

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7284718号

(P7284718)

(45)発行日 令和5年5月31日(2023.5.31)

(24)登録日 令和5年5月23日(2023.5.23)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/113(2010.01)

C 1 2 N 15/113 1 4 0 Z

C 1 2 N 15/12 (2006.01)

C 1 2 N 15/12 Z N A

C 1 2 N 15/87 (2006.01)

C 1 2 N 15/87 Z

C 1 2 N 5/0783(2010.01)

C 1 2 N 5/0783

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

請求項の数 13 (全41頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-572710(P2019-572710)

(86)(22)出願日 平成30年6月27日(2018.6.27)

(65)公表番号 特表2020-530981(P2020-530981
A)

(43)公表日 令和2年11月5日(2020.11.5)

(86)国際出願番号 PCT/SG2018/050313

(87)国際公開番号 WO2019/004939

(87)国際公開日 平成31年1月3日(2019.1.3)

審査請求日 令和3年6月21日(2021.6.21)

(31)優先権主張番号 10201705285S

(32)優先日 平成29年6月27日(2017.6.27)

(33)優先権主張国・地域又は機関
シンガポール(SG)

前置審査

(73)特許権者 503231882

エージェンシー フォー サイエンス, テ
クノロジー アンド リサーチシンガポール国, 1 3 8 6 3 2 シンガ
ポール, フージョノポリス ウェイ 1,
コネクシス ノース タワー # 2 0 - 1 0

(73)特許権者 519460948

ライオン ティーシーアール プライベ
ート リミテッドシンガポール国 6 1 8 3 0 5 シンガポ
ール トゥカン イノベーション グローブ
2 ナンバー 0 9 - 0 3 ジェイティ
ー メドテック ハブ

(74)代理人 100083806

弁理士 三好 秀和

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 T細胞の機能を調節するためのアンチセンスオリゴヌクレオチド

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

T細胞の殺傷能力、又は細胞傷害効果、抗腫瘍効果、若しくは抗ウイルス効果を発揮する能力、T細胞が抗ウイルス性サイトカインを産生する能力、T細胞の増殖、のうちの1つ又は複数を調節する、アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む組成物であって、

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、PD-1遺伝子のアイソフォーム発現を改変することによって、T細胞により発現されるPD-1遺伝子の発現を調節し、

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、前記PD-1遺伝子のブレ mRNA にアニールすることによりエクソスキッピングを誘発することができ、

前記オリゴヌクレオチドは、PD-1 RNA のエクソン2若しくは3における標的領域に特異的にハイブリダイズし、それによってPD-1の可溶性アイソフォームを発現させ膜結合型PD-1の発現を減少させる、

組成物。

【請求項 2】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号6508及び69648のいずれか1つから選択される配列を含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項 3】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも1個のヌクレオチドの糖が置換された修飾ポリヌクレオチド骨格を含む、請求項1又は2に記載の組成物。

【請求項 4】

10

20

前記修飾ポリヌクレオチド骨格は、ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー(PMO)、ペプチド結合ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー(PPMO)、及び非ペプチドデンドリマーオクタグアニジン部分タグ化モルホリノオリゴマーからなる群から選択される、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは修飾ポリヌクレオチド骨格を含み、前記修飾ポリヌクレオチド骨格は、少なくとも1個の修飾ヌクレオチド間連結を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 6】

前記修飾ヌクレオチド間連結は修飾ホスフェートを含み、前記修飾ホスフェートは、非架橋酸素原子が硫黄原子で置換されたもの、ホスホネート、ホスホロチオエート、ホスホモルホリデート、ホスホロピペラジデート、及びホスホロアミデートからなる群から選択される、請求項 5 に記載の組成物。

10

【請求項 7】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、リボ核酸(RNA)、デオキシリボ核酸(DNA)、DNAホスホロチオエート、RNAホスホロチオエート、2'-O-メチル-オリゴリボヌクレオチド及び2'-O-メチル-オリゴデオキシリボヌクレオチド、2'-O-ヒドロカルビルリボ核酸、2'-O-ヒドロカルビルDNA、2'-O-ヒドロカルビルRNAホスホロチオエート、2'-O-ヒドロカルビルDNAホスホロチオエート、2'-F-ホスホロチオエート、2'-F-ホスホジエステル、2'-メトキシエチルホスホロチオエート、2-メトキシエチルホスホジエステル、デオキシメチレン(メチルイミノ)(デオキシMMI)、2'-O-ヒドロカルビルMMI、デオキシ-メチルホスホネート、2'-O-ヒドロカルビルメチルホスホネート、モルホリノ、4'-チオDNA、4'-チオRNA、ペプチド核酸、3'-アミデート、デオキシ3'-アミデート、2'-O-ヒドロカルビル3'-アミデート、ロックド核酸、シクロヘキサン核酸、三環式DNA、2'フルオロ-アラビノ核酸、N3'-P5'ホスホロアミデート、カルバメート連結、ホスホトリエステル連結、ナイロン骨格修飾、及びこれらいずれかの混合物からなる群から選択される骨格を含み、

20

及び/又は、

前記オリゴヌクレオチドは、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドの活性、細胞分布、又は細胞取り込みを増強する1個又は複数個のコンジュゲートに化学的に連結されている、請求項 1 又は 2 に記載の組成物。

30

【請求項 8】

患者の癌、及び/又はウイルス感染、又は自己免疫疾患の処置における使用のための、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 9】

患者の癌、及び/又はウイルス感染、又は自己免疫疾患のための医薬の製造における、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の組成物の使用。

【請求項 10】

処置される疾患は癌であり、前記患者は、さらなる抗がん剤又は抗がん処置が施される患者であり、及び/又は、

前記癌は、HBV誘発性HCC、EBV誘発性非ホジキンリンパ腫からなる群から選択されるいずれか1つである、

40

請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 11】

薬学的に許容される担体をさらに含む、請求項 1 ~ 8 及び 10 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 12】

患者の疾患を処置する方法における使用のための、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 8 及び 10 ~ 12 のいずれか一項に記載の組成物を製造する方法であって、

50

インビトロまたはエキソビボでエレクトロポレーションによりT細胞を前記アンチセンスオリゴヌクレオチドとmRNAとでトランスフェクトすることを含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はアンチセンスオリゴヌクレオチドに関する。具体的には、本発明は、エクソンススキッピングを誘発することができるアンチセンスオリゴヌクレオチドに関する。より具体的には、本発明は、免疫療法の技術分野でのそのようなアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用に関し、具体的には、腫瘍並びに/又はウイルス感染(例えば、B型肝炎誘発性肝細胞癌、EBV誘発性NKT細胞リンパ腫、並びに他の慢性の感染、例えば、慢性HBV感染、及びヒトサイトメガロウイルス感染等)に対する免疫療法のものに関する。

10

【0002】

本明細書では、T細胞により発現される免疫関連遺伝子又は免疫調節遺伝子の(例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO: Antisense OligoNucleotide)により媒介されるエクソンススキッピング又はイントロン保持による)直接的で選択的な下方制御により、T細胞の機能(例えば、増殖の増加、殺傷能力、又は抗ウイルス性サイトカインの産生)が調節されることが示される。

【背景技術】

【0003】

癌免疫療法是、ジャーナルScienceにより「2013年のブレイクスルー」と宣言された[1]。編集者により行なわれた声明は、現在進行中のいくつかの有望な臨床試験と、新規のパラダイムシフト(いまや療法是、腫瘍に対してではなく、免疫系の方に向けられるのである)を認めたいという願望とにより正当化される[2]。この戦略の変更は、様々な他のアプローチの失敗と、癌の新規の特徴として「免疫回避」を定義することにつながる新規の発見とにより支持される。事実、癌細胞はその表面上に、潜在的に検出され得る癌細胞の除去につながり得る改変分子(腫瘍関連抗原)を有することが多いことから、免疫系は監視及び腫瘍根絶において積極的な役割を果たすことが、当技術分野での新たな進展により実証されている。それにもかかわらず、癌は、監視を回避するか又は免疫反応を沈黙させることが可能であることが多い。そのため、機能的で迅速な免疫抗腫瘍活性の回復が、癌との長い未解決の闘いにおける改善として役立つ可能性がある。

20

30

【0004】

免疫療法の最初のアプローチの1つは、免疫系を刺激することができるサイトカイン(例えばIL-2)の投与で構成されたが、現在では、養子T細胞移入と免疫チェックポイント遮断の両方が広く使用されている[3]。養子T細胞移入とは、患者への、操作されたリンパ球の投与のことであり、この操作プロセスは、T細胞の活性化及び/又は腫瘍関連抗原に対する再指向化(redirection)を目的とする。様々な概念実証研究により、養子移入療法における、操作されたT細胞の潜在的能力が既に明らかにされており、重要なアイデアは、抗原レセプター遺伝子の移入によるT細胞特異性の再指向化である。少数の戦略が過去数十年の間に開発され、それらは従来型T細胞レセプター(TCR: T cell receptor)の組換えバリエーション、又は膜貫通ドメイン及び活性化ドメインに連結された抗体様レセプター鎖の複合体(CAR)に関わるものである[4]。

40

【0005】

キメラ抗原レセプター(CAR: chimeric antigen receptor)は、下記の3つの機能単位で形成されている:抗原認識のための細胞外ドメイン、膜貫通アンカー、及び細胞内シグナル伝達ドメイン[5]。一番目は抗体様単鎖であり、この主な利点は、抗原結合の強度(従来のT細胞レセプターと比べて数倍)と、認識がHLAに拘束されず抗原提示細胞(APC: antigen presenting cell)上の抗原提示経路にも依存しないという事実とである。代わりに、シグナル伝達ドメインは、共刺激ドメインとの組み合わせでCD3ζの要素に由来する。CARは過去数十年の間に大きく進化しており、多くの研究が進行中であり、有望な結果が得られているが、現時点では、特定されている具体的な標的はほんの少数であり、さらに

50

、このレセプターは、その非生理的性質に起因して免疫原性である可能性がある。

【0006】

養子免疫療法に使用されるT細胞レセプター(TCR)は、内因性TCR鎖との二量体化を回避するように操作されている生理的ヘテロ二量体で構成され、CD3複合体のシグナル伝達要素と共に発現される[6]。TCRは、MHC-I(主要組織適合性複合体-I)分子との組み合わせで、表面上で提示された抗原に結合する。このアプローチは、MHC-I/ペプチド複合体に対するTCRが抗原特異的T細胞から既に単離されて特徴付けられている設定に限定され、癌細胞の提示経路に依存する。しかしながら、CARとは対照的に、TCRは、非免疫原性である生理的構造を有しており、インビボでの活性が生理的条件下で既に知られている。

【0007】

慢性B型肝炎又はB型肝炎ウイルス(HBV: Hepatitis B virus)に関連する肝細胞癌(HCC: hepatocellular carcinoma)の文脈では、養子T細胞療法は肯定的な結果を示している。具体的には、HLAにより拘束されるHBV特異的TCRを発現するウイルスベクターで形質導入されたT細胞は、MHC-I分子と関連して提示されるウイルスのコア及びエンベロープタンパク質に由来するペプチドを認識することができる[7]。この認識により、HBV感染細胞の溶解をもたらすHBV特異的T細胞の活性化が誘発される。さらに、この同じ細胞が、HBsAg陽性HCCが再発された患者で成功裏に使用された[8]。患者に注入されたHBV特異的TCR再指向型T細胞(HBV-specific TCR-redirected T-cell)はインビボで増殖することができ、インビトロでの試験により、その特異性及びその活性化状態が確認された。免疫療法は、T細胞ケモカイン及びALT(アラニントランスアミナーゼ、肝細胞溶解のマーカー)の増加と一緒に、処置の4週間後にHBsAbレベルの低下を誘発した。

【0008】

しかしながら、レトロウイルス又はレンチウイルスで安定に形質導入した細胞の治療での使用は、下記の2つの異なる観点から懸念を生じる場合がある：第1に、挿入変異誘発のリスクを完全に排除することができない。第2に、慢性患者の肝臓の90%までがウイルスに感染している可能性があることから、大量のHBVターゲティングT細胞の存在が肝毒性を引き起こす可能性がある。様々な戦略が調査されており、そのうちの1つは、エレクトロポレーションによる、HBV特異的TCRをコードするmRNAのトランスフェクションであり、この方法はレンチウイルス系の使用を排除し、さらにはTCRの一時的な発現をもたらす。HBV特異的TCRの / 鎖をコードするmRNAがエレクトロポレートされたT細胞は、レトロウイルス系又はレンチウイルス系でトランスフェクトされたものと比較して、より高い頻度でT細胞レセプターを発現し得る[9]。このエレクトロポレートされた細胞は、インビトロで抗原発現標的を溶解させることができ、且つマウスPDXモデルにおいて腫瘍増殖をブロックすることができた。この方法の利点は、高いトランスフェクション率、及びTCRの一時的な発現である。この最後の点は、トランスフェクトされたT細胞を患者に複数回注入することを要し、欠点とみなされる場合があるが、HBV特異性が数日後に失われ肝臓へのダメージが制限されることから、安全面では改善が顕著である。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

T細胞の特異性を改変する可能性を受け、本発明者らは、T細胞の機能をさらに改変することが可能であるかどうかを問うた。例えば、腫瘍微小環境下でT細胞の削除又は枯渇をもたらす免疫チェックポイント分子(例えば、PD-1及びCTLA-4)[10]をブロックすることにより、癌細胞と闘うT細胞の能力を増強させることが有益である可能性がある。或いは、殺傷能力が低下しているT細胞を用いて、潜在的な毒性副作用を制限することが重要となる可能性がある(例えば、パーフォリン又はグランザイムのレベルを下方制御することにより)。細胞発現の改変に一般に使用される様々な戦略(CRISPR/Cas9媒介型、TALEN媒介型、RNA干渉)の中から、本発明者らは、アンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)によるアンチセンス技術[11]を使用することを選んだ。ASOは、標的遺伝子のプレmRNAにアニールしてその生理的スプライシングに干渉することができる、化学的に修飾されたRN

10

20

30

40

50

Aの短いオリゴマー(約25/30個の塩基長)である[12]。ASOは、ヌクレアーゼに対する耐性を改善するために、及びインピボでの使用に有利な薬物動態学的特性及び薬力学的特性をもたらすために、化学的に修飾される必要がある。ASOは、正しいスプライシングに必要なシスエレメントをマスクするために、プレmRNAの特定の部位にアニールするように設計されており、従って、標的プレmRNAとスプライシング機構との間の相互作用が改変される。結果として、このことは、プロセスされたmRNAの実質的な欠陥につながり、最終的にはその安定性及び翻訳に影響を及ぼすことになる。このメカニズムを利用して、タンパク質の機能又は安定性の基礎となるエクソンの、成熟mRNAからの排除を誘発することにより、望まれない遺伝子の機能のノックダウンを得ることができる。この除去は、実際には、非機能性タンパク質をコードするmRNAアイソフォームの作成につながり得、あるいはmRNAのナンセンス媒介性崩壊(NMD:nonsense-mediated decay)を引き起こし得る[13]。

10

【0010】

過去数年で、アンチセンス媒介性スプライシング調節は着実に進歩しており、前臨床的モデルから、デュシェンヌ型筋ジストロフィー及び脊髄性筋萎縮症の臨床試験段階へと発達して、顕著な結果を示しており、遺伝子治療のよりエキサイティングな進歩の基盤を用意している[14][15]。単純なノックダウンが望まれる場合には他の方法(例えば、RNA干渉又は翻訳阻害)を使用し得るが、ASOはオフターゲット効果がより少なく、インピボでの安定性がより高いことが実証されており、そのことにより臨床開発のためにより適しており魅力的となっている[16]。

20

【0011】

グランザイムB及びパーフォリンのプレmRNAのスプライシングを妨げるアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)を設計し、HBV特異的T細胞のVアルファ/ベータ鎖をコードするmRNAとの組み合わせでヒトリンパ球に導入した。TCR再指向型T細胞の細胞傷害性T細胞機能を改変するASOの効率を分析した。本発明者らは、エレクトロポレーションの24時間後に、このリンパ球の50%がHBV特異的TCRを発現し、ASOにより標的とされたmRNAの有意な改変を示すことを実証した。タンパク質レベルでは、HBV特異的TCR再指向型T細胞はパーフォリン発現の40%減少を示した。その結果、パーフォリンのノックダウンは、HBVに感染した標的を溶解させるT細胞能力の35%減少をもたらす。しかしながら、細胞傷害性の減少と共に抗ウイルス活性の減損は検出されなかった。

30

【0012】

結論として、本発明者らは、特定のウイルス抗原の認識のためにT細胞の抗原特異性を一時的に再指向化すると同時にそれら細胞の機能を調節することができることを実証した。数個の概念実証実験で本方法の効率を証明した後、本発明者らは、腫瘍微小環境下での有効性を高めるためにTCR再指向型T細胞を改変することを目指した。要約すると、本発明者らの結果は、腫瘍及び慢性ウイルス感染の標的化された及びパーソナライズされた治療においてより安全に適用され得る、より効率的なエフェクターの設計のために有望であると見られる。

【0013】

本発明を完全に理解し且つ容易に実用化するために、ここでは、あくまで非限定的な例として、本発明の好ましい実施形態を説明する。この説明は、添付の例示的な図を参照する。

40

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】トランスフェクトされていないT細胞(左側)、FAMで標識付けされたASOがトランスフェクトされたT細胞(中央)、及びFAM標識付きのASOと一緒にHBV特異的TCRがトランスフェクトされたT細胞(右側)を示すフローサイトメトリープロットを示す。TCRは、PE(フィコエリトリン)がコンジュゲートされた五量体を使用して染色し、ASOはFAM(6-カルボキシフルオレセイン)で標識付けされている。

【図2】A. 下部:スクランブル化(scrambled)ASO(左側)、500ピコモルのIFN- γ 特異的

50

ASO(中央)、又は1500ピコモルの同じASO(右側)で処理されたT細胞中のIFN- mRNAを増幅させるPCR反応を示す。分離されたレーンは、エレクトロポレートされていないT細胞中のIFN- mRNAの増幅を示す。上部:完全長 (FL) 転写産物のPSI (スプライシングされたパーセンテージのインデックス(Percentage Spliced Index))を表すヒストグラムバーを示す。PSIは、分析されたエクソンの包含レベルを提供する。B.細胞内サイトカイン染色からの、スクランブル化ASOで処理されたT細胞のMFI (median fluorescence intensity、蛍光強度中央値)に対して正規化されたIFN- 蛍光染色及びTNF- 蛍光染色のMFIを示すヒストグラムバーを示す。

【図3】A. HCV複製又は培養培地中のIFN- 濃度との関係における、HuH7 HCV-レプリコン細胞株中のルシフェラーゼ発現を示す。B.スクランブル化ASOで処理されたT細胞による阻害に対して正規化された、IFN- -ASOで処理されたT細胞によるHuH7 HCV-レプリコン細胞株中でのHCV阻害のパーセンテージを表すヒストグラムバーを示す。

10

【図4】様々な量(1500-2500-5000ピコモル)のIFN- 特異的ASO又はスクランブル化ASO(2500ピコモル)のエレクトロポレーションの24-48-96時間後のIFN- mRNAのPCR増幅を示す。

【図5】2500ピコモルのグランザイムB特異的ASO (#266又は#267)、パーフォリン特異的ASO (#268又は#269)、又はスクランブル化 (scr) ASOのエレクトロポレーションの24時間後のグランザイムB (GZMB) 及びパーフォリン (PRF1) のmRNAのPCR増幅を示す。GZMB (左側) 及びPRF1 (右側) の両方に関して、完全長PCR産物と、予測されるエクソンスキップ産物の長さとして注釈が付されている。上部:グランザイムエクソンスキップ反応のPSIを表すヒストグラムバーを示す。ゲル中で特異的なバンドが検出されないことから、パーフォリンについては同じ測定を行なうことができない。

20

【図6】グランザイムBプレ-mRNA(左側)又はパーフォリンプレ-mRNA(右側)を標的とするASOがエレクトロポレートされたT細胞中での細胞内サイトカイン染色実験におけるMFI又は陽性細胞のパーセンテージを表すヒストグラムバーを示す。値は、スクランブル化ASOがエレクトロポレートされたT細胞から得られた値に対して正規化されている。

【図7】A. xCELLigence(登録商標)RTCA DPのウェルを表す。B.細胞インデックスは、ウェル内で測定されるインピーダンスに比例する無限の単位であり、そのインピーダンスは細胞培養密度に比例する。

【図8】A. xCELLigence(登録商標)RTCA DPで得られた、経時的にプロットされた細胞インデックスを示す。HBV産生肝癌細胞株を感知ウェル上に播種し、細胞増殖を24時間にわたりモニタリングした。処理されたHBV特異的TCR再指向型T細胞を培養物に添加し(1:2のエフェクター:標的比)、その細胞傷害能力を測定した。T細胞を、スクランブル化ASO(赤色)、パーフォリンを標的とするASO(緑色)、グランザイム及びパーフォリンを標的とする2種のASO(青色及び黄色の線)で前処理した。黒色の線は、T細胞が添加されていないウェル中で記録された細胞インデックスを表す。全ての細胞インデックスは、T細胞が培養物に添加された瞬間に対して正規化されている。B. HBV産生肝癌細胞株を含む培養物中での24時間後の、HBV特異的TCR再指向型T細胞の細胞傷害能力を表すヒストグラムバーを示す。

30

【図9】コントロール実験からのデータを示す。

40

【図10】コントロール実験からのデータを示す。

【図11】AON #887(配列番号6508)、888(配列番号69648)、及び1173(配列番号2565) (標的PD-1及びCTLA-4用)を使用する実験から得られたデータを示す。

【図12】AON #887(配列番号6508)、888(配列番号69648)、及び1173(配列番号2565) (標的PD-1及びCTLA-4用)を使用する実験から得られたデータを示す。

【図13】AON #887(配列番号6508)、888(配列番号69648)、及び1173(配列番号2565) (標的PD-1及びCTLA-4用)を使用する実験から得られたデータを示す。

【図14】AON #887(配列番号6508)、888(配列番号69648)、及び1173(配列番号2565) (標的PD-1及びCTLA-4用)を使用する実験から得られたデータを示す。

【図15】AON #887(配列番号6508)、888(配列番号69648)、及び1173(配列番号25

50

65) (標的PD-1及びCTLA-4用)を使用する実験から得られたデータを示す。

【図16】AON #263(配列番号7274)(標的IFN- γ 用)を使用する実験から得られたデータを示す。

【図17】AON #263(配列番号7274)(標的IFN- γ 用)を使用する実験から得られたデータを示す。

【図18】AON #268(配列番号15372)(標的パーフォリン用)を使用する実験から得られたデータを示す。

【図19】AON #268(配列番号15372)(標的パーフォリン用)を使用する実験から得られたデータを示す。

【図20】AON #524(配列番号63352)、527(配列番号67190)、及び526(配列番号66260)(標的CD244、TIM3(HAVCR2)、及びTGIT用)を使用する実験から得られたデータを示す。

10

【図21】AON #442(配列番号25333)、443(配列番号25599)、444(配列番号25676)、462(配列番号43942)、463(配列番号45170)、及び464(配列番号45445)(標的PRDM1及びREL用)を使用する実験から得られたデータを示す。

【図22】AON #523(配列番号61632)(標的CD160用)を使用する実験から得られたデータを示す。

【図23】AON 522(配列番号53882)(標的CD80用)を使用する実験から得られたデータを示す。

【図24】本発明の実施形態に係る修飾配列の一例を示す。

20

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明は、T細胞の機能の直接的で選択的なモジュレータを提供する。直接的とは、T細胞の機能性に関与する重要な遺伝子の発現又はスプライシングを直接調節することを意味する。選択的とは、調節が配列特異的であり、他のmRNAの発現又はスプライシングを調節しないことを意味する。スプライシングの異常な調節は病理(例えば癌)と関連し得るから、望ましくない副作用(即ち、治療により引き起こされる医原性効果)を防ぐためにこれは重要である。これは、機能(例えば、標的細胞を死滅させる能力、又はウイルス複製を阻害する能力)がエキソピボで改変されたTCR再指向型T細胞を投与する工程を含む、対象の癌を処置する方法が提供されると言うことと同等である。そのような機能の改変は、T細胞にアンチセンスオリゴヌクレオチドをエキソピボで投与することにより達成され得る。

30

【0016】

特定の実施形態によれば、癌は特定の抗原を発現し、この抗原は、TCR再指向型T細胞により標的とされ得る(例えばウイルスHBVタンパク質)。特定の実施形態によれば、特定の抗原の発現は、この特定の抗原が配列決定方法により検出され得ることを意味する。特定の実施形態によれば、この癌は、ウイルスにより誘発される癌又はウイルスが発現する癌(例えば、HBV誘発性HCC、EBV誘発性NKTリンパ腫)の群から選択される。T細胞の機能の任意の直接的で選択的なモジュレータは、本明細書で教示される方法に適し得るが(例えば、小分子、レンチウイルス又はレトロウイルスをベースとするshRNAベクター又はCRISPRベクター)、T細胞モジュレータがRNAレベルにおいて作用することが特に想定される。より具体的には、この阻害剤はアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)である。このアンチセンスオリゴヌクレオチドは、T細胞の機能に重要な遺伝子(例えば、IFNガンマ、パーフォリン、グランザイム、PD-1)の発現又はスプライシングに影響を与えるべきである。さらにより具体的に想定されるのは、エクソスキッピングを誘発するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。最も具体的には、スキップされるエクソンは、IFNガンマのエクソン2又は3、パーフォリンのエクソン2b、グランザイムのエクソン3、PD-1のエクソン2のいずれかである。従って、本明細書で同様に提供されるのは、上述の転写産物でエクソスキッピングを誘発するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。そのようなアンチセンスオリゴヌクレオチドはまた、薬物としての使用のためにも提供される。具体的には、このアンチセンスオリゴヌクレオチドは癌免疫療法のために提供される。ASOは、

40

50

単一薬剤として使用されてもよいし、T細胞の機能を改変するためにT細胞に同時にエレクトロポレートされてもよい。本明細書において、過去に公開されたと見られる文献のリスト又は議論は、その文献が必ずしも技術水準の一部であるか又は一般的な知識であるという自認として受け取られるべきではない。

【0017】

本明細書で言及されるあらゆる文献は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0018】

本開示は、1種又は複数種のアンチセンスポリヌクレオチド、並びに腫瘍及び/又はウイルス感染(例えば、B型肝炎誘発性肝細胞癌、EBV誘発性NKT細胞リンパ腫等)に対する戦略における医薬組成物でのこのアンチセンスポリヌクレオチドの使用に関する。ここで、T細胞により発現される免疫関連遺伝子又は免疫調節遺伝子の(例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)により媒介されるエクソンスキッピング又はイントロン保持による)直接的で選択的な下方制御により、T細胞の機能(例えば、ウイルス複製の直接阻害、又は標的とされる抗原を発現する細胞の選択的殺傷)が調節されることが示される。

【0019】

本発明の第1の態様では、T細胞の機能を調節するアンチセンスオリゴヌクレオチドが提供される。

【0020】

用語「機能を調節する」は、T細胞の機能(例えば、ヒトでのT細胞の応答、標的とのT細胞の相互作用等)の阻害、低下、制御、又は増強を含む、...の活性のあらゆる阻害又は増加を含むことが意図される。様々な実施形態では、本アンチセンスオリゴヌクレオチドは、T細胞の増殖、T細胞の殺傷能力、又は抗ウイルスサイトカインを産生する能力のうちの1つ又は複数を調節する。

【0021】

T細胞の活性は、任意の適切なインビトロでの、細胞の、又はインビボでのアッセイを使用して、ASO配列が存在しない他は同じ条件下での同じアッセイにおける、本発明のASOによるトランスフェクションではないT細胞の活性と比較して、少なくとも1%、好ましくは少なくとも5%、例えば少なくとも10%又は少なくとも25%、例えば、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、若しくは90%以上で測定され得る。当業者には明らかであるように、「調節する」は、T細胞の標的、リガンド、レセプター、又は基質のうちの1つ又は複数に関するT細胞レセプターの親和性、結合活性(avidity)、特異性、及び/又は選択性の変化(増加又は減少のいずれかであり得る)をもたらすことも含み得る。当業者には明らかであるように、このこともやはり、任意の適切な方法で、及び/又はそれ自体が既知である任意の適切なアッセイ(例えば、本明細書で説明されているアッセイ若しくは本明細書で引用された先行技術でのアッセイ)を使用して、決定し得る。「調節する」はまた、T細胞レセプター及びその標的が関与する1種又は複数種の生物学的な又は生理学的なメカニズム、効果、応答、機能、経路、又は活性(例えば、シグナル伝達経路又は代謝経路、及びそれらの関連する生物学的な又は生理学的な効果)に関する変化(即ち、それぞれアゴニスト又はアンタゴニストとしての活性)をもたらすことも意味し得る。やはり当業者には明らかであるように、アゴニスト又はアンタゴニスト等の作用は、任意の適切な方法で、及び/又はそれ自体が既知である任意の適切な(インビトロでの、及び通常は細胞の又はアッセイでの)アッセイを使用して決定し得る。具体的には、意図された生物学的な又は生理学的な活性が、本発明のASOが存在しない他は同じ条件下での同じアッセイにおけるその生物学的な又は生理学的な活性と比較して、それぞれ少なくとも1%、好ましくは少なくとも5%、例えば少なくとも10%又は少なくとも25%、例えば、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、若しくは90%以上増加するか又は減少するようなアゴニスト又はアンタゴニストとしての作用が存在し得る。

【0022】

一部の実施形態では、本アンチセンスオリゴヌクレオチドは、T細胞により発現される免疫関連遺伝子又は免疫調節遺伝子の活性又は発現のレベルのうちの1つ又は複数を調節

10

20

30

40

50

するが、但し、この遺伝子はCTLA4遺伝子ではない。この発現のレベルには、免疫関連遺伝子又は免疫調節遺伝子のアイソフォーム発現を改変するためのスプライシングの調節が含まれる。

【0023】

他の実施形態では、本アンチセンスオリゴヌクレオチドは、免疫チェックポイント分子をブロックすることによりT細胞の機能を調節する。この免疫チェックポイント分子はPD-1であり得る。

【0024】

他の実施形態では、この発現のレベルは、免疫関連遺伝子又は免疫調節遺伝子の直接的な又は選択的な下方制御のうちの1つである。本オリゴヌクレオチドは、免疫関連遺伝子又は免疫調節遺伝子のプレmRNA又は成熟mRNAの標的領域に特異的にハイブリダイズし、この遺伝子は、IFN- γ 、グランザイム、パーフォリン1、PD-1、PRDM1、PD-L1、CD40LG、NDFIP1、PDCD1LG2、REL、BTLA、CD80、CD160、CD244、LAG3、TIGIT、及びTIM-3を含む群から選択されるいずれか1つであり得る。

【0025】

「ハイブリダイゼーション」は、ワトソン-クリックDNA相補性、Hoogsteen結合、又は当技術分野で既知の他の配列特異的結合の規則に従う、水素結合による核酸の2本又は3本の鎖間の相互作用を意味する。ハイブリダイゼーションは、当技術分野で既知の様々なストリンジェンシー条件下で実施され得る。「特異的にハイブリダイズする」とは、本明細書で使用される場合、相補的であるか又は実質的に相補的であるポリヌクレオチド鎖間の安定した二本鎖を可能にするハイブリダイゼーションのことである。例えば、21個のヌクレオチド単位を有するポリヌクレオチド鎖が21個のヌクレオチド単位の別のポリヌクレオチドと塩基対を形成し得るが、各鎖の19個の塩基のみが相補的であるか又は実質的に相補的であり、その結果、「二本鎖」は19個の塩基対を有する。残余の塩基は、例えば、5'オーバーハング及び/又は3'オーバーハングとして存在し得る。さらに、この二本鎖内では100%の相補性は必要ではなく、二本鎖内で実質的な相補性が許容される。実質的な相補性は75%以上の相補性を指す。例えば、19個の塩基対からなる二本鎖中の1個のミスマッチは94.7%の相補性をもたらす、この二本鎖は実質的に相補的となる。

【0026】

ある実施形態では、本オリゴヌクレオチドは、IFN- γ RNAのエクソン、イントロン、又はエクソン-イントロン境界の標的領域に特異的にハイブリダイズし、この標的領域は、エクソン1及びエクソン2を含む群から選択されるいずれか1つである。

【0027】

他の実施形態では、本オリゴヌクレオチドは、パーフォリンのエクソン、イントロン、又はエクソン-イントロン境界の標的領域に特異的にハイブリダイズし、この標的領域はエクソン2bである。

【0028】

他の実施形態では、本オリゴヌクレオチドは、グランザイムRNAのエクソン、イントロン、又はエクソン-イントロン境界の標的領域に特異的にハイブリダイズし、この標的領域はエクソン3である。

【0029】

他の実施形態では、本オリゴヌクレオチドは、PD-1 RNAのエクソン、イントロン、又はエクソン-イントロン境界の標的領域に特異的にハイブリダイズし、この標的領域はエクソン2である。

【0030】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号1~69575のいずれか1つから選択される配列を含んでもよい。

【0031】

後に議論するように、本発明のオリゴヌクレオチド(AON)の配列は修飾されてもよい。この修飾配列の一例を図24に示す。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 2 】

ある実施形態において、本発明で使用する35種の配列を下記の表1に示す。

【 0 0 3 3 】

【 表 1 】

0615_263_2OM_E2	IFNG	5' - GUU CCA UUA UCC GCU ACA UCU GAA UGA CCU GC - 3'
0615_264_2OM_E3	IFNG	5' - UUU GAA GUA AAA GGA GAC AAU UUG GCU CUG CAU U - 3'
0615_265_2OM_E3	IFNG	5' - UUU UGG AUG CUC UGG UCA UCU UUA AAG UUU UUA - 3'
0615_266_2OM_E3	GZMB	5' - UAU UGU GGG CCC CCA AGG UGA CAU UUA UG - 3'
0615_267_2OM_E3	GZMB	5' - UAA ACU GCU GGG UCG GCU CCU GUU CUU UGA - 3'
0615_268_2OM_E2b	PRF1	5' - UGU AGG GCA UUU UCA CAG AGG GUG CAG GU - 3'
0615_269_2OM_E2b	PRF1	5' - AUG CCC AGG AGG AGC AGA CGG GCU GCC AUG - 3'
0915_315_2OM_E2	PD-1	5' - GUU CCA GGG CCU GUC UGG GG - 3'
0915_316_2OM_E2	PD-1	5' - AGG GCU GGG GAG AAG GUG GGG - 3'
0915_317_2OM_E2	PD-1	5' - AGU UUA GCA CGA AGC UCU CCG AUG UGU - 3'
0915_318_2OM_E3	PD-L1	5' - CAC AUA UAG GUC CUU GGG AAC CGU GA - 3'
0915_319_2OM_E4	PD-L1	5' - CAG UUC AUG UUC AGA GGU GAC UGG AUC C - 3'
0316_442_2OM_E4	PRDM1	5' - AGG UUU UGC UCC CGG GGA GAG U - 3'
0316_443_2OM_E4	PRDM1	5' - GGU GAA GCU CCC CUC UGG AAU AGA U - 3'
0316_444_2OM_E4	PRDM1	5' - AUG GUG UAG AAG UAG AUG UUC AUC CCG UU - 3'
0316_447_2OM_E3	CD40LG	5' - UGU UUU CUU UCU UCG UCU CCU CUU UGU UU - 3'
0316_448_2OM_E2	CTLA4	5' - AAG GUC AAC UCA UUC CCC AUC AUG UAG GUU G - 3'
0316_449_2OM_E2	CTLA4	5' - GUG GCU UUG CCU GGA GAU GCA UA - 3'
0316_450_2OM_E2	CTLA4	5' - UUG CCG CAC AGA CUU CAG UCA C - 3'
0316_451_2OM_E2	CTLA4	5' - AUG CAU ACU CAC ACA CAA AGC UGG - 3'
0316_452_2OM_E3	NDRP1	5' - AUA ACU GGG CAG UGU UGU AGC UAC AUU G - 3'
0316_453_2OM_E3	NDRP1	5' - UGG AAA CCC AGA CUC AUC CUU GUA GU - 3'
0316_457_2OM_E3	PDCD1LG2	5' - UCC AGU GUC AAA GUU GCA UUC CAG GGU - 3'
0316_458_2OM_E4	PDCD1LG2	5' - UCA UCU GUU UCU GGA ACC UUU AGG AUG UGA GU - 3'
0316_462_2OM_E2	FEL	5' - GGG UUG UUC AAU UAU CUC UAU AUA CCG GU - 3'
0316_463_2OM_E3	FEL	5' - GGU UUA UAU GGG UCA UUC UUU GUU ACU AA - 3'
0316_464_2OM_E3	FEL	5' - UAG UAG CCG UCU CUG CAG UCU UUU C - 3'
0616_520_2OM_E2	BTLA	5' - UGC UAA GAU GGA GUG UUC AGA UUG UCU CUU UAU A - 3'
0616_521_2OM_E4	BTLA	5' - AAU UUC CCU UCC UGC UGU GUC AGA GAG - 3'
0616_522_2OM_E2	CD80	5' - UGG GUC UCC AAA GGU UGU GGA UUU AGU UU - 3'
0616_523_2OM_E3	CD160	5' - AAC UUG AAG CAA AUG UUG GCU CUG CUG GUA - 3'
0616_524_2OM_E5	CD244	5' - UCG UAA AUU GUCAAA AAU UCC UUG GGA CUG GUC U - 3'
0616_525_2OM_E2	LAG3	5' - GAG AUC CUG GAG GGG GAU UGU GG - 3'
0616_526_2OM_E3	TIGIT	5' - AAU GGA AUC UGG AAC CUG GCA CCG U - 3'
0616_527_2OM_E4	TIM-3	5' - AUU UAU AUC AGG GAG GCU CCC CAG UG - 3'

Table 1

【 0 0 3 4 】

表2は、表1の配列に対応し配列表に示されている、対応する配列番号を示す。

【 0 0 3 5 】

10

20

30

40

50

【表 2】

配列一覧	表1における 配列番号	配列表に 示された 配列番号
guuccauuauccgcuacaucugaaugaccugc	1	7274
uuugaaguaaaaaggagacaauuuggcucugcauu	2	7970
uuuuggaugcucuggucaucuuuaaguuuua	3	8521
uaauugugggcccccaaggugacauuuauug	4	11414
uaaacugcugggucggcuccuguuuuuuga	5	11514
uguagggcauuuucacagaggugcaggu	6	15372
augcccaggaggagcagacgggucgccaug	7	15458
guuccagggccugucugggg	8	3680
agggcugggggagaaggugggg	9	3817
aguuuagcacgaagcucuccgaugugu	10	3877
cacauauagguccuugggaaccguga	11	19411
caguucauguuucagaggugacuggaucc	12	20993
agguuuugcucccgaggagagu	13	25333
ggugaagcuccccucuggaauagau	14	25599
auggugugaagaugaugauuaucccgau	15	25676
uguuuuuuuuuuuucgucuccucuuuuuu	16	32803
aaggucaacucauucccaucauguagguug	17	400
guggcuuugccuggagauucaua	18	1073
uugccgcacagacuucagucac	19	1097
augcauacucacacacaaagcugg	20	1684
auaacugggcaguguuguagcuacauug	21	35585
uggaaaccagacucauccuuguagu	22	35761
uccagugucaaaguugcauuccaggu	23	40204
ucaucuguuuucuggaaccuuuaggauugagu	24	42491
ggguuguucaauuauucucuaauacgggu	25	43942
gguuuauaugggucuuuuuuuuuuuuuu	26	45170
uaguagccgucucugcagucuuuuu	27	45445
ugcuagaaggaguguuucagauugucuuuuua	28	46162
aaauucccuuccugcugugucagagag	29	53243
ugggucuccaaagguuuggaauuuuuuu	30	53882
aacuugaagcaaauguuggcucugcuggua	31	#N/A
ucguaaaauugucaaaaaauuccuugggacuggucu	32	63352
gagauccuggaggggggaugugg	33	63703
aauggaaucuggaaccuggcaccgu	34	66260
auuuauaucagggaggcuccccagug	35	67190

Table 2

【0036】

ある実施形態では、本発明は、下記の配列のうちのいずれか1つを有するオリゴヌクレオチドを提供する：配列番号6508、69648、2565、7274、15372、63352、67190、66260、25333、25599、25676、43942、45170、45445、61632、及び53882。

【0037】

「オリゴヌクレオチド」は、あらゆるポリヌクレオチドを指すことが意図される。「ポリヌクレオチド」は、ヌクレオチドで構成されるオリゴマーである。ポリヌクレオチドは、DNA、そのRNA修飾型、又はそれらの組み合わせで構成されてもよい。用語「ヌクレオ

チド」又はその複数形は、本明細書で使用される場合、本明細書で議論されている修飾形態及びその他の態様で当技術分野において既知である修飾形態と互換的である。ある特定の場合では、当技術分野は、天然に存在するヌクレオチド及び重合可能なヌクレオチドの修飾型を包含する用語「核酸塩基」を使用する。そのため、ヌクレオチド又は核酸塩基は、天然に存在する核酸塩基アデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、チミン(T)、及びウラシル(U)だけでなく、非天然の核酸塩基、例えば、キサンチン、ジアミノプリン、8-オキソ-N6-メチルアデニン、7-デアザキサンチン、7-デアザグアニン、N4,N4-エタノシトシン(ethanocytosin)、N',N'-エタノ-2,6-ジアミノプリン、5-メチルシトシン(mC)、5-(C[3]-C6)-アルキニル-シトシン、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、プソイドイソシトシン、2-ヒドロキシ-5-メチル-4-トリ-アゾロピリジン、イソシトシン、イソグアニン、イノシン、並びにBenner et al、米国特許第5,432,272号明細書及びSusan M. Freier and Karl-Heinz Altmann, 1997, Nucleic Acids Research, vol. 25: pp 4429-4443で記述されている「非天然」核酸塩基をも意味する。用語「核酸塩基」はまた、既知のプリン複素環及びピリミジン複素環だけでなく、それらの複素環類似体及び互変異性体も含む。さらに天然に存在する核酸塩基及び非天然の核酸塩基として、米国特許第3,687,808号明細書(Merigan, et al)で開示されているもの、Antisense Research and Application, Ed. S. T. Crooke and B. Lebleu, CRC Press, 1993における、Sanghviによる第15章で開示されているもの、Englisch et al, 1991, Angewandte Chemie, International Edition, 30: 613-722で開示されているもの(特に、622頁及び623頁を参照)、及びthe Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, J. I. Kroschwitz Ed., John Wiley & Sons, 1990, pages 858-859, Cook, Anti-Cancer Drug Design 1991, 6, 585-607で開示されているものが挙げられ、これらのそれぞれは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)。様々な態様では、ポリヌクレオチドとして、1種又は複数種の「ヌクレオシド塩基」又は「塩基ユニット」も挙げられ、これは、核酸塩基のように機能し得る複素環化合物等の化合物を含み、最も古典的な意味ではヌクレオシド塩基ではないがヌクレオシド塩基として機能する特定の「ユニバーサル塩基」も含む。ユニバーサル塩基として、3-ニトロピロール、任意で置換されたインドール(例えば、5-ニトロインドール)、及び任意で置換されたヒポキサンチンが挙げられる。他の望ましいユニバーサル塩基として、ピロール、及びジアゾール又はトリアゾール誘導体が挙げられ、これらには当技術分野で既知のユニバーサル塩基が含まれる。

【0038】

ポリヌクレオチドとして修飾核酸塩基も挙げられ得る。「修飾塩基」は、当技術分野では、天然の塩基(例えば、アデニン、グアニン、シトシン、ウラシル、及び/若しくはチミン)と対を形成し得、並びに/又は非天然の塩基と対を形成し得るものであると理解される。例示的な修飾塩基が欧州特許第1072679号明細書及び国際公開第97/12896号パンフレットで説明されており、これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。修飾核酸塩基として下記が挙げられるがこれらに限定されない:5-メチルシトシン(5-me-C)、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、アデニン及びグアニンの6-メチル誘導体及び他のアルキル誘導体、アデニン及びグアニンの2-プロピル誘導体及び他のアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミン及び2-チオシトシン、5-ハロウラシル及びシトシン、ピリミジン塩基の5-プロピニルウラシル及びシトシン及び他のアルキニル誘導体、6-アゾウラシル、シトシン及びチミン、5-ウラシル(シュードウラシル(pseudouracil))、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシル及び他の8-置換アデニン及びグアニン、5-ハロ、特に5-プロモ、5-トリフルオロメチル、及び他の5-置換ウラシル及びシトシン、7-メチルグアニン及び7-メチルアデニン、2-F-アデニン、2-アミノ-アデニン、8-アザグアニン、及び8-アザアデニン、7-デアザグアニン、及び7-デアザアデニン、及び3-デアザグアニン、及び3-デアザアデニン。さらなる修飾塩基として下記が挙げられる:三環式ピリミジン、例えば、フェノキサジンシチジン(1H-ピリミド[5,4-b][1,4]ベンゾキサジン-2(3H)-オン)、フェノチアジンシチジン(1H-ピリミド[5,4-b][1,4]ベンゾチアジン-2(3H)-オン)、G-クランプス(G-clamps)

、例えば、置換フェノキサジンシチジン(例えば、9-(2-アミノエトキシ)-H-ピリミド[5,4-b][1,4]ベンゾキサジン-2(3H)-オン)、カルバゾールシチジン(2H-ピリミド[4,5-b]インドール-2-オン)、ピリドインドールシチジン(H-ピリド[3',2':4,5]ピロロ[2,3-d]ピリミジン-2-オン)。修飾塩基として、プリン塩基又はピリミジン塩基が他の複素環に置き換えられているもの(例えば、7-デアザ-アデニン、7-デアザグアノシン、2-アミノピリジン、及び2-ピリドン)も挙げられ得る。さらなる核酸塩基として、米国特許第3,687,808号明細書で開示されているもの、The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990で開示されているもの、Englisch et al, 1991, Angewandte Chemie, International Edition, 30: 613により開示されているもの、及びSanghvi, Y. S., Chapter 15, Antisense Research and Applications, pages 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., ed., CRC Press, 1993により開示されているものが挙げられる。これらの塩基のうちのいくつかは、ポリヌクレオチドの結合親和性を高めるのに有用であり、5-置換ピリミジン、6-アザピリミジン、並びにN-2、N-6、及び0-6置換プリン、例えば、2-アミノプロピルアデニン、5-プロピニルウラシル、及び5-プロピニルシトシンが挙げられる。5-メチルシトシン置換は、核酸二本鎖の安定性を0.6~1.2 上昇させることが分かっており、ある特定の態様では、2'-O-メトキシエチル糖修飾と組み合わせられる。米国特許第3,687,808号明細書、同第4,845,205号明細書;同第5,130,302号明細書;同第5,134,066号明細書;同第5,175,273号明細書;同第5,367,066号明細書;同第5,432,272号明細書;同第5,457,187号明細書;同第5,459,255号明細書;同第5,484,908号明細書;同第5,502,177号明細書;同第5,525,711号明細書;同第5,552,540号明細書;同第5,587,469号明細書;同第5,594,121号明細書、同第5,596,091号明細書;同第5,614,617号明細書;同第5,645,985号明細書;同第5,830,653号明細書;同第5,763,588号明細書;同第6,005,096号明細書;同第5,750,692号明細書、及び同第5,681,941号明細書を参照されたい。これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【0039】

当業者は、本開示に従ってアンチセンスポリヌクレオチドを容易に設計し得る。例えば、当技術分野の一般的な教示として下記が挙げられるがこれらに限定されず: Aartsma-Rus et al, Methods Mol Biol. 867: 117-29 (2012); Aartsma-Rus et al, Methods Mol Biol. 867: 97-116 (2012); van Roon-Mom et al., Methods Mol Biol. 867: 79-96 (2012)、これらのそれぞれは参照により本明細書に組み込まれる。一般的なガイドラインとしては、3個の連続したGヌクレオチド又はCヌクレオチドを回避することを試みること、自己構造を支持する長さ及び配列を選択すること(ヘアピン化は避けられる)、及びプライマー二量体を形成する可能性がある配列を回避することも挙げられる。一部の実施形態では、本開示のアンチセンスポリヌクレオチドは、エクソン、又はイントロン、又はイントロン-エクソン境界に特異的にハイブリダイズするように設計されているものであり、その結果、このアンチセンスポリヌクレオチドは、T細胞により発現される免疫関連の又は免疫調節性の遺伝子/核酸の、完全にエクソン内にある配列に特異的にハイブリダイズするか、又は、このアンチセンスポリヌクレオチドの約1個のヌクレオチドが、このアンチセンスポリヌクレオチドがそのような核酸に特異的にハイブリダイズされた場合に、前記イントロン-エクソン境界をまたがる。アンチセンスポリヌクレオチドが完全にエクソン内にある配列に特異的にハイブリダイズする一部の実施形態では、このアンチセンスポリヌクレオチドの末端が、このエクソンの末端から約1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個以上のヌクレオチドにあることが企図される。

【0040】

ポリヌクレオチド中のヌクレオチド単位の1個以上の糖及び/又は1個以上のヌクレオチド間連結の両方がそれぞれ、「非天然の」糖(即ち、リボース若しくはデオキシリボース以外の糖)又はヌクレオチド間連結に置き換えられている修飾ポリヌクレオチドが使用に企図される。一態様では、この実施形態はペプチド核酸(PNA: peptide nucleic acid)を企図する。PNA化合物では、ポリヌクレオチドの糖骨格は、アミド含有(即ち、N-(2-アミノ

10

20

30

40

50

エチル)-グリシン単位間のペプチド結合)骨格に置き換えられている。例えば、米国特許第5,539,082号明細書;同第5,714,331号明細書;及び同第5,719,262号明細書、並びにNielsen et al, Science, 1991, 254, 1497-1500を参照されたい。これらの開示は、参照により本明細書に組み込まれる。修飾ポリヌクレオチドはまた、1個又は複数個の置換糖基を含んでもよい。一態様では、糖の修飾として、2'-ヒドロキシル基が糖環の3'炭素原子又は4'炭素原子に連結され、それにより二環式糖基が形成されるロックド核酸(LNA: Locked Nucleic Acid)が挙げられる。この連結は、ある特定の態様では、2'酸素原子及び4'炭素原子を架橋するメチレン(-CH₂-)_[n]基(nは1又は2である)である。LNA及びその調製は、国際公開第98/39352号パンフレット及び同第99/14226号パンフレットで説明されており、これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。本発明において、好ましくは、本アンチセンスオリゴヌクレオチドは修飾ポリヌクレオチド骨格を含む。この修飾ポリヌクレオチド骨格は、ポリヌクレオチドのうちの少なくとも1個の糖の代わりに修飾部分を含んでもよい。

10

【0041】

様々な実施形態において、修飾ポリヌクレチド骨格を含むアンチセンスオリゴヌクレオチド。この修飾ポリヌクレオチド骨格は、このポリヌクレオチドのうちの少なくとも1個の糖の代わりに修飾部分を含んでもよい。この修飾部分は、ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー(PMO: phosphorodiamidate morpholino oligomer)、ペプチド結合ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー(PPMO: peptide-conjugated phosphorodiamidate morpholino oligomer)、及び非ペプチドデンドリマーオクタグアニジン部分タグ化モルホリノオリゴマーからなる群から選択されてもよい。

20

【0042】

様々な実施形態では、この修飾ポリヌクレオチド骨格は、少なくとも1個の修飾ヌクレオチド間連結を含んでもよい。この修飾ヌクレオチド間連結は、修飾ホスフェートを含んでもよい。この修飾ホスフェートは、硫黄原子を置換する非架橋酸素原子、ホスホネート、ホスホロチオエート、ホスホジエステル、ホスホモルホリデート、ホスホロピペラジデート、及びホスホロアミデートを含む群から選択される。

【0043】

様々な実施形態では、本アンチセンスオリゴヌクレオチドは、リボ核酸、デオキシリボ核酸、DNAホスホロチオエート、RNAホスホロチオエート、2'-O-メチル-オリゴリボヌクレオチド及び2'-O-メチル-オリゴデオキシリボヌクレオチド、2'-O-ヒドロカルビルリボ核酸、2'-O-ヒドロカルビルDNA、2'-O-ヒドロカルビルRNAホスホロチオエート、2'-O-ヒドロカルビルDNAホスホロチオエート、2'-F-ホスホロチオエート、2'-F-ホスホジエステル、2'-メトキシエチルホスホロチオエート、2'-メトキシエチルホスホジエステル、デオキシメチレン(メチルイミノ)(デオキシMMI)、2'-O-ヒドロカルビルMMI、デオキシ-メチルホスホネート、2'-O-ヒドロカルビルメチルホスホネート、モルホリノ、4'-チオDNA、4'-チオRNA、ペプチド核酸、3'-アミデート、デオキシ3'-アミデート、2'-O-ヒドロカルビル3'-アミデート、ロックド核酸、シクロヘキサン核酸、三環式DNA、2'フルオロ-アラビノ核酸、N3'-P5'ホスホロアミデート、カルバメート連結、ホスホトリエステル連結、ナイロン骨格修飾、及び上述の骨格の混合物を含む群から選択される骨格を含む。

30

40

【0044】

様々な実施形態では、本オリゴヌクレオチドは、このアンチセンスオリゴヌクレオチドの活性、細胞分布、又は細胞取り込みを増強する1個又は複数個のコンジュゲートに化学的に連結されている。

【0045】

このオリゴヌクレオチドは、このアンチセンスオリゴヌクレオチドの活性、細胞分布、又は細胞取り込みを増強する1個又は複数個のコンジュゲートに化学的に連結されてもよい。

【0046】

本開示の化合物を予防薬又は治療薬としても使用し得、遺伝的疾患の処置の目的に利用

50

してもよい。そのため、有利なことに、本発明に係るアンチセンスオリゴヌクレオチドは、患者の癌又は自己免疫疾患の処置で使用され得る。このアンチセンスオリゴヌクレオチドに加えて、この患者に、さらなる抗がん剤又は処置を施してもよい。この癌は、HBV誘発性HCC、EBV誘発性非ホジキンリンパ腫を含む群から選択されるいずれか1つであり得る。

【0047】

従って、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用して、免疫調節分子（例えば、IFN-ガンマ、グランザイム、パーフォリン1等）に対する非常に有効な（IC₅₀ 2.5nM）薬物候補のための新規製剤を調製し得る。本発明の別の態様では、本発明に係るアンチセンスオリゴヌクレオチドと薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物が提供される。

10

【0048】

薬学的に許容される担体は一般に、対象への投与に適した物質を指し、この担体は生物学的に有害ではなものである、さもなければ望ましくない効果を引き起こしてしまう。そのような担体は概して、薬の不活性成分である。典型的には、担体は、何らかの望ましくない生物学的効果を引き起こすことなく、又はこの担体が含まれる医薬組成物の他の成分のいずれかと有害な態様で相互作用することなく、活性成分と一緒に対象に投与される。適切な医薬担体は、全体が参照により本明細書に組み込まれるMartin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., (1990)に記述されている。

【0049】

20

本開示のより具体的な形態では、薬学的に許容される希釈剤、保存料、可溶化剤、乳化剤、アジュバント及び/又は担体と一緒に、アンチセンスポリヌクレオチドの治療上有効な量を含む医薬組成物が提供される。そのような組成物は、様々な緩衝成分、pH及びイオン強度の希釈剤（例えば、ホスフェート、Tris-HCl、アセテート）、並びに添加剤、例えば、界面活性剤及び可溶化剤（例えば、Tween 80、Polysorbate 80）、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、二亜硫酸ナトリウム）、保存料（例えば、チメロゾール(Thimersol)、ベンジルアルコール）、並びに増量物質（例えば、ラクトース、マンニトール）を含む。この材料を、ポリマー化合物（例えば、限定されないが、ポリ乳酸又はポリグリコール酸等）の粒子調製物に組み込んでよいし、リポソームに組み込んでよい。ヒアルロン酸を使用してもよい。そのような組成物は、開示された組成物の物理的状態、安定性、インピボでの放出速度、及びインピボでのクリアランス速度に影響を及ぼし得る。この組成物は、液体形態で調製されてもよいし、凍結乾燥形態等の乾燥粉末であってもよい。

30

【0050】

本開示に従って提供される医薬組成物を当技術分野で既知の任意の手段により投与し得ることが認識されるだろう。好ましくは、投与のための医薬組成物を、注射により、経口で、又は肺経路若しくは鼻経路により投与する。本アンチセンスポリヌクレオチドを、様々な実施形態では、静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、又は皮下の投与ルートにより送達する。様々な実施形態では、この組成物は、裸で又は送達剤との複合体で、患者への非経口投与に適している。担体は、ナノ粒子、例えば、ポリマーナノ粒子;リポソーム、例えば、pH感受性リポソーム、抗体がコンジュゲートしたリポソーム;ウイルスベクター、カチオン性脂質、ポリマー、UsnRNA、例えば、U7 snRNA、及び細胞膜透過ペプチド（cell penetrating peptide）を含む群から選択され得る。

40

【0051】

本アンチセンスオリゴヌクレオチドを、経口投与してもよいし、直腸投与してもよいし、経粘膜投与してもよいし、腸内投与してもよいし、筋肉内投与してもよいし、皮下投与してもよいし、髄内投与してもよいし、髄腔内投与してもよいし、直接脳室内投与してもよいし、静脈内投与してもよいし、硝子体内投与してもよいし、腹腔内投与してもよいし、鼻腔内投与してもよいし、眼内投与してもよい。

【0052】

本発明のアンチセンス分子は、任意の薬学的に許容される塩、エステル、若しくはその

50

ようなエステル塩、又はヒト等の動物への投与時に生物学的に活性なその代謝産物若しくは残基を(直接的に又は間接的に)提供し得る他の化合物を包含する。従って、例えば、本開示は、本発明の化合物のプロドラッグ及び薬学的に許容される塩、そのようなプロドラッグの薬学的に許容される塩、並びに他の生物学的等価物にも関する。

【0053】

用語「薬学的に許容される塩」は、本発明の化合物の生理学的に及び薬学的に許容される塩(即ち、親化合物の所望の生物活性を保持し、且つ望ましくない毒性作用を与えない塩)を指す。

【0054】

ポリヌクレオチドについて、薬学的に許容される塩の好ましい例として下記が挙げられるがこれらに限定されない:(a)カチオン(例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、マグネシウム、カルシウム)、ポリアミン(例えば、スベルミン及びスベルミジン)と共に形成される塩;(b)無機酸(例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、硝酸)と共に形成される酸付加塩;(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)と共に形成される塩;並びに(d)元素陰イオン(例えば、塩素、臭素、及びヨウ素)から形成される塩。本開示の医薬組成物は、局所処置が望ましいか全身処置が望ましいかに応じて、及び処置する領域に応じて、多くの方法で投与され得る。投与は、局所(例えば、眼性、及び直腸送達等で粘膜へ)、肺性、例えば、粉末若しくはエアロゾルの吸入によるもの(噴霧器、気管内、鼻腔内、表皮、及び経皮によるものを含む)、経口、又は非経口であり得る。非経口投与として、静脈内、動脈内、皮下、腹腔内、若しくは筋肉内の注射若しくは注入;又は頭蓋内(例えば、髄腔内又は脳室内)投与が挙げられる。少なくとも1個の2'-O-メトキシエチル修飾を有するポリヌクレオチドは、経口投与に特に有用であると考えられる。

【0055】

単位投与形態で好都合に提供され得る本開示の医薬製剤を、製薬産業で公知の従来の技術に従って調製し得る。そのような技術は、活性成分と薬学的担体又は添加剤とを会合させる工程を含む。一般に、製剤は、活性成分と、液体担体、もしくは細かく分割された固体担体、又はその両方とを均一に会合させ、次いで必要に応じて製品を成形することにより調製される。

【0056】

追加の治療薬との併用療法も本開示により企図される。本開示の組成物に付随して送達され得る治療薬の例として、限定されないが、グルココルチコイドステロイド(例えば、限定されないが、プレドニゾン及びデフラザコート)、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、ベータアドレナリンレセプターブロッカー、抗線維化剤、及びこれらの組み合わせが挙げられる。

【0057】

一部の実施形態では、例えば、適切な宿主細胞中での本発明のポリヌクレオチドの発現を導くためにこのポリヌクレオチドを含むベクター(例えば発現ベクター)を用いて、本発明を遺伝子治療において使用し得る。そのようなベクターは、例えば、宿主細胞中でポリヌクレオチドを増幅させてこのポリヌクレオチドの有用な量を創出するのに有用であり、且つ組換え技術を使用してタンパク質を発現させるのに有用である。一部の実施形態では、このベクターは、本発明のポリヌクレオチドが発現制御配列を含むポリヌクレオチドに作動可能に連結されている発現ベクターである。

【0058】

様々な実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドを含む組成物は、T細胞レセプター遺伝子をコードする核酸分子をさらに含み得る。ある実施形態では、この核酸分子はmRNA分子であり得る。

【0059】

10

20

30

40

50

T細胞に核酸を導入する方法(当技術分野で公知であり且つ日常的に実行されている)として、形質転換、トランスフェクション、エレクトロポレーション、核注入、又は担体(例えば、リボソーム、ミセル、ゴースト細胞、及びプロトプラスト)との融合が挙げられる。この宿主T細胞は単離及び/又は精製され得る。このT細胞はまた、インビボでポリペプチドの一時的な又は永続的な発現を引き起こすためにインビボで形質転換された細胞であり得る。このT細胞はまた、例えば、治療目的のためにインビボでポリペプチドを産生するために、エキソビボで形質転換されて形質転換後に導入される単離細胞であり得る。

【0060】

本発明のASOを、当技術分野で公知のトランスフェクションの方法によりT細胞に導入してもよい。この方法として、ソノフォレーシス、電気パルス、エレクトロポレーション、浸透圧ショック、リン酸カルシウム沈殿、及びDEAEデキストラントランスフェクション、脂質媒介送達、受動送達等が挙げられる。用語「T細胞をトランスフェクトする」は、核酸分子をT細胞に導入し得るあらゆる手段を含むことが意図されている。用語「トランスフェクション」は、哺乳動物細胞への核酸の導入に有用な様々な技術(例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、DEAE-デキストラン処理、リポフェクション、マイクロインジェクション、及びウイルス感染)を包含する。哺乳動物細胞をトランスフェクトするのに適した方法は、Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press (1989))、及び他の実験室テキストに見出され得る。

【0061】

同様に、本ASOを、ウイルスベクターを使用してT細胞に導入してもよい。そのようなウイルスベクターとして、例えば、組換えレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、及び単純ヘルペスウイルス-1が挙げられる。レトロウイルスベクター及びアデノ随伴ウイルスベクターは一般に、特にヒトにインビボで外因性遺伝子を導入するために選択される組換え遺伝子送達システムであると理解される。或いは、レトロウイルスベクター及びアデノ随伴ウイルスベクターを、T細胞にエキソビボで外因性遺伝子を導入するために使用し得る。これらのベクターはT細胞への遺伝子の効率的な送達をもたらし、導入された核酸は宿主細胞の染色体DNA中に安定的に組み込まれる。

【0062】

本発明で有用な別のウイルス遺伝子送達システムは、アデノウイルス由来のベクターを利用する。アデノウイルスのゲノムは、目的の遺伝子産物をコードして発現するが通常の溶解性ウイルスのライフサイクルにおいて複製する能力に関しては不活性化されるように操作され得る。目的の遺伝子を含む核酸分子の送達に有用な、さらに別のウイルスベクターシステムは、アデノ随伴ウイルスである。

【0063】

本ASOは、細胞送達ビヒクルにより運ばれてT細胞に送達されてもよい。そのようなビヒクルとして、例えば、カチオン性リポソーム(Lipofectin(商標))、又は誘導体化された(例えば、抗体がコンジュゲートされた)ポリリシンコンジュゲート、グラミシジンS、人工ウイルスエンベロープが挙げられる。これらのビヒクルは、プラスミド、ベクター、又はウイルスDNAに組み込まれている核酸を送達し得る。具体的な実施形態では、初代Tリンパ球における核酸分子の効率的な導入は、Philip, R. et al. (1994) Mol. Cell. Biol. 14, 2411で説明されているように、カチオン性リポソームと複合体化されたアデノ随伴ウイルスプラスミドDNAで初代Tリンパ球をトランスフェクトすることにより得られる。

【0064】

本発明の別の実施形態では、本ASOは可溶性分子複合体の形態で送達されてもよい。この複合体は、核酸結合剤と、特定のT細胞の表面分子に結合する細胞特異的結合剤とで構成されている担体に、放出可能に結合された核酸を含み、後で細胞によって内在化され得るサイズのものである。

【0065】

本発明の別の実施形態では、核酸はパーティクルガン (particle bombardment) によ

10

20

30

40

50

りT細胞に導入される。

【0066】

様々な実施形態では、本ASOは、特にT細胞の増殖中に、T細胞に受動的に送達されてもよい(即ち、追加のトランスフェクション試薬なしに送達される)。増殖は、本明細書で使用される場合、容器内での及び当技術分野で公知の条件下での、トランスフェクトされた神経幹細胞による子孫細胞の産生を含む。増殖は、適切な培地及び細胞成長因子の存在下で起こり得る。本ASOは、0%血清条件下等の低血清条件下で、培養中(例えば、限定されないが、培養プレート、培養皿、マルチウェルプレート等の中)のT細胞に受動的に送達されてもよい。そのような条件は、Invitrogen及びHyClone等の多くの企業から市販されている、標準的な、当技術分野で試験済みの低血清培地で培養された細胞を含む。一例では、細胞を最初に血清培地に播種し、次いで、この血清培地を、24時間にわたり、本開示の3つに分かれた(tripartite)オリゴヌクレオチド複合体を含む低血清培地に置き換え、次いで、この低血清培地を血清培地に置き換える。

10

【0067】

様々な実施形態では、トランスフェクション試薬は、ポリマー、脂質、脂質-ポリマー、及び/又はそれらの組み合わせ、及び/又は細胞ターゲティング部分若しくは細胞内ターゲティング部分を含むそれらの誘導体、及び/又は膜不安定化成分、及び1種若しくは複数種の送達増強剤からなる群から選択され得る。

【0068】

本発明の別の態様では、患者の疾患を処置する方法であって、本発明に係るアンチセンスオリゴヌクレオチド、又は本発明に係る組成物の治療上有効な量を投与することを含む方法が提供される。

20

【0069】

用語「有効な量」又は「治療上有効な量」は、処置される疾患状態の1種若しくは複数種の症状を処置するのに、阻害するのに、若しくは軽減するのに十分な投与量、又は、望ましい薬理学的効果及び/又は生理学的効果を他の方法でもたらす(特に、選択された抗原に対するT細胞応答を増強する)のに十分な投与量を意味する。正確な投与量は、様々な因子(例えば、対象に依存する変数(例えば、年齢、免疫系の健康状態等)、疾患、及び施されている処置)に従って変動するだろう。

【0070】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」は、ありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤等を含む。薬学的に活性な物質のためのそのような媒体及び薬剤の使用は、当技術分野で公知である。活性化化合物と不適合でない限り、治療用組成物におけるあらゆる従来の媒体又は薬剤の使用が企図される。この組成物には、補助的な活性化化合物も組み込まれ得る。

30

【0071】

本アンチセンスオリゴヌクレオチド又は組成物を、経口投与してもよいし、直腸投与してもよいし、経粘膜投与してもよいし、腸内投与してもよいし、筋肉内投与してもよいし、皮下投与してもよいし、髄内投与してもよいし、髄腔内投与してもよいし、直接脳室内投与してもよいし、静脈内投与してもよいし、硝子体内投与してもよいし、腹腔内投与してもよいし、鼻腔内投与してもよいし、眼内投与してもよい。それでもやはり、実績のある全身投与オプションとして、静脈内、腹腔内、鼻腔内、及び髄腔内が挙げられる。ASOと、送達担体(例えば、ナノ粒子、ポリマーベースの又はリポソームベースのビヒクル)との複合体化により、特定の組織へのASOの送達効率がさらに増強され得る。

40

【0072】

様々な実施形態では、本アンチセンスオリゴヌクレオチドはT細胞にトランスフェクトされており、本方法は、そのトランスフェクトされたT細胞を患者に投与することを含む。このアンチセンスオリゴヌクレオチドは、エレクトロポレーションプロセスによりT細胞にトランスフェクトまたは導入してもよい。

【0073】

50

或いは、T細胞への本発明のオリゴヌクレオチドの導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、形質導入、感染、マイクロインジェクション、組換えウイルス及びレトロウイルス感染、又は他の方法により達成され得る。そのような方法は、多くの標準的な実験室マニュアル(例えば、Davis et al, Basic Methods In Molecular Biology (1986))で説明されている。本発明のポリペプチドは、実際に、組換えベクターを欠く宿主細胞により発現され得ることが特に企図される。

【0074】

様々な実施形態では、担体は、ナノ粒子、例えば、ポリマーナノ粒子;リポソーム、例えば、pH感受性リポソーム、抗体がコンジュゲートしたリポソーム;ウイルスベクター、カチオン性脂質、ポリマー、UsnRNA、例えば、U7 snRNA、及び細胞膜透過ペプチドからなる群から選択される。

10

【0075】

様々な実施形態では、本アンチセンスオリゴヌクレオチド又は組成物を、経口投与するか、又は直腸投与するか、又は経粘膜投与するか、又は腸内投与するか、又は筋肉内投与するか、又は皮下投与するか、又は髄内投与するか、又は髄腔内投与するか、又は直接脳室内投与するか、又は静脈内投与するか、又は硝子体内投与するか、又は腹腔内投与するか、又は鼻腔内投与するか、又は眼内投与する。

【0076】

疾患は、HBV誘発性HCC、EBV誘発性非ホジキンリンパ腫を含む群から選択される癌であり得る。

20

【0077】

従って、本発明に係るアンチセンスオリゴヌクレオチドは医薬品において有用である。

【0078】

本発明の別の態様では、T細胞により発現される免疫関連遺伝子又は免疫調節遺伝子のプレ-mRNAのエクソンスキッピングを誘発する方法であって、本発明の上記の態様のうちのいずれか1つに係るアンチセンスオリゴヌクレオチド又は組成物を細胞に送達することを含む方法が提供される。

【0079】

様々な実施形態では、細胞はヒト細胞である。

30

【0080】

本発明の別の態様では、T細胞の機能を調節する方法であって、本発明に係るアンチセンスオリゴヌクレオチドをこのT細胞に投与することを含む方法が提供される。

【0081】

この方法は、T細胞レセプター遺伝子をコードする核酸分子をこのT細胞に投与することにより、このT細胞の特異性を調節することをさらに含む。T細胞レセプター遺伝子をコードする核酸分子を、エレクトロポレーションによりT細胞にトランスフェクト又は導入する。

【0082】

本発明のさらに別の態様では、本発明に係るアンチセンスオリゴヌクレオチドで形質転換又はトランスフェクトされたT細胞が提供される。様々な実施形態では、このアンチセンスオリゴヌクレオチドを、エレクトロポレーションプロセスによりT細胞にトランスフェクト又は導入する。

40

【0083】

T細胞は、T細胞レセプター遺伝子をコードする核酸分子をさらに含んでもよく、この核酸分子はmRNAである。

【0084】

本発明のさらに別の態様では、任意選択で容器中の、本発明に係るアンチセンスオリゴヌクレオチドと、パッケージ添付文書、パッケージラベル、説明書、又は他のラベリングとを含むキットが提供される。

50

【 0 0 8 5 】

本出願は免疫療法の技術分野に関し、具体的には、腫瘍及び/又はウイルス感染(例えば、B型肝炎誘発性肝細胞癌、EBV誘発性NKT細胞リンパ腫等)に対する免疫療法の技術分野に関する。ここで、T細胞により発現される免疫関連遺伝子又は免疫調節遺伝子の[例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)により媒介されるエクソンスキッピング又はイントロン保持による]直接的で選択的な下方制御により、T細胞の機能(例えば、ウイルス複製の直接阻害、又は標的とされる抗原を発現する細胞の選択的殺傷)が調節されることが示される。

【 0 0 8 6 】

定義

本発明は、特定の実施形態に関して及び特定の図面を参照して説明されているが、本発明はそれらに限定されず、特許請求の範囲によってのみ限定される。特許請求の範囲での参照符号は、範囲を限定すると解釈されるべきではない。説明されている図面は概略にすぎず、非限定的である。図面では、要素の一部のサイズが誇張されている場合があり、例示の目的のために縮尺通りに描かれていない。用語「含む」が本明細書及び特許請求の範囲で使用される場合、この用語は他の要素又は工程を除外しない。単数の名詞への言及時に不定冠詞又は定冠詞(例えば、「a」又は「an」、「the」)が使用される場合には、これは、他のことが具体的に述べられていない限り、その名詞の複数形を含む。さらに、本明細書及び特許請求の範囲における用語第1、第2、第3等は、類似の要素を区別するために使用され、必ずしも順番又は時系列を説明するためではない。そのように使用される用語は適切な状況下で交換可能であること、及び本明細書で説明されている本発明の実施形態は、本明細書で説明されているか又は例示されているものとは別の順序で作動可能であることを理解されたい。

【 0 0 8 7 】

下記の用途又は定義は、本発明の理解を助けるためにのみ提供される。本明細書で具体的に定義されない限り、本明細書で使用される全ての用語は、本発明の技術分野の当業者にとっての意味と同じ意味を有する。実施者は、当技術分野の定義及び用語に関して、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Press, Plainville, New York (1989);及びAusubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (Supplement 47), John Wiley & Sons, New York (1999)を特に参考にする。本明細書で提供される定義は、当業者により理解されるものと比べて小さい範囲を有すると解釈されるべきではない。

【実施例】

【 0 0 8 8 】

実施例1

ASOは、HBV特異的TCR再指向型初代T細胞に効率的に導入され得る。

初代T細胞の特異性を改変するために、本発明者らは、[9]のように、エレクトロポレーション法を使用して、HBVのエンベロープタンパク質中のペプチド(S183-191)を認識するTCRのVアルファ/ベータ鎖をコードするmRNAで初代T細胞をトランスフェクトした。このペプチドは通常、抗原提示細胞(APC)の表面上に又はHBV感染肝細胞上に、MHC-Iを介して提示される。従って、T細胞の表面上のS183-191特異的TCRの発現により、T細胞は、HBVの存在を認識し得るようになり、最終的にはTCR活性化を受けるようになる。T細胞の表面上でのHBV特異的TCRの発現は、MHC多量体による単純な表面染色とフローサイトメトリ分析とを使用して評価し得る。MHC多量体は、抗原特異的T細胞を特定するように設計された、MHC分子の標識されたオリゴマー形態であり、MHC多量体は特定の特異性のT細胞レセプターに直接結合することができ、この特異性は、MHC分子とこのMHC分子上に提示されるペプチドとの組み合わせにより決定される。同様に、本発明者らは、RNAエレクトロポレーションを使用してT細胞の機能を改変し、望ましくない遺伝子の様々なエクソンを標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)を導入した。

【 0 0 8 9 】

活性化された初代T細胞中においてASOを送達する可能性を評価するために、本発明者らは、FAMで標識付けされたスクランブル化ASOを使用し、それを単独で又はTCRをコードするmRNAとの組み合わせでT細胞に導入し、フローサイトメトリーを使用してその存在を探した。図1の中央のパネルに示すように、FAM標識付きASOのみがエレクトロポレートされたT細胞の94%がフルオロフォアに対して陽性であり、このことは、エレクトロポレーションがオリゴマーを送達するための有効な方法であることを示す。同様に、右側のパネルは、FAM-ASOと一緒にTCRがエレクトロポレートされているT細胞が両方のトランスフェクト物に対して陽性であることを示す。最も重要なことに、T細胞のやはり94%がASOに対して陽性を示し、このことは、2種の異なる分子を導入しても送達効率が低下しないことを意味する。図1の右側のプロットも、二重にエレクトロポレートされたT細胞が、アッセイで使用された2種のフルオロフォアで二重染色されていることを示し、このことは、単一の反応で両方のトランスフェクト物を送達することができ、その結果、(TCRの導入により)T細胞の特異性を改変し、そして(ASOの導入により)T細胞の機能を改変することができたことを意味する。

10

【0090】

さらに、別の実験では、本発明者らは、同一のT細胞で、互いに16時間離れた2つの別々の反応でTCR及びASOをエレクトロポレートした。本発明者らがこの異なるスケジュールに興味があったのは、TCRの発現のピークとASOの活性のピークとが一致し得ず、これらの同時送達はT細胞に対する非協調的な効果をもたらす可能性があったからである。また、この特定の実験スケジュールにより、本発明者らは、TCRの発現とASOの送達との両方を得ることができた(データは示さない)。従って、本発明者らは、2種の分子を異なる時点で導入して、これらの分子の最適なタイミングにこれらの分子の効果を調整することができることを証明し得る。

20

【0091】

実施例2

初代T細胞において、ASOにより遺伝子発現が調節され得る。

(HBV特異的TCRを伴う又は伴わない)初代活性化T細胞中でのASOのトランスフェクションの実行可能性を証明した後、本発明者らは、標的遺伝子のスプライシングに干渉するオリゴヌクレオチドの能力を試験することへと進んだ。概念実証のために、本発明者らは、インターフェロン- γ (IFN- γ) プレ-mRNAのエクソン2を標的とするASOを設計することを選択し、なぜならば、実験室で、そのようなサイトカインの存在及び活性を評価するために様々なツールを利用し得るからである。本発明者らは、トランスフェクトされた細胞のcDNAに対してシンプルなPCRを実施して完全長及び短い(エクソンがスキップされた)アイソフォームの両方を増幅させるPCR産物を得るために、(IFN- γ)のエクソン2を囲むプライマーを設計した[11]。この技術の特異性を評価するためのコントロールは、非ターゲティング/スクランブル化配列で初代細胞をトランスフェクトして実施する。図2.AはPCRの結果を示し、ASOがプレ-mRNAのスプライシングを用量依存的に妨げ、最終mRNAからエクソン2が排除されることが明らかである。500ピコモルのIFN- γ ターゲティングASOでトランスフェクトされたT細胞の8%だけがmRNAレベルで効果を示すところ、同一のオリゴマーの3倍の量でトランスフェクトされたT細胞は、完全長転写産物の92%の減少を示す。スクランブル化ASOで処理されたT細胞は、IFN- γ 転写産物のいかなる改変も示さない。しかしながら、図2.Aで明らかなように、本発明者らが予想したようにエクソンがスキップされたmRNAをナンセンス媒介性RNA崩壊により除去することは達成できなかった。免疫関連タンパク質のバイオインフォマティクス検索の後、本発明者らは、多くのスプライスバリエントが生理的条件下で通常存在するが、機能的に特徴付けられていないことが多いことを理解した。

30

40

【0092】

次いで、本発明者らは、タンパク質レベルでIFN- γ の豊富さを測定して、スプライシングの改変がタンパク質のノックダウンに反映されていることを検証しようとした。図2.Bは、トランスフェクトされた細胞から完全長mRNAがほぼ完全に除去されたにもかかわらず

50

ず、IFN- γ が細胞内サイトカイン染色により依然として検出され得たことを示す。この染色により、スクラブル化ASOがトランスフェクトされたT細胞に対して、IFN- γ -特異的ASOで処理されたT細胞の蛍光が25%だけ減少していることが明らかになる。

【0093】

mRNAレベルでの結果とタンパク質レベルでの結果との間のこの不一致は、PCRにより検出されNMDにより除去されていない、エクソンがスキップされた形態の存在により説明される可能性がある。このmRNAは、いずれにせよ、細胞内サイトカイン染色で抗体により非特異的に検出されるIFN- γ のより短いアイソフォームへと翻訳される可能性がある。T細胞中でのこのエクソンがスキップされたアイソフォームの存在に関してタンパク質レベルで試験するために、ウエスタンブロットを実施し得たが、このアッセイの実行可能性及び結果の品質は、より短いタンパク質を非特異的に検出する抗体の能力に依然として依存し、そのため本発明者らは、これが本発明者らの研究の目的とは無関係であることに同意した。

【0094】

従って、本発明者らは、処置の効果の尺度として、ASOがトランスフェクトされた細胞により産生されるIFN- γ の機能を試験することに進んだ。この目的のために、本発明者らは、IFN- γ 抗ウイルス効果に対して非常に敏感なHCV-レプリコンを含むプラスミドがトランスフェクトされたHuH7細胞株の使用を含む、十分に確立された機能アッセイを使用した[17](図3.A)。トランスフェクションに使用されるプラスミドは、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼも含み、従って、細胞中で検出されるルシフェラーゼ活性は、HCVの「複製」に比例する(図3.A)。

【0095】

本発明者らは、ASOで処理されたT細胞の刺激に由来する上清の存在下で、HCV-レプリコン細胞株を一晩培養し、ルシフェラーゼアッセイを実施して、産生されたIFN- γ がレプリコンの産生を停止することができるかどうかを検証した。図3.Bは、IFN- γ を標的とするASOがトランスフェクトされている、刺激されたT細胞は、ウイルス複製の制御能力がより低い(スクラブル化ASOがエレクトロポレートされたT細胞と比較して50%低い)ことを示す。このことから、エクソンがスキップされたアイソフォームに由来するサイトカインは機能しないことが証明される。

【0096】

最後に、使用されるトランスフェクション法の主なゴールのうちの1つは効果の一過性であることから、本発明者らは、エクソンスキッピングがmRNAレベルでどれだけ長く維持されたかを調べた。図4において、処置の効果が時間と共に薄まり、エレクトロポレーションの96時間後には完全に消失することが見られる。

【0097】

実施例3

初代T細胞において、ASOにより細胞傷害性が調節され得る。

序論で述べたように、HCCのような悪性腫瘍の治療のための養子T細胞移入の使用の1つの考えられる欠点は、実質的に全肝臓がエフェクターT細胞の標的となる可能性があり、深刻な結果がもたらされうる、肝臓細胞傷害性である。このリスクを制限し治療の安全性を改善するために採用される1つの手段は、エレクトロポレーションにより誘導されるT細胞レセプター発現の一過性であるが、本発明者らは、アンチセンス技術を使用して、TCR再指向型T細胞の細胞傷害性機能も改変することができるかどうかを問うた。同一の設定を使用して、本発明者らは、グランザイムB(ASO #266及び#267)、並びにパーフォリン(ASO #268及び#269)のプレmRNAのそれぞれエクソン3及びエクソン2を標的とするASOを導入した。パーフォリン及びグランザイムは、細胞間細胞傷害性で作用する2種の主なエフェクターである。

【0098】

図5において、本発明者らは、エレクトロポレーションの24時間後(及び、既に処置の6時間後、データは示さない)に、2種のタンパク質のスプライシングの改変をmRNAレベル

10

20

30

40

50

で検出し得ることを示す。グランザイム特異的ASOは、スクランブル化ASOと比較して、91%のエクソンスキップ(#266)及び70%のエクソンスキップ(#267)を生じ得る。興味深いことに、グランザイムBは、3種の異なるスプライシングアイソフォームを天然に提示し、ASOは、完全長転写産物と短い長さの転写産物との間の比率を改変するのみであることに気付くことができる。残念ながら、文献には、これらの異なるアイソフォームのタンパク質レベルでの存在及び生理的機能(もしあるとすれば)の報告は存在しない。そのため、本発明者らは、これらのアイソフォームがタンパク質に翻訳されるかどうか、及び細胞内サイトカイン染色での検出のために本発明者らが使用する抗体によっても検出されるかどうかは分からない。

【0099】

加えて、同一の図から、パーフォリンのmRNAの完全長バンドはパーフォリン特異的ASOのトランスフェクション後に検出不能であるが、同時に、処置の後に得られると思われる、より短いアイソフォームも検出不能であることに気付く。完全長転写産物の欠如は、パーフォリンのプレmRNAを標的とするASOの効果により説明され得る。一方、スプライシングの変化により産生された、エクソンがスキップされた転写産物は、ナンセンス媒介性RNA崩壊にさらされる可能性があり、このことが、ゲルからのバンドの欠如を説明し得る。しかしながら、この仮説を検証するためには、より多くの実験を実行する必要がある。

【0100】

次に、本発明者らは、RNAレベルでの改変がタンパク質発現の何らかの改変に反映されるかどうかを調べることに進み、そのため、本発明者らは、細胞内サイトカイン染色を実施して、2種の標的タンパク質のレベルを測定した。図6は、エレクトロポレーションの24時間後の細胞内でのタンパク質の存在量の尺度として、グランザイム陽性及び/又はパーフォリン陽性の細胞の割合と蛍光強度中央値(MFI)とを示す。図6から、本発明者らは、グランザイムBのレベルに大きな改変を検出しない。このことは、上記で説明した複数のアイソフォームの存在により説明される可能性がある。実際に、この転写産物は、より短いタンパク質へと翻訳され得、このアッセイで使用される抗体に結合し得た。この仮説を検証するためには、前の段落のIFN- γ の細胞内サイトカイン染色の場合と同様に、T細胞中でのこのより短いタンパク質の存在を評価するためにウエスタンブロットが必要であるが、同じ制約がある。

【0101】

一方、特異的ASOで処理されたパーフォリン陽性T細胞は、スクランブル化ASOがエレクトロポレートされたT細胞と比較して低いMFIを示す(減少は劇的ではなく、80%にとどまる)。興味深いことに、本発明者らは、パーフォリン陽性細胞数の一貫した且つ大幅な減少に気付く(スクランブル化ASOで処理されたT細胞と比較して60%)。この現象の一つの考えられる説明は、パーフォリンプレmRNAを標的とするASOが非常に有効であり、細胞に入るとタンパク質の産生を完全に停止し得るという事実である。この理由のために、陽性細胞数は減少したがMFIは劇的には変化しなかった。

【0102】

パーフォリンを標的とするASOで処理されたT細胞はグランザイムBのレベルのいかなる変化も示さないことから、このアッセイはASOの効果が特異的であることも示している。

【0103】

次いで、本発明者らは、ASOで処理されたT細胞の細胞傷害能力が、アンチセンスオリゴヌクレオチドにより誘発されるエクソンスキップに起因して改変されるかどうかを検証することへと進んだ。従って、本発明者らは、xCELLigence(登録商標) RTCA DP (Acea Biosciences)を使用して細胞傷害性アッセイをセットアップした。xCELLigence(登録商標)RTCA DPは、非侵襲的な電気インピーダンスを使用して細胞の増殖及び付着をラベルフリーでリアルタイムにモニタリングするための機器である[18]。このアッセイの機能ユニットは、プレートウェルの底部上の電極のセットである。導電性溶液中にある場合、この電極に渡る電位の印可により、電子が、陰極端子から出てこの導電性媒体を通過しつつ陽極端子に沈着する(図7A)。この現象は、電極と溶液との間の直接的な相互作用に依存し

10

20

30

40

50

、そのため、電極-溶液界面での付着細胞の存在により電子の流れが妨げられる。このインピーダンスの大きさは細胞の数、サイズ、及び形状に依存し、ウェルの底部で測定されたインピーダンスを利用して、これらの変数の測定値(細胞インデックス)を得ることが可能である(図7B)。この実験方法を使用して、本発明者らは、HBV特異的TCR再指向型T細胞とHBV産生細胞との共培養をセットアップして、本発明者らの改変エフェクターの殺傷能力を研究することができた。

【0104】

図8.Aは、HBV産生細胞を死滅させるHBV特異的T細胞の能力を示す。ASOノックダウンT細胞中でのパーフォリン及び/又はグランザイムBの産生の減弱により、このT細胞が、スクランブル化ASOがトランスフェクトされたTCR再指向型T細胞のように標的を死滅させることは妨げられることは明らかである。より詳細には、培養物へのエフェクターの追加の24時間後に、スクランブル化ASOで処理されたTCR再指向型T細胞は付着細胞のほとんど全てを死滅させ、標的をウェルの底部から分離させて細胞インデックスの低下を引き起こした(赤色)ことが見られる。同じ現象を、HBV産生細胞をグランザイムノックダウンT細胞と一緒に培養したウェルで観察する(黄色)。逆に、パーフォリン特異的ASOで処理されたHBV特異的T細胞は、共培養の開始から24時間後に殺傷能力の20%の低下を示す(青色)。興味深いことに、TCR再指向型T細胞に、パーフォリン転写産物及びグランザイムB転写産物を標的とするASOと一緒にトランスフェクトした場合には、細胞傷害性能力がさらに低下する(最大35%)。この結果は、T細胞がグランザイムBノックダウンされた場合に変化に気付かなかった場合であっても、2種のトランスフェクト物の効果が相加的となった(緑色)ことを示す。この不一致は、本発明者らが破壊しようとしている系の生物学を考慮すれば簡単に説明し得る。生理的条件下では、実際に、パーフォリンは、孔を形成する細胞溶解性タンパク質として細胞傷害性リンパ球(CTL: cytotoxic lymphocyte)により使用される。標的細胞の膜に形成されたこの孔は、グランザイムBの受動的拡散を可能にするが、これはプログラムされた細胞死のプロセスに関与するカスパーゼを開裂するプロアポトーシスプロテアーゼである。結果として、パーフォリン単独の作用が標的細胞の溶解を誘発するのに十分であることから、グランザイムB単独のノックダウンは、CTLの細胞傷害能力を劇的には改変しない。一方、両方のタンパク質がノックダウンされた場合には、プロアポトーシス経路及び細胞溶解経路が両方とも破壊され、CTLの殺傷能力が実質的に改変される。

【0105】

さらなる実施例及びデータ

図9は、AONが、典型的には、トランスフェクトされたT細胞の生存率に影響を及ぼさず、且つTCR発現を妨げないことを示す。図9(a)は、エレクトロポレートされていない細胞と比較した、HBV特異的TCR、AON、又はその両方を伴うT細胞EPの生存率を示す。図9(b)は、TCR又はTCR+AONを伴う、活性化された又は静止中のT細胞EPでのTCR発現を示す(フローサイトメトリーにおけるMHC多量体染色により測定した)。

【0106】

図10も同様に、AONが、典型的には、トランスフェクトされたTCR再指向型T細胞の抗ウイルス活性及び細胞傷害性に影響を及ぼさないことを示す。図10(a)は、細胞内サイトカイン染色によるフローサイトメトリーを示し、図10(b)は、インピーダンス細胞傷害性アッセイから得られた結果を示す。これらの図から、スクランブル化AONがトランスフェクトされたHBV特異的TCR再指向型T細胞は、HBV発現標的と共培養された場合に、(未処理のTCR再指向型T細胞と比較して)同等の炎症性サイトカイン産生(A)及び細胞傷害性を示すことが分かる。

【0107】

しかしながら、本発明では、本発明のAON(特に、本出願で同定された配列)がT細胞の機能を改変し得ることを本発明者らは発見した。例えば、本発明のAONは初代ヒトT細胞に効率的にエレクトロポレートされ得、選択的にスプライシングを改変することができる。図11を参照すると、AON #887(配列番号6508)及び#1173(配列番号2565)は、エレ

クトロポレーションの24時間後に、それぞれ膜結合型から可溶性型へのPD-1及びCTLA4の切り替えを示す。画像は、T細胞cDNAに対する断片長分析PCRを示す。各ピークの高さは、転写産物の存在量に比例する。

【0108】

本発明のAONはまた、細胞生存率を改変することなくエクソン包含を特異的に切り替えることもでき、このAONの効果は、同時TCRエレクトロポレーションと適合性がある。図12を参照すると、AON #887(配列番号6508)は、エレクトロポレーション(EP)の24/48時間後にPD-1の膜結合型アイソフォームから可溶性アイソフォームへの切り替えをmRNAレベルで示す(A及びB)。TCR mRNAの同時エレクトロポレーションにおいても、エレクトロポレーションの24時間後の細胞生存率は有意な影響を受けない(C)。AON単独又はAON+TCRの多重エレクトロポレーションは、PD-1エクソン3のPSIの一貫した減少を示す(D)。

10

【0109】

加えて、AONは、TCR発現に影響を及ぼすことなく膜結合タンパク質を特異的に減少させることができる。図13を参照すると、AON #887がエレクトロポレートされたT細胞は、タンパク質レベルで、PD-1の膜結合型アイソフォーム(A、フローサイトメトリー)から可溶性アイソフォーム(B、ELISA)への切り替えを示す。エレクトロポレートされたTCRのフローサイトメトリーデータは、AONにより有意に改変されない(C)。

【0110】

AONの組み合わせはまた、単独使用でのAONよりも、膜結合PD-1を特異的に減少させることができる。図14を参照すると、AON #887+#888がエレクトロポレートされたT細胞は、mRNAレベルで、PD-1の膜結合型アイソフォーム(右側のボックスで強調されている(A))から可溶性アイソフォーム(左側のボックスで強調されている(A))への切り替えを示す。PD-1のエクソン3 PSIの定量を(B)に示す。可溶性PD-1の増加は、ELISAスコアの増加によりタンパク質レベルで反映される(C)。

20

【0111】

具体的には、AON #887+#888(配列番号69648)は、T細胞により媒介される標的細胞死滅を増強することができる。図15は、AON #887/888+TCRがエレクトロポレートされたT細胞が、AON SCR+TCRがエレクトロポレートされた細胞と比較して、いかに3DモデルでHBV⁺肝細胞癌の全体的な死滅を増加させたかを示す。

30

【0112】

図16及び17は、標的IFN- γ に対する本AONの効果を示す。IFN- γ 特異的AONにより誘発されるエクソンスキッピングは、用量依存的であり且つ一過性である。図16は、細胞1個当たりの1.5/2.5/5フェムトモルのAONを示し、IFN- γ を標的とするAONの異なる量によるトランスフェクションの0-6-12-18-24-48-72時間後に抽出したRNAに対してPCRが行なわれている。

【0113】

図17は、IFN- γ を標的とするAONで処理されたT細胞の機能的変化を示す。より少ないIFN- γ を産生するT細胞は、TMEにおいてより少ないPD-L1発現を誘発すると推測された。図17(a)は、HBV特異的TCR再指向型T細胞(IFN- γ を標的とするAONを伴う又は伴わない)をHBV発現標的と共に培養し、5時間後に上清を集めることを示す。その後、この上清をTHP-1細胞に添加し(単独又は希釈状態で)、THP-1によるPD-L1の発現をフローサイトメトリーにより測定する。図17(a):THP-1によるPD-L1 MFI。図17(b):(スクランブル化コントロールと比較した)AONで処理されたTCR再指向型T細胞からの上清と共に培養したTHP-1でのPD-L1の減少率。図17(c):IFN- γ AONがトランスフェクトされた、活性化されたT細胞の上清と一緒に培養後での、JFH細胞中でのウイルス複製(ルシフェラーゼアッセイにより測定した)。ここで、JFH-ルシフェラーゼHCVレプリコンは、ルシフェラーゼに連結されたHCVを発現する細胞株である。この細胞株は、IFN- γ 抗ウイルス活性に非常に敏感である。上記AONで処理されたT細胞からの上清は、JFH細胞中でのウイルス複製を制御する能力がより低く、従ってIFN- γ の産生がより少ない。

40

50

【 0 1 1 4 】

図18は、PRFを標的とするAONがタンパク質レベルを特異的に減少させ、健康なドナー又はCHB患者からのT細胞で使用され得ることを示す。図18(a)及び(b)は、健康なドナー又は慢性B型肝炎患者から増殖され、PRFを標的とするAONで処理された、T細胞の細胞内サイトカイン染色(PRIF)である。この実験は、目的とするT細胞中でも表現型が達成されることを示す。図18(c)は、TCR再指向型T細胞(灰色)、スクランブル化AONで処理されたT細胞(中央の2つのバー)、及びPRFを標的とするAONで処理されたT細胞(一番右側の2つのバー)のPRF及びGZMBのICSを示す。GZMBのレベルはAONにより改変されないが、PRFのレベルは、PRF AONで処理されたT細胞でのみ改変される。図18(d)は、PRF mRNAについてのqPCRを示す。PRF mRNAのレベルは、本発明の特異的AONのトランスフェクション後に減少する。

10

【 0 1 1 5 】

図19は、PRFを標的とするAONで処理されたTCR再指向型T細胞は細胞傷害性がより低いことを示す。図19(a)は、HBV特異的TCR再指向型T細胞(PRIF特異的AONを伴う及び伴わない)をHBV発現標的と共に培養する細胞傷害性アッセイで得られた代表的なグラフである。PRF AONで処理されたT細胞は、コントロールと比べて細胞傷害性が低い。Fig19(b)は、4例の異なるドナーからの細胞を使用して実施した実験の平均値に基づいて得られた結果である。

【 0 1 1 6 】

図20は、特定のエクソンのスキッピングを誘発する本AONが、標的mRNA(具体的には、標的CD244(一番左側の2つのバー)、TIM3(中央の2つのバー)、及びTGIT(一番右側の2つのバー))のNMD媒介性減少を引き起こしていることを示す。AON #524(CD244に対する)、#527(対TIM3)、及び#526(対TGIT)がエレクトロポレートされたT細胞で得られたRT-qPCRデータは、これらの遺伝子のmRNAの相対存在量がそれぞれのAONの存在下で強く減少することを示す。

20

【 0 1 1 7 】

図21は、特定のエクソンのスキッピングを誘発する本AONが、標的mRNA(具体的には、標的PRDM1(一番左側の4つのバー)、及びREL(一番右側の4つのバー))のNMD媒介性減少を引き起こしていることを示す。図を参照すると、AON #442、#443、及び#444(PRDM1に対する)、#462、#463、#464(対REL)がエレクトロポレートされたT細胞で得られたRT-qPCRデータは、これらの遺伝子のmRNAの相対存在量がそれぞれのAONの存在下で減少することを示している。

30

【 0 1 1 8 】

図22は、AON #523がCD160エクソン3のスキッピングをいかに効率的に誘発し、アイソフォーム切り替えを引き起こすかを示す。図22(a)は、AONスクランブル又はAON #523がエレクトロポレートされたT細胞のFLA-PCRが、2種の野生型アイソフォーム(緑色の長方形)からエクソン3を除くアイソフォーム(一番左側の2つのボックス)への切り替えを示すことを示す。図22(b)は、AON 523がエレクトロポレートされたT細胞で得られたRT-qPCRデータは、CD160転写産物の相対存在量が増加することを示すことを示す。

【 0 1 1 9 】

図23は、AON #522がCD80エクソン2のスキッピングをいかに効率的に誘発し、アイソフォーム切り替えを引き起こすかを示す。図23(a)は、AONスクランブル又はAON 522がエレクトロポレートされたT細胞のFLA-PCRが、野生型アイソフォーム(一番左側のボックス)からエクソン2を除くアイソフォーム(一番右側のボックス)ピークへの切り替えを示すことを示す。他のピークはラダーとして示されている。図23(b)は、AON 522がエレクトロポレートされたT細胞で得られたRT-qPCRデータが、CD80転写産物の相対存在量の増加を示すことを示している。

40

【 0 1 2 0 】

本開示は以下の実施形態を含む。

[1]

50

T細胞の機能を調節するためのアンチセンスオリゴヌクレオチド。

[2]

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、

T細胞の増殖、T細胞の殺傷能力もしくは抗ウイルス性サイトカインを産生する能力のうちの1つ又は複数を調節する、[1]に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

[3]

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、T細胞により発現される免疫関連遺伝子又は免疫調節遺伝子の活性又は発現のレベルのうちの1つ又は複数を調節し、但し、前記遺伝子はCTLA4遺伝子ではない、[1]又は[2]に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

[4]

前記発現のレベルは、前記免疫関連遺伝子又は免疫調節遺伝子のアイソフォーム発現を改変するスプラシング調節である、[3]に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

[5]

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、免疫チェックポイント分子をブロックすることによりT細胞の機能を調節する、[3]に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

[6]

前記免疫チェックポイント分子はPD-1である、[5]に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

[7]

前記発現のレベルは、前記免疫関連遺伝子又は免疫調節遺伝子の直接的な又は選択的な下方制御のうちの1つである、[3]に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

[8]

前記オリゴヌクレオチドは、前記免疫関連遺伝子又は免疫調節遺伝子のプレmRNA又は成熟mRNAの標的領域に特異的にハイブリダイズする、[7]に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

[9]

前記遺伝子は、IFN- γ 、グランザイム、パーフォリン1、PD-1、PRDM1、PD-L1、CD40LG、NDFIP1、PDCD1LG2、REL、BTLA、CD80、CD160、CD244、LAG3、TIGIT、ADORA2A、及びTIM-3を含む群から選択されるいずれか1つである、[8]に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

[10]

前記オリゴヌクレオチドは、IFN- γ RNAのエクソン、イントロン、又はエクソン-イントロン境界の標的領域に特異的にハイブリダイズし、前記標的領域は、エクソン1及びエクソン2を含む群から選択されるいずれか1つである、[9]に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

[11]

前記オリゴヌクレオチドは、パーフォリンのエクソン、イントロン、又はエクソン-イントロン境界の標的領域に特異的にハイブリダイズし、前記標的領域はエクソン2bである、[9]に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

[12]

前記オリゴヌクレオチドは、グランザイムRNAのエクソン、イントロン、又はエクソン-イントロン境界の標的領域に特異的にハイブリダイズし、前記標的領域はエクソン3である、[9]に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

[13]

前記オリゴヌクレオチドは、PD-1 RNAのエクソン、イントロン、又はエクソン-イントロン境界の標的領域に特異的にハイブリダイズし、前記標的領域はエクソン2である、[9]に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

[14]

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号6508、69648、2565、7274、15372、63352、67190、66260、25333、25599、25676、43942、45170、4544

10

20

30

40

50

5、61632、及び53882のいずれか1つから選択される配列を含む、[1]～[13]のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

[15]

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは修飾ポリヌクレオチド骨格を含む、[1]～[14]のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

[16]

前記修飾ポリヌクレオチド骨格は、ポリヌクレオチドの少なくとも1個の糖の代わりに修飾部分を含む、[15]に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

[17]

前記修飾部分は、ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー(PMO)、ペプチド結合ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー(PPMO)、及び非ペプチドデンドリマーオクタグアニジン部分タグ化モルホリノオリゴマーからなる群から選択される、[16]に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

[18]

前記修飾ポリヌクレオチド骨格は、少なくとも1個の修飾ヌクレオチド間連結を含む、[15]～[17]のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

[19]

前記修飾ヌクレオチド間連結は修飾ホスフェートを含む、[18]に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

[20]

前記修飾ホスフェートは、硫黄原子を置換する非架橋酸素原子、ホスホネート、ホスホリチオエート、ホスホジエステル、ホスホモルホリデート、ホスホピペラジデート、及びホスホロアミデートを含む群から選択される、[19]に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

[21]

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、リボ核酸、デオキシリボ核酸、DNAホスホリチオエート、RNAホスホリチオエート、2'-O-メチル-オリゴリボヌクレオチド及び2'-O-メチル-オリゴデオキシリボヌクレオチド、2'-O-ヒドロカルビルリボ核酸、2'-O-ヒドロカルビルDNA、2'-O-ヒドロカルビルRNAホスホリチオエート、2'-O-ヒドロカルビルDNAホスホリチオエート、2'-F-ホスホリチオエート、2'-F-ホスホジエステル、2'-メトキシエチルホスホリチオエート、2-メトキシエチルホスホジエステル、デオキシメチレン(メチルイミノ)(デオキシMMI)、2'-O-ヒドロカルビルMMI、デオキシ-メチルホスホネート、2'-O-ヒドロカルビルメチルホスホネート、モルホリノ、4'-チオDNA、4'-チオRNA、ペプチド核酸、3'-アミデート、デオキシ3'-アミデート、2'-O-ヒドロカルビル3'-アミデート、ロッキング核酸、シクロヘキササン核酸、三環式DNA、2'フルオロ-アラビノ核酸、N3'-P5'ホスホロアミデート、カルバメート連結、ホスホトリエステル連結、ナイロン骨格修飾、及び上述の骨格の混合物を含む群から選択される骨格を含む、[1]～[20]のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

[22]

前記オリゴヌクレオチドは、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドの活性、細胞分布、又は細胞取り込みを増強する1個又は複数個のコンジュゲートに化学的に連結されている、[1]～[21]のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

[23]

患者の癌又は自己免疫疾患の処置における使用のための[1]～[22]のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

[24]

前記疾患は癌であり、前記患者は、さらなる抗がん剤又は処置が施される患者である、[23]に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

[25]

前記癌は、HBV誘発性HCC、EBV誘発性非ホジキンリンパ腫を含む群から選択されるい

10

20

30

40

50

ずれか1つである、[23] 又は [24] に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

[26]

[1] ~ [25] のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドと、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。

[27]

T細胞レセプター遺伝子をコードする核酸分子をさらに含む [26] に記載の組成物。

[28]

前記核酸分子はmRNAである、[27] に記載の組成物。

[29]

前記組成物は、裸で又は送達剤との複合体で、患者への非経口投与に適している、[26] ~ [28] のいずれか一項に記載の組成物。

[30]

前記担体は、ナノ粒子、例えば、ポリマーナノ粒子;リポソーム、例えば、pH感受性リポソーム、抗体結合リポソーム;ウイルスベクター、カチオン性脂質、ポリマー、UsnRNA、例えば、U7 snRNA、及び細胞膜透過ペプチドを含む群から選択される、[29] に記載の組成物。

[31]

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、経口投与、又は直腸投与、又は経粘膜投与、又は腸内投与、又は筋肉内投与、又は皮下投与、又は髄内投与、又は髄腔内投与、又は直接脳室内投与、又は静脈内投与、又は硝子体内投与、又は腹腔内投与、又は鼻腔内投与、又は眼内投与される、[26] ~ [30] のいずれか一項に記載の組成物。

[32]

患者の疾患を処置する方法であって、[1] ~ [25] のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド、又は [26] ~ [31] のいずれか一項に記載の組成物の薬学的有効量を投与することを含む方法。

[33]

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドはT細胞にトランスフェクトされており、前記方法は、前記患者への前記トランスフェクトされたT細胞を投与することを含む、[32] に記載の方法。

[34]

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ソノフォレーシス、電気パルス、エレクトロポレーション、浸透圧ショック、リン酸カルシウム沈殿、及びDEAEデキストラントランスフェクション、脂質媒介送達、及び受動送達を含む群から選択されるいずれか1つにより、T細胞にトランスフェクトされているか、又は導入されている、[33] に記載の方法。

[35]

前記担体は、ナノ粒子、例えば、ポリマーナノ粒子;リポソーム、例えば、pH感受性リポソーム、抗体結合リポソーム;ウイルスベクター、カチオン性脂質、ポリマー、UsnRNA、例えば、U7 snRNA、及び細胞透過性ペプチドからなる群から選択される、[32] ~ [34] のいずれか一項に記載の方法。

[36]

前記アンチセンスオリゴヌクレオチド又は組成物が、経口投与、又は直腸投与、又は経粘膜投与、又は腸内投与、又は筋肉内投与、又は皮下投与、又は髄内投与、又は髄腔内投与、又は直接脳室内投与、又は静脈内投与、又は硝子体内投与、又は腹腔内投与、又は鼻腔内投与、又は眼内投与される、[32] ~ [35] のいずれか一項に記載の方法。

[37]

前記疾患は、HBV誘発性HCC、EBV誘発性非ホジキンリンパ腫を含む群から選択される癌である、[32] ~ [36] のいずれか一項に記載の方法。

[38]

医薬品における [1] ~ [25] のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用。

10

20

30

40

50

[3 9]

T細胞により発現される免疫関連遺伝子又は免疫調節遺伝子のプレmRNAのエクソンスキッピングを誘発する方法であって、[1] ~ [25] のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド又は[26] ~ [31] のいずれか一項に記載の組成物を細胞に送達することを含む方法。

[4 0]

前記細胞はヒト細胞である、[39] に記載の方法。

[4 1]

T細胞の機能を調節する方法であって、[1] ~ [25] のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドを前記T細胞に投与することを含む方法。

10

[4 2]

前記方法は、T細胞レセプター遺伝子をコードする核酸分子を前記T細胞に投与することにより前記T細胞の特異性を調節することをさらに含む、[41] に記載の方法。

[4 3]

T細胞レセプター遺伝子をコードする前記核酸分子を、ソノフォレーシス、電気パルス、エレクトロポレーション、浸透圧ショック、リン酸カルシウム沈殿、及びDEAEデキストラントランスフェクション、脂質媒介送達、及び受動送達を含む群から選択されるいずれか1つにより、前記T細胞にトランスフェクトさせるか、又は導入する、[42] に記載の方法。

[4 4]

[1] ~ [25] のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドで形質転換されたか又はトランスフェクトされたT細胞。

20

[4 5]

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、エレクトロポレーションにより前記T細胞にトランスフェクトされているか、又は導入されている、[44] に記載のT細胞。

[4 6]

T細胞レセプター遺伝子をコードする核酸分子をさらに含む[44] 又は[45] に記載のT細胞。

[4 7]

前記核酸分子はmRNAである、[46] に記載のT細胞。

30

[4 8]

任意選択で容器中の、[1] ~ [25] のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドと、パッケージ挿入物、パッケージラベル、説明書、又は他のラベリングとを含むキット。

上記の説明では本発明の好ましい実施形態が説明されているが、本発明から逸脱することなく、設計又は構成の詳細における多くの変形又は改変を行ない得ることを当業者は理解するだろう。

【 0 1 2 1 】

参考文献

40

[1] Jennifer Couzin-Frankel, "Cancer Immunotherapy," *Science* (80-.), vol. 342, no. December, p. 1432, 2013.

[2] K. C. M. Straathof, C. M. Bollard, U. Popat, M. H. Huls, T. Lopez, M. C. Morriss, M. V Gresik, A. P. Gee, H. V Russell, M. K. Brenner, C. M. Rooney, and H. E. Heslop, "Treatment of nasopharyngeal carcinoma with Epstein-Barr virus - specific T lymphocytes," *Therapy*, vol. 105, no. 5, pp. 1898–1904, 2005.

[3] M. H. Geukes Foppen, M. Donia, I. M. Svane, and J. B. a G. Haanen, "Tumor-infiltrating lymphocytes for the treatment of metastatic cancer," *Mol. Oncol.*, vol. 9, no. 10, pp. 1918–1935, 2015.

10

[4] W. Qasim and A. J. Thrasher, "Progress and prospects for engineered T cell therapies," *Br. J. Haematol.*, vol. 166, no. 6, pp. 818–829, 2014.

[5] B. Savoldo, C. A. Ramos, E. Liu, M. P. Mims, M. J. Keating, G. Carrum, R. T. Kamble, C. M. Bollard, A. P. Gee, Z. Mei, H. Liu, B. Grilley, C. M. Rooney, H. E. Heslop, M. K. Brenner, and G. Dotti, "CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients," *J. Clin. Invest.*, vol. 121, no. 5, pp. 1822–1826, 2011.

20

[6] L. a Johnson, R. a Morgan, M. E. Dudley, L. Cassard, J. C. Yang, M. S. U. S. Kammula, R. E. Royal, R. M. Sherry, J. R. Wunderlich, and C. R. Lee, "regression and targets normal tissues expressing cognate antigen Gene therapy with human and mouse T cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen," *Hematology*, vol. 114, no. 3, pp. 535–547, 2009.

[7] A. J. Gehring, S. A. Xue, Z. Z. Ho, D. Teoh, C. Ruedl, A. Chia, S. Koh, S. G. Lim, M. K. Maini, H. Stauss, and A. Bertoletti, "Engineering virus-specific T cells that target HBV infected hepatocytes and hepatocellular carcinoma cell lines," *J. Hepatol.*, vol. 55, no. 1, pp. 103–110, 2011.

30

[8] W. Qasim, M. Brunetto, A. J. Gehring, S.-A. Xue, A. Schurich, A. Khakpoor, H. Zhan, P. Ciccorossi, K. Gilmour, D. Cavallone, F. Moriconi, F. Farzhenah, A. Mazzoni, L. Chan, E. Morris, A. Thrasher, M. K. Maini, F. Bonino, H. Stauss, and A. Bertoletti, "Immunotherapy of HCC metastases with autologous T cell receptor redirected T cells, targeting HBsAg in a liver transplant patient.," *J. Hepatol.*, vol. 62, no. 2, pp. 486–491, 2015.

[9] S. Koh, N. Shimasaki, R. Suwanarusk, Z. Z. Ho, A. Chia, N. Banu, S. W. Howland, A. S. M. Ong, A. J. Gehring, H. Stauss, L. Renia, M. Sällberg, D. Campana, and A. Bertoletti, "A

40

practical approach to immunotherapy of hepatocellular carcinoma using T cells redirected against hepatitis B virus,” *Mol. Ther. Nucleic Acids*, vol. 2, no. August, p. e114, 2013.

[10] E. J. Wherry, S. J. Ha, S. M. Kaech, W. N. Haining, S. Sarkar, V. Kalia, S. Subramaniam, J. N. Blattman, D. L. Barber, and R. Ahmed, “Molecular Signature of CD8+ T Cell Exhaustion during Chronic Viral Infection,” *Immunity*, vol. 27, no. 4, pp. 670–684, 2007.

[11] P. a. Morcos, “Achieving targeted and quantifiable alteration of mRNA splicing with Morpholino oligos,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 358, no. 2, pp. 521–527, 2007.

[12] G. Schmajuk, H. Sierakowska, and R. Kole, “Antisense Oligonucleotides with Different Backbones,” *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 31, pp. 21783–21789, 1999.

[13] E. M. McNally and E. J. Wyatt, “Welcome to the splice age: Antisense oligonucleotide-mediated exon skipping gains wider applicability,” *J. Clin. Invest.*, vol. 126, no. 4, pp. 1236–1238, 2016.

[14] V. Straub, O. Veldhuizen, M. Bertoli, M. Eagle, J. Walton, G. Campion, I. Ferreira, T. Braakman, A. Labourkas, S. Giannakopoulos, T. Voit, P. Carlier, A. Moraux, L. Servais, I. De Myologie, E. Niks, J. Verschuuren, P. Spitali, and L. U. M. Cen-, “A Phase I/IIa Clinical Trial in Duchenne Muscular Dystrophy Using Systemically Delivered Morpholino Antisense Oligomer to Skip Exon 53 (SKIP-NMD),” *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.*, vol. 26, pp. 92–95, 2015.

[15] J. T. Van Den Akker, D. Ph, B. E. Burm, D. Ph, P. F. Ekhardt, M. Sc, N. Heuvelmans, T. Holling, D. Ph, A. a Janson, G. J. Platenburg, M. Sc, J. a Sipkens, M. Sc, J. M. A. Sitsen, D. Ph, A. Aartsma-rus, D. Ph, G. B. Van Ommen, D. Ph, S. J. De Kimpe, D. Ph, J. C. Van Deutekom, and D. Ph, “Systemic Administration of PRO051 in Duchenne’s Muscular Dystrophy,” pp. 1513–1522, 2011.

[16] N. J. Gogtay and K. Sridharan, “Therapeutic Nucleic Acids: Current clinical status,” *Br. J. Clin. Pharmacol.*, pp. 1–14, 2016.

[17] J. Jo, U. Aichele, N. Kersting, R. Klein, P. Aichele, E. Bisse, A. K. Sewell, H. E. Blum, R. Bartenschlager, V. Lohmann, and R. Thimme, “Analysis of CD8+ T-Cell-Mediated Inhibition of Hepatitis C Virus Replication Using a Novel Immunological Model,” *Gastroenterology*, vol. 136, no. 4, pp. 1391–1401, 2009.

[18] A. J. Davenport, M. R. Jenkins, R. S. Cross, C. S. Yong, H. M. Prince, D. S. Ritchie, J. a Trapani, M. H. Kershaw, P. K. Darcy, and P. J. Neeson, “CAR-T Cells Inflict Sequential Killing of Multiple Tumor Target Cells,” *Cancer Immunol. Res.*, vol. 3, no. 5, pp. 483–94, 2015.

10

20

30

40

50

【図面】

【図 1】

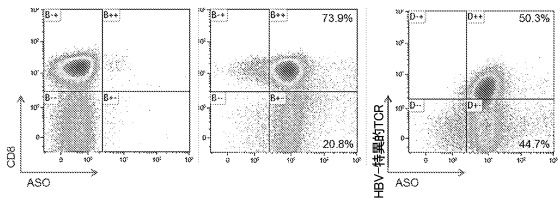


Figure 1

【図 2】

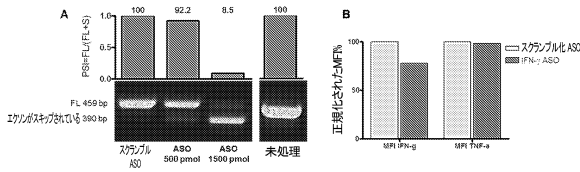


Figure 2

【図 3】

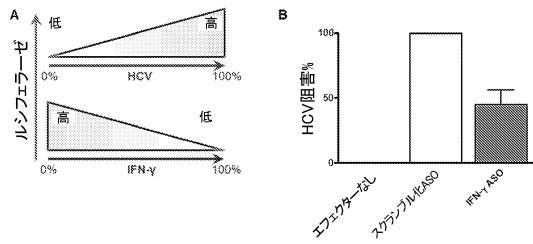


Figure 3

【図 4】

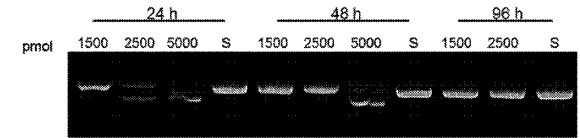


Figure 4

10

20

30

40

50

【 図 5 】

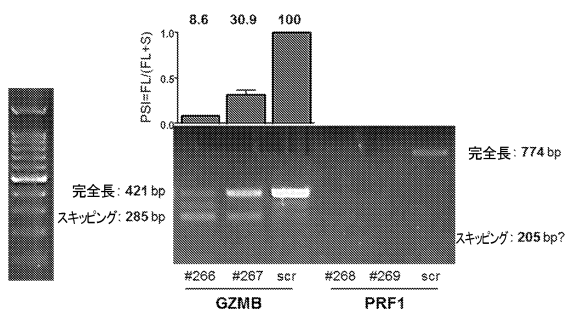


Figure 5

【 図 6 】

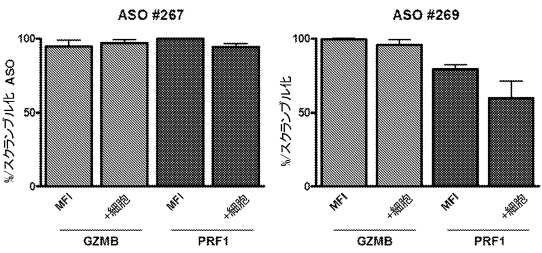


Figure 6

【 図 7 】

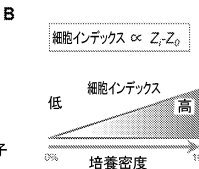
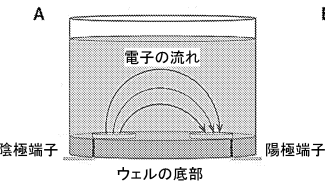


Figure 7

【 図 8 】

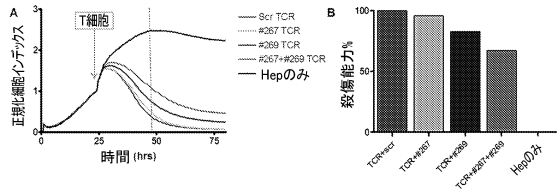


Figure 8

10

20

30

40

50

【図 9】

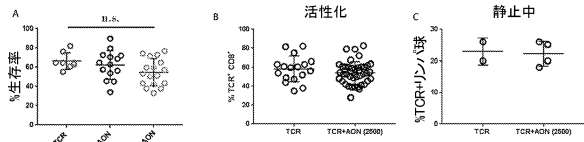


Figure 9

【図 10】

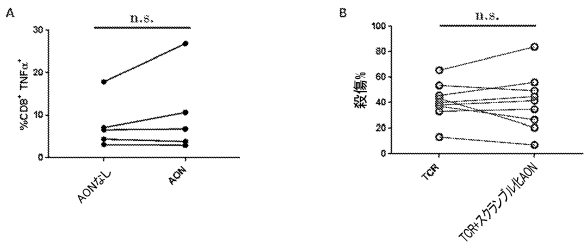


Figure 10

【図 11 a】

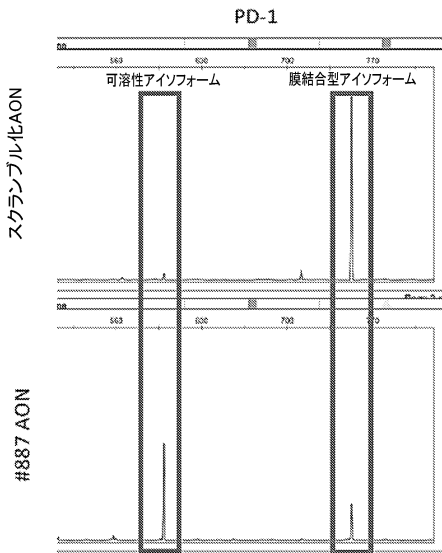


Figure 11(a)

【図 11 b】

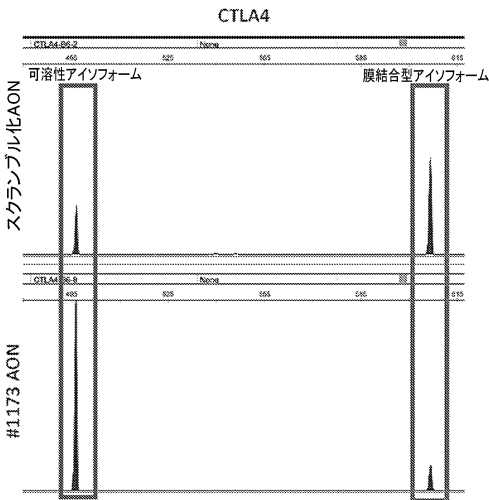


Figure 11(b)

10

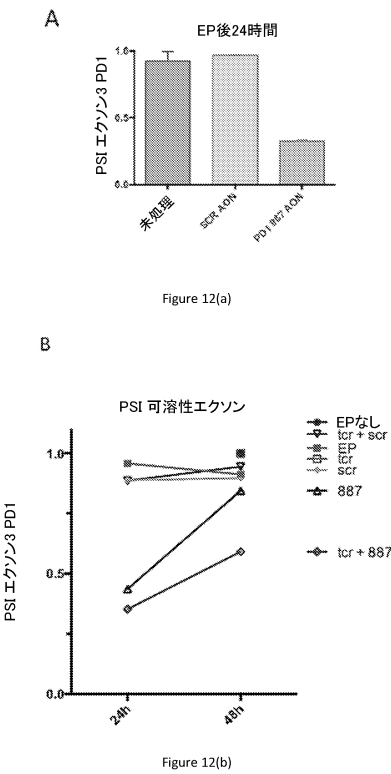
20

30

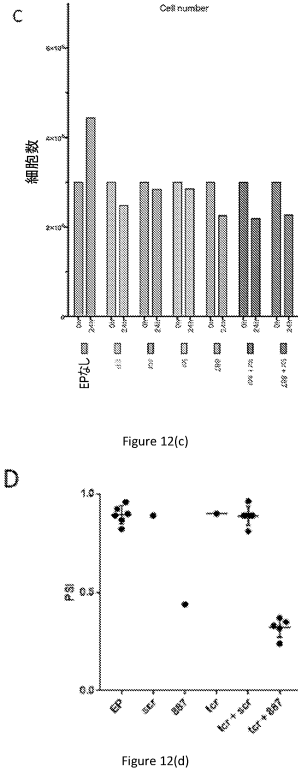
40

50

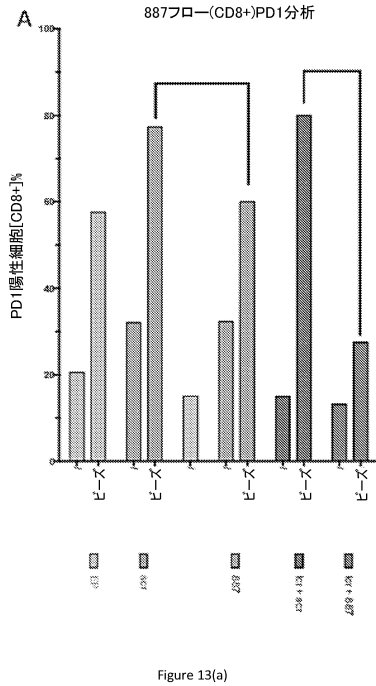
【図 1 2 a - b】



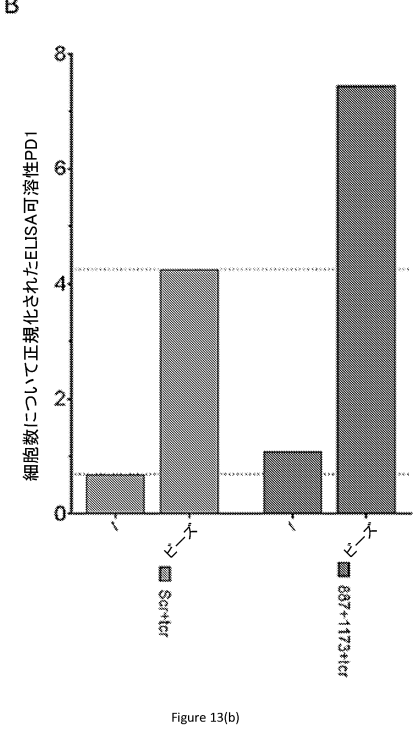
【図 1 2 c - d】



【図 1 3 a】



【図 1 3 b】



10

20

30

40

50

【図 13 c】

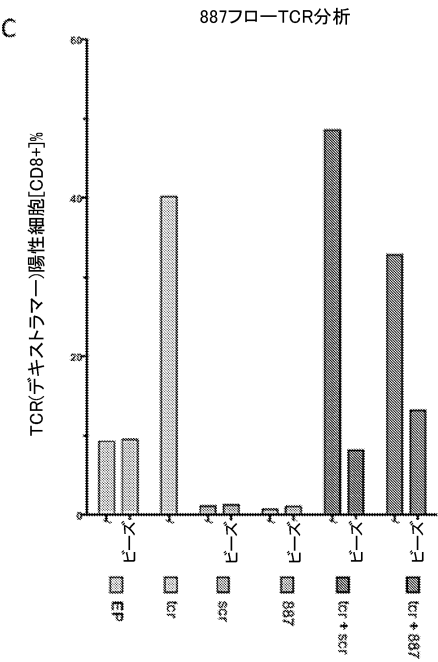


Figure 13(c)

【図 14 a】

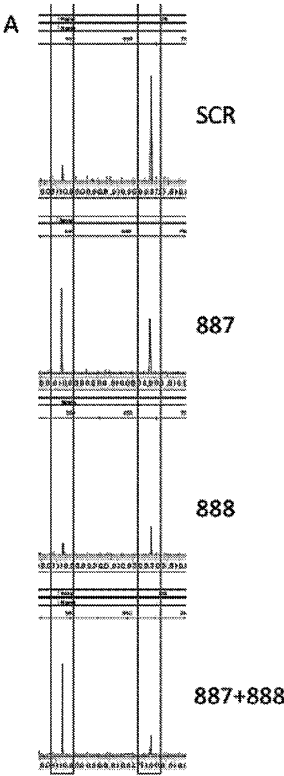


Figure 14(a)

【図 14 b - c】

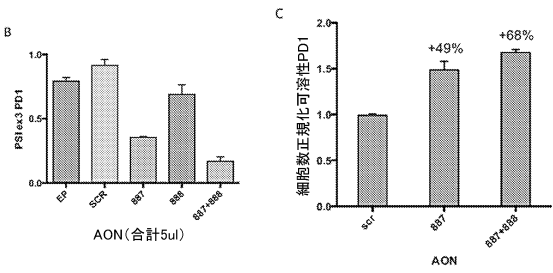


Figure 14(b) and 14(c)

【図 15】

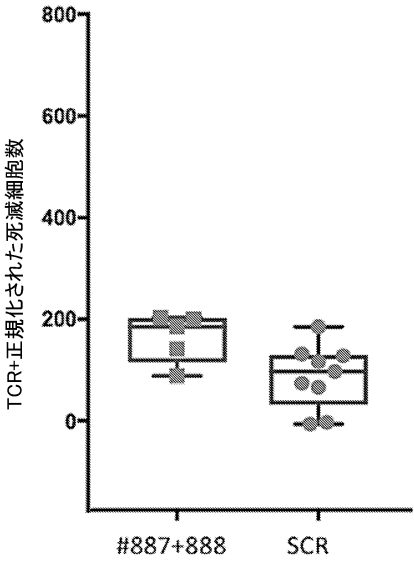


Figure 15

10

20

30

40

50

【図 16】

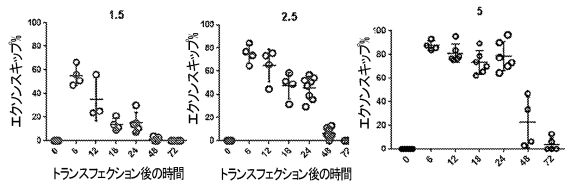


Figure 16

【図 17】

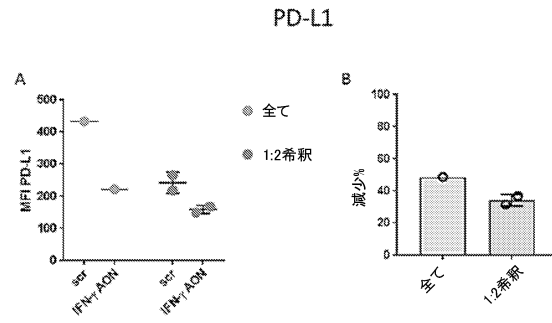


Figure 17(a)

ウイルス阻害

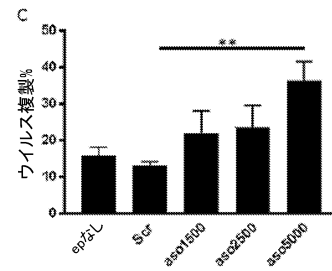


Figure 17(b)

【図 18】

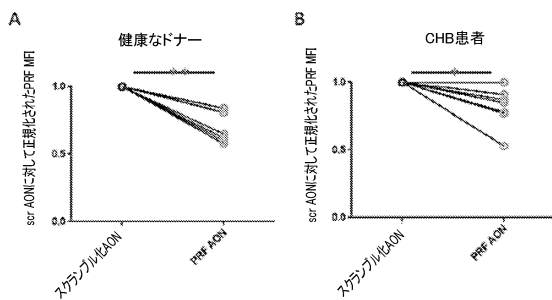


Figure 18(a) and 18(b)

【図 19】

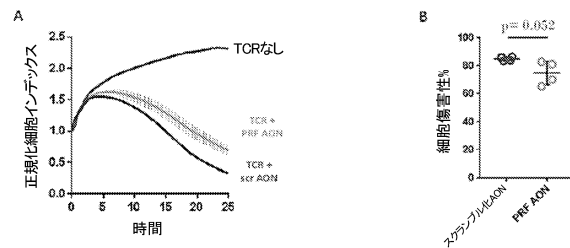


Figure 19(a) and 19(b)

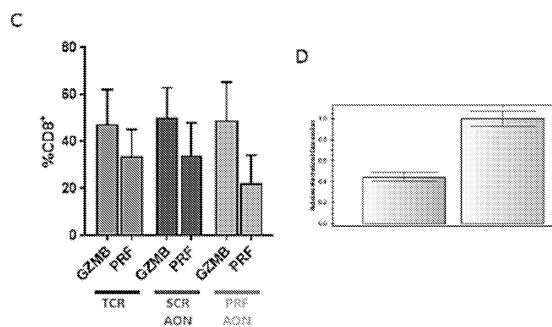


Figure 18(c) and 18(d)

10

20

30

40

50

【図 2 0】

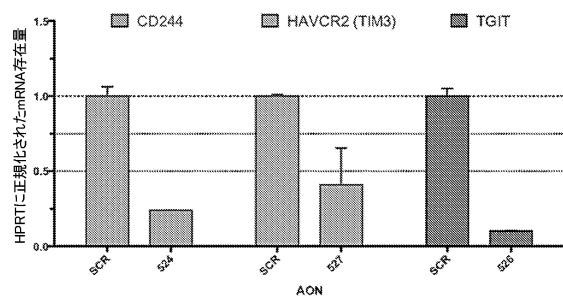


Figure 20

【図 2 1】

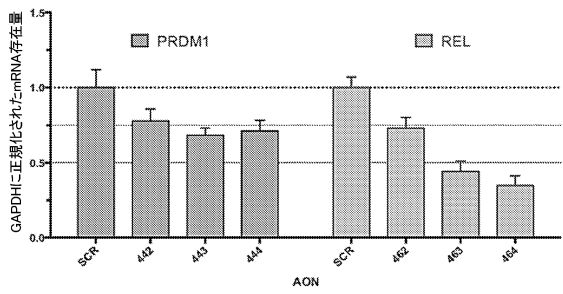


Figure 21

10

【図 2 2 a】

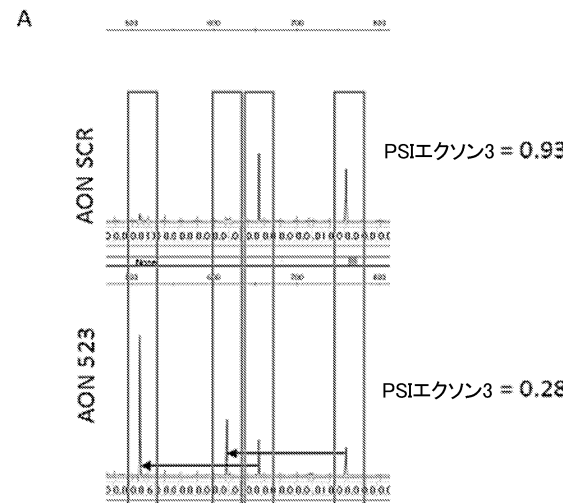


Figure 22(a)

【図 2 2 b】

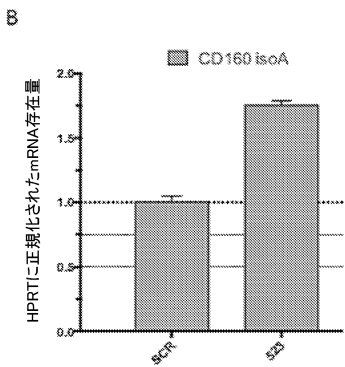


Figure 22(b)

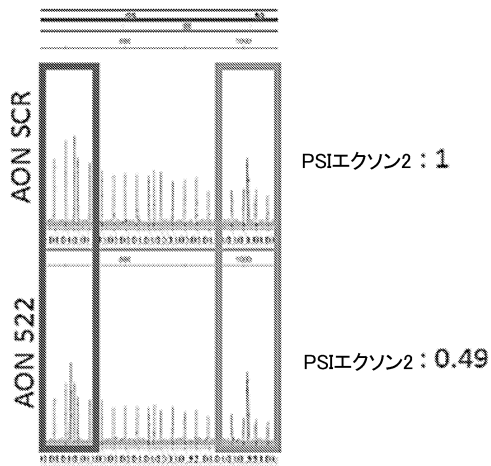
20

30

40

50

【 図 2 3 a 】



フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088	
A 6 1 K	31/7105(2006.01)	A 6 1 K	31/7105	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	

(74)代理人 100111235

弁理士 原 裕子

(74)代理人 100195257

弁理士 大淵 一志

(74)代理人 100201189

弁理士 安原 二良

(72)発明者 グッチオーネ、 エルネスト

シンガポール国 1 3 8 6 7 3 シンガポール バイオポリス ドライブ 6 1 プロテオス インステ
ィチュート オブ モレキュラー アンド セル バイオロジー 気付

(72)発明者 ウィー、 ケン ブーン デイブ

シンガポール国 1 3 8 6 3 2 シンガポール フュージョノポリス ウェイ 1 コネクシス ノース
ナンバー 1 6 - 1 6 インスティチュート オブ ハイ パフォーマンス コンピューティング 気付

(72)発明者 ベルトレッティ、 アントニオ

シンガポール国 1 3 8 6 7 3 シンガポール バイオポリス ドライブ 6 1 プロテオス レベル 6
ライオン ティーシーアール 気付

審査官 山内 達人

(56)参考文献 特表 2 0 1 7 - 5 1 3 4 8 5 (J P , A)

国際公開第 2 0 1 7 / 0 9 3 9 6 9 (W O , A 1)

特表 2 0 1 0 - 5 0 5 7 4 1 (J P , A)

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N

C 0 7 K

A 6 1 P

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

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