

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6600621号  
(P6600621)

(45) 発行日 令和1年10月30日(2019.10.30)

(24) 登録日 令和1年10月11日(2019.10.11)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 31/711 (2006.01)	A 6 1 K 31/711
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00
A 6 1 K 47/34 (2017.01)	A 6 1 K 47/34
A 6 1 K 47/42 (2017.01)	A 6 1 K 47/42

請求項の数 15 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-502925 (P2016-502925)	(73) 特許権者	515254367
(86) (22) 出願日	平成26年3月14日 (2014. 3. 14)		テチュロン インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2016-515518 (P2016-515518A)		アメリカ合衆国 バージニア州 ブラック
(43) 公表日	平成28年5月30日 (2016. 5. 30)		スパーダ クラフト ドライブ 2200
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/028855		スイート 2475
(87) 国際公開番号	W02014/144442	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開日	平成26年9月18日 (2014. 9. 18)		弁理士 清水 初志
審査請求日	平成29年3月9日 (2017. 3. 9)	(74) 代理人	100102118
(31) 優先権主張番号	61/786, 946		弁理士 春名 雅夫
(32) 優先日	平成25年3月15日 (2013. 3. 15)	(74) 代理人	100160923
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 山口 裕孝
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
		(74) 代理人	100142929
			弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 黄色ブドウ球菌感染の治療のためのアンチセンス分子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus) 膜安定性タンパク質のコード領域に対してアンチセンスでありかつ該コード領域に生理的条件下でハイブリダイズする、ポリヌクレオチド配列を含む、黄色ブドウ球菌の増殖を阻害するアンチセンス分子またはその塩であって、前記アンチセンス分子が、SEQ ID NO: 1および2からなる群より選択される配列と少なくとも90%同一の核酸配列を含み、かつ細胞透過分子に結合されている、前記アンチセンス分子またはその塩。

【請求項 2】

SEQ ID NO: 1および2からなる群より選択される配列と少なくとも95%同一の核酸配列を含む、請求項1記載のアンチセンス分子。

10

【請求項 3】

SEQ ID NO: 1および2からなる群より選択される核酸配列を含む、請求項1記載のアンチセンス分子。

【請求項 4】

オリゴヌクレオチドである、請求項1~3のいずれか一項記載のアンチセンス分子。

【請求項 5】

HPLCで99~100%均質である、請求項1~4のいずれか一項記載のアンチセンス分子。

【請求項 6】

修飾された主鎖を含む、請求項1~5のいずれか一項記載のアンチセンス分子。

20

## 【請求項 7】

修飾された主鎖が、PNA主鎖である、請求項6記載のアンチセンス分子。

## 【請求項 8】

細胞透過分子が細胞透過ペプチドである、請求項1~7のいずれか一項記載のアンチセンス分子。

## 【請求項 9】

送達ポリマーに複合体化された、請求項1~8のいずれか一項記載のアンチセンス分子を含む、組成物。

## 【請求項 10】

送達ポリマーが、ホスホニウムイオン基またはアンモニウムイオン基を含むカチオン性ブロックコポリマーである、請求項9記載の組成物。

10

## 【請求項 11】

黄色ブドウ球菌を含む組織または黄色ブドウ球菌を含むと疑われる組織における黄色ブドウ球菌の増殖を阻害するための組成物の調製における、請求項1~8のいずれか一項記載のアンチセンス分子またはその塩の使用。

## 【請求項 12】

前記組成物が局所投与用である、請求項11記載の使用。

## 【請求項 13】

動物における黄色ブドウ球菌感染を治療するための組成物の調製における、請求項1~8のいずれか一項記載のアンチセンス分子またはその塩の使用。

20

## 【請求項 14】

SEQ ID NO: 1のヌクレオチド配列を含む、請求項1~8のいずれか一項記載のアンチセンス分子。

## 【請求項 15】

前記アンチセンス分子が、SEQ ID NO: 1のヌクレオチド配列を含む、請求項11~13のいずれか一項記載の使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

政府の権益

30

本研究は、フェーズI SBIR契約番号W911QX-12-C-0072の下、国防総省国防高等研究事業局 (Defense Advanced Research Project Agency) により一部基づくものである。米国政府は、本発明に対し一定の権利を有する。

## 【0002】

発明の分野

本発明の分野は、黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus) 感染の治療に有用な膜安定性タンパク質を標的とするアンチセンスポリヌクレオチド試薬に関する。

## 【発明の概要】

## 【0003】

黄色ブドウ球菌感染の治療および黄色ブドウ球菌の増殖の阻害に有用なアンチセンス分子が提供される。該アンチセンス分子は、黄色ブドウ球菌膜安定性タンパク質を標的とし、天然の核酸ポリマーおよび非天然の核酸ポリマーを含みうるが、ただし該膜タンパク質はFmhBではない。非天然の核酸ポリマーには、PNA、PMO、および合成的に修飾されたDNAおよびRNAなどの、修飾された主鎖を有するポリマーが含まれる。本発明には、天然のDNAおよびRNAにハイブリダイズする、任意の型の合成的に修飾されたDNAまたはRNAが含まれる。一つの態様において、アンチセンス分子は塩または複合体の形態である。一つの態様において、アンチセンス分子はカチオン性ポリマー分子に複合体化されている。別の態様において、アンチセンス分子は細胞透過分子に結合されている。本発明のアンチセンス分子を含む薬学的組成物もまた提供される。

40

## 【0004】

50

一つの態様において、本発明は、黄色ブドウ球菌膜安定性タンパク質のコード領域に対してアンチセンスであり、かつ該コード領域に生理的条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド配列を含む、黄色ブドウ球菌の増殖を阻害するアンチセンス分子またはその塩を提供する。一つの態様において、該アンチセンス分子は長さが10~50核酸塩基である。別の態様において、該アンチセンス分子は、黄色ブドウ球菌膜安定性タンパク質のコード領域に対して完全に相補的であるが、ただし該膜タンパク質はFmhBではない。別の態様において、該アンチセンス分子はSEQ ID NO:1~16からなる群より選択される配列と少なくとも80%同一である。別の態様において、該アンチセンス分子はオリゴヌクレオチドである。別の態様において、該アンチセンス分子は実質的に純粋である。別の態様において、該アンチセンス分子は修飾された主鎖を含む。別の態様において、該修飾された主鎖はPNA主鎖である。別の態様において、該アンチセンス分子は細胞透過分子に結合されている。別の態様において、該細胞透過分子はペプチドである。別の態様において、該ペプチドは細胞透過ペプチド(CPP)である。別の態様において、該アンチセンス分子は送達ポリマーに複合体化されている。別の態様において、送達ポリマーはホスホニウムイオン基またはアンモニウムイオン基を含むカチオン性ブロックコポリマーである。

【0005】

本発明はまた、本発明のアンチセンス分子または組成物を、黄色ブドウ球菌を含む組織または黄色ブドウ球菌を含むと疑われる組織に投与する工程を含む、黄色ブドウ球菌の増殖を阻害する方法も提供する。一つの態様において、該投与する工程は局所投与である。

【0006】

本発明はまた、その必要がある動物に本発明のアンチセンス分子または組成物の有効量を投与する工程を含む、黄色ブドウ球菌感染を治療する方法も提供する。以下に、本発明の基本的な諸特徴および種々の態様を列挙する。

[1]

黄色ブドウ球菌(Staphylococcus aureus)膜安定性タンパク質のコード領域に対してアンチセンスでありかつ該コード領域に生理的条件下でハイブリダイズする、ポリヌクレオチド配列を含み、長さが10~50核酸塩基である、黄色ブドウ球菌の増殖を阻害するアンチセンス分子またはその塩であり、ただし該膜タンパク質がFmhBではない、アンチセンス分子またはその塩。

[2]

黄色ブドウ球菌膜安定性タンパク質のコード領域に対して完全に相補的である、[1]のアンチセンス分子。

[3]

SEQ ID NO: 1~16からなる群より選択される配列と少なくとも80%同一である、[1]または[2]のアンチセンス分子。

[4]

SEQ ID NO: 1~16からなる群より選択される配列を有する、[1]または[2]のアンチセンス分子。

[5]

オリゴヌクレオチドである、[1]~[4]のいずれかのアンチセンス分子。

[6]

実質的に純粋である、[1]~[5]のいずれかのアンチセンス分子。

[7]

修飾された主鎖を含む、[1]~[6]のいずれかのアンチセンス分子。

[8]

修飾された主鎖が、PNA主鎖である、[7]のアンチセンス分子。

[9]

細胞透過分子に結合されている、[1]~[8]のいずれかのアンチセンス分子。

[10]

細胞透過分子がペプチドである、[9]のアンチセンス分子。

[ 1 1 ]

ペプチドが細胞透過ペプチドである、[ 10 ] のアンチセンス分子。

[ 1 2 ]

送達ポリマーに複合体化された、[ 1 ] ~ [ 11 ] のいずれかのアンチセンス分子を含む、組成物。

[ 1 3 ]

送達ポリマーが、ホスホニウムイオン基またはアンモニウムイオン基を含むカチオン性ブロックコポリマーである、[ 12 ] の組成物。

[ 1 4 ]

[ 1 ] ~ [ 11 ] のいずれかのアンチセンス分子または [ 12 ] ~ [ 13 ] の組成物を、黄色ブドウ球菌を含む組織または黄色ブドウ球菌を含むと疑われる組織に投与する工程を含む、黄色ブドウ球菌の増殖を阻害する方法。

10

[ 1 5 ]

前記アンチセンス分子または組成物の局所投与を含む、[ 14 ] の方法。

[ 1 6 ]

その必要がある動物に [ 1 ] ~ [ 11 ] のいずれかのアンチセンス分子または [ 12 ] ~ [ 13 ] の組成物の有効量を投与する工程を含む、黄色ブドウ球菌感染を治療する方法。

## 【図面の簡単な説明】

## 【 0 0 0 7 】

【図 1】MRSA インビトロ調査。抗細菌核酸剤の有効性を示す。ペプチド-PNA を MRSA USA 300 の培養物中の細菌に対して試験した。さらなる調査のため、これらの結果をバンコマイシンを用いて標準化した。

20

【図 2】図 2A ~ 2B。a) 1  $\mu$ M の FITC-ペプチド剤による処置の 2 時間後の MRSA 蛍光オーバーレイ。b) 1  $\mu$ M の FITC-ペプチド剤による処置の 2 時間後の AcB 蛍光オーバーレイ。スケールバー = 100  $\mu$ m。この図は、細胞透過ペプチドが、単独で用いた場合に非毒性であることを示す。

【図 3】0  $\mu$ M、1  $\mu$ M、10  $\mu$ M、および 20  $\mu$ M 濃度の PNA-ペプチドアンチセンス抗生物質での 8 時間にわたる対数期 MRSA 増殖阻害を示す。左下は陽性対照 (FmhB) を示し、右下は陰性対照を示す。

【図 4】マウスにおける、薬物動態学的エンドポイントでの、PNA-ペプチドアンチセンス抗生物質の単回用量忍容性研究のための、投与量を記載する表である。

30

【図 5】マウスにおける、PNA-ペプチドアンチセンス抗生物質の複数回用量安全性研究の投与スケジュールを記載する表である。

【図 6】マウスにおける、PNA-ペプチドアンチセンス抗生物質の複数回用量に関する安全性データの棒グラフを示す。複数回用量の投与後、マウスの肝臓マーカー (ALP、ALT、AST、CPK)、腎臓マーカー (BUN)、および体重を評価した。棒グラフ：肝臓および腎臓マーカー。線グラフ：動物の体重。

【図 7】マウスにおける黄色ブドウ球菌血液感染モデルの生残データの線グラフを示す。

【図 8】PNA-ペプチドアンチセンス抗生物質のインビボ有効性を示す。表は、MRSA および PNA-ペプチドアンチセンス抗生物質を注射したマウスに対する用量および治療計画を記載する。棒グラフは、治療 24 時間後のマウス血液における細菌負荷を示す。

40

## 【発明を実施するための形態】

## 【 0 0 0 8 】

## 配列表の簡単な説明

配列表中のポリヌクレオチド配列には、黄色ブドウ球菌膜安定性タンパク質のコード配列が含まれる。SEQ ID NO: 31 ~ 44 参照。

## 【 0 0 0 9 】

配列表中のポリヌクレオチド配列には、アンチセンスデオキシリボ核酸 (DNA) および/または、ペプチド核酸 (PNA) などの修飾核酸も含まれる。これらの配列は、少なくとも下記の表 1 に記載される黄色ブドウ球菌膜安定性タンパク質の発現をノックダウンするこ

50

とができる。

【 0 0 1 0 】

(表1) 膜安定性タンパク質を標的とするアンチセンスポリヌクレオチド

タンパク質標的	アンチセンスポリヌクレオチド配列
アラニンラセマーゼ	CCGACATATTAC (SEQ ID NO: 6)
細胞分裂タンパク質FtsI (ペプチドグリカンシンセターゼ)	CATTACTACGCA (SEQ ID NO: 3)
D-アラニン-D-アラニンリガーゼ	TGTCATTTCGTTTTTC (SEQ ID NO: 16)
グルタミン酸ラセマーゼ	ATTCATATTCGGTCA (SEQ ID NO: 9)
マルチモジュールトランスペプチダーゼ- トランスグリコシラーゼ/ペニシリン結合タンパク質 1A/1B (PBP1)	TCATACGCGGTC (SEQ ID NO: 5)
マルチモジュールトランスペプチダーゼ- トランスグリコシラーゼ/ペニシリン結合タンパク質 1A/1B (PBP1)	CGTCATACGCGGTCC (SEQ ID NO: 1)

ホスホ-N-アセチルムラモイル- ペンタペプチド-トランスフェラーゼ	ACAAAAATCATAACT (SEQ ID NO: 10)	
アミドトランスフェラーゼとクラスターを 成すことが見出された、提唱されたアミノ酸リガーゼ	GTCTCATGTGTTTCC (SEQ ID NO: 15)	
tRNA依存型リピドII-Gly-グリシンリガーゼ (FmhB)	TCCATGATTTAT (SEQ ID NO: 30)	
tRNA依存型リピドII-Gly-グリシンリガーゼ (FmhB)	TTTTCCATGATTTAT (SEQ ID NO: 28)	10
tRNA依存型リピドII-Gly-グリシンリガーゼ@ tRNA依存型リピドII-GlyGly-グリシンリガーゼ @FemA、メチシリン耐性に必須の因子	TACTCATTTTATCAA (SEQ ID NO: 12)	
UDP-N-アセチルグルコサミン1- カルボキシビニルトランスフェラーゼ	CATCGTAAATCC (SEQ ID NO: 7)	
UDP-N-アセチルグルコサミン1- カルボキシビニルトランスフェラーゼ	ATCCATCGTAAATCC (SEQ ID NO: 2)	20
UDP-N-アセチルグルコサミン-N-アセチルムラミル- (ペンタペプチド)ピロホスホリル-ウンデカプレノール N-アセチルグルコサミントランスフェラーゼ	TTTCGTCATTAA (SEQ ID NO: 4)	
UDP-N-アセチルグルコサミン-N-アセチルムラミル- (ペンタペプチド)ピロホスホリル-ウンデカプレノール N-アセチルグルコサミントランスフェラーゼ	GATTTTCGTCATTAA (SEQ ID NO: 13)	30
UDP-N-アセチルムラミン酸-アラニンリガーゼ	AGTGTGTCATTATAT (SEQ ID NO: 14)	
UDP-N-アセチルムラモイルアラニル -D-グルタミン酸-L-リジンリガーゼ	TGCATCCAAACTGAA (SEQ ID NO: 8)	
ウンデカプレニルピロリン酸シンセターゼ	TTAAACATGGTCTTT (SEQ ID NO: 11)	

## 【 0 0 1 1 】

本配列表は、tRNA依存型リピドIIグリシンリガーゼ (FmhB) の対照配列 :

ttttccatgatttat (SEQ ID NO:28)

; および非コード陰性対照 (NC) :

aacattttggtttt (SEQ ID NO: 29)

も含む。

## 【 0 0 1 2 】

本配列表中のペプチド配列には、核酸およびナノ粒子を細菌細胞にターゲティングおよび/または局在化し、細菌膜の透過を促進するペプチドが含まれる。表2を参照。

## 【 0 0 1 3 】

(表2) 細胞透過ペプチド

10

20

30

40

50

ペプチド名	アミノ酸配列
KFF ペプチド	KFFKFFKFFK (SEQ ID NO: 17)
RFF ペプチド	RFFRFFRFFR (SEQ ID NO: 18)
マガイニン2	GIGKWLHSAKKFGKAFVGEIMNS (SEQ ID NO: 19)
トランスポーチン10	AGYLLGKINLKALAALAKKIL (SEQ ID NO: 20)
インドリシジン	ILPWKWPWWPWR (SEQ ID NO: 27)
TAT ペプチド	GRKKRRQRRRPQ (SEQ ID NO: 26)
PENETRATIN 1 ペプチド	RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 25)
両親媒性ペプチド	LLIILRRRIRKQAHASHK (SEQ ID NO: 24)
環状d,1- $\alpha$ -ペプチド	KQRWLWLW (SEQ ID NO: 23)
環状d,1- $\alpha$ -ペプチド	RRKWLWLW (SEQ ID NO: 22)
環状d,1- $\alpha$ -ペプチド	KKLWLW (SEQ ID NO: 21)

10

## 【 0 0 1 4 】

## 定義

本開示において使用される用語は当技術分野で使用される通常の意味を有する。

20

## 【 0 0 1 5 】

ポリマーは、モノマーと呼ばれる単位の直鎖である。ポリマーにおいて、モノマー単位は同一であってもよく、異なってもよい。ポリマーは天然の（自然界で作られた）ものであってもよいし、合成のものであってもよい。本発明のポリマーは、核酸ポリマー、ポリペプチド、および合成の送達ポリマーを含む。

## 【 0 0 1 6 】

核酸はヌクレオチドの直鎖ポリマーである。自然界で作られる核酸は、アデニン、シトシン、グアニン、およびチミンのデオキシリボ核酸（DNA）塩基を含むか、またはアデニン、シトシン、グアニン、およびウラシルのリボ核酸（RNA）塩基を含む。本明細書で使用されるポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドとは核酸分子を指し、いかなる長さのゲノムDNA、cDNA、RNA、またはmRNAも含む。核酸、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチドは交換可能に使用されうる用語である。

30

## 【 0 0 1 7 】

修飾された核酸とは、ワトソン-クリックの塩基対法則に従う配列特異性で、天然のDNAおよびRNAにハイブリダイズする、非天然ポリマーである。修飾された核酸の例は、ホスホロチオエート-オリゴデオキシヌクレオチド（PS-ODN）、ロック核酸（LNA）、2'-O-メチルオリゴリボヌクレオチド（2'-O-Me）、ホスホロジアミデートモルホリノオリゴヌクレオチド（PMO）、およびペプチド核酸（PNA）である。修飾された核酸は、修飾された主鎖を有し、一般に天然の核酸よりも分解に対して抵抗性がある。本発明には、天然のDNAおよびRNAにハイブリダイズする任意の型の合成修飾DNAまたはRNAが含まれる。例えば、米

40

## 【 0 0 1 8 】

本発明のアンチセンス分子は、天然の核酸にハイブリダイズする非天然ポリマーから構成されていてもよい。中でも、メチル化塩基、ホスホリル化塩基、イノシン、チオウリジン、シュードウリジン（pseudouridine）、ジヒドロウリジン、キューオシン（queuosine

50

)、およびワイオシン (wyosine) などの、異型ヌクレオシド塩基が用いられていてもよい。このような異型塩基を含むアンチセンスポリマーの例は、米国特許第7,875,733号、同第7,919,612号、同第7,939,677号、同第8,314,229号、同第8,372,969号、および同第8,377,898号に開示されている。

#### 【0019】

「アンチセンスポリヌクレオチド」という用語は、対象となる標的ヌクレオチド配列の少なくとも一部に相補的であり、かつ生理的条件下で標的ヌクレオチド配列にハイブリダイズする、核酸分子を指す。アンチセンス分子は、予め選択された標的核酸をコードする一つまたは複数の核酸と特異的にハイブリダイズする。「標的核酸」および「標的をコードする核酸」という用語は、標的をコードするDNA、そのDNAから転写されたRNA (プレmRNAおよびmRNAを含む)、およびそのRNAに由来するcDNAも包含する。アンチセンス化合物とその標的核酸とのハイブリダイゼーションは、該核酸の正常機能を妨げる。このように標的核酸の機能がそれに特異的にハイブリダイズする化合物によって調節されることを、一般にアンチセンスと称する。妨げられるDNAの機能には、複製および転写が含まれる。妨げられるRNAの機能には、全ての重要な機能、例えば、タンパク質翻訳部位へのRNAの転移、RNAからのタンパク質翻訳、一つまたは複数のmRNA種を生ずるRNAのスプライシング、および、RNAに関与しうるかまたはRNAに促進されうる触媒活性、などが含まれる。このような標的核酸機能の妨げによる総合的な効果は、標的の発現の調節である。本発明の文脈において、調節とは遺伝子の発現の増加 (刺激) または減少 (阻害) のいずれかを意味する。本発明の文脈において、阻害は遺伝子発現の調節の形態である。

#### 【0020】

ポリヌクレオチドは、二つの一本鎖ポリヌクレオチドの間でハイブリダイゼーションが反平行配置で生じる場合に、互いに相補的であると記載される。

#### 【0021】

二つの配列間の同一性パーセントは、二つの配列の最適なアラインメントのために導入する必要のあるギャップ数、および各ギャップの長さを考慮に入れた、それらの配列が共有する同一部位の数の関数である。配列の比較ならびに同一性および類似性パーセントの決定は、数学的アルゴリズムを用いて行うことができる (例えば、Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; および Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991を参照)。好ましい態様において、二配列間の同一性パーセントはClustal Wアルゴリズムを用いて生成されるアラインメントに基づいて決定される (Thompson, J. D. et al., 1994, Nucleic Acids Res. 22:4673-4680)。このアルゴリズムは多くの商業的ソフトウェアパッケージ、本件の場合はVector NTI スイート (バージョン8.0) のalignX ソフトウェアプログラム、に組み込まれている。既定のClustal Wパラメーターを用いて、同一性パーセント値を計算するペアワイズアラインメントを生成した (gap opening penaltyが10; gap extension penaltyが0.1)。同一性パーセント値は、同一塩基数 ÷ 総塩基数 × 100と定義される。アラインメント中の配列の長さが異なる場合 (ギャップまたは伸長により) は、最も長い配列の長さを全長の値として計算に使用する。

#### 【0022】

タンパク質は、ペプチド結合により結合したアミノ酸の一つまたは複数の鎖を含むポリマーである。タンパク質は、通常、三次元形態に折りたたまれ、生物学的機能を促進する。

#### 【0023】

ポリペプチドは、ペプチド結合により結合したアミノ酸のポリマーである。「タンパク質」、「ポリペプチド」、および「ペプチド」という用語は、一般に交換可能に使用され

10

20

30

40

50

るが、ポリペプチドおよびペプチドは一般にタンパク質よりも長さが短い。

【0024】

「荷電」、「非荷電」、「カチオン性」、および「アニオン性」という用語は、近中性pH、例えば約6~8における、化学的部分の優勢状態を指す。一つの態様において、該用語は生理的pH、すなわち約7.4における化学的部分の優勢状態を指す。したがって、カチオン性主鎖結合は、pH7.4において大部分が正に荷電している。

【0025】

「実質的に純粋」という用語は、アンチセンス分子が、その他の物質、例えば他の核酸、タンパク質、脂質、炭水化物、および該分子に天然に付随する他の物質などを実質的に含まないことを意味する。一つの態様において、実質的に純粋なアンチセンス分子は、HPLCで95~95%均質なものである。別の態様において、実質的に純粋なアンチセンス分子は、HPLCで99~100%均質なものである。

【0026】

発明の詳細な説明

本発明は、本明細書に含まれる下記の本発明の態様の詳細な説明および例を参照することによって理解されうる。本明細書で使用される用語は、本発明の態様を説明することを目的とするものであり、限定することを意図するものではない。

【0027】

本発明の特定の局面には、生理的条件下において黄色ブドウ球菌膜安定性タンパク質のコード領域にアンチセンスであるアンチセンス分子を含む、黄色ブドウ球菌感染の治療に有用な、かつ/または黄色ブドウ球菌の増殖を阻害する、アンチセンス分子が含まれる。一つの態様において、アンチセンス分子はSEQ ID NO:31~44からなる群より選択される黄色ブドウ球菌膜安定性コード領域にハイブリダイズする。一つの態様において、アンチセンス分子は10~50核酸塩基を含む、すなわち10~50-merである。別の態様において、アンチセンス分子は10~25-mer、12~20-mer、12~15-mer、11-mer、12-mer、13-mer、14-mer、15-mer、16-mer、17-mer、18-mer、19-mer、20-mer、21-mer、22-mer、23-mer、24-mer、25-mer、26-mer、27-mer、28-mer、29-mer、または30-merである。アンチセンス分子のヌクレオチド配列は、好ましくは開始コドンにまたがる結合部位において選択される。専売(proprietary)ソフトウェアは、開始コドンを含む10塩基、11塩基、12塩基、13塩基、14塩基、15塩基、16塩基、17塩基、18塩基、19塩基、および/または20~40塩基(非限定的な例として)のウィンドウサイズをスキャンし、塩基含量によって潜在自己フォールディング性をランク付けする。該ソフトウェアアルゴリズムは、開始コドンをまたぐようにプログラムされていてよい。または、該アルゴリズムは、任意で開始コドン領域をまたぐようにプログラムされていてよい。アンチセンス配列の選択は、これらのデータから手動で確定するか、経験的データおよびパラメータ重み付けから導出される自動化プロセスによって確定することができる。膜安定性タンパク質発現遺伝子に対するこれらのアンチセンス分子は、ヒトのトランスクリプトームとは無関係(orthogonal)である。一つの態様において、アンチセンス分子は、37を超えるT<sub>m</sub>、低い自己フォールディング性、有意な開始コドンとの重なり、などの特徴を示す塩基長を有する。

【0028】

別の態様において、本発明はSEQ ID NO:1~16から選択される配列と少なくとも80%同一のポリヌクレオチド配列を提供する。具体的には、該配列は、天然または非天然ヌクレオチドによる一つまたは複数の置換、付加、欠失、および/または挿入を、標的遺伝子の調節活性が実質的に減弱しないように含む。改変体は、SEQ ID NO:1~16からなる群より選択される配列と、少なくとも約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、または89%の配列同一性を示し；別の態様においては、少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を示す。同一性パーセントは、当業者に周知のコンピューターアルゴリズムを使用することを含む任意の方法を使用して、ポリヌクレオチドの配列を対象ポリヌクレオチドの対応部分と比較することにより容易に決定されうる。アルゴリズムにはAlignまたはBLASTアルゴリズムが含まれる

10

20

30

40

50

(Altschul, 1991 J. Mol. Biol. 219:555-565; Henikoff and Henikoff, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919)。

【 0 0 2 9 】

本発明の一つの態様において、有効成分はターゲティング/細胞透過分子に結合される。本発明の一つの局面において、ターゲティング分子はペプチドを含む。該ペプチドは、細胞透過ペプチド (CPP) を含む。利用されるペプチドは、細胞ターゲティングおよび/または膜透過を促進する一つまたは複数の機能を有する。特に、本発明の治療的ポリヌクレオチドは、ペプチドをアンチセンス分子に結合することによって、宿主内の黄色ブドウ球菌に送達することができる。アンチセンス分子を細菌の膜破壊のためのペプチドに結合することにより、特異性を提供し、毒性を減少させる。細胞透過ペプチドの例には、SEQ ID NO:17~27を有するペプチドが含まれる。細胞透過ペプチドのさらなる例およびそれらをアンチセンス分子に結合する方法は、米国特許第8,354,387号、同第8,354,093号、同第8,313,778号、同第8,299,236号、同第8,242,081号、同第8,211,468号、同第8,207,293号、同第8,138,383号、同第8,044,019号、同第8,039,587号、同第7,943,581号、および同第7,879,813号に記載されている。別の態様において、細胞透過ペプチドは、米国特許第8,338,366号に開示されているように、HIV tat、ヘルペスウイルスVP22、ショウジョウバエアンテナペディアホメオボックス遺伝子産物、シグナル配列、融合配列、またはプロテグリンIに由来する。アンチセンス分子-ペプチド結合体は、システインがペプチドとDNAとの間のリンカーとしての機能を果たす、固相合成の方法によって作製してもよい。当技術分野で公知の他の方法を用いてもよい (例えば、Dirksen, A., et al., J. Am. Chem. Soc. 2006. 128, 15602-3を参照)。

【 0 0 3 0 】

本発明において有用なCPPは、多様な起源のペプチドである。カチオン性核酸担体ペプチドは、本発明の合成ポリマーと混合した際に生産的なナノ粒子を形成する。一つの例は、Xie et al., Molecular Therapy 2004, 10, 652-659に記載されるペプチド

**KFFKFFKFFK (SEQ ID NO: 17)**

である。さらなるペプチドには、TATペプチドおよびペネトラチン (PENETRATIN) が含まれる。TATペプチド

**GRKKRRQRRRPQ (SEQ ID NO: 26)**

は、ヒト免疫不全ウイルスの転写トランス活性化因子 (TAT) に由来し、CPPである。CPPは、細胞膜の親脂質性の障壁を乗り越えて、大きな分子や粒子をその生物学的作用のために細胞内へと送達する。ペネトラチンペプチドは、アンテナペディアタンパク質のホメオドメインの第3ヘリックスに対応する、配列

**RQIKIWFQNRMRKWK (SEQ ID NO: 25)**

の16アミノ酸ペプチドである。

【 0 0 3 1 】

有用なCPPはまた、Fernandez-Lopez et al., Nature 2001, 412, 452-455に記載される、

**KQRWLWLW (SEQ**

**ID NO: 23), RRKWLWLW (SEQ ID NO: 22), および KKLWLW, (SEQ ID NO: 21)**

などの環状d,l- ペプチドも含む。これらのペプチドはそれ自体の抗菌的性質を有すると共に、積み荷 (cargo) を内部細胞送達するための担体としても機能する。さらに、Nekhotiaeva et al. FASEB J. 2010, 394-396に記載される、両親媒性ペプチド

**LLILRRRIRKQAHASK (SEQ ID NO: 24)**

およびトランスポーチン10 (TP10)

**AGYLLGKINLKALAALAKKIL (SEQ ID NO: 20)**

が、生産的なナノ粒子を形成する。アフリカツメガエルから単離されたマガイニン2ペプチド (Karas et al, Biochemistry 2002, 41,10723-31)

**GIGKWLHSAKKFGKAFVGEIMNS (SEQ ID NO:19)**

などのトリプトファンに富むペプチドも、本発明において有用なさらなるCPPである。さらに、ウシの好中球から単離されたインドリシジン

#### ILPWKWPWWPWRR (SEQ ID NO: 27)

も、本発明において有用な別のCPPである。類似の配列および特性を有するこれらのペプチドおよび他のペプチドは、機能的代替物であると当業者によって認識され、本願発明に包含される。さらにこれらのペプチドは、所望によりまたは必要により、機能を向上させるために改変されうる。

#### 【0032】

ペプチドおよびポリヌクレオチドのバルク合成は、高忠実度合成機を介した固相-足場・保護/脱保護合成を含む標準的な方法を使用し、Neo Group, Inc. (Cambridge, MA)などの委託製造業者によって行うことができる。ペプチド-PNAまたはペプチド-DNA成分は、病原体に進入してその遺伝的制御を攪乱する、治療的分子である。

10

#### 【0033】

一つの態様において、アンチセンス分子は、スクシンイミジル-6-ヒドラジノニコチネートアセトンヒドラゾンとスクシンイミジル-4-ホルミルベンゾエートとのカップリング化学を利用する周知の結合方法を用いてCPPに結合される。これは、特異的で、挙動が良好で、かつ高効率な、ペプチド-DNAカップリングのための結合方法である。ペプチドを核酸に共有結合するため、N末端を反応性基で修飾することによりペプチドを調製し、反応させる。一つの態様においては、ペプチドのN末端をS6H(スクシンイミジル-6-ヒドラジノニコチネートアセトンヒドラゾン)で修飾する。N保護ペプチドを脱塩し、無水DMFに溶解する。次に、2倍モル過剰のS6Hを攪拌溶液に添加し、室温で2時間反応させる。仕上げ(workup)は、Dirksen et al. J. Am. Chem. Soc. 2006 128, 15602-3に記載される手法などの、当技術分野で公知の手法に従う。ペプチドを核酸に結合する当技術分野で公知の他の方法を用いてもよい。

20

#### 【0034】

ペプチドの細胞取り込みをモニターするために、FITCアッセイを利用してよい。ペプチドをフルオレセインイソチオシアネート(FITC)に結合し、蛍光顕微鏡法を用いて取り込みをモニターした。図2A~2Bは、MRSA(図2A)およびAcB(図2B)において試験したいくつかのペプチドについてのアッセイ結果を示す(1 $\mu$ MのFITC-ペプチド試薬での処置2時間後の蛍光オーバーレイ、スケールバー=100 $\mu$ m)。MRSAに関しては、KFFおよびRFFモチーフを有するらせん型カチオン性ペプチドが、細胞への進入に有効であった。また、マガニン-FITCもMRSAへの進入に有効であった。図2A~2Bに示すいずれの顕微鏡像においても、試験濃度(1 $\mu$ M)のペプチドに由来する殺菌効果は見られない。

30

#### 【0035】

本発明の別の態様において、アンチセンス分子は送達ポリマーと組み合わせられる。ポリマーベースのナノ粒子薬物送達プラットフォームは、多様なポリヌクレオチド療法様式のセットに適合可能である。本発明の一つの局面において、送達ポリマーはカチオン性である。本発明の別の局面において、送達ポリマーはホスホニウムイオンおよび/またはアンモニウムイオンを含む。本発明の別の例においては、アンチセンス分子は送達ポリマーと組み合わせられ、該組成物が溶液中でナノ粒子を形成する。さらなる態様において、ナノ粒子ポリプレックスは血清中で安定であり、直径が約30nm~5000nmの範囲の大きさを有する。一つの態様において、粒子は直径が約300nm未満である。例えば、ナノ粒子は直径が約50nm未満である。

40

#### 【0036】

一つの態様において、送達媒体は、PCT/US12/42974に記載される、ホスホニウムイオン基またはアンモニウムイオン基を含むカチオン性ブロックコポリマーを含む。一つの態様において、該ポリマーは、ジブロック-ポリ[(エチレングリコール)<sub>9</sub>メチルエチルメタクラレート(methacralate)][スチリルホスホニウム]である。本発明の別の態様において、送達ポリマーは、Tranter et al. Amer Soc Gene Cell Ther, Dec 2011に記載されるグリコアミドアミン; US20090105115およびUS20090124534に記載される、ポリヒドロキシルア

50

ミドアミン、樹状巨大分子、炭水化物含有ポリエステルを含む。本発明の他の態様において、核酸送達媒体は、カチオン性ポリペプチドまたはカチオン性脂質を含む。カチオン性ポリペプチドの例は、ポリリジンである。米国特許第5,521,291号を参照。

【0037】

一つの態様において、アンチセンス分子は、送達または担体ポリマーを含む組成物の一部である。別の態様において、アンチセンス分子は、アンチセンス分子を血清中で安定に輸送可能なナノ粒子ポリプレックスの一部である。ポリプレックス組成物は、平均直径が約500 nm未満、例えば約300 nm未満、または約200 nm、好ましくは約150 nm未満、例えば約100 nm未満の粒子の形態で互いに会合している、合成送達ポリマー（担体ポリマー）および生物活性化合物を含む。本発明は、直径が約40nm～500nmの範囲の粒子を包含する。

10

【0038】

一つの態様において、送達または担体ポリマーは、PCT/US12/42974に記載される、ホスホニウムイオン基またはアンモニウムイオン基を含むカチオン性ブロックコポリマーを含む。本発明の別の態様において、送達または担体ポリマーは、Tranter et al. Amer Soc Gene Cell Ther, Dec 2011に記載されるグリコアミドアミン；US20090105115およびUS20090124534に記載される、ポリヒドロキシリアミドアミン、樹状巨大分子、炭水化物含有ポリエステルを含む。専売の（proprietary）、局在型生分解性ナノ粒子システムである、ポリグリコアミドアミン（PGAA）ポリマーシステムは、さらなる送達または担体ポリマーである。ポリ（ガラクトアルアミドアミン（galactaramidoamine））は、細胞毒性が低い効率的なカチオン性ポリマー媒体である（Wongrakpanich et al. Pharmaceutical Development and Technology, January 12, 2012）。Hemp et al. Biomacromolecules, 2012 13:2439-45に開示されるナノ粒子送達システムは、本発明において有用なもう一つの送達または担体ポリマーである。

20

【0039】

本発明の別の態様において、送達または担体ポリマーはカチオン性ポリペプチドまたはカチオン性脂質を含む。ポリL-リジン（PLL）、ポリエチレンイミン（PEI）、キトサン、およびそれらの誘導体などのポリマーも本発明に包含される。これらの化合物を用いた核酸送達は、遺伝子とポリカチオン性送達剤との静電相互作用により駆動される複合体形成に依拠する。ポリマー-DNA複合体は、直径が60nm～120nmのオーダーの粒子に凝縮する。直鎖PEIおよびPLL等のポリマーは、様々な細胞において高いトランスフェクション率を有する。

30

【0040】

インビボの核酸送達には、長い循環時間と細胞取り込みを可能にするため、十分に小さなポリプレックスを必要とする大きさの制約がある。さらに、ポリプレックスは塩および血清に誘導される凝集に耐性がなければならない。血清安定性は、一般に、24時間維持可能な約150nmまたはそれ以下より小さい流体力学的半径の粒子サイズと関連している。核酸治療薬および送達ポリマーを含む、本発明のナノ粒子は、血清安定性のための流体力学的半径および材料特性を有する。特に、送達ポリマーは、核酸と組み合わせられた際、その治療的積み荷（cargo）を生理条件下において保護する。送達ポリマーは、溶液中でポリヌクレオチドと組み合わせられた際に、ナノ粒子へと自発的に自己アセンブリする特徴を有するよう設計されている。

40

【0041】

本発明は、血清で安定なナノ粒子を形成する他の送達ポリマーも意図する。本発明は、送達ポリマーの型に限定されず、核酸の特徴、例えば、長さ、組成、電荷、および結合ペプチドの有無などに適合可能でありうる。送達ポリマーはまた、生じるナノ粒子の材料特性、例えば、流体力学的半径、宿主の血流における安定性、宿主への毒性、および宿主細胞内への積み荷（cargo）の放出能力、などに適合可能でありうる。

【0042】

一つの態様において、アンチセンス分子またはその透過ペプチド結合体は、塩の形態で投与される。塩は、酸付加または塩基付加塩を含む、いかなる薬学的に許容される塩であ

50

ってよい。酸との薬学的に許容される塩の例は、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、ヨウ化水素酸、フッ化水素酸、亜リン酸、などの無機酸と形成されるものを含む。また、脂肪族モノおよびジカルボン酸、フェニル置換アルカン酸、ヒドロキシアルカン酸、アルカン二酸、芳香族酸、脂肪族および芳香族スルホン酸などの有機酸、例えば、酢酸、トリフルオロ酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、ピルビン酸、シュウ酸、マレイン酸、マロン酸、コハク酸、フマル酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、ケイ皮酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、サリチル酸などと形成される塩も含まれる。したがって、例示的な塩には、硫酸塩、ピロ硫酸塩、重硫酸塩、亜硫酸塩、亜硫酸水素塩、硝酸塩、リン酸塩、リン酸一水素塩、リン酸二水素塩、メタリン酸塩、ピロリン酸塩、塩化物、臭化物、ヨウ化物、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、プロピオン酸塩、カプリル酸塩、イソ酪酸塩、シュウ酸塩、マロン酸塩、コハク酸スベリン酸塩、セバシン酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、マンデル酸塩、安息香酸塩、クロロ安息香酸塩、メチル安息香酸塩、ジニトロ安息香酸塩、フタル酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、トルエンスルホン酸塩、フェニル酢酸塩、クエン酸塩、乳酸塩、リンゴ酸塩、酒石酸塩、メタンスルホン酸塩、などが含まれる。また、アミノ酸の塩、例えばアルギン酸塩、グルコン酸塩、およびガラクトロン酸塩（例えば、Berge S. M. et al., "Pharmaceutical Salts," Journal of Pharmaceutical Science, 66:1-19 (1997)を参照）も意図される。塩基性アンチセンス分子の酸付加塩は、当業者が熟知している方法や技術に従って、遊離の塩基形態に十分な量の所望の酸を接触させて塩を生成することによって、作製されうる。

10

#### 【0043】

20

薬学的に許容される塩基付加塩は、遊離の酸に無機塩基または有機塩基を付加することによって形成される。薬学的に許容される塩基付加塩は、金属またはアミン、例えばアルカリおよびアルカリ土類金属ならびに有機アミンと形成されうる。無機塩基に由来する塩には、ナトリウム、カリウム、リチウム、アンモニウム、カルシウム、マグネシウム、鉄、亜鉛、銅、マンガン、アルミニウム塩などが含まれるがこれらに限定されない。有機塩基に由来する塩には、一級、二級、および三級アミン、天然の置換アミンを含む置換アミン、環状アミン、ならびに塩基性イオン交換樹脂の塩、例えば、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、ジエチルアミン、トリエチルアミン、トリプロピルアミン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、2-ジメチルアミノエタノール、2-ジエチルアミノエタノール、ジシクロヘキシルアミン、リジン、アルギニン、ヒスチジン、カフェイン、プロカイン、N,N-ジベンジルエチレンジアミン、クロロプロカイン、ヒドラバミン、コリン、ベタイン、エチレンジアミン、エチレンジアニリン、N-メチルグルカミン、グルコサミン、メチルグルカミン、テオプロミン、プリン、ピペラジン、ピペリジン、N-エチルピペリジン、ポリアミン樹脂などの塩が含まれるが、これらに限定されない。

30

#### 【0044】

アンチセンス分子は、薬学的に許容される希釈剤、賦形剤、または担体を含む薬学的組成物の一部として投与される。適切な希釈剤、賦形剤、および担体は当技術分野において周知であり、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gernnar Ed., 1985)に記載されている。注射または注入に適した薬学的投与剤形には、注射可能または注入可能な無菌溶液または分散液（任意でリポソームにカプセル化される）の即時調製用に適合された、活性成分を含む無菌水溶液もしくは分散液、または無菌粉末が含まれる。全ての場合において、最終的な剤形は、製造および保存の条件下において無菌、液状、かつ安定でなければならない。液体の担体または媒体は、例えば、水、食塩水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液状ポリエチレングリコールなど）、植物油、非毒性グリセリルエステル、およびそれらの適切な混合物を含む、溶媒または液体の分散媒でありうる。適切な流動性は、例えば、リポソームを形成することによって、分散液の場合は所要の粒子サイズを維持することによって、または、界面活性剤を使用することによって、維持することができる。微生物の活動は、様々な抗細菌および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなどによって防ぐことができる。多くの場合において、例えば糖

40

50

類、緩衝剤、または塩化ナトリウムなどの等張剤を含むことが好ましい。注射可能組成物の吸収は、該組成物において例えばモノステアリン酸アルミニウムやゼラチンなどの吸収を遅らせる物質を使用することによって、延長することができる。

【0045】

無菌の注射可能溶液は、適切な溶媒中の所要量のアンチセンス分子を、上記に挙げた様々な他の成分と混合した後、必要であれば、フィルター滅菌を行うことによって調製される。無菌注射可能溶液を調製するための無菌粉末の場合、好ましい調製方法は、真空乾燥および凍結乾燥技術であり、これにより予めフィルター滅菌した溶液に存在する活性成分と追加の所望の成分の粉末が生じる。

【0046】

本発明は、黄色ブドウ球菌感染を治療する方法および黄色ブドウ球菌の増殖を阻害する方法も提供する。一つの態様において、黄色ブドウ球菌はメチシリン耐性(MRSA)株である。一つの態様において、黄色ブドウ球菌感染の治療を受ける動物は、感染領域における膿産生、腫脹、膿瘍、カルブネル(carbuncle)、麦粒腫(sty)、および/または蜂巣炎(cellulitis)を含む、一つまたは複数の黄色ブドウ球菌感染の症状を呈する。該動物は、敗血症または肺炎の兆候を呈することもある。

【0047】

一つの態様において、アンチセンス分子は、静脈内、筋肉内、または腹腔内注射によって投与される。別の態様において、アンチセンス分子は、例えば黄色ブドウ球菌に感染していると疑われる組織に、局所的に投与される。別の態様において、アンチセンス分子は経口投与される。経口投与する場合は、胃の酸環境からアンチセンス分子を保護して上部胃腸管でアンチセンス分子を放出する腸溶コーティングを施した薬学的組成物の一部として、アンチセンス分子を製剤化してもよい。別の態様においては、一定期間実質的に継続してアンチセンス分子を放出する徐放性製剤の一部として、アンチセンス分子を製剤化してもよい。

【0048】

本発明に従ってアンチセンス分子で治療されうる動物には、該アンチセンス分子での治療により恩恵を受ける可能性があるいかなる動物も含まれる。そのような動物には、ヒト、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギなどの哺乳動物が含まれる。

【0049】

アンチセンス分子は、黄色ブドウ球菌感染の治療または黄色ブドウ球菌の増殖の阻害に有効な量で投与される。当該量は、投与形態、動物の年齢、動物の体重、哺乳動物の表面積に応じて大きく変化する。アンチセンス分子、その結合体、塩、および/または複合体の量は、1 pmol/kg ~ 1 mmol/kgの範囲で変化する。別の態様において、当該量は、1 nmol/kg ~ 10 mmol/kgの範囲で変化する。局所投与する場合、アンチセンス分子、その結合体、塩、および/または複合体の量は、1 ~ 99重量%の範囲で変化する。別の態様において、アンチセンス分子、その結合体、塩、および/または複合体の量は、1 ~ 10重量%の範囲で変化する。

【実施例】

【0050】

実施例I

ペプチド-PNA結合体の合成：全てのPNA剤は、不均一固相ペプチド合成技術を用いて調製し、HPLCで精製した。

【0051】

裸のポリヌクレオチドの直接投与は、培養中のMRSAの病原性を阻害するために使用されてきたが、ヒトにおける核酸療法の重大な障壁は、細菌の細胞壁である。細胞壁の障壁を乗り越えるために、これらの細菌細胞壁を透過することができる、細菌感染生物に由来するペプチドを、核酸又は修飾核酸に付加し、細菌内への核酸の進入を向上させることができる。

【0052】

10

20

30

40

50

NEO-Bio Group, Cambridge, MAにより製造された高忠実度合成機を用いて、DNA配列を合成した。次に、ポリヌクレオチドを、細菌膜の透過とポリヌクレオチドの進入を可能にするペプチドに結合した。本発明においては、システインがペプチドとDNA間のリンカーとしての機能を果たす、ペプチド-DNAカップリングのための固相合成方法を利用した。

【0053】

特定の態様において、アンチセンス15-mer DNAおよびPNA類似体を、細胞培養における試験用に合成した。文献からの陽性対照 (FmhB) ; および陰性対照 (NC) として使用する非コード配列も合成した。各ポリヌクレオチドを、細胞透過ペプチド (CPP) モチーフ: KFFKFFKFFK (SEQ ID NO: 17) に結合した。

【0054】

PNA-CPPおよびDNA-CPP候補物の両方を合成し、試験した。各結合体の質量分析を行い、合成が成功していることを確認した。PNA-ペプチドおよびDNA-ペプチド候補物の純度を、HPLCを用いて決定した。PNA-ペプチドは、純度約99.9%を達成したが、DNA-ペプチドは>87%を達成した。DNA-ペプチドの方が不純物の度合いが高かったのは、DNAとCPPペプチドを別々に作製し最終精製工程の前にそれらを結合することを必要とする工程が原因である可能性が高い。反対に、PNA剤の合成では約99%の純度をもたらした。PNA-ペプチド治療薬の高い純度および製造の単純さは、戦場 (battlefield arenas) における現行適正製造基準に準拠した (cGMP-compliant) 製造の面で、DNA-ペプチド候補物に比べて優位性を提供する。

【0055】

実施例II

FITCアッセイを使用して、ペプチドの細胞取り込みをモニターした。ペプチドをフルオレセインイソチオシアネート (FITC) に結合し、蛍光顕微鏡法を用いて取り込みをモニターした。図2A~2Bは、MRSA (図2A) およびAcB (図2B) において試験したいくつかのペプチドについてのアッセイ結果を示す (1 $\mu$ MのFITC-ペプチド試薬での処置2時間後の蛍光オーバーレイ、スケールバー = 100 $\mu$ m)。MRSAに関しては、KFFおよびRFFモチーフを有するらせん型カチオン性ペプチドが、細胞への進入に有効であった。また、マガイニン-FITCもMRSAへの進入に有効であった。図2A~2Bに示すいずれの顕微鏡像においても、試験濃度 (1 $\mu$ M) のペプチドに由来する殺菌効果は見られない。

【0056】

実施例III

MRSAインビトロ調査: MRSAに対するPNA-ペプチド分子の配列特異的効果の実証を、MRSA USA 300において行った。MRSA USA 300は、米国、カナダ、および欧州における市中感染症の主要原である。クローンFPR3757は、ATCCより培養物 (ATCC (登録商標) BAA-1556TM) としておよびゲノムDNA (ATCC (登録商標) BAA-1556D-5) として入手可能な、多剤耐性USA 300株である。MRSA USA 300株は十分に特徴付けがなされており、信頼性のある評価 (benchmarking) が可能である。解凍したばかりの冷凍細菌ストックを、1:3000、1:1500、1:600、および1:300にわたる範囲の異なる希釈度でTryptic Soy Broth (TSB, Becton-Dickinson) に接種することにより、MRSA増殖曲線を作成した。吸光度の読み取りを、毎時600nm ( $A_{600}$ ) および550nm ( $A_{550}$ ) にてBiomate 3S分光光度計 (Thermo Scientific) を用いて行い、最適な測定設定を確立するとともに、細菌の増殖動態を特徴付けする。550nmにおける読み取り値の方がわずかに高い感度をもたらす。より低い希釈滴定と、より高い吸光度へのより早い時間値とで、相関が見られる。A550を、バンコマイシン滴定および最小阻害濃度 (MIC) アッセイにおける増殖を評価するための最適な測定として確立する。

【0057】

バンコマイシン滴定を、適切な試験範囲を決定するために確立した。800 $\mu$ g/mlのストック溶液をTSBに十倍希釈して80 $\mu$ g/mlとし、さらに40、20、10、5、および2.5 $\mu$ g/mlになるようTSBにそれぞれ段階希釈した。MRSA USA 300株を初期対数期OD550値が0.111にな

10

20

30

40

50

るまで培養し、80~2.5 µg/mlの範囲のバンコマイシンで処置した。550nmにおける吸光度の測定値を、4時間の期間にわたり1時間毎に得た。

【0058】

最小阻害濃度(MIC)解析は、Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, 7th ed.; Approved Standard M7-A7; CLSI: Wayne, PA, USA, 2006; volume 26, No. 2に記載されるとおりに行った。バンコマイシンおよびメチシリンを対照として使用した。MICは、A<sub>600</sub>で検出される細菌増殖を阻害する薬剤の最小濃度として決定した。

【0059】

時間-殺菌(time-kill)解析を、Haste et al. J. Antibiot. 2010, 63, 219-224に記載されるとおりに行った。様々な濃度の薬剤をファルコンチューブに分注した。5E5 cfu/mlの細菌を4 ml、チューブに添加した。チューブは振とう機中で37 °Cでインキュベートし、0、2、4、および8時間の時点で、細菌増殖についてA<sub>600</sub>により引き続き解析する。

【0060】

ポリヌクレオチド-ペプチド剤のMRSAに対する配列特異的効果：バイオインフォマティクスにより決定されたPNA-ペプチドアンチセンス配列について、幅広い濃度を試験した。FmhBを文献(Xie et al., Molecular Therapy, 2004, 10, 652-659)からの陽性対照として使用し、末端(KFF)<sub>3</sub>Kモチーフを有する非コード配列を、ペプチドの膜破壊による殺菌効果を表す陰性対照(NC)として使用した。誘導期の細菌を処置し、増殖の阻害および後の時点における回復能を判定することにより、配列特異的阻害を実証した。候補薬剤および非コード配列対照は、無菌RNaseフリー、DNaseフリー水で20 µM、5 µM、1 µM、250 µM、および25 µMの範囲に希釈した。MRSA増殖の阻害を、幅広いPNA-ペプチド濃度にわたって観察した。

【0061】

時間経過を、MRSA株USA 300を用いて行った。TSBに1:100で希釈した解凍したばかりのMRSAを、個々のPNA-ペプチド分子を含むウェルに添加する。追加の陽性対照として12.5 µg/mlのバンコマイシン、陰性対照として水のみもアッセイした。試料は、225 RPMで回転(orbital)振とうしながら37 °Cでインキュベートし、2時間おきに8時間にわたって測定した。MRSAの増殖阻害が5 µM濃度で経時的に観察された。

【0062】

対数期増殖においては、PNA-ペプチド結合体は約1 µMもの低濃度で、DNA-ペプチド結合体は約10 µMもの低濃度で阻害が観察された。

【0063】

細胞透過ペプチドをFITCに結合させて培養中の細胞に添加したら、細胞培養実験の期間中、細胞は生存し続けた。

【0064】

実施例 IV

DNA-ペプチド結合体を溶解するため、上昇させたpH=9でTrisバッファーに分散させた。結合体を40 °Cで24時間穏やかに攪拌した。この期間の後、まだ濁りが見られたため、結合体をさらに6時間穏やかに攪拌しながら80 °Cまで加熱した後、透明な溶液を得た。最初の溶液を、DNA-ペプチド結合体同士の自己アセンブリの可能性について見るため、DLSにより試験する。多くの荷電ポリマーで呈されるように、溶液において自己凝集が観察され、300nm~1ミクロンの範囲の広範な多分散凝集体を示した。

【0065】

粒子の大きさは、血液循環時間およびクリアランスを決定する重要な役割を果たす。また、組織透過、クリアランス能、および選択性の予測因子でもある。ポリマー含有粒子は、siRNAおよびDNAで検証されており、ヌクレアーゼによる分解から核酸を保護することができ、血流中でのコロイド安定性を目的に設計することができる。本発明のアンチセンス分子-ペプチド結合体を、血清安定性のホスホニウムブロックコポリマーと組み合わせ、ポリプレックスを形成した。このジブロックコポリマーは、負に荷電したDNAと超分子ア

10

20

30

40

50

センブリを形成する。該粒子は、中性ポリエチレングリコール (PEG) ブラシと、表面上でコア-シェル型の形態を形成する。ポリプレックスの流体力学的半径をZetasizer (Nano ZS) 動的光散乱 (DLS) 計 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) で測定する。サイズ比較として、担体ポリマーの無いDNA-ペプチド結合体を、pH=9のTrisバッファー中、1 mg/mlで測定した。3種類の濃度における、このDNA-ペプチドとジブロックポリ[(エチレングリコール)<sub>9</sub>メチルエチルメタクラレート][スチリルホスホニウム]との結合体は、40nm~300nmの大きさの範囲を呈した。

【0066】

DNA-ペプチド結合体とのナノ粒子形成は、物理的な因子に依存した。DNA領域は負に荷電し、

10

**KFFKFFKFFK (SEQ ID NO: 17)**

の領域は正に荷電しているため、結合体は溶液中で強力な分子内会合を呈する。広範な形成条件を評価した。電荷対電荷比が2~4(ホスホニウム+/DNA リン酸 -)、および[DNA-ペプチド結合体]が 0.5mg/mlおよびそれ未満で、最適な粒子が形成する。濃度が0.5mg/mlを超えた時、大きな凝集体が形成していることを動的光散乱 (DLS) 分析が示した。DLSデータは、形成前濃度が最終的なナノ粒子の大きさの範囲に影響することを示し、0.5mg/mlではおよそ90nm~100nmの群をなす最大のナノ粒子を形成し、0.1mg/mlでは直径40nmもの小ささの粒子を形成することを示している。

【0067】

DNA-ペプチド結合体を溶解するため、上昇させたpH=9でTrisバッファーに分散させた。結合体を40 で24時間穏やかに攪拌した。この期間の後、まだ濁りが見られるため、結合体をさらに6時間穏やかに攪拌しながら80 まで加熱し、その後、透明な溶液が得られる。最初の溶液を、DNA-ペプチド結合体同士の自己アセンブリの可能性について見るため、DLSにより試験した。多くの荷電ポリマーで呈されるように、溶液において自己凝集が観察され、300nm~1 μmの範囲の広範な多分散凝集体を示した。

20

【0068】

実施例V

PNA-ペプチドアンチセンス抗生物質の安全性を評価するため、マウスにおける単回用量忍容性調査を行った。図4に示すように、マウスを各群15匹の4つの群に分けた。各群に、媒体対照 (PBS) または1 mg/kg、3.3 mg/kg、もしくは10 mg/kgの用量のPNA-ペプチドアンチセンス抗生物質を一回静脈内注射した。

30

【0069】

注射後、図4に示すとおりに血清および組織を回収した。試料は、PNA-ペプチドアンチセンス抗生物質投与の15分、30分、1時間、4時間、および12時間後に回収した。これらの試料は、生物学的安全性マーカーおよびPNA-ペプチドアンチセンス抗生物質の生体内分布解析に関して評価することができる。

【0070】

注射後の外面的な毒性の兆候について動物を観察した。全ての動物が処置後も生き残り、外面的な毒性の兆候は何も示さなかった。これらの結果は、PNA-ペプチド抗生物質が、10mg/kgもの高い単回用量で投与した場合に、インピボで安全であることを示す。

40

【0071】

実施例VI

PNA-ペプチドアンチセンス抗生物質の安全性をさらに評価するために、複数回用量安全性研究をマウスにおいて行った。マウスを各群10匹の4つの群に分けた。各群に、媒体対照 (PBS) またはPNA-ペプチドアンチセンス抗生物質のいずれかを、図5に示す投与スケジュールにしたがって複数回静脈内注射した。

【0072】

注射後、体重、食欲、および毛づくろいなどの外面的な毒性の兆候について動物をモニターした。処置群に応じて、動物を3日、4日、または7日後に屠殺し、血液試料を回収して肝臓および腎臓の生物学的マーカーを測定した (図5)。

50

## 【 0 0 7 3 】

どの群も死亡は観察されなかった。全ての動物が、通常の食欲および毛づくろい行動を示した。さらに、どの処置群においても体重の有意な変化は観察されなかった（図6）。肝臓マーカー（ALT、ALP、AST、およびCPK）および腎臓マーカー（BUN）は全ての処置群において正常のようであった。これらの結果は、PNA-ペプチドアンチセンス抗生物質が、10mg/kgもの高い複数回用量で投与した場合に、インビボで安全であることを示す。

## 【 0 0 7 4 】

## 実施例VII

PNA-ペプチドアンチセンス抗生物質のインビボ有効性を評価するために、黄色ブドウ球菌血液感染マウスモデルを構築した。図7は、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）の用量を増加させてマウスに投与した際の生残データを示す。マウスに、媒体対照（4%ブタ胃ムチン）または $4 \times 10^6$ 、 $2 \times 10^7$ 、もしくは $1 \times 10^8$ コロニー形成単位（CFU）のMRSAのいずれかを投与した。図7に示すように、このマウスモデルにおけるLD<sub>50</sub>は、およそ $2 \times 10^7$ CFUであった。

10

## 【 0 0 7 5 】

血液感染マウスモデルを確立した後、PNA-ペプチドアンチセンス抗生物質の有効性を評価した。マウスを各群10匹の3つの群に分けた。各群に、 $2 \times 10^7$  CFU/mlの濃度のMRSAを0.2 mlの容量で静脈内注射した。次に各群を(i)媒体対照（PBS）；(ii)用量10 mg/kgのPNA-ペプチドアンチセンス抗生物質；または(iii)バンコマイシン（2 mg/kg）（陽性対照となる）で処置した。PNA-ペプチドアンチセンス抗生物質処置は、1日2回、4日間行った。

20

## 【 0 0 7 6 】

図8は、処置の24時間後のマウス血液における細菌負荷を示す。図8に示すように、PNA-ペプチドアンチセンス抗生物質による処置は、対照群と比較して、血液中のMRSAレベルを減少させた。これらの結果は、PNA-ペプチドアンチセンス抗生物質がインビボで有効であることを示す。

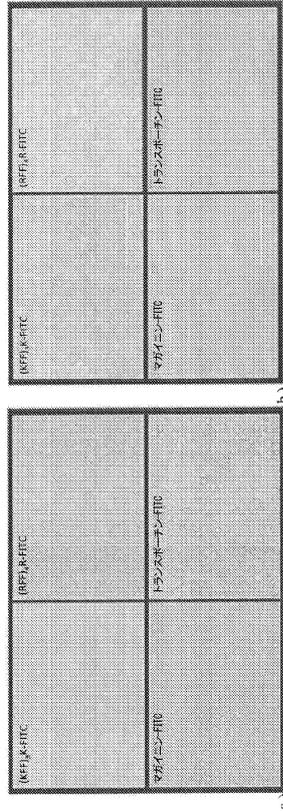
## 【 0 0 7 7 】

本明細書において引用された全ての特許、特許出願、および刊行物は、参照として完全に組み入れられる。

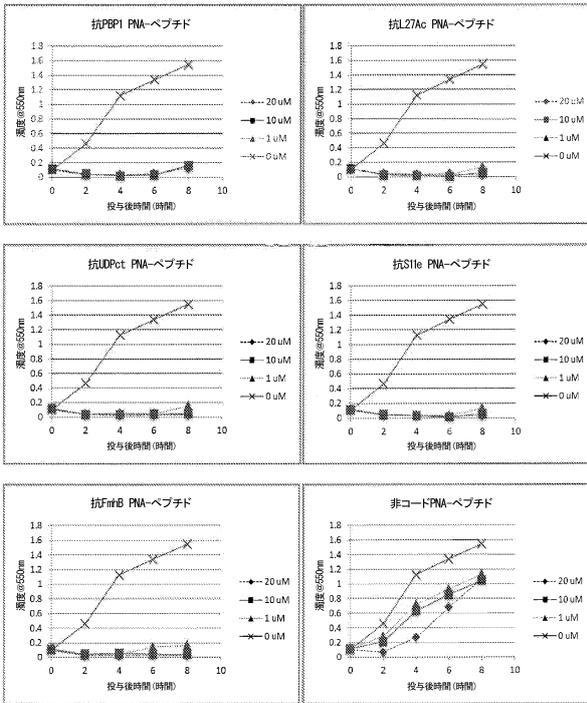
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】

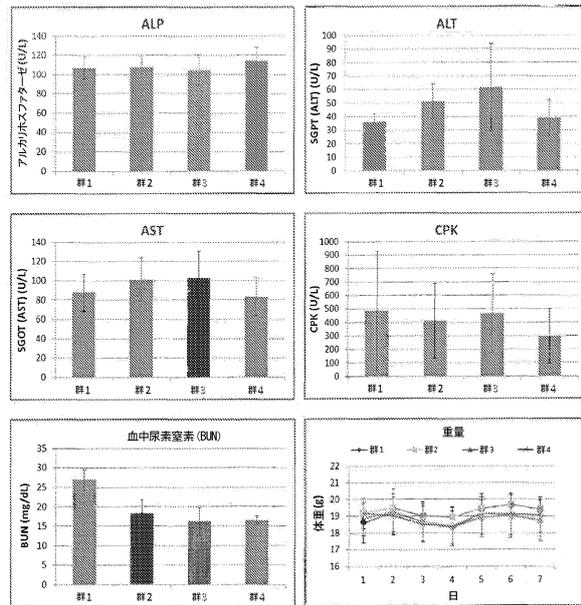
群番号	N	剤	用量レベル (mg/kg)	容量	投与経路	投与スケジュール	最終採血 (血清) 時間	組織採取
1	15	媒体 (PBS)	N/A	0.2 ml	IV	qd x 1	30分	肝臓、腎臓、脾臓、および腸臓を採取し、凍結して-80℃で保存
2	15	抗PBP1 PMA-ペプチド	1	0.2 ml	IV	qd x 1	15分	
3	15	抗PBP1 PMA-ペプチド	3.3	0.2 ml	IV	qd x 1	30分	
4	15	抗PBP1 PMA-ペプチド	10	0.2 ml	IV	qd x 1	4時間	

15分、30分、1時間、4時間、および10時間の時点で、3匹のマウス/群を最終採血する。

【 図 5 】

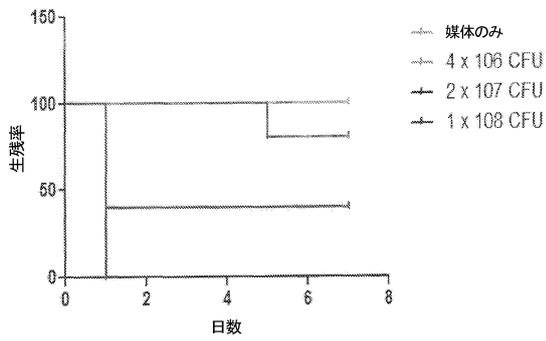
群番号	N	剤	用量レベル (mg/kg)	容量	投与経路	投与スケジュール
1	10	媒体 (PBS)	N/A	0.2 ml	IV	qd x 7
2	10	抗PP1 PM-ベゾチド	10	0.2 ml	IV	qd x 7
3	10	抗PP1 PM-ベゾチド	10	0.2 ml	IV	q2d x 4
4	10	抗PP1 PM-ベゾチド	10	0.2 ml	IV	q3d x 3

【 図 6 】



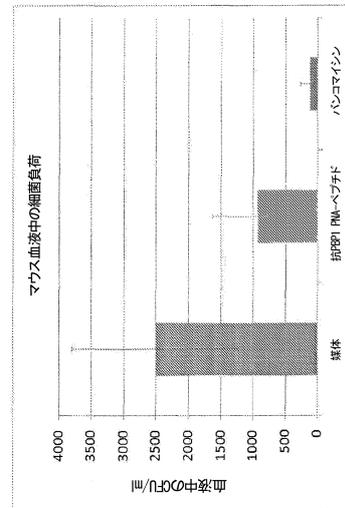
【 図 7 】

血液感染マウスモデルの構築



【 図 8 】

群番号	N	MIRSA 接種 (CFU/mL)	容量 (mL)	剤	用量 (mg/kg)	経路	投与スケジュール
1	10	4 x 10 <sup>7</sup>	0.2	媒体 (PBS)	10	IV	b.i.d X 4
2	10	4 x 10 <sup>6</sup>	0.2	抗PP1 PM-ベゾチド	10	IV	b.i.d X 4
3	10	4 x 10 <sup>6</sup>	0.2	バンコマイシン	2	IV	b.i.d X 4



【配列表】

0006600621000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
 C 1 2 N 15/113 (2010.01) C 1 2 N 15/113 Z N A Z  
 C 0 7 K 14/315 (2006.01) C 0 7 K 14/315

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 マローン ブレット

アメリカ合衆国 バージニア州 ペアリスバーグ リバーバンド ドライブ 567

(72)発明者 ブライソン ジョシュア

アメリカ合衆国 バージニア州 ブラックスバーグ ブルック サークル 1218

審査官 吉森 晃

(56)参考文献 特表2003-518946(JP,A)

特開2004-236602(JP,A)

Molecular Therapy, 2004年, Vol.10, No.4, p.652-659

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2011年, Vol.55, No.7, pp.3261-3271

Appl. Microbiol. Biotechnol., 2010年, Vol.86, pp.397-402

Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria, 2010年, Vol.21, No.2, pp.95-106

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15 / 0 0 - 15 / 9 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / R E G I S T R Y / W P I D S  
( S T N )

U n i P r o t / G e n e S e q

P u b M e d