着した酸素原子および1個の付着した窒素原子を有するリンを含み、一方、「ホスホロジアミデート」基は、2個の付着した酸素原子および2個の付着した窒素原子を有するリンを含む。本明細書に記載されているモルホリノをベースとするオリゴマーの非荷電またはカチオン性のヌクレオシド間連結において、1個の窒素は必ず連結鎖に対してペンダントである。ホスホロジアミデート連結における第2の窒素は典型的には、モルホリン環構造における環窒素である。

10

【0133】

特定の実施形態では、モルホリノサブユニットは、構造：

【化8】



20

によるリン含有サブユニット間連結によって接合しており、式中、 $Y_1$  = 酸素(O)または硫黄、窒素、または炭素であり、 $Z$  = 酸素または硫黄、好ましくは、酸素であり、 $P_j$ は、塩基特異的水素結合によって、ポリヌクレオチド中の塩基に結合するのに有効であるプリンまたはピリミジン塩基対合部分であり、 $X$ は、 $-NRR'$ であり、式中、 $R$ および $R'$ は、同じまたは異なり、かつHまたはアルキルのいずれかである。特定の実施形態では、 $X$ は、 $-NRR'$ であり、式中、 $R$ および $R'$ は、同じまたは異なり、かつHまたはメチルのいずれかである。

30

【0134】

また含まれるのは、図1A～1Eにおける式のヌクレオチドの配列を含むアンチセンスオリゴマーである。図1Aにおいて、 $B$ は、塩基特異的水素結合によって、ポリヌクレオチドにおける塩基に結合するのに有効であるプリンまたはピリミジン塩基対合部分である。 $Y_1$ または $Y_2$ は、酸素、硫黄、窒素、または炭素、好ましくは、酸素であり得る。リンからペンダントである $X$ 部分は、フッ素、アルキルもしくは置換アルキル、アルコキシもしくは置換アルコキシ、チオアルコキシもしくは置換チオアルコキシ、または環状構造、例えば、モルホリンもしくはピペリジンを含めた、非置換、一置換、もしくは二置換窒素であり得る。アルキル、アルコキシおよびチオアルコキシは、1～6個の炭素原子を含む。 $Z$ 部分は、硫黄または酸素であってよく、好ましくは、酸素である。

40

【0135】

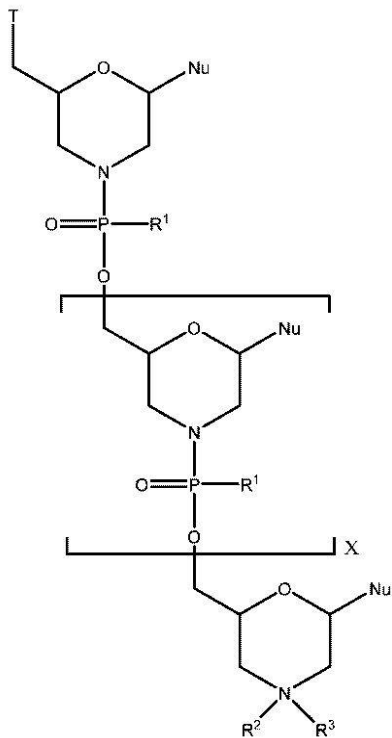
したがって、本開示の様々な実施形態は、モルホリノサブユニット、および1つのサブユニットのモルホリノ窒素を隣接するサブユニットの5'環外炭素に接合するリン含有サブユニット間連結から構成され、かつ(a)約10～40個のヌクレオチド塩基、ならびに(b)生化学的経路および/もしくは細胞プロセスに関連するタンパク質、または本明細書に記載されている抗生物質耐性に関連するタンパク質をコードする細菌mRNA標的配列と特異的にハイブリダイズするのに十分な長さおよび相補性の標的化配列を有する、実質的に非荷電のアンチセンスモルホリノオリゴマーを含む。一部の場合、オリゴマーは細胞透過性ペプチド(CPP)にコンジュゲートしている。

【0136】

50

様々な態様では、本開示のアンチセンスオリゴマーは、式 (I) :

【化 9】



10

20

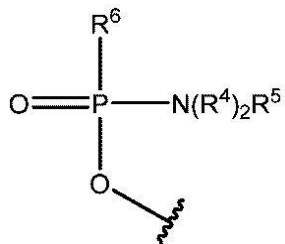
の化合物または薬学的に許容されるその塩を含み、

式中、各 Nu は、一緒になって標的化配列を形成する核酸塩基であり、

X は、9 ~ 38 の整数であり、

T は、OH および式 :

【化 10】

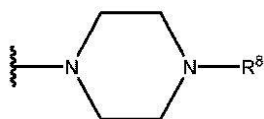


30

の部分から選択され、

式中、各 R<sup>4</sup> は、独立して C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキルであり、R<sup>5</sup> は、電子対および H から選択され、R<sup>6</sup> は、OH、-N(R<sup>7</sup>)CH<sub>2</sub>C(O)NH<sub>2</sub>、および式 :

【化 11】



40

の部分から選択され、

式中、

R<sup>7</sup> は、H および C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキルから選択され、

R<sup>8</sup> は、G、-C(O)-R<sup>9</sup>OH、アシル、トリチルおよび 4 - メトキシトリチルから選択され、

R<sup>9</sup> は式 -(O-アルキル)<sub>y</sub> - のものであり、式中、y は、3 ~ 10 の整数であり、y 個のアルキル基のそれぞれは、C<sub>2</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキルから独立して選択され、

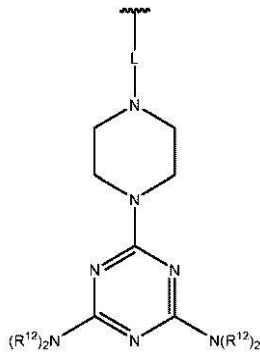
R<sup>1</sup> の各実例は、-N(R<sup>10</sup>)<sub>2</sub>R<sup>11</sup> であり、式中、各 R<sup>10</sup> は、独立して C<sub>1</sub>

50

～C<sub>6</sub>アルキルであり、R<sup>1 1</sup>は、電子対およびHから選択され、

R<sup>2</sup>は、H、G、アシル、トリチル、4-メトキシトリチル、ベンゾイル、ステアロイルおよび式：

【化12】



10

の部分から選択され、

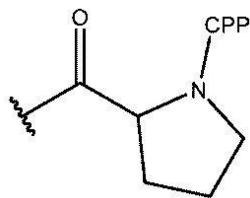
式中、Lは、-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>C(O)-および-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C(O)-から選択され、各R<sup>1 2</sup>は、式-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OC(O)N(R<sup>1 4</sup>)<sub>2</sub>のものであり、各R<sup>1 4</sup>は、式-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub>のものであり、

R<sup>3</sup>は、電子対、HおよびC<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキルから選択され、

20

Gは、細胞透過性ペプチド(「CPP」)、ならびに-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>NH-CPP、-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH-CPP、-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>NH-CPP、および-C(O)CH<sub>2</sub>NH-CPPから選択されるリンカー部分であるか、またはGは、式：

【化13】



30

のものであり、式中、CPPは、CPPのカルボキシ末端でアミド結合によってリンカー部分に付着しており、ただし、Gの1つのみの実例が存在し、

標的化配列が、生化学的経路および/または細胞プロセスに関連するタンパク質をコードする細菌mRNA標的配列と特異的にハイブリダイズする。

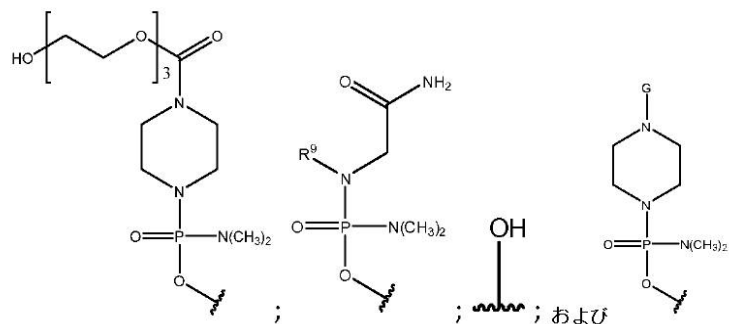
【0137】

一部の実施形態では、Xは9～18である。ある特定の実施形態では、Xは、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30である。

ある特定の実施形態では、Tは、

40

## 【化 1 4】



10

から選択される。

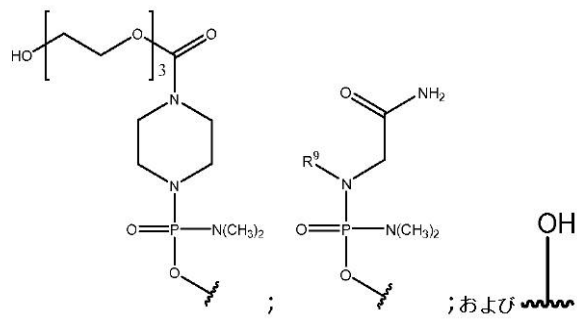
## 【 0 1 3 8】

一部の実施形態では、 $R^2$  は、H、G、アシル、トリチル、4 - メトキシトリチル、ベンゾイルおよびステアロイルから選択される。

## 【 0 1 3 9】

様々な実施形態では、T は、

## 【化 1 5】



20

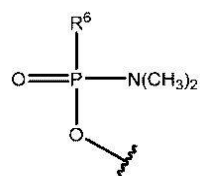
から選択され、 $R^2$  は G である。

## 【 0 1 4 0】

一部の実施形態では、T は、式：

30

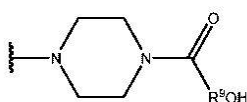
## 【化 1 6】



のものであり、

$R^6$  は、式：

## 【化 1 7】



40

のものであり、

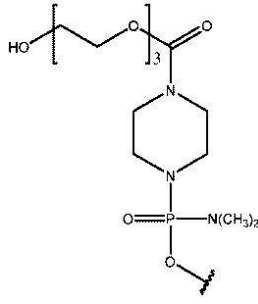
$R^2$  は G である。

## 【 0 1 4 1】

ある特定の実施形態では、T は、式：



## 【化 18】



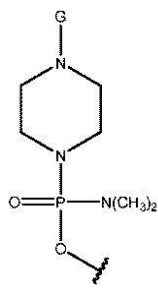
のものであり、  
 $R^2$  は G である。

10

## 【0142】

ある特定の実施形態では、T は、式：

## 【化 19】



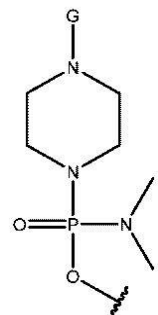
のものである。

20

## 【0143】

一部の実施形態では、 $R^2$  は G であるか、または T は、式：

## 【化 20】



のものである。

30

## 【0144】

一部の実施形態では、 $R^2$  は、H、アシル、トリチル、4 - メトキシトリチル、ベンゾイルおよびステアロイルから選択される。

## 【0145】

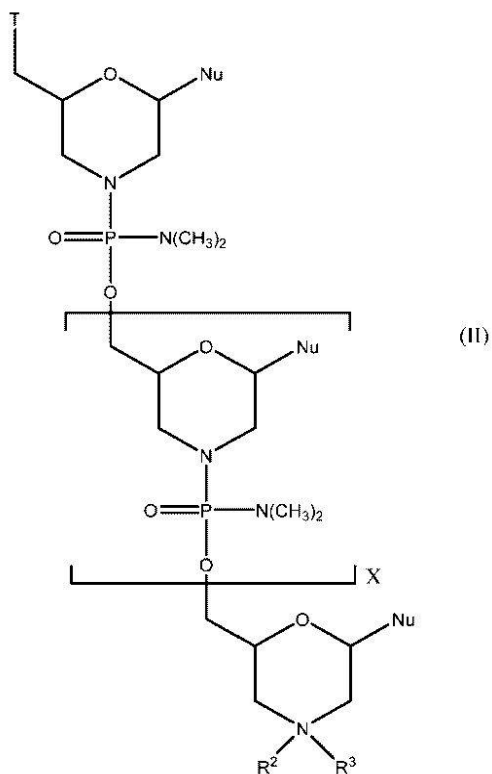
40

様々な実施形態では、 $R^2$  は、H または G から選択され、 $R^3$  は、電子対または H から選択される。特定の実施形態では、 $R^2$  は G である。一部の実施形態では、 $R^2$  は H またはアシルである。一部の実施形態では、各  $R^1$  は、 $-N(CH_3)_2$  である。一部の実施形態では、 $R^1$  の少なくとも 1 つの実例は、 $-N(CH_3)_2$  である。ある特定の実施形態では、 $R^1$  の各実例は、 $-N(CH_3)_2$  である。

## 【0146】

本開示の様々な実施形態では、本開示のアンチセンスオリゴマーは、式 (II)：

## 【化 2 1】



10

20

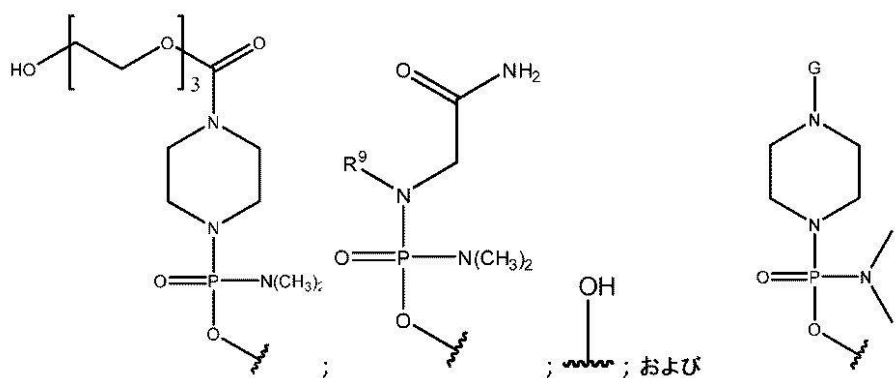
の化合物または薬学的に許容されるその塩を含み、

式中、各 Nu は、一緒になって標的化配列を形成する核酸塩基であり、

X は 9 ~ 28 の整数であり、

T は、

## 【化 2 2】



30

から選択され、

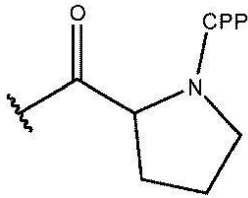
R<sup>2</sup> は、H、G、アシル、トリチル、4 - メトキシトリチル、ベンゾイルおよびステア  
ロイルから選択され、

40

R<sup>3</sup> は、電子対、HおよびC<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキルから選択され、

G は、細胞透過性ペプチド (「CPP」)、ならびに - C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>NH - C  
PP、- C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH - CPP、- C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHC(O)(C  
H<sub>2</sub>)<sub>5</sub>NH - CPPおよび - C(O)CH<sub>2</sub>NH - CPP から選択されるリンカー部分  
であるか、または G は、式：

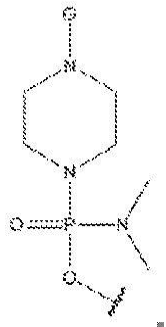
## 【化 2 3】



のものであり、式中、CPPは、CPPのカルボキシ末端でアミド結合によってリンカー部分に付着しており、ただし、Gの1つのみの実例が存在する。一部の実施形態では、Tは上で定義されているTEGであり、R<sup>2</sup>はGであり、R<sup>3</sup>は電子対またはHである。ある特定の実施形態では、R<sup>2</sup>はH、アシル、トリチル、4-メトキシトリチル、ベンゾイルおよびステアロイルから選択され、Tは、式：

10

## 【化 2 4】



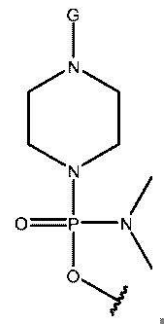
20

のものである。

## 【0 1 4 7】

一部の実施形態では、R<sup>2</sup>はGであるか、またはTは、式：

## 【化 2 5】



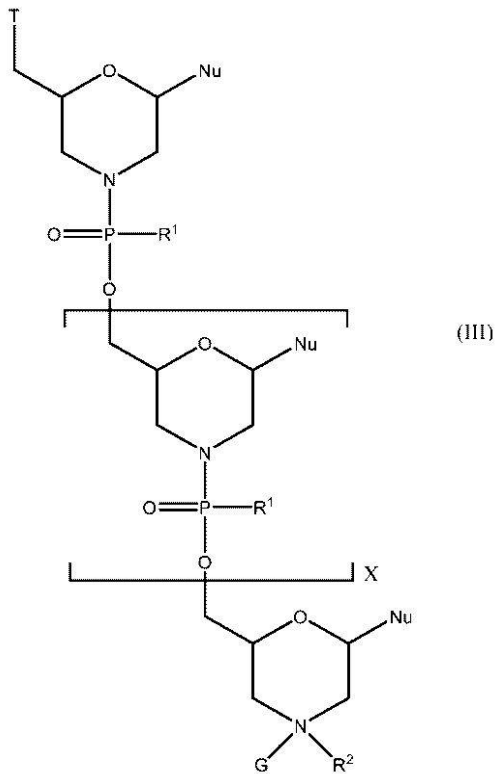
30

のものである。

## 【0 1 4 8】

様々な態様では、本開示のアンチセンスオリゴマーは、式 ( I I I )：

## 【化 2 6】



10

20

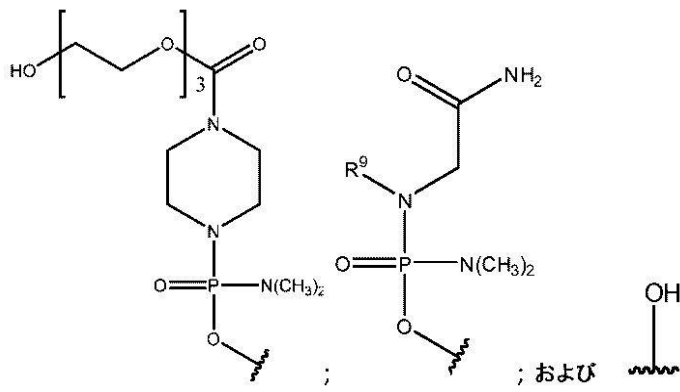
の化合物または薬学的に許容されるその塩を含み、

式中、各 Nu は、一緒になって標的化配列を形成する核酸塩基であり、

X は 9 ~ 28 の整数であり、

T は、

## 【化 2 7】



30

から選択され、

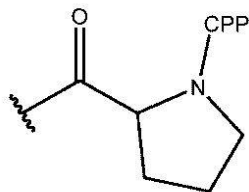
R<sup>1</sup> の各実例は、-N(R<sup>10</sup>)<sub>2</sub>R<sup>11</sup>であり、式中、各 R<sup>10</sup> は、独立して C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキルであり、R<sup>11</sup> は、電子対および H から選択され、

R<sup>2</sup> は、電子対、H および C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキルから選択され、

G は、細胞透過性ペプチド (「CPP」)、ならびに -C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>NH-CPP、-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH-CPP、-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>NH-CPP および -C(O)CH<sub>2</sub>NH-CPP から選択されるリンカー部分であるか、または G は、式：

40

## 【化 28】



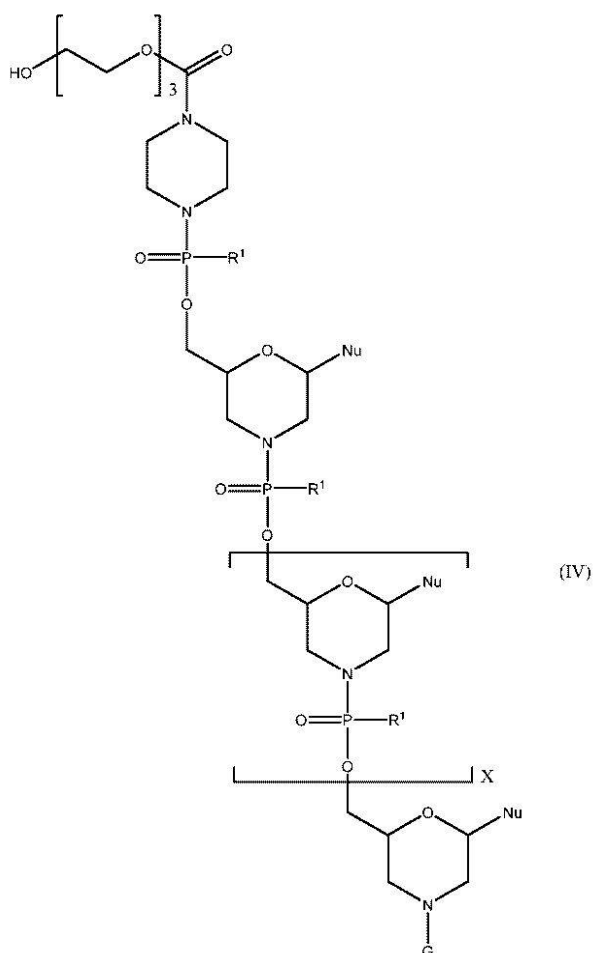
のものであり、式中、CPPは、CPPのカルボキシ末端においてアミド結合によってリンカー部分に付着している。一部の実施形態では、 $R^1$ の少なくとも1つの実例は、 $-N(CH_3)_2$ である。ある特定の実施形態では、 $R^1$ の各実例は、 $-N(CH_3)_2$ である。

10

## 【0149】

様々な態様では、本開示のアンチセンスオリゴマーは、式(IV)：

## 【化 29】



20

30

の化合物または薬学的に許容されるその塩を含み、

40

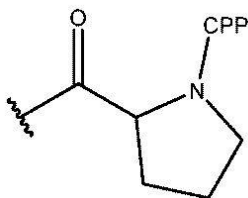
式中、Xは9～28の整数であり、

各Nuは、一緒になって標的化配列を形成する核酸塩基であり、

$R^1$ の各実例は、 $-N(R^{10})_2R^{11}$ であり、式中、各 $R^{10}$ は、独立して $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、 $R^{11}$ は、電子対およびHから選択され、

Gは、細胞透過性ペプチド(「CPP」)、ならびに $-C(O)(CH_2)_5NH-CPP$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NH-CPP$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NH-CPP$ および $-C(O)CH_2NH-CPP$ から選択されるリンカー部分であるか、またはGは、式：

## 【化 3 0】



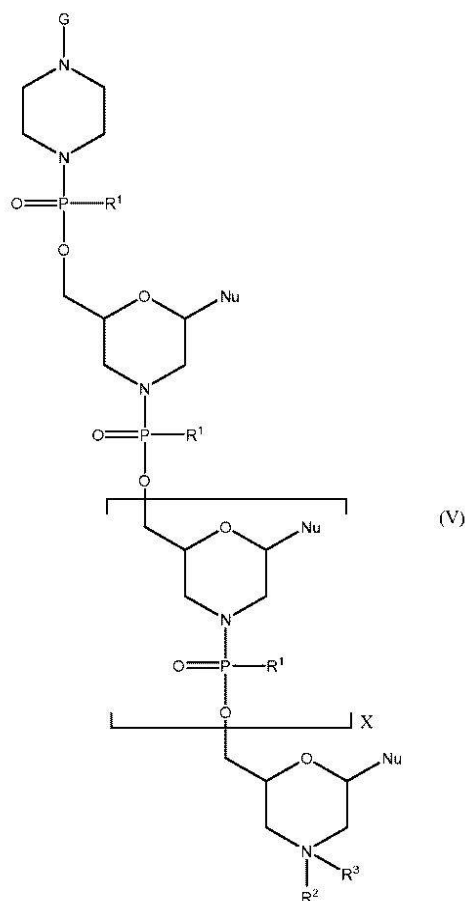
のものであり、式中、CPPは、CPPのカルボキシ末端においてアミド結合によってリンカー部分に付着している。一部の実施形態では、 $R^1$ の少なくとも1つの実例は、 $-N(CH_3)_2$ である。ある特定の実施形態では、 $R^1$ の各実例は、 $-N(CH_3)_2$ である。

10

## 【0150】

様々な態様では、本開示のアンチセンスオリゴマーは、式(V)：

## 【化 3 1】



20

30

の化合物であり得、

式中、

40

Xは9～18の整数であり、

各Nuは、一緒になって標的化配列を形成する核酸塩基であり、

$R^1$ の各実例は、 $-N(R^{10})_2R^{11}$ であり、式中、各 $R^{10}$ は、独立して $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、 $R^{11}$ は、電子対およびHから選択され、

$R^2$ は、H、トリチル、4-メトキシトリチル、アシル、ベンゾイルおよびステアロイルから選択され、

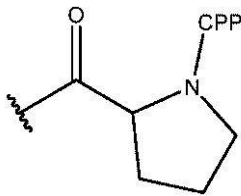
$R^3$ は、電子対、Hおよび $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、

Gは、細胞透過性ペプチド(「CPP」)、ならびに $-C(O)(CH_2)_5NH-CPP$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NH-CPP$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NH-CPP$ および $-C(O)CH_2NH-CPP$ から選択されるリンカー部分

50

であるか、または G は、式：

【化 3 2】



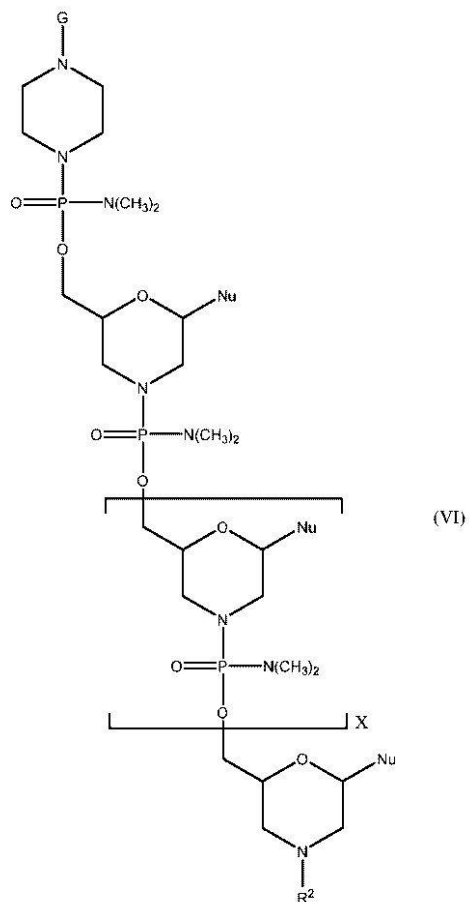
のものであり、式中、CPPは、CPPのカルボキシ末端においてアミド結合によってリンカー部分に付着している。一部の実施形態では、 $R^1$ の少なくとも1つの实例は、 $-N(CH_3)_2$ である。ある特定の实施形態では、 $R^1$ の各实例は、 $-N(CH_3)_2$ である。

10

【0151】

様々な態様では、本開示のアンチセンスオリゴマーは、式(VI)：

【化 3 3】



20

30

の化合物または薬学的に許容されるその塩を含み、

40

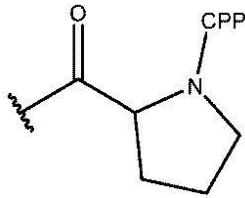
式中、Xは9～28の整数であり、

各Nuは、一緒になって標的化配列を形成する核酸塩基であり、

$R^2$ はHまたはアシルから選択され、

Gは、細胞透過性ペプチド(「CPP」)、ならびに $-C(O)(CH_2)_5NH-CPP$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NH-CPP$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NH-CPP$ および $-C(O)CH_2NH-CPP$ から選択されるリンカー部分であるか、またはGは、式：

## 【化 3 4】



のものであり、式中、CPPは、CPPのカルボキシ末端においてアミド結合によってリンカー部分に付着している。

## 【0152】

10

アンチセンスオリゴマーは、当技術分野において公知であり、本明細書において引用した参照文献において記載されている方法を用いて、段階的固相合成によって調製することができる。

## 【0153】

## B. 細胞透過性ペプチド

ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、細胞透過性ペプチド(CPP)にコンジュゲートしている。一部の実施形態では、CPPは、アルギニンに富んだペプチドである。「アルギニンに富んだ担体ペプチド」は、CPPが少なくとも2個、好ましくは、2、3、4、5、6、7、または8個のアルギニン残基を有し、それぞれは1個または複数の非荷電の疎水性残基によって任意選択で分離しており、約6～14個のアミノ酸残基を任意選択で含有することを意味する。図1F～1Hは、5'および3'PMOコンジュゲートを含めた実施例において使用されるCPP-PMOコンジュゲートの例示的な化学構造を示す。

20

## 【0154】

例示的なCPPを、表C1(配列番号57～68)において提供する。

## 【表2-3】

表 C1: 例示的な細胞透過性ペプチド		
名称	配列	配列番号
(RXR) <sub>4</sub>	RXRRXRXRXR	57
(RFF) <sub>3</sub> R	RFFRFFRFFR	58
(RXR) <sub>4</sub> XB	RXRRXRXRXRXB	59
(RFF) <sub>3</sub> RXB	RFFRFFRFFRXB	60
(RFR) <sub>4</sub>	RFRFRFRFRFR	61
(RYR) <sub>4</sub>	RYRRYRRYRRYR	62
(RGR) <sub>4</sub>	RGRGRGRGRGR	63
(RFR) <sub>4</sub> XB	RFRFRFRFRFRXB	64
(RYR) <sub>4</sub> XB	RYRRYRRYRRYXB	65
(RGR) <sub>4</sub> XB	RGRGRGRGRGRXB	66
(RFF) <sub>3</sub> RXB	RFFRFFRFFRXB	67
(RFF) <sub>3</sub> RG	RFFRFFRFFRG	68
Xは、6-アミノヘキサン酸である;Bはβ-アラニンである;Fはフェニルアラニンである;Yはチロシンである;Gはグリシンである;Rはアルギニンである。		

30

40

## 【0155】

一部の実施形態では、CPPは、そのC末端において、1アミノ酸リンカー、2アミノ酸リンカー、3アミノ酸リンカー、4アミノ酸リンカー、または5アミノ酸リンカーを介して、オリゴマーの3'末端または5'末端に連結している。

## 【0156】

CPP、これらの合成、およびCPPをオリゴマーにコンジュゲートする方法は、例えば、すべてが参照によりその全体が組み込まれている国際特許出願公開第WO2004/097017号、同第WO2009/005793号、および同第WO2012/150960号において詳述されている。

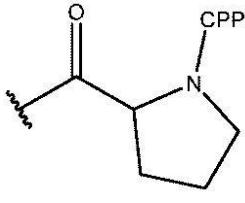
50



## 【0157】

一部の実施形態では、CPPは、そのC末端において、1アミノ酸リンカー、2アミノ酸リンカー、3アミノ酸リンカー、4アミノ酸リンカー、または5アミノ酸リンカーを介して、オリゴマーの3'末端または5'末端に連結している。式(I)~(VI)のアンチセンスオリゴマー化合物を含めた特定の実施形態では、リンカーは、 $-C(O)(CH_2)_5NH-CPP$  (Xリンカー)、 $-C(O)(CH_2)_2NH-CPP$  (Bリンカー)、 $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NH-CPP$  (XBペプチドリンカー)、および $-C(O)CH_2NH-CPP$  (Gリンカー)、または式：

## 【化35】



10

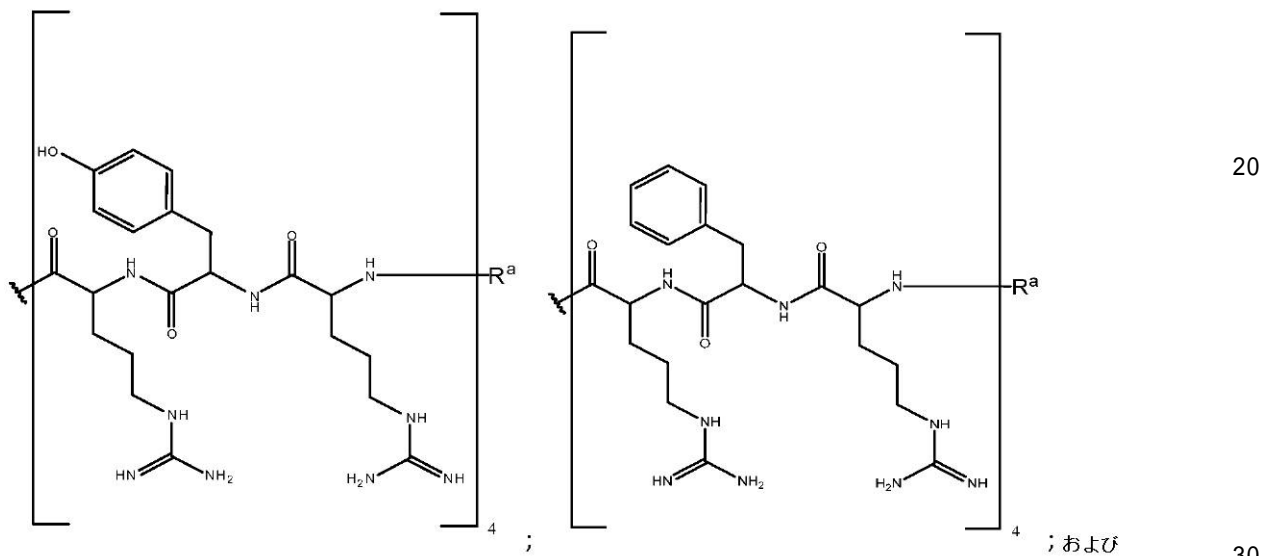
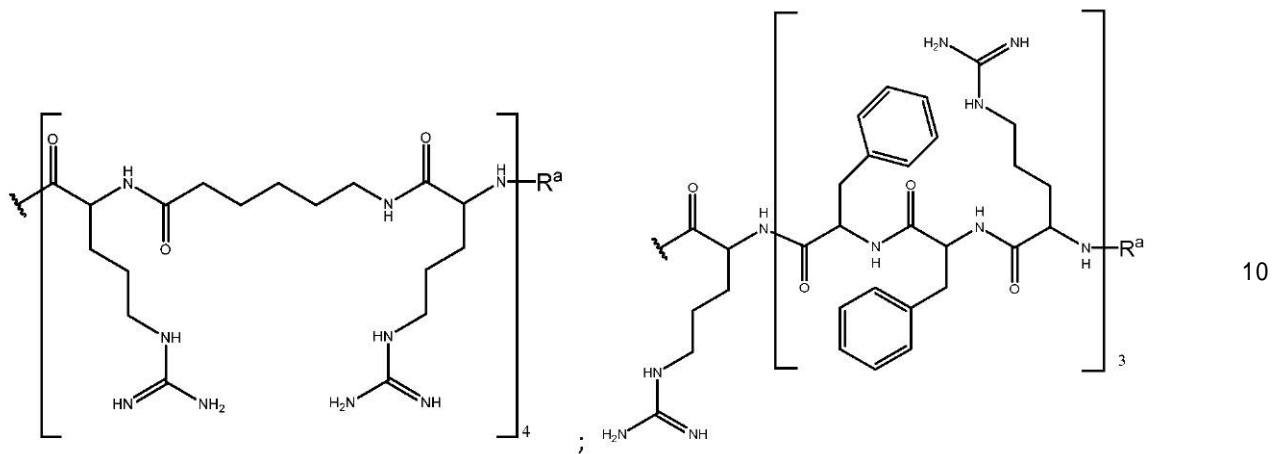
を含むことができ、式中、CPPは、CPPのカルボキシ末端においてアミド結合によってリンカー部分に付着している。式(I)~(VI)のアンチセンスオリゴマー化合物を含めた本開示の一部の実施形態において、Gは、配列番号59、60および64~68から選択される。式(I)~(VI)のアンチセンスオリゴマー化合物を含めた様々な実施形態では、CPPは、配列番号57および61~63から選択される。

20

## 【0158】

一部の実施形態では、式(I)~(VI)のアンチセンスオリゴマー化合物を含め、CPPは、

## 【化 3 6】

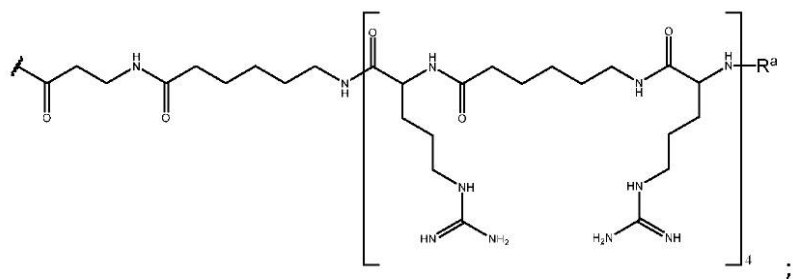


(式中、 $R^a$  は、H、アセチル、ベンゾイルおよびステアロイルから選択される) から選択される。

## 【0159】

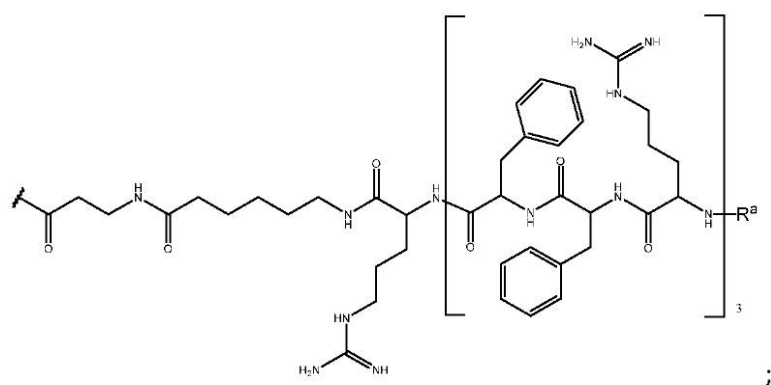
一部の実施形態では、式(I)～(VI)のアンチセンスオリゴマー化合物を含め、Gは、

【化 3 7】

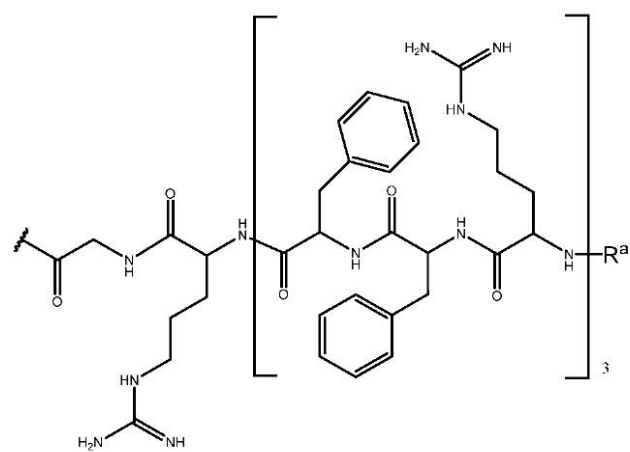


10

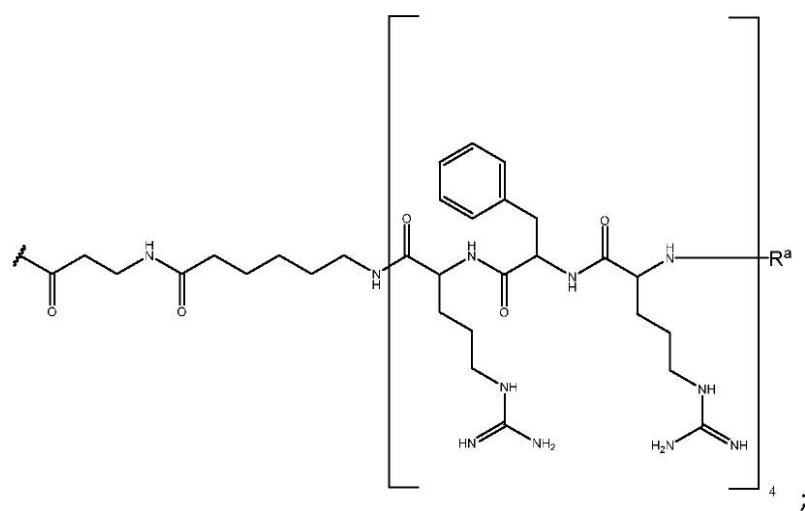
【化 3 8】



20

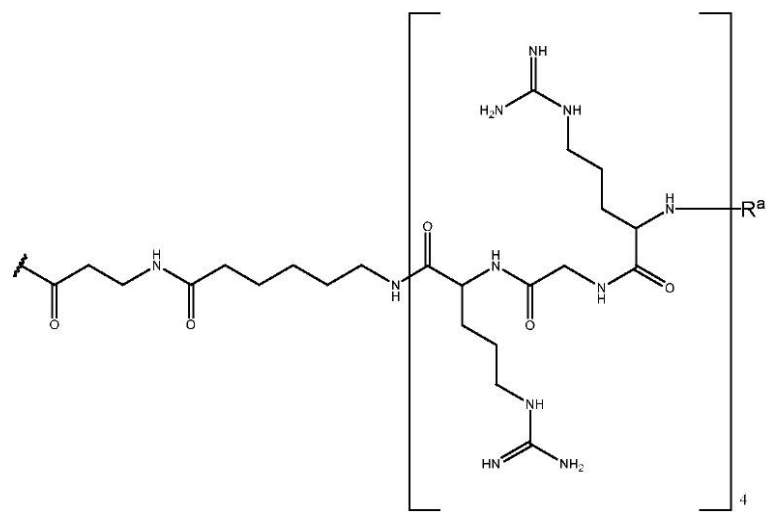
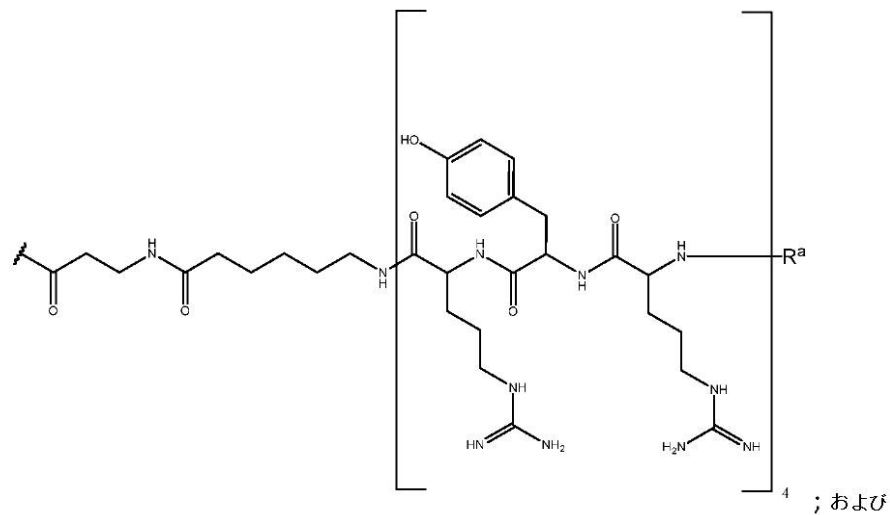


30



40

## 【化 3 9】



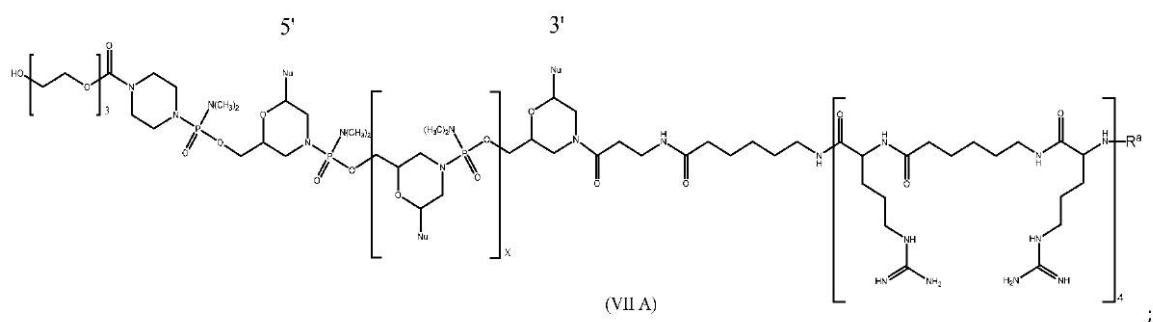
30

(式中、 $R^a$  は、H、アセチル、ベンゾイルおよびステアロイルから選択される) から選択される。

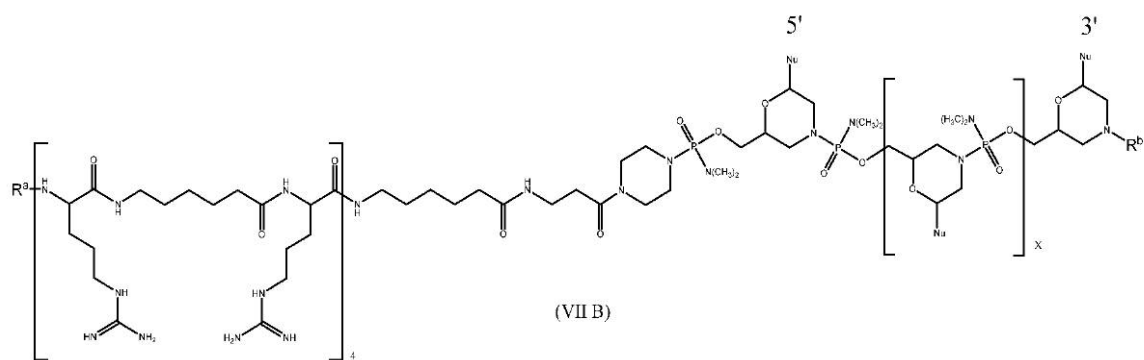
## 【0160】

様々な態様では、本開示のアンチセンスオリゴマー、または薬学的に許容されるその塩は、

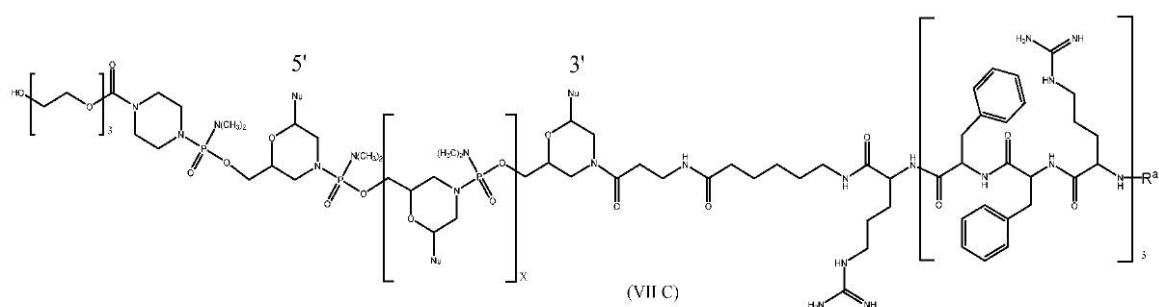
## 【化 4 0】



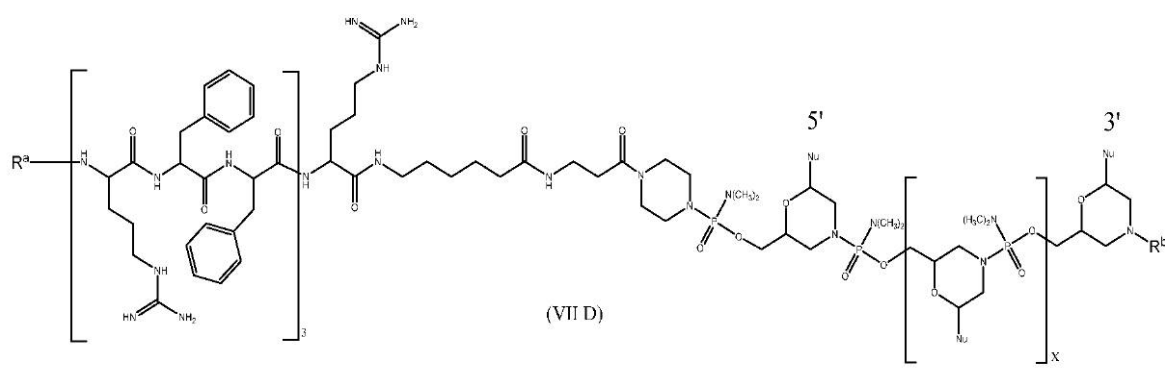
## 【化 4 1】



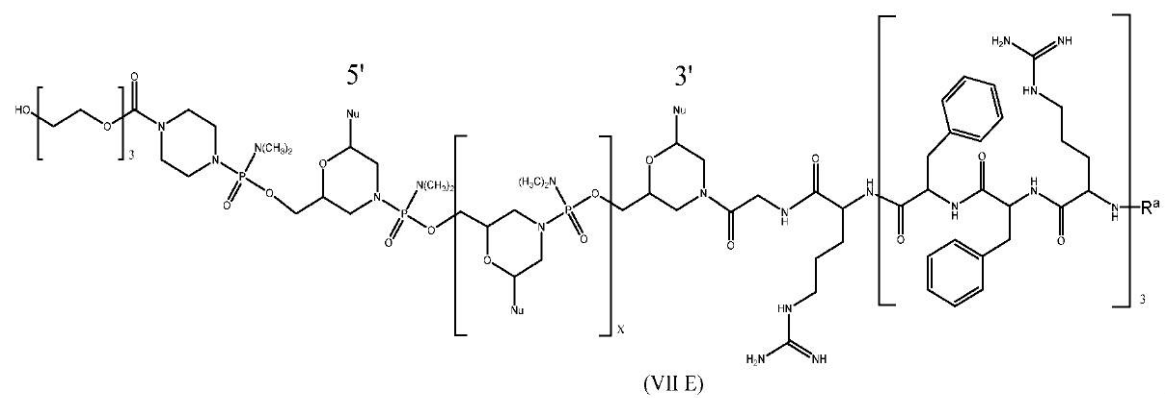
10



20

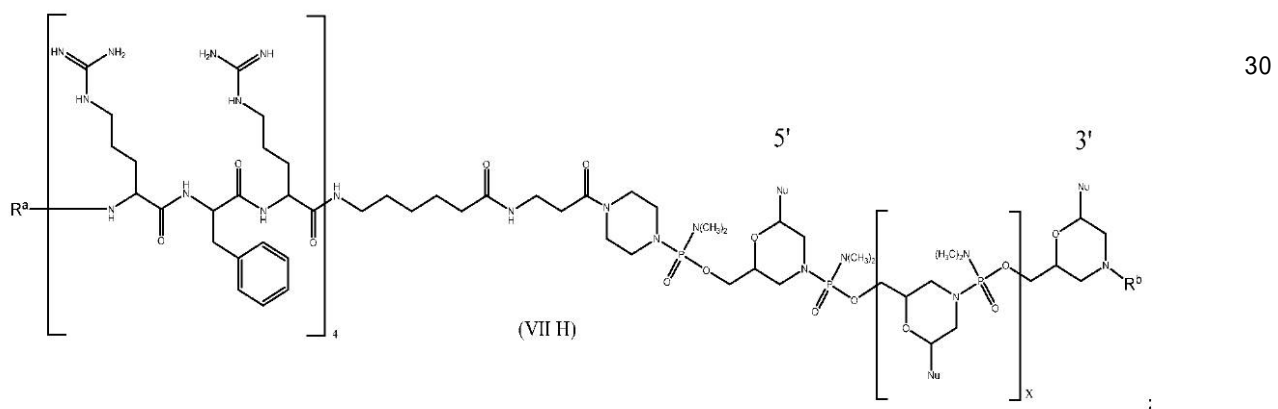
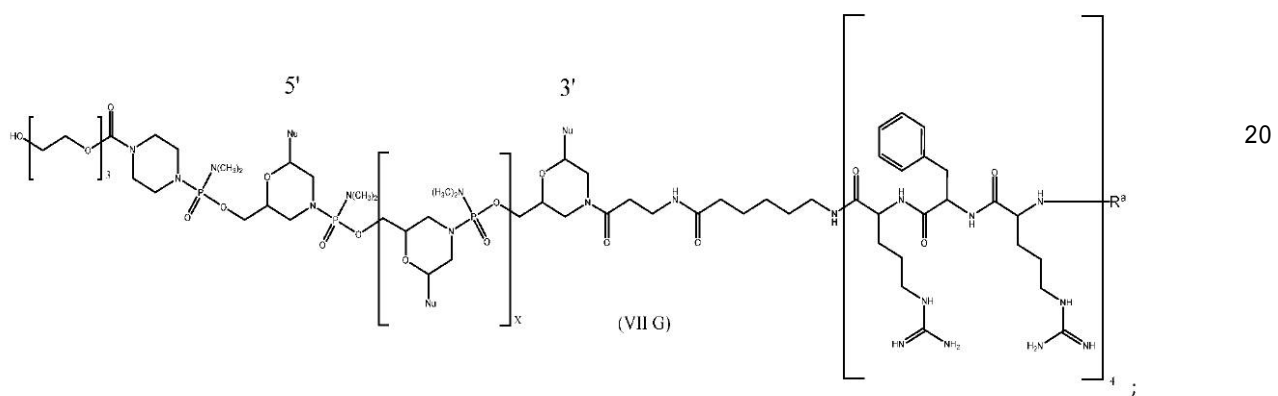
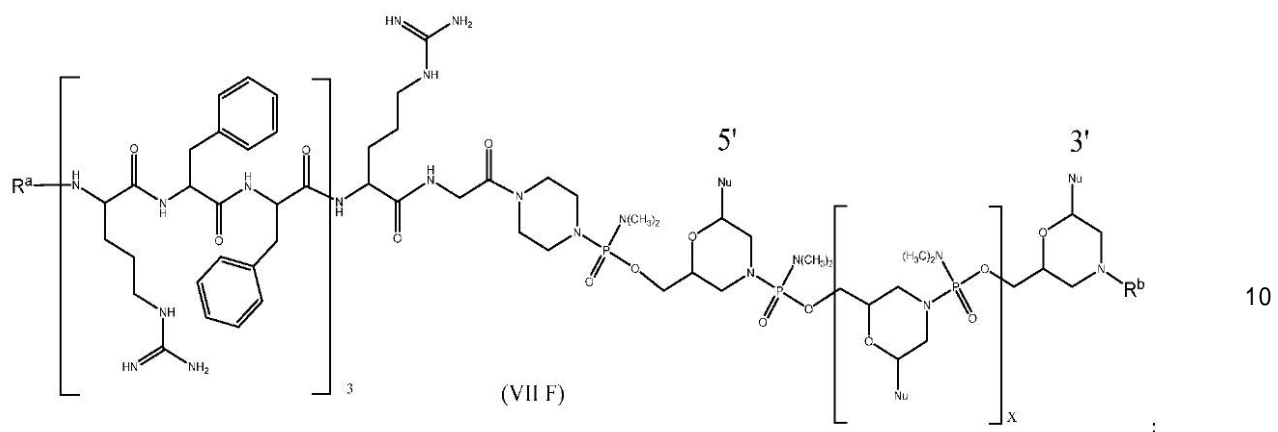


30

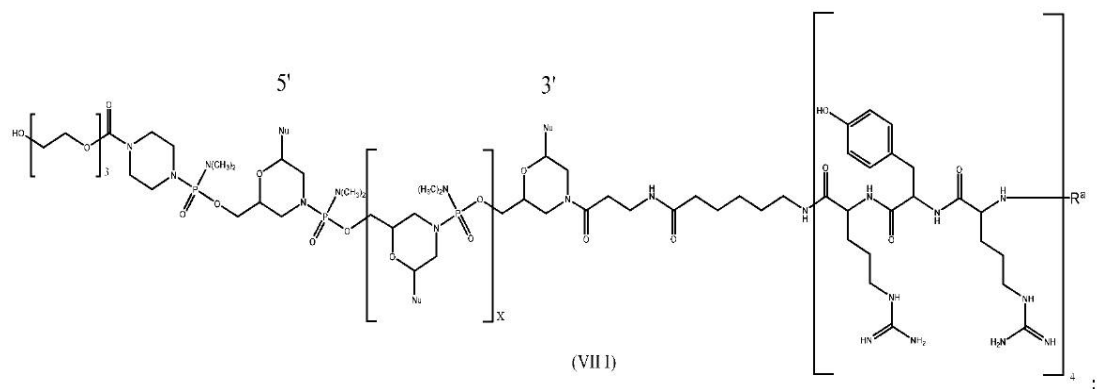


40

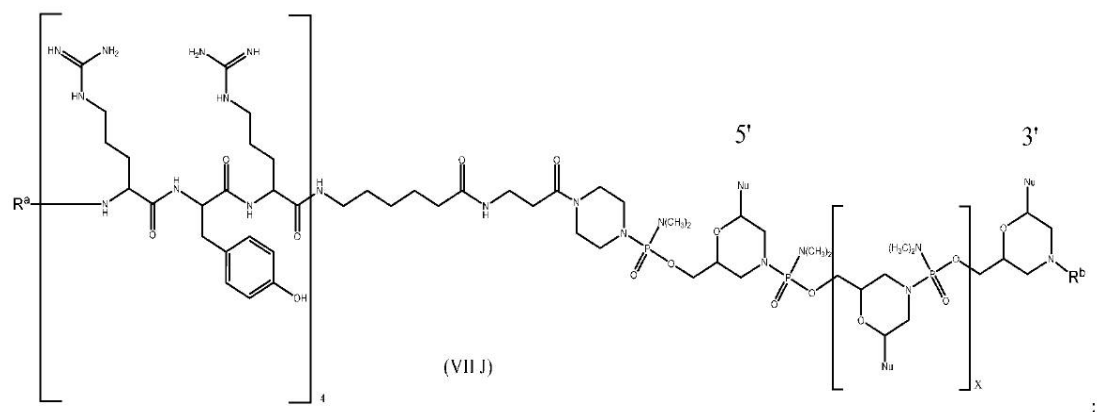
## 【化 4 2】



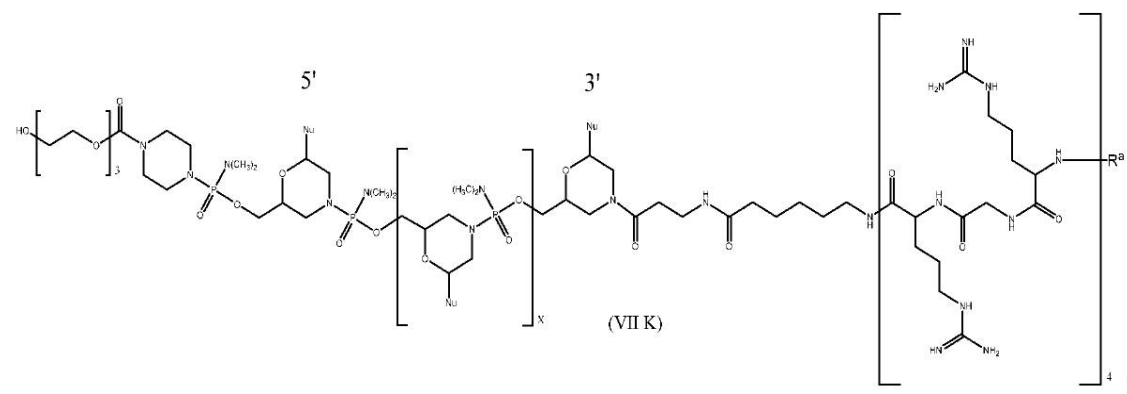
## 【化 4 3】



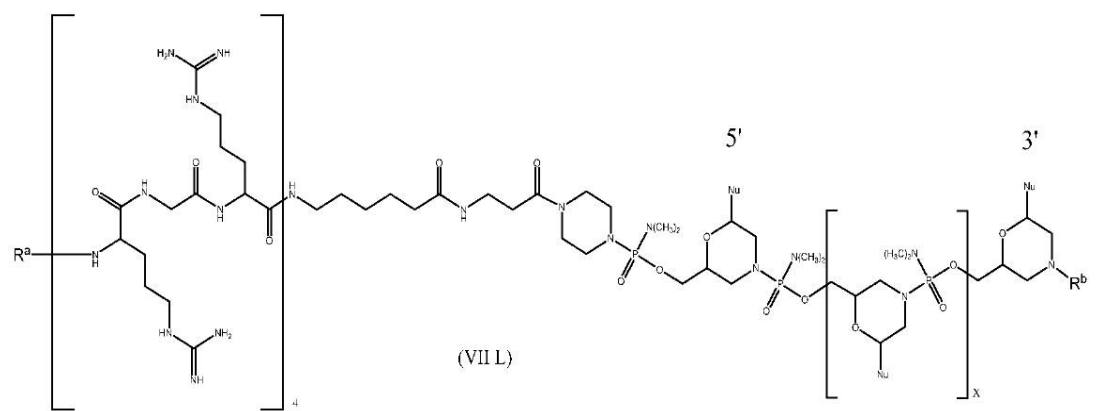
10



20



30



40

(式中、Xは、9～38の整数であり、R<sup>a</sup>は、H、アセチル、ベンゾイルおよびステア

50

ロイルから選択され、 $R^b$ は、H、アセチル、ベンゾイル、ステアロイル、トリチルおよび4-メトキシトリチルから選択され、各Nuは、プリンまたはピリミジン塩基対合部分であり、これらの部分は一緒になって、上記の標的化配列を形成する)から選択される、式(VII)のアンチセンスオリゴマーを含む。

#### 【0161】

##### C. アンチセンスオリゴマー標的化配列

式(I)~(VII)のアンチセンスオリゴマー化合物を含めた本開示のアンチセンスオリゴマーの様々な実施形態では、標的化配列は、生化学的経路および/または細胞プロセスに関連するタンパク質、あるいは抗生物質耐性に関連するタンパク質をコードする細菌mRNA標的配列と特異的にハイブリダイズすることができる。一部の実施形態では、標的配列は、細菌mRNAの翻訳開始コドンおよび/または細菌mRNAの翻訳開始コドンの上流もしくは下流の約30塩基内の配列を含む。

#### 【0162】

様々な実施形態では、生化学的経路および/または細胞プロセスに関連するタンパク質は、脂肪酸生合成タンパク質であり得る。一部の実施形態では、脂肪酸生合成タンパク質は、アシルキャリアータンパク質であることができる。ある特定の実施形態では、アシルキャリアータンパク質はAcPであり得る。一部の実施形態では、脂肪酸生合成タンパク質は、アセチル補酵素Aカルボキシラーゼのカルボキシルトランスフェラーゼアルファサブユニットであり得る。ある特定の実施形態では、アセチル補酵素AカルボキシラーゼのカルボキシルトランスフェラーゼアルファサブユニットはAccAであり得る。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号1~11であり得、この場合、チミン塩基(T)は、任意選択でウラシル塩基(U)である。ある特定の実施形態では、標的化配列は、表2A中の標的化配列(例えば、配列番号1~11)の少なくとも1つを含むかもしくはそれからなる、表2A中の標的化配列(例えば、配列番号1~11)の少なくとも10の連続するヌクレオチドのフラグメントを含むかもしくはそれらからなる、または表2A中の標的化配列(例えば、配列番号1~11)に少なくとも80%の配列同一性を有する変異体を含むかもしくはそれからなり、この場合、チミン塩基(T)は、任意選択でウラシル塩基(U)である。

#### 【0163】

一部の実施形態では、生化学的経路および/または細胞プロセスに関連するタンパク質は、ペプチドグリカン生合成タンパク質であり得る。ある特定の実施形態では、ペプチドグリカン生合成タンパク質は、UDP-N-アセチルグルコサミン1-カルボキシビニルトランスフェラーゼであることができる。一部の実施形態では、UDP-N-アセチルグルコサミン1-カルボキシビニルトランスフェラーゼは、MurAであり得る。

#### 【0164】

一部の実施形態では、生化学的経路および/または細胞プロセスに関連するタンパク質は、リボソームタンパク質である。ある特定の実施形態では、リボソームタンパク質は、50Sリボソームタンパク質L28である。一部の実施形態では、50Sリボソームタンパク質L28はRpmBである。

#### 【0165】

様々な実施形態では、生化学的経路および/または細胞プロセスに関連するタンパク質は、細胞エネルギーホメオスタシスタンパク質である。一部の実施形態では、この細胞エネルギーホメオスタシスタンパク質は、アデニル酸キナーゼである。ある特定の実施形態では、アデニル酸キナーゼはAdkである。

#### 【0166】

一部の実施形態では、生化学的経路および/または細胞プロセスに関連するタンパク質は、タンパク質生合成タンパク質である。ある特定の実施形態では、タンパク質生合成タンパク質は、翻訳開始因子である。様々な実施形態では、翻訳開始因子はInfAである。

#### 【0167】



一部の実施形態では、生化学的経路および／または細胞プロセスに関連するタンパク質は、細胞分裂タンパク質である。ある特定の実施形態では、細胞分裂タンパク質は、細菌の細胞分裂の隔壁の見込み部位において環に集合するタンパク質である。例えば、一部の実施形態では、細菌の細胞分裂の隔壁の見込み部位において環に集合するタンパク質は、FtsZである。

#### 【0168】

ある特定の実施形態では、生化学的経路および／または細胞プロセスに関連するタンパク質は、RNA合成タンパク質である。一部の実施形態では、RNA合成タンパク質はRNAポリメラーゼのシグマD因子である。例えば、ある特定の実施形態では、RNAポリメラーゼのシグマD因子はRpoDである。

10

#### 【0169】

一部の実施形態では、生化学的経路および／または細胞プロセスに関連するタンパク質は、芳香族化合物の生合成タンパク質である。ある特定の実施形態では、芳香族化合物の生合成タンパク質は、コリスミ酸シンターゼ（5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸ホスホリアーゼ）である。例えば、一部の実施形態では、コリスミ酸シンターゼ（5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸ホスホリアーゼ）は、AroCである。

#### 【0170】

一部の実施形態では、抗生物質耐性に関連するタンパク質は、BlaT、CmlおよびAdeAの1つまたは複数から選択される。

#### 【0171】

20

生化学的経路および／または細胞プロセスに関連するタンパク質がペプチドグリカン生合成タンパク質、リボソームタンパク質、細胞エネルギーホメオスタシスタンパク質、タンパク質生合成タンパク質、細胞分裂タンパク質、RNA合成タンパク質、芳香族化合物の生合成タンパク質または抗生物質耐性であり得る、一部の実施形態では、標的化配列は、表2B中に示されている標的化配列（例えば、配列番号12～56）のうちの少なくとも1つを含むかもしくはそれからなる、表2B中の標的化配列（例えば、配列番号12～56）の少なくとも10の連続するヌクレオチドのフラグメントを含むかもしくはそれらからなる、または表2B中の標的化配列（例えば、配列番号12～56）に少なくとも80%の配列同一性を有する変異体を含むかもしくはそれからなり、この場合、チミン塩基（T）は、任意選択でウラシル塩基（U）である。

30

#### 【0172】

ある特定の実施形態では、式（I）～（VII）のアンチセンスオリゴマー化合物を含め、標的化配列は、

- a) 配列番号1 (CTTCGATAGTG) (Xは9である) ;
  - b) 配列番号2 (ATATCGCTCAC) (Xは9である) ;
  - c) 配列番号3 (ATTCTCCTCAT) (Xは9である) ;
  - d) 配列番号4 (CACAGGAATTCT) (Xは9である) ;
  - e) 配列番号5 (TTGCCATTAGC) (Xは9である) ;
  - f) 配列番号6 (CTGTAGTGATTTTCAACA) (Xは15である) ;
  - g) 配列番号7 (TTATCTACCAT) (Xは9である) ;
  - h) 配列番号8 (GCACGTTTTCAT) (Xは9である) ;
  - i) 配列番号9 (AGAAAACCCAT) (Xは9である) ;
  - j) 配列番号10 (TTGATAGTTCAT) (Xは9である) ; および
  - k) 配列番号11 (GCTTTTTCAT) (Xは9である)
- (チミン塩基(T)はウラシル塩基(U)であってもよい) から選択される。

40

#### 【0173】

一部の実施形態では、式（I）～（VII）のアンチセンスオリゴマー化合物を含め、標的化配列は、

- a) 配列番号12 (ATCCATTTCAGT) (Xは9である) ;

50

- b) 配列番号 13 (CATTTAGTTTG) (Xは9である) ;  
 c) 配列番号 14 (AATTTATCCAT) (Xは9である) ;  
 d) 配列番号 15 (AAAATTTATCCA) (Xは9である) ;  
 e) 配列番号 16 (ACTCGGGACAT) (Xは9である) ;  
 f) 配列番号 17 (CTATTCTCCAA) (Xは9である) ;  
 g) 配列番号 18 (GGCAGACTCGG) (Xは9である) ;  
 h) 配列番号 19 (CTTAGACATGG) (Xは9である) ;  
 i) 配列番号 20 (ATGATACGCAT) (Xは9である) ;  
 j) 配列番号 21 (TCTTTGGCCAT) (Xは9である) ;  
 k) 配列番号 22 (TCAAAATGAGGC) (Xは9である) ;  
 l) 配列番号 23 (AATGAGGCCAT) (Xは9である) ;  
 m) 配列番号 24 (ATAGTTTCTCTCC) (Xは11である) ;  
 n) 配列番号 25 (TCATCTTTGCT) (Xは9である) ;  
 o) 配列番号 26 (TTTTGCTCCAT) (Xは9である) ;  
 p) 配列番号 27 (TTCCTTGCCAT) (Xは9である) ;  
 q) 配列番号 28 (TTTCCAGCCAT) (Xは9である) ;  
 r) 配列番号 29 (ACGCTAATCAT) (Xは9である) ;  
 s) 配列番号 30 (TGTTTGATCAT) (Xは9である) ;  
 t) 配列番号 31 (AATTCGAGCAT) (Xは9である) ;  
 u) 配列番号 32 (TGTTAAAGAGC) (Xは9である) ;  
 v) 配列番号 33 (CTTGTAACCAACCA) (Xは13である) ;  
 w) 配列番号 34 (GGTGCAGTCAAT) (Xは9である) ;  
 x) 配列番号 35 (GACTTAATCAA) (Xは9である) ;  
 y) 配列番号 36 (CTACTGGTCAAT) (Xは9である) ;  
 z) 配列番号 37 (CATTGAGATTT) (Xは9である) ;  
 aa) 配列番号 38 (ACATCTGTCAAT) (Xは9である) ;  
 bb) 配列番号 39 (TTCCTGATTCAT) (Xは9である) ;  
 cc) 配列番号 40 (GTATATGCCAT) (Xは9である) ;  
 dd) 配列番号 41 (TCCCTGCATCAT) (Xは9である) ;  
 ee) 配列番号 42 (ATATACCTCAT) (Xは9である) ;  
 ff) 配列番号 43 (GTTACCCCTGACCGACCA) (Xは15である) ;  
 gg) 配列番号 44 (GTTACCCCTGACCAACCA) (Xは14である) ;  
 hh) 配列番号 45 (TGTTTCAATACG) (Xは9である) ;  
 ii) 配列番号 46 (GGTTTGGCCAAAG) (Xは9である) ;  
 jj) 配列番号 47 (TGTTTCAACCAT) (Xは9である) ;  
 kk) 配列番号 48 (IIIIITCGCCAA) (Xは9である) ;  
 ll) 配列番号 49 (CTCTTAATGAT) (Xは9である) ;  
 mm) 配列番号 50 (ATCCACACAAG) (Xは9である) ;  
 nn) 配列番号 51 (TCCACCAAGTCAACA) (Xは13である) ;  
 oo) 配列番号 52 (AGAGTTTCAAGG) ;  
 pp) 配列番号 53 (GGTGCTCAAAC)  
 (チミン塩基(T)はウラシル塩基(U)であってもよい)  
 から選択される。

## 【0174】

本開示の一部の実施形態では、式(I)~(VII)のアンチセンスオリゴマー化合物を含め、標的化配列は、

- a) 配列番号 54 (ATACTGTCCAA) ;  
 b) 配列番号 55 (CTCTTCTTTT) ; および  
 c) 配列番号 56 (TCCCTTCTGATT)  
 (式中、Xは9であり、チミン塩基(T)はウラシル塩基(U)であってもよい)

から選択される。

【 0 1 7 5 】

D . 例示的なアンチセンスオリゴマー

本開示の例示的なアンチセンスオリゴマー ( A O N ) には、以下の表 3 A ~ B に記載されているものを含む。

【表 3 - 1】

表 3A: 例示的な脂肪酸合成関連標的化配列 AON						
PMO 名	標的遺伝子	標的化配列(TS)*	TS 配列番号	5'付着***	3'付着**	CPP 配列番号
PPMO#1	acpP	CTTCGATAGTG	1	(RXR) <sub>4</sub> XB-	アセチル	59
PPMO#2	acpP	CTTCGATAGTG	1	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#3	acpP	CTTCGATAGTG	1	(RFR) <sub>4</sub> XB-	アセチル	59
PPMO#4	acpP	CTTCGATAGTG	1	TEG	(RYR) <sub>4</sub> XB	59
PPMO#5	acpP	CTTCGATAGTG	1	TEG	(RGR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#6	acpP	ATATCGCTCAC	2	(RXR) <sub>4</sub> XB-	アセチル	59
PPMO#7	acpP	ATATCGCTCAC	2	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#8	acpP	ATTCTCCTCAT	2	(RXR) <sub>4</sub> XB-	アセチル	59
PPMO#9	acpP	ATATCGCTCAC	2	(RFR) <sub>4</sub> XB-	アセチル	64
PPMO#10	acpP	ATATCGCTCAC	2	(RGR) <sub>4</sub> XB	アセチル	66
PPMO#11	acpP	ATATCGCTCAC	2	(RYR) <sub>4</sub> XB-	アセチル	65
PPMO#12	acpP	ATATCGCTCAC	2	(RXR) <sub>4</sub> XB-	H	59
PPMO#13	acpP	ATTCTCCTCAT	3	TEG	(RFF) <sub>3</sub> RXB-	67
PPMO#14	acpP	CACAGGAATTC	4	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#15	acpS	TTGCCATTAGC	5	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#16	acp-E	CTGTAGTGATTTCACC A	6	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#17	fabA	TTATCTACCAT	7	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#18	fabB	GCACGTTTCAT	8	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#19	fabI	AGAAAACCCAT	9	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#20	gapA	TTGATAGTCAT	10	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#21	accA	GCTTTTTTCAT	11	(RXR) <sub>4</sub> XB-	アセチル	59
PPMO#68	Scramble	TCT CAG ATG GT	71	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59

チミン(T)はウラシル(U)であり得、逆もまた同様である。Iはイノシンである。  
 \*\*X は 6-アミノヘキサ酸であり、B はベータ-アラニンであり、G はグリシンであり、F はフェニルアラニンであり、Y はチロシンであり、TEG は上で定義されている。  
 \*\*\*X は、6-アミノヘキサ酸であり、B はベータ-アラニンであり、5'CPP は、上記の pip-PDA 部分を介して連結している。

10

20

30

【表 3 - 2】

表 3B: 他の生化学的経路、細胞プロセスおよび/または抗生物質耐性を標的化する例示的な AON						
PMO 名	標的遺伝子	標的化配列(TS)*	TS 配列番号	5'付着***	3'付着**	CPP 配列番号
PPMO#22	murA	ATCCATTAGT	12	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#23	murA	CATTTAGTTTG	13	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#24	murA	AATTTATCCAT	14	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#25	murA	AAATTTATCCA	15	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#26	rpmB	ACTCGGGACAT	16	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#27	rpmB	CTATTCTCCAA	17	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#28	rpmB	GGCAGACTCGG	18	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#29	rpmB	CTTAGACATGG	19	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#30	adk	ATGATACGCAT	20	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#31	infA	TCTTTGGCCAT	21	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#32	ftsZ	TCAAATGAGGC	22	(RXR) <sub>4</sub> XB-	アセチル	59
PPMO#33	ftsZ	TCAAATGAGGC	22	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#34	ftsZ	AATGAGGCCAT	23	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#35	ftsZ	ATAGTTTCTCTCC	24	(RXR) <sub>4</sub> XB-	アセチル	59
PPMO#36	rpoD	TCATCTTTGCT	25	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#37	rpoD	TTTTGCTCCAT	26	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#38	aroC	TTCCCTGCCAT	27	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#39	aroC	TTCCAGCCAT	28	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#40	murF	ACGCTAATCAT	29	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#41	lpxC	TGTTTGATCAT	30	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#42	kdtA	AATTCGAGCAT	31	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#43	boxA	TGTTAAAGAGC	32	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#44	rpoD-E	CTTGTAACCACACCA	33	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#45	pryC	GGTGCAGTCAT	34	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#46	pryA	GACTTAATCAA	35	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#47	lgt	CTACTGGTCAT	36	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#48	folA	CATTGAGATTT	37	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#49	infB	ACATCTGTCAT	38	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#50	nrdA	TTCTGATTCAT	39	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#51	nrdB	GTATATGCCAT	40	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#52	zipA	TCCTGCATCAT	41	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#53	coaA	ATATACCTCAT	42	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#54	gyrA-E	GTTACCCTGACCGACCA	43	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#55	gyrA-E	GTTACCCTGACCACCA	44	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#56	mrdA	TGTTTCATACG	45	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#57	lpxB	GGTTTGCCAAG	46	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#58	lpxC	TGTTTCACCAT	47	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#59	kdtA	IIITCGCCAA	48	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#60	boxA	CTCTTAATGAT	49	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#61	boxC	ATCCACACAAG	50	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#62	rpoD-E	TCCACCAAGTCACCA	51	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#63	pryC	AGAGTTCAAGG	52	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59

10

20

30

40

【表 3 - 3】

表 3B: 他の生化学的経路、細胞プロセスおよび/または抗生物質耐性を標的化する例示的な AON						
PMO 名	標的遺伝子	標的化配列(TS)*	TS 配列番号	5'付着***	3'付着**	CPP 配列番号
PPMO#64	carA	GGTGCTCAAAC	53	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#65	adeA	ATACTGTCCAA	54	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#66	blaT	CTCTTCCTTTT	55	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
PPMO#67	cml	TCCTTCTGATT	56	TEG	(RXR) <sub>4</sub> XB-	59
<p>チミン(T)はウラシル(U)であり得、逆もまた同様である。Iはイノシンである。</p> <p>**X は 6-アミノヘキサン酸であり、B はベータ-アラニンであり、G はグリシンであり、F はフェニルアラニンであり、Y はチロシンであり、TEG は上で定義されている。</p> <p>***X は、6-アミノヘキサン酸であり、B はベータ-アラニンであり、5'CPP は、上記の pip-PDA 部分を介して連結している。</p>						

10

## 【 0 1 7 6 】

## I V . 使用の方法および製剤

本開示の実施形態は、本明細書において記載されているアンチセンスオリゴマーを使用して、生化学的経路、細胞プロセスおよび/または抗生物質耐性に関連する 1 つまたは複数の細菌のタンパク質の発現および活性を低下させる方法を含む。ある特定の実施形態は、アンチセンスオリゴマーを単独で、または 1 種もしくは複数の追加の抗微生物剤と組み合わせて使用し、細菌の複製、増殖または成長を低下させる、例えば、被験体において細菌感染を処置する方法を含む。一部の例では、アンチセンスオリゴマーは、1 種または複数の抗微生物剤に対する細菌の感受性を向上させる。

20

## 【 0 1 7 7 】

アンチセンスオリゴマーを、通常、薬学的に許容される担体と組み合わせて含む、医薬組成物も含まれる。ある特定の医薬組成物は、1 種または複数の抗微生物剤をさらに含むことができる。本明細書において提供されている方法は、*in vitro* または *in vivo* で実施することができる。

30

## 【 0 1 7 8 】

例えば、ある特定の実施形態は、それを必要とする被験体（例えば、細菌感染を有する被験体または細菌感染を有する危険性がある被験体）に、本明細書に記載されているアンチセンスオリゴマーまたは医薬組成物を投与することを含む、被験体において細菌感染を処置する方法を含む。また含まれるのは、細菌と本明細書に記載されているアンチセンスオリゴマーとを接触させることを含む、細菌の複製を低減させる方法である。

## 【 0 1 7 9 】

一部の実施形態では、細菌は、*Escherichia* および *Acinetobacter* の属から選択される。

## 【 0 1 8 0 】

*Escherichia* は、*Enterobacteriaceae* 科由来のグラム陰性の非孢子形成の条件的嫌気性桿状細菌の属であり、*Escherichia* が関連する病因の大多数に関連している種 *Escherichia coli* を含む。

40

## 【 0 1 8 1 】

*Acinetobacter* は、*Gamma proteobacteria* の綱に属するグラム陰性菌の属である。臨床的に関連性のある *Acinetobacter* 種群の例は、*Acinetobacter calcoaceticus - baumannii* 種群（グルコース酸化非溶血性）、*Acinetobacter lwoffii*（グルコース陰性非溶血性）、および *Acinetobacter haemolyticus*（溶血性）を含む。具体例は、*Acinetobacter baumannii* を含む。

50

## 【0182】

こうして、一部の実施形態では、細菌は、*Escherichia* または *Acinetobacter* の属の上記のメンバーのいずれかである。具体的な実施形態では、細菌は *Escherichia coli* または *Acinetobacter baumannii* である。一部の実施形態では、細菌は、表 E 1 中の株の 1 つまたは複数から選択される。

## 【0183】

ある特定の実施形態では、細菌は、細菌の多剤耐性 (MDR) 株である。複数薬剤耐性 (multiple drug resistance) (MDR)、多剤耐性 (multi-drug resistance) または多耐性 (multiresistance) は、疾患を引き起こす微生物 (細菌、ウイルス、真菌または寄生生物) が別個の抗微生物薬、例えば、抗生物質、抗真菌薬、抗ウイルス薬、抗寄生生物薬などに耐えることができる状態である。特定の実施形態では、細菌は、広範囲薬剤耐性 (extensively-drug resistant) (XDR) または汎薬剤耐性 (pan-drug resistant) (PDR) である。一部の実施形態では、細菌は、広域スペクトルの -ラクタマーゼ (ESBL) 産生グラム陰性菌、または多剤耐性グラム陰性桿状 (MDR GNR) MDRGN 細菌である。具体的な実施形態では、細菌は、MDR *Escherichia* 例えば、MDR *Escherichia coli*、または MDR *Acinetobacter*、例えば、MDR *Acinetobacter baumannii* である。

## 【0184】

生化学的経路および/または細胞プロセスに関連する遺伝子の例には、例えば、*Escherichia* または *Acinetobacter* に由来する、*acpP*、*accA*、*acpS* および/または *fab* 遺伝子などの脂肪酸生合成遺伝子 (およびそれらの関連タンパク質) が含まれる。特定の実施形態では、細菌は、アシルキャリアータンパク質をコードする *acpP* 遺伝子を含む、または発現する。特定の実施形態では、細菌は *accA* 遺伝子を含むまたは発現し、この遺伝子は、アセチル補酵素 A カルボキシラーゼのカルボキシルトランスフェラーゼアルファサブユニットをコードする。具体的な実施形態では、脂肪酸生合成に関連する 1 つまたは複数の遺伝子を含むまたは発現する細菌は、*Escherichia* 種、例えば *Escherichia coli* である。具体的な実施形態では、脂肪酸生合成に関連する 1 つまたは複数の遺伝子を含む、または発現する細菌は、*Acinetobacter* 種である。これらの実施形態および関連する実施形態の一部では、それを必要とする被験体が免疫無防備状態であり、嚢胞性線維症 (CF) または慢性肉芽腫症 (CGD) などの、根底にある肺疾患を有する。

## 【0185】

生化学的経路および/または細胞プロセスに関連する遺伝子の例には、例えば *Escherichia* 種に由来するペプチドグリカン生合成遺伝子 (およびそれらの関連タンパク質) が含まれる。特定の実施形態では、細菌は、UDP-N-アセチルグルコサミン 1-カルボキシビニルトランスフェラーゼをコードする *murA* 遺伝子を含む、または発現する。具体的な実施形態では、ペプチドグリカン生合成に関連する 1 つまたは複数の遺伝子を含むまたは発現する細菌は、*Escherichia coli* である。

## 【0186】

生化学的経路および/または細胞プロセスに関連する遺伝子の例には、例えば、*Escherichia* 種または *Acinetobacter spp.* に由来する、リボソームタンパク質遺伝子 (およびそれらの関連タンパク質) が含まれる。特定の実施形態では、細菌は、50S リボソームタンパク質 L28 をコードする *rpmB* 遺伝子を含む、または発現する。具体的な実施形態では、リボソームタンパク質遺伝子に関連する 1 つまたは複数の遺伝子を含むまたは発現する細菌は、*Escherichia coli* または *Acinetobacter spp.* である。

## 【0187】

生化学的経路および/または細胞プロセスに関連する遺伝子の例には、例えば *Escherichia* 種に由来する細胞のホメオスタシス遺伝子（およびそれらの関連タンパク質）が含まれる。特定の実施形態では、細菌は、アデニル酸キナーゼをコードする *adk* 遺伝子を含むか、または発現する。具体的な実施形態では、細胞のホメオスタシス遺伝子に関連する1つまたは複数の遺伝子を含むまたは発現する細菌は、*Escherichia coli* である。

【0188】

生化学的経路および/または細胞プロセスに関連する遺伝子の例には、例えば *Escherichia* 種に由来するタンパク質生合成遺伝子（およびそれらの関連タンパク質）が含まれる。特定の実施形態では、細菌は、翻訳開始因子をコードする *infA* 遺伝子を含む、または発現する。具体的な実施形態では、タンパク質生合成遺伝子に関連する1つまたは複数の遺伝子を含むまたは発現する細菌は、*Escherichia coli* である。

10

【0189】

生化学的経路および/または細胞プロセスに関連する遺伝子の例には、例えば *Acinetobacter* spp. に由来する細胞分裂遺伝子（およびそれらの関連タンパク質）が含まれる。特定の実施形態では、細菌は、細菌の細胞分裂の隔壁の見込み部位における環に集合するタンパク質をコードする、*ftsZ* 遺伝子を含む、または発現する。具体的な実施形態では、細胞分裂遺伝子に関連する1つまたは複数の遺伝子を含むまたは発現する細菌は、*Acinetobacter* spp. である。

20

【0190】

生化学的経路および/または細胞プロセスに関連する遺伝子の例には、例えば *Acinetobacter* spp. に由来するRNA合成遺伝子（およびそれらの関連タンパク質）が含まれる。特定の実施形態では、細菌は、RNAポリメラーゼのシグマD因子をコードする *rpoD* 遺伝子を含む、または発現する。具体的な実施形態では、RNA合成遺伝子に関連する1つまたは複数の遺伝子を含むまたは発現する細菌は、*Acinetobacter* spp. である。

【0191】

生化学的経路および/または細胞プロセスに関連する遺伝子の例には、例えば *Acinetobacter* spp. に由来する芳香族化合物の生合成遺伝子（およびそれらの関連タンパク質）が含まれる。特定の実施形態では、細菌は、コリスミ酸シンターゼ（5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸ホスホリアーゼ）をコードする *aroC* 遺伝子を含む、または発現する。具体的な実施形態では、芳香族化合物の生合成遺伝子に関連する1つまたは複数の遺伝子を含むまたは発現する細菌は、*Acinetobacter* spp. である。

30

【0192】

一部の実施形態では、細菌（単数または複数）は、1つまたは複数の抗生物質耐性遺伝子を含む（例えば、コードする）。抗生物質耐性遺伝子（およびそれらの関連タンパク質）の一般的な例には、ある種の抗微生物剤を酵素的に非活性化することができるベータ-ラクタマーゼ、および抗微生物剤の透過性または能動排出（ポンプアウト）を増加させる遺伝子/タンパク質が挙げられる。抗生物質耐性遺伝子の特定の例には、TEMベータ-ラクタマーゼ（*blaT*）、クロラムフェニコール耐性遺伝子である *cmI* および耐性-小結節形成-細胞分裂（*RND*）型多剤排出ポンプサブユニット *AdeA*（*adeA*）が含まれる。具体的な実施形態では、細菌は、*blaT*、*cmI* および *adeA* から選択される少なくとも1つの抗生物質耐性遺伝子を含むまたは発現する、*Escherichia coli* または *Acinetobacter* spp. である。

40

【0193】

一部の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、細菌（単数または複数）における、生化学的経路、細胞プロセスおよび/または抗生物質耐性に関連する遺伝子の発現を低下させる。例えば、一部の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、対照（例えば、アン

50

チセンスオリゴマーの非存在、スクランブルオリゴマー、オリゴマーとの接触前)と比べて、約または少なくとも約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900もしくは1000%またはそれを超えて(すべての整数およびその間の範囲を含めた)あるいは、対照に対して、約または少なくとも約2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、200、300、400、500、1000倍もしくはそれを超えて(すべての整数およびその間の範囲を含めた)発現を低下させる。一部の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、AcpP、AccA、MurA、RpmB、Adk、InfA、FtsZ、RpoD、AroC、BlaT、Cmlおよび/もしくはAdeAの1つまたは複数の発現を低下させ、細菌は、AcpP、AccA、MurA、RpmB、Adk、InfA、FtsZ、RpoD、AroC、BlaT、Cmlおよび/もしくはAdeAの1つまたは複数を含むかまたはそれらを発現する、AcinetobacterまたはEscherichia種である。遺伝子またはタンパク質発現は、in vitro(例えば、実施例を参照されたい)またはin vivoで測定することができる。

#### 【0194】

一部の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、細菌(単数または複数)の成長を低減または阻害する。例えば、一部の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、対照(例えば、アンチセンスオリゴマー、スクランブルオリゴマーが存在しない、オリゴマーとの接触の前)と比べて、約または少なくとも約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900、もしくは1000%もしくはそれを超えて(すべての整数およびその間の範囲を含めた)、または対照と比べて、約または少なくとも約2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、200、300、400、500、1000倍もしくはそれを超えて(すべての整数およびその間の範囲を含めた)細菌(単数または複数)の成長を低減させる。細菌成長は、in vitro(例えば、実施例を参照されたい)またはin vivoで測定することができる。特定の実施形態では、細菌の成長を低下させるアンチセンスオリゴマーは、AcpP、AccA、MurA、RpmB、Adk、InfA、FtsZ、RpoD、AroC、BlaT、Cmlおよび/もしくはAdeAの1つまたは複数から選択される、生化学的経路および/または細胞プロセスに関連するタンパク質に対して標的化され、細菌は、AcpP、AccA、MurA、RpmB、Adk、InfA、FtsZ、RpoD、AroC、BlaT、Cmlおよび/もしくはAdeAの1つまたは複数を含むまたは発現する、AcinetobacterまたはEscherichia種である。一部の実施形態では、本明細書に記載されている通り、アンチセンスオリゴマーは、1つまたは複数の抗微生物剤と組み合わせて用いられ、例えば、細菌(単数または複数)の成長を相乗的に低下させる。

#### 【0195】

一部の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、対照と比べて、約または少なくとも約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900、もしくは約1000%もしくはそれを超えて(すべての整数およびその間の範囲を含めた)、または対照と比べて、少なくとも約2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、もしくは100倍もしくはそれを超えて(すべての整数およびその間の範囲を含めた)細菌のペリプラズムにおけるベータ-ラクタマーゼ(例えば、カルバペネマーゼ)活性を低減させ

10

20

30

40

50



る。一部の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、細菌のペリプラズムにおいてメロペネマーゼ (meropenemase) 酵素活性を低減させる。特定の実施形態では、ベータ-ラクタマーゼ活性を低減させるアンチセンスオリゴマーは、bla<sub>T</sub>に対して標的化され、細菌は、Bla<sub>T</sub>を含むか、または発現する、Acinetobacter、またはEscherichia種、例えば、Escherichia coliまたはAcinetobacter baumanniiである。これらは、例示的な細菌種であり、bla<sub>T</sub>遺伝子を発現している任意の細菌は、本明細書に記載されている化合物および方法に対して影響されやすいと予想される。ベータ-ラクタマーゼ活性は、当技術分野で通例の技術によって測定することができる。

#### 【0196】

一部の実施形態では、方法はin vivoで実施され、それを必要とする被験体、例えば、本明細書に記載されている細菌の1つまたは複数に感染しているか、または感染している危険性があるそれを必要とする被験体にアンチセンスオリゴマーを投与することを含む。このように、本明細書に記載のアンチセンスオリゴマーを、被験体に投与して、本明細書に記載されている細菌のいずれかによる感染症を（予防的または治療的に）処置することができる。このような処置と併せて、薬理ゲノミクス（例えば、個体の遺伝子型/表現型と、外来性化合物または薬物に対するその個体の応答との間の関係の研究）を考慮し得る。治療薬の代謝における差異は、薬理学的活性薬物の用量および血中濃度の間の関係を変化させることによって重度の毒性または治療上の失敗をもたらす得る。

#### 【0197】

このように、医師または臨床医は、治療剤を投与するかどうかの決定において、関連性のある薬理ゲノミクス研究において得た知識を適用し、治療剤による処置の投与量および/または治療レジメンを適合させることを考慮し得る。

#### 【0198】

標的核酸へのアンチセンスオリゴマーの有効な送達は、処置の一態様である。アンチセンスオリゴマー送達の経路には、これらに限定されないが、経口および非経口経路を含めた様々な全身的経路、例えば、静脈内、皮下、腹腔内、および筋内、ならびに吸入、経皮的、および局部送達が含まれる。適当な経路は、処置を受けている被験体の状態に応じて当業者が決定し得る。血管または血管外循環、血液またはリンパ系、および脳脊髄液は、アンチセンスオリゴマーを導入し得る一部の非限定的な部位である。直接的なCNS送達を用いてもよく、例えば、脳内、脳室内、または髄腔内投与を、投与経路として使用し得る。

#### 【0199】

ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、経皮的な方法で（例えば、リボソーム中に任意選択でパッケージ化されているアンチセンスオリゴマーの、例えばエマルジョン中への組込みにより）送達することができる。このような経皮的およびエマルジョン/リボソーム媒介性送達の方法は、例えば、その内容が参照により本明細書中にその全体が組み込まれている米国特許第6,965,025号において、当技術分野におけるアンチセンスオリゴマーの送達について記載されている。

#### 【0200】

本明細書に記載されているアンチセンスオリゴマーはまた、埋め込み可能なデバイスを紹介して送達され得る。このようなデバイスの設計は当技術分野において承認されているプロセスであり、例えば、合成埋め込み物の設計は、例えば、その内容が参照により組み込まれている米国特許第6,969,400号に記載されている。

#### 【0201】

アンチセンスオリゴマーは、当技術分野において承認されている技術（例えば、トランスフェクション、電気穿孔法、融合、リボソーム、コロイド状ポリマー粒子、ならびにウイルスおよび非ウイルスベクター、ならびに当技術分野において公知の他の手段）を使用して、細胞中に導入することができる。選択される送達の方法は、オリゴマー化学、処置される細胞、および細胞の場所によって少なくとも決まり、これは当業者には明らかであ

10

20

30

40

50

る。例えば、局在化は、リボソームを方向付ける表面上の特異的マーカーを有するリボソーム、標的細胞を含有する組織中への直接の注入、特異的受容体媒介性取込みなどによって達成することができる。

#### 【0202】

当技術分野において公知のように、アンチセンスオリゴマーは、例えば、リボソーム媒介性取込み、脂質コンジュゲート、ポリリシン媒介性取込み、ナノ粒子媒介性取込み、および受容体媒介性エンドサイトーシス、ならびにさらなる送達の新エンドサイトーシスモード、例えば、マイクロインジェクション、透過処理（例えば、ストレプトトリシンの透過処理、アニオン性ペプチド透過処理）、電気穿孔法を伴う方法、および当技術分野において公知の送達の様々な非侵襲的非エンドサイトーシス方法を使用して送達し得る（例えば、参照によりその全体が組み込まれているDokkaおよびRojanasakul、Advanced Drug Delivery Reviews、44巻：35～49頁を参照されたい）。

10

#### 【0203】

アンチセンスオリゴマーは、生理学的におよび/または薬学的に許容される任意の好都合なビヒクルまたは担体中で投与され得る。このような組成物は、当業者によって用いられる種々の標準的な薬学的に許容される担体のいずれかを含み得る。例には、これらに限定されないが、食塩水、リン酸緩衝食塩水（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含まれる。適切な生理学的に許容される担体の選択は、投与の選択したモードによって変化する。「薬学的に許容される担体」は、薬学的投与と適合性のありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などを含むことを意図する。薬学的に活性な物質のためのこのような媒体および薬剤の使用は、当技術分野で周知である。任意の通常の媒体または薬剤が活性化合物と不適合である場合を除き、組成物におけるその使用が意図される。補助的活性化合物をまた、組成物中に組み込むことができる。

20

#### 【0204】

本明細書に記載されている化合物（例えば、アンチセンスオリゴマー、抗微生物剤）は一般に、遊離酸または遊離塩基として利用され得る。代わりに、本明細書に記載の化合物は、酸付加塩または塩基付加塩の形態で使用され得る。本明細書に記載の遊離アミノ化合物の酸付加塩は、当技術分野で周知の方法によって調製してもよく、有機酸および無機酸から形成され得る。適切な有機酸は、マレイン酸、フマル酸、安息香酸、アスコルビン酸、コハク酸、メタンスルホン酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、シュウ酸、プロピオン酸、酒石酸、サリチル酸、クエン酸、グルコン酸、乳酸、マンデル酸、ケイ皮酸、アスパラギン酸、ステアリン酸、パルミチン酸、グリコール酸、グルタミン酸、およびベンゼンスルホン酸を含む。

30

#### 【0205】

適切な無機酸は、塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、および硝酸を含む。塩基付加塩はカルボン酸アニオンと共に形成されるそれらの塩を含み、有機および無機カチオン、例えば、アルカリ金属およびアルカリ土類金属から選択されるもの（例えば、リチウム、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、バリウムおよびカルシウム）、ならびにアンモニウムイオンおよびその置換誘導体（例えば、ジベンジルアンモニウム、ベンジルアンモニウム、2-ヒドロキシエチルアンモニウムなど）と形成される塩を含む。このように、用語「薬学的に許容される塩」は、ありとあらゆる許容される塩の形態を包含することを意図する。

40

#### 【0206】

さらに、プロドラッグがまた、本開示の文脈内に含まれる。プロドラッグは、このようなプロドラッグが患者に投与されるとき、化合物をin vivoで放出する任意の共有結合的に結合した担体である。プロドラッグは一般に、通例の操作によってまたはin vivoで修飾が切断され、親化合物が生じるように官能基を修飾することによって調製

50

される。プロドラッグは、例えば、ヒドロキシ、アミンまたはスルフヒドリル基が、患者に投与されたとき切断されてヒドロキシ、アミンまたはスルフヒドリル基を形成する任意の基に結合している本開示の化合物を含む。このように、プロドラッグの代表例は、本明細書に記載のアンチセンスオリゴマーのアルコールおよびアミン官能基のアセテート、ホルメートおよびベンゾエート誘導体を含む（しかしこれらに限定されない）。さらに、カルボン酸（-COOH）の場合、エステル、例えば、メチルエステル、エチルエステルなどを用いてもよい。

#### 【0207】

一部の場合において、リポソームを用いて、細胞中へのアンチセンスオリゴマーの取込みを促進し得る（例えば、Williams, S. A., Leukemia, 10巻（12号）：1980～1989頁、1996年；Lappalainenら、Antiviral Res., 23巻：119頁、1994年；Uhlmannら、antisense oligomers: a new therapeutic principle, Chemical Reviews, 第90巻、第4号、25、544～584頁、1990年；Gregoriadis, G., 第14章、Liposomes, Drug Carriers in Biology and Medicine, 287～341頁、Academic Press, 1979年を参照されたい）。ヒドロゲルはまた、例えば、WO93/01286に記載されているように、アンチセンスオリゴマー投与のためのビヒクルとして使用され得る。代わりに、オリゴマーは、ミクロスフィ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巻：4429～4432頁、30号、1987年を参照されたい）。代わりに、アンチセンスオリゴマーと複合体化したガスを充填した微小気泡の使用は、米国特許第6,245,747号に記載されているように標的組織への送達を増進することができる。持続放出組成物をまた使用し得る。これらは、成形した物品、例えば、フィルムまたはマイクロカプセルの形態の半透性ポリマーマトリックスを含み得る。

#### 【0208】

ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、適切な医薬担体中で、細菌感染（例えば、抗生物質耐性またはMDR細菌感染）の症状を示す哺乳動物被験体、例えば、ヒトまたは家畜に投与される。一部の態様では、被験体は、ヒト被験体、例えば、細菌感染を有すると診断されている患者である。特定の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、薬学的に許容される担体中に含有され、経口的に送達される。一部の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、薬学的に許容される担体中に含有され、静脈内に（i.v.）送達される。

#### 【0209】

一部の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、少なくとも200～400 nMのピーク血中濃度のアンチセンスオリゴマーをもたらすのに有効な量および様式で投与される。典型的には、1つまたは複数の用量のアンチセンスオリゴマーは、一般に規則的な間隔で約1～2週間の期間投与される。経口投与のためのある特定の用量は、70 kg 当たり約1～1000 mg のオリゴマーである。場合によって、患者あたり1000 mg 超の用量のオリゴマーが必要であり得る。i.v. 投与のために、一部の用量は、70 kg 当たり約0.5 mg～1000 mg のオリゴマーである。アンチセンスオリゴマーは、規則的な間隔で短期間、例えば、2週間またはそれ未満毎日投与され得る。しかし、場合によって、アンチセンスオリゴマーは、より長期間にわたって間欠的に投与される。投与は、抗微生物剤（例えば、抗生物質）または本明細書に記載のような他の治療的処置の投与の前か、または同時でよい。処置レジメンは、処置を受けている被験体の免疫アッセイ、他の生化学的試験および生理学的検査の結果に基づいて、示されるように調節され得る（用量、頻度、経路など）。

#### 【0210】

本明細書に記載のアンチセンスオリゴマーを使用した有効な *in vivo* の処置レジ

10

20

30

40

50

メンは、投与の持続期間、用量、頻度および経路、ならびに処置を受けている被験体の状態によって変化し得る（すなわち、予防的投与 対 限局性感染または全身性感染に応じた投与）。したがって、このような *in vivo* の療法は、処置を受けている特定のタイプの障害または細菌感染に適している試験によるモニタリング、および最適な治療成績を達成するための用量または処置レジメンにおける対応する調節を含むことが多い。

#### 【0211】

処置は、例えば、当技術分野において公知の疾患の一般指標によってモニターし得る。*in vivo* で投与された本明細書に記載のアンチセンスオリゴマーの有効性は、アンチセンスオリゴマーの投与の前、間および後に、被験体から採取した生物学的体試料（組織、血液、尿など）から決定され得る。このような試料のアッセイは、（１）当業者には公知の手順、例えば、電気泳動ゲル移動度アッセイを使用して、標的配列および非標的配列を伴うヘテロ二重鎖形成が存在するか、または存在しないかについてモニターすること；（２）標準的な技術、例えば、RT-PCR、ノーザンブロッティング、ELISAまたはウエスタンブロッティングによって決定するような、参照正常 mRNA またはタンパク質に対して変異体 mRNA の量をモニターすることを含む。

#### 【0212】

##### III. 併用療法

ある特定の実施形態は、併用療法、例えば、抗微生物剤、例えば、抗生物質と組み合わせたアンチセンスオリゴマーの投与を含む。併用療法を用いて、例えば、１種または複数の抗微生物剤に対する所与の細菌の感度または感受性を増加させ、それによって治療成績（例えば、感染症の消散）を改善させることができる。同様に、ある特定の併用療法を用いて、例えば、１種または複数の抗微生物剤に対する所与の細菌の耐性を低減または逆転させることができる。特定の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、所与の細菌に対する抗生物質の最小発育阻止濃度（MIC）を低減させる。ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴマーおよび抗微生物剤は、細菌の成長の低下および／または細菌の細胞死滅の向上に相乗作用を示す。また含まれるのは、アンチセンスオリゴマーおよび抗微生物剤、例えば、抗生物質を含む本明細書に記載のような医薬組成物である。

#### 【0213】

一部の実施形態では、アンチセンスオリゴマーおよび抗微生物剤は、別々に投与される。ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴマーおよび抗微生物剤は、逐次的に投与される。一部の実施形態では、アンチセンスオリゴマーおよび抗微生物剤は、例えば、同じまたは異なる医薬組成物の一部として同時に投与される。

#### 【0214】

アンチセンスオリゴマーと組み合わせて投与することができる抗微生物剤（例えば、抗生物質）の例には、ベータ-ラクタム系抗生物質、例えば、カルバペネム、ペニシリンおよびペニシリン誘導体（またはペナム）、アンピシリン、クロラムフェニコール、セファロsporin（例えば、セファセトリル（Cefacetile）（セファセトリル（cephacetile））、セファドロキシル（Cefadroxil）（セファドロキシル（cefadroxyl）；Duricef）、セファレキシン（Cephalexin）（セファレキシン（cefalexin）；Keflex）、セファログリシン（Cefaloglycin）（セファログリシン（cephaloglycin））、セファロニウム（Cefalonium）（セファロニウム（cephalonium））、セファロリジン（cefaloridine）（セファロリジン（cephaloridine））、セファロチン（Cefalotin）（セファロチン（cephalothin）；Keflin）、セファピリン（Cefapirin）（セファピリン（cephapirin）；Cefadryl）、セファトリジン、セファザフルール、セファゼドン、セファゾリン（Cefazolin）（セファゾリン（cephazolin）；Ancef、Kefzol）、セフラジン（Cefradine）（セフラジン（cephradine）；Velosef）、セフロキサジン、セフテゾール、セファクロル（Cecclor、Distaclor、Keflor、Raniclor）、セフォニ

シド (Monocid)、セフプロジル (セフプロキシル; Cefzil)、セフロキシム (Zefu、Zinnat、Zinacef、Ceftin、Biofuroksym、Xorimax)、セフゾナム、セフメタゾール、セフォテタン、セフォキシチン、ロラカルベフ (Lorabid); セファマイシン: セフペラゾン、セフメタゾール (Zefazone)、セフミノクス、セフォテタン (Cefotan)、セフォキシチン (Mefoxin)、セフォチアム (Pansporin)、セフカペン、セフダロキシム、セフジニル (Sefdin、Zinir、Omnicef、Kefnir)、セフジトレン、セフェタメト、セフィキシム (Fixx、Zifi、Suprax)、セフメノキシム、セフォジジム、セフォタキシム (Claforan)、セフォベシン (Convenia)、セフピミゾール、セフボドキシム (Vantin、PECEF)、セフテラム、セフチブテン (Cedax)、セフチオフル、セフチオレン、セフチゾキシム (Cefizox)、セフトリアキソン (Rocephin)、セフォベラゾン (Cefobid)、セフタジジム (Meezat、Fortum、Fortaz)、ラタモキセフ (モキサラクタム)、セフクリジン、セフェピム (Maxipime)、セフルプレナム、セフォセリス、セフォゾプラン、セフピロム (Cefrom)、セフキノム、フロモキセフ、セフトピブロール、セフタロリン、セファロラム、セファパロール、セフカネル、セフェドロロール、セフェンピドン、セフェトリゾール、セフィピトリル、セフマチレン、セフメピジウム (Cefmepidium)、セフォキサゾール、セフロチル (Cefrotil)、セフスミド (Cefsumide)、セフチオキシド (Ceftioxide)、セフラセチム (Cefuracetim)、およびモノバクタム (例えば、アズトレオナム、チゲモナム (tigemonam)、ノカルジン (nocardin) A、タブトキシム (tabtoxin)); アミノグリコシド、例えば、トブラマイシン、ゲンタマイシン、カナマイシン a、アミカシン、ジベカシン、シソマイシン、ネチルマイシン、ネオマイシン B、ネオマイシン C、ネオマイシン E (パロモマイシン)、およびストレプトマイシン; テトラサイクリン、例えば、テトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、デメクロサイクリン、リメサイクリン、メクロサイクリン、メタサイクリン、ミノサイクリン、ロリテトラサイクリン、およびドキシサイクリン; スルホンアミド、例えば、スルファセタミド、スルファジアジン、スルファジミジン、スルファフラゾール、スルフィソミジン、スルファドキシム、スルファメトキサゾール、スルファモキソール、スルファジメトキシム、スルファメトキシピリダジン、スルファメトキシジアジン、スルファドキシム、およびスルファメトピラジン; キノロン、例えば、シノキサシン、ナリジキシム酸、オキシロリン酸 (Uroxin)、ピロミド酸 (Panacid)、ピベミド酸 (Dolcol) ロソキサシン (Eradacil)、シプロフロキサシン (Alcipro、Ciprobay、Cipro、Ciproxin、ウルトラシプロ (ultracipro)、エノキサシン (Enroxil、Penetrex)、フレロキサシン (Megalone、Roquinol)、ロメフロキサシン (Maxaquin)、ナジフロキサシン (Acuatim、Nadoxin、Nadixa)、ノルフロキサシン (Lexinor、Noroxin、Quinabic、Janacin)、オフロキサシン (Floxin、Oxaldin、Tarivid)、ペフロキサシン (Peflacin)、ルフロキサシン (Uroflox)、バロフロキサシン (Baloxin)、グレパフロキサシン (Raxar)、レボフロキサシン (Cravit、Levaquin、Tavanic)、パズフロキサシン (Pasil、Pazucross)、スパルフロキサシン (Zagam)、テマフロキサシン (Omni-flox)、トスフロキサシン (Ozex、Tosacin)、クリナフロキサシン、ガチフロキサシン (Zigat、Tequin) (Zymar-opt h.)、ゲミフロキサシン (Factive)、モキシフロキサシン (Acflox Woodward、Avelox、Vigamox、シタフロキサシン (Gracevit)、トロバフロキサシン (Trovan)、ブルリフロキサシン (Quisnon); オキサゾリジノン、例えば、エペレゾリド (eperezolid)、リネゾリド、ポシゾリド (posizolid)、ラデゾリド (radezolid)、ランベゾリド (ranbezolid)、ステゾ

10

20

30

40

50

リド (s u t e z o l i d)、およびテジゾリド；ポリミキシン、例えば、ポリスポリン (p o l y s p o r i n)、ネオスポリン (n e o s p o r i n)、ポリミキシンB、ポリミキシンE (コリスチン)；リファマイシン、例えば、リファンピシンまたはリファンピン、リファブチン、リファペンチン、およびリファキシミン；リピアルマイシン (l i p i a r m y c i n)、例えば、フィダキソマイシン；マクロライド、例えば、アジスロマイシン、クラリスロマイシン、ジリスロマイシン、エリスロマイシン、ロキシスロマイシン、テリスロマイシン、カルボマイシン (c a r b o m y c i n) A、ジョサマイシン、キタサマイシン、ミデカマイシン / 酢酸ミデカマイシン、オレアンドマイシン、ソリスロマイシン (s o l i t h r o m y c i n)、スピラマイシン、およびトロレアンドマイシン；リンコサミド、例えば、リンコマイシン、クリンダマイシン、およびピルリマイシン；環状リポペプチド、例えば、ダプトマイシン；グリコペプチド、例えば、バンコマイシンおよびテイコプラニン (t e i c h o p l a n i n)；グリシルサイクリン、例えば、チゲサイクリンが含まれる。このように、上記の抗生物質の任意の1つまたは複数は、本明細書に記載されている細菌 (単数または複数) のいずれかの処置のために本明細書に記載されているアンチセンスオリゴマーのいずれかと合わせることができる。

#### 【0215】

一部の実施形態では、抗微生物剤は、本明細書に記載されている通り、アミノグリコシド系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質および - ラクタム系抗生物質の1つまたは複数から選択される。これらの実施形態および関連する実施形態の一部では、細菌は、a c c Aの1つまたは複数から選択される遺伝子を含むまたは発現し、アンチセンスオリゴマーは、脂肪酸生合成遺伝子に対して標的化される。これらの実施形態および関連する実施形態の一部では、細菌は、m u r Aの1つまたは複数から選択される遺伝子を含むまたは発現し、アンチセンスオリゴマーは、ペプチドグリカン生合成遺伝子に対して標的化される。これらの実施形態および関連する実施形態の一部では、細菌は、r p m Bの1つまたは複数から選択される遺伝子を含むまたは発現し、アンチセンスオリゴマーは、リボソームタンパク質遺伝子に対して標的化される。これらの実施形態および関連する実施形態の一部では、細菌は、a d kの1つまたは複数から選択される遺伝子を含むまたは発現し、アンチセンスオリゴマーは、細胞のホメオスタシス遺伝子に対して標的化される。これらの実施形態および関連する実施形態の一部では、細菌は、i n f Aの1つまたは複数から選択される遺伝子を含むまたは発現し、アンチセンスオリゴマーは、タンパク質生合成遺伝子に対して標的化される。これらの実施形態および関連する実施形態の一部では、細菌は、f t s Zの1つまたは複数から選択される遺伝子を含むまたは発現し、アンチセンスオリゴマーは、細胞分裂遺伝子に対して標的化される。これらの実施形態および関連する実施形態の一部では、細菌は、r p o Dの1つまたは複数から選択される遺伝子を含むまたは発現し、アンチセンスオリゴマーは、RNA合成遺伝子に対して標的化される。これらの実施形態および関連する実施形態の一部では、細菌は、a r o Cの1つまたは複数から選択される遺伝子を含むまたは発現し、アンチセンスオリゴマーは、芳香族化合物の生合成遺伝子に対して標的化される。具体的な実施形態では、細菌はE s c h e r i c h i a c o l iまたはA c i n e t o b a c t e r s p p .である。

#### 【0216】

一部の実施形態では、抗微生物剤は、本明細書に記載のようなベータ - ラクタム系抗生物質である。これらおよび関連する実施形態のある特定のものでは、細菌は、ベータ - ラクタマーゼ、例えば、B l a Tを含むか、または発現し、アンチセンスオリゴマーは、ベータ - ラクタマーゼに対して標的化される。特定の実施形態では、抗微生物剤は、カルバペネムである。カルバペネムの例は、メロペネム、イミペネム、エルタペネム、ドリペネム、パニペネム、ピアペネム、ラズペネム、テビペネム、レナペネム、トモペネムおよびアンピシリンを含む。具体的な実施形態では、抗微生物剤はメロペネムである。特定の実施形態では、抗微生物剤は、セファロスポリン (セフェム)、ペニシリンまたはペニシリン誘導体 (ペナム) である。特定の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、細菌、例えば、E . c o l iまたはA c i n e t o b a c t e r b a u m a n n i iのMDR株

10

20

30

40

50

に対する、メロペネムなどのカルバペネムのMICを低下させる。一部の実施形態では、アンチセンスオリゴマーと、メロペネムなどのカルバペネムとを組み合わせると、例えば、*E. coli*または*Acinetobacter baumannii*のMDR株の、細菌の細胞成長を低下（例えば、相乗的に低下）させるか、または細菌の細胞死滅を向上（例えば、相乗的に向上）させる。

#### 【0217】

一部の実施形態では、抗微生物剤は、本明細書に記載されている、アミノグリコシドである。アミノグリコシドの例には、トブラマイシン、ゲンタマイシン、カナマイシンa、アミカシン、ジベカシン、シソマイシン、ネチルマイシン、ネオマイシンB、ネオマイシンC、ネオマイシンE（パロモマイシン）およびストレプトマイシンが含まれる。具体的な実施形態では、抗微生物剤はトブラマイシンである。特定の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、細菌、例えば、*E. coli*または*Acinetobacter baumannii*のMDR株に対する、トブラマイシンなどのアミノグリコシドのMICを低下させる。一部の実施形態では、アンチセンスオリゴマーと、トブラマイシンなどのアミノグリコシドとを組み合わせると、例えば、*E. coli*または*Acinetobacter baumannii*のMDR株の細菌の細胞成長を低下（例えば、相乗的に低下）させるか、または細菌の細胞死滅を向上（例えば、相乗的に向上）させる。これらおよび関連する実施形態の一部では、細菌は、抗生物質耐性遺伝子adeAを含むか、または発現し、アンチセンスオリゴマーは、抗生物質耐性遺伝子に対して標的化される。具体的な実施形態では、細菌は、*Escherichia coli*または*Acinetobacter baumannii*である。

#### 【0218】

ある特定の実施形態では、抗微生物剤は、コリスチン（ポリミキシンE）、ポリスポリン、ネオスポリンまたはポリミキシンBなどのポリミキシンである。具体的な実施形態では、抗微生物剤はコリスチンである。特定の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、細菌、例えば、*E. coli*または*Acinetobacter baumannii*のMDR株に対する、コリスチンなどのポリミキシンのMICを低下させる。一部の実施形態では、アンチセンスオリゴマーと、コリスチンなどのポリミキシンとを組み合わせると、例えば、*E. coli*または*Acinetobacter baumannii*のMDR株の細菌の細胞成長を低下（例えば、相乗的に低下）させるか、または細菌の細胞死滅を向上（例えば、相乗的に向上）させる。

#### 【0219】

ある特定の実施形態では、抗微生物剤は、セフトジジム、ドキシサイクリン、ピペラシリン、メロペネム、クロラムフェニコール、および/またはコトリモキサゾール（トリメトプリム/スルファメトキサゾール）の1つまたは複数を含む。これらの実施形態および関連する実施形態の一部では、細菌は、*cm1*などの1つまたは複数の抗生物質耐性遺伝子を含むまたは発現する*Escherichia*種であり、アンチセンスオリゴマーは、抗生物質耐性遺伝子に対して標的化される。具体的な実施形態では、細菌は*Escherichia coli*である。

#### 【0220】

一部の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、抗微生物剤単独と比べて、抗微生物剤に対する所与の細菌の感受性または感度を増加させる。例えば、ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、抗微生物剤単独と比べて、標的化されている細菌（単数または複数）に対する抗微生物剤の殺菌性（細胞死滅）および/または静菌性（成長緩徐化）活性を増加させることによって、抗微生物剤に対する細菌（単数または複数）の感受性または感度を増加させる。特定の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、抗微生物剤単独と比べて、約または少なくとも約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900、もしくは1000%もしくはそれを超えて（すべての整数およびその間の範

10

20

30

40

50

囲を含めた)、または抗微生物剤単独と比べて、約または少なくとも約2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、200、300、400、500、1000倍もしくはそれを超えて(すべての整数およびその間の範囲を含めた)感受性または感度を増加させる。一部の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、抗微生物剤単独と比べて、所与の細菌の抗微生物剤に対する感受性または感度を相乗的に増加させる。

#### 【0221】

一部の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、抗微生物剤単独と比べて、標的化されている細菌(単数または複数)に対する抗微生物剤の最小発育阻止濃度(MIC)を低減させる。「最小発育阻止濃度」または「MIC」は、一晚(*in vitro*)のインキュベーション後の微生物の目に見える成長を阻害する抗微生物剤の最も低い濃度を指す。最小発育阻止濃度は、抗微生物剤に対する微生物の耐性を確認し、また新たな抗微生物剤の活性をモニターするために診断検査室において重要である。MICは一般に、細菌性生物に対する抗微生物剤の活性の最も基本的な実験室測定値と見なされる。このように、ある特定の実施形態では、オリゴマーは、細菌(単数または複数)に対する抗微生物剤の最小発育阻止濃度(MIC)を、抗微生物剤単独と比べて少なくとも約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900、もしくは1000%またはそれを超えて(すべての整数およびその間の範囲を含めた)低減させる。ある特定の実施形態では、オリゴマーは、細菌(単数または複数)に対する抗微生物剤の最小発育阻止濃度(MIC)を、抗微生物剤単独に対して約または少なくとも約2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、200、300、400、500、1000倍またはそれを超えて(すべての整数およびその間の範囲を含めた)低減させる。一部の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、抗微生物剤単独と比べて、標的化される細菌(単数または複数)に対する抗微生物剤のMICを相乗的に低下させる。

#### 【0222】

一部の実施形態では、感度を増加させるかまたはMICを低下させるアンチセンスオリゴマーはb1aTに対して標的化され、細菌は、B1aTを含むまたは発現する*Escherichia coli*または*Acinetobacter* spp.であり、抗微生物剤は、セファロスポリン、ペニシリン、ペニシリン誘導体(ペナム)またはアンピシリンなどのベータ-ラクタムである。

#### 【0223】

一部の実施形態では、感度を向上させるかまたはMICを低下させるアンチセンスオリゴマーはcm1に対して標的化され、細菌は、Cm1を含むまたは発現する*Escherichia coli*または*Acinetobacter* spp.であり、抗微生物剤は、クロラムフェニコールである。

#### 【0224】

特定の実施形態では、感度を向上させるかまたはMICを低下させるアンチセンスオリゴマーはadeAに対して標的化され、細菌は、AdeAを含むまたは発現する*Escherichia coli*または*Acinetobacter baumannii*であり、抗微生物剤は、アミノグリコシド系抗生物質(例えば、 Tobramycin、Gentamicin、 Kanamycin、Amikacin、Gibekacin、Sisomicin、Netilmicin、Neomycin B、Neomycin C、Neomycin E (Paromomycin)、Streptomycin)、テトラサイクリン系抗生物質(例えば、Tetracycline、Chlortetracycline、Oxitetraacycline、Demeclocycline、Rimethacycline、Meclocycline、Metacycline、Minocycline、Roxithromycin、Doxithromycin)、または -ラクタム系抗生物質(例えば、カルバペネム、ペニシリン誘導体(ペナム)、セファロ



スポリン（セフェム）、モノバクタム）である。

【0225】

特定の実施形態では、感度を向上させるかまたはMICを低下させるアンチセンスオリゴマーはaccAに対して標的化され、細菌は、AccAを含むまたは発現する*Escherichia coli*または*Acinetobacter baumannii*であり、抗微生物剤は、アミノグリコシド系抗生物質（例えば、トブラマイシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、アミカシン、ジベカシン、シソマイシン、ネチルマイシン、ネオマイシンB、ネオマイシンC、ネオマイシンE（パロモマイシン）、ストレプトマイシン）、テトラサイクリン系抗生物質（例えば、テトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、デメクロサイクリン、リメサイクリン、メクロサイクリン、メ

10

【0226】

特定の実施形態では、感度を向上させるかまたはMICを低下させるアンチセンスオリゴマーはmurAに対して標的化され、細菌は、MurAを含むまたは発現する*Escherichia coli*または*Acinetobacter baumannii*であり、抗微生物剤は、アミノグリコシド系抗生物質（例えば、トブラマイシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、アミカシン、ジベカシン、シソマイシン、ネチルマイシン、ネオマイシンB、ネオマイシンC、ネオマイシンE（パロモマイシン）、ストレプトマイシン）、テトラサイクリン系抗生物質（例えば、テトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、デメクロサイクリン、リメサイクリン、メクロサイクリン、メ

20

【0227】

特定の実施形態では、感度を向上させるかまたはMICを低下させるアンチセンスオリゴマーはrpmBに対して標的化され、細菌は、RpmBを含むまたは発現する*Escherichia coli*または*Acinetobacter baumannii*であり、抗微生物剤は、アミノグリコシド系抗生物質（例えば、トブラマイシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、アミカシン、ジベカシン、シソマイシン、ネチルマイシン、ネオマイシンB、ネオマイシンC、ネオマイシンE（パロモマイシン）、ストレプトマイシン）、テトラサイクリン系抗生物質（例えば、テトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、デメクロサイクリン、リメサイクリン、メクロサイクリン、メ

30

【0228】

特定の実施形態では、感度を向上させるかまたはMICを低下させるアンチセンスオリゴマーはadkに対して標的化され、細菌は、Adkを含むまたは発現する*Escherichia coli*または*Acinetobacter baumannii*であり、抗微生物剤は、アミノグリコシド系抗生物質（例えば、トブラマイシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、アミカシン、ジベカシン、シソマイシン、ネチルマイシン、ネオマイシンB、ネオマイシンC、ネオマイシンE（パロモマイシン）、ストレプトマイシン）、テトラサイクリン系抗生物質（例えば、テトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、デメクロサイクリン、リメサイクリン、メクロサイクリン、メ

40

【0229】

50

特定の実施形態では、感度を向上させるかまたはMICを低下させるアンチセンスオリゴマーはinfAに対して標的化され、細菌は、InfAを含むまたは発現するEscherichia coliまたはAcinetobacter baumanniiであり、抗微生物剤は、アミノグリコシド系抗生物質（例えば、 Tobramycin、Gentamicin、カナマイシン、アミカシン、ジベカシン、シソマイシン、ネチルマイシン、ネオマイシンB、ネオマイシンC、ネオマイシンE（パロモマイシン）、ストレプトマイシン）、テトラサイクリン系抗生物質（例えば、テトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、デメクロサイクリン、リメサイクリン、メクロサイクリン、メタサイクリン、ミノサイクリン、ロリテトラサイクリン、ドキシサイクリン、または - ラクタム系抗生物質（例えば、カルバペネム、ペニシリン誘導体（ペナム）、セファロスポリン（セフェム）、モノバクタム）である。

10

#### 【0230】

特定の実施形態では、感度を向上させるかまたはMICを低下させるアンチセンスオリゴマーはftsZに対して標的化され、細菌は、FtsZを含むまたは発現するEscherichia coliまたはAcinetobacter baumanniiであり、抗微生物剤は、アミノグリコシド系抗生物質（例えば、 Tobramycin、Gentamicin、カナマイシン、アミカシン、ジベカシン、シソマイシン、ネチルマイシン、ネオマイシンB、ネオマイシンC、ネオマイシンE（パロモマイシン）、ストレプトマイシン）、テトラサイクリン系抗生物質（例えば、テトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、デメクロサイクリン、リメサイクリン、メクロサイクリン、メタサイクリン、ミノサイクリン、ロリテトラサイクリン、ドキシサイクリン、または - ラクタム系抗生物質（例えば、カルバペネム、ペニシリン誘導体（ペナム）、セファロスポリン（セフェム）、モノバクタム）である。

20

#### 【0231】

特定の実施形態では、感度を向上させるかまたはMICを低下させるアンチセンスオリゴマーはrpoDに対して標的化され、細菌は、RpoDを含むまたは発現するEscherichia coliまたはAcinetobacter baumanniiであり、抗微生物剤は、アミノグリコシド系抗生物質（例えば、 Tobramycin、Gentamicin、カナマイシン、アミカシン、ジベカシン、シソマイシン、ネチルマイシン、ネオマイシンB、ネオマイシンC、ネオマイシンE（パロモマイシン）、ストレプトマイシン）、テトラサイクリン系抗生物質（例えば、テトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、デメクロサイクリン、リメサイクリン、メクロサイクリン、メタサイクリン、ミノサイクリン、ロリテトラサイクリン、ドキシサイクリン、または - ラクタム系抗生物質（例えば、カルバペネム、ペニシリン誘導体（ペナム）、セファロスポリン（セフェム）、モノバクタム）である。

30

#### 【0232】

特定の実施形態では、感度を向上させるかまたはMICを低下させるアンチセンスオリゴマーはaroCに対して標的化され、細菌は、AroCを含むまたは発現するEscherichia coliまたはAcinetobacter baumanniiであり、抗微生物剤は、アミノグリコシド系抗生物質（例えば、 Tobramycin、Gentamicin、カナマイシン、アミカシン、ジベカシン、シソマイシン、ネチルマイシン、ネオマイシンB、ネオマイシンC、ネオマイシンE（パロモマイシン）、ストレプトマイシン）、テトラサイクリン系抗生物質（例えば、テトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、デメクロサイクリン、リメサイクリン、メクロサイクリン、メタサイクリン、ミノサイクリン、ロリテトラサイクリン、ドキシサイクリン、または - ラクタム系抗生物質（例えば、カルバペネム、ペニシリン誘導体（ペナム）、セファロスポリン（セフェム）、モノバクタム）である。

40

#### 【0233】

##### VI. 処置をモニターする方法

本明細書に記載の方法が関与する所与の治療レジメンの有効性は、例えば、細菌感染の

50

一般指標、例えば、全血球計算（ＣＢＣ）、核酸検出方法、免疫診断試験、または細菌培養によってモニターされ得る。

【０２３４】

一部の態様では、細菌感染の同定およびモニタリングは、（１）核酸検出方法、（２）血清学的検出方法、すなわち、従来の免疫アッセイ、（３）培養方法、および（４）生化学的方法の１つまたは複数が関与する。このような方法は、定性的または定量的であり得る。

【０２３５】

核酸プローブは、公に利用可能である細菌核酸配列に基づいて設計してもよく、特定の細菌タイプ、例えば、特定の種もしくは株に特異的であるか、または細菌の１つ超の種もしくはタイプに共通していてもよい（すなわち、グラム陽性菌またはグラム陰性菌）、細菌感染を示す標的遺伝子または代謝物（すなわち、毒素）を検出するために使用され得る。核酸増幅検査（例えば、ＰＣＲ）をまた、このような検出方法において使用し得る。

【０２３６】

血清学的同定は、生物標本、例えば、糞便、尿、脳脊髄液、血液などから単離した細菌試料または培養物を使用して達成され得る。細菌の検出のための免疫アッセイは一般に、当業者が通例通り用いる方法、例えば、ＥＬＩＳＡまたはウエスタンブロットによって行われる。さらに、特定の細菌株または細菌種に対して特異的なモノクローナル抗体は、商業的に利用可能であることが多い。

【０２３７】

培養方法を使用して、これらに限定されないが、好気性培養対嫌気性培養、様々な培養条件下での成長および形態を含めた技術を用いることによって、特定のタイプの細菌を単離および同定し得る。例示的な生化学的試験は、グラム染色（Ｇｒａｍ、１８８４年；グラム陽性菌は濃青色に染まり、そしてグラム陰性細菌は赤色に染まる）、酵素的分析、ならびにファージタイピングを含む。

【０２３８】

このような診断試験および定量試験、ならびに細菌感染を示す他の生理学的因子の正確な性質は、細菌標的、処置される状態、および処置が予防的または治療的であるかどうかによって変化することが理解される。

【０２３９】

被験体が特定のタイプの細菌感染を有すると診断された場合において、細菌感染の状態はまた、典型的には、処置を受けている特定のタイプの細菌感染をモニターするために当業者が使用する診断技術を使用してモニターされる。

【０２４０】

ＰＭＯまたはＰＰＭＯ処置レジメンは、処置を受けている被験体の免疫アッセイ、他の生化学的試験および生理学的検査の結果に基づいて、示したように調節（用量、頻度、経路など）され得る。

【０２４１】

上記から、どのように本開示の様々な目的および特色が満たされるかが認識される。方法は、増進された細胞取込みおよび抗細菌作用を達成する抗ａｃｐＰアンチセンスオリゴマーを使用して、細菌感染、例えば、多剤耐性（ＭＤＲ）細菌に対する療法において改善を提供する。その結果、必要とされる化合物の価格および量の両方に関して、薬物療法はより有効であり、より安価である。

【０２４２】

１つの例示的な態様は、実質的に任意の病原性細菌に対して有効な化合物を、例えば、新たな薬物耐性株に対する迅速な応答のために容易に設計および試験することができることである。

【０２４３】

下記の実施例は、本開示を例示することを意図するが、本開示を限定することを意図しない。本明細書において言及する特許および非特許参照文献のそれぞれは、参照によりそ

10

20

30

40

50

の全体が組み込まれている。

#### 【実施例】

##### 【0244】

##### 材料および方法

ペプチドにコンジュゲートしたホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー。PPMOは、既に記載されている通り、Sarepta Therapeutics Inc. (Cambridge, MA、米国)において合成して精製した(Tilleyら、Antimicrob Agents Chemother 50巻:2789~2796頁、2006年)。凍結乾燥したPPMOを超高純度水に溶解し、滅菌濾過した。PPMOペプチドは、示されているオリゴマー配列の5'または3'末端のどちらかに付着した。

10

##### 【0245】

細菌。特に明記されていない限り、細菌の株はUT Southwesternの臨床微生物学研究所から得た。株は、ATCC、E. coli Genetic Stock Center (Yale University)から購入したもの、または共同研究者から提供されたものも含んだ。それらの株は、ゲノムが配列決定された分離株と様々なレベルの抗生物質耐性を有する臨床分離株の両方を含んだ。単一コロニーをミューラーヒントン陽イオン調整(MHII)ブロス(Becton-Dickinson Difco BBL, Franklin Lakes, NJ、米国)中で、固定相(1~2 mL、37、250 rpm)に好氣的に成長させた。OD600をとり、個々の株のコロニー形成単位(CFU)/mL/ODに基づいて、 $5 \times 10^5$ の作業用ストック液を生成した。作業用ストック液は150 mM NaClに希釈し、トリプチックソイ寒天w/5%ヒツジ血液プレート(Remel, Lenexa, KS)上で平板培養して、開始濃度を確認した。最少栄養条件に関しては、E. coliをMOPS最少培地(Neidhartら、J Bacteriol、119巻:736~747頁、1974年)中でインキュベートし、Acinetobacterを10 mMクエン酸塩を含むAB最少培地(Agrobacterium最少培地)(Clark、J Mol Biol 23巻:99~112頁、1967年)で行った。

20

##### 【0246】

最小阻害濃度アッセイ。最小阻害濃度(MIC)アッセイは、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)によって記載されている微量希釈法を使用して、ミューラーヒントンII培地中で行った。培養物の光学密度(OD)は、595~600 nmでマイクロプレート分光光度計で読み取った。37の好氣的成長(200~250 rpm)を18~20時間行った後、 $< 0.06$ のODを含む100  $\mu$ lの培養物を成長なしとして点数化した。抗生物質は、Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO、米国)から購入した。

30

##### 【0247】

最小殺菌濃度アッセイ。最小殺菌濃度(MBC)アッセイはMICとして行い、アリコートを開封した時点で採取して150 mM NaClに希釈し、平板培養した。プレートを18時間、インキュベートし、コロニーを数えた。PPMOのIC<sub>75</sub>を、試験した株の75%におけるMIC値として定義した。

40

##### 【0248】

透過型電子顕微鏡検査(TEM)。指定した時間点において、細菌の試料を遠心分離して、ハンクス平衡塩類溶液(HBSS-) (Life Technologies, Gibco, Grand Island, NY、米国)で洗浄し、1/2 Karnovsky固定液(4%パラホルムアルデヒド、2.5%グルタルアルデヒドおよび0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液)に再懸濁し、Electron Microscopy Core Facility UT Southwestern Medical Center, Dallas, TXによって処理するまで、4で保管した。TEMグリッドを調べ、画像はFEI Tecnai G2 Spirit Biotwin顕微鏡(FEI Company, Hillsboro, OR、米国)で取り込んだ。

50

## 【0249】

相乗作用の研究。MICは、96ウェルプレートで、PPMOおよび古典的な抗生物質（示した通り）で行った。PPMOは、プレートで最初に水平方向に希釈し、古典的な抗生物質をプレートの列を横切って希釈した。阻害は目視観察およびOD600（Berenbaumら、J Antimicrob Chemother 12巻：555～563頁、1983年およびBerenbaum、J Infect Dis 137巻：122～130頁、1978年を参照されたい）によって決定した。コロニー数の決定に関しては、標的生物のアリコートをもとの濃度のPPMO、慣用的な抗生物質、または両方の組み合わせとともにインキュベートし、37℃で成長させて、250rpmで遠心分離した。培養物を0および24時間の時間点で、150mM NaClに希釈し、平板培養して、次に、コロニーを数えた。相乗作用は、記載されているイソボール（isobole）法を使用して定量した（Tallarida、Genes Cancer 2巻：1003～8頁、2011年を参照されたい）：（抗生物質の有効濃度/MIC）+（PPMOの有効濃度/PPMOのMIC）。1未満の計算値が相乗作用を示した。

10

## 【0250】

グラフィカルソフトウェア。標準偏差およびグラフ分析は、GraphPad Prism（登録商標）6ソフトウェア（GraphPad Software, Inc., San Diego, CA、米国）で行った。

## 【0251】

（実施例1）

E. coliのacpPに対して標的化されるPPMOの活性

E. coliのacpP遺伝子に対して標的化される、細胞透過性ペプチドにコンジュゲートしたホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー（PPMO）を調製し、その効力を、E. coliの多剤耐性株（AIS070834）に対してin vitroで評価した。

20

## 【0252】

acpP標的化PPMO#2は、以下の配列：5'-CTTCGATAGTG-3'（配列番号1）を有する。PPMOは、その3'末端で、(RXR)<sub>4</sub>XB（配列番号59）のC末端ベータ-アラニンにコンジュゲートした。

30

## 【0253】

acpP標的化PPMO（1μM）は、単独で、またはトブラマイシン（2μg/ml）との組み合わせのどちらかで細菌培養物に加えた。PPMOスクランブル対照（1μM）、ペプチド対照（1μM）およびトブラマイシン（2μg/ml）を個別にまたは様々な組み合わせで、細菌培養物に加えた。コロニー形成単位（CFU）は24時間で計数した。

## 【0254】

図2Aに示されている通り、acpP標的化PPMO#2により、スクランブルPPMO対照およびペプチド対照に比べて、E. coliの多剤耐性株の細菌の成長（コロニー形成単位；CFU）が約1log低下しただけではなく、トブラマイシンと組み合わせると、対照に比べて、細菌の成長が4logを超えて相乗的に低下した。トブラマイシンおよび対照PPMO（単独または組み合わせのどちらも）は、細菌の成長に対して有意な効果を有しなかった。

40

## 【0255】

（実施例2）

トブラマイシンのMICに対するacpP標的化PPMOの効果

E. coliの多剤耐性株（AIS070834）に対するトブラマイシンの最小発育阻止濃度（MIC）への効果について、PPMOを試験した。

## 【0256】

acpP標的化PPMO#1は、以下の配列：5'-CTTCGATAGTG-3'（

50

配列番号 1) を有する。PPMO を、その 5' 末端で、(RXR)<sub>4</sub>XB (配列番号 59) の C 末端ベータ - アラニンにコンジュゲートした。

【0257】

トブラマイシンの MIC は、96 ウェルマイクロタイタープレートフォーマットにおいて、Clinical Laboratory Standards Institute の微量希釈法を使用して測定した。各マイクロタイタープレートには、トブラマイシンの複数の同一希釈系列が含まれた。トブラマイシンの各希釈系列において、固定量の PPMO を加えた。抗生物質の各希釈系列は、様々な濃度の PPMO を含んだ。結果を図 2B ~ 2C に示す。

【0258】

図 2B (線形目盛) および図 2C (対数目盛) は、acpP 標的化 PPMO # 1 の量を増加させることにより、E. coli の多剤耐性株に対してトブラマイシンの最小発育阻止濃度 (MIC) が濃度依存的に有意に低下したことを示す。

【0259】

(実施例 3)

A. baumannii の acpP に対して標的化される PPMO の活性

A. baumannii の acpP 遺伝子に対して標的化される、細胞透過性ペプチドにコンジュゲートしたホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー (PPMO) を調製し、その効力を、A. baumannii (AYE) の多剤耐性株に対して *in vitro* で評価した。

【0260】

acpP 標的化 PPMO # 7 は、以下の配列: 5' - ATATCGCTCAC - 3' (配列番号 2) を有する。PPMO を、その 3' 末端で (RXR)<sub>4</sub>XB (配列番号 59) の C 末端ベータ - アラニンにコンジュゲートした。

【0261】

acpP 標的化 PPMO # 7 (2 μM) を、単独で、またはコリスチン (0.25 μg/ml)、メロペネム (0.5 μg/ml) もしくはトブラマイシン (2 μg/ml) との組み合わせのどちらかで細菌培養物に加えた。PPMO スクランブル対照 (2 μM)、コリスチン (0.25 μg/ml)、メロペネム (0.5 μg/ml) およびトブラマイシン (2 μg/ml) を個別にまたは様々な組み合わせで、細菌培養物に加えた。コロニー形成単位 (CFU) は 24 時間で計数した。結果を図 3 ~ 5 に示す。

【0262】

図 3 は、acpP 標的化 PPMO # 7 により、スクランブル PPMO 対照に比べて、A. cinetobacter baumannii (AYE) の多剤耐性株の細菌の成長 (コロニー形成単位; CFU) が約 6 log 低下しただけではなく、コリスチンと組み合わせると、細菌の成長が検出不能なレベル (acpP 標的化 PPMO 単独と比べて、さらに約 3 log) まで相乗的に低下したことを示す。コリスチンおよび対照 PPMO (単独または組み合わせのどちらも) は、細菌の成長に対するこの有意な効果を有していなかった。

【0263】

図 4 は、acpP 標的化 PPMO # 7 により、スクランブル PPMO 対照に比べて、A. cinetobacter baumannii (AYE) の多剤耐性株の細菌の成長 (コロニー形成単位; CFU) が約 5 log 低下しただけではなく、メロペネムと組み合わせると、細菌の成長が acpP 標的化 PPMO 単独と比べて、さらに約 2 log、相乗的に低下したことを示す。メロペネムおよび対照 PPMO (単独または組み合わせのどちらも) は、細菌の成長に対するこの有意な効果を有していなかった。

【0264】

図 5 は、acpP 標的化 PPMO # 7 により、スクランブル PPMO 対照に比べて、A. cinetobacter baumannii (AYE) の多剤耐性株の細菌の成長 (コロニー形成単位; CFU) が約 6 log 低下しただけではなく、トブラマイシンと組み

10

20

30

40

50

合わせると、細菌がa c p P 標的化 P P M O 単独と比べて、さらに約 1 l o g、相乗的に低下したことを示す。トブラマイシンおよび対照 P P M O（単独または組み合わせのどちらも）は、細菌の成長に対するこの有意な効果を有していなかった。

#### 【 0 2 6 5 】

（実施例 4）

抗生物質の M I C に対する a c p P 標的化 P P M O の効果

A c i n e t o b a c t e r b a u m a n n i i ( A Y E ) および E . c o l i A I S 0 7 0 8 3 4 の多剤耐性株に対する、コリスチン、メロペネムおよびトブラマイシンの最小発育阻止濃度 ( M I C ) への効果について、実施例 3 からの P P M O # 7 を試験した。

10

#### 【 0 2 6 6 】

抗生物質コリスチン、メロペネム、およびトブラマイシンの M I C を、96 ウェルマイクロタイタープレートフォーマットの C l i n i c a l L a b o r a t o r y S t a n d a r d s I n s t i t u t e の微量希釈法を使用して測定した。各抗生物質の複数の同一の希釈系列を、各マイクロタイタープレート上に含めた。抗生物質の各希釈系列において、固定量の P P M O を加えた。抗生物質の各希釈系列は、異なる濃度の P P M O を含んだ。結果を図 3 ~ 8 に示す。

#### 【 0 2 6 7 】

図 6 は、a c p P 標的化 P P M O # 7 の量を増加させることにより、A c i n e t o b a c t e r b a u m a n n i i ( A Y E ) の多剤耐性株に対するコリスチンの M I C が濃度依存的に有意に低下したことを示す。2  $\mu$  M の P P M O の存在下で、コリスチンの M I C は、1  $\mu$  g / m L から 0 . 2 5  $\mu$  g / m L まで低下し（図 3 も参照されたい）、相乗作用は 0 . 7 5 であった。

20

#### 【 0 2 6 8 】

図 7 は、a c p P 標的化 P P M O # 7 の量を増加させても、A c i n e t o b a c t e r b a u m a n n i i ( A Y E ) の多剤耐性株に対するメロペネムの M I C が濃度依存的に有意に低下したことを示す。P P M O の非存在下で、メロペネムの M I C は 2  $\mu$  g / m L であり、これは、4  $\mu$  M の P P M O が存在する場合、0 . 2 5  $\mu$  g / m L まで低下した（図 4 も参照されたい）。メロペネムと a c p P 標的化 P P M O との間の相乗作用は 0 . 7 5 であった。

30

#### 【 0 2 6 9 】

この効果は、相乗作用がアミノグリコシド系のトブラマイシンの場合にも認められたので、細菌の膜構造に影響を及ぼした抗生物質に限定されるものではなかった。図 8 は、a c p P 標的化 P P M O # 7 の量を増加させることにより、A c i n e t o b a c t e r b a u m a n n i i ( A Y E ) の多剤耐性株に対してトブラマイシンの M I C が濃度依存的に有意に低下したことを示す。P P M O の非存在下で、トブラマイシンの M I C は 6 4  $\mu$  g / m L であった。M U C は、4  $\mu$  M の P P M O の存在下で、2  $\mu$  g / m L まで低下した（図 5 も参照されたい）。トブラマイシンと a c p P 標的化 P P M O との間の相乗作用は 0 . 6 2 5 であった。

#### 【 0 2 7 0 】

試験したすべての抗生物質に関して、P P M O または抗生物質単独のどちらか一方と比較して、P P M O を抗生物質と組み合わせた場合、少なくとも 1 l o g の C F U / m L に対応する低下があった。8  $\mu$  M またはそれ未満のスクランブル P P M O は、単独では活性を示さず、試験した抗生物質と相乗作用も示さなかった。

40

#### 【 0 2 7 1 】

a c p P ( P P M O # 1 ) と同じ 3 種の抗生物質との間の同様の相乗作用が、E . c o l i 株 A I S 0 7 0 8 3 4（図 1 2 A ~ 1 2 F を参照されたい）において認められた。図 1 2 A ~ 1 2 B はコリスチンの結果を示し、図 1 2 C ~ 1 2 D はメロペネムの結果を示し、図 1 2 E ~ 1 2 F はトブラマイシンの結果を示す。すべての場合において、a c p P 標的化 P P M O により、試験した抗生物質の M I C が有意に低下した。遊離ペプチド ( R X

50

R) 4 X B も試験し、それ自体は、測定不能な M I C ( データは図示せず ) を有した。

【 0 2 7 2 】

( 実施例 5 )

必須遺伝子を標的化する P P M O は、A c i n e t o b a c t e r s p p . および E . c o l i の i n v i t r o での成長を阻害する

A c i n e t o b a c t e r s p p . および E . c o l i の i n v i t r o での成長を阻害する能力について、a c p P に対して標的化される P P M O を試験した。細菌株ならびに培養およびアッセイ条件は、上記の材料および方法のセクションに記載されている。

【 0 2 7 3 】

10

M I C は、上記の両方の属の細菌について、富培地および最少培地の両方で行った。E . c o l i ( 約 2 2 株 ) および A c i n e t o b a c t e r s p p . ( 約 3 4 株 ) のパネルは、以下の表 E 1 に示されている通り、薬物感受性株と多剤耐性株の両方を含んだ。



【表 4】

表 E1			
病原体	株	特徴	供給源
<i>E. coli</i>	W3110	非病原性, K-12	E. coli Genetics Stock Center, New Haven, CT
<i>E. coli</i>	SMS-3-5	MDR	ATCC
<i>E. coli</i>	CVB-1	NDM1 産生体	G. Rossolini, University of Siena, Italy
<i>E. coli</i>	BCT-B-036NDM-1	NDM1 産生体	P. Nordmann, Hopital de Bicetre, Paris
<i>E. coli</i>	NDM1-E	NDM1 産生体	S. Poutanen, Mt. Sinai Hospital, Toronto
<i>E. coli</i>	BAA-196	ESBL, TEM-10	ATCC
<i>E. coli</i>	BAA-200	MDR, SVH-4	ATCC
<i>E. coli</i>	BAA-202	ESBL, セフトジジム (ceftazidime)耐性	ATCC
<i>E. coli</i>	ATCC700928	UTI, 配列決定されているゲノム	ATCC
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	MIC 感受性に対する対照株	ATCC
<i>E. coli</i>	E2348/69	EPEC	J. Kaper, University of Maryland, Baltimore, MD
<i>E. coli</i>	1001728	NDM1 産生体	J. K. Rasheed, CDC, Atlanta, GA
<i>E. coli</i>	1101851	NDM1 産生体	J. K. Rasheed, CDC, Atlanta, GA
<i>E. coli</i>	AIS070834	NDM1 産生体	J. K. Rasheed, CDC, Atlanta, GA
<i>E. coli</i>	AI071077	NDM1 産生体	J. K. Rasheed, CDC, Atlanta, GA
<i>A. baumannii</i>	BAA-1710	MDR, 配列決定されているゲノム	ATCC
<i>A. baumannii</i>	BAA-1709	配列決定されているゲノム	ATCC
<i>A. baumannii</i>	AB0057	MDR	Todd Hoopman, UTSW
<i>A. baumannii</i>	ATCC 17978	配列決定されているゲノム	ATCC
<i>A. baumannii</i>	ATCC 17961		ATCC
<i>A. baumannii</i>	ATCC 17906		ATCC
<i>A. baumannii</i>	AYE (pNDM-1)	NDM-1 を有する AYE	Bruce Geller, OSU
<i>A. baumannii</i>	BCT-13-026NDM-1	NDM1 産生体	P. Nordmann, Hopital de Bicetre, Paris
<i>A. baumannii</i>	ATCC 19606	配列決定されているゲノム	ATCC
<i>A. iwoffii</i>	ATCC 17976	配列決定されているゲノム	ATCC
<i>A. baumannii</i>	HUMC-1		Brad Spellberg, USC

## 【 0 2 7 4 】

使用した P P M O のすべておよびそれらの配列の一覧表示が提供されている (表 3 A ~ B)。P P M O は、脂肪酸、リボポリサッカライドまたはペプチドグリカン生合成を含めた、様々な経路における、公知のまたは推定上の必須の細菌遺伝子に対して設計した。使用した培地に関わりなく、アシルキャリアータンパク質 (A c p P) に標的化される P P M O は、*E. coli* と *Acinetobacter* の両方において、最良の *in vitro* 阻害を示した。M H I I では、6 種の P P M O が *E. coli* において最も活性で

10

20

30

40

50

あり、4  $\mu$ M またはそれ未満の  $IC_{75}$  であった (図 13 A)。6 種のうちの 5 種はすべて、*acpP* に標的化され、差異は標的上の様々なペプチド付着または位置に関するものであった。*acpP* PPMO は、 $IC_{75}$  が 1 ~ 4  $\mu$ M の範囲の MIC を有した。他の活性な PPMO は *murA* を標的化し、 $IC_{75}$  が 4  $\mu$ M の MIC を有した。

#### 【0275】

細菌の遺伝子が必須かどうかの決定は、細菌を成長させた培地に基づいて、変動し得る。MOPS 最少培地において、15 種の *E. coli* 株をスクリーニングした (図 13 B)。このスクリーニングにより、 $IC_{75}$  が、4  $\mu$ M またはそれ未満の MIC を有する PPMO の数が 10 種に増加した。10 種のうちの 6 種が、MHII 培地において有効であることが分かった PPMO となったが、MIC 値は改善され、最も強力な *acpP* PPMO は  $IC_{75}$  が 0.5  $\mu$ M の MIC を有した。追加の強力な PPMO が同定され、遺伝子標的: *rpmB* (組換えリボソームタンパク質遺伝子;  $IC_{75}$  の MIC が 0.5 および 1  $\mu$ M)、*adk* (アデニル酸キナーゼ遺伝子;  $IC_{75}$  の MIC が 2  $\mu$ M) および *infA* (抗転写終結遺伝子;  $IC_{75}$  の MIC が 4  $\mu$ M) を含んだ。

#### 【0276】

*Acinetobacter* では、*acpP* PPMO #6 および #7 は、富栄養 MHII 培地において、それぞれ、 $IC_{75}$  の MIC が 2 ~ 4  $\mu$ M を有した。これらの PPMO は、オリゴマーの 5' (PPMO #6) 末端または 3' (PPMO #7) 末端上の同一ペプチドの位置決めだけが異なった (図 13 C)。*E. coli* において認められた通り、最少培地中で試験した *Acinetobacter* では、*in vitro* で活性を示した PPMO の数が増加した。MHII 中で活性であった 2 種と合わせて、4 種の追加の *acpP* PPMO が活性を有することが分かり、 $IC_{75}$  は 2 ~ 4  $\mu$ M の範囲の MIC であった。AB 最少培地において、 $IC_{75}$  が 4  $\mu$ M を有する *ftsZ* (細胞分裂 Z 環) および  $IC_{75}$  が 4  $\mu$ M を有する *accA* (アセチル補酵素 A カルボキシラーゼのカルボキシルトランスフェラーゼアルファサブユニット) を含め、さらなる遺伝子標的を同定した (図 13 D)。

#### 【0277】

最少培地における PPMO の活性の増強が MDR 株においても同様に維持され、*E. coli* W3110、ならびに *A. baumannii* AYE および 0057 は、富培地と比較した場合の 1 ~ 2 分の 1 である MIC 値を有した (図 13 A ~ D; 図 9 A ~ 9 C; 図 10 A ~ 10 C; および 図 12 A ~ 12 C を参照されたい)。

#### 【0278】

図 9 A は、*acpP* (PPMO #1)、*acpP* (PPMO #2)、*acpP* (PPMO #3)、*acpP* (PPMO #4)、*acpP* (PPMO #5)、*murA* (PPMO #24)、およびスクランブル (Scr) 対照で攻撃した *E. coli* W3110 の結果を示す。図 9 B ~ 9 C は、それぞれ、*acpP* (PPMO #7)、*acpP* (PPMO #8)、*acpP* (PPMO #13)、*acpP* (PPMO #14)、*ftsZ* (PPMO #33)、*ftsZ* (PPMO #34)、*rpmB* (PPMO #29) およびスクランブル (Scr) 対照で攻撃した *A. baumannii* AYE (9 B) および *A. baumannii* 0057 (9 C) の結果を示す。

#### 【0279】

PPMO は、動態 MBC アッセイにより測定される通り、多剤耐性 (MDR) 株において殺菌性でもあった。様々な濃度の PPMO の存在下または非存在下で、MDR 株である *E. coli* 1101851、*A. baumannii* AYE および *A. baumannii* 0057 を成長させて、試料を様々な時間点で平板培養し、存在している生存細菌の量を決定した (上記の MBC アッセイ)。結果を図 10 A ~ 10 C に示す。多剤耐性があるかに関わらず、PPMO は、時間依存的死滅と濃度依存的死滅の両方を実証した。1 ~ 2  $\mu$ M の濃度の PPMO により、2 時間までに、*E. coli* 1101851 において 4 log よりも大きく生存度が低下した (図 10 A)。8 時間までに、0.0625  $\mu$ M またはそれ超の試験した濃度のすべてが殺菌性であり、検出限界未満であった。

## 【0280】

PPMOは、*A. baumannii*株AYEおよびAB0057においても、時間依存的死滅と濃度依存的死滅の両方を実証したが、*E. coli*における場合よりも、PPMOの濃度が高く、死滅速度も遅かった。24時間では、試験した両方の株において、acpP標的化PPMO (PPMO#7)は殺菌性であり、 $> 4 \mu\text{M}$ のPPMO濃度では、検出限界未満であった (図10B~10C)。同じペプチドに連結しているスクランブルオリゴ配列を有するPPMO (Scr - (RXR)4)は、いずれの株に対しても効果はなかった (図10A~10C)。

## 【0281】

多剤耐性*E. coli*株であるAIS070834に対する、acpP標的化PPMOと3種の異なる抗生物質との間にも相乗作用が存在した (図12A~12Fを参照されたい)。コリスチン、メロペネムおよびトブラマイシンのMICは、様々な濃度のacpP標的化PPMO (PPMO#1)またはスクランブル (Scr) 対照PPMOを用いて測定した。生存細胞は、抗生物質単独、PPMO単独、またはそれらの組み合わせで24時間、培養して計数した。図12A~12Bはコリスチンの結果を示し、図12C~12Dはメロペネムの結果を示し、図12E~12Fはトブラマイシンの結果を示す。すべての場合において、acpP標的化PPMOにより、試験した抗生物質のMICが有意に低下した。遊離ペプチド (RXR)4XBも試験し、それ自体は、測定不能なMIC (データは図示せず) を有した。

## 【0282】

全体的に、これらのデータは、とりわけ、MDR株を含めた*Acinetobacter* spp. および*E. coli*のacpPおよび他の遺伝子に対して標的化されるPPMOが、臨床関連濃度 (例えば、 $IC_{75}$ が $4 \mu\text{M}$ またはそれ未満) において殺菌性であることを示す。これらのデータはまた、acpPおよび他の遺伝子に対して標的化されるPPMOが、*Acinetobacter*および*Escherichia*のMDR株において、古典的な抗生物質であるトブラマイシン、メロペネムおよびコリスチンと相乗作用を示したこと、ならびにそれらの抗生物質の効力を回復させたことを示す。したがって、PPMOは、単独で、または従来の抗生物質と相乗的に使用することができた。阻害濃度未満の抗生物質をPPMOと組み合わせて使用した場合、*A. baumannii*および*E. coli*の生存度または成長は有意に低下した。コリスチンなどの一部の抗生物質に関しては、PPMOと組み合わせると、 $> 3 \log$ の生存度低下をもたらした。

## 【0283】

## (実施例6)

*Acinetobacter*の細胞壁に対するacpP標的化PPMOの効果

透過型電子顕微鏡検査 (TEM) を使用して、acpP標的化PPMOでの攻撃後の*Acinetobacter*に対する形態変化を研究した。富栄養MHII培地 (ミューラーヒントン陽イオン調整ブロス; Becton - Dickinson Difco BBL、Franklin Lakes、NJ、米国) において、 $40 \mu\text{M}$ の濃度のacpP PPMO (PPMO#7) またはスクランブル (Scr) PPMO対照の存在下、または非存在下で、*A. baumannii* AYEを成長させた。図11Aおよび11Bは、0時間で、PPMOが何ら存在しない場合の、無傷の細胞壁および細胞質空間を有する*A. baumannii* AYEを示す。これは、Scr PPMO (図11C~11D) およびacpP PPMO (図11E~11F) の存在下の、0時間時におけるAYEにも該当した。インキュベーションの6時間後、Scr PPMOによりインキュベートした細胞 (図11I~11J) は、未処置試料のもの (図11G~11H) と区別不能であった。対照的に、acpP標的化PPMOとの6時間のインキュベーション後、細胞壁の崩壊が観察された (図11K~11L)。この崩壊は早くも3時間で認められた (データは図示せず)。これらの結果は、acp PPMOの存在下での*Acinetobacter*の細胞生存度の低下は、少なくとも一部、PPMOが細胞壁に損傷をもたらす能力によるものであることを示唆している。

## 【0284】

## (実施例7)

PPMOは従来の抗生物質との組み合わせで相乗的である

活性なPPMOと従来の抗生物質との組み合わせが、それらの効果において相加的かまたは相乗的かを決定するため、チェッカーボードMICアッセイ (checkerboard MIC assay) を行った。漸増濃度のftsZ PPMO (PPMO # 46) またはスクランブル (Scr) PPMO (Scr - 1)、および漸増濃度のコリスチン、メロペナムまたはトブラマイシンのいずれかとともに、多剤耐性E. coli AIS 070834をインキュベートした。

## 【0285】

2  $\mu$ MのftsZ PPMO存在下では、コリスチンのMICは、0.5  $\mu$ g/mLから0.05  $\mu$ g/mLまで低下した (図14A)。さらに、メロペナムのMICは、ftsZ PPMOの濃度が増加するにつれて低下した。ftsZ PPMOの非存在下では、メロペナムのMICは12  $\mu$ g/mLであり、これは、4  $\mu$ MのftsZ PPMOが存在する場合、2  $\mu$ g/mLまで低下した (図14C)。相乗作用がアミノグリコシド系のトブラマイシンの場合にも認められたので、この効果は細菌の膜構造に影響を及ぼした抗生物質に限定されるものではなかった。ftsZ PPMOの非存在下では、トブラマイシンのMICは270  $\mu$ g/mLであった。これは、2  $\mu$ MのPPMOの存在下では、ほとんど検出不能レベルにまで低下した (図14E)。試験したすべての抗生物質に関して、PPMOまたは抗生物質単独のどちらか一方と比較して、ftsZ PPMOを抗生物質と組み合わせた場合、少なくとも4 logのCFU/mLに対応する低下があった (図14B、図14D、図14F)。32  $\mu$ Mもしくはそれ未満のスクランブルPPMO、または32  $\mu$ Mもしくはそれ未満の遊離ペプチド (RXR)<sub>4</sub>XBは、単独では活性を示さず、試験した抗生物質と相乗作用も示さなかった。

## 【0286】

## (実施例8)

非必須抗生物質耐性遺伝子に標的化されるPPMOは、MDR株の従来の抗生物質に対する感受性を回復する。

PPMOによる抗生物質耐性のモジュレートは、代替的な治療戦略であり得る。概念の証拠として、特異的な非必須抗生物質耐性遺伝子を標的化するよう、PPMOを設計した。blaTは、TEMベータ-ラクタマーゼファミリーの一部であり、SMS-3-5のようなE. coliの環境株中に見出される。SMS-3-5はベータ-ラクタム系のアンピシリン (MIC > 1024  $\mu$ g/mL) に耐性であるが、漸増濃度のblaT PPMO (PPMO # 66) とインキュベートした場合、MICは、累進的に低下した (図15A)。cm1Aは、環境のE. coli株において見出される、アミノグリコシド耐性遺伝子である。SMS-3-5はクロラムフェニコール (MIC > 512  $\mu$ g/mL) に耐性であるが、漸増濃度のcm1A PPMO (PPMO # 67) とインキュベートした場合、MICもやはり、用量依存的に累進的に低下した (図15B)。

## 【0287】

PPMOによる抗生物質耐性遺伝子の妨害が他の属に有効であり得るかどうかを確認するため、AdeABC RND型多剤排出ポンプの構成成分をコードするadeAに対するPPMO (PPMO # 65) と共にA. baumannii AYEをインキュベートした。AdeABCは、アミノグリコシドを含む様々な抗生物質に耐性を与える。MHIIおよびAB最少培地の両方で、様々な濃度のトブラマイシンおよびadeA PPMOによりAYEを処置した。両方の培地において、トブラマイシン単独は64  $\mu$ g/mLのMICを有したが、adeA PPMOの濃度を増加すると、トブラマイシンのMICは有意に低下する (図16A、図16B)。8  $\mu$ MのadeA PPMOの場合、トブラマイシンのMICは、MHIIおよび最少培地において、それぞれ4  $\mu$ g/mLおよび1  $\mu$ g/mLに低下した。8  $\mu$ MでのスクランブルPPMOは、トブラマイシンのMICに対して効果を有さなかった。

【図 1 - 1】

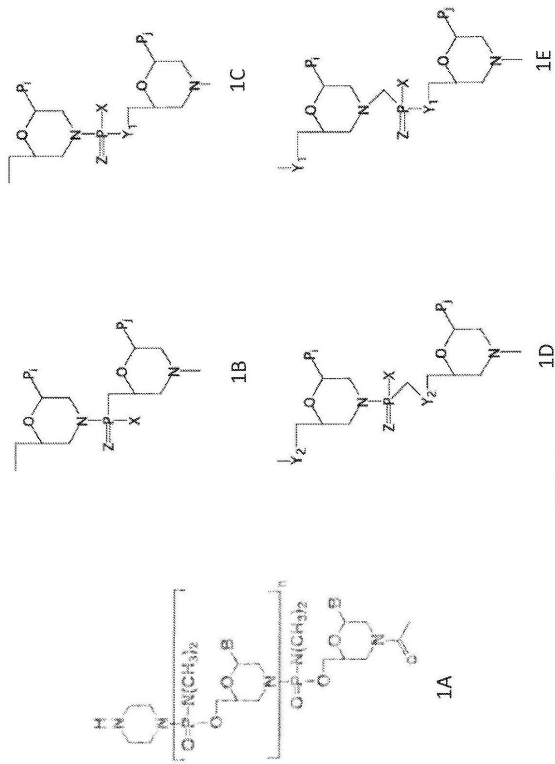


FIG. 1

【図 1 - 2】

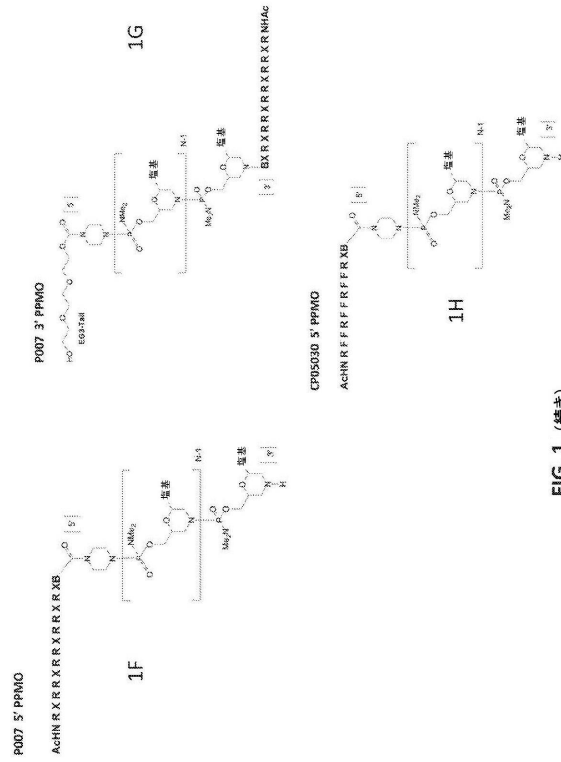


FIG. 1 (続き)

【図 2 A】

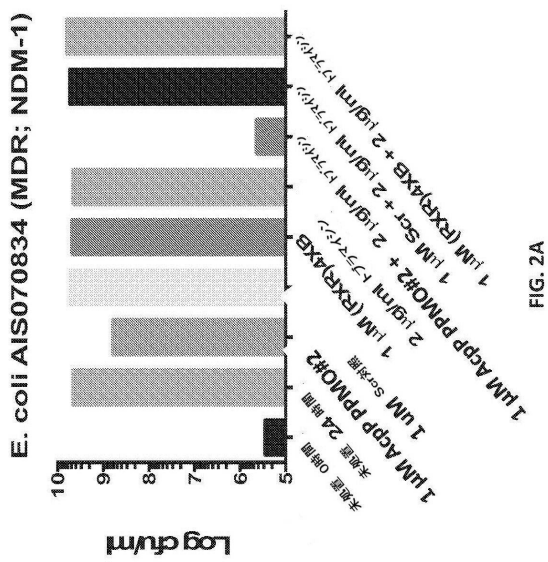


FIG. 2A

【図 2 B】

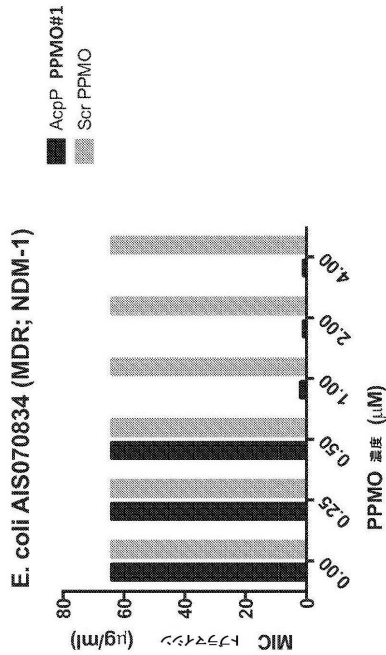


FIG. 2B

【 図 2 C 】

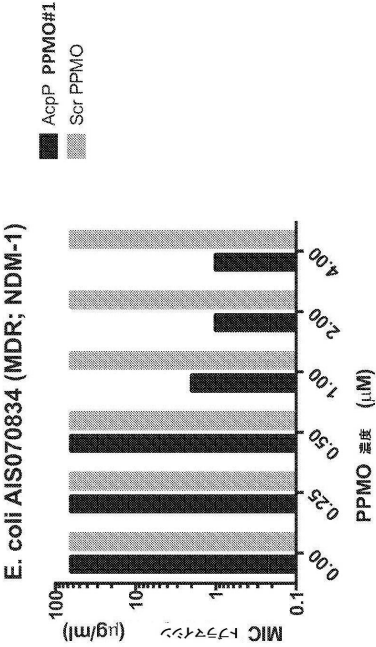


FIG. 2C

【 図 3 】

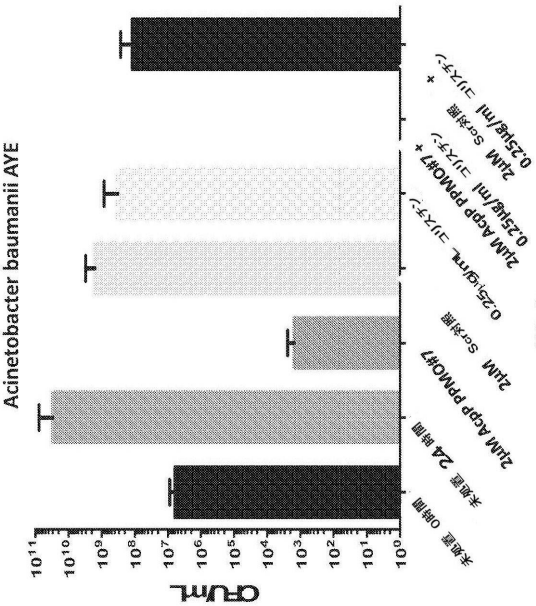


FIG. 3

【 図 4 】

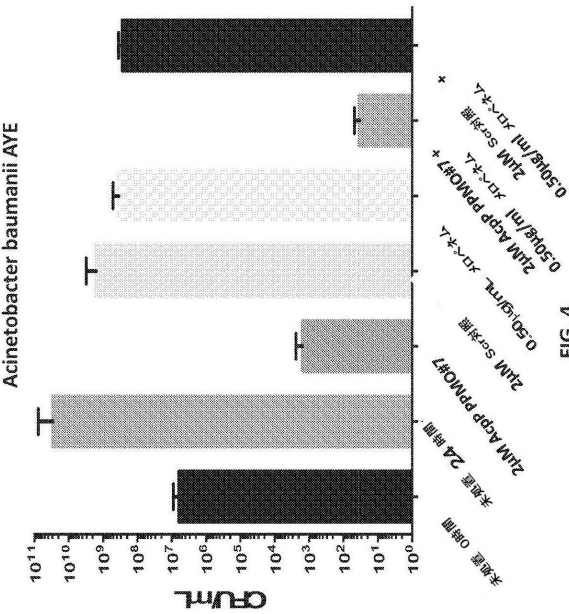


FIG. 4

【 図 5 】

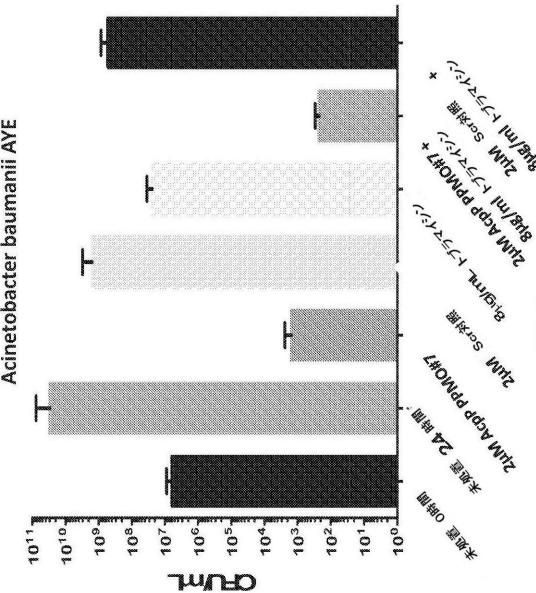


FIG. 5

【 図 6 】

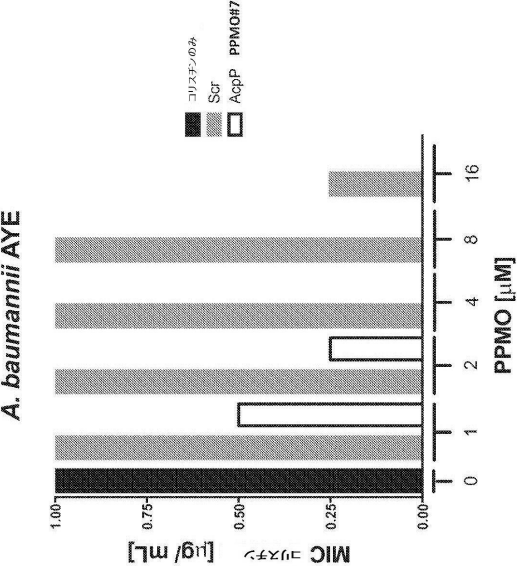


FIG. 6

【 図 7 】

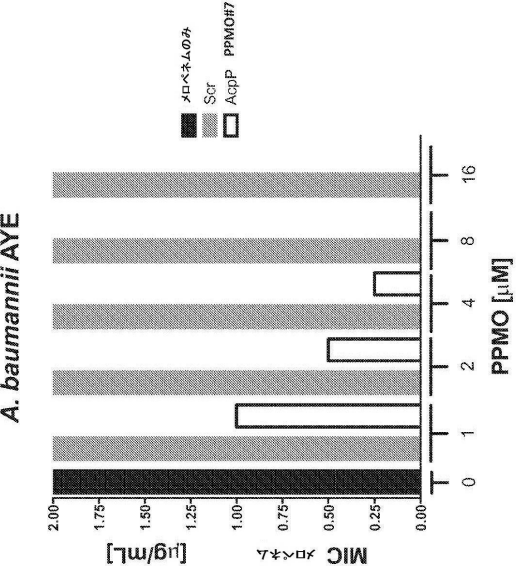


FIG. 7

【 図 8 】

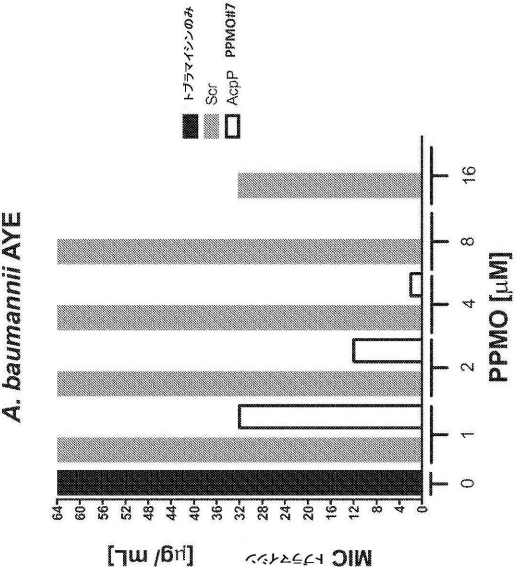


FIG. 8

【 図 9 - 1 】

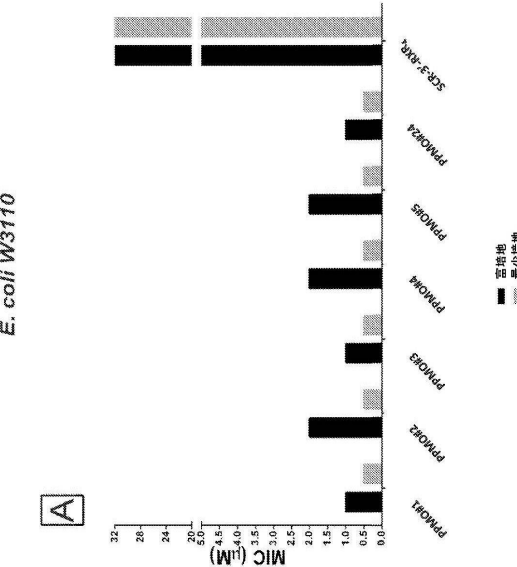


FIG. 9

【図 9 - 2】

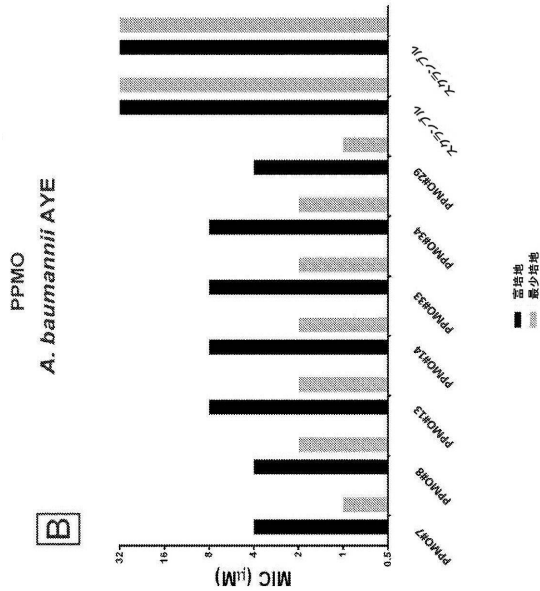


FIG. 9 (続き)

【図 9 - 3】

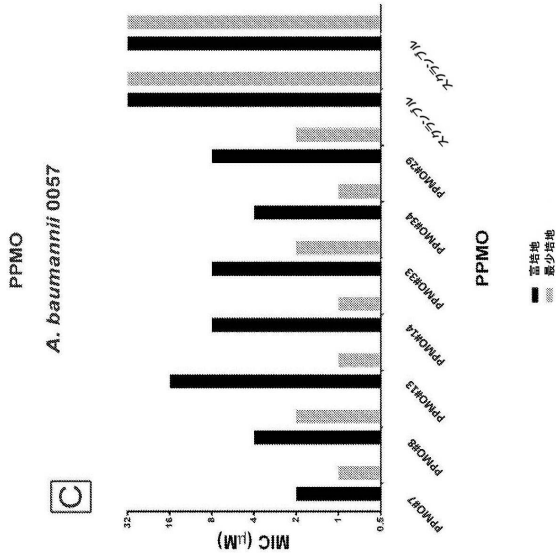
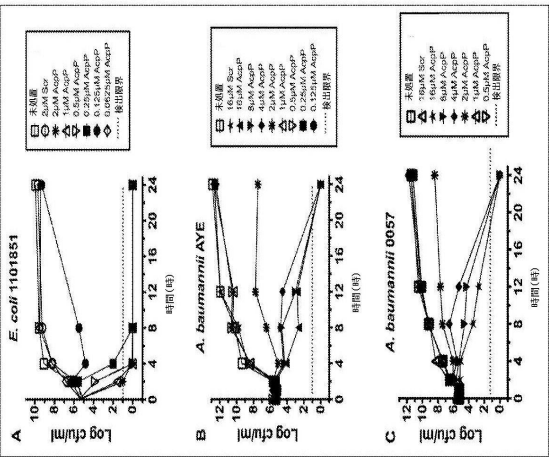


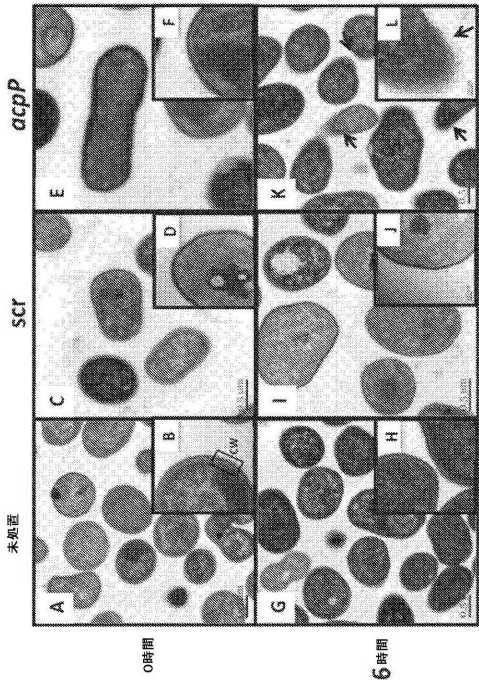
FIG. 9 (続き)

【図 10】



【図 11】

FIG. 10

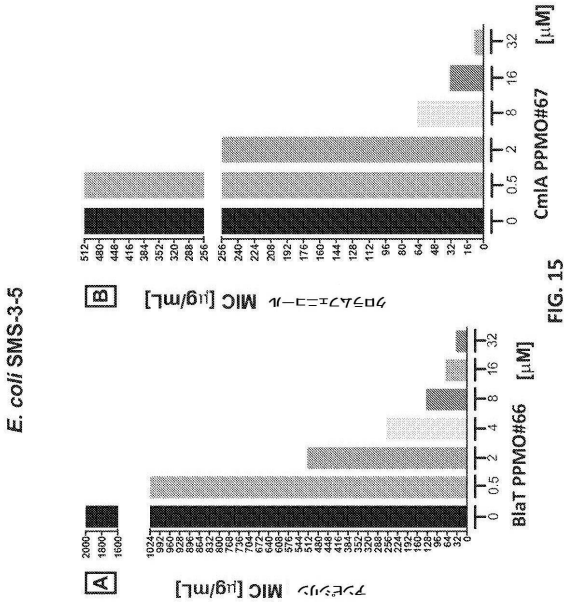




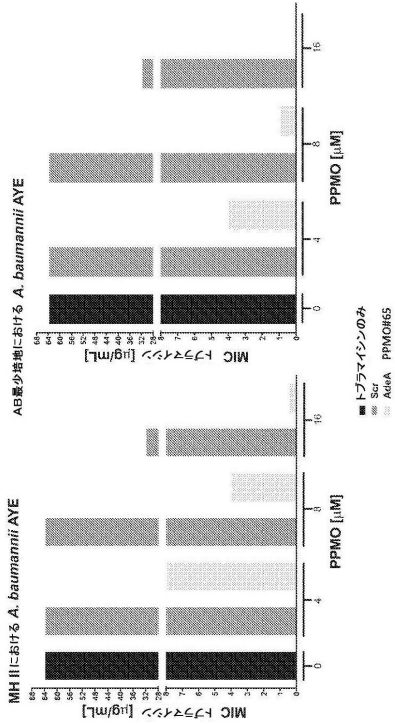




【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



【 配列表 】

0006687542000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 38/08	(2019.01)	A 6 1 K 38/08	
A 6 1 K 38/10	(2006.01)	A 6 1 K 38/10	
A 6 1 K 31/675	(2006.01)	A 6 1 K 31/675	
A 6 1 P 31/04	(2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
C 0 7 H 15/234	(2006.01)	C 0 7 H 15/234	

(72)発明者 ゲラー , ブルース エル .  
 アメリカ合衆国 オレゴン 9 7 3 3 0 , コーバリス , エヌ . ダブリュー . コンコード ド  
 ライブ 6 9 9 4

(72)発明者 グリーンバーグ , デイビッド  
 アメリカ合衆国 テキサス 7 5 0 1 9 , コッペル , ピーカン ホロー ドライブ 4 0 8

審査官 星 功介

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 8 / 0 0 8 1 1 3 ( WO , A 1 )  
 NIKAI DO et al . , FEMS MICROBIOLOGY REVIEWS , 2012, Vol.36 , p.340-363

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0  
 C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
 C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S  
 ( S T N )