(19)日本国特許庁(JP)　　(12)公表特許公報(A)　　(11)公表番号
特表2022-513159
(P2022-513159A)
(43)公表日　令和4年2月7日(2022.2.7)

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/62*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/62	Ｚ	４Ｂ０５０
Ｃ０７Ｋ	*19/00*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	19/00		４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ	*15/63*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/63	Ｚ	４Ｃ０８４
Ｃ１２Ｎ	*1/15*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/15		４Ｃ０８６
Ｃ１２Ｎ	*1/19*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/19		４Ｃ０８７

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全71頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2021-530978(P2021-530978)
(86)(22)出願日　令和1年11月27日(2019.11.27)
(85)翻訳文提出日　令和3年5月28日(2021.5.28)
(86)国際出願番号　PCT/US2019/063798
(87)国際公開番号　WO2020/113135
(87)国際公開日　令和2年6月4日(2020.6.4)
(31)優先権主張番号　62/778,361
(32)優先日　平成30年12月12日(2018.12.12)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/772,907
(32)優先日　平成30年11月29日(2018.11.29)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/780,442
最終頁に続く

(71)出願人　519397987
フラッグシップ パイオニアリング イノベーションズ ブイ， インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１４２， ケンブリッジ， ケンブリッジ パークウェイ ５５， ８ティーエイチ フロア
(74)代理人　100145403
弁理士　山尾 憲人
(74)代理人　100122301
弁理士　冨田 憲史
(74)代理人　100157956
弁理士　稲井 史生
(74)代理人　100170520
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＲＮＡを調節する方法

(57)【要約】
本開示は、一般に、例えばＰｕｍｉｌｉｏ相同性ドメインを含むポリペプチドを使用してＲＮＡを調節するための方法及び組成物に関する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
（ａ）複数（例えば、２～５０、１０～３０、又は１６～２１）のＲＮＡ塩基結合モチーフであって、それらの各々がＲＮＡ塩基に結合し、且つ標的ＲＮＡ配列内の番号順の前記ＲＮＡ塩基に結合するようにＲＮＡ結合ドメイン内で規則正しい、ＲＮＡ塩基結合モチーフを含む前記ＲＮＡ結合ドメインを、（ｂ）異種ＲＮＡ編集ドメインに連結されて含むポリペプチド。
【請求項２】
（ａ）複数（例えば、２～５０、１０～３０、又は１６～２１）のＲＮＡ塩基結合モチーフであって、それらの各々がＲＮＡ塩基に結合し、且つ標的ＲＮＡ配列内の番号順の前記ＲＮＡ塩基に結合するようにＲＮＡ結合ドメイン内で規則正しい、ＲＮＡ塩基結合モチーフを含む前記ＲＮＡ結合ドメインを、（ｂ）異種ＲＮＡ編集ドメインに連結されて含み、ヌクレアーゼ又はその機能断片を含まない、ポリペプチド。
【請求項３】
（ａ）複数（例えば、２～５０、１０～３０、又は１６～２１）のＲＮＡ塩基結合モチーフであって、それらの各々がＲＮＡ塩基に結合し、且つ標的ＲＮＡ配列内の番号順の前記ＲＮＡ塩基に結合するようにＲＮＡ結合ドメイン内で規則正しい、ＲＮＡ塩基結合モチーフを含む前記ＲＮＡ結合ドメインを、（ｂ）デアミナーゼ又はその機能断片若しくは変異体の触媒ドメインを含む異種ＲＮＡ編集ドメインに連結されて含むポリペプチド。
【請求項４】
（ａ）複数（例えば、２～５０、１０～３０、又は１６～２１）のＲＮＡ塩基結合モチーフであって、それらの各々がＲＮＡ塩基に結合し、且つ標的ＲＮＡ配列内の番号順の前記ＲＮＡ塩基に結合するようにＲＮＡ結合ドメイン内で規則正しい、ＲＮＡ塩基結合モチーフを含む前記ＲＮＡ結合ドメインを、（ｂ）スプライシング因子を含む異種ＲＮＡエフェクターに連結されて含むポリペプチド。
【請求項５】
前記複数のＲＮＡ塩基結合モチーフが、少なくとも３（例えば、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、１４～２４の間、１５～２３の間、１６～２２の間、１６～２１の間、２～２０の間、２～１５の間、２～１０の間、２～８の間、３～２０の間、３～１５の間、３～１０の間、３～８の間、４～８の間、最大２５、最大３０）のＰＵＭ　ＲＮＡ結合モチーフを含む、請求項１～４のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項６】
前記ＲＮＡ結合ドメインが、２～５０の間のヌクレオチド（例えば、１４～３０の間、１５～２６の間、１６～２１の間、２～４０の間、２～３０の間、２～２５の間、２～２０の間、５～５０の間、５～４０の間、５～３０の間、５～２５の間、５～２０の間、５～１５の間、２～１８の間、２～１５の間、２～１２の間、２～１０の間、２～９の間、２～８の間、３～２０の間、３～１５の間、３～１０の間、３～９の間、３～８の間、４～１２の間、４～１０の間、４～９の間、４～８の間、５～１０の間、５～９の間、５～８の間のヌクレオチド）のＲＮＡ配列に結合する、請求項１～５のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項７】
前記ＲＮＡ結合ドメインが、９０～５００の間のアミノ酸残基、例えば、９０～４５０の間のアミノ酸残基、９０～４００の間のアミノ酸残基、９０～３５０の間のアミノ酸残基、９０～３００の間のアミノ酸残基、１２０～４００の間のアミノ酸残基である、請求項１～６のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項８】
前記ＲＮＡ結合ドメインが、野生型ＰＵＭ－ＨＤ、例えば野生型ヒトＰＵＭ１－ＨＤの対応するアミノ酸配列に対して、少なくとも８０％の同一性（例えば、少なくとも８５％の同一性、少なくとも８７％の同一性、少なくとも９０％の同一性、少なくとも９２％の同

一性、少なくとも９５％の同一性、少なくとも９７％の同一性、少なくとも９８％の同一性、又は９９％の同一性）及び１００％未満の同一性を有する、請求項１～７のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項９】
前記ＲＮＡ結合ドメインが、疾患関連突然変異を含むＲＮＡ配列に結合する、請求項１～８のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項１０】
前記ＲＮＡ結合ドメインが、疾患関連突然変異を含むＲＮＡ配列に結合し、且つ前記ＲＮＡ編集ドメインが、前記疾患関連突然変異を編集する（例えば修正する）、請求項１～９のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項１１】
前記ＲＮＡ編集ドメインが、ＲＮＡデアミナーゼ（例えば、アデノシンデアミナーゼ又はシチジンデアミナーゼ）又はその機能断片若しくは変異体の触媒ドメインを含むポリペプチドを含む、請求項１～１０のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項１２】
前記ＲＮＡ編集ドメインが、ＲＮＡ上で作用するアデノシンデアミナーゼ（ＡＤＡＲ）（例えば、ヒトＡＤＡＲｌ、ヒトＡＤＡＲ２、ヒトＡＤＡＲ３、又はヒトＡＤＡＲ４）；ｔＲＮＡ上で作用するアデノシンデアミナーゼ（ＡＤＡＴ）；ＲＮＡ上で作用するシトシンデアミナーゼ（ＣＤＡＲ）；又はその機能断片若しくは変異体の前記触媒ドメインを含む、請求項１～１１のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項１３】
前記デアミナーゼの前記触媒ドメインが、表Ｂに示される配列に対して少なくとも８０％同一（例えば、少なくとも８５％、８７％、９０％、９２％、９５％、９８％、９９％、１００％同一）である、請求項１１又は１２に記載のポリペプチド。
【請求項１４】
前記ＲＮＡ編集ドメインが、前記標的ＲＮＡ配列又は前記標的配列を含むＲＮＡの少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０（例えば、１～１０、１～９、１～８、１～７、１～６、１～５、１～４、１～３、１～２、２～１０、２～９、２～８、２～７、２～６、２～５、２～４、２～３、３～１０、３～９、３～８、３～７、３～６、３～５、３～４、４～１０、４～９、４～８、４～７、４～６、４～５、５～１０、５～９、５～８、５～７、５～６、６～１０、６～９、６～８、６～７、７～１０、７～９、７～８、８～１０、８～９、又は９～１０）のヌクレオチドを修飾する、請求項１～１３のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項１５】
前記ＲＮＡ編集ドメインが、前記標的ＲＮＡ配列又は前記標的配列を含むＲＮＡの単一ヌクレオチドを修飾する、請求項１～１４のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項１６】
前記ＲＮＡ編集ドメインが、ある塩基を別の塩基に変化させる、例えば、シトシンをウラシルに；アデノシンをイノシンに；又はグアノシンをアデノシンに変化させる、請求項１～１５のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項１７】
前記ＲＮＡ編集ドメインが、前記標的ＲＮＡ配列のアミノ酸コード配列を修飾する、請求項１～１６のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項１８】
前記標的ＲＮＡ配列の前記アミノ酸コード配列に対する前記修飾により、前記標的ＲＮＡ配列によってコードされる産物ポリペプチドのアミノ酸配列が変更される、請求項１７に記載のポリペプチド。
【請求項１９】
前記ＲＮＡ編集ドメインが、前記標的ＲＮＡ配列の少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０（例えば、１～１０、１～９、１～８、１～７、１～６、１～５、

１～４、１～３、１～２、２～１０、２～９、２～８、２～７、２～６、２～５、２～４、２～３、３～１０、３～９、３～８、３～７、３～６、３～５、３～４、４～１０、４～９、４～８、４～７、４～６、４～５、５～１０、５～９、５～８、５～７、５～６、６～１０、６～９、６～８、６～７、７～１０、７～９、７～８、８～１０、８～９、又は９～１０）のヌクレオチド、及び任意選択的には前記標的ＲＮＡ配列の１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０以下のヌクレオチドを修飾する、請求項１～１８のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項２０】

前記ＲＮＡ結合ドメインが、ＲＮＡの二次構造に結合する、請求項１～１９のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項２１】

前記ＲＮＡ結合ドメインが、プレｍＲＮＡ、例えばプレｍＲＮＡのイントロン－エクソン接合部に結合する、請求項１～２０のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項２２】

前記標的ＲＮＡ配列又は前記標的ＲＮＡ配列を含むＲＮＡの二次構造を（例えばその形成を）阻害し、不安定化し、且つ／又は除去する、請求項１～２１のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項２３】

前記標的ＲＮＡ配列又は前記標的ＲＮＡ配列を含むＲＮＡのスプライシングを変更する、請求項１～２２のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項２４】

前記標的ＲＮＡ配列又は前記標的ＲＮＡ配列を含むＲＮＡのスプライシングをスプライス部位（例えば標的スプライス部位）で阻害し、例えば除去し、また任意選択的には前記標的ＲＮＡ配列又は前記標的ＲＮＡ配列を含むＲＮＡのスプライシングを１以上の他のスプライス部位（例えば１以上の非標的スプライス部位）で阻害しない、請求項２３に記載のポリペプチド。

【請求項２５】

遺伝子、例えば前記標的ＲＮＡ配列をコードする遺伝子の発現を減少させる、請求項１～２４のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項２６】

前記標的ＲＮＡ配列によってコードされる産物ポリペプチドのレベルを低下させる、請求項１～２５のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項２７】

前記標的ＲＮＡ配列又は前記標的ＲＮＡ配列を含むＲＮＡにおける停止コドン、例えば未成熟停止コドンを除去する、請求項１～２６のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項２８】

前記標的ＲＮＡ配列又は前記標的ＲＮＡ配列を含むＲＮＡにおける停止コドン、例えば未成熟停止コドンを作出する、請求項１～２７のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項２９】

前記ＲＮＡ結合ドメインの前記複数のＲＮＡ塩基結合モチーフの少なくとも２（例えば、３、４、５、６、７、８、９又はそれ以上）が、リンカー、例えばアミノ酸リンカーによって連結される、請求項１～２８のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項３０】

前記ＲＮＡ結合ドメイン及び前記ＲＮＡ編集ドメインが、リンカー、例えばアミノ酸リンカーによって連結される、請求項１～２９のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項３１】

スプライシング因子をさらに含む、請求項１～３０のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項３２】

請求項１～３１のいずれか一項に記載のポリペプチド、及び前記標的ＲＮＡ配列に相補的

な配列を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む組成物。
【請求項３３】
請求項１～３２のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードする核酸。
【請求項３４】
ＲＮＡ、例えばｍＲＮＡである、請求項３３に記載の核酸。
【請求項３５】
請求項３３又は３４に記載の核酸、及び前記標的ＲＮＡ配列に相補的な配列を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む組成物。
【請求項３６】
請求項３３又は３４に記載の核酸、及び前記標的ＲＮＡ配列に相補的な配列を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドをコードする核酸を含む組成物。
【請求項３７】
請求項３３又は３４に記載の核酸を含む発現ベクター（例えば、プラスミドベクター、ウイルスベクター）。
【請求項３８】
請求項１～３７のいずれか一項に記載の外因性ポリペプチド、請求項３３若しくは３４に記載の核酸、請求項３５若しくは３６に記載の組成物、又は請求項３７に記載のベクターを含む宿主細胞（例えば、細菌宿主細胞、哺乳動物宿主細胞）。
【請求項３９】
請求項１～３８のいずれか一項に記載のポリペプチド、核酸、ベクター、組成物、又は宿主細胞及び薬学的に許容できる賦形剤を含むＧＭＰグレードの医薬組成物。
【請求項４０】
薬学的担体（例えば、小胞、リポソーム、ＬＮＰ）中にカプセル封入又は製剤化された、請求項１～３９のいずれか一項に記載のポリペプチド、核酸、ベクター、組成物、医薬組成物、又は宿主細胞。
【請求項４１】
標的ＲＮＡを修飾する（例えば、その配列を変化させる）方法であって、細胞、組織又は対象を、請求項１～４０のいずれか一項に記載のポリペプチド、核酸、ベクター、組成物、又は宿主細胞、又はＧＭＰグレードの医薬組成物と、前記ポリペプチドの前記ＲＮＡ結合ドメインが前記細胞、組織又は対象における前記標的ＲＮＡに結合し、且つ前記ポリペプチドの前記ＲＮＡ編集ドメインが前記標的ＲＮＡを編集するのに十分な量及び時間で接触させることを含む方法。
【請求項４２】
前記標的ＲＮＡが、二次及び／又は三次構造を有するプレｍＲＮＡ又はｍＲＮＡである、請求項４１に記載の方法。
【請求項４３】
前記標的ＲＮＡが、プレｍＲＮＡ、例えばプレｍＲＮＡのイントロン－エクソン接合部である、請求項４１又は４２に記載の方法。
【請求項４４】
前記ポリペプチドが、前記標的ＲＮＡのヌクレオチド配列を変更する、請求項４１～４３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４５】
変更することが、前記標的ＲＮＡ配列又は前記標的配列を含むＲＮＡの少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０（例えば、１～１０、１～９、１～８、１～７、１～６、１～５、１～４、１～３、１～２、２～１０、２～９、２～８、２～７、２～６、２～５、２～４、２～３、３～１０、３～９、３～８、３～７、３～６、３～５、３～４、４～１０、４～９、４～８、４～７、４～６、４～５、５～１０、５～９、５～８、５～７、５～６、６～１０、６～９、６～８、６～７、７～１０、７～９、７～８、８～１０、８～９、又は９～１０）のヌクレオチドを修飾することを含む、請求項４４に記載の方法。

【請求項４６】
変更することが、前記標的ＲＮＡ配列又は前記標的配列を含むＲＮＡの単一ヌクレオチドを修飾することを含む、請求項４４に記載の方法。
【請求項４７】
変更することが、ある塩基を別の塩基に変化させること、例えば、シトシンをウラシルに；アデノシンをイノシンに；又はグアノシンをアデノシンに変化させることを含む、請求項４４～４６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４８】
変更することが、前記標的ＲＮＡ配列のアミノ酸コード配列を修飾することを含む、請求項４４～４７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４９】
前記標的ＲＮＡ配列の前記アミノ酸コード配列に対する前記修飾により、前記標的ＲＮＡ配列によってコードされる産物ポリペプチドのアミノ酸配列が変更される、請求項４８に記載の方法。
【請求項５０】
前記標的ＲＮＡが、細胞、組織又は対象においてプレｍＲＮＡ又はｍＲＮＡを含み、且つ前記ポリペプチドが、前記プレｍＲＮＡ又はｍＲＮＡの二次又は三次構造を変更する（例えば、増強又は低減する）、請求項４１～４９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５１】
前記標的ＲＮＡが、細胞、組織又は対象においてプレｍＲＮＡ又はｍＲＮＡを含み、且つ前記ポリペプチドが、前記プレｍＲＮＡ又はｍＲＮＡのスプライシングを変更する、請求項４１～５０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５２】
前記ポリペプチドが、前記プレｍＲＮＡ又はｍＲＮＡのスプライシングをスプライス部位（例えば標的スプライス部位）で阻害し、例えば除去し、且つ任意選択的には、前記プレｍＲＮＡ又はｍＲＮＡのスプライシングを１以上の他のスプライス部位（例えば、１以上の非標的スプライス部位）で阻害しない、請求項５１に記載のポリペプチド。
【請求項５３】
前記標的ＲＮＡが、エプスタイン・バーウイルス（ＥＢＶ）ｍＲＮＡ、例えばＥＢＶ核抗原１（ＥＢＮＡ１）ｍＲＮＡを含む、請求項１～５２のいずれか一項に記載の医薬組成物、ポリペプチド、核酸、ベクター、組成物、宿主細胞、又は方法。
【請求項５４】
前記標的ＲＮＡが、棘筋ニューロン２（ＳＭＮ２）ｍＲＮＡを含む、請求項１～５３のいずれか一項に記載の医薬組成物、ポリペプチド、核酸、ベクター、組成物、宿主細胞、又は方法。
【請求項５５】
前記標的ＲＮＡが、ＧｌｕＡ２　ｍＲＮＡを含む、請求項１～５４のいずれか一項に記載の医薬組成物、ポリペプチド、核酸、ベクター、組成物、宿主細胞、又は方法。
【請求項５６】
前記ポリペプチドが、配列番号１３～２１から選択されるアミノ酸配列、又はそれらに対して少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を有する、若しくはそれらと比較して、１、２、３、４、５、６、７、８、９、若しくは１０以下の塩基改変（例えば、置換、欠失、又は挿入）を有するアミノ酸配列を含む、請求項１～５５のいずれか一項に記載の医薬組成物、ポリペプチド、核酸、ベクター、組成物、宿主細胞、又は方法。
【請求項５７】
前記ＲＮＡ結合ドメインが、配列番号２２～２５から選択される、又はそれらと比較して１、２、３、４、５、６、７、８、９、若しくは１０以下の塩基改変を有するＲＮＡ配列を含む標的ＲＮＡ配列に結合する、請求項１～５６のいずれか一項に記載の医薬組成物、ポリペプチド、核酸、ベクター、組成物、宿主細胞、又は方法。

【請求項５８】
対象、例えばヒト対象における疾患又は障害を治療する方法であって、請求項１～５７のいずれか一項に記載のポリペプチド、医薬組成物、核酸、ベクター、組成物、又は宿主細胞を有効量で前記対象に投与し、それにより前記疾患又は障害を治療することを含み、
ここで前記疾患又は障害が、マイヤー・ゴーリン症候群、ゼッケル症候群４、ジュベール症候群５、レーバー先天黒内障１０；シャルコー・マリー・トゥース病、２型；シャルコー・マリー・トゥース病、２型；アッシャー症候群、２Ｃ型；脊髄小脳失調２８；脊髄小脳失調２８；脊髄小脳失調２８；ＱＴ延長症候群２；シェーグレン・ラルソン症候群；遺伝性フルクトース尿症；遺伝性フルクトース尿症；神経芽細胞腫；神経芽細胞腫；カルマン症候群１；カルマン症候群１；カルマン症候群１；異調染色性白血球栄養症、レット症候群、筋萎縮性側索硬化症タイプ１０、リー・フラウメニ症候群、嚢胞性線維症、ハーラー症候群、α－１－アンチトリプシン（Ａ１ＡＴ）欠乏、パーキンソン病、アルツハイマー病、白化現象、筋萎縮性側索硬化症、喘息、ｂ－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）、遠位脊髄性筋萎縮（ＤＳＭＡ）、デュシェンヌ型／ベッカー型筋ジストロフィー、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、家族性腺腫性ポリポーシス、ガラクトース血症、ゴーシェ病、グルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼ、血友病、遺伝性ヘマトクロマトーシス、ハンター症候群、ハンチントン病、炎症性腸疾患（ＩＢＤ）、遺伝性多凝集反応症候群、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、筋ジストロフィー、筋緊張性ジストロフィーＩ型及びＩＩ型、神経線維腫症、ニーマン・ピック病Ａ型、Ｂ型及びＣ型、ＮＹ－ｅｓｏ１関連がん、ポイツ・ジェガース症候群、フェニルケトン尿症、ポンペ病、原発性毛様体病、プロトロンビン変異関連障害、例えばプロトロンビンＧ２０２１０Ａ突然変異、肺高血圧症、網膜色素変性症、サンドホフ病、重症複合免疫不全症候群（ＳＣＩＤ）、鎌状赤血球貧血、脊髄性筋萎縮、シュタルガルト病、テイ・サックス病、アッシャー症候群、Ｘ連鎖性免疫不全、スタージ・ウェーバー症候群、及びがんから選択される、方法。
【請求項５９】
エプスタイン・バーウイルス（ＥＢＶ）によって感染された、又はそれによる感染が疑われる対象（例えばヒト対象）を治療する方法であって、請求項１～５８のいずれか一項に記載のポリペプチド、医薬組成物、核酸、ベクター、組成物、又は宿主細胞を有効量で前記対象に投与し、それによりエプスタイン・バーウイルス（ＥＢＶ）によって感染された、又はそれによる感染が疑われる前記対象を治療することを含む方法。
【請求項６０】
前記対象が、単核球症又はがん（例えば、バーキットリンパ腫、ホジキンリンパ腫、及び上咽頭がん）を有する、請求項５９に記載の方法。
【請求項６１】
棘筋萎縮（ＳＭＡ）を有する対象（例えばヒト対象）を治療する方法であって、請求項１～６０のいずれか一項に記載のポリペプチド、医薬組成物、核酸、ベクター、組成物、又は宿主細胞を有効量で前記対象に投与し、それによりＳＭＡを有する前記対象を治療することを含む方法。
【請求項６２】
筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）を有する対象（例えばヒト対象）を治療する方法であって、請求項１～６１のいずれか一項に記載のポリペプチド、医薬組成物、核酸、ベクター、組成物、又は宿主細胞を有効量で前記対象に投与し、それによりＡＬＳを有する前記対象を治療することを含む方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願
本願は、２０１８年１１月２９日に出願された米国特許出願第６２／７７２，９０７号明

細書、２０１８年１２月１２日に出願された米国特許出願第６２／７７８，３６１号明細書、及び２０１８年１２月１７日に出願された米国特許出願第６２／７８０，４４２号明細書に対する優先権を主張し、それらの内容はそれら全体が参照により本明細書中に各々援用される。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００２】

生物学的過程を調節するため、ＲＮＡの構造及び機能を変更するための組成物及び方法が本明細書に記載される。

【０００３】

一次ヌクレオチド配列は、ＲＮＡの二次及び三次構造を決定する。ヌクレオチドの塩基対合により、タンパク質などのＲＮＡリガンドの結合に必要なステム、ループ及び組み合わせが形成される。そのようなことから、一次配列の編集とそれによるＲＮＡの二次及び／又は三次構造は、そのリガンド結合特性を変更し、リガンド（例えばＲＮＡ結合ポリペプチド）の機能を変更することなく下流プロセスを調節する方法を提供し得る。ＲＮＡの一次、二次、及び三次構造と機能、並びに／又はスプライシングを調節し、ＲＮＡ－リガンド相互作用によってもたらされるプロセス、及び／又はＲＮＡコード産物の発現に影響するための組成物及び関連方法が本明細書に記載される。

【０００４】

したがって、一態様では、本開示は、（ａ）複数（例えば、２～５０、１０～３０、又は１６～２１）のＲＮＡ塩基結合モチーフであって、それらの各々がＲＮＡ塩基に結合し、且つ標的ＲＮＡ配列内の番号順のＲＮＡ塩基に結合するようにＲＮＡ結合ドメイン内で規則正しい、ＲＮＡ塩基結合モチーフを含むＲＮＡ結合ドメインを、（ｂ）異種ＲＮＡ編集ドメインに連結されて含むポリペプチドを対象とする。

【０００５】

別の態様では、本開示は、（ａ）複数（例えば、２～５０、１０～３０、又は１６～２１）のＲＮＡ塩基結合モチーフであって、それらの各々がＲＮＡ塩基に結合し、且つ標的ＲＮＡ配列内の番号順のＲＮＡ塩基に結合するようにＲＮＡ結合ドメイン内で規則正しい、ＲＮＡ塩基結合モチーフを含むＲＮＡ結合ドメインを、（ｂ）異種ＲＮＡ編集ドメインに連結されて含むポリペプチドを対象とし、ここでポリペプチドはヌクレアーゼ又はその機能断片を含まない。

【０００６】

別の態様では、本開示は、（ａ）複数（例えば、２～５０、１０～３０、又は１６～２１）のＲＮＡ塩基結合モチーフであって、それらの各々がＲＮＡ塩基に結合し、且つ標的ＲＮＡ配列内の番号順のＲＮＡ塩基に結合するようにＲＮＡ結合ドメイン内で規則正しい、ＲＮＡ塩基結合モチーフを含むＲＮＡ結合ドメインを、（ｂ）デアミナーゼ又はその機能断片若しくは変異体の触媒ドメインを含む異種ＲＮＡ編集ドメインに連結されて含むポリペプチドを対象とする。

【０００７】

別の態様では、本開示は、（ａ）複数（例えば、２～５０、１０～３０、又は１６～２１）のＲＮＡ塩基結合モチーフであって、それらの各々がＲＮＡ塩基に結合し、且つ標的ＲＮＡ配列内の番号順のＲＮＡ塩基に結合するようにＲＮＡ結合ドメイン内で規則正しい、ＲＮＡ塩基結合モチーフを含むＲＮＡ結合ドメインを、（ｂ）スプライシング因子を含む異種ＲＮＡエフェクターに連結されて含むポリペプチドを対象とする。

【０００８】

いくつかの実施形態では、複数のＲＮＡ塩基結合モチーフは、少なくとも３（例えば、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、１４～２４の間、１５～２３の間、１６～２２の間、１６～２１の間、２～２０の間、２～１５の間、２～１０の間、２～８の間、３～２０の間、３～１５の間、３～１０の間、３～８の間、４～８の間、最大２５、最大３０）のＰＵＭ ＲＮＡ結合モチーフを含む。

【０００９】
いくつかの実施形態では、ＲＮＡ結合ドメインは、２～５０の間のヌクレオチド（例えば、１４～３０の間、１５～２６の間、１６～２１の間、２～４０の間、２～３０の間、２～２５の間、２～２０の間、５～５０の間、５～４０の間、５～３０の間、５～２５の間、５～２０の間、５～１５の間、２～１８の間、２～１５の間、２～１２の間、２～１０の間、２～９の間、２～８の間、３～２０の間、３～１５の間、３～１０の間、３～９の間、３～８の間、４～１２の間、４～１０の間、４～９の間、４～８の間、５～１０の間、５～９の間、５～８の間のヌクレオチド）のＲＮＡ配列に結合する。
【００１０】
いくつかの実施形態では、ＲＮＡ結合ドメインは、９０～５００の間のアミノ酸残基、例えば、９０～４５０の間のアミノ酸残基、９０～４００の間のアミノ酸残基、９０～３５０の間のアミノ酸残基、９０～３００の間のアミノ酸残基、１２０～４００の間のアミノ酸残基である。
【００１１】
いくつかの実施形態では、ＲＮＡ結合ドメインは、野生型ＰＵＭ－ＨＤ、例えば野生型ヒトＰＵＭ１－ＨＤの対応するアミノ酸配列に対して、少なくとも８０％の同一性（例えば、少なくとも８５％の同一性、少なくとも８７％の同一性、少なくとも９０％の同一性、少なくとも９２％の同一性、少なくとも９５％の同一性、少なくとも９７％の同一性、少なくとも９８％の同一性、又は９９％の同一性）及び１００％未満の同一性を有する。
【００１２】
いくつかの実施形態では、ＲＮＡ結合ドメインは、疾患関連突然変異を含むＲＮＡ配列に結合する。
【００１３】
いくつかの実施形態では、ＲＮＡ結合ドメインは、疾患関連突然変異を含むＲＮＡ配列に結合し、ＲＮＡ編集ドメインは、疾患関連突然変異を編集する（例えば修正する）。
【００１４】
いくつかの実施形態では、ＲＮＡ編集ドメインは、ＲＮＡデアミナーゼ（例えば、アデノシンデアミナーゼ又はシチジンデアミナーゼ）又はその機能断片若しくは変異体の触媒ドメインを含むポリペプチドを含む。
【００１５】
いくつかの実施形態では、ＲＮＡ編集ドメインは、ＲＮＡ上で作用するアデノシンデアミナーゼ（ＡＤＡＲ）（例えば、ヒトＡＤＡＲｌ、ヒトＡＤＡＲ２、ヒトＡＤＡＲ３、又はヒトＡＤＡＲ４）；ｔＲＮＡ上で作用するアデノシンデアミナーゼ（ＡＤＡＴ）；ＲＮＡ上で作用するシトシンデアミナーゼ（ＣＤＡＲ）；又はその機能断片若しくは変異体の触媒ドメインを含む。
【００１６】
いくつかの実施形態では、デアミナーゼの触媒ドメインは、表Ｂに示される配列に対して少なくとも８０％同一（例えば、少なくとも８５％、８７％、９０％、９２％、９５％、９８％、９９％、１００％同一）である。
【００１７】
いくつかの実施形態では、ＲＮＡ編集ドメインは、標的ＲＮＡ配列又は標的配列を含むＲＮＡの少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０（例えば、１～１０、１～９、１～８、１～７、１～６、１～５、１～４、１～３、１～２、２～１０、２～９、２～８、２～７、２～６、２～５、２～４、２～３、３～１０、３～９、３～８、３～７、３～６、３～５、３～４、４～１０、４～９、４～８、４～７、４～６、４～５、５～１０、５～９、５～８、５～７、５～６、６～１０、６～９、６～８、６～７、７～１０、７～９、７～８、８～１０、８～９、又は９～１０）のヌクレオチドを修飾する。
【００１８】
いくつかの実施形態では、ＲＮＡ編集ドメインは、標的ＲＮＡ配列又は標的配列を含むＲＮＡの単一ヌクレオチドを修飾する。

【００１９】
いくつかの実施形態では、ＲＮＡ編集ドメインは、ある塩基を別の塩基に変化させる、例えば、シトシンをウラシルに；アデノシンをイノシンに；又はグアノシンをアデノシンに変化させる。
【００２０】
いくつかの実施形態では、ＲＮＡ編集ドメインは、標的ＲＮＡ配列のアミノ酸コード配列を修飾する。
【００２１】
いくつかの実施形態では、標的ＲＮＡ配列のアミノ酸コード配列に対する修飾により、標的ＲＮＡ配列によってコードされる産物ポリペプチドのアミノ酸配列が変更される。
【００２２】
いくつかの実施形態では、ＲＮＡ編集ドメインは、標的ＲＮＡ配列の少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０（例えば、１～１０、１～９、１～８、１～７、１～６、１～５、１～４、１～３、１～２、２～１０、２～９、２～８、２～７、２～６、２～５、２～４、２～３、３～１０、３～９、３～８、３～７、３～６、３～５、３～４、４～１０、４～９、４～８、４～７、４～６、４～５、５～１０、５～９、５～８、５～７、５～６、６～１０、６～９、６～８、６～７、７～１０、７～９、７～８、８～１０、８～９、又は９～１０）のヌクレオチド、及び任意選択的には標的ＲＮＡ配列の１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０以下のヌクレオチドを修飾する。
【００２３】
いくつかの実施形態では、ＲＮＡ結合ドメインは、ＲＮＡの二次構造に結合する。
【００２４】
いくつかの実施形態では、ＲＮＡ結合ドメインは、プレｍＲＮＡ、例えばプレｍＲＮＡのイントロン－エクソン接合部に結合する。
【００２５】
いくつかの実施形態では、該ポリペプチドは、標的ＲＮＡ配列又は標的ＲＮＡ配列を含むＲＮＡの二次構造を（例えばその形成を）阻害し、不安定化し、及び／又は除去する。
【００２６】
いくつかの実施形態では、該ポリペプチドは、標的ＲＮＡ配列又は標的ＲＮＡ配列を含むＲＮＡのスプライシングを変更する。
【００２７】
いくつかの実施形態では、該ポリペプチドは、標的ＲＮＡ配列又は標的ＲＮＡ配列を含むＲＮＡのスプライシングをスプライス部位（例えば標的スプライス部位）で阻害し、例えば除去し、また任意選択的には標的ＲＮＡ配列又は標的ＲＮＡ配列を含むＲＮＡのスプライシングを１以上の他のスプライス部位（例えば１以上の非標的スプライス部位）で阻害しない。
【００２８】
いくつかの実施形態では、該ポリペプチドは、遺伝子、例えば標的ＲＮＡ配列をコードする遺伝子の発現を減少させる。
【００２９】
いくつかの実施形態では、該ポリペプチドは、標的ＲＮＡ配列によってコードされる産物ポリペプチドのレベルを低下させる。
【００３０】
いくつかの実施形態では、該ポリペプチドは、標的ＲＮＡ配列又は標的ＲＮＡ配列を含むＲＮＡにおける停止コドン、例えば未成熟停止コドンを除去する。
【００３１】
いくつかの実施形態では、該ポリペプチドは、標的ＲＮＡ配列又は標的ＲＮＡ配列を含むＲＮＡにおける停止コドン、例えば未成熟停止コドンを作出する。
【００３２】
いくつかの実施形態では、ＲＮＡ結合ドメインの複数のＲＮＡ塩基結合モチーフの少なく

とも２（例えば、３、４、５、６、７、８、９又はそれ以上）は、リンカー、例えばアミノ酸リンカーによって連結される。
【００３３】
いくつかの実施形態では、ＲＮＡ結合ドメイン及びＲＮＡ編集ドメインは、リンカー、例えばアミノ酸リンカーによって連結される。
【００３４】
いくつかの実施形態では、該ポリペプチドは、スプライシング因子をさらに含む。
【００３５】
別の態様では、本開示は、本明細書に記載のポリペプチド、及び標的ＲＮＡ配列に相補的な配列を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む組成物を対象とする。
【００３６】
別の態様では、本開示は、本明細書に記載のポリペプチドをコードする核酸を対象とする。
【００３７】
いくつかの実施形態では、該核酸は、ＲＮＡ、例えばｍＲＮＡである。
【００３８】
別の態様では、本開示は、本明細書に記載の核酸、及び標的ＲＮＡ配列に相補的な配列を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む組成物を対象とする。
【００３９】
別の態様では、本開示は、本明細書に記載の核酸、及び標的ＲＮＡ配列に相補的な配列を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドをコードする核酸を含む組成物を対象とする。
【００４０】
別の態様では、本開示は、本明細書に記載の核酸を含む発現ベクター（例えば、プラスミドベクター、ウイルスベクター）を対象とする。
【００４１】
別の態様では、本開示は、本明細書に記載のポリペプチド、核酸、組成物、又はベクターを含む宿主細胞（例えば、細菌宿主細胞、哺乳動物宿主細胞）を対象とする。
【００４２】
別の態様では、本開示は、本明細書に記載のポリペプチド、核酸、ベクター、組成物、又は宿主細胞、及び薬学的に許容できる賦形剤を含むＧＭＰグレードの医薬組成物を対象とする。
【００４３】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリペプチド、核酸、ベクター、組成物、医薬組成物、又は宿主細胞は、薬学的担体（例えば、小胞、リポソーム、ＬＮＰ）中にカプセル封入又は製剤化される。
【００４４】
別の態様では、本開示は、標的ＲＮＡを修飾する（例えば、その配列を変化させる）方法であって、細胞、組織又は対象を、本明細書に記載のポリペプチド、核酸、ベクター、組成物、宿主細胞、又はＧＭＰグレードの医薬組成物と、ポリペプチドのＲＮＡ結合ドメインが細胞、組織又は対象における標的ＲＮＡに結合し、且つポリペプチドのＲＮＡ編集ドメインが標的ＲＮＡを編集するのに十分な量及び時間で接触させることを含む方法を対象とする。
【００４５】
いくつかの実施形態では、標的ＲＮＡは、二次及び／又は三次構造を有するプレｍＲＮＡ又はｍＲＮＡである。
【００４６】
いくつかの実施形態では、標的ＲＮＡは、プレｍＲＮＡ、例えばプレｍＲＮＡのイントロン－エクソン接合部である。
【００４７】
いくつかの実施形態では、該ポリペプチドは、標的ＲＮＡのヌクレオチド配列を変更する

。
【００４８】
いくつかの実施形態では、変更することは、標的ＲＮＡ配列又は標的配列を含むＲＮＡの少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０（例えば、１～１０、１～９、１～８、１～７、１～６、１～５、１～４、１～３、１～２、２～１０、２～９、２～８、２～７、２～６、２～５、２～４、２～３、３～１０、３～９、３～８、３～７、３～６、３～５、３～４、４～１０、４～９、４～８、４～７、４～６、４～５、５～１０、５～９、５～８、５～７、５～６、６～１０、６～９、６～８、６～７、７～１０、７～９、７～８、８～１０、８～９、又は９～１０）のヌクレオチドを修飾することを含む。
【００４９】
いくつかの実施形態では、変更することは、標的ＲＮＡ配列又は標的配列を含むＲＮＡの単一ヌクレオチドを修飾することを含む。
【００５０】
いくつかの実施形態では、変更することは、ある塩基を別の塩基に変化させること、例えば、シトシンをウラシルに；アデノシンをイノシンに；又はグアノシンをアデノシンに変化させることを含む。
【００５１】
いくつかの実施形態では、変更することは、標的ＲＮＡ配列のアミノ酸コード配列を修飾することを含む。
【００５２】
いくつかの実施形態では、標的ＲＮＡ配列のアミノ酸コード配列に対する修飾により、標的ＲＮＡ配列によってコードされる産物ポリペプチドのアミノ酸配列が変更される。
【００５３】
いくつかの実施形態では、標的ＲＮＡは、細胞、組織又は対象においてプレｍＲＮＡ又はｍＲＮＡを含み、該ポリペプチドは、プレｍＲＮＡ又はｍＲＮＡの二次又は三次構造を変更する（例えば、増強又は低減する）。
【００５４】
いくつかの実施形態では、標的ＲＮＡは、細胞、組織又は対象においてプレｍＲＮＡ又はｍＲＮＡを含み、該ポリペプチドは、プレｍＲＮＡ又はｍＲＮＡのスプライシングを変更する。
【００５５】
いくつかの実施形態では、該ポリペプチドは、プレｍＲＮＡ又はｍＲＮＡのスプライシングをスプライス部位（例えば標的スプライス部位）で阻害し、例えば除去し、任意選択的には、プレｍＲＮＡ又はｍＲＮＡのスプライシングを１以上の他のスプライス部位（例えば、１以上の非標的スプライス部位）で阻害しない。
【００５６】
いくつかの実施形態では、標的ＲＮＡは、エプスタイン・バーウイルス（Ｅｐｓｔｅｉｎ－Ｂａｒｒ　ｖｉｒｕｓ）（ＥＢＶ）ｍＲＮＡ、例えばＥＢＶ核抗原１（ＥＢＮＡ１）ｍＲＮＡを含む。
【００５７】
いくつかの実施形態では、標的ＲＮＡは、棘筋ニューロン２（ｓｐｉｎａｌ　ｍｕｓｃｌｅ　ｎｅｕｒｏｎ　２）（ＳＭＮ２）ｍＲＮＡを含む。
【００５８】
いくつかの実施形態では、標的ＲＮＡは、ＧｌｕＡ２　ｍＲＮＡを含む。
【００５９】
いくつかの実施形態では、該ポリペプチドは、配列番号１３～２１から選択されるアミノ酸配列、又はそれらに対して少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を有する、若しくはそれらと比較して、１、２、３、４、５、６、７、８、９、若しくは１０以下の塩基

改変（例えば、置換、欠失、又は挿入）を有するアミノ酸配列を含む。
【００６０】
いくつかの実施形態では、ＲＮＡ結合ドメインは、配列番号２２～２５から選択される、又はそれらと比較して１、２、３、４、５、６、７、８、９、若しくは１０以下の塩基改変を有するＲＮＡ配列を含む標的ＲＮＡ配列に結合する。
【００６１】
別の態様では、本開示は、対象、例えばヒト対象における疾患又は障害を治療する方法であって、本明細書に記載のポリペプチド、医薬組成物、核酸、ベクター、組成物、又は宿主細胞を有効量で対象に投与し、それにより疾患又は障害を治療することを含み、ここで疾患又は障害が、マイヤー・ゴーリン症候群、ゼッケル症候群４、ジュベール症候群５、レーバー先天黒内障１０；シャルコー・マリー・トゥース病、２型；シャルコー・マリー・トゥース病、２型；アッシャー症候群、２Ｃ型；脊髄小脳失調２８；脊髄小脳失調２８；脊髄小脳失調２８；ＱＴ延長症候群２；シェーグレン・ラルソン症候群；遺伝性フルクトース尿症；遺伝性フルクトース尿症；神経芽細胞腫；神経芽細胞腫；カルマン症候群１；カルマン症候群１；カルマン症候群１；異調染色性白血球栄養症、レット症候群、筋萎縮性側索硬化症タイプ１０、リー・フラウメニ症候群、嚢胞性線維症、ハーラー症候群、α－１－アンチトリプシン（Ａ１ＡＴ）欠乏、パーキンソン病、アルツハイマー病、白化現象、筋萎縮性側索硬化症、喘息、ｂ－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）、遠位脊髄性筋萎縮（ＤＳＭＡ）、デュシェンヌ型／ベッカー型筋ジストロフィー、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、家族性腺腫性ポリポーシス、ガラクトース血症、ゴーシェ病、グルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼ、血友病、遺伝性ヘマトクロマトーシス（Ｈｅｒｅｄｉｔａｒｙ　Ｈｅｍａｔｏｃｈｒｏｍａｔｏｓｉｓ）、ハンター症候群、ハンチントン病、炎症性腸疾患（ＩＢＤ）、遺伝性多凝集反応症候群、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、筋ジストロフィー、筋緊張性ジストロフィーＩ型及びＩＩ型、神経線維腫症、ニーマン・ピック病Ａ型、Ｂ型及びＣ型、ＮＹ－ｅｓｏ１関連がん、ポイツ・ジェガース症候群、フェニルケトン尿症、ポンペ病、原発性毛様体病（Ｐｒｉｍａｒｙ　Ｃｉｌｉａｒｙ　Ｄｉｓｅａｓｅ）、プロトロンビン変異関連障害、例えばプロトロンビンＧ２０２１０Ａ突然変異、肺高血圧症、網膜色素変性症、サンドホフ病、重症複合免疫不全症候群（ＳＣＩＤ）、鎌状赤血球貧血、脊髄性筋萎縮、シュタルガルト病、テイ・サックス病、アッシャー症候群、Ｘ連鎖性免疫不全、スタージ・ウェーバー症候群、及びがんから選択される、方法を対象とする。
【００６２】
別の態様では、本開示は、エプスタイン・バーウイルス（Ｅｐｓｔｅｉｎ－Ｂａｒｒ　ｖｉｒｕｓ）（ＥＢＶ）によって感染された、又はそれによる感染が疑われる対象（例えばヒト対象）を治療する方法であって、本明細書に記載のポリペプチド、医薬組成物、核酸、ベクター、組成物、又は宿主細胞を有効量で対象に投与し、それによりエプスタイン・バーウイルス（Ｅｐｓｔｅｉｎ－Ｂａｒｒ　ｖｉｒｕｓ）（ＥＢＶ）によって感染された、又はそれによる感染が疑われる対象を治療することを含む方法を対象とする。
【００６３】
いくつかの実施形態では、対象は、単核球症又はがん（例えば、バーキットリンパ腫、ホジキンリンパ腫、及び上咽頭がん）を有する。
【００６４】
別の態様では、本開示は、棘筋萎縮（ＳＭＡ）を有する対象（例えばヒト対象）を治療する方法であって、本明細書に記載のポリペプチド、医薬組成物、核酸、ベクター、組成物、又は宿主細胞を有効量で対象に投与し、それによりＳＭＡを有する対象を治療することを含む方法を対象とする。
【００６５】
別の態様では、本開示は、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）を有する対象（例えばヒト対象

）を治療する方法であって、本明細書に記載のポリペプチド、医薬組成物、核酸、ベクター、組成物、又は宿主細胞を有効量で対象に投与し、それによりＡＬＳを有する対象を治療することを含む方法を対象とする。

【図面の簡単な説明】

【００６６】

【図１Ａ】例示的なＲＮＡエディター組成物：ＧｌｕＡ２．ＲＢＤ－ｈＡＤＡＲＤＤの図解（１Ａ）及び予想として得られるＧｌｕＡ２　ｍＲＮＡ配列の編集の例示（１Ｂ）を示す。

【図１Ｂ】例示的なＲＮＡエディター組成物：ＧｌｕＡ２．ＲＢＤ－ｈＡＤＡＲＤＤの図解（１Ａ）及び予想として得られるＧｌｕＡ２　ｍＲＮＡ配列の編集の例示（１Ｂ）を示す。

【図２】棘筋萎縮患者におけるヒトＳＭＮ２スプライシングの例示を示す。

【図３】例示的なＲＮＡエディター組成物：ＳＭＮ２．ＲＢＤ－ｈＡＤＡＲＤＤ及びＳＭＮ２　ｍＲＮＡ配列の予想として得られる修正編集の例示を示す。

【図４】ＭＦＯＬＤによって予測された二次構造による、宿主における免疫応答を誘導するためにウイルス　ｍＲＮＡの二次構造を増強するためのＥＢＮＡ１の配列の編集を示す例示を示す。

【発明を実施するための形態】

【００６７】

本発明は、ＲＮＡ編集組成物（ＲＮＡ－ｅｄｉｔｉｎｇ　ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎ）及び関連方法を説明する。本明細書に記載の組成物（例えば医薬組成物）は、複数（例えば、２～５０、２～３０、１５～３０、１６～２１、５～２０、５～１５、５～１０）のＲＮＡ塩基結合モチーフであって、それらの各々がＲＮＡ塩基に結合し、且つ標的ＲＮＡ配列内の番号順のＲＮＡ塩基に結合するようにＲＮＡ結合ドメイン内で規則正しい、ＲＮＡ塩基結合モチーフを含むＲＮＡ結合ドメインを、異種ＲＮＡ編集ドメイン、例えばデアミナーゼ、例えばアデノシンデアミナーゼ又はシチジンデアミナーゼに連結されて含むポリペプチドを含む。本明細書に記載の組成物及び方法は、ＲＮＡ配列を修飾するため、例えば、ＲＮＡの二次及び／又は三次構造；スプライシング；コードポリペプチドのアミノ酸配列；若しくはコードポリペプチドの発現のレベルの１以上を変更する、又は停止コドン（例えば未成熟停止コドン）を付加若しくは除去するため、使用されてもよい。実施形態では、ＲＮＡ結合ドメインは、ＲＮＡに結合し、ＲＮＡ編集ドメインは、ＲＮＡの二次及び／又は三次構造を増強若しくは低減し、且つ／又はＲＮＡのスプライシングを変更するため、ＲＮＡを編集する。いくつかの実施形態では、該組成物は、例えばＲＮＡに対する免疫応答を低減するため、二本鎖ＲＮＡ構造の量を低減する。いくつかの実施形態では、該組成物は、例えばＲＮＡに対する免疫応答を増強するため、二本鎖ＲＮＡ構造の量を増強する。いくつかの実施形態では、該組成物は、病理学的なスプライス産物を生じさせる疾患関連突然変異を修正する。

【００６８】

定義

本明細書で用いられるとき、用語「ドメイン」は、生体分子の特定の機能に寄与する生体分子の構造を指す。ドメインは、生体分子の隣接領域（例えば隣接配列）又は異なる非隣接領域（例えば非隣接配列）を含んでもよい。タンパク質ドメインの例として、限定はされないが、ＲＮＡ結合ドメイン、エフェクタードメイン、ＲＮＡ編集ドメインが挙げられる。

【００６９】

本明細書で用いられるとき、用語「外因性」は、生体分子（核酸配列又はポリペプチドなど）を参照して使用されるとき、生体分子がヒト介入により宿主ゲノム、細胞又は生物に導入されたことを意味する。例えば、組換えＤＮＡ技術又は他の方法を用いて、既存のゲノム、細胞、組織又は対象に添加される核酸は、既存の核酸配列、細胞、組織又は対象に対して外因性である。

【００７０】
本明細書で用いられるとき、用語「異種」は、第１の要素を第２の要素との関連で説明するために用いられるとき、第１の要素及び第２の要素が、前述のように処理され、天然に存在しないことを意味する。例えば、異種ポリペプチド、核酸分子、構築物又は配列は、（ａ）発現される場合の細胞にとって天然でない、ポリペプチド、核酸分子、又はポリペプチド若しくは核酸分子配列の一部、（ｂ）天然状態と比べて改変又は突然変異されている、ポリペプチド又は核酸分子、又はポリペプチド若しくは核酸分子の一部、或いは（ｃ）類似条件下での天然発現レベルと比べて変更された発現を有するポリペプチド又は核酸分子、を指す。例えば、遺伝子又は核酸分子の発現を通常は天然に発現される遺伝子又は核酸分子とは異なる方法で調節するため、異種制御配列（例えば、プロモーター、エンハンサー）が使用されてもよい。別の例では、ポリペプチド又は核酸配列の異種ドメイン（例えば、ポリペプチドのＲＮＡ結合ドメイン又はポリペプチドのＲＮＡ結合ドメインをコードする核酸）は、他のドメインに対して処理されてもよい、又はポリペプチド又はそのコード核酸の他のドメイン若しくは部分に対して、異なる配列であってもよいか若しくは異なる供給源に由来してもよい。特定の実施形態では、異種核酸分子は、天然の宿主細胞ゲノム内に存在してもよいが、改変された発現レベルを有するか又は異なる配列若しくは双方を有してもよい。他の実施形態では、異種核酸分子は、宿主細胞又は宿主ゲノムに対して内因性でなくてもよいが、その代わりに形質転換（例えば、トランスフェクション、エレクトロポレーション）により宿主細胞内に導入されていてもよく、ここで添加された分子は、宿主ゲノムに組み込まれてもよい、又は一過性に（例えばｍＲＮＡ）若しくは２世代以上にわたり準安定性に（例えば、エピソームウイルスベクター、プラスミド又は他の自己複製ベクター）、染色体外遺伝子材料として存在し得る。
【００７１】
本明細書で用いられるとき、用語「突然変異される」、「突然変異」及び同根語は、核酸配列に適用されるとき、核酸配列内のヌクレオチドが、参照核酸配列（例えば、天然、野生型又は非病理学的核酸配列）と比べて、挿入、欠失又は改変（例えば点突然変異）されてもよいことを意味する。
【００７２】
本明細書で用いられるとき、「核酸」は、限定はされないが、ｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡ、ｍＲＮＡ、ｔＲＮＡを含むＲＮＡ及びＤＮＡ分子の双方を指し、合成核酸分子、例えば化学合成されるか又は組換え生成されるもの、例えば本明細書に記載のヌクレオチド配列も含む。核酸分子は、二本鎖又は一本鎖、それらの組み合わせ、環状又は線状であり得る。一本鎖の場合、核酸分子は、センス鎖又はアンチセンス鎖であり得る。核酸配列は、当業者によって容易に理解されるように、化学的に若しくは生化学的に修飾されてもよく、又は非天然若しくは誘導体化ヌクレオチド塩基を有してもよい。かかる修飾は、例えば、標識、メチル化、１以上の天然に存在するヌクレオチドの類似体との置換、非荷電結合などのヌクレオチド間修飾（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホロアミド酸、カルバミン酸など）、荷電結合（例えば、ホスホロチオエート、ジチオリン酸など）、懸垂部分、（例えば、ポリペプチド）、介入物（例えば、アクリジン、ソラレンなど）、キレート剤、アルキル化剤、及び修飾結合（例えばαアノマー核酸など）を含む。ポリヌクレオチドを、水素結合及び他の化学的相互作用を介して指定配列に結合するその能力において模倣する合成分子も含まれる。かかる分子は、当該技術分野で公知であり、例えば、分子の骨格においてペプチド結合がリン酸塩結合の代替である場合のものを含む。他の修飾は、例えば、リボース環が架橋部分又は「ロックド」核酸中に見出される修飾などの他の構造を有する場合の類似体を含み得る。
【００７３】
本明細書で用いられるとき、ポリペプチドの「ＲＮＡ結合ドメイン」は、標的ＲＮＡ配列に特異的に結合するポリペプチドのドメインである。ＲＮＡ結合ドメインは、複数のＲＮＡ塩基結合モチーフを含んでもよく、それらの各々は、ＲＮＡ塩基に特異的に結合する能力があり、且つ標的ＲＮＡ配列内の番号順のＲＮＡ塩基に結合するようにＲＮＡ結合ドメ

インン内で規則正しい。本明細書で用いられるとき、「ＰＵＭ　ＲＮＡ結合モチーフ」は、Ｐｕｍｉｌｉｏ相同性ドメイン（ＰＵＭ－ＨＤ）のＲＮＡ塩基結合リピートに対して相同性であるか又はそれに由来するモチーフである。実施形態では、ＰＵＭ　ＲＮＡ結合モチーフは、ＰＵＭ－ＨＤのＲＮＡ塩基結合リピートに対して、少なくとも８０％（例えば、８５％、８７％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％又は１００％）同一であり、特定のＲＮＡ塩基に対する結合特異性を有する。いくつかの実施形態では、ＰＵＭ　ＲＮＡ結合モチーフは、モジュラー単位を有する。いくつかの実施形態では、モジュラー単位は、ＲＮＡ塩基アデニンに結合し、ここでモジュラー単位のアミノ酸１はシステインであり、モジュラー単位のアミノ酸２はチロシンであり、及びモジュラー単位のアミノ酸５はグルタミンである。いくつかの実施形態では、モジュラー単位は、ＲＮＡ塩基ウラシルに結合し、ここでモジュラー単位のアミノ酸１はアスパラギンであり、モジュラー単位のアミノ酸２はチロシンであり、及びモジュラー単位のアミノ酸５はグルタミンである。いくつかの実施形態では、モジュラー単位は、ＲＮＡ塩基グアニンに結合し、ここでモジュラー単位のアミノ酸１はセリンであり、モジュラー単位のアミノ酸２はチロシンであり、及びモジュラー単位のアミノ酸５はグルタミン酸である。いくつかの実施形態では、モジュラー単位は、ＲＮＡ塩基シトシンに結合し、ここでモジュラー単位のアミノ酸１はセリンであり、モジュラー単位のアミノ酸２はチロシンであり、及びモジュラー単位のアミノ酸５はアルギニンである。いくつかの実施形態では、モジュラー単位は、シトシンに結合し、ここでモジュラー単位のアミノ酸１はセリンであり、モジュラー単位のアミノ酸２はチロシンであり、及びモジュラー単位のアミノ酸５はアルギニンである。かかるモジュラー単位、並びにＲＮＡ結合モチーフ及びドメインを設計し、作成する方法は、例えば、Ａｄａｍａｌａ　ｅｔ　ａｌ．２０１６．ＰＮＡＳ　１１３（１９）：Ｅ２５７９－Ｅ２５８８及び米国特許出願公開第２０１６／０２３８５９３号明細書にて見出される。

【００７４】

本明細書で用いられるとき、「ＲＮＡエフェクター」は、ＲＮＡ上で、その構造及び／又は機能を調節する、例えば標的ＲＮＡのヌクレオチド配列を編集するように作用する部分である。ＲＮＡエフェクターの例が、標的ＲＮＡ配列の１以上の塩基を編集する酵素の触媒ドメイン（「ＲＮＡ編集」ドメイン）、例えば、デアミナーゼ、例えばシトシンをウラシルに編集するシチジンデアミナーゼ、アデノシンをイノシンに編集するアデノシンデアミナーゼの触媒ドメイン、又はＧをＡに変換する能力を有することが報告されているＡＰＯＢＥＣ３Ａの触媒ドメインである（例えば、Ａｈｍａｄｒｅｚａ　ｅｔ　ａｌ．２０１５．ＰｌｏＳ　ｏｎｅ　１０．３：ｅ０１２００８９などの場合）。かかる酵素は、ＲＮＡ上で作用するアデノシンデアミナーゼ（ＡＤＡＲ）（例えば、ヒトＡＤＡＲｌ、ヒトＡＤＡＲ２、ヒトＡＤＡＲ３、又はヒトＡＤＡＲ４）；ｔＲＮＡ上で作用するアデノシンデアミナーゼ（ＡＤＡＴ）、ＲＮＡ上で作用するシトシンデアミナーゼ（ＣＤＡＲ）、ＡＰＯＢＥＣ、ＡＰＯＢＥＣ３Ａ　Ａ３Ａ、ＴａｄＡ又はＣＤＡを含む。

【００７５】

本明細書で用いられるとき、用語「宿主」細胞は、本明細書で用いられるとき、中にタンパク質及び／又は遺伝子材料が導入されている細胞及び／又はそのゲノムを指す。該用語は、特定の対象細胞及び／又はゲノムを指すだけでなく、かかる細胞の子孫及び／又はかかる細胞の子孫のゲノムを指すことが意図される。突然変異又は環境的影響のいずれかに起因し、特定の修飾が続く世代に生じることがあるため、かかる子孫は、実際には親細胞と同一でなくてもよいとしても、本明細書で用いられるような用語「宿主細胞」の範囲内に含まれる。宿主ゲノム又は宿主細胞は、培養下で成長した単離された細胞若しくは細胞株、又はかかる細胞若しくは細胞株から単離されたゲノム材料であってもよい、又は生体組織若しくは生物を含む宿主細胞若しくは宿主ゲノムであってもよい。

【００７６】

本明細書で用いられるとき、本明細書に記載の組成物の用語「有効な」又は「十分な」量及び／又は時間は、細胞、組織又は対象、例えば哺乳動物（例えばヒト）に投与されるとき、所望される結果、例えば、細胞レベル、組織レベル、又は臨床結果での効果をもたら

すのに十分である質及び／又は時間を指し、それ故、「有効な」又は「十分な」又はそれに対する同義語は、それが適用されている文脈に依存する。例えば、ＲＮＡ構造を調節する文脈では、それは組成物（例えば、ポリペプチド、核酸、ベクターなど）の投与を伴わずに得られる応答と比べての、ＲＮＡ構造への変化を達成するのに十分な組成物の量である。かかる量に対応することになる所与の本明細書に記載の組成物の量は、様々な要素、例えば、所与の薬剤、医薬製剤、投与経路、疾患又は障害のタイプ、細胞、組織若しくは対象の同一性（例えば、年齢、性別、体重）、又は処置されている宿主などに応じて変動することになるにもかかわらず、当業者によりルーチン的に決定され得る。さらに、本明細書で用いられるとき、本開示の組成物の「治療有効量」は、対照と比べて、対象において有利であるか又は所望される結果をもたらす量である。本明細書で定義される通り、本開示の組成物の治療有効量は、当該技術分野で公知の通常の方法により、当業者により容易に決定されてもよい。投与計画は、最適な治療応答をもたらすように調節されてもよい。

【００７７】

本明細書で用いられるとき、用語「増強する」及び「低減する」は、参照と比べて、測定対象の機能、発現、又は活性を各々、結果的により大きい量又はより小さい量に調節することを指す。例えば、本明細書に記載の組成物の投与後、本明細書に記載のようなＲＮＡの機能及び／又は構造（例えば、発現又は制御活性）は、細胞、組織又は対象において、投与前の量と比べて、少なくとも５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％又は９８％又はそれ以上、増強又は低減されてもよい。一般に、測定対象は、投与後、投与が列挙された効果を、例えば、数時間、数日、少なくとも１週、１か月、３か月、若しくは６か月にわたり有している時点で、又は治療計画が対象の状況下で開始している上で測定される。

【００７８】

本明細書で用いられるとき、「医薬組成物」又は「製剤」は、疾患の緩和、治療、若しくは予防において薬理学的活性若しくは他の直接的効果を有する組成物若しくは調製物、及び／又はヒト使用が指示されるその最終剤形又は製剤である。医薬組成物は、典型的にはＧＭＰグレードである、即ち、それはヒトに使用されるべき組成物としての米国規制当局（ＦＤＡ）の規格を満たす。例えば、ＧＭＰグレードの組成物は、典型的には内毒素について試験され、内毒素を特定量未満で有するリリース基準を満たす。

【００７９】

「治療」及び「治療する」は、本明細書で用いられるとき、疾患、病態、又は障害に対する改善、寛解、安定化（即ち、悪化しないこと）、予防又は治癒が意図される、対象の医学的管理を指す。この用語は、積極的治療（疾患、病態、又は障害を改善することを対象とする治療）、原因療法（関連する疾患、病態、又は障害の原因を対象とする治療）、対症療法（症状の軽減を意図して設計された治療）、予防的治療（関連する疾患、病態、又は障害の発生を最小化するか又は部分的若しくは完全に阻害することを対象とする治療）；並びに支持療法（別の治療法を補うために用いられる治療）を含む。治療はまた、疾患又は病態の程度の低減；疾患又は病態の伝播を予防すること；疾患又は病態の進行の遅延又は緩徐化；疾患又は病態の寛解又は緩和；及び検出可能又は検出不能である寛解（部分的又は全体的のいずれか）を含む。疾患又は病態を「寛解」又は「緩和」することは、治療の不在下での程度又は時間経過と比べて、疾患、障害、又は病態の程度及び／若しくは望ましくない臨床症状が低減され、且つ／又は進行の時間経過が緩徐化若しくは延長されることを意味する。「治療」はまた、治療を受けていない場合、生存を想定される生存と比べて延長することを意味し得る。治療を必要とする者は、病態若しくは障害を既に有する者、並びに病態若しくは障害を有する傾向がある者又は病態若しくは障害が予防されるべきである者を含む。

【００８０】

ＲＮＡ結合ドメイン

本明細書に記載のポリペプチドのＲＮＡ結合ドメインは、標的ＲＮＡ配列に特異的に結合する。ＲＮＡ結合ドメインは、複数のＲＮＡ塩基結合モチーフを含んでもよく、それらの各々は、ＲＮＡ塩基に特異的に結合する能力があり、且つモチーフは、例えば標的ＲＮＡ配列内の番号順のＲＮＡ塩基に結合するようにＲＮＡ結合ドメイン内で規則正しい。ＲＮＡ結合モチーフは、Ｐｕｍｉｌｉｏ相同性ドメイン（ＰＵＭ－ＨＤ）のＲＮＡ塩基結合リピートに対して相同性であるか又はそれに由来する配列に基づいてもよい（「ＰＵＭ　ＲＮＡ結合モチーフ」）。実施形態では、ＰＵＭ　ＲＮＡ結合モチーフは、ＰＵＭ－ＨＤのＲＮＡ塩基結合モチーフに対して、少なくとも８０％（例えば、８５％、８７％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％又は１００％）同一であり、特定のＲＮＡ塩基に対する結合特異性を有する。ＰＵＭ　ＲＮＡ結合モチーフでは、標的ＲＮＡ塩基に対する特異性は、核酸のワトソン・クリックエッジに結合する、水素結合又はファンデルワールス相互作用によって支配される、トポロジカルに等価なタンパク質表面上の保存された位置に基づいて改変される。これらのトポロジーは、グアニンを認識するため、１番目及び５番目の位置でグルタミン酸及びセリン；アデニンを認識するため、グルタミン及びシステイン／セリン；及びウラシルを認識するため、グルタミン及びアスパラギンを用いて、ＲＮＡに標的化される。かかるモジュラー単位、並びにＲＮＡ結合モチーフ及びドメインを設計し、作成する方法は、例えば、Ｌｕ　ｅｔ　ａｌ．２００９．Ｃｕｒｒ　Ｏｐｉｎ　Ｓｔｒｕｃｔ　Ｂｉｏｌ．１９（１）：１１０－１１５；Ａｄａｍａｌａ　ｅｔ　ａｌ．２０１６．ＰＮＡＳ　１１３（１９）：Ｅ２５７９－Ｅ２５８８；及び米国特許出願公開第２０１６／０２３８５９３号明細書にて見出される。

【００８１】

実施形態では、ＲＮＡ結合ドメインは、野生型ＰＵＭ－ＨＤ、例えば野生型ヒトＰＵＭ１－ＨＤの対応するアミノ酸配列に対して、少なくとも８０％の同一性（例えば、少なくとも８５％の同一性、少なくとも８７％の同一性、少なくとも９０％の同一性、少なくとも９２％の同一性、少なくとも９５％の同一性、少なくとも９７％の同一性、少なくとも９８％の同一性、又は９９％の同一性）及び１００％未満の同一性を有する。一例では、突然変異誘発について標的にするためのＨｓＰＵＭ１－ＨＤ　ＲＮＡ結合モチーフ及びそれに相関する認識されたヌクレオチドが表Ａに示される（Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．２００２．Ｃｅｌｌ　１１０（４）：５０１－１２）。

【００８２】

【表１】

表A

リピート	リピートのアミノ酸配列	標的残基	ヌクレオチド
R1	HIMEFSQDQHGSRFIQLKLERATP AERQLVFNEILQ	Ser863, Arg864, Gln867	A
R3	HVLSLALQMYGCRVIQKALEFIPS DQQNEMVRELDG	Cys935, Arg936, Gln939	A
R5	QVFALSTHPYGCRVIQRILEHCLP DQTLPILEELHQ	Cys1007, Arg1008, Gln1011	A
R7	NVLVLSQHKFASNVVEKCVTHAS RTERAVLIDEVCTMNDGPHS	Ser1079, Ans1080, Glu1083	G
R2	AAYQLMVDVFGNYVIQKFFEFGS LEQKLALAERIRG	Asn899, Tyr900, Gln903	U
R4	HVLKCVKDQNGNHVVQKCIECV QPQSLQFIIDAFKG	Asn971, His972, Gln975	U
R6	HTEQLVQDQYGNYVIQHVLEHGR PEDKSKIVAEIRG	Asn1043, Tyr1044, Gln1047	U
R8	ALYTMMKDQYANYVVQKMIDV AEPGQRKIVMHKIRP HIATLRKYTYGKHILAKLEKYYM KNGVDLG	Tyr1123, Asn 1122, Gln1126	U

【００８３】

例えば、リピート７内のグアニン（Ｇ）でなくウラシル（Ｕ）に結合するため、例えば、Ｃｈｅｏｎｇ ａｎｄ Ｔａｎａｋａ．２００６．ＰＮＡＳ ｖｏｌ．１０３，３７：１３６３５－９に記載の通り、アミノ酸残基変化：Ｅ１０８３Ｑ、Ｓ１０７９Ｎ及びＮ１０８０Ｙが設けられる。

【００８４】

改変されたＲＮＡ結合ドメインは、標的ＲＮＡ配列に結合するように設計される。典型的には、ＲＮＡ結合ドメインは、２～５０ＲＮＡヌクレオチド（例えば、２～５０ヌクレオチド（例えば、２～５０、２～４０、２～３０、２～２５、２～２４、２～２３、２～２２、２～２１、２～２０、２～１９、２～１８、２～１７、２～１６、２～１５、２～１４、２～１３、２～１２、２～１１、２～１０、２～９、２～８、５～５０、５～４０、５～３０、５～２５、５～２４、５～２３、５～２２、５～２１、５～２０、５～１９、５～１８、５～１７、５～１６、５～１５、５～１４、５～１３、５～１２、５～１１、５～１０、５～９、５～８、１０～５０、１０～４０、１０～３０、１０～２５、１０～２４、１０～２３、１０～２２、１０～２１、１０～２０、１０～１９、１０～１８、１０～１７、１０～１６、１０～１５、１０～１４、１０～１３、１０～１２、１０～１１、１５～５０、１５～４０、１５～３０、１５～２５、１５～２４、１５～２３、１５～２２、１５～２１、１５～２０、１５～１９、１５～１８、１５～１７、１５～１６、１

６～５０、１６～４０、１６～３０、１６～２５、１６～２４、１６～２３、１６～２２、１６～２１、１６～２０、１６～１９、１６～１８、１６～１７、１７～５０、１７～４０、１７～３０、１７～２５、１７～２４、１７～２３、１７～２２、１７～２１、１７～２０、１７～１９、１７～１８、１８～５０、１８～４０、１８～３０、１８～２５、１８～２４、１８～２３、１８～２２、１８～２１、１８～２０、１８～１９、１９～５０、１９～４０、１９～３０、１９～２５、１９～２４、１９～２３、１９～２２、１９～２１、１９～２０、２０～５０、２０～４０、２０～３０、２０～２５、２０～２４、２０～２３、２０～２２、２０～２１、２１～５０、２１～４０、２１～３０、２１～２５、２１～２４、２１～２３、２１～２２、２５～５０、２５～４０、２５～３０、３０～５０、３０～４０、又は４０～５０、３～２０、３～１５、３～１０、３～９、３～８、４～１２、４～１０、４～９、４～８、５～１０、５～９、５～８ヌクレオチド）の標的配列に結合する。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ結合ドメインは、１６～２１ＲＮＡヌクレオチドの標的配列に結合する。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ結合ドメインは、少なくとも１６のＲＮＡヌクレオチド（及び任意選択的には、３０以下、２９、２８、２７、２６、２５、２４、２３、２２、又は２１のＲＮＡヌクレオチド）に結合する。複数のＲＮＡ塩基結合モチーフは、少なくとも３（例えば、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、２～２０の間、２～１５の間、２～１０の間、２～８の間、３～２０の間、３～１５の間、３～１０の間、３～８の間、４～８の間、最大２５、最大３０）のＰＵＭ　ＲＮＡ結合モチーフを含んでもよい。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ結合ドメインは、２～５０、２～４０、２～３０、２～２５、２～２４、２～２３、２～２２、２～２１、２～２０、２～１９、２～１８、２～１７、２～１６、２～１５、２～１４、２～１３、２～１２、２～１１、２～１０、２～９、２～８、５～５０、５～４０、５～３０、５～２５、５～２４、５～２３、５～２２、５～２１、５～２０、５～１９、５～１８、５～１７、５～１６、５～１５、５～１４、５～１３、５～１２、５～１１、５～１０、５～９、５～８、１０～５０、１０～４０、１０～３０、１０～２５、１０～２４、１０～２３、１０～２２、１０～２１、１０～２０、１０～１９、１０～１８、１０～１７、１０～１６、１０～１５、１０～１４、１０～１３、１０～１２、１０～１１、１５～５０、１５～４０、１５～３０、１５～２５、１５～２４、１５～２３、１５～２２、１５～２１、１５～２０、１５～１９、１５～１８、１５～１７、１５～１６、１６～５０、１６～４０、１６～３０、１６～２５、１６～２４、１６～２３、１６～２２、１６～２１、１６～２０、１６～１９、１６～１８、１６～１７、１７～５０、１７～４０、１７～３０、１７～２５、１７～２４、１７～２３、１７～２２、１７～２１、１７～２０、１７～１９、１７～１８、１８～５０、１８～４０、１８～３０、１８～２５、１８～２４、１８～２３、１８～２２、１８～２１、１８～２０、１８～１９、１９～５０、１９～４０、１９～３０、１９～２５、１９～２４、１９～２３、１９～２２、１９～２１、１９～２０、２０～５０、２０～４０、２０～３０、２０～２５、２０～２４、２０～２３、２０～２２、２０～２１、２１～５０、２１～４０、２１～３０、２１～２５、２１～２４、２１～２３、２１～２２、２５～５０、２５～４０、２５～３０、３０～５０、３０～４０、又は４０～５０のＰＵＭ　ＲＮＡ結合モチーフ、例えば、結合されたＲＮＡヌクレオチドの数（例えば標的ＲＮＡ配列の長さ）に対応するある数のＰＵＭ　ＲＮＡ結合モチーフを含む。

【００８５】

いくつかの実施形態では、ＲＮＡ結合ドメインは、ＧｌｕＡ２（例えばヒトＧｌｕＡ２）遺伝子によってコードされるｍＲＮＡ内の標的ＲＮＡ配列に結合する。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ結合ドメインは、ヒトＧｌｕＡ２遺伝子の１５３７～１５５２に対応するヌクレオチドを含む標的ＲＮＡ配列、又は参照配列ＮＭ＿０００８２６内のヌクレオチド１５３７～１５５２の５０塩基内の核酸配列に結合する。

【００８６】

いくつかの実施形態では、ＲＮＡ結合ドメインは、ＳＭＮ２（例えばヒトＳＭＮ２）遺伝子によってコードされるｍＲＮＡ内の標的ＲＮＡ配列に結合する。いくつかの実施形態で

は、ＲＮＡ結合ドメインは、ヒトＳＭＮ２遺伝子の３１，９９５～３２，０１０に対応するヌクレオチドを含む標的ＲＮＡ配列、又は参照配列ＮＭ－０２２８７６内のヌクレオチド３１，９９５～３２，０１０の５０塩基内の核酸配列に結合する。

【００８７】

本明細書に記載のＲＮＡ結合ドメインは、９０～５００の間のアミノ酸残基、例えば、９０～４５０の間のアミノ酸残基、９０～４００の間のアミノ酸残基、９０～３５０の間のアミノ酸残基、９０～３００の間のアミノ酸残基、１２０～４００の間のアミノ酸残基であってもよい。ＲＮＡ結合ドメインは、ＲＮＡ配列、例えばｍＲＮＡ配列、例えば二次又は三次構造に折り畳まれたｍＲＮＡ配列、例えば二本鎖ＲＮＡ配列に結合してもよい。ＲＮＡ結合ドメインは、ＲＮＡ配列、例えばｍＲＮＡ配列、例えば疾患関連突然変異、例えば点突然変異を含むｍＲＮＡ配列に結合してもよい。

【００８８】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のＰＵＭ　ＲＮＡ結合モチーフは、シトシンに結合する。より詳細には、ＰＵＭ　ＲＮＡ結合モチーフは、例えば米国特許第１０２３３２１８Ｂ２号明細書（本明細書で参照により援用される）の方法により、シトシンに結合するように改変されてもよい。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ結合ドメインは、シトシンに結合する１以上のＰＵＭ　ＲＮＡ結合モチーフを含む。例えば、シトシンに結合するＰＵＭ　ＲＮＡ結合モチーフは、式$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$（式中、

X_1はグルタミン（Ｑ）であり、X_2はヒスチジン（Ｈ）であり；X_3はグリシン（Ｇ）であり；X_4はグリシン（Ｇ）、アラニン（Ａ）、セリン（Ｓ）、トレオニン（Ｔ）及びシステイン（Ｃ）を含む群から選択され；X_5はアルギニン（Ｒ）であり；X_6はフェニルアラニン（Ｆ）であり；X_7はイソロイシン（Ｉ）であり；X_8はアルギニン（Ｒ）であり；X_9はロイシン（Ｌ）であり；X_{10}はリジン（Ｋ）であり；且つX_{11}はロイシン（Ｌ）であるか；又は

X_1はバリン（Ｖ）であり；X_2はフェニルアラニン（Ｆ）であり；X_3はグリシン（Ｇ）であり；X_4はグリシン（Ｇ）、アラニン（Ａ）、セリン（Ｓ）、トレオニン（Ｔ）及びシステイン（Ｃ）を含む群から選択され；X_5はチロシン（Ｙ）であり；X_6はバリン（Ｖ）であり；X_7はイソロイシン（Ｉ）であり；X_8はアルギニン（Ｒ）であり；X_9はリジン（Ｋ）であり；X_{10}はフェニルアラニン（Ｆ）であり；且つX_{11}はフェニルアラニン（Ｆ）であるか；又は

X_1はメチオニン（Ｍ）であり；X_2はチロシン（Ｙ）であり；X_3はグリシン（Ｇ）であり；X_4はグリシン（Ｇ）、アラニン（Ａ）、セリン（Ｓ）、トレオニン（Ｔ）及びシステイン（Ｃ）を含む群から選択され；X_5はアルギニン（Ｒ）であり；X_6はバリン（Ｖ）であり；X_7はイソロイシン（Ｉ）であり；X_8はアルギニン（Ｒ）であり；X_9はリジン（Ｋ）であり；X_{10}はアラニン（Ａ）であり；且つX_{11}はロイシン（Ｌ）であるか；又は

X_1はグルタミン（Ｑ）であり；X_2はアスパラギン（Ｎ）であり；X_3はグリシン（Ｇ）であり；X_4はグリシン（Ｇ）、アラニン（Ａ）、セリン（Ｓ）、トレオニン（Ｔ）及びシステイン（Ｃ）を含む群から選択され；X_5はヒスチジン（Ｈ）であり；X_6はバリン（Ｖ）であり；X_7はバリン（Ｖ）であり；X_8はアルギニン（Ｒ）であり；X_9はリジン（Ｋ）であり；X_{10}はシステイン（Ｃ）であり；且つX_{11}はイソロイシン（Ｉ）であるか；又は

X_1はプロリン（Ｐ）であり；X_2はチロシン（Ｙ）であり；X_3はグリシン（Ｇ）であり；X_4はグリシン（Ｇ）、アラニン（Ａ）、セリン（Ｓ）、トレオニン（Ｔ）及びシステイン（Ｃ）を含む群から選択され；X_5はアルギニン（Ｒ）であり；X_6はバリン（Ｖ）であり；X_7はイソロイシン（Ｉ）であり；X_8はアルギニン（Ｒ）であり；X_9はアルギニン（Ｒ）であり；X_{10}はイソロイシン（Ｉ）であり；且つX_{11}はロイシン（Ｌ）であるか；又は

X_1はグルタミン（Ｑ）であり；X_2はチロシン（Ｙ）であり；X_3はグリシン（Ｇ）で

あり；Ｘ４はグリシン（Ｇ）、アラニン（Ａ）、セリン（Ｓ）、トレオニン（Ｔ）及びシステイン（Ｃ）を含む群から選択され；Ｘ５はチロシン（Ｙ）であり；Ｘ６はバリン（Ｖ）であり；Ｘ７はイソロイシン（Ｉ）であり；Ｘ８はアルギニン（Ｒ）であり；Ｘ９はヒスチジン（Ｈ）であり；Ｘ１０はバリン（Ｖ）であり；且つＸ１１はロイシン（Ｌ）であるか；又は
Ｘ１はリジン（Ｋ）であり；Ｘ２はフェニルアラニン（Ｆ）であり；Ｘ３はアラニン（Ａ）であり；Ｘ４はグリシン（Ｇ）、アラニン（Ａ）、セリン（Ｓ）、トレオニン（Ｔ）及びシステイン（Ｃ）を含む群から選択され；Ｘ５はアスパラギン（Ｎ）であり；Ｘ６はバリン（Ｖ）であり；Ｘ７はバリン（Ｖ）であり；Ｘ８はアルギニン（Ｒ）であり；Ｘ９はリジン（Ｋ）であり；Ｘ１０はシステイン（Ｃ）であり；且つＸ１１はバリン（Ｖ）であるか；又は
Ｘ１はグルタミン（Ｑ）であり；Ｘ２はチロシン（Ｙ）であり；Ｘ３はアラニン（Ａ）であり；Ｘ４はグリシン（Ｇ）、アラニン（Ａ）、セリン（Ｓ）、トレオニン（Ｔ）及びシステイン（Ｃ）を含む群から選択され；Ｘ５はチロシン（Ｙ）であり；Ｘ６はバリン（Ｖ）であり；Ｘ７はバリン（Ｖ）であり；Ｘ８はアルギニン（Ｒ）であり；Ｘ９はリジン（Ｋ）であり；Ｘ１０はメチオニン（Ｍ）であり；且つＸ１１はイソロイシン（Ｉ）である）
を有する配列を含んでもよい。

【００８９】

例えば、シトシンに結合するＲＮＡ結合モチーフは、アミノ酸配列ＱＹＧＧＹＶＩＲＨＶＬ（配列番号１００）を含んでもよい。いくつかの実施形態では、シトシンに結合するＲＮＡ結合モチーフを含むＲＮＡ結合ドメインは、アミノ酸配列：

【化１】

GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIQLKLERATPAERQLVFNEILQ
AAYQLMVDVFGNYVIQKFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGCRVIQKALEFIPS
DQQVINEMVRELDGHVLKCVKDQNGNHVVQKCIECVQPQSLQFIIDAFKGQVFALSTHPY
GCRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGGYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEI
RGNVLVLSQHKFASNVVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQYANYVVQKMIDVAEPG
QRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG (配列番号101)

を含んでもよい。

【００９０】

例示的なＲＮＡ結合ドメイン
例えば複数のＲＮＡ結合モチーフ（例えば、ＰＵＭ－ＨＤに相同であるか又は由来する複数のＰＵＭ　ＲＮＡ結合モチーフ又は配列）を含む例示的なＲＮＡ結合ドメインは、配列番号１３若しくは１５～２１のＲＮＡ結合ドメイン、又は配列番号４若しくは６～１２によってコードされるものを含む。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ結合ドメインは、配列番号１３若しくは１５～２１のＲＮＡ結合ドメインに対して、少なくとも８０、８５、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、若しくは９９％の同一性を有する（又はそれらと比較して、１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０以下の塩基改変を含む）か、又は配列番号４若しくは６～１２のＲＮＡ結合ドメインをコードする配列に対して、少なくとも８０、８５、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、若しくは９９％の同一性を有する核酸配列によってコードされるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ結合ドメインは、第１の例示的なＲＮＡ結合ドメインからの１以上のＲＮＡ結合モチーフ及び第２の例示的なＲＮＡ結合ドメインからの１以上のＲＮＡ結合モチーフを含む。

【００９１】

（Ｇ４Ｓ）３リンカーを伴う二重ＰＵＦ設計（野生型ＰＵＦ標的化配列）
ｍＲＮＡ配列：

【化２】

augggcaggagcaggcuuuuggaagauuuucgaaacaaccgCuaccccaauuuacaacugcgggagauugcugga
cauauaauggaauuuucccaagaccagcauggguccagauucauucagcugaaacuggagcgugccacaccagcug
agcgccagcuugucuucaaugaaauccuccaggcugccuaccaacucaugguggauguguuugguaauuacgucau
ucagaaguucuuugaauuuggcagucuugaacagaagcuggcuuuggcagaacggauucgaggccacguccuguc
auuggcacuacagauguauggcugccguguuauccagaaagcucuugaguuuauuccuucagaccagcagaaugag
augguucgggaacuagauggccaugucuugaaguguguguaaagaucagaauggcaaucacgugguucagaaaugc
auugaaauguguacagccccagucuuugcaauuuaucaucgaugcguuuaagggacagguauuugccuuauccacac
auccuuauggcugccgagugauucagagaauccuggagcacugucucccugaccagacacucccuauuuuagagga
gcuucaccagcacacagagcagcuuguacaggaucaauauggaaauuauguaauccaacauguacuggagcacggu
cguccugaggauaaaagcaaaauuguagcagaaauccgaggcaauguacuuguauugagucagcacaaauuugcaa
gcaauguuguggagaaguguguuacucacgccucacguacggagcgcgcugugcucaucgaugaggugugcacca
ugaacgacgguccccacagugccuuauacaccaugaugaaggaccaguaugccaacuacgugguccagaagaugau
ugacguggcggagccaggccagcggaagaucgucaugcauaagauccggccccacaucgcaacucuucguaaguac
accuauggcaagcacauucuggccaagcuggagaaguacuacaugaagaacgguguugacuuagggGGAGGU
GGCGGAUCGGGAGGUGGCGGAUCGGGAGGUGGCGGAUCGggcaggagcaggcuuuu
ggaagauuuucgaaacaaccgCuaccccaauuuacaacugcgggagauugcuggacauauaauggaauuuucccaa
gaccagcauggguccagauucauucagcugaaacuggagcgugccacaccagcugagcgccagcuugucuucaaug
aaauccuccaggcugccuaccaacucaugguggauguguuugguaauuacgucauucagaaguucuuugaauuug
gcagucuugaacagaagcuggcuuuggcagaacggauucgaggccacguccugucauuggcacuacagauguaug
gcugccguguuauccagaaagcucuugaguuuauuccuucagaccagcagaaugagaugguucgggaacuagaug
gccaugucuugaagugugugaaagaucagaauggcaaucacgugguucagaaaugcauugaauguguacagcccca
gucuuugcaauuuuaucaucgaugcguuuaagggacagguauuugccuuauccacacauccuuauggcugccgagu
gauucagagaauccuggagcacugucucccugaccagacacucccuauuuuagaggagcuucaccagcacacagagc
agcuuguacaggaucaauauggaaauuauguaauccaacauguacuggagcacggucguccugaggauaaaagcaa
aauuguagcagaaauccgaggcaauguacuuguauugagucagcacaaauuugcaagcaauguuguggagaagug
uguuacucacgccucacguacggagcgcgcugugcucaucgaugaggugugcaccaugaacgacgguccccacagu
gccuuauacaccaugaugaaggaccaguaugccaacuacgugguccagaagaugauugacguggcggagccaggcc
agcggaagaucgucaugcauaagauccggccccacaucgcaacucuucguaaguacaccuauggcaagcacauucug
gccaagcuggagaaguacuacaugaagaacgguguugacuuaggguga
(配列番号4)

タンパク質配列：

【化３】

MGRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIQLKLERATPAERQLV
FNEILQAAYQLMVDVFGNYVIQKFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGC
RVIQKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVLKCVKDQNGNHVVQKCIECVQPQSLQFII
DAFKGQVFALSTHPYGCRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGNYV
IQHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFASNVVEKCVTHASRTERAVLIDE
VCTMNDGPHSALYTMMKDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHIATLR
KYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLGGGGGSGGGGSGGGGSGRSRLLEDFRNNR
YPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIQLKLERATPAERQLVFNEILQAAYQLMVD
VFGNYVIQKFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGCRVIQKALEFIPSDQQ
NEMVRELDGHVLKCVKDQNGNHVVQKCIECVQPQSLQFIIDAFKGQVFALSTHP
YGCRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGNYVIQHVLEHGRPEDKS
KIVAEIRGNVLVLSQHKFASNVVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALY
TMMKDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEK
YYMKNGVDLG* (配列番号13)

【００９２】

Ｅ４８８Ｑ突然変異を有するＡＤＡＲ２ＤＤのドメイン（アミノ酸２９９～７０１）

mＲＮＡ配列：
【化４】

AUGCUCCACCUCGACCAAACACCCAGCAGACAGCCUAUCCCUUCCGAAGGA
CUGcagcugcauuuaccgcagguuuuagcugacgcugucucacgccugguccuggguaaguuuggugaucugac
cgacaacuucuccucccccucacgcucgcagaaaagugcuggcuggagucgucaugacaacaggcacagauguuaaa
gaugccaaggugauaaguguuucuacaggaggcaaauguauuaauggugaauacaugagugaucguggccuugca
uuaaaaugacugccaugcagaaauaauaucucggagauccuugcucagauuucuuuauacacaacuugagcuuuacu
uaaaauaacaaagaugaucaaaaaagauccaucuuucagaaaucagagcgaggggguuuaggcugaaggagaaugu
ccaguuucaucuguacaucagcaccucucccuguggagaugccagaaucuucucaccacaugagccaauccuggaa
gaaccagcagauagacacccaaaucguaaagcaagaggacagcuacggaccaaaauagagucuggucaggggacgau
uccagugcgcuccaaugcgagcauccaaacgugggacggggugcugcaaggggagcggcugcucaccauguccugc
agugacaagauugcacgcuggaacgugguggggcauccagggaucacugcucagcauuuucguggagcccauuuac
uucucgagcaucauccugggcagccuuuaccacggggaccaccuuuccagggccauguaccagcggaucuccaaca
uagaggaccugccaccucucuacacccucaacaagccuuugcucaguggcaucagcaaugcagaagcacggcagcca
gggaaggccccccaacuucagugucaacuggacgguaggcgacuccgcuauugaggucaucaacgccacgacuggga
aggaugagcugggccgcgcgucccgccuguguaagcacgcguuguacugucgcuggaugcgugugcacggcaagg
uucccucccacuuacuacgcuccaagauuaccaagcccaacguguaccaugaguccaagcuggcggcaaaggaguac
caggccgccaaggcgcgucuguucacagccuucaucaaggcggggcuggggccuggguggagaagcccaccgagc
aggaccaguucucacucacgCCUUGA
(配列番号5)

タンパク質配列：
【化５】

MLHLDQTPSRQPIPSEGLQLHLPQVLADAVSRLVLGKFGDLTDNFSSPHARRKVL
AGVVMTTGTDVKDAKVISVSTGGKCINGEYMSDRGLALNDCHAEIISRRSLLRFL
YTQLELYLNNKDDQKRSIFQKSERGGFRLKENVQFHLYISTSPCGDARIFSPHEPI
LEEPADRHPNRKARGQLRTKIESGQGTIPVRSNASIQTWDGVLQGERLLTMSCSD
KIARWNVVGIQGSLLSIFVEPIYFSSIILGSLYHGDHLSRAMYQRISNIEDLPPLYTL
NKPLLSGISNAEARQPGKAPNFSVNWTVGDSAIEVINATTGKDELGRASRLCKHA
LYCRWMRVHGKVPSHLLRSKITKPNVYHESKLAAKEYQAAKARLFTAFIKAGL
GAWVEKPTEQDQFSLTP* (配列番号14)

【００９３】
ＡＤＡＲ２ＤＤに融合された二重ＰＵＦ設計の融合ポリペプチド（野生型ＰＵＦ標的化配列）
mＲＮＡ配列：
【化６】

AUGGACUAUAAGGACCACGACGGAGACUACAAGGAUCAUGAUAUUGAUUA
CAAAGACGAUGACGAUAAGAUGGCCCCAAAGAAGAAGCGGAAGGUCGGUA
UCCACGGAGUCCCAGCAGCCCUCCACCUCGACCAAACACCCAGCAGACAGC
CUAUCCCUUCCGAAGGACUGcagcugcauuuaccgcagguuuuagcugacgcugucucacgccugg
uccuggguaaguuuggugaucugaccgacaacuucuccucccccucacgcucgcagaaaagugcuggcuggagucgu
caugacaacaggcacagauguuaaagaugccaaggugauaaguguuucuacaggaggcaaauguauuaauggugaa
uacaugagugaucguggccuugcauuaaaaugacugccaugcagaaauaauaucucggagauccuugcucagauuuc
uuuauacacaacuugagcuuuacuuaaaauaacaaagaugaucaaaaaagauccaucuuucagaaaucagagcgaggg
gguuuaggcugaaggagaauguccaguuucaucuguacaucagcaccucucccuguggagaugccagaaucuuc
ucaccacaugagccaauccuggaagaaccagcagauagacacccaaaucguaaagcaagaggacagcuacggaccaaa
auagagucuggucaggggacgauuccagugcgcuccaaugcgagcauccaaacgugggacggggugcugcaaggg
gagcggcugcucaccauguccugcagugacaagauugcacgcuggaacgugguggggcauccagggaucacugcuca

【化７】

gcauuuucguggagcccauuuacuucucgagcaucauccugggcagccuuuaccacggggaccaccuuuccagggc
cauguaccagcggaucuccaacauagaggaccugccaccucucuacacccucaacaagccuuugcucaguggcauca
gcaaugcagaagcacggcagccagggaaggccccc aacuucagugucaacuggacgguaggcgacuccgcuauuga
ggucaucaacgccacgacugggaaggaugagcugggccgcgcgucccgccuguguaagcacgcguuguacugucgc
uggaugcgugugcacggcaaggu ucccucccacuuacuacgcuccaagauuaccaagcccaacguguaccaugagu
ccaagcuggcggcaaaggaguaccaggccgccaaggcgcgucuguucacagccuucaucaaggcggggcuggggc
cuggguggagaagcccaccgagcaggaccaguucucacucacgCCUGGAGGUGGCGGAUCGGGAG
GUGGCGGAUCGGGAGGUGGCGGAUCGggcaggagcaggcuuuuggaagauuuucgaaacaac
cgCuaccccaauuuacaacugcgggagauugcuggacauauaaauggaauuuuucccaagaccagcauggguccagau
ucauucagcugaaacuggagcgugccacaccagcugagcgccagcuugucuucaaugaaauccuccaggcugccua
ccaacucaugguggauguguuugguaauuacgucauucagaaguucuuugaauuuggcagucuugaacagaagcu
ggcuuuggcagaacggauucgaggccacguccugucauuggcacuacagauguauggcugccguguuauccagaa
agcucuugaguuuauuccuucagaccagcagaaugagaugguucgggaacuagauggccaugucuugaagugugu
gaaagaucagaauggcaaucacgugguucagaaaugcauugaaauguguacagccccagucuuugcaauuuaucauc
gaugcguuuaagggacagguauuugccuuauccacacauccuuauggcugccgagugauucagagaaauccuggag
cacugucucccugaccagacacucccuauuuuagaggagcuucaccagcacacagagcagcuuguacaggaucaaua
uggaaauuauguaauccaacauguacuggagcacggucguccugaggauaaaagcaaaauuguagcagaaauccga
ggcaauguacuuguauugagucagcacaaauuugcaagcaauguuguggagaaguguguuacucacgccucacgu
acggagcgcgcugugcucaucgaugaggugugcaccaugaacgacgguccccacagugccuuauacaccaugauga
aggaccaguaugccaacuacgugguccagaagaugauugacguggcggagccaggccagcggaagaucgucaugca
uaagauccggccccacaucgcaacucuucguaaguacaccuauggcaagcacauucuggccaagcuggagaaguacu
acaugaagaacgguguugacuuagggGGAGGUGGCGGAUCGGGAGGUGGCGGAUCGGGA
GGUGGCGGAUCGggcaggagcaggcuuuuggaagauuuucgaaacaaccgCuaccccaauuuacaacugc
gggagauugcuggacauauaaauggaauuuuccccaagaccagcauggguccagauucauucagcugaaacuggagcg
ugccacaccagcugagcgccagcuugucuucaaugaaauccuccaggcugccuaccaacucaugguggauguguuu
gguaauuacgucauucagaaguucuuugaauuuggcagucuugaacagaagcuggcuuuggcagaacggauucga
ggccacguccugucauuggcacuacagauguauggcugccguguuauccagaaagcucuugaguuuauuccuuca
gaccagcagaaugagaugguucgggaacuagauggccaugucuugaaguguguga aagaucagaauggcaaucacg
ugguucagaaaugcauugaaauguguacagccccagucuuugcaauuuaucaucgaugcguuuaagggacagguau
uugccuuauccacacauccuuauggcugccgagugauucagagaauccuggagcacugucucccugaccagacacu
cccuauuuuagaggagcuucaccagcacacagagcagcuuguacaggaucaauauggaaauuauguaauccaacau
guacuggagcacggucguccugaggauaaaagcaaaauuguagcagaaauccgaggcaauguacuuguauugaguc
agcacaaauuugcaagcaauguuguggagaaguguguuacucacgccucacguacggagcgcgcugugcucaucga
ugaggugugcaccaugaacgacgguccccacagugccuuauacaccaugaugaaggaccaguaugccaacuacgug
guccagaagaugauugacguggcggagccaggccagcggaagaucgucaugcauaagauccggccccacaucgcaa
cucuucguaaguacaccuauggcaagcacauucuggccaagcuggagaaguacuacaugaagaacgguguugacuu
agggAGCGGCGGCAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAG
AAGAAGAAGuga
(配列番号6)

タンパク質配列：

【化８】

MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKMAPKKKRKVGIHGVPAALHLDQTPSRQPI
PSEGLQLHLPQVLADAVSRLVLGKFGDLTDNFSSPHARRKVLAGVVMTTGTDV
KDAKVISVSTGGKCINGEYMSDRGLALNDCHAEIISRRSLLRFLYTQLELYLNNK
DDQKRSIFQKSERGGFRLKENVQFHLYISTSPCGDARIFSPHEPILEEPADRHPNRK
ARGQLRTKIESGQGTIPVRSNASIQTWDGVLQGERLLTMSCSDKIARWNVVGIQG
SLLSIFVEPIYFSSIILGSLYHGDHLSRAMYQRISNIEDLPPLYTLNKPLLSGISNAEA
RQPGKAPNFSVNWTVGDSAIEVINATTGKDELGRASRLCKHALYCRWMRVHGK
VPSHLLRSKITKPNVYHESKLAAKEYQAAKARLFTAFIKAGLGAWVEKPTEQDQ
FSLTPGGGGSGGGGSGGGGSGRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQH
GSRFIQLKLERATPAERQLVFNEILQAAYQLMVDVFGNYVIQKFFEFGSLEQKLA
LAERIRGHVLSLALQMYGCRVIQKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVLKCVKDQNG
NHVVQKCIECVQPQSLQFIIDAFKGQVFALSTHPYGCRVIQRILEHCLPDQTLPILE
ELHQHTEQLVQDQYGNYVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFASNV
VEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQYANYVVQKMIDVAE
PGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLGGGGGSGGGGS
GGGGSGRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIQLKLERATPAE
RQLVFNEILQAAYQLMVDVFGNYVIQKFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQ
MYGCRVIQKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVLKCVKDQNGNHVVQKCIECVQPQ
SLQFIIDAFKGQVFALSTHPYGCRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQY
GNYVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFASNVVEKCVTHASRTERA
VLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHI
ATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLGSGGKRPAATKKAGQAKKKK* (SEQ
(配列番号15)

【００９４】

ヒトＧｌｕＡ２（参照配列ＮＭ＿０００８２６）のヌクレオチド１５３７～１５５２のヌクレオチド配列（ａｕｃａｕｇａｕｃａａｇａａｇｃ（配列番号２２））に対して標的化される（Ｇ４Ｓ）３リンカーを伴う二重ＰＵＦ設計

ｍＲＮＡ配列：

【化９】

augGGCCGCAGCCGCCUUUUGGAAGAUUUUCGAAACAACCGGUACCCCAAU
UUACAACUGCGGGAGAUUGCCGGACAUAUAAUGGAAUUUUCCCAAGACCA
GCAUGGGUCCAGAUUCAUUCGCCUGAAACUGGAGCGUGCCACACCAGCUG
AGCGCCAGCUUGUCUUUAAUGAAAUCCUCCAGGCUGCCUACCAACUCAUGG
UGGAUGUGUUUGGUAGUUACGUCAUUGAGAAGUUCUUUGAAUUUGGCAGU
CUUGAACAGAAGCUGGCUUUGGCAGAACGGAUUCGAGGUCACGUCCUGUC
AUUGGCACUACAGAUGUAUGGCUGCCGUGUUAUCCAGAAAGCUCUUGAGU
UUAUUCCUUCAGACCAGCAGAAUGAGAUGGUUCGGGAACUAGAUGGCCAU
GUCUUGAAGUGUGUGAAAGAUCAGAAUGGCUGUCACGUGGUUCAGAAAUG
CAUUGAAUGUGUACAGCCCCAGUCUUUGCAAUUUAUCAUCGAUGCGUUUA
AGGGCCAGGUAUUUGCCUUAUCCACACAUCCUUAUGGCUCCCGAGUGAUU
GAGAGAAUCCUGGAGCACUGUCUCCCUGACCAGACACUCCCUAUUUUAGA
GGAGCUUCACCAGCACACAGAGCAGCUUGUACAGGAUCAAUAUGGAUGUU
AUGUAAUCCAACAUGUACUGGAGCACGGUCGUCCUGAGGAUAAAAGCAAA
AUUGUAGCAGAAAUCCGAGGCAAUGUACUUGUAUUGAGUCAGCACAAAUU
UGCAUGCAAUGUUGUGCAGAAGUGUGUUACUCACGCCUCACGUACGGAGC
GCGCUGUGCUCAUCGAUGAGGUGUGCACCAUGAACGACGGUCCCCACAGU
GCCUUAUACACCAUGAUGAAGGACCAGUAUGCCAGCUACGUGGUCCGCAA
GAUGAUUGACGUGGCGGAGCCAGGCCAGCGGAAGAUCGUCAUGCAUAAGA
UCCGACCCCACAUCGCAACUCUUCGUAAGUACACCUAUGGCAAGCACAUUC
UGGCCAAGCUGGAGAAGUACUACAUGAAGAACGGUGUUGACUUAGGGGGA
GGUGGCGGAUCGGGAGGUGGCGGAUCGGGAGGUGGCGGAUCGGGCCGCAG
CCGCCUUUUGGAAGAUUUUCGAAACAACCGGUACCCCAAUUUACAACUGC
GGGAGAUUGCCGGACAUAUAAUGGAAUUUUCCCAAGACCAGCAUGGGAAC
AGAUUCAUUCAGCUGAAACUGGAGCGUGCCACACCAGCUGAGCGCCAGCU
UGUCUUUAAUGAAAUCCUCCAGGCUGCCUACCAACUCAUGGUGGAUGUGU
UUGGUUGUUACGUCAUUCAGAAGUUCUUUGAAUUUGGCAGUCUUGAACAG
AAGCUGGCUUUGGCAGAACGGAUUCGAGGUCACGUCCUGUCAUUGGCACU
ACAGAUGUAUGGCUCCCGUGUUAUCGAGAAAGCUCUUGAGUUUAUUCCUU
CAGACCAGCAGAAUGAGAUGGUUCGGGAACUAGAUGGCCAUGUCUUGAAG
UGUGUGAAAGAUCAGAAUGGCAAUCACGUGGUUCAGAAAUGCAUUGAAUG
UGUACAGCCCCAGUCUUUGCAAUUUAUCAUCGAUGCGUUUAAGGGACAGG
UAUUUGCCUUAUCCACACAUCCUUAUGGCUGCCGAGUGAUUCAGAGAAUC
CUGGAGCACUGUCUCCCUGACCAGACACUCCCUAUUUUAGAGGAGCUUCAC
CAGCACACAGAGCAGCUUGUACAGGAUCAAUAUGGAAGUUAUGUAAUCCG
CCAUGUACUGGAGCACGGUCGUCCUGAGGAUAAAAGCAAAAUUGUAGCAG
AAAUCCGAGGCAAUGUACUUGUAUUGAGUCAGCACAAAUUUGCAAACAAU
GUUGUGCAGAAGUGUGUUACUCACGCCUCACGUACGGAGCGCGCUGUGCU
CAUCGAUGAGGUGUGCACCAUGAACGACGGUCCCCACAGUGCCUUAUACAC
CAUGAUGAAGGACCAGUAUGCCUGCUACGUGGUCCAGAAGAUGAUUGACG
UGGCGGAGCCAGGCCAGCGGAAGAUCGUCAUGCAUAAGAUCCGACCCCACA
UCGCAACUCUUCGUAAGUACACCUAUGGCAAGCACAUUCUGGCCAAGCUG
GAGAAGUACUACAUGAAGAACGGUGUUGACUUAGGGuga
(配列番号7)

タンパク質配列：

【化１０】

MGRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIRLKLERATPAERQLV
FNEILQAAYQLMVDVFGSYVIEKFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGCR
VIQKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVLKCVKDQNGCHVVQKCIECVQPQSLQFIID
AFKGQVFALSTHPYGSRVIERILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGCYVIQ
HVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFACNVVQKCVTHASRTERAVLIDEV
CTMNDGPHSALYTMMKDQYASYVVRKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHIATLRKY
TYGKHILAKLEKYYMKNGVDLGGGGGSGGGGSGGGGSGRSRLLEDFRNNRYPN
LQLREIAGHIMEFSQDQHGNRFIQLKLERATPAERQLVFNEILQAAYQLMVDVFG
CYVIQKFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGSRVIEKALEFIPSDQQNEM
VRELDGHVLKCVKDQNGNHVVQKCIECVQPQSLQFIIDAFKGQVFALSTHPYGC
RVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVA
EIRGNVLVLSQHKFANNVVQKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMM
KDQYACYVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYYM
KNGVDLG* (配列番号16)

【００９５】

ＡＤＡＲ２ＤＤ（ヒトＧｌｕＡ２（参照配列ＮＭ＿０００８２６）のヌクレオチド１５３７～１５５２のヌクレオチド配列［ａｕｃａｕｇａｕｃａａｇａａｇｃ］（配列番号２２）に対して標的化されたＰＵＦ）に融合された二重ＰＵＦ設計の融合ポリペプチドｍＲＮＡ配列：

【化１１】

AUGGACUAUAAGGACCACGACGGAGACUACAAGGAUCAUGAUAUUGAUUA
CAAAGACGAUGACGAUAAGAUGGCCCCAAAGAAGAAGCGGAAGGUCGGUA
UCCACGGAGUCCCAGCAGCCCUCCACCUCGACCAAACACCCAGCAGACAGC
CUAUCCCUUCCGAAGGACUGcagcugcauuuaccgcagguuuuagcugacgcugucucacgccugg
uccuggguaaguuuggugaucugaccgacaacuucuccucccccucacgcucgcagaaaagugcuggcuggagucgu
caugacaacaggcacagauguuaaagaugccaaggugauaaguguuucuacaggaggcaaauguauuaauggugaa
uacaugagugaucguggccuugcauuaaaaugacugccaugcagaaauaauaucucggagauccuugcucagauuuc
uuuauacacaacuugagcuuuacuuaaauaacaaagaugaucaaaaaagauccaucuuucagaaaucagagcgaggg
ggguuuaggcugaaggagaauguccaguuucaucuguacaucagcaccucucccuguggagaugccagaaucuuc
ucaccacaugagccaauccuggaagaaccagcagauagacacccaaaucguaaagcaagaggacagcuacggaccaaa
auagagucuggucaggggacgauuccagugcgcuccaaugcgagcauccaaacgugggacggggugcugcaaggg
gagcggcugcucaccauguccugcagugacaagauugcacgcuggaacgugguggggcauccagggaucacugcuca
gcauuuucguggagcccauuuacuucucgagcaucaucccugggcagccuuuaccacggggaccaccuuuccagggc
cauguaccagcggaucuccaacauagaggaccugccaccucucuacacccucaacaagccuuugcucaguggcauca
gcaaugcagaagcacggcagccagggaaggcccccaacuucagugucaacuggacgguaggcgacuccgcuauuga
ggucaucaacgccacgacugggaaggaugagcugggccgcgcgucccgccuguguaagcacgcguuguacugucgc
uggaugcgugugcacggcaaggguucccucccacuuacuacgcuccaagauuaccaagcccaacguguaccaugagu
ccaagcuggcggcaaaggaguaccaggccgccaaggcgcgucuguucacagccuucaucaaggcggggcuggggggc
cuggguggagaagcccaccgagcaggaccaguucucacucacgCCUGGAGGUGGCGGAUCGGGAG
GUGGCGGAUCGGGAGGUGGCGGAUCGGGCCGCAGCCGCCUUUUGGAAGAU
UUUCGAAACAACCGGUACCCCAAUUUACAACUGCGGGAGAUUGCCGGACA
UAUAAUGGAAUUUUCCCAAGACCAGCAUGGGUCCAGAUUCAUUCGCCUGA
AACUGGAGCGUGCCACACCAGCUGAGCGCCAGCUUGUCUUUAAUGAAAUC
CUCCAGGCUGCCUACCAACUCAUGGUGGAUGUGUUUGGUAGUUACGUCAU
UGAGAAGUUCUUUGAAUUUGGCAGUCUUGAACAGAAGCUGGCUUUGGCAG
AACGGAUUCGAGGUCACGUCCUGUCAUUGGCACUACAGAUGUAUGGCUGC
CGUGUUAUCCAGAAAGCUCUUGAGUUUAUUCCUUCAGACCAGCAGAAUGA
GAUGGUUCGGGAACUAGAUGGCCAUGUCUUGAAGUGUGUGAAAGAUCAGA
AUGGCUGUCACGUGGUUCAGAAAUGCAUUGAAUGUGUACAGCCCCAGUCU
UUGCAAUUUAUCAUCGAUGCGUUUAAGGGCCAGGUAUUUGCCUUAUCCAC
ACAUCCUUAUGGCUCCCGAGUGAUUGAGAGAAUCCUGGAGCACUGUCUCC
CUGACCAGACACUCCCUAUUUUAGAGGAGCUUCACCAGCACACAGAGCAGC
UUGUACAGGAUCAAUAUGGAUGUUAUGUAAUCCAACAUGUACUGGAGCAC
GGUCGUCCUGAGGAUAAAAGCAAAAUUGUAGCAGAAAUCCGAGGCAAUGU
ACUUGUAUUGAGUCAGCACAAAUUUGCAUGCAAUGUUGUGCAGAAGUGUG
UUACUCACGCCUCACGUACGGAGCGCGCUGUGCUCAUCGAUGAGGUGUGC
ACCAUGAACGACGGUCCCCACAGUGCCUUAUACACCAUGAUGAAGGACCAG
UAUGCCAGCUACGUGGUCCGCAAGAUGAUUGACGUGGCGGAGCCAGGCCA
GCGGAAGAUCGUCAUGCAUAAGAUCCGACCCCACAUCGCAACUCUUCGUAA
GUACACCUAUGGCAAGCACAUUCUGGCCAAGCUGGAGAAGUACUACAUGA
AGAACGGUGUUGACUUAGGGGGAGGUGGCGGAUCGGGAGGUGGCGGAUCG
GGAGGUGGCGGAUCGGGCCGCAGCCGCCUUUUGGAAGAUUUUCGAAACAA
CCGGUACCCCAAUUUACAACUGCGGGAGAUUGCCGGACAUAUAAUGGAAU
UUUCCCAAGACCAGCAUGGGAACAGAUUCAUUCAGCUGAAACUGGAGCGU
GCCACACCAGCUGAGCGCCAGCUUGUCUUUAAUGAAAUCCUCCAGGCUGCC
UACCAACUCAUGGUGGAUGUGUUUGGUUGUUACGUCAUUCAGAAGUUCUU

【化１２】

UGAAUUUGGCAGUCUUGAACAGAAGCUGGCUUUGGCAGAACGGAUUCGAG
GUCACGUCCUGUCAUUGGCACUACAGAUGUAUGGCUCCCGUGUUAUCGAG
AAAGCUCUUGAGUUUAUUCCUUCAGACCAGCAGAAUGAGAUGGUUCGGGA
ACUAGAUGGCCAUGUCUUGAAGUGUGUGAAAGAUCAGAAUGGCAAUCACG
UGGUUCAGAAAUGCAUUGAAUGUGUACAGCCCCAGUCUUUGCAAUUUAUC
AUCGAUGCGUUUAAGGGACAGGUAUUUGCCUUAUCCACACAUCCUUAUGG
CUGCCGAGUGAUUCAGAGAAUCCUGGAGCACUGUCUCCCUGACCAGACACU
CCCUAUUUUAGAGGAGCUUCACCAGCACACAGAGCAGCUUGUACAGGAUC
AAUAUGGAAGUUAUGUAAUCCGCCAUGUACUGGAGCACGGUCGUCCUGAG
GAUAAAAGCAAAAUUGUAGCAGAAAUCCGAGGCAAUGUACUUGUAUUGAG
UCAGCACAAAUUUGCAAACAAUGUUGUGCAGAAGUGUGUUACUCACGCCU
CACGUACGGAGCGCGCUGUGCUCAUCGAUGAGGUGUGCACCAUGAACGAC
GGUCCCCACAGUGCCUUAUACACCAUGAUGAAGGACCAGUAUGCCUGCUAC
GUGGUCCAGAAGAUGAUUGACGUGGCGGAGCCAGGCCAGCGGAAGAUCGU
CAUGCAUAAGAUCCGACCCCACAUCGCAACUCUUCGUAAGUACACCUAUGG
CAAGCACAUUCUGGCCAAGCUGGAGAAGUACUACAUGAAGAACGGUGUUG
ACUUAGGGAGCGGCGGCAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGG
CCAAGAAGAAGAAGuga
(配列番号8)

タンパク質配列：

【化１３】

MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKMAPKKKRKVGIHGVPAALHLDQTPSRQPI
PSEGLQLHLPQVLADAVSRLVLGKFGDLTDNFSSPHARRKVLAGVVMTTGTDV
KDAKVISVSTGGKCINGEYMSDRGLALNDCHAEIISRRSLLRFLYTQLELYLNNK
DDQKRSIFQKSERGGFRLKENVQFHLYISTSPCGDARIFSPHEPILEEPADRHPNRK
ARGQLRTKIESGQGTIPVRSNASIQTWDGVLQGERLLTMSCSDKIARWNVVGIQG
SLLSIFVEPIYFSSIILGSLYHGDHLSRAMYQRISNIEDLPPLYTLNKPLLSGISNAEA
RQPGKAPNFSVNWTVGDSAIEVINATTGKDELGRASRLCKHALYCRWMRVHGK
VPSHLLRSKITKPNVYHESKLAAKEYQAAKARLFTAFIKAGLGAWVEKPTEQDQ
FSLTPGGGGSGGGGSGGGGSGRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQH
GSRFIRLKLERATPAERQLVFNEILQAAYQLMVDVFGSYVIEKFFEFGSLEQKLAL
AERIRGHVLSLALQMYGCRVIQKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVLKCVKDQNGC
HVVQKCIECVQPQSLQFIIDAFKGQVFALSTHPYGSRVIERILEHCLPDQTLPILEE
LHQHTEQLVQDQYGCYVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFACNVV
QKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQYASYVVRKMIDVAEP
GQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLGGGGGSGGGGSG
GGGSGRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGNRFIQLKLERATPAER
QLVFNEILQAAYQLMVDVFGCYVIQKFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQM
YGSRVIEKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVLKCVKDQNGNHVVQKCIECVQPQSL
QFIIDAFKGQVFALSTHPYGCRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYG
SYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFANNVVQKCVTHASRTERAV
LIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQYACYVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHIA
TLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLGSGGKRPAATKKAGQAKKKK*
(配列番号17)

【００９６】

ヒトＳＭＮ２（参照配列ＮＭ－０２２８７６）のヌクレオチド３１，９９５～３２，０１０のヌクレオチド配列（ＡＣＡＧＧＧＵＵＵＵＡＧＡＣＡＡ（配列番号２４））に対して

標的化される（Ｇ４Ｓ）３リンカーを伴う二重ＰＵＦ設計
ｍＲＮＡ配列：
【化１４】

augGGCCGCAGCCGCCUUUUGGAAGAUUUUCGAAACAACCGGUACCCCAAU
UUACAACUGCGGGAGAUUGCCGGACAUAUAAUGGAAUUUUCCCAAGACCA
GCAUGGGUCCAGAUUCAUUCAGCUGAAACUGGAGCGUGCCACACCAGCUG
AGCGCCAGCUUGUCUUUAAUGAAAUCCUCCAGGCUGCCUACCAACUCAUGG
UGGAUGUGUUUGGUUGUUACGUCAUUCAGAAGUUCUUUGAAUUUGGCAGU
CUUGAACAGAAGCUGGCUUUGGCAGAACGGAUUCGAGGUCACGUCCUGUC
AUUGGCACUACAGAUGUAUGGCUCCCGUGUUAUCCGCAAAGCUCUUGAGU
UUAUUCCUUCAGACCAGCAGAAUGAGAUGGUUCGGGAACUAGAUGGCCAU
GUCUUGAAGUGUGUGAAAGAUCAGAAUGGCUGUCACGUGGUUCAGAAAUG
CAUUGAAUGUGUACAGCCCCAGUCUUUGCAAUUUAUCAUCGAUGCGUUUA
AGGGCCAGGUAUUUGCCUUAUCCACACAUCCUUAUGGCUCCCGAGUGAUU
GAGAGAAUCCUGGAGCACUGUCUCCCUGACCAGACACUCCCUAUUUUAGA
GGAGCUUCACCAGCACACAGAGCAGCUUGUACAGGAUCAAUAUGGAUGUU
AUGUAAUCCAACAUGUACUGGAGCACGGUCGUCCUGAGGAUAAAAGCAAA
AUUGUAGCAGAAAUCCGAGGCAAUGUACUUGUAUUGAGUCAGCACAAAUU
UGCAAACAAUGUUGUGCAGAAGUGUGUUACUCACGCCUCACGUACGGAGC
GCGCUGUGCUCAUCGAUGAGGUGUGCACCAUGAACGACGGUCCCCACAGU
GCCUUAUACACCAUGAUGAAGGACCAGUAUGCCAACUACGUGGUCCAGAA
GAUGAUUGACGUGGCGGAGCCAGGCCAGCGGAAGAUCGUCAUGCAUAAGA
UCCGACCCCACAUCGCAACUCUUCGUAAGUACACCUAUGGCAAGCACAUUC
UGGCCAAGCUGGAGAAGUACUACAUGAAGAACGGUGUUGACUUAGGGGGA
GGUGGCGGAUCGGGAGGUGGCGGAUCGGGAGGUGGCGGAUCGGGCCGCAG
CCGCCUUUUGGAAGAUUUUCGAAACAACCGGUACCCCAAUUUACAACUGC
GGGAGAUUGCCGGACAUAUAAUGGAAUUUUCCCAAGACCAGCAUGGGAAC
AGAUUCAUUCAGCUGAAACUGGAGCGUGCCACACCAGCUGAGCGCCAGCU
UGUCUUUAAUGAAAUCCUCCAGGCUGCCUACCAACUCAUGGUGGAUGUGU
UUGGUAAUUACGUCAUUCAGAAGUUCUUUGAAUUUGGCAGUCUUGAACAG
AAGCUGGCUUUGGCAGAACGGAUUCGAGGUCACGUCCUGUCAUUGGCACU
ACAGAUGUAUGGCUCCCGUGUUAUCGAGAAAGCUCUUGAGUUUAUUCCUU
CAGACCAGCAGAAUGAGAUGGUUCGGGAACUAGAUGGCCAUGUCUUGAAG
UGUGUGAAAGAUCAGAAUGGCAGUCACGUGGUUGAGAAAUGCAUUGAAUG
UGUACAGCCCCAGUCUUUGCAAUUUAUCAUCGAUGCGUUUAAGGGACAGG
UAUUUGCCUUAUCCACACAUCCUUAUGGCUCCCGAGUGAUUGAGAGAAUC
CUGGAGCACUGUCUCCCUGACCAGACACUCCCUAUUUUAGAGGAGCUUCAC
CAGCACACAGAGCAGCUUGUACAGGAUCAAUAUGGAUGUUAUGUAAUCCA
ACAUGUACUGGAGCACGGUCGUCCUGAGGAUAAAAGCAAAAUUGUAGCAG
AAAUCCGAGGCAAUGUACUUGUAUUGAGUCAGCACAAAUUUGCAAGCUAU
GUUGUGCGCAAGUGUGUUACUCACGCCUCACGUACGGAGCGCGCUGUGCU
CAUCGAUGAGGUGUGCACCAUGAACGACGGUCCCCACAGUGCCUUAUACAC
CAUGAUGAAGGACCAGUAUGCCUGCUACGUGGUCCAGAAGAUGAUUGACG
UGGCGGAGCCAGGCCAGCGGAAGAUCGUCAUGCAUAAGAUCCGACCCCACA
UCGCAACUCUUCGUAAGUACACCUAUGGCAAGCACAUUCUGGCCAAGCUG
GAGAAGUACUACAUGAAGAACGGUGUUGACUUAGGGuga
(配列番号9)

タンパク質配列：

【化１５】

MGRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIQLKLERATPAERQLV
FNEILQAAYQLMVDVFGCYVIQKFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGS
RVIRKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVLKCVKDQNGCHVVQKCIECVQPQSLQFII
DAFKGQVFALSTHPYGSRVIERILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGCYVI
QHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFANNVVQKCVTHASRTERAVLIDE
VCTMNDGPHSALYTMMKDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHIATLR
KYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLGGGGGSGGGGSGGGGSGRSRLLEDFRNNR
YPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGNRFIQLKLERATPAERQLVFNEILQAAYQLMVD
VFGNYVIQKFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGSRVIEKALEFIPSDQQN
EMVRELDGHVLKCVKDQNGSHVVEKCIECVQPQSLQFIIDAFKGQVFALSTHPY
GSRVIERILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGCYVIQHVLEHGRPEDKSKI
VAEIRGNVLVLSQHKFASYVVRKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYT
MMKDQYACYVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKY
YMKNGVDLG* (配列番号18)

【００９７】

ＡＤＡＲ２ＤＤ（ヒトＳＭＮ２（参照配列ＮＭ－０２２８７６）のヌクレオチド３１，９９５～３２，０１０のヌクレオチド配列［ＡＣＡＧＧＧＵＵＵＵＡＧＡＣＡＡ］（配列番号２５）に対して標的化されるＰＵＦ）に融合された二重ＰＵＦ設計の融合ポリペプチドｍＲＮＡ配列：

【化１６】

AUGGACUAUAAGGACCACGACGGAGACUACAAGGAUCAUGAUAUUGAUUA
CAAAGACGAUGACGAUAAGAUGGCCCCAAAGAAGAAGCGGAAGGUCGGUA
UCCACGGAGUCCCAGCAGCCCUCCACCUCGACCAAACACCCAGCAGACAGC
CUAUCCCUUCCGAAGGACUGcagcugcauuuaccgcagguuuuagcugacgcugucucacgccugg
uccuggguaaguuuggugaucugaccgacaacuucuccucccccucacgcucgcagaaaagugcuggcuggagucgu
caugacaacaggcacagauguuaaagaugccaaggugauaaguguuucuacaggaggcaaauguauuaauggugaa
uacaugagugaucguggccuugcauuaaaugacugccaugcagaaauaauaucucggagauccuugcucagauuuc
uuuauacacaacuugagcuuuacuuaaauaacaaagaugaucaaaaaagauccaucuuucagaaaucagagcgaggg
ggguuuaggcugaaggagaauguccaguuucaucuguacaucagcaccucucccuguggagaugccagaaucuuc
ucaccacaugagccaauccuggaagaaccagcagauagacacccaaaucguaaagcaagaggacagcuacggaccaaa
auagagucuggucaggggacgauuccagugcgcuccaaugcgagcauccaaacgugggacggggugcugcaaggg
gagcggcugcucaccauguccugcagugacaagauugcacgcuggaacgugguggcauccagggaucacugcuca
gcauuuucguggagcccauuuacuucucgagcaucauccugggcagccuuuaccacggggaccaccuuuccagggc
cauguaccagcggaucuccaacauagaggaccugccaccucucuacacccucaacaagccuuugcucaguggcauca
gcaaugcagaagcacggcagccagggaaggccccaacuucagugucaacuggacgguaggcgacuccgcuauuga
ggucaucaacgccacgacugggaaggaugagcugggccgcgcgucccgccuguguaagcacgcguuguacugucgc
uggaugcgugugcacggcaaggguucccucccacuuacuacgcuccaagauuaccaagcccaacguguaccaugagu
ccaagcuggcggcaaaggaguaccaggccgccaaggcgcgucuguucacagccuucaucaaggcggggcugggggc
cuggguggagaagcccaccgagcaggaccaguucucacucacgCCUGGAGGUGGCGGAUCGGGAG
GUGGCGGAUCGGGAGGUGGCGGAUCGGGCCGCAGCCGCCUUUUGGAAGAU

【化１７】

UUUCGAAACAACCGGUACCCCAAUUUACAACUGCGGGAGAUUGCCGGACA
UAUAAUGGAAUUUUCCCAAGACCAGCAUGGGUCCAGAUUCAUUCAGCUGA
AACUGGAGCGUGCCACACCAGCUGAGCGCCAGCUUGUCUUUAAUGAAAUC
CUCCAGGCUGCCUACCAACUCAUGGUGGAUGUGUUUGGUUGUUACGUCAU
UCAGAAGUUCUUUGAAUUUGGCAGUCUUGAACAGAAGCUGGCUUUGGCAG
AACGGAUUCGAGGUCACGUCCUGUCAUUGGCACUACAGAUGUAUGGCUCC
CGUGUUAUCCGCAAAGCUCUUGAGUUUAUUCCUUCAGACCAGCAGAAUGA
GAUGGUUCGGGAACUAGAUGGCCAUGUCUUGAAGUGUGUGAAAGAUCAGA
AUGGCUGUCACGUGGUUCAGAAAUGCAUUGAAUGUGUACAGCCCCAGUCU
UUGCAAUUUAUCAUCGAUGCGUUUAAGGGCCAGGUAUUUGCCUUAUCCAC
ACAUCCUUAUGGCUCCCGAGUGAUUGAGAGAAUCCUGGAGCACUGUCUCC
CUGACCAGACACUCCCUAUUUUAGAGGAGCUUCACCAGCACACAGAGCAGC
UUGUACAGGAUCAAUAUGGAUGUUAUGUAAUCCAACAUGUACUGGAGCAC
GGUCGUCCUGAGGAUAAAAGCAAAAUUGUAGCAGAAAUCCGAGGCAAUGU
ACUUGUAUUGAGUCAGCACAAAUUUGCAAACAAUGUUGUGCAGAAGUGUG
UUACUCACGCCUCACGUACGGAGCGCGCUGUGCUCAUCGAUGAGGUGUGC
ACCAUGAACGACGGUCCCCACAGUGCCUUAUACACCAUGAUGAAGGACCAG
UAUGCCAACUACGUGGUCCAGAAGAUGAUUGACGUGGCGGAGCCAGGCCA
GCGGAAGAUCGUCAUGCAUAAGAUCCGACCCCACAUCGCAACUCUUCGUAA
GUACACCUAUGGCAAGCACAUUCUGGCCAAGCUGGAGAAGUACUACAUGA
AGAACGGUGUUGACUUAGGGGGAGGUGGCGGAUCGGGAGGUGGCGGAUCG
GGAGGUGGCGGAUCGGGCCGCAGCCGCCUUUUGGAAGAUUUUCGAAACAA
CCGGUACCCCAAUUUACAACUGCGGGAGAUUGCCGGACAUAUAAUGGAAU
UUUCCCAAGACCAGCAUGGGAACAGAUUCAUUCAGCUGAAACUGGAGCGU
GCCACACCAGCUGAGCGCCAGCUUGUCUUUAAUGAAAUCCUCCAGGCUGCC
UACCAACUCAUGGUGGAUGUGUUUGGUAAUUACGUCAUUCAGAAGUUCUU
UGAAUUUGGCAGUCUUGAACAGAAGCUGGCUUUGGCAGAACGGAUUCGAG
GUCACGUCCUGUCAUUGGCACUACAGAUGUAUGGCUCCCGUGUUAUCGAG
AAAGCUCUUGAGUUUAUUCCUUCAGACCAGCAGAAUGAGAUGGUUCGGGA
ACUAGAUGGCCAUGUCUUGAAGUGUGUGAAAGAUCAGAAUGGCAGUCACG
UGGUUGAGAAAUGCAUUGAAUGUGUACAGCCCCAGUCUUUGCAAUUUAUC
AUCGAUGCGUUUAAGGGACAGGUAUUUGCCUUAUCCACACAUCCUUAUGG
CUCCCGAGUGAUUGAGAGAAUCCUGGAGCACUGUCUCCCUGACCAGACACU
CCCUAUUUUAGAGGAGCUUCACCAGCACACAGAGCAGCUUGUACAGGAUC
AAUAUGGAUGUUAUGUAAUCCAACAUGUACUGGAGCACGGUCGUCCUGAG
GAUAAAAGCAAAAUUGUAGCAGAAAUCCGAGGCAAUGUACUUGUAUUGAG
UCAGCACAAAUUUGCAAGCUAUGUUGUGCGCAAGUGUGUUACUCACGCCU
CACGUACGGAGCGCGCUGUGCUCAUCGAUGAGGUGUGCACCAUGAACGAC
GGUCCCCACAGUGCCUUAUACACCAUGAUGAAGGACCAGUAUGCCUGCUAC
GUGGUCCAGAAGAUGAUUGACGUGGCGGAGCCAGGCCAGCGGAAGAUCGU
CAUGCAUAAGAUCCGACCCCACAUCGCAACUCUUCGUAAGUACACCUAUGG
CAAGCACAUUCUGGCCAAGCUGGAGAAGUACUACAUGAAGAACGGUGUUG
ACUUAGGGAGCGGCGGCAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGG
CCAAGAAGAAGAAGuga
(配列番号10)

タンパク質配列：

【化１８】

MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKMAPKKKRKVGIHGVPAALHLDQTPSRQPI
PSEGLQLHLPQVLADAVSRLVLGKFGDLTDNFSSPHARRKVLAGVVMTTGTDV
KDAKVISVSTGGKCINGEYMSDRGLALNDCHAEIISRRSLLRFLYTQLELYLNNK
DDQKRSIFQKSERGGFRLKENVQFHLYISTSPCGDARIFSPHEPILEEPADRHPNRK
ARGQLRTKIESGQGTIPVRSNASIQTWDGVLQGERLLTMSCSDKIARWNVVGIQG
SLLSIFVEPIYFSSIILGSLYHGDHLSRAMYQRISNIEDLPPLYTLNKPLLSGISNAEA
RQPGKAPNFSVNWTVGDSAIEVINATTGKDELGRASRLCKHALYCRWMRVHGK
VPSHLLRSKITKPNVYHESKLAAKEYQAAKARLFTAFIKAGLGAWVEKPTEQDQ
FSLTPGGGGSGGGGSGGGGSGRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQH
GSRFIQLKLERATPAERQLVFNEILQAAYQLMVDVFGCYVIQKFFEFGSLEQKLA
LAERIRGHVLSLALQMYGSRVIRKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVLKCVKDQNG
CHVVQKCIECVQPQSLQFIIDAFKGQVFALSTHPYGSRVIERILEHCLPDQTLPILE
ELHQHTEQLVQDQYGCYVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFANNV
VQKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQYANYVVQKMIDVAE
PGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLGGGGGSGGGGS
GGGGSGRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGNRFIQLKLERATPAE
RQLVFNEILQAAYQLMVDVFGNYVIQKFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQ
MYGSRVIEKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVLKCVKDQNGSHVVEKCIECVQPQS
LQFIIDAFKGQVFALSTHPYGSRVIERILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYG
CYVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFASYVVRKCVTHASRTERAV
LIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQYACYVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHIA
TLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLGSGGKRPAATKKAGQAKKKK*
(配列番号19)

【００９８】

スプライシングモジュレーターｈＴＲＡ２－β１

ｍＲＮＡ配列（下線太字領域［ＢｂｓＩカセット］内のＰＵＦ挿入部位（例えば欠失部位））：

【化１９】

AUGGACUACAAGGACCACGAUGGAGAUUAUAAAGACCACGACAUCGACUA
UAAGGACGACGACGACAAGAUGAGCGACAGCGGCGAGCAGAACUACGGCG
AGAGAGAGUCCAGAAGCGCCAGCAGAUCCGGCUCCGCUCACGGAAGCGGA
AAGAGCGCUAGACAUACCCCCGCCAGAAGCAGAUCCAAGGAGGAUUCUAG
AAGGAGCAGAAGCAAGAGCAGAUCUAGAAGCGAAUCUAGAUCCAGAUCUA
GAAGAAGCUCUAGAAGGCACUACACAAGGUCUAGAAGCAGAUCUAGAAGC
CAUAGAAGAAGCAGAUCCAGAAGCUACUCUAGAGACUACAGAAGGAGACA
CAGCCACUCCCACAGCCCUAUGUCCACAAGAAGAAGGCACGUGGGCAAUAG
GGCCAACCCCGACCCUAACCCCAAGAAGAAGAGGAAGGUGGGC**UCCGGCG**
UCUUCggcGAAGACGGCAGCGGCCCUAAGAAGAAGAGGAAGGUGGGCAGC
AGCAGCAUCACCAAGAGACCCCACACCCCUACCCCCGGCAUCUACAUGGGC
AGACCCACCUACGGCUCCUCUAGAAGGAGAGACUACUACGACAGAGGCUAC
GAUAGAGGCUACGACGAUAGAGAUUAUUACUCUAGAUCCUACAGAGGCGG
CGGAGGAGGCGGAGGCGGAUGGAGAGCUGCCCAAGACAGAGACCAGAUCU
AUAGAAGAAGGAGCCCCAGCCCCUACUAUAGCAGAGGCGGCUACAGAUCU
AGAUCUAGAUCUAGAAGCUAUAGCCCCAGAAGAUACGGCGGCAGCUACCC
UUACGACGUGCCCGACUACGCCUGA
(配列番号11)

タンパク質配列（下線太字領域［ＢｂｓＩカセット］内に挿入されたＰＵＦ）：

【化２０】

MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKMSDSGEQNYGERESRSASRSGSAHGSGKS
ARHTPARSRSKEDSRRSRSKSRSRSESRSRSRRSSRRHYTRSRSRSRSHRRSRSRS
YSRDYRRRHSHSHSPMSTRRRHVGNRANPDPNPKKKRKVG**SGVFGEDGS**GPKK
KRKVGSSSITKRPHTPTPGIYMGRPTYGSSRRRDYYDRGYDRGYDDRDYYSRSY
RGGGGGGGGWRAAQDRDQIYRRRSPSPYYSRGGYRSRSRSRSYSPRRYGGSYPY
DVPDYA* (配列番号20)

【００９９】

二重ＰＵＦ設計によるｈＴＲＡ２－β１の融合ポリペプチドｍＲＮＡ配列：

【化２１】

AUGGACUACAAGGACCACGAUGGAGAUUAUAAAGACCACGACAUCGACUA
UAAGGACGACGACGACAAGAUGAGCGACAGCGGCGAGCAGAACUACGGCG
AGAGAGAGUCCAGAAGCGCCAGCAGAUCCGGCUCCGCUCACGGAAGCGGA
AAGAGCGCUAGACAUACCCCCGCCAGAAGCAGAUCCAAGGAGGAUUCUAG
AAGGAGCAGAAGCAAGAGCAGAUCUAGAAGCGAAUCUAGAUCCAGAUCUA
GAAGAAGCUCUAGAAGGCACUACACAAGGUCUAGAAGCAGAUCUAGAAGC
CAUAGAAGAAGCAGAUCCAGAAGCUACUCUAGAGACUACAGAAGGAGACA
CAGCCACUCCCACAGCCCUAUGUCCACAAGAAGAAGGCACGUGGGCAAUAG
GGCCAACCCCGACCCUAACCCCAAGAAGAAGAGGAAGGUGGGCGGAGGUG
GCGGAUCGggcaggagcaggcuuuuggaagauuuucgaaacaaccgCuaccccaauuuacaacugcgggaga
uugcuggacauauaauggaauuuucccaagaccagcauggguccagauucauucagcugaaacuggagcgugccac
accagcugagcgccagcuugucuucaaugaaauccuccaggcugccuaccaacucaugguggauguguuugguaau
uacgucauucagaaguucuuugaauuuggcagucuugaacagaagcuggcuuuggcagaacggauucgaggccac
guccugucauuggcacuacagauguauggcugccguguuauccagaaagcucuugaguuuauuccuucagaccag
cagaaugagaugguucgggaacuagauggccaugucuugaagugugugaaagaucagaauggcaaucacgugguu
cagaaaugcauugaaugugguacagccccagucuuugcaauuuaucaucgaugcguuuaagggacagguauuugcc
uuauccacacauccuuauggcugccgagugauucagagaauccuggagcacugucucccugaccagacacucccua
uuuuagaggagcuucaccagcacacagagcagcuuguacaggaucaauauggaaauuauguaauccaacauguacu
ggagcacggucguccugaggauaaaagcaaaauuguagcagaaauccgaggcaauguacuuguauugagucagcac
aaauuugcaagcaauguuguggagaaguguguuacucacgccucacguacggagcgcgcugugcucaucgaugag
gugugcaccaugaacgacgguccccacagugccuuauacaccaugaugaaggaccaguaugccaacuacguggucc
agaagaugauugacguggcggagccaggccagcggaagaucgucaugcauaagauccggccccacaucgcaacucu
ucguaaguacaccuauggcaagcacauucuggccaagcuggagaaguacuacaugaagaacgguguugacuuaggg
GGAGGUGGCGGAUCGGGAGGUGGCGGAUCGGGAGGUGGCGGAUCGggcaggag
caggcuuuuggaagauuuucgaaacaaccgCuaccccaauuuacaacugcgggagauugcuggacauauaauggaa
uuuucccaagaccagcauggguccagauucauucagcugaaacuggagcgugccacaccagcugagcgccagcuug
ucuucaaugaaauccuccaggcugccuaccaacucaugguggauguguuugguaauuacgucauucagaaguucu
uugaauuuggcagucuugaacagaagcuggcuuuggcagaacggauucgaggccacguccugucauuggcacuac
agauguauggcugccguguuauccagaaagcucuugaguuuauuccuucagaccagcagaaugagaugguucggg
aacuagauggccaugucuugaagugugugaaagaucagaauggcaaucacgugguucagaaaugcauugaaugug
uacagccccagucuuugcaauuuaucaucgaugcguuuaagggacagguauuugccuuauccacacauccuuaugg
cugccgagugauucagagaauccuggagcacugucucccugaccagacacucccuauuuuagaggagcuucaccag
cacacagagcagcuuguacaggaucaauauggaaauuauguaauccaacauguacuggagcacggucguccugagg
auaaaagcaaaauuguagcagaaauccgaggcaauguacuuguauugagucagcacaaauuugcaagcaauguugu
ggagaaguguguuacucacgccucacguacggagcgcgcugugcucaucgaugaggugugcaccaugaacgacgg
uccccacagugccuuauacaccaugaugaaggaccaguaugccaacuacguggguccagaagaugauugacguggcg
gagccaggccagcggaagaucgucaugcauaagauccggccccacaucgcaacucuucguaaguacaccuauggcaa
gcacauucuggccaagcuggagaaguacuacaugaagaacgguguugacuuaggGAGCGGCGGCGGCCC
UAAGAAGAAGAGGAAGGUGGGCAGCAGCAGCAUCACCAAGAGACCCCACA
CCCCUACCCCCGGCAUCUACAUGGGCAGACCCACCUACGGCUCCUCUAGAA
GGAGAGACUACUACGACAGAGGCUACGAUAGAGGCUACGACGAUAGAGAU
UAUUACUCUAGAUCCUACAGAGGCGGCGGAGGAGGCGGAGGCGGAUGGAG
AGCUGCCCAAGACAGAGACCAGAUCUAUAGAAGAAGGAGCCCCAGCCCCUA
CUAUAGCAGAGGCGGCUACAGAUCUAGAUCUAGAUCUAGAAGCUAUAGCC
CCAGAAGAUACGGCGGCAGCUACCCUUACGACGUGCCCGACUACGCCUGA
(配列番号12)

タンパク質配列：

【化２２】

MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKMSDSGEQNYGERESRSASRSGSAHGSGKS
ARHTPARSRSKEDSRRSRSKSRSRSESRSRSRRSSRRHYTRSRSRSRSHRRSRSRS
YSRDYRRRHSHSHSPMSTRRRHVGNRANPDPNPKKKRKVGGGGGSGRSRLLED
FRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIQLKLERATPAERQLVFNEILQAAY
QLMVDVFGNYVIQKFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGCRVIQKALEFI
PSDQQNEMVRELDGHVLKCVKDQNGNHVVQKCIECVQPQSLQFIIDAFKGQVFA
LSTHPYGCRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGNYVIQHVLEHGRP
EDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFASNVVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPH
SALYTMMKDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGKHILA
KLEKYYMKNGVDLGGGGGSGGGGSGGGGSGRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAG
HIMEFSQDQHGSRFIQLKLERATPAERQLVFNEILQAAYQLMVDVFGNYVIQKFF
EFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGCRVIQKALEFIPSDQQNEMVRELDGH
VLKCVKDQNGNHVVQKCIECVQPQSLQFIIDAFKGQVFALSTHPYGCRVIQRILE
HCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGNYVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVL
VLSQHKFASNVVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQYAN
YVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDL
GSGGGPKKKRKVGSSSITKRPHTPTPGIYMGRPTYGSSRRRDYYDRGYDRGYDD
RDYYSRSYRGGGGGGGGWRAAQDRDQIYRRRSPSPYYSRGGYRSRSRSRSYSPR
RYGGSYPYDVPDYA* (配列番号21)

【０１００】

ＲＮＡエフェクター

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドは、ＲＮＡエフェクターを含む。

【０１０１】

いくつかの実施形態では、ＲＮＡエフェクターは、ヌクレアーゼ（例えば、エンドヌクレアーゼ及び／又はエキソヌクレアーゼ）活性を含まない。いくつかの実施形態では、ＲＮＡエフェクターは、ヌクレアーゼ（例えば、エンドヌクレアーゼ及び／又はエキソヌクレアーゼ）を含まない。いくつかの実施形態では、ＲＮＡエフェクターは、ヌクレアーゼ又はその機能断片を含まない。いくつかの実施形態では、ＲＮＡエフェクターは、リン酸ジエステル結合を破壊しない。

【０１０２】

ＲＮＡエフェクターのさらなる例が、スプライシングモジュレーター、例えばスプライシング因子である。スプライシングモジュレーターは、細胞スプライシング機構の１以上の成分を動員する薬剤を含み得る。スプライシングモジュレーターはまた、細胞スプライシング機構の１以上の成分の（例えば、標的ＲＮＡ配列又は標的ＲＮＡ配列を含むＲＮＡへの）結合を阻害又は遮断する薬剤を包含し得る。いくつかの実施形態では、スプライシング因子は、細胞スプライシング機構の天然に存在する成分又はその機能断片若しくは変異体を含む。いくつかの実施形態では、スプライシング因子は、細胞スプライシング機構の組換え及び／若しくは合成成分又はその機能断片若しくは変異体を含む。いくつかの実施形態では、スプライシングモジュレーター（例えばスプライシング因子）は、Ｓａｍ６８、ｈｎＲＮＰ　Ｇ、ＳＲＳＦ１、ｈｎＲＮＰ　Ａ１／Ａ２、ＴＤＰ－４３、ＳＲｐ－３０ｃ、ＰＳＦ、又はｈｎＲＮＰ　Ｍを含む。

【０１０３】

いくつかの実施形態では、ＲＮＡエフェクターは、例えば下記の通り、ＲＮＡ編集ドメインを含む。

【０１０４】

ＲＮＡ編集ドメイン

本明細書に記載の特定のポリペプチドは、ＲＮＡ編集ドメインを含む。

【０１０５】
いくつかの実施形態では、ＲＮＡ編集ドメインは、ＲＮＡにおける置換を生成する。
【０１０６】
いくつかの実施形態では、ＲＮＡ編集ドメインは、ＲＮＡにおける挿入又は欠失を生成する。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ編集ドメインは、ＲＮＡにおける５未満、４、３、２、又は１のヌクレオチドの挿入を生成する。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ編集ドメインは、ＲＮＡにおける５未満、４、３、２、又は１のヌクレオチドの欠失を生成する。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ編集ドメインは、（ａ）リン酸ジエステル結合を破壊し、ＲＮＡの第１部分とＲＮＡの第２部分とを生成し、（ｂ）任意選択的には第１又は第２部分からヌクレオチドを付加又は除去し、且つ（ｃ）第１部分を第２部分と再結合する。いくつかの実施形態では、このＲＮＡ編集は、ＲＮＡにおける１以上のヌクレオチドの挿入、欠失、又は置換をもたらす。挿入及び欠失を生成するためのＲＮＡ編集は、例えば、Ｂｅｎｎｅ“ＲＮＡ ｅｄｉｔｉｎｇ ｉｎ ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍｅｓ”Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ２２１：１（１９９４）ｐａｇｅｓ９－２３（その全体が参照により本明細書中に援用される）に記載されている。
【０１０７】
いくつかの実施形態では、ＲＮＡ編集ドメインは、標的ＲＮＡ配列、その機能断片若しくは変異体（例えば、シチジン又はアデノシンデアミナーゼの機能断片又は変異体）の１以上の塩基を編集する酵素の触媒ドメインを含む。ＲＮＡ編集ドメインは、ＲＮＡデアミナーゼ、例えば、アデノシンデアミナーゼ、シチジンデアミナーゼの触媒ドメインを含むポリペプチド配列であってもよい。例えば、ＲＮＡ編集ドメインは、ＲＮＡ上で作用するアデノシンデアミナーゼ（ＡＤＡＲ）（例えば、ヒトＡＤＡＲｌ、ヒトＡＤＡＲ２、ヒトＡＤＡＲ３、又はヒトＡＤＡＲ４）；ｔＲＮＡ上で作用するアデノシンデアミナーゼ（ＡＤＡＴ）；ＲＮＡ上で作用するシトシンデアミナーゼ（ＣＤＡＲ）の触媒ドメインである。実施形態では、デアミナーゼの触媒ドメインは、表Ｂ中の同定されたジェンバンク受入番号を有する配列に対して、少なくとも８０％同一（例えば、少なくとも８５％、８７％、９０％、９２％、９５％、９８％、９９％、１００％同一）である配列を含む。実施形態では、デアミナーゼの触媒ドメインは、表Ｂ中に示される触媒コアドメイン配列に対して、少なくとも８０％同一（例えば、少なくとも８５％、８７％、９０％、９２％、９５％、９８％、９９％、１００％同一）である配列を含む。
【０１０８】

【表２】

表 B.シチジン及びアデノシンデアミナーゼの触媒コアドメイン(Maas and Rich, BioEssays 22:790-802(2000) John Wiley & Sons, Inc.)

遺伝子	種	ジェンバンク受入番号	clustal W1.8 による配列アライメント(触媒コアドメイン)
APOBEC1	マウス	U22262	SNHVEVNFLEKFTTERY-FRPTWFLSWSPCGECSR
APOBEC1	ヒト	L26234	TNHVEVNFIKKFTSERD-FHPTWFLSWSPCWECSQ
APOBEC1	ウサギ	OCU10695	TNHVEVNFLEKLTSEGR-LGPTWFLSWSPCWECSM
APOBEC2	ヒト	AF161698	AAHAEEAFFNTILPAFD---PTWYVSSSPCAACAD
AID	マウス	AF132979	GCHVELLFLRYISD-WD-LDPTWFTSWSPCYDCAR
ADAR1	ヒト	HSU10439	DCHAEIISRRGFIRFLY-SELHLYISTAPCGDGAL
ADAR1	アフリカツメガエル(X.laevis)	XLU88065	DCHAEVVSRRGFIRFLY-SQLHLYISTAPCGDGAL
ADAR2	ヒト	HSU76420	DCHAEIISRRSLLRFLY-TQLHLYISTSPCGDARI
ADAR2	ラット	RNU43534	DCHAEIISRRSLLRFLY-AQLHLYISTSPCGDARI
RED2	ラット	RNU74586	DCHAEIVARRAFLHFLY-TQLHLYVSTSPCGDARL
ADAR	線虫(C. elegans)	AF051275	DCHAEILARRGLLRFLY-SEVHLFINTAPCGVARI
ADAR	キイロショウジョウバエ(D. melanogaster)	DMBN35H14a	DSHAEIVSRRCLLKYLY-AQFHLYINTAPCGDARI
dCMP/CMP	ヒト	L12136	VCHAELNAIMN-KNSTDVKGCSMYVALFPCNECAK
dCMP/CMP	酵母	YSCDCD1	CLHAEENALLEAGRDRVGQNATLYCDTCPCLTCSV
CDA	ヒト	L27943	GICAERTAIQKAVSEGY-KDFMQDDFISPCGACRQ
CDA	大腸菌(E. coli)	ECCDD	TVHAEQSAISHAWLSGE-KALAITVNYTPCGHCRQ
hypCDA	線虫(C. elegans)	P30648	VVHAEMNAIIN-KRCTTLHDCTVYVTLFPCNKCAQ
hypCDA	大腸菌(E. coli)	P30134	TAHAEIMALRQGGLVMQ-NYRTLYVTLEPCVMCAG
hypCDA	インフルエンザ菌(H. influenza)	P44931	TAHAEIIALRNGAKNIQ-NYRTLYVTLEPCTMCAG
ADAT1	ヒト	AF125188	DSHAEVIARRSFQRYLL-HQLVFFSSHTPCGDASI
ADAT1	酵母	SCE7297	DCHAEILALRGANTVLL-NRIALYISRLPCGDASM
ADAT1	キイロショウジョウバエ(D. melanogaster)	AF192530	DSHAEVLARRGFLRFLY-QELHFLSTQTPCGDACI
ADAT2	ヒト	AL031320.6a	TRHAEMVAIDQVLDWCRQSGTVLYVTVEPCIMCAA
ADAT2	酵母	SCE242667	VAHAEFMGIDQIKAMLG-SRGTLYVTVEPCIMCAS
ADAT3	ヒト	AC012615.1a	LLHAVMVCVDLVARGQGRGGYDLYVTREPCAMCAM
ADAT3	酵母	SCE242668	IDHSVMVGIRAVGERLR-EGVDVYLTHEPCSMCSM

【０１０９】

いくつかの実施形態では、ＲＮＡ編集ドメインは、一本鎖ＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ）を標的にするデアミナーゼを含む。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ編集ドメインは、二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）を標的にするデアミナーゼを含む。理論によって拘束されることを望まないが、ｍＲＮＡが典型的には一本鎖ＲＮＡであるが、ｍＲＮＡは、ｄｓＲＮＡを標的にするデアミナーゼによって編集されてもよいｄｓＲＮＡを形成する二次構成要素を含んでもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物は、標的ＲＮＡ配列に対する相補性を有し、且つ標的ＲＮＡ配列にハイブリダイズする能力がある核酸（例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド）をさらに含んでもよい。理論によって拘束されることを望まないが、ｄｓＲＮＡは標的ＲＮＡ配列に対する相補性を有する核酸、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチドによって形成され、標的ＲＮＡ配列は、例えばｄｓＲＮＡを形成するｍＲＮＡ二次構造の不在下で、ｄｓＲＮＡを標的にするデアミナーゼによって標的化されることを許容してもよい。いくつかの実施形態では、標的ＲＮＡ配列に対する相補性を有する核酸は、ＤＮＡを含む。いくつかの実施形態では、標的ＲＮＡ配列に対する相補性を有する核酸は、ＲＮＡを含む。いくつかの実施形態では、標的ＲＮＡ配列に対する相補性を有する核酸は、１以上の修飾又は合成ヌクレオチドを含む。

【０１１０】

標的ＲＮＡ配列、例えばＧｌｕＡ２　ｍＲＮＡ又はＳＭＮ２　ｍＲＮＡに対する相補性を有する例示的な核酸（例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド）として、限定はされないが、配列番号２６～２９が挙げられる。

【０１１１】
ＧＬＵＡ２に対する７０ｎｔの標的化配列
ｍＲＮＡ配列（太字／下線で修飾される残基）：
【化２３】

5’-ggcuauggcaucgcaacaccuaaaggauccucauua**A**ggugggguggaauaguauaacaauaugcuaaaug-3’ (配列番号26)

ＳＭＮ２に対する６６ｎｔの標的化配列（太字／下線におけるＰＵＦ標的化）：
【化２４】

5’-UUUUUUAACUUCCUUUAUUUUCCUU**ACAGGGUUUUAGACAA**AAUCAAAAAGAAGGAAGGUGCUCAC-3’ (配列番号27)

ＧＬＵＡ２に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド標的化配列
【化２５】

5’-ACTATTCCACCCACC**G**TAATGAGGATCCTT-3’ (配列番号28)

ＳＭＮ２に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド標的化配列
５’－ＴＣＡＣＴＴＴＣＡＴＡＡＴＧＣＴＧＧ－３’（配列番号２９）
【０１１２】
例示的なＲＮＡ編集ドメインとして、限定はされないが、配列番号１４～２１の、又は配列番号５～１２によってコードされる、ＲＮＡ編集ドメインが挙げられる。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ編集ドメインは、配列番号１４～２１のＲＮＡ編集ドメインに対して、少なくとも８０、８５、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、若しくは９９％の同一性を有する（又はそれらと比較して１、２、３、４、５、６、７、８、９、若しくは１０以下の変更を含む）か、又は配列番号５～１２のＲＮＡ編集ドメインのコード配列に対して、少なくとも８０、８５、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、若しくは９９％の同一性を有する核酸配列によってコードされるアミノ酸配列を含む。
【０１１３】
リンカー
いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドは、１以上のリンカーを含んでもよい。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ結合ドメイン内のＲＮＡ塩基結合モチーフは、リンカーによって連結される。いくつかの実施形態では、ＲＮＢＡ結合ドメイン及びＲＮＡ編集ドメインは、それらの間にリンカーを有する。リンカーは、化学結合、例えば１以上の共有結合又は非共有結合であってもよい。いくつかの実施形態では、結合は共有結合である。いくつかの実施形態では、結合は非共有結合である。いくつかの実施形態では、リンカーは、ペプチドリンカーである。かかるリンカーは、２～３０の間、又はそれ以上のアミノ酸であってもよい。いくつかの実施形態では、例えば二次及び三次構造の分子柔軟性をもたらすため、又はドメイン若しくはモチーフが機能する（例えば標的に結合する）ために分離する一方で、立体障害を最小化することを可能にするため、リンカーが使用される。リンカーは、本明細書に記載のフレキシブル、リジッド、及び／又は切断可能リンカーを含んでもよい。いくつかの実施形態では、柔軟性をもたらすため、リンカーは、少なくとも１つのグリシン、アラニン、及びセリンアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、例えば負に帯電したスルホン酸基、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）基、又はピロリン酸ジエステル基を含む、疎水性リンカーである。いくつかの実施形態では、リンカーは、ある部分（例えばドメイン）を別の部分から選択的に放出するために切断可能であるが、未成熟切断を阻止するために十分に安定である。

【０１１４】
一般に使用されるフレキシブルリンカーは、主にＧｌｙ及びＳｅｒ残基のストレッチからなる配列（「ＧＳ」リンカー）を有する。フレキシブルリンカーは、ある程度の運動又は相互作用を必要とするドメインを連結するのに有用であってもよく、小さい非極性（例えばＧｌｙ）又は極性（例えば、Ｓｅｒ又はＴｈｒ）アミノ酸を含んでもよい。さらに、Ｓｅｒ又はＴｈｒを包含することで、水分子と水素結合を形成することにより、水溶液中でのリンカーの安定性が維持され得、ひいてはリンカーとタンパク質部分との間の好ましくない相互作用が低減され得る。
【０１１５】
リジッドリンカーは、ドメイン間の固定距離を保持し、それらの独立した機能を維持するために有用である。リジッドリンカーはまた、融合における１以上の成分の安定性又は生物活性を保存するのにドメインの空間的分離がクリティカルであるとき、有用であってもよい。リジッドリンカーは、αヘリックス構造又はＰｒｏリッチ配列（ＸＰ）ｎ（ここでＸは、任意のアミノ酸、好ましくはＡｌａ、Ｌｙｓ、又はＧｌｕを指す）を有してもよい。
【０１１６】
切断可能リンカーは、遊離機能ドメインをインビボで放出してもよい。いくつかの実施形態では、リンカーは、還元試薬又はプロテアーゼの存在などの特定条件下で切断されてもよい。インビボでの切断可能リンカーでは、ジスルフィド結合の可逆性が利用されてもよい。一例として、２つのＣｙｓ残基間のトロンビン感受性配列（例えばＰＲＳ）が挙げられる。ＣＰＲＳＣのインビトロでのトロンビン処理により、トロンビン感受性配列の切断がもたらされる一方で、可逆的ジスルフィド結合は、未変化のままである。かかるリンカーは、公知であり、例えば、Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．２０１３．Ｆｕｓｉｏｎ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｌｉｎｋｅｒｓ：Ｐｒｏｐｅｒｔｙ，Ｄｅｓｉｇｎ ａｎｄ Ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌｉｔｙ．Ａｄｖ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ Ｒｅｖ．６５（１０）：１３５７－１３６９に記載されている。融合中でのリンカーのインビボ切断はまた、特定の細胞若しくは組織内、特定条件下、インビボで発現される、又は特定の細胞区画内に制限されるプロテアーゼにより実施されてもよい。多数のプロテアーゼの特異性により、制限された区画内でのリンカーのより緩徐な切断がもたらされる。
【０１１７】
連結分子の例として、疎水性リンカー、例えば負に帯電したスルホン酸基；脂質、例えばポリ（－－ＣＨ$_2$－－）炭化水素鎖、例えば、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）基、その不飽和変異体、そのヒドロキシル化変異体、そのアミド化若しくはそれ以外のＮ含有変異体、非炭素リンカー；炭水化物リンカー；リン酸ジエステルリンカー、又は破壊剤の２以上の成分（例えば２つのポリペプチド）に共有結合する能力がある他の分子が挙げられる。非共有結合リンカーも含まれ、例えばポリペプチドの疎水性領域又はポリペプチドの疎水性延長部、例えばロイシン、イソロイシン、バリン、又はおそらくはさらにアラニン、フェニルアラニン、又はさらにチロシン、メチオニン、グリシン又は他の疎水性残基が豊富に存在する一連の残基を通じてポリペプチドが連結される疎水性脂質小球などが挙げられる。破壊剤の成分が電荷に基づく化学を用いて連結されてもよいことで、破壊剤の正に帯電した成分が負に帯電した別の成分又は核酸に連結される。
【０１１８】
組成物を作成する方法
組換えタンパク質又はポリペプチド（例えば本明細書に記載のポリペプチド）を作成する方法は、当該技術分野ではルーチン的である。一般に、Ｓｍａｌｅｓ＆Ｊａｍｅｓ（Ｅｄｓ．），Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ：Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ），Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ（２００５）；ａｎｄ Ｃｒｏｍｍｅｌｉｎ，Ｓｉｎｄｅｌａｒ＆Ｍｅｉｂｏｈｍ（Ｅｄｓ．），Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ

（２０１３）を参照されたし。

【０１１９】

本開示の組成物のタンパク質又はポリペプチドは、例えば標準の固相技術を利用することにより、生化学的に合成可能である。かかる方法は、排他的固相合成、部分的固相合成法、断片縮合、古典的溶液合成を含む。これらの方法は、ペプチドが比較的短い（即ち１０ｋＤａ）とき、且つ／又はそれが組換え技術により生成できず（例えば核酸配列によってコードされない）、ひいては異なる化学に関わるとき、用いることができる。固相合成手順は、当該技術分野で周知であり、さらに、Ｊｏｈｎ Ｍｏｒｒｏｗ Ｓｔｅｗａｒｔ ａｎｄ Ｊａｎｉｓ Ｄｉｌｌａｈａ Ｙｏｕｎｇ，Ｓｏｌｉｄ Ｐｈａｓｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｅｓ，２ｎｄ Ｅｄ．，Ｐｉｅｒｃｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｍｐａｎｙ，１９８４；及びＣｏｉｎ，Ｉ．，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，２：３２４７－３２５６，２００７によって記載されている。

【０１２０】

より長いポリペプチドの場合、組換え方法が用いられてもよい。組換え治療用ポリペプチドを作成する方法は、当該技術分野ではルーチン的である。一般に、Ｓｍａｌｅｓ＆Ｊａｍｅｓ（Ｅｄｓ．），Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ：Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ），Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ（２００５）；及びＣｒｏｍｍｅｌｉｎ，Ｓｉｎｄｅｌａｒ＆Ｍｅｉｂｏｈｍ（Ｅｄｓ．），Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ（２０１３）を参照されたし。治療用の医薬タンパク質又はポリペプチドを作成するための例示的方法は、哺乳動物細胞における発現を含むが、組換えタンパク質は、昆虫細胞、酵母、細菌、又は他の細胞を適切なプロモーターの制御下で使用しても生成することができる。哺乳動物発現ベクターは、複製起点などの非転写配列、好適なプロモーター、並びに他の５’又は３’隣接非転写配列、並びに５’又は３’非翻訳配列、例えば、必要なリボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナー及びアクセプター部位、及び終結配列を含んでもよい。異種ＤＮＡ配列の発現に必要とされる他の遺伝要素を提供するため、ＳＶ４０ウイルスゲノム由来のＤＮＡ配列、例えばＳＶ４０起点、初期プロモーター、スプライス、及びポリアデニル化部位が使用されてもよい。細菌、真菌、酵母、及び哺乳動物細胞宿主での使用に適したクローニング及び発現ベクターは、Ｇｒｅｅｎ＆Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（Ｆｏｕｒｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ），Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（２０１２）に記載されている。

【０１２１】

大量のポリペプチドが所望される場合、例えば、Ｂｒｉａｎ Ｂｒａｙ，Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖｉｅｗｓ Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ，２：５８７－５９３，２００３；及びＷｅｉｓｓｂａｃｈ＆Ｗｅｉｓｓｂａｃｈ，１９８８，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，ＮＹ，Ｓｅｃｔｉｏｎ ＶＩＩＩ，ｐｐ４２１－４６３によって記載される技術を用いて、それは作成可能である。組換えタンパク質を発現させ、作成するため、様々な哺乳動物細胞培養系を利用することができる。哺乳動物発現系の例として、ＣＨＯ細胞、ＣＯＳ細胞、ＨｅＬＡ及びＢＨＫ細胞株が挙げられる。タンパク質治療薬を作成するための宿主細胞培養方法は、Ｚｈｏｕ ａｎｄ Ｋａｎｔａｒｄｊｉｅｆｆ（Ｅｄｓ．），Ｍａｍｍａｌｉａｎ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅｓ ｆｏｒ Ｂｉｏｌｏｇｉｃｓ Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇ（Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ／Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ），Ｓｐｒｉｎｇｅｒ（２０１４）に記載されている。本明細書に記載の組成物は、組換えタンパク質をコードするベクター、例えばウイルスベクター、例えばレンチウイルスベクターを含んでもよい。いくつかの実施形態では、ベクター、例えばウイルスベクターは、組換えタンパク質をコードする核酸を含んでもよい。ウイルス及びバクテリオファージ発現ベクターは、伝統的な遺伝子操作により作成される。分裂及

び非分裂細胞への遺伝子導入の場合、ウイルス発現ベクターは、レンチウイルス又はアデノウイルス（ＡＡＶ）を含んでもよい。中枢神経系（ＣＮＳ）への遺伝子導入の場合、ＡＡＶベクター又はＭ１３バクテリオファージベクターのいずれかが使用されてもよい。

【０１２２】

タンパク質治療薬の精製については、Ｆｒａｎｋｓ，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ，Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ，ａｎｄ Ｓｔａｂｉｌｉｚａｔｉｏｎ，Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ（２０１３）；及びＣｕｔｌｅｒ，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ），Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ（２０１０）に記載されている。

【０１２３】

本明細書に記載のような核酸又は本明細書に記載のタンパク質をコードする核酸は、ベクター中に組み込まれてもよい。ベクター、例えばレンチウイルスなどのレトロウイルス由来のものは、導入遺伝子の長期の安定な組込み及び娘細胞におけるその増殖を可能にすることから、長期遺伝子導入を達成するために好適なツールである。ベクターの例として、発現ベクター、複製ベクター、プローブ生成ベクター、及び配列決定ベクターが挙げられる。発現ベクターは、ウイルスベクターの形態で細胞に提供されてもよい。ウイルスベクター技術は、当該技術分野で周知であり、種々のウイルス学及び分子生物学のマニュアルに説明されている。ベクターとして有用であるウイルスとして、限定はされないが、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、及びレンチウイルスが挙げられる。一般に、好適なベクターは、少なくとも１つの生物において機能的な複製起点、プロモーター配列、便宜的な制限エンドヌクレアーゼ部位、及び１以上の選択可能マーカーを有する。

【０１２４】

天然又は合成核酸の発現は、典型的には目的の遺伝子をコードする核酸をプロモーターに作動可能に連結し、構築物を発現ベクターに組み込むことにより達成される。ベクターは、真核生物における複製及び組み込みに適し得る。典型的なクローニングベクターは、所望される核酸配列の発現にとって有用な転写及び翻訳ターミネーター、開始配列、並びにプロモーターを有する。

【０１２５】

追加的なプロモーター領域、例えば増強配列は、転写開始の頻度を調節してもよい。典型的には、これらの配列は転写開始部位の３０～１１０ｂｐ上流の領域内に位置するが、近年、いくつかのプロモーターが同様に転写開始部位の下流に機能的要素を有することが示されている。プロモーター領域間のスペーシングはフレキシブルであることが多いことから、プロモーター機能は、領域が互いに対して反転又は移動されるとき、保存される。チミジンキナーゼ（ｔｋ）プロモーターでは、プロモーター領域間のスペーシングは、活性が低下し始める前に５０ｂｐ離れるまで増加し得る。プロモーターに応じて、転写を活性化するため、各領域が協同的又は非依存的に機能し得るように思われる。

【０１２６】

好適なプロモーターの一例が、最初期サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター配列である。このプロモーター配列は、それに作動可能に連結された任意のポリヌクレオチド配列の発現を高レベルで駆動する能力がある強力な構成的プロモーター配列である。いくつかの実施形態では、好適なプロモーターが伸長成長因子－１α（ＥＦ－１α）である。しかし、他の構成的プロモーター配列、例えば限定はされないが、サルウイルス４０（ＳＶ４０）初期プロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルス（ＭＭＴＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）長末端リピート（ＬＴＲ）プロモーター、ＭｏＭｕＬＶプロモーター、トリ白血病ウイルスプロモーター、エプスタイン・バーウイルス最初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、並びにヒト遺伝子プロモーター、例えば限定はされないが、アクチンプロモーター、ミオシンプロモーター、ヘモグロビンプロモーター、及びクレアチンキナーゼプロモーターも使用されてもよい。

【０１２７】
本開示は、任意の特定のプロモーター又はプロモーターのカテゴリー（例えば構成的プロモーター）の使用に限定されるように解釈されるべきではない。例えば、いくつかの実施形態では、誘導性プロモーターが本開示の一部として検討される。いくつかの実施形態では、誘導性プロモーターの使用により、それが作動可能に連結される対象のポリヌクレオチド配列の発現を、かかる発現が所望されるときに活性化する能力がある分子スイッチが提供される。いくつかの実施形態では、誘導性プロモーターの使用により、発現を、所望されないときに不活性化する能力がある分子スイッチが提供される。誘導性プロモーターの例として、限定はされないが、メタロチオニンプロモーター、グルココルチコイドプロモーター、プロゲステロンプロモーター、及びテトラサイクリンプロモーターが挙げられる。

【０１２８】
いくつかの実施形態では、導入されるべき発現ベクターはまた、ウイルスベクターを介してトランスフェクト又は感染されることが探求された細胞の集団から細胞を発現する同定及び選択を促進するため、選択可能マーカー遺伝子若しくはレポーター遺伝子のいずれか又は双方を有し得る。いくつかの態様では、選択可能マーカーは、ＤＮＡの分離片に対して実施され、同時トランスフェクション法において使用されてもよい。宿主細胞内での発現を可能にするため、選択可能マーカーとレポーター遺伝子の双方は、適切な発現調節配列と隣接されてもよい。有用な選択可能マーカーは、例えば抗生物質耐性遺伝子、例えばｎｅｏなどを含んでもよい。

【０１２９】
いくつかの実施形態では、潜在的にトランスフェクトされた細胞を同定するため、且つ／又は発現調節配列の機能性を評価するため、レポーター遺伝子が使用されてもよい。一般に、レポーター遺伝子は、（レポーター遺伝子の）レシピエント供給源中に存在しないか又はそれによって発現され、且ついくつかの容易に検出可能な特性、例えば酵素活性又は可視化可能な蛍光により発現が明らかにされるようなポリペプチドをコードする遺伝子である。レポーター遺伝子の発現は、ＤＮＡがレシピエント細胞に導入されてからの好適な時点でアッセイされる。好適なレポーター遺伝子は、ルシフェラーゼ、βガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、分泌されたアルカリホスファターゼをコードする遺伝子、又は緑色蛍光タンパク質遺伝子（例えば、Ｕｉ－Ｔｅｉ ｅｔａｌ．，２０００ ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔｅｒｓ ４７９：７９－８２）を含んでもよい。好適な発現系は、周知であり、公知の技術を用いて調製されるか又は商業的に得られてもよい。一般に、レポーター遺伝子の最高レベルでの発現を示す最小の５’隣接領域を有する構築物は、プロモーターとして同定される。かかるプロモーター領域は、レポーター遺伝子に連結され、薬剤のプロモーター駆動転写を調節する能力について評価するため、使用されてもよい。

【０１３０】
適用
ＲＮＡ編集組成物（例えば、本明細書に記載のポリペプチド、核酸、ベクター及び宿主細胞）は、例えば、細胞、組織又は対象におけるＲＮＡ中の機能欠失変異（例えば１以上の点突然変異）を修正することにより、治療的ニーズに対処し得る。例えば、遺伝子中の突然変異、例えば１以上の点突然変異に関連する疾患を治療するため、ＲＮＡ編集組成物（例えば、本明細書に記載のポリペプチド、核酸、ベクター及び宿主細胞）が使用されてもよい。

【０１３１】
本明細書に記載の組成物（例えば、本明細書に記載のポリペプチド、核酸、ベクター及び宿主細胞）は、疾患又は状態を治療するため、使用されてもよい。いくつかの実施形態では、疾患は、マイヤー・ゴーリン症候群、ゼッケル症候群４、ジュベール症候群５、レーバー先天黒内障１０；シャルコー・マリー・トゥース病、２型；シャルコー・マリー・トゥース病、２型；アッシャー症候群、２Ｃ型；脊髄小脳失調２８；脊髄小脳失調２８；脊

髄小脳失調２８；ＱＴ延長症候群２；シェーグレン・ラルソン症候群；遺伝性フルクトース尿症；遺伝性フルクトース尿症；神経芽細胞腫；神経芽細胞腫；カルマン症候群１；カルマン症候群１；カルマン症候群１；異調染色性白血球栄養症、レット症候群、筋萎縮性側索硬化症タイプ１０、リー・フラウメニ症候群、嚢胞性線維症、ハーラー症候群、α－１－アンチトリプシン（Ａ１ＡＴ）欠乏、パーキンソン病、アルツハイマー病、白化現象、筋萎縮性側索硬化症、喘息、ｂ－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）、遠位脊髄性筋萎縮（ＤＳＭＡ）、デュシェンヌ型／ベッカー型筋ジストロフィー、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、家族性腺腫性ポリポーシス、ガラクトース血症、ゴーシェ病、グルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼ、血友病、遺伝性ヘマトクロマトーシス（Ｈｅｒｅｄｉｔａｒｙ Ｈｅｍａｔｏｃｈｒｏｍａｔｏｓｉｓ）、ハンター症候群、ハンチントン病、炎症性腸疾患（ＩＢＤ）、遺伝性多凝集反応症候群、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、筋ジストロフィー、筋緊張性ジストロフィーＩ型及びＩＩ型、神経線維腫症、ニーマン・ピック病Ａ型、Ｂ型及びＣ型、ＮＹ－ｅｓｏ１関連がん、ポイツ・ジェガース症候群、フェニルケトン尿症、ポンペ病、原発性毛様体病（Ｐｒｉｍａｒｙ Ｃｉｌｉａｒｙ Ｄｉｓｅａｓｅ）、プロトロンビン変異関連障害、例えばプロトロンビンＧ２０２１０Ａ突然変異、肺高血圧症、網膜色素変性症、サンドホフ病、重症複合免疫不全症候群（ＳＣＩＤ）、鎌状赤血球貧血、脊髄性筋萎縮、シュタルガルト病、テイ・サックス病、アッシャー症候群、Ｘ連鎖性免疫不全、スタージ・ウェーバー症候群、及びがんから選択される。いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書中に列挙される疾患又は障害から選択から選択される疾患又は障害（例えば遺伝性障害）を治療又は予防するための薬剤の製造における本明細書に記載の組成物（例えば、本明細書に記載のポリペプチド、核酸、ベクター、又は宿主細胞）の使用を対象とする。

【０１３２】

製剤化、投与及び送達

様々な実施形態では、本開示は、薬学的に許容できる賦形剤とともに製剤化された、本明細書に記載のポリペプチド、核酸、ベクター及び宿主細胞の医薬組成物を提供する。薬学的に許容できる賦形剤は、一般に安全、非毒性で望ましい医薬組成物を調製するのに有用な賦形剤を含み、且つ動物使用とともにヒト医薬品使用にとって許容できる賦形剤を含む。かかる賦形剤は、水性であっても又は非水性であってもよい。適切な賦形剤は、組成物の、例えば、安定性、溶解度、緩衝化に寄与してもよい。タンパク質治療薬の製剤化は、Ｍｅｙｅｒ（Ｅｄ．），Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｄｒｕｇ Ｐｒｏｄｕｃｔｓ：Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈｅｓ ｔｏ ｆｏｒｍｕｌａｔｉｏｎ ｉｎ ｔｈｅ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇ，ａｎｄ ｔｈｅ Ｃｌｉｎｉｃ，Ｗｏｏｄｈｅａｄ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｓｅｒｉｅｓ（２０１２）に記載されている。

【０１３３】

本開示に従う医薬組成物は、治療有効量で送達されてもよい。正確な治療有効量は、対象に対して所望される治療効果を有する、組成物、例えば本明細書に記載のポリペプチド、核酸、ベクター及び宿主細胞の量である。この量は、限定はされないが、（活性、薬物動態、薬力学、及び生物学的利用率を含む）治療化合物の特徴、（年齢、性別、疾患タイプ及びステージ、全身健康状態、所与の用量に対する応答性、及び処方のタイプを含む）対象の生理的状態、製剤中の薬学的に許容できる１以上の担体の性質、及び／又は投与経路を含む種々の要素に応じて変化することになる。対象への投与様式は、全身、非経口、経腸又は局所を含んでもよい。

【０１３４】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリペプチド又は核酸組成物は、ベクターを用いて、細胞、組織又は対象に送達されてもよい。ベクターは、例えばプラスミド又はウイルスであってもよい。いくつかの実施形態では、送達は、インビボ、インビトロ、エク

スビボ、又はインサイチュである。いくつかの実施形態では、ウイルスは、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、レンチウイルス、アデノウイルスである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリペプチド又は核酸組成物は、ウイルス様粒子又はビロソームとともに細胞に送達される。いくつかの実施形態では、送達では、２以上のウイルス、ウイルス様粒子又はビロソームが使用される。

【０１３５】

リポソーム製剤

本明細書に記載のポリペプチド、医薬組成物、核酸、ベクター、組成物、又は宿主細胞の送達用の媒体又は担体として好適な例示的製剤は、マイクロエマルション、単層、ミセル、二重層、小胞又は脂質粒子を含む。これらの製剤は、本明細書に記載のポリペプチド、医薬組成物、核酸、ベクター、組成物、又は宿主細胞における生体適合性及び生分解性送達系を提供する。

【０１３６】

リポソームは、球状の１以上の二重層内に配置された両親媒性脂質からなる、脂質粒子の一例を提供する。リポソームは、親油性材料及び水性内部から形成された膜を有する単層又は多重層小胞である。水性部分は、送達される対象の、本明細書に記載のポリペプチド、医薬組成物、核酸、ベクター、組成物、又は宿主細胞を含む。カチオン性リポソームは、細胞壁に融合可能であるという利点を有する。非カチオン性リポソームは、細胞壁と効率的には融合可能でないが、インビボでマクロファージにより取り込まれる。

【０１３７】

リポソームは、小さい直径；生体適合性及び生分解性；広範囲の内容物、例えば水及び脂質可溶性薬剤を組み込む能力を含む、いくつかの利点を有する。リポソームは、それらの内部区画内のカプセル封入剤を代謝及び分解から保護し得る（Ｒｏｓｏｆｆ，ｉｎ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ，Ｌｉｅｂｅｒｍａｎ，Ｒｉｅｇｅｒ ａｎｄ Ｂａｎｋｅｒ（Ｅｄｓ．），１９８８，Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．，ｖｏｌｕｍｅ １，ｐ．２４５）。リポソーム製剤の調製における重要な検討対象が、リポソームの脂質表面電荷、小胞サイズ及び水性体積である。

【０１３８】

リポソームは、２つの広範なクラスに属する。カチオン性リポソームは、安定な複合体を形成するため、負に帯電したＤＮＡ分子と相互作用する正に帯電したリポソームである。正に帯電したＤＮＡ／リポソーム複合体は、負に帯電した細胞表面に結合し、エンドソーム内に内部移行される。エンドソーム内の酸性ｐＨに起因し、リポソームは、破裂され、それらの内容物を細胞質内に放出する（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．，１９８７，１４７，９８０－９８５）。

【０１３９】

ｐＨ感受性であるか又は負に帯電したリポソームは、ＤＮＡを有する複合体ではなくＤＮＡを捕捉する。ＤＮＡと脂質の双方が同様に帯電されるため、複合体形成ではなく反発が生じる。にもかかわらず、一部のＤＮＡがこれらのリポソームの水性内部内に捕捉される。チミジンキナーゼ遺伝子をコードするＤＮＡを培養下の細胞単層に送達するため、ｐＨ感受性リポソームが使用されている。外因性遺伝子の発現が標的細胞内で検出された（Ｚｈｏｕ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ，１９９２，１９，２６９－２７４）。

【０１４０】

リポソーム組成物の１つの主要タイプは、天然由来ホスファチジルコリン以外のリン脂質を含む。例えば、中性リポソーム組成物は、ジミリストイルホスファチジルコリン（ＤＭＰＣ）又はジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）から形成され得る。アニオン性リポソーム組成物は、一般にジミリストイルホスファチジルグリセロールから形成される一方で、アニオン性膜融合リポソームは、主にジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）から形成される。リポソーム組成物の別のタイプは、ホスファチジ

ルコリン（ＰＣ）、例えば、大豆ＰＣ、及び卵ＰＣなどから形成される。別のタイプは、リン脂質及び／又はホスファチジルコリン及び／又はコレステロールの混合物から形成される。

【０１４１】

薬剤の皮膚への送達に適した例示的な非イオン性リポソーム系は、非イオン性界面活性剤及びコレステロールを含む系を含む。シクロスポリンＡをマウス皮膚の真皮内に送達するため、Ｎｏｖａｓｏｍｅ（商標）Ｉ（ジラウリン酸グリセリル／コレステロール／ポリオキシエチレン－１０－ステアリルエーテル）及びＮｏｖａｓｏｍｅ（商標）ＩＩ（ジステアリン酸グリセリル／コレステロール／ポリオキシエチレン－１０－ステアリルエーテル）を含む非イオン性リポソーム製剤が使用された。結果によると、かかる非イオン性リポソーム系が、シクロスポリンＡの皮膚の異なる層への沈着を促進する場合に有効であることが示された（Ｈｕ　ｅｔ　ａｌ．Ｓ．Ｔ．Ｐ．Ｐｈａｒｍａ．Ｓｃｉ．，１９９４，４，６，４６６）。

【０１４２】

リポソームは、１以上の特定化された脂質であって、リポソームに組み込まれるとき、かかる特定化された脂質が欠如しているリポソームと比べて増強された循環寿命をもたらすものを含むように、立体的に安定化され得る。立体的に安定化されたリポソームの例が、リポソームの小胞形成脂質部分の一部が、（Ａ）１以上の糖脂質、例えばモノシアロガングリオシドＧＭ１を含むか、又は（Ｂ）１以上の親水性ポリマー、例えばポリエチレングリコール（ＰＥＧ）部分で誘導体化される場合のものである（Ａｌｌｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔｅｒｓ，１９８７，２２３，４２；Ｗｕ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，１９９３，５３，３７６５）。長期循環、例えばステルスリポソームも利用することができる。かかるリポソームは、一般に米国特許第５，０１３，５５６号明細書に記載されている。本明細書で開示される化合物は、例えば、米国特許第３，８４５，７７０号明細書；米国特許第３，９１６，８９９号明細書；米国特許第３，５３６，８０９号明細書；米国特許第３，５９８，１２３号明細書；及び米国特許第４，００８，７１９号明細書に記載の徐放手段及び／又は送達装置によっても投与することができる。

【０１４３】

１以上の糖脂質を含む様々なリポソームは、当該技術分野で公知である。Ｐａｐａｈａｄｊｏｐｏｕｌｏｓ　ｅｔ　ａｌ．（Ａｎｎ．Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，１９８７，５０７，６４）は、モノシアロガングリオシドＧＭ１、硫酸ガラクトセレブロシド及びホスファチジルイノシトールがリポソームの血液半減期を改善する能力を報告した。これらの知見は、Ｇａｂｉｚｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．，１９８８，８５，６９４９）により詳説された。米国特許第４，８３７，０２８号明細書及び国際公開第８８／０４９２４号パンフレット（双方ともにＡｌｌｅｎらに交付）は、（１）スフィンゴミエリン及び（２）ガングリオシドＧＭ１又はガラクトセレブロシド硫酸エステルを含むリポソームを開示している。米国特許第５，５４３，１５２号明細書（Ｗｅｂｂら）は、スフィンゴミエリンを含むリポソームを開示している。１，２－ｓｎ－ジミリストイルホスファチジルコリンを含むリポソームは、国際公開第９７／１３４９９号パンフレット（Ｌｉｍら）で開示されている。

【０１４４】

脂質を含むリポソームは、１以上の親水性ポリマーで誘導体化され得、その調製方法は、当該技術分野で公知である。Ｓｕｎａｍｏｔｏ　ｅｔ　ａｌ．（Ｂｕｌｌ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．Ｊｐｎ．，１９８０，５３，２７７８）では、ＰＥＧ部分を含有する非イオン性清浄剤２Ｃ１２１５Ｇを含むリポソームが記載された。Ｉｌｌｕｍ　ｅｔ　ａｌ．（ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔ．，１９８４，１６７，７９）では、ポリスチレン粒子の高分子グリコールでの親水性コーティングにより、有意に増加した血液半減期が得られることが記載された。ポリアルキレングリコール（例えばＰＥＧ）のカルボキシ基の結合により修飾された合成リン脂質は、Ｓｅａｒｓによって記載されている（米国特許第４，４２６，３３０号明

細書及び米国特許第４，５３４，８９９号明細書）。Ｋｌｉｂａｎｏｖ ｅｔ ａｌ．（ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．，１９９０，２６８，２３５）では、ＰＥＧ又はステアリン酸ＰＥＧで誘導体化されたホスファチジルエタノールアミン（ＰＥ）を含むリポソームが血液循環半減期における有意な増加を有することを示す実験が記載された。Ｂｌｕｍｅ ｅｔ ａｌ．（Ｂｉｏｃｈｉｍｉｃａ ｅｔ Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａ Ａｃｔａ，１９９０，１０２９，９１）では、かかる観察結果が、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＳＰＥ）及びＰＥＧの組み合わせから形成された、他のＰＥＧで誘導体化されたリン脂質、例えばＤＳＰＥ－ＰＥＧに拡張された。外部表面上に共有結合的に結合されたＰＥＧ部分を有するリポソームは、欧州特許第０４４５１３１Ｂ１号明細書及び国際公開第９０／０４３８４号パンフレット（Ｆｉｓｈｅｒに交付）に記載されている。ＰＥＧで誘導体化されたＰＥを１～２０モル百分率で含有するリポソーム組成物、及びその使用方法は、Ｗｏｏｄｌｅら（米国特許第５，０１３，５５６号明細書及び米国特許第５，３５６，６３３号明細書）及びＭａｒｔｉｎら（米国特許第５，２１３，８０４号明細書及び欧州特許第０４９６８１３Ｂ１号明細書）によって記載されている。いくつかの他の脂質－ポリマーコンジュゲートを含むリポソームは、国際公開第９１／０５５４５号パンフレット及び米国特許第５，２２５，２１２号明細書（双方ともＭａｒｔｉｎらに交付）並びに国際公開第９４／２００７３号パンフレット（Ｚａｌｉｐｓｋｙら）に開示されている。ＰＥＧ修飾セラミド脂質を含むリポソームは、国際公開第９６／１０３９１号パンフレット（Ｃｈｏｉら）に記載されている。米国特許第５，５４０，９３５号明細書（Ｍｉｙａｚａｋｉら）及び米国特許第５，５５６，９４８号明細書（Ｔａｇａｗａら）は、表面上の機能的部分でさらに誘導体化され得るＰＥＧ含有リポソームについて記載している。

【０１４５】

核酸を含むいくつかのリポソームは、当該技術分野で公知である。Ｔｈｉｅｒｒｙらに交付された国際公開第９６／４００６２号パンフレットは、リポソーム中に高分子量の核酸をカプセル封入するための方法を開示している。Ｔａｇａｗａらに交付された米国特許第５，２６４，２２１号明細書は、タンパク質結合リポソームについて開示している。Ｒａｈｍａｎらに交付された米国特許第５，６６５，７１０号明細書は、リポソーム中にオリゴデオキシヌクレオチドをカプセル封入する特定の方法を記載している。

【０１４６】

界面活性剤では、乳剤（マイクロエマルションを含む）及びリポソームなどの製剤に広範な用途が見出される。多くの異なるタイプの界面活性剤（天然と合成の双方）の特性を分類し、ランク付けする最も一般的な方法は、親水性／親油性バランス（ＨＬＢ）の使用による。親水性基（「頭部」としても公知）の性質は、製剤中で使用される異なる界面活性剤をカテゴリー化するのに最も有用な手段を提供する。製剤、配合物及び乳剤中での界面活性剤の使用についてはレビューされている（Ｒｉｅｇｅｒ，ｉｎ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ，Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．，１９８８，ｐ．２８５）。

【０１４７】

送達媒体の別の例として、ＳＬＮの特徴を保持し、薬剤安定性及び充填能力を改善し、且つ薬剤漏出を阻止する、修飾された固体脂質ナノ粒子（ＳＬＮ）である、ナノ構造脂質担体（ＮＬＣ）が挙げられる。ポリマーナノ粒子（ＰＮＰ）は、薬物送達の重要な成分である。これらのナノ粒子は、特異的標的への薬物送達を有効に誘導し、薬剤安定性及び薬物制御放出を改善し得る。リポソームとポリマーとを組み合わせた脂質－ポリマーナノ粒子（ＰＬＮ）も利用されてもよい。これらのナノ粒子は、ＰＮＰ及びリポソームの相補的利点を有する。ＰＬＮは、コア－シェル構造から構成され；ポリマーコアは安定な構造をもたらし、且つリン脂質シェルは優れた生体適合性をもたらす。レビューとして、例えば、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．２０１７，Ｎａｎｏｍａｔｅｒｉａｌｓ ７，１２２；ｄｏｉ：１０．３３９０／ｎａｎｏ７０６０１２２を参照されたし。

【０１４８】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の核酸、ベクター、又は組成物は、例えば核酸

－脂質粒子を形成するため、脂質製剤中にカプセル封入され得る。核酸脂質粒子は、典型的にはカチオン性脂質、非カチオン性脂質、及び粒子（例えばＰＥＧ－脂質コンジュゲート）の凝集を阻止する脂質を含有する。これらの粒子は、静脈内（ｉ．ｖ．）注射後の循環寿命延長を示し、遠位部位（例えば、投与部位から物理的に離れた部位）で蓄積することから、全身適用にとって有用である。ＰＣＴ公開の国際公開第００／０３６８３号パンフレットに示されるようなカプセル封入された縮合剤－核酸複合体を含む粒子。該粒子は、典型的には、約５０ｎｍ～約１５０ｎｍ、より典型的には約６０ｎｍ～約１３０ｎｍ、より典型的には約７０ｎｍ～約１１０ｎｍ、最も典型的には約７０ｎｍ～約９０ｎｍの平均直径を有し、実質的に非毒性である。さらに、核酸は、本発明の核酸－脂質粒子中に存在するとき、水溶液中でヌクレアーゼによる分解に抵抗性がある。核酸－脂質粒子及びそれらの調製方法は、例えば、米国特許第５，９７６，５６７号明細書；米国特許第５，９８１，５０１号明細書；米国特許第６，５３４，４８４号明細書；米国特許第６，５８６，４１０号明細書；米国特許第６，８１５，４３２号明細書；及びＰＣＴ公開の国際公開第９６／４０９６４号パンフレットに開示されている。

【０１４９】

一実施形態では、脂質対薬物比（質量／質量比）（例えば、脂質対ｄｓＲＮＡ比）は、約１：１～約５０：１、約１：１～約２５：１、約３：１～約１５：１、約４：１～約１０：１、約５：１～約９：１、又は約６：１～約９：１の範囲内となる。

【０１５０】

カチオン性脂質は、例えば、Ｎ，Ｎ－ジオレイル－Ｎ，Ｎ－ジメチル塩化アンモニウム（ＤＯＤＡＣ）、Ｎ，Ｎ－ジステアリル－Ｎ，Ｎ－ジメチル臭化アンモニウム（ＤＤＡＢ）、Ｎ－（Ｉ－（２，３－ジオレオイルオキシ）プロピル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチル塩化アンモニウム（ＤＯＴＡＰ）、Ｎ－（Ｉ－（２，３－ジオレイルオキシ）プロピル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチル塩化アンモニウム（ＤＯＴＭＡ）、Ｎ，Ｎ－ジメチル－２，３－ジオレイルオキシ）プロピルアミン（ＤＯＤＭＡ）、１，２－ジリノレイオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｉｎＤＭＡ）、ｌ，２－ジリノレニルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｅｎＤＭＡ）、１，２－ジリノレイルカルバモイルオキシ－３－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｉｎ－Ｃ－ＤＡＰ）、１，２－ジリノレイオキシ－３－（ジメチルアミノ）アセトキシプロパン（ＤＬｉｎ－ＤＡＣ）、１，２－ジリノレイオキシ－３－モルホリノプロパン（ＤＬｉｎ－ＭＡ）、１，２－ジリノレオイル－３－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｉｎＤＡＰ）、１，２－ジリノレイルチオ－３－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｉｎ－Ｓ－ＤＭＡ）、１－リノレオイル－２－リノレイルオキシ－３－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｉｎ－２－ＤＭＡＰ）、１，２－ジリノレイルオキシ－３－トリメチルアミノプロパン塩化物塩（ＤＬｉｎ－ＴＭＡ．Ｃｌ）、１，２－ジリノレオイル－３－トリメチルアミノプロパン塩化物塩（ＤＬｉｎ－ＴＡＰ．Ｃｌ）、１，２－ジリノレイルオキシ－３－（Ｎ－メチルピペラジノ）プロパン（ＤＬｉｎ－ＭＰＺ）、又は３－（Ｎ，Ｎ－ジリノレイルアミノ）－１，２－プロパンジオール（ＤＬｉｎＡＰ）、３－（Ｎ，Ｎ－ジオレイルアミノ）－１，２－プロパンジオ（ＤＯＡＰ）、１，２－ジリノレイルオキソ－３－（２－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノ）エトキシプロパン（ＤＬｉｎ－ＥＧ－ＤＭＡ）、ｌ，２－ジリノレニルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｉｎＤＭＡ）、２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノメチル－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ）若しくはその類似体、（３ａＲ，５ｓ，６ａＳ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－２，２－ジ（（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエニル）テトラヒドロ－３ａＨ－シクロペンタ［ｄ］［１，３］ジオキソール－５－アミン、（６Ｚ，９Ｚ，２８Ｚ，３１Ｚ）－ヘプタトリアコンタ－６，９，２８，３１－テトラエン－１９－イル４－（ジメチルアミノ）ブタン酸（ＭＣ３）、１，１’－（２－（４－（２－（（２－（ビス（２－ヒドロキシドデシル）アミノ）エチル）（２－ヒドロキシドデシル）アミノ）エチル）ピペラジン－１－イル）エチルアザンジイル）ジドデカン－２－オール（Ｔｅｃｈ　Ｇ１）、又はそれらの混合物であってもよい。カチオン性脂質は、該粒子中に存在する全脂質の約２０モル％～約５０モル％又は約４０モル％を含んでもよい。

【０１５１】
一実施形態では、脂質粒子は、４０％の２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノエチル－［１，３］－ジオキソラン：１０％のＤＳＰＣ：４０％のコレステロール：１０％のＰＥＧ－Ｃ－ＤＯＭＧ（モル百分率）を含むとともに、６３．０±２０ｎｍの粒径及び０．０２７のｓｉＲＮＡ／脂質比を有する。
【０１５２】
非カチオン性脂質は、アニオン性脂質又は中性脂質、例えば限定はされないが、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルコリン（ＤＯＰＣ）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルグリセロール（ＤＯＰＧ）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（ＤＰＰＧ）、ジオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＰＯＰＥ）、ジオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ＤＯＰＥ－ｍａｌ）、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＰＰＥ）、ジミリストイルホスホエタノールアミン（ＤＭＰＥ）、ジステアロイル－ホスファチジル－エタノールアミン（ＤＳＰＥ）、１６－Ｏ－モノメチルＰＥ、１６－Ｏ－ジメチルＰＥ、１８－１－トランスＰＥ、１－ステアロイル－２－オレオイル－ホスファチジエタノールアミン（ＳＯＰＥ）、コレステロール、又はそれらの混合物であってもよい。非カチオン性脂質は、コレステロールが含まれる場合、該粒子中に存在する全脂質の約５モル％～約９０モル％、約１０モル％、又は約５８モル％であってもよい。
【０１５３】
粒子の凝集を阻害するコンジュゲート脂質は、例えば、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）－脂質、例えば限定はされないが、ＰＥＧ－ジアシルグリセロール（ＤＡＧ）、ＰＥＧ－ジアルキルオキシプロピル（ＤＡＡ）、ＰＥＧ－リン脂質、ＰＥＧ－セラミド（Ｃｅｒ）、又はそれらの混合物であってもよい。ＰＥＧ－ＤＡＡコンジュゲートは、例えば、ＰＥＧ－ジラウリルオキシプロピル（Ｃｉ$_2$）、ＰＥＧ－ジミリスチルオキシプロピル（Ｃｉ$_4$）、ＰＥＧ－ジパルミチルオキシプロピル（Ｃｉ$_6$）、又はＰＥＧ－ジステアリルオキシプロピル（Ｃ］$_8$）であってもよい。粒子の凝集を阻止するコンジュゲート脂質は、該粒子中に存在する全脂質の０モル％～約２０モル％又は約２モル％であってもよい。
【０１５４】
いくつかの実施形態では、核酸－脂質粒子は、コレステロールを、例えば該粒子中に存在する全脂質の約１０モル％～約６０モル％又は約４８モル％でさらに含む。
【０１５５】
一実施形態では、製剤は、例えば、２０１０年６月１０日に出願された国際出願ＰＣＴ／ＵＳ１０／２８２２４号明細書（本明細書で参照により援用される）に記載のＭＣ３を含む製剤である。ＭＣ３含有製剤の合成及び構造は、例えば、参照により援用される、国際公開第２０１３／１５５２０４号パンフレットの１１４～１１９頁に記載されている。いくつかの実施形態では、ＭＣ３製剤は、ＤＬｉｎ－Ｍ－Ｃ３－ＤＭＡ（即ち、（６Ｚ，９Ｚ，２８Ｚ，３１Ｚ）－ヘプタトリアコンタ－６，９，２８，３１－テトラエン－１９－イル４－（ジメチルアミノ）ブタン酸）の調製物を含む。
【０１５６】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリペプチド、核酸、ベクター又は宿主細胞の組成物は、リポソーム又は他の類似する小胞中で製剤化されてもよい。リポソームは、内部水性区画を囲む単層又は多重層の脂質二重層並びに比較的不透過性の外部親油性リン脂質二重層から構成された球状小胞構造である。リポソームは、アニオン性、中性又はカチオン性であってもよい。リポソームは、生体適合性、非毒性であり、親水性及び親油性薬剤分子の双方を送達し、それらのカーゴを血漿酵素により分解から保護し、それらの負荷を生物学的膜及び血液脳関門（ＢＢＢ）を通じて輸送し得る（例えば、レビューとして、Ｓｐｕｃｈ ａｎｄ Ｎａｖａｒｒｏ，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ

ｅｒｙ，ｖｏｌ．２０１１，Ａｒｔｉｃｌｅ　ＩＤ４６９６７９，１２　ｐａｇｅｓ，２０１１．ｄｏｉ：１０．１１５５／２０１１／４６９６７９を参照）。

【０１５７】

小胞は、いくつかの異なるタイプの脂質から作成され得るが、薬物担体としてのリポソームを作成するため、リン脂質が最も一般的に使用される。小胞は、限定はされないが、ＤＯＴＭＡ、ＤＯＴＡＰ、ＤＯＴＩＭ、ＤＤＡＢを単独で含むか、又はコレステロールと一緒に含み、ＤＯＴＭＡ及びコレステロール、ＤＯＴＡＰ及びコレステロール、ＤＯＴＩＭ及びコレステロール、並びにＤＤＡＢ及びコレステロールを生成してもよい。多重膜小胞脂質を調製するための方法は、当該技術分野で公知である（例えば、米国特許第６，６９３，０８６号明細書を参照、多重膜小胞脂質製剤に関するその教示内容は、参照により本明細書中に援用される）。脂質膜が水溶液と混合されるとき、小胞形成は自発的であり得るが、それはまた、ホモジナイザー、ソニケーター、又は押出成形装置に使用により振盪の形態で力を加えることにより促進され得る（例えば、レビューとして、Ｓｐｕｃｈ　ａｎｄ　Ｎａｖａｒｒｏ，Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，ｖｏｌ．２０１１，Ａｒｔｉｃｌｅ　ＩＤ４６９６７９，１２　ｐａｇｅｓ，２０１１．ｄｏｉ：１０．１１５５／２０１１／４６９６７９を参照）。押し出された脂質は、サイズを低減するフィルターを介して押し出すことにより調製可能であり、それはＴｅｍｐｌｅｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈ，１５：６４７－６５２，１９９７に記載の通りである（押し出された脂質製剤に関するその教示内容は、参照により本明細書中に援用される）。

【０１５８】

脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）は、生体適合性及び生分解性送達系を本明細書に記載の医薬組成物に提供する担体の別の例である。ナノ構造脂質担体（ＮＬＣ）は、ＳＬＮの特徴を保持し、薬剤安定性及び充填能力を改善し、且つ薬剤漏出を阻止する、修飾された固体脂質ナノ粒子（ＳＬＮ）である。ポリマーナノ粒子（ＰＮＰ）は、薬物送達の重要な成分である。これらのナノ粒子は、特異的標的への薬物送達を有効に誘導し、薬剤安定性及び薬物制御放出を改善し得る。リポソームとポリマーとを組み合わせた担体の新しいタイプである脂質－ポリマーナノ粒子（ＰＬＮ）も利用されてもよい。これらのナノ粒子は、ＰＮＰ及びリポソームの相補的利点を有する。ＰＬＮは、コア－シェル構造から構成され；ポリマーコアは安定な構造をもたらし、且つリン脂質シェルは優れた生体適合性をもたらす。それ故、２つの成分は、薬剤カプセル化効率を増加させ、表面修飾を促進し、水溶性薬剤の漏出を阻止する。レビューとして、例えば、Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．２０１７，Ｎａｎｏｍａｔｅｒｉａｌｓ　７，１２２；ｄｏｉ：１０．３３９０／ｎａｎｏ７０６０１２２を参照されたし。

【０１５９】

エキソソームもまた、本明細書に記載の組成物及び系のための薬物送達媒体として使用可能である。レビューとして、Ｈａ　ｅｔ　ａｌ．Ｊｕｌｙ２０１６．Ａｃｔａ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａ　Ｓｉｎｉｃａ　Ｂ．Ｖｏｌｕｍｅ　６，Ｉｓｓｕｅ　４，Ｐａｇｅｓ　２８７－２９６；ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０１６／ｊ．ａｐｓｂ．２０１６．０２．００１を参照されたし。

【０１６０】

本明細書に引用されるすべての刊行物、特許出願、特許、並びに他の出版物及び参考文献（例えば、配列データベース参照番号）は、それら全体が参照により援用される。例えば、本明細書中で参照されるすべてのジェンバンク、ユニジーン、及びＥｎｔｒｅｚ配列は、例えば本明細書中のいずれかの表又は実施例において参照により援用される。特に指定されない限り、本明細書中で特定される配列受入番号は、例えば本明細書中のいずれかの表において、２０１８年１１月２９日時点で最新のデータベースエントリーを指す。１つの遺伝子又はタンパク質が複数の配列受入番号を参照するとき、配列変異体のすべてが包含される。

【実施例】

【０１６１】
本発明は、以下の実施例により、さらに例示される。実施例は、あくまで例示目的で提示され、決して本発明の範囲又は内容を限定するものとして解釈されるべきではない。
【０１６２】
実施例１：融合構築物の設計及び発現
本実施例は、ＲＮＡ編集ドメインに融合されたＲＮＡ結合ドメインを含む融合タンパク質の設計及び生成について説明する。
【０１６３】
ＲＮＡ結合ドメイン：標的ＲＮＡの８ヌクレオチド配列が、上記の、またＣｈｅｏｎｇ ａｎｄ Ｔａｎａｋａ．２００６．ＰＮＡＳ ｖｏｌ．１０３，３７：１３６３５－９によるトポロジカルなタンパク質認識コードに変換される。このコードは、例えば、Ｑｕｉｃｋ Ｃｈａｎｇｅ ＩＩ ＸＬ部位特異的突然変異誘発キット（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ，ＬａＪｏｌｌａ，ＣＡ）によるＰＵＭ１をコードするｐＴＹＢ３プラスミドの部位特異的突然変異誘発を用いて、ジェンバンクのアミノ酸配列：ＡＡＧ３１８０７．１のＧｌｙ８２８～Ｇｌｙ１１７６である、ＰＵＭ１のＲＮＡ結合ドメイン（配列番号１）内に組み込まれる。
【０１６４】
ＲＮＡ編集ドメイン：Ｋｕｔｔａｎ ａｎｄ Ｂａｓｓ．２０１２．ＰＮＡＳ ２０１２及びＰｈｅｌｐｓ，Ｋｅｌｌｙ Ｊ ｅｔ ａｌ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ２０１５に記載の通り、デアミナーゼ活性の増強を意図して、Ｅ４８８Ｑ突然変異を有するヒトＡＤＡＲ２（ｈＡＤＡＲ２ＤＤ）（配列番号２のアミノ酸２７６～７０１）の触媒活性ドメインを有するように、構築物を設計する。
【０１６５】
Ｓｉｎｎａｍｏｎ ｅｔ ａｌ．２０１７．ＰＮＡＳ １１４．４４（２０１７）：Ｅ９３９５－Ｅ９４０２に記載のプライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）により、上記のＲＮＡ結合及びＲＮＡ編集ドメインのＯＲＦの対応配列を上記プラスミドから合成し、増幅し、次に製造業者の使用説明書に従い、Ｇｉｂｓｏｎ Ａｓｓｅｍｂｌｙ（登録商標）プロトコル（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ）を使用し、アンピシリン耐性ｐｃＤＮＡ－ＣＭＶベクター骨格にクローン化し、ＲＮＡ結合ドメインはｈＡＤＡＲ２ＤＤのＣ末端にインフレームで融合される。ＤＮＡ配列決定により、構築物を確認する。
【０１６６】
融合タンパク質は、大腸菌（Ｅ．Ｃｏｌｉ）株ＢＬ２１（ＤＥ３）細胞内で発現可能である。プラスミドは、大腸菌（Ｅ．Ｃｏｌｉ）細胞内で発現させ、３７℃、ＬｅｎｎｏｘＬＢ培地（Ｓｉｇｍａ，ＵＳＡ）中で一晩成長させる。Ｗａｎｇ，Ｘ．ｅｔ ａｌ ２００２に記載の通り、細胞を、６０００ｇで３０分間の遠心分離により収集し、次に溶解緩衝液に再懸濁し、超音波処理し、精製する。可溶化液を２０，０００ｒｐｍで３０分間の回転により清澄化し、次に１０ｍｌのＮｉ－ＮＴＡアガロースカラム（Ｑｉａｇｅｎ，ＵＳＡ）に充填する。溶出物をＳｅｐｈｅｄｅｘ７５ゲル濾過カラムで精製し、次に１０ｍＭのトリス（ｐＨ７．４）、１５０ｍＭのＮａＣｌ、及び２ｍＭのジチオトレイトール（ＤＴＴ）中で約５．５ｍｇ／ｍｌまで濃縮する。Ｗａｎｇ，Ｘ．ｅｔ ａｌ．２００２及びＤａｗｓｏｎ，Ｔ．Ｒ．２００３に記載の通り、一定分量を液体窒素で急速冷凍し、－８０℃で貯蔵する。
【０１６７】
タンパク質精製をＳＤＳ／ＰＡＧＥ及びクーマシーブルー染色により確認する。融合タンパク質のピーク画分を、１００μｇ／ｍｌのウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）で連続希釈し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分離し、標準としてのＢＳＡの既知濃度と比較する。
【０１６８】
実施例２：編集効率アッセイ
本実施例は、本明細書に記載のように調製した融合タンパク質の編集効率を評価するため

のアッセイについて説明する。
【０１６９】
Ｐａｎｏｐｌｙ（商標）ヒトＡＤＡＲノックダウンＨＥＫ２９３細胞（ＣｒｅａｔｉｖｅＢｉｏｇｅｎｅ，Ｓｈｉｒｌｅｙ，ＮＹ）を、（３×１０^{5}個／ウェル）の密度で、１０％ウシ胎仔血清、１％ペニシリン－ストレプトマイシン溶液、１ｍＭのピルビン酸ナトリウム、及び２ｍＭのグルタミンを添加したダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）中、３７℃、５％CO_2で２４時間維持した、ポリ－ｄ－リジンでコーティングした２４ウェルプレート上に播種する。製造業者のプロトコルに従い、細胞にリポフェクタミン２０００を有する融合タンパク質の構築物をトランスフェクトし、トランスフェクション後７２時間維持する。製造業者の使用説明書に従い、ＴＲＩＺＯＬ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）により、全ＲＮＡを細胞から単離し、次に１ｕｇの全ＲＮＡに対するＤＮａｓｅＩ処理、続いて逆転写を行うことにより、ＲＮＡ編集効率を検証する。ｃＤＮＡを、無作為に選択したＲＴプライマーを用いるｉＳｃｒｉｐｔ　ｃＤＮＡ合成キット（ＢｉｏＲａｄ，Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，ＣＡ）により合成し、ＰＣＲ増幅にかける。Ｗｅｔｔｅｎｇｅｌ　ｅｔ　ａｌ．２０１６．Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　４５，５：２７９７－２８０８に記載の通り、生成物を直接的に配列決定し、対象の融合タンパク質をトランスフェクトしたＡＤＡＲ欠損細胞の（Ａ）のイノシン（Ｉ）への置換をそれらの時間一致対照と比較する。
【０１７０】
実施例３：例示的なＯＲＦ点突然変異のＲＮＡ編集
本実施例は、本発明の融合ポリペプチドがＯＲＦ　ｍＲＮＡを編集する能力を示す。
【０１７１】
本実施例では、ＲＮＡ編集を用いて、神経障害における調節不能なイオンフラックスに関する輸送タンパク質の配列及び機能を変更する。ニューロンでは、α－アミノ－３－ヒドロキシ－５－メチル－４－イソキサゾールプロピオン酸（ＡＭＰＡ）複合体のＧｌｕＡ２サブユニットのほぼ９９％を、天然に存在するＡＤＡＲ複合体によって編集する。このＧｌｕＡ２の編集により、極性グルタミン（Ｑ）に対するコドンが荷電アルギニン（Ｒ）に対するコドンに変換される。ＧｌｕＡ２が編集されている場合、この変換は運動ニューロンにおけるCa^{2+}の透過性低下をもたらす。筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）を有する患者は、このＧｌｕＡ２の編集低下と、それから得られる運動ニューロンにおけるカルシウム関連興奮毒性（ｅｘｃｉｔｏｔｏｘｉｔｙ）を示す。本発明のポリペプチドを使用し、ヒトＧｌｕＡ２　ｍＲＮＡの標的コドンを編集することで、得られたタンパク質において修正されたアミノ酸置換Ｑ６０７Ｒを生成することができる。ＧｌｕＡ２のアミノ酸６０７に対するコドンは、ヒトＧｌｕＡ２ヌクレオチド配列（ＮＣＢＩ参照配列ＮＭ＿００１０８３６２０．１）のヌクレオチド１５５５～１５５７を含む。それ故、本発明のエフェクターポリペプチドは、関連コドンＣＡＧ（グルタミン）をＣＧＧ（アルギニン）として解読されるＣＩＧに編集することになるヒトＡＤＡＲの触媒ドメインを、ヒトＧｌｕＡ２ヌクレオチド配列のヌクレオチド１５５５～１５５７の上流の配列に特異的に結合することになるＲＮＡ結合（標的化）ドメインに連結されて含む（図１を参照）。特に、エフェクターポリペプチドは、次のように構築される：
ＲＮＡ結合ドメイン：ＰＵＭ１－ＨＤの配列を、編集対象の標的コドン上流の８ヌクレオチド配列（ヒトＧｌｕＡ２ヌクレオチド配列のアミノ酸１５４５～１５５２：ｃａａｇａａｇｃ）に結合するように変更し、次のようなＧｌｕＡ２．ＲＢＤを作出する：
リピート１：突然変異Ｓ８６３Ｃ及びＱ８６７Ｒ
野生型：ＨＩＭＥＦＳＱＤＱＨＧＳＲＦＩＱＬＫＬＥＲＡＴＰＡＥＲＱＬＶＦＮＥＩＬＱ
ＧｌｕＡ２認識のための突然変異体：ＨＩＭＥＦＳＱＤＱＨＧＣＲＦＩＲＬＫＬＥＲＡＴＰＡＥＲＱＬＶＦＮＥＩＬＱ
リピート２：突然変異Ｎ８９９Ｓ及びＹ８６７Ｒ
野生型：ＡＡＹＱＬＭＶＤＶＦＧＮＹＶＩＱＫＦＦＥＦＧＳＬＥＱＫＬＡＬＡＥＲＩＲＧ
ＧｌｕＡ２認識のための突然変異体：ＡＡＹＱＬＭＶＤＶＦＧＳＲＶＩＱＫＦＦＥＦＧＳ

ＬＥＱＫＬＡＬＡＥＲＩＲＧ
リピート３：突然変異Ｃ９３５Ｓ、Ｒ９３６Ｎ及びＱ９３９Ｅ
野生型：ＨＶＬＳＬＡＬＱＭＹＧＣＲＶＩＱＫＡＬＥＦＩＰＳＤＱＱＮＥＭＶＲＥＬＤＧ
ＧｌｕＡ２認識のための突然変異体：ＡＡＹＱＬＭＶＤＶＦＧＳＮＶＩＥＫＦＦＥＦＧＳ
ＬＥＱＫＬＡＬＡＥＲＩＲＧ
リピート４：突然変異Ｎ９７１Ｓ及びＨ９７２Ｒ
野生型：ＨＶＬＫＣＶＫＤＱＮＧＮＨＶＶＱＫＣＩＥＣＶＱＰＱＳＬＱＦＩＩＤＡＦＫＧ
ＧｌｕＡ２認識のための突然変異体：ＨＶＬＫＣＶＫＤＱＮＧＳＲＶＶＱＫＣＩＥＣＶＱ
ＰＱＳＬＱＦＩＩＤＡＦＫＧ
リピート５：突然変異なし
野生型：ＱＶＦＡＬＳＴＨＰＹＧＣＲＶＩＱＲＩＬＥＨＣＬＰＤＱＴＬＰＩＬＥＥＬＨＱ
ＧｌｕＡ２認識のための突然変異体：ＱＶＦＡＬＳＴＨＰＹＧＣＲＶＩＱＲＩＬＥＨＣＬ
ＰＤＱＴＬＰＩＬＥＥＬＨＱ
リピート６：Ｎ１０４３Ｓ、Ｙ１０４４Ｎ及びＱ１０４７Ｅ
野生型：ＨＴＥＱＬＶＱＤＱＹＧＮＹＶＩＱＨＶＬＥＨＧＲＰＥＤＫＳＫＩＶＡＥＩＲＧ
ＧｌｕＡ２認識のための突然変異体：ＨＴＥＱＬＶＱＤＱＹＧＳＮＶＩＥＨＶＬＥＨＧＲ
ＰＥＤＫＳＫＩＶＡＥＩＲＧ
リピート７：突然変異なし
野生型：ＮＶＬＶＬＳＱＨＫＦＡＳＮＶＶＥＫＣＶＴＨＡＳＲＴＥＲＡＶＬＩＤＥＶＣＴ
ＭＮＤＧＰＨＳ
ＧｌｕＡ２認識のための突然変異体：ＮＶＬＶＬＳＱＨＫＦＡＳＮＶＶＥＫＣＶＴＨＡＳ
ＲＴＥＲＡＶＬＩＤＥＶＣＴＭＮＤＧＰＨＳ
リピート８：Ｎ１１２２Ｃ及びＱ１１２６Ｒ
野生型：
【化２６】

ALYTMMKDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRP
HIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG

ＧｌｕＡ２認識のための突然変異体：
【化２７】

ALYTMMKDQYACYVVRKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYY
MKNGVDLG

【０１７２】
ＲＮＡ編集ドメイン：ＲＮＡ編集ドメインは、ヒトＡＤＡＲ２ＤＤの触媒ドメインを含み、実施例１のように設計し、作成する。融合構築物ＧｌｕＡ２．ＲＢＤ－ＡＤＡＲ２ＤＤのＰＣＲライゲーション及び増幅を、Ａｄａｍａｌａ，ｅｔ　ａｌ．２０１６．ＰＮＡＳ１１３．１９：Ｅ２５７９－Ｅ２５８８に記載のように実施する。本実施例の方法における使用を意図した代替的な例示的構築物は、本明細書に開示されるＲＮＡ編集ドメイン、ＲＮＡエフェクター、及び／又はポリペプチド（及び／又はそれらをコードする核酸）、例えば配列番号１６又は１７（及び／又は配列番号７又は８）を含む。代替的な例示的な標的ＲＮＡ配列は、ヒトＧｌｕＡ２（参照配列ＮＭ＿０００８２６）のヌクレオチド１５３７～１５５２に対応するｍＲＮＡ配列又はヒトＧｌｕＡ２のヌクレオチド１５３７～１５５２の５０ヌクレオチド以内の配列を含む。
【０１７３】
アッセイ：上記のＧｌｕＡ２．ＲＢＤ－ＡＤＡＲ２ＤＤ構築物は、以下の試験モデルにて使用する。
【０１７４】

マウス神経芽細胞腫（Ｎ２Ａ）細胞を２４ウェルプレート内に１×１０^{3}個の細胞／ウェルの密度で播種し、１０％ウシ胎仔血清、１％ペニシリン－ストレプトマイシン溶液、１ｍＭのピルビン酸ナトリウム、及び２ｍＭのグルタミンを添加したイーグル最小必須培地（ＥＭＥＭ）中、３７℃、５％CO_2で一晩維持する。２４時間後、細胞に、ＡＤＡＲ ｓｉＲＮＡレンチウイルス（ａｂｍ ｃａｔ：ｉＶ０３７７５９ａ）プラスミドをトランスフェクトする。ＡＤＡＲノックダウンを、ＡＤＡＲ発現レベルについてのウエスタンブロットにより確認する。

【０１７５】

２４時間後、Ｏｐｔｉ－ＭＥＭ還元血清培地（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）中のＡＤＡＲ欠損Ｎ２Ａ細胞に、リポフェクタミン２０００（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び上記の１２５ｎｇのＧｌｕＡ２．ＲＢＤ－ＡＤＡＲ２ＤＤプラスミドをトランスフェクトする。７２間後、製造業者のウェブサイト上のプロトコルに従い、ＴＲＩＺＯＬ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて全ＲＮＡを細胞から単離し、次に１ｕｇの全ＲＮＡに対するＤＮａｓｅＩ処理、続いて逆転写を行うことにより、ＲＮＡ編集を検証する。ｃＤＮＡを、ＧｌｕＡ２ ＲＴ－プライマー（ｆｗｄ：ＣＡＴＣＧＡＡＡＧＴＧＣＴＧＡＧＧＡＴ及びｒｅｖ：ＡＧＧＧＣＴＣＴＧＣＡＣＴＣＣＴＣＡＴＡ）を用いるｉＳｃｒｉｐｔ ｃＤＮＡ合成キット（ＢｉｏＲａｄ，Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，ＣＡ）により合成し、ＰＣＲ増幅にかける。Ｗｅｔｔｅｎｇｅｌ，Ｊａｃｑｕｅｌｉｎｅ ｅｔ ａｌに記載の通り、生成物を直接的に配列決定し、ＧｌｕＡ２．ＲＢＤ－ＡＤＡＲ２ＤＤをトランスフェクトしたＡＤＡＲ欠損細胞の（Ａ）からイノシン（Ｉ）への置換の速度を、ＡＤＡＲ活性を伴わないそれらの時間一致対照と比較する。

【０１７６】

実施例４：代替的なスプライス産物を生成するためのプレｍＲＮＡの編集

幼児死亡率の主な遺伝的原因である脊髄性筋萎縮（ＳＭＡ）では、ＳＭＮ１遺伝子の突然変異又は不在に起因し、ＳＭＮタンパク質が欠如している（Ｈｕａ ｅｔ ａｌ．２００７．ＰＬｏＳ ｂｉｏｌｏｇｙ ｖｏｌ．５，４：ｅ７３．）。ヒトは、ＳＭＮタンパク質を生成する能力があるＳＭＮ１とほぼ同一のＳＭＮ２遺伝子（ヒト（Ｈｏｍｏ ｓａｐｉｅｎｓ）の生存運動ニューロン２、セントロメア（ＳＭＮ２）、染色体５上のＲｅｆＳｅｑＧｅｎｅ、ＮＣＢＩ参照配列：ＮＧ＿００８７２８．１）を有するが、エクソン７の６番目の位置での重要なシトシン（Ｃ）のチミジン（Ｔ）への突然変異（転写物内のＣ６Ｕ変異）及びイントロン７の１００番目の位置でのアデノシン（Ａ）のグアノシン（Ｇ）への変異（Ａ１００Ｇ）により、スプライス部位の認識が低減され、プレｍＲＮＡのスプライシング事象におけるエクソン７のスキッピングが生じる（Ｓｉｎｇｈ ｅｔ ａｌ．２０１２．ＰＬｏＳ Ｏｎｅ ７．１１：ｅ４９５９５）。スキップされたエクソンに起因し、続いて生じるＳＭＮタンパク質は、不安定で且つ部分的に機能的であり、ＳＭＡ表現型をもたらす。本実施例は、ＳＭＮ２のプレｍＲＮＡにおけるエクソン７の「スプライシングアウト」を低減し、それによりＳＭＮの生成を救出し、疾患表現型を抑制し得る、例示的な本明細書に記載の組成物の設計及び作成について説明する。

【０１７７】

プラスミドの構築

ＲＮＡ結合ドメイン：ＳＭＮ２プレｍＲＮＡを修飾し、ＳＭＮ２ ＲＮＡ結合ｈＡＤＡＲＤＤ融合構築物を伴うエクソン７の封入を駆動する。エクソン７の封入を増強するＳＭＮ２の標的配列は、Ｈｕａ ｅｔ ａｌ．２００７．ＰＬｏＳ ｂｉｏｌｏｇｙ ｖｏｌ．５，４：ｅ７３に記載されている。ＳＭＮ２のエクソン７を標的にするため、ＰＵＭ１－ＨＤの部位特異的突然変異誘発を実施し、８ヌクレオチド配列：ＵＵＡＧＡＣＡＡ（ヒトＳＭＮ２ ＮＣＢＩ参照配列ＮＧ＿００８７２８．１の２７００３～２７０１０位）を標的にする。

【０１７８】

ＰＵＭ１に設けるべき突然変異は次の通りである：

リピート１：突然変異Ｓ８６３Ｎ及びＲ８６４Ｙ

野生型：ＨＩＭＥＦＳＱＤＱＨＧＳＲＦＩＱＬＫＬＥＲＡＴＰＡＥＲＱＬＶＦＮＥＩＬＱ
ＳＭＮ２認識のための突然変異体：
【化２８】

HIMEFSQDQHGNYFIQLKLERATPAERQLVFNEILQ

リピート２：突然変異なし
野生型：ＡＡＹＱＬＭＶＤＶＦＧＮＹＶＩＱＫＦＦＥＦＧＳＬＥＱＫＬＡＬＡＥＲＩＲＧ
ＳＭＮ２認識のための突然変異体：ＡＡＹＱＬＭＶＤＶＦＧＮＹＶＩＱＫＦＦＥＦＧＳＬ
ＥＱＫＬＡＬＡＥＲＩＲＧ
リピート３：突然変異なし
野生型：ＨＶＬＳＬＡＬＱＭＹＧＣＲＶＩＱＫＡＬＥＦＩＰＳＤＱＱＮＥＭＶＲＥＬＤＧ
ＳＭＮ２認識のための突然変異体：ＡＡＹＱＬＭＶＤＶＦＧＣＲＶＩＱＫＦＦＥＦＧＳＬ
ＥＱＫＬＡＬＡＥＲＩＲＧ
リピート４：Ｎ９７１Ｓ、Ｈ９７２Ｎ及びＱ９７５Ｅ
野生型：ＨＶＬＫＣＶＫＤＱＮＧＮＨＶＶＱＫＣＩＥＣＶＱＰＱＳＬＱＦＩＩＤＡＦＫＧ
ＳＭＮ２認識のための突然変異体：
【化２９】

HVLKCVKDQNGSNVVEKCIECVQPQSLQFIIDAFKG

リピート５：突然変異なし
野生型：ＱＶＦＡＬＳＴＨＰＹＧＣＲＶＩＱＲＩＬＥＨＣＬＰＤＱＴＬＰＩＬＥＥＬＨＱ
ＳＭＮ２認識のための突然変異体：ＱＶＦＡＬＳＴＨＰＹＧＣＲＶＩＱＲＩＬＥＨＣＬＰ
ＤＱＴＬＰＩＬＥＥＬＨＱ
リピート６：Ｎ１０４３Ｃ及びＱ１０４７Ｒ
野生型：ＨＴＥＱＬＶＱＤＱＹＧＮＹＶＩＱＨＶＬＥＨＧＲＰＥＤＫＳＫＩＶＡＥＩＲＧ
ＳＭＮ２認識のための突然変異体：
【化３０】

HTEQLVQDQYGCYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG

リピート７：Ｓ１０７９Ｃ、Ｎ１０８０Ｒ及びＥ１０８３Ｑ
野生型：ＮＶＬＶＬＳＱＨＫＦＡＳＮＶＶＥＫＣＶＴＨＡＳＲＴＥＲＡＶＬＩＤＥＶＣＴ
ＭＮＤＧＰＨＳ
ＳＭＮ２認識のための突然変異体：
【化３１】

NVLVLSQHKFACRVVQKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHS

リピート８：Ｎ１１２２Ｃ及びＹ１１２３Ｒ
野生型：
【化３２】

ALYTMMKDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRP
HIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG

ＳＭＮ２認識のための突然変異体：

【化３３】

ALYTMMKDQYACRVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRP
HIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG

【０１７９】
ＲＮＡ編集ドメイン：ＲＮＡ編集ドメインは、ヒトＡＤＡＲ２ＤＤの触媒ドメインを含み、実施例１のように設計し、作成する。
【０１８０】
融合構築物ＳＭＮ２．ＲＢＤ－ＡＤＡＲ２ＤＤのＰＣＲライゲーション及び増幅を、Ａｄａｍａｌａ，ｅｔ ａｌ．２０１６．ＰＮＡＳ １１３．１９：Ｅ２５７９－Ｅ２５８８に記載のように実施する。本実施例の方法における使用を意図した代替的な例示的構築物は、本明細書で開示されるＲＮＡ編集ドメイン、ＲＮＡエフェクター、及び／又はポリペプチド（及び／又はそれらをコードする核酸）、例えば配列番号１８又は１９（及び／又は配列番号９又は１０）を含む。代替的な例示的な標的ＲＮＡ配列は、ヒトＳＭＮ２（参照配列ＮＭ－０２２８７６）のヌクレオチド３１，９９５～３２，０１０に対応するｍＲＮＡ配列又はヒトＳＭＮ２のヌクレオチド３１，９９５～３２，０１０の５０ヌクレオチド内の配列を含む。
【０１８１】
細胞培養及びトランスフェクション
ヒトＳＭＡタイプＩ線維芽細胞（Ｃｏｒｉｅｌｌ Ｒｅｐｏｓｉｔｏｒｉｅｓ）細胞をトランスフェクションの２４時間前に蒔き、３７℃、５％CO_2の１０％の非不活化ＦＢＳを添加したＤＭＥＭ中で維持する。約５０％のコンフルエンスで、細胞に０．５μｇのＳＭＮ２．ＲＢＤ－ｈＡＤＡＲＤＤプラスミドを一過性にトランスフェクトする。４時間後、培地を新しい培地と交換する。４８時間のトランスフェクション後、全ＲＮＡを抽出する。
【０１８２】
エクソン封入におけるＲＴ－ＰＣＲ
Ｃｈｏ ｅｔ ａｌ．２０１４．Ｂｉｏｃｈｉｍｉｃａ ｅｔ Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａ Ａｃｔａ （ＢＢＡ）－Ｇｅｎｅ Ｒｅｇｕｌａｔｏｒｙ Ｍｅｃｈａｎｉｓｍ １８３９．６：５１７－５２５において以前に記載された通り、上記の試験細胞に対し、ＳＭＮ２のエクソン７スプライシングを検出するためのＲＴ－ＰＣＲ分析を実施する。対照細胞に、ＲＮＡ結合融合を伴わずにｈＡＤＡＲＤＤを発現するプラスミドをトランスフェクトする。
【０１８３】
ＲｉｂｏＥｘ試薬（Ｇｅｎｅａｌｌ）及びエタノール沈殿により、対照及び試験哺乳動物細胞から全ＲＮＡを抽出する。１μｇのＲＮＡ、０．５μｇのオリゴｄＴ、ｄＮＴＰ混合物（０．５ｍＭの各ｄＮＴＰ）、６ｍＭのＭｇＣｌ２、４μｌの５×ＩｍＰｒｏｍ－ＩＩ（商標）反応緩衝液及び１μｌのＩｍＰｒｏｍ－ＩＩ（商標）逆転写酵素（Ｐｒｏｍｅｇａ）を含有する２０μｌの総体積中で逆転写を実施する。ＳＭＮ＋エクソン７、ＳＭＮ－エクソン７及びＧＡＰＤＨ対照のＲＴ－ＰＣＲ増幅を実施し、（例えば、Ｃｈｏ ｅｔ ａｌ．のエクソン６及びエクソン８ＰＣＲプライマーを使用して増幅した）ＰＣＲ産物を、エチジウムブロマイド溶液（０．５μ／ｍｌ）を用いて２％アガロースゲル上で分析する。試験細胞は、エクソン７を含むより大きいＳＭＮ２ ｍＲＮＡを生成する。ＰＣＲ産物をＤｄｅＩ（ＮＥＢ）で消化し、５％天然ポリアクリルアミドゲル上に負荷し、検出する。
【０１８４】
実施例５：エプスタイン・バーウイルス（Ｅｐｓｔｅｉｎ－Ｂａｒｒ ｖｉｒｕｓ）に対する抗ウイルス応答を誘導するためのＥＢＮＡ１の配列の編集
エプスタイン・バーウイルス（Ｅｐｓｔｅｉｎ－Ｂａｒｒ ｖｉｒｕｓ）（ＥＢＶ）は、

単核球症を引き起こし、バーキットリンパ腫、ホジキンリンパ腫、及び上咽頭がんを含む多くのヒトがんに関連する（Ｔｅｌｌａｍ ｅｔ ａｌ．２００８．ＰＮＡＳ １０５．２７：９３１９－９３２４）。初期溶菌感染後、ＥＢＶは、免疫監視を回避し、潜在的感染下で存続することが示されている。潜在的感染中、抗ウイルス性細胞傷害性Ｔ応答を制限するため、ＥＢＶコード核抗原１（ＥＢＮＡ１）は、コード化タンパク質配列を維持するが、結果的な二次構造が抗ウイルス応答及び下流の抗原提示にとって必要な二本鎖ステムの特徴を含まないように、ｍＲＮＡで使用されるコドンにバイアスをかける。ＥＢＮＡ中のグリシン－アラニンリピートドメイン（ＧＡｒ）は、翻訳効率及び増強された免疫認識に関与する。このドメインでは、ＧＡｒドメイン内のグリシン残基の９９％及びアラニン残基の１００％（ＵｎｉｐｒｏｔＫＢ Ｐ０３２１１の８７～３５２位）は、グリシン及びアラニンプリンコドンのヒト平均の各々、４９．３％及び３３．３％よりも有意に多いプリンコドン（ＧＧＧ、ＧＧＡ、及びＧＣＡ）からなる（Ｔｅｌｌａｍ）。本実施例は、抗ウイルス応答を誘導するため、ＥＢＮＡ１の配列を編集し、ウイルスｍＲＮＡの二次構造を増強するための例示的な本明細書に記載の組成物の設計及び作成について説明する。

【０１８５】

プラスミド構築

ＲＮＡ結合ドメイン：ＥＢＶ Ｅ１－ＧＡｒの配列は、Ｔｅｌｌａｍ ｅｔ ａｌ．２００８．ＰＮＡＳ １０５．２７：９３１９－９３２４（Ｔａｂｌｅ １）中で参照される。本実施例では、ＥＢＶ Ｅ１－Ｇａｒ二次構造を標的にするため、Ｔｅｌｌａｍ ｅｔ ａｌのＴａｂｌｅ １に見出される天然ＥＢＮＡ１ ＧＡｒの１０５－ｍｅｒヌクレオチド配列の２０～２７位に見出される、８ヌクレオチド配列：ＧＣＧＧＧＡＧＧで、ＰＵＭ１－ＨＤの部位特異的突然変異誘発を実施する。

【化３４】

5’TAAaggagcaggagcagga**gcgggagg**ggcaggagcaggaggggcaggagcaggaggaggggcaggagcaggaggag
gggcaggaggggcaggaggggcaggaAT-3’

【０１８６】

この配列を標的にするための、ｈＰＵＭ１に設けられるべき突然変異は次の通りである：

リピート１：Ｒ８６４Ｎ及びＱ８６７Ｅ

野生型：ＨＩＭＥＦＳＱＤＱＨＧＳＲＦＩＱＬＫＬＥＲＡＴＰＡＥＲＱＬＶＦＮＥＩＬＱ

突然変異体：

【化３５】

HIMEFSQDQHGSNFIELKLERATPAERQLVFNEILQ

リピート２：Ｎ８９９Ｃ及びＱ９０３Ｒ

野生型：ＡＡＹＱＬＭＶＤＶＦＧＮＹＶＩＱＫＦＦＥＦＧＳＬＥＱＫＬＡＬＡＥＲＩＲＧ

突然変異体：

【化３６】

AAYQLMVDVFGCYVIRKFFEFGSLEQKLALAERIRG

リピート３：Ｃ９３５Ｓ、Ｒ９３６Ｎ及びＱ９３９Ｅ

野生型：ＨＶＬＳＬＡＬＱＭＹＧＣＲＶＩＱＫＡＬＥＦＩＰＳＤＱＱＮＥＭＶＲＥＬＤＧ

突然変異体：

【化３７】

AAYQLMVDVFGSNVIEKFFEFGSLEQKLALAERIRG

リピート４：Ｎ９７１Ｓ、Ｈ９７２Ｎ及びＱ９７５Ｅ
野生型：ＨＶＬＫＣＶＫＤＱＮＧＮＨＶＶＱＫＣＩＥＣＶＱＰＱＳＬＱＦＩＩＤＡＦＫＧ
突然変異体：
【化３８】

HVLKCVKDQNGSNVVEKCIECVQPQSLQFIIDAFKG

リピート５：Ｃ１００７Ｓ、Ｒ１００８Ｎ及びＱ１０１１Ｅ
野生型：ＱＶＦＡＬＳＴＨＰＹＧＣＲＶＩＱＲＩＬＥＨＣＬＰＤＱＴＬＰＩＬＥＥＬＨＱ
突然変異体：
【化３９】

QVFALSTHPYGSNVIERILEHCLPDQTLPILEELHQ

リピート６：Ｎ１０４３Ｓ及びＹ１０４４Ｒ
野生型：ＨＴＥＱＬＶＱＤＱＹＧＮＹＶＩＱＨＶＬＥＨＧＲＰＥＤＫＳＫＩＶＡＥＩＲＧ
突然変異体：
【化４０】

HTEQLVQDQYGSRVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG

リピート７：突然変異なし
野生型：ＮＶＬＶＬＳＱＨＫＦＡＳＮＶＶＥＫＣＶＴＨＡＳＲＴＥＲＡＶＬＩＤＥＶＣＴＭＮＤＧＰＨＳ
リピート８：Ｎ１１２２Ｓ、Ｙ１１２３Ｎ及びＱ１１２６Ｅ
野生型：
【化４１】

ALYTMMKDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRP
HIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG

突然変異体：
【化４２】

ALYTMMKDQYASNVVEKMIDVAEPGQRKIVMHKIRP
HIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG

【０１８７】
ＲＮＡ編集ドメイン：ＲＮＡ編集ドメインは、ヒトＡＤＡＲ２ＤＤの触媒ドメインを含み、実施例１のように設計し、作成する。
【０１８８】
融合構築物ＥＢＶＥ１－ＧＡｒ．ＲＢＤ－ＡＤＡＲ２ＤＤのＰＣＲライゲーション及び増幅を、Ａｄａｍａｌａ，ｅｔ　ａｌ．２０１６．ＰＮＡＳ　１１３．１９：Ｅ２５７９－Ｅ２５８８に記載のように実施する。
【０１８９】
ＥＢＮＡ１発現構築物

ＥＢＮＡ１発現構築物を作成するため、完全長ＥＢＶコードＥＢＮＡ１（Ｅ１）及びＥＢＮＡ１　ＧＡｒ配列（ＥＢＮＡ１－ＧＡ）の１０２－ｎｔ増加分を発現ベクターｐｃＤＮＡ３（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）にクローン化する。次に、Ｔｅｌｌａｍに記載のように、発現ベクターにＧＦＰをコードする配列（ｐＥＧＦＰ－Ｎ１；Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）をインフレームでサブクローニングする。

【０１９０】

細胞培養及びトランスフェクション

ＤＧ７５（ＡＴＣＣ）又はＨＥＫ２９３細胞を、Ｔｅｌｌａｍ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ　ＰＮＡＳ　２００８において以前に記載のように、２ｍＭのＬ－グルタミン、１００単位／ｍｌのペニシリン、及び１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシン＋１０％ＦＣＳを添加したＲＰＭＩ培地１６４０中で維持する。

【０１９１】

ＥＢＮＡ１構築物のトランスフェクション

ＢｉｏＲａｄ　Ｇｅｎｅ　Ｐｕｌｓｅｒ（９６０μＦ、２５０Ｖ、０．４ｃｍのギャップ電極、３００μｌのアッセイ体積、２５℃）を使用することにより、細胞に１０μｇの発現構築物をトランスフェクトする。ＥＢＶのトランスフェクションの２時間後、細胞に０．５μｇのＥＢＶＥ１－ＧＡｒ．ＲＢＤ－ＡＤＡＲ２ＤＤ遺伝子プラスミドを一過性にトランスフェクトし、次に４時間後、培地を新しい培地と交換する。Ｔｅｌｌａｍ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ　ＰＮＡＳ　２００８に記載のように、最終トランスフェクションの２４時間後、細胞を収集し、ＳＤＳ／ＰＡＧＥにかけ、抗ＧＦＰ（１：２，０００）又はアクチンｍＡｂ（１：１，０００）のいずれかで免疫ブロットする。

【０１９２】

翻訳アッセイ

ＥＢＮＡ１／ｐｃＤＮＡ３発現構築物をＸｂａＩで直線化し、１μｇの鋳型を、５０μＣｉの［α－３２Ｐ］ＵＴＰ（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を加えたＲｉｂｏｐｒｏｂｅインビトロ転写システム（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用することにより、Ｔ７ＲＮＡポリメラーゼで転写させる。翻訳アッセイにおいては、ＥＢＮＡ１／ｐｃＤＮＡ３ベクターを、２５０μＣｉの３５［Ｓ］メチオニン（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を加えた共役された転写／翻訳の網状赤血球可溶化液システム（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用することにより、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼでインビトロ転写及び翻訳する。Ｔｅｌｌａｍ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ　ＰＮＡＳ　２００８に記載のように、可溶化液にＳＤＳ／ＰＡＧＥ及びオートラジオグラフィーを施す。配列決定により編集を確認する。

【０１９３】

ＳＨＡＰＥ分析

Ｚｕｋｅｒ，Ｍ．ｅｔ　ａｌ　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ　Ｒｅｓ　２００３に記載のように、編集された配列の最低エネルギーの確証をＭＦＯＬＤによって予測する。

【０１９４】

ｑＲＴ－ＰＣＲ

ＭＭＬＶ　ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ　ＩＩＩ逆転写酵素（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）及びランダム六量体と組み合わせた固定されたオリゴ（Ｔ）１８プライマーを使用することによる、ＥＢＮＡ１及び１サンプルあたり１μｇの単離されたＲＮＡのｃＤＮＡ合成。Ｓｙｂｒ　Ｇｒｅｅｎに基づく蛍光検出システム及びＡＢＩ　Ｐｒｉｓｍ　７９００配列検出システム（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を使用するｑＲＴ－ＰＣＲを用いて、ｍＲＮＡ存在量を測定する。Ｔｅｌｌａｍ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ　ＰＮＡＳ　２００８に記載のように、リボソームタンパク質Ｐ０（ＲＰＬＰ０；ジェンバンク受入番号ＮＭ＿０５３２７５）をすべてのサンプルにおける参照遺伝子として使用する。

【０１９５】

各ｑＲＴ－ＰＣＲは、２．５ｍｌの２×Ｓｙｂｒ　Ｇｒｅｅｎマスターミックス（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）、５００ｎＭの最終濃度を各々与える０．２５ｍｌの各プライマー、１．０ｍｌの水、及び１．０ｍｌのストックｃＤＮＡ鋳型の１／１０希釈

物を有する。循環条件は、９５℃で１５秒間及び６０℃で１分間の４０サイクルである必要がある。各実行の完了時、解離融解曲線分析を実施する。

【０１９６】

タンパク質合成の測定

ＨＥＫ２９３細胞に、ＥＢＶＥ１－ＧＡｒ．ＲＢＤ－ＡＤＡＲ２ＤＤとともにＥＢＮＡ１－ＧＦＰ発現構築物をトランスフェクトする。トランスフェクションの２４時間後、細胞を、２０μＣｉ／ｍｌの３［Ｈ］メチオニン（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を含有する成長培地中、３７℃で１２～１４時間標識する。細胞をＰＢＳで洗浄し、メチオニンを含まない成長培地中、３７℃で３０分間インキュベートし、１００μＣｉの３５［Ｓ］メチオニンで３０分間パルスする。パルス後、細胞を、１％トリトンＸ１００及びプロテアーゼ阻害剤を有するトリス緩衝生理食塩水で溶解し、プロテインＡセファロースで予備清澄化し、可溶化液を抗ＧＦＰ又はｍＡｂからβチューブリン（Ｓｉｇｍａ）で免疫沈降させる。免疫沈降サンプルを１０ｍｌのシンチラント液Ｕｌｔｉｍａ Ｇｏｌｄ（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ Ｌｉｆｅ ａｎｄ Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）に添加し、Ｐａｃｋａｒｄ液体シンチレーションアナライザーＴｒｉ－ｃａｒｂ２１００ＴＲでカウントする。

【０１９７】

実施例６：配列

配列番号１

ＰＵＭ１のＲＮＡ結合ドメイン；ジェンバンク：ＡＡＧ３１８０７．１のアミノ酸配列のＧｌｙ８２８～Ｇｌｙ１１７６

【化４３】

GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIQLKLERATPAERQLVFNEILQ
AAYQLMVDVFGNYVIQKFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGCRVIQKALEFIPS
DQQNEMVRELDGHVLKCVKDQNGNHVVQKCIECVQPQSLQFIIDAFKGQVFALSTHPYGC
RVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGNYVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG
NVLVLSQHKFASNVVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQYANYVVQK
MIDVAEPGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG

配列番号２

ＡＤＡＲ２アミノ酸配列；ＮＣＢＩ参照配列ＮＧ＿０５２０１５．１

【化４４】

LSNGGGGGPGRKRPLEEGSNGHSKYRLKKRRKTPGPVLPKNALMQLNEIKPGLQYTLLSQ
TGPVHAPLFVMSVEVNGQVFEGSGPTKKKAKLHAAEKALRSFVQFPNASEAHLAMGRTLS
VNTDFTSDQADFPDTLFNGFETPDKAEPPFYVGSNGDDSFSSSGDLSLSASPVPASLAQP
PLPVLPPFPPPSGKNPVMILNELRPGLKYDFLSESGESHAKSFVMSVVVDGQFFEGSGRN
KKLAKARAAQSALAAIFNLHLDQTPSRQPIPSEGLQLHLPQVLADAVSRLVLGKFGDLTD
NFSSPHARRKVLAGVVMTTGTDVKDAKVISVSTGTKCINGEYMSDRGLALNDCHAEIISR
RSLLRFLYTQLELYLNNKDDQKRSIFQKSERGGFRLKENVQFHLYISTSPCGDARIFSPH
EPILEGSRSYTQAGVQWCNHGSLQPRPPGLLSDPSTSTFQGAGTTEPADRHPNRKARGQL
RTKIESG**E**GTIPVRSNASIQTWDGVLQGERLLTMSCSDKIARWNVVGIQGSLLSIFVEPI
YFSSIILGSLYHGDHLSRAMYQRISNIEDLPPLYTLNKPLLSGISNAEARQPGKAPNFSV
NWTVGDSAIEVINATTGKDELGRASRLCKHALYCRWMRVHGKVPSHLLRSKITKPNVYHE
SKLAAKEYQAAKARLFTAFIKAGLGAWVEKPTEQDQFSLTP (配列番号2)

配列番号３：ＧｌｕＡ２のアミノ酸配列；ＮＣＢＩ参照配列：ＮＭ＿０００８２６．３

【化４５】

MQKIMHISVL LSPVLWGLIF GVSSNSIQIG GLFPRGADQE YSAFRVGMVQ
FSTSEFRLTP HIDNLEVANS FAVTNAFCSQ FSRGVYAIFG FYDKKSVNTI
TSFCGTLHVS FITPSFPTDG THPFVIQMRP DLKGALLSLI EYYQWDKFAY
LYDSDRGLST LQAVLDSAAE KKWQVTAINV GNINNDKKDE MYRSLFQDLE
LKKERRVILD CERDKVNDIV DQVITIGKHV KGYHYIIANL GFTDGDLLKI
QFGGANVSGF QIVDYDDSLV SKFIERWSTL EEKEYPGAHT TTIKYTSALT
YDAVQVMTEA FRNLRKQRIE ISRRGNAGDC LANPAVPWGQ GVEIERALKQ
VQVEGLSGNI KFDQNGKRIN YTINIMELKT NGPRKIGYWS EVDKMVVTLT
ELPSGNDTSG LENKTVVVTT ILESPYVMMK KNHEMLEGNE RYEGYCVDLA
AEIAKHCGFK YKLTIVGDGK YGARDADTKI WNGMVGELVY GKADIAIAPL
TITLVREEVI DFSKPFMSLG ISIMIKKPQK SKPGVFSFLD PLAYEIWMCI
VFAYIGVSVV LFLVSRFSPY EWHTEEFEDG RETQSSESTN EFGIFNSLWF
SLGAFMQQGC DISPRSLSGR IVGGVWWFFT LIIISSYTAN LAAFLTVERM
VSPIESAEDL SKQTEIAYGT LDSGSTKEFF RRSKIAVFDK MWTYMRSAEP
SVFVRTTAEG VARVRKSKGK YAYLLESTMN EYIEQRKPCD TMKVGGNLDS
KGYGIATPKG SSLRNAVNLA VLKLNEQGLL DKLKNKWWYD KGECGSGGGD
SKEKTSALSL SNVAGVFYIL VGGLGLAMLV ALIEFCYKSR AEAKRMKVAK
NAQNINPSSS QNSQNFATYK EGYNVYGIES VKI

【図面】

【図１Ａ】

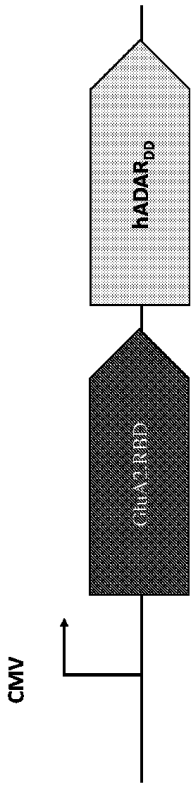


FIG. 1A

【図１Ｂ】

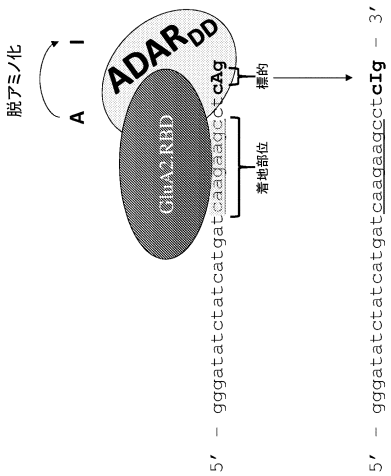
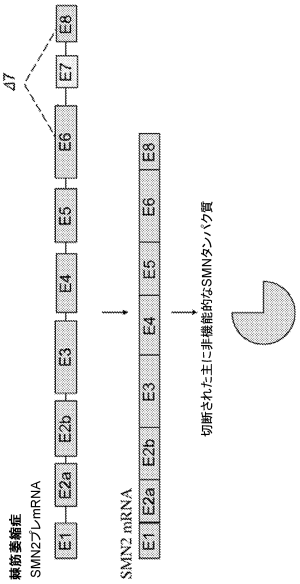


図 1B

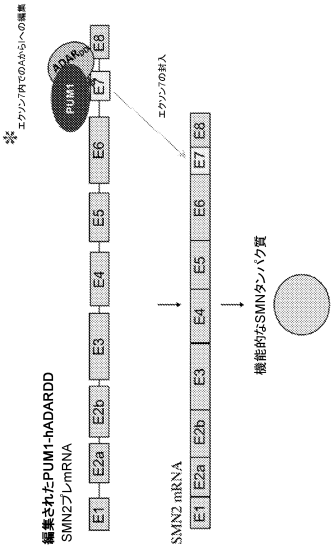
【図２】

図 2



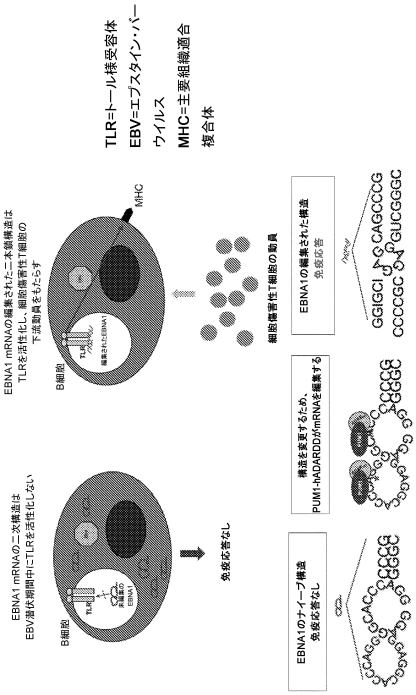
【図３】

図 3



【図４】

図 4



【配列表】
20225131590000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2019/063798

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N9/78
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 C07K

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, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012/068627 A1 (UNIV WESTERN AUSTRALIA [AU]; FILIPOVSKA ALEKSANDRA [AU] ET AL.) 31 May 2012 (2012-05-31)	1,2, 4-12, 38-40, 48-52, 56-58
Y	abstract page 8; claims 1-17,23,24,; sequences 16,18,39	53-55, 59-62

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] 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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
27 February 2020	10/03/2020

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Gurdjian, Didier

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2019/063798

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018/161032 A1 (UNIV CALIFORNIA [US]) 7 September 2018 (2018-09-07)	1-3,6,7, 9-13, 16-18, 27, 32-41, 44-50, 56-58
Y	abstract page 26 - page 27; claims 1,13-52,71-73; figure 23; table 1	53-55, 59-62

X	WO 2018/017144 A1 (UNIV BRANDEIS [US]) 25 January 2018 (2018-01-25)	1-3,5, 9-18, 32-38, 41, 46-50, 56-58,62
	abstract; claims 1-20; figures 1,12,14; sequence 4 page 4, line 23 - page 6, line 35 page 10, paragraph 1	

X	WO 2018/053037 A1 (THE JACKSON LABORATORY [US]) 22 March 2018 (2018-03-22)	1,2, 4-12, 38-40, 48-52, 56-58
Y	abstract paragraph [0008] paragraph [0097] - paragraph [0126]; claims 1-21,; figure 1; examples 1-3; sequences 2,3,19,29-35,107,109	53-55, 59-62

X	YANG WANG ET AL: "Engineered proteins with Pumilio/ fem-3 mRNA binding factor scaffold to manipulate RNA metabolism", FEBS JOURNAL, vol. 280, no. 16, 1 August 2013 (2013-08-01), pages 3755-3767, XP055499176, GB ISSN: 1742-464X, DOI: 10.1111/febs.12367	1-12, 14-38, 41-52
Y	abstract page 7, paragraph 2 - paragraph 3; figures 1-3	53-55, 59-62

	-/--	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2019/063798

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Weijin Xu ET AL: "Mechanistic implications of enhanced editing by a HyperTRIBE RNA-binding protein", , 1 February 2018 (2018-02-01), XP055671360, DOI: 10.1261/rna Retrieved from the Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5769745/pdf/173.pdf [retrieved on 2020-02-24] abstract; figure 6	1-3,5-7, 11-20
X	Y. LIU ET AL: "Chimeric double-stranded RNA-specific adenosine deaminase ADAR1 proteins reveal functional selectivity of double-stranded RNA-binding domains from ADAR1 and protein kinase PKR", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 97, no. 23, 7 November 2000 (2000-11-07), pages 12541-12546, XP055671361, US ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.97.23.12541 abstract	1-3,5-7, 11-20
Y	YAMASHITA TAKENARI ET AL: "The molecular link between inefficient GluA2 Q/R site-RNA editing and TDP-43 pathology in motor neurons of sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients", BRAIN RESEARCH, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1584, 16 December 2013 (2013-12-16), pages 28-38, XP029064507, ISSN: 0006-8993, DOI: 10.1016/J.BRAINRES.2013.12.011 abstract page 36, left-hand column, paragraph 1	55,62
Y	T. H. COADY ET AL: "Trans-Splicing-Mediated Improvement in a Severe Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy", THE JOURNAL OF NEUROSCIENCE, vol. 30, no. 1, 6 January 2010 (2010-01-06), pages 126-130, XP055672065, US ISSN: 0270-6474, DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4489-09.2010 abstract	54,61

-/--

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2019/063798

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	VICTORIA E. S. ARMERO ET AL: "Transcriptome-wide analysis of alternative RNA splicing events in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinomas", PLOS ONE, vol. 12, no. 5, 11 May 2017 (2017-05-11), page e0176880, XP055672070, DOI: 10.1371/journal.pone.0176880 abstract	53,59,60
A	YU CHEN ET AL: "Engineering RNA-binding proteins for biology", FEBS JOURNAL, vol. 280, no. 16, 5 July 2013 (2013-07-05) , pages 3734-3754, XP055671381, GB ISSN: 1742-464X, DOI: 10.1111/febs.12375 abstract page 3 - page 7	5-8
A	WANG ET AL: "Modular Recognition of RNA by a Human Pumilio-Homology Domain", CELL, vol. 110, no. 4, 23 August 2002 (2002-08-23), pages 501-512, XP055608842, DOI: 10.1016/S0092-8674(02)00873-5 cited in the application the whole document	5-8
A	LU G ET AL: "Understanding and engineering RNA sequence specificity of PUF proteins", CURRENT OPINION IN STRUCTURAL BIOLOGY, ELSEVIER LTD, GB, vol. 19, no. 1, 1 February 2009 (2009-02-01), pages 110-115, XP026045679, ISSN: 0959-440X, DOI: 10.1016/J.SBI.2008.12.009 [retrieved on 2009-01-29] the whole document	5-8
A	US 2016/238593 A1 (BOYDEN EDWARD S [US] ET AL) 18 August 2016 (2016-08-18) abstract; claims 1-22	5-8

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2019/063798

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012068627 A1	31-05-2012	US 2013323813 A1	05-12-2013
		US 2017210782 A1	27-07-2017
		WO 2012068627 A1	31-05-2012
WO 2018161032 A1	07-09-2018	CN 110612353 A	24-12-2019
		EP 3589751 A1	08-01-2020
		GB 2574769 A	18-12-2019
		WO 2018161032 A1	07-09-2018
WO 2018017144 A1	25-01-2018	EP 3487998 A1	29-05-2019
		JP 2019525774 A	12-09-2019
		US 2019390186 A1	26-12-2019
		WO 2018017144 A1	25-01-2018
WO 2018053037 A1	22-03-2018	AU 2017327384 A1	11-04-2019
		CA 3036695 A1	22-03-2018
		CN 109982710 A	05-07-2019
		EP 3512535 A1	24-07-2019
		EP 3512565 A1	24-07-2019
		JP 2019528718 A	17-10-2019
		US 2019218261 A1	18-07-2019
		WO 2018053035 A1	22-03-2018
		WO 2018053037 A1	22-03-2018
US 2016238593 A1	18-08-2016	US 2016238593 A1	18-08-2016
		US 2020033330 A1	30-01-2020

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*1/21 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/21		４Ｈ０４５
Ｃ１２Ｎ	*5/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10		
Ｃ１２Ｎ	*15/09 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/09	１００	
Ａ６１Ｐ	*25/28 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/28		
Ａ６１Ｐ	*25/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/00		
Ａ６１Ｐ	*35/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		
Ａ６１Ｐ	*7/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	7/00		
Ａ６１Ｐ	*21/02 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	21/02		
Ａ６１Ｐ	*43/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１０５	
Ａ６１Ｐ	*25/16 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/16		
Ａ６１Ｐ	*11/06 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	11/06		
Ａ６１Ｐ	*11/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	11/00		
Ａ６１Ｐ	*21/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	21/00		
Ａ６１Ｐ	*21/04 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	21/04		
Ａ６１Ｐ	*17/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	17/00		
Ａ６１Ｐ	*7/06 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	7/06		
Ａ６１Ｐ	*7/04 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	7/04		
Ａ６１Ｐ	*25/14 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/14		
Ａ６１Ｐ	*1/04 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/04		
Ａ６１Ｐ	*7/02 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	7/02		
Ａ６１Ｐ	*27/02 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	27/02		
Ａ６１Ｐ	*13/02 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	13/02		
Ａ６１Ｐ	*3/10 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/10		
Ａ６１Ｐ	*9/12 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/12		
Ａ６１Ｐ	*31/12 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/12		
Ａ６１Ｐ	*31/20 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/20		
Ａ６１Ｐ	*35/02 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/02		
Ａ６１Ｐ	*11/04 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	11/04		
Ａ６１Ｋ	*38/16 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/16		
Ａ６１Ｋ	*48/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00		
Ａ６１Ｋ	*35/76 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/76		
Ａ６１Ｋ	*31/7088(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7088		
Ａ６１Ｋ	*31/711(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/711		
Ａ６１Ｋ	*35/12 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/12		
Ｃ１２Ｎ	*9/78 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	9/78	ＺＮＡ	
Ｃ０７Ｋ	*14/00 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	14/00		
Ｃ１２Ｎ	*15/113 (2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/113	Ｚ	

(32)優先日　平成30年12月17日(2018.12.17)
(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,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,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

弁理士　笹倉 真奈美
(72)発明者　ベリー， デイビッド アーサー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１４２， ケンブリッジ， ケンブリッジ パークウェイ ５５， ８ティーエイチ フロア
(72)発明者　ローズ， クリスタリン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１４２， ケンブリッジ， ケンブリッジ パークウェイ ５５， ８ティーエイチ フロア
(72)発明者 ファレリ， ジェレミア デイル
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１４２， ケンブリッジ， ケンブリッジ パークウェイ ５５， ８ティーエイチ フロア

Ｆターム（参考） 4B050 CC03 CC05 FF12E FF14E LL01
4B065 AA26X AB01 AC14 BA02 CA24 CA31 CA44
4C084 AA01 AA02 AA07 AA13 BA02 BA08 BA22 BA23 MA24 MA52
MA55 NA14 ZA011 ZA012 ZA021 ZA022 ZA151 ZA152 ZA161 ZA162 ZA331
ZA332 ZA421 ZA422 ZA511 ZA512 ZA531 ZA532 ZA541 ZA542 ZA551 ZA552
ZA591 ZA592 ZA621 ZA622 ZA681 ZA682 ZA811 ZA812 ZA891 ZA892 ZA941
ZA942 ZB211 ZB212 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272 ZB331 ZB332 ZC351 ZC352
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 MA24 MA52 MA55 NA14
ZA01 ZA02 ZA15 ZA16 ZA33 ZA42 ZA51 ZA53 ZA54 ZA55 ZA59
ZA62 ZA68 ZA81 ZA89 ZA94 ZB21 ZB26 ZB27 ZB33 ZC35
4C087 AA01 AA02 BB64 BB65 CA12 MA24 MA52 MA55 NA14 ZA01
ZA02 ZA15 ZA16 ZA33 ZA42 ZA51 ZA53 ZA54 ZA55 ZA59 ZA62
ZA68 ZA81 ZA89 ZA94 ZB21 ZB26 ZB27 ZB33 ZC35
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 DA89 EA28 FA74 GA22 GA26