

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7284101号
(P7284101)

(45)発行日 令和5年5月30日(2023.5.30)

(24)登録日 令和5年5月22日(2023.5.22)

(51)国際特許分類	F I
C 1 2 N	15/56 (2006.01)
A 6 1 K	9/127(2006.01)
A 6 1 K	9/51 (2006.01)
A 6 1 K	48/00 (2006.01)
A 6 1 P	3/10 (2006.01)
C 1 2 N	15/56
A 6 1 K	9/127
A 6 1 K	9/51
A 6 1 K	48/00
A 6 1 P	3/10

請求項の数 19 (全57頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2019-565348(P2019-565348)
(86)(22)出願日	平成30年5月31日(2018.5.31)
(65)公表番号	特表2020-522244(P2020-522244)
	A)
(43)公表日	令和2年7月30日(2020.7.30)
(86)国際出願番号	PCT/US2018/035477
(87)国際公開番号	WO2018/222926
(87)国際公開日	平成30年12月6日(2018.12.6)
審査請求日	令和3年5月26日(2021.5.26)
(31)優先権主張番号	62/513,350
(32)優先日	平成29年5月31日(2017.5.31)
(33)優先権主張国・地域又は機関	
	米国(US)
前置審査	

(73)特許権者	516134291 ウルトラジェニクス フーマシュー イカル インク. ULTRAGENYX PHARMAC EUTICAL INC. アメリカ国 カリフォルニア 94949 ナヴァト レヴェロニコート 60
(74)代理人	100107984 弁理士 廣田 雅紀
(74)代理人	100182305 弁理士 廣田 鉄平
(74)代理人	100096482 弁理士 東海 裕作
(74)代理人	100131093 弁理士 堀内 真

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 糖原病Ⅱ型のための治療薬

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号2のヒトアミロ-アルファ-1,6-グルコシダーゼ、4-アルファ-グルカノトランスフェラーゼ(hAGL)をコードする核酸塩基配列を含むポリヌクレオチドであって、hAGLをコードする前記核酸塩基配列が、配列番号41と少なくとも99.9%同一であり、前記ポリヌクレオチドにコードされるポリペプチドがhAGL活性を有する、前記ポリヌクレオチド。

【請求項2】

少なくとも1つのウリジン残基が、N¹メチルプソイドウリジンで置換される、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

【請求項3】

全てのウリジン残基が、N¹メチルプソイドウリジンで置換される、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

【請求項4】

5'キャップを含む、請求項1-3のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

【請求項5】

5'非翻訳領域(5'UTR)を含む、請求項1-4のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

【請求項6】

5'UTRが、タバコエッチウイルス(TEV)に由来する、請求項に記載のポリヌク

レオチド。

【請求項 7】

3' UTR が、配列番号 3 を含む、請求項又は 6 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 8】

3' 非翻訳領域 (3' UTR) を含む、請求項 1 ～ 7 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

【請求項 9】

3' UTR が、アフリカツメガエルベータグロビンに由来する、請求項 1 ～ 7 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

【請求項 10】

3' UTR が、配列番号 5 を含む、請求項又は 9 に記載のポリヌクレオチド。

10

【請求項 11】

3' ポリ A テールを含む、請求項 1 ～ 10 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

【請求項 12】

3' ポリ A テールが、60 ～ 220 個のアデノシンヌクレオチド長である、請求項 1 ～ 10 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

【請求項 13】

3' ポリ A テールが、約 100 個のヌクレオチド長である、請求項 2 ～ 10 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

【請求項 14】

請求項 1 ～ 13 のいずれかに記載の 1 又は 2 以上のポリヌクレオチドと、薬学的に許容される担体とを含む組成物。

20

【請求項 15】

担体が、トランスフェクション試薬、ナノ粒子、及びリポソームから選択される、請求項 1 ～ 14 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 16】

担体が、ナノ粒子である、請求項 1 ～ 15 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 17】

ナノ粒子が、ATX-002、ATX-081、ATX-095 及び ATX-126 から選択される、請求項 1 ～ 16 のいずれかに記載の組成物。

30

【請求項 18】

請求項 1 ～ 17 のいずれかに記載の組成物を含む、hAGL の活性低下に関連する疾患若しくは障害の改善剤、予防剤、発症遅延剤、又は治療剤。

【請求項 19】

疾患が糖原病 III 型である、請求項 1 ～ 18 のいずれかに記載の組成物を含む、hAGL の活性低下に関連する疾患若しくは障害の改善剤、予防剤、発症遅延剤、又は治療剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2017 年 5 月 31 日に出願された米国仮特許出願第 62/513,350 号の優先権を主張するものであり、この仮出願は、全ての目的のために参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

40

【0002】

本発明は、分子生物学および遺伝学の分野、ならびに翻訳可能な分子から生成される生物製剤および治療薬に関する。より具体的には、本発明は、インビボにおいて、および治療薬として使用するための、活性ポリペプチドまたはタンパク質に翻訳される能力を有する分子についての方法、構造、および組成物に関する。

【0003】

電子的に提出されたテキストファイルの説明

本明細書と共に電子的に提出されたテキストファイルの内容は、参照によりそれらの全

50

体が本明細書に組み込まれる：配列表のコンピューター可読形式コピー（ファイル名：ULP1_041_01WO_SeqList_ST25.txt、記録日：2018年5月30日、ファイルサイズ：226キロバイト）。

【背景技術】

【0004】

糖原病III型（GSDIIIまたはCori病としても知られている）は、アミロ-アルファ-1, 6-グルコシダーゼ、4-アルファ-グルカノトランスフェラーゼ（AGL）として知られるグリコーゲン脱分岐酵素の欠損によって引き起こされるグリコーゲン代謝の稀な（発生率1:100,000）先天異常である。この常染色体劣性代謝障害は、さまざまな肝臓、心筋、および骨格筋の関与により特徴付けられる。

10

【0005】

欠損酵素であるAGLの組織発現の違いに基づいて、GSDIIIには4つのサブタイプがある。GSDIIIAは、全GSDIIIの約85%を占め、肝臓および筋肉の両方における酵素欠損に起因して、肝臓および筋肉の病変を呈する。GSDIIIBは約15%を占め、通常、肝臓のみにおける酵素欠損に起因して、肝臓の病変のみを呈する。一方、GSDIIICとGSDIIIDは両方とも非常に稀（rate）であり、GSDIIICは、グルコシダーゼ脱分岐活性の欠損に起因すると考えられ、GSDIIIDは、トランスフェラーゼ脱分岐活性の欠損に起因すると考えられている。

20

【0006】

乳児期および小児期早期では、肝病変は、ケトン性低血糖、肝腫大、高脂血症、および肝トランスアミナーゼ上昇として現れる。青年期および成人期では、肝疾患は目立たなくなる。肥大型心筋症は、通常小児期に、GSDIIIA患者の大部分で発症する。大多数においては無症状であるが、重度の心機能障害、うっ血性心不全、そしてまれに突然死にまで至り、その臨床的意義には幅がある。衰弱として現れる骨格筋ミオパシーは、通常小児期には明らかではないが、ゆっくりと進行し、通常は成人で顕著となる。

20

【0007】

影響を受ける臓器と一致して、GSDIII患者の血清には、高いアラニントランスアミナーゼ（ALT）、アスパラギン酸トランスアミナーゼ（AST）、アルカリホスファターゼ（ALP）、および/またはクレアチンホスホキナーゼ（CPK）活性が頻繁に存在する。

30

【0008】

上記のように、GSDIIIは、AGLの欠損によって引き起こされる。この欠損は一般に、AGL遺伝子の遺伝性変異（複数可）に起因すると考えられ、GSDIIIに罹患した対象においてAGL酵素活性の部分的または完全な消失をもたらす。GSDIII患者におけるAGLタンパク質の分子解析は、いくつかの民族集団で実施されており、100を超える異なるAGL変異が報告されている。Goldsteinら、2010、Genet. Med. 12: 424-430を参照されたい。Sentnerら、2013、JIMD Rep. 7: 19-26も参照されたい。

30

【0009】

現在、GSDIIIには効果的な治療法がない。多くの場合、夜間の経胃点滴栄養補給またはコーンスターーチサプリメントを使用することにより、炭水化物を多く含む食事を頻繁に摂取して低血糖をコントロールする試みが行われている。一方、ミオパシーの患者は、日中の高タンパク食に加えて、夜間は経腸注入を行うことにより、治療されている。症状の一時的な改善は少数の患者で報告されているが、高タンパク食が進行性ミオパシーを予防または治療することを実証する長期データはない。Chen YT、Burchell A, Glycogen storage disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, The metabolic and molecular basis of inherited disease. New York: McGraw Hill, 1995: 935-65を参照されたい。進行性ミオパシーおよび/または心筋症は、成人の罹患率の主な原因であり、進行性肝硬変お

40

50

および肝癌を呈する患者が報告されている。したがって、この疾患の根底にある原因、すなわち A G L 酵素活性の欠損に対処することができる治療が緊急に必要とされている。

【 0 0 1 0 】

今まで、G S D I I I における A G L などの、おそらく細胞膜を介して外因性酵素を細胞質へと送達する効率的かつ特異的な細胞取り込み機序の欠失に起因して細胞質ゾルに欠損酵素が存在する疾患では、酵素置換は探求されてこなかった。

【 0 0 1 1 】

本発明は、G S D I I I などの A G L 欠損に関連する疾患または状態を改善、予防、または治療することができる、活性 A G L を提供するために細胞質で翻訳される能力を有する分子、構造、および組成物を提供することにより、上記の必要性に対処する。

10

【発明の概要】

【 0 0 1 2 】

本発明は、1又は2以上の活性ポリペプチドおよびタンパク質、またはその断片を提供するために使用され得る、翻訳される能力を有する新規分子を含む組成物を提供する。本発明はさらに、さまざまな障害の予防または治療のための新規分子を含むこれらの組成物の使用方法を提供する。より具体的には、本発明の実施形態は、活性アミロ - アルファ - 1, 6 - グルコシダーゼ、4 - アルファ - グルカノトランスフェラーゼ (A G L) を提供する翻訳可能な分子を含む組成物、およびG S D I I I の治療のための組成物の使用方法を提供する。

【 0 0 1 3 】

本発明の翻訳可能な分子は、A G L ポリペプチドまたはタンパク質を産生するための機能的な細胞質内活性を有し得る。ペプチドおよびタンパク質は、治療モダリティのために活性があり得る。

20

【 0 0 1 4 】

本発明の翻訳可能な分子は、特に細胞の細胞質において長い半減期を有し得る。翻訳可能な分子は、A G L 欠損に関連する疾患または状態を改善、予防、または治療するために活性がある製品を提供するように発現可能であり得る。

【 0 0 1 5 】

本開示は、A G L ポリペプチドまたはタンパク質を産生するための翻訳可能な分子についての一連の構造を提供する。いくつかの実施形態では、翻訳可能な分子は、翻訳される能力の増大、および / または天然m R N A よりも長い半減期を有することができる。

30

【 0 0 1 6 】

本発明の翻訳可能な分子は、医薬品において、ならびに活性ポリペプチドおよびタンパク質を産生および送達するための方法および組成物において、使用することができる。本発明の翻訳可能な分子を使用して、インビトロ、エクスピボ、またはインビボでポリペプチドまたはタンパク質を提供することができる。

【 0 0 1 7 】

本開示の実施形態は、ヒトアミロ - アルファ - 1, 6 - グルコシダーゼ、4 - アルファ - グルカノトランスフェラーゼ (A G L) または A G L 活性を有するその断片を発現するための一連の新規のポリヌクレオチドを提供する。ポリヌクレオチドは、天然ヌクレオチドおよび化学修飾ヌクレオチドを含むことができる。ポリヌクレオチドは、ヒト A G L または A G L 活性を有するその断片を提供するように発現可能であり得る。

40

【 0 0 1 8 】

さらなる態様では、本発明は、ヒトアミロアルファ - 1, 6 - グルコシダーゼ、4 - アルファ - グルカノトランスフェラーゼ (A G L) 、または A G L 活性を有するその断片を発現するように1又は2以上のロックされていない核酸 (u n l o c k e d n u c l e i c a c i d) (U N A) モノマーを含む一連の新規な翻訳可能なオリゴマーを提供する。翻訳可能なオリゴマーは、天然ヌクレオチドおよび化学修飾ヌクレオチドと共に、1又は2以上のU N A モノマーを含むことができる。1又は2以上のU N A モノマーを含む翻訳可能なオリゴマーは、ヒトアミロ - アルファ - 1, 6 - グルコシダーゼ、4 - アルフ

50

ア - グルカノトランスフェラーゼ (A G L) または A G L 活性を有するその断片を提供するように発現可能であり得る。

【 0 0 1 9 】

特定の態様では、本発明の翻訳可能な分子は、ポリペプチドまたはタンパク質、またはその断片の高効率な発現を提供することができる。発現は、インビトロ、エクスピボ、またはインビボであり得る。

【 0 0 2 0 】

いくつかの実施形態では、本発明の分子は、同じポリペプチドまたはタンパク質をコードする天然の成熟 m R N A よりも増大した細胞質半減期を有し得る。本発明の分子および組成物は、天然の成熟 m R N A に対して増大した機能的細胞活性を提供することができる。 10

【 0 0 2 1 】

さらなる態様では、本発明の翻訳可能な分子は、天然の成熟 m R N A と比較して、ペプチドまたはタンパク質産物を提供する薬剤としての増大した活性を提供することができる。本発明の翻訳可能な分子は、効果的な治療に必要とされる用量レベルを軽減し得る。

【 0 0 2 2 】

本発明の実施形態は以下を含む。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 3 】

【 図 1 】本発明の翻訳可能な分子を使用した、インビトロにおけるヒトアミロ - アルファ - 1 , 6 - グルコシダーゼ、4 - アルファ - グルカノトランスフェラーゼ (A G L 、 N M _ 0 0 0 0 2 8) の発現の結果を示す。図 1 は、参照分子 5 3 4 に対して正規化された A M L 1 2 および C 2 C 1 2 細胞における A G L の相対的発現を示す。縦軸は、参照に対する倍率増大を反映しており、例えば、1 0 は、参照より 1 0 倍増大している。参照分子を含む分子は、タバコエッチャイルス (T E V) 5 ' U T R およびアフリカツメガエルゼノバスペーダグロビン (X B G) 3 ' U T R を含む。分子は転写中にキャップされ、N¹メチルプソイドウリジンを用いて合成されたため、ウリジンの 1 0 0 % が N¹メチルプソイドウリジンで置換された。 A G L をコードする翻訳可能な分子は、2 つの細胞株 (A M L 1 2 、 C 2 C 1 2) でトランスフェクトされた。細胞を溶解し、トランスフェクション後 6 時間で回収した。 A G L に特異的な抗体 (a b 1 3 3 7 2 0 、ウサギ) を使用して A G L を検出するために、定量的ウエスタンプロットを実施した。 20

【 図 2 】本発明の翻訳可能な分子を使用した、インビトロにおけるヒトアミロ - アルファ - 1 , 6 - グルコシダーゼ、4 - アルファ - グルカノトランスフェラーゼ (A G L 、 N M _ 0 0 0 0 2 8) の発現の結果を示す。図 2 は、参照分子 5 3 4 に対して正規化された A M L 1 2 および C 2 C 1 2 細胞における A G L の相対的発現を示す。縦軸は、参照に対する倍率増大を反映しており、例えば、1 0 は、参照より 1 0 倍増大している。参照分子を含む分子は、タバコエッチャイルス (T E V) 5 ' U T R およびアフリカツメガエルベータグロビン (X B G) 3 ' U T R を含む。分子は転写中にキャップされ、N¹メチルプソイドウリジンを用いて合成されたため、ウリジンの 1 0 0 % が N¹メチルプソイドウリジンで置換された。 A G L をコードする翻訳可能な分子は、2 つの細胞株 (A M L 1 2 、 C 2 C 1 2) でトランスフェクトされた。細胞を溶解し、トランスフェクション後 2 4 時間で回収した。 A G L に特異的な抗体 (a b 1 3 3 7 2 0 、ウサギ) を使用して A G L を検出するために、定量的ウエスタンプロットを実施した。 30

【 図 3 】本発明の翻訳可能な分子を使用した、インビボにおけるヒトアミロ - アルファ - 1 , 6 - グルコシダーゼ、4 - アルファ - グルカノトランスフェラーゼ (A G L 、 N M _ 0 0 0 0 2 8) の発現の結果を示す。図 3 は、2 4 時間および 4 8 時間の時点での翻訳可能な分子 5 2 8 および 5 3 4 (参照) についての W T マウスにおける A G L の相対的発現を示す。分子は、タバコエッチャイルス (T E V) 5 ' U T R およびアフリカツメガエルベータグロビン (X B G) 3 ' U T R を含む。分子は転写中にキャップされ、N¹メチルプソイドウリジンを用いて合成されたため、ウリジンの 1 0 0 % が N¹メチルプソイドウリジンで置換された。 A G L をコードする翻訳可能な分子は、それぞれ脂質ナノ粒子製剤中で 40

10

20

30

40

50

調製され、10 mg / kg でWTマウスに静脈内注射された。マウスの肝臓を24時間と48時間で採取し、AGLに特異的な抗体(ab133720、ウサギ)を使用してAGLを検出するために、定量的ウエスタンプロットを実施した。

【図4】本発明の翻訳可能な分子を使用した、インビボにおけるヒトアミロ・アルファ-1, 6-グルコシダーゼ、4-アルファ-グルカノトランスフェラーゼ(AGL、NM_000028)の発現の結果を示す。図4は、ベースラインPBS(100)と比較した、翻訳可能な分子525、527、528、529、および546の投与後のWTマウスにおけるAGLの相対的肝臓発現を示す。AGLをコードする合成された翻訳可能な分子525、527、528、529、および546は、脂質ナノ粒子製剤中で調製され、WTマウスにIPを介して注射された。注入された用量は10 mpkであり、さらなる分析のために6時間目に肝臓を採取した。AGLに特異的な抗体(ab133720、ウサギ)を使用してAGLを検出するために、定量的ウエスタンプロットを実施した。

【図5】3つの翻訳可能な分子：546、1783、および1784からのヒトAGLの発現の結果を示す。ヒト初代肝細胞にコドン最適化したmRNAをトランスフェクトし、トランスフェクションの6、24、48、72時間後にIn-Cel1 Western(商標)によりAGLタンパク質発現を測定した。mRNA配列の発現を未処理の対照('unt')と比較した。

【図6】野生型C57BL/6マウスにおける脂質ナノ粒子と共に製剤化されたさまざまなmRNA分子からのヒトAGLの発現を示す。肝生検試料からのホモジネート中のmRNA分子から発現した外因性ヒトAGLのタンパク質濃度(ng/mg)は、多重反応モニタリングアッセイにより決定された。グラフ中546.1、736.1、738.1、737.1、731.1、および1783.1として示されている翻訳可能な分子は、実施例2で記載されるように、それぞれ546、736、738、737、731、および1783と同じである。一方、翻訳可能な分子546.7は、実施例2に記載されている546と同じ核酸塩基配列を有するが、翻訳可能な分子546を合成するために使用されたN¹-メチルブソイドウリジンではなく、ウリジンの代わりに5-メトキシウリジンを用いて合成された。

【図7】脂質ナノ粒子を用いて製剤化されたさまざまなmRNA分子で処理した野生型C57BL/6マウスにおける内因性マウスAGLの発現を示す。肝生検試料からのホモジネート中で発現した内因性マウスAGLのタンパク質濃度(ng/mg)は、多重反応モニタリングアッセイによって決定された。グラフ中546.1、736.1、738.1、737.1、731.1、および1783.1として示されている翻訳可能な分子は、実施例2で記載されるように、それぞれ546、736、738、737、731、および1783と同じである。一方、翻訳可能な分子546.7は、実施例2に記載されている546と同じ核酸塩基配列を有するが、翻訳可能な分子546を合成するために使用されたN¹-メチルブソイドウリジンではなく、ウリジンの代わりに5-メトキシウリジンを用いて合成された。

【図8】ビヒクル('VEH')で処理したAGLノックアウトマウスからの肝臓の組織病理学を示す。顕著ないし重度の肝細胞の空胞化、および中程度ないし顕著なグリコーゲン蓄積における増大が、ビヒクルで処理した肝細胞内で観察された。

【図9】ATX2脂質ナノ粒子を用いて製剤化された翻訳可能な分子546で処理したAGLノックアウトマウスからの肝臓の組織病理学を示す。軽度ないし中程度の肝細胞の空胞化のみ、および軽度ないし中程度の肝細胞内のグリコーゲン蓄積における増大のみが、ATX2脂質ナノ粒子を用いて製剤化された翻訳可能な分子546で処理した肝細胞内で観察された。

【発明を実施するための形態】

【0024】

本発明は、治療用途に使用される一連の新規薬剤および組成物を提供する。本発明の分子および組成物は、対象においてGSDIIIおよび/またはアミロ・アルファ-1, 6-グルコシダーゼ、4-アルファ-グルカノトランスフェラーゼ(AGL)の存在または

10

20

30

40

50

機能の低下に関連した疾患を改善、予防、または治療するために使用することができる。

【 0 0 2 5 】

いくつかの実施形態では、本発明は、ヒトアミロ - アルファ - 1 , 6 - グルコシダーゼ、4 - アルファ - グルカノトランスフェラーゼを発現するための、合成の、精製された、翻訳可能なポリヌクレオチド分子を包含する。分子は、天然および化学修飾ヌクレオチドを含み、ヒトアミロ - アルファ - 1 , 6 - グルコシダーゼ、4 - アルファ - グルカノトランスフェラーゼ (A G L) 、または A G L 活性を有するその断片をコードし得る。

【 0 0 2 6 】

特定の実施形態では、本開示は、ヒトアミロアルファ - 1 , 6 - グルコシダーゼ、4 - アルファ - グルカノトランスフェラーゼ (A G L) 、または A G L 活性を有するその断片を発現するための 1 又は 2 以上の U N A モノマーを含む、合成の、精製された、翻訳可能なオリゴマー分子を含む。翻訳可能なオリゴマーは、1 又は 2 以上の U N A モノマー、ならびに天然ヌクレオチドおよび化学修飾ヌクレオチドを含むことができる。1 又は 2 以上の U N A モノマーを含む翻訳可能なオリゴマーは、ヒトアミロ - アルファ - 1 , 6 - グルコシダーゼ、4 - アルファ - グルカノトランスフェラーゼ (A G L) または A G L 活性を有するその断片を提供するように発現可能であり得る。

10

【 0 0 2 7 】

本明細書で使用されるとき、「翻訳可能な」という用語は、「発現可能な」という用語と互換的に使用されてもよく、ポリヌクレオチドまたはその一部が宿主細胞によってポリペプチドに変換される能力を指す。当技術分野で理解されているように、翻訳は、細胞の細胞質内のリボソームがポリペプチドを作成するプロセスである。翻訳では、メッセンジャー R N A (m R N A) は、リボソーム複合体中、 t R N A によってデコードされ、特定のアミノ酸鎖またはポリペプチドを産生する。さらに、本明細書でオリゴマーに関して使用されるとき、「翻訳可能な」という用語は、オリゴマーの少なくとも一部、例えば、オリゴマー配列のコード領域 (コード配列または C D S としても知られる) がタンパク質またはその断片に変換されることが可能であることを意味する。

20

【 0 0 2 8 】

本明細書で使用されるとき、「モノマー」という用語は、同じまたは異なる種類の別の分子と結合してオリゴマーを形成することができる、単一の単位、例えば、単一の核酸を指す。いくつかの実施形態では、モノマーは、ロックされていない核酸、すなわち、 U N A モノマーであってもよい。

30

【 0 0 2 9 】

一方、「オリゴマー」という用語は、「ポリヌクレオチド」と互換的に使用され、少なくとも 2 つのモノマーを含む分子を指し、 D N A および R N A などのオリゴヌクレオチドを含む。 R N A モノマーおよび / またはロックされていない核酸 (U N A) モノマーを含有するオリゴマーの場合、本発明のオリゴマーは、コード配列 (C D S) に加えて配列を含有することができる。これらの追加の配列は、非翻訳配列、すなわち、宿主細胞によってタンパク質に変換されない配列であり得る。これらの非翻訳配列は、5 ' キャップ、5 ' 非翻訳領域 (5 ' U T R) 、3 ' 非翻訳領域 (3 ' U T R) 、およびポリアテール領域などのテール領域を含むことができる。本明細書でさらに詳細に説明されるように、これらの非翻訳配列のいずれもが、1 又は 2 以上の U N A モノマーを含んでもよく、これらの U N A モノマーは、宿主細胞の機構によって翻訳されることができない。本発明の文脈において、「翻訳可能なオリゴマー」、「翻訳可能な分子」、「翻訳可能なポリヌクレオチド」、または「翻訳可能な化合物」は、タンパク質またはその断片、例えば、ヒト A G L タンパク質またはその断片に変換されることが可能である、 R N A のコード領域 (例えば、ヒト A G L のコード配列またはそのコドン最適化バージョン) などの領域を含む配列を指す。

40

【 0 0 3 0 】

本明細書で使用されるとき、「コドン最適化」という用語は、タンパク質発現レベルを増大させるコードされたタンパク質アミノ酸配列を変更することなく異なるコドンを選択することにより再設計された天然 (または天然の意図的に設計された変異体) コード配列

50

を意味する (Gustafssonら、Codon bias and heterologous protein expression. 2004、Trends Biotechnol 22: 346 - 53)。高コドン適応指数 (codon adaptation index) (CAI)、Low U法、mRNA二次構造、シス調節配列、GC含有量、および他の多くの類似変数などの変数は、タンパク質発現レベルと多少相関することが示されている (Villalobosら、Gene Designer: a synthetic biology tool for constructing artificial DNA segments. 2006、BMC Bioinformatics 7: 285)。高CAI (コドン適応指数) 法は、全タンパク質コード配列について最も頻繁に使用される同義のコドンを選択する。各アミノ酸のために最も頻繁に使用されるコドンは、ヒトゲノムの74218個のタンパク質コード遺伝子から推定される。Low U法は、U部分がより少ない同義のコドンに置換ができるUを含有するコドンのみを標的とする。置換にいくつかの選択肢がある場合、より頻繁に使用されるコドンが選択され得る。配列内の残りのコドンは、Low U法によって変更されない。この方法は、5-メトキシウリジンを用いて合成されるコード配列を設計するために、開示されたmRNAと組み合わせて使用され得る。

【0031】

本開示を備えた当業者には理解されるように、本発明の翻訳可能な分子は、対象においてアミロ-アルファ-1, 6-グルコシダーゼ、4-アルファ-グルカノトランスフェラーゼ (AGL) の活性低下に関連する (例えば、濃度、存在、および/または機能の低下に起因する) 任意の疾患または障害を改善、予防、または治療するために使用され得る。いくつかの実施形態では、本発明の翻訳可能な分子は、GSD IIIa、GSD IIIb、GSD IIIc、およびGSD IIId (本明細書では集合的にまたは個別に「GSD III」または「糖原病III型」と称される) のうちの1又は2以上を改善、予防、または治療するための方法において使用されることができる。本明細書で治療される疾患または障害 (例えば、GSD IIIa、GSD IIIb、GSD IIIc、またはGSD IIId) は、低血糖 (低血糖症)、肝臓の肥大 (肝腫大)、血液中の過剰な脂肪量 (高脂血症)、肝酵素の血中濃度の上昇、慢性肝疾患 (肝硬変)、肝不全、低成長、低身長、良性腫瘍 (腺腫)、肥大型心筋症、心機能障害、うっ血性心不全、骨格筋ミオパシー、および/または不十分な筋緊張 (筋緊張低下) に関連してもよい。いくつかの実施形態では、本発明の翻訳可能な分子を使用して、これらの前述の症状のいずれかまたは全てを改善、予防、または治療することができる。

【0032】

当業者には理解されるように、GSD IIIは、AGL欠損症、Cori病、コリ病、脱分岐欠損症、Forbes病、グリコーゲン脱分岐欠損症、GSD3、または限界デキストリン症 (細胞質ゾル内の限界デキストリン構造に起因する) を含むが、これらに限定されない、当技術分野での任意の数の代替的な名称によって参照されることができる。したがって、GSD IIIは、本明細書、実施例、図面、および特許請求の範囲でのこれらの代替的な名称のいずれかと互換的に使用することができる。

【0033】

機能的AGL部分をコードする本発明の翻訳可能な分子は、それを必要とする患者 (例えば、GSD III患者) の肝臓、特に肝細胞に送達することができ、患者の活性AGLレベルを上昇させることができる。翻訳可能な分子は、患者におけるGSD IIIの症状を予防、治療、改善、または逆転するために使用されることができる。

【0034】

さらなる態様では、本発明の翻訳可能な分子はまた、疾患を制御するために特定の食事へのGSD III患者の依存を軽減するために使用することができる。例えば、本発明の翻訳可能な分子を使用して、頻繁な高炭水化物の食事および/またはタンパク質が異常に多い食事へのGSD III患者の依存を軽減することができる。

【0035】

10

20

30

40

50

本発明の実施形態はさらに、ヒトアミロ - アルファ - 1 , 6 - グルコシダーゼ、4 - アルファ - グルカノトランスフェラーゼ (A G L) を発現するように翻訳可能な分子を作製するためのプロセスを包含する。プロセスには、天然および化学修飾ヌクレオシド三リン酸の存在下でインビトロで A G L D N A 鑄型を転写して生成物混合物を形成することと、生成物混合物を精製して翻訳可能な分子を単離することと、が含まれる。翻訳可能な分子はまた、当技術分野で既知の方法によって作製されてもよい。

【 0 0 3 6 】

本発明の分子は、R N A および / または U N A モノマーを含有する翻訳可能な分子であり得る。これらの翻訳可能な分子は、特に細胞質において長い半減期を有し得る。長期間翻訳可能な分子は、対象においてアミロ - アルファ - 1 , 6 - グルコシダーゼ、4 - アルファ - グルカノトランスフェラーゼ (A G L) の活性低下に関連する (例えば、濃度、存在、および / または機能の低下に起因する) 疾患または障害を改善、予防、または治療するため使用され得る。

10

【 0 0 3 7 】

本発明の翻訳可能な分子の特性は、それらの分子構造に従って生じ、その全体の分子の構造は、全体として、それらの特性に基づいて顕著な利益を提供することができる。本発明の実施形態は、タンパク質濃度の増大またはタンパク質活性の増大を有利に提供する 1 又は 2 以上の特性を有する翻訳可能な分子を提供することができる。本発明の分子および組成物は、対象においてアミロ - アルファ - 1 , 6 - グルコシダーゼ、4 - アルファ - グルカノトランスフェラーゼ (A G L) の活性低下に関連する (例えば、濃度、存在、および / または機能の低下に起因する) 任意の疾患または障害を改善、予防、または治療するための治療剤を含む製剤を提供することができる。

20

【 0 0 3 8 】

本発明は、インビトロ、エクスピボ、およびインビボにおいて活性ポリペプチドまたはタンパク質を提供するために驚くほど翻訳可能な一連の翻訳可能な分子を提供する。

【 0 0 3 9 】

本発明の翻訳可能な分子は、1 又は 2 以上の活性ポリペプチドまたはタンパク質、またはその断片を提供するように発現可能である。

【 0 0 4 0 】

翻訳可能な構造および組成物は、増大した翻訳活性または細胞質半減期を有し得る。これらの実施形態では、翻訳可能な構造および組成物は、天然の m R N A と比較して、哺乳動物細胞の細胞質内で機能的半減期を延長させることができる。

30

【 0 0 4 1 】

本明細書で使用されるとき、「半減期」という用語は、核酸またはタンパク質の濃度または活性などの量が、期間の開始時に測定された値の半分に低下するのに必要とされる時間である。

【 0 0 4 2 】

本明細書では、1 又は 2 以上の U N A モノマーを含有するオリゴマーを含む、本発明の翻訳可能な分子についての一連の構造が提供される。1 又は 2 以上の U N A モノマーを含有するオリゴマーには、特殊なリンカー基を組み込むことができる。リンカー基は、翻訳可能な分子の鎖に結合することができる。各リンカー基は核酸塩基に結合することもできる。

40

【 0 0 4 3 】

いくつかの態様では、リンカー基はモノマーであり得る。モノマーを結合して、鎖分子を形成することができる。本発明の鎖分子において、リンカー基モノマーは、鎖の任意の点で結合することができる。

【 0 0 4 4 】

特定の態様では、リンカー基モノマーは、本発明の鎖分子に結合することができ、その結果、リンカー基モノマーは、鎖の末端付近または鎖の任意の位置に存在する。

【 0 0 4 5 】

50

さらなる態様では、鎖分子のリンカー基はそれぞれ核酸塩基に結合することができる。鎖分子内の核酸塩基の存在は、鎖分子内の核酸塩基の配列を提供することができる。

【0046】

特定の実施形態では、本発明は、特定の天然ヌクレオチド、または非天然ヌクレオチド、または修飾ヌクレオチド、または化学修飾ヌクレオチドと共に、リンカー基モノマーの新規な組み合わせを組み込む鎖構造を有する翻訳可能なオリゴマー分子を提供する。

【0047】

本発明のオリゴマー分子は、核酸塩基の配列を表示することができ、インピトロ、エクスピボ、またはインピボにおいてポリペプチドまたはタンパク質を発現するように設計することができる。発現されたポリペプチドまたはタンパク質は、自然、天然または野生型mRNAから発現されたタンパク質に対応する活性、またはネガティブまたはドミナントネガティブタンパク質に対応する活性を含む、さまざまな形態の活性を有し得る。

10

【0048】

いくつかの態様では、本発明は、細胞の天然核酸分子の少なくとも一断片と同一の塩基配列を有する、活性のある翻訳可能なオリゴマー分子を提供することができる。

【0049】

いくつかの実施形態では、細胞は、真核細胞、哺乳動物細胞、またはヒト細胞であり得る。

【0050】

本発明は、リンカー基モノマーを組み込む翻訳可能なオリゴマー剤についての構造、方法、および組成物を提供する。本発明のオリゴマー分子は、治療用製剤中の活性剤として使用することができる。

20

【0051】

本発明は、対象の細胞内でポリペプチドまたはタンパク質として発現される能力があるため、治療効果を提供するために有用な一連の翻訳可能な分子を提供する。

【0052】

特定の実施形態では、翻訳可能な分子は、モノマーから構成されるオリゴマーとして構造化され得る。本発明のオリゴマー構造は、特定のヌクレオチドと共に、1又は2以上のリンカー基モノマーを含有してもよい。

30

【0053】

特定の実施形態では、翻訳可能な分子は核酸塩基配列を含むことができ、一部は天然ポリヌクレオチド配列と十分な相同性を有することにより、任意のアイソフォームのペプチドまたはタンパク質を発現するように設計することができる。

【0054】

いくつかの実施形態では、翻訳可能な分子は、長さが約200～約12,000個、またはそれ以上のモノマーであり得る。特定の実施形態では、翻訳可能な分子は、長さが1,000～9,000個のモノマー、長さが3,000～7,000個のモノマー、または長さが4,000～6,000個のモノマーであり得る。例示的な一実施形態では、翻訳可能な分子は、長さが4,500～5,500個のモノマーである。さらなる例示的な一実施形態では、翻訳可能な分子は、長さが約5,000個のモノマーである。

40

【0055】

いくつかの実施形態では、翻訳可能な分子は、1～約800個のUNAモノマーを含有することができる。特定の実施形態では、翻訳可能な分子は、1～600個のUNAモノマー、または1～100個のUNAモノマー、または1～12個のUNAモノマーを含むことができる。

【0056】

いくつかの実施形態では、翻訳可能な分子は、1～約800個のロックド核酸(LNA)モノマーを含むことができる。特定の実施形態では、翻訳可能な分子は、1～600個のLNAモノマー、または1～100個のLNAモノマー、または1～12個のLNAモノマーを含有することができる。

50

【0057】

本発明の翻訳可能な分子は、5' キャップ、モノマーの5' 非翻訳領域、モノマーのコード領域、モノマーの3' 非翻訳領域、およびモノマーのテール領域を含み得る。

【0058】

本発明の翻訳可能な分子は、1又は2以上のU N Aモノマーを含有するモノマーの3' 非翻訳領域を含み得る。

【0059】

本発明の翻訳可能な分子は、1又は2以上のU N Aモノマーを含有するモノマーのテール領域を含み得る。

【0060】

本発明の翻訳可能な分子は、細胞内での翻訳のために動作可能な、または例えば、5' キャップ、5' 非翻訳領域、コード領域、3' 非翻訳領域、およびポリAテールを含むm R N Aの領域の機能を有する、配列または構造の領域を含むことができる。

【0061】

本発明はさらに、1又は2以上の翻訳可能な分子を含む1又は2以上のベクターを細胞に送達する方法を企図する。さらなる実施形態では、本発明はまた、1又は2以上の翻訳可能な分子を細胞へ送達することを企図する。

【0062】

いくつかの実施形態では、1又は2以上の翻訳可能な分子は、インビトロ、エクスピボ、またはインビボで細胞に送達され得る。当技術分野で知られているウイルスおよび非ウイルスの導入方法を使用して、哺乳動物細胞に翻訳可能な分子を導入することができる。翻訳可能な分子は、薬学的に許容されるビヒクルを用いて、または例えば、ナノ粒子またはリポソームを用いて送達することができる。

【0063】

いくつかの実施形態では、本発明の翻訳可能な構造および組成物は、天然の組成物を利用する場合と比較して、培養物における細胞運命操作に必要なトランスフェクションの数および頻度を軽減することができる。

【0064】

さらなる態様では、本発明は、天然m R N Aを利用する場合と比較して、活性剤としての翻訳可能な分子の活性増大を提供する。

【0065】

いくつかの態様では、本発明は、天然の核酸、ポリペプチド、またはタンパク質により誘導されるものと比較して、細胞の自然免疫応答を低下させ得る翻訳可能な分子を提供することができる。

【0066】

本発明は、天然分子と比較して、デアデニル化に対して不応性である合成翻訳可能な分子を提供することができる。

【0067】

特定の実施形態では、本発明は、天然分子と比較して、比活性が増大し、機能的半減期がより長い、合成翻訳可能分子を提供することができる。本発明の合成翻訳可能分子は、異所性タンパク質発現のレベル増大を提供することができる。ベクターを使用して翻訳可能な分子を発現させる場合、細胞への送達レベルが増大し、細胞傷害性の自然免疫反応が抑制され、より高いレベルの異所性タンパク質発現が到達され得る。本発明の翻訳可能な分子は、天然m R N Aよりも増大した比活性およびより長い機能的半減期を有し得る。

【0068】

特定の態様では、翻訳可能な分子は、天然m R N Aと比較して多くの突然変異を有し得る。

【0069】

さらなる態様では、本発明は、3' 末端および/または5' 末端に結合した切断可能な送達および標的化部分を有する翻訳可能な分子を提供することができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 0 】

一般に、トランスフェクションによって送達された合成翻訳可能分子の比活性は、単位時間あたりの送達された転写物あたりの発現されたタンパク質分子の数として見ることができる。

【 0 0 7 1 】

本明細書で使用されるとき、翻訳効率とは、インビトロまたはインビボにおける翻訳可能な分子の翻訳によるタンパク質またはポリペプチドの產生の尺度を指す。

【 0 0 7 2 】

本発明は、1又は2以上のUNAモノマー、および多数の核酸モノマーを含有することができる一連の翻訳可能なオリゴマー分子を提供し、この翻訳可能な分子は、ポリペプチドまたはタンパク質を提供するように発現可能である。

10

【 0 0 7 3 】

いくつかの実施形態では、本発明は、1又は2以上の非翻訳領域に1又は2以上のUNAモノマー、および多数の核酸モノマーを含有することができる一連の翻訳可能なオリゴマー分子を含み、この翻訳可能な分子は、ポリペプチドまたはタンパク質を提供するように発現可能である。

【 0 0 7 4 】

いくつかの実施形態では、本発明は、テール領域に1又は2以上のUNAモノマー、および多数の核酸モノマーを含有する一連の翻訳可能な分子を含み、この翻訳可能な分子は、ポリペプチドまたはタンパク質を提供するように発現可能である。

20

【 0 0 7 5 】

いくつかの実施形態では、翻訳可能な分子は、修飾された5'キャップを含有することができる。

【 0 0 7 6 】

さらなる実施形態では、翻訳可能な分子は、モノマーの翻訳促進5'非翻訳領域を含有することができる。

【 0 0 7 7 】

追加の実施形態では、翻訳可能な分子は、モノマーの翻訳促進3'非翻訳領域を含有することができる。

【 0 0 7 8 】

追加の実施形態では、翻訳可能な分子は、モノマーの3'非翻訳領域に1又は2以上のUNAモノマーを含有することができる。

30

【 0 0 7 9 】

さらなる実施形態では、翻訳可能な分子は、モノマーのテール領域に1又は2以上のUNAモノマーを含有することができる。

【 0 0 8 0 】

さらなる実施形態では、翻訳可能な分子は、ポリAテールに1又は2以上のUNAモノマーを含有することができる。

【 0 0 8 1 】

いくつかの実施形態では、翻訳可能な分子は、モノマーの3'非翻訳領域またはモノマーのテール領域、例えば、ポリAテールに1又は2以上のLNAモノマーを含有することができる。

40

【 0 0 8 2 】

別の態様では、本発明の翻訳可能な分子は、同じ翻訳産物をコードする天然のmRNAと比較して、インビボで少なくとも2倍、3倍、5倍、または10倍の翻訳効率の増大を示し得る。

【 0 0 8 3 】

さらなる態様では、翻訳可能な分子は、同じポリペプチドまたはタンパク質をコードする天然のmRNAと比較して、インビボで少なくとも2倍、3倍、5倍、または10倍増大したポリペプチドまたはタンパク質レベルを產生することができる。

50

【0084】

特定の実施形態では、翻訳可能な分子は、同じポリペプチドまたはタンパク質をコードする天然のmRNAと比較して、インビボでポリペプチドまたはタンパク質のレベル増大を提供することができる。例えば、ポリペプチドまたはタンパク質のレベルは、10%、または20%、または30%、または40%、または50%、またはそれ以上増大されることができる。

【0085】

さらなる実施形態では、本発明は、本発明の翻訳可能な分子を含有する組成物を対象に投与することにより、対象の疾患または状態を治療するための方法を提供する。

【0086】

本発明の翻訳可能な分子は、対象においてアミロ・アルファ-1,6-グルコシダーゼ、4-アルファ-グルカノトランスフェラーゼ(AGL)の活性低下に関連する(例えば、濃度、存在、および/または機能の低下に起因する)疾患または障害などの疾患または障害を改善、予防、または治療するために使用され得る。これらの実施形態では、本発明の翻訳可能な分子を含む組成物を投与して、対象におけるAGL酵素の濃度または有効性を調節、調整、または増大させることができる。いくつかの態様では、酵素は、患者が異常な量を有する未修飾の天然酵素であり得る(例えば、AGL活性を部分的または完全に無効とするAGLの変異バージョンを有する患者)。いくつかの態様では、酵素は、AGLの変異バージョンを保有する患者を治療するために使用することができる未修飾の天然AGL酵素であり得る。例示的な実施形態では、本発明の翻訳可能な分子は、GSDII 10

Iを改善、予防、または治療するために使用され得る。

【0087】

いくつかの実施形態では、翻訳可能な分子は、細胞または対象に送達され、翻訳されて

、細胞または対象におけるAGLレベルを増大させることができる。

【0088】

本明細書で使用されるとき、「対象」という用語は、ヒトまたは任意の非ヒト動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウマ、または靈長類)を指す。ヒトには、出生前および出生後の形態が含まれる。多くの実施形態では、対象はヒトである。対象は患者であり得、これは、疾患の診断または治療のために医療機関に提示しているヒトを指す。「対象」という用語は、本明細書では「個人」または「患者」と互換的に使用される。対象は、疾患または障害を患っているか、または疾患または障害に感受性があり得るが、疾患または障害の症状を示しても示さなくてもよい。

【0089】

例示的な一実施形態では、本発明の対象は、アミロアルファ-1,6-グルコシダーゼ、4-アルファ-グルカノトランスフェラーゼ(AGL)の活性が低下した(例えば、濃度、存在、および/または機能の低下に起因する)対象である。さらなる例示的な一実施形態では、対象はヒトである。

【0090】

いくつかの実施形態では、本発明の翻訳可能な分子を含む組成物を投与すると、治療対象の肝臓AGLタンパク質レベルが増大する可能性がある。いくつかの実施形態では、本発明の翻訳可能な分子を含む組成物を投与すると、治療前の対象のベースラインAGLタンパク質レベルに対して、約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%の肝臓AGLタンパク質レベルにおける増大がもたらされる。例示的な一実施形態では、本発明の翻訳可能な分子を含む組成物を投与すると、治療前の対象のベースライン肝臓AGLレベルに対して、肝臓AGLレベルの増大がもたらされる。いくつかの実施形態では、肝臓AGLレベルの増大は、少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、100%、200%、またはそれ以上であり得る。

【0091】

いくつかの実施形態では、本発明の翻訳可能な分子から発現されるAGLタンパク質は

10

20

30

40

50

、肝臓、血清、血漿、腎臓、心臓、筋肉、脳、脳脊髄液、またはリンパ節で検出可能である。例示的な実施形態では、A G L タンパク質は、肝臓の細胞、例えば、治療対象の肝細胞で発現される。

【 0 0 9 2 】

いくつかの実施形態では、本発明の翻訳可能な分子を含む組成物を投与すると、治療対象の肝臓の総タンパク質 1 m g あたり、約 1 0 n g / m g 、約 2 0 n g / m g 、約 5 0 n g / m g 、約 1 0 0 n g / m g 、約 1 5 0 n g / m g 、約 2 0 0 n g / m g 、約 2 5 0 n g / m g 、約 3 0 0 n g / m g 、約 3 5 0 n g / m g 、約 4 0 0 n g / m g 、約 4 5 0 n g / m g 、約 5 0 0 n g / m g 、約 6 0 0 n g / m g 、約 7 0 0 n g / m g 、約 8 0 0 n g / m g 、約 9 0 0 n g / m g 、約 1 0 0 0 n g / m g 、約 1 2 0 0 n g / m g 、または約 1 5 0 0 n g / m g 、またはそれを上回る天然の非変異ヒト A G L (すなわち、異常または変異 A G L とは対照的に、正常または野生型 A G L) タンパク質レベルの発現がもたらされる。

【 0 0 9 3 】

本明細書で使用されるとき、目的とする 1 又は 2 以上の値に適用される「約」または「およそ」という用語は、述べられた参照値に類似する値を指す。特定の実施形態では、「およそ」または「約」という用語は、別のことが明記されない限り、または文脈から別のことが明らかな場合を除き、言及された参照値のいずれかの方向 (より大きいまたはより小さい) の 1 0 % 、 9 % 、 8 % 、 7 % 、 6 % 、 5 % 、 4 % 、 3 % 、 2 % 、 1 % 、またはそれ未満の範囲内に入る一連の値 (そのような数が可能な値の 1 0 0 % を超える場合を除く) を指す。

【 0 0 9 4 】

いくつかの態様では、天然の非変異ヒト A G L タンパク質の発現は、本発明の翻訳可能な分子を含む組成物の投与の 6 、 1 2 、 1 8 、 2 4 、 3 0 、 3 6 、 4 8 、 6 0 、および / または 7 2 時間後に検出可能である。いくつかの態様では、天然の非変異ヒト A G L タンパク質の発現は、本発明の翻訳可能な分子を含む組成物の投与の 1 日、 2 日、 3 日、 4 日、 5 日、 6 日、および / または 7 日後に検出可能である。いくつかの実施形態では、天然の非変異ヒト A G L タンパク質の発現は、投与の 1 週間、 2 週間、 3 週間、および / または 4 週間後に検出可能である。いくつかの実施形態では、天然の非変異ヒト A G L タンパク質の発現は、本発明の翻訳可能な分子を含む組成物の投与後に検出可能である。いくつかの実施形態では、天然の非変異ヒト A G L タンパク質の発現は、本発明の翻訳可能な分子を含む組成物の投与後、肝臓、例えば肝細胞で検出可能である。

【 0 0 9 5 】

翻訳可能な分子を作製するための変異体鑄型

本明細書に記載のさまざまな実施形態では、翻訳可能なオリゴマーは、A G L をコードする m R N A を含んでもよく、A G L をコードする m R N A はコドン最適化されている。いくつかの実施形態では、A G L は、ヒト A G L (すなわち、h A G L) である。いくつかの実施形態では、ヒト A G L は、配列番号 2 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ヒト A G L は、配列番号 2 のアミノ酸配列からなる。

【 0 0 9 6 】

いくつかの実施形態では、変異体 D N A 鑄型を利用して、A G L をコードすることができる翻訳可能な分子を作製することができる。本開示の変異体 D N A 鑄型は、翻訳可能な分子を作製するプロセスおよび翻訳可能な分子の効率において利点を示し得る。鑄型のバリエーションを利用して、本発明の翻訳可能な分子における修飾ヌクレオチドまたはモノマーの組み込みを強化することができる。特定の態様では、鑄型のバリエーションを利用して、翻訳可能な分子の構造的特徴を強化することができる。翻訳可能な分子の強化された構造的特徴は、ポリペプチドまたはタンパク質産物を提供するための翻訳効率を含む、予想外にも有利な特性を提供することができる。

【 0 0 9 7 】

本発明のいくつかの態様では、鑄型のバリエーションは、鑄型鎖中の特定のヌクレオチ

10

20

30

40

50

ドの存在または出現頻度の軽減を含み得る。特定のヌクレオチドの存在を軽減することにより、本開示の構造およびプロセスを変更して、A G Lをコードする翻訳可能なR N A産物の驚くほど改善された特性を達成する非天然型を提供することができる。

【0098】

本発明の態様は、翻訳可能な分子を作製するためのプロセスにおいて変異体D N A鑄型を必要としてもよい。D N A分子は、転写されてA G Lをコードする標的翻訳可能な分子を提供することができるヌクレオチドの非コード鑄型鎖を有することができる。

【0099】

標的の翻訳可能な分子は、天然または修飾、合成または天然源に由来するかどうかにかかわらず、任意のR N Aであり得る。

【0100】

いくつかの実施形態では、コドン割り当てを保持しながら、鑄型鎖のオープンリーディングフレームが代替形態に変換される変異体D N A鑄型を使用することができる。

【0101】

特定の実施形態では、代替コドン最適化および/または配列縮重に基づいて代替ヌクレオチドが使用されるD N A鑄型を使用することができる。

【0102】

さらなる実施形態では、D N A鑄型は、コドン割り当てを保存しながら、特定のヌクレオチドを代替ヌクレオチドで置換してもよい。

【0103】

本発明の実施形態は、A G Lをコードする翻訳可能な分子を作製するためのプロセスで使用される本発明のD N A鑄型において代替コドンを有利に利用する。本発明のD N A鑄型において達成され得るバリエーションは、多くのプロセスにおいて好ましいコドンを必要とする可能性がある細胞および生物の場合よりも範囲がはるかに大きくなり得る。本発明において、翻訳可能な分子を転写するためのD N A鑄型において、広範囲の代替コドンおよび位置を使用することができる。

【0104】

本発明のさらなる態様では、鑄型のバリエーションは、鑄型鎖中の特定のヌクレオチドの存在または出現頻度の軽減を含み得る。例えば、鑄型内のヌクレオチドの存在は、鑄型内のヌクレオチドの25%未満のレベルに軽減され得る。さらなる例では、鑄型内のヌクレオチドの存在は、鑄型内のヌクレオチドの20%未満のレベルに軽減され得る。いくつかの例では、鑄型内のヌクレオチドの存在は、鑄型内のヌクレオチドの16%未満のレベルに軽減され得る。特定の例では、鑄型内のヌクレオチドの存在は、鑄型内のヌクレオチドの12%未満のレベルまで軽減され得る。

【0105】

ヒトA G L

ヒトA G L遺伝子は、およそ174.8 k D aの分子量を伴う、1532個のアミノ酸タンパク質をコードする。A G Lは、グリコーゲン分解において1,4-アルファ-D-グルカン:1,4-アルファ-D-グルカン-4-アルファ-D-グリコシルトランスフェラーゼおよびアミロ-1,6-グルコシダーゼとして作用する多機能酵素である。上記のように、正常なA G L活性の遺伝的欠損は糖原病I I Iを引き起す。

【0106】

コンセンサスヒトA G Lコード配列は、配列番号1に示される4,599個の核酸塩基のR N A配列を有する。

【0107】

N C B I アクセッション番号N P _ 0 0 0 0 1 9 . 2 にて見出されるコンセンサスヒトA G Lコード配列は、配列番号2に翻訳される。

【0108】

いくつかの実施形態では、翻訳可能な分子は、h A G Lの天然m R N Aと比較して有利に増大した翻訳効率で、ヒトアミロアルファ-1,6-グルコシダーゼ、4-アルファ-

10

20

30

40

50

グルカノトランスフェラーゼ (h A G L) を発現するように、作製および使用することができる。h A G L を発現する翻訳可能な分子は、疾患を改善、予防、または治療するための方法における使用に好適な活性を示し得る。いくつかの実施形態では、翻訳可能な分子は、1又は2以上のU N Aモノマーを含み得る。

【0109】

いくつかの態様では、翻訳可能な分子は、5'キャップ、5'UTR、翻訳開始配列、例えば、コザック配列、ヒトA G L C D S、3'UTR、および/またはテール領域を含み得る。例示的な実施形態では、翻訳可能な分子は、5'キャップ (m7GpppGm)、タバコエッチウイルス (T E V) の5'UTR、コザック配列、ヒトA G L C D S、アフリカツメガエルベータグロビンの3'UTR、およびテール領域を含み得る。さらなる例示的な実施形態では、ヒトA G L C D Sは、以下にさらに詳細に記載される配列番号7~32または配列番号41~45のコドン最適化配列を含み得る。本明細書に記載されるこれらおよび他の実施形態のいずれにおいても、翻訳可能な分子は1又は2以上のU N Aモノマーを含んでもよい。本明細書に記載されるこれらおよび他の実施形態のいずれにおいても、翻訳可能な分子は1又は2以上のL N Aモノマーを含んでもよい。

【0110】

A G Lの天然m R N Aと比較して、分子の翻訳効率を増大させることができる。特に、48時間後、分子の翻訳効率は、A G Lの天然m R N Aと比較して2倍超になり得る。

【0111】

いくつかの実施形態では、本発明に好適なm R N A配列は、ヒトA G Lタンパク質をコードするm R N A配列を含む。天然に存在するヒトA G Lタンパク質の配列は、配列番号2に示される。

【0112】

いくつかの実施形態では、好適なm R N A配列は、ヒトA G Lの相同体または変異体をコードするm R N A配列であり得る。本明細書で使用する場合、ヒトA G Lタンパク質の相同体または変異体は、実質的なA G Lタンパク質活性を保持しながら、野生型または天然に存在するヒトA G Lタンパク質と比較して1又は2以上のアミノ酸置換、欠失、および/または挿入を含有する、修飾ヒトA G Lタンパク質であり得る。いくつかの態様では、本発明に好適なm R N Aは、ヒトA G Lタンパク質と実質的に同一のタンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、本発明に好適なm R N Aは、配列番号2と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一のアミノ酸配列をコードする。いくつかの実施形態では、本発明に好適なm R N Aは、ヒトA G Lタンパク質の断片または一部をコードする。

【0113】

いくつかの態様では、本発明に好適なm R N Aは、ヒトA G Lタンパク質の断片または部分をコードし、タンパク質の断片または部分は、野生型タンパク質のものと同様のA G L活性を依然として維持している。

【0114】

いくつかの態様では、本発明に好適なm R N Aは、配列番号7~32または配列番号41~45と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一である配列を含む。

【0115】

いくつかの実施形態では、本発明の翻訳可能なオリゴマー分子は、配列番号7~32または配列番号41~45と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一であるコード配列を含む翻訳可能なオリゴマー分子は、5'キャップ、5'UTR、翻訳開始配列、3'UTR、およびテール領域から選択される1又は2以上の配列をさらに含む。

10

20

30

40

50

【0116】

いくつかの実施形態では、本発明の翻訳可能なオリゴマー分子は、配列番号1の全長ヒトA G Lコード配列にわたって野生型ヒトA G Lコード配列に対して80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%未満同一であるコード配列を含み、機能的ヒトA G Lタンパク質を発現する。例示的な実施形態では、本発明の翻訳可能なオリゴマー分子は、配列番号1の全長ヒトA G Lコード配列にわたって野生型ヒトA G Lコード配列に対して80%未満同一であるコード配列を含み、機能的ヒトA G Lタンパク質を発現する。別の例示的な実施形態では、本発明の翻訳可能なオリゴマー分子は、配列番号1の全長ヒトA G Lコード配列にわたって野生型ヒトA G Lコード配列に対して80%未満同一であるコード配列を含み、機能的ヒトA G Lタンパク質を発現し、このコード配列は、配列番号7～32または配列番号41～45から選択された配列に対して少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一である。さらに別の例示的な実施形態では、本発明の翻訳可能なオリゴマー分子は、配列番号1の全長ヒトA G Lコード配列にわたって野生型ヒトA G Lコード配列に対して80%未満同一であるコード配列を含み、機能的ヒトA G Lタンパク質を発現し、このコード配列は、配列番号7～32または配列番号41～45から選択される配列に対して少なくとも95%同一である。さらに別の例示的な実施形態では、本発明の翻訳可能なオリゴマー分子は、配列番号1の全長ヒトA G Lコード配列にわたって野生型ヒトA G Lコード配列に対して80%未満同一であるコード配列を含み、機能的ヒトA G Lタンパク質を発現し、このコード配列は、配列番号19、配列番号31、または配列番号45から選択される配列に対して少なくとも95%同一である。したがって、いくつかの実施形態では、本出願は、配列番号1の全長ヒトA G Lコード配列にわたって野生型ヒトA G Lコード配列に対して80%未満同一である核酸塩基配列を含むか、またはそれからなるポリヌクレオチドであって、このヒトA G Lコード配列が、配列番号7～32または配列番号41～45から選択された配列に対して少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一である、ポリヌクレオチドを提供する。例示的な実施形態では、本出願は、配列番号1の全長ヒトA G Lコード配列にわたって野生型ヒトA G Lコード配列に対して80%未満同一である核酸塩基配列を含むか、またはそれからなるポリヌクレオチドであって、このヒトA G Lコード配列が、配列番号19、配列番号31、または配列番号45から選択される配列に対して少なくとも95%同一である、ポリヌクレオチドを提供する。特定の実施形態では、本出願は、配列番号1の全長ヒトA G Lコード配列にわたって野生型ヒトA G Lコード配列に対して80%未満同一である核酸塩基配列を含むポリヌクレオチドであって、このヒトA G Lコード配列が、配列番号19に対して少なくとも95%同一である、ポリヌクレオチドを提供する。別の特定の実施形態では、本出願は、配列番号1の全長ヒトA G Lコード配列にわたって野生型ヒトA G Lコード配列に対して80%未満同一である核酸塩基配列を含むポリヌクレオチドであって、このヒトA G Lコード配列が、配列番号31に対して少なくとも95%同一である、ポリヌクレオチドを提供する。別の特定の実施形態では、本出願は、配列番号1の全長ヒトA G Lコード配列にわたって野生型ヒトA G Lコード配列に対して80%未満同一である核酸塩基配列を含むポリヌクレオチドであって、このヒトA G Lコード配列が、配列番号45に対して少なくとも95%同一である、ポリヌクレオチドを提供する。

【0117】

いくつかの実施形態では、本発明の翻訳可能なオリゴマー分子は、別の配列に融合されたA G Lタンパク質の全長、断片または部分を含む融合タンパク質をコードする（例えば、NまたはC末端融合）。いくつかの実施形態では、NまたはC末端配列は、シグナル配列または細胞標的化配列である。

【0118】

UNAモノマーおよびオリゴマー

いくつかの実施形態では、リンカー基モノマーは、以下に示されるようなプロパン-1

10

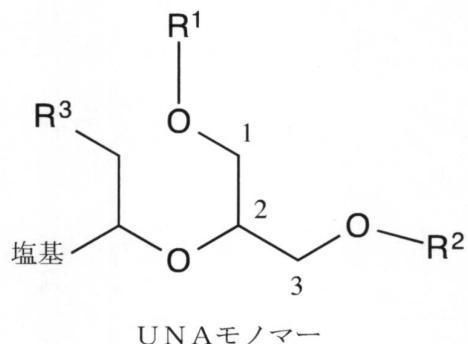
20

30

40

50

, 2, 3 - トリ - イル - トリソキシ構造に基づく小さな有機分子である、ロックされていないヌクレオモノマー (UNAモノマー) であり得る：



10

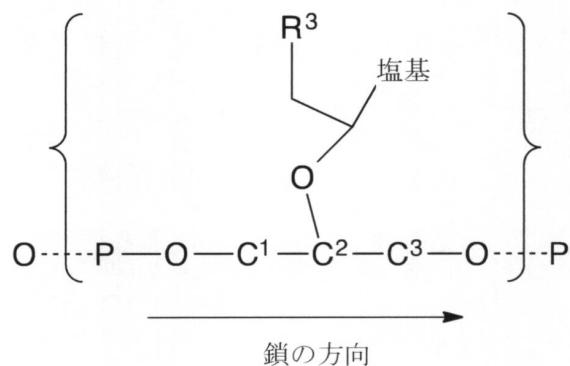
式中、R¹およびR²はHであり、R¹およびR²はホスホジエステル結合であり得、塩基は核酸塩基であり得、R³は以下に記載される官能基である。

【0119】

別の観点では、UNAモノマーの主な原子は、以下のようにIUPAC表記法で描画することができる；

20

UNAモノマー単位



30

ここで、オリゴマー鎖の進行方向は、プロパン残基の1末端から3末端の方向である。

【0120】

核酸塩基の例には、ウラシル、チミン、シトシン、5 - メチルシトシン、アデニン、グアニン、イノシン、ならびに天然および非天然の核酸塩基類似体が含まれる。

【0121】

核酸塩基の例には、プソイドウラシル、1 - メチルプソイドウラシル (m1) 、すなわち、N¹ - メチルプソイドウラシル、および5 - メトキシウラシルが含まれる。

40

【0122】

一般に、ヌクレオチドではないUNAモノマーは、オリゴマー内の内部リンカーモノマーとなり得る。オリゴマー内の内部UNAモノマーの両側には、他のモノマーが隣接している。

【0123】

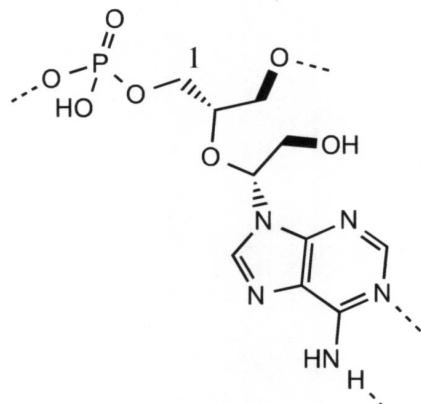
例えば、オリゴマーが複合体または二重鎖を形成し、複合体または二重鎖中に核酸塩基を持つ他のモノマーが存在する場合、UNAモノマーは塩基対合に関与することができる。

【0124】

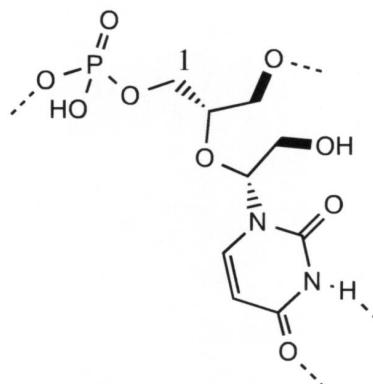
R³が-OHである、プロパン - 1 - イルの位置とプロパン - 3 - イルの位置の両方で

50

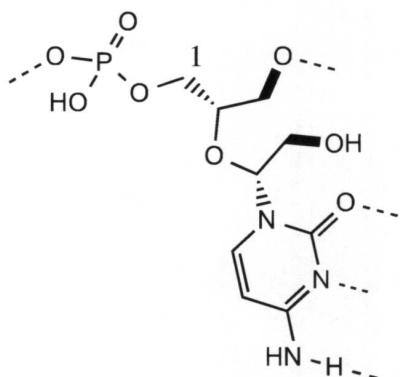
隣接する内部モノマーとしての U N A モノマーの例を以下に示す。



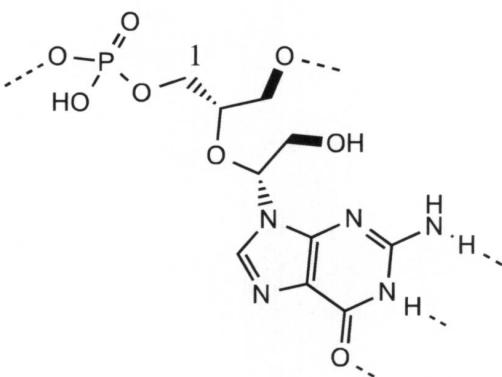
UNA-A



UNA-U



UNA-C



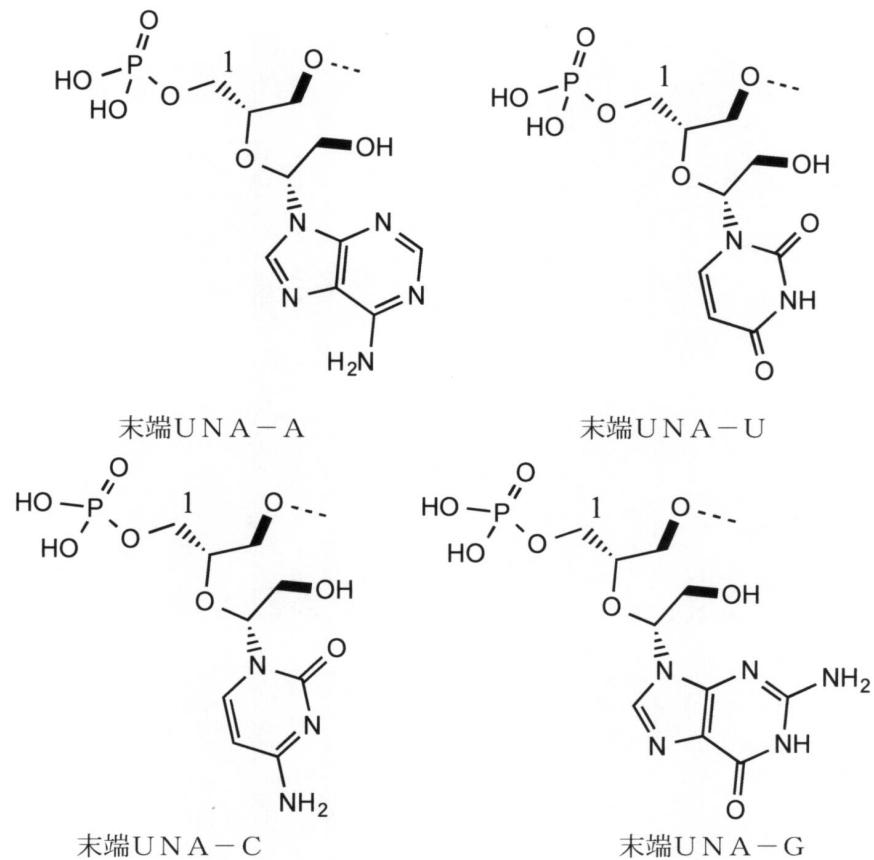
UNA-G

[0 1 2 5]

U N A モノマーは、オリゴマーの末端モノマーであることができ、U N A モノマーは、プロパン-1-イルの位置またはプロパン-3-イルの位置のいずれかで1つのモノマーのみに結合する。U N A モノマーはヌクレオチドとは異なり、柔軟な有機構造であるため、末端U N A モノマーはオリゴマーの柔軟なターミネーターとなることができる。

[0 1 2 6]

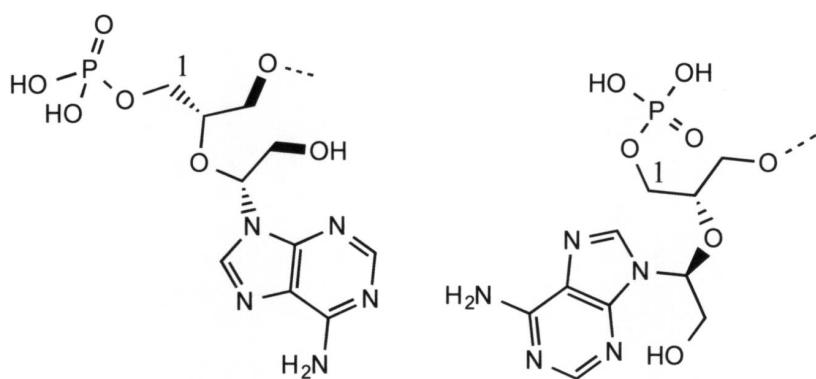
プロパン-3-イルの位置で結合した末端モノマーとしてのUNAモノマーの例を以下に示す。



【0127】

UNAモノマーは柔軟な分子になり得るため、末端モノマーとしてのUNAモノマーは、大きく異なる立体構造をとることができる。プロパン-3-イルの位置で結合した末端モノマーとしてのエネルギーが最小化されたUNAモノマーの立体構造の一例を以下に示す。

30



UNA-A末端の形態：破線の結合は、プロパン-3-イル結合を示す

【0128】

とりわけ、UNAモノマーの構造により、UNAモノマーは天然に存在するヌクレオチドに結合することが可能となる。

【0129】

UNAオリゴマーは、UNAモノマーからなる鎖、ならびに天然に存在するヌクレオシドに基づき得るさまざまなヌクレオチドであり得る。

50

【0130】

いくつかの実施形態では、UNAモノマーの官能基R³は、-OR⁴、-SR⁴、-NR⁴₂、-NH(C=O)R⁴、モルホリノ、モルホリン-1-イル、ピペラジン-1-イル、または4-アルカノイル-ピペラジン-1-イルであり得、R⁴は、存在ごとに同じであるかまたは異なり、H、アルキル、コレステロール、脂質分子、ポリアミン、アミノ酸、またはポリペプチドであり得る。

【0131】

UNAモノマーは、有機分子である。UNAモノマーは、核酸モノマーまたはヌクレオチドではなく、天然に存在するヌクレオシドまたは修飾された天然に存在するヌクレオシドでもない。

10

【0132】

本発明のUNAオリゴマーは、合成鎖分子である。

【0133】

いくつかの実施形態では、上に示すように、UNAモノマーは、UNA-A(Aと指定)、UNA-U(Uと指定)、UNA-C(Cと指定)、およびUNA-G(Gと指定)であり得る。

【0134】

本明細書で使用でき得る名称には、2'-O-メチル修飾リボヌクレオチドを指す、mA、mG、mC、およびmUが含まれる。

【0135】

本明細書で使用でき得る名称には、2'-デオキシTヌクレオチドを指す、dTが含まれる。

20

【0136】

本明細書で使用される場合、オリゴマー配列の文脈において、記号Nは、任意の天然ヌクレオチドモノマー、または任意の修飾ヌクレオチドモノマーを表すことができる。

【0137】

本明細書で使用される場合、オリゴマー配列の文脈において、記号Qは、非天然、修飾、または化学修飾ヌクレオチドモノマーを表す。

【0138】

本明細書で使用される場合、オリゴマー配列の文脈において、記号Xは、UNAモノマーを表すために使用され得る。

30

【0139】

修飾および化学修飾ヌクレオチド

本明細書の修飾または化学修飾ヌクレオチドの例では、アルキル、シクロアルキル、またはフェニル置換基は非置換であり得るか、または1又は2以上のアルキル、ハロ、ハロアルキル、アミノ、またはニトロ置換基でさらに置換され得る。

【0140】

核酸モノマーの例には、当技術分野で知られているそのような任意のヌクレオチドを含む、非天然、修飾、および化学修飾ヌクレオチドが含まれる。

【0141】

修飾または化学修飾ヌクレオチドの例には、5-ヒドロキシシチジン、5-アルキルシチジン、5-ヒドロキシアルキルシチジン、5-カルボキシシチジン、5-ホルミルシチジン、5-アルコキシシチジン、5-アルキニルシチジン、5-ハロシチジン、2-チオシチジン、N⁴-アルキルシチジン、N⁴-アミノシチジン、N⁴-アセチルシチジン、およびN⁴,N⁴-ジアルキルシチジンが含まれる。

40

【0142】

修飾または化学修飾ヌクレオチドの例には、5-ヒドロキシシチジン、5-メチルシチジン、5-ヒドロキシメチルシチジン、5-カルボキシシチジン、5-ホルミルシチジン、5-メトキシシチジン、5-プロピニルシチジン、5-プロモシチジン、5-ヨードシチジン、2-チオシチジン；N⁴-メチルシチジン、N⁴-アミノシチジン、N⁴-アセチ

50

ルシチジン、およびN⁴ , N⁴ -ジメチルシチジンが含まれる。

【0143】

修飾または化学修飾ヌクレオチドの例には、5 - ヒドロキシウリジン、5 - アルキルウリジン、5 - ヒドロキシアルキルウリジン、5 - カルボキシウリジン、5 - カルボキシアルキルエステルウリジン、5 - ホルミルウリジン、5 - アルコキシウリジン、5 - アルキニルウリジン、5 - ハロウリジン、2 - チオウリジン、および6 - アルキルウリジンが含まれる。

【0144】

修飾または化学修飾ヌクレオチドの例には、5 - ヒドロキシウリジン、5 - メチルウリジン、5 - ヒドロキシメチルウリジン、5 - カルボキシウリジン、5 - カルボキシメチルエステルウリジン、5 - ホルミルウリジン、5 - メトキシウリジン、5 - プロピニルウリジン、5 - プロモウリジン、5 - フルオロウリジン、5 - ヨードウリジン、2 - チオウリジン、および6 - メチルウリジンが含まれる。

10

【0145】

修飾または化学修飾ヌクレオチドの例には、5 - メトキカルボニルメチル - 2 - チオウリジン、5 - メチルアミノメチル - 2 - チオウリジン、5 - カルバモイルメチルウリジン、5 - カルバモイルメチル - 2 ' - O - メチルウリジン、1 - メチル - 3 - (3 - アミノ - 3 - カルボキシプロピル) プソイドウリジン、5 - メチルアミノメチル - 2 - セレノウリジン、5 - カルボキシメチルウリジン、5 - メチルジヒドロウリジン、5 - タウリノメチルウリジン、5 - タウリノメチル - 2 - チオウリジン、5 - (イソペンテニルアミノメチル) ウリジン、2 ' - O - メチルプソイドウリジン、2 - チオ - 2 ' O - メチルウリジン、および3 , 2 ' - O - ジメチルウリジンが含まれる。

20

【0146】

修飾または化学修飾ヌクレオチドの例には、N⁶ - メチルアデノシン、2 - アミノアデノシン、3 - メチルアデノシン、8 - アザアデノシン、7 - デアザアデノシン、8 - オキソアデノシン、8 - プロモアデノシン、2 - メチルチオ - N⁶ - メチルアデノシン、N⁶ - イソペンテニルアデノシン、2 - メチルチオ - N⁶ - イソペンテニルアデノシン、N⁶ - (シス - ヒドロキシイソペンテニル) アデノシン、2 - メチルチオ - N⁶ - (シス - ヒドロキシイソペンテニル) アデノシン、N⁶ - グリシニルカルバモイルアデノシン、N⁶ - スレオニルカルバモイル - アデノシン、N⁶ - メチル - N⁶ - スレオニルカルバモイル - アデノシン、N⁶ - ジメチルアデノシン、N⁶ - ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン、2 - メチルチオ - N⁶ - ヒドロキシノルバリルカルバモイル - アデノシン、N⁶ - アセチル - アデノシン、7 - メチル - アデニン、2 - メチルチオ - アデニン、2 - メトキシ - アデニン、アルファ - チオ - アデノシン、2 ' - O - メチル - アデノシン、N⁶ , 2 ' - O - ジメチル - アデノシン、N⁶ , N⁶ , 2 ' - O - トリメチル - アデノシン、1 , 2 ' - O - ジメチル - アデノシン、2 ' - O - リボシルアデノシン、2 - アミノ - N⁶ - メチル - プリン、1 - チオ - アデノシン、2 ' - F - アラ - アデノシン、2 ' - F - アデノシン、2 ' - OH - アラ - アデノシン、およびN⁶ - (19 - アミノ - ペンタオキサノナデシル) - アデノシンが含まれる。

30

【0147】

修飾または化学修飾ヌクレオチドの例には、N¹ - アルキルグアノシン、N² - アルキルグアノシン、チエノグアノシン、7 - デアザグアノシン、8 - オキソグアノシン、8 - プロモグアノシン、O⁶ - アルキルグアノシン、キサントシン、イノシン、およびN¹ - アルキルイノシンが含まれる。

40

【0148】

修飾または化学修飾ヌクレオチドの例には、N¹ - メチルグアノシン、N² - メチルグアノシン、チエノグアノシン、7 - デアザグアノシン、8 - オキソグアノシン、8 - プロモグアノシン、O⁶ - メチルグアノシン、キサントシン、イノシン、およびN¹ - メチルイノシンが含まれる。

50

【0149】

修飾または化学修飾ヌクレオチドの例には、ブソイドウリジンが含まれる。ブソイドウリジンの例には、N¹ - アルキルブソイドウリジン、N¹ - シクロアルキルブソイドウリジン、N¹ - ヒドロキシブソイドウリジン、N¹ - ヒドロキシアルキルブソイドウリジン、N¹ - フェニルブソイドウリジン、N¹ - フェニルアルキルブソイドウリジン、N¹ - アミノアルキルブソイドウリジン、N³ - アルキルブソイドウリジン、N⁶ - アルキルブソイドウリジン、N⁶ - アルコキシブソイドウリジン、N⁶ - ヒドロキシブソイドウリジン、N⁶ - ヒドロキシアルキルブソイドウリジン、N⁶ - モルホリノブソイドウリジン、N⁶ - フェニルブソイドウリジン、およびN⁶ - ハロブソイドウリジンが含まれる。ブソイドウリジンの例には、N¹ - アルキル - N⁶ - アルキルブソイドウリジン、N¹ - アルキル - N⁶ - アルコキシブソイドウリジン、N¹ - アルキル - N⁶ - ヒドロキシアルキルブソイドウリジン、N¹ - アルキル - N⁶ - モルホリノブソイドウリジン、N¹ - アルキル - N⁶ - フェニルブソイドウリジン、およびN¹ - アルキル - N⁶ - ハロブソイドウリジンが含まれる。これらの例では、アルキル、シクロアルキル、およびフェニル置換基は非置換であってもよく、またはアルキル、ハロ、ハロアルキル、アミノ、またはニトロ置換基でさらに置換されてもよい。10

【0150】

ブソイドウリジンの例には、N¹ - メチルブソイドウリジン、N¹ - エチルブソイドウリジン、N¹ - プロピルブソイドウリジン、N¹ - シクロプロピルブソイドウリジン、N¹ - フェニルブソイドウリジン、N¹ - アミノメチルブソイドウリジン、N³ - メチルブソイドウリジン、N¹ - ヒドロキシブソイドウリジン、およびN¹ - ヒドロキシメチルブソイドウリジンが含まれる。20

【0151】

核酸モノマーの例には、当技術分野で知られているそのような任意のヌクレオチドを含む、修飾および化学修飾ヌクレオチドが含まれる。

【0152】

修飾および化学修飾ヌクレオチドモノマーの例には、当技術分野で既知の任意のヌクレオチド、例えば、2' - O - メチルリボヌクレオチド、2' - O - メチルプリンヌクレオチド、2' - デオキシ - 2' - フルオロリボヌクレオチド、2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチド、2' - デオキシリボヌクレオチド、2' - デオキシプリンヌクレオチド、ユニバーサル塩基ヌクレオチド、5 - C - メチル - ヌクレオチド、および逆デオキシ脱塩基モノマー残基が含まれる。30

【0153】

修飾および化学修飾ヌクレオチドモノマーの例には、3' - 末端安定化ヌクレオチド、3' - グリセリルヌクレオチド、3' - 逆脱塩基ヌクレオチド、および3' - 逆チミジンが含まれる。

【0154】

修飾および化学修飾ヌクレオチドモノマーの例には、ロックされた核酸ヌクレオチド(LNA)、2' - O, 4' - C - メチレン - (D - リボフラノシリル)ヌクレオチド、2' - メトキシエトキシ(MOE)ヌクレオチド、2' - メチル - チオ - エチル、2' - デオキシ - 2' - フルオロヌクレオチド、および2' - O - メチルヌクレオチドが含まれる。例示的な一実施形態では、修飾モノマーはロックされた核酸ヌクレオチド(LNA)である。40

【0155】

修飾および化学修飾ヌクレオチドモノマーの例には、2' , 4' - 拘束2' - O - メトキシエチル(cMOE)および2' - O - エチル(cEt)修飾DNAが含まれる。

【0156】

修飾および化学修飾ヌクレオチドモノマーの例には、2' - アミノヌクレオチド、2' - O - アミノヌクレオチド、2' - C - アリルヌクレオチド、および2' - O - アリルヌクレオチドが含まれる。

【0157】

修飾および化学修飾ヌクレオチドモノマーの例には、N⁶メチルアデノシンヌクレオチドが含まれる。

【0158】

修飾および化学修飾ヌクレオチドモノマーの例には、修飾塩基5-(3-アミノ)プロピルウリジン、5-(2-メルカプト)エチルウリジン、5-プロモウリジン；8-プロモグアノシン、または7-デアザアデノシンを伴うヌクレオチドモノマーが含まれる。

【0159】

修飾および化学修飾ヌクレオチドモノマーの例には、2'-O-アミノプロピル置換ヌクレオチドが含まれる。

【0160】

修飾および化学修飾ヌクレオチドモノマーの例は、ヌクレオチドの2'-OH基を2'-R、2'-OR、2'-ハロゲン、2'-SR、または2'-アミノ(式中、RはH、アルキル、アルケニル、またはアルキニルであり得る)で置換することを含む。

【0161】

修飾ヌクレオチドのいくつかの例は、Saenger, Principles of Nucleic Acid Structure, Springer-Verlag, 1984にて提供される。

【0162】

上記の塩基修飾の例は、糖修飾および結合修飾を含むヌクレオシドまたはヌクレオチド構造のさらなる修飾と組み合わせることができる。

【0163】

特定の修飾または化学修飾ヌクレオチドモノマーは、天然に見出される場合がある。

【0164】

1又は2以上のUNAモノマーを含有する翻訳可能な分子

本発明の態様は、1又は2以上のUNAモノマーを含有するオリゴマー化合物である翻訳可能な分子についての構造および組成物を提供する。翻訳可能なオリゴマーは、薬学的組成物のための活性剤であり得る。いくつかの実施形態では、翻訳可能なオリゴマーは、ヒトAGLまたはその変異体をコードする。

【0165】

本発明のオリゴマー翻訳可能な分子は、1又は2以上のUNAモノマーを含有してもよい。本発明のオリゴマー分子は、ペプチドおよびタンパク質治療薬を供給するための製剤中の活性剤として使用することができる。いくつかの実施形態では、翻訳可能なオリゴマーは、ヒトAGLまたはその変異体をコードする。

【0166】

いくつかの実施形態では、本発明は、特定の天然ヌクレオチド、非天然ヌクレオチド、修飾ヌクレオチド、または化学修飾ヌクレオチドと共に、UNAモノマーの新規な組み合わせを組み込む構造を有する翻訳可能なオリゴマー化合物を提供する。

【0167】

本発明の翻訳可能なオリゴマー化合物は、約200～約12,000塩基長の長さを有することができる。本発明の翻訳可能なオリゴマー化合物は、約1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、または約9000塩基の長さを有することができる。いくつかの実施形態では、本発明の翻訳可能なオリゴマー化合物は、約4000、4100、4200、4300、4400、4500、4600、4700、4800、4900、5000、5100、5200、5300、5400、または約5500塩基の長さを有することができる。例示的な実施形態では、本発明の翻訳可能なオリゴマー化合物は、約5000塩基の長さを有する。

【0168】

さらなる態様では、1又は2以上のUNAモノマーを含む本発明のオリゴマーの翻訳可能な化合物は、薬理学的に活性な分子であり得る。翻訳可能なオリゴマー分子は、インビトロ、インビボ、またはエクソビボにおいてペプチドまたはタンパク質活性剤を生成する

10

20

30

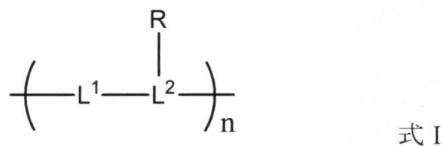
40

50

ための薬学的有効成分として使用することができる。例示的な一実施形態では、本発明の翻訳可能なオリゴマー化合物は、ヒトA G Lまたはその変異体をコードする。

【0169】

本発明の翻訳可能なオリゴマー分子は、式Iの構造を有することができる：



10

式中、 L^1 は結合であり、 n は200~12,000であり、存在ごとに L^2 は式-C¹-C²-C³-を有するUNAリンカー基であり、RはC²に結合し、式-OCH(C¹H₂R³)R⁵を有し、R³は-O R⁴、-SR⁴、-NR⁴₂、-NH(C=O)R⁴、モルホリノ、モルホリン-1-イル、ピペラジン-1-イル、または4-アルカノイル-ピペラジン-1-イルであり、R⁴は、存在ごとに同じであるかまたは異なり、H、アルキル、コレステロール、脂質分子、ポリアミン、アミノ酸、もしくはポリペプチドであり、R⁵は核酸塩基であり、またはL²(R)は、リボースなどの糖であり、Rは核酸塩基であり、またはL²は、修飾リボースなどの修飾された糖であり、Rは核酸塩基である。特定の実施形態では、核酸塩基は、修飾された核酸塩基であり得る。 L^1 は、ホスホジエステル結合であり得る。

20

【0170】

翻訳可能なオリゴマー分子の塩基配列は、核酸塩基の任意の配列であり得る。

【0171】

いくつかの態様では、本発明の翻訳可能なオリゴマー分子は、任意のモノマー間の位置に任意の数のホスホロチオエートインターモノマー結合を有することができる。

【0172】

いくつかの実施形態では、翻訳可能なオリゴマー分子のインターモノマー結合のいずれか1又は2以上は、ホスホジエステル、ジチオエートを含むホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、および他の化学修飾形態であり得る。

30

【0173】

翻訳可能なオリゴマー分子がUNAモノマーで終わる場合、上記の位置番号付けに従つて、末端位置は1末端となるか、または末端位置は3末端となる。

【0174】

強化された翻訳

本発明の翻訳可能な分子は、分子の翻訳効率を高める領域を組み込むことができる。

【0175】

一般に、当技術分野で知られている翻訳エンハンサー領域を翻訳可能な分子の構造に組み込んで、ペプチドまたはタンパク質の収量を増大させることができる。

【0176】

翻訳エンハンサー領域を含有する翻訳可能な分子は、ペプチドまたはタンパク質の産生の増大を提供することができる。

40

【0177】

いくつかの実施形態では、翻訳エンハンサー領域は、翻訳可能な分子の5'または3'非翻訳領域を含むか、またはそれに位置することができる。

【0178】

翻訳エンハンサー領域の例には、TEV 5'UTRおよびアフリカツメガエルベータグロビン3'UTRに由来する天然に存在するエンハンサー領域が含まれる。

【0179】

分子構造および配列

50

翻訳可能な分子は、標的ペプチドまたはタンパク質を発現するように設計することができる。いくつかの実施形態では、標的ペプチドまたはタンパク質は、対象の状態または疾患に関連し得る。

【0180】

いくつかの態様では、翻訳可能な分子の塩基配列は、mRNAの塩基配列の少なくとも有効な部分またはドメインと同一の部分を含むことができ、有効な部分は、翻訳可能な分子の翻訳産物に治療活性を付与するのに十分である。

【0181】

いくつかの態様では、本発明は、細胞の天然核酸分子の少なくとも一断片と同一の塩基配列を有する、活性のある翻訳可能な分子を提供する。

10

【0182】

特定の実施形態では、翻訳可能な分子の塩基配列は、1又は2以上の塩基変異を除いて、mRNAの塩基配列と同一の部分を含むことができる。翻訳可能な分子の変異の数は、mRNAよりも実質的に低い活性を有する翻訳可能な分子の翻訳産物を產生する量を超えてはならない。

【0183】

本発明の翻訳可能なオリゴマーUNA分子は、核酸塩基の配列を表示することができ、インビトロ、エクスピボ、またはインビボにおいてペプチドまたはタンパク質を発現するように設計することができる。発現されたペプチドまたはタンパク質は、天然または自然mRNAから発現されたタンパク質に対応する活性を含む、さまざまな形態の活性を有し得る。

20

【0184】

いくつかの実施形態では、本発明の翻訳可能な分子は、約400～15,000モノマーの鎖長を有してもよく、ここで、UNAモノマーではない任意のモノマーは、NまたはQモノマーであり得る。

【0185】

分子キップ構造

本発明の翻訳可能な分子は、当技術分野で知られているように、さまざまな基およびそれらの類似体でキップされた5'末端を有し得る。例示的な実施形態では、5'キップは、m7GpppGmキップであってもよい。さらなる実施形態では、5'キップは、m7GpppA、m7GpppC；非メチル化キップ類似体（例えば、GpppG）；ジメチル化キップ類似体（例えば、m2,7GpppG）、トリメチル化キップ類似体（例えば、m2,2,7GpppG）、ジメチル化対称キップ類似体（例えば、m7Gpppm7G）、またはアンチリバースキップ類似体（例えば、ARCA；m7,2'OmegpppG、m72'dGpppG、m7,3'OmegpppG、m7,3'dGpppG、およびそれらのテトラホスフェート誘導体）（例えば、Jemielity、Jら、RNA 9:1108-1122(2003)を参照されたい）から選択され得る。

30

他の実施形態では、5'キップは、ARCAキップ(3'-OMe-m7G(5')pppG)であってもよい。5'キップは、mCAP(m7G(5')ppp(5')G⁷N-メチル-グアノシン-5'-トリホスフェート-5'-グアノシン)であってもよい。5'キップは、加水分解に耐性があり得る。

40

【0186】

5'キップ構造のいくつかの例は、WO 2015/051169 A2、WO / 2015 / 061491、および米国特許第8,093,367号および同第8,304,529号で提供される。

【0187】

テール領域

いくつかの実施形態では、AGLをコードする翻訳可能なオリゴマーは、エキソヌクレアーゼ分解からmRNAを保護する役割を果たすことができるテール領域を含む。いくつかの実施形態では、テール領域はポリAテールであり得る。

50

【0188】

ポリAテールは、例えば、合成またはインビトロ転写RNAにテールを追加するためにポリAポリメラーゼを使用するなど、当技術分野で知られているさまざまな方法を使用して追加されることができる。他の方法は、ポリAテールをコードする転写ベクターの使用、またはリガーゼの使用（例えば、T4 RNAリガーゼおよび/またはT4 DNAリガーゼを使用したスプリント連結による）を含み、ポリAはセンスRNAの3'末端に連結され得る。いくつかの実施形態では、上記の方法のいずれかの組み合わせが利用される。

【0189】

いくつかの実施形態では、翻訳可能なオリゴマーは、3'ポリAテール構造を含む。いくつかの実施形態では、ポリAテールの長さは少なくとも約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、200、または300個のヌクレオチドであり得る。いくつかの実施形態では、3'ポリAテールは、約5～300個のアデノシンヌクレオチド（例えば、約30～250個のアデノシンヌクレオチド、約60～220個のアデノシンヌクレオチド、約80～200個のアデノシンヌクレオチド、約90～約150個のアデノシンヌクレオチド、または約100～約120個のアデノシンヌクレオチド）を含有する。例示的な実施形態では、3'ポリAテールは、約100個のヌクレオチド長である。別の例示的な実施形態では、3'ポリAテールは、約115個のヌクレオチド長である。別の例示的な実施形態では、3'ポリAテールは、約250個のヌクレオチド長である。

【0190】

いくつかの実施形態では、3'ポリAテールは、1又は2以上のUNAモノマーを含む。いくつかの実施形態では、3'ポリAテールは、2、3、4、5、10、15、20、またはそれ以上のUNAモノマーを含有する。例示的な実施形態では、3'ポリAテールは、2つのUNAモノマーを含有する。さらなる例示的な実施形態では、3'ポリAテールは、連続して、すなわち3'ポリAテール中で互いに隣接して見出される2つのUNAモノマーを含有する。

【0191】

例示的な実施形態では、3'ポリAテールは、配列番号6に示される配列を含むか、またはそれからなる。別の例示的な実施形態では、3'ポリAテールは、配列番号38に示される配列を含むか、またはそれからなる。さらに別の例示的な実施形態では、3'ポリAテールは、配列番号39に示される配列を含むか、またはそれからなる。

【0192】

いくつかの実施形態では、翻訳可能なオリゴマーは、3'ポリCテール構造を含む。いくつかの実施形態では、ポリCテールの長さは少なくとも約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、200、または300個のヌクレオチドであり得る。いくつかの実施形態では、3'ポリCテールは、約5～300個のシトシンヌクレオチド（例えば、約30～250個のシトシンヌクレオチド、約60～220個のシトシンヌクレオチド、約80～200個のシトシンヌクレオチド、約90～150個のシトシンヌクレオチド、または約100～約120個のシトシンヌクレオチド）を含有する。例示的な実施形態では、3'ポリCテールは、約100個のヌクレオチド長である。別の例示的な実施形態では、3'ポリCテールは、約115個のヌクレオチド長である。ポリCテールは、ポリAテールに追加されてもよく、またはポリAテールの代替となってもよい。ポリCテールは、ポリAテールの5'末端またはポリAテールの3'末端に追加されてもよい。

【0193】

いくつかの実施形態では、ポリAおよび/またはポリCテールの長さは、本発明の修飾された翻訳可能なオリゴマー分子の安定性、したがってタンパク質の転写を制御するために調整される。例えば、ポリAテールの長さは翻訳可能な分子の半減期に影響を与える可能性があるため、ポリAテールの長さを調整してmRNAのヌクレアーゼ耐性レベルを修飾し、それによってポリヌクレオチド発現および/または標的細胞におけるポリペプチド産生の時間経過を制御することができる。

10

20

30

40

50

【0194】

5' および 3' 非翻訳領域 (UTR)

いくつかの実施形態では、AGLをコードする翻訳可能なオリゴマーは、5' 非翻訳領域および/または3' 非翻訳領域を含み得る。当技術分野で理解されているように、5' および/または3' UTRは、mRNAの安定性または翻訳効率に影響を与える。例示的な一実施形態では、翻訳可能なオリゴマーは、5' UTRおよび3' UTRを含む。

【0195】

いくつかの実施形態では、翻訳可能なオリゴマーは、少なくとも約25、50、75、100、125、150、175、200、300、400、または500個のヌクレオチドである5' UTRを含み得る。いくつかの態様では、5' UTRは、約50~300個のヌクレオチド(例えば、約75~250個のヌクレオチド、約100~200個のヌクレオチド、約120~150個のヌクレオチド、または約135個のヌクレオチド)を含有する。例示的な一実施形態では、5' UTRは、約135個のヌクレオチド長である。

10

【0196】

いくつかの実施形態では、5' UTRは、翻訳可能なオリゴマーの安定性を高めるために、比較的安定であることが当技術分野で知られているmRNA分子(例えば、ヒストン、チューブリン、グロビン、GAPDH、アクチン、またはクエン酸回路酵素)に由来する。他の実施形態では、5' UTR配列は、CMV最初期1(IE1)遺伝子の部分配列を含み得る。5' UTR配列の例は、米国特許第9,149,506号にて見出され得る。いくつかの実施形態では、5' UTRは、ヒトIL-6、アラニンアミノトランスフェラーゼ1、ヒトアポリポタンパク質E、ヒトフィブリノーゲンアルファ鎖、ヒトトランスサイレチン、ヒトハプトグロビン、ヒトアルファ-1-アンチキモトリプシン、アンチトロンビン、ヒトアルファ-1-アンチトリプシン、ヒトアルブミン、ヒトベータグロビン、ヒト補体C3、ヒト補体C5、SynK、AT1G58420、マウスベータグロビン、マウスアルブミン、およびタバコエッチャイルス、または前述のいずれかの断片の5' UTRから選択される配列を含む。例示的な一実施形態では、5' UTRは、タバコエッチャイルス(TEV)に由来する。さらなる例示的な一実施形態では、5' UTRは、配列番号3に示される配列を含むか、またはそれからなる。さらに別の例示的な実施形態では、5' UTRは、配列番号3に示される配列の断片、例えば、配列番号3の少なくとも10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、または125個の連続したヌクレオチドの断片である。

20

【0197】

いくつかの実施形態では、翻訳可能なオリゴマー分子は、内部リボソーム進入部位(IRES)を含む。当技術分野で理解されているように、IRESは、末端非依存的な様式で翻訳開始を可能にするRNA要素である。例示的な実施形態では、IRESは、5' UTR内にある。他の実施形態では、IRESは、5' UTRの外側にあってもよい。

30

【0198】

いくつかの実施形態では、翻訳可能なオリゴマーは、少なくとも約25、50、75、100、125、150、175、200、300、400、または500個のヌクレオチドである3' UTRを含み得る。いくつかの態様では、3' UTRは、約50~300個のヌクレオチド(例えば、約75~250個のヌクレオチド、約100~200個のヌクレオチド、約140~175個のヌクレオチド、または約160個のヌクレオチド)を含有する。例示的な一実施形態では、3' UTRは、約160個のヌクレオチド長である。

40

【0199】

いくつかの実施形態では、3' UTRは、1又は2以上のUNAモノマーを含む。いくつかの実施形態では、3' UTRは、2、3、4、5、10、15、20、またはそれ以上のUNAモノマーを含有する。

【0200】

3' UTR配列の例は、米国特許第9,149,506号にて見出され得る。いくつかの実施形態では、3' UTRは、アラニンアミノトランスフェラーゼ1、ヒトアポリポタンパ

50

ク質 E、ヒトフィブリノゲンアルファ鎖、ヒトハプトグロビン、ヒトアンチトロンビン、ヒトアルファグロビン、ヒトベータグロビン、ヒト補体 C3、ヒト成長因子、ヒトヘプシン、M A L A T - 1、マウスベータグロビン、マウスアルブミン、およびアフリカツメガエルベータグロビン、または前述のいずれかの断片の 3' UTR から選択される配列を含む。例示的な実施形態では、3' UTR は、アフリカツメガエルベータグロビンに由来する。別の例示的な実施形態では、3' UTR は、アフリカツメガエルベータグロビンに由来し、1 又は 2 以上の UNA モノマーを含有する。さらなる例示的な実施形態では、3' UTR は、配列番号 5 および 33 ~ 37 に示される配列を含むか、またはそれからなる。さらに別の例示的な実施形態では、3' UTR は、配列番号 5 および 33 ~ 37 に示される配列の断片、例えば、配列番号 5 および 33 ~ 37 の少なくとも 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、または 150 個の連続したヌクレオチドの断片である。 10

【0201】

特定の例示的な実施形態では、AGL をコードする翻訳可能なオリゴマーは、配列番号 3 の 5' UTR 配列と、配列番号 5 および 33 ~ 37 から選択される 3' UTR 配列とを含む。いくつかの実施形態では、AGL をコードする翻訳可能なオリゴマーは、配列番号 6、配列番号 38、または配列番号 39 に示されるポリ A テールをさらに含む。いくつかの実施形態では、AGL の mRNA コード配列は、配列番号 7 ~ 32 または配列番号 41 ~ 45 から選択される配列を含む。 20

【0202】

トリプル停止コドン

いくつかの実施形態では、AGL をコードする翻訳可能なオリゴマーは、トリプル停止コドンを作り出す CDS のすぐ下流の配列を含み得る。翻訳の効率を高めるために、トリプル停止コドンを組み込むことができる。いくつかの実施形態では、翻訳可能なオリゴマーは、配列番号 7 ~ 32 または配列番号 41 ~ 45 に例示されるように、本明細書に記載の PAH CDS のすぐ下流の配列 A U A A G U G A A (配列番号 40) を含み得る。 30

【0203】

翻訳開始部位

いくつかの実施形態では、AGL をコードする翻訳可能なオリゴマーは、翻訳開始部位を含み得る。そのような配列は当技術分野で知られており、コザック配列を含む。例えば、Kozak、Marilyn (1988) Mol. and Cell Biol.、8: 2737 - 2744; Kozak、Marilyn (1991) J. Biol. Chem.、266: 19867 - 19870; Kozak、Marilyn (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA、87: 8301 - 8305; および Kozak、Marilyn (1989) J. Cell Biol.、108: 229 - 241、およびそれらに引用されている参考文献を参照されたい。当技術分野で理解されているように、コザック配列は、真核生物 mRNA の翻訳開始部位あたりを中心とする短いコンセンサス配列であり、mRNA の翻訳の効率的な開始を可能にする。リボソーム翻訳機構は、コザック配列の文脈で AUG 開始コドンを認識する。 40

【0204】

いくつかの実施形態では、翻訳開始部位、例えば、コザック配列は、AGL のコード配列の上流に挿入される。いくつかの実施形態では、翻訳開始部位は、5' UTR の下流に挿入される。特定の例示的な実施形態では、翻訳開始部位は、AGL のコード配列の上流および 5' UTR の下流に挿入される。 40

【0205】

当技術分野で理解されているように、コザック配列の長さはさまざまあり得る。一般的に、リーダー配列の長さを増やすと翻訳が強化される。

【0206】

いくつかの実施形態では、AGL をコードする翻訳可能なオリゴマーは、配列番号 4 の配列を有するコザック配列を含む。特定の例示的な実施形態では、AGL をコードする翻 50

訳可能なオリゴマーは、配列番号4の配列を有するコザック配列を含み、このコザック配列は、5'UTRのすぐ下流およびAGLのコード配列のすぐ上流にある。

【0207】

合成方法

さまざまな態様では、本発明は、翻訳可能なメッセンジャー分子の合成方法を提供する。

【0208】

本発明の翻訳可能な分子は、本明細書に開示される方法、ならびに当技術分野で既知の任意の関連技術を使用して合成および単離することができる。

【0209】

核酸を調製するためのいくつかの方法は、例えば、Merino, Chemical Synthesis of Nucleoside Analogues (2013); Gait, Oligonucleotide synthesis: a practical approach (1984); Herdewijn, Oligonucleotide Synthesis, Methods in Molecular Biology, Vol. 288 (2005)にて提供される。

10

【0210】

いくつかの実施形態では、翻訳可能な分子は、インビトロ転写 (IVT) 反応によって作製することができる。ヌクレオシド三リン酸 (NTP) の混合物は、T7試薬を使用して重合されて、例えば、DNA鑄型からRNAを產生することができる。DNA鑄型は、RNase不含DNaseを用いて分解でき、RNAはカラム分離される。

20

【0211】

いくつかの実施形態では、リガーゼを使用して、合成オリゴマーをRNA分子またはRNA転写物の3'末端に連結して、翻訳可能な分子を形成することができる。3'末端に連結される合成オリゴマーは、ポリAテールの機能性を提供でき、有利には、3' - エキソヌクレアーゼによるその除去に対する耐性を提供することができる。連結された産物の翻訳可能な分子は、増大した比活性を有することができ、異所性タンパク質発現のレベルの増大を提供することができる。

【0212】

特定の実施形態では、本発明の翻訳可能な分子の連結産物は、天然の特異性を有するRNA転写物を用いて作製され得る。連結産物は、天然の特異性との適合性を確保するためには、5'末端でRNA転写物の構造を保持する合成分子であり得る。

30

【0213】

さらなる実施形態では、本発明の翻訳可能な分子の連結産物は、外因性RNA転写物または非天然RNAを用いて作製され得る。連結産物は、RNAの構造を保持する合成分子であり得る。

【0214】

理論に縛られることを望まないが、細胞内の標準的なmRNA分解経路には、以下の工程が含まれる：(i) ポリAテールは、3'エキソヌクレアーゼによって徐々に断片に切り戻され、効率的な翻訳に必要なループ相互作用を閉鎖し、キャップを攻撃に対して開かれた状態にする；(ii) 複合体のキャップ除去は、5'キャップを除去する；(iii) 転写物の保護されておらず翻訳的に機能しない残留物は、5'および3'エキソヌクレアーゼ活性により分解される。

40

【0215】

本発明の実施形態は、天然の転写物よりも高い翻訳活性を有することができる新しい翻訳可能な構造を含む。とりわけ、本明細書の翻訳可能な分子は、脱アデニル化の過程でエキソヌクレアーゼがポリAテールを切り戻すのを防ぐことができる。

【0216】

本発明の実施形態は、翻訳可能な分子の構造、組成物、および方法を提供する。本発明の実施形態は、1又は2以上のUNAモノマーを含有し、かつ機能的半減期が増大した翻訳可能な分子を提供することができる。

50

【0217】

驚くべきことに、mRNA転写物のライゲーション生成物への高い変換により、mRNA転写物の3'末端への合成オリゴマーのライゲーションを達成できることが見出された。

【0218】

本明細書で使用するポリAテールおよびポリAオリゴマーという用語は、モノマーのオリゴマーを指し、モノマーは、アデニンに基づくヌクレオチド、UNAモノマー、天然に存在するヌクレオチド、修飾ヌクレオチド、またはヌクレオチド類似体を含むことができる。

【0219】

RNAの3'末端へのライゲーションのためのオリゴマーは、長さが2~120個のモノマー、長さが3~120個のモノマー、長さが4~120個のモノマー、長さが5~120個のモノマー、またはそれ以上であってもよい。例示的な実施形態では、ライゲーションのためのオリゴマーは、長さが約30個のモノマーである。

10

【0220】

脂質に基づく製剤

脂質に基づく製剤は、それらの生体適合性と大規模生産の容易さから、RNAの最も有望な送達系の1つとしてますます認識されてきた。カチオン性脂質は、RNA送達のための合成材料として広く研究されてきた。一緒に混合した後、核酸をカチオン性脂質によって凝縮し、リポプレックスとして知られる脂質/核酸複合体を形成する。これらの脂質複合体は、遺伝物質をヌクレアーゼの作用から保護し、負に帯電した細胞膜と相互作用することにより細胞内に送達することができる。リポプレックスは、生理的pHで正に荷電した脂質と負に荷電した核酸を直接混合することにより調製することができる。

20

【0221】

従来のリポソームは、カチオン性、アニオン性、または中性の(リン)脂質とコレステロールで構成することができる脂質二重層で構成されており、水性コアを封入している。脂質二重層と水性空間の両方に、それぞれ疎水性または親水性化合物を組み込むことができる。インビボにおけるリポソームの特性および挙動は、親水性ポリマーコーティング、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)をリポソーム表面に追加して、立体安定化を付与することにより修飾することができる。さらに、リポソームは、リガンド(抗体、ペプチド、炭水化物など)をその表面または結合したPEG鎖の末端部に結合することにより、特定の標的化に使用することができる(Front Pharmacol. 2015 Dec 1; 6: 286)。

30

【0222】

リポソームは、水性区画を囲むリン脂質二重層で構成されるコロイド状脂質に基づく、および界面活性剤に基づく送達系である。それらは球状の小胞として存在してもよく、サイズは20nm~数ミクロンの範囲となり得る。カチオン性脂質に基づくリポソームは、静電相互作用を介して負に帯電した核酸と複合体を形成することができ、生体適合性、低毒性、インビボ臨床応用に必要な大規模生産の可能性を提供する複合体をもたらす。リポソームは、取り込みのために細胞膜と融合することができる;細胞内に入ると、リポソームはエンドサイトーシス経路を介して処理され、次いで、遺伝物質はエンドソーム/担体から細胞質に放出される。リポソームは基本的に生体膜の類似体であり、天然および合成リン脂質の両方から調製することができることを考慮して、その優れた生体適合性のため、リポソームは薬物送達ビヒクルとして長い間認められてきた(Int J Nanomedicine. 2014; 9: 1833-1843)。

40

【0223】

カチオン性リポソームは、伝統的に、プラスミドDNA、アンチセンスオリゴ、およびsiRNA/スマートヘアピンRNA-shRNAを含むオリゴヌクレオチドのための最も一般的に使用される非ウイルス送達系であってきました。DOTAP、(1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパン)およびDOTMA(N-[1-(2,3-ジオレオイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムメチルサルフ

50

エート)などのカチオン性脂質は、負に帯電した核酸と複合体またはリポプレックスを形成し、静電相互作用によりナノ粒子を形成し、インビトロでの高いトランスフェクション効率を提供する。さらに、中性1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン(DOPC)に基づくナノリポソームとしてのRNA送達のための中性脂質に基づくナノリポソームが開発された(Adv Drug Deliv Rev. 2014 Feb; 66: 110-116)。

いくつかの実施形態によれば、本明細書に記載の発現可能なポリヌクレオチドおよび異種mRNA構築物は、脂質製剤化される。脂質製剤は、リポソーム、リポプレックス、PLGAなどのコポリマー、および脂質ナノ粒子から選択されることが好ましいが、これらに限定されない。好ましい一実施形態では、脂質ナノ粒子(LNP)は以下を含む：

- (a) 核酸、
- (b) カチオン性脂質、
- (c) 凝集低減剤(ポリエチレングリコール(PEG)脂質またはPEG修飾脂質など)、
- (d) 場合により非カチオン性脂質(中性脂質など)、および
- (e) 場合により、ステロール。

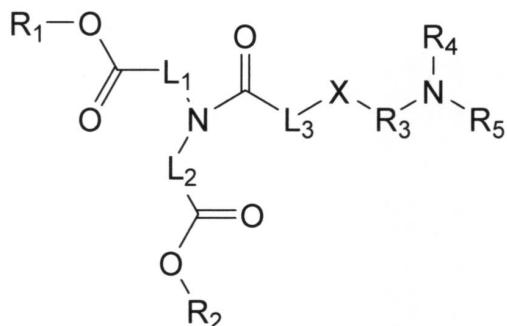
【0224】

一実施形態では、脂質ナノ粒子製剤は、約20~60%のカチオン性脂質:5~25%の中性脂質:25~55%のステロール、0.5~15%のPEG脂質のモル比の、(i)少なくとも1つのカチオン性脂質；(ii)中性脂質；(iii)コレステロールなどのステロール；および(iv)PEG脂質からなる。

【0225】

チオカルバメートおよびカルバメート含有脂質製剤

本発明の活性分子の送達のための脂質および脂質組成物のいくつかの例は、WO/2015/074085およびUSSN 15/387,067に示されており、これらのそれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。特定の実施形態では、脂質は以下の式の化合物、またはその薬学的に許容される塩であり、



式中、

R₁およびR₂は両方とも、1~14個の炭素からなる直鎖アルキル、または2~14個の炭素からなるアルケニルまたはアルキニルからなり、

L₁およびL₂は両方とも、5~18個の炭素からなるか、またはNと複素環を形成する、直鎖アルキレンまたはアルケニレンからなり、

XはSであり、

L₃は、結合、または1~6個の炭素からなるか、もしくはNと複素環を形成する、直鎖アルキレンからなり、

R₃は、1~6個の炭素からなる直鎖または分岐アルキレンからなり、

R₄およびR₅は同じであるかまたは異なり、それぞれ水素、または1~6個の炭素か

10

20

30

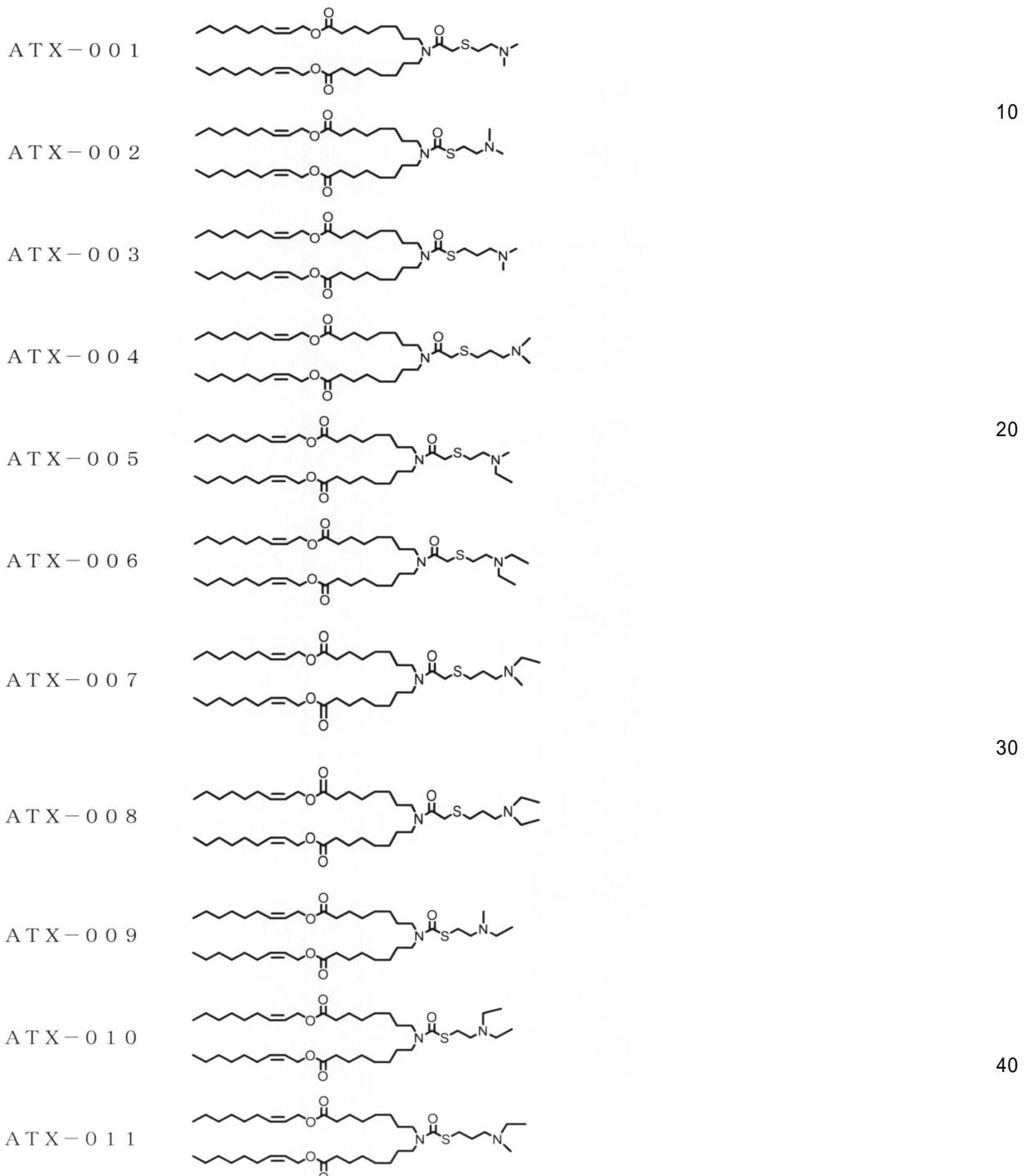
40

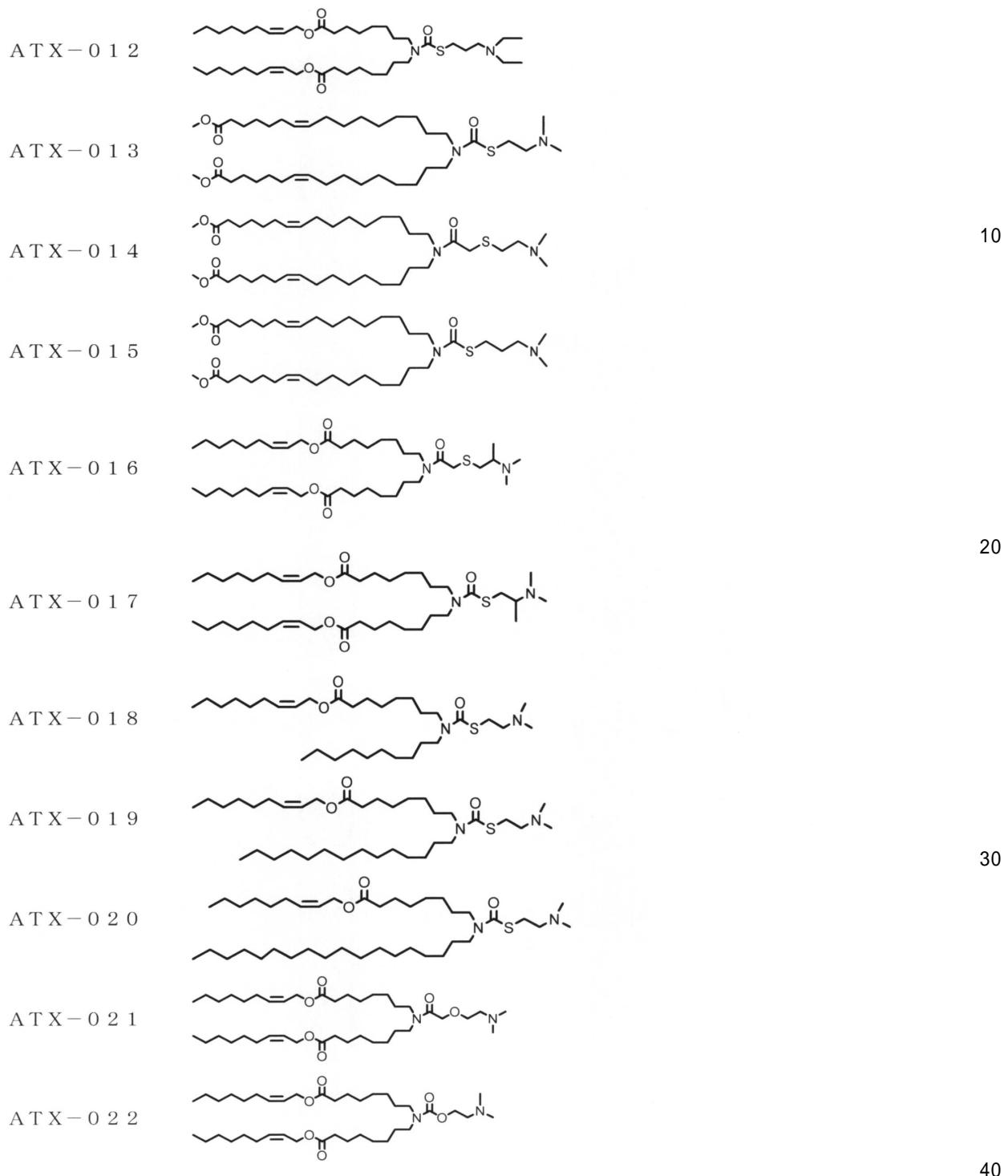
50

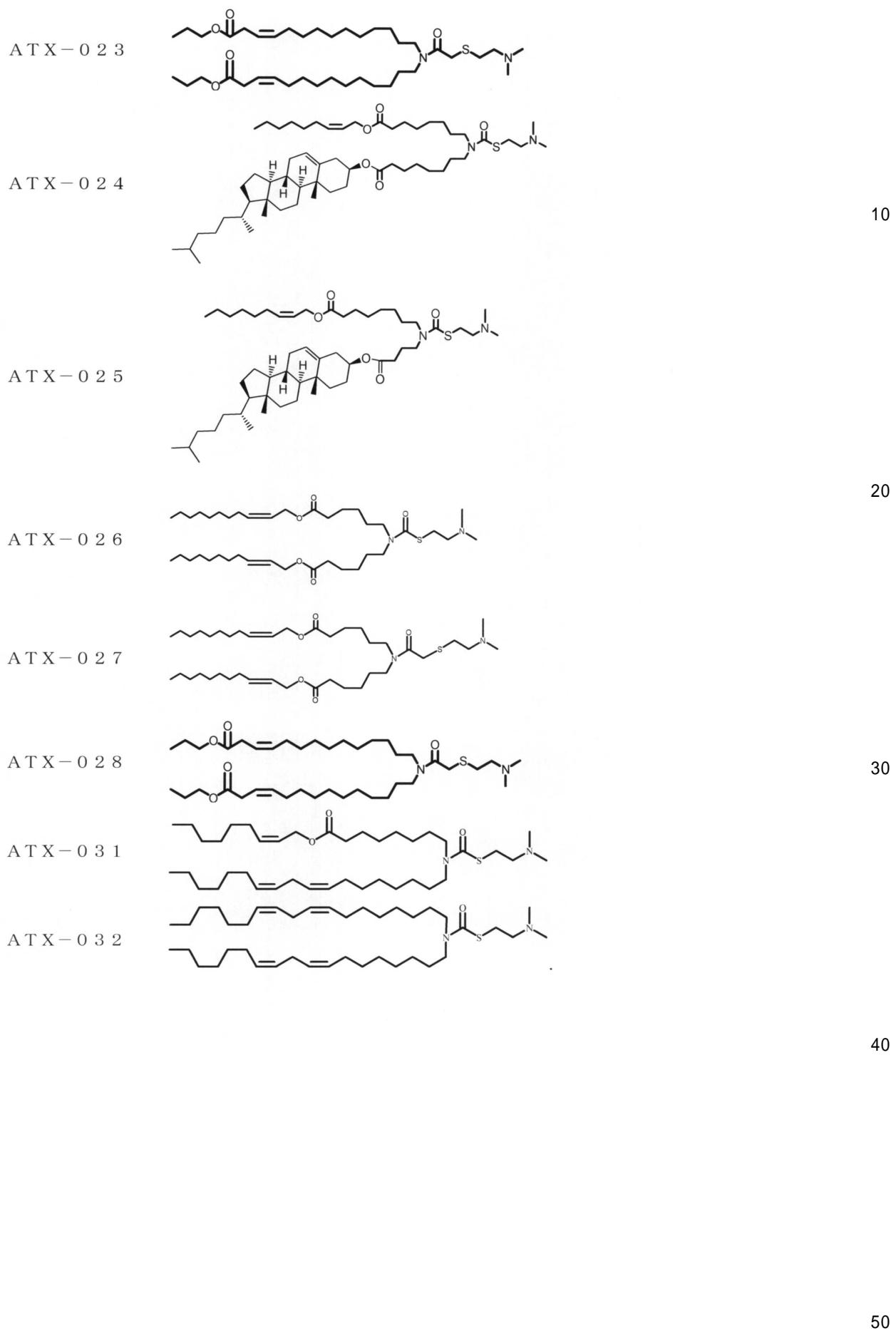
らなる直鎖または分岐アルキルからなるか、
または、その薬学的に許容される塩からなる。

【0226】

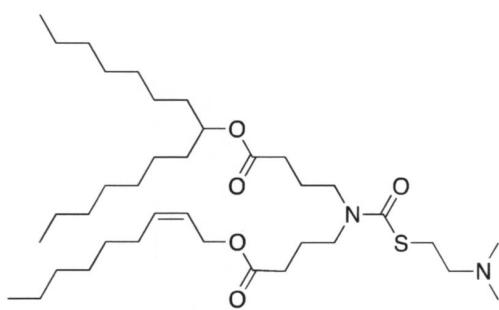
脂質製剤は、以下のうちから選択される1又は2以上のイオン化可能なカチオン性脂質を含んでもよい：





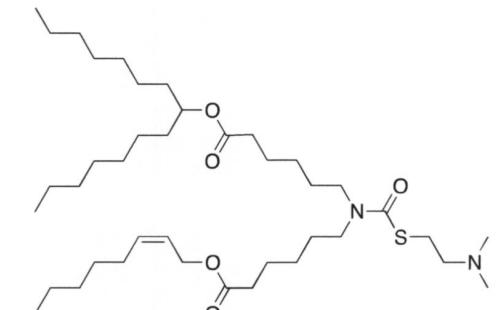


A T X - 0 8 1



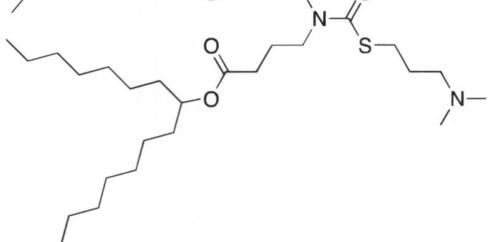
10

A T X - 0 9 5



20

A T X - 0 1 2 6



30

【 0 2 2 7 】

カチオン性脂質

脂質ナノ粒子は、好ましくは、脂質ナノ粒子を形成するのに好適なカチオン性脂質を含む。好ましくは、カチオン性脂質は、ほぼ生理的 pH で正の正味荷電を保有する。

【 0 2 2 8 】

カチオン性脂質は、例えば、N, N - ジオレイル - N, N - ジメチルアンモニウムクロリド (DODAC)、N, N - ジステアリル - N, N - ジメチルアンモニウムプロミド (DDAB)、1, 2 - ジオレオイルトリメチルアンモニウムプロパンクロリド (DOTAP) (N - (2, 3 - ジオレオイルオキシ) プロピル) - N, N, N - トリメチルアンモニウムクロリドおよび 1, 2 - ジオレイルオキシ - 3 - トリメチルアミノプロパンクロリド塩としても知られている)、N - (1 - (2, 3 - ジオレイルオキシ) プロピル) - N, N, N - トリメチルアンモニウムクロリド (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 - ジリノレイルオキシ - N, N - ジメチルアミノプロパン (DLinDMA)、1, 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 - y - 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

40

50

ノレイオキシ - 3 - (ジメチルアミノ)アセトキシプロパン (D L i n - D A C)、1 , 2 - ジリノレイオキシ - 3 - モルホリノプロパン (D L i n - M A)、1 , 2 - ジリノレオイル - 3 - ジメチルアミノプロパン (D L i n D A P)、1 , 2 - ジリノレイルチオ - 3 - ジメチルアミノプロパン (D L i n - S - D M A)、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 (D L i n - 2 - D M A P)、1 , 2 - ジリノレイルオキシ - 3 - トリメチルアミノプロパンクロリド塩 (D L i n - T M A . C I)、1 , 2 - ジリノレオイル - 3 - トリメチルアミノプロパンクロリド塩 (D L i n - T A P . C I)、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 (D L i n - M P Z)、または3 - (N , N - ジリノレイルアミノ) - 1 , 2 - プロパンジオール (D L i n A P)、3 - (N , N - ジオレイルアミノ) - 1 , 2 - プロパンジオ (D O A P)、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 (D L i n - E G - D M A)、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 (D L i n - K - D M A)、またはその類似体、(3 a R , 5 s , 6 a S) - N , N - ジメチル - 2 , 2 - ジ ((9 Z , 12 Z) - オクタデカ - 9 , 12 - ジエニル)テトラヒドロ - 3 a H - シクロペンタ [d] [1 , 3] ジオキソール - 5 - アミン、(6 Z , 9 Z , 28 Z , 31 Z) - 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)ブタノアート (M C 3)、1 , 1 , - (2 - (4 - (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)エチルアザネジイル)ジドデカン - 2 - オール (C 12 - 200)、2 , 2 - ジリノレイル - 4 - (2 - ジメチルアミノエチル) - [1 , 3] - ジオキソラン (D L i n - K - C 2 - D M A)、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 (D L i n - K - D M A)、(6 Z , 9 Z , 28 Z , 31 Z) - ヘプタトリアコンタ - 6 , 9 , 28 3 1 - テトラエン - 19 - イル 4 - (ジメチルアミノ)ブタノアート (D L i n - M - C 3 - D M A)、3 - ((6 Z , 9 Z , 28 Z , 31 Z) - ヘプタトリアコンタ - 6 , 9 , 28 , 31 - テトラエン - 19 - イルオキシ) - N , N - ジメチルプロパン - 1 - アミン (M C 3 エーテル)、4 - ((6 Z , 9 Z , 28 Z , 31 Z) - ヘプタトリアコンタ - 6 , 9 , 28 , 31 - テトラエン - 19 - イルオキシ) - N , N - ジメチルブタン - 1 - アミン (M C 4 エーテル)、または前述のいずれかの任意の組み合わせであり得る。他のカチオン性脂質は、N , N - ジステアリル - N , N - ジメチルアンモニウムプロミド (D D A B)、3 P - (N - (N ' , N ' - ジメチルアミノエタン) - カルバモイル)コレステロール (D C - C h o i)、N - (1 - (2 , 3 - ジオレイルオキシ)プロピル) - N - 2 - (スペルミンカルボキサミド)エチル) - N , N - ジメチルアンモニウムトリフルオロアセテート (D O S P A)、ジオクタデシルアミドグリシルカルボキシスペルミン (D O G S)、1 , 2 - ジレオイル - s n - 3 - ホスホエタノールアミン (D O P E)、1 , 2 - ジオレオイル - 3 - ジメチルアンモニウムプロパン (D O D A P)、N - (1 , 2 - ジミリスチルオキシプロブ - 3 - イル) - N , N - ジメチル - N - ヒドロキシエチルアンモニウムプロミド (D M R I E)、および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 (X T C)を含むが、これらに限定されない。さらに、例えば、リポフェクチン (G I B C O / B R L から入手可能なD O T M A およびD O P E を含む)、およびリポフェクタミン (G I B C O / B R L から入手可能なD O S P A およびD O P E を含む)などのカチオン性脂質の市販の調製物を使用することができる。

【0229】

他の好適なカチオン性脂質は、国際公開第W O 0 9 / 0 8 6 5 5 8 号、同第W O 0 9 / 1 2 7 0 6 0 号、同第W O 1 0 / 0 4 8 5 3 6 号、同第W O 1 0 / 0 5 4 4 0 6 号、同第W O 1 0 / 0 8 8 5 3 7 号、同第W O 1 0 / 1 2 9 7 0 9 号、および同第W O 2 0 1 1 / 1 5 3 4 9 3 号；米国特許公開第2 0 1 1 / 0 2 5 6 1 7 5 号、同第2 0 1 2 / 0 1 2 8 7 6 0 号、および同第2 0 1 2 / 0 0 2 7 8 0 3 号；米国特許第8 , 1 5 8 , 6 0 1 号；およびL o v e ら、P N A S 、1 0 7 (5)、1 8 6 4 - 6 9 、2 0 1 0 において開示されている。他の好適なアミノ脂質は、アルキル置換基が異なるもの（例えば、N - エチル

10

20

30

40

50

- N - メチルアミノ - 、および N - プロピル - N - エチルアミノ -) を含む、代替脂肪酸基および他のジアルキルアミノ基を有するものを含む。一般に、特にフィルター滅菌の目的のために複合体を約 0.3 ミクロン未満のサイズにする必要がある場合、より低い飽和度のアシル鎖を有するアミノ脂質が、より容易にサイズ決めされる。C 14 ~ C 22 の範囲の炭素鎖長を持つ不飽和脂肪酸を含有するアミノ脂質を使用してもよい。他の足場を使用して、アミノ基とアミノ脂質の脂肪酸または脂肪アルキル部分とを分離することもできる。

【 0 2 3 0 】

さらに好ましい一実施形態では、LNPは、特許出願第 PCT / EP 2017 / 064 066 号による式 (III) のカチオン性脂質を含む。この文脈において、PCT / EP 2017 / 064066 の開示も参照により本明細書に組み込まれる。

10

【 0 2 3 1 】

特定の実施形態では、本発明のアミノまたはカチオン性脂質は、少なくとも 1 つのプロトン化可能な、または脱プロトン化可能な基を有し、その結果、脂質は生理的 pH 以下の pH (例えば pH 7.4) では正に荷電し、第 2 の pH 、好ましくは、生理的 pH 以上では、中性である。もちろん、pH の関数としてのプロトンの付加または除去は平衡プロセスであり、荷電脂質または中性脂質への言及は主な種の性質を指し、脂質の全てが荷電または中性形態で存在することを必要としないことが理解されよう。2 つ以上のプロトン化可能な基または脱プロトン化可能な基を有する脂質、または双性イオン性の脂質は、本発明における使用から除外されない。特定の実施形態では、プロトン化可能な脂質は、約 4 ~ 約 11 の範囲のプロトン化可能な基の pKa 、例えば、約 5 ~ 約 7 の pKa を有する。

20

【 0 2 3 2 】

カチオン性脂質は、粒子中に存在する総脂質の約 20 mol 1 % ~ 約 70 もしくは 75 mol 1 % 、または約 45 ~ 約 65 mol 1 % 、または約 20 、 25 、 30 、 35 、 40 、 45 、 50 、 55 、 60 、 65 、または約 70 mol 1 % を構成する。別の実施形態では、脂質ナノ粒子は、カチオン性脂質のモル基準で約 25 % ~ 約 75 % 、例えば、モル基準で (脂質ナノ粒子中の脂質の総モル 100 % に基づいて) 、約 20 ~ 約 70 % 、約 35 ~ 約 65 % 、約 45 ~ 約 65 % 、約 60 % 、約 57.5 % 、約 57.1 % 、約 50 % 、または約 40 % を含む。一実施形態では、カチオン性脂質の核酸に対する比は、約 3 ~ 約 15 、例えば、約 5 ~ 約 13 、または約 7 ~ 約 11 などである。

30

【 0 2 3 3 】

薬学的組成物

いくつかの態様では、本発明は、翻訳可能な化合物と薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物を提供する。

【 0 2 3 4 】

薬学的組成物は、局所投与または全身投与が可能であり得る。いくつかの態様では、薬学的組成物は、任意の投与モダリティが可能であり得る。特定の態様では、投与は、静脈内、皮下、経肺、筋肉内、腹腔内、経皮、経口、吸入、または経鼻投与を含む、任意の経路によるものであり得る。

40

【 0 2 3 5 】

本発明の実施形態は、脂質製剤中に翻訳可能な化合物を含有する薬学的組成物を含む。

【 0 2 3 6 】

いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、カチオン性脂質、アニオン性脂質、ステロール、ペグ化脂質、および前述の任意の組み合わせから選択される 1 又は 2 以上の脂質を含み得る。いくつかの実施形態では、翻訳可能な化合物を含有する薬学的組成物は、カチオン性脂質、リン脂質、コレステロール、およびペグ化脂質を含む。

【 0 2 3 7 】

特定の実施形態では、薬学的組成物は、リポソームを実質的に含まなくてもよい。

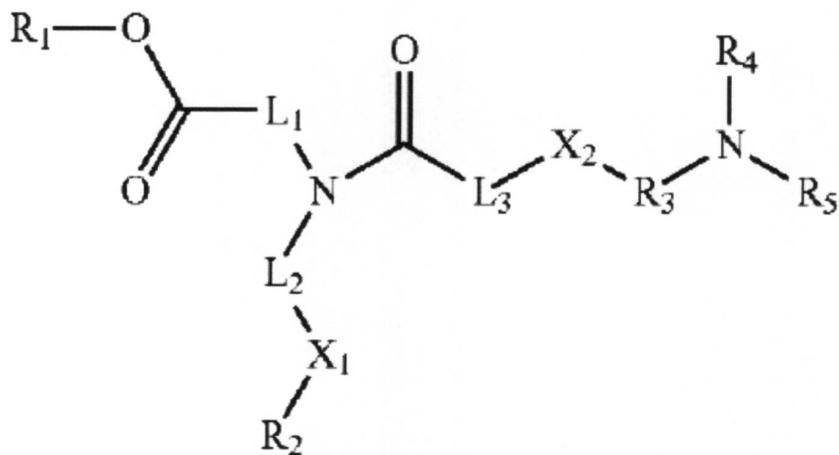
【 0 2 3 8 】

さらなる実施形態では、薬学的組成物は、ナノ粒子を含むことができる。

50

【0239】

本発明の活性分子の送達のための脂質および脂質組成物のいくつかの例は、WO / 2015 / 074085 に示されており、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。特定の実施形態では、脂質は、カチオン性脂質である。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、式IIの化合物を含む：



式II、

式中、R₁およびR₂は同じまたは異なり、それぞれ直鎖または分岐アルキル、アルケニル、またはアルキニルであり、L₁およびL₂は同じであるかまたは異なり、それぞれ少なくとも5個の炭素原子を有する直鎖アルキルであるか、またはNと複素環を形成し、X₁は結合、または-CO---O---であり、それによりL₂-CO---O---R₂が形成され、X₂はSまたはOであり、L₃は結合または低級アルキルであり、R₃は低級アルキルであり、R₄およびR₅は同じであるかまたは異なり、それぞれ低級アルキルである。

また、本明細書に記載されるのは、式中、L₃が存在せず、R₁およびR₂がそれぞれ少なくとも7個の炭素原子からなり、R₃がエチレンまたはn-プロピレンであり、R₄およびR₅がメチルまたはエチルであり、L₁およびL₂がそれぞれ、少なくとも5個の炭素原子を有する直鎖アルキルからなる、式IIの化合物である。また、本明細書に記載されるのは、式中、L₃が存在せず、R₁およびR₂がそれぞれ少なくとも7個の炭素原子からなり、R₃がエチレンまたはn-プロピレンであり、R₄およびR₅がメチルまたはエチルであり、L₁およびL₂がそれぞれ、少なくとも5個の炭素原子を有する直鎖アルキルからなる、式IIの化合物である。また、本明細書に記載されるのは、式中、L₃が存在せず、R₁およびR₂がそれぞれ少なくとも9個の炭素原子のアルケニルからなり、R₃がエチレンまたはn-プロピレンであり、R₄およびR₅がメチルまたはエチルであり、L₁およびL₂がそれぞれ、少なくとも5個の炭素原子を有する直鎖アルキルからなる、式IIの化合物である。また、本明細書に記載されるのは、式中、L₃がメチレンであり、R₁およびR₂がそれぞれ少なくとも7個の炭素原子からなり、R₃がエチレンまたはn-プロピレンであり、R₄およびR₅がメチルまたはエチルであり、L₁およびL₂がそれぞれ、少なくとも5個の炭素原子を有する直鎖アルキルからなる、式IIの化合物である。また、本明細書に記載されるのは、式中、L₃がメチレンであり、R₁およびR₂がそれぞれ少なくとも9個の炭素原子からなり、R₃がエチレンまたはn-プロピレンであり、R₄およびR₅がメチルまたはエチルであり、L₁およびL₂がそれぞれ、少なくとも7個の炭素原子を有する直鎖アルキルからなる、式IIの化合物である。また、本明細書に記載されるのは、式中、L₃がメチレンであり、R₁が、少なくとも9個の炭素原子を有するアルケニルからなり、R₂が少なくとも7個の炭素原子を有するアルケニルからなり、R₃がn-プロピレンであり、R₄およびR₅がメチルであり、L₁およびL₂がそれぞれ、

10

20

30

40

50

少なくとも 7 個の炭素原子を有する直鎖アルキルからなる、式 I I の化合物である。また、本明細書に記載されるのは、式中、 L_3 がメチレンであり、 R_1 および R_2 がそれぞれ少なくとも 9 個の炭素原子を有するアルケニルからなり、 R_3 がエチレンであり、 R_4 および R_5 がそれぞれメチルであり、 L_1 および L_2 がそれぞれ、少なくとも 7 個の炭素原子を有する直鎖アルキルからなる、式 I I の化合物である。

【 0 2 4 0 】

例示的な実施形態では、カチオン性脂質は、ATX-001、ATX-002、ATX-003、ATX-004、ATX-005、ATX-006、ATX-007、ATX-008、ATX-009、ATX-010、ATX-011、ATX-012、ATX-013、ATX-014、ATX-015、ATX-016、ATX-017、ATX-018、ATX-019、ATX-020、ATX-021、ATX-022、ATX-023、ATX-024、ATX-025、ATX-026、ATX-027、ATX-028、ATX-029、ATX-030、ATX-031、ATX-032、ATX-081、ATX-095、およびATX-126、またはその薬学的に許容される塩からなる群から選択される化合物を含む。

10

【 0 2 4 1 】

特定の例示的な実施形態では、カチオン性脂質は、ATX-002、ATX-081、ATX-095、またはATX-126を含む。

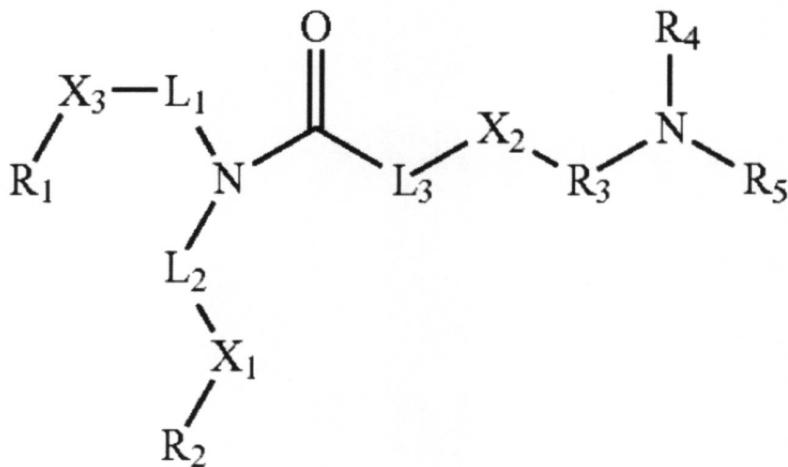
【 0 2 4 2 】

いくつかの実施形態では、カチオン性脂質またはその薬学的に許容される塩は、ナノ粒子または脂質分子の二重層を含む脂質組成物で提示されてもよい。脂質二重層は、好ましくは中性脂質またはポリマーをさらに含む。脂質組成物は、液体媒体を含むことが好ましい。組成物は、本発明の翻訳可能な化合物をさらにカプセル化することが好ましい。脂質組成物は、好ましくは、本発明の翻訳可能な化合物および中性脂質またはポリマーをさらに含む。脂質組成物は、翻訳可能な化合物をカプセル化することが好ましい。

20

【 0 2 4 3 】

さらなる実施形態では、カチオン性脂質は、式 I I I の化合物を含む：



30

式 I I I 、

40

式中、 R_1 および R_2 は同じであるかまたは異なり、それぞれ 1 ~ 9 個の炭素からなる直鎖または分岐アルキル、2 ~ 11 個の炭素からなるアルケニルもしくはアルキニル、またはコレステリルであり、 L_1 および L_2 は同じであるかまたは異なり、それぞれ 5 ~ 18 個の炭素からなる直鎖アルキレンまたはアルケニレンであり X_1 は $- - \text{CO} - - \text{O} - -$ であり、これにより $- L_2 - \text{CO} - - \text{O} - - R_2$ が形成され、 X_2 は S または O であり、 X_3 は $- - \text{CO} - - \text{O} - -$ であり、これにより $- L_1 - \text{CO} - - \text{O} - - R_1$ が形成され、 L_3 は結合であり、 R_3 は 1 ~ 6 個の炭素からなる直鎖または分岐アルキレンであり、 R_4 およ

50

び R_5 は同じであるかまたは異なり、それぞれ水素、または 1 ~ 6 個の炭素からなる直鎖もしくは分岐アルキルであるか、またはその薬学的に許容される塩である一実施形態では、 X_2 は S である。別の実施形態では、 R_3 は、エチレン、n-プロピレン、またはイソブチレンから選択される。さらに別の実施形態では、 R_4 および R_5 は、別々にメチル、エチル、またはイソプロピルである。さらに別の実施形態では、 L_1 および L_2 は同じである。さらに別の実施形態では、 L_1 および L_2 は異なる。さらに別の実施形態では、 L_1 または L_2 は、7 個の炭素を有する直鎖アルキレンからなる。さらに別の実施形態では、 L_1 または L_2 は、9 個の炭素を有する直鎖アルキレンからなる。さらに別の実施形態では、 R_1 および R_2 は同じである。さらに別の実施形態では、 R_1 および R_2 は異なる。さらに別の実施形態では、 R_1 および R_2 はそれぞれアルケニルからなる。さらに別の実施形態では、 R_1 および R_2 はそれぞれアルキルからなる。さらに別の実施形態では、アルケニルは、単一の二重結合からなる。さらに別の実施形態では、 R_1 または R_2 は 9 個の炭素からなる。さらに別の実施形態では、 R_1 または R_2 は 11 個の炭素からなる。さらに別の実施形態では、 R_1 または R_2 は 7 個の炭素からなる。さらに別の実施形態では、 L_3 は結合であり、 R_3 はエチレンであり、 X_2 は S であり、 R_4 および R_5 はそれぞれメチルである。さらに別の実施形態では、 L_3 は結合であり、 R_3 は n-プロピレンであり、 X_2 は S であり、 R_4 および R_5 はそれぞれメチルである。さらに別の実施形態では、 L_3 は結合であり、 R_3 はエチレンであり、 X_2 は S であり、 R_4 および R_5 はそれぞれエチルである。

【0244】

当業者には理解されるように、式 I I および I I I の化合物は、本開示の範囲内でもある塩を形成する。本明細書における式 I I および I I I の化合物への言及は、他に示されない限り、その塩への言及を含むと理解される。本明細書で使用されるとき、「塩（複数可）」という用語は、無機酸および / または有機酸で形成される酸性塩、ならびに無機塩基および / または有機塩基で形成される塩基性塩を意味する。さらに、式 I I または I I I の化合物が、ピリジンまたはイミダゾールなどの、しかしこれらに限定されない塩基性部分と、カルボン酸などの、しかしこれらに限定されない酸性部分との両方を含有する場合、双性イオン（「内部塩」）が形成されてもよく、これは、本明細書で使用されるとき、「塩（複数可）」という用語の中に含まれる。塩は、薬学的に許容される（すなわち、非毒性、生理学的に許容される）塩であり得るが、他の塩も有用である。式 I I または I I I の化合物の塩は、塩が沈殿する培地などの培地中、または水性培地中で、例えば、式 I I または I I I の化合物を、等量などの酸または塩基の一定量と反応させることにより形成されてもよく、次いで、凍結乾燥される。

【0245】

例示的な酸付加塩には、酢酸塩、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスコルビン酸塩、アスパラギン酸塩、安息香酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、重硫酸塩、ホウ酸塩、酪酸塩、クエン酸塩、樟脳酸塩、樟脳スルホン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、フマル酸塩、グルコヘプタン酸塩、グリセロリン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキサン酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、2-ヒドロキシエタンスルホン酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩、メタンスルホン酸塩、2-ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、シュウ酸塩、ペクチニン酸塩、過硫酸塩 3-フェニルプロピオン酸塩、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバリニン酸塩、ピロピオン酸塩、サリチル酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、スルホン酸塩（本明細書に記載のものなど）、酒石酸塩、チオシアノ酸塩、トルエンスルホン酸塩（トシレートとしても知られる）、ウンデカン酸塩などが含まれる。さらに、塩基性薬学的化合物からの薬学的に有用な塩の形成のために好適であると一般に考えられている酸は、例えば、S. Bergeland、J. Pharmaceutical Sciences (1977) 66 (1) 1-19; P. Gould, International J. Pharmaceutics (1986) 33 201-217; Andersonら、The Practice of Medicinal Chemistry (1996)、Academic Press、

New York ; および The Orange Book (Food & Drug Administration, Washington, D. C. それらのウェブサイトにて)により考察されている。これらの開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0246】

例示的な塩基性塩には、アンモニウム塩、ナトリウム、リチウム、およびカリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウムおよびマグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、有機塩基(例えば、有機アミン)との塩、例えば、ベンザチン、ジシクロヘキシルアミン、ヒドラバミン(N, N - ビス(デヒドロアビエチル)エチレンジアミンと形成される)、 N - メチル - D - グルカミン、 N - メチル - D - グルカミド、 t - プチルアミン、およびアルギニン、リジンなどのアミノ酸との塩が含まれる。塩基性窒素含有基は、低級アルキルハライド(例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチルの塩化物、臭化物、ヨウ化物)、硫酸ジアルキル(例えば、硫酸ジメチル、ジエチル、ジブチル、ジアミル)、長鎖ハロゲン化物(例えば、デシル、ラウリル、ミリスチル、ステアリルの塩化物、臭化物、ヨウ化物)、ハロゲン化アリールアルキル(例えば、臭化ベンジルおよびフェネチル)等などの物質を用いて、第四級化され得る。

【0247】

そのような全ての酸および塩基の塩は、本開示の範囲内で薬学的に許容される塩であることが意図され、全ての酸および塩基の塩は、本開示の目的のために対応する化合物の遊離形態と同等であると見なされる。式IIまたはIIIの化合物は、水和形態を含む非溶媒和形態および溶媒和形態で存在し得る。一般に、水、エタノールなどの薬学的に許容される溶媒との溶媒和形態は、本開示の目的のための非溶媒和形態と同等である。式IIまたはIIIの化合物およびその塩、溶媒和物は、それらの互変異性形態で(例えば、アミドまたはイミノエーテルとして)存在し得る。そのような互変異性体は全て、本開示の一部として本明細書で企図されている。

【0248】

本明細書に記載のカチオン性脂質化合物は、本発明の翻訳可能な化合物と組み合わされて、微粒子、ナノ粒子、リポソーム、またはミセルを形成することができる。粒子、リポソーム、またはミセルによって送達される本発明の翻訳可能な化合物は、気体、液体、または固体の形態であってもよい。カチオン性脂質化合物および翻訳可能な化合物は、他のカチオン性脂質化合物、ポリマー(合成または天然)、界面活性剤、コレステロール、炭水化物、タンパク質、脂質などと組み合わされて、粒子を形成してもよい。次いで、これらの粒子は、場合により、薬学的賦形剤と組み合わされて、薬学的組成物を形成することができる。

【0249】

特定の実施形態では、カチオン性脂質化合物は、相対的に細胞非毒性である。カチオン性脂質化合物は、生体適合性および生分解性であり得る。カチオン性脂質は、約5.5～約7.5、より好ましくは、約6.0～約7.0の範囲のpKaを有し得る。それは、約3.0～約9.0、または約5.0～約8.0の望ましいpKaを持つように設計されてもよい。

【0250】

カチオン性脂質化合物を含有する組成物は、30～70%のカチオン性脂質化合物、0～60%のコレステロール、0～30%のリン脂質、および1～10%のポリエチレングリコール(PEG)であり得る。好ましくは、組成物は、30～40%のカチオン性脂質化合物、40～50%のコレステロール、および10～20%のPEGである。他の好ましい実施形態では、組成物は、50～75%のカチオン性脂質化合物、20～40%のコレステロール、および5～10%のリン脂質、および1～10%のPEGである。組成物は、60～70%のカチオン性脂質化合物、25～35%のコレステロール、および5～10%のPEGを含有し得る。組成物は、最大90%のカチオン性脂質化合物、および2～15%のヘルパー脂質を含んでもよい。製剤は、例えば、8～30%の化合物、5～30%のヘルパー脂質、および0～20%のコレステロール；4～25%のカチオン性脂質

10

20

30

40

50

、4～25%のヘルパー脂質、2～25%のコレステロール、10～35%のコレステロール-PEG、および5%のコレステロール-アミン；または2～30%のカチオン性脂質、2～30%のヘルパー脂質、1～15%のコレステロール、2～35%のコレステロール-PEG、および1～20%のコレステロール-アミン；または最大90%のカチオン性脂質、および2～10%のヘルパー脂質、またはさらには100%のカチオン性脂質、を含有する脂質粒子製剤であり得る。

【0251】

いくつかの実施形態では、1又は2以上のコレステロールに基づく脂質は、コレステロール、PEG化コレステロール、およびDC-Chol (N,N-ジメチル-N-エチルカルボキサミドコレステロール)、および1,4-ビス(3-N-オレイルアミノ-プロピル)ピペラジンから選択される。例示的な実施形態では、コレステロールに基づく脂質は、コレステロールである。10

【0252】

いくつかの態様では、1又は2以上のペグ化脂質、すなわち、PEG修飾脂質。いくつかの実施形態では、1又は2以上のPEG修飾された脂質は、C₆-C₂₀の長さのアルキル鎖（複数可）で脂質に共有結合した、長さが最大5kDaのポリ（エチレン）グリコール鎖を含む。いくつかの実施形態では、PEG修飾された脂質は、N-オクタノイル-スフィンゴシン-1-[スクシニル（メトキシポリエチレングリコール）-2000]などの誘導体化セラミドである。いくつかの実施形態では、PEG修飾またはPEG化された脂質は、PEG化コレステロールまたはジミリストイルグリセロール（DMG）-PEG-2Kである。例示的な実施形態では、PEG修飾脂質は、PEG化コレステロールである。20

【0253】

追加の実施形態では、薬学的組成物は、ウイルスまたは細菌ベクター内にオリゴマー化合物を含有することができる。

【0254】

本開示の薬学的組成物は、当技術分野で知られている担体、希釈剤、または賦形剤を含んでもよい。薬学的組成物および方法の例は、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences、Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro ed. 1985)、およびRemington, The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition (2005)に記載されている。30

【0255】

薬学的組成物のための賦形剤の例には、抗酸化剤、懸濁剤、分散剤、防腐剤、緩衝剤、張性剤、および界面活性剤が含まれる。

【0256】

本発明の薬剤または薬学的製剤の有効用量は、細胞内で翻訳可能な分子の翻訳を引き起こすのに十分な量であり得る。

【0257】

治療有効用量は、治療効果を引き起こすのに十分な薬剤または製剤の量であり得る。治療的有効用量は、1回以上の別々の投与で、かつ異なる経路により、投与することができる。当技術分野で理解されるように、治療有効用量または治療的有効量は、本発明の薬学的組成物に含まれる治療剤の総量に基づいて主に決定される。一般に、治療的有効量は、対象に有意な利益を達成するのに十分である（例えば、GSDIIIを治療する、調節する、治癒する、予防する、および/または改善する）。例えば、治療的有効量は、所望の治療効果および/または予防効果を達成するのに十分な量であり得る。一般に、治療剤を必要とする対象に投与される治療剤（例えば、AGLをコードする翻訳可能なオリゴマー）の量は、対象の特徴に依存するであろう。そのような特徴には、対象の状態、疾患の重症度、全般的な健康状態、年齢、性別、および体重が含まれる。当業者は、これらおよび他の関連因子に応じて適切な投与量を容易に決定することができるであろう。さらに、客40

10

20

30

40

50

観的アッセイと主観的アッセイの両方を任意で使用して、最適な用量範囲を特定することができる。

【0258】

本明細書で提供される方法は、本明細書に記載の治療有効用量の翻訳可能な化合物（例えば、A GLをコードする翻訳可能なオリゴマー）の単回投与および複数回投与を企図する。A GLをコードする翻訳可能な化合物を含む薬学的組成物は、対象の状態の性質、重症度、および程度（例えば、対象のGSDII疾患状態およびGSDIIIの関連症状の重症度、および／または対象のA GL活性レベル）に応じて、通常の間隔で投与され得る。いくつかの実施形態では、治療有効用量の本発明の翻訳可能な化合物（例えば、A GLをコードする翻訳可能なオリゴマー）は、通常の間隔で（例えば、1年に1回、6ヶ月に1回、4ヶ月に1回、3ヶ月に1回、2ヶ月に1回、1ヶ月に1回）、隔週、毎週、毎日、1日2回、1日3回、1日4回、1日5回、1日6回、または連続的に、定期的に投与され得る。

10

【0259】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物は、そこに含まれるA GLをコードする翻訳可能な化合物の持続放出に適するよう製剤化される。そのような持続放出組成物は、延長された投与間隔で対象に都合よく投与され得る。例えば、一実施形態では、本発明の薬学的組成物は、対象に1日2回、毎日、または1日おきに投与される。いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物は、対象に、週に2回、週に1回、10日ごと、2週間ごと、28日ごと、毎月、6週間ごと、8週間ごと、隔月ごと、3ヶ月ごと、4ヶ月ごと、6ヶ月ごと、9ヶ月ごと、または1年に1回投与される。また、本明細書では、長期にわたってA GLをコードする翻訳可能な化合物を送達または放出するためのデポ投与（例えば、皮下、筋肉内）用に製剤化された薬学的組成物も企図される。好ましくは、使用される持続放出手段は、安定性を高めるために、A GLをコードする翻訳可能な化合物に加えられた修飾と組み合わされる。

20

【0260】

いくつかの実施形態では、治療有効用量は、投与時に、1～1000 pg/ml、または1～1000 ng/ml、または1～1000 μg/ml、またはそれ以上のA GLの血清または血漿レベルをもたらし得る。

30

【0261】

いくつかの実施形態では、本発明の翻訳可能な分子を含む組成物の治療有効用量を投与すると、治療対象の肝臓A GLタンパク質レベルが増大する可能性がある。いくつかの実施形態では、本発明の翻訳可能な分子を含む組成物を投与すると、治療前の対象のベースラインA GLタンパク質レベルに対して、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%の肝臓A GLタンパク質レベルにおける増大がもたらされる。特定の実施形態では、本発明の翻訳可能な分子を含む組成物の治療有効用量を投与すると、治療前の対象のベースライン肝臓A GLレベルに対して、肝臓A GLレベルの増大がもたらされる。いくつかの実施形態では、ベースライン肝臓A GLレベルに対する肝臓A GLレベルの増大は、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、100%、200%、またはそれ以上である。

40

【0262】

いくつかの実施形態では、治療有効用量は、定期的に投与された場合、治療前のベースラインレベルと比較して肝臓でのA GLの発現の増大をもたらす。いくつかの実施形態では、本発明の翻訳可能な分子を含む組成物の治療有効用量を投与すると、治療対象の肝臓の総タンパク質1 mgあたり、約10 ng/mg、約20 ng/mg、約50 ng/mg、約100 ng/mg、約150 ng/mg、約200 ng/mg、約250 ng/mg、約300 ng/mg、約350 ng/mg、約400 ng/mg、約450 ng/mg、約500 ng/mg、約600 ng/mg、約700 ng/mg、約800 ng/mg、約900 ng/mg、約1000 ng/mg、約1200 ng/mg、または約1500 ng/mg、またはそれを上回るA GLタンパク質レベルの発現がもたらされる。

50

【0263】

いくつかの実施形態では、A G L をコードする翻訳可能なオリゴマーを含む組成物の治療有効用量を投与すると、アラニントランスアミナーゼ (A L T) 、アスパラギン酸トランスタミナーゼ (A S T) 、アルカリホスファターゼ (A L P) 、クレアチンホスホキナーゼ (C P K) 、グリコーゲン、および限界デキストリン (つまり、グリコーゲンの加水分解によって產生される低分子炭水化物) から選択される 1 又は 2 以上のマーカーのレベルの低下がもたらされる。

【0264】

いくつかの実施形態では、治療有効用量は、定期的に投与された場合、生体試料中の A L T 、 A S T 、 A L P 、および / または C P K レベルの低下をもたらす。いくつかの実施形態では、本発明の翻訳可能な分子を含む組成物の治療有効用量を投与すると、治療前のベースライン A L T 、 A S T 、 A L P 、および / または C P K レベルと比較して、少なくとも約 5 % 、少なくとも約 10 % 、少なくとも約 15 % 、少なくとも約 20 % 、少なくとも約 25 % 、少なくとも約 30 % 、少なくとも約 35 % 、少なくとも約 40 % 、少なくとも約 45 % 、少なくとも約 50 % 、少なくとも約 55 % 、少なくとも約 60 % 、少なくとも約 65 % 、少なくとも約 70 % 、少なくとも約 75 % 、少なくとも約 80 % 、少なくとも約 85 % 、少なくとも約 90 % 、または少なくとも約 95 % だけ、生体試料 (例えば、血漿または血清試料) 中の A L T 、 A S T 、 A L P 、および / または C P K レベルの低下がもたらされる。いくつかの実施形態では、生体試料は、血漿、血清、全血、尿、または脳脊髄液から選択される。

10

【0265】

特定の例示的な実施形態では、治療有効用量は、定期的に投与された場合、例えば、 A L T 活性 / リットル (U / l) の単位で測定されるような、血清または血漿試料中の A L T レベルの低下をもたらす。いくつかの実施形態では、本発明の翻訳可能な分子を含む組成物の治療有効用量を投与すると、治療前のベースライン A L T レベルと比較して、少なくとも約 5 % 、少なくとも約 10 % 、少なくとも約 15 % 、少なくとも約 20 % 、少なくとも約 25 % 、少なくとも約 30 % 、少なくとも約 35 % 、少なくとも約 40 % 、少なくとも約 45 % 、少なくとも約 50 % 、少なくとも約 55 % 、少なくとも約 60 % 、少なくとも約 65 % 、少なくとも約 70 % 、少なくとも約 75 % 、少なくとも約 80 % 、少なくとも約 85 % 、少なくとも約 90 % 、または少なくとも約 95 % だけ、生体試料 (例えば、血漿または血清試料) 中の A L T レベルの低下がもたらされる。例示的な一実施形態では、本発明の翻訳可能な分子を含む組成物の治療有効用量を投与すると、治療前のベースライン A L T レベルと比較して、少なくとも約 50 % だけ、生体試料 (例えば、血漿または血清試料) 中の A L T レベルの低下がもたらされる。さらなる例示的な一実施形態では、 A L T レベルは、絶食後、例えば、絶食の 6 、 8 、 10 、 12 、 18 、または 24 時間後に測定される。

20

【0266】

他の例示的な実施形態では、治療有効用量は、定期的に投与された場合、例えば、 A S T 活性 / リットル (U / l) の単位で測定されるような、血清または血漿試料中の A S T レベルの低下をもたらす。いくつかの実施形態では、本発明の翻訳可能な分子を含む組成物の治療有効用量を投与すると、治療前のベースライン A S T レベルと比較して、少なくとも約 5 % 、少なくとも約 10 % 、少なくとも約 15 % 、少なくとも約 20 % 、少なくとも約 25 % 、少なくとも約 30 % 、少なくとも約 35 % 、少なくとも約 40 % 、少なくとも約 45 % 、少なくとも約 50 % 、少なくとも約 55 % 、少なくとも約 60 % 、少なくとも約 65 % 、少なくとも約 70 % 、少なくとも約 75 % 、少なくとも約 80 % 、少なくとも約 85 % 、少なくとも約 90 % 、または少なくとも約 95 % だけ、生体試料 (例えば、血漿または血清試料) 中の A S T レベルの低下がもたらされる。例示的な一実施形態では、本発明の翻訳可能な分子を含む組成物の治療有効用量を投与すると、治療前のベースライン A S T レベルと比較して、少なくとも約 50 % だけ、生体試料 (例えば、血漿または血清試料) 中の A S T レベルの低下がもたらされる。さらなる例示的な一実施形態では、

30

40

50

A S T レベルは、絶食後、例えば、絶食の 6、8、10、12、18、または 24 時間後に測定される。

【 0 2 6 7 】

A L T、A S T、A L P、および / または C P K レベルの測定は、当技術分野で知られている任意の方法を使用して、例えば、L i u l a、2 0 1 4、M o l G e n e t a n d M e t a b o l i s m 1 1 1 : 4 6 7 - 7 6 に記載されているような F u j i D r i - C h e m C l i n i c a l C h e m i s t r y A n a l y z e r F D C 3 5 0 0 を使用して、実施することができる。

【 0 2 6 8 】

他の例示的な実施形態では、治療有効用量は、定期的に投与された場合、生体試料中のグリコーゲンレベルの低下をもたらす。いくつかの実施形態では、本発明の翻訳可能な分子を含む組成物の治療有効用量を投与すると、治療前のベースライングリコーゲンレベルと比較して、少なくとも約 5 %、少なくとも約 10 %、少なくとも約 15 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 25 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 35 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 45 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 55 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 65 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 75 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、または少なくとも約 95 %だけ、生体試料（例えば、肝臓試料）中のグリコーゲン蓄積の軽減がもたらされる。いくつかの実施形態では、生体試料は、肝臓、心臓、横隔膜、大腿四頭筋、および腓腹筋から選択される器官の一部である。例示的な一実施形態では、生体試料は、肝臓切片、例えば、肝細胞の切片である。

10

20

30

【 0 2 6 9 】

他の例示的な実施形態では、治療有効用量は、定期的に投与された場合、生体試料中の限界デキストリンレベルの低下をもたらす。いくつかの実施形態では、本発明の翻訳可能な分子を含む組成物の治療有効用量を投与すると、治療前のベースライン限界デキストリンレベルと比較して、少なくとも約 5 %、少なくとも約 10 %、少なくとも約 15 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 25 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 35 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 45 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 55 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 65 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 75 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、または少なくとも約 95 %だけ、生体試料（例えば、肝臓試料）中の限界デキストリン蓄積の軽減がもたらされる。いくつかの実施形態では、生体試料は、肝臓、心臓、横隔膜、大腿四頭筋、および腓腹筋から選択される器官の一部である。例示的な一実施形態では、生体試料は、肝臓切片、例えば、肝細胞の切片である。さらなる例示的な一実施形態では、治療有効用量は、定期的に投与された場合、治療前のベースライン限界デキストリンレベルと比較して、肝臓試料中の限界デキストリンレベルの少なくとも 50 %、60 %、70 %、または 80 % の軽減をもたらす。

40

【 0 2 7 0 】

さらなる実施形態では、治療有効用量は、定期的に投与された場合、治療対象の肝線維症の発症を遅延させる。いくつかの実施形態では、治療有効用量は、定期的に投与された場合、G S D I I I を患っている対象において肝線維症の発症を緩慢化させるか、肝線維症の量を軽減させる。

【 0 2 7 1 】

インビボでの活性剤薬剤（例えば、A G L をコードする翻訳可能なオリゴマー）の治療有効用量は、約 0 . 0 0 1 ~ 約 5 0 0 m g / k g 体重の用量であり得る。例えば、治療有効用量は、約 0 . 0 0 1 ~ 0 . 0 1 m g / k g 体重、または 0 . 0 1 ~ 0 . 1 m g / k g 、または 0 . 1 ~ 1 m g / k g 、または 1 ~ 1 0 m g / k g 、または 1 0 ~ 1 0 0 m g k g であってもよい。いくつかの実施形態では、A G L をコードする翻訳可能なオリゴマーは、約 0 . 1 ~ 約 1 0 m g / k g 体重、例えば、約 0 . 5 ~ 約 5 m g / k g 、約 1 ~ 約 4 . 5 m g / k g 、または約 2 ~ 約 4 m g / k g の範囲の用量で提供される。

50

【0272】

インビボでの活性薬剤（例えば、A G L をコードする翻訳可能なオリゴマー）の治療有効用量は、少なくとも 0.001 mg / kg 体重、または少なくとも約 0.01 mg / kg、または少なくとも約 0.1 mg / kg、または少なくとも約 1 mg / kg、または少なくとも約 2 mg / kg、または少なくとも約 3 mg / kg、または少なくとも約 4 mg / kg、または少なくとも約 5 mg / kg、または少なくとも約 10 mg / kg、少なくとも約 20 mg / kg、少なくとも約 50 mg / kg、またはそれ以上の用量であり得る。いくつかの実施形態では、A G L をコードする翻訳可能なオリゴマーは、約 0.1 mg / kg、約 0.5 mg / kg、約 1 mg / kg、約 1.5 mg / kg、約 2 mg / kg、約 2.5 mg / kg、約 3 mg / kg、約 3.5 mg / kg、約 4 mg / kg、約 5 mg / kg、または約 6、7、8、9、10、15、20、25、50、75、または 100 mg / kg の用量で提供される。10

【0273】

本明細書に示される核酸塩基配列は、特に明記しない限り、左から右に、5' ~ 3' である。

【0274】

トランスフェクション

一部の実験では、翻訳可能なメッセンジャー分子を 96 ウェルプレート中の Hepa 1 - 6 または AML 12 細胞にトランスフェクトした。全てのトランスフェクションについて、Messenger MAX トランスフェクション試薬 (Thermo Fisher Scientific) を製造元指示書に従って使用した。他の適切な細胞株には、HEK 293 および Hep 3 B 細胞が含まれる。20

【0275】

インビトロでのトランスフェクションプロトコルの一例は、以下のとおりである：

【0276】

トランスフェクションの少なくとも 8 時間前に、肝細胞 Hepa 1 - 6 細胞を、96 ウェルプレートにウェルあたり 5000 細胞でプレーティングする。

【0277】

10 % の FBS および非必須アミノ酸を含有する 90 μL の D M E M 培地に代え、トランスフェクション実験を開始する直前に 96 ウェルプレートの各ウェルに 90 μL を加える。30

【0278】

製造元の指示に従って、Messenger MAX トランスフェクション試薬 (Thermo Fisher Scientific) の翻訳可能な分子複合体を調製する。

【0279】

96 ウェルプレート中の細胞を含有するウェルに複合体の 10 μL を移す。

【0280】

目的の時点の後に培地を採取し、各ウェルに 100 μL の新鮮な培地を追加する。標準的な製造元のプロトコルを使用して、A G L についての E L I S A アッセイが実行されるまで、培地は - 80 で保たれる。40

【0281】

インビボでのトランスフェクションプロトコルの一例は、次のとおりである：

【0282】

翻訳可能な分子は、ナノ粒子を用いて製剤化される。

【0283】

ナノ粒子製剤化された翻訳可能な分子 (1 mg / kg) を B L 57 B L / c マウス (4 ~ 6 週齢) に、外側尾静脈への標準的な i v 注射により注射する。

【0284】

注射後の適切な時間に、ヘパリンでコーティングされた微量遠心管中の約 50 μL の血液を採取する。50

【0285】

4で3,000×gで10分間遠心分離する。

【0286】

上清（血漿）を新しい微量遠心管に移す。標準的な製造元のプロトコルを使用して、A GLについてのELISAアッセイが実行されるまで、血漿は-80で保たれる。

【0287】

ナノ粒子製剤

mRNAを含有するエタノール／水性緩衝液中の脂質を適切な容量で使用して、mRNAを含有する脂質ナノ粒子を調製することができる。NanoSsemlrマイクロ流体デバイスをこの目的のために使用し、その後、下流の処理を行うことができる。例えば、ナノ粒子を調製するために、所望の量の標的mRNAを5mMのクエン酸緩衝液（pH 3.5）に溶解してもよい。脂質は適切なモル比でエタノール中で溶解することができる。構成脂質のモルパーセント比は、例えば、50%のイオン化可能な脂質、7%のDSPC（1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、Avanti Polar Lipids）、40%のコレステロール（Avanti Polar Lipids）、および3%のDMG-PEG（1,2-ジミリストイル-sn-グリセロール、メトキシポリエチレングリコール、PEG鎖の分子量：2000；NOF America Corporation）であり得る。次に、脂質とmRNA溶液をマイクロ流体デバイス（Precision NanoSystems）中で1:3（エタノール：水相）の流量比で組み合わせることができる。合わせた合計流速は12mL/分であり得る。脂質ナノ粒子を形成し、その後、透析装置（Float-a-lyzer、Spectrum Labs）でリン酸緩衝液を使用して一晩透析し、続いてAmicon Ultra-15遠心フィルター（Merck Millipore）を使用して濃縮することにより、精製することができる。粒子サイズは、動的光散乱（ZEN3600、Malvern Instruments）によって決定することができる。「カプセル化」効率は、LNPスラリー（Fi）にRiboGreen（Molecular Probes）を添加した際の蛍光によって測定されるカプセル化されていないmRNA含量を決定し、次に、この値をLNPの1%のTriton X-100（Ft）による溶解時に得られる総mRNA含量と比較することにより、計算することができ、ここで、「カプセル化」のパーセンテージ = (Ft - Fi) / Ft × 100である。カプセル化とは、形態に関係なく、ナノ粒子中にmRNAを含めることを指す。

【0288】

In-Cell Western

96ウェルコラーゲンプレートを使用して、DMEM/FBS培養培地中に適切な密度で細胞を播種した。最適なコンフルエンスで、細胞をトランスフェクション試薬ミックス（MessengerMaxおよびOpti-MEM）で希釈した標的mRNAでトランスフェクトした。細胞をCO2インキュベーター内に置き、成長させた。所望の時点で、培地を除去し、細胞を4%の新鮮なPFAで20分間固定した。その後、固定液を除去し、細胞をTBSで5分間数回透過処理した。透過処理洗浄が完了すると、細胞をブロッキングバッファーで45分間インキュベートした。次に、一次抗体を加え、室温で1時間インキュベートした。その後、細胞をTBSで数回洗浄し、次いで、ブロッキングバッファーで希釈したCell Tag 700染色液を含有する二次抗体と共に1時間インキュベートした。最後に、細胞をTBSで数回洗浄し、続いてTBSで最後に洗浄した。次に、プレートをLicor検出システムを使用して画像化し、Cell Tag 700で標識した細胞の総数に対してデータを正規化した。

【0289】

テールPCR産物の生成

各mRNA発現コンストラクトを含有するプラスミドDNA（10ng）を使用して、製造元の指示に従って、2X KAPA HiFi PCRミックス（KR0370）を使用した50μlのPCR反応においてポリアテール120PCR産物を生成することがで

10

20

30

40

50

きる。この産物は、Thermo Fisher Scientificからの2%のゲル上で確認され、低分子量ラダー(Thermo Fisher Scientific, 10068-013)の強度に基づいておおよそ定量化され、Qiagen PCR精製キットで洗浄して、50ulの水中に再懸濁することができる。

【0290】

合成のためのインビトロ転写(IVT)

以下のプロトコルは、NEB Hiscribe T7 RNAポリメラーゼ試薬を使用した200μlのIVT反応についてのものであり、約1mgのRNAが得られるはずである。必要に応じて、個々の100mMのNTPストック(ATP、GTP、CTP、UTP)又は化学修飾された対応物)を解凍し、それらを一緒にプールすることにより、2.5X NTPミックスを調製した。IVT反応では、約2~4μgの鋳型を200μlの反応に使用した。10倍のIVT反応バッファー、2.5倍のdNTPミックス、鋳型DNA、およびT7 RNAポリメラーゼをピペッティングによりよく混合し、37℃で4時間インキュベートする。DNA鋳型を分解するために、IVT反応液を700ulのヌクレアーゼ不含水で希釈し、10倍のDNase IバッファーとRNase不含DNase Iの20ulをIVTミックスに加え、37℃で15分間インキュベートする。次いで、(1mlに)希釈され、かつDNase処理された反応物は、製造元の指示に従って、最終的にRNase不含水で溶出することにより、Qiagen RNaseasy Maxiカラムにより精製される。次いで、使用した再懸濁バッファーに応じて、A260/A280が約1.8~2.2になるはずのUV吸光度によって、精製されたRNAを定量化する。

10

20

30

【0291】

IVT RNAの酵素的キャッピング

酵素的キャッピングのために、最大1mgのIVT転写物の処理に適した、NEBのワンステップキャッピングおよび2'-O-メチル化反応の50倍にスケールアップしたバージョンを使用することができる。転写物の長さは100ntほど短いという仮定に基づいて、20μlの反応で10μgのRNAが推奨される。ただし、転写物について、反応に対する基質の容量をより大きくすることは許容されるが、転写物の長さは一般により長くなる(約300~600nt)。キャッピング反応を開始する前に、RNAを65℃で5分間変性させ、次いで、急冷して、二次構造を緩和させる。合計1mlのキャッピング反応では、100μl(10倍)のキャッピングバッファーと共に700μlのヌクレアーゼ不含水中の1mgの変性RNAを使用し、50μl(10mM)GTP、50μl(4mM)のSAM、50μlの(10U/μl)ワクシニアキャッピング酵素、および50μlのmRNAキャップ2'-O-メチルトランスフェラーゼを50U/μlで合わせ、37℃で1時間インキュベートする。得られたキャップされたmRNAは、RNase不含水を使用して溶出され、RNaseyカラム上で再精製され、ナノドロップにより定量化される。mRNAは、二次構造を除去するために変性および急冷した後、変性ゲルにレーンあたり500ngの精製産物を流すことにより、ゲル上でも可視化される。

【実施例】

【0292】

実施例1：参照用の翻訳可能な分子534。

この実施例では、参照用の翻訳可能な分子534が作製され、ヒトWTアミロ-アルファ-1,6-グルコシダーゼ、4-アルファ-グルカノトランスフェラーゼ(AGL)の発現に使用された。翻訳可能な分子は、5'キャップ(7mGpppG)、TEVの5'UTR、コザック配列、WT AGL CDS(配列番号1)、アフリカツメガエル-グロビンの3'UTR、および114個のAからなるポリ(A)テール領域(すなわち、「ポリ(A)114テール領域」)を含んだ。参照用の翻訳可能な分子はさらに、AGL CDSのすぐ下流に配列番号40の配列を含んだ。この参照用の翻訳可能な分子は、ウリジンの代わりにN¹メチルアラニンを用いて合成された。

40

【0293】

50

この参照用翻訳可能な分子の構造の詳細は以下のとおりである：配列番号3のタバコエツチウイルス(TEV)5'UTR、配列番号4のコザック配列、配列番号5のアフリカツメガエルベータグロビン(XBG)3'UTR、および配列番号6のポリ(A)114テール。

【0294】

以下の実施例の翻訳可能な分子は、m7GpppGmキャップである5'キャップを用いて合成することができる。以下の実施例の翻訳可能な分子は、5' - UTR(例えば、TEVの5'UTR(配列番号3))、翻訳開始配列(例えば、配列番号4のコザック配列)、配列番号40の配列、3'UTR(例えば、アフリカツメガエルベータグロビンの3'UTR(配列番号5))、およびポリ(A)テール(例えば、配列番号6、配列番号38、または配列番号39のポリAテール)を含有することができる。

【0295】

実施例2：AGLをコードする翻訳可能な分子。

この実施例では、翻訳可能な分子522~533、546、730~740、および1783~1784を作製し、有利にも増大した翻訳効率を伴ってヒトアミロ-アルファ-1,6-グルコシダーゼ、4-アルファ-グルカノトランスフェラーゼ(AGL)を発現させるために使用した。ヒトアミロ-アルファ-1,6-グルコシダーゼ、4-アルファ-グルカノトランスフェラーゼ(AGL)を発現するこれらの翻訳可能な分子は、GSDI IIを改善または治療するための方法での使用に好適な活性を示した。これらの翻訳可能な分子は、5'キャップ(7mGpppG)、TEVの5'UTR、コザック配列、AGL CDS、およびアフリカツメガエルベータグロビンの3'UTRを含んだ。翻訳可能な分子522~533、546、および1783~1784は、ポリ(A)114テール領域をさらに含む。翻訳可能な分子730は、ポリ(A)100テール領域をさらに含み、一方、翻訳可能な分子731~740は、ポリ(A)110テール領域をさらに含む。翻訳可能な分子522~533、546、730~740、および1783~1784は、AGL CDSのすぐ下流に配列番号40の配列をさらに含む。ポリ(A)114テール領域ではなく、ポリ(A)100テール領域を含有することを除いて、それぞれ546および1783と同一である、2つの追加の翻訳可能な分子、2258および2259が開発された。1783および2259のコード配列は、配列番号45に反映されるように、12個のヌクレオチドの違いを含むように任意に修飾されてもよい。この実施例で記載される翻訳可能な分子は、ウリジンの代わりにN¹-メチルブソイドウリジンを用いて合成された。

【0296】

翻訳可能な分子の各々のAGL CDSは、以下の配列で構成される：

分子	A G L C D S
5 2 2	配列番号 7
5 2 3	配列番号 8
5 2 4	配列番号 9
5 2 5	配列番号 10
5 2 6	配列番号 11
5 2 7	配列番号 12
5 2 8	配列番号 13
5 2 9	配列番号 14
5 3 0	配列番号 15
5 3 1	配列番号 16
5 3 2	配列番号 17
5 3 3	配列番号 18
5 4 6 & 2 2 5 8	配列番号 19
7 3 0	配列番号 20
7 3 1	配列番号 21
7 3 2	配列番号 22
7 3 3	配列番号 23
7 3 4	配列番号 24
7 3 5	配列番号 25
7 3 6	配列番号 26
7 3 7	配列番号 27
7 3 8	配列番号 28
7 3 9	配列番号 29
7 4 0	配列番号 30
1 7 8 3 & 2 2 5 9	配列番号 31
1 7 8 4	配列番号 32

10

20

30

【0297】

この実施例の翻訳可能な分子は、A M L 1 2 およびC 2 C 1 2 細胞で翻訳され、ヒトA G L を產生した。

【0298】

実施例3：アフリカツメガエルベータ-グロビン3' UTRに基づく翻訳エンハンサー。

この実施例では、翻訳可能な分子の翻訳効率を高めるのに使用するための3' UTR配列の構造が示される。

【0299】

配列番号33～37に示される塩基配列は、機能的にアフリカツメガエルベータグロビンの3' - UTRに対応し得る翻訳可能な分子の部分である。完全な翻訳可能な分子は、5' キャップ(m7GpppGm)、5' - UTR、および下の配列の上流のコード領域(CDS)、および下の配列の下流のポリAテールを含み、そのそれぞれが天然ヒトmRNAの構造に対応する。上記のように、場合によりコザック配列が使用されてもよい。したが

40

50

つて、以下の断片を組み込んだ翻訳可能な分子は、翻訳効率を高めることが可能である。アフリカツメガエルベータグロビン遺伝子配列は、アクセッション番号NM_001096347.1で示される。

【0300】

実施例4：ヒト初代肝細胞におけるAGL発現

この実施例では、ヒト初代肝細胞に、コドン最適化したmRNA分子546、1783、および1784をトランスフェクトした。AGLタンパク質の発現は、トランスフェクションの6、24、48、および72時間後にIn-Cel1 Western（商標）により測定した。未処理の対照（「unt」）と比較したmRNA配列の発現を図5に示す。

10

【0301】

実施例5：野生型マウスにおけるAGLタンパク質発現のインビオ分析

この実施例では、野生型C57BL/6マウスに、脂質ナノ粒子と共に製剤化されたヒトAGL mRNAを注射した。注射の6時間後にマウスを犠牲にした。肝生検試料をマウスから採取し、肝臓ホモジネートにおけるヒトおよびマウスAGLタンパク質発現を分析した。図6は、さまざまなmRNA分子からのヒトAGLタンパク質の異所性発現を示す。図7は、マウスAGLタンパク質レベルを示し、処理されたマウスにわたってマウスAGLタンパク質の内因性発現の同様のレベルを示す。図6および7に示されるように、翻訳可能な分子546.7は、翻訳可能な分子546と同一の核酸塩基配列を有するが、ウリジンの代わりにN¹-メチルブソイドウリジンではなく5-メトキシウリジンを用いて合成された。

20

【0302】

実施例6：mRNA処理はGSD3マウスにおけるグリコーゲン蓄積を軽減する

この実施例では、AGLノックアウトマウスを、ビヒクル、またはATX2脂質ナノ粒子で製剤化された翻訳可能な分子546で処置した。ビヒクル（「VEH」）で処置したノックアウトマウスからの肝臓は、顕著ないし重度の肝細胞の空胞化、および中程度ないし顕著な肝細胞内のグリコーゲン蓄積を示した（図8）。対照的に、ATX2脂質ナノ粒子で製剤化した翻訳可能な分子546で処置したノックアウトマウスからの肝臓は、軽度ないし中程度のみの肝細胞の空胞化、および軽度ないし中程度のみの肝細胞内のグリコーゲン蓄積を有した（図9）。この実施例に示されている組織病理学の結果に基づくと、ビヒクルで処置されたKOマウスと比較して、mRNAで処置されたノックアウトマウスからの肝臓における肝細胞の空胞化および肝臓内のグリコーゲン蓄積の重症度が軽減されたようにみえる。

30

【0303】

実施例7：AGLを発現する追加の翻訳可能な分子

4つの追加の翻訳可能な分子-1970、1987、SD1、およびSD2-は、それぞれ配列番号41、42、43、および44に示された、さらに修飾されたコドン最適化ヒトAGLコード配列を用いて設計された。翻訳可能な分子1970、1987、SD1、およびSD2は、5'キャップ（7mGpppG）、TEVの5'UTR、コザック配列、コード配列のすぐ下流の配列番号40の配列、アフリカツメガエルベータグロビンの3'UTR、およびポリ(A)テール領域（例えば、ポリ(A)100、110、または114テール領域）をさらに含む。これらの翻訳可能な分子は、ウリジンの代わりにN¹-メチルブソイドウリジンまたは5-メトキシウリジンのいずれかを用いて任意に合成することができる。

40

【0304】

本明細書に具体的に記載されている全ての刊行物、特許、および文献は、あらゆる目的のために参照により組み込まれる。

【0305】

本発明は、記載される特定の方法論、プロトコル、材料、および試薬に限定されず、これらは変化し得ることが理解される。また、本明細書で使用される用語は、特定の実施形

50

態のみを説明するためのものであり、添付の特許請求の範囲に含まれる本発明の範囲を限定するものではないことも理解されたい。

【0306】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用されるように、単数形「a」、「a n」、および「t h e」は、文脈がそうでないことを明確に示さない限り、複数の参照を含むことに留意しなければならない。同様に、「a」(または「a n」)、「1又は2以上」、および「少なくとも1つ」という用語は、本明細書で互換的に使用することができる。また、「含む」、「含んでいる(c o m p r i s i n g)」、「含有する(c o n t a i n i n g)」、「含める(i n c l u d i n g)」、および「有する(h a v i n g)」という用語は、互換的に使用することができることも留意される。

10

【0307】

さらに詳述することなく、当業者は、上記の説明に基づいて、本発明を最大限に利用することができると考えられる。したがって、以下の特定の実施形態は、単なる例示として解説されるべきであり、いかなる形であれ本開示の残りの部分を限定するものではない。

【0308】

本明細書に開示されている全ての特徴は、任意の組み合わせで組み合わせることができる。本明細書で開示される各々の特徴は、同じ、同等の、または同様の目的を果たす代替的な特徴に置き換えることができる。

20

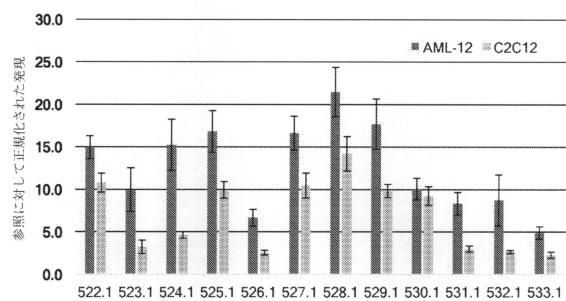
30

40

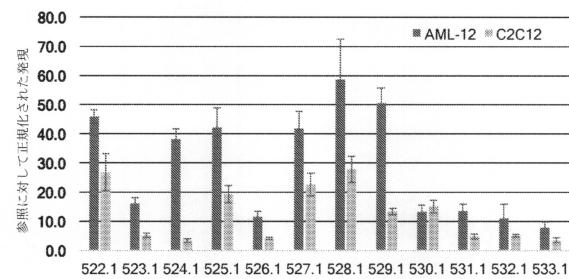
50

【図面】

【図 1】

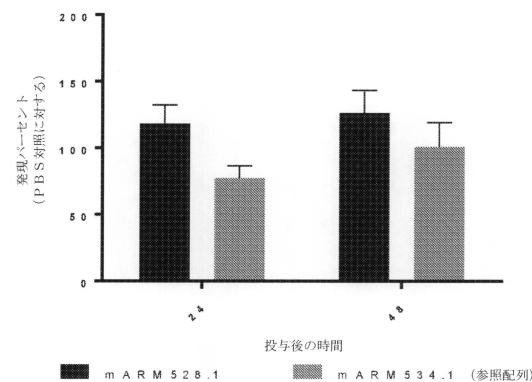


【図 2】



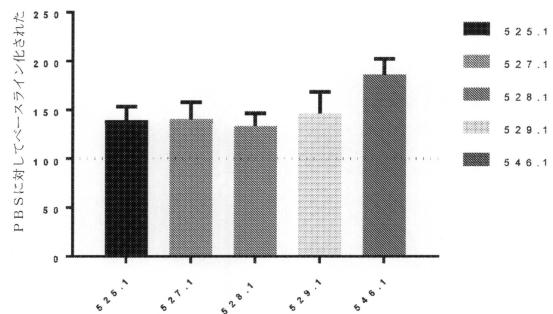
【図 3】

WTマウスにおけるAGL発現



【図 4】

WTマウス肝臓におけるAGL発現



10

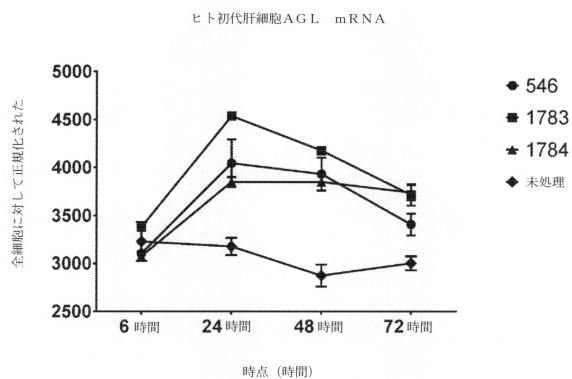
20

30

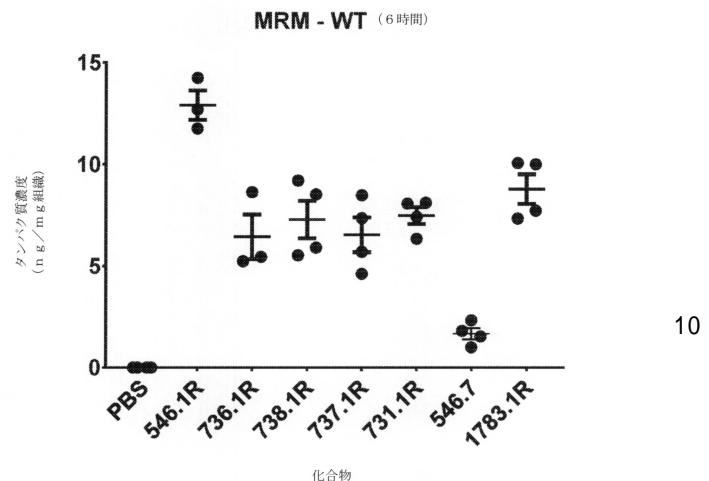
40

50

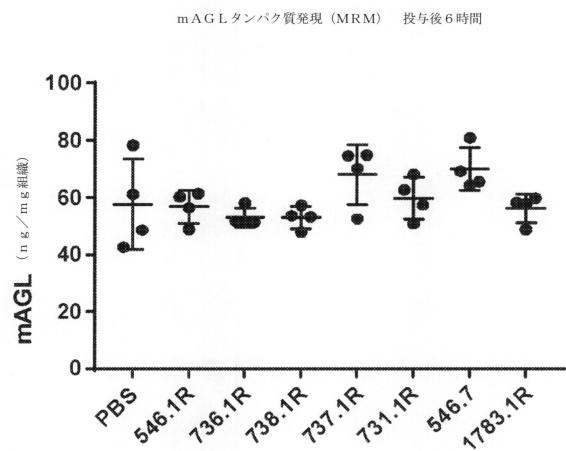
【図 5】



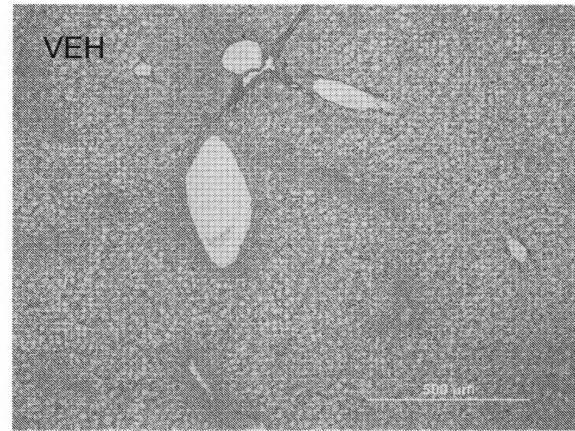
【図 6】



【図 7】



【図 8】



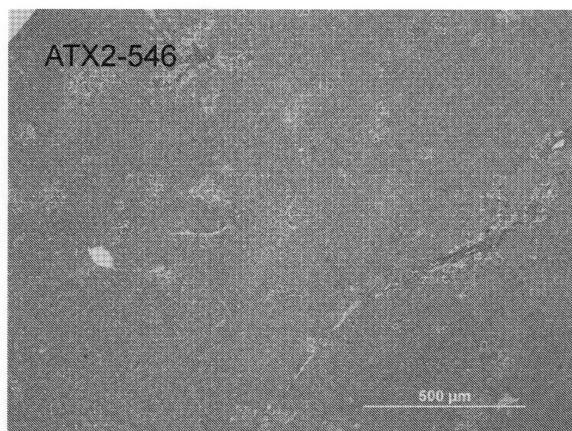
20

30

40

50

【図9】



【配列表】

0007284101000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

F I

A 6 1 P 43/00 1 1 1

(74)代理人 100150902

弁理士 山内 正子

(74)代理人 100141391

弁理士 園元 修一

(72)発明者 タチカワ キヨシ

アメリカ国 9 2 1 2 9 カリフォルニア サンディエゴ フェアグローブレーン 9 4 3 9 # 2 0 6

(72)発明者 ペレス - ガルシア カルロス ゲスタヴォ

アメリカ国 9 2 1 0 4 カリフォルニア サンディエゴ フロリダストリート 4 0 8 0 アパート # 2

(72)発明者 チブクラ パドマナブ

アメリカ国 9 2 1 0 1 カリフォルニア サンディエゴ パシフィックハイウェイ 1 3 2 5 ユニット 2 8 0 3

(72)発明者 バースカラン ハリ

アメリカ国 9 2 1 0 5 カリフォルニア サンディエゴ バークストリート 5 9 2 7

(72)発明者 コボー クリスチャン ダブリュー.

アメリカ国 0 2 4 6 1 マサチューセッツ ボストン ビバリーロード 3 3

(72)発明者 ドアティ ショーン クリストファー

アメリカ国 9 4 9 5 4 カリフォルニア ペタルーマ テクノロジーレーン 1 4 0 0 アパート 3 0 5

審査官 福間 信子

(56)参考文献 特表 2 0 1 6 - 5 1 3 1 1 4 (J P , A)

国際公開第 2 0 1 6 / 0 7 0 1 6 6 (WO , A 2)

国際公開第 2 0 1 7 / 0 5 4 0 8 6 (WO , A 1)

国際公開第 2 0 1 0 / 0 0 5 5 6 5 (WO , A 2)

国際公開第 2 0 1 5 / 1 9 2 0 9 2 (WO , A 1)

(58)調査した分野 (Int.Cl. , DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 9 0

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

U n i P r o t / G e n e S e q

S w i s s P r o t / G e n e S e q