

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5425396号
(P5425396)

(45) 発行日 平成26年2月26日(2014.2.26)

(24) 登録日 平成25年12月6日(2013.12.6)

(51) Int.Cl.		F I		
C 1 2 N 15/113 (2010.01)		C 1 2 N	15/00	Z N A G
A 6 1 K 31/7125 (2006.01)		A 6 1 K	31/7125	
A 6 1 K 31/713 (2006.01)		A 6 1 K	31/713	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)		A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P 31/14 (2006.01)		A 6 1 P	31/14	

請求項の数 23 (全 53 頁)

(21) 出願番号	特願2007-532436 (P2007-532436)	(73) 特許権者	501237039
(86) (22) 出願日	平成17年9月15日 (2005.9.15)		サレプタ セラピューティクス, インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2008-513012 (P2008-513012A)		アメリカ合衆国 オレゴン 97333, コーバリス, エス. ダブリュー. リサーチ ウェイ 4575, スイート 200
(43) 公表日	平成20年5月1日 (2008.5.1)	(74) 代理人	100066692
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/032815		弁理士 浅村 皓
(87) 国際公開番号	W02006/033933	(74) 代理人	100072040
(87) 国際公開日	平成18年3月30日 (2006.3.30)		弁理士 浅村 肇
審査請求日	平成20年9月10日 (2008.9.10)	(74) 代理人	100102897
(31) 優先権主張番号	60/611,063		弁理士 池田 幸弘
(32) 優先日	平成16年9月16日 (2004.9.16)	(74) 代理人	100088926
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 長沼 暉夫
(31) 優先権主張番号	11/226,995		
(32) 優先日	平成17年9月14日 (2005.9.14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アンチセンス抗ウイルス化合物及び s s RNA ウイルス感染を治療する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

西ナイル熱ウイルスの哺乳動物宿主細胞の複製を阻止する際の使用のためのオリゴヌクレオチド化合物であって、

- (i) ヌクレアーゼ耐性骨格を有すること、
- (ii) 哺乳動物宿主細胞による取込みが可能であること、
- (iii) 15 から 40 の間のヌクレオチド塩基を含有すること、
- (iv) 配列番号 4 に相補的である少なくとも 15 の連続する塩基のターゲティング配列を有すること、

(v) 少なくとも 45 の解離 Tm で西ナイル熱ウイルスゲノムとヘテロ二重鎖構造を形成でき、かつ前記ウイルスのプラス鎖 RNA 鎖の 5' 末端領域におけるステムループ二次構造を破壊する活性を有することを特徴とする化合物。

【請求項 2】

黄熱病ウイルスの哺乳動物宿主細胞の複製を阻止する際の使用のためのオリゴヌクレオチド化合物であって、

- (i) ヌクレアーゼ耐性骨格を有すること、
- (ii) 哺乳動物宿主細胞による取込みが可能であること、
- (iii) 15 から 40 の間のヌクレオチド塩基を含有すること、
- (iv) 配列番号 5 に相補的である少なくとも 15 の連続する塩基のターゲティング配列を有すること、

10

20

(v) 少なくとも45 の解離 T m で 黄熱病ウイルスゲノム とヘテロ二重鎖構造を形成でき、かつ前記ウイルスのプラス鎖 R N A 鎖の 5 ' 末端領域におけるステムループ二次構造を破壊する活性を有することを特徴とする化合物。

【請求項 3】

Dengue 熱ウイルス 2 型 の哺乳動物宿主細胞の複製を阻止する際の使用のためのオリゴヌクレオチド化合物であって、

(i) ヌクレアーゼ耐性骨格を有すること、

(i i) 哺乳動物宿主細胞による取込みが可能であること、

(i i i) 15 から 40 の間のヌクレオチド塩基を含有すること、

(i v) 配列番号 6 に相補的である少なくとも 15 の 連続する塩基のターゲティング配列 を有すること、

10

(v) 少なくとも45 の解離 T m で Dengue 熱ウイルス 2 型 ゲノムとヘテロ二重鎖構造を形成でき、かつ前記ウイルスのプラス鎖 R N A 鎖の 5 ' 末端領域におけるステムループ二次構造を破壊する活性を有することを特徴とする化合物。

【請求項 4】

ダニ媒介性脳炎ウイルス の哺乳動物宿主細胞の複製を阻止する際の使用のためのオリゴヌクレオチド化合物であって、

(i) ヌクレアーゼ耐性骨格を有すること、

(i i) 哺乳動物宿主細胞による取込みが可能であること、

(i i i) 15 から 40 の間のヌクレオチド塩基を含有すること、

(i v) 配列番号 8 に相補的である少なくとも 15 の 連続する塩基のターゲティング配列 を有すること、

20

(v) 少なくとも45 の解離 T m で ダニ媒介性脳炎ウイルス ゲノムとヘテロ二重鎖構造を形成でき、かつ前記ウイルスのプラス鎖 R N A 鎖の 5 ' 末端領域におけるステムループ二次構造を破壊する活性を有することを特徴とする化合物。

【請求項 5】

ブタ生殖及び呼吸器症候群ウイルス の哺乳動物宿主細胞の複製を阻止する際の使用のためのオリゴヌクレオチド化合物であって、

(i) ヌクレアーゼ耐性骨格を有すること、

(i i) 哺乳動物宿主細胞による取込みが可能であること、

(i i i) 15 から 40 の間のヌクレオチド塩基を含有すること、

(i v) 配列番号 35 に相補的である少なくとも 15 の 連続する塩基のターゲティング配列 を有すること、

30

(v) 少なくとも45 の解離 T m で ブタ生殖及び呼吸器症候群ウイルス ゲノムとヘテロ二重鎖構造を形成でき、かつ前記ウイルスのプラス鎖 R N A 鎖の 5 ' 末端領域におけるステムループ二次構造を破壊する活性を有することを特徴とする化合物。

【請求項 6】

非荷電リン含有サブユニット間連結により連結している複数のモルホリノサブユニットを含み、その連結部位が、1つのサブユニットのモルホリノ窒素を隣接サブユニットの 5 ' 環外炭素に連ねるものである、請求項 1 ~ 5 までのいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド化合物。

40

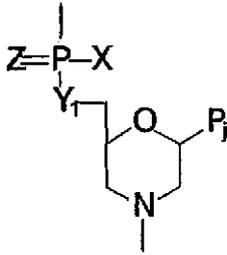
【請求項 7】

前記サブユニット間連結部がホスホロジアミデート連結部である、請求項 6 に記載のオリゴヌクレオチド化合物。

【請求項 8】

前記モルホリノサブユニットが、以下の構造に従ってホスホロジアミデート連結部により結合されている、請求項 7 に記載のオリゴヌクレオチド化合物

【化 2】



【式中、 $Y_1 = O$ 、 $Z = O$ 、 P_j は、ポリヌクレオチド中の塩基に対して、塩基特異的水素結合により、結合するプリン又はピリミジン塩基対部分であり、 X は、アルキル、アルコキシ、チオアルコキシ又はアルキルアミノである】。

【請求項 9】

$X = NR_2$ であり、ここで、各 R は、独立して水素又はメチルである、請求項 8に記載のオリゴヌクレオチド化合物。

【請求項 10】

前記オリゴヌクレオチド化合物が、前記ウイルス標的配列への結合に関して、 50 を超える T_m を有し、前記化合物が、哺乳動物細胞により能動的に吸収される、請求項 1 ~ 5までのいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド化合物。

【請求項 11】

前記オリゴヌクレオチド化合物と、前記化合物の宿主細胞への取込みを増強するアルギニンに富むポリペプチドの共有結合複合体である、請求項 1 ~ 5までのいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド化合物。

【請求項 12】

前記アルギニンに富むポリペプチドが、配列番号 $121 \sim 126$ と同定されている配列の 1 つを有する、請求項 11に記載のオリゴヌクレオチド化合物。

【請求項 13】

前記ターゲティング配列が配列番号 47 を含む、請求項 1に記載のオリゴヌクレオチド化合物。

【請求項 14】

前記ターゲティング配列が配列番号 51 を含む、請求項 3に記載のオリゴヌクレオチド化合物。

【請求項 15】

前記ターゲティング配列が配列番号 55 を含む、請求項 4に記載のオリゴヌクレオチド化合物。

【請求項 16】

ターゲティング配列が配列番号 109 を含む、請求項 5に記載のオリゴヌクレオチド化合物。

【請求項 17】

オリゴヌクレオチドが配列番号 49 を含む、請求項 2に記載のオリゴヌクレオチド化合物。

【請求項 18】

オリゴヌクレオチドが配列番号 47 からなる、請求項 1に記載のオリゴヌクレオチド化合物。

【請求項 19】

オリゴヌクレオチドが配列番号 49 からなる、請求項 2に記載のオリゴヌクレオチド化合物。

【請求項 20】

オリゴヌクレオチドが配列番号 51 からなる、請求項 3に記載のオリゴヌクレオチド化

10

20

30

40

50

合物。

【請求項 2 1】

オリゴヌクレオチドが配列番号 5 5 からなる、請求項 4 に記載のオリゴヌクレオチド化合物。

【請求項 2 2】

オリゴヌクレオチドが配列番号 1 0 9 からなる、請求項 5 に記載のオリゴヌクレオチド化合物。

【請求項 2 3】

前記ウイルスにより感染したホストの感染を治療するための医薬の調製における、請求項 1 ~ 2 2 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド化合物の使用。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、フラビウイルス、ヘパシウイルス、エンテロウイルス、リノウイルス、ヘパトウイルス、アプトウイルス、ヘペウイルス、コロナウイルス、アルテリウイルス、ベシウイルス、ノロウイルス、マムストロウイルス、アルファウイルス、及びルビウイルス感染の治療の際に使用するアンチセンスオリゴヌクレオチド化合物並びに該化合物を使用する抗ウイルス治療方法に関する。

【0 0 0 2】

引用文献：

20

以下の引用文は、本分野の背景又は本発明に関する。

Banerjee, R. 及び A. Dasgupta (2001). 「ピクロナウイルス 2C ポリペプチドとウイルスマイナス鎖 RNA との相互作用。(Interaction of picornavirus 2C polypeptide with the viral negative-strand RNA)」J Gen Virol 82 (Pt 11): 2621 ~ 7 頁。

Banerjee, R. 及び A. Dasgupta (2001). 「C 型肝炎ウイルスプロテアーゼ/ヘリカーゼ NS3 とウイルスプラス鎖及びマイナス鎖 RNA の 3' - 末端配列との特異的相互作用。(Specific interaction of hepatitis C virus protease/helicase NS3 with the 3' - terminal sequences of viral positive- and negative-strand RNA)」J Virol 75 (4); 1708 ~ 21 頁。

30

Banerjee, R., A. Echeverriら (1997). 「ポリオウイルスコード化 2C ポリペプチドは、ウイルスマイナス鎖 RNA の 3' - 末端配列に特異的に結合する。(Poliovirus-encoded 2C polypeptide specifically binds to the 3' - terminal sequences of viral negative-strand RNA)」J Virol 71 (12); 9570 ~ 8 頁。

Banerjee, R., W. Tsaiら (2001). 「ポリオウイルスコード化 2C / 2BC ポリペプチド類と 3' 末端マイナス鎖クローバーリーフとの相互作用は、無傷のステム-ループ b を必要とする。(Interaction of poliovirus-encoded 2C / 2BC polypeptides with the 3' terminus negative-strand cloverleaf requires an intact stem-loop b)」Virology 280 (1): 41 ~ 51 頁。

40

Blommers, M. J., U. Piellesら (1994). 「RNA にハイブリダイズされた核酸類縁体の構造決定に対するアプローチ。2' - OMe RNA と単アミド骨格修飾を含有するオリゴヌクレオチドとの間の二重鎖に関する NMR 研究。(An approach to the structure determination

50

of nucleic acid analogues hybridized to RNA. NMR studies of a duplex between 2'-OMe RNA and an oligonucleotide containing a single amide backbone modification)」*Nucleic Acids Res* 22 (20): 4187~94頁。

Gait, M. J.、A. S. Jonesら(1974)「ポリヌクレオチド類の合成類縁体XII。ホスホジエステル基の代わりにオキシアセトアミド結合又はオキシホルムアミド結合を含有するチミジン誘導体の合成。(Synthetic-analogues of polynucleotides XII. Synthesis of thymidine derivatives containing an oxyacetamide- or an oxyformamide-linkage instead of a phosphodiester group)」*J Chem Soc [Perkin 1]* 0 (14): 1684~6頁。

Holland, J. (1993). *Emerging Virus*. S. S. Morse. ニューヨーク及びオックスフォード、オックスフォード大学プレス: 203~218頁。

Lesnikowski, Z. J.、M. Jaworskaら(1990)。「部分的に規定された立体化学のオクタ(チミジンメタンホスホネート)類: 合成及びペンタデカデオキシリボアデニル酸への結合に対するリンにおけるキラリティーの効果。(Octa(thymidine methanephosphonates) of partially defined stereochemistry synthesis and effect of chirality at phosphorus on binding to pentadecadeoxyriboadenylic acid)」*Nucleic Acids Res* 18 (8): 2109~15頁。

Markoff, L. (2003)。「フラビウイルスRNAにおける5'-及び3'-非コード化領域。(5'- and 3'-noncoding regions in flavivirus RNA)」*Adv Virus Res* 59: 177~228頁。

Mertes, M. P. 及び E. A. Coats (1969)。「ジヌクレオシドのカルボネート類縁体の合成。3'-チミジニル5'-チミジニルカーボネート、3'-チミジニル5'-(5-フルオロ-2'-デオキシウリジニル)カーボネート、及び3'-(5-フルオロ-2'-デオキシウリジニル)5'-チミジニルカーボネート。(Synthesis of carbonate analogs of dinucleosides. 3'-Thymidinyl 5'-thymidinyl carbonate, 3'-Thymidinyl 5'-(5-fluoro-2'-deoxyuridinyl) carbonate, and 3'-(5-fluoro-2'-deoxyuridinyl) 5'-thymidinyl carbonate)」*J Med Chem* 12 (1): 154~7頁。

Moulton, H. M.、M. H. Nelsonら(2004)。「アルギニンリッチペプチド類に結合したアンチセンスモルホリノオリゴマー類の細胞取込み。(Cellular uptake of antisense morpholino oligomers conjugated to arginine-rich peptides)」*Bioconjug Chem* 15 (2): 290~9頁。

Murray, R.ら(1998). *Medical Microbiology*. セントルイス、ミズーリ州、Mosby Press: 542~543頁。

Neuman, B. W.、D. A. Steinら(2004)。「ゲノムの5'末端に対し特異的なアンチセンスモルホリノオリゴマー類は、コロナウイルスの増殖及び成長(ダガー)を阻止する。(Antisense Morpholino-Oligomers Directed against the 5' End of the Genome Inhibit Coronavirus Proliferation and

10

20

30

40

50

Growth (dagger))」J. Virol. 78 (11): 5891~5899 頁。

O'Ryan, M. (1992). Clinical Virology Manual. S. Spector 及び G. Lancz、ニューヨーク、Elsevier Science: 361~196 頁。

Pardigon, N., E. Lenchesら (1993). 「シンドビスアルファウイルスのマイナス鎖RNAの3'末端の細胞タンパク質に関する複数結合部位。(Multiple binding sites for cellular proteins in the 3' end of Sindbis alphavirus minus-sense RNA)」J. Virol. 67 (8): 5003~11 頁。 10

Pardigon, N. 及び J. H. Strauss (1992). 「細胞タンパク質は、シンドビスウイルスのマイナス鎖RNAの3'末端に結合する。(Cellular proteins bind to the 3' end of Sindbis virus minus-strand RNA)」J. Virol. 66 (2): 1007~15 頁。

Paul, A. V. (2002). 「ピコナウイルスゲノム複製の可能な一体化メカニズム (Possible unifying mechanism of picornavirus genome replication)」Molecular Biology of Picornaviruses. B. L. Semler 及び E. Wimmer. ワシントンDC、ASM Press: 227~246 頁。 20

Roehl, H. H., T. B. Parsleyら (1997). 「3CDプロテナーゼによる細胞ポリペプチドの処理は、ポリオウイルスリボヌクレオタンパク質複合体形成を必要とする。(Processing of a cellular polypeptide by 3CD proteinase is required for poliovirus ribonucleoprotein complex formation)」J. Virol. 71 (1): 578~85 頁。

Roehl, H. H. 及び B. L. Semler (1995). 「ポリオウイルス感染は、ウイルスのマイナス鎖RNAの3'末端で2種のリボヌクレオタンパク質の形成を増強する。(Poliovirus infection enhances the formation of two ribonucleoprotein complexes at the 3' end of viral negative-strand RNA)」J. Virol. 69 (5): 2954~61 頁。 30

Smith, A. W., D. E. Skillingら (1998). 「海洋貯水場からのカリシウイルスの発生: 人畜共通及び種間の移動。(Calicivirus emergence from ocean reservoirs: zoonotic and interspecies movements)」Emerge Infect Dis. 4 (1): 13~20 頁。

Summerton, J. 及び D. Weller (1997). 「モルホリノアンチセンスオリゴマー類: デザイン、調製、及び性質。(Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties)」Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 7 (3): 187~95 頁。 40

Xu, W. Y. (1991). 「中国におけるウサギのウイルス出血性疾患: 疫学及び特徴付け。(Viral haemorrhagic disease of rabbits in the People's Republic of China: epidemiology and virus characterisation)」Rev. Sci. Tech. 10 (2): 393~408 頁。

Zuker, M. (2003). 「核酸折りたたみ及びハイブリダイゼーション予測に関するMfold。(Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction 50

)」Nucleic Acids Res 31(13):3406~15頁。

【背景技術】

【0003】

一本鎖RNA(ssRNA)ウイルスは、野生動物、家畜及びヒトにおいて多くの疾患を引き起こす。これらのウイルスは、遺伝的及び抗原的多様性があり、幅広い組織向性並びに広範囲の病原可能性を示す。いくつかの最も病原性のウイルス、例えば、カリシウイルスのインキュベーション期間は非常に短い。ウイルス複製及び毒性因子の発現は、早期防御機構(Xu1991年)を圧倒し、急性並びに重篤な症状を引き起こす可能性がある。

【0004】

多くのウイルス感染に特定の治療措置はない。この感染は、血清型特異的であり、自然免疫は、しばしば短期であるか、又は欠いている(Murrayら、1998年)。これらの病原性ウイルスに対する免疫化は、多様な血清型のため実行不可能である。RNAウイルス複製過程は、有効な遺伝子修復機構を欠き、RNAウイルス複製誤差率の現在の推定値は、各ゲノム複製が、1つから10の誤差を生じることが予想でき、したがって多数の変異体数を生じるようである(Holland1993年)。しばしば、これらの血清型は、交差防御を示さないため、いずれか1つの血清型による感染が、他の血清型による感染に対して防御を行わない。例えば、カリシウイルスのベシウイルス属に対するワクチンは、40超の種々の中和血清型に対する防御を提供しなければならないと考えられ(Smith、Skillingら、1998年)、カリシウイルス科の他の属に対するワクチンにも、同じ限界があることが予想される。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

したがって、フラビウイルス科、ピコルノウイルス科、カリシウイルス科、トガウイルス科、アルテリウイルス科、コロナウイルス科、アストロウイルス科又はヘペウイルス科ファミリーにおける小型一本鎖のプラス鎖RNAウイルスなどを含む、いくつかのウイルスファミリーにおいて有効な抗ウイルス療法の必要性が残されている。

【課題を解決するための手段】

【0006】

一態様において、本発明は、一本鎖のプラス鎖ゲノムを有し、フラビウイルス科、ピコルノウイルス科、カリシウイルス科、トガウイルス科、アルテリウイルス科、コロナウイルス科、アストロウイルス科又はヘペウイルス科のウイルスファミリーの中の1種から選択されるRNAウイルスの宿主細胞内の複製を阻止するのに有効な抗ウイルス化合物を製造する方法を含む。該方法は最初に、感染ウイルスのプラス鎖の5'末端40塩基内の領域を、内部ステムループ二次構造を形成できる、ウイルス標的配列として同定することを含む。次に：

(i)ヌクレアーゼ耐性骨格、

(ii)哺乳動物宿主細胞による取込みが可能であること、

(iii)12から40の間のヌクレオチド塩基を含有すること、

(iv)内部二重鎖構造を形成できるウイルスゲノム領域に相補的である少なくとも12のサブユニットのターゲティング配列を有すること、並びに

(v)(i)該ウイルスのプラス鎖及び該オリゴヌクレオチド化合物からなり、(ii)少なくとも45の解離 T_m 及びこのようなステムループ構造の破壊を特徴とするヘテロ二重鎖構造を、ウイルス標的配列と共に形成する能力を特徴とする、オリゴヌクレオチド類縁化合物を段階的固相合成によって構築する。

【0007】

該標的配列は、5'末端配列の分析、例えば、入力された最小RNA配列の自由エネルギー状態に関する探索に基づき二次構造予測を実施できるコンピュータプログラムにより5'末端40塩基の分析を得ることにより同定できる。

10

20

30

40

50

【0008】

別の態様において、本発明は、一本鎖のプラス鎖ゲノムを有し、フラビウイルス科、ピコルノウイルス科、カリシウイルス科、トガウイルス科、アルテリウイルス科、コロナウイルス科、アストロウイルス科又はヘペウイルス科のウイルスファミリーの中の1種から選択される感染RNAウイルスの複製を哺乳動物宿主細胞内において阻止する方法を含む。該方法は：

(i)ヌクレアーゼ耐性骨格、

(ii)哺乳動物宿主細胞による取込みが可能であること、

(iii)12から40の間のヌクレオチド塩基を含有すること、

(iv)内部ステムループ二次構造を形成できるプラス鎖ウイルスゲノムの5'末端40塩基内の領域に相補的である少なくとも12のサブユニットのターゲティング配列を有することを特徴とするオリゴヌクレオチド類縁化合物のウイルス抑制量を感染宿主細胞に投与することを含む。(i)該ウイルスのプラス鎖及び該オリゴヌクレオチド化合物からなり、(ii)少なくとも45の解離T_m及びこのようなステムループ二次構造の破壊を特徴とする、ヘテロ二重鎖構造を形成するために、該化合物を宿主細胞に投与すると有効である。該化合物は、ウイルスに感染した、又はウイルス感染の危険性のある哺乳動物対象に投与できる。

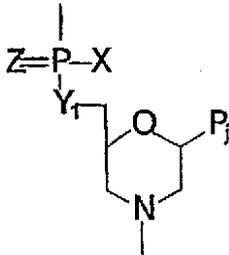
10

【0009】

該化合物は、1つのサブユニットのモルホリノ窒素を隣接サブユニットの5'環外炭素に結合させている非荷電リン含有サブユニット間連結部により結合させたモルホリノサブユニットから構成できる。一実施形態において、該サブユニット間連結部は、構造：

20

【化1】



30

を有するものなどのホスホロジアミデート連結部であり、

式中、Y₁ = O、Z = O、P_jは、ポリヌクレオチド中の塩基に対する塩基特異的水素結合による結合に有効なプリン又はピリミジン塩基対部分であり、Xは、アルキル、アルコキシ、チオアルコキシ、又は各Rが、独立して水素又はメチルである、例えば、X = NR₂のアルキルアミノである。

【0010】

該化合物は、該ウイルスのプラス鎖とこのようなヘテロ二重鎖構造を形成できるオリゴヌクレオチド類縁部分及び該化合物の感染宿主細胞への取込みを促進させるのに有効なアルギニンに富むポリペプチドの共有結合複合体であり得る。

40

【0011】

関連する一態様において、本発明は：

(a)一本鎖のプラス鎖RNAゲノムを有し、フラビウイルス科、ピコルノウイルス科、カリシウイルス科、トガウイルス科、アルテリウイルス科、コロナウイルス科、アストロウイルス科又はヘペウイルス科ファミリーの中の1種から選択されるRNAウイルスの該プラス鎖RNAの5'末端40塩基内の領域であって、内部ステムループ二次構造を形成できる領域と、

(b)(i)ヌクレアーゼ耐性骨格、

(ii)哺乳動物宿主細胞による取込みが可能であること、

(iii)12から40の間のヌクレオチド塩基を含有すること、

50

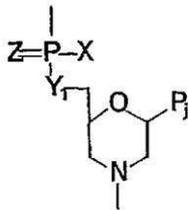
(iv) 該ウイルスのプラス鎖RNA鎖の5'末端40塩基内のこのようなステムループ二次構造を伴う領域に相補的である少なくとも12のサブユニットのターゲティング配列を有することを特徴とし、

ヘテロ二重鎖複合体が、少なくとも45の解離 T_m を有し、このようなステムループ二次構造を破壊することを特徴とするオリゴヌクレオチド類縁化合物との間で形成されるヘテロ二重鎖複合体を含む。

【0012】

代表的な化合物は、非荷電リン含有サブユニット間連結により連結している複数のモルホリノサブユニットから構成され、その連結部位が、1つのサブユニットのモルホリノ窒素を隣接サブユニットの5'環外炭素に連ねている。該化合物が、構造：

【化2】



のようなホスホロジアミデート連結部を有してもよく、

式中、 $Y_1 = O$ 、 $Z = O$ 、 P_j は、ポリヌクレオチド中の塩基に対する塩基特異的水素結合による結合に有効なプリン又はピリミジン塩基対部分であり、 X は、アルキル、アルコキシ、チオアルコキシ又はアルキルアミノである。好ましい化合物において、 $X = NR_2$ であり、ここで、各 R は、独立して水素又はメチルである。該化合物は、オリゴヌクレオチド類縁体単独又は該類縁体と、該化合物の宿主細胞への取込みを増強できるアルギニンに富むポリペプチドとの複合体であり得る。

【0013】

本発明はまた、一本鎖のプラス鎖RNAゲノムを有し、哺乳動物対象中のフラビウイルス科、ピコルノウイルス科、カリシウイルス科、トガウイルス科、アルテリウイルス科、コロナウイルス科、アストロウイルス科又はヘペウイルス科ファミリーの中の1種から選択されるRNAウイルスによるウイルス感染の存在を検出するか、又は哺乳動物対象を感染するようなウイルスと、該ウイルスに対し特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチド類縁化合物との間の有効な相互作用の存在を確認する方法に関する。該方法を実施する際に、(a) 該ウイルスのプラス鎖RNA鎖の5'末端40塩基内のステムループ二次構造を伴う領域に相補的である少なくとも12のサブユニットのターゲティング配列を含む12~40のサブユニットの配列、(b) 各々の連結部が1つのサブユニットのモルホリノ窒素を隣接サブユニットの5'環外炭素に結合させている、非荷電リン含有サブユニット間連結部により結合されたモルホリノサブユニット、及び(c) プラス鎖ウイルスssRNAゲノムにより形成でき、少なくとも45の解離 T_m 並びに該ステムループ二次構造の破壊を特徴するヘテロ二重鎖構造を有するオリゴヌクレオチド類縁化合物を該対象に投与する。

【0014】

該化合物が投与された後の選択された時間に、対象からの体液サンプルを得て；該ウイルスのプラス鎖RNAの相補的配列5'末端領域により複合化されたアンチセンスオリゴヌクレオチドを含むヌクレアーゼ耐性のヘテロ二重鎖の存在に関してサンプルをアッセイする。

【0015】

さらに別の態様において、本発明は、一本鎖のプラス鎖RNAゲノムを有し、前記化合物を投与することにより、フラビウイルス科、ピコルノウイルス科、カリシウイルス科、トガウイルス科、又はコロナウイルス科ファミリー及びE型肝炎ウイルスから選択される

10

20

30

40

50

RNAウイルスの哺乳動物宿主細胞における複製を阻止する際の使用のためのオリゴヌクレオチド類縁化合物を含む。該化合物は：

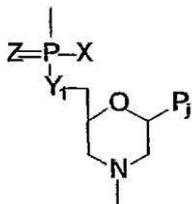
- (i)ヌクレアーゼ耐性骨格、
- (ii)哺乳動物宿主細胞による取込みが可能であること、
- (iii)12から40の間のヌクレオチド塩基を含有すること、
- (iv)前記ウイルスのプラス鎖RNA鎖の5'末端40塩基内のステムループ二次構造を伴う領域に相補的である少なくとも12のサブユニットのターゲティング配列を有すること、
- (v)プラス鎖ウイルスssRNAゲノムにより形成でき、ヘテロ二重鎖構造が、少なくとも45の解離 T_m 及び前記ステムループ二次構造の破壊を有することを特徴とする。

10

【0016】

代表的な化合物は、非荷電リン含有サブユニット間連結により連結している複数のモルホリノサブユニットから構成され、その連結部位が、1つのサブユニットのモルホリノ窒素を隣接サブユニットの5'環外炭素に連ねている。該化合物は、構造：

【化3】



20

のようなホスホロジアミデート連結部を有することができ、

式中、 $Y_1 = O$ 、 $Z = O$ 、 P_j は、ポリヌクレオチド中の塩基に対する塩基特異的水素結合による結合に有効なプリン又はピリミジン塩基対部分であり、 X は、アルキル、アルコキシ、チオアルコキシ又はアルキルアミノである。好ましい化合物において、 $X = NR_2$ であり、ここで、各 R は、独立して水素又はメチルである。該化合物は、オリゴヌクレオチド類縁体単独であるか、又は該類縁体と該化合物の宿主細胞への取込みを増強できるアルギニンに富むポリペプチドとの複合体であり得る。

30

【0017】

以下に記載されたフラビウイルス又はヘパシウイルスの治療のために、ターゲティング配列は、以下の配列のうちの1つにステムループ二次構造を伴う領域に相補的である：

- (i)セントルイス脳炎ウイルスに対する配列番号1；
- (ii)日本脳炎ウイルスに対する配列番号2；
- (iii)マリーバレー脳炎ウイルスに対する配列番号3；
- (iv)西ナイル熱ウイルスに対する配列番号4；
- (v)黄熱病ウイルスに対する配列番号5；
- (vi)デング熱2型ウイルスに対する配列番号6；
- (vii)C型肝炎ウイルスに対する配列番号7；
- (viii)ダニ媒介性脳炎ウイルスに対する配列番号8；
- (ix)オムスク出血性熱ウイルスに対する配列番号9；
- (x)ポーワッサン(Powassan)ウイルスに対する配列番号10。

40

【0018】

これらのウイルスに対する代表的なターゲティング配列は、以下の配列を含むか、又は関連標的配列における二重鎖二次構造の1つ又は複数の領域と重なるこれらの配列の一部を含む：

- (i)セントルイス脳炎ウイルスに対する配列番号41及び42；
- (ii)日本脳炎ウイルスに対する配列番号43及び44；

50

- (i i i) マリーバレー脳炎ウイルスに対する配列番号 4 5 及び 4 6 ;
- (i v) 西ナイル熱ウイルスに対する配列番号 4 7 及び 4 8 ;
- (v) 黄熱病ウイルスに対する配列番号 4 9 及び 5 0 ;
- (v i) デング熱ウイルスに対する配列番号 5 1、5 2 ;
- (v i i) C 型肝炎ウイルスに対する配列番号 5 3 及び 5 4 ;
- (v i i i) ダニ媒介性脳炎ウイルスに対する配列番号 5 5 及び 5 6 ;
- (i x) オムスク出血性熱ウイルスに対する配列番号 5 7 及び 5 8 ;
- (x) Powassan ウイルスに対する配列番号 5 9 及び 6 0 。

【 0 0 1 9 】

エンテロウイルス、リノウイルス、ヘパトウイルス又はアフトウイルスの治療のため、
ターゲティング配列は、以下の配列のうちの一つにステムループ二次構造を伴う領域に相
補的である：

10

- (i) マホニイ及びセーピン株のポリオウイルスに対する配列番号 1 1 ;
- (i i) ヒト腸内ウイルス A に対する配列番号 1 2 ;
- (i i i) ヒト腸内ウイルス B に対する配列番号 1 3 ;
- (i v) ヒト腸内ウイルス C に対する配列番号 1 4 ;
- (v) ヒト腸内ウイルス D に対する配列番号 1 5 ;
- (v i) ヒト腸内ウイルス E に対する配列番号 1 6 ;
- (v i i) ウシ腸内ウイルスに対する配列番号 1 7 ;
- (v i i i) ヒトライノウイルス 8 9 に対する配列番号 1 8 ;
- (i x) ヒトライノウイルス B に対する配列番号 1 9 ;
- (x) 口蹄疫ウイルスに対する配列番号 2 0 ;
- (x i) A 型肝炎ウイルスに対する配列番号 2 1 。

20

【 0 0 2 0 】

これらのウイルスに対する代表的なターゲティング配列は、以下の配列を含むか、又は
関連標的配列における二重鎖二次構造の一つ又は複数の領域と重なるこれらの配列の一部
を含む：

- (i) マホニイ及びセーピン株のポリオウイルスに対する配列番号 6 1 及び 6 2 ;
- (i i) ヒト腸内ウイルス A に対する配列番号 6 3 及び 6 4 ;
- (i i i) ヒト腸内ウイルス B に対する配列番号 6 5 及び 6 6 ;
- (i v) ヒト腸内ウイルス C に対する配列番号 6 7 及び 6 8 ;
- (v) ヒト腸内ウイルス D に対する配列番号 6 9 及び 7 0 ;
- (v i) ヒト腸内ウイルス E に対する配列番号 7 1 及び 7 2 ;
- (v i i) ウシ腸内ウイルスに対する配列番号 7 3 及び 7 4 ;
- (v i i i) ヒトライノウイルス 8 9 に対する配列番号 7 5 及び 7 6 ;
- (i x) ヒトライノウイルス B に対する配列番号 7 7 及び 7 8 ;
- (x) 口蹄疫ウイルスに対する配列番号 7 9 及び 8 0 ;
- (x i) A 型肝炎ウイルスに対する配列番号 8 1 及び 8 2 。

30

【 0 0 2 1 】

カリシウイルス又はノロウイルスの治療のため、ターゲティング配列は、以下の配列の
うちの一つにステムループ二次構造を伴う領域に相補的である：

40

- (i) ネコのカリシウイルスに対する配列番号 2 2 ;
- (i i) イヌのカリシウイルスに対する配列番号 2 3 ;
- (i i i) ブタの腸内カリシウイルスに対する配列番号 2 4 ;
- (i v) カリシウイルス株 N B に対する配列番号 2 5 ;
- (v) ノーウォークウイルスに対する配列番号 2 6 。

【 0 0 2 2 】

これらのウイルスに対する代表的なターゲティング配列は、以下の配列を含むか、又は
関連標的配列における二重鎖二次構造の一つ又は複数の領域と重なるこれらの配列の一部
を含む：

50

- (i) ネコのカリシウイルスに対する配列番号 8 3 及び 8 4 ;
- (i i) イヌのカリシウイルスに対する配列番号 8 5 及び 8 6 ;
- (i i i) ブタの腸内カリシウイルスに対する配列番号 8 7 及び 8 8 ;
- (i v) カリシウイルス株 N B に対する配列番号 8 9 及び 9 0 ;
- (v) ノーウォークウイルスに対する配列番号 9 1 及び 9 2 。

【 0 0 2 3 】

ヘペウイルス、E型肝炎ウイルスの治療のため、ターゲティング配列は、配列番号 2 7 と同定されている配列内のステムループ二次構造を伴う領域に相補的である。代表的なターゲティング配列は、配列番号 9 3 及び 9 4 を含むか、又は関連標的配列における二次構造の 1 つ又は複数の領域と重なるこれらの一部を含む。

10

【 0 0 2 4 】

ルビウイルス又はアルファウイルスの治療のため、ターゲティング配列は、以下の配列のうち 1 つにステムループ二次構造を伴う領域に相補的である：

- (i) 風疹ウイルスに対する配列番号 2 8 ;
- (i i) 東部ウマ脳炎ウイルスに対する配列番号 3 8 ;
- (i i i) 西部ウマ脳炎ウイルスに対する配列番号 3 9 ;
- (i v) ベネズエラウマ脳脊髄炎ウイルスに対する配列番号 4 0 。

【 0 0 2 5 】

これらの各ウイルスに対する代表的なターゲティング配列は、以下の配列番号、又は関連標的配列における二重鎖二次構造の 1 つ又は複数の領域と重なるこれら配列の一部により同定される：

20

- (i) 風疹ウイルスに対する配列番号 9 5 及び 9 6 ;
- (i i) 東部ウマ脳炎ウイルスに対する配列番号 1 1 5 及び 1 1 6 ;
- (i i i) 西部ウマ脳炎ウイルスに対する配列番号 1 1 7 及び 1 1 8 ;
- (i v) ベネズエラウマ脳脊髄炎ウイルスに対する配列番号 1 1 9 及び 1 2 0 。

【 0 0 2 6 】

コロナウイルス又はアルテリウイルスの治療のため、ターゲティング配列は、以下の配列のうち 1 つにステムループ二次構造を伴う領域に相補的である：

- (i) S A R S コロナウイルス T O R 2 に対する配列番号 2 9 ;
- (i i) ブタ流行性下痢ウイルスに対する配列番号 3 0 ;
- (i i i) 伝染性胃腸炎ウイルスに対する配列番号 3 1 ;
- (i v) ウシコロナウイルスに対する配列番号 3 2 ;
- (v) ヒトコロナウイルス 2 2 9 E に対する配列番号 3 3 ;
- (v i) マウス肝炎ウイルスに対する配列番号 3 4 ;
- (v i i) ブタ生殖及び呼吸症候群ウイルスに対する配列番号 3 5 。

30

【 0 0 2 7 】

これらの各ウイルスに対する代表的なターゲティング配列は、以下の配列番号、又は関連標的配列における二重鎖二次構造の 1 つ又は複数の領域と重なるこれら配列の一部により同定される：

- (i) S A R S コロナウイルス T O R 2 に対する配列番号 9 7 及び 9 8 ;
- (i i) ブタ流行性下痢ウイルスに対する配列番号 9 9 及び 1 0 0 ;
- (i i i) 伝染性胃腸炎ウイルスに対する配列番号 1 0 1 及び 1 0 2 ;
- (i v) ウシコロナウイルスに対する配列番号 1 0 3 及び 1 0 4 ;
- (v) ヒトコロナウイルス 2 2 9 E に対する配列番号 1 0 5 及び 1 0 6 ;
- (v i) マウス肝炎ウイルスに対する配列番号 1 0 7 及び 1 0 8 ;
- (v i i) ブタ生殖及び呼吸症候群ウイルスに対する配列番号 1 0 9 及び 1 1 0 。

40

【 0 0 2 8 】

マスタロウイルス、ヒトアストロウイルスの治療のため、ターゲティング配列は、配列番号 3 7 と同定される配列内のステムループ二次構造を伴う領域に相補的である。代表的なターゲティング配列は、配列番号 1 1 3 及び 1 1 4 であるか、又は関連標的配列にお

50

ける二重鎖二次構造の1つ又は複数の領域と重なるこれらの配列の一部である。

【0029】

ウマ動脈炎ウイルスの治療のため、ターゲティング配列は、配列番号36と同定される配列内のステムループ二次構造を伴う領域に相補的である。代表的なターゲティング配列は、配列番号111、112、又は関連標的配列における二重鎖二次構造の1つ又は複数の領域と重なるこれらの配列の一部を含む。

【0030】

本発明のこれら及び他の対象並びに特徴は、本発明の以下の詳細な説明が、添付の図面と関連して読み出すとより完全に認識される。

【発明を実施するための最良の形態】

10

【0031】

I. 定義

本明細書に用いられる下記の用語は、他に指定されない限り以下の意味を有する。

【0032】

用語の「オリゴヌクレオチド類縁体」とは、(i)修飾された骨格構造、例えば、天然のオリゴ-及びポリヌクレオチドに見られる標準的ホスホジエステル連結部以外の骨格、及び(ii)場合によっては修飾された糖部分、例えば、リボース又はデオキシリボース部分ではなくてモルホリノ部分を有するオリゴヌクレオチドを指す。該類縁体は、標準的ポリヌクレオチド塩基と対のワトソン-クリック塩基により水素結合できる塩基を支持し、類縁骨格は、オリゴヌクレオチド類縁体分子と、標準的ポリヌクレオチド(例えば、一本鎖RNA又は一本鎖DNA)における塩基との間の配列特異の様式でこのような水素結合を可能にする様式で塩基を提供する。好ましい類縁体は、本質的に非荷電リン含有骨格を有するものである。

20

【0033】

オリゴヌクレオチド類縁体における本質的に非荷電リン含有骨格は、サブユニット連結部の大部分、例えば、60%から100%の間が、生理的pHで非荷電であり、単一のリン原子を含有する。該類縁体は、8つから40の間のサブユニット、典型的には約8~25のサブユニット、及び好ましくは約12から25のサブユニットを含有する。該類縁体は、下記に定義されるように標的配列に相補性の完全配列又は相補性に近い配列を有することができる。

30

【0034】

オリゴヌクレオチド類縁体の「サブユニット」とは、該類縁体の1つのヌクレオチド(又はヌクレオチド類縁体)単位を指す。この用語は、結合したサブユニット間連結部のありなしでのヌクレオチド単位を指すことができるが、「荷電サブユニット」を指す場合、荷電は、典型的にサブユニット間連結部(例えば、リン酸連結部又はホスホロチオエート連結部)内に存する。

【0035】

「モルホリノオリゴヌクレオチド類縁体」は、図2A~2Dに示される形体のモルホリノサブユニット構造からなるオリゴヌクレオチド類縁体であり、(i)この構造は、1つのサブユニットのモルホリノ窒素を隣接サブユニットの5'環外炭素に結合させて、1個から3個の原子長のリン含有連結部により一緒に結合されており、(ii)P_i及びP_jは、ポリヌクレオチド内の塩基に対する塩基特異的水素結合による結合に有効なプリン又はピリミジン塩基対部分である。プリン又はピリミジン塩基対部分は、典型的にはアデニン、シトシン、グアニン、ウラシル又はチミンである。モルホリノオリゴマーの合成、構造、及び結合特性は、米国特許第5,698,685号、米国特許第5,217,866号、米国特許第5,142,047号、米国特許第5,034,506号、米国特許第5,166,315号、米国特許第5,521,063号、及び米国特許第5,506,337号に詳述され、それらのすべては、参照として本明細書に組み込まれている。

40

【0036】

図2Bに示されたサブユニット及び連結部は、図3B(6個の原子は:1個のモルホリ

50

ノ窒素、1個の結合されたリン原子、リン原子の5'環外炭素に結合する原子(通常酸素)、5'環外炭素、及び次のモルホリノ環の2個の炭素原子を含む)に示されているように、6個の原子の反復単位骨格用に使用される。これらの構造において、5'環外モルホリノ炭素をリン基に結合させる原子 Y_1 は、硫黄、窒素、炭素又は好ましくは酸素であり得る。リンからの側基のX部分は、塩基特異的な水素結合を妨げない任意の安定な基である。好ましいX基としては、フルオロ、アルキル、アルコキシ、チオアルコキシ、環状アミンを含むアルキルアミノが挙げられ、それらのすべては、塩基特異的結合が破壊されない限り、種々置換できる。アルキル、アルコキシ及びチオアルコキシは、好ましくは1~6個の炭素原子を含む。アルキルアミノとは、好ましくは低級アルキル(C_1 から C_6 まで)置換を称し、環状アミン類は、場合によっては、酸素、窒素、及び硫黄から選択された1~2個のさらなるヘテロ原子を含有する、好ましくは、5員環から7員環窒素のヘテロ環である。Zは、硫黄又は酸素であり、酸素であることは好ましい。

10

【0037】

好ましいモルホリノオリゴマーは、ホスホロジアミデート結合モルホリノオリゴマーであり、本明細書ではPMOと称される。このようなオリゴマーは、図2Bに示されるようなモルホリノサブユニット構造からなり、 $X = NH_2$ 、 NHR 、又は NR_2 (式中Rは、低級アルキル、好ましくはメチルである)であり、 $Y = O$ 、及び $Z = O$ であり、 P_i 及び P_j は、塩基特異的水素結合により、ポリヌクレオチドにおける塩基を結合させるのに有効なプリン又はピリミジン塩基対部分である。また、交互ホスホロジアミデート連結部を有する構造が好ましく、図2Bにおいて、メトキシ又はエトキシなど、 $X =$ 低級アルコキシであり、 $Y = NH$ 又はRが低級アルキルであるNRであり、 $Z = O$ である。

20

【0038】

特に、アルキル基、アルコキシ基、チオアルコキシ基、又はアルキルアミノ基に関して用語の「置換されている」とは、例えば、ハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、チオール、アルキルチオ、アミノ、アルキルアミノ、イミノ、オキソ(ケト)、ニトロ、シアノ、又はカルボン酸、スルホン酸、又はホスホン酸のような種々の酸、又はエステル類などのヘテロ原子含有置換基を有する炭素上の水素原子の交換を指す。それはまた、アルキル基、カルボニル基又は他の炭素含有基を有するヘテロ原子上の水素原子(アミン水素など)の交換を指すことができる。

【0039】

ウイルスゲノムRNAに関連する、本明細書に用いられる用語の「標的」は、ウイルスゲノムRNAを称し、特に本明細書に記載された一本鎖RNA(ssRNA)ウイルスのプラス鎖RNA鎖の5'末端40の塩基内のステムループ二次構造を伴う領域を指す。

30

【0040】

用語の「標的配列」とは、オリゴヌクレオチド類縁体の特異的である標的RNAの一部であり、即ち、オリゴヌクレオチド類縁体が、相補的配列のワトソン-クリック塩基対によりハイブリダイズする配列を指す。以下から分かるとおり、標的配列は、ウイルスのプラス鎖RNAの連続領域であり得るか、二次構造に関与する5'配列と3'配列の両方の相補的断片からなり得る。

【0041】

用語の「ターゲティング配列」は、RNAゲノム内の標的配列に相補的である(さらに本質的に相補的を意味する)オリゴヌクレオチド類縁体における配列である。類縁化合物の全配列、又は一部だけは、標的配列に相補的であり得る。例えば、20の塩基を有する類縁体において、12~14だけが、ターゲティング配列となり得る。典型的に、ターゲティング配列は、類縁体の連続塩基で形成されるが、例えば、類縁体の反対端から一緒に置かれる場合、標的配列にかける配列を構成する非連続配列から交互に形成できる。以下に見られるように、標的配列及びターゲティング配列は、ウイルスのプラス鎖RNA鎖の5'末端40の塩基内の領域に対する類縁体の結合が、二次構造、特にこの領域における3'ステムループ構造の大部分を破壊するために作用するように選択される。

40

【0042】

50

標的配列及びターゲティング配列は、ハイブリダイゼーションが逆平行配位で生じる場合、互いに「相補的」とであると記載される。ターゲティング配列は、標的配列に「ほとんど」又は「本質的な」相補性及び本発明の目的のための機能をなお有し得、即ち、なお「相補的」であり得る。本発明に使用されるオリゴヌクレオチド類縁化合物は、10のヌクレオチドから標的配列を有しながら多くて1つのミスマッチを有することが好ましく、20から多くて1つのミスマッチを有することが好ましい。代わりに、使用されたアンチセンスオリゴマー類は、本明細書に明示された代表的なターゲティング配列を有して、少なくとも90%配列相同性、好ましくは少なくとも95%配列相同性を有する。

【0043】

本質的に45 超、好ましくは少なくとも50、典型的には60 ~ 80 又はそれ以上の T_m による生理的条件下で、オリゴマーが標的にハイブリダイズする場合、オリゴヌクレオチド類縁体は、標的ポリヌクレオチドに「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、ストリンジентなハイブリダイゼーション条件に対応することが好ましい。所与のイオン強度及びpHにおいて、 T_m は、標的配列の50%が、相補的ポリヌクレオチドにハイブリダイズする温度である。繰り返すが、このようなハイブリダイゼーションは、標的配列にアンチセンスオリゴマーの「ほとんど」又は「本質的な」相補性を生じ得、並びに正確な相補性を生じ得る。

【0044】

「ヌクレアーゼ耐性」のオリゴマー分子(オリゴマー)は、その骨格が、体内で共通の細胞外及び細胞内ヌクレアーゼにより非ハイブリダイズ又はハイブリダイズの形態で、ヌクレアーゼ開裂に本質的に耐性であるものを指す；即ち、該オリゴマーが曝される体内の通常のヌクレアーゼ条件下でヌクレアーゼ開裂がほとんどないか、又はまったくないことを示す。

【0045】

「ヘテロ二重鎖」とは、オリゴヌクレオチド類縁体と標的RNAの相補的部分との間の二重鎖を指す。「ヌクレアーゼ耐性ヘテロ二重鎖」とは、該ヘテロ二重鎖が、二重鎖RNA/RNA又はRNA/DNA複合体を切断できるRNAs e Hなどの細胞内及び細胞外ヌクレアーゼによりインビボ分解に本質的に耐性になるように、アンチセンスオリゴマーのその相補的標的への結合により形成されるヘテロ二重鎖を指す。

【0046】

「標的RNAに關与する塩基特異的細胞内結合事象」とは、オリゴヌクレオチド類縁体の細胞内標的RNA配列への特異的結合を指す。このような結合の塩基特異性は、配列特異性である。例えば、一本鎖ポリヌクレオチドは、配列に相補的である一本鎖ポリヌクレオチドに特異的に結合できる。

【0047】

感染ssRNAウイルスに対して標的にされたアンチセンスオリゴマーの「有効量」は、感染ウイルスの複製率、及び/又はウイルス負荷、及び/又はウイルス感染を伴う症状を減少させるのに有効な量である。

【0048】

本明細書に用いられる用語の「体液」は、尿、唾液、血漿、血液、髄液、など、対象から得られた種々のサンプルタイプ、或いは皮膚細胞又は皮膚細片などの生体起源の他のサンプルを包含し、細胞又はそれに懸濁された細胞断片、又は液体培地及びその溶液を指すことができる。

【0049】

用語の「相対量」は、試験測定と対照測定との間で比較が成される際に使用される。反応で複合体を形成する試薬の相対量は、対照種と反応する量と比較して試験種と反応する量である。対照種は、同じアッセイで別々に操作し得るか、同じサンプルの一部(例えば、組織断片中の悪性領域周囲の正常な組織)であり得る。

【0050】

個体又は細胞の「処置」は、個体又は細胞の自然過程を変更するための手段として提供

10

20

30

40

50

される本発明の任意のタイプである。処置は、限定はしないが、例えば、製薬組成物の投与を含み、予防的実施、又は病的事象の開始に続く実施、或いは病因薬剤との接触を実施できる。特定のウイルスによる感染と診断された患者に関する関連用語の「治療成績の改善」とは、ウイルス増殖、又はウイルス負荷、或いはその特定のウイルスによる感染に伴う検出可能な症状の遅速化又は減少を指す。

【0051】

薬剤が、細胞膜を通過して通過拡散以外のメカニズムにより細胞に入ることができる場合、薬剤は「哺乳動物細胞により能動的に吸収」される。この薬剤は、例えば、「能動輸送」により輸送でき、例えばATP依存輸送メカニズムにより、或いは「輸送促進」により、哺乳動物の細胞膜を通過して薬剤の輸送に関連し、薬剤の輸送タンパク質への結合を必要とする輸送メカニズムによって細胞膜を通過してアンチセンス薬剤の輸送に関連し、次いで膜を通過した結合薬剤の通過を促進する。能動的輸送及び促進輸送の双方に関して、オリゴヌクレオチド類縁体は、下記に定義されるように、本質的に非荷電骨格を有することが好ましい。或いは、アンチセンス化合物は、飲食作用メカニズムにより細胞内に取り込むことができるカチオン性脂質又はリポソームで複合化されたアニオン性骨格を有する薬剤などの複合化形態で製剤化できる。この類縁体はまた、例えば5'末端又は3'末端でアルギニンに富むペプチド、例えば、HIV TATタンパク質の一部、又はポリアルギニンに複合し、記載された標的宿主細胞への輸送を促進できる(Moulton、Nelsonら2004年)。本発明を実施する上で有用な代表的なアルギニンに富むペプチドは、配列リスト表において配列番号121~126として記載されている。

【0052】

生理的条件下で自発的に、一本鎖RNAの1つ又は複数の領域によって分離される二本鎖(二重鎖)RNAの1つ又は複数の領域を形成できる場合、配列は、「内部ステムループ二次構造を形成可能」である。この構造におけるステム及びループは、ループ化一本鎖領域において終端する二重鎖RNA領域(ステム)を言う。本発明により包含されるいくつかのウイルスの5'末端領域のステムループ構造は、図4A~4Eに見られる。西ナイルウイルス(WNV)又はHCVに見られるように、例えば(図4A)、ステムループ構造は、単独ステム、単独ループ、及び非二重鎖末端領域を含むことができる。他の場合において、例えば、黄熱病ウイルス(YFV)又はデング熱-2ウイルス(図4A)、ステムループ二次構造は、非二重鎖領域により散在された2つ以上の二本鎖「ステム」領域及び単独ループを含み得る。

【0053】

「このようなステムループ構造の破壊」とは、本発明のオリゴヌクレオチド類縁化合物と、ウイルスゲノムの5'末端領域内の二重鎖形成配列との間で安定なヘテロ二重鎖複合体を形成することにより、この領域内の二重鎖RNA形成を妨げることによる、RNAウイルスプラス鎖ゲノムの5'末端領域のステムループ構造の任意の部分の破壊を意味する。ウイルスゲノムの5'末端領域内の二次ステムループ構造を破壊できるターゲティング配列の選択則は、以下に考察される。

【0054】

II. 標的ウイルス

本発明は、一本鎖のプラス鎖RNAウイルスの有効性は、(i)プラス鎖ウイルスRNA鎖の5'末端配列に対し、特にこの領域のステムループ二次構造に寄与する標的配列に対して標的にし、(ii)アンチセンス化合物と宿主細胞内のウイルスとの間の有効な相互作用を可能にする、物理的及び薬物動態学的特徴を有する、アンチセンスオリゴヌクレオチド類縁化合物に、ウイルスにより感染した細胞を曝露させることによって達成できるという発見に基づいている。一態様において、オリゴマーは、ウイルスにより感染した哺乳動物対象を治療する際に使用できる。

【0055】

本発明は、(i)一本鎖、(ii)正極性、及び(iii)32kb未満であるゲノムを有するRNAウイルスを標的にする。標的ウイルスはまた、ウイルスRNA複製にお

る第1ステップとして負極性、マイナス鎖又は陰方向RNAを有するゲノムRNA鎖を合成する。特に標的ウイルスファミリーとしては、フラビウイルス科、ピコルナウイルス科、カリシウイルス科、トガウイルス科、アルテリウイルス科、コロナウイルス科、アストロウイルス科及びヘペウイルス科ファミリーが挙げられる。ファミリー、属及び種により組織化された標的ウイルスは、表1に記載されている。これら8つのファミリー及びそれらのメンバーの各々の種々の物理的、形態学的、及び生物学的特徴は、例えば、Text book of Human Virology, R. Belshé 編集、第2版、Mosby、1991年及びthe University Virus Database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/index.htm)に見ることができる。各ファミリーの重要な生物学的特徴のいくつかは、以下に要約している。

10

【0056】

A. フラビウイルス科。このファミリーのメンバーはいくつかの重大なヒト病原体を含み、それらの中で、フラビウイルス属の蚊媒介性メンバーは、黄熱病ウイルス(YFV)、西ナイル熱ウイルス(WNV)、日本脳炎ウイルス(JEV)、セントルイス脳炎ウイルス(SLEV)、マリーバレー脳炎ウイルス、クンジン(Kunjin)ウイルス、及び4つの血清型のデング熱ウイルス(DEN1~4)を含む。

【0057】

フラビウイルス属のダニ媒介性メンバーとしては、ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)及びオムスク出血性熱ウイルス(OHFV)、跳躍病ウイルス、ポーワッサン(Powassan)ウイルス、キャサヌール森林病ウイルス及びアルカーマ(Alkhurma)ウイルスが挙げられる。

20

【0058】

フラビウイルス科はまた、ヘパシウイルス属のメンバーであるC型肝炎ウイルスを含む。

【0059】

B. ピコルナウイルス科。これは、医学的に重要なファミリーであり、そのメンバーは、ヒト及び動物双方を感染させ、重篤な麻痺(麻痺性ポリオ)、アスペクト髄膜炎、肝炎、胸側痛、心筋炎、皮膚発疹、及び風邪を引き起こすことがあり；不明瞭な感染が共通している。いくつかの医学的に重要な属は、このファミリーのメンバー；ポリオウイルス(PV)及びヒト腸内ウイルス(例えば、コクサッキーウイルス)などの腸内ウイルス；A型肝炎ウイルス(HAV)を含む肝炎ウイルス；ライノウイルス；及び口蹄疫ウイルス(FMDV)を含むアフタウイルスである。

30

【0060】

ヒトラインウイルス89(HRV-89)及びヒトラインウイルスB(HRV-B)などのライノウイルス類は、ヒトの感冒の素因として認められている。血清型は、1Aから100まで指定されている。伝播は、主としてエアロゾル経路であり、ウイルスは鼻内で複製する。

【0061】

すべてプラス鎖RNAウイルスのように、ピコルナウイルスのゲノムRNAは、感染性であり；即ち、ゲノムRNAは、宿主の転写事象なしで直接ウイルスタンパク質の合成を指示することができる。

40

【0062】

C. カリシウイルス科。カリシウイルス科のメンバーは、ヒト及び動物双方を感染させる。ベシウイルス属は、上皮水疱形成を含み、動物の流産急発の原因の疑い、並びにいくつかの形態のヒト肝炎(非AからEを通して)の疑いのある哺乳動物において、疾患発現を生じる(Smithら、1998年)。他のカリシウイルス科属としては、ノーウォーク様及びサッポロ様ウイルスが挙げられ、ヒトカリシウイルス、及びウサギ出血性疾患ウイルス、特に急性且つ致死性のウイルスを含むウサギウイルスを共に含む。

50

【0063】

ヒトカリシウイルスは、成人において世界中に広がったウイルス性下痢発生、並びに乳児の重要な病原体の最も共通した原因である(O'Ryan 1992年)。消化管に棲息する少なくとも5つのタイプのヒトカリシウイルスがある。ノーウォークウイルスは、急性流行性胃腸炎を生じる一般に広まったヒト作用物質であり、ヒトにおける全発生胃腸炎のおよそ10%の原因となっている(Murrayら、1998年)。

【0064】

ベシウイルスは現在、いくらかあいまいで宿主特異的として見なされているものから、より可変域群の既知のウイルス病原体の1つとして認められているものまで出現する。例えば、単一血清型は、海水魚(オパールアイ)、アシカ、ブタ、及びヒトを含む16種の多様な群の動物種を感染させることが示されている。

10

【0065】

D. トガウイルス。このファミリーのメンバーは、ヒト及び動物双方を感染させる蚊媒介性ウイルスを含む。該ファミリーは、アルファウイルス属及びルビウイルス(風疹)を含む。代表的なアルファウイルスとしては、シンドブス、西部ウマ脳炎ウイルス(WEEV)、東部ウマ脳炎ウイルス(EEEV)及びベネズエラウマ脳炎ウイルス(VEEV)が挙げられる。

【0066】

E. E型肝炎様ウイルス。E型肝炎ウイルス(HEV)は、1987年に最初に記載され、1991年米国で初めて報告された、該ウイルスは、小型一本鎖RNA特性に基づきカリシウイルス科のメンバーとして最初に記載された。いくつかは、HEVを依然としてカリシウイルス科に属するものとして分類されるが、最近では、ヘペウイルス科ファミリーのメンバーとしてのみ分類されている。感染は、A型肝炎ウイルス感染に非常に似ていると考えられている。この疾患は、初期感染約20日後に現れる急性ウイルス感染であり、ウイルスは、血清中に約20日間見ることができる。伝染は、汚染水を介して生じ、地理的には、未開発国に限定される。

20

【0067】

F. コロナウイルス科、アルテリウイルス科及びアストロウイルス科。コロナウイルス科のメンバーは、通常の風邪の10%から30%及び他の呼吸器系感染を引き起こすヒトコロナウイルス並びにマウス肝炎ウイルスを含む。さらに最近、重度急性呼吸器症候群(SARS)のウイルス原因が、コロナウイルスであると確認されている。アルテリウイルス科としては、2種の重要な動物ウイルス、ウマ動脈炎ウイルス(EAV)及びブタ生殖並びに呼吸器症候群ウイルス(PRRSV)が挙げられる。アストロウイルス科としては、ヒトアストロウイルス(HAstV)が挙げられる。

30

【0068】

下表1は、ファミリー及び属により組織化された本発明の標的ウイルスを記載している。

【0069】

【表1】

ファミリー	層	ウイルス	
フラビウイルス科	フラビウイルス	セントルイス脳炎ウイルス (SLEV)	
		日本脳炎ウイルス (JEV)	
		マリーバレー脳炎ウイルス (MVEV)	
		西ナイル熱ウイルス(WNV)	
		黄熱病ウイルス(YFV)	
		デング熱ウイルス1型~4型(DEN1-4)	
		ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)	
		オムスク出血性熱ウイルス(OHFV)	
		ポーワッサン (Powassan) ウイルス	
		ヘパシウイルス	C型肝炎ウイルス(HCV)
ピコルナウイルス科	腸内ウイルス	ポリオウイルス(PV)	
		ヒト腸内ウイルスA (HEV-A)	
		ヒト腸内ウイルスB (HEV-B)	
		ヒト腸内ウイルスC (HEV-C)	
		ヒト腸内ウイルスD (HEV-D)	
		ヒト腸内ウイルスE (HEV-E)	
		ウシ腸内ウイルス (BEV)	
		ライノウイルス	ヒトライノウイルスB (HRV-B)
			ヒトライノウイルス89 (HRV-89)
			アプタウイルス
	ヘパトウイルス	A型肝炎ウイルス(HAV)	
カリシウイルス科	ベシウイルス	ネコカリシウイルス (FCV)	
		イヌカリシウイルス (CaCV)	
		ブタ腸内カリシウイルス (PoCV)	
		カリシウイルス株NB (CVNB)	
		ノロウイルス	ノーウォークウイルス(NV)
へペウイルス科	へペウイルス	E型肝炎ウイルス(HEV)	
トガウイルス科	ルビウイルス	風疹ウイルス(RUBV)	
		アルファウイルス	東部ウマ脳炎ウイルス(EEEV)
			西部ウマ脳炎ウイルス(WEEV)
			ベネズエラウマ脳炎ウイルス(VEEV)
コロナウイルス科	コロナウイルス	ブタ流行性下痢 (PEDV)	
		伝染性胃腸炎(TGEV)	
		SARS コロナウイルス (SARS-CoV)	
		ウシコロナウイルス (BCoV)	
		ヒトコロナウイルス 229E (HCoV-229E)	
		マウス肝炎(MHV)	
アルテリウイルス科	アルテリウイルス	ウマ動脈炎ウイルス(EAV)	
		ブタ呼吸器及び生殖症候群 (PRRSV)	
アストロウイルス科	ママストロウイルス	ヒト動脈炎ウイルス(HAstV)	

10

20

30

【0070】

III. ウイルス標的領域

RNAテンプレート上でRNAを合成する能力において、すべてのRNAウイルスのような一本鎖のプラス鎖RNAウイルスは独特である。このタスクを達成するために、それらのウイルスは、独特なRNA依存RNAポリメラーゼ(RdRp)の合成、可能性としてウイルスRNAの3'及び5'末端の複数未翻訳領域(UTR)に特異的結合する他のタンパク質の合成をコードし、誘導する。ウイルスRNA類は、線状分子であるので、RdRp類は、それらのゲノムの5'末端の完全性を保持しながらデノボRNA複製を開始させるために独特な方法を使用しなければならない。プラス鎖(+鎖)ウイルスRNA複製は、以下の経路を経て進行することが一般に受け入れられている：

+鎖RNA -鎖RNA合成 RF +鎖RNA合成

40

50

式中、「-鎖RNA」は、「+鎖RNA」に相補的なマイナスセンス又はマイナス鎖RNAであり、「RF」（複製形態）は、二本鎖RNAである。マイナス鎖RNAは、ウイルスタンパク質への翻訳又は新たに形成されたビリオンへの取込みを予定するプラス鎖RNAの複数コピーの複製用のテンプレートとして用いられる。ポリオウイルス感染細胞内のプラス鎖対マイナス鎖RNAの比率は、C型肝炎細胞においておよそ50：1であり、各マイナス鎖RNAは、多数のプラス鎖RNA分子の合成用のテンプレートとして役立つことを示している。

【0071】

本発明は、プラス鎖RNAウイルスのいくつかのクラスは、ウイルスプラス鎖の5'UTR内の配列、特に5'UTR内の1つ又は複数のシス作用性因子（ステムループ構造）を破壊するようにデザインされた配列に結合できるアンチセンス化合物にウイルスを曝すことによって有効に阻止できるという発見に基づいている。

【0072】

したがって、有効な標的領域（アンチセンス化合物が結合するプラス鎖5'UTRの配列）を同定する際の第1のステップとして、1つは、ステムループ二次構造に關与する5'UTR内のこれらの領域を同定する。これは、例えば、インプットRNA配列の最小自由エネルギー状態に関する検索に基づくコンピュータアシスト二次構造予測により成すことができる（Zuker 2003年）。この分析を、種々の標的ウイルスの5'UTR領域の末端40の塩基に適用すると、図4A～4Bに示されている二次構造又はステムループが得られる。図に見られるように、二次構造（シス作用性因子を形成）の領域は、典型的に末端20～25の塩基に見られるが、多くの場合、40位までの塩基に見られる。したがって、好ましい標的配列は、最末端40までのヌクレオチド、典型的には5'末端5～35のヌクレオチドを含むプラス鎖RNAの5'末端領域である。好ましい標的領域は、図4A～4Dに示されているように、これらの領域の二次構造に關与するこれらの塩基を含む。特にターゲティング配列は、プラス鎖RNAの5'末端領域に相補的であり、RNAに対する化合物のハイブリダイゼーションが、この領域のステムループ二次構造、好ましくは大抵の5'末端ステムループ二次構造を破壊するのに有効になるように選択される少なくとも12の塩基配列を含む。例として、図4Aは、NCBI GenBankのデータベースなどのよく知られた出所源から入手できるウイルスゲノム配列の二次構造を示している。或いは、当業者は、開示された文献において、例えば、指定されたウイルスに関する配列情報を開示している参考文献を検索することにより、多数の対象ウイルスに関する配列を見つけることができる。完全又は部分的ウイルス配列が得られたら、ウイルスの5'末端配列が同定される。

【0073】

8つのウイルスファミリーの各々の一般的ゲノム構成は下記に考察され、次いで代表的な標的配列が、各ファミリー内の選択メンバー（属、種又は株）に關して得られる。

【0074】

A．ピコルナウイルス科。典型的なピコルナウイルスであるヒトライノウイルス89のゲノム（図3A）は、一本鎖、プラス鎖、およそ7.2kbのポリアデニル化RNAの単一分子である。該ゲノムは、第1のポリタンパク質の上流、単一のORF、及びその5'末端に共有結合で連結しているVPg（結合ウイルスゲノム）タンパク質に位置している長い618のヌクレオチドUTRを含む。ORFは、2つのセグメントに細分され、その各々は、ポリタンパク質をコードする。第1のセグメントは、開裂され、続いてVP1からVP4のウイルスタンパク質を形成するポリタンパク質をコードし、第2のセグメントは、プロテアーゼ及びポリメラーゼを含むウイルスタンパク質の前駆体であるポリタンパク質をコードする。ORFはポリA終止配列で終結する。

【0075】

B．カリシウイルス科。図3Bは、カリシウイルスのゲノム、この場合はノーウォークウイルスを示している。該ゲノムは、感染、一本鎖、およそ7.6kbのプラス鎖RNAの単一分子である。図に示されるように、該ゲノムは、非修飾の第1のオープンリーディ

10

20

30

40

50

ングフレームの小型UTR上流を含む。該ゲノムの3'末端は、ポリアデニル化されている。該ゲノムは、3つのオープンリーディングフレームを含んでいる。第1のオープンリーディングフレームは、ポリタンパク質をコードし、続いて開裂してヘリカーゼ、プロテアーゼ、RNA依存RNAポリメラーゼ、及びウイルスゲノムRNAの5'末端に結合するタンパク質の「VPg」を含むウイルス非構造的タンパク質を形成する（Clark及びLambden、2000年）。第2のオープンリーディングフレームは、単一カプシドタンパク質をコードし、第3のオープンリーディングフレームは、実在する塩基性であって、恐らくRNAと結合できる構造的タンパク質であると報告されているものをコードする。

【0076】

C. トガウイルス科。図3Cは、トガウイルスのゲノムの構造、この場合トガウイルスゲノムの風疹ウイルスである。該ゲノムは、感染している一本鎖、およそ9.8kbのプラス鎖RNAの単一線状分子である。5'末端は、7-メチルG分子によりキャップされ、3'末端は、ポリアデニル化されている。完全長且つサブゲノムのメッセンジャーRNAを示しており、翻訳後のポリタンパク質の開裂は、RNA複製中に生じる。該ゲノムはまた、2つのオープンリーディングフレームを含んでいる。第1のオープンリーディングフレームは、ポリタンパク質をコードし、続いて4つの機能性タンパク質、nsP1からnsP4に開裂する。第2のオープンリーディングフレームは、ウイルスカプシドタンパク質をコードし、3つの他のウイルスタンパク質、PE2、6K及びE1に開裂する。

【0077】

D. フラビウイルス科。図3Dは、ヘパシウイルス属のC型肝炎のゲノム構造を示している。HCVゲノムは、約9.6kbの一本鎖のプラス鎖RNAの単一線状分子であり、341のヌクレオチド5'UTRを含有する。5'末端は、m⁷GppAmp分子によりキャップされ、3'末端は、ポリアデニル化されていない。該ゲノムは、1つだけのオープンリーディングフレームを含んでおり、前駆体ポリタンパク質をコードして6つの構造的且つ機能的タンパク質に分離できる。

【0078】

E. コロナウイルス科。図3Eは、ヒトコロナウイルス229Eのゲノム構造を示している。このコロナウイルスは、コロナウイルス科及び292ヌクレオチド5'UTRに典型的なおよそ27.4kbの大型ゲノムを有している。該ウイルスゲノムの大抵の5'-ORFは、ウイルスコード化プロテアーゼにより開裂されて、RdRp及びヘリカーゼなどのいくつかの非構造的タンパク質を放出する大型ポリタンパク質に翻訳される。次にこれらのタンパク質は、ウイルスゲノムを複製させ、並びに他のウイルスタンパク質の合成に使用される入れ子型転写を発生させる。

【0079】

5'末端を表す代表的なウイルス核酸配列、対応するウイルスゲノムに関する第1の（大抵は5'末端）40塩基のプラス鎖配列についてのGenBank参照は、下表2に記載している。表2のヌクレオチド配列番号は、プラス鎖RNAのGenBank参照から引用されている。これらの配列は、文献又は特許情報源の入手できる遺伝子配列データベースから利用できる5つのウイルスファミリーにおいて、他の配列の単なる説明だけであることを認識するであろう。配列番号1~40として同定されている下記の配列もまた、本明細書の最後に配列表、表4に記載している。

【0080】

表2の標的配列は、表示されたウイルスRNA類のプラス鎖配列の5'末端における40塩基である。示しているこの配列は、5'から3'への配向にあるので、3'末端ヌクレオチドは、記載された配列の末端にある。塩基記号「N」は、これらの位置のヌクレオチドが現在知られていないことを示している。ステムループ二次構造を伴う各配列内の領域は、図4A~4Dに示しているこれらの配列における予測された二次構造から見ることができる。

【0081】

10

20

30

40

50

【表 2 - 1】

表2 代表的な3' 末端のウイルス核酸標的配列

ウイルス	GenBank 登録番号	標的配列 (5' から3')	配列 番号
セントリス脳炎 ウイルス (SLEV)	M18929	GNNGATGTTTCGCGTCGGTGAGCGGAGAGGAA ACAGATTTTC	1
日本脳炎ウイルス (JEV)	NC 001437	AGAAGTTTATCTGTGTGAACTTCTTGGCTTAG TATCGTTG	2
マリーバレー脳炎 ウイルス (MVEV)	NC 000943	AGACGTTTCATCTGCGTGAGCTTCCGATCTCA GTATTGTTT	3
西ナイル熱ウイルス (WNV)	NC 001563	AGTAGTTCGCCTGTGTGAGCTGACAACTTA GTAGTGTTT	4
黄熱病ウイルス (YFV)	NC 002031	AGTAAATCCTGTGTGCTAATTGAGGTGCATT GGTCTGCAA	5
デング熱ウイルス2型 (DEN2)	M20558	AGTTGTTAGTCTACGTGGACCGACAAAGACA GATTCTTTG	6
C型肝炎ウイルス (HCV)	NC 004102	GCCAGCCCCCTGATGGGGGCGACACTCCACC ATGAATCAC	7
ダニ媒介性脳炎 ウイルス (TBEV)	NC 001672	AGATTTTCTTGCACGTGCATGCGTTTGCTTCG GACAGCAT	8
オムスク出血性熱 ウイルス (OHFV)	NC 005062	AGATTTTCTTGCACGTGCGTGCGCTTGCTTCA GACAGCAA	9
ポーワッサンウイルス	NC 003687	AGATTTTCTTGCACGTGTGTGCGGGTGCTTTA GTCAGTGT	10
ポリオウイルスー マホニイ株 (PV)	NC 002058	TTAAAACAGCTCTGGGGTTGTACCCACCCCA GAGGCCAC	11
ヒト腸内ウイルスA (HEV-A)	NC 001612	TTAAAACAGCCTGTGGGGTTGTACCCACCCAC AGGGCCAC	12
ヒト腸内ウイルスB (HEV-B)	NC 001472	TTAAAACAGCCTGTGGGGTTGTTCCACCCAC AGGCCATT	13
ヒト腸内ウイルスC (HEV-C)	NC 001428	TTAAAACAGCTCTGGGGTTGCTCCACCCCA GAGGCCAC	14
ヒト腸内ウイルスD (HEV-D)	NC 001430	TTAAAACAGCTCTGGGGTTGTTCCACCCCA GAGGCCAC	15
ヒト腸内ウイルスE (HEV-E)	NC 003988	GAGTGTTCCACCCAACAGGCCCACTGGGTG TTGTACTCT	16
ウシ腸内ウイルス (BEV)	NC 001859	TTAAAACAGCCTGGGGTTGTACCCACCCCT GGGGCCAC	17
ヒトラノウイルス89 (HRV-89)	NC 001617	TTAAAACAGGAGTGGGGTTGTTCCCACTCAC TCCACCCAT	18
ヒトラノウイルスB (HRV-B)	NC 001490	TTAAAACAGCGGATGGGTATCCCAACCATTG ACCCATTGG	19

10

20

30

40

【表 2 - 2】

ウイルス	GenBank 登録番号	標的配列 (5' から3')	配列 番号
口蹄疫ウイルス (FMDV)	AY593768	TTGAAAGGGGGCGCTAGGGTTTCACCCCTAG CATGCCAAC	20
A型肝炎ウイルス (HAV)	NC 001489	TTCAAGAGGGGTCTCCGGGAATTTCCGGAGT CCCTCTTGG	21
ネコカリシウイルス (FCV)	NC 001481	GTAAAAGAAATTTGAGACAATGTCTCAAAC CTGAGCTTC	22
イヌカリシウイルス (CaCV)	NC 004542	GTAAATGAGAAATGGCTTCTGCCATCGCTCT CTCGAGCTC	23
ブタ腸内カリシ ウイルス (PoCV)	NC 000940	GTGATCGTGATGGCTAATTGCCGTCCGTTGC CTATTGGGC	24
カリシウイルス株NB (CVNB)	NC 004064	GTGATTTAATTATAGAGAGATAGTGACTTTC ACTTTTCTT	25
ノーウォークウイルス (NV)	NC 001959	GTGAATGATGATGGCGTCAAAAGACGTCGTT CCTACTGCT	26
E型肝炎ウイルス (HEV)	NC 001434	GCCATGGAGGCCCATCAGTTTATTAAGGCTC CTGGCATCA	27
風疹ウイルス (RUBV)	NC 001545	ATGGAAGCTATCGGACCTCGCTTAGGACTCC CATTCCCAT	28
SARSコロナウイルス (SARS-CoV)	NC 004718	ATATTAGGTTTTTACCTACCCAGGAAAAGCC AACCAACCT	29
ブタ流行性下痢 (PEDV)	NC 003436	ACTTAAAAAGATTTTCTATCTACGGATAGTTA GCTCTTTT	30
伝染性胃腸炎 (TGEV)	NC 002306	ACTTTTAAAGTAAAGTGAGTGTAGCGTGGCT ATATCTCTT	31
ウシコロナウイルス (BCoV)	NC 003045	GATTGCGAGCGATTTGCGTGCGTGCATCCCG CTTCACTGA	32
ヒトコロナウイルス 229E (HCoV-229E)	NC 002645	ACTTAAGTACCTTATCTATCTACAGATAGAAA AGTTGCTT	33
マウス肝炎 (MHV)	NC 001846	TATAAGAGTGATTGGCGTCCGTACGTACCCT CTCAACTCT	34
ブタ生殖及び 呼吸器症候群 (PRRSV)	AF 176348	ATGACGTATAGGTGTTGGCTCTATGCCTTGG CATTTGTAT	35
ウマ動脈炎ウイルス (EAV)	NC 002532	GCTCGAAGTGTGTATGGTGCCATATACGGCT CACCACCAT	36
ヒト動脈炎ウイルス (HAstV)	NC 001943	CCAAGAGGGGGGTGGTGGTGGCCTTTGGCT TATCAGTGT	37
東部ウマ脳炎 ウイルス (EEEV)	NC 003899	ATAGGGTACGGTGTAGAGGCAACCACCCTAT TTCCACCTA	38
西部ウマ脳炎 ウイルス (WEEV)	NC 003908	ACCCTACAACTAATCGATCCAATATGGAAA GAATTCACG	39
ベネズエラウマ脳炎 ウイルス (VEEV)	NC 001449	ATGGGCGGCGCAAGAGAGAAGCCCAAACCAA TTACCTACC	40

【 0 0 8 2 】

ターゲティング配列を選択するために、プラス鎖RNA (配列番号1~40) の5'末

端領域の相補的配列にハイブリダイズさせる場合、この領域内のステムループ二次構造、好ましくはこの領域内の最初のステム構造を破壊するのに有効である配列を探す。例として、西部ナイル熱ウイルス（図4AのWNV）に関する好適なターゲティング配列は、図に示されたステムループ構造を破壊するであろう。3つの一般的なクラスの配列は、好適と思われる（代表的な12~14の塩基ターゲティング配列は、説明目的のために示す）：

（1）ステム及びその周囲塩基の大抵の5'塩基（1~14）を標的にする5'-ACAGGCGAACTACT-3'などの配列；

（2）ステム及びその周囲塩基（13~24）の相補的塩基を標的にする5'-GTCAGCTCACAC-3'などの配列；

（3）ステムループ及び周囲塩基（7~20）の片側又は両「側」の部分の部分を標的にする5'-GCTCACACAGGCGA-3'などの配列であって、典型的にはこの配列は、すべてを破壊するはずであるが、少なくともステム構造を形成する2~4の対塩基を破壊する。

【0083】

この選択手法は、表2に示される他の配列に適用できる方法であることを認識するであろう。例えば、図4Aに示される黄熱病ウイルス（YFV）に関して、上記3つの一般的なクラス後にパターン化される代表的な14~18の塩基配列としては、以下の配列を挙げるができる：

（1）最初のステム及び周囲塩基の大抵の5'塩基（1~16）を標的にする5'-GCACACAGGATTTACT-3'などの配列；

（2）最初のステム及びその周囲塩基（22~35）の相補的塩基を標的にする5'-GTCCAATGCACCTC-3'などの配列；

（3）ステム及び周囲塩基（15~32）の両側の一部を標的にする5'-CAATGCACCTCAATTAGC-3'などの配列。

【0084】

当然のことながら、このように選択されたターゲティング配列は、例えば、12塩基のようにより短くできるか、又は例えば、20塩基のようにより長くでき、この配列が、標的とのハイブリダイゼーションの際にステム構造を破壊するのに十分に相補的で、ウイルスプラス鎖により45以上のT_mを有するヘテロ二重鎖を形成する限り、少数のミスマッチを含むであろう。

【0085】

より一般的に、標的とターゲティング配列との間の相補性度は、安定な二重鎖を形成するのに十分である。アンチセンスオリゴマーと標的RNA配列との相補性領域は、8~11塩基と短くてもよいが、好ましくは12~15以上の塩基、例えば、12~20の塩基、又は12~25の塩基である。約14~15の塩基のアンチセンスオリゴマーは、一般にウイルスゲノムに独特な相補性配列を有するほど十分に長い。さらに、相補性塩基の最短長は、下記に考察されるように、必要な結合T_mを達成するために要求され得る。

【0086】

40塩基と長いオリゴマーは、好適となり得るが、少なくとも最少数の塩基、例えば、8~11、好ましくは12~15の塩基が、標的配列に相補的である。しかしながら、一般に細胞内への促進又は能動的取込みは、約30未満、好ましくは25未満、より好ましくは、20又はそれ以下の塩基のオリゴマーが最適である。さらに以下に記載されているPMOオリゴマーに関して、結合安定性と取込みの最適バランスは、一般に、14~22の塩基長で生じる。

【0087】

該オリゴマーは、ウイルス核酸標的配列に対して100%相補的であり得るか、又は例えば、オリゴマーとウイルス核酸標的配列との間で形成されたヘテロ二重鎖が、細胞ヌクレアーゼの作用及びインピボで発生し得る他の分解様式に耐えるほど十分に安定である限り変異体を収容させるためにミスマッチを含み得る。ヌクレアーゼによる開裂に対して感

10

20

30

40

50

受性が低いオリゴマー骨格を下記に考察する。ミスマッチが存在する場合、ハイブリッド二重鎖の中央よりも末端領域に対する不安定化が少ない。許されるミスマッチ数は、よく理解された二重鎖安定性の原理に従って、オリゴマーの長さ、二重鎖中のG:C塩基対のパーセンテージ、二重鎖中のミスマッチの位置に依る。このようなアンチセンスオリゴマーは、ウイルス核酸標的配列に対して必ずしも100%相補的ではないが、核酸標的の生物活性、例えば、ウイルスタンパク質の発現が調節されるように、標的配列に安定且つ特異的に結合することが有効である。

【0088】

オリゴマーと標的配列との間で形成された二重鎖の安定性とは、結合 T_m の機能及び細胞酵素的開裂に対する二重鎖の感受性である。相補的配列RNAに関するアンチセンス化合物の T_m は、Hamesらによる、Nucleic Acid Hybridization, IRL Press、1985年、107~108頁に記載されたもの、又はMiyada C.G.及びWallace R.B.、1987年、Oligonucleotide hybridization techniques, Methods Enzymol. 154巻、94~107頁に記載されたものなど、従来の方法により測定できる。各アンチセンスオリゴマーは、体温超、好ましくは50超の相補的配列RNAに関する結合 T_m を有する必要がある。 T_m は、60~80の範囲又はそれ以上が好ましい。よく知られた原理によれば、相補的ベースのRNAハイブリッドに関するオリゴマー化合物の T_m は、二重鎖におけるC:G対塩基の比率を増加させることにより、及び/又はヘテロ二重鎖の長さ(塩基対における)を増やすことにより上昇できる。同時に、細胞取込みを最適にする目的のために、オリゴマーのサイズを制限することが有利となり得る。この理由について、20以下の塩基長で高い T_m (50以上)を示す化合物は、一般に、高い T_m 値に関して20塩基よりも大きいことを必要とするものよりも好ましい。

【0089】

下表3は、表示されたウイルスのプラス鎖の5'末端40塩基領域の上流及び下流部分に相補的である5'から3'への配向性における代表的なターゲティング配列を示す。この配列は、ターゲティング配列が、上記に考察された一般的な分類則に従って選択される1つ又は複数のターゲティング配列のコレクションをここに提供する。したがって、例えば、セントルイス脳炎ウイルスに対する標的を選択する際に、配列番号40又は41、或いはウイルスの5'末端UTRにおける二次構造形成を阻止するのに有効な配列の一部のいずれかを選択できるであろう。

【0090】

10

20

30

【表3 - 1】

表3

5' 末端プラス鎖領域を標的にする代表的なアンチセンス配列

ウイルス	GenBank 登録番号	Ncts.	配列 (5' から3')	配列 番号
セントルイス脳炎ウイルス	M16614	1-18 11-30	ACCGACGCGAACATCNNC TCCTCTCCGCTCACCGACGC	41 42
日本脳炎ウイルス	NC 001437	1-18 11-30	TCACACAGATAAACTTCT AAGCCAAGAAGTTCACACAG	43 44
マリーバレー脳炎 ウイルス	NC 000943	1-18 11-30	TCACGCAGATGAACGTCT GAGATCGGAAGCTCACGCAG	45 46
西ナイル熱ウイルス	NC 001563	1-20 11-31	GCTCACACAGGCGAACTACT TAAGTTTGTCTCAGCTCACACAG	47 48
黄熱病ウイルス	NC 002031	1-22 21-40	CAATTAGCACACAGGATTTACT TTGCAGACCAATGCACCTCA	49 50
デング熱2型ウイルス	M20558	1-20 11-30	GTCCACGTAGACTAACAACCT GTCTTTGTCTCGTCCACGTAG	51 52
C型肝炎ウイルス	NC 004102	1-17 10-29	CCCATCAGGGGGCTGGC TGGAGTGTGCCCCCATCAG	53 54
ダニ媒介性脳炎ウイルス	NC 001672	1-20 21-40	ATGCACGTGCAAGAAAATCT ATGCTGTCCGAAGCAAACGC	55 56
オムスク出血性熱 ウイルス	NC 005062	1-21 13-32	CACGCACGTGCAAGAAAATCT TGAAGCAAGCGCACGCACGT	57 58
ポーワッサンウイルス	NC 003687	1-20 21-40	ACACACGTGCAAGAAAATCT ACACTGACTAAAGCACCCGC	59 60
ポリオウイルスー マホニイ株	NC 002058	1-24 21-40	GGTACAACCCAGAGCTGTTTTAA GTGGGCCCTCTGGGGTGGGTA	61 62
ヒト腸内ウイルス A	NC 001612	1-20 21-40	CAACCCACAGGCTGTTTTAA GTGGGCCCTCTGGGGTGGGTA	63 64
ヒト腸内ウイルス B	NC 001472	1-20 21-40	CAACCCACAGGCTGTTTTAA AATGGGCCTCTGGGGTGGGAA	65 66
ヒト腸内ウイルス C	NC 001428	1-20 21-40	CAACCCACAGGCTGTTTTAA GTGGGCCCTCTGGGGTGGGAG	67 68
ヒト腸内ウイルス D	NC 001430	1-20 21-40	CAACCCACAGGCTGTTTTAA GTGGGCCCTCTGGGGTGGGAA	69 70
ヒト腸内ウイルス E	NC 003988	1-20 21-40	CCTGTTGGGTGGGAACACTC AGAGTACAACACCCAGTGGG	71 72
ウシ腸内ウイルス	NC 001859	1-20 21-40	CAACCCACAGGCTGTTTTAA GTGGGCCCTCTGGGGTGGGTA	73 74
ヒトラノウイルス 89	NC 001617	1-20 21-40	CAACCCACTCCCAGTTTTAA ATGGGTGGAGTGAGTGGGAA	75 76
ヒトラノウイルス B	NC 001490	1-20 21-40	ATACCCATCCGCTGTTTTAA CCAATGGGTGCAATGGTGGG	77 78
口蹄疫ウイルス	AY593768	1-21 21-40	AACCCTAGCGCCCCCTTTCAA GTTGGCATGCTAGGGGTGAA	79 80
A型肝炎ウイルス	NC 001489	1-20 21-40	TCCCGGAGACCCCTCTTGAA CCAAGAGGGACTCCGGAAAT	81 82
ネコカリシウイルス	NC 001481	1-20 21-40	TTGTCTCAAATTTCTTTTAC GAAGCTCAGAGTTTGAGACA	83 84
イヌカリシウイルス	NC 004542	1-20 21-40	AGAAGCCATTTCTCATTAAAC GAGCTCGAGAGAGCGATGGC	85 86
ブタ腸内カリシウイルス	NC 000940	1-20 13-32	CAATTAGCCATCACGATCAC GGCAACGGACGGCAATTAGC	87 88
カリシウイルス株NB	NC 004064	1-20 11-30	TCTCTCTATAATTAATCAC AAAGTCACTATCTCTCTATA	89 90

10

20

30

40

【表 3 - 2】

ウイルス	GenBank 登録番号	Ncts.	配列 (5' から3')	配列 番号
ノーウォークウイルス	NC 001959	1-20 21-40	TTGACGCCATCATCATTCAC AGCAGTAGGAACGACGTCTT	91 92
E型肝炎ウイルス	NC 001434	1-20 21-40	AACTGATGGGCCTCCATGGC TGATGCCAGGAGCCTTAATA	93 94
風疹ウイルス	NC 001545	1-20 21-40	CGAGGTCCGATAGCTTCCAT ATGGGAATGGGAGTCCTAAG	95 96
SARSコロナウイルス TOR2	NC 004718	1-20 21-40	GGTAGGTAAAAACCTAATAT AGGTGGTTGGCTTTTCCTG	97 98
ブタ流行性下痢	NC 003436	1-20 21-40	GATAGAAAATCTTTTTAAGT AAAAGAGCTAACTATCCGTA	99 100
伝染性胃腸炎	NC 002306	1-20 11-30	ACTCACTTTACTTTAAAAGT GCCACGCTACACTCACTTTA	101 102
ウシコロナウイルス	NC 003045	1-20 21-40	CACGCAAATCGCTCGCAATC TCAGTGAAGCGGGATGCACG	103 104
ヒトコロナウイルス 229E	NC 002645	1-20 21-40	GATAGATAAGGTACTTAAAGT AAGCAACTTTTCTATCTGTA	105 106
マウス肝炎	NC 001846	1-21 18-39	CGGACGCCAATCACTCTTATA GAGTTGAGAGGGTACGTACGGA	107 108
ブタ生殖及び 呼吸器症候群	AF176348	5-25 21-40	CATAGAGCCAACACCTATACG ATACAAATGCCAAGGCATAG	109 110
ウマ動脈炎ウイルス	NC 002532	1-20 21-40	GCACCATACACACTTCGAGC ATGGTGGTGAGCCGTATATG	111 112
ヒトアストローウイルス	NC 001943	1-20 11-30	AATCACCACCCCTCTTGG GCCAAAGGCCAATCACCACC	113 114
東部ウマ脳炎ウイルス	NC 003899	1-20 21-40	GCCTCTACACCGTACCCTAT TAGGTGGAAATAGGGTGGTT	115 116
西部ウマ脳炎ウイルス	NC 003908	1-20 21-40	GATCGATTAGTTTGTAGGGT CGTGAATTCTTCCATATTG	117 118
ベネズエラウマ脳炎 ウイルス	NC 001449	1-20 21-40	TTCTCTTTGCGCCGCCAT GGTAGGTAATTGGTTGGGC	119 120

【 0 0 9 1 】

I V . アンチセンスオリゴヌクレオチド類縁化合物

A . 性質

上記に詳述されたように、アンチセンスオリゴヌクレオチド類縁化合物（用語の「アンチセンス」とは、化合物がウイルスのセンス又はプラス鎖RNAに対して標的にされることを表す）は、マイナス鎖RNAの二次的構造を伴う5'末端40塩基の領域を標的にする塩基配列を有している。さらに、宿主細胞、例えば、感染哺乳動物対象に投与された場合、該オリゴマーは感染ウイルスを有効に標的にできる。この要件は、オリゴマー化合物が（a）哺乳動物細胞による能動的に吸収される能力を有し、（b）吸収されたら、約45超の T_m を有する標的ssRNAとで二重鎖を形成する場合に合致する。

【 0 0 9 2 】

下記に記載されるように、細胞により吸収される能力は、オリゴマー骨格が本質的に変化せず、好ましくは、オリゴマー構造が、細胞膜を通過する能動的又は促進輸送のための基質として認識されることを必要とする。標的RNAとで安定な二重鎖を形成するオリゴマーの能力はまた、オリゴマーの骨格、並びに上記の因子、標的に関するアンチセンスオリゴマーの長さ及び相補性度、G:C対A:T塩基マッチの比率、及びミスマッチ塩基のいずれかの位置に依存する。細胞ヌクレアーゼに耐えるアンチセンスオリゴマーの能力は、細胞の細胞質への薬剤の残存及び究極の送達を促進する。

【 0 0 9 3 】

10

20

30

40

50

任意の所与の本質的に非荷電骨格を、これらの要件に合致させる能力に関して試験する方法を下記に開示する。

【0094】

A1. 細胞による能動的又は促進的取込み

アンチセンス化合物は、遊離（非複合体化）形態で投与された場合は、宿主の細胞膜を越える促進的若しくは能動的輸送によって、又は複合体形態で投与された場合は、エンドサイトーシスの機構によって宿主細胞に取り込まれ得る。

【0095】

薬剤が遊離形態で投与される場合は、アンチセンス化合物は実質的に非荷電であるはずで、これは、そのサブユニット間連結部の大多数が、生理学的 pH で非荷電であることを意味している。実施された実験は、本発明を支持して、15量体から20量体のオリゴマーでは、少数の、例えば、1~2の正味荷電は、実質的に非荷電の骨格を有する一定のオリゴマーの細胞取込みを実際に増強できることを示している。荷電は、オリゴマー自体に、例えば、骨格連結部内に担持できるか、又は末端荷電基付属体にあり得る。荷電連結部の数は、4つの非荷電連結部につき、1以下の荷電連結部であることが好ましい。その数は、10の非荷電連結部につき1以下の荷電連結部、又は20の非荷電連結部につき1以下の荷電連結部であることがより好ましい。一実施形態において、オリゴマーは完全に非荷電である。

10

【0096】

また、オリゴマーは、反対電荷がおよそ等しい数で存在する限り、陰電荷と陽電荷双方の骨格連結部を含有できる。該オリゴマーは、いずれかの電荷の3~5連続サブユニット超の連なりを含有しないことが好ましい。例えば、該オリゴマーは、所与の数のアニオン性連結部、例えば、ホスホロチオエート又はN3' P5'ホスホラミデート連結部、それに匹敵する数のN, N-ジエチレンジアミンホスホラミデートなどのカチオン性連結部を有し得る(Daigle, 2000年)。正味の荷電は、中性であるか、又はオリゴマー1つにつき、せいぜい1~2の正味荷電であることが好ましい。

20

【0097】

該アンチセンス剤は、実質的に又は完全に非荷電であることに加えて、細胞膜を越えたオリゴマーの輸送を促進するか、又は能動輸送することのできる膜輸送系に関する基質（即ち、1つ又は複数の膜タンパク質）であることが好ましい。この特徴は、オリゴマー相互作用又は細胞取込みに関する多数の試験うちの1つによって、以下のとおり判定できる。

30

【0098】

第1の試験は、細胞表面で置換するか、又は選択された荷電オリゴマー、例えば、ホスホロチオエートオリゴマーによって置換されるオリゴマー化合物の能力を調べることによって、細胞表面受容体における結合を評価する。約10~300nMの間の最終オリゴマー濃度で、典型的には蛍光標識されている所与の量の試験オリゴマーと共に細胞をインキュベートする。その少し後、例えば10~30分後（試験オリゴマーの有意な内在化が生じる前に）、置換性化合物を、漸増させた濃度で加える。試験化合物が細胞表面受容体に結合できるならば、置換性化合物は試験化合物と入れ替わるのが見られるであろう。置換性化合物が10×試験化合物濃度以下の濃度で50%の置換を生じることが示されれば、該試験化合物は、細胞輸送系に関して、置換性化合物と同じ認識部位で結合すると考えられる。

40

【0099】

第2の試験では、標識レポーター、例えば、蛍光レポーターを細胞内に輸送する試験化合物の能力を調べることによって、細胞輸送が測定される。約10~300nMの間の最終濃度で加えられた標識試験化合物の存在下で細胞をインキュベートする。30~120分のインキュベーション後、細胞内標識に関して、例えば顕微鏡で細胞を検査する。有意な細胞内標識が存在すれば、該試験化合物が促進的又は能動的輸送によって輸送されることの証拠となる。

50

【0100】

アンチセンス化合物もまた複合形態で投与でき、複合化剤は、典型的にはポリマー、例えば、カチオン性脂質、ポリペプチド、又は非生物学的カチオン性ポリマーであり、アンチセンス化合物上の何らかの正味荷電と反対の荷電を有する。アニオン性オリゴヌクレオチド類とカチオン性脂質又は他のポリマー成分との間の二重層複合体などの複合体を形成する方法がよく知られている。例えば、カチオン性脂質DOTMA (N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド)及び中性リン脂質DOPE (ジオレイルホスファチジルエタノールアミン)を含有するリポソーム組成物、Lipofectin (登録商標) (Felgnerら、1987年)が広く使用されている。投与後、典型的にはエンドソーム体における粒子封入化に関するエンドサイトーシス機構によって、該複合体は細胞に取り込まれる。

10

【0101】

また、アンチセンス化合物は、アンチセンスオリゴマーの5'又は3'末端に共有結合で連結したアルギニンに富んだペプチドとの複合形態で投与することもできる。該ペプチドは、典型的には8~16のアミノ酸であり、アルギニンとフェニアラニンやシステインなどの他のアミノ酸との混合物からなる。アルギニンに富んだペプチド-PMO複合体は、アンチセンスオリゴマーの細胞取込みを増強させるために使用できる(例えば、Moulton、Nelsonら、2004年を参照)。

【0102】

いくつかの例では、細胞へのアンチセンスオリゴヌクレオチドの取込みを促進するために、リポソームが使用できる(例えば、Williams, S.A., Leukemia 10(12):1980~1989頁、1996年; Lappalainenら、Antiviral Res. 23:119頁、1994年; Uhlmannら、ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES: A NEW THERAPEUTIC PRINCIPLE, Chemical Reviews, 第90巻、第4号、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)。例えば、国際公開第93/01286号などのヒドロゲル類もまた、アンチセンスオリゴマー投与のための媒体として使用できる。或いは、オリゴヌクレオチドは、ミクロスフェア又はマイクロ粒子において投与できる(例えば、Wu, G.Y.及びWu, C.H., J. Biol. Chem. 262:4429~4432頁、1987年を参照)。或いは、米国特許第6,245,747号に記載されているとおり、アンチセンスオリゴマーと複合化した気体充填微小泡の使用により、標的組織への送達を増強できる。

20

30

【0103】

或いは、また、本発明の他の態様により、任意の所与の骨格を有するオリゴマーの必要な性質は、単純なインビボ試験によって確認でき、該試験では、標識化合物をある動物に投与し、オリゴマー投与の数時間後にその動物から採取した体液サンプルを、標的RNAとのヘテロ二重鎖の存在に関してアッセイする。この方法は、下記の小節Dに詳述されている。

40

【0104】

A2. RNAアーゼHに対する実質的抵抗性

アンチセンスオリゴヌクレオチドによる発現抑制を説明する2つの一般的機構が提案されている(例えば、Agrawalら、1990年; Bonhamら、1995年; 及びBoudvillainら、1997年を参照)。第1に、オリゴヌクレオチドとウイルスRNAとの間に形成されたヘテロ二重鎖は、RNAアーゼHに対する基質として働き、ウイルスRNAの開裂を導く。このクラスに属するか、又は属すると提案されているオリゴヌクレオチドとしては、ホスホロチオエート類、ホスホトリエステル類、及びホスホジエステル類(非修飾「天然」オリゴヌクレオチド)が挙げられる。このような化合物は、オリゴマー:RNA二重鎖構造におけるウイルスRNAをRNAアーゼHによって加水分解し

50

、したがって、機能を失わせる。

【0105】

「立体的ブロッカー」或いは「RNAアーゼH不活性」又は「RNAアーゼH抵抗性」と呼ばれるオリゴヌクレオチド類縁体の第2のクラスは、RNAアーゼHの基質として働くことは観察されておらず、標的RNA核細胞質輸送、スプライシング又は翻訳を立体的に妨害することによって作用していると考えられる。このクラスには、メチルホスホネート類 (Toulmeら、1996年)、モルホリノオリゴヌクレオチド類、ペプチド核酸 (PNA類)、一定の2'-O-アシル又は2'-O-アルキル修飾オリゴヌクレオチド類 (Bonham、1995年)、及びN3'-P5'ホスホラミデート類 (Gee、1998年; Ding、1996年)が含まれる。

10

【0106】

試験オリゴマーとRNA-オリゴマー二重鎖を形成し、次いでSteinらに記載された標準的なアッセイ条件下、RNAアーゼHと共に該二重鎖をインキュベートすることによって、試験オリゴマーを、そのRNAアーゼH抵抗性に関してアッセイすることができる。RNAアーゼHに曝露後、完全な二重鎖の存在又は不在を、ゲル電気泳動又は質量分析によってモニターできる。

【0107】

A3. インビボ取込み

本発明の他の態様によって、所与のアンチセンスオリゴマータイプが、上述の特徴、即ち、高 T_m 、宿主細胞によって能動的に取り込まれる能力、及びRNAアーゼHに対する実質的抵抗性を提供することを確認するための簡単に迅速な試験が提供される。この方法は、適切にデザインされたアンチセンス化合物は、哺乳動物対象に投与された際、ウイルスRNA標的の相補的部分と安定なヘテロ二重鎖を形成し、この二重鎖が引き続き尿(又は他の体液)中に現れるという発見に基づいている。この方法の詳細はまた、その開示が参照として本明細書に組み込まれている標題が「標的RNA検出のための非侵襲的方法」(非侵襲的方法)の共有の米国特許出願第09/736,920号にも述べられている。

20

【0108】

簡単に述べると、評価される骨格を含有し、知られたRNAに対して標的化された塩基配列を有する試験オリゴマーを哺乳動物対象に注入する。宿主RNA又は感染ウイルスのRNAなどの何らかの細胞内RNAに対してアンチセンスオリゴマーを指向させ得る。投与数時間(典型的には8~72時間)後、アンチセンス-RNAヘテロ二重鎖の存在に関して尿をアッセイする。ヘテロ二重鎖が検出される場合、該骨格は、本発明のアンチセンスオリゴマーにおける使用に好適である。

30

【0109】

引き続いての分析を促進するために、哺乳動物対象にとって適切な場合は、例えば、蛍光タグ又は放射性タグによって試験オリゴマーを標識できる。該アッセイは、任意の好適な固相又は液体フォーマットにおけるものであり得る。一般に、固相アッセイは、先ず、ヘテロ二重鎖検体を固相支持体、例えば、粒子又はポリマー又は試験ストリップ基質に結合し、結合したヘテロ二重鎖の存在/量を検出する。液体相アッセイにおいては、妨害性のサンプル成分を除去するために、典型的には、検体サンプルを前処理する。オリゴマーが標識されている場合、ヘテロ二重鎖の存在は標識タグを検出することによって確認される。非標識化合物では、ヘテロ二重鎖は、固相フォーマットにおける場合は免疫アッセイによって、溶液又は懸濁液フォーマットにおける場合は、質量分析又は他の知られた方法によって検出できる。

40

【0110】

アンチセンスオリゴマーがウイルスゲノムのウイルス特異的領域(上記のようなウイルスRNAの5'末端領域など)に相補的である場合、所与のssRNAウイルスの存在、又は治療方法時におけるウイルス量の減少を検出するために、該方法を用いることができる。

【0111】

50

B. オリゴマー骨格の例

オリゴヌクレオチド類縁体に使用できる非イオン性連結部の例を図1A～1Gに示す。これらの図で、Bは好ましくは、アデニン、シトシン、グアニン及びウラシルから選択された、ポリヌクレオチドにおける塩基への、塩基特異的水素結合による結合に有効なプリン又はピリミジン塩基対部分を表す。好適な骨格構造としては、カルボネート連結部(図1A、 $R=O$)及びカルバメート連結部(図1A、 $R=NH_2$) (Mertes及びCoats、1969年; Gait、Jonesら、1974年); アルキルホスホネート連結部及びホスホトリエステル連結部(図1B'、 $R=$ アルキル又は $-O-$ アルキル) (Lesnikowski、Jaworskaら、1990年); アミド結合(図1C) (Blommers、Pielersら、1994年); スルホン連結部及びスルホンアミド連結部(図1D、 $R_1、R_2=CH_2$) (Roughten、1995年; McElroy、1994年); 及びチオホルムアセチル連結部(図1E) (Matteucci、1990年; Cross、1997年)が挙げられる。後者は、ホスホロチオエートアンチセンス化合物との増強された二重鎖及び三重鎖安定性を有することが報告されている(Cross、1997年)。また、図1Fにおける構造の3'-メチレン-N-メチルヒドロキシアミノ化合物が報告されている(Mohan、1995年)。

【0112】

ペプチド核酸(PNA)(図1G)は、骨格が、ピリミジン又はプリン塩基が結合しているN-(2-アミノエチル)グリシン単位からなるデオキシリボース骨格と構造的に同形である、DNAの類縁体である。天然のピリミジン及びプリン塩基を含有するPNAは、ワトソン-クリック塩基対則に従って相補的なオリゴヌクレオチドにハイブリダイズし、塩基対認識に関してDNAによく似ている(Egholmら、1993年)。PNAの骨格は、ホスホジエステル結合ではなく、ペプチド結合によって形成されているため、それらはアンチセンス適用にまさに好適である。該骨格は非荷電であるため、通常よりも大きな熱的安定性を示すPNA/DNA又はPNA/RNA二重鎖が生じる。PNAは、ヌクレアーゼ又はプロテアーゼによっては認識されない。

【0113】

好ましいオリゴマー構造には、上記のとおり、非荷電連結部によって結合した、塩基対部分を有するモルホリノベースのサブユニットが用いられる。特に好ましいものは、図2A～2Dに示されたような、実質的に非荷電のホスホロジアミデートが結合したモルホリノオリゴマーである。アンチセンスオリゴマーを含むモルホリノオリゴヌクレオチドは、例えば、共有の米国特許第5,698,685号、第5,217,866号、第5,142,047号、第5,034,506号、第5,166,315号、第5,185,444号、第5,521,063号、及び第5,506,337号に詳述されており、これらはすべて参照として本明細書に明示的に組み込まれている。

【0114】

モルホリノベースのサブユニットの重要な性質には、安定な非荷電骨格連結部によりオリゴマー形体において結合される能力; 形成されたポリマーが、標的RNAなどの相補的塩基標的核酸と、10～14塩基ほどの短いオリゴマーとも、高 T_m でハイブリダイズできるように、ヌクレオチド塩基(例えば、アデニン、シトシン、グアニン又はウラシル)を支持する能力; 哺乳動物細胞内に能動輸送されるオリゴマーの能力; 及びRNAアーゼ分解に抵抗するオリゴマー: RNAヘテロ二重鎖の能力、が含まれる。

【0115】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドに対する骨格構造の例としては各々が非電荷のリン含有サブユニット結合によって連結部した、図2A～2Dに示された - モルホリノサブユニットのタイプが挙げられる。図2Aは、モルホリノ環が1原子ホスホアミド連結部によって結合している、5原子反復単位の骨格を形成するリン含有連結部を示している。図2Bは、6原子反復単位の骨格を生じる連結部を示している。この構造で、5'モルホリノ炭素をリン基に結合する原子Yは、イオウ、窒素、炭素又は、好ましくは酸素であり得る。リンから懸垂しているX部分は、フッ素、アルキル又は置換アルキル、アルコ

キシ又は置換アルコキシ、チオアルコキシ又は置換チオアルコキシ、或いはモルホリン又はピペリジンなどの非置換、一置換、又は二置換窒素であり得る。アルキル、アルコキシ及びチオアルコキシは、1～6個の炭素を含むことが好ましい。Z部分は、イオウ又は酸素であり、好ましくは、酸素である。

【0116】

図2C及び2Dに示された連結部は、7原子単位長の骨格にデザインされたものである。構造3Cにおいて、X部分は構造3Bにおけるものであり、Y部分は、メチレン、イオウ、又は好ましくは、酸素であり得る。構造2Dにおいて、X及びY部分は、構造2Bにおけるものである。特に好ましいモルホリノオリゴヌクレオチドとしては、図2Bに示された形体のモルホリノサブユニット構造からなるものが挙げられ、ここで、 $X = NH_2$ 又は $N(CH_3)_2$ 、 $Y = O$ 、及び $Z = O$ である。

10

【0117】

上述のように、実質的に非荷電のオリゴマーは、限定数、例えば、5つの非荷電連結部各々につき約1つまで、より好ましくは、10の非荷電連結部各々につき約1つまでの荷電連結部を含むことが有利であると考えられる。したがって、少数の荷電連結部、例えば、荷電ホスホルアミデート又はホスホロチオエートもまた該オリゴマーに組み込むことができる。

【0118】

アンチセンス化合物は上記に挙げた文献に詳述された方法を用いて、段階的固相合成によって調製することができる。いくつかの場合、例えば薬物動態を増強するために、又は該化合物の捕捉又は検出を促進するために、該アンチセンス化合物に追加の化学的部分を加えることが望ましいと考えられる。このような部分は、標準的な合成法に従って、典型的には、該オリゴマーの末端に共有結合で連結できる。例えば、ポリエチレングリコール部分又は他の親水性ポリマー、例えば、10～100の単量体サブユニットを有するものが、溶解度の増大に有用であり得る。1つ又は複数の荷電基、例えば、有機酸などのアニオン性荷電基は細胞の取込みを増強させ得る。検出を目的に、フルオレセイン又は放射性標識基などのレポーター部分を結合できる。或いは、オリゴマーに結合したレポーター部分は、標識抗体又はストレプトアビジンを結合できる抗原又はビオチンなどのリガンドであり得る。アンチセンスオリゴマーの結合又は修飾のための部分の選択においては、生体適合性であり、望ましくない副作用なしに対象によって忍容される可能性の高い群の化学的化合物を選択することが一般に望ましいことは勿論である。

20

30

【0119】

V. ウイルス複製の阻害

上記に詳述されたアンチセンス化合物は、フラビウイルス科、ピコルノウイルス科、カリシウイルス科、トガウイルス科、アルテリウイルス科、コロナウイルス科、アストロウイルス科及びヘペウイルス科ファミリーのssRNAウイルスの複製阻害に有用である。一実施形態において、このような阻害は、これらのウイルスによる宿主動物の感染症の治療に有効である。したがって、一実施形態において、該方法は、ウイルスに感染した細胞を、特定のウイルスの複製を阻害する上で有効なアンチセンス剤に接触させることを含む。この実施形態において、アンチセンス剤は、好適な製薬的担体中、所与のウイルスに感染した哺乳動物対象、例えば、ヒト又は家畜に投与される。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、宿主内RNAウイルスの増殖を制止すると考えられる。宿主の正常な増殖又は発達に対する有害な影響がほとんど、又はまったくなしで、RNAウイルスの数を減少させることができるか、又は除去できる。

40

【0120】

A. 感染物質の同定

感染を引き起こす特定のウイルスを、当業界に既知の方法、例えば、血清学的方法若しくは培養方法、又は本発明のアンチセンスオリゴマーを用いる方法によって決定できる。

【0121】

血清学的同定には、対象の生物学的検体、例えば、糞便、尿、脳脊髄液、血液などから

50

単離したウイルスサンプル又は培養物が用いられる。ウイルス検出用の免疫アッセイは、一般に、当業者によってルーチンの用いられている方法、例えば、E L I S A又はウェスタンブロットによって実施される。また、特定のウイルス株又はウイルス種に特異的なモノクローナル抗体は、市販されていることが多い。

【0122】

特定のタイプのウイルスを単離及び同定するために、限定はしないが、種々の培養条件下で、増殖率及び形体などの特徴を比較することなどの方法を用いることにより、培養法が使用できる。

【0123】

感染対象におけるウイルス感染物質を同定する他の方法では、ウイルスの広範囲のファミリー及び/又は属、例えば、ピコルノウイルス科、カリシウイルス科、トガウイルス科及びフラビウイルス科を標的にする1種又は複数のアンチセンスオリゴマーが用いられる。任意の特徴的なウイルスRNAを標的にする配列が使用できる。所望の標的配列は、(i) 広範囲のウイルスファミリー及び/又は属に共通であり、(ii) ヒトには見られないものであることが好ましい。多数の感染性ウイルスに関する特徴的な核酸配列は、公開データベースにおいて入手でき、特定のオリゴマーデザインのベースとして役立ち得る。

【0124】

複数の各オリゴマーに関し、以下のステップが実施される：(a) 該オリゴマーを対象に投与する；(b) 前記投与後の選択された時間に、該対象から体液サンプルを得る；及び(c) アンチセンスオリゴマー及びウイルスゲノムの相補的部分を含むヌクレアーゼ抵抗性ヘテロ二重鎖の存在に関して、サンプルをアッセイする。ステップ(a)～(c)は、このようなオリゴマーの少なくとも1種のオリゴマー、又は該ウイルス又はウイルスファミリーの同定に必要な数のオリゴマーに関して実施する。オリゴマーは連続的に、又はより簡便には同時に、投与でき、アッセイできる。アンチセンスオリゴマー及び所与の知られたウイルス又はウイルスのファミリーのウイルスゲノムの相補的部分を含むヘテロ二重鎖の存在(又は不在)に基づいて、ウイルスを同定する。

【0125】

広範囲のファミリーを標的にするオリゴマーの第1群を先ず利用し、続いて広範囲のファミリー/属内の特定の属及び/又は種及び/又は株に相補的な、選択されたオリゴマーを利用することによって同定することが好ましい。オリゴマーのこの第2の群は、広範囲のファミリー/属内の特定の属及び/又は種及び/又は株に特異的なターゲティング配列を含む。いくつかの異なる第2のオリゴマーの集合、即ち、第1段階で試験された広範囲のウイルスファミリー/属各々に関するものが一般に提供される。(i) 試験される個々の属/種/株に特異的で、且つ(ii) ヒトには見られない、配列が選択される。

【0126】

B. アンチセンスオリゴマーの投与

標的核酸へのアンチセンスオリゴマーの効果的な送達は処置の重要な態様である。本発明によるアンチセンスオリゴマーの送達経路としては、限定はしないが、経口及び非経口経路を含む種々の全身的経路、例えば、静脈内、皮下、腹腔内、及び筋肉内送達、並びに吸入、経皮及び局所送達が挙げられる。適切な経路は、治療下の対象の病態に適切なものが、当業者により決定できる。例えば、皮膚のウイルス感染の治療におけるアンチセンスオリゴマーの送達に適切な経路は局所送達であり、一方、ウイルス呼吸器感染の治療におけるアンチセンスオリゴマーの送達は吸入による。また、オリゴマーをウイルス感染部位へ、又は血流へ、直接送達することもできる。

【0127】

アンチセンスオリゴマーは、生理学的に許容できる任意の簡便な媒体中で投与できる。このような組成物としては、当業者によって用いられる種々の標準的な製薬的に許容できる担体を挙げることができる。例としては、限定はしないが、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、水、水性エタノール、油/水乳液又はトリグリセリド乳液などの乳液、錠剤及びカプセル剤が挙げられる。生理学的に許容できる好適な担体の選択は、選択

10

20

30

40

50

された投与様式によって変わる。

【0128】

いくつかの例では、細胞内へのアンチセンスオリゴヌクレオチドの取込みを促進するために、リポソームが使用できる（例えば、Williams, S. A., *Leukemia* 10(12): 1980~1989頁、1996年; Lappalainenら、*Antiviral Res.* 23: 119頁、1994年; Uhlmannら、*ANTI SENSE OLIGONUCLEOTIDES: A NEW THERAPEUTIC PRINCIPLE*, *Chemical Reviews*, 第90巻、第4号、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)。ヒドロゲルもまた、アンチセンスオリゴマー投与のための媒体として、例えば、国際公開第93/01286号に記載されるとおりに使用できる。或いは、オリゴヌクレオチドは、ミクロスフェア又はミクロ粒子において投与できる（例えば、Wu, G. Y. 及びWu, C. H., *J. Biol. Chem.* 262: 4429~4432頁、1987年を参照）。或いは、米国特許第6,245,747号に記載されているとおり、アンチセンスオリゴマーと複合化した気体充填微小泡の使用により、標的組織への送達を増強できる。

10

【0129】

持続放出組成物もまた使用できる。これらには、フィルム又はミクロカプセルなどの形状化製品の形体における半透過性ポリマー基質が含まれる。

20

【0130】

本発明の一態様において、対象はヒト対象、例えば、局所又は全身のウイルス感染と診断された患者である。また、患者の病態によっても、本発明のアンチセンスオリゴマーの予防的投与を指示できる。例えば、(1)免疫無防備状態である；(2)火傷被害者である；(3)留置カテーテルを有する、又は(4)手術を受けようとしているか、又は最近、手術を受けた、患者の場合である。好ましい一実施形態において、該オリゴマーは、製薬的に許容できる担体中に含有され、経口送達されるホスホロジアミデートモルホリノオリゴマーである。他の好ましい実施形態において、該オリゴマーは、製薬的に許容できる担体中に含有され、静脈内(i.v.)送達されるホスホロジアミデートモルホリノオリゴマーである。

30

【0131】

本方法の他の適用において、対象は、家畜動物、例えば、ニワトリ、シチメンチョウ、ブタ、ウシ又はヤギなどであり、処置は予防的又は治療的である。本発明にはまた、上記のタイプの抗ウイルスアンチセンス化合物のサブ治療的量を添加した食料穀物を含有する家畜及び家禽食料組成物が含まれる。抗ウイルス剤のサブ治療的濃度を添加した食料穀物を家畜及び家禽に給餌する方法において、該食料穀物が上記の抗ウイルスオリゴヌクレオチド組成物のサブ治療的量を添加した改善も考慮される。

【0132】

アンチセンス化合物は、一般に、少なくとも200~400 nMのアンチセンスオリゴマーの最高血中濃度をもたらす上で有効な量及び様式で投与される。典型的には、1つ又は複数の用量のアンチセンスオリゴマーが、一般に規則的な間隔で、約1週間から2週間の期間投与される。経口投与に好ましい用量は、70 kg 当たり、約1~100 mg のオリゴマーである。いくつかの場合、100 mg オリゴマー/患者超の用量が必要であり得る。i.v. 投与では、好ましい用量は、70 kg 当たり、約0.5 mg から100 mg のオリゴマーである。アンチセンスオリゴマーは、短い期間、例えば、2週間又はそれ未満の間、毎日、規則的な間隔で投与できる。しかし、いくつかの場合、該オリゴマーは、より長い期間にわたって間欠的に投与される。投与に引き続いて、又は投与と同時に、抗生物質又は他の治療処置が与えられる。治療法は、治療下の対象の免疫アッセイ、他の生物学的試験及び生理学的検査の結果に基づいて、指示されたとおりに調整(用量、回数、経路など)できる。

40

50

【 0 1 3 3 】

C . 治療のモニタリング

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた有効なインビボ治療法は、投与の期間、用量、回数及び経路、並びに治療下の対象の病態（即ち、予防的投与対局所的又は全身的感染に応じた投与）によって変わり得る。したがって、このようなインビボ療法は、最適な治療結果を達成するために、治療下のウイルス感染の具体的タイプにとって適切な試験によるモニタリング、及び用量又は治療法における対応する調整をしばしば必要とする。例えば、全血算（CBC）、核酸検出法、免疫診断試験、ウイルス培養、又はヘテロ二重鎖の検出など、感染の全身的指標によって、治療をモニターできる。

【 0 1 3 4 】

1つ又は複数のタイプのRNAウイルスの増殖阻害、又は除去における、本発明のインビボ投与されたアンチセンスオリゴマーの有効性を、アンチセンスオリゴマーの投与前、投与中及び投与後に対象から採取した生物学的サンプル（組織、血液、尿など）から、判定できる。このようなサンプルのアッセイとしては、（1）当業者に既知の方法、例えば、電気泳動ゲル移動アッセイを用いて、標的配列及び非標的配列とのヘテロ二重鎖形成の存在又は不在のモニタリング；（2）ELISA又はウェスタンブロットなどの標準的方法により決定されたウイルスタンパク質産生量のモニタリング、又は（3）例えば、スピアマン-カーバーの方法によるウイルス滴定に及ぼす効果の測定、が挙げられる（例えば、Pari, G. S. 5、Antimicrob. Agents and Chemotherapy 39（5）：1157～1161頁、1995年；Anderson, K. P. 5、Antimicrob. Agents and Chemotherapy 40（9）：2004～2011頁、1996年、Cottrel, G. E.（編）：Manual of Standard Methods for Veterinary Microbiology、60～93頁、1978年を参照）。

【 0 1 3 5 】

アンチセンスオリゴマー処置の有効性をモニタリングする好ましい方法は、アンチセンスRNAヘテロ二重鎖の検出による。アンチセンスオリゴマー投与後の選択時間において、サンプル中のヘテロ二重鎖種の存在を検出、及び/又はそのレベルを測定するために、体液を採取する。典型的に、体液サンプルを、投与3～24時間後、好ましくは投与6～24時間後に採取する。上記に示されたように、体液サンプルは、尿、唾液、血漿、血液、髄液、又は他の生体起源のサンプルであり得、それに懸濁した細胞又は細胞断片、或いは液体媒体及びその溶液を含み得る。採取されたサンプル量は、典型的には0.1mlから10mlの範囲、好ましくは約1ml以下である。

【 0 1 3 6 】

このサンプルは、望ましくない成分を除くために処理でき、及び/又はサンプル中のヘテロ二重鎖種を処理して、例えば、RNAアーゼと処理することによって、望ましくないssRNAのオーバーハング領域を除く。もちろん、ヘテロ二重鎖検出は、サイズ分離、例えば、質量分析の電気泳動に依りオーバーハングを除去することが特に重要である。

【 0 1 3 7 】

種々の方法は、サンプルから望ましくない成分を除去するために利用できる。例えば、ヘテロ二重鎖は、ネットで陰電荷を有することから、電気泳動又はイオン交換技術は、中性又は陽電荷物質からヘテロ二重鎖を分離するために使用できる。また、サンプルは、表面に結合した抗体又はヘテロ二重鎖を特異的に結合できる他の試剤を有する固体支持体と接触できる。未結合物質を除去するために支持体を洗浄後、ヘテロ二重鎖は、例えば、電気泳動、質量分析又は免疫アッセイにより、さらなる分析のために本質的に精製された形態で遊離できる。

【 0 1 3 8 】

VI . ヘテロ二重鎖複合体

別の態様において、本発明は、

(a) 一本鎖のプラス鎖RNAゲノムを有し、フラビウイルス科、ピコルノウイルス科

10

20

30

40

50

、カリシウイルス科、トガウイルス科、アルテリウイルス科、コロナウイルス科、アストロウイルス科又はヘペウイルス科ファミリーの中の1種から選択されるRNAウイルスのプラス鎖RNAの5'末端40塩基内の領域であって、内部ステムループ二次構造を形成できる領域と、

(b)(i)ヌクレアーゼ耐性骨格、

(ii)哺乳動物宿主細胞による取込みが可能であること、

(iii)12から40の間のヌクレオチド塩基を含有すること、

(iv)該ウイルスのプラス鎖RNA鎖の5'末端40塩基内のこのようなステムループ二次構造を伴う領域に相補的である少なくとも12のサブユニットのターゲティング配列を有することを特徴とし、

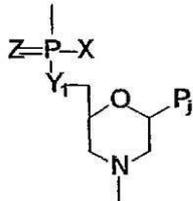
前記ヘテロ二重鎖複合体が、少なくとも45の解離 T_m を有し、このようなステムループ構造を破壊する、オリゴヌクレオチド類縁化合物と

の間で形成されるヘテロ二重鎖複合体を含む。

【0139】

代表的な化合物は、非荷電リン含有サブユニット間連結により連結している複数のモルホリノサブユニットから構成され、その連結部位が、1つのサブユニットのモルホリノ窒素を隣接サブユニットの5'環外炭素に連ねている。該化合物は、構造

【化4】



のようなホスホロジアミデート連結部を有し、

式中、 $Y_1 = O$ 、 $Z = O$ 、 P_j は、ポリヌクレオチド中の塩基に対する塩基特異的水素結合による結合に有効なプリン又はピリミジン塩基対部分であり、 X は、アルキル、アルコキシ、チオアルコキシ又はアルキルアミノである。好ましい化合物において、 $X = NR_2$ であり、ここで、各 R は、独立して水素又はメチルである。該化合物は、オリゴヌクレオチド類縁体単独であるか、又は該類縁体と該化合物の宿主細胞への取込みを増強できるアルギニンに富むポリペプチドとの複合体である。

【0140】

一実施形態において、宿主細胞に投与された場合、該化合物は、(i)ウイルスのプラス鎖及びオリゴヌクレオチド化合物からなり、(ii)少なくとも45の解離 T_m 及びこのようなステムループ二次構造の破壊を特徴とするヘテロ二重鎖構造を形成するのに有効である。

【実施例】

【0141】

以下の実施例を説明するが、本発明を限定する意図は決してない。

【0142】

材料及び方法

標準的な組換えDNA技術は、Ausubel, FMら、「CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY」、John Wiley and Sons社、ペンシルバニア州メディア、1992年、及びSambrook, Jら、「MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL」、Cold Spring Harbor Laboratory Press、ニューヨーク州コールドスプリングハーバー、2巻、1989年に記載されているように、すべて構築のために使用された。

10

20

30

40

50

【0143】

すべてのペプチドは、Global Peptide Services (コロラド州フォートコリンズ) 又はAVI BioPharma (オレゴン州コルバリス) により注文合成され、>90%純度に精製された(下記実施例2を参照)。PMO類は、例えば、(Summerton及びWeller 1997年) 及び米国特許第5,185,444号に記載されている既知の方法に従ってAVI BioPharmaで合成された。

【0144】

PMOオリゴマー類は、記載された細胞取込みを増強させるためにアルギニンに富むペプチド(R₉F₂C-5'PMO)と5'末端で複合した(米国特許出願第60/466,703号及びMoulton、Nelsonら、2004年)。

10

【0145】

(実施例1)

フラビウイルス科(黄熱病ウイルス)のインビトロでのアンチセンス阻止作用

黄熱病ウイルス(YFV)に対する有効なワクチンは、長年にわたって入手できたが、このウイルスは、50%と高い死亡率を有する出血熱の主要原因となり続けている。世界中で、年間の黄熱病が200,000症例(30,000人の死者)と推測されている。少数の移入症例もまた、黄熱病のない国で発生している(WHO、データ表100、2001年)。

【0146】

YFV(配列番号49)の5'プラス鎖末端を標的にしたPMOアンチセンスオリゴマーは、4-濃縮試験で評価された。標準的なCPE試験は、ベロ細胞の18時間の単層(80~100%集密的)を用い、培地を排出し、PMO又はスクランブル対照配列の各濃度を加え、次いでウイルス又はウイルス希釈液を15分以内で加えた。抗ウイルス試験及び細胞毒性試験の双方に対して、2つのウェルを各濃度の化合物に用いる。プレートを密封し、ほぼ最大のウイルスCPEを誘導するために必要な標準時間でインキュベートした。次いでプレートを、下記の方法によりニュートラルレッドで染色し、生存細胞を示す取込みパーセンテージは、バックグラウンドを除くために取られた差を用いる405nmと540nmの二波長でマイクロプレートのオートリーダー上で読み取った。およそウイルス阻止濃度が50%のエンドポイント(EC50)及び細胞阻止濃度が50%のエンドポイント(IC50)として判定され、それらから一般的な選択指標(S.I.)が算出された： $S.I. = (IC50) / (EC50)$ 。S.I.が3以上は、有意な抗ウイルス活性を示している。5'プラス鎖末端領域(配列番号49)を標的にするPMOは、このアッセイにおいて21のS.I.を生じた。

20

30

【0147】

(実施例2)

フラビウイルス科(デング熱ウイルス血清型1~4)のインビトロでのアンチセンス阻止作用

デング熱/デング出血熱(DF/DHF)は、過去20年にわたって世界中の主要な健康問題の1つとなっている。デングウイルス(DEN)の地理的分布、その媒介動物の蚊及び疾患の負担が増え続けている。世界保健機構では、年間5千万~1億人の新たな感染があると推測している。DF/DHFは、現在、南アジアにおける幼児の間で入院及び死亡の主要原因となっており、アメリカでも急増している。ワクチン又は有効な治療法は現在ない。好結果となるワクチン又は治療法における1つの要件は、DENの4つのヒト血清型すべてに対して有効であることである。この試験の目的は、培養ベロ細胞におけるDENの4つの血清型の複製の阻止において、5'プラス鎖末端ステムループを標的にするPMOの有効性及び特異性を評価することであった。PMOは、ウイルス転写及び/又は翻訳において重要となり得るプラス鎖DEN2 RNAの配列要素を標的にするようにデザインされた(Markoff 2003年)。本試験のPMOは、ベロE6細胞への侵入を促進させるために、アルギニンに富むペプチドに複合させた(Moulton、Nelsonら、2004年; Neuman、Steinら、2004年)。

40

50

【0148】

デング2ウイルス(DEN2)の5'プラス鎖末端領域にハイブリダイズさせるためにデザインされたPMO、5'SL(配列番号51)は、哺乳動物細胞培養におけるデングウイルス複製を阻止する能力を評価した。培養細胞への侵入を促進させるために、PMO類を短いアルギニンに富むペプチド(R₉F₂C-5'PMO)と複合させた。ベロE6細胞は、DEN血清型1~4(それぞれDEN1、DEN2、DEN3、DEN4)で接種してPMO剤と共にインキュベートし、ウイルス力価を、5~8日後にブランクアッセイにより測定した。5'プラス鎖末端(5'SL)を標的にする化合物は、図5Aに示されるように、4日間にわたって用量依存及び配列特異的な様式で対照と比較して、4オーダー超の大きさでDEN2力価を減少させた。5'SL-PMOの10μM溶液は、図5A~5Bに示されるように、2超から4オーダーの大きさで、いくつかの場合では検出限界未満で4つのデング血清型すべての力価を減少させた。5'SL-PMO間の2つの塩基対ミスマッチであり、DEN4の標的配列であるため、5'SL-PMOは、DEN1、DEN2、DEN3に対して(対数減少4)よりもDEN4(対数減少2)に対して効果が小さかった。有効な抗DEN化合物は、ベロE6細胞で増殖した西ナイルウイルス(WNV)の力価を変化させなかった。このデータは、5'SL-PMO化合物は、DEN1~4の治療薬としての可能性があることを示している。

10

【0149】

(実施例3)

コロナウイルス科(ブタ生殖及び呼吸器症候群ウイルス、PRRSV)のインビトロでのアンチセンス阻止作用

20

ブタ生殖及び呼吸器症候群(PRRS)は、若齢ブタにおける雌ブタにおける生殖不良及び呼吸器疾患を特徴とする接触性ウイルス伝染病である。原因物体であるPRRSVは、コロナウイルス科の他のメンバーと同様のゲノム構成を有する一本鎖RNAウイルスである。PRRSは、ブタ産業に対して重大な経済的損失をもたらすが、ワクチンはこの数年間広く使用されている。特異的な抗PRRSV薬物は、PRRSV感染を予防し、制御するために一体化した方法の1つとして緊急に必要である。PRRSVの5'プラス鎖末端領域を標的にするPMO(PRRSV-1a、配列番号109)は、下記のようにウイルス複製を阻止する能力を試験した。

【0150】

30

第1の試験は、PRRSV-1a-PMOが、ウイルス誘導の細胞病原性作用(CPE)の発生を阻止できるかどうかを判定するためにデザインされた。以前に報告されたように、この実験に対してATCC-CRL11171細胞を用いた。CRL11171単層細胞は、DMEM中、37℃で4時間、PRRSV-1a-PMO(配列番号109)と共に処理した。PMO類を細胞から除き、感染多重度(MOI)1におけるPRRSV株VR2385で接種した。細胞を培養し、CPE発生について毎日観測した。ブランク対照及び対照PMO(DSScr、スクランブル配列のPMO)を、陰性対照として含んだ。また、細胞培養培地を採取し、PRRSV力価を測定するためにCRL11171細胞中で滴定した。

【0151】

40

未翻訳領域(UTR)の5'プラス鎖末端を標的にするPRRSV-1a-PMOは、PRRSV複製を阻止するのに有効であることが分かった(図6)。16μMでPRRSV-1a-PMOで処理した細胞は、対照よりも細胞病原性作用(CPE)発生がはるかに小さかった(図7)。PRRSV感染後、CPEは明瞭に認識できた(陽性)が、未感染対照細胞は、単層が無傷のままであった(ブランク)。PMO-PRRSV-1aは、CPE発生を減少させたが、対照PMOを含む他のPMO類は、CPEを阻止する上で大きな効果がなかった。細胞及び培地を、PRRSV収量の滴定のために収穫した。組織培養感染用量(TCID₅₀)を、異なる希釈液におけるCPE発生に基づいて算出した。PRRSV-1aは、90%超までウイルス収量を減じた(図示せず)。

【0152】

50

PRRSV-1a PMOによるPRRSV複製の阻止もまた、用量依存であることを示した。上記のPMO処理及びウイルス培養条件を用いて、PRRSV-1a及びDSScr対照PMOの3つの異なる濃度(4、8及び16mM)を、ウイルス滴定により測定されたウイルス複製を阻止する能力についてPRRSV感染CRL11171細胞に対して試験した。図6に示されるように、PRRSV-1a PMOは、用量依存様式でPRRSV複製を阻止する。

【0153】

(実施例4)

ダニ媒介性脳炎ウイルスのアンチセンス阻止作用

本実施例は、2種のフラビウイルス：ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBE)及び西ナイルウイルス(WNV)に対して本発明のアンチセンスPMO化合物の抗ウイルス活性を試験するために工夫された。2種のPMOオリゴマーを、抗ウイルス活性；TBE 5'SL、配列番号57及び；スクランブル対照配列DSScr(5'-AGTCTCGACTTGCTACCTCA-3'配列番号133)について評価した。双方のPMOオリゴマーは、アルギニンに富むペプチド(R₉F₂C-5'-PMO)と5'末端で複合させて、記載されている(米国特許出願第60/466,703号及びMoulton、Nelsonら2004年)細胞取込みを増強させた。WNVとTBE 5'SL標的PMOとの間の相同性がないので、WNV感染は陰性制御感染を呈した。この制御は、各PMO類の非特異的ウイルス抑制レベルを示す。PMO化合物は、2mMストック溶液を提供するために調製し、次いで組織培養細胞についてウイルスの標準的な用量に対して滴定した。細胞を、感染多重度(MOI)1で感染させ、ウイルス収量は、18時間感染後に採取された上澄液培地のサンプル中で評価した。

【0154】

本実施例では2種のウイルス株を用いた：

- 1) TC401西ナイル99-34940-31A(ニューヨーク株)継代2
- 2) TC339ダニ媒介脳炎ウイルス(Hypr株)継代49

【0155】

継代130のSW 13細胞(RPMI 1640培地プラス5%FBSにおいて増殖させたヒト白人副腎皮質腺癌細胞系ECAA87031801)の4つのT175組織培養フラスコ(NUNC)を、トリプシン-EDTA(1x)で2回洗浄し、37で2~3分間インキュベートした。該細胞を、フラスコ1つ当たり、11.5mlの増殖培地に再懸濁し、プールした。プールした細胞懸濁液で細胞のカウントを実施すると、結果は、 1.74×10^6 細胞/mlで、99%の生存度を有した。4つのT175フラスコに播種するために6mlの細胞懸濁液を用い、40mlの細胞懸濁液を270mlに希釈した。これを、15の6ウェルプレートにおいて、1ウェル当たり3mlのアリコートに分配した。該プレートを一晩インキュベートして、集密化した細胞単層を形成させた。

【0156】

各PMO化合物を、4mlの無血清RPMI 1640培地中、25、20、15、10及び5 μ Mに希釈した。2つの6ウェルプレートのウェルから培地を取り出した。適切な化合物希釈液の2mlを、プレートのすべてのウェルに分配し、これを、双方のPMO化合物に関し、別個のプレートで反復した。該プレートを37で5時間インキュベートした。2種のウイルスを-70の冷凍庫から取り出して速やかに解凍した。各ウイルスを 2×10^6 pfu/mlに希釈し、42mlの無血清培地を作製した。該6ウェルプレートをインキュベーターから取り出し、前処理培地を、全ウェルから吸引した。対照プレート(化合物なし)の各ウェルに、1mlの培地を加えた。プレートの各組は、 2×10^6 pfu/mlに希釈したTBE又はWNのいずれかを受けた。該プレートを室温で1時間インキュベートし、次いで培地を取り出し、2mlのRPMI 1640プラス1%FBSプラス細胞の前処理に用いたのと同じ濃度の試験化合物と取り替えた。該プレートを37で18時間インキュベートした。

【0157】

ウイルス滴定決定用の24ウェルプレートを調製するために、継代131のSW 13細胞の8つのT175組織培養フラスコ(NUNC)を、トリプシン-EDTA(1×)で2回洗浄し、37で2~3分間インキュベートした。該細胞を、フラスコ1つ当たり、11.5mlの増殖培地に再懸濁し、プールした。プールした細胞懸濁液で細胞のカウントを実施すると、結果は、 1.7×10^6 細胞/mlで、99%の生存度を有した。80mlの細胞懸濁液を680mlに希釈した。これらの細胞を、8つの24ウェルプレートにおいて、1ウェル当たり1mlのアリコートに分配した。該プレートを一晩インキュベートして、集密化した細胞単層を形成させた。

【0158】

感染18時間後、PMO処理し、ウイルス感染した6ウェルプレートの培地上澄液を、各個のウェルから採取した。270マイクロリットルの無血清培地を有する96ウェルプレートの単一カップに、各採取物の30マイクロリットルを入れた。サンプルの残りをクリオチューブに入れ、-70で保存した。24ウェルプレートから培地を取り、250μlの滴定希釈液を96ウェルプレートから24ウェルプレートに移し、これを37で1時間インキュベートした。1mlのアガロースオーバーレイ培地を各ウェルに加え、アガロースを室温でゲル化させた後、該プレートを37で5日間インキュベートした。5日後、インキュベーターからプレートを取り出し、各ウェルに1mlの10%ホルモル生理食塩水を加え、該プレートを室温で3日間放置した。アガロース培地を除去するために流水下で該プレートを洗浄し、逆さにして排液しながら残りのプレートを洗浄した。次いで、各ウェルに1mlの0.1%ナフタレン黒色染色を受けさせ、プレートを30分間置いてから、染色を取り出し、プレートを流水下で洗浄した。次いでそれらを3時間乾燥した(逆さに)。ウイルスプラークをカウントし、滴定を決定した。

【0159】

図8は、未処置対照のパーセンテージとして、PMO処置感染物から得られたウイルス滴定を示しており、ウイルス感染細胞は、TBEV又はWNVのいずれかによって感染させ、TBEVアンチセンス化合物で処置したものであり、ここで、PMO化合物は、5'SL(配列番号57)か又は対照PMO(DSscr、スクランブル塩基配列)である。図8におけるウイルス滴定の比較から見られるように、化合物濃度の増加と共にすべての細胞(処置及び対照)でウイルス滴定のかなりの減少があり、これは、アンチセンス化合物と対照化合物の双方に存在するアルギニンに富んだ結合ペプチドの細胞毒性効果によると考えられる。しかし、化合物濃度が5μM以上では、WNV(図8)に対して、また、DSscrスクランブル対照配列に対して、TBEV阻害の配列特異的増加が見られる。

【0160】

(実施例5)

マウスにおける西ナイルウイルス(WNV)感染に及ぼすPMOの効果

PMOは、ホスホロジアミデートサブユニット間連結部によって結合したモルホリン環からなる骨格に結合したプリン及びピリミジン塩基を含有する約20サブユニットの長さに典型的に合成された、非荷電、水溶性、ヌクレアーゼ抵抗性のアンチセンス剤である。本発明を支持する実験では、PMOの5'端へのアルギニンに富んだペプチド(P007を指す;配列番号122)の複合が、培養細胞内へのPMOの送達を大きく促進することが示された。ウイルスゲノムの種々の標的にするP007-PMOは、種々の程度にWNVウイルス感染を阻害した。それらの中でも、5'末端の20のヌクレオチド(5'端;配列番号47)を標的にするPMOは強力な抗ウイルス活性を示した。

【0161】

観察値をインピボ条件に拡張するために、マウスで実験を行った。メスのBALB/cマウスを用いた。該マウスはSimonsen Laboratories(ギルロイ、カリフォルニア州)から入手した。実験の開始時点で、マウスは動物施設で1週間を過ごしており、6週齢超であった。該マウスの体重は、12.3gから19.8g、平均は16.1gであった。実験は、ユタ州立大学実験動物研究センター(LARC)においてBSL-3動物スーツで行われた。2種のPMO化合物が用いられた:1)5'末端(NG

040006；配列番号47)を標的にするPMO及び；2)同じPMOが5'端でP007アルギニンに富んだペプチド(配列番号122)と複合し、NG040005と称されるもの。NG040007は、非結合のスクランブル対照PMOである。アンプリゲン(Ampligen)(登録商標)は、陽性対照の抗ウイルス化合物として使用され、William M. Mitchell (School of Medical Pathology、バンダービルト大学、ナッシュビル、TN 37240)から入手した。アンプリゲンはRNA様分子であるため、RNアーゼフリーの材料及びDEPC処理水を使用することにより、RNアーゼの汚染を防ぐように注意した。

【0162】

20匹の動物を有するプラセボ群11を除いて、10匹の動物を各処置群に無作為に割り当てた。腹腔内処置を開始してから24時間後に、引き続きWNV接種を行った。PMO処置は、ウイルス接種の4時間前、ウイルス注入の1、2、3、4、5及び5日後(dpi)に、毎日続けた。アンプリゲンを毎日-1、1、3及び5dpiで腹腔内処置した。投与量及び処置群を、生存率及び死亡までの平均日数(MDD)と共に下表に示す。NG040005及びアンプリゲンは、プラセボ対照に比較して、WNV感染マウスのMDDを増加させた(表4)。

【0163】

【表4】

表4. マウスにおける西ナイル熱ウイルス感染に対するPMOの効果

動物	: メス BALB/c マウス、>6 週齢	処置スケジュール	: 毎日
ウイルス	: 西ナイル熱ウイルス、NYカラス脳ホモジネート 10 ^{6.3} 感染単位、皮下注射		1日前、4時間前、1、2、3、4、5、6日後
薬物希釈液	: 生理食塩水		治療経路: 腹腔内
			実験期間: 1日

薬物	用量	スケジュール	生存% (生存匹数/ 全匹数)	MDD ^a ± SD	生存分析 ^b
NG040005	250 µg/inj	qd, -1d, -4h, 1,2,3,4,5,6d	50% (5/10)	14.0 ± 3.8***	P = 0.20
NG040006	750 µg/inj	qd, -1d, -4h, 1,2,3,4,5,6d	40% (4/10)	8.2 ± 1.0	P = 0.95
アンプリゲン	14 mg/kg	qd, -1d, 1,3,5d	80% (8/10)	13.5 ± 4.9	P ≥ 0.01**
プラセボ	--	qd, -1d, -4h, 1,2,3,4,5,6d	35% (7/20)	8.6 ± 1.3	--

^a 21日目までのマウス死亡日に対する平均日。スチューデントt-検定を、解析用に用いた。

^b Logランク生存分析

毒性対照は、化合物量が限定されていたので、この最初の実験では実施しなかった。

* P 0.05、** P 0.01、*** P 0.001、プラセボと比較。

【0164】

【表 5 - 1】

表5. 配列表

配列番号	5' から3' の配列
1	GNNGATGTTTCGCGTCGGTGAGCGGAGAGGAAACAGATTTTC
2	AGAAGTTTATCTGTGTGAACCTTCTTGGCTTAGTATCGTTG
3	AGACGTTTCATCTGCGTGAGCTTCCGATCTCAGTATTGTTT
4	AGTAGTTCGCCTGTGTGAGCTGACAACTTAGTAGTGTTT
5	AGTAAATCCTGTGTGCTAATTGAGGTGCATTGGTCTGCAA
6	AGTTGTTAGTCTACGTGGACCGACAAAGACAGATTCTTTG
7	GCCAGCCCCCTGATGGGGGCGACACTCCACCATGAATCAC
8	AGATTTTCTTGCACGTGCATGCGTTTGCTTCGGACAGCAT
9	AGATTTTCTTGCACGTGCGTGCGCTTGCTTCAGACAGCAA
10	AGATTTTCTTGCACGTGTGTGCGGGTGCTTTAGTCAGTGT
11	TTAAAACAGCTCTGGGGTTGTACCCACCCAGAGGCCAC
12	TTAAAACAGCCTGTGGGGTTGTACCCACCCACAGGGCCCAC
13	TTAAAACAGCCTGTGGGGTTGTTCCCACCCACAGGCCATT
14	TTAAAACAGCTCTGGGGTTGCTCCCACCCAGAGGCCAC
15	TTAAAACAGCTCTGGGGTTGTTCCCACCCAGAGGCCAC
16	GAGTGTTCACCCAACAGGCCACTGGGTGTTGTACTCT
17	TTAAAACAGCCTGGGGTTGTACCCACCCCTGGGGCCCAC
18	TTAAAACAGCCTGGGGTTGTTCCCACCTCACTCCACCCAT
19	TTAAAACAGCGGATGGGTATCCCACCATTTCGACCCATTGG
20	TTGAAAGGGGGCGCTAGGGTTTCACCCCTAGCATGCCAAC
21	TTCAAGAGGGGTCTCCGGGAATTTCCGGAGTCCCTCTTGG
22	GTAAAAGAAATTTGAGACAATGTCTCAAACCTCTGAGCTTC
23	GTTAATGAGAAATGGCTTCTGCCATCGCTCTCTCGAGCTC
24	GTGATCGTGATGGCTAATTGCCGTCCGTTGCCTATTGGGC
25	GTGATTTAATTATAGAGAGATAGTGACTTTCACCTTTTCTT
26	GTGAATGATGATGGCGTCAAAGACGTCGTTCCCTACTGCT
27	GCCATGGAGGCCATCAGTTTATTAAGGCTCCTGGCATCA
28	ATGGAAGCTATCGGACCTCGCTTAGGACTCCCATTCCCAT
29	ATATTAGGTTTTTACCTACCCAGGAAAAGCCAACCAACCT
30	ACTTAAAAGATTTTCTATCTACGGATAGTTAGCTCTTTT
31	ACTTTTAAAGTAAAGTGAGGTAGCGTGGCTATATCTCTT
32	GATTGCGAGCGATTTGCGTGCGTGCATCCCGCTTCACTGA
33	ACTTAAGTACCTTATCTATCTACAGATAGAAAAGTTGCTT
34	TATAAGAGTGATTGGCGTCCGTACGTACCCTCTCAACTCT
35	ATGACGTATAGGTGTTGGCTCTATGCCTTGGCATTGTAT
36	GCTCGAAGTGTGTATGGTGCCATATACGGCTCACCACCAT
37	CCAAGAGGGGGGTGGTGATTGGCCTTTGGCTTATCAGTGT
38	ATAGGGTACGGTGTAGAGGCAACCACCCTATTTCACCTA
39	ACCCTACAACTAATCGATCCAATATGGAAAGAATTCACG
40	ATGGGCGGCGCAAGAGAGAAGCCCAAACCAATTACCTACC
41	ACCGACGCGAACATCNC

10

20

30

40

【表 5 - 2】

配列番号	5' から3' の配列
42	TCCTCTCCGCTCACCGACGC
43	TCACACAGATAAACTTCT
44	AAGCCAAGAAGTTCACACAG
45	TCACGCAGATGAACGTCT
46	GAGATCGGAAGCTCACGCAG
47	GCTCACACAGGCGAACTACT
48	TAAGTTTGTCAGCTCACACAG
49	CAATTAGCACACAGGATTTACT
50	TTGCAGACCAATGCACCTCA
51	GTCCACGTAGACTAACAACCT
52	GTCTTTGTCCGGTCCACGTAG
53	CCCATCAGGGGGCTGGC
54	TGGAGTGTGCCCCCATCAG
55	ATGCACGTGCAAGAAAATCT
56	ATGCTGTCCGAAGCAAACGC
57	CACGCACGTGCAAGAAAATCT
58	TGAAGCAAGCGCACGCACGT
59	ACACACGTGCAAGAAAATCT
60	ACACTGACTAAAGCACCCGC
61	GGTACAACCCAGAGCTGTTTTAA
62	GTGGGCCTCTGGGGTGGGTA
63	CAACCCACAGGCTGTTTTAA
64	GTGGGCCCTGTGGGTGGGTA
65	CAACCCACAGGCTGTTTTAA
66	AATGGGCCTGTGGGTGGGAA
67	CAACCCAGAGCTGTTTTAA
68	GTGGGCCTCTGGGGTGGGAG
69	CAACCCAGAGCTGTTTTAA
70	GTGGGCCTCTGGGGTGGGAA
71	CCTGTTGGGTGGGAACACTC
72	AGAGTACAACACCCAGTGGG
73	CAACCCACAGGCTGTTTTAA
74	GTGGGCCCCAGGGGTGGGTA
75	CAACCCACTCCAGTTTTAA
76	ATGGGTGGAGTGAGTGGGAA
77	ATACCCATCCGCTGTTTTAA
78	CCAATGGGTGGAATGGTGGG
79	AACCCTAGCGCCCCCTTTCAA
80	GTTGGCATGCTAGGGGTGAA
81	TCCCGGAGACCCCTCTTGAA
82	CCAAGAGGGACTCCGGAAAT
83	TTGTCTCAAATTTCTTTTAC
84	GAAGCTCAGAGTTTGAGACA
85	AGAAGCCATTTCTCATTAAC

10

20

30

40

50

【表 5 - 3】

配列番号	5' から3' の配列
86	GAGCTCGAGAGAGCGATGGC
87	CAATTAGCCATCACGATCAC
88	GGCAACGGACGGCAATTAGC
89	TCTCTCTATAATTAATCAC
90	AAAGTCACTATCTCTCTATA
91	TTGACGCCATCATCATTAC
92	AGCAGTAGGAACGACGTCTT
93	AACTGATGGGCTCCATGGC
94	TGATGCCAGGAGCCTTAATA
95	CGAGGTCCGATAGCTTCCAT
96	ATGGGAATGGGAGTCCTAAG
97	GGTAGGTA AAAACCTAATAT
98	AGGTTGGTTGGCTTTTCCTG
99	GATAGAAAATCTTTTAAAGT
100	AAAAGAGCTAACTATCCGTA
101	ACTCACTTTACTTTAAAAGT
102	GCCACGCTACACTCACTTA
103	CACGCAAATCGCTCGCAATC
104	TCAGTGAAGCGGGATGCACG
105	GATAGATAAGGTACTTAAGT
106	AAGCAACTTTTCTATCTGTA
107	CGGACGCCAATCACTCTTATA
108	GAGTTGAGAGGGTACGTACGGA
109	CATAGAGCCAACACCTATACG
110	ATACAAATGCCAAGGCATAG
111	GCACCATACACACTTCGAGC
112	ATGGTGGTGAGCCGTATATG
113	AATCACCACCCCTCTTGG
114	GCCAAAGGCCAATCACCACC
115	GCCTCTACACCGTACCCTAT
116	TAGGTGGAAATAGGGTGGTT
117	GATCGATTAGTTTGTAGGGT
118	CGTGAATTCTTTCCATATTG
119	TTCTCTCTTGCGCCGCCAT
120	GGTAGGTAATTGGTTTGGGC

10

20

30

【 0 1 6 5 】

40

【表 6】

名称	ペプチド配列 (NH ₂ から COOH)	配列番号
P003	RRRRRRRRRFFC	121
P007	(RAhxR) ₄ AhxβAla	122
P008	(RAhx) ₈ βAla	123
RX4	(RAhx) ₄ βAla	124
RXR2	(RAhxR) ₂ AhxβAla	125
RXR3	(RAhxR) ₃ AhxβAla	126

10

【 0 1 6 6 】

【表 7】

配列番号	5' から3' の配列
127	ACAGGCGAACTACT
128	GTCAGCTCACAC
129	GCTCACACAGGCGA
130	GCACACAGGATTTACT
131	GTCCAATGCACCTC
132	CAATGCACCTCAATTAGC
133	AGTCTCGACTTGCTACCTCA

20

【図面の簡単な説明】

【 0 1 6 7 】

【図 1 A】非荷電骨格を有する種々のオリゴヌクレオチド類縁体の骨格構造を示す図である。

30

【図 1 B】非荷電骨格を有する種々のオリゴヌクレオチド類縁体の骨格構造を示す図である。

【図 1 C】非荷電骨格を有する種々のオリゴヌクレオチド類縁体の骨格構造を示す図である。

【図 1 D】非荷電骨格を有する種々のオリゴヌクレオチド類縁体の骨格構造を示す図である。

【図 1 E】非荷電骨格を有する種々のオリゴヌクレオチド類縁体の骨格構造を示す図である。

【図 1 F】非荷電骨格を有する種々のオリゴヌクレオチド類縁体の骨格構造を示す図である。

40

【図 1 G】非荷電骨格を有する種々のオリゴヌクレオチド類縁体の骨格構造を示す図である。

【図 2 A】代表的なモルホリノオリゴヌクレオチドの反復サブユニットセグメントを示す図である。

【図 2 B】代表的なモルホリノオリゴヌクレオチドの反復サブユニットセグメントを示す図である。

【図 2 C】代表的なモルホリノオリゴヌクレオチドの反復サブユニットセグメントを示す図である。

【図 2 D】代表的なモルホリノオリゴヌクレオチドの反復サブユニットセグメントを示す図である。

50

【図3A】代表的なウイルス及びウイルス標的部位のゲノムを示す略図である。

【図3B】代表的なウイルス及びウイルス標的部位のゲノムを示す略図である。

【図3C】代表的なウイルス及びウイルス標的部位のゲノムを示す略図である。

【図3D】代表的なウイルス及びウイルス標的部位のゲノムを示す略図である。

【図3E】代表的なウイルス及びウイルス標的部位のゲノムを示す略図である。

【図4A】代表的なウイルスに関する5'末端プラス鎖領域の予測された二次構造の例を示す図である。

【図4B】代表的なウイルスに関する5'末端プラス鎖領域の予測された二次構造の例を示す図である。

【図4C】代表的なウイルスに関する5'末端プラス鎖領域の予測された二次構造の例を示す図である。

10

【図4D】代表的なウイルスに関する5'末端プラス鎖領域の予測された二次構造の例を示す図である。

【図4E】代表的なウイルスに関する5'末端プラス鎖領域の予測された二次構造の例を示す図である。

【図5A】デング熱ウイルスタイプ1~4の5'プラス鎖末端領域を標的とするアンチセンスオリゴマーの存在下、感染ペロ細胞においてデング熱ウイルス複製の阻止を示す図である。

【図5B】デング熱ウイルスタイプ1~4の5'プラス鎖末端領域を標的とするアンチセンスオリゴマーの存在下、感染ペロ細胞においてデング熱ウイルス複製の阻止を示す図である。

20

【図5C】デング熱ウイルスタイプ1~4の5'プラス鎖末端領域を標的とするアンチセンスオリゴマーの存在下、感染ペロ細胞においてデング熱ウイルス複製の阻止を示す図である。

【図5D】デング熱ウイルスタイプ1~4の5'プラス鎖末端領域を標的とするアンチセンスオリゴマーの存在下、感染ペロ細胞においてデング熱ウイルス複製の阻止を示す図である。

【図6】PMOが、ウイルス力価により測定されるPRRSV複製を減少できることを示す図である。

【図7】PRRSVで接種されたCRL11171細胞のインビトロPMO処理により細胞病原性作用が減じられていることを示す図である。

30

【図8】TBEVの5'末端領域を標的とするPMOの存在下、インビトロTBEV複製の減少を示す図である。

【図 1 A】

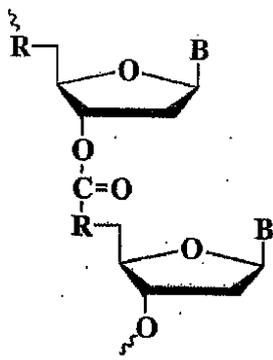


Fig. 1A

【図 1 B】

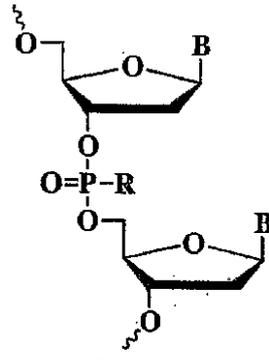


Fig. 1B

【図 1 C】

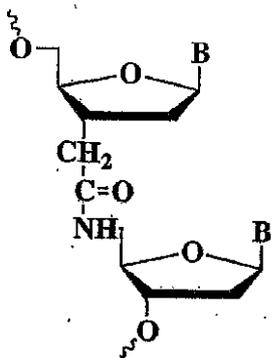


Fig. 1C

【図 1 D】

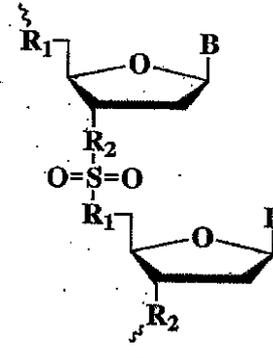


Fig. 1D

【 1 E】

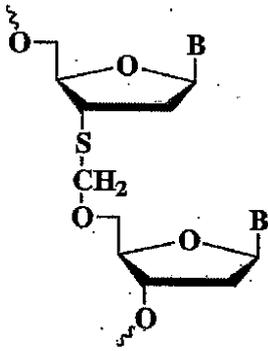


Fig. 1E

【 1 F】

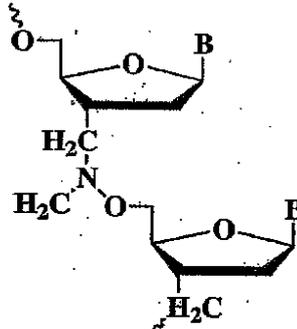


Fig. 1F

【 1 G】

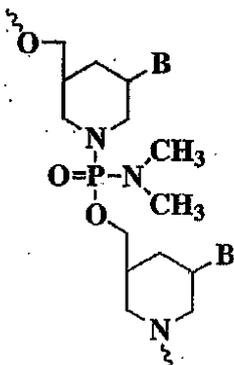


Fig. 1G

【 2 B】

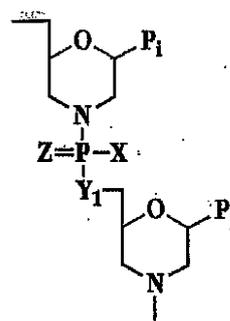


Fig. 2B

【 2 A】

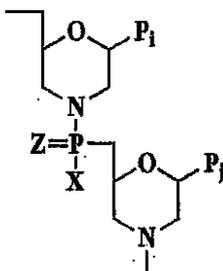


Fig. 2A

【図2C】

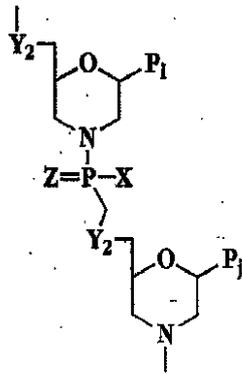


Fig. 2C

【図2D】

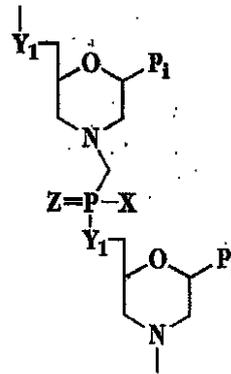
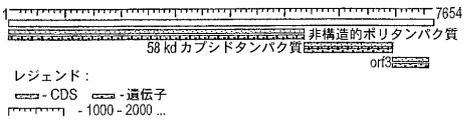


Fig. 2D

【図3A】



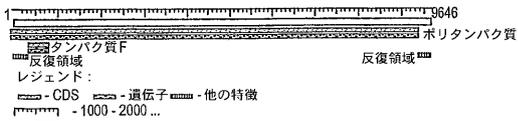
【図3B】



【図3C】



【図3D】



【図3E】



【図4A】

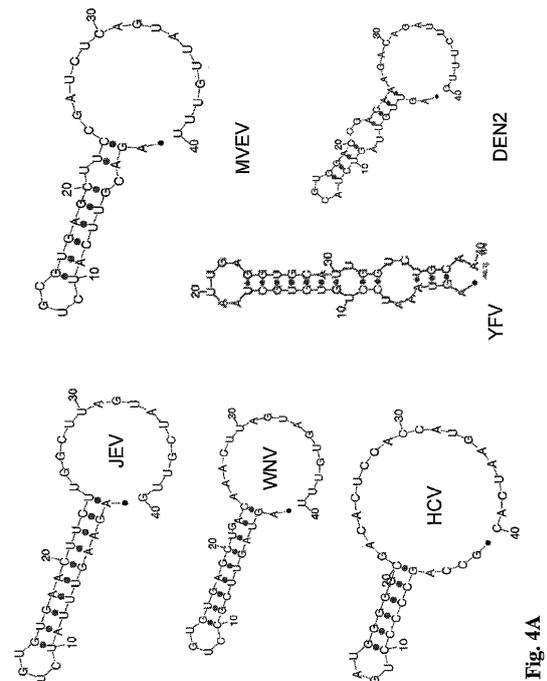


Fig. 4A

【 図 4 B 】

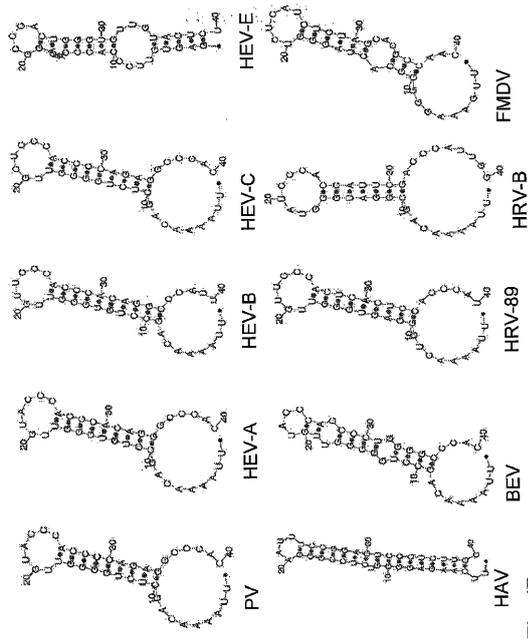
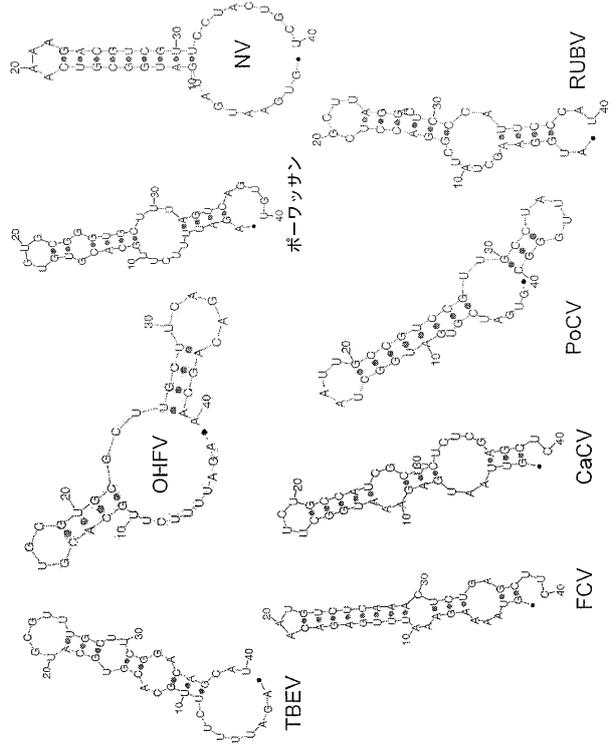


Fig. 4B

【 図 4 C 】



【 図 4 D 】

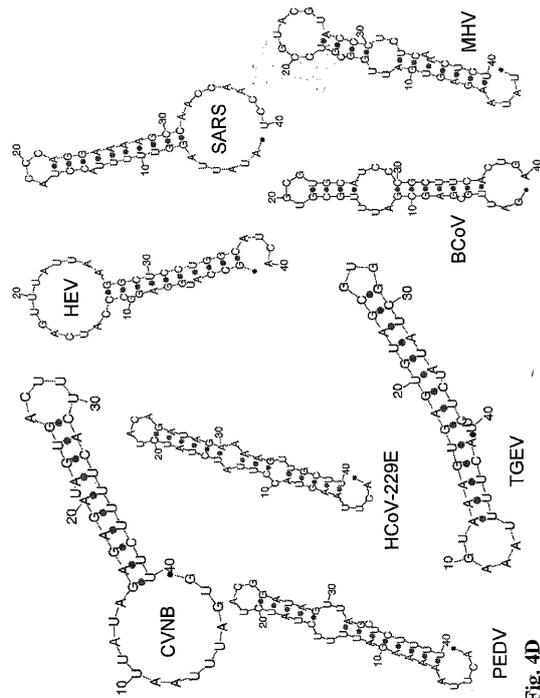


Fig. 4D

【 図 4 E 】

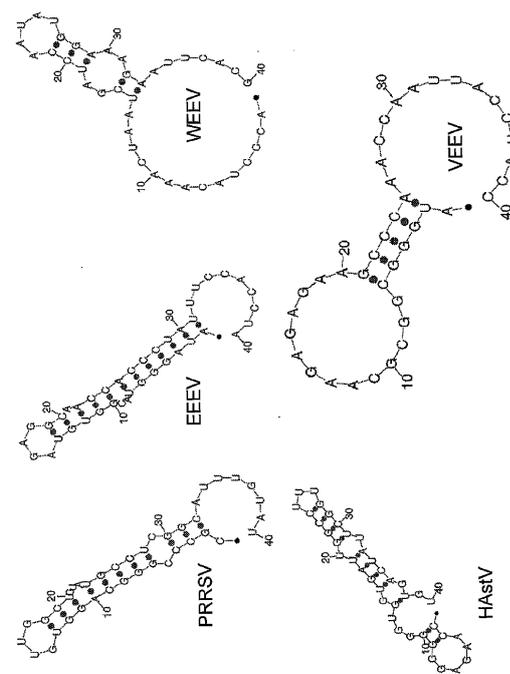
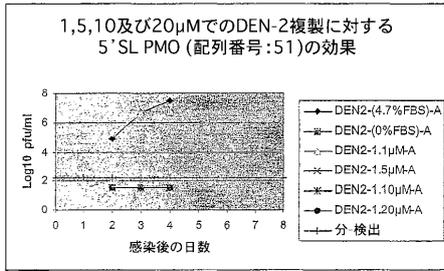
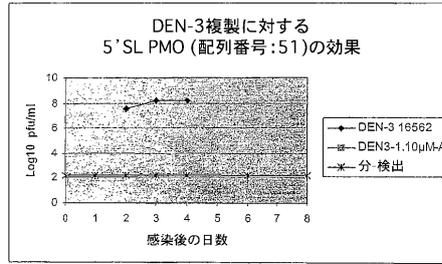


Fig. 4E

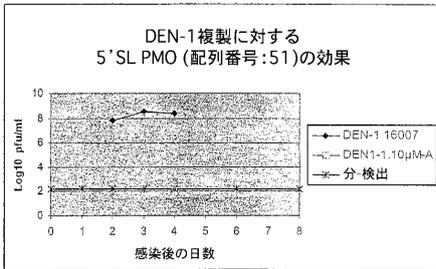
【図5A】



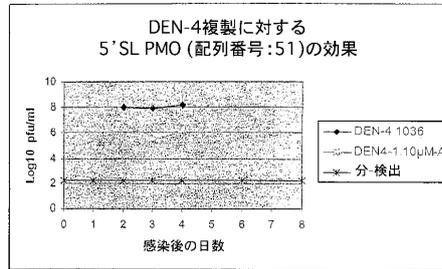
【図5C】



【図5B】

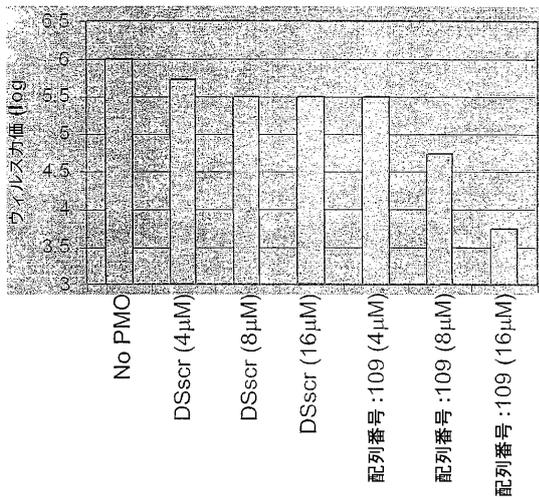


【図5D】

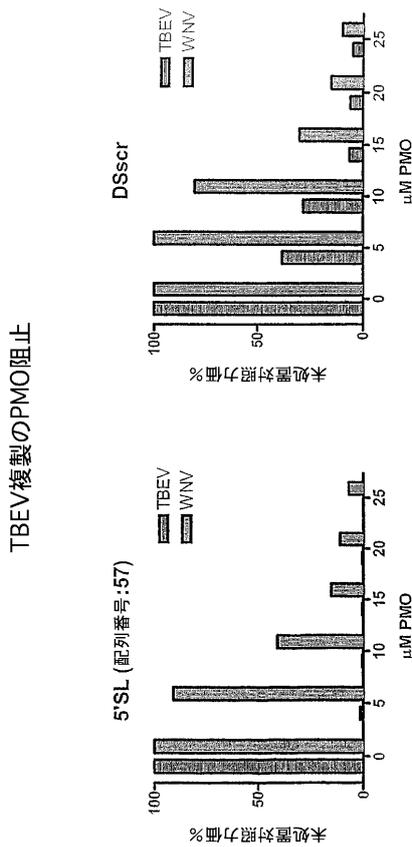


【図6】

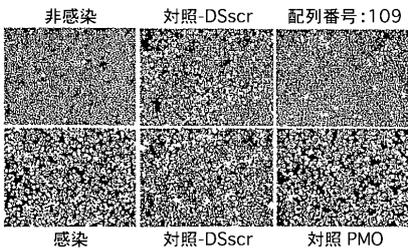
PMO PRRSV-1a (配列番号109)はPRRSV複製を阻止する



【図8】



【図7】



【配列表】

0005425396000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 アイバーセン、パトリック、エル。
アメリカ合衆国、オレゴン、アルバニー、 エヌ．ダブリュー．フェアー オークス プレース
5 9 0 2
- (72)発明者 ステイン、デーヴィッド、エー。
アメリカ合衆国、オレゴン、コーバリス、 エヌ．ダブリュー．エバーグリーン ストリート 2
1 3 5

審査官 北田 祐介

- (56)参考文献 国際公開第2003/033657(WO, A1)
特開2001-226400(JP, A)
特表2007-527227(JP, A)
Antimicrob Agents Chemother., 2001年, 第45巻, 1043 - 1052ページ
Nucleic Acids Res., 1999年, 第27巻, 4328 - 4334ページ
Bioconjug Chem., 2004年2月, 第15巻, 290 - 299ページ
Antisense Nucleic Acid Dev., 1997年, 第7巻, 187 - 195ページ
J Virol., 1996年, 第70巻, 5203 - 5212ページ
J Virol., 2003年, 第77巻, 10623-10629ページ
J Virol., 2005年4月, 第79巻, 4599-4609ページ

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
A 6 1 K 4 8 / 0 0
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)
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)
P u b M e d
S c i e n c e D i r e c t