

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6901966号  
(P6901966)

(45) 発行日 令和3年7月14日(2021.7.14)

(24) 登録日 令和3年6月22日(2021.6.22)

(51) Int.Cl.

F 1

|                |           |                |         |
|----------------|-----------|----------------|---------|
| C 12 N 15/113  | (2010.01) | C 12 N 15/113  | Z N A Z |
| A 61 K 31/787  | (2006.01) | A 61 K 31/787  |         |
| A 61 P 31/04   | (2006.01) | A 61 P 31/04   |         |
| A 61 K 31/7125 | (2006.01) | A 61 K 31/7125 |         |

請求項の数 14 (全 86 頁)

|                    |                               |
|--------------------|-------------------------------|
| (21) 出願番号          | 特願2017-512874 (P2017-512874)  |
| (86) (22) 出願日      | 平成27年5月15日 (2015.5.15)        |
| (65) 公表番号          | 特表2017-522044 (P2017-522044A) |
| (43) 公表日           | 平成29年8月10日 (2017.8.10)        |
| (86) 國際出願番号        | PCT/US2015/031150             |
| (87) 國際公開番号        | W02015/175977                 |
| (87) 國際公開日         | 平成27年11月19日 (2015.11.19)      |
| 審査請求日              | 平成30年5月14日 (2018.5.14)        |
| (31) 優先権主張番号       | 61/994,750                    |
| (32) 優先日           | 平成26年5月16日 (2014.5.16)        |
| (33) 優先権主張国・地域又は機関 | 米国 (US)                       |
| (31) 優先権主張番号       | 62/099,046                    |
| (32) 優先日           | 平成26年12月31日 (2014.12.31)      |
| (33) 優先権主張国・地域又は機関 | 米国 (US)                       |

(73) 特許権者 516341280

オレゴン ステート ユニバーシティ  
アメリカ合衆国 オレゴン 97331-  
3804, コーバリス, ナッシュ ホー  
ル 220

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】アンチセンス抗化合物および方法

(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、および(b)病原性因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)にコンジュゲートしている、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11 (T C A A G T T T T C C)
- 2) 配列番号12 (T C C T T T T A T T C)
- 3) 配列番号13 (C C A T C A A G T T T)
- 4) 配列番号14 (G G C A A T T C C A T)、および
- 5) 配列番号27 (C C A T T A C C C C T)

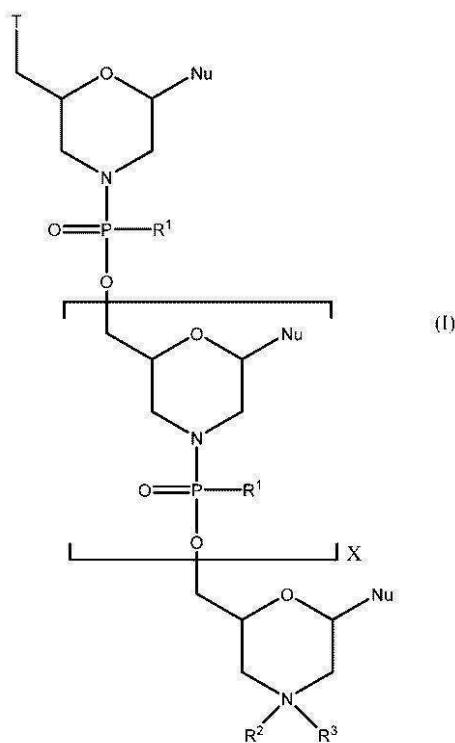
10

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

【請求項 2】

前記アンチセンスモルホリノオリゴマーが、式(I):

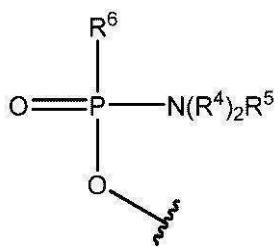
## 【化43】



10

20

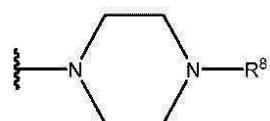
のものまたは薬学的に許容されるその塩であり、  
 式中、各  $Nu$  は、一緒にになって標的化配列を形成する核酸塩基であり、  
 $X$  は、9 ~ 38 の整数であり、  
 $T$  は、OH および式：  
 【化44】



30

の部分から選択され、式中、各  $R^4$  は、独立に、C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> 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<sup>7</sup>)CH<sub>2</sub>C(O)NH<sub>2</sub>、および式：

## 【化45】



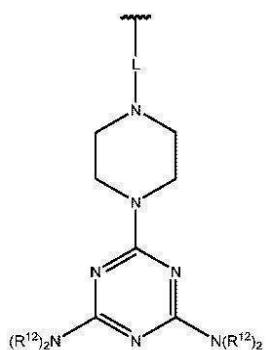
40

の部分から選択され、式中、  
 $R^7$  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<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、  
 $R^9$  は、式  $-(O-\text{アルキル})_y$  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<sub>2</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキルから独立に選択され、  
 $R^{10}$  の各々は、-N(R<sup>10</sup>)<sub>2</sub>R<sup>11</sup> であり、式中、各  $R^{10}$  は、独立に、C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキルであり、  
 $R^{11}$  は、電子対およびHから選択され、

50

$R^2$  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46】



10

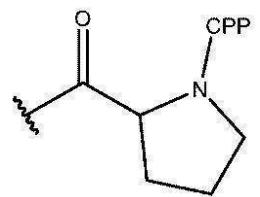
の部分から選択され、式中、Lは、-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>C(O)-および-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C(O)-から選択され、各R<sup>1~2</sup>は、式-C(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OC(O)N(R<sup>1~4</sup>)<sub>2</sub>のものであり、式中、各R<sup>1~4</sup>は、式-C(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NHC(=NH)NH<sub>2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

$R^3$ 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>NH<sub>2</sub>C(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：

20

【化47】



のものであり、式中、前記CPPは、前記CPPのカルボキシ末端において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、

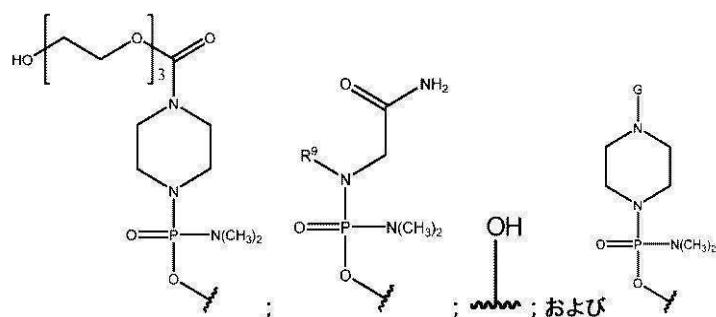
30

前記標的化配列が、前記病原性因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、請求項1に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

【請求項3】

Tが、

【化48】



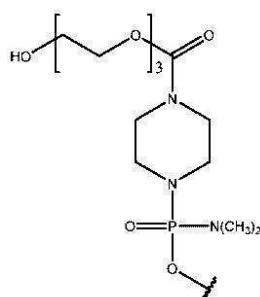
40

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。

【請求項4】

Tが、式：

## 【化 5 2】

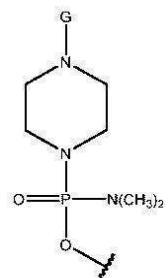


のものであり、そして  $R^2$  が、G である、請求項 2 に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。10

## 【請求項 5】

T が、式：

## 【化 5 3】



20

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、-  $N(C_2H_5)_2$  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。

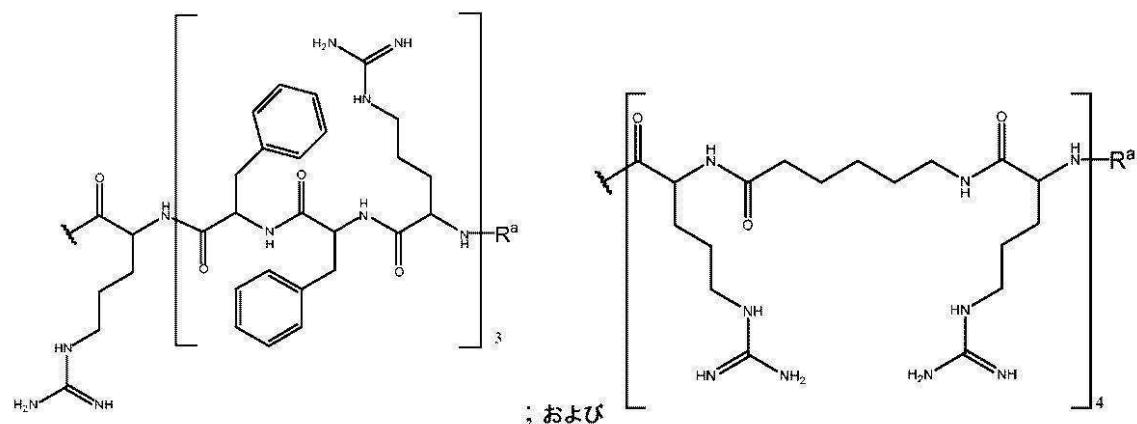
## 【請求項 7】

各  $R^1$  が、-  $N(C_2H_5)_2$  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、30

## 【化 5 4】



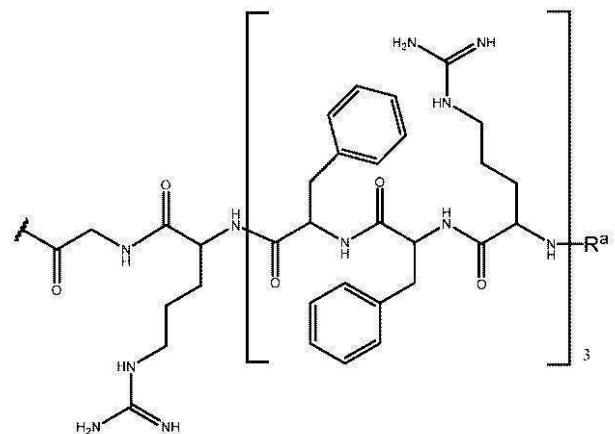
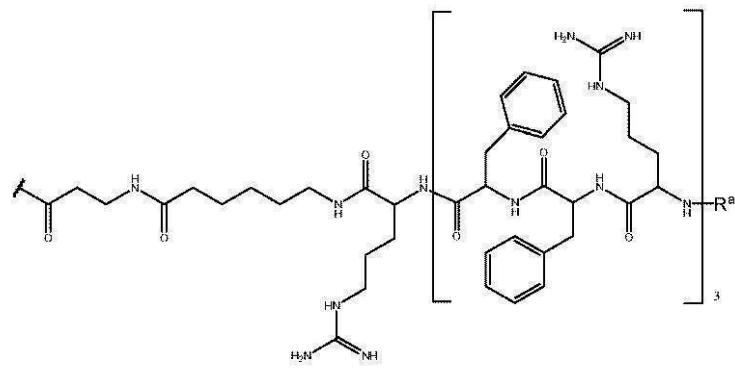
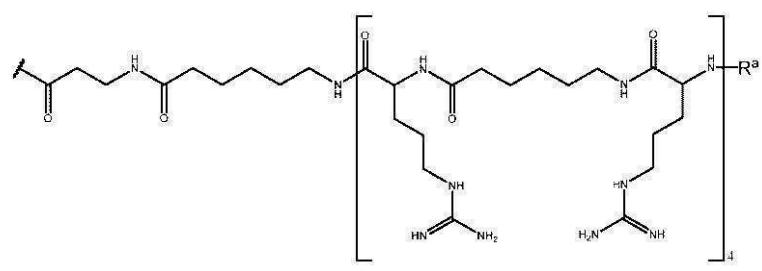
40

から選択され、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、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 9】

G が、

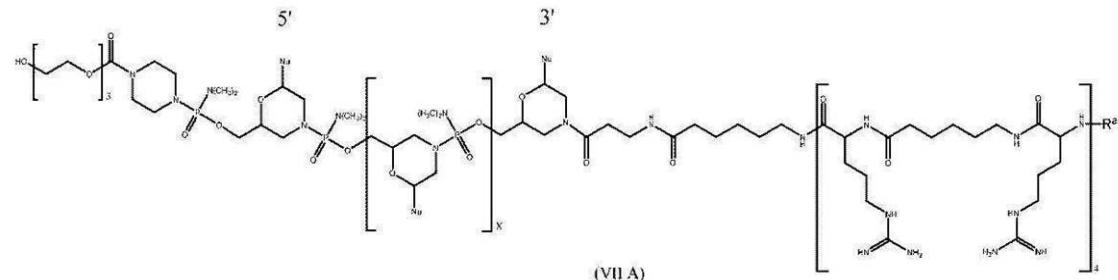
## 【化 5 5】



から選択され、式中、R<sup>a</sup>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、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 5 6】



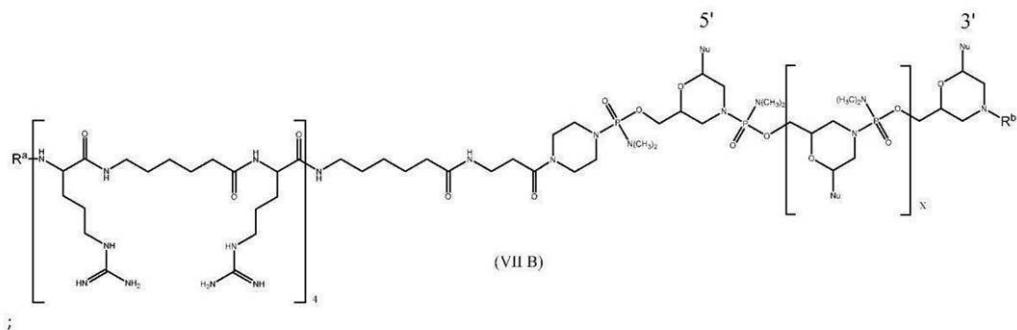
10

20

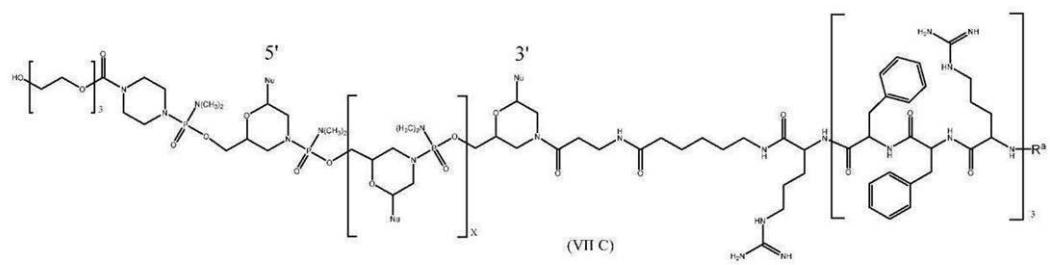
30

40

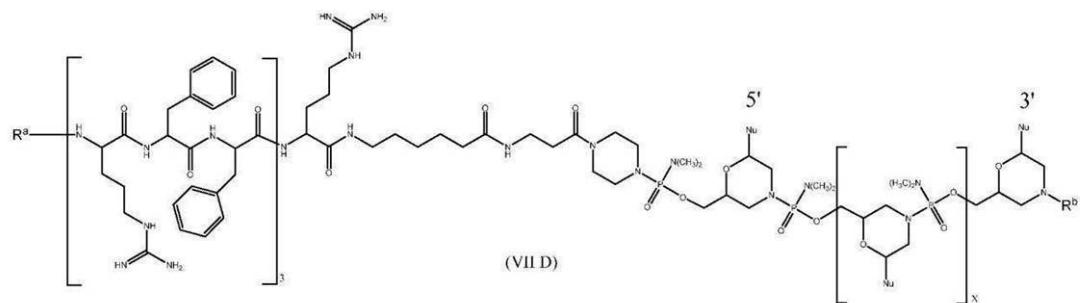
【化 5 7】



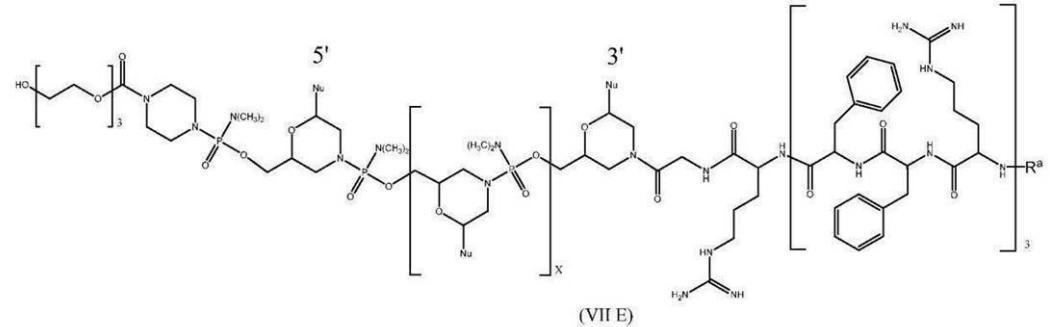
10



20

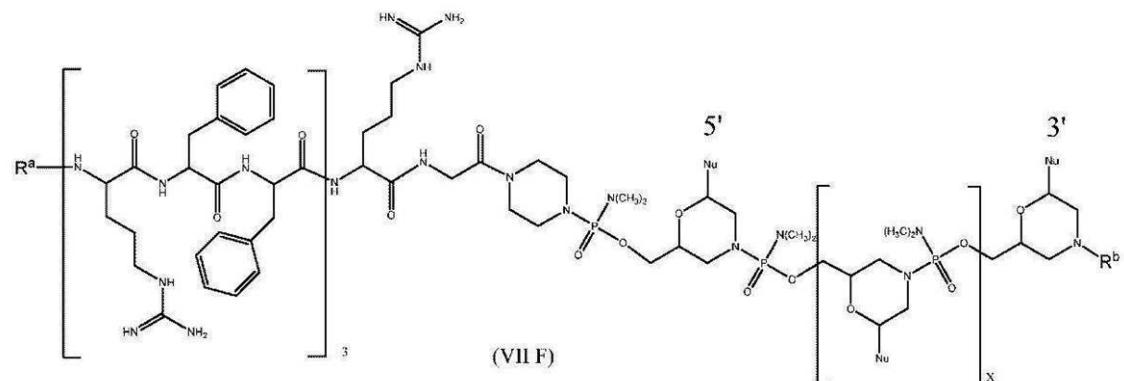


30



40

## 【化 5 8】



10

から選択される式 (VIII) 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<sup>a</sup>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<sup>b</sup>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、そしてXおよびNuは、請求項2で定義された通りである、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 1 1】

前記標的化配列が、

20

- a ) 配列番号 1 1 ( T C A A G T T T T C C ) ;
- b ) 配列番号 1 2 ( T C C T T T T A T T C ) ;
- c ) 配列番号 1 3 ( C C A T C A A G T T T ) ; および
- d ) 配列番号 1 4 ( G G C A A T T C C A T ) ;

から選択され、ここでXが、9であり、チミン塩基(T)が、ウラシル塩基(U)であり得る、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 2 7 ( C C A T T A C C C C T ) であり、ここでXが、9であり、チミン塩基(T)が、ウラシル塩基(U)であり得る、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。

30

## 【請求項 1 3】

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が、請求項2で定義された通りである、医薬組成物。

## 【請求項 1 4】

細菌中の病原性因子の発現および活性を低減させるのに使用するための、請求項2で定義され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。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

40

## 【0 0 0 1】

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16日に出願された米国出願第61/994,750号、2014年12月31日に出願された米国出願第62/099,046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。

## 【0 0 0 2】

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

50

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、S A T H - 0 0 3 \_ 0 3 W O \_ S T 2 5 . t x t である。テキストファイルは約 1 0 K B であり、2 0 1 5 年 5 月 1 5 日に作製され、E F S - ウェブによって電子的に提出されている。

【 0 0 0 3 】

本開示は、細菌病原性因子、例えば、抗生物質耐性、バイオフィルム形成または脂肪酸生合成の一因となる遺伝子に対して標的化されるアンチセンスモルホリノオリゴマー、ならびに関連する組成物、ならびに、例えば、感染した哺乳動物被験体の処置におけるオリゴマーおよび組成物を使用する方法に関する。

【 背景技術 】

【 0 0 0 4 】

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スポリンは、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ィコプラニン ( t e i c h o p l a n i n ) 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 D N A 複製を阻害するキノロン、細菌 R N A 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、テトラヒドロフォレートの産生のための経路における酵素の阻害剤を含む。

【 0 0 0 5 】

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 3 0 S リボソームサブユニットを標的化し、5 0 S 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、3 0 S リボソームサブユニットを標的化し、対応する m R N A コドンとのアミノアシル化した t R N A のアライ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、5 0 S 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。

【 0 0 0 6 】

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、ベータ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ベータ - 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、t e t A 、t e t G 、t e t L 、および t e t K 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、多くのベータ - 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 ( P B P ) 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。

【 0 0 0 7 】

バイオフィルム形成はまた、他の臨床上の困難の中でも抗生物質耐性をもたらし得る。典型的には、細菌が感染した宿主内でバイオフィルムを形成する状況において、感染症は

処置不能となり、慢性状態へと発達し得る。慢性バイオフィルムをベースとする感染症の顕著な特徴は、抗生物質処置および多くの他の通常の抗微生物剤に対する耐性だけでなく、宿主防御を逃れる能力も含む。したがって、バイオフィルムを防止または崩壊させる戦略は、治療上の目的であり、治療的に有効であろう。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

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。

10

【課題を解決するための手段】

【0009】

本開示の実施形態は部分的に、細菌病原性因子のアンチセンス標的化が、とりわけ、そうでなければ抗生物質耐性である病原性細菌の抗生物質感受性を増加させ、ある特定の病原性細菌が、処置困難なバイオフィルムを形成および維持する能力を低減させることができるという発見に関する。例えば、抗生物質耐性遺伝子のアンチセンス標的化、例えば、カルバペネマーゼおよび排出ポンプは、多くの一般に使用される抗生物質に対する抗生物質耐性 (例えば、多剤耐性) 細菌の感受性を増加させ、例えば、抗生物質と組み合わせて、このような細菌の処置において有用性を見出すことができたことが示された。また、バイオフィルム形成と関連する遺伝子のアンチセンス標的化は、現存するバイオフィルムを崩壊させ、新たなバイオフィルムの産生を低減させることができた。このようなアンチセンス標的化は、例えば、抗生物質に対するバイオフィルム形成細菌の感受性を増加させる、バイオフィルム形成細菌に対する単独型療法において、および併用療法として有用性を見出すことができた。

20

【0010】

したがって、本開示の実施形態は、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、および(b) 病原性因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み、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。

30

【0011】

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。

【0012】

一部の実施形態では、病原性因子は、抗生物質耐性タンパク質、バイオフィルム形成タンパク質または脂肪酸生合成と関連するタンパク質である。

40

【0013】

ある特定の実施形態では、抗生物質耐性タンパク質は、ニューデリーメタロ-ベータ-ラクタマーゼ (NDM-1) 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1つまたは複数から選択される。具体的な実施形態では、標的配列は、表1Aから選択される。一部のアンチセンスオリゴマーは、表2Aに記載されている標的化配列、表2Aにおける標的化配列の少なくとも10の連続するヌクレオチドのフラグメント、または表2Aにおける標的化配列と少なくとも80%の配列同一性を有する変異体を含むか、これらからなるか、またはこれらから本質的になる。

【0014】

一部の実施形態では、バイオフィルム形成タンパク質は、cepIまたはsuhBの1

50

つまたは複数によってコードされる。特定の実施形態では、標的配列は、表 1 B から選択される。一部のアンチセンスオリゴマーは、表 2 B に記載されている標的化配列、表 2 B における標的化配列の少なくとも 10 の連続するヌクレオチドのフラグメント、または表 2 B における標的化配列と少なくとも 80 % の配列同一性を有する変異体を含むか、これらからなるか、またはこれらから本質的になる。

## 【0015】

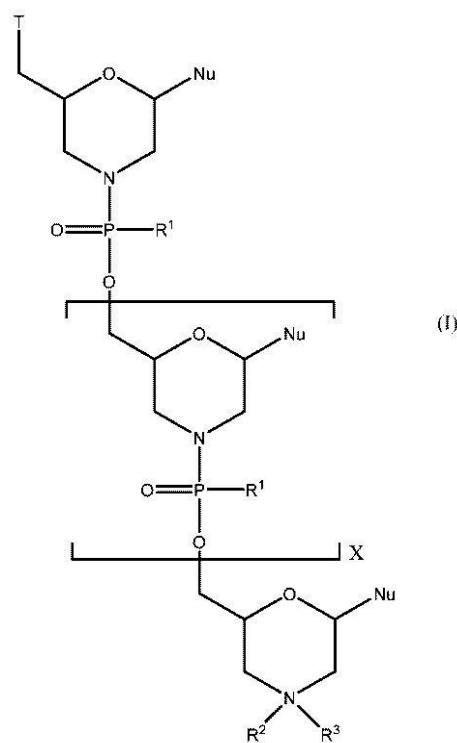
一部の実施形態では、脂肪酸生合成と関連するタンパク質は、a c p P の 1 つまたは複数によってコードされるアシルキャリアータンパク質である。特定の実施形態では、標的配列は、表 1 C から選択される。一部のアンチセンスオリゴマーは、表 2 C に記載されている標的化配列、表 2 C における標的化配列の少なくとも 10 の連続するヌクレオチドのフラグメント、または表 2 C における標的化配列と少なくとも 80 % の配列同一性を有する変異体を含むか、これらからなるか、またはこれらから本質的になる。

10

## 【0016】

ある特定の実施形態では、本開示のアンチセンスモルホリノオリゴマーは、式 (I) :

## 【化 1】



30

のもの、または薬学的に許容されるその塩であり得、

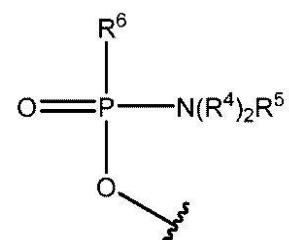
式中、各 Nu は、一緒になって標的化配列を形成する核酸塩基であり、

X は、9 ~ 38 の整数であり、

T は、OH および式 :

## 【化 2】

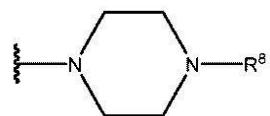
40



の部分から選択され、式中、各 R<sup>4</sup> は、独立に、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 :

50

## 【化3】



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、

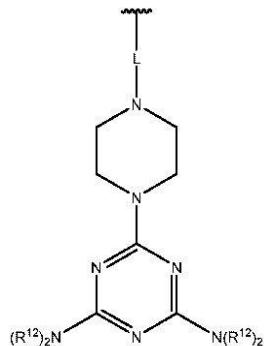
R<sup>9</sup>は、式-(O-アルキル)<sub>y</sub>-のものであり、式中、yは、3～10の整数であり、  
10  
y個のアルキル基のそれぞれは、C<sub>2</sub>～C<sub>6</sub>アルキルから独立に選択され、

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、独立に、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4】



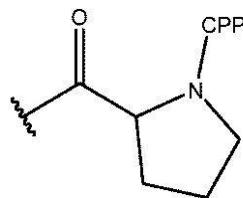
20

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>NH<sub>2</sub>=NH-NH<sub>2</sub>のものであり、  
30

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-CPP、-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH-CPP、-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>C(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5】



40

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おり、ただし、Gの1つのみの実例が存在し、

標的化配列は、病原性因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。

## 【0017】

ある特定の実施形態では、CPPは、アルギニンに富んだペプチドである。ある特定の実施形態では、CPPは、表1Cから選択される。

50

## 【0018】

また含まれるのは、細菌（複数可）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（複数可）において病原性因子の発現および活性を低減させる方法である。

## 【0019】

一部の実施形態では、細菌は、被験体中にあり、方法は、アンチセンスオリゴマーを被験体に投与することを含む。

## 【0020】

ある特定の実施形態では、細菌は、*Escherichia*、*Acinetobacter*、*Klebsiella*、および*Burkholderia*の属から選択される。10 ある特定の実施形態では、細菌は、*Escherichia coli*、*Acinetobacter baumannii*、*Klebsiella pneumoniae*、または*Burkholderia cepacia*（種群（complex））である。ある特定の実施形態では、細菌は、*Escherichia coli*、*Acinetobacter baumannii*、または*Klebsiella pneumoniae*であり、病原性因子は、NDM-1およびAdeAの1つまたは複数から選択される抗生物質耐性タンパク質である。

## 【0021】

一部の実施形態では、細菌は、*Burkholderia cepacia*（種群）であり、病原性因子は、cepIおよびsuhBの1つまたは複数によってコードされるバイオフィルム形成タンパク質である。ある特定の実施形態では、*Burkholderia cepacia*（種群）は、*Burkholderia cenocepacia*、*Burkholderia multivorans*、*Burkholderia vietnamiensis*、*Burkholderia stabilis*、*Burkholderia anthina*、*Burkholderia pyrrhociniae*、*Burkholderia dolosa*、および/または*Burkholderia ambifaria*の1つまたは複数を含む。ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴマーの投与は、バイオフィルムの形成または現存するバイオフィルムを少なくとも約10%低減させる。ある特定の実施形態では、被験体は、免疫無防備状態であり、根底にある肺疾患有する。具体的な実施形態では、被験体は、囊胞性線維症（CF）または慢性肉芽腫症（CGD）を有する。2030

## 【0022】

一部の実施形態では、細菌は、*Burkholderia cepacia*（種群）であり、病原性因子は、acPPの1つまたは複数によってコードされる、脂肪酸合成と関連する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、*Burkholderia cepacia*（種群）は、*Burkholderia cenocepacia*、*Burkholderia multivorans*、*Burkholderia vietnamiensis*、*Burkholderia stabilis*、*Burkholderia anthina*、*Burkholderia pyrrhociniae*、*Burkholderia dolosa*、および/または*Burkholderia ambifaria*の1つまたは複数を含む。ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴマーの投与は、バイオフィルムの形成または現存するバイオフィルムを少なくとも約10%低減させる。ある特定の実施形態では、被験体は、免疫無防備状態であり、根底にある肺疾患有する。具体的な実施形態では、被験体は、囊胞性線維症（CF）または慢性肉芽腫症（CGD）を有する。40

## 【0023】

一部の方法は、オリゴマーを抗微生物剤と別々または同時に投与することを含み、例えば、オリゴマーの投与は、抗微生物剤に対する細菌の感受性を増加させる。一部の方法は、エアゾール化によってオリゴマーを投与することを含む。

## 【0024】

ある特定の実施形態では、細菌は、Escherichia coli、Acinetobacter baumannii、またはKlebsiella pneumoniaeであり、病原性因子は、NDM-1であり、抗微生物剤は、カルバペネムである。ある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。

【0025】

一部の実施形態では、細菌は、Escherichia coli、Acinetobacter baumannii、またはKlebsiella pneumoniaeであり、病原性因子は、AdeA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1つまたは複数から選択される。ある特定の実施形態では、アミノグリコシドは、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。ある特定の実施形態では、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1つまたは複数から選択される。ある特定の実施形態では、-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)、セファロスポリン(セフェム)、およびモノバクタムの1つまたは複数から選択される。

【0026】

ある特定の実施形態では、細菌は、Burkholderia cepacia(種群)であり、病原性因子は、cepIまたはsuhBの1つまたは複数によってコードされるバイオフィルム形成タンパク質であり、抗微生物剤は、セフタジム、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つまたは複数から選択される。

【0027】

ある特定の実施形態では、細菌は、Burkholderia cepacia(種群)であり、病原性因子は、acpPの1つまたは複数によってコードされる、脂肪酸生合成と関連するアシルキャリアタンパク質であり、抗微生物剤は、セフタジム、ミノサイクリン、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つまたは複数から選択される。

【0028】

一部の実施形態では、オリゴマーは、抗微生物剤単独に対して少なくとも約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)を低減させる。ある特定の実施形態では、オリゴマーは、抗微生物剤単独に対して少なくとも約10%、抗微生物剤に対する細菌の感受性を増加させる。

【0029】

また含まれるのは、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薬学的に許容される担体を含む医薬組成物である。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、および(b)病原性因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標的化配列を有

10

20

30

40

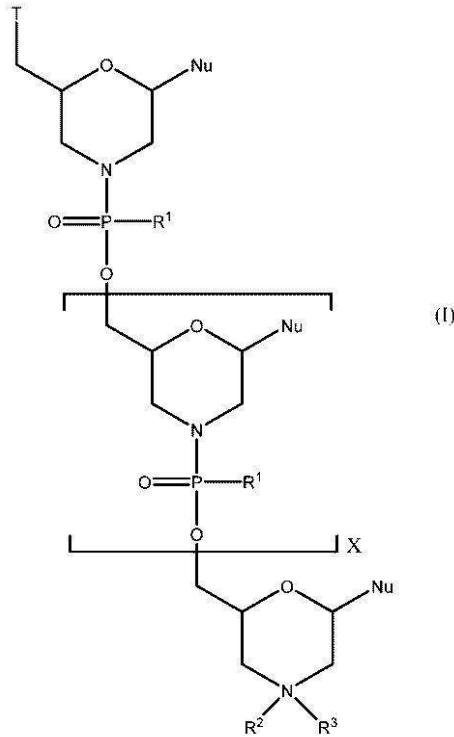
50

し、細胞透過性ペプチド( CPP )にコンジュゲートしている、アンチセンスモルホリノオリゴマー。

(項目2)

前記アンチセンスモルホリノオリゴマーが、式(I)：

【化43】



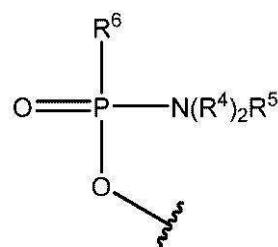
のものまたは薬学的に許容されるその塩であり、

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、

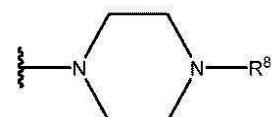
T は、OH および式：

【化44】



の部分から選択され、式中、各 R4 は、独立に、C1 ~ C6 アルキルであり、R5 は、電子対およびHから選択され、R6 は、OH、-N(R7)CH2C(O)NH2、および式：

【化45】



の部分から選択され、式中、

R7 は、H および C1 ~ C6 アルキルから選択され、

20

—

30

40

50

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、

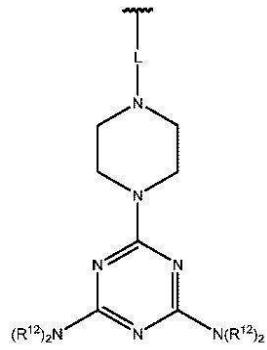
R<sup>9</sup> は、 式 - ( O - アルキル )<sub>y</sub> - のものであり、 式中、 y は、 3 ~ 10 の整数であり、 y 個のアルキル基のそれぞれは、 C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキルから独立に選択され、

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、 独立に、 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 4 6】



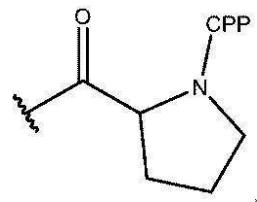
10

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

G は、 細胞透過性ペプチド ( 「 CPP 」 ) 、 ならびに - C ( O ) ( C H<sub>2</sub> )<sub>5</sub> N H - C P P 、 - C ( O ) ( C H<sub>2</sub> )<sub>2</sub> N H - C P P 、 - C ( O ) ( C H<sub>2</sub> )<sub>2</sub> N H C ( O ) ( C H<sub>2</sub> )<sub>5</sub> N H - C P P 、 および - C ( O ) C H<sub>2</sub> N H - C P P 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 7】



30

のものであり、 式中、 前記 CPP は、 前記 CPP のカルボキシ末端において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、 病原性因子をコードする細菌 m R N A 標的配列と特異的にハイブリダイズする、 項目 1 に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

( 項目 3 )

前記標的配列が、 前記細菌 m R N A の翻訳開始コドンおよび / または前記細菌 m R N A 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 2 に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

( 項目 4 )

前記病原性因子が、 ニューデリーメタロ - ベータ - ラクタマーゼ ( N D M - 1 ) および耐性 - 小結節形成 - 細胞分裂 ( R N D ) 型多剤排出ポンプサブユニット A d e A ( a d e A ) の少なくとも 1 つから選択される抗生物質耐性タンパク質であるか、 または前記病原

40

50

性因子が、バイオフィルム形成タンパク質である、項目2または3に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

(項目5)

前記標的配列が、配列番号1～4から選択され、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)

前記標的化配列が、配列番号11～15に記載されているか、配列番号11～15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11～15と少なくとも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4に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

10

(項目7)

前記バイオフィルム形成タンパク質が、CepIまたはSuhBの少なくとも1つによってコードされる、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)

前記標的配列が、配列番号5～9から選択され、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7に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

(項目9)

前記標的化配列が、配列番号16～24に記載されているか、配列番号16～24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16～24と少なくとも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7に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

20

(項目10)

前記病原性因子が、脂肪酸生合成と関連するタンパク質である、項目2または3に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

(項目11)

脂肪酸生合成と関連する前記タンパク質が、アシルキャリアータンパク質である、項目10に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

30

(項目12)

前記アシルキャリアータンパク質が、AcPPである、項目11に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

(項目13)

前記標的配列が、配列番号10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12に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

(項目14)

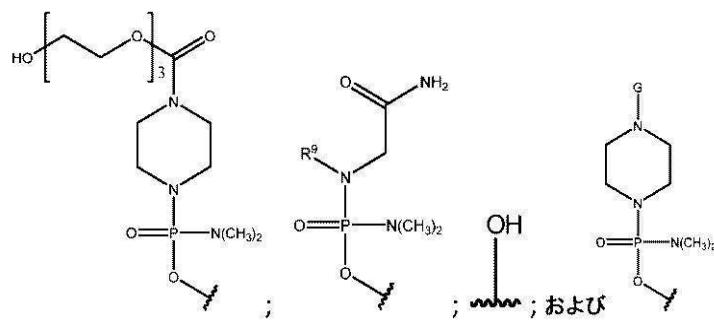
前記標的化配列が配列番号25～37に記載されているか、配列番号25～37の少なくとも10の連続するヌクレオチドのフラグメントを含むか、または配列番号25～37と少なくとも80%の配列同一性を有する変異体を含み、ここでチミン塩基(T)が任意選択で、ウラシル塩基(U)である、項目12に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

40

(項目15)

Tが、

## 【化48】



10

から選択される、項目1に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

(項目16)

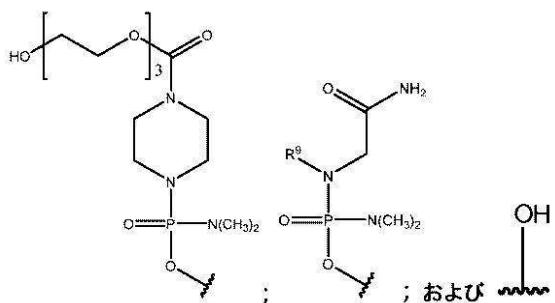
$R^2$  が、H、G、アシル、トリチル、4-メトキシトリチル、ベンゾイル、およびステアロイルから選択される、項目1または15に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

—

(項目17)

Tが、

## 【化49】



20

から選択され、そして

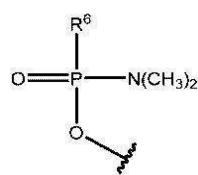
30

$R^2$  が、Gである、項目1に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

(項目18)

Tが、式：

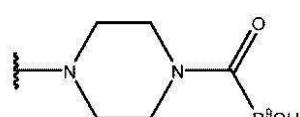
## 【化50】



40

のものであり、 $R^6$ が、式：

## 【化51】

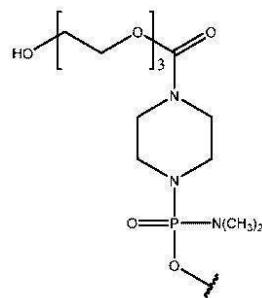


のものであり、そして $R^2$ が、Gである、項目1に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

(項目19)

50

Tが、式：  
【化52】

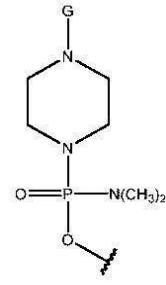


10

のものであり、そして  $R^2$  が、G である、項目 1 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、式：

【化53】



20

のものである、項目 1 に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

(項目21)  
 $R^2$  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 1 または 20 に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

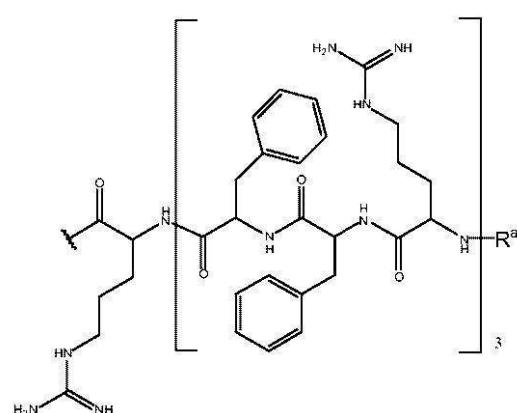
(項目22)  
 $R^1$  の少なくとも 1 つの実例が、 $-N(CH_3)_2$  である、項目 1 または 15 から 21 のいずれか一項に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

(項目23)  
各  $R^1$  が、 $-N(CH_3)_2$  である、項目 22 に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

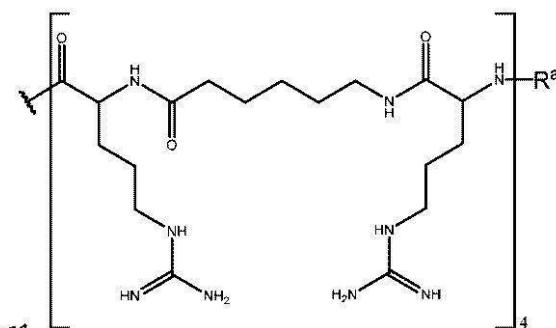
(項目24)

前記 CPP が、

【化54】



；および



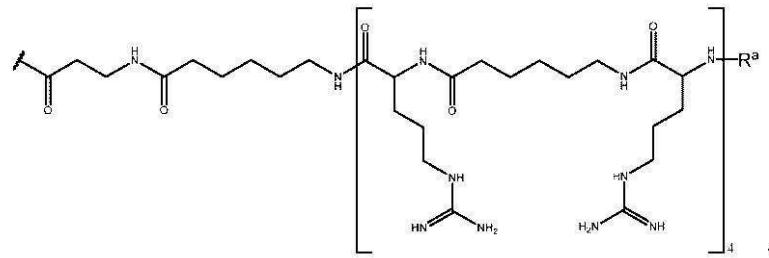
40

50

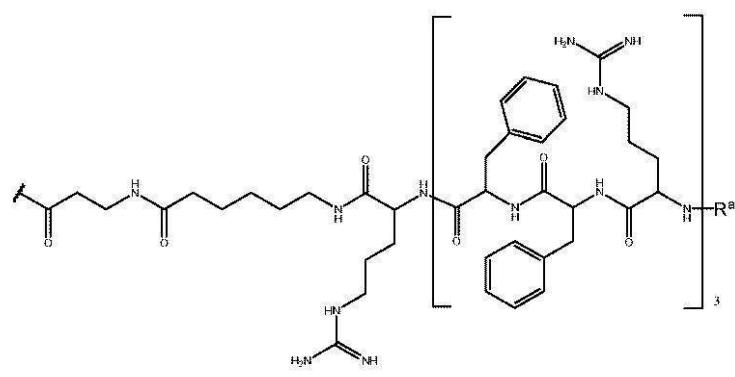
から選択され、式中、R<sup>a</sup>は、H、アセチル、ベンゾイル、およびステアロイルから選択される、項目1および15から23のいずれか一項に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

(項目25)

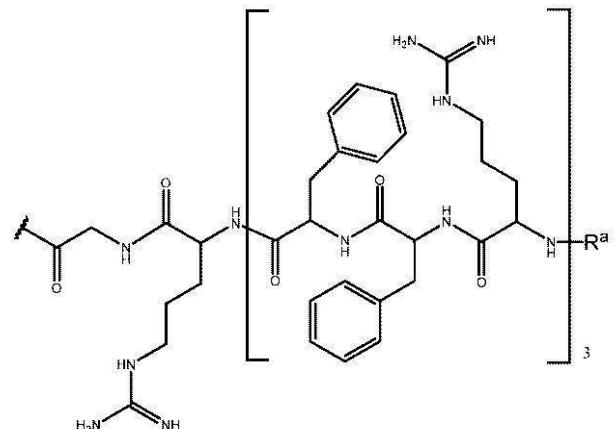
Gが、  
【化55】



10



20



30

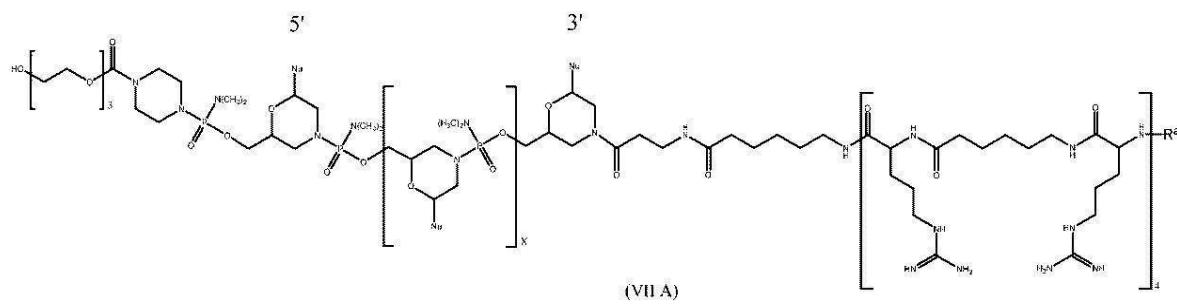
から選択され、式中、R<sup>a</sup>は、H、アセチル、ベンゾイル、およびステアロイルから選択される、項目1または15から23のいずれか一項に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

(項目26)

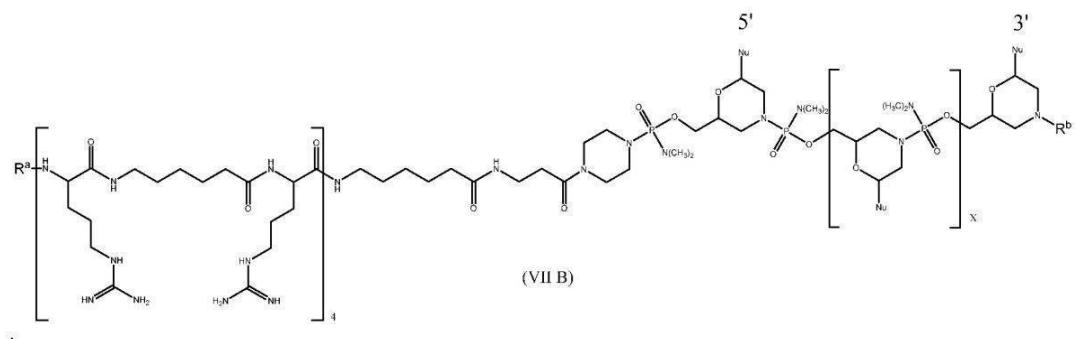
前記アンチセンスオリゴマーが、

40

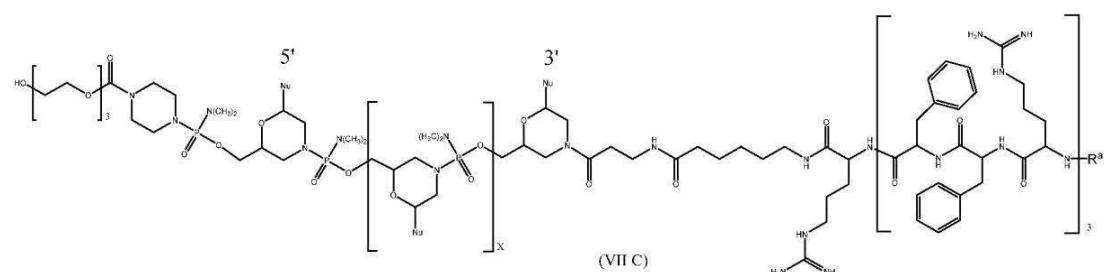
## 【化 5 6】



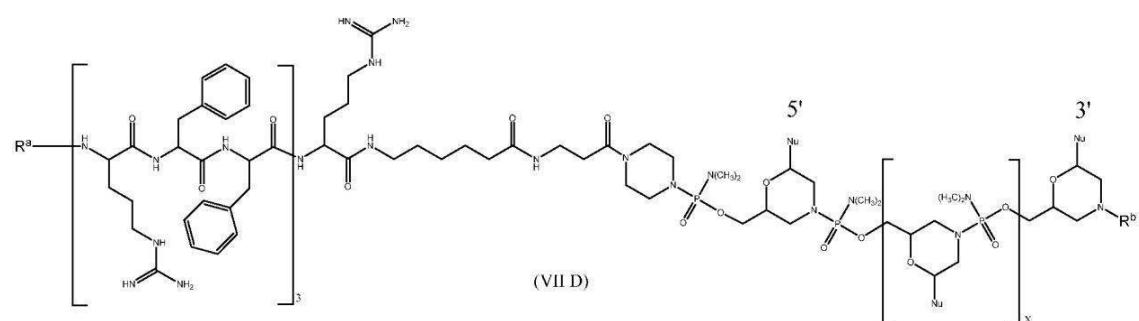
【化 5 7】



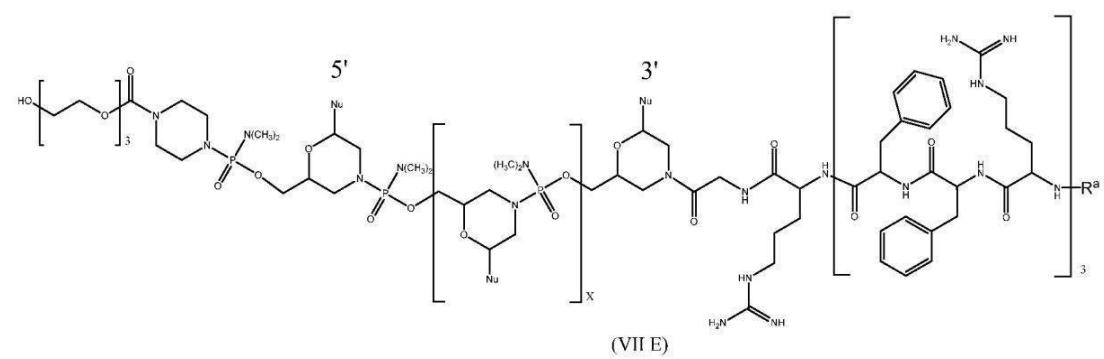
10



20

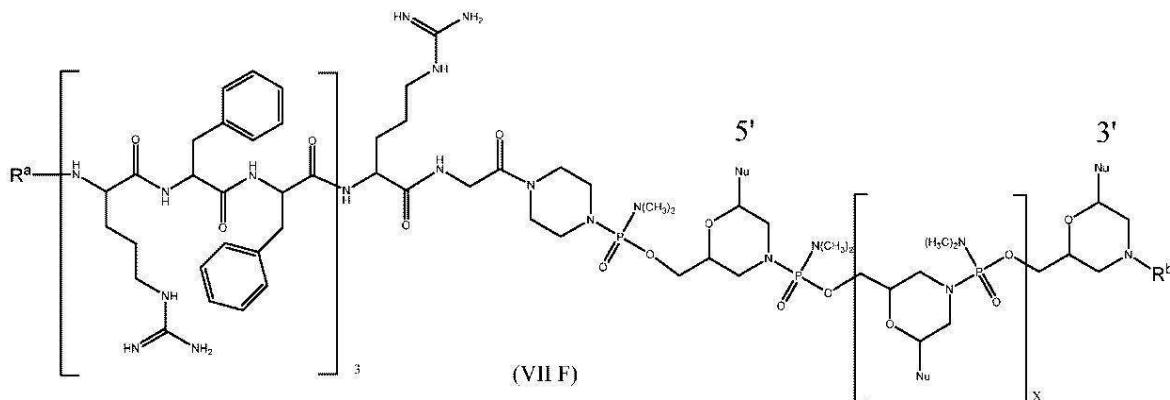


30



40

## 【化 5 8】



10

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<sup>a</sup>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<sup>b</sup>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、そしてXおよびNuは、項目1で定義された通りである、項目1に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

(項目27)

20

R<sup>a</sup>が、アセチルであり、そしてR<sup>b</sup>が、Hである、項目26に記載のアンチセンスモルホリノオリゴマー。

(項目28)

前記標的化配列が、

- a) 配列番号11 (T C A A G T T T T C C) ;
- b) 配列番号12 (T C C T T T T A T T C) ;
- c) 配列番号13 (C C A T C A A G T T T) ;
- d) 配列番号14 (G G C A A T T C C A T) ;
- e) 配列番号15 (A T A C T G T C C A A) ;

から選択され、ここでXが、9であり、チミン塩基(T)が、ウラシル塩基(U)であり得る、項目15から27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。

30

(項目29)

前記標的化配列が、

- a) 配列番号16 (A A G G T C T G C A T) ;
- b) 配列番号17 (T C G G A T C T G T G) ;
- c) 配列番号18 (C A T G G A T G T C C) ;
- d) 配列番号19 (C G T G A A C G A A G) ;
- e) 配列番号20 (C G T G T G G C A A C) ;
- f) 配列番号21 (G C C C G A G A T C C) ;
- g) 配列番号22 (C T T T C G T T C G C) ;
- h) 配列番号23 (A T G C A T G A G C C) ; および
- i) 配列番号24 (G G A T G C A T G A G) ;

40

から選択され、ここでXが、9であり、チミン塩基(T)が、ウラシル塩基(U)であり得る、項目15から27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30)

前記標的化配列が、

- a) 配列番号25 (G T C C A T T A C C C) ;
- b) 配列番号26 (C A T T A C C C C T C) ;
- c) 配列番号27 (C C A T T A C C C C T) ;
- d) 配列番号28 (T C C A T T A C C C C) ;

50

- e ) 配列番号 29 ( T G T C C A T T A C C ) ;  
 f ) 配列番号 30 ( T T G T C C A T T A C ) ;  
 g ) 配列番号 31 ( G T T G T C C A T T A ) ;  
 h ) 配列番号 32 ( T G T T G T C C A T T ) ;  
 i ) 配列番号 33 ( A T G T T G T C C A T ) ;  
 j ) 配列番号 34 ( T T T A C A A G T G C ) ;  
 k ) 配列番号 35 ( C C T C C G A G G G A ) ;  
 l ) 配列番号 36 ( A C A C G T T G T T C ) ; および  
 m ) 配列番号 37 ( A G T T C A G C G A C ) ,

から選択され、ここで  $\times$  が、9 であり、チミン塩基 (T) が、ウラシル塩基 (U) であり得る、項目 15 から 27 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。

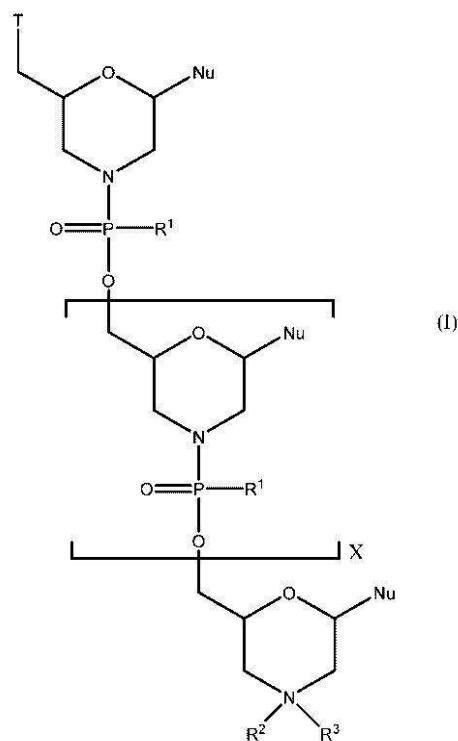
(項目 31)

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が、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、および (b) 病原性因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標的化配列を有し、前記オリゴマーが、細胞透過性ペプチド (CPP) にコンジュゲートしている、医薬組成物。

(項目 32)

前記アンチセンスモルホリノオリゴマーが、式 (I) :

【化 59】



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 :

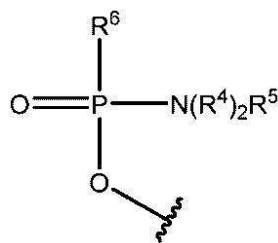
10

20

30

40

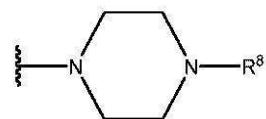
## 【化60】



の部分から選択され、式中、各R<sup>4</sup>は、独立に、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：

10

## 【化61】



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、

20

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>アルキルから独立に選択され、

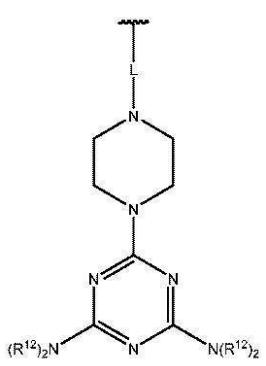
R<sup>1</sup>の各実例は、-N(R<sup>10</sup>)<sub>2</sub>、R<sup>11</sup>であり、式中、各R<sup>10</sup>は、独立に、C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキルであり、

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62】

30



40

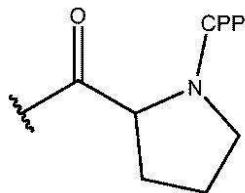
の部分から選択され、式中、Lは、-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>C(O)-および-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C(O)-から選択され、各R<sup>12</sup>は、式-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OC(O)N(R<sup>14</sup>)<sub>2</sub>のものであり、式中、各R<sup>14</sup>は、式-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH<sub>2</sub>(=NH)NH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

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：

50

## 【化 6 3】



のものであり、式中、前記 CPP は、前記 CPP のカルボキシ末端において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、病原性因子をコードする細菌 m RNA 標的配列と特異的にハイブリダイズする、項目 3 1 に記載の医薬組成物。

10

## (項目 3 3)

前記標的配列が、前記細菌 m RNA の翻訳開始コドンおよび / または前記細菌 m RNA の前記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、項目 3 2 に記載の医薬組成物。

## (項目 3 4)

前記標的化配列が、配列番号 11 ~ 15 に記載されているか、配列番号 11 ~ 15 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 11 ~ 15 と少なくとも 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 3 2 に記載の医薬組成物。

20

## (項目 3 5)

前記標的化配列が、配列番号 16 ~ 24 に記載されているか、配列番号 16 ~ 24 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 16 ~ 24 と少なくとも 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 3 2 に記載の医薬組成物。

## (項目 3 6)

前記標的化配列が、配列番号 25 ~ 37 に記載されているか、配列番号 25 ~ 37 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 25 ~ 37 と少なくとも 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 3 2 に記載の医薬組成物。

30

## (項目 3 7)

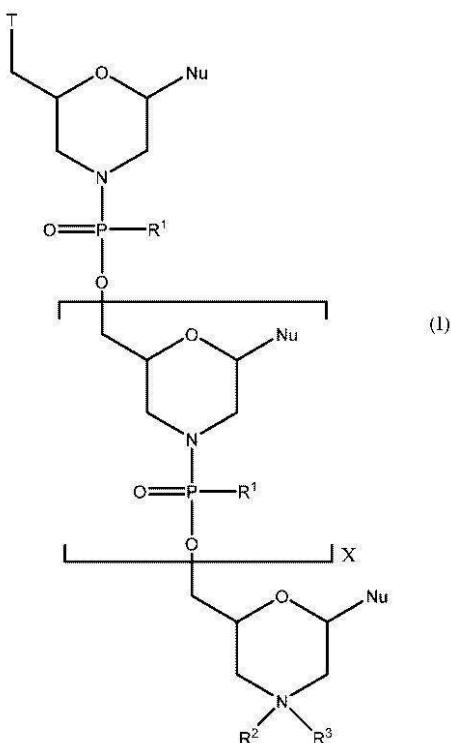
細菌中の病原性因子の発現および活性を低減させる方法であって、前記方法は、前記細菌とアンチセンスモルホリノオリゴマーとを接触させるステップを含み、前記アンチセンスモルホリノオリゴマーは、モルホリノサブユニット、および 1 つのサブユニットのモルホリノ基を隣接するサブユニットの 5' 環外炭素に接合するリン含有サブユニット間連結から構成され、かつ (a) 約 10 ~ 40 個のヌクレオチド塩基、および (b) 病原性因子をコードする細菌 m RNA 標的配列と特異的にハイブリダイズするのに十分な長さおよび相補性の標的化配列を有し、前記オリゴマーは、細胞透過性ペプチド (CPP) にコンジュゲートしている、方法。

40

## (項目 3 8)

前記アンチセンスモルホリノオリゴマーが、式 (I) :

## 【化64】



20

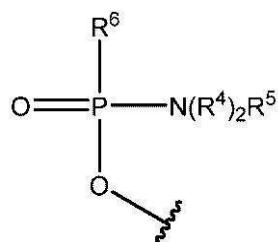
のものまたは薬学的に許容されるその塩であり、

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、

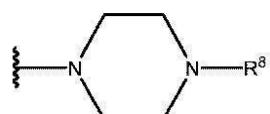
T は、OH および式：

## 【化65】



の部分から選択され、式中、各 R4 は、独立に、C1 ~ C6 アルキルであり、R5 は、電子対およびHから選択され、R6 は、OH、-N(R7)CH2C(O)NH2、および式：

## 【化66】



の部分から選択され、式中、

R7 は、H および C1 ~ C6 アルキルから選択され、

R8 は、G、-C(O)-R9OH、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、

R9 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、C2 ~ C6 アルキルから独立に選択され、

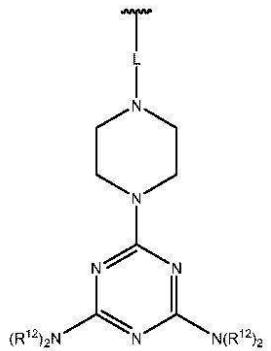
50

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、独立に、 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】



10

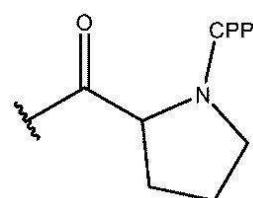
の部分から選択され、式中、 L は、 - C ( O ) ( C H<sub>2</sub> )<sub>6</sub> C ( O ) - および - C ( O ) ( C H<sub>2</sub> )<sub>2</sub> S<sub>2</sub> ( C H<sub>2</sub> )<sub>2</sub> C ( O ) - から選択され、各 R<sup>12</sup> は、式 - ( C H<sub>2</sub> )<sub>2</sub> O C ( O ) N ( R<sup>14</sup> )<sub>2</sub> のものであり、式中、各 R<sup>14</sup>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

20

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 ) ( C H<sub>2</sub> )<sub>5</sub> N H - C P P 、 - C ( O ) ( C H<sub>2</sub> )<sub>2</sub> N H C ( O ) ( C H<sub>2</sub> )<sub>5</sub> N H - C P P 、および - C ( O ) C H<sub>2</sub> N H - C P P から選択されるリンカー部分であるか、または G は、式：

【化 6 8】



30

のものであり、式中、前記 CPP は、前記 CPP のカルボキシ末端において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、前記病原性因子をコードする細菌 m R N A 標的配列と特異的にハイブリダイズする、項目 3 7 に記載の方法。

(項目 3 9)

前記細菌が、被験体中にあり、前記方法が、前記アンチセンスモルホリノオリゴマーを前記被験体に投与するステップを含む、項目 3 7 に記載の方法。

40

(項目 4 0)

前記細菌が、Escherichia、Acinetobacter、Klebsiella、およびBurkholderia の属から選択される、項目 3 7 または 3 9 に記載の方法。

(項目 4 1)

前記細菌が、Escherichia coli、Acinetobacter baumannii、Klebsiella pneumoniae、またはBurkholderia cepacia (種群) である、項目 4 0 に記載の方法。

(項目 4 2)

50

前記細菌が、Escherichia coli、Acinetobacter baumannii、またはKlebsiella pneumoniaeであり、前記病原性因子が、NDM-1およびadeAの1つまたは複数から選択される抗生物質耐性タンパク質である、項目37に記載の方法。

(項目43)

前記細菌が、Burkholderia cepacia(種群)であり、前記病原性因子が、cepIおよびsuhBの1つまたは複数によってコードされるバイオフィルム形成タンパク質である、項目37に記載の方法。

(項目44)

前記細菌が、Burkholderia cepacia(種群)であり、前記病原性因子が、acpPによってコードされるアシルキャリアータンパク質である、項目37に記載の方法。

10

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1-1】図1A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1B～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1F～Hは、例示的なPPMOにおいて使用される例示的なペプチドPMOコンジュゲート構造を示す。

【図1-2】図1A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1B～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1F～Hは、例示的なPPMOにおいて使用される例示的なペプチドPMOコンジュゲート構造を示す。

20

【0031】

【図2】図2は、adeAに対して標的化されるPPMOによるAdeA(排出ポンプ)を発現しているAcinetobacter baumanniiの処置が、アミノグリコシド系抗生物質であるゲンタマイシンのMICを有意に低減させたことを示す。

【0032】

【図3】図3は、adeAに対して標的化されるPPMOによるAdeAを発現しているAcinetobacter baumanniiの処置が、アミノグリコシド系抗生物質であるトブラマイシンのMICを有意に低減させたことを示す。

30

【0033】

【図4】図4は、adeAに対して標的化されるPPMOによるAdeAを発現しているAcinetobacter baumanniiの処置が、テトラサイクリンのMICを有意に低減させたことを示す。

【0034】

【図5A】図5Aは、NDM-1に対して標的化されるPPMOによるNDM-1を発現しているAcinetobacter baumanniiの処置が、カルバペネム系抗生物質であるメロペネムのMICを有意に低減させたことを示す。図5Bは、NDM-1に対して標的化されるPPMOおよびメロペネムが、NDM-1を発現しているAcinetobacter baumanniiのコロニー形成単位(CFU)の数を相乗的に低減させたことを示す。

40

【図5B】図5Aは、NDM-1に対して標的化されるPPMOによるNDM-1を発現しているAcinetobacter baumanniiの処置が、カルバペネム系抗生物質であるメロペネムのMICを有意に低減させたことを示す。図5Bは、NDM-1に対して標的化されるPPMOおよびメロペネムが、NDM-1を発現しているAcinetobacter baumanniiのコロニー形成単位(CFU)の数を相乗的に低減させたことを示す。

【0035】

【図6】図6は、NDM-1に対して標的化されるPPMOによるNDM-1を発現しているEscherichia coliの処置が、カルバペネム系抗生物質であるメロペ

50

ネムのMICを有意に低減させたことを示す。

【0036】

【図7A】図7A～7Bは、acpP、suhBまたはcepIに対して標的化されるPPMOによるバイオフィルム形成Burkholderiaの処置が、バイオフィルムの形成を攪乱するだけでなく(7A; PPMOをバイオフィルム形成の前に加え、48時間インキュベートした)、確立したバイオフィルムを崩壊させたことを示す(7B; PPMOとの48時間のインキュベーションの前に、バイオフィルムを48時間成長させた)。

【図7B】図7A～7Bは、acpP、suhBまたはcepIに対して標的化されるPPMOによるバイオフィルム形成Burkholderiaの処置が、バイオフィルムの形成を攪乱するだけでなく(7A; PPMOをバイオフィルム形成の前に加え、48時間インキュベートした)、確立したバイオフィルムを崩壊させたことを示す(7B; PPMOとの48時間のインキュベーションの前に、バイオフィルムを48時間成長させた)。

【0037】

【図8A】図8A～8Cは、蛍光を発現しているBurkholderiaを使用し、共焦点顕微鏡を利用した、MBECペグ上のバイオフィルム形成の低減を視覚的に示す。図8Aは、48時間における未処置のバイオフィルムを示し、図8Bは、10μMのスクランブルPPMO対照で処置された48時間のバイオフィルムを示し、図8Cは、10μMのcepI標的化PPMOで処置された48時間のバイオフィルムを示す。

【図8B】図8A～8Cは、蛍光を発現しているBurkholderiaを使用し、共焦点顕微鏡を利用した、MBECペグ上のバイオフィルム形成の低減を視覚的に示す。図8Aは、48時間における未処置のバイオフィルムを示し、図8Bは、10μMのスクランブルPPMO対照で処置された48時間のバイオフィルムを示し、図8Cは、10μMのcepI標的化PPMOで処置された48時間のバイオフィルムを示す。

【図8C】図8A～8Cは、蛍光を発現しているBurkholderiaを使用し、共焦点顕微鏡を利用した、MBECペグ上のバイオフィルム形成の低減を視覚的に示す。図8Aは、48時間における未処置のバイオフィルムを示し、図8Bは、10μMのスクランブルPPMO対照で処置された48時間のバイオフィルムを示し、図8Cは、10μMのcepI標的化PPMOで処置された48時間のバイオフィルムを示す。

【0038】

【図9】図9は、cepI PPMOおよびアミノグリコシド系抗生物質であるトプラマイシンが、バイオフィルム生物負荷量を低減させることにおいて相乗的であることを示す。

【0039】

【図10】図10は、表2Cにおいて列挙したものを含めた、様々なPPMOについての最小発育阻止濃度(MIC)値のヒートマップを示す。PPMOを、様々なレベルの抗生物質耐性を有する39のBcc臨床分離株のパネルに対して試験した。

【0040】

【図11】図11は、PPMOがBccにおいて殺菌性であることを示す。B. cenocepaciaの2つの異なる分離株を、異なるacpP PPMOの存在下または非存在下で24時間インキュベートした。3つのacpP PPMOすべては、臨床CF分離株B. cenocepacia K56-2(パネルA)において成長の有意な低減をもたらし、この効果はまた、汎耐性株B. cenocepacia HI4277について見られた(パネルB)。

【0041】

【図12】図12は、acpP PPMOが、人工のCF痰においてBcc成長を阻害することを示す。B. cenocepacia K56-2を、単独で、または10μMもしくは20μMの濃度でのスクランブル配列(Scr)プラセボPPMOもしくはacpP PPMO(PPMO #15、表2C)のいずれかの存在下でインキュベートした。培地またはPPMOを、2、8および12時間において投与した。試料を24時間においてプレーティングし、CFU/mlを決定した。

10

20

30

40

50

## 【0042】

【図13】図13は、acpP PP MOが*B. cenocepacia* J2315においてバイオフィルム形成を防止することを示す。*B. cenocepacia* J2315を、acpP PP MO (10 μM)、スクランブルPP MO (10 μM)、ペプチドまたは培地単独のいずれかの存在下で、MBECバイオフィルムアッセイプレートを利用して48時間成長させた。バイオフィルム産生は、クリスタルバイオレット法を利用して測定した。

## 【0043】

【図14A】図14A～14Cは、acpP PP MOが現存する*B. cenocepacia*バイオフィルムを崩壊させることができることを示す。dsRedを発現している*B. cenocepacia* J2315を、MBECペグ上で48時間成長させた。ペグを、PP MOなし、10 μMの濃度のスクランブル(Scr)対照PP MO、または10 μMの濃度のacpP PP MOのいずれかを含有する新鮮な培地に移動した。MBECペグをさらに48時間インキュベートし、次いで、バイオフィルムについて蛍光緑色のピーナッツ・アグルチニン染料で染色し、共焦点顕微鏡で画像化した。PP MOなし(図14A)またはScr PP MO(図14B)は、厚いバイオフィルムを示す一方で、acpP PP MO処置したペグ(図14C)は、目に見えない生物のポケットを有するバイオフィルムを示した。

【図14B】図14A～14Cは、acpP PP MOが現存する*B. cenocepacia*バイオフィルムを崩壊させることができることを示す。dsRedを発現している*B. cenocepacia* J2315を、MBECペグ上で48時間成長させた。ペグを、PP MOなし、10 μMの濃度のスクランブル(Scr)対照PP MO、または10 μMの濃度のacpP PP MOのいずれかを含有する新鮮な培地に移動した。MBECペグをさらに48時間インキュベートし、次いで、バイオフィルムについて蛍光緑色のピーナッツ・アグルチニン染料で染色し、共焦点顕微鏡で画像化した。PP MOなし(図14A)またはScr PP MO(図14B)は、厚いバイオフィルムを示す一方で、acpP PP MO処置したペグ(図14C)は、目に見えない生物のポケットを有するバイオフィルムを示した。

【図14C】図14A～14Cは、acpP PP MOが現存する*B. cenocepacia*バイオフィルムを崩壊させることができることを示す。dsRedを発現している*B. cenocepacia* J2315を、MBECペグ上で48時間成長させた。ペグを、PP MOなし、10 μMの濃度のスクランブル(Scr)対照PP MO、または10 μMの濃度のacpP PP MOのいずれかを含有する新鮮な培地に移動した。MBECペグをさらに48時間インキュベートし、次いで、バイオフィルムについて蛍光緑色のピーナッツ・アグルチニン染料で染色し、共焦点顕微鏡で画像化した。PP MOなし(図14A)またはScr PP MO(図14B)は、厚いバイオフィルムを示す一方で、acpP PP MO処置したペグ(図14C)は、目に見えない生物のポケットを有するバイオフィルムを示した。

## 【0044】

【図15】図15は、PP MOのエアゾール送達が、肺感染モデルにおける*B. mucilans*の負荷量を低減させることを示す。慢性肉芽腫症(CGD)マウスを、Bcc感染モデルとして使用した。Aerogenネブライザーを使用して、感染6時間後の1回の用量としてスクランブル(Scr)PP MO (300 μg)またはacpP PP MO (PP MO #15、表2C、300 μgもしくは30 μg)のいずれかを送達した。感染の24時間後にマウスを安樂死させ、肺負荷量をCFU/gとして決定した。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0045】

## 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、本開示が属する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

10

20

30

40

50

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。

【0046】

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（a n element）」は、1つの要素または1つ超の要素を意味する。

【0047】

「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、または長さと、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。

【0048】

「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。

【0049】

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。

【0050】

「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。

【0051】

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、リポソーム、リン酸カルシウム、ポリエチレンイミン）、電気穿孔法（例えば、又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開示のオリゴマーの送達を含む。

【0052】

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ポンサーを可能とする。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、参照によりその全体が組み込まれている米国特許出願第2010/0016215号に開示されている。

【0053】

「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。

10

20

30

40

50

## 【0054】

「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。

## 【0055】

「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挿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。

## 【0056】

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ーを「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。

## 【0057】

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（例えば、プリンまたはピリミジン塩基対合部分）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

10

20

30

40

50

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。

【0058】

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。

【0059】

「ヌクレアーゼ耐性」オリゴマーは、体内または細菌細胞内的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。

【0060】

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。

【0061】

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。

【0062】

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Tm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、Tm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。

【0063】

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

10

20

30

40

50

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。一部の実施形態では、十分な長さのオリゴマーは、長さが10～40もしくは10～30ヌクレオチド、例えば、長さが約10～11、10～12、10～13、10～14、10～15、10～16、10～17、10～18、10～19、10～20、10～25、10～28、10～30、10～40、11～12、11～13、11～14、11～15、11～16、11～17、11～18、11～19、11～20、11～25、11～28、11～30、もしくは11～40ヌクレオチド、または長さが約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、もしくは40ヌクレオチドである。

## 【0064】

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、Altschulら、Nucleic Acids Res., 25巻: 3389頁、1997年によって開示されているようなBLASTファミリーのプログラムも参照し得る。

## 【0065】

「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。

## 【0066】

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：

10

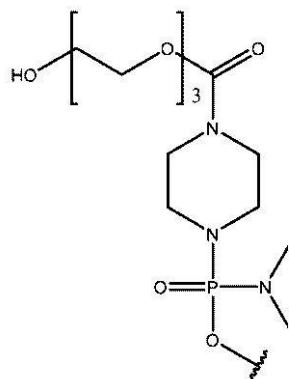
20

30

30

40

## 【化6】



10

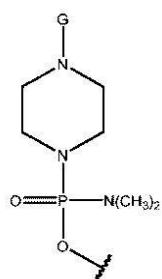
のものであることを含む。

## 【0067】

用語「p i p - P D A」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パーティーを含む）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、「p i p - P D A」は、式（I）または（II）の化合物のTが、式：

## 【化7】

20



のものであることを含む。

## 【0068】

30

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。

## 【0069】

「翻訳開始コドン領域」は、遺伝子の翻訳開始コドンの上流または下流の30塩基である領域を指す。

## 【0070】

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。

40

## 【0071】

「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。

50

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。

【0072】

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。

【0073】

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。

【0074】

細菌病原性因子を標的化するための配列

10

ある特定の実施形態は、病原性因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。病原性因子の一般例は、抗生物質耐性遺伝子、バイオフィルム形成遺伝子、脂肪酸合成と関連する遺伝子、およびこれらのコードされたタンパク質を含む。さらに、病原性因子は、感染のプロセスの間に細菌に利益を提供する他の遺伝子の発現（転写および/または翻訳）を制御する調節タンパク質をコードする遺伝子を含む。

【0075】

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または2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、細菌mRNA標的配列の翻訳開始コドン（例えば、ATG；AUG）の上流もしくは下流の約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の塩基、または約1、2、約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以内の塩基である配列を含有する。例えば、特定の実施形態では、標的配列の5'末端は、細菌mRNAの翻訳開始コドンにおけるアデニン、ウラシル、またはグアニンヌクレオチドである。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のヌクレオチド（例えば、グアニン）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において始まる。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（例えば、アデニン）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において始まる。

20

【0076】

一部の実施形態では、病原性因子は、抗生物質耐性遺伝子またはそのコードされたタンパク質、すなわち、少なくとも1種の抗微生物剤に対する細菌の耐性と関連する遺伝子またはタンパク質である。抗生物質耐性遺伝子の一般例は、ある特定の抗微生物剤を酵素的

30

40

50

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を含む。抗生物質耐性遺伝子の特定の例は、ニューデリーメタロ - ベータ - ラクタマーゼ（N D M - 1）および耐性 - 小結節形成 - 細胞分裂（R N D）型多剤排出ポンプサブユニットA d e A（a d e A）を含む。N D M - 1 および A d e A 耐性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 Aにおいて提供する。

【0077】

一部の実施形態では、病原性因子は、バイオフィルム形成遺伝子またはそのコードされたタンパク質、すなわち、バイオフィルムの形成と関連するか、またはその一因となる遺伝子またはタンパク質である。バイオフィルムは、表面、例えば、組織表面または移植した医療デバイスの表面上で互いに接着する細菌細胞の任意の群を含むことができる。このような接着細胞は、例えば、細胞外D N A、タンパク質、および多糖類から構成されるポリマー混合物である細胞外ポリマー物質（E P S）の自己產生されたマトリックス内に包埋されていることが多い。細菌は、表面上の特異的または非特異的付着部位の細胞認識、栄養的手掛けりを含み得る多くの因子に応答して、または場合により阻害濃度未満の抗生物質への細胞の曝露によって、バイオフィルムを形成する。バイオフィルム内で成長する微生物細胞は、同じ生物の個々の細胞とは生理学的に別個である。例えば、細菌細胞が成長のバイオフィルムモードに切り替わったとき、細菌細胞は挙動における表現型シフトを起こし、ここである特定の遺伝子（例えば、バイオフィルム形成に関連する）が差次的にレギュレートされる。バイオフィルム形成遺伝子の特定の例は、c e p I、c e p R、およびs u h Bを含む。特定の実施形態では、c e p I 遺伝子は、Burkholderia種または亜種（例えば、Burkholderia cepacia種群、Burkholderia cenocepacia）由来であり、アシルホモセリンラクトンシンターゼをコードする。一部の実施形態では、s u h B 遺伝子は、Burkholderia種または亜種（例えば、Burkholderia cepacia種群、Burkholderia cenocepacia）由来であり、推定上のイノシトール-1-モノホスファターゼをコードする。ある特定の実施形態では、c e p R 遺伝子は、Burkholderia種または亜種（例えば、Burkholderia cepacia種群、Burkholderia cenocepacia）由来であり、アシルホモセリンラクトン依存的調節タンパク質をコードする。Burkholderia由来のバイオフィルム形成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 Bにおいて提供する。

【0078】

一部の実施形態では、病原性因子は、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（A C P）、例えば、A c p P；4'- - ホスホパンテイン補欠分子族をa p o - A C Pに移動して、機能的ホロ - A C P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（A c p S）；脂肪酸生合成の最初の方向決定ステップ（c o m m i t t e d s t e p）におけるマロニル - C o Aへのアセチル - C o A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 - C o Aカルボキシラーゼ；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（F a b）酵素、例えば、F a b A、F a b I、F a b F、F a b B、F a b D、F a b H、F a b GおよびF a b Zを含む。脂肪酸生合成と関連する遺伝子の特定の例は、アシルキャリアータンパク質a c p P 遺伝子を含む。アシルキャリアータンパク質a c 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 Cにおいて提供する。

10

20

30

40

【表 1 - 1】

| 表 1: 例示的な標的配列  |  |      |
|--|--|------|
| 表 1A: 例示的な抗生物質耐性標的配列   |  |      |
| 説明   | 配列*  | 配列番号 |
| E.coli ニューデリーメタロ-ベータ-ラクタマーゼ-1 (NDM-1)                                      | GTTTTTAATG CTGAATAAAA GGAAAAC TTG <u>ATGGAATTGC</u><br>CCAATATTAT GCACCCGGTC | 1    |
| Klebsiella pneumoniae クローン KPM_nasey ニューデリーメタロ-ベータ-ラクタマーゼ 1 (blaNDM-1) 遺伝子 | GTTTTTAATG CTGAATAAAA GGAAAAC TTG <u>ATGGAATTGC</u><br>CCAATATTAT GCACCCGGTC | 2    |
| Acinetobacter baumannii メタロ-ベータ-ラクタマーゼ                                     | AACATCAAAA AGTCACTAGG TTTGGACAGT <u>ATGCAAAAGC</u><br>ATCTTTACT TCCTTTATTT   | 3    |
| Acinetobacter baumannii 1605RND 型多剤排出ポンプサブユニット AdeA                        | AACATCAAAA AGTCACTAGG TTTGGACAGT <u>ATGCAAAAGC</u><br>ATCTTTACT TCCTTTATTT   | 4    |
| 表 1B: 例示的なバイオフィルム形成標的配列  |  |      |
| 説明   | 配列*  | 配列番号 |
| cepI   | GCATACAAAAA GCACAGATCC GAGGACATCC <u>ATGCAGACCT</u><br>TCGTTCACGA GGAAGGGCGG | 5    |
| Burkholderia cenocepacia J2315N-アシルホモセリンラクトンシンターゼ                          |  | 30   |
| cepI   | TCACTTGAAA ATAAGTGGA AGCACTTGTA <u>ATGAATATTA</u><br>TTGCTGGATT TCAAAACAAT   | 6    |
| Actinetobacter baumannii AB307-0294  |  |      |
| suhB   | TCTTCAAATT TGTATTGTAG TGGGTGTTCA <u>ATGGAACCTA</u><br>TGGTGGTGAT GGCTGCGCGT  | 7    |
| Actinetobacter baumannii AYE   |  | 40   |
| SuhB   | CCCGTGC CGC CGGCTACAGG ATCCAGGCTC <u>ATGCATCCCA</u><br>TGCTAACAT TGCTGTCAAG  | 8    |
| Burkholderia cenocepacia J2315 イノシトール-1-リン酸                                |  |      |

【表 1 - 2】

|  |   |      |
|--|---|------|
| suhB 遺伝子<br>ID: 6932290 遺伝子座タグ<br>BCAL2157 | CCCGTGCCGCCGGCTACAGGATCCAGGCTCATGCATCCCATGCTAACATT<br>GCTGTCAAGGCTGCGCGCGCGACAGATCATCAATCGCGGTCCCTC<br>GATCTCGACCTGATCGAGATCCGCAAGAACGAGCAGCAGAACGACTTCGTCACC<br>GAAGTGGACAAGGCCGCGAAGACGCGATCATCGAGACGCTGAAGACCGCC<br>TACCCGACCACCGCATCCTCGCGGAGGAATCGGGCGAATCGACAACGAA<br>TCCGAATTCAAGTGGATCATCGATCCGCTCGACGGCACGACCAACTTCATC<br>CACGGCTCCGTATTACTGCGTATCGATCGCGCTCGAGCACAAGGGCGTC<br>GTCACGCAGGCCGCGTCTACGATCCGAACAAGAACGACCTGTTCACGCC<br>ACCCGCGGCCGCCGCATACCTGAACGACCGCCGCATCCGCGTCGCC<br>CGCGACCGCCTGGCAGACGCACTGGTCGGCACGGGCTTCCGCGAG<br>AAGGACGGCCTCGACGCCTACGCGCCTTCAACCGAAATGACGCAAGGCC<br>TGCACGGGCCTGCGCGTCCGGCGCGCGCTCGATCTCGCAACGTC<br>GCGGCCGGCGCGCTCGACGCGTTCTCGAGCAAGGCATCAACGTGTGGGAC<br>ATGGCAGGGCGACGCCGATTCCTGCATCGCCACGAGATCGTCGCCGAAC<br>TACACGGGCACGCCGATTCCTGCATCGCCACGAGATCGTCGCCGAAC<br>CC | 9    |
|  |   | 10   |
| 表 1c: 例示的な脂肪酸生合成と関連する標的配列                  |   |      |
| 説明   | 配列*   | 配列番号 |
| acpP<br>アシルキャリアー<br>タンパク質                  | GCGCACTTGTAAATCTGAACCTTCCCTCGGAGGGTAATGGACAACATCGA<br>ACAACGTGTCAAGAACGATGTCGCTGAACAA   | 10   |
|  |   | 20   |
| *チミン (T) はウラシル (U) であってよい                  |   |      |

## 【0079】

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。

30

## 【0080】

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 塩基ほどの短さであり得るが、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。

40

## 【0081】

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

50

、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1～10）に対して相補的である。

#### 【0082】

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。

#### 【0083】

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Tm、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Tm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Tmを有し得る。60～80の範囲またはそれ超のTm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Tm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、細胞の取り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。

#### 【0084】

下記の表2A～Cは、本明細書に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。

10

20

30

40

【表 2 - 1】

| 表 2A: 例示的な抗生物質耐性標的化配列 |                |         |
|-----------------------|----------------|---------|
| 標的遺伝子                 | 標的化配列(TS)*     | TS 配列番号 |
| NDM-1                 | TCA AGT TTT CC | 11      |
| NDM-1                 | TCC TTT TAT TC | 12      |
| NDM-1                 | CCA TCA AGT TT | 13      |
| NDM-1                 | GGC AAT TCC AT | 14      |
| adeA                  | ATA CTG TCC AA | 15      |

10

【表 2 - 2】

| 表 2B: 例示的なバイオフィルム形成標的化配列 |                |         |
|--------------------------|----------------|---------|
| 標的遺伝子                    | 標的化配列(TS)*     | TS 配列番号 |
| cepl                     | AAG GTC TGC AT | 16      |
| cepl                     | TCG GAT CTG TG | 17      |
| cepl                     | CAT GGA TGT CC | 18      |
| cepl                     | CGT GAA CGA AG | 19      |
| cepl                     | CGT GTG GCA AC | 20      |
| cepl                     | GCC CGA GAT CC | 21      |
| cepl                     | CTT TCG TTC GC | 22      |
| suhB                     | ATG CAT GAG CC | 23      |
| suhB                     | GGA TGC ATG AG | 24      |

20

30

## 【表 2 - 3】

| 表 2C: 例示的な脂肪酸生合成と関連する標的化配列 |              |         |
|----------------------------|--------------|---------|
| 標的遺伝子                      | 標的化配列(TS)*   | TS 配列番号 |
| acpP                       | GTCCATTACCC  | 25      |
| acpP                       | CATTACCCCTC  | 26      |
| acpP                       | CCATTACCCCT  | 27      |
| acpP                       | TCCATTACCCC  | 28      |
| acpP                       | TGTCCATTACC  | 29      |
| acpP                       | TTGTCCATTAC  | 30      |
| acpP                       | GTTGTCCATTA  | 31      |
| acpP                       | TGTTGTCCATT  | 32      |
| acpP                       | ATGTTGTCCAT  | 33      |
| acpP                       | TTTACAAGTGC  | 34      |
| acpP                       | CCTCCGAGGGGA | 35      |
| acpP                       | ACACGTTGTT   | 36      |
| acpP                       | AGTTCAGCGAC  | 37      |

\*チミン(T)は、ウラシル(U)であってよい。

## 【0085】

このように、ある特定のアンチセンスオリゴマーは、表 2 における標的化配列（例えば、配列番号 11 ~ 37）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 における標的化配列（例えば、配列番号 11 ~ 37）のいずれかの約または少なくとも約 6、7、8、9、10、11、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 2 における標的化配列（例えば、配列番号 11 ~ 37）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。

## 【0086】

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）。

## 【0087】

## I. 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、病原性因子をコードする細菌 m R N A 標的配列と特異的にハイブリダイズし、それによって病原性因子タンパク質の発現（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 m を有する、標的 m R N A と安定的な二重鎖（またはヘテロ二重

10

20

30

40

50

鎖)を形成するとき、この必要条件を任意選択で満たす。

【0088】

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又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2(上述)において列挙する。

【0089】

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ルアミデートまたはホスホ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、オリゴヌクレオチド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。

【0090】

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Summertonら、1997年、Antisense and Nucleic Acid Drug Development、7巻、187~195頁において詳述されている。

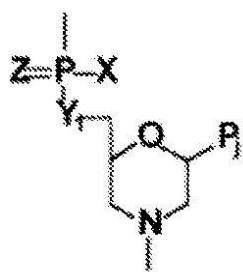
【0091】

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。「ホスホルアミデート」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ドントである。ホスホ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。

【0092】

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、および(b)病原性因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み、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。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】



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<sub>j</sub>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。

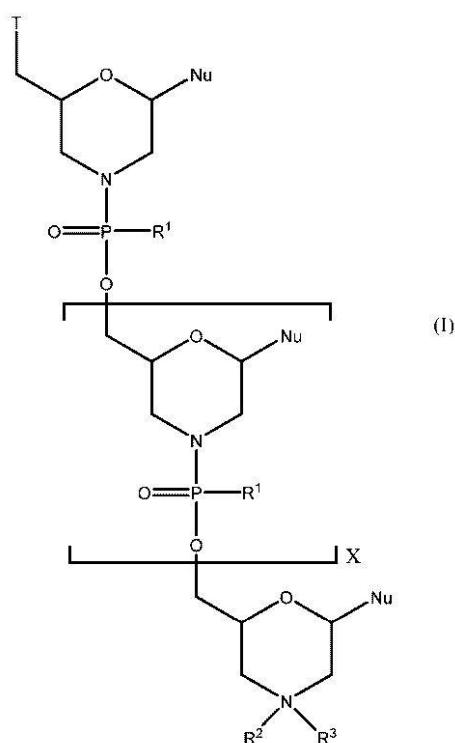
## 【0093】

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<sub>1</sub>またはY<sub>2</sub>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。

## 【0094】

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】



の化合物または薬学的に許容されるその塩を含み、

10

20

30

40

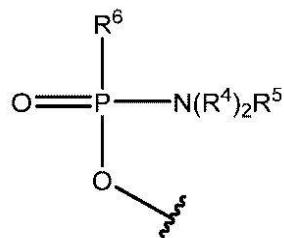
50

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 ~ 38 の整数であり、

$T$  は、OH および式：

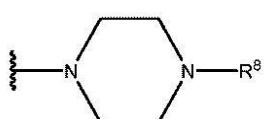
【化10】



10

の部分から選択され、式中、各  $R^4$  は、独立に、 $C_1 \sim C_6$  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11】



の部分から選択され、式中、

20

$R^7$  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 $- (O\text{-アルキル})_y -$  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、 $C_2 \sim C_6$  アルキルから独立に選択され、

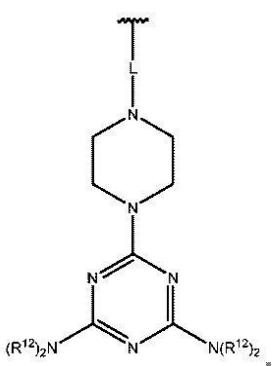
$R^{10}$  の各実例は、 $-N(R^{10})_2R^{11}$  であり、式中、各  $R^{10}$  は、独立に、 $C_1 \sim C_6$  アルキルであり、

$R^{11}$  は、電子対およびHから選択され、

$R^{12}$  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：

30

【化12】



40

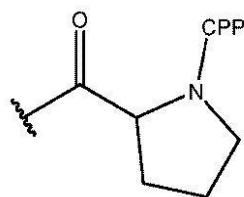
の部分から選択され、式中、 $L$  は、 $-C(O)(CH_2)_6C(O) -$  および  $-C(O)(CH_2)_2S_2(CH_2)_2C(O) -$  から選択され、各  $R^{12}$  は、式 $- (CH_2)_2OC(O)N(R^{14})_2$  のものであり、式中、各  $R^{14}$  は、式 $- (CH_2)_6NHC(=NH)NH_2$  のものであり、

$R^3$  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：

50

## 【化13】



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パートに付着しており、ただし、Gの1つのみの実例が存在し、  
標的化配列は、病原性因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。 10

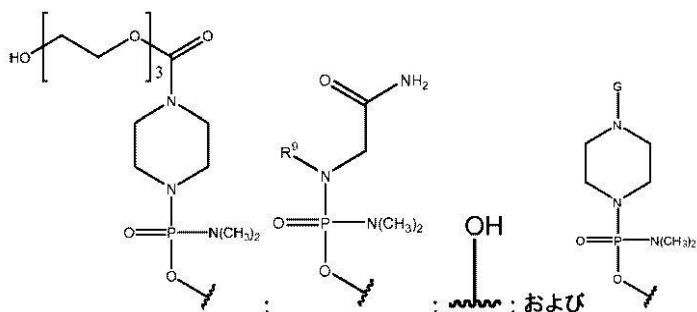
## 【0095】

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。

## 【0096】

ある特定の実施形態では、Tは、

## 【化14】



20

から選択される。

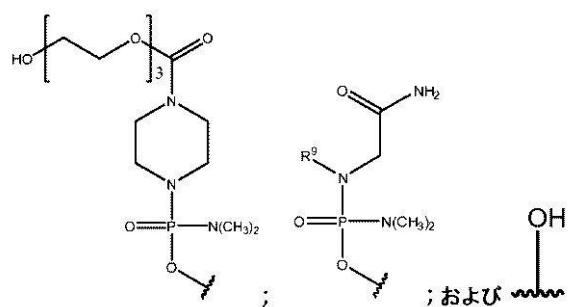
## 【0097】

一部の実施形態では、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る。 30

## 【0098】

様々な実施形態では、Tは、

## 【化15】



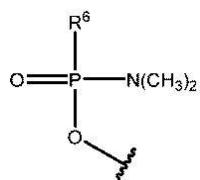
40

から選択され、R<sup>2</sup>は、Gである。

## 【0099】

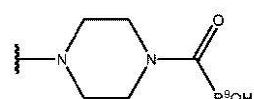
一部の実施形態では、Tは、式：

## 【化16】



のものであり、R<sup>6</sup>は、式：

## 【化17】



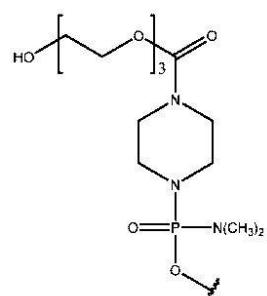
10

のものであり、R<sup>2</sup>は、Gである。

## 【0100】

ある特定の実施形態では、Tは、式：

## 【化18】



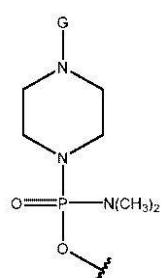
20

のものであり、R<sup>2</sup>は、Gである。

## 【0101】

ある特定の実施形態では、Tは、式：

## 【化19】



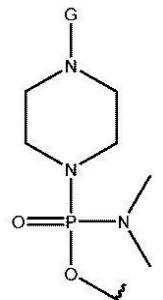
30

のものである。

## 【0102】

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20】



40

50

のものである。

【0103】

一部の実施形態では、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る。

【0104】

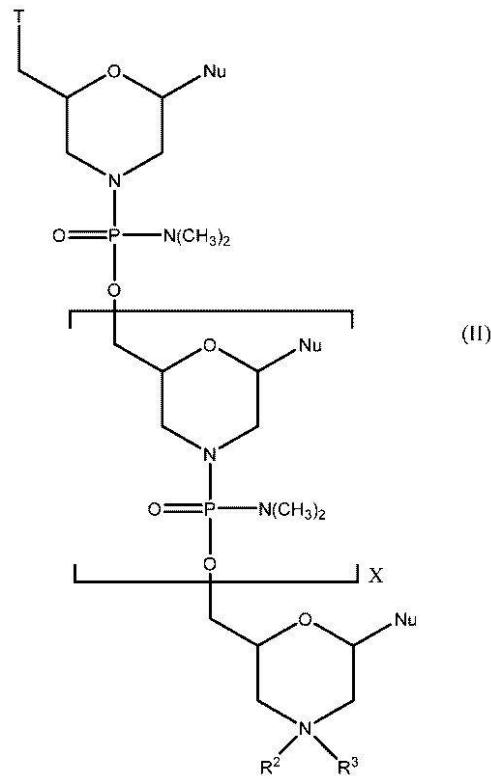
様々な実施形態では、R<sup>2</sup>は、HまたはGから選択され、R<sup>3</sup>は、電子対またはHから選択される。特定の実施形態では、R<sup>2</sup>は、Gである。一部の実施形態では、R<sup>2</sup>は、Hまたはアシルである。一部の実施形態では、各R<sup>1</sup>は、-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>である。一部の実施形態では、R<sup>1</sup>の少なくとも1つの実例は、-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>である。ある特定の実施形態では、R<sup>1</sup>の各実例は、-N(CH<sub>3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

10

【0105】

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21】



20

30

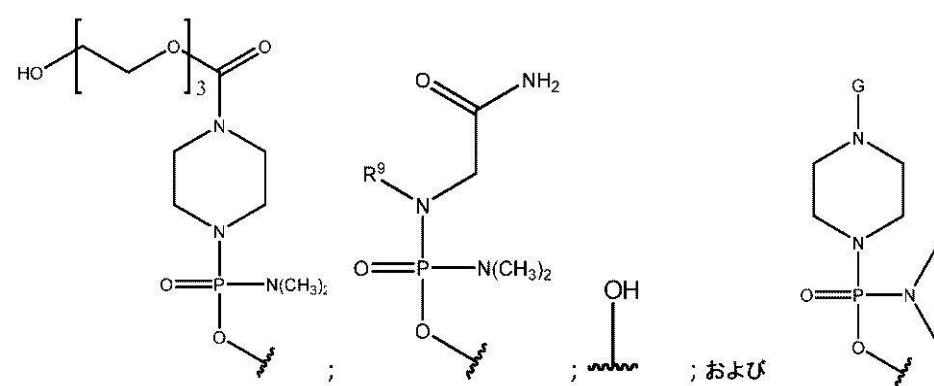
の化合物または薬学的に許容されるその塩を含み、

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22】



40

50

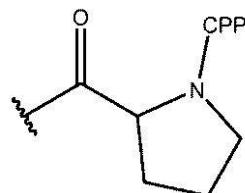
から選択され、

$R^2$  は、H、G、アシル、トリチル、4-メトキシトリチル、ベンゾイル、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  $-C(O)(CH_2)_5NH-CPP$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NH-CPP$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NH-C(O)(CH_2)_5NH-CPP$ 、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：

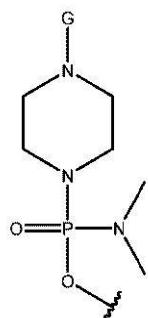
【化23】



10

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おり、ただし、G の 1 つのみの実例が存在する。様々な実施形態では、 $R^2$  は、G であるか、または T は、式：

【化24】



20

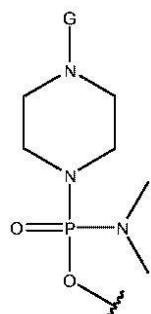
のものである。

【0106】

30

一部の実施形態では、T は、上記に定義されているような TEG であり、 $R^2$  は、G であり、 $R^3$  は、電子対または H である。ある特定の実施形態では、 $R^2$  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、T は、式：

【化25】



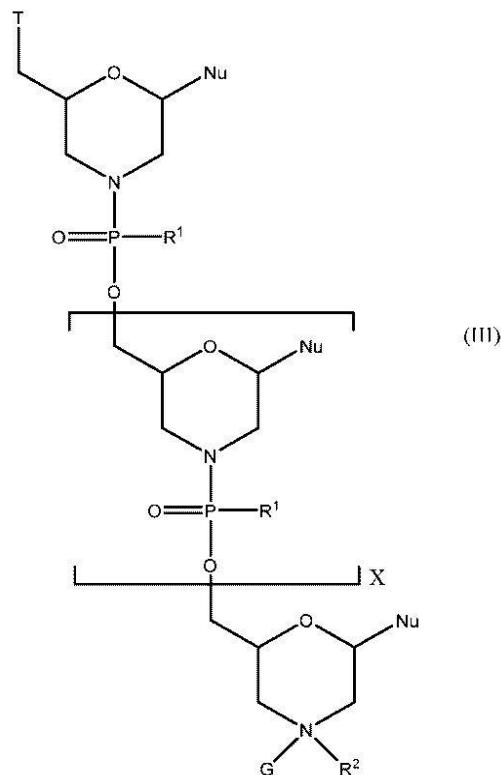
40

のものである。

【0107】

様々な態様では、本開示のアンチセンスオリゴマーは、式 (III)：

## 【化26】



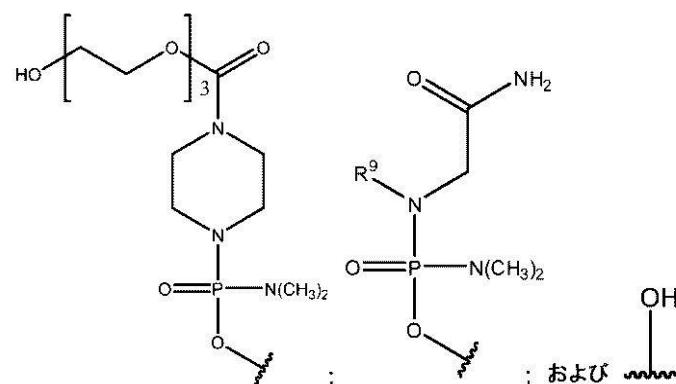
の化合物または薬学的に許容されるその塩を含み、

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

$\text{X}$  は、9 ~ 28 の整数であり、

$\text{T}$  は、

## 【化27】



から選択され、

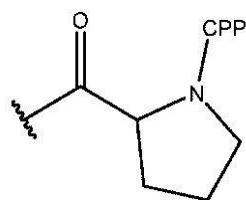
$\text{R}^1$  の各実例は、 $-\text{N}(\text{R}^{10})_2\text{R}^{11}$  であり、式中、各  $\text{R}^{10}$  は、独立に、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$  アルキルであり、 $\text{R}^{11}$  は、電子対および  $\text{H}$  から選択され、

$\text{R}^2$  は、電子対、 $\text{H}$ 、および  $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$  アルキルから選択され、

$\text{G}$  は、細胞透過性ペプチド（「 $\text{CPP}$ 」）、ならびに $-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_5\text{NH}-\text{CPP}$ 、 $-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_2\text{NH}-\text{CPP}$ 、 $-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_2\text{NH}-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_5\text{NH}-\text{CPP}$ 、および $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{NH}-\text{CPP}$ から選択されるリンカー部分であるか、または  $\text{G}$  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パートに付着している。

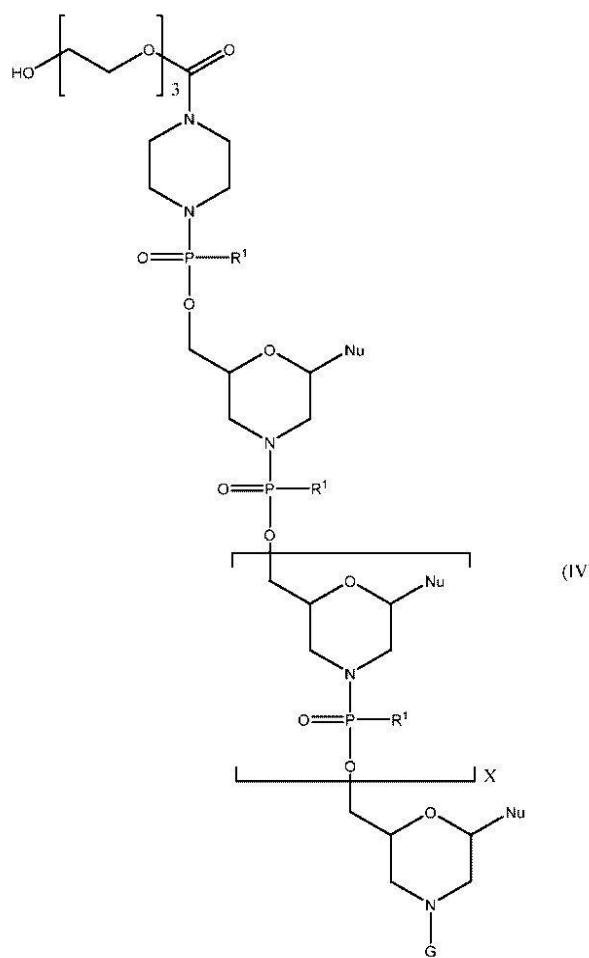
## 【0108】

一部の実施形態では、R<sup>1</sup>の少なくとも1つの実例は、-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>である。ある特定の実施形態では、R<sup>1</sup>の各実例は、-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>である。

## 【0109】

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】



の化合物または薬学的に許容されるその塩を含み、式中、Xは、9～28の整数であり、

各Nuは、一緒にになって標的化配列を形成する核酸塩基であり、

R<sup>1</sup>の各実例は、-N(R<sup>1</sup>)<sub>2</sub>R<sup>1</sup>であり、式中、各R<sup>1</sup>は、独立に、C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキルであり、R<sup>1</sup>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<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パートであるか、またはGは、式：

10

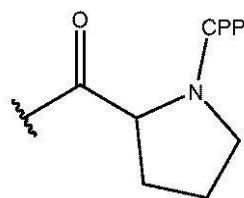
20

30

40

50

【化 3 0】

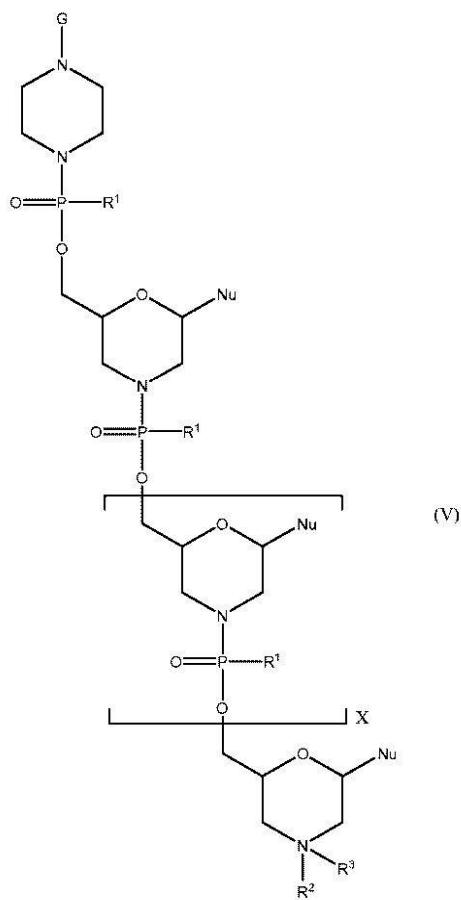


のものであり、式中、 CPP は、 CPP のカルボキシ末端においてアミド結合によってリソカーパ部分に付着している。一部の実施形態では、  $R^1$  の少なくとも 1 つの実例は、  $-N(C_2H_5)_2$  である。ある特定の実施形態では、  $R^1$  の各実例は、  $-N(C_2H_5)_2$  である。

[ 0 1 1 0 ]

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】



の化合物であってよく、式中、  
X は、9 ~ 18 の整数であり、

各  $N_u$  は、一緒にあって標的化配列を形成する核酸塩基であり、

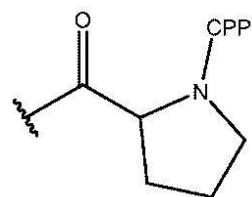
$R^{1-}$  の各実例は、 $-N(R^{1-}R^0)_2R^{1-}$  であり、式中、各  $R^{1-}R^0$  は、独立に、 $C_1 \sim C_6$  アルキルであり、 $R^{1-}$  は、電子対およびHから選択され、

$R^2$  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<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> NH C (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-部分であるか、または G は、式：

## 【化32】

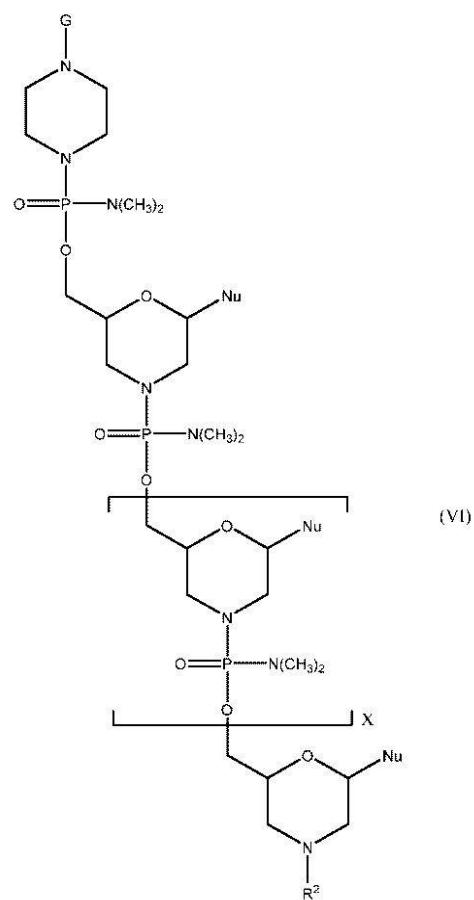


のものであり、式中、CPPは、CPPのカルボキシ末端においてアミド結合によってリンカーパートに付着している。一部の実施形態では、R<sup>1</sup>の少なくとも1つの実例は、-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>である。ある特定の実施形態では、R<sup>1</sup>の各実例は、-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>である。  
10

## 【0111】

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33】



20

30

の化合物または薬学的に許容されるその塩を含み、式中、

Xは、9～28の整数であり、

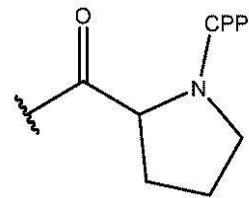
各Nuは、一緒にになって標的化配列を形成する核酸塩基であり、

R<sup>2</sup>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<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>NH-C(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パートであるか、またはGは、式：

40

## 【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。

## 【0112】

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考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。

## 【0113】

## 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

## 【0114】

例示的なCPPを、表C1において提供する(配列番号38～42)。

## 【表2-4】

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>     | RXRRXRRXRRXR   | 38   |
| (RFF) <sub>3</sub> R   | RFFRFFRFFR     | 39   |
| (RXR) <sub>4</sub> XB  | RXRRXRRXRRXRXB | 40   |
| (RFF) <sub>3</sub> RXB | RFFRFFRFFRXB   | 41   |
| (RFF) <sub>3</sub> RG  | RFFRFFRFFR     | 42   |

Xは、6-アミノヘキサン酸であり、Bは、β-アラニンであり、Fは、フェニルアラニンである

30

## 【0115】

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、すべてが参考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。

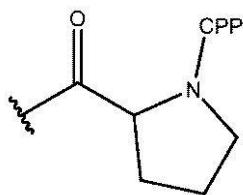
40

## 【0116】

一部の実施形態では、CPPは、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、そのC末端においてオリゴマーの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<sub>2</sub>)<sub>5</sub>NH-CPP(Xリンカー)、-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH-CPP(Bリンカー)、-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>NH-CPP(XBペプチドリンカー)、および-C(O)CH<sub>2</sub>NH-CPP(Glyリンカー)を含むことができるか、またはGは、式：

50

## 【化 3 5】

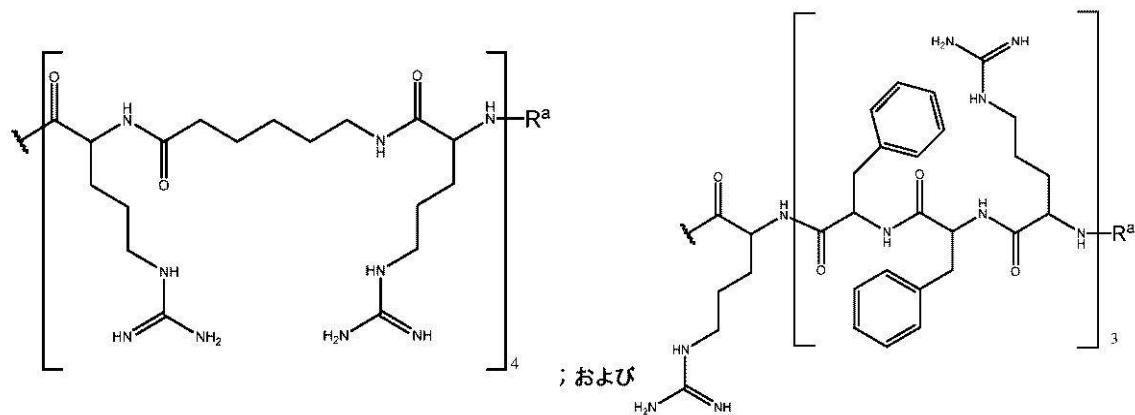


のものであり、式中、CPPは、CPPのカルボキシ末端においてアミド結合によってリンカー部分に付着している。式(I)～(V)のアンチセンスオリゴマー化合物を含めた本開示の一部の実施形態において、Gは、配列番号40～42から選択される。式(I)～(V)のアンチセンスオリゴマー化合物を含めた様々な実施形態では、CPPは、配列番号38および39から選択され、リンカーは、上記の群から選択される。

## 【0117】

式(I)～(V)のアンチセンスオリゴマー化合物を含めた一部の実施形態では、CPPは、

## 【化 3 6】

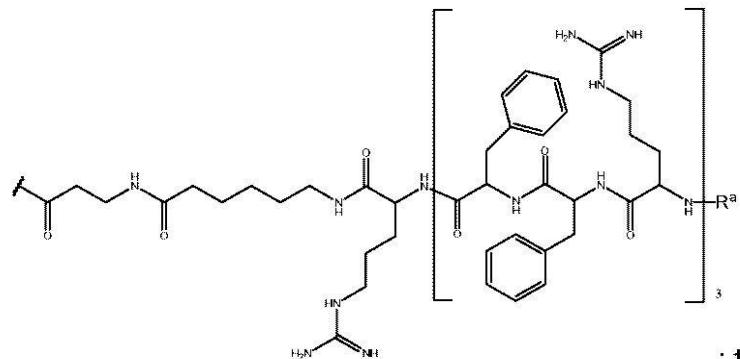
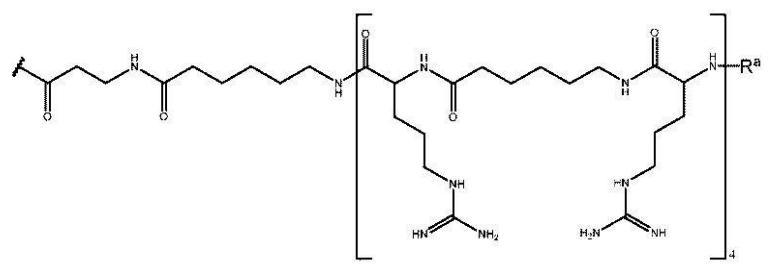


から選択され、式中、R<sup>a</sup>は、H、アセチル、ベンゾイル、およびステアロイルから選択される。

## 【0118】

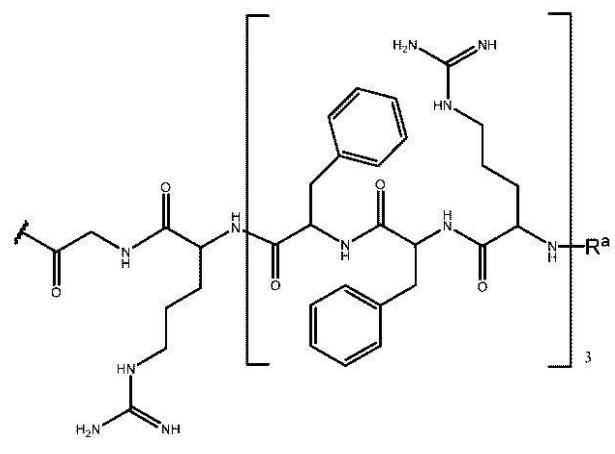
式(I)～(V)のアンチセンスオリゴマー化合物を含めた一部の実施形態では、Gは、

【化 3 7】



10

; および



20

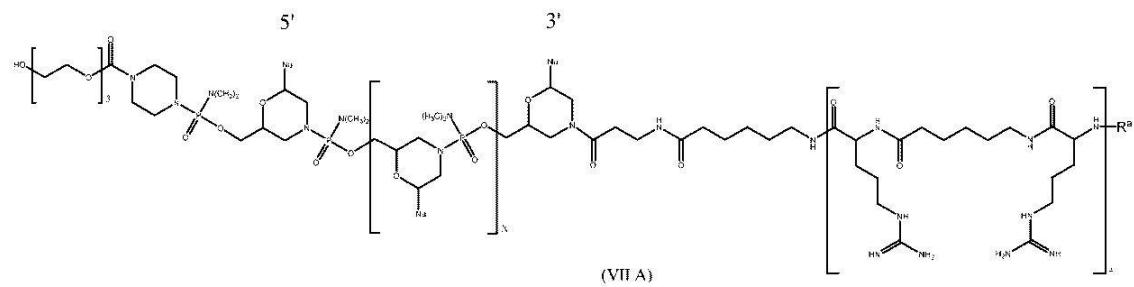
;

30

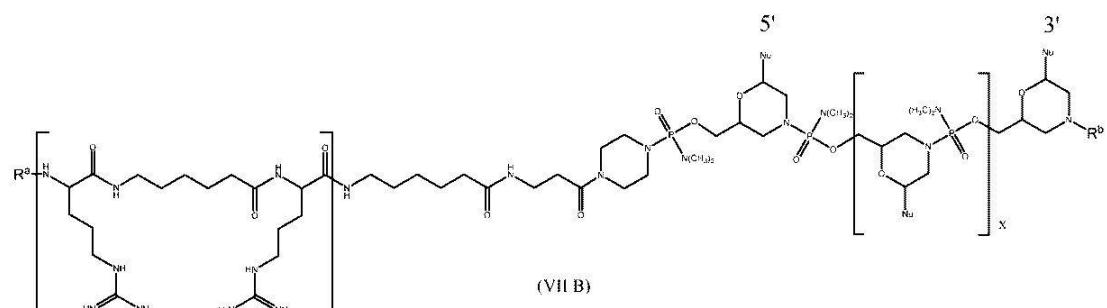
から選択され、式中、R<sup>a</sup>は、H、アセチル、ベンゾイル、およびステアロイルから選択される。

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、

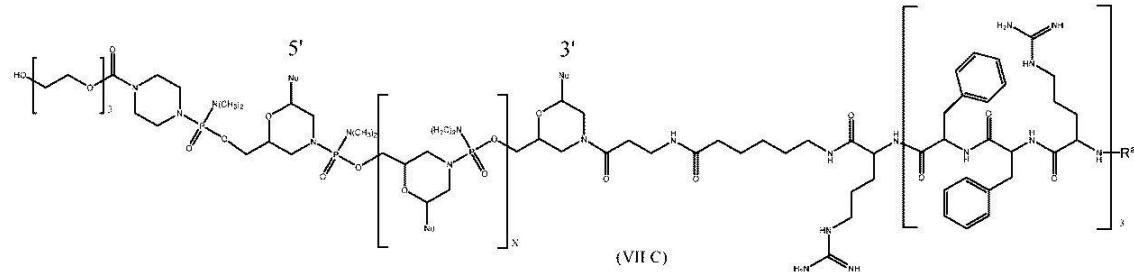
【化 3 8】



10

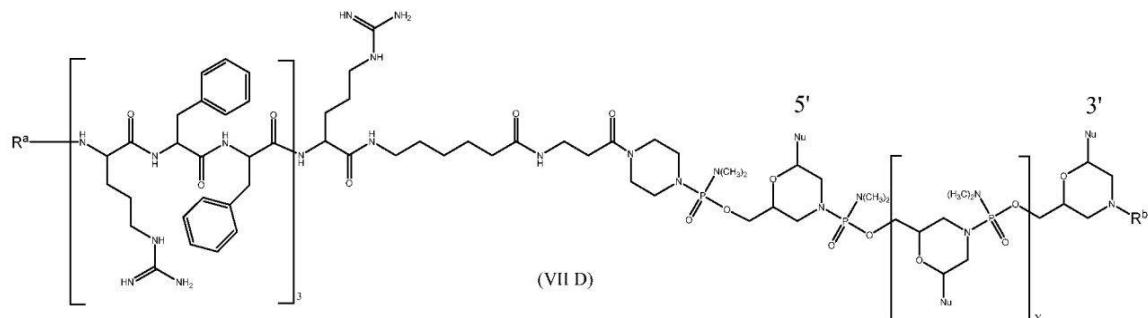


20

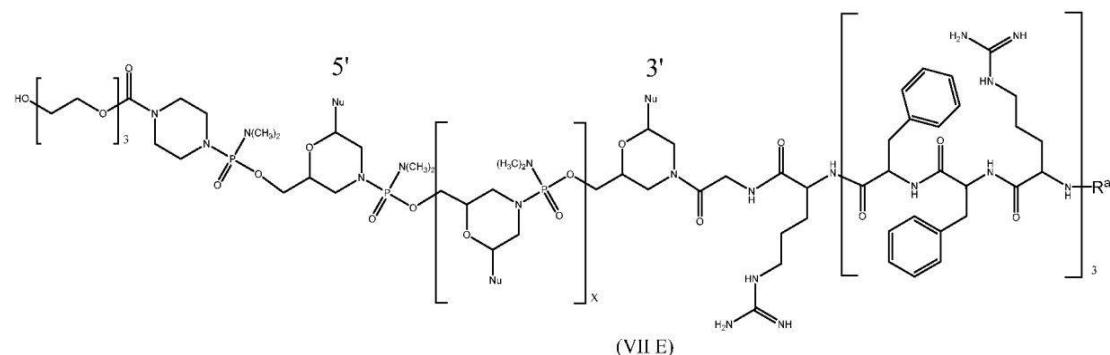


30

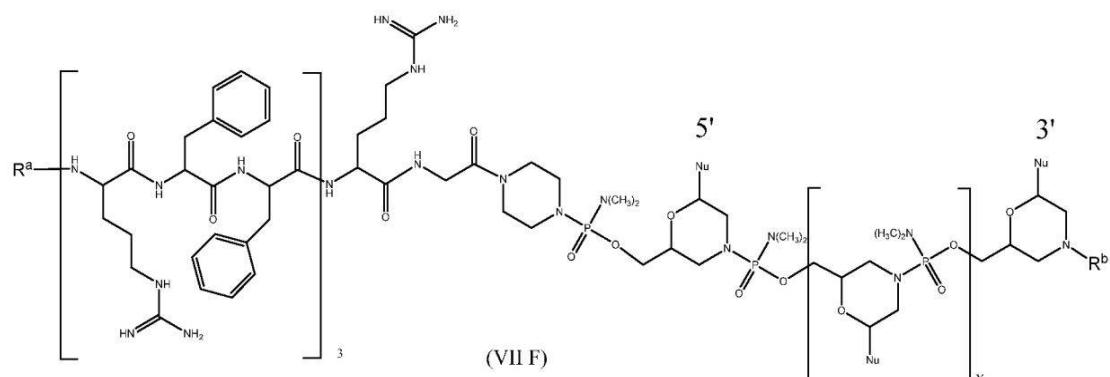
## 【化 3 9】



10



20



30

から選択される式（VII）のアンチセンスオリゴマーを含み、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、およびステアロイルから選択され、R<sup>b</sup>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、一緒になって上記の標的化配列を形成するプリンまたはピリミジン塩基対合部分である。

## 【0119】

40

## 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、病原性因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。ある特定の実施形態では、病原性因子は、抗生物質耐性タンパク質またはバイオフィルム形成タンパク質であってよい。一部の実施形態では、抗生物質耐性タンパク質は、ニューデリーメタロ-ベータ-ラクタマーゼ（NDM-1）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つから選択され得る。一部の実施形態では、標的配列は

50

、配列番号 1 ~ 4 から選択することができ、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、配列番号 11 ~ 15 に記載されている標的化配列の 1 つであってよい、配列番号 11 ~ 15 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んでもよい、または配列番号 11 ~ 15 と少なくとも 80 % の配列同一性を有する変異体を含んでもよく、チミン塩基 (T) は任意選択で、ウラシル塩基 (U) である。一部の実施形態では、バイオフィルム形成タンパク質は、Cep I または Suh B の少なくとも 1 つによってコードされ得る。ある特定の実施形態では、標的配列は、配列番号 5 ~ 9 から選択することができ、チミン塩基 (T) は任意選択で、ウラシル塩基 (U) である。一部の実施形態では、標的化配列は、配列番号 16 ~ 24 に記載されている標的化配列の 1 つであってよい、配列番号 16 ~ 24 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んでもよい、または配列番号 16 ~ 24 と少なくとも 80 % の配列同一性を有する変異体を含んでもよく、チミン塩基 (T) は任意選択で、ウラシル塩基 (U) である。様々な実施形態では、病原性因子は、acp P の 1 つまたは複数によってコードされる、脂肪酸生合成と関連する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 P あり得る。一部の実施形態では、標的配列は、配列番号 10 であってよく、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、配列番号 25 ~ 37 に記載されている標的化配列の 1 つであってよい、配列番号 25 ~ 37 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んでもよい、または配列番号 25 ~ 37 と少なくとも 80 % の配列同一性を有する変異体を含んでもよく、チミン塩基 (T) は任意選択で、ウラシル塩基 (U) である。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一部の実施形態において、標的化配列は、  
 【化 40】

- a) 配列番号 11 (TCA AGT TTT CC);
- b) 配列番号 12 (TCC TTT TAT TC);
- c) 配列番号 13 (CCA TCA AGT TT);
- d) 配列番号 14 (GGC AAT TCC AT); および
- e) 配列番号 15 (ATA CTG TCC AA),

から選択され、X は、9 であり、チミン塩基 (T) は、ウラシル塩基 (U) あり得る。

【0120】

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様々な実施形態では、標的化配列は、

【化 41】

- a) 配列番号 16 (AAG GTC TGC AT);
- b) 配列番号 17 (TCG GAT CTG TG);
- c) 配列番号 18 (CAT GGA TGT CC);
- d) 配列番号 19 (CGT GAA CGA AG);
- e) 配列番号 20 (CGT GTG GCA AC);
- f) 配列番号 21 (GCC CGA GAT CC);
- g) 配列番号 22 (CTT TCG TTC GC);
- h) 配列番号 23 (ATG CAT GAG CC); および
- i) 配列番号 24 (GGA TGC ATG AG),

から選択され、X は、9 であり、チミン塩基 (T) は、ウラシル塩基 (U) あり得る。

10

20

30

40

50

## 【0121】

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ある特定の実施形態では、標的化配列は、

## 【化42】

- a) 配列番号 25 (GTCCATTACCC);
- b) 配列番号 26 (CATTACCCCTC);
- c) 配列番号 27 (CCATTACCCCT);
- d) 配列番号 28 (TCCATTACCCC);
- e) 配列番号 29 (TGTCCATTACC);
- f) 配列番号 30 (TTGTCCATTAC);
- g) 配列番号 31 (GTTGTCCATTA);
- h) 配列番号 32 (TGTTGTCCATT);
- i) 配列番号 33 (ATGTTGTCCAT);
- j) 配列番号 34 (TTTACAAAGTGC);
- k) 配列番号 35 (CCTCCGAGGGA);
- l) 配列番号 36 (ACACGTTGTTC);
- m) 配列番号 37 (AGTTCAGCGAC),

10

20

から選択され、Xは、9であり、チミン塩基(T)は、ウラシル塩基(U)であり得る。

## 【0122】

## 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(AON)は、下記の表3A～3Cに記載されているものを含む。

## 【表3-1】

30

表3A: 例示的な抗生物質耐性標的化配列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 | NDM-1 | TCA AGT TTT CC | 11     | TEG  | (RXR) <sub>4</sub> XB- | 40      |
| PPMO#2 | NDM-1 | TCC TTT TAT TC | 12     | TEG  | (RXR) <sub>4</sub> XB- | 40      |
| PPMO#3 | NDM-1 | CCA TCA AGT TT | 13     | TEG  | (RXR) <sub>4</sub> XB- | 40      |
| PPMO#4 | NDM-1 | GGC AAT TCC AT | 14     | TEG  | (RXR) <sub>4</sub> XB- | 40      |
| PPMO#5 | adeA  | ATA CTG TCC AA | 15     | TEG  | (RXR) <sub>4</sub> XB- | 40      |

\*チミン(T)はウラシル(U)であってよい;

\*\*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、TEGは、上記で定義する。

40

## 【表3-2】

| 表3B: 例示的なバイオフィルム形成標的化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#6                   | cepI  | AAG GTC TGC AT | 16     | (RFF) <sub>3</sub> RXB- | H                       | 41      |
| PPMO#7                   | cepI  | TCG GAT CTG TG | 17     | TEG                     | (RFF) <sub>3</sub> RXB- | 41      |
| PPMO#8                   | cepI  | CAT GGA TGT CC | 18     | TEG                     | (RFF) <sub>3</sub> RXB- | 41      |
| PPMO#9                   | cepI  | CGT GAA CGA AG | 19     | TEG                     | (RFF) <sub>3</sub> RXB- | 41      |
| PPMO#10                  | cepI  | CGT GTG GCA AC | 20     | TEG                     | (RFF) <sub>3</sub> RXB- | 41      |
| PPMO#11                  | cepI  | GCC CGA GAT CC | 21     | TEG                     | (RFF) <sub>3</sub> RXB- | 41      |
| PPMO#12                  | cepI  | CTT TCG TTC GC | 22     | TEG                     | (RFF) <sub>3</sub> RXB- | 41      |
| PPMO#13                  | suhB  | ATG CAT GAG CC | 23     | TEG                     | (RFF) <sub>3</sub> RXB- | 41      |
| PPMO#14                  | suhB  | GGA TGC ATG AG | 24     | TEG                     | (RFF) <sub>3</sub> RXB- | 41      |

\*チミン(T)はウラシル(U)であってよい;

\*\* 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、TEG は、上記で定義する。

\*\*\* 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、5'CPP は、上記の pip-PDA 部分を介して連結している。

10

## 【表3-3】

| 表3C: 例示的な脂肪酸合成と関連する標的化配列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#15                     | acpP  | GTCCATTACCC  | 25     | (RFF) <sub>3</sub> RXB- | H                       | 41      |
| PPMO#16                     | acpP  | GTCCATTACCC  | 25     | TEG                     | (RFF) <sub>3</sub> RXB- | 41      |
| PPMO#17                     | acpP  | GTCCATTACCC  | 25     | (RFF) <sub>3</sub> RG-  | H                       | 42      |
| PPMO#18                     | acpP  | CATTACCCCTC  | 26     | (RFF) <sub>3</sub> RXB- | H                       | 41      |
| PPMO#19                     | acpP  | CCATTACCCCT  | 27     | (RFF) <sub>3</sub> RXB- | H                       | 41      |
| PPMO#20                     | acpP  | TCCATTACCCC  | 28     | (RFF) <sub>3</sub> RXB- | H                       | 41      |
| PPMO#21                     | acpP  | TGTCCATTACC  | 29     | (RFF) <sub>3</sub> RXB- | H                       | 41      |
| PPMO#22                     | acpP  | TTGTCCATTAC  | 30     | (RFF) <sub>3</sub> RXB- | H                       | 41      |
| PPMO#23                     | acpP  | GTTGTCCATTA  | 31     | (RFF) <sub>3</sub> RXB- | H                       | 41      |
| PPMO#24                     | acpP  | TGTTGTCCATT  | 32     | (RFF) <sub>3</sub> RXB- | H                       | 41      |
| PPMO#25                     | acpP  | ATGTTGTCCAT  | 33     | (RFF) <sub>3</sub> RXB- | H                       | 41      |
| PPMO#26                     | acpP  | TTTACAAGTGC  | 34     | TEG                     | (RFF) <sub>3</sub> RXB- | 41      |
| PPMO#27                     | acpP  | CCTCCGAGGGGA | 35     | TEG                     | (RFF) <sub>3</sub> RXB- | 41      |
| PPMO#28                     | acpP  | ACACGTTGTT   | 36     | TEG                     | (RFF) <sub>3</sub> RXB- | 41      |
| PPMO#29                     | acpP  | AGTTCAGCGAC  | 37     | TEG                     | (RFF) <sub>3</sub> RXB- | 41      |

\*チミン(T)はウラシル(U)であってよい;

\*\* 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、TEG は、上記で定義する。

30

\*\*\* 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、5'CPP は、上記の pip-PDA 部分を介して連結している。

40

## 【0123】

## I I . 使用の方法および製剤

本開示の実施形態は、1種または複数の細菌病原性因子の発現および活性を低減させる本明細書に記載されているアンチセンスオリゴマーを使用する方法を含む。ある特定の実

50

施形態は、アンチセンスオリゴマーを使用して、細菌の複製、増殖、病原性因子、または成長を低減させ、例えば、単独で、または1種もしくは複数のさらなる抗微生物剤と組み合わせて、被験体において細菌感染を処置する方法を含む。一部の場合において、アンチセンスオリゴマーは、抗生物質に対する細菌の感受性を増加させる。ある特定の実施形態は、本明細書に記載されているアンチセンスオリゴマーを使用して、細菌バイオフィルムの形成または存在を低減させ、例えば、単独で、または1種もしくは複数のさらなる抗微生物剤と組み合わせて、被験体において細菌感染を処置する方法を含む。

【0124】

また含まれるのは、典型的には、薬学的に許容される担体と組み合わせた、アンチセンスオリゴマーを含む医薬組成物である。本明細書において提供する方法は、*in vitro*または*in vivo*で実施することができる。

【0125】

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（単数または複数）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、病原性因子をコードする遺伝子を含む細菌（単数または複数）の病原性および/またはバイオフィルム形成を低減させる方法である。

【0126】

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

【0127】

*Escherichia*は、*Enterobacteriaceae*科由来のグラム陰性の非胞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与している種*Escherichia coli*を含む。

【0128】

*Acinetobacter*は、*Gammaproteobacteria*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。

【0129】

*Klebsiella*は、突出した多糖類をベースとする莢膜を有する非運動性グラム陰性オキシダーゼ陰性の桿状細菌の属である。*Klebsiella*生物は、広範囲の病態、例えば、肺炎、尿路感染、敗血症、髄膜炎、下痢、および軟部組織感染をもたらすことができる。ヒト感染症の大部分は、*Klebsiella pneumoniae*および*Klebsiella oxytoca*によってもたらされる。

【0130】

*Burkholderia*（従前は、*Pseudomonas*の一部）は、ほぼ遍在性のグラム陰性の運動性偏性好気性桿状細菌の群を指す。これらのプロテオバクテリアは、病原性細菌、例えば、鼻疽に関与している*Burkholderia mallei*；類鼻疽の原因因子である*Burkholderia pseudomallei*；および例えば、囊胞性線維症（CF）を有する被験体における肺感染症の重要な病原体である*Burkholderia cepacia*を含む。*Burkholderia cepacia*（または*Burkholderia cepacia*種群）は、例えば、*Burkholderia cenocepacia*、*Burkholderia multivora*、*Burkholderia vietnamensis*、*Burkholderia*

10

20

30

40

50

*eria stabilis*、*Burkholderia anthina*、*Burkholderia pyrrociniae*、*Burkholderia dolosa*、および／または*Burkholderia ambifaria*を含めた多くの異なる亜種から構成されるグラム陰性菌である。

【0131】

*Pseudomonas*は、*Pseudomonadaceae*科に属するグラム陰性好気性*gamma proteobacteria*の属である。*Pseudomonas aeruginosa*は、臨床的に関連性のある新興の日和見病原体としてますます認識されている。これは低い抗生物質感受性を有し、バイオフィルムを形成することができる。*Pseudomonas spp.*はペニシリン、および関連するベータ-ラクタム系抗生物質の大部分に対して天然に耐性であるが、一部は、ピペラシリン、イミペネム、チカルシリン、および／またはシプロフロキサシンに対して感受性である。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、およびアミカシンは、*Pseudomonas*感染の処置のための他の有望な微生物剤である。

【0132】

このように、一部の実施形態では、細菌は、*Escherichia*、*Acinetobacter*、*Klebsiella*、*Burkholderia*、および*Pseudomonas*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*、*Acinetobacter baumannii*、*Klebsiella pneumoniae*、*Burkholderia cepacia*（種群）、または*Pseudomonas aeruginosa*の1つまたは複数である。

【0133】

ある特定の実施形態では、細菌は、多剤耐性（MDR）細菌（単数または複数）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、*Klebsiella pneumoniae*カルバペネマーゼ（KPC）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 coli*、MDR *Acinetobacter baumannii*、MDR *Klebsiella pneumoniae*、MDR *Burkholderia cepacia*（種群）、またはMDR *Pseudomonas aeruginosa*である。

【0134】

上で述べたように、本明細書に記載されている細菌（単数または複数）は典型的には、1種または複数の病原性因子、例えば、抗生物質耐性遺伝子、バイオフィルム形成遺伝子および／または脂肪酸生合成と関連する遺伝子を含む（例えば、コードする）。抗生物質耐性遺伝子（およびこれらの関連するタンパク質）の一般例は、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）を増加させる遺伝子／タンパク質を含む。抗生物質耐性遺伝子の特定の例は、ニューデリーメタロ-ベータ-ラクタマーゼ（NDM-1）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）を含む。具体的な実施形態では、細菌は、NDM-1およびadeAから選択される少なくとも1種の抗生物質耐性遺伝子を含むか、または発現する*Escherichia coli*、*Acinetobacter baumannii*、または*Klebsiella*

10

20

30

40

50

la pneumoniaeである。

【0135】

バイオフィルム形成遺伝子（およびこれらの関連するタンパク質）の例は、例えば、Burkholderia由来のcepI、cepR、および/またはsuhB遺伝子を含む。特定の実施形態では、細菌は、アシルホモセリンラクトンシンターゼをコードするcepI遺伝子を含むか、または発現する。一部の実施形態では、細菌は、イノシトール-1-リン酸をコードするsuhB遺伝子を含むか、または発現する。具体的な実施形態では、1つまたは複数のバイオフィルム形成遺伝子を含むか、または発現する細菌は、Burkholderia種、例えば、Burkholderia cepaciaまたはBurkholderia cepacia（種群）である。これら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は、免疫無防備状態であり、根底にある肺疾患、例えば、囊胞性線維症（CF）または慢性肉芽腫症（CGD）を有する。

10

【0136】

脂肪酸合成と関連する遺伝子（およびこれらの関連するタンパク質）の例は、例えば、Burkholderia由来のacpP、acpS、および/またはfab遺伝子を含む。特定の実施形態では、細菌は、アシルキャリアタンパク質をコードするacpP遺伝子を含むか、または発現する。具体的な実施形態では、脂肪酸合成と関連する1種または複数の遺伝子を含むか、または発現する細菌は、Burkholderia種、例えば、Burkholderia cepaciaまたはBurkholderia cepacia（種群）である。これら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は、免疫無防備状態であり、根底にある肺疾患、例えば、囊胞性線維症（CF）または慢性肉芽腫症（CGD）を有する。

20

【0137】

一部の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、細菌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、もしくは1000%もしくはそれ超（すべての整数およびその間の範囲を含めた）、または对照と比べて、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、もしくは100倍もしくはそれ超（すべての整数およびその間の範囲を含めた）細菌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。一部の実施形態では、本明細書に記載のように、アンチセンスオリゴマーを、1種または複数の抗微生物剤と組み合わせて用いる。

30

【0138】

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%もしくはそれ超（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倍もしくはそれ超（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（例えば、カルバペネマーゼ）活性を低減させるアンチセンスオリゴマーは、N

40

50

DM-1に対して標的化され、細菌は、NDM-1を含むか、または発現する、*Acinetobacter*、*Escherichia*、または*Klebsiella*種、例えば、*Escherichia coli*、*Acinetobacter baumannii*、または*Klebsiella pneumoniae*である。これらは、例示的な細菌種であり、NDM-1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（例えば、カルバペネマーゼ）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。

#### 【0139】

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、オリゴマーが存在しない）と比べて、バイオフィルム形成および/または現存するバイオフィルムのレベルを低減させる。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%もしくはそれ超（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倍もしくはそれ超（すべての整数およびその間の範囲を含めた）バイオフィルム形成および/または現存するバイオフィルムのレベルを低減させる。特定の実施形態では、バイオフィルム形成および/または現存するバイオフィルムのレベルを低減させるアンチセンスオリゴマーは、cepI、cepR、suhB、および/またはacpPに対して標的化され、細菌は、cepI、cepR、suhBおよび/またはacpPを含むか、または発現する、*Burkholderia*種、例えば、*Burkholderia cepacia*（種群）またはその亜種（例えば、*Burkholderia cenocepacia*、*Burkholderia multivorans*、*Burkholderia vietnamiensis*、*Burkholderia stabilis*、*Burkholderia anthina*、*Burkholderia pyrrociniae*、*Burkholderia dolosa*、*Burkholderia ambifaria*）である。バイオフィルム形成および/または現存するバイオフィルムのレベルは、*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。

#### 【0140】

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（単数または複数）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、本開示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（単数または複数）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し得る。

#### 【0141】

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。

#### 【0142】

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

10

20

30

40

50

的、および局部送達が含まれる。アンチセンスオリゴマーは、送達のためにエアゾール化され得る。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。

#### 【0143】

ある特定の実施形態では、本開示のアンチセンスオリゴマーは、経皮的な方法で（例えば、リポ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/リポ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。

10

#### 【0144】

ある特定の実施形態では、本開示のアンチセンスオリゴマーは、エアゾール化によって送達することができる。エアゾールとして肺へ医薬を投与する利点は、経口療法と比較したより急速な作用の発現；気道への直接の送達による高い局所濃度；乏しい経口バイオアベイラビリティーを有する薬物の針によらない全身的送達；ならびに皮下または静脈内注射を必要とする薬物のための疼痛を伴わず針によらない送達を含む。肺を標的とする伝統的なエアゾール療法は、短時間作用性 2-アドレナリン作用性アゴニストおよび長時間作用性 2-アドレナリン作用性アゴニスト（LABA）、抗コリン作用薬、吸入コルチコステロイド剤（ICS）、非ステロイド性抗炎症剤、抗生物質および粘液溶解剤からなる。これらの薬物を送達するデバイスは、単独で、もしくはスペーサーに付着させて使用される加圧式定量吸入器（pMDI）、またはバルブ式保持チャンバー（VHC）、息によって作動する（BA）-pMDI、乾燥粉末吸入器（DPI）、ジェットネブライザー、振動メッシュネブライザーおよびソフトミスト吸入器を含む。喘息および慢性閉塞性肺疾患（COPD）の管理のための十分に確立した処置ガイドラインはそれぞれ、これらの医薬を投与する主要な経路として吸入療法を推奨している。囊胞性線維症（CF）についての処置ガイドラインはまた、エアゾール化した医薬の吸入についての推奨を含む。

20

#### 【0145】

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。

30

#### 【0146】

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、リポソーム、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る。例えば、局在化は、リポ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ポソーム、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。

40

#### 【0147】

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、リポ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非エンドサイトーシスマード、例えば、マイクロインジェクション、透過処理（例えば、ストレプトリシン〇透過処理、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マ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、A

50

dvanced Drug Delivery Reviews、44巻：35～49頁  
を参照されたい)。

【0148】

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。

【0149】

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、本開示の化合物は、酸付加塩または塩基付加塩の形態で使用され得る。本開示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。

【0150】

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。

【0151】

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、本開示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。

【0152】

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; Uhmannら、antise

10

20

30

40

50

nse 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。

#### 【0153】

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。

#### 【0154】

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200～400nMのピーカ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、70kg当たり約1～1000mgのオリゴマーである。場合によって、患者あたり1000mg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、70kg当たり約0.5mg～1000mg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)。

#### 【0155】

本開示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。

#### 【0156】

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で投与された本開示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、R T - P C R、ノーザンプロッティング、E L I S A またはウエスタンプロッティングによって決定するような、参照正常m R N A またはタンパク質に対して変異体m R N A の量をモニターすることを含む。

### 【0157】

#### I I I . 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抗生物質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、細菌に対する抗生物質の最小発育阻止濃度（M I C）を低減させる。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。

### 【0158】

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。

### 【0159】

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）、セファロスボリン（例えば、セファセトリル（C e f a c e t r i l e ）（セファセトリル（c e p h a c e t r i l e ））、セファドロキシル（C e f a d r o x i l ）（セファドロキシル（c e f a d r o x y l ）；D u r i c e f ）、セファレキシン（C e p h a l e x i n ）（セファレキシン（c e f a l e x i n ）；K e f l e x ）、セファログリシン（C e f a l o g l y c i n ）（セファログリシン（c e p h a l o g l y c i n ））、セファロニウム（C e f a l o n i u m ）（セファロニウム（c e p h a l o n i u m ））、セファロリジン（c e f a l o r i d i n e ）（セファロリジン（c e p h a l o r a d i n e ））、セファロチン（C e f a l o t i n ）（セファロチン（c e p h a l o t h i n ）；K e f l i n ）、セファピリン（C e f a p i r i n ）（セファピリン（c e p h a p i r i n ）；C e f a d r y l ）、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（C e f a z o l i n ）（セファゾリン（c e p h a z o l i n ）；A n c e f 、K e f z o l ）、セフラジン（C e f r a d i n e ）（セフラジン（c e p h r a d i n e ）；V e l o s e f ）、セフロキサジン、セフテゾール、セファクロル（C e c l o r 、D i s t a c l o r 、K e f l o r 、R a n i c l o r ）、セフォニシド（M o n o c i d ）、セフプロジル（セフプロキシル；C e f z i l ）、セフロキシム（Z e f u 、Z i n n a t 、Z i n a c e f 、C e f t i n 、B i o f u r o k s y m 、X o r i m a x ）、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（L o r a b i d ）；セファマイシン：セフブペラゾン、セフメタゾール（Z e f a z o n e ）、セフミノクス、セフォテタン（C e f o t a n ）、セフォキシチン（M e f o x i n ）、セフォチアム（P a n s p o r i n ）、セフカペン、セフダロキシム、セフジニル（S e f d i n 、Z i n i r 、O m n i c e f 、K e f n i r ）、セフジトレニ、セフェタメト、セフィキシム（F i x x 、Z i f i 、S u p r a x ）、セフメノキシム、セフォジジム、セフォタキシム（C l a f o r a n ）、セフォベシン（C o n v e n i a ）、セフピミゾール、セフポドキシム（V a n t i n 、P E C E F ）、セフテラム、セフチブテン（C e d a x ）、セフチオフル、セフチオレン、セフチゾキシム（C e f i z o x ）、セフトリアキソン（R o c e p h i n ）、セフォペラゾン（C e f o b i d ）、セフタジジム（M e e z a t 、F o r t u m 、F o r t a z ）、ラタモキセフ（モキサラクタム）、セフクリジン、セフェビ

10

20

30

40

50

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、セフトビプロール、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、セフィビトリル、セフマチレン、セフメピジウム (Cefmepidium) 、セフオキサゾール、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 (Cefuracetime) ) 、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、タブトキシン (tabtoxin) ) ; アミノグリコシド、例えば、トブライマイシン、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、スルフイソミジン、スルファドキシン、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ン、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、スルファドキシン、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、ナリジキシン酸、オキソリン酸 (Uroxin) 、ピロミド酸 (Panacid) 、ピペミド酸 (Dolcol) ロソキサシン (Eradacil) 、シプロフロキサシン (Alcipro、Ciproabay、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 (Peflaccine) 、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) 、スバルフロキサシン (Zagam) 、テマフロキサシン (Omniflox) 、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-opth.) 、ゲミフロキサシン (Factive) 、モキシフロキサシン (Acfloxx Woodward、Avelox、Vigamox、シタフロキサシン (Gracevit) 、トロバフロキサシン (Trovon) 、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) 、ステゾリド (sutezolid) 、およびテジゾリド; ポリミキシン、例えば、ポリスポリン (polysporin) 、ネオスポリン (neosporin) 、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、リファベンチン、およびリファキシミン; リピアルマイシン (lipiarmycin) 、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 (carbomycin) 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 (solithromycin) 、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、ダブトマイシン; 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 (teicoplanin) ; 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のいずれ 10 20 30 40 50

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。

#### 【0160】

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、N D M - 1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、およびトモペネムを含む。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、カルバペネマーゼ、例えば、N D M - 1を含むか、または発現し、アンチセンスオリゴマーは、カルバペネマーゼ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*、*Acinetobacter baumannii*、または*Klebsiella pneumoniae*である。

#### 【0161】

一部の実施形態では、抗微生物剤は、アミノグリコシド、例えば、本明細書に記載のようなトブラマイシンまたはゲンタマイシンまたはテトラサイクリンである。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 a d e A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*、*Acinetobacter baumannii*、または*Klebsiella pneumoniae*である。

#### 【0162】

ある特定の実施形態では、抗微生物剤は、セフタジム、ドキシサイクリン、ピペラシン、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。これらおよび関連する実施形態の一部では、細菌は、1つまたは複数のバイオフィルム形成遺伝子、例えば、c e p I、c e p R、および / もしくは s u h Bを含むか、または発現する*Burkholderia cepacia*種であり、アンチセンスオリゴマーは、バイオフィルム形成遺伝子（複数可）に対して標的化される。具体的な実施形態では、細菌は、*Burkholderia cepacia*または*Burkholderia cepacia*種群である。具体的な実施形態では、被験体は、免疫無防備状態であり、根底にある肺疾患、例えば、囊胞性線維症（C F）または慢性肉芽腫症（C G D）を有する。

#### 【0163】

ある特定の実施形態では、抗微生物剤は、セフタジム、ドキシサイクリン、ピペラシン、ミノサイクリン、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。これらおよび関連する実施形態の一部では、細菌は、脂肪酸生合成と関連する1種もしくは複数の遺伝子、例えば、a c p Pを含むか、または発現する*Burkholderia cepacia*種であり、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をコードする遺伝子（複数可）に対して標的化される。具体的な実施形態では、細菌は、*Burkholderia cepacia*または*Burkholderia cepacia*種群である。具体的な実施形態では、被験体は、免疫無防備状態であり、根底にある肺疾患、例えば、囊胞性線維症（C F）または慢性肉芽腫症（C G D）を有する。

#### 【0164】

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の感度を増加させる。特定の実施形態では、アンチセンスは、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、

10

20

30

40

50

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%もしくはそれ超(すべての整数およびその間の範囲を含めた)、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、もしくは100倍もしくはそれ超(すべての整数およびその間の範囲を含めた)感度を増加させる。

#### 【0165】

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、一晩(*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%またはそれ超(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、もしくは100倍(すべての整数およびその間の範囲を含めた)低減させる。

#### 【0166】

一部の実施形態では、感度を増加させるか、またはMICを低減させるアンチセンスオリゴマーは、NDM-1に対して標的化され、細菌は、NDM-1を含むか、または発現する*Escherichia coli*、*Acinetobacter baumannii*、または*Klebsiella pneumoniae*であり、抗微生物剤は、カルバペネム、例えば、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、ビアペネム、ラズペネム、テビペネム、レナペネム、またはトモペネムである。

#### 【0167】

特定の実施形態では、感度を増加させるか、またはMICを低減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を含むか、または発現する*Escherichia coli*、*Acinetobacter baumannii*、または*Klebsiella pneumoniae*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)、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-Lак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。

#### 【0168】

特定の実施形態では、感度を増加させるか、またはMICを低減させるアンチセンスオリゴマーは、cepIに対して標的化され、細菌は、cepIを含むか、または発現する*Burkholderia*種、例えば、*Burkholderia cepacia*(種群)またはその亜種(例えば、*Burkholderia cenocepacia*、*B*

10

20

30

40

50

*Burkholderia multivorans*、*Burkholderia vietnamiensis*、*Burkholderia stabilis*、*Burkholderia anthina*、*Burkholderia pyrrociniae*、*Burkholderia dolosa*、*Burkholderia ambifaria* ) であり、抗微生物剤は、セフタジジム、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つまたは複数から選択される。

【0169】

特定の実施形態では、感度を増加させるか、またはMICを低減させるアンチセンスオリゴマーは、suhBに対して標的化され、細菌は、suhBを含むか、または発現する 10  
*Burkholderia*種、例えば、*Burkholderia cepacia*(種群)またはその亜種(例えば、*Burkholderia cenocepacia*、*Burkholderia multivorans*、*Burkholderia vietnamiensis*、*Burkholderia stabilis*、*Burkholderia anthina*、*Burkholderia pyrrociniae*、*Burkholderia dolosa*、*Burkholderia ambifaria*)であり、抗微生物剤は、セフタジジム、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つまたは複数から選択される。

【0170】

特定の実施形態では、感度を増加させるか、またはMICを低減させるアンチセンスオリゴマーは、acppPに対して標的化され、細菌は、acppPを含むか、または発現する 20  
*Burkholderia*種、例えば、*Burkholderia cepacia*(種群)またはその亜種(例えば、*Burkholderia cenocepacia*、*Burkholderia multivorans*、*Burkholderia vietnamiensis*、*Burkholderia stabilis*、*Burkholderia anthina*、*Burkholderia pyrrociniae*、*Burkholderia dolosa*、*Burkholderia ambifaria*)であり、抗微生物剤は、セフタジジム、ドキシサイクリン、ピペラシリン、ミノサイクリン、メロペネム、クロラムフェニコール、および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つまたは複数から選択される。

【0171】

IV. 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。

【0172】

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。

【0173】

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。

【0174】

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、

10

20

30

40

50

当業者が通常通り用いる方法、例えば、E L I S A またはウエスタンプ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。

【 0 1 7 5 】

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 ( G r a m 、 1 8 8 4 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。

【 0 1 7 6 】

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。

【 0 1 7 7 】

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。

【 0 1 7 8 】

P M O または P P M O 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。

【 0 1 7 9 】

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病原性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 ( M D R ) 細菌および / またはバイオフィルム形成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。

【 0 1 8 0 】

本開示の 1 つの例示は、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 30 とである。

【 0 1 8 1 】

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、参照によりその全体が組み込まれている。

【 実施例 】

【 0 1 8 2 】

( 実施例 1 )

a d e A に対して標的化される P P M O の活性

耐性 - 小結節形成 - 細胞分裂 ( R N D ) 型多剤排出ポンプサブユニット a d e A ( a d e A ) 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タモルホリノオリゴマー ( P P M O ) を調製し、 a d e A を発現している A c i n e t o b a c t e r b a u m a n i i に対する様々な抗生物質の最小発育阻止濃度 ( M I C ) を低減させる能力について試験した。

【 0 1 8 3 】

a d e A を標的化する P P M O は、下記の配列 : A T A C T G T C C A A ( 配列番号 1 5 ; P P M O # 5 ) を有する。 P P M O は、その 3 ' 末端において ( R X R ) <sub>4</sub> X B ( 配列番号 4 0 ) の C 末端 - アラニン残基にコンジュゲートさせた。

【 0 1 8 4 】

抗生物質ゲンタマイシン、トブラマイシン、およびテトラサイクリンの M I C を、 9 6

10

20

30

40

50

ウェルマイクロタイタープレートフォーマットの Clinical Laboratory Standards Institute 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 PPMO を加えた。抗生物質の各希釈系列は、異なる濃度の PPMO を含んだ。

【0185】

結果を図 2 ~ 4 において示す。これらの図は、adeA を標的化する PPMO による adeA (排出ポンプ) を発現している *Acinetobacter baumannii* の処置が、ゲンタマイシン (図 2) 、トブラマイシン (図 3) 、およびテトラサイクリン (図 4) の MIC を、それぞれ濃度依存的な様式で有意に低減させたことを示す。

10

【0186】

(実施例 2)

NDM-1 に対して標的化される PPMO の活性

ニューデリーメタロ - ベータ - ラクタマーゼ (NDM-1) に対して標的化される、ペプチドにコンジュゲートしたホスホジアミデートモルホリノオリゴマー (PPMO) を調製し、NDM-1 を発現している *Acinetobacter baumannii* および *E. coli* に対するメロペネムの最小発育阻止濃度 (MIC) を低減させる能力について試験した。

【0187】

NDM-1 に対して標的化される PPMO は、下記の配列 : T C A A G T T T T C C (配列番号 11 ; PPMO # 1) ; T C C T T T T A T T C (配列番号 12 ; PPMO # 2) ; C C A T C A A G T T T (配列番号 13 ; PPMO # 3) ; および G G C A A T T C C A T (配列番号 14 ; PPMO # 4) を有する。PPMO のそれぞれを、その 3' 末端において (R X R) <sub>4</sub> X B (配列番号 40) の C 末端 - アラニン残基にコンジュゲートさせた。

20

【0188】

メロペネムの MIC を、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。メロペネム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。メロペネムの各希釈系列において、固定量の PPMO を加えた。メロペネムの各希釈系列は、異なる濃度の PPMO を含んだ。

30

【0189】

図 5 A ~ 5 B および 6 に示すように、NDM-1 を標的化する PPMO は、細菌に応じて、メロペネムの MIC を約 8 ~ 32 倍低減させた。これらの図は、NDM-1 を標的化する PPMO による、NDM-1 を発現している *Acinetobacter baumannii* (図 5 A) および NDM-1 を発現している *E. coli* (図 6) の処置が、メロペネムの MIC を濃度依存的な様式で有意に低減させたことを示す。図 5 B は、NDM-1 を標的化する PPMO およびメロペネムが、NDM-1 を発現している *Acinetobacter baumannii* のコロニー形成単位 (CFU) の数を相乗的に低減させたことを示す。このように、PPMO 処置した細胞のペリプラズムにおけるメロペネマーゼ酵素活性は、加えた PPMO の量と反比例であることが観察された。

40

【0190】

同様の効果が、*Klebsiella pneumoniae* について示された。8 μM の濃度で、最も有効な NDM-1 を標的化する PPMO は、メロペネムの MIC を約 64 μM から約 4 μM に低減させた (データは示さず)。

【0191】

このように、NDM-1 を標的化する PPMO は、3 つの多剤耐性病原体において NDM-1 の発現を抑制し、メロペネムの MIC を感受性の濃度に低減させた。

【0192】

(実施例 3)

50

バイオフィルムおよびアシルキャリアータンパク質遺伝子に対して標的化される P P M O の活性

バイオフィルム形成遺伝子 *suhB* および *cepI* ならびにアシルキャリアータンパク質 *acpP* 遺伝子に対して標的化される、ペプチドにコンジュゲートしたホスホロジアミデータモルホリノオリゴマー ( P P M O ) を調製し、バイオフィルム形成を低減させ、 *Burkholderia cenocepacia* J 2 3 1 5 において確立したバイオフィルムを崩壊させる能力について試験した。

【 0 1 9 3 】

*suhB* を標的化する P P M O は、下記の配列： A T G C A T G A G C C ( 配列番号 2 3 ; P P M O # 1 3 ) ；および G G A T G C A T G A G ( 配列番号 2 4 ; P P M O # 1 4 ) を有する。 10

【 0 1 9 4 】

*cepI* を標的化する P P M O は、下記の配列： A A G G T C T G C A T ( 配列番号 1 6 ; P P M O # 6 ) ； T C G G A T C T G T G ( 配列番号 1 7 ; P P M O # 7 ) ； C A T G G A T G T C C ( 配列番号 1 8 ; P P M O # 8 ) ； C G T G A A C G A A G ( 配列番号 1 9 ; P P M O # 9 ) ； C G T G T G G C A A C ( 配列番号 2 0 ; P P M O # 1 0 ) ； G C C C G A G A T C C ( 配列番号 2 1 ; P P M O # 1 1 ) ；および C T T T C G T T C G C ( 配列番号 2 2 ; P P M O # 1 2 ) を有する。

【 0 1 9 5 】

*suhB* を標的化する P P M O および *cepI* を標的化する P P M O のそれぞれを、その 3' 末端において ( R F F )<sub>3</sub> R X B ( 配列番号 4 1 ) の C 末端 - アラニン残基にコンジュゲートさせた。 20

【 0 1 9 6 】

*acpP* を標的化する P P M O は、表 3 C ( P P M O # 1 5 ~ 2 9 ) において示すような配列およびペプチドコンジュゲーションを有する。

【 0 1 9 7 】

9 6 ウエルポリスチレンマイクロタイプレートを使用して、バイオフィルムを、 1 5 0  $\mu$  l の *Burkholderia cenocepacia* J 2 3 1 5 の培養物中で形成させた。バイオフィルム形成を低減させる P P M O の能力を試験するために、 P P M O ( 1 ~ 1 0  $\mu$  M ) を、バイオフィルム形成の前に細菌培養物に加え、細菌と共に 4 8 時間インキュベートした。確立したバイオフィルムを低減させる P P M O の能力を試験するために、細菌培養物を 4 8 時間成長させ、 P P M O ( 1 ~ 1 0  $\mu$  M ) の添加の前にバイオフィルムを形成させ、次いで、 P P M O の存在下でさらに 4 8 時間インキュベートした。分析のために、液体培養物を除去し、マイクロタイプレートに接着しているバイオフィルムをクリスタルバイオレットで染色した。バイオフィルムにおけるクリスタルバイオレット染色の量を測定し、これがバイオフィルムの量と比例的であることを見出した。共焦点レーザー走査顕微鏡 ( C L S M ) 、および d s R e d を発現している *Burkholderia cenocepacia* J 2 3 1 5 を使用して、バイオフィルムの構造的变化を可視化した ( 図 8 A ~ 8 C を参照されたい ) 。 30

【 0 1 9 8 】

図 7 A ~ 7 B に示すように、 *acpP* 、 *suhB* または *cepI* に対して標的化される P P M O によるバイオフィルム形成 *Burkholderia* の処置は、バイオフィルムの形成を攪乱するだけでなく ( 7 A ; P P M O をバイオフィルム形成の前に加え、 4 8 時間インキュベートした ) 、確立したバイオフィルムも崩壊させた ( 7 B ; バイオフィルムを、 P P M O との 4 8 時間のインキュベーションの前に 4 8 時間成長させた ) 。 1 0  $\mu$  M の濃度の、 *acpP* を標的化する P P M O は、バイオフィルム形成を約 4 5 % 低減させ、現存するバイオフィルムを約 5 0 % 低減させた。 1 0  $\mu$  M の濃度の、 *cepI* を標的化する P P M O は、バイオフィルム形成を約 5 2 % 低減させ、現存するバイオフィルムを約 6 5 % 低減させた。 1 0  $\mu$  M の濃度の、 *suhB* を標的化する P P M O は、バイオフィルム形成を約 4 0 % 低減させ、現存するバイオフィルムを約 4 2 % 低減させた。このように、 40

バイオフィルムを C L S M で可視化したとき、 c e p I を標的化する P P M O および s u h B を標的化する P P M O の存在下でバイオフィルム形成の劇的な低減があった。

【 0 1 9 9 】

( 実施例 4 )

P P M O は抗生物質と相乗的に作用し、確立したバイオフィルムにおける細菌成長を低減させる

バイオフィルム形成遺伝子 c e p I に対して標的化される P P M O を調製し、 B u r k h o l d e r i a c e n o c e p a c i a J 2 3 1 5 においてアミノグリコシド系抗生物質であるトプラマイシンと組み合わせて、確立したバイオフィルムにおける細菌成長を低減させる能力について試験した。 10

【 0 2 0 0 】

c e p I を標的化する P P M O は、下記の配列：表 3 B における P P M O # 6 ~ 1 2 を有する。

【 0 2 0 1 】

P P M O のそれぞれを、 3 ' 末端において ( R F F ) <sub>3</sub> R X B ( 配列番号 4 1 ) とコンジュゲートさせた。

【 0 2 0 2 】

確立したバイオフィルムにおける細菌成長を低減させる c e p I P P M O およびトプラマイシンの能力を試験するために、細菌培養物を 4 8 時間成長させ、 P P M O 、または P P M O およびトプラマイシンの添加の前にバイオフィルムを形成させ、次いで、 P P M O なし、スクランブル対照 P P M O 、 6 4  $\mu$  g / m L または 1 2 8  $\mu$  g / m L のトプラマイシンを伴うスクランブル対照 P P M O 、 c e p I P P M O 、および 6 4  $\mu$  g / m L または 1 2 8  $\mu$  g / m L のトプラマイシンを伴う c e p I P P M O の存在下でさらに 4 8 時間インキュベートした。細菌成長を C F U / m L として測定した。 20

【 0 2 0 3 】

図 9 に示すように、 c e p I P P M O 単独、またはトプラマイシンを伴うスクランブル P P M O は、未処置バイオフィルムと比較して、細菌成長を有意に約 2 1 0 g 阻害することができた。しかし、トプラマイシンと組み合わせた c e p I P P M O は、確立したバイオフィルム上の細菌成長をさらに有意に阻害することができ、より高い濃度のトプラマイシン ( 1 2 8  $\mu$  g / m L ) で、 c e p I P P M O 単独と比較して、細菌 C F U / m L をもう 1 1 0 g だけ低減させることができた。 30

【 0 2 0 4 】

( 実施例 5 )

P P M O は B c c のメンバーを阻害する

様々な体の部位から得た様々なレベルの抗生物質耐性を有する臨床分離株を含めた種々の B c c 分離株を試験した。株バンクは、ヒト疾患をもたらすことが報告されている最も頻繁に遭遇する種を含む 3 9 の分離株を含んだ。図 1 0 に示すように、 6 つの P P M O ( P P M O # 1 9 ~ 2 3 および 2 5 ) は、 8  $\mu$  M またはそれ未満の I C <sub>7 5</sub> 値を達成した。これらの P P M O の 6 つすべては、 A c p P ( 脂肪酸生合成と関連するアシルキャリアータンパク質 ) を標的化した。 6 つの P P M O における差異は、標的 m R N A 上の代替的な位置付け部位と関連した。最も強力な P P M O ( P P M O # 1 9 ) は、 4  $\mu$  M の I C <sub>7 5</sub> を有した。 a c p P P P M O 標的化配列を、表 3 C において列挙する。 40

【 0 2 0 5 】

( 実施例 6 )

P P M O は B c c において殺菌性である

B c c の多くのメンバーは、内因的に抗生物質耐性であり、処置を困難なものとしている。 B . c e n o c e p a c i a は、囊胞性線維症 ( C F ) 患者が遭遇する最も一般的の種の 1 つである。 B . c e n o c e p a c i a の 2 つの異なる分離株を、異なる a c p P P P M O の存在下または非存在下で 2 4 時間インキュベートした ( 図 1 1 ) 。

【 0 2 0 6 】

a c p P を標的化する P P M O は、下記の配列： G T C C A T T A C C C ( P P M O # 15 ; 配列番号 25 ) ; C C A T T A C C C C T ( P P M O # 19 ; 配列番号 27 ) ; および T T G T C C A T T A C ( P P M O # 22 ; 配列番号 30 ) を有する。

【 0 2 0 7 】

P P M O のそれを、その 5' 末端において ( R F F )<sub>3</sub> R X B ( 配列番号 41 ) の C 末端 - アラニン残基にコンジュゲートさせた。

【 0 2 0 8 】

B . c e n o c e p a c i a K 5 6 - 2 ( ゲノム配列決定した臨床 C F 分離株 ; パネル A ) において、3つの P P M O はすべて、成長の有意な低減をもたらし、1つの P P M O ( P P M O # 19 ; 配列番号 27 ; 16 μM ) は、開始接種材料と比較して成長の > 3 10 log の低減、強力な殺菌効果をもたらした。重要なことに、この効果は、B . c e n o c e p a c i a の汎耐性株 ( H I 4 2 7 7 、 C F 患者由来の汎耐性大流行分離株 ; 図 11 、パネル B ) においてさえ見られた。この株はすべての伝統的な抗生物質に対して耐性を示したにも関わらず、P P M O # 19 は殺菌性であった。P P M O # 19 の M I C は、H I 4 2 7 7 において 8 μM であったが ( 図 10 ) 、成長を阻害する P P M O の能力は、任意の特定の株における抗生物質耐性の根底にあるレベルによって決まらないことを例示し、これはこのアプローチについての肯定的な意味を伴う重要な知見である。

【 0 2 0 9 】

( 実施例 7 )

P P M O は痰における B c c 成長を阻害する

20

C F 患者における慢性感染は、通常肺において顕在化する。さらに、B c c および P . a e r u g i n o s a のメンバーは、バイオフィルムを形成することが公知である。これらのバイオフィルムおよび C F 患者によって形成された濃厚な痰は、抗生物質による処置を特に困難なものとし、これらの病原体は肺の環境から完全に根絶することは実質的に不可能なものとなる。

【 0 2 1 0 】

P P M O を試験して、P P M O が痰においてこれらの活性を保持したかどうかを決定した。「人工の C F 痰」を作製するために十分に記載された方法を使用して、実験を行って、P P M O がこの環境における B c c の負荷量を低減させることができたかどうかを調べた ( 図 12 ) 。 B . c e n o c e p a c i a K 5 6 - 2 を、単独で、またはスクランブル配列 ( S c r ) プラセボ P P M O もしくは a c p P P P M O ( P P M O # 15 ) いずれかの存在下でインキュベートした。 a c p P を標的化する P P M O は、下記の配列： G T C C A T T A C C C ( P P M O # 15 ; 配列番号 25 ) を有する。P P M O を、その 5' 末端において ( R F F )<sub>3</sub> R X B ( 配列番号 41 ) の C 末端 - アラニン残基にコンジュゲートさせた。培地または P P M O を、2、8 および 12 時間ににおいて投与した。試料を 24 時間ににおいてプレーティングし、C F U / m l を決定した。 a c p P P P M O は、生物負荷量を低減させることができた ( 10 μM および 20 μM の投与の両方において ) 。 10 μM の投与で、処置なしの対照と比較して 24 時間までに C F U / m l において概ね 210 g の低減があった。 20 μM の投与で、> 310 g の低減が見られた。 20 μM の群において早くも 8 時間ににおいて、および 10 μM の群において早くも 12 時間ににおいてこの低減は明らかであった。これらの実験は、C F 患者において見られる濃厚な粘性の痰中においてさえ、P P M O が活性のままであることを示す。これは、P P M O の活性を痰において試験した最初のものである。

30

【 0 2 1 1 】

( 実施例 8 )

a c p P P P M O は、バイオフィルム形成を防止し、現存するバイオフィルムを解体することの両方が可能である

40

バイオフィルムの形成は重要な病原性形質であり、P . a e r u g i n o s a および B c c の両方によって利用される。B c c バイオフィルムを成長させて、バイオフィルム形成を防止し、現存するバイオフィルムを解体することの両方を行うことの能力について、

50

PPMOを試験した。B. cenocepacia J2315 (ゲノム配列決定した流行性CF分離株)を、再現性のあるバイオフィルムを日毎に成長させるペグを含有するM B E Cバイオフィルムアッセイプレートを利用して成長させた。J2315を、acpp PPMO (10 μM)、スクランブルPPMO (10 μM)、ペプチドまたは培地単独のいずれかの存在下で48時間成長させた(図13)。acpp PPMOを標的化するPPMO (PPMO #19)は、下記の配列: C C A T T A C C C C T (配列番号27)を有する。PPMOを、その5'末端において(RFF)<sub>3</sub>RXB (配列番号41)のベータ-アラニン残基にコンジュゲートさせた。バイオフィルム産生を、クリスタルバイオレット方法を利用して測定した。見られ得るように、acpp PPMOは、バイオフィルム形成を、対照と比較して>50%低減させた。次いで、acpp PPMOを試験して、これが現存するバイオフィルムを崩壊させることができたかどうかを調べた。バイオフィルムを48時間成長させ、次いで、成熟したバイオフィルムペグを、培地単独(図14A)、10 μMでのスクランブル対照PPMO (図14B)または10 μMでのacpp PPMO (図14C)を有する新鮮なプレートに移した。プレートをさらに48時間インキュベートし、バイオフィルム形成を、クリスタルバイオレットによって、および共焦点顕微鏡によっての両方で測定した。蛍光赤色を発現しているJ2315株によって測定されるように、acpp PPMOは、共焦点顕微鏡およびクリスタルバイオレット測定の両方によって存在するバイオフィルムの量を有意に低減させた(図14C)。現存するバイオフィルムを崩壊させるPPMO (必須の遺伝子標的に対して設計)の能力は、新規および決定的に重要な知見である。

## 【0212】

## (実施例9)

PPMOのエアゾール送達は、肺感染モデルにおいてB. multivoransの負荷量を低減させる

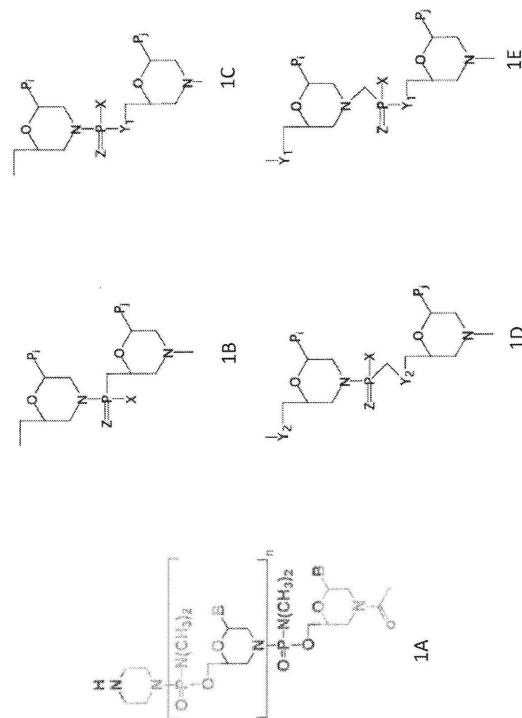
慢性肺感染症の状況における肺への直接のPPMOの送達は有用である。慢性肉芽腫症(CGD)マウスを、Bcc感染モデルとして使用した。これらのマウスは、様々なBcc株に感染したとき、有意な罹患率と死亡率が生じる。マウスに、臨床B. multivorans分離株を鼻腔内で感染させた(図15)。Aerogenネブライザーを使用して、スクランブル(Scr)PPMO (300 μg)またはacpp PPMO (PPMO #15、300 μgもしくは30 μg)のいずれかを感染の6時間後の1回の用量として送達した。acpp PPMOを標的化するPPMOは、下記の配列: G T C C A T T A C C C (配列番号25)を有する。PPMOを、その5'末端において(RFF)<sub>3</sub>RXB (配列番号41)のC末端-アラニン残基にコンジュゲートさせた。感染の24時間後にマウスを安樂死させ、肺負荷量を決定した。単一の300 μg用量のacpp PPMOは、肺負荷量を93%低減させ、これは統計的に有意な減少であった。PPMOのエアゾール送達は実行可能な治療戦略であり、重要なことに、これはBcc PPMOの噴霧送達が試みられた最初のものである。

10

20

30

### 【 図 1 - 1 】



【 図 1 - 2 】

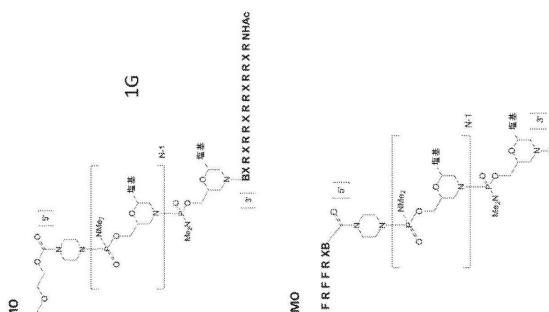
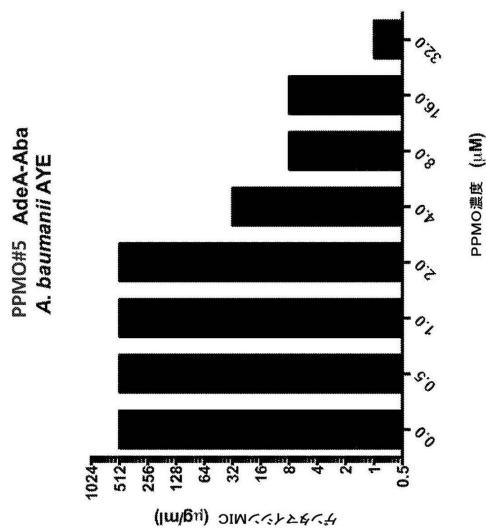


FIG. 1



【図2】



### 【図3】

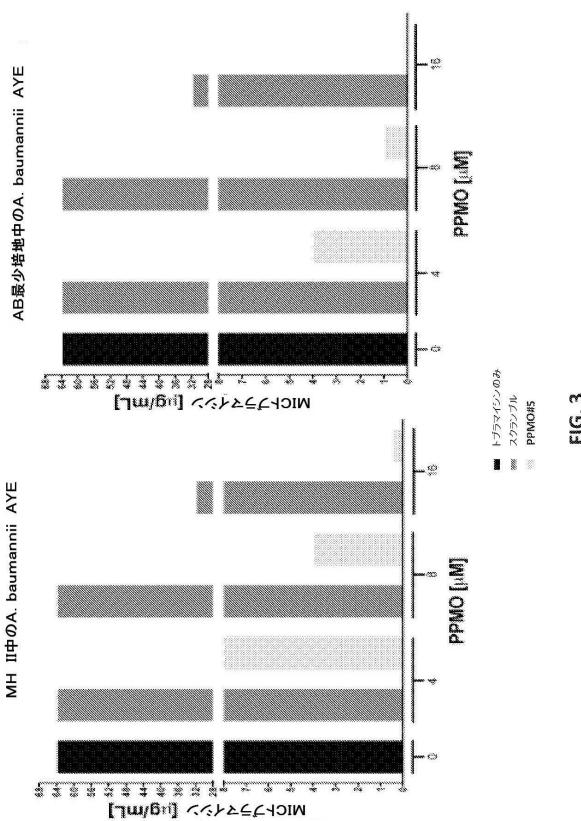


FIG. 2

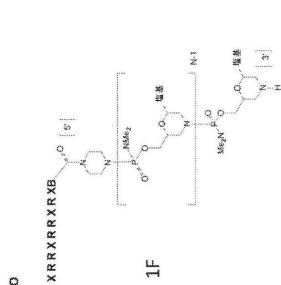
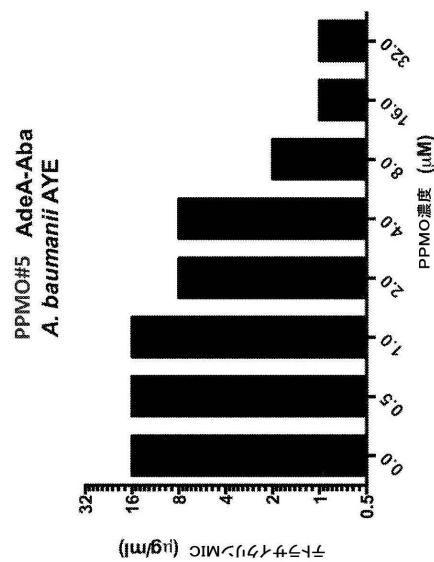


FIG. 1

【 四 4 】



## 【図5A】

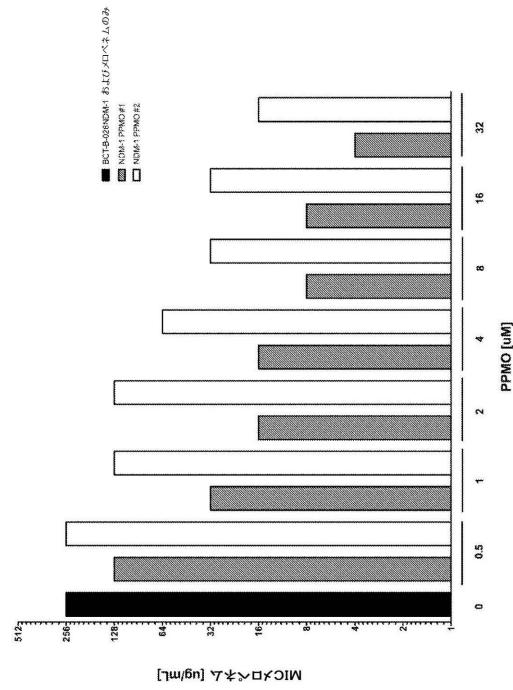
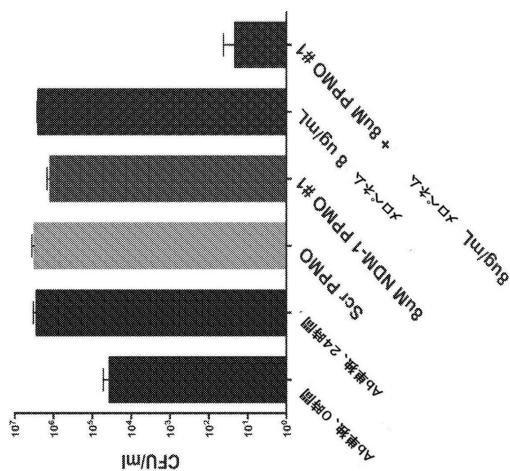


FIG. 4

A. baumannii BCT-B-026NDM-1

【図 5 B】



【 四 6 】

FIG. 5B *E. coli* BCT-B-036 (NDM-1)

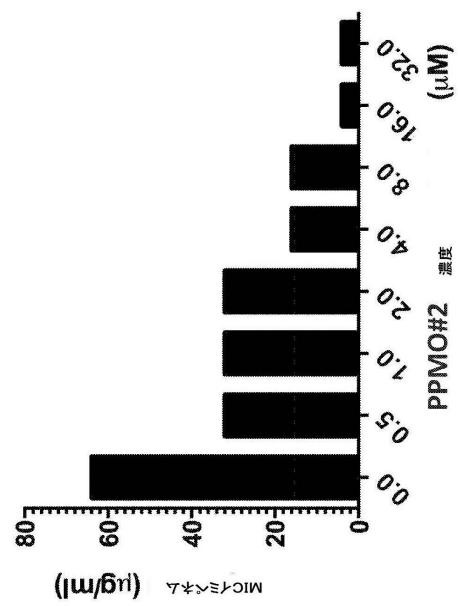


FIG. 5B

FIG. 6

【図 7 A】

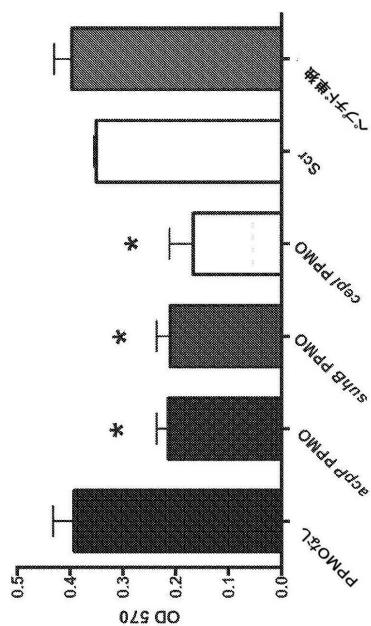


FIG. 7A

【図 7 B】

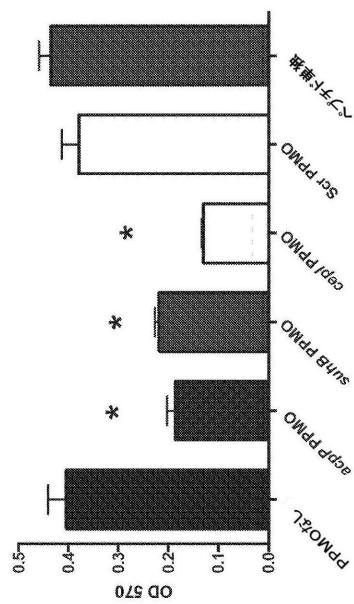


FIG. 7B

【図 8 A】

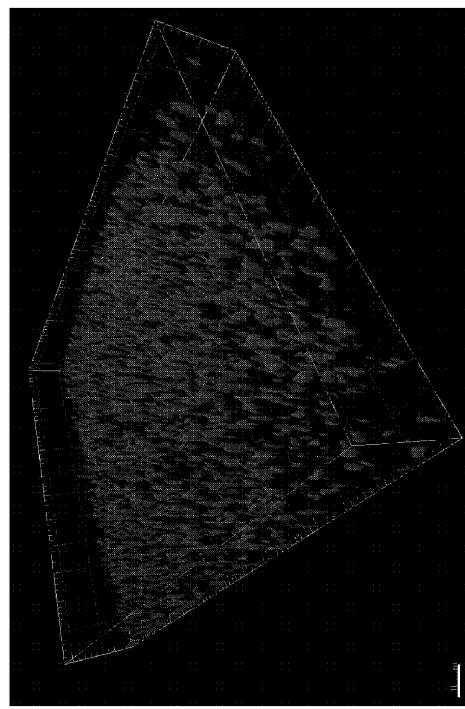


FIG. 8A

【図 8 B】

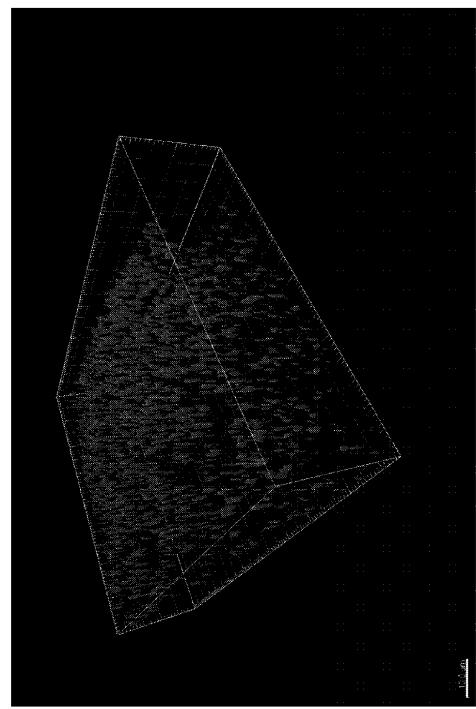


FIG. 8B

【図 8 C】

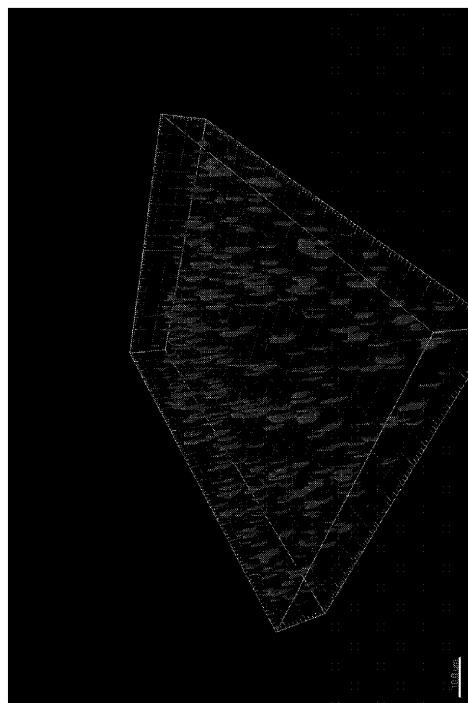
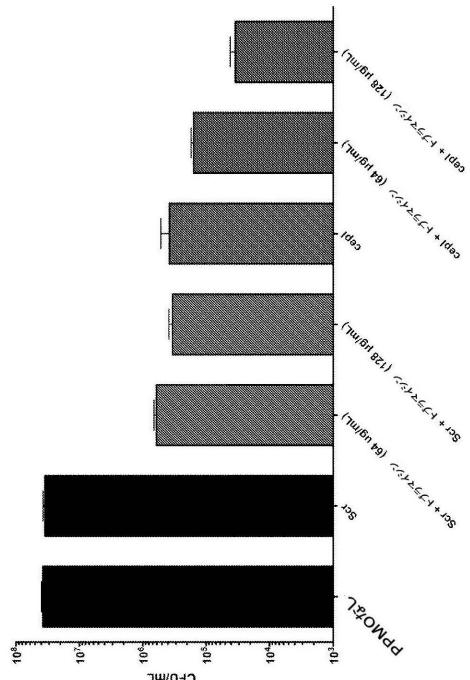


FIG. 8C

【図9】



୬  
୮  
୯

【 図 1 0 】

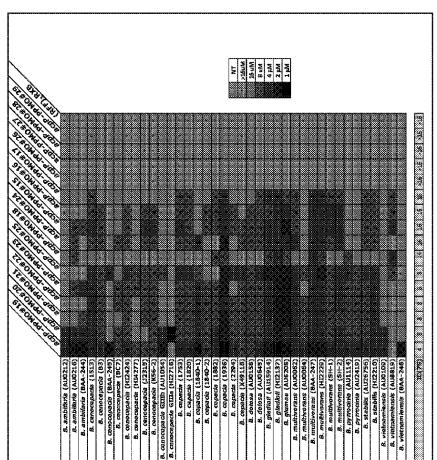
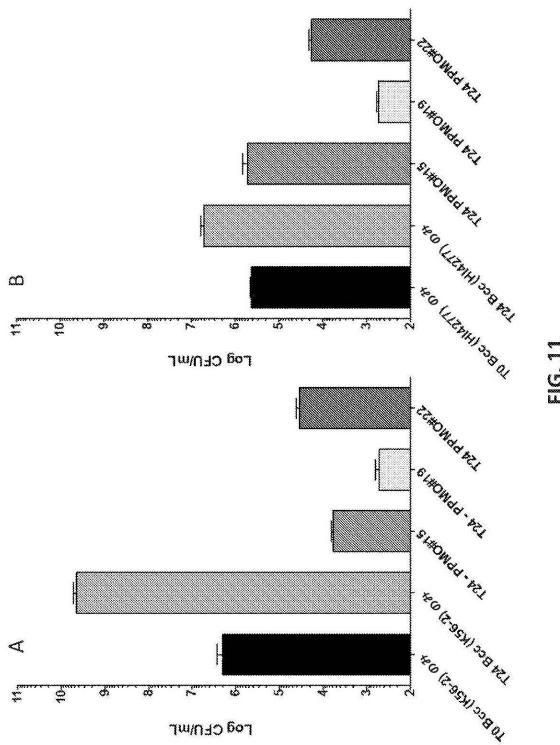


FIG. 10

【 図 1 1 】



11

【図 1 2】

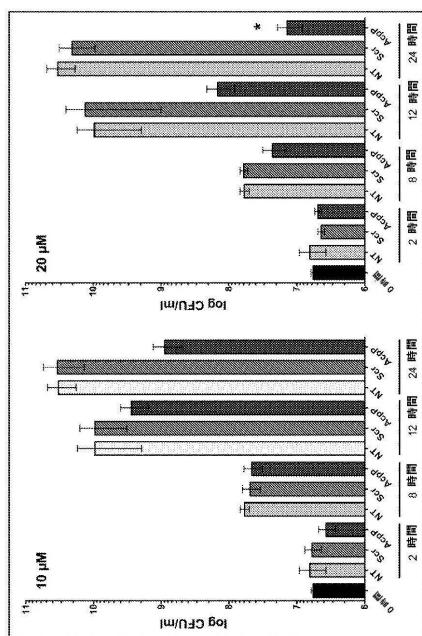


FIG. 12

【図 1 3】

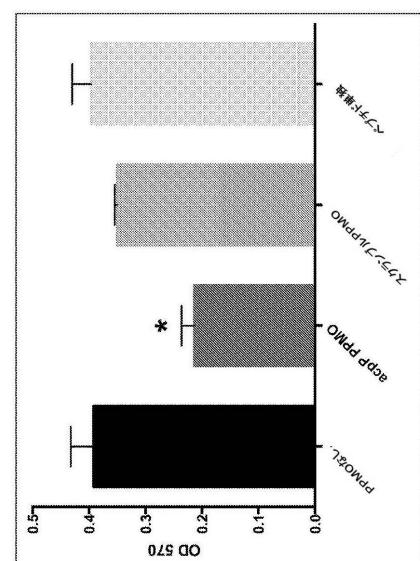


FIG. 13

【図 1 4 A】

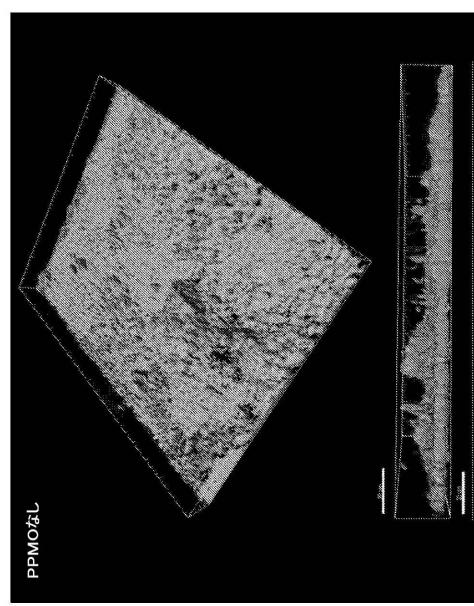


FIG. 14A

【図 1 4 B】

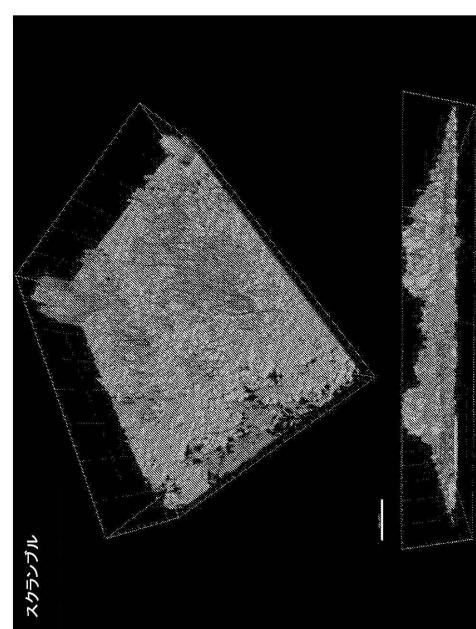


FIG. 14B

【図 14C】

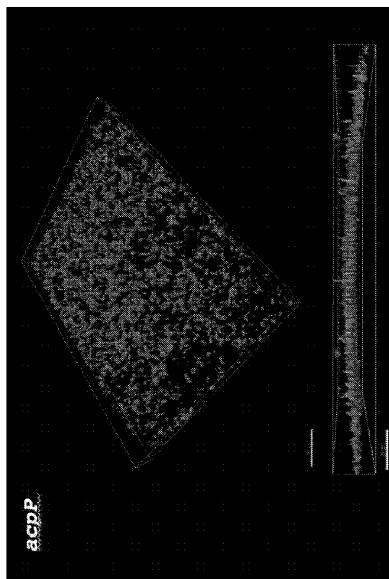


FIG. 14C

【図 15】

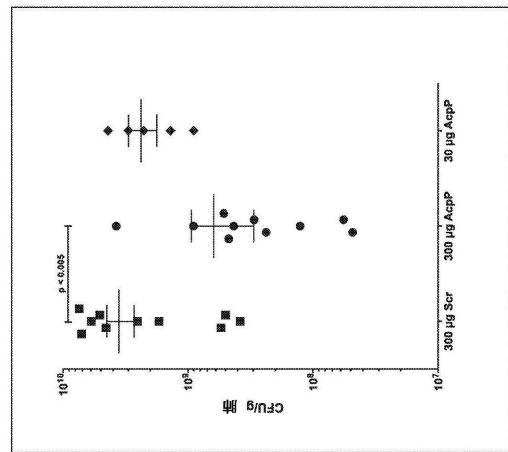


Fig. 15

【配列表】

0006901966000001.app

---

フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 62/129,746  
(32)優先日 平成27年3月6日(2015.3.6)  
(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

前置審査

(73)特許権者 500039463

ボード オブ リージェンツ,ザ ユニバーシティ オブ テキサス システム  
BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM  
アメリカ合衆国 78701 テキサス州,オースティン,ウェスト 7番 ストリート 210  
210 West 7th Street Austin, Texas 78701 U.S.A

.

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 ゲラー, ブルース エル.

アメリカ合衆国 オレゴン 97330, コーバリス, エヌ.ダブリュー. コンコード ド  
ライブ 6994

(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 75019, コッペル, ピーカン ホロー ドライブ 408

審査官 星 功介

(56)参考文献 國際公開第2008/008113 (WO, A1)

The Journal of Infectious Diseases, 2010, Vol.201, No.12, pp.1822-1830

YONG et al., Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009, vol.53, No.12, p.5046-5054

HUBER et al., Microbiology, 2001, Vol.147, p.2517-2528

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 12 N 15/00 - 15/90

A 61 K 31/00 - 31/80

JST Plus / JMED Plus / JST7580 (JDreamIII)

Cplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS / WPIDS (STN)