

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成20年3月21日(2008.3.21)

【公表番号】特表2007-521813(P2007-521813A)

【公表日】平成19年8月9日(2007.8.9)

【年通号数】公開・登録公報2007-030

【出願番号】特願2006-551815(P2006-551815)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

A 6 1 K 45/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 K 31/7088 (2006.01)

A 6 1 K 31/7105 (2006.01)

A 6 1 K 31/711 (2006.01)

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 29/00 (2006.01)

A 6 1 P 31/12 (2006.01)

A 6 1 P 37/08 (2006.01)

A 6 1 P 9/00 (2006.01)

A 6 1 P 31/00 (2006.01)

A 6 1 K 31/712 (2006.01)

A 6 1 K 31/7125 (2006.01)

A 6 1 K 38/00 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 Q 1/68 A

A 6 1 K 45/00

A 6 1 P 43/00 1 1 1

A 6 1 K 31/7088

A 6 1 K 31/7105

A 6 1 K 31/711

A 6 1 K 48/00

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 29/00

A 6 1 P 31/12

A 6 1 P 37/08

A 6 1 P 9/00

A 6 1 P 31/00

A 6 1 K 31/712

A 6 1 K 31/7125

A 6 1 K 37/02

【手続補正書】

【提出日】平成20年2月1日(2008.2.1)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

調節RNA - リガンド相互作用を調整するオリゴヌクレオチドの同定および選択のための方法であって、

(a) リガンド、例えばタンパク質による認識に必要なRNA分子の二次構造要素を規定することおよび選択すること、

(b) 当該RNAの二次構造の集合において工程(a)の二次構造要素の熱力学的確率を計算すること、

(c) 少なくとも部分的に逆相補的なオリゴヌクレオチドにハイブリダイズされる当該RNAの二次構造の集合において工程(a)の二次構造要素の熱力学的確率を計算すること、

(d) 規定の確率閾値を超えて当該二次構造要素の熱力学的確率を変化させるオリゴヌクレオチドを同定および選択し、そして任意にオリゴヌクレオチドを以下の工程(e)、(f)および(g)に定義の通り実験的にパリデートすること、

(e) 工程(d)で決定したオリゴヌクレオチドを提供すること、ならびに任意に、

(f) 工程(a)の当該二次構造要素を含むRNAを工程(e)のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズすること、そして

(g) 当該二次構造要素の熱力学的確率への当該ハイブリダイゼーションの作用を決定し、さらに該RNAとハイブリダイズすることにより調節RNA - リガンド相互作用を調節できるオリゴヌクレオチドを選択すること

を含む、方法。

【請求項 2】

標的遺伝子発現を増強するかまたは沈黙できるオリゴヌクレオチドを同定するための、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

該リガンドがHuRであり、HuRによる認識に必要な二次構造を含む該RNA分子がmRNAである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

該mRNAがIL - 2である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

該mRNAがTNFである、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

工程(d)で選択されたオリゴヌクレオチドが

配列番号 1 : A A G G C C T G A T A T G T T T T A A G、

配列番号 2 : A A T A T A A A A T T T A A A T A T T T、

配列番号 3 : T A G A G C C C C T A G G G C T T A C A、

配列番号 4 : T G A A A C C A T T T T A G A G C C C C、

配列番号 5 : A A G G C C U G A U A U G U U U U A A G、

配列番号 6 : A A U A U A A A A U U U A A A U A U U U、

配列番号 7 : U A G A G C C C C U A G G G C U U A C A、

配列番号 8 : U G A A A C C A U U U U A G A G C C C C

からなる群より選択される配列を有する、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

工程(d)で選択されたオリゴヌクレオチドが

配列番号 9 : T C G G C C A G C T C C A C G T C C C G、

配列番号 10 : T C T G G T A G G A G A C G G C G A T G、

配列番号 11 : A C G G C G A T G C G G C T G A T G G T、

配列番号 12 : T T C T G G A G G C C C A G T T T G A、

配列番号 13 : A T T C C A G A T G T C A G G G A T C A、および

配列番号 14 : A T C A C A A G T G C A A A C A T A A A

からなる群より選択される配列を有する、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

請求項 1 の方法により同定できるオリゴヌクレオチドの RNA 分子へのハイブリダイゼーションの作用を調整する薬剤を同定するアッセイ法であって、

(a) リガンドによる認識に必要な二次構造要素を含む RNA を候補化合物の存在下および不在下に規定の確率閾値を超えて当該二次構造要素の熱力学的確率を変化させるオリゴヌクレオチドへハイブリダイズすること、

(b) 当該候補化合物の存在下および不在下に当該 RNA の当該オリゴヌクレオチドへのハイブリダイゼーションの作用を決定すること

(c) ハイブリダイゼーションの作用を調整する薬剤を同定することを含む、アッセイ法。

【請求項 9】

RNA 分子の、請求項 1 の方法により同定できるオリゴヌクレオチドへのハイブリダイゼーションの作用を模倣する薬剤を同定するアッセイ法であって、

(a) リガンドによる認識に必要な二次構造要素を含む RNA を規定の確率閾値を超えて当該二次構造要素の熱力学的確率を変化させるオリゴヌクレオチドへハイブリダイズすること、

(b) リガンドによる認識に必要な二次構造要素を含む RNA を、請求項 1 の方法により同定できるオリゴヌクレオチドと同様な作用を有すると期待される候補化合物へハイブリダイズすること、

(c) ハイブリダイゼーションの作用を工程 (a) および (b) について決定すること、そして (d) 候補化合物の中から工程 (a) のハイブリダイゼーションの作用を模倣する薬剤を同定すること

を含む、アッセイ法。

【請求項 10】

ハイブリダイゼーションの作用をハイブリダイゼーションの作用に関連するシグナルを測定することにより決定して、その作用は RNA 二次構造、RNA 三次構造、RNA - リガンドの親和性、RNA のオリゴマー化もしくは多量体化、リガンドのオリゴマー化もしくは多量体化、リガンドの立体配座変化、RNA - リガンド認識の下流作用の効率、RNA のスプライシング、共有 RNA 修飾、RNA の局在化、RNA の安定性、RNA の翻訳およびタンパク質の発現プロファイルにおける変化からなる群より選択される、請求項 8 または 9 に記載のアッセイ法。

【請求項 11】

RNA が mRNA である、請求 8 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のアッセイ法。

【請求項 12】

RNA、リガンドおよびオリゴヌクレオチドが請求項 3 ~ 7 のいずれかに記載されているものである、請求項 8 ~ 11 のいずれか 1 項に記載のアッセイ法。

【請求項 13】

高処理能力スクリーニングのための請求項 8 ~ 12 のいずれか 1 項に記載のアッセイ法の使用。

【請求項 14】

医薬品としての使用のための請求項 8 ~ 13 のいずれか 1 項に記載のアッセイ法により同定される薬剤。

【請求項 15】

請求項 1 に記載の方法により同定される規定の確率閾値を超えて二次構造要素の熱力学的確率を変化させる、オリゴヌクレオチド。

【請求項 16】

配列番号 1 : A A G G C C T G A T A T G T T T T A A G、

配列番号 2 : A A T A T A A A A T T T A A A T A T T T、

配列番号 3 : TAGAGCCCTAGGGCTTACA、
 配列番号 4 : TGA AACCATTTTAGAGCCCC、
 配列番号 5 : AAGGCCUGAUAUGUUUAAG、
 配列番号 6 : AAUAUAAA AUUAUAUU、
 配列番号 7 : UAGAGCCCUAGGGCUACA、
 配列番号 8 : UGA AACCAUUUAAGAGCCCC、
 配列番号 9 : TCGGCCAGCTCCACGTC CCG、
 配列番号 10 : TCTGGTAGGAGACGGCGATG、
 配列番号 11 : ACGCGGATGCGGGCTGATGGT、
 配列番号 12 : TTCTGGAGGCCCCAGTTTGA、
 配列番号 13 : ATTCCAGATGTCAGGGATCA、および
 配列番号 14 : ATCACAAAGTGCA AACATAA
 からなる群より選択される配列を有する、オリゴヌクレオチド。

【請求項 17】

任意の化学修飾を持つRNAのもしくはDNA分子である、請求項 1 に記載の方法により同定されるオリゴヌクレオチドまたは請求項 16 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 18】

ペプチド核酸もしくはロックド核酸分子である、請求項 1 に記載の方法により同定されるオリゴヌクレオチドまたは請求項 16 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 19】

調節RNA - リガンド相互作用を操作するための請求項 15 ~ 18 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチドの使用。

【請求項 20】

遺伝子の発現を操作する、例えば遺伝子発現を増強するかまたは沈黙するための、請求項 15 から 18 のいずれかに記載の使用。

【請求項 21】

RNA分子の安定性に影響するための請求項 15 ~ 18 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチドの使用。

【請求項 22】

TNF mRNA 安定性を増加させるための、請求項 5 に記載の方法により同定したオリゴヌクレオチドの使用。

【請求項 23】

TNF 発現を増加させるための、請求項 5 に記載の方法により同定したオリゴヌクレオチドの使用。

【請求項 24】

IL - 2 mRNA 安定性および / または IL - 2 遺伝子発現を増加させるための、配列番号 1、2、3 および 4 から選択されるオリゴヌクレオチドの使用。

【請求項 25】

TNF mRNA 安定性および / または TNF 遺伝子発現を増加させるための、配列番号 14 のオリゴヌクレオチドの使用。

【請求項 26】

少なくとも一つの薬学的賦形剤に加えて、請求項 8 に記載のアッセイにより同定される薬剤もしくは請求項 15 ~ 18 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチドを含む、医薬組成物。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0004

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0004】

他の巨大分子のように、等しい配列 s の RNA 分子は、セット (s) により表示される、多くの異なる構造を形成し得る。 (s) の中でそれぞれの二次構造 について、積重ね塩基対、ヘアピンループ、内部ループ、隆起および多分枝ループに対するエネルギーの寄与を合計することにより自由エネルギー $F(\gamma)$ (ランダムコイル構造に比べて) を計算することができる。これらの寄与は、実験的に決定されてきている(Mathews D. H. et al., J. Mol. Biol. 1999, 288 (5): 911-40)。構造は、構造の熱力学的平衡の集合の中で均等に分布されていないが、構造の頻度はその安定性(即ちその自由エネルギー)に依存して、次の式のように計算され得る:

【数 1】

$p(\Psi) = \frac{1}{Z} \exp\left(-\frac{F(\Psi)}{RT}\right)$	(1)
--	-----

(式中、

【数 2】

$$Z = \sum_{\gamma \in \Sigma(s)} \exp(-F(\gamma)/RT)$$

は、RNA 分子の分配関数であり、 T は温度であって、 R は一般気体定数である)。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0013

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0013】

一つの態様において、本発明は、

(a) リガンド、例えばタンパク質、による認識に要求される RNA 分子の二次構造要素を規定することおよび選択すること、

(b) 当該 RNA 二次構造の集合において工程 (a) の二次構造要素の熱力学的確率を計算すること、

(c) 少なくとも部分的に逆相補的オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされる当該 RNA 二次構造の集合において工程 (a) の二次構造要素の熱力学的確率を計算すること、

(d) 規定の確率閾値を超えて当該二次構造要素の熱力学的確率を変化するオリゴヌクレオチドを決定すること、

(e) 工程 (d) で決定したオリゴヌクレオチドを提供すること、ならびに任意に、

(f) 工程 (a) の当該二次構造要素を含む RNA を工程 (e) のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズし、そして該二次構造要素の熱力学的確率への当該ハイブリダイゼーションの作用を決定すること

を含む調節 RNA - リガンド相互作用を調整する方法を提供する。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0038

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0038】

さらなる態様では、本発明は以下のアッセイ法を提供する:

(I) RNA 分子のオリゴヌクレオチドへのハイブリダイゼーションの作用を調整する薬剤を同定するアッセイであって、

(a) リガンドによる認識に必要な二次構造要素を含む RNA を候補化合物の存在下においておよび不在下において規定の確率閾値を超えて当該二次構造要素の熱力学的確率を変化オリゴヌクレオチドへハイブリダイズすること、

(b) 当該候補化合物の存在下においておよび不在下において当該RNAの当該オリゴヌクレオチドへのハイブリダイゼーションの作用を決定すること、ならびに

(c) ハイブリダイゼーションの作用を調整する薬剤を同定することを含む、アッセイ法。

(II) RNA分子のオリゴヌクレオチドへのハイブリダイゼーションの作用を模倣する薬剤を同定するアッセイ法であって、

(a) リガンドによる認識に必要な二次構造要素を含むRNAを規定の確率閾値を超えて当該二次構造要素の熱力学的確率を変化するオリゴヌクレオチドへハイブリダイズすること、

(b) リガンドによる認識に必要な二次構造要素を含むRNAをオリゴヌクレオチドのように同様な作用を有すると期待される候補化合物へハイブリダイズすること、

(c) ハイブリダイゼーションの作用を工程(a)および(b)について決定すること、ならびに

(d) 工程(a)のハイブリダイゼーションの作用を模倣する薬剤を同定することを含む、アッセイ法。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0041

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0041】

好ましい態様では、本発明のアッセイでのハイブリダイゼーションの作用を、ハイブリダイゼーションの作用に関連するシグナルを測定することにより決定して、その作用は、二次のRNA構造、三次のRNA構造、RNA-リガンド親和性、RNAのオリゴマー化もしくは多量体化、リガンドのオリゴマー化もしくは多量体化、リガンドの立体配座変化、RNA-リガンド認識の下流作用の効率、RNAのスプライシング、共有RNA修飾、RNAの局在化、RNAの安定性、RNAの翻訳およびタンパク質の発現プロファイルにおける変化からなる群より選択される。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0042

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0042】

そのようなアッセイは、本発明のオリゴヌクレオチドを候補化合物の存在下もしくは不在下において興味のあるRNAにハイブリダイズすることおよび当該作用を調整するかもしくは模倣する薬剤を同定するために当該ハイブリダイゼーションの作用に関連する表現型読み出しを測定することにより実現され得る。当該ハイブリダイゼーションの作用は、上記に説明されるように表現型読み出しに関連するシグナルを測定することにより例えば決定される。例えば、mRNA調節のレベルにおいてARE制御遺伝子を薬物可能にするために、当該アッセイを使用することができる。本発明のオープナーもしくはクローザーに強く関連するかもしくは似ているmRNA構造の変化を誘発するために、細胞が小分子のRNA類またはタンパク質のようなモジュレーターを使用することを想定して、本発明のオープナーもしくはクローザーを使用して、標的特異性mRNAの安定性アッセイをデザインし得る。本発明のオープナーを用いる例示的アッセイ原理を図11および12に図示している。オープナーは、蛍光強度、寿命もしくは蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)の測定のような、標準的な蛍光分光方法により例えば検出される、構造の転位に至る。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0055

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0055】

図4：IL-2 オープナーはIL-2 3'UTRへのインビトロのHuR親和性を増加する

組換えHuRのIL-2 3'UTRへの見かけの親和性をオープナーの存在下および不在下において1D-FIDA検出で決定する。全ての4個の試験されたIL-2 特異的オープナーは、見かけの解離定数 K_d^{app} (Op_1 有り： $K_d^{app} = 11.80 \pm 1.48$ nM； Op_2 有り： $K_d^{app} = 18.91 \pm 1.91$ nM； Op_3 有り： $K_d^{app} = 8.38 \pm 1.18$ nM； Op_4 有り： $K_d^{app} = 19.52 + / - 2.20$ nM；オープナー無し： $K_d^{app} = 32.77 \pm 4.48$ nM；0.5 nMでのIL-2 3'UTR；それぞれ、25、25、5および1 nMでのオープナー)の減少により反映された、IL-2 3'UTRとのHuRの会合を強化する。負の対照オリゴヌクレオチドのIL-2 3'UTRへのハイブリダイゼーションは、HuRとの相互作用に影響を受けないままにする(N_1 有り： $K_d^{app} = 32.91 \pm 6.34$ nM； N_2 有り： $K_d^{app} = 32.77 \pm 3.72$ nM、25 nM濃度での N_1 および N_2)(A)。オープナーのハイブリダイゼーションにより誘発される親和性の増加は、0.38 nMのオープナー濃度で最大半減飽和を持つ飽和カーブを示している(Op_3 ハイブリダイゼーションの見かけの親和性 = 134 (± 54) pM)。開かれたIL-2 3'UTRへのHuR結合の見かけの親和性は、両方が1.56 nMで、 8.57 ± 1.33 nMの K_d^{app} において最大値に近づいている(全ての実験において0.5 nMでのIL-2 3'UTR)(B)。 Op_1 の存在下においては、解離定数は、オープナーの濃度が増加するにつれて1.56 nMの Op_1 濃度において、 $K_d^{app} = 11.80 \pm 1.48$ nMの最小値に減少している(全ての実験において2.5 nMでのIL-2 3'UTR)。 Op_1 については、この最適値を超えて濃度を増加させることは、作用を逆戻りさせて、解離定数が再び増加する。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0060

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0060】

図9：TNF- α オープナーはTNF- α 3'UTRへのインビトロのHuR親和性を増加する

組換えHuRのTNF- α 3'UTRへの見かけの親和性をオープナー、クローザーもしくは負の対照オリゴヌクレオチドの存在下においておよび不在下において1D-FIDAアッセイで決定する。TNF- α のクローザー Cl_T は、見かけの解離定数 K_d^{app} の増加により反映された、TNF- α 3'UTRとのHuRの会合を明らかに低減する。作用は、クローザーの濃度と相関している。作用は、最高のクローザーの濃度で2.5倍までの K_d の増加(Cl_T 有り： $K_d^{app} = 13.80 \pm 2.41$ nM、クローザー無し： $K_d^{app} = 5.63 \pm 0.87$ nM)をもって最高値に近づいている(A)。オープナーの Op_T は、TNF- α 3'UTRへのHuRの親和性を2倍まで増加して(B)、それは計算で予測された作用と良好な整合性にある(図8)。しかしながら、0.5 nM以上のオープナーの濃度では、作用は、増加した解離定数に向かって再び逆戻りする。負の対照オリゴヌクレオチド N_T とのハイブリダイゼーションは、実験の全体の濃度範囲に亘ってHuR-TNF- α 3'UTRの親和性に影響を及ぼさない(C)。TNF- α 3'UTRの濃度は、全ての実験において1 nMである。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0063

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0063】

図12：オープナーをベースにするインビトロアッセイのデザイン I I : H u R 結合
これに代えて、アッセイ戦略を mRNA 上でおよび H u R 上で二つの蛍光体の間のエネルギー転移を測定することにより H u R 結合事象の検出へシフトし得る。mRNA のラベルは、(A) 3' 末端に共役的に付着させる(例えば、Qin P. Z. et al., Methods, 1999, 18 (1): 60-70の中に記載されているように)もしくは(B)オープナーのオリゴヌクレオチドを介して導入されるかのいずれかであり得る。この設定では、オープナーにより誘発される立体配座の転位を、引き続き工程である、H u R mRNA 会合の測定により間接的に決定する。それ故に、H u R 阻害剤は、mRNA の立体配座に作用する化合物と同一のシグナルを生成して、適切な対向スクリーニングにおいて選別される必要があるであろう。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0068

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0068】

(実施例)

実施例 A 実験プロトコル

a) 蛍光的に標識した RNA の作製。公表された手順[例えば、Chaix C. et al., Nucleic Acids Symp. Ser. 1989, (21): 45-6; Scaringe S. A. et al., Nucleic Acids Res. 1990, 18 (18): 5433-41、を参照]および製造業者のプロトコルを採用して、5' - O - ジメトキシトリチル - 2' - O - トリイソプロピルオキシメチルで保護された 5' - シアノエチル - (N, N - ジイソプロピル -)ヌクレオチド ホスホラミダイト(Glen Research)を用いる394A合成機(Applied Biosystems)の上で、5' - アミノ - C 6 で修飾された RNA を合成する。ORN を支持体から開裂し、塩基で、ホスフェートでおよび 2' で脱保護して、標準的プロトコルに従って変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により精製する。参考文献(Gray D. M. et al., Methods in Enzymology 1995, 246: 19-34)にしたがって決定して、260 nmにおける正確な分子吸光係数を用いて、ブーゲ - ランベルト - ベーアの法則にしたがって260 nmにおけるUV吸収から、RNA の濃度を計算する。解析 RP - HPLC分析(VYDAC C₁₈ カラム、5 μm、300、4.6 mm x 250 mm、45分で0 ~ 50% CH₃CNの勾配溶出をもってTEAAC(0.1 M、pH 7.0)の中で、260 nmにおけるUV検出)にしたがって、全てのORN類は > 99% 純粋である。第一級アミンのサクシニミジルエステルで活性化した蛍光体との標準的反応で、TMR (Molecular Probes)を5'アミノリンカーに付着して、安定なカルボキサミドを形成する。未反応の染料を、ヒドロキシルアミン塩酸塩の添加により加水分解する。標識RNAをゲルろ過により遊離の染料から分離し、RP - HPLCにより未標識RNAから精製して、上で説明されるように、UV吸収分光法によるが、260 nmにおける染料の吸収を補正して、濃度を決定する。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0069

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0069】

T7 RNAポリメラーゼ(T7 MEGASCRIPTインビトロ転写キット、Ambion)を持つ dsDNA テンプレートからの流出転写により、3' UTR 類を作製する。IL - 2 および TNF - α (IL - 2 : nt 707 - 1035、TNF - α : nt 872 - 1568、それぞれ、GenBank受け入れ番号 NM_000589 および NM_000594) の 3' U

T R 類を包含しているプライマーを用いて、P C R 増幅の間に転写テンプレートの中に、T 7 プロモーターを組み込む。本質的に参考文献(Qin P. Z. et al., Methods 1999, 18 (1): 60-70)に記載されているように、転写物を $\text{Na}(m-)\text{IO}_4$ で 3' 末端で酸化して、ヒドラジドで活性化された C y 3 (AP Biotech) に結合する。生成物を合成 O R N 類について説明したように、R P - H P L C により引き続いて精製し、脱塩して、ゲルろ過により水溶液の中に移す。260 nm における染料の吸収を補正する U V / V I S 吸収分光法による C y 3 のおよび R N A の濃度の決定により、1 : 1 の標識付け化学量論を制御する。

【手続補正 1 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0070

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0070】

組換えヒト H u R の作製。全長 H u R (アミノ酸 1 ~ 326、RefSeq 受け入れ: NP_001410) のためのコード化配列を、活性化ヒトリンパ球から作製される c D N A から増幅する。ベクター p T X B 1 (IMPACT [登録商標] - CN システム、New England Biolabs) の N d e l および S a p I 部位の中に、生成物を指向性にクローン化して、さらに別のアミノ酸の挿入無しでインテイン - キチン結合ドメインタグとの C 末端融合を許容する。I P T G (1 m M、28 ° で 6 時間) との誘導時に大腸菌の ER2566 (New England Biolabs) の中で融合タンパク質を発現する。T r i s / C l の緩衝液 (トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン、20 m M、p H 8.0)、N a C l (800 m M)、E D T A (1 m M) および Pluronic F - 127 (0.2 % w / v、Molecular Probes) 中の連続的凍結 / 解凍により、細菌の細胞を溶菌する。D N A 消化の後で、溶菌液を超遠心分離により透明にして、融合タンパク質をキチンアガロースビーズ (New England Biolabs) の上に捕獲する。溶菌緩衝液での大量の洗浄の後で、12 時間 4 ° で 2 - メルカプトエタンスルホン酸でのインテインタグのチオールで誘発するカラム上の自己スプライシング [例えば、Cantor E. J. et al., Protein Expr. Purif. 2001, 22 (1): 135-40、を参照] により、組換えタンパク質を回収する。いかなる共溶出されたインテインタグおよび未開裂の融合タンパク質を、第二の減法親和性工程で溶出液から除去する。タンパク質を、ゲルろ過 (D G - 10 カラム、Bio - Rad) により保存緩衝液 (N a₂ H P O₄ / N a H₂ P O₄ (25 m M) p H 7.2、N a C l (800 m M)、Pluronic F - 127 (0.2 % w / v)) の中に移し、液体窒素の中で小アリコートにショック凍結をして、- 80 ° で保存する。これらの条件下では、全長 H u R は、更に高度の凝集状態の存在無しで可溶性であって (分析用サイズ排除クロマトマトグラフ)、R R M ドメインについての特徴的な C D スペクトル (Manival X. et al., Nucleic Acids Res. 2001, 29 (11): 2223-30) を示している。タンパク質は、L C / E I - M S の、R P - H P L C のおよび S D S - P A G E の分析にしたがって > 99 % 純粋である。N 末端シーケンシングは、定量的に M e t₁ が欠落している正確な N 末端を明らかにしている。濃度の正確な決定のために、精製された H u R を凍結乾燥し、塩酸グアニジウム (6 M) 中に溶解して、濃度を参考文献 (Gill S. C. et al., Anal. Biochem. 1989, 182 (2): 319-26 を参照) にしたがって U V 分光法により測定する。この溶液を、R P - H P L C の定量化による H u R 濃度の測定のための外部標準として使用する。

【手続補正 1 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0071

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0071】

2 D - F I D A - 異方性 H u R - R N A 結合アッセイ。蛍光的に標識された R N A を、アッセイ緩衝液 (P B S、Pluronic F - 127 (0.1 % w / v)、M g C l₂ (5 m M)) の中で 2 分間 80 ° で変性し、室温に冷却することにより (- 1.13 / 秒) 再折りたたみ、0.

5 n M に希釈すると、それは、記述された設定(Ecotec BA, 2001, 2D-FIDA Quick Guide, Hamburg)において共焦点容積の中で < 1 の蛍光粒子の平均を保証する。それぞれの試料の中の正確な濃度を、点広がり関数(EVOTEC BioSystems, 2001)に対する調整パラメータにより与えられるように、平行の F C S 評価から誘導される粒子数および共焦点容積のサイズに基づいて決定する。蛍光的に標識された R N A を、増加する濃度の組換え H u R に対して滴定する(少なくとも 1 1 個の滴定点)。それぞれの測定に先立って、少なくとも 1 5 分間室温で、H u R - R N A の試料をインキュベートする。

P L C の定量化による H u R 濃度の測定のための外部標準として使用する。

【手続補正 1 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 7 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 7 2】

2 D - F I D A での蛍光異方性の決定により真の平衡条件下に、H u R - R N A の複合体形成をモニターする。EvotecOAI PickoScreen機器の上で 9 6 穴のガラス底マイクロタイタープレート(Whatman)の中で環境温度(2 3 . 5 ° で一定)で、測定を実施する。Olympu s の倒立顕微鏡 IX70 をベースにする機器は、二つの蛍光検出器、蛍光発光経路の中で偏光ビームスプリッターおよび励起経路の中でさらに別の直線偏光フィルターを備えている。H e N E レーザー(= 5 4 3 n m 、レーザー出力 = 4 9 5 μ W) を蛍光励起に使用する。励起レーザー光を、O D = 5 を持つ干渉バリヤーフィルターにより光学検出経路からブロックする。アッセイ緩衝液中の T M R の 0 . 5 n M 溶液を、共焦点ピンホール(7 0 μ m) の調整のためにおよび機器の G 因子の決定(Lakowicz J. R. 「蛍光分光法の原理、第 2 版」(Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2 ed.)、New York, 1999, Plenum Publishers)のために使用する。1 0 回の F I D A 測定を、それぞれの穴について 1 0 秒の測定時間および 4 0 μ 秒の滞留時間で実施する。分子輝度 q を、F I D A アリゴリズム(Kas k P. et al., Biophys.J. 2002, 78 (4): 1703-13)を用いて、それぞれの偏光チャンネルについての 2 D - F I D A の粗データから抽出する。適切なパラメータ：緩衝液の別々の測定で決定されるように、両方のチャンネルの中でのバックグラウンド強度(普通は約 0 . 5 k H z)、T M R での調整測定で決定されるように、共焦点容積パラメータ A 0 および A 1 (普通は A 0 約 - 0 . 4 および A 1 約 0 . 0 8)、単一の成分適合。異方性 を、平行のおよび垂直の偏光についての分子輝度から方程式[V](Lakowicz, 1999、上を参照)により計算して、1 0 回の連続の測定から平均する。

【数 9】

$r = \frac{q_{\parallel} - G \cdot q_{\perp}}{q_{\parallel} + 2 \cdot G \cdot q_{\perp}}$	M
---	---

式中、 q_{\parallel} 、 q_{\perp} は：平行のおよび垂直の偏光チャンネルの中の分子輝度で、G は機器の G 因子を意味する。

【手続補正 1 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 7 4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 7 4】

1 D - F I D A H u R m R N A 結合アッセイ。標識された m R N A もしくは 3 ' U T R を、アッセイ緩衝液(P B S、Pluronic F - 127(0 . 1 % w / v)、M g C l ₂(5 m M))の中で 2 分間 8 0 ° で熱的に変性して、室温に冷却することにより(- 1 . 1 3 / 秒)再折りたたみする。オープナー、クローザーもしくは負の対照の O R N 類(MWG Biotech、

配列は表 1 を参照)を、0.5 および 100 nM の間の最終濃度に加える。Cy 3 で標識された mRNA の最終濃度は 0.5 nM であって、正確な粒子数を、2D-FIDA 異方性測定について説明されているように、決定する。

【手続補正 16】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0075

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0075】

標識された mRNA を、オープナーもしくは負の対照の ORN 類の存在下および不在下において増加する濃度の HuR に対して滴定する。RNA への HuR 結合により誘発される Cy 3 の分子輝度の変化の決定による ID-FIDA で、HuR-mRNA の複合体形成をモニターする。HeNe レーザー(= 543 nm、レーザー出力 = 495 μW) を蛍光励起に使用して、光学的な設定は、光学的経路の中で、一つの検出チャンネルのみを使用して、偏光ビームスプリッターを何も使用しない、2D-FIDA 異方性測定についての設定と類似している。FIDA アリゴリズムを用いて、1D-FIDA の粗データから、分子輝度 q を抽出して、20 回の連続の測定(それぞれ 10 秒)から平均する。蛍光強度測定に適用される、方程式 [VI] に類似の方程式に基づいて、分子輝度データを適合する。

【数 11】

$$q = q_{\min} + \frac{(q_{\max} - q_{\min}) * \left([RNA_0] + [HuR_0] + K_d^{app} \right) - \sqrt{\left([RNA_0] + [HuR_0] + K_d^{app} \right)^2 - 4 * [RNA_0] * [HuR_0]}}{2 * [RNA_0]}$$

[VII]

q_{\min} : 遊離 RNA の分子輝度、 q_{\max} : RNA-HuR 複合体の分子輝度、 q : 与えられる HuR_0 のおよび RNA_0 の濃度での定常状態平衡についての平均分子輝度。全ての提示されたデータは、少なくとも三回の独立した実験からの平均である。

【手続補正 17】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0094

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0094】

【図 4】IL-2 オープナーは IL-2 3'UTR へのインピトロの HuR 親和性を増加する；組換え HuR の IL-2 3'UTR への見かけの親和性をオープナーの存在下および不在下において 1D-FIDA 検出で決定する。全ての 4 個の試験された IL-2 特異的オープナーは、見かけの解離定数 K_d^{app} (Op_1 有りで： $K_d^{app} = 11.80 \pm 1.48$ nM； Op_2 有りで： $K_d^{app} = 18.91 \pm 1.91$ nM； Op_3 有りで： $K_d^{app} = 8.38 \pm 1.18$ nM； Op_4 有りで： $K_d^{app} = 19.52 \pm 1.20$ nM；オープナー無しで： $K_d^{app} = 32.77 \pm 4.48$ nM；0.5 nM での IL-2 3'UTR；それぞれ、25、25、5 および 1 nM でのオープナー)の減少により反映された、IL-2 3'UTR との HuR の会合を強化する。負の対照オリゴヌクレオチドの IL-2 3'UTR へのハイブリダイゼーションは、HuR との相互作用に影響を受けないままにする (N_1 有りで： $K_d^{app} = 32.91 \pm 6.34$ nM； N_2 有りで： $K_d^{app} = 32.77 \pm 3.72$ nM、25 nM 濃度での N_1 および N_2) (A)。オープナーのハイブリダイゼーションにより誘発される親和性の増加は、0.38 nM のオープナー濃度で最大半減飽和を持つ飽和カーブを示している (Op_3 ハイブリダイゼーションの見かけの親和性 = 134 (± 54) pM)。開かれた IL-2 3'UTR への HuR 結合の見かけの親和性は、両方が 1.56 nM で、 8.57 ± 1.33 nM の K_d^{app}

において最大値に近づいている(全ての実験において0.5 nMでのIL-2 3'UTR)(B)。Op₁の存在下においては、解離定数は、オープナーの濃度が増加するにつれて1.56 nMのOp₁濃度において、 $K_d^{aPP} = 11.80 \pm 1.48$ nMの最小値に減少している(全ての実験において2.5 nMでのIL-2 3'UTR)。Op₁については、この最適値を超えて濃度を増加させることは、作用を逆戻りさせて、解離定数が再び増加する。

【手続補正18】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0099

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0099】

【図9】TNF- α オープナーはTNF- α 3'UTRへのインビトロのHuR親和性を増加する；組換えHuRのTNF- α 3'UTRへの見かけの親和性をオープナー、クローザーもしくは負の対照オリゴヌクレオチドの存在下においておよび不在下において1D-FIDAアッセイで決定する。TNF- α のクローザーCl_Tは、見かけの解離定数 K_d^{aPP} の増加により反映された、TNF- α 3'UTRとのHuRの会合を明らかに低減する。作用は、クローザーの濃度と相関している。作用は、最高のクローザーの濃度で2.5倍までのK_dの増加(Cl_T有り： $K_d^{aPP} = 13.80 \pm 2.41$ nM、クローザー無し： $K_d^{aPP} = 5.63 \pm 0.87$ nM)をもって最高値に近づいている(A)。オープナーのOp_Tは、TNF- α 3'UTRへのHuRの親和性を2倍まで増加して(B)、それは計算で予測された作用と良好な整合性にある(図8)。しかしながら、0.5 nM以上のオープナーの濃度では、作用は、増加した解離定数に向かって再び逆戻りする。負の対照オリゴヌクレオチドN_Tとのハイブリダイゼーションは、実験の全体の濃度範囲に亘ってHuR-TNF- α 3'UTRの親和性に影響を及ぼさない(C)。TNF- α 3'UTRの濃度は、全ての実験において1 nMである。

【手続補正19】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0102

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0102】

【図12】オープナーをベースにするインビトロアッセイのデザインII：HuR結合；これに代えて、アッセイ戦略をmRNA上でおよびHuR上で二つの蛍光体の間のエネルギー転移を測定することによりHuR結合事象の検出へシフトし得る。mRNAのラベルは、(A)3'末端に共役的に付着させる(例えば、Qin P. Z. et al., Methods, 1999, 18(1): 60-70の中に記載されているように)もしくは(B)オープナーのオリゴヌクレオチドを介して導入されるかのいずれかであり得る。この設定では、オープナーにより誘発される立体配座の転位を、引き続く工程である、HuR-mRNA会合の測定により間接的に決定する。それ故に、HuR阻害剤は、mRNAの立体配座に作用する化合物と同一のシグナルを生成して、適切な対向スクリーニングにおいて選別される必要があるであろう。