(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2012-522013
(P2012-522013A)
(43)公表日　平成24年9月20日(2012.9.20)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C07D 231/12	(2006.01)	C07D	231/12	B	4B024
C12Q 1/02	(2006.01)	C12Q	1/02		4B063
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	A	4C033
A61P 31/14	(2006.01)	A61P	31/14		4C055
A61P 43/00	(2006.01)	A61P	43/00	111	4C084

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 78 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2012-502307 (P2012-502307)
(86)(22)出願日　平成22年3月26日 (2010.3.26)
(85)翻訳文提出日　平成23年10月21日 (2011.10.21)
(86)国際出願番号　PCT/US2010/028917
(87)国際公開番号　WO2010/111653
(87)国際公開日　平成22年9月30日 (2010.9.30)
(31)優先権主張番号　61/164,167
(32)優先日　平成21年3月27日 (2009.3.27)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　504168260
ザ　ユーエービー　リサーチ　ファウンデーション
アメリカ合衆国　アラバマ　３５２９４－０１１１，　バーミンハム，　サード　アヴェニュー　サウス　１５３０，　エービー７７０

(71)出願人　511232673
ディスカバリーバイオメッド，　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　アラバマ　３５２０３，　バーミンハム，　ファースト　アベニュー　エヌ．　１５００，　スイート　エル１４０

最終頁に続く

(54)【発明の名称】調節ＩＲＥＳ媒介翻訳

(57)【要約】
ＩＲＥＳ含有ＲＮＡ分子を含むウイルスによって媒介されたウイルス感染、またはＲＮＡ分子のＩＲＥＳ媒介翻訳の増加もしくは減少に関連する癌を予防または処置する際に使用するための化合物および方法が本明細書に提供される。また、ＩＲＥＳ媒介翻訳を阻害または促進する方法も提供される。また、ＩＲＥＳ媒介翻訳を阻害する薬剤をスクリーニングする方法も提供される。被検体における癌を処置または予防する方法もまた提供される。

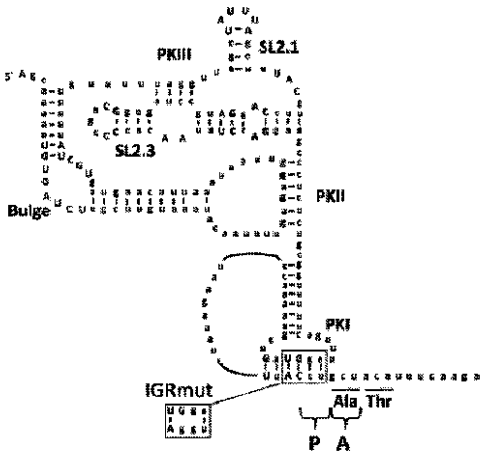
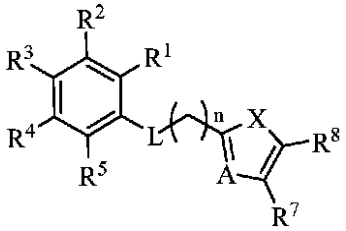


Figure 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
以下の化学式の化合物
【化３】



またはそのプロドラックの医薬的に許容可能な塩であって、
Ａは、ＣＲ^{9}またはＮであり、
Ｌは、－Ｏ－ＣＲ^{10}Ｒ^{11}Ｃ（Ｏ）－ＮＲ^{6}－、－ＮＲ^{12}－ＮＲ^{6}－、Ｃ（Ｏ）－ＮＲ^{6}－、－ＳＯ$_{2}$－ＮＲ^{6}－、－ＣＨ$_{2}$－ＮＲ^{6}－、－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－ＮＲ^{6}－、または置換もしくは非置換ヘテロアリールであり、
ｎは、０、１、または２であり、
Ｘは、－ＣＲ^{13}＝ＣＲ^{14}－、－Ｎ＝ＣＲ^{15}－、－ＣＲ^{15}＝Ｎ－、ＮＲ^{16}、Ｏ、またはＳであり、
Ｒ^{1}、Ｒ^{2}、Ｒ^{3}、Ｒ^{4}、Ｒ^{5}、Ｒ^{7}、Ｒ^{8}、Ｒ^{9}、Ｒ^{10}、Ｒ^{11}、Ｒ^{13}、Ｒ^{14}、およびＲ^{15}の各々は、水素、ハロゲン、ヒドロキシル、トリフルオロメチル、置換もしくは非置換チオ、置換もしくは非置換アルコキシル、置換もしくは非置換アリールオキシル、置換もしくは非置換アミノ、置換もしくは非置換Ｃ$_{1-12}$アルキル、置換もしくは非置換Ｃ$_{2-12}$アルケニル、置換もしくは非置換Ｃ$_{2-12}$アルキニル、置換もしくは非置換Ｃ$_{1-12}$ヘテロアルキル、置換もしくは非置換Ｃ$_{2-12}$ヘテロアルケニル、置換もしくは非置換Ｃ$_{2-12}$ヘテロアルキニル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールから独立して選択され、
Ｒ^{6}、Ｒ^{12}、およびＲ^{16}の各々は、水素、置換もしくは非置換Ｃ$_{1-12}$アルキル、置換もしくは非置換Ｃ$_{2-12}$アルケニル、置換もしくは非置換Ｃ$_{2-12}$アルキニル、置換もしくは非置換Ｃ$_{1-12}$ヘテロアルキル、置換もしくは非置換Ｃ$_{2-12}$ヘテロアルケニル、置換もしくは非置換Ｃ$_{2-12}$ヘテロアルキニル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換カルボニルから独立して選択される、
化合物。
【請求項２】
Ｒ^{1}およびＲ^{2}は、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルケニル、置換もしくは非置換シクロアルキニル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルケニル、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキニルを形成するように組み合わせられる、請求項１に記載の化合物。
【請求項３】
Ｒ^{2}およびＲ^{3}は、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルケニル、置換もしくは非置換シクロアルキニル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルケニル、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキニルを形成するように組み合わせられる、請求項１に記載の化合物。
【請求項４】
Ｒ^{3}およびＲ^{4}は、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール

、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルケニル、置換もしくは非置換シクロアルキニル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルケニル、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキニルを形成するように組み合わせられる、請求項１に記載の化合物。

【請求項５】

R^5およびR^6は、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルケニル、置換もしくは非置換シクロアルキニル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルケニル、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキニルを形成するように組み合わせられる、請求項１に記載の化合物。

【請求項６】

Ａは、ＣＨまたはＮである、請求項１に記載の化合物。

【請求項７】

Ｌは、置換または非置換ピラゾールである、請求項１に記載の化合物。

【請求項８】

R^3は、エトキシ、ジメチルアミノ、またはクロロである、請求項１に記載の化合物。

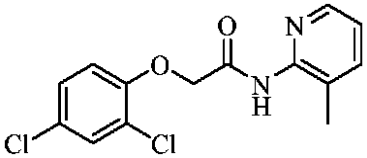
【請求項９】

Ｘは、Ｓまたは－ＣＨ＝ＣＨ－である、請求項１に記載の化合物。

【請求項１０】

前記化合物は、

【化４】

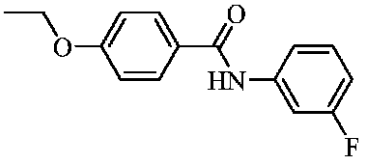


である、請求項１に記載の化合物。

【請求項１１】

前記化合物は、

【化５】

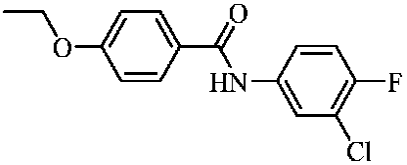


である、請求項１に記載の化合物。

【請求項１２】

前記化合物は、

【化６】

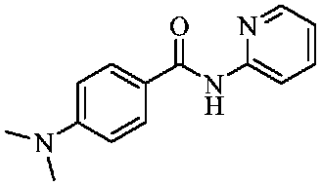


である、請求項１に記載の化合物。

【請求項１３】

前記化合物は、

【化７】

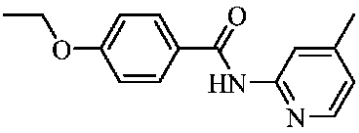


である、請求項１に記載の化合物。

【請求項１４】

前記化合物は、

【化８】

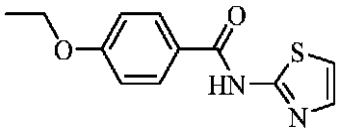


である、請求項１に記載の化合物。

【請求項１５】

前記化合物は、

【化９】

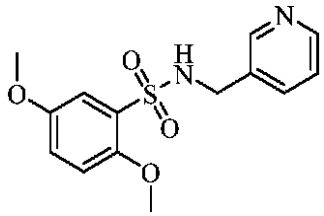


である、請求項１に記載の化合物。

【請求項１６】

前記化合物は、

【化１０】

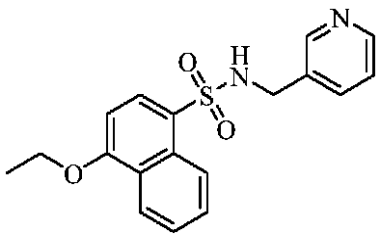


である、請求項１に記載の化合物。

【請求項１７】

前記化合物は、

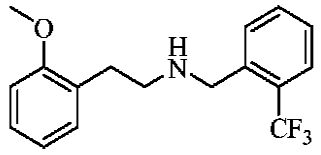
【化１１】



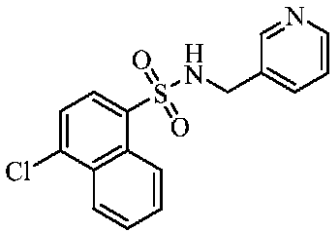
である、請求項１に記載の化合物。

【請求項１８】

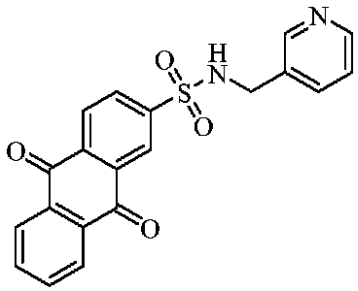
前記化合物は、
【化１２】



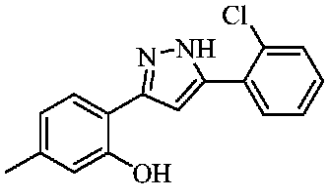
である、請求項１に記載の化合物。
【請求項１９】
前記化合物は、
【化１３】



である、請求項１に記載の化合物。
【請求項２０】
前記化合物は、
【化１４】

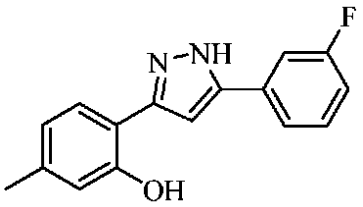


である、請求項１に記載の化合物。
【請求項２１】
前記化合物は、
【化１５】



である、請求項１に記載の化合物。
【請求項２２】
前記化合物は、

【化１６】



である、請求項１に記載の化合物。

【請求項２３】

被検体におけるウイルス感染を処置または予防する方法であって、

（ａ）ウイルス感染を患うまたはウイルス感染を発症する危険性がある被検体を識別することであって、前記ウイルス感染は、ＩＲＥＳ含有ＲＮＡ分子を含むウイルスによって媒介されることと、

（ｂ）請求項１～２２に記載の化合物のいずれかの治療的に有効な量を、前記被検体に投与することと、

を含む、方法。

【請求項２４】

前記化合物は、対照と比較して、前記被検体におけるリボソームタンパク質Ｓ２５（Ｒｐｓ２５）発現または機能を低下させる、請求項２３に記載の方法。

【請求項２５】

対照と比較して、前記被検体におけるリボソームタンパク質Ｓ２５（Ｒｐｓ２５）発現または機能を低下させる治療的に有効な量の薬剤を、前記被検体に投与することをさらに含む、請求項２３に記載の方法。

【請求項２６】

薬剤は、小分子、ポリペプチド、核酸分子、ペプチド模倣薬、またはそれらの組み合わせから成る群から選択される、請求項２５に記載の方法。

【請求項２７】

前記薬剤は、核酸分子である、請求項２６に記載の方法。

【請求項２８】

前記核酸分子は、アンチセンス分子、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）分子、ミクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）分子、ＲＮＡアプタマー、またはそれらの組み合わせから成る群から選択される、請求項２７に記載の方法。

【請求項２９】

前記核酸分子は、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）分子である、請求項２８に記載の方法。

【請求項３０】

前記ｓｉＲＮＡ分子は、配列番号５を含む、請求項２９に記載の方法。

【請求項３１】

前記ウイルスは、ピコルナウイルス科内のウイルス、ジシストロウイルス科内のウイルス、フラビウイルス科内のウイルス、ヘルペスウイルス科内のウイルス、レトロウイルス科内のウイルス、およびポックスウイルス科内のウイルスから成る群から選択される、請求項２３に記載の方法。

【請求項３２】

前記ウイルスは、ジシストロウイルス科内のウイルスを含む、請求項３１に記載の方法。

【請求項３３】

前記ウイルスは、コオロギ麻痺ウイルス、タウラ症候群ウイルス、およびイスラエル急性麻痺ウイルスから成る群から選択される、請求項３２に記載の方法。

【請求項３４】

前記ウイルスは、フラビウイルス科内のウイルスを含む、請求項３１に記載の方法。
【請求項３５】
前記ウイルスは、Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）である、請求項３４に記載の方法。
【請求項３６】
被検体におけるウイルス感染を処置または予防する方法であって、
（ａ）ウイルス感染を患うまたはウイルス感染を発症する危険性がある被検体を識別することであって、前記ウイルス感染は、ＩＲＥＳ含有ＲＮＡ分子を含むウイルスによって媒介されることと、
（ｂ）前記被検体に有効量の治療薬剤を投与することであって、前記薬剤は、対照と比較して、前記被検体におけるリボソームタンパク質Ｓ２５（Ｒｐｓ２５）発現または機能を低下させることと、
を含む、方法。
【請求項３７】
前記ウイルスは、ピコルナウイルス科のウイルス、ジシストロウイルス科のウイルス、フラビウイルス科のウイルス、ヘルペスウイルス科のウイルス、レトロウイルス科のウイルス、ポックスウイルス科のウイルスから成る群から選択される、請求項３６に記載の方法。
【請求項３８】
前記ウイルスは、ジシストロウイルス科内のウイルスである、請求項３７に記載の方法。
【請求項３９】
前記ウイルスは、コオロギ麻痺ウイルス、タウラ症候群ウイルス、およびイスラエル急性麻痺ウイルスから成る群から選択される、請求項３８に記載の方法。
【請求項４０】
前記ウイルスは、フラビウイルス科内のウイルスを含む、請求項３７に記載の方法。
【請求項４１】
前記ウイルスは、Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）である、請求項４０に記載の方法。
【請求項４２】
薬剤は、小分子、ポリペプチド、核酸分子、ペプチド模倣薬、またはそれらの組み合わせから成る群から選択される、請求項３６に記載の方法。
【請求項４３】
前記薬剤は、核酸分子である、請求項４２に記載の方法。
【請求項４４】
前記核酸分子は、アンチセンス分子、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）分子、ミクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）分子、ＲＮＡアプタマー、またはそれらの組み合わせから成る群から選択される、請求項４３に記載の方法。
【請求項４５】
前記核酸分子は、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）分子である、請求項４４に記載の方法。
【請求項４６】
前記ｓｉＲＮＡ分子は、配列番号５を含む、請求項４５に記載の方法。
【請求項４７】
内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）媒介翻訳を阻害する方法であって、
（ａ）細胞を提供することであって、前記細胞は、ＩＲＥＳ含有ＲＮＡ分子を含むことと、
（ｂ）リボソームタンパク質Ｓ２５（Ｒｐｓ２５）発現または機能を低下させる薬剤と前記細胞を接触させることであって、対照と比較するＲｐｓ２５発現または機能の低下は、前記薬剤がＩＲＥＳ媒介翻訳を阻害することを示すことと、
を含む、方法。
【請求項４８】

対照と比較して、前記ＩＲＥＳ含有ＲＮＡ分子により発現されたタンパク質のレベル低下を検出することによって、ＩＲＥＳ媒介翻訳が阻害されることを判断することをさらに含む、請求項４７に記載の方法。

【請求項４９】

前記Ｒｐｓ２５の機能は、Ｒｐｓ２５の前記ＩＲＥＳに対する結合を阻止することによって低下する、請求項４７に記載の方法。

【請求項５０】

前記Ｒｐｓ２５の機能は、Ｒｐｓ２５の前記リボソームに対する結合を阻止することによって低下する、請求項４７に記載の方法。

【請求項５１】

Ｒｐｓ２５の発現は、Ｒｐｓ２５　ＲＮＡまたはタンパク質発現のレベルを減少させることによって低下する、請求項４７に記載の方法。

【請求項５２】

前記薬剤は、小分子、ポリペプチド、核酸分子、ペプチド模倣薬、またはそれらの組み合わせから成る群から選択される、請求項４７に記載の方法。

【請求項５３】

前記薬剤は、核酸分子である、請求項５２に記載の方法。

【請求項５４】

前記核酸分子は、アンチセンス分子、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）分子、ミクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）分子、ＲＮＡアプタマー、またはそれらの組み合わせから成る群から選択される、請求項５３に記載の方法。

【請求項５５】

前記核酸分子は、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）分子である、請求項５４に記載の方法。

【請求項５６】

前記ｓｉＲＮＡ分子は、配列番号５を含む、請求項５５に記載の方法。

【請求項５７】

前記ＩＲＥＳ含有ｍＲＮＡは、ホタルルシフェラーゼｍＲＮＡ、ＶＥＧＦ　ｍＲＮＡ、ＭＮＴ　ｍＲＮＡ、Ｓｅｔ７　ｍＲＮＡ、Ｌ－ｍｙｃ　ｍＲＮＡ、ＭＴＧ８ａ　ｍＲＮＡ、Ｍｙｂ　ｍＲＮＡ、ＢＩＰ　ｍＲＮＡ、ｅＩＦ４Ｇ　ｍＲＮＡ、ＰＩＭ－１　ｍＲＮＡ、ＣＹＲ６１　ｍＲＮＡ、ｐ２７　ｍＲＮＡ、ＸＩＡＰ　ｍＲＮＡ、ＢＡＧ－１　ｍＲＮＡ、またはそれらの組み合わせから成る群から選択される、請求項４７に記載の方法。

【請求項５８】

前記ＩＲＥＳ含有ｍＲＮＡ分子は、ホタルルシフェラーゼｍＲＮＡである、請求項５７に記載の方法。

【請求項５９】

被検体における癌を処置または予防する方法であって、

（ａ）癌を患うまたは癌を発症する危険性がある被検体を識別することであって、前記癌は、ｍＲＮＡ分子の内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）媒介翻訳の増加に関連することと、

（ｂ）請求項１～２３に記載の化合物のいずれかの治療的に有効な量を、前記被検体に投与することと、

を含む、方法。

【請求項６０】

前記化合物は、対照と比較して、前記被検体におけるリボソームタンパク質Ｓ２５（Ｒｐｓ２５）発現または機能を低下させる、請求項５９に記載の方法。

【請求項６１】

対照と比較して、前記被検体におけるリボソームタンパク質Ｓ２５（Ｒｐｓ２５）発現または機能を低下させる治療的に有効な量の薬剤を、前記被検体に投与することをさらに含む、請求項５９に記載の方法。

【請求項６２】
薬剤は、小分子、ポリペプチド、核酸分子、ペプチド模倣薬、またはそれらの組み合わせから成る群から選択される、請求項６１に記載の方法。
【請求項６３】
前記薬剤は、核酸分子である、請求項６２に記載の方法。
【請求項６４】
前記核酸分子は、アンチセンス分子、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）分子、ミクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）分子、ＲＮＡアプタマー、またはそれらの組み合わせから成る群から選択される、請求項６３に記載の方法。
【請求項６５】
前記核酸分子は、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）分子である、請求項６４に記載の方法。
【請求項６６】
前記ｓｉＲＮＡ分子は、配列番号５を含む、請求項６５に記載の方法。
【請求項６７】
被検体における癌を処置または予防する方法であって、
（ａ）癌を患うまたは癌を発症する危険性がある被検体を識別することであって、前記癌は、細胞ｍＲＮＡの内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）媒介翻訳の増加に関連すること、
（ｂ）前記被検体に有効量の治療薬剤を投与することであって、前記薬剤は、対照と比較して、前記被検体におけるリボソームタンパク質Ｓ２５（Ｒｐｓ２５）発現または機能を低下させることと、
を含む、方法。
【請求項６８】
薬剤は、小分子、ポリペプチド、核酸分子、ペプチド模倣薬、またはそれらの組み合わせから成る群から選択される、請求項６７に記載の方法。
【請求項６９】
前記薬剤は、核酸分子である、請求項６８に記載の方法。
【請求項７０】
前記核酸分子は、アンチセンス分子、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）分子、ミクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）分子、ＲＮＡアプタマー、またはそれらの組み合わせから成る群から選択される、請求項６９に記載の方法。
【請求項７１】
前記核酸分子は、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）分子である、請求項７０に記載の方法。
【請求項７２】
前記ｓｉＲＮＡ分子は、配列番号５を含む、請求項７１に記載の方法。
【請求項７３】
被検体における癌を処置または予防する方法であって、
（ａ）癌を患うまたは癌を発症する危険性がある被検体を識別することであって、前記癌は、細胞ｍＲＮＡの内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）媒介翻訳の減少に関連することと、
（ｂ）前記被検体に有効量の治療薬剤を投与することであって、前記薬剤は、対照と比較して、前記被検体におけるリボソームタンパク質Ｓ２５（Ｒｐｓ２５）発現または機能を増加させることと、
を含む、方法。
【請求項７４】
薬剤は、小分子、ポリペプチド、核酸分子、ペプチド模倣薬、またはそれらの組み合わせから成る群から選択される、請求項７３に記載の方法。
【請求項７５】

前記薬剤は、核酸分子である、請求項７４に記載の方法。
【請求項７６】
前記核酸分子は、Ｒｐｓ２５をコード化する核酸またはその機能的断片を含む、請求項７５に記載の方法。
【請求項７７】
内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）媒介翻訳を阻害または促進する薬剤をスクリーニングする方法であって、
（ａ）リボソームタンパク質Ｓ２５（Ｒｐｓ２５）またはＲｐｓ２５をコード化する核酸およびＩＲＥＳ含有ＲＮＡ分子を含む系を提供することと、
（ｂ）前記系を、スクリーニングされる前記薬剤と接触させることと、
（ｃ）Ｒｐｓ２５発現または機能を判断することであって、Ｒｐｓ２５発現または機能のレベルの減少は、前記薬剤がＩＲＥＳ媒介翻訳を阻害することを示し、Ｒｐｓ２５発現または機能のレベルの増加は、前記薬剤がＩＲＥＳ媒介翻訳を促進することを示すことと、
を含む、方法。
【請求項７８】
前記系は、細胞を含む、請求項７７に記載の方法。
【請求項７９】
前記系は、生体外アッセイを含む、請求項７７に記載の方法。
【請求項８０】
前記被験薬剤は、小分子、ポリペプチド、核酸分子、ペプチド模倣薬、またはそれらの組み合わせから成る群から選択される、請求項７７に記載の方法。
【請求項８１】
請求項７７に記載の方法によって単離された薬剤。
【請求項８２】
ＩＲＥＳ含有細胞ＲＮＡ分子を識別する方法であって、
（ａ）細胞におけるＲｐｓ２５発現または機能を阻害することと、
（ｂ）前記細胞におけるタンパク質発現パターンを判断することと、
（ｃ）前記細胞における前記タンパク質発現パターンを対照と比較することであって、対照と比較する細胞ＲＮＡ分子のタンパク質発現の減少は、前記細胞ＲＮＡ分子がＩＲＥＳを含有することを示すことと、
を含む、方法。
【請求項８３】
内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）媒介翻訳を促進する方法であって、
（ａ）細胞を提供することであって、前記細胞は、ＩＲＥＳ含有ＲＮＡ分子を含むことと、
（ｂ）リボソームタンパク質Ｓ２５（Ｒｐｓ２５）発現または機能を増加させる薬剤と前記細胞を接触させることであって、対照と比較するＲｐｓ２５発現または機能の増加は、前記薬剤がＩＲＥＳ媒介翻訳を促進することを示すことと、
を含む、方法。
【請求項８４】
ＩＲＥＳ媒介翻訳が、対照と比較して、前記ＩＲＥＳ含有ＲＮＡ分子によりコード化されたタンパク質のレベルの増加を検出することによって促進されることを判断することをさらに含む、請求項８３に記載の方法。
【請求項８５】
内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）媒介翻訳を促進する方法であって、Ｒｐｓ２５タンパク質をコード化する核酸またはその機能的断片を細胞に提供することを含む、方法。
【請求項８６】
被検体における癌を検出する方法であって、
（ａ）被検体におけるＲｐｓ２５発現のレベルを判断することと、

（ｂ）Ｒｐｓ２５のレベルを基準と比較することと、
（ｃ）癌の存在を判断することと、
を含む、方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、その全体が本明細書に組み込まれる２００９年３月２７日に出願された米国仮出願第６１／１６４，１６７号に対する優先権を主張する。
【０００２】
連邦政府による資金提供を受けた研究開発の記載
本発明は、国立衛生研究所からの認可番号ＣＭ０８４５４７および５Ｔ３２ＨＬ００７５５３からの助成および国立癌研究所からの認可番号ＣＡ－１３１４８－３１からの助成により行われた。米国政府は、本発明において一定の権利を有する。
【背景技術】
【０００３】
メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）の大部分は、翻訳のキャップ依存的機構を使用して翻訳される。しかしながら、メッセージの５％～１０％は、規定されないキャップ非依存的機構も使用して翻訳を開始する。５’非翻訳領域に位置する内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）を含有するｍＲＮＡは、キャップ非依存的機構によって翻訳を開始することができる。
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００４】
内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）含有ＲＮＡ分子を含むウイルスによって媒介されたウイルス感染、またはｍＲＮＡ分子のＩＲＥＳ媒介翻訳の増加もしくは減少に関連する癌を予防または処置する際に使用するための化合物および方法が提供される。本方法は、内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）含有ＲＮＡ分子を含むウイルスによって媒介されたウイルス感染を患うまたはウイルス感染を発症する危険性がある被検体を識別することと、本明細書に提供する化合物のいずれかの治療的に有効な量を、被検体に投与することとを含む。本化合物は、リボソームタンパク質Ｓ２５（Ｒｐｓ２５）発現または機能を低下させ得るか、または低下させ得ない。したがって、本方法は、Ｒｐｓ２５発現または機能を低下させる治療的に有効な量の薬剤を被検体に投与することを含むか、またはさらに含む。
【０００５】
また、ＩＲＥＳ媒介翻訳を阻害する方法も提供される。具体的には、細胞を提供することであって、細胞は、ＩＲＥＳ含有ＲＮＡ分子を含むことと、細胞を薬剤と接触させることであって、薬剤は、対照と比較して、リボソームタンパク質Ｓ２５（Ｒｐｓ２５）発現または機能を低下させることとを含む方法が提供される。本方法は、対照と比較して、ＩＲＥＳ含有ＲＮＡ分子により発現されたタンパク質のレベルの低下を検出することによって、ＩＲＥＳ媒介翻訳が阻害されることを判断することをさらに含むことができる。
【０００６】
また、ＩＲＥＳ媒介翻訳を阻害する薬剤をスクリーニングする方法も提供される。具体的には、Ｒｐｓ２５またはＲｐｓ２５をコード化する核酸およびＩＲＥＳ含有ＲＮＡ分子を含む系を提供することと、系を、被験薬剤と接触させることと、Ｒｐｓ２５発現または機能を判断することとを含む方法が提供される。Ｒｐｓ２５発現または機能のレベルの減少は、薬剤がＩＲＥＳ媒介翻訳を阻害することを示す。
【０００７】
また、ＩＲＥＳ含有ＲＮＡ分子を識別する方法も提供される。本方法は、細胞におけるＲｐｓ２５発現または機能を阻害することと、細胞におけるタンパク質発現パターンを判

断することと、細胞におけるタンパク質発現パターンを対照と比較することとを含む。対照と比較するＲＮＡ分子のタンパク質発現の減少は、ＲＮＡ分子がＩＲＥＳを含有することを示す。

【０００８】

さらに、ＩＲＥＳ媒介翻訳を促進する方法が提供される。本方法は、細胞を提供することであって、細胞は、ＩＲＥＳ含有ＲＮＡ分子を含むことと、細胞を薬剤と接触させることであって、薬剤は、対照と比較して、Ｒｐｓ２５発現または活性を増加させることとを含む。本方法は、ＩＲＥＳ媒介翻訳が、対照と比較して、ＩＲＥＳ含有ＲＮＡ分子により発現されたタンパク質のレベルの増加を検出することによって促進されることを判断することをさらに含むことができる。

【図面の簡単な説明】

【０００９】

【図１】ＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳの２次構造の略図を示す。ジシトロウイルス科のＩ型　ＩＧＲ　ＩＲＥＳにおける保存ヌクレオチドは、大文字で表わされる。

【図２Ａ】出芽酵母が増殖にＲｐｓ２５を必要としないことを示す。図２Ａは、胞子形成された、ヘテロ接合ｒｐｓ２５ａΔｂΔ２倍体酵母から解剖された４分子の画像を示す。図２Ｂ（上）は、図２Ｂ（下）に示す酵母増殖プレートの画像のマップを示す。図２Ｂ（下）は、ｐＳ２５Ａレスキュープラスミドを合成培地に含むおよび含まない野生型株およびＲｐｓ２５欠失株の増殖を実証するプレートの画像を示す。プレートは、３０℃で３日間増殖された。

【図２Ｂ】出芽酵母が増殖にＲｐｓ２５を必要としないことを示す。図２Ａは、胞子形成された、ヘテロ接合ｒｐｓ２５ａΔｂΔ２倍体酵母から解剖された４分子の画像を示す。図２Ｂ（上）は、図２Ｂ（下）に示す酵母増殖プレートの画像のマップを示す。図２Ｂ（下）は、ｐＳ２５Ａレスキュープラスミドを合成培地に含むおよび含まない野生型株およびＲｐｓ２５欠失株の増殖を実証するプレートの画像を示す。プレートは、３０℃で３日間増殖された。

【図３Ａ】ＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳが生体内での翻訳開始にＲｐｓ２５を必要とすることを示す。図３Ａは、ΔＡＵＧジシストロン性ルシフェラーゼレポーターの図を示す。ジシストロン性レポーターの転写は、ＰＧＫ１プロモーターの制御下にある。ウミシイタケルシフェラーゼは、キャップ依存的機構によって翻訳され、ホタル発現は、機能的ＩＧＲ　ＩＲＥＳに依存する。ホタルルシフェラーゼコード領域の第１のＡＵＧを欠失させて、ホタルルシフェラーゼ活性が、開始のためにＡＵＧ開始コドンを必要としない機能的ＩＧＲ　ＩＲＥＳに単に依存しているかを確認する。図３Ｂは、野生型（灰色棒）またはＩＧＲｍｕｔ（白色棒）ＩＧＲ　ＩＲＥＳを有するジシストロン性レポーターで形質転換されたｐＳ２５Ａレスキュープラスミドを含むおよび含まない野生型およびＲｐｓ２５欠失株のＩＲＥＳ活性を表わすヒストグラムを示す。ホタルルシフェラーゼ値を、内部対照として、ウミシイタケルシフェラーゼ値に正規化し、１００％に任意に設定された野生型酵母におけるＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳによる活性の割合として表現される。データ値を酵母株毎に与え、ｎ＝３の標準誤差が示される。図３Ｃは、図３Ｂのウミシイタケルシフェラーゼ値およびホタルルシフェラーゼ値を示し、ｎ＝３の標準誤差が示される。

【図３Ｂ】ＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳが生体内での翻訳開始にＲｐｓ２５を必要とすることを示す。図３Ａは、ΔＡＵＧジシストロン性ルシフェラーゼレポーターの図を示す。ジシストロン性レポーターの転写は、ＰＧＫ１プロモーターの制御下にある。ウミシイタケルシフェラーゼは、キャップ依存的機構によって翻訳され、ホタル発現は、機能的ＩＧＲ　ＩＲＥＳに依存する。ホタルルシフェラーゼコード領域の第１のＡＵＧを欠失させて、ホタルルシフェラーゼ活性が、開始のためにＡＵＧ開始コドンを必要としない機能的ＩＧＲ　ＩＲＥＳに単に依存しているかを確認する。図３Ｂは、野生型（灰色棒）またはＩＧＲｍｕｔ（白色棒）ＩＧＲ　ＩＲＥＳを有するジシストロン性レポーターで形質転換されたｐＳ２５Ａレスキュープラスミドを含むおよび含まない野生型およびＲｐｓ２５欠失株のＩＲＥＳ活性を表わすヒストグラムを示す。ホタルルシフェラーゼ値を、内部対照と

して、ウミシイタケルシフェラーゼ値に正規化し、１００％に任意に設定された野生型酵母におけるＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳによる活性の割合として表現される。データ値を酵母株毎に与え、ｎ＝３の標準誤差が示される。図３Ｃは、図３Ｂのウミシイタケルシフェラーゼ値およびホタルルシフェラーゼ値を示し、ｎ＝３の標準誤差が示される。

【図３Ｃ】ＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳが生体内での翻訳開始にＲｐｓ２５を必要とすることを示す。図３Ａは、ΔＡＵＧジシストロン性ルシフェラーゼレポーターの図を示す。ジシストロン性レポーターの転写は、ＰＧＫ１プロモーターの制御下にある。ウミシイタケルシフェラーゼは、キャップ依存的機構によって翻訳され、ホタル発現は、機能的ＩＧＲ　ＩＲＥＳに依存する。ホタルルシフェラーゼコード領域の第１のＡＵＧを欠失させて、ホタルルシフェラーゼ活性が、開始のためにＡＵＧ開始コドンを必要としない機能的ＩＧＲ　ＩＲＥＳに単に依存しているかを確認する。図３Ｂは、野生型（灰色棒）またはＩＧＲｍｕｔ（白色棒）ＩＧＲ　ＩＲＥＳを有するジシストロン性レポーターで形質転換されたｐＳ２５Ａレスキュープラスミドを含むおよび含まない野生型およびＲｐｓ２５欠失株のＩＲＥＳ活性を表わすヒストグラムを示す。ホタルルシフェラーゼ値を、内部対照として、ウミシイタケルシフェラーゼ値に正規化し、１００％に任意に設定された野生型酵母におけるＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳによる活性の割合として表現される。データ値を酵母株毎に与え、ｎ＝３の標準誤差が示される。図３Ｃは、図３Ｂのウミシイタケルシフェラーゼ値およびホタルルシフェラーゼ値を示し、ｎ＝３の標準誤差が示される。

【図４】ＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳが、Ｒｐｓ２５を欠く４０Ｓリボソームサブユニットに結合することができないことを示す。野生型（上）と、ｐＳ２５Ａレスキュープラスミドを含む（下）および含まない（中）のｒｐｓ２５ａΔｂΔ酵母株からの４０Ｓリボソームサブユニットの増加濃度を、放射性標識野生型ＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳ　ＲＮＡで培養した。アスタリスクは、汚染６０Ｓサブユニット（右）からの８０Ｓ複合体を示す。解離定数（K_d）は、フィルタ結合アッセイによって独立して判断された。ｎ＝３の標準誤差が示される。

【図５Ａ】Ｒｐｓ２５の欠失が、グローバル翻訳にわずかな影響しか及ぼさないことを示す。図５Ａは、野生型、ｒｐｓ２５ａΔ、ｒｐｓ２５ｂΔ、およびｒｐｓ２５ａΔｂΔ欠失株のポリソーム分析を示す。ポリソーム対モノソーム比（Ｐ／Ｍ）が示される。図５Ｂは、野生型株およびｒｐｓ２５ａΔｂΔ株について^{35}Ｓ－メチオニン混入により判断されたタンパク質合成速度のヒストグラムを示す。図５Ｃは、［５，６－^{3}Ｈ］ウラシルによるパルスチェイス標識化を介して視覚化された、野生型株およびｒｐｓ２５ａΔｂΔ株についてｒＲＮＡ生合成を実証するゲルの画像を示す。図５Ｄ（上）は、リードスルーデュアルルシフェラーゼレポーターの図を示す。野生型、ｒｐｓ２５ａΔｂΔ、および図５Ｄ（下）に示すように、テトラヌクレオチド終止コドンを含むレポーターを有するｐＳ２５Ａ株を含むｒｐｓ２５ａΔｂΔについて、リードスルー効率を測定した。野生型株とｒｐｓ２５ａΔｂΔ株との間の倍率変化は、各テトラヌクレオチドの下に示す。ｎ＝４の標準誤差が示される。図５Ｅ（上）は、プログラムされたリボソームフレームシフトレポーターの図を示す。図５Ｅ（下）において、野生型、ｒｐｓ２５ａΔｂΔ、またはｐＳ２５Ａプラスミドを含むｒｐｓ２５ａΔｂΔの株について、レポーター毎のフレームシフト効率について試験した。ｎ＝３の標準誤差が示される。図５Ｆは、図５Ｆ（下）において、野生型株、ｒｐｓ２５ａΔｂΔ株、またはレスキュープラスミド（ｐＳ２５Ａ）を含むｒｐｓ２５ａΔｂΔ株のミスコードを示す。図５Ｆ（上）に示すホタルＯＲＦにおいて突然変異を含むデュアルルシフェラーゼレポーターを使用して、ミスコードについて測定した。ミスコードの割合を、グラフの各棒の上に示し、ｎ＝４の標準誤差が示される。

【図５Ｂ】Ｒｐｓ２５の欠失が、グローバル翻訳にわずかな影響しか及ぼさないことを示す。図５Ａは、野生型、ｒｐｓ２５ａΔ、ｒｐｓ２５ｂΔ、およびｒｐｓ２５ａΔｂΔ欠失株のポリソーム分析を示す。ポリソーム対モノソーム比（Ｐ／Ｍ）が示される。図５Ｂは、野生型株およびｒｐｓ２５ａΔｂΔ株について^{35}Ｓ－メチオニン混入により判断されたタンパク質合成速度のヒストグラムを示す。図５Ｃは、［５，６－^{3}Ｈ］ウラシルによるパルスチェイス標識化を介して視覚化された、野生型株およびｒｐｓ２５ａΔｂΔ株

についてｒＲＮＡ生合成を実証するゲルの画像を示す。図５Ｄ（上）は、リードスルーデュアルルシフェラーゼレポーターの図を示す。野生型、ｒｐｓ２５ａΔｂΔ、および図５Ｄ（下）に示すように、テトラヌクレオチド終止コドンを含むレポーターを有するｐＳ２５Ａ株を含むｒｐｓ２５ａΔｂΔについて、リードスルー効率を測定した。野生型株とｒｐｓ２５ａΔｂΔ株との間の倍率変化は、各テトラヌクレオチドの下に示す。ｎ＝４の標準誤差が示される。図５Ｅ（上）は、プログラムされたリボソームフレームシフトレポーターの図を示す。図５Ｅ（下）において、野生型、ｒｐｓ２５ａΔｂΔ、またはｐＳ２５Ａプラスミドを含むｒｐｓ２５ａΔｂΔの株について、レポーター毎のフレームシフト効率について試験した。ｎ＝３の標準誤差が示される。図５Ｆは、図５Ｆ（下）において、野生型株、ｒｐｓ２５ａΔｂΔ株、またはレスキュープラスミド（ｐＳ２５Ａ）を含むｒｐｓ２５ａΔｂΔ株のミスコードを示す。図５Ｆ（上）に示すホタルＯＲＦにおいて突然変異を含むデュアルルシフェラーゼレポーターを使用して、ミスコードについて測定した。ミスコードの割合を、グラフの各棒の上に示し、ｎ＝４の標準誤差が示される。

【図５Ｃ】Ｒｐｓ２５の欠失が、グローバル翻訳にわずかな影響しか及ぼさないことを示す。図５Ａは、野生型、ｒｐｓ２５ａΔ、ｒｐｓ２５ｂΔ、およびｒｐｓ２５ａΔｂΔ欠失株のポリソーム分析を示す。ポリソーム対モノソーム比（Ｐ／Ｍ）が示される。図５Ｂは、野生型株およびｒｐｓ２５ａΔｂΔ株について^{35}Ｓ－メチオニン混入により判断されたタンパク質合成速度のヒストグラムを示す。図５Ｃは、［５，６－^{3}Ｈ］ウラシルによるパルスチェイス標識化を介して視覚化された、野生型株およびｒｐｓ２５ａΔｂΔ株についてｒＲＮＡ生合成を実証するゲルの画像を示す。図５Ｄ（上）は、リードスルーデュアルルシフェラーゼレポーターの図を示す。野生型、ｒｐｓ２５ａΔｂΔ、および図５Ｄ（下）に示すように、テトラヌクレオチド終止コドンを含むレポーターを有するｐＳ２５Ａ株を含むｒｐｓ２５ａΔｂΔについて、リードスルー効率を測定した。野生型株とｒｐｓ２５ａΔｂΔ株との間の倍率変化は、各テトラヌクレオチドの下に示す。ｎ＝４の標準誤差が示される。図５Ｅ（上）は、プログラムされたリボソームフレームシフトレポーターの図を示す。図５Ｅ（下）において、野生型、ｒｐｓ２５ａΔｂΔ、またはｐＳ２５Ａプラスミドを含むｒｐｓ２５ａΔｂΔの株について、レポーター毎のフレームシフト効率について試験した。ｎ＝３の標準誤差が示される。図５Ｆは、図５Ｆ（下）において、野生型株、ｒｐｓ２５ａΔｂΔ株、またはレスキュープラスミド（ｐＳ２５Ａ）を含むｒｐｓ２５ａΔｂΔ株のミスコードを示す。図５Ｆ（上）に示すホタルＯＲＦにおいて突然変異を含むデュアルルシフェラーゼレポーターを使用して、ミスコードについて測定した。ミスコードの割合を、グラフの各棒の上に示し、ｎ＝４の標準誤差が示される。

【図５Ｄ】Ｒｐｓ２５の欠失が、グローバル翻訳にわずかな影響しか及ぼさないことを示す。図５Ａは、野生型、ｒｐｓ２５ａΔ、ｒｐｓ２５ｂΔ、およびｒｐｓ２５ａΔｂΔ欠失株のポリソーム分析を示す。ポリソーム対モノソーム比（Ｐ／Ｍ）が示される。図５Ｂは、野生型株およびｒｐｓ２５ａΔｂΔ株について^{35}Ｓ－メチオニン混入により判断されたタンパク質合成速度のヒストグラムを示す。図５Ｃは、［５，６－^{3}Ｈ］ウラシルによるパルスチェイス標識化を介して視覚化された、野生型株およびｒｐｓ２５ａΔｂΔ株についてｒＲＮＡ生合成を実証するゲルの画像を示す。図５Ｄ（上）は、リードスルーデュアルルシフェラーゼレポーターの図を示す。野生型、ｒｐｓ２５ａΔｂΔ、および図５Ｄ（下）に示すように、テトラヌクレオチド終止コドンを含むレポーターを有するｐＳ２５Ａ株を含むｒｐｓ２５ａΔｂΔについて、リードスルー効率を測定した。野生型株とｒｐｓ２５ａΔｂΔ株との間の倍率変化は、各テトラヌクレオチドの下に示す。ｎ＝４の標準誤差が示される。図５Ｅ（上）は、プログラムされたリボソームフレームシフトレポーターの図を示す。図５Ｅ（下）において、野生型、ｒｐｓ２５ａΔｂΔ、またはｐＳ２５Ａプラスミドを含むｒｐｓ２５ａΔｂΔの株について、レポーター毎のフレームシフト効率について試験した。ｎ＝３の標準誤差が示される。図５Ｆは、図５Ｆ（下）において、野生型株、ｒｐｓ２５ａΔｂΔ株、またはレスキュープラスミド（ｐＳ２５Ａ）を含むｒｐｓ２５ａΔｂΔ株のミスコードを示す。図５Ｆ（上）に示すホタルＯＲＦにおいて突然変異を含むデュアルルシフェラーゼレポーターを使用して、ミスコードについて測定した

。ミスコードの割合を、グラフの各棒の上に示し、ｎ＝４の標準誤差が示される。
【図５Ｅ】Ｒｐｓ２５の欠失が、グローバル翻訳にわずかな影響しか及ぼさないことを示す。図５Ａは、野生型、ｒｐｓ２５ａΔ、ｒｐｓ２５ｂΔ、およびｒｐｓ２５ａΔｂΔ欠失株のポリソーム分析を示す。ポリソーム対モノソーム比（Ｐ／Ｍ）が示される。図５Ｂは、野生型株およびｒｐｓ２５ａΔｂΔ株について^{35}Ｓ－メチオニン混入により判断されたタンパク質合成速度のヒストグラムを示す。図５Ｃは、［５，６－^{3}Ｈ］ウラシルによるパルスチェイス標識化を介して視覚化された、野生型株およびｒｐｓ２５ａΔｂΔ株についてｒＲＮＡ生合成を実証するゲルの画像を示す。図５Ｄ（上）は、リードスルーデュアルルシフェラーゼレポーターの図を示す。野生型、ｒｐｓ２５ａΔｂΔ、および図５Ｄ（下）に示すように、テトラヌクレオチド終止コドンを含むレポーターを有するｐＳ２５Ａ株を含むｒｐｓ２５ａΔｂΔについて、リードスルー効率を測定した。野生型株とｒｐｓ２５ａΔｂΔ株との間の倍率変化は、各テトラヌクレオチドの下に示す。ｎ＝４の標準誤差が示される。図５Ｅ（上）は、プログラムされたリボソームフレームシフトレポーターの図を示す。図５Ｅ（下）において、野生型、ｒｐｓ２５ａΔｂΔ、またはｐＳ２５Ａプラスミドを含むｒｐｓ２５ａΔｂΔの株について、レポーター毎のフレームシフト効率について試験した。ｎ＝３の標準誤差が示される。図５Ｆは、図５Ｆ（下）において、野生型株、ｒｐｓ２５ａΔｂΔ株、またはレスキュープラスミド（ｐＳ２５Ａ）を含むｒｐｓ２５ａΔｂΔ株のミスコードを示す。図５Ｆ（上）に示すホタルＯＲＦにおいて突然変異を含むデュアルルシフェラーゼレポーターを使用して、ミスコードについて測定した。ミスコードの割合を、グラフの各棒の上に示し、ｎ＝４の標準誤差が示される。
【図５Ｆ】Ｒｐｓ２５の欠失が、グローバル翻訳にわずかな影響しか及ぼさないことを示す。図５Ａは、野生型、ｒｐｓ２５ａΔ、ｒｐｓ２５ｂΔ、およびｒｐｓ２５ａΔｂΔ欠失株のポリソーム分析を示す。ポリソーム対モノソーム比（Ｐ／Ｍ）が示される。図５Ｂは、野生型株およびｒｐｓ２５ａΔｂΔ株について^{35}Ｓ－メチオニン混入により判断されたタンパク質合成速度のヒストグラムを示す。図５Ｃは、［５，６－^{3}Ｈ］ウラシルによるパルスチェイス標識化を介して視覚化された、野生型株およびｒｐｓ２５ａΔｂΔ株についてｒＲＮＡ生合成を実証するゲルの画像を示す。図５Ｄ（上）は、リードスルーデュアルルシフェラーゼレポーターの図を示す。野生型、ｒｐｓ２５ａΔｂΔ、および図５Ｄ（下）に示すように、テトラヌクレオチド終止コドンを含むレポーターを有するｐＳ２５Ａ株を含むｒｐｓ２５ａΔｂΔについて、リードスルー効率を測定した。野生型株とｒｐｓ２５ａΔｂΔ株との間の倍率変化は、各テトラヌクレオチドの下に示す。ｎ＝４の標準誤差が示される。図５Ｅ（上）は、プログラムされたリボソームフレームシフトレポーターの図を示す。図５Ｅ（下）において、野生型、ｒｐｓ２５ａΔｂΔ、またはｐＳ２５Ａプラスミドを含むｒｐｓ２５ａΔｂΔの株について、レポーター毎のフレームシフト効率について試験した。ｎ＝３の標準誤差が示される。図５Ｆは、図５Ｆ（下）において、野生型株、ｒｐｓ２５ａΔｂΔ株、またはレスキュープラスミド（ｐＳ２５Ａ）を含むｒｐｓ２５ａΔｂΔ株のミスコードを示す。図５Ｆ（上）に示すホタルＯＲＦにおいて突然変異を含むデュアルルシフェラーゼレポーターを使用して、ミスコードについて測定した。ミスコードの割合を、グラフの各棒の上に示し、ｎ＝４の標準誤差が示される。
【図６Ａ】哺乳類におけるＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳ活性およびＨＣＶ　ＩＲＥＳ活性にＲｐｓ２５が必要とされるかを示す。図６Ａは、ノーザンブロット法の画像を示し、Ｒｐｓ２５がｓｉＲＮＡを使用してノックダウンされたことが実証される。ノーザン分析により、ｓｉＲＮＡトランスフェクションの４８時間、７２時間、および９６時間後にｍＲＮＡレベルを検査した。Ｒｐｓ２５　ｍＲＮＡのレベルをβ－アクチンに正規化し、各時点で対照の割合として表現される。図６Ｂは、ΔＡＵＧジシストロン性ルシフェラーゼレポーターにおいてＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳを含有する哺乳類ＤＮＡ発現ベクターの図を示す。レポーターの転写は、ＣＭＶプロモーターによって促進される。図６Ｃは、ヒーラ細胞におけるｓｉＲＮＡトランスフェクション９６時間後におけるＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳ活性を表わすヒストグラムを示す。レポータープラスミドによるトランスフェクション（図６Ｂに示す）を、ｓｉＲＮＡノックダウン４８時間後に実行した。ｎ＝３の標

準誤差が示される。図６Ｄは、図６Ｃのウミシイタケルシフェラーゼ値およびホタルルシフェラーゼ値を示す。図６Ｅは、ノーザンブロット法の画像を示し、Ｒｐｓ２５がｓｉＲＮＡを使用してノックダウンされたことが実証される。ノーザン分析により、ｓｉＲＮＡトランスフェクションの７２時間後にｍＲＮＡレベルを検査した。Ｒｐｓ２５　ｍＲＮＡのレベルをβ－アクチンに正規化し、各時点で対照の割合として表現される。図６Ｆは、ジシストロン性ルシフェラーゼレポーターにおいてＨＣＶ　ＩＲＥＳを含有する哺乳類ＤＮＡ発現ベクターの図を示す。図６Ｇは、対照またはＲｐｓ２５　ｓｉＲＮＡを含む細胞におけるＨＣＶ　ＩＲＥＳのＩＲＥＳ活性を表わすヒストグラムを示す。ｓｉＲＮＡノックダウン２４時間後にレポーターを細胞内にトランスフェクトし、７２時間でアッセイした。実験１および２について、それぞれｎ＝５またはｎ＝４の標準誤差が示される。図６Ｈは、図６Ｇのウミシイタケルシフェラーゼ値およびホタルルシフェラーゼ値を示す。

【図６Ｂ】哺乳類におけるＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳ活性およびＨＣＶ　ＩＲＥＳ活性にＲｐｓ２５が必要とされるかを示す。図６Ａは、ノーザンブロット法の画像を示し、Ｒｐｓ２５がｓｉＲＮＡを使用してノックダウンされたことが実証される。ノーザン分析により、ｓｉＲＮＡトランスフェクションの４８時間、７２時間、および９６時間後にｍＲＮＡレベルを検査した。Ｒｐｓ２５　ｍＲＮＡのレベルをβ－アクチンに正規化し、各時点で対照の割合として表現される。図６Ｂは、ΔＡＵＧジシストロン性ルシフェラーゼレポーターにおいてＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳを含有する哺乳類ＤＮＡ発現ベクターの図を示す。レポーターの転写は、ＣＭＶプロモーターによって促進される。図６Ｃは、ヒーラ細胞におけるｓｉＲＮＡトランスフェクション９６時間後におけるＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳ活性を表わすヒストグラムを示す。レポータープラスミドによるトランスフェクション（図６Ｂに示す）を、ｓｉＲＮＡノックダウン４８時間後に実行した。ｎ＝３の標準誤差が示される。図６Ｄは、図６Ｃのウミシイタケルシフェラーゼ値およびホタルルシフェラーゼ値を示す。図６Ｅは、ノーザンブロット法の画像を示し、Ｒｐｓ２５がｓｉＲＮＡを使用してノックダウンされたことが実証される。ノーザン分析により、ｓｉＲＮＡトランスフェクションの７２時間後にｍＲＮＡレベルを検査した。Ｒｐｓ２５　ｍＲＮＡのレベルをβ－アクチンに正規化し、各時点で対照の割合として表現される。図６Ｆは、ジシストロン性ルシフェラーゼレポーターにおいてＨＣＶ　ＩＲＥＳを含有する哺乳類ＤＮＡ発現ベクターの図を示す。図６Ｇは、対照またはＲｐｓ２５　ｓｉＲＮＡを含む細胞におけるＨＣＶ　ＩＲＥＳのＩＲＥＳ活性を表わすヒストグラムを示す。ｓｉＲＮＡノックダウン２４時間後にレポーターを細胞内にトランスフェクトし、７２時間でアッセイした。実験１および２について、それぞれｎ＝５またはｎ＝４の標準誤差が示される。図６Ｈは、図６Ｇのウミシイタケルシフェラーゼ値およびホタルルシフェラーゼ値を示す。

【図６Ｃ】哺乳類におけるＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳ活性およびＨＣＶ　ＩＲＥＳ活性にＲｐｓ２５が必要とされるかを示す。図６Ａは、ノーザンブロット法の画像を示し、Ｒｐｓ２５がｓｉＲＮＡを使用してノックダウンされたことが実証される。ノーザン分析により、ｓｉＲＮＡトランスフェクションの４８時間、７２時間、および９６時間後にｍＲＮＡレベルを検査した。Ｒｐｓ２５　ｍＲＮＡのレベルをβ－アクチンに正規化し、各時点で対照の割合として表現される。図６Ｂは、ΔＡＵＧジシストロン性ルシフェラーゼレポーターにおいてＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳを含有する哺乳類ＤＮＡ発現ベクターの図を示す。レポーターの転写は、ＣＭＶプロモーターによって促進される。図６Ｃは、ヒーラ細胞におけるｓｉＲＮＡトランスフェクション９６時間後におけるＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳ活性を表わすヒストグラムを示す。レポータープラスミドによるトランスフェクション（図６Ｂに示す）を、ｓｉＲＮＡノックダウン４８時間後に実行した。ｎ＝３の標準誤差が示される。図６Ｄは、図６Ｃのウミシイタケルシフェラーゼ値およびホタルルシフェラーゼ値を示す。図６Ｅは、ノーザンブロット法の画像を示し、Ｒｐｓ２５がｓｉＲＮＡを使用してノックダウンされたことが実証される。ノーザン分析により、ｓｉＲＮＡトランスフェクションの７２時間後にｍＲＮＡレベルを検査した。Ｒｐｓ２５　ｍＲＮＡのレベルをβ－アクチンに正規化し、各時点で対照の割合として表現される。図６Ｆは、ジシストロン性ルシフェラーゼレポーターにおいてＨＣＶ　ＩＲＥＳを含有する哺乳類Ｄ

ＮＡ発現ベクターの図を示す。図６Ｇは、対照またはＲｐｓ２５　ｓｉＲＮＡを含む細胞におけるＨＣＶ　ＩＲＥＳのＩＲＥＳ活性を表わすヒストグラムを示す。ｓｉＲＮＡノックダウン２４時間後にレポーターを細胞内にトランスフェクトし、７２時間でアッセイした。実験１および２について、それぞれｎ＝５またはｎ＝４の標準誤差が示される。図６Ｈは、図６Ｇのウミシイタケルシフェラーゼ値およびホタルルシフェラーゼ値を示す。

【図６Ｄ】哺乳類におけるＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳ活性およびＨＣＶ　ＩＲＥＳ活性にＲｐｓ２５が必要とされるかを示す。図６Ａは、ノーザンブロット法の画像を示し、Ｒｐｓ２５がｓｉＲＮＡを使用してノックダウンされたことが実証される。ノーザン分析により、ｓｉＲＮＡトランスフェクションの４８時間、７２時間、および９６時間後にｍＲＮＡレベルを検査した。Ｒｐｓ２５　ｍＲＮＡのレベルをβ－アクチンに正規化し、各時点で対照の割合として表現される。図６Ｂは、ΔＡＵＧジシストロン性ルシフェラーゼレポーターにおいてＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳを含有する哺乳類ＤＮＡ発現ベクターの図を示す。レポーターの転写は、ＣＭＶプロモーターによって促進される。図６Ｃは、ヒーラ細胞におけるｓｉＲＮＡトランスフェクション９６時間後におけるＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳ活性を表わすヒストグラムを示す。レポータープラスミドによるトランスフェクション（図６Ｂに示す）を、ｓｉＲＮＡノックダウン４８時間後に実行した。ｎ＝３の標準誤差が示される。図６Ｄは、図６Ｃのウミシイタケルシフェラーゼ値およびホタルルシフェラーゼ値を示す。図６Ｅは、ノーザンブロット法の画像を示し、Ｒｐｓ２５がｓｉＲＮＡを使用してノックダウンされたことが実証される。ノーザン分析により、ｓｉＲＮＡトランスフェクションの７２時間後にｍＲＮＡレベルを検査した。Ｒｐｓ２５　ｍＲＮＡのレベルをβ－アクチンに正規化し、各時点で対照の割合として表現される。図６Ｆは、ジシストロン性ルシフェラーゼレポーターにおいてＨＣＶ　ＩＲＥＳを含有する哺乳類ＤＮＡ発現ベクターの図を示す。図６Ｇは、対照またはＲｐｓ２５　ｓｉＲＮＡを含む細胞におけるＨＣＶ　ＩＲＥＳのＩＲＥＳ活性を表わすヒストグラムを示す。ｓｉＲＮＡノックダウン２４時間後にレポーターを細胞内にトランスフェクトし、７２時間でアッセイした。実験１および２について、それぞれｎ＝５またはｎ＝４の標準誤差が示される。図６Ｈは、図６Ｇのウミシイタケルシフェラーゼ値およびホタルルシフェラーゼ値を示す。

【図６Ｅ】哺乳類におけるＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳ活性およびＨＣＶ　ＩＲＥＳ活性にＲｐｓ２５が必要とされるかを示す。図６Ａは、ノーザンブロット法の画像を示し、Ｒｐｓ２５がｓｉＲＮＡを使用してノックダウンされたことが実証される。ノーザン分析により、ｓｉＲＮＡトランスフェクションの４８時間、７２時間、および９６時間後にｍＲＮＡレベルを検査した。Ｒｐｓ２５　ｍＲＮＡのレベルをβ－アクチンに正規化し、各時点で対照の割合として表現される。図６Ｂは、ΔＡＵＧジシストロン性ルシフェラーゼレポーターにおいてＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳを含有する哺乳類ＤＮＡ発現ベクターの図を示す。レポーターの転写は、ＣＭＶプロモーターによって促進される。図６Ｃは、ヒーラ細胞におけるｓｉＲＮＡトランスフェクション９６時間後におけるＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳ活性を表わすヒストグラムを示す。レポータープラスミドによるトランスフェクション（図６Ｂに示す）を、ｓｉＲＮＡノックダウン４８時間後に実行した。ｎ＝３の標準誤差が示される。図６Ｄは、図６Ｃのウミシイタケルシフェラーゼ値およびホタルルシフェラーゼ値を示す。図６Ｅは、ノーザンブロット法の画像を示し、Ｒｐｓ２５がｓｉＲＮＡを使用してノックダウンされたことが実証される。ノーザン分析により、ｓｉＲＮＡトランスフェクションの７２時間後にｍＲＮＡレベルを検査した。Ｒｐｓ２５　ｍＲＮＡのレベルをβ－アクチンに正規化し、各時点で対照の割合として表現される。図６Ｆは、ジシストロン性ルシフェラーゼレポーターにおいてＨＣＶ　ＩＲＥＳを含有する哺乳類ＤＮＡ発現ベクターの図を示す。図６Ｇは、対照またはＲｐｓ２５　ｓｉＲＮＡを含む細胞におけるＨＣＶ　ＩＲＥＳのＩＲＥＳ活性を表わすヒストグラムを示す。ｓｉＲＮＡノックダウン２４時間後にレポーターを細胞内にトランスフェクトし、７２時間でアッセイした。実験１および２について、それぞれｎ＝５またはｎ＝４の標準誤差が示される。図６Ｈは、図６Ｇのウミシイタケルシフェラーゼ値およびホタルルシフェラーゼ値を示す。

【図６Ｆ】哺乳類におけるＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳ活性およびＨＣＶ　ＩＲＥＳ活性

にＲｐｓ２５が必要とされるかを示す。図６Ａは、ノーザンブロット法の画像を示し、Ｒｐｓ２５がｓｉＲＮＡを使用してノックダウンされたことが実証される。ノーザン分析により、ｓｉＲＮＡトランスフェクションの４８時間、７２時間、および９６時間後にｍＲＮＡレベルを検査した。Ｒｐｓ２５　ｍＲＮＡのレベルをβ－アクチンに正規化し、各時点で対照の割合として表現される。図６Ｂは、ΔＡＵＧジシストロン性ルシフェラーゼレポーターにおいてＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳを含有する哺乳類ＤＮＡ発現ベクターの図を示す。レポーターの転写は、ＣＭＶプロモーターによって促進される。図６Ｃは、ヒーラ細胞におけるｓｉＲＮＡトランスフェクション９６時間後におけるＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳ活性を表わすヒストグラムを示す。レポータープラスミドによるトランスフェクション（図６Ｂに示す）を、ｓｉＲＮＡノックダウン４８時間後に実行した。ｎ＝３の標準誤差が示される。図６Ｄは、図６Ｃのウミシイタケルシフェラーゼ値およびホタルルシフェラーゼ値を示す。図６Ｅは、ノーザンブロット法の画像を示し、Ｒｐｓ２５がｓｉＲＮＡを使用してノックダウンされたことが実証される。ノーザン分析により、ｓｉＲＮＡトランスフェクションの７２時間後にｍＲＮＡレベルを検査した。Ｒｐｓ２５　ｍＲＮＡのレベルをβ－アクチンに正規化し、各時点で対照の割合として表現される。図６Ｆは、ジシストロン性ルシフェラーゼレポーターにおいてＨＣＶ　ＩＲＥＳを含有する哺乳類ＤＮＡ発現ベクターの図を示す。図６Ｇは、対照またはＲｐｓ２５　ｓｉＲＮＡを含む細胞におけるＨＣＶ　ＩＲＥＳのＩＲＥＳ活性を表わすヒストグラムを示す。ｓｉＲＮＡノックダウン２４時間後にレポーターを細胞内にトランスフェクトし、７２時間でアッセイした。実験１および２について、それぞれｎ＝５またはｎ＝４の標準誤差が示される。図６Ｈは、図６Ｇのウミシイタケルシフェラーゼ値およびホタルルシフェラーゼ値を示す。

【図６Ｇ】哺乳類におけるＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳ活性およびＨＣＶ　ＩＲＥＳ活性にＲｐｓ２５が必要とされるかを示す。図６Ａは、ノーザンブロット法の画像を示し、Ｒｐｓ２５がｓｉＲＮＡを使用してノックダウンされたことが実証される。ノーザン分析により、ｓｉＲＮＡトランスフェクションの４８時間、７２時間、および９６時間後にｍＲＮＡレベルを検査した。Ｒｐｓ２５　ｍＲＮＡのレベルをβ－アクチンに正規化し、各時点で対照の割合として表現される。図６Ｂは、ΔＡＵＧジシストロン性ルシフェラーゼレポーターにおいてＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳを含有する哺乳類ＤＮＡ発現ベクターの図を示す。レポーターの転写は、ＣＭＶプロモーターによって促進される。図６Ｃは、ヒーラ細胞におけるｓｉＲＮＡトランスフェクション９６時間後におけるＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳ活性を表わすヒストグラムを示す。レポータープラスミドによるトランスフェクション（図６Ｂに示す）を、ｓｉＲＮＡノックダウン４８時間後に実行した。ｎ＝３の標準誤差が示される。図６Ｄは、図６Ｃのウミシイタケルシフェラーゼ値およびホタルルシフェラーゼ値を示す。図６Ｅは、ノーザンブロット法の画像を示し、Ｒｐｓ２５がｓｉＲＮＡを使用してノックダウンされたことが実証される。ノーザン分析により、ｓｉＲＮＡトランスフェクションの７２時間後にｍＲＮＡレベルを検査した。Ｒｐｓ２５　ｍＲＮＡのレベルをβ－アクチンに正規化し、各時点で対照の割合として表現される。図６Ｆは、ジシストロン性ルシフェラーゼレポーターにおいてＨＣＶ　ＩＲＥＳを含有する哺乳類ＤＮＡ発現ベクターの図を示す。図６Ｇは、対照またはＲｐｓ２５　ｓｉＲＮＡを含む細胞におけるＨＣＶ　ＩＲＥＳのＩＲＥＳ活性を表わすヒストグラムを示す。ｓｉＲＮＡノックダウン２４時間後にレポーターを細胞内にトランスフェクトし、７２時間でアッセイした。実験１および２について、それぞれｎ＝５またはｎ＝４の標準誤差が示される。図６Ｈは、図６Ｇのウミシイタケルシフェラーゼ値およびホタルルシフェラーゼ値を示す。

【図６Ｈ】哺乳類におけるＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳ活性およびＨＣＶ　ＩＲＥＳ活性にＲｐｓ２５が必要とされるかを示す。図６Ａは、ノーザンブロット法の画像を示し、Ｒｐｓ２５がｓｉＲＮＡを使用してノックダウンされたことが実証される。ノーザン分析により、ｓｉＲＮＡトランスフェクションの４８時間、７２時間、および９６時間後にｍＲＮＡレベルを検査した。Ｒｐｓ２５　ｍＲＮＡのレベルをβ－アクチンに正規化し、各時点で対照の割合として表現される。図６Ｂは、ΔＡＵＧジシストロン性ルシフェラーゼレポーターにおいてＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳを含有する哺乳類ＤＮＡ発現ベクターの図

を示す。レポーターの転写は、ＣＭＶプロモーターによって促進される。図６Ｃは、ヒーラ細胞におけるｓｉＲＮＡトランスフェクション９６時間後におけるＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳ活性を表わすヒストグラムを示す。レポータープラスミドによるトランスフェクション（図６Ｂに示す）を、ｓｉＲＮＡノックダウン４８時間後に実行した。ｎ＝３の標準誤差が示される。図６Ｄは、図６Ｃのウミシイタケルシフェラーゼ値およびホタルルシフェラーゼ値を示す。図６Ｅは、ノーザンブロット法の画像を示し、Ｒｐｓ２５がｓｉＲＮＡを使用してノックダウンされたことが実証される。ノーザン分析により、ｓｉＲＮＡトランスフェクションの７２時間後にｍＲＮＡレベルを検査した。Ｒｐｓ２５　ｍＲＮＡのレベルをβ－アクチンに正規化し、各時点で対照の割合として表現される。図６Ｆは、ジシストロン性ルシフェラーゼレポーターにおいてＨＣＶ　ＩＲＥＳを含有する哺乳類ＤＮＡ発現ベクターの図を示す。図６Ｇは、対照またはＲｐｓ２５　ｓｉＲＮＡを含む細胞におけるＨＣＶ　ＩＲＥＳのＩＲＥＳ活性を表わすヒストグラムを示す。ｓｉＲＮＡノックダウン２４時間後にレポーターを細胞内にトランスフェクトし、７２時間でアッセイした。実験１および２について、それぞれｎ＝５またはｎ＝４の標準誤差が示される。図６Ｈは、図６Ｇのウミシイタケルシフェラーゼ値およびホタルルシフェラーゼ値を示す。

【図７Ａ】哺乳類細胞におけるＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳ媒介翻訳にＲｐｓ２５が必要とされるかを示す。図７Ａは、哺乳類細胞に使用されるジシストロン性レポーターの図を示す。図７Ｂは、Ｒｐｓ２５　ｓｈＲＮＡの対照を含むレンチウイルスで形質導入されたヒーラ細胞のノーザンブロット法の画像を示す。ノーザンブロット法は、Ｒｐｓ２５　ｍＲＮＡレベルのノックダウンを実証する。Ｒｐｓ２５　ｍＲＮＡのレベルをβ－アクチンに正規化し、対照の割合として表現される。図７Ｃは、ヒーラ細胞におけるＲｐｓ２５のｓｈＲＮＡ媒介ノックダウン後のＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳ活性を示すヒストグラムを示す。ｎ＝３の標準誤差が示される。

【図７Ｂ】哺乳類細胞におけるＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳ媒介翻訳にＲｐｓ２５が必要とされるかを示す。図７Ａは、哺乳類細胞に使用されるジシストロン性レポーターの図を示す。図７Ｂは、Ｒｐｓ２５　ｓｈＲＮＡの対照を含むレンチウイルスで形質導入されたヒーラ細胞のノーザンブロット法の画像を示す。ノーザンブロット法は、Ｒｐｓ２５　ｍＲＮＡレベルのノックダウンを実証する。Ｒｐｓ２５　ｍＲＮＡのレベルをβ－アクチンに正規化し、対照の割合として表現される。図７Ｃは、ヒーラ細胞におけるＲｐｓ２５のｓｈＲＮＡ媒介ノックダウン後のＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳ活性を示すヒストグラムを示す。ｎ＝３の標準誤差が示される。

【図７Ｃ】哺乳類細胞におけるＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳ媒介翻訳にＲｐｓ２５が必要とされるかを示す。図７Ａは、哺乳類細胞に使用されるジシストロン性レポーターの図を示す。図７Ｂは、Ｒｐｓ２５　ｓｈＲＮＡの対照を含むレンチウイルスで形質導入されたヒーラ細胞のノーザンブロット法の画像を示す。ノーザンブロット法は、Ｒｐｓ２５　ｍＲＮＡレベルのノックダウンを実証する。Ｒｐｓ２５　ｍＲＮＡのレベルをβ－アクチンに正規化し、対照の割合として表現される。図７Ｃは、ヒーラ細胞におけるＲｐｓ２５のｓｈＲＮＡ媒介ノックダウン後のＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳ活性を示すヒストグラムを示す。ｎ＝３の標準誤差が示される。

【図８Ａ】ＩＲＥＳ活性の減少が経時的に維持されることを示す。ＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳ活性は、Ｒｐｓ２５に対してｓｈＲＮＡを発現する安定細胞株において大幅に減少する。図８Ａは、ノーザンブロット法の画像およびウエスタンブロット法の画像を示し、Ｒｐｓ２５を対象とするｓｉＲＮＡおよびｓｈＲＮＡの両方によるＲｐｓ２５のノックダウンが実証される。Ｒｐｓ２５　ｍＲＮＡのレベルは、β－アクチンに正規化され、対照の割合として表現される。図８Ｂは、ヒーラ細胞におけるＲｐｓ２５のｓｉＲＮＡおよびｓｈＲＮＡ媒介ノックダウン後のＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳ活性を表わすヒストグラムを示す。ｎ＝３の標準誤差が示される。

【図８Ｂ】ＩＲＥＳ活性の減少が経時的に維持されることを示す。ＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳ活性は、Ｒｐｓ２５に対してｓｈＲＮＡを発現する安定細胞株において大幅に減少する。図８Ａは、ノーザンブロット法の画像およびウエスタンブロット法の画像を示し、

Ｒｐｓ２５を対象とするｓｉＲＮＡおよびｓｈＲＮＡの両方によるＲｐｓ２５のノックダウンが実証される。Ｒｐｓ２５　ｍＲＮＡのレベルは、β－アクチンに正規化され、対照の割合として表現される。図８Ｂは、ヒーラ細胞におけるＲｐｓ２５のｓｉＲＮＡおよびｓｈＲＮＡ媒介ノックダウン後のＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳ活性を表わすヒストグラムを示す。ｎ＝３の標準誤差が示される。

【図９】２つの種類のＩＧＲ　ＩＲＥＳにおいてＲｐｓ２５がＩＲＥＳ媒介翻訳に必要とされるかを示す。ＣｒＰＶ　ＩＲＥＳは、ジシストロウイルスと呼ばれるウイルス科に属する。加えて、２つの種類のＩＧＲ　ＩＲＥＳが存在する。ＣｒＰＶ　ＩＲＥＳは、種類Ｉに属し、種類ＩＩメンバーは、ドメインＩＩＩにおいて、より大きなバルジおよび余分なステムループを有する。ヒストグラムに実証されるように、被験科の各メンバーは、Ｒｐｓ２５の非存在下で効率的に翻訳することができなかった。Ｒｐｓ２５の損失は両種のＩＧＲ　ＩＲＥＳに影響を及ぼすことから、強調された２つのステムループとＲｐｓ２５が相互作用することが考えられ、この領域は、２つの種類間で保存される。

【図１０Ａ】哺乳類細胞におけるＨＣＶ　ＩＲＥＳ媒介翻訳および複製にＲｐｓ２５が必要とされることを示す。図１０Ａは、Ｒｐｓ２５を対象とするｓｈＲＮＡによるＲｐｓ２５のノックダウンを実証するノーザンブロット法を示す。図１０Ｂは、ヒーラ細胞におけるＲｐｓ２５のｓｈＲＮＡ媒介ノックダウン後のＨＣＶ　ＩＲＥＳ活性を表わすヒストグラムを示す。ｎ＝３の標準誤差が示される。図１０Ｃは、Ｒｐｓ２５のｓｉＲＮＡ媒介ノックダウンによってＨｕｈ７細胞におけるＨＣＶ複製が阻害されることを実証するウエスタンブロット法の画像を示す（左）。さらに、ｓｉＲＮＡによる処理によってＲｐｓ２５　ｍＲＮＡがノックダウンされることを実証するノーザンブロット法の画像が示される（右）。対照またはＲｐｓ２５　ｓｉＲＮＡで２４時間処置されたＨｕｈ７細胞を、ＨＣＶレプリコンで感染させた。７２時間後、定量的ウエスタン分析のために、β－アクチン抗体およびＨＣＶタンパク質ＮＳ５Ａに対する抗体の両方を使用して、細胞を採取し、タンパク質抽出した。

【図１０Ｂ】哺乳類細胞におけるＨＣＶ　ＩＲＥＳ媒介翻訳および複製にＲｐｓ２５が必要とされることを示す。図１０Ａは、Ｒｐｓ２５を対象とするｓｈＲＮＡによるＲｐｓ２５のノックダウンを実証するノーザンブロット法を示す。図１０Ｂは、ヒーラ細胞におけるＲｐｓ２５のｓｈＲＮＡ媒介ノックダウン後のＨＣＶ　ＩＲＥＳ活性を表わすヒストグラムを示す。ｎ＝３の標準誤差が示される。図１０Ｃは、Ｒｐｓ２５のｓｉＲＮＡ媒介ノックダウンによってＨｕｈ７細胞におけるＨＣＶ複製が阻害されることを実証するウエスタンブロット法の画像を示す（左）。さらに、ｓｉＲＮＡによる処理によってＲｐｓ２５　ｍＲＮＡがノックダウンされることを実証するノーザンブロット法の画像が示される（右）。対照またはＲｐｓ２５　ｓｉＲＮＡで２４時間処置されたＨｕｈ７細胞を、ＨＣＶレプリコンで感染させた。７２時間後、定量的ウエスタン分析のために、β－アクチン抗体およびＨＣＶタンパク質ＮＳ５Ａに対する抗体の両方を使用して、細胞を採取し、タンパク質抽出した。

【図１０Ｃ】哺乳類細胞におけるＨＣＶ　ＩＲＥＳ媒介翻訳および複製にＲｐｓ２５が必要とされることを示す。図１０Ａは、Ｒｐｓ２５を対象とするｓｈＲＮＡによるＲｐｓ２５のノックダウンを実証するノーザンブロット法を示す。図１０Ｂは、ヒーラ細胞におけるＲｐｓ２５のｓｈＲＮＡ媒介ノックダウン後のＨＣＶ　ＩＲＥＳ活性を表わすヒストグラムを示す。ｎ＝３の標準誤差が示される。図１０Ｃは、Ｒｐｓ２５のｓｉＲＮＡ媒介ノックダウンによってＨｕｈ７細胞におけるＨＣＶ複製が阻害されることを実証するウエスタンブロット法の画像を示す（左）。さらに、ｓｉＲＮＡによる処理によってＲｐｓ２５　ｍＲＮＡがノックダウンされることを実証するノーザンブロット法の画像が示される（右）。対照またはＲｐｓ２５　ｓｉＲＮＡで２４時間処置されたＨｕｈ７細胞を、ＨＣＶレプリコンで感染させた。７２時間後、定量的ウエスタン分析のために、β－アクチン抗体およびＨＣＶタンパク質ＮＳ５Ａに対する抗体の両方を使用して、細胞を採取し、タンパク質抽出した。

【図１１】ピコナウイルスＩＲＥＳの活性をＲｐｓ２５が強化することを示す。Ｒｐｓ２

５ノックダウンがピコナウイルスＩＲＥＳ媒介翻訳に影響を及ぼすことを実証するヒストグラムが示される。４つのウイルスＩＲＥＳのうちの１つを有するジシストロン性レポーターを、Ｒｐｓ２５のｓｉＲＮＡ媒介ノックダウン４８時間後に、細胞内にトランスフェクトした。ＩＲＥＳ活性を９６時間に測定した。ｎ＝３の標準誤差が示される。ＥＣＭＶ：脳心筋炎ウイルス；ＰＶ：ポリオウイルス；ＥＶ７１：エンテロウイルス７１。ＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳは、比較のために示される。

【図１２Ａ】Ｒｐｓ２５に対する軽度から重度の依存性を細胞ＩＲＥＳが明示することを示す。図１２Ａは、Ｒｐｓ２５を対象とするｓｉＲＮＡによるＲｐｓ２５のノックダウンを実証するノーザンブロット法の画像を示す。図１２Ｂは、ヒーラ細胞におけるＲｐｓ２５のｓｉＲＮＡ媒介ノックダウン後に、ＩＲＥＳ要素を有することで知られる複数の細胞ＲＮＡの細胞ＩＲＥＳ活性を表わすヒストグラムを示す。対照およびＲｐｓ２５　ｓｉＲＮＡにより４８時間処置されたヒーラ細胞における細胞ＩＲＥＳについてのジシストロン性レポーターアッセイを実行した。ＩＲＥＳ活性を９６時間後に測定し、１００％に任意設定される対照細胞において測定された対応するＩＲＥＳ活性の割合として表現される。ｎ＝３の標準誤差が示される。

【図１２Ｂ】Ｒｐｓ２５に対する軽度から重度の依存性を細胞ＩＲＥＳが明示することを示す。図１２Ａは、Ｒｐｓ２５を対象とするｓｉＲＮＡによるＲｐｓ２５のノックダウンを実証するノーザンブロット法の画像を示す。図１２Ｂは、ヒーラ細胞におけるＲｐｓ２５のｓｉＲＮＡ媒介ノックダウン後に、ＩＲＥＳ要素を有することで知られる複数の細胞ＲＮＡの細胞ＩＲＥＳ活性を表わすヒストグラムを示す。対照およびＲｐｓ２５　ｓｉＲＮＡにより４８時間処置されたヒーラ細胞における細胞ＩＲＥＳについてのジシストロン性レポーターアッセイを実行した。ＩＲＥＳ活性を９６時間後に測定し、１００％に任意設定される対照細胞において測定された対応するＩＲＥＳ活性の割合として表現される。ｎ＝３の標準誤差が示される。

【図１３Ａ】Ｂａｇ－１細胞ＩＲＥＳが翻訳にＲｐｓ２５を必要とすることを示す。図１３Ａは、Ｒｐｓ２５を対象とするｓｉＲＮＡによるＲｐｓ２５のノックダウンを実証するノーザンブロット法の画像を示す。図１３Ｂは、ヒーラ細胞におけるＲｐｓ２５のｓｉＲＮＡ媒介ノックダウン後の、Ｂａｇ－１およびｃ－ｍｙｃの細胞ＩＲＥＳ活性を表わすヒストグラムを示す。図１３Ｃは、３つのＩＲＥＳ要素のステムループの略図を示す。翻訳についてＲｐｓ２５に依存するＩＲＥＳ要素、ＣｒＰＶ要素、およびＢａｇ－１　ＩＲＥＳ要素は、保存された配列モチーフ（ＡＮＹモチーフ）を共有する。

【図１３Ｂ】Ｂａｇ－１細胞ＩＲＥＳが翻訳にＲｐｓ２５を必要とすることを示す。図１３Ａは、Ｒｐｓ２５を対象とするｓｉＲＮＡによるＲｐｓ２５のノックダウンを実証するノーザンブロット法の画像を示す。図１３Ｂは、ヒーラ細胞におけるＲｐｓ２５のｓｉＲＮＡ媒介ノックダウン後の、Ｂａｇ－１およびｃ－ｍｙｃの細胞ＩＲＥＳ活性を表わすヒストグラムを示す。図１３Ｃは、３つのＩＲＥＳ要素のステムループの略図を示す。翻訳についてＲｐｓ２５に依存するＩＲＥＳ要素、ＣｒＰＶ要素、およびＢａｇ－１　ＩＲＥＳ要素は、保存された配列モチーフ（ＡＮＹモチーフ）を共有する。

【図１３Ｃ】Ｂａｇ－１細胞ＩＲＥＳが翻訳にＲｐｓ２５を必要とすることを示す。図１３Ａは、Ｒｐｓ２５を対象とするｓｉＲＮＡによるＲｐｓ２５のノックダウンを実証するノーザンブロット法の画像を示す。図１３Ｂは、ヒーラ細胞におけるＲｐｓ２５のｓｉＲＮＡ媒介ノックダウン後の、Ｂａｇ－１およびｃ－ｍｙｃの細胞ＩＲＥＳ活性を表わすヒストグラムを示す。図１３Ｃは、３つのＩＲＥＳ要素のステムループの略図を示す。翻訳についてＲｐｓ２５に依存するＩＲＥＳ要素、ＣｒＰＶ要素、およびＢａｇ－１　ＩＲＥＳ要素は、保存された配列モチーフ（ＡＮＹモチーフ）を共有する。

【図１４】ＩＧＲ　ＩＲＥＳの４０Ｓリボソームとの相互作用のモデルを示す（上）。酵母４０Ｓサブユニットに結合されたＩＧＲ　ＩＲＥＳのＣｒｙｏ－ＥＭ構造は、２つの配向で示される。左上図は、４０Ｓサブユニットの界面側を示し、ＩＧＲ　ＩＲＥＳは、Ｐ部位およびＥ部位を占めるｍＲＮＡチャンネルに結合される（Ｓｃｈｕｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ，　Ｎａｔ．　Ｓｔｒｕｃｔ．　Ｍｏｌ．　Ｂｉｏｌ．　１３：１０９２－６　（２０

０６））。右上図は、示されるように、ＳＬ２．３の裏側を示すために、Ｘ軸に沿って９０°およびＹ軸に沿って１１０°回転された複合体を示す。囲まれた範囲の拡大図は、ＳＬ２．３およびＳＬ２．１の４０Ｓサブユニットとの相互作用を示す。ＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳの密度は、明確にするために除去されており、ＩＧＲ　ＩＲＥＳ構造のモデルが示される。加えて、原核生物ｒＲＮＡおよびタンパク質（ＰＤＢ：１Ｓ１Ｈ）の原子モデルは、Ｃｒｙｏ－ＥＭ密度にモデル化されている（Ｓｐａｈｎ　ｅｔ　ａｌ，　ＥＭＢＯ　Ｊ．　２３；１００８－１９　（２００４））。これらのモデルによって、Ｒｐｓ２５であり得るＲｐｓ５付近のリボソームの表面における非割り当て密度が明らかになる。この位置におけるタンパク質は、ＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳ　ＳＬ２．３と相互作用することが予測され得、Ｎ－末端またはＣ－末端伸張を有するＳＬ２．１と相互作用し得る。

【図１５】Ｈｕｈ７ヒト肝細胞におけるＨＣＶ　ＩＲＥＳデュアルＬＵＣレポーターの一過性トランスフェクション最適化を示す。複数の陽イオン性脂質ベースの一過性トランスフェクション試薬を使用して、レポーターの一過性トランスフェクションがハイスループットスクリーンに実現可能かを判断した。

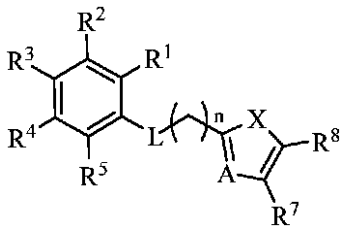
【図１６】ＨＣＶ　ＩＲＥＳ翻訳阻害剤スクリーンのハイスループットプレートマップを示す。図１６（上）は、半自動化ハイスループットスクリーンのプレートマップを示す。ウェルＡ１～Ａ６は、標準的な培地中１％ＤＭＳＯで処置される。ウェルＡ７～Ａ１２は、ＨＣＶ　ＩＲＥＳデュアルＬＵＣレポーターのみでトランスフェクトされる。ウェルＢ１～Ｈ１２は、３組の試験小分子で３通りに処置される（例えば、ウェルＢ１～Ｂ３は、化合物Ａで処置され、ウェルＢ４～６は、化合物Ｂで処理される等）。図１６（下）は、完全自動化ハイスループットスクリーンのプレートマップを示す。列１は、模擬トランスフェクトされる。列２～１２は、ＨＣＶ　ＩＲＥＳデュアルＬＵＣレポーターでトランスフェクトされる。列１および１２は、小分子を必要としないが、標準的な培地中に１％ＤＭＳＯを有する。列２～１１は、各小分子が３つの異なるウェルで評価され、かつ同一のウェルに２つの化合物が一緒に存在しないロボットおよび専有の３通りのバッチ沈着フォーマットでプレートされた８０の小分子を必要とする。

【図１７Ａ】９６０の初期化合物を使用するハイスループットスクリーンの試験実行の結果を示す。図１７Ａは、対照（試験分子無し：培地中の１％ＤＭＳＯ）対実験条件（試験小分子の３通りの評価）におけるＨＣＶウイルスの程度としてウミシイタケＬＵＣシグナル対ホタルＬＵＣシグナルの比率を実証するヒストグラムを示す。１２のマイクロタイタープレートにおいて、プレート毎に平均２つのヒットが認められた。全てのヒット小分子は、１％ＤＭＳＯのみに暴露された模擬トランスフェクト対照に対して示される。図１７Ｂは、０．０２μＭから２０μＭにおける阻害剤を使用するＨＣＶ　ＩＲＥＳ媒介翻訳の濃度依存的阻害を実証するヒストグラムを示す。図１７Ｃは、トランスフェクション後７２時間後のＮＳ５Ａレベルの低下によって証明されたように、２μＭの阻害剤の存在下で、Ｈｕｈ７細胞においてＨＣＶ複製が阻害されることを明示するウエスタンブロット法の画像を示す。図１７Ｄは、ＩＲＥＳ媒介翻訳を阻害することが分かった初期化合物を示す。

【図１７Ｂ】９６０の初期化合物を使用するハイスループットスクリーンの試験実行の結果を示す。図１７Ａは、対照（試験分子無し：培地中の１％ＤＭＳＯ）対実験条件（試験小分子の３通りの評価）におけるＨＣＶウイルスの程度としてウミシイタケＬＵＣシグナル対ホタルＬＵＣシグナルの比率を実証するヒストグラムを示す。１２のマイクロタイタープレートにおいて、プレート毎に平均２つのヒットが認められた。全てのヒット小分子は、１％ＤＭＳＯのみに暴露された模擬トランスフェクト対照に対して示される。図１７Ｂは、０．０２μＭから２０μＭにおける阻害剤を使用するＨＣＶ　ＩＲＥＳ媒介翻訳の濃度依存的阻害を実証するヒストグラムを示す。図１７Ｃは、トランスフェクション後７２時間後のＮＳ５Ａレベルの低下によって証明されたように、２μＭの阻害剤の存在下で、Ｈｕｈ７細胞においてＨＣＶ複製が阻害されることを明示するウエスタンブロット法の画像を示す。図１７Ｄは、ＩＲＥＳ媒介翻訳を阻害することが分かった初期化合物を示す

。
【図１７Ｃ】９６０の初期化合物を使用するハイスループットスクリーンの試験実行の結果を示す。図１７Ａは、対照（試験分子無し：培地中の１％ＤＭＳＯ）対実験条件（試験小分子の３通りの評価）におけるＨＣＶウイルスの程度としてウミシイタケＬＵＣシグナル対ホタルＬＵＣシグナルの比率を実証するヒストグラムを示す。１２のマイクロタイタープレートにおいて、プレート毎に平均２つのヒットが認められた。全てのヒット小分子は、１％ＤＭＳＯのみに暴露された模擬トランスフェクト対照に対して示される。図１７Ｂは、０．０２μＭから２０μＭにおける阻害剤を使用するＨＣＶ　ＩＲＥＳ媒介翻訳の濃度依存的阻害を実証するヒストグラムを示す。図１７Ｃは、トランスフェクション後７２時間後のＮＳ５Ａレベルの低下によって証明されたように、２μＭの阻害剤の存在下で、Ｈｕｈ７細胞においてＨＣＶ複製が阻害されることを明示するウエスタンブロット法の画像を示す。図１７Ｄは、ＩＲＥＳ媒介翻訳を阻害することが分かった初期化合物を示す。
【図１７Ｄ】９６０の初期化合物を使用するハイスループットスクリーンの試験実行の結果を示す。図１７Ａは、対照（試験分子無し：培地中の１％ＤＭＳＯ）対実験条件（試験小分子の３通りの評価）におけるＨＣＶウイルスの程度としてウミシイタケＬＵＣシグナル対ホタルＬＵＣシグナルの比率を実証するヒストグラムを示す。１２のマイクロタイタープレートにおいて、プレート毎に平均２つのヒットが認められた。全てのヒット小分子は、１％ＤＭＳＯのみに暴露された模擬トランスフェクト対照に対して示される。図１７Ｂは、０．０２μＭから２０μＭにおける阻害剤を使用するＨＣＶ　ＩＲＥＳ媒介翻訳の濃度依存的阻害を実証するヒストグラムを示す。図１７Ｃは、トランスフェクション後７２時間後のＮＳ５Ａレベルの低下によって証明されたように、２μＭの阻害剤の存在下で、Ｈｕｈ７細胞においてＨＣＶ複製が阻害されることを明示するウエスタンブロット法の画像を示す。図１７Ｄは、ＩＲＥＳ媒介翻訳を阻害することが分かった初期化合物を示す。
【図１８】構造において共通性を共有し、かつＨｕｈ７ヒト肝細胞におけるＨＣＶ　ＩＲＥＳ媒介翻訳の阻害を呈するハイスループットアッセイにおいて識別された小分子のクラスターを示す略図を示す。
【図１９Ａ】ＩＲＥＳ媒介翻訳を阻害する追加の識別された化合物を示す。図１９Ａは、２ｍＭにおける試験化合物のＩＲＥＳ活性割合を実証するヒストグラムを示す。図１９Ｂは、ＩＲＥＳ媒介翻訳を阻害する識別された化合物の構造を示す。
【図１９Ｂ】ＩＲＥＳ媒介翻訳を阻害する追加の識別された化合物を示す。図１９Ａは、２ｍＭにおける試験化合物のＩＲＥＳ活性割合を実証するヒストグラムを示す。図１９Ｂは、ＩＲＥＳ媒介翻訳を阻害する識別された化合物の構造を示す。
【発明を実施するための形態】
【００１０】
被検体におけるウイルス感染または癌の処置または予防のための化合物が本明細書において提供される。ウイルス感染は、例えば、内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）含有ＲＮＡ分子を含むウイルスによって媒介され得る。
【００１１】
癌は、例えば、細胞ｍＲＮＡ分子のＩＲＥＳ媒介翻訳の増加または減少によって引き起こされ得る。
【００１２】
本明細書に説明するウイルス感染（例えば、ＨＣＶ）または癌（例えば、乳癌）の処置のための化合物は、化学式Ｉ：
【００１３】

【化１】



I

【００１４】
が表わす化合物と、
そのプロドラックの医薬的に許容可能な塩とを含む。

【００１５】
化学式Ｉでは、Ａは、ＣＲ^{9}またはＮである。いくつかの例では、Ａは、ＣＨまたはＮである。

【００１６】
また、化学式Ｉでは、Ｌは、－Ｏ－ＣＲ^{10}Ｒ^{11}Ｃ（Ｏ）－ＮＲ^{6}－、－ＮＲ^{12}－ＮＲ^{6}－、－Ｃ（Ｏ）－ＮＲ^{6}－、－ＳＯ$_{2}$－ＮＲ^{6}－、－ＣＨ$_{2}$－ＮＲ^{6}－、－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－ＮＲ^{6}－、または置換もしくは非置換ヘテロアリールである。いくつかの例では、Ｌは、置換または非置換ピラゾールである。

【００１７】
加えて、化学式Ｉでは、ｎは、０、１、または２である。

【００１８】
また、化学式Ｉでは、Ｘは、－ＣＲ^{13}＝ＣＲ^{14}－、－Ｎ＝ＣＲ^{15}－、－ＣＲ^{15}＝Ｎ－、ＮＲ^{16}、Ｏ、またはＳである。Ｘは、五員環または六員環における原子であることができる。例えば、ＸがＮＲ^{16}、Ｏ、またはＳである場合、Ｘは、五員環の原子である（例えば、チオフェニル、ピロリル、フラニル、オキサゾリル、チアゾリル、またはイミダゾリル）。Ｘが－ＣＲ^{13}＝ＣＲ^{14}－、－Ｎ＝ＣＲ^{15}－、または－ＣＲ^{15}＝Ｎ－である場合、Ｘは、例えば、フェニル、ピリジニル、またはピラジニル等の六員環の原子である。いくつかの例では、Ｘは、Ｓまたは－ＣＨ＝ＣＨ－である。

【００１９】
さらに、化学式Ｉでは、Ｒ^{1}、Ｒ^{2}、Ｒ^{3}、Ｒ^{4}、Ｒ^{5}、Ｒ^{7}、Ｒ^{8}、Ｒ^{9}、Ｒ^{10}、Ｒ^{11}、Ｒ^{13}、Ｒ^{14}、およびＲ^{15}の各々は、水素、ハロゲン、ヒドロキシル、トリフルオロメチル、置換もしくは非置換チオ、置換もしくは非置換アルコキシル、置換もしくは非置換アリールオキシル、置換もしくは非置換アミノ、置換もしくは非置換Ｃ$_{1-12}$アルキル、置換もしくは非置換Ｃ$_{2-12}$アルケニル、置換もしくは非置換Ｃ$_{2-12}$アルキニル、置換もしくは非置換Ｃ$_{1-12}$ヘテロアルキル、置換もしくは非置換Ｃ$_{2-12}$ヘテロアルケニル、置換もしくは非置換Ｃ$_{2-12}$ヘテロアルキニル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールから独立して選択される。いくつかの例では、Ｒ^{3}は、エトキシ、ジメチルアミノ、またはクロロである。

【００２０】
また、化学式Ｉでは、Ｒ^{6}、Ｒ^{12}、およびＲ^{16}の各々は、水素、置換もしくは非置換Ｃ$_{1-12}$アルキル、置換もしくは非置換Ｃ$_{2-12}$アルケニル、置換もしくは非置換Ｃ$_{2-12}$アルキニル、置換もしくは非置換Ｃ$_{1-12}$ヘテロアルキル、置換もしくは非置換Ｃ$_{2-12}$ヘテロアルケニル、置換もしくは非置換Ｃ$_{2-12}$ヘテロアルキニル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換カルボニルから独立して選択される。

【００２１】
本明細書で使用する際、用語のアルキル、アルケニル、およびアルキニルは、直鎖および分枝鎖の１価の置換基を含む。例として、メチル、エチル、イソブチル、３－ブチニル

、およびその同等物が挙げられる。本明細書に説明する化合物および方法とともに有用であるこれらの群の範囲は、C_1－C_{20}アルキル、C_2－C_{20}アルケニル、およびC_2－C_{20}アルキニルを含む。本明細書に説明する化合物および方法とともに有用であるこれらの群の追加の範囲は、C_1－C_{12}アルキル、C_2－C_{12}アルケニル、C_2－C_{12}アルキニル、C_1－C_6アルキル、C_2－C_6アルケニル、C_2－C_6アルキニル、C_1－C_4アルキル、C_2－C_4アルケニル、およびC_2－C_4アルキニルを含む。

【００２２】

ヘテロアルキル、ヘテロアルケニル、およびヘテロアルキニルは、アルキル、アルケニル、およびアルキニルと同様に定義されるが、骨格内にＯ、Ｓ、もしくはＮヘテロ原子またはそれらの組み合わせを含有することができる。本明細書に説明する化合物および方法とともに有用であるこれらの群の範囲は、C_1－C_{20}ヘテロアルキル、C_2－C_{20}ヘテロアルケニル、およびC_2－C_{20}ヘテロアルキニルを含む。本明細書に説明する化合物および方法とともに有用であるこれらの群の追加の範囲は、C_1－C_{12}ヘテロアルキル、C_2－C_{12}ヘテロアルケニル、C_2－C_{12}ヘテロアルキニル、C_1－C_6ヘテロアルキル、C_2－C_6ヘテロアルケニル、C_2－C_6ヘテロアルキニル、C_1－C_4ヘテロアルキル、C_2－C_4ヘテロアルケニル、およびC_2－C_4ヘテロアルキニルを含む。

【００２３】

用語のシクロアルキル、シクロアルケニル、およびシクロアルキニルは、単一の環または複数の縮合環を有する環式アルキル基を含む。例として、シクロヘキシル、シクロペンチルエチル、およびアダマンタニルが挙げられる。本明細書に説明する化合物および方法とともに有用であるこれらの群の範囲は、C_3－C_{20}シクロアルキル、C_3－C_{20}シクロアルケニル、およびC_3－C_{20}シクロアルキニルを含む。本明細書に説明する化合物および方法とともに有用であるこれらの群の追加の範囲は、C_5－C_{12}シクロアルキル、C_5－C_{12}シクロアルケニル、C_5－C_{12}シクロアルキニル、C_5－C_6シクロアルキル、C_5－C_6シクロアルケニル、およびC_5－C_6シクロアルキニルを含む。

【００２４】

用語のヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルケニル、およびヘテロシクロアルキニルは、シクロアルキル、シクロアルケニル、およびシクロアルキニルと同様に定義されるが、環状骨格内にＯ、Ｓ、もしくはＮヘテロ原子またはそれらの組み合わせを含むことができる。本明細書に説明する化合物および方法とともに有用であるこれらの群の範囲は、C_3－C_{20}ヘテロシクロアルキル、C_3－C_{20}ヘテロシクロアルケニル、およびC_3－C_{20}ヘテロシクロアルキニルを含む。本明細書に説明する化合物および方法とともに有用であるこれらの群の追加の範囲は、C_5－C_{12}ヘテロシクロアルキル、C_5－C_{12}ヘテロシクロアルケニル、C_5－C_{12}ヘテロシクロアルキニル、C_5－C_6ヘテロシクロアルキル、C_5－C_6ヘテロシクロアルケニル、およびC_5－C_6ヘテロシクロアルキニルを含む。

【００２５】

アリール分子は、例えば、交互単共有結合および２重共有結合から成る場合と同じように番号付けられる非局在化電子によって連結される典型的には６個の炭素原子の１つ以上の平面集合を組み込む環状炭化水素を含む。アリール分子の例として、ベンゼンが挙げられる。ヘテロアリール分子は、Ｏ、Ｎ、またはＳ等の原子のその環状主鎖に沿って置換基を含む。ヘテロ原子が導入される場合、５つの原子の集合、例えば、４つの炭素およびヘテロ原子は、芳香族系を生成することができる。ヘテロアリール分子の例として、フラン、ピロール、チオフェン、イミダゾール、オキサゾール、ピリジン、ピラゾール、およびピラジンが挙げられる。また、アリールおよびヘテロアリール分子は、追加の縮合環、例えば、ベンゾフラン、インドール、ベンゾチオフェン、ナフタレン、アントラセン、およびキノリンも含むことができる。

【００２６】

本明細書で使用するアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアルキル、ヘテロアルケニル、ヘテロアルキニル、ヘテロアリール、シクロアルキル、シクロアルケ

ニル、シクロアルキニル、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルケニル、またはヘテロシクロアルキニル分子は、置換または非置換であることができる。本明細書で使用する際、用語の置換は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアルキル、ヘテロアルケニル、ヘテロアルキニル、ヘテロアリール、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルケニル、またはヘテロシクロアルキニル基の、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアルキル、ヘテロアルケニル、ヘテロアルキニル、ヘテロアリール、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルケニル、またはヘテロシクロアルキニルの主鎖に付着した位置への添加、例えば、これらの分子の内の１つによる水素の置換である。置換基の例として、ヒドロキシル、ハロゲン（例えば、Ｆ、Ｂｒ、Ｃｌ、またはＩ）、およびカルボキシル基が挙げられるが、これらに限定されない。反対に、本明細書で使用する際、用語の非置換は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアルキル、ヘテロアルケニル、ヘテロアルキニル、ヘテロアリール、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルケニル、またはヘテロシクロアルキニルが、水素の完全補充を有し、すなわち、置換、例えば、直鎖デカン（－（CH_2）$_9$－CH_3）を含まずにその飽和レベルに相応する。

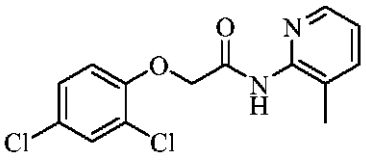
【００２７】

化合物Ｉでは、フェニル環上の隣接Ｒ基、すなわち、R^1、R^2、R^3、R^4、およびR^5は、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルケニル、置換もしくは非置換シクロアルキニル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクロアルケニル、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキニル基を形成するように組み合わせられることができる。例えば、R^5は、ホルムアミド基であることができ、R^6は、エチレン基であることができ、これらは、組み合わせてピリジノン基を形成する。他の隣接Ｒ基は、R^1およびR^2、R^2およびR^3、ならびにR^3およびR^4の組み合わせを含む。

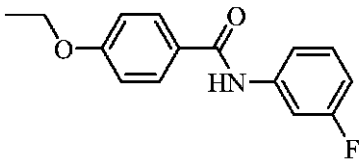
化学式Ｉの具体的な例は、以下の通りである。

【００２８】

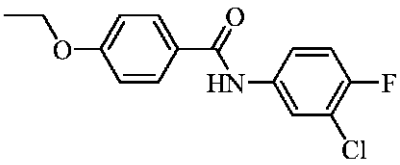
【化２－１】



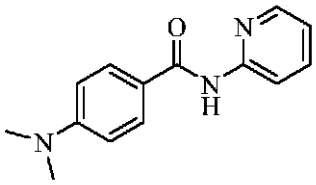
化合物 I-1



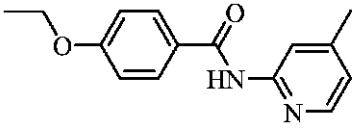
化合物 I-2



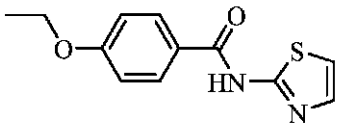
化合物 I-3



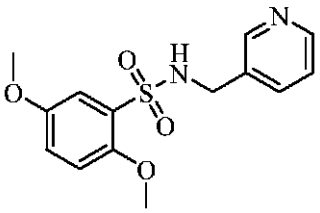
化合物 I-4



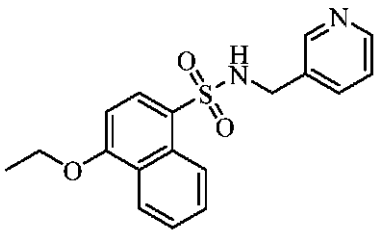
化合物 I-5



化合物 I-6



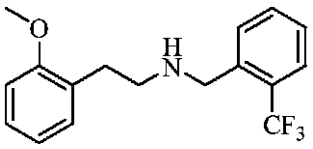
化合物 I-7



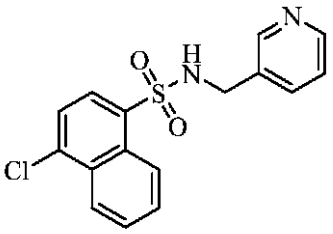
化合物 I-8

【００２９】

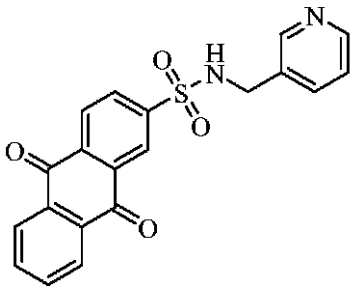
【化２－２】



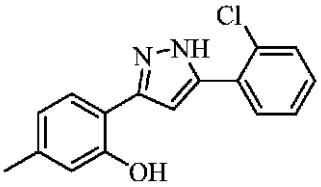
化合物 I-9



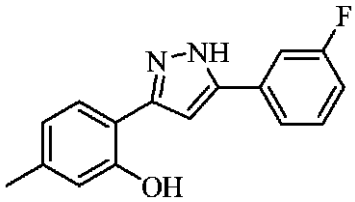
化合物 I-10



化合物 I-11



化合物 I-12



化合物 I-13

【００３０】

化学式Ｉの変形例には、化合物毎に上述した種々の成分の添加、除去、または移動が含まれる。同様に、１つ以上のキラル中心が分子に存在する場合、分子のキラリティーを変更することができる。本明細書に説明する化合物は、純粋な形態で、または異性体の混合として単離されることができる。加えて、化合物合成は、種々の化学基の保護および脱保護を伴うことができる。保護および脱保護の使用と、適切な保護基の選択とは、当業者が判断することができる。保護基の化学的性質については、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるＷｕｔｓ ａｎｄ Ｇｒｅｅｎｅ, Ｐｒｏｔｅｃｔｉｖｅ Ｇｒｏｕｐｓ ｉｎ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ, ４ｔｈ Ｅｄ., Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ, ２００６に記載されている。

【００３１】

本明細書に説明する化合物は、当業者が理解するように、有機合成またはその変形について当業者が既知である多種多様の方式で調製されることができる。本明細書に説明する化合物は、容易に入手可能な出発材料から調製されることができる。最適反応条件は、使用する特定の反応物または溶媒に応じて変動し得るが、このような条件は、当業者によって判断されることができる。

【００３２】

本明細書に説明する化合物を生成する反応は、有機合成の当業者が選択可能である溶媒中で実行されることができる。溶媒は、反応を実行する条件下、すなわち、温度および圧力下で、出発材料（反応物）、中間体、または生成物と実質的に非反応性であることができる。反応は、１つの溶媒中、または２つ以上の溶媒の混合中で実行されることができる

。生成物または中間体形成は、当技術分野において既知の任意の適切な方法に従って監視されることができる。例えば、生成物形成は、核磁気共鳴分光学法（例えば、^{1}Ｈまたは^{13}Ｃ）、赤外線分光学法、分光光度法（例えば、紫外線可視）、もしくは質量分析法等の分光学的手段によって、または高性能液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）もしくは薄層クロマトグラフィー等のクロマトグラフィーによって監視されることができる。

【００３３】

被検体におけるウイルス感染を処置または予防する方法が本明細書において提供される。本方法は、ウイルス感染を患うまたはウイルス感染を発症する危険性がある被検体を識別することであって、ウイルス感染は、ＩＲＥＳ含有ＲＮＡ分子を含むウイルスによって媒介されることと、本明細書に開示する化合物のうちのいずれかの治療的に有効な量を被検体に投与することとを含む。本化合物は、例えば、対照と比較して、被検体においてＲｐｓ２５発現または機能を低下させることができる。任意選択により、本方法は、対照と比較して、被検体におけるＲｐｓ２５発現または機能を低下させる治療的に有効な量の薬剤を、被検体に投与することをさらに含む。

【００３４】

本方法は、例えば、ウイルス感染を患うまたはウイルス感染を発症する危険性がある被検体を識別することであって、ウイルス感染は、ＩＲＥＳ含有ＲＮＡ分子を含むウイルスによって媒介されることと、対照と比較して、被検体におけるＲｐｓ２５発現または機能を低下させる治療的に有効な量の薬剤を、被検体に投与することとを含むことができる。

【００３５】

本明細書において使用する際、Ｒｐｓ２５発現または機能を低下させる薬剤は、例えば、小分子、ポリペプチド、核酸分子、ペプチド模倣薬、またはそれらの組み合わせから成る群から選択されることができる。任意選択により、核酸分子は、アンチセンス分子、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）分子、ミクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）分子、ＲＮＡアプタマー、またはそれらの組み合わせから成る群から選択される。ｓｉＲＮＡ分子は、例えば、配列番号５を含むことができる。

【００３６】

任意選択により、ウイルスは、ピコルナウイルス科内のウイルス、ジシストロウイルス科内のウイルス、フラビウイルス科内のウイルス、ヘルペスウイルス科内のウイルス、レトロウイルス科内のウイルス、およびポックスウイルス科内のウイルスから成る群から選択される。任意選択により、ウイルスは、コオロギ麻痺ウイルス、タウラ症候群ウイルス、およびイスラエル急性麻痺ウイルスから成る群から選択される。任意選択により、ウイルスは、Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）である。

【００３７】

また、内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）媒介翻訳を阻害する方法も本明細書において提供される。本方法は、細胞を提供することであって、細胞は、ＩＲＥＳ含有ＲＮＡ分子を含むことと、Ｒｐｓ２５発現または機能を低下させる薬剤と細胞を接触させることとを含む。対照と比較するＲｐｓ２５発現または機能の低下は、薬剤がＩＲＥＳ媒介翻訳を阻害することを示す。任意選択により、本方法は、対照と比較して、ＩＲＥＳ含有ＲＮＡ分子により発現されたタンパク質のレベル低下を判断することによって、ＩＲＥＳ媒介翻訳が阻害されることを判断することをさらに含む。Ｒｐｓ２５の発現は、Ｒｐｓ２５ＲＮＡまたはタンパク質発現のレベルを減少させることによって低下することができる。Ｒｐｓ２５の機能は、例えば、Ｒｐｓ２５のＩＲＥＳ含有ＲＮＡ分子に対する結合を阻害することによって、低下することができる。任意選択により、Ｒｐｓ２５の機能は、Ｒｐｓ２５の４０Ｓリボソームサブユニットに対する結合を阻害することによって低下することができる。

【００３８】

任意選択により、ＩＲＥＳ含有ｍＲＮＡは、ホタルルシフェラーゼｍＲＮＡ、ＶＥＧＦ　ｍＲＮＡ、ＭＮＴ　ｍＲＮＡ、Ｓｅｔ７　ｍＲＮＡ、Ｌ－ｍｙｃ　ｍＲＮＡ、ＭＴＧ８ａ　ｍＲＮＡ、Ｍｙｂ　ｍＲＮＡ、ＢＩＰ　ｍＲＮＡ、ｅＩＦ４Ｇ　ｍＲＮＡ、ＰＩＭ－

１　ｍＲＮＡ、ＣＹＲ６１　ｍＲＮＡ、ｐ２７　ｍＲＮＡ、ＸＩＡＰ　ｍＲＮＡ、ＢＡＧ－１　ｍＲＮＡ、またはそれらの組み合わせから成る群から選択される。

【００３９】

被検体における癌を処置または予防する方法がさらに提供される。本方法は、癌を患うまたは癌を発症する危険性がある被検体を識別することであって、癌は、ｍＲＮＡ分子のＩＲＥＳ媒介翻訳の増加または減少に関連することと、本明細書に説明する化合物のいずれかのうちの治療的に有効な量を被検体に投与することとを含む。任意選択により、本化合物は、ｍＲＮＡのＩＲＥＳ媒介翻訳の増加に関連する癌において、被検体におけるＲｐｓ２５発現または機能を低下させる。任意選択により、本方法は、ｍＲＮＡのＩＲＥＳ媒介翻訳の増加に関連する癌において、対照と比較して、Ｒｐｓ２５発現または機能を低下させる治療的に有効な量の薬剤を、被検体に投与することをさらに含む。任意選択により、本化合物は、ｍＲＮＡのＩＲＥＳ媒介翻訳の減少に関連する癌において、Ｒｐｓ２５発現または機能を増加させる。任意選択により、本方法は、ｍＲＮＡのＩＲＥＳ媒介翻訳の減少に関連する癌において、対照と比較して、Ｒｐｓ２５発現または機能を増加させる治療的に有効な量の薬剤を、被検体に投与することをさらに含む。

【００４０】

本方法は、例えば、癌を患うまたは癌を発症する危険性がある被検体を識別することであって、癌は、ｍＲＮＡ分子のＩＲＥＳ媒介翻訳の増加に関連することと、対照と比較して、Ｒｐｓ２５発現または機能を低下させる治療的に有効な量の薬剤を、被検体に投与することとを含むことができる。本方法は、例えば、癌を患うまたは癌を発症する危険性がある被検体を識別することであって、癌は、ｍＲＮＡ分子のＩＲＥＳ媒介翻訳の減少に関連することと、対照と比較して、Ｒｐｓ２５発現または機能を増加させる治療的に有効な量の薬剤を、被検体に投与することとを含むことができる。任意選択により、薬剤は、核酸分子である。核酸分子は、例えば、Ｒｐｓ２５をコード化する核酸またはその機能的断片を含むことができる。

【００４１】

本明細書において定義する際、ＩＲＥＳ媒介翻訳の増加または減少に関連する癌は、１つ以上のＩＲＥＳ含有ｍＲＮＡの翻訳における増加もしくは減少に起因して転移する癌、および／またはそれを呈して存在する癌によって引き起こされる癌である。１つ以上のＩＲＥＳ含有ｍＲＮＡの翻訳における増加または減少は、癌の転移による癌の発生からの癌の存続期間中の任意の時点に直接的または間接的に寄与する。癌の例として、乳癌、前立腺癌、肺癌、肝臓癌、膵臓癌、皮膚癌、精巣癌、卵巣癌、甲状腺癌、口腔／食道癌、および／または脳癌が挙げられるが、これらに限定されない。

【００４２】

また、ＩＲＥＳ媒介翻訳を阻害または促進する薬剤をスクリーニングする方法も提供される。本方法は、Ｒｐｓ２５またはＲｐｓ２５をコード化する核酸およびＩＲＥＳ含有ＲＮＡ分子を含む系を提供することと、系をスクリーニングされる薬剤と接触させることと、Ｒｐｓ２５発現または機能を判断することとを含む。Ｒｐｓ２５発現または機能のレベルの減少は、薬剤がＩＲＥＳ媒介翻訳を阻害することを示す。Ｒｐｓ２５発現または機能のレベルの増加は、薬剤がＩＲＥＳ媒介翻訳を促進することを示す。任意選択により、系は、細胞を含む。細胞は、自然発生のＩＲＥＳ含有ＲＮＡ分子を含有することができる。また、細胞は、人工ＩＲＥＳ含有ＲＮＡ分子を含有するように修飾されることもできる。任意選択により、系は、生体外アッセイを含む。被験薬剤は、例えば、小分子、ポリペプチド、核酸分子、ペプチド模倣薬、またはそれらの組み合わせから成る群から選択されることができる。また、本明細書に説明するスクリーニング方法によって単離された薬剤も提供される。

【００４３】

また、ＩＲＥＳ含有ＲＮＡ分子を識別する方法も提供される。本方法は、細胞におけるＲｐｓ２５発現または機能を阻害することと、細胞におけるタンパク質発現パターンを判断することと、タンパク質発現パターンを対照と比較することとを含む。対照と比較する

ＲＮＡ分子のタンパク質発現の減少は、ＲＮＡ分子がＩＲＥＳを含有することを示す。本方法は、新規のＩＲＥＳ含有ＲＮＡ分子を識別すること、または以前仮定されたＩＲＥＳ含有ＲＮＡ分子を検証することを含むことができる。Ｒｐｓ２５発現または機能は、本明細書に説明する薬剤、例えば、配列番号５を含むｓｉＲＮＡを使用して阻害されることができる。細胞のタンパク質発現パターンを判断することは、例えば、タンパク質配列を行うこと、または細胞内におけるポリソーム画分に関するディープシークエンシングアッセイを実行することを含むことができる。代替として、タンパク質発現パターンを判断することは、当技術分野において既知のタンパク質発現を判断する他の方法を使用することを含むことができる。

【００４４】

ＩＲＥＳ媒介翻訳を促進する方法がさらに提供され、本方法は、細胞を提供することであって、細胞は、ＩＲＥＳ含有ＲＮＡ分子を含むことと、対照と比較してＲｐｓ２５発現または機能を増加させる薬剤と細胞を接触させることとを含む。Ｒｐｓ２５発現または機能の増加は、薬剤がＩＲＥＳ媒介翻訳を促進することを示す。任意選択により、本方法は、対照と比較して、ＩＲＥＳ含有ＲＮＡ分子によりコード化されたタンパク質のレベルの増加を検出することによって、ＩＲＥＳ媒介翻訳が促進されるかを判断することをさらに含む。

【００４５】

また、ＩＲＥＳ媒介翻訳を促進する方法も提供され、本方法は、Ｒｐｓ２５タンパク質をコード化する核酸またはその機能的断片を細胞に提供することを含む。このような方法は、生体内または生体外であることができる。

【００４６】

また、被検体における癌を検出する方法も提供され、本方法は、被検体におけるＲｐｓ２５発現のレベルを判断することと、Ｒｐｓ２５のレベルを基準と比較することと、癌の存在を判断することとを含む。Ｒｐｓ２５翻訳または機能のレベルにおける調節は、癌の存在と相関する。類似のステップを使用して、処置の有効性を検出することができる。例えば、Ｒｐｓ２５のレベルは検出され、Ｒｐｓ２５翻訳または機能のレベルの増加は、処置が無効であるか、または処置を変更する必要があるかを示す。

【００４７】

本明細書に説明するように、ＩＲＥＳ含有ＲＮＡ分子は、人工的に生成されるか、または自然発生であることができる。人工的に生成されたＩＲＥＳ含有ＲＮＡ分子は、例えば、ホタルルシフェラーゼタンパク質の翻訳を制御するＩＲＥＳを含有するホタルルシフェラーゼｍＲＮＡであることができる。また、人工的に生成されたＩＲＥＳ含有ＲＮＡ分子は、緑色蛍光タンパク質の翻訳を制御するＩＲＥＳを含有する緑色蛍光タンパク質ｍＲＮＡであることもできる。これらのＩＲＥＳ含有ＲＮＡ分子は、概して、ＩＲＥＳ媒介翻訳のレポーターとして使用される。自然発生のＩＲＥＳ含有ＲＮＡ分子は、例えば、細胞またはウイルスＲＮＡ分子であることができる。ＩＲＥＳ含有細胞ＲＮＡは、例えば、ＶＥＧＦ　ｍＲＮＡ、ＭＮＴ　ｍＲＮＡ、Ｓｅｔ７　ｍＲＮＡ、Ｌ－ｍｙｃ　ｍＲＮＡ、ＭＴＧ８ａ　ｍＲＮＡ、Ｍｙｂ　ｍＲＮＡ、ＢＩＰ　ｍＲＮＡ、ｅＩＦ４Ｇ　ｍＲＮＡ、ＰＩＭ－１　ｍＲＮＡ、ＣＹＲ６１　ｍＲＮＡ、ｐ２７　ｍＲＮＡ、ＸＩＡＰ　ｍＲＮＡ、およびＢＡＧ－１　ｍＲＮＡから成る群から選択されることができる。ＩＲＥＳ含有ウイルスｍＲＮＡ分子は、ピコルナウイルス科のウイルス、ジシストロウイルス科のウイルス、フラビウイルス科のウイルス、レトロウイルス科のウイルス、ヘルペスウイルス科のウイルス、またはポックスウイルス科のウイルスに見られる。

【００４８】

本明細書に説明するように、Ｒｐｓ２５タンパク質発現のレベルは、例えば、ウエスタンブロット法、酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）、酵素免疫測定法（ＥＩＡ）、放射免疫測定法（ＲＩＡ）、またはタンパク質アレイから成る群から選択されるアッセイを使用して判断されることができる。Ｒｐｓ２５ＲＮＡ発現のレベルは、例えば、マイクロアレイ解析、ジーンチップ、ノーザンブロット法、原位置ハイブリダイゼーション、逆転

写ポリメラーゼ連鎖反応法（ＲＴ－ＰＣＲ）、ワンステップＰＣＲ、およびリアルタイム定量リアルタイム（ｑＲＴ）－ＰＣＲから成る群から選択されるアッセイを使用して判断されることができる。タンパク質またはＲＮＡ発現を判断するための分析技法については既知である。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，３ｒｄ Ｅｄ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ（２００１）を参照されたい。

【００４９】

本明細書に説明するように、Ｒｐｓ２５機能のレベルは、例えば、ＲＮＡ移動度シフトアッセイ、ＲＮＡ架橋アッセイ、ＲＮＡ親和性アッセイ、タンパク質－タンパク質結合アッセイ、およびＩＲＥＳ含有ＲＮＡ分子のＩＲＥＳ媒介翻訳を測定するアッセイから成る群から選択されるアッセイを使用して、判断されることができる。Ｒｐｓ２５機能の減少は、例えば、対照と比較して、ＩＲＥＳ含有ＲＮＡ分子に対する結合の損失、４０Ｓリボソームサブユニットに対する結合の損失、またはＩＲＥＳ含有ＲＮＡ分子のＩＲＥＳ媒介翻訳の減少によって実証されることができる。Ｒｐｓ２５機能の増加は、例えば、対照と比較して、ＩＲＥＳ含有ＲＮＡ分子に対する結合の強化、４０Ｓリボソームサブユニットに対する結合の強化、またはＩＲＥＳ含有ＲＮＡ分子のＩＲＥＳ媒介翻訳の増加によって、実証されることができる。また、Ｒｐｓ２５機能の増加は、対照と比較して、ＩＲＥＳ含有分子のＩＲＥＳ媒介翻訳の増加によっても実証されることができる。

【００５０】

本明細書で使用する際、薬剤は、例えば、小分子、ポリペプチド、核酸分子、ペプチド模倣薬、またはそれらの組み合わせから成る群から選択されることができる。任意選択により、ポリペプチドは、抗体である（例えば、Ｒｐｓ２５、４０Ｓリボソームサブユニット、またはＩＲＥＳ自体に対する抗体）。任意選択により、核酸分子は、Ｒｐｓ２５阻害核酸分子である。

【００５１】

Ｒｐｓ２５阻害核酸分子は、例えば、アンチセンス分子、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）分子、ミクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）分子、ＲＮＡアプタマー、またはそれらの組み合わせから成る群から選択されることができる。

【００５２】

２１－２５ヌクレオチドｓｉＲＮＡ配列またはｍｉＲＮＡ配列は、例えば、低分子ヘアピン型ＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）配列、つまり６０－８０ヌクレオチド前駆体配列の転写によって、発現ベクターから産生されることができ、その後、ｓｉＲＮＡ配列またはｍｉＲＮＡ配列を産生するように細胞ＲＮＡｉ機構によって処理される。代替として、２１－２５ヌクレオチドｓｉＲＮＡ配列またはｍｉＲＮＡ配列は、例えば、化学的に合成されることができる。ｓｉＲＮＡ配列またはｍｉＲＮＡ配列の化学合成は、Ｄｈａｒｍａｃｏｎ，Ｉｎｃ．（Ｌａｆａｙｅｔｔｅ，ＣＯ）、Ｑｉａｇｅｎ（Ｖａｌｅｎｃｉａ，ＣＡ）、およびＡｍｂｉｏｎ（Ａｕｓｔｉｎ，ＴＸ）等の企業から市販されている。ｓｉＲＮＡ配列は、好ましくは、Ｒｐｓ２５ ｍＲＮＡ内の特異的な配列を正確な相補性と結合させ、その結果、Ｒｐｓ２５ ｍＲＮＡ分子の分解をもたらす。ｓｉＲＮＡ配列は、Ｒｐｓ２５ ｍＲＮＡ分子内のいかなる位置でも結合することができる。任意選択により、Ｒｐｓ２５ ｓｉＲＮＡ配列は、ヒトＲｐｓ２５ ｍＲＮＡヌクレオチド配列のヌクレオチド２８３－３０１に対応する配列５’－ＧＧＡＣＵＵＡＵＣＡＡＡＣＵＧＧＵＵＵ－３’（配列番号１１）を標的とすることができ、この場合、位置１は、ＧｅｎＢａｎｋの登録番号ＮＭ＿００１０２８のＲｐｓ２５ ｍＲＮＡ分子のコード配列の第１のヌクレオチドで開始する。任意選択により、ｓｉＲＮＡ配列は、配列番号５を含む。ｍｉＲＮＡ配列は、好ましくは、Ｒｐｓ２５ ｍＲＮＡ内の特異的な配列を、正確な、または正確とは言えない相補性と結合させ、その結果、Ｒｐｓ２５ ｍＲＮＡ分子の翻訳抑制をもたらす。ｍｉＲＮＡ配列は、Ｒｐｓ２５ ｍＲＮＡ配列内のいかなる位置でも結合することができるが、好ましくは、Ｒｐｓ２５ ｍＲＮＡ分子の３’非翻訳領域内で結合する。ｓｉＲＮＡ分

子またはｍｉＲＮＡ分子を送達する方法は、当技術分野において既知であり、例えば、Ｏｈ ａｎｄ Ｐａｒｋ, Ａｄｖ. Ｄｒｕｇ. Ｄｅｌｉｖ. Ｒｅｖ. ６１（１０）：８５０－６２ （２００９）; Ｇｏｎｄｉ ａｎｄ Ｒａｏ, Ｊ. Ｃｅｌｌ Ｐｈｙｓｉｏｌ. ２２０（２）：２８５－９１ （２００９）；およびＷｈｉｔｅｈｅａｄ ｅｔ ａｌ, Ｎａｔ. Ｒｅｖ. Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖ. ８（２）：１２９－３８ （２００９）を参照されたい。

【００５３】

アンチセンス核酸配列は、例えば、Ｒｐｓ２５ ｍＲＮＡの少なくとも特異的部分に相補的であるＲＮＡおよび／またはＲｐｓ２５をコード化する内在性遺伝子を産生するように、発現ベクターから転写されることができる。特定の細胞条件下におけるアンチセンス核酸のハイブリダイゼーションは、結果として、転写および／または翻訳を阻害することによって、Ｒｐｓ２５タンパク質発現の阻害をもたらす。

【００５４】

本明細書に説明する抗体は、Ｒｐｓ２５を結合し、Ｒｐｓ２５の機能に拮抗する。任意選択により、本明細書に説明する抗体は、ＩＲＥＳ要素を結合し、ＩＲＥＳ要素に対するＲｐｓ２５の結合を阻害する。用語の抗体は、本明細書において広義で使用され、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の両方を含む。また、本用語は、ヒト抗体および／またはヒト化抗体も指すことができる。ヒトモノクローナル抗体産生のための技法の例として、Ｃｏｌｅ ｅｔ ａｌ. （Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ, Ａｌａｎ Ｒ. Ｌｉｓｓ, ｐ. ７７, １９８５） ａｎｄ ｂｙ Ｂｏｅｒｎｅｒ ｅｔ ａｌ. （Ｊ. Ｉｍｍｕｎｏｌ. １４７（１）：８６－９５ （１９９１））に説明する技法が挙げられる。また、ヒト抗体（およびその断片）は、ファージディスプレイライブラリを使用して産生されることもできる（Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍ ｅｔ ａｌ., Ｊ. Ｍｏｌ. Ｂｉｏｌ. ２２７：３８１ （１９９１）; Ｍａｒｋｓ ｅｔ ａｌ., Ｊ. Ｍｏｌ. Ｂｉｏｌ. ２２２：５８１ （１９９１））。また、開示するヒト抗体は、形質転換動物からも入手されることができる。例えば、免疫化に応答して、ヒト抗体の完全なレパートリーを産生可能な形質転換変異マウスについて説明されている（例えば、Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓ ｅｔ ａｌ, Ｐｒｏｃ. Ｎａｔｌ. Ａｃａｄ. Ｓｃｉ. ＵＳＡ ９０：２５５１－５ （１９９３）; Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓ ｅｔ ａｌ, Ｎａｔｕｒｅ ３６２：２５５－８ （１９９３）; Ｂｒｕｇｇｅｒｍａｎｎ ｅｔ ａｌ., Ｙｅａｒ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌ. ７：３３ （１９９３）参照）。

【００５５】

本明細書で使用する際、用語の抗体は、いかなる種類の全免疫グロブリン（すなわち、インタクト抗体）も包含するが、これに限定されない。また、用語の抗体またはその断片は、２重もしくは複数の抗原またはエピトープ特異性、ならびにハイブリッド断片を含むＦ（ａｂ’）２、Ｆａｂ’、Ｆａｂ、およびその同等物等の断片を有する、キメラ抗体およびハイブリッド抗体も包含することができる。したがって、その特異的抗原を結合する能力を保持する抗体の断片が提供される。例えば、Ｒｐｓ２５および／またはＩＲＥＳ結合活性を維持する抗体の断片は、用語の抗体またはその断片の意味内に含まれる。

【００５６】

任意選択により、抗体は、モノクローナル抗体である。用語のモノクローナル抗体は、本明細書で使用する際、抗体の実質的に均質の集団からの抗体を指し、すなわち、集団を含む個々の抗体は、少量で存在し得る可能な自然発生の変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は、Ｋｏｈｌｅｒ ａｎｄ Ｍｉｌｓｔｅｉｎ, Ｎａｔｕｒｅ, ２５６：４９５ （１９７５）またはＨａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ, Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ, Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ. Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎｓ, Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ （１９８８）に説明する方法等のハイブリドーマ方法を使用して調製されてもよい。また、モノクローナル抗体は、米国特許第４，８１６，５６７号に説明する方法等の組み換えＤＮＡ方法によって作製されて

もよい。

【００５７】

任意選択により、Ｒｐｓ２５は、ヒトに関するものである。任意選択により、Ｒｐｓ２５は、非ヒトに関するものである（例えば、齧歯動物、イヌ科の動物、またはネコ科の動物）。ＧｅｎＢａｎｋに開示する多種多様の配列が存在し、これらの配列および他の配列は、個々の配列または断片が本明細書に含まれるように、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。本明細書で使用する際、Ｒｐｓ２５は、リボソームＳ２５ポリペプチドと、その同族体、変異体、およびイソフォームを指す。例えば、ヒトＲｐｓ２５のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＮＭ＿００１０２８およびＮＰ＿００１０１９．１においてそれぞれ発見される。したがって、上述のＧｅｎＢａｎｋ登録番号のヌクレオチド配列に少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％、またはそれ以上同一のヌクレオチド配列を含むＲｐｓ２５のヌクレオチド配列が提供される。また、上述のＧｅｎＢａｎｋ登録番号の配列に少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％、またはそれ以上同一のアミノ酸配列を含むＲｐｓ２５のアミノ酸配列も提供される。

【００５８】

ポリペプチド配列、その変異体、および断片をコード化する核酸が開示される。これらの配列は、特異的タンパク質配列に関連する全ての縮重配列、すなわち、１つの特定のタンパク質配列をコード化する配列を有する全ての核酸と、タンパク質配列の開示された変異体および誘導体をコード化する縮重核酸を含む全ての核酸とを含む。したがって、各特定の核酸配列を本明細書に書き出すことはできないが、あらゆる配列が実際は開示され、開示されたタンパク質配列によって本明細書に説明されることを理解されたい。

【００５９】

本明細書で使用する際、用語のペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質は、ペプチド結合によりリンクされた２つ以上のアミノ酸から構成される分子を意味するように使用される。また、タンパク質、ペプチド、およびポリペプチドは、アミノ酸配列を指すように、本明細書において交換可能に使用される。用語のポリペプチドまたはタンパク質が、分子を含む特定のサイズまたは特定の数のアミノ酸を提案するように本明細書において使用されないこと、ならびに開示するポリペプチドが、いくつかのアミノ酸残基までまたはそれ以上のアミノ酸残基を含有することができることを認識されたい。

【００６０】

その断片を含む全てのペプチド、ポリペプチド、およびタンパク質に関し、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質の性質または機能を改変しない変異Ｒｐｓ２５ポリペプチドのアミノ酸配列における追加の修飾が発生することができることを理解されたい。このような修飾には、保存アミノ酸置換が含まれ、以下により詳細に論じられる。

【００６１】

本明細書に提供するポリペプチドは、所望の機能を有する。Ｒｐｓ２５は、ＩＲＥＳ要素を結合し、かつＩＲＥＳ媒介翻訳を促進するリボソーム複合体の一部である。ポリペプチドは、本明細書に説明する生体外アッセイを使用して、その所望の活性について試験される。

【００６２】

本明細書に説明するポリペプチドは、所望の機能が維持される限り、さらに修飾および変異されることができる。本明細書に開示する遺伝子およびタンパク質の任意の既知の修飾および誘導体または発生し得るものを規定する１つの方式が、特異的な既知の配列との同一性に関して修飾および誘導体を規定することによるものであることを理解されたい。具体的には、本明細書に提供されるＲｐｓ２５および変異体に対して少なくとも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パーセントの同一性を有するポリペプチドが開示される。当業者は、２つのポリペプチドの同一性の判断法を容易に理解する。例えば、同一性がその最高レベルになる

ように、２つの配列をアラインメントした後に同一性を計算することができる。

【００６３】

同一性を計算する別の方式は、発表されたアルゴリズムによって実行されることができる。比較のための配列の最適なアラインメントは、Ｓｍｉｔｈ ａｎｄ Ｗａｔｅｒｍａｎ，Ａｄｖ．Ａｐｐｌ．Ｍａｔｈ ２：４８２（１９８１）の局所的同一性アルゴリズムによって、Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ ａｎｄ Ｗｕｎｓｃｈ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８：４４３（１９７０）の同一性アラインメントアルゴリズムによって、Ｐｅａｒｓｏｎ ａｎｄ Ｌｉｐｍａｎ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８５：２４４４（１９８８）の類似性方法の検索によって、これらのアルゴリズムのコンピュータ化実装によって（ＧＡＰ，ＢＥＳＴＦＩＴ，ＦＡＳＴＡ，ａｎｄ ＴＦＡＳＴＡ ｉｎ ｔｈｅ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｐａｃｋａｇｅ，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ，５７５ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｄｒ．，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）、または検査によって、行われてもよい。

【００６４】

同じ種類の同一性は、例えば、核酸アラインメントに関連する少なくとも材料について参照により本明細書に組み込まれる、Ｚｕｋｅｒ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４４：４８－５２（１９８９）；Ｊａｅｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：７７０６－１０（１９８９）；Ｊａｅｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．１８３：２８１－３０６（１９８９）に開示されたアルゴリズムによって、核酸について入手されることができる。方法のいずれかが、典型的には、使用可能であること、ならびに一定の事例では、これらの種々の方法の結果が異なり得るが、当業者は、これらの方法のうちの少なくとも１つで同一性を発見することを理解し、配列が、記述の同一性を有し、かつ本明細書に開示されると言われ得ることを理解されたい。

【００６５】

タンパク質修飾は、アミノ酸配列修飾を含む。アミノ酸配列における修飾は、対立遺伝子変異として（例えば、遺伝的多型に起因して）自然に発生し得るか、環境の影響に起因して（例えば、紫外線に対する暴露によって）発生し得るか、または誘起された点突然変異体、欠失変異体、挿入変異体および置換変異体等のヒトの介入によって（例えば、クローンＤＮＡ配列の突然変異によって）産生され得る。これらの修飾は、結果的に、アミノ酸配列における変化をもたらすか、サイレント変異を提供するか、制限部位を修飾するか、または他の特異的突然変異を提供することができる。アミノ酸配列修飾は、典型的には、置換修飾、挿入修飾、または欠失修飾の３つの種類のうちの１つ以上に当てはまる。挿入は、アミノ末端融合および／または末端融合と、単一または複数のアミノ残基の配列内挿入とを含む。挿入は、通常、例えば、約１個から４個の残基のアミノ末端融合またはカルボキシル末端融合の挿入よりも小さい挿入である。欠失は、タンパク質配列からの１つ以上のアミノ酸残基の除去を特徴とする。典型的には、約２個から６個以下の残基が、タンパク質分子内の任意の一部位で欠失される。アミノ酸置換は、典型的には、単一の残基に関するが、一度に多数の異なる位置で発生することができ、挿入は、通常、約１個から１０個のアミノ酸残基であり、欠失は、約１個から３０個の残基の範囲である。欠失または挿入は、好ましくは、隣接する対、すなわち、２個の残基の欠失または２個の残基の挿入で行われる。置換、欠失、挿入、または任意のそれらの組み合わせを組み合わせて、最終構築物に到達してもよい。突然変異は、リーディングフレーム外に配列を配置してはならず、好ましくは、二次的ｍＲＮＡ構造を産生し得る相補領域を生成しない。置換修飾は、少なくとも１つの残基が除去され、異なる残基がその場所に挿入されることである。このような置換は、概して、以下の表１に従って行われ、保存的置換と呼ばれる。

【００６６】

【表１】

表１：アミノ酸置換

アミノ酸	置換（その他は当技術分野において既知である）
Ala	Ser, Gly, Cys
Arg	Lys, Gln, Met, Ile
Asn	Gln, His, Glu, Asp
Asp	Glu, Asn, Gln
Cys	Ser, Met, Thr
Gln	Asn, Lys, Glu, Asp
Glu	Asp, Asn, Gln
Gly	Pro, Ala
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val, Met
Leu	Ile, Val, Met
Lys	Arg, Gln, Met, Ile
Met	Leu, Ile, Val
Phe	Met, Leu, Tyr, Trp, His
Ser	Thr, Met, Cys
Thr	Ser, Met, Val
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, His
Val	Ile, Leu, Met

【００６７】

特異的アミノ酸置換を含む修飾は、既知の方法によって行われる。例として、修飾は、タンパク質をコード化するＤＮＡにおけるヌクレオチドの部位特異的突然変異によって行われ、これによって、修飾をコード化するＤＮＡが産生され、その後、組み換え細胞培養においてＤＮＡが発現される。既知の配列を有するＤＮＡの所定の部位において置換変異を行う技法は、周知であり、例えばＭ１３プライマー突然変異およびＰＣＲ突然変異が挙げられる。

【００６８】

被検体におけるウイルス感染または癌を処置または予防する方法が本明細書において提供される。このような方法は、本明細書に開示する有効量の化合物、または小分子、ポリペプチド、核酸分子、ペプチド模倣薬、もしくはそれらの組み合わせを含む薬剤を投与することを含む。任意選択により、小分子、ポリペプチド、核酸分子、および／またはペプチド模倣薬は、医薬組成物内に含有される。

【００６９】

提供される小分子、ポリペプチド、核酸分子、および／またはペプチド模倣薬を含有する組成物が、最適には、本明細書に説明する医薬的に許容可能な担体を含んで本明細書において提供される。本明細書に提供される組成物は、生体外投与または生体内投与に適切である。医薬的に許容可能な担体は、非生物学的である材料あるいは望ましい材料を意味し、すなわち、材料は、望ましくない生物学的効果を引き起こさずに、または材料が含有

される医薬組成物の他の成分に有害的に相互作用せずに、被検体に投与される。担体は、活性成分のいかなる分解も最小限に抑えるように、および被検体におけるいかなる副作用も最小限に抑えるように選択される。

【００７０】

適切な担体およびその製剤については、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：　Ｔｈｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ　ａｎｄ　Ｐｒａｃｔｉｃｅ　ｏｆ　Ｐｈａｒｍａｃｙ，　２１ｓｔ　Ｅｄｉｔｉｏｎ，　Ｄａｖｉｄ　Ｂ．　Ｔｒｏｙ，　ｅｄ．，　Ｌｉｐｐｉｃｏｔｔ　Ｗｉｌｌｉａｍｓ　＆　Ｗｉｌｋｉｎｓ　（２００５）に説明されている。典型的には、製剤等張性を与えるために、適切な量の医薬的に許容可能な塩を製剤中に使用する。医薬的に許容可能な担体の例として、滅菌水、生理食塩水、リンガー溶液等の緩衝液、およびデキストロース溶液が挙げられるが、これらに限定されない。溶液のｐＨは、概して、約５から約８、または約７から７．５である。他の担体は、免疫原性ポリペプチドを含有する固体疎水性ポリマーの半透過性マトリクス等の徐放性製剤を含む。マトリクスは、成形品の形態、例えば、フィルム、リポソーム、または微粒子である。一定の担体が、例えば、投与経路および投与される組成物濃度に応じて、より好ましくてもよい。担体は、薬剤、例えば、小分子、ポリペプチド、核酸分子、および／またはペプチド模倣薬をヒトまたは他の被検体に投与するのに適切な担体である。

【００７１】

組成物は、所望する処置が局所かまたは全身かに応じて、および処置する部位に応じて、多数の方式で投与される。組成物は、局所、経口、非経口、静脈内、関節内、腹腔内、筋肉内、皮下、腔内、経皮、肝内、頭蓋内、噴霧／吸入を含むいくつかの投与経路を介して、または気管支鏡検査法を介する設置によって、投与される。任意選択により、組成物は、経口吸入投与、鼻孔吸入投与、または鼻腔内粘膜投与によって投与される。吸入による組成物の投与は、例えば、エアロゾルの形態で噴霧機構または液滴機構による送達を介して、鼻または口を通ることができる。癌処置の場合、組成物または薬剤は、腫瘍内または腫瘍上に直接投与されることができる。

【００７２】

非経口投与のための調製は、滅菌水溶液または非水溶液、懸濁液、および乳剤を含む。非水溶媒の例として、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油等の植物油、オレイン酸エチル等の注射用有機エステルが挙げられる。水溶性担体には、生理食塩水および緩衝媒質を含む、水、アルコール溶液／水溶液、乳剤、または懸濁液が含まれる。非経口ビヒクルには、塩化ナトリウム溶液、ブドウ糖リンゲル液、ブドウ糖および塩化ナトリウム、乳酸加リンゲル液、または固定油が含まれる。静脈内ビヒクルには、流体および栄養補充薬、電解質補充薬（ブドウ糖リンゲル液ベースのもの等）、およびその同等物が含まれる。保存剤および他の添加剤、例えば、抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤、および不活性ガス、およびその同等物等が、任意選択により存在する。

【００７３】

局所投与のための製剤には、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、点滴薬、坐薬、噴霧、液体、および粉末が含まれる。従来の医薬担体、水溶液、粉末または油ベース、増粘剤、およびその同等物が、任意選択により、必要であるか、または望ましい。

【００７４】

経口投与のための組成物には、粉末または顆粒、水または非水媒質中の懸濁液または溶液、カプセル、サシェ、または錠剤が含まれる。増粘剤、香味剤、希釈剤、乳化剤、分散助剤、または結合剤が、任意選択により望ましい。

【００７５】

任意選択により、核酸分子またはポリペプチドは、ポリペプチドをコード化する核酸分子または核酸配列を含むベクターによって投与される。生体外または生体内のいずれかで、例えば発現ベクターを介して核酸分子および／またはポリペプチドを細胞に送達するために使用可能である多数の組成物および方法が存在する。これらの方法および組成物は、主に、ウイルスベースの送達システムおよび非ウイルスベースの送達システムの２つの種

類に分類されることができる。このような方法は、当技術分野において周知であり、本明細書に説明する組成物および方法とともに使用するために容易に適合可能である。

【００７６】

本明細書で使用する際、プラスミドまたはウイルスベクターは、分解せずに開示する核酸を細胞内に移動する薬剤であり、核酸が送達される細胞において核酸分子および／またはポリペプチドの発現を生じるプロモーターを含む。ウイルスベクターは、例えば、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポリオウイルス、シンドビス、およびＨＩＶ骨格を有するこれらのウイルスを含む他のＲＮＡウイルスである。また、ベクターとしての使用に適切にするこれらのウイルスの特性を共有する任意のウイルス科も好ましい。レトロウイルスベクターは、概して、ベクターおよびベクターを作製する方法について、参照により本明細書に組み込まれるＣｏｆｆｉｎ ｅｔ ａｌ，Ｒｅｔｏｒｖｉｒｕｓｅｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９９７）によって説明される。複製欠損アデノウイルスの構築について説明されている（Ｂｅｒｋｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ ６１：１２１３－２０（１９８７）；Ｍａｓｓｉｅ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．６：２８７２－８３（１９８６）；Ｈａｊ－Ａｈｍａｄ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ ５７：２６７－７４（１９８６）；Ｄａｖｉｄｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ ６１：１２２６－３９（１９８７）；Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １５：８６８－７２（１９９３））。これらのウイルスのベクターとしての便益および使用は、初期感染細胞内で複製することができるが、新しい感染ウイルス粒子を形成することができないため、他の細胞型に拡散可能である程度で制限される。組み換えアデノウイルスは、気道上皮、肝細胞、血管内皮、ＣＮＳ実質、および多数の他の組織部位への直接生体内送達の後に高効率を達成することが分かっている。他の有用なシステムには、例えば、複製および宿主制限非複製ワクシニアウイルスベクターが含まれる。

【００７７】

提供されるポリペプチドおよび／または核酸分子は、ウイルス様粒子を介して送達されることができる。ウイルス様粒子（ＶＬＰ）は、ウイルスの構造タンパク質由来のウイルスタンパク質から成る。ウイルス様粒子を作製および使用するための方法は、例えば、Ｇａｒｃｅａ ａｎｄ Ｇｉｓｓｍａｎｎ，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １５：５１３－７（２００４）に説明される。

【００７８】

提供されるポリペプチドは、サブウイルス濃密体（ＤＢ）によって送達されることができる。ＤＢは、膜融合によって、タンパク質を標的細胞内に移動する。ＤＢを作製および使用するための方法は、例えば、Ｐｅｐｐｅｒｌ－Ｋｌｉｎｄｗｏｒｔｈ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ １０：２７８－８４（２００３）に説明される。

【００７９】

提供されるポリペプチドは、テグメント凝集体によって送達されることができる。テグメント凝集体を作製および使用するための方法は、国際公開第ＷＯ２００６／１１０７２８号に説明される。

【００８０】

非ウイルスベースの送達方法は、ポリペプチドをコード化する核酸分子および核酸配列を含む発現ベクターを含むことができ、核酸は、発現制御配列に作用可能にリンクされる。適切なベクター骨格には、例えば、プラスミド、人工染色体、ＢＡＣ、ＹＡＣ、またはＰＡＣ等の当技術分野において日常的に使用されるものが含まれる。多数のベクター系および発現系が、Ｎｏｖａｇｅｎ（Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）、Ｃｌｏｎｅｔｅｃｈ（Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ，ＣＡ）、Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ（Ｌａ Ｊｏｌｌａ，ＣＡ）、およびＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ／Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）等の企業から市販されている。ベクターは、典型的には、１つ以上の調節領域を含有する。調節領域には、プロモーター配列、エンハンサー配列、応答要素、タンパク質認

識部位、誘導要素、タンパク質結合配列、５’および３’非翻訳領域（ＵＴＲ）、転写開始部位、終結配列、ポリアデニル化配列、およびイントロンが含まれるが、これらに限定されない。

【００８１】

哺乳類宿主細胞におけるベクターからの転写を制御する好適なプロモーターは、種々の源、例えば、ポリオーマ、シミアンウイルス４０（ＳＶ４０）、アデノウイルス、レトロウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス、およびサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）等のウイルスのゲノムから、または異種哺乳類プロモーター、例えば、β－アクチンプロモーターもしくはＥＦ１αプロモーターから、またはハイブリッドもしくはキメラプロモーター（例えば、β－アクチンプロモーターに融合されたＣＭＶプロモーター）から入手されてもよい。当然ながら、宿主細胞または関連種からのプロモーターも本明細書において有用である。

【００８２】

エンハンサーは、概して、転写開始部位から固定距離をおかずに機能し、かつ転写単位までの５’または３’であることができるＤＮＡの配列を指す。さらに、エンハンサーは、イントロン内ならびにコード配列自体内に存在することができる。エンハンサーの長さは通常１０ｂｐから３００ｂｐの間であり、シスにおいて機能する。エンハンサーは、通常、近接プロモーターからの転写を増加させるように機能する。また、エンハンサーは、転写の調節を媒介する応答要素も含有することができる。哺乳類遺伝子からの多くのエンハンサー配列（グロビン、エラスターゼ、アルブミン、フェトプロテイン、およびインスリン）が既知であるが、典型的には、一般的な発現について、真核細胞ウイルスからのエンハンサーが使用される。好適な例として、複製起点の後期側にあるＳＶ４０エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側にあるポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーが挙げられる。

【００８３】

プロモーターおよび／またはエンハンサーは、誘導性であることができる（例えば、化学的または物理的に調節される）。化学的に調節されるプロモーターおよび／またはエンハンサーは、例えば、アルコール、テトラサイクリン、ステロイド、または金属の存在によって調節されることができる。物理的に調節されるプロモーターおよび／またはエンハンサーは、例えば、温度および光等の環境要因によって調節されることができる。任意選択により、プロモーターおよび／またはエンハンサー領域は、転写される転写単位の領域の発現を最大限にするように、構成的プロモーターおよび／またはエンハンサーとしての役割を果たすことができる。一定のベクターでは、プロモーターおよび／またはエンハンサー領域は、細胞型に特異的な方式で活性であることができる。任意選択により、一定のベクターでは、プロモーターおよび／またはエンハンサー領域は、細胞型に関係なく、全ての真核細胞において活性であることができる。この種類の好適なプロモーターとして、ＣＭＶプロモーター、ＳＶ４０プロモーター、β－アクチンプロモーター、ＥＦ１αプロモーター、およびレトロウイルスの長い端末反復（ＬＴＲ）が挙げられる。

【００８４】

また、ベクターは、例えば、複製起点および／またはマーカーも含むことができる。マーカー遺伝子は、細胞上で、選択可能な表現型、例えば、抗生物質耐性をもたらすことができる。マーカー生成物は、ベクターが細胞に送達されているか、および一旦送達されると、発現されているかを判断するために使用される。哺乳類細胞の選択可能なマーカーの例として、ジヒドロ葉酸還元酵素（ＤＨＦＲ）、チミジンキナーゼ、ネオマイシン、ネオマイシン類似体Ｇ４１８、ハイグロマイシン、ピューロマイシン、およびブラストサイジンが挙げられる。このような選択可能なマーカーが、哺乳類宿主細胞内への移動に成功する場合、形質転換された哺乳類宿主細胞は、選択圧下に置かれる場合に生存することができる。他のマーカーの例として、例えば、大腸菌ｌａｃＺ遺伝子、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、およびルシフェラーゼが挙げられる。加えて、発現ベクターは、発現されたポリペプチドの操作または検出（例えば、浄化または局在）を容易にするように設計されたタグ配列を含むことができる。ＧＦＰ、グルタチオンＳ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）

、ポリヒスチジン、ｃ－ｍｙｃ、血球凝集素、またはＦＬＡＧ™タグ（Ｋｏｄａｋ； Ｎｅｗ Ｈａｖｅｎ， ＣＴ）配列等のタグ配列は、典型的には、コード化されたポリペプチドとの融合として発現される。このようなタグは、カルボキシル末端またはアミノ末端のいずれかを含むポリペプチド内のいずれの位置にも挿入されることができる。

【００８５】

本明細書において使用する際、被検体は、脊椎動物、より具体的には、哺乳類（例えば、ヒト、ウマ、ネコ、イヌ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、マウス、ウサギ、ラット、およびモルモット）、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、および任意の他の動物であることができる。本用語は、特定の年齢または性別を示さない。したがって、成体および新生の被検体が、雄雌にかかわらず、含まれるように意図される。本明細書で使用する際、患者または被検体は、交換可能に使用されてもよく、病気または疾患（例えば、ウイルス感染または癌）を有する被検体を指すことができる。用語の患者または被検体は、ヒトおよび動物の被検体を含む。

【００８６】

被検体には、癌を患うまたは癌を発症する危険性がある被検体、またはウイルス感染を患うまたはウイルス感染を発症する危険性がある被検体が含まれる。癌を発症する危険性がある被検体は、遺伝的に癌にかかりやすい可能性があり、例えば、家族歴を有するか、あるいは病気もしくは疾患を引き起こすまたは免疫欠陥であり得る遺伝子の突然変異を有する。ウイルス感染を発症する危険性がある被検体は、ウイルス感染にかかりやすい可能性があり、例えば、被検体をウイルス感染にかかる危険性のある状態に置く職業を有するか、免疫不全を有するか、またはウイルスに暴露されている。現在癌またはウイルス感染を患う被検体は、癌またはウイルス感染の１つまたは複数の症状を有し、癌またはウイルス感染と診断されている可能性がある。

【００８７】

本明細書に説明する方法および薬剤は、予防的処置および治療的処置の両方に有用である。予防的使用では、本明細書に説明する治療的に有効な量の薬剤は、発病前（例えば、癌またはウイルス感染の明らかな徴候前）または初期発症中（例えば、癌またはウイルス感染の初期徴候および症状時）に、被検体に投与される。予防的投与は、癌またはウイルス感染の症状の顕在化の前に、数年間から何年間もの間発生し得る。予防的投与は、癌に対する遺伝的素因と診断された被検体の予防的処置において使用されることができる。治療的処置は、癌またはウイルス感染の診断または発症後に、本明細書に説明する治療的に有効な量の薬剤を被検体に投与することを伴う。

【００８８】

本明細書に教示する方法によると、被検体は、有効量の薬剤を投与される。用語の有効量および有効投与量は、交換可能に使用される。用語の有効量は、所望の生理学的反応（例えば、ウイルス感染または癌の処置をもたらすＩＲＥＳ媒介翻訳のレベルの減少）を産生するのに必要な任意の量として定義される。有効量および薬剤の投与スケジュールは、経験的に判断されてもよく、このような判断を行うことは、当技術分野の技術内にある。投与に関する投与量範囲は、病気または疾患のうちの１つ以上の症状が影響を受ける（例えば、低減または遅延する）所望の効果を産生するのに十分多量である。投与量は、不要な交差反応、アナフィラキシー反応、およびその同等物等の実質的な副作用を引き起こすほど多量であってはならない。概して、投与量は、年齢、病状、性別、病気の種類、病気もしくは疾患の程度、投与経路、または他の薬物がレジメンに含まれるか否かに応じて変動し、当業者によって判断されることができる。投与量は、いかなる禁忌の場合も個々の医師によって調整されることができる。投与量は、変動することができ、１日間または数日間の間、毎日１回以上の用量投与で投与されることができる。所定の種類の医薬品の適切な投与量についてのガイダンスは、文献に見られ得る。

【００８９】

本明細書で使用する際、用語の処置、処置する、または処置することは、病気（例えば、癌）もしくは病状（例えば、ウイルス感染）の影響または病気または病状の症状を低減

させる方法を指す。したがって、開示する方法では、処置は、罹患している病気もしくは病状の重症度または病気もしくは病状の症状における１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、または１００％の低減を指すことができる。例えば、病気を処置するための方法は、対照と比較して、被検体における病気の１つ以上の症状が１０％低減する場合に、処置であると考えられる。したがって、低減は、自然レベルまたは対照レベルと比較して、１０％から１００％の間の１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、または任意のパーセントの低減であることができる。また、処置は、１つ以上の症状の進行を遅らせることも含むことができる。処置が、必ずしも、病気、病状、または病気もしくは病状の症状の治癒または完全切除を指すとは限らないことを理解されたい。したがって、処置は、例えば、ウイルス感染または癌の１つ以上の症状における改善を指す。

【００９０】

本明細書で使用する際、病気（例えば、癌）または病状（例えば、ウイルス感染）に関する用語の予防する、予防すること、および予防は、行為、例えば、病気または病状の１つ以上の症状を被検体が示し始める前または示し始めるのとほぼ同時に発生する治療薬剤であって、病気または病状の１つ以上の症状の発症または悪化を阻害または遅延させる治療薬剤の投与を指す。本明細書で使用する際、減少、低減、または阻害することの言及は、対照レベルと比較して、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、またはそれ以上の変化を含む。このような用語は、完全排除を含むが、必ずしも完全排除を含むとは限らない。

【００９１】

対照は、処置の欠如または薬剤もしくは組成物の欠如を意味する。したがって、対照は、処置前または処置後の、既知の基準、または被検体、細胞、もしくは系であることができる。また、対照は、未処置の被検体、細胞、または系であることができる。

【００９２】

開示する方法および組成物に使用可能であるか、それらとともに使用可能であるか、それらの調製に使用可能であるか、またはそれらの生成物である材料、組成物、および成分が開示される。これらの材料および他の材料は、本明細書に開示され、これらの材料の組み合わせ、サブセット、相互作用、グループ等が開示される場合、これらの化合物の各種々の個々のおよび集団的組み合わせおよび置換の具体的な言及が、明示的に開示され得なくても、各々が、具体的に想定され、本明細書において説明されることを理解されたい。例えば、方法について開示および説明され、方法を含む多数の分子に加えることができる多数の修正について説明される場合、方法のあらゆる組み合わせおよび置換ならびに可能な修正が、これとは異なる具体的な規定がない限り、具体的に想定される。同様に、これらの任意のサブセットまたは組み合わせも、具体的に想定および開示される。本概念は、開示する組成物を使用する方法におけるステップを含むがこれらに限定されない全ての態様に当てはまる。したがって、実行可能な多種多様の追加のステップが存在する場合、これらの追加のステップの各々が、開示する方法の方法ステップの任意の具体的な方法ステップまたはその組み合わせであることができること、ならびにこのような各組み合わせまたは組み合わせのサブセットが具体的に想定され、開示されるものと考えられるべきであることを理解されたい。

【００９３】

本明細書に引用する出版物および引用される資料は、参照によりその全体が本明細書に具体的に組み込まれる。

【実施例】

【００９４】

一般的方法

一般的な酵母および細胞培養

本研究で使用する出芽酵母株は、サッカロミセス属欠失プロジェクトからのものであった：野生型（ＢＹ４７４１：ＭＡＴα　ｈｉｓ３ΔＩ　ｌｅｕ２Δ０　ｍｅｔ１５Δ０

ｕｒａ３Δ０）、ｒｐｓ２５αΔ（ＢＹ４６５７：ＭＡＴα　ｈｉｓ３ΔＩ　ｌｅｕ２Δ０　ｍｅｔ１５Δ０　ｕｒａ３Δ０　ｒｐｓ２５ａ：：ＫａｎＭＸ）、およびｒｐｓ２５ｂＤ（ＢＹ１５２４２：ＭＡＴα　ｈｉｓ３ΔＩ　ｌｅｕ２Δ０　ｌｙｓ２Δ０　ｕｒａ３Δ０　ｒｐｓ２５ｂ：：ＫａｎＭＸ）（Ｗｉｎｚｅｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２８５：９０１－６　（１９９９））。ｒｐｓ２５ａΔｂΔ（ＳＲＴ２２１：ＭＡＴα　ｈｉｓ３ΔＩ　ｌｅｕ２Δ０　ｌｙｓ２Δ０　ｕｒａ３Δ０　ｒｐｓ２５ａ：：ａｎＭＸ　ｒｐｓ２５ｂ：：ＫａｎＭＸ）を、標準的な遺伝子的技術を使用して、ＢＹ４６５７およびＢＹ　１５２４２を交配させ、胞子を形成させ、およびテトラドを解剖することによって生成した（Ｔｒｅｃｏ　ａｎｄ　Ｗｉｎｓｔｏｎ，Ｃｕｒｒ．Ｐｒｏｔｏｃ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．８２；１３．１２．１１－１３．１２．１２（２００８））。標準的な方法を使用して、酵母株を増殖および形質転換させた（Ｂｅｃｋｅｒ　ａｎｄ　Ｌｕｎｄｂｌａｄ，Ｃｕｒｒ．Ｐｒｏｔｏｃ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２７：１３．１７．１１－１３．１７．１０（１９９３）；Ｔｒｅｃｏ　ａｎｄ　Ｌｕｎｄｂｌａｄ，Ｃｕｒｒ．Ｐｒｏｔｏｃ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２３：１３．１１．１１－１３．１１．１７（１９９３））。サザンブロット法を実行して、ＲＰＳ２５ＡおよびＲＰＳ２５Ｂの両方が、ｒｐｓ２５ａΔｂΔ酵母株において分裂することを確認した。

【００９５】

完全培地（１０％［ｖ／ｖ］ウシ胎仔血清、１％［ｖ／ｖ］Ｌ－グルタミン酸、１％［ｖ／ｖ］ペニシリン、およびストレプトマイシンで補充された高グルコースダルベッコ変法イーグル培地［ＤＭＥＭ］）中に、３７℃および５％ＣＯ２でヒーラ細胞（Ａｍｂｉｏｎ；Ａｕｓｔｉｎ，ＴＸ）を保持した。

【００９６】

プラスミド操作

プライマー（Ｓ２５ａｄｄｓｔｏｐ＿センス、５’－ＡＡＣＣＡＣＴＴＴＧＴＡＣＡＡＧＡＡＡＧＣＴＴＡＧＴＴＴＴＣＡＧＡＡＧＣＡＧＴＡＧＣＴＣＴＧ－３’（配列番号１）；Ｓ２５ａｄｄｓｔｏｐ＿アンチセンス、５’－ＣＡＧＡＧＣＴＡＣＴＧＣＴＴＣＴＧＡＡＡＡＣＴＡＡＧＣＴＴＴＣＴＴ　ＧＴＡＣＡＡＡＧＴＧＧＴＴ－３’（配列番号２）を使用して、以前説明されているように（Ｄｅｎｉｚ　ｅｔ　ａｌ．，ＲＮＡ　１５：９３２－４６　（２００９））、部位特異的突然変異誘発によって、ＲＰＳ２５Ａ　ＯＲＦの後およびＣ末端Ｈｉｓ６タグの前に、ＵＡＡ終止コドンをｐＳ２５Ａレスキュープラスミド（Ｏｐｅｎ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ；Ｈｕｎｔｓｖｉｌｌｅｄ，ＡＬ，ｃａｔａｌｏｇ　ｎｏ．　ＹＳＣ３８６９－９５１８４９０）内に挿入した。高コピージシストロン性レポーター（ｐＳＲＴ２０９）を生成するために、ＰＧＫ１プロモーター、ウミシイタケルシフェラーゼＯＲＦ、ＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳ（ヌクレオチド６０２８－６２１３）、およびΔＡＴＧホタルルシフェラーゼを含有するｐＤｕａｌＬｕｃ（Ｄｅｎｉｚ　ｅｔ　ａｌ．，ＲＮＡ　１５：９３２－４６　（２００９））からのＢａｍＨＩおよびＳａｌＩ断片を、ｐＲＳ４２５プラスミド（Ｃｈｒｉｓｔｉａｎｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅ　１１０：１１９－２２　（１９９２））のＢａｍＨＩ部位およびＳａｌＩ部位内にサブクローニングした。特異的プライマー（ΔＰＫＩ＿センス、５’－ＣＡＧＡＴＴＡＧＧＴＡＧＴＣＧＡＡＡＡＡＣＣＴＡＡＧＡＡＡＴＴＴ　ＡＧＧＴＧＣＴＡＣＡＴＴＴＣＡＡＧＡＴＴ－３’（配列番号３）；ΔＰＫＩ＿アンチセンス、５’－ＡＡＴＣＴＴＧＡＡ
ＡＴＧＴＡＧＣＡＣＣＴＡＡＡＴＴＴＣＴＴＡＧＧＴＴＴＴＴＣＧＡＣＴＡＣＣＴＡＡＴＣＴＧ－３’（配列番号４）（Ｄｅｎｉｚ　ｅｔ　ａｌ，ＲＮＡ　１５：９３２－４６　（２００９））を使用して、部位特異的突然変異誘発によって、ＩＧＲｍｕｔ陰性対照ｐＳＲＴ２１０を生成した。ｐΔＥＭＣＶプラスミド（Ｃａｒｔｅｒ　ａｎｄ　Ｓａｒｎｏｗ，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７５：２８３０１－７（２０００））を修飾して、下流Ａｐａｌ制限部位をホタルルシフェラーゼシストロンからＢａｍＨＩに変化させ、ｐＳＲＴ２２２を生成することによって、クローニングを促進した。哺乳類のジシ

ストロン性ＩＧＲ　ＩＲＥＳレポーターｐＳＲＴ２０６を構築するために、ウミシイタケルシフェラーゼＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳ（ヌクレオチド６０２８－６２１３）およびＤＡＴＧホタルルシフェラーゼを含有する、ｐＤｕａｌＬｕｃ（Ｄｅｎｉｚ　ｅｔ　ａｌ．，　ＲＮＡ　１５：９３２－４６　（２００９））からのＮｈｅＩからＸｈｏＩの断片を、ｐＳＲＴ２２２のＮｈｅＩ部位およびＢａｍＨＩ部位内にクローニングした。リードスルーレポーターおよびミスコードレポーターについては、以前に説明されている（Ｋｅｅｌｉｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，　ＲＮＡ　１０：６９１－７０３　（２００４）；　Ｓａｓ－Ｍａｒｃｏ　ａｎｄ　Ｂｅｄｗｅｌｌ，　Ｊ．　Ｍｏｌ．　Ｂｉｏｌ．　３４８：８０１－１５　（２００５））。フレームシフトレポーターについては、以前に説明されている（Ｈａｒｇｅｒ　ａｎｄ　Ｄｉｎｍａｎ，　ＲＮＡ　９：１０１９－２４　（２００３））。

【００９７】

ルシフェラーゼアッセイ

以前に説明されているように（Ｄｅｎｉｚ　ｅｔ　ａｌ．，　ＲＮＡ　１５：９３２－４６　（２００９））、ＩＲＥＳおよびフレームシフトルシフェラーゼアッセイを実行した。簡潔に言うと、指示レポータープラスミドで酵母株を形質転換した。ルシフェラーゼ活性を測定するために、細胞を、ＳＤ培地中、３０℃で、対数期中間まで増殖した。細胞の１つのOD_{600}をペレット状にし、１００ｍＬの１３受動的溶解緩衝液（ＰＬＢ）で２分間溶解した。製造会社のプロトコルに従ってデュアルルシフェラーゼアッセイキット（Ｐｒｏｍｅｇａ；　Ｍａｄｉｓｏｎ，　ＷＩ）を使用して、Ｌｕｍａｔ　ＬＢ　９５０７ルミノメータ（Ｂｅｒｔｈｏｌｄ；　Ｏａｋ　Ｒｉｄｇｅ，　ＴＮ）で、株毎の発光を測定した。各アッセイを３通り実行した。ＩＲＥＳ活性は、野生型株のホタル／ウミシイタケルシフェラーゼ比率に正規化されたホタル／ウミシイタケルシフェラーゼ比率として表現される。

【００９８】

デュアルルシフェラーゼフレームシフトレポーター（Ｈａｒｇｅｒ　ａｎｄ　Ｄｉｎｍａｎ，　ＲＮＡ　９：　１０１９－２４　（２００３））を使用して、フレームシフト活性を測定した。フレームシフトは、フレームシフトシグナルが欠如し、かつ同一のリーディングフレームに両方のルシフェラーゼを有する、対照のホタル／ウミシイタケルシフェラーゼ比率により割られたフレームシフトレポーターのホタル／ウミシイタケルシフェラーゼ比率として表現される。リードスルーおよびミスコードを、レポーターを使用して測定した。簡単に言うと、$1X10^4$細胞を対数期中間に採取し、製造会社のプロトコル（Ｐｒｏｍｅｇａ；　Ｍａｄｉｓｏｎ，　ＷＩ）に従って、デュアルルシフェラーゼアッセイを４通り実行した。ウミシイタケルシフェラーゼＯＲＦの後の終止コドンにおけるリードスルーまたはミスコード事象の発生時にホタルルシフェラーゼが翻訳された。ホタルルシフェラーゼ活性の量を、内部対照としてのウミシイタケルシフェラーゼ活性に正規化した。次いで、この値を、理論的に１００％リードスルーまたはミスコードであり得る、終止コドンまたはセンスコドンが存在しないレポーターからのウミシイタケルシフェラーゼに正規化されたホタルルシフェラーゼ活性で割ることによって、レポーター毎のリードスルー値またはミスコード値の割合が提供された。したがって、株毎のリードスルーまたはミスコードの割合は、ホタル／ウミシイタケルシフェラーゼ活性比率（センスコドンまたはミスコードレポーター）により割られたホタル／ウミシイタケルシフェラーゼ活性比率（終止コドンまたはミスコードレポーター）に１００を掛けるものとして表現される。

【００９９】

ヒーラ細胞中のルシフェラーゼ活性を測定するために、６ウェルプレートからの細胞を、リン酸緩衝生理食塩水（１３７ｍＭのＮａＣｌ、２．７ｍＭのＫＣｌ、１０ｍＭの第２リン酸ナトリウム、ｐＨ７．４の２ｍＭのリン酸カリウム）で洗浄し、微小遠心管に移動した。細胞を遠心分離でペレット状にし、２００ｍＬの１３ＰＬＢ（Ｐｒｏｍｅｇａ）で、室温で１５分間溶解し、製造会社のプロトコル（Ｐｒｏｍｅｇａ）に従って、ＬｕｍａｔＬＢ９５０７ルミノメータ（Ｂｅｒｔｈｏｌｄ）を使用して、２０ｍＬの溶解物をアッ

セイした。全てのアッセイを３通り実行した。

【０１００】

ポリソームプロフィル

酵母株を合成最少培地中で対数期中間まで増殖した（OD_{600}＝０．６）。細胞を氷上で冷却し、シクロヘキサミドを添加して、０．１ｍｇ／ｍＬの終濃度にした。細胞を遠心分離で採取し（１３，０００ｇ、４℃で５分）、溶解緩衝液（ｐＨ８．０の２０ｍＭのトリス－ＨＣｌ、１４０ｍＭのＫＣｌ、１．５ｍＭのＭｇＣｌ２、０．５ｍＭのＤＴＴ、１％トリトンＸ－１００、０．１ｍｇ／ｍＬのシクロヘキサミド、１ｍｇ／ｍＬのヘパリン）で一度洗浄した。遠心分離（２０００ｇ、４℃で５分）の後、ペレットを溶解緩衝液中で再懸濁し、ガラスビーズ破砕によって細胞を溶解した。溶解物を遠心分離によって除去し、勾配緩衝液（ｐＨ８．０の２０ｍＭのトリス－ＨＣｌ、１４０ｍＭのＫＣｌ、５ｍＭのＭｇＣｌ２、０．５ｍＭのＤＴＴ、０．１ｍｇ／ｍＬのシクロヘキサミド、１ｍｇ／ｍＬのヘパリン）中で作製された２０％～５０％ショ糖密度勾配の上に層状にした。１５１，２６３ｇにおいて、４℃で１６０分間、Ｂｅｃｋｍａｎ　ＳＷ４１ローターにおいて、勾配を遠心分離によって処理した。画分を回収し、ＩＳＣＯ　ＵＡ－５吸収度モニター（Ｔｅｌｅｄｙｎｅ；　Ｔｈｏｕｓａｎｄ　Ｏａｋｓ，　ＣＡ）を使用して、A_{254}を記録した。

【０１０１】

４０Ｓ－結合アッセイ

酵母をＹＰＤ（野生型またはｒｐｓ２５ａΔｂΔ）または合成最少培地（ｒｐｓ２５ａΔｂΔ＋ｐＳ２５Ａ）中で増殖して、１．０のOD_{600}にした。次いで、細胞を採取し、リボ溶解緩衝液（ｐＨ７．４の２０ｍＭのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．６の１００ｍＭのＫＯＡｃ、２．５ｍＭのＭｇ（ＯＡｃ）$_2$、１ｍｇ／ｍＬのヘパリン、２ｍＭのＤＴＴ、Ｃｏｍｐｌｅｔｅプロテアーゼ阻害剤錠剤ＥＤＴＡフリー（Ｒｏｃｈｅ））中でガラスビーズ破砕によって溶解した。細胞溶解物を遠心分離によって浄化し、ショ糖クッション上に層状にし、１２３，３７９ｇで２３７分間、Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｔｙｐｅ　４２．１ローターで回転させて、ポリソームをペレット状にした。ポリソームを高塩濃度洗浄液（ｐＨ７．４の２０ｍＭのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．６の１００ｍＭのＫＯＡｃ、２．５ｍＭのＭｇ（ＯＡｃ）$_2$、５００ｍＭのＫＣｌ、１ｍｇ／ｍＬのヘパリン、２ｍＭのＤＴＴ］中で一時間再懸濁し、ショ糖クッション［ｐＨ７．４の２０ｍＭのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．６の１００ｍＭのＫＯＡｃ、２．５ｍＭのＭｇ（ＯＡｃ）２，５００ｍＭのＫＣｌ、１Ｍのショ糖、２ｍＭのＤＴＴ］上で層状にし、４２４，４８０ｇで３０分間、Ｂｅｃｋｍａｎ　ＴＬＡ　１００．３ローターで遠心分離機にかけた。ピューロマイシン（４ｍＭ）の添加によりポリソームをｍＲＮＡから放出し、５％～２０％ショ糖密度勾配（ｐＨ７．４の５０ｍＭのＨＥＰＥＳ、５００ｍＭのＫＣｌ、５ｍＭの$MgCl_2$、０．１ｍＭのＥＤＴＡ、２ｍＭのＤＴＴ）を通して、リボソームサブユニットを遠心分離によって分離した。勾配を画分し、４０Ｓサブユニットを含有する画分をＭｉｃｒｏｃｏｎ遠心濃縮器（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ；　Ｂｉｌｌｅｒｉｃａ，　ＭＡ）で濃縮し、勾配緩衝液を、サブユニット保管緩衝液（２０ｍＭのＨｅｐｅｓ、ｐＨ７．４のＫＯＨ、ｐＨ７．６の１００ｍＭのＫＯＡｃ、２．５ｍＭのＭｇ（ＯＡｃ）$_2$、２５０ｍＭのショ糖、２ｍＭのＤＴＴ）と交換した。精製サブユニットの完全性を評価するために、リボソーム抽出緩衝液（ｐＨ５．０の０．３ＭのＮａＯＡｃ、１２．５ｍＭのＥＤＴＡ、０．５％のＳＤＳ）中で、２０ｐｍｏｌの精製４０Ｓサブユニットから、フェノール（ｐＨ７．０）で３回、クロロホルムで１回、ＲＮＡを３回抽出した。ＲＮＡをエタノールで沈着させ、１ｐｍｏｌのＲＮＡを、５％変性ポリアクリルアミドゲル上で分離し、メチレンブルー（ｐＨ５．０の０．５ＭのＮａＯＡｃ中の０．０４％）で視覚化した。

【０１０２】

放射性標識ＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳ　ＲＮＡを、ＮａｒＩ線形化単シストロン性ルシフェラーゼプラスミド（Ｗｉｌｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｃｅｌｌ　１０２：５１１－２０　（２０００））から転写した。放射性標識転写産物を、Ｔ７　ＲｉｂｏＭａｘ　Ｔ

ｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎキット（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用して、α－^{32}Ｐ－ＵＴＰで生成した。転写産物を、６％の変性ポリアクリルアミドゲル上でゲル精製し、溶出緩衝液（０．５ＭのＮＨ$_4$ＯＡｃ、１ｍＭのＥＤＴＡ、０．１％のＳＤＳ）中で１２時間溶出した。ＲＮＡを、フェノール酸：クロロホルム（３：１）（Ａｍｂｉｏｎ； Ａｕｓｔｉｎ, ＴＸ）で一度抽出し、エタノールで沈着させ、Ｈ２Ｏ中で再懸濁した。

【０１０３】

天然ゲルシフトでは、１Ｘリコン緩衝液中（ｐＨ７．４の３０ｍＭのＨＥＰＥＳ ＫＯＨ、ｐＨ７．６の１００ｍＭのＫＯＡｃ、５ｍＭのＭｇＣｌ$_2$、２ｍＭのＤＴＴ）の０－２８６ｎＭの４０Ｓサブユニットを含む１ｎＭの放射性標識ＲＮＡを、室温で１５分間インキュベートした。複合体を、４％の非変性ポリアクリルアミドゲル上で分離した。ＰｈｏｓｐｈｏｒＩｍａｇｅｒ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｙｎａｍｉｃｓ Ｉｎｃ., Ｓｕｎｎｙｖａｌｅ, ＣＡ）を使用して、バンドを視覚化した。ＥｃｏＲＩで線形化されたｐＣＤＮＡ３ベクターから転写された５０ｎｇ／μＬの非競合ＲＮＡを含む１Ｘリコン緩衝液中で、広範な濃度の放射性標識ＩＲＥＳ ＲＮＡ（２ｎＭから３００ｎＭ）で、１００ｎＭの精製４０Ｓサブユニットで、フィルタ結合アッセイを実行した。反応物を室温で２０分間インキュベートし、その後、Ｗｈａｔｍａｎ Ｐｒｏｔｒａｎニトロセルロースフィルタ（Ｓｉｇｍａ； Ｓｔ. Ｌｏｕｉｓ, ＭＯ）を通してろ過した。１ｍＬの１３リコン緩衝液でフィルタを２度洗浄し、ａＷａｌｌａｃ１４０９シンチレーションカウンター（Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ； Ｗａｌｔｈａｍ, ＭＡ）を使用して、シンチレーション流体中で計数した。Ｋ$_d$値を、３回の独立した実験から計算した。

【０１０４】

ｒＲＮＡプロセッシング

ｒＲＮＡプロセッシングを検査するために、酵母株を、ｐＲＳ４２６（Ｃｈｒｉｓｔｉａｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ, Ｇｅｎｅ １１０： １１９－２２ （１９９２））、ＵＲＡ３骨格を含む２μベクターで形質転換し、ウラシルを欠く選択培地中で０．８ＯＤ$_{600}$まで増殖した。１００マイクロリットルの［５，６－^{3}Ｈ］ウラシル（５０Ｃｉ／ｍｍｏｌ, Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ）を培地に添加して、０．１００ｍＣｉの終濃度のために、３０℃で３分間培養し、０．０６４ｍｇ／ｍＬの冷却ウラシルで、［５，６－^{3}Ｈ］ウラシルを追跡した。冷却ウラシルの添加後０分、２分、５分、および１５分で試料を除去し、液体窒素中で急速冷凍した。ＲＮＡを試料から単離し、ＭＯＰＳ緩衝液（２０ｍＭのＭＯＰＳ、５ｍＭのＮａＯＡｃ、ｐＨ７．０の１ｍＭのＥＤＴＡ）中の変性１％アガロースゲル、１％アガロース、および１６％ホルムアルデヒドで継続した。ＲＮＡをＨｙＢｏｎｄ－Ｎ$^+$ナイロン膜（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ； Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ, ＮＪ）に移動し、ａｍｐｌｉｆｙ（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）に浸漬し、乾燥し、オートラジオグラフィを使用して視覚化した。

【０１０５】

タンパク質合成速度

［^{35}Ｓ］メチオニン混入によって、タンパク質合成速度を判断した。簡単に言うと、野生型酵母株およびｒｐｓ２５ａΔｂΔ酵母株を、メチオニンを含まない選択培地中でＯＤ$_{600}$０．５まで増殖した。初期時点では、各培養物を冷却メチオニン（５０ｍＭ）および［^{35}Ｓ］メチオニン（１ｍＣｉ／ｍＬ； ＥａｓｙＴａｇ ＥＸＰＲＥＳＳ^{35}Ｓ、７４ＭＢｑ、Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ）で調整した。１５分間隔で、ＯＤ$_{600}$を判断し、１ｍＬの培養物を２００ｍＬの冷却５０％トリクロロ酢酸（ＴＣＡ）に添加した。試料を１０分間氷上で培養し、２０分間７０℃で培養し、Ｗｈａｔｍａｎ ＧＦ／Ａフィルタを通してろ過した。１０ｍＬの５％冷却ＴＣＡでフィルタを洗浄し、その後、１０ｍＬの９５％エタノールで洗浄し、シンチレーション計数の前に１０分間乾燥させた。タンパク質合成速度を、３回の独立した実験から判断した。

【０１０６】

ｓｉＲＮＡおよびＤＮＡトランスフェクション

Ｒｐｓ２５を標的とするカスタム２本鎖ｓｉＲＮＡをＡｍｂｉｏｎから購入した：セン

ス、５’－ＧＧＡＣＵＵＡＵＣ　ＡＡＡＣＵＧＧＵＵＵｔｔ－３’（配列番号５）、およびアンチセンス、５’－ＡＡＡＣＣＡＧＵＵＵＧＡＵＡＡＧＵＣＣｔｔ－３’（配列番号６）（ｓｉＲＮＡＩＤ　＃１４２２２０）。陰性対照である非標的ｓｉＲＮＡをＤｈａｒｍａｃｏｎから購入した（ｓｉＣＯＮＴＲＯＬ　Ｎｏｎｔａｒｇｅｔｉｎｇ　ｓｉＲＮＡ　＃１）（Ｄｈａｒｍａｃｏｎ；　Ｌａｆａｙｅｔｔｅ，　ＣＯ）。抗生物質を含まない完全培地中で２　３　１０５ヒーラ細胞により重層された２０ｍｍプレートにおいて、７５ｍＭのｓｉＲＮＡを５ｍＬのｓｉＰＯＲＴ　ＮｅｏＦＸトランスフェクション試薬（Ａｍｂｉｏｎ）と混合することによって、ヒーラ細胞をｓｉＲＮＡでトランスフェクトした。ウェル当たり４ｍｇのＤＮＡを使用して、製造会社のプロトコルに従ってＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；　Ｃａｒｌｓｂａｄ，　ＣＡ）を使用して、ＤＮＡトランスフェクションをｓｉＲＮＡ処置後２４時間または４８時間後に実行した。７２時間または９６時間におけるルシフェラーゼ分析、またはノーザン分析のいずれかのために細胞を採取した。

【０１０７】

ｓｈＲＮＡレンチウイルスベクターを、ｐＬＶＴＨＭベクター（Ａｄｄｇｅｎｅ　ｐｌａｓｍｉｄ　１２２４７；　Ａｄｄｇｅｎｅ；　Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，　ＭＡ）を使用して構築した。ｒｐＳ２５　ｓｈＲＮＡオリゴ（センス、５’－ｃｇｃｇｔｃｃｃｃＧＧＡＣＴＴＡＴＣＡＡＡＣＴＧＧＴＴＴＴｔｃａａｇａｇａＡＡＡＣＣＡＧＴＴＴＧＡＴＡＡＧＴＣＣｔｔｔｔｔｔ　ｇｇａａａｔ－３’（配列番号１２）およびアンチセンス、５’－ｃｇａｔｔｔｃｃａａａａａＣＣＴＧＡＡＴＡＧＴＴＴＧＡＣＣＡＡＡａｇａｇａａｃｔｔＴＴＴＧＧＴＣＡＡＡＣＴＡＴＴＣＡＧＧｃｃｃｃｔ－３’（配列番号１３））を商業的に合成し（ＩＤＴ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ；　Ｃｏｒａｌｖｉｌｌｅ、ＩＡ）、リン酸化し（Ｔ４　Ｋｉｎａｓｅ，　Ｐｒｏｍｅｇａ）、ＣｌａＩ／ＭｌｕＩ制限ｐＬＶＴＨＭベクター内に結合する前にアニールした。シークエンシングによりクローニングを検証した。レンチウイルスベクター、パッケージングプラスミド（ｐｓＰＡＸ２［ａｄｄｇｅｎｅ　ｐｌａｓｍｉｄ　１２２６０］）、およびＶＳＶ－Ｇエンベローププラスミド（ｐＭＧ２．Ｇ［ａｄｄｇｅｎｅ　ｐｌａｓｍｉｄ　１２２５９］）のＨＥＫ２９３Ｔ細胞内への共トランスフェクションによって、ウイルスを生成した。２４時間後、２日間、１２時間毎に上清を回収した。０．２ｕｍのフィルタを使用してウイルス上清をフィルタ滅菌し、標的細胞株に直接使用した。

【０１０８】

ノーザン分析

製造会社の指示書に従ってＴＲＩｚｏｌ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ；　Ｃａｒｌｓｂａｄ，　ＣＡ）によるトランスフェクションの４８時間、７２時間、および９６時間後に、ｓｉＲＮＡ処置細胞から全てのＲＮＡを採取した。４マイクログラムのＲＮＡを、ＭＯＰＳ緩衝液中の変性アガロースゲル（０．８％アガロース、１６％ホルムアルデヒド）上で分離し、Ｚｅｔａ－Ｐｒｏｂｅ膜（Ｂｉｏ－Ｒａｄ；　Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，　ＣＡ）に移動した。以下のプライマー：センス、５’－ＡＴＧＣＣＧＣＣＴＡ　ＡＧＧＡＣＧＡＣ－３’（配列番号７）、およびアンチセンス、５’－ＴＣ　ＡＴＧＣ　ＡＴＣＴＴＣ　ＡＣＣ　ＡＧＣ－３’（配列番号８）を含むＨｅＬａ　ｃＤＮＡプールから増幅されたＰＣＲ生成物を使用して、Ｐｒｉｍｅ－ａ－Ｇｅｎｅキット（Ｐｒｏｍｅｇａ）および^{32}Ｐ－ｄＣＴＰ（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）で、放射性標識Ｒｐｓ２５プローブを生成した。製造会社のプロトコルに従って膜をハイブリタイズし、オートラジオグラフィによって分析した。剥離緩衝液（０．１％ＳＳＣ、０．５％ＳＤＳ）中、９５℃で膜を剥離し、β－アクチン（プライマー：センス、５’－ＧＣＡＣＴＣＴ　ＴＣＣＡＧＣＣＴＴＣＣ－３’（配列番号９）、およびアンチセンス、５’－ＧＣＧＣＴＣＡＧＧＡＧＧＧＡＧＣＡＡＴ－３’（配列番号１０））について再検出した。

【０１０９】

実施例１：Ｒｐｓ２５は、ＩＲＥＳ活性に必須である

コオロギ麻痺ウイルス（ＣｒＰＶ）ＩＧＲ　ＩＲＥＳは、～１８０ヌクレオチド長さを

有し、生体外で４０Ｓサブユニットに直接結合し、その後、６０Ｓサブユニットを動員して、翻訳的に有能な８０Ｓリボソームを集合させることができる。これは、酵母細胞および哺乳類細胞の両方において、生体内で翻訳を開始することができる。したがって、これは、ＩＧＲ ＩＲＥＳのリボソームとの相互作用の良いモデルとしての役割を果たす。ＩＧＲ ＩＲＥＳ（図１）は、３つのシュードノット構造（ＰＫＩ、ＰＫＩＩ、およびＰＫＩＩＩ）から成る。シストロウイルス科において最高配列保存を有する範囲（図１、大文字のヌクレオチド参照）は、ループ領域に位置し、リボソームと直接相互作用することが予測されている。ステムループ２．１（ＳＬ２．１）、ＳＬ２．３、およびＰＫＩＩＩは、翻訳および４０Ｓ複合体形成の減少をもたらす、ステムループの突然変異分析に基づく４０Ｓサブユニット動員を担うと考えられる（Ｊａｎ ａｎｄ Ｓａｒｎｏｗ, Ｊ. Ｍｏｌ. Ｂｉｏ. ３２４：８８９－９０２ （２００２）；Ｃｏｓｔａｎｔｉｎｏ ａｎｄ Ｋｉｅｆｔ, ＲＮＡ １１：３３２－４３ （２００５））。ＩＧＲ ＩＲＥＳの結晶化研究および低温電子顕微鏡観察（ｃｒｙｏ－ＥＭ）研究により、ＳＬ２．１およびＳＬ２．３が相互に隣接して突出して４０Ｓリボソームに接触する密集したコアを、ＩＲＥＳが形成することが明らかになった（Ｓｐａｈｎ ｅｔ ａｌ., Ｃｅｌｌ １１８：４６５－７５ （２００４）；Ｐｆｉｎｇｓｔｅｎ ｅｔ ａｌ., Ｓｃｉｅｎｃｅ ３１４：１４５０－４ （２００６）；Ｓｃｈｕｌｅｒ ｅｔ ａｌ., Ｎａｔ. Ｓｔｒｕｃｔ. Ｍｏｌ. Ｂｉｏｌ. １３：１０９２－６ （２００６）；Ｃｏｓｔａｎｔｉｎｏ ｅｔ ａｌ., Ｎａｔ. Ｓｔｒｕｃｔ. Ｍｏｌ. Ｂｉｏｌ. １５：５７－ ６４ （２００８））。ＰＫＩＩおよびバルジ領域は、６０Ｓサブユニットと相互作用することが予測される（Ｓｃｈｕｌｅｒ ｅｔ ａｌ., Ｎａｔ. Ｓｔｒｕｃｔ. Ｍｏｌ. Ｂｉｏｌ. １３：１０９２－６ （２００６））。ＰＫＩは、リボソームのＰ部位に配置され、Ａ部位に配置される隣接コドンにおいて翻訳を開始する（Ｗｉｌｓｏｎ ｅｔ ａｌ., Ｃｅｌｌ １０２：５１１－２０ （２０００））。

【０１１０】

２つの証拠により、Ｒｐｓ２５がＩＧＲ ＩＲＥＳと相互作用し得ることが提案される。第１に、Ｒｐｓ２５は、チャバネアオカメムシ腸ウイルス（ＰＳＩＶ）ＩＧＲ ＩＲＥＳに生体外で架橋結合する（Ｎｉｓｈｉｙａｍａ ｅｔ ａｌ., Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ. ３５：１５１４－２１ （２００７））。第２に、８０Ｓリボソームに結合したＣｒＰＶ ＩＧＲ ＩＲＥＳ のｃｒｙｏ－ＥＭモデルによって、ＳＬ２．１がＲｐｓ５と相互作用し、ＳＬ２．３が、原核細胞相同体を含まない隣接タンパク質密度と相互作用することが予測される（Ｓｃｈｕｌｅｒ ｅｔ ａｌ., Ｎａｔ. Ｓｔｒｕｃｔ. Ｍｏｌ. Ｂｉｏｌ. １３：１０９２－６ （２００６））。真核細胞リボソームによる架橋結合実験は、Ｒｐｓ５に近接するものとしてＲｐｓ２５を識別した（Ｕｃｈｉｕｍｉ ｅｔ ａｌ., Ｊ. Ｂｉｏｃｈｅｍ. ９０：１８５－９３ １９８１）。

【０１１１】

Ｒｐｓ２５ｐが生体内のＣｒＰＶ ＩＧＲ ＩＲＥＳ活性に関与し得るか否かを判断するために、ＲＰＳ２５の酵母ノックアウト株を生成した。出芽酵母中の大部分のリボソームタンパク質と同様に、ＲＰＳ２５は、ゲノムにおいて重複している。遺伝子は、Ｃ－末端において１つのアミノ酸だけ異なるタンパク質Ｒｐｓ２５ａおよびＲｐｓ２５ｂをコード化する。ｒｐｓ２５ａΔおよびｒｐｓ２５ｂΔ半数体を交配させて、２倍体を得た。２倍体の胞子形成および４分子の解剖によって、一貫して、野生型増殖速度で増殖した２つのコロニーと、よりゆっくり増殖した２つのコロニーとがもたらされた（図２）。ＲＰＳ２５ＡおよびＲＰＳ２５Ｂ欠失を、ＰＣＲおよびサザン分析の両方によって確認し、以前の研究に一致して、Ｒｐｓ２５ｐが、出芽酵母における必須タンパク質ではないことが明示された（Ｆｅｒｒｅｉｒａ－Ｃｅｒｃａ ｅｔ ａｌ., Ｍｏｌ. Ｃｅｌｌ ２０：２６３－７５ （２００５））。ＲＰＳ２５Ａは、細胞中のＲｐｓ２５ｐの～６６％を占め（Ｇｈａｅｍｍａｇｈａｍｉ ｅｔ ａｌ., Ｎａｔｕｒｅ ４２５：７３７－４

１（２００３））、これによって、ＲＰＳ２５Ｂの欠失が細胞増殖にいかなる欠陥ももたらさない理由が説明され得る。ＲＰＳ２５Ａを発現するプラスミドは、ｒｐｓ２５ａΔ株およびｒｐｓ２５ａΔｂΔ株の増殖欠陥を救うことができた（図２Ｂ）。

【０１１２】

生体内でのＩＲＥＳ媒介翻訳にＲｐｓ２５が必要とされるかを判断するために、ウミシイタケルシフェラーゼＯＲＦとホタルルシフェラーゼＯＲＦとの間に挿入されたＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳを含有するジシストロン性レポーターを野生型酵母株および変異酵母株に形質転換した（図３Ａ）。ＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳが、ＡＵＧメチオニンコドンではなく、アラニンコドンで開始することから、ホタルルシフェラーゼＯＲＦのＡＵＧ開始コドンを欠失させて、潜在プロモーターにより生成された転写産物から活性ホタルルシフェラーゼの発現を排除した（Ｄｅｎｉｚ　ｅｔ　ａｌ．，　ＲＮＡ　１５：９３２－４６　（２００９））。ホタルルシフェラーゼ活性は、Ｎ－末端切断に敏感であり、アミノ酸残基３－１０の欠失は、野生型レベルの０．１％までホタルルシフェラーゼ活性を減少させる（Ｓｕｎｇ　ａｎｄ　Ｋａｎｇ，　Ｐｈｏｔｏｃｈｅｍ．　Ｐｈｏｔｏｂｉｏｌ．　６８：７４９－５３　（１９９８））。ゆえに、開始ＡＵＧコドンを欠失することによって、キャップ依存的機構を使用して翻訳を開始し得る潜在プロモーターから生成された任意の転写産物は、次のインフレームＡＵＧコドンが２９コドン下流にあるため、ホタル活性をもたらさない。さらに、ＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳは、野生型酵母株において活性であるが、ＰＫＩにおいて塩基対合を分裂させる非活性ＩＧＲｍｕｔは、いかなるＩＲＥＳ活性ももたない（図３Ｂ；　Ｄｅｎｉｚ　ｅｔ　ａｌ．，　ＲＮＡ　１５：９３２－４６　（２００９））。ｒｐｓ２５ｂΔ株が、野生型に類似するＩＧＲ　ＩＲＥＳ活性を有することが分かった。対照的に、ｒｐｓ２５ａΔ株は、～４０％ＩＲＥＳ活性を呈するが、ｒｐｓ２５ａΔｂΔ変異株は、野生株の２．３％で、事実上ＩＲＥＳ活性をもたない。ＲＰＳ２５Ａがプラスミドから発現される場合、ＩＲＥＳ活性は、ｒｐｓ２５ａΔ株およびｒｐｓ２５ａΔｂΔ株の両方について、野生型レベルまで回復する（図３Ｂおよび図３Ｃ）。対照的に、キャップ依存的翻訳は、Ｒｐｓ２５の欠如の影響を受けない（図３Ｃ、ウミシイタケＲＬＵ）。まとめると、これらの結果により、キャップ依存的翻訳以外のＩＧＲ　ＩＲＥＳ活性が、Ｒｐｓ２５タンパク質に依存することが実証される。

【０１１３】

ｒｐｓ２５ａΔｂΔ株におけるＩＧＲ　ＩＲＥＳ活性の欠如は、４０Ｓサブユニットを動員するＩＲＥＳの欠陥か、または６０Ｓサブユニット加入または疑似転座等の何らかの他の下流処理における欠陥によって引き起こされ得る。ＩＧＲ　ＩＲＥＳは、精製４０Ｓサブユニットに結合し、その後、６０Ｓサブユニットを動員して、８０Ｓ複合体を生体外で形成することが分かっている（Ｗｉｌｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ，　Ｃｅｌｌ　１０２：５１１－２０　（２０００）；　Ｊａｎ　ｅｔ　ａｌ，　Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ　１００：１５４１０－５　（２００３）；　Ｐｅｓｔｏｖａ　ａｎｄ　Ｈｅｌｌｅｎ，　Ｇｅｎｅｓ　Ｄｅｖ．　１７：１８１－６　（２００３））。ＩＲＥＳ活性の減少が、ＩＲＥＳの４０Ｓサブユニットを結合する能力の欠如に起因したかを判断するために、天然ゲルシフトを、放射性標識ＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳ　ＲＮＡおよび野生型、ｒｐｓ２５ａΔｂΔ、またはｒｐｓ２５ａΔｂΔ＋ｐＳ２５Ａ酵母株のいずれかからの精製４０Ｓリボソームサブユニットで実行した。ＩＧＲ　ＩＲＥＳ　ＲＮＡは、５．５ｎＭの解離定数で野生型４０Ｓサブユニットに結合することができ、これは、放射性標識ＲＮＡの移動度のシフトによっても証明される（図４、上）。しかしながら、Ｒｐｓ２５ｐが存在しない場合、ＩＧＲ　ＩＲＥＳ　ＲＮＡの４０Ｓサブユニットを結合する能力は、最高濃度の４０Ｓサブユニットであっても著しく損なわれた（図４、中）。Ｒｐｓ２５がプラスミドから発現される場合、４０Ｓサブユニットに対するＩＧＲ　ＩＲＥＳの結合は回復する（図４、下）。ｒｐｓ２５ａΔｂΔ＋ｐＳ２５Ａゲルシフトでは、４０Ｓ調製におけるいくつかの汚染６０Ｓサブユニットに起因して、８０Ｓ複合体の形成が認められた（図４、アスタリスク）。精製サブユニットから単離されたリボソームＲＮＡ（ｒＲＮＡ）のゲルは、ｒＲＮＡが無傷であることを実証し、ｒｐｓ２５ａΔｂΔリ

ボソームによる４０Ｓサブユニット結合の欠如が、Ｒｐｓ２５タンパク質の欠如に起因し、サブユニットの分解に起因しないことを示した。これらの結合アッセイは、ｒｐｓ２５ａΔｂΔ酵母がＩＲＥＳ活性をもたらさなかった（図３）生体内で判断されたＩＧＲ　ＩＲＥＳ活性と一致する。ＩＲＥＳ活性および４０Ｓリボソームサブユニット結合は、Ｒｐｓ２５がプラスミドから発現された場合に、野生型レベルまで救われた。したがって、出芽酵母におけるＲｐｓ２５の欠失は、本質的に、４０Ｓサブユニットを動員するＩＲＥＳの無能力に起因して、生体内のＩＧＲ　ＩＲＥＳ活性を排除する。

【０１１４】

実施例２：Ｒｐｓ２５欠失は、グローバル翻訳およびリボソーム忠実性にわずかな影響しか及ぼさない。

ＲＰＳ２５遺伝子のノックアウトが、ＩＲＥＳ媒介翻訳の劇的な減少をもたらすことから、Ｒｐｓ２５が任意の他のリボソーム機能に必要とされるか否かを判断することが求められた。野生型、ｒｐｓ２５ａΔ、ｒｐｓ２５ｂΔ、およびｒｐｓ２５ａΔｂΔ酵母に関するポリソーム分析を実施した（図５Ａ）。欠失株の全ては、類似のポリソームプロフィルおよびポリソーム対モノソーム比を有した。ポリソーム画分の減少が認められなかったため、Ｒｐｓ２５の一方または両方のコピーの欠失が、グローバル翻訳開始に著しい欠陥を引き起こさないことが判断された。これは、以前に分かっていることに一致している（Ｆｅｒｒｅｉｒａ－Ｃｅｒｃａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ　２０：２６３－７５　（２００５））。また、これらの結果は、ウミシイタケルシフェラーゼ活性が、欠失株の全てにおいて野生型活性に類似したという観測にも一致している。グローバルタンパク質合成に対するＲｐｓ２５欠失の影響をより慎重に評価するために、^{35}Ｓ－メチオニン混入アッセイを実行した。これらの結果により、ｒｐｓ２５ａΔｂΔ株が、野生型株よりもグローバルタンパク質合成において、わずかな減少（１９％）（図５Ｂ）を呈することが示される。４０Ｓおよび６０Ｓサブユニットの量は、全ての株において類似すると考えられ、リボソーム生合成における欠陥は提案されない。これをより慎重に評価するために、野生型株およびｒｐｓ２５ａΔｂΔ株についてパルスチェイス実験を実行した（図５Ｃ）。完全に処理された２５Ｓおよび１８Ｓ　ｒＲＮＡ種の出現は、２重欠失変異体においてわずかに遅延する。しかしながら、プレｒＲＮＡ種の明らかな蓄積は存在せず、２５Ｓおよび１８Ｓ　ｒＲＮＡの量は、野生型株とｒｐｓ２５ａΔｂΔ株との間では類似すると考えられる。タンパク質合成速度に認められたわずかな低下または遅延ｒＲＮＡ生合成速度は、認められた低速増殖表現型に寄与し得る。

【０１１５】

Ｒｐｓ２５ｐを欠くリボソームが翻訳エラーの増加を呈したか否かを判断するために、終始コドンのリードスルー、ミスコード、およびプログラムされたリボソームフレームシフト（ＰＲＦ）について検査した。デュアルルシフェラーゼリードスルーレポーターを使用する終止コドン認識の効率について測定した（図５Ｄ、上）。翻訳終止は、終止コドンだけでなく、周囲背景、具体的には、終止コドン直後のヌクレオチド（テトラヌクレオチド終結シグナル）にも依存する（Ｂｏｎｅｔｔｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．　２５１　：３３４－４５　（１９９５））。３つの終止コドンの各々について以下のヌクレオチドとしてアデノシンまたはシトシンを含むデュアルルシフェラーゼリードスルーレポーターを使用する野生型、ｒｐｓ２５ａΔｂΔ、およびｐＳ２５Ａ株を含むｒｐｓ２５ａΔｂΔにおけるリードスルーの割合を、アッセイした。ｒｐｓ２５ａΔｂΔ株が、試験されたテトラヌクレオチド終止コドンの全てについて、野生型株に比べて終止コドン認識の増加を呈したことが認められた（図５Ｄ）。重要なことは、ｐＳ２５Ａレスキュープラスミドが、リードスルーを野生型レベルに回復させたことである。リードスルーに認められた一貫した減少は、これが、任意の特定の終止コドンに特異的ではない一般現象であることを実証する。

【０１１６】

リードスルーに加え、ＰＲＦに対するＲＰＳ２５欠失の影響についても検査した。フレームシフトは、ｍＲＮＡにおける特定のシグナルが、３’方向（＋１ＰＲＦ）または５’

方向（－１ＰＲＦ）にリーディングフレームを変更するようにリボソームを誘起させる場合に発生し得る（Ｎａｍｙ ｅｔ ａｌ，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ １３：１５７－１６８（２００４）；Ｂｒｉｅｒｌｅｙ ａｎｄ Ｄｏｓ Ｒａｍｏｓ，Ｖｉｒｕｓ Ｒｅｓ．１１９：２９－４２（２００６）；Ｇｉｅｄｒｏｃ ａｎｄ Ｃｏｒｎｉｓｈ，Ｖｉｒｕｓ Ｒｅｓ．１３９：１９３－２０８（２００９））。フレームシフトは、２つの要素、つまり、ｔＲＮＡ移動またはミスアラインメントが好ましい滑り配列と、リボソーム停止を引き起こすことによって処理を増強する刺激要素とによって引き起こされる。ＲＰＳ２５の欠失が、プログラムされたリボソームフレームシフトに任意の影響を及ぼすかを判断するために、ウミシイタケルシフェラーゼＯＲＦとホタルルシフェラーゼＯＲＦとの間の領域に挿入された４つのウイルスＰＲＦシグナル（Ｌ－Ａ、ＨＩＶ、Ｔｙ１、およびＴｙ３）のうちの１つを含有するデュアルルシフェラーゼレポーターを使用した（図５Ｅ、上；Ｈａｒｇｅｒ ａｎｄ Ｄｉｎｍａｎ，ＲＮＡ ９：１０１９－２４（２００３））。Ｌ－ＡおよびＨＩＶは、両方とも、プログラムされた－１リボソームフレームシフトシグナルであり、データによって、野生型とｒｐｓ２５ａΔｂΔリボソームフレームシフト値との間に差異が無いことが示される（図５Ｅ）。しかしながら、Ｔｙ１＋１ＰＲＦシグナルについて、ｒｐｓ２５ａΔｂΔ株においてフレームシフトの増加と、Ｔｙ３＋１ ＰＲＦシグナルについてわずかな増加とが存在する（図５Ｅ）。Ｔｙ１＋１フレームシフトは、リボソームのＡ部位のＡＧＧコドンにおけるリボソーム停止により、Ｔｙレトロトランスポゾンにおける７－ｎｔ配列において発生する。ＡＧＧコドンを復号化するｔＲＮＡの利用可能性は低く、停止および後続のｍＲＮＡ滑りが引き起こされる。ｒｐｓ２５ａΔｂΔ株における＋１フレームシフトの量は、依然として、野生型出芽酵母細胞について報告されているものの範囲内にある（Ｂｅｌｃｏｕｒｔ ａｎｄ Ｆａｒａｂａｕｇｈ，Ｃｅｌｌ ６２：３３９－５２（１９９０））が、このシグナルが、野生型と比べて、ｒｐｓ２５ａΔｂΔ細胞においてほぼ２倍であることに留意されたい。重要なことは、野生型のフレームシフト速度が、ｒｐｓ２５ａΔｂΔ株にｐＳ２５Ａレスキュープラスミドが存在した場合に回復したことである。最後に、ホタルルシフェラーゼのコドン２４５において有害のヒスチジンからアルギニンへの突然変異を含有するデュアルルシフェラーゼミスコードレポーターを使用して、ミスコードについて検査した（図５Ｆ、上；Ｓａｌａｓ－Ｍａｒｃｏ ａｎｄ Ｂｅｄｗｅｌｌ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３４８：８０１－８１５（２００５））。この位置におけるアミノ酸の誤取り込みにより、ホタルルシフェラーゼ活性の増加がもたらされる。野生型株とｒｐｓ２５ａΔｂΔ株との間に、誤取り込みにおける差異は認められなかった（図５Ｆ、下）。まとめると、これらの結果により、概して、リボソームが機能性であり、かつ４０Ｓサブユニットからの Ｒｐｓ２５ｐの欠失が、リボソーム機能における顕著な欠陥をもたらさないことが実証される。これは、Ｒｐｓ２５ｐが活性および４０Ｓサブユニットに対する結合に絶対的に必要とされるＩＧＲ ＩＲＥＳ媒介翻訳におけるその役割とは著しく対照的である。

【０１１７】

実施例３：ＩＲＥＳ媒介翻訳におけるＲｐｓ２５の機能は、哺乳類において保存される。ＩＧＲ ＩＲＥＳが、植物、哺乳類、および酵母等の多種多様の有機体からのリボソームで翻訳を開始する機能を果たすことから、ＩＧＲ ＩＲＥＳ媒介翻訳におけるＲｐｓ２５ｐの機能が哺乳類細胞において保存されるか否かを判断することが求められた。ＲＰＳ２５は、哺乳類のゲノムにおけるコピーの１つだけに存在し、その４７％は、酵母ＲＰＳ２５Ａに同一であり、７１％は酵母ＲＰＳ２５Ａに類似する。ＲＰＳ２５ ｍＲＮＡに対するｓｉＲＮＡを使用して、ヒーラ細胞におけるＲｐｓ２５タンパク質の発現をノックダウンした。ＲＰＳ２５ ｍＲＮＡの７５％の減少が達成された（図６Ａ）。Ｒｐｓ２５ノックダウンが哺乳類細胞におけるＩＧＲ ＩＲＥＳ活性に影響を及ぼすか否かを判断するために、シストロン間領域においてＣｒＰＶ ＩＧＲ ＩＲＥＳを含有するジシストロン性ルシフェラーゼレポーターを細胞においてトランスフェクトした（図６Ｂ）。Ｒｐｓ２５がノックダウンされた場合に、ＩＧＲ ＩＲＥＳ媒介翻訳の６０％の減少が認められた

（図６Ｃ）。この阻害レベルは、細胞におけるＲｐｓ２５タンパク質の６６％の減少に対応するｒｐｓ２５ａΔに認められた阻害（図３）と同等である（Ｇｈａｅｍｍａｇｈａｍｉ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｎａｔｕｒｅ　４２５：７３７－４１　（２００３））。また、酵母における実験に一致して、キャップ依存的翻訳の顕著な減少は、Ｒｐｓ２５がノックダウンされた場合に認められなかった（図６Ｄ）。Ｒｐｓ２５タンパク質のノックダウンは、適正な抗体の欠乏に起因して確認することができなかった。しかしながら、ＲＰＳ２５ｍＲＮＡとＩＧＲ　ＩＲＥＳ媒介翻訳との両方の減少が認められたことから、タンパク質レベルも影響を受けたと考えられる。哺乳類細胞におけるＩＧＲ　ＩＲＥＳ機能にＲｐｓ２５が必要とされることが結論付けられる。

【０１１８】

他のＩＲＥＳにＲｐｓ２５が必要とされるか否かを判断するために、Ｒｐｓ２５損失のＨＣＶ　ＩＲＥＳに対する影響について分析した。対照またはＲｐｓ２５　ｓｉＲＮＡをヒーラ細胞にトランスフェクトして、Ｒｐｓ２５をノックダウンした（図６Ｅ）。次いで、２４時間後、ＨＣＶ　ＩＲＥＳジシストロン性レポーターをトランスフェクトし（図６Ｆ）、ＩＲＥＳ活性についてアッセイした。Ｒｐｓ２５　ｍＲＮＡがノックダウンされた場合、ＨＣＶ　ＩＲＥＳ活性において劇的な減少が認められ、ＨＣＶ　ＩＲＥＳにもＲｐｓ２５が必要とされることが実証された（図６Ｇ）。さらに、Ｒｐｓ２５　ｓｈＲＮＡを生成し、レンチウイルスベクター内にクローニングしてＲｐｓ２５をノックダウンした。

【０１１９】

類似の実験において、対照またはＲｐｓ２５　ｓｈＲＮＡを含有するレンチウイルス構築物をヒーラ細胞内に形質導入して、Ｒｐｓ２５をノックダウンした（図７Ｂ）。次いで、２４時間後、ＨＣＶ　ＩＲＥＳジシストロン性レポーター（図７Ａ）をトランスフェクトし、ＩＲＥＳ活性についてアッセイした。Ｒｐｓ２５　ｍＲＮＡがノックダウンされた場合、ＨＣＶ　ＩＲＥＳ活性において劇的な減少が認められ（図７Ｃ）、ＨＣＶ　ＩＲＥＳ活性にＲｐｓ２５が必要とされることがさらに確認された。

【０１２０】

実施例４：Ｒｐｓ２５は、他のウイルスＲＮＡおよび細胞ＲＮＡのＩＲＥＳ媒介翻訳に必要とされる。

また、両種のＩＧＲ　ＩＲＥＳにＲｐｓ２５が必要とされるかも判断された。ＣｒＰＶは、２つの種類のＩＧＲ　ＩＲＥＳを含有するジシストロウイルス科に属する。ＣｒＰＶ　ＩＲＥＳは、種類Ｉに属し、一方、種類ＩＩ　ＩＲＥＳは、ＩＲＥＳのドメインＩＩＩにおいてより大きなバルジおよび余分なステムループを有する。上記に実行した実験に類似する実験では、両種のＩＧＲ　ＩＲＥＳのＩＲＥＳ媒介翻訳にＲｐｓ２５が必須であることが判断された（図９）。

【０１２１】

また、Ｒｐｓ２５は、ピコナウイルスＩＲＥＳ活性を強化することも分かっている。脳心筋炎ウイルスＩＲＥＳ、ポリオウイルスＩＲＥＳ、およびエンテロウイルス７１　ＩＲＥＳを含有するジシストロン性レポーター構築物を、生成および使用して、ＩＲＥＳ媒介翻訳に対するＲｐｓ２５ノックダウンの影響について判断した。Ｒｐｓ２５のノックダウンによって、これらのピコナウイルスＩＲＥＳ要素からのＩＲＥＳ媒介翻訳のレベルの減少がもたらされた（図１１）。

【０１２２】

ＨＣＶ要素およびＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳ要素は、構造的および機能的に異なるが、これらの両方は、Ｒｐｓ２５について同一の要件を共有する。Ｒｐｓ２５依存性が他の種類のＩＲＥＳ要素に拡張されるかを判断するために、２つの細胞ＩＲＥＳであるＢａｇ－１およびｃ－ｍｙｃを使用して、Ｒｐｓ２５が翻訳に必要とされるかを判断した。Ｂａｇ－１　ＩＲＥＳ要素は、翻訳についてＲｐｓ２５に依存することが分かった（図１３Ｂ）。ｃ－ｍｙｃ　ＩＲＥＳ要素は、翻訳についてＲｐｓ２５に依存しなかった（図１３Ｂ）。ＨＣＶ、ＣｒＰＶ、およびＢａｇ－１　ＩＲＥＳの系統発生的比較によって、類似の配列モチーフが存在することが判断された（図１３Ｃ）。具体的には、これらは、ループ

領域においてＡＧＣ配列を含有するステムループを有する。ＣｒＰＶ　ＩＧＲ　ＩＲＥＳステムループにおける広範な部位特異的突然変異誘発を実行し、ＡＧＣだけが機能する配列ではないことが示され、ＡＮＹ（Ａ：アデニン、Ｎ：任意のヌクレオチド、Ｙ：ピリミジン）モチーフを有する任意の配列は、結果として、野生型ＩＲＥＳ活性またはそれ以上の活性をもたらす。このコンセンサス配列は、ウイルスのジシストロウイルス科における全ての既知のＳＬ２．３配列と一致する（Ｎａｋａｓｈｉｍａ　ａｎｄ　Ｕｃｈｉｕｍｉ，　Ｖｉｒｕｓ　Ｒｅｓ．　１３９：１３７－４７　（２００９））。興味深いことに、ＨＣＶドメインＩＩｂ（ＵＡＧＣＣＡＵ）（配列番号１４）は、全てのＨＣＶ遺伝子型ならびに密接に関連する古典的ブタ熱ウイルス（ＣＳＦＶ）の中でも特に、１００％保存される。ＨＣＶ　ＩＲＥＳのドメインＩＩｂは、Ｒｐｓ２５の予測位置であるリボソームのＥ部位と相互作用する（Ｕｃｈｉｕｍｉ　ｅｔ　ａｌ，　Ｊ．　Ｂｉｏｃｈｅｍ．　９０：１８５－９５　（１９８１）；およびＬａｎｄｒｙ　ｅｔ　ａｌ，　Ｇｅｎｅｓ　Ｄｅｖ．　２３：２７５３－６４　（２００９））。

【０１２３】

Ｂａｇ－１およびｃ－ｍｙｃ　ＩＲＥＳ要素に加え、ＩＲＥＳの使用により翻訳される複数の細胞ＲＮＡも存在する。いくつかの細胞ＩＲＥＳ要素をジシストロン性ＩＲＥＳレポーター内にクローニングした。ｓｉＲＮＡによるＲｐｓ２５のノックダウンは、細胞ＩＲＥＳ要素のＩＲＥＳ媒介翻訳のレベル低下をもたらした（図１２）。Ｂａｇ－１レベルが、ＣｒＰＶ　ＩＲＥＳ要素のレベルまで低下したことに留意されたい。

【０１２４】

実施例５：ＨＣＶ　ＩＲＥＳデュアルＬＵＣレポーターのＨｕｈ７ヒト肝細胞内への一過性トランスフェクションの最適化。

アッセイ設計および最適化における第１の障害は、Ｈｕｈ７ヒト肝細胞が、陽イオン性脂質トランスフェクション試薬の使用で容易にトランスフェクト可能かを判断することであった。ＬｉｐｏｆｅｃｔＡＭＩＮＥ試薬（Ｇｉｂｃｏ－ＢＲＬ；　Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；　Ｃａｒｌｓｂａｄ，　ＣＡ）は、単独で使用する場合に、あまり有効ではなかった。しかしながら、ＬｉｐｏｆｅｃｔＡＭＩＮＥ　ＰＬＵＳおよびＬｉｐｏｆｅｃｔＡＭＩＮＥ　２０００を、ＨＣＶ　ＩＲＥＳ　Ｄｕａｌ　ＬＵＣレポータープラスミドの増加量と比較した（図１５）。ＬｉｐｏｆｅｃｔＡＭＩＮＥ　２０００は、ＬｉｐｏｆｅｃｔＡＭＩＮＥ　ＰＬＵＳほど有効ではなかった。最初にＰＬＵＳ試薬をプラスミドＤＮＡと混合して、Ｇｉｂｃｏ－ＢＲＬが開発し、かつＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎが入手した専有化学により、ＬｉｐｏｆｅｃｔＡＭＩＮＥによって、より有効なトランスフェクションのためにＤＮＡを刺激した。ＬｉｐｏｆｅｃｔＡＭＩＮＥ　ＰＬＵＳ媒介一過性トランスフェクションは、２マイクログラムのプラスミドおよび６マイクロリットルの両方のＰＬＵＳ試薬およびＬｉｐｏｆｅｃｔＡＭＩＮＥ試薬を９６ウェルプレート（１２ウェル）の列毎に使用した場合に、十分なシグナルを産生した。この最適化された条件は、以下に提示される実験設計、最適化、および実装に適用され、全ての後の実験を実行または修正する（すなわち、アッセイがより少ないウェルにさらに小型化される場合）ベンチマークとなる。

【０１２５】

２つの異なる９６ウェルマイクロタイタープレート設計を使用して、実際の試験小分子によりほぼ最適化されたアッセイを「テストドライブ」した。両設計によって、各試験小分子は、３通りにスクリーニング可能になる（すなわち、マイクロタイタープレート内の３つの異なるウェルにおける）。最初の１６０の被験化合物では、第１の設計を使用した（図１６、上）。初期パイロットハイスループット「テストドライブ」において９６０の全小分子をスクリーニングする次の８００の化合物では、あらゆるハイスループットバイオアッセイおよびプログラムの自動化ロボット実装の標準的な設計である第２の設計を使用した（図１６、下）。いずれの設計でも、ヒット化合物は、達成された強固なデュアルＬＵＣシグナルにより、容易に認識可能であった（以下参照）。

【０１２６】

実施例６：　小分子スクリーンにより、ＨＣＶ　ＩＲＥＳ翻訳阻害剤の識別がもたらされ

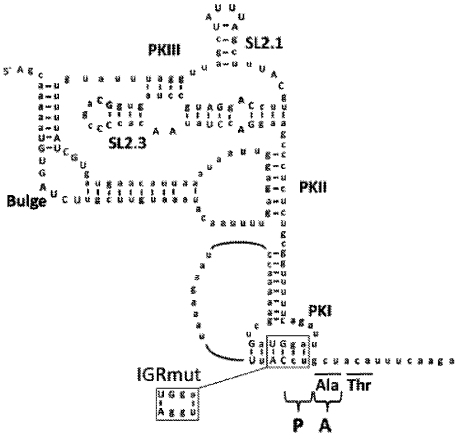
る。

合成有機小分子の大量回収の最初の１２のトレイからスクリーニングされた９６０の小分子から、２４のヒット化合物が識別された。このパイロット実験により、２．５％のヒット率が明らかにされる。図１７Ａでは、ＨＣＶ　ＩＲＥＳの阻害％が対照の割合として示されるヒストグラムにおいてデータ低下が提示される。このデータ提示により、ＨＣＶ　ＩＲＥＳ阻害剤（ｓｉＲＮＡを使用してＲＰＳ２５レベルを低下させた場合のヒーラ細胞において上記に示したデータとかなり類似する）が明らかになる。この初期のヒットシリーズ内の軽度、大幅な、および著しい阻害能力の連続が分かる。小分子のサブセットは、この初期ヒットシリーズにおいて共通の構造または骨格を共有した（図１８）。

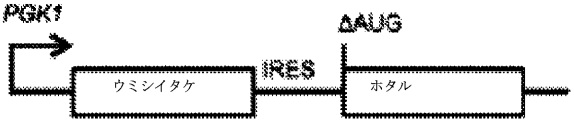
【０１２７】

識別された阻害剤のうち、新規化合物は、濃度に依存してＨＣＶ　ＩＲＥＳ媒介翻訳を阻害し（図１７Ｂ）、２μＭ濃度でＨｕｈ７細胞におけるＨＣＶ複製を阻害することが分かった（図１７Ｃ）。化合物は、全て、類似の構造を共有し、ハイスループットスクリーンから独立したアッセイで実証された（図１７Ｄ）。上述のように実行した追加のスクリーンにより、ＩＲＥＳ媒介翻訳を阻害する３つのさらなる化合物の識別がもたらされた（図１９Ａ）。化合物の構造を図１９Ｂに示す。

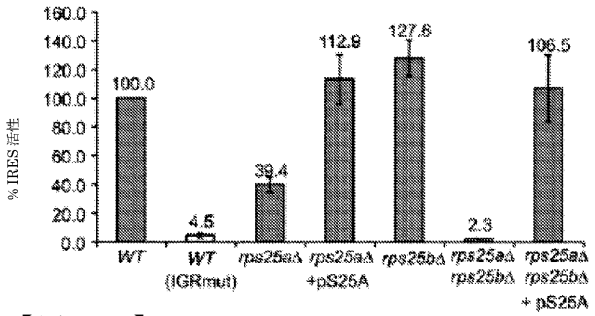
【図１】



【図３Ａ】



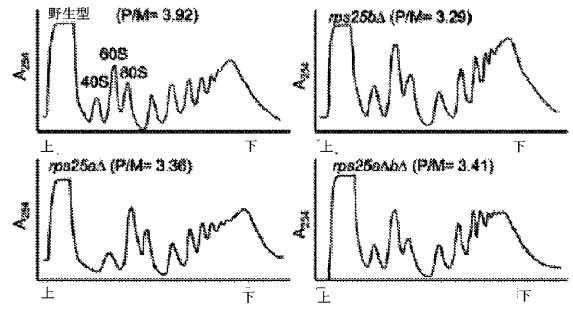
【図３Ｂ】



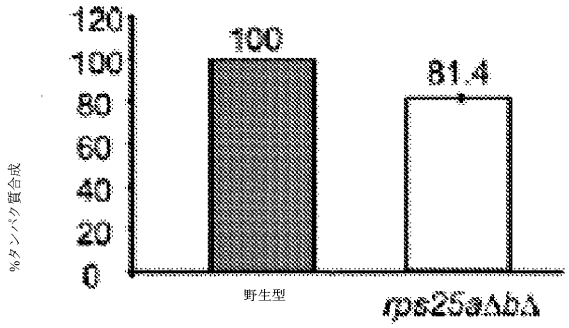
【図３Ｃ】

	ウミシイタケ RLUs	ホタル RLUs
野生型 + WT IGR	125,964±16,785	3,877±139
野生型 + IGRmut	159,138± 7,808	220±90
*rps25a*Δ	144,693±10,646	1,782±65
*rps25a*Δ + pS25a	130,284±13,279	4,306±314
*rpS25b*Δ	187,869±14,908	7,595±1,506
*rps25a*Δ/*rps25b*Δ	215,529±22,680	184±54
*rps25a*Δ/*rps25b*Δ + pS25a	186,403±26,562	5,139±871

【図５Ａ】



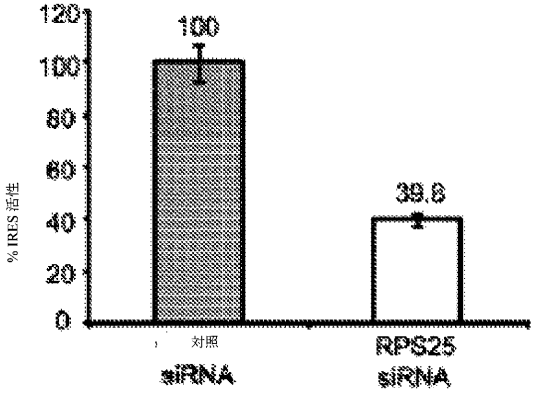
【図５Ｂ】



【図６Ｂ】



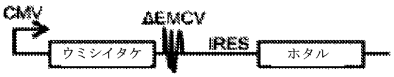
【図６Ｃ】



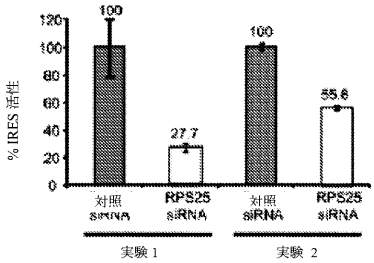
【図６Ｄ】

siRNA	ウミシイタケ RLU	ホタル RLU
対照	178,815 ±8,983	33,042 ±2,317
RPS25	159,774 ±8,527	11,740 ±751

【図６Ｆ】



【図６Ｇ】



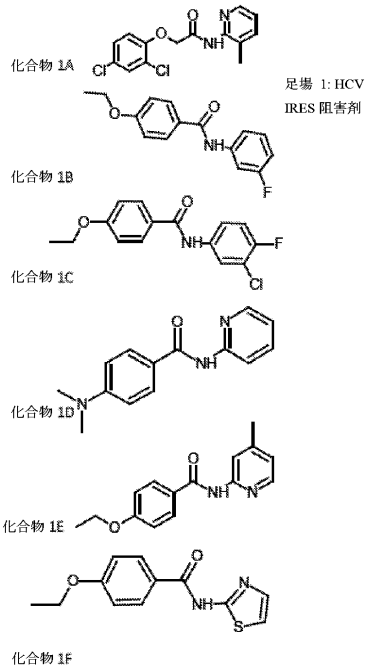
【図６Ｈ】

実験	siRNA	ウミシイタケ RLU	ホタル RLU
1	対照	3,150,340 ±529,463	93,447 ±18,663
1	RPS25	4,601,900 ±259,808	39,453 ±2,729
2	対照	7,845,550 ±381,977	199,179 ±4,342
2	RPS25	9,066,920 ±259,932	127,799 ±3,229

【図７Ａ】

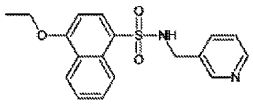


【図１８】

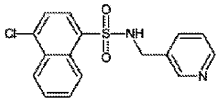


足場 1: HCV IRES 阻害剤

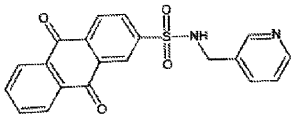
【図１９Ｂ】



ID 5654311

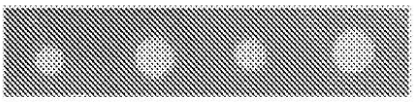


ID ST045957

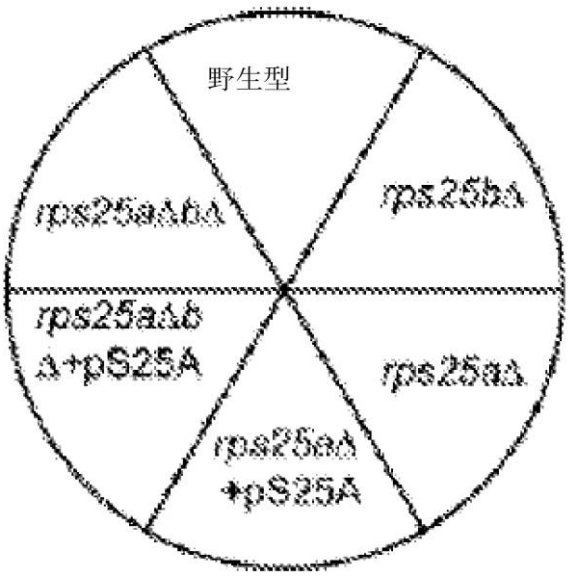


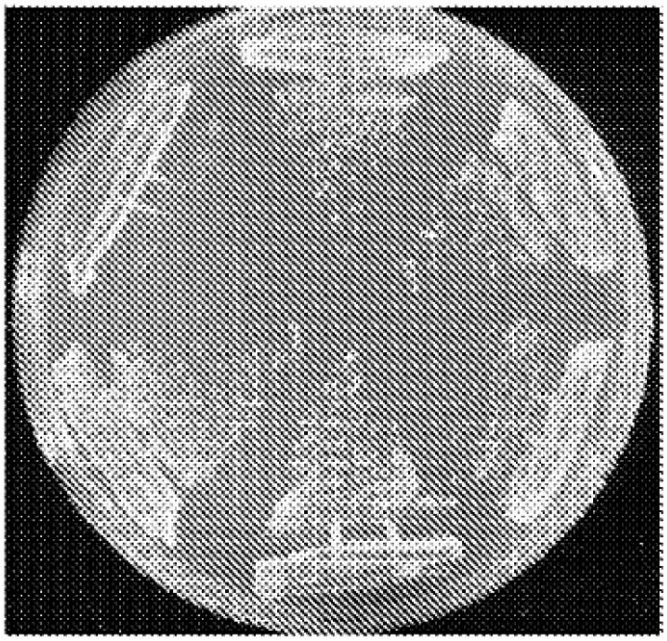
ID ST046947

【図２Ａ】

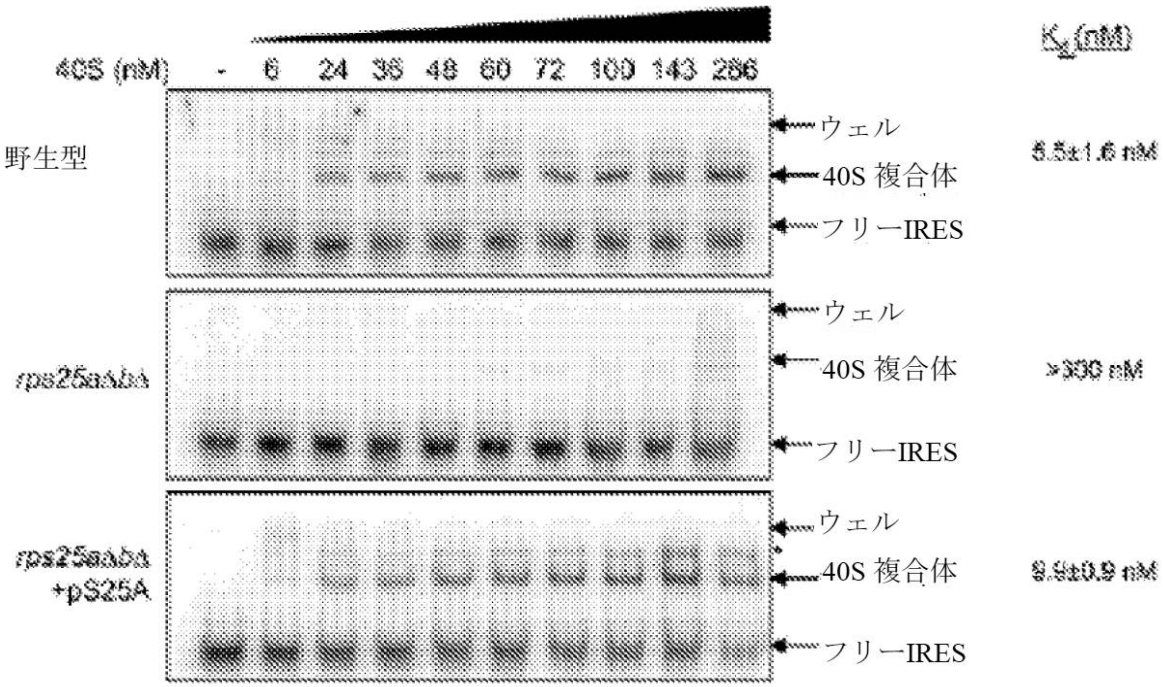


【図２Ｂ】

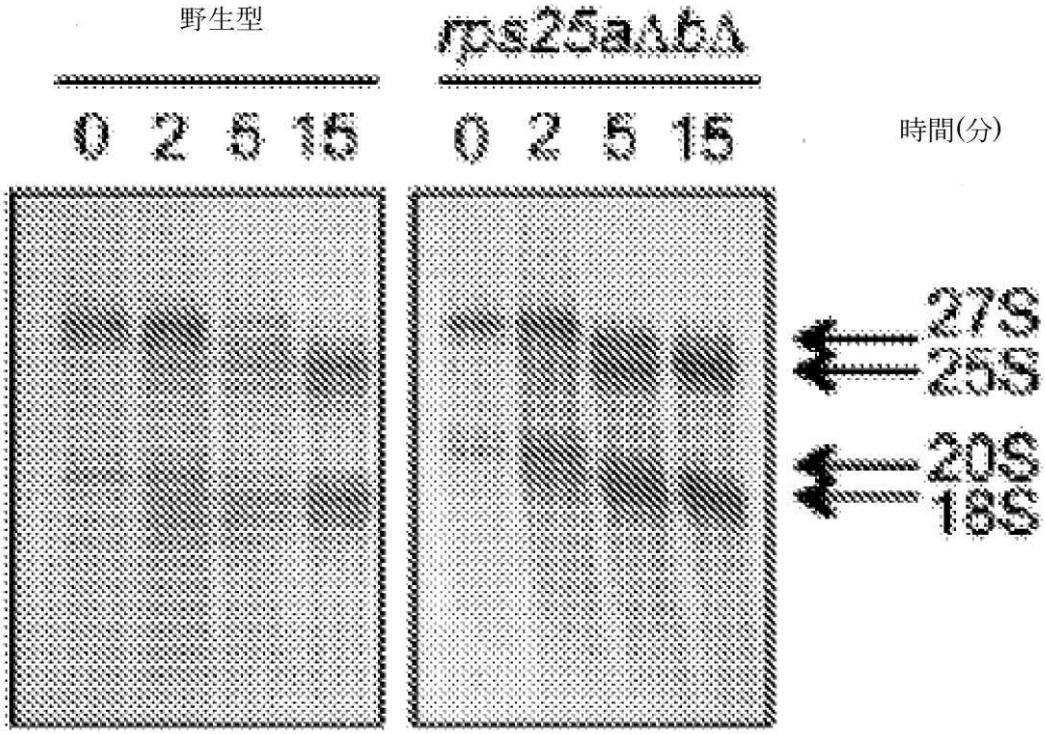

野生型
rps25bΔ
rps25aΔ
rps25aΔ+pS25A
rps25aΔbΔ
rps25aΔbΔ+pS25A



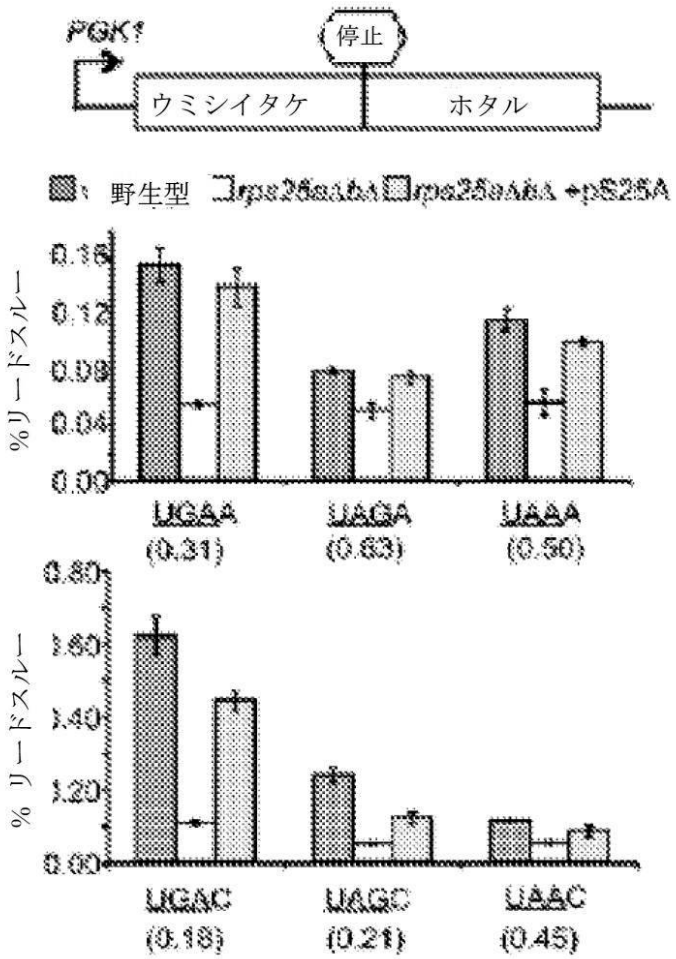
【図４】


40S (nM) - 6 24 36 48 60 72 100 143 286
K_d(nM)
野生型
ウェル
40S 複合体
フリーIRES
6.5±1.6 nM
rps25aΔbΔ
ウェル
40S 複合体
フリーIRES
>300 nM
rps25aΔbΔ
+pS25A
ウェル
40S 複合体
フリーIRES
9.9±0.9 nM

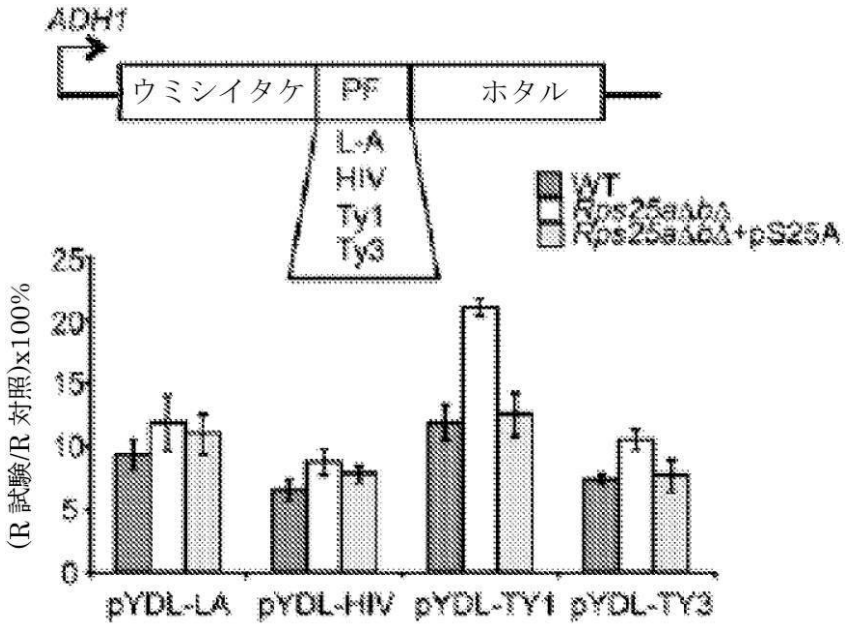
【図５Ｃ】


野生型
rps25aΔbΔ
0 2 5 15
0 2 5 15
時間(分)
27S
25S
20S
18S

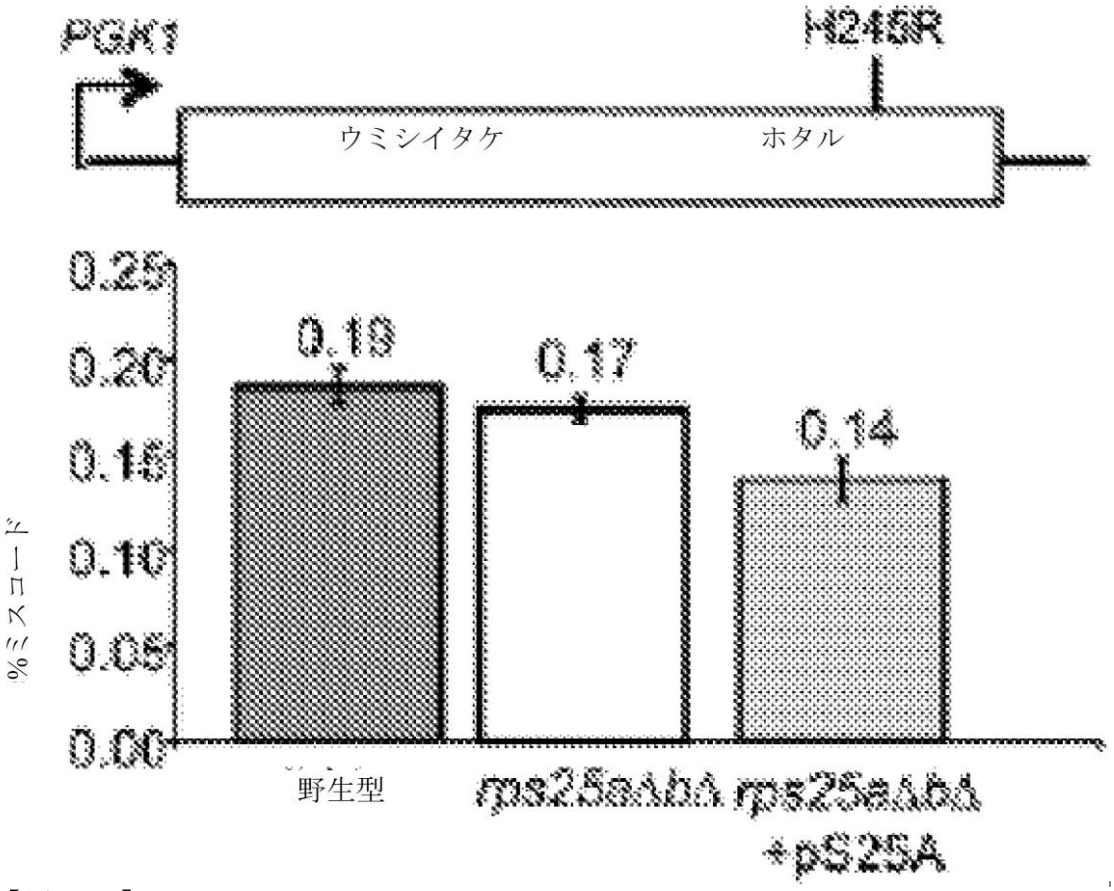
【図５Ｄ】


PGK1
停止
ウミシイタケ
ホタル
野生型
%リードスルー
0.16
0.12
0.08
0.04
0.00
UGAA
(0.31)
UAGA
(0.63)
UAAA
(0.50)
0.80
1.60
1.40
1.20
1.00
UGAC
(0.18)
UAGC
(0.21)
UAAC
(0.45)

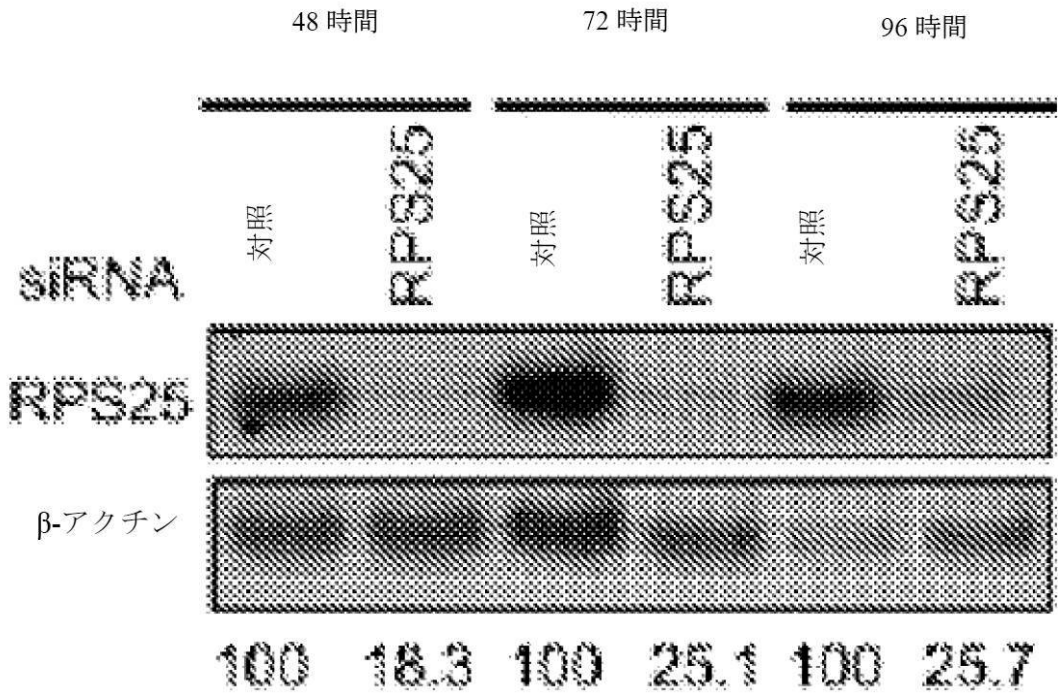
【図５Ｅ】


ADH1
ウミシイタケ
PF
ホタル
L-A
HIV
Ty1
Ty3
WT
(R 試験/R 対照)x100%
25
20
15
10
5
0
pYDL-LA
pYDL-HIV
pYDL-TY1
pYDL-TY3

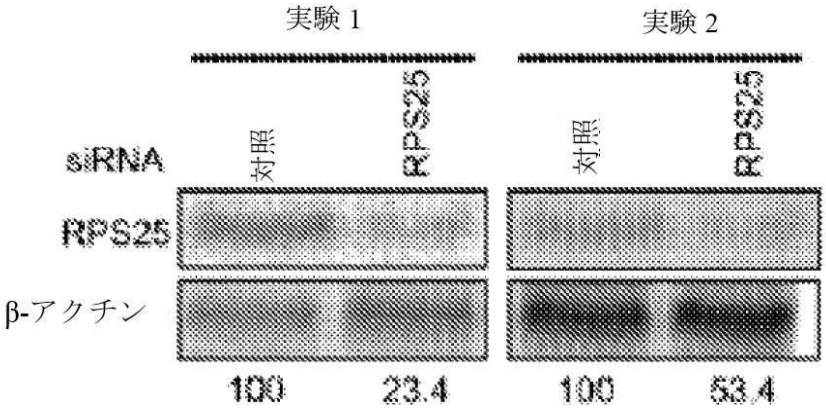
【図５Ｆ】


PGK1
H245R
ウミシイタケ
ホタル
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
%ミスコード
0.19
0.17
0.14
野生型
rps25aΔbΔ
rps25aΔbΔ
+pS25A

【図６Ａ】

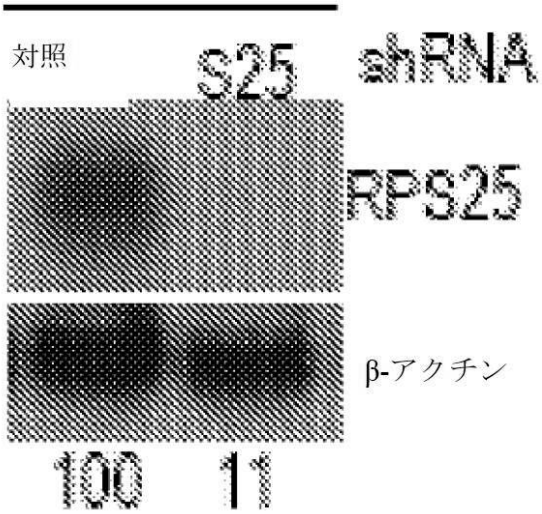

48 時間
72 時間
96 時間
siRNA
対照
αRPS25
対照
αRPS25
対照
αRPS25
RPS25
β-アクチン
100 18.3 100 25.1 100 25.7

【図６Ｅ】

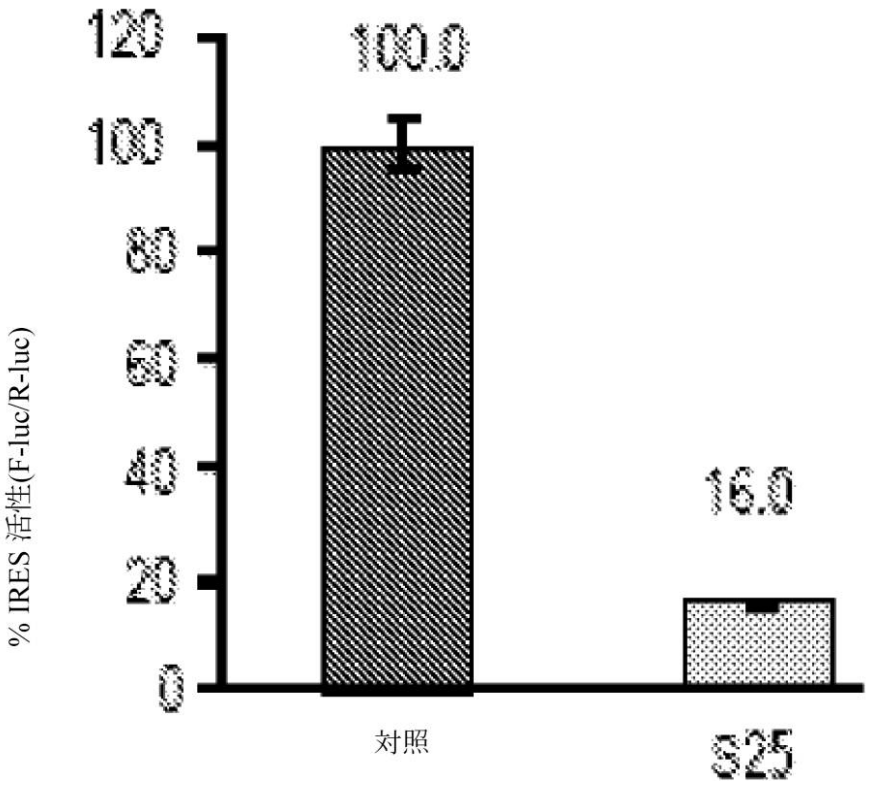

実験１
実験２
siRNA
対照
RPS25
対照
RPS25
RPS25
β-アクチン
100
23.4
100
53.4

【図７Ｂ】

ノーザン

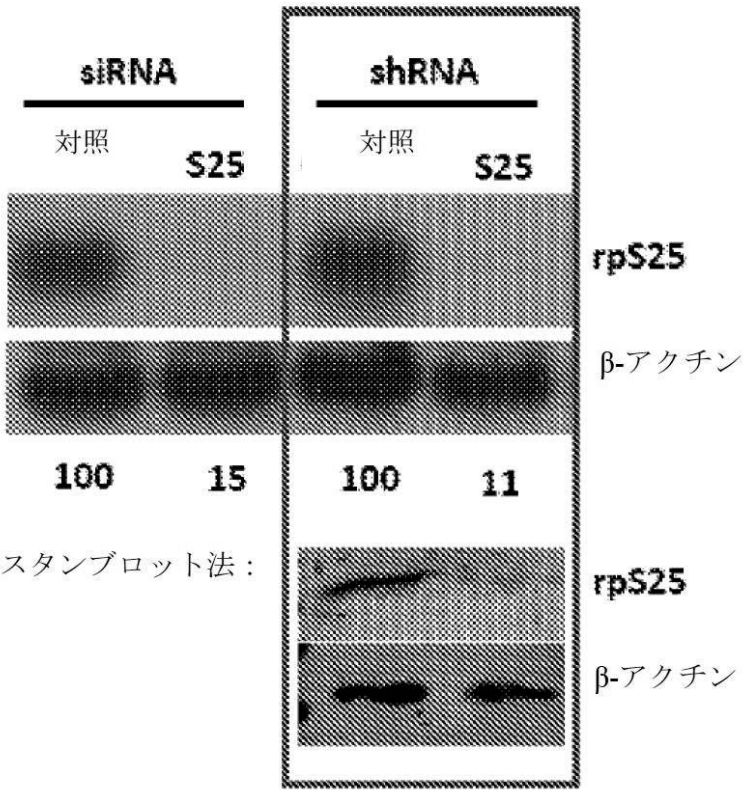

対照
S25
shRNA
RPS25
β-アクチン
100
11

【図７Ｃ】



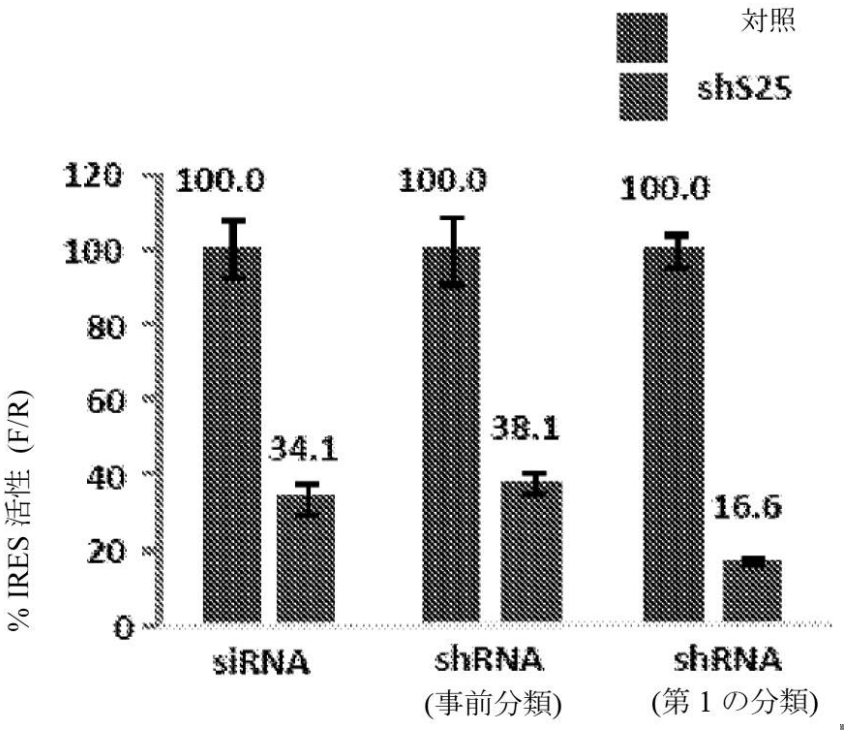
【図８Ａ】

ノーザンブロット法：

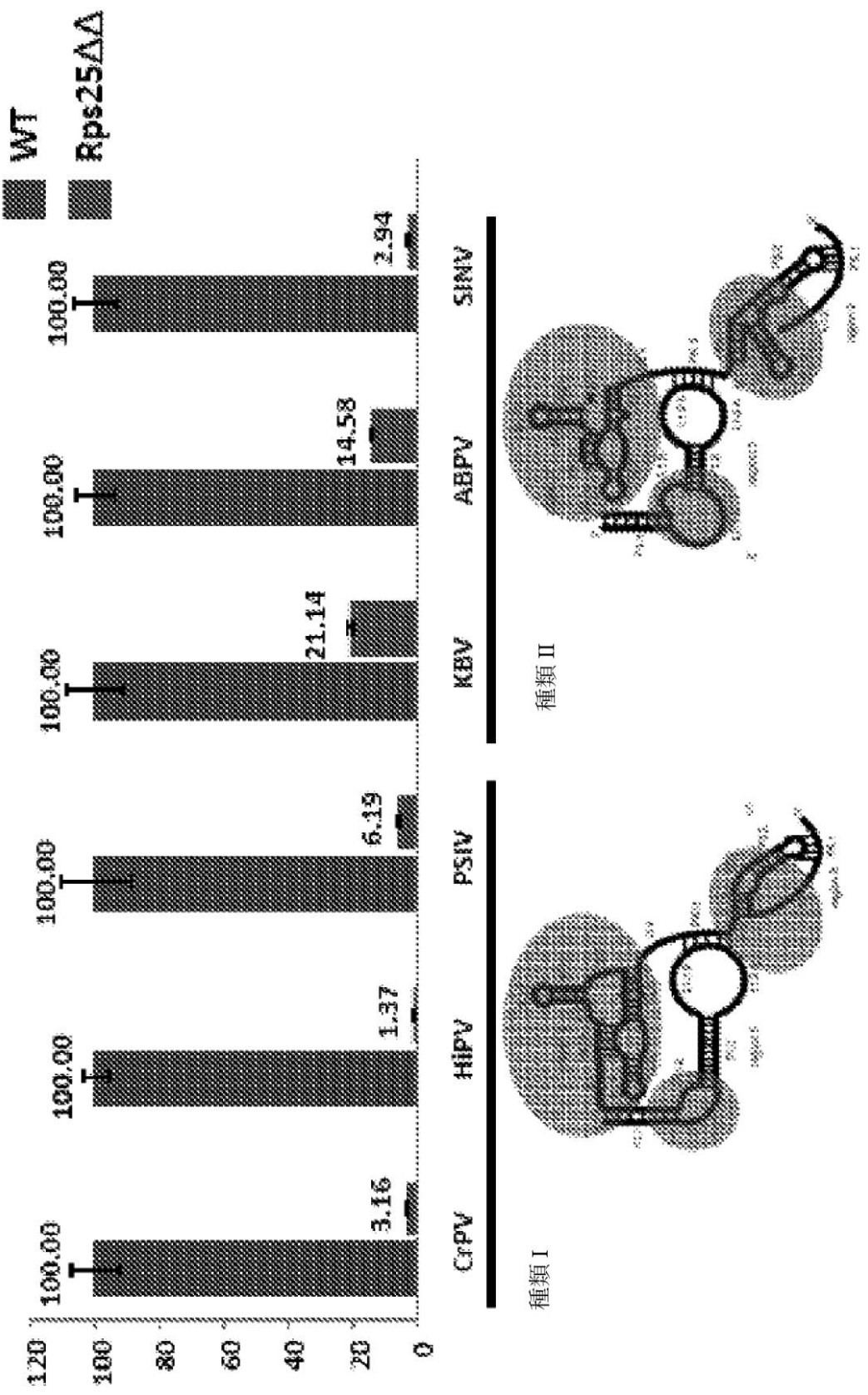


ウエスタンブロット法：

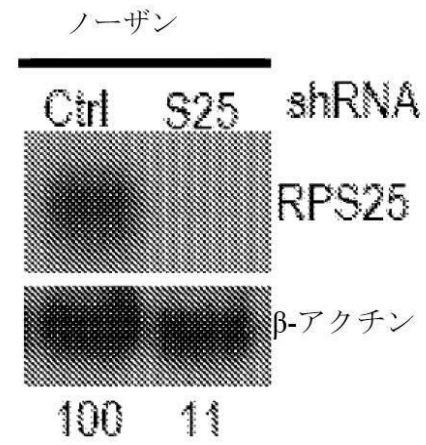
【図８Ｂ】


対照
shS25
% IRES 活性 (F/R)
120
100
80
60
40
20
0
100.0
34.1
100.0
38.1
100.0
16.6
siRNA
shRNA
(事前分類)
shRNA
(第１の分類)

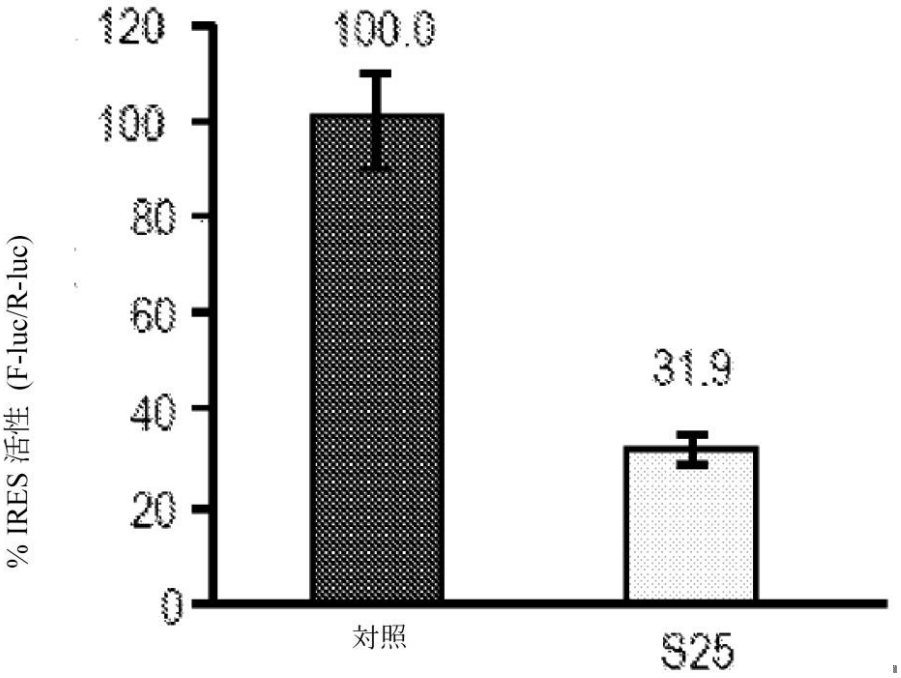
【図９】


WT
Rps25ΔΔ
120
100
80
60
40
20
0
100.00
3.16
100.00
1.37
100.00
6.19
100.00
21.14
100.00
14.58
100.00
2.94
CrPV
HiPV
PSIV
KBV
ABPV
SINV
種類 I
種類 II

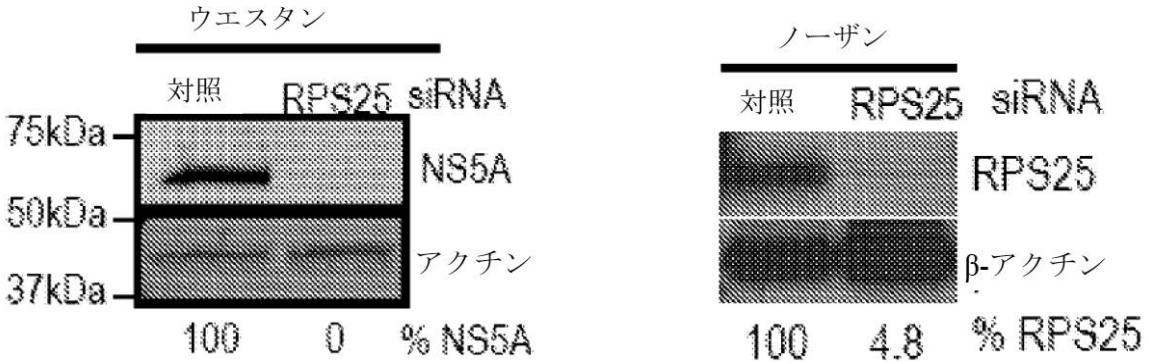
【図１０Ａ】



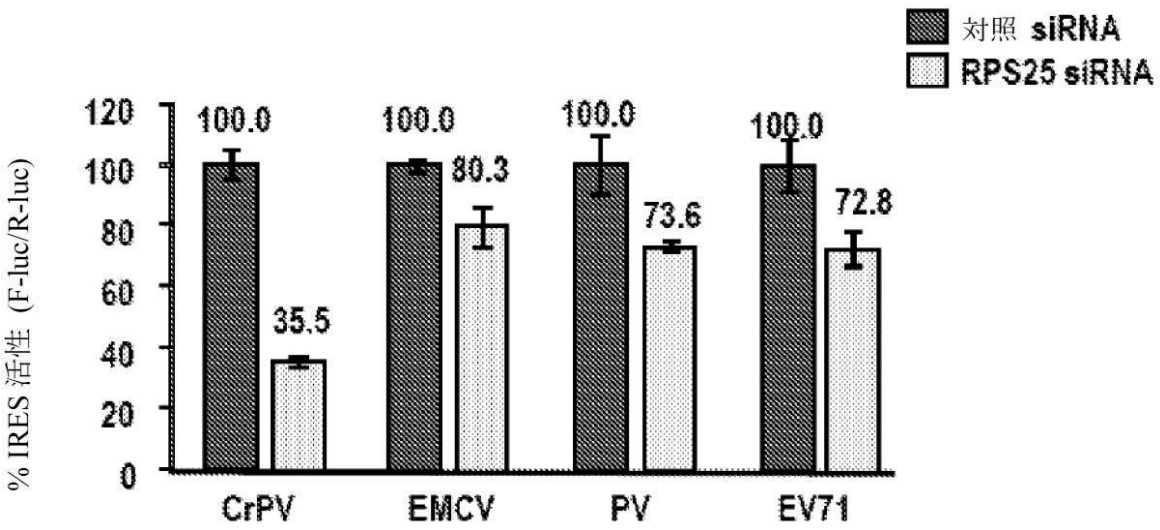
【図１０Ｂ】



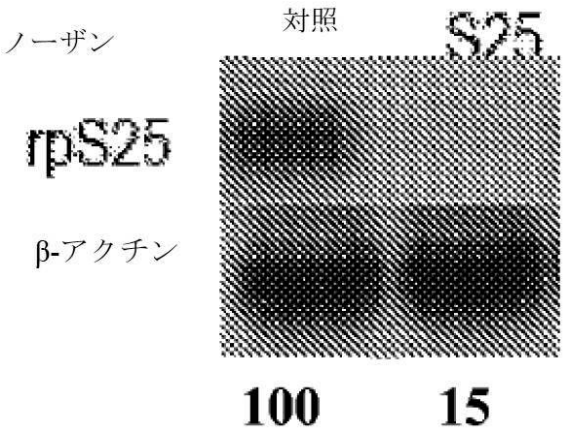
【図１０Ｃ】



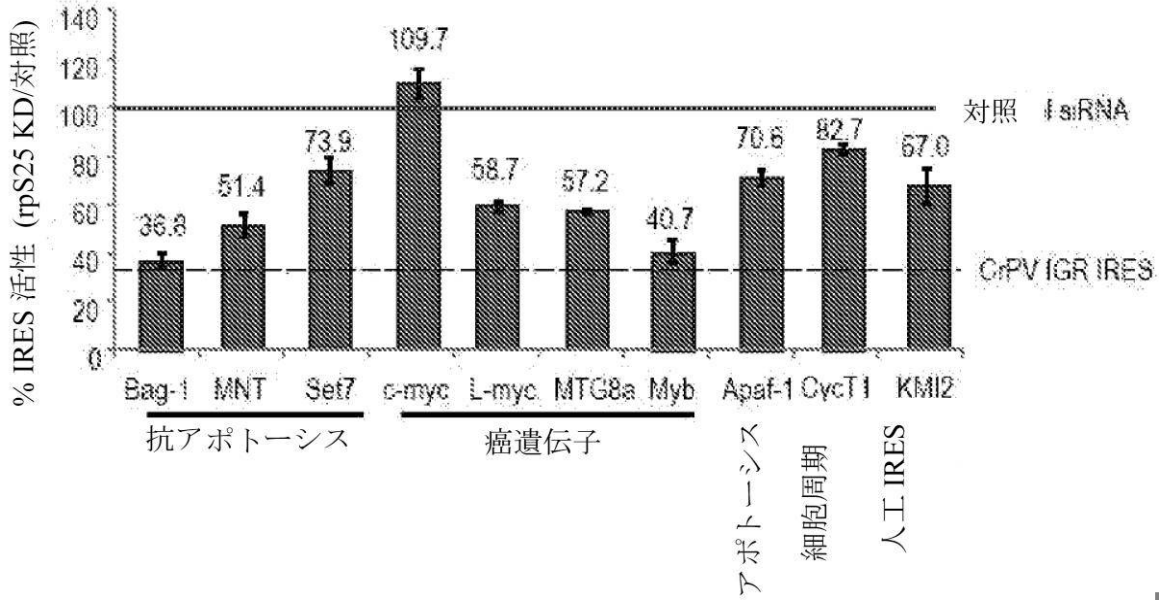
【図１１】



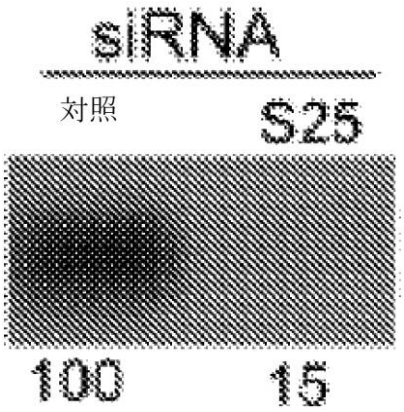
【図１２Ａ】



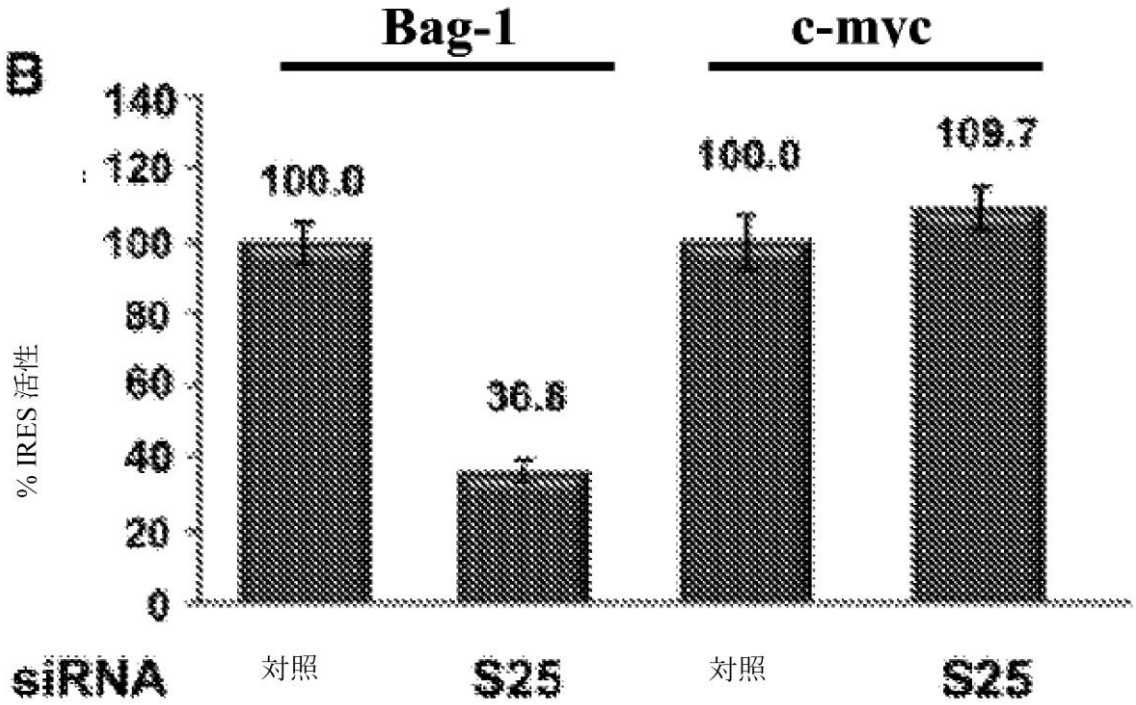
【図１２Ｂ】



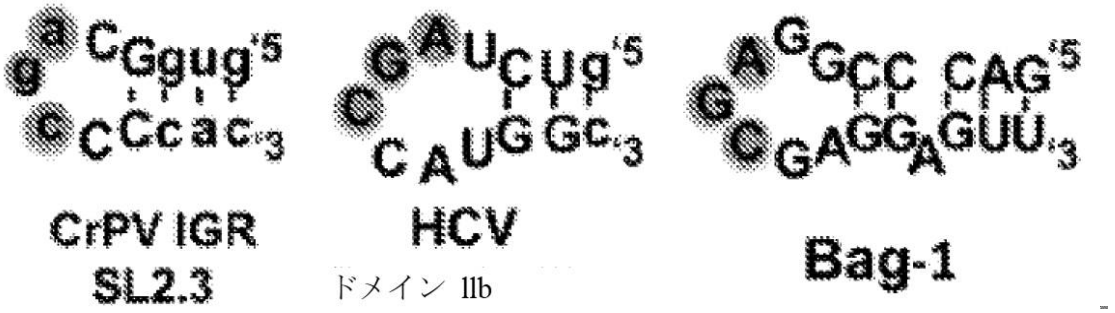
【図１３Ａ】



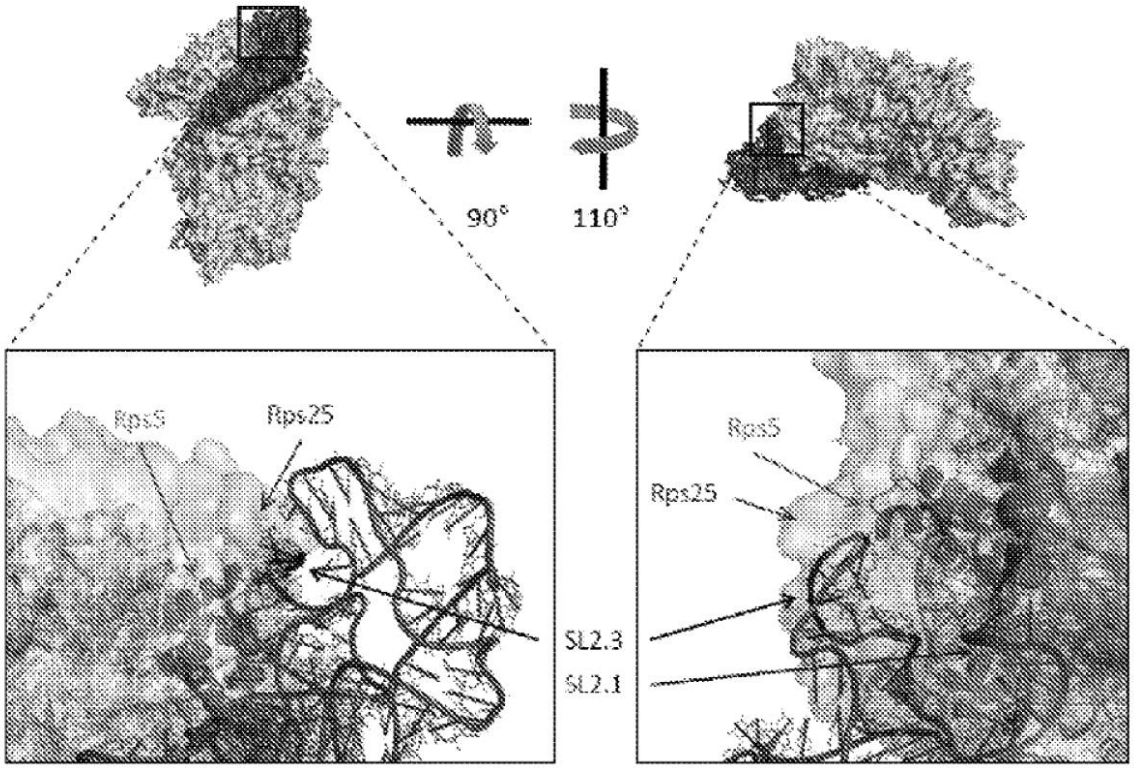
【図１３Ｂ】



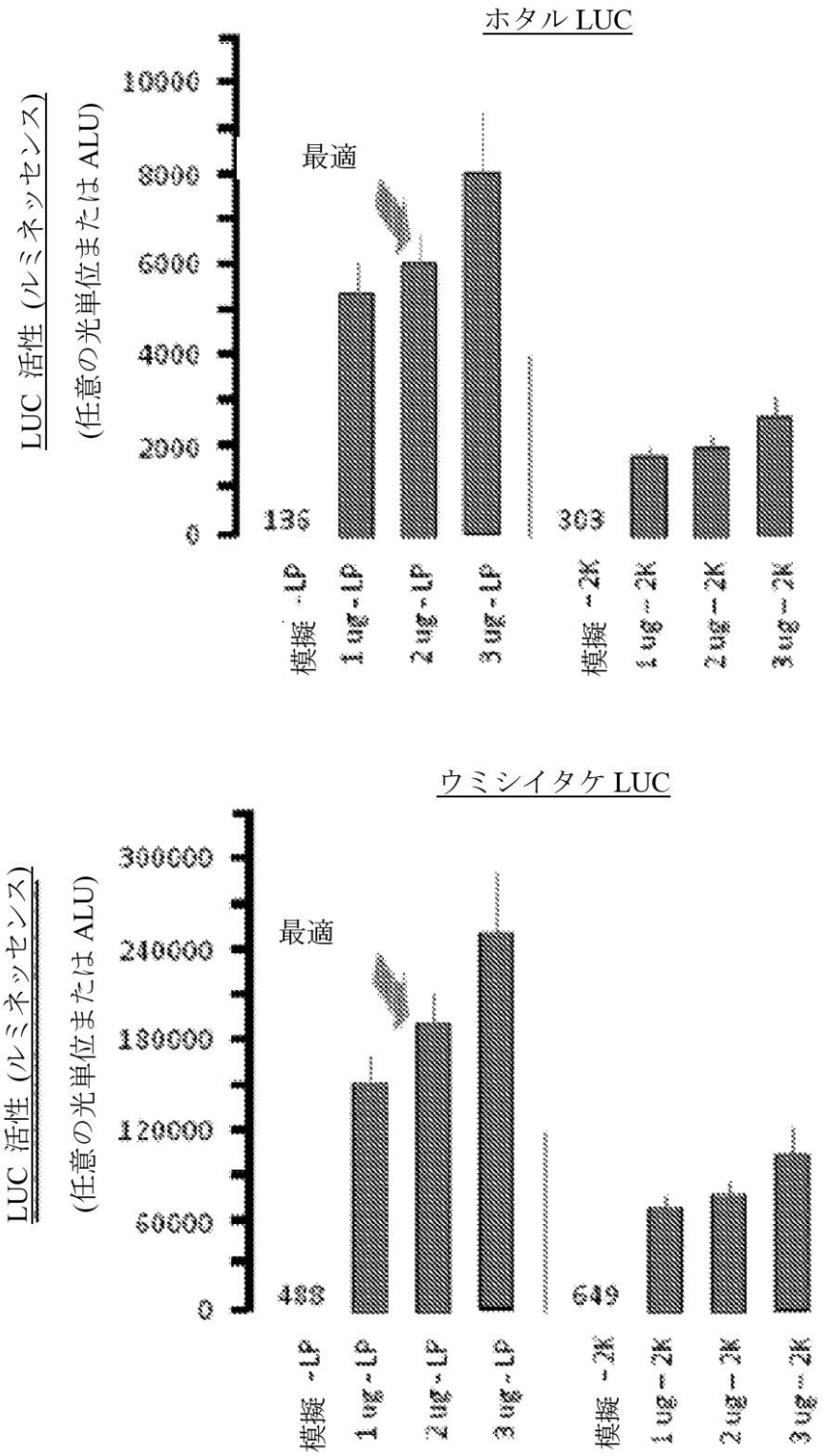
【図１３Ｃ】



【図１４】

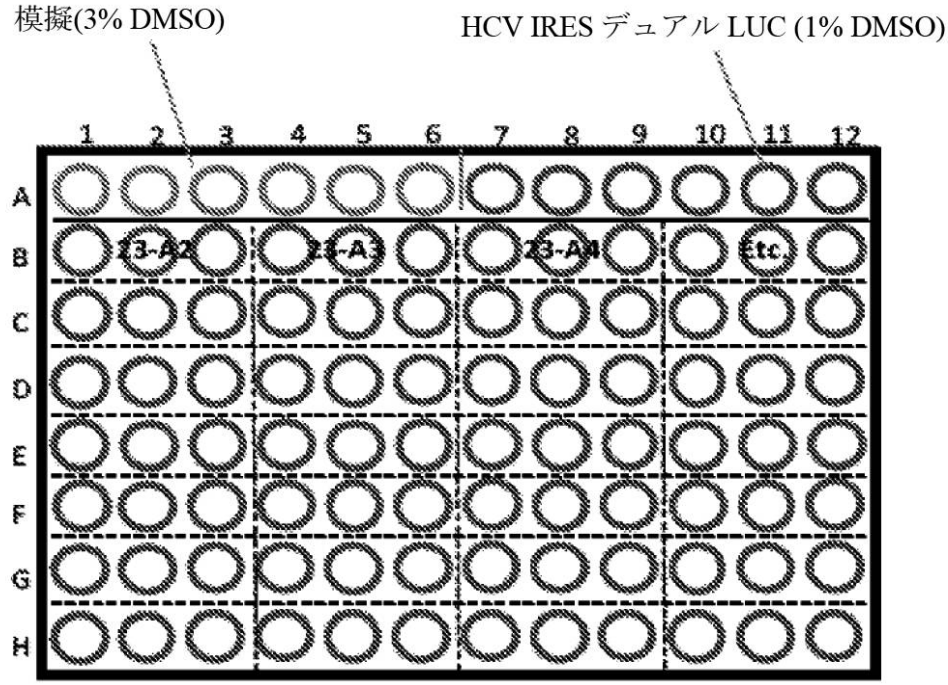


【図１５】


ホタル LUC
LUC 活性 (ルミネッセンス)
(任意の光単位または ALU)
10000
8000
6000
4000
2000
0
最適
136
模擬 -LP
1 ug-LP
2 ug-LP
3 ug-LP
303
模擬 -2K
1 ug-2K
2 ug-2K
3 ug-2K
ウミシイタケ LUC
LUC 活性 (ルミネッセンス)
(任意の光単位または ALU)
300000
240000
180000
120000
60000
0
最適
48
模擬 -LP
1 ug-LP
2 ug-LP
3 ug-LP
6
模擬 -2K
1 ug-2K
2 ug-2K
3 ug-2K

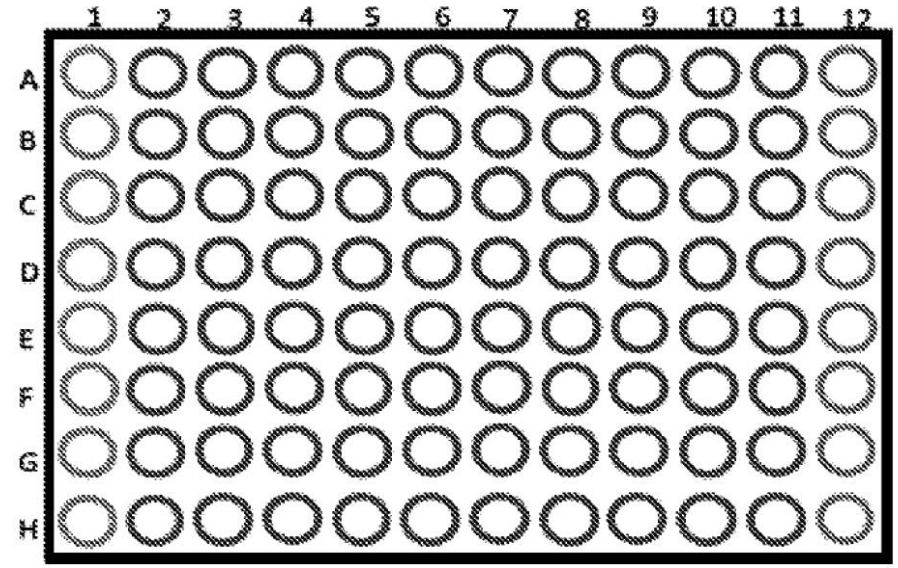
【図１６】

半自動化 HTS バイオアッセイ「テストドライブ」



完全自動化およびロボット HTS バイオアッセイ

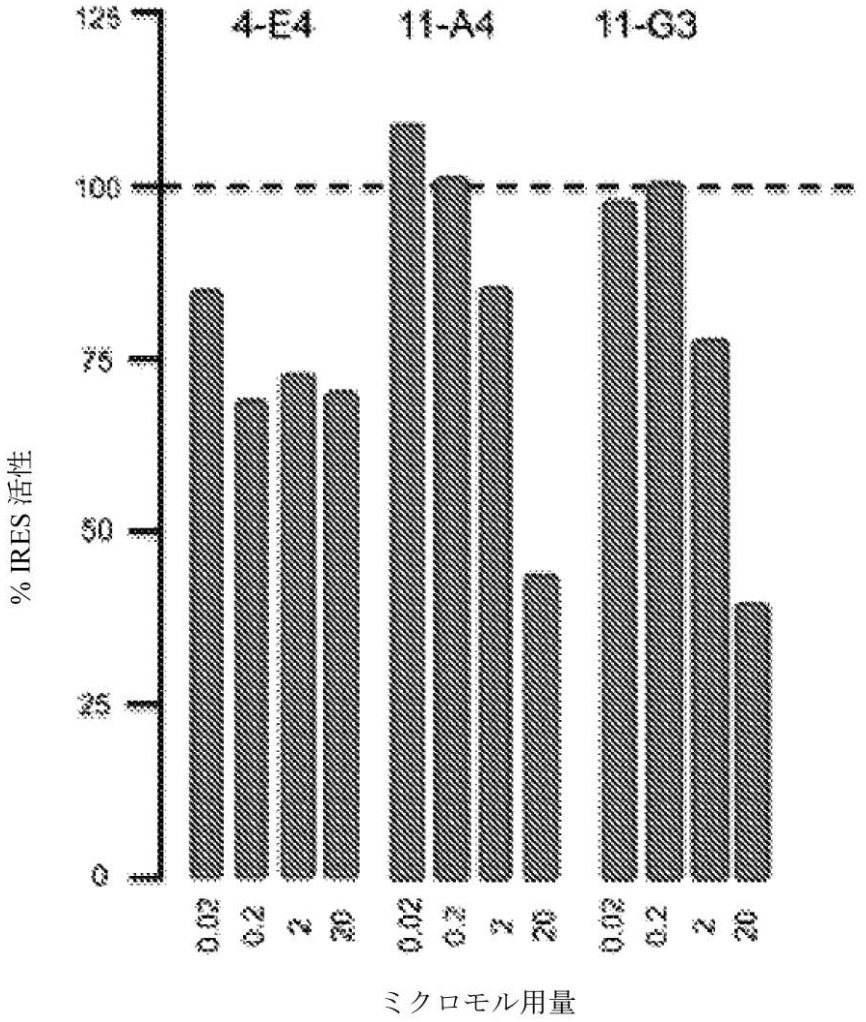
列 1 は模擬トランスフェクトされる。
列 2～12 は、HCV IRES デュアル LUC レポーターでトランスフェクトされる。



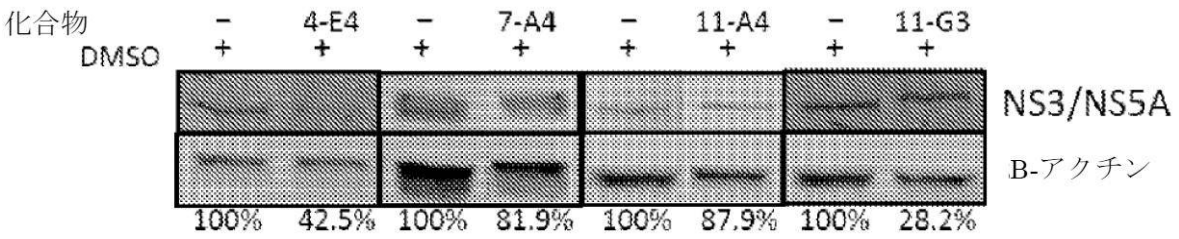
【図１７Ａ】

ウミシイタケ LUC/ホタル LUC
活性
(パミネッセンス)
(対照の%としての任意の光単位または ALU)
100%
80%
60%
40%
20%
0
Neg
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24
模擬
対照
ヒト肝細胞における推定 HCV IRES 阻害剤
中程度
有意
顕著

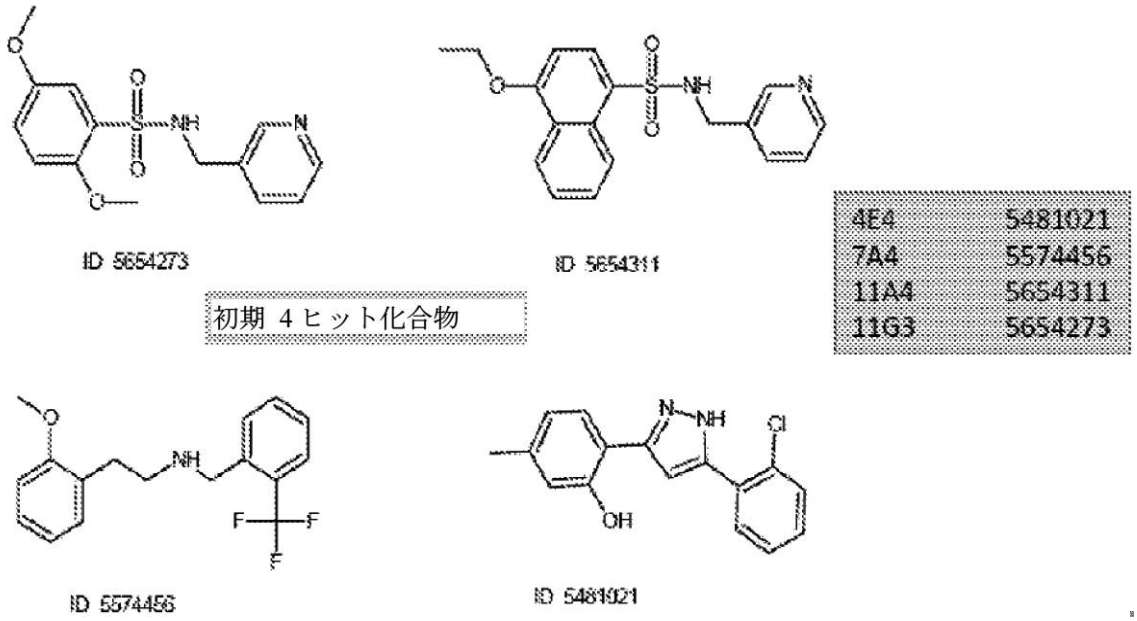
【図１７Ｂ】


4-E4
11-A4
11-G3
125
100
75
50
25
0
% IRES 活性
0.02
0.2
2
20
ミクロモル用量

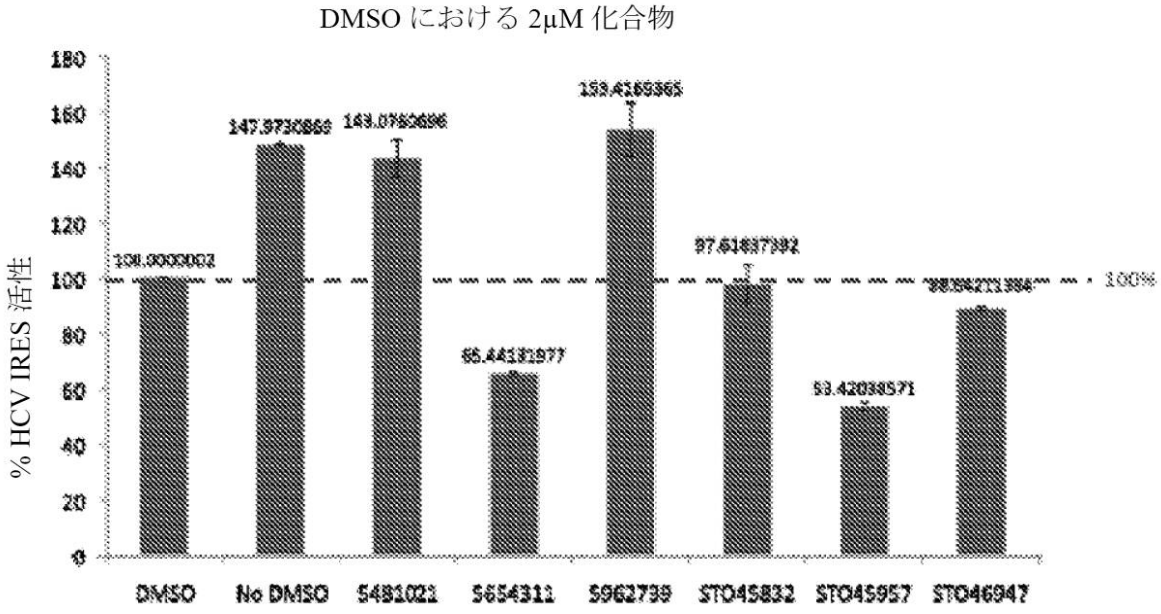
【図１７Ｃ】


化合物
DMSO
－
4-E4
7-A4
11-A4
11-G3
＋
NS3/NS5A
B-アクチン
100%
42.5%
81.9%
87.9%
28.2%

【図１７Ｄ】



【図１９Ａ】



【配列表】

2012522013000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2010/028917

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/44(2006.01)i, A61K 31/426(2006.01)i, A61K 31/4164(2006.01)i, A61K 38/16(2006.01)i, A61K 31/7105(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i, A61P 31/12(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 31/44; A61K 31/4162; C07C 271/28; A61K 31/415; A01N 43/50; C07C 271/00; C07D 207/46; A01N 43/40

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

Korean utility models and applications for utility models
Japanese utility models and applications for utility models

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

eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: IRES, IRES-mediated translation, internal ribosome entry site

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	US 2005-0113423 A1 (VANGOOR, FREDERICK. F. et al.) 26 May 2005 See table 1(IA-58, IA-106), claims 1 and 9.	1,6-10,21-22 18
X	US 5139564 A1 (PARK, SANG W. et al.) 18 August 1992 See column 1, lines 11-35.	1,6,10
X	WO 2008-004798 A1 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 10 January 2008 See claim 1, table 1.	1,6,10
X A	US 2003-0171341 A1 (SUN, DONGXU. et al.) 11 September 2003 See claim 1.	1-5,16-17,19-20 18
X	PANKUCH,G.A. et al. Activities of Tizoxanide and Nitazoxanide Compared to Those of Five Other Thiazolides and Three Other Agents against Anaerobic Species. Antimicrobial Agents & Chemotherapy, March 2006, Vol. 50, No. 3, pp.1111-1117. See figure 1.	1,15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents,such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
17 JANUARY 2011 (17.01.2011)	**21 JANUARY 2011 (21.01.2011)**

Name and mailing address of the ISA/KR
Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea
Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer
Jeong Hyun Ah
Telephone No. 82-42-481-8739

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2010/028917

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LAI, Y. Y. et al. Synthesis and biological relationships of 3`,6-substituted 2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid derivatives as antimitotic agents. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2005, Vol.13, pp. 265-275. See scheme 1.	1,11-12
X	RAKIC, B. et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha Antagonism Inhibits Hepatitis C Virus Replication. Chemistry & Biology, January 2006, Vol. 13, pp. 23-30. See figure 1(B).	1,13-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2010/028917

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 23-86
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 23-86 pertain to methods for treatment of the human or animal body (method of treating a viral infection or a cancer in a human), and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 59
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required addtional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US2010/028917

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2005-0113423 A1	26.05.2005	US 2005-113423 A1	26.05.2005
		US 2010-144798 A1	10.06.2010
US 5139564 A1	18.08.1992	JP 62-120357 A	01.06.1987
		KR 10-1989-0001568 B1	08.05.1989
WO 2008-004798 A1	10.01.2008	KR 10-0787131 B1	21.12.2007
		US 2009-306078 A1	10.12.2009
		WO 2008-004798 A8	13.08.2009
		WO 2008-004798 A8	10.01.2008
US 2003-0171341 A1	11.09.2003	US 2003-171341 A1	11.09.2003
		US 7049468 B2	23.05.2006

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ　31/7088	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7088		４Ｃ０８６
Ａ６１Ｋ　31/7105	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7105		４Ｈ００６
Ａ６１Ｐ　35/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		
Ａ６１Ｋ　38/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	37/02		
Ｃ０７Ｄ 213/75	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｄ	213/75	ＣＳＰ	
Ａ６１Ｋ　31/44	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/44		
Ｃ０７Ｄ 277/20	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｄ	277/46		
Ｃ０７Ｄ 277/46	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/426		
Ａ６１Ｋ　31/426	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｄ	213/42		
Ｃ０７Ｄ 213/42	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/4402		
Ａ６１Ｋ　31/4402	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/4406		
Ａ６１Ｋ　31/4406	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/415		
Ａ６１Ｋ　31/415	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｃ	235/56		
Ｃ０７Ｃ 235/56	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｃ	217/60		
Ｃ０７Ｃ 217/60	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/00	Ａ	
Ｃ１２Ｎ　15/09	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/00	Ｇ	
Ｃ１２Ｎ　15/113	*(2010.01)*				

(81)指定国　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(72)発明者　トンプソン，　サニー　アール.
アメリカ合衆国　アラバマ　３５２４３，　バーミンハム，　ブライアー　オーク　ドライブ　３８２０
(72)発明者　シュウィーバート，　エリク　ミルズ
アメリカ合衆国　アラバマ　３５２４２，　バーミンハム，　グレンストーン　レーン　２８０５
(72)発明者　ストレイフ，　ジョン　エイチ.
アメリカ合衆国　アラバマ　３５２２６，　バーミンハム，　カムデン　リッジ　６４７

Ｆターム(参考)　4B024 AA01 CA04 CA11
4B063 QA01 QA19 QQ08 QQ53
4C033 AD15 AD17 AD20
4C055 AA01 BA01 BA02 BA53 BB08 BB15 CA01 CA02 CA06 CA27
CB16 DA01 DA06
4C084 AA01 AA02 BA03 NA14 ZB261 ZB331 ZC411
4C086 AA01 AA02 BC17 BC36 BC82 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB26
ZB33 ZC41

4H006 AA01 AA03 AB29