

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-501347

(P2023-501347A)

(43)公表日 令和5年1月18日(2023.1.18)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)		
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113	1 4 0 Z	4 B 0 6 5	
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z Z N A	4 C 0 8 4	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		4 C 0 8 6	
A 6 1 K	31/7105(2006.01)	A 6 1 K	31/7105		4 C 0 8 7	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00			
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全63頁)	最終頁に続く
(21)出願番号	特願2022-526035(P2022-526035)	(71)出願人	517366013	ノース カロライナ ステート ユニバー シティ NORTH CAROLINA STAT E UNIVERSITY アメリカ合衆国、ノースカロライナ州 2 7 6 0 6、ラレー、セカンド フロア ー、メイン キャンパス ドライブ 1 0 2 1 (74)代理人 100110249 弁理士 下田 昭 (74)代理人 100113022 弁理士 赤尾 謙一郎 (72)発明者 グレン ビー クルース アメリカ合衆国、ノースカロライナ州 最終頁に続く		
(86)(22)出願日	令和2年11月9日(2020.11.9)					
(85)翻訳文提出日	令和4年6月22日(2022.6.22)					
(86)国際出願番号	PCT/US2020/059682					
(87)国際公開番号	WO2021/092562					
(87)国際公開日	令和3年5月14日(2021.5.14)					
(31)優先権主張番号	62/932,664					
(32)優先日	令和1年11月8日(2019.11.8)					
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)					
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く					

(54)【発明の名称】 アレルギー性疾患を治療するための F c ε R I β 及び M S 4 A 6 A を組み合わせたエクソ
ンスキップ

(57)【要約】

高親和性 I g E 受容体 (F c ε R I) により媒介される疾患及び病状を治療するための組成物と方法が提供される。また、M S 4 A 6 A タンパク質をコードする m R N A のスプライシングを調節するためのアンチセンスオリゴマーが提供され、任意に、F c ε R I β タンパク質をコードする m R N A のスプライシングを調節するためのアンチセンスオリゴマーも提供され、それによって F c ε R I の細胞表面発現を減少させる。更に、個体のアナフィラキシー反応を阻害するため、個体のアレルギー状態を治療するため、個体のアレルギー反応の発生を減らすため、アナフィラキシー反応を発症するリスクのある個体を治療するため、及び個体の肥満細胞関連疾患を治療するために、このアンチセンスオリゴマーを、肥満細胞の脱顆粒、サイトカインの放出、移動、及び増殖を阻害するために使用する方法も提供される。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

10～50の連結されたヌクレオシドを含むアンチセンスオリゴマーであって、該アンチセンスオリゴマーは、MS4A6Aタンパク質をコードするpre-mRNA分子の領域に標的化され、該標的化された領域が、MS4A6Aをコードするpre-mRNAのスプライシングに参与する配列を含む、アンチセンスオリゴマー。

【請求項 2】

前記アンチセンスオリゴマーの、前記MS4A6Aをコードするpre-mRNAへのハイブリダイゼーションが、該pre-mRNAのスプライシングを変更する、請求項1に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項 3】

前記アンチセンスオリゴマーの、MS4A6Aをコードするpre-mRNAへのハイブリダイゼーションが、高親和性IgE受容体(FcεRI)の細胞表面発現を低減する、請求項1に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項 4】

前記標的化領域が、イントロン配列、エクソン配列、イントロン／エクソンジャンクションを含む配列、スプライスドナー配列、スライスアクセプター配列、スライスエンハンサー配列、スプライス分岐点配列、又はポリピリミジントラクトからなる群から選択されるポリヌクレオチド配列の少なくとも一部分を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項 5】

前記ポリヌクレオチド配列が、イントロン3配列、エクソン4配列、イントロン3／エクソン4ジャンクションを含む配列、エクソン4スプライスドナー配列、エクソン4スライスアクセプター配列、エクソン4スライスエンハンサー配列、エクソン4スプライス分岐点配列、エクソン4ポリピリミジントラクト、又は前記MS4A6Aタンパク質の第1の膜貫通ドメインをコードするエクソンから成る群から選択される、請求項4に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項 6】

前記MS4A6Aタンパク質が、ヒトMS4A6Aタンパク質、マウスMS4A6Aタンパク質、イヌMS4A6Aタンパク質、ネコMS4A6Aタンパク質、及びウマMS4A6Aタンパク質から成る群から選択される、請求項1～5のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項 7】

前記アンチセンスオリゴマーのMS4A6A pre-mRNAへのハイブリダイゼーションが、エクソン4の少なくとも一部を欠く成熟MS4A6A mRNA分子の産生をもたらす、請求項5に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項 8】

前記アンチセンスオリゴマーのMS4A6A pre-mRNAへのハイブリダイゼーションが、短縮されたMS4A6Aタンパク質をコードするmRNA分子の産生をもたらす、請求項5に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項 9】

前記10～50の連結されたヌクレオシドが、前記オリゴヌクレオチドが標的配列へ特異的にハイブリダイズするように、前記MS4A6Aをコードするpre-mRNA中の標的核酸配列に十分に相補的な標的化核酸配列を含む、から本質的に成る、又はのみから成る、請求項1に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項 10】

前記アンチセンスオリゴマーの、前記MS4A6Aをコードするpre-mRNAへのハイブリダイゼーションが、該pre-mRNAのスプライシングを変更する、請求項9に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項 11】

10

20

30

40

50

前記アンチセンスオリゴマーの、前記MS4A6AをコードするプレmRNAへのハイブリダイゼーションが、高親和性IgE受容体(FcεRI)の細胞表面発現を低減する、請求項9に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項12】

前記標的配列が、該標的配列中の少なくとも6つの連続した核酸塩基に完全に相補的な少なくとも6つの連続した核酸塩基を含む、請求項9に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項13】

前記標的化配列が、該標的配列中の連続した核酸塩基の等しい長さに、その全体の長さにわたって少なくとも80%相補的である、請求項9に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項14】

前記標的化配列が、イントロン配列、エクソン配列、イントロン／エクソンジャンクションを含む配列、スプライスドナー配列、スライスアクセプター配列、スプライスエンハンサー配列、スプライス分岐点配列、又はポリピリミジントラクトから成る群から選択されるポリヌクレオチド配列の少なくとも一部分を含む、請求項9～13のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項15】

前記ポリヌクレオチド配列が、イントロン3配列、エクソン4配列、イントロン3／エクソン4ジャンクションを含む配列、エクソン4スプライスドナー配列、エクソン4スライスアクセプター配列、エクソン4スプライスエンハンサー配列、エクソン4スプライス分岐点配列、又はエクソン4ポリピリミジントラクトから成る群から選択される、請求項14に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項16】

前記MS4A6Aタンパク質が、ヒトMS4A6Aタンパク質、マウスMS4A6Aタンパク質、イヌMS4A6Aタンパク質、ネコMS4A6Aタンパク質、及びウマMS4A6Aタンパク質から成る群から選択される、請求項9～15のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項17】

前記MS4A6Aタンパク質が、ヒトMS4A6Aタンパク質、及びマウスMS4A6Aタンパク質から選択される、請求項16に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項18】

前記標的配列が、配列番号1、3、7、及び9から成る群から選択されるポリヌクレオチド配列の少なくとも一部分を含む、から本質的に成る、又はのみから成る、請求項17に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項19】

前記一部分が、少なくとも10の連続したヌクレオチドである、請求項18に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項20】

前記標的化配列が、前記配列番号1、3、7、及び9から成る群から選択される配列に、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、又は少なくとも98%同一である配列を含む、から本質的に成る、又はのみから成る、請求項18に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項21】

前記標的配列が、配列番号1、3、7、及び9から成る群から選択される配列を含む、から本質的に成る、又はのみから成る、請求項18に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項22】

前記標的配列が、配列番号1、3、7、及び9から成る群から選択される配列の逆方向の相補物中の、少なくとも10の連続した核酸に同一である、配列中の少なくとも10の連続した核酸を含む、から本質的に成る、又はのみから成る、請求項17に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項23】

10

20

30

40

50

前記標的配列が、配列番号 1、3、7、及び 9 から成る群から選択される配列の少なくとも一部分に、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、又は少なくとも 98% 相補的である配列を含む、から本質的に成る、又はのみから成る、請求項 17 に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項 24】

前記標的配列が、配列番号 1、3、7、及び 9 から成る群から選択される配列の少なくとも一部分に相補的な配列に、その全長に渡って、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、又は少なくとも 98% 同一である、請求項 17 に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項 25】

前記標的配列が、配列番号 1、3、7、及び 9 から成る群から選択される配列の少なくとも一部分に相補的である、請求項 17 に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項 26】

前記 MS4A6A 転写物が、配列番号 1、7、又はこれらに少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、又は少なくとも 98% 同一である核酸配列を含む、請求項 1 に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項 27】

前記アンチセンスオリゴマーが、アンチセンス mRNA 分子である、請求項 1～26 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項 28】

前記アンチセンス mRNA 分子が、ヌクレオシド修飾、ヌクレオシド間修飾、糖修飾、糖-ヌクレオシド間リンケージ修飾、及びそれらの組み合わせから成る群から選択される修飾を含む、請求項 27 に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項 29】

前記修飾が、リボヌクレアーゼによる前記アンチセンス RNA 分子の分解への耐性を増加させる、請求項 28 に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項 30】

前記アンチセンスオリゴマーが、配列番号 22 又は 26 を含む、から本質的に成る、又はのみから成る、請求項 1～29 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項 31】

請求項 1～30 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマーをコードする発現ベクター。

【請求項 32】

前記アンチセンスオリゴマーが、モルホリノオリゴマーである、請求項 1～30 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項 33】

請求項 1～30 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー、請求項 31 に記載の発現ベクター、請求項 32 に記載のモルホリノオリゴマー、又はこれらの組み合わせを含む、から本質的に成る、又はのみから成る、医薬組成物。

【請求項 34】

細胞又は組織中の MS4A6A タンパク質をコードする mRNA 分子のスプライシングを調節する方法であって、該細胞又は組織を、請求項 1～30 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー、請求項 31 に記載の発現ベクター、請求項 32 に記載のモルホリノオリゴマー、又はこれらの組み合わせに接触させる段階を含む方法。

【請求項 35】

細胞中の FcεRI タンパク質の細胞表面発現を低減する方法であって、該細胞を、請求項 1～30 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー、請求項 31 に記載の発現ベクター、請求項 32 に記載のモルホリノオリゴマー、又はこれらの組み合わせに接触させる段階を含む方法。

【請求項 36】

肥満細胞においてFcεRI受容体複合体依存性脱顆粒を調節する方法であって、該肥満細胞を、請求項1～29のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー、請求項30に記載の発現ベクター、請求項31に記載のモルホリノオリゴマー、又はこれらの組み合わせに接触させる段階を含む方法。

【請求項37】

FcεRI受容体複合体依存性肥満細胞移動を調節する方法であって、該肥満細胞を、請求項1～30のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー、請求項31に記載の発現ベクター、請求項32に記載のモルホリノオリゴマー、又はこれらの組み合わせに接触させる段階を含む方法。

【請求項38】

サイトカイン放出を調節する方法であって、サイトカインを産生する細胞を、請求項1～30のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー、請求項31に記載の発現ベクター、請求項32に記載のモルホリノオリゴマー、又はこれらの組み合わせに接触させる段階を含む方法。

【請求項39】

前記方法が、個体中で遂行される、請求項33～38のいずれか一項に記載の方法。

【請求項40】

個体においてアナフィラキシー反応を阻害する方法であって、該個体に、請求項1～30のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー、請求項31に記載の発現ベクター、請求項32に記載のモルホリノオリゴマー、又はこれらの組み合わせを投与する段階を含む方法。

【請求項41】

個体においてアレルギー性病態を治療する方法であって、それを必要とする個体に、請求項1～30のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー、請求項31に記載の発現ベクター、請求項32に記載のモルホリノオリゴマー、又はこれらの組み合わせを投与する段階を含む方法。

【請求項42】

前記アレルギー性病態が、喘息、アトピー性皮膚炎、慢性鼻炎、アレルギー性結膜炎、及び慢性副鼻腔炎から成る群から選択される、請求項41に記載の方法。

【請求項43】

個体においてアレルギー反応の発生を低減させる方法であって、アレルギー反応を起こすリスクのある個体に、請求項1～30のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー、請求項31に記載の発現ベクター、請求項32に記載のモルホリノオリゴマー、又はこれらの組み合わせの有効量を投与する段階を含む方法。

【請求項44】

アナフィラキシー反応を起こすリスクがある個体を治療する方法であって、それを必要とする個体に、請求項1～30のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー、請求項31に記載の発現ベクター、請求項32に記載のモルホリノオリゴマー、又はこれらの組み合わせを投与する段階を含む方法。

【請求項45】

個体において肥満細胞関連疾患を治療する方法であって、この個体に、請求項1～30のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー、請求項31に記載の発現ベクター、請求項32に記載のモルホリノオリゴマー、又はこれらの組み合わせを投与する段階を含む方法。

【請求項46】

前記肥満細胞関連疾患が、肥満細胞症又は肥満細胞腫瘍である、請求項45に記載の方法。

【請求項47】

前記肥満細胞症が肥満細胞腫である、請求項46に記載の方法。

【請求項48】

10

20

30

40

50

前記個体が、ヒト、マウス、イヌ、ネコ又はウマである、請求項 39～47 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 49】

更に、FcεRIβタンパク質をコードするプレmRNAの領域を標的とする第2のアンチセンスオリゴマーを、それを必要とする個体に投与する段階を含む、請求項 35～48 のいずれか一項に記載の方法であって、該FcεRIβが標的化された領域が、FcεRIβをコードするプレmRNAのスプライシングに関与する配列を含む方法。

【請求項 50】

前記アンチセンスオリゴマーのFcεRIβをコードするプレmRNAへのハイブリダイゼーションが、FcεRIβをコードするプレmRNAのスプライシングを変化させる、請求項 49 に記載の方法。

10

【請求項 51】

前記アンチセンスオリゴマーの、FcεRIβをコードするプレmRNAへのハイブリダイゼーションが、高親和性IgE受容体(FcεRI)の細胞表面発現を低減する、請求項 49 又は 50 に記載の方法。

【請求項 52】

前記FcεRIβ標的領域が、イントロン配列、エクソン配列、イントロン／エクソンジャンクションを含む配列、スプライスドナー配列、スライスアクセプター配列、スプライスエンハンサー配列、スプライス分岐点配列、又はポリピリミジントラクトからなる群から選択されるポリヌクレオチド配列の少なくとも一部分を含む、請求項 49～51 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 53】

前記ポリヌクレオチド配列が、イントロン2配列、エクソン3配列、イントロン2／エクソン3ジャンクションを含む配列、エクソン3スプライスドナー配列、エクソン3スライスアクセプター配列、エクソン3スプライスエンハンサー配列、エクソン3スプライス分岐点配列、エクソン3ポリピリミジントラクトから成る群から選択される、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 54】

前記FcεRIβタンパク質が、ヒトFcεRIβタンパク質、マウスFcεRIβタンパク質、イヌFcεRIβタンパク質、ネコFcεRIβタンパク質、及びウマFcεRIβタンパク質から成る群から選択される、請求項 49～53 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 55】

前記アンチセンスオリゴマーのFcεRIβプレmRNAへのハイブリダイゼーションが、エクソン3の少なくとも一部を欠く成熟FcεRIβ mRNA分子の産生をもたらす、請求項 49～54 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 56】

前記アンチセンスオリゴマーのFcεRIβプレmRNAへのハイブリダイゼーションが、FcεRIβをコードするmRNA分子の産生をもたらす、請求項 55 に記載の方法。

40

【請求項 57】

前記10～50の連結されたヌクレオシドが、前記オリゴヌクレオチドが標的配列へ特異的にハイブリダイズするように、前記FcεRIβをコードするプレmRNA中の標的核酸配列に十分に相補的な標的化核酸配列を含む、請求項 49～56 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 58】

前記アンチセンスオリゴマーの、前記FcεRIβをコードするプレmRNAへのハイブリダイゼーションが、該FcεRIβをコードするプレmRNAのスプライシングを変更する、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 59】

50

前記アンチセンスオリゴマーの、前記 $Fc\epsilon RI\beta$ をコードするプレmRNAへのハイブリダイゼーションが、高親和性 IgE 受容体 ($Fc\epsilon RI$) の細胞表面発現を低減する、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 60】

前記 $Fc\epsilon RI\beta$ 標的配列が、該 $Fc\epsilon RI\beta$ 標的配列中の少なくとも 6 つの連続した核酸塩基に完全に相補的な少なくとも 6 つの連続した核酸塩基を含む、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 61】

前記 $Fc\epsilon RI\beta$ 標的化配列が、該 $Fc\epsilon RI\beta$ 標的配列中の連続した核酸塩基の等しい長さに、その全体の長さにわたって少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、又は少なくとも 98% 相補的である、請求項 57 に記載の方法。

10

【請求項 62】

前記 $Fc\epsilon RI\beta$ 標的化配列が、イントロン配列、エクソン配列、イントロン／エクソンジャンクションを含む配列、スプライスドナー配列、スライスアクセプター配列、スプライスエンハンサー配列、スプライス分岐点配列、又はポリピリミジントラクトから成る群から選択されるポリヌクレオチド配列の少なくとも一部分を含む、請求項 57～61 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 63】

前記ポリヌクレオチド配列が、イントロン 2 配列、エクソン 3 配列、イントロン 2／エクソン 3 ジャンクションを含む配列、エクソン 3 スプライスドナー配列、エクソン 3 スライスアクセプター配列、エクソン 3 スプライスエンハンサー配列、エクソン 3 スプライス分岐点配列、又はエクソン 3 ポリピリミジントラクトから成る群から選択される、請求項 62 に記載の方法。

20

【請求項 64】

前記 $Fc\epsilon RI\beta$ をコードするプレmRNAが、MS4A2 遺伝子から転写される、請求項 57～63 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 65】

前記 $Fc\epsilon RI\beta$ タンパク質が、ヒト $Fc\epsilon RI\beta$ タンパク質、マウス $Fc\epsilon RI\beta$ タンパク質、イヌ $Fc\epsilon RI\beta$ タンパク質、ネコ $Fc\epsilon RI\beta$ タンパク質、及びウマ $Fc\epsilon RI\beta$ タンパク質から成る群から選択される、請求項 57～64 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 66】

前記 $Fc\epsilon RI\beta$ タンパク質が、ヒト $Fc\epsilon RI\beta$ タンパク質及びマウス $Fc\epsilon RI\beta$ タンパク質から選択される、請求項 65 に記載の方法。

【請求項 67】

前記 $Fc\epsilon RI\beta$ 標的配列が、配列番号 4、6、10、及び 12 から成る群から選択されるポリヌクレオチド配列の少なくとも一部分を含む、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 68】

前記一部分が、少なくとも 10 の連続したヌクレオチドである、請求項 67 に記載の方法。

40

【請求項 69】

前記 $Fc\epsilon RI\beta$ 標的化配列が、前記配列番号 4、6、10、及び 12 から成る群から選択される配列に、少なくとも 90% 同一である配列を含む、から本質的に成る、又はのみから成る、請求項 67 に記載の方法。

【請求項 70】

前記 $Fc\epsilon RI\beta$ 標的配列が、配列番号 4、6、10、及び 12 から成る群から選択される配列を含む、から本質的に成る、又はのみから成る、請求項 67 に記載の方法。

【請求項 71】

前記 $Fc\epsilon RI\beta$ 標的配列が、配列番号 4、6、10、及び 12 のいずれかの逆方向の相

50

補物である配列中の、少なくとも 10 の連続した核酸に同一である、配列中の少なくとも 10 の連続した核酸を含む、から本質的に成る、又はのみから成る、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 72】

前記 F c ε R I β 標的配列が、配列番号 4、6、10、及び 12 から成る群から選択される配列の少なくとも一部分に、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 %、又は少なくとも 98 % 相補的である配列を含む、から本質的に成る、又はのみから成る、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 73】

前記 F c ε R I β 標的配列が、配列番号 4、6、10、及び 12 から成る群から選択される配列に相補的な配列に、その全長に渡って、少なくとも 80 % 同一である、請求項 66 に記載の方法。

10

【請求項 74】

前記 F c ε R I β 標的配列が、配列番号 4、6、10、及び 12 から成る群から選択される配列に相補的である、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 75】

前記 F c ε R I β をコードするプレ m R N A の転写物が、

配列番号 6 のヌクレオチド 1-158、1029-1158、1673-1807、4129-4185、4737-4895、5301-5399、及び 6895-9804、又は、これらに少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 %、又は少なくとも 98 % 同一のヌクレオチド配列を含む、又は

20

配列番号 12 のヌクレオチド 1-160、938-1037、1543-1677、4047-4103、4711-4866、5206-5304、及び 6149-8200、又は、これらに少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 %、又は少なくとも 98 % 同一のヌクレオチド配列を含む、

請求項 49 に記載の方法。

【請求項 76】

前記アンチセンスオリゴマーが、アンチセンス m R N A 分子である、請求項 49 ~ 75 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 77】

前記アンチセンス m R N A 分子が、ヌクレオシド修飾、ヌクレオシド間修飾、糖修飾、糖-ヌクレオシド間リンケージ修飾、及びそれらの組み合わせから成る群から選択される修飾を含む、請求項 76 に記載の方法。

30

【請求項 78】

前記修飾が、リボヌクレアーゼによる前記アンチセンス R N A 分子の分解への耐性を増加させる、請求項 77 に記載の方法。

【請求項 79】

前記アンチセンスオリゴマーが、配列番号 22 又は 26 を含む、から本質的に成る、若しくはのみから成る、又は

少なくとも 2 つのアンチセンスオリゴマーが採用され、そのうちの少なくとも 1 つが、配列番号 22 を含む、から本質的に成る、若しくはのみから成り、かつそのうちの少なくとも 1 つが、配列番号 26 を含む、から本質的に成る、若しくはのみから成る、

40

請求項 34 ~ 78 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 80】

請求項 1 ~ 30 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー、請求項 31 に記載の発現ベクター、請求項 32 に記載のモルホリノオリゴマー、又はこれらの組み合わせを含む、から本質的に成る、又はのみから成り、更に、以下を含む医薬組成物。

(i) F c ε R I β をコードするプレ m R N A のスプライシングに関与する配列を含む、から本質的に成る、又はのみから成る、領域を標的にする第 2 のアンチセンスオリゴマー；及び／又は

50

(i i) 該第2のアンチセンスオリゴマーをコードする発現ベクター；及び／又は
(i i i) $Fc\epsilon RI\beta$ をコードするプレmRNAのスプライシングに關与する配列を含む、から本質的に成る、又はのみから成る、領域を標的にするモルホリノオリゴマー

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【0001】

本出願は、2019年11月8日に提出された米国仮特許出願第62/932,664号の優先権を主張し、本明細書にはその全体が参照により組み込まれる。

本発明は、米国国立衛生研究所によって付与された助成金番号ES025128の下での米国政府の支援によってなされた。そのため米国政府は本発明に一定の権利を有する。

10

【技術分野】

【0002】

本発明は、 $Fc\epsilon RI\beta$ タンパク質の細胞表面発現を調節し、それによって、IgE媒介性免疫応答を調節するための、アンチセンスオリゴヌクレオチドの使用に關する。より詳細には、本発明は、いくつかの実施態様において、 $Fc\epsilon RI\beta$ プレ-mRNA及びMS4A6Aプレ-mRNAの両方におけるエクソンスキップの誘導によって、 $Fc\epsilon RI\beta$ タンパク質の細胞表面発現を調節するための組成物及び方法に關する。

【背景技術】

【0003】

米国において3000万人以上が喘息に罹患し、有病率は増加している。大部分の喘息治療法は、グルココルチコステロイドにより炎症を静め、 β -アゴニストにより気道狭窄を軽減することに依存する。炎症の源を標的化する、より指向性のアプローチが必要である。肥満細胞は、炎症を駆動しIgE指向性抗原に応答して気管支収縮を直接誘導するメディエーターの放出を介して、アレルギー喘息において重要な役割を果たす。肥満細胞は、喘息において、肺中の重要な構造（粘膜下腺、気道上皮、及び気道平滑筋（ASM）束等）に侵入する。喘息におけるASMの中への肥満細胞浸潤は、気道過敏症の発症におそらく重大であるが、その理由は、この重要な特色が、好酸球増加性気管支炎の患者（これらの患者は気道過敏症を呈しないこと以外は喘息に表現型で類似する）に比較して、喘息患者において明らかな唯一の免疫病理学的差異の1つであるからである。喘息のこの特色は、気道過敏症の駆動力として肥満細胞を強く暗示する。しかしながら、新たな喘息治療法は、個別の多面的なメディエーターの効果に対抗するか免疫寛容を誘導することを試みるものであるが、それらは、効果がないか又は重篤な有害効果を有するかのいずれかであり得る。喘息を治療する現在利用可能な薬物のどれも、肥満細胞機能を特異的に標的化しない。

20

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明は、むしろ過感作を生ずる β -アゴニスト、グルココルチコイド、又はアレルギーの投与ではなく、異なるアプローチ（すなわちIgE指向性抗原への細胞応答の改変）に依存する。このアプローチは、ヒト11q12~q13での1又はそれ以上の遺伝子がアレルギー及び喘息感受性に強くリンクされるという知見、ならびにMS4A遺伝子ファミリーが11q12~q13の付近にクラスター化されるという知識に基づく。遺伝子MS4A1（タンパク質CD20をコードする）及びMS4A2（ $Fc\epsilon RI\beta$ タンパク質をコードする）は、それぞれ、B細胞及び肥満細胞の活性化及び分裂増殖に付随することも公知である。更に及び本明細書において開示されるように、ヒトMS4A6A遺伝子（本明細書において及び文献中でヒトMS4A6遺伝子とも称される）も、ヒト染色体11のこの領域内に所在する。したがって、これらの遺伝子は、これらの遺伝領域とアレルギーとの連鎖についての候補と判断される。

40

【課題を解決するための手段】

【0005】

50

それゆえ、本発明は、いくつかの実施態様において、10～50の連結されたヌクレオシドを含むアンチセンスオリゴマーであって、MS4A6Aタンパク質をコードするプレmRNA分子の領域又はFcεRIβタンパク質をコードするプレmRNA分子の領域へ標的化される、アンチセンスオリゴマーを提供する。標的化領域は、MS4A6AをコードするプレmRNA及び／又はFcεRIβをコードするプレmRNAへのアンチセンスオリゴマーのハイブリダイゼーションが、MS4A6AをコードするプレmRNA及び／又はFcεRIβをコードするプレmRNAのスプライシングを変更するように、MS4A6AをコードするプレmRNA及び／又はFcεRIβをコードするプレmRNAのスプライシングに参与する配列を含み得る。MS4A6AをコードするプレmRNA及び／又はFcεRIβをコードするプレmRNAへのアンチセンスオリゴマーのハイブリダイゼーションは、いくつかの実施態様において、高親和性IgE受容体(FcεRI)の細胞表面発現を低減し得る。

10

【0006】

いくつかの実施態様において、標的化領域は、イントロン配列、エクソン配列、イントロン／エクソンジャンクションを含む配列、スプライスドナー配列、スライスアクセプター配列、スプライスエンハンサー配列、スプライス分岐点配列、ポリピリミジントラクト、及び／又は第1の膜貫通ドメインをコードするエクソンから成る群から選択されるポリヌクレオチド配列の少なくとも一部分を含む。いくつかの実施態様において、MS4A6AをコードするプレmRNAの標的化領域は、イントロン3配列、エクソン4配列、イントロン3／エクソン4ジャンクションを含む配列、エクソン4スプライスドナー配列、エクソン4スライスアクセプター配列、エクソン4スプライスエンハンサー配列、エクソン4スプライス分岐点配列、又はエクソン4ポリピリミジントラクトから選択されるポリヌクレオチド配列を含み得る。いくつかの実施態様において、プレmRNAの標的化領域は、標的タンパク質の第1の膜貫通ドメインをコードするポリヌクレオチド配列を含む。

20

【0007】

いくつかの実施態様において、1又はそれ以上のアンチセンスオリゴマーは、MS4A6A遺伝子から転写されたMS4A6AをコードするプレmRNA(「MS4A6AプレmRNA」)の領域へ標的化され、いくつかの実施態様において、1又はそれ以上のアンチセンスオリゴマーは、MS4A2遺伝子から転写されたFcεRIβをコードするプレmRNA(「MS4A2プレmRNA」)の領域へ標的化される。転写産物によってコードされるMS4A6Aタンパク質及びFcεRIβタンパク質は、任意の哺乳動物からのものであり得、いくつかの実施態様においてヒト、いくつかの実施態様においてマウス、いくつかの実施態様においてイヌ、いくつかの実施態様においてネコ、いくつかの実施態様においてウマが挙げられる(例えば、コードされるMS4A6A及び／又はFcεRIβタンパク質は、ヒトMS4A6A及び／又はFcεRIβタンパク質、マウスMS4A6A及び／又はFcεRIβタンパク質、イヌMS4A6A及び／又はFcεRIβタンパク質、ネコMS4A6A及び／又はFcεRIβタンパク質、又はウマMS4A6A及び／又はFcεRIβタンパク質、あるいは任意の他の哺乳動物からのMS4A6A及び／又はFcεRIβタンパク質であり得る)。いくつかの実施態様において、MS4A6AプレmRNA及び／又はFcεRIβプレmRNAは、それぞれ、ヒトMS4A6Aタンパク質及び／又はFcεRIβタンパク質をコードする。いくつかの実施態様において、ヒトMS4A6AプレmRNAは、配列番号3又はそのサブ配列を含む。いくつかの実施態様において、マウスMS4A6AプレmRNAは、配列番号9又はそのサブ配列を含む。いくつかの実施態様において、ヒトMS4A6Aタンパク質は、配列番号2又はそのサブ配列を含む。いくつかの実施態様において、マウスMS4A6Aタンパク質は、配列番号8又はそのサブ配列を含む。いくつかの実施態様において、ヒトMS4A2プレmRNAは、配列番号6又はそのサブ配列を含む。いくつかの実施態様において、マウスMS4A2プレmRNAは、配列番号12又はそのサブ配列を含む。いくつかの実施態様において、ヒトMS4A2タンパク質は、配列番号5又はそのサブ配列を含む。いくつかの実施態様において、マウスMS4A6Aタンパク質は、配列番号11又はそのサブ配列を含む。

30

40

50

いくつかの実施態様において、マウスMS4A6ヌクレオチド配列は、GENBANK（登録商標）バイオシーケンスデータベースのアクセッション番号NM_027209.3、NM_028595.4、及びNM_026835.2のうちの1つに対応し、それらは、それぞれ、GENBANK（登録商標）バイオシーケンスデータベースのアクセッション番号NP_081485.2、NP_082871.2、及びNP_081111.1として開示されるタンパク質をコードする。

【0008】

MS4A6AプレmRNA及び／又はMS4A2プレmRNAへの本明細書において示されるアンチセンスオリゴマーのハイブリダイゼーションは、いくつかの実施態様において、それぞれ、成熟MS4A6A mRNA及び／又は成熟MS4A2 mRNAのエクソン4（MS4A6A）又はエクソン3（MS4A2）の一部又はすべてを欠く、成熟MS4A6A mRNA分子又は成熟MS4A2 mRNA分子の産生をもたらす。いくつかの実施態様において、MS4A2プレmRNAへの本明細書において示されるアンチセンスオリゴマーのハイブリダイゼーションは、短縮されたFcεRIβタンパク質をコードするmRNA分子の産生をもたらす。短縮されたFcεRIβタンパク質は、 ϵ -FcεRIβであり得る。いくつかの実施態様において、MS4A6AプレmRNAへの及び／又はMS4A2プレmRNAへの本明細書において示されるアンチセンスオリゴマーのハイブリダイゼーションは、高親和性IgE受容体（FcεRI）を発現する細胞の膜へのFcεRIβタンパク質の局在化の低減をもたらす。

いくつかの実施態様において、本発明は、10～50の連結されたヌクレオチドを含むアンチセンスオリゴマーであって、オリゴマーが標的配列へ特異的にハイブリダイズするように、MS4A6AをコードするプレmRNA及び／又はMS4A2をコードするプレmRNA中の標的核酸配列に十分に相補的な標的化核酸配列を含む、10～50の連結されたヌクレオチドを提供する。MS4A6AをコードするプレmRNA及び／又はMS4A6AをコードするプレmRNAへのアンチセンスオリゴマーのハイブリダイゼーションは、プレmRNAのスプライシングを変更する。MS4A6AをコードするプレmRNA及び／又はMS4A6AをコードするプレmRNAへのアンチセンスオリゴマーのハイブリダイゼーションは、いくつかの実施態様において、高親和性IgE受容体（FcεRI）の細胞表面発現を低減する。

【0009】

いくつかの実施態様において、アンチセンスオリゴマー中の標的化配列は、標的配列中の少なくとも6つの連続した核酸塩基に完全に相補的な少なくとも6つの連続した核酸塩基を含み、標的配列は、配列番号3、6、9、及び12のうちの任意の1つのサブ配列である。アンチセンスオリゴマー中の標的化配列は、標的配列中の連続した核酸塩基の等しい長さ、その全体の長さにわたって少なくとも80%相補的であり得る。標的化配列は、イントロン配列、エクソン配列、イントロン／エクソンジャンクションを含む配列、スプライスドナー配列、スライサクセプター配列、スプライスエンハンサー配列、スプライス分岐点配列、ポリピリミジントラクト、及び／又は第1の膜貫通領域をコードするエクソンから選択されるポリヌクレオチド配列の少なくとも一部分を含み得る。いくつかの実施態様において、ポリヌクレオチド配列は、イントロン2配列、エクソン3配列、イントロン2／エクソン3ジャンクションを含む配列、エクソン3スプライスドナー配列、エクソン3スライサクセプター配列、エクソン3スプライスエンハンサー配列、エクソン3スプライス分岐点配列、エクソン3ポリピリミジントラクト、MS4A2の第1の膜貫通ドメインをコードするエクソン、又はそれらの組み合わせから選択されるMS4A2配列である。いくつかの実施態様において、ポリヌクレオチド配列は、イントロン3配列、エクソン4配列、イントロン3／エクソン4ジャンクションを含む配列、エクソン4スプライスドナー配列、エクソン4スライサクセプター配列、エクソン4スプライスエンハンサー配列、エクソン4スプライス分岐点配列、エクソン4ポリピリミジントラクト、MS4A6Aの第1の膜貫通ドメインをコードするエクソン、又はそれらの組み合わせから選択されるMS4A6A配列である。

【0010】

いくつかの実施態様において、ターゲット核酸配列は、MS4A6A遺伝子から転写されたMS4A6AをコードするプレmRNA中に存在し得る。コードされるMS4A6Aタンパク質は、ヒト、マウス、イヌ、ネコ、又はウマを包含する任意の哺乳動物からのものであり得る。いくつかの実施態様において、MS4A6AプレmRNAは、ヒトMS4A6Aタンパク質をコードする。いくつかの実施態様において、標的核酸配列は、MS4A2遺伝子から転写されたMS4A6AをコードするプレmRNA中に存在し得る。コードされるMS4A6A／FcεRIβタンパク質は、ヒト、マウス、イヌ、ネコ、又はウマを包含する任意の哺乳動物からのものであり得る。いくつかの実施態様において、MS4A2プレmRNAは、ヒトFcεRIβタンパク質をコードする。

10

本発明のアンチセンスオリゴマーは、いくつかの実施態様において、10～50の連結されたヌクレオシドを含むか、当該ヌクレオシドから本質的になるか、又は当該ヌクレオシドのみから成り、10～50の連結されたヌクレオシドは、プレmRNA分子中の標的核酸配列に少なくとも部分的に相補的な核酸配列を含むか、当該核酸配列から本質的になるか、又は当該核酸配列のみから成り、当該プレmRNA分子は、いくつかの実施態様において配列番号2、いくつかの実施態様において配列番号5、いくつかの実施態様において配列番号8、及びいくつかの実施態様において配列番号11を含むタンパク質をコードする。タンパク質は、配列番号1及び7のいずれかを含むMS4A6A転写物、又は配列番号4及び10のいずれかを含むMS4A2転写物によってコードされ得る。いくつかの実施態様において、プレmRNAへのアンチセンスオリゴマーのハイブリダイゼーションは、プレmRNAのスプライシングを変更し得る。プレmRNAへのアンチセンスオリゴマーのハイブリダイゼーションは、高親和性IgE受容体(FcεRI)の細胞表面発現を低減し得る。いくつかの実施態様において、本発明のアンチセンスオリゴマーは、MS4A6A遺伝子産物を標的化し、いくつかの実施態様において、アンチセンスオリゴマーは、配列番号22を含むか、配列番号22から本質的になるか、又は配列番号22から成る。いくつかの実施態様において、本発明のアンチセンスオリゴマーは、MS4A2遺伝子産物を標的化し、いくつかの実施態様において、アンチセンスオリゴマーは、配列番号26を含むか、配列番号26から本質的になるか、又は配列番号26から成る。

20

【0011】

いくつかの実施態様において、MS4A6A標的配列は、配列番号1、3、7、及び9から成る群から選択されるポリヌクレオチド配列の少なくとも一部分、又は配列番号4、6、10、及び12から成る群から選択されるポリヌクレオチド配列の一部分を含むMS4A2配列を含み得る。一部分は、少なくとも10の連続したヌクレオチドであり得る。標的配列は、配列番号1、3、4、6、7、9、10、及び12から成る群から選択されるポリヌクレオチド配列の少なくとも一部分から成る群から選択される配列に少なくとも90%同一の配列を含み得る。

30

【0012】

いくつかの実施態様において、MS4A6A標的化配列又はMS4A2標的化配列は、配列番号1、3、4、6、7、9、10、及び12から選択される配列中の少なくとも10の連続した核酸塩基に配列で完全に相補的な少なくとも10の連続した核酸塩基を含み得る。標的化配列は、配列番号1、3、4、6、7、9、10、及び12から選択される配列の少なくとも一部分に相補的なヌクレオチド配列に少なくとも80%同一の配列を含み得る。例示的で非限定的なMS4A2標的配列及び標的化配列は、米国特許出願公開第2019／0062756号（これは、参照することによってその全体が援用され、配列表を含む）中で開示される。

40

【0013】

これらのアンチセンスオリゴマーは、いくつかの実施態様において、アンチセンスRNA分子であり得、当該アンチセンスRNA分子は、いくつかの実施態様において、ヌクレオシド修飾、ヌクレオシド間修飾、糖修飾、糖-ヌクレオシド間リンケージ修飾、及びそれらの組み合わせから選択される修飾を更に含む。かかる修飾は、リボヌクレアーゼによ

50

るアンチセンスRNA分子の分解への耐性を増加させ得る。モルホリノオリゴマーは、例示的で非限定的な修飾アンチセンスオリゴマーである。

いくつかの実施態様において、本発明は、本明細書において示されるアンチセンスオリゴマーを発現する発現ベクターも提供するが、いくつかの実施態様において、本発明は、本明細書において示されるアンチセンスオリゴマーを含むか、当該アンチセンスオリゴマーから本質的になるか、又は当該アンチセンスオリゴマーから成る医薬組成物に関する。

【0014】

いくつかの実施態様において、本発明は、細胞を、本明細書において示される1又はそれ以上のアンチセンスオリゴマー、発現ベクター、及び／又は組成物と接触させ、それによってMS4A6A mRNA及び／又はMS4A2 mRNAのスプライシングを調節することによって、細胞中のMS4A6A mRNA及び／又はMS4A2 mRNA（例えばプレmRNA）のスプライシングを調節する方法に関する。細胞によって産生される全長MS4A6Aをコードする及び／又はMS4A2をコードするmRNAの量は、いくつかの実施態様において少なくとも50%、いくつかの実施態様において少なくとも60%、いくつかの実施態様において少なくとも70%、いくつかの実施態様において少なくとも80%、いくつかの実施態様において少なくとも90%、いくつかの実施態様において少なくとも95%、いくつかの実施態様において少なくとも97%、及びいくつかの実施態様において少なくとも99%低減され得るか、又はいくつかの実施態様において完全に消失され得る。

【0015】

いくつかの実施態様において、本発明は、細胞中のFcεRIの細胞表面発現を低減する方法に関する。いくつかの実施態様において、本発明の方法は、細胞を、本明細書において示される少なくとも1つのアンチセンスオリゴマー、発現ベクター、又は組成物と接触させ、それによって細胞の表面上のFcεRIの発現を低減することを含む。細胞表面上で発現されるFcεRIの量は、いくつかの実施態様において少なくとも50%、いくつかの実施態様において少なくとも60%、いくつかの実施態様において少なくとも70%、いくつかの実施態様において、少なくとも80%、いくつかの実施態様において少なくとも90%、いくつかの実施態様において少なくとも95%、いくつかの実施態様において少なくとも97%、いくつかの実施態様において少なくとも99%低減され得るか、又はいくつかの実施態様において完全に消失され得る。いくつかの実施態様において、少なくとも1つのアンチセンスオリゴマーは、MS4A6A mRNAのスプライシングを調節する。いくつかの実施態様において、少なくとも1つのアンチセンスオリゴマーは、MS4A2 mRNAのスプライシングを調節する。いくつかの実施態様において、本発明の方法は、細胞を、本明細書において示される少なくとも2つのアンチセンスオリゴマー、発現ベクター、及び／又は組成物と接触させることを含み、少なくとも2つアンチセンスオリゴマー、発現ベクター、及び／又は組成物は、MS4A6A mRNAのスプライシングを調節する少なくとも1つの第1のアンチセンスオリゴマー及びMS4A2/FcεRI β mRNAのスプライシングを調節する少なくとも1つの第2のアンチセンスオリゴマーを含む。いくつかの実施態様において、少なくとも1つの第1のアンチセンスオリゴマーは、配列番号22を含むか、配列番号22から本質的になるか、又は配列番号22から成る。いくつかの実施態様において、少なくとも1つの第2のアンチセンスオリゴマーは、MS4A2遺伝子産物を標的化し、いくつかの実施態様において、アンチセンスオリゴマーは、配列番号26を含むか、配列番号26から本質的になるか、又は配列番号26から成る。

【0016】

いくつかの実施態様において、本発明は、肥満細胞においてFcεRI受容体複合体依存性脱顆粒を調節する方法に関する。いくつかの実施態様において、本発明の方法は、肥満細胞を、本明細書において示される少なくとも1つのアンチセンスオリゴマー、発現ベクター、及び／又は組成物と接触させ、それによって肥満細胞においてFcεRI受容体複合体依存性脱顆粒を調節することを含む。FcεRI受容体複合体依存性脱顆粒は、い

くつかの実施態様において少なくとも50%、いくつかの実施態様において少なくとも60%、いくつかの実施態様において少なくとも70%、いくつかの実施態様において少なくとも80%、いくつかの実施態様において少なくとも90%、いくつかの実施態様において少なくとも95%、いくつかの実施態様において少なくとも97%、いくつかの実施態様において少なくとも99%低減され得るか、又はいくつかの実施態様において完全に消失され得る。いくつかの実施態様において、本発明の方法は、肥満細胞を、本明細書において示される少なくとも2つのアンチセンスオリゴマー、発現ベクター、及び／又は組成物と接触させることを含み、少なくとも2つアンチセンスオリゴマー、発現ベクター、及び／又は組成物は、MS4A6A mRNAのスプライシングを調節する少なくとも1つの第1のアンチセンスオリゴマー及びMS4A2/FcεRI β mRNAのスプライシングを調節する少なくとも1つの第2のアンチセンスオリゴマーを含む。いくつかの実施態様において、少なくとも1つの第1のアンチセンスオリゴマーは、配列番号22を含むか、配列番号22から本質的になるか、又は配列番号22から成る。いくつかの実施態様において、少なくとも1つの第2のアンチセンスオリゴマーは、MS4A2遺伝子産物を標的化し、いくつかの実施態様において、アンチセンスオリゴマーは、配列番号26を含むか、配列番号26から本質的になるか、又は配列番号26から成る。

10

【0017】

いくつかの実施態様において、本発明は、FcεRI受容体複合体依存性肥満細胞移動を調節する方法に関する。いくつかの実施態様において、本発明の方法は、肥満細胞を、本明細書において示される少なくとも1つのアンチセンスオリゴマー、発現ベクター、及び／又は組成物と接触させ、それによって肥満細胞においてFcεRI受容体複合体依存性脱顆粒を調節することを含む。FcεRI受容体複合体依存性脱顆粒は、いくつかの実施態様において少なくとも50%、いくつかの実施態様において少なくとも60%、いくつかの実施態様において少なくとも70%、いくつかの実施態様において少なくとも80%、いくつかの実施態様において少なくとも90%、いくつかの実施態様において少なくとも95%、いくつかの実施態様において少なくとも97%、いくつかの実施態様において少なくとも99%低減され得るか、又はいくつかの実施態様において完全に消失され得る。いくつかの実施態様において、本発明の方法は、肥満細胞を、本明細書において示される少なくとも2つのアンチセンスオリゴマー、発現ベクター、及び／又は組成物と接触させることを含み、少なくとも2つアンチセンスオリゴマー、発現ベクター、及び／又は組成物は、MS4A6A mRNAのスプライシングを調節する少なくとも1つの第1のアンチセンスオリゴマー及びMS4A2/FcεRI β mRNAのスプライシングを調節する少なくとも1つの第2のアンチセンスオリゴマーを含む。いくつかの実施態様において、少なくとも1つの第1のアンチセンスオリゴマーは、配列番号22を含むか、配列番号22から本質的になるか、又は配列番号22から成る。いくつかの実施態様において、少なくとも1つの第2のアンチセンスオリゴマーは、MS4A2遺伝子産物を標的化し、いくつかの実施態様において、アンチセンスオリゴマーは、配列番号26を含むか、配列番号26から本質的になるか、又は配列番号26から成る。

20

30

【0018】

いくつかの実施態様において、本発明は、サイトカイン放出を調節する方法に関する。いくつかの実施態様において、本発明の方法は、サイトカインを産生する細胞を、本明細書において示される少なくとも1つのアンチセンスオリゴマー、発現ベクター、及び／又は組成物と接触させ、それによってサイトカイン放出を調節することを含む。サイトカインは、いくつかの実施態様において血管作用性アミン、いくつかの実施態様においてプロテオグリカン、いくつかの実施態様においてプロテアーゼ、いくつかの実施態様において増殖因子、いくつかの実施態様においてケモカイン、いくつかの実施態様において炎症誘発性脂質メディエーター、いくつかの実施態様においてヒスタミン、いくつかの実施態様においてセロトニン、いくつかの実施態様においてヘパリン、いくつかの実施態様においてトリプターゼ、いくつかの実施態様においてキマーゼ、いくつかの実施態様においてTNFα、いくつかの実施態様においてIL-1、いくつかの実施態様においてIL-6、い

40

50

いくつかの実施態様においてIL-8、いくつかの実施態様においてIL-10、いくつかの実施態様においてTNF α 、いくつかの実施態様においてVEGF、いくつかの実施態様においてTGF β 、いくつかの実施態様においてCCL2-4、いくつかの実施態様においてプロスタグランジン、及び／又はいくつかの実施態様においてロイコトリエンであり得る。放出される少なくとも1つのサイトカインの量は、いくつかの実施態様において少なくとも50%、いくつかの実施態様において少なくとも60%、いくつかの実施態様において少なくとも70%、いくつかの実施態様において、少なくとも80%、いくつかの実施態様において少なくとも90%、いくつかの実施態様において少なくとも95%、いくつかの実施態様において少なくとも97%、いくつかの実施態様において少なくとも99%低減され得るか、又はいくつかの実施態様において完全に消失され得る。これらの方法は、培養又は個体の身体中の細胞で遂行され得る。

10

【0019】

いくつかの実施態様において、本発明は、本明細書において示される少なくとも1つのアンチセンスオリゴマー、発現ベクター、及び／又は組成物を個体へ投与することによって、個体においてアナフィラキシー反応を阻害する方法に関する。

いくつかの実施態様において、本発明は、本明細書において示される1又はそれ以上のアンチセンスオリゴマー、発現ベクター、及び／又は組成物をかかる治療を必要とする個体へ投与することによって、個体においてアレルギー性病態を治療する方法に関する。治療されるアレルギー性病態は、喘息、アトピー性皮膚炎、慢性鼻炎、慢性副鼻腔炎、及び／又はアレルギー性結膜炎であり得る。

20

いくつかの実施態様において、本発明は、本明細書において示される1又はそれ以上のアンチセンスオリゴマー、発現ベクター、及び／又は組成物を、アレルギー反応を急性的及び／又は慢性的に経験するか、あるいはアレルギー反応を有するリスクがある個体へ投与することによって、個体においてアレルギー反応の発生及び／又は重症度を低減させる方法に関する。

いくつかの実施態様において、本発明は、本明細書において示される1又はそれ以上のアンチセンスオリゴマー、発現ベクター、及び／又は組成物を、アナフィラキシー反応を起こすリスクがある個体へ投与することによって、アナフィラキシー反応を起こすリスクがある個体を治療する方法に関する。

30

【0020】

いくつかの実施態様において、本発明は、本明細書において示される1又はそれ以上のアンチセンスオリゴマー、発現ベクター、及び／又は組成物を、かかる治療を必要とする個体へ投与することを含む、個体において肥満細胞関連疾患を治療する方法に関する。肥満細胞関連疾患は、肥満細胞腫を含む、肥満細胞症又は肥満細胞腫瘍であり得る。

いくつかの実施態様において、本明細書において示される1又はそれ以上のアンチセンスオリゴマー、発現ベクター、及び／又は組成物が投与される個体は、哺乳動物、任意選択でヒト、マウス、イヌ、ネコ、又はウマである。

したがって、本発明の目的は、MS4A6A遺伝子産物及びMS4A2遺伝子産物の発現の調節のための組成物及び方法を提供する。これ及び他の目的は、本発明によって、全体として又は部分的に達成される。

40

上述された本発明の目的、他の目的、及び本発明の利点は、本発明及び非限定的実施例の以下の記載及び図の検討後に当業者に明らかになるだろう。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】ヒトFc ϵ R β スプライススイッチングオリゴヌクレオチド(SSO)は、Fc ϵ R β 機能の低減に効果がない。図1A：ヒトLAD2細胞のFc ϵ R β のRT-PCRから、全長産物(FL-Fc ϵ R β)から短縮産物(t-Fc ϵ R β)への150塩基対(bp)のサイズのシフトがあり、効率的なエクソンスキップが実証された。 β -アクチンを対照として使用した。図1B：LAD2細胞へのFc ϵ R β SSOのトランスフェクションは、KIT発現に影響せずに、表面Fc ϵ R β 発現の58%の低減を

50

もたらした。黒色バー：対照；灰色バー：FcεRIβ SSO。図1C：FcεRIβ SSOのトランスフェクションは、わずかであるが有意にIgE依存性肥満細胞脱顆粒を低減した。黒色円：対照；灰色円：FcεRIβ SSO。図1D：Ca²⁺流入は、LAD2においてFcεRIβ SSOによって有意に影響を受けなかった。黒色円：対照；灰色円：FcεRIβ SSO。データは、少なくとも3つの独立した実験からの平均±標準誤差である。統計：二元配置ANOVA及びSidakの事後検定。**p* < 0.01；****p* < 0.001；*****p* < 0.0001；n.s. 有意でない。

【図2】ヒトLAD2肥満細胞におけるMS4Aファミリーの発現。図2A：大多数のMS4A遺伝子ファミリーは、複数のスプライスバリエーションを含む。したがって、MS4A遺伝子ファミリーのすべてについてのプライマーを、すべての公知のバリエーションの間で同一のmRNAの領域を増幅するようにデザインした。MS4A6Aは2つのバンドを増幅し、シーケンス及びクローニング実験から、肥満細胞がMS4A6Aの新規の短縮物を発現することが決定された。図2B：肥満細胞は、MS4A4バリエーション1及びバリエーション3を発現した。図2C：hMCMにおいて発現された全長（FL）及び短縮（t）スプライスバリエーションのMS4A遺伝子ファミリーメンバーの図式表示。スプライスバリエーション特異的RT-PCR、オープンリーディングフレームのクローニング、及びシーケンスの組み合わせを用いて、発現を決定した。TM1～TM4：それぞれ膜貫通ドメイン1～4。ITAM：免疫受容体チロシン活性化モチーフ、暗灰色ボックスにより図示する。淡灰色ボックス：エクソン。

【0022】

【図3】MS4A6Aは、推定上のヘミ-ITAMを含む。MS4A6Aのシーケンスから、MS4A6Aが、FcεRIβ ITAM中の第1のDxxYxxLに同等な、C末端中のコンセンサス配列DxxYxxLを備えた推定上のヘミ-ITAMドメインを含むことが示された。FcεRIβ ITAMの第1のチロシン残基は、Lynを結合することが公知であり、MS4A6Aのヘミ-ITAMは、FcεRIβのLyn結合領域と同じ配列を含む。

【図4】ヒト肥満細胞はMS4A6Aを発現し、MS4A6Aは可能性のあるヘミ-ITAMモチーフを含むし、肥満細胞脱顆粒及び表面FcεRIα発現において中等度の役割を有する。図4A及び図4B：GFP FcεRIβコンストラクト及びGFP MS4A6Aコンストラクトによるヒト肥満細胞のトランスフェクションは、良好なGFP発現を示した。図4C：トランスフェクションされた肥満細胞からのウエスタンブロットから、抗MS4A6A（α-MS4A6）抗体がFcεRIβではなくMS4A6Aへ結合したことが示された。α-β-アクチン：抗β-アクチン抗体により検出されたβ-アクチン：図4D。MS4A6AのshRNAノックダウンは、両方のMS4A6Aスプライスバリエーションの発現の低減をもたらした。B-アクチン：β-アクチン、ローディング対照。図4E及び図4F：ウエスタンブロットによるタンパク質発現の定量（図4E）は、shMS4A6A処理によるQPCRによって査定されたmRNA発現（図4F）と合致した。図4G及び図4H：shMS4A6Aは、IgE架橋（XL）に応答するヒト肥満細胞脱顆粒（図4G）及びカルシウム流入（図4H）を中等度であるが有意に低減した。黒色シンボル：対照；白色シンボル：shMS4A6。図4I：shMS4A6Aは表面FcεRIα発現をおよそ40%低減した。これらのデータは、以前に報告されたFcεRIβ SSO処理のデータを反映するようであった（Cruse et al., 2016）。

【0023】

【図5】MS4A6Aのエクソンスキップは、FcεRIβに匹敵して働き、FcεRIβ又はMS4A6Aのいずれかを単独を標的化するSSOは、ヒト肥満細胞の脱顆粒を停止するために不十分であるが、両方のタンパク質を標的化する組み合わせのSSOは、相乗効果を有する。図5A：FcεRIβ又はMS4A6Aのいずれかを効率的且つ特異的に標的化するSSOは、各々のmRNAのエクソンスキップを誘導した。二重SSOは、効率的に両方のmRNAをスキップした。図5B及び図5C：細胞数及び生存率は、スキップによって有意に影響を受けなかった。図5D：表面FcεRIα発現は、FcεRIβ

(60%)又はMS4A6A(40%)のいずれかのスキップによって低減されたが、両方のスキップは、表面での受容体発現の低減を有意に増加させた(80%)。図5E:FcεRIのαサブユニット及びγサブユニットの発現は、エクソンスキップによって影響を受けず、FcεRIα表面発現の低減がトラフィッキングに起因することを示唆した。図5F及び図5G:FcεRIβ又はMS4A6Aのいずれか単独をスキップするエクソンは、脱顆粒の低減で効果がなかったが、両方のmRNAをスキップするエクソンは、IgE XLに応答する脱顆粒(図5F)を著しく低減し、GPCR MRGX2受容体を介して作用する化合物48/80に応答する脱顆粒(図5G)は低減しない。

【図6】MS4A6A及びFcεRIβのエクソンスキップは、初代ヒト肥満細胞において匹敵するものである。図6A~図6D。ヒト肥満細胞におけるFcεRIβ及びMS4A6Aの役割が、初代細胞へも適用可能であることを確認するために、臍帯血由来肥満細胞を用いた。CBDMCは、表面上のFcεRIαを発現すること及びIgE XLに回答して脱顆粒することに、IL-4によるプライミングが要求される未成熟細胞である。図6E:一旦プライミングされたならば、FcεRIβ(暗灰色;各々の群中の左側から2番目)及びMS4A6A(淡灰色;各々の群中の左側から3番目)のエクソンスキップは、LAD2細胞に匹敵するものであったが、CBDMCが、両方のタンパク質の一緒のスキップ(中間の灰色;各々の群中の最も右側)に比較して、両方のタンパク質の単一スキップに対してより敏感であったという点は除く。これは、おそらくこれらの未成熟細胞における表面FcεRIαの低い発現レベル(図6Cを参照)に起因していた。図6F. IgE非依存的活性化をイオノマイシンの添加によって調査し、この活性化はSSOによって影響されなかった。例示的な実験を示す。黒色バー:対照(各々の群中の最も左側);暗灰色バー:FcεRIαスキップ単独(各々の群中の左側から2番目)。淡灰色バー:MS4A6スキップ単独(各々の群中の左側から3番目)。中間の灰色バー:FcεRIα及びMS4A6の一緒のスキップ(各々の群中の最も右側)。

【0024】

【図7】MS4A6Aのエクソンスキップは、タンパク質レベルで短縮アイソフォームの発現を強いる。図4において検証されたMS4A6A抗体は、全長MS4A6Aアイソフォーム(FL-MS4A6A)及び短縮MS4A6Aアイソフォーム(短縮-MS4A6A)の両方を認識した。MS4A6A SSOは、短縮MS4A6Aの発現をもたらしたが、FcεRIβ SSOはもたらさなかった。NSバンド:<15kDaの非特異的バンド。FL MS4A6Aは25kDaであると予測され、短縮MS4A6Aは20kDaであると予測でされる。

【図8】FcεRIβは、臍帯血由来MCにおいてFcεRI依存性サイトカイン放出を駆動するが、MS4A6はしない。図8A. pg/mlとして示した、IgE XLに回答したCBDMCからのIL-8サイトカイン放出。図8B. IgE XLに回答して放出されるサイトカインの量はCBDMCドナー間で変動するので、データを、各々のドナーについてのSSO処理によるパーセント阻害として分析し、これは、各々のドナーについてのデータを効果的に正規化するものである。これらのデータから、FcεRIβ(暗灰色バー;各々の群中の左側から2番目)が標的化された場合又はFcεRIβ及びMS4A6の両方が標的化された(中間の灰色バー;各々の群中の最も左側)場合のみに、サイトカイン産生の阻害が有意に誘導されたが、MS4A6単独(淡灰色バー;各々の群中の左側から3番目)が標的化された場合に、そうではなかったことが示された。データは、3つの実験からの平均±標準誤差である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0025】

配列表の簡潔な記載

配列番号1は、本発明の例示的なヒトMS4A6A遺伝子産物のヌクレオチド配列である。それは、GENBANK(登録商標)バイオシーケンスデータベースのアクセッション番号NM_152852.3に対応する。

配列番号2は、配列番号1によってコードされるアミノ酸配列である。それは、GEN

BANK（登録商標）バイオシーケンスデータベースのアクセッション番号NP__690591.1に対応する。配列番号2に対応するタンパク質は、4つの膜貫通ドメインを含み、アミノ酸49～71（膜貫通ドメイン1；TM1）、アミノ酸86～105（膜貫通ドメイン2；TM2）、112～134（膜貫通ドメイン3；TM3）、及びアミノ酸180～202（膜貫通ドメイン4；TM4）を含む。

配列番号3は、ヒトMS4A6Aゲノム遺伝子座の例示的なヌクレオチド配列である。それは、GENBANK（登録商標）バイオシーケンスデータベースのアクセッション番号NC__000011.10のヌクレオチド60, 171, 607～60, 184, 666の逆方向の相補物に対応する。

配列番号4は、本発明の例示的なヒトMS4A2遺伝子産物のヌクレオチド配列である。それは、GENBANK（登録商標）バイオシーケンスデータベースのアクセッション番号NM__000139.5に対応する。

配列番号5は、配列番号4によってコードされるアミノ酸配列である。それは、GENBANK（登録商標）バイオシーケンスデータベースのアクセッション番号NP__000130.1に対応する。

配列番号6は、ヒトMS4A2ゲノム遺伝子座の例示的なヌクレオチド配列である。それは、GENBANK（登録商標）バイオシーケンスデータベースのアクセッション番号NC__000011.10のヌクレオチド60, 088, 664～60, 098, 467に対応する。

配列番号7は、本発明の例示的なマウスMS4A6A遺伝子産物のヌクレオチド配列である。それは、GENBANK（登録商標）バイオシーケンスデータベースのアクセッション番号NM__027209.3に対応する。

配列番号8は、配列番号7によってコードされるアミノ酸配列である。それは、GENBANK（登録商標）バイオシーケンスデータベースのアクセッション番号NP__081485.2に対応する。

配列番号9は、マウスMS4A6Aゲノム遺伝子座の例示的なヌクレオチド配列である。それは、GENBANK（登録商標）バイオシーケンスデータベースのアクセッション番号NC__000085.6のヌクレオチド11, 518, 519～11, 530, 403に対応する。

配列番号10は、本発明の例示的なマウスMS4A2遺伝子産物のヌクレオチド配列である。それは、GENBANK（登録商標）バイオシーケンスデータベースのアクセッション番号NM__013516.2に対応する。

【0026】

配列番号11は、配列番号10によってコードされるアミノ酸配列である。それは、GENBANK（登録商標）バイオシーケンスデータベースのアクセッション番号NP__038544.1に対応する。

配列番号12は、マウスMS4A2ゲノム遺伝子座の例示的なヌクレオチド配列である。それは、GENBANK（登録商標）バイオシーケンスデータベースのアクセッション番号NC__000085.6のヌクレオチド11, 615, 520～11, 623, 719の逆方向の相補物に対応する。

配列番号13及び14は、配列番号1の例示的なヒトMS4A6A遺伝子産物の472塩基対（bp）サブ配列を増幅するために用いられ得る、例示的なオリゴヌクレオチドプライマーの配列である。

配列番号15は、配列番号1の例示的なヒトMS4A6A遺伝子産物のエクソン3～6のヌクレオチド配列である。

配列番号16は、標的化後にエクソン4を欠失するようにデザインされた、配列番号1の例示的なヒトMS4A6A遺伝子産物のヌクレオチド配列である。それは、配列番号1のエクソン5及び6へ融合されたエクソン3に対応する。

配列番号17は、標的化後にエクソン4を欠失するようにデザインされた、配列番号1の例示的なヒトMS4A6A遺伝子産物によってコードされる予測アミノ酸配列である。

10

20

30

40

50

それは、配列番号 16 によってコードされたアミノ酸配列に対応し、配列番号 2 のアミノ酸 95～247 へ融合された配列番号 2 のアミノ酸 1～49 にも対応する。

配列番号 18 は、標的化後にエクソン 3 を欠失するようにデザインされた、配列番号 4 の例示的なヒト MS4A2 遺伝子産物によってコードされる予測アミノ酸配列である。それは、配列番号 5 のアミノ酸 108～244 へ融合された配列番号 5 のアミノ酸 1～61 に対応する。

配列番号 19 は、ヒト MS4A6A 転写産物に関するオリゴデザインのために可能な標的を備えた例示的な配列（配列番号 19）を提示する。

【0027】

配列番号 20 及び 21 は、ヒト MS4A6A 転写産物を標的化するための追加の例示的な標的配列を提示し、それぞれ配列番号 19 のヌクレオチド 1～76 及び配列番号 19 のヌクレオチド 162～250 に対応する。いくつかの実施態様において、配列番号 20 及び 21 のサブ配列は、例示的な標的配列として用いられ得、配列番号 20 のヌクレオチド 27～76 及び配列番号 21 のヌクレオチド 1～40 が挙げられるがこれらに限定されない。

配列番号 22～25 は、ヒト MS4A6A 遺伝子産物のエクソン 4 を標的化するための例示的な標的化配列及び標的配列を提示する。配列番号 22 は、配列番号 23 を含むヒト MS4A6A 遺伝子産物を標的化し得る、本明細書において開示される標的化実験において用いられる例示的なオリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列であり、配列番号 24 は、配列番号 25 を含むヒト MS4A6A 遺伝子産物を標的化し得る、例示的なオリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列である。

配列番号 26 は、本明細書において開示される MS4A2 標的化実験において用いられる例示的なオリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列である。

【0028】

詳細な説明

FcεRIβ スプライススイッチングオリゴヌクレオチド (SSO) は、重要なタンパク質-タンパク質相互作用を消失させ、マウス肥満細胞 (MC) において表面 FcεRI 発現の喪失をもたらすが、ヒト細胞においてあまり効率的ではない (Cruse et al., 2016)。FcεRIβ と同じ遺伝子ファミリー (すなわち MS4A 遺伝子ファミリー) からの FcεRIβ 様のタンパク質が、ヒトにおいて、FcεRIβ を補償して、FcεRI の新規調節因子及び FcεRI についての可能性のあるサブユニットとして作用し得る可能性がある。ヒト (hu) MC が、FcεRIβ (MS4A2)、MS4A4、及び MS4A6A を発現することが見出され、MS4A6A が、FcεRI の表面発現を安定化し、FcεRIβ との冗長性を呈する C 末端のヘミー ITAM を介してシグナル伝達を開始する可能性がある。MS4A4 が FcεRI シグナル伝達において機能するが、FcεRIβ 及び MS4A6A のものとは別のメカニズムを介する可能性もある。MS4A4 は、ITAM 又はヘミー ITAM を含有せず、したがって、おそらく FcεRIβ 又は MS4A6A と同じ手法でシグナル伝達を引き起こさない。むしろ、MS4A4 が、脂質ラフトの中への FcεRI 複合体の動員を増進して、PLCγ1 を介するシグナル伝達を増幅し、ストアからの Ca^{2+} 放出及びストア作動性 Ca^{2+} 流入 (SOCE) を増加させる可能性がある。全体的に、そして任意の特定の作動理論によって束縛されることを望むものではないが、細胞表面への FcεRI のトラフィックにおける FcεRIβ の公知の機能に加えて、FcεRIβ 様のタンパク質は、ヒト中の原形質膜で FcεRI と動的に相互作用して、IgE への FcεRI 及び MC の応答を調節し得る。特に、そして本明細書において開示されるように、FcεRIβ 及び MS4A6A タンパク質が、FcεRI との会合を競合し、それらの ITAM モチーフ及びヘミー ITAM モチーフを介して、別個のシグナル伝達複合体をそれぞれ増進することが、確立された。

【0029】

本発明は、研究中の遺伝子についての新規機能を解明するだけでなく、アレルギーに対する本発明の治療的アプローチをヒトへ変換すること、革新的な治療標的を同定すること

、及び新規 I g E シグナル伝達メカニズムを確立することも容易にする。MS4A6A は、可能性のあるヘミー ITAM を含有し、それは、MS4A6A を MS4A ファミリー内でユニークなものとする。したがって、FcεRI 複合体中の FcεRIβ 及び MS4A6A の比の変更は、FcεRI シグナルのオン及びオフの脱調節を介して、アレルギー患者中の MC の応答性を微調整するように作用し得る。加えて、オルタナティブスプライシングが、タンパク質の機能及び受容体との相互作用を変化させ、調節についての別の層を加え得ることも、本明細書において開示される。

MC は、I g E 及び抗原に応答して炎症誘発性メディエーターを放出することによって、アレルギー性疾患において重要な役割を果たす（総説については Cruse & Bradding, 2016; Virk et al., 2016 を参照）。しかしながら、現在利用可能な薬物は、MC の機能を直接及び特異的に標的化しない。SSO を利用して FcεRIβ のオルタナティブスプライシングを誘導する先駆的な治療的戦略が、本明細書において開示される（Cruse et al., 2016）。FcεRIβ SSO は、タンパク質-タンパク質相互作用を標的化し、マウスにおいて表面 FcεRI 発現の喪失をもたらす、喘息及び他のアレルギー性疾患についてのケアを改善する可能性を実証する。しかしながら、FcεRIβ SSO は、マウス (mo) MC に比較して、huMC においてあまり有効ではない（Cruse et al., 2016）。huMC へ変換することができないということは、各々の種における FcεRI 複合体形成を十分に理解することが必要であることを強調する。ヒト及びマウスにおいて、FcεRI は、もっぱら MC 及び好塩基球において四量体複合体として発現され、ここでは、FcεRIβ サブユニットが発現される（Kuester et al., 1992; Maurer et al., 1994; Kinet, 1999; Kraft et al., 2004）。しかしながら、ヒトにおいて、FcεRI は、FcεRIβ を欠く三量体複合体としても存在し、複数の細胞タイプで発現される（Bieber et al., 1992; Maurer et al., 1994; Maurer et al., 1996; Holloway et al., 2001; Cheung et al., 2010; Dehlink et al., 2010; Vasudev et al., 2012; Greer et al., 2014; Platzer et al., 2015）。マウスは、三量体 FcεRI を発現しない（Kinet, 1999; Kraft & Kinet, 2007; Gould & Sutton, 2008）。したがって、FcεRIβ は、ヒトにおける FcεRI トラフィックのためにより重要ではなく、三量体 FcεRI は、FcεRIβ SSO を変換することができない原因となり得る。しかしながら、FcεRIβ の標的破壊と組み合わせたヒト化 FcεRIα によるマウス（それは三量体 FcεRI を発現する）における研究で、三量体 FcεRI のみを発現するマウスを生成し、これらのマウスから、三量体 FcεRI は、強い脱顆粒応答又は着実な Ca²⁺ シグナルを惹起しないことが実証される（Dombrowicz et al., 1998）。したがって、本明細書において提示されたデータは、三量体 FcεRI と適合せず、huMC における FcεRIβ SSO の低い有効性が異なるメカニズムを介することを示唆した。

【0030】

未同定の FcεRIβ 様のタンパク質が、ヒト FcεRI において存在し機能し得るという示唆は、ヒト及びマウスの FcεRI を特徴づける独創的な実験の捕捉説明として提案された（Alber et al., 1991）。この中で提示されたデータから、FcεRIβ 様のタンパク質が存在することが示される。MS4A 遺伝子は、ヒトにおいて 16 の遺伝子のファミリーであり、それらは MS4A1 (CD20) 及び MS4A2 (FcεRIβ) に関連し、免疫細胞において発現される（Liang & Tedder, 2001; Liang et al., 2001）。それらは、類似するトポロジーを備えた 4 回膜貫通 (TM) タンパク質であるが、トラスパニンへの相同性は低い。MS4A 遺伝子は、染色体 11q12~q13 の付近にクラスターになっており（Liang & Tedder, 2001; Liang et al., 2001）、それは、アレルギー及び喘息感受性にリンクする領域である（Lympay et al., 1992; Sandford et al., 1993; Stafford et al., 1994）。加えて、MS4A2、MS4A4A、及び MS4A6A は、ゲノムワイド関連解析によりアルツハイマー病の発症に関連している（Hollingworth et al., 2011; Naj et al., 2011）。複数の MS4A ファミリーメンバーの発現は、新生物形成にも関与していた（Bangur et al., 2004; Koslowski et al.,

2008;Dalerba et al.,2011;Michel et al.,2013;Ye et al.,2014)。しかしながら、MS4A遺伝子クラスターの機能は、大部分は不明であり、そのため疾患状態への連鎖の有意性は不明のままである。MS4Aタンパク質は、別個の Ca^{2+} チャンネルとして作用することが提案されている(Bubien et al.,1993;Koslowski et al.,2008)。加えて、MS4Aタンパク質は、嗅覚ネックレス感覚性ニューロン(olfactory neck lace sensory neuron)における化学受容体として作用し、そこで、当該受容体が脂肪酸及びフェロモンを含む様々なリガンドを認識して、これらの特殊化されたニューロンにおいて Ca^{2+} 応答を引き起こし得る(Greer et al.,2016)。

【0031】

高親和性IgE受容体のサブユニットであるFcεRIβ(それは細胞表面へのFcεRI複合体のトラフィックングのために重要である)のエクソンスキップを利用する治療戦略は、米国特許出願公開第2019/0062756号中で開示される。肥満細胞標的化オリゴヌクレオチド(MTO)によるFcεRIβのエクソンスキップは、それによりトラフィックングにおける機能を消失させ、マウスにおいてインビトロ及びインビボで表面FcεRI発現及びアレルゲンへの応答性の喪失をもたらして、肥満細胞及び好塩基球を特異的に標的化しダウンレギュレートし、これらのことは、即時型アレルギー応答に重要である。

【0032】

本発明のアプローチは、原形質膜へのIgE受容体のトラフィックングを消失させる治療的アンチセンスオリゴヌクレオチドのための新規プラットフォームを利用する。このアプローチの能力は、肥満細胞及び好塩基球においてもつばら発現されるタンパク質を標的化し、これらの細胞の特異的な標的化及びそれらの機能のダウンレギュレーションを可能にするということである。FcεRIβは、アレルギー及び喘息のための可能性のある治療標的として考えられていたが、MTOの解明までは、薬物によりこの遺伝子を標的化する実現可能なアプローチは出現していなかった。エクソンスキップを誘導するアンチセンスオリゴヌクレオチドの臨床的治療有用性はデュシェンヌ型筋ジストロフィーにおいて実証されており、薬物は良好な忍容性を示す。しかしながら、突然変異エクソンをスキップするオリゴヌクレオチドの使用は、患者DNAをシーケンスして原因となる突然変異を同定することを要求する。患者における各々の突然変異エクソンは、そのエクソンを標的化するオリゴヌクレオチドについての臨床試験を要求し、薬物開発を遅らせ費用を増加させる。非突然変異エクソンのスキップが、トラフィックングの変更をもたらす特異的なタンパク質-タンパク質相互作用の消失及びアレルギー応答のために重要な受容体の表面発現の喪失によるタンパク質の機能の変更に用いられるので、本発明のアプローチは革新的である。したがって、非突然変異エクソンが標的化されるので、本発明のMTO技術は、すべての患者において同じエクソンを標的化し、開発に対する負担を軽減する。

【0033】

しかしながら、マウス細胞においてFcεRIβを標的化するための本発明のアプローチの有効性にもかかわらず、ヒト肥満細胞における有効性は低減される。ヒト細胞におけるFcεRIβの標的化の有効性の低減についての理由は、明らかではないが、ヒトFcεRI発現とマウスFcεRI発現との間の基本的な差異に関連し得る。ヒト及びマウスの両方において、四量体FcεRIは、もつばら肥満細胞及び好塩基球において発現され、そこでは、FcεRIβサブユニットが発現される。しかしながら、ヒトにおいて、FcεRIは、FcεRIβを欠く三量体FcεRI複合体として存在することができ、複数の細胞タイプで発現されるが、マウスが三量体FcεRIの発現を欠くようであり、したがってFcεRI発現が肥満細胞及び好塩基球に制限される。肥満細胞における5つのMS4A遺伝子の発現が確立され、FcεRIβへの比較を示すスプライスバリエーションが発現が決定された。FcεRIβのエクソン3は、FcεRI複合体のトラフィックングにおけるFcεRIβの機能のために重要である。大多数のMS4Aタンパク質の第1及び第2の膜貫通ドメインをコードする対応するエクソンの高度に保存されたスプライシングは、このエクソンがMS4Aタンパク質のトラフィックングのためにも重要であり得るこ

とを示す。MS4A6Aのオルタナティブスプライシングの重要性を調査するため、FcεRIβのために成功して使用された同じエクソンスキップ方法が、MS4A6Aに適用可能なように、本明細書において開示される。エクソンスキップMS4A6Aが、MS4A6Aのノックダウンに匹敵する表面FcεRI発現の低減をもたらすことが更に同定された。他のFcεRIサブユニット（FcεRIα及びFcεRIγ）の定量的RT-PCRから、FcεRIβ又はMS4A6Aのエクソンスキップにより、mRNAが低減されないことが明らかにされ、この効果が、遺伝子発現ではなく、むしろ受容体のトラフィッキングのダウンレギュレーション起因することが確認された。これらのデータから、MS4A6Aの同等なエクソンが、FcεRIβのものに匹敵し、したがってヒト細胞のFcεRIのトラフィッキングにおける全長タンパク質の機能のために重要であることが示唆される。総合すると、これらのデータから、FcεRIβ及びMS4A6Aが原形質膜へのFcεRIトラフィッキングにおいて部分的に冗長な役割を有し、いずれのタンパク質単独の標的化では脱顆粒の最大阻害を達成するために不十分であることが示唆された。しかしながら、FcεRIβ及びMS4A6Aの同時のエクソンスキップは、表面FcεRI発現における相加的な低減をもたらし、それは脱顆粒の著しい低減を導く。

10

【0034】

マウス細胞において良好に働くアレルギー性疾患のための新規治療戦略が同定されたが、ヒト細胞において同等な有効性は観察されなかった（米国特許出願公開第2019/0062756号を参照）。ヒト細胞における有効性の低減についてのメカニズムは同定されており、本明細書において開示され、MS4A6Aタンパク質がヒト細胞においてFcεRIβを補償することができ、このタンパク質がFcεRIβと同じ手法で標的化され得ることが決定された。したがって、本発明の治療アプローチがヒトにおいて働くために、FcεRIβ及びMS4A6Aの両方を標的化する肥満細胞標的化オリゴヌクレオチドの組み合わせが、用いられ得る。

20

したがって、高親和性FcγRIII受容体（FcγRIII）によって媒介される疾患及び症候群を治療する方法を含むアトピー性疾患を治療する新規方法が、本明細書において開示される。本発明は、FcεRIβタンパク質の新規の短縮アイソフォーム（t-FcεRIβ）の本発明者の解明に部分的に基づき、それは第1及び第2の膜貫通領域を欠如し、それについてのmRNAの転写物はエクソン3で短縮される（Cruse et al., 2010；米国特許出願公開第2019/0062756号も参照されたく、その内容は、参照することによってその全体が本明細書に援用される）。この短縮FcεRIβタンパク質は、原形質膜へトラフィッキングせず、原形質膜上のFcεRIの発現の低減をもたらす。t-FcεRIβの知見及びその関連する効果は、FcεRIβ mRNA転写物の選択的編集の解明を導き、それは、アンチセンス技術を使用してt-FcεRIβを産生し、FcεRIβタンパク質の細胞表面発現の減少をもたらすものである。これは、次にIgE媒介性疾患から生じる症状の減少を導く。したがって、本明細書において示される方法及び化合物は、FcεRIの細胞表面発現のダウンレギュレートによって、FcεRI媒介性疾患を治療するために有用である。

30

【0035】

アンチセンス技術は、遺伝子産物の発現レベルを修飾する有効な方法であることが実証された（例えば米国特許第8,765,703号、米国特許第8,946,183号、及び米国特許公開第2015/0376615号を参照されたく、参照することによってこれらの全体が本明細書に援用される）。アンチセンス技術は、mRNAの正常なプロセッシングにおける既知のステップを妨害することによって働く。簡潔には、RNA分子は、細胞の核中でゲノムDNAから転写される。一次mRNA又はプレmRNAと呼ばれるこれらの新たに合成されたmRNA分子は、リボソームでのタンパク質への翻訳のために、細胞質への輸送前にプロセッシングされなくてはならない。かかるプロセッシングは、5'メチル化キャップの添加及びmRNAの3'末端へのポリ（A）テールの添加を含む。

40

【0036】

次いで哺乳動物のmRNAの90～95%の成熟が、mRNAのスプライシングにより

50

起こる。イントロン（又は介在配列）は、成熟mRNAのコーディング配列中に含まれない、一次転写物（又はそれをコードするDNA）の領域である。エクソン（発現される配列）は、それが細胞質に到達する場合に成熟mRNA中に残存する一次転写物（又はそれをコードするDNA）の領域である。スプライシングプロセスの間に、プレmRNA分子中のエクソンは一緒にスプライスされて、成熟mRNA配列を形成する。スプライスジャンクション（スプライス部位とも称される）は、どの配列が除去されるか、ならびに繋がる末端がどこで開始及び停止するかを決定するために、細胞装置によって利用される。ジャンクションの5'側の配列は5'スプライス部位又はスプライスドナー部位と呼ばれるが、ジャンクションの3'側の配列は3'スプライス部位又はスプライスアクセプター部位と称される。スプライシングにおいて、上流のエクソンの3'末端は、下流エクソンの5'末端部に連結される。したがって、スプライスされていないRNA（又はプレmRNA）は、イントロンの5'末端でエクソン／イントロンジャンクション及びイントロンの3'末端でイントロン／エクソンジャンクションを有する。イントロンが除去された後に、エクソンは、成熟mRNA中で、エクソン／エクソンジャンクション又は境界と時には称されるもののところで、連続している。潜在的スプライス部位は、あまり頻繁に使用されないものであるが、通常のスプライス部位がブロックされるか又は利用不可能な場合に使用され得る。細胞によってエクソンの異なる組み合わせの使用は、単一遺伝子からの複数のmRNA転写物をもたらし得る。

10

【0037】

アンチセンス技術の1つの適用において、アンチセンスオリゴヌクレオチド（AON）は、関心の遺伝子から転写されたmRNA分子に結合し、その分解を増加させることによって、又は立体障害によりmRNAの翻訳若しくは移行を防止することによって、mRNAを不活性化する（「オフにする」）。最終結果は、対応する遺伝子の発現（すなわち対応する遺伝子によってコードされたタンパク質の最終的な産生）が防止されるということである。

20

代替的に、アンチセンス技術は、遺伝子転写物のスプライシングに影響するように使用され得る。この適用において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、スプライス前のRNA分子（プレメッセンジャーRNA又はプレmRNA）に結合し、細胞のスプライシング装置を再度方向付けて、それによって、スプライスされたmRNA分子のエクソン内容物の修飾をもたらす。したがって、修飾されたmRNAによってコードされたタンパク質の全体的な配列は、スプライシングが変更されなかったmRNAから翻訳されたタンパク質（すなわち全長の野生型タンパク質）とは異なる。変更されたmRNAから翻訳されるタンパク質は、短縮し得る、及び／又は適切な機能のために要求される重要な配列を欠き得る。典型的には、スプライシングに影響を与えるために使用される化合物は、標的化されているmRNAに相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドであるか、又は当該オリゴヌクレオチドを含有する。かかるオリゴヌクレオチドは、本明細書において「アンチセンスオリゴヌクレオチド」（AON）と称される。

30

【0038】

本開示は、FcεRIβタンパク質をコードするmRNAのスプライシングを調節し、それによって、細胞の表面上で発現されたFcεRIタンパク質の量又は「レベル」の減少を引き起こす、アンチセンス技術を提供する。したがって、本明細書において示される方法は、概して、MS4A2転写物を発現する細胞を、MS4A2プレmRNAの領域へ標的化されたアンチセンスオリゴマーと接触させることによって達成され得る。かかる接触は、細胞によるアンチセンスオリゴマーの取り込み、MS4A2 mRNAへのオリゴマーのハイブリダイゼーション、及びMS4A2プレmRNAのスプライシングの後続する調節をもたらす。いくつかの実施態様において、MS4A2 mRNAのスプライシングのかかる調節は、FcεRIの細胞表面発現を減少させる。

40

【0039】

本発明は、本明細書において記載される特定の実施態様に限定されず、それゆえ変動し得る。追加で、本明細書において使用される専門用語は、特定の実施態様のみを記載する

50

目的のためであり、本発明の範囲が請求項によってのみ限定されるので、最終的に特許請求された発明に対して限定するとは意図されない。

本明細書及び添付の請求項において使用される時、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、及び「その(the)」は、文脈が別段明らかに指示しない限り、複数の指示物を包含する。例えば、核酸分子(a nucleic acid molecule)は、1又はそれ以上の核酸分子を指す。それゆえ、「1つの(a)」、「1つの(an)」、「1又はそれ以上の」、及び「少なくとも1つの」という用語は、互換的に使用され得る。同様に、「含む(comprising)」、「包含する(including)」、及び「有する(having)」という用語は、互換的に使用され得る。請求項は、任意選択の要素を除外するように作成され得ることが、更に指摘される。それゆえ、この記述は、請求項の要素の列挙に関連する「もっぱら」、「のみ」、及び同種のものといった排他的な用語の使用、又は「否定的な」限定の使用のための先行詞として役立つことを意図する。

10

【0040】

本明細書において使用される時、MS4A6A遺伝子、MS4A6A、及び同種のは、哺乳動物からのMS4A6Aタンパク質をコードする遺伝子を指す。MS4A6A遺伝子の例としては、GENBANK（登録商標）バイオシーケンスデータベースのアクセッション番号NM__152852.3（ヒト）、NM__027209.3（マウスMS4A6Ab、NP__081485.2をコードする）、NM__028595.4（マウスMS4A6Ac、NP__082871.2をコードする）、及びNM__026835.2（マウスMS4A6Ad、NP__081111.1をコードする）が挙げられるがこれらに限定されない。同様に、MS4A6Aコーディング配列は、MS4A6Aタンパク質の少なくとも一部分をコードする核酸配列を指す。かかる一部分は、タンパク質の断片（例えば全タンパク質のうちの任意の一部分からの10、20、30、40、50、60、70、80、90、若しくは100の連続したアミノ酸セグメント）、エクソン、又はドメイン（例えば膜貫通ドメイン）であり得るか、あるいは、それは、任意のスプライシングバリエーションを包含するタンパク質全体を指し得る。本明細書において示されるMS4A6A遺伝子又はコーディング配列は、かかる遺伝子又はコーディング配列を有する任意の哺乳動物からのものであり得る。MS4A6A遺伝子又はコーディング配列は、ヒト、マウス、イヌ、ネコ、又はウマからのものであり得る。

20

30

【0041】

MS4A6Aゲノム遺伝子座は、ヒト染色体11及びマウス染色体19上で見出され得る。ヒト及びマウスのMS4A6Aゲノム遺伝子座のヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号3及び9で提示される。

本明細書において使用される時、MS4A6A転写物は、MS4A6A遺伝子から転写されるRNA分子である。いくつかの実施態様において、本明細書において示されるオリゴマーによって標的化されるMS4A6A転写物は、一次転写物又はプレmRNA分子である。本明細書において使用される時、一次mRNA又はプレmRNAは、まだスプライシングを受けていないmRNA転写物である。したがって、成熟mRNA分子は、スプライシングを受けたmRNA分子である。

40

それぞれ配列番号3及び9で示されるヒト及びマウスのMS4A6Aゲノム遺伝子座に関して、これらの遺伝子座についてのイントロンとエクソンの境界が、表1中で提示される。

【0042】

50

【表 1】

表 1 ヒト及びマウスの MS4A6A インترون／エクソン境界の要約

	配列番号 3 中のヌクレオチド	配列番号 9 中のヌクレオチド
エクソン 1	1-125	1-116
イントロン 1	126-1335	117-1764
エクソン 2	1336-1689	1765-1927
イントロン 2	1690-2925	1928-3112
エクソン 3	2926-3086	3113-3247
イントロン 3	3087-4701	3248-5251
エクソン 4	4702-4836	5352-5408
イントロン 4	4837-6350	5409-8141
エクソン 5	6351-6407	8142-8339
イントロン 5	6408-9057	8340-10015
エクソン 6	9058-9265	10016-10117
イントロン 6	9266-11537	10118-10929
エクソン 7	11538-11639	10930-11845
イントロン 7	11640-12413	
エクソン 8	12414-13060	

10

20

【0043】

配列番号 1 は、ヒト MS4A6A ゲノム遺伝子座に由来する例示的な cDNA 配列である。表 1 中で言及される 8 つのエクソンは、配列番号 1 の以下のヌクレオチド位置：1～125（エクソン 1）、126～478（エクソン 2）、479～640（エクソン 3）、641～775（エクソン 4）、776～832（エクソン 5）、833～1042（エクソン 6）、1043～1144（エクソン 7）、及び 1145～1791（エクソン 8）に対応する。開始コドン（ATG）は配列番号 1 のヌクレオチド 494～496 に対応し、終止コドン（TAA）は配列番号 1 のヌクレオチド 1238～1240 に対応する。オリゴヌクレオチドプライマー hMS4A6A-Fw（5'-GAGGACTCAGCTGGAAACCA-3'；配列番号 13）は配列番号 1 のヌクレオチド 451～470 に対応し、オリゴヌクレオチドプライマー hMS4A6A-Rv（5'-GGCAGACAGAGCACTCAGAA-3'（配列番号 14）は、配列番号 1 のヌクレオチド 585～877 の逆方向の相補物に対応し、それは、ヒト MS4A6A 転写物のサブ配列を増幅する（同じものの中の欠失についてアッセイすることを包含する）ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）において、オリゴヌクレオチドプライマー hMS4A6A-Fw と共に使用され得る。特に米国特許出願公開第 2019/0062756 号の配列番号 23～1006 として開示される重複するアンチセンスオリゴマー配列、及びそれらがどのようにヒト MS4A2 プレ mRNA の配列に関連するかを参照することによって、当業者は、ヒト及びマウスの MS4A6A 遺伝子産物を標的化するアンチセンスオリゴマーの完全なパネルをデザインすることができる。

30

40

【0044】

本明細書において使用される時、MS4A2 遺伝子、MS4A2、及び同種のもは、哺乳動物からの FcεRIβ タンパク質をコードする遺伝子を指す。MS4A2 遺伝子の例としては、GENBANK（登録商標）バイオシーケンスデータベースのアクセッション番号 NM_000139.5（ヒト）及び NM_013516.2（マウス）が挙げられるがこれらに限定されない。同様に、MS4A2 コーディング配列は、FcεRIβ タンパク質の少なくとも一部分をコードする核酸配列を指す。かかる一部分は、タンパク質

50

の断片（例えば全タンパク質のうちの任意の一部分からの10、20、30、40、50、60、70、80、90、若しくは100の連続したアミノ酸セグメント）、エクソン、又はドメイン（例えば膜貫通ドメイン）であり得るか、あるいは、それは、任意のスプライシングバリエーションを含むタンパク質全体を指し得る。本明細書において示されるMS4A2遺伝子又はコーディング配列は、かかる遺伝子又はコーディング配列を有する任意の哺乳動物からのものであり得る。MS4A2遺伝子又はコーディング配列は、ヒト、マウス、イヌ、ネコ、又はウマからのものであり得る。

MS4A2ゲノム遺伝子座は、ヒト染色体11及びマウス染色体19上で見出され得る。ヒト及びマウスのMS4A2ゲノム遺伝子座のヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号6及び12で提示される。

本明細書において使用される時、MS4A2転写物は、MS4A2遺伝子から転写されるRNA分子である。いくつかの実施態様において、本明細書において示されるオリゴマーによって標的化されるMS4A2転写物は、一次転写物又はプレmRNA分子である。本明細書において使用される時、一次mRNA又はプレmRNAは、まだスプライシングを受けていないmRNA転写物である。したがって、成熟mRNA分子は、スプライシングを受けたmRNA分子である。

それぞれ配列番号6及び12で示されるヒト及びマウスのMS4A2ゲノム遺伝子座に関して、これらの遺伝子座についてのイントロンとエクソンの境界が、表2中で提示される。

【0045】

【表2】

表2 ヒト及びマウスのMS4A2イントロン／エクソン境界の要約

	配列番号6中のヌクレオチド	配列番号12中のヌクレオチド
エクソン1	1-158	1-160
イントロン1	159-1028	161-937
エクソン2	1029-1158	938-1037
イントロン2	1159-1672	1038-1542
エクソン3	1673-1807	1543-1677
イントロン3	1808-4126	1678-4046
エクソン4	4127-4185	4047-4103
イントロン4	4186-4736	4104-4710
エクソン5	4737-4895	4711-4866
イントロン5	4896-6300	4867-5205
エクソン6	6301-5399	5206-5304
イントロン6	5400-6894	5305-6148
エクソン7	6895-9804	6149-8200

【0046】

ヒト又はマウスのMS4A2プレmRNAを標的化し得る例示的なアンチセンスオリゴマーは、米国特許出願公開第2019/0062756号（これは、参照することによってその全体が援用される）中で開示される。

本明細書において使用される時、アンチセンスオリゴマーという用語は、核酸分子（mRNA分子等）中の配列へハイブリダイズすることが可能な核酸塩基を含むポリマー分子を指す。核酸塩基という用語は、本明細書において使用される時、ヌクレオシドのヘテロ環塩基部分を指す。概して、核酸塩基は、別のヌクレオシドの塩基へ水素結合することができる、1又はそれ以上の原子、又は原子の基を含有する、任意の基である。「非修飾」又は「天然」の核酸塩基（プリン核酸塩基アデニン（A）及びグアニン（G）、ならびに

ピリミジン核酸塩基チミン（T）、シトシン（C）、及びウラシル（U）等）に加えて、当業者に公知の修飾された核酸塩基又は核酸塩基模倣体も、本開示に適する。「修飾された核酸塩基」という用語は、親核酸塩基に構造で類似する核酸塩基（例えば7-デアザプリン、5-メチルシトシン、G-クランプ、又は三環式フェノキサジン核酸塩基模倣体等）を指す。これらの修飾された核酸塩基の調製のための方法は、当業者に公知である。

当技術分野において公知であるように、ヌクレオシドは、塩基-糖の組み合わせである。ヌクレオシドの塩基部分は、通常はヘテロ環塩基（例えば核酸塩基又は単純に「塩基」）である。かかるヘテロ環塩基の2つの最も一般的なクラスは、プリン及びピリミジンである。ヌクレオチドは、ヌクレオシドの糖部分へ共有結合で連結されたリン酸基を更に含むヌクレオシドである。ペントフラノシル糖を含むヌクレオシドについては、リン酸基は、糖の2'、3'、又は5'ヒドロキシル部分に連結され得る。オリゴヌクレオチドの形成において、リン酸基は、互いに隣接するヌクレオシドを共有結合で連結して、直線状ポリマー化合物を形成する。オリゴヌクレオチド内で、リン酸基は、オリゴヌクレオチドのヌクレオシド間骨格の形成と、一般的には称される。RNA及びDNAの正常なリンケージ又は骨格は、3'から5'へのホスホジエステル結合である。

【0047】

RNA分子が、多くの場合短い半減期を有し、治療剤としてのそれらの使用を問題のあるものとするということは当技術分野において理解されている。したがって、活性を変更するためにオリゴヌクレオチド中の化学修飾を含むことは、多くの場合好ましい。化学修飾は、例えばその標的RNAのためのアンチセンスオリゴマーの親和性の増加、ヌクレアーゼ耐性（例えばRNAse H等のリボヌクレアーゼへの耐性）の増加、及び／又はオリゴマーの薬物動態学（例えば半減期）の変更によって、オリゴマー活性を変更し得る。例えば、オリゴマーが、その標的配列へハイブリダイズする能力を維持するが、それはオリゴマーへ所望される特徴（例えば分解への耐性、半減期の増加など）を付与する基により糖、核酸塩基、及び／又はヌクレオシド間リンケージを置き換えることは可能である。かかる基は、類似体（例えば糖類似体、核酸塩基類似体など）と称され得る。概して、類似体は、糖又は糖-ヌクレオシド間リンケージの組み合わせの代わりに使用され、核酸塩基は、選択された標的へのハイブリダイゼーションのために維持される。糖模倣体の代表的な例としては、シクロヘキセニル又はモルホリノが挙げられるがこれらに限定されない。糖-ヌクレオシド間リンケージの組み合わせについての模倣体の代表的な例としては、ペプチド核酸（PNA）、及び非荷電のアキラルリンケージによって連結されるモルホリノ基が挙げられるがこれらに限定されない。いくつかの実例において、類似体は、核酸塩基の代わりに使用される。代表的な核酸塩基模倣体は当技術分野において周知であり、三環式フェノキサジン類似体及びユニバーサル塩基が挙げられるがこれらに限定されない（Berg et al., 2000、参照することによって本明細書に援用される）。かかる糖、ヌクレオシド、及び核酸塩基模倣体の例は、米国特許第8,765,703号及び同第8,946,183号（それらは、参照することによって本明細書に援用される）中で開示される。糖、ヌクレオシド、及び核酸塩基模倣体の合成の方法、ならびにオリゴヌクレオチドを産生するためのかかる模倣体の使用は、当業者に周知である。

【0048】

オリゴマーという用語は、オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシド、オリゴヌクレオチド類似体、オリゴヌクレオチド模倣体、及びキメラ性のそれらの組み合わせを包含する。かかる分子は、概して当業者に公知である。本明細書において示されるオリゴマーとしては、プライマー、プローブ、アンチセンス化合物、アンチセンスオリゴヌクレオチド、外部ガイド配列（EGS）オリゴヌクレオチド、代替スプライサー、及びsiRNAが挙げられるがこれらに限定されない。それゆえ、これらの化合物は、一本鎖、二本鎖、環状、分岐状、又はヘアピンの形態で導入され得、構造要素（内部又は端部の膨らみ又はループ等）を含有し得る。

【0049】

本明細書において示されるオリゴマーは、mRNA分子のスプライシングを調節するた

10

20

30

40

50

めに、細胞又は個体への投与に好適な任意の長さであり得る。例えば、本明細書において示されるアンチセンスオリゴマーは、約10～約50の核酸塩基（すなわち約10～約50の連結されたヌクレオシド）を含み得る。当業者は、これが10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、又は50の核酸塩基のアンチセンスオリゴマーを具体的に表現することを認識するだろう。いくつかの実施態様において、本明細書において示されるアンチセンスオリゴマーは、10～30の核酸塩基若しくは10～25の核酸塩基を含み得るか、又は当該核酸塩基から成り得る。本明細書において示されるアンチセンスオリゴマーのために適切な長さを決定する方法は、当業者に公知である。

10

【0050】

本明細書において使用される時、「へ標的化される」、「標的化」という用語、及び同種のもは、それが所望される核酸分子（所望されるmRNA分子等）と特異的にハイブリダイズするように、アンチセンスオリゴマーをデザインするプロセスを指す。「ハイブリダイズする」、「ハイブリダイゼーション」、「へハイブリダイズする」という用語、及び同種のもは、技術分野の用語であり、オリゴヌクレオチドの相補鎖中の核酸塩基（例えばmRNA分子中のアンチセンスオリゴマー及び標的配列）の対合を指す。特定のメカニズムに限定されるものではないが、対合の最も一般的なメカニズムは水素結合を含み、それは、相補的なヌクレオシド又はヌクレオチド塩基（核酸塩基）の間の、Watson-Crick水素結合、Hoogsteen水素結合、又は逆Hoogsteen水素結合であり得る。例えば、天然塩基のアデニンは、天然核酸塩基のチミジン及びウラシルに相補的であり、それらは水素結合の形成を介して対合する。同様に、天然塩基のグアニンは、天然塩基のシトシン及び5-メチルシトシンに相補的である。

20

【0051】

本明細書において示される文脈において、「特異的にハイブリダイズする」という語句は、本明細書において記載されるアンチセンスオリゴマーが、MS4A6Aタンパク質又はFcεRIβタンパク質に構造で無関係なタンパク質をコードするmRNAを結合するのではなく、MS4A6Aタンパク質又はFcεRIβタンパク質をコードするmRNA（例えばプレmRNA）を優先的に結合する能力を指す。更に、標的配列を優先的に結合するアンチセンスオリゴマーは、MS4A6Aタンパク質又はFcεRIβタンパク質をコードするmRNA（MS4A6AプレmRNA又はFcεRIβプレmRNA）とハイブリダイズするが、MS4A6Aタンパク質又はFcεRIβタンパク質に構造で無関係なタンパク質をコードするmRNA分子との有意なハイブリダイゼーションを呈しないものである。本明細書において使用される文脈において、有意なハイブリダイゼーションは、例えばアンチセンスオリゴマーが所望される効果を達成する能力を妨害するために十分な高い親和性又はアビディティーで、MS4A6Aタンパク質又はFcεRIβタンパク質に構造で無関係なタンパク質をコードするmRNAへ本明細書において示されるオリゴマーが結合することである。かかる所望される効果の例としては、MS4A6AプレmRNA又はMS4A2プレmRNAのスプライシングの調節、FcεRIタンパク質の表面発現のレベルの低減、及び個体におけるアレルギー症状の低減又は阻害が挙げられるがこれらに限定されない。したがって、アンチセンスオリゴマー中の核酸塩基の線状配列と標的配列中の核酸塩基の線状配列との間に、特異的結合が所望される条件下で（すなわち、インビボのアッセイ又は治療処置の場合の生理的条件下で、及びアッセイがインビトロアッセイで遂行される場合の条件下で）、非標的核酸配列へのアンチセンスオリゴマーの有意な結合を回避するために十分な程度の相補性がある場合に、標的配列について特異的である（特異的にハイブリダイズ可能である、特異的にハイブリダイズするなど）と、アンチセンスオリゴマーが判断されることが、当業者によって理解されるだろう。

30

40

【0052】

本明細書において使用される時、「相補物」、「相補的な」、「相補性」という用語、

50

及び同種のものは、オリゴマー中の核酸塩基と標的配列中の核酸塩基との間の正確な対合についての能力を指す。したがって、オリゴマーのある特定の位置での核酸塩基（例えばアデニン）が、標的核酸中の標的配列中のある特定の位置で核酸塩基（例えばウラシル）と水素結合することが可能ならば、その時、オリゴマーと標的核酸との間で水素結合する位置は、相補的な位置であると判断される。通常、相補物、相補的、相補性という用語、及び同種のものは、第1の核酸分子（例えばオリゴマー）中の連続したヌクレオチドの定義された数と第2の核酸分子（例えばmRNA分子）中の連続したヌクレオチドの類似する数との間の比較の文脈で考察され、単一の塩基と塩基の様式では考察されない。例えば、アンチセンスオリゴマーが25ヌクレオチドの長さであるならば、標的配列とのその相補性は、通常、オリゴマー全体の配列又はその定義された一部分と、mRNA分子中の複数の連続したヌクレオチドとの比較によって決定される。各々の分子中の対応する位置の十分な数が、互いと水素結合し得る核酸塩基によって占められる場合に、オリゴマー及び標的配列は互いに対して相補的である。位置を占める塩基が、塩基が相補的であるならば水素結合を形成するように空間的にアレンジされる場合に、当該位置は対応する。一例として、標的配列中の同様のサイズの配列とオリゴマーの配列を比較する場合に、オリゴマー中の第1のヌクレオチドは、選ばれたヌクレオチドと標的配列の開始のところで比較される。次いで、オリゴマー中の第2のヌクレオチド（第1のヌクレオチドに対して3'）は、ヌクレオチドと、選ばれた開始ヌクレオチドに対して3'で直接比較される。次いでこのプロセスは、オリゴマーの長さに沿って各々のヌクレオチドにより継続される。したがって、「特異的にハイブリダイズ可能な」及び「相補的な」という用語は、安定的且つ特異的な結合がアンチセンス化合物と標的核酸との間で起こるような、連続した核酸塩基の十分な数にわたる十分な程度の正確な対合又は相補性を示すために使用される用語である。

10

20

30

40

50

【0053】

第1の核酸分子が第2の核酸分子と特異的にハイブリダイズするハイブリダイゼーション条件は、一般的には、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件と当該技術分野において称される。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件が、配列依存性であり、異なる状況において異なり得ることは、当業者によって理解される。したがって、本明細書において示されるオリゴマーが標的配列へ特異的にハイブリダイズするストリンジェントな条件は、オリゴマー配列と標的配列の相補性、及びそれらが調査されているアッセイの性質によって決定される。当業者は、所与のアッセイ又は所与の使用のための特定の標的配列へ特異的にハイブリダイズする相補的な配列をデザインすることが可能である。

核酸分子へ標的化されたアンチセンスオリゴマーをデザインするプロセスは、通常標的核酸（その発現は調節される予定である）の同定及び標的核酸分子の配列の決定により開始する。本明細書において使用される時、「標的核酸」、「MS4A6Aタンパク質又はFcεRIβタンパク質をコードする核酸」という用語、及び同種のものは、例えばMS4A6Aタンパク質又はFcεRIβタンパク質をコードするDNA、かかるDNAから転写されたRNA（プレmRNA及びmRNAを包含する）、及びかかるRNAに由来するcDNAを網羅する。例えば、標的核酸は細胞の遺伝子（又はプレmRNA又はそれから転写されたmRNA）であり得、その発現は特定の障害又は疾患状態に付随する。したがって、いくつかの実施態様において、有益な標的核酸は、MS4A6Aタンパク質又はFcεRIβタンパク質をコードする。いくつかの実施態様において、標的核酸は、MS4A6A転写物又はMS4A2転写物である。いくつかの実施態様において、標的核酸は、MS4A6AプレmRNA又はMS4A2プレmRNAである。

【0054】

一旦標的核酸が同定されたならば、標的化プロセスは、アンチセンス相互作用が起こる少なくとも1つの標的領域を決定し、それによって標的核酸のスプライシングを調節することを含む。本明細書において使用される時、標的領域は、少なくとも1つの同定可能な構造、機能、又は特徴を有する標的核酸の一部として定義される。例示的な標的領域は

、プレmRNA分子のスプライシングに関与する配列を含むものである。かかる同定可能な構造、機能、又は特徴の例としては、イントロン若しくはエクソン、イントロン／エクソンジャンクション、スプライスドナー部位、スプライスアクセプター部位、スプライス分岐点、又はスプライスエンハンサー部位の少なくとも一部分が挙げられるがこれらに限定されない。したがって、いくつかの実施態様において、標的領域は、イントロン若しくはエクソン、スプライスドナー部位、スプライスアクセプター部位、スプライス分岐点、及び／又はスプライスエンハンサー部位の少なくとも一部分を含む。いくつかの実施態様において、標的領域は、イントロン若しくはエクソン、スプライスドナー部位、スプライスアクセプター部位、スプライス分岐点、及び／又はスプライスエンハンサー部位でのものを含む。

10

【0055】

標的領域の同定に続いて、次いで標的領域内の標的配列が同定され得る。本明細書において使用される時、標的配列は、本明細書において示されるアンチセンスオリゴマーが特異的にハイブリダイズする標的領域中の核酸配列である。例示的な標的配列は、プレmRNAのスプライシングに関与するものである。一旦標的配列が同定されたならば、アンチセンスオリゴマーが標的核酸へ特異的にハイブリダイズするように、標的配列へ十分に相補的な核酸塩基配列を含んで、アンチセンスオリゴマーはデザインされる。より具体的には、アンチセンスオリゴマーが標的核酸へ特異的にハイブリダイズするように、当該アンチセンスオリゴマーが標的配列へ十分に相補的な連続したヌクレオチドの領域を含有して、アンチセンスオリゴマーのヌクレオチド配列はデザインされる。オリゴマー中の連続して相補的なヌクレオチドのかかる領域は、「アンチセンス配列」又は「標的化配列」と称され得る。

20

【0056】

2つの核酸配列の間の相補性の程度が大きいほど、ハイブリダイゼーション相互作用はより強くより特異的であることが、当技術分野において周知である。最も強く最も特異的なハイブリダイゼーションが、完全に相補的な2つの核酸分子の間に起こることも良く理解されている。本明細書において使用される時、完全に相補的という用語は、核酸配列中の各々の核酸塩基が、第2の核酸分子中の対応する位置における核酸塩基と水素結合が可能な状況を指す。いくつかの実施態様において、標的化配列は、標的配列に完全に相補的である。いくつかの実施態様において、標的化配列は、標的配列中の少なくとも6の連続した核酸塩基領域に完全に相補的な少なくとも6の連続した核酸塩基領域を含む。いくつかの実施態様において、標的化配列は、標的配列中の少なくとも8の連続した核酸塩基配列に完全に相補的な少なくとも8の連続した核酸塩基配列を含む。いくつかの実施態様において、標的化配列は、標的配列中の少なくとも10の連続した核酸塩基配列に完全に相補的な少なくとも10の連続した核酸塩基配列を含む。いくつかの実施態様において、標的化配列は、標的配列中の少なくとも12の連続した核酸塩基配列に完全に相補的な少なくとも12の連続した核酸塩基配列を含む。いくつかの実施態様において、標的化配列は、標的配列中の少なくとも14の連続した核酸塩基配列に完全に相補的な少なくとも14の連続した核酸塩基配列を含む。いくつかの実施態様において、標的化配列は、標的配列中の少なくとも16の連続した核酸塩基配列に完全に相補的な少なくとも16の連続した核酸塩基配列を含む。いくつかの実施態様において、標的化配列は、標的配列中の少なくとも18の連続した核酸塩基配列に完全に相補的な少なくとも18の連続した核酸塩基配列を含む。いくつかの実施態様において、標的化配列は、標的配列中の少なくとも20の連続した核酸塩基配列に完全に相補的な少なくとも20の連続した核酸塩基配列を含む。

30

40

【0057】

標的化配列が、本明細書において示されるアンチセンスオリゴマーの全体を構成し得ること、又は本明細書において示されるアンチセンスオリゴマーの単に一部分を構成し得ることは、当業者によって理解されるだろう。例えば、30のヌクレオチドから成るオリゴマーにおいて、すべての30ヌクレオチドは、30の連続したヌクレオチド標的配列に相補的であり得る。代替的に、例えば、オリゴマー中の20の連続したヌクレオチドのみが

50

、20の連続したヌクレオチド標的配列に相補的であり得、オリゴマー中の残りの10ヌクレオチドは、標的配列の外側のヌクレオチドに一致しない。いくつかの実施態様において、本明細書において示されるオリゴマーは、長さで少なくとも10の核酸塩基、少なくとも11の核酸塩基、少なくとも12の核酸塩基、少なくとも13の核酸塩基、少なくとも14の核酸塩基、少なくとも15の核酸塩基、少なくとも16の核酸塩基、少なくとも17の核酸塩基、少なくとも18の核酸塩基、少なくとも19の核酸塩基、少なくとも20の核酸塩基、少なくとも21の核酸塩基、少なくとも22の核酸塩基、少なくとも23の核酸塩基、少なくとも24の核酸塩基、少なくとも25の核酸塩基、少なくとも26の核酸塩基、少なくとも27の核酸塩基、少なくとも28の核酸塩基、少なくとも29の核酸塩基、若しくは少なくとも30の核酸塩基、少なくとも35の核酸塩基、少なくとも40の核酸塩基、少なくとも45の核酸塩基、又は少なくとも50の核酸塩基以上の標的化配列を有する。

10

【0058】

オリゴマーの活性（例えばスプライシングの調節）を消失させること無しに、標的化配列と標的配列との間にミスマッチを組入れることが可能であることが、当業者によって理解されるだろう。更に、アンチセンスオリゴマーが標的化された核酸分子へ特異的にハイブリダイズすることが可能な限り、かかるミスマッチは、標的化配列と標的配列との間のアンチセンス相互作用内のどこでも起き得る。したがって、アンチセンスオリゴマーが標的配列へ特異的にハイブリダイズする限り、本明細書において示されるアンチセンスオリゴマーは、約20%までのミスマッチのヌクレオチドを含み、それによって標的配列へのアンチセンスオリゴマーの塩基対合を破壊する。いくつかの実施態様において、アンチセンスオリゴマーは、20%以下、約15%以下、約10%以下、約5%以下、又は約3%以下のミスマッチを含む。いくつかの実施態様において、対合に関与するアンチセンスオリゴマー中のヌクレオチドと相補的な標的配列との間でミスマッチはない。いくつかの実施態様において、ミスマッチは、連続した位置で起こらない。例えば3つのミスマッチ位置を含有するアンチセンスオリゴマー中で、いくつかの実施態様において、ミスマッチの位置は、標的配列中のヌクレオチドと相補的な連続したヌクレオチドのラン（例えば3、4、5など）によって分離される。

20

【0059】

パーセント同一性の使用は、2つの核酸配列の間のミスマッチの数を定義する一般的な手法である。例えば、同じ核酸塩基対合能力を有する2つの配列が、100%同一であると判断されるだろう。更に、ウラシル及びチミジンの両方がアデニンと結合するであろうことを理解されたい。したがって、たとえ1つが位置xでウラシルを有し、他のものが対応する位置xでチミジンを有したとしても、他の点では配列で同一の2つの分子は、同一であると判断されるだろう。パーセント同一性は、オリゴマー化合物の全体の長さ又は単にオリゴマーの一部にわたって計算され得る。例えば、標的配列に対する標的化配列のパーセント同一性を計算して、標的配列を含む核酸分子へ結合する標的化配列を含むオリゴマーの能力を決定することができる。いくつかの実施態様において、標的化配列は、標的核酸分子中の標的配列へ、その全体の長さにはわたって少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも97%同一、少なくとも98%同一、又は少なくとも99%同一である。いくつかの実施態様において、標的化配列は、標的核酸分子中の標的配列に、その全体の長さにはわたって同一である。

30

40

【0060】

アンチセンスオリゴマーが、本明細書において記載されるアンチセンスオリゴマーと同様に機能するために、本明細書において開示されるオリゴマー配列に同一である必要がないことは、当業者によって理解される。本明細書において教示されたアンチセンスオリゴマーの短くされたバージョン、又は本明細書において教示されたアンチセンスオリゴマーの同一でないバージョンは、本明細書において示される範囲内に入る。同一でないバージョンは、各々の塩基が、本明細書において開示されるアンチセンスオリゴマーと100%の同一性を有していないものである。代替的に、同一でないバージョンは、異なる対合活

50

性を備えた異なる塩基と置き換えられた少なくとも1つの塩基（例えばGは、C、A、又はTによって置き換えられ得る）を含み得る。パーセント同一性は、それが比較されているオリゴマーへ対応する同一の塩基対合がある塩基の数に従って計算される。同一でない塩基は、互いに隣接し得るか、オリゴマーの全体にわたって分散し得るか、又は両方であり得る。例えば、20merの核酸塩基の2～17と同じ配列を有する16merは、20merに80%同一である。代替的に、20merに同一でない4つの核酸塩基を含有する20merも、20merに80%同一である。18merの核酸塩基の1～14と同じ配列を有する14merは、18merに78%同一である。かかる計算は、当業者の能力内で適切である。したがって、本明細書において示されるアンチセンスオリゴマーは、アンチセンスオリゴマーが所望されるmRNA分子のスプライシングを調節することが可能な限り、本明細書において開示される配列に少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、又は少なくとも98%同一のオリゴヌクレオチド配列を含む。

10

20

30

40

50

【0061】

本明細書において示されるアンチセンスオリゴマーは、mRNA分子のスプライシングを調節することが可能である。本明細書において使用される時、スプライシングの「調節」は、もたらされたスプライスされたmRNA分子が、エクソンスkip（又はエクソン組入れ）の結果としてのエクソンの所望される組み合わせ、1つ若しくは複数のエクソン中の欠失、又はスプライスされたmRNA中の通常は見出されない追加の配列（例えばイントロン性配列）を含有するように、アンチセンスオリゴマーがプレmRNA転写物のプロセッシングに影響する能力を指す。例えば、スプライシングの調節は、スプライスされたmRNA（成熟mRNA）が1つのエクソンの少なくとも一部分又は全体を欠くように、MS4A6AプレmRNA及び／又はMS4A2プレmRNAのスプライシングに影響することを指し得る。いくつかの実施態様において、スプライスされたmRNAは、エクソン3の少なくとも一部分を欠く。

【0062】

FcεRIβタンパク質の短縮アイソフォーム（t-FcεRIβ）は、細胞中に存在し、かかる短縮は、FcεRIβタンパク質をコードするmRNAのエクソン3中の短縮に起因することが、以前に考察された。かかる短縮mRNA分子の数又は「レベル」は、全長エクソン3を含むMS4A2 mRNA分子のレベルよりもはるかに少ないことが示されている。したがって、本開示を記載する目的のために、短縮FcεRIβタンパク質をコードする短縮mRNAを産生するための、アンチセンスオリゴマーの影響に起因するMS4A2プレmRNAのスプライシングは、オルタナティブスプライシングと称され得る。更に、アンチセンスオリゴマーの影響に起因するエクソン3の少なくとも一部分又は全体を欠くMS4A2 mRNAの転写物は、オルタナティブスプライシングの産物である。したがって、本明細書において示される文脈において、スプライシングの調節は、MS4A2プレmRNA分子のオルタナティブスプライシングを誘導し、それによってエクソン3の全体を含有するmRNA分子のレベルを低減し、エクソン3の少なくとも一部分を欠くmRNA分子のレベルを増加させることを指し得る。

それゆえ、本明細書において示されるいくつかの実施態様は、10～50の連結されたヌクレオチドを含むアンチセンスオリゴマーに関し、当該オリゴマーは、MS4A6タンパク質又はFcεRIβタンパク質をコードするRNA分子の領域へ標的化される。いくつかの実施態様において、RNA分子へのオリゴマーのハイブリダイゼーションは、RNA分子のスプライシングを調節する。

【0063】

本明細書において示されるいくつかの実施態様は、MS4A6A mRNA分子及び／又はMS4A2 mRNA分子の標的領域中の標的配列に十分に相補的な核酸配列を含むアンチセンスオリゴマーであって、標的配列へ特異的にハイブリダイズし、それによってMS4A6A mRNAの転写物及び／又はMS4A2 mRNAの転写物のスプライシングを調節するアンチセンスオリゴマーに関する、

これらのアンチセンスオリゴマーは、10～50の連結されたヌクレオシドから成り得る。これらのアンチセンスオリゴマーは、15～35の連結されたヌクレオチドを含み得る。これらのアンチセンスオリゴマーは、15～35の連結されたヌクレオチドから成り得る。これらのアンチセンスオリゴマーは、10の連結されたヌクレオシド、11の連結されたヌクレオシド、12の連結されたヌクレオシド、13の連結されたヌクレオシド、14の連結されたヌクレオシド、15の連結されたヌクレオシド、16の連結されたヌクレオシド、17の連結されたヌクレオシド、18の連結されたヌクレオシド、19の連結されたヌクレオシド、20の連結されたヌクレオシド、21の連結されたヌクレオシド、22の連結されたヌクレオシド、23の連結されたヌクレオシド、24の連結されたヌクレオシド、25の連結されたヌクレオシド、26の連結されたヌクレオシド、27の連結されたヌクレオシド、28の連結されたヌクレオシド、29の連結されたヌクレオシド、30の連結されたヌクレオシド、31の連結されたヌクレオシド、32の連結されたヌクレオシド、33の連結されたヌクレオシド、34の連結されたヌクレオシド、34の連結されたヌクレオシド、36の連結されたヌクレオシド、37の連結されたヌクレオシド、38の連結されたヌクレオシド、39の連結されたヌクレオシド、40の連結されたヌクレオシド、41の連結されたヌクレオシド、42の連結されたヌクレオシド、43の連結されたヌクレオシド、44の連結されたヌクレオシド、45の連結されたヌクレオシド、46の連結されたヌクレオシド、47の連結されたヌクレオシド、48の連結されたヌクレオシド、49の連結されたヌクレオシド、又は50の連結されたヌクレオシドを含み得るか、又は当該ヌクレオシドから成り得る

10

20

【0064】

mRNA分子は、MS4A6Aタンパク質又はFcεRIβタンパク質を産生する任意の哺乳動物からのMS4A6Aタンパク質又はFcεRIβタンパク質をコードし得る。かかる哺乳動物の例としては、ヒト、マウス、イヌ、ネコ、及びウマが挙げられるがこれらに限定されない。いくつかの実施態様において、mRNAは、配列番号1、4、7、及び10のうちの任意の1つに少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%、又は100%同一のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施態様において、mRNAは、配列番号2、5、8、及び11のうちの任意の1つに少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする。いくつかの実施態様において、mRNAは、配列番号2又は配列番号5を含むタンパク質をコードする。

30

【0065】

RNA分子は、MS4A6A mRNA転写物又はMS4A2転写物であり得る。いくつかの実施態様において、RNA分子は、MS4A6A mRNA分子である。いくつかの実施態様において、RNA分子は、MS4A2 mRNA分子である。いくつかの実施態様において、RNA分子は、MS4A6AプレmRNAである。いくつかの実施態様において、RNA分子は、MS4A2プレmRNAである。

40

アンチセンスオリゴマーによって標的化された標的領域は、RNA分子のスプライシングに機能的に関与するRNA分子の任意の領域であり得る。「機能的にスプライシングに関与する」によって、標的領域中の配列が、細胞のスプライシング装置（例えばスプライセオソーム又はその構成要素）によって利用されて、mRNA分子のスプライシングを達成することが意味される。かかる領域の例としてはイントロン配列を含む領域、エクソン配列を含む領域、イントロン／エクソンジャンクションを含む領域、スプライスドナー部位配列を含む領域、スプライスアクセプター部位配列を含む領域、スプライスエンハンサー部位配列を含む領域、分岐点配列を含む領域、及びポリピリミジントラクトを含む領域が挙げられるがこれらに限定されない。かかる配列は、当業者に公知である。かかる配列は、本明細書において開示もされる。

【0066】

したがっていくつかの実施態様において、標的領域は、エクソン配列、イントロン配列

50

、エクソン／イントロンジャンクションを含む配列、スプライスドナー部位配列、スプライスアクセプター部位配列、スプライスエンハンサー部位配列、分岐点配列、及びポリピリミジントラクトから成る群から選択される配列の少なくとも一部分を含む。本明細書において示される文脈において、「少なくとも一部分」は、長さで、少なくとも5ヌクレオシド、少なくとも6ヌクレオシド、少なくとも7ヌクレオシド、少なくとも8ヌクレオシド、少なくとも9ヌクレオシド、少なくとも10ヌクレオシド、少なくとも11ヌクレオシド、少なくとも12ヌクレオシド、少なくとも13ヌクレオシド、少なくとも14ヌクレオシド、少なくとも15ヌクレオシド、少なくとも16ヌクレオシド、少なくとも17ヌクレオシド、少なくとも18ヌクレオシド、少なくとも19ヌクレオシド、又は少なくとも20ヌクレオシドを指す。いくつかの実施態様において、少なくとも一部分は、公知の10
スプライスドナー部位配列、スプライスアクセプター部位配列、スプライスエンハンサー部位配列、分岐点配列、又はポリピリミジン配列の少なくとも10%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも90%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも97%を含む。スプライスドナー部位配列、スプライスアクセプター部位配列、スプライスエンハンサー部位配列、分岐点配列、又はポリピリミジン配列は、MS4A6AプレmRNA又はMS4A2プレmRNAからのものであり得る。

【0067】

いくつかの実施態様において、標的領域は、本明細書において示されるMS4A6A配列又はMS4A2配列の少なくとも一部分を含み、それらは、配列番号1、3、4、6、7、9、10、及び12のうちの任意の1つであり得、いくつかの実施態様において、配列番号3、配列番号6、配列番号9、又は配列番号12の一部分を含む。いくつかの実施態様において、少なくとも一部分は、本明細書において示されるMS4A6A配列又はMS4A2配列の少なくとも10%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも97%を含む。いくつかの実施態様において、少なくとも一部分は、本明細書において示されるMS4A6A配列又はMS4A2配列の一部分に少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも97%同一のポリヌクレオチド配列を含む。

いくつかの実施態様において、標的領域は、配列番号3、6、9、及び12から成る群から選択される配列の少なくとも一部分に少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%、又は100%同一のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施態様において、標的領域は、配列番号3、6、9、及び12から成る群から選択される配列の少なくとも一部分を含む。

【0068】

いくつかの実施態様において、アンチセンスオリゴマーは、MS4A6AプレmRNA又はMS4A2プレmRNAのスプライシングに関与する領域又は配列へ標的化される。いくつかの実施態様において、アンチセンスオリゴマーは、MS4A6A若しくはMS4A2のイントロン配列、MS4A6A若しくはMS4A2のエクソン配列、MS4A6A若しくはMS4A2のスプライスドナー部位配列、MS4A6A若しくはMS4A2のスプライスアクセプター部位配列、MS4A6A若しくはMS4A2のスプライスエンハンサー部位配列、MS4A6A若しくはMS4A2の分岐点配列、又はMS4A6A若しくはMS4A2のポリピリミジントラクトへ標的化される。いくつかの実施態様において、アンチセンスオリゴマーは、MS4A6AプレmRNAのエクソン4又はMS4A2プレmRNAのエクソン3へ標的化されている。いくつかの実施態様において、アンチセンスオリゴマーは、MS4A6Aエクソン4スプライスドナー配列若しくはMS4A2エクソン3スプライスドナー配列、MS4A6Aエクソン4若しくはMS4A2エクソン3スプライスアクセプター配列、又はMS4A6Aエクソン4若しくはMS4A2エクソン3スプライスエンハンサー配列へ標的化される。

【0069】

いくつかの実施態様において、アンチセンスオリゴマーは、MS4A6A mRNA又

10

20

30

40

50

はMS4A2 mRNAからの、スプライスドナー部位配列、スプライスアクセプター部位配列、スプライスエンハンサー部位配列、分岐点配列、又はポリピリミジン配列の少なくとも一部分に完全に相補的な配列に少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、又は少なくとも99%同一の標的化配列を含む。いくつかの実施態様において、アンチセンスオリゴマーは、MS4A6A mRNA又はMS4A2 mRNAからの、スプライスドナー部位配列、スプライスアクセプター部位配列、スプライスエンハンサー部位配列、分岐点配列、又はポリピリミジン配列の少なくとも一部分に完全に相補的な標的化配列を含む。いくつかの実施態様において、アンチセンスオリゴマーは、配列番号3、6、9、及び12から成る群から選択される配列の少なくとも一部分に完全に相補的な配列に少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%、又は100%同一の標的化配列を含む。いくつかの実施態様において、アンチセンスオリゴマーは、配列番号3、6、9、及び12から成る群から選択される配列の少なくとも一部分に完全に相補的な配列に少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%、又は100%同一の標的化配列を含む。一部分は、いくつかの実施態様において、少なくとも10ヌクレオチドの長さである。アンチセンスオリゴマーは、MS4A6AプレmRNA分子又はMS4A2プレmRNA分子のスプライシングを調節し得る。

10

【0070】

いくつかの実施態様において、標的領域は、MS4A6A又はMS4A2のスプライスドナー部位配列、MS4A6A又はMS4A2のスプライスアクセプター部位配列、MS4A6A又はMS4A2のスプライスエンハンサー部位配列、MS4A6A又はMS4A2の分岐点配列、及びMS4A6A又はMS4A2のポリピリミジン配列から選択される配列の少なくとも一部分を含む。いくつかの実施態様において、少なくとも一部分は、MS4A6A若しくはMS4A2のスプライスドナー部位配列、MS4A6A若しくはMS4A2のスプライスアクセプター部位配列、MS4A6A若しくはMS4A2のスプライスエンハンサー部位配列、MS4A6A若しくはMS4A2の分岐点配列、又はMS4A6A若しくはMS4A2のポリピリミジン配列のうちの少なくとも10%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも90%、又は少なくとも90%を含む。MS4A6A若しくはMS4A2のスプライスドナー部位配列、MS4A6A若しくはMS4A2のスプライスアクセプター部位配列、MS4A6A若しくはMS4A2のスプライスエンハンサー部位配列、MS4A6A若しくはMS4A2の分岐点配列、又はMS4A6A若しくはMS4A2のポリピリミジン配列は、MS4A6AプレmRNA又はMS4A2プレmRNAのエクソン3又はエクソン4からであり得る。一部分は、少なくとも10ヌクレオチドの長さであり得る。アンチセンスオリゴマーは、MS4A6AプレmRNA分子又はMS4A2プレmRNA分子のスプライシングを調節し得る。

20

30

【0071】

いくつかの実施態様において、アンチセンスオリゴマー（すなわち「標的化配列」）によって含まれる相補的な核酸配列は、MS4A6A mRNA又はMS4A2 mRNAからの、スプライスドナー部位配列、スプライスアクセプター部位配列、スプライスエンハンサー部位配列、分岐点配列、又はポリピリミジン配列の少なくとも一部分に完全に相補的な配列に少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、又は少なくとも99%同一である。いくつかの実施態様において、アンチセンスオリゴマーによって含まれる相補的な核酸配列は、配列番号3、6、9、又は12から成る群から選択される配列の一部分に完全に相補的な配列に少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%、又は100%同一の配列を含む。一部分は、いくつかの実施態様において、少なくとも10ヌクレオチドの長さであり得る。アンチセンスオリゴマーは、いくつかの実施態様において、MS4A6AプレmRNA分子又はMS4A2プレmRNA分子のスプライシングを調節し得る。

40

ここでゲノム配列を参照して、いくつかの実施態様において、標的領域は、MS4A6A又はMS4A2のスプライスドナー部位配列、MS4A6A又はMS4A2のスプライ

50

スアクセプター部位配列、MS4A6A又はMS4A2のスプライスエンハンサー部位配列、MS4A6A又はMS4A2の分岐点配列、及びMS4A6A又はMS4A2のポリピリミジン配列から選択される配列の少なくとも一部分を含み、その各々は、配列番号3（例えばヒトMS4A6Aゲノム遺伝子座の例示的なヌクレオチド配列）、配列番号6（例えばヒトMS4A2ゲノム遺伝子座の例示的なヌクレオチド配列）、配列番号9（例えばマウスMS4A6Aゲノム遺伝子座の例示的なヌクレオチド配列）、又は配列番号12（例えばマウスMS4A2ゲノム遺伝子座の例示的なヌクレオチド配列）のサブ配列である。いくつかの実施態様において、標的領域は、イントロン／エクソン境界の各々の側でヌクレオチドを含み、いくつかの実施態様において、イントロン／エクソン境界の5'に少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、若しくはそれ以上のヌクレオチド、イントロン／エクソン境界の3'に少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、若しくはそれ以上のヌクレオチド、又は任意の組み合わせでイントロン／エクソン境界の5'及び3'に少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、若しくはそれ以上のヌクレオチドを含む。ヒト及びマウスのMS4A6A及びMS4A2の遺伝学的遺伝子座のためのイントロン／エクソン境界は、それぞれ表1及び2中で示される。

10

【0072】

本明細書において示される本発明のいくつかの実施態様は、本明細書において示されるアンチセンスオリゴマーを発現する発現ベクターに関する。本明細書において使用される時、「発現ベクター」は、ポリメラーゼによるポリヌクレオチド配列の転写が本明細書において示されるアンチセンスオリゴマーの産生をもたらすように、プロモーターへ機能的に連結されたポリヌクレオチド配列を含む核酸分子である。例示的な発現ベクターは、ポリヌクレオチドが挿入され得るか又はクローニングされ得る、例えばプラスミド、バクテリオファージ、酵母、又はウイルス（例えばアデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルス、レトロウイルスなど）に由来するポリヌクレオチド分子、いくつかの実施態様においてDNA分子を含む。好適な発現ベクターは、当業者に公知である。

20

本明細書において示される本発明のいくつかの実施態様は、本明細書において示されるアンチセンスオリゴマー又は発現ベクターを含む医薬組成物に関する。かかる組成物は、本明細書において記載されるアンチセンスオリゴマー又は発現ベクターの治療的送達に好適である。したがって、本開示は、1又はそれ以上の薬学的に許容される担体（添加物）及び／又は希釈物質と一緒に製剤化された、治療有効量の本明細書において記載されるアンチセンスオリゴマー又は発現ベクターの1つ又は複数を含む医薬組成物を提供する。いくつかの実施態様において、本明細書において示されるアンチセンスオリゴマー及び／又は発現ベクターが単独で投与されることは可能であるが、いくつかの実施態様において、本発明の化合物は医薬組成物として投与される。

30

【0073】

本明細書において示される医薬組成物は、固体又は液体の形態での投与のために特に製剤化され得、以下の：（1）経口投与、例えば飲薬（水溶液若しくは非水溶液又は懸濁物）、錠剤（例えば頬側、舌下、及び全身的な吸収のために標的化されたもの）、ボーラス、粉末、顆粒、舌へ適用のためのペースト；（2）非経口投与、例えば皮下、筋肉内、静脈内、硬膜外の注射による、例えば滅菌溶液若しくは懸濁物又は持続放出製剤；（3）局所適用、例えば皮膚へ適用されるクリーム、軟膏、又は制御放出パッチ若しくは噴霧；（4）腔内に又は直腸内、例えばベッサリー、クリーム、又は泡；（5）舌下；（6）眼；（7）経皮；（8）肺の中への吸入、例えばネブライザー又はエアロゾル吸入器によるもの；あるいは（9）経鼻に適合したものが挙げられる。好適な担体、添加物、及び希釈物質の例は、米国特許出願公開第2015／0361428号（それは、参照することによってその全体が本明細書に援用される）中で記載される。

40

【0074】

上で記載されてきたように、本明細書において示されるアンチセンスオリゴマーは、F

50

c R I (M S 4 A 2 遺伝子の産物) の細胞表面発現を低減し得る。かかる低減は、M S 4 A 6 A タンパク質及び／又は F c ε R I β タンパク質をコードする m R N A 分子のスプライシングの調節によって達成される。より具体的には、本明細書において示されるアンチセンスオリゴマーは、それぞれエクソン 4 又はエクソン 3 を含む M S 4 A 6 A 及び／又は F c ε R I β をコードする m R N A 分子の産生を減少させ、それぞれエクソン 4 又はエクソン 3 を欠く M S 4 A 6 A 及び／又は F c ε R I β をコードする m R N A 分子の産生を増加させる。これらの後者の M S 4 A 6 A 及び／又は F c ε R I β をコードする m R N A 分子はそれぞれエクソン 4 又はエクソン 3 を欠くので、コードされた M S 4 A 6 A タンパク質及び／又は F c ε R I β タンパク質は、細胞膜への F c ε R I 複合体のトラフィッキングのために要求される第 1 の膜貫通ドメインを欠く。

10

したがって、本明細書において示される本発明のいくつかの実施態様は、細胞中の M S 4 A 6 A m R N A 及び／又は F c ε R I β m R N A のスプライシングを調節する方法であって、細胞を本明細書において示される 1 又はそれ以上のアンチセンスオリゴマーと接触させることを含む方法に関する。細胞は、M S 4 A 6 A m R N A 分子及び／又は F c ε R I β m R N A 分子を発現する任意の細胞であり得る。したがって、細胞は、培養中の細胞又は個体の身体中の細胞であり得る。いくつかの実施態様において、細胞は、表皮ランゲルハンス細胞、好酸球、肥満細胞、又は好塩基球である。特定の実施態様において、細胞は、肥満細胞である。

【0075】

m R N A は、配列番号 1 及び 7 (M S 4 A 6 A) 又は配列番号 4 及び 10 (M S 4 A 2) のうちの 1 つに少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 %、少なくとも 99 %、又は 100 % 同一のヌクレオチド配列を含み得る。いくつかの実施態様において、m R N A は、配列番号 2 及び 8 (M S 4 A 6 A) 又は配列番号 5 及び 11 (M S 4 A 2) のうちの 1 つに少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 %、又は少なくとも 99 % 同一のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする。いくつかの実施態様において、m R N A は配列番号 2、5、8、又は 11 を含むタンパク質をコードする。

20

いくつかの実施態様において、アンチセンスオリゴマーは、M S 4 A 6 A プレ m R N A 及び／又は M S 4 A 2 プレ m R N A のスプライシングに関与する標的領域へハイブリダイズする。いくつかの実施態様において、アンチセンスオリゴマーは、M S 4 A 6 A 及び／又は M S 4 A 2 のスプライスドナー部位配列、M S 4 A 6 A 及び／又は M S 4 A 2 のスプライスアクセプター部位配列、M S 4 A 6 A 及び／又は M S 4 A 2 のスプライスエンハンサー部位配列、M S 4 A 6 A 及び／又は M S 4 A 2 の分岐点配列、ならびに M S 4 A 6 A 及び／又は M S 4 A 2 のポリピリミジン配列から成る群から選択される配列の少なくとも一部分を含む m R N A 中の標的領域へハイブリダイズする。M S 4 A 6 A 及び／又は M S 4 A 2 のスプライスドナー部位配列、M S 4 A 6 A 及び／又は M S 4 A 2 のスプライスアクセプター部位配列、M S 4 A 6 A 及び／又は M S 4 A 2 のスプライスエンハンサー部位配列、M S 4 A 6 A 及び／又は M S 4 A 2 の分岐点配列、あるいは M S 4 A 6 A 及び／又は M S 4 A 2 のポリピリミジン配列は、M S 4 A 6 A のエクソン 4 及び／又は M S 4 A 2 プレ m R N A のエクソン 3 からのものであり得る。

30

40

【0076】

本明細書において示されるアンチセンスオリゴマーによる M S 4 A 6 A プレ m R N A 及び／又は F c ε R I β プレ m R N A のスプライシングの調節は、M S 4 A 6 A タンパク質及び／又は F c ε R I β タンパク質の短縮形態を産生する、短縮 m R N A (t - M S 4 A 6 A m R N A 及び／又は t - F c ε R I β m R N A) の産生をもたらし得る。t - M S 4 A 6 A 及び t - F c ε R I β m R N A は、それらがそれぞれエクソン 4 又はエクソン 3 中で短縮され、それによって第 1 及び第 2 の膜貫通領域を欠く M S 4 A 6 A タンパク質及び F c ε R I β タンパク質を産生する点で、完全な長さの M S 4 A 6 A m R N A 及び F c ε R I β m R N A (それぞれ F L - M S 4 A 6 A m R N A 及び F L - F c ε R I β m R N A) とは異なる。通常は、肥満細胞中の F L - M S 4 A 6 A m R N A 及び

50

FL-FcεRIβ mRNAの量は、t-MS4A6A mRNA及びt-FcεRIβ mRNAの量より多い。したがって、本明細書において示される本発明のいくつかの実施態様は、肥満細胞中のt-MS4A6A mRNA及び／又はt-FcεRIβ mRNAに対するFL-MS4A6A mRNA及び／又はFL-FcεRIβ mRNAの比を変更する方法であって、肥満細胞を、本明細書において示される1又はそれ以上のアンチセンスオリゴマーと接触させることを含む方法に関する。肥満細胞の本明細書において示される1又はそれ以上のアンチセンスオリゴマーとの接触は、FL-MS4A6A mRNA及び／又はFL-FcεRIβ mRNAの量の減少ならびにt-MS4A6A mRNA及び／又はt-FcεRIβ mRNAの量の増加を引き起こし得る。本明細書において示されるアンチセンスオリゴマーと肥満細胞の接触は、FL-MS4A6A mRNA／t-MS4A6A mRNA比及び／又はFL-FcεRIβ mRNA／t-FcεRIβ mRNA比の減少をもたらし得る。いくつかの実施態様において、細胞によって産生されるFL-MS4A6A mRNA及び／又はFL-FcεRIβ mRNAの量は、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、又は少なくとも99%まで減少する。

10

【0077】

本発明は、いくつかの実施態様において細胞のFcεRIタンパク質の細胞表面発現を低減する方法であって、細胞を本明細書において示される1又はそれ以上のアンチセンスオリゴマーと接触させることを含む方法にも関する。本明細書において示される実施態様において、細胞は、その表面上でFcεRIタンパク質を発現する任意の細胞であり得る。したがって、細胞は、培養（例えば組織培養）中の細胞又は個体の身体中の細胞であり得る。いくつかの実施態様において、細胞は、表皮ランゲルハンス細胞、好酸球、肥満細胞、又は好塩基球であり得る。特定の実施態様において、細胞は、肥満細胞である。

20

いくつかの実施態様において、細胞の表面上で発現されるFcεRIの量は、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、又は少なくとも99%まで減少する。

【0078】

肥満細胞は、アレルギー反応中の免疫グロブリン(Ig)E誘導性脱顆粒について周知である、先天性免疫系の組織結合の細胞である。したがって、肥満細胞は、表面上で大量のFcεRI受容体を発現する。FcεRIへのIgEの結合が本質的に不可逆的であるので、肥満細胞は、大部分はIgEにより覆われている。肥満細胞の主要機能は、主なトリガーとしての免疫グロブリン(Ig)Eによる、脱顆粒であると考えられる。一旦IgE分子が特異的な抗原又はアレルゲンに遭遇したならば、IgE：FcεRI架橋及びカルシウム流入は肥満細胞の脱顆粒を導く。その結果として、ヒスタミンが放出され、周知の症状（気管支収縮又は痒み等）を引き起こす。したがって、本明細書において示される一実施態様は、FcεRI依存性肥満細胞脱顆粒を調節する方法であって、肥満細胞を本明細書において示されるアンチセンスオリゴマーと接触させることを含む方法である。本開示に従って、細胞は、培養（例えば組織培養）中の細胞又は個体の身体中の細胞であり得る。

30

40

【0079】

活性化に際して、肥満細胞は、血管作用性アミン（例えばヒスタミン及びセロトニン）、プロテオグリカン（例えばヘパリン）、プロテアーゼ（例えばトリプターゼ及びキマーゼ）、及びいくつかの前貯蔵されたサイトカイン（例えばTNFα）等の細胞質顆粒からの前形成されたメディエーターを迅速に放出する。肥満細胞は、増殖因子、サイトカイン、及びケモカイン（IL-1、IL-6、IL-8、IL-10、TNFα、VEGF、TGFβ、CCL2〜4等）、そして炎症促進性脂質メディエーター（プロスタグランジン及びロイコトリエン等）を含む、おびただしい量のメディエーターも放出する。したがって、本明細書において示される一実施態様は、肥満細胞からの1又はそれ以上のメディエーターの放出を調節する方法であって、肥満細胞を本明細書において示されるアンチセ

50

ンスオリゴマーと接触させることを含み、1又はそれ以上のメディエーターが、肥満細胞産生血管作用性アミン、肥満細胞産生プロテオグリカン、肥満細胞産生プロテアーゼ、サイトカイン、増殖因子、ケモカイン、及び炎症促進性脂質メディエーターから成る群から選択される方法である。1又はそれ以上のメディエーターは、ヒスタミン、セロトニン、ヘパリン、トリプターゼ、キマーゼ、TNF α 、IL-1、IL-6、IL-8、IL-10、TNF α 、VEGF、TGF β 、CCl2-4、プロスタグランジン、及びロイコトリエンのうちの任意の1つであり得る。特定の実施態様において、肥満細胞は、培養中の細胞又は個体の身体中の細胞であり得る。

【0080】

先天性免疫における要素として、肥満細胞は、免疫応答を開始し増幅する能力を有する (Bulfone-Paus & Rahri, 2015を参照)。いくつかの系統の証拠から、メディエーターの分泌を経由する獲得免疫応答（それは、樹状細胞（DC）の成熟、機能、及び組織への動員又は局所的排出リンパ節への移動を持続させる）の感作相に肥満細胞が参加すると実証された。しかしながら、異なる起源及びサブセットの肥満細胞及びT細胞が、緊密な細胞-細胞相互作用を確立し、双方向の様式でそれぞれのエフェクター機能を調節するので、肥満細胞は重要なエフェクター機能も発揮し、これは様々なモデルにおいて示されている。したがって、本明細書において示される一実施態様は、個体中の免疫応答を低減する方法であって、本明細書において示されるアンチセンスオリゴマーを個体へ投与することを含む方法である。かかる免疫応答は、IGE媒介性免疫応答であり得るが、そうである必要はない。

【0081】

本明細書において示されるアンチセンスオリゴマーは、Fc ϵ RI β タンパク質を発現する任意の個体へ投与され得る。本明細書において使用される時、個体、対象、患者という用語、及び同種のもは、Fc ϵ RI β タンパク質を発現する任意の哺乳動物を網羅することを意味し、例示的な哺乳動物はヒトである。個体、対象、及び患者という用語それら自体によっては、特定の年齢、性別、人種、及び同種のもを表わさない。したがって、オス又はメスであるかにかかわらず任意の年齢の個体は、本開示によってカバーされることが意図される。同様に、本明細書において示される方法は、ヒトの任意の人種へ適用され得、例えばコーカサス人（白人）、アフリカ系アメリカ人（黒人）、アメリカ先住民、ハワイ先住民、スペイン系アメリカ人、ラテンアメリカ人、アジア人、及びヨーロッパ人が挙げられる。本明細書において示されるいくつかの実施態様において、かかる特徴は重要であり得る。かかる事例において、重要な特徴（複数可）（例えば年齢、性別、人種など）は、指示されるだろう。追加で、「個体」という用語は、ヒト及び非ヒト動物の両方を網羅する。本明細書において示されるアンチセンスオリゴマーが投与され得る好適な非ヒト動物としては、愛玩動物（すなわちペット）、食用動物、使役動物、又は動物園の動物が挙げられるがこれらに限定されない。例示的な動物としては、ネコ、イヌ、ウマ、フェレット及び他のイタチ科の動物、ウシ、ヒツジ、ブタ、及び齧歯動物が挙げられるがこれらに限定されない。

【0082】

本明細書において示されるアンチセンスオリゴマーは、任意の好適な投与経路によって個体へ投与され得る。かかる経路の例としては、経口経路及び非経口経路（例えば静脈内（IV）、皮下、腹腔内（IP）、及び筋肉内）、吸入（例えば霧化及び吸入）、ならびに経皮送達（例えば局所）が挙げられるがこれらに限定されない。本明細書において示されるアンチセンスオリゴマーを個体の血流の中へ送達するために任意の有効な方法も、これらの方法において企図される。例えば、アンチセンスオリゴマーの経皮送達は、局所投与に適合した薬学的に許容される担体の使用によって達成され得る。アンチセンスオリゴマーは、他の分子（タンパク質又は脂質等）の非存在下において投与され得るか、又は他の分子（タンパク質又は脂質等）との複合体中で投与され得る。例えば、アンチセンスオリゴマーをカプセル化するための陽イオン性脂質の使用は、米国特許第8,569,256号及び米国特許第6,806,084号（それらは、参照することによってそれらの全

体が本明細書に援用される) 中で開示される。同様に、ペプチド連結モルホリノアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用は、米国特許出願公開第 2015/0238627 号 (参照することによって本明細書に援用される) 中で開示される。IgE 及び IgE 媒介性免疫応答は、多数のアレルギー性病態に関与することが公知である。本明細書において示されるアンチセンスオリゴマーが、FcεRI 媒介性応答を低減することができるので、かかるアンチセンスオリゴマーはアレルギー性病態を治療するために使用され得る。したがって、本明細書において示される一実施態様は、かかる治療を必要とする個体へ本明細書において示されるアンチセンスオリゴマーを投与することによって、個体におけるアレルギー性病態を治療する方法である。治療されているアレルギー性病態は、FcεRI を含む経路によって媒介される任意の病態であり得る。かかる病態としては、喘息、食物アレルギー、アレルギー性結膜炎、及びアトピー性皮膚炎が挙げられるがこれらに限定されない。アンチセンスオリゴマーをデザインし、細胞及び対象へ投与する方法及び組成物は、例えば米国特許第 7,973,015 号; 同第 8,236,557 号; 同第 8,268,962 号; 同第 8,304,398 号; 同第 8,361,979 号; 同第 8,802,645 号; 同第 9,080,170 号; 同第 9,238,042 号; 同第 9,598,703 号; 同第 9,738,891 号; 同第 9,862,945 号; 同第 10,030,894 号; 同第 10,188,633 号; 及び同第 10,590,420 号 (この各々の開示の全体は、参照することによってその全体が援用される) 中で記載される。

10

【0083】

本発明に従うアンチセンスオリゴヌクレオチドの用量範囲は、いくつかの実施態様において、厳格なプロトコル要求性が存在する臨床試験 (インビボの使用) における用量漸増試験に基づいてデザインされる。本明細書において定義される分子又はオリゴヌクレオチドは、いくつかの実施態様において 0.1~20 mg/kg、及びいくつかの実施態様において 0.5~10 mg/kg の範囲の用量で使用され得る。

20

いくつかの実施態様において、0.1 nM~1 μM の間の範囲である本明細書において定義されるアンチセンスオリゴヌクレオチドの濃度が、いくつかの実施態様において使用される。いくつかの実施態様において、使用される濃度は 0.3~400 nM の間であり、いくつかの実施態様において、1~200 nM の間である。複数のオリゴヌクレオチドが使用されるならば、この濃度又は用量は、いくつかの実施態様において、オリゴヌクレオチドの全濃度又は全用量を指し得、いくつかの実施態様において、各々の添加されたオリゴヌクレオチドの濃度又は用量を指し得る。

30

【0084】

上で与えられるオリゴヌクレオチド (複数可) の濃度又は用量の範囲は、インビトロ又はエクスビボ使用のための例示的な濃度又は用量である。当業者は、使用されるオリゴヌクレオチド (複数可)、治療される標的細胞、遺伝子標的及びその発現レベル、使用される培地、ならびにトランスフェクション及びインキュベーションの条件に依存して、使用されたオリゴヌクレオチド (複数可) の濃度又は用量が更に変動し得ること及び更に最適化される必要があり得ることを理解するだろう。

本発明に従う使用のために本明細書において定義されるオリゴヌクレオチドは、所望されないアレルギー反応を発症することによって影響を受けたかそのリスクがある個体のインビボの細胞、組織、及び/又は器官への投与に好適であり得、インビボ、エクスビボ、又はインビトロで投与され得る。前記オリゴヌクレオチドは、個体のインビボの細胞、組織、及び/又は器官へ直接又は間接的に投与され得、インビボ、エクスビボ、又はインビトロで直接又は間接的に投与され得る。

40

【0085】

本発明のオリゴヌクレオチドは、当技術分野において公知の好適な技法を使用して間接的に投与され得る。オリゴヌクレオチドは、例えば個体、又は前記個体の細胞、組織、若しくは器官へ発現ベクターの形態で提供することができ、発現ベクターは、前記オリゴヌクレオチド又は複数のオリゴヌクレオチドを含む 1 又はそれ以上の転写物をコードする。発現ベクターは、いくつかの実施態様において、遺伝子送達ビヒクルを介して細胞、組織

50

、器官、又は個体の中へ導入され得る。いくつかの実施態様において、本明細書において同定される分子の発現又は転写を駆動する、発現カセット又は転写カセットを含むウイルススペースの発現ベクターが提供される。好ましい送達ビヒクルは、ウイルスベクター（アデノ随伴ウイルスベクター（AAV）、又はレンチウイルスベクター等のレトロウイルスベクター等）である（例えば、De Angelis et al.; 2002; Goyenvalle et al.; 2004; Denti et al., 2006を参照）。また、プラスミド、人工染色体（細胞のヒトゲノム中の標的化された相同組み換え及び組込みのために好適なプラスミドが挙げられるがこれらに限定されない）は、本明細書において定義されるオリゴヌクレオチドの送達のために好適に適用され得る。

【0086】

オリゴヌクレオチドは、そのまま送達され得る。しかしながら、オリゴヌクレオチドは、ウイルスベクターによってもコードされ得る。典型的には、これは、転写物の一部分中のオリゴヌクレオチドの配列を含むRNA転写物の形態である。

オリゴヌクレオチド及び／又はその等価物を、個体、あるいは前記個体の細胞、組織、及び／又は器官に提供する方法における改善が予想される。かかる将来の改善は、本発明の組成物及び方法を使用して、mRNAの再構築に対する言及された効果を達成するために、本発明の中へ当然援用することができる。オリゴヌクレオチド及び／又はその等価物は、個体、前記個体の細胞、組織、及び／又は器官へそのまま送達され得る。オリゴヌクレオチド及び／又はその等価物を投与する場合に、いくつかの実施態様において、オリゴヌクレオチド及び／又はその等価物は、送達方法と適合性のある溶液中で溶解される。静脈内、皮下、筋肉内、髄腔内、及び／又は脳室内の投与のために、いくつかの実施態様において、溶液は生理的食塩水である。いくつかの実施態様において、細胞へ、及び／又は細胞、組織、及び／又は器官の中へ本明細書において定義される構成物の各々の送達を援助する賦形剤を使用する。例示的な賦形剤としては、本明細書において定義される各々の構成物を送達する複合体、ナノ粒子、ミセル、小胞、及び／又はリポソームを形成することが可能なもの、細胞膜を介する小胞若しくはリポソームと複合体化されるもの、当該小胞体若しくはリポソームと会合されるもの、及び／又は当該小胞体若しくはリポソーム中にトラップされるものが挙げられるがこれらに限定されない。これらの賦形剤の多くは、当技術分野において公知である。好適な賦形剤は、ポリエチレンイミン（PEI）又は類似する陽イオン性ポリマー（ポリプロピレンイミン又はポリエチレンイミンコポリマー（PEC）及び誘導体が挙げられる）合成両親媒性物質（SAINT-18）、LIPOFECTIN（商標）ブランドリポフェクションエンハンサー、DOTAP、及び／又はウイルス性カプシドタンパク質を含み、それらは、本明細書において定義される各々の構成物を細胞、組織、及び／又は器官へ送達することができる粒子へと自己組織化が可能である。かかる賦形剤は、オリゴヌクレオチド（アンチセンス核酸等）を様々な培養細胞へ効率的に送達することが示された。それらの高いトランスフェクション能力は、全体的な細胞生存に関して除かれた低度から中等度の毒性と組み合わせられる。構造的な修飾の容易性は、それらのさらなる（インビボ）核酸転移特徴及び毒性のさらなる修飾及び分析を可能にするために使用され得る。

【0087】

LIPOFECTIN（商標）ブランドリポフェクションエンハンサーは、リポソームトランスフェクション薬剤の例を表わす。それは、2つの脂質成分、陽イオン性脂質N-[1-(2,3ジオレオイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド（DOTMA）（cp. DOTAPはメチル硫酸塩である）及び中性脂質ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（DOPE）から成る。中性成分は細胞内放出を媒介する。送達系の別の群は、ポリマーナノ粒子である。

ジエチルアミノエチルアミノエチル（DEAE）-デキストラン（それはDNAトランスフェクション試薬として周知である）のようなポリカチオンは、ブチルシアノアクリレート（PBCA）及びヘキシルシアノアクリレート（PHCA）と組み合わせられて、本明細書において定義される各々の構成物（好ましくはオリゴヌクレオチド）を細胞膜を横

10

20

30

40

50

切って細胞の中への送達することができる陽イオン性ナノ粒子を製剤化し得る。

これらの一般的なナノ粒子材料に加えて、陽イオン性ペプチドプロタミンは、コロイドによりオリゴヌクレオチドを製剤化するための代替のアプローチを提供する。このコロイド性ナノ粒子系はいわゆるプロティクル (proticl e) を形成することができ、それは、パッケージングする単純な自己組織化プロセスによって調製され得、オリゴヌクレオチドの細胞内放出を媒介する。当業者は、本発明の組成物及び方法における使用のための、特にヒトにおける使用のための、オリゴヌクレオチドをパッケージングし送達するために、上記のうちの任意のもの又は他の商業的に入手可能な代替の賦形剤及び送達系を選択及び適合させ得る。

【0088】

加えて、オリゴヌクレオチドは、細胞、細胞質、及び／又はその核の中へ取り込みを容易にするように特異的にデザインされた標的化リガンドへ共有結合又は非共有結合で連結され得る。かかるリガンドは、(i) 細胞の取り込みを容易にする、細胞、組織、若しくは器官特異的要素を認識する化合物 (ペプチド (様) 構造が挙げられるがこれらに限定されない) 及び／又は (ii) 細胞の中への取り込み及び／又は小胞 (例えばエンドソーム又はリソソーム) からのオリゴヌクレオチドの細胞内放出を容易にすることが可能な化学化合物を含み得る。

【0089】

したがって、いくつかの実施態様において、オリゴヌクレオチドは、組成物又は医薬品又は組成物中で製剤化され、それは、少なくとも賦形剤及び／又は送達のための標的化リガンド及び／又は細胞へのその送達デバイス及び／又はその細胞内送達の促進物質と共に提供される。したがって、本発明は、オリゴヌクレオチドを含み、少なくとも1つの賦形剤及び／又は送達のための標的化リガンド及び／又は細胞への前記オリゴヌクレオチドの送達デバイス及び／又はその細胞内送達の促進物質を更に含む、薬学的に許容される組成物も網羅する。組成物が、追加の構成物 (後に本明細書において定義されるような補助化合物等) を含むならば、組成物の各々の構成物が、1つの単一の組み合わせ又は組成物又は調製物中で製剤化されなくてもよいことが理解されよう。それらの本質に依存して、当業者は、どの型の製剤が本明細書において定義される各々の構成物についての最も適切なものであるか精通しているだろう。

【0090】

いくつかの実施態様において、標的細胞は、肥満細胞である。アレルギー性の人 (その人の組織肥満細胞及び他の細胞タイプは、FcεRIへ既に結合した抗原特異的IgEを有する) において、元の抗原又は交差反応性のある二価若しくは多価の抗原への再曝露は、隣接するFcεRI結合IgEの架橋及び結果として生ずる表面FcεRIの凝集をもたらす。FcεRI凝集が十分な強度及び継続期間である場合に、多様な群の生物学的に活性のある産物の分泌を最終的にもたらす複合体シグナル伝達事象を開始するように、肥満細胞及び好塩基球を触発する。総体として、抗原誘導性及びIgE誘導性の肥満細胞脱顆粒直後に放出されたメディエーターは、それらの放出の数分以内に、即時過敏症 (又は早期相) 反応と称される応答を誘導する。気道に局在するならば、この応答は、血管透過性の増加、気道平滑筋の収縮、及び粘液分泌の促進を特徴とし、気流の急性的な低減及び喘鳴をもたらす。応答が全身的なならば、それはアナフィラキシーをもたらす、この破滅的な免疫応答は、適切に治療されなければ急速に死をもたらす (総説についてはGallili & Tsai, 2012を参照)。したがって、本明細書において示される本発明のいくつかの実施態様は、個体中のアナフィラキシー反応を防止又は治療する方法であって、本明細書において示される1又はそれ以上のアンチセンスオリゴマーをかかるとして必要とする個体へ投与することを含む方法に関する。本明細書において示されるアンチセンスオリゴマーは、アナフィラキシー反応又は個体において予想されるアナフィラキシー反応より先に投与され得る。本明細書において示されるアンチセンスオリゴマーは、いくつかの実施態様において、規則的間隔で投与されて、アナフィラキシー反応を有するリスクがあるか又はアナフィラキシーショックを発症する個体において、任意のアナフィラ

10

20

30

40

50

キシー反応の出現率及び／又は重症度を防止又は低減させる。治療されている個体は、アナフィラキシー反応を有することについて即時のリスクがあってもなくてもよい。本明細書において示される本発明のいくつかの実施態様は、したがって個体においてアナフィラキシー反応を調節する方法であって、本明細書において示されるアンチセンスオリゴマーをかける治療を必要とする個体へ投与することを含む方法に関する。

【0091】

肥満細胞症は、あまりにも多くの肥満細胞及び肥満細胞前駆体を有する個体によって引き起こされる、稀な肥満細胞活性化障害である。肥満細胞がアトピー性応答に関与するので、肥満細胞症に罹患する個体は、蕁麻疹、掻痒、及びアナフィラキシーショックを受けやすい。したがって、本明細書において示される1つの方法は、肥満細胞症に罹患する個体を治療する方法であって、本明細書において示されるアンチセンスオリゴマーをかける治療を必要とする個体へ投与することを含む方法である。個体は、肥満細胞症の症状（掻痒、蕁麻疹、及びアナフィラキシー等）を既に呈していてもいなくてもよい。いくつかの実施態様において、アンチセンスオリゴマーは、肥満細胞症の症状の発症についてのリスクがある個体へ投与される。

【0092】

肥満細胞は骨髓中で産生され、身体の結合組織の全体にわたって見出される。若干の個体において、肥満細胞は皮膚に蓄積し、隆起として現われるクラスターを形成する。肥満細胞のかかるクラスターは、肥満細胞腫と称される。肥満細胞腫から生じる一般的な症状は掻痒であるが、罹患した個体は、色素性蕁麻疹、紅潮、悪心、嘔吐、下痢、及び腹痛も経験し得る。本明細書において示される1つの方法は、個体へ本明細書において示されるアンチセンスオリゴマーを投与することによって、肥満細胞腫と診断されたか又は肥満細胞腫を有する疑いのある個体を治療する方法である。いくつかの実施態様において、アンチセンスオリゴマーの投与は、肥満細胞腫から生じる1又はそれ以上の症状を消失させる。

本開示は、またMS4A6A mRNA及び／又はFcεRIβ mRNAのスプライシングの調節、FcεRIタンパク質の細胞表面発現の低減、個体におけるアナフィラキシー反応の調節、及び／又はアレルギー性病態についての個体の治療のためのキットであって、本明細書において示される少なくとも1つのアンチセンスオリゴマーを含むキットを提供する。キットは、キットの使用のための指示書、及び本明細書において示される方法を実践するために必要な様々な試薬（バッファー等）も含み得る。これらの試薬又はバッファーは、細胞又は個体へ本明細書において示されるアンチセンスオリゴマーの投与のために有用であり得る。キットは、本明細書において示される方法を実践するために必要な任意の材料（シリンジ、チューブ、スワブ、及び同種のもの等）も含み得る。いくつかの実施態様において、本発明は、オリゴヌクレオチド及び後に本明細書において定義されるようなさらなる補助化合物を含むキットのパーツの形態である、組成物又は調製物を提供する。

【0093】

本発明は、いくつかの実施態様において、様々な疾患、障害、及び／又は病態を治療及び／又は予防するためにそれを必要とする対象において、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いる方法にも関する。例示的なかかる方法としては、細胞又は組織におけるMS4A6Aタンパク質をコードするmRNAのスプライシングを調節する方法、細胞におけるFcεRIタンパク質の細胞表面発現を低減する方法、肥満細胞におけるFcεRI受容体複合体依存性脱顆粒を調節する方法、FcεRI受容体複合体依存性肥満細胞移動を調節する方法、サイトカイン放出を調節する方法、個体におけるアナフィラキシー反応を阻害する方法、個体におけるアレルギー性病態を治療する方法、個体におけるアレルギー反応の出現率を低減する方法、アナフィラキシー反応を発症するリスクがある個体を治療する方法、及び個体における肥満細胞関連疾患を治療する方法が挙げられるがこれらに限定されない。これら及び他の治療法及び／又は予防法は、本発明の考慮後に当業者に明らかである。

【実施例】

【0094】

本明細書において示される以下の実施例は、例証及び記載の目的のために提示されている。これらの実施例は、本発明開示の教示に相応しい変更及び改変であるとして、本明細書において開示される形態へ本開示を限定するようには意図されず、関連技術の技能又は知識は、本明細書において示される範囲内である。先行技術によって許容される程度まで代替の実施態様を含むように、添付の特許請求の範囲が解釈されることが意図される。

さらなる記載無しに、当業者は、先行する記載及び以下の例示的な実施例を使用して、本発明の化合物を作製及び利用することができ、本発明の方法を実践することができると思われる。したがって、以下の実施例は、特に本発明の実施態様を指摘するものであり、いかなる手法でも本発明の残りの部分を限定すると解釈されるべきではない。

10

【0095】

実施例 1

FcεRIβ SSOは、原形質膜へのマウスFcεRIを消失させる

肥満細胞（MC）におけるエクソン3を欠くFcεRIβの短縮されたアイソフォームの発現（Cruse et al., 2010; Cruse et al., 2013）を同定した。MS4A2のエクソン3は、FcεRIβの第1及び第2のTMDメインをコードする。FcεRIβの第1のTMDメインは、原形質膜へのFcεRI複合体のトラフィッキングのために重要である（Singleton et al., 2009）。FcεRIβのオルタナティブスプライシングがFcεRI複合体との会合の喪失をもたらすことが予測された。この予測が確認され（Cruse et al., 2010; Cruse et al., 2013）、オルタナティブなFcεRIβスプライシングにより、細胞表面へのFcεRIトラフィッキングを消失させることを強制するように、SSOが計画された。FcεRIβ SSOはマウスの骨髄由来培養MC（BMMC）において効率的であり、表面FcεRI発現の対応する消失があった（Cruse et al., 2016）。SSO処理BMMCは、したがってIgE依存性脱顆粒の証拠が無く、抗原へ無応答性であったが、タプシガルギンに応答する脱顆粒は影響されなかった（Cruse et al., 2016）。類似する結果は、レシオメトリックFura2測定を使用するCa²⁺シグナル伝達で観察され、サイトカイン産生は同じパターンに従った（Cruse et al., 2016）。総合すると、これらのデータから、FcεRIβのエクソン3がFcεRI機能のために重要であることが実証された。

20

30

【0096】

実施例 2

FcεRIβ SSOは、huMCにおいてあまり有効ではない

これらのデータから、このアプローチがヒトへ変換されるならば、当該アプローチはMCを標的化する可能性が実証された。しかしながら、FcεRIβ SSOは、huMC中であまり有効ではない。FcεRIβエクソン3のエクソンスキップを用いて、FcεRIβタンパク質の第1の膜貫通ドメインをコードする成熟mRNAの領域を除去した。配列ATAGATATATACTCACAAATATGGCTCC（配列番号26）によるSSOによりFcεRIβ mRNAを標的化して、エクソン3のエクソンスキップを誘導した。しかしながら、FcεRIβの効率的なエクソンスキップにもかかわらず（図1A）、表面FcεRIαの最大約60%の低減を達成することができる（図1B）。配列CACAAATATGGCTCCCCAGAAATGGA（これも高度に効率的なエクソンスキップを達成し、匹敵する結果を与えた）によりFcεRIβエクソン3の内部領域を標的化するSSOによるFcεRIβも利用した（Cruse et al., 2016）。配列AGTACAGAGCAGACAACCTGTTC CAによる別のSSO標的化FcεRIβエクソン3は、匹敵する有効性であった。試験された標的SSOには関係なく、脱顆粒（図1C）及びCa²⁺流入のわずかな低減が観察されたが、後者のものは有意性に達しなかった（図1D）。ヒトへ変換できないことについての1つの説明は、細胞株の中へトランスフェクションされた場合に、ヒトFcεRIαは、FcεRIβの非存在下において原形質膜へトラフィッキングできるということである（Alber et al., 1991; Donnadieu

40

50

et al., 2000; On et al., 2004)。しかしながら、これはありそうもないメカニズムであり、その理由は、表面FcεRI発現の有効性の低減について説明することができるが、脱顆粒及びCa²⁺のデータについて説明することができないからである。ヒト化FcεRIαにより示されるように、FcεRIβは、インビトロ及びインビボでFcεRIシグナル伝達を10倍増幅し(Alber et al., 1991; Dombrowicz et al., 1996; Dombrowicz et al., 1998; Donnadieu et al., 2000; On et al., 2004)、三量体FcεRIは、着実なCa²⁺流入を引き起こさない(Dombrowicz et al., 1998)。したがって、FcεRIβはhMHCにおけるFcεRI機能のために無くても済む可能性があり、そこで、FcεRIβ様のタンパク質はFcεRIβを補償し得る。

10

【0097】

実施例 3

HuMCは、FcεRIβへの高い配列相同性の有る複数のMS4Aタンパク質を発現する

FcεRIβを含む遺伝子ファミリーの他のメンバーは、FcεRIβ様のタンパク質であり得る。LAD2ヒトMCが標準的培養条件下で、MS4A2(FcεRIβ)、MS4A3、MS4A4A、MS4A6A、及びMS4A7を発現することが決定された(図2A及び2B)。他の公知のMS4A遺伝子についてのRT-PCRは、通常の培養条件下で陰性であった。LAD2細胞について示されるように、MS4A3及びMS4A7が発現された(図2A)が、発現は、標準的な条件下でほとんど検出不可能であり、これらの遺伝子が恐らく主要なFcεRIβ様のタンパク質ではないことを示唆された。MS4A2(FcεRIβ)、MS4A4A、及びMS4A6Aが、類似するレベルで発現されるので、MS4A4及びMS4A6Aは、hMHCにおけるFcεRIβ様のタンパク質についての最も可能性の高い候補である。

20

【0098】

実施例 4

MS4A6Aは、表面FcεRI発現及びIgE依存性脱顆粒を増進する

MS4A6A及びMS4A2(FcεRIβ)は保存された特色を有するので(図2C)、MS4A6AがFcεRIをトラフィックティングすることができ、FcεRIβ様のタンパク質として作用することができるかが調査された。MS4A2(FcεRIβ)は、原形質膜へトラフィックティングしないか又はFcεRIと会合しない短縮アイソフォームを有する(Cruse et al., 2010; Cruse et al., 2013; Cruse et al., 2016)。MS4A2(FcεRIβ)のこのオルタナティブスプライシングは、おそらく遺伝子発現のレベルを変更する必要性無しに表面でのFcεRI発現を変更する調節プロセスである。MS4A6Aは、同等なオルタナティブスプライシングを有する(図2A及び2Cを参照)。MS4A6AのRT-PCRバンドのシーケンスから、新規オルタナティブスプライシングがMS4A2(FcεRIβ)と正確にアライメントされることが確認された。シーケンスから、MS4A6Aが推定上の細胞質ヘミ-ITAM(それは、MS4A2(FcεRIβ)ITAMのLynキナーゼに結合し、同様にシグナル伝達する能力を有することが予測される)を含有することも決定された(図3)。

30

40

【0099】

両方のMS4A6Aアイソフォームをノックダウンすることが記載されたレンチウイルス送達(Cruse et al., 2013; Cruse et al., 2015)による標準的RNAiアプローチを使用して、遺伝子発現をノックダウンするためにshRNAを最初に用いた。次いでMS4A6Aノックダウンの確認のために使用される抗体を、MS4A6Aへの特異性について試験した。MS4A6A及びFcεRIβをクローン化し、GFPタグと共にLAD2細胞の中へトランスフェクションして、フローサイトメトリーによって発現を確認した(図4A及び4Bを参照)。トランスフェクションを確認した後に、細胞溶解物を抽出し、ウェスタンブロットによって染色して、MS4A6A抗体を検証した(図4C)。次いでMS4A6Aバリエーションのノックダウンを遂行し、両方のMS4A6Aバリエーションのノ

50

ックダウンを、ウエスタンブロット（図4D及び4Eを参照）そして定量的PCR（図4F）によって確認した。MS4A6Aのノックダウンは、MCの脱顆粒（図4Gを参照）及びカルシウム流入（図4H）を阻害し、FcεRIβのエクソンスキップに匹敵していた（図1Cを参照）。FcεRIβ又はMS4A6Aいずれかのノックダウンは両方とも、表面FcεRI発現の低減をもたらした（図4Iを参照）。したがって、MS4A6A及びFcεRIβは、FcεRIの脱顆粒及びトラフィッキングにおいて関連する機能を遂行し、いずれかのタンパク質の破壊単独ではIgE媒介性脱顆粒を消失させるには不適切であり得る。

【0100】

実施例5

全長MS4A6Aは、FcεRI機能を増進する

FcεRIβ及びMS4A6Aの第1及び第2の膜貫通（TM）ドメインの高度に保存されたスプライシング（図を2C参照）から、MS4A6Aのエクソン4（それはFcεRIβのエクソン3とほぼ正確にアライメントする）も、MS4A6A機能のために重要であることが示される。配列ATAGATATATACCTCACAAATATGGCTCC（配列番号26）によりFcεRIβのエクソン3を標的化するエクソンスキップを誘導するために使用されたSSO方法を、配列TCTGGATAGTCTGTGGGAAGAGAAA（配列番号22）によりMS4A6Aの標的エクソン4をエクソンスキップする状況で、本明細書において用い、FcεRIβエクソン3SSOが、MS4A2のエクソンスキップについて特異的であったが、SSOによるMS4A6Aエクソン4スキップが、MS4A6Aのエクソン4のエクソンスキップを効率的且つ特異的に誘導したことが決定された（図5Aを参照）。FcεRIβエクソン3及びMS4A6Aエクソン4のSSOの両方を同時に用いることにより、両方のmRNAのエクソンスキップが誘導された（図5A）。SSOによるFcεRIβのエクソン3又はMS4A6Aのエクソン4のエクソンスキップは、細胞数（図5B）又は生存率（図5C）に有意に影響しなかった。しかしながら、MS4A6Aエクソン4及びFcεRIβエクソン3のSSOは、標準的なshRNAレンチウイルスアプローチを使用するFcεRIβ又はMS4A6Aのノックダウン（図4I）に匹敵して、表面FcεRIα発現を低減した（図5）。FcεRIβエクソン3SSO及びMS4A6Aエクソン4SSOの組み合わせは、FcεRI表面発現を>80%低減する相加効果を有していた（図5D）。FcεRIβエクソン3SSO及びMS4A6Aエクソン4SSOによる表面FcεRIα発現の低減にもかかわらず（図5D）、FcεRIα及びFcεRIγの転写物のレベルは変更されず、FcεRIβ又はMS4A6Aのいずれかが標的化された場合に、発現ではなくFcεRIトラフィッキングの欠陥が示唆される（図5E）。FcεRIβのエクソン3又はMS4A6Aのエクソン4についてのSSOによるIgE架橋に応答する脱顆粒単独では、わずかな効果のみがあったが、組み合わせで使用されたFcεRIβエクソン3SSO及びMS4A6Aエクソン4SSOは、IgE依存性脱顆粒を著しく阻害したが（図5F）、化合物48/80依存性脱顆粒はそうではなかった（図5G）。総合すると、これらのデータから、FcεRIトラフィッキング及びシグナル伝達において、FcεRIβエクソン3及びMS4A6Aエクソン4が冗長又は部分的に冗長な役割を果たすことが示唆された。他の活性化肥満細胞受容体（この事例において化合物48/80によるMRGPRX2活性化）による効果の欠如から、全般的な応答ではなくFcεRIへの特異性が実証される。

【0101】

MS4A6Aエクソン4をFcεRIβエクソン3に匹敵して標的化することができ、それは、オルタナティブスプライシングを誘導して、それぞれMS4A6Aタンパク質又はFcεRIβタンパク質の第1の膜貫通ドメインを除去することによるものである。FcεRIβのエクソン3又はMS4A6Aのエクソン4のいずれかをスキップするエクソンの結果は、FcεRIαの表面発現の低減であり、それはおそらく原形質膜へのトラフィッキングの低減に起因する。本開示のデータから、FcεRIβ及びMS4A6Aの両

10

20

30

40

50

方の全長スプライスバリエントが、FcεRIのサブユニットを形成することができ、ヒト肥満細胞の原形質膜へ受容体複合体をトラフィッキングできることが示唆される（図4I及び5Dを参照）。第1及び第2の膜貫通ドメインを欠く各々のタンパク質の短縮スプライスバリエントのみの発現を誘導するためにいずれかのタンパク質をエクソンスキップすることは、FcεRI複合体の中へのそのタンパク質の取り込みを低減し、FcεRIαの表面発現を低減すると思われる（図5D）。しかしながら、他のタンパク質を含有する残存するFcεRI複合体は、脱顆粒を起こすのに十分なシグナルを達成することが可能である。これに反して、各々のタンパク質の最初の2つの膜貫通ドメインを除去するために両方のタンパク質をエクソンスキップすることは、脱顆粒が起こることを停止することができる。

10

【0102】

これらのデータを、次に、初代臍帯血由来肥満細胞（CBDMC）における脱顆粒を使用して、FcεRIβエクソン3及びMS4A6Aエクソン4のエクソンスキップについて確認した。CBDMCは未成熟表現型を維持しており、IgE架橋へ応答するために（図6A）及びFcεRIの表面発現をアップレギュレートするために（図6C及び6Dを参照）、IL-4によりプライミングされなくてはならないことが公知である。一旦プライミングされたならば、それらは応答し、FcεRIβエクソン3及びMS4A6Aエクソン4の単独及び組み合わせでのエクソンスキップは、LAD2肥満細胞に匹敵していた（図6E）。イオノマイシンによる陽性対照（図6B）は、いずれかのタンパク質についてのmRNAのエクソンスキップによって影響を受けなかった（図6F）。

20

MS4A6Aのエクソン4のエクソンスキップは、全長バージョンではなく短縮MS4A6Aタンパク質の産生をもたらし、我々によって提案されたメカニズムを確認するものである（図7）。MS4A6Aエクソン4のこのエクソンスキップは、明らかなFcεRIβエクソン3との交差反応性が無く特異的であり、全長MS4A6A機能の研究を可能にする。

【0103】

最終的に、FcεRIβのエクソン3及びMS4A6Aのエクソン4のエクソンスキップのサイトカイン合成に対する効果を試験した。脱顆粒とは対照的に、MS4A6Aがあたかも臍帯血細胞におけるIL-8産生で最少の役割のみを果たすか又は役割がなく、そのIL-8産生はFcεRIβ単独によって媒介されるように思われた（図8A）。臍帯血MCのドナー間のサイトカイン放出の量について変動があった（図8A）が、各々のドナーについての標準的な対照に比較して各々のドナーをサイトカイン放出の%阻害として分析した時に、FcεRIβエクソン3が標的化された場合に限り、サイトカイン産生（IL-8）の一貫して有意な阻害が達成された（図8B）。総合すると、これらのデータから、MS4A6AではなくFcεRIβがこれらの細胞におけるサイトカイン産生の重要な駆動力であることが示唆された。

30

【0104】

実施例の考察

喘息及び関連するアレルギー性疾患は一般的なものである。喘息は、先進国において10人のうち最大1人に影響する。喘息の患者の約10%は、現行の治療的アプローチによりコントロールすることができない。コントロール不良の喘息に関連する著しい罹患率に加えて、経済的負担は、結核及びHIV/AIDSの組み合わせより大きい。アレルギー性疾患は、有病率中で劇的に増加し、先進国世界における小児の最大50%がアレルギーへの検査結果が陽性であり、したがってアレルギー治療薬は非常に興味を持たれる。最近の治療は、肥満細胞を直接標的化することではなく、肥満細胞によって放出されたメディエーターの効果を標的化するか、又は広範囲の細胞を標的化するコルチコステロイドを使用する。本明細書において開示されるアプローチは、より直接的なアプローチである。

40

【0105】

本明細書において開示されるデータは、高親和性IgE受容体（FcεRI）のトラフィッキング及びシグナル伝達において、膜通過4A（MS4A）遺伝子ファミリーメンバ

50

一のMS4A6A及び別のMS4A遺伝子ファミリーメンバーのFcεRIβ (MS4A2によってコードされる) についての冗長な又は部分的に冗長な機能を初めて実証する。MS4A6Aは、FcεRIβ (MS4A2) と同じ遺伝子ファミリー中にある未知の機能のタンパク質である。我々は、初めて、その機能を報告し、MS4A6Aの最初の2つの膜貫通ドメインがFcεRI生物学における機能のために重要であることを実証する。FcεRIβも匹敵する方法で機能し、この場合もやはり、最初の2つの膜貫通ドメインはFcεRI生物学における機能のために重要である (Cruse et al., 2010, Cruse et al., 2013, Cruse et al., 2016)。我々は、ヒトFcεRIβエクソン3をエクソンスキップして最初の2つの膜貫通ドメインを除去することが、FcεRI表面発現を低減するが、IgE活性化に応答してヒト肥満細胞において脱顆粒を消失させるのには不十分であることを本明細書において実証する。同じことはMS4A6Aエクソン4について当てはまり、MS4A6Aエクソン4をエクソンスキップして最初の2つの膜貫通ドメインを除去することは、表面FcεRI発現を低減するが、ヒト肥満細胞においてIgE依存性脱顆粒を消失させることは成功しない。しかしながら、これらのSSOにより両方のタンパク質を同時に標的化することは、IgEを介して抗原に应答するヒト肥満細胞脱顆粒を消失させる。このことは、MS4A6Aについての機能を実証するだけでなく、FcεRIβ及びMS4A6Aの両方がFcεRI機能において冗長性を呈し、したがって両方のタンパク質がIgE依存性肥満細胞活性化に寄与することも同定する。

10

【0106】

肥満細胞における表面FcεRI発現を、消失させることができる。加えて、特異的な組織内の肥満細胞を、標的化することができるかもしれない。例えば、皮膚アレルギーを治療するために皮膚中の肥満細胞を特異的に標的化するクリームを開発することができるかもしれない。喘息のために、吸入器は、特異的に肺中の肥満細胞を標的化することができるだろう。アレルギー性鼻炎において、鼻粘膜へAONを送達するために、鼻内噴霧器を使用することができるかもしれない。これらの疾患の臨床的な需要は満たされておらず、長期間インビボで投与された場合に有効である肥満細胞機能の特異的な阻害物質はない。したがって、このアプローチの可能性は非常に有意義である。

20

異なる製剤 (マイクロ粒子の吸入及び局所クリーム等) でのアンチセンスオリゴヌクレオチド (AON) を使用することは報告されており、したがって肥満細胞活性化を低減するAON薬物についての多くの適用がある。クリームで投与され得るAON及び送達方法が、皮膚肥満細胞を標的化するために開発されるならば、これは、アトピー性皮膚炎における肥満細胞活性化を消失させることができるだろう。肺へ吸入器として送達されたAONのエアロゾルは、喘息における肺肥満細胞を標的化し、喘息におけるIgE媒介性肺炎症及び喘鳴に対して保護するだろう。同様に、鼻内噴霧器は、鼻粘膜中の肥満細胞を標的化し、アレルギー性鼻炎におけるこれらの細胞を特異的に標的化するために使用され得る。加えて、腸中の肥満細胞の活性化ならびに食物アレルギー及びアナフィラキシーに対して保護するためにFcεRIに対するAONの経口投与を投与することができるだろう。

30

【0107】

本明細書において示される前述の実施例は、例証及び記載の目的のために提示された。これらの実施例は、本発明の記載の教示と相応しい変更及び改変であるとして、本明細書において開示される形態へ本開示を限定するようには意図されず、関連技術の技能又は知識は、本明細書において示される範囲内である。先行技術によって許容される程度まで代替の実施態様を含むように、添付の特許請求の範囲が解釈されることが意図される。

40

【0108】

参考文献

すべての特許、特許出願及びその公報、科学雑誌論文、ならびにデータベースエントリー (GENBANK (登録商標) バイオシーケンスデータベースエントリー、及びその中に含まれる利用可能なすべてアノテーションが挙げられるがこれらに限定されない) を包含するがこれらに限定されない、本開示中及び本明細書に添付された補遺中でリストされたすべての参考文献は、それらが本明細書において用いられる方法論、技法、及び／又は

50

組成物を、補足する、説明する、それらのためのバックグラウンドを提供する、及び／又は、教示する程度まで参照することによってそれらの全体が本明細書に援用される。参照文献の考察は、単にそれらの著者らによって行われた主張を要約することを意図するものである。任意の参照文献（又は任意の参照文献の一部）が、関連する先行技術を構成することを承認するものではない。任意の引用された参照文献の正確性及び適切性に異議を申し立てる権利は、明示的に留保される。

【0109】

Alber et al. (1991) Structure-function relationships in the mast cell high affinity receptor for IgE. Role of the cytoplasmic domains and of the beta subunit. *J Biol Chem* 266:22613-22620.

10

Alshahrani et al. (2014) CEACAM2 negatively regulates hemi (ITAM-bearing) GPVI and CLEC-2 pathways and thrombus growth in vitro and in vivo. *Blood* 124:2431-2441.

Bangur et al. (2004) Identification and characterization of L985P, a CD20 related family member over-expressed in small cell lung carcinoma. *Int J Oncol* 25:1583-1590.

Berger et al. (2000) Universal bases for hybridization, replication and chain termination. *Nuc Acid Res* 28:2911-2914.

Bieber et al. (1992) Human epidermal Langerhans cells express the high affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI). *The Journal of Experimental Medicine* 175:1285-1290.

20

Bubien et al. (1993) Transfection of the CD20 cell surface molecule into ectopic cell types generates a Ca²⁺ conductance found constitutively in B lymphocytes. *J Cell Biol* 121:1121-1132.

Bulfone-Paus & Rahri (2015) Mast cells as regulators of T cell response s. *Front Immunol* 6:394.

Cheung et al. (2010) Cutting edge: CD49d+ neutrophils induce Fc epsilon RI expression on lung dendritic cells in a mouse model of postviral asthma. *The Journal of Immunology* 185:4983-4987.

Cruse & Bradding (2016) Mast cells in airway diseases and interstitial lung disease. *European Journal of Pharmacology* 778:125-138.

30

Cruse et al. (2010) A novel Fc epsilon RI beta-chain truncation regulates human mast cell proliferation and survival. *The FASEB Journal* 24:4047-4057.

Cruse et al. (2013) A truncated splice-variant of the Fc epsilon RI beta receptor subunit is critical for microtubule formation and degranulation in mast cells. *Immunity* 38:906-917.

Cruse et al. (2015) The CD20 homologue MS4A4 directs trafficking of KIT toward clathrin-independent endocytosis pathways and thus regulates receptor signaling and recycling. *Mol Biol Cell* 26:1711-1727.

Cruse et al. (2016) Exon skipping of Fc epsilon RI beta eliminates expression of the high-affinity IgE receptor in mast cells with therapeutic potential for allergy. *Proc Natl Acad Sci USA* 113:14115-14120.

40

Dalerba et al. (2011) Single-cell dissection of transcriptional heterogeneity in human colon tumors. *Nat Biotechnol* 29:1120-1127.

De Angelis et al. (2002) Chimeric snRNA molecules carrying antisense sequences against the splice junctions of exon 51 of the dystrophin pre-mRNA induce exon skipping and restoration of a dystrophin synthesis in Delta 48-50 DMD cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:9456-9461.

Dehlink et al. (2010) Relationships between levels of serum IgE, cell-bound IgE, and IgE-receptors on peripheral blood cells in a pediatric po

50

pulation. PLoS One 5:e12204.

Denti et al. (2006) Chimeric adeno-associated virus/antisense U1 small nuclear RNA effectively rescues dystrophin synthesis and muscle function by local treatment of mdx mice. Hum Gene Ther 17:565-574.

Dombrowicz et al. (1996) Anaphylaxis mediated through a humanized high affinity IgE receptor. J Immunol 157:1645-1651.

Dombrowicz et al. (1998) Allergy-associated FcR β is a molecular amplifier of IgE- and IgG-mediated in vivo responses. Immunity 8:517-529.

Donnadieu et al. (2000) A second amplifier function for the allergy-associated Fc ϵ RI- β subunit. Immunity 12:515-523.

Furumoto et al. (2004) The Fc ϵ RI β immunoreceptor tyrosine-based activation motif exerts inhibitory control on MAPK and I κ B kinase phosphorylation and mast cell cytokine production. J Biol Chem 279:49177-49187.

Galli & Tsai (2012) IgE and mast cells in allergic disease. Nature Medicine 18(5):693-704.

Gould & Sutton (2008) IgE in allergy and asthma today. Nature Reviews Immunology 8:205-217.

Goyenvallé et al. (2004) Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. Science 306:1796-1799.

Greer et al. (2014) Serum IgE clearance is facilitated by human Fc ϵ RI internalization. The Journal of Clinical Investigation 124:1187-1198.

Greer et al. (2016) A Family of non-GPCR Chemosensors Defines an Alternative Logic for Mammalian Olfaction. Cell 165:1734-1748.

Hollingworth et al. (2011) Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. Nat Genet 43:429-435.

Holloway et al. (2001) Expression of the high-affinity IgE receptor on peripheral blood dendritic cells: differential binding of IgE in atopic asthma. Journal of Allergy and Clinical Immunology 107:1009-1018.

Kimura et al. (1996) Downstream signaling molecules bind to different phosphorylated immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) peptides of the high affinity IgE receptor. J Biol Chem 271:27962-27968.

Kinet (1999) The high-affinity IgE receptor (Fc ϵ RI): from physiology to pathology. Annual Review of Immunology 17:931-972.

Koslowski et al. (2008) MS4A12 is a colon-selective store-operated calcium channel promoting malignant cell processes. Cancer Res 68:3458-3466.

Kraft & Kinet (2007) New developments in Fc ϵ RI regulation, function and inhibition. Nature Reviews Immunology 7:365-378.

Kraft et al. (2004) The role of the Fc ϵ RI β -chain in allergic diseases. International Archives of Allergy and Immunology 135:62-72.

Kuster et al. (1992) The gene and cDNA for the human high affinity immunoglobulin E receptor beta chain and expression of the complete human receptor. Journal of Biological Chemistry 267:12782-12787.

Liang & Tedder (2001) Identification of a CD20-, Fc ϵ RI β -, and HTm4-related gene family: sixteen new MS4A family members expressed in human and mouse. Genomics 72:119-127.

Liang et al. (2001) Structural organization of the human MS4A gene cluster on Chromosome 11q12. Immunogenetics 53:357-368.

Lympány et al. (1992) Genetic analysis of the linkage between chromos

10

20

30

40

50

ome 11q and atopy. Clin Exp Allergy 22:1085-1092.

Manne et al. (2015) Distinct pathways regulate Syk protein activation downstream of immune tyrosine activation motif (ITAM) and hemITAM receptors in platelets. J Biol Chem 290:11557-11568.

Maurer et al. (1994) Expression of functional high affinity immunoglobulin E receptors (Fc epsilon RI) on monocytes of atopic individuals. The Journal of Experimental Medicine 179:745-750.

Maurer et al. (1996) Peripheral blood dendritic cells express Fc epsilon RI as a complex composed of Fc epsilon RI alpha- and Fc epsilon RI gamma-chains and can use this receptor for IgE-mediated allergen presentation. The Journal of Immunology 157:607-616.

Michel et al. (2013) Identification of the novel differentiation marker MS4A8B and its murine homolog MS4A8A in colonic epithelial cells lost during neoplastic transformation in human colon. Cell Death Dis 4:e469.

Naj et al. (2011) Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. Nat Genet 43:436-441.

On et al. (2004) Molecular dissection of the FcRβ signaling amplifier. Journal of Biological Chemistry 279:45782-45790.

Osborne et al. (1996) The inositol 5'-phosphatase SHIP binds to immunoreceptor signaling motifs and responds to high affinity IgE receptor aggregation. J Biol Chem 271:29271-29278.

Parravicini et al. (2002) Fyn kinase initiates complementary signals required for IgE-dependent mast cell degranulation. Nat Immunol 3:741-748.

Platzer et al. (2015) Dendritic cell-bound IgE functions to restrain allergic inflammation at mucosal sites. Mucosal Immunology 8:516-532.

Sandford et al. (1993) Localisation of atopy and beta subunit of high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI) on chromosome 11q. Lancet 341:332-334.

Singleton et al. (2009) The first transmembrane region of the β-chain stabilizes the tetrameric FcεRI complex. Molecular immunology 46:2333-2339.

Stafford et al. (1994) A 2.8 Mb YAC contig in 11q12-q13 localizes candidate genes for atopy: Fc epsilon RI beta and CD20. Hum Mol Genet 3:779-785.

U.S. Patent Application Publication Nos. 2015/0238627; 2015/0361428; 2015/0376615; 2019/0062756.

U.S. Patent Nos. 6,806,084; 7,973,015; 8,236,557; 8,268,962; 8,304,398; 8,361,979; 8,569,256; 8,765,703; 8,802,645; 8,946,183; 9,080,170; 9,238,042; 9,598,703; 9,738,891; 9,862,945; 10,030,894; 10,188,633; and 10,590,420.

Vasudev et al. (2012) Expression of high-affinity IgE receptor on human peripheral blood dendritic cells in children. PLoS One 7:e32556.

Virk et al. (2016) Mast cells and their activation in lung disease. Transl Res 174:60-76.

Ye et al. (2014) MS4A8B promotes cell proliferation in prostate cancer. Prostate 74:911-922.

【0110】

ここに開示されている発明の範囲から逸脱することなく、ここに開示されている発明の様々な詳細を変更することができることは理解されたい。さらに、上記の説明は、説明の

10

20

30

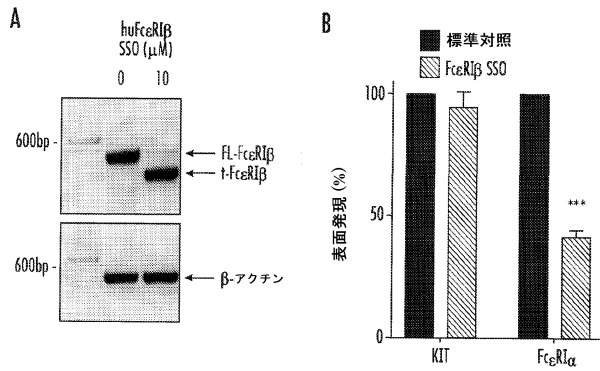
40

50

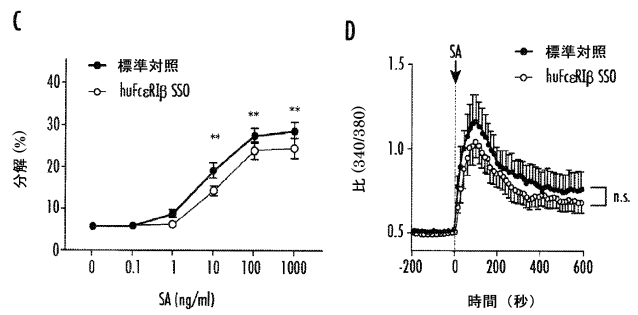
みを目的としており、本発明を限定することを目的としたものではない。

【図面】

【図 1 A B】

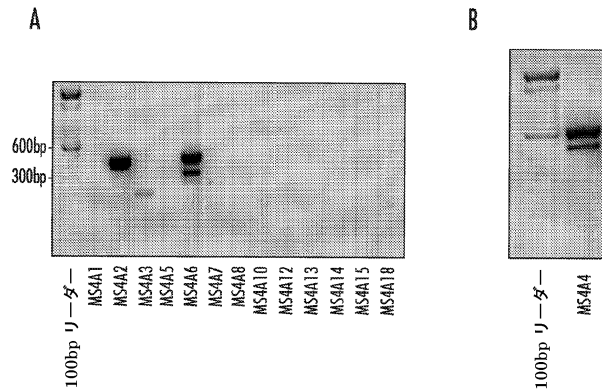


【図 1 C D】

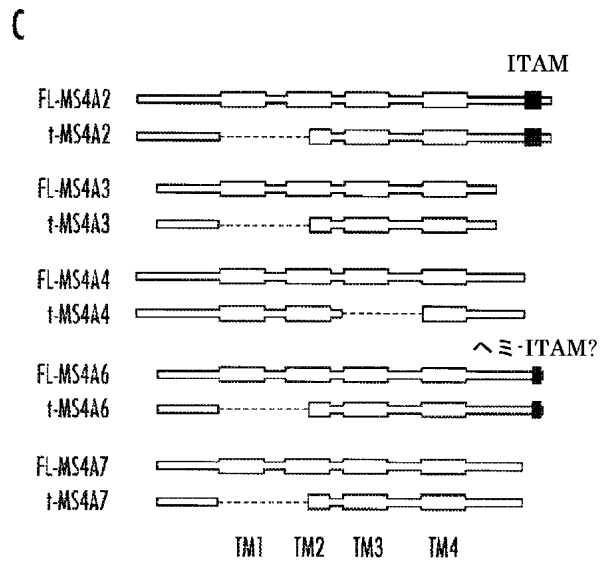


10

【図 2 A B】



【図 2 C】



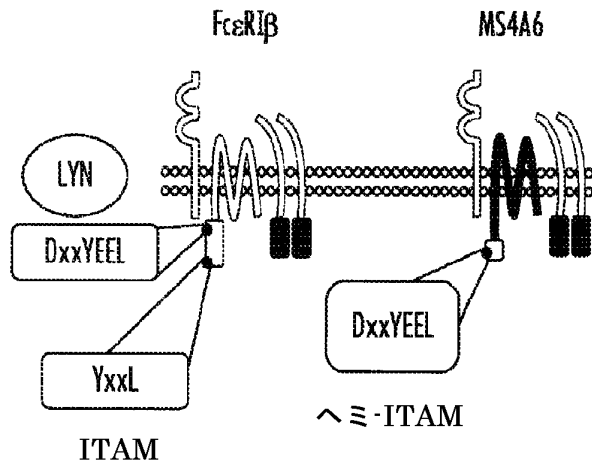
20

30

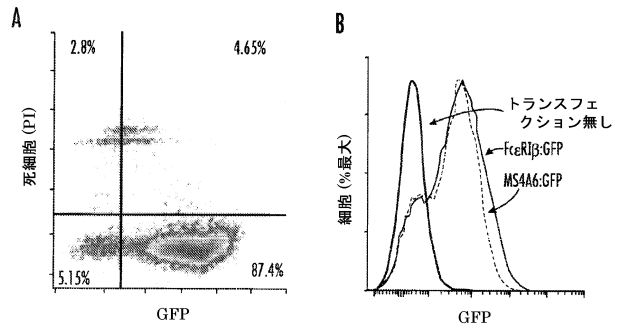
40

50

【図 3】

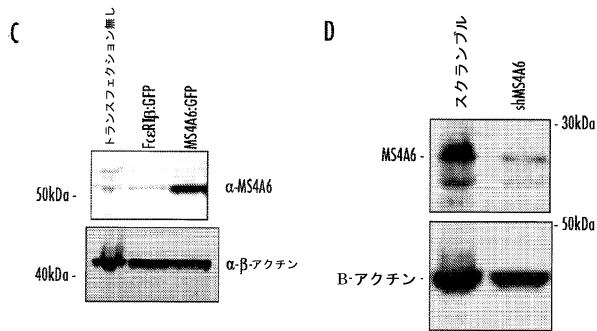


【図 4 A B】

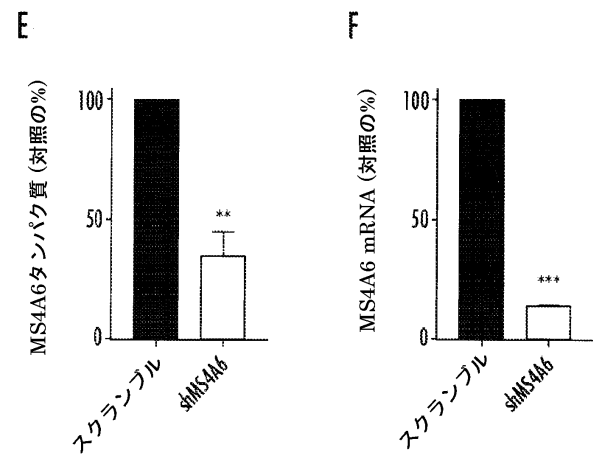


10

【図 4 C D】



【図 4 E F】



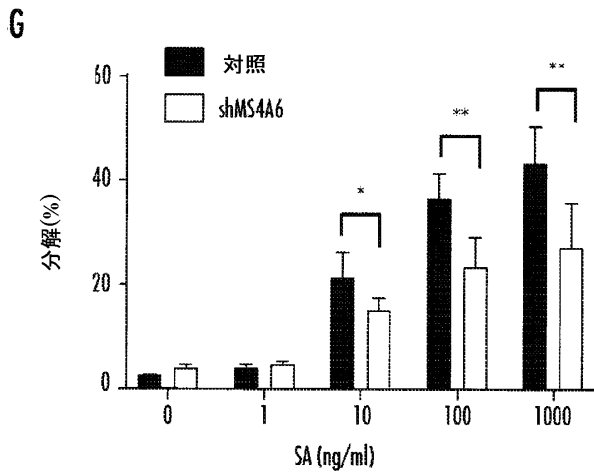
20

30

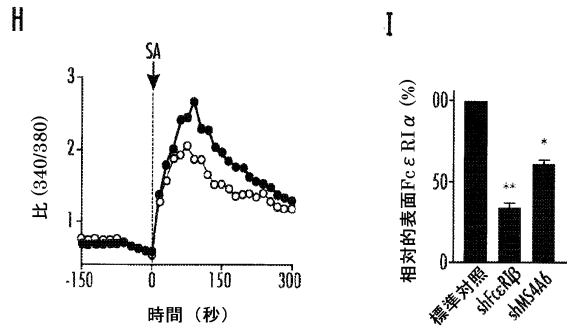
40

50

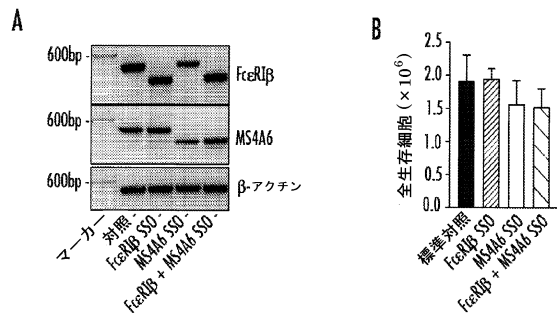
【図 4 G】



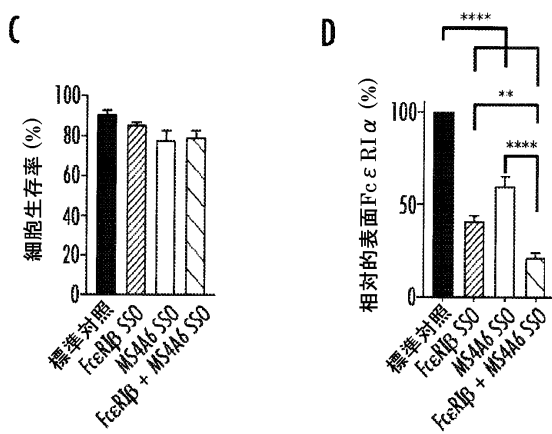
【図 4 H I】



【図 5 A B】



【図 5 C D】



10

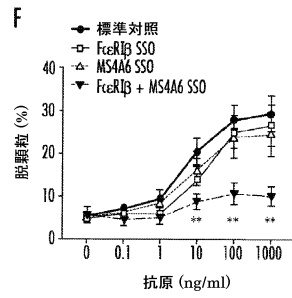
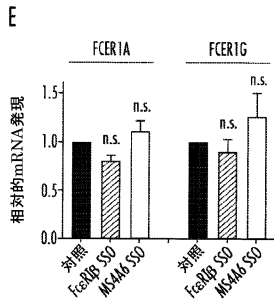
20

30

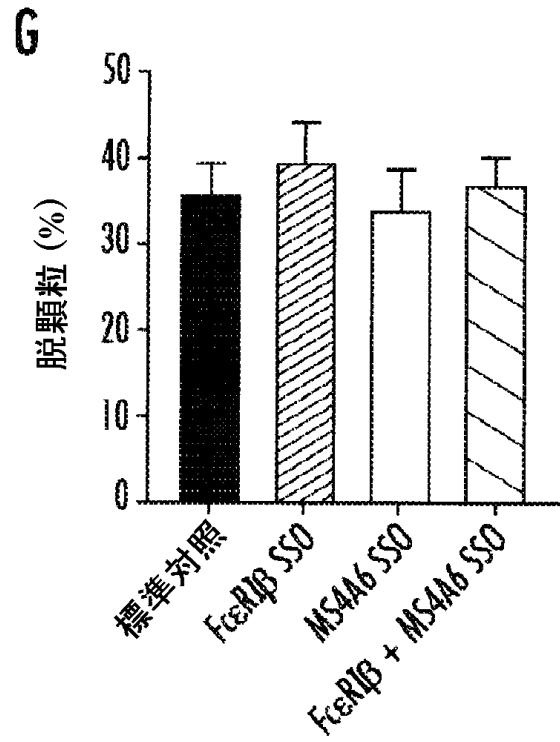
40

50

【図 5 E F】



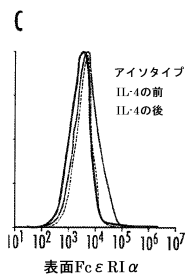
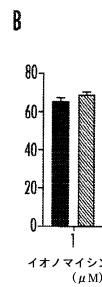
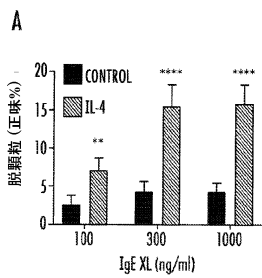
【図 5 G】



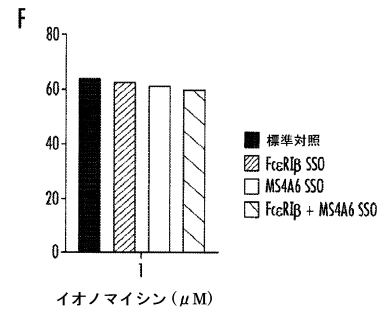
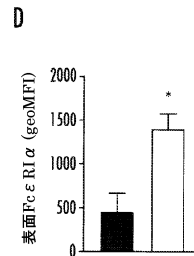
10

20

【図 6 A B C】



【図 6 D E F】

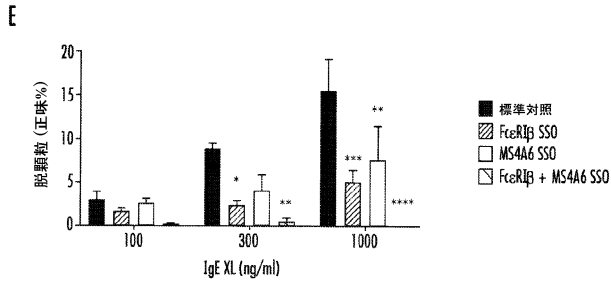


30

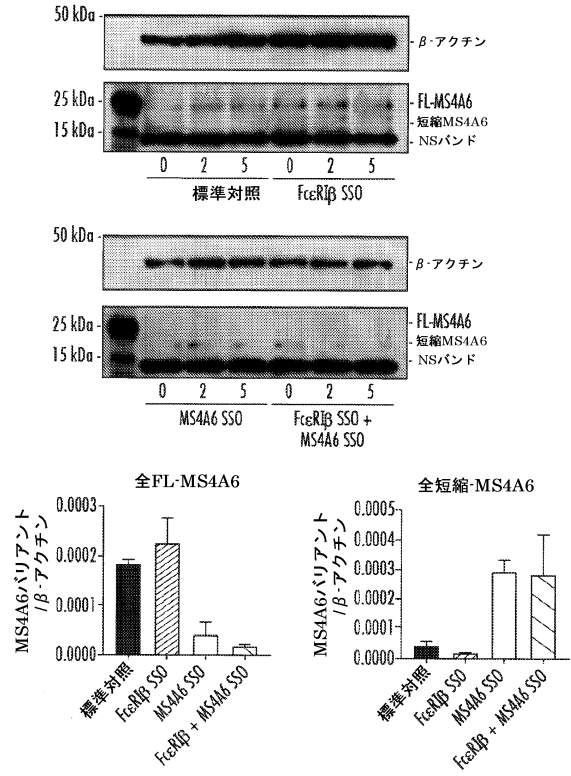
40

50

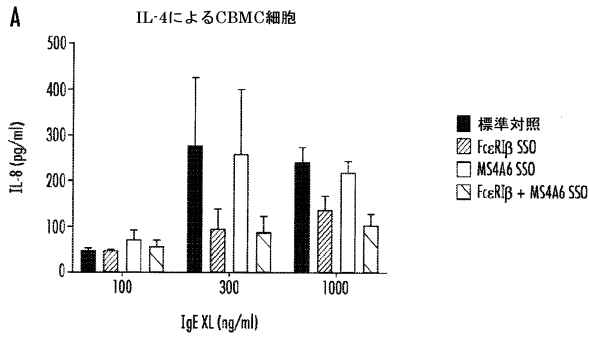
【図 6 E】



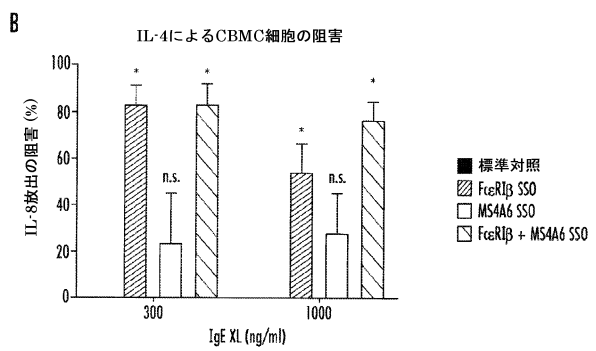
【図 7】



【図 8 A】



【図 8 B】



10

20

30

40

50

【配列表】

2023501347000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 20/59682

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - A61K 45/06, A61K 48/00, C07H 21/02, C12N 15/85 (2021.01) CPC - C12N 15/113, C12N 2320/31, C12N 2320/33, C12N 2320/50, C12Q 1/6883, C12N2310/11		
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) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CRUSE et al., Exon skipping of FcεR1β eliminates expression of the high-affinity IgE receptor in mast cells with therapeutic potential for allergy. PNAS, 6 December 2016, Vol. 113, No. 49, p 14115-14120. Abstract; p14115, col 1, para 3; col 2, para 1; p14116, col 1, para 3-4; p14119, col 2, para 2; Supporting Information, p1, col 1, para 3	1-5, 7-15, 26
Y	LIANG et al., Structural organization of the human MS4A gene cluster on Chromosome 11q12. Immunogenetics, 21 June 2001, Vol. 53, p 357-368. Abstract; p358, col 1, para 2; p362, Fig.4 legend; p363, Figure 5 legend	1-5, 7-15, 26
Y	US 2012/0029059 A1 (WILTON et al.) 2 February 2012 (02.02.2012) Abstract; Claim 15; Claim 22; Claim 34; para [0077]	12-13, (14-15)/(12-13)
Y	WO 2019/200383 A1 (OHIO STATE INNOVATION FOUNDATION) 17 October 2019 (17.10.2019) SEQ ID NO:69	26
☐ 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 another 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 14 March 2021 (14.03.2021)		Date of mailing of the international search report MAR 29 2021
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Lee Young Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 20/59682

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.e of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☒ forming part of the international application as filed:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 20/59682

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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
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.: 6, 16-25, 27-80
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

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

20

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

—Please see continuation in first extra sheet —

1. ☐ As all required additional 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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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.:
1-5, 7-15, 26, limited to SEQ ID NO:1

30

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.

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 20/59682

Continuation of Box No. III. Observations where unity of invention is lacking.

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I+, Claims 1-5, 7-15, 26, directed to an antisense oligomer comprising 10 to 50 linked nucleosides, wherein the antisense oligomer is targeted to a region of a pre-mRNA encoding a human MS4A6A protein, and wherein the targeted region comprises sequences involved in splicing of the human MS4A6A-encoding pre-mRNA. The antisense oligomer will be searched to the extent that the MS4A6A transcript comprises SEQ ID NO: 1 (note, this is the first claimed sequences for MS4A6A transcript). It is believed that claims 1-5, 7-15, 26 encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that the targeted region comprises sequences involved in splicing of the MS4A6A-encoding pre-mRNA comprising human MS4A6A transcript of SEQ ID NO: 1. Additional antisense oligomer(s) targeting additional MS4A6A transcript(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected antisense oligomer(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be an antisense oligomer comprising 10 to 50 linked nucleosides, wherein the antisense oligomer is targeted to a region of a pre-mRNA encoding a murine MS4A6A protein, and wherein the targeted region comprises sequences involved in splicing of the murine MS4A6A-encoding pre-mRNA comprising a murine MS4A6A transcript of SEQ ID NO: 7 (claims 1-5, 7-15, 26).

The inventions listed as Group I+ do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special technical features

The inventions of Group I+ each include the special technical feature of a unique nucleic acid sequence. Each nucleic acid sequence encodes a unique polypeptide, and is considered a distinct technical feature.

Common technical features

No technical features are shared between the nucleic acid sequences of Group I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Group I+ were considered to share the technical features of including:

an antisense oligomer comprising 10 to 50 linked nucleosides, wherein the antisense oligomer is targeted to a region of a pre-mRNA encoding a MS4A6A protein, and wherein the targeted region comprises sequences involved in splicing of the MS4A6A-encoding pre-mRNA, these shared technical features are made obvious by the article entitled "Exon skipping of FcεR1β eliminates expression of the high-affinity IgE receptor in mast cells with therapeutic potential for allergy" by Cruse et al., (PNAS, 6 December 2016, Vol. 113, No. 49, p 14115-14120) (hereinafter "Cruse") in view of the article entitled "Structural organization of the human MS4A gene cluster on Chromosome 11q12" by Liang et al., (Immunogenetics, 21 June 2001, Vol. 53, p 357-368) (hereinafter "Liang").

Cruse teaches an antisense oligomer comprising 10 to 50 linked nucleosides, wherein the antisense oligomer is targeted to a region of a pre-mRNA encoding a MS4A protein, and wherein the targeted region comprises sequences involved in splicing of the MS4A-encoding pre-mRNA (Abstract - "Here, we describe an innovative approach for targeting mast cells in vitro and in vivo using antisense oligonucleotide-mediated exon skipping of the beta-subunit of the high-affinity IgE receptor (FcεR1β) to eliminate surface high-affinity IgE receptor (FcεR1) expression and function, rendering mast cells unresponsive to IgE-mediated activation"; p14116, col 1, para 3 - "We attempted to induce exon skipping with AONs designed to target Ms4a2 exon 3 at the intron-exon boundary and identified that FcεR1β AONs dose-dependently induced exon skipping of FcεR1β mRNA as indicated by RT-PCR compared with cells transfected with an equivalent 25-mer standard control AON (Fig. 1C)."; p14119, col 2, para 2 - "We have devised an AON approach to alter splicing of FcεR1β with the potential of treating allergic conditions such as asthma and atopic dermatitis"). Cruse does not expressly teach MS4A6A.

—please see continuation on next sheet—

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 20/59882

Continuation of Box No. III. Observations where unity of invention is lacking.

—continued from previous sheet—

Liang teaches MS4A6A (Abstract - 'In the current study, we identified three additional human MS4A genes: MS4A4E, MS4A6E, and MS4A10. All family members have at least four potential transmembrane domains and N- and C-terminal cytoplasmic domains encoded by distinct exons, except MS4A6E which contains two transmembrane domains ... Sequence polymorphisms were identified in the MS4A6E gene and common splice variants were observed for the MS4A4A, MS4A5, MS4A6A, and MS4A7 genes. Thus, the MS4A family currently includes 24 distinct human and mouse genes'). Since Liang teaches MS4A genes are closely related group of genes on chromosome 11q12 and many are involved in atopy function and are expressed in leukocytes (p358, col 1, para 2 - 'In addition, Chr 11q13 is a genomic region linked to atopy, with nucleotide sequence polymorphisms in MS4A2 and MS4A3 correlating with disease susceptibility (Adra et al. 1999; Cookson et al. 1999; Kinet 1999; Moffatt and Cookson 1998). Whether sequence polymorphisms identified in the MS4A2 and MS4A6A genes similarly associate with allergic disease has not yet been determined'), and Cruse teaches gene loci 11q12-q13 are strongly linked to allergy and asthma susceptibility (p14115, col 1, para 3 - 'An approach for intervention in allergic inflammation that we have pursued is based on the finding that the gene loci 11q12-q13 are strongly linked to allergy and asthma susceptibility and that the membrane spanning 4A (MS4A) gene family is clustered around 11q12-q13 (4-7).'), it would have been obvious to one of ordinary skill in the art that MS4A6A could be functionally related to MS4A, and thus exon-skipping of MS4A6A may also provide reduction in allergic immune response of mast cells by analogy to MS4A according to Cruse. Further, since Liang teaches the genomic organization of the MS4A6A gene including exon/intron junctions, it would have been obvious to use this information to design an oligonucleotide targeting these regions, for exon-skipping, according to Cruse.

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Group I+ inventions lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

NOTE, continuation of number 4 above: claims 6, 16-25, 27-80 are held unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K	35/76	(2015.01)	A 6 1 K	35/76	
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	11/02	(2006.01)	A 6 1 P	11/02	
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	11/06	
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P	37/08	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5

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

2 7 5 0 2、アベックス、チャールオン ダウンズ レーン 1 6 9 6

F ターム (参考)

4B065 AA93X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA23 CA24 CA44
4C084 AA13 NA14 ZA331 ZA332 ZA341 ZA342 ZA591 ZA592 ZA891 ZA892
ZB081 ZB082 ZB131 ZB132 ZB211 ZB212
4C086 AA01 AA03 EA16 MA01 NA14 ZA33 ZA34 ZA59 ZA89 ZB08
ZB13 ZB21
4C087 AA01 BC83 NA13 NA14 ZA33 ZA34 ZA59 ZA89 ZB08 ZB13
ZB21