

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2023-504661
(P2023-504661A)

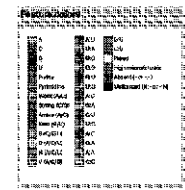
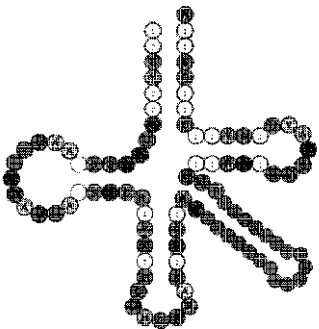
(43)公表日 令和5年2月6日(2023.2.6)

(51)国際特許分類		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 Z N A	4 C 0 7 6
C 1 2 N	15/86 (2006.01)	C 1 2 N	15/86	Z	4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/861 (2006.01)	C 1 2 N	15/861	Z	4 C 0 8 6
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z	4 C 0 8 7
C 1 2 N	15/867 (2006.01)	C 1 2 N	15/867	Z	
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全166頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2022-533139(P2022-533139)	(71)出願人	522218404	シェイプ・セラピューティクス・インコーポレイテッド Shape Therapeutics Inc. アメリカ合衆国98019ワシントン州シアトル、テリー・アベニュー・ノース219、スウィート100 100145403 弁理士 山尾 憲人 100122301 弁理士 富田 憲史 100157956 弁理士 稲井 史生 100170520	
(86)(22)出願日	令和2年12月1日(2020.12.1)				
(85)翻訳文提出日	令和4年7月29日(2022.7.29)				
(86)国際出願番号	PCT/US2020/062671				
(87)国際公開番号	WO2021/113218				
(87)国際公開日	令和3年6月10日(2021.6.10)				
(31)優先権主張番号	62/942,690				
(32)優先日	令和1年12月2日(2019.12.2)				
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				
(31)優先権主張番号	62/942,667				
(32)優先日	令和1年12月2日(2019.12.2)				
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				
(31)優先権主張番号	63/010,856				
		最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 疾患の処置のための標的化トランスファーRNA

(57)【要約】

疾患を引き起こす未成熟停止コドンを認識するおよびリードスルーする、操作されたtRNA分子および操作されたサプレッサーtRNA分子をコードするベクターが提供される。操作されたtRNAまたは操作されたtRNAをコードするベクターの医薬製剤は、タンパク質をコードする核酸配列中に存在する未成熟停止コドンによって引き起こされるタンパク質のトランケーションに関連する疾患の処置における使用のために提供される。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 3～22 または 103～122 のいずれか 1 つの核酸配列と比べて、T ループ、T システム、D ループ、D システム、可変ループ、アンチコドンシステム、またはアンチコドンループに突然変異を含む操作された tRNA 変異体を含む組成物であって、

a) 操作された tRNA またはその変異体をコードする第 1 のベクターおよび第 1 の緑色蛍光タンパク質をコードするスクリーニング mRNA をコードする第 2 のベクターを第 1 のヒト細胞にトランスフェクトすることであって、第 1 の緑色蛍光タンパク質をコードするスクリーニング mRNA が未成熟停止コドンを含む、トランスフェクトすること；

b) 第 2 の緑色蛍光タンパク質をコードする同等のスクリーニング mRNA をコードする第 3 のベクターを第 2 のヒト細胞にトランスフェクトすることであって、同等のスクリーニング mRNA が未成熟停止コドンを含まない、トランスフェクトすること；ならびに

c) 第 1 のヒト細胞および第 2 のヒト細胞から放射された蛍光の量を比較することによって決定した場合、操作された tRNA 変異体が、対象に投与されると、未成熟停止コドンが欠如する同等の mRNA を使用して産生した同等のポリペプチドと比べて、実質的に全長のポリペプチドをコードする標的 mRNA 中の未成熟停止コドンの抑制によって、実質的に全長のポリペプチドの少なくとも 10% の産生を回復させることができる、組成物。

10

【請求項 2】

操作された tRNA 変異体が、配列番号 23～48 または 123～148 のいずれか 1 つと少なくとも 70% の配列同一性を有する、請求項 1 に記載の組成物。

20

【請求項 3】

操作された tRNA 変異体が、配列番号 6 または 106 と少なくとも 70% 同一である配列を含み、配列番号 6 または 106 の 2、4、6、12、23、27、28、31、39、40、42、43、44、46、49、50、64、65、67、69 または 71 位に置換を有する、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

2 位での置換が C への置換であり、4 位での置換が C への置換であり、6 位での置換が T への置換であり、6 位での置換が A への置換であり、12 位での置換が C への置換であり、23 位での置換が G への置換であり、27 位での置換が C への置換であり、28 位での置換が C への置換であり、31 位での置換が C への置換であり、39 位での置換が G への置換であり、40 位での置換が C への置換であり、42 位での置換が G への置換であり、43 位での置換が G への置換であり、44 位での置換が G への置換であり、46 位での置換が A への置換であり、49 位での置換が G への置換であり、50 位での置換が T への置換であり、64 位での置換が A への置換であり、65 位での置換が C への置換であり、67 位での置換が A への置換であり、67 位での置換が T への置換であり、69 位での置換が G への置換であり、71 位での置換が C への置換であり、または 71 位での置換が G への置換である、請求項 3 に記載の組成物。

30

【請求項 5】

操作された tRNA 変異体の配列が、置換を除いて、配列番号 6 または 106 と同一である、請求項 3 または 4 に記載の組成物。

40

【請求項 6】

操作された tRNA 変異体が、プロキシ測定、半減期測定、アミノ酸変換効率測定、またはシンテターゼもしくはリボソーム機構への結合の測定によって決定した場合、配列番号 6 または 106 に提供される配列を含む同等の tRNA と比較して、インビボ (in vivo) で安定性の増加を示す、請求項 3～5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 7】

操作された tRNA 変異体が、配列番号 45 または 145 の配列を含む、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 8】

50

操作された tRNA 変異体が、配列番号 3 または 103 のいずれか 1 つと少なくとも 70 % 同一である配列を含み、配列番号 3 または 103 の 2、6、13、15、22、28、31、37、39、42、44、50、64、67、71 または 72 位に置換を有する、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 9】

2 位での置換が G への置換であり、6 位での置換が G への置換であり、13 位での置換が C への置換であり、15 位での置換が G への置換であり、22 位での置換が G への置換であり、28 位での置換が C への置換であり、31 位での置換が A への置換であり、37 位での置換が G への置換であり、39 位での置換が T への置換であり、42 位での置換が G への置換であり、44 位での置換が A への置換であり、50 位での置換が C への置換であり、64 位での置換が G への置換であり、67 位での置換が C への置換であり、71 位での置換が C への置換であり、または 72 位での置換が C への置換である、請求項 8 に記載の組成物。

10

【請求項 10】

操作された tRNA 変異体の配列が、置換を除いて、配列番号 3 または 103 と同一である、請求項 8 または 9 に記載の組成物。

【請求項 11】

操作された tRNA 変異体が、プロキシ測定、半減期測定、アミノ酸変換効率測定、またはシンテターゼもしくはリボソーム機構への結合の測定によって決定した場合、配列番号 3 または 103 に提供される配列を含む同等の tRNA と比較して、インビボで安定性の増加を示す、請求項 8 ～ 10 のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 12】

操作された tRNA 変異体が、配列番号 32 または 132 の配列を含む、請求項 1、2 または 8 ～ 11 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 13】

操作された tRNA 変異体が、配列番号 5 または 105 と少なくとも 70 % 同一である配列を含み、配列番号 5 または 105 の 73 位に置換を有する、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 14】

73 位での置換が G への置換である、請求項 13 に記載の組成物。

30

【請求項 15】

操作された tRNA 変異体の配列が、置換を除いて、配列番号 5 または 105 と同一である、請求項 13 または 14 に記載の組成物。

【請求項 16】

操作された tRNA 変異体が、プロキシ測定、半減期測定、アミノ酸変換効率測定、またはシンテターゼもしくはリボソーム機構への結合の測定によって決定した場合、配列番号 5 または 105 に提供される配列を含む同等の tRNA と比較して、インビボで安定性の増加を示す、請求項 13 ～ 15 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 17】

操作された tRNA 変異体が、リシン、アルギニン、ヒスチジン、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、プロリン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ピロリシン (pyrolysine) もしくはセレノシステインを含むアミノ酸でアシル化されているか、または非標準アミノ酸でアシル化されている、請求項 1 ～ 16 のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項 18】

未成熟停止コドンが、オパール停止コドン、オーカー停止コドンまたはアンバー停止コドンである、請求項 1 ～ 17 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 19】

ポリペプチドが、MeCP2 ポリペプチド、FoxG1 ポリペプチド、CDKL5 ポリ

50

ペプチド、MYH9ポリペプチド、COL11A2ポリペプチドまたはMYO7Aポリペプチドを含む、請求項1～18のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項20】

操作されたtRNA変異体が、実質的に全長のポリペプチドの少なくとも20%の産生を回復させることができる、請求項1～19のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項21】

操作されたtRNA変異体が、実質的に全長のポリペプチドの少なくとも40%の産生を回復させることができる、請求項1～19のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項22】

操作されたtRNA変異体が、実質的に全長のポリペプチドの少なくとも60%の産生を回復させることができる、請求項1～19のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項23】

操作されたtRNA変異体が、実質的に全長のポリペプチドの少なくとも80%の産生を回復させることができる、請求項1～19のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項24】

組成物が、操作されたtRNA変異体をコードするポリヌクレオチドを含む、請求項1～23のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項25】

ポリヌクレオチドがウイルスベクター中にある、請求項24に記載の組成物。

【請求項26】

ウイルスベクターが、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターまたはレンチウイルスベクターである、請求項25に記載の組成物、

【請求項27】

AAVベクターが、AAV2/5ベクター、AAV2/6ベクター、AAV2/7ベクター、AAV2/8ベクターまたはAAV2/9ベクターを含む、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

AAVが、AAV5由来のキャプシドを含む、請求項26～27のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項29】

ポリヌクレオチドが、AAV2由来の逆位末端反復(ITR)配列を含む、請求項26～28のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項30】

ポリヌクレオチドが、突然変異した末端分離部位を有し、末端ヌクレオチドが欠如している、逆位末端反復を含む、請求項26～29のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項31】

末端ヌクレオチドが、A領域の少なくとも一部、D領域の少なくとも一部、またはその両方を含む、請求項30に記載の組成物。

【請求項32】

ポリヌクレオチドが自己相補的である、請求項27～31のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項33】

ポリヌクレオチドが、同じ操作されたtRNA変異体の2つ以上、3つ以上、4つ以上、5つ以上または6つ以上のコピーをコードする、請求項25～32のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項34】

ポリヌクレオチドが、異なる操作されたtRNA変異体の2つ以上、3つ以上、4つ以上、5つ以上または6つ以上のコピーをコードする、請求項25～33のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項35】

10

20

30

40

50

ポリヌクレオチドが、少なくとも約 50 ヌクレオチド、少なくとも約 100 ヌクレオチド、少なくとも約 150 ヌクレオチドまたは少なくとも約 200 ヌクレオチドを含むスタッファー配列を含む、請求項 25～34 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 36】

スタッファー配列が、ポリヌクレオチド内の操作された tRNA 変異体の 1 つまたは複数のコピーの 3' または 5' にある、請求項 35 に記載の組成物。

【請求項 37】

スタッファー配列が、ポリヌクレオチド内の操作された tRNA 変異体の 2 つ以上のコピーを分離する、請求項 35 または 36 に記載の組成物。

【請求項 38】

操作された tRNA 変異体、または操作された tRNA をコードするポリヌクレオチドが、デリバリーシステム中に存在する、請求項 24～37 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 39】

デリバリーシステムが、リボソーム、荷電ポリマー、非荷電ポリマー、ナノ粒子、界面活性剤、浸透増強剤、遺伝子導入剤、リン脂質、ミセル、合成ベクター、高分子、デンドリマー、生体高分子、ウイルス粒子、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項 38 に記載の組成物。

【請求項 40】

請求項 1～39 のいずれか一項に記載の組成物、および薬学的に許容される賦形剤、担体または希釈剤を含む医薬組成物。

【請求項 41】

用量単位形態の請求項 40 に記載の医薬組成物。

【請求項 42】

請求項 1～39 のいずれか一項に記載の組成物、または請求項 40 もしくは 41 に記載の医薬組成物、および包装または容器を含む、キット。

【請求項 43】

請求項 42 に記載のキットを作製する方法であって、組成物または医薬組成物を包装または容器と接触させることを含む、方法。

【請求項 44】

疾患または障害の処置または予防の方法であって、請求項 1～40 のいずれか一項に記載の組成物をそれを必要とする対象に投与することを含む、方法。

【請求項 45】

それを必要とする対象における疾患または状態を処置または予防する方法であって、操作された tRNA もしくはその変異体、または操作された tRNA もしくはその変異体をコードするポリヌクレオチドを対象に投与すること；および未成熟停止コドンが欠如する mRNA を使用して産生した同等のポリペプチドと比べて、少なくとも約 10% の効率でインビボで実質的に全長のポリペプチドを産生させることを含み、操作された tRNA またはその変異体が、実質的に全長のポリペプチドをコードする標的 mRNA において未成熟停止コドンをリードスルーすることができる、方法。

【請求項 46】

それを必要とする対象における疾患または状態を処置または予防する方法であって、操作された tRNA もしくはその変異体、または操作された tRNA もしくはその変異体をコードするポリヌクレオチドを対象に投与し、それによって対象における疾患または状態を少なくとも部分的に処置することを含み、操作された tRNA またはその変異体が、ポリペプチドをコードする標的 mRNA 中の未成熟停止コドンを認識し、操作された tRNA またはその変異体が、標的 mRNA の翻訳の間に、未成熟停止コドンのセンスコドンへの解釈を少なくとも部分的に形質転換し、

10

20

30

40

50

- a) 操作された tRNA またはその変異体をコードする第 1 のベクターおよび第 1 のマーカーをコードするスクリーニング mRNA をコードする第 2 のベクターを第 1 のヒト細胞にトランスフェクトすることであって、第 1 のマーカーをコードするスクリーニング mRNA が未成熟停止コドンを含む、トランスフェクトすること；
- b) 第 2 のマーカーをコードする同等のスクリーニング mRNA をコードする第 3 のベクターを第 2 のヒト細胞にトランスフェクトすることであって、同等のスクリーニング mRNA が未成熟停止コドンを含まない、トランスフェクトすること；ならびに
- c) 第 1 のヒト細胞および第 2 のヒト細胞から放射された測定可能なシグナルの量を比較すること

によって決定した場合、未成熟停止コドンが欠如する同等の mRNA を使用して産生した同等のポリペプチドと比べて、少なくとも約 10 % の効率でインビボで実質的に全長のポリペプチドを産生する、方法。

【請求項 47】

操作された tRNA またはその変異体が、配列番号 003 ~ 48 または 103 ~ 148 のいずれか 1 つと少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 % または少なくとも 95 % の配列同一性を有する、請求項 45 または 46 に記載の組成物。

【請求項 48】

操作された tRNA またはその変異体が、配列番号 3 ~ 48 または 103 ~ 148 のいずれか 1 つを含む、請求項 45 ~ 47 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 49】

操作された tRNA またはその変異体が、配列番号 3、6、7、32、45、103、106、107、132 または 145 のいずれか 1 つを含む、請求項 45 または 46 に記載の方法。

【請求項 50】

操作された tRNA またはその変異体を対象に投与することが、操作された tRNA またはその変異体をコードするポリヌクレオチドを含むウイルスを投与することを含む、請求項 45 ~ 49 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 51】

ウイルスが、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス (AAV) またはレンチウイルスを含む、請求項 50 に記載の方法。

【請求項 52】

ウイルスが、AAV2 / 5、AAV2 / 6、AAV2 / 7、AAV2 / 8 または AAV2 / 9 を含む、請求項 50 または 51 に記載の方法。

【請求項 53】

ウイルスが AAV5 キャプシドを含む、請求項 50 ~ 52 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 54】

操作された tRNA またはその変異体をコードするポリヌクレオチドが、AAV2 逆位末端反復 (ITR) 配列を含む、請求項 50 ~ 53 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 55】

操作された tRNA またはその変異体をコードするポリヌクレオチドが、突然変異した末端分離部位を有し、末端ヌクレオチドが欠如している、逆位末端反復を含む、請求項 50 ~ 54 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 56】

末端ヌクレオチドが、A 領域の少なくとも一部、D 領域の少なくとも一部、またはその両方を含む、請求項 55 に記載の方法。

【請求項 57】

操作された tRNA またはその変異体をコードするポリヌクレオチドが自己相補的である、請求項 50 ~ 56 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 58】

操作された tRNA またはその変異体をコードするポリヌクレオチドが、操作された tRNA またはその変異体の追加の 1 つ以上、2 つ以上、3 つ以上、4 つ以上、5 つ以上または 6 つ以上のコピーをコードする、請求項 50 ～ 57 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 59】

操作された tRNA またはその変異体をコードするポリヌクレオチドが、操作された tRNA またはその変異体と異なる第 2 の操作された tRNA またはその変異体の 2 つ以上、3 つ以上、4 つ以上、5 つ以上または 6 つ以上のコピーをコードする、請求項 50 ～ 58 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 60】

操作された tRNA またはその変異体をコードするポリヌクレオチドが、少なくとも約 50 ヌクレオチド、少なくとも約 100 ヌクレオチド、少なくとも約 150 ヌクレオチドまたは少なくとも約 200 ヌクレオチドを含むスタッパー配列を含む、請求項 50 ～ 59 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 61】

スタッパー配列が、ポリヌクレオチド内の操作された tRNA またはその変異体の 1 つまたは複数のコピーの 3' または 5' にある、請求項 60 に記載の方法。

【請求項 62】

スタッパー配列が、ポリヌクレオチド内の操作された tRNA またはその変異体の 2 つ以上のコピーを分離する、請求項 60 または 61 に記載の方法。

【請求項 63】

操作された tRNA もしくはその変異体、または操作された tRNA もしくはその変異体をコードするポリヌクレオチドが、デリバリーシステム中にある、請求項 45 ～ 62 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 64】

デリバリーシステムが、リボソーム、荷電ポリマー、非荷電ポリマー、ナノ粒子、界面活性剤、浸透増強剤、遺伝子導入剤、リン脂質、ミセル、合成ベクター、高分子、デンドリマー、生体高分子、ウイルス粒子、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項 63 に記載の方法。

【請求項 65】

操作された tRNA もしくはその変異体、または操作された tRNA もしくはその変異体をコードするポリヌクレオチドが、薬学的に許容される賦形剤、担体または希釈剤を含む医薬組成物中にある、請求項 50 ～ 64 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 66】

医薬組成物が用量単位形態である、請求項 65 に記載の方法。

【請求項 67】

対象が、標的 mRNA 中の未成熟停止コドンに関連する疾患または状態を有する、請求項 44 ～ 66 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 68】

ポリヌクレオチドが、未成熟停止コドンが欠如する同等の mRNA を使用して産生した同等のポリペプチドと比べて、少なくとも約 10 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 80 % または少なくとも約 90 % の効率で産生され、それによって対象における疾患または状態が少なくとも部分的に処置される、請求項 44 ～ 67 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 69】

疾患または状態が、レット症候群、嚢胞性線維症、網膜色素変性症または難聴を含む、請求項 67 または 68 に記載の方法。

【請求項 70】

難聴が、常染色体優性 17 難聴、常染色体優性 13 難聴または常染色体優性 11 難聴を

10

20

30

40

50

含む、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 71】

対象がヒトである、請求項 44～70 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 72】

対象が非ヒト動物である、請求項 44～70 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 73】

投与が、経口、直腸、非経口、静脈内、動脈内、髄腔内、眼内、耳、脳室内、大槽内、脳室内または腹腔内である、請求項 44～72 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 74】

疾患または状態がレット症候群であり、レット症候群の少なくとも 1 つの症状が軽減される、請求項 67～73 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 75】

レット症候群の少なくとも 1 つの症状が、成長遅滞、脳成長遅滞、小頭症、動作もしくは協調の減少もしくは喪失、手の制御の低減、歩行能力の減少、硬直性もしくは痙縮性の動作、話す能力の減少、視力の減少 (decreased eye)、無関心、反復的な手の動作、普通でない眼球運動、呼吸困難、易刺激性、恐怖、不安、認知障害、けいれん、異常な脳波、脊柱側弯、不整脈または異常な睡眠パターンを含む、請求項 74 に記載の方法。

【請求項 76】

$1 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{15}$ ウイルスゲノムが投与される、請求項 44～75 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 77】

対象がおよそ 10～30 歳である、請求項 44～76 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 78】

組成物が、標的 mRNA のナンセンス媒介 mRNA デコイ (NMD) を減少させるかまたは阻害する、請求項 44～77 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 79】

組成物が、ベースラインの標的 mRNA 測定値と比べて、対象における標的 mRNA の量を増加させる、請求項 44～78 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 80】

ポリヌクレオチドが MeCP2 ポリペプチドを含む、請求項 1～79 のいずれか一項に記載の組成物または方法。

30

【請求項 81】

未成熟停止コドンが、MeCP2 ポリペプチドの 168、255、270、294、198、186、453、8 (例えば、アイソフォーム 2 において)、9 (例えば、アイソフォーム 1 において)、84、85、89、91、106、111、115、133、162、167、188、190、211、250、253、268、306、309、344、354、420、458、468、471、478 または 484 位のアミノ酸において R をコードする突然変異から生じる、請求項 80 に記載の組成物または方法。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

相互参照

本出願は、全体が参照により本明細書に取り込まれる、2019 年 12 月 2 日に出願された米国仮出願第 62/942690 号、2019 年 12 月 2 日に出願された第 62/942667 号、2020 年 4 月 16 日に出願された第 63/010856 号、および 2020 年 11 月 10 日に出願された第 63/111856 号の優先権を主張する。

【0002】

配列表の参照による取り込み

本出願は、電子形式の配列表と共に提出されている。配列表は、サイズ 86,501 バ

50

イトである、2020年11月30日作成された、ファイル名54761-709_601__SL.txtとして提供される。配列表の電子形式における情報は、その全体が参照により取り込まれる。

【発明の概要】

【0003】

一部の実施形態では、配列番号3～22または103～122のいずれか1つの核酸配列と比べて、Tループ、Tステム、Dループ、Dステム、可変ループ、アンチコドンステム、またはアンチコドンループに突然変異を含む操作されたtRNA変異体を含む組成物が本明細書に開示され、対象への投与の際、操作されたtRNA変異体は、操作されたtRNAまたはその変異体をコードする第1のベクターおよび第1の緑色蛍光タンパク質をコードするスクリーニングmRNAをコードする第2のベクターを第1のヒト細胞にトランスフェクトすることであって、第1の緑色蛍光タンパク質をコードするスクリーニングmRNAは、未成熟停止コドンを含む、トランスフェクトすること；第2の緑色蛍光タンパク質をコードする同等のスクリーニングmRNAをコードする第3のベクターを第2のヒト細胞にトランスフェクトすることであって、同等のスクリーニングmRNAは、未成熟停止コドンを含まない、トランスフェクトすること；ならびに第1のヒト細胞および第2のヒト細胞から放出された蛍光の量を比較することによって適宜決定した場合、未成熟停止コドンが欠如する同等のmRNAを使用して産生される同等のポリペプチドと比べて、実質的に全長のポリペプチドをコードする標的mRNAにおける未成熟停止コドンの抑制によって、実質的に全長のポリペプチドの少なくとも10%の産生を回復させることができる。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、配列番号23～48または123～148のいずれか1つと少なくとも70%の配列同一性を含むことができる。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、配列番号6または106と少なくとも70%同一である配列を含むことができ、配列番号6または106の2、4、6、12、23、27、28、31、39、40、42、43、44、46、49、50、64、65、67、69、または71位に置換を有し得る。一部の実施形態では、2位での置換は、Cへの置換であり得るか、4位での置換は、Cへの置換であり得るか、6位での置換は、Tへの置換であり得るか、6位での置換は、Aへの置換であり得るか、12位での置換は、Cへの置換であり得るか、23位での置換は、Gへの置換であり得るか、27位での置換は、Cへの置換であり得るか、28位での置換は、Cへの置換であり得るか、31位での置換は、Cへの置換であり得るか、39位での置換は、Gへの置換であり得るか、40位での置換は、Cへの置換であり得るか、42位での置換は、Gへの置換であり得るか、43位での置換は、Gへの置換であり得るか、44位での置換は、Gへの置換であり得るか、46位での置換は、Aへの置換であり得るか、49位での置換は、Gへの置換であり得るか、50位での置換は、Tへの置換であり得るか、64位での置換は、Aへの置換であり得るか、65位での置換は、Cへの置換であり得るか、67位での置換は、Aへの置換であり得るか、67位での置換は、Tへの置換であり得るか、69位での置換は、Gへの置換であり得るか、71位での置換は、Cへの置換であり得るか、または71位での置換は、Gへの置換であり得る。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体の配列は、置換を除いて、配列番号6または106と同一であり得る。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、プロキシ測定、半減期測定、アミノ酸変換効率測定、またはシンターゼもしくはリボソーム機構への結合の測定によって決定した場合、配列番号6または106に提供される配列を含む同等のtRNAと比較して、インビボ(in vivo)で安定性の増加を示し得る。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、配列番号45または145の配列を含むことができる。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、配列番号3または103のいずれか1つと少なくとも70%同一である配列を含むことができ、配列番号3または103の2、6、13、15、22、28、31、37、39、42、44、50、64、67、71、または72位に置換を含むことができる。一部の実施形態では、2位での置換は、Gへの置換であり得るか、6位での置換は、Gへの置換であり得るか、13位での置換は、Cへの置換であり得るか、15位で

10

20

30

40

50

の置換は、Gへの置換であり得るか、22位での置換は、Gへの置換であり得るか、28位での置換は、Cへの置換であり得るか、31位での置換は、Aへの置換であり得るか、37位での置換は、Gへの置換であり得るか、39位での置換は、Tへの置換であり得るか、42位での置換は、Gへの置換であり得るか、44位での置換は、Aへの置換であり得るか、50位での置換は、Cへの置換であり得るか、64位での置換は、Gへの置換であり得るか、67位での置換は、Cへの置換であり得るか、71位での置換は、Cへの置換であり得るか、または72位での置換は、Cへの置換であり得る。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体の配列は、置換を除いて、配列番号3または103と同一であり得る。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、プロキシ測定、半減期測定、アミノ酸荷電効率測定、またはシンテターゼもしくはリボソーム機構への結合の測定によって決定される、配列番号3または103において提供される配列を含む比較可能なtRNAと比較して、インビボで増加した安定性を示し得る。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、配列番号32または132の配列を含むことができる。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、配列番号5または105と少なくとも70%同一である配列を含むことができ、配列番号5または105の73位に置換を有し得る。一部の実施形態では、73位での置換は、Gへの置換であり得る。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体の配列は、置換を除いて、配列番号5または105と同一であり得る。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、代理測定、半減期測定、アミノ酸荷電効率測定、または合成酵素もしくはリボソーム機構への結合の測定によって決定される、配列番号5または105において提供される配列を含む比較可能なtRNAと比較して、インビボで増加した安定性を示し得る。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、リジン、アルギニン、ヒスチジン、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、プロリン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ピロリジン、またはセレノシステインを含むアミノ酸でアシル化することができるか、または非標準アミノ酸でアシル化することができる。一部の実施形態では、未成熟停止コドンは、オパール停止コドン、オーカー停止コドン、またはアンバー停止コドンであり得る。一部の実施形態では、ポリペプチドは、MeCP2ポリペプチド、FoxG1ポリペプチド、CDKL5ポリペプチド、MYH9ポリペプチド、COL11A2ポリペプチド、またはMYO7Aポリペプチドを含むことができる。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、実質的に全長のポリペプチドの少なくとも20%の産生を回復させることができる。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、実質的に全長のポリペプチドの少なくとも40%の産生を回復させることができる。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、実質的に全長のポリペプチドの少なくとも60%の産生を回復させる能力がある。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、実質的に全長のポリペプチドの少なくとも80%の産生を回復させる能力がある。一部の実施形態では、組成物は、操作されたtRNA変異体をコードするポリヌクレオチドを含むことができる。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、ウイルスベクター中であり得る。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、またはレンチウイルスベクターであり得る。一部の実施形態では、AAVベクターは、AAV2/5ベクター、AAV2/6ベクター、AAV2/7ベクター、AAV2/8ベクター、またはAAV2/9ベクターを含む。一部の実施形態では、AAVは、AAV5由来のキャプシドを含むことができる。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、AAV2由来の逆位末端反復(ITR)配列を含むことができる。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、突然変異した末端分離部位を有し、末端ヌクレオチドが欠如している逆位末端反復を含み得る。一部の実施形態では、末端ヌクレオチドは、A領域の少なくとも一部、D領域の少なくとも一部、または両方を含み得る。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、自己相補的であることができる。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、同じ操作されたtRNA変異体の2つ以上、3つ以上、4つ以上、5つ以上、または6つ以上のコピーをコードすることができる。一部の実施形態

10

20

30

40

50

では、ポリヌクレオチドは、異なる操作された tRNA 変異体の 2 つ以上、3 つ以上、4 つ以上、5 つ以上、または 6 つ以上のコピーをコードすることができる。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、少なくとも約 50 ヌクレオチド、少なくとも約 100 ヌクレオチド、少なくとも約 150 ヌクレオチド、または少なくとも約 200 ヌクレオチドを含むスタッファー配列を含むことができる。一部の実施形態では、スタッファー配列は、ポリヌクレオチド内の操作された tRNA 変異体の 1 つまたは複数のコピーの 3' または 5' であり得る。一部の実施形態では、スタッファー配列は、ポリヌクレオチド内の操作された tRNA 変異体の 2 つ以上のコピーを分離することができる。一部の実施形態では、操作された tRNA 変異体または操作された tRNA をコードするポリヌクレオチドは、デリバリーシステムに存在することができる。一部の実施形態では、デリバリーシステムは、リボソーム、荷電ポリマー、非荷電ポリマー、ナノ粒子、界面活性剤、浸透増強剤、遺伝子導入剤、リン脂質、ミセル、合成ベクター、高分子、デンドリマー、生体高分子、ウイルス粒子、またはそれらの任意の組合せを含むことができる。一部の実施形態では、ポリペプチドは、MeCP2 ポリペプチドを含むことができる。一部の実施形態では、未成熟停止コドンは、MeCP2 ポリペプチドのアミノ酸 168、255、270、294、198、186、453、8（例えば、アイソフォーム 2 中）、9（例えば、アイソフォーム 1 中）、84、85、89、91、106、111、115、133、162、167、188、190、211、250、253、268、306、309、344、354、420、458、468、471、478、または 484 位に R をコードする突然変異から生じ得る。一部の実施形態では、組成物および薬学的に許容される賦形剤、担体または希釈剤を含む医薬組成物が、本明細書に開示される。一部の実施形態では、医薬組成物は、用量単位形態を含むことができる。一部の実施形態では、組成物または医薬組成物、およびパッケージングまたは容器を含むキットが、本明細書に開示される。一部の実施形態では、組成物または医薬組成物をパッケージングまたは容器と接触させることを含む、キットを製造する方法が、本明細書に開示される。一部の実施形態では、それを必要とする対象に組成物を投与することを含む、疾患または障害の処置または予防方法が、本明細書に開示される。

10

20

30

40

50

【0004】

一部の実施形態では、対象に、操作された tRNA もしくはその変異体または操作された tRNA もしくはその変異体をコードするポリヌクレオチドを投与すること；および未成熟停止コドンが欠如する mRNA を使用して産生される同等のポリペプチドと比べて、少なくとも約 10% の効率で、インビボで実質的に全長のポリペプチドを産生することを含む、操作された tRNA またはその変異体は、実質的に全長のポリペプチドをコードする標的 mRNA 中の未成熟停止コドンを通じてリーディングすることができる、それを必要とする対象における疾患または状態を処置または予防する方法が、本明細書に開示される。一部の実施形態では、対象に、操作された tRNA もしくはその変異体または操作された tRNA をコードするポリヌクレオチドもしくはその変異体を投与し、これにより、対象における疾患または状態を少なくとも一部処置することを含む、それを必要とする対象における疾患または状態を処置または予防する方法が、本明細書に開示され、操作された tRNA またはその変異体は、ポリペプチドをコードする標的 mRNA における未成熟停止コドンを認識し、操作された tRNA またはその変異体は、標的 mRNA の翻訳中に、未成熟停止コドンのセンスコドンへの解釈を少なくとも部分的に形質転換し、操作された tRNA またはその変異体をコードする第 1 のベクターおよび第 1 のマーカーをコードするスクリーニング mRNA をコードする第 2 のベクターを第 1 のヒト細胞にトランスフェクトすること、第 1 のマーカーをコードするスクリーニング mRNA は、未成熟停止コドンを含むことができる；第 2 のマーカーをコードする同等のスクリーニング mRNA をコードする第 3 のベクターを第 2 のヒト細胞にトランスフェクトすること、同等のスクリーニング mRNA は、未成熟停止コドンを含まなくてもよい；および第 1 のヒト細胞から放出される検出可能なシグナルの量と第 2 のヒト細胞から放出される検出可能なシグナルの量を比較することによって決定されてもよい、未成熟停止コドンが欠如する同等の mRNA

NAを使用して産生される同等のポリペプチドと比べて、少なくとも約10%の効率で、インビボで実質的に全長のポリペプチドを産生することができる。一部の実施形態では、操作されたtRNAまたはその変異体は、配列番号003~48または103~148のいずれか1つと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%の配列同一性を含むことができる。一部の実施形態では、操作されたtRNAまたはその変異体は、配列番号3~48または103~148のいずれか1つを含むことができる。一部の実施形態では、操作されたtRNAまたはその変異体は、配列番号3、6、7、32、45、103、106、107、132、または145のいずれか1つを含むことができる。一部の実施形態では、対象に操作されたtRNAまたはその変異体を投与することは、操作されたtRNAまたはその変異体をコードするポリヌクレオチドを含むウイルスを投与することを含むことができる。一部の実施形態では、ウイルスは、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)、またはレンチウイルスを含むことができる。一部の実施形態では、ウイルスは、AAV2/5、AAV2/6、AAV2/7、AAV2/8、またはAAV2/9を含むことができる。一部の実施形態では、ウイルスは、AAV5キャプシドを含むことができる。一部の実施形態では、操作されたtRNAまたはその変異体をコードするポリヌクレオチドは、AAV2逆位末端反復(ITER)配列を含むことができる。一部の実施形態では、操作されたtRNAまたはその変異体をコードするポリヌクレオチドは、突然変異した末端分離部位を有し、末端ヌクレオチドが欠如している逆位末端反復を含み得る。一部の実施形態では、末端ヌクレオチドは、A領域の少なくとも一部、D領域の少なくとも一部、または両方を含む。一部の実施形態では、操作されたtRNAまたはその変異体をコードするポリヌクレオチドは、自己相補的である。一部の実施形態では、操作されたtRNAまたはその変異体をコードするポリヌクレオチドは、操作されたtRNAまたはその変異体の追加の1つまたは複数、2つ以上、3つ以上、4つ以上、5つ以上、または6つ以上のコピーをコードすることができる。一部の実施形態では、操作されたtRNAまたはその変異体をコードするポリヌクレオチドは、操作されたtRNAまたはその変異体とは異なる、第2の操作されたtRNAまたはその変異体の2つ以上、3つ以上、4つ以上、5つ以上、または6つ以上のコピーをコードすることができる。一部の実施形態では、操作されたtRNAまたはその変異体をコードするポリヌクレオチドは、少なくとも約50ヌクレオチド、少なくとも約100ヌクレオチド、少なくとも約150ヌクレオチド、または少なくとも約200ヌクレオチドを含むスタッパー配列を含むことができる。一部の実施形態では、スタッパー配列は、ポリヌクレオチド内の操作されたtRNAまたはその変異体の1つまたは複数のコピーの3'または5'であることができる。一部の実施形態では、スタッパー配列は、ポリヌクレオチド内の操作されたtRNAまたはその変異体の2つ以上のコピーを分離することができる。一部の実施形態では、操作されたtRNAもしくはその変異体または操作されたtRNAもしくはその変異体をコードするポリヌクレオチドは、デリバリーシステムにあることができる。一部の実施形態では、デリバリーシステムは、リポソーム、荷電ポリマー、非荷電ポリマー、ナノ粒子、界面活性剤、浸透増強剤、遺伝子導入剤、リン脂質、ミセル、合成ベクター、高分子、デンドリマー、生体高分子、ウイルス粒子、または任意のその組合せを含むことができる。一部の実施形態では、操作されたtRNAもしくはその変異体または操作されたtRNAもしくはその変異体をコードするポリヌクレオチドは、薬学的に許容される賦形剤、担体または希釈剤を含む医薬組成物中にある。一部の実施形態では、医薬組成物は、用量単位形態であり得る。一部の実施形態では、対象は、標的mRNA中の未成熟停止コドンと関連する疾患または状態を有し得る。一部の実施形態では、ポリペプチドは、未成熟停止コドンが欠如する同等のmRNAを使用して産生される同等のポリペプチドと比べて、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、または少なくとも約90%の効率で産生し、これにより、対象における疾患または状態を少なくとも一部、処置することができる。一部の実施形態では、疾患または状態は、レット症候群、嚢胞性線維症、

10

20

30

40

50

網膜色素変性症、または難聴を含み得る。一部の実施形態では、難聴は、常染色体優性 17 難聴、常染色体優性 13 難聴、または常染色体優性 11 難聴を含み得る。一部の実施形態では、対象はヒトである。一部の実施形態では、対象は、非ヒト動物であり得る。一部の実施形態では、投与は、経口、直腸、非経口、静脈内、動脈内、くも膜下腔内、眼内、耳、脳室内、大槽内、脳室内、または腹腔内であり得る。一部の実施形態では、疾患または状態は、レット症候群であり得、レット症候群の少なくとも 1 つの症状が、軽減される。一部の実施形態では、レット症候群の少なくとも 1 つの症状は、成長遅滞、脳成長遅滞、小頭症、動作もしくは協調の減少もしくは喪失、手の制御の低減、歩行能力の減少、硬直性もしくは痙縮性の動作、話す能力の減少、視力の低下、無関心、反復的な手の動作、普通でない眼球運動、呼吸困難、易刺激性、恐怖、不安、認知障害、けいれん、異常な脳波、脊柱側弯、不整脈、または異常な睡眠パターンを含み得る。一部の実施形態では、 $1 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{15}$ ウイルスゲノムを投与することができる。一部の実施形態では、対象は、およそ 10 ～ 30 歳であり得る。一部の実施形態では、組成物は、標的 mRNA のナンセンス媒介 mRNA デコイ (NMD) を減少させるかまたは阻害することができる。一部の実施形態では、組成物は、ベースラインの標的 mRNA 測定値と比べて、対象における標的 mRNA の量を増加させることができる。一部の実施形態では、ポリペプチドは、MeCP2 ポリペプチドを含むことができる。一部の実施形態では、未成熟停止コドンは、MeCP2 ポリペプチドのアミノ酸 168、255、270、294、198、186、453、8 (例えば、アイソフォーム 2 中)、9 (例えば、アイソフォーム 1 中)、84、85、89、91、106、111、115、133、162、167、188、190、211、250、253、268、306、309、344、354、420、458、468、471、478、または 484 位に R をコードする突然変異から生じ得る。

10

20

30

40

50

【0005】

本開示の態様は、その対象における疾患または状態を処置する方法を提供することができる。方法は、対象に、操作された tRNA もしくはその変異体または操作された tRNA もしくはその変異体をコードするポリヌクレオチドを投与すること；および未成熟停止コドンが欠如する同等の mRNA を使用して産生される同等のポリペプチドと比べて、少なくとも約 10 % の効率で、インビボで実質的に全長のポリペプチドを産生することを含むことができ、操作された tRNA またはその変異体は、実質的に全長のポリペプチドをコードする標的 mRNA 中の未成熟停止コドンを通じてリーディングすることができ得る。本開示の別の態様は、それを必要とする対象における疾患または状態を処置する方法を提供することができる。方法は、対象に、操作された tRNA もしくはその変異体または操作された tRNA もしくはその変異体をコードするポリヌクレオチドを投与し、これにより、対象における疾患または状態を少なくとも一部、処置することを含むことができ、操作された tRNA またはその変異体は、ポリペプチドをコードする mRNA 中の未成熟停止コドンを認識し、操作された tRNA またはその変異体は、mRNA の翻訳中に、未成熟停止コドンのセンスコドンへの解釈を少なくとも部分的に形質転換し、(a) 操作された tRNA またはその変異体をコードする第 1 のベクターおよび第 1 のマーカーをコードするスクリーニング mRNA をコードする第 2 のベクターを第 1 のヒト細胞にトランスフェクトすること、第 1 のマーカーをコードするスクリーニング mRNA は、未成熟停止コドンを含むことができる；(b) 第 2 のマーカーをコードする同等のスクリーニング mRNA をコードする第 3 のベクターを第 2 のヒト細胞にトランスフェクトすること、同等のスクリーニング mRNA は、未成熟停止コドンを含まなくてよい；および (c) 第 1 のヒト細胞から放出される検出可能なシグナルの量と第 2 のヒト細胞から放出される検出可能なシグナルの量を比較することによって決定される、未成熟停止コドンが欠如する同等の mRNA を使用して産生される同等のポリペプチドと比べて、少なくとも約 10 % の効率で、インビボで実質的に全長のポリペプチドを産生することができる。一部の実施形態では、第 1 のヒト細胞または第 2 のヒト細胞は、HEK293 細胞であり得る。一部の実施形態では、方法は、実質的に全長のポリペプチドの少なくとも約 20 %、少なくとも約

30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約92%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、少なくとも約99%、または100%の発現を回復させることをさらに含むことができる。一部の実施形態では、操作されたtRNAまたはその変異体は、未成熟停止コドンが欠如する同等のmRNAを使用して産生される同等のポリペプチドと比べて、少なくとも約35%の効率で、実質的に全長のポリペプチドを産生することができる。一部の実施形態では、操作されたtRNAまたはその変異体は、リジン、アルギニン、ヒスチジン、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、プロリン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ピロリジン、およびセレノシステインからなる群から選択されるアミノ酸でアシル化することができる。一部の実施形態では、操作されたtRNAまたはその変異体は、アルギニンでアシル化することができる。一部の実施形態では、操作されたtRNAまたはその変異体は、非標準アミノ酸でアシル化することができる。一部の実施形態では、ポリペプチドをコードするmRNAは、MeCP2に対応する。一部の実施形態では、操作されたtRNAまたはその変異体は、mRNAの翻訳中に、インビボで未成熟停止コドンに応答して、アミノ酸を、mRNAによってコードされる新生MeCP2ポリペプチド鎖に挿入することができ、アミノ酸は、挿入されたとき、未成熟停止コドンが欠如する同等のmRNAを使用して産生される同等のMeCP2ポリペプチドと比較して、少なくとも一部の機能的なMeCP2ポリペプチドを産生するのに十分であり得る。一部の実施形態では、mRNAは、少なくとも2つの未成熟停止コドンを含むことができる。一部の実施形態では、少なくとも2つの未成熟停止コドンは、同じ停止コドンであり得る。一部の実施形態では、少なくとも2つの未成熟停止コドンは、異なる停止コドンであり得る。一部の実施形態では、未成熟停止コドンは、MeCP2ポリペプチドに対応する配列のアミノ酸168、255、270、294、198、186、453、8（例えば、アイソフォーム2中）、9（例えば、アイソフォーム1中）、84、85、89、91、106、111、115、133、162、167、188、190、211、250、253、268、306、309、344、354、420、458、468、471、478、もしくは484位、またはそれらの任意の組合せに、RからXを生じることができ、Xは、未成熟停止コドンであり得る。一部の実施形態では、未成熟停止コドンは、オパール停止コドンであり得る。一部の実施形態では、未成熟停止コドンは、アンバー停止コドンであり得る。一部の実施形態では、未成熟停止コドンは、オーカー停止コドンであり得る。一部の実施形態では、操作されたtRNAまたはその変異体は、リジルtRNA、アルギニルtRNA、ヒスチジルtRNA、グリシルtRNA、アラニルtRNA、バリルtRNA、ロイシルtRNA、イソロイシルtRNA、メチオニルtRNA、フェニルアラニルtRNA、トリプトファニルtRNA、プロリルtRNA、セリルtRNA、スレオニルtRNA、システニルtRNA、チロシルtRNA、アスパラギニルtRNA、グルタミルtRNA、アスパルチルtRNA、ピロールリジルtRNA、セレノシスチルtRNAまたはグルタミルtRNAであり得る。一部の実施形態では、操作されたtRNAまたはその変異体は、操作されたtRNA前駆体であり得る。一部の実施形態では、操作されたtRNAまたはその変異体は、イントロン配列を含むことができる。一部の実施形態では、イントロン配列は、操作されたtRNAまたはその変異体を含有する細胞内でスプライシングされ、これにより、成熟な操作されたtRNAまたはその変異体を産生することができる。一部の実施形態では、対象はヒトであり得る。一部の実施形態では、対象は、非ヒト動物であり得る。一部の実施形態では、ヒトは、およそ生誕時～約40歳の年齢であり得る。一部の実施形態では、ヒトは、約6月齢～約15歳の年齢であり得る。一部の実施形態では、ヒトは、胚または胎児であり得る。一部の実施形態では、疾患または状態は、レット症候群を含み得る。一部の実施形態では、疾患または状態は、嚢胞性線維症を含み得る。一部の実施形態では、疾患または状態は、網膜色素変性症を含み得る。一部の実施形態では、疾患または状態は、難聴を含み得る。一部の実施形態では、難聴

10

20

30

40

50

は、常染色体優性 17 難聴、常染色体優性 13 難聴、または常染色体優性 11 難聴を含み得る。一部の実施形態では、投与することは、経口投与すること、直腸投与すること、または非経口投与することであり得る。一部の実施形態では、投与することは、非経口投与することであり得、非経口投与することは、静脈内投与すること、動脈内投与すること、くも膜下腔内投与すること、眼内投与すること、耳に投与すること、脳室内投与すること、または腹腔内投与することであり得る。一部の実施形態では、投与は、大槽内 (ICM) であり得る。一部の実施形態では、投与は、脳室内 (ICV) であり得る。一部の実施形態では、ポリペプチドは、MeCP2 ポリペプチドを含むことができる。一部の実施形態では、ポリペプチドは、FoxG1 ポリペプチドを含むことができる。一部の実施形態では、ポリペプチドは、CDKL5 ポリペプチドを含むことができる。一部の実施形態では、ポリペプチドは、MYH9 ポリペプチドを含むことができる。一部の実施形態では、ポリペプチドは、COL11A2 ポリペプチドを含むことができる。一部の実施形態では、ポリペプチドは、MYO7A ポリペプチドを含むことができる。一部の実施形態では、投与は、期間中、少なくとも 2 回行うことができる。一部の実施形態では、期間は、約 24 時間であり得る。一部の実施形態では、方法は、疾患または状態を予防する方法であり得、予防は、操作された tRNA もしくはその変異体または操作された tRNA もしくはその変異体をコードするポリヌクレオチドの対象への予防投与を含み得る。一部の実施形態では、操作された tRNA またはその変異体をコードするポリヌクレオチドを、対象に投与することができる。一部の実施形態では、操作された tRNA またはその変異体をコードするポリヌクレオチドは、ベクターに含まれ得る。一部の実施形態では、ベクターは、ウイルスベクターであり得る。一部の実施形態では、ベクターは、プラスミド、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター、レンチウイルス (LV) ベクターを含むことができる。一部の実施形態では、AAV ベクターは、(a) AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11 もしくは AAV12 を含む血清型、または (b) AAV-DJ、AAV-DJ/8、AAV-Rh10、AAV-Rh74、AAV-レトロ、AAV-PHP.B、AAV8-PHP.eB、AAV-PHP.S もしくは AAV-2i8 を含むシュードタイプを有する AAV 由来のものであることができる。一部の実施形態では、AAV ベクターは、複製遺伝子を含むゲノムならびに第 1 の AAV 血清型由来の逆位末端反復および第 2 の AAV 血清型由来のキャプシドタンパク質を含むことができる。一部の実施形態では、AAV ベクターは、AAV2/5 ベクター、AAV2/6 ベクター、AAV2/7 ベクター、AAV2/8 ベクター、または AAV2/9 ベクターを含み得る。一部の実施形態では、AAV ベクターは、AAV2/5 ベクターであり得る。一部の実施形態では、操作された tRNA もしくはその変異体または操作された tRNA もしくはその変異体をコードするポリヌクレオチドは、デリバリーシステムに存在することができる。一部の実施形態では、デリバリーシステムは、リポソーム、荷電ポリマー、非荷電ポリマー、ナノ粒子、界面活性剤、浸透増強剤、遺伝子導入剤、リン脂質、ミセル、合成ベクター、高分子、デンドリマー、生体高分子、ウイルス粒子、またはそれらの任意の組合せを含むことができる。一部の実施形態では、方法は、(i) 動員領域および (ii) 標的化領域を含むか、またはコードするポリヌクレオチド配列を含む組成物を投与することをさらに含み、ポリヌクレオチド配列は、RNA 編集実体を動員し、編集実体は、ポリヌクレオチド配列および mRNA と接触したとき、mRNA の未成熟停止コドンのヌクレオチドの塩基上で化学修飾を行い、これにより、未成熟停止コドンセンスコドンに変換する。一部の実施形態では、RNA 編集実体は、(a) ADAR ポリペプチド；(b) APOBEC ポリペプチド；(c) (a) もしくは (b) の生物学的に活性なフラグメント；または (d) (c) の生物学的に活性なフラグメントを含む融合タンパク質を含むことができる。一部の実施形態では、疾患または状態は、レット症候群を含み得、mRNA は、MeCP2 ポリペプチドをコードし、未成熟停止コドンは、オパール停止コドンであり得、操作された tRNA またはその変異体は、アルギニル tRNA であり得、対象は、0~6 歳の年齢のヒトであり得、操作された tRNA またはその変異体が、対象に AAV ベクターと

10

20

30

40

50

して投与されたとき、操作された tRNA またはその変異体は、MeCP2 ポリペプチドをコードする mRNA の翻訳中に、未成熟停止コドンのアルギニンセンスコドンへの解釈を

少なくとも部分的に形質転換し、実質的に全長の MeCP2 ポリペプチドを産生し、これにより、レット症候群を少なくとも一部、処置する。一部の実施形態では、操作された tRNA またはその変異体は、メチル基、フルオロ基、メトキシエチル基、エチル基、リン酸塩基、アミド基、エステル基、またはそれらの任意の組合せを含む化学修飾を含むことができる。一部の実施形態では、対象は、投与前に、疾患または状態を有するとの診断を受けていてもよい。一部の実施形態では、診断は、インビトロ (in vitro) 診断検査によって決定することができる。

10

【0006】

本開示の別の態様は、組成物を提供する。組成物は、本明細書に記載される操作された tRNA またはその変異体；および薬学的に許容される賦形剤、希釈剤、または担体を含むことができる。本開示の別の態様は、容器において本明細書で述べられる組成物を含むキットを提供する。本開示の別の態様は、対象に、操作された tRNA 変異体または操作された tRNA 変異体をコードするポリヌクレオチドを投与することを含む、それを必要とする対象における疾患または状態を処置する方法を提供し、操作された tRNA 変異体は、配列番号 3 ~ 22 のいずれか 1 つで提供される参照 tRNA の配列における 1 つまたは複数の突然変異を含むことができ、操作された tRNA 変異体は、ポリペプチドをコードする mRNA における未成熟停止コドンを認識し、mRNA の翻訳中に、未成熟停止コドンのセンスコドンへの解釈を少なくとも部分的に形質転換して、インビボで実質的に全長のポリペプチドを産生する。一部の実施形態では、1 つまたは複数の突然変異は、互いにワトソン・クリック塩基対形成しない操作された tRNA 変異体のアクセプターシステムまたはアンチコドンシステムにおける少なくとも 2 つのヌクレオチドの、ワトソン・クリック塩基対形成する少なくとも 2 つのヌクレオチドでの置換を含むことができる。一部の実施形態では、1 つまたは複数の突然変異は、配列番号 3 または参照 tRNA の 5' 末端に関して、ヌクレオチド 72 位におけるチミンのシトシンでの置換を含むことができる。操作された tRNA 変異体は、配列番号 23 の配列を含むことができる。一部の実施形態では、1 つまたは複数の突然変異は、配列番号 103 または参照 tRNA の 5' 末端に関して、ヌクレオチド 72 位におけるウラシルのシトシンでの置換を含むことができる。操作された tRNA 変異体は、配列番号 123 の配列を含むことができる。一部の実施形態では、操作された tRNA 変異体は、配列番号 3 または参照 tRNA の 5' 末端に関して、ヌクレオチド 2 位にシトシンおよびヌクレオチド 71 位にグアニンを含むことができる。操作された tRNA 変異体は、配列番号 24 の配列を含むことができる。一部の実施形態では、操作された tRNA 変異体は、配列番号 103 または参照 tRNA の 5' 末端に関して、ヌクレオチド 2 位にシトシンおよびヌクレオチド 71 位にグアニンを含むことができる。操作された tRNA 変異体は、配列番号 124 の配列を含むことができる。一部の実施形態では、1 つまたは複数の突然変異は、ヌクレオチド 6 位においてグアニンで置換されたアデニンおよびヌクレオチド 67 位においてシトシンで置換されたチミンを含むことができ、ヌクレオチド 6 位およびヌクレオチド 67 位は、配列番号 3 または参照 tRNA の 5' 末端に関してであり得る。操作された tRNA 変異体は、配列番号 25 の配列を含むことができる。一部の実施形態では、1 つまたは複数の突然変異は、ヌクレオチド 6 位においてグアニンで置換されたアデニンおよびヌクレオチド 67 位においてシトシンで置換されたウラシルを含むことができ、ヌクレオチド 6 位およびヌクレオチド 67 位は、配列番号 103 または参照 tRNA の 5' 末端に関してであり得る。操作された tRNA 変異体は、配列番号 125 の配列を含むことができる。一部の実施形態では、1 つまたは複数の突然変異は、ヌクレオチド 13 位においてシトシンで置換されたチミンおよびヌクレオチド 22 位においてグアニンで置換されたアデニンを含むことができ、ヌクレオチド 13 位およびヌクレオチド 22 位は、配列番号 3 または参照 tRNA の 5' 末端に関してであり得る。操作された tRNA 変異体は、配列番号 26 の配列を含むことができる。一

20

30

40

50

部の実施形態では、1つまたは複数の突然変異は、ヌクレオチド13位においてシトシンで置換されたウラシルおよびヌクレオチド22位においてグアニンで置換されたアデニンを含むことができ、ヌクレオチド13位およびヌクレオチド22位は、配列番号103または参照tRNAの5'末端に関してであり得る。操作されたtRNA変異体は、配列番号126の配列を含むことができる。一部の実施形態では、1つまたは複数の突然変異は、配列番号3または参照tRNAの5'末端に関して、ヌクレオチド15位においてグアニンで置換されたアデニンを含むことができる。操作されたtRNA変異体は、配列番号27の配列を含むことができる。一部の実施形態では、1つまたは複数の突然変異は、配列番号103または参照tRNAの5'末端に関して、ヌクレオチド15位においてグアニンで置換されたアデニンを含むことができる。操作されたtRNA変異体は、配列番号127の配列を含むことができる。一部の実施形態では、1つまたは複数の突然変異は、ヌクレオチド28位においてシトシンで置換されたチミンおよびヌクレオチド42位においてグアニンで置換されたアデニンを含むことができ、ヌクレオチド28位およびヌクレオチド42位は、配列番号3または参照tRNAの5'末端に関してであり得る。操作されたtRNA変異体は、配列番号28の配列を含むことができる。一部の実施形態では、1つまたは複数の突然変異は、ヌクレオチド28位においてシトシンで置換されたウラシルおよびヌクレオチド42位においてグアニンで置換されたアデニンを含むことができ、ヌクレオチド28位およびヌクレオチド42位は、配列番号103または参照tRNAの5'末端に関してであり得る。操作されたtRNA変異体は、配列番号128の配列を含むことができる。一部の実施形態では、1つまたは複数の突然変異は、ヌクレオチド31位においてアデニンで置換されたシトシンおよびヌクレオチド39位においてチミンで置換されたグアニンを含むことができ、ヌクレオチド31位およびヌクレオチド39位は、配列番号3または参照tRNAの5'末端に関してであり得る。操作されたtRNA変異体は、配列番号29の配列を含むことができる。一部の実施形態では、1つまたは複数の突然変異は、ヌクレオチド31位においてアデニンで置換されたシトシンおよびヌクレオチド39位においてウラシルで置換されたグアニンを含むことができ、ヌクレオチド31位およびヌクレオチド39位は、配列番号103または参照tRNAの5'末端に関してであり得る。操作されたtRNA変異体は、配列番号129の配列を含むことができる。一部の実施形態では、1つまたは複数の突然変異は、配列番号3または参照tRNAの5'末端に関して、ヌクレオチド37位においてグアニンで置換されたアデニンを含むことができる。操作されたtRNA変異体は、配列番号30の配列を含むことができる。一部の実施形態では、1つまたは複数の突然変異は、配列番号103または参照tRNAの5'末端に関して、ヌクレオチド37位においてグアニンで置換されたアデニンを含むことができる。操作されたtRNA変異体は、配列番号130の配列を含むことができる。一部の実施形態では、1つまたは複数の突然変異は、配列番号3または参照tRNAの5'末端に関して、ヌクレオチド44位においてアデニンで置換されたグアニンを含むことができる。操作されたtRNA変異体は、配列番号31の配列を含むことができる。一部の実施形態では、1つまたは複数の突然変異は、配列番号103または参照tRNAの5'末端に関して、ヌクレオチド44位においてアデニンで置換されたグアニンを含むことができる。操作されたtRNA変異体は、配列番号131の配列を含むことができる。一部の実施形態では、1つまたは複数の突然変異は、ヌクレオチド50位においてシトシンで置換されたチミンおよびヌクレオチド64位においてグアニンで置換されたアデニンを含むことができ、ヌクレオチド50位およびヌクレオチド64位は、配列番号3または参照tRNAの5'末端に関してであり得る。操作されたtRNA変異体は、配列番号32の配列を含むことができる。一部の実施形態では、1つまたは複数の突然変異は、ヌクレオチド50位においてシトシンで置換されたウラシルおよびヌクレオチド64位においてグアニンで置換されたアデニンを含むことができ、ヌクレオチド50位およびヌクレオチド64位は、配列番号103または参照tRNAの5'末端に関してであり得る。操作されたtRNA変異体は、配列番号132の配列を含むことができる。一部の実施形態では、1つまたは複数の突然変異は、ヌクレオチド6位においてチミンで置換されたシトシンお

10

20

30

40

50

50

いてチミンで置換されたグアニンを含むことができ、ヌクレオチド6位およびヌクレオチド67位は、配列番号6または参照tRNAの5'末端に関してであり得る。操作されたtRNA変異体は、配列番号41の配列を含むことができる。一部の実施形態では、1つまたは複数の突然変異は、ヌクレオチド6位においてアデニンで置換されたシトシンおよびヌクレオチド67位においてウラシルで置換されたグアニンを含むことができ、ヌクレオチド6位およびヌクレオチド67位は、配列番号106または参照tRNAの5'末端に関してであり得る。操作されたtRNA変異体は、配列番号141の配列を含むことができる。一部の実施形態では、1つまたは複数の突然変異は、ヌクレオチド12位においてシトシンで置換されたグアニンおよびヌクレオチド23位においてグアニンで置換されたシトシンを含むことができ、ヌクレオチド12位およびヌクレオチド23位は、配列番号6または参照tRNAの5'末端に関してであり得る。操作されたtRNA変異体は、配列番号42の配列を含むことができる。一部の実施形態では、1つまたは複数の突然変異は、ヌクレオチド12位においてシトシンで置換されたグアニンおよびヌクレオチド23位においてグアニンで置換されたシトシンを含むことができ、ヌクレオチド12位およびヌクレオチド23位は、配列番号106または参照tRNAの5'末端に関してであり得る。操作されたtRNA変異体は、配列番号142の配列を含むことができる。一部の実施形態では、1つまたは複数の突然変異は、ヌクレオチド27位においてシトシンで置換されたチミンおよびヌクレオチド43位においてグアニンで置換されたアデニンを含むことができ、ヌクレオチド27位およびヌクレオチド43位は、配列番号6または参照tRNAの5'末端に関してであり得る。操作されたtRNA変異体は、配列番号43の配列を含むことができる。一部の実施形態では、1つまたは複数の突然変異は、ヌクレオチド27位においてシトシンで置換されたウラシルおよびヌクレオチド43位においてグアニンで置換されたアデニンを含むことができ、ヌクレオチド27位およびヌクレオチド43位は、配列番号106または参照tRNAの5'末端に関してであり得る。操作されたtRNA変異体は、配列番号143の配列を含むことができる。一部の実施形態では、1つまたは複数の突然変異は、ヌクレオチド28位においてシトシンで置換されたチミンおよびヌクレオチド42位においてグアニンで置換されたアデニンを含むことができ、ヌクレオチド28位およびヌクレオチド42位は、配列番号6または参照tRNAの5'末端に関してであり得る。操作されたtRNA変異体は、配列番号44の配列を含むことができる。一部の実施形態では、1つまたは複数の突然変異は、ヌクレオチド28位においてシトシンで置換されたウラシルおよびヌクレオチド42位においてグアニンで置換されたアデニンを含むことができ、ヌクレオチド28位およびヌクレオチド42位は、配列番号106または参照tRNAの5'末端に関してであり得る。操作されたtRNA変異体は、配列番号144の配列を含むことができる。一部の実施形態では、1つまたは複数の突然変異は、配列番号6または参照tRNAの5'末端に関して、ヌクレオチド40位においてシトシンで置換されたチミンを含むことができる。操作されたtRNA変異体は、配列番号45の配列を含むことができる。一部の実施形態では、1つまたは複数の突然変異は、配列番号106または参照tRNAの5'末端に関して、ヌクレオチド40位においてシトシンで置換されたウラシルを含むことができる。操作されたtRNA変異体は、配列番号145の配列を含むことができる。一部の実施形態では、1つまたは複数の突然変異は、ヌクレオチド31位においてシトシンで置換されたアデニンおよびヌクレオチド39位においてグアニンで置換されたチミンを含むことができ、ヌクレオチド31位およびヌクレオチド39位は、配列番号6または参照tRNAの5'末端に関してであり得る。操作されたtRNA変異体は、配列番号46の配列を含むことができる。一部の実施形態では、1つまたは複数の突然変異は、ヌクレオチド31位においてシトシンで置換されたアデニンおよびヌクレオチド39位においてグアニンで置換されたウラシルを含むことができ、ヌクレオチド31位およびヌクレオチド39位は、配列番号106または参照tRNAの5'末端に関してであり得る。操作されたtRNA変異体は、配列番号146の配列を含むことができる。一部の実施形態では、1つまたは複数の突然変異は、配列番号6または参照tRNAの5'末端に関して、ヌクレオチド44位においてグアニンで置換さ

10

20

30

40

50

れたアデニンを含むことができる。操作された tRNA 変異体は、配列番号 47 の配列を含むことができる。一部の実施形態では、1 つまたは複数の突然変異は、配列番号 106 または参照 tRNA の 5' 末端に関して、ヌクレオチド 44 位においてグアニンで置換されたアデニンを含むことができる。操作された tRNA 変異体は、配列番号 147 の配列を含むことができる。一部の実施形態では、1 つまたは複数の突然変異は、配列番号 6 または参照 tRNA の 5' 末端に関して、ヌクレオチド 46 位においてアデニンで置換されたグアニンを含むことができる。操作された tRNA 変異体は、配列番号 48 の配列を含むことができる。一部の実施形態では、1 つまたは複数の突然変異は、配列番号 106 または参照 tRNA の 5' 末端に関して、ヌクレオチド 46 位においてアデニンで置換されたグアニンを含むことができる。操作された tRNA 変異体は、配列番号 148 の配列を含むことができる。一部の実施形態では、ポリペプチドは、(a) 操作された tRNA 変異体をコードする第 1 のベクターおよび第 1 の緑色蛍光タンパク質をコードするスクリーニング mRNA をコードする第 2 のベクターを第 1 のヒト細胞にトランスフェクトすること、第 1 の緑色蛍光タンパク質をコードするスクリーニング mRNA は、未成熟停止コドンを含むことができる；(b) 第 2 の緑色蛍光タンパク質をコードする同等のスクリーニング mRNA をコードする第 3 のベクターを第 2 のヒト細胞にトランスフェクトすること、同等のスクリーニング mRNA は、未成熟停止コドンを含まない；および (c) 第 1 のヒト細胞から放出される蛍光の量と第 2 のヒト細胞から放出される蛍光の量を比較することによって決定される、未成熟停止コドンを欠き得る同等の mRNA を使用して産生される同等のポリペプチドと比べて、少なくとも約 10% の効率で産生することができる。一部の実施形態では、ポリペプチドは、未成熟停止コドンが欠如する同等の mRNA を使用して産生される同等のポリペプチドと比べて、少なくとも約 80% の効率で産生し、これにより、対象における疾患または状態を少なくとも一部、処置することができる。一部の実施形態では、操作された tRNA 変異体は、リジン、アルギニン、ヒスチジン、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、プロリン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ピロリジン、およびセレノシステインからなる群から選択されるアミノ酸でアシル化することができる。一部の実施形態では、操作された tRNA 変異体は、非標準アミノ酸でアシル化することができる。一部の実施形態では、操作された tRNA 変異体は、mRNA の翻訳中に、インビボで未成熟停止コドンに応答して、アミノ酸を、mRNA によってコードされる新生 MeCP2 ポリペプチド鎖に挿入し、アミノ酸は、挿入されたとき、未成熟停止コドンが欠如する同等の mRNA を使用して産生される同等の MeCP2 ポリペプチドと比較して、少なくとも一部の機能的な MeCP2 ポリペプチドを産生するのに十分であり得る。一部の実施形態では、mRNA は、少なくとも 2 つの未成熟停止コドンを含むことができる。一部の実施形態では、少なくとも 2 つの未成熟停止コドンは、同じ停止コドンであり得る。一部の実施形態では、少なくとも 2 つの未成熟停止コドンは、異なる停止コドンであり得る。一部の実施形態では、操作された tRNA 変異体は、リジル tRNA、アルギニル tRNA、ヒスチジル tRNA、グリシル tRNA、アラニル tRNA、バリル tRNA、ロイシル tRNA、イソロイシル tRNA、メチオニル tRNA、フェニルアラニル tRNA、トリプトファニル tRNA、プロリル tRNA、セリル tRNA、スレオニル tRNA、システイニル tRNA、チロシル tRNA、アスパラギニル tRNA、グルタミニル tRNA、アスパルチル tRNA、ピロールリジル tRNA、セレノシスチル tRNA またはグルタミル tRNA であり得る。一部の実施形態では、操作された tRNA 変異体は、操作された tRNA 前駆体であり得る。一部の実施形態では、操作された tRNA 変異体は、イントロン配列を含むことができる。一部の実施形態では、イントロン配列は、操作された tRNA 変異体を含有する細胞内でスプライシングされ、これにより、成熟な操作された tRNA 変異体を産生することができる。一部の実施形態では、対象はヒトであり得る。一部の実施形態では、ヒトは、およそ生誕時～約 40 歳の年齢であり得る。一部の実施形態では、ヒトは、約 6 月齢～約 15 歳の年齢であり得る。一部の実施形態では、ヒトは、胚または

10

20

30

40

50

胎児であり得る。一部の実施形態では、疾患または状態は、レット症候群を含み得る。一部の実施形態では、疾患または状態は、嚢胞性線維症を含み得る。一部の実施形態では、疾患または状態は、網膜色素変性症を含み得る。一部の実施形態では、疾患または状態は、難聴を含み得る。一部の実施形態では、難聴は、常染色体優性 17 難聴、常染色体優性 13 難聴、または常染色体優性 11 難聴を含み得る。一部の実施形態では、未成熟停止コドンは、オパール停止コドンであり得る。

【0007】

一部の実施形態では、投与することは、経口投与すること、直腸投与すること、または非経口投与することであり得る。一部の実施形態では、投与することは、非経口投与することであり得、非経口投与することは、静脈内投与すること、動脈内投与すること、くも膜下腔内投与すること、眼内投与すること、耳に投与すること、脳室内投与すること、頭蓋内、実質への頭蓋内、または腹腔内投与することであり得る。一部の実施形態では、ポリペプチドは、MeCP2 ポリペプチドを含むことができる。一部の実施形態では、ポリペプチドは、FoxG1 ポリペプチドを含むことができる。一部の実施形態では、ポリペプチドは、CDKL5 ポリペプチドを含むことができる。一部の実施形態では、ポリペプチドは、MYH9 ポリペプチドを含むことができる。一部の実施形態では、ポリペプチドは、COL11A2 ポリペプチドを含むことができる。一部の実施形態では、ポリペプチドは、MYO7A ポリペプチドを含むことができる。一部の実施形態では、投与は、期間中、少なくとも 2 回行うことができる。一部の実施形態では、期間は、約 24 時間であり得る。一部の実施形態では、方法は、疾患または状態を予防する方法であり得、予防は、操作された tRNA 変異体または操作された tRNA 変異体をコードするポリヌクレオチドの対象への予防投与を含み得る。一部の実施形態では、操作された tRNA 変異体をコードするポリヌクレオチドを、対象に投与することができる。一部の実施形態では、ベクターは、ウイルスベクターであり得る。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター、またはレンチウイルスベクターであり得る。一部の実施形態では、AAV ベクターは、複製遺伝子を含むゲノムならびに第 1 の AAV 血清型由来の逆位末端反復および第 2 の AAV 血清型由来のキャプシドタンパク質を含むことができる。一部の実施形態では、AAV ベクターは、AAV2/5 ベクター、AAV2/6 ベクター、AAV2/7 ベクター、AAV2/8 ベクター、または AAV2/9 ベクターを含み得る。一部の実施形態では、AAV ベクターは、AAV2/5 ベクターであり得る。一部の実施形態では、操作された tRNA 変異体または操作された tRNA をコードするポリヌクレオチドは、デリバリーシステムに存在することができる。一部の実施形態では、デリバリーシステムは、リポソーム、荷電ポリマー、非荷電ポリマー、ナノ粒子、界面活性剤、浸透増量剤、遺伝子導入剤、リン脂質、ミセル、合成ベクター、高分子、デンドリマー、生体高分子、ウイルス粒子、または任意のその組合せを含むことができる。一部の実施形態では、方法は、(i) 動員領域および (ii) 標的化領域を含む RNA 編集ポリヌクレオチドを含むか、またはコードするポリヌクレオチド配列を含む組成物を投与することをさらに含むことができ、ポリヌクレオチド配列は、動員領域の少なくとも一部を介して編集実体を動員し、編集実体は、RNA 編集ポリヌクレオチド配列および mRNA と接触したとき、mRNA の未成熟停止コドンのヌクレオチドの塩基上で化学修飾を行い、これにより、未成熟停止コドンをセンスコドンに変換する。一部の実施形態では、編集実体は、(a) ADAR ポリペプチド；(b) APOBEC ポリペプチド；(c) (a) もしくは (b) の生物学的に活性なフラグメント；または (d) (c) の生物学的に活性なフラグメントを含む融合タンパク質を含むことができる。一部の実施形態では、疾患または状態は、レット症候群を含み得、mRNA は、MeCP2 ポリペプチドをコードし、未成熟停止コドンは、オパール停止コドンであり得、操作された tRNA 変異体は、アルギニル tRNA であり得、対象は、0~6 歳の年齢のヒトであり得、操作された tRNA 変異体が、対象に AAV ベクターとして投与されたとき、操作された tRNA 変異体は、MeCP2 ポリペプチドをコードする mRNA の翻訳中に、未成熟停止コドンのアルギニンセンスコドンへの解釈を少なくとも部分的に形質転換し、

10

20

30

40

50

実質的に全長の MeCP2 ポリペプチドを産生し、これにより、レット症候群を少なくとも一部、処置する。一部の実施形態では、操作された tRNA 変異体は、メチル基、フルオロ基、メトキシエチル基、エチル基、リン酸塩基、アミド基、エステル基、またはそれらの任意の組合せを含む化学修飾を含むことができる。一部の実施形態では、操作された tRNA 変異体、または操作された tRNA をコードするポリヌクレオチド変異体は、薬学的に許容される担体、賦形剤、希釈剤、または担体をさらに含む医薬単位投薬形態に含まれ得る。一部の実施形態では、対象は、疾患または状態を有するとの診断を受けた。一部の実施形態では、診断は、インビトロ診断検査によって決定された。

【0008】

本開示の別の態様は、組成物を提供する。組成物は、配列番号 3～22 のいずれかに提供される配列に関して、1 つまたは複数の突然変異を含む操作された tRNA 変異体を含むことができる。一部の実施形態では、操作された tRNA 変異体は、配列番号 23～配列番号 48 のいずれか 1 つと少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 92 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 %、少なくとも 99 %、または 100 % の配列同一性を含むことができる。一部の実施形態では、操作された tRNA 変異体は、配列番号 1 と少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 92 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 %、少なくとも 99 %、または 100 % の配列同一性を含むことができる。一部の実施形態では、操作された tRNA 変異体は、配列番号 2 と少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 92 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 %、少なくとも 99 %、または 100 % の配列同一性を含むことができる。本開示の別の態様は、組成物を提供し、組成物は、操作された tRNA 変異体または操作された tRNA 変異体をコードするポリヌクレオチドを含むことができ、操作された tRNA 変異体は、配列番号 3～22 のいずれかに提供される配列を含む参照 tRNA と比較して、操作された tRNA の配列における 1 つまたは複数の突然変異を含むことができ、操作された tRNA 変異体は、ポリペプチドをコードする mRNA における未成熟停止コドンを確認し、mRNA の翻訳中に、未成熟停止コドンのセンスコドンへの解釈を少なくとも部分的に形質転換して、実質的に全長のポリペプチドを産生する。一部の実施形態では、操作された tRNA 変異体は、配列番号 6 と少なくとも 70 % 同一であり得る配列を含むことができ、配列番号 6 の配列の 2、4、6、12、23、27、28、31、39、40、42、43、44、46、49、50、64、65、67、69、または 71 位において置換を含むことができる。一部の実施形態では、2 位での置換は、C への置換であり得るか、4 位での置換は、C への置換であり得るか、6 位での置換は、T への置換であり得るか、6 位での置換は、A への置換であり得るか、12 位での置換は、C への置換であり得るか、23 位での置換は、G への置換であり得るか、27 位での置換は、C への置換であり得るか、28 位での置換は、C への置換であり得るか、31 位での置換は、C への置換であり得るか、39 位での置換は、G への置換であり得るか、40 位での置換は、C への置換であり得るか、42 位での置換は、G への置換であり得るか、43 位での置換は、G への置換であり得るか、44 位での置換は、G への置換であり得るか、46 位での置換は、A への置換であり得るか、49 位での置換は、G への置換であり得るか、50 位での置換は、T への置換であり得るか、64 位での置換は、A への置換であり得るか、65 位での置換は、C への置換であり得るか、67 位での置換は、A への置換であり得るか、67 位での置換は、T への置換であり得るか、69 位での置換は、G への置換であり得るか、71 位での置換は、C への置換であり得るか、または 71 位での置換は、G への置換であり得る。一部の実施形態では、操作された tRNA 変異体の配列は、複数の置換を含むことができる。一部の実施形態では、操作された tRNA 変異体の配列は、置換（複数可）を除いて、配列番号 6 の配列に対して同一であり得る。一部の実施形態では、操作された tRNA 変異体は、プロキシ測定、半減期測定、アミノ酸変換効率測定、またはシンターゼもしくはリボソーム機構への結合の測定によって決定した場合、配列番号 6 に提供される配列を含む同等の tRNA と比較して、インビボで安定性の増加を示す。一部の実

10

20

30

40

50

施形態では、操作された tRNA 変異体は、配列番号 3 と少なくとも 70% 同一であり得る配列を含むことができ、配列番号 3 の 2、6、13、15、22、28、31、37、39、42、44、50、64、67、71、または 72 に置換を含むことができる。一部の実施形態では、2 位での置換は、G への置換であり得るか、6 位での置換は、G への置換であり得るか、13 位での置換は、C への置換であり得るか、15 位での置換は、G への置換であり得るか、22 位での置換は、G への置換であり得るか、28 位での置換は、C への置換であり得るか、31 位での置換は、A への置換であり得るか、37 位での置換は、G への置換であり得るか、39 位での置換は、T への置換であり得るか、42 位での置換は、G への置換であり得るか、44 位での置換は、A への置換であり得るか、50 位での置換は、C への置換であり得るか、64 位での置換は、G への置換であり得るか、67 位での置換は、C への置換であり得るか、71 位での置換は、C への置換であり得るか、または 72 位での置換は、C への置換であり得る。一部の実施形態では、操作された tRNA 変異体の配列は、複数の置換を含むことができる。一部の実施形態では、操作された tRNA 変異体の配列は、置換（複数可）を除いて、配列番号 3 と同一であり得る。一部の実施形態では、操作された tRNA 変異体は、プロキシ測定、半減期測定、アミノ酸荷電効率測定、またはシンテターゼもしくはリボソーム機構への結合の測定によって決定される、配列番号 3 において提供される配列を含む比較可能な tRNA と比較して、インビボで増加した安定性を示す。一部の実施形態では、操作された tRNA 変異体は、配列番号 5 と少なくとも 70% 同一であり得る配列を含むことができ、配列番号 5 の 73 位に置換を含むことができる。一部の実施形態では、73 位での置換は、G への置換であり得る。一部の実施形態では、操作された tRNA 変異体の配列は、複数の置換を含むことができる。一部の実施形態では、操作された tRNA 変異体の配列は、置換を除いて、配列番号 5 と同一であり得る。一部の実施形態では、操作された tRNA 変異体は、代理測定、半減期測定、アミノ酸荷電効率測定、または合成酵素もしくはリボソーム機構への結合の測定によって決定される、配列番号 5 において提供される配列を含む比較可能な tRNA と比較して、インビボで増加した安定性を示す。一部の実施形態では、1 つまたは複数の突然変異は、互いにワトソン・クリック塩基対形成しない操作された tRNA 変異体のアクセプターステムまたはアンチコドンステムにおける少なくとも 2 つのヌクレオチドの、ワトソン・クリック塩基対形成する少なくとも 2 つのヌクレオチドでの置換を含むことができる。一部の実施形態では、操作された tRNA 変異体は、配列番号 3 または参照 tRNA の 5' 末端に関して、ヌクレオチド 2 位にシトシンおよびヌクレオチド 71 位にグアニンを含むことができる。一部の実施形態では、1 つまたは複数の突然変異は、配列番号 3 または参照 tRNA の 5' 末端に関して、ヌクレオチド 72 位におけるチミンのシトシンでの置換を含むことができる。一部の実施形態では、1 つまたは複数の突然変異は、ヌクレオチド 22 位においてグアニンで置換されたシトシンおよびヌクレオチド 71 位においてシトシンで置換されたグアニンを含むことができ、ヌクレオチド 22 位およびヌクレオチド 71 位は、配列番号 3 または参照 tRNA の 5' 末端に関してであり得る。一部の実施形態では、1 つまたは複数の突然変異は、ヌクレオチド 6 位においてグアニンで置換されたアデニンおよびヌクレオチド 67 位においてシトシンで置換されたチミンを含むことができ、ヌクレオチド 6 位およびヌクレオチド 67 位は、配列番号 3 または参照 tRNA の 5' 末端に関してであり得る。一部の実施形態では、1 つまたは複数の突然変異は、ヌクレオチド 13 位においてシトシンで置換されたチミンおよびヌクレオチド 22 位においてグアニンで置換されたアデニンを含むことができ、ヌクレオチド 13 位およびヌクレオチド 22 位は、配列番号 3 または参照 tRNA の 5' 末端に関してであり得る。一部の実施形態では、1 つまたは複数の突然変異は、配列番号 3 または参照 tRNA の 5' 末端に関して、ヌクレオチド 15 位においてグアニンで置換されたアデニンを含むことができる。一部の実施形態では、1 つまたは複数の突然変異は、ヌクレオチド 28 位においてシトシンで置換されたチミンおよびヌクレオチド 42 位においてグアニンで置換されたアデニンを含むことができ、ヌクレオチド 28 位およびヌクレオチド 42 位は、配列番号 3 または参照 tRNA の 5' 末端に関してであり得る。一部の実施形態では、1 つまたは

10

20

30

40

50

複数の突然変異は、ヌクレオチド 31 位においてアデニンで置換されたシトシンおよびヌクレオチド 39 位においてチミンで置換されたグアニンを含むことができ、ヌクレオチド 31 位およびヌクレオチド 39 位は、配列番号 3 または参照 tRNA の 5' 末端に関してであり得る。一部の実施形態では、1 つまたは複数の突然変異は、配列番号 3 または参照 tRNA の 5' 末端に関して、ヌクレオチド 37 位においてグアニンで置換されたアデニンを含むことができる。一部の実施形態では、1 つまたは複数の突然変異は、配列番号 3 または参照 tRNA の 5' 末端に関して、ヌクレオチド 44 位においてアデニンで置換されたグアニンを含むことができる。一部の実施形態では、1 つまたは複数の突然変異は、配列番号 3 または参照 tRNA の 5' 末端に関して、ヌクレオチド 73 位においてグアニンで置換されたアデニンを含むことができる。一部の実施形態では、1 つまたは複数の突然変異は、ヌクレオチド 50 位においてチミンで置換されたシトシンおよびヌクレオチド 64 位においてアデニンで置換されたグアニンを含むことができ、ヌクレオチド 50 位およびヌクレオチド 64 位は、配列番号 4 または参照 tRNA の 5' 末端に関してであり得る。一部の実施形態では、1 つまたは複数の突然変異は、ヌクレオチド 50 位においてウラシルで置換されたシトシンおよびヌクレオチド 64 位においてアデニンで置換されたグアニンを含むことができ、ヌクレオチド 50 位およびヌクレオチド 64 位は、配列番号 104 または参照 tRNA の 5' 末端に関してであり得る。一部の実施形態では、1 つまたは複数の突然変異は、ヌクレオチド 6 位においてチミンで置換されたシトシンおよびヌクレオチド 67 位においてアデニンで置換されたグアニンを含むことができ、ヌクレオチド 6 位およびヌクレオチド 67 位は、配列番号 6 または参照 tRNA の 5' 末端に関してであり得る。一部の実施形態では、1 つまたは複数の突然変異は、ヌクレオチド 49 位においてグアニンで置換されたシトシンおよびヌクレオチド 65 位においてシトシンで置換されたグアニンを含むことができ、ヌクレオチド 49 位およびヌクレオチド 65 位は、配列番号 6 または参照 tRNA の 5' 末端に関してであり得る。一部の実施形態では、1 つまたは複数の突然変異は、ヌクレオチド 50 位においてチミンで置換されたシトシンおよびヌクレオチド 64 位においてアデニンで置換されたグアニンを含むことができ、ヌクレオチド 50 位およびヌクレオチド 64 位は、配列番号 106 または参照 tRNA の 5' 末端に関してであり得る。一部の実施形態では、1 つまたは複数の突然変異は、配列番号 6 または参照 tRNA の 5' 末端に関して、ヌクレオチド 71 位においてグアニンで置換されたチミンを含むことができる。一部の実施形態では、1 つまたは複数の突然変異は、ヌクレオチド 4 位においてシトシンで置換されたチミンおよびヌクレオチド 69 位においてグアニンで置換されたアデニンを含むことができ、ヌクレオチド 4 位およびヌクレオチド 69 位は、配列番号 6 または参照 tRNA の 5' 末端に関してであり得る。一部の実施形態では、1 つまたは複数の突然変異は、ヌクレオチド 6 位においてアデニンで置換されたシトシンおよびヌクレオチド 67 位においてチミンで置換されたグアニンを含むことができ、ヌクレオチド 6 位およびヌクレオチド 67 位は、配列番号 6 または参照 tRNA の 5' 末端に関してであり得る。一部の実施形態では、1 つまたは複数の突然変異は、ヌクレオチド 12 位においてシトシンで置換されたグアニンおよびヌクレオチド 23 位においてグアニンで置換されたシトシンを含むことができ、ヌクレオチド 12 位およびヌクレオチド 23 位は、配列番号 6 または参照 tRNA の 5' 末端に関してであり得る。一部の実施形態では、1 つまたは複数の突然変異は、ヌクレオチド 27 位においてシトシンで置換されたチミンおよびヌクレオチド 43 位においてグアニンで置換されたアデニンを含むことができ、ヌクレオチド 27 位およびヌクレオチド 43 位は、配列番号 6 または参照 tRNA の 5' 末端に関してであり得る。一部の実施形態では、1 つまたは複数の突然変異は、ヌクレオチド 28 位においてシトシンで置換されたチミンおよびヌクレオチド 42 位においてグアニンで置換されたアデニンを含むことができ、ヌクレオチド 28 位およびヌクレオチド 42 位は、配列番号 6 または参照 tRNA

10

20

30

40

50

NAの5'末端に関してであり得る。一部の実施形態では、1つまたは複数の突然変異は、配列番号6または参照tRNAの5'末端に関して、ヌクレオチド40位においてシトシンで置換されたチミンを含むことができる。一部の実施形態では、1つまたは複数の突然変異は、ヌクレオチド31位においてシトシンで置換されたアデニンおよびヌクレオチド39位においてグアニンで置換されたチミンを含むことができ、ヌクレオチド31位およびヌクレオチド39位は、配列番号6または参照tRNAの5'末端に関してであり得る。一部の実施形態では、1つまたは複数の突然変異は、配列番号6または参照tRNAの5'末端に関して、ヌクレオチド44位においてグアニンで置換されたアデニンを含むことができる。一部の実施形態では、1つまたは複数の突然変異は、配列番号6または参照tRNAの5'末端に関して、ヌクレオチド46位においてアデニンで置換されたグアニンを含むことができる。一部の実施形態では、ポリペプチドは、(a)操作されたtRNAまたはその変異体をコードする第1のベクターおよび第1の緑色蛍光タンパク質をコードするスクリーニングmRNAをコードする第2のベクターを第1のヒト細胞にトランスフェクトすること、第1の緑色蛍光タンパク質をコードするスクリーニングmRNAは、未成熟停止コドンを含むことができる；(b)第2の緑色蛍光タンパク質をコードする同等のスクリーニングmRNAをコードする第3のベクターを第2のヒト細胞にトランスフェクトすること、同等のスクリーニングmRNAは、未成熟停止コドンを含まない；および(c)第1のヒト細胞から放出される蛍光の量と第2のヒト細胞から放出される蛍光の量を比較することによって決定される、未成熟停止コドンが欠如する同等のmRNAを使用して産生される同等のポリペプチドと比べて、少なくとも約10%の効率で産生することができる。一部の実施形態では、ポリペプチドは、未成熟停止コドンが欠如する同等のmRNAを使用して産生される同等のポリペプチドと比べて、少なくとも約80%の効率で産生し、これにより、対象における疾患または状態を少なくとも一部、処置することができる。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、リジン、アルギニン、ヒスチジン、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、プロリン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ピロリジン、およびセレノシステインからなる群から選択されるアミノ酸でアシル化することができる。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、非標準アミノ酸でアシル化することができる。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、mRNAの翻訳中に、インビボで未成熟停止コドンに応答して、アミノ酸を、mRNAによってコードされる新生MeCP2ポリペプチド鎖に挿入し、アミノ酸は、挿入されたとき、未成熟停止コドンが欠如する同等のmRNAを使用して産生される同等のMeCP2ポリペプチドと比較して、少なくとも一部の機能的なMeCP2ポリペプチドを産生するのに十分であり得る。一部の実施形態では、mRNAは、少なくとも2つの未成熟停止コドンを含むことができる。一部の実施形態では、少なくとも2つの未成熟停止コドンは、同じ停止コドンであり得る。一部の実施形態では、少なくとも2つの未成熟停止コドンは、異なる停止コドンであり得る。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、リジルtRNA、アルギニルtRNA、ヒスチジルtRNA、グリシルtRNA、アラニルtRNA、バリルtRNA、ロイシルtRNA、イソロイシルtRNA、メチオニルtRNA、フェニルアラニルtRNA、トリプトファニルtRNA、プロリルtRNA、セリルtRNA、スレオニルtRNA、システニルtRNA、チロシルtRNA、アスパラギニルtRNA、グルタミニルtRNA、アスパルチルtRNA、ピロールリジルtRNA、セレノシスチルtRNAまたはグルタミルtRNAであり得る。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、操作されたtRNA前駆体であり得る。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、イントロン配列を含むことができる。一部の実施形態では、イントロン配列は、操作されたtRNA変異体を含有する細胞内でスプライシングされ、これにより、成熟な操作されたtRNA変異体を産生することができる。一部の実施形態では、対象はヒトであり得る。一部の実施形態では、ヒトは、およそ生誕時~約40歳の年齢であり得る。一部の実施形態では、ヒトは、約6月齢~約15歳の年齢であり得る。一部の実施形態では、

10

20

30

40

50

ヒトは、胚または胎児であり得る。一部の実施形態では、疾患または状態は、レット症候群を含み得る。一部の実施形態では、疾患または状態は、嚢胞性線維症を含み得る。一部の実施形態では、疾患または状態は、網膜色素変性症を含み得る。一部の実施形態では、疾患または状態は、難聴を含み得る。一部の実施形態では、難聴は、常染色体優性17難聴、常染色体優性13難聴、または常染色体優性11難聴を含み得る。一部の実施形態では、未成熟停止コドンは、オパール停止コドンであり得る。一部の実施形態では、投与することは、経口投与すること、直腸投与すること、または非経口投与することであり得る。一部の実施形態では、投与することは、非経口投与することであり得、非経口投与することは、静脈内投与すること、動脈内投与すること、くも膜下腔内投与すること、眼内投与すること、耳に投与すること、脳室内投与すること、または腹腔内投与することであり得る。一部の実施形態では、ポリペプチドは、MeCP2ポリペプチドを含むことができる。一部の実施形態では、ポリペプチドは、FoxG1ポリペプチドを含むことができる。一部の実施形態では、ポリペプチドは、CDKL5ポリペプチドを含むことができる。一部の実施形態では、ポリペプチドは、MYH9ポリペプチドを含むことができる。一部の実施形態では、ポリペプチドは、COL11A2ポリペプチドを含むことができる。一部の実施形態では、ポリペプチドは、MYO7Aポリペプチドを含むことができる。一部の実施形態では、投与は、期間中、少なくとも2回行うことができる。一部の実施形態では、期間は、約24時間であり得る。一部の実施形態では、組成物は、疾患または状態を予防する組成物であり得、予防は、操作されたtRNA変異体または操作されたtRNA変異体をコードするポリヌクレオチドの対象への予防投与を含み得る。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体をコードするポリヌクレオチドを、対象に投与することができる。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、ウイルスベクターであり得る。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、またはレンチウイルスベクターであり得る。一部の実施形態では、AAVベクターは、複製遺伝子を含むゲノムならびに第1のAAV血清型由来の逆位末端反復および第2のAAV血清型由来のキャプシドタンパク質を含むことができる。一部の実施形態では、AAVベクターは、AAV2/5ベクター、AAV2/6ベクター、AAV2/7ベクター、AAV2/8ベクター、またはAAV2/9ベクターを含み得る。一部の実施形態では、AAVベクターは、AAV2/5ベクターであり得る。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体または操作されたtRNAをコードするポリヌクレオチドは、デリバリーシステムに存在することができる。一部の実施形態では、デリバリーシステムは、リボソーム、荷電ポリマー、非荷電ポリマー、ナノ粒子、界面活性剤、侵入エンハンサー、遺伝子導入剤、リン脂質、ミセル、合成ベクター、高分子、デンドリマー、バイオポリマー、ウイルス粒子、または任意のその組合せを含むことができる。一部の実施形態では、組成物は、ポリヌクレオチド配列、またはポリヌクレオチド配列をコードするベクターを含む組成物を投与することをさらに含むことができ、ポリヌクレオチド配列は、(i)動員領域および(ii)標的化領域を含むことができ、ポリヌクレオチド配列は、動員領域の少なくとも一部を介して編集実体を動員し、編集実体は、ポリヌクレオチド配列およびmRNAと接触したとき、mRNAの未成熟停止コドンのヌクレオチドの塩基上で化学修飾を行い、これにより、未成熟停止コドンセンスコドンに変換する。一部の実施形態では、編集実体は、(a)ADARポリペプチド；(b)APOBECポリペプチド；(c)(a)もしくは(b)の生物学的に活性なフラグメント；または(d)(c)の生物学的に活性なフラグメントを含む融合タンパク質を含むことができる。一部の実施形態では、疾患または状態は、レット症候群を含み得、mRNAは、MeCP2ポリペプチドをコードし、未成熟停止コドンは、オパール停止コドンであり得、操作されたtRNA変異体は、アルギニルtRNAであり得、対象は、0~6歳の年齢のヒトであり得、操作されたtRNA変異体が、対象にAAVベクターとして投与されたとき、操作されたtRNA変異体は、MeCP2ポリペプチドをコードするmRNAの翻訳中に、未成熟停止コドンのアルギニンセンスコドンへの解釈を少なくとも部分的に形質転換し、実質的に全長のMeCP2ポリペプチドを産生し、これにより、レット症候群を少なくとも一部

10

20

30

40

50

、処置する。一部の実施形態では、操作された tRNA 変異体は、メチル基、フルオロ基、メトキシエチル基、エチル基、リン酸塩基、アミド基、エステル基、またはそれらの任意の組合せを含む化学修飾を含むことができる。一部の実施形態では、組成物は、単離することができる。本開示の別の態様は、医薬組成物を提供し、医薬組成物は、本明細書で述べられる組成物のいずれか、および薬学的に許容される賦形剤、希釈剤、または担体を含むことができる。本開示の別の態様は、本明細書で述べられる組成物のいずれかを含む、単離された細胞を提供する。本開示の別の態様は、本明細書で述べられる組成物のいずれかを含む、単離された複数の細胞を提供する。本開示の別の態様は、本明細書で述べられる組成物のいずれかの、操作された tRNA 変異体、または操作された tRNA をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。一部の実施形態では、ベクターは、（例えば、5' から 3' の順に）：（a）第 1 のプロモーター；（b）第 1 の定量カセット；（c）第 2 のプロモーター；（d）第 2 の定量カセット；（e）第 3 のプロモーター；（f）操作された tRNA をコードするポリヌクレオチドを含む導入遺伝子；または（g）検出可能なポリペプチドをコードするレポーター遺伝子を適宜さらに含むことができる。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、プロモーターの 5' ITR 上流およびレポーター遺伝子の 3' ITR 下流をさらに含むことができる。一部の実施形態では、本明細書において、検出可能なポリペプチドは、mCherry、緑色蛍光タンパク質（GFP）、または β -ガラクトシダーゼを含むことができる。一部の実施形態では、本明細書において、第 1 のプロモーターおよび第 2 のプロモーターは、U6 プロモーターであり得、U6 プロモーターは、適宜メチル化することができるか、または U6 プロモーターは、適宜マウス U6 プロモーターであり得る。一部の実施形態では、本明細書において、第 3 のプロモーターは、ヒトサイトメガロウイルス（CMV）プロモーターであり得る。一部の実施形態では、ベクターは、精製し、単離することができる。

10

20

30

40

50

【0009】

一部の実施形態は、（a）本明細書で述べられる組成物のいずれか、本明細書で述べられる医薬組成物、本明細書で述べられる単離された細胞（複数可）、または本明細書で述べられるベクター；および（b）組成物を保存するために設計された容器を含むキットに関する。

【0010】

本開示の別の態様は、本明細書で述べられるベクターを生成する方法を提供し、方法は、操作された tRNA 変異体、または操作された tRNA をコードするポリヌクレオチドを、骨格ベクター配列の導入遺伝子に導入することを含む。

【0011】

本開示の別の態様は、本明細書に記載される医薬組成物を生成する方法を提供し、方法は、操作された tRNA 変異体、または操作された tRNA 変異体をコードするポリヌクレオチドを、薬学的に許容される賦形剤、希釈剤、または担体に導入することを含む。

【0012】

それを必要とする対象における疾患または状態を処置する方法が、本明細書に開示される。一部の実施形態では、方法は、対象に、操作された tRNA または操作された tRNA をコードするベクターを投与することを含むことができる。一部の実施形態では、操作された tRNA は、ポリペプチドをコードする mRNA における未成熟停止コドンを認識することができる。一部の実施形態では、操作された tRNA は、mRNA の翻訳中に、未成熟停止コドンのセンスコドンへの解釈を少なくとも部分的に形質転換することができる、未成熟停止コドンが欠如する同等の mRNA を使用して産生される同等のポリペプチドと比べて、約 1%～約 100%（例えば、少なくとも約 80%）の効率で、実質的に全長のポリペプチドを産生することができる。一部の実施形態では、効率は、（a）操作された tRNA をコードする第 1 のベクターおよび第 1 の緑色蛍光タンパク質をコードするスクリーニング mRNA をコードする第 2 のベクターを第 1 のヒト細胞にトランスフェクトすること、第 1 の緑色蛍光タンパク質をコードするスクリーニング mRNA は、未成熟停止コドンを含むことができる；（b）第 2 の緑色蛍光タンパク質をコードする同等のスク

リーニング mRNA をコードする第 3 のベクターを第 2 のヒト細胞にトランスフェクトすること、同等のスクリーニング mRNA は、未成熟停止コドンを含まなくてもよい；および (c) 第 1 のヒト細胞から放出される蛍光の量と第 2 のヒト細胞から放出される蛍光の量を比較することによって決定することができる。一部の実施形態では、操作された tRNA は、リジン、アルギニン、ヒスチジン、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、プロリン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ピロリジン、およびセレノシステインからなる群から選択されるアミノ酸でアシル化することができる。一部の実施形態では、操作された tRNA は、非標準アミノ酸でアシル化することができる。一部の実施形態では、操作された tRNA は、mRNA の翻訳中に、インビボで未成熟停止コドンに応答して、アミノ酸を、mRNA によってコードされる新生 MeCP2 ポリペプチド鎖に挿入することができ、アミノ酸は、挿入されたとき、未成熟停止コドンが欠如する同等の mRNA を使用して産生される同等の MeCP2 ポリペプチドと比較して、少なくとも一部の機能的な MeCP2 ポリペプチドを産生するのに十分であり得る。一部の実施形態では、mRNA は、少なくとも 2 つの未成熟停止コドンを含むことができる。一部の実施形態では、少なくとも 2 つの未成熟停止コドンは、同じ停止コドンであり得る。一部の実施形態では、少なくとも 2 つの未成熟停止コドンは、異なる停止コドンであり得る。一部の実施形態では、操作された tRNA は、リジル tRNA、アルギニル tRNA、ヒスチジル tRNA、グリシル tRNA、アラニル tRNA、バリル tRNA、ロイシル tRNA、イソロイシル tRNA、メチオニル tRNA、フェニルアラニル tRNA、トリプトファニル tRNA、プロリル tRNA、セリル tRNA、スレオニル tRNA、システニル tRNA、チロシル tRNA、アスパラギニル tRNA、グルタミル tRNA、ピロールリジル tRNA、セレノシチル tRNA、アスパルチル tRNA、またはグルタミル tRNA であり得る。一部の実施形態では、操作された tRNA は、操作された tRNA 前駆であり得る。一部の実施形態では、操作された tRNA は、イントロン配列を含むことができる。一部の実施形態では、イントロン配列は、操作された tRNA を含有する細胞内でスプライシングされ、これにより、成熟な操作された tRNA を産生することができる。一部の実施形態では、対象は、ヒトであり得る。一部の実施形態では、ヒトは、およそ生誕時～約 40 歳の年齢であり得る。一部の実施形態では、ヒトは、約 6 月齢～約 15 歳の年齢であり得る。一部の実施形態では、ヒトは、胚または胎児であり得る。一部の実施形態では、疾患または状態は、レット症候群を含み得る。一部の実施形態では、疾患または状態は、嚢胞性線維症を含み得る。一部の実施形態では、疾患または状態は、網膜色素変性症を含み得る。一部の実施形態では、疾患または状態は、難聴を含み得る。一部の実施形態では、難聴は、常染色体優性 17 難聴、常染色体優性 13 難聴、または常染色体優性 11 難聴を含み得る。一部の実施形態では、未成熟停止コドンは、オパール停止コドンであり得る。一部の実施形態では、投与することは、経口投与すること、直腸投与すること、または非経口投与することであり得る。一部の実施形態では、投与することは、非経口投与することであり得、非経口投与することは、静脈内投与すること、動脈内投与すること、くも膜下腔内投与すること、眼内投与すること、耳に投与すること、脳室内投与すること、または腹腔内投与することであり得る。一部の実施形態では、ポリペプチドは、MeCP2 ポリペプチドを含むことができる。一部の実施形態では、ポリペプチドは、FoxG1 ポリペプチドを含むことができる。一部の実施形態では、ポリペプチドは、CDKL5 ポリペプチドを含むことができる。一部の実施形態では、ポリペプチドは、MYH9 ポリペプチドを含むことができる。一部の実施形態では、ポリペプチドは、COL11A2 ポリペプチドを含むことができる。一部の実施形態では、ポリペプチドは、MYO7A ポリペプチドを含むことができる。一部の実施形態では、投与は、期間中、少なくとも 2 回行うことができる。一部の実施形態では、期間は、約 24 時間であり得る。一部の実施形態では、方法は、疾患または状態を予防する方法であり得、予防は、操作された tRNA または操作された tRNA をコードするベクターの対象への予防投与を含み得る。一部の実施形態では、操作された tRNA

10

20

30

40

50

をコードするベクターを、対象に投与することができる。一部の実施形態では、ベクターは、ウイルスベクターであり得る。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、またはレンチウイルスベクターであり得る。一部の実施形態では、操作された tRNA または tRNA をコードするベクターは、デリバリーシステムに存在することができる。一部の実施形態では、デリバリーシステムは、リボソーム、荷電ポリマー、非荷電ポリマー、ナノ粒子、界面活性剤、浸透増強剤、遺伝子導入剤、リン脂質、ミセル、合成ベクター、高分子、デンドリマー、生体高分子、ウイルス粒子、またはそれらの任意の組合せを含むことができる。一部の実施形態では、方法は、ポリヌクレオチド配列、またはポリヌクレオチド配列をコードするベクターを含む組成物を投与することをさらに含むことができ、ポリヌクレオチド配列は、(i) 動員領域および (ii) 標的化領域を含むことができ、ポリヌクレオチド配列は、動員領域の少なくとも一部を介して編集実体を動員することができ、編集実体は、ポリヌクレオチド配列および mRNA と接触したとき、mRNA の未成熟停止コドンのヌクレオチドの塩基上で化学修飾を行い、これにより、未成熟停止コドンをセンスコドンに変換することができる。一部の実施形態では、編集実体は、ADAR ポリペプチドまたは APOBEC ポリペプチドであり得る。一部の実施形態では、疾患または状態は、レット症候群を含むことができ、mRNA は、MeCP2 ポリペプチドをコードすることができ、停止コドンは、オパール停止コドンであり得、操作された tRNA は、アルギニル tRNA であり得、対象は、0 ~ 6 歳の年齢のヒトであり得、操作された tRNA が、対象に AAV ベクターとして投与され得るとき、操作された tRNA は、MeCP2 ポリペプチドをコードする mRNA の翻訳中に、未成熟停止コドンのアルギニンセンスコドンへの解釈を少なくとも部分的に形質転換することができ、実質的に全長の MeCP2 ポリペプチドを産生し、これにより、レット症候群を少なくとも一部処置することができる。

10

20

30

40

50

【0013】

それを必要とする対象における疾患または状態を処置する方法もまた、本明細書に開示される。一部の実施形態では、方法は、対象に、操作された tRNA または操作された tRNA をコードするベクターを投与することを含むことができる。一部の実施形態では、操作された tRNA は、ポリペプチドをコードする mRNA における未成熟停止コドンを認識することができる。一部の実施形態では、操作された tRNA は、mRNA の翻訳中に、未成熟停止コドンのセンスコドンへの解釈を少なくとも部分的に形質転換することができ、未成熟停止コドンが欠如する同等の mRNA を使用して産生される同等のポリペプチドと比べて、少なくとも約 10 % の効率で、インビボで実質的に全長のポリペプチドを産生し、これにより、対象における疾患または状態を少なくとも一部、処置する。一部の実施形態では、操作された tRNA は、リジン、アルギニン、ヒスチジン、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、プロリン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ピロリジン、およびセレノシステインからなる群から選択されるアミノ酸でアシル化することができる。一部の実施形態では、操作された tRNA は、非標準アミノ酸でアシル化することができる。一部の実施形態では、操作された tRNA は、mRNA の翻訳中に、インビボで未成熟停止コドンに応答して、アミノ酸を、mRNA によってコードされる新生 MeCP2 ポリペプチド鎖に挿入することができ、アミノ酸は、挿入されたとき、未成熟停止コドンが欠如する同等の mRNA を使用して産生される同等の MeCP2 ポリペプチドと比較して、少なくとも一部の機能的な MeCP2 ポリペプチドを産生するのに十分であり得る。一部の実施形態では、mRNA は、少なくとも 2 つの未成熟停止コドンを含むことができる。一部の実施形態では、少なくとも 2 つの未成熟停止コドンは、同じ停止コドンであり得る。一部の実施形態では、少なくとも 2 つの未成熟停止コドンは、異なる停止コドンであり得る。一部の実施形態では、操作された tRNA は、リジル tRNA、アルギニル tRNA、ヒスチジル tRNA、グリシル tRNA、アラニル tRNA、バリル tRNA、ロイシル tRNA、イソロイシル tRNA、メチオニル tRNA、フェニルアラニル tRNA、トリプトファニル tRNA、

プロリル tRNA、セリル tRNA、スレオニル tRNA、システイニル tRNA、チロシル tRNA、アスパラギニル tRNA、グルタミニル tRNA、アスパルチル tRNA、ピロールリジル tRNA、セレノシスチル tRNA または グルタミル tRNA であり得る。一部の実施形態では、操作された tRNA は、操作された tRNA 前駆であり得る。一部の実施形態では、操作された tRNA は、イントロン配列を含むことができる。一部の実施形態では、イントロン配列は、操作された tRNA を含有する細胞内でスプライシングされ、これにより、成熟な操作された tRNA を産生することができる。一部の実施形態では、対象は、ヒトであり得る。一部の実施形態では、ヒトは、およそ生誕時～約 40 歳の年齢であり得る。一部の実施形態では、ヒトは、約 6 月齢～約 15 歳の年齢であり得る。一部の実施形態では、ヒトは、胚または胎児であり得る。一部の実施形態では、疾患または状態は、レット症候群を含み得る。一部の実施形態では、疾患または状態は、嚢胞性線維症を含み得る。一部の実施形態では、疾患または状態は、網膜色素変性症を含み得る。一部の実施形態では、疾患または状態は、難聴を含み得る。一部実施形態では、難聴は、常染色体優性 17 難聴、常染色体優性 13 難聴、または常染色体優性 11 難聴を含み得る。一部の実施形態では、停止コドンは、オパール停止コドンであり得る。一部の実施形態では、投与することは、経口投与すること、直腸投与すること、または非経口投与することであり得る。一部の実施形態では、投与することは、非経口投与することであり得、非経口投与することは、静脈内投与すること、動脈内投与すること、くも膜下腔内投与すること、眼内投与すること、耳に投与すること、脳室内投与すること、または腹腔内投与することであり得る。一部の実施形態では、ポリペプチドは、MeCP2 ポリペプチドを含むことができる。一部の実施形態では、ポリペプチドは、FoxG1 ポリペプチドを含むことができる。一部の実施形態では、ポリペプチドは、CDKL5 ポリペプチドを含むことができる。一部の実施形態では、ポリペプチドは、MYH9 ポリペプチドを含むことができる。一部の実施形態では、ポリペプチドは、COL11A2 ポリペプチドを含むことができる。一部の実施形態では、ポリペプチドは、MYO7A ポリペプチドを含むことができる。一部の実施形態では、投与は、期間中、少なくとも 2 回行うことができる。一部の実施形態では、期間は、約 24 時間であり得る。一部の実施形態では、方法は、疾患または状態を予防する方法であり得、予防は、操作された tRNA または操作された tRNA をコードするベクターの対象への予防投与を含み得る。一部の実施形態では、操作された tRNA をコードするベクターを、対象に投与することができる。一部の実施形態では、ベクターは、ウイルスベクターであり得る。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、またはレンチウイルスベクターであり得る。一部の実施形態では、操作された tRNA または tRNA をコードするベクターは、デリバリーシステムに存在することができる。一部の実施形態では、デリバリーシステムは、リポソーム、荷電ポリマー、非荷電ポリマー、ナノ粒子、界面活性剤、浸透増強剤、遺伝子導入剤、リン脂質、ミセル、合成ベクター、高分子、デンドリマー、生体高分子、ウイルス粒子、またはそれらの任意の組合せを含むことができる。一部の実施形態では、方法は、ポリヌクレオチド配列、またはポリヌクレオチド配列をコードするベクターを含む組成物を投与することをさらに含むことができ、ポリヌクレオチド配列は、(i) 動員領域および (ii) 標的化領域を含むことができ、ポリヌクレオチド配列は、動員領域の少なくとも一部を介して編集実体を動員することができ、編集実体は、ポリヌクレオチド配列および mRNA と接触したとき、mRNA の未成熟停止コドンのヌクレオチドの塩基上で化学修飾を行い、これにより、未成熟停止コドンをセンスコドンに変換することができる。一部の実施形態では、編集実体は、ADAR ポリペプチドまたは APOBEC ポリペプチドであり得る。一部の実施形態では、疾患または状態は、レット症候群を含むことができ、mRNA は、MeCP2 ポリペプチドをコードすることができ、停止コドンは、オパール停止コドンであり得、操作された tRNA は、アルギニル tRNA であり得、対象は、0～6 歳の年齢のヒトであり得、操作された tRNA が、対象に AA V ベクターとして投与され得るとき、操作された tRNA は、MeCP2 ポリペプチドをコードする mRNA の翻訳中に、未成熟停止コドンのアルギニンセンスコドンへの

10

20

30

40

50

解釈を少なくとも部分的に形質転換することができ、実質的に全長の M e C P 2 ポリペプチドを産生し、これにより、レット症候群を少なくとも一部処置することができる。

【0014】

操作された tRNA または操作された tRNA をコードするベクター；および賦形剤、希釈剤、または担体を含むことができる組成物もまた、本明細書に開示される。一部の実施形態では、操作された tRNA は、ポリペプチドをコードする mRNA における未成熟停止コドンを確認することができる。一部の実施形態では、操作された tRNA は、mRNA の翻訳中に、未成熟停止コドンのセンスコドンへの解釈を少なくとも部分的に形質転換し、未成熟停止コドンが欠如する同等の mRNA を使用して産生される同等のポリペプチドと比べて、少なくとも約 80% の効率で、実質的に全長のポリペプチドを産生することができる。一部の実施形態では、効率は、(a) 操作された tRNA をコードする第 1 のベクターおよび第 1 の緑色蛍光タンパク質をコードするスクリーニング mRNA をコードする第 2 のベクターを第 1 のヒト細胞にトランスフェクトすること、第 1 の緑色蛍光タンパク質をコードするスクリーニング mRNA は、未成熟停止コドンを含むことができる；(b) 第 2 の緑色蛍光タンパク質をコードする同等のスクリーニング mRNA をコードする第 3 のベクターを第 2 のヒト細胞にトランスフェクトすること、同等のスクリーニング mRNA は、未成熟停止コドンを含まなくてもよい；および (c) 第 1 のヒト細胞から放出される蛍光の量と第 2 のヒト細胞から放出される蛍光の量を比較することによって決定することができる。一部の実施形態では、操作された tRNA は、リジン、アルギニン、ヒスチジン、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、プロリン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ピロリジン、およびセレノシステインからなる群から選択されるアミノ酸でアシル化することができる。一部の実施形態では、操作された tRNA は、非標準アミノ酸でアシル化することができる。一部の実施形態では、操作された tRNA は、mRNA の翻訳中に、未成熟停止コドンに回答して、アミノ酸を、mRNA によってコードされる新生ポリペプチド鎖に挿入することができ、アミノ酸は、挿入されたとき、未成熟停止コドンを欠き得る同等の mRNA を使用して産生される同等のポリペプチドと比較して、少なくとも一部の機能的なポリペプチドを産生するのに十分であり得る。一部の実施形態では、第 1 の緑色蛍光タンパク質をコードするスクリーニング mRNA は、少なくとも 2 つの未成熟停止コドンを含むことができる。一部の実施形態では、少なくとも 2 つの未成熟停止コドンは、同じ停止コドンであり得る。一部の実施形態では、少なくとも 2 つの未成熟停止コドンは、異なる停止コドンであり得る。一部の実施形態では、操作された tRNA は、リジル tRNA、アルギニル tRNA、ヒスチジル tRNA、グリシル tRNA、アラニル tRNA、バリル tRNA、ロイシル tRNA、イソロイシル tRNA、メチオニル tRNA、フェニルアラニル tRNA、トリプトファニル tRNA、プロリル tRNA、セリル tRNA、スレオニル tRNA、システニル tRNA、チロシル tRNA、アスパラギニル tRNA、グルタミニル tRNA、アスパルチル tRNA、ピロールリジル tRNA、セレノシスチル tRNA またはグルタミル tRNA であり得る。一部の実施形態では、操作された tRNA は、操作された tRNA 前駆であり得る。一部の実施形態では、操作された tRNA は、イントロン配列を含むことができる。一部の実施形態では、イントロン配列は、操作された tRNA を含有する細胞内でスプライシングされ、これにより、成熟な操作された tRNA を産生することができる。一部の実施形態では、第 1 のヒト細胞または第 2 のヒト細胞は、HEK293 細胞であり得る。一部の実施形態では、組成物は、操作された tRNA をコードするベクターを含むことができる。一部の実施形態では、ベクターは、ウイルスベクターであり得る。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、またはレンチウイルスベクターであり得る。一部の実施形態では、操作された tRNA または操作された tRNA をコードするベクターは、リボソーム、ナノ粒子、またはウイルス粒子に存在することができる。一部の実施形態では、操作された tRNA は、アルギニル tRNA であり得、未成熟停止コドンは、オパー

10

20

30

40

50

ル停止コドンであり得、操作された tRNA は、ベクターに存在し得、ベクターは、アデノ随伴ウイルスベクターであり得、第 1 のヒト細胞および第 2 のヒト細胞は、HEK293 細胞であり得る。

【0015】

容器に本明細書に記載される組成物を含むことができるキットもまた、本明細書に開示される。一部の実施形態は、組成物を容器と接触することを含む、キットを製造する方法を含む。

【0016】

本開示の追加の態様および利点は、以下の詳細な説明から当業者に容易に明らかになり、本開示の単に説明としての実施形態が示され、記載される。認識される通り、本開示は、他および異なる実施形態であり得、そのいくつかの詳細は、全てが本開示から逸脱することなく、様々な明らかな点で修飾することができる。従って、図面および説明は、制限としてではなく、事実上説明としてみなされるべきである。

【0017】

参照による取り込み

本明細書で述べられる全ての刊行物、特許および特許出願は、それぞれの個々の刊行物、特許、または特許出願が、参照により組み込まれると具体的かつ個別に示されたかのように、同じ程度まで本明細書において参照により取り込まれる。参照により取り込まれる刊行物および特許または特許出願が、本明細書に含まれる本開示と矛盾する程度まで、本明細書は、任意のこのような矛盾する材料に取って代わり、および／または優先することが意図される。

【0018】

本発明の新たな特性は、添付の請求の範囲において具体性を伴い記載される。本発明の特性および利点のより良好な理解は、本発明の原理が利用される、説明的な実施形態を記載する以下の詳細な説明、および添付の図面を参照して得られる。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図 1】図 1 は、一部の実施形態による操作された tRNA 抑制因子の 1 または 2 つのコピーをコードするプラスミドコンストラクトを模式的に説明する。

【図 2-A】図 2 A は、ヒト Arg tRNA のコンセンサス二次構造および配列を模式的に説明する。

【図 2-B】図 2 B は、一部の実施形態による、抑制因子 tRNA を操作するための突然変異誘発から除外されたヒト Arg tRNA のコンセンサス二次構造および配列における部位を模式的に説明する。

【図 3-A】図 3 A は、一部の実施形態による、mRNA における未成熟オパール停止コドンの抑制のため、「TCA」に修飾された「CCT」のアンチコドン配列を有するアルギニン (Arg) tRNA 抑制因子を模式的に説明する。

【図 3-B】図 3 B は、一部の実施形態による、mRNA における未成熟オパール停止コドンの抑制のため、「TCA」に修飾された「TCT」のアンチコドン配列を有する Arg tRNA 抑制因子を模式的に説明する。

【図 4】図 4 は、一部の実施形態による、操作された tRNA 抑制因子および mCherry 蛍光レポーターをコードするプラスミドベクターで、操作された GFP (未成熟オパール停止コドンを含む) を安定的に発現する細胞をトランスフェクトするワークフローを模式的に説明する。

【図 5-A】図 5 A は、図 5 B および図 6 を含む、一部の実施形態によるヒト胚性腎 (HEK) 細胞における操作された tRNA 抑制因子活性をスクリーニングするための実験的なワークフローを模式的に説明する。この模式図は、図 4 で描かれる実験的な機構を時間的に示す。

【図 5-B】図 5 B は、一部の実施形態による、安定的に組み換えられた GFP レポーターにおける 2 つの異なる、Arg から停止コドンへの突然変異を有する 2 つの HEK 細胞

10

20

30

40

50

株における操作された *Arg tRNA* 抑制因子分子による未成熟停止コドン抑制を示す。

【図 5 - C】図 5 C は、一部の実施形態による、異なる *Arg* から停止への突然変異を有する 2 つの *HEK* 細胞株間の操作された *Arg tRNA* 抑制因子分子による未成熟停止コドン抑制の相関解析を示す。

【図 6】図 6 は、一部の実施形態による、*R 7 4 X* または *R 9 7 X* *Arg* から停止コドンへの突然変異を有する異なる *HEK* 細胞株における操作された *Arg tRNA* 抑制因子分子による未成熟停止コドン抑制を示す。

【図 7】図 7 は、図 8 ~ 9 B を含む、一部の実施形態による、本明細書に記載される操作された *tRNA* 抑制因子分子を評価するための二重のプラスミドスクリーニングシステムのワークフローを模式的に説明する。

【図 8 - A】図 8 A は、一部の実施形態による、図 7 に示される二重のプラスミドスクリーニングシステムを使用した、2 つの異なる、*Arg* から停止コドンへの突然変異を含有する操作された *GFP* を発現する *HEK* 細胞における、パーセンテージリードスルー（緑色蛍光を示す *tRNA* / *mCherry* 産生細胞の分画）に関して測定された、操作された *Arg tRNA* 抑制因子分子による未成熟停止コドン抑制の代表的な結果を示す。

【図 8 - B】図 8 B は、一部の実施形態による、図 8 A において使用される、*Arg* から停止への突然変異を含有する 2 つの異なる操作された *GFP* レポーター：*R 9 7 4 X* と *R 9 7 X* の間の本明細書に記載される操作された *Arg tRNA* 抑制因子分子による未成熟停止コドン抑制の相関解析を示す。

【図 9 - A】図 9 A は、一部の実施形態による、二重のプラスミドスクリーニングシステムによる、2 つの異なる、*Arg* から停止への突然変異（*R 7 4 X* および *R 9 7 X*、*X* は、オパール停止コドンである）を有する *HEK* 細胞株における未成熟停止コドン抑制の効率を示す。

【図 9 - B】図 9 B は、一部の実施形態による、図 9 A において使用される、*Arg* から停止への突然変異を含有する 2 つの異なる操作された *GFP* レポーター：*R 9 7 4 X* と *R 9 7 X* の間の本明細書に記載される操作された *Arg tRNA* 抑制因子分子による未成熟停止コドン抑制の相関解析を示す。

【図 10 - A】図 10 A は、一部の実施形態による、野生型 (*WT*) *mRNA*（上部）、41 位にオパール未成熟停止コドン、および 73 位にオパール停止コドンをコードする *K 5 6 2* 細胞におけるルシフェラーゼの模式 *mRNA* を示す。

【図 10 - B】図 10 B は、一部の実施形態による、破壊されたルシフェラーゼのトランスフェクションプロセスを模式的に説明する。

【図 10 - C】図 10 C は、一部の実施形態による、破壊されたルシフェラーゼスクリーニングシステムを使用して、図 10 A に示される 2 つの異なる未成熟オパール停止コドンを含有する *K 5 6 2* 細胞株における本明細書に記載される操作された *Arg tRNA* 抑制因子分子の抑制の効率を示す。

【図 11 - A】図 11 A は、一部の実施形態による、*WT mRNA*（上部）、アミノ酸 74 位にオパール未成熟停止コドンおよびアミノ酸 97 位にオパール停止コドンをコードする *HEK 2 9 3* 細胞における緑色蛍光タンパク質 (*GFP*) の模式 *mRNA* を示す。

【図 11 - B】図 11 B は、一部の実施形態による、操作された *Arg tRNA* 抑制因子分子による未成熟終止コドン (*PTC*) のリードスルーでの細胞のパーセンテージを示す。

【図 11 - C】図 11 C は、一部の実施形態による、破壊された *GFP* スクリーニングシステムを使用した、2 つの、異なる *Arg* から停止への突然変異を有する細胞における、本明細書に記載される操作された *Arg tRNA* 抑制因子分子による未成熟終止コドン (*PTC*) のリードスルーを示す。

【図 11 - D】図 11 D は、一部の実施形態による、破壊された *GFP* スクリーニングシステムを使用した、2 つの、異なる *Arg* から停止への突然変異を有する細胞における、本明細書に記載される操作された *Arg tRNA* 抑制因子分子の抑制の効力を示す。

【図 11 - E】図 11 E は、一部の実施形態による、ベクターマップを模式的に説明する

10

20

30

40

50

。

【図 1 1 - F】図 1 1 F は、図 1 1 B に示される結果を得るために使用された二重のトランスフェクションシステムを模式的に説明する。

【図 1 1 - G】図 1 1 G は、一部の実施形態による、破壊されていない GFP と比較して、mCherry タグを有する Arg tRNA 抑制因子を使用した、破壊された GFP におけるオパール停止コドンを抑止するプロセスを模式的に説明する。

【図 1 2】図 1 2 は、一部の実施形態による、フローサイトメトリーによる、本明細書に記載される異なる操作された Arg tRNA 分子の効率レベルの例を示す。

【図 1 3】図 1 3 は、操作された tRNA 分子が有用であり得る、代替の停止コドンの例を示す。

【図 1 4 - A】図 1 4 A は、一部の実施形態による、操作された tRNA コンストラクトについてのベクター設計を模式的に説明する。

【図 1 4 - B】図 1 4 B は、一部の実施形態による、一次ニューロンをトランスフェクトするため使用される操作された tRNA コンストラクトについてのベクター設計を模式的に説明する。

【図 1 5 - A】図 1 5 A は、一部の実施形態による、停止コドンリードスルーの代表的なウエスタンブロット例を説明する。

【図 1 5 - B】図 1 5 B は、一部の実施形態による、異なる操作された tRNA 停止コドンリードスルーのヒストグラムである。

【図 1 6 - A】図 1 6 A ~ 1 6 F は、一部の実施形態による、操作された tRNA およびその変異体で処置された R255X Ret マウスモデル由来のニューロン細胞培養の代表的なフローサイトメトリー結果を示す。

【図 1 6 - B】同上。

【図 1 6 - C】同上。

【図 1 6 - D】同上。

【図 1 6 - E】同上。

【図 1 6 - F】同上。

【図 1 7 - A】図 1 7 A ~ 1 7 D は、一部の実施形態による、D4F3 抗体を使用した、代表的なフローサイトメトリー MeCP2 シグナルを示す。

【図 1 7 - B】同上。

【図 1 7 - C】同上。

【図 1 7 - D】同上。

【図 1 7 - E F】図 1 7 E ~ 1 7 H は、一部の実施形態による、NeuN 抗体 MAB377 を使用した、代表的なフローサイトメトリー MeCP2 シグナルを示す。

【図 1 7 - G H】同上。

【図 1 8 - A】図 1 8 A は、一部の実施形態による、MeCP2 シグナルを有するニューロンのパーセンテージを描くヒストグラムである。

【図 1 8 - B】図 1 8 B は、一部の実施形態による、操作された tRNA またはその変異体を有するレンチウイルスにより形質導入されたニューロンにおける総 MeCP2 シグナルを描くヒストグラムである。

【図 1 9】図 1 9 A ~ 1 9 G は、一部の実施形態による、外来性プロモーターを有する、または有さない、操作された tRNA の 1 つまたは複数のコピーを有する異なるベクター設計を模式的に説明する。

【図 2 0 - A】図 2 0 A は、一部の実施形態による、異なるベクターを使用した、操作された tRNA リードスルーを有する細胞の割合を描くグラフである。

【図 2 0 - B】図 2 0 B は、一部の実施形態による、異なるベクターを使用した、細胞における総操作された tRNA リードスルーを描くグラフである。

【図 2 1】図 2 1 A ~ 2 1 C は、一部の実施形態による、操作された tRNA の 1 つまたは複数のコピーの異なる AAV-9 ベクター設計を模式的に説明する。

【図 2 2 - A】図 2 2 A は、一部の実施形態による、操作された tRNA の 1 つまたは複

10

20

30

40

50

数のコピーを有する単一鎖の A A V 9 ベクターの模式的な例を説明する。

【図 2 2 - B】図 2 2 B は、一部の実施形態による、操作された t R N A の 1 つまたは複数のコピーを有する自己相補的 A A V 9 ベクターの模式的な例を説明する。

【図 2 3 - A】図 2 3 A は、一部の実施形態による、逆位末端反復から異なる距離で置かれた操作された t R N A またはその変異体を有する A A V 骨格のベクターコンストラクトを模式的に説明する。

【図 2 3 - B】図 2 3 B ~ 2 3 C は、一部の実施形態による、異なる向きで置かれた操作された t R N A またはその変異体を有する A A V 骨格のベクターコンストラクトを模式的に説明する。

【図 2 3 - C】同上。

【図 2 4】図 2 4 は、図 2 5 ~ 図 2 8 において使用されるゲーティングストラテジーを示す。

【図 2 5】図 2 5 は、配列番号 3 の 0 のコピー、1 つのコピー、3 つのコピー、または 6 つのコピーを有する自己相補的 A A V 2 / 9 コンストラクトの例となるフローサイトメトリードットプロットを示す。

【図 2 6】図 2 6 は、配列番号 3 の 0 のコピー、1 つのコピー、3 つのコピー、または 6 つのコピーを有する単一の標準的かつ自己相補的な A A V 2 / 9 コンストラクトについての細胞生存率のプロットを示す。

【図 2 7 - A】図 2 7 A および 2 7 B は、配列番号 3 の 0 のコピー、1 つのコピー、3 つのコピー、または 6 つのコピーを有する 1 本鎖のかつ自己相補的な A A V 2 / 9 コンストラクトについての感染性プロットを示す。

【図 2 7 - B】同上。

【図 2 8 - A】図 2 8 A および 2 8 B は、配列番号 3 の 0 のコピー、1 つのコピー、3 つのコピー、または 6 つのコピーを有する 1 本鎖のかつ自己相補的な A A V 2 / 9 コンストラクトについての P T C リードスルーのプロットを示す。

【図 2 8 - B】同上。

【図 2 9 - A】図 2 9 A および 2 8 B は、P T C 抑制を示したパーセンテージ細胞 (A)、ならびに C C T の 2 つのコピーまたは 3 つのコピーをコードし、t R N A ペイロードを分ける 6 b p のスペーサー、5 0 0 b p のスペーサー、1 0 0 b p のスペーサー、2 0 0 b p のスペーサー、または 5 0 0 b p のスペーサーをコードするプラスミドについて抑制された P T C の総パーセント (B) のプロットを示す。

【図 2 9 - B】同上。

【図 3 0 - A】図 3 0 A および 3 0 B は、一部の実施形態に従った、それぞれ、S T 2 1 の % G F P および G F P M F I % のプロットを示す。

【図 3 0 - B】同上。

【図 3 1】図 3 1 は、一部の実施形態による、g R N A の編集効率を改善するための代表的なストラテジーを示す。

【図 3 2】図 3 2 は、一部の実施形態による、代表的な g R N A 設計を説明する。

【図 3 3】図 3 3 は、一部の実施形態による、機能アッセイのルシフェラーゼ獲得の例を示す。

【図 3 4】図 3 4 は、一部の実施形態による、代表的な g R N A 設計をスクリーニングするための実験の代表的な結果を示す。

【図 3 5】図 3 5 は、一部の実施形態による、代表的なスクリーニングアッセイ、細胞株、ならびに分析アッセイおよびツールを示す。

【図 3 6】図 3 6 は、一部の実施形態による、A D A R 1 K O 細胞株を生成するための代表的なコンストラクトを説明する。

【図 3 7】図 3 7 は、一部の実施形態による、A D A R 1 K O 細胞株を生成するための代表的なコンストラクトを説明する。

【図 3 8】図 3 8 は、一部の実施形態による、A D A R 2 を A D A R 1 K O 細胞に統合するための模式的なプロセスを説明する。

10

20

30

40

50

【図 39】図 39 は、一部の実施形態による、デジタル液滴 PCR (ddPCR) プロセスの模式図を説明する。

【図 40】図 40 は、一部の実施形態による、PCR プライマーおよびプローブセットを設計するための ddPCR を使用した代表的な分析を示す。

【図 41】図 41 は、一部の実施形態による、gRNA 発現を定量するための代表的なシステムを示す。

【図 42】図 42 は、一部の実施形態による、標的細胞へのトランスフェクション後の gRNA の高い細胞レベルの例を示す。

【図 43】図 43 は、一部の実施形態による、HEK293 細胞における Rab7a の編集における代表的な gRNA コンストラクトおよびそれらの効率を示す。

【図 44】図 44 は、一部の実施形態による、HEK293 細胞における Rab7a の編集における gRNA コンストラクトおよびそれらの効率の例を示す。

【図 45】図 45 は、一部の実施形態による、ハイスループットスクリーニング方法と共に gRNA 設計の利用における代表的なアプローチを説明する。

【図 46】図 46 は、一部の実施形態による、オパール未成熟突然変異を有する代表的なルシフェラーゼを示す。

【図 47-A】図 47A~47E は、本明細書に記載されるポリヌクレオチドを含むことができる代表的なベクターマップを示す。

【図 47-B】同上。

【図 47-C】同上。

【図 47-D】同上。

【図 47-E】同上。

【図 48-A】図 48A~48B は、本明細書に記載されるポリヌクレオチドを含むことができる代表的なベクターマップを示す。

【図 48-B】同上。

【図 49】図 49 は、哺乳類ノンセンス介在性減衰の機序の例を示す。

【発明を実施するための形態】

【0020】

タンパク質における突然変異を導く未成熟停止コドンは、レット症候群などの、重篤な神経発生の障害に関係する。未成熟停止コドンを含む mRNA 分子の翻訳は、切断されたポリペプチドまたはタンパク質を産生するための翻訳プロセスの未成熟終結を引き起こし得る。本明細書において使用される場合、「未成熟停止コドン」は、「未成熟終止コドン」(PTC)と互換的に使用することができる。特に、小児における神経発生に重要なタンパク質の意図されないランケーションは、重篤かつ人生を変える疾患または障害を引き起こし得る。

【0021】

MECP2 (NCBI 遺伝子 ID: 4204) によってコードされる、タンパク質メチル-CpG 結合タンパク質 2 (MeCP2) は、ニューロンの機能に重要であり得、ニューロン間の結合の維持において役割を果たすことができる。加えて、MeCP2 は、正常な脳機能をもたらすタンパク質をコードする多くの遺伝子の制御因子であり得る。レット症候群は、MECP2 遺伝子における未成熟停止コドンを含む、MeCP2 における機能を喪失する突然変異によって引き起こされ得る。健康な個体において、MeCP2 タンパク質は、配列番号 49 に関して、または配列番号 50 に関して、アミノ酸 168、186、198、255、270、294 および 453 位にアルギニン (Arg) を含有することができる。レット症候群の患者において、アミノ酸 168、255、270、294、198、186 および 453 位での MeCP2 タンパク質の翻訳の未成熟な終結を引き起こす、MeCP2 タンパク質における突然変異は、MeCP2 の機能の喪失を引き起こし、レットを引き起こす突然変異の 25% より多くを合わせて占める。MECP2 におけるアルギニン (Arg) は、R8 (アイソフォーム 2 についてのみ)、R9 (アイソフォーム 1 についてのみ)、R84、R85、R89、R91、R106、R111、R115

10

20

30

40

50

、R133、R162、R167、R188、R190、R211、R250、R253、R268、R306、R309、R344、R354、R420、R458、R468、R471、R478、およびR484位においても見られる。本開示は、R168X、R255X、R270X、R294X、R198X、R186X、R453X、R8X（アイソフォーム2中）、R9X（アイソフォーム1中）、R84X、R85X、R89X、R91X、R106X、R111X、R115X、R133X、R162X、R167X、R188X、R190X、R211X、R250X、R253X、R268X、R306X、R309X、R344X、R354X、R420X、R458X、R468X、R471X、R478X、R484X、またはそれらの任意の組合せのいずれか1つを含む、MeCP2タンパク質における任意の位置に存在し得る未成熟停止コドンの未成熟停止コドンリードスルーすることができる、操作されたtRNAおよび操作されたtRNA変異体を提供する。進行した神経障害を有する大人のMeCP2欠損マウスにおけるMeCP2再活性化は、疾患を強く逆転させ得ることが、示されている。

10

【0022】

MeCP2タンパク質の第1の異性体のタンパク質配列の例は、配列番号49のアミノ酸配列であり得る。一部の実施形態では、MeCP2タンパク質は、MeCP2の第1の異性体を含むことができる。MeCP2タンパク質の第2の異性体のタンパク質配列の例は、配列番号50のアミノ酸配列であり得る。一部の実施形態では、MeCP2タンパク質は、MeCP2の第2の異性体を含むことができる。

【0023】

鋳型メッセンジャーRNA（mRNA）における未成熟停止コドンのリードスルーを可能にするために未成熟停止コドンを抑制する操作されたトランスファーRNA（tRNA）分子が、本明細書において提供される。これらは、「操作されたtRNA抑制因子分子」または「操作されたtRNA抑制因子」としても言及される。本明細書において使用される場合、「抑制」および「リードスルー」は、本明細書に開示される操作されたtRNAおよびその変異体の活性を言及するために互換的に使用することができる。ある場合では、ウイルスベクターである、本開示の操作されたtRNA分子をコードするベクターがまた提供される。操作されたtRNA分子または操作されたtRNA分子をコードするベクターは、インビボでの、操作されたtRNA分子の標的細胞または組織へのウイルス粒子介在性デリバリーのため、ウイルスにパッケージングすることができる。ある場合では、ウイルスは、アデノ随伴ウイルス（AAV）であることができる。操作されたtRNA分子（複数可）または操作されたtRNA分子（複数可）をコードするベクター（複数可）を含む、本明細書に記載される組成物は、対象へのデリバリーのため、AAV（IV/CNS）ベクターを利用することができる。AAVベクターデリバリーは、単一の用量で長期の恩恵を達成することができ、マルチプレックス標的化の機会をもたらすことができる。方法は、CNS/IV投薬を用いた、中枢神経指向性および体内分布を促進することができるAAV血清型を同定することを含むことができる。本開示の操作されたtRNAは、未成熟停止コドンの認識のための操作されたアンチコドンを含むことができる。操作されたtRNA構造の1つまたは複数の領域を安定化するか、または改善することができる、それらの親の操作されたtRNA配列と比べて、突然変異を有する、操作されたtRNA変異体もまた、本明細書において提供される。例えば、本開示の操作されたtRNA変異体は、アクセプターステム、Dループ、Dステム、Tループ、Tステム、可変ループ、アンチコドンステム、アンチコドンループ、またはそれらの任意の組合せにおける突然変異を有することができる。複数の操作されたtRNA抑制因子ペイロード、GFPもしくはmCherryなどのマーカー、スタッファー配列、またはそれらの任意の組合せのパッケージングを含む、ウイルスベクターにおける操作されたtRNA抑制因子分子のパッケージングのための、様々なコンストラクトもまた、本明細書に開示される。

30

40

【0024】

ウイルスにパッケージングされてもよい操作されたtRNAまたは操作されたtRNA変異体または操作されたtRNAもしくは操作されたtRNA変異体をコードするベクタ

50

ーをデリバリーする方法が、本明細書において提供される。ある場合では、操作された tRNA もしくは操作された tRNA 変異体、または操作された tRNA もしくは操作された tRNA 変異体をコードするベクターのデリバリーは、本明細書に記載される疾患、状態、または障害（例えば、レット症候群）を処置するのに有効であり得る。

【0025】

I. 組成物

操作された tRNA 分子、操作された tRNA 変異体、操作された tRNA 前駆体分子、操作された tRNA 前駆体変異体、または操作された tRNA、操作された tRNA 前駆体分子、操作された tRNA 変異体、もしくは操作された tRNA 前駆体変異体をコードするベクターを含む組成物が、本明細書に開示される。本明細書に記載される操作された tRNA または操作された tRNA 変異体は、ポリペプチドをコードする mRNA における未成熟停止コドン（例えば、正しい（例えば、疾患を引き起こさない）アミノ酸を成長しているペプチドに加えることによって、未成熟停止コドンのセンスコドンへの解釈を少なくとも部分的に形質転換することができる。「未成熟」停止コドンは、存在するとき、野生型対応物と比べて、ポリペプチドの意図されないランケーションをもたらす停止コドン）を指すことができる。停止コドンリードスルーまたは未成熟停止コドンリードスルー（PTC）としても知られる、このようなランケーションは、未成熟停止コドンが欠如する同等の mRNA を使用して産生される同等のポリペプチドと比べて、約 1%～約 100% の効率で、実質的に全長のポリペプチドを産生することができる。ある場合では、効率は、少なくとも約 1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または 99% であり得る。ある場合では、効率は、少なくとも約 1%～約 10%、5%～約 20%、10%～約 35%、25%～約 50%、40%～約 70%、60%～約 80%、75%～約 90% または約 85%～約 100% であり得る。

【0026】

ある場合では、未成熟終結コドン（PTC）リードスルーの効率は、PTC リードスルーのインビボ効率を含むことができる。ある場合では、PTC リードスルーのインビボ効率は、疾患または状態を少なくとも一部処置することによって決定することができる。例えば、PTC リードスルーのインビボ効率は、聴く能力を少なくとも一部改善すること、見る能力を少なくとも一部改善すること、運動能力、認知能力またはそれらの任意の組合せを少なくとも一部改善することによって測定することができる。ある場合では、PTC リードスルーの効率は、（a）操作された tRNA またはその変異体をコードする第 1 のベクターおよび第 1 の緑色蛍光タンパク質をコードするスクリーニング mRNA をコードする第 2 のベクターを第 1 のヒト細胞にトランスフェクトすること、第 1 の緑色蛍光タンパク質をコードするスクリーニング mRNA は、未成熟停止コドン（これは、（例えば、「破壊された」 GFP）として本明細書において言及することができる）を含むことができる；（b）第 2 の緑色蛍光タンパク質をコードする同等のスクリーニング mRNA をコードする第 3 のベクターを第 2 のヒト細胞にトランスフェクトすること、同等のスクリーニング mRNA は、未成熟停止コドンを含まない；および（c）第 1 のヒト細胞から放出される蛍光の量と第 2 のヒト細胞から放出される蛍光の量を比較することによって決定される、PTC 抑制リードスルーのインビトロ効率などの、PTC リードスルーのインビトロ効率を含むことができる。ある場合では、緑色蛍光タンパク質は、少なくとも 2 つの未成熟停止コドンを含むことができる。ある場合では、未成熟停止コドンは、同じ停止コドン、または異なる停止コドンであり得る。

【0027】

PTC リードスルーのインビボ効率は、約 1%～100% であり得る。PTC リードスルーのインビボ効率は、約 10%～100% であり得る。PTC リードスルーのインビボ効率は、約 20%～100% であり得る。PTC リードスルーのインビボ効率は、約 30%～100% であり得る。PTC リードスルーのインビボ効率は、約 40%～100% であり得る。PTC リードスルーのインビボ効率は、約 50%～100% であり得る。PTC

Cリードスルーのインビボ効率は、約60%~100%であり得る。PTCリードスルーのインビボ効率は、約70%~100%であり得る。PTCリードスルーのインビボ効率は、約75%~100%であり得る。PTCリードスルーのインビボ効率は、約80%~100%であり得る。PTCリードスルーのインビボ効率は、約85%~100%であり得る。PTCリードスルーのインビボ効率は、約90%~100%であり得る。PTCリードスルーのインビボ効率は、約95%~100%であり得る。PTCリードスルーのインビボ効率は、約20%~約40%であり得る。PTCリードスルーのインビボ効率は、約20%~60%であり得る。PTCリードスルーのインビボ効率は、約10%~70%であり得る。

【0028】

PTCリードスルーのインビトロ効率は、約1%~100%であり得る。PTCリードスルーのインビトロ効率は、約10%~100%であり得る。PTCリードスルーのインビトロ効率は、約20%~100%であり得る。PTCリードスルーのインビトロ効率は、約30%~100%であり得る。PTCリードスルーのインビトロ効率は、約40%~100%であり得る。PTCリードスルーのインビトロ効率は、約50%~100%であり得る。PTCリードスルーのインビトロ効率は、約60%~100%であり得る。PTCリードスルーのインビトロ効率は、約70%~100%であり得る。PTCリードスルーのインビトロ効率は、約75%~100%であり得る。PTCリードスルーのインビトロ効率は、約80%~100%であり得る。PTCリードスルーのインビトロ効率は、約85%~100%であり得る。PTCリードスルーのインビトロ効率は、約90%~100%であり得る。PTCリードスルーのインビトロ効率は、約95%~100%であり得る。PTCリードスルーのインビトロ効率は、約20%~約40%であり得る。PTCリードスルーのインビトロ効率は、約20%~60%であり得る。PTCリードスルーのインビトロ効率は、約10%~70%であり得る。

【0029】

一部の実施形態は、ポリペプチドに関する。一部の実施形態では、ポリペプチドは、ポリペプチドのフラグメントを含み得る。一部の実施形態では、ポリペプチドは、ポリペプチドのフラグメントを少なくとも含むことができる。一部の実施形態では、ポリペプチドは、全長ポリペプチドを含むことができる。一部の実施形態では、ポリペプチドは、mRNAによってコードすることができる。一部の実施形態では、ポリペプチドのフラグメントは、未成熟停止コドンを含むmRNAによってコードすることができる。一部の実施形態では、全長ポリペプチドは、未成熟停止コドンを有さないmRNAによってコードすることができる。

【0030】

本明細書に開示される操作されたtRNAおよびその変異体は、本明細書に開示される通り、未成熟停止コドンリードスルーすることができる。例えば、操作されたtRNAおよびその変異体は、MECP2遺伝子におけるArgからオパール停止コドンへの突然変異の未成熟停止コドンリードスルーすることができる。一部の実施形態では、操作されたtRNAおよびその変異体は、MECP2遺伝子におけるR168X突然変異の未成熟停止コドンリードスルーを可能にすることができる。一部の実施形態では、操作されたtRNAおよびその変異体は、MECP2遺伝子におけるR255X突然変異の未成熟停止コドンリードスルーを可能にすることができる。一部の実施形態では、操作されたtRNAおよびその変異体は、MECP2遺伝子におけるR270X突然変異の未成熟停止コドンリードスルーを可能にすることができる。一部の実施形態では、操作されたtRNAおよびその変異体は、MECP2遺伝子におけるR294X突然変異の未成熟停止コドンリードスルーを可能にすることができる。一部の実施形態では、操作されたtRNAおよびその変異体は、MECP2遺伝子におけるR198X突然変異の未成熟停止コドンリードスルーを可能にすることができる。一部の実施形態では、操作されたtRNAおよびその変異体は、MECP2遺伝子におけるR453X突然変異の未成熟停止コドンリードスルーを可能にすることができる。

【0031】

一部の実施形態では、ポリペプチドをコードする mRNA は、MeCP2 に対応する。

【0032】

ある場合では、操作された tRNA または操作された tRNA 変異体は、標準的なアミノ酸でアシル化することができる。ある場合では、操作された tRNA または操作された tRNA 変異体は、非標準アミノ酸でアシル化することができる。非標準アミノ酸は、p-アセチルフェニルアラニン、p-プロパルギルオキシフェニルアラニン、p-アジドフェニルアラニン、o-メチルチロシン、p-ヨードフェニルアラニン、3-ヨードチロシン、p-フェニルアラニン、2-アミノカプリル酸、p-ベンゾイルフェニルアラニン、o-ニトロベンジルシステイン、o-ニトロベンジルセリン、4,5-ジメトキシ-2-ニトロベンジルセリン、o-ニトロベンジルリジン、ダンシルアラニン、アセチルリジン、メチルヒスチジン、2-アミノノナン酸、2-アミノデカン酸、2-アミノデカン酸、Cbz-リジン、Boc-リジン、またはアリルオキシカルボニルリジンを含むことができる。

10

【0033】

一部の実施形態では、操作された tRNA または操作された tRNA 変異体は、表 1 に提供される、選択されたアミノ酸でアシル化することができる。

【0034】

表 1. アミノ酸、1文字および3文字コード

20

30

40

50

【表 1】

アミノ酸	3 文字コード	1 文字コード
アラニン	ala	A
アルギニン	arg	R
アスパラギン	asn	N
アスパラギン酸	asp	D
アスパラギンまたは アスパラギン酸	asx	B
システイン	cys	C
グルタミン酸	glu	E
グルタミン	gln	Q
グルタミンまたはグ ルタミン酸	glx	Z
グリシン	gly	G
ヒスチジン	his	H
イソロイシン	ile	I
ロイシン	leu	L
リジン	lys	K
メチオニン	met	M
フェニルアラニン	phe	F
プロリン	pro	P
セリン	ser	S
スレオニン	thr	T
トリプトファン	trp	W
チロシン	tyr	Y
バリン	val	V

10

20

30

【0035】

ある場合では、操作された tRNA または操作された tRNA 変異体は、リジンでアシル化することができる。ある場合では、操作された tRNA または操作された tRNA 変異体は、アルギニンでアシル化することができる。ある場合では、操作された tRNA または操作された tRNA 変異体は、ヒスチジンでアシル化することができる。ある場合では、操作された tRNA または操作された tRNA 変異体は、グリシンでアシル化することができる。ある場合では、操作された tRNA または操作された tRNA 変異体は、アラニンでアシル化することができる。ある場合では、操作された tRNA または操作された tRNA 変異体は、バリンでアシル化することができる。ある場合では、操作された tRNA または操作された tRNA 変異体は、ロイシンでアシル化することができる。ある場合では、操作された tRNA または操作された tRNA 変異体は、イソロイシンでアシル化することができる。ある場合では、操作された tRNA または操作された tRNA 変異体は、メチオニンでアシル化することができる。ある場合では、操作された tRNA または操作された tRNA 変異体は、フェニルアラニンでアシル化することができる。ある場合では、操作された tRNA または操作された tRNA 変異体は、トリプトファンでアシル化することができる。ある場合では、操作された tRNA または操作された tRNA 変異体は、プロリンでアシル化することができる。ある場合では、操作された tRNA または操作された tRNA 変異体は、セリンでアシル化することができる。ある場合では、

40

50

操作された tRNA または操作された tRNA 変異体は、スレオニンでアシル化することができる。ある場合では、操作された tRNA または操作された tRNA 変異体は、システインでアシル化することができる。ある場合では、操作された tRNA または操作された tRNA 変異体は、チロシンでアシル化することができる。ある場合では、操作された tRNA または操作された tRNA 変異体は、アスパラギンでアシル化することができる。ある場合では、操作された tRNA または操作された tRNA 変異体は、グルタミンでアシル化することができる。ある場合では、操作された tRNA または操作された tRNA 変異体は、アスパラギン酸でアシル化することができる。ある場合では、操作された tRNA または操作された tRNA 変異体は、グルタミン酸でアシル化することができる。ある場合では、操作された tRNA または操作された tRNA 変異体は、ピロリジンでアシル化することができる。ある場合では、操作された tRNA または操作された tRNA 変異体は、セレノシステインでアシル化することができる。

10

【0036】

一部の実施形態では、操作された tRNA または操作された tRNA 変異体は、リジル tRNA、アルギニル tRNA、ヒスチジル tRNA、グリシル tRNA、アラニル tRNA、バリル tRNA、ロイシル tRNA、イソロイシル tRNA、メチオニル tRNA、フェニルアラニル tRNA、トリプトファニル tRNA、プロリル tRNA、セリル tRNA、スレオニル tRNA、システニル tRNA、チロシル tRNA、アスパラギニル tRNA、グルタミル tRNA、アスパルチル tRNA、ピロールリジル tRNA、セレノシスチル tRNA またはグルタミル tRNA であり得る。

20

【0037】

本開示は、特定のハイブリッド tRNA または直交性 tRNA / tRNA シンターゼ対を取り込むことを企図する。ある場合では、操作された tRNA または操作された tRNA 変異体は、他の種由来のデザイナー tRNA (2つの異なる天然に存在する tRNA から作製されたハイブリッド tRNA など) または直交性 tRNA を含むことができる。ある場合では、合成またはキメラ直交性 tRNA - tRNA シンターゼ対を使用するか、または含むことができる。ある場合では、天然に存在する tRNA シンターゼと相互作用することができる合成 tRNA が、含まれるか、または使用される。ある場合では、ピロールリジル tRNA またはセレノシスチル tRNA は、非標準アミノ酸を操作された tRNA または操作された tRNA 変異体に取り込むための遺伝子コード拡大において使用することができる。

30

【0038】

ある場合では、操作された tRNA または操作された tRNA 変異体は、リジン - tRNA、アルギニン - tRNA、ヒスチジン - tRNA、グリシン - tRNA、アラニン - tRNA、バリン - tRNA、ロイシン - tRNA、イソロイシン - tRNA、メチオニン - tRNA、フェニルアラニン - tRNA、トリプトファニン - tRNA、プロリン - tRNA、セリン - tRNA、スレオニン - tRNA、システニン - tRNA、チロシン - tRNA、アスパラギニン - tRNA、グルタミン - tRNA、アスパルティン - tRNA、またはグルタミン - tRNA であり得る。

【0039】

ある場合では、操作された tRNA または操作された tRNA 変異体は、ヒト tRNA に由来することができる。ある場合では、操作された tRNA または操作された tRNA 変異体は、非ヒト tRNA に由来することができる。ある場合では、操作された tRNA または操作された tRNA 変異体は、ヒト tRNA に直交性であり得る tRNA に由来することができる。操作された tRNA または操作された tRNA 変異体は、操作された tRNA または操作された tRNA 変異体を認識することができ、操作された tRNA または操作された tRNA 変異体をアミノ酸でアシル化することができる、アミノ - アシルシンターゼによってアシル化することができる。ある場合では、操作された tRNA または操作された tRNA 変異体は、操作された tRNA 前駆体または操作された tRNA 前駆体変異体であり得る。このような操作されたプレ tRNA またはその変異体は、イントロ

40

50

ン配列を含むことができる。ある場合では、イントロン配列をスプライシングして、成熟な操作された tRNA またはその変異体を産生することができる。ある場合では、イントロン配列は、操作された tRNA またはその変異体を含有する細胞内でスプライシングすることができる。ある場合では、イントロン配列がスプライシングされると、成熟な操作された tRNA または操作された tRNA 変異体は、未成熟停止コドンのセンスコドンへの解釈を少なくとも部分的に形質転換することができる。ある場合では、イントロンを有する操作された tRNA 前駆体またはその変異体は、イントロンを有さない操作された tRNA 前駆体またはその変異体と比較して、未成熟停止コドンのセンスコドンへの解釈の形質転換においてより効率的であり得る。効率は、イントロンを有する操作された抑制因子 tRNA 前駆体またはその変異体をコードするベクターを、操作された抑制因子 tRNA 前駆体またはその変異体が認識する未成熟停止コドンを含む初代細胞株に形質転換すること、および未成熟停止コドンリードスルーのレベルを、イントロンを有さない操作された抑制因子 tRNA 前駆体またはその変異体をコードするベクターで形質転換されている別の同等の細胞に対して比較することによって、測定することができる。ある場合では、全長タンパク質の量の決定を使用して、未成熟停止コドンリードスルーを測定することができる。

10

【0040】

操作された tRNA またはその変異体は、目的のアミノ酸をコードするコドンの代わりに、停止コドンと塩基対形成するアンチコドン配列を用いて操作することができる。例えば、アルギニン（目的のアミノ酸）が、正常であり得る（例えば、疾患を引き起こさない）、成長するポリペプチドにおける位置の未成熟停止コドンを標的化する操作された tRNA またはその変異体。ある場合では、未成熟停止コドンと塩基対形成するアンチコドン配列を有する操作された Arg tRNA またはその変異体は、停止コドンと塩基対形成することができ、Arg が負荷された操作された tRNA またはその変異体が、Arg を成長するポリペプチド分子に付加することを可能にし、これにより、未成熟停止コドンのリードスルーに影響することができる。

20

【0041】

本開示の操作された tRNA s または操作された tRNA 変異体は、アンバー停止コドン（UAG）、オーカー停止コドン（UAA）、もしくはオパール停止コドン（UGA）、またはその組合せを認識し、抑制するよう操作することができる。ある場合では、操作された tRNA またはその変異体は、アンバー停止コドン（UAG）のリードスルーを抑制するよう操作することができる。ある場合では、操作された tRNA またはその変異体は、オーカー停止コドン（UAA）のリードスルーを抑制するよう操作することができる。ある場合では、操作された tRNA またはその変異体は、オパール停止コドン（UGA）のリードスルーを抑制するよう操作することができる。ある場合では、本開示は、アンバー停止コドン、オーカー停止コドン、およびオパール停止コドンの 1 つより多くを認識し、抑制することができる、複数の操作された tRNA またはその変異体の組成物を提供する（図 13）。アンバー停止コドンを認識し、抑制することができる操作された tRNA またはその変異体は、アルギニン（Arg）tRNA イソデコーダーを含むことができる。アンバー停止コドンを認識し、抑制することができる操作された tRNA またはその変異体は、グルタミン（Gln）tRNA イソデコーダーを含むことができる（図 13）。オーカー停止コドンを認識し、抑制することができる操作された tRNA またはその変異体は、アルギニン（Arg）tRNA イソデコーダーを含むことができる。オーカー停止コドンを認識し、抑制することができる操作された tRNA またはその変異体は、グルタミン（Gln）tRNA イソデコーダーを含むことができる（図 13）。一部の実施形態では、アンバー停止コドンを認識し、抑制することができる操作された tRNA またはその変異体は、天然に存在する Gln tRNA イソデコーダーに対して約 70%～約 100% の配列類似性を有することができる。一部の実施形態では、オーカー停止コドンを認識し、抑制することができる操作された tRNA またはその変異体は、天然に存在する Gln tRNA イソデコーダーに対して約 70%～約 100% の配列類似性を有するこ

30

40

50

とができる。一部の実施形態では、アンバー停止コドンを認識し、抑制することができる操作された tRNA またはその変異体は、天然に存在する Arg tRNA イソデコーダーに対して約 70%～約 100% の配列類似性を有することができる。一部の実施形態では、オーカー停止コドンを認識し、抑制することができる操作された tRNA またはその変異体は、天然に存在する Arg tRNA イソデコーダーに対して約 70%～約 100% の配列類似性を有することができる。

【0042】

本明細書に記載される停止コドンのいずれか 1 つと塩基対形成するよう構成されるアンチコドンを含む操作された tRNA またはその変異体は、本明細書に記載されるアミノ酸（標準または非標準）のいずれか 1 つを負荷することができる。図 2A は、ヒト Arg tRNA のコンセンサス二次構造を説明する。図 2B は、本明細書に開示される操作 tRNA を生成するために突然変異誘発から除外されたヒト Arg tRNA のコンセンサス二次構造および配列における部位を説明する。

【0043】

一部の実施形態では、操作された tRNA またはその変異体によって標的化される mRNA は、1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、または 5 つの未成熟停止コドンを含むことができる。従って、本明細書に記載される操作された tRNA またはその変異体は、1 つまたは複数の未成熟停止コドンのリードレスを生じ、実質的に全長のポリペプチドを少なくとも一部、回復させることができる。ある場合では、実質的に全長のポリペプチドを少なくとも一部、回復させることは、疾患または状態を少なくとも一部、処置することを含むことができる。ある場合では、操作された tRNA またはその変異体は、PTCリードレスの約 30%～約 99% を回復させることができる。ある場合では、操作された tRNA またはその変異体は、PTCリードレスの約 40%～約 45%、約 40%～約 50%、約 40%～約 55%、約 40%～約 60%、約 40%～約 65%、約 40%～約 70%、約 40%～約 75%、約 40%～約 80%、約 40%～約 85%、約 40%～約 90%、約 40%～約 95%、約 45%～約 50%、約 45%～約 55%、約 45%～約 60%、約 45%～約 65%、約 45%～約 70%、約 45%～約 75%、約 45%～約 80%、約 45%～約 85%、約 45%～約 90%、約 45%～約 95%、約 50%～約 55%、約 50%～約 60%、約 50%～約 65%、約 50%～約 70%、約 50%～約 75%、約 50%～約 80%、約 50%～約 85%、約 50%～約 90%、約 50%～約 95%、約 55%～約 60%、約 55%～約 65%、約 55%～約 70%、約 55%～約 75%、約 55%～約 80%、約 55%～約 85%、約 55%～約 90%、約 55%～約 95%、約 60%～約 65%、約 60%～約 70%、約 60%～約 75%、約 60%～約 80%、約 60%～約 85%、約 60%～約 90%、約 60%～約 95%、約 65%～約 70%、約 65%～約 75%、約 65%～約 80%、約 65%～約 85%、約 65%～約 90%、約 65%～約 95%、約 70%～約 75%、約 70%～約 80%、約 70%～約 85%、約 70%～約 90%、約 70%～約 95%、約 75%～約 80%、約 75%～約 85%、約 75%～約 90%、約 75%～約 95%、約 80%～約 85%、約 80%～約 90%、約 80%～約 95%、約 85%～約 90%、約 85%～約 95%、または約 90%～約 95% を回復させることができる。ある場合では、操作された tRNA またはその変異体は、PTCリードレスの約 40% を少なくとも回復させることができる。ある場合では、2 つ以上の停止コドンは、同じ停止コドンであり得る。ある場合では、2 つ以上の停止コドンは、異なる停止コドンであり得る。ある場合では、標的 mRNA が、同じ停止コドンである 2 つ以上の停止コドンを含むとき、1 つのタイプの操作された tRNA またはその変異体を使用して、全長ポリペプチドを少なくとも一部、回復させることができる。ある場合では、標的 mRNA が、異なる停止コドンである 2 つ以上の停止コドンを含むとき、1 つより多くのタイプの操作された tRNA またはその変異体を使用して、全長ポリペプチドを少なくとも一部、回復させることができる。一部の実施形態では、操作された tRNA または操作された tRNA 変異体は、標的 mRNA のノンセンス介在性減衰を低減するか、または防ぐことができる。

10

20

30

40

50

【0044】

本明細書に開示される操作されたtRNAを修飾して、操作されたtRNA変異体を産生することができる。例えば、本明細書に開示される操作されたtRNAは、参照tRNAと比べて、修飾することができる。ある場合では、修飾は、ヌクレオチドの挿入または置換などの、操作されたtRNAの配列における突然変異であり得る。ある場合では、突然変異され得る配列は、DNA配列、tRNA配列またはtRNA前駆体配列であり得る。ある場合では、修飾は、操作されたtRNAの配列におけるヌクレオチドの化学修飾であり得る。化学修飾は、メチル基、フルオロ基、メトキシエチル基、エチル基、リン酸塩基、アミド基、エステル基、またはそれらの任意の組合せを含むことができる。ある場合では、操作されたtRNAまたはその変異体は、メチル基、フルオロ基、メトキシエチル基、エチル基、リン酸塩基、アミド基、エステル基、またはそれらの任意の組合せを含む化学修飾を含むことができる。

10

【0045】

参照tRNAは、操作されたtRNAが、1つより多くの突然変異を有するように、野生型tRNAまたは操作されたtRNAであり得る。これに関して、野生型tRNAまたは操作されたtRNAは、「骨格」または「親」tRNAとして言及することができる。

【0046】

突然変異は、アクセプターステム、アンチコドンステム、Dループ、Dステム、およびTループ、Tステム、または本開示の操作されたtRNA変異体を産生するための可変領域もしくはループを含むが、これらに限定されない、操作されたtRNAの任意の領域において成すことができる。例えば、ワトソン・クリック塩基対形成を増加させるための、アクセプターステムおよびアンチコドンステムにおけるヌクレオチドの置換は、操作されたtRNAのアクセプターおよびアンチコドンステムを安定化することができる。本明細書に開示される操作されたtRNAへの突然変異の非限定的な例が、表2に提供される。

20

【0047】

表2. 操作されたtRNA変異体を産生するための操作されたtRNAの代表的な突然変異

【表2】

配列番号3に対する修飾			配列番号6に対する修飾			
72T>C	13T>C	31C>A	6C>T	67G>A	49C>G	31A>C
2C>G	22A>G	39G>T	65G>C	50C>T	64G>A	39T>G
71G>C	15A>G	37A>G	71T>G	4T>C	69A>G	44A>G
6A>G	28T>C	44G>A	6C>A	67G>T	12G>C	46G>A
67T>C	42A>G	50T>C	23C>G	27T>C	43A>G	2G>C
64A>G			28T>C	42A>G	40T>C	71T>C

30

40

*N>N'は、Nが、N'に置換され得ることを意味する。N>N'に先行する数字は、操作されたtRNAをコードするDNA配列に関して、ヌクレオチド位置を示す。

チミン（「T」）は、DNAの文脈でのみ存在することができ、tRNA配列に関するととき、ウラシル（「U」）に言及することは理解されるべきである。

【0048】

一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体が、本明細書に開示される。操作されたtRNA変異体は、Tループ、Tステム、Dループ、Dステム、可変ループ、アンチコドンステム、またはアンチコドンループにおける突然変異を含むことができる。突然変異は、配列番号3～22または103～122のいずれか1つの核酸配列と比べてであり得

50

る。一部の実施形態では、突然変異は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、もしくは15個の突然変異、または前述の数の突然変異のいずれか2つによって定義される範囲の突然変異を含むことができる。一部の実施形態では、突然変異は、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、または少なくとも15個の突然変異を含むことができる。一部の実施形態では、突然変異は、1個以下、2個以下、3個以下、4個以下、5個以下、6個以下、7個以下、8個以下、9個以下、10個以下、11個以下、12個以下、または13個以下、14個以下、または15個以下の突然変異を含むことができる。一部の実施形態では、突然変異は、Tループ、Tシステム、Dループ、Dシステム、可変ループ、アンチコドンシステム、アンチコドンループ、またはその組合せにおける突然変異を含むことができる。一部の実施形態では、突然変異は、Tループにおける突然変異を含むことができる。一部の実施形態では、突然変異は、Tシステムにおける突然変異を含むことができる。一部の実施形態では、突然変異は、Dループにおける突然変異を含むことができる。一部の実施形態では、突然変異は、Dシステムにおける突然変異を含むことができる。一部の実施形態では、突然変異は、可変ループにおける突然変異を含むことができる。一部の実施形態では、突然変異は、アンチコドンシステムにおける突然変異を含むことができる。一部の実施形態では、突然変異は、アンチコドンループにおける突然変異を含むことができる。一部の実施形態では、突然変異は、TループおよびTシステムにおける突然変異を含むことができる。一部の実施形態では、突然変異は、TループおよびDループにおける突然変異を含むことができる。一部の実施形態では、突然変異は、TループおよびDシステムにおける突然変異を含むことができる。一部の実施形態では、突然変異は、Tループおよび可変ループにおける突然変異を含むことができる。一部の実施形態では、突然変異は、Tループおよびアンチコドンシステムにおける突然変異を含むことができる。一部の実施形態では、突然変異は、Tループおよびアンチコドンループにおける突然変異を含むことができる。一部の実施形態では、突然変異は、TシステムおよびDループにおける突然変異を含むことができる。一部の実施形態では、突然変異は、Tシステムおよび可変ループにおける突然変異を含むことができる。一部の実施形態では、突然変異は、Tシステムおよびアンチコドンシステムにおける突然変異を含むことができる。一部の実施形態では、突然変異は、Tシステムおよびアンチコドンシステムにおける突然変異を含むことができる。一部の実施形態では、突然変異は、DループおよびDシステムにおける突然変異を含むことができる。一部の実施形態では、突然変異は、Dループおよび可変ループにおける突然変異を含むことができる。一部の実施形態では、突然変異は、Dループおよびアンチコドンシステムにおける突然変異を含むことができる。一部の実施形態では、突然変異は、Dループおよび可変ループにおける突然変異を含むことができる。一部の実施形態では、突然変異は、Dシステムおよびアンチコドンシステムにおける突然変異を含むことができる。一部の実施形態では、突然変異は、アンチコドンシステムおよびアンチコドンシステムにおける突然変異を含むことができる。一部の実施形態では、突然変異は、アンチコドンシステムおよびアンチコドンシステムにおける突然変異を含むことができる。

10

20

30

40

50

【0049】

ある場合では、操作されたtRNA変異体は、配列番号3に関して、72C、2G、71C、6G、67C、64G、13C、22G、15G、28C、42G、31A、39T、37G、44A、もしくは50C、またはそれらの任意の組合せを含むことができる。ある場合では、操作されたtRNA変異体は、72Cを含むことができる。ある場合では、操作されたtRNA変異体は、2Gを含むことができる。ある場合では、操作されたtRNA変異体は、71Gを含むことがで

きる。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、6 G を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、6 7 C を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、6 4 G を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、1 3 C を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、2 2 G を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA は、1 5 G を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、2 8 C を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、4 2 G を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、3 1 A を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、3 9 T を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、3 7 G を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、4 4 A を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、5 0 C を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、配列番号 3 に対して約 7 0 % ~ 約 1 0 0 % の配列同一性を有することができる。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、配列番号 2 3、2 4、2 5、2 5、2 7、2 8、2 9、3 0、3 1 または 3 2 の配列を含む操作された tRNA 変異体の 1 つを含むことができる。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、配列番号 2 3、2 4、2 5、2 5、2 7、2 8、2 9、3 0、3 1 または 3 2 の配列を含む操作された tRNA 変異体に対して約 7 0 % ~ 約 1 0 0 % の配列同一性を有することができる。

10

【0050】

ある場合では、操作された tRNA 変異体は、配列番号 6 の配列と比べて、2 C、6 T、6 5 C、7 1 G、7 1 C、6 A、2 3 G、2 8 C、6 7 A、5 0 T、4 C、6 7 T、2 7 C、4 2 G、4 9 G、6 4 A、6 9 G、1 2 C、4 3 G、4 0 C、3 1 C、3 9 G、4 4 G もしくは 4 6 A、またはそれらの任意の組合せを含む操作された tRNA TCT1 の変異体であり得る。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、6 T を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、6 5 C を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、2 C を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、7 1 C を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、4 6 A を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、7 1 G を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、6 A を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、2 3 G を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、2 8 C を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、6 7 A を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、5 0 T を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、4 C を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、6 7 T を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、2 7 C を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、4 2 G を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、4 9 G を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、6 4 A を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、6 9 G を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、1 2 C を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、4 3 G を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、4 0 C を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、3 1 C を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、3 9 G を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、4 4 G を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、配列番号 6 の配列に対して約 7 0 % ~ 約 1 0 0 % の配列同一性を有することができる。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、配列番号 3 5 ~ 4 8 の配列のうちの 1 つを含む。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、配列番号 3、配列番号 3 2、配列番号 6、または配列番号 4 5 から選択される配列を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、配列番号 3、配列番号 3 2、配列番号 6、または配列番号 4 5、ならびに配列番号 1 および 2 を含む。一部の実施形態では、操作された tRNA 変

20

30

40

50

異体は、配列番号 3 を含むことができる。一部の実施形態では、操作された tRNA 変異体は、配列番号 32 を含むことができる。一部の実施形態では、操作された tRNA 変異体は、配列番号 6 を含むことができる。一部の実施形態では、操作された tRNA 変異体は、配列番号 45 を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、配列番号 35 ～ 48 の配列を含む操作された tRNA 変異体のいずれかに対して約 70 % ～ 約 100 % の配列同一性を有することができる。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、配列番号 35 ～ 48 の配列を含む操作された tRNA 変異体のいずれかと比較して、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、または 100 % の配列同一性を有することができる。

【0051】

ある場合では、操作された tRNA 変異体は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または 20 個以上のアミノ酸置換を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA 変異体は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または 20 個以下のアミノ酸置換を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA またはその変異体は、アンチコドンにおける置換を含まない。ある場合では、本明細書に記載される操作された tRNA または操作された tRNA 変異体が、表 3 において提供され得る。一部の実施形態では、操作された tRNA またはその変異体に、配列番号 1 の配列を含む 5' 末端配列および／または配列番号 2 の配列を含む 3' 末端配列が隣接することができる。一部の実施形態では、5' 末端配列は、操作された tRNA またはその変異体のリーダー配列であり得る。一部の実施形態では、3' 末端配列は、操作された tRNA またはその変異体のポリ-T 終結シグナルおよびトレーラー配列であり得る。

【0052】

表 3. tRNA 配列

10

20

30

40

50

【表 3 - 1】

名称	配列 番号	5'から 3'の tRNA 配列(DNA)	配列 番号	5'から 3'の tRNA 配列(RNA)
tRNA の 5'末端	1	GGTGGTATTGCCCGGAGTAGA AGCACCTGTGACTAACTGTGCC AA	101	GGUGGUAAUUGCCCGGAGUAGAA GCACCUGUGACUAAACUGUGCCA A
tRNA の 3'末端	2	TTTTTTGATGGCCAGCTCCGAG GATCTAGCGTACTGAGTCGCCC AGTCT	102	UUUUUUGAUGGCCAGCUCCGAG GAUCUAGCGUACUGAGUCGCCC AGUCU
CCT2	3	GCCCCAGTGGCCTAATGGATA AGGCACTGGCCTTCAAAGCCA GGGATTGTGGGTTCGAGTCCC ACCTGGGGTG	103	GCCCCAGUGGCCUAAUGGAUAA GGCACUGGCCUCAAAGCCAGG GAUUGUGGGUUCGAGUCCCACC UGGGGUG
CCT1	4	GCCCCAGTGGCCTAATGGATA AGGCACTGGCCTTCAAAGCCA GGGATTGTGGGTTCGAGTCCC ACCTGGGGTA	104	GCCCCAGUGGCCUAAUGGAUAA GGCACUGGCCUCAAAGCCAGG GAUUGUGGGUUCGAGUCCCACC UGGGGUA
CCT3	5	GCCCCGGTGGCCTAATGGATA AGGCATTGGCCTTCAAAGCCA GGGATTGTGGGTTCGAGTCCC ACCCGGGGTA	105	GCCCCGGUGGCCUAAUGGAUAA GGCAUUGGCCUCAAAGCCAGG GAUUGUGGGUUCGAGUCCCACC CGGGGUA
TCT1	6	GGCTCCGTGGCGCAATGGATA GCGCATTGGACTTCAAATTCAA AGGTTCCGGGTTCGAGTCCCC GCGGAGTCG	106	GGCUCUGUGGCGCAAUGGAUAG CGCAUUGGACUCAAUUCAAA GGUUCGGGUUCGAGUCCCGG GGAGUCG
CCT4	7	GCCCCAGTGGCCTAATGGATA AGGCATTGGCCTTCAAAGCCA GGGATTGTGGGTTCGAGTCCC ATCTGGGGTG	107	GCCCCAGUGGCCUAAUGGAUAA GGCAUUGGCCUCAAAGCCAGG GAUUGUGGGUUCGAGUCCCAUC UGGGGUG
CCT5	8	GCCCCAGTGGCCTGATGGATA AGGTACTGGCCTTCAAAGCCA GGGATTGTGGGTTCGAGTCC ACCTGGGGTA	108	GCCCCAGUGGCCUGAUGGAUAA GGUACUGGCCUCAAAGCCAGG GAUUGUGGGUUCGAGUCCACC UGGGGUA
TCT2	9	GGCTCTGTGGCGCAATGGATA GCGCATTGGACTTCAAATTCAA AGGTTGTGGGTTCGAATCCAC CAGAGTCG	109	GGCUCUGUGGCGCAAUGGAUAG CGCAUUGGACUCAAUUCAAA GGUUGUGGGUUCGAAUCCACC AGAGUCG
TCT3	10	GGCTCTGTGGCGCAATGGATA GCGCATTGGACTTCAAATTCAA AGGTTGTGGGTTCGAGTCCCA CCAGAGTCG	110	GGCUCUGUGGCGCAAUGGAUAG CGCAUUGGACUCAAUUCAAA GGUUGUGGGUUCGAGUCCACC AGAGUCG
TCT4	11	GTCTCTGTGGCGCAATGGACG AGCGCGCTGGACTTCAAATCCA GAGGTTCCGGGTTCGAGTCCC GGCAGAGATG	111	GUCUCUGUGGCGCAAUGGACGA GCGCGCUGGACUCAAUCCAG AGGUUCCGGGUUCGAGUCCCG CAGAGAUG
TCT5	12	GGCTCTGTGGCGCAATGGATA GCGCATTGGACTTCAAATTCAA AGGTTGCGGGTTCGAGTCCCT CCAGAGTCG	112	GGCUCUGUGGCGCAAUGGAUAG CGCAUUGGACUCAAUUCAAA GGUUGCGGGUUCGAGUCCCUCC AGAGUCG
TCG1	13	GGCCGCGTGGCCTAATGGATA AGGCGTCTGACTTCAGATCAGA AGATTGCAGGTTTCGAGTCCGC CGCGGTTCG	113	GGCCGCGUGGCCUAAUGGAUAA GGCGUCUGACUUCAGAUACAGAA GAUUGCAGGUUCGAGUCCUGCC GCGGUCG
TCG2	14	GACCACGTGGCCTAATGGATA AGGCGTCTGACTTCAGATCAGA AGATTGAGGGTTCGAATCCCTC CGTGGTTA	114	GACCACGUGGCCUAAUGGAUAA GGCGUCUGACUUCAGAUACAGAA GAUUGAGGGUUCGAAUCCCUCC GUGGUUA

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

TCG3	15	GACCGCGTGGCCTAATGGATA AGGCGTCTGACTTCAGATCAGA AGATTGAGGGTTCGAGTCCCTT CGTGGTTCG	115	GACCGCGUGGCCUAAUGGAUAA GGCGUCUGACUUCAGAUCAAGAA GAUUGAGGGUUCGAGUCCCUUC GUGGUUCG
TCG4	16	GACCACGTGGCCTAATGGATA AGGCGTCTGACTTCAGATCAGA AGATTGAGGGTTCGAATCCCTT CGTGGTTA	116	GACCACGUGGCCUAAUGGAUAA GGCGUCUGACUUCAGAUCAAGAA GAUUGAGGGUUCGAAUCCCUUC GUGGUUA
TCG5	17	GACCACGTGGCCTAATGGATA AGGCGTCTGACTTCAGATCAGA AGATTGAGGGTTCGAATCCCTT CGTGGTTG	117	GACCACGUGGCCUAAUGGAUAA GGCGUCUGACUUCAGAUCAAGAA GAUUGAGGGUUCGAAUCCCUUC GUGGUUG
TCG6	18	GGCCGTGTGGCCTAATGGATA AGGCGTCTGACTTCAGATCAAA AGATTGCAGGTTTCTGAGTTCTGC CACGGTTCG	118	GGCCGUGUGGCCUAAUGGAUAA GGCGUCUGACUUCAGAUCAAAA GAUUGCAGGUUUGAGUUCUGCC ACGGUCG
CCG1	19	GGCCGCGTGGCCTAATGGATA AGGCGTCTGATTTCAGATCAGA AGATTGAGGGTTCGAGTCCCTT CGTGGTTCG	119	GGCCGCGUGGCCUAAUGGAUAA GGCGUCUGAUUUCAGAUCAAGAA GAUUGAGGGUUCGAGUCCCUUC GUGGUUCG
CCG2	20	GACCCAGTGGCCTAATGGATA AGGCATCAGCCTTCAGAGCTG GGGATTGTGGGTTTCGAGTCCC ATCTGGGTCG	120	GACCCAGUGGCCUAAUGGAUAA GGCAUCAGCCUUCAGAGCUGGG GAUUGUGGGUUCGAGUCCCAUC UGGGUCG
ACG1	21	GGGCCAGTGGCGCAATGGATA ACGCGTCTGACTTCAGATCAGA AGATTCCAGGTTTCGACTCCTGG CTGGCTCG	121	GGGCCAGUGGCGCAAUGGAUAA CGCGUCUGACUUCAGAUCAAGAA GAUUCAGGUUCGACUCCUGGC UGGCUCG
ACG2	22	GGGCCAGTGGCGCAATGGATA ACGCGTCTGACTTCAGATCAGA AGATTCTAGGTTTCGACTCCTGG CTGGCTCG	122	GGGCCAGUGGCGCAAUGGAUAA CGCGUCUGACUUCAGAUCAAGAA GAUUCUAGGUUCGACUCCUGGC UGGCUCG
CCT2.1	23	GCCCCAGTGGCCTAATGGATA AGGCACTGGCCTTCAAAGCCA GGGATTGTGGGTTTCGAGTCCC ACCTGGGGCG	123	GCCCCAGUGGCCUAAUGGAUAA GGCACUGGCCUUCAAAAGCCAGG GAUUGUGGGUUCGAGUCCACC UGGGGCG
CCT2.2	24	GCCCCAGTGGCCTAATGGATA AGGCACTGGCCTTCAAAGCCA GGGATTGTGGGTTTCGAGTCCC ACCTGGGCTG	124	GCCCCAGUGGCCUAAUGGAUAA GGCACUGGCCUUCAAAAGCCAGG GAUUGUGGGUUCGAGUCCACC UGGGCUG
CCT2.3	25	GCCCCGTTGGCCTAATGGATA AGGCACTGGCCTTCAAAGCCA GGGATTGTGGGTTTCGAGTCCC ACCCGGGGTG	125	GCCCCGUGGCCUAAUGGAUAA GGCACUGGCCUUCAAAAGCCAGG GAUUGUGGGUUCGAGUCCACC CGGGGUG
CCT2.4	26	GCCCCAGTGGCCCAATGGATA GGGCACTGGCCTTCAAAGCCA GGGATTGTGGGTTTCGAGTCCC ACCTGGGGTG	126	GCCCCAGUGGCCCAAUGGAUAG GGCACUGGCCUUCAAAAGCCAGG GAUUGUGGGUUCGAGUCCACC UGGGGUG
CCT2.5	27	GCCCCAGTGGCCTAGTGGATA AGGCACTGGCCTTCAAAGCCA GGGATTGTGGGTTTCGAGTCCC ACCTGGGGTG	127	GCCCCAGUGGCCUAGUGGAUAA GGCACUGGCCUUCAAAAGCCAGG GAUUGUGGGUUCGAGUCCACC UGGGGUG
CCT2.6	28	GCCCCAGTGGCCTAATGGATA AGGCACCGGCTTCAAAGCCG GGGATTGTGGGTTTCGAGTCCC ACCTGGGGTG	128	GCCCCAGUGGCCUAAUGGAUAA GGCACCGGCCUUCAAAAGCCGGG GAUUGUGGGUUCGAGUCCACC UGGGGUG
CCT2.7	29	GCCCCAGTGGCCTAATGGATA AGGCACTGGACTTCAAATCCAG GGATTGTGGGTTTCGAGTCCCA CCTGGGGTG	129	GCCCCAGUGGCCUAAUGGAUAA GGCACUGGACUUCAAAUCCAGG GAUUGUGGGUUCGAGUCCACC UGGGGUG

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

CCT2.8	30	GCCCCAGTGGCCTAATGGATA AGGCACTGGCCTTCAGAGCCA GGGATTGTGGGTTCGAGTCCC ACCTGGGGTG	130	GCCCCAGUGGCCUAAUGGAUAA GGCACUGGCCUUCAGAGCCAGG GAUUGUGGGUUCGAGUCCCACC UGGGGUG
CCT2.9	31	GCCCCAGTGGCCTAATGGATA AGGCACTGGCCTTCAAAGCCA GAGATTGTGGGTTCGAGTCCC ACCTGGGGTG	131	GCCCCAGUGGCCUAAUGGAUAA GGCACUGGCCUUCAGAGCCAGA GAUUGUGGGUUCGAGUCCCACC UGGGGUG
CCT2.10	32	GCCCCAGTGGCCTAATGGATA AGGCACTGGCCTTCAAAGCCA GGGATTGTGGGTTCGAGTCCC GCCTGGGGTG	132	GCCCCAGUGGCCUAAUGGAUAA GGCACUGGCCUUCAGAGCCAGG GAUUGUGGGUUCGAGUCCCGCC UGGGGUG
CCT1.1	33	GCCCCAGTGGCCTAATGGATA AGGCACTGGCCTTCAAAGCCA GGGATTGTGGGTTCGAGTCCC ACCTGGGGTG	133	GCCCCAGUGGCCUAAUGGAUAA GGCACUGGCCUUCAGAGCCAGG GAUUGUGGGUUCGAGUCCCACC UGGGGUG
CCT3.1	34	GCCCCGGTGGCCTAATGGATA AGGCATTGGCCTTCAAAGCCA GGGATTGTGGGTTCGAGTCCC ACCCGGGGTG	134	GCCCCGGUGGCCUAAUGGAUAA GGCAUUGGCCUUCAGAGCCAGG GAUUGUGGGUUCGAGUCCCACC CGGGGUG
TCT1.1	35	GGCTCTGTGGCGCAATGGATA GCGCATTGGACTTCAAATTCAA AGGTTCCGGGTTCGAGTCCCG GCAGAGTCG	135	GGCUCUGUGGCGCAAUGGAUAG CGCAUUGGACUUCAAAUCAAA GGUUCGGGUUCGAGUCCCGGC AGAGUCG
TCT1.2	36	GGCTCCGTGGCGCAATGGATA GCGCATTGGACTTCAAATTCAA AGGTTCCGGGTTCGAGTCCCG CCGGAGTCG	136	GGCUCUGUGGCGCAAUGGAUAG CGCAUUGGACUUCAAAUCAAA GGUUGCGGGUUCGAGUCCCGCC GGAGUCG
TCT1.3	37	GGCTCCGTGGCGCAATGGATA GCGCATTGGACTTCAAATTCAA AGGTTCTGGGTTCGAGTCCCA GCGGAGTCG	137	GGCUCUGUGGCGCAAUGGAUAG CGCAUUGGACUUCAAAUCAAA GGUUCUGGGUUCGAGUCCAGC GGAGUCG
TCT1.4	38	GGCTCCGTGGCGCAATGGATA GCGCATTGGACTTCAAATTCAA AGGTTCCGGGTTCGAGTCCCG GCGGAGCCG	138	GGCUCUGUGGCGCAAUGGAUAG CGCAUUGGACUUCAAAUCAAA GGUUCGGGUUCGAGUCCCGGC GGAGCCG
TCT1.5	39	GCCTCCGTGGCGCAATGGATA GCGCATTGGACTTCAAATTCAA AGGTTCCGGGTTCGAGTCCCG GCGGAGGCG	139	GCCUCCGUGGCGCAAUGGAUAG CGCAUUGGACUUCAAAUCAAA GGUUCGGGUUCGAGUCCCGGC GGAGGCG
TCT1.6	40	GGCCCCGTGGCGCAATGGATA GCGCATTGGACTTCAAATTCAA AGGTTCCGGGTTCGAGTCCCG GCGGGGTGCG	140	GGCCCCGUGGCGCAAUGGAUAG CGCAUUGGACUUCAAAUCAAA GGUUCGGGUUCGAGUCCCGGC GGGGUCG
TCT1.7	41	GGCTCAGTGGCGCAATGGATA GGCATTGGACTTCAAATTCAA AGGTTCCGGGTTCGAGTCCCG GCTGAGTCG	141	GGCUCAGUGGCGCAAUGGAUAG CGCAUUGGACUUCAAAUCAAA GGUUCGGGUUCGAGUCCCGGC UGAGUCG
TCT1.8	42	GGCTCCGTGGCCCAATGGATA GGCATTGGACTTCAAATTCAA AGGTTCCGGGTTCGAGTCCCG GCGGAGTCG	142	GGCUCUGUGGCCCAATGGAUAG GGCAUUGGACUUCAAAUCAAA GGUUCGGGUUCGAGUCCCGGC GGAGUCG
TCT1.9	43	GGCTCCGTGGCGCAATGGATA GGCACTGGACTTCAAATTCAAG AGGTTCCGGGTTCGAGTCCCG GCGGAGTCG	143	GGCUCUGUGGCGCAAUGGAUAG CGCACUGGACUUCAAAUCAGA GGUUCGGGUUCGAGUCCCGGC GGAGUCG
TCT1.10	44	GGCTCCGTGGCGCAATGGATA GCGCATCGGACTTCAAATTCCA AGGTTCCGGGTTCGAGTCCCG GCGGAGTCG	144	GGCUCUGUGGCGCAAUGGAUAG CGCAUCGGACUUCAAAUCGAA GGUUCGGGUUCGAGUCCCGGC GGAGUCG

10

20

30

40

50

【表 3 - 4】

TCT1.11	45	GGCTCCGTGGCGCAATGGATA GCGCATTGGACTTCAAATCCAA AGGTTCCGGGTTTCGAGTCCCG GCGGAGTCG	145	GGCUCCGUGGCGCAAUGGAUAG CGCAUUGGACUUCAAAUCCAAA GGUCCGGGUUCGAGUCCCGGC GGAGUCG
TCT1.12	46	GGCTCCGTGGCGCAATGGATA GCGCATTGGCCTTCAAAGTCAA AGGTTCCGGGTTTCGAGTCCCG GCGGAGTCG	146	GGCUCCGUGGCGCAAUGGAUAG CGCAUUGGCCUUCAAAGUCAAA GGUCCGGGUUCGAGUCCCGGC GGAGUCG
TCT1.13	47	GGCTCCGTGGCGCAATGGATA GCGCATTGGACTTCAAATTCAA GGGTTCCGGGTTTCGAGTCCCG GCGGAGTCG	147	GGCUCCGUGGCGCAAUGGAUAG CGCAUUGGACUUCAAAUUCAAG GGUCCGGGUUCGAGUCCCGGC GGAGUCG
TCT1.14	48	GGCTCCGTGGCGCAATGGATA GCGCATTGGACTTCAAATTCAA AGATTCCGGGTTTCGAGTCCCG GCGGAGTCG	148	GGCUCCGUGGCGCAAUGGAUAG CGCAUUGGACUUCAAAUUCAAA GAUCCGGGUUCGAGUCCCGGC GGAGUCG

10

【0053】

一部の実施形態は、DNA配列（例えば、配列番号1～48のいずれか）を指す。一部の
 実施形態では、DNA配列は、類似のRNA配列（例えば、配列番号101～148の
 いずれか）と互換可能であり得る。一部の実施形態は、RNA配列を指す。一部の実施形
 態では、RNA配列は、類似のDNA配列で互換可能であり得る。一部の実施形態では、
 UおよびTは、本明細書において提供される配列において互換することができる。一部の
 実施形態は、表3において提供されるDNA配列などのDNA配列を指す。一部の実施形
 態では、DNA配列は、表3における対応するRNA配列などの、本明細書において提供
 される類似のRNA配列と互換可能であり得る。一部の実施形態は、表3において提供さ
 れるRNA配列などのRNA配列を指す。一部の実施形態では、RNA配列は、表3にお
 ける対応するDNA配列などの、本明細書において提供される類似のDNA配列と互換可
 能であり得る。一部の実施形態では、本明細書に記載される操作されたtRNAは、表3
 において提供されるDNA配列を含むことができる。一部の実施形態では、本明細書に記
 載される操作されたtRNAは、表3において提供されるRNA配列を有する。一般的に
 、UおよびTは、配列間で互換されることができ、依然として、本明細書に記載される方
 法および組成物に有用であり得る。操作されたtRNAまたはtRNA配列を記載する一
 部の実施形態は、表3におけるDNAまたはRNA配列を含むことができる。操作された
 tRNAまたはtRNA配列を記載する一部の実施形態は、表3におけるDNA配列を含
 むことができる。操作されたtRNAまたはtRNA配列を記載する一部の実施形態は、
 表3におけるRNA配列を含むことができる。ある場合では、配列番号1～48のいづれ
 かへの言及は、配列番号101～148内の対応する配列への言及を含むことができるか
 、または逆も真なりであり得る。ある場合では、表3のDNA配列を含む操作されたtR
 NAまたは操作されたtRNA変異体に対して本明細書でなされる言及は、DNA配列を
 含むポリヌクレオチドによってコードされるRNA配列を含むtRNAを含むことができ
 る。

20

30

40

【0054】

一部の実施形態では、Aは、アデノシンを含む核酸塩基であり得る。一部の実施形態で
 は、Aは、リボースまたはデオキシリボース、およびアデノシンを含むヌクレオシドであ
 り得る。一部の実施形態では、Aは、リン酸塩、リボースまたはデオキシリボース、およ
 びアデノシンを含むヌクレオチドであり得る。一部の実施形態では、Tは、チミンを含む
 核酸塩基であり得る。一部の実施形態では、Tは、リボースまたはデオキシリボース、お
 よびチミンを含むヌクレオシドであり得る。一部の実施形態では、Tは、リン酸塩、リボ
 ースまたはデオキシリボース、およびチミンを含むヌクレオチドであり得る。一部の実施
 形態では、Uは、ウラシルを含む核酸塩基であり得る。一部の実施形態では、Uは、リボ

50

ースまたはデオキシリボース、およびウラシルを含むヌクレオシドであり得る。一部の実施形態では、Uは、リン酸塩、リボースまたはデオキシリボース、およびウラシルを含むヌクレオチドであり得る。一部の実施形態では、Cは、シトシンを含む核酸塩基であり得る。一部の実施形態では、Cは、リボースまたはデオキシリボース、およびシトシンを含むヌクレオシドであり得る。一部の実施形態では、Cは、リン酸塩、リボースまたはデオキシリボース、およびシトシンを含むヌクレオチドであり得る。一部の実施形態では、Gは、グアニンを含む核酸塩基であり得る。一部の実施形態では、Gは、リボースまたはデオキシリボース、およびグアニンを含むヌクレオシドであり得る。一部の実施形態では、Gは、リン酸塩、リボースまたはデオキシリボース、およびグアニンを含むヌクレオチドであり得る。

10

【0055】

一部の実施形態では、操作されたtRNAまたはその変異体は、BLASTを使用して測定される、配列番号3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、または22の配列のいずれかに対して、約70%~約99%の同一性を有する配列を含むことができる。ある場合では、操作されたtRNAと配列番号3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、または22の配列のいずれかの間の配列同一性は、約70%~約80%、80%~約90%、約85%~約95%、約90%~約95%、約95%~約99%であり得る。ある場合では、操作されたtRNAと配列番号3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、または22の配列のいずれかの間の配列同一性は、少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上であり得る。ある場合では、操作されたtRNAと配列番号3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、または22の配列のいずれかの間の配列同一性は、多くて約99%、98%、97%、69%、59%、94%、93%、92%、91%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%、75%、74%、73%、72%、71%、70%以下であり得る。例えば、配列番号4の配列を含む操作されたtRNAは、配列番号3に対して約98.6%の配列同一性を有することができる。

20

30

【0056】

一部の実施形態では、操作されたtRNAまたはその変異体は、BLASTを使用して測定される、配列番号103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、または122の配列のいずれかに対して、約70%~約99%の同一性を有する配列を含むことができる。ある場合では、操作されたtRNAと配列番号103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、または122の配列のいずれかの間の配列同一性は、約70%~約80%、80%~約90%、約85%~約95%、約90%~約95%、約95%~約99%であり得る。ある場合では、操作されたtRNAと配列番号103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、または122の配列のいずれかの間の配列同一性は、少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上であり得る。ある場合では、操作されたtRNAと配列番号103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、または122の配列のいずれかの間の配列同一性は、多

40

50

くて約 99%、98%、97%、69%、59%、94%、93%、92%、91%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%、75%、74%、73%、72%、71%、70% 以下であり得る。例えば、配列番号 104 の配列を含む操作された tRNA は、配列番号 103 に対して約 98.6% の配列同一性を有することができる。

【0057】

ある場合では、操作された tRNA またはその変異体は、BLAST を使用して測定される、配列番号 3、4、5、または 6 の配列のいずれかに対して、約 70%～約 99% の同一性を有する配列を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA と配列番号 3、4、5、または 6 の配列のいずれかの間の配列同一性は、約 70%～約 80%、80%～約 90%、約 85%～約 95%、約 90%～約 95%、約 95%～約 99% であり得る。ある場合では、操作された tRNA と配列番号 3、4、5、または 6 の配列のいずれかの間の配列同一性は、少なくとも 70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 以上であり得る。ある場合では、操作された tRNA と配列番号 3、4、5、または 6 の配列のいずれかの間の配列同一性は、多くて約 99%、98%、97%、69%、59%、94%、93%、92%、91%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%、75%、74%、73%、72%、71%、70% 以下であり得る。例えば、配列番号 35 の配列を含む操作された tRNA 変異体は、配列番号 6 の配列に対して約 97% の配列同一性を有することができる。

【0058】

ある場合では、操作された tRNA またはその変異体は、配列番号 3、6、7、32、または 45 の配列のいずれかと約 70%～約 99% の同一性を有する配列を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA と配列番号 3、6、7、32、または 45 の配列のいずれかとの間の配列同一性は、約 70%～約 80%、80%～約 90%、約 85%～約 95%、約 90%～約 95%、約 95%～約 99% であり得る。

【0059】

ある場合では、操作された tRNA またはその変異体は、本明細書に開示される操作された tRNA または操作された tRNA 変異体配列に対して約 70%～約 100% の同一性を有する配列を含むことができる（例えば、表 3 で開示される配列を含む）。ある場合では、操作された tRNA またはその変異体は、操作された tRNA または操作された tRNA 変異体配列に対して約 70%～約 99% の同一性を有する配列を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA またはその変異体は、操作された tRNA または操作された tRNA 変異体配列と比較して、少なくとも 70% の同一性を有する配列を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA またはその変異体は、操作された tRNA または操作された tRNA 変異体配列と比較して、少なくとも 75% の同一性を有する配列を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA またはその変異体は、操作された tRNA または操作された tRNA 変異体配列と比較して、少なくとも 80% の同一性を有する配列を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA またはその変異体は、操作された tRNA または操作された tRNA 変異体配列と比較して、少なくとも 85% の同一性を有する配列を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA またはその変異体は、操作された tRNA または操作された tRNA 変異体配列と比較して、少なくとも 90% の同一性を有する配列を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA またはその変異体は、操作された tRNA または操作された tRNA 変異体配列と比較して、少なくとも 91% の同一性を有する配列を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA またはその変異体は、操作された tRNA または操作された tRNA 変異体配列と比較して、少なくとも 92% の同一性を有する配列を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA またはその変異体は、操作された tRNA また

50

50

[illegible]

50

50

【 0 0 6 0 】

【 0 0 6 1 】

ある場合では、操作されたtRNAまたはその変異体は、配列番号32の配列に対して約70%～約99%の同一性を有する配列を含むことができる。ある場合では、操作されたtRNAまたはその変異体は、配列番号132の配列に対して約70%～約99%の同一性を有する配列を含むことができる。ある場合では、操作されたtRNAまたはその変異体は、配列番号32または132の配列と比較して、少なくとも75%の同一性を有する配列を含むことができる。ある場合では、操作されたtRNAまたはその変異体は、配

る配列を含むことができる。ある場合では、操作された tRNA またはその変異体は、配

30

40

50

20

30

50

20

30

50

変異体は、配列番号 7 または 107 の配列と比較して 100 % の同一性を有する配列を含むことができる。一部の実施形態では、% 同一性は、配列番号 7 または 107 のヌクレオチドの範囲（例えば、長さの 70 ~ 100 %）にわたるものであり得る。一部の実施形態では、% 同一性は、配列番号 7 または 107 のヌクレオチドの長さの 70 % の範囲にわたるものであり得る。一部の実施形態では、% 同一性は、配列番号 7 または 107 のヌクレオチドの長さの 75 % の範囲にわたるものであり得る。一部の実施形態では、% 同一性は、配列番号 7 または 107 のヌクレオチドの長さの 80 % の範囲にわたるものであり得る。一部の実施形態では、% 同一性は、配列番号 7 または 107 のヌクレオチドの長さの 85 % の範囲にわたるものであり得る。一部の実施形態では、% 同一性は、配列番号 7 または 107 のヌクレオチドの長さの 90 % の範囲にわたるものであり得る。一部の実施形態では、% 同一性は、配列番号 7 または 107 のヌクレオチドの長さの 95 % の範囲にわたるものであり得る。一部の実施形態では、% 同一性は、配列番号 7 または 107 のヌクレオチドの長さの 100 % の範囲にわたるものであり得る。

10

【0065】

本明細書に記載される修飾を含む操作された tRNA 変異体は、ある場合では、対応する親 tRNA と比較して、改善された抑制効率を示すことができる。ある場合では、抑制効率は、対応する親 tRNA についての抑制効率より約 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、10 %、11 %、12 %、13 %、14 %、15 %、16 %、17 %、18 %、19 %、20 %、21 %、22 %、23 %、24 %、25 %、26 %、27 %、28 %、29 %、または 30 % 以上であり得る。ある場合では、抑制効率は、対応する親 tRNA についての抑制効率より約 1 % ~ 約 30 %、約 2 % ~ 約 29 %、約 3 % ~ 約 28 %、約 4 % ~ 約 27 %、約 5 % ~ 約 26 %、約 6 % ~ 約 25 %、約 7 % ~ 約 24 %、約 8 % ~ 約 23 %、約 9 % ~ 約 22 %、約 10 % ~ 約 21 %、約 11 % ~ 約 20 %、約 12 % ~ 約 19 %、約 13 % ~ 約 18 %、約 14 % ~ 約 17 %、または約 15 % ~ 約 16 % 以上であり得る。

20

【0066】

ある場合では、本明細書に記載される修飾を含む操作された tRNA 変異体は、対応する親 tRNA の安定性と比較して、より良好な安定性を示すことができる。C-G 結合は、A-T 結合または非ワトソン・クリック結合より強力であり得るため、A-T または非ワトソン・クリックの代わりに、塩基対を C-G に変更することは、操作された tRNA に対する安定化効果を少なくとも有することができる。安定性は、例えば、熱力学的安定性または操作された tRNA の分解からの遮蔽に関して、異なる方法で測定することができる。塩基対を G-C 結合に変更することは、熱力学的ならびに分解遮蔽を少なくとももたらすことができ、それ故、操作された tRNA を分解から安定化することを測定する案は現在ない。

30

【0067】

一部の実施形態は、配列番号 3 ~ 22 のいずれかに提供される配列に関して、1 つまたは複数の突然変異を含む操作された tRNA 変異体を含む組成物を含む。一部の実施形態では、操作された tRNA 変異体は、配列番号 23 ~ 配列番号 48 のいずれか 1 つと少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 92 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 %、少なくとも 99 %、または 100 % の配列同一性を含むことができる。一部の実施形態は、操作された tRNA 変異体または操作された tRNA 変異体をコードするポリヌクレオチドを含むことができる組成物を含むことができる。一部の実施形態では、操作された tRNA 変異体は、配列番号 3 ~ 22 のいずれかに提供される配列を含む参照 tRNA と比較して、操作された tRNA の配列において 1 つまたは複数の突然変異を含むことができる。一部の実施形態では、操作された tRNA 変異体は、ポリペプチドをコードする mRNA における未成熟停止コドンを確認し、mRNA の翻訳中に、未成熟停止コドンのセンスコドンへの解釈を少なくとも部分的に形質転換して、実質的に全長のポリペプチドを産生することができる。

40

【0068】

50

10

20

30

40

50

施形態では、39位での置換は、Gへのものであり得る。一部の実施形態では、40位での置換は、Cへの置換であり得る。一部の実施形態では、42位での置換は、Gへのものであり得る。一部の実施形態では、43位での置換は、Gへの置換であり得る。一部の実施形態では、44位での置換は、Gへの置換であり得る。一部の実施形態では、46位での置換は、Aへの置換であり得る。一部の実施形態では、49位での置換は、Gへの置換であり得る。一部の実施形態では、50位での置換は、Tへの置換であり得る。一部の実施形態では、64位での置換は、Aへの置換であり得る。一部の実施形態では、65位での置換は、Cへの置換であり得る。一部の実施形態では、67位での置換は、Aへの置換であり得る。一部の実施形態では、67位での置換は、Tへの置換であり得る。一部の実施形態では、69位での置換は、Gへのものであり得る。一部の実施形態では、71位での置換は、Cへの置換であり得る。一部の実施形態では、71位での置換は、Gへのものであり得る。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体の配列は、複数の置換を含むことができる。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体の配列は、置換（複数可）を除いて、配列番号6または106と同一であり得る。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、プロキシ測定、半減期測定、アミノ酸変換効率測定、またはシンターゼもしくはリボソーム機構への結合の測定によって決定した場合、配列番号6に提供される配列を含む同等のtRNAと比較して、インビボで安定性の増加を示すことができる。

10

【0070】

一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、配列番号3と少なくとも70%同一であり得る配列を含むことができる。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、配列番号3と少なくとも75%同一であり得る配列を含むことができる。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、配列番号3と少なくとも80%同一であり得る配列を含むことができる。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、配列番号3と少なくとも85%同一であり得る配列を含むことができる。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、配列番号3と少なくとも90%同一であり得る配列を含むことができる。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、配列番号3と少なくとも95%同一であり得る配列を含むことができる。

20

【0071】

一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、配列番号3または103の2、6、13、15、22、28、31、37、39、42、44、50、64、67、71、または72位に置換を含むことができる。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、配列番号3または103の2位に置換を含むことができる。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、配列番号3または103の6位に置換を含むことができる。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、配列番号3または103の13位に置換を含むことができる。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、配列番号3または103の15位に置換を含むことができる。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、配列番号3または103の22位に置換を含むことができる。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、配列番号3または103の28位に置換を含むことができる。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、配列番号3または103の31位に置換を含むことができる。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、配列番号3または103の37位に置換を含むことができる。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、配列番号3または103の39位に置換を含むことができる。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、配列番号3または103の42位に置換を含むことができる。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、配列番号3または103の44位に置換を含むことができる。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、配列番号3または103の50位に置換を含むことができる。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、配列番号3または103の64位に置換を含むことができる。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、配列番号3または103の67位に置換を含むことができる。一部の実施形態では、操作された

30

40

50

tRNA変異体は、配列番号3または103の71位に置換を含むことができる。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、配列番号3または103の72位に置換を含むことができる。一部の実施形態では、2位での置換は、Gへの置換であり得る。一部の実施形態では、6位での置換は、Gへの置換であり得る。一部の実施形態では、13位での置換は、Cへの置換であり得る。一部の実施形態では、15位での置換は、Gへの置換であり得る。一部の実施形態では、22位での置換は、Gへの置換であり得る。一部の実施形態では、28位での置換は、Cへの置換であり得る。一部の実施形態では、31位での置換は、Aへの置換であり得る。一部の実施形態では、37位での置換は、Gへの置換であり得る。一部の実施形態では、39位での置換は、Tへの置換であり得る。一部の実施形態では、42位での置換は、Gへのものであり得る。一部の実施形態では、44位での置換は、Aへの置換であり得る。一部の実施形態では、50位での置換は、Cへの置換であり得る。一部の実施形態では、64位での置換は、Gへの置換であり得る。一部の実施形態では、67位での置換は、Cへの置換であり得る。一部の実施形態では、71位での置換は、Cへの置換であり得る。一部の実施形態では、72位での置換は、Cへの置換であり得る。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体の配列は、複数の置換を含む。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体の配列は、置換（複数可）を除いて、配列番号3または配列番号103と同一であり得る。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、プロキシ測定、半減期測定、アミノ酸変換効率測定、またはシンターゼもしくはリボソーム機構への結合の測定によって決定した場合、配列番号3または配列番号103に提供される配列を含む同等のtRNAと比較して、インビボで安定性の増加を示す。

【0072】

一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、配列番号5と少なくとも70%同一であり得る配列を含むことができ、配列番号5の73位に置換を含むことができる。一部の実施形態では、73位での置換は、Gへの置換であり得る。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体の配列は、複数の置換を含むことができる。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体の配列は、置換を除いて、配列番号5と同一であり得る。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、代理測定、半減期測定、アミノ酸荷電効率測定、または合成酵素もしくはリボソーム機構への結合の測定によって決定される、配列番号5において提供される配列を含む同等なtRNAと比較して、インビボで増加した安定性を示すことができる。

【0073】

一部の実施形態では、安定性の増加を示す操作されたtRNA変異体を含む組成物が、本明細書において開示される。一部の実施形態では、安定性の増加は、増加した熱力学的安定性を含むことができる。

【0074】

追加のRNA編集システム

一部の実施形態では、操作されたtRNAまたはその変異体を使用した停止コドンリードスルーは、核酸編集技術によって達成することができる。例えば、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（CRISPR）-Casベースのシステムを使用して、mRNAをコードする遺伝子を編集して、未成熟停止コドンを除くことができる。ある場合では、RNA編集システムを使用して、mRNAにおける未成熟停止コドンを直接編集することができる。

【0075】

RNA編集システムは、(i) 動員領域および／または(ii) 標的化領域を含むことができる操作されたポリヌクレオチド配列を含むことができる。このようなポリヌクレオチド配列は、例えば、動員領域の少なくとも一部を介して、RNA編集実体を動員することができる。ある場合では、RNA編集システムは、動員領域を含まなくてもよい。編集実体は、操作されたポリヌクレオチド配列および標的mRNAと接触されたとき、mRNAの未成熟停止コドンのヌクレオチドの塩基上で化学修飾を行い、これにより、未成熟停

止コドンセンスコドンに変換することができる。

【0076】

本明細書に記載されるRNA編集実体は、ADAR1またはADAR2を含む、ADAR（ADAR、NCBI遺伝子ID：103によってコードされる）などの、2本鎖RNA特異的アデノシンデアミナーゼを含むことができる。編集実体は、APOBECサブユニットA（NCBI遺伝子ID：200315）、B（NCBI遺伝子ID：9582）、C（NCBI遺伝子ID：27350）、D（NCBI遺伝子ID：140564）、H（NCBI遺伝子ID：164668）などの、アポリタンパク質B mRNA編集酵素（APOBEC）を含むことができる。RNA編集実体は、内在性であり得る。RNA編集実体は、RNA編集システムの一部として外因性にデリバリーすることができる。

10

【0077】

ある場合では、未成熟停止コドンのセンスコドンへの変更は、未成熟停止コドンのセンスコドンへの編集の効率で行うことができる。RNA編集の効率は、ポリペプチドをコードする未成熟停止コドンを含む2つの同等の細胞または細胞株の全長ポリペプチドの量を比較することによって決定することができる。1つの細胞または細胞株は、RNA編集システムを含むことができ、一方、他の細胞または細胞株は、RNA編集システムを有さなくてもよい。2つの細胞間の全長ポリペプチドの量の比較を決定することができる。一部の実施形態では、RNA編集実体による標的RNAのヌクレオチドの塩基の編集は、（i）標的RNAを初代細胞株に直接または間接的に導入すること（例えば、トランスフェクトすること）、（ii）操作されたポリヌクレオチド（例えば、動員領域および／または標的化領域を有するポリヌクレオチド）を初代細胞株に直接または間接的に導入すること（例えば、トランスフェクトすること）、ならびに（iii）標的RNAを配列決定することを含む、インビトロアッセイにおいて決定することができる。ある場合では、標的RNAを初代細胞株にトランスフェクトすることは、標的RNAをコードするプラスミドを初代細胞株にトランスフェクトすることを含むことができる。ある場合では、操作されたポリヌクレオチドを初代細胞株にトランスフェクトすることは、操作されたポリヌクレオチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、プラスミド）を初代細胞株にトランスフェクトすることを含むことができる。ある場合では、標的RNAが、逆転写酵素によってcDNAに変換されることを含むことができた後、配列決定は、標的RNAのサンガー配列決定を含むことができる。

20

30

【0078】

ある場合では、RNA編集の効率は、RNA編集のインビボ効率を含むことができる。ある場合では、RNA編集のインビボ効率は、疾患または状態を少なくとも一部処置することによって決定することができる。例えば、RNA編集のインビボ効率は、聴く能力を少なくとも一部改善すること、見る能力を少なくとも一部改善すること、運動能力、認知能力またはそれらの任意の組合せを少なくとも一部改善することによって測定することができる。ある場合では、RNA編集の効率は、RNA編集のインビトロ効率を含むことができる。

【0079】

RNA編集のインビボ効率は、約1%～100%であり得る。RNA編集のインビボ効率は、約10%～100%であり得る。RNA編集のインビボ効率は、約20%～100%であり得る。RNA編集のインビボ効率は、約30%～100%であり得る。RNA編集のインビボ効率は、約40%～100%であり得る。RNA編集のインビボ効率は、約50%～100%であり得る。RNA編集のインビボ効率は、約60%～100%であり得る。RNA編集のインビボ効率は、約70%～100%であり得る。RNA編集のインビボ効率は、約75%～100%であり得る。RNA編集のインビボ効率は、約80%～100%であり得る。RNA編集のインビボ効率は、約85%～100%であり得る。RNA編集のインビボ効率は、約90%～100%であり得る。RNA編集のインビボ効率は、約95%～100%であり得る。RNA編集のインビボ効率は、約20%～約40%

40

50

であり得る。RNA編集のインビボ効率は、約20%~60%であり得る。RNA編集のインビボ効率は、約10%~70%であり得る。

【0080】

RNA編集のインビトロ効率は、約1%~100%であり得る。RNA編集のインビトロ効率は、約10%~100%であり得る。RNA編集のインビトロ効率は、約20%~100%であり得る。RNA編集のインビトロ効率は、約30%~100%であり得る。RNA編集のインビトロ効率は、約40%~100%であり得る。RNA編集のインビトロ効率は、約50%~100%であり得る。RNA編集のインビトロ効率は、約60%~100%であり得る。RNA編集のインビトロ効率は、約70%~100%であり得る。RNA編集のインビトロ効率は、約75%~100%であり得る。RNA編集のインビトロ効率は、約80%~100%であり得る。RNA編集のインビトロ効率は、約85%~100%であり得る。RNA編集のインビトロ効率は、約90%~100%であり得る。RNA編集のインビトロ効率は、約95%~100%であり得る。RNA編集のインビトロ効率は、約20%~約40%であり得る。RNA編集のインビトロ効率は、約20%~60%であり得る。RNA編集のインビトロ効率は、約10%~70%であり得る。

10

【0081】

操作されたtRNAおよびその変異体ならびにtRNA前駆体をコードするベクターの一部の実施形態では、ベクターは、操作されたtRNAもしくはその変異体または操作されたtRNA前駆体もしくはその変異体をコードすることができる。一部の実施形態では、組成物は、ベクターを含むことができる。ある場合では、ベクターは、プラスミドまたはウイルスベクターを含むことができる。ある場合では、操作されたtRNAもしくはその変異体または操作されたtRNA前駆体もしくはその変異体をコードするベクターは、対象に投与することができる。ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、これらのいずれかの一部、またはそれらの任意の組合せを含むことができる。ある場合では、ベクターは、2本鎖DNAまたは1本鎖DNAなどの、DNAを含むことができる。ベクターは、RNAを含むことができる。ベクターは、組換えベクターを含むことができる。ある場合では、ベクターは、天然に存在するベクターから修飾することができる。ベクターは、2本鎖DNAまたは1本鎖DNAなどの、DNAを含むことができる。ベクターは、RNAを含むことができる。ある場合では、RNAは、塩基修飾を含むことができる。ベクターは、組換えベクターを含むことができる。ベクターは、天然に存在するベクターから修飾することができるベクターであり得る。ベクターは、天然に存在しないベクターの少なくとも一部を含むことができる。任意のベクターを利用することができる。ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、これらのいずれかの一部、またはそれらの任意の組合せを含むことができる。ある場合では、ベクターは、AAVベクターを含むことができる。ベクターを修飾して、修飾されたVP1タンパク質(例えば、VP1タンパク質を含むよう修飾されたAAVベクター)を含むことができる。態様では、AAVベクターは、組換えAAV(rAAV)ベクターであり得る。rAAVは、野生型AAV(wtAAV)において見られる実質的に類似のキャプシド配列および構造からなり得る。しかしながら、rAAVは、AAVタンパク質-コード配列が実質的に欠けており、それらの場所で設計された、対象ポリペプチドなどの、治療遺伝子発現カセットを有するゲノムをキャプシド形成する。ある場合では、ウイルス起源の配列は、ITRであり得、ベクター産生中に、ゲノム複製およびパッケージングをガイドする必要がある。適当なAAVベクターは、任意のAAV血清型または血清型の組合せから選択することができる。例えば、AAVベクターは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、またはそれらの任意の組合せのいずれか1つであり得る。ある場合では、ベクターは、その天然の指向性に基づき、選択することができる。ある場合では、ベクター血清型は、血液脳関門を通過するその能力に基づき、選択することができる。AAV9およびAAV10は

20

30

40

50

、血液脳関門を通過して、ニューロンおよびグリアを形質導入することが示されている。態様では、AAVベクターは、AAV2、AAV5、AAV6、AAV8、またはAAV9であり得る。ある場合では、AAVベクターは、少なくとも2つの血清型のキメラであり得る。態様では、AAVベクターは、血清型AAV2およびAAV5であり得る。ある場合では、キメラAAVベクターは、AAV2由来のrepおよびITR配列ならびにAAV5由来のcap配列を含むことができる。一部の実施形態では、AAVベクターは、自己相補的であることができる。ある場合では、AAVベクターは、逆位末端反復を含むことができる。他の場合では、AAVベクターは、自己相補的逆位末端反復(scITR)配列を含むことができる。ある場合では、rep、cap、およびITR配列は混合され、本明細書において提供される異なるAAV血清型の全てと一致し得る。ある場合では、適切なAAVベクターは、例えば、キャプシドまたはrepタンパク質における修飾を包含するようさらに修飾することができる。修飾はまた、欠損、挿入、突然変異、およびその組合せを含むことができる。ある場合では、ベクターに対する修飾を、免疫原性を低減するよう行って、反復投与を可能にすることができる。ある場合では、反復投与が、免疫原性を低減し、および／または除去するために行い得るとき、利用することができるベクターの血清型は、変更することができる。

10

【0082】

ベクターを利用して、核酸をデリバリーすることができる。ベクターは、2本鎖DNAまたは1本鎖DNAなどの、DNAを含むことができる。ベクターは、RNAを含むことができる。ある場合では、RNAは、塩基修飾を含むことができる。ベクターは、組み換えベクターを含むことができる。ベクターは、天然に存在するベクターから修飾することができるベクターであり得る。ベクターは、天然に存在しないベクターの少なくとも一部を含むことができる。任意のベクターを利用することができる。ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、これらのいずれかの一部、またはそれらの任意の組合せを含むことができる。ある場合では、ベクターは、AAVベクターを含むことができる。ベクターは、1本鎖骨格(例えば、図22Aに示されるウイルス骨格)を含むことができる。ある場合では、ベクターは、自己相補的領域(例えば、図22Bに示されるウイルス骨格)を含むことができる骨格を含むことができる。ベクターを修飾して、修飾されたVP1タンパク質(例えば、VP1タンパク質を含むよう修飾されたAAVベクター)を含むことができる。態様では、AAVベクターは、組換えAAV(rAAV)ベクターであり得る。rAAVは、野生型AAV(wtAAV)において見られる実質的に類似のキャプシド配列および構造からなり得る。しかしながら、rAAVは、AAVタンパク質-コード配列が実質的に欠けており、それらの場所で設計された、対象ポリペプチドなどの、治療遺伝子発現カセットを有するゲノムをキャプシド形成する。ある場合では、ウイルス起源の配列は、ITRであり得、ベクター産生中に、ゲノム複製およびパッケージングをガイドする必要がある。適切なAAVベクターは、任意のAAV血清型または血清型の組合せから選択することができる。例えば、AAVベクターは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、またはそれらの任意の組合せのいずれか1つであり得る。ある場合では、ベクターは、その天然の指向性に基づき、選択することができる。ある場合では、ベクター血清型は、血液脳関門を通過するその能力に基づき、選択することができる。AAV9およびAAV10は、血液脳関門を通過して、ニューロンおよびグリアを形質導入することが示されている。態様では、AAVベクターは、AAV2、AAV5、AAV6、AAV8、またはAAV9であり得る。ある場合では、AAVベクターは、少なくとも2つの血清型のキメラであり得る。態様では、AAVベクターは、血清型AAV2およびAAV5であり得る。ある場合では、キメラAAVベクターは、AAV2由来のrepおよびITR配列ならびにAAV5由来のcap配列を含むことができる。一部の実施形態では、AAVベクターは、自己相補的であることができる。ある場合では、AAVベクターは、逆位末端反復を含むことができる。他の場合では、AAVベクターは、自己相

20

30

40

50

補的逆位末端反復 (s c I T R) 配列を含むことができる。ある場合では、r e p、c a p、および I T R 配列は混合され、本明細書において提供される異なる A A V 血清型の全てと一致し得る。ある場合では、適当な A A V ベクターは、例えば、キャプシドまたは r e p タンパク質における修飾を包含するようさらに修飾することができる。修飾はまた、欠損、挿入、突然変異、およびその組合せを含むことができる。ある場合では、ベクターに対する修飾を、免疫原性を低減するよう行って、反復投与を可能にすることができる。ある場合では、反復投与が、免疫原性を低減し、および／または除去するために行い得るとき、利用することができるベクターの血清型は、変更することができる。

【0083】

ある場合では、A A V ベクターは、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 10、A A V 11もしくはA A V 12を含む血清型、またはA A V-D J、A A V-D J／8、A A V-R h 10、A A V-R h 74、A A V-レトロ、A A V-P H P . B、A A V 8-P H P . e B、A A V-P H P . SもしくはA A V-2 i 8を含むシュードタイプを有するA A V由来のものであることができる。ある場合では、A A V ベクターは、複製遺伝子を含むゲノムならびに第1のA A V 血清型由来の逆位末端反復および第2のA A V 血清型由来のキャプシドタンパク質を含むことができる。ある場合では、A A V ベクターは、A A V 2／5ベクター、A A V 2／6ベクター、A A V 2／7ベクター、A A V 2／8ベクター、またはA A V 2／9ベクターを含み得る。ある場合では、A A V ベクターは、A A V 2／5ベクターであり得る。

【0084】

一部の実施形態では、A A V ベクターは、ウイルスゲノム1つ当たり操作されたt R N Aまたはその変異体の2～6つのコピーを含むことができる。ある場合では、A A V ベクターは、操作されたt R N A、操作されたt R N A 変異体、またはその組合せを含むことができる。ある場合では、A A V ベクターは、ウイルスゲノム1つ当たり1～2、1～3、1～4、1～5、1～6、1～7、1～8、1～9、1～10、2～3、2～4、2～5、2～6、2～7、2～8、2～9、または2～10のコピーを含むことができる。ある場合では、A A V ベクターは、ウイルスゲノム1つ当たり1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10のコピーを含むことができる。一部の実施形態では、A A V ベクターは、ウイルスゲノム1つ当たり1～5、1～10、1～15、1～20、1～25、1～30、1～35、1～40、1～45、または1～50のコピーを含むことができる。

【0085】

ある場合では、操作されたt R N Aもしくはその変異体、操作されたt R N Aもしくはその変異体をコードするベクター、または両方は、デリバリーシステムに存在することができる。ある場合では、デリバリーシステムは、ウイルス粒子、リポソーム、ナノ粒子、エキソソーム、細胞外小胞、ナノメッシュ、荷電ポリマー、非荷電ポリマー、界面活性剤、浸透増強剤、遺伝子導入剤、リン脂質、ミセル、合成ベクター、高分子、デンドリマー、生体高分子、またはそれらの任意の組合せを含むことができる。

【0086】

ある場合では、操作されたt R N Aもしくはその変異体または操作されたt R N Aもしくはその変異体をコードするベクターは、ウイルス粒子、リポソーム、ナノ粒子、エキソソーム、細胞外小胞、ナノメッシュ、またはそれらの任意の組合せに存在し得る。ある場合では、ベクターは、ポリペプチドコート内部に存在し得る。

【0087】

一部の実施形態では、操作されたt R N Aもしくはその変異体、操作されたt R N A 前駆体もしくはその変異体、または両方は、医薬組成物などの組成物において含まれ得る。一部の実施形態では、操作されたt R N Aもしくはその変異体をコードするベクター、操作されたt R N A 前駆体もしくはその変異体をコードするベクター、またはそれらの任意の組合せは、医薬組成物などの組成物において含まれ得る。ある場合では、組成物は、賦形剤、希釈剤または担体を含むことができる。

【0088】

一部の実施形態では、本明細書に開示される組成物は、単位用量形態または複数用量形態であることができる。例えば、本明細書に記載される医薬組成物は、単位用量形態であることができる。本明細書で使用される、単位用量形態は、ヒトまたは非ヒト対象（例えば、動物）への投与に適した物理的離散単位を指すことができる。ある場合では、単位用量形態は、個別にパッケージングすることができる。それぞれの単位用量は、医薬担体、希釈剤、賦形剤、またはそれらの任意の組合せと関連して所望の治療効果を生じるのに十分であり得る、予め決定された量の有効成分（複数可）を含有することができる。単位用量形態の例は、アンプル、シリンジ、および個別にパッケージングされた錠剤およびカプセル剤を含むことができる。ある場合では、単位用量形態は、使い捨てのシリンジにおいて含まれることができる。ある場合では、単位投薬形態は、その分画または倍数において投与されることができる。複数用量形態は、単一容器にパッケージングされた、複数の同一の単位用量形態であることができ、分離した単位用量形態において投与されることができる。複数用量形態の例は、バイアル、錠剤もしくはカプセル剤のボトル、またはポイントもしくはガロンのボトルを含み得る。ある場合では、複数用量形態は、同じ医薬的に活性な薬剤を含むことができる。ある場合では、複数用量形態は、異なる医薬的に活性な薬剤を含むことができる。

10

【0089】

本明細書に記載される組成物は、賦形剤を含むことができる。賦形剤は、幹細胞に加えることができるか、またはその供給源由来の幹細胞と同時に単離することができる。賦形剤は、DMSO、グリセロール、ポリビニルピロリドン（PVP）、またはそれらの任意の組合せなどの、凍結保存剤を含むことができる。賦形剤は、スクロース、トレハロース、デンプン、これらのいずれかの塩、これらのいずれかの誘導体、またはそれらの任意の組合せなどの、凍結保存剤を含むことができる。賦形剤は、pH剤（例えば、組成物の成分の酸化もしくは分解を最小にするため）、安定化剤（例えば、組成物の成分の修飾もしくは分解を防ぐため）、緩衝化剤（例えば、温度安定性を増強するため）、可溶化剤（例えば、タンパク質溶解性を増加させるため）、またはそれらの任意の組合せを含むことができる。賦形剤は、界面活性剤、糖、アミノ酸、酸化防止剤、塩、非イオン性界面活性剤、可溶化剤、トリグリセリド、アルコール、またはそれらの任意の組合せを含むことができる。賦形剤は、炭酸ナトリウム、酢酸塩、クエン酸塩、リン酸塩、ポリエチレングリコール（PEG）、ヒト血清アルブミン（HSA）、ソルビトール、スクロース、トレハロース、ポリソルベート80、リン酸ナトリウム、スクロース、二リン酸ナトリウム、マンニトール、ポリソルベート20、ヒスチジン、クエン酸塩、アルブミン、水酸化ナトリウム、グリシン、クエン酸ナトリウム、トレハロース、アルギニン、酢酸ナトリウム、酢酸塩、HCl、エデト酸2ナトリウム、レシチン、グリセリン、キサンタンゴム、大豆イソフラボン、ポリソルベート80、エチルアルコール、水、テプレノン、またはそれらの任意の組合せを含むことができる。賦形剤は、Handbook of Pharmaceutical Excipients, American Pharmaceutical Association (1986)に記載される賦形剤であり得る。

20

30

【0090】

本明細書に記載される組成物は、アジュバント、希釈剤、結合剤、安定剤、緩衝剤、塩、親油性溶媒、保存剤、アジュバントなどの、不活性（例えば、検出可能な薬剤もしくはは標識）または活性な、天然に生じるか、または天然に生じない担体を含むことができる。ある場合では、担体は、薬学的に許容される担体を含むことができる。担体はまた、医薬賦形剤ならびに添加剤であるタンパク質、ペプチド、アミノ酸、脂質、ならびに炭水化物（例えば、単糖、ジース、トリース、テトラースオリゴ糖、およびオリゴ糖を含む、糖；アルジトール、アルドリン酸（aldolic acid）、エステル化糖などの誘導体化糖；ならびに多糖または糖ポリマー）を含み、1～99.99重量%または体積%を単独または組合せで含む、単独または組合せで存在することができる。代表的なタンパク質賦形剤は、ヒト血清アルブミン（HSA）、組換えヒトアルブミン（rHA）、ゼラチン、カゼ

40

50

インなどの血清アルブミンを含む。緩衝化能で機能することもできる、代表的なアミノ酸成分、抗体成分、または両方は、アラニン、アルギニン、グリシン、アルギニン、ベタイン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、システイン、リジン、ロイシン、イソロイシン、バリン、メチオニン、フェニルアラニン、アスパルテームなどを含む。本テクノロジーの範囲内の炭水化物賦形剤もまた、含むことができ、その例は、フルクトース、マルトース、ガラクトース、グルコース、D-マンノース、ソルボースなどの単糖；ラクトース、スクロース、トレハロース、セロビオースなどの、二糖；ラフィノース、メレチトース、マルトデキストリン、デキストラン、デンプンなどの、多糖；ならびにマンニトール、キシリトール、マルチトール、ラクチトール、キシリトールソルビトール（グルシトール）、およびミオイノシトールなどの、アルジトールを含むが、これらに限定されない。

10

【0091】

組成物は、希釈剤を含むことができる。希釈剤の非限定的な例は、水、グリセロール、メタノール、エタノール、および他の類似の生体適合性希釈剤を含むことができる。ある場合では、希釈剤は、酢酸、クエン酸、マレイン酸、塩酸、リン酸、硝酸、硫酸、または類似物などの水性酸であり得る。他の場合では、希釈剤は、炭酸カルシウムなどの炭酸アルカリ金属；リン酸カルシウムなどのリン酸アルカリ金属；硫酸カルシウムなどの硫酸アルカリ金属；セルロース、微結晶セルロース、酢酸セルロースなどのセルロース誘導体；酸化マグネシウム、デキストリン、フルクトース、デキストロース、パルミトステアリン酸グリセリン、ラクチトール、コリン、ラクトース、マルトース、マンニトール、シメチコン、ソルビトール、デンプン、アルファ化デンプン、タルク、キシリトールならびに／あるいはその無水物、水和物および／もしくは薬学的に許容される誘導体、またはその組合せを含む群から選択することができる。

20

【0092】

ある場合では、本明細書に記載される組成物は、本明細書に記載される疾患または状態を予防するために投与することができる。例えば、本明細書に記載される組成物を予防的に投与して、疾患または状態の発生率を予防することができる。予防は、疾患または状態の1つまたは複数の症状の出現、発生、または発生率を少なくとも一部、低減することができる。

【0093】

核酸が、本明細書に開示される。核酸は、図46A～46Fまたは配列番号52～56のいずれかに記載されるプラスミドまたはベクターを含むことができる。核酸は、本明細書に記載されるAAVなどのウイルスベクター内でデリバリーされるか、または封入されることができる。このような核酸のいずれかのいくつかのバージョンは、本明細書に記載される方法で使用することができる。例えば、核酸を含むAAVは、投与することができる。

30

【0094】

ガイドRNA

ガイドRNA設計

一部の実施形態では、ガイドRNA（gRNA）などの操作されたポリヌクレオチドが、本明細書に開示される。本明細書に開示される方法の一部の実施形態は、gRNAの製造または使用、例えば、gRNAのそれを必要とする対象への投与を含む。

40

【0095】

gRNAの編集効率およびgRNAの編集効率を改善するための代表的な戦略に影響し得る様々なパラメーターが、図31に示される。複数の操作されたgRNAは、例えば、gRNAガイド長を変更すること、gRNAにおけるバルジを導入すること（例えば、gRNAにおいてA/Cミスマッチを入れること）、またはgRNAにおいてGLURDドメインを入れることによって、設計され、スクリーニングされることができる。代表的なgRNA設計が、図32に示される。

【0096】

50

メディアムスループットスクリーニングアッセイを使用して、ガイドRNA (gRNA) またはtRNA (例えば、操作されたtRNAまたはその変異体) をスクリーニングすることができる。メディアムスループットスクリーニングは、機能獲得 (例えば、ルシフェラーゼ獲得のシグナル) アッセイを含むことができる。図33は、開始コドンが、下流ルシフェラーゼの産生を増加させることができるtRNAを使用して、開始コドンを誤翻訳することによって減弱される、ルシフェラーゼ獲得の機能アッセイの例を示す。図34は、代表的なgRNA設計をスクリーニングするために行われた実験のいくつかの結果を示す。

【0097】

動員配列が不存在である場合などの、ある場合では、操作されたポリヌクレオチドは、対象RNA編集実体 (例えば、ADAR) と関連して、標的RNAの編集を促進し、および／または対象標的RNAによってコードされるポリペプチドの発現を調節することができる。これは、構造特性を通じて達成することができる。構造特性は、ミスマッチ、対称バルジ、非対称バルジ、対称内部ループ、非対称内部ループ、ヘアピン、ゆらぎ塩基対、構造化モチーフ、環状化RNA、化学修飾、またはそれらの任意の組合せのいずれか1つを含むことができる。態様では、2本鎖RNA (dsRNA) 基質、例えば、ハイブリダイズしたポリヌクレオチド鎖は、本開示の操作されたポリヌクレオチドの標的RNAへのハイブリダイゼーションの際に形成することができる。本開示のdsRNA基質に存在し得る、いくつかの構造特性のうちの1つに対応し得る特性が、本明細書に記載される。特性の例は、ミスマッチ、バルジ (対称バルジもしくは非対称バルジ)、内部ループ (対称内部ループもしくは非対称内部ループ)、またはヘアピン (非標的化ドメインを含む動員ヘアピンもしくはヘアピン) を含むことができる。本開示の操作されたポリヌクレオチドは、1~50種の特性を有することができる。本開示の操作されたポリヌクレオチドは、1~5、5~10、10~15、15~20、20~25、25~30、30~35、35~40、40~45、45~50、5~20、1~3、4~5、2~10、20~40、10~40、20~50、30~50、4~7、または8~10種の特性を有することができる。

【0098】

本明細書に開示される、構造化モチーフは、dsRNA基質において2種以上の特性を含むことができる。

【0099】

2本鎖RNA (dsRNA) 基質は、本開示の操作されたガイドRNAの標的RNAへのハイブリダイゼーションに形成することができる。本明細書に開示される、ミスマッチは、dsRNA内の標的RNAにおける反対のヌクレオチドに対形成されない、ガイドRNAにおけるヌクレオチドを指すことができる。ミスマッチは、塩基対形成しないか、相補的でなく、または両方でない、任意の2つのヌクレオチドを含むことができる。一部の実施形態では、ミスマッチは、A/Cミスマッチであり得る。A/Cミスマッチは、標的RNAにおけるAの反対の、本開示の操作されたガイドRNAにおけるCを含むことができる。A/Cミスマッチは、標的RNAにおけるCの反対の、本開示の操作されたガイドRNAにおけるAを含むことができる。実施形態では、G/Gミスマッチは、標的RNAにおけるGの反対の、本開示の操作されたガイドRNAにおけるGを含むことができる。一部の実施形態では、編集部位の5'に位置するミスマッチは、編集されるべき標的Aの塩基フリッピングを促進することができる。ミスマッチはまた、配列特異性を与えるのを助けることができる。実施形態では、ミスマッチは、G/Gミスマッチを含むことができる。実施形態では、ミスマッチは、A/Cミスマッチを含むことができ、Aは、標的RNAにあり、Cは、操作されたポリヌクレオチドの標的化配列にある。別の実施形態では、A/CミスマッチにおけるAは、対象RNA編集実体によって編集される標的RNAにおけるヌクレオチドの塩基であり得る。

【0100】

態様では、構造特性は、独立して、操作されたポリヌクレオチドにおいて形成すること

ができる。他の場合では、構造特性は、操作されたポリヌクレオチドが標的RNAに結合したとき、形成することができる。構造特性はまた、操作されたポリヌクレオチドが、ペプチド、ヌクレオチド、または小分子などの他の分子と関連するとき、形成することができる。ある特定の実施形態では、操作されたポリヌクレオチドの構造特性は、標的RNAと独立して、形成することができ、その構造は、標的RNA領域との操作されたポリペプチドハイブリダイゼーションの結果として変更することができる。ある特定の実施形態では、構造特性は、操作されたポリヌクレオチドが、標的RNAと関連したとき、存在する。

【0101】

ある場合では、構造特性は、ヘアピンであり得るか、または含むことができる。ある場合では、操作されたポリヌクレオチドは、ヘアピンドメインが欠如し得る。他の場合では、操作されたポリヌクレオチドは、ヘアピンドメインまたは1つより多くのヘアピンドメインを含有することができる。ヘアピンは、ポリヌクレオチド中のどこにでも位置することができる。本明細書に開示される、ヘアピンは、RNA二本鎖であり得、単一のRNA鎖自体をフォールディングして、RNA二本鎖を形成することを含むことができる。単一のRNA鎖は、互いのフォールディング領域塩基対の上流および下流のヌクレオチド配列を有するため、それ自体がフォールディングされ得る。ヘアピンは、二本鎖構造全体の10～500ヌクレオチド長を有することができる。ヘアピンのステムループ構造は、3～15ヌクレオチド長であり得る。ヘアピンは、本明細書に開示される操作されたポリヌクレオチドのいずれかに存在することができる。本明細書に開示される操作されたポリヌクレオチドは、1～10のヘアピンを有することができる。一部の実施形態では、本明細書に開示される操作されたポリヌクレオチドは、1つのヘアピンを有する。一部の実施形態では、本明細書に開示される操作されたポリヌクレオチドは、2つのヘアピンを有する。本明細書に開示される、ヘアピンは、動員ヘアピンまたはヘアピンまたは非動員ヘアピンを指すことができる。ヘアピンは、本開示の操作されたポリヌクレオチド内のどこにでも位置することができる。一部の実施形態では、1つまたは複数のヘアピンは、本開示の操作されたポリヌクレオチドの3'末端に、本開示の操作されたポリヌクレオチドの5'末端に、もしくは本開示の操作されたポリヌクレオチドの標的化配列内、またはそれらの任意の組合せに存在する。

【0102】

一部の態様では、構造特性は、本明細書に開示される動員ヘアピンを含むことができる。動員ヘアピンは、ADARなどの、RNA編集実体を動員することができる。一部の実施形態では、動員ヘアピンは、GluR2ドメインを含むことができる。一部の実施形態では、動員ヘアピンは、Aluドメインを含むことができる。

【0103】

なお別の態様では、構造特性は、非動員ヘアピンを含むことができる。本明細書に開示される非動員ヘアピンは、操作されたポリヌクレオチドの標的RNAへの局在化を改善する機能性を示すことができる。一部の実施形態では、非動員ヘアピンは、核内繫留を改善する。一部の実施形態では、非動員ヘアピンは、U7 snRNA由来のヘアピンを含むことができる。

【0104】

別の態様では、構造特性は、ゆらぎ塩基を含むことができる。ゆらぎ塩基対は、弱く対形成する2つの塩基を指すことができる。例えば、本開示のゆらぎ塩基対は、Uと対形成したGを指すことができる。

【0105】

本開示のヘアピンは、任意の長さのものであり得る。態様では、ヘアピンは、約5～200以上のヌクレオチドであり得る。ある場合では、ヘアピンは、約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49

、 50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、
 63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、7
 6、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89
 、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、1
 02、103、104、105、106、107、108、109、110、111、1
 12、113、114、115、116、117、118、119、120、121、1
 22、123、124、125、126、127、128、129、130、131、1
 32、133、134、135、136、137、138、139、140、141、1
 42、143、144、145、146、147、148、149、150、151、1
 52、153、154、155、156、157、158、159、160、161、1
 62、163、164、165、166、167、168、169、170、171、1
 72、173、174、175、176、177、178、179、180、181、1
 82、183、184、185、186、187、188、189、190、191、1
 92、193、194、195、196、197、198、199、200、201、2
 02、203、204、205、206、207、208、209、210、211、2
 12、213、214、215、216、217、218、219、220、221、2
 22、223、224、225、226、227、228、229、230、231、2
 32、233、234、235、236、237、238、239、240、241、2
 42、243、244、245、246、247、248、249、250、251、2
 52、253、254、255、256、257、258、259、260、261、2
 62、263、264、265、266、267、268、269、270、271、2
 72、273、274、275、276、277、278、279、280、281、2
 82、283、284、285、286、287、288、289、290、291、2
 92、293、294、295、296、297、298、299、300、301、3
 02、303、304、305、306、307、308、309、310、311、3
 12、313、314、315、316、317、318、319、320、321、3
 22、323、324、325、326、327、328、329、330、331、3
 32、333、334、335、336、337、338、339、340、341、3
 42、343、344、345、346、347、348、349、350、351、3
 52、353、354、355、356、357、358、359、360、361、3
 62、363、364、365、366、367、368、369、370、371、3
 72、373、374、375、376、377、378、379、380、381、3
 82、383、384、385、386、387、388、389、390、391、3
 92、393、394、395、396、397、398、399、または400以上の
 ヌクレオチドを含むことができる。他の場合では、ヘアピンはまた、5～10、5～20
 、5～30、5～40、5～50、5～60、5～70、5～80、5～90、5～10
 0、5～110、5～120、5～130、5～140、5～150、5～160、5～
 170、5～180、5～190、5～200、5～210、5～220、5～230、
 5～240、5～250、5～260、5～270、5～280、5～290、5～30
 0、5～310、5～320、5～330、5～340、5～350、5～360、5～
 370、5～380、5～390、または5～400ヌクレオチドを含むことができる。
 ヘアピンは、ヌクレオチドループによって分けられた2本鎖のハイブリダイズしたRNA
 からなる2本鎖RNAモチーフ／構造にハイブリダイズするために、それ自体に対する十
 分な相補性を有するRNAの単一鎖から形成される構造特性であることができる。

10

20

30

40

50

【0106】

ある場合では、構造特性は、バルジであり得る。バルジは、標的鎖と操作されたポリヌ
 クレオチド鎖の間に単一（意図的な）核酸ミスマッチを含むことができる。他の場合では
 、塩基のミスマッチした伸長であるバルジ領域が、ハイブリダイズした相補的dsRNA
 領域を有する両側で隣接する場合、鎖間の1つより多くの連続ミスマッチは、バルジを構
 成する。バルジは、ポリヌクレオチドの任意の位置に位置することができる。ある場合で

は、バルジは、5'ヒドロキシルまたは3'ヒドロキシルから約30～約70ヌクレオチドに位置することができる。

【0107】

一部の実施形態では、2本鎖RNA (dsRNA) 基質は、本開示の操作されたポリヌクレオチドの標的RNAへのハイブリダイゼーションの際に形成することができる。本明細書に開示される、バルジは、dsRNA基質の形成の際に、形成される構造を指すことができ、操作されたポリヌクレオチドまたは標的RNAのいずれかにおけるヌクレオチドは、反対鎖上のそれらの位置の対応物に相補的ではない。バルジは、dsRNA基質の2次または3次構造を変更することができる。バルジは、dsRNA基質の操作されたポリヌクレオチド側またはdsRNA基質の標的RNA側の1～4ヌクレオチドを有することができる。一部の実施形態では、本開示の操作されたポリヌクレオチドは、2つのバルジを有することができる。一部の実施形態では、本開示の操作されたポリヌクレオチドは、3つのバルジを有することができる。一部の実施形態では、本開示の操作されたポリヌクレオチドは、4つのバルジを有することができる。一部の実施形態では、dsRNA基質におけるバルジの存在は、標的RNAにおける標的Aを選択的に編集し、非標的のオフターゲット編集を低減するために、ADARを位置付けることができる。一部の実施形態では、dsRNA基質におけるバルジの存在は、追加のADARを動員することができる。本明細書に開示されるdsRNA基質におけるバルジは、他のRNA編集実体などの、他のタンパク質を動員することができる。一部の実施形態では、編集部位の5'に位置するバルジは、編集されるべき標的Aの塩基フリッピングを促進することができる。バルジはまた、配列特異性を与えるのを助けることができる。バルジは、標的Aの選択的編集を生じる向きでそれを構成することによって、ADAR編集を指示することを助けることができる。

10

20

【0108】

一部の態様では、2本鎖RNA (dsRNA) 基質は、本開示の操作されたポリヌクレオチドの標的RNAへのハイブリダイゼーションの際に形成することができる。バルジは、対称バルジまたは非対称バルジであり得る。バルジは、dsRNA基質のガイドRNA側または標的RNA側のいずれか上の1～4つの関与するヌクレオチドによって形成することができる。ある場合では、対称バルジは、同じ数のヌクレオチドが、バルジの各側に存在するとき、形成することができる。対称バルジは、dsRNA基質の操作されたポリヌクレオチド側またはdsRNA基質の標的RNA側の2～4ヌクレオチドを有することができる。例えば、本開示のdsRNA基質における対称バルジは、dsRNA基質の操作されたポリヌクレオチド側および標的RNA側上に同じ数のヌクレオチドを有することができる。本開示の対称バルジは、dsRNA標的の操作されたポリヌクレオチド側上の2つのヌクレオチドおよびdsRNA基質の標的RNA側上の2つのヌクレオチドによって形成することができる。本開示の対称バルジは、dsRNA標的の操作されたポリヌクレオチド側上の3つのヌクレオチドおよびdsRNA基質の標的RNA側上の3つのヌクレオチドによって形成することができる。本開示の対称バルジは、dsRNA標的の操作されたポリヌクレオチド側上の4つのヌクレオチドおよびdsRNA基質の標的RNA側上の4つのヌクレオチドによって形成することができる。

30

40

【0109】

ある場合では、2本鎖RNA (dsRNA) 基質は、本開示の操作されたガイドRNAの標的RNAへのハイブリダイゼーションの際に形成することができる。バルジは、対称バルジまたは非対称バルジであり得る。ある場合では、非対称バルジは、異なる数のヌクレオチドが、バルジの各側に存在するとき、形成することができる。非対称バルジは、dsRNA基質のガイドRNA側または標的RNA側のいずれか上の1～4つの関与するヌクレオチドによって形成することができる。例えば、本開示のdsRNA基質における非対称バルジは、dsRNA基質の操作されたガイドRNA側および標的RNA側上に異なる数のヌクレオチドを有することができる。本開示の非対称バルジは、dsRNA基質の操作されたガイドRNA側上の0ヌクレオチドおよびdsRNA基質の標的RNA側上の

50

1つのヌクレオチドによって形成することができる。本開示の非対称バルジは、dsRNA基質の標的RNA側上の0ヌクレオチドおよびdsRNA基質の操作されたガイドRNA側上の1つのヌクレオチドによって形成することができる。本開示の非対称バルジは、dsRNA基質の操作されたガイドRNA側上の0のヌクレオチドおよびdsRNA基質の標的RNA側上の2つのヌクレオチドによって形成することができる。本開示の非対称バルジは、dsRNA基質の標的RNA側上の0ヌクレオチドおよびdsRNA基質の操作されたガイドRNA側上の2つのヌクレオチドによって形成することができる。本開示の非対称バルジは、dsRNA基質の操作されたガイドRNA側上の0のヌクレオチドおよびdsRNA基質の標的RNA側上の3つのヌクレオチドによって形成することができる。本開示の非対称バルジは、dsRNA基質の標的RNA側上の0ヌクレオチドおよびdsRNA基質の操作されたガイドRNA側上の3つのヌクレオチドによって形成することができる。本開示の非対称バルジは、dsRNA基質の操作されたガイドRNA側上の0のヌクレオチドおよびdsRNA基質の標的RNA側上の4つのヌクレオチドによって形成することができる。本開示の非対称バルジは、dsRNA基質の標的RNA側上の0ヌクレオチドおよびdsRNA基質の操作されたガイドRNA側上の4つのヌクレオチドによって形成することができる。本開示の非対称バルジは、dsRNA基質の操作されたガイドRNA側上の1つのヌクレオチドおよびdsRNA基質の標的RNA側上の2つのヌクレオチドによって形成することができる。本開示の非対称バルジは、dsRNA基質の標的RNA側上の1ヌクレオチドおよびdsRNA基質の操作されたガイドRNA側上の2つのヌクレオチドによって形成することができる。本開示の非対称バルジは、dsRNA基質の操作されたガイドRNA側上の1つのヌクレオチドおよびdsRNA基質の標的RNA側上の3つのヌクレオチドによって形成することができる。本開示の非対称バルジは、dsRNA基質の標的RNA側上の1ヌクレオチドおよびdsRNA基質の操作されたガイドRNA側上の3つのヌクレオチドによって形成することができる。本開示の非対称バルジは、dsRNA基質の操作されたガイドRNA側上の1つのヌクレオチドおよびdsRNA基質の標的RNA側上の4つのヌクレオチドによって形成することができる。本開示の非対称バルジは、dsRNA基質の標的RNA側上の1ヌクレオチドおよびdsRNA基質の操作されたガイドRNA側上の4つのヌクレオチドによって形成することができる。本開示の非対称バルジは、dsRNA基質の操作されたガイドRNA側上の2つのヌクレオチドおよびdsRNA基質の標的RNA側上の3つのヌクレオチドによって形成することができる。本開示の非対称バルジは、dsRNA基質の標的RNA側上の2ヌクレオチドおよびdsRNA基質の操作されたガイドRNA側上の3つのヌクレオチドによって形成することができる。本開示の非対称バルジは、dsRNA基質の操作されたガイドRNA側上の2つのヌクレオチドおよびdsRNA基質の標的RNA側上の4つのヌクレオチドによって形成することができる。本開示の非対称バルジは、dsRNA基質の標的RNA側上の2ヌクレオチドおよびdsRNA基質の操作されたガイドRNA側上の4つのヌクレオチドによって形成することができる。本開示の非対称バルジは、dsRNA基質の操作されたガイドRNA側上の3つのヌクレオチドおよびdsRNA基質の標的RNA側上の4つのヌクレオチドによって形成することができる。本開示の非対称バルジは、dsRNA基質の標的RNA側上の3ヌクレオチドおよびdsRNA基質の操作されたガイドRNA側上の4つのヌクレオチドによって形成することができる。ある場合では、構造特性は、ループである。

10

20

30

40

50

【0110】

態様では、2本鎖RNA (dsRNA) 基質は、本開示の操作されたポリヌクレオチドの標的RNAへのハイブリダイゼーションの際に形成することができる。本明細書に開示される、内部ループは、dsRNA基質の形成の際に形成される構造を指すことができ、操作されたポリヌクレオチドまたは標的RNAのいずれかにおけるヌクレオチドは、反対の鎖上のそれらの位置の対応物に相補的ではなく、dsRNA基質の標的RNA側または操作されたポリヌクレオチド側上のいずれかの内部ループの1つの側は、5つより多くのヌクレオチドを含むことができる。内部ループは、対称内部ループまたは非対称内部ループ

ブであり得る。編集部位の近くに存在する内部ループは、編集されるべき標的RNAにおける標的Aの塩基フリッピングを助けることができる。ある場合では、2本鎖RNA (dsRNA) 基質は、本開示の操作されたポリヌクレオチドの標的RNAへのハイブリダイゼーションの際に形成することができる。内部ループは、対称内部ループまたは非対称内部ループであり得る。ある場合では、対称内部ループは、同じ数のヌクレオチドが、内部ループの各側に存在するとき、形成することができる。例えば、本開示のdsRNA基質における対称内部ループは、dsRNA基質の操作されたポリヌクレオチド側および標的RNA側上に同じ数のヌクレオチドを有することができる。本開示の対称内部ループは、dsRNA標的の操作されたポリヌクレオチド側上の5つのヌクレオチドおよびdsRNA基質の標的RNA側上の5つのヌクレオチドによって形成することができる。本開示の対称内部ループは、dsRNA標的の操作されたポリヌクレオチド側上の6つのヌクレオチドおよびdsRNA基質の標的RNA側上の6つのヌクレオチドによって形成することができる。本開示の対称内部ループは、dsRNA標的の操作されたポリヌクレオチド側上の7つのヌクレオチドおよびdsRNA基質の標的RNA側上の7つのヌクレオチドによって形成することができる。本開示の対称内部ループは、dsRNA標的の操作されたポリヌクレオチド側上の8つのヌクレオチドおよびdsRNA基質の標的RNA側上の8つのヌクレオチドによって形成することができる。本開示の対称内部ループは、dsRNA標的の操作されたポリヌクレオチド側上の9つのヌクレオチドおよびdsRNA基質の標的RNA側上の9つのヌクレオチドによって形成することができる。本開示の対称内部ループは、dsRNA標的の操作されたポリヌクレオチド側上の10つのヌクレオチドおよびdsRNA基質の標的RNA側上の10のヌクレオチドによって形成することができる。

10

20

【0111】

態様では、2本鎖RNA (dsRNA) 基質は、本開示の操作されたポリヌクレオチドの標的RNAへのハイブリダイゼーションの際に形成することができる。内部ループは、対称内部ループまたは非対称内部ループであり得る。ある場合では、非対称内部ループは、異なる数のヌクレオチドが、内部ループの各側に存在するとき、形成することができる。例えば、本開示のdsRNA基質における非対称内部ループは、dsRNA基質の操作されたポリヌクレオチド側および標的RNA側上に異なる数のヌクレオチドを有することができる。本開示の非対称内部ループは、dsRNA基質の操作されたポリヌクレオチド側上の5つのヌクレオチドおよびdsRNA基質の標的RNA側上の6つのヌクレオチドによって形成することができる。本開示の非対称内部ループは、dsRNA基質の標的RNA側上の5つのヌクレオチドおよびdsRNA基質の操作されたポリヌクレオチド側上の6つのヌクレオチドによって形成することができる。本開示の非対称内部ループは、dsRNA基質の操作されたポリヌクレオチド側上の5つのヌクレオチドおよびdsRNA基質の標的RNA側上の7つのヌクレオチドによって形成することができる。本開示の非対称内部ループは、dsRNA基質の標的RNA側上の5つのヌクレオチドおよびdsRNA基質の操作されたポリヌクレオチド側上の7つのヌクレオチドによって形成することができる。本開示の非対称内部ループは、dsRNA基質の操作されたポリヌクレオチド側上の5つのヌクレオチドおよびdsRNA基質の標的RNA側上の8つのヌクレオチド内部ループによって形成することができる。本開示の非対称内部ループは、dsRNA基質の標的RNA側上の5つのヌクレオチドおよびdsRNA基質の操作されたポリヌクレオチド側上の8つのヌクレオチドによって形成することができる。本開示の非対称内部ループは、dsRNA基質の操作されたポリヌクレオチド側上の5つのヌクレオチドおよびdsRNA基質の標的RNA側上の9つのヌクレオチド内部ループによって形成することができる。本開示の非対称内部ループは、dsRNA基質の標的RNA側上の5つのヌクレオチドおよびdsRNA基質の操作されたポリヌクレオチド側上の9つのヌクレオチドによって形成することができる。本開示の非対称内部ループは、dsRNA基質の操作されたポリヌクレオチド側上の5つのヌクレオチドおよびdsRNA基質の標的RNA側上の10のヌクレオチド内部ループによって形成することができる。本開示の非対称内部ル

30

40

50

40

50

バルジまたはループを含む構造特性は、任意のサイズのものであることができる。ある場合では、バルジまたはループは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50塩基を少なくとも含むことができる。ある場合では、バルジまたはループは、合計約1～10、5～15、10～20、15～25、または20～30塩基を少なくとも含むことができる。

【0113】

ある場合では、構造特性は、構造化モチーフである。本明細書に開示される、構造化モチーフは、dsRNA基質において2種以上の構造特性を含むことができる。構造化モチーフは、正確な位置（複数可）においてADAR編集のための理想的な基質を生じるための、上記の請求項におけるなどの、構造特性の任意の組合せを含むことができる。これらの構造モチーフを人工的に操作して、ADAR編集を最大にすることができ、および／またはこれらの構造モチーフをモデル化して、公知のADAR基質を再現することができる。

10

【0114】

ある場合では、構造特性は、少なくとも一部の環状化のポリヌクレオチドを含むことができる。ある場合では、本明細書において提供されるポリヌクレオチドは、環状化されるか、または環状の配置にあることができる。一部の態様では、少なくとも一部の環状のポリヌクレオチドは、5'ヒドロキシルまたは3'ヒドロキシルが欠如し得る。

20

【0115】

ガイドRNAスクリーニングおよび定量

複数のスクリーニングアッセイ、細胞株、および分析ツールを開発して、gRNAまたはtRNAを含む様々なコンストラクトの効率をスクリーニングするか、または分析した。図35は、代表的なスクリーニングアッセイ、細胞株、ならびに分析アッセイおよびツールを示す。ノックアウト（KO）細胞株が生成された。ある場合では、KO細胞株は、ADAR1を欠き得る。ある場合では、KO細胞株は、ADAR2が欠如する。ADAR1 KO細胞株を生成するための欠損した領域および代表的なADAR1 KO細胞株におけるタンパク質発現分析の例は、図36に示される。ADAR2 KO細胞株を生成するための欠損した領域および代表的なADAR2 KO細胞株におけるmRNAレベルの例は、図37に示される。ある場合では、ADAR1は、ADAR2 KO細胞株に安定的に組換えることができる。ある場合では、ADAR2は、ADAR1 KO細胞株に安定的に組換えることができる（例えば、図38）。

30

【0116】

ある場合では、デジタル液滴PCRを使用して、遺伝子発現、スプライス変異体、gRNA、編集の程度、変異体のコピー数などを定量する。デジタル液滴PCR（ddPCR）プロセスのモードが、図39に描かれる。PCRプライマーおよびプローブセットを設計するために使用されたddPCRを使用した代表的な分析が、図40に示される。ある場合では、gRNAの細胞発現は、例えば、ddPCRを使用することによって、アッセイを使用して定量される（gRNA^Q）。ddPCRアッセイを設計して、gRNAの末端（例えば、3'末端または5'末端）に位置し得る普遍的なタグを使用して、gRNAの細胞発現を定量することができる（例えば、図41）。図42は、標的細胞へのトランスフェクション後のgRNAの高い細胞レベルの例を示す。gRNAの細胞発現レベルの定量を使用して、細胞におけるRNA編集を分析することができる（例えば、gRNAと編集効率の間の関係を確立する）。

40

【0117】

ある場合では、ヘアピン構造をgRNAにおいて導入して、安定性を増加させる。代表的なgRNAコンストラクトおよびHEK293細胞におけるRab7aの編集におけるそれらの効率は、図43に示される。データは、U6+27ループのgRNAへの添加は

50

、A D A R 2 の存在下での編集効率を増加させることができることを示唆する。g R N A コンストラクトの他の例および H E K 2 9 3 細胞における R a b 7 a の編集におけるそれらの効率は、図 4 4 に示される。

【0118】

ある場合では、合理的および半合理的な g R N A 設計は、ハイスループットスクリーニングと組み合わされる。図 4 5 は、ハイスループットスクリーニング方法を用いた g R N A 設計の利用における代表的なアプローチを説明する。

【0119】

II. 方法

デリバリー方法

ある場合では、本明細書に記載される組成物（例えば、医薬組成物）を投与して、操作された t R N A もしくはその変異体または操作された t R N A もしくはその変異体をコードするベクターの、生物学的作用の所望の部位へのデリバリーを可能にすることができる。例えば、本明細書に記載される操作された t R N A またはその変異体をコードする核酸は、ウイルスベクターに含まれることができ、静脈内投与によって投与されることができる。処置または療法を必要とする範囲への本明細書に開示される投与は、制限することを目的としないが、例えば、経口投与、局所投与、静脈内投与、吸入投与、またはそれらの任意の組合せによって達成することができる。一部の実施形態では、デリバリーは、注射、カテーテル法、胃瘻造設管投与、骨内投与、点眼、脳室内投与、耳投与、経皮投与、経口投与、直腸投与、鼻投与、腔内投与、空洞内投与、経尿道投与、舌下投与、頭蓋内注射、実質への頭蓋内注射、大槽内（I C M）、脳室内（I C V）またはその組合せを含むことができる。デリバリーは、身体の罹患した組織または領域への直接適用を含むことができる。ある場合では、局所投与は、ローション、溶液、エマルジョン、クリーム、バーム、オイル、ペースト、スティック、エアロゾル、泡沫、ゼリー、泡沫、マスク、パッド、粉末、固体、チンキ、バター、パッチ、ゲル、スプレー、点滴、液体製剤、皮膚などの、表面の外部表面への軟膏を投与することを含むことができる。一部の実施形態では、投与は、注射を含むことができる。一部の実施形態では、デリバリーは、注射を含むことができる。デリバリーは、くも膜下腔内注射、脳室内注射、または大槽内注射を含むことができる。本明細書において提供される組成物は、任意の方法によって投与することができる。投与の方法は、動脈内注射、大槽内注射、筋内注射、実質内注射、腹腔内注射、脊髄内注射、くも膜下腔内注射、静脈注射、脳室内注射、定位注射、皮下注射、硬膜外、またはそれらの任意の組合せによるものであり得る。デリバリーは、非経口投与を含むことができる。非経口投与の例は、静脈内投与すること、動脈内投与すること、くも膜下腔内投与すること、眼内投与すること、耳投与すること、脳室内投与すること、または腹腔内投与することを含むことができる。ある場合では、デリバリーは、装置由来であり得る。ある場合では、デリバリーは、ポンプ、注入ポンプ、またはその組合せによって投与することができる。一部の実施形態では、デリバリーは、浣腸、点眼、鼻スプレー、またはそれらの任意の組合せによるものであり得る。ある場合では、対象は、監督の不存在下で組成物を投与することができる。ある場合では、対象は、医療専門家（例えば、医師、看護師、医師のアシスタント、用務員、ホスピス労働者など）の監督下で組成物を投与することができる。一部の実施形態では、医療専門家は、組成物を投与することができる。

【0120】

ある場合では、投与は、経口摂取であり得る。ある場合では、デリバリーは、カプセル剤または錠剤であり得る。経口摂取デリバリーは、お茶、エリキシル剤、食品、飲料、飲み物、シロップ、液体、ジェル、カプセル、錠剤、油、チンキ、またはそれらの任意の組合せを含むことができる。一部の実施形態では、食品は、医療用の食品であり得る。ある場合では、カプセル剤は、ヒドロキシメチルセルロースを含むことができる。一部の実施形態では、カプセル剤は、ゼラチン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、プルラン、またはそれらの任意の組合せを含むことができる。ある場合では、カプセル剤は、コーティング、例えば、腸内コーティングを含むことができる。一部の実施形態では、カプセル

10

20

30

40

50

剤は、ヒプロメロースカプセル剤などのベジタリアン製品またはビーガン製品を含むことができる。一部の実施形態では、デリバリーは、吸入器、散布器、噴霧器、気化器、またはその組合せによる吸入を含むことができる。

【0121】

ある場合では、組成物は、単一単位用量または分割単位用量として投与／適用することができる。ある場合では、本明細書に記載される組成物は、第1の時間ポイントおよび第2の時間ポイントで投与することができる。ある場合では、第1の投与が、1時間、2時間、4時間、8時間、12時間、16時間、20時間、1日、2日、4日、7日、2週間、4週間、2カ月間、3カ月間、4カ月間、5カ月間、6カ月間、7カ月間、8カ月間、9カ月間、10カ月間、11カ月間、1年以上の投与時間の差で、他の投与の前に投与することができるように、組成物は、投与することができる。

10

【0122】

本明細書に開示される組成物の投与または適用は、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、または100日の連続または非連続の日数の処置持続時間行うことができる。ある場合では、処置持続時間は、約1～約30日間、約2～約30日間、約3～約30日間、約4～約30日間、約5～約30日間、約6～約30日間、約7～約30日間、約8～約30日間、約9～約30日間、約10～約30日間、約11～約30日間、約12～約30日間、約13～約30日間、約14～約30日間、約15～約30日間、約16～約30日間、約17～約30日間、約18～約30日間、約19～約30日間、約20～約30日間、約21～約30日間、約22～約30日間、約23～約30日間、約24～約30日間、約25～約30日間、約26～約30日間、約27～約30日間、約28～約30日間、または約29～約30日間であり得る。

20

【0123】

本明細書に開示される組成物の投与または適用は、少なくとも約1週間、少なくとも約1カ月間、少なくとも約1年間、少なくとも約2年間、少なくとも約3年間、少なくとも約4年間、少なくとも約5年間、少なくとも約6年間、少なくとも約7年間、少なくとも約8年間、少なくとも約9年間、少なくとも約10年間、少なくとも約15年間、少なくとも約20年間以上の処置持続時間行うことができる。投与は、対象の生涯の間1カ月に1回または1年に1回などの、対象の生涯に繰り返し行うことができる。投与は、少なくとも約1年間、5年間、10年間、15年間、20年間、25年間、30年間以上の間、1カ月に1回または1年に1回などの、対象の人生の実質的な部分に繰り返し行うことができる。

30

【0124】

本明細書に開示される組成物の投与または適用は、1日に少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、または24回行うことができる。ある場合では、本明細書に開示される組成物の投与または適用は、1週間に少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、または21回行うことができる。ある場合では、本明細書に開示される組成物の投与または適用は、1カ月に少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53

40

50

、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、または90回投与することができる。

【0125】

ある場合では、対象は、疾患の診断を受けていてもよい。ある場合では、対象は、疾患の診断を受けていなくてもよい。診断は、1つまたは複数の症状、またはそれらの任意の組合せに基づく臨床診断である、血液検査を含むことができる。診断（血液検査など）は、ポリペプチドをコードするmRNAにおける突然変異（例えば、未成熟停止コドン）の存在または不存在を確かに行うことができる。ある場合では、診断検査は、対象由来の生物学的試料を配列決定（例えば、サンガーの配列決定または合成による配列決定）することを含むことができる。mRNAの一部における突然変異の存在または不存在は、複数の突然変異（約1～約200個の突然変異など）を含むことができる。臨床診断は、1つまたは複数の症状に基づくことができる。症状は、失語症、手の意図的な使用の喪失、不随意的手の運動、運動性の喪失、歩行障害、筋緊張の喪失、けいれん、脊柱側弯、睡眠障害、成長速度の遅延、呼吸の問題、またはそれらの任意の組合せを含むことができる。ある場合では、症状は、聴力の喪失、会話および音の消音、単語の理解が困難、一定の聴覚が困難、視力喪失、視野欠損、視野の混濁、霧視、目の不快またはそれらの任意の組合せを含むことができる。ある場合では、症状は、咳、痰を伴う咳、息切れ、脂肪便、脂っこい便、不妊、体重減少、塩っぱい皮膚、呼吸困難またはそれらの任意の組合せを含むことができる。

10

20

【0126】

一部の実施形態では、AAVベクターなどのウイルスベクターの使用が、本明細書に開示される。ウイルスベクターは、操作されたmRNAを含むウイルスゲノムを含むことができる。ウイルスベクターは、操作されたmRNA変異体を含むウイルスゲノムを含むことができる。ウイルスベクターは、本明細書に記載されるコンストラクトを含むウイルスゲノムを含むことができる。ある場合では、方法は、ウイルスベクターを投与することを含むことができる。

【0127】

一部の実施形態では、少なくとも 1×10^3 ウイルスゲノムが、投与される。一部の実施形態では、少なくとも 1×10^4 ウイルスゲノムが、投与される。一部の実施形態では、少なくとも 1×10^5 ウイルスゲノムが、投与される。一部の実施形態では、少なくとも 1×10^6 ウイルスゲノムが、投与される。一部の実施形態では、少なくとも 1×10^7 ウイルスゲノムが、投与される。一部の実施形態では、少なくとも 1×10^8 ウイルスゲノムが、投与される。一部の実施形態では、少なくとも 1×10^9 ウイルスゲノムが、投与される。一部の実施形態では、少なくとも 1×10^{10} ウイルスゲノムが、投与される。一部の実施形態では、少なくとも 1×10^{11} ウイルスゲノムが、投与される。一部の実施形態では、少なくとも 1×10^{12} ウイルスゲノムが、投与される。一部の実施形態では、少なくとも 1×10^{13} ウイルスゲノムが、投与される。一部の実施形態では、少なくとも 1×10^{14} ウイルスゲノムが、投与される。一部の実施形態では、少なくとも 1×10^{15} ウイルスゲノムが、投与される。一部の実施形態では、少なくとも 1×10^{16} ウイルスゲノムが、投与される。一部の実施形態では、少なくとも 1×10^{17} ウイルスゲノムが、投与される。一部の実施形態では、少なくとも 1×10^{18} ウイルスゲノムが、投与される。一部の実施形態では、少なくとも 1×10^{19} ウイルスゲノムが、投与される。一部の実施形態では、少なくとも 1×10^{20} ウイルスゲノムが、投与される。一部の実施形態では、 1×10^3 以下のウイルスゲノムが、投与される。一部の実施形態では、 1×10^4 以下のウイルスゲノムが、投与される。一部の実施形態では、 1×10^5 以下のウイルスゲノムが、投与される。一部の実施形態では、 1×10^6 以下のウイルスゲノムが、投与される。一部の実施形態では、 1×10^7 以下のウイルスゲノムが、投与される。一部の実施形態では、 1×10^8 以下のウイルスゲノムが、投与される。

30

40

50

一部の実施形態では、 1×10^9 以下のウイルスゲノムが、投与される。一部の実施形態では、 1×10^{10} 以下のウイルスゲノムが、投与される。一部の実施形態では、 1×10^{11} 以下のウイルスゲノムが、投与される。一部の実施形態では、 1×10^{12} 以下のウイルスゲノムが、投与される。一部の実施形態では、 1×10^{13} 以下のウイルスゲノムが、投与される。一部の実施形態では、 1×10^{14} 以下のウイルスゲノムが、投与される。一部の実施形態では、 1×10^{15} 以下のウイルスゲノムが、投与される。一部の実施形態では、 1×10^{16} 以下のウイルスゲノムが、投与される。一部の実施形態では、 1×10^{17} 以下のウイルスゲノムが、投与される。一部の実施形態では、 1×10^{18} 以下のウイルスゲノムが、投与される。一部の実施形態では、 1×10^{19} 以下のウイルスゲノムが、投与される。一部の実施形態では、 1×10^{20} 以下のウイルスゲノムが、投与される。一部の実施形態では、 $1 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{15}$ のウイルスゲノムが、投与される。一部の実施形態では、 $1 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{16}$ のウイルスゲノムが、投与される。一部の実施形態では、 $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{17}$ のウイルスゲノムが、投与される。

10

20

30

40

50

【0128】

一部の実施形態では、操作されたtRNAまたはその変異体を含む組成物が、本明細書において開示される。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体を含む組成物が、本明細書において開示される。一部の実施形態では、組成物は、医薬組成物を含むことができる。医薬組成物は、操作されたtRNAまたはその変異体および薬学的に許容される賦形剤、担体または希釈剤を含むことができる。医薬組成物は、操作されたtRNA変異体および薬学的に許容される賦形剤、担体または希釈剤を含むことができる。医薬組成物は、用量単位形態であり得る。

【0129】

処置方法

疾患、障害または状態を処置する方法が、本明細書において提供される。疾患、障害または状態を予防する方法が、本明細書において提供される。疾患もしくは障害の処置方法、または疾患もしくは障害の予防方法が、本明細書において提供される。

【0130】

所望のアミノ酸の代わりに、未成熟停止コドンにコードするmRNA配列における突然変異と関連し得る疾患、障害または状態を処置する方法が、本明細書において提供される。ある場合では、停止コドンは、オパール(TGA; UGA)、オーカー(TAA; UAA)、またはアンバー(TAG; UAG)停止コドンであり得る。ある場合では、mRNA配列における疾患を引き起こす突然変異は、Arg(例えば、CGU、CGC、CGA、CGG、AGA、またはAAG)をコードするコドンの場所に、オパール停止コドン(TGA; UGA)を含むことができる。ある場合では、mRNA配列における疾患を引き起こす突然変異は、グルタミン(例えば、CCA、CAG)をコードするコドンの場所に、オーカー(TAA; UAA)またはオーカー(TAG; UAG)停止コドンを含むことができる。ある場合では、未成熟停止コドンは、切断されたバージョンのポリペプチドまたはタンパク質をもたらす。ある場合では、疾患、障害、または状態は、増加したレベルの切断されたバージョンのポリペプチド、または減少したレベルの実質的に全長のポリペプチドによって引き起こされ得る。

【0131】

例えば、レット症候群は、MeCP2のポリペプチド配列におけるArgから停止への突然変異により引き起こされ得る。健康な個体において、MeCP2タンパク質は、配列番号49に関して、または配列番号50に関して、アミノ酸168、255、270、294、198、186および453位にアルギニン(Arg)を含有する。レット症候群の患者において、アミノ酸168、255、270、294、198、186および453位でのMeCP2タンパク質の翻訳の未成熟な終結を引き起こす、MeCP2タンパク質における突然変異は、MeCP2の機能の喪失を引き起こし、レットを引き起こす突然変異の25%より多くを合わせて占める。MECP2におけるアルギニン(Arg)は、

R 8（アイソフォーム 2 についてのみ）、R 9（アイソフォーム 1 についてのみ）、R 8 4、R 8 5、R 8 9、R 9 1、R 1 0 6、R 1 1 1、R 1 1 5、R 1 3 3、R 1 6 2、R 1 6 7、R 1 8 8、R 1 9 0、R 2 1 1、R 2 5 0、R 2 5 3、R 2 6 8、R 3 0 6、R 3 0 9、R 3 4 4、R 3 5 4、R 4 2 0、R 4 5 8、R 4 6 8、R 4 7 1、R 4 7 8、および R 4 8 4 位においても見られる。本開示は、R 1 6 8 X、R 2 5 5 X、R 2 7 0 X、R 2 9 4 X、R 1 9 8 X、R 1 8 6 X、R 4 5 3 X、R 8 X（アイソフォーム 2 中）、R 9 X（アイソフォーム 1 中）、R 8 4 X、R 8 5 X、R 8 9 X、R 9 1 X、R 1 0 6 X、R 1 1 1 X、R 1 1 5 X、R 1 3 3 X、R 1 6 2 X、R 1 6 7 X、R 1 8 8 X、R 1 9 0 X、R 2 1 1 X、R 2 5 0 X、R 2 5 3 X、R 2 6 8 X、R 3 0 6 X、R 3 0 9 X、R 3 4 4 X、R 3 5 4 X、R 4 2 0 X、R 4 5 8 X、R 4 6 8 X、R 4 7 1 X、R 4 7 8 X、R 4 8 4 X、またはそれらの任意の組合せのいずれか 1 つを含む、MeCP2 タンパク質における任意の位置に存在し得る未成熟停止コドンの未成熟停止コドンリードスルーすることができる、操作された tRNA および操作された tRNA 変異体を提供する。ある場合では、対象におけるレット症候群は、本明細書に記載される組成物を対象に投与することによって処置することができ、組成物は、疾患を引き起こす未成熟停止コドン（例えば、UGA）と塩基対形成するアンチコドン配列を有する操作された tRNA またはその変異体を含むことができる。翻訳中、操作された tRNA またはその変異体は、Arg が負荷され得、成長する MeCP2 ポリペプチドに移動され、これにより、対象における MeCP2 発現を少なくとも実質的に回復させることができる。ある場合では、実質的に保存された MeCP2 ポリペプチドは、WT MeCP2 タンパク質と比較して、機能的であり得る。ある場合では、MeCP2 ポリペプチドを回復させることは、未成熟停止コドンが欠如する同等の mRNA を使用して産生される同等のポリペプチドと比べて、少なくとも 10 % より高い有効性で、本明細書に記載される組成物によって行うことができる。

10

20

30

40

50

【0132】

ある場合では、mRNA は、1 つ、2 つ、3 つ、4 つまたは 5 つの未成熟停止コドンを含むことができる。従って、本明細書に記載される操作された tRNA またはその変異体は、未成熟停止コドンのリードスルーを生じ、実質的に全長のポリペプチドを少なくとも一部、回復させ、疾患または状態を少なくとも一部、処置することができる。ある場合では、妊娠中のメス対象は、本明細書に記載される組成物を投与することができる。妊娠中のメス対象は、妊娠の 1 つまたは複数の段階で組成物を投与することができる。メス対象は、出生前期中の妊娠が生じる前に、組成物を投与することができる。ある場合では、妊娠中のメス対象内の胚または胎児は、本明細書に記載される組成物を投与することができる。ある場合では、胚は、インビトロの設定において本明細書に記載される組成物を投与することができる。

【0133】

疾患または状態は、レット症候群、自閉症、ウエスト症候群、レノックス・ガストー症候群、てんかん性脳症（EEP）、ピット・ホプキンス症候群、またはそれらの任意の組合せを含むことができる。ある場合では、疾患または状態は、嚢胞性線維症、難聴（例えば、常染色体優性 17 難聴、常染色体優性 13 難聴、常染色体優性 11 難聴）網膜色素変性症またはそれらの任意の組合せを含むことができる。ある場合では、疾患または状態は、テイ・サックス病、パーキンソン病、嚢胞性線維症、アッシャー症候群、ウォルマン病、肝疾患（アルファ-1 アンチトリプシン（AAT）欠乏症）、またはそれらの任意の組合せを含むことができる。疾患または状態は、神経変性疾患、筋肉障害、代謝障害、眼の障害（例えば、眼の疾患）、癌、またはそれらの任意の組合せを含むことができる。疾患または状態は、嚢胞性線維症、白皮症、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、喘息、β-サラセミア、カダシル症候群、シャルコー・マリー・トゥース病、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、認知症、遠位型脊髄性筋萎縮症（DSMA）、栄養障害型表皮水疱症、表皮水疱症、ファブリー病、第 V 因子ライデン関連障害、家族性大腸腺腫症、ポリープ症、ガラクトース血症、ゴーシェ病、グルコース-6-リン酸脱水素酵素、血友病、遺伝性ヘモクロマトーシス、ハンター症候群、ハンチントン病、ハーラー症候群、炎症性腸疾患（

I B D)、遺伝性多凝集症候群、レーバー先天黒内障、レッシュ・ナイハン症候群、リンチ症候群、マルファン症候群、ムコ多糖症、I および I I 型筋緊張性ジストロフィー、神経線維腫症、ニーマン・ピック病 A 型、B 型および C 型、N Y e s o 1 関連癌、パーキンソン病、ポイツ・ジェガース症候群、フェニルケトン尿症、ポンペ病、一次線毛病、プロトロンビン G 2 0 2 1 0 A 突然変異などの、プロトロンビン突然変異関連障害、肺高血圧、網膜色素変性症、サンドホフ病、複合免疫不全症候群 (S C I D)、鎌状赤血球貧血、脊髄性筋萎縮症、シュタルガルト病、X 関連免疫不全、様々な形態の癌 (例えば、B R C A 1 および 2 関連乳癌ならびに卵巣癌) を含むことができる。疾患または状態は、筋ジストロフィー、オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、肺癌、皮膚癌、シュタルガルト病、シャルコー・マリー・トゥース病、またはそれらの任意の組合せを含むことができる。疾患または状態は、筋ジストロフィーを含むことができる。筋ジストロフィーは、筋緊張性、デュシェンヌ型、ベッカー型、肢帯型、顔面肩甲上腕型、先天性、眼咽頭型、遠位型、エメリー・ドレイフス型、またはそれらの任意の組合せを含むことができる。疾患または状態は、慢性疼痛などの、疼痛を含むことができる。疼痛は、神経障害性疼痛、侵害受容性疼痛、またはその組合せを含むことができる。侵害受容性疼痛は、内臓疼痛、体性疼痛、またはその組合せを含み得る。

10

【0134】

ある場合では、疾患または状態は、レット症候群であり得る。レット症候群は、広範な関連障害を含み得る。レット症候群は、非定型レット症候群を含み得る。レット症候群は、肢帯型変異体、ザッペッラ型変異体、ハンフェルド型変異体またはそれらの任意の組合せを含み得る。疾患または状態は、M E C P 2、C D K L 5、F O X G 1、S T X B P 1、T C F 4、S C N 2 A、W D R 4 5、M E F 2 C、またはそれらの任意の組合せにおける 1 つまたは複数の突然変異によって引き起こされる、任意の数の疾患を含み得る。一部の実施形態では、レット症候群は、M e C P 2、F o x G 1、または C D K L 5 などのポリペプチドをコードする m R N A に存在する未成熟停止コドンによって引き起こされ得る。例えば、レット症候群に罹患している対象は、M e C P 2 ポリペプチドをコードする m R N A における R 1 6 8 X、R 2 2 5 X、R 2 7 0 X、R 2 9 4 X、R 1 9 8 X、または R 4 5 3 X 突然変異を有し得、X は、未成熟停止コドンであり得る。従って、本明細書に記載される操作された t R N A またはその変異体は、m R N A における未成熟停止コドンを認識し、停止コドンに応答して、アミノ酸を新生 M e C P 2 ポリペプチドに挿入し、これにより、実質的に全長の M e C P 2 ポリペプチドを少なくとも一部、回復させることができる。ある場合では、少なくとも一部、回復させることは、操作された t R N A またはその変異体で処置されていない対象と比較して、操作された t R N A またはその変異体で処置された対象における全長 M e C P 2 ポリペプチドの量を決定することによって測定することができる。ある場合では、レット症候群に罹患している対象は、C D K L 5 ポリペプチドをコードする m R N A における R 5 9 X、R 1 3 4 X、R 5 5 0 X、R 5 5 9 X、R 9 5 2 X、R 9 7 0 X、Q 1 1 8 X、Q 3 4 7 X、Q 4 5 9 X、Q 4 6 4 X、Q 6 5 2 X、Q 8 0 5 X、Q 8 3 2 X、Q 8 3 4 X、Q 8 6 5 X、または Q 9 0 2 X 突然変異を有し得、X は、未成熟停止コドンであり得る。ある場合では、レット症候群に罹患している対象は、F O X G 1 ポリペプチドをコードする m R N A における Q 4 6 X、Q 8 6 X、または Q 1 9 6 X 突然変異を有し得、X は、未成熟停止コドンであり得る。従って、本明細書に記載される操作された t R N A またはその変異体は、m R N A における未成熟停止コドンを認識し、停止コドンに応答して、アミノ酸を新生 C D K L 5 または F O X G 1 ポリペプチドに挿入し、これにより、実質的に全長のポリペプチドを少なくとも一部、回復させることができる。ある場合では、少なくとも一部、回復させることは、操作された t R N A またはその変異体で処置されていない対象と比較して、操作された t R N A またはその変異体で処置された対象における全長ポリペプチドの量を決定することによって測定することができる。

20

30

40

【0135】

ある場合では、ポリペプチドは、F o x G 1 ポリペプチドを含む。ある場合では、本明

50

細書に記載される操作された tRNA またはその変異体は、FoxG1 mRNA における未成熟停止コドン（UGA）を認識し、停止コドンに回答して、アミノ酸を新生 FoxG1 ポリペプチドに挿入し、これにより、実質的に全長のポリペプチドを少なくとも一部、回復させることができる。ある場合では、FoxG1 における未成熟停止コドンは、Q46X、Q86X、または Q196X にあり得、X は、停止コドン突然変異を表す。

【0136】

一部の実施形態では、レット症候群の少なくとも 1 つの症状が、軽減される。例えば、レット症候群の症状に関連する測定値は、ベースラインの測定値との比較において、改善され得る。レット症候群の症状の例は、成長遅滞、脳成長遅滞、小頭症、動作もしくは協調の減少もしくは喪失、手の制御の低減、歩行能力の減少、硬直性もしくは痙縮性の動作、話す能力の減少、視力の低下、無関心、反復的な手の動作、普通でない眼球運動、呼吸困難、易刺激性、恐怖、不安、認知障害、けいれん、異常な脳波、脊柱側弯、不整脈、または異常な睡眠パターンを含み得る。

10

【0137】

一部の実施形態では、疾患または状態は、レット症候群であり、レット症候群の少なくとも 1 つの症状が、軽減される。ある場合では、レット症候群の症状は、本明細書において提供される操作された tRNA または操作された tRNA 変異体を使用して、停止コドンを通じてリードすることによって、軽減することができる。ある場合では、レット症候群の症状は、停止コドンを通じて、時間のほぼ 5 %、時間のほぼ 10 %、時間のほぼ 15 %、時間のほぼ 20 %、または時間のほぼ 25 % をリードすることによって軽減されることができ、ある場合では、レット症候群の症状は、停止コドンを通じて、時間の少なくとも 5 %、時間の少なくとも 10 %、時間の少なくとも 15 %、時間の少なくとも 20 %、または時間の少なくとも 25 % をリードすることによって軽減されることができ、

20

【0138】

ある場合では、ポリペプチドは、CDKL5 ポリペプチドを含む。ある場合では、本明細書に記載される操作された tRNA またはその変異体は、CDKL5 mRNA における未成熟停止コドン（UGA）を認識し、停止コドンに回答して、アミノ酸を新生 CDKL5 ポリペプチドに挿入し、これにより、実質的に全長のポリペプチドを少なくとも一部、回復させることができる。ある場合では、CDKL5 における未成熟停止コドンは、R59X、R134X、R550X、R559X、R952X、R970X、Q118X、Q347X、Q459X、Q464X、Q652X、Q805X、Q832X、Q834X、Q865X、または Q902X であり得、X は、停止コドン突然変異を表す。

30

【0139】

ある場合では、疾患または状態は、難聴であり得る。難聴のいくつかの形態は、MYH9、COL11A2、または MYO7A などのポリペプチドをコードする mRNA に存在する未成熟停止コドンの存在によって引き起こされ得る。一部の実施形態では、常染色体優性 17 形態の難聴は、MYH9 ポリペプチドをコードする mRNA における R1933X 突然変異から生じ得る。一部の実施形態では、常染色体優性 13 形態の難聴は、COL11A2 ポリペプチドをコードする mRNA における R845X 突然変異から生じ得る。一部の実施形態では、常染色体優性 11 形態の難聴は、MYO7A ポリペプチドをコードする mRNA における R666X 突然変異から生じ得る。

40

【0140】

ある場合では、疾患または状態は、アッシャー症候群であり得る。アッシャー症候群 IB 型などのいくつかの形態のアッシャー症候群は、MYO7A 突然変異と関連し得る。アッシャー症候群は、混合性難聴および盲目と関連し得る。MYO7A は、アクチン結合分子モーターであり得るミオシンをコードすることができるミオシン VIIA をコードする。ある場合では、突然変異は、C628X 突然変異、R1861X 突然変異、または両方を含むことができる。ある場合では、突然変異は、A26E 突然変異、P132L 突然変異、R241G 突然変異、L366P 突然変異、I1045T 突然変異、L1863P 突然変異、G1218R 突然変異、R1240Q 突然変異、A1492V 突然変異、A22

50

04P 突然変異またはそれらの任意の組合せを含むことができる。

【0141】

ある場合では、疾患または状態は、ポリペプチドをコードするmRNAに存在する未成熟停止コドンの存在によって引き起こされる嚢胞性線維症であり得る。ある場合では、疾患または状態は、ポリペプチドをコードするmRNAに存在する未成熟停止コドンの存在によって引き起こされる網膜色素変性症であり得る。

【0142】

処置は、対象に、本明細書に記載される1つまたは複数の組成物を投与することを含むことができる。処置は、併用療法の対象への投与を含むことができる。ある場合では、併用療法は、癌処置（例えば、放射線療法、化学療法、CAR-T療法、免疫療法、ホルモン療法、凍結融解壊死治療）を含むことができる。ある場合では、併用療法は、外科手術、抗生物質、抗ウイルス薬、またはそれらの任意の組合せを含むことができる。ある場合では、併用療法は、粘液希釈、嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子（CFTR）モジュレーター療法、肺移植、気管支拡張剤、気道クリアランス、抗炎症医薬、噴霧器処置、経口膵酵素、便軟化剤を含むことができる。ある場合では、併用療法は、エ렉サカフトール（ellexacafitor）、アイバカフトールおよびテザカフトール、ルマカフトール、またはそれらの任意の組合せを含むことができる。一部の実施形態では、併用療法は、理学療法、水治療法、作業療法、言語療法、給餌補助、抗てんかん薬、抗逆流薬、レボカルニチンまたはそれらの任意の組合せを含むことができる。併用療法は、外科手術、ステロイド療法、非ステロイド性抗炎症薬（NSAID）またはそれらの任意の組合せを含むことができる。ある場合では、併用療法は、視力喪失（例えば、眼鏡、もしくは矯正眼科手術）を修復することを助けるか、または聴力消失（例えば、補聴器）を処置することを助けることができる。ある場合では、併用療法は、RNAまたはDNA編集テクノロジーを含むことができる。処置は、疾患または状態を治療することを含み得る。処置は、疾患または状態の1つまたは複数の症状を実質的に低減することを含み得る。

【0143】

一部の実施形態では、対象への操作されたtRNAまたはその変異体の投与を含む方法が、本明細書において開示される。一部の実施形態は、対象への操作されたtRNA変異体の投与を含む。一部の実施形態では、操作されたtRNAまたはその変異体は、ポリペプチドをコードするmRNAにおける未成熟停止コドンを認識し、操作されたtRNAまたはその変異体は、mRNAの翻訳中に、未成熟停止コドンのセンスコドンへの解釈を少なくとも部分的に形質転換し、操作されたtRNAまたはその変異体をコードする第1のベクターおよび第1のマーカをコードするスクリーニングmRNAをコードする第2のベクターを第1のヒト細胞にトランスフェクトすること、第1のマーカをコードするスクリーニングmRNAは、未成熟停止コドンを含むことができる；第2のマーカをコードする同等のスクリーニングmRNAをコードする第3のベクターを第2のヒト細胞にトランスフェクトすること、同等のスクリーニングmRNAは、未成熟停止コドンを含まなくてもよい；および第1のヒト細胞から放出される検出可能なシグナルの量と第2のヒト細胞から放出される検出可能なシグナルの量を比較することによって決定されてもよい、未成熟停止コドンが欠如する同等のmRNAを使用して産生される同等のポリペプチドと比べて、少なくとも約10%の効率で、インビボで実質的に全長のポリペプチドを産生する。

【0144】

診断方法

本明細書に記載される方法および組成物は、疾患もしくは状態の存在もしくは不存在を同定すること、疾患もしくは状態を処置すること、またはそれらの任意の組合せを含むことができる。方法は、必要とする対象に、薬学的に許容される量の、本明細書に記載される操作されたtRNAまたはその変異体などの組成物または化合物を投与することを含むことができる。

【0145】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、対象は、投与前に、疾患または状態を有すると診断されているか、または含むことができる。一部の実施形態では、診断は、インビトロ診断検査によって決定されるか、または含むことができる。一部の実施形態では、処置は、診断の際に、提供されることができる。

【0146】

ナンセンス媒介減衰の阻害

一部の実施形態では、操作されたtRNAは、標的mRNAを含むmRNAのノンセンス介在性減衰(NMD)を抑制する。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体は、NMDを抑制する。操作されたtRNAまたは操作されたtRNA変異体によるNMDのこのような抑制は、本明細書に記載される方法のいずれかに含まれ得る。一部の実施形態は、細胞を操作されたtRNA、またはその変異体と接触させることを含む、NMDを阻害する方法を含むことができる。一部の実施形態では、接触は、細胞における標的mRNAのNMDの予防または減少をもたらすことができる。一部の実施形態では、接触は、ベースラインの測定値と比べて、細胞における標的mRNA測定値における増加をもたらすことができる。一部の実施形態は、それを必要とする対象に、操作されたtRNA、またはその変異体を投与することを含む、NMDを阻害する方法を含むことができる。一部の実施形態では、投与は、対象における標的mRNAのNMDの予防または減少をもたらすことができる。一部の実施形態では、投与は、ベースラインの測定値と比べて、対象における標的mRNA測定値における増加をもたらすことができる。標的mRNA測定値における増加は、対象から採取された第1の試料におけるベースラインの標的mRNA測定値と比べた、対象から採取された第1の試料におけるものであり得る。第1のおよび／または第2の試料は、本明細書に記載される組織または体液試料を含むことができる。

10

20

【0147】

ある場合では、操作されたtRNAまたはその変異体は、標的mRNAのNMDを、1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%もしくは100%、または前述のパーセンテージのいずれか2つの範囲で減少させることができる。ある場合では、操作されたtRNAまたはその変異体は、標的mRNAのNMDを、少なくとも約1%～約10%、5%～約20%、10%～約35%、25%～約50%、40%～約70%、60%～約80%、75%～約90%または約85%～約100%減少させることができる。

30

【0148】

NMDは、ある場合では、未成熟終止コドン(PTC)を含有するmRNAを分解する品質管理経路であり得る。エクソンとエクソンの接合は、mRNAがNMDの標的とされるかどうかを決定するため特徴付けられる。mRNAのスプライシング中に、エクソン接合複合体(EJC)は、エクソンとエクソンの接合の上流に20～24ヌクレオチドを形成することができる。EJCは、翻訳の第2ラウンド中に置換されるまで、スプライシング後に、mRNAに結合したままであり得る。PTCが存在しない場合、EJCは、翻訳中に、取り除かれることができ、これにより、mRNA抵抗性をNMDによる分解に付与する。PTCが、EJCの上流の少なくとも50ヌクレオチドに存在する場合、リボソームは、停止し、EJCは、mRNAと安定的に関連したままであり得る。この複合体は、両方がNMDに関与し得る、核原形質シャトル因子、およびUpf3を動員することができる異種性タンパク質組成物、核周囲タンパク質を有する動的構造であり得る。Upf1などのRNA依存性ヘリカーゼは、翻訳放出因子によってmRNAに動員され、終結したリボソームと下流のEJCを架橋して、mRNAの減衰を誘導し得る活性なNMD複合体を形成することができる。この分解は、キャップ除去、続いて5'から3'への減衰およびデアデニレーション、続いて3'から5'への減衰を含むことができる。PTCリードスルーの場合、終結複合体とEJCの間の架橋は、ある場合では、形成することができず、リボソームは、EJCタンパク質複合体を突然変異体転写物から脱離することができ、もはやNMDの標的ではあり得ない。これは、停止コドンリードスルーが、どのように、NM

40

50

Dを弱め、mRNAを安定化することができるかを説明するのを助けることができる。操作されたtRNAまたはその変異体は、本明細書に記載されるNMDのこれらの態様のいずれかと干渉することができる。

【0149】

PTC抑制は、(1)翻訳の継続および／または(2)最終のEJCのmRNAからの解離を可能にすることによって、NMDを阻害することができる(例えば、図49-Kee ling and Bedwell, Wiley Interdiscip Rev RNA (2011)から適用、を参照のこと)。

【0150】

PTC／ナンセンス突然変異を含有する標的mRNAの、抑制因子tRNAによるPTC抑制およびリードスルーは、NMD経路を回避し、標的mRNAのレベルを安定化／増加させる方法のうちの1つであり得る。例えば、抑制因子tRNAのウルリッヒ病線維芽細胞へのトランスフェクションは、標的mRNAの上方制御をもたらすことが示されたことを含むことができるSako et al, NASS (2006)。

【0151】

本明細書に記載される抑制因子tRNAを用いたPTCリードスルーは、標的mRNAのナンセンス介在性減衰(NMD)を阻害することができる。これは、標的mRNAの細胞内レベルを増加させることができる。標的mRNAにおけるPTCの続く抑制は、全長機能的タンパク質を産生することができる。

【0152】

製造方法

本明細書に記載される操作されたtRNAもしくはその変異体、操作されたtRNAもしくはその変異体をコードするポリヌクレオチド、または医薬組成物を生成する方法が、本明細書において提供される。方法は、本明細書に開示される態様を含むことができる。ある場合では、複数のプロモーター、1つまたは複数の操作されたtRNAまたはその変異体をコードする遺伝子配列を含むことができるベクターが、産生され得る。ベクターは、第1のプロモーター(例えば、hU6、またはmU6プロモーター)、第2のプロモーター(例えば、hU6、またはmU6プロモーター)、第3のプロモーター(例えば、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)プロモーター)、操作されたtRNAまたはその変異体をコードするポリヌクレオチドを含む導入遺伝子、および検出可能なポリペプチドをコードするレポーター遺伝子を含むことができる。ポリヌクレオチドは、プロモーターの上流に5' ITRを含むことができる。ある場合では、ポリヌクレオチドは、レポーター遺伝子下流に3' ITRを含むことができる。ある場合では、レポーター遺伝子は、mCherry、緑色蛍光タンパク質(GFP)、またはβ-ガラクトシダーゼをコードする1つまたは複数の遺伝子を含むことができる。第1のプロモーターまたは第2のプロモーターは、U6プロモーター(例えば、ヒトU6(hU6))を含むことができる。U6プロモーターは、ヒトU6プロモーターまたはマウスU6プロモーターであり得る。U6プロモーターは、メチル化されることができる。第3のプロモーターは、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)プロモーターであり得る。ある場合では、ベクターは、精製または単離によって産生することができる。ある場合では、プロモーターは、U7プロモーターであり得る。ある場合では、プロモーターは、PolIIIプロモーターであり得る。

【0153】

パッケージング

本開示は、操作されたtRNAまたはその変異体、プロモーター、スタッパー配列、およびそれらの任意の組合せをパッケージングするウイルスベクターを提供する。一部の実施形態では、本開示のウイルスベクターは、操作されたtRNAまたはその変異体の1つまたは複数のコピーをパッケージングすることができる。一部の実施形態では、本開示のウイルスベクターは、操作されたtRNAまたはその変異体の2つのコピーをパッケージングすることができる。一部の実施形態では、本開示のウイルスベクターは、操作されたtRNAまたはその変異体の3つのコピーをパッケージングすることができる。一部の実施形態では、本開示のウイルスベクターは、操作されたtRNAまたはその変異体の4

つのコピーをパッケージングすることができる。一部の実施形態では、本開示のウイルスベクターは、操作されたtRNAまたはその変異体の6つのコピーをパッケージングすることができる。一部の実施形態では、本開示のウイルスベクターは、操作されたtRNAまたはその変異体の6つのコピーより多くをパッケージングすることができる。本開示のウイルスベクターは、操作されたtRNAまたはその変異体の1~200、1~100、50~100、20~40、10~50、または1~70のコピーをパッケージングすることができる。一部の実施形態では、本開示のウイルスベクターは、操作されたtRNAまたはその変異体の少なくとも1、10、20、30、40、50、70、100、200、300、400以上のコピーをパッケージングすることができる。一部の実施形態では、本開示のウイルスベクターは、操作されたtRNAまたはその変異体の多くても約400、300、200、100、70、50、40、30、20、10、2つ以下のコピーをパッケージングすることができる。

10

【0154】

1つまたは複数の操作されたtRNAまたはその変異体は、プラスミド、AAVベクター、レンチウイルスベクター、または任意の他のベクターシステムを含むが、これらに限定されない、ベクターにおいてパッケージングされることができる。本明細書に開示されるベクターはまた、GFPまたはmCherryなどの、マーカーまたはレポーター遺伝子をコードすることができる。本明細書に開示されるベクターはまた、ヒトU6(hU6)などの、上流外来性プロモーターをコードすることができる。一部の実施形態では、操作されたtRNAもしくはその変異体、マーカー、および／またはスタッファー配列は、外来性プロモーター(例えば、マウスU6(mU6)またはヒトU6(hU6)プロモーター)の制御下にある、ウイルスベクターにおいてパッケージングされる。一部の実施形態では、操作されたtRNA抑制因子もしくはその変異体、マーカー、および／またはスタッファー配列は、外来性プロモーターを含まないウイルスベクターにおいてパッケージングされる。ある場合では、ベクターは、複数のプロモーター、1つまたは複数の操作されたtRNAまたはその変異体をコードする遺伝子配列を含むことができる。ベクターは、第1のプロモーター(例えば、hU6、またはmU6プロモーター)、第2のプロモーター(例えば、hU6、またはmU6プロモーター)、第3のプロモーター(例えば、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)プロモーター)、操作されたtRNAまたはその変異体をコードするポリヌクレオチドを含む導入遺伝子、および検出可能なポリペプチドをコードするレポーター遺伝子を含むことができる。ポリヌクレオチドは、プロモーターの上流に5' ITRを含むことができる。ある場合では、ポリヌクレオチドは、レポーター遺伝子下流に3' ITRを含むことができる。ある場合では、レポーター遺伝子は、mCherry、緑色蛍光タンパク質(GFP)、またはβ-ガラクトシダーゼをコードする1つまたは複数の遺伝子を含むことができる。第1のプロモーターまたは第2のプロモーターは、U6プロモーター(例えば、ヒトU6(hU6))を含むことができる。U6プロモーターは、ヒトU6プロモーターまたはマウスU6プロモーターであり得る。U6プロモーターは、メチル化されることができる。第3のプロモーターは、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)プロモーターであり得る。ある場合では、ベクターは、精製し、単離することができる。

20

30

40

【0155】

本開示のベクターをまたスタッファー配列にパッケージングして、デリバリーされるべきゲノム全体をパッケージングするウイルス粒子の良好な産生を確かに行うことができる。例えば、天然に存在するスタッファー配列(例えば、イチゴまたはラムダファージ由来のDNA)が、ベクターにおいて含まれ得る。一部の実施形態では、スタッファー配列は、完全な合成配列であり得る。一部の実施形態では、本明細書において提供されるベクターは、1~6つの操作されたtRNAまたはその変異体およびスタッファー配列をパッケージングする。一部の実施形態では、本明細書において提供されるベクターは、外来性hU6プロモーター、1~6つの操作されたtRNAおよびスタッファー配列をパッケージングする。スペーサー配列は、スタッファー配列または充填剤配列を含むことができる。

50

スパーサー配列、スタッファー配列、または充填剤配列は、一部の実施形態では、互換的に言及され得る。ある場合では、ベクターは、ITRから異なる距離で、操作されたtRNAまたはその変異体の配列を置くことができる1つまたは複数のスパーサー配列を含むことができる。スパーサー配列は、6ヌクレオチド (nt) 長の配列を含むことができる。スパーサー配列は、10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、600、1000ヌクレオチドまたは本明細書で述べられるヌクレオチドの2つの数のいずれかの間にある任意の数のヌクレオチドを含むことができる。例えば、スパーサー配列は、約10nt～約100nt、約100nt～約500nt、約50～約600nt、または約200nt～約1000ntを含むことができる。ある場合では、スパーサー配列は、6未満のntまたは1000を超えるntを含むことができる。ある場合では、スパーサー配列は、スタッファー配列を含むことができる。スタッファー配列は、約25、約50、約100、約150、約200、約250、または約300ヌクレオチド長であり得る。スタッファー配列は、25、50、100、150、200、250、もしくは300ヌクレオチド長、または前述の数のいずれか2つを含む長さの範囲のヌクレオチドであり得る。一部の実施形態では、スタッファー配列は、少なくとも25のヌクレオチド、少なくとも50のヌクレオチド、少なくとも100のヌクレオチド、少なくとも150のヌクレオチド、少なくとも200のヌクレオチド、少なくとも250のヌクレオチド、または少なくとも300のヌクレオチドを含むことができる。一部の実施形態では、スタッファー配列は、少なくとも約50のヌクレオチド、少なくとも約100のヌクレオチド、少なくとも約150のヌクレオチド、または少なくとも約200のヌクレオチドである。一部の実施形態では、スタッファー配列は、少なくとも250のヌクレオチド、少なくとも300のヌクレオチド、少なくとも350のヌクレオチド、少なくとも400のヌクレオチド、少なくとも450のヌクレオチド、または少なくとも500のヌクレオチドを含むことができる。一部の実施形態では、スタッファー配列は、25以下のヌクレオチド、50以下のヌクレオチド、100以下のヌクレオチド、150以下のヌクレオチド、200以下のヌクレオチド、250以下のヌクレオチド、または300以下のヌクレオチドを含むことができる。一部の実施形態では、スタッファー配列は、約50以下のヌクレオチド、約100以下のヌクレオチド、約150以下のヌクレオチド、または約200以下のヌクレオチドである。一部の実施形態では、スタッファー配列は、250以下のヌクレオチド、300以下のヌクレオチド、350以下のヌクレオチド、400以下のヌクレオチド、450以下のヌクレオチド、または500以下のヌクレオチドを含むことができる。

【0156】

一部の実施形態では、スタッファー配列は、ポリヌクレオチド内の操作されたtRNA変異体の1つまたは複数のコピーの5'にある。一部の実施形態では、スタッファー配列は、ポリヌクレオチド内の操作されたtRNA変異体の1つまたは複数のコピーの3'にある。一部の実施形態では、スタッファー配列は、ポリヌクレオチド内の操作されたtRNA変異体の2つ以上のコピーを分離する。一部の実施形態では、複数のスタッファー配列は、ポリヌクレオチド内の操作されたtRNA変異体の複数コピーを分離する。例えば、操作されたtRNAまたは操作されたtRNA変異体をコードするポリヌクレオチドは、操作されたtRNAまたは操作されたtRNA変異体の第1のコピー、続いて第1のスタッファー配列、続いて操作されたtRNAまたは操作されたtRNA変異体の第2のコピー、続いて第2のスタッファー配列、続いて操作されたtRNAまたは操作されたtRNA変異体の第3のコピー (5'から3'の向きで) を含むことができる。操作されたtRNAもしくは操作されたtRNA変異体の第1のコピーの5'に、または操作されたtRNAもしくは操作されたtRNA変異体の第3のコピーの3'に1つまたは複数のスタッファー配列が存在し得る。

【0157】

配列番号57は、充填剤配列を含むポリヌクレオチドの例を含む。一部の実施形態は、配列番号57と少なくとも75%の同一性、少なくとも80%の同一性、少なくとも85

10

20

30

40

50

%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、もしくは100%の同一性を有するポリヌクレオチド、またはそのフラグメント（例えば、本明細書において提供されるスパーサー配列のいずれかを含むフラグメント）を含む。一部の実施形態では、配列番号57のフラグメントは、10、20、30、40、50、75、100、200、300、400、500、750、1000、1500、2000、2500以上のヌクレオチド長、または前述の数のいずれか2つによって定義される範囲のヌクレオチドである。

【0158】

ある場合では、操作されたtRNAまたはその変異体のITRからの距離を変更することは、操作されたtRNAまたはその変異体の停止コドンリードスルーの効率を増加させることができる。ある場合では、ベクターコンストラクトにおける操作されたtRNAまたはその変異体の配列の向きは、操作されたtRNAまたはその変異体の停止コドンリードスルーの効率に影響し得る。ある場合では、ベクターは、異なる向きで置かれたベクターにおいて1つまたは複数の操作されたtRNA配列または操作されたtRNA変異体配列を含むことができる。

【0159】

III. キット

一部の実施形態では、キットは、本明細書に記載される組成物および容器を含むことができる。例えば、キットは、医薬組成物を含むことができ、操作されたtRNAもしくはその変異体、操作されたtRNAもしくはその変異体をコードするポリヌクレオチド（例えば、ベクター）、または両方を含むことができる。ある場合では、容器は、プラスチック、ガラス、金属、またはそれらの任意の組合せであり得る。ある場合では、キットは、それを必要とする対象への投与についての指示書などの、使用についての指示書を含むことができる。

【0160】

ある場合では、本明細書に記載される組成物を含むパッケージングされた製品は、正しくラベルを付され得る。ある場合では、本明細書に記載される医薬組成物は、優良医薬品製造基準（cGMP）およびラベリング規則に従い製造され得る。ある場合では、本明細書に開示される医薬組成物は、無菌であり得る。

【0161】

一部の実施形態では、操作されたtRNAまたはその変異体を含むキットが、本明細書に開示される。一部の実施形態では、操作されたtRNA変異体を含むキットが、本明細書において開示される。一部の実施形態では、キットは、本明細書に記載される医薬組成物（例えば、適宜、用量単位形態にある操作されたtRNAまたはその変異体および薬学的に許容される賦形剤、担体または希釈剤）を含むことができる。一部の実施形態では、キットは、パッケージングまたは容器を含むことができる。一部の実施形態では、キットは、パッケージングを含むことができる。一部の実施形態では、キットは、容器を含むことができる。

【0162】

一部の実施形態は、キットを製造する方法に関する。方法は、組成物をパッケージングまたは容器と接触させることを含むことができる。方法は、組成物をパッケージングと接触させることを含むことができる。方法は、組成物をパッケージングと接触させる工程を含むことができる。

【0163】

IV. 定義

別段定義されない限り、本明細書において使用される当該技術分野の全ての用語、記号ならびに他の技術用語および化学用語または用語法は、請求される主題が属する当業者により通常理解されるのと同じ意味を有することが意図される。ある場合では、通常理解される意味を有する用語は、明確性および／または即時参照のため本明細書において定義され、本明細書におけるこのような定義の包含は、必ずしも、当該技術分野において一般的

10

20

30

40

50

に理解され得るものに渡る実質的な相違を表すと解釈されるべきではない。

【0164】

本出願を通じて、様々な実施形態は、範囲フォーマットで提示され得る。範囲フォーマットでの説明は、単に便宜および簡潔さのためのものであり得、本開示の範囲の確固たる制限として理解されるべきでないことは、理解されるべきである。従って、範囲の記載は、具体的に開示される全ての可能性のあるサブレンジならびにその範囲内の個々の数値を有するとみなされるべきである。例えば、1～6などの範囲の記載は、1～3、1～4、1～5、2～4、2～6、3～6などの具体的に開示されるサブレンジ、ならびにその範囲内の個々の数、例えば、1、2、3、4、5、および6を有するとみなされるべきである。これは、範囲の広さに関わらず、適用する。

10

【0165】

本明細書および請求の範囲において使用される通り、単数形「a」、「an」および「the」は、文脈が別段明確に示さない限り、複数の参照物を含む。例えば、用語「1個の試料」は、その混合物を含む、複数の試料を含む。

【0166】

用語「決定すること」、「測定すること」、「評価すること」、「査定すること」、「アッセイすること」および「分析すること」は、測定値の形態を指すために、本明細書において互換的にしばしば使用される。用語は、構成要素が存在し得るかどうか（例えば、検出）を決定することを含む。これらの用語は、定量的、定性的または定量的かつ定性的な決定を含むことができる。評価することは、相対的または絶対的であり得る。「存在を検出すること」は、それが、文脈に依存して存在し得るか、または不存在であり得るかどうかを決定することに加えて、存在するものの量を決定することを含むことができる。

20

【0167】

用語「インビボ」は、対象の身体において生じる現象を記載するために使用することができる。

【0168】

用語「エクスビボ (ex vivo)」は、対象の身体外で生じる現象を記載するために使用することができる。エクスビボアッセイは、対象において行うことができない。むしろ、それは、対象由来の試料標本において行うことができる。試料で行われるエクスビボアッセイの例は、「インビトロ」アッセイであり得る。

30

【0169】

用語「インビトロ」は、物質が得られ得る、生物学的供給源から分離され得るように、実験室試薬を保持するための容器に含有される、生じる現象を記載するために使用することができる。インビトロアッセイは、生細胞および死細胞が利用される、細胞ベースのアッセイを包含することができる。インビトロアッセイはまた、インタクトな細胞が利用されない、細胞フリーアッセイを包含することができる。

【0170】

本明細書において使用される場合、用語「約」数は、その数のプラスまたはマイナス10%の数を指すことができる。用語「約」範囲は、その最小値のマイナス10%およびその最大値のプラス10%の範囲を指すことができる。

40

【0171】

本明細書において使用される場合、用語「処置」または「処置すること」は、レシピエントにおいて有益または所望の結果を得るための、医薬または他の治療介入レジメンを参照して使用される。有益または所望の結果は、治療上の恩恵および／または予防上の恩恵を含むが、これらに限定されない。治療恩恵は、症状または根底にある処置される障害の根絶または回復を指すことができる。また、対象が、依然として、根底にある障害で苦しめられ得るにも関わらず、改善が、対象において観察され得るように、治療上の恩恵は、根底にある障害と関連する、1つまたは複数の生理学的症状の根絶または回復を伴い、達成することができる。予防効果は、疾患もしくは状態の出現を遅延させること、予防すること、もしくは回復させること、疾患もしくは状態の症状の発生を遅延させることもしく

50

は回復させること、疾患もしくは状態の進行を遅延させること、停止させること、もしくは逆転させること、またはそれらの任意の組合せを含む。予防上の恩恵のため、特定の疾患を発症するリスクのある対象、または疾患の1つまたは複数の生理学的症状を報告している対象は、この疾患の診断がなされていなくても、処置を受けることができる。

【0172】

用語「対象」、「宿主」、「個体」、および「患者」は、動物、典型的には、哺乳動物を指すために、本明細書において互換的に使用される。任意の適当な対象は、本明細書に記載される組成物が投与されるか、または本明細書に記載される方法によって処置されることができる。哺乳動物の非限定的な例は、ヒト、非ヒト霊長類（例えば、類人猿、テナガザル、チンパンジー、オランウータン、サル、マカクなど）、飼育動物（例えば、イヌおよびネコ）、家畜（例えば、ウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ブタ）ならびに実験動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、モルモット）を含む。一部の実施形態では、哺乳動物は、ヒトであり得る。哺乳動物は、任意の年齢であり得るか、または発生の任意の段階（例えば、大人、十代、小児、幼児、または子宮内の哺乳類）であり得る。ある場合では、ヒトは、胚、胎児、小児、または大人であり得る。ある場合では、ヒトは、約1日～約7日齢、1週～約5週齢、1月～約12月齢、1歳～約10歳、6月～約15歳、5歳～約25歳、20歳～約50歳、40歳～約80歳、75歳～約100歳、または約90歳～約130歳であり得る。哺乳類は、オスまたはメスであり得る。一部の実施形態では、対象はオスであり得る。一部の実施形態では、対象はメスであり得る。一部の実施形態では、対象は、ヒトであり得る。一部の実施形態では、対象は、レット症候群などの、疾患または状態を含むことができるか、または有することが疑われ得る。ある場合では、対象は、生殖に適した年齢の妊娠したヒトなどの、妊娠した対象であり得る。一部の実施形態では、患者は、約20歳であり得る。一部の実施形態では、患者は、年齢10～30歳であり得る。

10

20

【0173】

一部の実施形態では、患者は、少なくとも5歳、少なくとも10歳、少なくとも15歳、少なくとも20歳、少なくとも25歳、少なくとも30歳、少なくとも35歳、少なくとも50歳、少なくとも75歳、または少なくとも95歳である。一部の実施形態では、患者は、5歳以下、10歳以下、15歳以下、20歳以下、25歳以下、30歳以下、35歳以下、50歳以下、75歳以下、または95歳以下である。

30

【0174】

「真核生物の細胞」は、モネラ界を除く、生命の界の全てを含む。それらは、膜に結合した核を通じて容易に区別することができる。動物、植物、真菌、および原生生物は、真核生物であり得るか、または細胞が、内部の膜および細胞骨格によって複合体構造に組織化され得る生物であり得る。特徴的な膜結合構造は、核であり得る。用語「宿主」は、例えば、酵母、高等植物、昆虫および哺乳類細胞を含む、真核生物宿主を含むことができる。真核生物の細胞または宿主の非限定的な例は、サル、ウシ、ブタ、マウス、ラット、トリ、爬虫類およびヒトを含む。真核生物の細胞の他の例は、細胞株を含むことができる。ある場合では、初代細胞または細胞は、ニューロン、視細胞（例えば、S錐体細胞、L錐体細胞、M錐体細胞、杆体細胞細胞）、網膜色素上皮細胞、グリア細胞（例えば、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリア）、筋細胞（例えば、筋芽細胞、筋管）、肝細胞、肺上皮細胞、または線維芽細胞（例えば、皮膚線維芽細胞）であり得る。ある場合では、細胞は、水平細胞、神経節細胞、または双極細胞であり得る。ある場合では、細胞株は、HEK293T、HEK293、NCI-60、MCF-7、HL-60、RD、LHCN分化細胞、LHCN未分化細胞、Saos-2、CHO、またはHeLa細胞などの、哺乳類細胞株であり得る。ある場合では、細胞株は、Sf9などの、昆虫細胞株であり得る。

40

【0175】

用語「タンパク質」、「ペプチド」および「ポリペプチド」は、互換的に使用することができ、その広義の意味で、2つ以上のサブユニットアミノ酸、アミノ酸類似体、または

50

ペプチドミメティックの化合物を指すことができる。サブユニットは、ペプチド結合により結合されることができる。別の実施形態では、サブユニットは、他の結合、例えば、エステル、エーテルなどによって結合されることができる。タンパク質またはペプチドは、少なくとも2つのアミノ酸を含有することができる、タンパク質配列またはペプチド配列を含むことができる、最大数のアミノ酸に生じる制限はない。本明細書において使用される、用語「アミノ酸」は、グリシンならびに両方のDおよびL光学異性体、アミノ酸類似体およびペプチドミメティックを含む、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、または合成アミノ酸のいずれかを指すことができる。本明細書において使用される場合、用語「融合タンパク質」は、1つより多くの天然に存在する、または組換え産生されたタンパク質由来のドメインを含むタンパク質を指すことができ、一般的に、それぞれのドメインが、異なる機能を果たす。この点について、用語「リンカー」は、適宜、融合したタンパク質ドメインの立体構造を保存する、それらのそれぞれの機能を損ない得る、融合したタンパク質ドメイン間の好ましくない相互作用を防ぐ、または両方のために、これらのドメインと一緒に結合するため使用され得るタンパク質フラグメントを指すことができる。

10

【0176】

用語「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」は、互換的に使用され、任意の長さのヌクレオチドの重合形態、デオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチドのいずれか、またはその類似体を指すことができる。ポリヌクレオチドは、任意の3次元構造を有することができる、公知もしくは未知の、任意の機能を果たすことができる。以下は、ポリヌクレオチドの非限定的な例：遺伝子または遺伝子フラグメント（例えば、プローブ、プライマー、ESTもしくはSAGEタグ）、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA（mRNA）、トランスファーRNA、リボソームRNA、RNAi、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離されたDNA、任意の配列の単離されたRNA、核酸プローブ、およびプライマーである。ポリヌクレオチドは、修飾されたヌクレオチド、例えば、メチル化ヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体を含むことができる。存在するなら、ヌクレオチド構造への修飾は、ポリヌクレオチドのアセンブリ前または後に授けられ得る。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分により中断され得る。ポリヌクレオチドは、重合作用後、例えば、標識成分との結合によりさらに修飾され得る。用語はまた、2本鎖分子と1本鎖分子の両方を指すことができる。別段特定または要求されなければ、ポリヌクレオチドであり得る本発明の任意の実施形態は、2本鎖形態と、2本鎖形態を作製することが公知または推定される2つの相補的な1本鎖形態のそれぞれの両方を包含する。

20

30

【0177】

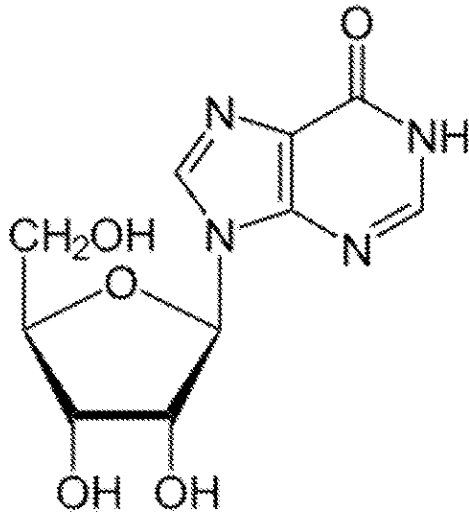
ポリヌクレオチドは、特定の配列のヌクレオチドからなることができる。ヌクレオチドは、ヌクレオシドおよびリン酸塩基を含むことができる。ヌクレオチドは、糖（例えば、リボースまたは2'デオキシリボース）および窒素塩基などの、核酸塩基を含むことができる。核酸塩基の非限定的な例は、アデニン（A）、シトシン（C）、グアニン（G）、チミン（T）、ウラシル（U）、およびイノシン（I）を含む。一部の実施形態では、Iは、ヒポキサンチンが、P-N9-グリコシド結合を介してリボフラノースに結合され得るとき、形成されることができ、これにより、化学構造：

40

【0178】

50

【化 1】



10

をもたらし得る。イノシンは、グアニン（G）として翻訳機構によってリードされることができる。

20

【0179】

用語「ポリヌクレオチド配列」は、ポリヌクレオチド分子のアルファベット表示であり得る。このアルファベット表示は、中心処理ユニットを有するコンピューター内のデータベースにインプットされ、バイオインフォマティクスアプリケーション、例えば、機能ゲノミクス及び相同性検索のため使用され得る。

【0180】

「相同性」または「同一性」または「類似性」は、2つのペプチド間または2つの核酸分子間の配列類似性を指すことができる。相同性は、比較の目的のため配列され得る、それぞれの配列における位置を比較することによって決定されることができる。比較された配列における位置は、同じ塩基またはアミノ酸によって占められ得るとき、次に、分子は、その位置において相同であり得る。配列間の相同性の程度は、配列によって共有される一致または相同な位置の数の関数であり得る。「無関連」または「非相同な」配列は、本開示の配列のうちの1つと、40%未満の同一性、または代わりに、25%未満の同一性を共有する。配列相同性は、参照配列に対する配列の%同一性を指すことができる。任意の特定の配列は、本明細書に記載される任意の配列（本明細書に記載される特定の核酸配列と対応し得る）と少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%または99%同一であり得るかどうかの現実問題として、このような特定のポリペプチド配列は、Bestfitプログラム（Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711）のような公知のコンピュータープログラムを使用して、通常決定することができる。特定の配列が、例えば、参照配列に対して95%同一であるかどうかを決定するためのBestfitまたは任意の他の配列整列プログラムを使用するとき、パラメーターは、同一性のパーセンテージが、参照配列の全長にわたり計算されることができ、トータルの参照配列の最大5%の配列相同性におけるギャップが可能になり得るように、設定され得る。

30

40

【0181】

ある場合では、全体的な配列アライメントとしても言及される、参照配列（クエリー配列、すなわち、本開示の配列）と対象配列の間の同一性は、Brutlag et al. (Comp. App. Biosci. 6:237-245 (1990)) のアルゴリズムに基づくFASTDBコンピューター

50

ープログラムを使用して決定することができる。一部の実施形態では、FASTDBアミノ酸アライメントにおいて使用される、同一性が、狭義で解釈され得る、特定の実施形態についてのパラメーターは、スコアリングスキーム＝PAM（パーセント許容突然変異）0、k-タプル＝2、ミスマッチペナルティ＝1、結合ペナルティ＝20、ランダム化群長＝0、カットオフスコア＝1、ウィンドウサイズ＝配列長、ギャップペナルティ＝5、ギャップサイズペナルティ＝0.05、ウィンドウサイズ＝500またはどんなに短くても、対象配列の長さを含むことができる。本実施形態によると、対象配列が、内部欠損のためでなく、NまたはC末端欠損に起因したクエリー配列より短くてもよい場合、全体的パーセント同一性を計算するとき、FASTDBプログラムが、対象配列のNおよびC末端ランケーションを占めないという事実を考慮して、マニュアル補正が結果に対してなされ得る。クエリー配列と比べて、NおよびC末端で切断された対象配列について、パーセント同一性は、対象配列のNおよびC末端の側面であり得る、クエリー配列の残基数を計算することによって補正することができ、クエリー配列の総塩基のパーセントとして、対応する対象残基と一致／整列することができない。残基が一致／整列され得るかどうかの決定は、FASTDB配列アライメントの結果によって決定することができる。次に、このパーセンテージは、特定のパラメーターを使用して、FASTDBプログラムによって計算される、パーセント同一性から引かれ、最終のパーセント同一性スコアを得ることができる。この最終パーセント同一性スコアは、この実施形態の目的のため使用することができる。ある場合では、クエリー配列と一致／整列することができない、対象配列のNおよびC末端の残基のみが、パーセント同一性スコアを手動で調節する目的が考慮され得る。すなわち、対象配列の最もNおよびC末端残基の外側のクエリー残基位置のみが、このマニュアル補正が考慮される。例えば、90残基の対象配列を、100残基のクエリー配列と整列させて、パーセント同一性を決定することができる。欠損は、対象配列のN末端で生じ、それ故、FASTDBアライメントは、N末端の第1の10残基の一致／アライメントを示さない。10の対形成していない残基は、配列の10%（NおよびC末端の不一致な残基数／クエリー配列における残基の総数）を表し、故に、10%は、FASTDBプログラムによって計算されるパーセント同一性スコアから引くことができる。残る90残基が、完全に一致する場合、最終のパーセント同一性は、90%であり得る。別の例では、90残基の対象配列は、100残基のクエリー配列と比較することができる。今回、欠損は、内部欠損であり得、故に、クエリーと一致／整列され得ない対象配列のNまたはC末端に残基は存在し得ない。この場合では、FASTDBによって計算されるパーセント同一性は、手動で補正することができない。再度、クエリー配列と一致／整列され得ない、FASTDBアライメントにおいて提示される、対象配列のNおよびC末端の外側の残基位置のみが、手動で補正されることができる。

10

20

30

40

50

【0182】

ある場合では、全体的な配列アライメントとしても言及される、参照配列（クエリー配列、すなわち、本開示の配列）と対象配列の間の同一性は、Brutlag et al.(Comp. App. Biosci. 6:237-245 (1990))のアルゴリズムに基づくFASTDBコンピュータプログラムを使用して決定することができる。一部の実施形態では、FASTDBアミノ酸アライメントにおいて使用される、同一性が、狭義で解釈され得る、特定の実施形態についてのパラメーターは、スコアリングスキーム＝PAM（パーセント許容突然変異）0、k-タプル＝2、ミスマッチペナルティ＝1、結合ペナルティ＝20、ランダム化群長＝0、カットオフスコア＝1、ウィンドウサイズ＝配列長、ギャップペナルティ＝5、ギャップサイズペナルティ＝0.05、ウィンドウサイズ＝500またはどんなに短くても、対象配列の長さを含むことができる。本実施形態によると、対象配列が、内部欠損のためでなく、NまたはC末端欠損に起因したクエリー配列より短くてもよい場合、全体的パーセント同一性を計算するとき、FASTDBプログラムが、対象配列のNおよびC末端ランケーションを占めないという事実を考慮して、マニュアル補正が結果に対してなされ得る。クエリー配列と比べて、NおよびC末端で切断された対象配列について、パーセント同一性は、対象配列のNおよびC末端の側面であり得る、クエリー配列の残基数を

計算することによって補正することができ、クエリー配列の総塩基のパーセントとして、対応する対象残基と一致／整列することができない。残基が一致／整列され得るかどうかの決定は、FASTDB配列アライメントの結果によって決定することができる。次に、このパーセンテージは、特定のパラメーターを使用して、FASTDBプログラムによって計算される、パーセント同一性から引かれ、最終のパーセント同一性スコアを得ることができる。この最終パーセント同一性スコアは、この実施形態の目的のため使用することができる。ある場合では、クエリー配列と一致／整列することができない、対象配列のNおよびC末端の残基のみが、パーセント同一性スコアを手動で調節する目的が考慮され得る。すなわち、対象配列の最もNおよびC末端残基の外側のクエリー残基位置のみが、このマニュアル補正が考慮される。例えば、90残基の対象配列を、100残基のクエリー配列と整列させて、パーセント同一性を決定することができる。欠損は、対象配列のN末端で生じ、それ故、FASTDBアライメントは、N末端の第1の10残基の一致／アライメントを示さない。10の対形成していない残基は、配列の10%（NおよびC末端の不一致な残基数／クエリー配列における残基の総数）を表し、故に、10%は、FASTDBプログラムによって計算されるパーセント同一性スコアから引くことができる。残る90残基が、完全に一致する場合、最終のパーセント同一性は、90%であり得る。別の例では、90残基の対象配列は、100残基のクエリー配列と比較することができる。今回、欠損は、内部欠損であり得、故に、クエリーと一致／整列され得ない対象配列のNまたはC末端に残基は存在し得ない。この場合では、FASTDBによって計算されるパーセント同一性は、手動で補正することができない。再度、クエリー配列と一致／整列され得ない、FASTDBアライメントにおいて提示される、対象配列のNおよびC末端の外側の残基位置のみが、手動で補正されることができる。

10

20

30

40

50

【0183】

「トランスファーリボ核酸」または「tRNA」は、mRNAをタンパク質に翻訳するのを助ける核酸分子であり得る。tRNAは、3つのヘアピンループ；アンチコドンコードする「ステム」位置を含むことができるこれらのループの1つを含む、特有の折り畳み構造を有することができる。アンチコドンは、mRNA上の対応するコドンを認識することができる。それぞれのtRNAは、mRNAコドンに対応するアミノ酸が「負荷され」得る。負荷は、酵素であるtRNAシンターゼによって達成することができる。そのアンチコドンに対応するコドンのtRNA認識の際、tRNAは、成長するアミノ酸鎖に荷電して、ポリペプチドまたはタンパク質を形成することができる、アミノ酸をトランスファーすることができる。内在性tRNAは、内在性tRNAシンターゼで荷電することができる。従って、内在性tRNAは、典型的には、標準的なアミノ酸で荷電される。外部供給源からもたらされる、直交性tRNAは、対応する直交性tRNAシンターゼを必要とすることができる。このような直交性tRNAは、標準的なアミノ酸と非標準アミノ酸の両方で荷電することができる。非標準アミノ酸の非限定的な例は、“Adding New Chemistries to the Genetic Code” By C. Liu and P. Schultz, *Annu. Rev. Biochem.* 79:413-44 (2010)において見られる。一部の実施形態では、tRNAが荷電され得るアミノ酸を検出可能に標識して、インビボでの検出が可能になる。標識の適当な技術は、天然でないアミノ酸を含有するアジド／アルキンが、直交性tRNA／シンターゼ対によって付加され、これにより、フルオロフォアまたは他のこのような分子を含むアルキン／アジドを使用して検出され得る、クリックケミストリーを含むが、これらに限定されない。

【0184】

本明細書において使用される、用語「操作されたtRNA」は、例えば、アンチコドン領域における同等の野生型tRNAと比べて、操作されたtRNAの配列において少なくとも1つの相違を有するトランスファーRNAを指すことができる。本明細書において使用される、用語「操作されたtRNA変異体」または「その変異体」は、参照操作されたtRNAと比較して、それらの配列における突然変異を有するトランスファーRNAを指すことができる。一部の実施形態では、操作されたtRNAまたはその変異体は、「抑制

因子 tRNA またはその変異体」、「tRNA 抑制因子」または「操作された tRNA 抑制因子」として言及され、一般的に、mRNA における未成熟停止コドンリードスルーを抑制することができる操作された tRNA またはその変異体を指すことができる。

【0185】

用語「tRNA イソデコーダー」は、アミノアシル化されるとき、同じアミノ酸でアミノアシル化される tRNA 分子を指すために、本明細書において互換的に使用することができる。ある場合では、tRNA イソデコーダーは、同じアンチコドン配列を共有する tRNA 分子を指すことができる。

【0186】

ポリペプチドまたはタンパク質をコードする配列を含む RNA 分子である「メッセンジャー RNA」または「mRNA」が、本明細書において言及される。一般的に、RNA は、DNA から転写することができる。ある場合では、配列における非タンパク質コード領域を含有する前駆体 mRNA は、DNA から転写され、次に、処理されて、非コード領域（イントロン）の全てまたは一部を除去して、成熟 mRNA が産生され得る。本明細書において使用される場合、用語「mRNA 前駆体」は、非タンパク質コード領域を除去するための処理を受ける前に、DNA から転写される RNA 分子を指すことができる。

【0187】

用語「停止コドン」は、翻訳の終結をシグナル伝達するメッセンジャー RNA 内の 3 つのヌクレオチドの連続した配列を指すことができる。非限定的な例は、RNA、UAG（アンバー）、UAA（オーカー）、UGA（オパールとしても知られる、アンバー）および DNA TAG、TAA または TGA を含む。別段示されない限り、用語はまた、未成熟停止コドンを導入する DNA または RNA 内のノンセンス突然変異を含むことができ、これにより、任意の得られたタンパク質が異常に短くなり得る。様々な停止コドンに対応する tRNA は、それらの停止コドンに対応する名称：アンバー（UAG）、オーカー（UAA）、およびオパール（UGA）によって知られている。

【0188】

「基準アミノ酸」は、例えば、表 4 に示されるアミノ酸を含む、天然で生じる、その 20 種のアミノ酸を指す。

【0189】

表 4. 3 文字略語、1 文字略語、構造、および対応するコドンで示される天然に存在するアミノ酸

10

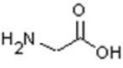
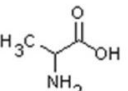
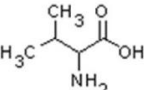
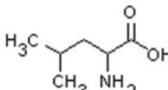
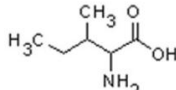
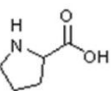
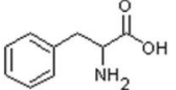
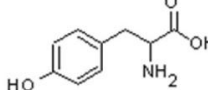
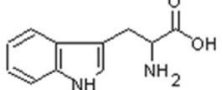
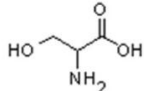
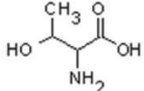
20

30

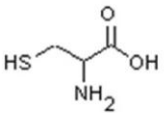
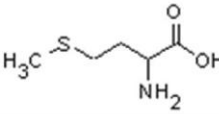
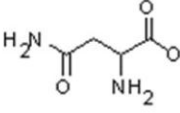
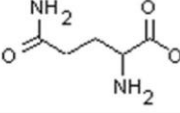
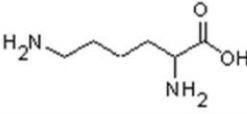
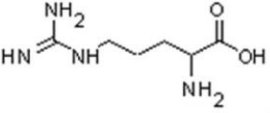
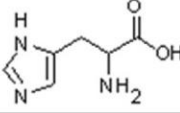
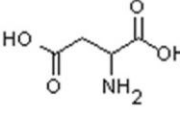
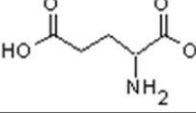
40

50

【表 4 - 1】

非極性、脂肪族残基				
グリシン	Gly	G		GGU GGC GGA GGG
アラニン	Ala	A		GCU GCC GCA GCG
バリン	Val	V		GUU GUC GUA GUG
ロイシン	Leu	L		UUA UUG CUU CUC CUA CUG
イソロイシン	Ile	I		AUU AUC AUA
プロリン	Pro	P		CCU CCC CCA CCG
芳香族性残基				
フェニルアラニン	Phe	F		UUU UUC
チロシン	Tyr	Y		UAU UAC
トリプトファン	Trp	W		UGG
極性、無電荷の残基				
セリン	Ser	S		UCU UCC UCA UCG AGU AGC
スレオニン	Thr	T		ACU ACC ACA ACG

【表 4 - 2】

システイン	Cys	C		UGU UGC
メチオニン	Met	M		AUG
アスパラギン	Asn	N		AAU AAC
グルタミン	Gln	Q		CAA CAG
正に荷電した残基				
リジン	Lys	K		AAA AAG
アルギニン	Arg	R		CGU CGC CGA CGG AGA AGG
ヒスチジン	His	H		CAU CAC
負に荷電した残基				
アスパラギン酸	Asp	D		GAU GAC
グルタミン酸	Glu	E		GAA GAG

【0190】

用語「有効量」は、所望の効果を達成するのに十分な量を指すことができる。治療または予防適用の文脈において、有効量は、一般的な健康、年齢、性別、体重および医薬組成物に対する抵抗性などの、個々の対象の問題の状態のタイプおよび重症度ならびに特徴に依存し得る。一部の実施形態では、有効量は、レット症候群、または難聴などの疾患を有する患者を、少なくとも一部処置するために必要とされ得る量であり得る。ある場合では、当業者は、これらおよび他の要因に依存して適当な量を決定することができる。

【0191】

インビトロでの適用の場合、一部の実施形態では、有効量は、問題の適用の大きさおよび性質に依存するであろう。これはまた、インビトロでの標的および用いられる方法の性質および感度にも依存するであろう。ある場合では、当業者は、これらおよび他の考慮すべき事項に基づき、有効量を決定することができるであろう。有効量は、実施形態に依存

して、1つまたは複数の組成物投与を含むことができる。

【0192】

本明細書において使用される、タンパク質の発現に関して、用語「回復させること」は、以前のタンパク質発現が、未成熟停止コドンなどの突然変異に起因して、切断された、全長タンパク質の発現を確立する能力を指すことができる。

【0193】

本明細書において使用される、用語「突然変異」は、参照配列との比較であり得る、核酸配列またはポリペプチド配列の変更を指すことができる。突然変異は、DNA分子、RNA分子（例えば、tRNA、mRNA）、またはポリペプチドもしくはタンパク質、あるいはそれらの任意の組合せで生じ得る。参照配列は、NCBI参照配列データベース（RefSeq）データベースなどのデータベースから得ることができる。突然変異を構成し得る特定の変更は、1つまたは複数のヌクレオチドまたは1つまたは複数のアミノ酸における置換、欠損、挿入、転化、または変換を含むことができる。突然変異を有さない、ポリペプチド配列をコードする、核酸配列における突然変異の非限定的な例は、あるコドンの別のものへの置換をもたらし得る「ミスセンス」突然変異、特定のアミノ酸をコードするもの由来のコドンを停止コドン（タンパク質の切断された翻訳をもたらし得る）に変更し得る「ナンセンス」突然変異、または得られたタンパク質に対する作用を有さないものであり得る「サイレント」突然変異を含む。突然変異は、DNAまたはRNA配列における1つのみのヌクレオチドに影響する突然変異を指すことができる、「点突然変異」であり得る。突然変異は、「スプライス部位突然変異」であり得、現在のmRNA前駆体（イントロンを除去するための処理の前）であり得、これにより、スプライス部位の不正確な描写からのタンパク質のミス翻訳およびしばしばトランケーションをもたらし得る。突然変異は、融合遺伝子であり得る。融合対または融合遺伝子は、転座、中間部欠損、染色体逆位、またはそれらの任意の組合せなどの突然変異から生じ得る。突然変異は、三倍体化、四倍体化などの、反復配列の数における変異性を構成することができる。例えば、突然変異は、所定の配列（すなわち、コピー数のバリエーション、またはCNV）と関連するコピー数における増加または減少であり得る。突然変異は、異なる対立遺伝子における2つ以上の配列変更または1つの対立遺伝子における2つ以上の配列変更を含み得る。突然変異は、モザイクなどの、1つの対立遺伝子における1つの位置における2つの異なるヌクレオチドを含み得る。突然変異は、キメラなどの、1つの対立遺伝子における1つの位置における2つの異なるヌクレオチドを含み得る。突然変異は、悪性組織に存在することができる。突然変異は、一塩基多様性（SNV）を含むことができる。突然変異は、配列変異体、配列バリエーション、配列変更、または対立遺伝子変異体を含むことができる。

【0194】

突然変異の存在または不存在は、疾患または状態を発症する増加したリスクを示し得る。突然変異の存在または不存在は、疾患または状態の存在を示し得る。突然変異は、良性組織に存在することができる。突然変異の不存在は、組織または試料が良性であり得ることを示すことができる。代替として、突然変異の不存在は、組織または試料が良性であり得ることを示し得ない。本明細書に記載される方法は、試料における突然変異の存在を同定することを含むことができる。

【0195】

本明細書で使用される、用語「コードする」は、ポリヌクレオチドの、対応する遺伝子発現産物を産生するのに十分な情報または指示配列をもたらす能力を指すことができる。非限定的な例では、mRNAは、翻訳中に、ポリペプチドをコードすることができ、一方、DNAは、転写中に、mRNA分子をコードすることができる。

【0196】

用語「相補な」または「相補性」は、例えば、水素結合（例えば、典型的なワトソン・クリック）、共有結合、または他の類似の方法によって、対応する核酸配列と1つまたは複数の結合を形成する、核酸の能力を指すことができる。ワトソン・クリック塩基対形成

において、二重水素結合は、核酸塩基 T と A の間で形成し、一方、三重水素結合は、核酸塩基 C と G の間で形成する。例えば、配列 A - G - T は、配列 T - C - A に相補であり得る。パーセント相補性は、第 2 の核酸配列（例えば、それぞれ、50%、60%、70%、80%、90%、および 100% 相補である 10 のうち 5、6、7、8、9、10）と水素結合（例えば、ワトソン・クリック塩基対形成）を形成することができる核酸分子における残基のパーセンテージを示す。「完全な相補性」は、核酸配列の全ての連続した残基が、第 2 の核酸配列における同じ数の連続した残基と水素結合するであろうことを意味し得る。本明細書において使用される、「実質的に相補な」は、10、15、20、25、30、35、40、45、50 以上のヌクレオチドの領域に渡り少なくとも 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、または 100% であり得る相補性の程度を指すことができるか、またはストリンジェントな条件（すなわち、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件）下でハイブリダイズする 2 つの核酸を指すことができる。核酸は、非特定の配列を含むことができる。本明細書において使用される場合、用語「非特定の配列」または「特定でない」は、任意の他の核酸配列に相補的であるよう設計されることができず、または任意の他の核酸配列に部分的にのみ相補的であり得る、一連の残基を含有する核酸配列を指すことができる。

10

【0197】

単独または「モチーフ」と組み合わせて使用される、用語「ヘアピン」、「ヘアピンループ」、「ステムループ」、および／または「ループ」は、ヘアピンまたはループを形成し、似ている 1 本鎖ポリヌクレオチド分子における構造を指すことができる。ポリヌクレオチド分子の第 1 のヌクレオチド配列およびポリヌクレオチド分子における第 2 のヌクレオチド配列が、塩基対形成するか、またはそうでなければ、結合して、ヘアピンもしくはループ構造を形成するとき、この構造が形成することができる。このような構造は、図 2 において説明され、一部の実施形態による、天然に存在するまたは操作された tRNA における様々なステムループ構造を示す。

20

【0198】

本明細書において使用される場合、用語「ドメイン」は、タンパク質、ポリヌクレオチド（例えば、操作された tRNA）またはポリペプチドの特定の領域を指すことができ、特定の機能と関連することができる。例えば、「RNAヘアピンモチーフと関連するドメイン」は、1 つまたは複数の RNAヘアピンに結合するタンパク質のドメインを指すことができる。

30

【0199】

本開示が、ポリペプチド、タンパク質、ポリヌクレオチドまたは抗体に関するとき、かかるものの均等物または生物学的な均等物が、本開示の範囲内にあることが意図され得ることは、明確な制限および別段意図されない限り、判断されるべきであり得る。本明細書において使用される場合、用語「その生物学的な均等物」は、参照タンパク質、抗体、ポリペプチドまたは核酸に言及が、依然として所望の構造または機能性を維持しながら、最小の相同性を有するものを意図するとき、「その均等物」と同義であることが意図され得る。本明細書において具体的に引用されない限り、本明細書で述べられる任意のポリヌクレオチド、ポリペプチドまたはタンパク質がまた、その均等物を含むことが意図され得る。例えば、均等物は、参照タンパク質、ポリペプチドまたは核酸に対する少なくとも約 70% の相同性もしくは同一性、または少なくとも約 80% の相同性もしくは同一性およびあるいは、または少なくとも約 85%、またはあるいは少なくとも約 90%、またはあるいは少なくとも約 95%、またはあるいは 98% のパーセント相同性もしくは同一性を意図し、参照タンパク質、ポリペプチドまたは核酸に対する実質的に均等な生物学的活性を示す。あるいは、ポリヌクレオチドに言及するとき、その均等物は、ストリンジェントな条件下で、参照ポリヌクレオチドまたはその相補鎖とハイブリダイズするポリヌクレオチドであり得る。

40

【0200】

「RNA編集実体」は、標的 RNA 配列を編集することができる内在性酵素を含むこと

50

ができる。ある場合では、RNA編集実体は、組換え酵素を含むことができる。ある場合では、RNA編集実体は、融合ポリペプチドを含むことができる。一部の実施形態では、RNA編集実体は、APOBEC1、APOBEC2、APOBEC3A、APOBEC3B、APOBEC3C、APOBEC3D（「APOBEC3E」は、ここで、これを指すことができる）、APOBEC3F、APOBEC3G、APOBEC3H、APOBEC4、活性化誘導性（シチジン）デアミナーゼ（AID）、ADAR1、ADAR1p110、ADAR1p150、ADAR2、ADAR3、またはそれらの任意の組合せを含むことができる。ある場合では、RNA編集実体は、APOBEC1、APOBEC2、APOBEC3A、APOBEC3B、APOBEC3C、APOBEC3D（「APOBEC3E」は、ここで、これを指すことができる）、APOBEC3F、APOBEC3G、APOBEC3H、APOBEC4、活性化誘導性（シチジン）デアミナーゼ（AID）、ADAR1、ADAR1p110、ADAR1p150、ADAR2、ADAR3、またはそれらの任意の組合せに対する少なくとも約80%の配列相同性を含むことができる。ある場合では、RNA編集実体は、ウイルスによりコードされるRNA依存性RNAポリメラーゼであり得る。ある場合では、RNA編集実体は、麻疹、ムンプス、またはパラインフルエンザ由来のウイルスによりコードされるRNA依存性RNAポリメラーゼであり得る。ある場合では、RNA編集実体は、標的RNAにおいてヌクレオチドまたは複数のヌクレオチドを付加するか、または欠損することができるトリパノソーマ・ブルセイ（*Trypanosoma brucei*）由来の酵素であり得る。ある場合では、RNA編集実体は、標的RNAにおいてウラシルまたは1つより多くのウラシルを付加するか、または欠損することができるトリパノソーマ・ブルセイ由来の酵素であり得る。

10

20

【0201】

本明細書において使用される、用語「ADAR」は、RNA配列におけるアデノシン（A）をイノシン（I）に変換することができるアデノシンデアミナーゼを指すことができる。ADAR1およびADAR2は、インビボでのmRNA編集に関与することができるADARの2つの代表的な種であり得る。ADAR1の非限定的な代表的な配列は、以下の参照数：HGNC：225；Entrez遺伝子：103；Ensembl：ENSG00000160710；OMIM：146920；UniProtKB：P55265；およびGeneCard：GC01M154554、ならびにその生物学的な均等物の下見出すことができる。ADAR2の非限定的な代表的な配列は、以下の参照数：HGNC：226；Entrez遺伝子：104；Ensembl：ENSG00000197381；OMIM：601218；UniProtKB：P78563；およびGeneCard：GC21P045073、ならびにその生物学的な均等物の下見出すことができる。

30

【0202】

本明細書において使用される、用語「APOBEC」は、CからUへの変更を触媒する、mRNA編集に関与する、進化的に保存されたシチジンデアミナーゼのファミリー内にある任意のタンパク質、およびその均等物を指すことができる。ある点で、用語APOBECは、APOBEC1、APOBEC2、APOBEC3A、APOBEC3B、APOBEC3C、APOBEC3E、APOBEC3F、APOBEC3G、APOBEC3H、APOBEC4、またはその互いの均等物のいずれか1つを指すことができる。ADARDメインに融合されるか、またはRNA編集システムにおける使用に適したそれらを付与するための代替りのドメインに融合される、1つまたは複数のAPOBECドメインを含む融合タンパク質の非限定的な代表的な配列が、本明細書において提供することができる。この目的のために、APOBECは、異なる変換によるにも関わらず、編集を触媒する、ADARの均等物と見なすことができる。従って、理論によって拘束されないが、本出願人は、ADARベースの編集システムを用いた使用が本明細書で企図される全ての実施形態が、APOBECベースのRNA編集システムにおける使用に適用することができると思う。

40

50

【0203】

本明細書において使用される節の表題は、構成目的のみのためであり、記載される主題を制限すると解釈されるべきではない。

【0204】

V. 実施形態

以下の非限定的な実施形態が提供される。

1. それを必要とする対象における疾患または状態を処置する方法であって、対象に、操作されたtRNAもしくはその変異体または操作されたtRNAもしくはその変異体をコードするポリヌクレオチドを投与すること；および未成熟停止コドンが欠如するmRNAを使用して産生される同等のポリペプチドと比べて、少なくとも約10%の効率で、インビボで実質的に全長のポリペプチドを産生することを含み、

操作されたtRNAまたはその変異体は、実質的に全長のポリペプチドをコードするmRNAにおける未成熟停止コドンを通じて、リードすることができる、方法。

2. それを必要とする対象における疾患または状態を処置する方法であって、対象に、操作されたtRNAもしくはその変異体または操作されたtRNAもしくはその変異体をコードするポリヌクレオチドを投与し、これにより、対象における疾患または状態を少なくとも一部、処置すること；

操作されたtRNAまたはその変異体は、ポリペプチドをコードするmRNAにおける未成熟停止コドンを認識し、操作されたtRNAまたはその変異体は、mRNAの翻訳中に、未成熟停止コドンのセンスコドンへの解釈を少なくとも部分的に形質転換し、

a) 操作されたtRNAまたはその変異体をコードする第1のベクターおよび第1のマーカをコードするスクリーニングmRNAをコードする第2のベクターを、第1のヒト細胞にトランスフェクトすること、第1のマーカをコードするスクリーニングmRNAは、未成熟停止コドンを含む；

b) 第2のマーカをコードする同等のスクリーニングmRNAをコードする第3のベクターを第2のヒト細胞にトランスフェクトすること、同等のスクリーニングmRNAは、未成熟停止コドンを含まない；および

c) 第1のヒト細胞から放出される検出可能なシグナルの量と第2のヒト細胞から放出される検出可能なシグナルの量を比較することによって決定される、未成熟停止コドンが欠如する同等のmRNAを使用して産生される同等のポリペプチドと比べて、少なくとも約10%の効率で、インビボで、実質的に全長のポリペプチドを産生する、方法。

3. 第1のヒト細胞または第2のヒト細胞が、HEK293細胞である、実施形態2の組成物。

4. 実質的に全長のポリペプチドの少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約92%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、少なくとも約99%、または100%の発現を回復させることをさらに含む、実施形態1~3のいずれか1つの方法。

5. 操作されたtRNAまたはその変異体が、未成熟停止コドンが欠如する同等のmRNAを使用して産生される同等のポリペプチドと比べて、少なくとも約35%の効率で、実質的に全長のポリペプチドを産生する、実施形態3の方法。

6. 操作されたtRNAまたはその変異体が、リジン、アルギニン、ヒスチジン、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、プロリン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ピロリジン、およびセレノシステインからなる群から選択されるアミノ酸でアシル化される、実施形態1~5のいずれか1つの方法。

7. 操作されたtRNAまたはその変異体が、アルギニンでアシル化される、実施形態1~6のいずれか1つの方法。

8. 操作されたtRNAまたはその変異体が、非標準アミノ酸でアシル化される、実施形

10

20

30

40

50

態 1 ～ 7 のいずれか 1 つの方法。

9. ポリペプチドをコードする mRNA が、少なくとも MeCP2 のフラグメントに対応する、実施形態 1 ～ 8 のいずれか 1 つの方法。

10. 操作された tRNA またはその変異体が、mRNA の翻訳中に、インビボで未成熟停止コドンに回答して、アミノ酸を、mRNA によってコードされる新生 MeCP2 ポリペプチド鎖に挿入し、アミノ酸は、挿入されたとき、未成熟停止コドンが欠如する同等の mRNA を使用して産生される同等の MeCP2 ポリペプチドと比較して、少なくとも一部の機能的な MeCP2 ポリペプチドを産生するのに十分である、実施形態 1 ～ 9 のいずれか 1 つの方法。

11. mRNA が、少なくとも 2 つの未成熟停止コドンを含む、実施形態 1 ～ 10 のいずれか 1 つの方法。

12. 少なくとも 2 つの未成熟停止コドンが、同じ停止コドンである、実施形態 11 の方法。

13. 少なくとも 2 つの未成熟停止コドンが、異なる停止コドンである、実施形態 11 の方法。

14. 未成熟停止コドンが、MeCP2 ポリペプチドの対応する配列における、アミノ酸 168、255、270、294、198、186、453、8（アイソフォーム 2 中）、9（アイソフォーム 1 中）、84、85、89、91、106、111、115、133、162、167、188、190、211、250、253、268、306、309、344、354、420、458、468、471、478、もしくは 484 位、またはそれらの任意の組合せに、R から X を生じ、X は、未成熟停止コドンである、実施形態 1 ～ 13 のいずれか 1 つの方法。

15. 未成熟停止コドンが、オパール停止コドンである、実施形態 1 ～ 14 のいずれか 1 つの方法。

16. 未成熟停止コドンが、アンバー停止コドンである、実施形態 1 ～ 14 のいずれか 1 つの方法。

17. 未成熟停止コドンが、オーカー停止コドンである、実施形態 1 ～ 14 のいずれか 1 つの方法。

18. 操作された tRNA またはその変異体が、リジル tRNA、アルギニル tRNA、ヒスチジル tRNA、グリシル tRNA、アラニル tRNA、バリル tRNA、ロイシル tRNA、イソロイシル tRNA、メチオニル tRNA、フェニルアラニル tRNA、トリプトファニル tRNA、プロリル tRNA、セリル tRNA、スレオニル tRNA、システイニル tRNA、チロシル tRNA、アスパラギニル tRNA、グルタミンイル tRNA、アスパルチル tRNA、ピロールリジル tRNA、セレノシスチル tRNA またはグルタミル tRNA である、実施形態 1 ～ 17 のいずれか 1 つの方法。

19. 操作された tRNA またはその変異体が、操作された tRNA 前駆体である、実施形態 1 ～ 18 のいずれか 1 つの方法。

20. 操作された tRNA またはその変異体が、イントロン配列を含む、実施形態 19 の方法。

21. イントロン配列が、操作された tRNA またはその変異体を含有する細胞内でスプライシングされ、これにより、成熟な操作された tRNA またはその変異体を産生する、実施形態 20 の方法。

22. 対象がヒトである、実施形態 1 ～ 21 のいずれか 1 つの方法。

23. 対象が非ヒト動物である、実施形態 1 ～ 21 のいずれか 1 つの方法。

24. ヒトが、約生誕時～約 40 歳の年齢である、実施形態 22 の方法。

25. ヒトが、約 6 カ月間～約 15 歳の年齢である、実施形態 22 または 25 の方法。

26. ヒトが、胚または胎児である、実施形態 22 の方法。

27. 疾患または状態が、レット症候群を含む、実施形態 1 ～ 26 のいずれか 1 つの方法。

28. 疾患または状態が、嚢胞性線維症を含む、実施形態 1 ～ 26 のいずれか 1 つの方法

10

20

30

40

50

。

29. 疾患または状態が、網膜色素変性症を含む、実施形態1～26のいずれか1つの方法。

30. 疾患または状態が、難聴を含む、実施形態1～26のいずれか1つの方法。

31. 難聴が、常染色体優性17難聴、常染色体優性13難聴、または常染色体優性11難聴を含む、実施形態30の方法。

32. 投与することは、経口投与すること、直腸投与すること、または非経口投与することである、実施形態1～31のいずれか1つの方法。

33. 投与することは、非経口投与することであり、非経口投与することは、静脈内投与すること、動脈内投与すること、くも膜下腔内投与すること、眼内投与すること、耳投与すること、脳室内投与すること、または腹腔内投与することである、実施形態32の方法

10

。

34. 投与することが、大槽内（ICM）である、実施形態1～31のいずれか1つの方法。

35. 投与することが、脳室内（ICV）である、実施形態1～31のいずれか1つの方法。

36. ポリペプチドが、MeCP2ポリペプチド、またはそのフラグメントを含む、実施形態1～35のいずれか1つの方法。

37. ポリペプチドが、FoxG1ポリペプチド、またはそのフラグメントを含む、実施形態1～35のいずれか1つの方法。

20

38. ポリペプチドが、CDKL5ポリペプチド、またはそのフラグメントを含む、実施形態1～35のいずれか1つの方法。

39. ポリペプチドが、MYH9ポリペプチド、またはそのフラグメントを含む、実施形態1～35のいずれか1つの方法。

40. ポリペプチドが、COL11A2ポリペプチド、またはそのフラグメントを含む、実施形態1～35のいずれか1つの方法。

41. ポリペプチドが、MYO7Aポリペプチド、またはそのフラグメントを含む、実施形態1～35のいずれか1つの方法。

42. 投与することが、期間中、少なくとも2回行われる、実施形態1～41のいずれか1つの方法。

30

43. 期間が、約24時間である、実施形態42の方法。

44. 方法が、疾患または状態を予防する方法であり、予防することが、操作されたtRNAもしくはその変異体または操作されたtRNAもしくはその変異体をコードするポリヌクレオチドの対象への予防投与を含む、実施形態1～43のいずれか1つの方法。

45. 操作されたtRNAまたはその変異体をコードするポリヌクレオチドが、対象に投与される、実施形態1～44のいずれか1つの方法。

46. 操作されたtRNAまたはその変異体をコードするポリヌクレオチドが、ベクターに含まれる、実施形態44または45の方法。

47. ベクターが、ウイルスベクターである、実施形態46の方法。

48. ベクターが、プラスミド、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、レンチウイルス（LV）ベクターを含む、実施形態46または47の方法。

40

49. AAVベクターが、

a) AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11もしくはAAV12を含む血清型、または

b) AAV-DJ、AAV-DJ/8、AAV-Rh10、AAV-Rh74、AAV-レトロ、AAV-PHP.B、AAV8-PHP.eB、AAV-PHP.SもしくはAAV-2i8を含むシュードタイプを有するAAV由来のものである、実施形態48の方法。

50. AAVベクターが、複製遺伝子を含むゲノムならびに第1のAAV血清型由来の逆位末端反復および第2のAAV血清型由来のキャプシドタンパク質を含む、実施形態48

50

または 49 の方法。

51. AAVベクターが、AAV2/5ベクター、AAV2/6ベクター、AAV2/7ベクター、AAV2/8ベクター、またはAAV2/9ベクターを含む、実施形態48～50のいずれか1つの方法。

52. AAVベクターが、AAV2/5ベクターである、実施形態48～51のいずれか1つの方法。

53. 操作されたtRNAもしくはその変異体、または操作されたtRNAもしくはその変異体をコードするポリヌクレオチドが、デリバリーシステムに存在する、実施形態1～52のいずれか1つの方法。

54. デリバリーシステムが、リボソーム、荷電ポリマー、非荷電ポリマー、ナノ粒子、界面活性剤、浸透増強剤、遺伝子導入剤、リン脂質、ミセル、合成ベクター、高分子、デンドリマー、生体高分子、ウイルス粒子、またはそれらの任意の組合せを含む、実施形態53の方法。

55. (i) 動員領域および(ii) 標的化領域を含むか、またはコードするポリヌクレオチド配列を含む組成物を投与することをさらに含み、ポリヌクレオチド配列が、RNA編集実体を動員し、編集実体が、ポリヌクレオチド配列およびmRNAと接触させたとき、mRNAの未成熟停止コドンのヌクレオチドの塩基上で化学修飾を行い、これにより、未成熟停止コドンをセンスコドンに変換する、実施形態1～54のいずれか1つの方法。

56. RNA編集実体が、

a) ADARポリペプチド；

b) APOBECポリペプチド；

c) (a)もしくは(b)の生物学的に活性なフラグメント；または

d) (c)の生物学的に活性なフラグメント、(a)のADARポリペプチド、または(b)のAPOBECポリペプチドを含む融合タンパク質を含む、実施形態55の方法。

57. 疾患または状態が、レット症候群を含み、mRNAが、MeCP2ポリペプチドをコードし、未成熟停止コドンが、オパール停止コドンであり、操作されたtRNAまたはその変異体が、アルギニルtRNAであり、対象が、0～6歳の年齢のヒトであり、操作されたtRNAまたはその変異体が、対象にAAVベクターとして投与されたとき、操作されたtRNAまたはその変異体が、MeCP2ポリペプチドをコードするmRNAの翻訳中に、未成熟停止コドンのアルギニンセンスコドンへの解釈を少なくとも部分的に形質転換し、実質的に全長のMeCP2ポリペプチドを産生し、これにより、レット症候群を少なくとも一部、処置する、実施形態1の方法。

58. 操作されたtRNAまたはその変異体が、メチル基、フルオロ基、メトキシエチル基、エチル基、リン酸塩基、アミド基、エステル基、またはそれらの任意の組合せを含む化学修飾を含む、実施形態1～57のいずれか1つの方法。

59. 対象が、投与前に、疾患または状態を有すると診断されている、実施形態1～58のいずれか1つの方法。

60. 診断が、インビトロ診断検査によって決定されている、実施形態59の方法。

61. a) 実施形態1～60のいずれか1つの操作されたtRNAまたはその変異体；および薬学的に許容される賦形剤、希釈剤、または担体を含む、組成物。

62. 実施形態61の組成物を容器において含む、キット。

63. それを必要とする対象における疾患または状態を処置する方法であって、対象に、操作されたtRNA変異体または操作されたtRNA変異体をコードするポリヌクレオチドを投与することを含み、操作されたtRNA変異体が、配列番号3～22のいずれか1つにおいて提供される参照tRNAの配列における1つまたは複数の突然変異を含み、操作されたtRNA変異体が、ポリペプチドをコードするmRNAにおける未成熟停止コドンを認識し、mRNAの翻訳中に、未成熟停止コドンのセンスコドンへの解釈を少なくとも部分的に形質転換して、インビボで実質的に全長のポリペプチドを産生する、方法。

64. 1つまたは複数の突然変異が、互いにワトソン・クリック塩基対形成しない操作さ

10

20

30

40

50

れた tRNA 変異体のアクセプターシステムまたはアンチコドンシステムにおける少なくとも 2 つのヌクレオチドの、ワトソン・クリック塩基対形成する少なくとも 2 つのヌクレオチドでの置換を含む、実施形態 63 の方法。

65. 1 つまたは複数の突然変異が、配列番号 3 または参照 tRNA の 5' 末端に関して、ヌクレオチド 72 位におけるチミンのシトシンでの置換を含む、実施形態 63 または 64 の方法。

66. 操作された tRNA 変異体が、配列番号 3 または参照 tRNA の 5' 末端に関して、ヌクレオチド 2 位にシトシンおよびヌクレオチド 71 位にグアニンを含む、実施形態 63 または 64 の方法。

67. 1 つまたは複数の突然変異が、ヌクレオチド 6 位においてグアニンで置換されたアデニンおよびヌクレオチド 67 位においてシトシンで置換されたチミンを含み、ヌクレオチド 6 位およびヌクレオチド 67 位が、配列番号 3 または参照 tRNA の 5' 末端に関してである、実施形態 63 または 64 の方法。

68. 1 つまたは複数の突然変異が、ヌクレオチド 13 位においてシトシンで置換されたチミンおよびヌクレオチド 22 位においてグアニンで置換されたアデニンを含み、ヌクレオチド 13 位およびヌクレオチド 22 位が、配列番号 3 または参照 tRNA の 5' 末端に関してである、実施形態 63 または 64 の方法。

69. 1 つまたは複数の突然変異が、配列番号 3 または参照 tRNA の 5' 末端に関して、ヌクレオチド 15 位においてグアニンで置換されたアデニンを含む、実施形態 63 または 64 の方法。

70. 1 つまたは複数の突然変異が、ヌクレオチド 28 位においてシトシンで置換されたチミンおよびヌクレオチド 42 位においてグアニンで置換されたアデニンを含み、ヌクレオチド 28 位およびヌクレオチド 42 位が、配列番号 3 または参照 tRNA の 5' 末端に関してである、実施形態 63 または 64 の方法。

71. 1 つまたは複数の突然変異が、ヌクレオチド 31 位においてアデニンで置換されたシトシンおよびヌクレオチド 39 位においてチミンで置換されたグアニンを含み、ヌクレオチド 31 位およびヌクレオチド 39 位が、配列番号 3 または参照 tRNA の 5' 末端に関してである、実施形態 63 または 64 の方法。

72. 1 つまたは複数の突然変異が、配列番号 3 または参照 tRNA の 5' 末端に関して、ヌクレオチド 37 位においてグアニンで置換されたアデニンを含む、実施形態 63 または 64 の方法。

73. 1 つまたは複数の突然変異が、配列番号 3 または参照 tRNA の 5' 末端に関して、ヌクレオチド 44 位においてアデニンで置換されたグアニンを含む、実施形態 63 または 64 の方法。

74. 1 つまたは複数の突然変異が、ヌクレオチド 50 位においてシトシンで置換されたチミンおよびヌクレオチド 64 位においてグアニンで置換されたアデニンを含み、ヌクレオチド 50 位およびヌクレオチド 64 位が、配列番号 3 または参照 tRNA の 5' 末端に関してである、実施形態 63 または 64 の方法。

75. 1 つまたは複数の突然変異が、ヌクレオチド 6 位においてチミンで置換されたシトシンおよびヌクレオチド 67 位においてアデニンで置換されたグアニンを含み、ヌクレオチド 6 位およびヌクレオチド 67 位が、配列番号 6 または参照 tRNA の 5' 末端に関してである、実施形態 63 または 64 の方法。

76. 1 つまたは複数の突然変異が、ヌクレオチド 49 位においてグアニンで置換されたシトシンおよびヌクレオチド 65 位においてシトシンで置換されたグアニンを含み、ヌクレオチド 49 位およびヌクレオチド 65 位が、配列番号 6 に関してである、実施形態 63 または 64 の方法。

77. 1 つまたは複数の突然変異が、ヌクレオチド 50 位においてチミンで置換されたシトシンおよびヌクレオチド 64 位においてアデニンで置換されたグアニンを含み、ヌクレオチド 50 位およびヌクレオチド 64 位が、配列番号 6 または参照 tRNA の 5' 末端に関してである、実施形態 63 または 64 の方法。

10

20

30

40

50

78. 1つまたは複数の突然変異が、配列番号6または参照 tRNA の5'末端に関して、ヌクレオチド71位においてシトシンで置換されたチミンを含む、実施形態63または64の方法。

79. 1つまたは複数の突然変異が、ヌクレオチド2位においてシトシンで置換されたグアニンおよびヌクレオチド71位においてグアニンで置換されたチミンを含み、ヌクレオチド2位およびヌクレオチド72位が、配列番号6または参照 tRNA の5'末端に関してである、実施形態63または64の方法。

80. 1つまたは複数の突然変異が、ヌクレオチド4位においてシトシンで置換されたチミンおよびヌクレオチド69位においてグアニンで置換されたアデニンを含み、ヌクレオチド4位およびヌクレオチド69位が、配列番号6または参照 tRNA の5'末端に関してである、実施形態63または64の方法。

81. 1つまたは複数の突然変異が、ヌクレオチド6位においてアデニンで置換されたシトシンおよびヌクレオチド67位においてチミンで置換されたグアニンを含み、ヌクレオチド6位およびヌクレオチド67位が、配列番号6または参照 tRNA の5'末端に関してである、実施形態63または64の方法。

82. 1つまたは複数の突然変異が、ヌクレオチド12位においてシトシンで置換されたグアニンおよびヌクレオチド23位においてグアニンで置換されたシトシンを含み、ヌクレオチド12位およびヌクレオチド23位が、配列番号6または参照 tRNA の5'末端に関してである、実施形態63または64の方法。

83. 1つまたは複数の突然変異が、ヌクレオチド27位においてシトシンで置換されたチミンおよびヌクレオチド43位においてグアニンで置換されたアデニンを含み、ヌクレオチド27位およびヌクレオチド43位が、配列番号6または参照 tRNA の5'末端に関してである、実施形態63または64の方法。

84. 1つまたは複数の突然変異が、ヌクレオチド28位においてシトシンで置換されたチミンおよびヌクレオチド42位においてグアニンで置換されたアデニンを含み、ヌクレオチド28位およびヌクレオチド42位が、配列番号6または参照 tRNA の5'末端に関してである、実施形態63または64の方法。

85. 1つまたは複数の突然変異が、配列番号6または参照 tRNA の5'末端に関して、ヌクレオチド40位においてシトシンで置換されたチミンを含む、実施形態63または64の方法。

86. 1つまたは複数の突然変異が、ヌクレオチド31位においてシトシンで置換されたアデニンおよびヌクレオチド39位においてグアニンで置換されたチミンを含み、ヌクレオチド31位およびヌクレオチド39位が、配列番号6または参照 tRNA の5'末端に関してである、実施形態63または64の方法。

87. 1つまたは複数の突然変異が、配列番号6または参照 tRNA の5'末端に関して、ヌクレオチド44位においてグアニンで置換されたアデニンを含む、実施形態63または64の方法。

88. 1つまたは複数の突然変異が、配列番号6または参照 tRNA の5'末端に関して、ヌクレオチド46位においてアデニンで置換されたグアニンを含む、実施形態63または64の方法。

89. ポリペプチドが、

a) 操作された tRNA 変異体をコードする第1のベクターおよび第1の緑色蛍光タンパク質をコードするスクリーニング mRNA をコードする第2のベクターを第1のヒト細胞にトランスフェクトすること、第1の緑色蛍光タンパク質をコードするスクリーニング mRNA が、未成熟停止コドンを含む；

b) 第2の緑色蛍光タンパク質をコードする同等のスクリーニング mRNA をコードする第3のベクターを第2のヒト細胞にトランスフェクトすること、同等のスクリーニング mRNA は、未成熟停止コドンを含まない；および

c) 第1のヒト細胞から放出される蛍光の量と第2のヒト細胞から放出される蛍光の量を比較することによって決定される、未成熟停止コドンが欠如する同等の mRNA を使用し

10

20

30

40

50

て産生される同等のポリペプチドと比べて、少なくとも約 10 % の効率で産生される、実施形態 63 ~ 88 のいずれか 1 つの方法。

90. ポリペプチドが、未成熟停止コドンが欠如する同等の mRNA を使用して産生される同等のポリペプチドと比べて、少なくとも約 80 % の効率で産生され、これにより、対象における疾患または状態を少なくとも一部、処置する、実施形態 63 ~ 89 のいずれか 1 つの方法。

91. 操作された tRNA 変異体が、リジン、アルギニン、ヒスチジン、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、プロリン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ピロリジン、およびセレノシステインからなる群から選択されるアミノ酸でアシル化される、実施形態 63 ~ 90 のいずれか 1 つの方法。

10

92. 操作された tRNA 変異体が、非標準アミノ酸でアシル化される、実施形態 63 ~ 91 のいずれか 1 つの方法。

93. 操作された tRNA 変異体が、mRNA の翻訳中に、インビボで未成熟停止コドンに応答して、アミノ酸を、mRNA によってコードされる新生 MeCP2 ポリペプチド鎖に挿入し、アミノ酸は、挿入されたとき、未成熟停止コドンが欠如する同等の mRNA を使用して産生される同等の MeCP2 ポリペプチドと比較して、少なくとも一部の機能的な MeCP2 ポリペプチドを産生するのに十分である、実施形態 63 ~ 92 のいずれか 1 つの方法。

94. mRNA が、少なくとも 2 つの未成熟停止コドンを含む、実施形態 63 ~ 93 のいずれか 1 つの方法。

20

95. 少なくとも 2 つの未成熟停止コドンが、同じ停止コドンである、実施形態 94 の方法。

96. 少なくとも 2 つの未成熟停止コドンが、異なる停止コドンである、実施形態 94 の方法。

97. 操作された tRNA 変異体が、リジル tRNA、アルギニル tRNA、ヒスチジル tRNA、グリシル tRNA、アラニル tRNA、バリル tRNA、ロイシル tRNA、イソロイシル tRNA、メチオニル tRNA、フェニルアラニル tRNA、トリプトファニル tRNA、プロリル tRNA、セリル tRNA、スレオニル tRNA、システニル tRNA、チロシル tRNA、アスパラギニル tRNA、グルタミニル tRNA、アスパルチル tRNA、ピロールリジル tRNA、セレノシスチル tRNA またはグルタミル tRNA である、実施形態 63 ~ 96 のいずれか 1 つの方法。

30

98. 操作された tRNA 変異体が、操作された tRNA 前駆体である、実施形態 63 ~ 97 のいずれか 1 つの方法。

99. 操作された tRNA 変異体が、イントロン配列を含む、実施形態 98 の方法。

100. イントロン配列が、操作された tRNA 変異体を含有する細胞内でスプライシングされ、これにより、成熟な操作された tRNA 変異体を産生する、実施形態 98 の方法。

101. 対象がヒトである、実施形態 63 ~ 100 のいずれか 1 つの方法。

102. ヒトが、約生誕時 ~ 約 40 歳の年齢である、実施形態 101 の方法。

40

103. ヒトが、約 6 カ月間 ~ 約 15 歳の年齢である、実施形態 101 の方法。

104. ヒトが、胚または胎児である、実施形態 101 の方法。

105. 疾患または状態が、レット症候群を含む、実施形態 63 ~ 104 のいずれか 1 つの方法。

106. 疾患または状態が、嚢胞性線維症を含む、実施形態 63 ~ 104 のいずれか 1 つの方法。

107. 疾患または状態が、網膜色素変性症を含む、実施形態 63 ~ 104 のいずれか 1 つの方法。

108. 疾患または状態が、難聴を含む、実施形態 63 ~ 104 のいずれか 1 つの方法。

109. 難聴が、常染色体優性 17 難聴、常染色体優性 13 難聴、または常染色体優性 1

50

1 難聴を含む、実施形態 1 0 8 の方法。

1 1 0 . 未成熟停止コドンが、オパール停止コドンである、実施形態 6 3 ~ 1 0 9 のいずれか 1 つの方法。

1 1 1 . 投与することは、経口投与すること、直腸投与すること、または非経口投与することである、実施形態 6 3 ~ 1 1 0 のいずれか 1 つの方法。

1 1 2 . 投与することは、非経口投与することであり、非経口投与することは、静脈内投与すること、動脈内投与すること、くも膜下腔内投与すること、眼内投与すること、耳投与すること、脳室内投与すること、頭蓋内、実質への頭蓋内、または腹腔内投与することである、実施形態 6 3 ~ 1 1 1 の方法。

1 1 3 . ポリペプチドが、MeCP2 ポリペプチドを含む、実施形態 6 3 ~ 1 1 2 のいずれか 1 つの方法。

1 1 4 . ポリペプチドが、FoxG1 ポリペプチドを含む、実施形態 6 3 ~ 1 1 2 のいずれか 1 つの方法。

1 1 5 . ポリペプチドが、CDKL5 ポリペプチドを含む、実施形態 6 3 ~ 1 1 2 のいずれか 1 つの方法。

1 1 6 . ポリペプチドが、MYH9 ポリペプチドを含む、実施形態 6 3 ~ 1 1 2 のいずれか 1 つの方法。

1 1 7 . ポリペプチドが、COL11A2 ポリペプチドを含む、実施形態 6 3 ~ 1 1 2 のいずれか 1 つの方法。

1 1 8 . ポリペプチドが、MYO7A ポリペプチドを含む、実施形態 6 3 ~ 1 1 2 のいずれか 1 つの方法。

1 1 9 . 投与することが、期間中、少なくとも 2 回行われる、実施形態 6 3 ~ 1 1 2 のいずれか 1 つの方法。

1 2 0 . 期間が、約 2 4 時間である、実施形態 1 1 9 の方法。

1 2 1 . 疾患または状態を予防する方法であり、予防することが、操作された tRNA 変異体または操作された tRNA 変異体をコードするポリヌクレオチドを対象に予防投与することを含む、実施形態 6 3 ~ 1 2 0 のいずれか 1 つの方法。

1 2 2 . 操作された tRNA 変異体をコードするポリヌクレオチドが、対象に投与される、実施形態 6 3 ~ 1 2 1 のいずれか 1 つの方法。

1 2 3 . ベクターが、ウイルスベクターである、実施形態 6 3 ~ 1 2 2 の方法。

1 2 4 . ウイルスベクターが、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター、またはレンチウイルスベクターである、実施形態 1 2 3 の方法。

1 2 5 . AAV ベクターが、複製遺伝子を含むゲノムならびに第 1 の AAV 血清型由来の逆位末端反復および第 2 の AAV 血清型由来のキャプシドタンパク質を含む、実施 1 2 4 の方法。

1 2 6 . AAV ベクターが、AAV2 / 5 ベクター、AAV2 / 6 ベクター、AAV2 / 7 ベクター、AAV2 / 8 ベクター、または AAV2 / 9 ベクターを含む、実施 1 2 4 または 1 2 5 の方法。

1 2 7 . AAV ベクターが、AAV2 / 5 ベクターである、実施形態 1 2 4 ~ 1 2 6 のいずれか 1 つの方法。

1 2 8 . 操作された tRNA 変異体または操作された tRNA をコードするポリヌクレオチドが、デリバリーシステムに存在する、実施形態 6 3 ~ 1 2 7 のいずれか 1 つの方法。

1 2 9 . デリバリーシステムが、リポソーム、荷電ポリマー、非荷電ポリマー、ナノ粒子、界面活性剤、浸透増強剤、遺伝子導入剤、リン脂質、ミセル、合成ベクター、高分子、デンドリマー、生体高分子、ウイルス粒子、またはそれらの任意の組合せを含む、実施形態 1 2 8 の方法。

1 3 0 . (i) 動員領域および (ii) 標的化領域を含む RNA 編集ポリヌクレオチドを含むか、またはコードするポリヌクレオチド配列を含む組成物を投与することをさらに含み、ポリヌクレオチド配列が、動員領域の少なくとも一部を介して編集実体を動員し、編集実体は、RNA 編集ポリヌクレオチド配列および mRNA と接触されたとき、mRNA

10

20

30

40

50

の未成熟停止コドンのヌクレオチドの塩基上で化学修飾を行い、これにより、未成熟停止コドンセンスコドンに変換する、実施形態 63～129 のいずれか 1 つの方法。

131. 編集実体が、

a) ADAR ポリペプチド；

b) APOBEC ポリペプチド；

c) (a) もしくは (b) の生物学的に活性なフラグメント；または

d) (c) の生物学的に活性なフラグメント、(a) の ADAR ポリペプチド、または (b) の APOBEC ポリペプチドを含む融合タンパク質を含む、実施形態 130 の方法。

132. 疾患または状態が、レット症候群を含み、mRNA が、MeCP2 ポリペプチドをコードし、未成熟停止コドンが、オパール停止コドンであり、操作された tRNA が、アルギニル tRNA であり、対象が、0～6 歳の年齢のヒトであり、操作された tRNA 変異体が、対象に AAV ベクターとして投与されたとき、操作された tRNA 変異体が、MeCP2 ポリペプチドをコードする mRNA の翻訳中に、未成熟停止コドンのアルギニンセンスコドンへの解釈を少なくとも部分的に形質転換し、実質的に全長の MeCP2 ポリペプチドを産生し、これにより、レット症候群を少なくとも一部、処置する、実施形態 63 の方法。

133. 操作された tRNA 変異体が、メチル基、フルオロ基、メトキシエチル基、エチル基、リン酸塩基、アミド基、エステル基、またはそれらの任意の組合せを含む化学修飾を含む、実施形態 63～132 のいずれか 1 つの方法。

134. 操作された tRNA 変異体または操作された tRNA 変異体をコードするポリヌクレオチドが、薬学的に許容される担体、賦形剤、希釈剤、または担体をさらに含む医薬単位投薬形態で含まれる、実施形態 63～133 のいずれか 1 つの方法。

135. 対象が、疾患または状態を有すると診断されている、実施形態 63～134 のいずれか 1 つの方法。

136. 診断が、インビトロ診断検査によって決定されている、実施形態 135 の方法。

137. 配列番号 3～22 のいずれかに提供される配列に関して、1 つまたは複数の突然変異を含む操作された tRNA 変異体を含む、組成物。

138. 操作された tRNA 変異体が、配列番号 23～配列番号 48 のいずれか 1 つと少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 92%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 99%、または 100% の配列同一性を有する、実施形態 137 の組成物。

139. 操作された tRNA 変異体または操作された tRNA 変異体をコードするポリヌクレオチドを含み、操作された tRNA 変異体が、配列番号 3～22 のいずれかに提供される配列を含む参照 tRNA と比較して、操作された tRNA の配列における 1 つまたは複数の突然変異を含み、操作された tRNA 変異体は、ポリペプチドをコードする mRNA における未成熟停止コドン認識し、mRNA の翻訳中に、未成熟停止コドンのセンスコドンへの解釈を少なくとも部分的に形質転換して、実質的に全長のポリペプチドを産生する、組成物。

140. 操作された tRNA 変異体が、配列番号 6 と少なくとも 70% 同一であり、配列番号 6 の 2、4、6、12、23、27、28、31、39、40、42、43、44、46、49、50、64、65、67、69、または 71 位に置換を有する配列を含む、実施形態 137～139 のいずれか 1 つの組成物。

141. 2 位での置換が、C への置換であり、4 位での置換が、C への置換であり、6 位での置換が、T への置換であり、6 位での置換が、A への置換であり、12 位での置換が、C への置換であり、23 位での置換が、G への置換であり、27 位での置換が、C への置換であり、28 位での置換が、C への置換であり、31 位での置換が、C への置換であり、39 位での置換が、G への置換であり、40 位での置換が、C への置換であり、42 位での置換が、G への置換であり、43 位での置換が、G への置換であり、44 位での置換が、G への置換であり、46 位での置換が、A への置換であり、49 位での置換が、G への置換であり、50 位での置換が、T への置換であり、64 位での置換が、A への置換

10

20

30

40

50

であり、65位での置換が、Cへの置換であり、67位での置換が、Aへの置換であり、67位での置換が、Tへの置換であり、69位での置換が、Gへの置換であり、71位での置換が、Cへの置換であり、または71位での置換が、Gへの置換である、実施形態140の組成物。

142. 操作されたtRNA変異体の配列が、複数の置換を含む、実施形態140または141の組成物。

143. 操作されたtRNA変異体の配列が、置換（複数可）を除いて、配列番号6と同一である、実施形態140～142のいずれか1つの組成物。

144. 操作されたtRNA変異体が、プロキシ測定、半減期測定、アミノ酸変換効率測定、またはシンターゼもしくはリボソーム機構への結合の測定によって決定した場合、配列番号6に提供される配列を含む同等のtRNAと比較して、インビボで安定性の増加を示す、実施形態140～143のいずれか1つの組成物。

145. 操作されたtRNA変異体が、配列番号3と少なくとも70%同一であり、配列番号3の2、6、13、15、22、28、31、37、39、42、44、50、64、67、71、または72位に置換を有する配列を含む、実施形態137～139のいずれか1つの組成物。

146. 2位での置換が、Gへの置換であり、6位での置換が、Gへの置換であり、13位での置換が、Cへの置換であり、15位での置換が、Gへの置換であり、22位での置換が、Gへの置換であり、28位での置換が、Cへの置換であり、31位での置換が、Aへの置換であり、37位での置換が、Gへの置換であり、39位での置換が、Tへの置換であり、42位での置換が、Gへの置換であり、44位での置換が、Aへの置換であり、50位での置換が、Cへの置換であり、64位での置換が、Gへの置換であり、67位での置換が、Cへの置換であり、71位での置換が、Cへの置換であり、または72位での置換が、Cへの置換である、実施形態145の組成物。

147. 操作されたtRNA変異体の配列が、複数の置換を含む、実施形態145または146の組成物。

148. 操作されたtRNA変異体の配列が、置換（複数可）を除いて、配列番号3と同一である、実施形態145～147のいずれか1つの組成物。

149. 操作されたtRNA変異体が、プロキシ測定、半減期測定、アミノ酸変換効率測定、またはシンターゼもしくはリボソーム機構への結合の測定によって決定した場合、配列番号3に提供される配列を含む同等のtRNAと比較して、インビボで安定性の増加を示す、実施形態145～148のいずれか1つの組成物。

150. 操作されたtRNA変異体が、配列番号5と少なくとも70%同一であり、配列番号5の73位に置換を有する配列を含む、実施形態137～139のいずれか1つの組成物。

151. 位置73での置換が、Gへの置換である、実施形態150の組成物。

152. 操作されたtRNA変異体の配列が、複数の置換を含む、実施形態150または151の組成物。

153. 操作されたtRNA変異体の配列が、置換を除いて、配列番号5と同一である、実施形態150～152のいずれか1つの組成物。

154. 操作されたtRNA変異体が、プロキシ測定、半減期測定、アミノ酸変換効率測定、またはシンターゼもしくはリボソーム機構への結合の測定によって決定した場合、配列番号5に提供される配列を含む同等のtRNAと比較して、インビボで安定性の増加を示す、実施形態150～153のいずれか1つの組成物。

155. 1つまたは複数の突然変異が、互いにワトソン・クリック塩基対形成しない操作されたtRNA変異体のアクセプターステムまたはアンチコドンステムにおける少なくとも2つのヌクレオチドの、ワトソン・クリック塩基対形成する少なくとも2つのヌクレオチドでの置換を含む、実施形態150の組成物。

156. 操作されたtRNA変異体が、配列番号3または参照tRNAの5'末端に関して、ヌクレオチド2位にシトシンおよびヌクレオチド71位にグアニンを含む、実施形態

10

20

30

40

50

150～153のいずれか1つの組成物。

157. 1つまたは複数の突然変異が、配列番号3または参照tRNAの5'末端に関して、ヌクレオチド72位におけるチミンのシトシンでの置換を含む、実施形態137～139のいずれか1つの方法。

158. 1つまたは複数の突然変異が、ヌクレオチド22位においてグアニンで置換されたシトシンおよびヌクレオチド71位においてシトシンで置換されたグアニンを含み、ヌクレオチド22位およびヌクレオチド71位が、配列番号3または参照tRNAの5'末端に関してである、実施形態137～139のいずれか1つの組成物。

159. 1つまたは複数の突然変異が、ヌクレオチド6位においてグアニンで置換されたアデニンおよびヌクレオチド67位においてシトシンで置換されたチミンを含み、ヌクレオチド6位およびヌクレオチド67位が、配列番号3または参照tRNAの5'末端に関してである、実施形態137～139のいずれか1つの組成物。

160. 1つまたは複数の突然変異が、ヌクレオチド13位においてシトシンで置換されたチミンおよびヌクレオチド22位においてグアニンで置換されたアデニンを含み、ヌクレオチド13位およびヌクレオチド22位が、配列番号3または参照tRNAの5'末端に関してである、実施形態137～139のいずれか1つの組成物。

161. 1つまたは複数の突然変異が、配列番号3または参照tRNAの5'末端に関して、ヌクレオチド15位におけるグアニンで置換されたアデニンを含む、実施形態137～139のいずれか1つの組成物。

162. 1つまたは複数の突然変異が、ヌクレオチド28位においてシトシンで置換されたチミンおよびヌクレオチド42位においてグアニンで置換されたアデニンを含み、ヌクレオチド28位およびヌクレオチド42位が、配列番号3または参照tRNAの5'末端に関してである、実施形態137～139のいずれか1つの組成物。

163. 1つまたは複数の突然変異が、ヌクレオチド31位においてアデニンで置換されたシトシンおよびヌクレオチド39位においてチミンで置換されたグアニンを含み、ヌクレオチド31位およびヌクレオチド39位が、配列番号3または参照tRNAの5'末端に関してである、実施形態137～139のいずれか1つの組成物。

164. 1つまたは複数の突然変異が、配列番号3または参照tRNAの5'末端に関して、ヌクレオチド37位におけるグアニンで置換されたアデニンを含む、実施形態137～139のいずれか1つの組成物。

165. 1つまたは複数の突然変異が、配列番号3または参照tRNAの5'末端に関して、ヌクレオチド44位におけるアデニンで置換されたグアニンを含む、実施形態137～139のいずれか1つの組成物。

166. 1つまたは複数の突然変異が、配列番号3または参照tRNAの5'末端に関して、ヌクレオチド73位におけるグアニンで置換されたアデニンを含む、実施形態137～139のいずれか1つの組成物。

167. 1つまたは複数の突然変異が、ヌクレオチド50位においてチミンで置換されたシトシンおよびヌクレオチド64位においてアデニンで置換されたグアニンを含み、ヌクレオチド50位およびヌクレオチド64位が、配列番号4または参照tRNAの5'末端に関してである、実施形態137～139のいずれか1つの組成物。

168. 1つまたは複数の突然変異が、ヌクレオチド6位においてチミンで置換されたシトシンおよびヌクレオチド67位においてアデニンで置換されたグアニンを含み、ヌクレオチド6位およびヌクレオチド67位が、配列番号6または参照tRNAの5'末端に関してである、実施形態137～139のいずれか1つの組成物。

169. 1つまたは複数の突然変異が、ヌクレオチド49位においてグアニンで置換されたシトシンおよびヌクレオチド65位においてシトシンで置換されたグアニンを含み、ヌクレオチド49位およびヌクレオチド65位が、配列番号6または参照tRNAの5'末端に関してである、実施形態137～139のいずれか1つの組成物。

170. 1つまたは複数の突然変異が、ヌクレオチド50位においてチミンで置換されたシトシンおよびヌクレオチド64位においてアデニンで置換されたグアニンを含み、ヌク

10

20

30

40

50

レオチド 50 位およびヌクレオチド 64 位が、配列番号 6 または参照 tRNA の 5' 末端に関してである、実施形態 137 ~ 139 のいずれか 1 つの組成物。

171. 1 つまたは複数の突然変異が、配列番号 6 または参照 tRNA の 5' 末端に関して、ヌクレオチド 71 位におけるグアニンで置換されたチミンを含む、実施形態 137 ~ 139 のいずれか 1 つの組成物。

172. 1 つまたは複数の突然変異が、ヌクレオチド 4 位においてシトシンで置換されたチミンおよびヌクレオチド 69 位においてグアニンで置換されたアデニンを含み、ヌクレオチド 4 位およびヌクレオチド 69 位が、配列番号 6 または参照 tRNA の 5' 末端に関してである、実施形態 137 ~ 139 のいずれか 1 つの組成物。

173. 1 つまたは複数の突然変異が、ヌクレオチド 6 位においてアデニンで置換されたシトシンおよびヌクレオチド 67 位においてチミンで置換されたグアニンを含み、ヌクレオチド 6 位およびヌクレオチド 67 位が、配列番号 6 または参照 tRNA の 5' 末端に関してである、実施形態 137 ~ 139 のいずれか 1 つの組成物。

174. 1 つまたは複数の突然変異が、ヌクレオチド 12 位においてシトシンで置換されたグアニンおよびヌクレオチド 23 位においてグアニンで置換されたシトシンを含み、ヌクレオチド 12 位およびヌクレオチド 23 位が、配列番号 6 または参照 tRNA の 5' 末端に関してである、実施形態 137 ~ 139 のいずれか 1 つの組成物。

175. 1 つまたは複数の突然変異が、ヌクレオチド 27 位においてシトシンで置換されたチミンおよびヌクレオチド 43 位においてグアニンで置換されたアデニンを含み、ヌクレオチド 27 位およびヌクレオチド 43 位が、配列番号 6 または参照 tRNA の 5' 末端に関してである、実施形態 137 ~ 139 のいずれか 1 つの組成物。

176. 1 つまたは複数の突然変異が、ヌクレオチド 28 位においてシトシンで置換されたチミンおよびヌクレオチド 42 位においてグアニンで置換されたアデニンを含み、ヌクレオチド 28 位およびヌクレオチド 42 位が、配列番号 6 または参照 tRNA の 5' 末端に関してである、実施形態 137 ~ 139 のいずれか 1 つの組成物。

177. 1 つまたは複数の突然変異が、配列番号 6 または参照 tRNA の 5' 末端に関して、ヌクレオチド 40 位におけるシトシンで置換されたチミンを含む、実施形態 137 ~ 139 のいずれか 1 つの組成物。

178. 1 つまたは複数の突然変異が、ヌクレオチド 31 位においてシトシンで置換されたアデニンおよびヌクレオチド 39 位においてグアニンで置換されたチミンを含み、ヌクレオチド 31 位およびヌクレオチド 39 位が、配列番号 6 または参照 tRNA の 5' 末端に関してである、実施形態 137 ~ 139 のいずれか 1 つの組成物。

179. 1 つまたは複数の突然変異が、配列番号 6 または参照 tRNA の 5' 末端に関して、ヌクレオチド 44 位におけるグアニンで置換されたアデニンを含む、実施形態 137 ~ 139 のいずれか 1 つの組成物。

180. 1 つまたは複数の突然変異が、配列番号 6 または参照 tRNA の 5' 末端に関して、ヌクレオチド 46 位におけるアデニンで置換されたグアニンを含む、実施形態 137 ~ 139 のいずれか 1 つの組成物。

181. ポリペプチドが、

a) 操作された tRNA またはその変異体をコードする第 1 のベクターおよび第 1 の緑色蛍光タンパク質をコードするスクリーニング mRNA をコードする第 2 のベクターを第 1 のヒト細胞にトランスフェクトすること、第 1 の緑色蛍光タンパク質をコードするスクリーニング mRNA が、未成熟停止コドンを含む；

b) 第 2 の緑色蛍光タンパク質をコードする同等のスクリーニング mRNA をコードする第 3 のベクターを第 2 のヒト細胞にトランスフェクトすること、同等のスクリーニング mRNA は、未成熟停止コドンを含まない；および

c) 第 1 のヒト細胞から放出される蛍光の量と第 2 のヒト細胞から放出される蛍光の量を比較することによって決定される、未成熟停止コドンが欠如する同等の mRNA を使用して産生される同等のポリペプチドと比べて、少なくとも約 10 % の効率で産生される、実施形態 137 ~ 180 のいずれか 1 つの組成物。

10

20

30

40

50

182. ポリペプチドが、未成熟停止コドンが欠如する同等のmRNAを使用して産生される同等のポリペプチドと比べて、少なくとも約80%の効率で産生され、これにより、対象における疾患または状態を少なくとも一部、処置する、実施形態181の組成物。

183. 操作されたtRNA変異体が、リジン、アルギニン、ヒスチジン、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、プロリン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ピロリジン、およびセレノシステインからなる群から選択されるアミノ酸でアシル化される、実施形態137~182のいずれか1つの組成物。

184. 操作されたtRNA変異体が、非標準アミノ酸でアシル化される、実施形態137~182のいずれか1つの組成物。

185. 操作されたtRNA変異体が、mRNAの翻訳中に、インビボで未成熟停止コドンに応答して、アミノ酸を、mRNAによってコードされる新生MeCP2ポリペプチド鎖に挿入し、アミノ酸は、挿入されたとき、未成熟停止コドンが欠如する同等のmRNAを使用して産生される同等のMeCP2ポリペプチドと比較して、少なくとも一部の機能的なMeCP2ポリペプチドを産生するのに十分である、実施形態137~182のいずれか1つの組成物。

186. mRNAが、少なくとも2つの未成熟停止コドンを含む、実施形態137~185のいずれか1つの組成物。

187. 少なくとも2つの未成熟停止コドンが、同じ停止コドンである、実施形態186の組成物。

188. 少なくとも2つの未成熟停止コドンが、異なる停止コドンである、実施形態186の組成物。

189. 操作されたtRNA変異体が、リジルtRNA、アルギニルtRNA、ヒスチジルtRNA、グリシルtRNA、アラニルtRNA、バリルtRNA、ロイシルtRNA、イソロイシルtRNA、メチオニルtRNA、フェニルアラニルtRNA、トリプトファンルtRNA、プロリルtRNA、セリルtRNA、スレオニルtRNA、システイニルtRNA、チロシルtRNA、アスパラギニルtRNA、グルタミニルtRNA、アスパルチルtRNA、ピロールリジルtRNA、セレノシスチルtRNAまたはグルタミルtRNAである、実施形態137~188のいずれか1つの組成物。

190. 操作されたtRNA変異体が、操作されたtRNA前駆体である、実施形態137~189のいずれか1つの組成物。

191. 操作されたtRNA変異体が、イントロン配列を含む、実施形態190の組成物。

192. イントロン配列が、操作されたtRNA変異体を含有する細胞内でスプライシングされ、これにより、成熟な操作されたtRNA変異体を産生する、実施形態191の組成物。

193. 対象がヒトである、実施形態137~192のいずれか1つの組成物。

194. ヒトが、約生誕時~約40歳の年齢である、実施形態193の組成物。

195. ヒトが、約6カ月間~約15歳の年齢である、実施形態193の組成物。

196. ヒトが、胚または胎児である、実施形態193の組成物。

197. 疾患または状態が、レット症候群を含む、実施形態137~196のいずれか1つの組成物。

198. 疾患または状態が、嚢胞性線維症を含む、実施形態137~196のいずれか1つの組成物。

199. 疾患または状態が、網膜色素変性症を含む、実施形態137~196のいずれか1つの組成物。

200. 疾患または状態が、難聴を含む、実施形態137~196のいずれか1つの組成物。

201. 難聴が、常染色体優性17難聴、常染色体優性13難聴、または常染色体優性1

10

20

30

40

50

1 難聴を含む、実施形態 200 の組成物。

202. 未成熟停止コドンが、オパール停止コドンである、実施形態 137~201 のいずれか 1 つの組成物。

203. 投与することは、経口投与すること、直腸投与すること、または非経口投与することである、実施形態 137~202 のいずれか 1 つの組成物。

204. 投与することは、非経口投与することであり、非経口投与することは、静脈内投与すること、動脈内投与すること、くも膜下腔内投与すること、眼内投与すること、耳投与すること、脳室内投与すること、または腹腔内投与することである、実施形態 137~203 のいずれか 1 つの組成物。

205. ポリペプチドが、MeCP2 ポリペプチドを含む、実施形態 137~204 のいずれか 1 つの組成物。

206. ポリペプチドが、FoxG1 ポリペプチドを含む、実施形態 137~204 のいずれか 1 つの組成物。

207. ポリペプチドが、CDKL5 ポリペプチドを含む、実施形態 137~204 のいずれか 1 つの組成物。

208. ポリペプチドが、MYH9 ポリペプチドを含む、実施形態 137~204 のいずれか 1 つの組成物。

209. ポリペプチドが、COL11A2 ポリペプチドを含む、実施形態 137~204 のいずれか 1 つの組成物。

210. ポリペプチドが、MYO7A ポリペプチドを含む、実施形態 137~204 のいずれか 1 つの組成物。

211. 投与することが、期間中、少なくとも 2 回行われる、実施形態 137~204 のいずれか 1 つの組成物。

212. 期間が、約 24 時間である、実施形態 211 の組成物。

213. 疾患または状態を予防する組成物であり、予防することが、操作された tRNA 変異体または操作された tRNA 変異体をコードするポリヌクレオチドを対象に予防投与することを含む、実施形態 137~212 のいずれか 1 つの組成物。

214. 操作された tRNA 変異体をコードするポリヌクレオチドが、対象に投与される、実施形態 137~213 のいずれか 1 つの組成物。

215. ポリヌクレオチドが、ウイルスベクターである、実施形態 214 の組成物。

216. ウイルスベクターが、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター、またはレンチウイルスベクターである、実施形態 215 の組成物。

217. AAV ベクターが、複製遺伝子を含むゲノムならびに第 1 の AAV 血清型由来の逆位末端反復および第 2 の AAV 血清型由来のキャプシドタンパク質を含む、実施形態 216 の方法。

218. AAV ベクターが、AAV2/5 ベクター、AAV2/6 ベクター、AAV2/7 ベクター、AAV2/8 ベクター、または AAV2/9 ベクターを含む、216 または 217 の方法。

219. AAV ベクターが、AAV2/5 ベクターである、実施形態 216~218 のいずれか 1 つの方法。

220. 操作された tRNA 変異体または操作された tRNA をコードするポリヌクレオチドが、デリバリーシステムに存在する、実施形態 137~219 のいずれか 1 つの組成物。

221. デリバリーシステムが、リポソーム、荷電ポリマー、非荷電ポリマー、ナノ粒子、界面活性剤、浸透増強剤、遺伝子導入剤、リン脂質、ミセル、合成ベクター、高分子、デンドリマー、生体高分子、ウイルス粒子、またはそれらの任意の組合せを含む、実施形態 220 の組成物。

222. ポリヌクレオチド配列、またはポリヌクレオチド配列をコードするベクターを含む組成物を投与することをさらに含み、ポリヌクレオチド配列が、(i) 動員領域および (ii) 標的化領域を含み、ポリヌクレオチド配列が、動員領域の少なくとも一部を介し

10

20

30

40

50

て編集実体を動員し、編集実体が、ポリヌクレオチド配列およびmRNAと接触されたとき、mRNAの未成熟停止コドンのヌクレオチドの塩基上で化学修飾を行い、これにより、未成熟停止コドンをセンスコドンに変換する、実施形態137～221のいずれか1つの組成物。

223. 編集実体が、

a) ADARポリペプチド；

b) APOBECポリペプチド；

c) (a) もしくは (b) の生物学的に活性なフラグメント；または

d) (c) の生物学的に活性なフラグメント、(a) のADARポリペプチド、または (b) のAPOBECポリペプチドを含む融合タンパク質を含む、実施形態222の組成物

。224. 疾患または状態が、レット症候群を含み、mRNAが、MeCP2ポリペプチドをコードし、未成熟停止コドンが、オパール停止コドンであり、操作されたtRNAが、アルギニルtRNAであり、対象が、0～6歳の年齢のヒトであり、操作されたtRNA変異体が、対象にAAVベクターとして投与されたとき、操作されたtRNA変異体が、MeCP2ポリペプチドをコードするmRNAの翻訳中に、未成熟停止コドンのアルギニンセンスコドンへの解釈を少なくとも部分的に形質転換し、実質的に全長のMeCP2ポリペプチドを産生し、これにより、レット症候群を少なくとも一部、処置する、実施形態223の組成物。

225. 操作されたtRNA変異体が、メチル基、フルオロ基、メトキシエチル基、エチル基、リン酸塩基、アミド基、エステル基、またはそれらの任意の組合せを含む化学修飾を含む、実施形態137～224のいずれか1つの組成物。

226. 単離される、実施形態137～225のいずれか1つの組成物。

227. 実施形態137～226の組成物および薬学的に許容される賦形剤、希釈剤、または担体を含む、医薬組成物。

228. 実施形態137～227のいずれか1つの組成物を含む、単離された細胞。

229. 実施形態137～228のいずれか1つの組成物を含む、単離された複数の細胞。

230. 実施形態137～229のいずれか1つの組成物の操作されたtRNA変異体、または操作されたtRNA変異体をコードするポリヌクレオチドを含む、ベクター。

231. (例えば、5'から3'の順に)：

a) 第1のプロモーター；

b) 第1の定量カセット；

c) 第2のプロモーター；

d) 第2の定量カセット；

e) 第3のプロモーター；

f) 操作されたtRNA変異体をコードするポリヌクレオチドを含む導入遺伝子；

g) 検出可能なポリペプチドをコードするレポーター遺伝子；または

h) それらの任意の組合せをさらに含む、実施形態230のベクター。

232. ポリヌクレオチドが、プロモーターの5' ITR上流およびレポーター遺伝子の3' ITR下流をさらに含む、実施形態231のベクター。

233. 本明細書において、検出可能なポリペプチドが、mCherry、緑色蛍光タンパク質(GFP)、またはβ-ガラクトシダーゼを含む、実施形態231または232のベクター。

234. 本明細書において、第1のプロモーターおよび第2のプロモーターが、U6プロモーターであり、U6プロモーターが、メチル化されてもよいか、またはU6プロモーターが、マウスU6プロモーターであってもよい、実施形態231のベクター。

235. 本明細書において、第3のプロモーターが、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)プロモーターである、実施形態231のベクター。

236. 精製されるか、または単離される、実施形態231～235のいずれか1つのベ

クター。

237. a) 実施形態137～226のいずれか1つの組成物、実施形態227の医薬組成物、実施形態228もしくは229の単離された細胞（複数可）、または実施形態230～236のいずれか1つのベクター；および

b) 組成物を保存するために構成された容器を含む、キット。

238. 操作されたtRNA変異体、または操作されたtRNA変異体をコードするポリヌクレオチドを、骨格ベクター配列の導入遺伝子に導入することを含む、実施形態230～236のいずれか1つのベクターを生成する方法。

239. 操作されたtRNA変異体、または操作されたtRNA変異体をコードするポリヌクレオチドを、薬学的に許容される賦形剤、希釈剤、または担体に導入する工程を含む、実施形態227の医薬組成物を生成する方法。

【実施例】

【0205】

VI. 実施例

以下の実施例は、説明としての目的のためにのみ含まれ、本発明の範囲を限定することは意図されない。

【0206】

【実施例1】

操作したアルギニンtRNA

5つの天然に存在するヒトアルギニン（Arg）tRNAイソデコーダーが存在する。本実施例では、5つのArgイソデコーダーのそれぞれを、オパール停止コドンを認識するためのアンチコドン配列に突然変異させて、骨格ベクターにクローニングした（本明細書において以下、Arg-tRNA（UGA）イソデコーダーと言及する）。図1に示す、これらのベクターは、それぞれのArg-tRNA（UGA）イソデコーダーの1つのコピー（左）または2つのコピー（右）を含有していた。一方のコピーは、ヒトU6プロモーター下にあり、他方は、マウスU6プロモーター（mU6）下にあるものであった。しかしながら、Arg-tRNA（UGA）イソデコーダーの両方のコピーは、それらの内在性プロモーターを保持していた。それぞれの構築物はまた、トランスフェクション効率の評価を可能にするためのmCherryタグの発現をもたらすCMVプロモーターを含有していた。それぞれのベクターは、ITR領域に特異的なプライマーを使用するqPCRによる定量のため使用した、末端逆位配列（ITR）領域をさらに含有していた。図1（右）は、操作したtRNA（UGA）イソデコーダーをコードする遺伝子の2つのコピーを含む、本明細書に記載する構築物を示し、図1（左）は、マウスU6プロモーター下ではなく、ヒトU6プロモーター下に、操作したtRNA（UGA）イソデコーダーをコードする遺伝子の1つのコピーのみを含むベクターの例を示す。本明細書に記載するベクターを使用して、操作したArg tRNA分子のライブラリーを生成して、抑制効率についてスクリーニングした。

【0207】

図2Aは、ヒトArg tRNAのコンセンサス二次構造を説明する。図2Bは、本明細書に開示される操作tRNAを生成するために突然変異誘発から除外されたヒトArg tRNAのコンセンサス二次構造および配列における部位を説明する。コンセンサス二次構造およびヒトArg tRNAの配列。切り出した残基（黒色の線を付す）は、一部の実施形態による操作した抑制因子tRNAを作製するための標的化変異誘発のための推定部位を選択しながら除外した、高度に保存された位置／ヌクレオチドを示す。

【0208】

【実施例2】

操作したtRNA分子のmRNA編集効率

K562細胞における破壊したルシフェラーゼスクリーニング

K562細胞を操作して、R41X（図10A中の中央の線）またはR73X（図10A中の下の線）未成熟オパール停止コドン、Xは、オパール停止コドンを表す、のいずれ

10

20

30

40

50

かによって破壊したルシフェラーゼ遺伝子を安定的に発現させた（図10A）。図39は、野生型（WTルシフェラーゼならびに野生型活性のパーセントで示すルシフェラーゼ）と比較して、いくつかのこのような突然変異に起因した、ルシフェラーゼ活性の喪失の例を示す。破壊したルシフェラーゼトランスフェクションプロセスの模式図を、図10Bに提供し得る。アミノ酸位置は、ルシフェラーゼをコードする全長鋳型mRNAと比べることができる。これらの操作した細胞を、2つの生物学的複製物のそれぞれについて二重で、上記のArg-tRNA（UGA）イソデコーダーを用いてヌクレオフェクションした（SF緩衝液、FF120プログラム、1ウェル当たりDNA1 μ g、1ウェル当たり細胞200K個）。トランスフェクションの48時間後、ルシフェラーゼを、Promega Nano-Glo（登録商標）ルシフェラーゼアッセイシステム（N1110）によって、培地50 μ lを使用して測定し、mRNAを、製造元の指示に従い、Qiagen RNeasy Plusキット（74136）によって細胞溶解物から単離した。mCherryを有する操作したtRNAおよびその変異体のため使用したベクター設計の模式図を、図14Aに示す。ベクターは、2つのU6プロモーターの上流に位置する操作したtRNAまたはその変異体の2つのコピーを有していた。一方は、ヒトU6（hU6）プロモーターであり、他方は、マウスU6（mU6）プロモーターであった。スクリーニングを、一過性のトランスフェクションを使用して行った。ルシフェラーゼ読み取り値を、1000msの測定時間でVarioskan LUXによって得た。mCherryのmRNA発現を、TaqMan Fast Advanced Master mix（ThermoFisher 4444557）およびFAMコンジュゲートTaqMan プローブ（Mr07319439__mr）を使用して、定量的PCR（Biorad CFX Connect）によって得た。mCherry mRNA発現を、二重の技術的複製物において測定した。一方の技術的複製物は、ハウスキーピング遺伝子Hprtを含有しており、他方の技術的複製物は、ハウスキーピング遺伝子Gapdh（VICコンジュゲートTaqManプロブ）を含有していた。これらの技術的複製物を平均化し、次に、これを使用して、トランスフェクション効率についてその代表的ならびに対照のルシフェラーゼ読み取り値を標準化した。それぞれのデータポイントは、図10Cに示す通り、2つの生物学的複製物の平均の標準誤差（+/-SEM）と共に平均を表す。

【0209】

HEK293細胞における破壊したGFPスクリーニング。

HEK293を、上記の通り、図14Aに示すベクターならびにR74XまたはR97X未成熟停止コドン（300ng）、Xは、オパール停止コドンを表す（図11A）のいずれかによって破壊したGFP遺伝子（ST21骨格）を含有する構築物を使用して、Arg-tRNA（UGA）イソデコーダー（300ng）（例えば、20のArg-tRNA（UGA）イソデコーダーのセット由来）を用いてトランスフェクトした。アミノ酸位置は、GFPをコードする全長鋳型mRNAと比べることができる。ST21（例えば、配列番号51）ベクターマップを、図11Eに提供する。トランスフェクションを、DNAと2:1の比で、製造元の指示に従い、TransIT293試薬（Mirus Bio MIR2705）を使用して達成した。細胞30K~60K個を、1ウェル毎に播種し、1ウェル当たりの細胞数を、それぞれの生物学的複製物において一定に維持した。48および72時間後、細胞を、1:2000希釈で15分間、生死判別色素であるZombie Violetを用いて染色し、その後、フローサイトメトリーによって分析した。細胞破片、二重のもの、および死細胞（Zombie Violet陽性）を除去するため、細胞を選択した（例えば、フローサイトメトリーFACSマシンを使用してゲーティング）。それぞれのArg-tRNA（UGA）イソデコーダーの順序は、48時間ポイントと72時間ポイントの間で同一であったが、GFP発現の強度は、48時間ポイントでより強かった。従って、図11B~11Dにおいて描かれたグラフは全て、48時間のデータを反映する。それぞれのデータポイントは、図11B~11Dに示す通り、3つの生物学的複製物の平均の標準誤差（+/-SEM）と共に平均を表す。図11B~11Dにおいて、生細胞を、mCherryに基づき、（例えば、フローサイトメトリー

10

20

30

40

50

FACSゲーティングによって)さらに選択して、Arg-tRNA抑制因子分子を受け取った生細胞の集団を選択し、次に、GFPによって、操作した破壊したGFP遺伝子のリードスルーを示した細胞(tRNA+)を含有するArg-tRNA抑制因子分子の集団を選択した。図11Fは、二重のトランスフェクションシステムを模式的に示し、HEK293を、Arg-tRNA(UGA)イソデコーダー(300ng)(例えば、20のArg-tRNA(UGA)イソデコーダーのセット由来)ならびにR74XまたはR97X未成熟停止コドン(300ng)、Xは、オパール停止コドンを表す、のいずれかによって破壊したGFP遺伝子(ST21骨格)を含有する構築物を用いてトランスフェクトし、R74XまたはR97Xを、図11Aに示す。分析の結果を、図11Bに示す。図11Bにおいて、y軸は、GFP陽性(GFP+)細胞のパーセンテージを示し、リードスルーが、Arg-tRNA抑制因子分子を受け取った細胞(tRNA+細胞)の出現率であり得ることを示し得る。20のうち14のV1.0イソデコーダーにおいて、操作したtRNAを発現する細胞の50%以上が、PTC抑制の存在を有する。図11Cにおいて、y軸は、破壊したGFPおよび操作したArg-tRNA抑制因子分子をトランスフェクトした細胞におけるGFP平均蛍光強度(MFI)を、破壊していないGFP(対照細胞)でトランスフェクトした細胞におけるGFP MFIに標準化することによって、抑制されたPTCの総パーセントを示す。20のうち8のV1.0イソデコーダーにおいて、PTCの70%以上が、リードスルーを示している細胞において抑制される。図11Gは、図11Cに示す結果を得るために使用した、破壊していないGFPと比較して、mCherryタグを有するArg-tRNA抑制因子を使用して破壊したGFPにおけるオパール停止コドンの抑制プロセスを模式的に示す。図11Dにおいて、y軸は、mCherry発現によって測定する、操作したArg-tRNA抑制因子分子をトランスフェクトした細胞に標準化した、破壊したGFPおよび操作したArg-tRNA抑制因子分子をトランスフェクトした細胞におけるGFP MFIを示す。tRNA効力についてのこの代理を使用して、20のうちの5つのV1.0イソデコーダーは、そうでなければそれらがし得るより、比較的に少ないtRNAを得て、PTCを抑制することができる。図11Dに示す、20のうち4つの操作したtRNA(それぞれが、配列番号4、配列番号22、配列番号6、または配列番号7のいずれか1つを含む)の蛍光画像化データを、図12において提供する。使用したST21骨格プラスミドの配列を、配列番号51として含む。

10

20

30

【0210】

図12は、細胞におけるGFP産生に基づき、低い効率、中程度の効率、または高い効率の抑制因子活性のArg-tRNA(UGA)イソデコーダー(例えば、操作されたtRNAは、配列番号4、配列番号22、配列番号6、または配列番号7の1つを含む)を同定するためのフローサイトメトリー結果を示す。生細胞を、mCherryに基づき、(例えば、フローサイトメトリーFACSゲーティングによって)選択して、Arg-tRNA抑制因子分子を受け取った生細胞の集団を選択し、次に、GFPによって、操作された破壊したGFP遺伝子のリードスルーを示した細胞(tRNA+)を含有するArg-tRNA抑制因子分子の集団を選択した。図12におけるy軸は、操作されたArg-tRNA抑制因子分子でトランスフェクションした細胞を示す、mCherry発現を示し、x軸は、破壊したGFPでトランスフェクトした細胞を示す、GFP発現を示す。高いGFP発現は、Arg-tRNA抑制因子分子によって破壊したGFP遺伝子における成熟停止コドン前駆体の首尾良いリードスルーを示す。言い換えると、より高い活性の抑制因子tRNA(Arg-tRNA(UGA)イソデコーダー)は、存在する比較的低いtRNA分子によって産生される破壊したGFP遺伝子由来のより高いレベルのGFP産生をもたらすことができる。効力についての代理を、グラフの曲線を調べることによって観察することができる。20の操作されたtRNAの蛍光画像化結果の分析を、本明細書に記載する通り、図11Dにおいて提供する。

40

【0211】

【実施例3】

50

Arg イソデコーダーにおける突然変異は、より良好な抑制効率を生じる

本明細書に記載する様々な突然変異またはその変異体（もしくはArg tRNA イソデコーダー）の役割を解明するために、10の突然変異を、「CCT」のアンチコドン配列を有する操作されたtRNA配列番号3の操作されたtRNA配列に導入して、操作したtRNA変異体配列番号23～32を得、これを、図3Aにおいて図として説明する。アクセプターシステムを安定化すると考えられる突然変異は、G1T72からG1C72、C2G71からG2C71、および／またはA6T67からG6C67を含むが、これらに限定されない。操作されたtRNAのDステム領域を安定化すると考えられる突然変異は、T13A22からC13G22を含むが、これらに限定されない。アンチコドンシステムを安定化すると考えられる突然変異は、T28A42からC28G42を含むが、これらに限定されない。Tステムを安定化すると考えられる突然変異は、T50A64からC50G64を含むが、これらに限定されない。ヒトtRNAのコンセンサスAボックスプロモーター配列と一致する突然変異は、A15からG15を含む。ヒトArg tRNAのコンセンサスアンチコドンシステム配列と一致する突然変異は、C31G39からA31T39を含む。コンセンサス配列は、全てのヒトArg tRNA イソデコーダー（例えば、図2に示す）のアライメントの際に生じ得る。20のうちの14の固有のArg tRNA配列は、A31T39を有し、これにより、コンセンサス配列の塩基対部分を付与する。しかしながら、CCT イソデコーダーは、C31G39を有し、抑制効率を評価するために、コンセンサスA31T39と一致するよう修飾した。コンセンサスヒトArg配列と一致する突然変異は、G44Aを含む。アンチコドンのすぐ下流の+1位を変更させる、A37Gを含む突然変異を生じさせた。アンチコドン領域は、塩基34～36を含むことができる。+1位は、37位とみなすことができ、従って、突然変異A37Gを作製して、アンチコドン領域の右横の塩基の変更の、抑制効率に対する効果を評価した。

【0212】

同様に、14つの突然変異を、「TCT」のアンチコドン配列を有する配列番号6の操作したtRNA配列に導入して、それぞれが、配列番号35～48の配列を含む、14の操作されたtRNA変異体を生成し、これを、図3Bにおいて図で説明する。親tRNA配列番号6およびその14の変異体の配列を、配列番号35～48として表3において提供する。アクセプターシステムを安定化する突然変異は、G2T71からG2C71、G2T71からC2G71、T4A69からC4G69を含むが、これらに限定されないと考えることができる。アンチコドンシステムを安定化すると考えられるいくつかの代表的な突然変異は、コンセンサスArg tRNA配列と比較して、T28A42からC28G42、G30T40からG30C40、T27A43からC27G43、またはA31T39からC31G39（例えば、操作されたtRNA変異体配列番号37、42、48、29、31における）を含む。配列番号36において、C49を、G49に変更して、コンセンサスArg tRNA配列と部分的に一致させ、配列番号27のA15における突然変異を、G15に変更して、単にArg tRNA配列ではなく、全てのヒトtRNAのコンセンサスAボックス配列と一致させることができる。変異体tRNA配列を、表3に提供する。操作されたtRNA配列におけるコンセンサス配列と一致する突然変異は、C49からG49、C50G64からT50A64、G12C23からC12G23、またはG46Aを含むが、これらに限定されない。配列番号3と一致する配列番号6に対して作製した突然変異は、C6G67からA6T67、A44GおよびT27A43からC27G43を含む。他のTCT イソデコーダー配列（例えば、配列番号9～012）と一致する突然変異は、C6G67からT6A67を含む。上記の突然変異を含有する変異体を作製して、これらの変更の、操作したtRNAの抑制効率に対する効果を評価した。

【0213】

〔実施例4〕

抑制効率についての操作されたtRNA分子のスクリーニング

本明細書に記載する、操作された抑制因子tRNAを、実施例1に記載した通り、mCherry タグを含むプラスミドベクターにクローニングした。代表的なワークフロープ

10

20

30

40

50

ロセスを、図 4 に示し得る。プラスミドを、ヒト胚性腎細胞からもたらされた細胞株である、HEK293（またはHEK細胞）にトランスフェクションした。破壊した緑色蛍光タンパク質（GFP）遺伝子を、PiggyBac（PB）トランスポゾンシステムを使用して、ノンセンス突然変異（例えば、R74XまたはR97Xにおける）により、未成熟停止コドンを含むHEK細胞染色体DNAに安定的に組み換えた。以下の実施例において、HEK細胞を、トランスポゾンに対するPBトランスポザーゼ比1：5または1：2.5を使用して、トランスフェクションした。それぞれのデータポイントは、1つの生物学的複製物の平均を標準偏差（+/-SD）と共に表す。

【0214】

図5Aは、図4に示す破壊したGFP遺伝子を有するHEK細胞におけるスクリーニング抑制因子tRNAの模式的ワークフローを示す。HEK細胞（濃度20,000細胞/ウェルで播種した）を、操作された（抑制因子）tRNAをコードするプラスミドまたは抑制因子tRNAを含まない対照プラスミド300ナノグラム（ng）を使用して、48時間でトランスフェクションした。破壊していないGFPプラスミドを有する配列番号3または6の配列を含む操作されたtRNAを有するST21骨格を、陽性対照（またはベンチマーク）として使用した。不活性なtRNAプラスミド（例えば、配列番号8の配列、または配列番号18の配列を含む）ならびにGFPをコードするプラスミド（ST21）を、陰性対照として使用した。フローゲーティングを、単一染色およびトランスフェクションしていない細胞に基づき、設定した。リードスルーを、フローサイトメトリーを使用して、トランスフェクションの48時間後に評価して、GFPが陽性でもあった、tRNA-mCherry陽性細胞の分画を測定した。測定を、生細胞の集団において行った。

【0215】

図5Bは、操作されたtRNA配列番号3、または6由来の操作されたtRNA変異体を含む操作された抑制因子tRNA変異体、ならびに陽性および陰性対照プラスミドについてのR74X（黒色の四角）およびR97X（灰色の四角）におけるtRNAおよびGFP陽性細胞のパーセンテージ比を示す。全ての変異体は、保持された抑制因子活性を示した。配列番号32（502）の配列を含む操作されたtRNA変異体は、約70%の抑制因子活性（停止コドンリードスルー）を示した。少なくとも約60%の抑制因子活性を有する変異体を、灰色の四角501を使用して示す。40,000細胞/ウェルおよびトランスポザーゼ：トランスポゾン比1：5を、本研究のため使用した。データは、それぞれのGFP構築物についての1つの複製物を示す。

【0216】

R74XとR79X突然変異、Xは、オパール停止コドンを表す、の間の抑制因子活性の相関を調べて、突然変異の位置に起因した相違を見出した。図5Cは、R²値約0.88での相関を示す。結果は、抑制因子活性は、アルギニン突然変異の位置に実質的に依存しなかったことを示す。加えて、いくつかの高い性能の操作されたtRNA変異体それぞれは、配列番号32、39、40、45、47、および34の配列の1つを含んでいた。少なくとも約60%抑制因子活性を有する操作されたtRNA変異体（図5Bにおける灰色の四角501）を、楕円形511を使用して、図5Cにおいて印を付ける。

【0217】

類似の実験を、R74Xおよび/またはR97Xを含む未成熟停止コドンを有する破壊したGFPを安定的に組み込むための細胞におけるトランスポゾンに対するPBトランスポザーゼ比1：5、ならびにR74Xを含む未成熟停止コドンを有するGFPを組み込むための細胞におけるトランスポゾンに対するPBトランスポザーゼ比1：2.5を含む、3つの安定な細胞株において繰り返した。操作された抑制因子tRNA変異体を有する細胞を示す、GFPおよびmCherry陽性細胞のパーセンテージリードスルーの比を、陽性対照（例えば、配列番号3の配列を含む）と比較した（またはこれによって標準化した）。データポイントは、3つの異なる細胞株-R74X（1：2.5）、R74X（1：5）およびR97X（1：5）に渡る、平均+/-平均（SD）からの標準偏差を表す

。結果を、図 6 に示す。平均値を、SD 値を表すエラーバーと共に、濃い四角で示す。全ての変異体は、全ての 3 つの細胞株において保持された抑制因子活性を示した。

【0218】

〔実施例 5〕

操作された tRNA 分子の二重プラスミドスクリーニング

操作された tRNA をコードする DNA 配列を、本明細書に記載する通り、mCherry タグを含むベクターに取り込んだ。破壊した GFP タグを含む第 2 のプラスミドも提供した。HEK 細胞を、操作された tRNA プラスミドおよび GFP プラスミドを同時トランスフェクションした。プラスミドの安定的な組み込みを伴う細胞を、10～12 日間のピューロマイシン処理 ($5 \mu\text{g}/\text{mL}$) を使用して、破壊した GFP 構築物の組み込みについて選択した。操作された tRNA を有するプラスミドの安定的な組み込みを伴う細胞は、操作された tRNA および mCherry を発現していた。両方のプラスミドの安定的な組み込みを伴う細胞は、GFP および mCherry を発現していた。図 7 は、2 つのプラスミドを用いて細胞を同時トランスフェクションするプロセス、および両方のプラスミドの安定的な組み込みを伴う細胞を選択するプロセスの模式図を示す。フローサイトメトリーを、トランスフェクションの 48 時間後に行った。

10

【0219】

〔実施例 6〕

二重プラスミドシステムを使用した抑制効率の測定

HEK 細胞 40,000 個を、ウェルに播種した。播種の 24 時間後に、細胞を、実施例 5 に記載した、プラスミドのそれぞれの 300 ナノグラム (ng) を用いてトランスフェクションした。細胞を、トランスフェクションの 48 時間後に、フローサイトメトリーに供した。両方のプラスミドの安定的な組み込みを伴う細胞における GFP および mCherry の幾何学的平均蛍光強度を測定した。図 8 A は、図 7 に示す二重のプラスミドスクリーニングシステムを使用した、2 つの異なる、Arg から停止コドンへの突然変異 (R74X および R97X、X は、オパール停止コドンを表す) を含有する操作された GFP を発現する 2 つの異なる HEK 細胞における、パーセンテージリードスルー (緑色蛍光を示す tRNA / mCherry 産生細胞の分画) に関して測定された、操作された Arg tRNA 抑制因子分子による未成熟停止コドン抑制の代表的な結果を示す。74 位と 97 位における異なるアルギニン突然変異 (R74X および R97X) を有する細胞間で、R2 との非常に高い相関約 0.99 を確立した (図 8 B)。高い相関は、操作された tRNA 抑制因子活性を、異なるアルギニン位置で実質的に保持したことを示す。これらの結果は、灰色の四角 801 (例えば、配列番号 34、配列番号 39、配列番号 40、配列番号 30、配列番号 32、または配列番号 5 の配列を含む) を使用して示す、操作された tRNA または操作された tRNA 変異体のいくつかは、細胞へのトランスフェクションの際に、高いパーセンテージの PTC リードスルーを有する細胞 (90% より高い tRNA + 細胞) を生じたことを示した。

20

30

【0220】

本明細書に記載する、同じ実験の結果を、mCherry 発現レベルに基づき標準化して、未成熟停止コドン抑制の効率を評価した。従って、抑制効率を、GFP シグナル (操作された GFP における停止突然変異のリードスルーによって産生) の平均蛍光強度を、mCherry シグナル (tRNA 発現レベルと相関する) の平均蛍光強度と標準化することによって、評価することができる。図 9 A は、二重のプラスミドスクリーニングシステムによる、2 つの異なる、Arg から停止への突然変異 (R74X および R97X、X は、オパール停止コドンを表す) を有する HEK 細胞株における未成熟停止コドン抑制の効率を示す。Arg から停止への突然変異: R74X および R97X を含有する 2 つの異なる操作された GFP レポーター間で、R² との非常に高い相関約 0.89 を確立した (図 9 B)。高い相関は、操作された tRNA 抑制因子効率を、異なるアルギニン位置で実質的に保持したことを示す。全体として、本明細書に開示する実施例において記載する通り、本明細書に開示する HEK 細胞における抑制因子 tRNA 活性の結果は、アルギニン

40

50

イソデコーダーにおける抑制因子 tRNA 活性を保存し、および／または増強することができるアンチコドン突然変異以外の突然変異のセットを示す。それぞれ配列番号 3、32、34、39、45、および 47 の配列を含む複数の操作された tRNA またはその変異体は、破壊した GFP レポーターシステムの安定的な発現と一過性の発現の両方にわたり、高いアルギニン抑制因子活性（または停止コドンリードスルー）を示した。図 5 B（502）および図 6 に示す配列番号 32 の配列を有する tRNA の結果は、配列番号 32 に存在する突然変異（T50A64→C50G64）が、配列番号 3 tRNA をさらに安定化することができ、抑制活性（例えば、効率）の改善を導き得ることを示す。別の例では、天然に存在するイソデコーダー配列番号 6 において、同じ位置で、A-T 塩基対（例えば、配列番号 37 の配列を含む操作された tRNA 変異体）への G-C 塩基対変更は、tRNA のアルギニン抑制因子活性（例えば、アルギニン抑制効率）を減少することができる。いくつかの実施例において、配列番号 33 または配列番号 34 に含まれる A73G 突然変異は、抑制因子効率を改善する。結果（図 5 B、6、8 A および 9 A）において、配列番号 39 または配列番号 45 において作製した、G-T の非ワトソン・クリック対の、アクセプターシステムにおける G-C ワトソン・クリック対、またはアンチコドンシステムにおける C-G ワトソン・クリック対への変更は、アクセプター／アンチコドンシステムを安定化することができ、C-G 結合が、G-C と比較して、2～71 位で大いに好ましいことを示すことができることも、示すことができる。

10

20

30

40

50

【0221】

[実施例 7]

レット症候群モデル

選択した操作された tRNA を、R255X レットモデルマウスから回収した初代神経培養物において試験した。図 14 B は、初代神経培養物において使用したベクター設計の模式図を示す。ベクターは、ヒト U6（hU6）プロモーターの上流に位置する選択した操作された tRNA またはその変異体のコピーを含んでいた。ベクターを、レンチウイルス（pSMPUW）にパッケージングした。

【0222】

選択した操作された tRNA は、それぞれが、配列番号 6、9、10、11、20、3、7、および 13 から選択される配列の 1 つを含む、操作された tRNA の 8 つを含んでおり、破壊したルシフェラーゼスクリーニング実験において強いルシフェラーゼシグナルを生成し、ならびに破壊した GFP スクリーニング実験において強い GFP シグナルを生成した。同じ実験において最も弱いシグナルを生成した、それぞれが、配列番号 19 または 8 の配列を個別に含む、操作された tRNA の 2 つを、陰性対照として使用した。

【0223】

R255X レットモデルマウスから回収した初代神経培養物を回収するために、出生後 0～2 日のマウス子を、同じマウス系統の野生型のオスのマウスと交雑した R255X ヘテロのメス（the Jackson Laboratory、ストック番号 012602）から得た。子を安楽死させて、脳および皮膚試料を回収した。皮膚試料を、遺伝子型判定のため使用した。脳を単離し、小脳を取り除いた。脳の残りの部分を、パパインで消化し、Loオボムコイドおよび DNase で洗浄し、解離させ、70 ミクロンのフィルターを通して濾過した。翌日、細胞培養物を、本明細書に記載する通り、選択した操作された tRNA を発現するレンチウイルスを用いて感染させた。細胞を、解体の 1 週間後（トランスフェクションの 6 日後）に回収した。タンパク質精製プロセスを、タンパク質分解酵素阻害因子（ThermoFisher 78444）を含有する RIPA 緩衝液における機械的解体を使用して、細胞上で行った。MeCP2 タンパク質レベルを、MeCP2 の C 末端に対する抗体（ThermoFisher 49-1049）を使用した免疫ブロッティングによって測定した。MeCP2 タンパク質の検出を使用して、R255X の操作された tRNA リードスルーを調べた。図 15 A は、配列番号 19 の配列を含む操作された tRNA（陰性対照）によるリードスルーの欠如を示す代表的なウエスタンブロット例ならびに配列番号 20、3、および 7 の配列をそれぞれ含む操作された tRNA に

よる、変動するレベルでの首尾良いリードスルーを示す代表的なウエスタンブロット例を説明する。図15Bは、それぞれの試料におけるGapdhシグナル、次いで、野生型対照によって標準化したMeCP2 ECLシグナルのヒストグラムを示す。それぞれのカラムは、操作されたtRNAリードスルーを表し、それぞれのカラム内のそれぞれのデータポイント（濃い円）は、異なるマウスから収集したデータを表す。データは、平均+/-SEM（エラーバー）を表す。

【0224】

別の研究において、本明細書に記載する、初代神経培養物を、4つの操作されたtRNAならびにその変異体（例えば、配列番号8、39、45、および7）で処理した。フローサイトメトリー結果を、図16A~16Fに示す。神経培養物を、単離の5日後に感染させ、単離の1週間後（感染の48時間後）にフローサイトメトリーによって分析した。ウイルスベクター設計を、図14Bに示すことができ、レンチウイルスを使用してもたらしめた。単一の生細胞を選択した。次に、さらなる選択（フローサイトメトリーゲーティング）を行って、操作されたtRNA（tRNA+細胞）の存在を示すmCherryシグナル（mCherry+）、および最終的にMeCP2抗体シグナルも有するニューロン（NeuN+細胞）についてゲーティングした。選択した集団を、図16A~16Fにおける異なる処理群について台形を使用して示す。無処理のR255X細胞（図16A）は、mCherry発現レンチウイルスによって形質転換されていないので、mCherry+細胞を有さない。操作されたtRNA配列番号8で処理したR255X細胞は、ごくわずかなMeCP2+集団を示した（図16B）。操作されたtRNA変異体（例えば、配列番号39）で処理したR255X細胞（図16C）、操作されたtRNA変異体配列番号45で処理したR255X細胞（図16D）、または操作されたtRNA配列番号7で処理したR255X細胞（図16E）は、MeCP2陽性集団におけるそれぞれの増加を示す。事実、操作されたtRNA配列番号7で処理した細胞におけるMeCP2+集団分布は、陰性対照として使用した、操作されたtRNA配列番号8を感染させた野生型（WT）集団と同等であった（図16F）。WT対照群を使用して、フローサイトメトリープロセスにおけるゲーティングストラテジーを確実にした。

【0225】

ニューロンにおけるMeCP2発現を測定するために本明細書において使用したフローサイトメトリーを、同じマウス系統の野生型のオスのマウスと交雑させたR255Xヘテロのメス（the Jackson Laboratory、ストック番号012602）由来の細胞培養物を使用してさらに検証した。培養物を、本明細書に記載する通り、生成した。図17A~17Dは、抗体D4F3を使用した、MeCP2シグナル結果を説明する。細胞シグナル伝達MeCP2抗体D4F3は、野生型（WT）神経培養物における強い発現（図17A）、R255Xヘテロのメスにおけるおよそ半分の野生型発現（図17B）、およびR255Xオスにおいて認識できる発現がないこと（図17C）、または染色されない試料（図17D）を示す。図17E~17Hは、抗体Sigma NeuN抗体MAB377を使用した、MeCP2シグナル結果を説明する。Sigma NeuN抗体MAB377は、染色されない対照LUHMES（LUH）細胞（図17E）または染色されない初代培養物（図17H）においてシグナルを生成しなかった。しかしながら、それは、ほぼ全ての分化したLUHMES細胞を染色し（図17F）、これは、v-myc導入遺伝子を停止するためのドキシサイクリンを用いた処置後、この細胞株が経験する完全な分化を付与する正の対照として機能した。初代神経培養物（図17G）において、このNeuN抗体は、アストロサイトおよびオリゴデンドロサイトなどの、神経細胞1701の他の神経細胞タイプ1702に対する推定比に対応する、全ての細胞の約60%を染色した。

【0226】

別の実験において、初代神経培養物を、本明細書に記載するR255Xレットモデルマウスから単離した。単離の5日後、神経培養物を、9つの選択した操作されたtRNAまたは操作されたtRNA変異体配列：配列番号39、28、34、40、7、45、6、

3 2 または 3 の 1 つを含む構築物（図 1 4 B）を含むレンチウイルスを用いて感染させた。細胞培養物を、図 1 7 A ～ 1 7 H に記載する通り、感染の 2 日後に分析した。MeCP2 を発現したレンチウイルス（mCherry+）によって形質導入した神経細胞（NeuN+）のパーセンテージを示すヒストグラムを、図 1 8 A において説明することができる。操作された tRNA 配列番号 3 を有するレンチウイルスによって形質導入した神経細胞のほぼ 60 % が、MeCP2 シグナルを示した。このレベルの MeCP2 発現は、野生型細胞と同等であり得、MeCP2 を、形質導入した神経細胞の約 70 % において発現した。図 1 8 B は、形質導入の 2 日後に、細胞において発現した PTC の総パーセントを示す。本明細書に記載する構築物を有するレンチウイルスを用いて形質導入した細胞における MeCP2 の平均蛍光強度（MFI）を、野生型マウスから単離した神経培養物における MeCP2 MFI に標準化した。配列番号 6 の配列を含む操作された tRNA は、PTC の約 65 %（細胞における 65 % MeCP2 産生）を抑制することができた。

10

【0227】

【実施例 8】

ベクター設計

7 つの異なるベクターを設計して、（I）外来性プロモーターが、tRNA 産生を増強し、従って、有効性を増強するか、（II）コピー数が、tRNA 産生を増強し、従って、有効性を増強するかを調べた。図 1 9 A ～ 1 9 G は、操作した tRNA 配列番号 3 の 1 つ、2 つまたは 3 つのコピーを有する、7 つの異なる構築物を示す。構築物は、mU6、hU6、またはその組合せを含んでいた。HEK293 を、上流 hU6 を有するか、有さない、1 ～ 6 つのコピーにおける配列番号 3（300 ng）の配列を含む操作された tRNA（図 1 9 A ～ 図 1 9 G は、操作された tRNA 抑制因子の 1 ～ 3 つのコピーを有する構築物の模式的な例を示す）を用いてトランスフェクションした。構築物はまた、図 1 1 A に示す遺伝子に類似する、R74X または R97X 未成熟停止コドン（300 ng）、X は、未成熟停止コドンを表す、のいずれかによって破壊した GFP 遺伝子（ST21 骨格）を含んでいた。トランスフェクションを、DNA と 3：1 の比で、製造元の指示に従い、TransIT293 試薬（Mirus Bio MIR2705）を使用して達成した。細胞 50 K 個を、1 ウェル毎に播種した。2 つの生物学的複製を行った。フローサイトメトリーを使用し、細胞をゲーティングして、細胞破片、二重のもの、および死細胞（Zombie Violet 陽性）を取り除いた。次に、生細胞を、mCherry によってさらにゲーティングして、操作された tRNA を受け取った生細胞の集団を選択し、次に、操作された破壊した GFP 遺伝子のリードスルーを示した操作された tRNA 含有細胞（tRNA+）の集団を選択するために GFP によってゲーティングした。図 2 0 A は、GFP をまた発現する tRNA+ 細胞のパーセントを示し、これは、リードスルーが生じ得ることを示している。結果は、上流 hU6 プロモーターが、tRNA 内部プロモーターを超える認識できる恩恵をもたらさなかったことを示した。図 2 0 B は、破壊した GFP および操作された tRNA をトランスフェクトした細胞における GFP 平均蛍光強度（MFI）を、破壊していない GFP（対照細胞）でトランスフェクトした細胞における GFP MFI に標準化することによって、抑制された PTC の総パーセントを示す。図 2 0 B に示す通り、tRNA コピー数が多いほど、より高い PTC 抑制をもたらした。

20

30

40

【0228】

【実施例 9】

レット症候群の処置

GFP スクリーニングを使用して同定した Arg-tRNA イソデコーダーを、AAV ベクターにクローニングすることができる。AAV ベクターを、Arg-tRNA イソデコーダーをコードする導入遺伝子を含む AAV ウイルス粒子を産生する AAV ヘルパーベクターを含む哺乳類細胞株にトランスフェクトすることができる。AAV ベクターの例は、本明細書に記載する AAV2/5 ベクター、AAV2/6 ベクター、AAV2/7 ベクター、AAV2/8 ベクター、もしくは AAV2/9 ベクター、または任意の AAV ベクターを含むが、これらに限定されない。

50

【0229】

変動する用量のAAVを、MeCP2ポリペプチドをコードするmRNAにおけるR168X、R225X、R270X、R294X、R198X、R186XおよびR453X突然変異、Xは、UGAオパール停止コドンを表す、に起因して、レット症候群に罹患している対象において投与する。対象を、処置経過にわたり、レット症候群の病理の改善についてモニターする。病理の改善は、Arg-tRNAイソデコーダーによる未成熟停止コドンの抑制に起因し、停止コドンのリードスルーおよび未成熟停止コドンに応答したアルギニンのMeCP2ポリペプチドへの挿入をもたらす。

【0230】

【実施例10】

難聴の処置

上記の通り調製したAAVベクターを使用して、MYH9ポリペプチドをコードするmRNAにおけるR1933X突然変異、COL11A2ポリペプチドをコードするmRNAにおけるR845X突然変異、またはMYO7AポリペプチドをコードするmRNAにおけるR666X突然変異、Xは、UGAオパール停止コドンを表す、に起因した、難聴に罹患している対象を処置することができる。対象を、聴力検査を使用して、処置経過にわたり、難聴の病理の改善についてモニターする。病理の改善は、Arg-tRNAイソデコーダーによる未成熟停止コドンの抑制に起因し、停止コドンのリードスルーおよび未成熟停止コドンに応答したアルギニンのMYH9、COL11A2、またはMYO7Aポリペプチドへの挿入をもたらす。

【0231】

【実施例11】

自己相補的ベクター設計

図24～図28Bに示すデータを、以下の通り収集した：R74X（STX488）またはR97X未成熟停止コドン（STX489）を含む破壊したGFP構築物を、破壊したアルギニン1つ当たり2つの独立したpiggybac細胞株を生じる、トランスポゾンに対するトランスポザーゼ比1：5および1：2.5でpiggybacシステムを用いて、K562細胞に安定的に組み込んだ。piggybacペイロードを含有する細胞を、使用前少なくとも8日間、5μg/mLピューロマイシンを使用して選択した。配列番号3の配列を含む、変動するコピー数の操作されたtRNAを含む構築物を、1本鎖または自己相補的骨格にクローニングした。これらの構築物を、AAV2/9にパッケージングした。表5は、構築物を記載する。破壊したGFP構築物のpiggybac組み込みを伴うK562細胞（96ウェルフォーマットの1ウェル当たり50K）を、百万vg/ウイルス細胞を用いて感染させた。細胞を、48時間後、フローサイトメトリーによって分析した。それぞれのデータポイントは、生物学的複製物（n=2～3）である。複製物のうち2つは、1：5の組み込みのものであり、3つ目は、1：2.5の組み込みのものである。データは、平均+/-SEMを表す。

【0232】

表5. 図24～28Bにおいて使用したコンストラクト

10

20

30

40

50

【表 5】

プラスミド名	ベクター 骨格名:	挿入 DNA 名:	プロモーター 情報(qPCR 用):	PolyA 情報 (qPCR 用):	ITR から ITR の導入遺伝子 カセットの大 きさ:
pssAAV-wtITR2- 0xCCT2- CMVmChSV40- ラムダ-strw2- wtITR2	pUC57	STX588	CMV	SV40	4309
pssAAV-wtITR2- 1xCCT2- CMVmChSV40- ラムダ-strw2- wtITR2	pUC57	STX626	CMV	SV40	4435
pssAAV-wtITR2- 3xCCT2- CMVmChSV40- ラムダ-strw2- wtITR2	pUC57	STX627	CMV	SV40	4593
pssAAV-wtITR2- 6xCCT2- CMVmChSV40- ラムダ-strw2- wtITR2	pUC57	STX593	CMV	SV40	4824
psscAAV-scITR- 0xCCT2- CMVmChSV40- ラムダ-strw2- wtITR2	pUC57	STX586	CMV	SV40	1922/3747
psscAAV-scITR- 1xCCT2- CMVmChSV40- ラムダ-strw2- wtITR2	pUC57	STX587	CMV	SV40	2004/3911
psscAAV-scITR- 3xCCT2- CMVmChSV40- ラムダ-strw2- wtITR2	pUC57	STX589	CMV	SV40	2162/4227
psscAAV-scITR- 6xCCT2- CMVmChSV40- ラムダ-strw2- wtITR2	pUC57	STX590	CMV	SV40	2393/4689

【0233】

図24は、図25～図28Bのため使用したゲーティングストラテジーを説明する模式図を示す。示した代表的な試料は、自己相補的スタッファー配列（sc 0×）である。細胞をゲーティングして、細胞破片、二重のもの、および死細胞（Zombie Violet 陽性）を取り除いた。生細胞を、mCherryによってさらにゲーティングして、Arg tRNA抑制因子分子を受け取った生細胞の集団を選択し、次に、GFPによって、操作された破壊したGFP遺伝子のリードスルーを示した細胞（tRNA+）を含有するArg tRNA抑制因子分子の集団を選択した。

【0234】

図 25 は、配列番号 3 の配列を含む操作された tRNA の 0、1、3、または 6 つのコピーをパッケージングする自己相補的 AAV2/9 についての代表的なフロープロットを示す。y 軸は、GFP（リードスルーが生じることを示している）も発現する tRNA + 細胞のパーセントを示す。x 軸は、側方散乱を示す。配列番号 3 の配列を含む操作された tRNA の 0 ×（スタッファー配列のみ）または 1 × コピーを発現する AAV2/9 を伴う細胞の形質導入の際に、破壊した GFP 構築物（R97X をここに示す）のリードスルーは存在しなかった。対照的に、配列番号 3 の配列を含む操作された tRNA の 3 × または 6 × コピーを発現する AAV2/9 を用いた形質導入の際に、約 60 ~ 70 % のリードスルーが存在した。

【0235】

10

図 26 は、百万 v g / ウイルス細胞を用いた破壊した GFP 構築物の piggyback 組み込みを伴う K562 細胞の形質導入が、細胞生存率を変更しなかったことを示す。ここで、細胞をゲーティングして、細胞破片、二重のもの、および死細胞（Zombie Violt 陽性）を取り除いた。生存率は、未感染細胞および感染細胞において細胞の約 90 ~ 100 % であった。

【0236】

図 27A および図 27B は、変動するコピー数の tRNA を伴う 1 本鎖 AAV および自己相補的 AAV の形質導入効率を示す。図 27A に示す通り、mCherry を発現した生細胞のパーセンテージは、細胞を特定の AAV によって形質導入したことを示した。図 27B は、形質導入し（mCherry+）、PTC 抑制（GFP+）を示した細胞における mCherry の平均蛍光指数を示す。これらの試料（百万 v g / 細胞）のそれぞれのウイルス負荷量の標準化にも関わらず、1 × AAV は、3 × または 6 × ウイルスより、多くの細胞を、より高いレベルで形質導入した。1 本鎖骨格は、形質導入効率をほぼもたらさなかった。

20

【0237】

図 28A および図 28B は、試験したそれぞれの群で、未成熟停止コドンのリードスルーのプロットを示す。図 28A のプロットにおいて、y 軸は、PTC 抑制を示した特定の tRNA を受け取った細胞のパーセンテージを表す。配列番号 3 の配列を含む、3 × および 6 × バージョンの操作された tRNA は、R97X を発現する形質導入した細胞の 50 ~ 85 % のリードスルーおよび R74X を発現する形質導入した細胞の 90 ~ 100 % のリードスルーを生じた。図 28B のプロットにおいて、y 軸は、操作された Arg tRNA 抑制因子分子を形質導入した細胞における GFP 平均蛍光強度（MFI）を、破壊していない GFP（対照細胞）でトランスフェクトした細胞における GFP MFI に標準化することによって、抑制された PTC の総パーセントを示す。配列番号 3 の配列を含む 6 × 操作された tRNA の自己相補的バージョンは、1 本鎖バージョンより優れたリードスルーを示した。しかしながら、配列番号 3 の配列を含む 3 × 操作された tRNA の自己相補的バージョンは、配列番号 3 の配列を含む 6 × 操作された tRNA の自己相補的バージョンより良好に機能した。それぞれのデータポイントは、生物学的複製物（n = 2 ~ 3）である。データは、平均 + / - SEM を表す。

30

【0238】

40

配列番号 3 の配列を含む操作された tRNA の 6 つ（図 21A）、3 つ（図 21B）、または 1 つ（図 21C）のコピーを有する AAV2/9 ベクターを設計した。AAV ベクターを、1 本鎖骨格（図 22A）または自己相補的骨格（図 22B）から作製した。1 本鎖骨格は、AAV ベクターを充填するための多量のスタッファー DNA 2201、2202、または 2203 を含んでいた。構築物は、mCherry タグの発現をもたらす CMV プロモーターを含んでいた。自己相補的骨格設計の効率を調べるために、自己相補的骨格における配列番号 3 の配列を含む操作された tRNA の 0、3、または 6 つのコピーを発現する AAV9 ベクターを、3 × 10⁶ v g / 脳のタイターで、オスの R255X マウス 0 ~ 2 または 5 ~ 8 日齢の子（試料サイズについては表 6 を参照）の側脳室（ICV）に一側性注入する。対照マウスは、2 匹のマウス（n = 2）を含む注射していない

50

R 2 5 5 Xマウス、および4匹のマウス（ $n = 4$ ）を含む注射したWTマウス（0×構築物）を含む。脳を、3つの領域（海馬、皮質、および脳の残りの部分）に顕微解剖し、フローサイトメトリーのため処理して、形質導入した細胞（mCherry+）における全長MeCP2の発現を評価する。

【0239】

表6. tRNAコピー数研究設計

【表6】

遺伝子型	性別	注射	AAV	年齢	試料サイズ
R255X	M	一側性	scAAV9-0x	P0-2	2
				P5-8	2
			scAAV9- CCT2-3x	P0-2	3
				P5-8	3
			scAAV9- CCT2 -6x	P5-8	2
			注射なし	P5-8	2
WT	M	一側性	scAAV9-0x	P0-2	2
				P5-8	2

10

【0240】

20

【実施例12】

スペーサー配列を用いたベクター設計

操作されたtRNAのリードスルー効率に対する、ベクター構築物における異なる長さのスペーサーを使用した末端逆位配列（ITR）間に操作されたtRNAまたはその変異体を入れる効果を試験した。ITRから異なる距離で入れた操作されたtRNAまたはその変異体を有するAAV骨格の例を、図23Aに模式的に示す。ベクターは、配列番号3の配列を含む操作されたtRNAの3つのコピーを有するAAVベクターを含む。操作されたtRNAまたはその変異体の3つのコピーを、6、50、100、200、または500ヌクレオチドのスペーサー配列で隔てた。スペーサー配列は、6ヌクレオチドのリンカー配列であるAACAAまたは終結配列であるTTTTTを含むことができる。スペーサー配列は、本明細書に開示するスタッファー配列を含むことができる。リンカー配列は、米で見出されたバイシストロニックtRNA-sncRNAに基づく。本明細書に記載する研究設計の例を、表6に提供する。

30

【0241】

図29Aおよび29Bは、変動するスペーサー長を含むベクター設計を用いた、K562細胞におけるプラスミドトランスフェクションの結果を示す。R74X（STX488）およびまたはR97X未成熟停止コドン（STX489）を含む破壊したGFP構築物を、破壊したアルギニン1つ当たり2つの独立したpiggybac細胞株を生じる、トランスポゾンに対するトランスポザーゼ比1：5および1：2.5でpiggybacシステムを用いて、K562細胞に安定的に組み込んだ。piggybacペイロードを含む細胞を、使用前少なくとも8日間、5μg/mLピューロマイシンを使用して選択した。配列番号3の操作されたtRNAの2つのコピーおよび6塩基対のスペーサーを含む2×構築物、または配列番号3の操作されたtRNAの3つのコピーおよび変動するスペーサー長の50（STX617）、100（STX618）、200（STX619）、または500（STX620）塩基対スペーサーを含む3×構築物を、自己相補的骨格にクローニングした。これらの構築物を、前述のK562細胞（SF緩衝液、FF120プログラム、1ウェル当たりDNA1μg、1ウェル当たり200K細胞）にヌクレオフェクションした。500bpスペーサー構築物での大きさの制約のため、mCherryはこの骨格に含まれなかった。細胞を、72時間後、フローサイトメトリーによって分析した。細胞をゲーティングして、細胞破片、二重のもの、および死細胞（Zombie

40

50

Violet陽性)を取り除いた。生細胞を、GFPによってさらにゲーティングして、操作された破壊したGFP遺伝子のリードスルーを示した細胞の集団を選択した。複製物のうち2つは、1:5の組み込みのものであり、3つ目は、1:2.5の組み込みのものである。それぞれのデータポイントは、生物学的複製物(n=3)である。データは、平均+/-SEMを表す。

【0242】

図29Aにおいて、y軸は、PTC抑制を示した細胞のパーセンテージを表す。配列番号3の配列を含む操作されたtRNAの100および200bpのスペーサーバージョンは、破壊したアルギニン残基のいずれかを発現する形質導入した細胞の60~95%でのリードスルーを生じた。対照的に、50bpおよび500bpのスペーサーを有する配列番号3の構築物は、R97X株について効率の低減を示した。図29Bにおいて、y軸は、操作されたArg tRNA抑制因子分子をトランスフェクトした細胞におけるGFP平均蛍光強度(MFI)を、破壊していないGFP(対照細胞)でトランスフェクトした細胞におけるGFP MFIに標準化することによって、抑制されたPTCの総パーセントを示す。再度、100または200bpのスペーサーを有する配列番号3の構築物は、最高のGFP強度を示した。

10

【0243】

加えて、操作されたtRNAのリードスルー効率に対する、AAV構築物における配列番号3の配列を含む操作されたtRNAの向きの効果を試験した。異なる距離で、AAV骨格に入れた操作されたtRNAまたはその変異体の例を、図23B~23Cに示す。図30Aおよび30Bは、様々な位置または向きで操作されたtRNAを有する構築物についてのデータを含む。

20

【0244】

ITRと比べて異なる位置を有する1x配列番号3の構築物を、自己相補的骨格にクローニングした(表7)。これらの構築物を、AAV2/9にパッケージングした。R74X(STX488)またはR97X未成熟停止コドン(STX489)を含む破壊したGFP構築物を、トランスポゾンに対するトランスポザーゼ比1:5でpiggybacシステムを用いて、K562細胞に安定的に組み込んだ。破壊したGFP構築物のpiggybac組み込みを伴うK562細胞(96ウェルフォーマットの1ウェル当たり50K)を、百万vg/ウイルス細胞を用いて感染させた。細胞を、48時間後、フローサイトメトリーによって分析した。細胞をゲーティングして、細胞破片、二重のもの、および死細胞(Zombie Violet陽性)を取り除いた。生細胞を、GFPによってさらにゲーティングして、操作された破壊したGFP遺伝子のリードスルーを示した細胞の集団を選択した。それぞれのデータポイントは、生物学的複製物(n=3)である。データは、平均+/-SEMを表す。実験群を、破壊していないGFP(標識したST21;陽性対照)および形質導入なし(陰性対照)と比較した。

30

【0245】

表7. 図30Aおよび30Bにおいて使用したコンストラクト

40

50

【表 7】

プラスミド名	ベクター骨格名:	挿入 DNA 名:	プロモーター情報(qPCR 用):	PolyA 情報 (qPCR 用):	ITR から ITR の導入遺伝子カセットのサイズ:
pscAAV-wtITR2-CCT2-ラムダ-scITR	pUC57	STX0631	なし	なし	2273/4456
pscAAV-wtITR2-lambda-CCT2-ラムダ-scITR	pUC57	STX0632	なし	なし	2272/4454
pscAAV-wtITR2-ラムダ-CCT2-scITR	pUC57	STX0633	なし	なし	2297/4504

10

【0246】

20

【実施例 13】

操作された tRNA のインビボでの特徴決定

マウスにおけるインビボ実験を設計して、操作された tRNA またはその変異体の効率をさらに決定して、停止コドンリードスルーを行い、異なる細胞タイプおよび／または異なる脳領域における毒性、ならびにリードスルー効率をモニターした。オスの野生型 (WT)、R255X、および R168X マウスに、5～8 日齢で、配列番号 3、6、7、32 または 45 の配列を含む操作された tRNA またはその変異体を発現する AAV (例えば、AAV2/9) を、 3×10^{10} ベクターゲノム (vg) / 脳の用量で、側脳室 (ICV) に両側性に注射する。マウスを、高架式十字迷路 (EPM) および巣作り検査での性能について検査し、注射の 3 週間後に安楽死させる。一方の脳半球を、海馬、皮質、および脳の残りの部分に顕微解剖し、フローサイトメトリーによる全長 MeCP2 の評価のため分離させる。他方の半球を、免疫組織化学 (IHC)、ウエスタンブロット、または mRNA 分析のため使用することができる。mCherry は、AAV に存在する。このコホートは、それぞれの脳領域および神経細胞タイプにおける MeCP2 リードスルーの程度、毒性、および未成熟停止コドンリードスルーの程度の決定を示す。本明細書に記載する研究設計の例を、表 8 に提供する。

30

【0247】

表 8. 操作された tRNA 研究設計のインビボでの特徴決定

40

50

【表 8】

遺伝子型	性別	処置	用量	試料サイズ
WT R168X R255X	M	注射なし	NA	3
		スタッファー配列のみのウィルスベクターの注射	3×10^{10} vg/脳	5
		AAV-tRNA 配列番号 3 の注射		5
		AAV-tRNA 配列番号 6 の注射		5
		AAV-tRNA 配列番号 7 の注射		5
		AAV-tRNA 配列番号 32 の注射		5
		AAV-tRNA 配列番号 45 の注射		5

10

【0248】

【実施例 14】

操作された tRNA のインビボでの有効性研究

マウスにおけるインビボ実験を設計して、選択した操作された tRNA またはその変異体の有効性を分析する。実施例 9 の 2 つの操作された tRNA またはその変異体は、最高の性能を選択することを示した。オスの WT、R255X、および R168X マウスを、0～2 日齢で、実施例 9 から同定した上位 2 つの操作された tRNA またはその変異体を発現する AAV（例えば、AAV2／9）を、 3×10^{10} ベクターゲノム（vg）／半球の用量で側脳室（ICV）に一側性に注射する。マウスは、巣作り、オープンフィールド試験（OFT）、高架式十字迷路（EPM）、条件つきかつ文脈的恐怖条件づけ、および感覚運動試験を含む完全行動分析を受ける。マウスを、注射の 2 カ月後、安楽死させるか、または寿命分析を行うことができる。一方の脳半球を、顕微解剖し、フローサイトメトリーによる全長 MeCP2 の評価のため分離させる。他方の半球を、免疫組織化学（IHC）、ウエスタンブロット、および／または mRNA 分析のため使用することができる。mCherry は、AAV に存在しない。この実験は、それぞれの脳領域および神経細胞タイプにおける MeCP2 リードスルーの程度が、行動結果に影響するのに十分であるかどうかを示す。本発明者らは、中枢髄液、血漿、血清、肝臓、腎臓、肺、または心臓由来の試料を収集し、分析することによって、毒性の任意の徴候をモニターする。本明細書に記載する研究設計の例を、表 9 に提供する。

20

30

【0249】

表 9. 操作された tRNA 研究設計のインビボ有効性研究

40

50

【表 9】

遺伝子型	性別	処置	用量	試料サイズ
WT	M	注射なし		10
	M	スタッファー配列のみのウィルスベクターの注射	3×10^{10} vg/半球	20
	M	AAV-tRNA 抑制因子 A の注射		20
	M	AAV-tRNA 抑制因子 B の注射		20
R168X R255X	M	注射なし		10
	M	スタッファー配列のみのウィルスベクターの注射	3×10^{10} vg/半球	30
	M	AAV-tRNA 抑制因子 A の注射		30
	M	AAV-tRNA 抑制因子 B の注射		30

10

【0250】

【実施例 15】

20

代表的なプラスミド

本明細書に記載する方法および組成物において使用することができる核酸構築物のいくつかの非限定な例は、表 10 および図 47A～47E に含む。これらの構築物の個々の特性を、単独、または他の構築物もしくは実施形態の特性と組み合わせて使用することができる。psscAAV-scITR-0x-CMVmChSV40-ラムダ-strw2-wtITR2 を含む核酸構築物を、本明細書に記載する操作された tRNA または操作された tRNA 変異体をコードするよう、適合させることができる。

【0251】

表 10. ベクターマップおよびプラスミド配列

【表 10】

30

psscAAV-scITR-3xCCT2-CMVmChSV40-ラムダ-strw2-wtITR2	pStw	STX604	図 47A	配列番号 52
psscAAV-scITR-3xTCT1-CMVmChSV40-ラムダ-strw2-wtITR2	pStw	STX605	図 47B	配列番号 53
psscAAV-scITR-3xTCT1.11-CMVmChSV40-ラムダ-strw2-wtITR2	pStw	STX606	図 47C	配列番号 54
psscAAV-scITR-3xCCT2.10-CMVmChSV40-ラムダ-strw2-wtITR2	pStw	STX607	図 47D	配列番号 55
psscAAV-scITR-3xCCT4-CMVmChSV40-ラムダ-strw2-wtITR2	pStw	STX608	図 47E	配列番号 56

40

【0252】

【実施例 16】

スペーサー配列

一部の実施形態は、スタッファー配列を含む。スタッファー配列を含むポリヌクレオチド構築物の非限定的な例を、48A～48B に示す。これらの構築物の個々の特性を、単独、または他の構築物もしくは実施形態の特性と組み合わせて使用することができる。いくつかのこのような実施形態の核酸構築物は、本明細書に記載する操作された tRNA または操作された tRNA 変異体をコードすることができる。図 48A～48B は、どのよ

50

【図 2 - B】

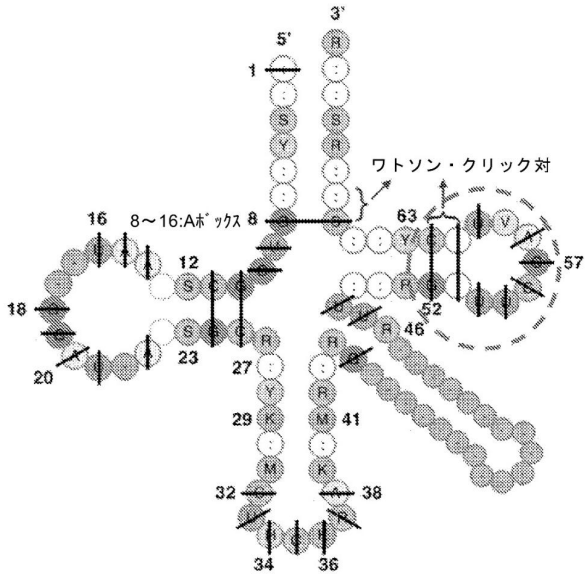


FIG. 2B

【図 3 - A】

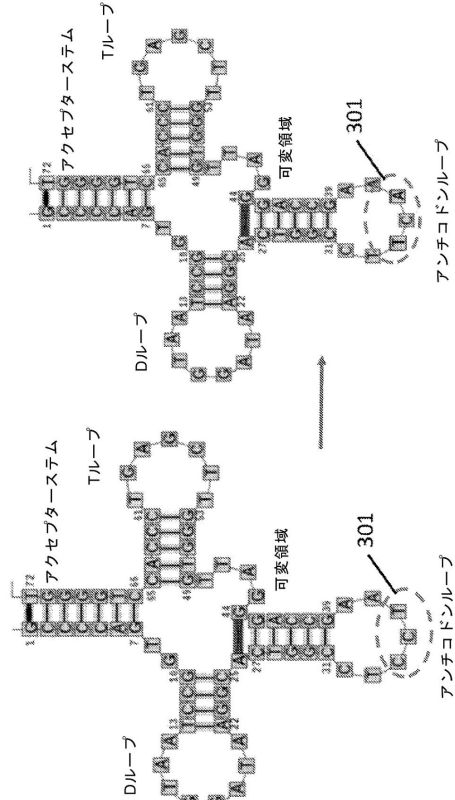


FIG. 3A

【図 3 - B】

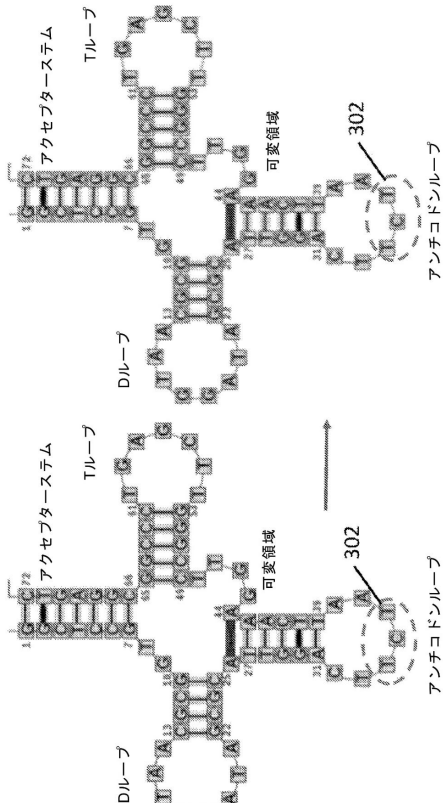


FIG. 3B

【図 4】

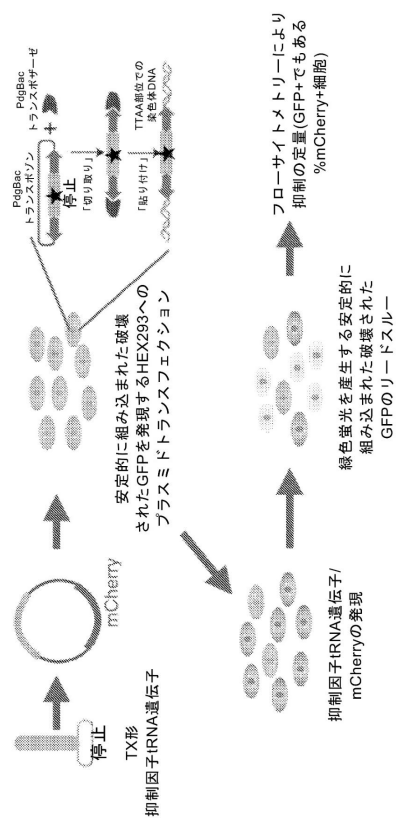


FIG. 4

10

20

30

40

50

【図 5 - A】

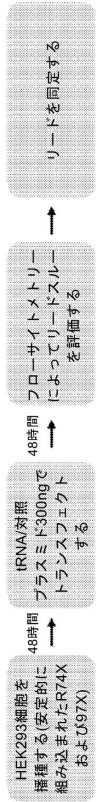


FIG. 5A

【図 5 - B】

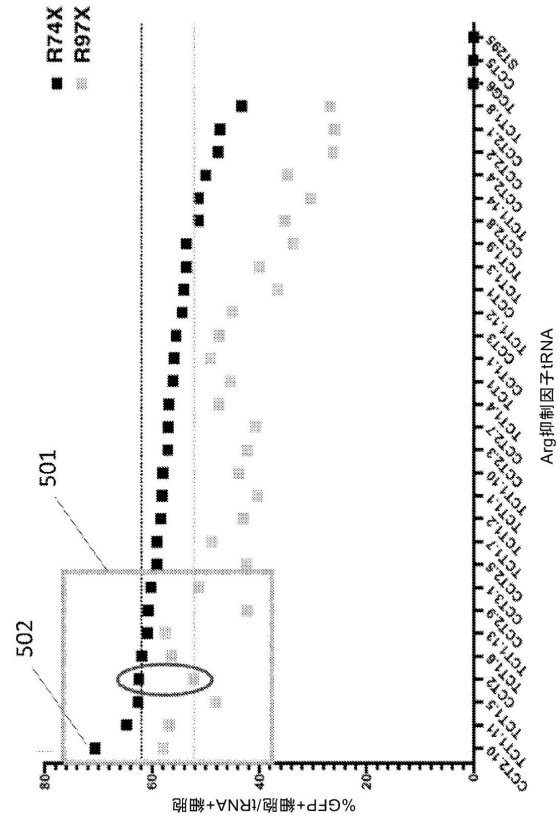


FIG. 5B

【図 5 - C】

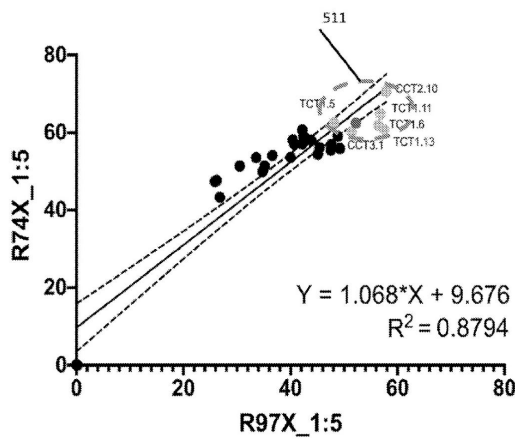


FIG. 5C

【図 6】

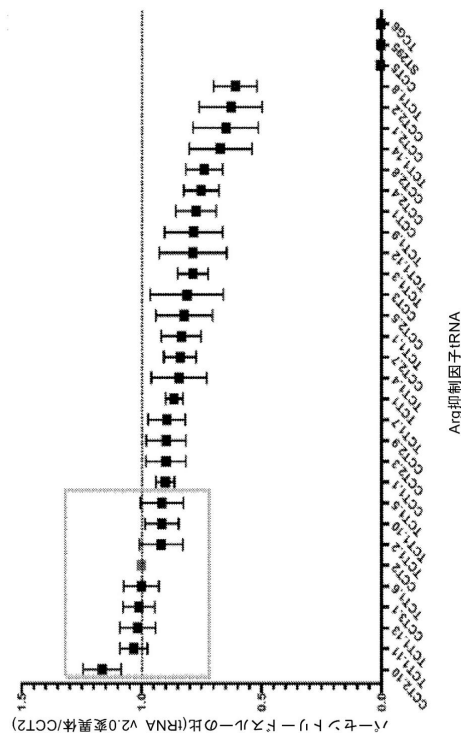


FIG. 6

10

20

30

40

50

【図 9 - B】

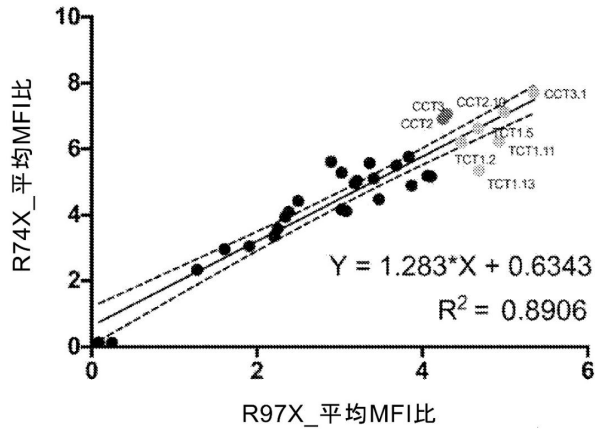


FIG. 9B

【図 10 - A】

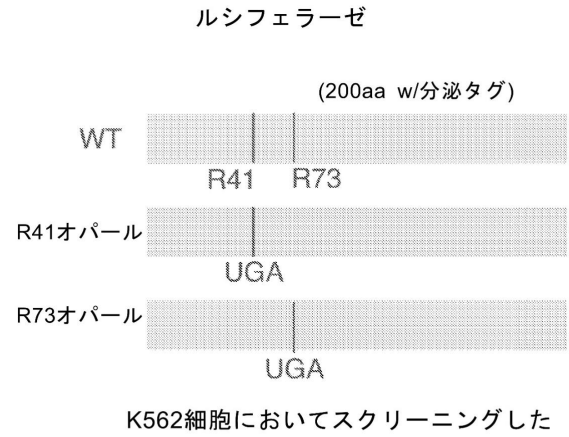


FIG. 10A

【図 10 - B】

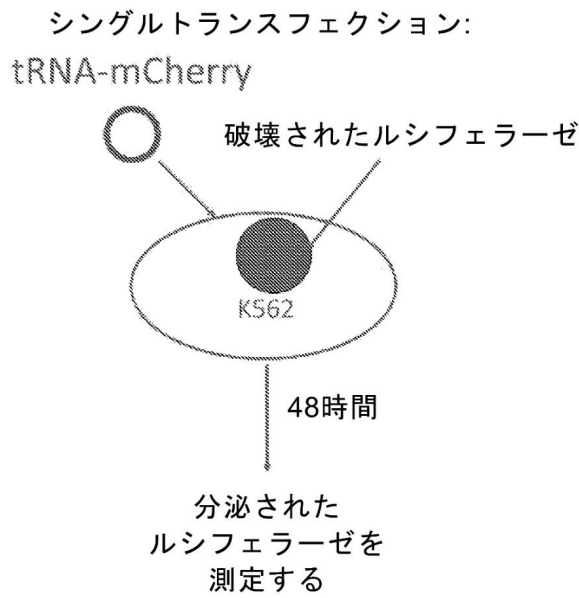


FIG. 10B

【図 10 - C】

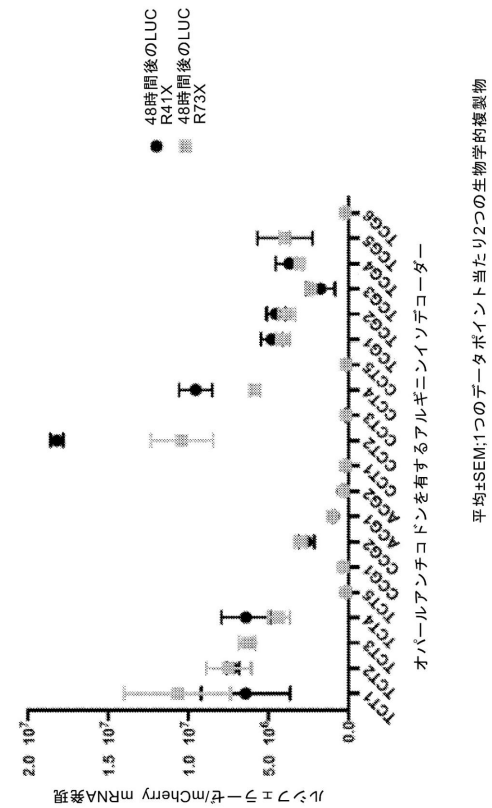


FIG. 10C

10

20

30

40

50

【図 1 1 - A】

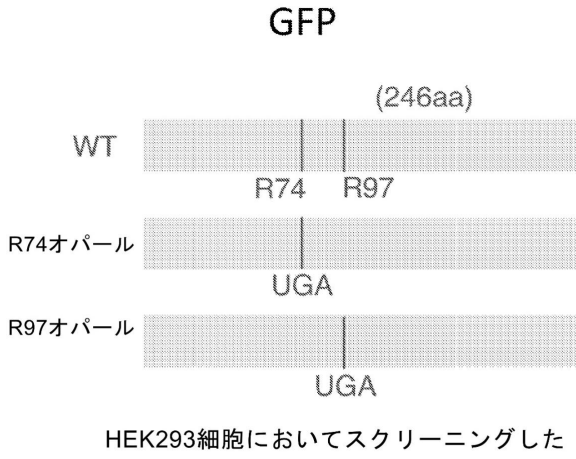


FIG. 11A

【図 1 1 - B】

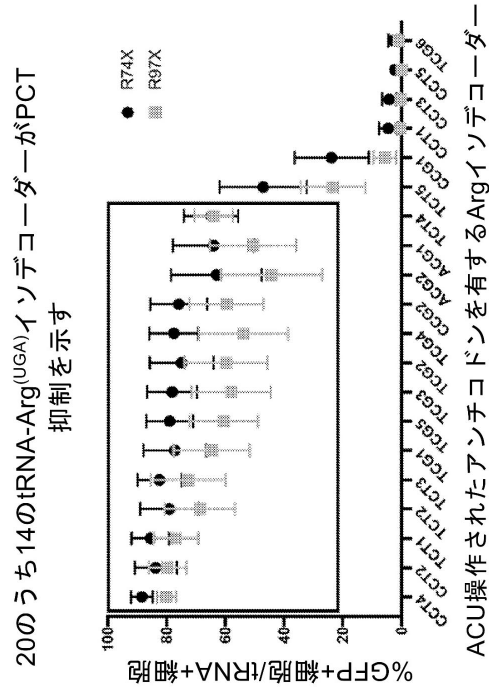


FIG. 11B

10

20

【図 1 1 - C】

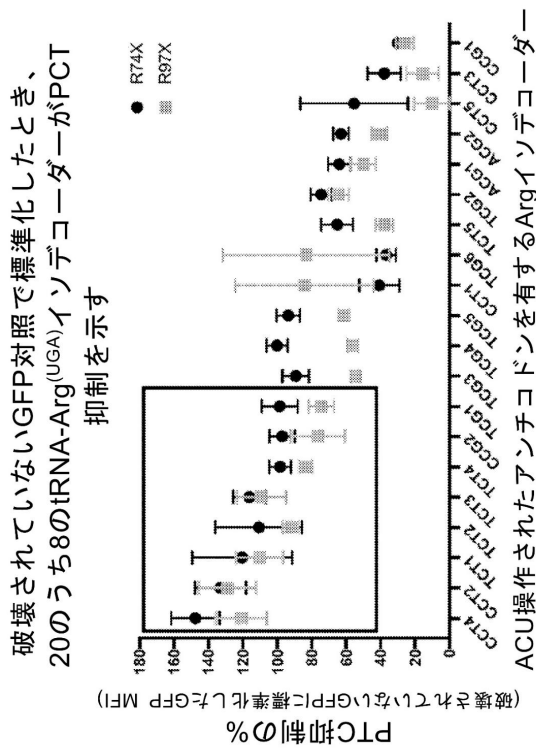


FIG. 11C

【図 1 1 - D】

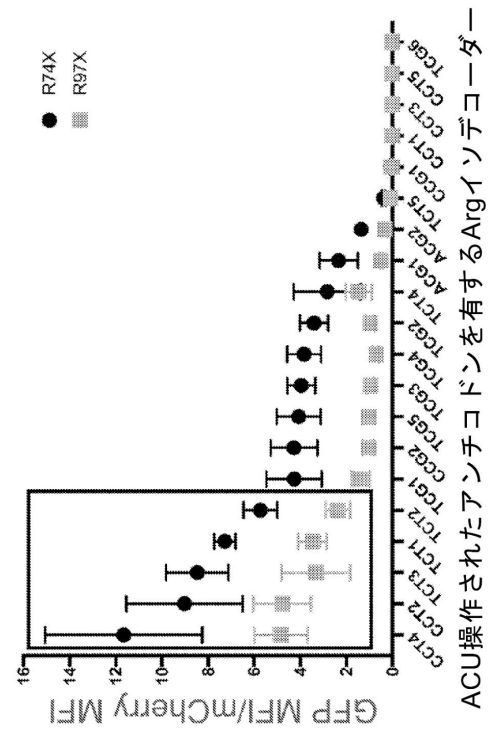


FIG. 11D

30

40

50

【図 11-E】



FIG. 11E

【図 11-F】

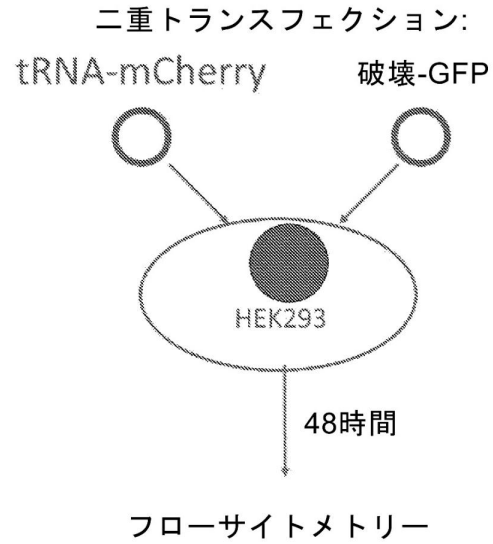


FIG. 11F

【図 11-G】

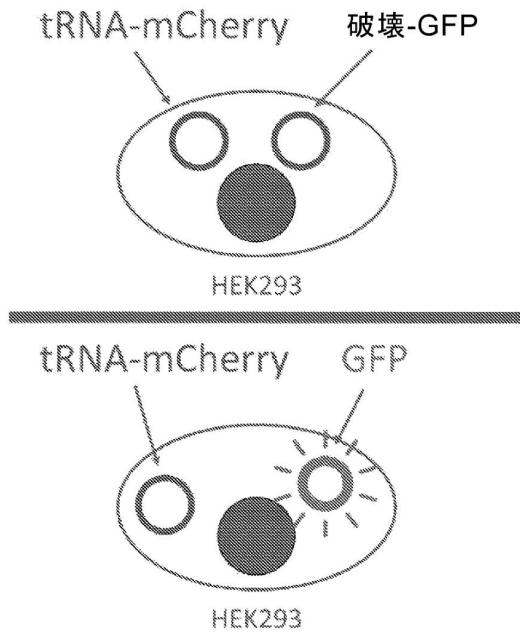


FIG. 11G

【図 12】

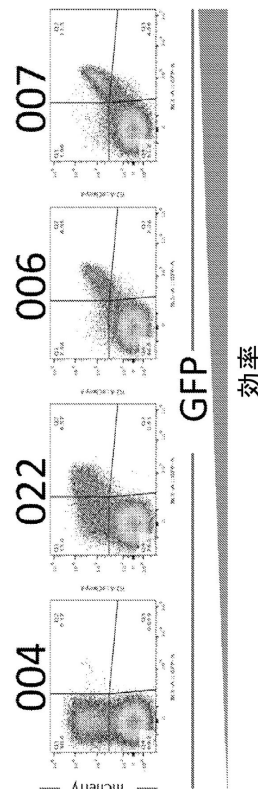


FIG. 12

10

20

30

40

50

【図 13】

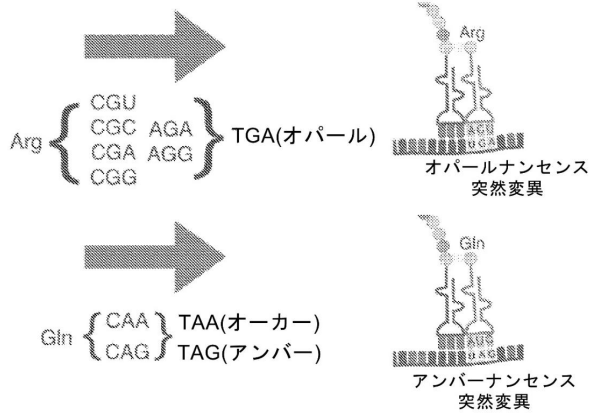


FIG. 13

【図 14 - A】

破壊されたルシフェラーゼおよびGFPにおける操作されたtRNA構築物のためのベクター設計



FIG. 14A

【図 14 - B】

R255X初代ニューロンにおけるv1.0およびv2.0構築物のためのベクター設計



FIG. 14B

【図 15 - A】

MeCP2

Gapdh

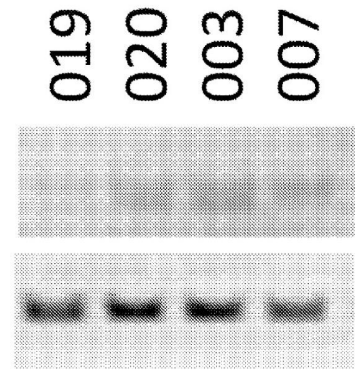


FIG. 15A

10

20

30

40

50

【図 15 - B】

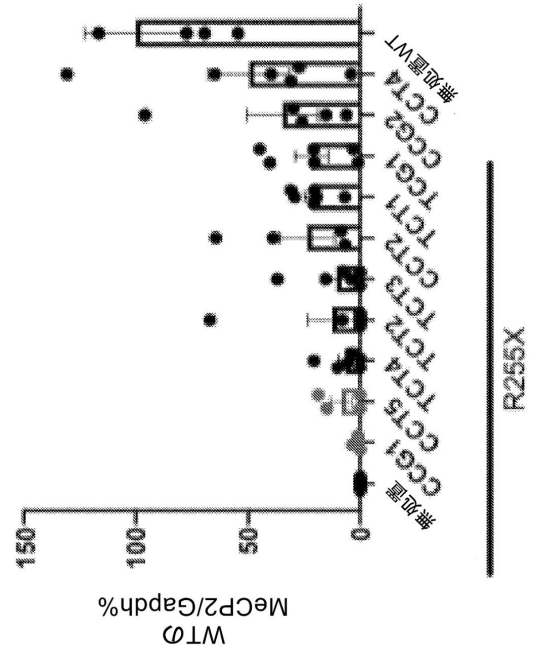


FIG. 15B

【図 16 - A】

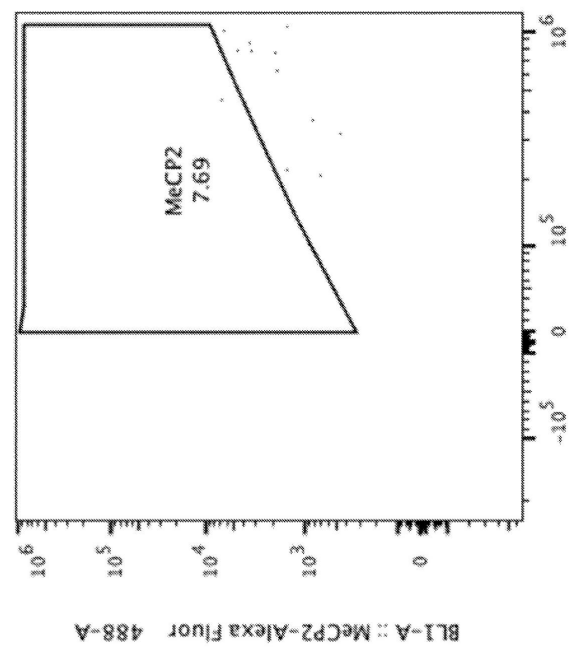


FIG. 16A

【図 16 - B】

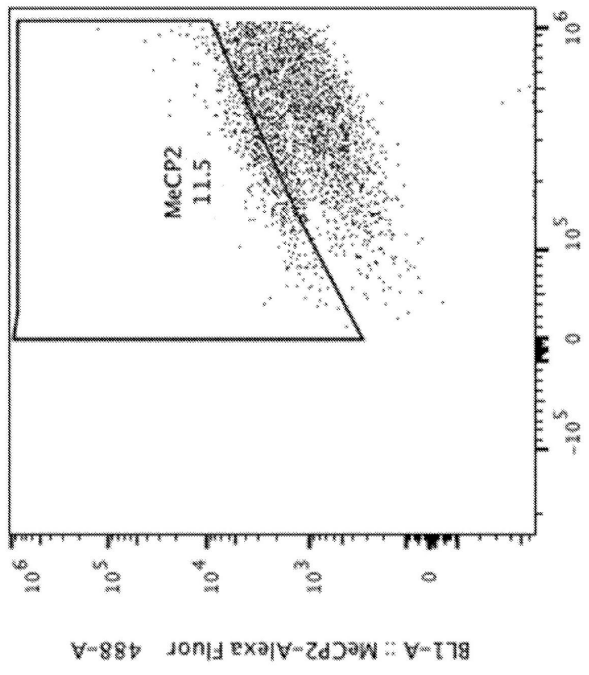


FIG. 16B

【図 16 - C】

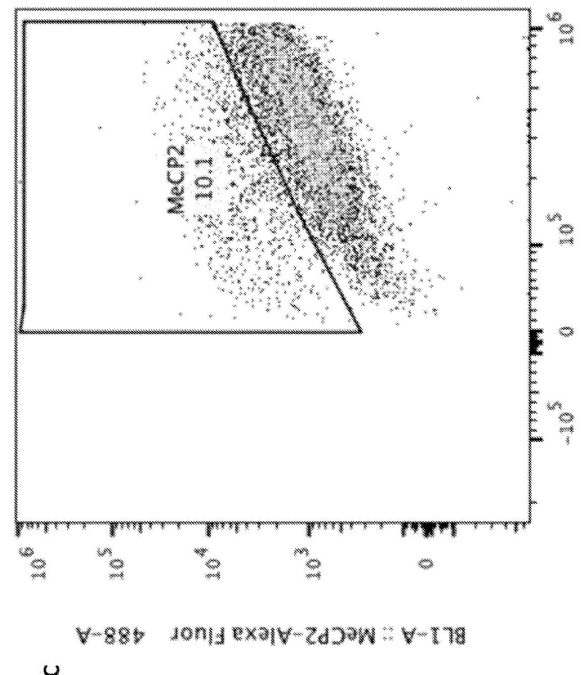


FIG. 16C

10

20

30

40

50

【図 16 - D】

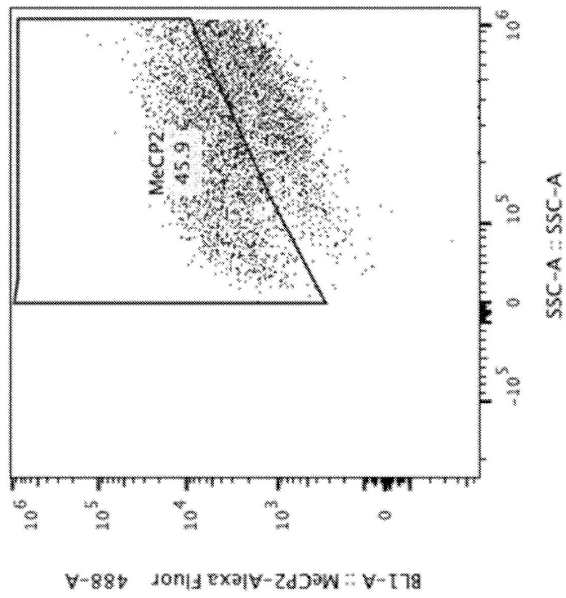


FIG. 16D

【図 16 - E】

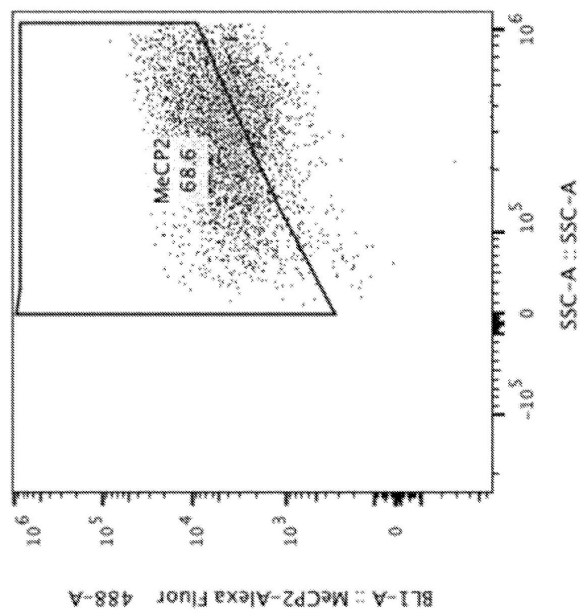


FIG. 16E

【図 16 - F】

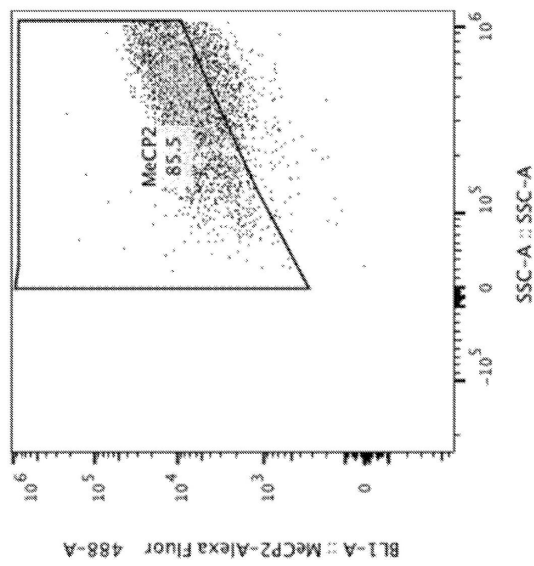


FIG. 16F

【図 17 - A】

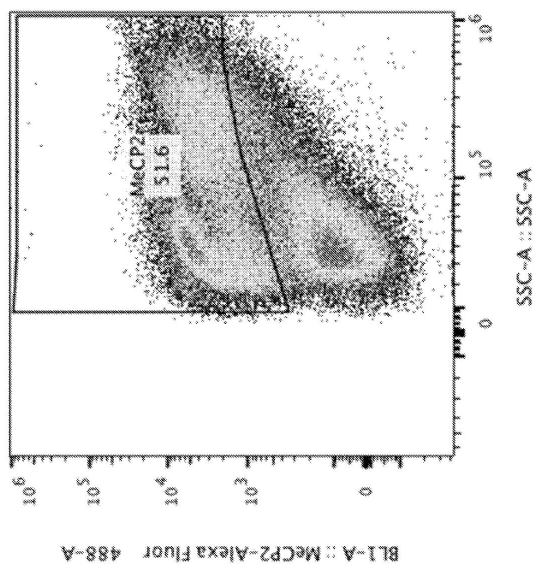


FIG. 17A

10

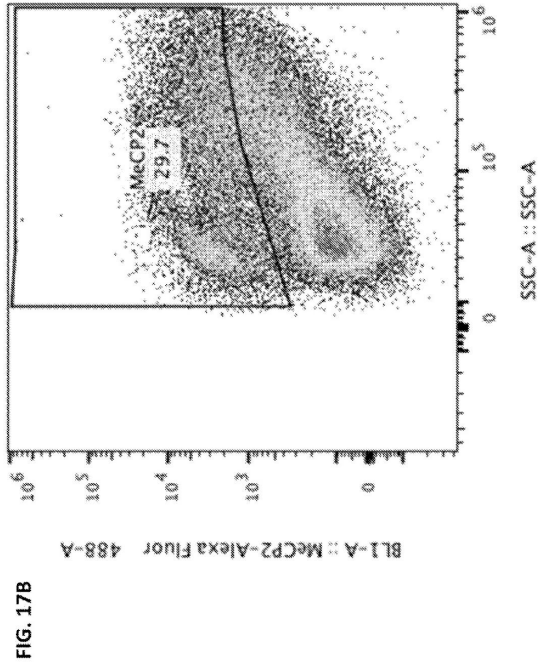
20

30

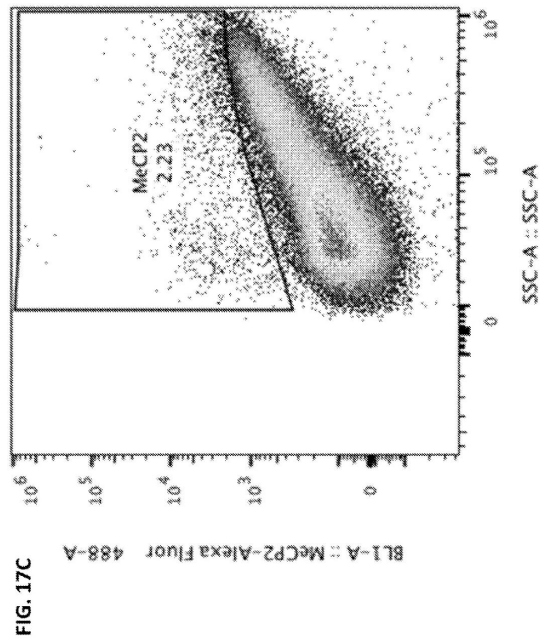
40

50

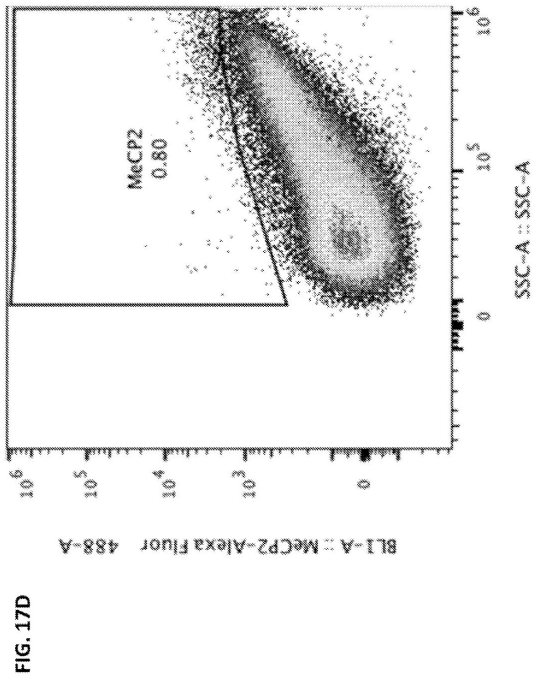
【図 17 - B】



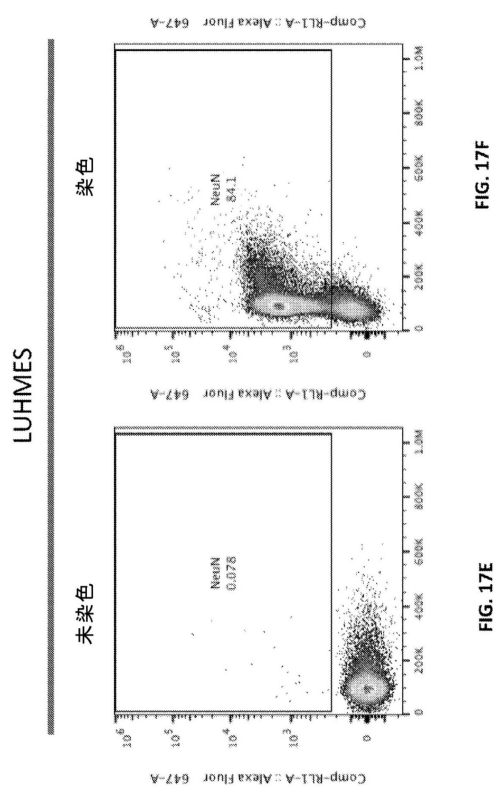
【図 17 - C】



【図 17 - D】



【図 17 - E F】



10

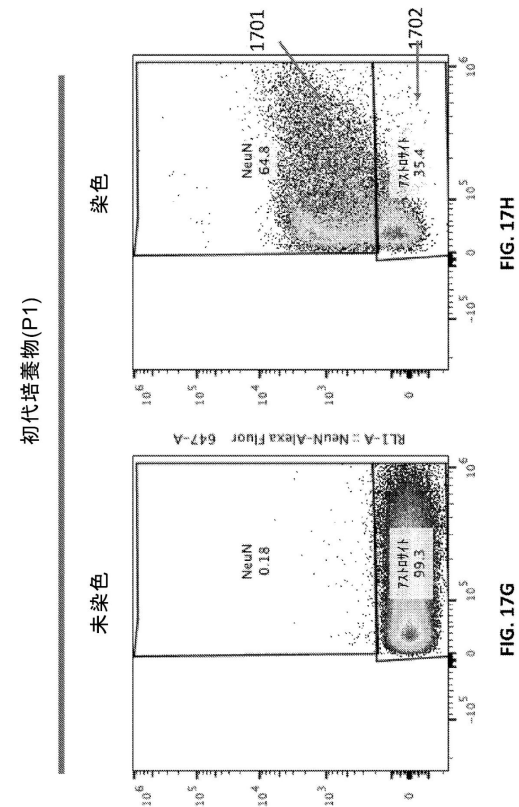
20

30

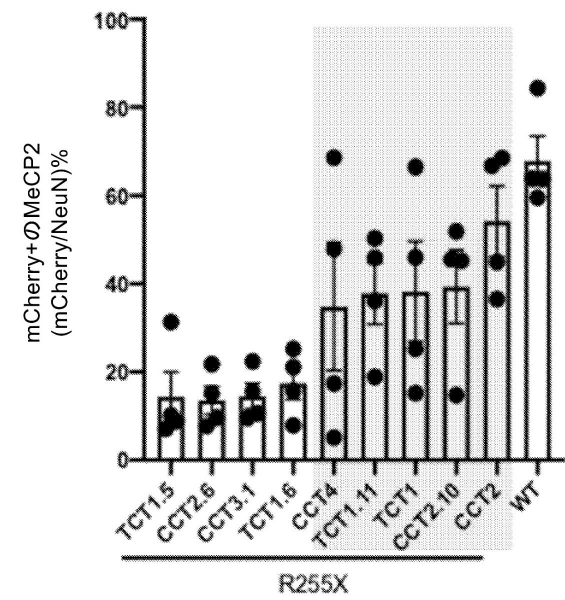
40

50

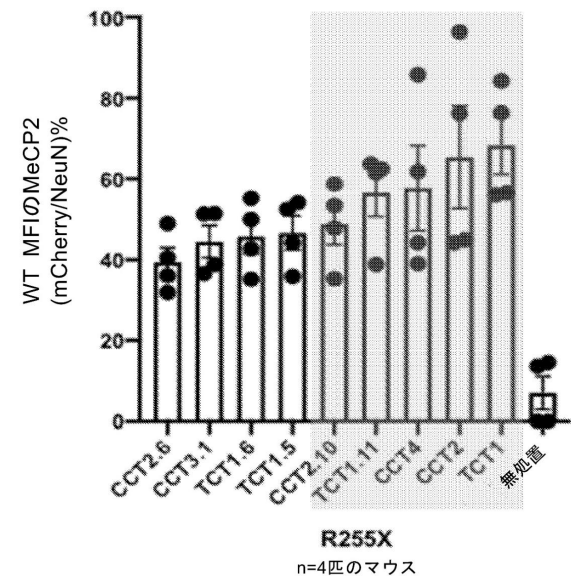
【 図 1 7 - G H 】



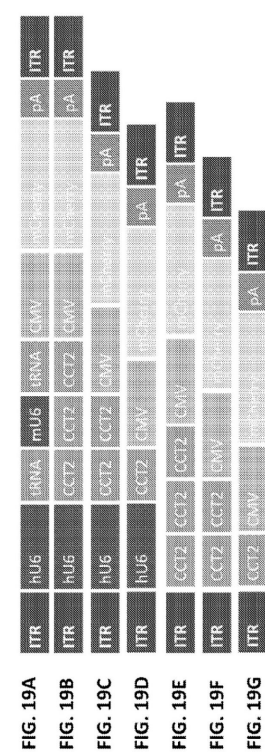
【 図 1 8 - A 】



【 図 1 8 - B 】



【 図 1 9 】



10

20

30

40

50

【図 20 - A】

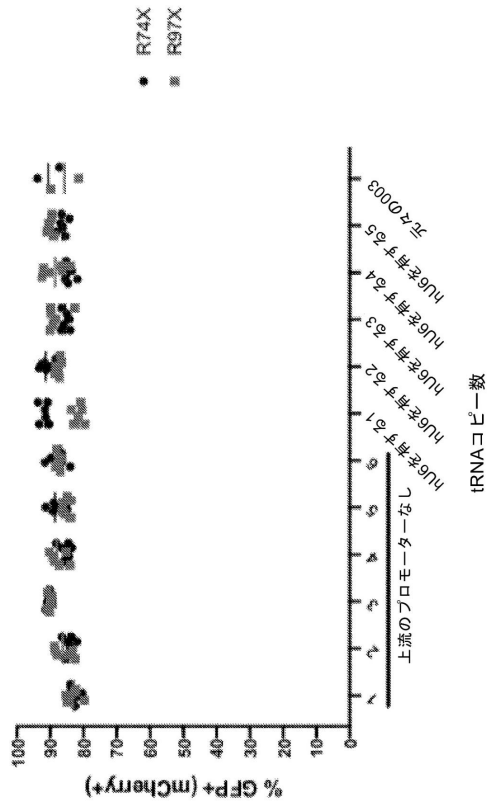


FIG. 20A

【図 20 - B】

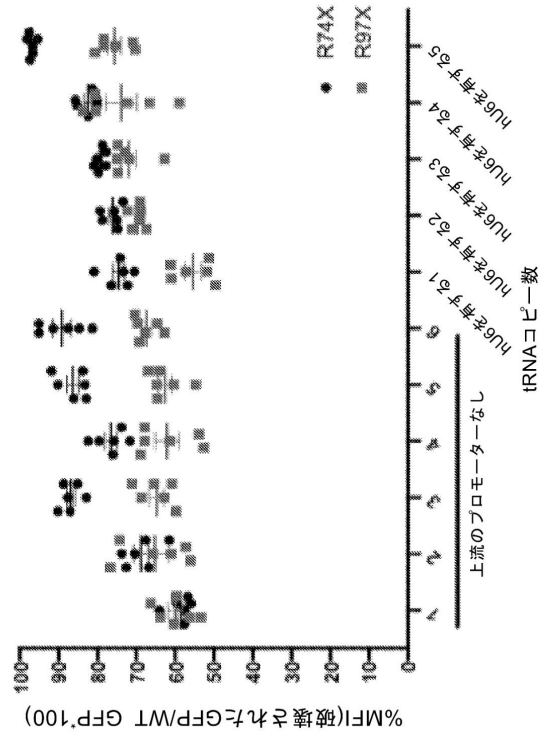
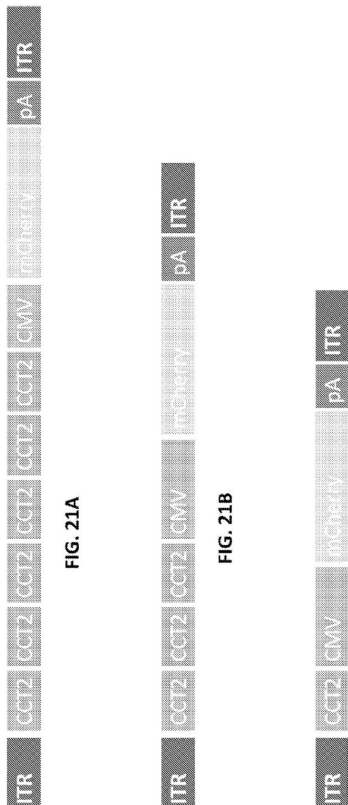


FIG. 20B

【図 21】



【図 22 - A】

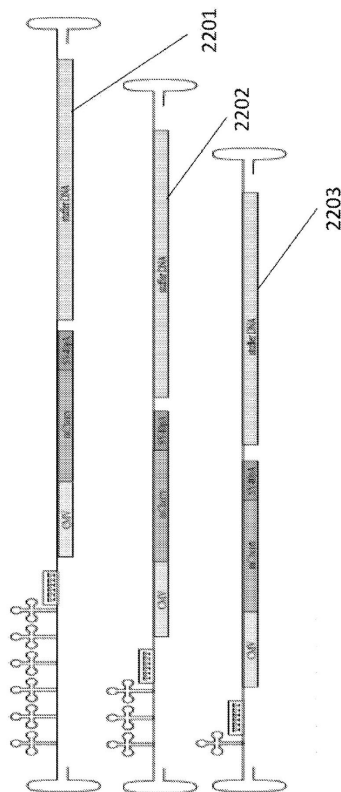


FIG. 22A

10

20

30

40

50

【図 2 2 - B】

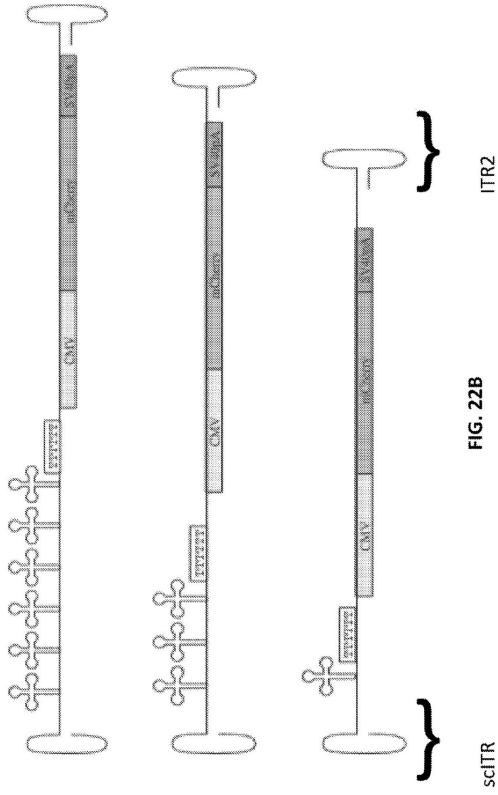


FIG. 22B

【図 2 3 - A】

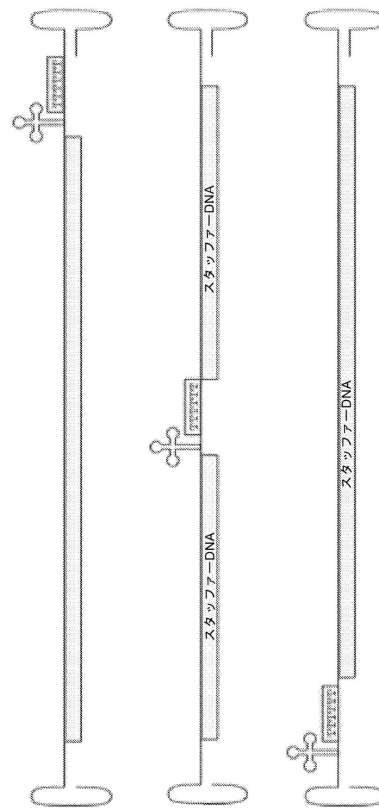


FIG. 23A

【図 2 3 - B】

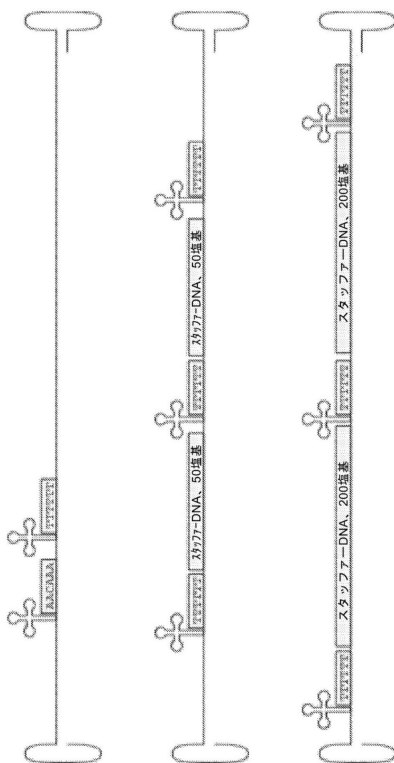


FIG. 23B

【図 2 3 - C】

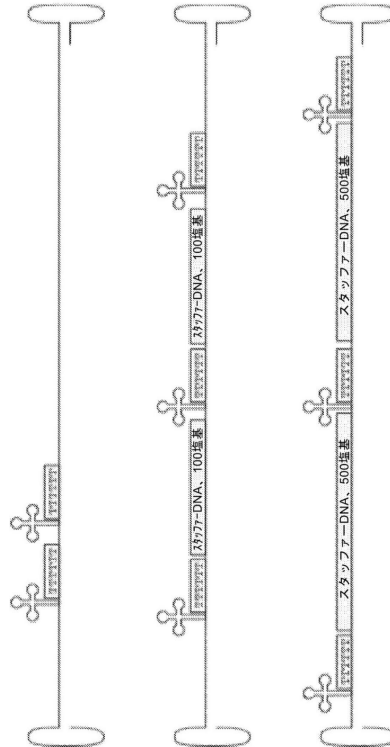


FIG. 23C

10

20

30

40

50

【図 24】

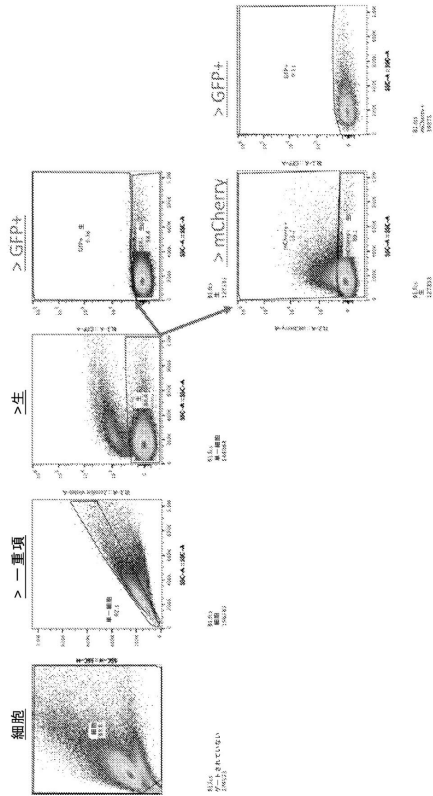


FIG. 24

【図 25】

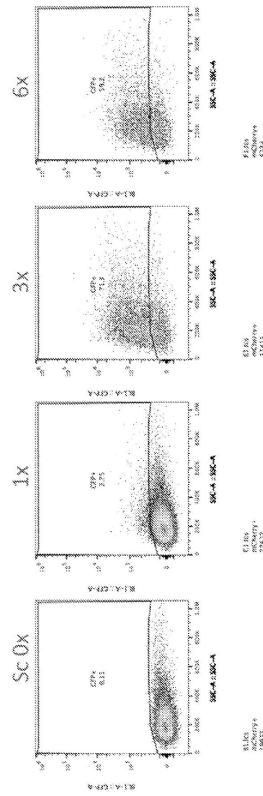
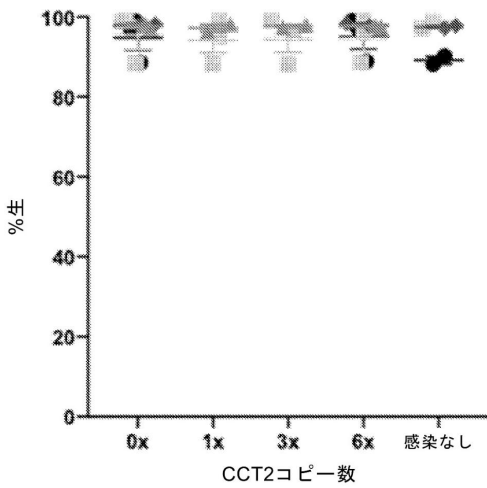


FIG. 25

ゲート:
細胞>一重項>生>mCherry+>GFP+

【図 26】

ゲーティング:細胞>一重項>生

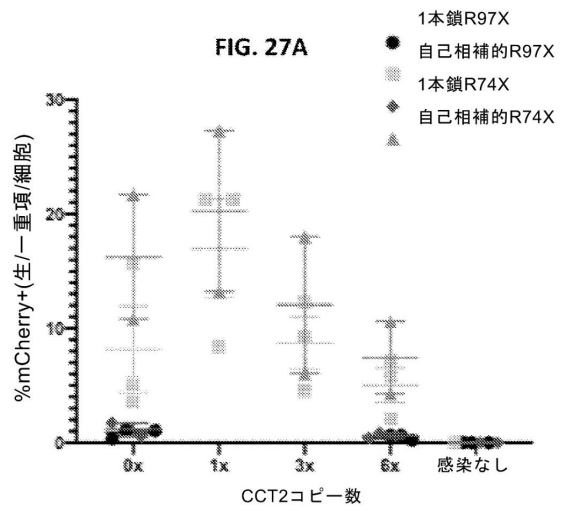


- 1本鎖R97X
- 自己相補的R97X
- ◆ 1本鎖R74X
- ▲ 自己相補的R74X

FIG. 26

【図 27 - A】

FIG. 27A



- 1本鎖R97X
- 自己相補的R97X
- ◆ 1本鎖R74X
- ▲ 自己相補的R74X

10

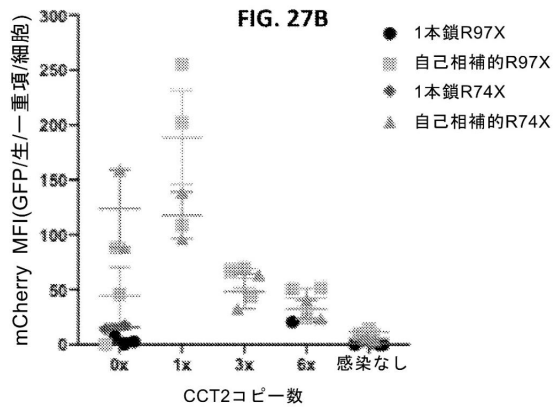
20

30

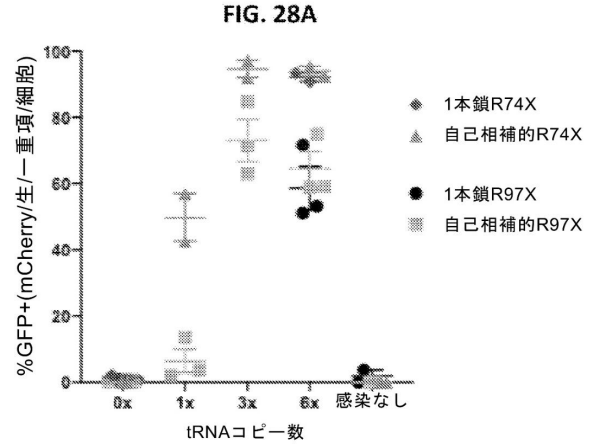
40

50

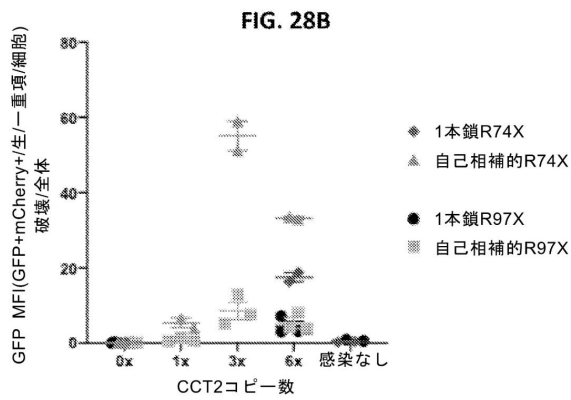
【図 27 - B】



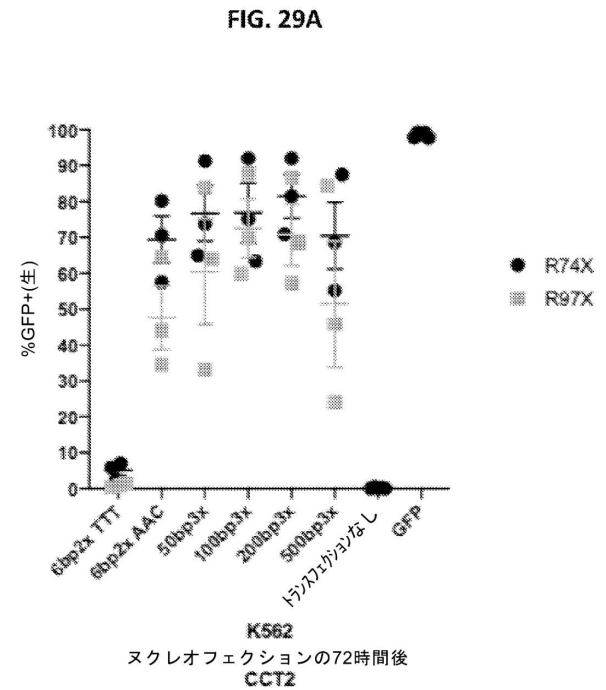
【図 28 - A】



【図 28 - B】



【図 29 - A】



生物学的複製物、平均±SEM

10

20

30

40

50

【図 40】

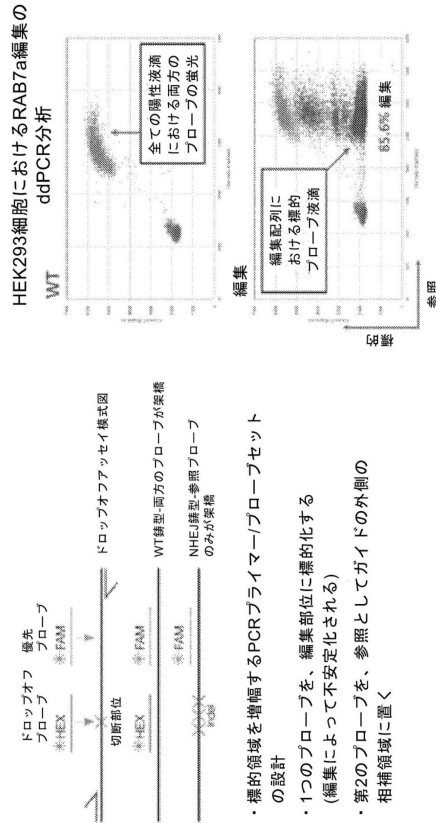


FIG. 40

【図 41】

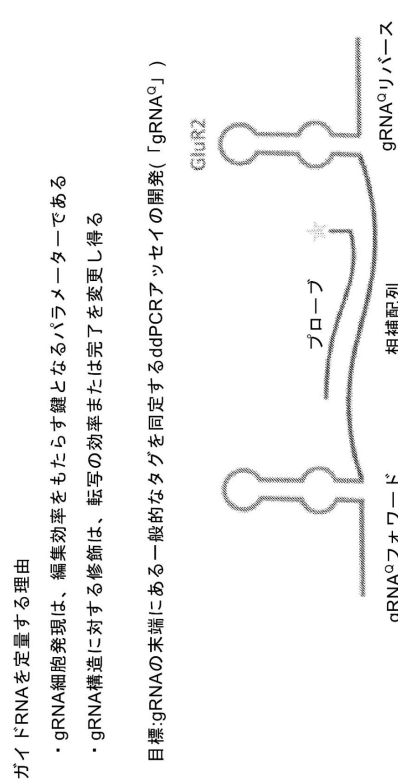


FIG. 41

【図 42】

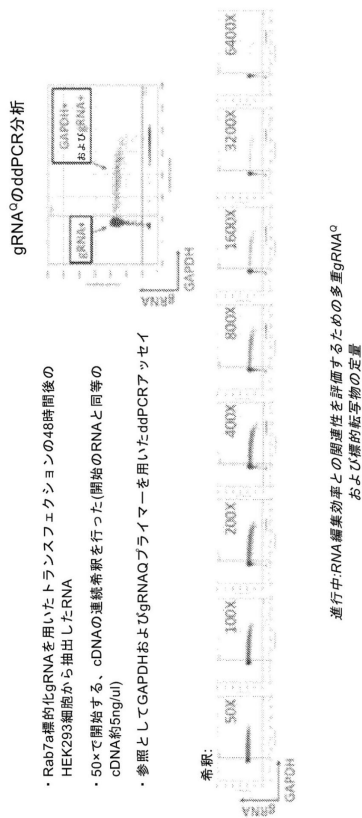


FIG. 42

【図 43】

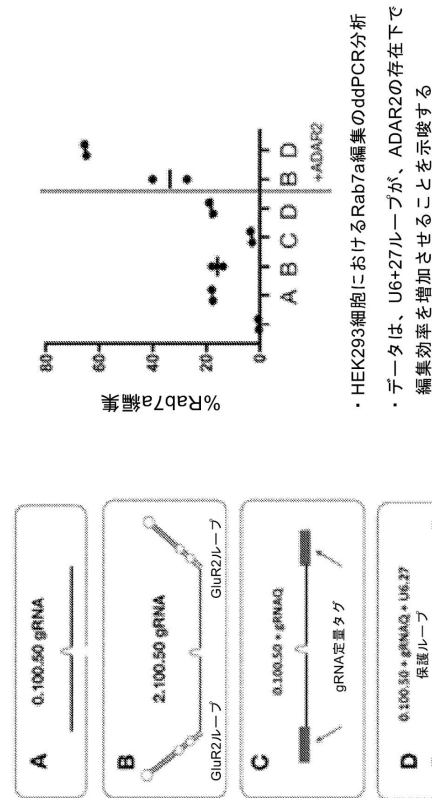


FIG. 43

【図 4 4】

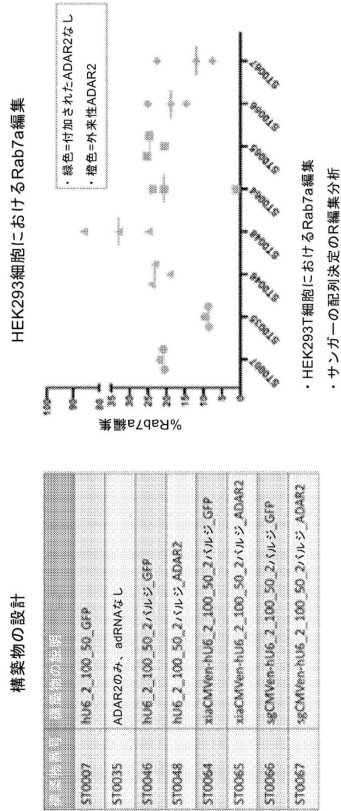


FIG. 44

【図 4 5】

半合理的な設計のハイスループットスクリーニングとの組み合わせ

- ・ADARは、配列ではなく、構造を認識し、これにより、有意な3D設計スペースが可能になる
- ・アプローチ番号1: gRNA/ADAR相互作用モジュールを使用することにより、gRNA配列へのADAR結合を増加させるための標的gRNA突然変異誘発ライブラリー (約10¹⁰) およびSELEXの生成
- ・アプローチ番号2: ADARを効率的に動員することが知られているAlu構成要素の使用 (ライブラリースクリーニングにも使用できる)
- ・アプローチ番号3: 追加の天然のADAR標的dsRNA構造物を特定するために利用可能な本発明者らのCLIP配列データ

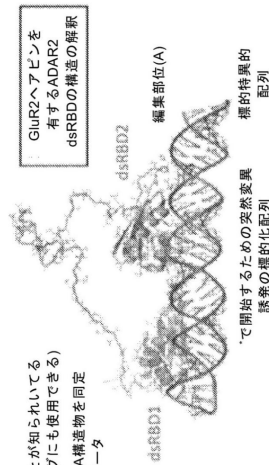


FIG. 45

【図 4 6】

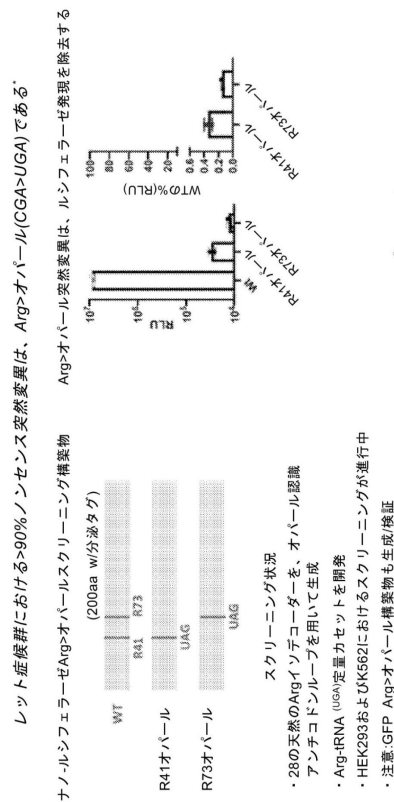


FIG. 46

【図 4 7 - A】

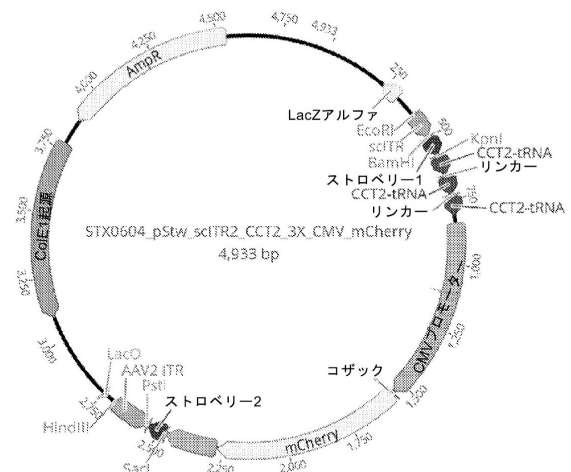


FIG. 47A

【図 47 - B】

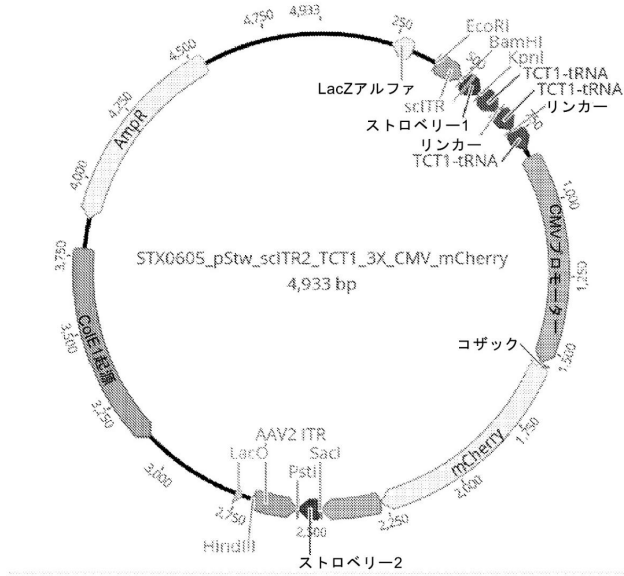


FIG. 47B

【図 47 - C】

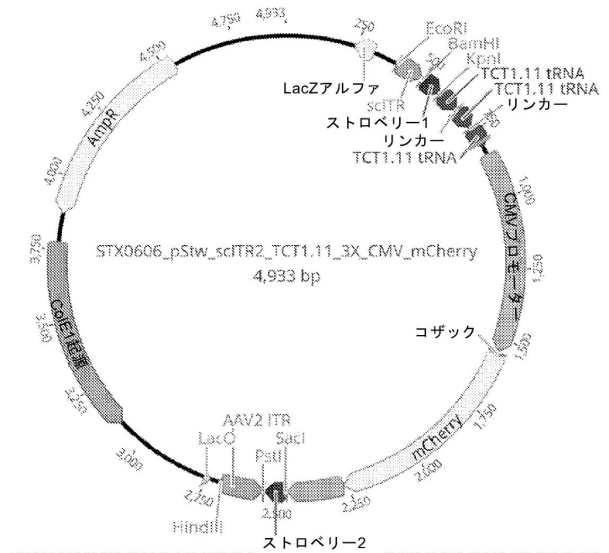


FIG. 47C

10

20

【図 47 - D】

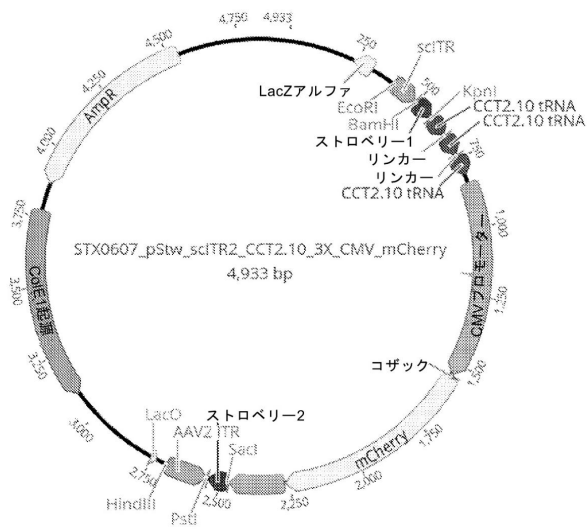


FIG. 47D

【図 47 - E】

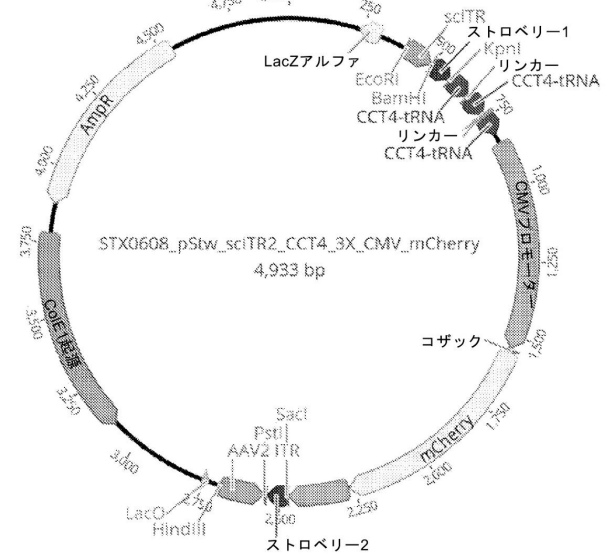


FIG. 47E

30

40

50

【図 48 - A】

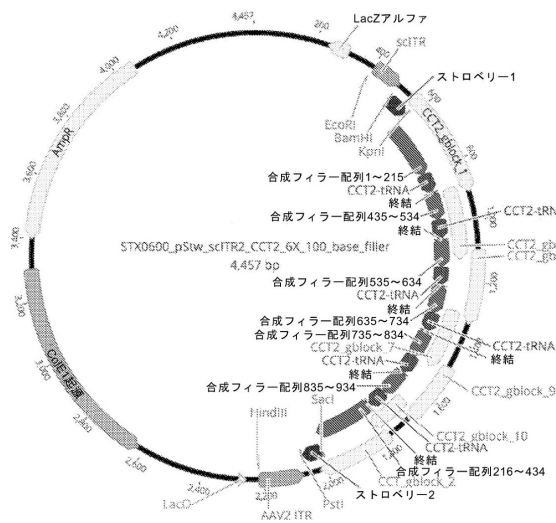


FIG. 48A

【図 48 - B】

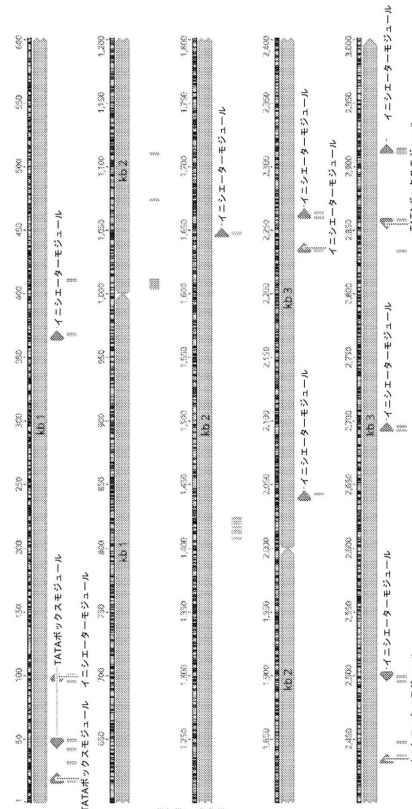


FIG. 48B

【図 49】

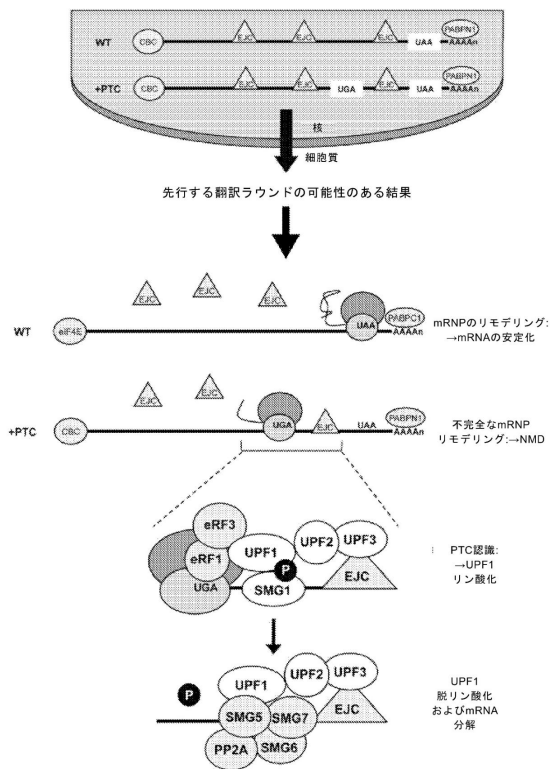


FIG. 49

10

20

30

40

50

【配列表】

2023504661000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2020/062671

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N15/11 A61K48/00 A61K31/7088
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/090169 A1 (WISTAR INST [US]; UNIV IOWA RES FOUND [US]) 9 May 2019 (2019-05-09) sequences 89-113 claims; examples	1-69, 71-73, 76-79 69,74, 75,80
Y	----- WO 2018/161032 A1 (UNIV CALIFORNIA [US]) 7 September 2018 (2018-09-07) the whole document	69,74, 75,80
X	----- WO 2019/090154 A1 (UNIV IOWA RES FOUND [US]; AHERN CHRISTOPHER [US]; LUECK JOHN D [US]) 9 May 2019 (2019-05-09) the whole document	1-69, 71-73, 76-79
	----- -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier application or patent but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 February 2021

Date of mailing of the international search report

09/03/2021

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Andres, Serge

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/062671

Q(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012/006551 A2 (BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL [US]; ANDERSON PAUL [US] ET AL.) 12 January 2012 (2012-01-12)	1-4,6, 13,14, 16-26, 33-47, 50,51, 58-68, 71-73, 78,79
	sequences 219-225,228-236 -----	
X,P	WO 2020/150608 A1 (FLAGSHIP PIONEERING INC [US]) 23 July 2020 (2020-07-23)	1-4,6,8, 9,11,13, 14, 16-26, 33-35, 38-47, 50,51, 58-60, 63-68, 71-73, 78,79
	claims; examples; sequences 32-60 -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2020/062671

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019090169 A1	09-05-2019	AU 2018360055 A1	04-06-2020
		AU 2018360065 A1	18-06-2020
		BR 112020008733 A2	03-11-2020
		CA 3081692 A1	09-05-2019
		CA 3081737 A1	09-05-2019
		CN 111712248 A	25-09-2020
		CN 111818945 A	23-10-2020
		EP 3703701 A1	09-09-2020
		EP 3703762 A1	09-09-2020
		JP 2021502078 A	28-01-2021
		KR 20200083550 A	08-07-2020
		KR 20200090171 A	28-07-2020
		US 2020291401 A1	17-09-2020
		WO 2019090154 A1	09-05-2019
		WO 2019090169 A1	09-05-2019
WO 2018161032 A1	07-09-2018	CN 110612353 A	24-12-2019
		EP 3589751 A1	08-01-2020
		GB 2574769 A	18-12-2019
		JP 2020508685 A	26-03-2020
		US 2020263180 A1	20-08-2020
		US 2020277607 A1	03-09-2020
		WO 2018161032 A1	07-09-2018
WO 2019090154 A1	09-05-2019	AU 2018360055 A1	04-06-2020
		AU 2018360065 A1	18-06-2020
		BR 112020008733 A2	03-11-2020
		CA 3081692 A1	09-05-2019
		CA 3081737 A1	09-05-2019
		CN 111712248 A	25-09-2020
		CN 111818945 A	23-10-2020
		EP 3703701 A1	09-09-2020
		EP 3703762 A1	09-09-2020
		JP 2021502078 A	28-01-2021
		KR 20200083550 A	08-07-2020
		KR 20200090171 A	28-07-2020
		US 2020291401 A1	17-09-2020
		WO 2019090154 A1	09-05-2019
		WO 2019090169 A1	09-05-2019
WO 2012006551 A2	12-01-2012	US 2013197067 A1	01-08-2013
		US 2017292126 A1	12-10-2017
		US 2020010832 A1	09-01-2020
		WO 2012006551 A2	12-01-2012
WO 2020150608 A1	23-07-2020	NONE	

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N	15/88 (2006.01)	C 1 2 N	15/88	Z
A 6 1 P	27/02 (2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	27/16 (2006.01)	A 6 1 P	27/16	
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76	
A 6 1 K	35/761 (2015.01)	A 6 1 K	35/761	
A 6 1 P	1/00 (2006.01)	A 6 1 P	1/00	
A 6 1 K	31/7105 (2006.01)	A 6 1 K	31/7105	
A 6 1 K	9/127 (2006.01)	A 6 1 K	9/127	
A 6 1 K	9/14 (2006.01)	A 6 1 K	9/14	
A 6 1 K	9/12 (2006.01)	A 6 1 K	9/12	
A 6 1 K	9/10 (2006.01)	A 6 1 K	9/10	
A 6 1 K	47/24 (2006.01)	A 6 1 K	47/24	
A 6 1 K	47/30 (2006.01)	A 6 1 K	47/30	

(32)優先日 令和2年4月16日(2020.4.16)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 63/111,856

(32)優先日 令和2年11月10日(2020.11.10)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

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

弁理士 笹倉 真奈美

(74)代理人 100221545

弁理士 白江 雄介

(72)発明者 ハス, デイビッド

アメリカ合衆国 9 8 1 0 9 ワシントン州シアトル、バイン・ストリート 7 5、ユニット 8 0 7

(72)発明者 スタイン, リアーナ

アメリカ合衆国 9 8 0 2 8 ワシントン州ケンモア、セブンティファースト・アベニュー・ノースイースト 1 5 9 0 1

(72)発明者 サリバン, リチャード

アメリカ合衆国 9 8 1 0 3 ワシントン州シアトル、パラタイン・アベニュー・ノース 9 0 5 5

(72)発明者 ラクシュマナン, アヌパマ

アメリカ合衆国 9 8 0 2 9 ワシントン州サマミッシュ、トゥーハンドレッドフォーティーエイス・コート・サウスイースト 4 1 2 9

(72)発明者 バーレイ, スティーブン

アメリカ合衆国 9 8 1 3 3 ワシントン州シアトル、ノース・ワンハンドレッドサーティース・ストリート 3 0 0、ユニット 1 2 5 0

F ターム (参考) 4C076 AA16 AA19 AA95 BB13 BB14 BB24 BB26 CC01 CC10 CC16

EE01

4C084 AA13 NA14 ZA011 ZA012 ZA331 ZA332 ZA341 ZA342

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 MA21 MA24 MA52 MA56 MA58

F ターム (参考)

MA60 NA13 NA14 ZA02 ZA33 ZA34 ZA66
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA52 MA55 MA56 MA58 MA60 MA66
NA14 ZA02 ZA33 ZA34