

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-14733

(P2019-14733A)

(43) 公開日 平成31年1月31日(2019.1.31)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C O 7 H 21/02 (2006.01)	C O 7 H 21/02 C S P	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/6851 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6851 Z N A Z	4 C O 5 7
C 1 2 Q 1/686 (2018.01)	C 1 2 Q 1/686 Z	4 C O 8 4
C 1 2 Q 1/6876 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6876 Z	4 C O 8 6
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	
審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 31 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2018-182340 (P2018-182340)	(71) 出願人	504013269
(22) 出願日	平成30年9月27日 (2018.9.27)		ロシュ・イノベーション・センター・コペンハーゲン・アクティエゼルスカプ
(62) 分割の表示	特願2016-140508 (P2016-140508) の分割		Roche Innovation Center Copenhagen A/S
原出願日	平成18年11月10日 (2006.11.10)		デンマーク、デーコー 2970ヘアスホルム、フレムティズヴァイ 3 番
(31) 優先権主張番号	60/735, 429	(71) 出願人	508141612
(32) 優先日	平成17年11月10日 (2005.11.10)		ザ ユニバーシティ オブ ノース カロライナ アット チャペル ヒル
(33) 優先権主張国	米国 (US)		THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL
(31) 優先権主張番号	60/862, 350		アメリカ合衆国 27599 ノースカロライナ州 チャペル ヒル
(32) 優先日	平成18年10月20日 (2006.10.20)		最終頁に続く
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

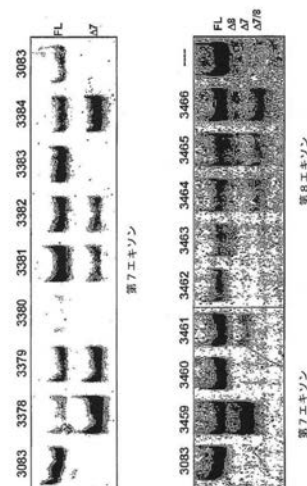
(54) 【発明の名称】 TNFスーパーファミリー受容体に対するスプライス切替オリゴマーならびに疾病治療における該オリゴマーの使用

(57) 【要約】

【課題】 TNFスーパーファミリー受容体に対するスプライス切替オリゴマー (SSO) 及び同SSOを含む組成物を提供すること。

【解決手段】 SEQ ID No. 90、100、101、102または103のヌクレオチド配列のみからなるオリゴマーは、2' O - Meリボヌクレオチドおよび2' O - 4' C - 連結型二環式リボフラノシル (LNA) ヌクレオチドもしくはヌクレオシドから構成される群から独立して選択される1または複数のヌクレオチドまたはヌクレオシドを含んでなる。

【選択図】 図14



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

SEQ ID No. 90、100、101、102または103のヌクレオチド配列のみからなるオリゴマーにおいて、

前記オリゴマーは、2' O - Me リボヌクレオチドおよび2' O - 4' C - 連結型二環式リボフラノシル (LNA) ヌクレオチドもしくはヌクレオシドから構成される群から独立して選択される1または複数のヌクレオチドまたはヌクレオシドを含んでなるオリゴマー。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、スプライス切替オリゴヌクレオチドまたはスプライス切替オリゴマー (SSO) を用いて、前駆体 mRNA 分子のスプライシングを制御し、タンパク質発現を調節するための、組成物および方法に関する。SSO はヌクレオチドに限定されるものではなく、配列特異的に標的 RNA とハイブリダイズすることが可能であってかつ RNase H を活性化しないかまたはそうでなければ標的 RNA の分解をもたらさない、あらゆるポリマーまたは分子を含んでいる。具体的に述べる実施形態は、腫瘍壊死因子 (TNF) スーパーファミリーの受容体に関するものである。

【背景技術】

【0002】

20

本願は、2006年10月20日に出願された米国仮特許出願第60/862,350号ならびに2005年11月10日に出願された米国仮特許出願第60/735,429号 (これらは参照により全体が本願に組込まれる) の優先権を主張する。

【0003】

真核細胞による mRNA の産生は二段階プロセスである。最初に、長い連続的な転写物である前駆体メッセンジャー RNA (前駆体 mRNA) が形成される。前駆体 mRNA は、タンパク質をコードする配列 (エキソン) と、該配列内に散在するタンパク質をコードしない配列 (イントロン) とを含んでいる。次に、スプライシングと呼ばれるプロセスによって、転写物のイントロンが削除されてエキソンが連結される。このプロセスは、成熟した機能的 mRNA の生成の重要なステップである。各イントロンの 5' 端はスプライス供与部位または 5' スプライス部位を含み、各イントロンの 3' 端はスプライス受容部位または 3' スプライス部位を含んでいる。前駆体 mRNA のプロセッシングには、総称としてスプライセオソームと呼ばれる、タンパク質と RNA 分子とを含んだ複合体が必要であり、スプライセオソームはスプライシングおよび核からの mRNA の輸送を行う。

30

【0004】

選択的スプライス部位が存在する場合、スプライシングのステップにより単一の遺伝子から2以上の (関連した) タンパク質を合成することが可能となる (例えば、非特許文献1を参照)。生理的なメカニズムとして選択的スプライシングを用いる遺伝子の中には、炎症系および免疫系に影響を及ぼすタンパク質サイトカインの細胞表面受容体がある。これらのタンパク質は膜内在型として発現され、サイトカインリガンドの結合に応答してシグナルを伝達する。そのようなサイトカイン受容体は、サイトカインに結合してシグナル伝達を防止することのできる分泌型としても存在する。これら2つの型の受容体は選択的スプライシングによって産生され、分子の膜貫通ドメインをコードするために必要な1以上のエキソンの欠失という点で異なっている。一部の受容体については、膜内在型受容体から細胞外ドメインがタンパク質分解的に切断されることにより、該受容体の、分泌性のスプライスバリエーションとは異なる可溶性フラグメントが生成される。

40

【0005】

そのような受容体ファミリーの1つが TNF 受容体 (TNFR) スーパーファミリーである。TNFR スーパーファミリーは目下、現時点で同定されている TNF スーパーファミリーの19種のリガンドのうち1つ以上と結合し、その結果として細胞のシグナル伝達

50

を仲介する、29種の受容体で構成されている。TNFRスーパーファミリーは、カルボキシ末端の細胞内ドメインと、共通のシステインリッチドメイン(CRD)を特徴とするアミノ末端の細胞外ドメインとを備えた、タイプIの膜貫通型タンパク質群である。TNFRスーパーファミリーは、2つのサブグループ、すなわち細胞内デスドメイン(DD)を含む受容体と、DDを欠く受容体とに分けることができる。DDは、受容体の活性化に続くアポトーシス誘導を担う、80アミノ酸のモチーフである。さらに、TNF- α 受容体タイプI(TNFSFR1A、以降「TNFR1」、例えばヒトmRNAについてはGenBank受入番号X55313)およびTNF- α 受容体タイプII(TNFSF1B、以降「TNFR2」、例えばヒトmRNAについてはGenBank受入番号NM_001066)は、多数の受容体サブユニットのアセンブリとその後のTNF- α への結合に必要な、プレリガンド結合アセンブリドメイン(PLAD)と呼ばれる共通の固有ドメインを有している。TNFRスーパーファミリーのほとんどのメンバーは、TNFR関連因子(TRAF)と会合することによりシグナル伝達を活性化する。この会合は、TNFRスーパーファミリーのメンバーの細胞内ドメインにある特定のモチーフによって仲介される(非特許文献2)。TNFRスーパーファミリーの他のメンバーには、RANK(TNFRSF11A)、CD40(TNFRSF5)、CD30(TNFRSF8)およびLT- β R(TNFRSF3)が含まれる。

10

【0006】

TNF- α は、膜結合型のホモトリマーとして存在する炎症性サイトカインであり、プロテアーゼのTNF- α 転換酵素(TACE)によって循環血中に放出される。TNF- α は、外傷および感染に対する炎症反応の仲介物質として循環血中に導入される。TNF- α 活性は、慢性関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎、乾癬および乾癬性関節炎のような炎症性疾患の進行に密接に関連している(非特許文献2)。大量感染の際に経験されるような、高濃度のTNF- α への急激な曝露は、敗血症をもたらす；敗血症の症状には、ショック、低酸素、多臓器不全および死亡が含まれる。慢性的な低量のTNF- α は、減量、脱水および体脂肪の減少を特徴とする疾病である悪液質の原因となる場合があり、また悪性腫瘍に関係している。

20

【0007】

TNF- α 活性は主に、2つの異なる遺伝子によってコードされる2つの受容体、TNFR1およびTNFR2を通して仲介される。TNFR1は、分子量およそ55キダルトン(kDa)の膜結合型タンパク質であり、TNFR2は分子量75kDaの膜結合型タンパク質である。いずれの受容体の可溶性細胞外ドメインも、メタロプロテアーゼの作用によって細胞膜からある程度脱落する。さらに、TNFR2の前駆体mRNAは選択的スプライシングを受け、完全長で活性型の膜結合型受容体(mTNFR2)、または膜貫通のためのコード配列を包含するエキソン7および8を欠いた分泌性のデコイ受容体(sTNFR2)のいずれかを生じる(非特許文献3)。sTNFR2はTNF- α に結合するが生理反応を誘発せず、したがってTNF- α 活性を低減する。TNFR1の内在的分泌性スプライスバリエーションはまだ同定されていないが、上記2つの受容体の遺伝子構造の類似性は、このTNFR1アイソフォームを生じる可能性を強く示唆している。

30

【0008】

TNFシグナル伝達経路を標的とする薬物で処理された、TNFR1およびTNFR2をいずれも欠くノックアウトマウスは、そのような薬物が脳卒中または外傷性脳損傷の治療に有益かもしれないことを示している(非特許文献4)。それぞれヒトの脳マラリアおよび多発性硬化症のモデルである、実験的に誘発された脳マラリア(非特許文献5)および自己免疫性脳脊髄炎(非特許文献6)におけるTNFR2の役割を確立するために、TNFR2ノックアウトマウスも使用された。

40

【0009】

TNFR2はT細胞上に高密度で存在し、間質性肺疾患の肺の微小環境において肺炎をもたらす免疫反応に関与するようである(非特許文献7)。TNFR2はヒトの脂質代謝障害にも関与しており、肥満およびインスリン抵抗性(非特許文献8)、家族性複合型

50

高脂血症（非特許文献 9、非特許文献 10）、高血圧および高コレステロール血症（非特許文献 11）と関連付けられてきた。TNFR2 は近年、ヒトのナルコレプシーと関連付けられた（非特許文献 12）。さらに、TNFR2 の多型は、全身性エリテマトーデスへの罹病性につながるようである（非特許文献 13）。

【0010】

CD40 のスプライスバリエント（非特許文献 14）（「Tone」）および CD95（FAS）のスプライスバリエント（非特許文献 15）が、悪性腫瘍において見出されている。これらのスプライスバリエントのいくつかは、エキソン 7 の読枠に影響する欠失または突然変異により、膜貫通領域を喪失している。これらが、悪性変換に起因する異常バリエントに相当するのか生理的な代替物に相当するのかについては、まだ不明である。

10

【0011】

TNFスーパーファミリーのメンバーによる過剰な活性が関与しているので、分泌型の量が増大し膜内在型の量が減少するように TNFR 受容体の選択的スプライシングを制御することは有用であろう。本発明は、この目的を達成するためのスプライス切替オリゴヌクレオチドまたはスプライス切替オリゴマー（SSO）を提供する。SSO はアンチセンスオリゴヌクレオチド（ASON）に似ている。しかしながら、ASON とは対照的に、SSO は、RNase H による標的 RNA の分解を引き起こすことなく標的 RNA にハイブリダイズすることができる。

【0012】

SSO は、ある種のサラセミアで見出された異常なスプライシングを修正するために使用されている（コール（Cole）の特許文献 1、非特許文献 16）。IL-5 受容体の α 鎖（IL-5R α ）を用いた研究から、膜貫通型エキソンを対象とする SSO が分泌型の合成を増大させ、膜内在型の合成を抑制することが実証された（ベネット（Bennett）の特許文献 2；非特許文献 17）。

20

【0013】

IL-5 受容体は、ヘテロダイマーとして生じるタイプの受容体のメンバーである。このインターロイキン 5 受容体（IL-5R）は、IL-3R の受容体ファミリーのメンバーであり、このファミリーにはインターロイキン 3 受容体（IL-3R）および GM-CSF も含まれる。IL-3R ファミリーのメンバーは、共有される共通の β 鎖と、サイトカインリガンド特異性を伝える固有の α 鎖とで構成される多重サブユニット受容体である。IL-3R ファミリーのメンバーは造血系において発現される。特に、IL-5 はもっぱら好酸球、好塩基球および B 細胞において発現される（非特許文献 18）。これらの受容体および本発明の TNFスーパーファミリーは配列相同性を持たず、別個のシグナル伝達経路において作用する。

30

【0014】

SSO は、膜貫通領域の上流にあるエキソン 6 が欠失した結果としてタンパク質の読枠が変更された、Tone の文献において検出された主要な CD40 スプライスバリエントを生産するために使用された。この SSO は予想どおりの mRNA スプライスバリエントをもたらしたが、分泌性の受容体は検出することができなかったため、該バリエント mRNA の翻訳産物は不安定なようであった（非特許文献 19）。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0015】

【特許文献 1】米国特許第 5,976,879 号明細書

【特許文献 2】米国特許第 6,210,892 号明細書

【非特許文献】

【0016】

【非特許文献 1】Gist, A., 2005, Scientific American, April, p. 60

【非特許文献 2】Palladino, M. A., et al., 2003, Nat. R

50

ev. Drug Discov. 2: 736 - 46

【非特許文献3】Lainez et al., 2004, Int. Immunol, 16: 169

【非特許文献4】Bruce, et al., 1996, Nat. Med. 2: 788

【非特許文献5】Lucas, R., et al., 1997, Eur. J. Immunol. 27: 1719

【非特許文献6】Suvannavejh, G. C., et al., 2000, Cell. Immunol., 205: 24

【非特許文献7】Agostini, C, et al., 1996, Am. J. Respir. Crit. Care Med, 153: 1359

【非特許文献8】Fernandez - Real, et al., 2000, Diabetes Care, 23: 831

【非特許文献9】Geurts, et al., 2000, Hum. Mol. Genet. 9: 2067

【非特許文献10】van Greevenbroek, et al., 2000, Atherosclerosis, 153: 1

【非特許文献11】Glenn, et al., 2000, Hum. Mol. Genet, 9: 1943

【非特許文献12】Komata, T., et al., 1999, Tissue Antigens, 53: 527

【非特許文献13】Hohjoh, H., et al., 2000, Tissue Antigens, 56: 446

【非特許文献14】Tone, M., et al., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. 98: 1751

【非特許文献15】Shen, L., et al., 2002, Am. J. Pathol. 161: 2123

【非特許文献16】Lacerra, G., et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. 97: 9591

【非特許文献17】Karras, J. G., et al., 2000, Mol. Pharm, 58: 380

【非特許文献18】Adachiand, T. and Alam, R., 1998, Am. J. Physiol. 275: C623 - 33

【非特許文献19】Siwkowski, A. M., et al., 2004, Nucleic Acids Res. 32; 2695

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0017】

本発明の目的は、TNFスーパーファミリー受容体に対するスプライス切替オリゴマー(SSO)及び同SSOを含む組成物を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0018】

上記した課題を解決するために、請求項1に記載の発明は、SEQ ID No. 90、100、101、102または103のヌクレオチド配列のみからなるオリゴマーにおいて、同オリゴマーは、2' O - Meリボヌクレオチドおよび2' O - 4' C - 連結型二環式リボフラノシル(LNA)ヌクレオチドもしくはヌクレオシドから構成される群から独立して選択される1または複数のヌクレオチドまたはヌクレオシドを含んでなるオリゴマー、を提供する。

【0019】

本発明は、TNF受容体(TNFR1およびTNFR2)ならびにTNFRスーパーファミリーのその他のサイトカイン受容体をコードする前駆体mRNAのスプライシングを

10

20

30

40

50

制御することにより、前記受容体の発現を制御するための組成物ならびに方法を提供する。より具体的には、本発明は、分泌型の発現増大および膜内在型の発現低下をもたらす。更に、本発明は、過剰なサイトカイン活性に関連した疾病の治療に使用することができる。

【0020】

膜内在型のmRNA中には存在するが、分泌型のmRNAを生じる一次転写産物（「前駆体mRNA」）からは除去されるエキソンは、「膜貫通エキソン」と呼ばれる。本発明には、受容体の前駆体mRNAの膜貫通エキソンおよび/または隣接するイントロンのどちらかに相補的な核酸および核酸アナログが用いられる。相補性は、スプライス部位にかかる前駆体mRNA配列中の配列に基づくものであってよく、限定するものではないが、エキソンイントロンジャンクションにまたがる配列に基づいた相補性を挙げることができる。あるいは相補性はイントロンの配列にのみ基づいてもよいし、または相補性はエキソンの配列にのみ基づいてもよい。

10

【0021】

利用可能かつ当業者に周知の、いくつかの代替となる化学成分がある。1つの重要な特徴は、2'-デオキシオリゴヌクレオチド（「アンチセンスオリゴヌクレオチド」、以降「ASON」）のようにRNaseHによる標的RNAの分解を引き起こすことなく、標的RNAにハイブリダイズする能力である。明確に述べれば、そのような化合物がスプライス切替オリゴマー（SSO）と呼ばれることになる。当業者には明らかなように、SSOには、限定するものではないが、2'-O-修飾オリゴヌクレオチドおよびリボヌクレオシドホスホロチオエート、ならびにペプチド核酸およびリボフラノシル系の結合を欠くその他のポリマーが挙げられる。

20

【0022】

本発明の1つの実施形態は、患者または生体対象へのSSOの投与により炎症性の疾病または状態を治療する方法である。投与されるSSOは、安定で分泌性でリガンド結合性の型のTNFRスーパーファミリー受容体をコードするスプライスバリエーションを生じるように、前駆体mRNAのスプライシングを変更し、それによってその受容体のリガンドの活性を減少させる。別の実施形態では、本発明は、細胞へのSSOの投与により、該細胞において安定で分泌性でリガンド結合性の型のTNFRスーパーファミリー受容体を産生させる方法である。

30

【0023】

本発明の前述およびその他の目的および態様は、本明細書中の図面ならびに後述の詳細において詳細に議論される。

【発明の効果】

【0024】

本発明によれば、TNFスーパーファミリー受容体に対するスプライス切替オリゴマー（SSO）及び同SSOを含む組成物が提供できた。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】腫瘍壊死因子受容体の前駆体mRNAの一部の構造ならびにTNFR1およびTNFR2に関するスプライス生成物を示す図。これらの転写物は通常、受容体の膜貫通ドメインをコードするエキソン7およびエキソン8を含んでいる。これらのエキソンの一方または両方を標的とするSSO（パー）は選択的スプライシングを誘発し、その結果として完全な膜貫通ドメインを欠く転写物を生じる。

40

【図2】細胞培養物におけるマウスTNFR1に対するSSOのスプライシング生成物を示す図。NIH-3T3細胞を、mockトランスフェクション[Lipofectamine（登録商標）2000（LFA2000のみ）]するか、あるいは記載の濃度の、第7エキソンをスキップするTNFR1 SSO（A7-5もしくはA7-10）単独、または第7エキソンをスキップするSSOと第8エキソンをスキップするSSO（A8-3）との組み合わせのいずれかを用いてトランスフェクションした。24時間後に全RN

50

Aを単離してRT-PCRを実施した。PCRプライマーを使用して第5エクソンから第9エクソンまでを増幅し、「完全長」のTNFR1が475bpのバンドによって表わされるようにした。第7エクソンを欠く転写物(Δエクソン7)、第7エクソンおよび第8エクソンの両方を欠く転写物(Δエクソン7/8)は、それぞれ361bpおよび332bpのバンドによって表わされる。

【図3】細胞培養物におけるマウスTNFR2に対するSSOのスプライシング生成物を示す図。NIH-3T3細胞を、mockトランスフェクション(LFA2000のみ)するか、あるいは記載の濃度の、第7エクソンをスキップするTNFR2 SSO(B7-6もしくはB7-1)単独、または第7エクソンをスキップするオリゴヌクレオチドと第8エクソンをスキップするオリゴヌクレオチド(B8-4)との組み合わせのいずれかをを用いてトランスフェクションした。24時間後に全RNAを単離してRT-PCRを実施した。PCRプライマーを使用して第5エクソンから第9エクソンまでを増幅し、「完全長」のTNFR2が486bpのバンドによって表わされるようにした。第7エクソンを欠く転写物(Δエクソン7)、第7エクソンおよび第8エクソンの両方を欠く転写物(Δエクソン7/8)は、それぞれ408bpおよび373bpのバンドによって表わされる。

10

【図4A】マウスTNFR1の第7エクソンおよび隣接するイントロンの配列を示す図。さらに、スプライス切替活性についてアッセイした2'-O-Me-オリゴリボヌクレオシド-ホスホロチオエートSSOの配列も示されている。

【図4B】マウスTNFR1の第8エクソンおよび隣接するイントロンの配列を示す図。さらに、スプライス切替活性についてアッセイした2'-O-Me-オリゴリボヌクレオシド-ホスホロチオエートSSOの配列も示されている。

20

【図5A】マウスTNFR2の第7エクソンおよび隣接するイントロンの配列を示す図。さらに、スプライス切替活性についてアッセイした2'-O-Me-オリゴリボヌクレオシド-ホスホロチオエートSSOの配列も示されている。

【図5B】マウスTNFR2の第8エクソンおよび隣接するイントロンの配列を示す図。さらに、スプライス切替活性についてアッセイした2'-O-Me-オリゴリボヌクレオシド-ホスホロチオエートSSOの配列も示されている。

【図6】ヒトおよびマウスのTNF受容体遺伝子の膜貫通エクソンをコードする領域のアラインメントを示す図。マウスの配列SEQ ID No. 107、108、109および110は、ヒトの配列SEQ ID No. 1、2、3および4にそれぞれ相同である。

30

【図7】図2および図3で述べたように実施したアッセイにおける、マウス初代肝細胞培養物についてのSSOによるスプライシング生成物を示す図。

【図8A】表2および表3に記載の、マウスおよびヒトのTNFR2(TNFRSF1B)のLNA SSO配列を示す図。標的とするエクソンに対する各SSOの相対位置を概略的に示している。

【図8B】表2および表3に記載の、マウスおよびヒトのTNFR2(TNFRSF1B)のLNA SSO配列を示す図。前駆体mRNA配列(5'→3')および該配列にハイブリダイズしたSSO(3'→5')を示している。

40

【図8C】表2および表3に記載の、マウスおよびヒトのTNFR1(TNFRSF1A)のLNA SSO配列を示す図。標的とするエクソンに対する各SSOの相対位置を概略的に示している。

【図8D】表2および表3に記載の、マウスおよびヒトのTNFR1(TNFRSF1A)のLNA SSO配列を示す図。前駆体mRNA配列(5'→3')および該配列にハイブリダイズしたSSO(3'→5')を示している。

【図9】LNA SSOで処理されたマウスL929細胞のスプライシング生成物を示す図。細胞を、最終濃度50nMの記載のLNA SSOでトランスフェクションした。24時間後、細胞を溶解してRT-PCRによりスプライス切替について分析した。上側パネルは第7エクソンを標的とするSSO；下側パネルは第8エクソンを標的とするSSO

50

である。FLは完全長のTNFR2アンプリコンであり；Δ7、Δ8、Δ7/8はそれぞれのTNFR2スプライスバリエーションのアンプリコンである。

【図10】TNFR2を標的とするLNA SSOの組み合わせを用いた、マウスL929細胞のスプライシング生成物を示す図。L929細胞を単一または複数の記載のLNA SSOそれぞれ50 nMで処理し、24時間後に図9で述べたようにして分析した。

【図11】TNFR1を標的とするLNA SSOの組み合わせを用いた、マウスL929細胞のスプライシング生成物を示す図。L929細胞を単一または複数の記載のLNA SSOそれぞれ50 nMで処理し、24時間後に図9で述べたようにして分析した。

【図12】LNA SSOで処理されたマウス初代肝細胞のスプライシング生成物を示す図。マウス初代肝細胞を、それぞれ最終濃度33 nMの単一または複数の記載のLNA SSOでトランスフェクションし、図9で述べたようにして分析した。

【図13】L929細胞（左）およびマウス初代肝細胞（右）由来の分泌型TNFR2スプライスバリエーションの検出をグラフで示す図。細胞を記載のLNA SSOでトランスフェクションした。72時間後、細胞外の培地を取り出して、R & D Systems（米国ミネソタ州ミネアポリス所在）のQuantikine（登録商標）マウスsTNFR1 ELISAキットの抗体を使用して、酵素免疫測定法（ELISA）によって分析した。データは1 mLあたりの可溶性TNFR2（pg）として表されている。

【図14】TNFR2を標的とするLNA SSOで処理されたヒト初代肝細胞のスプライシング生成物を示す図。ヒト初代肝細胞を記載のLNA SSOでトランスフェクションし、24時間後に図9で述べたようにしてRT-PCRによりスプライス切替について分析した。PCRプライマーを用いて第5エクソンから第9エクソンまでを増幅し、「完全長」（FL）のTNFR2が463 bpのバンドで表わされるようにした。第7エクソンを欠く転写物（Δエクソン7）、第8エクソンを欠く転写物（Δエクソン8）、第7エクソンおよび第8エクソンの両方を欠く転写物（Δエクソン7/8）は、それぞれ385 bp、428 bpおよび350 bpのバンドで表わされる。

【図15】マウスへのLNA 3274（上）および3305（下）の腹腔内（i.p.）注射に関するスプライシング生成物を示す図。LNA 3274は、1日あたり25 mg/kgとして4日間（4/1および4/10）または10日間（10/1）、i.p.注射した。最後の注射の1日後（4/1および10/1）または10日後（4/10）にマウスを屠殺し、肝臓由来の全RNAをRT-PCRによってTNFR2のスプライス切替について分析した。LNA 3305は、1日あたり記載の用量で4日間注射した。翌日にマウスを屠殺し、3274で処理した動物と同じようにして肝臓を分析した。

【図16】SSOで処理した10日後のマウス血清中の可溶性TNFR2の量をグラフで示す図（上側パネル）。マウスに、記載のSSOまたは生理食塩水（1群当たりn = 5）を1日あたり25 mg/kgとして10日間i.p.注射した。注射を始める4日前および最後の注射の後記載の日数において血清を回収した。血清を図13で述べたようにしてELISAで分析した。10日目にマウスを屠殺し、肝臓を図9で述べたようにしてRT-PCRによりTNFR2のスプライス切替について分析した（下側パネル）。

【図17】TNFR2 SSOで処理した後の血清中の可溶性TNFR1の量をグラフで示す図。図16由来のマウス血清を、R & D Systems（米国ミネソタ州ミネアポリス所在）のQuantikine（登録商標）マウスsTNFR1 ELISAキットの抗体を使用して、ELISAにより可溶性TNFR1について分析した。

【図18】SSOで処理した27日後のマウス血清中の可溶性TNFR2の量をグラフで示す図（上側パネル）。マウスを図16と同じように処理し、ただし最後の注射の27日後まで血清試料を回収した。LNA 3083および3272は、TNFR2スプライス切替能力のない対照のSSOである。27日目にマウスを屠殺し、肝臓を図9で述べたようにしてRT-PCRによりTNFR2のスプライス切替について分析した（下側パネル）。

【図19】LNAオリゴヌクレオチドで処理したマウス由来の血清中の抗TNF-α活性をグラフで示す図。L929細胞を、0.1 ng/mLのTNF-α（TNF）、または

10

20

30

40

50

TNF- α + 記載のオリゴヌクレオチドで処理したマウス由来の血清 10% のいずれかで処理した (図 18 も参照のこと)。細胞の生存率を 24 時間後に測定し、未処理の細胞 (未処理) に対して標準化した。

【図 20】図 19 で述べた細胞生存アッセイを使用して、LNA オリゴヌクレオチドで処理したマウス由来の血清の抗 TNF- α 活性を、組換え型可溶性 TNFR2 (rsTNFR2) および Enbre1 (登録商標) の活性と比較するグラフ。

【発明を実施するための形態】

【0026】

本明細書で使用されるように、用語「腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー」または「TNFRスーパーファミリー」または「TNFRSF」は、カルボキシ末端の細胞内ドメインと、共通のシステインリッチドメイン (CRD) を特徴とするアミノ末端の細胞外ドメインとを備えた、タイプ I の膜貫通型タンパク質群を指す。TNFRスーパーファミリーは受容体で構成され、該受容体は TNF スーパーファミリーの 1 または複数のリガンドに結合する結果として細胞のシグナル伝達を仲介する。TNFRスーパーファミリーは、2 つのサブグループ、すなわち細胞内デスドメイン (DD) を含む受容体と、DD を欠く受容体とに分けることができる。DD は、受容体の活性化に続くアポトーシス誘導を担う 80 アミノ酸のモチーフである。TNFRスーパーファミリーのメンバーには、限定するものではないが、TNFR1 (TNFRSF1A)、TNFR2 (TNFRSF1B)、RANK (TNFRSF11A)、CD40 (TNFRSF5)、CD30 (TNFRSF8) および LT- β R (TNFRSF3) が含まれる。

10

20

【0027】

本明細書で使用されるように、用語「腫瘍壊死因子スーパーファミリー」または「TNFスーパーファミリー」は、TNFRスーパーファミリーの 1 または複数の受容体に結合するリガンド群を指す。TNFファミリーのリガンドが対応する 1 または複数の受容体に結合すると、細胞のシグナル伝達が仲介される。TNFスーパーファミリーのメンバーには、限定するものではないが、TNF- α 、RANKL、CD40L、LT- α 、または LT- β が含まれる。

【0028】

本明細書で使用されるように、用語「炎症性の疾病または状態」は、TNFスーパーファミリー由来のリガンドが対応する 1 または複数の受容体に結合することに少なくとも部分的に起因するか、または該結合によって悪化する、疾病、障害またはその他の医学的状态を指す。そのような疾病または状態には、限定するものではないが、TNFスーパーファミリーのリガンドのレベル上昇、TNFRスーパーファミリー受容体レベルのレベル上昇、または対応するシグナル伝達経路の鋭敏化の増大を伴うものが挙げられる。炎症性の疾病または状態の例としては、限定するものではないが、慢性関節リウマチ、若年性慢性関節リウマチ、乾癬、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、炎症性腸疾患 (クローン病または潰瘍性大腸炎を含む)、肝炎、敗血症、アルコール性肝疾患、および非アルコール性の脂肪症が挙げられる。

30

【0029】

本明細書で使用されるように、用語「肝炎」は、少なくとも部分的には肝臓の炎症を特徴とする、消化器病学上の疾病、状態または障害を指す。肝炎の例としては、限定するものではないが、A 型肝炎ウイルス、B 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルス、または虚血 / 再灌流に関連した肝臓の炎症、に関連した肝炎が挙げられる。

40

【0030】

本明細書で使用されるように、用語「膜結合型」または「膜内在型」は、細胞膜を貫通するアミノ酸配列を有するタンパク質であって、細胞膜のいずれの側にもアミノ酸配列を備えているものを指す。

【0031】

本明細書で使用されるように、用語「安定で分泌性でリガンド結合性の型」は、「安定で可溶性でリガンド結合性の型」として知られることもあるように (ここで、用語「分泌

50

性」および「可溶性」は同意語であり、本明細書中では互換的である）、本来の膜結合型受容体の類縁タンパク質であって、該タンパク質が分泌性で安定であり、かつ対応するリガンドに結合する能力を維持しているものを指す。留意すべきことは、そのような分泌型が生理的なものであるかどうかによって上記の型が定義されるものではないこと、単にそのスプライスバリエーションの生成物が、生成された場合に分泌性で、安定で、かつリガンド結合能力を維持しているであろうということである。

【0032】

用語「分泌性」は、その型が可溶性であること、すなわち、細胞膜にはもはや結合しないことを意味する。この意味において、当業者に周知の従来のアッセイを用いて、ある型のうちのほとんどが膜と関係のないフラクション（例えば細胞上清中または血清中）に検出可能な場合、その型は可溶性ということになる。

10

【0033】

用語「安定な」とは、その分泌型が、当業者により従来のアッセイを用いて検出可能であることを意味する。例えば、ウエスタンブロット法、ELISAアッセイを用いて、患者から採取された細胞、細胞上清または血清からその型を検出することができる。

【0034】

用語「リガンド結合性」は、その型が、対応する膜内在型の特異的リガンド結合活性を少なくともあるレベル（すべてである必要はない）で保持していることを意味する。

本明細書で使用されるように、用語「リガンドの活性を低減する」とは、受容体へのリガンドの結合またはリガンドと受容体との相互作用に起因する細胞内シグナル伝達の減少をもたらす任意の作用を指す。例えば、活性は、リガンドが該リガンドの受容体の可溶型に結合することにより、あるいはリガンドに結合可能な膜型受容体の量を減少させることにより、低減可能である。

20

【0035】

本明細書で使用されるように、用語「前駆体mRNAのスプライシングを変更する」とは、細胞の標的前駆体mRNAのスプライシングを変更する結果としてスプライス生成物の比率を変更することを指す。そのようなスプライシングの変更は、当業者に周知の様々な技法によって検出可能である。例えば、細胞の全RNAについてのRT-PCRを用いて、SSO存在下および非存在下でのスプライス生成物の比率を検出することができる。

【0036】

本明細書で使用されるように、用語「相補的」は、SSOと、標的配列を含んでいるDNAまたはRNAとの間に、安定かつ特異的な結合が生じるような、十分な程度の相補性または正確な対合を示すために使用される。当分野では当然のことであるが、SSOの配列はその標的の配列に100%相補的である必要はない。スプライシングが可能な条件下で、標的への結合が生じ、かつ非特異的な結合は回避される場合に、十分な程度の相補性が存在する。

30

【0037】

本発明は、TNFRスーパーファミリー由来の受容体の選択的スプライシングを制御して、可溶性で、安定で、分泌性で、リガンド結合性の型の量が増大し、膜内在型の量が減少するようにするために、スプライス切替オリゴヌクレオチドまたはスプライス切替オリゴマー（SSO）を使用する。本発明の方法および組成物を、過剰なTNFスーパーファミリー活性に関連した疾病の治療に使用することができる。

40

【0038】

従って、本発明の1つの実施形態は、患者にSSOを投与することにより炎症性の疾病または状態を治療する方法である。投与されたSSOは、安定で、分泌性で、リガンド結合性の型のTNFRスーパーファミリー受容体をコードするスプライスバリエーションを生成するように前駆体mRNAのスプライシングを変更し、そうすることによって該受容体のリガンドの活性を減少させる。別の実施形態では、本発明は、細胞にSSOを投与することにより、該細胞において安定で、分泌性で、リガンド結合性の型のTNFスーパーファミリー受容体を生成する方法である。

50

【0039】

以下に議論される本発明の次の態様は先述の実施形態に当てはまる。

SSOの長さはアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASON)に類似しており、典型的には約10~24ヌクレオチドである。本発明は、RNAにハイブリダイズするが、従来のアンチセンス2'-デオキシオリゴヌクレオチドのようにRNAseHによる該RNAの破壊を活性化することはない、いくつかの化学成分でできたSSOを用いて実行することができる。本発明は、2'-O-メチルまたは2'-O-メチルオキシエチル・ホスホロチオエートのような、2'-O修飾された核酸オリゴマーを使用して実行することができる。核酸塩基は糖に連結される必要はなく、いわゆるペプチド核酸オリゴマーまたはモルホリン系オリゴマーを使用することができる。これらの様々な連結化学成分の比較については、サザニ、P.(Sazani, P.)ら、2001, Nucleic Acids Res. 29:3695に記載されている。スプライス切替オリゴヌクレオチドという用語は、上記の種のを包含するように意図されている。当業者は、アンチセンスオリゴヌクレオチドギャップマーとSSOとの関係を十分に理解するだろう。ギャップマー(gapmer)は、RNAseHを活性化する領域(典型的には2'-デオキシリボヌクレオシドホスホロチオエート)を含むASONであって、該領域には活性化作用のないヌクレアーゼ耐性オリゴマーが隣接している。一般に、ギャップマーASONの該隣接配列に適した任意の化学成分を、SSOに使用することができる。

10

【0040】

本発明のSSOは、よく知られた固相合成技法によって製造可能である。当分野で周知のそのような合成のための他の手段も、付随的に、または代替的に使用可能である。ホスホロチオエートおよびアルキル化誘導体のようなオリゴヌクレオチドを調製するために同様の技法を使用することはよく知られている。

20

【0041】

特に好ましい化学成分は、ロックされた核酸(LNA)によって提供される(コシキン、A.A.(Koshkin, A.A.)ら、1998, Tetrahedron 54:3607; オビカ、S.(Obika, S.)ら、1998, Tetrahedron Lett. 39:5401)。LNAは、リボフラノシル部分が2'-Oと4'-Cとの間の架橋によって二環となっていること以外の点では、従来のホスホジエステル結合したリボヌクレオチドである。この架橋により、リボフラノシル環の立体配座は、オリゴヌクレオチドが相補的RNAにハイブリダイズするときに採る立体配座(3'-endo配座)内に制約される。LNAの合成における最近の進歩については国際公開公報第03/095467号パンフレットに記載されている。架橋は、最も典型的にはメチレンまたはエチレンである。2'-O, 4'-C-エチレン架橋型の核酸(ENA)、ならびにその他のLNAの合成については、モリタ(Morita)ら、2003, Bioorg. & Med. Chem. 11:2211に記載されている。しかしながら、別の化学成分を使用することも可能であり、2'-Oが2'-Nで置き換えられてもよい。LNAおよび従来のヌクレオチドが混合されてキメラ状のSSOが形成されてもよい。例えば、LNAと2'-デオキシヌクレオチドとが交互になっている、またはLNAと2'-O-Meもしくは2'-O-MOEとが交互になっているキメラ状SSOを使用することができる。2'-デオキシヌクレオチドに限らず、これらの化学成分のうち任意のものの別例は、ホスホジエステルに代わるホスホロチオエートジエステル結合である。インビボでの使用については、ホスホロチオエート結合が好ましい。

30

40

【0042】

LNAヌクレオチドがSSOにおいて使用される場合、非LNAヌクレオチドも存在することが好ましい。LNAヌクレオチドは、かなりの非特異的結合を存在させる高いハイブリダイゼーション親和性を有し、このことは遊離SSOの有効濃度を低減する可能性がある。LNAヌクレオチドが使用される場合、LNAヌクレオチドは2'-デオキシヌクレオチドとともに好都合なように交互になされるとよい。交互になされるパターンには重要な意味はない。ヌクレオチドが交互になっているもの、ジヌクレオチドが交互になっ

50

ているもの、または混合型のパターン、例えば、L D L D L DまたはL L D L L DまたはL D D L D Dを使用することができる。2' - デオキシヌクレオチドまたは2' - デオキシヌクレオシドホスホリチオエートがL N Aヌクレオチドと混合される場合は、R N a s e Hの活性化の回避が重要である。S S OのL N Aヌクレオチドが約3分の1 ~ 3分の2であることが適切であろうと予想される。例えば、S S Oが12量体ならば、少なくとも4つのL N Aヌクレオチドおよび4つの従来型ヌクレオチドが存在することになる。

【0043】

S S Oの塩基は、従来のシトシン、グアニン、アデニン、およびウラシルまたはチミジンであってよい。別例として、修飾塩基も使用することができる。特に興味深いのは、結合親和性を増大させる修飾塩基である。好ましい修飾塩基の非限定的な一例は、いわゆるG形クランプまたは9 - (アミノエトキシ)フェノキサジンヌクレオチド、グアノシンとともに4つの水素結合を形成するシトシンアナログである。(フラナガン、W. M. (Flanagan, W. M.)ら、1999, Proc. Natl. Acad. Sci. 96: 3513; ホルメス、S. C. (Holmes, S. C.)、2003, Nucleic Acids Res. 31: 2759)。

10

【0044】

R N a s e Hを活性化しない、多数の代替化学成分を利用可能である。例えば、適切なS S Oは、ヌクレオチド間を架橋するリン酸残基のうち少なくとも1つまたはすべてが修飾リン酸であるオリゴヌクレオチドであってもよく、修飾リン酸は例えばメチルホスホネート、メチルホスホノチオエート、ホスホロモルホリデート、ホスホロピペラジデートおよびホスホロアミデートなどである。例えば、ヌクレオチド間を架橋するリン酸残基が1つおきに記載のように修飾されてもよい。別の非限定的な例では、そのようなS S Oは、ヌクレオチドのうち少なくとも1つまたはすべてが2' 低級アルキル部分(例えば、C1 ~ C4の、直線状または分岐状の、飽和または不飽和のアルキル、例えばメチル、エチル、エテニル、プロピル、1 - プロペニル、2 - プロペニル、およびイソプロピル)を含んでいるオリゴヌクレオチドである。例えば、ヌクレオチドが1つおきに記載のように修飾されてもよい。[米国特許第5, 976, 879号明細書の第4カラムの参考文献を参照のこと]。

20

【0045】

S S Oの長さ(すなわちオリゴマー中のモノマーの数)は、約10 ~ 約30塩基長となる。1つの実施形態では、20塩基の2' O - Me - リボヌクレオシドホスホリチオエートが有効である。当業者には当然のことであるが、親和性を増大させる化学修飾が使用される場合は、S S Oはより短くかつ特異性を保持したものとなりうる。さらに当業者には当然のことであるが、S S Oのサイズの上限は、標的配列の特異的認識を維持するため、かつ二次構造を形成するS S Oの分子内ハイブリダイゼーションを回避するための必要性によって、ならびに細胞に侵入可能な限度によって決まる。これらの制限は、S S Oの長さが増大すると(S S Oの親和性によって変わる特定の長さを超えると)、特異性の低下、不活性化、または不十分な活性が見出されることが多くなるであろうことを示唆している。

30

【0046】

本発明のS S Oには、限定するものではないが、S S Oの活性、細胞内分布もしくは細胞への取り込みを増強する1以上の部分またはコンジュゲートがS S Oに化学的に結合しているS S O修飾体が挙げられる。そのような部分には、限定するものではないが、脂質部分、例えばコレステロール部分、コール酸、チオエーテル、例えばヘキシル - S - トリチルチオール、チオコレステロール、脂肪鎖、例えばドデカンジオールまたはウンデシル残基、リン脂質、例えばジヘキサデシル - r a c - グリセロールまたはトリエチルアンモニウム1, 2 - ジ - O - ヘキサデシル - r a c - グリセロ - 3 - H - ホスホネート、ポリアミンまたはポリエチレングリコール鎖、アダマンタン酢酸、パルミチル部分、オクタデシルアミンまたはヘキシルアミノ - カルボニル - オキシコレステロール部分が挙げられる。

40

50

【 0 0 4 7 】

所与の S S O 中のすべての部位について一様に修飾されている必要はなく、実際、前述の修飾のうち 2 以上が単一の化合物に、あるいは S S O 内の単一のヌクレオシドに組み込まれてもよい。

【 0 0 4 8 】

S S O は、取り込み、分布及び吸収のうちの少なくとも一つを助けるために、例えばリポソーム、受容体を標的とする分子、経口用、直腸用、局所用もしくはその他の処方物のような、他の分子、分子構造体、または化合物の混合物とともに、混合、カプセル化、コンジュゲート化、またはそうでなければ会合されうる。

【 0 0 4 9 】

当業者には当然のことであるが、細胞の分化には、限定するものではないが、スプライセオソームの分化が含まれる。従って、本発明の任意の特定の S S O の活性は、該 S S O が導入される細胞種によって変わりうる。例えば、細胞種において有効な S S O は別の細胞種では効果がないかもしれない。

【 0 0 5 0 】

本発明の方法、オリゴヌクレオチドおよび製剤は、ヒトまたは動物の遺伝子におけるスプライシングを調べるためのインビトロまたはインビボのツールとしても有用である。そのような方法を、本明細書に記載の手順により、あるいは当業者には明白なその改良法により、実行することができる。

【 0 0 5 1 】

本発明は、医師が T N F スーパーファミリー・リガンドの影響またはそのようなりガンドによって活性化されるシグナル伝達経路を制限しようとする任意の状態を治療するために使用することができる。特に、本発明は炎症性疾患を治療するために使用することができる。1つの実施形態では、上記の状態は炎症性の全身性疾患（例えば慢性関節リウマチまたは乾癬性関節炎）である。別の実施形態では、その疾患は炎症性の肝臓病である。炎症性の肝臓病の例には、限定するものではないが、A 型、B 型または C 型肝炎ウイルスに関連した肝炎、アルコール性肝疾患、および非アルコール性の脂肪症が含まれる。さらに別の実施形態では、炎症性疾患は乾癬のような皮膚状態である。

【 0 0 5 2 】

本発明の用途には、限定するものではないが、既知の T N F アンタゴニストが有用であることが示されている疾患の治療が挙げられる。3つの特定の T N F アンタゴニストが現在 F D A に承認されている。その薬物は、エタネルセプト（E n b r e l（登録商標））、インフリキシマブ（R e m i c a d e（登録商標））およびアダリムマブ（H u m i r a（登録商標））である。これらの薬物のうち 1 つ以上が、慢性関節リウマチ、若年性慢性関節リウマチ、乾癬、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、および炎症性腸疾患（クローン病または潰瘍性大腸炎）の治療について承認されている。

【 0 0 5 3 】

好ましい実施形態では、受容体は T N F R 1 または T N F R 2 受容体である。他の実施形態では、受容体は、T N F R 1 および T N F R 2 に十分に相同な T N F R スーパーファミリーのメンバー（例えば、T N F R S F 3、T N F R S F 5、もしくは T N F R S F 1 1 A）であって、エキソン 7 および 8 に相同なエキソンのいずれかまたは両方の欠失により分泌型が生じるものである。当業者には当然のことであるが、本発明の実施可能性は、そのような分泌型が生理的なものかどうかによって決まるのではなく、単に、そのようなスプライスバリエーションの生成物が、分泌性で、安定で、リガンド結合能力を有していることによって決まる。

【 0 0 5 4 】

対象への S S O の投与は、A S O N のために開発された手法を使用して行うことができる。A S O N は、生理食塩水中に含めて 6 m g / k g の用量で 1 週間に 3 回の静脈内投与により、実験動物およびヒト対象に投与され成功している（ヤシシン、B . R .（Y a c y s y h n , B . R .）ら、2 0 0 2 , G u t 5 1 : 3 0（クローン病治療用の抗 I C

10

20

30

40

50

AM - 1 ASON) ; スティーヴンソン、J. (Stevenson, J.) ら、1999, J. Clinical Oncology 17: 2227 (PBM Cに標的設定された抗RAF - 1 ASON))。TNF - α を標的とする2' O - MOEホスホロチオエートASONの薬物動態が報告されている(ギアリー、R. S. (Geary, R. S.) ら、2003, Drug Metabolism and Disposition 31: 1419)。混合LNA / DNA分子の全身的な効能も報告されている(フルーター、K. (Fluiter, K.) ら、2003, Nucleic Acids Res. 31: 953)。

【0055】

マウスのモデル系におけるSSOの全身作用が、2' O - MOEホスホロチオエートおよびPNA化学成分を使用して調査された。重要な活性は、脳、胃および真皮を除き調査されたすべての組織で観察された(サザニ、P. (Sazani, P.) ら、2002, Nature Biotechnology 20, 1228)。

【0056】

一般に、従来のアンチセンス療法に有用な任意の投与方法を、本発明のSSOを投与するために使用することができる。培養細胞におけるSSOの試験については、ASONまたはSSOを試験するために開発された任意の技術を使用可能である。

【0057】

本発明の製剤は、水性担体のような生理学的または薬学的に許容可能な担体中にSSOを含んでなる。したがって、本発明で使用される製剤には、限定するものではないが、非経口投与、例えば、腹腔内、静脈内、動脈内、皮下、もしくは筋肉内への注射もしくは注入に適した製剤、ならびに、局所投与(例えば、眼科的投与および経腔送達などの経粘膜投与)、経口投与、直腸投与、経肺投与(噴霧器、気管内送達、鼻腔内送達などによる散剤もしくはエアロゾル剤の吸入あるいは注入)に適した製剤が挙げられる。該製剤は、単位投与形態として便利のように提供されてもよいし、また当分野において周知の任意の方法によって調製可能である。いかなる場合にも最適な投与経路は、被投与者、治療される病状の性質および重症度、ならびに使用される特定の活性化合物によって変化しうる。

【0058】

本発明の医薬品組成物には、限定するものではないが、その生理学的かつ薬学的に許容可能な塩、すなわち親化合物の所望の生物活性を保持し、かつ望ましくない毒物学的作用をもたらさない塩が含まれる。そのような塩の例には、(a)陽イオン、例えばナトリウム、カリウム、 NH_4^+ 、マグネシウム、カルシウム、スペルミンおよびスペルミジンのようなポリアミンなどとともに形成された塩；(b)無機酸、例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、硝酸などとともに形成された酸付加塩；(c)有機酸、例えば、酢酸、シュウ酸、酒石酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、グルコン酸、クエン酸、リンゴ酸、アスコルビン酸、安息香酸、タンニン酸、パルミチン酸、アルギン酸、ポリグルタミン酸、ナフタレンスルホン酸、メタンスルホン酸、p - トルエンスルホン酸、ナフタレンジスルホン酸、ポリガラクトロン酸などとともに形成された塩；ならびに(d)元素陰イオン、例えば、塩素、臭素およびヨウ素などから形成された塩；が挙げられる。

【0059】

本発明は、上記に議論したように、TNF - α などのサイトカインの過剰な活性を伴う炎症性障害に罹患した患者において、TNFRスーパーファミリーのメンバーの可溶型と対応する膜結合型との比率を増大させるための医薬を調製するための、上述のような特徴を有するSSOの用途を提供する。本発明による医薬の製造においては、SSOは一般に、特に許容可能な担体と混合される。該担体は、当然ながら、該製剤中で他の成分と混合可能であるという意味において許容可能でなければならず、また患者に有害であってはならない。担体は固体でも液体でもよい。SSOは本発明の製剤に組み込まれ、該製剤は、任意選択で1以上の付随的治療成分を含む構成成分を混合することから本質的に構成される、周知の任意の調剤技術によって調製可能である。

【0060】

本発明の製剤は、活性化合物の無菌の水性および非水性の注射用溶液を含むものでよく、その調製物は、意図した被投与者の血液と等張であり、かつ本質的に発熱性物質を含まないことが好ましい。これらの調製物は、酸化防止剤、緩衝剤、静菌薬、および製剤を意図した被投与者の血液と等張にする溶質を含有しうる。水性および非水性の無菌懸濁物は、限定するものではないが、懸濁化剤および粘稠化剤を含みうる。製剤は、単位用量または複数回用量の容器（例えば密封したアンプルおよびバイアル）中に提供されてもよく、また、使用直前に無菌の液体担体（例えば生理食塩水または注射用水）を添加するだけでよい冷凍乾燥（凍結乾燥）状態で保存されてもよい。

【0061】

製剤中では、SSOは、非経口投与に適している可能性のある、リボソームまたは微結晶のような脂質粒子または小胞内に含まれていてもよい。粒子は、その中にSSOが含まれる限りは、任意の適切な構造、例えば単層または多層であってよい。正に荷電した脂質、例えば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-アンモニウムメチルサルフェート、または「DOTAP」は、そのような粒子および小胞に特に好適である。そのような脂質粒子の調製物はよく知られている。[米国特許第5,976,879号明細書の第6カラムの参考文献を参照されたい]。

【0062】

SSOは、スプライシングを調節する任意の要素または要素の組み合わせを標的とすることが可能であり、該要素は例えば、3'スプライス部位、5'スプライス部位、ランチ部位、ポリピリミジントラクト、エキソン内スプライシングエンハンサ、エキソン内スプライシングサイレンサ、イントロン内スプライシングエンハンサ、およびイントロン内スプライシングサイレンサである。SSOの配列の決定には、以降の表を指標とすることが可能であり、その表は、配列および位置が図4、5、および8に示すとおりであるSSOの活性を示している。当業者であれば：1)エキソンに相補的なSSOは、スプライス受容部位またはスプライス供与部位のいずれにも相補的である必要はないこと（注：表1のSSO A7-10、B7-7およびB7-9）；2)イントロンの配列およびエキソンのわずかなヌクレオチドに相補的なSSOは有効な可能性があること（注：表1のA8-5およびB7-6）；3)エキソンに直接隣接しているイントロンに相補的なSSOも有効な可能性があること（注：表2の3312）；ならびに、4)通常は、オリゴヌクレオチド単独の有効性から、他のSSOと組み合わせたSSOの有効性が予測されること、に気付くであろう。

【0063】

当業者には当然のことであるが、ヒトTNF- α 受容体を標的とした本発明は、TNFR1またはTNFR2遺伝子のエキソン7または8および該エキソンに隣接するイントロンを含んでなる部分の少なくとも10ヌクレオチド、好ましくは15~20ヌクレオチドに相補的な配列を有するSSOを用いて、実行することができる。エキソン自体の少なくとも1ヌクレオチドが該相補配列内に含まれることがさらに好ましい。SEQ ID No. (配列番号) 1~4は、TNFR1 (SEQ ID No. 1及び2)ならびにTNFR2 (SEQ ID No. 3及び4)の、エキソン7および8とその隣にあるイントロンの隣接する50ヌクレオチドとの配列を含んでいる。親和性を増強する修飾（例えば、限定するものではないがLNAまたはG形クランプヌクレオチド）が使用される場合、当業者であればわかるようにSSOの長さを相応に短縮することができる。従来のヌクレオチドとLNAヌクレオチドとが交互になっているものを使用する場合、長さ16ヌクレオチドが有効である。LNAおよび従来のヌクレオチドが交互になるパターンは重要ではない。

【0064】

当業者であれば同様に分かるように、SSO配列の選択は、部分的な「ヘアピン状」二重鎖構造の形成をもたらす可能性のある自己相補的SSOを回避するように注意して行わなければならない。加えて、非特異的な塩基対合の可能性を最小限にするために、高いGC含量を避けるべきである。更に、例えばBLASTによって明らかとなる、標的外遺伝

10

20

30

40

50

子に一致する S S O も、回避すべきである。

【 0 0 6 5 】

状況によっては、ヒトおよび他の少なくとも 1 生物種を標的とすることができる S S O 配列を選択することが好ましいかもしれない。これらの S S O は、ヒトで使用する前に前記の他の生物種において本発明を試験し最適化することにより、規制当局の承認を受け、かつ薬剤を開発する目的に役立てるために使用することができる。例えば、ヒトの T N F R 2 を標的とする S E Q I D N o . 7 4 、 7 5 、 7 7 、 7 8 、 8 0 および 8 9 は、対応するアカゲザル (M a c a c a M u l l a t a) の配列とも 1 0 0 % 相補的である。その結果、これらの配列は、ヒトで使用する前にサルでの治療を試験するために使用することができる。

10

【 0 0 6 6 】

当業者には当然のことであるが、本発明の範囲から逸脱することなく、上述の本発明に様々な省略、追加および修飾をなすことが可能であり、すべてのそのような修飾および変更は、添付の特許請求の範囲によって定義されるように、本発明の範囲内にあるものと意図される。引用された参考文献、特許文献、特許出願または他の文書はすべて、参照によって本願に組み込まれる。

【実施例 1】

【 0 0 6 7 】

材料と方法

【オリゴヌクレオチド】 すべて一様に修飾された 2' - O - メチル - リボヌクレオシド - ホスホロチオエート (2' - O M e) 2 0 量体は、米国カリフォルニア州サンディエゴの T r i l i n k B i o t e c h n o l o g i e s により合成された。これらの配列を表 1 に列挙する。表 2 および表 3 は、2' デオキシ - および 2' O - 4' - (メチレン) - 二環式 - リボヌクレオシド - ホスホロチオエートが交互になっているキメラ状の L N A S S O の配列を示している。これらはデンマークの S a n t a r i s P h a r m a により合成された。各 L N A オリゴヌクレオチドについて、5' 末端ヌクレオシドは 2' O - 4' - メチレン - リボヌクレオシドであり、3' 末端リボヌクレオシドは 2' デオキシ - リボヌクレオシドであった。

20

【 0 0 6 8 】

【細胞培養およびトランスフェクション】 N I H - 3 T 3 細胞は、1 0 % のコロラド・ウシ胎仔血清および抗生物質を補足したダルベッコ改変イーグル培地 (D M E M) 中で維持した (3 7 ° C 、 5 % C O 2) 。 L 9 2 9 細胞は、1 0 % のウシ胎児血清および抗生物質を補足した最少必須培地中で維持した (3 7 ° C 、 5 % C O 2) 。トランスフェクションについては、N I H - 3 T 3 細胞または L 9 2 9 細胞のいずれかを 2 4 ウェルプレートに 1 ウェルあたり細胞 1 0 ⁵ 個として播種し、2 4 時間後にトランスフェクションした。オリゴヌクレオチドは、2 μ L の L i p o f e c t a m i n e (登録商標) 2 0 0 0 トランスフェクション試薬 (I n v i t r o g e n) を用いて、製造業者の指示に従って表示の濃度で複合体化した。その後、このヌクレオチド / 脂質複合体を細胞に付与し、何時間モインキュベーションした。その後、培地を吸引し、T R I - R e a g e n t (登録商標) (米国オハイオ州シンシナティの M R C) を用いて細胞をハーベストした。

30

40

【 0 0 6 9 】

【 R T - P C R 】 T R I - R e a g e n t (登録商標) (米国オハイオ州シンシナティの M R C) を用いて全 R N A を単離し、T N F R 1 または T N F R 2 の m R N A を、r T t h ポリメラーゼ (A p p l i e d B i o s y s t e m s) を用いて供給業者の指示に従って R T - P C R により増幅させた。マウスの T N F R 1 m R N A は、順方向プライマー P S 0 0 9 (S E Q I D N o . 1 1 1) (5' - G A A A G T G A G T G C G T C C C T T G C - 3') および逆方向プライマー P S 0 1 0 (S E Q I D N o . 1 1 2) (5' - G C A C G G A G C A G A G T G A T T C G - 3') を使用して増幅させた。マウスの T N F R 2 m R N A は、順方向プライマー P S 0 0 3 (S E Q I D N o . 1 1 3) (5' - G A G C C C C A A A T G G A

50

A A T G T G C - 3 ') および逆方向プライマー P S 0 0 4 (S E Q I D N o . 1 1 4) (5 ' - G C T C A A G G C C T A C T G C C - 3 ') を使用して増幅させた。ヒトの T N F R 2 m R N A は、順方向プライマー (S E Q I D N o . 1 1 5) (5 ' - A C T G A A A C A T C A G A C G T G G T G C - 3 ') および逆方向プライマー (S E Q I D N o . 1 1 6) (5 ' - C C T T A T C G G C A G G C A A G T G A G - 3 ') を使用して増幅させた。C y 5 標識された d C T P (G E H e a l t h c a r e) を、視認化のために P C R ステップに含めた (5 0 μ L の P C R 反応物あたり 0 . 1 μ L) 。 P C R のサイクルは、9 5 で 6 0 秒 ; 5 6 で 3 0 秒 ; 7 2 で 6 0 秒として全体で 2 2 サイクル実施した。P C R 生成物を 1 0 % の非変性ポリアクリルアミドゲルで分離し、C y 5 標識されたバンドを T y p h o o n (登録商標) 9 4 0 0 スキャナ (G E H e a l t h c a r e) で視認化した。スキャン結果を I m a g e Q u a n t (登録商標) (G E H e a l t h c a r e) ソフトウェアで定量した。

【 0 0 7 0 】

[マウス肝細胞培養物] 肝細胞の採取については、マウスの肝臓を、0 . 5 3 m g / m l のコラゲナーゼ (W o r t h i n g t o n 製、タイプ 1 (コード C L S)) を含む R P M I 培地で灌流した。灌流後、細胞懸濁液を回収し、1 0 % (体積比) F B S および 0 . 5 % ペニシリン・ストレプトマイシンと 1 n M のインスリンおよび 1 3 n M のデキサメタゾンを含んだ R P M I の停止液中に播種した。細胞およそ 3×10^5 個を、コラーゲンコーティングされた 6 ウェルプレートに播種した。播種用培地を、1 時間後に、1 0 % (体積比) F B S を含まない播種用培地で構成される維持用培地に交換した。様々な量のオリゴヌクレオチド - 脂質複合体を 2 4 時間後に付与した。細胞を、トランスフェクションの 2 4 時間後に T R I - R e a g e n t (登録商標) を用いて溶解した。

【 0 0 7 1 】

[ヒト肝細胞培養物] ヒトの肝細胞は、A D M E T t e c h n o l o g i e s 、またはノースカロライナ大学チャペルヒル校の T h e U N C C e l l u l a r M e t a b o l i s m a n d T r a n s p o r t C o r e のいずれかから、懸濁物として入手した。細胞を洗浄し、1 0 % の F B S 、1 μ g / m L のヒトインスリン、および 1 3 n M のデキサメタゾンを補足した R P M I 1 6 4 0 中に懸濁した。肝細胞を、培地 3 m L 中にプレート 1 枚当たり細胞 0 . 5 × 1 0 ⁶ 個として 6 ウェルプレートに播種した。1 ~ 1 . 5 時間後、付着していない細胞を取り除き、培地を、1 μ g / m L のヒトインスリンおよび 1 3 0 n M のデキサメタゾンを補足した F B S 非含有 R P M I 1 6 4 0 に交換した。

【 0 0 7 2 】

6 ウェルプレート中の肝細胞への L N A S S O の送達については、5 μ M の L N A ストック 1 0 μ L を 1 0 0 μ L の O P T I - M E M (登録商標) 中に希釈し、4 μ L の L i p o f e c t a m i n e (登録商標) 2 0 0 0 を 1 0 0 μ L の O P T I - M E M (登録商標) 中に希釈した。その後、この 2 0 0 μ L の複合体溶液を、2 8 0 0 μ L の培地を含んだ 6 ウェルプレート中の細胞に添加して合計 3 0 0 0 μ L とした。最終的な L N A 濃度は 1 7 n M であった。2 4 時間後、細胞を T R I - R e a g e n t (登録商標) 中にハーベストした。全 R N A を製造業者の指示に従って単離した。およそ 2 0 0 n g の全 R N A を、逆転写 P C R (R T - P C R) に供した。

【 0 0 7 3 】

[E L I S A] 細胞培養培地中またはマウス血清中の可溶性 T N F R 2 のレベルを決定するために、R & D S y s t e m s (米国ミネソタ州ミネアポリス) の Q u a n t i k i n e (登録商標) マウス s T N F R I I E L I S A キットを使用した。細胞培養培地中またはマウス血清中の可溶性 T N F R 1 のレベルを決定するために、R & D S y s t e m s (米国ミネソタ州ミネアポリス) の Q u a n t i k i n e (登録商標) マウス s T N F R I E L I S A キットを使用した。検出に使用した抗体は受容体のプロテアーゼ切断型も検出することに注意が必要である。

【 0 0 7 4 】

細胞培養実験については、細胞外の培地をトランスフェクションの72時間後に回収した。アッセイは、希釈していない培地50 μ Lを使用して、製造業者の手引きに従って実施した。アッセイ値の読み取りは、波長補正を570 nmとし、450 nmに設定したマイクロプレートリーダーを使用して実施した。

【 0 0 7 5 】

マウスのインビボ実験については、マウスからの血液を37℃で1時間凝固させ、14,000 rpmで10分間遠心分離した(Jouan社製BRA4i遠心機)。血清を回収し、1:10に希釈したマウス血清50 μ Lを使用して、製造業者の手引きに従ってアッセイした。アッセイ値の読み取りは、波長補正を570 nmとし、450 nmに設定したマイクロプレートリーダーを使用して実施した。

10

【 0 0 7 6 】

[L929細胞毒性アッセイ] 96ウェルプレートにプレート1枚当たり10⁴個として播種したL929細胞を、合計100 μ Lの細胞培養培地中に、記載のオリゴヌクレオチドで処理したマウス由来の血清10%の存在下、0.1 ng/mLのTNF- α (TNF)およびアクチノマイシンD(ActD)で処理した。対照のレーンには、未処理のマウス由来の血清10%として播種した。24時間後、20 μ LのCell Titer 96(登録商標)水溶液(Promega)を加えてマイクロプレートリーダーで490 nmでの吸光度を計測することにより、細胞の生存率を測定した。細胞生存率を、TNF/ActDで処理していない細胞に対して標準化した。

20

【実施例2】

【 0 0 7 7 】

SSOのスプライス切替活性に関する試験

SSOを合成し、NIH-3T3細胞またはL929細胞のいずれかへトランスフェクションした。SSOのスプライス切替能力を評価するために、該細胞由来の全RNAをRT-PCRで分析した。表1には、20ヌクレオチドの2'-O-Me-リボヌクレオシド-ホスホロチオエート型のマウスSSOの、配列およびスプライス切替活性が記載されている。表2には、16ヌクレオチドのキメラ状LNA型のマウスSSOの、配列およびスプライス切替活性が記載されている。表3には、16ヌクレオチドのキメラ状LNA型のヒトSSOの、配列およびスプライス切替活性が記載されている。各表はまた、相補領域およびヌクレオチド数によって各SSOの標的部位を列挙しており；例えば、I6:E7(8:8)は、第6イントロン(イントロン6)の最も3'側の8ヌクレオチドおよび第7エキソン(エキソン7)の最も5'側の8ヌクレオチドに相補的であることを意味し；E7(16)は、第7エキソン内の16ヌクレオチドに相補的であることを意味し；E8:I8(7:9)は、第8エキソン(エキソン8)の最も3'側の7ヌクレオチドおよび第8イントロン(イントロン8)の最も5'側の9ヌクレオチドに相補的であることを意味している。

30

【 0 0 7 8 】

【表 1】

表 1

マウスを標的とする2' O-Me-リボヌクレオシド-ホスホロチオエート型SSO

SEQ ID.	名称 *	配列 (5'-3')	活性	標的部位
5	A7-1	CCG CAG UAC CUG CAG ACC AG	-	I6:E7(6:14)
6	A7-2	GUA CCU GCA GAC CAG AGA GG	-	I6:E7(13:7)
7	A7-3	CUG CAG ACC AGA GAG GUU GC	-	I6:E7(18:2)
8	A7-4	ACU GAU GGA GUA GAC UUC GG	+	E7:I7(18:2)
9	A7-5	AGU CCU ACU UAC UGA UGG AG	+	E7:I7(8:12)
10	A7-6	CCA AAG UCC UAC UUA CUG AU	-	E7:I7(1:19)
11	A7-7	AGA UAA CCA GGG GCA ACA GC	-	E7(20)
12	A7-8	AGG AUA GAA GGC AAA GAC CU	-	E7(20)
13	A7-9	GGC ACA UUA AAC UGA UGA AG	-	E7(20)
14	A7-10	GGC CUC CAC CGG GGA UAU CG	+	E7(20)
15	A8-1	CUG GAG AAC AAA GAA ACA AG	-	I7:E8(19:1)
16	A8-2	AUC CCU ACA AAC UGG AGA AC	-	I7:E8(8:12)
17	A8-3	GGC ACG GGA UCC CUA CAA AC	++	E8(20)
18	A8-4	CUU CUC ACC UCU UUG ACA GG	++	E8:I8(12:8)
19	A8-5	UGG AGU CGU CCC UUC UCA CC	+	E8:I8(1:19)
20	B7-1	CUC CAA CAA UCA GAC CUA GG	+++	I6:E7(5:15)
21	B7-2	CAA UCA GAC CUA GGA AAA CG	+	I6:E7(11:9)
22	B7-3	AGA CCU AGG AAA ACG GCA GG	-	I6:E7(16:4)
23	B7-4	CCU UAC UUU UCC UCU GCA CC	-	E7:I8(14:6)
24	B7-5	GAG CAG AAC CUU ACU UUU CC	++	E7:I8(6:14)
25	B7-6	GAC GAG AGC AGA ACC UUA CU	++	E7:I7(1:19)
26	B7-7	UCA GCA GAC CCA GUG AUG UC	++	E7(20)
27	B7-8	AUG AUG CAG UUC ACC AGU CC	+	E7(20)
28	B7-9	UCA CCA GUC CUA ACA UCA GC	++	E7(20)
29	B7-10	CCU CUG CAC CAG GAU GAU GC	++	E7(20)
30	B8-1	UUC UCU ACA AUG AAG AGA GG	-	I7:E8(16:4)
31	B8-2	GGC UUC UCU ACA AUG AAG AG	-	I7:E8(13:7)
32	B8-3	UGU AGG CAG GAG GGC UUC UC	++	I7:E8(1:19)
33	B8-4	ACU CAC CAC CUU GGC AUC UC	++	E8:I8(14:6)
34	B8-5	GCA GAG GGA UAC UCA CCA CC	-	E8:I8(4:16)

*「A」の付いたSSOはTNFR1を、「B」の付いたSSOはTNFR2を標的とする。

【表 2】

表 2

マウスを標的とするキメラ状LAN-2'デオキシ-リボヌクレオシドホスホ
チオエート型SSO

SEQ ID.	名称	配列 5' to 3'	活性	標的部位
TNFR2 第7エキソン				
35	3272	CAA TCA GAC CTA GGA A	-	I6:E7(7:9)
36	3303	CAA CAA TCA GAC CTA G	-	I6:E7(4:12)
37	3304	CAG ACC TAG GAA AAC G	-	I6:E7(11:5)
38	3305	AGC AGA CCC AGT GAT G	++	E7(16)
39	3306	CCA GTC CTA ACA TCA G	+	E7(16)
40	3307	CAC CAG TCC TAA CAT C	+	E7(16)
41	3308	CTG CAC CAG GAT GAT G	+	E7(16)
42	3309	ACT TTT CCT CTG CAC C	+	E7:I7(14:2)
43	3310	CCT TAC TTT TCC TCT G	-	E7:I7(8:8)
44	3311	CAG AAC CTT ACT TTT C	++	E7:I7(5:11)
45	3274	AGA GCA GAA CCT TAC T	++	E7:I7(1:15)
46	3312	GAG AGC AGA ACC TTA C	++	E7:I7(0:16)
47	3273	ACC TTA CTT TTC CTC T	-	E7:I7(9:7)
TNFR2 第8エキソン				
48	3313	CTT CTC TAC AAT GAA G	-	I7:E8(11:5)
49	3314	CCT TGG CAT CTC TTT G	-	E8(16)
50	3315	TCA CCA CCT TGG CAT C	+	E8:I8(12:4)
51	3316	ACT CAC CAC CTT GGC A	+	E8:I8(10:6)
52	3317	GAT ACT CAC CAC CTT G	+	E8:I8(7:9)
53	3631	CTA CAA TGA AGA GAG G	-	I7(16)
54	3632	CTC TAC AAT GAA GAG A	-	I7:E8(14:2)
55	3633	AGG GAT ACT CAC CAC C	+	E8:I8(4:12)
56	3634	CAG AGG GAT ACT CAC C	+	E8:I8(1:15)
57	3635	CGC AGA GGG ATA CTC A	+	I8(16)
58	3636	GAA CAA GTC AGA GGC A	-	I7(16)
59	3637	GAG GCA GGA CTT CTT C	-	I7(16)
TNFR1 第7エキソン				
60	3325	CGC AGT ACC TGC AGA C	+	I6:E7(8:8)
61	3326	AGT ACC TGC AGA CCA G	-	I6:E7(11:5)
62	3327	GGC AAC AGC ACC GCA G	-	E7(16)
63	3328	CTA GCA AGA TAA CCA G	-	E7(16)
64	3329	GCA CAT TAA ACT GAT G	-	E7(16)
65	3330	CTT CGG GCC TCC ACC G	-	E7(16)
66	3331	CTT ACT GAT GGA GTA G	-	E7:I7(11:5)
67	3332	CCT ACT TAC TGA TGG A	-	E7:I7(7:9)
68	3333	GTC CTA CTT ACT GAT G	+	E7:I7(5:11)
TNFR1 第8エキソン				
69	3334	TCC CTA CAA ACT GGA G	+	E7:I7(5:11)
70	3335	GGC ACG GGA TCC CTA C	+	E8(16)
71	3336	CTC TTT GAC AGG CAC G	+	E8(16)
72	3337	CTC ACC TCT TTG ACA G	-	E8:I8(11:5)
73	3338	CCT TCT CAC CTC TTT G	-	E8:I8(7:9)

【0080】

【表 3】

表 3

ヒトを標的とするキメラ状LAN-2'デオキシ-リボヌクレオシドホスホロチオエート型SSO

SEQ ID.	名称	配列 5' to 3'	活性	標的部位
TNFR2 第7エキソン				
74	3378	CCA CAA TCA GTC CTA G	++	I6:E7(4:12)
75	3379	CAG TCC TAG AAA GAA A	++	I6:E7(11:5)
76	3380	AGT AGA CCC AAG GCT G	-	E7(16)
77	3381	CCA CTC CTA TTA TTA G	+	E7(16)
78	3382	CAC CAC TCC TAT TAT T	+	E7(16)
79	3383	CTG GGT CAT GAT GAC A	-	E7(16)
80	3384	ACT TTT CAC CTG GGT C	++	E7:I7(14:2)
81	3385	TCT TAC TTT TCA CCT G	-	E7:I7(10:6)
82	3459	TGG ACT CTT ACT TTT C	++	E7:I7(5:11)
83	3460	AGG ATG GAC TCT TAC T	-	E7:I7(1:15)
84	3461	AAG GAT GGA CTC TTA C	+	I7(16)
TNFR2 第8エキソン				
85	3462	CTT CTC TAT AAA GAG G	-	I7:E8(11:5)
86	3463	CCT TGG CTT CTC TCT G	+	E8(16)
87	3464	TCA CCA CCT TGG CTT C	+	E8:I8(12:4)
88	3465	ACT CAC CAC CTT GGC T	+	E8:I8(10:6)
89	3466	GAC ACT CAC CAC CTT G	+	E8:I8(7:9)
TNFR1 第7エキソン				
90	3478	TGT GGT GCC TGC AGA C	N/A	I6:E7(8:8)
91	3479	GGT GCC TGC AGA CAA A	N/A	I6:E7(11:5)
92	3480	GGC AAC AGC ACT GTG G	N/A	E7(16)
93	3481	CAA AGA AAA TGA CCA G	N/A	E7(16)
94	3482	ATA CAT TAA ACC AAT G	N/A	E7(16)
95	3483	GCT TGG ACT TCC ACC G	N/A	E7(16)
96	3484	CTC ACC AAT GGA GTA G	N/A	E7:I7(11:5)
97	3485	CAC TCA CCA ATG GAG T	N/A	E7:I7(9:7)
98	3587	CCC ACT CAC CAA TGG A	N/A	E7:I7(7:9)
99	3588	CCC CCA CTC ACC AAT G	N/A	E7:I7(5:11)
100	3589	AAA GCC CCC ACT CAC C	N/A	E7:I7(1:15)
TNFR1 第8エキソン				
101	3590	TTT CCC ACA AAC TGA G	N/A	I7:E8(5:11)
102	3591	GGT GTC GAT TTC CCA C	N/A	E8(16)
103	3592	CTC TTT TTC AGG TGT C	N/A	E8(16)
104	3593	CTC ACC TCT TTT TCA G	N/A	E8:I8(11:5)
105	3594	TCA TCT CAC CTC TTT T	N/A	E8:I8(7:9)
対 照				
106	3083	GCT ATT ACC TTA ACC C	N/A	N/A

【実施例 3】

【0081】

マウスL929細胞に対するSSOの作用

単一のLAN SSOをマウスL929細胞にトランスフェクションし、TNFR2のスプライス切替について分析した。図9(上)は、マウスの第7エキソンを標的とするLANのスプライス切替効果を示す。試験したLANのうち、少なくとも9つが何らかの活性を示した。特に、LAN3312、3274および3305は、第7エキソンを50%以上スキップ(読み飛ばし)させ; LAN3305による処理ではほとんど完全にスキップされた。図9(下)は、マウスの第8エキソンを標的とするSSOの活性を示す。このデータは、LAN3315および3316が、第8エキソンをおよそ20%スキップさせる能力について同等であることを示している。第8エキソンが小さく(35ヌクレオチド

)、したがって、第 8 エキソンを含む P C R フラグメントと第 8 エキシオンを欠く P C R フラグメントとの差も小さいことに留意されたい。

【実施例 4】

【0082】

マウス L 9 2 9 細胞に対する複数の S S O の作用

第 7 および第 8 エキシオンを標的とする L N A S S O を組み合わせて L 9 2 9 細胞にトランスフェクションし、そのような処理の結果 T N F R 2 Δ 7 / 8 m R N A が生成されるかどうかを測定した。図 10 のデータは、第 8 エキシオンを標的とする 3 3 1 5 または 3 3 1 6 と、第 7 エキシオンを標的とする L N A 3 3 0 5、3 3 0 9、3 3 1 2、または 3 2 7 4 のうちの 1 つとの組み合わせにより、同時に両方のエキソンがスキップされたことを示している。特に、L N A 3 3 0 5 および 3 3 1 5 を組み合わせた結果、60%以上が Δ 7 / 8 m R N A へと変化し、その残りはほとんど全てが Δ 7 m R N A であった。その他の組み合わせも有効であり；3 2 7 4 と 3 3 1 5 とでは 50%が Δ 7 / 8 m R N A へと変化した。これらのデータは、L N A S S O が、選択的にスプライシングされた T N F R 2 m R N A を生じさせるのに非常に有効であることを示している。同様に、T N F R 1 の第 7 および第 8 エキシオンを標的とする L N A S S O の組み合わせも、L 9 2 9 細胞において該 S S O それぞれに対応するエキソンの変化をもたらした（図 11）。

10

【実施例 5】

【0083】

マウス初代肝細胞に対する L N A S S O の作用

T N F R 2 L N A S S O をマウス初代肝細胞にトランスフェクションし、これらの細胞において該 S S O がスプライス切替に同程度に有効であることがわかった。特に、L N A 3 2 7 4 または 3 3 0 5 と L N A 3 3 1 5 との組み合わせを用いた処理により、L 9 2 9 細胞で見出されたのと非常によく似たスプライス切替プロファイルが示された（図 12）。これらのデータは、スプライシングの変化が意図したインビボ細胞標的において起きることを確認するものである。

20

【実施例 6】

【0084】

マウス細胞からの T N F R 2 スプライスバリエーションの分泌

L N A S S O が可溶性 T N F R 2 タンパク質の産生と細胞外の培地への分泌を引き起こす能力について試験した。L 9 2 9 細胞を上述のように L N A S S O で処理し、細胞外の培地試料をトランスフェクションの 48 時間後に回収した。該試料を、可溶性 T N F R 2 (Δ 7 および Δ 7 / 8 タンパク質アイソフォームのうちいずれか) に特異的な E L I S A によって定量した。図 13 の左側パネルは、R N A スプライシングの変化を最も良く引き起こした L N A が、最も多くのタンパク質を細胞外の培地へ分泌したことを示している。特に、L N A 3 3 0 5、3 3 1 2 および 3 2 7 4 は、最高の、バックグラウンドの少なくとも 3 . 5 倍の可溶性 T N F R 2 の増加をもたらし、また 250 p g / m L の可溶性スプライスバリエーションを生成させた。同様に処理したマウス初代肝細胞においても増加が見られた（図 13、右側パネル）。これらの初代細胞では、L N A 3 2 7 4 または 3 3 0 5 単独での処理により、細胞外の培地中の可溶性 T N F R 2 がおよそ 2 . 5 倍に増加し、該可溶性スプライスバリエーションが ~ 200 p g / m L 生成され、また 3 2 7 4 または 3 3 0 5 と 3 3 1 5 との組み合わせによってもタンパク質産生が増大した。従って、スプライスバリエーション m R N A の誘導は可溶性 T N F R 2 の産生および分泌と関連している。

30

40

【実施例 7】

【0085】

ヒト初代肝細胞に対する L N A S S O の作用

ヒト T N F R 2 前駆体 m R N A に対する L N A S S O を、培養されたヒト初代肝細胞にトランスフェクションした。図 14 は、第 7 エキシオンを標的とする 10 種の S S O のうち 7 種がある程度スプライス切替活性を示したことを表している。特に、L N A 3 3 7 8、3 3 8 4 および 3 4 7 9 は、第 7 エキシオンを少なくとも 75%スキップさせた。同様

50

に、第 8 エキソンを標的とする 5 種の S S O のうち 4 種が活性を示した。興味深いことに、L N A 3 4 6 4、3 4 6 5、または 3 4 6 6 は単独で $\Delta 7 / 8$ のスプライス除去に十分であり、これはマウス細胞では見られない観察結果であった。従って、第 7 エキソンおよび第 8 エキソンを両方スキップさせるために必要とされるのは 1 種類の S S O だけでよい。これらのデータは、スプライシングの変化が意図されたヒト治療標的において起きることを確認するものである。

【実施例 8】

【0086】

マウスにおける L N A S S O のインビボ注射

L N A 3 3 0 5 を、生理食塩水のみで希釈して $3 \text{ mg / kg} \sim 25 \text{ mg / kg}$ の用量として、1 日に 1 回、4 日間マウスに腹腔内 (i . p .) 注射した。5 日目にマウスを屠殺し、肝臓からの全 R N A を R T - P C R によって分析した。このデータは、細胞培養物において見られたのと同様のスプライス切替効果を示す。最大容量の 25 mg / kg では、L N A 3 3 0 5 はほとんど完全な $\Delta 7 \text{ m R N A}$ への変換をもたらした (図 1 5、下側パネル)。

10

【0087】

L N A 3 2 7 4 を用いた同様の手法により、 $\Delta 7 \text{ m R N A}$ への約 20 % の変換が引き起こされた。 $\Delta 7 \text{ m R N A}$ の誘導を最適化するために、L N A 3 2 7 4 の投与計画および最後の注射と動物の屠殺との間の時間の両方を変化させた。生理食塩水のみで希釈した 25 mg / kg の L N A 3 2 7 4 を、1 日に 1 回、4 日間マウスに注射 (i . p .) した。1 5 日目に分析したマウスでは、一方、第 5 日に分析したマウスでは、わずか 20 % しか $\Delta 7 \text{ m R N A}$ に変化しないことが実証された (図 1 5、上側パネル)。更に、10 日間注射され、11 日目に屠殺されたマウスでは、50 % の $\Delta 7 \text{ m R N A}$ の誘導が示された (図 1 5、上側パネル)。これらのインビボデータは、T N F R 2 L N A S S O が肝臓内で存続し、投与後少なくとも 10 日間はスプライス切替を誘導することができることを示唆している。

20

【実施例 9】

【0088】

循環血中の T N F R スプライスバリエーション

肝臓において $\Delta 7 \text{ m R N A}$ が誘導されると、分泌され循環血中に蓄積しうる可溶性 T N F R が産生されるはずである。従って、L N A 3 2 7 4、3 3 0 5、または対照の 3 0 8 3 を単独で用いて 1 日あたり 25 mg / kg の i . p . として 10 日間マウスを処理した。注射の前にマウスから採血し、また最後の注射の 1、5 および 10 日後にも採血した。血清を、可溶性 T N F R 2 の濃度について定量した。図 1 6 は、L N A 処理により $6000 \sim 8000 \text{ pg / mL}$ の可溶性 T N F R 2 ($\Delta 7$) が誘導されたことを示しており、この可溶性 T N F R 2 濃度は少なくとも 10 日間バックグラウンドより有意に高かった。

30

【0089】

同じ試料を可溶性 T N F R 1 の産生について分析した。可溶性 T N F R 1 の増加は観察されなかった (図 1 7)。

より長期の時点における効果を試験するために、同じ実験を実行し、マウスを、最後の注射の 27 日後まで血清中の可溶性 T N F R 2 について分析した。結果は、最後の L N A S S O 注射の 27 日後には可溶性 T N F R 2 レベルがごくわずかに減少することを示している (図 1 8)。このデータは、L N A の作用が少なくとも 27 日間続くことを示唆している。

40

【実施例 10】

【0090】

L N A S S O で処理されたマウスの抗 T N F - α 活性の測定

L N A 3 2 7 4 で処理されたマウス由来の血清の抗 T N F - α 活性を、L 9 2 9 細胞毒性アッセイで試験した。このアッセイでは、血清が、一定濃度の T N F - α の細胞毒性から培養 L 9 2 9 細胞を保護する能力に関して試験する。L 9 2 9 細胞を、96 ウェルプレ

50

ートに1ウェルあたり細胞 2×10^4 個として、 $100 \mu\text{L}$ の完全MEM培地(10%の通常のFBSを含有)中に播種し、37℃で24時間増殖させた。図19に示すように、LNA3274で処理したマウス由来の血清により、 0.1 ng/mL のTNF- α に曝露されたL929細胞の生存率が上昇したが、対照LNA(3083または3272)では上昇しなかった。従って、LNA3274血清は、TNF- α に結合して不活性化し、その結果としてTNF- α の細胞毒性から細胞を保護するのに十分な $\Delta 7$ TNFR2 TNF- α アンタゴニストを含んでいた。この抗TNF- α 活性は3274 LNAの最後の注射の5日後および27日後の動物の血清中に存在していた。

【実施例11】

【0091】

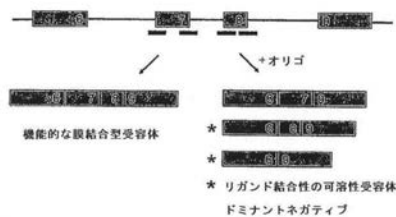
LNA SSOと他の抗TNF- α 剤との比較

L929細胞を、実施例10のようにして播種した。 $90 \mu\text{L}$ の無血清MEM、 0.1 ng/mL のTNF- α (TNF)および $1 \mu\text{g/mL}$ のアクチノマイシンD(ActD)を含み、(i)rsTNFR2(組換え型で可溶性)($0.01 \sim 3 \mu\text{g/mL}$)、(ii)LNA3274で処理したマウス由来の血清(未処理マウス由来の血清で希釈して $1.25 \sim 10\%$)、または(iii)Enbre1(登録商標)($0.45 \sim 150 \text{ pg/mL}$)のいずれかを含んで、最終的なマウス血清濃度が10%で最終体積 $100 \mu\text{L}$ とした試料を調製した。該試料を室温で30分間インキュベーションした。続いて、試料を播種した細胞に適用し、 $5\% \text{ CO}_2$ の加湿環境下で37℃にて ~ 24 時間インキュベーションした。 $20 \mu\text{L}$ のCell Titer 96(登録商標)水溶液(Promega)を添加してマイクロプレートリーダーで 490 nm での吸光度を計測することにより、細胞の生存率を測定した。細胞の生存率を、図20に示すように、TNF/ActDで処理していない細胞に対して標準化した。

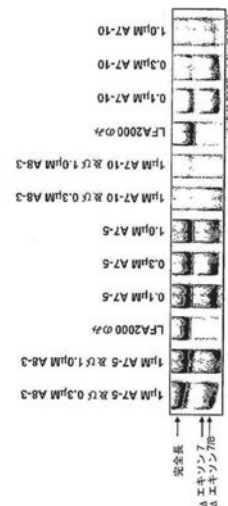
10

20

【図1】



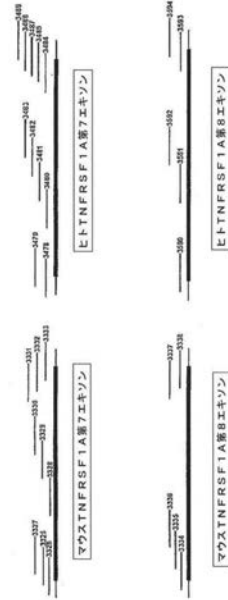
【図2】



【図 8 B】



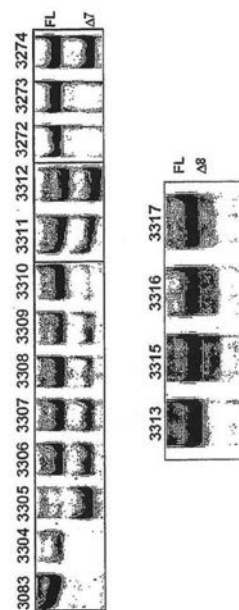
【図 8 C】



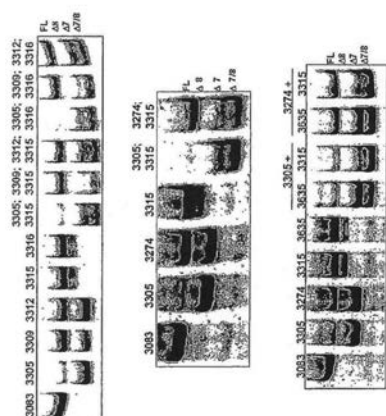
【図 8 D】



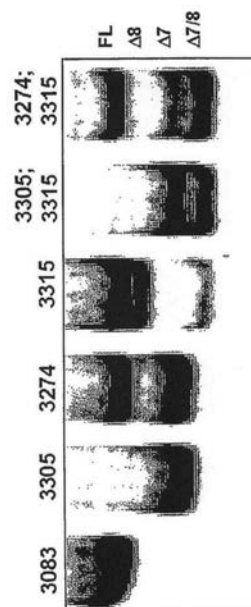
【図 9】



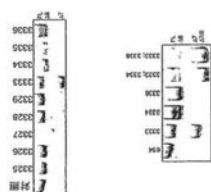
【 図 1 0 】



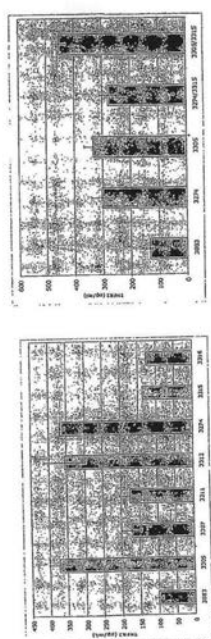
【 图 1 2 】



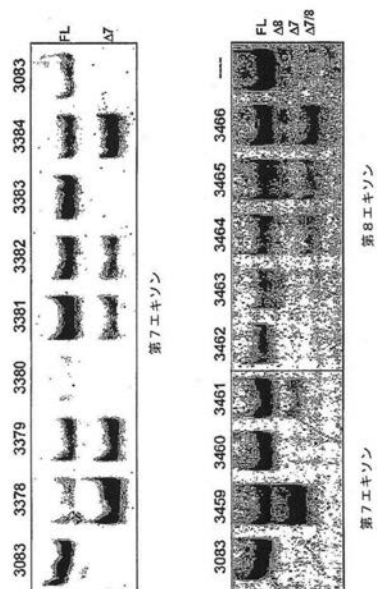
【 図 1 1 】



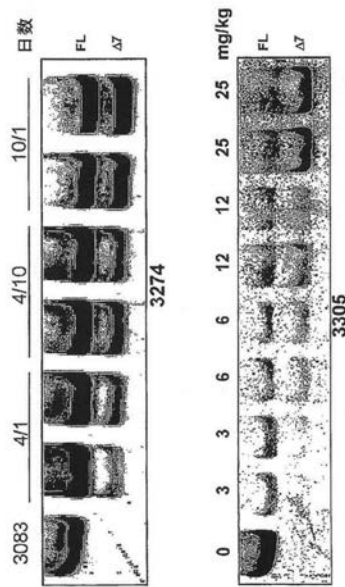
【 図 1 3 】



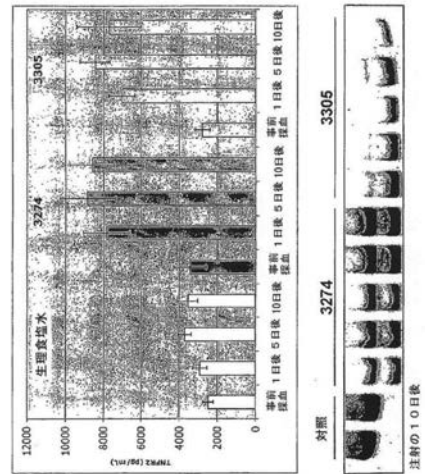
【 図 1 4 】



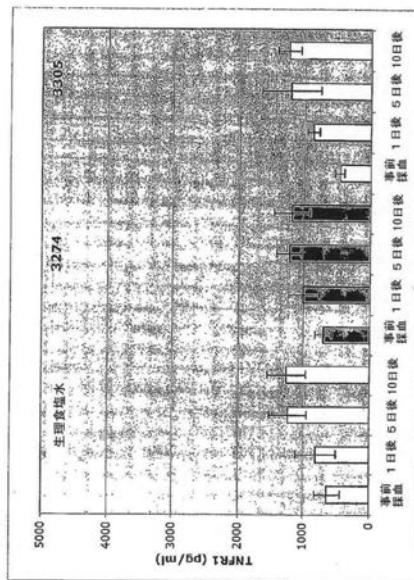
【図 15】



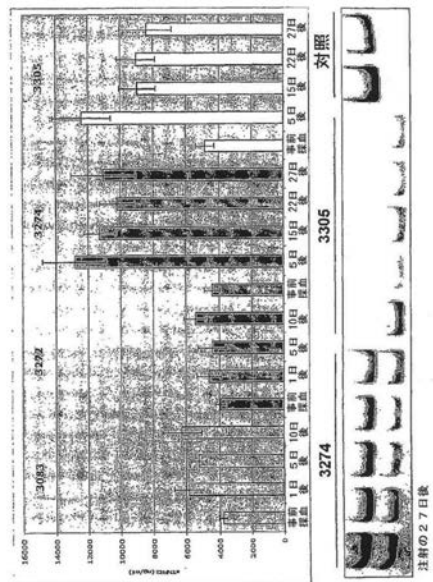
【図 16】



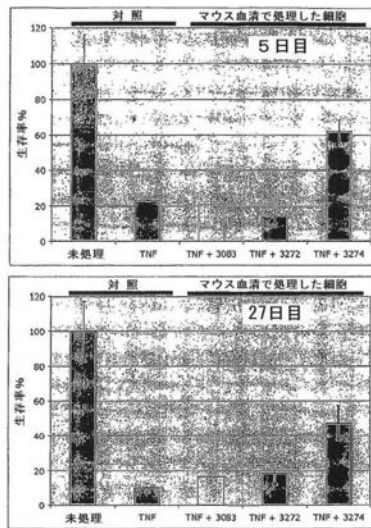
【図 17】



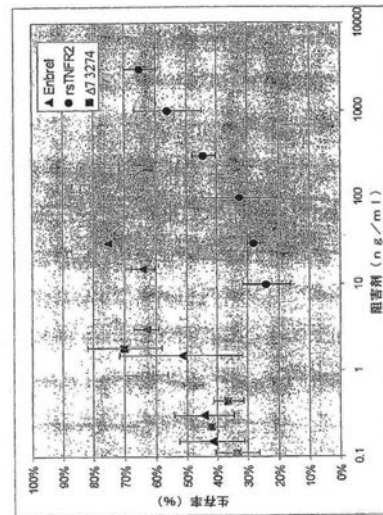
【図 18】



【図 19】



【図 20】



【配列表】

2019014733000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11	Z
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/14 (2006.01)	A 6 1 P 31/14	
A 6 1 P 31/20 (2006.01)	A 6 1 P 31/20	

(71)出願人 508142309
 エルコレ バイオテック インコーポレイテッド
 E R C O L E B I O T E C H , I N C .
 アメリカ合衆国 2 7 7 0 9 ノースカロライナ州 リサーチ トライアングル パーク キット
 クリーク ロード 7 0 3 0 スイート 2 5 0

(74)代理人 100105957
 弁理士 恩田 誠

(74)代理人 100068755
 弁理士 恩田 博宣

(74)代理人 100142907
 弁理士 本田 淳

(72)発明者 サザニ、 ペーター エル .
 アメリカ合衆国 2 7 5 1 4 ノースカロライナ州 チャペル ヒル トゥペロ レーン 5

(72)発明者 コール、 リシャルト
 アメリカ合衆国 2 7 5 1 4 ノースカロライナ州 チャペル ヒル ロングウッド ドライブ
 2 0 3

(72)発明者 オルム、 ヘンリック
 デンマーク国 D K - 3 5 0 0 バエルルーズ アネモネベジェ 4

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA13 QA18 QQ02 QQ08 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR55
 QR62 QR77 QS25 QS32 QX01 QX02
 4C057 BB04 CC03 DD03 MM02 MM09
 4C084 AA13 ZA68 ZA75 ZB11 ZB33
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA68 ZA75 ZB11 ZB33