(19)日本国特許庁(JP)　　(12)公表特許公報(A)　　(11)公表番号
特表2023-533174
(P2023-533174A)
(43)公表日　令和5年8月2日(2023.8.2)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ　15/11　(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	15/11	ＺＺＮＡ　４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ　1/15　(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	1/15	４Ｃ０７６
Ｃ１２Ｎ　1/19　(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	1/19	４Ｃ０８４
Ｃ１２Ｎ　1/21　(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	1/21	４Ｃ０８６
Ｃ１２Ｎ　5/10　(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	5/10	

審査請求　未請求　予備審査請求　有　（全164頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-576100(P2022-576100)
(86)(22)出願日　令和3年6月7日(2021.6.7)
(85)翻訳文提出日　令和5年2月8日(2023.2.8)
(86)国際出願番号　PCT/US2021/036165
(87)国際公開番号　WO2021/252354
(87)国際公開日　令和3年12月16日(2021.12.16)
(31)優先権主張番号　63/038,245
(32)優先日　令和2年6月12日(2020.6.12)
(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,
最終頁に続く

(71)出願人　508144129
ユニバーシティ オブ ロチェスター
アメリカ合衆国，ニューヨーク １４６４２，ロチェスター，エルムウッド アベニュ ６０１，ボックス ユーアールブイ
(74)代理人　110002077
園田・小林弁理士法人
(72)発明者　リュック， ジョン ディー．
アメリカ合衆国 １４６４２ ニューヨーク， ロチェスター， エルムウッド アヴェニュー ６０１， ボックス ユーアールヴィー
(72)発明者　ポーター， ジョセフ ジェー．
アメリカ合衆国 １４６４２ ニューヨーク， ロチェスター， エルムウッド ア
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＡＣＥ－ｔＲＮＡのコード化及び発現

(57)【要約】
本発明は、未成熟終止コドンに関連する疾患又は障害を治療するための組成物及び方法に関する。本発明のある特定の態様は、ポリヌクレオチド、ベクター及び宿主細胞、並びにそれらの使用に関する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
（１）プロモーター及び（ｉｉ）抗コドン編集ｔＲＮＡ（ＡＣＥ－ｔＲＮＡ）をコードする配列を含む、閉端環状非ウイルス非プラスミドＤＮＡ分子。
【請求項２】
分子が、閉端ＤＮＡスレッド（ＣＥＤＴ）分子又はミニサークル（ＭＣ）分子である、請求項１に記載の分子。
【請求項３】
ＤＮＡ核標的配列（ＤＴＳ）、転写増強５’リーダー配列（ＴＥＬＳ）及びＡＣＥ－ｔＲＮＡバーコード配列（ＡＢＳ）からなる群より選択される１つ又は複数のエレメントをさらに含む、請求項１又は２に記載の分子。
【請求項４】
ＤＴＳがＳＶ４０－ＤＴＳを含む、請求項３に記載の分子。
【請求項５】
いかなる細菌核酸配列も含まない請求項１～４のいずれか一項に記載の分子。
【請求項６】
４個以下のＣｐＧジヌクレオチドを含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の分子。
【請求項７】
ＣｐＧジヌクレオチドを含まない、請求項６に記載の分子。
【請求項８】
約２００～約１，０００ｂｐのサイズである、請求項１から７のいずれか一項に記載の分子。
【請求項９】
約５００ｂｐのサイズである、請求項８に記載の分子。
【請求項１０】
ＡＣＥ－ｔＲＮＡが、（ｉ）配列番号１～１０からなる群から選択されるか、又は（ｉｉ）配列番号１１～３０５からなる群から選択される配列によってコードされる配列を含む、請求項１～９のいずれか一項に記載の分子。
【請求項１１】
ＡＣＥ－ｔＲＮＡが、（ｉ）配列番号１、４、５及び８からなる群から選択されるか、又は（ｉｉ）配列番号７９及び９４からなる群から選択される配列によってコードされる配列を含む、請求項１０に記載の分子。
【請求項１２】
（ｉ）請求項１～１１のいずれか一項に記載の分子及び（ｉｉ）薬学的に許容される担体を含む薬学的製剤。
【請求項１３】
細胞においてＡＣＥ－ｔＲＮＡを発現させるための方法であって、（ｉ）細胞を請求項１～１１のいずれか一項に記載の分子と接触させること、及び（ｉｉ）細胞を、ＡＣＥ－ｔＲＮＡの発現を可能にする条件下で維持することを含む、方法。
【請求項１４】
（ｉ）細胞が、１つ又は複数の未成熟終止コドン（ＰＴＣ）を含む変異核酸を有し、（ｉｉ）変異体核酸の野生型がポリペプチドをコードし、（ｉｉｉ）ＡＣＥ－ｔＲＮＡが１つ又は複数のＰＴＣを救済し、ポリペプチドの発現を回復させる、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
ポリペプチドが嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子（ＣＦＴＲ）であり、変異核酸が切断型ＣＦＴＲをコードする、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
変異核酸がＴｒｐから終止のＰＴＣを有する、請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】

ＡＣＥ－ｔＲＮＡがＴｒｐから終止のＰＴＣをＬｅｕに翻訳する、請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】
請求項１～１１のいずれか一項に記載の分子を含む宿主細胞。
【請求項１９】
ＰＴＣに関連する疾患の治療を必要とする対象においてＰＴＣに関連する疾患を治療する方法であって、請求項１～１１のいずれか一項に記載の分子又は請求項１２に記載の薬学的組成物を対象に投与することを含む、方法。
【請求項２０】
疾患が、嚢胞性線維症、デュシェンヌ－ベッカー型筋ジストロフィー、網膜芽細胞腫、神経線維腫症、運動失調－毛細血管拡張症、テイ・サックス病、ウィルムス腫瘍、血友病Ａ、血友病Ｂ、メンケス病、ウルリッヒ病、β－サラセミア、２Ａ型及び３型フォン・ヴィレブランド病、ロビノウ症候群、短指症Ｂ型（指及び中手骨の短縮）、マイコバクテリア感染に対する遺伝性感受性、遺伝性網膜疾患、遺伝性出血傾向、失明、先天性神経感覚性難聴及び結腸無神経節症、並びに神経感覚性難聴、結腸無神経節症、末梢神経障害及び中枢性ミエリン形成異常を含む遺伝性神経発達障害、リドル症候群、色素性乾皮症、ファンコーニ貧血、貧血、甲状腺機能低下症、ｐ５３関連がん、食道がん、骨がん、卵巣がん、肝細胞がん、乳がん、肝細胞がん、線維性組織球腫、卵巣がん、ＳＲＹ性転換、トリオースリン酸イソメラーゼ－貧血、糖尿病、くる病、ハーラー症候群、ドラベ症候群、脊髄性筋ジストロフィー、アッシャー症候群、無虹彩症、コロイデレミア、眼性コロボマ、網膜色素変性、栄養障害性表皮水疱症、シュードキサントーマ・エラスチカム、アラジール症候群、ワールデンブルグ・シャー、乳児型神経セロイドリポフスチン症、シスチン症、Ｘ連鎖腎性尿崩症、マックアードル病及び多発性嚢胞腎疾患からなる群から選択される、請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
疾患が、錐体ジストロフィー、シュタルガルト病（ＳＴＧＤ１）、錐体杆体ジストロフィー、網膜色素変性症（ＲＰ）、加齢性黄斑変性症に対する感受性の増加、先天性停止性夜盲２（ＣＳＮＢ２）、先天性停止性夜盲１（ＣＳＮＢ１）、ベスト病、ＶＭＤ、及びレーバー先天性黒内障（ＬＣＡ１６）からなる群から選択される眼の遺伝性疾患である、請求項１９に記載の方法。
【請求項２２】
投与が、ナノ粒子、エレクトロポレーション、ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）、受容体標的化ポリプレックス、リピソーム、又は流体力学的注入を用いて行われる、請求項１９から２１のいずれか一項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本願は、２０２０年６月１２日に出願された米国仮出願第６３／０３８，２４５号の優先権を主張し、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。
【０００２】
技術分野
本発明は、抗コドン編集（ＡＣＥ）－ｔＲＮＡに基づく薬剤、及び未成熟終止コドン（ＰＴＣ）に関連する障害を治療するための方法に関する。
【背景技術】
【０００３】
遺伝コードは、ＤＮＡからタンパク質への翻訳の基礎であるトリプレット「コドン」を形成する４つのヌクレオチドを使用する。合計６４個のコドンが存在し、そのうち６１個がアミノ酸をコードするために、３個（ＴＡＧ、ＴＧＡ及びＴＡＡ）が翻訳終結シグナルをコードするために使用される。ナンセンス突然変異は、一般に単一ヌクレオチド置換に

よってアミノ酸コドンをＰＴＣに変化させ、欠損した切断型タンパク質及び重篤な形態の疾患をもたらす。ナンセンス突然変異は、全遺伝性疾患の１０％超、及び世界中で約３億人が罹患しているがんを含む約１，０００の遺伝のヒトの障害を占めている。実際、嚢胞性線維症（ＣＦ）は、「クラス１」のＰＴＣ変異（例えば、ｐ．Ｇ５４２Ｘ、ｐ．Ｒ５５３Ｘ及びｐ．Ｗ１２８２Ｘ）を有する全ＣＦ患者の約２２％に適するようになり、嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子（ＣＦＴＲ）の機能のほぼ完全な喪失及び重度の臨床症状をもたらす。ナンセンス関連疾患の非常に高い有病率及び統一機構のために、ＰＴＣ治療薬を同定するための協調的な努力がなされてきた。アミノグリコシド（ＡＭＧ）は、これらの取り組みの主要な焦点であった。しかし、長期化した使用に伴う耳毒性及び腎毒性は、それらの使用を臨床的に制限している。オフターゲット効果を低減するために合成ＡＭＧ誘導体が現在研究されているが、それらはしばしば低いリードスルー効率を被る。非ＡＭＧ小分子（例えば、タイロシン、アタルレン）も、毒性がほとんどない有望なＰＴＣリードスルー化合物として同定されている。しかし、これらの手法は、元のＰＴＣ部位におけるミスセンス変異の生成をしばしばもたらす近同族ｔＲＮＡの挿入を含めて、未だ克服されていないいくつかの課題を有する。さらに、化合物のいくつかは、ヒト初代細胞においてＰＴＣ抑制の効率が低く、アタルレンの第３相臨床治験不合格をもたらした（ＡＣＴ　ＤＭＤ第３相臨床治験、ＮＣＴ０１８２６４８７；ＡＣＴＣＦ、ＮＣＴ０２１３９３０６）。ナンセンス突然変異に関連する障害を治療するための治療剤及び方法が必要とされている。

【発明の概要】

【０００４】

本発明は、いくつかの態様において上述した必要性に対処する。

【０００５】

一態様では、本発明は、（１）プロモーター及び（ｉｉ）抗コドン編集ｔＲＮＡ（ＡＣＥ－ｔＲＮＡ）をコードする配列を含む、閉端環状非ウイルス非プラスミドＤＮＡ分子を提供する。分子は、閉端ＤＮＡスレッド（ＣＥＤＴ）分子又はミニサークル（ＭＣ）分子であり得る。分子は、ＤＮＡ核標的配列（ＤＴＳ）、転写増強５’リーダー配列（ＴＥＬＳ）及びＡＣＥ－ｔＲＮＡバーコード配列（ＡＢＳ）からなる群より選択される１つ又は複数のエレメントをさらに含み得る。５’リーダー配列の例としては、配列番号３０６が挙げられる。ＤＴＳの例としては、ＳＶ４０－ＤＴＳ、例えば配列番号３０７が挙げられる。いくつかの実施形態では、分子は、いかなる細菌核酸配列も含まない。分子は、４個以下のＣｐＧジヌクレオチドを含むことができる。好ましくは、分子はＣｐＧジヌクレオチドを含まない。分子は、約２００～約１，０００ｂｐのサイズ、例えば約５００ｂｐのサイズであり得る。ＡＣＥ－ｔＲＮＡは、ＴｒｐＴＧＡｃｈｒ１７．ｔｒｎａ３９、ＬｅｕＴＧＡｃｈｒ６．ｔｒｎａ８１、ＬｅｕＴＧＡｃｈｒ６．ｔｒｎａ１３５、ＬｅｕＴＧＡｃｈｒ１１．ｔｒｎａ４、ＧｌｙＴＧＡｃｈｒ１９．ｔｒｎａ２、ＧｌｙＴＧＡｃｈｒ１．ｔｒｎａ１０７、ＧｌｙＴＧＡｃｈｒ１７．ｔｒｎａ９、ＡｒｇＴＧＡｃｈｒ９．ｔｒｎａ６／ノイントロン、ＧｌｎＴＡＧｃｈｒ１．ｔｒｎａ１０１及びＧｌｎＴＡＧｃｈｒ６．ｔｒｎａ１７５からなる群から選択されるものであり得る。例としては、配列番号１～１０の配列を含むＲＮＡが挙げられる。さらなる例としては、配列番号１１～３０５によってコードされるものが挙げられる。一実施形態では、ＡＣＥ－ｔＲＮＡが、（ｉ）配列番号１、４、５及び８からなる群から選択される配列、又は（ｉｉ）配列番号７９及び９４からなる群から選択される配列によってコードされる配列を含む。

【０００６】

分子は、細胞におけるＡＣＥ－ｔＲＮＡの発現方法に用いることができる。発現したＡＣＥ－ｔＲＮＡは、ｍＲＮＡの翻訳中にＰＴＣをアミノ酸に戻す機能を有する。その目的に対して、本方法は、（ｉ）目的の細胞を上記の分子と接触させること、及び（ｉｉ）ＡＣＥ－ｔＲＮＡの発現を可能にする条件下で細胞を維持することを含む。細胞は、１つ又は複数のＰＴＣを含む変異体核酸を有することができる。その場合、野生型核酸は完全に機能的なポリペプチドをコードする。この方法を使用して、発現したＡＣＥ－ｔＲＮＡは

、細胞におけるポリペプチドの発現を回復させるか又はポリペプチドの機能的活性を改善するために、１つ又は複数のＰＴＣを救済する。例えば、ポリペプチドは嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子（ＣＦＴＲ）であり得、変異体核酸は切断型ＣＦＴＲをコードする。一例において、変異体核酸は、Ｔｒｐから終止のＰＴＣを有する。ＡＣＥ－ｔＲＮＡは、Ｔｒｐから終止のＰＴＣをＬｅｕに翻訳する。本発明の範囲内は、上記の分子の１つ以上を含む宿主細胞である。

【０００７】

上記の分子は、ＰＴＣ関連障害を治療するための方法において使用することができる。したがって、本発明はまた、（ｉ）分子及び（ｉｉ）薬学的に許容される担体を含む薬学的製剤を提供する。それを必要とする対象において、ＰＴＣに関連する疾患を治療する方法も提供される。この方法は、上記の分子又は薬学的組成物を対象に投与することを含む。疾患の例としては、嚢胞性線維症、デュシェンヌ－ベッカー型筋ジストロフィー、網膜芽細胞腫、神経線維腫症、運動失調－毛細血管拡張症、テイ・サックス病、ウィルムス腫瘍、血友病Ａ、血友病Ｂ、メンケス病、ウルリッヒ病、β－サラセミア、２Ａ型及び３型フォン・ヴィレブランド病、ロビノウ症候群、短指症Ｂ型（指及び中手骨の短縮）、マイコバクテリア感染に対する遺伝性感受性、遺伝性網膜疾患、遺伝性出血傾向、失明、先天性神経感覚性難聴及び結腸無神経節症、並びに神経感覚性難聴、結腸無神経節症、末梢神経障害及び中枢性ミエリン形成異常を含む遺伝性神経発達障害、リドル症候群、色素性乾皮症、ファンコーニ貧血、貧血、甲状腺機能低下症、ｐ５３関連がん、食道癌、骨癌、卵巣癌、肝細胞癌、乳癌、肝細胞癌、線維性組織球腫、卵巣癌、ＳＲＹ性転換、トリオースリン酸イソメラーゼ－貧血、糖尿病、くる病、ハーラー症候群、ドラベ症候群、脊髄性筋ジストロフィー、アッシャー症候群、無虹彩症、コロイデレミア、眼性コロボマ、網膜色素変性、栄養障害性表皮水疱症、シュードキサントーマ・エラスチカム、アラジール症候群、ワールデンブルグ・シャー、乳児型神経セロイドリポフスチン症、シスチン症、Ｘ連鎖腎性尿崩症、及び多発性嚢胞腎疾患を含む。いくつかの例では、疾患は、錐体ジストロフィー、シュタルガルト病（ＳＴＧＤ１）、錐体杆体ジストロフィー、網膜色素変性症（ＲＰ）、加齢性黄斑変性症に対する感受性の増加、先天性停止性夜盲２（ＣＳＮＢ２）、先天性停止性夜盲１（ＣＳＮＢ１）、ベスト病、ＶＭＤ、及びレーバー先天性黒内障（ＬＣＡ１６）からなる群から選択される眼の疾患である。

【０００８】

治療法は、ナノ粒子、エレクトロポレーション、ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）、受容体標的化ポリプレックス、リピソーム又は流体力学的注入を含む任意の適切な方法を使用して実施することができる。

【０００９】

本発明の１つ又は複数の実施形態の詳細は、以下の説明に記載される。本発明の他の特徴、目的、及び利点は、説明及び特許請求の範囲から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【００１０】

【図１】図１Ａ及び１Ｂは、治療上の送達によく適した２つの小型ＡＣＥ－ｔＲＮＡ発現カセットを示す図である。内部プロモーター箱Ａ及びＢ領域（約７６塩基対又はｂｐｓ）、並びに短い５’転写増強リーダー配列（ＴＥＬＳ、ハッシュ）を含むＡＣＥ－ｔＲＮＡの全発現カセットは、全長が約１２５ｂｐｓ以下である。図１Ｃは、ミニサークル及びＣＥＤＴの概略図を示す。

【図２】図２Ａ及び図２Ｂは、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ発現後のｍＲＮＡ転写物のリボソームプロファイリングを示す図である。（Ａ）コード化領域に＞５ＲＰＫＭ（遺伝子のキロベースあたりの読み取り／１００万のマッピングされた読み取り）を有し、３’ＵＴＲに＞０．５ＲＰＫＭを有する転写物について、ＡＣＥ　ｔＲＮＡサプレッサーと対照との間の３’ＵＴＲにおけるリボソームフットプリント密度のＬｏｇ２の倍率変化。各点は、１つの遺伝子転写物を表す。エラーバー：Ｍｅａｎ±ＳＤ。（Ｂ）ＣＤＳが遺伝子コード配列（各転写物は等しく重み付けされている）であるすべての転写物の終止コドンを囲む、正規

化された平均リボソームフットプリント占有率。（挿入図）（Ｂ）の拡大図。
【図３】ＡＣＥ－ｔＲＮＡミニサークル及び閉端ＤＮＡスレッド産生スキームを示す写真及び図のセットである。
【図４Ａ－Ｂ】Ａ及びＢは、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}のＭＣ及びＣＥＤＴが強固なＰＴＣ抑制能を示したことを示す図である。（Ａ）ＨＥＫ２９３細胞において、２００ｂｐｓもの小さなＭＣが、ＡＣＥ－ｔＲＮＡを発現し（白色バー）、ＰＴＣレポーターを安定的に発現した。（Ｂ）ＣＥＤＴは、１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞におけるＰＴＣレポーターの同時送達により、強固なＰＴＣの抑制を示した。
【図５Ａ－Ｆ】Ａ～Ｆは、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９改変１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞へのＡＣＥ－ｔＲＮＡのＣＥＤＴの送達がＣＦＴＲ機能を有意に救済し、ナンセンスコドン介在的分解（ＮＭＤ）を阻害することを示す写真及び図である。（Ａ）Ｔｒａｎｓｗｅｌｌでトランスフェクトされた１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞の代表的な画像。（Ｂ）Ｕｓｓｉｎｇチャンバー記録で、ＷＴ（黒）、空ベクターでトランスフェクトされたｐ．Ｒ１１６２Ｘ　１６ＨＢＥ１４ｏｅ－細胞（赤色）、及び５００ｂｐのＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}のＣＥＤＴ（青色）から追跡した代表的なＣｌ$^{－}$短絡電流。（Ｃ）平均Ｆｏｒｓｋｏｌｉｎ及びＩＢＭＸ並びに（Ｄ）Ｉｎｈｂ１７２応答は、５００ｂｐのＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}のＣＥＤＴ（青色）によるＣＦＴＲ機能の有意な救済を示した。（Ｅ）わずかな（３０％）トランスフェクション効率の後、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ｇｌｙ}（灰色の線）、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}（緑色の水平線）及びＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ｌｅｕ}（オランジュベールの線）をコードするプラスミドはすべて、ｑＰＣＲによって測定したとき、それぞれｐ．Ｇ５４２Ｘ、ｐ．Ｒ１１６２Ｘ及びｐＷ１２８２Ｘ　１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞でＮＭＤを有意に阻害した。重要なことに、５００ｂｐのＣＥＤＴ^{Ａｒｇ}（緑色の対角線）、８００ｂｐのＭＣ^{Ａｒｇ}（緑色の点）及び８００ｂｐのＭＣ^{Ｌｅｕ}（オレンジ色の点）はすべて、トランスフェクションの４８時間後に、それぞれのＣＦＴＲのＰＴＣのプラスミドベースの発現に対する有意で同等の救済をもたらした。すべてのコンストラクトが等量でトランスフェクトされた。＊ｐ＜０．０５；＊＊ｐ＜０．０００１。
【図５Ｇ】ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９改変１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞へのＡＣＥ－ｔＲＮＡのＣＥＤＴの送達がＣＦＴＲ機能を有意に救済し、ナンセンスコドン介在的分解（ＮＭＤ）を阻害することを示す写真及び図である。（Ａ）Ｔｒａｎｓｗｅｌｌでトランスフェクトされた１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞の代表的な画像。（Ｂ）Ｕｓｓｉｎｇチャンバー記録で、ＷＴ（黒）、空ベクターでトランスフェクトされたｐ．Ｒ１１６２Ｘ　１６ＨＢＥ１４ｏｅ－細胞（赤色）、及び５００ｂｐのＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}のＣＥＤＴ（青色）から追跡した代表的なＣｌ$^{－}$短絡電流。（Ｃ）平均Ｆｏｒｓｋｏｌｉｎ及びＩＢＭＸ並びに（Ｄ）Ｉｎｈｂ１７２応答は、５００ｂｐのＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}のＣＥＤＴ（青色）によるＣＦＴＲ機能の有意な救済を示した。（Ｅ）わずかな（３０％）トランスフェクション効率の後、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ｇｌｙ}（灰色の線）、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}（緑色の水平線）及びＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ｌｅｕ}（オランジュベールの線）をコードするプラスミドはすべて、ｑＰＣＲによって測定したとき、それぞれｐ．Ｇ５４２Ｘ、ｐ．Ｒ１１６２Ｘ及びｐＷ１２８２Ｘ　１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞でＮＭＤを有意に阻害した。重要なことに、５００ｂｐのＣＥＤＴ^{Ａｒｇ}（緑色の対角線）、８００ｂｐのＭＣ^{Ａｒｇ}（緑色の点）及び８００ｂｐのＭＣ^{Ｌｅｕ}（オレンジ色の点）はすべて、トランスフェクションの４８時間後に、それぞれのＣＦＴＲのＰＴＣのプラスミドベースの発現に対する有意で同等の救済をもたらした。すべてのコンストラクトが等量でトランスフェクトされた。＊ｐ＜０．０５；＊＊ｐ＜０．０００１。
【図６Ａ－Ｂ】Ａ及びＢは、マウスの肺へのミニベクターのエレクトロポレーション送達が気道上皮の効率的な形質導入及びＰＴＣリードスルーをもたらしたことを示す写真及び図である。（Ａ）マウスの肺気道上皮に、エレクトロポレーションによってＧＦＰ発現ベクター（挿入図）を効率的に形質導入した。（Ｂ）ＮＬｕｃ－ＵＧＡ　ＰＴＣレポータープラスミドとプラスミドＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}、５００ｂｐのＣＥＤＴ^{Ａｒｇ}、８００ｂｐのＭＣ^{Ｌｅｕ}及び８００ｂｐのＭＣ^{Ａｒｇ}との同時送達は、強力なＰＴＣの抑制をも

たらした。
【図７Ａ－Ｂ】Ａ及びＢは、５’フランキング配列がＡＣＥ－ｔＲＮＡ発現を調節したことを示す写真及び図である。（Ａ）ＨＥＫ２９３細胞におけるＷ１２８２Ｘ－ＣＦＴＲ及びＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Trp}_{UGA}$をＴＥＬＳあり（左レーン）なし（右レーン）でコードするｃＤＮＡのトランスフェクション後の完全長ＣＦＴＲタンパク質のウエスタンブロット（ＷＢ）によって示されるように、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Trp}_{UGA}$によるＷ１２８２Ｘ－ＣＦＴＲの抑制は、ヒトＴｙｒ　ＴＥＬＳによって増強された（左レーン）。（Ｂ）ＴＥＬＳスクリーニングＨＴＣ／ＨＴＳプラスミドの設計。
【図８Ａ－Ｄ】Ａ～Ｄは、ＡＣＥ－ｔＲＮＡプラスミドが核に能動的に輸送されなかったことを示す写真及び図である。（Ａ）ＡＣＥ－ｔＲＮＡプラスミドｃＤＮＡの、細胞の細胞質への注入は、細胞質局在化をもたらし、一方、（Ｂ）核注入は転写と一致する病巣の形成をもたらした。（Ｃ）空のプラスミドへのＳＶ４０　ＤＮＡ標的化配列の付加は、細胞質注入の４時間後に核局在化をもたらした。（Ｄ）ＳＶ４０　ＤＴＳを有するＡＣＥ－ｔＲＮＡのＭＣ及びＣＥＤＴの概略図。
【図９】肺におけるミニベクターＰＴＣ抑制の局在化、効率及び持続性を判定するためのＰＴＣレポータープラスミドを示す図である。
【図１０Ａ－Ｃ】Ａ～Ｃは、転写活性を測定するためのＡＣＥ－ｔＲＮＡバーコード技術を示す図である。（Ａ）ＡＣＥ－ｔＲＮＡバーコードスキーム（ＡＢＳ）の概略図。（Ｂ）ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Arg}及びＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Tro}バーコードのｑＰＣＲ測定。（Ｃ）ＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Arg}_{UGA}$及びＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Arg}_{UGA}$バーコードのＰＴＣ抑制活性。
【図１１Ａ－Ｃ】Ａ～Ｃは、は、転写活性を測定するための別のＡＣＥ－ｔＲＮＡバーコード技術を示す図である。（Ａ）ｔｉｓ　ＡＣＥ－ｔＲＮＡバーコードスキームの概略図。（Ｂ）ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Arg}及びＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Arg}バーコードのｑＲＴ－ＰＣＲ測定。（Ｃ）ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Arg}及びＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Arg}バーコードのＰＴＣ抑制活性。
【図１２Ａ】異なるサイズのＡｒｇＴＧＡミニサークルライゲーション産物及び対応するＰＣＲ産物を、エチジウムブロマイドを含有する１．５％アガロースゲルで分離したことを示す写真である。
【図１２Ｂ】異なるサイズのＡｒｇＴＧＡミニサークルライゲーション産物及び対応するＰＣＲ産物を、エチジウムブロマイドを含有する１．５％アガロースゲルで分離したことを示す写真である。
【図１２Ｃ】Ｔ５エキソヌクレアーゼでインキュベートし、エチジウムブロマイドを含有する１．５％アガロースゲル上で分離したＡｒｇＴＧＡミニサークルライゲーション産物及びＰＣＲ産物を示す写真である。ミニサークルライゲーションにおけるエキソヌクレアーゼ耐性産物の存在は、共有結合的に閉じたミニサークル産物の産生を示した。
【図１２Ｄ】Ｔ５エキソヌクレアーゼでインキュベートし、エチジウムブロマイドを含有する１．５％アガロースゲル上で分離したＡｒｇＴＧＡミニサークルライゲーション産物及びＰＣＲ産物を示す写真である。ミニサークルライゲーションにおけるエキソヌクレアーゼ耐性産物の存在は、共有結合的に閉じたミニサークル産物の産生を示した。
【図１３Ａ】２００ｂｐのＣＥＤＴ産物のＣＥＤＴ／４×ＡｒｇＴＧＡ産物の産生を示す図及び写真である。対応するＰＣＲ産物のそれぞれを陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製した後、Ｎ１５ファージプロテロメラーゼ（ｔｅｌＮ）で消化した。ＣＥＤＴ産物は、Ｔ５エキソヌクレアーゼ消化に対する耐性を示し、これは、ｔｅｌＮによる共有結合的に閉じた末端の産生を示す。制限酵素Ｂｓｕ３６Ｉによるエンドヌクレアーゼ切断後、各ＣＥＤＴ産物はＴ５エキソヌクレアーゼによる分解を受けやすかった。
【図１３Ｂ】４００ｂｐのＣＥＤＴ産物のＣＥＤＴ／４×ＡｒｇＴＧＡ産物の産生を示す図及び写真である。対応するＰＣＲ産物のそれぞれを陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製した後、Ｎ１５ファージプロテロメラーゼ（ｔｅｌＮ）で消化した。ＣＥＤＴ産物は、Ｔ５エキソヌクレアーゼ消化に対する耐性を示し、これは、ｔｅｌＮによる共有

結合的に閉じた末端の産生を示す。制限酵素Ｂｓｕ３６Ｉによるエンドヌクレアーゼ切断後、各ＣＥＤＴ産物はＴ５エキソヌクレアーゼによる分解を受けやすかった。
【図１３Ｃ】９００ｂｐのＣＥＤＴ／１×ＡｒｇＴＧＡ産物のＣＥＤＴ／４×ＡｒｇＴＧＡ産物の産生を示す図及び写真である。対応するＰＣＲ産物のそれぞれを陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製した後、Ｎ１５ファージプロテロメラーゼ（ｔｅｌＮ）で消化した。ＣＥＤＴ産物は、Ｔ５エキソヌクレアーゼ消化に対する耐性を示し、これは、ｔｅｌＮによる共有結合的に閉じた末端の産生を示す。制限酵素Ｂｓｕ３６Ｉによるエンドヌクレアーゼ切断後、各ＣＥＤＴ産物はＴ５エキソヌクレアーゼによる分解を受けやすかった。
【図１３Ｄ】９００ｂｐのＣＥＤＴ／４×ＡｒｇＴＧＡ産物の産生を示す図及び写真である。対応するＰＣＲ産物のそれぞれを陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製した後、Ｎ１５ファージプロテロメラーゼ（ｔｅｌＮ）で消化した。ＣＥＤＴ産物は、Ｔ５エキソヌクレアーゼ消化に対する耐性を示し、これは、ｔｅｌＮによる共有結合的に閉じた末端の産生を示す。制限酵素Ｂｓｕ３６Ｉによるエンドヌクレアーゼ切断後、各ＣＥＤＴ産物はＴ５エキソヌクレアーゼによる分解を受けやすかった。
【図１３Ｅ】８５０ｂｐの１×ＡｒｇＴＧＡミニサークル産生物及び８５０ｂｐの４×ＡｒｇＴＧＡミニサークル産生物をそれぞれ示す図及び写真のセットであり、両方ともＴ５エキソヌクレアーゼ消化に対する耐性を示し、共有結合的に閉じたミニサークルの産生を示している。制限酵素Ｓｍａｌによるエンドヌクレアーゼ切断後、各ミニサークル産物はＴ５エキソヌクレアーゼによる分解を受けやすかった。
【図１３Ｆ】８５０ｂｐの１×ＡｒｇＴＧＡミニサークル産生物及び８５０ｂｐの４×ＡｒｇＴＧＡミニサークル産生物をそれぞれ示す図及び写真のセットであり、両方ともＴ５エキソヌクレアーゼ消化に対する耐性を示し、共有結合的に閉じたミニサークルの産生を示している。制限酵素Ｓｍａｌによるエンドヌクレアーゼ切断後、各ミニサークル産物はＴ５エキソヌクレアーゼによる分解を受けやすかった。
【図１４】ｃＤＮＡ及びＲＮＡとしてのＡＣＥ－ｔＲＮＡの送達が、１６ＨＢＥ１４ｇｅ－細胞における内因性のＣＦＴＲのｍＲＮＡを救済したことを示す図のセットである。
【図１５Ａ】蛍光性ＰＴＣレポーター１６ＨＢＥ１４ｇｅ－細胞株を作製するためのコンストラクト、及びＰＴＣ抑制アッセイにおけるその細胞株の使用を示す、図のセットである。
【図１５Ｂ】蛍光性ＰＴＣレポーター１６ＨＢＥ１４ｇｅ－細胞株を作製するためのコンストラクト、及びＰＴＣ抑制アッセイにおけるその細胞株の使用を示す、図のセットである。
【図１６Ａ】ｃＤＮＡとしてのＡＣＥ－ｔＲＮＡの送達が、１６ＨＢＥ１４ｇｅ－細胞における内因性のＣＦＴＲのｍＲＮＡを救済したことを示す図のセットである。＊＊＝ｐ＜０．００１；＊＊＊＊＝ｐ＜０．０００１。
【図１６Ｂ】ｃＤＮＡとしてのＡＣＥ－ｔＲＮＡの送達が、１６ＨＢＥ１４ｇｅ－細胞における内因性のＣＦＴＲのｍＲＮＡを救済したことを示す図のセットである。＊＊＝ｐ＜０．００１；＊＊＊＊＝ｐ＜０．０００１。
【図１７Ａ】ＭＣでのＡＣＥ－ｔＲＮＡの送達が、１６ＨＢＥ１４ｇｅ－細胞における内因性のＲ１１６２Ｘ－ＣＦＴＲのｍＲＮＡを救済したことを示す図のセットである。
【図１７Ｂ】ＭＣでのＡＣＥ－ｔＲＮＡの送達が、１６ＨＢＥ１４ｇｅ－細胞における内因性のＲ１１６２Ｘ－ＣＦＴＲのｍＲＮＡを救済したことを示す図のセットである。
【図１８Ａ】ＭＣでのＡＣＥ－ｔＲＮＡの送達が、ロイシンで、１６ＨＢＥ１４ｇｅ－細胞における内因性のＷ１２８２Ｘ－ＣＦＴＲのｍＲＮＡを救済したことを示す図のセットである。
【図１８Ｂ】ＭＣでのＡＣＥ－ｔＲＮＡの送達が、ロイシンで、１６ＨＢＥ１４ｇｅ－細胞における内因性のＷ１２８２Ｘ－ＣＦＴＲのｍＲＮＡを救済したことを示す図のセットである。
【図１９Ａ】異なるＣＥＤＴでのＡＣＥ－ｔＲＮＡの送達が、１６ＨＢＥ１４ｇｅ－細胞

における内因性のＲ１１６２Ｘ－ＣＦＴＲのｍＲＮＡを救済したことを示す図のセットである。
【図１９Ｂ】異なるＣＥＤＴでのＡＣＥ－ｔＲＮＡの送達が、１６ＨＢＥ１４ｇｅ－細胞における内因性のＲ１１６２Ｘ－ＣＦＴＲのｍＲＮＡを救済したことを示す図のセットである。
【図２０】ＰＢ－Ｄｏｎｋｅｙシステムの開発を示す図である。
【図２１Ａ】ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}の安定な組み込み及び発現が、Ｒ１１６２Ｘ１６ＨＢＥ１４ｇｅ－細胞における内因性のＣＦＴＲ機能を救済したことを示す図のセットである。
【図２１Ｂ】ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}の安定な組み込み及び発現が、Ｒ１１６２Ｘ１６ＨＢＥ１４ｇｅ－細胞における内因性のＣＦＴＲ機能を救済したことを示す図のセットである。
【発明を実施するための形態】
【００１１】
本発明は、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ、関連ベクター、及び関連送達、並びにＰＴＣ又はナンセンス突然変異に関連する障害の治療のための使用に関する。
【００１２】
全遺伝性疾患の約１０～１５％がナンセンス突然変異によって引き起こされている。米国だけで約３００万人が罹患しており、全遺伝性遺伝性障害の１／３がナンセンス関連であると推定されている。単一のヌクレオチド変化がコドンをコードするアミノ酸を未成熟終止コドン（ＴＧＡ、ＴＡＧ又はＴＡＡ）に変換し、その結果、機能の完全な喪失又は変化を伴う切断型タンパク質、及びナンセンスコドン介在的分解（ＮＭＤ）経路によるｍＲＮＡ転写産物の分解がもたらされるこれらの疾患のすべてについて統一機構が存在する。本明細書に記載のＤＮＡ分子、薬学的製剤、方法及び細胞は、これらの疾患を治療するために使用することができる。
【００１３】
一態様では、本開示は、（１）プロモーター及び（ｉｉ）抗コドン編集ｔＲＮＡ（ＡＣＥ－ｔＲＮＡ）をコードする配列を含む、閉端環状非ウイルス非プラスミドＤＮＡ分子を提供する。
【００１４】
いくつかの実施形態では、分子は、閉端ＤＮＡスレッド（ＣＥＤＴ）分子又はミニサークル（ＭＣ）分子である。
【００１５】
上記の実施形態のいずれかにおいて、分子は、ＤＮＡ核標的配列（ＤＴＳ）、転写増強５’リーダー配列（ＴＥＬＳ）及びＡＣＥ－ｔＲＮＡバーコード配列（ＡＢＳ）からなる群より選択される１つ又は複数のエレメントをさらに含む。
【００１６】
一実施形態では、ＤＴＳはＳＶ４０－ＤＴＳを含む。
【００１７】
上記の実施形態のいずれにおいても、分子は、いかなる細菌核酸配列も含まない。
【００１８】
上記の実施形態のいずれかにおいて、分子は、４個、３個、２個、１個又はそれより少ないＣｐＧジヌクレオチドを含む。
【００１９】
一実施形態では、分子はＣｐＧジヌクレオチドを含まない。
【００２０】
上記の実施形態のいずれかにおいて、分子は約２００～約１，０００ｂｐのサイズである。
【００２１】
一実施形態では、分子は、約２００ｂｐ、２５０ｂｐ、３００ｂｐ、３５０ｂｐ、４０

０ｂｐ、４５０ｂｐ、５００ｂｐ、５５０ｂｐ、６００ｂｐ、６５０ｂｐ、７００ｂｐ、７５０ｂｐ、８００ｂｐ、８５０ｂｐ、９００ｂｐ、９５０ｂｐ、又は１０００ｂｐのサイズである。ＣＥＤＴのいくつかの例では、ＡＣＥ－ｔＲＮＡをコードする二本鎖の切片は、例えば、約２００ｂｐ、４００ｂｐ又は９００ｂｐのサイズであるが、対応するＣＥＤＴは、付加されたＣＥＤＴ末端に起因して、約２６０ｂｐ、４５６ｂｐ又は９５６ｂｐのサイズである。その場合、ＣＥＤＴは、ＡＣＥ－ｔＲＮＡをコードする二本鎖の切片のサイズを示すために、２００ｂｐのＣＥＤＴ、４００ｂｐのＣＥＤＴ、又は９００ｂｐのＣＥＤＴと呼ばれることがある。例えば、図１３及び図１９を参照されたい。

【００２２】

上記の実施形態のいずれかにおいて、ＡＣＥ－ｔＲＮＡは、（ｉ）配列番号１～１０からなる群から選択される配列、又は（ｉｉ）配列番号１１～３０５からなる群から選択される１つによってコードされる配列を含む。

【００２３】

一実施形態では、ＡＣＥ－ｔＲＮＡが、（ｉ）配列番号１、４、５及び８からなる群から選択される配列、又は（ｉｉ）配列番号７９及び９４からなる群から選択される配列によってコードされる配列を含む。

【００２４】

本開示はまた、（ｉ）上記の実施形態のいずれか１つの分子及び（ｉｉ）薬学的に許容される担体を含む薬学的製剤を提供する。

【００２５】

本開示はさらに、（ｉ）細胞を上記の任意の実施形態の分子と接触させること、及び（ｉｉ）細胞を、ＡＣＥ－ｔＲＮＡの発現を可能にする条件下で維持することを含む、細胞においてＡＣＥ－ｔＲＮＡを発現させるための方法を提供する。

【００２６】

方法の一実施形態では、（ｉ）細胞が、１つ又は複数の未成熟終止コドン（ＰＴＣ）を含む変異体核酸を有し、（ｉｉ）変異体核酸の野生型がポリペプチドをコードし、（ｉｉｉ）ＡＣＥ－ｔＲＮＡが１つ又は複数のＰＴＣを救済し、ポリペプチドの発現を回復させる。

【００２７】

一実施形態では、ポリペプチドは嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子（ＣＦＴＲ）であり、変異体核酸は切断型ＣＦＴＲをコードする。

【００２８】

一実施形態では、変異体核酸は、Ｔｒｐから終止のＰＴＣを有する。

【００２９】

一実施形態では、ＡＣＥ－ｔＲＮＡは、Ｔｒｐから終止のＰＴＣをＬｅｕに翻訳する。

【００３０】

本開示はさらに、上記の実施形態のいずれか１つの分子を含む宿主細胞を提供する。

【００３１】

本開示はさらに、ＰＴＣに関連する疾患の治療を必要とする対象においてＰＴＣに関連する疾患を治療する方法であって、上記の実施形態のいずれか１つの分子又は上記の薬学的組成物を対象に投与することを含む方法を提供する。

【００３２】

いくつかの実施形態では、疾患は、嚢胞性線維症、デュシェンヌ－ベッカー型筋ジストロフィー、網膜芽細胞腫、神経線維腫症、運動失調－毛細血管拡張症、テイ・サックス病、ウィルムス腫瘍、血友病Ａ、血友病Ｂ、メンケス病、ウルリッヒ病、β－サラセミア、２Ａ型及び３型フォン・ヴィレブランド病、ロビノウ症候群、短指症Ｂ型（指及び中手骨の短縮）、マイコバクテリア感染に対する遺伝性感受性、遺伝性網膜疾患、遺伝性出血傾向、失明、先天性神経感覚性難聴及び結腸無神経節症、並びに神経感覚性難聴、結腸無神経節症、末梢神経障害及び中枢性ミエリン形成異常を含む遺伝性神経発達障害、リドル症候群、色素性乾皮症、ファンコーニ貧血、貧血、甲状腺機能低下症、ｐ５３関連がん、食

道癌、骨癌、卵巣癌、肝細胞癌、乳癌、肝細胞癌、線維性組織球腫、卵巣癌、ＳＲＹ性転換、トリオースリン酸イソメラーゼ－貧血、糖尿病、くる病、ハーラー症候群、ドラベ症候群、脊髄性筋ジストロフィー、アッシャー症候群、無虹彩症、コロイデレミア、眼性コロボマ、網膜色素変性、栄養障害性表皮水疱症、シュードキサントーマ・エラスチカム、アラジール症候群、ワールデンブルグ・シャー、乳児型神経セロイドリポフスチン症、シスチン症、Ｘ連鎖腎性尿崩症、マックアードル病及び多発性嚢胞腎疾患からなる群から選択される。

【００３３】

いくつかの実施形態では、疾患は、錐体ジストロフィー、シュタルガルト病（ＳＴＧＤ１）、錐体杆体ジストロフィー、網膜色素変性症（ＲＰ）、加齢性黄斑変性症に対する感受性の増加、先天性停止性夜盲２（ＣＳＮＢ２）、先天性停止性夜盲１（ＣＳＮＢ１）、ベスト病、ＶＭＤ、及びレーバー先天性黒内障（ＬＣＡ１６）からなる群から選択される眼の遺伝性疾患である。

【００３４】

上記の治療方法の実施形態の中のいくつかの実施形態では、投与は、ナノ粒子、エレクトロポレーション、ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）、受容体標的化ポリプレックス、リピソーム、又は流体力学的注入を用いて行われる。

【００３５】

ＡＣＥ－ｔＲＮＡ

ＡＣＥ－ｔＲＮＡは、ＰＴＣが、最初に失われたアミノ酸又は異なるアミノ酸に効果的かつ治療的に復帰するように配列が操作された、被操作ｔＲＮＡ分子である。そのような被操作ｔＲＮＡは、特定のアミノ酸に対して疾患を引き起こすナンセンスコドンの「再編集」を可能にする。本明細書に開示されるように、被操作ｔＲＮＡは、ＴＡＣ又はＴＡＡにわたるＴＧＡなど、１種類の終止コドンのみを標的とすることができる。これらのｔＲＮＡ分子が小さいサイズであることは、ｔＲＮＡ及びプロモーターが一緒になってわずか約３００ｂｐであり得るので、これらを容易な発現に適したものにする。その目的のために、ヒトの細胞において機能的なｔＲＮＡ遺伝子の構造的成分を含むように、オリゴヌクレオチドを合成することができる。このオリゴヌクレオチドの配列は、特定のｔＲＮＡにナンセンス又は他の特定の突然変異を認識させるｔＲＮＡのアンチコドン領域において行われた置換を経る既知の配列に基づいて、設計することができる。ＡＣＥ－ｔＲＮＡの例としては、国際公開第２０１９０９０１５４号パンフレット、国際公開第２０１９０９０１６９号パンフレット及びＬｕｅｃｋ，Ｊ．Ｄ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ１０，８２２，２０１９に記載されているものが挙げられる。これらの各文献の内容は、参照により援用される。

【００３６】

一般に、ＡＣＥ－ｔＲＮＡは、Ｔアーム、Ｄアーム、及びアンチコドンアーム、並びにアクセプターアームを含む一般的な４アーム構造を有する（国際公開第２０１９０９０１６９号パンフレットの図２を参照）。Ｔアームは、「Ｔステム」と「ＴΨＣループ」とから構成されている。ある特定の実施形態において、Ｔステムは、ｔＲＮＡの安定性を高めるように改変される。特定の実施形態では、ＡＣＥ－ｔＲＮＡは、内因性のＴステム配列と比較して終止部位を抑制する生物活性を増加させる、被修飾Ｔステムを有する。

【００３７】

ＡＣＥ－ｔＲＮＡをＰＴＣの抑制に使用することができる。しかし、ＰＴＣの有効な抑制には潜在的な欠点がある。例えば、ＰＴＣ抑制戦略は、ｉｎ　ｖｉｖｏでの実際のナイーブな終止コドンのリードスルーをもたらし得、全体的なナイーブな終止コドンのリードスルーは有害であるという懸念があった。しかし、いくつかの細胞機構が、正常な終止のリードスルー及びその損傷効果の両方を制限するために配置されている。より具体的には、複数のフレーム内終止コドンが通常の翻訳の終結において頻繁に見出され、したがって効率的なＰＴＣ抑制因子の存在下での翻訳終結の確率を高めている。さらに、誤った翻訳の終結、特殊化されたユビキチンリガーゼ及びリボソーム関連経路に関するタンパク質の

同定及び分解のために、少なくとも２つの細胞機構が配置されている。遺伝子の末端の天然終止コドンは、増強された終結効率を促進する周囲の配列状況を有し、ＰＴＣに見られる終結複合体は「実際の」終止とは異なるという証拠がある。予想外にも、内因性の終止コドンのリードスルーが動物において一般的であり、有害ではないという発見は、ＰＴＣの抑制が実行可能な治療の手法であることを示唆している。実際、リボソームプロファイリングの予備データは、「実際の」終止のＡＣＥ－ｔＲＮＡリードスルーがまれであることを示唆している（図２）。

【００３８】

本発明に有用なＡＣＥ－ｔＲＮＡは、国際公開第２０１９０９０１５４号パンフレット、国際公開第２０１９０９０１６９号パンフレット及びＬｕｅｃｋ，Ｊ．Ｄ．ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ１０，８２２（２０１９）に記載されている戦略に従って、作製することができる。この戦略を使用して、細胞の培養におけるＰＴＣの効果的な救済のためのＡＣＥ－ｔＲＮＡの広範なライブラリーが作製されている。以下の表１は、本発明に有用なＡＣＥ－ｔＲＮＡのいくつかの例である。疾患を引き起こすＰＴＣを抑制するための他の被操作のヒトｔＲＮＡ配列としては、国際公開第２０１９０９０１５４号パンフレット、国際公開第２０１９０９０１６９号パンフレット及び、Ｌｕｅｃｋ，Ｊ．Ｄ．ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ１０，８２２（２０１９）に記載されているものが挙げられる。さらなる例としては、以下の表２の配列番号１１～３０５によってコードされるものが挙げられる。以下の各配列において、アンチコドンに対応する３文字の配列は、小さい場合には下線が引かれている。

表 1

番号	tRNAscan-SE の ID	配列	配列番号
1	TrpTGAchr17.trna39	GGCCUCGUGGCGCAACGGUAGCGCGUCUGAC UucaGAUCAGAAGGuUGCGUGUUCAAAUCACG UCGGGGUCA	1
22	LeuTGAchr6.trna81	ACCAGGAUGGCCGAGUGGUuAAGGCGUUGGAC UucaGAUCCAAUGGACAUAUGUCCGCGUGGGU UCGAACCCCACUCCUGGUA	2
23	LeuTGAchr6.trna135	ACCGGGAUGGCCGAGUGGUuAAGGCGUUGGA CUucaGAUCCAAUGGGCUGGUGCCCGCGUGGG UUCGAACCCCACUCUCGGUA	3
24	LeuTGAchr11.trna4	ACCAGAAUGGCCGAGUGGUuAAGGCGUUGGAC UucaGAUCCAAUGGAUUCAUAUCCGCGUGGGU UCGAACCCCACUUCUGGUA	4
17	GlyTGAchr19.trna2	GCGUUGGUGGUAUAGUGGUuAGCAUAGCUGCC UucaAAGCAGUUGaCCCGGGUUCGAUUCCCGG CCAACGCA	5
18	GlyTGAchr1.trna107	GCGUUGGUGGUAUAGUGGUgAGCAUAGCUGCC UucaAAGCAGUUGaCCCGGGUUCGAUUCCCGG CCAACGCA	6
19	GlyTGAchr17.trna9	GCGUUGGUGGUAUAGUGGUaAGCAUAGCUGCC UucaAAGCAGUUGaCCCGGGUUCGAUUCCCGG CCAACGCA	7
21	ArgTGAchr9.trna6/ノイントロン	GGCUCUGUGGCGCAAUGGAuAGCGCAUUGGAC UucaAAUUCAAAGGuUGUGGGUUCGAGUCCCA CCAGAGUCG	8
18	GlnTAGchr1.trna101	GGUUCCAUGGUGUAAUGGUaAGCACUCUGGAC UcuaAAUCCAGCGaUCCGAGUUCGAGUCUCGG UGGAACCU	9
27	GlnTAGchr6.trna175	GGCCCCAUGGUGUAAUGGUuAGCACUCUGGAC UcuaAAUCCAGCGaUCCGAGUUCAAAUCUCGG UGGGACCU	10

表２

番号	tRNAscan-SE の ID	配列	配列番号
1	TrpTGAchr17.trna39	GGCCTCGTGGCGCAACGGTAGCGCGTCTGACTtcaGATCAGAAGGtTGCGTGTTCAAATCACGTCGGGGTCA	11
2	TrpTGAchr17.trna10	GACCTCGTGGCGCAATGGTAGCGCGTCTGACTtcaGATCAGAAGGtTGCGTGTTCAAGTCACGTCGGGGTCA	12
3	TrpTGAchr6.trna171	GACCTCGTGGCGCAACGGTAGCGCGTCTGACTtcaGATCAGAAGGtTGCGTGTTCAAATCACGTCGGGGTCA	13
4	TrpTGAchr12.trna6	GACCTCGTGGCGCAACGGTAGCGCGTCTGACTtcaGATCAGAAGGcTGCGTGTTCGAATCACGTCGGGGTCA	14
5	TrpTGAchr7.trna3	GACCTCGTGGCGCAACGGCAGCGCGTCTGACTtcaGATCAGAAGGtTGCGTGTTCAAATCACGTCGGGGTCA	15
1	TrpTAGchr17.trna39	GGCCTCGTGGCGCAACGGTAGCGCGTCTGACTctaGATCAGAAGGtTGCGTGTTCAAATCACGTCGGGGTCA	16
2	TrpTAGchr17.trna10	GACCTCGTGGCGCAATGGTAGCGCGTCTGACTctaGATCAGAAGGtTGCGTGTTCAAGTCACGTCGGGGTCA	17
3	TrpTAGchr6.trna171	GACCTCGTGGCGCAACGGTAGCGCGTCTGACTctaGATCAGAAGGtTGCGTGTTCAAATCACGTCGGGGTCA	18
4	TrpTAGchr12.trna6	GACCTCGTGGCGCAACGGTAGCGCGTCTGACTctaGATCAGAAGGcTGCGTGTTCGAATCACGTCGGGGTCA	19
5	TrpTAGchr7.trna3	GACCTCGTGGCGCAACGGCAGCGCGTCTGACTctaGATCAGAAGGtTGCGTGTTCAAATCACGTCGGGGTCA	20
17	GlyTGAchr19.trna2	GCGTTGGTGGTATAGTGGTtAGCATAGCTGCCTtcaAAGCAGTTGaCCCGGGTTCGATTCCCGGCCAACGCA	21
18	GlyTGAchr1.trna107	GCGTTGGTGGTATAGTGGTgAGCATAGCTGCCTtcaAAGCAGTTGaCCCGGGTTCGATTCCCGGCCAACGCA	22
19	GlyTGAchr17.trna9	GCGTTGGTGGTATAGTGGTaAGCATAGCTGCCTtcaAAGCAGTTGaCCCGGGTTCGATTCCCGGCCAACGCA	23
2	ArgTGAchr3.trna8	GGGCCAGTGGCGCAATGGAtAACGCGTCTGACTtcaGATCAGAAGAtTCTAGGTTCGACTCCTGGCTGGCTCG	24
3	ArgTGAchr6.trna115	GGCCGCGTGGCCTAATGGAtAAGGCGTCTGATTtcaGATCAGAAGAtTGAGGGTTCGAGTCCCTTCGTGGTCG	25
4	ArgTGAchr17.trna21	GACCCAGTGGCCTAATGGAtAAGGCATCAGCCTtcaGAGCTGGGGAtTGTGGGTTCGAGTCCCATCTGGGTCG	26
5	ArgTGAchr17.trna16	GCCCCAGTGGCCTAATGGAtAAGGCACTGGCCTtcaAAGCCAGGGAtTGTGGGTTCGAGTCCCACCTGGGGTA	27

6	ArgTGAchr17.trna19	GCCCCAGTGGCCTAATGGAtAAGGCACTGGCCT tcaAAGCCAGGGAtTGTGGGTTCGAGTCCCACCT GGGGTG	28
7	ArgTGAchr16.trna3	GCCCCGGTGGCCTAATGGAtAAGGCATTGGCCT tcaAAGCCAGGGAtTGTGGGTTCGAGTCCCACCC GGGGTA	29
8	ArgTGAchr7.trna5	GCCCCAGTGGCCTAATGGAtAAGGCATTGGCCT tcaAAGCCAGGGAtTGTGGGTTCGAGTCCCATCT GGGGTG	30
9	ArgTGAchr16.trna13	GCCCCAGTGGCCTGATGGAtAAGGTACTGGCCT tcaAAGCCAGGGAtTGTGGGTTCGAGTTCCACCT GGGGTA	31
10	ArgTGAchr15.trna4	GGCCGCGTGGCCTAATGGAtAAGGCGTCTGACT tcaGATCAGAAGAtTGCAGGTTCGAGTCCTGCCG CGGTCG	32
11	ArgTGAchr6.trna4	GACCACGTGGCCTAATGGAtAAGGCGTCTGACT tcaGATCAGAAGAtTGAGGGTTCGAATCCCTCCG TGGTTA	33
12	ArgTGAchr17.trna17	GACCGCGTGGCCTAATGGAtAAGGCGTCTGACT tcaGATCAGAAGAtTGAGGGTTCGAGTCCCTTCG TGGTCG	34
13	ArgTGAchr6.trna3	GACCACGTGGCCTAATGGAtAAGGCGTCTGACT tcaGATCAGAAGAtTGAGGGTTCGAATCCCTTCG TGGTTA	35
14	ArgTGAchr6.trna125	GACCACGTGGCCTAATGGAtAAGGCGTCTGACT tcaGATCAGAAGAtTGAGGGTTCGAATCCCTTCG TGGTTG	36
15	ArgTGAchr9.trna5	GGCCGTGTGGCCTAATGGAtAAGGCGTCTGACT tcaGATCAAAAGAtTGCAGGTTTGAGTTCTGCCA CGGTCG	37
16	ArgTGAchr1.trna10	GGCTCCGTGGCGCAATGGAtAGCGCATTGGACT tcaAgaggctgaaggcATTCAAAGGtTCCGGGTTCGA GTCCCGGCGGAGTCG	38
17	ArgTGAchr1.trna10/ノイントロン	GGCTCCGTGGCGCAATGGAtAGCGCATTGGACT tcaAATTCAAAGGtTCCGGGTTCGAGTCCCGGCG GAGTCG	39
18	ArgTGAchr17.trna3	GGCTCTGTGGCGCAATGGAtAGCGCATTGGACT tcaAgtgacgaatagagcaATTCAAAGGtTGTGGGTTC GAATCCCACCAGAGTCG	40
19	ArgTGAchr17.trna3/ノイントロン	GGCTCTGTGGCGCAATGGAtAGCGCATTGGACT tcaAATTCAAAGGtTGTGGGTTCGAATCCCACCA GAGTCG	41
20	ArgTGAchr9.trna6	GGCTCTGTGGCGCAATGGAtAGCGCATTGGACT tcaAgctgagcctagtgtggtcATTCAAAGGtTGTGGGT TCGAGTCCCACCAGAGTCG	42
21	ArgTGAchr9.trna6/ノイントロン	GGCTCTGTGGCGCAATGGAtAGCGCATTGGACT tcaAATTCAAAGGtTGTGGGTTCGAGTCCCACCA GAGTCG	43
22	ArgTGAchr11.trna3	GGCTCTGTGGCGCAATGGAtAGCGCATTGGACT tcaAgatagttagagaaATTCAAAGGtTGTGGGTTCG AGTCCCACCAGAGTCG	44
23	ArgTGAchr1.trna79	GTCTCTGTGGCGCAATGGAcgAGCGCGCTGGAC TtcaAATCCAGAGGtTCCGGGTTCGAGTCCCGGC AGAGATG	45

25	ArgTGAchr6.trna52/ノイントロン	GGCTCTGTGGCGCAATGGAtAGCGCATTGGACT tcaAATTCAAAGGtTGCGGGTTCGAGTCCCTCCA GAGTCG	46
14	GlnTAGchr12.trna3	GGTTCCATGGTGTAATGGTaAGCACCCTGGACT ctaAATCCAGCAaCCAGAGTTCCAGTCTCAGCGt GGACCT	47
15	GlnTAGchr5.trna23	GGTAGTGTAGTCTACTGGTTAAACGCTTGGgCTc taACATTAAcGtCCTGGGTTCAAATCCCAGCTTT GTCA	48
16	GlnTAGchr6.trna147	GGTTCCATGGTGTAATGGTtAGCACTCTGGACTc taAATCCAGCGaTCCGAGTTCAAGTCTCGGTGGA ACCT	49
17	GlnTAGchr1.trna17	GGTTCCATGGTGTAATGGTgAGCACTCTGGACT ctaAATCCAGCGaTCCGAGTTCGAGTCTCGGTGG AACCT	50
18	GlnTAGchr1.trna101	GGTTCCATGGTGTAATGGTaAGCACTCTGGACT ctaAATCCAGCGaTCCGAGTTCGAGTCTCGGTGG AACCT	51
19	GlnTAGchr6.trna42	GGTTCCATGGTGTAATGGTtAGCACTCTGGACTc taAATCCGGTAaTCCGAGTTCAAATCTCGGTGGA ACCT	52
20	GlnTAGchr6.trna132	GGCCCCATGGTGTAATGGTcAGCACTCTGGACT ctaAATCCAGCGaTCCGAGTTCAAATCTCGGTGG GACCC	53
21	GlnTAGchr1.trna23	GGTTCCATGGTGTAATGGTaAGCACTCTGGACT ctaAATCCAGCCATCTGAGTTCGAGTCTCTGTGG AACCT	54
22	GlnTAGchr1.trna111	GGTTCCATGGTGTAATGGTgAGCACTTTGGACTc taAATACAGTGATCAGAGTTCAAGTCTCACTGGG ACCT	55
23	GlnTAGchr1.trna24	GGTTCCATGgGTTAATGGTgAGCACCCTGGACTc taAATCAAGCGaTCCGAGTTCAAATCTCGGTGGT ACCT	56
24	GlnTAGchr19.trna4	GTTTCCATGGTGTAATGGTgAGCACTCTGGACTc taAATCCAGAAATACATTCAAAGAATTAAGAACA	57
25	GlnTAGchr17.trna14	GGTCCCATGGTGTAATGGTtAGCACTCTGGACT ctaAATCCAGCGaTCCGAGTTCAAATCTCGGTGG GACCT	58
26	GlnTAGchr6.trna63	GGTCCCATGGTGTAATGGTtAGCACTCTGGACT ctaAATCCAGCAaTCCGAGTTCGAATCTCGGTGG GACCT	59
27	GlnTAGchr6.trna175	GGCCCCATGGTGTAATGGTtAGCACTCTGGACT ctaAATCCAGCGaTCCGAGTTCAAATCTCGGTGG GACCT	60
28	GlnTAGchr6.trna82	GGTCCCATGGTGTAATGGTtAGCACTCTGGGCT ctaAATCCAGCAaTCCGAGTTCGAATCTTGGTGG GACCT	61
29	GlnTAGchr2.trna26	GGCTGTGTACCTCAGTGGGcAAGGGTATGGACT ctaAAGCCAGACTaTTTGGGTTCAAATCCCAGCT TGGCCT	62
2	GlnTAAnmt-tRNA-Gln chrX.trna1	TAGGACATGGTGTGATAGGTAGCATGGAGAATT ttaGATTCTCAGGGGTAGGTTCAATTCCTACAGT TCTAG	63

3	GlnTAAnmt-tRNA-Glnchr7.trna32	TAGGACGTGGTGTGATAGGTAGCATGGGGAATTttaGATTCTCAGGGGTGGGTTCAATTCCTATAGTTCTAG	64
4	GlnTAAnmt-tRNA-Glnchr7.trna7	TAGGACGTGGTGTAGTAGGTAGCATGGAGAATGttaAATTCTCAGGGGTAGGTTCAATTCCTATAGTTCTAG	65
8	GlnTAAnmt-tRNA-Glnchr12.trna15	TCTAGGAtgTGGTGTGATAGGTAGCATGGAGAATTttaGATTCTCAGGGGTAGGTTCAATTCCTATaTTCTAGAA	66
9	GlnTAAnmt-tRNA-Glnchr2.trna21	TAGGACGTGGTGTGATAGGTAGCATGGAGAATTttaGATTCTCAGGGATGGGTTCAATTCCTATAGTCCTAG	67
10	GlnTAAnmt-tRNA-Glnchr2.trna9	TAGGACGTGGTGTGATAGGTAGCACGGAGAATTttaGATTCTCAGGGATGGGTTCAATTCCTGTAGTTCTAG	68
11	GlnTAAchr6.trna1	GGTTCCATGGTGTAATGGTtAGCACTCTGGACTttaAATCCAGCGaTCCGAGTTCAAATCTCGGTGGAACCT	69
16	GlnTAAchr6.trna147	GGTTCCATGGTGTAATGGTtAGCACTCTGGACTttaAATCCAGCGaTCCGAGTTCAAGTCTCGGTGGAACCT	70
17	GlnTAAchr1.trna17	GGTTCCATGGTGTAATGGTgAGCACTCTGGACTttaAATCCAGCGaTCCGAGTTCGAGTCTCGGTGGAACCT	71
18	GlnTAAchr1.trna101	GGTTCCATGGTGTAATGGTaAGCACTCTGGACTttaAATCCAGCGaTCCGAGTTCGAGTCTCGGTGGAACCT	72
19	GlnTAAchr6.trna42	GGTTCCATGGTGTAATGGTtAGCACTCTGGACTttaAATCCGGTAaTCCGAGTTCAAATCTCGGTGGAACCT	73
20	GlnTAAchr6.trna132	GGCCCCATGGTGTAATGGTcAGCACTCTGGACTttaAATCCAGCGaTCCGAGTTCAAATCTCGGTGGGACCC	74
21	GlnTAAchr1.trna23	GGTTCCATGGTGTAATGGTaAGCACTCTGGACTttaAATCCAGCCATCTGAGTTCGAGTCTCTGTGGAACCT	75
22	GlnTAAchr1.trna111	GGTTCCATGGTGTAATGGTgAGCACTTTGGACTttaAATACAGTGATCAGAGTTCAAGTCTCACTGGGACCT	76
23	GlnTAAchr1.trna24	GGTTCCATGgGTTAATGGTgAGCACCCTGGACTttaAATCAAGCGaTCCGAGTTCAAATCTCGGTGGTACCT	77
24	GlnTAAchr19.trna4	GTTTCCATGGTGTAATGGTgAGCACTCTGGACTttaAATCCAGAAATACATTCAAAGAATTAAGAACA	78
25	GlnTAAchr17.trna14	GGTCCCATGGTGTAATGGTtAGCACTCTGGACTttaAATCCAGCGaTCCGAGTTCAAATCTCGGTGGGACCT	79
26	GlnTAAchr6.trna63	GGTCCCATGGTGTAATGGTtAGCACTCTGGACTttaAATCCAGCAaTCCGAGTTCGAATCTCGGTGGGACCT	80
27	GlnTAAchr6.trna175	GGCCCCATGGTGTAATGGTtAGCACTCTGGACTttaAATCCAGCGaTCCGAGTTCAAATCTCGGTGGGACCT	81

28	GlnTAAchr6.trna82	GGTCCCATGGTGTAATGGTtAGCACTCTGGGCTttaAATCCAGCAaTCCGAGTTCGAATCTTGGTGGGACCT	82
29	GlnTAAchr2.trna26	GGCTGTGTACCTCAGTGGGcAAGGGTATGGACTttaAAGCCAGACTaTTTGGGTTCAAATCCCAGCTTGGCCT	83
31	GlnTAAchr8.trna10	GGTACAGTGTTAAAGGGGagaAAAATTGCTGACTttaAATaCAGTAGaCCTAGGTTTGAATCCTGGCTTTACCA	84
1	GluTAAchr1.trna106	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTtAGGATTCGGCGCTttaACCGCCGCGGCCCGGGTTCGATTCCCGGTCAGGGAA	85
2	GluTAAchr1.trna55	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTtAGGATTCGGCGCTttaACCGCCGCGGCCCGGGTTCGATTCCCGGTCAGGAAA	86
5	GluTAAchr2.trna18	TCCCATATGGTCTAGCGGTtAGGATTCCTGGTTttaACCCAGGTGGCCCGGGTTCGACTCCCGGTATGGGAA	87
8	GluTAAchr13.trna2	TCCCACATGGTCTAGCGGTtAGGATTCCTGGTTttaACCCAGGCGGCCCGGGTTCGACTCCCGGTGTGGGAA	88
9	GluTAAchr1.trna5	TCCCTGGTGGTCTAGTGGCtAGGATTCGGCGCTttaACCGCCGCGGCCCGGGTTCGATTCCCGGCCAGGGAA	89
10	GluTAAchr1.trna123	TCCCTGGTGGTCTAGTGGCtAGGATTCGGCGCTttaACCGCCGCGGCCCGGGTTCGATTCCCGGTCAGGGAA	90
1	GluTAGchr1.trna106	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTtAGGATTCGGCGCTctaACCGCCGCGGCCCGGGTTCGATTCCCGGTCAGGGAA	91
5	GluTAGchr2.trna18	TCCCATATGGTCTAGCGGTtAGGATTCCTGGTTctaACCCAGGTGGCCCGGGTTCGACTCCCGGTATGGGAA	92
6	GluTAGchr1.trna92	TCCGTGGTGGTCTAGTGGCtAGGATTCGGCGCTctaACCGCCTGCAGCTCGAGTTCGATTCCTGGTCAGGGAA	93
8	GluTAGchr13.trna2	TCCCACATGGTCTAGCGGTtAGGATTCCTGGTTctaACCCAGGCGGCCCGGGTTCGACTCCCGGTGTGGGAA	94
9	GluTAGchr1.trna5	TCCCTGGTGGTCTAGTGGCtAGGATTCGGCGCTctaACCGCCGCGGCCCGGGTTCGATTCCCGGCCAGGGAA	95
10	GluTAGchr1.trna123	TCCCTGGTGGTCTAGTGGCtAGGATTCGGCGCTctaACCGCCGCGGCCCGGGTTCGATTCCCGGTCAGGGAA	96
14	GluTAGchr1.trna86	TCCCTGGTGGTCTAGTGGCtAGGATTCGGCGCTctaACCGCCTGCAGCTCGAGTTCGATTCCTGGTCAGGGAA	97
7	TyrTAAchr6.trna14	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTttaGttggctgtgtccttagacATCCTTAGGtCGCTGGTTCGAATCCGGCTCGAAGGA	98
8	TyrTAAchr6.trna14／ノイントロン	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTttaGATCCTTAGGtCGCTGGTTCGAATCCGGCTCGAAGGA	99

9	TyrTAA chr7.trna12	GGGGGTATAGCTCAGGGCtAGAGCTtTTTGACTttaGAGCAAGAGGtCCCTGGTTCAAATCCAGGTTCTCCCT	100
10	TyrTAAchr7.trna28	TATAGCTCAGTGGTAGAGCATTTAACTttaGATCAAGAGGtCCCTGGATCAACTCTGGGTG	101
11	TyrTAAchr15.trna6	GTCAGTGTTGCACAACGGTtaAGTGAAGAGGCTttaAACCCAGACTGGATGGGTTCAATTCCCATCTCTGCCG	102
12	TyrTAA chr2.trna2	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTttaGtggatagggcgtggcaATCCTTAGGtCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA	103
13	TyrTAAchr2.trna2/ノイントロン	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTttaGATCCTTAGGtCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA	104
14	TyrTAAchr6.trna16	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTttaGgctcattaagcaaggtATCCTTAGGtCGCTGGTTCGAATCCGGCTCGGAGGA	105
15	TyrTAAchr6.trna16/ノイントロン	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTttaGATCCTTAGGtCGCTGGTTCGAATCCGGCTCGGAGGA	106
16	TyrTAAchr14.trna19	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTttaGattgtatagacatttgcggacATCCTTAGGtCGCTGGTTCGATTCCAGCTCGAAGGA	107
17	TyrTAAchr14.trna19/ノイントロン	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTttaGATCCTTAGGtCGCTGGTTCGATTCCAGCTCGAAGGA	108
18	TyrTAAchr8.trna2	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTttaGctacttcctcagcaggagacATCCTTAGGtCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA	109
19	TyrTAAchr8.trna2/ノイントロン	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTttaGATCCTTAGGtCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA	110
20	TyrTAAchr8.trna3	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTttaGgcgcgcgcccgtggccATCCTTAGGtCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA	111
21	TyrTAAchr8.trna3/ノイントロン	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTttaGATCCTTAGGtCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA	112
22	TyrTAAchr14.trna20	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTttaGcctgtagaaacatttgtggacATCCTTAGGtCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA	113
23	TyrTAAchr14.trna20/ノイントロン	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTttaGATCCTTAGGtCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA	114
24	TyrTAAchr14.trna17	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTttaGattgtacagacatttgcggacATCCTTAGGtCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA	115
25	TyrTAAchr14.trna17/ノイントロン	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTttaGATCCTTAGGtCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA	116
26	TyrTAAchr14.trna5	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTttaGtacttaatgtgtggtcATCCTTAGGtCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA	117

27	TyrTAAchr14.trna5/ノイントロン	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACT ttaGATCCTTAGGtCGCTGGTTCGATTCCGGCTC GAAGGA	118
28	TyrTAAchr6.trna17	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACT ttaGgggtttgaatgtggtcATCCTTAGGtCGCTGGTTC GAATCCGGCTCGGAGGA	119
29	TyrTAAchr6.trna17/ノイントロン	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACT ttaGATCCTTAGGtCGCTGGTTCGAATCCGGCTC GGAGGA	120
30	TyrTAAchr14.trna18	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACT ttaGactgcggaaacgtttgtggacATCCTTAGGtCGCT GGTTCAATTCCGGCTCGAAGGA	121
31	TyrTAAchr14.trna18/ノイントロン	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACT ttaGATCCTTAGGtCGCTGGTTCAATTCCGGCTC GAAGGA	122
32	TyrTAAchr6.trna15	CTTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACT ttaGgttcattaaactaaggcATCCTTAGGtCGCTGGTT CGAATCCGGCTCGAAGGA	123
33	TyrTAAchr6.trna15/ノイントロン	CTTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACT ttaGATCCTTAGGtCGCTGGTTCGAATCCGGCTC GAAGGA	124
34	TyrTAAchr8.trna11	TCTTCAATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACT ttaGgtgcacgcccgtggccATTCTTAGGTGCTGGTTT GATTCCGACTTGGAGAG	125
40	TyrTAAchr7.trna1	GGTAAAATGGCTGAGTAAGCATTAGACTttaAAT CTAAAGaCAGAGGTCAAGGCCTCTTTTTTCCT	126
4	TyrTAGchr1.trna52	GGTAAAATGACTGAGTAAGCATTAGACTctaAAT CTAAAGaCAGAGGTCAAGACCTCTTTTTACCA	127
5	TyrTAGchr11.trna9	GGTAAAATGGCTGAGTAAGCATTAGACTctaAAT CTAAAGaCAGAGGTCAAGGCCTCTTTTTACCA	128
7	TyrTAGchr6.trna14	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACT ctaGttggctgtgtccttagacATCCTTAGGtCGCTGGT TCGAATCCGGCTCGAAGGA	129
8	TyrTAGchr6.trna14/ノイントロン	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACT ctaGATCCTTAGGtCGCTGGTTCGAATCCGGCTC GAAGGA	130
9	TyrTAG chr7.trna12	GGGGGTATAGCTCAGGGCtAGAGCTtTTTGACTc taGAGCAAGAGGtCCCTGGTTCAAATCCAGGTTC TCCCT	131
10	TyrTAGchr7.trna28	TATAGCTCAGTGGTAGAGCATTTAACTctaGATC AAGAGGtCCCTGGATCAACTCTGGGTG	132
11	TyrTAGchr15.trna6	GTCAGTGTTGCACAACGGTtaAGTGAAGAGGCTc taAACCCAGACTGGATGGGTTCAATTCCCATCTC TGCCG	133
12	TyrTAG chr2.trna2	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACT ctaGtggatagggcgtggcaATCCTTAGGtCGCTGGTT CGATTCCGGCTCGAAGGA	134
13	TyrTAGchr2.trna2/ノイントロン	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACT ctaGATCCTTAGGtCGCTGGTTCGATTCCGGCTC GAAGGA	135
14	TyrTAGchr6.trna16	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACT ctaGgctcattaagcaaggtATCCTTAGGtCGCTGGTT CGAATCCGGCTCGGAGGA	136

15	TyrTAGchr6.trna16/ノイントロン	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACT ctaGATCCTTAGGtCGCTGGTTCGAATCCGGCTC GGAGGA	137
16	TyrTAGchr14.trna19	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACT ctaGattgtatagacatttgcggacATCCTTAGGtCGCT GGTTCGATTCCAGCTCGAAGGA	138
17	TyrTAG chr14.trna19/ノイントロン	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACT ctaGATCCTTAGGtCGCTGGTTCGATTCCAGCTC GAAGGA	139
18	TyrTAGchr8.trna2	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACT ctaGctacttcctcagcaggagacATCCTTAGGtCGCTG GTTCGATTCCGGCTCGAAGGA	140
19	TyrTAGchr8.trna2/ノイントロン	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACT ctaGATCCTTAGGtCGCTGGTTCGATTCCGGCTC GAAGGA	141
20	TyrTAGchr8.trna3	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACT ctaGgcgcgcgcccgtggccATCCTTAGGtCGCTGGT TCGATTCCGGCTCGAAGGA	142
21	TyrTAGchr8.trna3/ノイントロン	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACT ctaGATCCTTAGGtCGCTGGTTCGATTCCGGCTC GAAGGA	143
22	TyrTAGchr14.trna20	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACT ctaGcctgtagaaacatttgtggacATCCTTAGGtCGCT GGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA	144
23	TyrTAGchr14.trna20/ノイントロン	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACT ctaGATCCTTAGGtCGCTGGTTCGATTCCGGCTC GAAGGA	145
24	TyrTAGchr14.trna17	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACT ctaGattgtacagacatttgcggacATCCTTAGGtCGCT GGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA	146
25	TyrTAGchr14.trna17/ノイントロン	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACT ctaGATCCTTAGGtCGCTGGTTCGATTCCGGCTC GAAGGA	147
26	TyrTAGchr14.trna5	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACT ctaGtacttaatgtgtggtcATCCTTAGGtCGCTGGTT CGATTCCGGCTCGAAGGA	148
27	TyrTAGchr14.trna5/ノイントロン	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACT ctaGATCCTTAGGtCGCTGGTTCGATTCCGGCTC GAAGGA	149
28	TyrTAGchr6.trna17	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACT ctaGgggtttgaatgtggtcATCCTTAGGtCGCTGGTT CGAATCCGGCTCGGAGGA	150
29	TyrTAGchr6.trna17/ノイントロン	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACT ctaGATCCTTAGGtCGCTGGTTCGAATCCGGCTC GGAGGA	151
30	TyrTAGchr14.trna18	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACT ctaGactgcggaaacgtttgtggacATCCTTAGGtCGCT GGTTCAATTCCGGCTCGAAGGA	152
31	TyrTAGchr14.trna18/ノイントロン	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACT ctaGATCCTTAGGtCGCTGGTTCAATTCCGGCTC GAAGGA	153
32	TyrTAGchr6.trna15	CTTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACT ctaGgttcattaaactaaggcATCCTTAGGtCGCTGGT TCGAATCCGGCTCGAAGGA	154

33	TyrTAGchr6.trna15/ノイントロン	CTTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACT ctaGATCCTTAGGtCGCTGGTTCGAATCCGGCTC GAAGGA	155
34	TyrTAGchr8.trna11	TCTTCAATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACT ctaGgtgcacgcccgtggccATTCTTAGGTGCTGGTTT GATTCCGACTTGGAGAG	156
3	LeuTAAchr6.trna77	GGTAGCGTGGCCGAGCGGTctAAGGCGCTGGAT TttaGCTCCAGTCTCTTCGGGGGCGTGGGTTCAA ATCCCACCGCTGCCA	157
9	LeuTAAchr6.trna100/ノイントロン	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGAC TttaGTTCTGGTCTCCAATGGAGGCGTGGGTTCG AATCCCACTTCTGACA	158
10	LeuTAAchr6.trna73	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGAC TttaGcttggcttcctcgtgttgaggaTTCTGGTCTCCAA TGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA	159
11	LeuTAAchr6.trna73/ノイントロン	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGAC TttaGTTCTGGTCTCCAATGGAGGCGTGGGTTCG AATCCCACTTCTGACA	160
12	LeuTAAchr6.trna141	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGAC TttaGcttactgcttcctgtgttcgggtcTTCTGGTCTCC GTATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGA CA	161
13	LeuTAAchr6.trna141/ノイントロン	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGAC TttaGTTCTGGTCTCCGTATGGAGGCGTGGGTTC GAATCCCACTTCTGACA	162
14	LeuTAAchr6.trna142	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGAC TttaGttgctacttcccaggtttggggcTTCTGGTCTCCG CATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGAC A	163
15	LeuTAAchr6.trna142/ノイントロン	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGAC TttaGTTCTGGTCTCCGCATGGAGGCGTGGGTTC GAATCCCACTTCTGACA	164
16	LeuTAAchr1.trna54	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGAC TttaGgtaagcaccttgcctgcgggctTTCTGGTCTCCG GATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGAC A	165
18	LeuTAAchr11.trna1	GCCTCCTTAGTGCAGTAGGTAGCGCATCAGTCT ttaAATCTGAATGgtCCTGAGTTCAAGCCTCAGAG GGGGCA	166
22	LeuTAAchr6.trna81	ACCAGGATGGCCGAGTGGTtAAGGCGTTGGACT ttaGATCCAATGGACATATGTCCGCGTGGGTTCG AACCCCACTCCTGGTA	167
23	LeuTAAchr6.trna135	ACCGGGATGGCCGAGTGGTtAAGGCGTTGGACT ttaGATCCAATGGGCTGGTGCCCGCGTGGGTTCG AACCCCACTCTCGGTA	168
24	LeuTAAchr11.trna4	ACCAGAATGGCCGAGTGGTtAAGGCGTTGGACT ttaGATCCAATGGATTCATATCCGCGTGGGTTCG AACCCCACTTCTGGTA	169
25	LeuTAAchr6.trna156	ACCGGGATGGCTGAGTGGTtAAGGCGTTGGACT ttaGATCCAATGGACAGGTGTCCGCGTGGGTTCG AGCCCCACTCCCGGTA	170
26	LeuTAAchr6.trna79	ACTCATTTGGCTGAGTGGTtAAGGCATTGGACTt taGATCCAATGGAGTAGTGGCTGTGTGGGTTTAA ACCCCACTACTGGTA	171

27	LeuTAAchr1.trna9	GAGAAAGTcATCGTAGTTACGAAGTTGGCTttaACCCAGTTTtGGGAGGTTCAATTCCTTCCTTTCTCT	172
28	LeuTAAchr11.trna12	ACCAGGATGGCCAAGTAGTTaAAGGCACTGGACTttaGAGCCAATGGACATATGTCTGTGTGGGTTTGAACCCCACTCCTGGTG	173
29	LeuTAAchr17.trna42	GGTAGCGTGGCCGAGCGGTctAAGGCGCTGGATTttaGCTCCAGTCTCTTCGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACCGCTGCCA	174
30	LeuTAAchr14.trna2	GGTAGTGTGGCCGAGCGGTctAAGGCGCTGGATTttaGCTCCAGTCTCTTCGGGGGCGTGGGTTCGAATCCCACCACTGCCA	175
31	LeuTAAchr16.trna27	GGTAGCGTGGCCGAGTGGTctAAGGCGCTGGATTttaGCTCCAGTCATTTCGATGgCGTGGGTTCGAATCCCACCGCTGCCA	176
32	LeuTAAchr14.trna16	GGTAGTGTGGTTGAATGGTctAAGGCACTGAATTttaGCTCCAGTCTCTTTGGGGaCGTGGGTTTAAATCCCACTGCTGCAA	177
1	LeuTAGchr4.trna2	GTTAAGATGGCAGAGCCtGGTaATTGCActaAACTTAAAATTTTATAAtCAGAGGTTCAACTCCTCTTCTTAACA	178
2	LeuTAGnmtchrX.trna2	GTTAAGATGGCAGAGCCcGGCaATTGCActaGACTTAAAACTTTATAAtCAGAGGTTCAACTCCTCTCATTAACA	179
3	LeuTAGchr6.trna77	GGTAGCGTGGCCGAGCGGTctAAGGCGCTGGATTctaGCTCCAGTCTCTTCGGGGGCGTGGGTTCAAATCCCACCGCTGCCA	180
4	LeuTAGchr6.trna127	GGTAGCGTGGCCGAGTGGTctAAGACGCTGGATTctaGCTCCAGTCTCTTCGGGGGCGTGGGTTTGAATCCCACCGCTGCCA	181
7	LeuTAGchr5.trna20	GCCGAGCGGTctAAGGCTCCGGATTctaGCGCCGGTGTCTTCGGAGgCATGGGTTCGAATTCCAC	182
8	LeuTAGchr6.trna100	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGACTctaGctaagcttcctccgcggtggggaTTCTGGTCTCCAATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA	183
9	LeuTAGchr6.trna100/ノイントロン	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGACTctaGTTCTGGTCTCCAATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA	184
10	LeuTAGchr6.trna73	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGACTctaGcttggcttcctcgtgttgaggaTTCTGGTCTCCAATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA	185
11	LeuTAGchr6.trna73/ノイントロン	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGACTctaGTTCTGGTCTCCAATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA	186
12	LeuTAGchr6.trna141	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGACTctaGcttactgcttcctgtgttcgggtcTTCTGGTCTCCGTATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA	187
13	LeuTAGchr6.trna141/ノイントロン	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGACTctaGTTCTGGTCTCCGTATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA	188

14	LeuTAGchr6.trna142	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGAC TctaGttgctacttcccaggtttggggcTTCTGGTCTCCG CATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGAC A	189
15	LeuTAGchr6.trna142/ノイントロン	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGAC TctaGTTCTGGTCTCCGCATGGAGGCGTGGGTTC GAATCCCACTTCTGACA	190
16	LeuTAGchr1.trna54	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGAC TctaGgtaagcaccttgcctgcgggctTTCTGGTCTCCG GATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGAC A	191
18	LeuTAGchr11.trna1	GCCTCCTTAGTGCAGTAGGTAGCGCATCAGTCT ctaAATCTGAATGgtCCTGAGTTCAAGCCTCAGA GGGGGCA	192
22	LeuTAGchr6.trna81	ACCAGGATGGCCGAGTGGTtAAGGCGTTGGACT ctaGATCCAATGGACATATGTCCGCGTGGGTTCG AACCCCACTCCTGGTA	193
23	LeuTAGchr6.trna135	ACCGGGATGGCCGAGTGGTtAAGGCGTTGGACT ctaGATCCAATGGGCTGGTGCCCGCGTGGGTTC GAACCCCACTCTCGGTA	194
24	LeuTAGchr11.trna4	ACCAGAATGGCCGAGTGGTtAAGGCGTTGGACT ctaGATCCAATGGATTCATATCCGCGTGGGTTCG AACCCCACTTCTGGTA	195
25	LeuTAGchr6.trna156	ACCGGGATGGCTGAGTGGTtAAGGCGTTGGACT ctaGATCCAATGGACAGGTGTCCGCGTGGGTTC GAGCCCCACTCCCGGTA	196
26	LeuTAGchr6.trna79	ACTCATTTGGCTGAGTGGTtAAGGCATTGGACTc taGATCCAATGGAGTAGTGGCTGTGTGGGTTTAA ACCCCACTACTGGTA	197
29	LeuTAGchr17.trna42	GGTAGCGTGGCCGAGCGGTctAAGGCGCTGGAT TctaGCTCCAGTCTCTTCGGAGGCGTGGGTTCGA ATCCCACCGCTGCCA	198
30	LeuTAGchr14.trna2	GGTAGTGTGGCCGAGCGGTctAAGGCGCTGGAT TctaGCTCCAGTCTCTTCGGGGGCGTGGGTTCGA ATCCCACCACTGCCA	199
31	LeuTAGchr16.trna27	GGTAGCGTGGCCGAGTGGTctAAGGCGCTGGAT TctaGCTCCAGTCATTTCGATGgCGTGGGTTCGA ATCCCACCGCTGCCA	200
32	LeuTAGchr14.trna16	GGTAGTGTGGTTGAATGGTctAAGGCACTGAATT ctaGCTCCAGTCTCTTTGGGGaCGTGGGTTTAAA TCCCACTGCTGCAA	201
3	LeuTGAchr6.trna77	GGTAGCGTGGCCGAGCGGTctAAGGCGCTGGAT TtcaGCTCCAGTCTCTTCGGGGGCGTGGGTTCAA ATCCCACCGCTGCCA	202
8	LeuTGAchr6.trna100	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGAC TtcaGctaagcttcctccgcggtggggaTTCTGGTCTCC AATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGAC A	203
9	LeuTGAchr6.trna100/ノイントロン	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGAC TtcaGTTCTGGTCTCCAATGGAGGCGTGGGTTCG AATCCCACTTCTGACA	204
10	LeuTGAchr6.trna73	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGAC TtcaGcttggcttcctcgtgttgaggaTTCTGGTCTCCAA TGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA	205

11	LeuTGAchr6.trna73/ノイントロン	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGAC TtcaGTTCTGGTCTCCAATGGAGGCGTGGGTTCG AATCCCACTTCTGACA	206
12	LeuTGAchr6.trna141	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGAC TtcaGcttactgcttcctgtgttcgggtcTTCTGGTCTCC GTATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGA CA	207
13	LeuTGAchr6.trna141/ノイントロン	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGAC TtcaGTTCTGGTCTCCGTATGGAGGCGTGGGTTC GAATCCCACTTCTGACA	208
14	LeuTGAchr6.trna142	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGAC TtcaGttgctacttcccaggtttggggcTTCTGGTCTCCG CATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGAC A	209
15	LeuTGAchr6.trna142/ノイントロン	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGAC TtcaGTTCTGGTCTCCGCATGGAGGCGTGGGTTC GAATCCCACTTCTGACA	210
16	LeuTGAchr1.trna54	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGAC TtcaGgtaagcaccttgcctgcgggctTTCTGGTCTCCG GATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGAC A	211
22	LeuTGAchr6.trna81	ACCAGGATGGCCGAGTGGTtAAGGCGTTGGACT tcaGATCCAATGGACATATGTCCGCGTGGGTTCG AACCCCACTCCTGGTA	212
23	LeuTGAchr6.trna135	ACCGGGATGGCCGAGTGGTtAAGGCGTTGGACT tcaGATCCAATGGGCTGGTGCCCGCGTGGGTTC GAACCCCACTCTCGGTA	213
24	LeuTGAchr11.trna4	ACCAGAATGGCCGAGTGGTtAAGGCGTTGGACT tcaGATCCAATGGATTCATATCCGCGTGGGTTCG AACCCCACTTCTGGTA	214
25	LeuTGAchr6.trna156	ACCGGGATGGCTGAGTGGTtAAGGCGTTGGACT tcaGATCCAATGGACAGGTGTCCGCGTGGGTTC GAGCCCCACTCCCGGTA	215
26	LeuTGAchr6.trna79	ACTCATTTGGCTGAGTGGTtAAGGCATTGGACTt caGATCCAATGGAGTAGTGGCTGTGTGGGTTTA AACCCCACTACTGGTA	216
29	LeuTGAchr17.trna42	GGTAGCGTGGCCGAGCGGTctAAGGCGCTGGAT TtcaGCTCCAGTCTCTTCGGAGGCGTGGGTTCGA ATCCCACCGCTGCCA	217
30	LeuTGAchr14.trna2	GGTAGTGTGGCCGAGCGGTctAAGGCGCTGGAT TtcaGCTCCAGTCTCTTCGGGGGCGTGGGTTCGA ATCCCACCACTGCCA	218
31	LeuTGAchr16.trna27	GGTAGCGTGGCCGAGTGGTctAAGGCGCTGGAT TtcaGCTCCAGTCATTTCGATGgCGTGGGTTCGA ATCCCACCGCTGCCA	219
2	SerTAGnmtchr2.trna7	GAGAAGGTcATAGAGGTtATGGGATTGGCTctaA ACCAGTCTCTGGGGGGTTCGATTCCCTCCTTTT TCA	220
5	SerTAGchr6.trna148	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACT ctaAATCCATTGGGGTTTCCCCGCGCAGGTTCGA ATCCTGCCGACTACG	221
6	SerTAGchr6.trna50	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACT ctaAATCCATTGGGGTTTCCCCACGCAGGTTCGA ATCCTGCCGACTACG	222

7	SerTAGchr6.trna146	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTtAAGGTGATGGACT ctaAACCCATTGGGGTCTCCCCGCGCAGGTTCG AATCCTGCCGACTACG	223
8	SerTAGchr7.trna15	GGGTGTATGGCTCAGGGGTAGAGAATTTGACTc taGATCAAGAGGtCCCTGGTTCAAATCCAGGTGC CCCCT	224
9	SerTAGchr11.trna10	AGTTGTAGCTGAGTGGTtAAGGCAACGAGCTcta AATTCGTTGGTTTCTCTCTgTGCAGGTTTGAATC CTGCTAATTA	225
10	SerTAGchr11.trna8	CAAGAAATTCATAGAGGTTATGGGATTGGCTcta AACCAGTTTcAGGAGGTTCGATTCCTTCCTTTTT GG	226
12	SerTAGchr6.trna34	GCTGTGATGGCCGAGTGGTtAAGGCGTTGGACT ctaAATCCAATGGGGTCTCCCCGCGCAGGTTCAA ATCCTGCTCACAGCG	227
13	SerTAGchr6.trna138	GCTGTGATGGCCGAGTGGTtAAGGTGTTGGACT ctaAATCCAATGGGGGTTCCCCGCGCAGGTTCA AATCCTGCTCACAGCG	228
14	SerTAGchr12.trna2	GTCACGGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGTTGGACT ctaAATCCAATGGGGTTTCCCCGCACAGGTTCGA ATCCTGTTCGTGACG	229
15	SerTAGchr6.trna30	GACGAGGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACT ctaAATCCATTGTGCTCTGCACGCGTGGGTTCGA ATCCCACCCTCGTCG	230
16	SerTAGchr6.trna43	GACGAGGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACT ctaAATCCATTGTGCTCTGCACGCGTGGGTTCGA ATCCCACCTTCGTCG	231
17	SerTAGchr11.trna6	GGCCGGTTAGCTCAGTTGGTtAGAGCGTGCTcta ACTAATGCCAGGGtCGAGGTTTCGATCCCCGTA CGGGCCT	232
18	SerTAGchr6.trna61	GACGAGGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACT ctaAATCCATTGTGCTCTGCACACGTGGGTTCGA ATCCCATCCTCGTCG	233
19	SerTAGchr6.trna176	GAGGCCTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACTc taAATCCATTGTGCTCTGCACGCGTGGGTTCGAA TCCCATCCTCG	234
20	SerTAGchr10.trna2	GCAGCGATGGCCGAGTGGTtAAGGCGTTGGACT ctaAATCCAATGGGGTCTCCCCGCGCAGGTTCG AACCCTGCTCGCTGCG	235
21	SerTAGchr6.trna51	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACT ctaAATCCATTGGGGTTTCCCCGCGCAGGTTCGA ATCCTGCCGACTACG	236
22	SerTAGchr6.trna173	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACT ctaAATCCATTGGGGTCTCCCCGCGCAGGTTCGA ATCCTGCCGACTACG	237
23	SerTAGchr6.trna149	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACT ctaAATCCATTGGGGTTTCCCCGCGCAGGTTCGA ATCCTGTCGGCTACG	238
5	SerTGAchr6.trna148	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACT tcaAATCCATTGGGGTTTCCCCGCGCAGGTTCGA ATCCTGCCGACTACG	239
6	SerTGAchr6.trna50	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACT tcaAATCCATTGGGGTTTCCCCACGCAGGTTCGA ATCCTGCCGACTACG	240

7	SerTGAchr6.trna146	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTtAAGGTGATGGACT tcaAACCCATTGGGGTCTCCCCGCGCAGGTTCG AATCCTGCCGACTACG	241
9	SerTGAchr11.trna10	AGTTGTAGCTGAGTGGTtAAGGCAACGAGCTtca AATTCGTTGGTTTCTCTCTgTGCAGGTTTGAATC CTGCTAATTA	242
11	SerTGAchr17.trna41	GCTGTGATGGCCGAGTGGTtAAGGCGTTGGACT tcaAATCCAATGGGGTCTCCCCGCGCAGGTTCG AATCCTGCTCACAGCG	243
12	SerTGAchr6.trna34	GCTGTGATGGCCGAGTGGTtAAGGCGTTGGACT tcaAATCCAATGGGGTCTCCCCGCGCAGGTTCAA ATCCTGCTCACAGCG	244
13	SerTGAchr6.trna138	GCTGTGATGGCCGAGTGGTtAAGGTGTTGGACTt caAATCCAATGGGGGTTCCCCGCGCAGGTTCAA ATCCTGCTCACAGCG	245
14	SerTGAchr12.trna2	GTCACGGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGTTGGACT tcaAATCCAATGGGGTTTCCCCGCACAGGTTCGA ATCCTGTTCGTGACG	246
15	SerTGAchr6.trna30	GACGAGGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACT tcaAATCCATTGTGCTCTGCACGCGTGGGTTCGA ATCCCACCCTCGTCG	247
16	SerTGAchr6.trna43	GACGAGGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACT tcaAATCCATTGTGCTCTGCACGCGTGGGTTCGA ATCCCACCTTCGTCG	248
17	SerTGAchr11.trna6	GGCCGGTTAGCTCAGTTGGTtAGAGCGTGCTtca ACTAATGCCAGGGtCGAGGTTTCGATCCCCGTA CGGGCCT	249
18	SerTGAchr6.trna61	GACGAGGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACT tcaAATCCATTGTGCTCTGCACACGTGGGTTCGA ATCCCATCCTCGTCG	250
20	SerTGAchr10.trna2	GCAGCGATGGCCGAGTGGTtAAGGCGTTGGACT tcaAATCCAATGGGGTCTCCCCGCGCAGGTTCG AACCCTGCTCGCTGCG	251
21	SerTGAchr6.trna51	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACT tcaAATCCATTGGGGTTTCCCCGCGCAGGTTCGA ATCCTGCCGACTACG	252
22	SerTGAchr6.trna173	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACT tcaAATCCATTGGGGTCTCCCCGCGCAGGTTCGA ATCCTGCCGACTACG	253
23	SerTGAchr6.trna149	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACT tcaAATCCATTGGGGTTTCCCCGCGCAGGTTCGA ATCCTGTCGGCTACG	254
5	SerTAAchr6.trna148	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACT ttaAATCCATTGGGGTTTCCCCGCGCAGGTTCGA ATCCTGCCGACTACG	255
6	SerTAAchr6.trna50	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACT ttaAATCCATTGGGGTTTCCCCACGCAGGTTCGA ATCCTGCCGACTACG	256
7	SerTAAchr6.trna146	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTtAAGGTGATGGACT ttaAACCCATTGGGGTCTCCCCGCGCAGGTTCGA ATCCTGCCGACTACG	257
11	SerTAAchr17.trna41	GCTGTGATGGCCGAGTGGTtAAGGCGTTGGACT ttaAATCCAATGGGGTCTCCCCGCGCAGGTTCGA ATCCTGCTCACAGCG	258

12	SerTAAchr6.trna34	GCTGTGATGGCCGAGTGGTtAAGGCGTTGGACT ttaAATCCAATGGGGTCTCCCCGCGCAGGTTCAA ATCCTGCTCACAGCG	259
13	SerTAAchr6.trna138	GCTGTGATGGCCGAGTGGTtAAGGTGTTGGACTt taAATCCAATGGGGGTTCCCCGCGCAGGTTCAA ATCCTGCTCACAGCG	260
14	SerTAAchr12.trna2	GTCACGGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGTTGGACT ttaAATCCAATGGGGTTTCCCCGCACAGGTTCGA ATCCTGTTCGTGACG	261
15	SerTAAchr6.trna30	GACGAGGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACT ttaAATCCATTGTGCTCTGCACGCGTGGGTTCGA ATCCCACCCTCGTCG	262
16	SerTAAchr6.trna43	GACGAGGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACT ttaAATCCATTGTGCTCTGCACGCGTGGGTTCGA ATCCCACCTTCGTCG	263
17	SerTAAchr11.trna6	GGCCGGTTAGCTCAGTTGGTtAGAGCGTGCTtta ACTAATGCCAGGGtCGAGGTTTCGATCCCCGTA CGGGCCT	264
18	SerTAAchr6.trna61	GACGAGGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACT ttaAATCCATTGTGCTCTGCACACGTGGGTTCGA ATCCCATCCTCGTCG	265
19	SerTAAchr6.trna176	GAGGCCTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACTtt aAATCCATTGTGCTCTGCACGCGTGGGTTCGAA TCCCATCCTCG	266
20	SerTAAchr10.trna2	GCAGCGATGGCCGAGTGGTtAAGGCGTTGGACT ttaAATCCAATGGGGTCTCCCCGCGCAGGTTCGA ACCCTGCTCGCTGCG	267
21	SerTAAchr6.trna51	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACT ttaAATCCATTGGGGTTTCCCCGCGCAGGTTCGA ATCCTGCCGACTACG	268
22	SerTAAchr6.trna173	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACT ttaAATCCATTGGGGTCTCCCCGCGCAGGTTCGA ATCCTGCCGACTACG	269
23	SerTAAchr6.trna149	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACT ttaAATCCATTGGGGTTTCCCCGCGCAGGTTCGA ATCCTGTCGGCTACG	270
1	LysTAAchr19.trna6	GCCCAGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATAAGACT ttaAATCTCAGGGtTGTGGATTCGTGCCCCATGC TGGGTG	271
8	LysTAAchr16.trna31	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGAGACC ttaAATCTCAGGGtCGTGGGTTCGAGCCCCACGT TGGGCG	272
9	LysTAAchr16.trna11	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGGGACT ttaAATCTCAGGGtCGTGGGTTCGAGCCCCACGT TGGGCG	273
10	LysTAAchr16.trna30	GCCCGGCTAGCTCAGTCGATAGAGCATGAGACT ttaAATCTCAGGGtCGTGGGTTCGAGCCGCACGT TGGGCG	274
12	LysTAAchr16.trna6	GCCTGGCTAGCTCAGTCGGCAAAGCATGAGACT ttaAATCTCAGGGtCGTGGGCTCGAGCTCCATGT TGGGCG	275
16	LysTAAchr16.trna23	GCCTGGATAGCTCAGTTGGTAGAGCATCAGACT ttaAATCTGAGGGtCCAGGGTTCAAGTCCCTGTT CAGGCA	276

19	LysTAAchr19.trna8	ACCTGGGTAGCTTAGTTGGTAGAGCATTGGACT ttaAATTTGAGGGcCCAGGTTTCAAGTCCCTGTT TGGGTG	277
22	LysTAAchr2.trna15	GTTGGGGTAACTCAGTTGGTAGAGTAGCAGACT ttaCATCTGAGGGtCCAGGGTTTAAGTCCATGTC CAGGCA	278
23	LysTAAchr11.trna11	GCCTGGATAGCTCAGTTGGTAGAGCATCAGACT ttaAATCTGAGGGtCCAGGGTTCAAGTCCCTGTT CAGGCG	279
24	LysTAAchr6.trna144	GCCTGGATAGCTCAGTCGGTAGAGCATCAGACT ttaAATCTGAGGGtCCAGGGTTCAAGTCCCTGTT CAGGCG	280
25	LysTAAchr11.trna5	GCCCGGATAGCTCAGTCGGTAGAGCATCAGACT ttaAATCTGAGGGtCCGGGGTTCAAGTCCCTGTT CGGGCG	281
26	LysTAAchr6.trna150	GCCTGGGTAGCTCAGTCGGTAGAGCATCAGACT ttaAATCTGAGGGtCCAGGGTTCAAGTCCCTGTC CAGGCG	282
27	LysTAAchr6.trna70	GCCTGGATAGCTCAGTTGGTAGAACATCAGACT ttaAATCTGACGGtGCAGGGTTCAAGTCCCTGTT CAGGCG	283
29	LysTAAchr6.trna53	ACCTGGGTAGCTCAGTAGGTAGAACATCAGACT ttaAATCTGAGGGtCTAGGGTTCAAGTCCCTGTC CAGGCG	284
1	LysTAGchr19.trna6	GCCCAGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATAAGACT ctaAATCTCAGGGtTGTGGATTCGTGCCCCATGC TGGGTG	285
8	LysTAGchr16.trna31	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGAGACC ctaAATCTCAGGGtCGTGGGTTCGAGCCCCACGT TGGGCG	286
9	LysTAGchr16.trna11	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGGGACT ctaAATCTCAGGGtCGTGGGTTCGAGCCCCACGT TGGGCG	287
16	LysTAGchr16.trna23	GCCTGGATAGCTCAGTTGGTAGAGCATCAGACT ctaAATCTGAGGGtCCAGGGTTCAAGTCCCTGTT CAGGCA	288
19	LysTAGchr19.trna8	ACCTGGGTAGCTTAGTTGGTAGAGCATTGGACT ctaAATTTGAGGGcCCAGGTTTCAAGTCCCTGTT TGGGTG	289
23	LysTAGchr11.trna11	GCCTGGATAGCTCAGTTGGTAGAGCATCAGACT ctaAATCTGAGGGtCCAGGGTTCAAGTCCCTGTT CAGGCG	290
24	LysTAGchr6.trna144	GCCTGGATAGCTCAGTCGGTAGAGCATCAGACT ctaAATCTGAGGGtCCAGGGTTCAAGTCCCTGTT CAGGCG	291
25	LysTAGchr11.trna5	GCCCGGATAGCTCAGTCGGTAGAGCATCAGACT ctaAATCTGAGGGtCCGGGGTTCAAGTCCCTGTT CGGGCG	292
26	LysTAGchr6.trna150	GCCTGGGTAGCTCAGTCGGTAGAGCATCAGACT ctaAATCTGAGGGtCCAGGGTTCAAGTCCCTGTC CAGGCG	293
27	LysTAGchr6.trna70	GCCTGGATAGCTCAGTTGGTAGAACATCAGACT ctaAATCTGACGGtGCAGGGTTCAAGTCCCTGTT CAGGCG	294

4	CysTGAchr7.trna8	GGGGGCATAGCTCAGTGGTAGAGCATTTGACTtcaGATCAAGAGGtCCCTGGTTCAAATCCAGGTGCCCCCT	295
6	CysTGAchr7.trna24	GGGGGTATAGCTTAGCGGTAGAGCATTTGACTtcaGATCAAGAGGtCCCCGGTTCAAATCCGGGTGCCCCCT	296
7	CysTGAchr7.trna20	GGGGGTATAGCTTAGGGGTAGAGCATTTGACTtcaGATCAAAAGGtCCCTGGTTCAAATCCAGGTGCCCCTT	297
8	CysTGAchr7.trna29	GGGGGTATAGCTCAGGGGTAGAGCATTTGACTtcaGATCAAGAGGtCCCCAGTTCAAATCTGGGTGCCCCCT	298
10	CysTGAchr7.trna13	GGGGGTATAGCTCAGGGGTAGAGCATTTGACTtcaGATCAAGAGGtCTCTGGTTCAAATCCAGGTGCCCCCT	299
21	CysTGAchr7.trna23	GGGGGTATAGCTCAGGGGTAGAGCACTTGACTtcaGATCAAGAGGtCCCTGGTTCAAATCCAGGTGCCCCCT	300
22	CysTGAchr17.trna27	GGGGGTATAGCTCAGTGGTAGAGCATTTGACTtcaGATCAAGAGGtCCCTGGTTCAAATCCGGGTGCCCCCT	301
23	CysTGAchr15.trna3	GGGGGTATAGCTCAGTGGGTAGAGCATTTGACTtcaGATCAAGAGGtCCCCGGTTCAAATCCGGGTGCCCCCT	302
24	CysTGAchr3.trna6	GGGGGTGTAGCTCAGTGGTAGAGCATTTGACTtcaGATCAAGAGGtCCCTGGTTCAAATCCAGGTGCCCCT	303
25	CysTGAchr14.trna9	GGGGGTATAGCTCAGGGGTAGAGCATTTGACTtcaGATCAAGAGGtCCCCGGTTCAAATCCGGGTGCCCCCT	304
26	CysTGAchr3.trna5	GGGGGTATAGCTCAGGGGTAGAGCATTTGACTtcaGATCAAGAGGtCCCTGGTTCAAATCCAGGTGCCCCT	305

【００３９】

本明細書に開示されるように、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ遺伝子構造はＰＴＣ療法によく適合している。ｔＲＮＡ遺伝子は、内部プロモーターエレメント（図１の箱Ａ及びＢ）の２型ＲＮＡポリメラーゼ（Ｐｏｌ）ＩＩＩの認識によってｔＲＮＡに転写され、ｔＲＮＡは、短い（＜５０ｂｐ）５’隣接領域、及び短い一連のチミジンヌクレオチドからなる３’転写終結エレメント（約４チミジン、Ｔｓ）に隣接している。ほとんどのｔＲＮＡ遺伝子は７２～７６ｂｐｓの長さであり、したがって、ｔＲＮＡ発現カセット全体は約１２５ｂｐｓのみからなることができる（図１）。

【００４０】

最適化され得るＡＣＥ－ｔＲＮＡの転写及び翻訳機能に関与する様々な配列エレメントが存在する。ＲＮＡポリメラーゼＩＩＩは、２型遺伝子内プロモーターエレメントを利用して真核生物におけるｔＲＮＡ遺伝子の発現を駆動する（図１Ａ又は図１Ｂの箱Ａ及びＢ）。箱Ａ及びＢは２型プロモーターの機能に十分であるが、ｔＲＮＡの発現は、遺伝子に対して５’のところに、約５０ｂｐの配列（５’－フランキング配列）によって調節及び増強され得る。ｔＲＮＡの転写は、短いチミジンヌクレオチドのストレッチ（４個以下のチミジン、Ｔｓ）によって終結する。

【００４１】

本明細書に開示されるように、本発明者らは、嚢胞性線維症（「ＣＦ」）をもたらすＣ

ＦＴＲ遺伝子内に存在するものを含む、疾患を引き起こすＰＴＣの効率的かつ持続的な抑制を示す治療薬の開発のために、ミニサークル（ＭＣ）及び閉端ＤＮＡスレッド（ＣＥＤＴ）などの小型ＤＮＡベクターの作製におけるｔＲＮＡの独特の遺伝子特徴を利用した。

【００４２】

このＡＣＥ－ｔＲＮＡ手法は、（１）コドンの特異性、（２）シームレス救済をもたらすＰＴＣのＡＣＥ－ｔＲＮＡ抑制、したがってタンパク質の安定性、折り畳み、輸送及び機能に対する偽の影響を否定する、及び（３）ｐ．Ｇ５４２Ｘ又はｐ．Ｗ１２８２Ｘ　ＣＦ変異を有するＣＦＴＲチャネルなどの、影響を受けたタンパク質の意味ある機能的救済をもたらすＡＣＥ－ｔＲＮＡのこれらのｉｎ　ｖｉｔｒｏ送達を含む、他のリードスルー戦略を超えるいくつかの重要な利点を提供する。予備的結果は、内因性の翻訳終止コドンの最小限の抑制を示し、このことは、翻訳領域に対するわずかな副作用を示唆した。ＡＣＥ－ｔＲＮＡは、複数の細胞型においてＰＴＣの位置が異なるいくつかのｃＤＮＡ遺伝子において、ＰＴＣの抑制に有効であることが示されている。ＡＣＥ－ｔＲＮＡは、既知の有害な作用を伴わずにＰＴＣの抑制において高い効率を示すので、治療薬として使用することができる。

【００４３】

ミニベクター

本発明の一態様は、ＰＴＣ治療を目的とした、抑制ｔＲＮＡをコードする小型ＤＮＡミニベクターの作製及びｉｎ　ｖｉｖｏ送達に関する。最適な治療属性を考慮する場合、ゴールドスタンダードは１回限りの治療である。しかし、ワクチン以外では、これらの治癒はほとんど実現されていない。近年、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９が、ゲノムに永久的な変化を加えることができるために、有望な治療薬としての牽引力を得ている。重要なことに、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９によって行われるものを含むゲノム操作は、幹細胞集団が標的化されない限り、改変された細胞の寿命の間だけ持続する。細胞の代謝回転では、治療薬の再送達が必要であり、治療薬に対する免疫応答を考慮しなければならない。したがって、本発明者らは、反復送達、標的細胞に適合する半減期（例えば、気道上皮細胞）、病原性の低下及び挿入突然変異誘発の低い能力を可能にするために、限定された免疫原性のＡＣＥ－ｔＲＮＡプラットフォームに基づくＰＴＣ治療薬を設計することに着手した。

【００４４】

いくつかの実施形態では、ＤＮＡミニストリング、Ｄｏｇｇｙｂｏｎｅ　ＤＮＡ（商標）又は線状に共有結合的に閉鎖（ＬＣＣ）しているＤＮＡとしても知られている２つの小型ｃＤＮＡベクター形式、ミニサークル（ＭＣ）及び閉端ＤＮＡスレッド（ＣＥＤＴ）を生成し、使用する。例えば、ＡＣＥ－ｔＲＮＡを発現する小型ＤＮＡベクター（ミニベクター）を使用して、細胞、マウス及びブタにおけるｉｎ　ｖｉｖｏのデータセットを得て、ＣＦを含むナンセンス関連障害の治療を開発する。治療的有用性を有するＤＮＡ分子に関する実施形態では、ＤＮＡ鋳型は、典型的には、１つ以上のプロモーター又はエンハンサーエレメントと、目的のＲＮＡ又はタンパク質をコードする遺伝子又は他のコード配列とを含む発現カセットを含む。

【００４５】

本発明のベクターは、典型的には、上記のような発現カセット、すなわち、目的の遺伝子又はタンパク質をコードする配列に動作可能に連結された真核性プロモーター、及び場合により真核生物転写終結配列を含むか、それからなるか、又はそれから本質的になる発現カセットを含む。場合により、発現カセットは、以下に定義されるような最小発現カセット、すなわち、典型的には、（ｉ）細菌複製開始点、（ｉｉ）細菌選択マーカー（典型的には抗生物質耐性遺伝子）及び（ｉｉｉ）非メチル化ＣｐＧモチーフからなる群から選択される１つ以上の細菌又はベクター配列を欠く最小発現カセットであり得る。

【００４６】

好ましくは、本発明のベクターは、そのような不要な配列のいずれも含まない。すなわち、ベクターはそのような不要な配列を含まない。そのような不要な又は無関係な配列（細菌又はベクター配列としても記載される）は、細菌の複製開始点、細菌選択マーカー（

例えば、抗生物質耐性遺伝子）、及び非メチル化ＣｐＧジヌクレオチドを含み得る。そのような配列の欠失は、外来遺伝物質を含有しない「最小」の発現カセットを作り出す。また、上記の種類の細菌配列は、いくつかの治療手法において問題となり得る。例えば、哺乳動物細胞内で、細菌／プラスミドＤＮＡは、目的の遺伝子又はタンパク質の持続的発現が達成され得ないように、クローン化遺伝子をオフにすることができる。また、細菌増殖に使用される抗生物質耐性遺伝子は、ヒトの健康に対するリスクを引き起こす可能性がある。さらに、細菌プラスミド／ベクターＤＮＡは、望ましくない非特異的免疫応答を誘発し得る。細菌ＤＮＡ配列の特定の特徴、典型的にはＣｐＧモチーフとして知られる非メチル化シトシン－グアニンジヌクレオチドの存在もまた、望ましくない免疫応答をもたらし得る。

【００４７】

ミニサークル（ＭＣ）

ＭＣは、遺伝子発現のための最小配列、一般にプロモーター、目的の遺伝子（ＧＯＩ）及び終止配列のみを含有するように構築された小型の環状ベクター（＜５キロベース（ｋｂ））である。小さなサイズであると、細胞進入及び核への細胞内輸送が増加し、送達及び転写バイオアベイラビリティの増加をもたらす。さらに、それらは、コードされたＧＯＩの長期発現のための病原性及びエピソーマルサイレンシングを減少させるプラスミドに一般的に見られる細菌配列を欠いている。肝臓では、ＭＣが１１５日間より長くＧＯＩを発現し、試験終了前に発現の減少はほとんど又は全くないことが実証されている。

【００４８】

気道上皮は、マウスでは気管で６ヶ月、細気管支で１７ヶ月、ヒトでは５０日間の半減期を有する。小型ＤＮＡベクター、主に３ｋｂを超えるサイズのＭＣは、ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）、受容体標的化ポリプレックス、リピソーム、流体力学的注入及びエレクトロポレーションを含むいくつかの方法で、ｉｎ　ｖｉｖｏで広く送達することができる。ＣｐＧが少ないＣＦＴＲ（約７ｋｂ）をコードするＭＣが、ＰＥＩ凝縮及びエアロゾル化によってマウスの肺に送達されており、これにより、送達の５６日後に発現が持続していた。

【００４９】

閉端ＤＮＡスレッド（ＣＥＤＴ）

本明細書で使用される場合、「閉端ＤＮＡスレッド」又は「ＣＥＤＴ」は、閉じた線状のＤＮＡ分子を指す。そのような閉端線状ＤＮＡ分子は、図４Ｂ及び図８Ｄに示されるような一本鎖環状分子として見ることができる。ＣＥＤＴ分子は、典型的には、相補的ＤＮＡ鎖間の塩基ペアリングが存在しないヘアピンループとしても記載される、共有結合的に閉じた末端を含む。ヘアピンループは、相補的ＤＮＡ鎖の末端を結合する。このタイプの構造は、典型的には、閉鎖構造に末端ヌクレオチドを隔離することによって染色体ＤＮＡの喪失又は損傷から保護するために、染色体のテロメア末端に形成される。本明細書に記載されるＣＥＤＴ分子の特定の例では、ヘアピンループは相補的な塩基対ＤＮＡ鎖に隣接し、「ドッグボーン」形の構造（図４Ｂ及び８Ｄに示すようなもの）を形成する。

【００５０】

ＣＥＤＴ分子は、典型的には、共有結合的に閉じた末端、すなわちヘアピン末端を有するＤＮＡの線状二本鎖切片を含む。ヘアピンは、分子が完全に変性した場合に一本鎖環状ＤＮＡ分子が生成されるように、線状二本鎖ＤＮＡ鎖の末端を結合する。通常、本明細書に記載のＣＥＤＴは、配列が本質的に完全に相補的であるが、いくつかの小さな変形又は「ゆらぎ」は構造によって許容され得る。したがって、閉じた線状ＤＮＡ又はＣＥＤＴは、配列が少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％又は９５％相補的、又は少なくとも９６、９７、９８、９９又は１００％相補的であり得る。変性された場合、それは実質的に、互いに隣接する順方向（センス又はプラス）鎖及び逆方向（アンチセンス又はマイナス）鎖の両方を含む環状分子である。これは、相補配列（マイナス及びプラス）が別個の環状の鎖に存在するプラスミドＤＮＡ又はＭＣ　ＤＮＡとは対照的である（図４Ａを図４Ｂと比較）。

【００５１】
ヘアピンの頂点（末端又はターン）の中の塩基は、この点で、ＤＮＡ鎖にかかる配座的ストレスのために、塩基対を形成することができない場合がある。例えば、頂点の部分の頂点にある少なくとも２つの塩基対は塩基対を形成しない可能性があるが、正確な立体配座は、ＤＮＡが維持される条件及びヘアピン周囲の正確な配列に応じて、変動を受けやすい。したがって、２つ又はそれを超える塩基は、それらの相補的な性質にもかかわらず、関与する構造的なゆがみを考慮すると、対を形成することができない場合がある。ヘアピンの長さの中の非相補的塩基の一部「ゆらぎ」は、構造に影響を及ぼさない場合がある。ゆらぎは回文の切れ目であり得るが、配列は相補的なままであり得る。しかし、ヘアピンの配列は完全に自己相補的であることが好ましい。

【００５２】
相補性は、配列（５’から３’）での各ポリヌクレオチドの塩基が、どのようにして、同じ鎖（内部相補配列）又は異なる鎖であり得る逆平行（３’から５’）鎖の相補的な塩基、ＡからＴ（又はＵ）及びＣからＧと水素結合対を形成するかを記載する。この定義は、本発明の任意の実施形態又は実施形態に適用される。ヘアピンの配列は、９０％相補的、好ましくは９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９８％、９９％又は１００％相補的であることが好ましい。

【００５３】
ＣＥＤＴは、天然由来又は人工のいずれかの、二本鎖配列内の任意の配列を含み得る。それは、少なくとも１つのプロセシングより多いプロセシング酵素標的部位を含み得る。そのような標的配列は、ＤＮＡが場合により合成後にさらにプロセシングされることを可能にするためのものである。プロセシング酵素は、その標的部位を認識し、ＤＮＡをプロセシングする酵素である。プロセシング酵素標的配列は、制限酵素の標的配列であってもよい。制限酵素、すなわち制限エンドヌクレアーゼは、標的配列に結合し、特定の点で切断する。プロセシング酵素標的配列は、リコンビナーゼの標的であり得る。リコンビナーゼは、各リコンビナーゼに特異的な短い（３０～４０ヌクレオチド）標的部位配列間のＤＮＡ交換反応を指向的に触媒する。リコンビナーゼの例としては、Ｃｒｅリコンビナーゼ（標的配列としてｌｏｘＰを有する）及びＦＬＰリコンビナーゼ（短いフリッパーゼ認識標的（ＦＲＴ）部位を有する）が挙げられる。プロセシング酵素標的配列は、ｐｈｉＣ３１インテグラーゼなどの部位特異的インテグラーゼの標的であり得る。

【００５４】
プロセシング酵素標的配列は、ＣＥＤＴがＲＮＡ合成の鋳型になるように、ＲＮＡポリメラーゼの標的配列であってもよい。この場合、プロセシング酵素標的化部位はプロモーター、好ましくは真核性プロモーターである。その目的のために、ＣＥＤＴは、目的のＲＮＡ（例えば、ｔＲＮＡ）又はタンパク質を封入する配列に動作可能に連結された真核性プロモーター、及び場合により真核生物転写終結配列を含むか、それからなるか、又はそれから本質的になる発現カセットを含み得る。「プロモーター」は、ポリヌクレオチドの転写を開始及び調節するヌクレオチド配列である。「動作可能に連結された」は、そのように記載された成分がそれらの通常の機能を実行するように構成されるエレメントの配置を指す。したがって、核酸配列に動作可能に連結された所与のプロモーターは、適切な酵素が存在する場合、その配列の発現を行うことができる。「動作可能に連結された」という用語は、転写複合体によるプロモーターエレメントの認識時に目的のＤＮＡ配列の転写の開始を可能にするプロモーターエレメント及び目的のＤＮＡ配列のいずれかの間隔又は配向を包含することを意図している。

【００５５】
ＣＥＤＴ又はＭＣは、任意の適切な長さであってもよい。特に、ＣＥＤＴ又はＭＣは最大４ｋｂであり得る。好ましくは、ＤＮＡ鋳型は、１００ｂｐ～２ｋｂ、２００ｂｐ～１ｋｂ、最も好ましくは２００ｂｐ～８００ｂｐであり得る。２００ｂｐ以上のＭＣ及びＣＥＤＴは、複数のＡＣＥ－ｔＲＮＡカセットコピーを収容することができる。これにより、各ＭＣ及びＣＥＤＴユニットからのより高次のＡＣＥ－ｔＲＮＡ発現が可能になり得る

。各ミニベクターからのＡＣＥ－ｔＲＮＡの複数のコピーを有することにより、各ユニットに１つ以上の配列を含めることが可能になる。例えば、ロイシンＡＣＥ－ｔＲＮＡ及びトリプトファンＡＣＥ－ｔＲＮＡは、１つのＭＣ又はＣＥＤＴミニベクターに含めることができる。これらのＡＣＥ－ｔＲＮＡの両方は、異なるｔＲＮＡアミノアシルシンセターゼを利用するので、突然変異Ｗ１２８２Ｘ－ＣＦＴＲを救済又は抑制する際に嚢胞性線維症に有効であり、抑制活性を有意に増強することができる。

【００５６】

閉じたＤＮＡ分子は、治療剤、すなわち、ｉｎ　ｖｉｖｏで遺伝子産物を発現するために使用することができるＤＮＡ医薬としての有用性を有する。これは、それらの共有結合的に閉じた構造がエキソヌクレアーゼなどの酵素による攻撃を防ぎ、露出したＤＮＡ末端を有する「開放型」ＤＮＡ分子と比較して、遺伝子発現の安定性及び寿命が向上するためである。線状二本鎖開放型カセットは、宿主組織に導入した場合、遺伝子発現に関して非効率的であることが実証されている。これは、細胞外空間におけるエキソヌクレアーゼの作用によるカセットの不安定性に起因するとされてきた。

【００５７】

共有結合的に閉じた構造の内側のＤＮＡ末端の配列決定には、他の利点もある。ＤＮＡ末端がゲノムＤＮＡと一体化するのが妨げられるため、閉じた線状ＤＮＡ分子の安全性が向上する。また、閉じた線状構造は、宿主細胞の内側のＤＮＡ分子のコンカテマー化を防ぎ、したがって遺伝子産物の発現レベルをより高い感度で調節することができる。

【００５８】

ＣＥＤＴは、ＭＣと同じ利点すべてを有するが、共有結合的に閉じた末端を有する線状ＤＮＡカセットトポロジを示す。ＣＥＤＴは、その製造の容易さ、送達効率、低い病原性及び持続的発現のために、ワクチンを生成するための抗原の発現のためにｉｎ　ｖｉｖｏで使用されてきた。ＣＥＤＴは、ＧＭＰグレードで高い存在量で容易に完全に合成的に作製することができ、したがって迅速な設計及び製造を可能にするので、ＭＣを越えるいくつかの利点を有する。

【００５９】

ＣＥＤＴは、当技術分野で公知の方法を使用して作製することができる。ＣＥＤＴのセルフリー生産は、米国特許第９４９９８４７号明細書、米国特許第２０１９０１８５９２４号明細書、国際公開第２０１０／０８６６２６号パンフレット及び国際公開第２０１２／０１７２１０号パンフレットに記載されており、これらは参照により本明細書に組み込まれる。本方法は、ＤＮＡ鋳型を使用した各末端で共有結合的に閉じた線状二本鎖ＤＮＡ（閉じた線状ＤＮＡ）の生成に関し、ＤＮＡ鋳型は少なくとも１つのプロテロメラーゼ認識配列を含み、鋳型は少なくとも１つのＤＮＡポリメラーゼを使用して増幅され、プロテロメラーゼ酵素を使用して処理されて、閉じた線状ＤＮＡを生成する。閉じた線状ＤＮＡの閉端はそれぞれ、プロテロメラーゼ認識配列の一部を含む。閉じた線状ＤＮＡを鋳型として使用することは、列挙された用途に記載されており、そのような鋳型の使用は、製造中に最小限の量の試薬が浪費されることを意味するので有利である。これらの方法によって産生されるＣＥＤＴ分子は、線状であり、二本鎖であり、プロテロメラーゼ認識配列の一部によって各末端で共有結合的に閉じられている。この線状状二本鎖ＤＮＡ分子は、１つ以上のステムループモチーフを含むことができる。

【００６０】

本明細書に開示されるように、一例では、本開示は、電場を使用した、ＭＣ及びＣＥＤＴミニベクターなどのＡＣＥ－ｔＲＮＡ発現ミニベクターの肺への送達効率、並びにｉｎ　ｖｉｔｒｏ及びｉｎ　ｖｉｖｏでの気道上皮細胞におけるＰＴＣのＡＣＥ－ｔＲＮＡ抑制の有効性及び持続性を評価する。ＡＣＥ－ｔＲＮＡ遺伝子の小さなサイズ（約８０ｎｔ）を利用して、本発明者らは、知る限りこれまでで最小の治療用発現ベクターの作製に成功した。

【００６１】

有効なＡＣＥ－ｔＲＮＡのライブラリーが手元にあると、ｉｎ　ｖｉｖｏで最も有効な

送達方法を判定することができる。本明細書に開示されるように、３つの最も一般的なＣＦナンセンス突然変異（ｐ．Ｇ５４２Ｘ、ｐ．Ｗ１２８２Ｘ及びｐ．Ｒ５５３Ｘ）を標的とするために、ＭＣ及びＣＥＤＴにおいてＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Trp}_{UGA}$、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Leu}_{UGA}$、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Gly}_{UGA}$及びＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Arg}_{UGA}$をコードすることができる。ＭＣ及びＣＥＤＴ技術は、送達可能なプラットフォームとして、ここで実証されるナノ粒子、タンパク質複合体、及び電場を含む多数の送達方法と対にすることができる。ＭＣミニベクター及びＣＥＤＴミニベクターは、それらを遺伝子治療に魅力的なものにするいくつかの特徴、すなわち（１）細胞内輸送中の障害を克服することを可能にし、したがってバイオアベイラビリティを改善する、劇的に減少したサイズ、（２）より高い細胞進入効率、（３）転写活性構造の保有、及び（４）ゲノムインテグレーションを伴わない持続的な導入遺伝子発現を有する：。

【００６２】

設計構造

ミニベクター配列の設計は、発現効率及び持続性に重要な意味を有する。本明細書に開示されるように、本発明のミニベクター、ＭＣ又はＣＥＤＴのいずれかは、本明細書に記載されるようなｔＲＮＡ発現カセットに加えて、いくつかの有利なエレメント及び／又は破壊を場合により含む。例としては、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ－バーコード化配列（ＡＢＳ）、転写増強５’リーダー配列（ＴＥＬＳ）及びＤＮＡ核標的配列（ＤＴＳ）が挙げられる。

【００６３】

１つの重要な特徴は、ＣｐＧ配列含有量及びそのメチル化である。ＤＮＡメチル化及び転写に対するその影響は、広く研究されている。メチル化の欠如は、メチル化されたＣｐＧアイランドが不活性Ｘ染色体上及び親インプリント遺伝子のサイレンシングされた対立遺伝子に見出される活性転写のための前提条件である。さらに、ＤＮＡのｉｎ　ｖｉｔｒｏでのメチル化は遺伝子発現を阻害することが示されている。ＡＣＥ－ｔＲＮＡ遺伝子は非常に小さく、平均して４つのＣｐＧ配列しか含まないので、本発明者らは、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ発現の持続性を高めるために、自らのミニベクターを、ＣｐＧ配列をほとんど完全に欠いているように設計することができた。さらに、５００ｂｐｓであっても、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ遺伝子は、全ペイロードのほんの一部だけ消費して、３’ＡＢＳ、ＴＥＬＳ、及びＤＴＳを含む選択肢を残す。ＡＢＳ、ＴＥＬＳ及びＤＴＳの実施態様は、以下の実施例６及び７に記載されている。

【００６４】

ＰＴＣを効率的に抑制する能力は、ＰＴＣが存在する遺伝的環境によって意義深く支配される。したがって、ミニベクターから発現されるＡＣＥ－ｔＲＮＡの、培養中のヒト気道上皮などの標的細胞におけるＰＴＣを抑制する効率を判定することが不可欠である。その目的のために、転写活性を増加させ、ミニベクターを核に標的化することによって、ＴＥＬＳ及びＤＴＳを使用して、ｉｎ　ｖｉｖｏでのＡＣＥ－ｔＲＮＡ発現を増強することができる。

【００６５】

ＴＥＬＳ

ミニベクターからのＡＣＥ－ｔＲＮＡの発現の増加は、ＡＣＥ－ｔＲＮＡの治療有効性に対する送達効率の負荷を減少させ得る。真核生物ｔＲＮＡ遺伝子の転写が遺伝子内プロモーターエレメント（箱Ａ及びＢ）によって指令されることは十分に確立されているが、５’フランキング配列領域も、おそらくｐｏｌＩＩＩ転写複合体との相互作用を介してｔＲＮＡ転写を顕著に調節する。そのような領域は、転写促進５’リーダー配列（ＴＥＬＳ）として使用することができる。いくつかの例では、同一のコード配列を有するｔＲＮＡ遺伝子は、転写を増加又は減少させる異なる５’フランキング配列を有する。さらに、５’フランキング配列は、組織発現特異性を調節すると考えられる。その目的のために、ＴＥＬＳとしてヒトｔＲＮＡ　Ｔｙｒ５’リーダー配列（５’－ＡＧＣＧＣＴＣＣＧＧＴＴＴＴＴＣＴＧＴＧＣＴＧＡＡＣＣＴＣＡＧＧＧＧＡＣＧＣＣＧＡＣＡＣＡＣＧＴＡＣＡＣＧＴＣ－３’、配列番号３０６）を使用することができる。

【００６６】
図７Ａは、５’リーダー配列を含めると、Ｗ１２８２Ｘ－ＣＦＴＲに対するＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Trp}_{UGA}$の抑制活性が５倍超増加することを示す。約４１６個のｔＲＮＡ遺伝子がヒトゲノムにおいてアノテーションされている（ｔＲＮＡｓｃａｎ－ＳＥ　ｄａｔａｂａｓｅ，Ｌｏｗｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ　２５，９５５－９６４，（１９９７））。４１６個すべてのｔＲＮＡ遺伝子のｔＲＮＡ５’フランキング配列（１ｋｂ）を、本発明のＴＥＬＳとして使用することができる。
【００６７】
ＤＴＳ
ＤＮＡ核標的配列又はＤＴＳは、そうでなければ細胞質に局在化したＤＮＡの核内導入を支えるのに必要なＤＮＡ配列又はＤＮＡ配列の反復である。ウイルスのプロモーター又は哺乳動物遺伝子のプロモーターに天然に存在するＤＮＡ配列は、非分裂細胞で発現され得る発現ベクターに導入遺伝子を含むＤＮＡを組み込むことによって、それらのＤＮＡの核侵入をもたらす。ＤＴＳの非限定的な例は、エンハンサーリピート（５’－ａｔｇｃｔｔｇｃａ　ｔａｃｔｔｃｔｇｃｃ　ｔｇｃｔｇｇｇｇａｇ　ｃｃｔｇｇｇｇａｃｔ　ｔｔｃｃａｃａｃｃｃ　ｔａａｃｔｇａｃａｃ　ａｃａｔｔｃｃａｃａ　ｇｃｔｇｇｔｔｇｇｔ　ａｃｃｔｇｃａ－３’、配列番号３０７）を含有するＳＶ４０ゲノムからのＤＮＡ配列である。このＳＶ４０　ＤＴＳは、プラスミドＤＮＡの配列特異的ＤＮＡ核導入を支えることが示されている（例えば、Ｄｅａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｅｘｐ．Ｃｅｌｌ　Ｒｅｓ．２５３：７１３－７２２，１９９９）。本明細書に開示されているように、以下の例に記載されている方法で、追加のＤＴＳを取得することができる。
【００６８】
バーコード
本発明に記載されるミニベクターは、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ転写活性の直接的な測定を可能にする１つ又は複数のさらなるエレメントを含み得る。一例はバーコード配列である。
【００６９】
ｍＲＮＡ、ノンコーディングＲＮＡ、マイクロＲＮＡ、核内低分子／核小体ＲＮＡ及びｒＲＮＡ^{16S}を分析するために、標準的なＲＮＡシーケンシング（ＲＮＡ－ｓｅｑ）法が使用されている。しかし、ｔＲＮＡは、これらの標準的なＲＮＡ－ｓｅｑ法を実施することができない唯一の小型の細胞ＲＮＡのクラスである。直接的な方法を妨げる重大な障害には、ポリメラーゼ増幅に干渉する転写後修飾の存在、及びアダプターライゲーションをブロックする安定で広範な二次構造が含まれる。最近、これらの問題を回避するためにいくつかの方法が開発されているが、これらの手法は比較的複雑であり、コストが非常に高い。さらに、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ配列は、１つ又は複数の内因性のｔＲＮＡと１つのヌクレオチドのみが異なるので、ノーザンブロット、マイクロアレイ及び断片化ＲＮＡ－ｓｅｑは、外因性治療用ＡＣＥ－ｔＲＮＡ及び内因性のｔＲＮＡの発現レベルを識別することができない。いくつかの最近の研究では、ｔＲＮＡをプロモーターとして利用して、ｔＲＮＡ：ｓｇＲＮＡ（Ｃａｓ９単一ガイドＲＮＡ）融合転写物の高い発現レベルを駆動し、次いで、それを内因性のｔＲＮａｓｅ　Ｚによって効率的かつ正確に切断する。
【００７０】
本発明のミニベクターは、１つ以上のＡＣＥ－ｔＲＮＡ－バーコード化配列又はＡＢＳを含み得る。ＡＢＳは、ベクターがＡＣＥ－ｔＲＮＡ及びバーコードの融合転写物をコードするように、ＡＣＥ－ｔＲＮＡをコードする配列の３’又は５’にあり得る。一例では、バーコード配列は３’末端にあり、ミニベクターはＡＣＥ－ｔＲＮＡ：バーコード融合転写物をコードし、バーコード配列は内因性のｔＲＮａｓｅ　Ｚによって切断され、ｑＰＣＲ定量化を可能にして相対的なＡＣＥ－ｔＲＮＡ発現を判定しながら、完全に機能的なＡＣＥ－ｔＲＮＡを得ることができる（図１０Ａ）。以下の実施例１１に示すように、本発明者らは、マウスのゲノム配列と相同性のないランダムな２００ｂｐのバーコード配列を設計した。ＮＬｕｃ－ＵＧＡを安定して発現する１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞にトランスフェクトされた場合、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Arg}_{UGA}$－及びＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Trp}_{UGA}$－バ

ーコードは、ｑＰＣＲによってモニターした場合にロバストな発現を示すが、非バーコード化ＡＣＥ－ｔＲＮＡは意義あるシグナルを与えなかった（図１０Ｂ）。１つの場合では、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Arg}_{UGA}$の抑制活性は、３’バーコード配列の存在によって妨げられ得るが、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ活性の欠損は、バーコード配列に対してプローブ探査されるノーザンブロットによって判定することができる３’プロセシングが不十分であるためである可能性が最も高い。そのような欠損は、その配列がバーコード又は改変させたバーコードリンカー配列としても作用して３’プロセシングを改善することができる３’肝炎デルタウイルス（ＨＤＶ）自己切断リボザイムを使用することによって、修正することができる。３’リボザイムの組み込みは、改善されたＡＣＥ－ｔＲＮＡの３’プロセシングをもたらし、それらのＰＴＣ抑制活性を増加させ得る。さらに、ＡＢＳ技術は、ＮＬｕｃ　ＰＴＣレポーターを補完するためのＡＣＥ－ｔＲＮＡ発現の測定を可能にする（図９）。

【００７１】

本願の任意の実施形態では、本明細書に記載の核酸分子又はベクターは、場合により１つ以上のレポーター分子を含むことができる。レポーターは、細胞における発現が細胞に検出可能な形質を付与する分子である。様々な実施形態では、レポーターとしては、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）、β－ガラクトシルトランスフェラーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、ＮａｎｏＬｕｃ（登録商標）、アルカリホスファターゼ、並びに緑色蛍光性タンパク質（例えば、ＧＦＰ、ＴａｇＧＦＰ、Ｔ－Ｓａｐｐｈｉｒｅ、Ａｚａｍｉ　Ｇｒｅｅｎ、Ｅｍｅｒａｌｄ、ｍＷａｓａｂｉ、ｍＣｌｏｖｅｒ３）、赤色蛍光性タンパク質（例えば、ｔｄＴｏｍａｔｏ、ｍＲＦＰｌ、ＪＲｅｄ、ＨｃＲｅｄｌ、ＡｓＲｅｄ２、ＡＱ１４３、ｍＣｈｅｒｒｙ、ｍＲｕｂｙ３、ｍＰｌｕｍ）、黄色蛍光性タンパク質（例えば、ＥＹＦＰ、ｍＢａｎａｎａ、ｍＣｉｔｒｉｎｅ、ＰｈｉＹＦＰ、ＴａｇＹＦＰ、Ｔｏｐａｚ、Ｖｅｎｕｓ）、橙色蛍光性タンパク質（例えば、ＤｓＲｅｄ、Ｔｏｍａｔｏ、Ｋｕｓａｂｒｉａ　Ｏｒａｎｇｅ、ｍＯｒａｎｇｅ、ｍＴａｎｇｅｒｉｎｅ、ＴａｇＲＦＰ）、シアン蛍光性タンパク質（例えば、ＣＦＰ、ｍＴＦＰｌ、Ｃｅｒｕｌｅａｎ、ＣｙＰｅｔ、ＡｍＣｙａｎｌ）、青色蛍光性タンパク質（例えば、Ａｚｕｒｉｔｅ、ｍｔａｇＢＦＰ２、ＥＢＦＰ、ＥＢＦＰ２、Ｙ６６Ｈ）、近赤外蛍光性タンパク質（例えば、ｉＲＦＰ６７０、ｉＲＦＰ６８２、ｉＲＦＰ７０２、ｉＲＦＰ７１３及びｉＲＦＰ７２０）、赤外蛍光性タンパク質（例えば、ＩＦＰ１．４）及び光活性化可能蛍光性タンパク質（例えば、Ｋａｅｄｅ、Ｅｏｓ、ＩｒｉｓＦＰ、ＰＳ－ＣＦＰ）を含むがこれらに限定されない蛍光性タンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。

【００７２】

ＡＣＥ－ｔＲＮＡをコードする核酸の細胞への導入

外因性遺伝物質（例えば、１つ又は複数の治療用ＡＣＥ－ｔＲＮＡをコードする核酸又はミニベクター）を、遺伝子導入法、例えばトランスフェクション又は形質導入によってｉｎ　ｖｉｖｏで目的の標的細胞に導入して、遺伝子改変細胞をもたらすことができる。様々な発現ベクター（すなわち、標的細胞への外因性遺伝物質の送達を促進するためのビヒクル）が当業者に公知である。本明細書で使用される場合、「外因性遺伝物質」は、天然又は合成のいずれかであり、細胞に天然には見られない核酸又はオリゴヌクレオチド、又はそれが細胞において天然に見出される場合、細胞によって生物学的に意味のあるレベルで転写又は発現されない核酸又はオリゴヌクレオチドを指す。したがって、「外因性遺伝物質」には、例えば、ｔＲＮＡに転写され得る天然に存在しない核酸が含まれる。

【００７３】

本明細書で使用されるとき、「細胞のトランスフェクション」とは、細胞によって、付加された核酸（ＤＮＡ、ＲＮＡ、又はそれらのハイブリッド）の組み込みによる新しい遺伝物質を獲得されることを指す。したがって、トランスフェクションとは、物理的又は化学的方法を用いた細胞への核酸の導入を指す。リン酸カルシウム核酸共沈殿、ストロンチウムホスフェート核酸共沈殿、ＤＥＡＥ－デキストラン、エレクトロポレーション、カチオン性リポソーム媒介トランスフェクション及びタングステン粒子促進微小粒子ガンを含

むいくつかのトランスフェクション技術が、当業者に公知である。対照的に、「細胞の形質導入」は、ＤＮＡ又はＲＮＡウイルスを使用して核酸を細胞に移入するプロセスを指す。核酸を細胞に移入するためのＲＮＡウイルス（すなわち、レトロウイルス）は、本明細書では形質導入キメラレトロウイルスと呼ばれる。レトロウイルス内に含まれる外因性遺伝物質は、形質導入された細胞のゲノムに組み込まれる。キメラＤＮＡウイルス（例えば、治療剤をコードするｃＤＮＡを有するアデノウイルス）で形質導入された細胞は、そのゲノムに組み込まれた外因性遺伝物質を有しないが、細胞内で染色体外に保持された外因性遺伝物質を発現することができる。

【００７４】

典型的には、外因性遺伝物質は、新しい遺伝子の転写を制御するためのプロモーターと共に、異種遺伝子（治療用ＲＮＡ又はタンパク質をコードする）を含む。プロモーターは、特徴的には、転写を開始するのに必要な特定のヌクレオチド配列を有する。場合により、外因性遺伝物質は、所望の遺伝子転写活性を得るために必要な追加の配列（すなわち、エンハンサー）をさらに含む。この論述の目的では、「エンハンサー」は、プロモーターによって指示される基底転写レベルを変化させるために（シスで）コード配列と近接するように作用する、単純に任意の非翻訳ＤＮＡ配列である。外因性遺伝物質は、プロモーター及びコード配列がコード配列の転写を可能にするように動作可能に連結されたように、プロモーターのすぐ下流の細胞のゲノムに導入され得る。レトロウイルス発現ベクターは、挿入された外因性遺伝子の転写を制御するための外因性プロモーターのエレメントを含み得る。そのような外因性プロモーターには、構成的プロモーター及び誘導性プロモーターの両方が含まれる。

【００７５】

天然に存在する構成的プロモーターは、必須の細胞の機能の発現を制御する。その結果、構成的プロモーターの制御下にある遺伝子は、細胞が増殖するあらゆる条件下で発現される。例示的な構成的プロモーターには、特定の構成的又は「ハウスキーピング」機能をコードする以下の遺伝子のためのプロモーターが含まれる、すなわちヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ（ＨＰＲＴ）、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（ＤＨＦＲ）、アデノシンデアミナーゼ、ホスホグリセロールキナーゼ（ＰＧＫ）、ピルビン酸キナーゼ、ホスホグリセロールムターゼ、アクチンプロモーター、ユビキチン、伸長因子－１、及び当業者に公知の他の構成的プロモーターである。さらに、多くのウイルスプロモーターは、真核細胞において構成的に機能する。これらには、ＳＶ４０の早期プロモーター及び後期プロモーター、数ある中でも、モロニー白血病ウイルス及び他のレトロウイルスの長末端反復配列（ＬＴＲ）、単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼプロモーターが含まれる。したがって、上記の構成的プロモーターのいずれかを使用して、異種遺伝子インサートの転写を制御することができる。

【００７６】

誘導性プロモーターの制御下にある遺伝子は、誘導剤の存在下でのみ又はより高度に発現される（例えば、メタロチオネインプロモーターの制御下での転写は、特定の金属イオンの存在下で大きく増加する）。誘導性プロモーターには、それらの誘導因子が結合したときに転写を刺激する応答性エレメント（ＲＥ）が含まれる。例えば、血清因子、ステロイドホルモン、レチノイン酸及びサイクリックＡＭＰのＲＥがある。誘導性応答を得るために、特定のＲＥを含有するプロモーターを選択することができ、場合によっては、ＲＥ自体を異なるプロモーターに結合させ、それによって組換え遺伝子に誘導能を付与することができる。したがって、適切なプロモーターを選択することによって（構成的対誘導的、強対弱）、遺伝子改変細胞において治療剤の発現の存在及びレベルの両方を制御することが可能である。治療剤をコードする遺伝子が誘導性プロモーターの制御下にある場合、ｉｎ　ｓｉｔｕでの治療剤の送達は、遺伝子改変された細胞を、治療剤の転写を可能にする条件にｉｎ　ｓｉｔｕで曝露することによって、例えば薬剤の転写を制御する誘導性プロモーターの特異的誘導因子の注入によって、誘発される。例えば、メタロチオネインプロモーターの制御下にある遺伝子によってコードされる治療剤の遺伝子改変細胞によるｉ

ｎ　ｓｉｔｕ発現は、遺伝子改変細胞を適切な（すなわち、誘導する）金属イオンを含む溶液とｉｎ　ｓｉｔｕで接触させることによって、増強される。

【００７７】

したがって、ｉｎ　ｓｉｔｕで送達される治療剤の量は、（１）挿入された遺伝子の転写を指示するために使用されるプロモーターの性質、（すなわち、プロモーターが構成的であるか誘導性であるか、強いか弱いか）、（２）細胞に挿入される外因性遺伝子のコピー数、（３）患者に投与（例えば、移植）される形質導入／トランスフェクトされる細胞の数、（４）インプラントのサイズ（例えば、グラフト又はカプセル化発現システム）、（５）インプラント数、（６）形質導入／トランスフェクトされた細胞又はインプラントが所定の位置に残される時間の長さ、（７）遺伝子改変細胞による治療剤の産生速度などの因子を制御することによって調節される。特定の治療剤の治療有効用量の送達のためのこれらの因子の選択及び最適化は、上段に開示された因子及び患者の臨床プロファイルを考慮して、過度の実験なしに当業者の範囲内であると考えられる。

【００７８】

少なくとも１つのプロモーター、及び治療剤をコードする少なくとも１つの異種核酸に加えて、発現ベクターは、発現ベクターでトランスフェクト又は形質導入された細胞の選択を容易にするための選択遺伝子、例えばネオマイシン耐性遺伝子を含み得る。あるいは、細胞は、２つ以上の発現ベクター、治療剤をコードする遺伝子を含む少なくとも１つのベクター、選択遺伝子を含む他のベクターでトランスフェクトされる。適切なプロモーター、エンハンサー、選択遺伝子及び／又はシグナル配列の選択は、過度の実験なしに、当業者の範囲内であると考えられる。

【００７９】

本発明のＡＣＥ－ｔＲＮＡコンストラクトは、任意のタイプの標的細胞又は宿主細胞に挿入することができる。発現ベクターに関連して、ベクターは、当技術分野における任意の方法によって宿主細胞、例えば哺乳動物、細菌、酵母又は昆虫細胞に容易に導入することができる。例えば、発現ベクターは、物理的、化学的又は生物学的手段によって宿主細胞に移入することができる。

【００８０】

ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための物理的方法としては、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクション、パーティクルガン、マイクロインジェクション、エレクトロポレーションなどが挙げられる。ベクター及び／又は外因性核酸を含む細胞を産生する方法は、当技術分野で周知である。例えば、Ｓｅｅ，ｆｏｒ　ｅｘａｍｐｌｅ，Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．を参照されたい（２０１２，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ）。

【００８１】

目的のポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための生物学的方法には、ＤＮＡ及びＲＮＡベクターの使用が含まれる。ウイルスベクター、特にレトロウイルスベクターは、哺乳動物、例えばヒトの細胞に遺伝子を挿入するための最も広く使用されている方法となっている。他のウイルスベクターは、レンチウイルス、ポックスウイルス、単純ヘルペスウイルスＩ、アデノウイルス及びアデノ随伴ウイルスなどに由来し得る。例えば、米国特許第５，３５０，６７４号明細書、及び同第５，５８５，３６２号明細書を参照されたい。

【００８２】

ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための化学的手段としては、高分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、ビーズなどのコロイド分散体、及び水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセル、及びリポソームを含む脂質ベースの系が挙げられる。ｉｎ　ｖｉｔｒｏ及びｉｎ　ｖｉｖｏで送達ビヒクルとして使用するための例示的なコロイド系は、リポソーム（例えば、人工膜小胞）である。

【００８３】

転写因子Ａミトコンドリア（ＴＦＡＭ）などのＤＮＡ結合タンパク質の添加を使用して

、ＤＮＡを凝縮し、電荷を遮蔽することができる。小さいサイズ及びコンパクトな形状のために、ＤＮＡ：タンパク質（ＤＮＰ）複合体は、次いで、細胞透過性ペプチド、ＰＥＧ誘導体、リポソーム又はエレクトロポレーションによって細胞に送達され得る。いくつかの例では、ＤＮＡ結合タンパク質は、ＤＮＡミニベクターが転写される細胞質から核へのＤＮＰの能動的輸送のための核局在化シグナルをコードすることができる。

【００８４】

非ウイルス送達システムが利用される場合、例示的な送達ビヒクルはリポソームである。宿主細胞（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ、エクスビボ又はｉｎ　ｖｉｖｏ）への核酸の導入のために、脂質製剤の使用が企図される。別の態様では、核酸は脂質と会合していてもよい。脂質と会合した核酸は、リポソームの水性内部にカプセル化され得て、リポソームの脂質二重層の内部に散在し得て、リポソームとオリゴヌクレオチドの両方と会合した連結分子を介してリポソームに付着し得て、リポソームに封入され得て、リポソームと複合体を形成し得て、脂質を含有する溶液に分散され得て、脂質と混合され得て、脂質と組み合わされ得て、脂質に懸濁液として含まれ得て、ミセルと含有若しくは複合体を形成し得て、又はそうでなければ脂質と会合し得る。脂質、脂質／ＤＮＡ又は脂質／発現ベクター関連組成物は、溶液のいかなる特定の構造にも限定されない。例えば、それらは、二重層構造、ミセルとして、又は「崩壊」構造で存在し得る。それらはまた、溶液に単に散在してもよく、場合によってはサイズ又は形状が均一でない凝集体を形成する。脂質は、天然に存在する脂質又は合成脂質であり得る脂肪物質である。例えば、脂質には、細胞質に天然に存在する脂肪滴、並びに脂肪酸、アルコール、アミン、アミノアルコール、及びアルデヒドなどの長鎖脂肪族炭化水素及びそれらの誘導体を含有する化合物のクラスが含まれる。

【００８５】

使用に適した脂質は、市販の供給源から得ることができる。例えば、ジミリスチルホスファチジルコリン（「ＤＭＰＣ」は、Ｓｉｇｍａ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯから入手することができ、ジセチルホスフェート（「ＤＣＰ」は、Ｋ＆Ｋ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（ニューヨーク州プレインビュー）から入手することができ、コレステロール（「Ｃｈｏｉ」は、Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ－Ｂｅｈｒｉｎｇから入手することができ、ジミリスチルホスファチジルグリセロール（「ＤＭＰＧ」及び他の脂質は、Ａｖａｎｔｉ　Ｐｏｌａｒ　Ｌｉｐｉｄｓ，Ｉｎｃ．（アラバマ州バーミンガム）から入手することができる。クロロホルム又はクロロホルム／メタノールの脂質の保存溶液は、約－２０℃で保存することができる。クロロホルムは、メタノールよりも容易にエバポレートするので、唯一の溶媒として使用される。

【００８６】

「リポソーム」は、封入された脂質二重層又は凝集体の生成によって形成された様々な単層及び多層脂質ビヒクルを包含する総称である。リポソームは、リン脂質二重層膜及び内部水性媒体を有するベシクル構造を有するものとして特徴付けることができる。多層リポソームは、水性媒体によって分離された複数の脂質層を有する。それらは、リン脂質が過剰の水溶液に懸濁されると自然に形成する。脂質成分は、閉じた構造の形成前に自己再配列を受け、脂質二重層の間に水及び溶解した溶質を捕捉する（Ｇｈｏｓｈ　ｅｔ　ａｌ．，１９９１　Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ　５：５０５－１０）。しかし、溶液において通常のベシクル構造とは異なる構造を有する組成物も包含される。例えば、脂質は、ミセル構造をとるか、又は単に脂質分子の不均一な凝集体として存在し得る。リポフェクタミン－核酸複合体も企図される。

【００８７】

本発明の核酸分子は、エレクトロポレーションを介して、例えば米国特許第７，６６４，５４５号明細書に記載されている方法によって投与することができ、その内容は参照により本明細書に組み込まれる。エレクトロポレーションは、米国特許第６，３０２，８７４号明細書、同第５，６７６，６４６号明細書、同第６，２４１，７０１号明細書、同第６，２３３，４８２号明細書、同第６，２１６，０３４号明細書、同第６，２０８，８９３号明細書、同第６，１９２，２７０号明細書、同第６，１８１，９６４号明細書、同第

６，１５０，１４８号明細書、同第６，１２０，４９３号明細書、同第６，０９６，０２０号明細書、同第６，０６８，６５０号明細書、及び同第その５，７０２，３５９号明細書に記載されている方法及び／又は装置によって行うことができ、それらの内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。エレクトロポレーションは、低侵襲性装置を介して実行されてもよい。

【００８８】

低侵襲性エレクトロポレーション装置「ＭＩＤ」は、上述の組成物及び関連する流体を体組織に注入するための装置であり得る。装置は、中空針、ＤＮＡカセット、及び流体送達手段を含むことができ、装置は、使用中に流体送達手段を作動させて、針を前述の体組織に挿入する間にＤＮＡを体組織に同時に（例えば、自動的に）注入するように適合される。これは、針が挿入されている間にＤＮＡ及び関連する流体を徐々に注入できることが、体組織を通る流体のより均一な分布をもたらすという利点を有する。注入中に経験する痛みは、注入されるＤＮＡの分布がより広い領域にわたるために軽減され得る。

【００８９】

ＭＩＤは、針を使用せずに組織に組成物を注入してもよい。ＭＩＤは、組成物が組織の表面を穿刺し、下にある組織及び／又は筋肉に入るような力で、組成物を小さな流れ又はジェットとして注入することができる。小さな流れ又はジェットの背後の力は、数分の１秒以内にマイクロオリフィスを通る二酸化炭素などの圧縮ガスの膨張によって供給され得る。低侵襲性エレクトロポレーション装置及びそれらを使用する方法の例は、公開された米国特許出願公開第２００８０２３４６５５号明細書、米国特許第６，５２０，９５０号明細書、米国特許第７，１７１，２６４号明細書、米国特許第６，２０８，８９３号明細書、米国特許第６，００９，３４７号明細書、米国特許第６，１２０，４９３号明細書、米国特許第７，２４５，９６３号明細書、米国特許第７，３２８，０６４号明細書、及び米国特許第６，７６３，２６４号明細書に記載されており、これらの各々の内容は参照により本明細書に組み込まれる。ＭＩＤは、組織を痛みなく穿刺する液体の高速ジェットを生成する注入器を備えることができる。このような無針注入器は市販されている。本明細書で利用することができる無針注入器の例には、米国特許第３，８０５，７８３号明細書、同第４，４４７，２２３号明細書、同第５，５０５，６９７号明細書、及び同第４，３４２，３１０号明細書に記載されているものが含まれ、これらの各々の内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【００９０】

直接的又は間接的な電気輸送に適した形態の所望の組成物は、通常、組織への組成物の浸透を引き起こすのに十分な力で薬剤のジェットの送達を作動させるように組織表面を注入器と接触させることによって、無針注入器を使用して治療される組織に導入（例えば、注入）され得る。例えば、治療すべき組織が粘膜、皮膚又は筋肉である場合、作用物質は、作用物質を角質層を通って真皮層に、又はその下の組織及び筋肉にそれぞれ浸透させるのに十分な力で、粘膜又は皮膚表面に向かって投射される。

【００９１】

無針注入器は、あらゆる種類の組織、特に皮膚及び粘膜に組成物を送達するのによく適合している。いくつかの実施形態では、無針注入器を使用して、組成物を含有する液体を対象の皮膚又は粘膜の表面及び中に推進することができる。本発明の方法を用いて治療することができる様々な種類の組織の代表的な例としては、膵臓、喉頭、鼻咽頭、下咽頭、中咽頭、唇、喉、肺、心臓、腎臓、筋肉、乳房、結腸、前立腺、胸腺、精巣、皮膚、粘膜組織、卵巣、血管、又はそれらの任意の組み合わせが挙げられる。

【００９２】

ＭＩＤは、組織をエレクトロポレーションする針電極を有し得る。例えば矩形又は正方形のパターンで設定された、複数の電極アレイの複数の電極対間をパルス化することにより、一対の電極間のパルス化よりも改善された結果が得られる。例えば、「Ｎｅｅｄｌｅ Ｅｌｅｃｔｒｏｄｅｓ ｆｏｒ Ｍｅｄｉａｔｅｄ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ Ｄｒｕｇｓ ａｎｄ Ｇｅｎｅｓ」と題する米国特許第５，７０２，３５９号明細書には、針のア

レイが開示されており、療法の治療中、複数対の針にパルスをかけることができる。完全に記載されているかのように参照により本明細書に組み込まれるその出願では、針は円形アレイに配置されたが、針電極の対向する対の間でのパルス発生を可能にするコネクタ及びスイッチング装置を有する。組換え発現ベクターを細胞に送達するための一対の針電極を使用することができる。そのような装置及びシステムは、米国特許第６，７６３，２６４号に記載されており、その内容は参照により本明細書に組み込まれる。あるいは、ＤＮＡの注入及び通常の注入針に似た単針によるエレクトロポレーションを可能にし、現在使用されている装置によって送達されるものよりも低い電圧のパルスを適用し、したがって患者が経験する電気感覚を低減する単針装置を使用することができる。

【００９３】

ＭＩＤは、１つ以上の電極アレイを備え得る。アレイは、同じ直径又は異なる直径の２つ以上の針を備え得る。針は、均等又は不均等に離間し得る。針は、０．００５インチ～０．０３インチ、０．０１インチ～０．０２５インチ、又は０．０１５インチ～０．０２０インチの間であってもよい。針は、直径０．０１７５インチであってもよい。針は、０．５ｍｍ、１．０ｍｍ、１．５ｍｍ、２．０ｍｍ、２．５ｍｍ、３．０ｍｍ、３．５ｍｍ、４．０ｍｍ、又はそれ以上離間していてもよい。

【００９４】

ＭＩＤは、パルス発生器と、単一のステップで組成物及びエレクトロポレーションパルスを送達する２つ以上の針組成物注入器とからなってもよい。パルス発生器は、フラッシュカードで動作するパーソナルコンピュータを介したパルス及び注入パラメータの柔軟なプログラミング、並びにエレクトロポレーション及び患者のデータの包括的な記録及び記憶を可能にすることができる。パルス発生器は、短期間中に様々なボルトパルスを送達することができる。例えば、パルス発生器は、持続時間が１００ｍｓの３つの１５ボルトのパルスを送達することができる。そのようなＭＩＤの例は、米国特許第７，３２８，０６４号明細書に記載されているＥＬＧＥＮ１０００システムであり、その内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【００９５】

ＭＩＤは、身体又は植物の選択された組織の細胞へＤＮＡなどの高分子を導入するのを容易にするモジュール式電極システムであるＣＥＬＬＥＣＴＲＡ（ＩＮＯＶＩＯ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）の装置及びシステムであり得る。モジュール式電極システムは、複数の針電極、皮下注入針、プログラマブル定電流パルスコントローラから複数の針電極への導電リンクをもたらす電気コネクタ、及び電源を備えることができる。オペレータは、支持構造体に取り付けられた複数の針電極を把持し、それらを身体又は植物の選択された組織にしっかりと挿入することができる。次いで、高分子が、皮下注入針を介して選択された組織に送達される。プログラマブル定電流パルスコントローラが起動され、定電流電気パルスが複数の針電極に印加される。印加された定電流電気パルスは、複数の電極間の細胞内へ高分子を導入するのを容易にする。細胞の過熱による細胞死は、定電流パルスによって組織での電力散逸を制限することによって、最小限に抑えられる。Ｃｅｌｌｅｃｔｒａ装置及びシステムは米国特許第７，２４５，９６３号に記載されており、その内容は参照により本明細書に組み込まれる。ＭＩＤは、ＥＬＧＥＮ１０００システム（ＩＮＯＶＩＯ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）であり得る。ＥＬＧＥＮ１０００システムは、中空針及び流体送達手段を設ける装置を備え得て、装置は、使用中の流体送達手段を作動させて、針を体組織に挿入する間に、本明細書に記載の組成物である流体を前述の体組織に同時に（例えば自動的に）注入するように適合される。利点は、針が挿入されている間に流体を徐々に注入できることが、体組織を通る流体のより均一な分布をもたらすということである。注入中に経験される痛みは、流体の注入される体積の分布がより広い領域にわたるために軽減されるとも考えられる。

【００９６】

さらに、流体の自動的な注入は、注入された流体の実際の用量の自動的な監視及び登録を容易にする。このデータは、必要に応じて、文書化の目的で制御ユニットによって記憶

することができる。

【００９７】

注入速度は線形又は非線形のいずれかであり得、針が治療される対象の皮膚を通して挿入された後、及び腫瘍組織、皮膚、組織、肝臓組織、及び筋肉組織などの体組織にさらに挿入されている間に、注入が実行され得ることが理解されよう。

【００９８】

装置は、体組織への針の挿入を誘導するための針挿入手段をさらに備える。流体注入の速度は、針の挿入速度によって制御される。これは、針の挿入及び流体の注入の両方を、挿入速度を所望の注入速度に一致させることができるように制御することができるという利点を有する。これはまた、ユーザが装置を操作しやすくする。必要に応じて、体組織内に針を自動的に挿入するための手段を設けることができる。

【００９９】

ユーザは、流体の注入をいつ開始するかを選択することができる。しかし、理想的には、針の先端が筋肉組織に到達したときに注入が開始され、装置は、流体の注入を開始するのに十分な深さまで針が挿入されたときを感知するための手段を含むことができる。これは、針が所望の深さ（通常は筋組織が始まる深さである）に達したときに流体の注入を自動的に開始するように促すことができることを意味する。筋組織が始まる深さは、例えば、針が皮膚の層を通過するのに十分であると考えられる４ｍｍの値などの、予め設定された針の挿入の深さと解釈することができる。

【０１００】

感知手段は、超音波プローブを備えることができる。感知手段は、インピーダンス又は抵抗の変化を感知するための手段を備えることができる。この場合、手段は、そのように体組織内の針の深さを記録するのではなく、むしろ、針が異なるタイプの体組織から筋肉内に移動する際のインピーダンス又は抵抗の変化を感知するように適合される。これらの代替形態のいずれも、注入が開始され得ることを感知する比較的正確で操作が簡単な手段を提供する。針の挿入する深さは、必要に応じてさらに記録することができ、針の挿入する深さが記録されているときに注入される流体の量が判定されるように流体の注入を制御するために使用することができる。

【０１０１】

装置は、針を支持するためのベース、及びベースを内部に受け入れるためのハウジングをさらに備えることができ、ベースは、ベースがハウジングに対して第１の後方位置にあるときに針がハウジング内に引き込まれ、ベースがハウジング内の第２の前方位置にあるときに針がハウジングから延出するように、ハウジングに対して移動可能である。これは、ハウジングを患者の皮膚に整列させることができ、その後、ハウジングをベースに対して移動させることによって針を患者の皮膚に挿入することができるため、ユーザにとって有利である。

【０１０２】

上述のように、流体が皮膚に挿入されるときに針の長さにわたって均一に分配されるように、制御された速度の流体の注入を達成することが望ましい。流体送達手段は、制御された速度で流体を注入するように適合されたピストン駆動手段を備えることができる。ピストン駆動手段は、例えば、サーボモータによって作動させることができる。しかし、ピストン駆動手段は、ベースがハウジングに対して軸方向に移動することによって作動されてもよい。流体送達のための代替手段を設け得ることが理解されよう。したがって、例えば、制御された速度又は制御されていない速度で流体送達のために圧迫することができる密閉容器を、シリンジ及びピストンシステムの代わりに設けることができる。

【０１０３】

上述の装置は、任意のタイプの注入に使用することができる。しかし、エレクトロポレーションの分野において特に有用であることが想定され、したがって、針に電圧を印加するための手段をさらに備えることができる。これにより、針を注入のためだけでなく、エレクトロポレーション中の電極としても使用することができる。これは、電界が、注入さ

れた流体と同じ領域に印加されることを意味するので、特に有利である。従来、エレクトロポレーションには、電極を以前に注入された流体と正確に位置合わせすることが非常に困難であるという問題があり、そのため、ユーザは、より大きな領域にわたって必要とされるよりも大量の流体を注入し、注入された物質と電界との間の重なりを保証しようとするためにより高い領域にわたって電界を印加する傾向があった。本発明を使用すると、電界と流体との間の良好な適合を達成しながら、注入される流体の体積及び印加される電界のサイズの両方を低減することができる。

【０１０４】

外因性核酸を宿主細胞に導入するために使用される方法にかかわらず、宿主細胞に組換え核酸配列が存在することを確認するために、様々なアッセイが実施され得る。そのようなアッセイとしては、例えば、当業者に周知の「分子生物学的」アッセイ、例えば、サザンブロット及びノーザンブロット、ＲＴ－ＰＣＲ及びＰＣＲ、例えば免疫学的手段（ＥＬＩＳＡ及びウエスタンブロット）又は当業者に公知の他のアッセイによって、特定のペプチドの存在又は非存在を検出するなどの「生化学的」アッセイが挙げられる。

【０１０５】

一実施形態では、本発明は、ヒトナンセンスＣＦ細胞培養モデルにおけるＣＦＴＲｍＲＮＡ発現及びチャネル機能を救済するための、ＭＣ及びＣＥＤＴをコードするＡＣＥ－ｔＲＮＡの有効性を記載する。例えば、ＭＣ及びＣＥＤＴをコードするＡＣＥ－ｔＲＮＡをｐに送達した後、ｐ．Ｇ５４２Ｘ、ｐ．Ｒ１１６２Ｘ、ｐ．Ｗ１２８２Ｘ　１６ＨＢＥ１４ｏｅ－細胞、ＮＭＤからのＣＦＴＲ　ｍＲＮＡ発現のレスキューをｑＰＣＲによって判定し、ＣＦＴＲ機能をＵｓｓｉｎｇチャンバー記録によって評価する。また、（１）転写増強５’リーダー配列（ＴＥＬＳ）のライブラリーを使用してＡＣＥ－ｔＲＮＡ発現を増加させること、及び（２）ＤＮＡターゲティング配列（ＤＴＳ）のライブラリーを使用して核ターゲティング及び転写バイオアベイラビリティを増加させることを含む、いくつかの方法によってミニベクター治療能力を増強することも開示される。

【０１０６】

したがって、本発明のＤＮＡミニベクター（ＭＣ又はＣＥＤＴのいずれか）は、プロモーター及びアンチコドン編集ｔＲＮＡをコードする核酸配列を含む。ＤＮＡミニベクターは、ＴＥＬＳ、ＤＴＳ、ＡＢＳ及びレポーター核酸配列からなる群から選択される１つ又は２つ又は３つ又は４つのＤＮＡ配列をさらに含む。

【０１０７】

一実施形態では、ＤＮＡミニベクターは、プロモーター、アンチコドン編集ｔＲＮＡをコードする配列、及びＴＥＬＳを含む。

【０１０８】

一実施形態では、ＤＮＡミニベクターは、プロモーター、アンチコドン編集ｔＲＮＡをコードする配列、ＴＥＬＳ及びＤＴＳを含む。

【０１０９】

一実施形態では、ＤＮＡミニベクターは、プロモーター、アンチコドン編集ｔＲＮＡをコードする配列、ＴＥＬＳ、ＤＴＳ及びＡＢＳを含む。

【０１１０】

一実施形態では、ＤＮＡミニベクターは、プロモーター、アンチコドン編集ｔＲＮＡをコードする配列、ＴＥＬＳ、ＤＴＳ、ＡＢＳ及びレポーター配列を含む。

【０１１１】

本明細書に記載のＤＮＡミニベクターのいずれかにおいて、ＤＮＡミニベクターはＭＣである。

【０１１２】

本明細書に記載のＤＮＡミニベクターのいずれかにおいて、ＤＮＡミニベクターはＣＥＤＴである。

【０１１３】

別の実施形態では、本発明は、ｐ．Ｇ５４２Ｘ－ＣＦＴＲ及びｐ．Ｗ１２８２Ｘ－ＣＦ

ＴＲマウスの気道上皮におけるプラスミド、ＭＣ及びＣＥＤＴＳをコードするＡＣＥ－ｔＲＮＡによるナンセンス抑制の有効性及び持続性を記載する。ｃＤＮＡプラスミドＭＣ及びＣＥＤＴを発現するＡＣＥ－ｔＲＮＡを、電場を使用し、野生型ｐ．Ｇ５４２Ｘ－ＣＦＴＲ及びｐ．Ｗ１２８２Ｘ－ＣＦＴＲマウスの肺に送達することができる。定常状態のＣＦＴＲｍＲＮＡの発現は、免疫蛍光法（ＩＦ）及びウエスタンブロット（ＷＢ）によってｑＰＣＲ及びＣＦＴＲタンパク質によって測定することができる。ベクターの細胞特異的送達は、解剖された肺セグメントにおける蛍光ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）によって判定することができる。エンドポイントは、単回送達後４２日まで評価することができる。ベクターからのＡＣＥ－ｔＲＮＡ発現の持続性は、７日、１４日及び１、２、６及び１２ヶ月でのＰＴＣレポーターベクターのその後の送達及びＡＣＥ－ｔＲＮＡバーコード配列のｑＰＣＲによって野生型マウスの肺において定量することができる。

【０１１４】

さらに別の実施形態では、本発明は、他のより大きな実験動物の肺への送達後のＭＣ及びＣＥＤＴにコードされるＡＣＥ－ｔＲＮＡの効率及び持続性を記載する。野生型動物は、電場パルスによってＭＣ及びＣＥＤＴを受け取ることができる。ＡＣＥ－ｔＲＮＡ発現の持続性及び送達の肺マッピングを、ＰＴＣレポーターベクターのその後の送達、並びに蛍光ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）及び免疫蛍光（ＩＦ）と対になったＡＣＥ－ｔＲＮＡバーコード配列のｑＰＣＲによって６ヶ月まで判定することができる。

【０１１５】

疾患の状態及び治療方法

本開示の特定の実施形態は、本明細書に記載の治療剤（例えば、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ）をコードするベクターを哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物（ヒトなど）におけるＰＴＣに関連する疾患又は障害を治療する方法を提供する。本開示の特定の実施形態は、哺乳動物において疾患を治療するのに有用な医薬品を調製するための、本明細書に記載の治療剤又は治療剤をコードするベクターの使用を提供する。

【０１１６】

ＰＴＣに関連する疾患又は障害には、ジストロフィン中のＰＴＣによるデュシェンヌ型筋ジストロフィー及びベッカー型筋ジストロフィー、ＲＢＩ中のＰＴＣによる網膜芽細胞腫、ＮＦ１又はＮＦ２中のＰＴＣによる神経線維腫症、ＡＴＭ中のＰＴＣによる毛細管拡張性運動失調、ＨＥＸＡ中のＰＴＣによるテイ・サックス病、ＣＦＴＲ中のＰＴＣによる嚢胞性線維症、ＷＴ１中のＰＴＣによるウィルムス腫瘍、第ＶＩＩＩ因子中のＰＴＣによる血友病Ａ、第ＩＸ因子中のＰＴＣによる血友病Ｂ、ｐ５３中のＰＴＣによるｐ５３関連がん、メンケス病、ウルリッヒ病、ベータグロビン中のＰＴＣによるβサラセミア、ウィルブランド因子中のＰＴＣによる２Ａ型及び３型フォン・ヴィレブランド病、ロビノウ症候群短指症Ｂ型（指及び中手骨の短縮）、ＩＦＮＧＲ１におけるＰＴＣに起因するマイコバクテリア感染に対する遺伝的感受性、ＣＲＸにおけるＰＴＣに起因する遺伝性網膜疾患、凝固因子Ｘにおけるに起因する遺伝性出血傾向、ロドプシンにおけるＰＴＣに起因する遺伝性失明、ＳＯＸ１０におけるＰＴＣに起因する先天性神経感覚消失及び結腸無神経変性、並びにＳＯＸ１０におけるＰＴＣに起因する神経感覚消失、結腸無神経変性、末梢神経障害及び中枢性ミエリン形成異常性白質ジストロフィーを含む遺伝性神経発達障害、リドル症候群、色素性乾皮症、ファンコーニ貧血、貧血、甲状腺機能低下症、ｐ５３関連（例えば、ｐ５３扁平上皮癌、ｐ５３肝細胞癌、ｐ５３卵巣癌）、食道癌、骨癌、卵巣癌、肝細胞癌、乳癌、肝細胞癌、線維性組織球腫、卵巣癌、ＳＲＹ性転換、トリオースリン酸イソメラーゼ貧血、糖尿病及びくる病、その他多数のバリアントが含まれるが、これらに限定されない。一実施形態における本発明は、本発明のＡＣＥ－ｔＲＮＡの導入によってナンセンス突然変異に関連する、存在する突然変異の効果を逆転させることによって、嚢胞性線維症を治療するための組成物及び方法を含む。さらなる障害には、ハーラー症候群、ドラベ症候群、脊髄性筋ジストロフィー、アッシャー症候群、無虹彩症、コロイ

デレミア、眼性コロボマ、網膜色素変性症、栄養障害性表皮水疱症、シュードキサントーマ・エラスチカム、アラジール症候群、ワールデンブルグ・シャー、乳児神経セロイドリポフスチン症、シスチノーシス、Ｘ連鎖腎性尿崩症及び多発性嚢胞腎疾患が含まれる。

【０１１７】

本明細書に記載のＤＮＡ分子及び方法によって治療することができるＰＴＣに関連する疾患又は障害には、いくつかの眼疾患も含まれる。特定の変異を有する疾患及び遺伝子の例としては、以下のものが挙げられる。

錐体ジストロフィー（シュタルガルト病（ＳＴＧＤ１）、錐体杆体ジストロフィー、網膜色素変性症（ＲＰ）、及び加齢黄斑変性に対する感受性の増加）：ＫＣＮＶ２　Ｇｌｕ１４３Ｘ、ＫＣＮＶ２　Ｇｌｕ３０６Ｘ、ＫＣＮＶ２　Ｇｌｎ７６Ｘ、ＫＣＮＶ２　Ｇｌｕ１４８Ｘ、ＣＡＣＮＡ２Ｄ４、Ｔｙｒ８０２Ｘ、ＣＡＣＮＡ２Ｄ４、Ａｒｇ６２８Ｘ、ＲＰ２、Ａｒｇ１２０Ｘ、Ｒｈｏ、Ｓｅｒ３３４Ｘ、Ｒｐｅ６５、Ａｒｇ４４Ｘ、ＰＤＥ６Ａ、Ｌｙｓ４５５Ｘ；

先天性停止性夜盲２（ＣＳＮＢ２）：ＣＡＣＮＡ１Ｆ、Ａｒｇ９５８Ｘ、ＣＡＣＮＡ１Ｆ、Ａｒｇ８３０Ｘ

先天性停止性夜盲１（ＣＳＮＢ１）：ＴＲＰＭ１、Ｇｌｎ１１Ｘ、ＴＲＰＭ１、Ｌｙｓ２９４Ｘ、ＴＲＰＭ１、Ａｒｇ９７７Ｘ、ＴＲＰＭ１、Ｓｅｒ８８２Ｘ、ＮＹＸ、Ｗ３５０Ｘ

ベスト病又は、ＢＶＭＤ、ＢＥＳＴ１、Ｔｙｒ２９Ｘ、ＢＥＳＴ１、Ａｒｇ２００Ｘ、ＢＥＳＴ１、Ｓｅｒ５１７Ｘ

レーバー先天性黒内障（ＬＣＡ）：ＫＣＮＪ１３、Ｔｒｐ５３Ｘ、ＫＣＮＪ１３、Ａｒｇ１６６Ｘ、ＣＥＰ２９０、Ａｒｇ１５１Ｘ、ＣＥＰ２９０、Ｇｌｙ１８９０Ｘ、ＣＥＰ２９０、Ｌｙｓ１５７５Ｘ、ＣＥＰ２９０、Ａｒｇ１２７１Ｘ、ＣＥＰ２９０、Ａｒｇ１７８２Ｘ、ＣＲＢ１、Ｃｙｓ１３３２Ｘ、ＧＵＣＹ２Ｄ、Ｓｅｒ４４８Ｘ、ＧＵＣＹ２Ｄ、Ａｒｇ４１０９１Ｘ、ＬＣＡ５、Ｇｌｎ２７９Ｘ、ＲＤＨ１２、Ｔｙｒ１９４Ｘ、ＲＤＨ１２、Ｇｌｕ２７５Ｘ、ＳＰＡＴＡ７、Ａｒｇ１０８Ｘ、ＴＵＬＰ１、Ｇｌｎ３０１Ｘ；

アッシャー症候群１：ＵＳＨ１Ｃ、Ａｒｇ３１Ｘ、ＰＣＤＨ１５、Ａｒｇ３Ｘ、ＰＣＤＨ１５、Ａｒｇ２４５Ｘ、ＰＣＤＨ１５、Ａｒｇ６４３Ｘ、ＰＣＤＨ１５、Ａｒｇ９２９Ｘ、ＩＱＣＢ１、Ａｒｇ４６１Ｘ、ＩＱＣＢ１、Ａｒｇ４８９Ｘ、ＰＤＥ６Ａ、Ｇｌｎ６９Ｘ、ＡＬＭＳ１、Ｓｅｒ９９９Ｘ、ＡＬＭＳ１、Ａｒｇ３８０４Ｘ；

無虹彩症：Ｐａｘ６、Ｇｌｙ１９４Ｘ

眼コロボマ：Ｐａｘ２、Ａｒｇ１３９Ｘ、Ｌａｍｂ１、Ａｒｇ５２４Ｘ

コロイデレミア：ＲＥＰ１、Ｇｌｎ３２Ｘ

【０１１８】

一態様によれば、哺乳動物レシピエントにおいて治療剤を発現させるための細胞発現システムが提供される。発現システム（本明細書では、「遺伝子組換え細胞」とも呼ばれる）は、細胞と、治療剤を発現させるための発現ベクターとを含む。発現ベクターには、ウイルス、プラスミド、及び異種遺伝物質を細胞に送達するための他のビヒクルが含まれるが、これらに限定されない。したがって、本明細書で使用される「発現ベクター」という用語は、異種遺伝物質を細胞に送達するためのビヒクルを指す。特に、発現ベクターはＣＥＤＴ又はＭＣミニベクターである。発現ベクターの他の例としては、組換えアデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、又はレンチウイルス若しくはレトロウイルスベクターが挙げられる。

【０１１９】

発現ベクターは、異種遺伝子の転写を制御するためのプロモーターをさらに含む。プロモーターは、誘導性プロモーターであり得る。発現システムは、哺乳動物レシピエントへの投与に適合している。発現システムは、複数の不死化されていない遺伝子改変細胞を含み得、各細胞は、少なくとも１つの治療剤をコードする少なくとも１つの組換え遺伝子を含む。

【０１２０】
細胞発現システムは、ｉｎ　ｖｉｖｏで形成され得る。さらに別の態様によれば、哺乳動物レシピエントをｉｎ　ｖｉｖｏで治療するための方法が提供される。この方法は、異種遺伝子産物を発現させるための発現ベクターを、例えば静脈内投与によって、ｉｎ　ｓｉｔｕで患者の細胞に導入することを含む。ｉｎ　ｖｉｖｏで発現システムを形成するために、治療剤を発現させるための発現ベクターをｉｎ　ｖｉｖｏで哺乳動物レシピエントに静注で導入する。
【０１２１】
さらに別の態様によれば、哺乳動物レシピエントをｉｎ　ｖｉｖｏで治療するための方法が提供される。この方法は、標的治療剤をｉｎ　ｖｉｖｏで患者に導入することを含む。異種遺伝子を発現させるための発現ベクターは、異種遺伝子産物の転写を制御するための誘導性プロモーターを含み得る。したがって、ｉｎ　ｓｉｔｕでの治療剤の送達は、細胞を、異種遺伝子の転写を誘導する条件にｉｎ　ｓｉｔｕで曝露することによって制御される。
【０１２２】
本開示は、ＡＣＥ－ｔＲＮＡをコードする発現ベクターを細胞又は患者に投与することによって、対象（例えば、哺乳動物）の疾患を治療する方法を提供する。遺伝子治療の方法について、分子生物学及び遺伝子治療の当業者は、過度の実験をすることなく、本開示の新規方法で使用される発現ベクターの適切な投与量及び投与経路を判定することができるであろう。
【０１２３】
ある特定の実施形態において、本明細書に記載される作用物質及び方法は、ＰＴＣによって引き起こされる疾患の治療／管理のために使用され得る。例としては、デュシェンヌ－ベッカー型筋ジストロフィー、網膜芽細胞腫、神経線維腫症、毛細血管拡張性運動失調症、テイ・サックス病、嚢胞性線維症、ウィルムス腫瘍、血友病Ａ、血友病Ｂ、メンケス病、ウルリッヒ病、βサラセミア、２Ａ型及び３型フォン・ヴィレブランド病、ロビノウ症候群、短指症Ｂ型（指及び中手骨の短縮）、マイコバクテリア感染に対する遺伝的感受性、遺伝性網膜疾患、遺伝性出血傾向、遺伝性失明、先天性神経感覚消失及び結腸無神経変性、並びに神経感覚消失、結腸無神経変性、末梢神経障害及び中枢性ミエリン形成異常性白質ジストロフィーを含む遺伝性神経発達障害、リドル症候群、色素性乾皮症、ファンコーニ貧血、貧血、甲状腺機能低下症、ｐ５３関連がん（例えば、ｐ５３扁平上皮癌、ｐ５３肝細胞癌、ｐ５３卵巣癌）、食道癌、骨癌、卵巣癌、肝細胞癌、乳癌、肝細胞癌、線維性組織球腫、卵巣癌、ＳＲＹ性転換、トリオースリン酸イソメラーゼ貧血、糖尿病及びくる病、その他多数の変異体が含まれるが、これらに限定されない。この治療法は、改良された終止コドン抑制特異性をもたらすという点で有利である。本発明の治療用ＡＣＥ－ｔＲＮＡは、特定の終止コドン、例えばＴＧＡを標的とし、したがって、疾患に無関係な終止コドンでのオフターゲット効果を減少させる。本療法はまた、アミノ酸特異性をもたらすという点で有利である。発現されたｔＲＮＡは、疾患終止コドンの挿入によって失われたアミノ酸を特異的に置換するように操作され、したがってタンパク質の安定性、折り畳み及び輸送に対するいかなる偽の影響も打ち消される。
【０１２４】
特定の実施形態では、本システムはモジュール式であり、したがってあらゆる可能性のある疾患ＰＴＣに「パーソナル化」することができる。例えば、Ｔｒｐシンテターゼによって認識されるヒトゲノムには９つの個々のトリプトファンｔＲＮＡが存在し、それらのすべてがｍＲＮＡ　ＵＧＧコドンを抑制する。したがって、これらの９つのＴｒｐ　ｔＲＮＡのそれぞれは、コドン再編集耐性（ＵＧＧ→ＵＧＡ）の機会を提供する。さらに、遺伝暗号中の終止コドンに近接していることを考えると、アルギニンコドンのＰＴＣナンセンスコドンへの変異は疾患において一般的である。コドン編集耐性及び抑制の有効性について試験することができる３０を超えるＡｒｇ　ｔＲＮＡが存在する。アルギニンをコードするＡＣＥ－ｔＲＮＡは、遺伝子にかかわらず、すべてのＡｒｇ→ＰＴＣ変異に対して

実行可能な治療薬である。実際、ＬＣＡの３５％はナンセンス突然変異によって引き起こされ、その大部分は終止するアルギニンである。本発明のさらなる利点は、システム全体（ｔＲＮＡ＋プロモーター配列）がコンパクトであるため、容易な発現及び細胞特異的送達を提供することである。

【０１２５】

製剤

本発明に従って産生されたベクター又は別の形態のＤＮＡが十分な量で生成及び精製されると、本発明の方法は、ＤＮＡ組成物、例えば治療用ＤＮＡ組成物としてのその製剤をさらに含み得る。治療用ＤＮＡ組成物は、上記の種類の治療用ＤＮＡ分子を含む。そのような組成物は、所望の経路による投与に適合した形態の治療的有効量のＤＮＡ、例えば、経口、粘膜又は局所投与に適したエアロゾル、注入可能な組成物又は製剤を含むことができる。

【０１２６】

従来の薬学的調製物としてのＤＮＡの製剤化は、当業者に利用可能な標準的な薬学的製剤化学及び方法論を使用して行うことができる。任意の薬学的に許容される担体又は添加物が使用され得る。湿潤剤又は乳化剤、ｐＨ緩衝物質などの補助物質が添加物又はビヒクル中に存在してもよい。これらの添加物、ビヒクル及び補助物質は、一般に、過度の毒性なしに投与することができ、ワクチン組成物の場合、組成物を受けている個体において免疫応答を誘導しない医薬剤である。適切な担体はリポソームであり得る。

【０１２７】

薬学的に許容される添加物には、水、生理食塩水、ポリエチレングリコール、ヒアルロン酸、グリセロール及びエタノールなどの液体が含まれるが、これらに限定されない。薬学的に許容される塩、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、ホスフェート、硫酸塩などの鉱酸塩、及び酢酸塩、プロピオナート、マロン酸塩、ベンゾエートなどの有機酸の塩も含まれ得る。必須ではないが、調製物が組成物に含まれる場合、特にペプチド、タンパク質又は他の同様の分子のための安定剤として働く薬学的に許容される添加物を含むことも好ましい。ペプチドの安定剤としても作用する適切な担体の例としては、限定されないが、医薬グレードのデキストロース、スクロース、ラクトース、トレハロース、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、デキストランなどが挙げられる。他の適切な担体としては、やはり限定されないが、デンプン、セルロース、リン酸ナトリウム又はリン酸カルシウム、クエン酸、酒石酸、グリシン、高分子量ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、及びそれらの組み合わせが挙げられる。薬学的に許容される添加物、ビヒクル及び補助物質の完全な考察は、ＲＥＭＩＮＧＴＯＮ’Ｓ　ＰＨＡＲＭＡＣＥＵＴＩＣＡＬ　ＳＣＩＥＮＣＥＳ（Ｍａｃｋ　Ｐｕｂ．Ｃｏ．，Ｎ．Ｊ．１９９１）で入手でき、参照により本明細書に取込まれる。

【０１２８】

本発明の薬剤（例えば、ミニベクター）は、遺伝性疾患（例えば、嚢胞性線維症）に関連する少なくとも１つの症状の軽減をもたらすように投与することができる。投与される量は、選択される組成物、特定の疾患、体重、身体状態、及び対象の年齢、並びに予防又は治療が達成されるべきかどうかを含むがこれらに限定されない様々な要因に応じて変化する。そのような因子は、動物モデル又は当技術分野で周知の他の試験系を使用する臨床医によって容易に判定することができる。

【０１２９】

本発明は、本発明に開示される薬剤、例えばＡＣＥ－ｔＲＮＡ又は発現ベクターの投与によってＰＴＣに関連する疾患又は障害を治療することを想定している。本発明による治療剤の投与は、例えば、レシピエントの生理的状態、投与の目的が治療的であるか予防的であるか、及び当業者に公知の他の因子に応じて、連続的又は断続的であり得る。本発明の薬剤の投与は、予め選択された期間にわたって本質的に連続的であってもよく、又は一連の間隔を空けた用量であってもよい。局所投与及び全身投与の両方が企図される。

【０１３０】

本発明の治療剤（１つ又は複数）を有する１つ又は複数の適切な単位投与形態は、後述するように、場合により持続放出のために製剤化することができ（例えば、マイクロカプセル化を使用して）、静脈内及び筋肉内経路を含む非経口を含む様々な経路によって、並びに疾患組織への直接注入によって投与することができる。製剤は、適切な場合には、別個の単位投与形態で簡便には提示され得、薬学的に周知の方法のいずれかによって調製され得る。そのような方法は、治療剤を液体担体、固体マトリックス、半固体担体、微粉固体担体又はそれらの組み合わせと会合させ、次いで、必要に応じて、産生物を所望の送達システムに導入又は成形するステップを含み得る。

【０１３１】

本発明の治療剤を投与のために調製する場合、それらを薬学的に許容される担体、希釈剤又は添加物と組み合わせて薬学的製剤又は単位投与形態を形成することができる。そのような製剤中の全活性成分は、製剤の０．１～９９．９重量％を含む。薬学的に許容される担体は、製剤の他の成分と適合性であり、そのレシピエントに有害ではない担体、希釈剤、添加物及び／又は塩であり得る。投与のための有効成分は、粉末又は顆粒として溶液、懸濁液又はエマルジョンとして、存在し得る。

【０１３２】

本発明の治療剤を含有する薬学的製剤は、周知の容易に入手可能な成分を使用して、当技術分野で公知の手順によって調製することができる。本発明の治療剤はまた、例えば筋肉内、皮下又は静脈内経路による非経口投与に適切な溶液として製剤化することができる。本発明の治療剤の薬学的製剤はまた、水性若しくは無水の溶液若しくは分散体の形態、又は代替的にエマルジョン若しくは懸濁液の形態をとることができる。

【０１３３】

したがって、治療剤は、非経口投与（例えば、注入、例えばボーラス注入又は連続的注入による）のために製剤化されてもよく、アンプル、プレフィルドシリンジ、小容量点滴容器、又は防腐剤が添加された複数回投与容器に単位用量形態で提供されてもよい。活性成分は、油性又は水性ビヒクル中の懸濁液、溶液又はエマルジョンなどの形態をとることができ、懸濁化剤、安定化剤及び／又は分散剤などの調合剤を含有することができる。あるいは、活性成分は、使用前に適切なビヒクル、例えば滅菌パイロジェンフリー水で構成するために、滅菌固体の無菌の単離又は溶液からの凍結乾燥によって得られる粉末形態であってもよい。

【０１３４】

各剤形の個々のエアロゾル用量に含まれる１つ又は複数の活性成分の単位含有量は、複数の剤形の投与によって必要な有効量に達することができるので、それ自体が特定の適応症又は疾患を治療するための有効量を構成する必要はないことが理解されよう。さらに、有効量は、個別に、又は一連の投与のいずれかで、剤形の用量より少なく使用して達成され得る。

【０１３５】

本発明の薬学的製剤は、任意の成分として、薬学的に許容される担体、希釈剤、可溶化剤又は乳化剤、及び当技術分野で周知の種類の塩を含み得る。本発明の薬学的製剤に有用な担体及び／又は希釈剤の具体的な非限定的な例としては、水及び生理的に許容される緩衝生理食塩水、例えばリン酸緩衝生理食塩水ｐＨ７．０～８．０及び水が挙げられる。

【０１３６】

ナノ粒子組成物

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される薬学的組成物は、国際公開第２０２０２６３８８３号、国際公開第２０１３１２３５２３号パンフレット、国際公開第２０１２１７０９３０号パンフレット、国際公開第２０１１１２７２５５号パンフレット、及び国際公開第２００８１０３２７６号パンフレット、並びに米国特許出願公開第２０１３０１７１６４６号明細書に記載されているものなどの脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）として製剤化されており、これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。したがって、本開示は、（ｉ）送達剤を含む脂質組成物、及び（ｉｉ）少なくとも１つの核酸、例え

ばＡＣＥ－ｔＲＮＡ又はＡＣＥ－ｔＲＮＡをコードするＤＮＡ、例えばＭＣ又はＣＥＤＴを含むナノ粒子組成物を提供する。そのようなナノ粒子組成物では、本明細書に開示される脂質組成物は、核酸をカプセル化することができる。

【０１３７】

ナノ粒子組成物は、典型的にはマイクロメートル以下程度のサイズであり、脂質二重層を含むことができる。ナノ粒子組成物は、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）、リポソーム（例えば、脂質ベシクル）、及びリポプレックスを包含する。例えば、ナノ粒子組成物は、５００ｎｍ以下の直径を有する脂質二重層を有するリポソームであり得る。

【０１３８】

ナノ粒子組成物には、例えば、脂質ナノ粒子、リポソーム、及びリポプレックスが含まれる。いくつかの実施形態では、ナノ粒子組成物は、１つ以上の脂質二重層を含むベシクルである。特定の実施形態では、ナノ粒子組成物は、水性区画によって分離された２つ以上の同心二重層を含む。脂質二重層は、互いに官能化及び／又は架橋され得る。脂質二重層は、１つ以上のリガンド、タンパク質、又はチャネルを含むことができる。

【０１３９】

一実施形態では、脂質ナノ粒子は、イオン化可能な脂質、構造脂質、リン脂質、及び目的の核酸を含む。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、イオン化可能な脂質、ＰＥＧ修飾脂質、ステロール及び構造脂質を含む。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、約２０～６０％のイオン化可能な脂質、約５～２５％の構造脂質、約２５～５５％のステロール、及び約０．５～１５％のＰＥＧ修飾脂質のモル比を有する。

【０１４０】

いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、０．４未満の多分散性値を有する。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、中性ｐＨで正味の中性電荷を有する。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは５０～１５０ｎｍの平均直径を有する。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは８０～１００ｎｍの平均直径を有する。

【０１４１】

本明細書全体で定義されるように、「脂質」という用語は、疎水性又は両親媒性特性を有する小分子を指す。脂質は、天然に存在するものであってもよく、又は合成のものであってもよい。脂質のクラスの例としては、脂肪、ワックス、ステロール含有代謝産物、ビタミン、脂肪酸、グリセロ脂質、グリセロリン脂質、スフィンゴ脂質、サッカロ脂質及びポリケチド、並びにプレノール脂質が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの例では、いくつかの脂質の両親媒性により、それらは水性媒体中でリポソーム、ベシクル又は膜を形成する。

【０１４２】

いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、イオン化可能な脂質を含み得る。本明細書で使用される場合、「イオン化可能な脂質」という用語は、当技術分野におけるその通常の意味を有し、１つ以上の荷電した部分を含む脂質を指し得る。いくつかの実施形態では、イオン化可能な脂質は、正に荷電していても負に荷電していてもよい。イオン化可能な脂質は正に荷電していてもよく、その場合、「カチオン性脂質」と呼ぶことができる。特定の実施形態では、イオン化可能な脂質分子は、アミン基を含み得、イオン化可能なアミノ脂質と呼ばれ得る。本明細書で使用される場合、「荷電した部分」は、例えば、一価（＋１、又は１）、二価（＋２、又は２）、三価（＋３、又は３）などの形式的な電子電荷を有する化学的部分である。荷電した部分は、アニオン性（すなわち、負に荷電している）又はカチオン性（すなわち、正に荷電している）であり得る。正に荷電した部分の例としては、アミン基（例えば、第一級、第二級及び／又は第三級アミン）、アンモニウム基、ピリジニウム基、グアニジン基、及びイミジゾリウム基が挙げられる。特定の実施形態では、荷電した部分はアミン基を含むことができる。負に荷電した基又はその前駆体の例としては、カルボキシレート基、スルホネート基、硫酸塩基、ホスホネート基、ホスフェート基、ヒドロキシル基などが挙げられる。荷電した部分の電荷は、場合によっては、環境条件によって変化し得、例えば、ｐＨの変化は、部分の電荷を変化させ得、及び／又は

部分を荷電又は非荷電にし得る。一般に、分子の電荷密度は、所望するように選択され得る。

【０１４３】

いくつかの実施形態では、イオン化可能な脂質は、当技術分野で「イオン化可能なカチオン性脂質」と呼ばれることもあるイオン化可能なアミノ脂質である。一実施形態では、イオン化可能なアミノ脂質は、リンカー構造を介して接続された正に荷電した親水性頭部及び疎水性尾部を有し得る。これらに加えて、イオン化可能な脂質は、環状アミン基を含む脂質であってもよい。一実施形態では、イオン化可能な脂質は、国際公開第２０１３０８６３５４号パンフレット及び国際公開第２０１３１１６１２６号パンフレットに記載されているイオン化可能な脂質から選択されてもよいが、これらに限定されず、その各々の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。さらに別の実施形態では、イオン化可能な脂質は、米国特許第７，４０４，９６９号明細書の式ＣＬＩ－ＣＬＸＸＸＸＩＩから選択され得るが、これらに限定されず、その各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【０１４４】

一実施形態では、脂質は、その全体が参照により組み込まれる国際公開第２０１２１７０８８９号パンフレットに記載されているものなどの、切断可能な脂質であり得る。一実施形態では、脂質は、当技術分野で公知の方法によって、及び／又は国際公開第２０１３０８６３５４号パンフレットに記載されているように、合成することができ、その各々の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【０１４５】

ナノ粒子組成物は、様々な方法によって特徴付けることができる。例えば、顕微鏡法（例えば、透過型電子顕微鏡法又は走査電子顕微鏡）を使用して、ナノ粒子組成物の形態及びサイズ分布を調べることができる。ゼータ電位を測定するために、動的光散乱又は電位差測定（例えば、電位差滴定）を使用することができる。動的光散乱を利用して粒径を判定することもできる。Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ　Ｎａｎｏ　ＺＳ（Ｍａｌｖｅｒｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ　Ｌｔｄ，Ｍａｌｖｅｒｎ、ウスターシャー、英国）などの機器を使用して、粒径、多分散指数、及びゼータ電位などのナノ粒子組成物の複数の特性を測定することもできる。ナノ粒子のサイズは、限定されないが、炎症などの生物学的反応に対抗するのを助けることができ、又はポリヌクレオチドの生物学的効果を増加させることができる。本明細書で使用される場合、ナノ粒子組成物の文脈における「サイズ」又は「平均サイズ」は、ナノ粒子の平均直径を指す。

【０１４６】

一実施形態では、本明細書に記載の核酸は、約１０～約１００ｎｍの直径を有する脂質ナノ粒子に製剤化することができる。一実施形態では、ナノ粒子は、約１０～５００ｎｍの直径を有する。一実施形態では、ナノ粒子は、１００ｎｍを超える直径を有する。いくつかの実施形態では、ナノ粒子組成物の最大寸法は、１μｍ又はそれより短いもの（例えば、１μｍ、９００ｎｍ、８００ｎｍ、７００ｎｍ、６００ｎｍ、５００ｎｍ、４００ｎｍ、３００ｎｍ、２００ｎｍ、１７５ｎｍ、１５０ｎｍ、１２５ｎｍ、１００ｎｍ、７５ｎｍ、５０ｎｍ、又はそれより短いもの）である。

【０１４７】

ナノ粒子組成物は、比較的均質であり得る。多分散指数を使用して、ナノ粒子組成物の均一性、例えばナノ粒子組成物の粒径分布を示すことができる。小さな（例えば、０．３未満）多分散指数は、一般に、狭い粒径分布を示す。ナノ粒子組成物は、約０～約０．２５、例えば０．０１、０．０２、０．０３、０．０４、０．０５、０．０６、０．０７、０．０８、０．０９、０．１０、０．１１、０．１２、０．１３、０．１４、０．１５、０．１６、０．１７、０．１８、０．１９、０．２０、０．２１、０．２２、０．２３、０．２４又は０．２５の多分散指数を有することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるナノ粒子組成物の多分散指数は、約０．１０～約０．２０であり得る。

【０１４８】
ナノ粒子組成物のゼータ電位を使用して、組成物の動電電位を示すことができる。例えば、ゼータ電位は、ナノ粒子組成物の表面電荷を表すことができる。より高次に荷電した種が体内の細胞、組織、及び他のエレメントと望ましくなく相互作用する可能性があるため、正又は負である相対的に低い電荷を有するナノ粒子組成物が、概して望ましい。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるナノ粒子組成物のゼータ電位は、約－１０ｍＶ～約＋２０ｍＶ、約－１０ｍＶ～約＋１５ｍＶ、約１０ｍＶ～約＋１０ｍＶ、約－１０ｍＶ～約＋５ｍＶ、約－１０ｍＶ～約０ｍＶ、約－１０ｍＶ～約－５ｍＶ、約－５ｍＶ～約＋２０ｍＶ、約－５ｍＶ～約＋１５ｍＶ、約－５ｍＶ～約＋１０ｍＶ、約－５ｍＶ～約＋５ｍＶ、約－５ｍＶ～約０ｍＶ、約０ｍＶ～約＋２０ｍＶ、約０ｍＶ～約＋１５ｍＶ、約０ｍＶ～約＋１０ｍＶ、約０ｍＶ～約＋５ｍＶ、約＋５ｍＶ～約＋２０ｍＶ、約＋５ｍＶ～約＋約＋１５ｍＶ、又は約＋５ｍＶ～＋１０ｍＶであり得る。

【０１４９】
核酸／ポリヌクレオチドの「カプセル化効率」という用語は、供給される初期の量に対して、調製後にナノ粒子組成物によってカプセル化されるか、そうでなければ会合される核酸／ポリヌクレオチドの量を表す。本明細書で使用される場合、「カプセル化」は、完全な、実質的な、又は部分的な封入、閉じ込め、包囲、又は囲い込みを指すことができる。カプセル化効率は高いことが望ましい（例えば、１００％に近い）。カプセル化効率は、例えば、ナノ粒子組成物を分割する前後のナノ粒子組成物を含有する溶液の核酸／ポリヌクレオチドの量を、１つ以上の有機溶媒又は界面活性剤と比較することによって、測定することができる。

【０１５０】
蛍光を使用して、溶液の遊離ポリヌクレオチドの量を測定することができる。本明細書に記載のナノ粒子組成物の場合、核酸／ポリヌクレオチドのカプセル化効率は、少なくとも５０％、例えば５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％であり得る。いくつかの実施形態では、カプセル化効率は、少なくとも８０％であり得る。特定の実施形態では、カプセル化効率は、少なくとも９０％であり得る。

【０１５１】
本明細書に開示される薬学的組成物に存在する核酸／ポリヌクレオチドの量は、核酸／ポリヌクレオチドのサイズ、所望の標的及び／又は用途、又はナノ粒子組成物の他の特性などの複数の因子、並びに核酸／ポリヌクレオチドの特性に依存し得る。例えば、ナノ粒子組成物に有用な核酸／ポリヌクレオチドの量は、核酸／ポリヌクレオチドのサイズ（長さ又は分子量として表される）、配列、及び他の特性に依存し得る。ナノ粒子組成物の核酸／ポリヌクレオチドの相対的な量も変化し得る。本開示の脂質ナノ粒子組成物の中に存在する脂質組成物及び核酸／ポリヌクレオチドの相対的な量は、有効性及び忍容性を考慮して最適化することができる。

【０１５２】
ナノ粒子組成物を提供することに加えて、本開示はまた、ポリヌクレオチドをカプセル化することを含む脂質ナノ粒子を産生する方法を提供する。そのような方法は、本明細書に開示される薬学的組成物のいずれかを使用すること、及び当技術分野で公知の脂質ナノ粒子の製造方法に従って脂質ナノ粒子を製造することを含む。例えば、Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．（２０１５）’’Ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ｗｉｔｈ ｌｉｐｉｄ ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ’’ Ａｄｖ．Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ．Ｒｅｖ．８７：６８－８０、Ｓｉｌｖａ ｅｔ ａｌ．（２０１５）’’Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｓｙｓｔｅｍｓ ｆｏｒ Ｂｉｏｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ．Ｐａｒｔ Ｉ：Ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ ａｎｄ Ｍｉｃｒｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ’’ Ｃｕｒｒ．Ｐｈａｒｍ．Ｔｅｃｈｎｏｌ．１６：９４０－９５４、Ｎａｓｅｒｉ ｅｔ ａｌ．（２０１５）’’Ｓｏｌｉｄ Ｌｉｐｉｄ Ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ ａｎｄ Ｎａｎｏｓｔｒｕｃｔｕｒｅｄ Ｌｉｐｉｄ Ｃａｒｒｉｅｒｓ：Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ，Ｐｒｅｐａｒａｔ

ｉｏｎ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ’’ Ａｄｖ．Ｐｈａｒｍ．Ｂｕｌｌ．５：３０５－１３、Ｓｉｌｖａ ｅｔ ａｌ．（２０１５）’’Ｌｉｐｉｄ ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ ｆｏｒ ｔｈｅ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ ｂｉｏｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ’’ Ｃｕｒｒ．Ｐｈａｒｍ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１６：２９１－３０２、及びそこに引用されている参考文献を参照されたい。

【０１５３】

脂質ナノ粒子製剤は、典型的には、１つ以上の脂質を含む。いくつかの実施形態では、脂質は、当技術分野で「イオン化可能なカチオン性脂質」と呼ばれることもあるイオン化可能な脂質（例えば、イオン化可能なアミノ脂質）である。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子製剤は、リン脂質、構造脂質、及び粒子凝集を減少させることができる分子、例えばＰＥＧ又はＰＥＧ修飾脂質を含む他の成分をさらに含む。

【０１５４】

例示的なイオン化可能な脂質としては、限定されないが、本明細書に開示される化合物１～３４２、ＤＬｉｎ－ＭＣ$_3$－ＤＭＡ（ＭＣ$_3$）、ＤＬｉｎ－ＤＭＡ、ＤＬｅｎＤＭＡ、ＤＬｉｎ－Ｄ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－Ｍ－Ｃ２－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＫＣ$_3$－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＫＣ４－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－Ｃ２Ｋ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＭＰ－ＤＭＡ、ＤＯＤＭＡ、９８Ｎ１２－５、Ｃ$_1$２－２００、ＤＬｉｎ－Ｃ－ＤＡＰ、ＤＬｉｎ－ＤＡＣ、ＤＬｉｎＤＡＰ、ＤＬｉｎＡＰ、ＤＬｉｎ－ＥＧ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－２－ＤＭＡＰ、ＫＬ１０、ＫＬ２２、ＫＬ２５、オクチル－ＣＬｉｎＤＭＡ、オクチル－ＣＬｉｎＤＭＡ（２Ｒ）、オクチル－ＣＬｉｎＤＭＡ（２Ｓ）、及びそれらの任意の組み合わせのいずれか１つが挙げられる。他の例示的なイオン化可能な脂質としては、（１３Ｚ，１６Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－ノニルドコサ－１３，１６－ジエン－１－アミン（Ｌ６０８）、（２０Ｚ，２３Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルノナコサ－２０，２３－ジエン－１０－アミン、（１７Ｚ，２０Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘキサコサ－１７，２０ジエン－９－アミン、（１６Ｚ，１９Ｚ）－Ｎ５Ｎ－ジメチルペンタコサ－１６，１９－ジエン－８－アミン、（１３Ｚ，１６Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルドコサ－１３，１６－ジエン－５－アミン、（１２Ｚ，１５Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘニコサ－１２，１５－ジエン－４－アミン、（１４Ｚ，１７Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルトリコサ－１４，１７－ジエン－６－アミン、（１５Ｚ，１８Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルテトラコサ－１５，１８－ジエン－７－アミン、（１８Ｚ，２１Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘプタコサ－１８，２１－ジエン－１０－アミン、（１５Ｚ，１８Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルテトラコサ－１５，１８－ジエン－５－アミン、（１４Ｚ，１７Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルトリコサ－１４，１７－ジエン－４－アミン、（１９Ｚ，２２Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルオクタコサ－１９，２２－ジエン－９－アミン、（１８Ｚ，２１Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘプタコサ－１８，２１－ジエン－８－アミン、（１７Ｚ，２０Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘキサコサ－１７，２０－ジエン－７－アミン、（１６Ｚ，１９Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルペンタコサ－１６，１９－ジエン－６－アミン、（２２Ｚ，２５Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘントリアコンタ－２２，２５－ジエン－１０－アミン、（２１Ｚ，２４Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルトリアコンタ－２１，２４－ジエン－９－アミン、（１８Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘプタコス－１８－エン－１０－アミン、（１７Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘキサコス－１７－エン－９－アミン、（１９Ｚ，２２Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルオクタコサ－１９，２２－ジエン－７－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチルヘプタコサン－１０－アミン、（２０Ｚ，２３Ｚ）－Ｎ－エチル－Ｎ－メチルノナコサ－２０，２３－ジエン－１０－アミン、１－［（１１Ｚ，１４Ｚ）－１－ノニルコサ－１１，１４－ジエン－１－イル］ピロリジン、（２０Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘプタコス－２０－エン－１０－アミン、（１５Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルエプタコス－１５－エン－１０－アミン、（１４Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルノナコス－１４－エン－１０－アミン、（１７Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルノナコス－１７－エン－１０－アミン、（２４Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルトリトリアコン－２４－エン－１０－アミン、（２０Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルノナコス－２０－エン－１０－アミン、（２２Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘントリアコン－２２－エン－１０－アミン、（１６

Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルペンタコス－１６－エン－８－アミン、（１２Ｚ，１５Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－２－ノニルヘンニコサ－１２，１５－ジエン－１－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－オクチルシクロプロピル］エプタデカン－８－アミン、１－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－ヘキシルシクロプロピル］－Ｎ，Ｎ－ジメチルノナデカン－１０－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－オクチルシクロプロピル］ノナデカン－１０－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－２１－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－オクチルシクロプロピル］ヘニコサン－１０－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（１Ｓ，２Ｓ）－２－｛［（１Ｒ，２Ｒ）－２－ペンチルシクロプロピル］メチル｝シクロプロピル］ノナデカン－１０－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－オクチルシクロプロピル］ヘキサデカン－８－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－［（１Ｒ，２Ｓ）－２－ウンデシルシクロプロピル］テトラデカン－５－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－｛７－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－オクチルシクロプロピル］ヘプチル｝ドデカン－１－アミン、１－［（１Ｒ，２Ｓ）－２－ヘプチルシクロプロピル］－Ｎ，Ｎ－ジメチルオクタデカン－９－アミン、１－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－デシルシクロプロピル］－Ｎ，Ｎ－ジメチルペンタデカン－６－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－オクチルシクロプロピル］ペンタデカン－８－アミン、Ｒ－Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン、Ｓ－Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン、１－｛２－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］－１－［（オクチルオキシ）メチル］エチル｝ピロリジン、（２Ｓ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］－３－［（５Ｚ）－オクタ－５－エン－１－イルオキシ］プロパン－２－アミン、１－｛２－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］－１－［（オクチルオキシ）メチル］エチル｝アゼチジン、（２Ｓ）－１－（ヘキシルオキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－２－アミン、（２Ｓ）－１－（ヘプチルオキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－２－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－（ノニルオキシ）－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－２－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（９Ｚ）－オクタデカ－９－エン－１－イルオキシ］－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン；（２Ｓ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（６Ｚ，９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－６，９，１２－トリエン－１－イルオキシ］－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン、（２Ｓ）－１－［（１１Ｚ，１４Ｚ）－イコサ－１１，１４－ジエン－１－イルオキシ］－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－（ペンチルオキシ）プロパン－２－アミン、（２Ｓ）－１－（ヘキシルオキシ）－３－［（１１Ｚ，１４Ｚ）－イコサ－１１，１４－ジエン－１－イルオキシ］－Ｎ，Ｎ－ジメチルプロパン－２－アミン、１－［（１１Ｚ，１４Ｚ）－イコサ－１１，１４－ジエン－１－イルオキシ］－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン、１－［（１３Ｚ，１６Ｚ）－ドコサ－１３，１６－ジエン－１－イルオキシ］－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン、（２Ｓ）－１－［（１３Ｚ，１６Ｚ）－ドコサ－１３，１６－ジエン－１－イルオキシ］－３－（ヘキシルオキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルプロパン－２－アミン、（２Ｓ）－１－［（１３Ｚ）－ドコス－１３－エン－１－イルオキシ］－３－（ヘキシルオキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルプロパン－２－アミン、１－［（１３Ｚ）－ドコス－１３－エン－１－イルオキシ］－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン、１－［（９Ｚ）－ヘキサデカ－９－エン－１－イルオキシ］－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン、（２Ｒ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｈ（１－メトイルオクチル）オキシ］－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－２－アミン、（２Ｒ）－１－［（３，７－ジメチルオクチル）オキシ］－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオ

キシ］プロパン－２－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－（オクチルオキシ）－３－（｛８－［（１Ｓ，２Ｓ）－２－｛［（１Ｒ，２Ｒ）－２－ペンチルシクロプロピル］メチル｝シクロプロピル］オクチル｝オキシ）プロパン－２－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－｛［８－（２－オクチルシクロプロピル）オクチル］オキシ｝－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン、及び（１１Ｅ，２０Ｚ，２３Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルノナコサ－１１，２０，２－トリエン－１０－アミン、並びにそれらのいずれかの組み合わせを含む。

【０１５５】

リン脂質としては、限定されないが、グリセロリン脂質、例えば、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロール及びホスファチジン酸が挙げられる。リン脂質には、スフィンゴミエリンなどのホスホスフィンゴ脂質も含まれる。いくつかの実施形態では、リン脂質は、ＤＬＰＣ、ＤＭＰＣ、ＤＯＰＣ、ＤＰＰＣ、ＤＳＰＣ、ＤＵＰＣ、１８：０ジエチルエーテルＰＣ、ＤＬｎＰＣ、ＤＡＰＣ、ＤＨＡＰＣ、ＤＯＰＥ、４ＭＥ１６：０ＰＥ、ＤＳＰＥ、ＤＬＰＥ、ＤＬｎＰＥ、ＤＡＰＥ、ＤＨＡＰＥ、ＤＯＰＧ、及びそれらのいずれかの組み合わせである。いくつかの実施形態では、リン脂質は、ＭＰＰＣ、ＭＳＰＣ、ＰＭＰＣ、ＰＳＰＣ、ＳＭＰＣ、ＳＰＰＣ、ＤＨＡＰＥ、ＤＯＰＧ、及びそれらのいずれかの組み合わせである。いくつかの実施形態では、脂質組成物の中のリン脂質（例えば、ＤＳＰＣ）の量は、約１ｍｏｌ％～約２０ｍｏｌ％の範囲である。

【０１５６】

構造脂質には、ステロール及びステロール部分を含む脂質が含まれる。いくつかの実施形態では、構造脂質は、コレステロール、フェコステロール、シトステロール、エルゴステロール、カンペステロール、スチグマステロール、ブラシカステロール、トマチジン、トマチン、ウルソール酸、アルファ－トコフェロール、及びそれらの混合物を含む。いくつかの実施形態では、構造脂質はコレステロールである。いくつかの実施形態では、脂質組成物の構造脂質（例えば、コレステロール）の量は、約２０ｍｏｌ％～約６０ｍｏｌ％の範囲である。

【０１５７】

ＰＥＧ修飾脂質としては、ＰＥＧ修飾ホスファチジルエタノールアミン及びホスファチジン酸、ＰＥＧ－セラミドコンジュゲート（例えば、ＰＥＧ－ＣｅｒＣ$_{14}$又はＰＥＧ－ＣｅｒＣ２０）、ＰＥＧ修飾ジアルキルアミン及びＰＥＧ修飾１，２－ジアシルオキシプロパン－３－アミンが挙げられる。このような脂質は、ＰＥＧ化脂質とも呼ばれる。例えば、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ－ｃ－ＤＯＭＧ、ＰＥＧ－ＤＭＧ、ＰＥＧ－ＤＬＰＥ、ＰＥＧ－ＤＭＰＥ、ＰＥＧ－ＤＰＰＣ又はＰＥＧ－ＤＳＰＥ脂質であり得る。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ－脂質は、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－ＤＭＧ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－［アミノ（ポリエチレングリコール）］（ＰＥＧ－ＤＳＰＥ）、ＰＥＧ－ジステリルグリセロール（ＰＥＧ－ＤＳＧ）、ＰＥＧ－ジパルメトレイル、ＰＥＧ－ジオレイル、ＰＥＧ－ジステアリル、ＰＥＧ－ジアシルグリカミド（ＰＥＧ－ＤＡＧ）、ＰＥＧ－ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（ＰＥＧ－ＤＰＰＥ）、又はＰＥＧ－ｌ，２－ジミリスチロキシルプロピル－３－アミン（ＰＥＧ－ｃ－ＤＭＡ）である。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ部分は、約１０００、２０００、５０００、１万、１５，０００又は２万ダルトンのサイズを有する。いくつかの実施形態では、脂質組成物のＰＥＧ－脂質の量は、約０ｍｏｌ％～約５ｍｏｌ％の範囲である。

【０１５８】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のＬＮＰ製剤は、透過性エンハンサー分子をさらに含むことができる。非限定的な透過性エンハンサー分子は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第２００５０２２２０６４号明細書に記載されている。

【０１５９】

ＬＮＰ製剤は、ホスフェートコンジュゲートをさらに含むことができる。ホスフェート

コンジュゲートは、ｉｎ　ｖｉｖｏの循環時間を増加させ、及び／又はナノ粒子の標的送達を増加させることができる。ホスフェートコンジュゲートは、例えば国際公開第２０１３０３３４３８号パンフレット又は米国特許出願公開第２０１３０１９６９４８号明細書に記載されている方法によって作製することができる。ＬＮＰ製剤はまた、例えば、米国特許出願公開第２０１３００５９３６０号明細書、米国特許出願公開第２０１３０１９６９４８号明細書及び米国特許出願公開第２０１３００７２７０９号明細書に記載されているようなポリマーコンジュゲート（例えば、水可溶型コンジュゲート）を含むことができる。各参考文献は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０１６０】

ＬＮＰ製剤は、対象におけるナノ粒子の送達を増強するためのコンジュゲートを含むことができる。さらに、コンジュゲートは、対象におけるナノ粒子の食作用クリアランスを阻害することができる。いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、ヒト膜タンパク質ＣＤ４７から設計された「自己」ペプチド（例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Ｒｏｄｒｉｇｕｅｚ　ｅｔ　ａｌ，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２０１３３３９，９７１－９７５に記載の「自己」粒子）であり得る。Ｒｏｄｒｉｇｕｅｚらによって示されるように、自己ペプチドはナノ粒子のマクロファージ媒介性クリアランスを遅延させ、これによりナノ粒子の送達が増強された。

【０１６１】

ＬＮＰ製剤は、炭水化物担体を含むことができる。非限定的な例として、炭水化物担体としては、限定されないが、無水物修飾フィトグリコーゲン又はグリコーゲン型材料、オクテニルスクシネートフィトグリコーゲン、フィトグリコーゲンβ－デキストリン、無水物修飾フィトグリコーゲンβ－デキストリン（例えば、参照によりその全体が組み込まれる国際公開第２０１２１０９１２１号パンフレット）を挙げることができる。

【０１６２】

ＬＮＰ製剤は、粒子の送達を改善するために界面活性剤又はポリマーでコーティングすることができる。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、それだけに限らないが、その全体が参照により組み込まれる米国特許出願公開第２０１３０１８３２４４号明細書に記載されているような、中性表面電荷を有するＰＥＧコーティング及び／又はコーティングなどの親水性コーティングでコーティングすることができる。

【０１６３】

ＬＮＰ製剤は、米国特許第８，２４１，６７０号明細書、及び米国特許第２０１３１１００２８号明細書に記載されているように、脂質ナノ粒子が粘膜バリアに浸透することができるように、粒子の表面特性を変化させるように操作することができる。これらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。粘液を透過するように操作されたＬＮＰは、ポリマー材料（すなわち、ポリマーコア）及び／又はポリマービタミンコンジュゲート及び／又はトリブロックコポリマーを含むことができる。ポリマー材料は、ポリアミン、ポリエーテル、ポリアミド、ポリエステル、ポリカルバメート、ポリ尿素、ポリカーボネート、ポリ（スチレン）、ポリイミド、ポリスルホン、ポリウレタン、ポリアセチレン、ポリエチレン、ポリエチレンイミン、ポリイソシアネート、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリアクリロニトリル、及びポリアリレートを含むことができるが、これらに限定されない。

【０１６４】

粘液を透過するように操作されたＬＮＰはまた、表面改質剤、例えば、限定されないが、アニオン性タンパク質（例えば、ウシ血清アルブミン）、界面活性剤（例えば、カチオン性界面活性剤、例えばジメチルジオクタデシルアンモニウム臭化物）、糖類又は糖誘導体（例えば、シクロデキストリン）、核酸、ポリマー（例えば、ヘパリン、ポリエチレングリコール及びポロキサマー）、粘液溶解剤（例えば、Ｎ－アセチルシステイン、ヨモギ、ブロメライン、パパイン、クレロデンドラム、アセチルシステイン、ブロムヘキシン、カルボシステイン、エプラジノン、メスナ、アンブロキソール、ソブレロール、ドミドール、レトスチン、ステプロニン、チオプロニン、ゲルゾリン、チモシンｂ４ドルナーゼア

ルファ、ネルテネキシン、エルドステイン）及びｒｈＤＮａｓｅを含む様々なＤＮａｓｅを含み得る。いくつかの実施形態では、粘液透過性ＬＮＰは、粘膜透過性増強コーティングを含む低張性製剤であり得る。製剤は、それが送達される上皮に対して低張性であり得る。低張性製剤の非限定的な例は、例えば、国際公開第２０１３１１００２８号パンフレットに見出すことができ、これは参照によりその全体が組み込まれる。

【０１６５】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の核酸は、制御放出及び／又は標的化送達のために製剤化することができる。本明細書で使用される場合、「制御放出」は、治療結果をもたらすための特定の放出パターンに適合する薬学的組成物又は化合物放出プロファイルを指す。一実施形態では、核酸は、制御放出及び／又は標的化送達のために、本明細書に記載される及び／又は当技術分野で公知の送達剤にカプセル化することができる。本明細書で使用される場合、「カプセル化する」という用語は、封入する、包囲する、又は包み込むことを意味する。本発明の核酸の製剤に関するので、カプセル化は、実質的、完全又は部分的であり得る。「実質的にカプセル化される」という用語は、本発明の薬学的組成物又は化合物の少なくとも５０、６０、７０、８０、８５、９０、９５、９６、９７、９８、９９超、又は９９％超を送達剤の中に封入する、包囲する、又は包み込むことができることを意味する。「部分的にカプセル化」は、１０、１０、２０、３０、４０５０又はそれ未満の本発明の薬学的組成物又は化合物を送達剤の中に封入する、包囲する、又は包み込むことができるということを意味する。

【０１６６】

いくつかの実施形態では、核酸組成物は、持続放出のために製剤化することができる。本明細書で使用される場合、「持続放出」は、特定の期間にわたって放出速度に適合する薬学的組成物又は化合物を指す。期間は、数時間、数日、数週間、数ヶ月及び数年を含むことができるが、これらに限定されない。非限定的な例として、本明細書に記載の持続放出ナノ粒子組成物は、国際公開第２０１００７５０７２号パンフレット、米国特許出願公開第２０１００２１６８０４号明細書、米国特許出願公開第２０１１０２１７３７７号明細書、米国特許出願公開第２０１２０２０１８５９号明細書及び米国特許出願公開第２０１３０１５０２９５号明細書に開示されているように製剤化することができ、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ナノ粒子組成物は、それぞれ参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第２００８１２１９４９号パンフレット、国際公開第２０１０００５７２６号パンフレット、国際公開第２０１０００５７２５号パンフレット、国際公開第２０１１０８４５２１号パンフレット、国際公開第２０１１０８４５１８号パンフレット、米国特許出願公開第２０１００００６９４２６号明細書、米国特許出願公開第２０１２０００４２９３号明細書及び米国特許出願公開第２０１００１０４６５５号明細書に記載されているものなど、標的特異的であるように製剤化することができる。

【０１６７】

投与

上述の治療剤及び組成物は、本明細書に記載の１つ以上の組成物を対象に投与することによって、それを必要とする対象のＰＴＣ関連疾患を治療する、それに対して保護する、及び／又はそれを予防するために使用することができる。

【０１６８】

そのような薬剤及び組成物は、特定の対象の年齢、性別、体重及び状態、並びに投与経路などの要因を考慮して、医学界の当業者に周知の投与量及び技術によって、適用量で投与することができる。組成物の用量は、１μｇ～１０ｍｇ活性成分／ｋｇ体重／時間であり得、２０μｇ～１０ｍｇ成分／ｋｇ体重／時間であり得る。組成物は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０又は３１日ごとに投与することができる。有効な治療のための組成物用量の数は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０であり得る。

【０１６９】
薬剤又は組成物は、予防又は治療で投与することができる。治療用途では、薬剤又は組成物は、治療効果を誘発するのに十分な量で、それを必要とする対象に投与される。これを達成するのに十分な量を「治療有効用量」と定義する。この使用に有効な量は、例えば、投与される組成物レジメンの特定の組成物、投与様式、疾患の病期及び重症度、対象の一般的な健康状態、及び処方する医師の判断に依存する。
【０１７０】
薬剤又は組成物は、Ｄｏｎｎｅｌｌｙら（Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５：６１７－６４８（１９９７））、米国特許第５，５８０，８５９号明細書、米国特許第５，７０３，０５５号明細書及び米国特許第５，６７９，６４７号明細書に記載されているような当技術分野で周知の方法によって投与することができる。そのすべての内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。組成物のＤＮＡは、例えばワクチンガンを使用して、個体に投与することができる粒子又はビーズに複合体化することができる。当業者は、生理的に許容され得る化合物を含む薬学的に許容される担体の選択が、例えば、発現ベクターの投与経路に依存することを知っているであろう。組成物は、様々な経路を介して送達され得る。典型的な送達経路としては、非経口投与、例えば、皮内、筋肉内又は皮下送達が挙げられる。他の経路としては、経口投与、鼻腔内及び膣内経路が挙げられる。特に組成物のＤＮＡについては、組成物を個体の組織の間質腔に、送達することができる（米国特許第５，５８０，８５９号明細書及び米国特許第５，７０３，０５５号明細書、これらのすべての内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。組成物はまた、筋肉に投与することができ、又は皮内若しくは皮下注入を介して、又はイオン導入などによって経皮的に投与することができる。組成物の表皮投与も使用することができる。表皮投与は、表皮の最外層を機械的又は化学的に刺激して、刺激物に対する免疫応答を刺激することを含み得る（米国特許第５，６７９，６４７号明細書）。
【０１７１】
一実施形態では、組成物は、鼻腔を介した投与のために製剤化することができる。担体が固体である経鼻投与に適した製剤は、例えば約１０～約５００ミクロンの範囲の粒径を有する粗い粉末を含むことができ、これは嗅ぎタバコを摂取するように、すなわち、鼻の近くに保持された粉末の容器から鼻腔経路を通して急速に吸入することによって。投与される。製剤は、鼻腔スプレー、点鼻薬、又はネブライザーによるエアロゾル投与によるものであり得る。製剤は、組成物の水溶液又は油性溶液を含むことができる。
【０１７２】
組成物は、懸濁液、シロップ剤又はエリキシル剤などの液体製剤であり得る。組成物はまた、非経口、皮下、皮内、筋肉内又は静脈内投与（例えば、注入可能投与）のための調製物、例えば滅菌懸濁液又はエマルジョンであり得る。
【０１７３】
組成物は、リポソーム、ミクロスフェア又は他のポリマーマトリックス（米国特許第５，７０３，０５５号明細書；Ｇｒｅｇｏｒｉａｄｉｓ，Ｌｉｐｏｓｏｍｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌｓ．Ｉｔｏ ＩＩＩ（２ｎｄ ｅｄ．１９９３）、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる）に組み込むことができる。リポソームは、リン脂質又は他の脂質からなることができ、作製及び投与が比較的単純な非毒性の生理的に許容される代謝可能な担体であり得る。
【０１７４】
ＡＣＥ－ｔＲＮＡ又はＡＣＥ－ｔＲＮＡをコードする核酸分子は、経口、非経口、舌下、経皮、直腸、経粘膜、局所、吸入による、頬側投与による、胸膜内、静脈内、動脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、鼻腔内、髄腔内及び関節内又はそれらの組み合わせを含む異なる経路によって投与され得る。獣医学的使用のために、組成物は、通常の獣医学的実施に従って適切に許容される製剤として投与され得る。獣医は、特定の動物に最も適した投薬レジメン及び投与経路を容易に判定することができる。組成物は、従来のシリンジ、無針注入装置「マイクロプロジェクタイルによる銃の発射」、又はエレクトロポレーション（「

ＥＰ」）、「流体力学的方法」、若しくは超音波などの他の物理的方法によって投与することができる。

【０１７５】

ＡＣＥ－ｔＲＮＡ又はＡＣＥ－ｔＲＮＡをコードする核酸分子は、ｉｎ　ｖｉｖｏエレクトロポレーションを伴う又は伴わないＤＮＡ注入、リポソーム媒介性、ナノ粒子促進性、組換えアデノウイルス、組換えアデノウイルス関連ウイルス及び組換えワクシニアなどの組換えベクターを含むいくつかの周知の技術によって、哺乳動物に送達され得る。ＡＣＥ－ｔＲＮＡ又はＡＣＥ－ｔＲＮＡをコードする核酸分子は、ＤＮＡ注入及びｉｎ　ｖｉｖｏエレクトロポレーションを介して送達され得る。

【０１７６】

エレクトロポレーション

エレクトロポレーションによる組成物の投与は、細胞膜に可逆的細孔を形成させるのに有効なエネルギーパルスを哺乳動物の所望の組織に送達するように構成することができるエレクトロポレーション装置を使用して、達成することができ、好ましくは、エネルギーパルスは、ユーザによって入力されたプリセット電流と同様の定電流である。エレクトロポレーション装置は、エレクトロポレーションの成分及び電極アセンブリ又はハンドルアセンブリを備え得る。エレクトロポレーションの成分は、コントローラ、電流波形発生器、インピーダンステスタ、波形ロガー、入力エレメント、状態報告エレメント、通信ポート、メモリ成分、電源、及び電源スイッチを含む、エレクトロポレーション装置の様々なエレメントの１つ又は複数を含み、組み込むことができる。エレクトロポレーションは、ｉｎ　ｖｉｖｏのエレクトロポレーション装置、例えば、プラスミドによる細胞のトランスフェクションを容易にするためのＣＥＬＬＥＣＴＲＡ　ＥＰシステム又はＥＬＧＥＮエレクトロポレーターを使用して達成され得る。

【０１７７】

エレクトロポレーションの成分は、エレクトロポレーション装置の１つのエレメントとして機能することができ、他のエレメントは、エレクトロポレーションの成分と通ずる別個のエレメント（又は成分）である。エレクトロポレーションの成分は、エレクトロポレーションの成分とは別個のエレクトロポレーション装置のさらに他のエレメントと通ずることができるエレクトロポレーション装置の２つ以上のエレメントとして、機能することができる。１つの電気機械装置又は機械装置の一部として存在するエレクトロポレーション装置のエレメントは、１つの装置として、又は互いに通信する別個のエレメントとして機能することができるため、限定される必要がない。所望の組織において定電流を生成し、フィードバック機構を含む、エレクトロポレーションの成分は、エネルギーパルスを送達することができる。電極アセンブリは、空間配置の複数の電極を有する電極アレイを含むことができ、電極アセンブリは、エレクトロポレーション成分からエネルギーのパルスを受け取り、それを電極を通して所望の組織に送達する。複数の電極のうちの少なくとも１つは、エネルギーパルスの送達中は中性であり、所望の組織のインピーダンスを測定し、インピーダンスをエレクトロポレーションの成分に伝達する。フィードバック機構は、測定されたインピーダンスを受信することができ、エレクトロポレーションの成分によって送達されるエネルギーのパルスを調整して定電流を維持することができる。

【０１７８】

複数の電極は、分散するパターンでエネルギーのパルスを送達することができる。複数の電極は、プログラムされたシーケンスの下で電極の制御を介して非中央集権型パターンでエネルギーのパルスを送達することができ、プログラムされたシーケンスは、ユーザによってエレクトロポレーションの成分に入力される。プログラムされたシーケンスは、順番に送達される複数のパルスを含むことができ、複数のパルスの各パルスは、インピーダンスを測定する１つの中性電極を有する少なくとも２つの活性電極によって送達され、複数のパルスの後続のパルスは、インピーダンスを測定する１つの中性電極を有する少なくとも２つの活性電極のうちの異なる１つによって送達される。

【０１７９】

フィードバック機構は、ハードウェア又はソフトウェアのいずれかによって実行されてもよい。フィードバック機構は、アナログ閉ループ回路によって実行され得る。フィードバックは、５０μβ、２０μβ、１０又は１μβごとに行われるが、好ましくはリアルタイムフィードバック又は瞬時（すなわち、応答時間を判定するために利用可能な技術によって判定されるときに実質的に瞬間的である）である。中性電極は、所望の組織におけるインピーダンスを測定し、インピーダンスをフィードバック機構に伝達することができ、フィードバック機構は、インピーダンスに応答し、エネルギーのパルスを調整して、定電流をプリセット電流と同様の値に維持する。フィードバック機構は、エネルギーパルスの送達中に連続的かつ瞬時に定電流を維持することができる。

【０１８０】

本発明の組成物の送達を容易にし得るエレクトロポレーション装置及びエレクトロポレーションの方法の例としては、米国特許第７２４５９６３号明細書及び米国特許出願公開第２００５／００５２６３０号明細書に記載されているものが挙げられ、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。当技術分野で公知の他のエレクトロポレーション装置及びエレクトロポレーションの方法も、組成物の送達を容易にするために使用することができる。例えば、米国特許第９４５２２８５号明細書、米国特許第７２４５９６３号明細書、米国特許第５２７３５２５号明細書、米国特許第６１１０１６１号明細書、米国特許第６９５８０６０号明細書、米国特許第６９３９８６２号明細書、米国特許第６９７６６９号明細書、米国特許第７３２８０６４号明細書及び米国特許出願公開第２００５／００５２６３０号明細書を参照されたい。

【０１８１】

定義

核酸又はポリヌクレオチドは、ＤＮＡ分子（例えば、ｃＤＮＡ又はゲノムＤＮＡ）、ＲＮＡ分子（例えば、ｍＲＮＡ）、又はＤＮＡ若しくはＲＮＡアナログを指す。ＤＮＡ又はＲＮＡアナログは、ヌクレオチドアナログから合成することができる。核酸分子は、一本鎖又は二本鎖であり得るが、好ましくは二本鎖ＤＮＡである。「単離された核酸」は、その構造が任意の天然に存在する核酸の構造又は天然に存在するゲノム核酸の任意の断片の構造と同一ではない核酸を指す。したがって、この用語は、例えば、（ａ）天然に存在するゲノムＤＮＡ分子の一部の配列を有するが、天然に存在する生物のゲノム中の分子のその部分に隣接するコード配列の両方に隣接しないＤＮＡ、（ｂ）得られた分子がいずれかの天然に存在するベクター又はゲノムＤＮＡと同一でないように、ベクター又は原核生物若しくは真核生物のゲノムＤＮＡに組み込まれた核酸、（ｃ）ｃＤＮＡ、ゲノム断片、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によって産生される断片、又は制限断片などの別個の分子、及び（ｄ）ハイブリッド遺伝子、すなわち融合タンパク質をコードする遺伝子の一部である組換えヌクレオチド配列を包含する。上記の核酸は、本発明のｔＲＮＡを発現させるために使用することができる。この目的のために、核酸を適切な調節配列に動作可能に連結して発現ベクターを生成することができる。

【０１８２】

ベクターは、それが連結されている別の核酸を輸送することができる核酸分子を指す。ベクターは、自律複製又は宿主ＤＮＡへの組み込みが可能であってもなくてもよい。ベクターの例は、プラスミド、コスミド又はウイルスベクターが挙げられる。ベクターは、宿主細胞における目的の核酸の発現に適した形態の核酸を含む。好ましくは、ベクターは、発現される核酸配列に動作可能に連結された１つ以上の調節配列を含む。

【０１８３】

「調節配列」には、プロモーター、エンハンサー及び他の発現制御エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）が含まれる。調節配列には、ヌクレオチド配列の構成的発現を指示するもの、並びに組織特異的調節及び／又は誘導性配列が含まれる。発現ベクターの設計は、形質転換される宿主細胞の選択、所望のタンパク質又はＲＮＡの発現レベルなどの因子に依存し得る。発現ベクターを宿主細胞に導入して、目的のＲＮＡ又はポリペプチドを産生することができる。プロモーターは、ＲＮＡポリメラーゼがＤＮＡに結合して

ＲＮＡ合成を開始するように指示するＤＮＡ配列として定義される。強力なプロモーターは、ＲＮＡを高い頻度で開始させるものである。

【０１８４】

「プロモーター」は、ポリヌクレオチドの転写を開始及び調節するヌクレオチド配列である。プロモーターには、誘導性プロモーター（プロモーターに動作可能に連結されたポリヌクレオチド配列の発現は、被分析物、補助因子、制御タンパク質などによって誘導される）、抑制性プロモーター（プロモーターに動作可能に連結されたポリヌクレオチド配列の発現は、分析物、補因子、制御タンパク質などによって抑制される）及び構成的プロモーターが含まれ得る。「プロモーター」又は「制御エレメント」という用語は、完全な長さのプロモーター領域及びこれらの領域の機能的（例えば、転写又は翻訳を制御する）セグメントを含むことが意図される。

【０１８５】

「動作可能に連結された」は、そのように記載された成分がそれらの通常の機能を実行するように構成されるエレメントの配置を指す。したがって、核酸配列に動作可能に連結された所与のプロモーターは、適切な酵素が存在する場合、その配列の発現を行うことができる。プロモーターは、その発現を指示するように機能する限り、配列と近接する必要はない。したがって、例えば、介在する翻訳されていないが転写された配列がプロモーター配列と核酸配列との間に存在することができ、プロモーター配列は依然としてコード配列に「動作可能に連結された」と考えることができる。したがって、「動作可能に連結された」という用語は、転写複合体によるプロモーターエレメントの認識時に目的のＤＮＡ配列の転写の開始を可能にするプロモーターエレメント及び目的のＤＮＡ配列の任意の間隔又は配向を包含することを意図している。

【０１８６】

本明細書で使用される「発現カセット」は、適切な宿主細胞において特定のヌクレオチド配列の発現を指示することができる核酸配列を意味し、これは、終結シグナルに動作可能に連結され得る目的のヌクレオチド配列に動作可能に連結されたプロモーターを含み得る。それはまた、ヌクレオチド配列の適切な翻訳に必要な配列を含み得る。コード化領域は、通常、目的のＲＮＡ又はタンパク質をコードする。目的のヌクレオチド配列を含む発現カセットはキメラであり得る。発現カセットはまた、天然に存在するが、異種発現に有用な組換え形態で得られたものであってもよい。発現カセットにおけるヌクレオチド配列の発現は、宿主細胞が何らかの特定の刺激に曝露された場合にのみ転写を開始する構成的プロモーター又は調節可能なプロモーターの制御下にあり得る。多細胞生物の場合、プロモーターはまた、特定の組織若しくは器官又は発達段階に特異的であり得る。特定の実施形態では、プロモーターは、ＰＧＫ、ＣＭＶ、ＲＳＶ、ＨＩ又はＵ６プロモーター（Ｐｏｌ　ＩＩ及びＰｏｌ　ＩＩＩプロモーター）である。

【０１８７】

「核酸断片」は、所与の核酸分子の一部である。ポリヌクレオチド配列の「実質的な同一性」という用語は、ポリヌクレオチドが、標準的なパラメータを使用して記載されるアラインメントプログラムの１つを使用する参照配列と比較して、少なくとも７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、若しくは７９％、又は少なくとも８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、若しくは８９％、又は少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、若しくは９４％）、又はさらには少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の配列同一性を有する配列を含むことを意味する。

【０１８８】

本明細書で使用される場合、「ミニベクター」は、複製開始点及び抗生物質選択遺伝子を欠き、約１００ｂｐから約５ｋｂｐまでのサイズを有する、ミニサイズ及び環状ＤＮＡベクターシステム、例えば二本鎖環状ＤＮＡ（例えば、ミニサークル）又は閉じた線状ＤＮＡ分子（例えば、ＣＥＤＴ）を指す。それは、例えば、組換え部位の外側のプラスミド配列を排除するための親プラスミドの部位特異的組換えによって得ることができる。それ

は、例えば、プロモーター及び目的の核酸配列を含む、導入遺伝子発現カセットのみを有する核酸分子を含み、核酸配列は、例えば、ＰＴＣを抑制するためのＡＣＥ－ｔＲＮＡであり得、重要なことに、細菌起源の配列はない。

【０１８９】

「対象」という用語は、ヒト及び非ヒト動物を含む。治療のための好ましい対象はヒトである。本明細書で使用される場合、「対象」及び「患者」という用語は、対象が任意の形態の治療を受けているか、又は現在経験しているかどうかに関係なく、交換可能に使用される。本明細書で使用される場合、「対象（１人及び複数）」という用語は、限定するものではないが、哺乳動物（例えば、ウシ、ブタ、ラクダ、ラマ、ウマ、ヤギ、ウサギ、ヒツジ、ハムスター、モルモット、ネコ、イヌ、ラット及びマウス、非ヒト霊長類（例えば、カニクイザル、チンパンジーなどのサル）及びヒト）を含む任意の脊椎動物を指し得る。一実施形態では、対象はヒトである。別の実施形態では、対象は、疾患モデルとして適した実験的な非ヒト動物又は動物である。

【０１９０】

ＰＴＣ又はナンセンス突然変異、ＰＴＣ関連疾患、又はＰＴＣ関連疾患に関連する疾患又は障害とは、１つ又は複数のナンセンス突然変異が、単一ヌクレオチド置換によってアミノ酸コドンをＰＴＣに変化させ、その結果、欠損切断型タンパク質が生じることによって引き起こされる、又は特徴付けられる任意の状態のことを指す。

【０１９１】

本明細書で使用される場合、「治療すること」又は「治療」は、障害、障害の症状、障害に続発する疾患状態、又は障害に対する素因を治癒、緩和、軽減、矯正、発症の遅延、予防、又は改善する目的で、障害を有するか、又は障害を発症するリスクがある対象に化合物又は薬剤を投与することを指す。「予防する」、「予防すること」、「予防」、「予防処置」などの用語は、障害又は状態を有していないが、障害又は状態を発症するリスクがあるか又は発症しやすい対象において、障害又は状態を発症する確率を低下させることを指す。「改善」は、一般に、疾患又は障害の徴候又は症状の数又は重症度の低減を指す。

【０１９２】

「予防する」、「予防すること」、「予防」という用語は、一般に、対象における疾患又は障害の発症の減少を指す。予防は、完全であってもよく、例えば、対象における疾患又は障害の完全な欠如であってもよい。予防はまた部分的であってもよく、対象における疾患又は障害の発生が、本発明の実施形態がなければ生じたであろうものよりも少なくなるようにする。疾患を「予防すること」は、一般に、疾患の完全な発症を阻害することを指す。

【０１９３】

「薬学的組成物」という用語は、活性剤と不活性又は活性の担体との組み合わせを指し、組成物をｉｎ　ｖｉｖｏ又はエクスビボでの診断又は治療使用に特に適したものにする。「薬学的に許容される担体」は、対象に投与された後に、又は対象に投与されたとたん、望ましくない生理的効果を引き起こしはしない。薬学的組成物の担体は、活性成分と適合性があり、それを安定化することができるという意味でも「許容可能」でなければならない。１つ又は複数の可溶化剤を、活性化合物の送達のための薬学的担体として利用することができる。薬学的に許容される担体の例としては、剤形として使用可能な組成物を得るための生体適合性ビヒクル、アジュバント、添加剤及び希釈剤が挙げられるが、これらに限定されない。他の担体としては、コロイド状酸化ケイ素、ステアリン酸マグネシウム、セルロース、ラウリル硫酸ナトリウムなどが挙げられる。

【０１９４】

「約」という用語は、一般に、示された数の±１０％を指す。例えば、「約１０％」は９％～１１％の範囲を示すことができ、「約１」は０．９～１．１を意味することができる。「約」の他の意味は、四捨五入などの文脈から明らかであり得、例えば「約１」はまた、０．５から１．４を意味し得る。

【０１９５】
本明細書における値の範囲の列挙は、単に、その範囲内に入る各々の別個の値を個別に参照する簡略方法として役立つことを意図している。本明細書に別途指示がない限り、各々の個々の値は、本明細書に個別に列挙されているかのように本明細書に組み込まれる。
【実施例】
【０１９６】
実施例１　ＡＣＥ－ｔＲＮＡプラットフォーム
新規ハイスループットクローニング（ＨＴＣ）及びスクリーニング（ＨＴＳ）法を用いて、５００を超えるサプレッサーｔＲＮＡ（ＡＣＥ－ｔＲＮＡ）のライブラリーが最近開発された。ライブラリーでは、ヒトｔＲＮＡ遺伝子のアンチコドンを、疾患を引き起こすＰＴＣコドン（ＵＡＧ、ＵＡＡ及びＵＧＡ）を認識するように操作した。ＡＣＥ－ｔＲＮＡプラットフォームは、翻訳されたコドンからの１つのヌクレオチド変化の結果生じるすべての可能なＰＴＣを標的とした（$tRNA^{Arg}_{UGA}$、$tRNA^{Gln}_{UAA}$、$tRNA^{Gln}_{UAG}$、$tRNA^{Trp}_{UGA}$、$tRNA^{Trp}_{UAG}$、$tRNA^{Glu}_{UAA}$、$tRNA^{Glu}_{UAG}$、$tRNA^{Cys}_{UGA}$、$tRNA^{Tyr}_{UAG}$、$tRNA^{Tyr}_{UAA}$、$tRNA^{Leu}_{UGA}$、$tRNA^{Leu}_{UAG}$、$tRNA^{Leu}_{UAA}$、$tRNA^{Lys}_{UAG}$、$tRNA^{Lys}_{UGA}$、$tRNA^{Ser}_{UGA}$、$tRNA^{Ser}_{UAG}$、ａｎｄ$tRNA^{Ser}_{UAA}$）。$ACE-tRNA^{Gly}_{UGA}$（例えば、配列番号５）はＵＧＡコドンに特異的であり、これは、ＡＣＥ－ｔＲＮＡが３つすべての終止コドンを一般的に標的とする分子（例えば、小分子）よりもｉｎ　ｖｉｖｏでオフターゲット効果が少ないという前提を裏付けている。さらに、$ACE-tRNA^{Gly}_{UGA}$（例えば、配列番号５）は、ＨＥＫ２９３細胞における４８時間のインキュベーション後にＡＭＧ　Ｇ４１８及びゲンタマイシンよりも有意に優れたことが見出された。
【０１９７】
スクリーニングで同定されたＡＣＥ－ｔＲＮＡがアミノアシル－ｔＲＮＡシンセターゼによる認識を犠牲にして官能化されているかどうかを確かめるためにアッセイを行った。具体的には、最も効果的であるためには、ＡＣＥ－ｔＲＮＡは正しいアミノ酸（同族アミノ酸）でＰＴＣを抑制しなければならない。高分解能質量分析を使用して、$ACE-tRNA^{Gly}_{UGA}$及び$tRNA^{Trp}_{UGA}$の両方の同族アミノ酸が、高い忠実度でコードされ、シームレスなＰＴＣ抑制をもたらすことが確認された。
【０１９８】
「実際の終止」のＡＣＥ－ｔＲＮＡ依存的抑制の効率を判定するためにアッセイがまた行われた。その目的のために、$ACE-tRNA^{Gln}_{UAA}$、$ACE-tRNA^{Glu}_{UAG}$、$ACE-tRNA^{Arg}_{UGA}$、$ACE-tRNA^{Gly}_{UGA}$及び$ACE-tRNA^{Trp}_{UGA}$（例えば、配列番号７９及び９４によってコードされるもの、並びに配列番号８、５及び１を有するもの）をコードするｃＤＮＡプラスミドをＨＥＫ２９３細胞にトランスフェクトし、４８時間後、細胞ＲＮＡをＲｉｂｏ－Ｓｅｑに供して、３’非翻訳領域（ＵＴＲ）のリボソーム占有率が、対照と比較して、ＡＣＥ－ｔＲＮＡの存在下でより高いものであるかどうかを判定した（図２）。図２Ａは、ＵＡＡ（赤色）、ＵＡＧ（緑色）及びＵＧＡ（青色）を有する個々の転写物（ドット）のｍＲＮＡ　３’ＵＴＲリボソーム占有率の倍率変化を示す。リボソームの３’ＵＴＲ占有量は名目上の量であり、ＡＣＥ－ｔＲＮＡが「実際の」終止を有意に抑制しなかったことを示した。図２Ｂに示されるＲｉｂｏ－Ｓｅｑの結果により、ＡＣＥ－ｔＲＮＡの「真の」終止抑制活性の結果としての終止コドンに関連するすべての翻訳されたＲＮＡ転写産物上の３’ＵＴＲリボソーム占有の平均位置及び大きさの視覚化が可能になった。「鋸歯状」パターンが、個々のコドンリボソーム占有率を表した。$ACE-tRNA^{Arg}_{UGA}$による終止コドンの後に観察された連続した鋸歯状パターンは、フレーム内リードスルーを示したが、軽微であった。ＡＣＥ－ｔＲＮＡによる翻訳終結の平均的抑制が、ＨＥＫ２９３細胞におけるＡＣＥ－ｔＲＮＡのトランスフェクション後に最小であることは有望である。ＡＣＥ－ｔＲＮＡのオフターゲット効果は、トランスジェニック１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞及びマウスにおける持

続的発現後に調べられている。

【０１９９】

実施例２　ミニＤＮＡベクターの作製

ＡＣＥ－ｔＲＮＡが治療送達物として小型ＤＮＡベクターに効率的にコードされ得るかどうかを調べるためにアッセイを行った。

【０２００】

本発明者らはまず、どの程度小さいＭＣがＡＣＥ－ｔＲＮＡを効率的に発現するかを判定することに着手した。ＡＣＥ－ｔＲＮＡ発現カセットは１２５ｂｐｓであったため、理論的には生成可能な最小の発現ベクターであった。しかし、これまでにない状況では、転写因子の立体的制約及びＤＮＡの高度な屈曲がＡＣＥ－ｔＲＮＡの発現を阻害し得る可能性が考慮された。さらに、３００ｂｐｓ未満のそのような小型のＭＣの生成は、ＤＮＡ二重らせんの固有の剛性又は堅さによって妨げられる。線状ＤＮＡのライゲーション依存性の環状化は、反応のＤＮＡの濃度が低く（ナノモル濃度）、治療量の生成を妨げない限り、主に線状コンカテマーを含有する生成物をもたらす。ｉｎ　ｖｉｔｒｏの産生のためにこれらの問題を回避するための操作は、目的のＤＮＡ配列を有するＭＣの生成を妨げ、労働集約的なプロセス及び許容できない非効率性の両方をもたらす。２５０ｂｐｓ未満の大腸菌におけるＭＣの生成もまた、低い組換え効率を付与するＤＮＡの剛性のために問題があると報告されている。上に列挙した技術的困難性、及びほとんどの発現カセットが典型的には３ｋｂよりも大きいという事実のために、数キロベースよりも小さいＭＣを使用する研究はほとんどなく、本発明者らの知る限りでは、３８３及び４００ｂｐｓが最小の公開された発現ミニベクターであった。

【０２０１】

転写因子Ａ、ミトコンドリアとしても知られる組換えミトコンドリアＤＮＡ屈曲タンパク質、ＡＲＳ結合因子２タンパク質（Ａｂｆ２ｐ）を使用して（ＴＦＡＭ，Ｔｈｉｂａｕｌｔ，Ｔ．ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ　４５，ｅ２６－ｅ２６，ｄｏｉ：１０．１０９３／ｎａｒ／ｇｋｗ１０３４（２０１７））、本発明者らは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでミリグラム量で２００ｂｐｓという少量のＭＣの産生を合理化した（図３の方法Ｉ）。ここで、産生量は、約１．５ｍｇを生成するように容易にスケーリングすることができ、本発明者らの研究室では、大腸菌における組換えＤＮＡリガーゼ、ＤＮＡポリメラーゼ（ＰＨＵＳＩＯＮ）、Ｔ５エキソヌクレアーゼ及びＴＦＡＭタンパク質の生成及び精製によって生産コストが有意に最小化された。この方法を使用して、本発明者らは、サイズが２００～１０００ｂｐのＭＣを生成した（図３、方法Ｉ、底部のゲル）。以前に公開された方法（Ｋａｙ，Ｍ．Ａ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ２８，１２８７－１２８９，ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｂｔ．１７０８（２０１０））と同様に、φＣ３１依存性組換えを利用する社内で生成されたプラスミド（図３、方法ＩＩ）を使用して、大腸菌で５００ｂｐ以上のＭＣを生成した。

【０２０２】

上記の方法を使用して、異なるサイズの例示的なＡｒｇＴＧＡ（例えば、配列番号８をコードする）ミニサークルライゲーション産物を作製した。サイズには、約１０００ｂｐ、９００ｂｐ、８５０ｂｐ、８００ｂｐ、７００ｂｐ、６００ｂｐ、５０ｂｐ、４００ｂｐ、３００ｂｐ及び２００ｂｐが含まれた。図１２Ａ、図１２Ｂ、図１３Ｅ及び図１３Ｆに示すように、これらのＡｒｇＴＧＡミニサークルのライゲーション産物及びＰＣＲ産物は、エチジウムブロマイドを含有する１．５％アガロースゲルで分離及び可視化することができた。ＡｒｇＴＧＡミニサークルのライゲーション産物及び対応するＰＣＲ産物をＴ５エキソヌクレアーゼと共にインキュベートし、エチジウムブロマイドを含有するアガロースゲル上で分離した。ミニサークルライゲーションにおけるエキソヌクレアーゼ耐性産物の存在は、共有結合的に閉じたミニサークル産物の産生を示した（図１２Ｃ、図１２Ｄ、図１３Ｅ、図１３Ｆ）。

【０２０３】

ＭＣ及びＣＥＤＴ産物は、Ｔ５エキソヌクレアーゼ消化又はサイズ排除クロマトグラフ

ィー（図３の方法Ｉ、ＩＩ、ＩＩＩ及びＩＶ、底部のゲル）の使用によって親プラスミド骨格から効率的に精製することができる。これらの２つの方法を使用すると、本発明者らは、このプロジェクトに妥当なコストで（＜５００ｂｐのＭＣの約１．５ｍｇｓに対して約＄４００、≧５００ｂｐのＭＣの１００ｍｇに対して約＄５８０）、生成したいＭＣＡＣＥ－ｔＲＮＡ配列に迅速に対応することができる。

【０２０４】

ＣＥＤＴの産生がいくつかの方法で達成され得る場合（Ｗｏｎｇ，Ｓ．ｅｔ ａｌ．ＪＶｉｓ Ｅｘｐ，５３１７７－５３１７７，ｄｏｉ：１０．３７９１／５３１７７（２０１６），Ｓｃｈａｋｏｗｓｋｉ，Ｆ．ｅｔ ａｌ．Ｉｎ ｖｉｖｏ（Ａｔｈｅｎｓ，Ｇｒｅｅｃｅ）２１，１７－２３（２００７），ａｎｄ Ｈｅｉｎｒｉｃｈ，Ｊ．ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｍｅｄｉｃｉｎｅ（Ｂｅｒｌｉｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）８０，６４８－６５４，ｄｏｉ：１０．１００７／ｓ００１０９－００２－０３６２－２（２００２））、本発明者らは、大腸菌由来のエンドトキシン汚染を減少させるために、組換え原核生物テロメラーゼ、バクテリオファージＮ１５のプロテロメラーゼＴｅｌＮを使用するｉｎ ｖｉｔｒｏの手法を追求した。テロメア認識部位ｔｅｌＲＬ（５６ｂｐ）に作用して、プロテロメラーゼは環状プラスミドＤＮＡを効率的な一段階酵素反応で線状共有結合的に閉じたダンベル形状の分子に変換した。目的の遺伝子に隣接する発現プラスミドに２つのＴｅｌＲＬ部位を挿入すると、それを切断し、ＴｅｌＮ酵素（５’末端を３’末端にライゲートする）によって連結して、目的の遺伝子をコードする線状の閉端ミニＤＮＡスレッドを得た。この直接的な方法は、図３の方法ＩＩＩに概説されている。重要なことに、ｉｎ ｖｉｔｒｏの方法Ｉ及びＩＶを使用して、大量のエンドトキシンを含まないＭＣ及びＣＥＤＴをそれぞれ精製することが可能である（Ｂｕｔａｓｈ，Ｋ．Ａ．，ｅｔ ａｌ．，ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ２９，６１０－６１４，６１６，６１８－６１９，ｄｏｉ：１０．２１４４／００２９３ ｒｒ ０４（２０００））。方法ＩＩＩを使用して、本発明者らは、このプロジェクトに妥当なコストで様々なＡＣＥ－ｔＲＮＡ配列のＣＥＤＴを迅速に生成することができた（約１．５ｍｇｓのＣＥＤＴで約＄４００、１００ｍｇのＣＥＤＴで約＄１０００）。

【０２０５】

図１３Ａ、図１３Ｂ、図１３Ｃ及び図１３Ｄに示すのは、２００ｂｐのＣＥＤＴ（２つの２００ｂｐの連続するＡｒｇＴＧＡのＣＥＤＴセグメントを含有する６３４ｂｐのＰＣＲ産物を使用）、４００ｂｐのＣＥＤＴ（４００ｂｐのＣＥＤＴセグメントを含有する５７０ｂｐのＰＣＲ産物を使用）、９００ｂｐのＣＥＤＴ（１×ＡｒｇＴＧＡをコードする１０６５ｂｐのＰＣＲ産物を使用）及び９００ｂｐのＣＥＤＴ（４×ＡｒｇＴＧＡをコードする１０６５ｂｐのＰＣＲ産物を使用）を含む４つの例示的なＣＥＤＴの産生である。対応するＰＣＲ産物のそれぞれを陰イオン交換クロマトグラフィー（Ｍａｃｈｅｒｙ Ｎａｇｅｌキット）によって精製した後、上記のようにＴｅｌＮで消化した。隣接する２つのＴｅｌＲＬ部位がＴｅｌＮ酵素によって連結されると、４つのＣＥＤＴは、それぞれ２６０ｂｐ、４５６ｂｐ、９５６ｂｐ、及び９５６ｂｐになる。図に示されるように、ＣＥＤＴ産物は、Ｔ５エキソヌクレアーゼ消化に対する耐性を示し、これは、ＴｅｌＮによる共有結合的に閉じた末端の産生を示す。しかし、制限酵素Ｂｓｕ３６Ｉによるエンドヌクレアーゼ切断後、各ＣＥＤＴ産物はＴ５エキソヌクレアーゼによる分解を受けやすかった。

【０２０６】

実施例３ ＡＣＥ－ｔＲＮＡをコードするＭＣ及びＣＥＤＴによるＰＴＣ抑制の有効性。

上記の実施例に記載されるＭＣ及びＣＥＤＴ ＤＮＡベクターを、細胞の培養及びｉｎ ｖｉｖｏにおけるＰＴＣの抑制におけるそれらの有効性を検証するために調べた。手短に言えば、ＰＴＣレポーターｃｍｖ－ＮＬｕｃ－ＴＧＡを安定的に発現したＨＥＫ２９３細胞への２００～１０００ｂｐのＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}のＭＣの等量（配列番号８、図４Ａ、白色バー）のトランスフェクションは、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}のプラスミドベースの発現に匹敵する強固なＰＴＣ抑制をもたらした（図４Ａ、灰色のバー）。ここで、ＭＣ

がＡＣＥ－ｔＲＮＡの強固な発現及びその後のＰＴＣ抑制を助けることが初めて示された。本発明者らの知る限り、これらは、報告された最小の機能的発現のＭＣ（＜３８３ｂｐｓ）に関する結果であった。

【０２０７】

次に、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}（配列番号８）をコードする７００及び４００ｂｐのＣＥＤＴベクターが、ＰＴＣレポーターｃｍｖ－ＮＬｕｃ－ＵＧＡ（図４Ｂ）を安定的に発現する１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞にトランスフェクトされた。ＭＣとは異なり、４００及び７００ｂｐのＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}のＣＥＤＴは強力なＰＴＣ抑制を助けた（図４Ｂ、白色バー）が、それらはプラスミドに基づくＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Ａｒｇ}_{ＵＧＡ}$（図４Ｂ、灰色のバー）よりも有効性が低く、有意なサイズの効果を示し、４００ｂｐのＣＥＤＴは７００ｂｐのＣＥＤＴの半分程度ＰＴＣ抑制に有効であった。ベクターのサイズのこの明らかな効果がＡＣＥ－ｔＲＮＡの転写の効率に起因するのか、又はこの差異がトランスフェクションに基づく送達による細胞侵入効率の差に起因するのかは不明である。異なるトポロジー及びサイズのＤＮＡは、異なる担体による送達効率に有意に影響を及ぼすことが報告されていた。

【０２０８】

本明細書に概説されるように、２００～１０００ｂｐのＭＣ及びＣＥＤＴのＰＴＣレポーター１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞へのエレクトロポレーションに基づく送達を行うことによって、細胞進入に対するＤＮＡのサイズの影響に対処するために、さらなるアッセイを行う。エレクトロポレーションでは、ＤＮＡベクターのサイズの減少が細胞侵入を促進すると予想され、したがって、２００～５００ｂｐのＣＥＤＴによる抑制活性のいずれかの観察された減少は、ＤＮＡトポロジーによって付与される非効率的な転写によって説明される可能性が高い。

【０２０９】

実施例４　ＡＣＥ－ｔＲＮＡを用いた内因性のＣＦＴＲ　ＰＴＣの救済

以前の研究の大部分は、ｃＤＮＡからコードされるＰＴＣを救済するためにサプレッサーｔＲＮＡを使用していた。有益ではあるが、これらの研究は、肺上皮におけるＣＦＴＲの低い内因性の転写、ｍＲＮＡの転写後プロセシング／調節及びナンセンスコドン介在的分解（ＮＭＤ）など、ｉｎ　ｖｉｖｏで遭遇する障害のすべてを提示したわけではなかった。この実施例では、ヒト細気管支上皮細胞株である１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞を使用して、内因性のゲノムランドスケープ内のＡＣＥ－ｔＲＮＡｓ　ＰＴＣ抑制活性を判定した。また、位置ｐ．Ｇ５４２Ｘ－、ｐ．Ｒ１１６２Ｘ－及びｐ．Ｗ１２８２Ｘ－ＣＦＴＲにＰＴＣを引き起こすＣＦを担持するように改変されたＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９である変異体１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞も使用した。細胞を使用して、ＣＦＴＲ及び気道上皮のバイオロジー（Ｃｏｚｅｎｓ，Ａ．Ｌ．ｅｔ　ａｌ．Ａｍｅｒｉｃａｎ　ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　ｒｅｓｐｉｒａｔｏｒｙ　ｃｅｌｌ　ａｎｄｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ｂｉｏｌｏｇｙ１０，３８－４７（１９９４））を研究した。

【０２１０】

手短に言えば、ＷＴ　１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞が、トランスフェクション効率を判定するために、ＴＲＡＮＳＷＥＬＬインサートでＧＦＰ発現プラスミドによりトランスフェクトされた。３６時間後、細胞を画像化し、トランスフェクション効率が１０％未満であることが見出された（図５Ａ）。低いトランスフェクション効率にもかかわらず、使用Ｕｓｓｉｎｇチャンバー測定を行った。

【０２１１】

最初に、Ｒ１１６２Ｘ－ＣＦＴＲ　ＨＢＥ１４ｏ細胞を、ＣＭＶ－ｈＣＦＴＲプラスミドでＴｒａｎｓｗｅｌｌインサートにトランスフェクトして、ｈＣＦＴＲの機能的救済の「最良のシナリオ」を判定した。発現が強力なｐｏｌ　ＩＩプロモーターによって駆動されるにもかかわらず、ｈＣＦＴＲ　ｃＤＮＡトランスフェクションは、トランスフェクションの６日後に、たった約４％のＣＦＴＲチャネルの機能的救済をもたらした（図５Ｇ）。次に、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}（配列番号８）の５００ｂｐのＣＥＤＴを、同じ方法論

を使用してＲ１１６２Ｘ－ＣＦＴＲ　ＨＢＥ１４ｏ細胞に送達した。注目すべきことに、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}５００ｂｐのＣＥＤＴは、ＣＦＴＲ機能の約３％の救済をもたらし（図５Ｇ）、ＣＭＶ－ｈＣＦＴＲ　ｃＤＮＡによる全遺伝子置換の値と同様の値であった。

【０２１２】

図５Ｂ、図５Ｃ及び図５Ｄにも示されているように、ｐ．Ｒ１１６２Ｘ－ＣＦＴＲ１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞へのＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Ａｒｇ}_{ＵＧＡ}$５００ｂｐのＣＥＤＴのトランスフェクションの６日後において、本発明者らは、驚くべきことに、フォルスコリン及びＩＢＭＸの添加（図５Ｂ及びＣ、ＷＴの約３％）後におけるＣＦＴＲ機能の緩やかな救済（図５Ｂ、青線）、並びに空のベクター（図５Ｂ、Ｃ＆Ｄ、「Ｒ１１６２Ｘ＋空」）のトランスフェクション後における測定可能なＣＦＴＲ機能を伴わないＩｎｈ１７２（図８Ｂ及びＤ、ＷＴの３％）による阻害を測定した。ＣＦＴＲ機能のわずか１０～１５％の救済で、肺におけるＣＦ症状を逆転させるのに十分であると推定されていることに留意すべきである（Ａｍａｒａｌ，Ｍ．Ｄ．Ｐｅｄｉａｔｒｉｃ　Ｐｕｌｍｏｎｏｌｏｇｙ　３９，４７９－４９１，ｄｏｉ：１０．１００２／ｐｐｕｌ．２０１６８（２００５））。

【０２１３】

本発明者らは次に、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ転写物のトランスフェクション後にＡＣＥ－ｔＲＮＡがＮＭＤを阻害するかどうかを調べた。興味深いことに、プラスチックにトランスフェクションを行うことにより、効率がはるかに高いことが分かった（約３０％、図５Ｅ）。ｑＰＣＲを、ｐ．Ｇ５４２Ｘ－（図５Ｆ、左から２番目のバー）、ｐ．Ｒ１１６２Ｘ－（図５Ｆ、左から４番目、５番目、６番目）ｐ．Ｒ１１６２Ｘ－及びｐ．Ｗ１２８２Ｘ－ＣＦＴＲ（図５Ｆ、右から４つのバー）から単離されたｍＲＮＡに対して行った。空のＤＮＡベクター又はＡＣＥ－ｔＲＮＡをコードするＤＮＡベクターのトランスフェクションの２日後の１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞。ＣＦＴＲｍＲＮＡ発現が有意に減少した（ＷＴの２５％未満）ことが見出された。４×ＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Ｇｌｙ}_{ＵＧＡ}$（配列番号５、図５Ｆ、左から３番目のバー）及び４×ＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Ａｒｇ}_{ＵＧＡ}$（図５Ｆ、水平線を有する左から５番目のバー）プラスミドのトランスフェクションは、定常状態のＣＦＴＲｍＲＮＡレベルの有意な増加をもたらし、それぞれ約１０％及び約１５％であった。さらに、ｐ．Ｒ１１６２Ｘ－ＣＦＴＲ１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞に対するＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Ａｒｇ}_{ＵＧＡ}$５００ｂｐのＣＥＤＴ及び８００ｂｐのＭＣ（図５Ｆ、左から６番目のバー、７番目のバー）の送達は、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Ａｒｇ}_{ＵＧＡ}$プラスミドと同様の定常状態のＣＦＴＲｍＲＮＡの増加（約１５％）をもたらしたことが見出された。

【０２１４】

ｐ．Ｗ１２８２Ｘ－ＣＦＴＲ１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞における４×ＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Ｔｒｐ}_{ＵＧＡ}$（配列番号１）プラスミドのトランスフェクションは、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Ｔｒｐ}_{ＵＧＡ}$がライブラリーの最も機能していないファミリーであったので、ＣＦＴＲｍＲＮＡの定常状態の発現に影響を及ぼさなかった（図５Ｆ、右から３本目の線付きバー）。Ｕｓｓｉｎｇチャンバー記録（Ｘｕｅ，Ｘ．ｅｔ　ａｌ．，Ｈｕｍａｎｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ｇｅｎｅｔｉｃｓ　２６，３１１６－３１２９，ｄｏｉ：１０．１０９３／ｈｍｇ／ｄｄｘ１９６（２０１７））について測定されたように、ＣＦＴＲ　ｐ．Ｗ１２８２（ｐ．Ｗ１２８２Ｌ）におけるロイシンが、約８０％のＷＴ　ＣＦＴＲ機能を与えるということが以前に示されていた。本発明者らのＡＣＥ－ｔＲＮＡライブラリーは本質的にアラカートライブラリーであるため、最良の１×ＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Ｌｅｕ}_{ＵＧＡ}$（配列番号４）プラスミドを選択し、それらをｐ．Ｗ１２８２Ｘ－ＣＦＴＲ１６ＨＢＥ　２４ｏ細胞にトランスフェクトすることができ、これにより、ＣＦＴＲ　ｍＲＮＡの定常状態発現が約１７％有意に増加した（図５Ｆ、右から２番目の縦線付きバー）。

【０２１５】

図５に示されている結果は、ＡＣＥ－ｔＲＮＡが内因性のＣＦＴＲ　ｍＲＮＡのＮＭＤを強力に阻害し、ＣＦがＰＴＣを引き起こすことを初めて実証したが、これは、先駆けとなるラウンドの翻訳を促進することによるものである可能性が最も高い。さらに、Ｔｒａ

ｎｓｗｅｌｌではトランスフェクション効率がかなり低いにもかかわらず、ＣＥＤＴから発現されたＡＣＥ－ｔＲＮＡは、ｐ．Ｒ１１６２Ｘ－ＣＦＴＲ１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞において、内因性のＣＦＴＲの機能的レスキューを促進した。

【０２１６】

実施例５　ｉｎ　ｖｉｖｏでのＰＴＣのＡＣＥ－ｔＲＮＡ依存的リードスルー。

この実施例では、ｉｎ　ｖｉｖｏでのＰＴＣのＡＣＥ－ｔＲＮＡ依存的リードスルーを調べるためにアッセイを行った。

【０２１７】

最初に、ＣＭＶ－ＧＦＰをコードするｃＤＮＡプラスミドを、吸引後に電場を使用してマウスの肺に送達し、３日後に蛍光性顕微鏡法（図６Ａ）によって評価した。ＧＦＰ発現の定量は、遺伝子導入のエレクトロポレーション法が非常に効率的であり、すべての細胞型において肺の細胞の３３．２％±３．５％（複数のマウスからの複数の切片で１８から５２％）で発現が観察されることを示した。重要なことに、ＧＦＰ分布は、実質と比較して気道で優勢であるように見えた（図６Ａ、左挿入図）。

【０２１８】

次いで、効率的な送達がＰＴＣ抑制レポータープラスミドｐＮａｎｏＬｕｃ－ＵＧＡとＡＣＥ－ｔＲＮＡをコードするベクターとの同時送達によって達成され得るかどうかを判定するためにアッセイを行った。対照マウスにＰＴＣレポーターｐＮＬｕｃ－ＵＧＡプラスミドを投与して擬似ＰＴＣリードスルーを測定した。エレクトロポレーションの２日後、肺を解剖し、生理食塩水を灌流し、ビーズビーター装置内の溶解バッファー（ＰＲＯＭＥＧＡ）でホモジナイズした。溶解物を高速で回転させ、プレートリーダーを使用して上清をＮＬｕｃ活性について分析した。ＡＣＥ－ｔＲＮＡベクターの非存在下では、有意な発光は測定されなかった（図６Ｂ、左から１番目のバー）。ＡＣＥ－ｔＲＮＡＡｒｇ（配列番号８）プラスミド（図６Ｂ、左から２番目のバー）、５００ｂｐのＡＣＥ－ｔＲＮＡＡｒｇのＣＥＤＴ（図６Ｂ、中央のバー）、８００ｂｐのＡＣＥ－ｔＲＮＡＬｅｕ（配列番号４）ＭＣ（図６Ｂ、右から２番目のバー）及び８００ｂｐのＡＣＥ－ｔＲＮＡＡｒｇのＭＣ（図６Ｂ、右から１番目のバー）が、ｉｎ　ｖｉｖｏでマウスの肺においてＮＬｕｃ－ＰＴＣ救済を助けることが見出された。これらの結果は、（ｉ）ｐ．Ｇ５４２Ｘ－ＣＦＴＲ及びｐ．Ｗ１２８２Ｘ－ＣＦＴＲのマウスの気道上皮におけるプラスミド、ＭＣ及びＣＥＤＴＳをコードするＡＣＥ－ｔＲＮＡによるナンセンス抑制の有効性及び持続性、及び（ｉｉ）肺への送達後のＭＣ及びＣＥＤＴにコードされるＡＣＥ－ｔＲＮＡの効率及び持続性の原理の証明をもたらす。

【０２１９】

実施例６　ＴＥＬＳの同定

この実施例は、ＴＥＬＳを同定してｔＲＮＡ５’フランキング配列からのＡＣＥ－ｔＲＮＡ発現を増強するためのアッセイを記載する。Ｌｏｗｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ　２５，９５５－９６４，ｄｏｉ：１０．１０９３／ｎａｒ／２５．５．９５５（１９９７）に記載されている４１６個のｔＲＮＡ遺伝子のうちの１つ以上などのｔＲＮＡ遺伝子由来のｔＲＮＡ５’フランキング配列（約１ｋｂ）を使用することができる。

【０２２０】

哺乳動物細胞への送達後に発光を使用してＰＴＣ抑制のハイスループットクローニング（ＨＴＣ）及び定量的ハイスループットスクリーニング（ＨＴＳ）の両方を助けるオールインワンｃＤＮＡプラスミドに、各配列をクローニングする（図７Ｂ）。１ｋｂの５’フランキング配列を、ｇＢｌｏｃｋｓ（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）として、ＧＯＬＤＥＮ　ＧＡＴＥクローニングを使用して９６ウェル形式でＨＴＣ部位にクローニングし、ｃｃｄＢネガティブ選択と対にして、約１００％のクローニング効率を得る。すべてのクローンをサンガー配列決定によって確認する。ＴＥＬ配列をＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Ａｒｇ}{}_{ＵＧＡ}$－（配列番号８、図７Ｂ）のすぐの５’側にクローニングし、ＮＬｕｃ－ＵＧＡ抑制効率を、プレートリーダーを用いて９６ウェル様式で読み取ると

、ＰＴＣ抑制の増加はＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Ａｒｇ}{}_{ＵＧＡ}$の発現の増加を示す。最初のスクリーニングが完了した後、やはりｇＢｌｏｃｋ配列をクローニングすることによって、上位１０個の１ｋｂ配列を２５０ｂｐ配列に分割して転写増強の起源を同定する。ＡＣＥ－ｔＲＮＡの転写を増強又は阻害する１ｋｂリーダー配列を、多数の開発されたソフトウェアツール（Ｓｈａｒｏｖ，Ａ．Ａ．＆Ｋｏ，Ｍ．Ｓ．Ｈ．ＤＮＡ Ｒｅｓｅａｒｃｈ１６，２６１－２７３，ｄｏｉ：１０．１０９３／ｄｎａｒｅｓ／ｄｓｐ ０１４（２００９））^{106}を用いて配列モチーフについて分析する。１つ又は複数のＴＥＬＳは、ＡＣＥ－ｔＲＮＡの発現を数倍増強して、あまり効率的でない送達を可能にし、強力なＰＴＣ抑制を維持することができると予想される。また、この研究からの結果から、ｔＲＮＡ転写の調節に対する洞察を得る。

【０２２１】

実施例７　ＤＴＳの同定

この実施例は、ミニベクター核局在化を駆動するＤＴＳを同定するためのアッセイを記載する。

【０２２２】

プラスミドを非分裂細胞の核に標的化するいくつかのＤＮＡ配列が同定されている。例えば、Ｄｅａｎ，Ｄ．Ａ．Ｅｘｐ．Ｃｅｌｌ Ｒｅｓ．２３０，２９３－３０２（１９９７）、Ｄｅａｎ，Ｄ．Ａ．，ｅｔ ａｌ．，Ｅｘｐ．Ｃｅｌｌ Ｒｅｓ．２５３，７１３－７２２（１９９９）、Ｖａｃｉｋ，Ｊ．，ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ６，１００６－１０１４（１９９９）、Ｙｏｕｎｇ，Ｊ．Ｌ．，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．Ｃｅｌｌ １０Ｓ，４４３ａ（１９９９）、Ｌａｎｇｌｅ－Ｒｏｕａｕｌｔ，Ｆ．．Ｊ Ｖｉｒｏｌ ７２，６１８１－６１８５（１９９８）、Ｍｅｓｉｋａ，Ａ．，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ ３，６５３－６５７．（２００１）、Ｄｅｇｉｕｌｉｏ，Ｊ．Ｖ．，ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ，ｄｏｉ：ｇｔ２００９１６６［ｐｉｉ］ １０．１０３８／ｇｔ．２００９．１６６（２０１０）、Ｓａｃｒａｍｅｎｔｏ，Ｃ．Ｂ．，ｅｔ ａｌ．，Ｂｒａｚｉｌｉａｎ ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｍｅｄｉｃａｌ ａｎｄ ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ ｒｅｓｅａｒｃｈ ４３，７２２－７２７（２０１０）、及びＣｒａｍｅｒ，Ｆ．ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ １９，６７５－６８３，ｄｏｉ：１０．１０３８／ｃｇｔ．２０１２．５４（２０１２）を参照されたい。これらの配列に共通する特徴は、それらが転写因子の結合部位を含むことである。興味深いことに、ＳＶ４０エンハンサーは、核局在化配列（ＮＬＳ）を含有する＞１０の遍在的に発現された転写因子の結合のために、すべての細胞型においてＤＴＳとして作用する。典型的な転写因子は、核内に輸送され、その調節ＤＮＡ標的配列に結合し、転写を活性化又は抑制する。しかし、転写因子結合部位を含有するＤＮＡが細胞質に存在する場合、細胞質転写因子は、核取り込み前にこの部位に結合し（図８）、ＤＮＡ－タンパク質複合体を核内に転位させ得る。

【０２２３】

本発明者らは、６０を超える強力な一般的及び細胞特異的プロモーターをスクリーニングし、７つのＤＴＳを見出した。これらのうち、２つは遍在的に機能するが、５つは細胞のサブセットで発現される特異的転写因子に結合する。発現プラスミドへのＤＴＳの組み込みは、微量注入及びトランスフェクトされた非分裂細胞における遺伝子発現を増加させ、本発明にとって重要なことは、プラスミドの核標的化及びその後のｉｎ ｖｉｖｏでの遺伝子発現を増加させるように作用することが見出された。ここで、本発明者らは、ＡＣＥ－ｔＲＮＡをコードするミニベクター親ｐＵＣ５７プラスミドが、細胞質マイクロインジェクション後に、非分裂細胞の核に輸送されないことを示した。プラスミド核局在化及びその後のＡＣＥ－ｔＲＮＡの発現を改善するために、プラスミドにＳＶ４０　ＤＴＳを含めることができる。

【０２２４】

ＡＣＥ－ｔＲＮＡミニベクターの送達、発現、及び最終的にはナンセンス抑制を改善するために、核標的化においてＳＶ４０　ＤＴＳよりも効果的な、新しいＤＴＳを同定する

ためのスクリーニングを行うこともできる。すべての細胞のタイプにおいて作用するＤＴＳを同定することが好ましいので、遍在的に発現されるプロモーターをスクリーニングすることができる。マイクロアレイ、ＲＮＡｓｅｑ及び単一細胞シーケンシングによって同定されたハウスキーピング遺伝子の多数のデータベースが、例えば、Ｃｕｒｉｎａ，Ａ．ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ ３１，３９９－４１２，ｄｏｉ：１０．１１０１／ｇａｄ．２９３１３４．１１６（２０１７）、Ｅｉｓｅｎｂｅｒｇ，Ｅ．＆Ｌｅｖａｎｏｎ，Ｅ．Ｙ．Ｔｒｅｎｄｓ Ｇｅｎｅｔ １９，３６２－３６５，ｄｏｉ：１０．１０１６／Ｓ０１６８－９５２５（０３）００１４０－９（２００３）、及びＥｉｓｅｎｂｅｒｇ，Ｅ．＆Ｌｅｖａｎｏｎ，Ｅ．Ｙ．Ｔｒｅｎｄｓ Ｇｅｎｅｔ ２９，５６９－５７４，ｄｏｉ：１０．１０１６／ｊ．ｔｉｇ．２０１３．０５．０１０（２０１３）において公開されてきた。

【０２２５】

上位２０のハウスキーピング遺伝子のプロモーター配列は、公開された配列又は生物情報学的分析及びＤＢＴＳＳデータセット（ｄｂｔｓｓ．ｈｇｃ．ｊｐ）からの各プロモーターの転写開始部位の同定に基づいて同定することができる。これらのプロモーターは、典型的には５００～２０００ｂｐのサイズの範囲であり、ＣＭＶプロモーター由来のＧＦＰを発現するレポータープラスミド（ＤＴＳとして機能しない）に、ヒトゲノムＤＮＡからＰＣＲによってクローニングすることができる。このプラスミドはまた、三重鎖形成ペプチド核酸（ＰＮＡ）のための結合部位を担持して、ＤＮＡの蛍光性標識を可能にすることができる。Ｃｙ３標識ＰＮＡをプラスミドのこの部位にハイブリダイズさせることによって、高い量子収率の蛍光性標識プラスミドを生成して、核取り込みをリアルタイムで追跡することができる（Ｇａｓｉｏｒｏｗｓｋｉ，Ｊ．Ｚ．＆Ｄｅａｎ，Ｄ．Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ１２，４６０－４６７（２００５））。

【０２２６】

プラスミドをＣｙ３－ＰＮＡで直接標識する代替的な手法として、蛍光ｉｎ ｓｉｔｕハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）を行って、注入されたＤＮＡを可視化することもできる。ＤＴＳ候補プラスミドを、微量注入されたＡ５４９肺上皮細胞において３０分～８時間にわたって核取り込み活性について試験することができる（Ｄｅａｎ，Ｄ．Ａ．Ｅｘｐ．Ｃｅｌｌ Ｒｅｓ．２３０，２９３－３０２（１９９７），Ｄｅａｎ，Ｄ．Ａ．，ｅｔ ａｌ．，Ｅｘｐ．Ｃｅｌｌ Ｒｅｓ．２５３，７１３－７２２（１９９９），ａｎｄ Ｖａｃｉｋ，Ｊ．，ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ６，１００６－１０１４（１９９９））。本発明者らは、ＳＶ４０配列が３０分以内にプラスミドの核内取り込みを媒介することを見出したが、ＳＭＧＡプロモーターは、プラスミドが平滑筋細胞の核に局在するのに４時間を必要とする。この手法は、それらの核取り込み速度に基づいてＳＶ４０ ＤＴＳに対して配列をランク付けすることを可能にすることができる。ＤＴＳを含まないｐＵＣ５７プラスミドの陰性対照及びｐＵＣ５７－ＳＶ４０ ＤＴＳのポジティブコントロールもまた、注入後に細胞が生存可能なままであり、核内にＤＮＡを輸送する能力を有することを確実にするために注入することができる。

【０２２７】

細胞特異性を試験するために、候補ＤＴＳ含有プラスミドを、ＨＥＫ２９３、初代平滑筋細胞及び内皮細胞、並びにヒト線維芽細胞を含む複数の細胞型に、微量注入することができる。本発明者らの経験に基づいて、この画面から２～４つの一般的なＤＴＳを識別できると予測することができる。移入活性を示すプロモーター配列が同定されると、Ｍｉｌｌｅｒ，Ａ．Ｍ．＆Ｄｅａｎ，Ｄ．Ａ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ １５，１１０７－１１１５（２００８）、Ｄｅｇｉｕｌｉｏ，Ｊ．Ｖ．，ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ １７，５４１－５４９，ｄｏｉ：１０．１０３８／ｇｔ．２００９．１６６（２０１０）、及びＧｏｔｔｆｒｉｅｄ，Ｌ．，ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ ２３，７３４－７４２，ｄｏｉ：１０．１０３８／ｇｔ．２０１６．５２（２０１６）に記載されている方法で、核標的化を助ける最小配列の長さを同定するために、限られた数の切断型プロモーター（例えば、３～４）を作製することができる。次に、Ｄｅａｎ，Ｄ．Ａ．，ｅｔ ａｌ

．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ １０，１６０８－１６１５（２００３）、Ｍａｃｈａｄｏ－Ａｒａｎｄａ，Ｄ．ｅｔ ａｌ．Ａｍ Ｊ Ｒｅｓｐｉｒ Ｃｒｉｔ Ｃａｒｅ Ｍｅｄ １７１，２０４－２１１（２００５）、Ｍｕｔｌｕ，Ｇ．Ｍ．ｅｔ ａｌ．，Ａｍ Ｊ Ｒｅｓｐｉｒ Ｃｒｉｔ Ｃａｒｅ Ｍｅｄ １７６，５８２－５９０（２００７）、Ｚｈｏｕ，Ｒ．，ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ ｔｈｅｒａｐｙ １４，７７５－７８０，ｄｏｉ：１０．１０３８／ｓｊ．ｇｔ．３３０２９３６（２００７）、Ｙｏｕｎｇ，Ｊ．Ｌ．，ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ １１２１，１８９－２０４，ｄｏｉ：１０．１００７／９７８－１－４６１４－９６３２－８＿１７（２０１４）、及びＹｏｕｎｇ，Ｊ．Ｌ．ｅｔ ａｌ．，Ａｄｖ Ｇｅｎｅｔ ８９，４９－８８，ｄｏｉ：１０．１０１６／ｂｓ．ａｄｇｅｎ．２０１４．１０．００３（２０１５）に記載されているように、これらの最小ＤＴＳが、エレクトロポレーションによるマウスの肺への送達後のｉｎ ｖｉｖｏでのプラスミド核ターゲティングを助け、肺の薄い切片におけるｅＧＦＰ発現のためのＩＦによるプラスミドの核送達を定量化するかどうかを判定することができる。対照として、ＤＴＳ又はＳＶ４０ ＤＴＳを保有していないレポータープラスミドもマウスの肺に移入する。

【０２２８】

２～４個のプロモーターが培養細胞において一般的なＤＴＳ活性を示すことが予想される。したがって、マウスにおいて４つの潜在的ＤＴＳ及び２つの対照を試験することができる（ｎ＝６）。これを雄及び雌のＣ５７Ｂ６マウスで別々に試験し、実験を１回繰り返すこともできる。遺伝子導入の２日後、動物を安楽死させ、肺を灌流し、４％パラホルムアルデヒドで固定し、ショ糖溶液に通し、凍結薄切片化のためにＯＣＴに包埋する。ＧＦＰ陽性細胞を各細胞特異的マーカーと共にカウントして、各細胞型に対するＧＦＰ陽性細胞の数を判定する。アセチル化チューブリン（線毛気道上皮細胞）、ＣＣＳＰ（クラブ細胞）、Ｍｕｃ５ＡＣ（杯細胞）、ＣＤ３１（内皮細胞）及びＳＭＡＡ（平滑筋）に対する抗体を使用して、肺細胞型を同定することができる。本発明者らは、過去にこの手法を使用して、核移入の細胞特異性を判定した。次いで、最良の配列を本発明者らのＡＣＥ－ｔＲＮＡミニベクターに組み込んで、送達及び発現を最大化することができる。重要なことに、同定されたＤＴＳは、核標的化及び治療的導入遺伝子発現を増強するためのすべてのＤＮＡ治療手法に直接適用することができる。

【０２２９】

実施例８ ＤＴＳ及びＴＥＬＳを有するＭＣ及びＣＥＤＴ

この実施例では、５００ｂｐのＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Ａｒｇ}_{ＵＧＡ}$（配列番号８）ＭＣ及びＣＥＤＴへのＤＴＳ及びＴＥＬＳの組み込みが、核標的化、転写及びＰＴＣ抑制を改善するかどうかを調べるためにアッセイを行う。

【０２３０】

重要なことに、既存のＭＣ及びＣＥＤＴ技術は、細胞培養及びｉｎ ｖｉｖｏの両方で、ＰＴＣ抑制において効率的である（図４～図７及び図１０）。かく言うものの、ｔＲＮＡ転写因子（Ｐｏｌ ＩＩＩ転写エレメント）は、細胞質注入後にＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}のＭＣを核（図８Ｂ）の中にエスコートしなかった。したがって、核標的化、転写及びＰＴＣ抑制を改善するために、７２ヌクレオチドＳＶ４０ ＤＴＳ及び一般に活性なＤＴＳを有するＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Ａｒｇ}_{ＵＧＡ}$のＭＣ及びＣＥＤＴが生成されている。１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞へのこれらのベクターの細胞質及び核注入は、本明細書に記載されるのと同じ方法で行われる。

【０２３１】

ＤＮＡ局在化を、４時間後にＦＩＳＨを使用して判定する。以下に概説するように、ｐＮＬｕｃ－ＵＧＡ ＰＴＣレポータープラスミド（ＣＥＤＴ、ｎ＝８；ＣＥＤＴ－ＤＴＳ、ｎ＝８；ＭＣ、ｎ＝８；ＭＣ－ＤＴＳ、ｎ＝８；男性４人及び女性４人）と同時エレクトロポレーションをしたＤＴＳを伴う又は伴わないＣＥＤＴ及びＭＣを用いた限定的マウスの肺エレクトロポレーション試験も実施する。ＳＶ４０ ＤＴＳ及び４つのＤＴＳを、ＭＣ又はＣＥＤＴあたり合計５つのＤＴＳについて試験する（９６匹のマウスを使用）。

様々なＤＴＳの添加は、その核生物学的利用能を増加させることによってＡＣＥ－ｔＲＮＡ転写を大幅に増強し、その後ＰＴＣ抑制を増強すると仮定される。ＤＴＳ修飾を包含することは、ｉｎ　ｖｉｖｏのエレクトロポレーション研究において２倍を超えるＰＴＣ抑制をもたらし得ると予測される。

【０２３２】

実施例９　ミニベクターの細胞内ＰＴＣ抑制能力

この実施例は、１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞（ｐ．Ｇ５４２Ｘ、ｐ．Ｒ１１６２Ｘ及びｐ．Ｗ１２８２Ｘ）においてＰＴＣを抑制するミニベクターの能力を判定するための研究を記載する。ここで使用される送達方法は、ＬＯＮＺＡ　４Ｄ－ＮＵＣＬＥＯＦＥＣＴＯＲ（商標）Ｘシステムであり、溶液「ＳＧ」及びプログラムＣＭ－１３７は、１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞に対して既に最適化されている。

【０２３３】

ｐＲ１１６２Ｘ－ＣＦＴＲ１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞において、ベクターのサイズがＡＣＥ－ｔＲＮＡのＣＥＤＴ及びＭＣのＰＴＣ抑制に与える影響を、１２５、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００及び１０００ｂｐのＤＮＡミニベクターのスクリーニングを行うことによって調べる。ｐ．Ｒ１１６２Ｘ－ＣＦＴＲのレスキュー機能を、Ｕｓｓｉｎｇチャンバーの記録（ｎ＝４～６）及びその後のｑＰＣＲ分析を使用して判定して、定常状態のＣＦＴＲｍＲＮＡの発現を判定する（ｎ＝４～６）。Ｕｓｓｉｎｇチャンバーの記録の場合、本発明者らは、５ｍＭデキストロースを補充したＣｌ－勾配（１４０ｍＭのＣｌ－基底外側／４．８ｍＭのＣｌ－）及びその後のアミロライド（１００μＭ）の添加を用いてＥＮａＣ及びＤＩＤ（１００μＭ）をブロックしてＣａＣＣ活性をブロックする。その後、ＣＦＴＲはフォルスコリン（１０μＭ）及びＩＢＭＸ（３－イソブチル－１－メチルキサンチン、１００μＭ）によって活性化され、１０μＭのＩｎｈ１７２によって阻害される。ＣＦＴＲ活性のレスキューを、図５Ｂに記載されるように、Ｆ＆Ｉの前後及びＩｎｈ１７２の前後のブロックのΔI_{Cl}として分析する。

【０２３４】

最適なミニベクターの条件を使用して、ｐ．Ｗ１２８２Ｘ　１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞に送達されるＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Leu}_{UGA}$（配列番号４）をコードするＭＣ及びＣＥＤＴの機能を検証する。上記の例で同定された上位のＤＴＳ及びＴＥＬ配列は、最適のサイズのミニベクターに含まれる。ミニベクターのＰＴＣ抑制能を数倍に高めることが期待される。

【０２３５】

実施例１０　ＡＣＥ－ｔＲＮＡ発現ベクターは、マウスにおけるＣＦＴＲ　ｐ．Ｇ５４２Ｘ及びｐ．Ｗ１２８２Ｘを抑制する。

この実施例は、マウスの肺における、ＡＣＥ－ｔＲＮＡをコードするｃＤＮＡプラスミド、ＣＥＤＴ及びＭＣが、ＣＦＴＲのｐ．Ｇ５４２Ｘ及びｐ．Ｗ１２８２Ｘを抑制する能力を調べるための研究を記載する。ｐ．Ｇ５４２Ｘ及びｐ．Ｗ１２８２Ｘ－ＣＦＴＲのＰＴＣ変異を備えるマウスモデルが生成されている。例えば、ｐ．Ｇ５４２Ｘマウスは、ＭｃＨｕｇｈ，Ｄ．Ｒ．，ｅｔ　ａｌ．，ＰｌｏＳ　ｏｎｅ　１３，ｅ０１９９５７３，ｄｏｉ：１０．１３７１／ｊｏｕｒｎａｌ．ｐｏｎｅ．０１９９５７３（２０１８）において公表されている。これらのｐ．Ｇ５４２Ｘ及びｐ．Ｗ１２８２Ｘ－ＣＦＴＲマウスは、ＣＦＴＲ転写物の変化がヒトを細かく再現するので、ＰＴＣ治療を研究するために使用される。

【０２３６】

電界（エレクトロポレーション）法は、当技術分野で公知の方法を使用してＤＮＡベクターを肺に送達するために利用される。例えば、Ｄｅａｎ，Ｄ．Ａ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ　１０，１６０８－１６１５（２００３）、Ｚｈｏｕ，Ｒ．＆Ｄｅａｎ，Ｄ．Ａ．Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ　ｂｉｏｌｏｇｙ　ａｎｄ　ｍｅｄｉｃｉｎｅ（メイウッド、ニュージャージー州）２３２，３６２－３６９（２００７）、Ｏ’Ｒｅｉｌｌｙ，Ｍ．Ａ．ｅｔ　ａｌ．Ｔｈｅ　Ａｍｅｒｉｃａｎ　ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　ｐａｔｈ

ｏｌｏｇｙ １８１，４４１－４５１，ｄｏｉ：１０．１０１６／ｊ．ａｊｐａｔｈ．２０１２．０５．００５（２０１２）、Ｍｕｔｌｕ，Ｇ．Ｍ．ｅｔ ａｌ．，Ａｍｅｒｉｃａｎ ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｒｅｓｐｉｒａｔｏｒｙ ａｎｄ ｃｒｉｔｉｃａｌ ｃａｒｅ ｍｅｄｉｃｉｎｅ １７６，５８２－５９０，ｄｏｉ：１０．１１６４／ｒｃｃｍ．２００６０８－１２４６ＯＣ（２００７）、Ｂｌａｉｒ－Ｐａｒｋｓ，Ｋ．，ｅｔ ａｌ．，Ｔｈｅ ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｇｅｎｅ ｍｅｄｉｃｉｎｅ ４，９２－１００（２００２）、ａｎｄ Ｂａｒｎｅｔｔ，Ｒ．Ｃ．ｅｔ ａｌ．，Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ ｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ ｍｅｄｉｃｉｎｅ（メイウッド、ニュージャージー州）２４２，１３４５－１３５４，ｄｏｉ：１０．１１７７／１５３５３７０２１７７１３０００（２０１７）を参照のこと。ここでは、ｃＤＮＡプラスミド並びに５００ｂｐのＣＥＤＴ及びＭＣを、３週齢（離乳）ホモ接合性ＣＦＴＲのｐ．Ｇ５４２Ｘ（ＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Gly}_{UGA}$）及びｐ．Ｗ１２８２Ｘ（ＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Leu}_{UGA}$）マウスの肺に、エレクトロポレーションにより送達する。スクランブルのｔＲＮＡ配列をコードするｃＤＮＡプラスミド（ＭＣ及びＣＥＤＴの両方に対して２．７ｋｂのｐｕｃ５７親プラスミド）を、エレクトロポレーションの効果、及び発現されたＡＣＥ－ｔＲＮＡが肺細胞生存率に与える可能な効果の対照として使用する。簡潔には、塩平衡溶液中の５０ｕｌのＤＮＡ（２ｍｇ／ｍｌ）をマウスの肺に吸引する。送達直後に、イソフルランを投与しながら、小児の皮膚ペースメーカー電極（ＭＥＤＴＲＯＮＩＣＳ）を使用して一連の８×１０ｍｓｅｃの方形波電気パルス（２００Ｖ／ｃｍ）を動物に投与する。電極は、コンダクタンスを助けるために、少量の外科用潤滑剤を使用して、胸部の両側に配置される。

【０２３７】

マウスを、送達の７、１４及び２１日後（ｄ）に分析する。腸閉塞のために、ホモ接合ｐ．Ｇ５４２Ｘ－及びｐ．Ｗ１２８２Ｘ－ＣＦＴＲマウスのわずか４０％しか４０日齢まで生存しなかったので、研究は、各群について、ｎ＝６を達成するよう大規模コホートのマウス（ｎ＝１２）から開始する。合計で、最低で３８４匹のマウスを使用してこの研究を完了している。適切な実験動物を実現するために、両方の性別を使用している。各時点で、マウスを安楽死させ、肺を取り出し、左右の肺葉に分離する。凍結させた切片のため、ＯＣＴに埋め込む前に、右葉を灌流し、４％パラホルムアルデヒド／３０％スクロースで膨張固定する。左葉をタンパク質（ウエスタンブロット、ＷＢ）及びＲＮＡ単離のために急速凍結する。肺の左葉を液体窒素下で粉砕し、肺粉末の１／８をＣＦＴＲｍＲＮＡについて分析する。残りの肺を、１５０ｍＭのＮａＣｌ、５０ｍＭのＴｒｉｓ、ｐＨ８．０を含有するバッファーの中で、ダウンス式にホモジナイズし、プロテアーゼ阻害剤及び２％のＣＨＡＰＳ（ｗ／ｖ）を補充する。グリコシル化ＣＦＴＲタンパク質を、小麦胚芽アグルチン（ＷＧＡ）結合アガロースビーズを使用して親和性精製し、洗浄し、２００ｍＭのＮ－アセチルグルコサミン（ＮＡＧ）で溶出する。試料を、抗ＣＦＴＲ抗体（１：１０００；米国ＭＩＬＬＩＰＯＲＥのＭ３Ａ７）を使用して免疫ブロットする。マウス由来の腸は、ＷＢ及びｑＰＣＲ分析のための未治療組織対照として機能する。右葉の切片を、上、中央、及び下を表す肺の３つの高さで切断し、ミニベクター及びＤＡＰＩに向かってＦＩＳＨ（Ｃｙ５又はＣｙ３）で染色する（図８）。気道の細胞は、どの細胞がトランスフェクトされているかを同定するために、連続的な切片で特異的抗体と共染色することによって、同定される。定量は、肺の各レベルからの１０の切片におけるＦＩＳＨ＋細胞／総細胞の数を数えることによって行う。

【０２３８】

共染色に使用される抗体には、ケラチン５（粘膜下の腺の基底細胞）、アセチル化チューブリン及びＦｏｘＪ１（染色に応じて線毛又は非線毛気道上皮細胞）、神経発育因子受容体、ケラチン１４、ｐ６３（気道の基底細胞）、及びＭｕｃ５ＡＣ（杯細胞）が含まれる。ＣＦＴＲは、マウスモノクローナルＣＦＴＲ－７６９を使用して免疫組織化学及び免疫蛍光法によって検出される。エレクトロポレーションはＤＮＡを気道上皮細胞（図６Ａ）に送達するのに非常に効率的であるので、本発明者らは、ＩＦによって検出するのに十分高いレベルである、気道上皮細胞におけるＣＦＴＲタンパク質の有意な救済（＞１０％

）を予測している。
【０２３９】
炎症性サイトカインレベルを、マウスのサブセット（ｎ＝６）において、エレクトロポレーションの前及び直後に測定し、次いで、再度、肺採取時（７日の時点）に測定して、治療が炎症応答を引き起こしたかどうかを判定する。重要なことに、これは以前に、エレクトロポレーション後、ブタ又はマウスにおいて炎症性反応を示さなかった。ヘマトキシリン及びエオシン（Ｈ＆Ｅ）組織学的分析を行って、肺の形態の変化を検出する。
【０２４０】
実施例１１　ＷＴマウスの肺におけるＡＣＥ－ｔＲＮＡＡｒｇＵＧＡ発現ベクターの持続性
この実施例は、ＷＴマウスの肺におけるＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{ArgUGA}（配列番号８）発現プラスミド、ＣＥＤＴ及びＭＣの持続性を判定するための研究である。
【０２４１】
４０日間生存したｐ．Ｇ５４２Ｘ及びｐ．Ｗ１２８２Ｘ－ＣＦＴＲマウスが非常に少ないため、おそらく、実施例１０ではＣＥＤＴ及びＭＣからのＡＣＥ－ｔＲＮＡ発現の完全な持続性を判定することが不可能であり得る。本発明者らは、＞６ヶ月齢のマウスの肺における導入遺伝子の発現を実証した。したがって、本発明者らは、実施例１０）に以前に記載されたように、３週齢のＣ５７Ｂｌ／６雄ＷＴマウスの肺に、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{ArgUGA}をコードするｃＤＮＡプラスミド（ＭＣ及びＣＥＤＴの両方について２．７ｋｂのｐｕｃ５７親プラスミド）、５００ｂｐのＣＥＤＴ及びＭＣを送達し、それらの送達効率及び持続性並びにＰＴＣ抑制効率を判定する。スクランブルのｔＲＮＡ配列をコードする親プラスミドを、エレクトロポレーションの効果、並びに発現されたＡＣＥ－ｔＲＮＡが７日間、１４日間及び１ヶ月、２ヶ月、６ヶ月及び１２ヶ月で肺細胞の生存率に与える可能な効果の対照として使用する。
【０２４２】
試験は、治療あたり１０匹のマウス（雄５匹／雌５匹）で開始し、エンドポイントは、合計２４０匹のマウスについて、試験のこの部分のために使用される。各エンドポイントの３日前に、短いユビキチンＣプロモーター（ｓｈＵｂＣ）の制御下でｎ末端血液凝集素（ＨＡ）エピトープタグ及びｃ末端ＦＬＡＧエピトープタグを有するＮＬｕｃ－ＵＧＡタンパク質を発現する核標的化のためのＳＶ４０－ＤＴＳを有する小型（３ｋｂ）ＰＴＣレポーターｃＤＮＡプラスミドの後続的な送達を行う（図９）。
【０２４３】
定められたエンドポイントで、肺を取り出し、ＩＦ及びＦＩＳＨ分析（右葉）並びにタンパク質生化学（左葉）について、上記のように治療する。ＰＴＣレポータープラスミドは、多機能性であり、ミンベクター（ｍｉｎｖｅｃｔｏｒ）とは完全に異なる配列を有し、したがって、プラスミドの共送達効率を判定するためにｃｏ－ＦＩＳＨによって同定することができる。ミニベクターとＰＴＣレポータープラスミドが共局在する場合、リードスルー効率は、ｉｎ　ｖｉｖｏイメージングを使用するＮＬｕｃ発光、外植された肺組織のプレートリーダー測定（図６Ｂ）、又はｃ末端ＦＬＡＧタグを使用する生化学的測定（左葉）によって、判定することができる。ＮＬｕｃタンパク質の発現の後に、ｎ末端ＨＡエピトープタグを使用してＩＦ又はＷＢを続けることができ、ＰＴＣが抑制された場合にのみ、明らかなＦＬＡＧシグナルが存在する。重要なことに、このＤＮＡコンストラクトは、ＰＴＣ抑制のための最良のＡＣＥ－ｔＲＮＡ配列を同定するために本発明者らのハイスループットスクリーニングで使用されるものと類似している。これは、バックグラウンドのリードスルーを低減して真正なＰＴＣ抑制を忠実に報告することによって、ノイズに高いシグナルを与えるように修正されている。
【０２４４】
この試験では、マウスで概説した実験の再現性を確実にするために、１バッチで、５．５ｇのエンドトキシンを不含有のＰＴＣレポーターｃＤＮＡプラスミドを作製した（ＡＬＤＥＶＲＯＮ）。５００ｂｐのミニベクターの送達は、（細胞の共ＦＩＳＨ標識によって判定されるように）３ｋｂのＰＴＣレポータープラスミドよりも効率的であり、したがっ

てミニベクターのＰＴＣ抑制活性の過小評価を与えると予測される。本発明者らは、ミニベクターに対してＦＩＳＨを使用して、各エンドポイントでの肺におけるミニベクターの存在の持続性を判定し、ＰＴＣレポーターｃ末端ＦＬＡＧエピトープに対する発光及びＩＦを使用して、抑制作用の持続性を定量する。ＦＩＳＨと対にした実施例１０に詳述されているＩＦ抗体及び技術を使用して、どの細胞型が形質導入されているかを同定する。

【０２４５】

ＣＦＴＲの機能の測定を行うために、Ｇｒｕｂｂ，Ｂ．Ｒ．，ｅｔ ａｌ．，Ａｍ Ｊ Ｐｈｙｓｉｏｌ ２６７，Ｃ２９３－３００，ｄｏｉ：１０．１１５２／ａｊｐｃｅｌｌ．１９９４．２６７．１．Ｃ２９３（１９９４），１６０ Ｇｒｕｂｂ，Ｂ．Ｒ．ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ ３７１，８０２－８０６，ｄｏｉ：１０．１０３８／３７１８０２ａ０（１９９４）、及びＧｒｕｂｂ，Ｂ．Ｒ．，ｅｔ ａｌ．，Ａｍ Ｊ Ｐｈｙｓｉｏｌ ２６６，Ｃ１４７８－１４８３，ｄｏｉ：１０．１１５２／ａｊｐｃｅｌｌ．１９９４．２６６．５．Ｃ１４７８（１９９４）に記載されているように、気管を除去し、長手方向に半分に分割する。半分は、直径２ｍｍの開口チャンバーを有するＵｓｓｉｎｇチャンバー（ＰＨＹＳＩＯＬＯＧＩＣ ＩＮＳＴＲＵＭＥＮＴＳ）に分析のために取り付けられ、短絡電流は、Ｃｏｏｎｅｙ，Ａ．Ｌ．ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ４６，９５９１－９６００，ｄｏｉ：１０．１０９３／ｎａｒ／ｇｋｙ７７３（２０１８）、Ｃｏｏｎｅｙ，Ａ．Ｌ．ｅｔ ａｌ．，ＪＣＩ Ｉｎｓｉｇｈｔ １，ｄｏｉ：１０．１１７２／ｊｃｉ．ｉｎｓｉｇｈｔ．８８７３０（２０１６）、Ｍａｌｌ，Ｍ．，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｍｅｄ １０，４８７－４９３（２００４）、ａｎｄ Ｚｈｏｕ，Ｚ．ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｃｙｓｔ Ｆｉｂｒｏｓ １０ Ｓｕｐｐｌ ２，Ｓ１７２－１８２，ｄｏｉ：１０．１０１６／Ｓ１５６９－１９９３（１１）６００２１－０（２０１１）に記載されている方法で測定される。短絡電流の差は、図７Ｂ～図７Ｄで行われた実験と同様に、気管切片の基底外側に１０μＭのフォルスコリン及び１００μＭのＩＢＭＸを添加し、続いて１０μＭのＩｎｈ１７２を添加した後に計算される。残りの気管の切片を使用して、ＮＢＤ２ドメインに対するＣＦＴＲ７６９抗体を使用する免疫蛍光によって、気道におけるＣＦＴＲの発現を判定することができる。重要なことに、肺の切除された部分は、将来のＲＮＡｓｅｑ及びＲｉｂｏｓｅｑ研究のために積み立てられる。

【０２４６】

本明細書に記載されるいくつかの実験のために、本発明者らは、ＡＣＥ－ｔＲＮＡの持続的発現を外挿するためにＰＴＣ抑制プレートリーダー発光アッセイに依拠する。目標は、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ転写活性の直接的な測定を可能にする技術を創出することである。その目的のために、本発明者らは、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ：バーコード融合転写物をコードし、バーコード配列（ＡＢＳ）は内因性のｔＲＮａｓｅ Ｚによって切断され、ｑＰＣＲ定量化を可能にして相対的なＡＣＥ－ｔＲＮＡ発現を判定しながら、完全に機能的なＡＣＥ－ｔＲＮＡを得ることができる（図１０Ａ）。

【０２４７】

本発明者らは、マウスのゲノム配列と相同性のないランダムな２００ｂｐのバーコード配列を設計した。ＮＬｕｃ－ＵＧＡを安定して発現する１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞にトランスフェクトされた場合、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Arg}_{UGA}$－及びＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Trp}_{UGA}$－バーコードは、ｑＰＣＲによってモニターした場合にロバストな発現を示すが、非バーコード化ＡＣＥ－ｔＲＮＡは意義あるシグナルを与えなかった（図１０Ｂ）。しかし、１つの場合では、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Arg}_{UGA}$の抑制活性は、３’バーコード配列の存在によって妨げられた（図１０Ｃ）。ＡＣＥ－ｔＲＮＡ活性の欠損は、３’プロセシングが不十分であるためである可能性が最も高く、バーコード配列に対してプローブ探査されたノーザンブロットによって判定することができる。その配列がバーコード又は改変させたバーコードリンカー配列としても作用して３’プロセシングを改善する３’ＨＤＶ自己切断リボザイムをコードすることによって、ＡＢＳ技術を改善するための作業を行うことができる。３’リボザイムの組み込みは、改善されたＡＣＥ－ｔＲＮＡの３’プロセシングをもたらし、それらのＰＴＣ抑制活性を増加させ得る。さらに、ＡＢＳ技術はＮＬｕｃ ＰＴ

Ｃレポーターを補完するためのＡＣＥ－ｔＲＮＡ発現の測定を可能にする（図９）。
【０２４８】
別の実施形態では、本発明者らは、定常状態のＡＣＥ－ｔＲＮＡ転写活性の高分解能で直接的な測定を可能にする新規なＡＣＥ－ｔＲＮＡバーコードシステム技術を作り出した（図１１Ａ）。標準的なＲＮＡ－ｓｅｑ法は、広範な転写後修飾及び二次構造のために、ｔＲＮＡで実施することができない。Ｚｈｅｎｇ，Ｇ．ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　１２，８３５　ａｎｄ　Ｐａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｗｉｌｅｙ　Ｉｎｔｅｒｄｉｓｃｉｐ　Ｒｅｖ　ＲＮＡ　５，４６１－４８０，ｄｏｉ：１０．１００２／ｗｒｎａ．１２２４（２０１４）。さらに、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ配列は、１つ又は複数の内因性のｔＲＮＡと１つのヌクレオチドのみが異なり、したがって、ノーザンブロット、マイクロアレイ及び断片化ＲＮＡ－ｓｅｑは、外因性治療用ＡＣＥ－ｔＲＮＡ及び内因性のｔＲＮＡの発現レベルを識別することができない。したがって、本発明者らは、これらの問題を回避し、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ転写の信頼性の高い直接的かつ高感度のｑＲＴ－ＰＣＲ測定をもたらすバーコード技術を生成した。ここで、固有の３’バーコード配列は、ＨＤＶリボザイム（ｄｒｚ－Ｂｆｏ－２、６０ｂｐ）をコードする。（Ｗｅｂｂ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　３２６，９５３（２００９）、及びＷｅｂｂ　ｅｔ　ａｌ．，ＲＮＡ　Ｂｉｏｌ　８，７１９－７２７（２０１１））、転写後にＡＣＥ－ｔＲＮＡ本体から自身を効率的に切断する（９０％超）（図１１Ｂ）。ＡＣＥ－ｔＲＮＡの転写によって駆動されるＨＤＶの発現を、プローブベースのｑＲＴ－ＰＣＲを使用して定量する。重要なことに、バーコード化ベクターで発現されるＡＣＥ－ｔＲＮＡは、３’末端の２’、３’環状ホスフェート基修飾（Ｓｃｈｕｒｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ　３０，ｅ５６－ｅ５６，２００２）のために翻訳に関与することができず、したがってＰＴＣ抑制の結果を混同しない。
【０２４９】
実施例１２　Ｇ４１８及びＡＣＥ－ｔＲＮＡの内因性のＣＦＴＲのＰＴＣの救済
この実施例では、内因性のＣＦＴＲのＰＴＣの救済を調べ、従来のＰＴＣリードスルー剤（すなわち、Ｇ４１８）及びプラスミドに送達されたＡＣＥ－ｔＲＮＡと比較するために、試験が実行された。その目的のために、操作されたヒト細気管支上皮細胞株、１６ＨＢＥ１４ｇｅ－を使用した（Ｖａｌｌｅｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｃｙｓｔｉｃ　Ｆｉｂｒｏｓｉｓ，Ｖｏｌｕｍｅ　１８，Ｉｓｓｕｅ　４，Ｊｕｌｙ　２０１９，Ｐａｇｅｓ　４７６－４８３）。Ｇ４１８（Ｇｅｎｅｔｉｃｉｎ）は、リボソームの復号中心と相互作用し、近い同族ｔＲＮＡでＰＴＣの抑制を促進することによって作用し、したがって多くの場合誤ったアミノ酸を組み込む標準的なＰＴＣリードスルー剤である。その非特異的な性質のために、Ｇ４１８による救済は、ナンセンス突然変異からのミスセンス変異の生成をもたらす。対照的に、本明細書に開示されるようなＡＣＥ－ｔＲＮＡは、所望のアミノ酸に入れられる。
【０２５０】
アッセイを実施するために、Ｗ１２８２Ｘ－ＣＦＴＲ又はＲ１１６２Ｘ－ＣＦＴＲの変異を有する野生型１６ＨＢＥ１４ｇｅー細胞又は１６ＨＢＥ１４ｇｅー細胞は、（ｉ）１００ｕＭのＧ４１８又はビヒクルで処理するか、又は（ｉｉ）実施例４に記載の方法で、３つのＡＣＥ－ｔＲＮＡ（配列番号８、４及び１）、１×ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}、４×ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}、１×ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ｌｅｕ}、４×ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ｌｅｕ}、１×ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ｔｒｐ}及び４×ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ｔｒｐ}の１つ又は４つのコピーをコードする空のプラスミド又は様々なプラスミドで、トランスフェクトされた。４８時間後、対応するＣＦＴＲｍＲＮＡ発現レベルを次いで判定した。結果を図１４に示す。
【０２５１】
図に示されるように、プラスミドからコードされ、１６ＨＢＥ１４ｇｅ－細胞にトランスフェクトされたＡＣＥ－ｔＲＮＡは、アルギニン及びロイシンＡＣＥ－ｔＲＮＡを使用して、翻訳の先駆けとなるラウンドを促進することによって、Ｇ４１８よりも、ナンセンスコドン介在的分解過程の阻害において、有意に効果的であった。このデータの重要な態

様はまた、本明細書に開示されるプラットフォームがアラカルトのＰＴＣ抑制を助けることである。予想外にも、ロイシンＡＣＥ－ｔＲＮＡは、トリプトファンＡＣＥ－ｔＲＮＡよりも効果的にＷ１２８２Ｘを抑制することが見出された。Ｗ１２８２Ｘの位置のロイシンは、ＷＴレベルのＣＦＴＲ機能を助ける（Ｘｕ　ｅｔ　ａｌ．，Ｈｕｍ　Ｍｏｌ　Ｇｅｎｅｔ．２０１７　Ａｕｇ　１５；２６（１６）：３１１６－３１２９）ので、本明細書に記載のＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ｌｅｕ}を使用して、変異ｐｆ　Ｗ１２８２Ｘ－ＣＦＴＲを救済又は抑制することができる。

【０２５２】

ＰＴＣは、（ａ）完全な機能喪失又は変化した機能を有する切断型タンパク質、及び（ｂ）ＮＭＤ経路によるｍＲＮＡ転写物の分解の両方をもたらすので、両方のフロントに対するＡＣＥ－ｔＲＮＡの効果を調べるために、追加のアッセイを設計し、実施した。より具体的には、図１５Ａに示すように、１６ＨＢＥ１４ｇｅ－細胞を作製して、ＰＴＣリードスルー・レポーターｐｉｇｇｙＢａｃ導入遺伝子を発現させた。導入遺伝子はＰＴＣを有するｍＮｅｏｎＧｒｅｅｎ（ｍＮＧ）タンパク質をコードするので、ＡＣＥ－ｔＲＮＡによるＰＴＣの抑制は、発現したｍＮＧタンパク質からの蛍光に基づくＦＡＣの選別によって、定量することができる。その目的に対して、蛍光の増加は、翻訳レベルでのＰＴＣの抑制を表す。

【０２５３】

これらの細胞は、１００ｕＭのＧ４１８で処理するか、又は上記の方法で４×ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}をコードするプラスミドでトランスフェクトされた。次いで、細胞を、発現したｍＮＧタンパク質からの蛍光について調べた。結果を図１５Ｂに示す。図に示すように、アルギニンＡＣＥ－ｔＲＮＡは、強固なＰＴＣ抑制及び完全長のｍＮｅｏｎＧｒｅｅｎタンパク質の生成を助けた。対照的に、Ｇ４１８は強固なＰＴＣ抑制を助けなかった。灰色のプロファイルは、非処理のＰＢ－ｍＮｅｏｎＧｒｅｅｎ－Ｒ１１６２Ｘ－１６ＨＢＥ１４ｇｅ－細胞についてのものであった。

【０２５４】

実施例１３　様々なフォーマットで送達されるＡＣＥ－ｔＲＮＡの内因性のＣＦＴＲのＰＴＣのレスキュー

この実施例では、内因性のＣＦＴＲのＰＴＣの救済を調べ、様々なフォーマット、例えば、プラスミド、ＣＥＤＴ及びＭＣで送達されるＡＣＥ－ｔＲＮＡに送達されたＡＣＥ－ｔＲＮＡと比較するために、アッセイが実行された。ＰＴＣリードスルー・レポーターｐｉｇｇｙＢａｃ導入遺伝子（図１５Ａ）を発現する上記の１６ＨＢＥ１４ｇｅ－細胞を使用した。より具体的には、細胞が、ＡＣＥ－ｔＲＮＡをコードするプラスミド、ＣＥＤＴ又はＭＣでトランスフェクトされた。次いで、細胞をＦＡＣＳによって選別し、ｍＲＮＡを非緑色細胞及び緑色細胞から単離した。標的化ＲＴ－ｑＰＣＲを使用して、ＣＦＴＲのｍＲＮＡ発現を定量した。

【０２５５】

いくつかの論文では、細胞が、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}及びＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ｌｅｕ}をコードするプラスミド（配列番号８及び４）でトランスフェクトされた。結果を図１６Ａ及び図１６Ｂに示す。図１６Ｂに示すように、プラスミドを介して送達されたＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}及びＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ｌｅｕ}の両方が、それぞれＲ１１６２Ｘ及びＷ１２８２Ｘ１６ＨＢＥ１４ｇｅ－細胞からＣＦＴＲｍＲＮＡを有意にレスキューした。このようなＣＦＴＲのｍＲＮＡの救済は、緑色細胞（ＧＦＰ＋）及び非緑色細胞（ＧＦＰ－）の両方で観察された。非緑色の細胞が依然としてＣＦＴＲのｍＲＮＡ発現の救済をしていた理由は、ＡＣＥ－ｔＲＮＡが、有意なレベルの翻訳ではなく、先駆けとなるラウンドの翻訳によって、ｍＲＮＡの発現を効果的にレスキューしていたためであった。これらの結果は、ＮＭＤの阻害が強固な翻訳レスキューよりも達成が比較的容易であることを示唆した。

【０２５６】

他のアッセイでは、Ｒ１１６２Ｘ－ＣＦＴＲ及びＰＴＣリードスルー・レポーターｐｉｇｇｙＢａｃ導入遺伝子を有する１６ＨＢＥｇｅ細胞に、エレクトロポレーションによっ

てＡＣＥ－ｔＲＮＡをコードするミニサークルがトランスフェクトされた。これらの細胞をｍＲＮＡ発現分析のためにＦＡＣＳによって選別せず、むしろ集団全体を分析した。図１７Ａに示すように、ミニサークルをコードするＡＣＥ－ｔＲＮＡは、大部分の細胞において強固なｍＮｅｏｎＧｒｅｅｎの発現を助けた。これらの結果は、ミニサークルを発現するＡＣＥ－ｔＲＮＡが、タンパク質レベルで定量可能なレベルまでＰＴＣの抑制を助けることを示した。この救済は、親プラスミド（約７．０ｋｂのサイズ）及びスクランブルの対照よりも有意に良好であった。また、ＡＣＥ－ｔＲＮＡの１つのコピーをコードする８５０ｂｐのＭＣ（「１×ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}８５０ｂｐのＭＣ」）及びＡＣＥ－ｔＲＮＡの４つのコピーをコードする８５０ｂｐのＭＣ（「４×ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}８５０ｂｐのＭＣ」）は、同様のレベルのＣＦＴＲｍのＲＮＡの発現をもたらした（図１７Ｂ）。しかし、後者は、はるかに多くのｍＮｅｏｎＧｒｅｅｎの発現細胞をもたらした（図１７Ａ、下２つのパネル）。これらの結果は、ＡＣＥ－ｔＲＮＡの量の増加がＮＭＤ阻害を増加させるようには見えなかったが、タンパク質の生成を増加させることを示唆した。このレベルのｍＲＮＡ発現救済は、前例のない新規なものであった。

【０２５７】

さらなるアッセイを、Ｗ１２８２Ｘ－ＣＦＴＲ及びＰＴＣリードスルー・レポターｐｉｇｇｙＢａｃ導入遺伝子を有する１６ＨＢＥｇｅ細胞を使用して行った。これらのアッセイでは、細胞が、スクランブル対照、４コピーのＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ｌｅｕ}をコードするプラスミド（「４×ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ｌｅｕ}親プラスミド」）、又はエレクトロポレーションによって４コピーのＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ｌｅｕ}をコードする８５０ｂｐのＭＣ（「４×ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ｌｅｕ}８５０ｂｐのＭＣ」）でトランスフェクトされた。細胞をｍＲＮＡ発現分析のためにＦＡＣＳによって選別せず、むしろ集団全体を分析した。図１８Ａに示すように、ミニサークルは大部分の細胞で強固なｍＮｅｏｎＧｒｅｅｎ発現を助け、ミニサークルを発現するＡＣＥ－ｔＲＮＡがタンパク質レベルで定量可能なレベルまでＰＴＣ抑制を助けることを示した。この救済もまた、スクランブル対照及び親プラスミド（約７．０ｋｂのサイズ）よりも有意に良好であった。図１８Ｂを参照されたい。

【０２５８】

同様のアッセイを行って、ＣＥＤＴがまた、強固なタンパク質発現及びＲ１１６２Ｘ－ＣＦＴＲの救済の両方を助けたことを示した。より具体的には、Ｒ１１６２Ｘ－ＣＦＴＲ及びＰＴＣリードスルー・レポターｐｉｇｇｙＢａｃ導入遺伝子を有する１６ＨＢＥｇｅ細胞に、スクランブル対照、４×ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}をコードするプラスミド、及びエレクトロポレーションによって１ｘ又は４×ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}をコードする異なるサイズの４つのＣＥＤＴが、トランスフェクトされた。図１９に示すように、２００ｂｐ、４００ｂｐ及び９００ｂｐのＣＥＤＴは、強固なＣＦＴＲ　ｍＲＮＡ（図１９Ｂ）及びｍＮｅｏｎＧｒｅｅｎタンパク質発現（図１９Ａ）を助けた。ＣＦＴＲ　ｍＲＮＡ発現及びｍＮｅｏｎＧｒｅｅｎタンパク質発現を救済するそれらの能力は、ＣＥＤＴのサイズによって影響されなかった。

【０２５９】

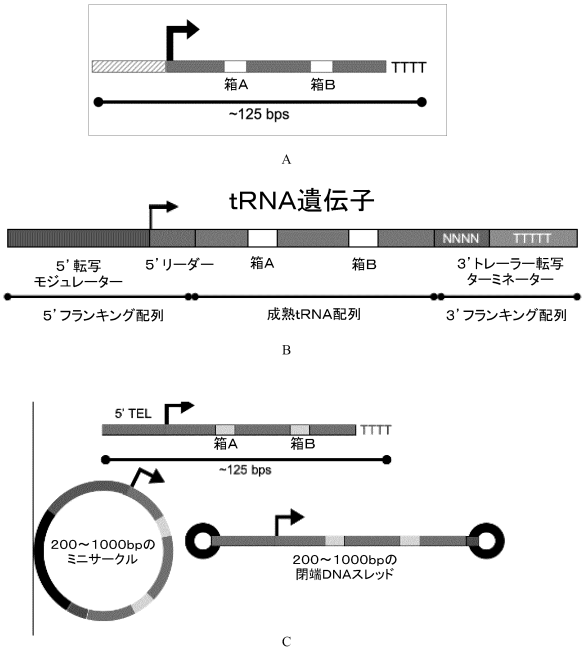
自然界では一過性であるトランスフェクションに加えて、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}の安定的なゲノムインテグレーションも調べた。それを行うために、ＰＢ－ドンキーシステム（図２０）を使用して、トランスポゾンリピート（ＴＲ）に隣接するＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}コード配列の複数のコピーを有するベクターを作製した。このベクターを使用して、ゲノムＤＮＡに安定的に組み込まれるＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}を有する１６ＨＢＥｇｅ細胞を作製した。これらの細胞を、ＣＦＴＲのｍＲＮＡの発現及びチャネル機能について、上記の様式で調べた。結果を図２１に示した。安定的に発現したＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}が内因性のＣＦＴＲの機能を救済することが見出された。定量的ＰＣＲ（ｑＰＣＲ）によるさらなる分析は、わずか１６個のＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}発現カセットが、野生型細胞についてのレベルの約６～７％でＲ１１６２Ｘ１６ＨＢＥ１４ｇｅ－細胞における強固なＣＦＴＲ機能を助けるのに十分であることを示した。

【０２６０】

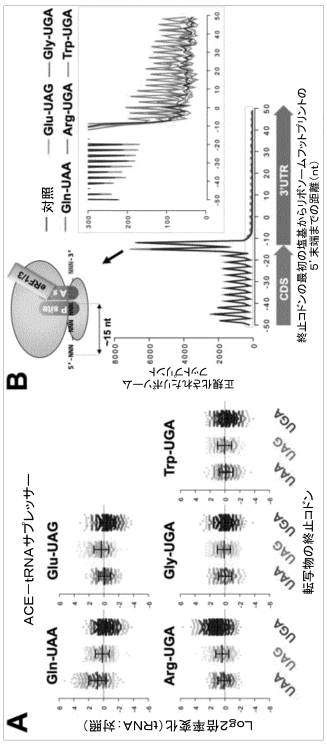
好ましい実施形態の前述の例及び説明は、特許請求の範囲によって定義される本発明を限定するものとしてではなく、むしろ例示するものとして解釈されるべきである。容易に理解されるように、特許請求の範囲に記載の本発明から逸脱することなく、上記の特徴の多数の変形及び組み合わせを利用することができる。そのような変形は、本発明の範囲からの逸脱と見なされず、そのような変形はすべて、後続の特許請求の範囲に含まれることが意図される。本明細書で引用されるすべての参考文献は、その全体が参照により組み込まれる。

【図面】

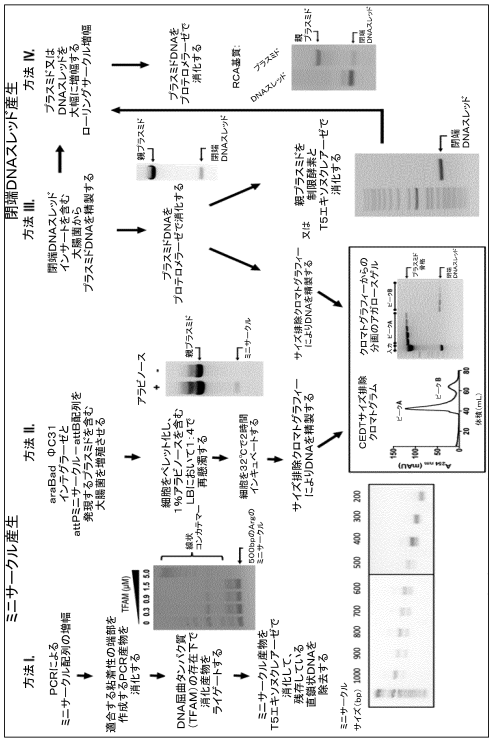
【図１】



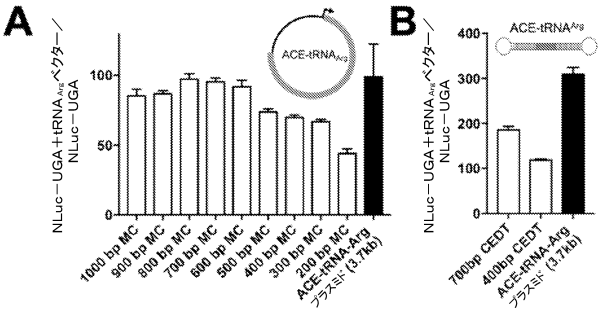
【図２】



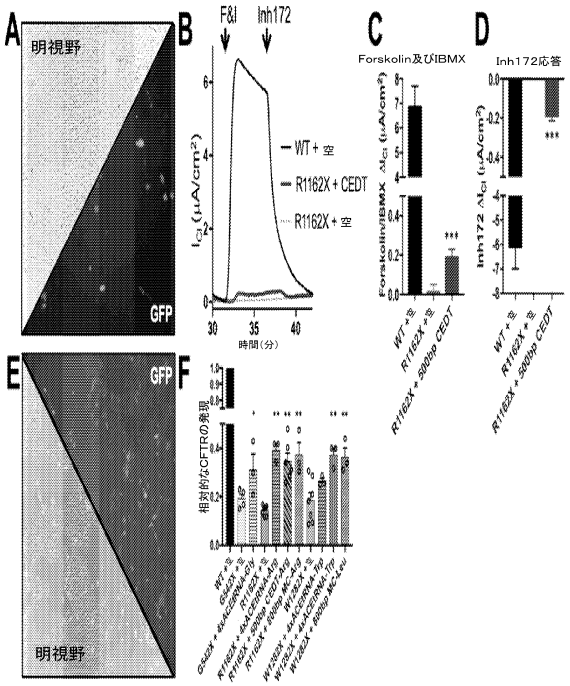
【図３】



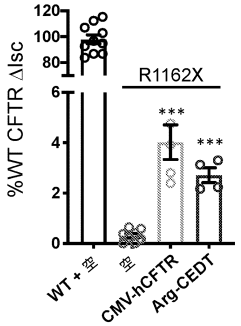
【図４Ａ－Ｂ】



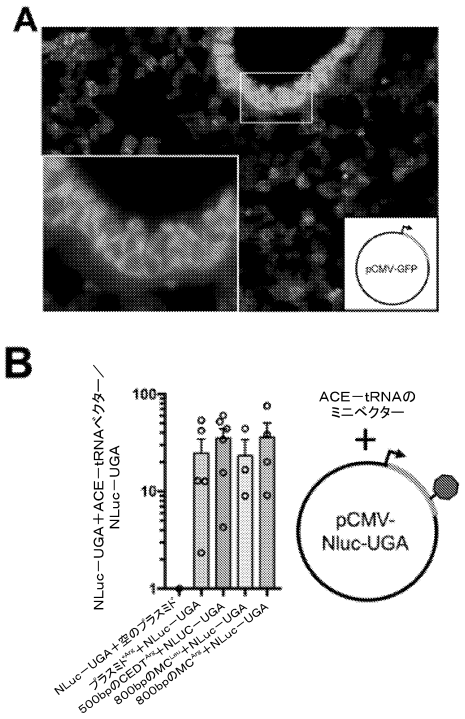
【図５Ａ－Ｆ】



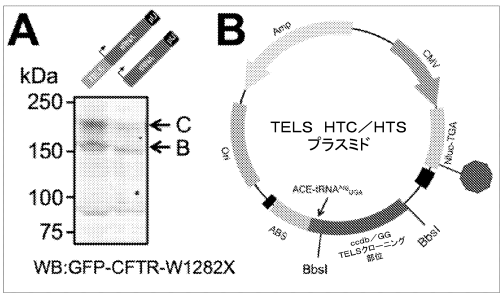
【図５Ｇ】



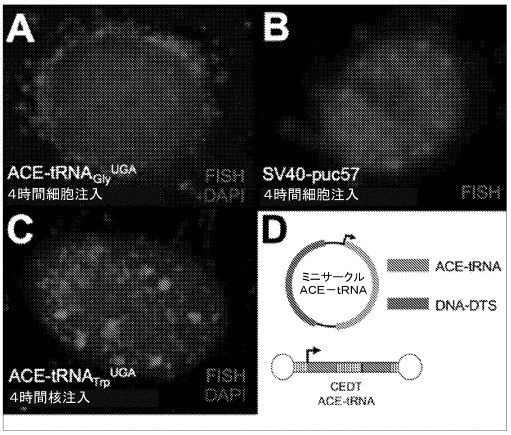
【図６Ａ－Ｂ】



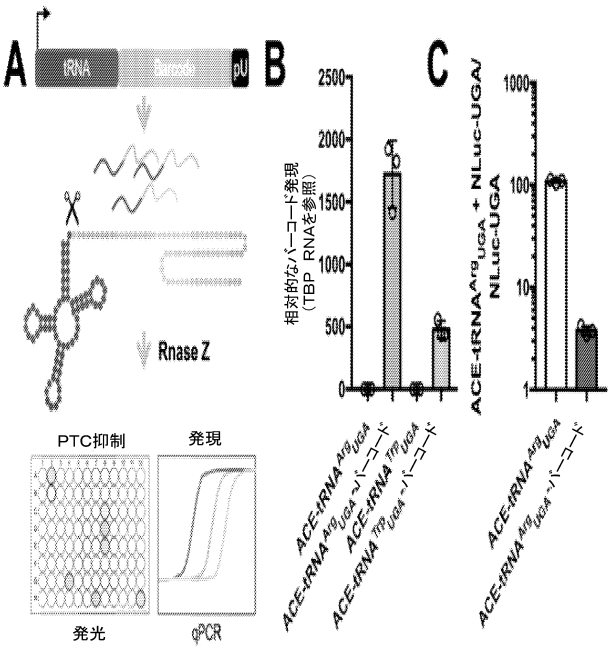
【図７Ａ－Ｂ】



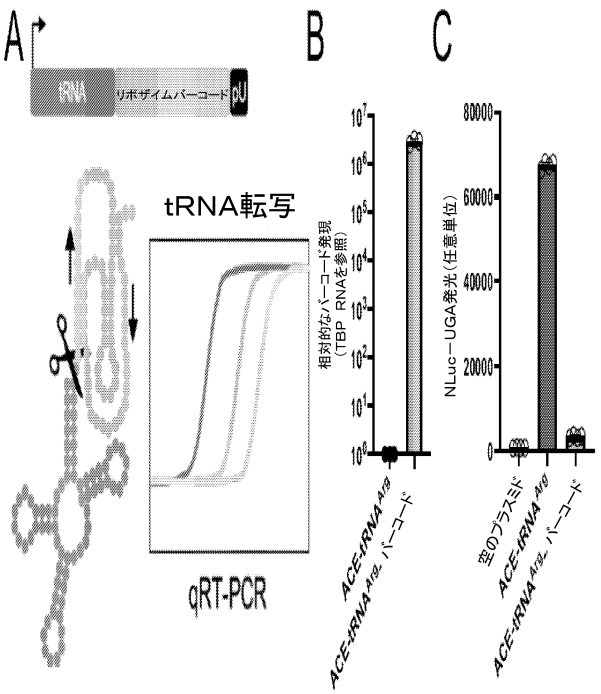
【図８Ａ－Ｄ】



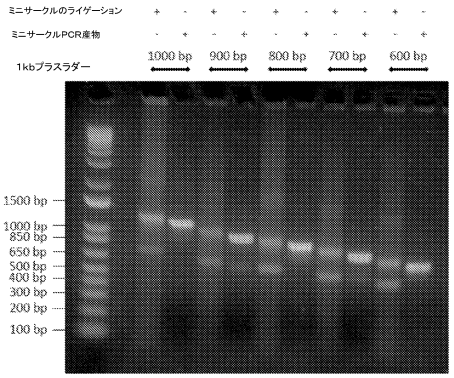
【図１０Ａ－Ｃ】



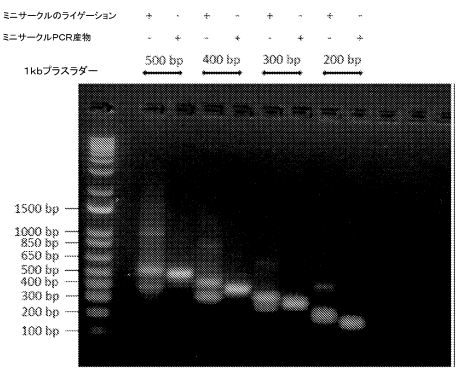
【図１１Ａ－Ｃ】



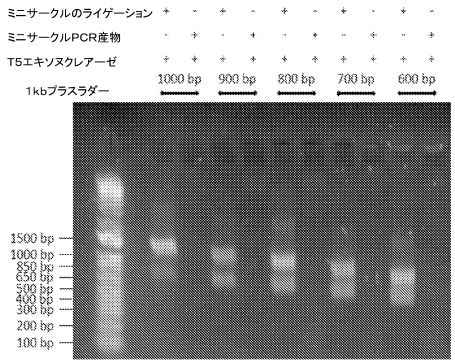
【図１２Ａ】



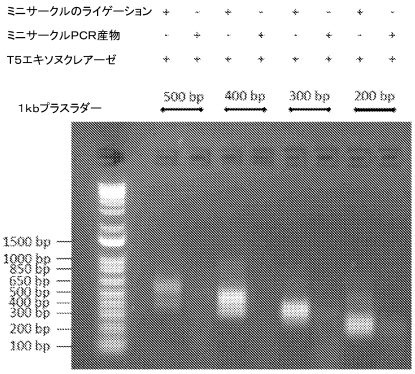
【図１２Ｂ】



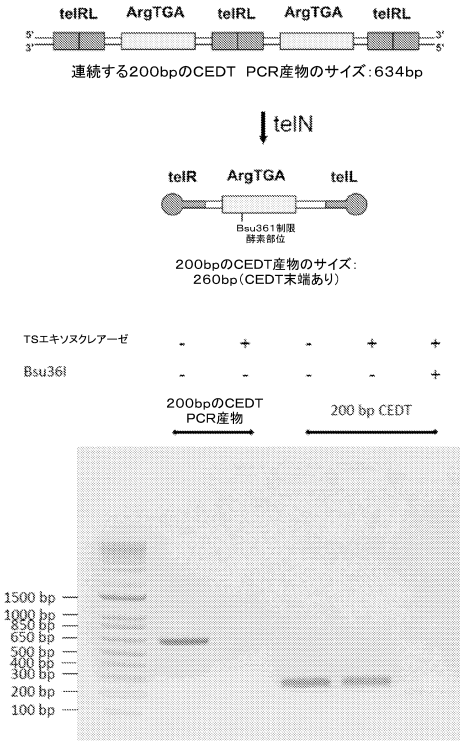
【図１２Ｃ】



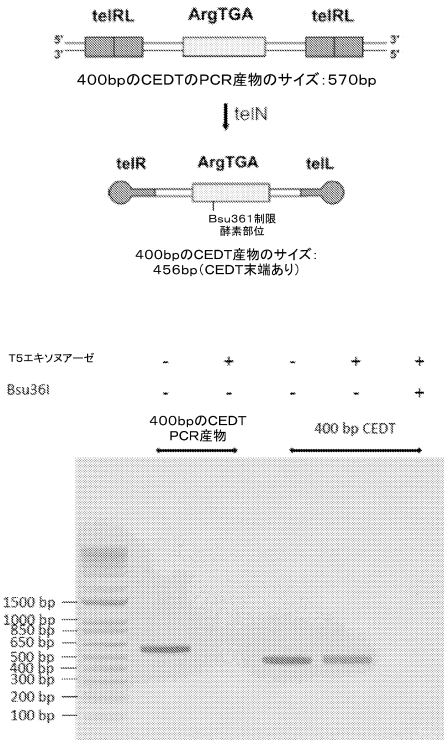
【図１２Ｄ】



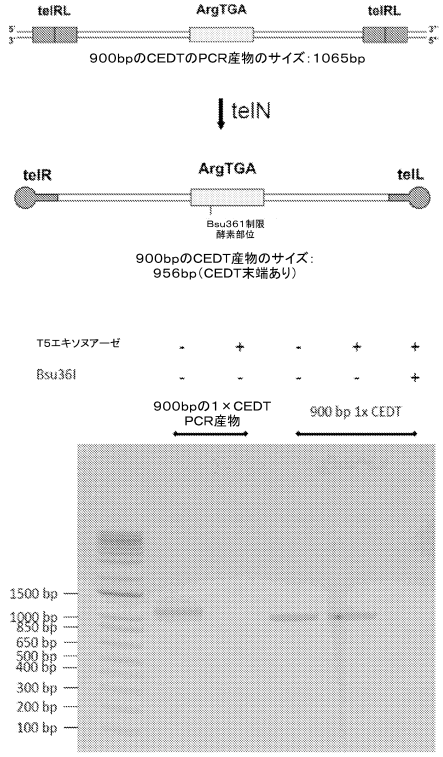
【図１３Ａ】



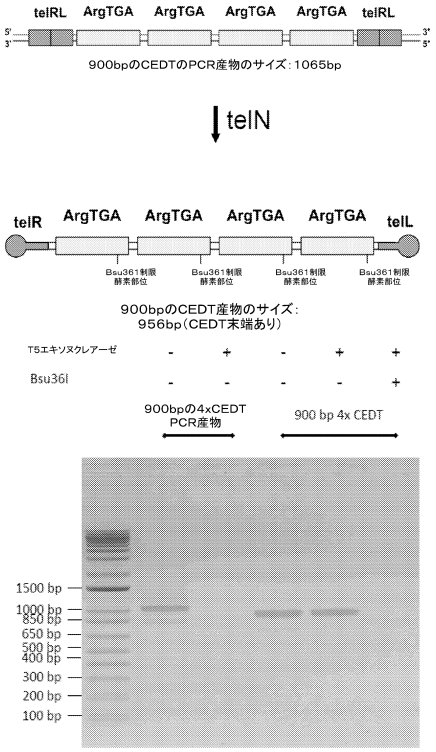
【図１３Ｂ】



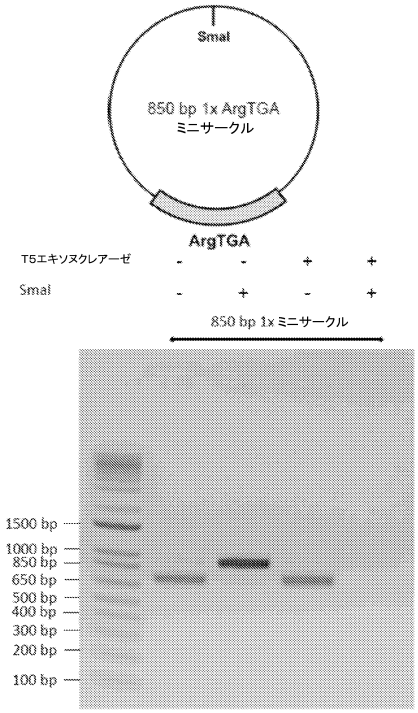
【図１３Ｃ】



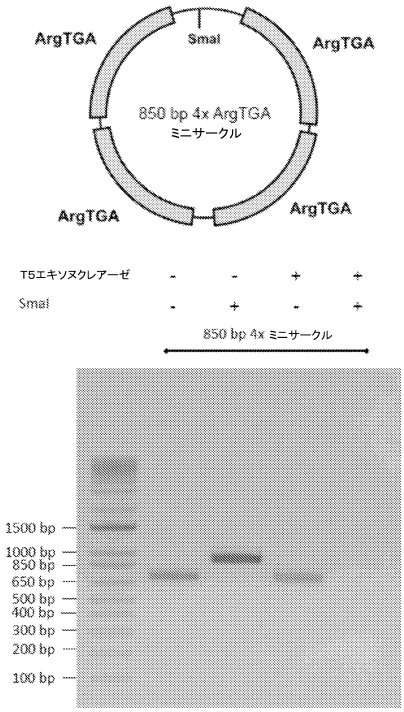
【図１３Ｄ】



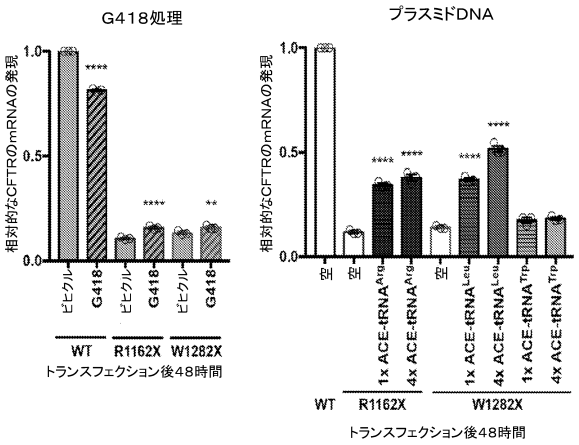
【図１３Ｅ】



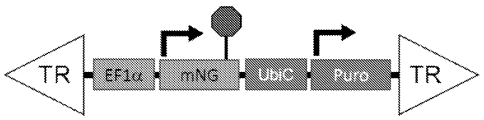
【図１３Ｆ】



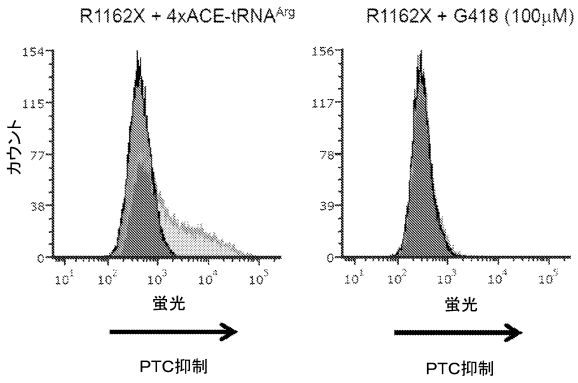
【図１４】



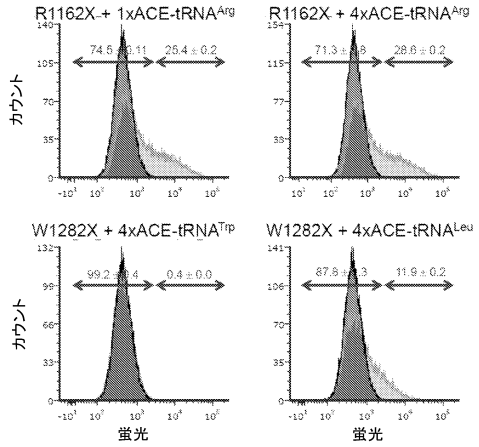
【図１５Ａ】



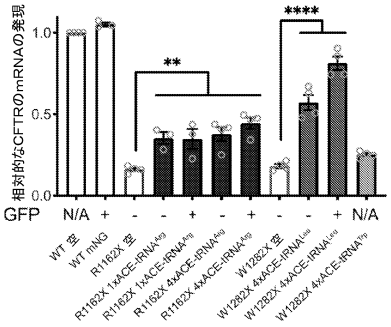
【図１５Ｂ】



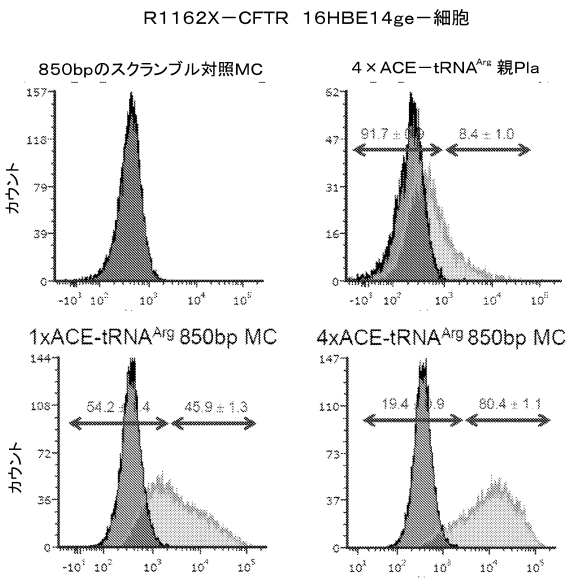
【図１６Ａ】



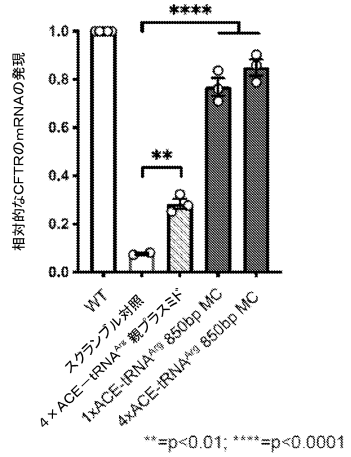
【図１６Ｂ】



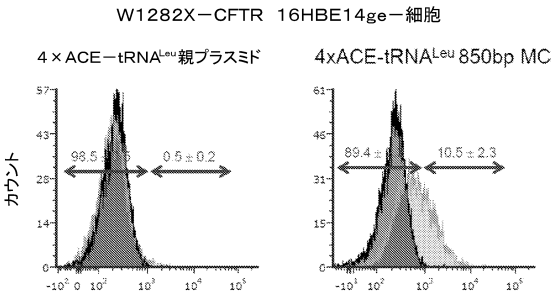
【図１７Ａ】



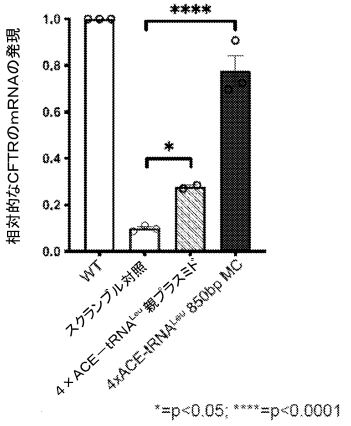
【図１７Ｂ】



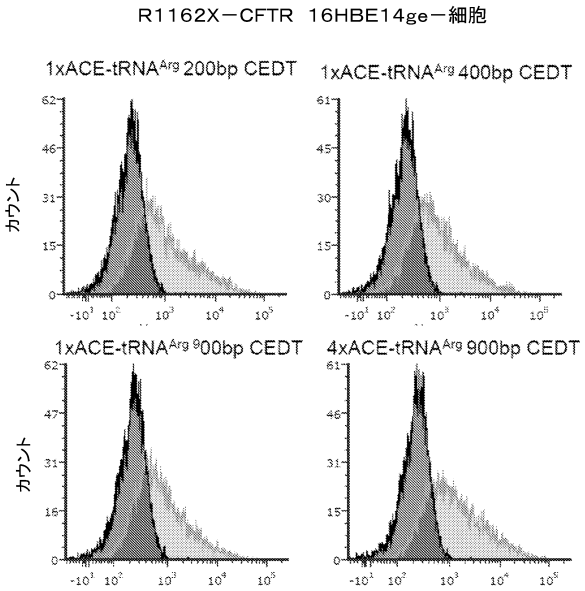
【図１８Ａ】



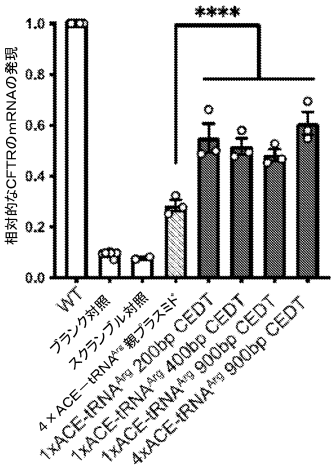
【図１８Ｂ】



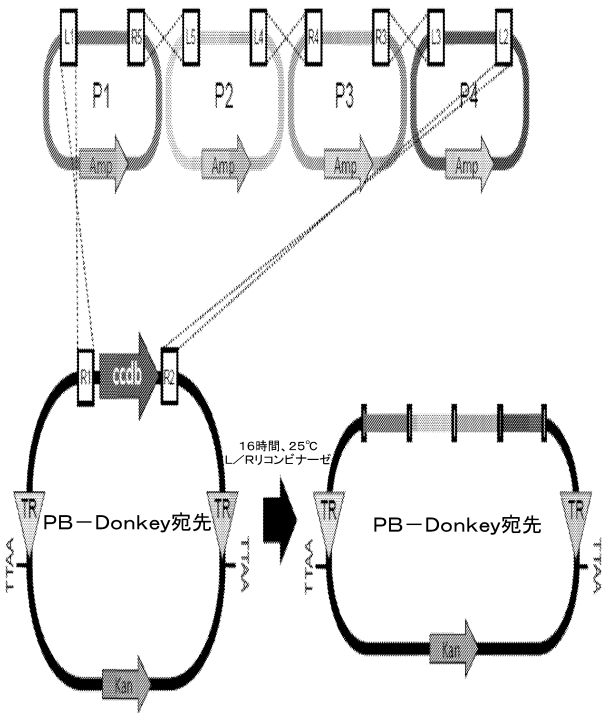
【図１９Ａ】



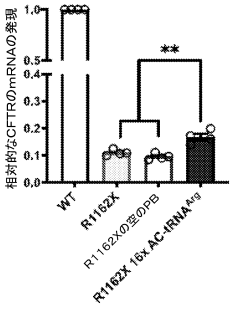
【図１９Ｂ】



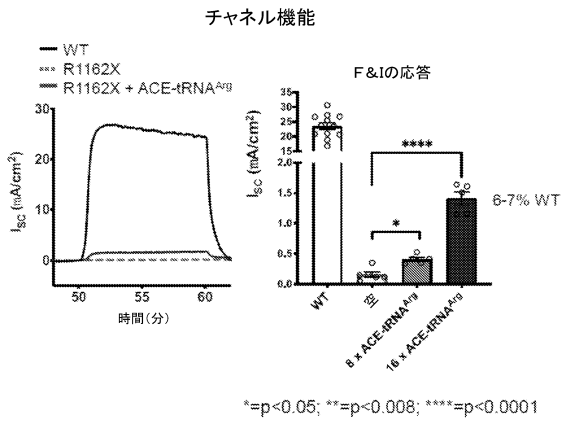
【図２０】



【図２１Ａ】



【図２１Ｂ】



【配列表】

<u>20235331740000001.app</u>

【手続補正書】
【提出日】令和4年4月8日(2022.4.8)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本願は、２０２０年６月１２日に出願された米国仮出願第６３／０３８，２４５号の優先権を主張し、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。
【０００２】
政府の利益
本発明は、国立衛生研究所によって授与されたＨＬ１５３９８８の下で政府の支援を受けてなされた。政府は、本発明に一定の権利を有する。
【０００３】
技術分野
本発明は、抗コドン編集（ＡＣＥ）－ｔＲＮＡに基づく薬剤、及び未熟終止コドン（ＰＴＣ）に関連する障害を治療するための方法に関する。
【背景技術】
【０００４】
遺伝コードは、ＤＮＡからタンパク質への翻訳の基礎であるトリプレット「コドン」を形成する４つのヌクレオチドを使用する。合計６４個のコドンが存在し、そのうち６１個がアミノ酸をコードするために、３個（ＴＡＧ、ＴＧＡ及びＴＡＡ）が翻訳終結シグナルをコードするために使用される。ナンセンス突然変異は、一般に単一ヌクレオチド置換によってアミノ酸コドンをＰＴＣに変化させ、欠損した切断型タンパク質及び重篤な形態の疾患をもたらす。ナンセンス突然変異は、全遺伝性疾患の１０％超、及び世界中で約３億人が罹患しているがんを含む約１，０００の遺伝のヒトの障害を占めている。実際、嚢胞性線維症（ＣＦ）は、「クラス１」のＰＴＣ変異（例えば、ｐ．Ｇ５４２Ｘ、ｐ．Ｒ５５３Ｘ及びｐ．Ｗ１２８２Ｘ）を有する全ＣＦ患者の約２２％に適するようになり、嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子（ＣＦＴＲ）の機能のほぼ完全な喪失及び重度の臨床症状をもたらす。ナンセンス関連疾患の非常に高い有病率及び統一機構のために、ＰＴＣ治療薬を同定するための協調的な努力がなされてきた。アミノグリコシド（ＡＭＧ）は、これらの取り組みの主要な焦点であった。しかし、長期化した使用に伴う耳毒性及び腎毒性は、それらの使用を臨床的に制限している。オフターゲット効果を低減するために合成ＡＭＧ誘導体が現在研究されているが、それらはしばしば低いリードスルー効率を被る。非ＡＭＧ小分子（例えば、タイロシン、アタルレン）も、毒性がほとんどない有望なＰＴＣリードスルー化合物として同定されている。しかし、これらの手法は、元のＰＴＣ部位におけるミスセンス変異の生成をしばしばもたらす近同族ｔＲＮＡの挿入を含めて、未だ克服されていないいくつかの課題を有する。さらに、化合物のいくつかは、ヒト初代細胞においてＰＴＣ抑制の効率が低く、アタルレンの第３相臨床治験不合格をもたらした（ＡＣＴ　ＤＭＤ第３相臨床治験、ＮＣＴ０１８２６４８７；ＡＣＴＣＦ、ＮＣＴ０２１３９３０６）。ナンセンス突然変異に関連する障害を治療するための治療剤及び方法が必要とされている。
【発明の概要】
【０００５】
本発明は、いくつかの態様において上述した必要性に対処する。
【０００６】

一態様では、本発明は、（１）プロモーター及び（ｉｉ）抗コドン編集ｔＲＮＡ（ＡＣＥ－ｔＲＮＡ）をコードする配列を含む、閉端環状非ウイルス非プラスミドＤＮＡ分子を提供する。分子は、閉端ＤＮＡスレッド（ＣＥＤＴ）分子又はミニサークル（ＭＣ）分子であり得る。分子は、ＤＮＡ核標的化配列（ＤＴＳ）、転写増強５’リーダー配列（ＴＥＬＳ）及びＡＣＥ－ｔＲＮＡバーコード配列（ＡＢＳ）からなる群より選択される１つ又は複数のエレメントをさらに含み得る。５’リーダー配列の例としては、配列番号３０６が挙げられる。ＤＴＳの例としては、ＳＶ４０－ＤＴＳ、例えば配列番号３０７が挙げられる。いくつかの実施形態では、分子は、いかなる細菌核酸配列も含まない。分子は、４個以下のＣｐＧジヌクレオチドを含むことができる。好ましくは、分子はＣｐＧジヌクレオチドを含まない。分子は、約２００～約１，０００ｂｐのサイズ、例えば約５００ｂｐのサイズであり得る。ＡＣＥ－ｔＲＮＡは、ＴｒｐＴＧＡｃｈｒ１７．ｔｒｎａ３９、ＬｅｕＴＧＡｃｈｒ６．ｔｒｎａ８１、ＬｅｕＴＧＡｃｈｒ６．ｔｒｎａ１３５、ＬｅｕＴＧＡｃｈｒ１１．ｔｒｎａ４、ＧｌｙＴＧＡｃｈｒ１９．ｔｒｎａ２、ＧｌｙＴＧＡｃｈｒ１．ｔｒｎａ１０７、ＧｌｙＴＧＡｃｈｒ１７．ｔｒｎａ９、ＡｒｇＴＧＡｃｈｒ９．ｔｒｎａ６／ノイントロン、ＧｌｎＴＡＧｃｈｒ１．ｔｒｎａ１０１及びＧｌｎＴＡＧｃｈｒ６．ｔｒｎａ１７５からなる群から選択されるものであり得る。例としては、配列番号１～１０の配列を含むＲＮＡが挙げられる。さらなる例としては、配列番号１１～３０５によってコードされるものが挙げられる。一実施形態では、ＡＣＥ－ｔＲＮＡが、（ｉ）配列番号１、４、５及び８からなる群から選択される配列、又は（ｉｉ）配列番号７９及び９４からなる群から選択される配列によってコードされる配列を含む。

【０００７】

分子は、細胞におけるＡＣＥ－ｔＲＮＡの発現方法に用いることができる。発現したＡＣＥ－ｔＲＮＡは、ｍＲＮＡの翻訳中にＰＴＣをアミノ酸に戻す機能を有する。その目的に対して、本方法は、（ｉ）目的の細胞を上記の分子と接触させること、及び（ｉｉ）ＡＣＥ－ｔＲＮＡの発現を可能にする条件下で細胞を維持することを含む。細胞は、１つ又は複数のＰＴＣを含む変異体核酸を有することができる。その場合、野生型核酸は完全に機能的なポリペプチドをコードする。この方法を使用して、発現したＡＣＥ－ｔＲＮＡは、細胞におけるポリペプチドの発現を回復させるか又はポリペプチドの機能的活性を改善するために、１つ又は複数のＰＴＣを救済する。例えば、ポリペプチドは嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子（ＣＦＴＲ）であり得、変異体核酸は切断型ＣＦＴＲをコードする。一例において、変異体核酸は、Ｔｒｐから終止のＰＴＣを有する。ＡＣＥ－ｔＲＮＡは、Ｔｒｐから終止のＰＴＣをＬｅｕに翻訳する。本発明の範囲内は、上記の分子の１つ以上を含む宿主細胞である。

【０００８】

上記の分子は、ＰＴＣ関連障害を治療するための方法において使用することができる。したがって、本発明はまた、（ｉ）分子及び（ｉｉ）薬学的に許容される担体を含む薬学的製剤を提供する。それを必要とする対象において、ＰＴＣに関連する疾患を治療する方法も提供される。この方法は、上記の分子又は薬学的組成物を対象に投与することを含む。疾患の例としては、嚢胞性線維症、デュシェンヌ－ベッカー型筋ジストロフィー、網膜芽細胞腫、神経線維腫症、運動失調－毛細血管拡張症、テイ・サックス病、ウィルムス腫瘍、血友病Ａ、血友病Ｂ、メンケス病、ウルリッヒ病、β－サラセミア、２Ａ型及び３型フォン・ヴィレブランド病、ロビノウ症候群、短指症Ｂ型（指及び中手骨の短縮）、マイコバクテリア感染に対する遺伝性感受性、遺伝性網膜疾患、遺伝性出血傾向、失明、先天性神経感覚性難聴及び結腸無神経節症、並びに神経感覚性難聴、結腸無神経節症、末梢神経障害及び中枢性ミエリン形成異常を含む遺伝性神経発達障害、リドル症候群、色素性乾皮症、ファンコーニ貧血、貧血、甲状腺機能低下症、ｐ５３関連がん、食道癌、骨癌、卵巣癌、肝細胞癌、乳癌、肝細胞癌、線維性組織球腫、卵巣癌、ＳＲＹ性転換、トリオースリン酸イソメラーゼ－貧血、糖尿病、くる病、ハーラー症候群、ドラベ症候群、脊髄性筋ジストロフィー、アッシャー症候群、無虹彩症、コロイデレミア、眼性コロボマ、網膜色素変性、栄養障害性表皮水疱症、シュードキサントーマ・エラスチカム、アラジル症候群

、ワールデンブルグ・シャー、乳児型神経セロイドリポフスチン症、シスチン症、Ｘ連鎖腎性尿崩症、及び多発性嚢胞腎疾患を含む。いくつかの例では、疾患は、錐体ジストロフィー、シュタルガルト病（ＳＴＧＤ１）、錐体杆体ジストロフィー、網膜色素変性症（ＲＰ）、加齢性黄斑変性症に対する感受性の増加、先天性停止性夜盲２（ＣＳＮＢ２）、先天性停止性夜盲１（ＣＳＮＢ１）、ベスト病、ＶＭＤ、及びレーバー先天性黒内障（ＬＣＡ１６）からなる群から選択される眼の疾患である。

【０００９】

治療法は、ナノ粒子、エレクトロポレーション、ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）、受容体標的化ポリプレックス、リピソーム又は流体力学的注入を含む任意の適切な方法を使用して実施することができる。

【００１０】

本発明の１つ又は複数の実施形態の詳細は、以下の説明に記載される。本発明の他の特徴、目的、及び利点は、説明及び特許請求の範囲から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【００１１】

【図１】図１Ａ及び１Ｂは、治療上の送達によく適した２つの小型ＡＣＥ－ｔＲＮＡ発現カセットを示す図である。内部プロモーター箱Ａ及びＢ領域（約７６塩基対又はｂｐｓ）、並びに短い５’転写増強リーダー配列（ＴＥＬＳ、ハッシュ）を含むＡＣＥ－ｔＲＮＡの全発現カセットは、全長が約１２５ｂｐｓ以下である。図１Ｃは、ミニサークル及びＣＥＤＴの概略図を示す。

【図２】図２Ａ及び図２Ｂは、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ発現後のｍＲＮＡ転写物のリボソームプロファイリングを示す図である。（Ａ）コード化領域に＞５ＲＰＫＭ（遺伝子のキロベースあたりの読み取り／１００万のマッピングされた読み取り）を有し、３’ＵＴＲに＞０．５ＲＰＫＭを有する転写物について、ＡＣＥ　ｔＲＮＡサプレッサーと対照との間の３’ＵＴＲにおけるリボソームフットプリント密度のＬｏｇ２の倍率変化。各点は、１つの遺伝子転写物を表す。エラーバー：Ｍｅａｎ±ＳＤ。（Ｂ）ＣＤＳが遺伝子コード配列（各転写物は等しく重み付けされている）であるすべての転写物の終止コドンを囲む、正規化された平均リボソームフットプリント占有率。（挿入図）（Ｂ）の拡大図。

【図３】ＡＣＥ－ｔＲＮＡミニサークル及び閉端ＤＮＡスレッド産生スキームを示す写真及び図のセットである。

【図４Ａ－Ｂ】Ａ及びＢは、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Arg}のＭＣ及びＣＥＤＴが強固なＰＴＣ抑制能を示したことを示す図である。（Ａ）ＨＥＫ２９３細胞において、２００ｂｐｓもの小さなＭＣが、ＡＣＥ－ｔＲＮＡを発現し（白色バー）、ＰＴＣレポーターを安定的に発現した。（Ｂ）ＣＥＤＴは、１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞におけるＰＴＣレポーターの同時送達により、強固なＰＴＣの抑制を示した。

【図５Ａ－Ｆ】Ａ～Ｆは、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９改変１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞へのＡＣＥ－ｔＲＮＡのＣＥＤＴの送達がＣＦＴＲ機能を有意に救済し、ナンセンスコドン介在的分解（ＮＭＤ）を阻害することを示す写真及び図である。（Ａ）Ｔｒａｎｓｗｅｌｌでトランスフェクトされた１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞の代表的な画像。（Ｂ）Ｕｓｓｉｎｇチャンバー記録で、ＷＴ（黒）、空ベクターでトランスフェクトされたｐ．Ｒ１１６２Ｘ　１６ＨＢＥ１４ｏｅ－細胞（赤色）、及び５００ｂｐのＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Arg}のＣＥＤＴ（青色）から追跡した代表的なＣｌ$^{-}$短絡電流。（Ｃ）平均Ｆｏｒｓｋｏｌｉｎ及びＩＢＭＸ並びに（Ｄ）Ｉｎｈｂ１７２応答は、５００ｂｐのＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Arg}のＣＥＤＴ（青色）によるＣＦＴＲ機能の有意な救済を示した。（Ｅ）わずかな（３０％）トランスフェクション効率の後、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Gly}（灰色の線）、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Arg}（緑色の水平線）及びＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Leu}（オランジュベールの線）をコードするプラスミドはすべて、ｑＰＣＲによって測定したとき、それぞれｐ．Ｇ５４２Ｘ、ｐ．Ｒ１１６２Ｘ及びｐＷ１２８２Ｘ　１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞でＮＭＤを有意に阻害した。重要なことに、５００ｂｐのＣＥＤＴ^{Arg}（緑色の対角線）、８００ｂｐのＭＣ^{Arg}（緑色の点）及び８００ｂｐのＭＣ^{Leu}（オレンジ色の点）はすべて、トランスフェクシ

ョンの４８時間後に、それぞれのＣＦＴＲのＰＴＣのプラスミドベースの発現に対する有意で同等の救済をもたらした。すべてのコンストラクトが等量でトランスフェクトされた。＊ｐ＜０．０５；＊＊ｐ＜０．０００１。

【図５Ｇ】ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９改変１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞へのＡＣＥ－ｔＲＮＡのＣＥＤＴの送達がＣＦＴＲ機能を有意に救済し、ナンセンスコドン介在的分解（ＮＭＤ）を阻害することを示す写真及び図である。（Ａ）Ｔｒａｎｓｗｅｌｌでトランスフェクトされた１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞の代表的な画像。（Ｂ）Ｕｓｓｉｎｇチャンバー記録で、ＷＴ（黒）、空ベクターでトランスフェクトされたｐ．Ｒ１１６２Ｘ　１６ＨＢＥ１４ｏｅ－細胞（赤色）、及び５００ｂｐのＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}のＣＥＤＴ（青色）から追跡した代表的なＣｌ$^{－}$短絡電流。（Ｃ）平均Ｆｏｒｓｋｏｌｉｎ及びＩＢＭＸ並びに（Ｄ）Ｉｎｈｂ１７２応答は、５００ｂｐのＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}のＣＥＤＴ（青色）によるＣＦＴＲ機能の有意な救済を示した。（Ｅ）わずかな（３０％）トランスフェクション効率の後、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ｇｌｙ}（灰色の線）、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}（緑色の水平線）及びＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ｌｅｕ}（オランジュベールの線）をコードするプラスミドはすべて、ｑＰＣＲによって測定したとき、それぞれｐ．Ｇ５４２Ｘ、ｐ．Ｒ１１６２Ｘ及びｐＷ１２８２Ｘ　１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞でＮＭＤを有意に阻害した。重要なことに、５００ｂｐのＣＥＤＴ^{Ａｒｇ}（緑色の対角線）、８００ｂｐのＭＣ^{Ａｒｇ}（緑色の点）及び８００ｂｐのＭＣ^{Ｌｅｕ}（オレンジ色の点）はすべて、トランスフェクションの４８時間後に、それぞれのＣＦＴＲのＰＴＣのプラスミドベースの発現に対する有意で同等の救済をもたらした。すべてのコンストラクトが等量でトランスフェクトされた。＊ｐ＜０．０５；＊＊ｐ＜０．０００１。

【図６Ａ－Ｂ】Ａ及びＢは、マウスの肺へのミニベクターのエレクトロポレーション送達が気道上皮の効率的な形質導入及びＰＴＣリードスルーをもたらしたことを示す写真及び図である。（Ａ）マウスの肺気道上皮に、エレクトロポレーションによってＧＦＰ発現ベクター（挿入図）を効率的に形質導入した。（Ｂ）ＮＬｕｃ－ＵＧＡ　ＰＴＣレポータープラスミドとプラスミドＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}、５００ｂｐのＣＥＤＴ^{Ａｒｇ}、８００ｂｐのＭＣ^{Ｌｅｕ}及び８００ｂｐのＭＣ^{Ａｒｇ}との同時送達は、強力なＰＴＣの抑制をもたらした。

【図７Ａ－Ｂ】Ａ及びＢは、５’フランキング配列がＡＣＥ－ｔＲＮＡ発現を調節したことを示す写真及び図である。（Ａ）ＨＥＫ２９３細胞におけるＷ１２８２Ｘ－ＣＦＴＲ及びＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Ｔｒｐ_{ＵＧＡ}}$をＴＥＬＳあり（左レーン）なし（右レーン）でコードするｃＤＮＡのトランスフェクション後の完全長ＣＦＴＲタンパク質のウエスタンブロット（ＷＢ）によって示されるように、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Ｔｒｐ_{ＵＧＡ}}$によるＷ１２８２Ｘ－ＣＦＴＲの抑制は、ヒトＴｙｒ　ＴＥＬＳによって増強された（左レーン）。（Ｂ）ＴＥＬＳスクリーニングＨＴＣ／ＨＴＳプラスミドの設計。

【図８Ａ－Ｄ】Ａ～Ｄは、ＡＣＥ－ｔＲＮＡプラスミドが核に能動的に輸送されなかったことを示す写真及び図である。（Ａ）ＡＣＥ－ｔＲＮＡプラスミドｃＤＮＡの、細胞の細胞質への注入は、細胞質局在化をもたらし、一方、（Ｂ）核注入は転写と一致する病巣の形成をもたらした。（Ｃ）空のプラスミドへのＳＶ４０　ＤＮＡ標的化配列の付加は、細胞質注入の４時間後に核局在化をもたらした。（Ｄ）ＳＶ４０　ＤＴＳを有するＡＣＥ－ｔＲＮＡのＭＣ及びＣＥＤＴの概略図。

【図９】肺におけるミニベクターＰＴＣ抑制の局在化、効率及び持続性を判定するためのＰＴＣレポータープラスミドを示す図である。

【図１０Ａ－Ｃ】Ａ～Ｃは、転写活性を測定するためのＡＣＥ－ｔＲＮＡバーコード技術を示す図である。（Ａ）ＡＣＥ－ｔＲＮＡバーコードスキーム（ＡＢＳ）の概略図。（Ｂ）ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}及びＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ｔｒｏ}バーコードのｑＰＣＲ測定。（Ｃ）ＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Ａｒｇ_{ＵＧＡ}}$及びＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Ａｒｇ_{ＵＧＡ}}$バーコードのＰＴＣ抑制活性。

【図１１Ａ－Ｃ】Ａ～Ｃは、は、転写活性を測定するための別のＡＣＥ－ｔＲＮＡバーコード技術を示す図である。（Ａ）ｔｉｓ　ＡＣＥ－ｔＲＮＡバーコードスキームの概略図

。（Ｂ）ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}及びＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}バーコードのｑＲＴ－ＰＣＲ測定。（Ｃ）ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}及びＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}バーコードのＰＴＣ抑制活性。

【図１２Ａ】異なるサイズのＡｒｇＴＧＡミニサークルライゲーション産物及び対応するＰＣＲ産物を、エチジウムブロマイドを含有する１．５％アガロースゲルで分離したことを示す写真である。

【図１２Ｂ】異なるサイズのＡｒｇＴＧＡミニサークルライゲーション産物及び対応するＰＣＲ産物を、エチジウムブロマイドを含有する１．５％アガロースゲルで分離したことを示す写真である。

【図１２Ｃ】Ｔ５エキソヌクレアーゼでインキュベートし、エチジウムブロマイドを含有する１．５％アガロースゲル上で分離したＡｒｇＴＧＡミニサークルライゲーション産物及びＰＣＲ産物を示す写真である。ミニサークルライゲーションにおけるエキソヌクレアーゼ耐性産物の存在は、共有結合的に閉じたミニサークル産物の産生を示した。

【図１２Ｄ】Ｔ５エキソヌクレアーゼでインキュベートし、エチジウムブロマイドを含有する１．５％アガロースゲル上で分離したＡｒｇＴＧＡミニサークルライゲーション産物及びＰＣＲ産物を示す写真である。ミニサークルライゲーションにおけるエキソヌクレアーゼ耐性産物の存在は、共有結合的に閉じたミニサークル産物の産生を示した。

【図１３Ａ】２００ｂｐのＣＥＤＴ産物のＣＥＤＴ／４×ＡｒｇＴＧＡ産物の産生を示す図及び写真である。対応するＰＣＲ産物のそれぞれを陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製した後、Ｎ１５ファージプロテロメラーゼ（ｔｅｌＮ）で消化した。ＣＥＤＴ産物は、Ｔ５エキソヌクレアーゼ消化に対する耐性を示し、これは、ｔｅｌＮによる共有結合的に閉じた末端の産生を示す。制限酵素Ｂｓｕ３６Ｉによるエンドヌクレアーゼ切断後、各ＣＥＤＴ産物はＴ５エキソヌクレアーゼによる分解を受けやすかった。

【図１３Ｂ】４００ｂｐのＣＥＤＴ産物のＣＥＤＴ／４×ＡｒｇＴＧＡ産物の産生を示す図及び写真である。対応するＰＣＲ産物のそれぞれを陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製した後、Ｎ１５ファージプロテロメラーゼ（ｔｅｌＮ）で消化した。ＣＥＤＴ産物は、Ｔ５エキソヌクレアーゼ消化に対する耐性を示し、これは、ｔｅｌＮによる共有結合的に閉じた末端の産生を示す。制限酵素Ｂｓｕ３６Ｉによるエンドヌクレアーゼ切断後、各ＣＥＤＴ産物はＴ５エキソヌクレアーゼによる分解を受けやすかった。

【図１３Ｃ】９００ｂｐのＣＥＤＴ／１×ＡｒｇＴＧＡ産物のＣＥＤＴ／４×ＡｒｇＴＧＡ産物の産生を示す図及び写真である。対応するＰＣＲ産物のそれぞれを陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製した後、Ｎ１５ファージプロテロメラーゼ（ｔｅｌＮ）で消化した。ＣＥＤＴ産物は、Ｔ５エキソヌクレアーゼ消化に対する耐性を示し、これは、ｔｅｌＮによる共有結合的に閉じた末端の産生を示す。制限酵素Ｂｓｕ３６Ｉによるエンドヌクレアーゼ切断後、各ＣＥＤＴ産物はＴ５エキソヌクレアーゼによる分解を受けやすかった。

【図１３Ｄ】９００ｂｐのＣＥＤＴ／４×ＡｒｇＴＧＡ産物の産生を示す図及び写真である。対応するＰＣＲ産物のそれぞれを陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製した後、Ｎ１５ファージプロテロメラーゼ（ｔｅｌＮ）で消化した。ＣＥＤＴ産物は、Ｔ５エキソヌクレアーゼ消化に対する耐性を示し、これは、ｔｅｌＮによる共有結合的に閉じた末端の産生を示す。制限酵素Ｂｓｕ３６Ｉによるエンドヌクレアーゼ切断後、各ＣＥＤＴ産物はＴ５エキソヌクレアーゼによる分解を受けやすかった。

【図１３Ｅ】８５０ｂｐの１×ＡｒｇＴＧＡミニサークル産生物及び８５０ｂｐの４×ＡｒｇＴＧＡミニサークル産生物をそれぞれ示す図及び写真のセットであり、両方ともＴ５エキソヌクレアーゼ消化に対する耐性を示し、共有結合的に閉じたミニサークルの産生を示している。制限酵素Ｓｍａｌによるエンドヌクレアーゼ切断後、各ミニサークル産物はＴ５エキソヌクレアーゼによる分解を受けやすかった。

【図１３Ｆ】８５０ｂｐの１×ＡｒｇＴＧＡミニサークル産生物及び８５０ｂｐの４×ＡｒｇＴＧＡミニサークル産生物をそれぞれ示す図及び写真のセットであり、両方ともＴ５エキソヌクレアーゼ消化に対する耐性を示し、共有結合的に閉じたミニサークルの産生を

示している。制限酵素Ｓｍａｌによるエンドヌクレアーゼ切断後、各ミニサークル産物はＴ５エキソヌクレアーゼによる分解を受けやすかった。
【図１４】ｃＤＮＡ及びＲＮＡとしてのＡＣＥ－ｔＲＮＡの送達が、１６ＨＢＥ１４ｇｅ－細胞における内因性のＣＦＴＲのｍＲＮＡを救済したことを示す図のセットである。
【図１５Ａ】蛍光性ＰＴＣレポーター１６ＨＢＥ１４ｇｅ－細胞株を作製するためのコンストラクト、及びＰＴＣ抑制アッセイにおけるその細胞株の使用を示す、図のセットである。
【図１５Ｂ】蛍光性ＰＴＣレポーター１６ＨＢＥ１４ｇｅ－細胞株を作製するためのコンストラクト、及びＰＴＣ抑制アッセイにおけるその細胞株の使用を示す、図のセットである。
【図１６Ａ】ｃＤＮＡとしてのＡＣＥ－ｔＲＮＡの送達が、１６ＨＢＥ１４ｇｅ－細胞における内因性のＣＦＴＲのｍＲＮＡを救済したことを示す図のセットである。＊＊＝ｐ＜０．００１；＊＊＊＊＝ｐ＜０．０００１。
【図１６Ｂ】ｃＤＮＡとしてのＡＣＥ－ｔＲＮＡの送達が、１６ＨＢＥ１４ｇｅ－細胞における内因性のＣＦＴＲのｍＲＮＡを救済したことを示す図のセットである。＊＊＝ｐ＜０．００１；＊＊＊＊＝ｐ＜０．０００１。
【図１７Ａ】ＭＣでのＡＣＥ－ｔＲＮＡの送達が、１６ＨＢＥ１４ｇｅ－細胞における内因性のＲ１１６２Ｘ－ＣＦＴＲのｍＲＮＡを救済したことを示す図のセットである。
【図１７Ｂ】ＭＣでのＡＣＥ－ｔＲＮＡの送達が、１６ＨＢＥ１４ｇｅ－細胞における内因性のＲ１１６２Ｘ－ＣＦＴＲのｍＲＮＡを救済したことを示す図のセットである。
【図１８Ａ】ＭＣでのＡＣＥ－ｔＲＮＡの送達が、ロイシンで、１６ＨＢＥ１４ｇｅ－細胞における内因性のＷ１２８２Ｘ－ＣＦＴＲのｍＲＮＡを救済したことを示す図のセットである。
【図１８Ｂ】ＭＣでのＡＣＥ－ｔＲＮＡの送達が、ロイシンで、１６ＨＢＥ１４ｇｅ－細胞における内因性のＷ１２８２Ｘ－ＣＦＴＲのｍＲＮＡを救済したことを示す図のセットである。
【図１９Ａ】異なるＣＥＤＴでのＡＣＥ－ｔＲＮＡの送達が、１６ＨＢＥ１４ｇｅ－細胞における内因性のＲ１１６２Ｘ－ＣＦＴＲのｍＲＮＡを救済したことを示す図のセットである。
【図１９Ｂ】異なるＣＥＤＴでのＡＣＥ－ｔＲＮＡの送達が、１６ＨＢＥ１４ｇｅ－細胞における内因性のＲ１１６２Ｘ－ＣＦＴＲのｍＲＮＡを救済したことを示す図のセットである。
【図２０】ＰＢ－Ｄｏｎｋｅｙシステムの開発を示す図である。
【図２１Ａ】ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}の安定な組み込み及び発現が、Ｒ１１６２Ｘ１６ＨＢＥ１４ｇｅ－細胞における内因性のＣＦＴＲ機能を救済したことを示す図のセットである。
【図２１Ｂ】ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}の安定な組み込み及び発現が、Ｒ１１６２Ｘ１６ＨＢＥ１４ｇｅ－細胞における内因性のＣＦＴＲ機能を救済したことを示す図のセットである。
【発明を実施するための形態】
【００１２】
本発明は、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ、関連ベクター、及び関連送達、並びにＰＴＣ又はナンセンス突然変異に関連する障害の治療のための使用に関する。
【００１３】
全遺伝性疾患の約１０～１５％がナンセンス突然変異によって引き起こされている。米国だけで約３００万人が罹患しており、全遺伝性遺伝性障害の１／３がナンセンス関連であると推定されている。単一のヌクレオチド変化がコドンをコードするアミノ酸を未熟終止コドン（ＴＧＡ、ＴＡＧ又はＴＡＡ）に変換し、その結果、機能の完全な喪失又は変化を伴う切断型タンパク質、及びナンセンスコドン介在的分解（ＮＭＤ）経路によるｍＲＮＡ転写産物の分解がもたらされるこれらの疾患のすべてについて統一機構が存在する。本

明細書に記載のＤＮＡ分子、薬学的製剤、方法及び細胞は、これらの疾患を治療するために使用することができる。

【００１４】

一態様では、本開示は、（１）プロモーター及び（ｉｉ）抗コドン編集ｔＲＮＡ（ＡＣＥ－ｔＲＮＡ）をコードする配列を含む、閉端環状非ウイルス非プラスミドＤＮＡ分子を提供する。

【００１５】

いくつかの実施形態では、分子は、閉端ＤＮＡスレッド（ＣＥＤＴ）分子又はミニサークル（ＭＣ）分子である。

【００１６】

上記の実施形態のいずれかにおいて、分子は、ＤＮＡ核標的化配列（ＤＴＳ）、転写増強５’リーダー配列（ＴＥＬＳ）及びＡＣＥ－ｔＲＮＡバーコード配列（ＡＢＳ）からなる群より選択される１つ又は複数のエレメントをさらに含む。

【００１７】

一実施形態では、ＤＴＳはＳＶ４０－ＤＴＳを含む。

【００１８】

上記の実施形態のいずれにおいても、分子は、いかなる細菌核酸配列も含まない。

【００１９】

上記の実施形態のいずれかにおいて、分子は、４個、３個、２個、１個又はそれより少ないＣｐＧジヌクレオチドを含む。

【００２０】

一実施形態では、分子はＣｐＧジヌクレオチドを含まない。

【００２１】

上記の実施形態のいずれかにおいて、分子は約２００～約１，０００ｂｐのサイズである。

【００２２】

一実施形態では、分子は、約２００ｂｐ、２５０ｂｐ、３００ｂｐ、３５０ｂｐ、４００ｂｐ、４５０ｂｐ、５００ｂｐ、５５０ｂｐ、６００ｂｐ、６５０ｂｐ、７００ｂｐ、７５０ｂｐ、８００ｂｐ、８５０ｂｐ、９００ｂｐ、９５０ｂｐ、又は１０００ｂｐのサイズである。ＣＥＤＴのいくつかの例では、ＡＣＥ－ｔＲＮＡをコードする二本鎖の切片は、例えば、約２００ｂｐ、４００ｂｐ又は９００ｂｐのサイズであるが、対応するＣＥＤＴは、付加されたＣＥＤＴ末端に起因して、約２６０ｂｐ、４５６ｂｐ又は９５６ｂｐのサイズである。その場合、ＣＥＤＴは、ＡＣＥ－ｔＲＮＡをコードする二本鎖の切片のサイズを示すために、２００ｂｐのＣＥＤＴ、４００ｂｐのＣＥＤＴ、又は９００ｂｐのＣＥＤＴと呼ばれることがある。例えば、図１３及び図１９を参照されたい。

【００２３】

上記の実施形態のいずれかにおいて、ＡＣＥ－ｔＲＮＡは、（ｉ）配列番号１～１０からなる群から選択される配列、又は（ｉｉ）配列番号１１～３０５からなる群から選択される１つによってコードされる配列を含む。

【００２４】

一実施形態では、ＡＣＥ－ｔＲＮＡが、（ｉ）配列番号１、４、５及び８からなる群から選択される配列、又は（ｉｉ）配列番号７９及び９４からなる群から選択される配列によってコードされる配列を含む。

【００２５】

本開示はまた、（ｉ）上記の実施形態のいずれか１つの分子及び（ｉｉ）薬学的に許容される担体を含む薬学的製剤を提供する。

【００２６】

本開示はさらに、（ｉ）細胞を上記の任意の実施形態の分子と接触させること、及び（ｉｉ）細胞を、ＡＣＥ－ｔＲＮＡの発現を可能にする条件下で維持することを含む、細胞においてＡＣＥ－ｔＲＮＡを発現させるための方法を提供する。

【００２７】
方法の一実施形態では、（ｉ）細胞が、１つ又は複数の未熟終止コドン（ＰＴＣ）を含む変異体核酸を有し、（ｉｉ）変異体核酸の野生型がポリペプチドをコードし、（ｉｉｉ）ＡＣＥ－ｔＲＮＡが１つ又は複数のＰＴＣを救済し、ポリペプチドの発現を回復させる。
【００２８】
一実施形態では、ポリペプチドは嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子（ＣＦＴＲ）であり、変異体核酸は切断型ＣＦＴＲをコードする。
【００２９】
一実施形態では、変異体核酸は、Ｔｒｐから終止のＰＴＣを有する。
【００３０】
一実施形態では、ＡＣＥ－ｔＲＮＡは、Ｔｒｐから終止のＰＴＣをＬｅｕに翻訳する。
【００３１】
本開示はさらに、上記の実施形態のいずれか１つの分子を含む宿主細胞を提供する。
【００３２】
本開示はさらに、ＰＴＣに関連する疾患の治療を必要とする対象においてＰＴＣに関連する疾患を治療する方法であって、上記の実施形態のいずれか１つの分子又は上記の薬学的組成物を対象に投与することを含む方法を提供する。
【００３３】
いくつかの実施形態では、疾患は、嚢胞性線維症、デュシェンヌ－ベッカー型筋ジストロフィー、網膜芽細胞腫、神経線維腫症、運動失調－毛細血管拡張症、テイ・サックス病、ウィルムス腫瘍、血友病Ａ、血友病Ｂ、メンケス病、ウルリッヒ病、β－サラセミア、２Ａ型及び３型フォン・ヴィレブランド病、ロビノウ症候群、短指症Ｂ型（指及び中手骨の短縮）、マイコバクテリア感染に対する遺伝性感受性、遺伝性網膜疾患、遺伝性出血傾向、失明、先天性神経感覚性難聴及び結腸無神経節症、並びに神経感覚性難聴、結腸無神経節症、末梢神経障害及び中枢性ミエリン形成異常を含む遺伝性神経発達障害、リドル症候群、色素性乾皮症、ファンコーニ貧血、貧血、甲状腺機能低下症、ｐ５３関連がん、食道癌、骨癌、卵巣癌、肝細胞癌、乳癌、肝細胞癌、線維性組織球腫、卵巣癌、ＳＲＹ性転換、トリオースリン酸イソメラーゼ－貧血、糖尿病、くる病、ハーラー症候群、ドラベ症候群、脊髄性筋ジストロフィー、アッシャー症候群、無虹彩症、コロイデレミア、眼性コロボマ、網膜色素変性、栄養障害性表皮水疱症、シュードキサントーマ・エラスチカム、アラジル症候群、ワールデンブルグ・シャー、乳児型神経セロイドリポフスチン症、シスチン症、Ｘ連鎖腎性尿崩症、マックアードル病及び多発性嚢胞腎疾患からなる群から選択される。
【００３４】
いくつかの実施形態では、疾患は、錐体ジストロフィー、シュタルガルト病（ＳＴＧＤ１）、錐体杆体ジストロフィー、網膜色素変性症（ＲＰ）、加齢性黄斑変性症に対する感受性の増加、先天性停止性夜盲２（ＣＳＮＢ２）、先天性停止性夜盲１（ＣＳＮＢ１）、ベスト病、ＶＭＤ、及びレーバー先天性黒内障（ＬＣＡ１６）からなる群から選択される眼の遺伝性疾患である。
【００３５】
上記の治療方法の実施形態の中のいくつかの実施形態では、投与は、ナノ粒子、エレクトロポレーション、ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）、受容体標的化ポリプレックス、リピソーム、又は流体力学的注入を用いて行われる。
【００３６】
ＡＣＥ－ｔＲＮＡ
ＡＣＥ－ｔＲＮＡは、ＰＴＣが、最初に失われたアミノ酸又は異なるアミノ酸に効果的かつ治療的に復帰するように配列が操作された、被操作ｔＲＮＡ分子である。そのような被操作ｔＲＮＡは、特定のアミノ酸に対して疾患を引き起こすナンセンスコドンの「再編集」を可能にする。本明細書に開示されるように、被操作ｔＲＮＡは、ＴＡＣ又はＴＡＡ

にわたるＴＧＡなど、１種類の終止コドンのみを標的とすることができる。これらのｔＲＮＡ分子が小さいサイズであることは、ｔＲＮＡ及びプロモーターが一緒になってわずか約３００ｂｐであり得るので、これらを容易な発現に適したものにする。その目的のために、ヒトの細胞において機能的なｔＲＮＡ遺伝子の構造的成分を含むように、オリゴヌクレオチドを合成することができる。このオリゴヌクレオチドの配列は、特定のｔＲＮＡにナンセンス又は他の特定の突然変異を認識させるｔＲＮＡのアンチコドン領域において行われた置換を経る既知の配列に基づいて、設計することができる。ＡＣＥ－ｔＲＮＡの例としては、国際公開第２０１９０９０１５４号パンフレット、国際公開第２０１９０９０１６９号パンフレット及びＬｕｅｃｋ，Ｊ．Ｄ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ１０，８２２，２０１９に記載されているものが挙げられる。これらの各文献の内容は、参照により援用される。

【００３７】

一般に、ＡＣＥ－ｔＲＮＡは、Ｔアーム、Ｄアーム、及びアンチコドンアーム、並びにアクセプターアームを含む一般的な４アーム構造を有する（国際公開第２０１９０９０１６９号パンフレットの図２を参照）。Ｔアームは、「Ｔステム」と「ＴΨＣループ」とから構成されている。ある特定の実施形態において、Ｔステムは、ｔＲＮＡの安定性を高めるように改変される。特定の実施形態では、ＡＣＥ－ｔＲＮＡは、内因性のＴステム配列と比較して終止部位を抑制する生物活性を増加させる、被修飾Ｔステムを有する。

【００３８】

ＡＣＥ－ｔＲＮＡをＰＴＣの抑制に使用することができる。しかし、ＰＴＣの有効な抑制には潜在的な欠点がある。例えば、ＰＴＣ抑制戦略は、ｉｎ　ｖｉｖｏでの実際のナイーブな終止コドンのリードスルーをもたらし得、全体的なナイーブな終止コドンのリードスルーは有害であるという懸念があった。しかし、いくつかの細胞機構が、正常な終止のリードスルー及びその損傷効果の両方を制限するために配置されている。より具体的には、複数のフレーム内終止コドンが通常の翻訳の終結において頻繁に見出され、したがって効率的なＰＴＣ抑制因子の存在下での翻訳終結の確率を高めている。さらに、誤った翻訳の終結、特殊化されたユビキチンリガーゼ及びリボソーム関連経路に関するタンパク質の同定及び分解のために、少なくとも２つの細胞機構が配置されている。遺伝子の末端の天然終止コドンは、増強された終結効率を促進する周囲の配列状況を有し、ＰＴＣに見られる終結複合体は「実際の」終止とは異なるという証拠がある。予想外にも、内因性の終止コドンのリードスルーが動物において一般的であり、有害ではないという発見は、ＰＴＣの抑制が実行可能な治療の手法であることを示唆している。実際、リボソームプロファイリングの予備データは、「実際の」終止のＡＣＥ－ｔＲＮＡリードスルーがまれであることを示唆している（図２）。

【００３９】

本発明に有用なＡＣＥ－ｔＲＮＡは、国際公開第２０１９０９０１５４号パンフレット、国際公開第２０１９０９０１６９号パンフレット及びＬｕｅｃｋ，Ｊ．Ｄ．ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ１０，８２２（２０１９）に記載されている戦略に従って、作製することができる。この戦略を使用して、細胞の培養におけるＰＴＣの効果的な救済のためのＡＣＥ－ｔＲＮＡの広範なライブラリーが作製されている。以下の表１は、本発明に有用なＡＣＥ－ｔＲＮＡのいくつかの例である。疾患を引き起こすＰＴＣを抑制するための他の被操作のヒトｔＲＮＡ配列としては、国際公開第２０１９０９０１５４号パンフレット、国際公開第２０１９０９０１６９号パンフレット及び、Ｌｕｅｃｋ，Ｊ．Ｄ．ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ１０，８２２（２０１９）に記載されているものが挙げられる。さらなる例としては、以下の表２の配列番号１１～３０５によってコードされるものが挙げられる。以下の各配列において、アンチコドンに対応する３文字の配列は、小さい場合には下線が引かれている。

表１

番号	tRNAscan-SE の ID	配列	配列番号
1	TrpTGAchr17.trna39	GGCCUCGUGGCGCAACGGUAGCGCGUCUGACUucaGAUCAGAAGGuUGCGUGUUCAAAUCACGUCGGGGUCA	1
22	LeuTGAchr6.trna81	ACCAGGAUGGCCGAGUGGUuAAGGCGUUGGACUucaGAUCCAAUGGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUA	2
23	LeuTGAchr6.trna135	ACCGGGAUGGCCGAGUGGUuAAGGCGUUGGACUucaGAUCCAAUGGGCUGGUGCCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCUCGGUA	3
24	LeuTGAchr11.trna4	ACCAGAAUGGCCGAGUGGUuAAGGCGUUGGACUucaGAUCCAAUGGAUUCAUAUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUUCUGGUA	4
17	GlyTGAchr19.trna2	GCGUUGGUGGUAUAGUGGUuAGCAUAGCUGCCUucaAAGCAGUUGaCCCGGGUUCGAUUCCCGGCCAACGCA	5
18	GlyTGAchr1.trna107	GCGUUGGUGGUAUAGUGGUgAGCAUAGCUGCCUucaAAGCAGUUGaCCCGGGUUCGAUUCCCGGCCAACGCA	6
19	GlyTGAchr17.trna9	GCGUUGGUGGUAUAGUGGUaAGCAUAGCUGCCUucaAAGCAGUUGaCCCGGGUUCGAUUCCCGGCCAACGCA	7
21	ArgTGAchr9.trna6/ｲﾝﾄﾛﾝ	GGCUCUGUGGCGCAAUGGAuAGCGCAUUGGACUucaAAUUCAAAGGuUGUGGGUUCGAGUCCCACCAGAGUCG	8
18	GlnTAGchr1.trna101	GGUUCCAUGGUGUAAUGGUaAGCACUCUGGACUcuaAAUCCAGCGaUCCGAGUUCGAGUCUCGGUGGAACCU	9
27	GlnTAGchr6.trna175	GGCCCCAUGGUGUAAUGGUuAGCACUCUGGACUcuaAAUCCAGCGaUCCGAGUUCAAAUCUCGGUGGGACCU	10

表２

番号	tRNAscan-SE の ID	配列	配列番号
1	TrpTGAchr17.trna39	GGCCTCGTGGCGCAACGGTAGCGCGTCTGACTtcaGATCAGAAGGtTGCGTGTTCAAATCACGTCGGGGTCA	11
2	TrpTGAchr17.trna10	GACCTCGTGGCGCAATGGTAGCGCGTCTGACTtcaGATCAGAAGGtTGCGTGTTCAAGTCACGTCGGGGTCA	12
3	TrpTGAchr6.trna171	GACCTCGTGGCGCAACGGTAGCGCGTCTGACTtcaGATCAGAAGGtTGCGTGTTCAAATCACGTCGGGGTCA	13
4	TrpTGAchr12.trna6	GACCTCGTGGCGCAACGGTAGCGCGTCTGACTtcaGATCAGAAGGcTGCGTGTTCGAATCACGTCGGGGTCA	14
5	TrpTGAchr7.trna3	GACCTCGTGGCGCAACGGCAGCGCGTCTGACTtcaGATCAGAAGGtTGCGTGTTCAAATCACGTCGGGGTCA	15
1	TrpTAGchr17.trna39	GGCCTCGTGGCGCAACGGTAGCGCGTCTGACTctaGATCAGAAGGtTGCGTGTTCAAATCACGTCGGGGTCA	16
2	TrpTAGchr17.trna10	GACCTCGTGGCGCAATGGTAGCGCGTCTGACTctaGATCAGAAGGtTGCGTGTTCAAGTCACGTCGGGGTCA	17
3	TrpTAGchr6.trna171	GACCTCGTGGCGCAACGGTAGCGCGTCTGACTctaGATCAGAAGGtTGCGTGTTCAAATCACGTCGGGGTCA	18
4	TrpTAGchr12.trna6	GACCTCGTGGCGCAACGGTAGCGCGTCTGACTctaGATCAGAAGGcTGCGTGTTCGAATCACGTCGGGGTCA	19
5	TrpTAGchr7.trna3	GACCTCGTGGCGCAACGGCAGCGCGTCTGACTctaGATCAGAAGGtTGCGTGTTCAAATCACGTCGGGGTCA	20
17	GlyTGAchr19.trna2	GCGTTGGTGGTATAGTGGTtAGCATAGCTGCCTtcaAAGCAGTTGaCCCGGGTTCGATTCCCGGCCAACGCA	21
18	GlyTGAchr1.trna107	GCGTTGGTGGTATAGTGGTgAGCATAGCTGCCTtcaAAGCAGTTGaCCCGGGTTCGATTCCCGGCCAACGCA	22
19	GlyTGAchr17.trna9	GCGTTGGTGGTATAGTGGTaAGCATAGCTGCCTtcaAAGCAGTTGaCCCGGGTTCGATTCCCGGCCAACGCA	23
2	ArgTGAchr3.trna8	GGGCCAGTGGCGCAATGGAtAACGCGTCTGACTtcaGATCAGAAGAtTCTAGGTTCGACTCCTGGCTGGCTCG	24
3	ArgTGAchr6.trna115	GGCCGCGTGGCCTAATGGAtAAGGCGTCTGATTtcaGATCAGAAGAtTGAGGGTTCGAGTCCCTTCGTGGTCG	25
4	ArgTGAchr17.trna21	GACCCAGTGGCCTAATGGAtAAGGCATCAGCCTtcaGAGCTGGGGAtTGTGGGTTCGAGTCCCATCTGGGTCG	26
5	ArgTGAchr17.trna16	GCCCCAGTGGCCTAATGGAtAAGGCACTGGCCTtcaAAGCCAGGGAtTGTGGGTTCGAGTCCCACCTGGGGTA	27
6	ArgTGAchr17.trna19	GCCCCAGTGGCCTAATGGAtAAGGCACTGGCCTtcaAAGCCAGGGAtTGTGGGTTCGAGTCCCACCTGGGGTG	28
7	ArgTGAchr16.trna3	GCCCCGGTGGCCTAATGGAtAAGGCATTGGCCTtcaAAGCCAGGGAtTGTGGGTTCGAGTCCCACCCGGGGTA	29
8	ArgTGAchr7.trna5	GCCCCAGTGGCCTAATGGAtAAGGCATTGGCCTtcaAAGCCAGGGAtTGTGGGTTCGAGTCCCATCTGGGGTG	30
9	ArgTGAchr16.trna13	GCCCCAGTGGCCTGATGGAtAAGGTACTGGCCTtcaAAGCCAGGGAtTGTGGGTTCGAGTTCCACCTGGGGTA	31
10	ArgTGAchr15.trna4	GGCCGCGTGGCCTAATGGAtAAGGCGTCTGACTtcaGATCAGAAGAtTGCAGGTTCGAGTCCTGCCGCGGTCG	32
11	ArgTGAchr6.trna4	GACCACGTGGCCTAATGGAtAAGGCGTCTGACTtcaGATCAGAAGAtTGAGGGTTCGAATCCCTCCGTGGTTA	33

12	ArgTGAchr17.trna17	GACCGCGTGGCCTAATGGAtAAGGCGTCTGACTtcaGATCAGAAGA tTGAGGGTTCGAGTCCCTTCGTGGTCG	34
13	ArgTGAchr6.trna3	GACCACGTGGCCTAATGGAtAAGGCGTCTGACTtcaGATCAGAAGA tTGAGGGTTCGAATCCCTTCGTGGTTA	35
14	ArgTGAchr6.trna125	GACCACGTGGCCTAATGGAtAAGGCGTCTGACTtcaGATCAGAAGA tTGAGGGTTCGAATCCCTTCGTGGTTG	36
15	ArgTGAchr9.trna5	GGCCGTGTGGCCTAATGGAtAAGGCGTCTGACTtcaGATCAAAAGA tTGCAGGTTTGAGTTCTGCCACGGTCG	37
16	ArgTGAchr1.trna10	GGCTCCGTGGCGCAATGGAtAGCGCATTGGACTtcaAgaggctgaa ggcATTCAAAGGtTCCGGGTTCGAGTCCCGGCGGAGTCG	38
17	ArgTGAchr1.trna10/ｲﾝﾄﾛﾝ	GGCTCCGTGGCGCAATGGAtAGCGCATTGGACTtcaAATTCAAAGG tTCCGGGTTCGAGTCCCGGCGGAGTCG	39
18	ArgTGAchr17.trna3	GGCTCTGTGGCGCAATGGAtAGCGCATTGGACTtcaAgtgacgaat agagcaATTCAAAGGtTGTGGGTTCGAATCCCACCAGAGTCG	40
19	ArgTGAchr17.trna3/ｲﾝﾄﾛﾝ	GGCTCTGTGGCGCAATGGAtAGCGCATTGGACTtcaAATTCAAAGG tTGTGGGTTCGAATCCCACCAGAGTCG	41
20	ArgTGAchr9.trna6	GGCTCTGTGGCGCAATGGAtAGCGCATTGGACTtcaAgctgagcct agtgtggtcATTCAAAGGtTGTGGGTTCGAGTCCCACCAGAGTCG	42
21	ArgTGAchr9.trna6/ｲﾝﾄﾛﾝ	GGCTCTGTGGCGCAATGGAtAGCGCATTGGACTtcaAATTCAAAGG tTGTGGGTTCGAGTCCCACCAGAGTCG	43
22	ArgTGAchr11.trna3	GGCTCTGTGGCGCAATGGAtAGCGCATTGGACTtcaAgatagttag agaaATTCAAAGGtTGTGGGTTCGAGTCCCACCAGAGTCG	44
23	ArgTGAchr1.trna79	GTCTCTGTGGCGCAATGGAcgAGCGCGCTGGACTtcaAATCCAGAG GtTCCGGGTTCGAGTCCCGGCAGAGATG	45
25	ArgTGAchr6.trna52/ｲﾝﾄﾛﾝ	GGCTCTGTGGCGCAATGGAtAGCGCATTGGACTtcaAATTCAAAGG tTGCGGGTTCGAGTCCCTCCAGAGTCG	46
14	GlnTAGchr12.trna3	GGTTCCATGGTGTAATGGTaAGCACCCTGGACTctaAATCCAGCAa CCAGAGTTCCAGTCTCAGCGtGGACCT	47
15	GlnTAGchr5.trna23	GGTAGTGTAGTCTACTGGTTAAACGCTTGGgCTctaACATTAAcGt CCTGGGTTCAAATCCCAGCTTTGTCA	48
16	GlnTAGchr6.trna147	GGTTCCATGGTGTAATGGTtAGCACTCTGGACTctaAATCCAGCGa TCCGAGTTCAAGTCTCGGTGGAACCT	49
17	GlnTAGchr1.trna17	GGTTCCATGGTGTAATGGTgAGCACTCTGGACTctaAATCCAGCGa TCCGAGTTCGAGTCTCGGTGGAACCT	50
18	GlnTAGchr1.trna101	GGTTCCATGGTGTAATGGTaAGCACTCTGGACTctaAATCCAGCGa TCCGAGTTCGAGTCTCGGTGGAACCT	51
19	GlnTAGchr6.trna42	GGTTCCATGGTGTAATGGTtAGCACTCTGGACTctaAATCCGGTAa TCCGAGTTCAAATCTCGGTGGAACCT	52
20	GlnTAGchr6.trna132	GGCCCCATGGTGTAATGGTcAGCACTCTGGACTctaAATCCAGCGa TCCGAGTTCAAATCTCGGTGGGACCC	53
21	GlnTAGchr1.trna23	GGTTCCATGGTGTAATGGTaAGCACTCTGGACTctaAATCCAGCCA TCTGAGTTCGAGTCTCTGTGGAACCT	54
22	GlnTAGchr1.trna111	GGTTCCATGGTGTAATGGTgAGCACTTTGGACTctaAATACAGTGA TCAGAGTTCAAGTCTCACTGGGACCT	55
23	GlnTAGchr1.trna24	GGTTCCATGgGTTAATGGTgAGCACCCTGGACTctaAATCAAGCGa TCCGAGTTCAAATCTCGGTGGTACCT	56
24	GlnTAGchr19.trna4	GTTTCCATGGTGTAATGGTgAGCACTCTGGACTctaAATCCAGAAA TACATTCAAAGAATTAAGAACA	57

25	GlnTAGchr17.trna14	GGTCCCATGGTGTAATGGTtAGCACTCTGGACTctaAATCCAGCGa TCCGAGTTCAAATCTCGGTGGGACCT	58
26	GlnTAGchr6.trna63	GGTCCCATGGTGTAATGGTtAGCACTCTGGACTctaAATCCAGCAa TCCGAGTTCGAATCTCGGTGGGACCT	59
27	GlnTAGchr6.trna175	GGCCCCATGGTGTAATGGTtAGCACTCTGGACTctaAATCCAGCGa TCCGAGTTCAAATCTCGGTGGGACCT	60
28	GlnTAGchr6.trna82	GGTCCCATGGTGTAATGGTtAGCACTCTGGGCTctaAATCCAGCAa TCCGAGTTCGAATCTTGGTGGGACCT	61
29	GlnTAGchr2.trna26	GGCTGTGTACCTCAGTGGGcAAGGGTATGGACTctaAAGCCAGACT aTTTGGGTTCAAATCCCAGCTTGGCCT	62
2	GlnTAAnmt-tRNA-Gln chrX.trna1	TAGGACATGGTGTGATAGGTAGCATGGAGAATTttaGATTCTCAGG GGTAGGTTCAATTCCTACAGTTCTAG	63
3	GlnTAAnmt-tRNA-Glnc hr7.trna32	TAGGACGTGGTGTGATAGGTAGCATGGGGAATTttaGATTCTCAGG GGTGGGTTCAATTCCTATAGTTCTAG	64
4	GlnTAAnmt-tRNA-Gln chr7.trna7	TAGGACGTGGTGTAGTAGGTAGCATGGAGAATGttaAATTCTCAGG GGTAGGTTCAATTCCTATAGTTCTAG	65
8	GlnTAAnmt-tRNA-Gln chr12.trna15	TCTAGGAtgTGGTGTGATAGGTAGCATGGAGAATTttaGATTCTCA GGGGTAGGTTCAATTCCTATaTTCTAGAA	66
9	GlnTAAnmt-tRNA-Gln chr2.trna21	TAGGACGTGGTGTGATAGGTAGCATGGAGAATTttaGATTCTCAGG GATGGGTTCAATTCCTATAGTCCTAG	67
10	GlnTAAnmt-tRNA-Glnchr2.trna9	TAGGACGTGGTGTGATAGGTAGCACGGAGAATTttaGATTCTCAGG GATGGGTTCAATTCCTGTAGTTCTAG	68
11	GlnTAAchr6.trna1	GGTTCCATGGTGTAATGGTtAGCACTCTGGACTttaAATCCAGCGa TCCGAGTTCAAATCTCGGTGGAACCT	69
16	GlnTAAchr6.trna147	GGTTCCATGGTGTAATGGTtAGCACTCTGGACTttaAATCCAGCGa TCCGAGTTCAAGTCTCGGTGGAACCT	70
17	GlnTAAchr1.trna17	GGTTCCATGGTGTAATGGTgAGCACTCTGGACTttaAATCCAGCGa TCCGAGTTCGAGTCTCGGTGGAACCT	71
18	GlnTAAchr1.trna101	GGTTCCATGGTGTAATGGTaAGCACTCTGGACTttaAATCCAGCGa TCCGAGTTCGAGTCTCGGTGGAACCT	72
19	GlnTAAchr6.trna42	GGTTCCATGGTGTAATGGTtAGCACTCTGGACTttaAATCCGGTAa TCCGAGTTCAAATCTCGGTGGAACCT	73
20	GlnTAAchr6.trna132	GGCCCCATGGTGTAATGGTcAGCACTCTGGACTttaAATCCAGCGa TCCGAGTTCAAATCTCGGTGGGACCC	74
21	GlnTAAchr1.trna23	GGTTCCATGGTGTAATGGTaAGCACTCTGGACTttaAATCCAGCCA TCTGAGTTCGAGTCTCTGTGGAACCT	75
22	GlnTAAchr1.trna111	GGTTCCATGGTGTAATGGTgAGCACTTTGGACTttaAATACAGTGA TCAGAGTTCAAGTCTCACTGGGACCT	76
23	GlnTAAchr1.trna24	GGTTCCATGgGTTAATGGTgAGCACCCTGGACTttaAATCAAGCGa TCCGAGTTCAAATCTCGGTGGTACCT	77
24	GlnTAAchr19.trna4	GTTTCCATGGTGTAATGGTgAGCACTCTGGACTttaAATCCAGAAA TACATTCAAAGAATTAAGAACA	78
25	GlnTAAchr17.trna14	GGTCCCATGGTGTAATGGTtAGCACTCTGGACTttaAATCCAGCGa TCCGAGTTCAAATCTCGGTGGGACCT	79
26	GlnTAAchr6.trna63	GGTCCCATGGTGTAATGGTtAGCACTCTGGACTttaAATCCAGCAa TCCGAGTTCGAATCTCGGTGGGACCT	80
27	GlnTAAchr6.trna175	GGCCCCATGGTGTAATGGTtAGCACTCTGGACTttaAATCCAGCGa TCCGAGTTCAAATCTCGGTGGGACCT	81

28	GlnTAAchr6.trna82	GGTCCCATGGTGTAATGGTtAGCACTCTGGGCTttaAATCCAGCAa TCCGAGTTCGAATCTTGGTGGGACCT	82
29	GlnTAAchr2.trna26	GGCTGTGTACCTCAGTGGGcAAGGGTATGGACTttaAAGCCAGACT aTTTGGGTTCAAATCCCAGCTTGGCCT	83
31	GlnTAAchr8.trna10	GGTACAGTGTTAAAGGGGagaAAAATTGCTGACTttaAATaCAGTA GaCCTAGGTTTGAATCCTGGCTTTACCA	84
1	GluTAAchr1.trna106	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTtAGGATTCGGCGCTttaACCGCCGCGG CCCGGGTTCGATTCCCGGTCAGGGAA	85
2	GluTAAchr1.trna55	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTtAGGATTCGGCGCTttaACCGCCGCGG CCCGGGTTCGATTCCCGGTCAGGAAA	86
5	GluTAAchr2.trna18	TCCCATATGGTCTAGCGGTtAGGATTCCTGGTTttaACCCAGGTGG CCCGGGTTCGACTCCCGGTATGGGAA	87
8	GluTAAchr13.trna2	TCCCACATGGTCTAGCGGTtAGGATTCCTGGTTttaACCCAGGCGG CCCGGGTTCGACTCCCGGTGTGGGAA	88
9	GluTAAchr1.trna5	TCCCTGGTGGTCTAGTGGCtAGGATTCGGCGCTttaACCGCCGCGG CCCGGGTTCGATTCCCGGCCAGGGAA	89
10	GluTAAchr1.trna123	TCCCTGGTGGTCTAGTGGCtAGGATTCGGCGCTttaACCGCCGCGG CCCGGGTTCGATTCCCGGTCAGGGAA	90
1	GluTAGchr1.trna106	TCCCTGGTGGTCTAGTGGTtAGGATTCGGCGCTctaACCGCCGCGG CCCGGGTTCGATTCCCGGTCAGGGAA	91
5	GluTAGchr2.trna18	TCCCATATGGTCTAGCGGTtAGGATTCCTGGTTctaACCCAGGTGG CCCGGGTTCGACTCCCGGTATGGGAA	92
6	GluTAGchr1.trna92	TCCGTGGTGGTCTAGTGGCtAGGATTCGGCGCTctaACCGCCTGCA GCTCGAGTTCGATTCCTGGTCAGGGAA	93
8	GluTAGchr13.trna2	TCCCACATGGTCTAGCGGTtAGGATTCCTGGTTctaACCCAGGCGG CCCGGGTTCGACTCCCGGTGTGGGAA	94
9	GluTAGchr1.trna5	TCCCTGGTGGTCTAGTGGCtAGGATTCGGCGCTctaACCGCCGCGG CCCGGGTTCGATTCCCGGCCAGGGAA	95
10	GluTAGchr1.trna123	TCCCTGGTGGTCTAGTGGCtAGGATTCGGCGCTctaACCGCCGCGG CCCGGGTTCGATTCCCGGTCAGGGAA	96
14	GluTAGchr1.trna86	TCCCTGGTGGTCTAGTGGCtAGGATTCGGCGCTctaACCGCCTGCA GCTCGAGTTCGATTCCTGGTCAGGGAA	97
7	TyrTAAchr6.trna14	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTttaGttggctgtg tccttagacATCCTTAGGtCGCTGGTTCGAATCCGGCTCGAAGGA	98
8	TyrTAAchr6.trna14/ﾉｲﾝﾄﾛﾝ	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTttaGATCCTTAGG tCGCTGGTTCGAATCCGGCTCGAAGGA	99
9	TyrTAA chr7.trna12	GGGGGTATAGCTCAGGGCtAGAGCTtTTTGACTttaGAGCAAGAGG tCCCTGGTTCAAATCCAGGTTCTCCCT	100
10	TyrTAAchr7.trna28	TATAGCTCAGTGGTAGAGCATTTAACTttaGATCAAGAGGtCCCTG GATCAACTCTGGGTG	101
11	TyrTAAchr15.trna6	GTCAGTGTTGCACAACGGTtaAGTGAAGAGGCTttaAACCCAGACT GGATGGGTTCAATTCCCATCTCTGCCG	102
12	TyrTAA chr2.trna2	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTttaGtggataggg cgtggcaATCCTTAGGtCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA	103
13	TyrTAAchr2.trna2/ﾉｲﾝﾄﾛﾝ	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTttaGATCCTTAGG tCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA	104
14	TyrTAAchr6.trna16	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTttaGgctcattaa gcaaggtATCCTTAGGtCGCTGGTTCGAATCCGGCTCGGAGGA	105

15	TyrTAAchr6.trna16/ｲﾝﾄﾛﾝ	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTttaGATCCTTAGGtCGCTGGTTCGAATCCGGCTCGGAGGA	106
16	TyrTAAchr14.trna19	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTttaGattgtatagacatttgcggacATCCTTAGGtCGCTGGTTCGATTCCAGCTCGAAGGA	107
17	TyrTAAchr14.trna19/ｲﾝﾄﾛﾝ	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTttaGATCCTTAGGtCGCTGGTTCGATTCCAGCTCGAAGGA	108
18	TyrTAAchr8.trna2	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTttaGctacttcctcagcaggagacATCCTTAGGtCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA	109
19	TyrTAAchr8.trna2/ｲﾝﾄﾛﾝ	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTttaGATCCTTAGGtCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA	110
20	TyrTAAchr8.trna3	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTttaGgcgcgcgccgtggccATCCTTAGGtCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA	111
21	TyrTAAchr8.trna3/ｲﾝﾄﾛﾝ	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTttaGATCCTTAGGtCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA	112
22	TyrTAAchr14.trna20	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTttaGcctgtagaaacatttgtggacATCCTTAGGtCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA	113
23	TyrTAAchr14.trna20/ｲﾝﾄﾛﾝ	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTttaGATCCTTAGGtCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA	114
24	TyrTAAchr14.trna17	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTttaGattgtacagacatttgcggacATCCTTAGGtCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA	115
25	TyrTAAchr14.trna17/ｲﾝﾄﾛﾝ	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTttaGATCCTTAGGtCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA	116
26	TyrTAAchr14.trna5	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTttaGtacttaatgtgtggtcATCCTTAGGtCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA	117
27	TyrTAAchr14.trna5/ｲﾝﾄﾛﾝ	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTttaGATCCTTAGGtCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA	118
28	TyrTAAchr6.trna17	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTttaGgggtttgaatgtggtcATCCTTAGGtCGCTGGTTCGAATCCGGCTCGGAGGA	119
29	TyrTAAchr6.trna17/ｲﾝﾄﾛﾝ	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTttaGATCCTTAGGtCGCTGGTTCGAATCCGGCTCGGAGGA	120
30	TyrTAAchr14.trna18	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTttaGactgcggaaacgtttgtggacATCCTTAGGtCGCTGGTTCAATTCCGGCTCGAAGGA	121
31	TyrTAAchr14.trna18/ｲﾝﾄﾛﾝ	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTttaGATCCTTAGGtCGCTGGTTCAATTCCGGCTCGAAGGA	122
32	TyrTAAchr6.trna15	CTTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTttaGgttcattaaactaaggcATCCTTAGGtCGCTGGTTCGAATCCGGCTCGAAGGA	123
33	TyrTAAchr6.trna15/ｲﾝﾄﾛﾝ	CTTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTttaGATCCTTAGGtCGCTGGTTCGAATCCGGCTCGAAGGA	124
34	TyrTAAchr8.trna11	TCTTCAATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTttaGgtgcacgcccgtggccATTCTTAGGTGCTGGTTTGATTCCGACTTGGAGAG	125
40	TyrTAAchr7.trna1	GGTAAAATGGCTGAGTAAGCATTAGACTttaAATCTAAAGaCAGAGGTCAAGGCCTCTTTTTTCCT	126
4	TyrTAGchr1.trna52	GGTAAAATGACTGAGTAAGCATTAGACTctaAATCTAAAGaCAGAGGTCAAGACCTCTTTTTACCA	127

5	TyrTAGchr11.trna9	GGTAAAATGGCTGAGTAAGCATTAGACTctaAATCTAAAGaCAGAG GTCAAGGCCTCTTTTTACCA	128
7	TyrTAGchr6.trna14	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTctaGttggctgtg tccttagacATCCTTAGGtCGCTGGTTCGAATCCGGCTCGAAGGA	129
8	TyrTAGchr6.trna14/ｲﾝﾄﾛﾝ	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTctaGATCCTTAGG tCGCTGGTTCGAATCCGGCTCGAAGGA	130
9	TyrTAG chr7.trna12	GGGGGTATAGCTCAGGGCtAGAGCTtTTTGACTctaGAGCAAGAGG tCCCTGGTTCAAATCCAGGTTCTCCCT	131
10	TyrTAGchr7.trna28	TATAGCTCAGTGGTAGAGCATTTAACTctaGATCAAGAGGtCCCTG GATCAACTCTGGGTG	132
11	TyrTAGchr15.trna6	GTCAGTGTTGCACAACGGTtaAGTGAAGAGGCTctaAACCCAGACT GGATGGGTTCAATTCCCATCTCTGCCG	133
12	TyrTAG chr2.trna2	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTctaGtggataggg cgtggcaATCCTTAGGtCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA	134
13	TyrTAGchr2.trna2/ｲﾝﾄﾛﾝ	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTctaGATCCTTAGG tCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA	135
14	TyrTAGchr6.trna16	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTctaGgctcattaa gcaaggtATCCTTAGGtCGCTGGTTCGAATCCGGCTCGGAGGA	136
15	TyrTAGchr6.trna16/ｲﾝﾄﾛﾝ	CCTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTctaGATCCTTAGG tCGCTGGTTCGAATCCGGCTCGGAGGA	137
16	TyrTAGchr14.trna19	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTctaGattgtatag acatttgcggacATCCTTAGGtCGCTGGTTCGATTCCAGCTCGAAG GA	138
17	TyrTAG chr14.trna19/ｲﾝﾄﾛﾝ	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTctaGATCCTTAGG tCGCTGGTTCGATTCCAGCTCGAAGGA	139
18	TyrTAGchr8.trna2	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTctaGctacttcct cagcaggagacATCCTTAGGtCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGG A	140
19	TyrTAGchr8.trna2/ｲﾝﾄﾛﾝ	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTctaGATCCTTAGG tCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA	141
20	TyrTAGchr8.trna3	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTctaGgcgcgcgcc cgtggccATCCTTAGGtCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA	142
21	TyrTAGchr8.trna3/ｲﾝﾄﾛﾝ	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTctaGATCCTTAGG tCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA	143
22	TyrTAGchr14.trna20	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTctaGcctgtagaa acatttgtggacATCCTTAGGtCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAG GA	144
23	TyrTAGchr14.trna20/ｲﾝﾄﾛﾝ	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTctaGATCCTTAGG tCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA	145
24	TyrTAGchr14.trna17	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTctaGattgtacag acatttgcggacATCCTTAGGtCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAG GA	146
25	TyrTAGchr14.trna17/ｲﾝﾄﾛﾝ	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTctaGATCCTTAGG tCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA	147
26	TyrTAGchr14.trna5	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTctaGtacttaatg tgtggtcATCCTTAGGtCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA	148
27	TyrTAGchr14.trna5/ｲﾝﾄﾛﾝ	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTctaGATCCTTAGG tCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA	149

28	TyrTAGchr6.trna17	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTctaGgggtttgaatgtggtcATCCTTAGGtCGCTGGTTCGAATCCGGCTCGGAGGA	150
29	TyrTAGchr6.trna17/ｲﾝﾄﾛﾝ	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTctaGATCCTTAGGtCGCTGGTTCGAATCCGGCTCGGAGGA	151
30	TyrTAGchr14.trna18	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTctaGactgcggaaacgtttgtggacATCCTTAGGtCGCTGGTTCAATTCCGGCTCGAAGGA	152
31	TyrTAGchr14.trna18/ｲﾝﾄﾛﾝ	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTctaGATCCTTAGGtCGCTGGTTCAATTCCGGCTCGAAGGA	153
32	TyrTAGchr6.trna15	CTTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTctaGgttcattaaactaaggcATCCTTAGGtCGCTGGTTCGAATCCGGCTCGAAGGA	154
33	TyrTAGchr6.trna15/ｲﾝﾄﾛﾝ	CTTTCGATAGCTCAGTTGGTAGAGCGGAGGACTctaGATCCTTAGGtCGCTGGTTCGAATCCGGCTCGAAGGA	155
34	TyrTAGchr8.trna11	TCTTCAATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTctaGgtgcacgccccgtggccATTCTTAGGTGCTGGTTTGATTCCGACTTGGAGAG	156
3	LeuTAAchr6.trna77	GGTAGCGTGGCCGAGCGGTctAAGGCGCTGGATTttaGCTCCAGTCTCTTCGGGGGCGTGGGTTCAAATCCCACCGCTGCCA	157
9	LeuTAAchr6.trna100/ｲﾝﾄﾛﾝ	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGACTttaGTTCTGGTCTCCAATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA	158
10	LeuTAAchr6.trna73	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGACTttaGcttggcttcctcgtgttgaggaTTCTGGTCTCCAATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA	159
11	LeuTAAchr6.trna73/ｲﾝﾄﾛﾝ	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGACTttaGTTCTGGTCTCCAATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA	160
12	LeuTAAchr6.trna141	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGACTttaGcttactgcttcctgtgttcgggtcTTCTGGTCTCCGTATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA	161
13	LeuTAAchr6.trna141/ｲﾝﾄﾛﾝ	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGACTttaGTTCTGGTCTCCGTATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA	162
14	LeuTAAchr6.trna142	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGACTttaGttgctacttcccaggtttggggcTTCTGGTCTCCGCATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA	163
15	LeuTAAchr6.trna142/ｲﾝﾄﾛﾝ	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGACTttaGTTCTGGTCTCCGCATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA	164
16	LeuTAAchr1.trna54	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGACTttaGgtaagcaccttgcctgcgggctTTCTGGTCTCCGGATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA	165
18	LeuTAAchr11.trna1	GCCTCCTTAGTGCAGTAGGTAGCGCATCAGTCTttaAATCTGAATGgtCCTGAGTTCAAGCCTCAGAGGGGGCA	166
22	LeuTAAchr6.trna81	ACCAGGATGGCCGAGTGGTtAAGGCGTTGGACTttaGATCCAATGGACATATGTCCGCGTGGGTTCGAACCCCACTCCTGGTA	167
23	LeuTAAchr6.trna135	ACCGGGATGGCCGAGTGGTtAAGGCGTTGGACTttaGATCCAATGGGCTGGTGCCCGCGTGGGTTCGAACCCCACTCTCGGTA	168
24	LeuTAAchr11.trna4	ACCAGAATGGCCGAGTGGTtAAGGCGTTGGACTttaGATCCAATGGATTCATATCCGCGTGGGTTCGAACCCCACTTCTGGTA	169
25	LeuTAAchr6.trna156	ACCGGGATGGCTGAGTGGTtAAGGCGTTGGACTttaGATCCAATGGACAGGTGTCCGCGTGGGTTCGAGCCCCACTCCCGGTA	170
26	LeuTAAchr6.trna79	ACTCATTTGGCTGAGTGGTtAAGGCATTGGACTttaGATCCAATGGAGTAGTGGCTGTGTGGGTTTAAACCCCACTACTGGTA	171

27	LeuTAAchr1.trna9	GAGAAAGTcATCGTAGTTACGAAGTTGGCTttaACCCAGTTTtGGGAGGTTCAATTCCTTCCTTTCTCT	172
28	LeuTAAchr11.trna12	ACCAGGATGGCCAAGTAGTTaAAGGCACTGGACTttaGAGCCAATGGACATATGTCTGTGTGGGTTTGAACCCCACTCCTGGTG	173
29	LeuTAAchr17.trna42	GGTAGCGTGGCCGAGCGGTctAAGGCGCTGGATTttaGCTCCAGTCTCTTCGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACCGCTGCCA	174
30	LeuTAAchr14.trna2	GGTAGTGTGGCCGAGCGGTctAAGGCGCTGGATTttaGCTCCAGTCTCTTCGGGGGCGTGGGTTCGAATCCCACCACTGCCA	175
31	LeuTAAchr16.trna27	GGTAGCGTGGCCGAGTGGTctAAGGCGCTGGATTttaGCTCCAGTCATTTCGATGgCGTGGGTTCGAATCCCACCGCTGCCA	176
32	LeuTAAchr14.trna16	GGTAGTGTGGTTGAATGGTctAAGGCACTGAATTttaGCTCCAGTCTCTTTGGGGaCGTGGGTTTAAATCCCACTGCTGCAA	177
1	LeuTAGchr4.trna2	GTTAAGATGGCAGAGCCtGGTaATTGCActaAACTTAAAATTTTATAAtCAGAGGTTCAACTCCTCTTCTTAACA	178
2	LeuTAGnmtchrX.trna2	GTTAAGATGGCAGAGCCcGGCaATTGCActaGACTTAAAACTTTATAAtCAGAGGTTCAACTCCTCTCATTAACA	179
3	LeuTAGchr6.trna77	GGTAGCGTGGCCGAGCGGTctAAGGCGCTGGATTctaGCTCCAGTCTCTTCGGGGGCGTGGGTTCAAATCCCACCGCTGCCA	180
4	LeuTAGchr6.trna127	GGTAGCGTGGCCGAGTGGTctAAGACGCTGGATTctaGCTCCAGTCTCTTCGGGGGCGTGGGTTTGAATCCCACCGCTGCCA	181
7	LeuTAGchr5.trna20	GCCGAGCGGTctAAGGCTCCGGATTctaGCGCCGGTGTCTTCGGAGgCATGGGTTCGAATTCCAC	182
8	LeuTAGchr6.trna100	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGACTctaGctaagcttcctccgcggtggggaTTCTGGTCTCCAATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA	183
9	LeuTAGchr6.trna100/ﾉｲﾝﾄﾛﾝ	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGACTctaGTTCTGGTCTCCAATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA	184
10	LeuTAGchr6.trna73	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGACTctaGcttggcttcctcgtgttgaggaTTCTGGTCTCCAATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA	185
11	LeuTAGchr6.trna73/ﾉｲﾝﾄﾛﾝ	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGACTctaGTTCTGGTCTCCAATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA	186
12	LeuTAGchr6.trna141	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGACTctaGcttactgcttcctgtgttcgggtcTTCTGGTCTCCGTATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA	187
13	LeuTAGchr6.trna141/ﾉｲﾝﾄﾛﾝ	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGACTctaGTTCTGGTCTCCGTATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA	188
14	LeuTAGchr6.trna142	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGACTctaGttgctacttcccaggtttggggcTTCTGGTCTCCGCATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA	189
15	LeuTAGchr6.trna142/ﾉｲﾝﾄﾛﾝ	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGACTctaGTTCTGGTCTCCGCATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA	190
16	LeuTAGchr1.trna54	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGACTctaGgtaagcaccttgcctgcgggctTTCTGGTCTCCGGATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA	191
18	LeuTAGchr11.trna1	GCCTCCTTAGTGCAGTAGGTAGCGCATCAGTCTctaAATCTGAATGgtCCTGAGTTCAAGCCTCAGAGGGGGCA	192
22	LeuTAGchr6.trna81	ACCAGGATGGCCGAGTGGTtAAGGCGTTGGACTctaGATCCAATGGACATATGTCCGCGTGGGTTCGAACCCCACTCCTGGTA	193

23	LeuTAGchr6.trna135	ACCGGGATGGCCGAGTGGTtAAGGCGTTGGACTctaGATCCAATGG GCTGGTGCCCGCGTGGGTTCGAACCCCACTCTCGGTA	194
24	LeuTAGchr11.trna4	ACCAGAATGGCCGAGTGGTtAAGGCGTTGGACTctaGATCCAATGG ATTCATATCCGCGTGGGTTCGAACCCCACTTCTGGTA	195
25	LeuTAGchr6.trna156	ACCGGGATGGCTGAGTGGTtAAGGCGTTGGACTctaGATCCAATGG ACAGGTGTCCGCGTGGGTTCGAGCCCCACTCCCGGTA	196
26	LeuTAGchr6.trna79	ACTCATTTGGCTGAGTGGTtAAGGCATTGGACTctaGATCCAATGG AGTAGTGGCTGTGTGGGTTTAAACCCCACTACTGGTA	197
29	LeuTAGchr17.trna42	GGTAGCGTGGCCGAGCGGTctAAGGCGCTGGATTctaGCTCCAGTC TCTTCGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACCGCTGCCA	198
30	LeuTAGchr14.trna2	GGTAGTGTGGCCGAGCGGTctAAGGCGCTGGATTctaGCTCCAGTC TCTTCGGGGGCGTGGGTTCGAATCCCACCACTGCCA	199
31	LeuTAGchr16.trna27	GGTAGCGTGGCCGAGTGGTctAAGGCGCTGGATTctaGCTCCAGTC ATTTCGATGgCGTGGGTTCGAATCCCACCGCTGCCA	200
32	LeuTAGchr14.trna16	GGTAGTGTGGTTGAATGGTctAAGGCACTGAATTctaGCTCCAGTC TCTTTGGGGaCGTGGGTTTAAATCCCACTGCTGCAA	201
3	LeuTGAchr6.trna77	GGTAGCGTGGCCGAGCGGTctAAGGCGCTGGATTtcaGCTCCAGTC TCTTCGGGGGCGTGGGTTCAAATCCCACCGCTGCCA	202
8	LeuTGAchr6.trna100	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGACTtcaGctaagctt cctccgcggtggggaTTCTGGTCTCCAATGGAGGCGTGGGTTCGAA TCCCACTTCTGACA	203
9	LeuTGAchr6.trna100/ｲﾝﾄﾛﾝ	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGACTtcaGTTCTGGTC TCCAATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA	204
10	LeuTGAchr6.trna73	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGACTtcaGcttggctt cctcgtgttgaggaTTCTGGTCTCCAATGGAGGCGTGGGTTCGAAT CCCACTTCTGACA	205
11	LeuTGAchr6.trna73/ｲﾝﾄﾛﾝ	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGACTtcaGTTCTGGTC TCCAATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA	206
12	LeuTGAchr6.trna141	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGACTtcaGcttactgc ttcctgtgttcgggtcTTCTGGTCTCCGTATGGAGGCGTGGGTTCG AATCCCACTTCTGACA	207
13	LeuTGAchr6.trna141/ｲﾝﾄﾛﾝ	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGACTtcaGTTCTGGTC TCCGTATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA	208
14	LeuTGAchr6.trna142	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGACTtcaGttgctact tcccaggtttggggcTTCTGGTCTCCGCATGGAGGCGTGGGTTCGA ATCCCACTTCTGACA	209
15	LeuTGAchr6.trna142/ｲﾝﾄﾛﾝ	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGACTtcaGTTCTGGTC TCCGCATGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACTTCTGACA	210
16	LeuTGAchr1.trna54	GTCAGGATGGCCGAGTGGTctAAGGCGCCAGACTtcaGgtaagcac cttgcctgcgggctTTCTGGTCTCCGGATGGAGGCGTGGGTTCGAA TCCCACTTCTGACA	211
22	LeuTGAchr6.trna81	ACCAGGATGGCCGAGTGGTtAAGGCGTTGGACTtcaGATCCAATGG ACATATGTCCGCGTGGGTTCGAACCCCACTCCTGGTA	212
23	LeuTGAchr6.trna135	ACCGGGATGGCCGAGTGGTtAAGGCGTTGGACTtcaGATCCAATGG GCTGGTGCCCGCGTGGGTTCGAACCCCACTCTCGGTA	213
24	LeuTGAchr11.trna4	ACCAGAATGGCCGAGTGGTtAAGGCGTTGGACTtcaGATCCAATGG ATTCATATCCGCGTGGGTTCGAACCCCACTTCTGGTA	214
25	LeuTGAchr6.trna156	ACCGGGATGGCTGAGTGGTtAAGGCGTTGGACTtcaGATCCAATGG ACAGGTGTCCGCGTGGGTTCGAGCCCCACTCCCGGTA	215

26	LeuTGAchr6.trna79	ACTCATTTGGCTGAGTGGTtAAGGCATTGGACTtcaGATCCAATGG AGTAGTGGCTGTGTGGGTTTAAACCCCACTACTGGTA	216
29	LeuTGAchr17.trna42	GGTAGCGTGGCCGAGCGGTctAAGGCGCTGGATTtcaGCTCCAGTC TCTTCGGAGGCGTGGGTTCGAATCCCACCGCTGCCA	217
30	LeuTGAchr14.trna2	GGTAGTGTGGCCGAGCGGTctAAGGCGCTGGATTtcaGCTCCAGTC TCTTCGGGGGCGTGGGTTCGAATCCCACCACTGCCA	218
31	LeuTGAchr16.trna27	GGTAGCGTGGCCGAGTGGTctAAGGCGCTGGATTtcaGCTCCAGTC ATTTCGATGgCGTGGGTTCGAATCCCACCGCTGCCA	219
2	SerTAGnmtchr2.trna7	GAGAAGGTcATAGAGGTtATGGGATTGGCTctaAACCAGTCTCTGG GGGGTTCGATTCCCTCCTTTTTCA	220
5	SerTAGchr6.trna148	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACTctaAATCCATTGG GGTTTCCCCGCGCAGGTTCGAATCCTGCCGACTACG	221
6	SerTAGchr6.trna50	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACTctaAATCCATTGG GGTTTCCCCACGCAGGTTCGAATCCTGCCGACTACG	222
7	SerTAGchr6.trna146	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTtAAGGTGATGGACTctaAACCCATTGG GGTCTCCCCGCGCAGGTTCGAATCCTGCCGACTACG	223
8	SerTAGchr7.trna15	GGGTGTATGGCTCAGGGGTAGAGAATTTGACTctaGATCAAGAGGt CCCTGGTTCAAATCCAGGTGCCCCCT	224
9	SerTAGchr11.trna10	AGTTGTAGCTGAGTGGTtAAGGCAACGAGCTctaAATTCGTTGGTT TCTCTCTgTGCAGGTTTGAATCCTGCTAATTA	225
10	SerTAGchr11.trna8	CAAGAAATTCATAGAGGTTATGGGATTGGCTctaAACCAGTTTcAG GAGGTTCGATTCCTTCCTTTTTGG	226
12	SerTAGchr6.trna34	GCTGTGATGGCCGAGTGGTtAAGGCGTTGGACTctaAATCCAATGG GGTCTCCCCGCGCAGGTTCAAATCCTGCTCACAGCG	227
13	SerTAGchr6.trna138	GCTGTGATGGCCGAGTGGTtAAGGTGTTGGACTctaAATCCAATGG GGGTTCCCCGCGCAGGTTCAAATCCTGCTCACAGCG	228
14	SerTAGchr12.trna2	GTCACGGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGTTGGACTctaAATCCAATGG GGTTTCCCCGCACAGGTTCGAATCCTGTTCGTGACG	229
15	SerTAGchr6.trna30	GACGAGGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACTctaAATCCATTGT GCTCTGCACGCGTGGGTTCGAATCCCACCCTCGTCG	230
16	SerTAGchr6.trna43	GACGAGGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACTctaAATCCATTGT GCTCTGCACGCGTGGGTTCGAATCCCACCTTCGTCG	231
17	SerTAGchr11.trna6	GGCCGGTTAGCTCAGTTGGTtAGAGCGTGCTctaACTAATGCCAGG GtCGAGGTTTCGATCCCCGTACGGGCCT	232
18	SerTAGchr6.trna61	GACGAGGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACTctaAATCCATTGT GCTCTGCACACGTGGGTTCGAATCCCATCCTCGTCG	233
19	SerTAGchr6.trna176	GAGGCCTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACTctaAATCCATTGTG CTCTGCACGCGTGGGTTCGAATCCCATCCTCG	234
20	SerTAGchr10.trna2	GCAGCGATGGCCGAGTGGTtAAGGCGTTGGACTctaAATCCAATGG GGTCTCCCCGCGCAGGTTCGAACCCTGCTCGCTGCG	235
21	SerTAGchr6.trna51	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACTctaAATCCATTGG GGTTTCCCCGCGCAGGTTCGAATCCTGCCGACTACG	236
22	SerTAGchr6.trna173	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACTctaAATCCATTGG GGTCTCCCCGCGCAGGTTCGAATCCTGCCGACTACG	237
23	SerTAGchr6.trna149	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACTctaAATCCATTGG GGTTTCCCCGCGCAGGTTCGAATCCTGTCGGCTACG	238
5	SerTGAchr6.trna148	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACTtcaAATCCATTGG GGTTTCCCCGCGCAGGTTCGAATCCTGCCGACTACG	239

6	SerTGAchr6.trna50	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACTtcaAATCCATTGG GGTTTCCCCACGCAGGTTCGAATCCTGCCGACTACG	240
7	SerTGAchr6.trna146	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTtAAGGTGATGGACTtcaAACCCATTGG GGTCTCCCCGCGCAGGTTCGAATCCTGCCGACTACG	241
9	SerTGAchr11.trna10	AGTTGTAGCTGAGTGGTtAAGGCAACGAGCTtcaAATTCGTTGGTT TCTCTCTgTGCAGGTTTGAATCCTGCTAATTA	242
11	SerTGAchr17.trna41	GCTGTGATGGCCGAGTGGTtAAGGCGTTGGACTtcaAATCCAATGG GGTCTCCCCGCGCAGGTTCGAATCCTGCTCACAGCG	243
12	SerTGAchr6.trna34	GCTGTGATGGCCGAGTGGTtAAGGCGTTGGACTtcaAATCCAATGG GGTCTCCCCGCGCAGGTTCAAATCCTGCTCACAGCG	244
13	SerTGAchr6.trna138	GCTGTGATGGCCGAGTGGTtAAGGTGTTGGACTtcaAATCCAATGG GGGTTCCCCGCGCAGGTTCAAATCCTGCTCACAGCG	245
14	SerTGAchr12.trna2	GTCACGGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGTTGGACTtcaAATCCAATGG GGTTTCCCCGCACAGGTTCGAATCCTGTTCGTGACG	246
15	SerTGAchr6.trna30	GACGAGGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACTtcaAATCCATTGT GCTCTGCACGCGTGGGTTCGAATCCCACCCTCGTCG	247
16	SerTGAchr6.trna43	GACGAGGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACTtcaAATCCATTGT GCTCTGCACGCGTGGGTTCGAATCCCACCTTCGTCG	248
17	SerTGAchr11.trna6	GGCCGGTTAGCTCAGTTGGTtAGAGCGTGCTtcaACTAATGCCAGG GtCGAGGTTTCGATCCCCGTACGGGCCT	249
18	SerTGAchr6.trna61	GACGAGGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACTtcaAATCCATTGT GCTCTGCACACGTGGGTTCGAATCCCATCCTCGTCG	250
20	SerTGAchr10.trna2	GCAGCGATGGCCGAGTGGTtAAGGCGTTGGACTtcaAATCCAATGG GGTCTCCCCGCGCAGGTTCGAACCCTGCTCGCTGCG	251
21	SerTGAchr6.trna51	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACTtcaAATCCATTGG GGTTTCCCCGCGCAGGTTCGAATCCTGCCGACTACG	252
22	SerTGAchr6.trna173	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACTtcaAATCCATTGG GGTCTCCCCGCGCAGGTTCGAATCCTGCCGACTACG	253
23	SerTGAchr6.trna149	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACTtcaAATCCATTGG GGTTTCCCCGCGCAGGTTCGAATCCTGTCGGCTACG	254
5	SerTAAchr6.trna148	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACTttaAATCCATTGG GGTTTCCCCGCGCAGGTTCGAATCCTGCCGACTACG	255
6	SerTAAchr6.trna50	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACTttaAATCCATTGG GGTTTCCCCACGCAGGTTCGAATCCTGCCGACTACG	256
7	SerTAAchr6.trna146	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTtAAGGTGATGGACTttaAACCCATTGG GGTCTCCCCGCGCAGGTTCGAATCCTGCCGACTACG	257
11	SerTAAchr17.trna41	GCTGTGATGGCCGAGTGGTtAAGGCGTTGGACTttaAATCCAATGG GGTCTCCCCGCGCAGGTTCGAATCCTGCTCACAGCG	258
12	SerTAAchr6.trna34	GCTGTGATGGCCGAGTGGTtAAGGCGTTGGACTttaAATCCAATGG GGTCTCCCCGCGCAGGTTCAAATCCTGCTCACAGCG	259
13	SerTAAchr6.trna138	GCTGTGATGGCCGAGTGGTtAAGGTGTTGGACTttaAATCCAATGG GGGTTCCCCGCGCAGGTTCAAATCCTGCTCACAGCG	260
14	SerTAAchr12.trna2	GTCACGGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGTTGGACTttaAATCCAATGG GGTTTCCCCGCACAGGTTCGAATCCTGTTCGTGACG	261
15	SerTAAchr6.trna30	GACGAGGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACTttaAATCCATTGT GCTCTGCACGCGTGGGTTCGAATCCCACCCTCGTCG	262
16	SerTAAchr6.trna43	GACGAGGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACTttaAATCCATTGT GCTCTGCACGCGTGGGTTCGAATCCCACCTTCGTCG	263

17	SerTAAchr11.trna6	GGCCGGTTAGCTCAGTTGGTtAGAGCGTGCTttaACTAATGCCAGG GtCGAGGTTTCGATCCCCGTACGGGCCT	264
18	SerTAAchr6.trna61	GACGAGGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACTttaAATCCATTGT GCTCTGCACACGTGGGTTCGAATCCCATCCTCGTCG	265
19	SerTAAchr6.trna176	GAGGCCTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACTttaAATCCATTGTG CTCTGCACGCGTGGGTTCGAATCCCATCCTCG	266
20	SerTAAchr10.trna2	GCAGCGATGGCCGAGTGGTtAAGGCGTTGGACTttaAATCCAATGG GGTCTCCCCGCGCAGGTTCGAACCCTGCTCGCTGCG	267
21	SerTAAchr6.trna51	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACTttaAATCCATTGG GGTTTCCCCGCGCAGGTTCGAATCCTGCCGACTACG	268
22	SerTAAchr6.trna173	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACTttaAATCCATTGG GGTCTCCCCGCGCAGGTTCGAATCCTGCCGACTACG	269
23	SerTAAchr6.trna149	GTAGTCGTGGCCGAGTGGTtAAGGCGATGGACTttaAATCCATTGG GGTTTCCCCGCGCAGGTTCGAATCCTGTCGGCTACG	270
1	LysTAAchr19.trna6	GCCCAGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATAAGACTttaAATCTCAGGG tTGTGGATTCGTGCCCCATGCTGGGTG	271
8	LysTAAchr16.trna31	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGAGACCttaAATCTCAGGG tCGTGGGTTCGAGCCCCACGTTGGGCG	272
9	LysTAAchr16.trna11	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGGGACTttaAATCTCAGGG tCGTGGGTTCGAGCCCCACGTTGGGCG	273
10	LysTAAchr16.trna30	GCCCGGCTAGCTCAGTCGATAGAGCATGAGACTttaAATCTCAGGG tCGTGGGTTCGAGCCGCACGTTGGGCG	274
12	LysTAAchr16.trna6	GCCTGGCTAGCTCAGTCGGCAAAGCATGAGACTttaAATCTCAGGG tCGTGGGCTCGAGCTCCATGTTGGGCG	275
16	LysTAAchr16.trna23	GCCTGGATAGCTCAGTTGGTAGAGCATCAGACTttaAATCTGAGGG tCCAGGGTTCAAGTCCCTGTTCAGGCA	276
19	LysTAAchr19.trna8	ACCTGGGTAGCTTAGTTGGTAGAGCATTGGACTttaAATTTGAGGG cCCAGGTTTCAAGTCCCTGTTTGGGTG	277
22	LysTAAchr2.trna15	GTTGGGGTAACTCAGTTGGTAGAGTAGCAGACTttaCATCTGAGGG tCCAGGGTTTAAGTCCATGTCCAGGCA	278
23	LysTAAchr11.trna11	GCCTGGATAGCTCAGTTGGTAGAGCATCAGACTttaAATCTGAGGG tCCAGGGTTCAAGTCCCTGTTCAGGCG	279
24	LysTAAchr6.trna144	GCCTGGATAGCTCAGTCGGTAGAGCATCAGACTttaAATCTGAGGG tCCAGGGTTCAAGTCCCTGTTCAGGCG	280
25	LysTAAchr11.trna5	GCCCGGATAGCTCAGTCGGTAGAGCATCAGACTttaAATCTGAGGG tCCGGGGTTCAAGTCCCTGTTCGGGCG	281
26	LysTAAchr6.trna150	GCCTGGGTAGCTCAGTCGGTAGAGCATCAGACTttaAATCTGAGGG tCCAGGGTTCAAGTCCCTGTCCAGGCG	282
27	LysTAAchr6.trna70	GCCTGGATAGCTCAGTTGGTAGAACATCAGACTttaAATCTGACGG tGCAGGGTTCAAGTCCCTGTTCAGGCG	283
29	LysTAAchr6.trna53	ACCTGGGTAGCTCAGTAGGTAGAACATCAGACTttaAATCTGAGGG tCTAGGGTTCAAGTCCCTGTCCAGGCG	284
1	LysTAGchr19.trna6	GCCCAGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATAAGACTctaAATCTCAGGG tTGTGGATTCGTGCCCCATGCTGGGTG	285
8	LysTAGchr16.trna31	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGAGACCctaAATCTCAGGG tCGTGGGTTCGAGCCCCACGTTGGGCG	286
9	LysTAGchr16.trna11	GCCCGGCTAGCTCAGTCGGTAGAGCATGGGACTctaAATCTCAGGG tCGTGGGTTCGAGCCCCACGTTGGGCG	287

16	LysTAGchr16.trna23	GCCTGGATAGCTCAGTTGGTAGAGCATCAGACTctaAATCTGAGGG tCCAGGGTTCAAGTCCCTGTTCAGGCA	288
19	LysTAGchr19.trna8	ACCTGGGTAGCTTAGTTGGTAGAGCATTGGACTctaAATTTGAGGG cCCAGGTTTCAAGTCCCTGTTTGGGTG	289
23	LysTAGchr11.trna11	GCCTGGATAGCTCAGTTGGTAGAGCATCAGACTctaAATCTGAGGG tCCAGGGTTCAAGTCCCTGTTCAGGCG	290
24	LysTAGchr6.trna144	GCCTGGATAGCTCAGTCGGTAGAGCATCAGACTctaAATCTGAGGG tCCAGGGTTCAAGTCCCTGTTCAGGCG	291
25	LysTAGchr11.trna5	GCCCGGATAGCTCAGTCGGTAGAGCATCAGACTctaAATCTGAGGG tCCGGGGTTCAAGTCCCTGTTCGGGCG	292
26	LysTAGchr6.trna150	GCCTGGGTAGCTCAGTCGGTAGAGCATCAGACTctaAATCTGAGGG tCCAGGGTTCAAGTCCCTGTCCAGGCG	293
27	LysTAGchr6.trna70	GCCTGGATAGCTCAGTTGGTAGAACATCAGACTctaAATCTGACGG tGCAGGGTTCAAGTCCCTGTTCAGGCG	294
4	CysTGAchr7.trna8	GGGGGCATAGCTCAGTGGTAGAGCATTTGACTtcaGATCAAGAGGt CCCTGGTTCAAATCCAGGTGCCCCCT	295
6	CysTGAchr7.trna24	GGGGGTATAGCTTAGCGGTAGAGCATTTGACTtcaGATCAAGAGGt CCCCGGTTCAAATCCGGGTGCCCCCT	296
7	CysTGAchr7.trna20	GGGGGTATAGCTTAGGGGTAGAGCATTTGACTtcaGATCAAAAGGt CCCTGGTTCAAATCCAGGTGCCCCTT	297
8	CysTGAchr7.trna29	GGGGGTATAGCTCAGGGGTAGAGCATTTGACTtcaGATCAAGAGGt CCCCAGTTCAAATCTGGGTGCCCCCT	298
10	CysTGAchr7.trna13	GGGGGTATAGCTCAGGGGTAGAGCATTTGACTtcaGATCAAGAGGt CTCTGGTTCAAATCCAGGTGCCCCCT	299
21	CysTGAchr7.trna23	GGGGGTATAGCTCAGGGGTAGAGCACTTGACTtcaGATCAAGAGGt CCCTGGTTCAAATCCAGGTGCCCCCT	300
22	CysTGAchr17.trna27	GGGGGTATAGCTCAGTGGTAGAGCATTTGACTtcaGATCAAGAGGt CCCTGGTTCAAATCCGGGTGCCCCCT	301
23	CysTGAchr15.trna3	GGGGGTATAGCTCAGTGGGTAGAGCATTTGACTtcaGATCAAGAGG tCCCCGGTTCAAATCCGGGTGCCCCCT	302
24	CysTGAchr3.trna6	GGGGGTGTAGCTCAGTGGTAGAGCATTTGACTtcaGATCAAGAGGt CCCTGGTTCAAATCCAGGTGCCCCCT	303
25	CysTGAchr14.trna9	GGGGGTATAGCTCAGGGGTAGAGCATTTGACTtcaGATCAAGAGGt CCCCGGTTCAAATCCGGGTGCCCCCT	304
26	CysTGAchr3.trna5	GGGGGTATAGCTCAGGGGTAGAGCATTTGACTtcaGATCAAGAGGt CCCTGGTTCAAATCCAGGTGCCCCCT	305

【００４０】

本明細書に開示されるように、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ遺伝子構造はＰＴＣ療法によく適合している。ｔＲＮＡ遺伝子は、内部プロモーターエレメント（図１の箱Ａ及びＢ）の２型ＲＮＡポリメラーゼ（Ｐｏｌ）ＩＩＩの認識によってｔＲＮＡに転写され、ｔＲＮＡは、短い（＜５０ｂｐ）５’隣接領域、及び短い一連のチミジンヌクレオチドからなる３’転写終結エレメント（約４チミジン、Ｔｓ）に隣接している。ほとんどのｔＲＮＡ遺伝子は７２～７６ｂｐｓの長さであり、したがって、ｔＲＮＡ発現カセット全体は約１２５ｂｐｓのみからなることができる（図１）。

【００４１】

最適化され得るＡＣＥ－ｔＲＮＡの転写及び翻訳機能に関与する様々な配列エレメントが存在する。ＲＮＡポリメラーゼＩＩＩは、２型遺伝子内プロモーターエレメントを利用して真核生物におけるｔＲＮＡ遺伝子の発現を駆動する（図１Ａ又は図１Ｂの箱Ａ及びＢ）。箱Ａ及びＢは２型プロモーターの機能に十分であるが、ｔＲＮＡの発現は、遺伝子に対して５’のところに、約５０ｂｐの配列（５’－フランキング配列）によって調節及び増

強され得る。ｔＲＮＡの転写は、短いチミジンヌクレオチドのストレッチ（４個以下のチミジン、Ｔｓ）によって終結する。

【００４２】

本明細書に開示されるように、本発明者らは、嚢胞性線維症（「ＣＦ」）をもたらすＣＦＴＲ遺伝子内に存在するものを含む、疾患を引き起こすＰＴＣの効率的かつ持続的な抑制を示す治療薬の開発のために、ミニサークル（ＭＣ）及び閉端ＤＮＡスレッド（ＣＥＤＴ）などの小型ＤＮＡベクターの作製におけるｔＲＮＡの独特の遺伝子特徴を利用した。

【００４３】

このＡＣＥ－ｔＲＮＡ手法は、（１）コドンの特異性、（２）シームレス救済をもたらすＰＴＣのＡＣＥ－ｔＲＮＡ抑制、したがってタンパク質の安定性、折り畳み、輸送及び機能に対する偽の影響を否定する、及び（３）ｐ．Ｇ５４２Ｘ又はｐ．Ｗ１２８２Ｘ　ＣＦ変異を有するＣＦＴＲチャネルなどの、影響を受けたタンパク質の意味ある機能的救済をもたらすＡＣＥ－ｔＲＮＡのこれらのｉｎ　ｖｉｔｒｏ送達を含む、他のリードスルー戦略を超えるいくつかの重要な利点を提供する。予備的結果は、内因性の翻訳終止コドンの最小限の抑制を示し、このことは、翻訳領域に対するわずかな副作用を示唆した。ＡＣＥ－ｔＲＮＡは、複数の細胞型においてＰＴＣの位置が異なるいくつかのｃＤＮＡ遺伝子において、ＰＴＣの抑制に有効であることが示されている。ＡＣＥ－ｔＲＮＡは、既知の有害な作用を伴わずにＰＴＣの抑制において高い効率を示すので、治療薬として使用することができる。

【００４４】

ミニベクター

本発明の一態様は、ＰＴＣ治療を目的とした、抑制ｔＲＮＡをコードする小型ＤＮＡミニベクターの作製及びｉｎ　ｖｉｖｏ送達に関する。最適な治療属性を考慮する場合、ゴールドスタンダードは１回限りの治療である。しかし、ワクチン以外では、これらの治癒はほとんど実現されていない。近年、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９が、ゲノムに永久的な変化を加えることができるために、有望な治療薬としての牽引力を得ている。重要なことに、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９によって行われるものを含むゲノム操作は、幹細胞集団が標的化されない限り、改変された細胞の寿命の間だけ持続する。細胞の代謝回転では、治療薬の再送達が必要であり、治療薬に対する免疫応答を考慮しなければならない。したがって、本発明者らは、反復送達、標的細胞に適合する半減期（例えば、気道上皮細胞）、病原性の低下及び挿入突然変異誘発の低い能力を可能にするために、限定された免疫原性のＡＣＥ－ｔＲＮＡプラットフォームに基づくＰＴＣ治療薬を設計することに着手した。

【００４５】

いくつかの実施形態では、ＤＮＡミニストリング、Ｄｏｇｇｙｂｏｎｅ　ＤＮＡ（商標）又は直鎖に共有結合的に閉鎖（ＬＣＣ）しているＤＮＡとしても知られている２つの小型ｃＤＮＡベクター形式、ミニサークル（ＭＣ）及び閉端ＤＮＡスレッド（ＣＥＤＴ）を生成し、使用する。例えば、ＡＣＥ－ｔＲＮＡを発現する小型ＤＮＡベクター（ミニベクター）を使用して、細胞、マウス及びブタにおけるｉｎ　ｖｉｖｏのデータセットを得て、ＣＦを含むナンセンス関連障害の治療を開発する。治療的有用性を有するＤＮＡ分子に関する実施形態では、ＤＮＡ鋳型は、典型的には、１つ以上のプロモーター又はエンハンサーエレメントと、目的のＲＮＡ又はタンパク質をコードする遺伝子又は他のコード配列とを含む発現カセットを含む。

【００４６】

本発明のベクターは、典型的には、上記のような発現カセット、すなわち、目的の遺伝子又はタンパク質をコードする配列に動作可能に連結された真核性プロモーター、及び場合により真核生物転写終結配列を含むか、それからなるか、又はそれから本質的になる発現カセットを含む。場合により、発現カセットは、以下に定義されるような最小発現カセット、すなわち、典型的には、（ｉ）細菌複製開始点、（ｉｉ）細菌選択マーカー（典型的には抗生物質耐性遺伝子）及び（ｉｉｉ）非メチル化ＣｐＧモチーフからなる群から選択される１つ以上の細菌又はベクター配列を欠く最小発現カセットであり得る。

【００４７】
好ましくは、本発明のベクターは、そのような不要な配列のいずれも含まない。すなわち、ベクターはそのような不要な配列を含まない。そのような不要な又は無関係な配列（細菌又はベクター配列としても記載される）は、細菌の複製開始点、細菌選択マーカー（例えば、抗生物質耐性遺伝子）、及び非メチル化ＣｐＧジヌクレオチドを含み得る。そのような配列の欠失は、外来遺伝物質を含有しない「最小」の発現カセットを作り出す。また、上記の種類の細菌配列は、いくつかの治療手法において問題となり得る。例えば、哺乳動物細胞内で、細菌／プラスミドＤＮＡは、目的の遺伝子又はタンパク質の持続的発現が達成され得ないように、クローン化遺伝子をオフにすることができる。また、細菌増殖に使用される抗生物質耐性遺伝子は、ヒトの健康に対するリスクを引き起こす可能性がある。さらに、細菌プラスミド／ベクターＤＮＡは、望ましくない非特異的免疫応答を誘発し得る。細菌ＤＮＡ配列の特定の特徴、典型的にはＣｐＧモチーフとして知られる非メチル化シトシン－グアニンジヌクレオチドの存在もまた、望ましくない免疫応答をもたらし得る。

【００４８】
ミニサークル（ＭＣ）
ＭＣは、遺伝子発現のための最小配列、一般にプロモーター、目的の遺伝子（ＧＯＩ）及び終止配列のみを含有するように構築された小型の環状ベクター（＜５キロベース（ｋｂ））である。小さなサイズであると、細胞進入及び核への細胞内輸送が増加し、送達及び転写バイオアベイラビリティの増加をもたらす。さらに、それらは、コードされたＧＯＩの長期発現のための病原性及びエピソーマルサイレンシングを減少させるプラスミドに一般的に見られる細菌配列を欠いている。肝臓では、ＭＣが１１５日間より長くＧＯＩを発現し、試験終了前に発現の減少はほとんど又は全くないことが実証されている。

【００４９】
気道上皮は、マウスでは気管で６ヶ月、細気管支で１７ヶ月、ヒトでは５０日間の半減期を有する。小型ＤＮＡベクター、主に３ｋｂを超えるサイズのＭＣは、ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）、受容体標的化ポリプレックス、リピソーム、流体力学的注入及びエレクトロポレーションを含むいくつかの方法で、ｉｎ　ｖｉｖｏで広く送達することができる。ＣｐＧが少ないＣＦＴＲ（約７ｋｂ）をコードするＭＣが、ＰＥＩ凝縮及びエアロゾル化によってマウスの肺に送達されており、これにより、送達の５６日後に発現が持続していた。

【００５０】
閉端ＤＮＡスレッド（ＣＥＤＴ）
本明細書で使用される場合、「閉端ＤＮＡスレッド」又は「ＣＥＤＴ」は、閉じた直鎖のＤＮＡ分子を指す。そのような閉端直鎖ＤＮＡ分子は、図４Ｂ及び図８Ｄに示されるような一本鎖環状分子として見ることができる。ＣＥＤＴ分子は、典型的には、相補的ＤＮＡ鎖間の塩基ペアリングが存在しないヘアピンループとしても記載される、共有結合的に閉じた末端を含む。ヘアピンループは、相補的ＤＮＡ鎖の末端を結合する。このタイプの構造は、典型的には、閉鎖構造に末端ヌクレオチドを隔離することによって染色体ＤＮＡの喪失又は損傷から保護するために、染色体のテロメア末端に形成される。本明細書に記載されるＣＥＤＴ分子の特定の例では、ヘアピンループは相補的な塩基対ＤＮＡ鎖に隣接し、「ドッグボーン」形の構造（図４Ｂ及び８Ｄに示すようなもの）を形成する。

【００５１】
ＣＥＤＴ分子は、典型的には、共有結合的に閉じた末端、すなわちヘアピン末端を有するＤＮＡの直鎖二本鎖切片を含む。ヘアピンは、分子が完全に変性した場合に一本鎖環状ＤＮＡ分子が生成されるように、直鎖二本鎖ＤＮＡ鎖の末端を結合する。通常、本明細書に記載のＣＥＤＴは、配列が本質的に完全に相補的であるが、いくつかの小さな変形又は「ゆらぎ」は構造によって許容され得る。したがって、閉じた直鎖ＤＮＡ又はＣＥＤＴは、配列が少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％又は９５％相補的、又は少なくとも９６、９７、９８、９９又は１００％相補的であり得る。変性された場合、それは実質的

に、互いに隣接する順方向（センス又はプラス）鎖及び逆方向（アンチセンス又はマイナス）鎖の両方を含む環状分子である。これは、相補配列（マイナス及びプラス）が別個の環状の鎖に存在するプラスミドＤＮＡ又はＭＣ　ＤＮＡとは対照的である（図４Ａを図４Ｂと比較）。

【００５２】

ヘアピンの頂点（末端又はターン）の中の塩基は、この点で、ＤＮＡ鎖にかかる配座的ストレスのために、塩基対を形成することができない場合がある。例えば、頂点の部分の頂点にある少なくとも２つの塩基対は塩基対を形成しない可能性があるが、正確な立体配座は、ＤＮＡが維持される条件及びヘアピン周囲の正確な配列に応じて、変動を受けやすい。したがって、２つ又はそれを超える塩基は、それらの相補的な性質にもかかわらず、関与する構造的なゆがみを考慮すると、対を形成することができない場合がある。ヘアピンの長さの中の非相補的塩基の一部「ゆらぎ」は、構造に影響を及ぼさない場合がある。ゆらぎは回文の切れ目であり得るが、配列は相補的なままであり得る。しかし、ヘアピンの配列は完全に自己相補的であることが好ましい。

【００５３】

相補性は、配列（５’から３’）での各ポリヌクレオチドの塩基が、どのようにして、同じ鎖（内部相補配列）又は異なる鎖であり得る逆平行（３’から５’）鎖の相補的な塩基、ＡからＴ（又はＵ）及びＣからＧと水素結合対を形成するかを記載する。この定義は、本発明の任意の実施形態又は実施形態に適用される。ヘアピンの配列は、９０％相補的、好ましくは９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９８％、９９％又は１００％相補的であることが好ましい。

【００５４】

ＣＥＤＴは、天然由来又は人工のいずれかの、二本鎖配列内の任意の配列を含み得る。それは、少なくとも１つのプロセシングより多いプロセシング酵素標的部位を含み得る。そのような標的配列は、ＤＮＡが場合により合成後にさらにプロセシングされることを可能にするためのものである。プロセシング酵素は、その標的部位を認識し、ＤＮＡをプロセシングする酵素である。プロセシング酵素標的配列は、制限酵素の標的配列であってもよい。制限酵素、すなわち制限エンドヌクレアーゼは、標的配列に結合し、特定の点で切断する。プロセシング酵素標的配列は、リコンビナーゼの標的であり得る。リコンビナーゼは、各リコンビナーゼに特異的な短い（３０～４０ヌクレオチド）標的部位配列間のＤＮＡ交換反応を指向的に触媒する。リコンビナーゼの例としては、Ｃｒｅリコンビナーゼ（標的配列としてｌｏｘＰを有する）及びＦＬＰリコンビナーゼ（短いフリッパーゼ認識標的（ＦＲＴ）部位を有する）が挙げられる。プロセシング酵素標的配列は、ｐｈｉＣ３１インテグラーゼなどの部位特異的インテグラーゼの標的であり得る。

【００５５】

プロセシング酵素標的配列は、ＣＥＤＴがＲＮＡ合成の鋳型になるように、ＲＮＡポリメラーゼの標的配列であってもよい。この場合、プロセシング酵素標的化部位はプロモーター、好ましくは真核性プロモーターである。その目的のために、ＣＥＤＴは、目的のＲＮＡ（例えば、ｔＲＮＡ）又はタンパク質を封入する配列に動作可能に連結された真核性プロモーター、及び場合により真核生物転写終結配列を含むか、それからなるか、又はそれから本質的になる発現カセットを含み得る。「プロモーター」は、ポリヌクレオチドの転写を開始及び調節するヌクレオチド配列である。「動作可能に連結された」は、そのように記載された成分がそれらの通常の機能を実行するように構成されるエレメントの配置を指す。したがって、核酸配列に動作可能に連結された所与のプロモーターは、適切な酵素が存在する場合、その配列の発現を行うことができる。「動作可能に連結された」という用語は、転写複合体によるプロモーターエレメントの認識時に目的のＤＮＡ配列の転写の開始を可能にするプロモーターエレメント及び目的のＤＮＡ配列のいずれかの間隔又は配向を包含することを意図している。

【００５６】

ＣＥＤＴ又はＭＣは、任意の適切な長さであってもよい。特に、ＣＥＤＴ又はＭＣは最

大４ｋｂであり得る。好ましくは、ＤＮＡ鋳型は、１００ｂｐ～２ｋｂ、２００ｂｐ～１ｋｂ、最も好ましくは２００ｂｐ～８００ｂｐであり得る。２００ｂｐ以上のＭＣ及びＣＥＤＴは、複数のＡＣＥ－ｔＲＮＡカセットコピーを収容することができる。これにより、各ＭＣ及びＣＥＤＴユニットからのより高次のＡＣＥ－ｔＲＮＡ発現が可能になり得る。各ミニベクターからのＡＣＥ－ｔＲＮＡの複数のコピーを有することにより、各ユニットに１つ以上の配列を含めることが可能になる。例えば、ロイシンＡＣＥ－ｔＲＮＡ及びトリプトファンＡＣＥ－ｔＲＮＡは、１つのＭＣ又はＣＥＤＴミニベクターに含めることができる。これらのＡＣＥ－ｔＲＮＡの両方は、異なるｔＲＮＡアミノアシルシンセターゼを利用するので、突然変異Ｗ１２８２Ｘ－ＣＦＴＲを救済又は抑制する際に嚢胞性線維症に有効であり、抑制活性を有意に増強することができる。

【００５７】

閉じたＤＮＡ分子は、治療剤、すなわち、ｉｎ　ｖｉｖｏで遺伝子産物を発現するために使用することができるＤＮＡ医薬としての有用性を有する。これは、それらの共有結合的に閉じた構造がエキソヌクレアーゼなどの酵素による攻撃を防ぎ、露出したＤＮＡ末端を有する「開放型」ＤＮＡ分子と比較して、遺伝子発現の安定性及び寿命が向上するためである。直鎖二本鎖開放型カセットは、宿主組織に導入した場合、遺伝子発現に関して非効率的であることが実証されている。これは、細胞外空間におけるエキソヌクレアーゼの作用によるカセットの不安定性に起因するとされてきた。

【００５８】

共有結合的に閉じた構造の内側のＤＮＡ末端の配列決定には、他の利点もある。ＤＮＡ末端がゲノムＤＮＡと一体化するのが妨げられるため、閉じた直鎖ＤＮＡ分子の安全性が向上する。また、閉じた直鎖構造は、宿主細胞の内側のＤＮＡ分子のコンカテマー化を防ぎ、したがって遺伝子産物の発現レベルをより高い感度で調節することができる。

【００５９】

ＣＥＤＴは、ＭＣと同じ利点すべてを有するが、共有結合的に閉じた末端を有する直鎖ＤＮＡカセットトポロジを示す。ＣＥＤＴは、その製造の容易さ、送達効率、低い病原性及び持続的発現のために、ワクチンを生成するための抗原の発現のためにｉｎ　ｖｉｖｏで使用されてきた。ＣＥＤＴは、ＧＭＰグレードで高い存在量で容易に完全に合成的に作製することができ、したがって迅速な設計及び製造を可能にするので、ＭＣを越えるいくつかの利点を有する。

【００６０】

ＣＥＤＴは、当技術分野で公知の方法を使用して作製することができる。ＣＥＤＴのセルフリー生産は、米国特許第９４９９８４７号明細書、米国特許第２０１９０１８５９２４号明細書、国際公開第２０１０／０８６６２６号パンフレット及び国際公開第２０１２／０１７２１０号パンフレットに記載されており、これらは参照により本明細書に組み込まれる。本方法は、ＤＮＡ鋳型を使用した各末端で共有結合的に閉じた直鎖二本鎖ＤＮＡ（閉じた直鎖ＤＮＡ）の生成に関し、ＤＮＡ鋳型は少なくとも１つのプロテロメラーゼ認識配列を含み、鋳型は少なくとも１つのＤＮＡポリメラーゼを使用して増幅され、プロテロメラーゼ酵素を使用して処理されて、閉じた直鎖ＤＮＡを生成する。閉じた直鎖ＤＮＡの閉端はそれぞれ、プロテロメラーゼ認識配列の一部を含む。閉じた直鎖ＤＮＡを鋳型として使用することは、列挙された用途に記載されており、そのような鋳型の使用は、製造中に最小限の量の試薬が浪費されることを意味するので有利である。これらの方法によって産生されるＣＥＤＴ分子は、直鎖であり、二本鎖であり、プロテロメラーゼ認識配列の一部によって各末端で共有結合的に閉じられている。この直鎖状二本鎖ＤＮＡ分子は、１つ以上のステムループモチーフを含むことができる。

【００６１】

本明細書に開示されるように、一例では、本開示は、電場を使用した、ＭＣ及びＣＥＤＴミニベクターなどのＡＣＥ－ｔＲＮＡ発現ミニベクターの肺への送達効率、並びにｉｎ　ｖｉｔｒｏ及びｉｎ　ｖｉｖｏでの気道上皮細胞におけるＰＴＣのＡＣＥ－ｔＲＮＡ抑制の有効性及び持続性を評価する。ＡＣＥ－ｔＲＮＡ遺伝子の小さなサイズ（約８０ｎｔ）

を利用して、本発明者らは、知る限りこれまでで最小の治療用発現ベクターの作製に成功した。

【００６２】

有効なＡＣＥ－ｔＲＮＡのライブラリーが手元にあると、ｉｎ　ｖｉｖｏで最も有効な送達方法を判定することができる。本明細書に開示されるように、３つの最も一般的なＣＦナンセンス突然変異（ｐ．Ｇ５４２Ｘ、ｐ．Ｗ１２８２Ｘ及びｐ．Ｒ５５３Ｘ）を標的とするために、ＭＣ及びＣＥＤＴにおいてＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Trp}_{UGA}$、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Leu}_{UGA}$、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Gly}_{UGA}$及びＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Arg}_{UGA}$をコードすることができる。ＭＣ及びＣＥＤＴ技術は、送達可能なプラットフォームとして、ここで実証されるナノ粒子、タンパク質複合体、及び電場を含む多数の送達方法と対にすることができる。ＭＣミニベクター及びＣＥＤＴミニベクターは、それらを遺伝子治療に魅力的なものにするいくつかの特徴、すなわち（１）細胞内輸送中の障害を克服することを可能にし、したがってバイオアベイラビリティを改善する、劇的に減少したサイズ、（２）より高い細胞進入効率、（３）転写活性構造の保有、及び（４）ゲノムインテグレーションを伴わない持続的な導入遺伝子発現を有する：。

【００６３】

設計構造

ミニベクター配列の設計は、発現効率及び持続性に重要な意味を有する。本明細書に開示されるように、本発明のミニベクター、ＭＣ又はＣＥＤＴのいずれかは、本明細書に記載されるようなｔＲＮＡ発現カセットに加えて、いくつかの有利なエレメント及び／又は破壊を場合により含む。例としては、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ－バーコード化配列（ＡＢＳ）、転写増強５’リーダー配列（ＴＥＬＳ）及びＤＮＡ核標的化配列（ＤＴＳ）が挙げられる。

【００６４】

１つの重要な特徴は、ＣｐＧ配列含有量及びそのメチル化である。ＤＮＡメチル化及び転写に対するその影響は、広く研究されている。メチル化の欠如は、メチル化されたＣｐＧアイランドが不活性Ｘ染色体上及び親インプリント遺伝子のサイレンシングされた対立遺伝子に見出される活性転写のための前提条件である。さらに、ＤＮＡのｉｎ　ｖｉｔｒｏでのメチル化は遺伝子発現を阻害することが示されている。ＡＣＥ－ｔＲＮＡ遺伝子は非常に小さく、平均して４つのＣｐＧ配列しか含まないので、本発明者らは、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ発現の持続性を高めるために、自らのミニベクターを、ＣｐＧ配列をほとんど完全に欠いているように設計することができた。さらに、５００ｂｐｓであっても、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ遺伝子は、全ペイロードのほんの一部だけ消費して、３’ＡＢＳ、ＴＥＬＳ、及びＤＴＳを含む選択肢を残す。ＡＢＳ、ＴＥＬＳ及びＤＴＳの実施態様は、以下の実施例６及び７に記載されている。

【００６５】

ＰＴＣを効率的に抑制する能力は、ＰＴＣが存在する遺伝的環境によって意義深く支配される。したがって、ミニベクターから発現されるＡＣＥ－ｔＲＮＡの、培養中のヒト気道上皮などの標的細胞におけるＰＴＣを抑制する効率を判定することが不可欠である。その目的のために、転写活性を増加させ、ミニベクターを核に標的化することによって、ＴＥＬＳ及びＤＴＳを使用して、ｉｎ　ｖｉｖｏでのＡＣＥ－ｔＲＮＡ発現を増強することができる。

【００６６】

ＴＥＬＳ

ミニベクターからのＡＣＥ－ｔＲＮＡの発現の増加は、ＡＣＥ－ｔＲＮＡの治療有効性に対する送達効率の負荷を減少させ得る。真核生物ｔＲＮＡ遺伝子の転写が遺伝子内プロモーターエレメント（箱Ａ及びＢ）によって指令されることは十分に確立されているが、５’フランキング配列領域も、おそらくｐｏｌＩＩＩ転写複合体との相互作用を介してｔＲＮＡ転写を顕著に調節する。そのような領域は、転写促進５’リーダー配列（ＴＥＬＳ）として使用することができる。いくつかの例では、同一のコード配列を有するｔＲＮＡ遺伝子は、転写を増加又は減少させる異なる５’フランキング配列を有する。さらに、５’

フランキング配列は、組織発現特異性を調節すると考えられる。その目的のために、ＴＥＬＳとしてヒトｔＲＮＡ　Ｔｙｒ５’リーダー配列（５’－ＡＧＣＧＣＴＣＣＧＧＴＴＴＴＣＴＧＴＧＣＴＧＡＡＣＣＴＣＡＧＧＧＧＡＣＧＣＣＧＡＣＡＣＡＣＧＴＡＣＡＣＧＴＣ－３’、配列番号３０６）を使用することができる。

【００６７】

図７Ａは、５’リーダー配列を含めると、Ｗ１２８２Ｘ－ＣＦＴＲに対するＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Trp}_{UGA}$の抑制活性が５倍超増加することを示す。約４１６個のｔＲＮＡ遺伝子がヒトゲノムにおいてアノテーションされている（ｔＲＮＡｓｃａｎ－ＳＥ　ｄａｔａｂａｓｅ，Ｌｏｗｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ　２５，９５５－９６４，（１９９７））。４１６個すべてのｔＲＮＡ遺伝子のｔＲＮＡ５’フランキング配列（１ｋｂ）を、本発明のＴＥＬＳとして使用することができる。

【００６８】

ＤＴＳ

ＤＮＡ核標的化配列又はＤＴＳは、そうでなければ細胞質に局在化したＤＮＡの核内導入を支えるのに必要なＤＮＡ配列又はＤＮＡ配列の反復である。ウイルスのプロモーター又は哺乳動物遺伝子のプロモーターに天然に存在するＤＮＡ配列は、非分裂細胞で発現され得る発現ベクターに導入遺伝子を含むＤＮＡを組み込むことによって、それらのＤＮＡの核侵入をもたらす。ＤＴＳの非限定的な例は、エンハンサーリピート（５’－ａｔｇｃ　ｔｔｔｇｃａ　ｔａｃｔｔｃｔｇｃｃ　ｔｇｃｔｇｇｇｇａｇ　ｃｃｔｇｇｇｇａｃｔ　ｔｔｃｃａｃａｃｃｃ　ｔａａｃｔｇａｃａｃ　ａｃａｔｔｃｃａｃａ　ｇｃｔｇｇｔｔ　ｇｇｔ　ａｃｃｔｇｃａ－３’、配列番号３０７）を含有するＳＶ４０ゲノムからのＤＮＡ配列である。このＳＶ４０　ＤＴＳは、プラスミドＤＮＡの配列特異的ＤＮＡ核導入を支えることが示されている（例えば、Ｄｅａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｅｘｐ．Ｃｅｌｌ　Ｒｅｓ．２５３：７１３－７２２，１９９９）。本明細書に開示されているように、以下の例に記載されている方法で、追加のＤＴＳを取得することができる。

【００６９】

バーコード

本発明に記載されるミニベクターは、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ転写活性の直接的な測定を可能にする１つ又は複数のさらなるエレメントを含み得る。一例はバーコード配列である。

【００７０】

ｍＲＮＡ、ノンコーディングＲＮＡ、マイクロＲＮＡ、核内低分子／核小体ＲＮＡ及びｒＲＮＡ^{16S}を分析するために、標準的なＲＮＡシーケンシング（ＲＮＡ－ｓｅｑ）法が使用されている。しかし、ｔＲＮＡは、これらの標準的なＲＮＡ－ｓｅｑ法を実施することができない唯一の小型の細胞ＲＮＡのクラスである。直接的な方法を妨げる重大な障害には、ポリメラーゼ増幅に干渉する転写後修飾の存在、及びアダプターライゲーションをブロックする安定で広範な二次構造が含まれる。最近、これらの問題を回避するためにいくつかの方法が開発されているが、これらの手法は比較的複雑であり、コストが非常に高い。さらに、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ配列は、１つ又は複数の内因性のｔＲＮＡと１つのヌクレオチドのみが異なるので、ノーザンブロット、マイクロアレイ及び断片化ＲＮＡ－ｓｅｑは、外因性治療用ＡＣＥ－ｔＲＮＡ及び内因性のｔＲＮＡの発現レベルを識別することができない。いくつかの最近の研究では、ｔＲＮＡをプロモーターとして利用して、ｔＲＮＡ：ｓｇＲＮＡ（Ｃａｓ９単一ガイドＲＮＡ）融合転写物の高い発現レベルを駆動し、次いで、それを内因性のｔＲＮａｓｅ　Ｚによって効率的かつ正確に切断する。

【００７１】

本発明のミニベクターは、１つ以上のＡＣＥ－ｔＲＮＡ－バーコード化配列又はＡＢＳを含み得る。ＡＢＳは、ベクターがＡＣＥ－ｔＲＮＡ及びバーコードの融合転写物をコードするように、ＡＣＥ－ｔＲＮＡをコードする配列の３’又は５’にあり得る。一例では、バーコード配列は３’末端にあり、ミニベクターはＡＣＥ－ｔＲＮＡ：バーコード融合転写物をコードし、バーコード配列は内因性のｔＲＮａｓｅ　Ｚによって切断され、ｑＰＣＲ定量化を可能にして相対的なＡＣＥ－ｔＲＮＡ発現を判定しながら、完全に機能的なＡ

ＣＥ－ｔＲＮＡを得ることができる（図１０Ａ）。以下の実施例１１に示すように、本発明者らは、マウスのゲノム配列と相同性のないランダムな２００ｂｐのバーコード配列を設計した。ＮＬｕｃ－ＵＧＡを安定して発現する１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞にトランスフェクトされた場合、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Arg}_{UGA}$－及びＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Trp}_{UGA}$－バーコードは、ｑＰＣＲによってモニターした場合にロバストな発現を示すが、非バーコード化ＡＣＥ－ｔＲＮＡは意義あるシグナルを与えなかった（図１０Ｂ）。１つの場合では、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Arg}_{UGA}$の抑制活性は、３’バーコード配列の存在によって妨げられ得るが、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ活性の欠損は、バーコード配列に対してプローブ探査されるノーザンブロットによって判定することができる３’プロセシングが不十分であるためである可能性が最も高い。そのような欠損は、その配列がバーコード又は改変させたバーコードリンカー配列としても作用して３’プロセシングを改善することができる３’肝炎デルタウイルス（ＨＤＶ）自己切断リボザイムを使用することによって、修正することができる。３’リボザイムの組み込みは、改善されたＡＣＥ－ｔＲＮＡの３’プロセシングをもたらし、それらのＰＴＣ抑制活性を増加させ得る。さらに、ＡＢＳ技術は、ＮＬｕｃ　ＰＴＣレポーターを補完するためのＡＣＥ－ｔＲＮＡ発現の測定を可能にする（図９）。

【００７２】

本願の任意の実施形態では、本明細書に記載の核酸分子又はベクターは、場合により１つ以上のレポーター分子を含むことができる。レポーターは、細胞における発現が細胞に検出可能な形質を付与する分子である。様々な実施形態では、レポーターとしては、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）、β－ガラクトシルトランスフェラーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、ＮａｎｏＬｕｃ（登録商標）、アルカリホスファターゼ、並びに緑色蛍光性タンパク質（例えば、ＧＦＰ、ＴａｇＧＦＰ、Ｔ－Ｓａｐｐｈｉｒｅ、Ａｚａｍｉ　Ｇｒｅｅｎ、Ｅｍｅｒａｌｄ、ｍＷａｓａｂｉ、ｍＣｌｏｖｅｒ３）、赤色蛍光性タンパク質（例えば、ｔｄＴｏｍａｔｏ、ｍＲＦＰｌ、ＪＲｅｄ、ＨｃＲｅｄｌ、ＡｓＲｅｄ２、ＡＱ１４３、ｍＣｈｅｒｒｙ、ｍＲｕｂｙ３、ｍＰｌｕｍ）、黄色蛍光性タンパク質（例えば、ＥＹＦＰ、ｍＢａｎａｎａ、ｍＣｉｔｒｉｎｅ、ＰｈｉＹＦＰ、ＴａｇＹＦＰ、Ｔｏｐａｚ、Ｖｅｎｕｓ）、橙色蛍光性タンパク質（例えば、ＤｓＲｅｄ、Ｔｏｍａｔｏ、Ｋｕｓａｂｒｉａ　Ｏｒａｎｇｅ、ｍＯｒａｎｇｅ、ｍＴａｎｇｅｒｉｎｅ、ＴａｇＲＦＰ）、シアン蛍光性タンパク質（例えば、ＣＦＰ、ｍＴＦＰｌ、Ｃｅｒｕｌｅａｎ、ＣｙＰｅｔ、ＡｍＣｙａｎｌ）、青色蛍光性タンパク質（例えば、Ａｚｕｒｉｔｅ、ｍｔａｇＢＦＰ２、ＥＢＦＰ、ＥＢＦＰ２、Ｙ６６Ｈ）、近赤外蛍光性タンパク質（例えば、ｉＲＦＰ６７０、ｉＲＦＰ６８２、ｉＲＦＰ７０２、ｉＲＦＰ７１３及びｉＲＦＰ７２０）、赤外蛍光性タンパク質（例えば、ＩＦＰ１．４）及び光活性化可能蛍光性タンパク質（例えば、Ｋａｅｄｅ、Ｅｏｓ、ＩｒｉｓＦＰ、ＰＳ－ＣＦＰ）を含むがこれらに限定されない蛍光性タンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。

【００７３】

ＡＣＥ－ｔＲＮＡをコードする核酸の細胞への導入

外因性遺伝物質（例えば、１つ又は複数の治療用ＡＣＥ－ｔＲＮＡをコードする核酸又はミニベクター）を、遺伝子導入法、例えばトランスフェクション又は形質導入によってｉｎ　ｖｉｖｏで目的の標的細胞に導入して、遺伝子改変細胞をもたらすことができる。様々な発現ベクター（すなわち、標的細胞への外因性遺伝物質の送達を促進するためのビヒクル）が当業者に公知である。本明細書で使用される場合、「外因性遺伝物質」は、天然又は合成のいずれかであり、細胞に天然には見られない核酸又はオリゴヌクレオチド、又はそれが細胞において天然に見出される場合、細胞によって生物学的に意味のあるレベルで転写又は発現されない核酸又はオリゴヌクレオチドを指す。したがって、「外因性遺伝物質」には、例えば、ｔＲＮＡに転写され得る天然に存在しない核酸が含まれる。

【００７４】

本明細書で使用されるとき、「細胞のトランスフェクション」とは、細胞によって、付加された核酸（ＤＮＡ、ＲＮＡ、又はそれらのハイブリッド）の組み込みによる新しい遺

伝物質を獲得されることを指す。したがって、トランスフェクションとは、物理的又は化学的方法を用いた細胞への核酸の導入を指す。リン酸カルシウム核酸共沈殿、ストロンチウムホスフェート核酸共沈殿、ＤＥＡＥ－デキストラン、エレクトロポレーション、カチオン性リポソーム媒介トランスフェクション及びタングステン粒子促進微小粒子ガンを含むいくつかのトランスフェクション技術が、当業者に公知である。対照的に、「細胞の形質導入」は、ＤＮＡ又はＲＮＡウイルスを使用して核酸を細胞に移入するプロセスを指す。核酸を細胞に移入するためのＲＮＡウイルス（すなわち、レトロウイルス）は、本明細書では形質導入キメラレトロウイルスと呼ばれる。レトロウイルス内に含まれる外因性遺伝物質は、形質導入された細胞のゲノムに組み込まれる。キメラＤＮＡウイルス（例えば、治療剤をコードするｃＤＮＡを有するアデノウイルス）で形質導入された細胞は、そのゲノムに組み込まれた外因性遺伝物質を有しないが、細胞内で染色体外に保持された外因性遺伝物質を発現することができる。

【００７５】

典型的には、外因性遺伝物質は、新しい遺伝子の転写を制御するためのプロモーターと共に、異種遺伝子（治療用ＲＮＡ又はタンパク質をコードする）を含む。プロモーターは、特徴的には、転写を開始するのに必要な特定のヌクレオチド配列を有する。場合により、外因性遺伝物質は、所望の遺伝子転写活性を得るために必要な追加の配列（すなわち、エンハンサー）をさらに含む。この論述の目的では、「エンハンサー」は、プロモーターによって指示される基底転写レベルを変化させるために（シスで）コード配列と近接するように作用する、単純に任意の非翻訳ＤＮＡ配列である。外因性遺伝物質は、プロモーター及びコード配列がコード配列の転写を可能にするように動作可能に連結されたように、プロモーターのすぐ下流の細胞のゲノムに導入され得る。レトロウイルス発現ベクターは、挿入された外因性遺伝子の転写を制御するための外因性プロモーターのエレメントを含み得る。そのような外因性プロモーターには、構成的プロモーター及び誘導性プロモーターの両方が含まれる。

【００７６】

天然に存在する構成的プロモーターは、必須の細胞の機能の発現を制御する。その結果、構成的プロモーターの制御下にある遺伝子は、細胞が増殖するあらゆる条件下で発現される。例示的な構成的プロモーターには、特定の構成的又は「ハウスキーピング」機能をコードする以下の遺伝子のためのプロモーターが含まれる、すなわちヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ（ＨＰＲＴ）、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（ＤＨＦＲ）、アデノシンデアミナーゼ、ホスホグリセロールキナーゼ（ＰＧＫ）、ピルビン酸キナーゼ、ホスホグリセロールムターゼ、アクチンプロモーター、ユビキチン、伸長因子－１、及び当業者に公知の他の構成的プロモーターである。さらに、多くのウイルスプロモーターは、真核細胞において構成的に機能する。これらには、ＳＶ４０の早期プロモーター及び後期プロモーター、数ある中でも、モロニー白血病ウイルス及び他のレトロウイルスの長末端反復配列（ＬＴＲ）、単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼプロモーターが含まれる。したがって、上記の構成的プロモーターのいずれかを使用して、異種遺伝子インサートの転写を制御することができる。

【００７７】

誘導性プロモーターの制御下にある遺伝子は、誘導剤の存在下でのみ又はより高度に発現される（例えば、メタロチオネインプロモーターの制御下での転写は、特定の金属イオンの存在下で大きく増加する）。誘導性プロモーターには、それらの誘導因子が結合したときに転写を刺激する応答性エレメント（ＲＥ）が含まれる。例えば、血清因子、ステロイドホルモン、レチノイン酸及びサイクリックＡＭＰのＲＥがある。誘導性応答を得るために、特定のＲＥを含有するプロモーターを選択することができ、場合によっては、ＲＥ自体を異なるプロモーターに結合させ、それによって組換え遺伝子に誘導能を付与することができる。したがって、適切なプロモーターを選択することによって（構成的対誘導的、強対弱）、遺伝子改変細胞において治療剤の発現の存在及びレベルの両方を制御することが可能である。治療剤をコードする遺伝子が誘導性プロモーターの制御下にある場合、

ｉｎ　ｓｉｔｕでの治療剤の送達は、遺伝子改変された細胞を、治療剤の転写を可能にする条件にｉｎ　ｓｉｔｕで曝露することによって、例えば薬剤の転写を制御する誘導性プロモーターの特異的誘導因子の注入によって、誘発される。例えば、メタロチオネインプロモーターの制御下にある遺伝子によってコードされる治療剤の遺伝子改変細胞によるｉｎ　ｓｉｔｕ発現は、遺伝子改変細胞を適切な（すなわち、誘導する）金属イオンを含む溶液とｉｎ　ｓｉｔｕで接触させることによって、増強される。

【００７８】

したがって、ｉｎ　ｓｉｔｕで送達される治療剤の量は、（１）挿入された遺伝子の転写を指示するために使用されるプロモーターの性質、（すなわち、プロモーターが構成的であるか誘導性であるか、強いか弱いか）、（２）細胞に挿入される外因性遺伝子のコピー数、（３）患者に投与（例えば、移植）される形質導入／トランスフェクトされる細胞の数、（４）インプラントのサイズ（例えば、グラフト又はカプセル化発現システム）、（５）インプラント数、（６）形質導入／トランスフェクトされた細胞又はインプラントが所定の位置に残される時間の長さ、（７）遺伝子改変細胞による治療剤の産生速度などの因子を制御することによって調節される。特定の治療剤の治療有効用量の送達のためのこれらの因子の選択及び最適化は、上段に開示された因子及び患者の臨床プロファイルを考慮して、過度の実験なしに当業者の範囲内であると考えられる。

【００７９】

少なくとも１つのプロモーター、及び治療剤をコードする少なくとも１つの異種核酸に加えて、発現ベクターは、発現ベクターでトランスフェクト又は形質導入された細胞の選択を容易にするための選択遺伝子、例えばネオマイシン耐性遺伝子を含み得る。あるいは、細胞は、２つ以上の発現ベクター、治療剤をコードする遺伝子を含む少なくとも１つのベクター、選択遺伝子を含む他のベクターでトランスフェクトされる。適切なプロモーター、エンハンサー、選択遺伝子及び／又はシグナル配列の選択は、過度の実験なしに、当業者の範囲内であると考えられる。

【００８０】

本発明のＡＣＥ－ｔＲＮＡコンストラクトは、任意のタイプの標的細胞又は宿主細胞に挿入することができる。発現ベクターに関連して、ベクターは、当技術分野における任意の方法によって宿主細胞、例えば哺乳動物、細菌、酵母又は昆虫細胞に容易に導入することができる。例えば、発現ベクターは、物理的、化学的又は生物学的手段によって宿主細胞に移入することができる。

【００８１】

ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための物理的方法としては、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクション、パーティクルガン、マイクロインジェクション、エレクトロポレーションなどが挙げられる。ベクター及び／又は外因性核酸を含む細胞を産生する方法は、当技術分野で周知である。例えば、Ｓｅｅ，ｆｏｒ　ｅｘａｍｐｌｅ，Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．を参照されたい（２０１２，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ）。

【００８２】

目的のポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための生物学的方法には、ＤＮＡ及びＲＮＡベクターの使用が含まれる。ウイルスベクター、特にレトロウイルスベクターは、哺乳動物、例えばヒトの細胞に遺伝子を挿入するための最も広く使用されている方法となっている。他のウイルスベクターは、レンチウイルス、ポックスウイルス、単純ヘルペスウイルスＩ、アデノウイルス及びアデノ随伴ウイルスなどに由来し得る。例えば、米国特許第５，３５０，６７４号明細書、及び同第５，５８５，３６２号明細書を参照されたい。

【００８３】

ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための化学的手段としては、高分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、ビーズなどのコロイド分散体、及び水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセル、及びリポソームを含む脂質ベースの系が挙げられる。ｉｎ　ｖｉ

ｔｒｏ及びｉｎ　ｖｉｖｏで送達ビヒクルとして使用するための例示的なコロイド系は、リポソーム（例えば、人工膜小胞）である。

【００８４】

転写因子Ａミトコンドリア（ＴＦＡＭ）などのＤＮＡ結合タンパク質の添加を使用して、ＤＮＡを凝縮し、電荷を遮蔽することができる。小さいサイズ及びコンパクトな形状のために、ＤＮＡ：タンパク質（ＤＮＰ）複合体は、次いで、細胞透過性ペプチド、ＰＥＧ誘導体、リポソーム又はエレクトロポレーションによって細胞に送達され得る。いくつかの例では、ＤＮＡ結合タンパク質は、ＤＮＡミニベクターが転写される細胞質から核へのＤＮＰの能動的輸送のための核局在化シグナルをコードすることができる。

【００８５】

非ウイルス送達システムが利用される場合、例示的な送達ビヒクルはリポソームである。宿主細胞（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ、エクスビボ又はｉｎ　ｖｉｖｏ）への核酸の導入のために、脂質製剤の使用が企図される。別の態様では、核酸は脂質と会合していてもよい。脂質と会合した核酸は、リポソームの水性内部にカプセル化され得て、リポソームの脂質二重層の内部に散在し得て、リポソームとオリゴヌクレオチドの両方と会合した連結分子を介してリポソームに付着し得て、リポソームに封入され得て、リポソームと複合体を形成し得て、脂質を含有する溶液に分散され得て、脂質と混合され得て、脂質と組み合わされ得て、脂質に懸濁液として含まれ得て、ミセルと含有若しくは複合体を形成し得て、又はそうでなければ脂質と会合し得る。脂質、脂質／ＤＮＡ又は脂質／発現ベクター関連組成物は、溶液のいかなる特定の構造にも限定されない。例えば、それらは、二重層構造、ミセルとして、又は「崩壊」構造で存在し得る。それらはまた、溶液に単に散在してもよく、場合によってはサイズ又は形状が均一でない凝集体を形成する。脂質は、天然に存在する脂質又は合成脂質であり得る脂肪物質である。例えば、脂質には、細胞質に天然に存在する脂肪滴、並びに脂肪酸、アルコール、アミン、アミノアルコール、及びアルデヒドなどの長鎖脂肪族炭化水素及びそれらの誘導体を含有する化合物のクラスが含まれる。

【００８６】

使用に適した脂質は、市販の供給源から得ることができる。例えば、ジミリスチルホスファチジルコリン（「ＤＭＰＣ」は、Ｓｉｇｍａ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯから入手することができ、ジセチルホスフェート（「ＤＣＰ」は、Ｋ＆Ｋ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（ニューヨーク州プレインビュー）から入手することができ、コレステロール（「Ｃｈｏｉ」は、Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ－Ｂｅｈｒｉｎｇから入手することができ、ジミリスチルホスファチジルグリセロール（「ＤＭＰＧ」及び他の脂質は、Ａｖａｎｔｉ　Ｐｏｌａｒ　Ｌｉｐｉｄｓ，Ｉｎｃ．（アラバマ州バーミンガム）から入手することができる。クロロホルム又はクロロホルム／メタノールの脂質の保存溶液は、約－２０℃で保存することができる。クロロホルムは、メタノールよりも容易にエバポレートするので、唯一の溶媒として使用される。

【００８７】

「リポソーム」は、封入された脂質二重層又は凝集体の生成によって形成された様々な単層及び多層脂質ビヒクルを包含する総称である。リポソームは、リン脂質二重層膜及び内部水性媒体を有するベシクル構造を有するものとして特徴付けることができる。多層リポソームは、水性媒体によって分離された複数の脂質層を有する。それらは、リン脂質が過剰の水溶液に懸濁されると自然に形成する。脂質成分は、閉じた構造の形成前に自己再配列を受け、脂質二重層の間に水及び溶解した溶質を捕捉する（Ｇｈｏｓｈ　ｅｔ　ａｌ．，１９９１　Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ　５：５０５－１０）。しかし、溶液において通常のベシクル構造とは異なる構造を有する組成物も包含される。例えば、脂質は、ミセル構造をとるか、又は単に脂質分子の不均一な凝集体として存在し得る。リポフェクタミン－核酸複合体も企図される。

【００８８】

本発明の核酸分子は、エレクトロポレーションを介して、例えば米国特許第７，６６４，５４５号明細書に記載されている方法によって投与することができ、その内容は参照に

より本明細書に組み込まれる。エレクトロポレーションは、米国特許第６，３０２，８７４号明細書、同第５，６７６，６４６号明細書、同第６，２４１，７０１号明細書、同第６，２３３，４８２号明細書、同第６，２１６，０３４号明細書、同第６，２０８，８９３号明細書、同第６，１９２，２７０号明細書、同第６，１８１，９６４号明細書、同第６，１５０，１４８号明細書、同第６，１２０，４９３号明細書、同第６，０９６，０２０号明細書、同第６，０６８，６５０号明細書、及び同第その５，７０２，３５９号明細書に記載されている方法及び／又は装置によって行うことができ、それらの内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。エレクトロポレーションは、低侵襲性装置を介して実行されてもよい。

【００８９】

低侵襲性エレクトロポレーション装置「ＭＩＤ」は、上述の組成物及び関連する流体を体組織に注入するための装置であり得る。装置は、中空針、ＤＮＡカセット、及び流体送達手段を含むことができ、装置は、使用中に流体送達手段を作動させて、針を前述の体組織に挿入する間にＤＮＡを体組織に同時に（例えば、自動的に）注入するように適合される。これは、針が挿入されている間にＤＮＡ及び関連する流体を徐々に注入できることが、体組織を通る流体のより均一な分布をもたらすという利点を有する。注入中に経験する痛みは、注入されるＤＮＡの分布がより広い領域にわたるために軽減され得る。

【００９０】

ＭＩＤは、針を使用せずに組織に組成物を注入してもよい。ＭＩＤは、組成物が組織の表面を穿刺し、下にある組織及び／又は筋肉に入るような力で、組成物を小さな流れ又はジェットとして注入することができる。小さな流れ又はジェットの背後の力は、数分の１秒以内にマイクロオリフィスを通る二酸化炭素などの圧縮ガスの膨張によって供給され得る。低侵襲性エレクトロポレーション装置及びそれらを使用する方法の例は、公開された米国特許出願公開第２００８０２３４６５５号明細書、米国特許第６，５２０，９５０号明細書、米国特許第７，１７１，２６４号明細書、米国特許第６，２０８，８９３号明細書、米国特許第６，００９，３４７号明細書、米国特許第６，１２０，４９３号明細書、米国特許第７，２４５，９６３号明細書、米国特許第７，３２８，０６４号明細書、及び米国特許第６，７６３，２６４号明細書に記載されており、これらの各々の内容は参照により本明細書に組み込まれる。ＭＩＤは、組織を痛みなく穿刺する液体の高速ジェットを生成する注入器を備えることができる。このような無針注入器は市販されている。本明細書で利用することができる無針注入器の例には、米国特許第３，８０５，７８３号明細書、同第４，４４７，２２３号明細書、同第５，５０５，６９７号明細書、及び同第４，３４２，３１０号明細書に記載されているものが含まれ、これらの各々の内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【００９１】

直接的又は間接的な電気輸送に適した形態の所望の組成物は、通常、組織への組成物の浸透を引き起こすのに十分な力で薬剤のジェットの送達を作動させるように組織表面を注入器と接触させることによって、無針注入器を使用して治療される組織に導入（例えば、注入）され得る。例えば、治療すべき組織が粘膜、皮膚又は筋肉である場合、作用物質は、作用物質を角質層を通って真皮層に、又はその下の組織及び筋肉にそれぞれ浸透させるのに十分な力で、粘膜又は皮膚表面に向かって投射される。

【００９２】

無針注入器は、あらゆる種類の組織、特に皮膚及び粘膜に組成物を送達するのによく適合している。いくつかの実施形態では、無針注入器を使用して、組成物を含有する液体を対象の皮膚又は粘膜の表面及び中に推進することができる。本発明の方法を用いて治療することができる様々な種類の組織の代表的な例としては、膵臓、喉頭、鼻咽頭、下咽頭、中咽頭、唇、喉、肺、心臓、腎臓、筋肉、乳房、結腸、前立腺、胸腺、精巣、皮膚、粘膜組織、卵巣、血管、又はそれらの任意の組み合わせが挙げられる。

【００９３】

ＭＩＤは、組織をエレクトロポレーションする針電極を有し得る。例えば矩形又は正方

形のパターンで設定された、複数の電極アレイの複数の電極対間をパルス化することにより、一対の電極間のパルス化よりも改善された結果が得られる。例えば、「Ｎｅｅｄｌｅ Ｅｌｅｃｔｒｏｄｅｓ ｆｏｒ Ｍｅｄｉａｔｅｄ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ Ｄｒｕｇｓ ａｎｄ Ｇｅｎｅｓ」と題する米国特許第５，７０２，３５９号明細書には、針のアレイが開示されており、療法の治療中、複数対の針にパルスをかけることができる。完全に記載されているかのように参照により本明細書に組み込まれるその出願では、針は円形アレイに配置されたが、針電極の対向する対の間でのパルス発生を可能にするコネクタ及びスイッチング装置を有する。組換え発現ベクターを細胞に送達するための一対の針電極を使用することができる。そのような装置及びシステムは、米国特許第６，７６３，２６４号に記載されており、その内容は参照により本明細書に組み込まれる。あるいは、ＤＮＡの注入及び通常の注入針に似た単針によるエレクトロポレーションを可能にし、現在使用されている装置によって送達されるものよりも低い電圧のパルスを適用し、したがって患者が経験する電気感覚を低減する単針装置を使用することができる。

【００９４】

ＭＩＤは、１つ以上の電極アレイを備え得る。アレイは、同じ直径又は異なる直径の２つ以上の針を備え得る。針は、均等又は不均等に離間し得る。針は、０．００５インチ～０．０３インチ、０．０１インチ～０．０２５インチ、又は０．０１５インチ～０．０２０インチの間であってもよい。針は、直径０．０１７５インチであってもよい。針は、０．５ｍｍ、１．０ｍｍ、１．５ｍｍ、２．０ｍｍ、２．５ｍｍ、３．０ｍｍ、３．５ｍｍ、４．０ｍｍ、又はそれ以上離間していてもよい。

【００９５】

ＭＩＤは、パルス発生器と、単一のステップで組成物及びエレクトロポレーションパルスを送達する２つ以上の針組成物注入器とからなってもよい。パルス発生器は、フラッシュカードで動作するパーソナルコンピュータを介したパルス及び注入パラメータの柔軟なプログラミング、並びにエレクトロポレーション及び患者のデータの包括的な記録及び記憶を可能にすることができる。パルス発生器は、短期間中に様々なボルトパルスを送達することができる。例えば、パルス発生器は、持続時間が１００ｍｓの３つの１５ボルトのパルスを送達することができる。そのようなＭＩＤの例は、米国特許第７，３２８，０６４号明細書に記載されているＥＬＧＥＮ１０００システムであり、その内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【００９６】

ＭＩＤは、身体又は植物の選択された組織の細胞へＤＮＡなどの高分子を導入するのを容易にするモジュール式電極システムであるＣＥＬＬＥＣＴＲＡ（ＩＮＯＶＩＯ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）の装置及びシステムであり得る。モジュール式電極システムは、複数の針電極、皮下注入針、プログラマブル定電流パルスコントローラから複数の針電極への導電リンクをもたらす電気コネクタ、及び電源を備えることができる。オペレータは、支持構造体に取り付けられた複数の針電極を把持し、それらを身体又は植物の選択された組織にしっかりと挿入することができる。次いで、高分子が、皮下注入針を介して選択された組織に送達される。プログラマブル定電流パルスコントローラが起動され、定電流電気パルスが複数の針電極に印加される。印加された定電流電気パルスは、複数の電極間の細胞内へ高分子を導入するのを容易にする。細胞の過熱による細胞死は、定電流パルスによって組織での電力散逸を制限することによって、最小限に抑えられる。Ｃｅｌｌｅｃｔｒａ装置及びシステムは米国特許第７，２４５，９６３号に記載されており、その内容は参照により本明細書に組み込まれる。ＭＩＤは、ＥＬＧＥＮ１０００システム（ＩＮＯＶＩＯ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）であり得る。ＥＬＧＥＮ１０００システムは、中空針及び流体送達手段を設ける装置を備え得て、装置は、使用中の流体送達手段を作動させて、針を体組織に挿入する間に、本明細書に記載の組成物である流体を前述の体組織に同時に（例えば自動的に）注入するように適合される。利点は、針が挿入されている間に流体を徐々に注入できることが、体組織を通る流体のより均一な分布をもたらすということである。注入中に経験される痛みは、流体の注入される体積の分布がより広い

領域にわたるために軽減されるとも考えられる。

【００９７】

さらに、流体の自動的な注入は、注入された流体の実際の用量の自動的な監視及び登録を容易にする。このデータは、必要に応じて、文書化の目的で制御ユニットによって記憶することができる。

【００９８】

注入速度は線形又は非線形のいずれかであり得、針が治療される対象の皮膚を通して挿入された後、及び腫瘍組織、皮膚、組織、肝臓組織、及び筋肉組織などの体組織にさらに挿入されている間に、注入が実行され得ることが理解されよう。

【００９９】

装置は、体組織への針の挿入を誘導するための針挿入手段をさらに備える。流体注入の速度は、針の挿入速度によって制御される。これは、針の挿入及び流体の注入の両方を、挿入速度を所望の注入速度に一致させることができるように制御することができるという利点を有する。これはまた、ユーザが装置を操作しやすくする。必要に応じて、体組織内に針を自動的に挿入するための手段を設けることができる。

【０１００】

ユーザは、流体の注入をいつ開始するかを選択することができる。しかし、理想的には、針の先端が筋肉組織に到達したときに注入が開始され、装置は、流体の注入を開始するのに十分な深さまで針が挿入されたときを感知するための手段を含むことができる。これは、針が所望の深さ（通常は筋組織が始まる深さである）に達したときに流体の注入を自動的に開始するように促すことができることを意味する。筋組織が始まる深さは、例えば、針が皮膚の層を通過するのに十分であると考えられる４ｍｍの値などの、予め設定された針の挿入の深さと解釈することができる。

【０１０１】

感知手段は、超音波プローブを備えることができる。感知手段は、インピーダンス又は抵抗の変化を感知するための手段を備えることができる。この場合、手段は、そのように体組織内の針の深さを記録するのではなく、むしろ、針が異なるタイプの体組織から筋肉内に移動する際のインピーダンス又は抵抗の変化を感知するように適合される。これらの代替形態のいずれも、注入が開始され得ることを感知する比較的正確で操作が簡単な手段を提供する。針の挿入する深さは、必要に応じてさらに記録することができ、針の挿入する深さが記録されているときに注入される流体の量が判定されるように流体の注入を制御するために使用することができる。

【０１０２】

装置は、針を支持するためのベース、及びベースを内部に受け入れるためのハウジングをさらに備えることができ、ベースは、ベースがハウジングに対して第１の後方位置にあるときに針がハウジング内に引き込まれ、ベースがハウジング内の第２の前方位置にあるときに針がハウジングから延出するように、ハウジングに対して移動可能である。これは、ハウジングを患者の皮膚に整列させることができ、その後、ハウジングをベースに対して移動させることによって針を患者の皮膚に挿入することができるため、ユーザにとって有利である。

【０１０３】

上述のように、流体が皮膚に挿入されるときに針の長さにわたって均一に分配されるように、制御された速度の流体の注入を達成することが望ましい。流体送達手段は、制御された速度で流体を注入するように適合されたピストン駆動手段を備えることができる。ピストン駆動手段は、例えば、サーボモータによって作動させることができる。しかし、ピストン駆動手段は、ベースがハウジングに対して軸方向に移動することによって作動されてもよい。流体送達のための代替手段を設け得ることが理解されよう。したがって、例えば、制御された速度又は制御されていない速度で流体送達のために圧迫することができる密閉容器を、シリンジ及びピストンシステムの代わりに設けることができる。

【０１０４】

上述の装置は、任意のタイプの注入に使用することができる。しかし、エレクトロポレーションの分野において特に有用であることが想定され、したがって、針に電圧を印加するための手段をさらに備えることができる。これにより、針を注入のためだけでなく、エレクトロポレーション中の電極としても使用することができる。これは、電界が、注入された流体と同じ領域に印加されることを意味するので、特に有利である。従来、エレクトロポレーションには、電極を以前に注入された流体と正確に位置合わせすることが非常に困難であるという問題があり、そのため、ユーザは、より大きな領域にわたって必要とされるよりも大量の流体を注入し、注入された物質と電界との間の重なりを保証しようとするためにより高い領域にわたって電界を印加する傾向があった。本発明を使用すると、電界と流体との間の良好な適合を達成しながら、注入される流体の体積及び印加される電界のサイズの両方を低減することができる。

【０１０５】

外因性核酸を宿主細胞に導入するために使用される方法にかかわらず、宿主細胞に組換え核酸配列が存在することを確認するために、様々なアッセイが実施され得る。そのようなアッセイとしては、例えば、当業者に周知の「分子生物学的」アッセイ、例えば、サザンブロット及びノーザンブロット、ＲＴ－ＰＣＲ及びＰＣＲ、例えば免疫学的手段（ＥＬＩＳＡ及びウエスタンブロット）又は当業者に公知の他のアッセイによって、特定のペプチドの存在又は非存在を検出するなどの「生化学的」アッセイが挙げられる。

【０１０６】

一実施形態では、本発明は、ヒトナンセンスＣＦ細胞培養モデルにおけるＣＦＴＲｍＲＮＡ発現及びチャネル機能を救済するための、ＭＣ及びＣＥＤＴをコードするＡＣＥ－ｔＲＮＡの有効性を記載する。例えば、ＭＣ及びＣＥＤＴをコードするＡＣＥ－ｔＲＮＡをｐに送達した後、ｐ．Ｇ５４２Ｘ、ｐ．Ｒ１１６２Ｘ、ｐ．Ｗ１２８２Ｘ　１６ＨＢＥ１４ｏｅ－細胞、ＮＭＤからのＣＦＴＲ　ｍＲＮＡ発現のレスキューをｑＰＣＲによって判定し、ＣＦＴＲ機能をＵｓｓｉｎｇチャンバー記録によって評価する。また、（１）転写増強５’リーダー配列（ＴＥＬＳ）のライブラリーを使用してＡＣＥ－ｔＲＮＡ発現を増加させること、及び（２）ＤＮＡターゲティング配列（ＤＴＳ）のライブラリーを使用して核ターゲティング及び転写バイオアベイラビリティを増加させることを含む、いくつかの方法によってミニベクター治療能力を増強することも開示される。

【０１０７】

したがって、本発明のＤＮＡミニベクター（ＭＣ又はＣＥＤＴのいずれか）は、プロモーター及びアンチコドン編集ｔＲＮＡをコードする核酸配列を含む。ＤＮＡミニベクターは、ＴＥＬＳ、ＤＴＳ、ＡＢＳ及びレポーター核酸配列からなる群から選択される１つ又は２つ又は３つ又は４つのＤＮＡ配列をさらに含む。

【０１０８】

一実施形態では、ＤＮＡミニベクターは、プロモーター、アンチコドン編集ｔＲＮＡをコードする配列、及びＴＥＬＳを含む。

【０１０９】

一実施形態では、ＤＮＡミニベクターは、プロモーター、アンチコドン編集ｔＲＮＡをコードする配列、ＴＥＬＳ及びＤＴＳを含む。

【０１１０】

一実施形態では、ＤＮＡミニベクターは、プロモーター、アンチコドン編集ｔＲＮＡをコードする配列、ＴＥＬＳ、ＤＴＳ及びＡＢＳを含む。

【０１１１】

一実施形態では、ＤＮＡミニベクターは、プロモーター、アンチコドン編集ｔＲＮＡをコードする配列、ＴＥＬＳ、ＤＴＳ、ＡＢＳ及びレポーター配列を含む。

【０１１２】

本明細書に記載のＤＮＡミニベクターのいずれかにおいて、ＤＮＡミニベクターはＭＣである。

【０１１３】

本明細書に記載のＤＮＡミニベクターのいずれかにおいて、ＤＮＡミニベクターはＣＥＤＴである。

【０１１４】

別の実施形態では、本発明は、ｐ．Ｇ５４２Ｘ－ＣＦＴＲ及びｐ．Ｗ１２８２Ｘ－ＣＦＴＲマウスの気道上皮におけるプラスミド、ＭＣ及びＣＥＤＴＳをコードするＡＣＥ－ｔＲＮＡによるナンセンス抑制の有効性及び持続性を記載する。ｃＤＮＡプラスミドＭＣ及びＣＥＤＴを発現するＡＣＥ－ｔＲＮＡを、電場を使用し、野生型ｐ．Ｇ５４２Ｘ－ＣＦＴＲ及びｐ．Ｗ１２８２Ｘ－ＣＦＴＲマウスの肺に送達することができる。定常状態のＣＦＴＲｍＲＮＡの発現は、免疫蛍光法（ＩＦ）及びウエスタンブロット（ＷＢ）によってｑＰＣＲ及びＣＦＴＲタンパク質によって測定することができる。ベクターの細胞特異的送達は、解剖された肺セグメントにおける蛍光ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）によって判定することができる。エンドポイントは、単回送達後４２日まで評価することができる。ベクターからのＡＣＥ－ｔＲＮＡ発現の持続性は、７日、１４日及び１、２、６及び１２ヶ月でのＰＴＣレポーターベクターのその後の送達及びＡＣＥ－ｔＲＮＡバーコード配列のｑＰＣＲによって野生型マウスの肺において定量することができる。

【０１１５】

さらに別の実施形態では、本発明は、他のより大きな実験動物の肺への送達後のＭＣ及びＣＥＤＴにコードされるＡＣＥ－ｔＲＮＡの効率及び持続性を記載する。野生型動物は、電場パルスによってＭＣ及びＣＥＤＴを受け取ることができる。ＡＣＥ－ｔＲＮＡ発現の持続性及び送達の肺マッピングを、ＰＴＣレポーターベクターのその後の送達、並びに蛍光ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）及び免疫蛍光（ＩＦ）と対になったＡＣＥ－ｔＲＮＡバーコード配列のｑＰＣＲによって６ヶ月まで判定することができる。

【０１１６】

疾患の状態及び治療方法

本開示の特定の実施形態は、本明細書に記載の治療剤（例えば、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ）をコードするベクターを哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物（ヒトなど）におけるＰＴＣに関連する疾患又は障害を治療する方法を提供する。本開示の特定の実施形態は、哺乳動物において疾患を治療するのに有用な医薬品を調製するための、本明細書に記載の治療剤又は治療剤をコードするベクターの使用を提供する。

【０１１７】

ＰＴＣに関連する疾患又は障害には、ジストロフィン中のＰＴＣによるデュシェンヌ型筋ジストロフィー及びベッカー型筋ジストロフィー、ＲＢＩ中のＰＴＣによる網膜芽細胞腫、ＮＦ１又はＮＦ２中のＰＴＣによる神経線維腫症、ＡＴＭ中のＰＴＣによる毛細管拡張性運動失調、ＨＥＸＡ中のＰＴＣによるテイ・サックス病、ＣＦＴＲ中のＰＴＣによる嚢胞性線維症、ＷＴ１中のＰＴＣによるウィルムス腫瘍、第ＶＩＩＩ因子中のＰＴＣによる血友病Ａ、第ＩＸ因子中のＰＴＣによる血友病Ｂ、ｐ５３中のＰＴＣによるｐ５３関連がん、メンケス病、ウルリッヒ病、ベータグロビン中のＰＴＣによるβサラセミア、ウィルブランド因子中のＰＴＣによる２Ａ型及び３型フォン・ヴィレブランド病、ロビノウ症候群短指症Ｂ型（指及び中手骨の短縮）、ＩＦＮＧＲ１におけるＰＴＣに起因するマイコバクテリア感染に対する遺伝的感受性、ＣＲＸにおけるＰＴＣに起因する遺伝性網膜疾患、凝固因子Ｘにおけるに起因する遺伝性出血傾向、ロドプシンにおけるＰＴＣに起因する遺伝性失明、ＳＯＸ１０におけるＰＴＣに起因する先天性神経感覚消失及び結腸無神経変性、並びにＳＯＸ１０におけるＰＴＣに起因する神経感覚消失、結腸無神経変性、末梢神経障害及び中枢性ミエリン形成異常性白質ジストロフィーを含む遺伝性神経発達障害、リドル症候群、色素性乾皮症、ファンコーニ貧血、貧血、甲状腺機能低下症、ｐ５３関連（例えば、ｐ５３扁平上皮癌、ｐ５３肝細胞癌、ｐ５３卵巣癌）、食道癌、骨癌、卵巣癌、肝細胞癌、乳癌、肝細胞癌、線維性組織球腫、卵巣癌、ＳＲＹ性転換、トリオースリン酸イソメラーゼ貧血、糖尿病及びくる病、その他多数のバリアントが含まれるが、こ

れらに限定されない。一実施形態における本発明は、本発明のＡＣＥ－ｔＲＮＡの導入によってナンセンス突然変異に関連する、存在する突然変異の効果を逆転させることによって、嚢胞性線維症を治療するための組成物及び方法を含む。さらなる障害には、ハーラー症候群、ドラベ症候群、脊髄性筋ジストロフィー、アッシャー症候群、無虹彩症、コロイデレミア、眼性コロボマ、網膜色素変性症、栄養障害性表皮水疱症、シュードキサントーマ・エラスチカム、アラジル症候群、ワールデンバー・シャー、乳児神経セロイドリポフスチン症、シスチノーシス、Ｘ連鎖腎性尿崩症及び多発性嚢胞腎疾患が含まれる。

【０１１８】

本明細書に記載のＤＮＡ分子及び方法によって治療することができるＰＴＣに関連する疾患又は障害には、いくつかの眼疾患も含まれる。特定の変異を有する疾患及び遺伝子の例としては、以下のものが挙げられる。

錐体ジストロフィー（シュタルガルト病（ＳＴＧＤ１）、錐体杆体ジストロフィー、網膜色素変性症（ＲＰ）、及び加齢黄斑変性に対する感受性の増加）：ＫＣＮＶ２　Ｇｌｕ１４３Ｘ、ＫＣＮＶ２　Ｇｌｕ３０６Ｘ、ＫＣＮＶ２　Ｇｌｎ７６Ｘ、ＫＣＮＶ２　Ｇｌｕ１４８Ｘ、ＣＡＣＮＡ２Ｄ４、Ｔｙｒ８０２Ｘ、ＣＡＣＮＡ２Ｄ４、Ａｒｇ６２８Ｘ、ＲＰ２、Ａｒｇ１２０Ｘ、Ｒｈｏ、Ｓｅｒ３３４Ｘ、Ｒｐｅ６５、Ａｒｇ４４Ｘ、ＰＤＥ６Ａ、Ｌｙｓ４５５Ｘ；

先天性停止性夜盲２（ＣＳＮＢ２）：ＣＡＣＮＡ１Ｆ、Ａｒｇ９５８Ｘ、ＣＡＣＮＡ１Ｆ、Ａｒｇ８３０Ｘ

先天性停止性夜盲１（ＣＳＮＢ１）：ＴＲＰＭ１、Ｇｌｎ１１Ｘ、ＴＲＰＭ１、Ｌｙｓ２９４Ｘ、ＴＲＰＭ１、Ａｒｇ９７７Ｘ、ＴＲＰＭ１、Ｓｅｒ８８２Ｘ、ＮＹＸ、Ｗ３５０Ｘ

ベスト病又は、ＢＶＭＤ、ＢＥＳＴ１、Ｔｙｒ２９Ｘ、ＢＥＳＴ１、Ａｒｇ２００Ｘ、ＢＥＳＴ１、Ｓｅｒ５１７Ｘ

レーバー先天性黒内障（ＬＣＡ）：ＫＣＮＪ１３、Ｔｒｐ５３Ｘ、ＫＣＮＪ１３、Ａｒｇ１６６Ｘ、ＣＥＰ２９０、Ａｒｇ１５１Ｘ、ＣＥＰ２９０、Ｇｌｙ１８９０Ｘ、ＣＥＰ２９０、Ｌｙｓ１５７５Ｘ、ＣＥＰ２９０、Ａｒｇ１２７１Ｘ、ＣＥＰ２９０、Ａｒｇ１７８２Ｘ、ＣＲＢ１、Ｃｙｓ１３３２Ｘ、ＧＵＣＹ２Ｄ、Ｓｅｒ４４８Ｘ、ＧＵＣＹ２Ｄ、Ａｒｇ４１０９１Ｘ、ＬＣＡ５、Ｇｌｎ２７９Ｘ、ＲＤＨ１２、Ｔｙｒ１９４Ｘ、ＲＤＨ１２、Ｇｌｕ２７５Ｘ、ＳＰＡＴＡ７、Ａｒｇ１０８Ｘ、ＴＵＬＰ１、Ｇｌｎ３０１Ｘ；

アッシャー症候群１：ＵＳＨ１Ｃ、Ａｒｇ３１Ｘ、ＰＣＤＨ１５、Ａｒｇ３Ｘ、ＰＣＤＨ１５、Ａｒｇ２４５Ｘ、ＰＣＤＨ１５、Ａｒｇ６４３Ｘ、ＰＣＤＨ１５、Ａｒｇ９２９Ｘ、ＩＱＣＢ１、Ａｒｇ４６１Ｘ、ＩＱＣＢ１、Ａｒｇ４８９Ｘ、ＰＤＥ６Ａ、Ｇｌｎ６９Ｘ、ＡＬＭＳ１、Ｓｅｒ９９９Ｘ、ＡＬＭＳ１、Ａｒｇ３８０４Ｘ；

無虹彩症：Ｐａｘ６、Ｇｌｙ１９４Ｘ

眼コロボマ：Ｐａｘ２、Ａｒｇ１３９Ｘ、Ｌａｍｂ１、Ａｒｇ５２４Ｘ

コロイデレミア：ＲＥＰ１、Ｇｌｎ３２Ｘ

【０１１９】

一態様によれば、哺乳動物レシピエントにおいて治療剤を発現させるための細胞発現システムが提供される。発現システム（本明細書では、「遺伝子組換え細胞」とも呼ばれる）は、細胞と、治療剤を発現させるための発現ベクターとを含む。発現ベクターには、ウイルス、プラスミド、及び異種遺伝物質を細胞に送達するための他のビヒクルが含まれるが、これらに限定されない。したがって、本明細書で使用される「発現ベクター」という用語は、異種遺伝物質を細胞に送達するためのビヒクルを指す。特に、発現ベクターはＣＥＤＴ又はＭＣミニベクターである。発現ベクターの他の例としては、組換えアデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、又はレンチウイルス若しくはレトロウイルスベクターが挙げられる。

【０１２０】

発現ベクターは、異種遺伝子の転写を制御するためのプロモーターをさらに含む。プロ

モーターは、誘導性プロモーターであり得る。発現システムは、哺乳動物レシピエントへの投与に適合している。発現システムは、複数の不死化されていない遺伝子改変細胞を含み得、各細胞は、少なくとも１つの治療剤をコードする少なくとも１つの組換え遺伝子を含む。

【０１２１】

細胞発現システムは、ｉｎ　ｖｉｖｏで形成され得る。さらに別の態様によれば、哺乳動物レシピエントをｉｎ　ｖｉｖｏで治療するための方法が提供される。この方法は、異種遺伝子産物を発現させるための発現ベクターを、例えば静脈内投与によって、ｉｎ　ｓｉｔｕで患者の細胞に導入することを含む。ｉｎ　ｖｉｖｏで発現システムを形成するために、治療剤を発現させるための発現ベクターをｉｎ　ｖｉｖｏで哺乳動物レシピエントに静注で導入する。

【０１２２】

さらに別の態様によれば、哺乳動物レシピエントをｉｎ　ｖｉｖｏで治療するための方法が提供される。この方法は、標的治療剤をｉｎ　ｖｉｖｏで患者に導入することを含む。異種遺伝子を発現させるための発現ベクターは、異種遺伝子産物の転写を制御するための誘導性プロモーターを含み得る。したがって、ｉｎ　ｓｉｔｕでの治療剤の送達は、細胞を、異種遺伝子の転写を誘導する条件にｉｎ　ｓｉｔｕで曝露することによって制御される。

【０１２３】

本開示は、ＡＣＥ－ｔＲＮＡをコードする発現ベクターを細胞又は患者に投与することによって、対象（例えば、哺乳動物）の疾患を治療する方法を提供する。遺伝子治療の方法について、分子生物学及び遺伝子治療の当業者は、過度の実験をすることなく、本開示の新規方法で使用される発現ベクターの適切な投与量及び投与経路を判定することができるであろう。

【０１２４】

ある特定の実施形態において、本明細書に記載される作用物質及び方法は、ＰＴＣによって引き起こされる疾患の治療／管理のために使用され得る。例としては、デュシェンヌ－ベッカー型筋ジストロフィー、網膜芽細胞腫、神経線維腫症、毛細血管拡張性運動失調症、テイ・サックス病、嚢胞性線維症、ウィルムス腫瘍、血友病Ａ、血友病Ｂ、メンケス病、ウルリッヒ病、βサラセミア、２Ａ型及び３型フォン・ヴィレブランド病、ロビノウ症候群、短指症Ｂ型（指及び中手骨の短縮）、マイコバクテリア感染に対する遺伝的感受性、遺伝性網膜疾患、遺伝性出血傾向、遺伝性失明、先天性神経感覚消失及び結腸無神経変性、並びに神経感覚消失、結腸無神経変性、末梢神経障害及び中枢性ミエリン形成異常性白質ジストロフィーを含む遺伝性神経発達障害、リドル症候群、色素性乾皮症、ファンコーニ貧血、貧血、甲状腺機能低下症、ｐ５３関連がん（例えば、ｐ５３扁平上皮癌、ｐ５３肝細胞癌、ｐ５３卵巣癌）、食道癌、骨癌、卵巣癌、肝細胞癌、乳癌、肝細胞癌、線維性組織球腫、卵巣癌、ＳＲＹ性転換、トリオースリン酸イソメラーゼ貧血、糖尿病及びくる病、その他多数の変異体が含まれるが、これらに限定されない。この治療法は、改良された終止コドン抑制特異性をもたらすという点で有利である。本発明の治療用ＡＣＥ－ｔＲＮＡは、特定の終止コドン、例えばＴＧＡを標的とし、したがって、疾患に無関係な終止コドンでのオフターゲット効果を減少させる。本療法はまた、アミノ酸特異性をもたらすという点で有利である。発現されたｔＲＮＡは、疾患終止コドンの挿入によって失われたアミノ酸を特異的に置換するように操作され、したがってタンパク質の安定性、折り畳み及び輸送に対するいかなる偽の影響も打ち消される。

【０１２５】

特定の実施形態では、本システムはモジュール式であり、したがってあらゆる可能性のある疾患ＰＴＣに「パーソナル化」することができる。例えば、Ｔｒｐシンテターゼによって認識されるヒトゲノムには９つの個々のトリプトファンｔＲＮＡが存在し、それらのすべてがｍＲＮＡ　ＵＧＧコドンを抑制する。したがって、これらの９つのＴｒｐ　ｔＲＮＡのそれぞれは、コドン再編集耐性（ＵＧＧ→ＵＧＡ）の機会を提供する。さらに、遺

伝暗号中の終止コドンに近接していることを考えると、アルギニンコドンのＰＴＣナンセンスコドンへの変異は疾患において一般的である。コドン編集耐性及び抑制の有効性について試験することができる３０を超えるＡｒｇ　ｔＲＮＡが存在する。アルギニンをコードするＡＣＥ－ｔＲＮＡは、遺伝子にかかわらず、すべてのＡｒｇ→ＰＴＣ変異に対して実行可能な治療薬である。実際、ＬＣＡの３５％はナンセンス突然変異によって引き起こされ、その大部分は終止するアルギニンである。本発明のさらなる利点は、システム全体（ｔＲＮＡ＋プロモーター配列）がコンパクトであるため、容易な発現及び細胞特異的送達を提供することである。

【０１２６】

製剤

本発明に従って産生されたベクター又は別の形態のＤＮＡが十分な量で生成及び精製されると、本発明の方法は、ＤＮＡ組成物、例えば治療用ＤＮＡ組成物としてのその製剤をさらに含み得る。治療用ＤＮＡ組成物は、上記の種類の治療用ＤＮＡ分子を含む。そのような組成物は、所望の経路による投与に適合した形態の治療的有効量のＤＮＡ、例えば、経口、粘膜又は局所投与に適したエアロゾル、注入可能な組成物又は製剤を含むことができる。

【０１２７】

従来の薬学的調製物としてのＤＮＡの製剤化は、当業者に利用可能な標準的な薬学的製剤化学及び方法論を使用して行うことができる。任意の薬学的に許容される担体又は添加物が使用され得る。湿潤剤又は乳化剤、ｐＨ緩衝物質などの補助物質が添加物又はビヒクル中に存在してもよい。これらの添加物、ビヒクル及び補助物質は、一般に、過度の毒性なしに投与することができ、ワクチン組成物の場合、組成物を受けている個体において免疫応答を誘導しない医薬剤である。適切な担体はリポソームであり得る。

【０１２８】

薬学的に許容される添加物には、水、生理食塩水、ポリエチレングリコール、ヒアルロン酸、グリセロール及びエタノールなどの液体が含まれるが、これらに限定されない。薬学的に許容される塩、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、ホスフェート、硫酸塩などの鉱酸塩、及び酢酸塩、プロピオナート、マロン酸塩、ベンゾエートなどの有機酸の塩も含まれ得る。必須ではないが、調製物が組成物に含まれる場合、特にペプチド、タンパク質又は他の同様の分子のための安定剤として働く薬学的に許容される添加物を含むことも好ましい。ペプチドの安定剤としても作用する適切な担体の例としては、限定されないが、医薬グレードのデキストロース、スクロース、ラクトース、トレハロース、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、デキストランなどが挙げられる。他の適切な担体としては、やはり限定されないが、デンプン、セルロース、リン酸ナトリウム又はリン酸カルシウム、クエン酸、酒石酸、グリシン、高分子量ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、及びそれらの組み合わせが挙げられる。薬学的に許容される添加物、ビヒクル及び補助物質の完全な考察は、ＲＥＭＩＮＧＴＯＮ’Ｓ　ＰＨＡＲＭＡＣＥＵＴＩＣＡＬ　ＳＣＩＥＮＣＥＳ（Ｍａｃｋ　Ｐｕｂ．Ｃｏ．，Ｎ．Ｊ．１９９１）で入手でき、参照により本明細書に取込まれる。

【０１２９】

本発明の薬剤（例えば、ミニベクター）は、遺伝性疾患（例えば、嚢胞性線維症）に関連する少なくとも１つの症状の軽減をもたらすように投与することができる。投与される量は、選択される組成物、特定の疾患、体重、身体状態、及び対象の年齢、並びに予防又は治療が達成されるべきかどうかを含むがこれらに限定されない様々な要因に応じて変化する。そのような因子は、動物モデル又は当技術分野で周知の他の試験系を使用する臨床医によって容易に判定することができる。

【０１３０】

本発明は、本発明に開示される薬剤、例えばＡＣＥ－ｔＲＮＡ又は発現ベクターの投与によってＰＴＣに関連する疾患又は障害を治療することを想定している。本発明による治療剤の投与は、例えば、レシピエントの生理的状態、投与の目的が治療的であるか予防的

であるか、及び当業者に公知の他の因子に応じて、連続的又は断続的であり得る。本発明の薬剤の投与は、予め選択された期間にわたって本質的に連続的であってもよく、又は一連の間隔を空けた用量であってもよい。局所投与及び全身投与の両方が企図される。

【０１３１】

本発明の治療剤（１つ又は複数）を有する１つ又は複数の適切な単位投与形態は、後述するように、場合により持続放出のために製剤化することができ（例えば、マイクロカプセル化を使用して）、静脈内及び筋肉内経路を含む非経口を含む様々な経路によって、並びに疾患組織への直接注入によって投与することができる。製剤は、適切な場合には、別個の単位投与形態で簡便には提示され得、薬学的に周知の方法のいずれかによって調製され得る。そのような方法は、治療剤を液体担体、固体マトリックス、半固体担体、微粉固体担体又はそれらの組み合わせと会合させ、次いで、必要に応じて、産生物を所望の送達システムに導入又は成形するステップを含み得る。

【０１３２】

本発明の治療剤を投与のために調製する場合、それらを薬学的に許容される担体、希釈剤又は添加物と組み合わせて薬学的製剤又は単位投与形態を形成することができる。そのような製剤中の全活性成分は、製剤の０．１～９９．９重量％を含む。薬学的に許容される担体は、製剤の他の成分と適合性であり、そのレシピエントに有害ではない担体、希釈剤、添加物及び／又は塩であり得る。投与のための有効成分は、粉末又は顆粒として溶液、懸濁液又はエマルジョンとして、存在し得る。

【０１３３】

本発明の治療剤を含有する薬学的製剤は、周知の容易に入手可能な成分を使用して、当技術分野で公知の手順によって調製することができる。本発明の治療剤はまた、例えば筋肉内、皮下又は静脈内経路による非経口投与に適切な溶液として製剤化することができる。本発明の治療剤の薬学的製剤はまた、水性若しくは無水の溶液若しくは分散体の形態、又は代替的にエマルジョン若しくは懸濁液の形態をとることができる。

【０１３４】

したがって、治療剤は、非経口投与（例えば、注入、例えばボーラス注入又は連続的注入による）のために製剤化されてもよく、アンプル、プレフィルドシリンジ、小容量点滴容器、又は防腐剤が添加された複数回投与容器に単位用量形態で提供されてもよい。活性成分は、油性又は水性ビヒクル中の懸濁液、溶液又はエマルジョンなどの形態をとることができ、懸濁化剤、安定化剤及び／又は分散剤などの調合剤を含有することができる。あるいは、活性成分は、使用前に適切なビヒクル、例えば滅菌パイロジェンフリー水で構成するために、滅菌固体の無菌の単離又は溶液からの凍結乾燥によって得られる粉末形態であってもよい。

【０１３５】

各剤形の個々のエアロゾル用量に含まれる１つ又は複数の活性成分の単位含有量は、複数の剤形の投与によって必要な有効量に達することができるので、それ自体が特定の適応症又は疾患を治療するための有効量を構成する必要はないことが理解されよう。さらに、有効量は、個別に、又は一連の投与のいずれかで、剤形の用量より少なく使用して達成され得る。

【０１３６】

本発明の薬学的製剤は、任意の成分として、薬学的に許容される担体、希釈剤、可溶化剤又は乳化剤、及び当技術分野で周知の種類の塩を含み得る。本発明の薬学的製剤に有用な担体及び／又は希釈剤の具体的な非限定的な例としては、水及び生理的に許容される緩衝生理食塩水、例えばリン酸緩衝生理食塩水ｐＨ７．０～８．０及び水が挙げられる。

【０１３７】

ナノ粒子組成物

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される薬学的組成物は、国際公開第２０２０２６３８８３号、国際公開第２０１３１２３５２３号パンフレット、国際公開第２０１２１７０９３０号パンフレット、国際公開第２０１１１２７２５５号パンフレット、及び国

際公開第２００８１０３２７６号パンフレット、並びに米国特許出願公開第２０１３０１７１６４６号明細書に記載されているものなどの脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）として製剤化されており、これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。したがって、本開示は、（ｉ）送達剤を含む脂質組成物、及び（ｉｉ）少なくとも１つの核酸、例えばＡＣＥ－ｔＲＮＡ又はＡＣＥ－ｔＲＮＡをコードするＤＮＡ、例えばＭＣ又はＣＥＤＴを含むナノ粒子組成物を提供する。そのようなナノ粒子組成物では、本明細書に開示される脂質組成物は、核酸をカプセル化することができる。

【０１３８】

ナノ粒子組成物は、典型的にはマイクロメートル以下程度のサイズであり、脂質二重層を含むことができる。ナノ粒子組成物は、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）、リポソーム（例えば、脂質ベシクル）、及びリポプレックスを包含する。例えば、ナノ粒子組成物は、５００ｎｍ以下の直径を有する脂質二重層を有するリポソームであり得る。

【０１３９】

ナノ粒子組成物には、例えば、脂質ナノ粒子、リポソーム、及びリポプレックスが含まれる。いくつかの実施形態では、ナノ粒子組成物は、１つ以上の脂質二重層を含むベシクルである。特定の実施形態では、ナノ粒子組成物は、水性区画によって分離された２つ以上の同心二重層を含む。脂質二重層は、互いに官能化及び／又は架橋され得る。脂質二重層は、１つ以上のリガンド、タンパク質、又はチャネルを含むことができる。

【０１４０】

一実施形態では、脂質ナノ粒子は、イオン化可能な脂質、構造脂質、リン脂質、及び目的の核酸を含む。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、イオン化可能な脂質、ＰＥＧ修飾脂質、ステロール及び構造脂質を含む。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、約２０～６０％のイオン化可能な脂質、約５～２５％の構造脂質、約２５～５５％のステロール、及び約０．５～１５％のＰＥＧ修飾脂質のモル比を有する。

【０１４１】

いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、０．４未満の多分散性値を有する。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、中性ｐＨで正味の中性電荷を有する。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは５０～１５０ｎｍの平均直径を有する。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは８０～１００ｎｍの平均直径を有する。

【０１４２】

本明細書全体で定義されるように、「脂質」という用語は、疎水性又は両親媒性特性を有する小分子を指す。脂質は、天然に存在するものであってもよく、又は合成のものであってもよい。脂質のクラスの例としては、脂肪、ワックス、ステロール含有代謝産物、ビタミン、脂肪酸、グリセロ脂質、グリセロリン脂質、スフィンゴ脂質、サッカロ脂質及びポリケチド、並びにプレノール脂質が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの例では、いくつかの脂質の両親媒性により、それらは水性媒体中でリポソーム、ベシクル又は膜を形成する。

【０１４３】

いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、イオン化可能な脂質を含み得る。本明細書で使用される場合、「イオン化可能な脂質」という用語は、当技術分野におけるその通常の意味を有し、１つ以上の荷電した部分を含む脂質を指し得る。いくつかの実施形態では、イオン化可能な脂質は、正に荷電していても負に荷電していてもよい。イオン化可能な脂質は正に荷電していてもよく、その場合、「カチオン性脂質」と呼ぶことができる。特定の実施形態では、イオン化可能な脂質分子は、アミン基を含み得、イオン化可能なアミノ脂質と呼ばれ得る。本明細書で使用される場合、「荷電した部分」は、例えば、一価（＋１、又は１）、二価（＋２、又は２）、三価（＋３、又は３）などの形式的な電子電荷を有する化学的部分である。荷電した部分は、アニオン性（すなわち、負に荷電している）又はカチオン性（すなわち、正に荷電している）であり得る。正に荷電した部分の例としては、アミン基（例えば、第一級、第二級及び／又は第三級アミン）、アンモニウム基、ピリジニウム基、グアニジン基、及びイミジゾリウム基が挙げられる。特定の実施形態

では、荷電した部分はアミン基を含むことができる。負に荷電した基又はその前駆体の例としては、カルボキシレート基、スルホネート基、硫酸塩基、ホスホネート基、ホスフェート基、ヒドロキシル基などが挙げられる。荷電した部分の電荷は、場合によっては、環境条件によって変化し得、例えば、ｐＨの変化は、部分の電荷を変化させ得、及び／又は部分を荷電又は非荷電にし得る。一般に、分子の電荷密度は、所望するように選択され得る。

【０１４４】

いくつかの実施形態では、イオン化可能な脂質は、当技術分野で「イオン化可能なカチオン性脂質」と呼ばれることもあるイオン化可能なアミノ脂質である。一実施形態では、イオン化可能なアミノ脂質は、リンカー構造を介して接続された正に荷電した親水性頭部及び疎水性尾部を有し得る。これらに加えて、イオン化可能な脂質は、環状アミン基を含む脂質であってもよい。一実施形態では、イオン化可能な脂質は、国際公開第２０１３０８６３５４号パンフレット及び国際公開第２０１３１１６１２６号パンフレットに記載されているイオン化可能な脂質から選択されてもよいが、これらに限定されず、その各々の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。さらに別の実施形態では、イオン化可能な脂質は、米国特許第７，４０４，９６９号明細書の式ＣＬＩ－ＣＬＸＸＸＩＩから選択され得るが、これらに限定されず、その各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【０１４５】

一実施形態では、脂質は、その全体が参照により組み込まれる国際公開第２０１２１７０８８９号パンフレットに記載されているものなどの、切断可能な脂質であり得る。一実施形態では、脂質は、当技術分野で公知の方法によって、及び／又は国際公開第２０１３０８６３５４号パンフレットに記載されているように、合成することができ、その各々の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【０１４６】

ナノ粒子組成物は、様々な方法によって特徴付けることができる。例えば、顕微鏡法（例えば、透過型電子顕微鏡法又は走査電子顕微鏡）を使用して、ナノ粒子組成物の形態及びサイズ分布を調べることができる。ゼータ電位を測定するために、動的光散乱又は電位差測定（例えば、電位差滴定）を使用することができる。動的光散乱を利用して粒径を判定することもできる。Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ　Ｎａｎｏ　ＺＳ（Ｍａｌｖｅｒｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ　Ｌｔｄ，Ｍａｌｖｅｒｎ、ウスターシャー、英国）などの機器を使用して、粒径、多分散指数、及びゼータ電位などのナノ粒子組成物の複数の特性を測定することもできる。ナノ粒子のサイズは、限定されないが、炎症などの生物学的反応に対抗するのを助けることができ、又はポリヌクレオチドの生物学的効果を増加させることができる。本明細書で使用される場合、ナノ粒子組成物の文脈における「サイズ」又は「平均サイズ」は、ナノ粒子の平均直径を指す。

【０１４７】

一実施形態では、本明細書に記載の核酸は、約１０～約１００ｎｍの直径を有する脂質ナノ粒子に製剤化することができる。一実施形態では、ナノ粒子は、約１０～５００ｎｍの直径を有する。一実施形態では、ナノ粒子は、１００ｎｍを超える直径を有する。いくつかの実施形態では、ナノ粒子組成物の最大寸法は、１μｍ又はそれより短いもの（例えば、１μｍ、９００ｎｍ、８００ｎｍ、７００ｎｍ、６００ｎｍ、５００ｎｍ、４００ｎｍ、３００ｎｍ、２００ｎｍ、１７５ｎｍ、１５０ｎｍ、１２５ｎｍ、１００ｎｍ、７５ｎｍ、５０ｎｍ、又はそれより短いもの）である。

【０１４８】

ナノ粒子組成物は、比較的均質であり得る。多分散指数を使用して、ナノ粒子組成物の均一性、例えばナノ粒子組成物の粒径分布を示すことができる。小さな（例えば、０．３未満）多分散指数は、一般に、狭い粒径分布を示す。ナノ粒子組成物は、約０～約０．２５、例えば０．０１、０．０２、０．０３、０．０４、０．０５、０．０６、０．０７、０．０８、０．０９、０．１０、０．１１、０．１２、０．１３、０．１４、０．１５、

０．１６、０．１７、０．１８、０．１９、０．２０、０．２１、０．２２、０．２３、０．２４又は０．２５の多分散指数を有することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるナノ粒子組成物の多分散指数は、約０．１０～約０．２０であり得る。

【０１４９】

ナノ粒子組成物のゼータ電位を使用して、組成物の動電電位を示すことができる。例えば、ゼータ電位は、ナノ粒子組成物の表面電荷を表すことができる。より高次に荷電した種が体内の細胞、組織、及び他のエレメントと望ましくなく相互作用する可能性があるため、正又は負である相対的に低い電荷を有するナノ粒子組成物が、概して望ましい。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるナノ粒子組成物のゼータ電位は、約－１０ｍＶ～約＋２０ｍＶ、約－１０ｍＶ～約＋１５ｍＶ、約１０ｍＶ～約＋１０ｍＶ、約－１０ｍＶ～約＋５ｍＶ、約－１０ｍＶ～約０ｍＶ、約－１０ｍＶ～約－５ｍＶ、約－５ｍＶ～約＋２０ｍＶ、約－５ｍＶ～約＋１５ｍＶ、約－５ｍＶ～約＋１０ｍＶ、約－５ｍＶ～約＋５ｍＶ、約－５ｍＶ～約０ｍＶ、約０ｍＶ～約＋２０ｍＶ、約０ｍＶ～約＋１５ｍＶ、約０ｍＶ～約＋１０ｍＶ、約０ｍＶ～約＋５ｍＶ、約＋５ｍＶ～約＋２０ｍＶ、約＋５ｍＶ～約＋約＋１５ｍＶ、又は約＋５ｍＶ～＋１０ｍＶであり得る。

【０１５０】

核酸／ポリヌクレオチドの「カプセル化効率」という用語は、供給される初期の量に対して、調製後にナノ粒子組成物によってカプセル化されるか、そうでなければ会合される核酸／ポリヌクレオチドの量を表す。本明細書で使用される場合、「カプセル化」は、完全な、実質的な、又は部分的な封入、閉じ込め、包囲、又は囲い込みを指すことができる。カプセル化効率は高いことが望ましい（例えば、１００％に近い）。カプセル化効率は、例えば、ナノ粒子組成物を分割する前後のナノ粒子組成物を含有する溶液の核酸／ポリヌクレオチドの量を、１つ以上の有機溶媒又は界面活性剤と比較することによって、測定することができる。

【０１５１】

蛍光を使用して、溶液の遊離ポリヌクレオチドの量を測定することができる。本明細書に記載のナノ粒子組成物の場合、核酸／ポリヌクレオチドのカプセル化効率は、少なくとも５０％、例えば５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％であり得る。いくつかの実施形態では、カプセル化効率は、少なくとも８０％であり得る。特定の実施形態では、カプセル化効率は、少なくとも９０％であり得る。

【０１５２】

本明細書に開示される薬学的組成物に存在する核酸／ポリヌクレオチドの量は、核酸／ポリヌクレオチドのサイズ、所望の標的及び／又は用途、又はナノ粒子組成物の他の特性などの複数の因子、並びに核酸／ポリヌクレオチドの特性に依存し得る。例えば、ナノ粒子組成物に有用な核酸／ポリヌクレオチドの量は、核酸／ポリヌクレオチドのサイズ（長さ又は分子量として表される）、配列、及び他の特性に依存し得る。ナノ粒子組成物の核酸／ポリヌクレオチドの相対的な量も変化し得る。本開示の脂質ナノ粒子組成物の中に存在する脂質組成物及び核酸／ポリヌクレオチドの相対的な量は、有効性及び忍容性を考慮して最適化することができる。

【０１５３】

ナノ粒子組成物を提供することに加えて、本開示はまた、ポリヌクレオチドをカプセル化することを含む脂質ナノ粒子を産生する方法を提供する。そのような方法は、本明細書に開示される薬学的組成物のいずれかを使用すること、及び当技術分野で公知の脂質ナノ粒子の製造方法に従って脂質ナノ粒子を製造することを含む。例えば、Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．（２０１５）’’Ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ｗｉｔｈ ｌｉｐｉｄ ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ’’ Ａｄｖ．Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ．Ｒｅｖ．８７：６８－８０、Ｓｉｌｖａ ｅｔ ａｌ．（２０１５）’’Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｓｙｓｔｅｍｓ ｆｏｒ Ｂｉｏｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ．Ｐａｒｔ Ｉ：Ｎａ

noparticles and Microparticles’’ Curr. Pharm. Technol. １６：９４０－９５４、Naseri et al.（２０１５）’’Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers：Structure, Preparation and Application’’ Adv. Pharm. Bull. ５：３０５－１３、Silva et al.（２０１５）’’Lipid nanoparticles for the delivery of biopharmaceuticals’’ Curr. Pharm. Biotechnol. １６：２９１－３０２、及びそこに引用されている参考文献を参照されたい。

【０１５４】

脂質ナノ粒子製剤は、典型的には、１つ以上の脂質を含む。いくつかの実施形態では、脂質は、当技術分野で「イオン化可能なカチオン性脂質」と呼ばれることもあるイオン化可能な脂質（例えば、イオン化可能なアミノ脂質）である。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子製剤は、リン脂質、構造脂質、及び粒子凝集を減少させることができる分子、例えばＰＥＧ又はＰＥＧ修飾脂質を含む他の成分をさらに含む。

【０１５５】

例示的なイオン化可能な脂質としては、限定されないが、本明細書に開示される化合物１～３４２、ＤＬｉｎ－ＭＣ$_3$－ＤＭＡ（ＭＣ$_3$）、ＤＬｉｎ－ＤＭＡ、ＤＬｅｎＤＭＡ、ＤＬｉｎ－Ｄ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－Ｍ－Ｃ２－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＫＣ$_3$－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＫＣ４－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－Ｃ２Ｋ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＭＰ－ＤＭＡ、ＤＯＤＭＡ、９８Ｎ１２－５、Ｃ$_1$２－２００、ＤＬｉｎ－Ｃ－ＤＡＰ、ＤＬｉｎ－ＤＡＣ、ＤＬｉｎＤＡＰ、ＤＬｉｎＡＰ、ＤＬｉｎ－ＥＧ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－２－ＤＭＡＰ、ＫＬ１０、ＫＬ２２、ＫＬ２５、オクチル－ＣＬｉｎＤＭＡ、オクチル－ＣＬｉｎＤＭＡ（２Ｒ）、オクチル－ＣＬｉｎＤＭＡ（２Ｓ）、及びそれらの任意の組み合わせのいずれか１つが挙げられる。他の例示的なイオン化可能な脂質としては、（１３Ｚ，１６Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－ノニルドコサ－１３，１６－ジエン－１－アミン（Ｌ６０８）、（２０Ｚ，２３Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルノナコサ－２０，２３－ジエン－１０－アミン、（１７Ｚ，２０Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘキサコサ－１７，２０ジエン－９－アミン、（１６Ｚ，１９Ｚ）－Ｎ５Ｎ－ジメチルペンタコサ－１６，１９－ジエン－８－アミン、（１３Ｚ，１６Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルドコサ－１３，１６－ジエン－５－アミン、（１２Ｚ，１５Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘニコサ－１２，１５－ジエン－４－アミン、（１４Ｚ，１７Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルトリコサ－１４，１７－ジエン－６－アミン、（１５Ｚ，１８Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルテトラコサ－１５，１８－ジエン－７－アミン、（１８Ｚ，２１Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘプタコサ－１８，２１－ジエン－１０－アミン、（１５Ｚ，１８Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルテトラコサ－１５，１８－ジエン－５－アミン、（１４Ｚ，１７Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルトリコサ－１４，１７－ジエン－４－アミン、（１９Ｚ，２２Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルオクタコサ－１９，２２－ジエン－９－アミン、（１８Ｚ，２１Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘプタコサ－１８，２１－ジエン－８－アミン、（１７Ｚ，２０Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘキサコサ－１７，２０－ジエン－７－アミン、（１６Ｚ，１９Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルペンタコサ－１６，１９－ジエン－６－アミン、（２２Ｚ，２５Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘントリアコンタ－２２，２５－ジエン－１０－アミン、（２１Ｚ，２４Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルトリアコンタ－２１，２４－ジエン－９－アミン、（１８Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘプタコス－１８－エン－１０－アミン、（１７Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘキサコス－１７－エン－９－アミン、（１９Ｚ，２２Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルオクタコサ－１９，２２－ジエン－７－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチルヘプタコサン－１０－アミン、（２０Ｚ，２３Ｚ）－Ｎ－エチル－Ｎ－メチルノナコサ－２０，２３－ジエン－１０－アミン、１－［（１１Ｚ，１４Ｚ）－１－ノニルコサ－１１，１４－ジエン－１－イル］ピロリジン、（２０Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘプタコス－２０－エン－１０－アミン、（１５Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルエプタコス－１５－エン－１０－アミン、（１４Ｚ）－Ｎ，Ｎ

－ジメチルノナコス－１４－エン－１０－アミン、（１７Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルノナコス－１７－エン－１０－アミン、（２４Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルトリトリアコン－２４－エン－１０－アミン、（２０Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルノナコス－２０－エン－１０－アミン、（２２Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルヘントリアコン－２２－エン－１０－アミン、（１６Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルペンタコス－１６－エン－８－アミン、（１２Ｚ，１５Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－２－ノニルヘンニコサ－１２，１５－ジエン－１－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－オクチルシクロプロピル］エプタデカン－８－アミン、１－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－ヘキシルシクロプロピル］－Ｎ，Ｎ－ジメチルノナデカン－１０－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－オクチルシクロプロピル］ノナデカン－１０－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－２１－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－オクチルシクロプロピル］ヘニコサン－１０－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（１Ｓ，２Ｓ）－２－｛［（１Ｒ，２Ｒ）－２－ペンチルシクロプロピル］メチル｝シクロプロピル］ノナデカン－１０－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－オクチルシクロプロピル］ヘキサデカン－８－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－［（１Ｒ，２Ｓ）－２－ウンデシルシクロプロピル］テトラデカン－５－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－｛７－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－オクチルシクロプロピル］ヘプチル｝ドデカン－１－アミン、１－［（１Ｒ，２Ｓ）－２－ヘプチルシクロプロピル］－Ｎ，Ｎ－ジメチルオクタデカン－９－アミン、１－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－デシルシクロプロピル］－Ｎ，Ｎ－ジメチルペンタデカン－６－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－オクチルシクロプロピル］ペンタデカン－８－アミン、Ｒ－Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン、Ｓ－Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン、１－｛２－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］－１－［（オクチルオキシ）メチル］エチル｝ピロリジン、（２Ｓ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］－３－［（５Ｚ）－オクタ－５－エン－１－イルオキシ］プロパン－２－アミン、１－｛２－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］－１－［（オクチルオキシ）メチル］エチル｝アゼチジン、（２Ｓ）－１－（ヘキシルオキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－２－アミン、（２Ｓ）－１－（ヘプチルオキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－２－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－（ノニルオキシ）－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－２－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（９Ｚ）－オクタデカ－９－エン－１－イルオキシ］－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン；（２Ｓ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－［（６Ｚ，９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－６，９，１２－トリエン－１－イルオキシ］－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン、（２Ｓ）－１－［（１１Ｚ，１４Ｚ）－イコサ－１１，１４－ジエン－１－イルオキシ］－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－（ペンチルオキシ）プロパン－２－アミン、（２Ｓ）－１－（ヘキシルオキシ）－３－［（１１Ｚ，１４Ｚ）－イコサ－１１，１４－ジエン－１－イルオキシ］－Ｎ，Ｎ－ジメチルプロパン－２－アミン、１－［（１１Ｚ，１４Ｚ）－イコサ－１１，１４－ジエン－１－イルオキシ］－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン、１－［（１３Ｚ，１６Ｚ）－ドコサ－１３，１６－ジエン－１－イルオキシ］－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン、（２Ｓ）－１－［（１３Ｚ，１６Ｚ）－ドコサ－１３，１６－ジエン－１－イルオキシ］－３－（ヘキシルオキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルプロパン－２－アミン、（２Ｓ）－１－［（１３Ｚ）－ドコス－１３－エン－１－イルオキシ］－３－（ヘキシルオキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルプロパン－２－アミン、１－［（１３Ｚ）－ドコス－１３－エン－１－イルオキシ］－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン、１－［（９Ｚ）－ヘキサデカ－９－エン－１－イルオキシ］－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－（オクチルオ

キシ）プロパン－２－アミン、（２Ｒ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｈ（１－メトイルオクチル）オキシ］－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－２－アミン、（２Ｒ）－１－［（３，７－ジメチルオクチル）オキシ］－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－２－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－（オクチルオキシ）－３－（｛８－［（１Ｓ，２Ｓ）－２－｛［（１Ｒ，２Ｒ）－２－ペンチルシクロプロピル］メチル｝シクロプロピル］オクチル｝オキシ）プロパン－２－アミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－｛［８－（２－オクチルシクロプロピル）オクチル］オキシ｝－３－（オクチルオキシ）プロパン－２－アミン、及び（１１Ｅ，２０Ｚ，２３Ｚ）－Ｎ，Ｎ－ジメチルノナコサ－１１，２０，２－トリエン－１０－アミン、並びにそれらのいずれかの組み合わせを含む。

【０１５６】

リン脂質としては、限定されないが、グリセロリン脂質、例えば、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロール及びホスファチジン酸が挙げられる。リン脂質には、スフィンゴミエリンなどのホスホスフィンゴ脂質も含まれる。いくつかの実施形態では、リン脂質は、ＤＬＰＣ、ＤＭＰＣ、ＤＯＰＣ、ＤＰＰＣ、ＤＳＰＣ、ＤＵＰＣ、１８：０ジエチルエーテルＰＣ、ＤＬｎＰＣ、ＤＡＰＣ、ＤＨＡＰＣ、ＤＯＰＥ、４ＭＥ１６：０ＰＥ、ＤＳＰＥ、ＤＬＰＥ、ＤＬｎＰＥ、ＤＡＰＥ、ＤＨＡＰＥ、ＤＯＰＧ、及びそれらのいずれかの組み合わせである。いくつかの実施形態では、リン脂質は、ＭＰＰＣ、ＭＳＰＣ、ＰＭＰＣ、ＰＳＰＣ、ＳＭＰＣ、ＳＰＰＣ、ＤＨＡＰＥ、ＤＯＰＧ、及びそれらのいずれかの組み合わせである。いくつかの実施形態では、脂質組成物の中のリン脂質（例えば、ＤＳＰＣ）の量は、約１ｍｏｌ％～約２０ｍｏｌ％の範囲である。

【０１５７】

構造脂質には、ステロール及びステロール部分を含む脂質が含まれる。いくつかの実施形態では、構造脂質は、コレステロール、フェコステロール、シトステロール、エルゴステロール、カンペステロール、スチグマステロール、ブラシカステロール、トマチジン、トマチン、ウルソール酸、アルファ－トコフェロール、及びそれらの混合物を含む。いくつかの実施形態では、構造脂質はコレステロールである。いくつかの実施形態では、脂質組成物の構造脂質（例えば、コレステロール）の量は、約２０ｍｏｌ％～約６０ｍｏｌ％の範囲である。

【０１５８】

ＰＥＧ修飾脂質としては、ＰＥＧ修飾ホスファチジルエタノールアミン及びホスファチジン酸、ＰＥＧ－セラミドコンジュゲート（例えば、ＰＥＧ－ＣｅｒＣ$_{14}$又はＰＥＧ－ＣｅｒＣ２０）、ＰＥＧ修飾ジアルキルアミン及びＰＥＧ修飾１，２－ジアシルオキシプロパン－３－アミンが挙げられる。このような脂質は、ＰＥＧ化脂質とも呼ばれる。例えば、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ－ｃ－ＤＯＭＧ、ＰＥＧ－ＤＭＧ、ＰＥＧ－ＤＬＰＥ、ＰＥＧＤＭＰＥ、ＰＥＧ－ＤＰＰＣ又はＰＥＧ－ＤＳＰＥ脂質であり得る。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ－脂質は、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－ＤＭＧ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－［アミノ（ポリエチレングリコール）］（ＰＥＧ－ＤＳＰＥ）、ＰＥＧ－ジステリルグリセロール（ＰＥＧ－ＤＳＧ）、ＰＥＧ－ジパルメトレイル、ＰＥＧ－ジオレイル、ＰＥＧ－ジステアリル、ＰＥＧ－ジアシルグリカミド（ＰＥＧ－ＤＡＧ）、ＰＥＧ－ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（ＰＥＧ－ＤＰＰＥ）、又はＰＥＧ－ｌ，２－ジミリスチロキシルプロピル－３－アミン（ＰＥＧ－ｃ－ＤＭＡ）である。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ部分は、約１０００、２０００、５０００、１万、１５，０００又は２万ダルトンのサイズを有する。いくつかの実施形態では、脂質組成物のＰＥＧ－脂質の量は、約０ｍｏｌ％～約５ｍｏｌ％の範囲である。

【０１５９】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のＬＮＰ製剤は、透過性エンハンサー分子をさらに含むことができる。非限定的な透過性エンハンサー分子は、参照によりその全体が

本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第２００５０２２２０６４号明細書に記載されている。

【０１６０】

ＬＮＰ製剤は、ホスフェートコンジュゲートをさらに含むことができる。ホスフェートコンジュゲートは、ｉｎ　ｖｉｖｏの循環時間を増加させ、及び／又はナノ粒子の標的送達を増加させることができる。ホスフェートコンジュゲートは、例えば国際公開第２０１３０３３４３８号パンフレット又は米国特許出願公開第２０１３０１９６９４８号明細書に記載されている方法によって作製することができる。ＬＮＰ製剤はまた、例えば、米国特許出願公開第２０１３００５９３６０号明細書、米国特許出願公開第２０１３０１９６９４８号明細書及び米国特許出願公開第２０１３００７２７０９号明細書に記載されているようなポリマーコンジュゲート（例えば、水可溶型コンジュゲート）を含むことができる。各参考文献は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０１６１】

ＬＮＰ製剤は、対象におけるナノ粒子の送達を増強するためのコンジュゲートを含むことができる。さらに、コンジュゲートは、対象におけるナノ粒子の食作用クリアランスを阻害することができる。いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、ヒト膜タンパク質ＣＤ４７から設計された「自己」ペプチド（例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Ｒｏｄｒｉｇｕｅｚ　ｅｔ　ａｌ，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２０１３３３９，９７１－９７５に記載の「自己」粒子）であり得る。Ｒｏｄｒｉｇｕｅｚらによって示されるように、自己ペプチドはナノ粒子のマクロファージ媒介性クリアランスを遅延させ、これによりナノ粒子の送達が増強された。

【０１６２】

ＬＮＰ製剤は、炭水化物担体を含むことができる。非限定的な例として、炭水化物担体としては、限定されないが、無水物修飾フィトグリコーゲン又はグリコーゲン型材料、オクテニルスクシネートフィトグリコーゲン、フィトグリコーゲンβ－デキストリン、無水物修飾フィトグリコーゲンβ－デキストリン（例えば、参照によりその全体が組み込まれる国際公開第２０１２１０９１２１号パンフレット）を挙げることができる。

【０１６３】

ＬＮＰ製剤は、粒子の送達を改善するために界面活性剤又はポリマーでコーティングすることができる。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、それだけに限らないが、その全体が参照により組み込まれる米国特許出願公開第２０１３０１８３２４４号明細書に記載されているような、中性表面電荷を有するＰＥＧコーティング及び／又はコーティングなどの親水性コーティングでコーティングすることができる。

【０１６４】

ＬＮＰ製剤は、米国特許第８，２４１，６７０号明細書、及び米国特許第２０１３１１００２８号明細書に記載されているように、脂質ナノ粒子が粘膜バリアに浸透することができるように、粒子の表面特性を変化させるように操作することができる。これらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。粘液を透過するように操作されたＬＮＰは、ポリマー材料（すなわち、ポリマーコア）及び／又はポリマービタミンコンジュゲート及び／又はトリブロックコポリマーを含むことができる。ポリマー材料は、ポリアミン、ポリエーテル、ポリアミド、ポリエステル、ポリカルバメート、ポリ尿素、ポリカーボネート、ポリ（スチレン）、ポリイミド、ポリスルホン、ポリウレタン、ポリアセチレン、ポリエチレン、ポリエチレンイミン、ポリイソシアネート、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリアクリロニトリル、及びポリアリレートを含むことができるが、これらに限定されない。

【０１６５】

粘液を透過するように操作されたＬＮＰはまた、表面改質剤、例えば、限定されないが、アニオン性タンパク質（例えば、ウシ血清アルブミン）、界面活性剤（例えば、カチオン性界面活性剤、例えばジメチルジオクタデシルアンモニウム臭化物）、糖類又は糖誘導体（例えば、シクロデキストリン）、核酸、ポリマー（例えば、ヘパリン、ポリエチレン

グリコール及びポロキサマー）、粘液溶解剤（例えば、Ｎ－アセチルシステイン、ヨモギ、ブロメライン、パパイン、クレロデンドラム、アセチルシステイン、ブロムヘキシン、カルボシステイン、エプラジノン、メスナ、アンブロキソール、ソブレロール、ドミドール、レトスチン、ステプロニン、チオプロニン、ゲルゾリン、チモシンｂ４ドルナーゼアルファ、ネルテネキシン、エルドステイン）及びｒｈＤＮａｓｅを含む様々なＤＮａｓｅを含み得る。いくつかの実施形態では、粘液透過性ＬＮＰは、粘膜透過性増強コーティングを含む低張性製剤であり得る。製剤は、それが送達される上皮に対して低張性であり得る。低張性製剤の非限定的な例は、例えば、国際公開第２０１３１１００２８号パンフレットに見出すことができ、これは参照によりその全体が組み込まれる。

【０１６６】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の核酸は、制御放出及び／又は標的化送達のために製剤化することができる。本明細書で使用される場合、「制御放出」は、治療結果をもたらすための特定の放出パターンに適合する薬学的組成物又は化合物放出プロファイルを指す。一実施形態では、核酸は、制御放出及び／又は標的化送達のために、本明細書に記載される及び／又は当技術分野で公知の送達剤にカプセル化することができる。本明細書で使用される場合、「カプセル化する」という用語は、封入する、包囲する、又は包み込むことを意味する。本発明の核酸の製剤に関するので、カプセル化は、実質的、完全又は部分的であり得る。「実質的にカプセル化される」という用語は、本発明の薬学的組成物又は化合物の少なくとも５０、６０、７０、８０、８５、９０、９５、９６、９７、９８、９９超、又は９９％超を送達剤の中に封入する、包囲する、又は包み込むことができることを意味する。「部分的にカプセル化」は、１０、１０、２０、３０、４０５０又はそれ未満の本発明の薬学的組成物又は化合物を送達剤の中に封入する、包囲する、又は包み込むことができるということを意味する。

【０１６７】

いくつかの実施形態では、核酸組成物は、持続放出のために製剤化することができる。本明細書で使用される場合、「持続放出」は、特定の期間にわたって放出速度に適合する薬学的組成物又は化合物を指す。期間は、数時間、数日、数週間、数ヶ月及び数年を含むことができるが、これらに限定されない。非限定的な例として、本明細書に記載の持続放出ナノ粒子組成物は、国際公開第２０１００７５０７２号パンフレット、米国特許出願公開第２０１００２１６８０４号明細書、米国特許出願公開第２０１１０２１７３７７号明細書、米国特許出願公開第２０１２０２０１８５９号明細書及び米国特許出願公開第２０１３０１５０２９５号明細書に開示されているように製剤化することができ、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ナノ粒子組成物は、それぞれ参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第２００８１２１９４９号パンフレット、国際公開第２０１０００５７２６号パンフレット、国際公開第２０１０００５７２５号パンフレット、国際公開第２０１１０８４５２１号パンフレット、国際公開第２０１１０８４５１８号パンフレット、米国特許出願公開第２０１００００６９４２６号明細書、米国特許出願公開第２０１２０００４２９３号明細書及び米国特許出願公開第２０１００１０４６５５号明細書に記載されているものなど、標的特異的であるように製剤化することができる。

【０１６８】

投与

上述の治療剤及び組成物は、本明細書に記載の１つ以上の組成物を対象に投与することによって、それを必要とする対象のＰＴＣ関連疾患を治療する、それに対して保護する、及び／又はそれを予防するために使用することができる。

【０１６９】

そのような薬剤及び組成物は、特定の対象の年齢、性別、体重及び状態、並びに投与経路などの要因を考慮して、医学界の当業者に周知の投与量及び技術によって、適用量で投与することができる。組成物の用量は、１μｇ～１０ｍｇ活性成分／ｋｇ体重／時間であり得、２０μｇ～１０ｍｇ成分／ｋｇ体重／時間であり得る。組成物は、１、２、３、４

、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０又は３１日ごとに投与することができる。有効な治療のための組成物用量の数は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０であり得る。

【０１７０】

薬剤又は組成物は、予防又は治療で投与することができる。治療用途では、薬剤又は組成物は、治療効果を誘発するのに十分な量で、それを必要とする対象に投与される。これを達成するのに十分な量を「治療有効用量」と定義する。この使用に有効な量は、例えば、投与される組成物レジメンの特定の組成物、投与様式、疾患の病期及び重症度、対象の一般的な健康状態、及び処方する医師の判断に依存する。

【０１７１】

薬剤又は組成物は、Ｄｏｎｎｅｌｌｙら（Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５：６１７－６４８（１９９７））、米国特許第５，５８０，８５９号明細書、米国特許第５，７０３，０５５号明細書及び米国特許第５，６７９，６４７号明細書に記載されているような当技術分野で周知の方法によって投与することができる。そのすべての内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。組成物のＤＮＡは、例えばワクチンガンを使用して、個体に投与することができる粒子又はビーズに複合体化することができる。当業者は、生理的に許容され得る化合物を含む薬学的に許容される担体の選択が、例えば、発現ベクターの投与経路に依存することを知っているであろう。組成物は、様々な経路を介して送達され得る。典型的な送達経路としては、非経口投与、例えば、皮内、筋肉内又は皮下送達が挙げられる。他の経路としては、経口投与、鼻腔内及び膣内経路が挙げられる。特に組成物のＤＮＡについては、組成物を個体の組織の間質腔に、送達することができる（米国特許第５，５８０，８５９号明細書及び米国特許第５，７０３，０５５号明細書、これらのすべての内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。組成物はまた、筋肉に投与することができ、又は皮内若しくは皮下注入を介して、又はイオン導入などによって経皮的に投与することができる。組成物の表皮投与も使用することができる。表皮投与は、表皮の最外層を機械的又は化学的に刺激して、刺激物に対する免疫応答を刺激することを含み得る（米国特許第５，６７９，６４７号明細書）。

【０１７２】

一実施形態では、組成物は、鼻腔を介した投与のために製剤化することができる。担体が固体である経鼻投与に適した製剤は、例えば約１０～約５００ミクロンの範囲の粒径を有する粗い粉末を含むことができ、これは嗅ぎタバコを摂取するように、すなわち、鼻の近くに保持された粉末の容器から鼻腔経路を通して急速に吸入することによって。投与される。製剤は、鼻腔スプレー、点鼻薬、又はネブライザーによるエアロゾル投与によるものであり得る。製剤は、組成物の水溶液又は油性溶液を含むことができる。

【０１７３】

組成物は、懸濁液、シロップ剤又はエリキシル剤などの液体製剤であり得る。組成物はまた、非経口、皮下、皮内、筋肉内又は静脈内投与（例えば、注入可能投与）のための調製物、例えば滅菌懸濁液又はエマルジョンであり得る。

【０１７４】

組成物は、リポソーム、ミクロスフェア又は他のポリマーマトリックス（米国特許第５，７０３，０５５号明細書；Ｇｒｅｇｏｒｉａｄｉｓ，Ｌｉｐｏｓｏｍｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌｓ．Ｉｔｏ　ＩＩＩ（２ｎｄ　ｅｄ．１９９３）、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる）に組み込むことができる。リポソームは、リン脂質又は他の脂質からなることができ、作製及び投与が比較的単純な非毒性の生理的に許容される代謝可能な担体であり得る。

【０１７５】

ＡＣＥ－ｔＲＮＡ又はＡＣＥ－ｔＲＮＡをコードする核酸分子は、経口、非経口、舌下、経皮、直腸、経粘膜、局所、吸入による、頬側投与による、胸膜内、静脈内、動脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、鼻腔内、髄腔内及び関節内又はそれらの組み合わせを含む異なる

経路によって投与され得る。獣医学的使用のために、組成物は、通常の獣医学的実施に従って適切に許容される製剤として投与され得る。獣医は、特定の動物に最も適した投薬レジメン及び投与経路を容易に判定することができる。組成物は、従来のシリンジ、無針注入装置「マイクロプロジェクタイルによる銃の発射」、又はエレクトロポレーション（「ＥＰ」）、「流体力学的方法」、若しくは超音波などの他の物理的方法によって投与することができる。

【０１７６】

ＡＣＥ－ｔＲＮＡ又はＡＣＥ－ｔＲＮＡをコードする核酸分子は、ｉｎ　ｖｉｖｏエレクトロポレーションを伴う又は伴わないＤＮＡ注入、リポソーム媒介性、ナノ粒子促進性、組換えアデノウイルス、組換えアデノウイルス関連ウイルス及び組換えワクシニアなどの組換えベクターを含むいくつかの周知の技術によって、哺乳動物に送達され得る。ＡＣＥ－ｔＲＮＡ又はＡＣＥ－ｔＲＮＡをコードする核酸分子は、ＤＮＡ注入及びｉｎ　ｖｉｖｏエレクトロポレーションを介して送達され得る。

【０１７７】

エレクトロポレーション

エレクトロポレーションによる組成物の投与は、細胞膜に可逆的細孔を形成させるのに有効なエネルギーパルスを哺乳動物の所望の組織に送達するように構成することができるエレクトロポレーション装置を使用して、達成することができ、好ましくは、エネルギーパルスは、ユーザによって入力されたプリセット電流と同様の定電流である。エレクトロポレーション装置は、エレクトロポレーションの成分及び電極アセンブリ又はハンドルアセンブリを備え得る。エレクトロポレーションの成分は、コントローラ、電流波形発生器、インピーダンステスタ、波形ロガー、入力エレメント、状態報告エレメント、通信ポート、メモリ成分、電源、及び電源スイッチを含む、エレクトロポレーション装置の様々なエレメントの１つ又は複数を含み、組み込むことができる。エレクトロポレーションは、ｉｎ　ｖｉｖｏのエレクトロポレーション装置、例えば、プラスミドによる細胞のトランスフェクションを容易にするためのＣＥＬＬＥＣＴＲＡ　ＥＰシステム又はＥＬＧＥＮエレクトロポレーターを使用して達成され得る。

【０１７８】

エレクトロポレーションの成分は、エレクトロポレーション装置の１つのエレメントとして機能することができ、他のエレメントは、エレクトロポレーションの成分と通ずる別個のエレメント（又は成分）である。エレクトロポレーションの成分は、エレクトロポレーションの成分とは別個のエレクトロポレーション装置のさらに他のエレメントと通ずることができるエレクトロポレーション装置の２つ以上のエレメントとして、機能することができる。１つの電気機械装置又は機械装置の一部として存在するエレクトロポレーション装置のエレメントは、１つの装置として、又は互いに通信する別個のエレメントとして機能することができるため、限定される必要がない。所望の組織において定電流を生成し、フィードバック機構を含む、エレクトロポレーションの成分は、エネルギーパルスを送達することができる。電極アセンブリは、空間配置の複数の電極を有する電極アレイを含むことができ、電極アセンブリは、エレクトロポレーション成分からエネルギーのパルスを受け取り、それを電極を通して所望の組織に送達する。複数の電極のうちの少なくとも１つは、エネルギーパルスの送達中は中性であり、所望の組織のインピーダンスを測定し、インピーダンスをエレクトロポレーションの成分に伝達する。フィードバック機構は、測定されたインピーダンスを受信することができ、エレクトロポレーションの成分によって送達されるエネルギーのパルスを調整して定電流を維持することができる。

【０１７９】

複数の電極は、分散するパターンでエネルギーのパルスを送達することができる。複数の電極は、プログラムされたシーケンスの下で電極の制御を介して非中央集権型パターンでエネルギーのパルスを送達することができ、プログラムされたシーケンスは、ユーザによってエレクトロポレーションの成分に入力される。プログラムされたシーケンスは、順番に送達される複数のパルスを含むことができ、複数のパルスの各パルスは、インピーダ

ンスを測定する１つの中性電極を有する少なくとも２つの活性電極によって送達され、複数のパルスの後続のパルスは、インピーダンスを測定する１つの中性電極を有する少なくとも２つの活性電極のうちの異なる１つによって送達される。

【０１８０】

フィードバック機構は、ハードウェア又はソフトウェアのいずれかによって実行されてもよい。フィードバック機構は、アナログ閉ループ回路によって実行され得る。フィードバックは、５０μβ、２０μβ、１０又は１μβごとに行われるが、好ましくはリアルタイムフィードバック又は瞬時（すなわち、応答時間を判定するために利用可能な技術によって判定されるときに実質的に瞬間的である）である。中性電極は、所望の組織におけるインピーダンスを測定し、インピーダンスをフィードバック機構に伝達することができ、フィードバック機構は、インピーダンスに応答し、エネルギーのパルスを調整して、定電流をプリセット電流と同様の値に維持する。フィードバック機構は、エネルギーパルスの送達中に連続的かつ瞬時に定電流を維持することができる。

【０１８１】

本発明の組成物の送達を容易にし得るエレクトロポレーション装置及びエレクトロポレーションの方法の例としては、米国特許第７２４５９６３号明細書及び米国特許出願公開第２００５／００５２６３０号明細書に記載されているものが挙げられ、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。当技術分野で公知の他のエレクトロポレーション装置及びエレクトロポレーションの方法も、組成物の送達を容易にするために使用することができる。例えば、米国特許第９４５２２８５号明細書、米国特許第７２４５９６３号明細書、米国特許第５２７３５２５号明細書、米国特許第６１１０１６１号明細書、米国特許第６９５８０６０号明細書、米国特許第６９３９８６２号明細書、米国特許第６６９７６６９号明細書、米国特許第７３２８０６４号明細書及び米国特許出願公開第２００５／００５２６３０号明細書を参照されたい。

【０１８２】

定義

核酸又はポリヌクレオチドは、ＤＮＡ分子（例えば、ｃＤＮＡ又はゲノムＤＮＡ）、ＲＮＡ分子（例えば、ｍＲＮＡ）、又はＤＮＡ若しくはＲＮＡアナログを指す。ＤＮＡ又はＲＮＡアナログは、ヌクレオチドアナログから合成することができる。核酸分子は、一本鎖又は二本鎖であり得るが、好ましくは二本鎖ＤＮＡである。「単離された核酸」は、その構造が任意の天然に存在する核酸の構造又は天然に存在するゲノム核酸の任意の断片の構造と同一ではない核酸を指す。したがって、この用語は、例えば、（ａ）天然に存在するゲノムＤＮＡ分子の一部の配列を有するが、天然に存在する生物のゲノム中の分子のその部分に隣接するコード配列の両方に隣接しないＤＮＡ、（ｂ）得られた分子がいずれかの天然に存在するベクター又はゲノムＤＮＡと同一でないように、ベクター又は原核生物若しくは真核生物のゲノムＤＮＡに組み込まれた核酸、（ｃ）ｃＤＮＡ、ゲノム断片、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によって産生される断片、又は制限断片などの別個の分子、及び（ｄ）ハイブリッド遺伝子、すなわち融合タンパク質をコードする遺伝子の一部である組換えヌクレオチド配列を包含する。上記の核酸は、本発明のｔＲＮＡを発現させるために使用することができる。この目的のために、核酸を適切な調節配列に動作可能に連結して発現ベクターを生成することができる。

【０１８３】

ベクターは、それが連結されている別の核酸を輸送することができる核酸分子を指す。ベクターは、自律複製又は宿主ＤＮＡへの組み込みが可能であってもなくてもよい。ベクターの例は、プラスミド、コスミド又はウイルスベクターが挙げられる。ベクターは、宿主細胞における目的の核酸の発現に適した形態の核酸を含む。好ましくは、ベクターは、発現される核酸配列に動作可能に連結された１つ以上の調節配列を含む。

【０１８４】

「調節配列」には、プロモーター、エンハンサー及び他の発現制御エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）が含まれる。調節配列には、ヌクレオチド配列の構成的発現

を指示するもの、並びに組織特異的調節及び／又は誘導性配列が含まれる。発現ベクターの設計は、形質転換される宿主細胞の選択、所望のタンパク質又はＲＮＡの発現レベルなどの因子に依存し得る。発現ベクターを宿主細胞に導入して、目的のＲＮＡ又はポリペプチドを産生することができる。プロモーターは、ＲＮＡポリメラーゼがＤＮＡに結合してＲＮＡ合成を開始するように指示するＤＮＡ配列として定義される。強力なプロモーターは、ＲＮＡを高い頻度で開始させるものである。

【０１８５】

「プロモーター」は、ポリヌクレオチドの転写を開始及び調節するヌクレオチド配列である。プロモーターには、誘導性プロモーター（プロモーターに動作可能に連結されたポリヌクレオチド配列の発現は、被分析物、補助因子、制御タンパク質などによって誘導される）、抑制性プロモーター（プロモーターに動作可能に連結されたポリヌクレオチド配列の発現は、分析物、補因子、制御タンパク質などによって抑制される）及び構成的プロモーターが含まれ得る。「プロモーター」又は「制御エレメント」という用語は、完全な長さのプロモーター領域及びこれらの領域の機能的（例えば、転写又は翻訳を制御する）セグメントを含むことが意図される。

【０１８６】

「動作可能に連結された」は、そのように記載された成分がそれらの通常の機能を実行するように構成されるエレメントの配置を指す。したがって、核酸配列に動作可能に連結された所与のプロモーターは、適切な酵素が存在する場合、その配列の発現を行うことができる。プロモーターは、その発現を指示するように機能する限り、配列と近接する必要はない。したがって、例えば、介在する翻訳されていないが転写された配列がプロモーター配列と核酸配列との間に存在することができ、プロモーター配列は依然としてコード配列に「動作可能に連結された」と考えることができる。したがって、「動作可能に連結された」という用語は、転写複合体によるプロモーターエレメントの認識時に目的のＤＮＡ配列の転写の開始を可能にするプロモーターエレメント及び目的のＤＮＡ配列の任意の間隔又は配向を包含することを意図している。

【０１８７】

本明細書で使用される「発現カセット」は、適切な宿主細胞において特定のヌクレオチド配列の発現を指示することができる核酸配列を意味し、これは、終結シグナルに動作可能に連結され得る目的のヌクレオチド配列に動作可能に連結されたプロモーターを含み得る。それはまた、ヌクレオチド配列の適切な翻訳に必要な配列を含み得る。コード化領域は、通常、目的のＲＮＡ又はタンパク質をコードする。目的のヌクレオチド配列を含む発現カセットはキメラであり得る。発現カセットはまた、天然に存在するが、異種発現に有用な組換え形態で得られたものであってもよい。発現カセットにおけるヌクレオチド配列の発現は、宿主細胞が何らかの特定の刺激に曝露された場合にのみ転写を開始する構成的プロモーター又は調節可能なプロモーターの制御下にあり得る。多細胞生物の場合、プロモーターはまた、特定の組織若しくは器官又は発達段階に特異的であり得る。特定の実施形態では、プロモーターは、ＰＧＫ、ＣＭＶ、ＲＳＶ、ＨＩ又はＵ６プロモーター（Ｐｏｌ　ＩＩ及びＰｏｌ　ＩＩＩプロモーター）である。

【０１８８】

「核酸断片」は、所与の核酸分子の一部である。ポリヌクレオチド配列の「実質的な同一性」という用語は、ポリヌクレオチドが、標準的なパラメータを使用して記載されるアラインメントプログラムの１つを使用する参照配列と比較して、少なくとも７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、若しくは７９％、又は少なくとも８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、若しくは８９％、又は少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、若しくは９４％）、又はさらには少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の配列同一性を有する配列を含むことを意味する。

【０１８９】

本明細書で使用される場合、「ミニベクター」は、複製開始点及び抗生物質選択遺伝子

を欠き、約１００ｂｐから約５ｋｂｐまでのサイズを有する、ミニサイズ及び環状ＤＮＡベクターシステム、例えば二本鎖環状ＤＮＡ（例えば、ミニサークル）又は閉じた直鎖ＤＮＡ分子（例えば、ＣＥＤＴ）を指す。それは、例えば、組換え部位の外側のプラスミド配列を排除するための親プラスミドの部位特異的組換えによって得ることができる。それは、例えば、プロモーター及び目的の核酸配列を含む、導入遺伝子発現カセットのみを有する核酸分子を含み、核酸配列は、例えば、ＰＴＣを抑制するためのＡＣＥ－ｔＲＮＡであり得、重要なことに、細菌起源の配列はない。

【０１９０】

「対象」という用語は、ヒト及び非ヒト動物を含む。治療のための好ましい対象はヒトである。本明細書で使用される場合、「対象」及び「患者」という用語は、対象が任意の形態の治療を受けているか、又は現在経験しているかどうかに関係なく、交換可能に使用される。本明細書で使用される場合、「対象（１人及び複数）」という用語は、限定するものではないが、哺乳動物（例えば、ウシ、ブタ、ラクダ、ラマ、ウマ、ヤギ、ウサギ、ヒツジ、ハムスター、モルモット、ネコ、イヌ、ラット及びマウス、非ヒト霊長類（例えば、カニクイザル、チンパンジーなどのサル）及びヒト）を含む任意の脊椎動物を指し得る。一実施形態では、対象はヒトである。別の実施形態では、対象は、疾患モデルとして適した実験的な非ヒト動物又は動物である。

【０１９１】

ＰＴＣ又はナンセンス突然変異、ＰＴＣ関連疾患、又はＰＴＣ関連疾患に関連する疾患又は障害とは、１つ又は複数のナンセンス突然変異が、単一ヌクレオチド置換によってアミノ酸コドンをＰＴＣに変化させ、その結果、欠損切断型タンパク質が生じることによって引き起こされる、又は特徴付けられる任意の状態のことを指す。

【０１９２】

本明細書で使用される場合、「治療すること」又は「治療」は、障害、障害の症状、障害に続発する疾患状態、又は障害に対する素因を治癒、緩和、軽減、矯正、発症の遅延、予防、又は改善する目的で、障害を有するか、又は障害を発症するリスクがある対象に化合物又は薬剤を投与することを指す。「予防する」、「予防すること」、「予防」、「予防処置」などの用語は、障害又は状態を有していないが、障害又は状態を発症するリスクがあるか又は発症しやすい対象において、障害又は状態を発症する確率を低下させることを指す。「改善」は、一般に、疾患又は障害の徴候又は症状の数又は重症度の低減を指す。

【０１９３】

「予防する」、「予防すること」、「予防」という用語は、一般に、対象における疾患又は障害の発症の減少を指す。予防は、完全であってもよく、例えば、対象における疾患又は障害の完全な欠如であってもよい。予防はまた部分的であってもよく、対象における疾患又は障害の発生が、本発明の実施形態がなければ生じたであろうものよりも少なくなるようにする。疾患を「予防すること」は、一般に、疾患の完全な発症を阻害することを指す。

【０１９４】

「薬学的組成物」という用語は、活性剤と不活性又は活性の担体との組み合わせを指し、組成物をｉｎ　ｖｉｖｏ又はエクスビボでの診断又は治療使用に特に適したものにする。「薬学的に許容される担体」は、対象に投与された後に、又は対象に投与されたとたん、望ましくない生理的効果を引き起こしはしない。薬学的組成物の担体は、活性成分と適合性があり、それを安定化することができるという意味でも「許容可能」でなければならない。１つ又は複数の可溶化剤を、活性化合物の送達のための薬学的担体として利用することができる。薬学的に許容される担体の例としては、剤形として使用可能な組成物を得るための生体適合性ビヒクル、アジュバント、添加剤及び希釈剤が挙げられるが、これらに限定されない。他の担体としては、コロイド状酸化ケイ素、ステアリン酸マグネシウム、セルロース、ラウリル硫酸ナトリウムなどが挙げられる。

【０１９５】

「約」という用語は、一般に、示された数の±１０％を指す。例えば、「約１０％」は９％～１１％の範囲を示すことができ、「約１」は０．９～１．１を意味することができる。「約」の他の意味は、四捨五入などの文脈から明らかであり得、例えば「約１」はまた、０．５から１．４を意味し得る。

【０１９６】

本明細書における値の範囲の列挙は、単に、その範囲内に入る各々の別個の値を個別に参照する簡略方法として役立つことを意図している。本明細書に別途指示がない限り、各々の個々の値は、本明細書に個別に列挙されているかのように本明細書に組み込まれる。

【実施例】

【０１９７】

実施例１　ＡＣＥ－ｔＲＮＡプラットフォーム

新規ハイスループットクローニング（ＨＴＣ）及びスクリーニング（ＨＴＳ）法を用いて、５００を超えるサプレッサーｔＲＮＡ（ＡＣＥ－ｔＲＮＡ）のライブラリーが最近開発された。ライブラリーでは、ヒトｔＲＮＡ遺伝子のアンチコドンを、疾患を引き起こすＰＴＣコドン（ＵＡＧ、ＵＡＡ及びＵＧＡ）を認識するように操作した。ＡＣＥ－ｔＲＮＡプラットフォームは、翻訳されたコドンからの１つのヌクレオチド変化の結果生じるすべての可能なＰＴＣを標的とした（$tRNA^{Arg}_{UGA}$、$tRNA^{Gln}_{UAA}$、$tRNA^{Gln}_{UAG}$、$tRNA^{Trp}_{UGA}$、$tRNA^{Trp}_{UAG}$、$tRNA^{Glu}_{UAA}$、$tRNA^{Glu}_{UAG}$、$tRNA^{Cys}_{UGA}$、$tRNA^{Tyr}_{UAG}$、$tRNA^{Tyr}_{UAA}$、$tRNA^{Leu}_{UGA}$、$tRNA^{Leu}_{UAG}$、$tRNA^{Leu}_{UAA}$、$tRNA^{Lys}_{UAG}$、$tRNA^{Lys}_{UGA}$、$tRNA^{Ser}_{UGA}$、$tRNA^{Ser}_{UAG}$、ａｎｄ$tRNA^{Ser}_{UAA}$）。ＡＣＥ－$tRNA^{Gly}_{UGA}$（例えば、配列番号５）はＵＧＡコドンに特異的であり、これは、ＡＣＥ－ｔＲＮＡが３つすべての終止コドンを一般的に標的とする分子（例えば、小分子）よりもｉｎ　ｖｉｖｏでオフターゲット効果が少ないという前提を裏付けている。さらに、ＡＣＥ－$tRNA^{Gly}_{UGA}$（例えば、配列番号５）は、ＨＥＫ２９３細胞における４８時間のインキュベーション後にＡＭＧ　Ｇ４１８及びゲンタマイシンよりも有意に優れたことが見出された。

【０１９８】

スクリーニングで同定されたＡＣＥ－ｔＲＮＡがアミノアシル－ｔＲＮＡシンセターゼによる認識を犠牲にして官能化されているかどうかを確かめるためにアッセイを行った。具体的には、最も効果的であるためには、ＡＣＥ－ｔＲＮＡは正しいアミノ酸（同族アミノ酸）でＰＴＣを抑制しなければならない。高分解能質量分析を使用して、ＡＣＥ－$tRNA^{Gly}_{UGA}$及び$tRNA^{Trp}_{UGA}$の両方の同族アミノ酸が、高い忠実度でコードされ、シームレスなＰＴＣ抑制をもたらすことが確認された。

【０１９９】

「実際の終止」のＡＣＥ－ｔＲＮＡ依存的抑制の効率を判定するためにアッセイがまた行われた。その目的のために、ＡＣＥ－$tRNA^{Gln}_{UAA}$、ＡＣＥ－$tRNA^{Glu}_{UAG}$、ＡＣＥ－$tRNA^{Arg}_{UGA}$、ＡＣＥ－$tRNA^{Gly}_{UGA}$及びＡＣＥ－$tRNA^{Trp}_{UGA}$（例えば、配列番号７９及び９４によってコードされるもの、並びに配列番号８、５及び１を有するもの）をコードするｃＤＮＡプラスミドをＨＥＫ２９３細胞にトランスフェクトし、４８時間後、細胞ＲＮＡをＲｉｂｏ－Ｓｅｑに供して、３’非翻訳領域（ＵＴＲ）のリボソーム占有率が、対照と比較して、ＡＣＥ－ｔＲＮＡの存在下でより高いものであるかどうかを判定した（図２）。図２Ａは、ＵＡＡ（赤色）、ＵＡＧ（緑色）及びＵＧＡ（青色）を有する個々の転写物（ドット）のｍＲＮＡ　３’ＵＴＲリボソーム占有率の倍率変化を示す。リボソームの３’ＵＴＲ占有量は名目上の量であり、ＡＣＥ－ｔＲＮＡが「実際の」終止を有意に抑制しなかったことを示した。図２Ｂに示されるＲｉｂｏ－Ｓｅｑの結果により、ＡＣＥ－ｔＲＮＡの「真の」終止抑制活性の結果としての終止コドンに関連するすべての翻訳されたＲＮＡ転写産物上の３’ＵＴＲリボソーム占有の平均位置及び大きさの視覚化が可能になった。「鋸歯状」パターンが、個々のコドンリボソーム占有率を表した。ＡＣＥ－$tRNA^{Arg}_{UGA}$による終止コドンの後に観察

された連続した鋸歯状パターンは、フレーム内リードスルーを示したが、軽微であった。ＡＣＥ－ｔＲＮＡによる翻訳終結の平均的抑制が、ＨＥＫ２９３細胞におけるＡＣＥ－ｔＲＮＡのトランスフェクション後に最小であることは有望である。ＡＣＥ－ｔＲＮＡのオフターゲット効果は、トランスジェニック１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞及びマウスにおける持続的発現後に調べられている。

【０２００】

実施例２　ミニＤＮＡベクターの作製

ＡＣＥ－ｔＲＮＡが治療送達物として小型ＤＮＡベクターに効率的にコードされ得るかどうかを調べるためにアッセイを行った。

【０２０１】

本発明者らはまず、どの程度小さいＭＣがＡＣＥ－ｔＲＮＡを効率的に発現するかを判定することに着手した。ＡＣＥ－ｔＲＮＡ発現カセットは１２５ｂｐｓであったため、理論的には生成可能な最小の発現ベクターであった。しかし、これまでにない状況では、転写因子の立体的制約及びＤＮＡの高度な屈曲がＡＣＥ－ｔＲＮＡの発現を阻害し得る可能性が考慮された。さらに、３００ｂｐｓ未満のそのような小型のＭＣの生成は、ＤＮＡ二重らせんの固有の剛性又は堅さによって妨げられる。直鎖ＤＮＡのライゲーション依存性の環状化は、反応のＤＮＡの濃度が低く（ナノモル濃度）、治療量の生成を妨げない限り、主に直鎖コンカテマーを含有する生成物をもたらす。ｉｎ　ｖｉｔｒｏの産生のためにこれらの問題を回避するための操作は、目的のＤＮＡ配列を有するＭＣの生成を妨げ、労働集約的なプロセス及び許容できない非効率性の両方をもたらす。２５０ｂｐｓ未満の大腸菌におけるＭＣの生成もまた、低い組換え効率を付与するＤＮＡの剛性のために問題があると報告されている。上に列挙した技術的困難性、及びほとんどの発現カセットが典型的には３ｋｂよりも大きいという事実のために、数キロベースよりも小さいＭＣを使用する研究はほとんどなく、本発明者らの知る限りでは、３８３及び４００ｂｐｓが最小の公開された発現ミニベクターであった。

【０２０２】

転写因子Ａ、ミトコンドリアとしても知られる組換えミトコンドリアＤＮＡ屈曲タンパク質、ＡＲＳ結合因子２タンパク質（Ａｂｆ２ｐ）を使用して（ＴＦＡＭ，Ｔｈｉｂａｕｌｔ，Ｔ．ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ　４５，ｅ２６－ｅ２６，ｄｏｉ：１０．１０９３／ｎａｒ／ｇｋｗ１０３４（２０１７））、本発明者らは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでミリグラム量で２００ｂｐｓという少量のＭＣの産生を合理化した（図３の方法Ｉ）。ここで、産生量は、約１．５ｍｇを生成するように容易にスケーリングすることができ、本発明者らの研究室では、大腸菌における組換えＤＮＡリガーゼ、ＤＮＡポリメラーゼ（ＰＨＵＳＩＯＮ）、Ｔ５エキソヌクレアーゼ及びＴＦＡＭタンパク質の生成及び精製によって生産コストが有意に最小化された。この方法を使用して、本発明者らは、サイズが２００～１０００ｂｐのＭＣを生成した（図３、方法Ｉ、底部のゲル）。以前に公開された方法（Ｋａｙ，Ｍ．Ａ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ２８，１２８７－１２８９，ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｂｔ．１７０８（２０１０））と同様に、φＣ３１依存性組換えを利用する社内で生成されたプラスミド（図３、方法ＩＩ）を使用して、大腸菌で５００ｂｐ以上のＭＣを生成した。

【０２０３】

上記の方法を使用して、異なるサイズの例示的なＡｒｇＴＧＡ（例えば、配列番号８をコードする）ミニサークルライゲーション産物を作製した。サイズには、約１０００ｂｐ、９００ｂｐ、８５０ｂｐ、８００ｂｐ、７００ｂｐ、６００ｂｐ、５０ｂｐ、４００ｂｐ、３００ｂｐ及び２００ｂｐが含まれた。図１２Ａ、図１２Ｂ、図１３Ｅ及び図１３Ｆに示すように、これらのＡｒｇＴＧＡミニサークルのライゲーション産物及びＰＣＲ産物は、エチジウムブロマイドを含有する１．５％アガロースゲルで分離及び可視化することができた。ＡｒｇＴＧＡミニサークルのライゲーション産物及び対応するＰＣＲ産物をＴ５エキソヌクレアーゼと共にインキュベートし、エチジウムブロマイドを含有するアガロースゲル上で分離した。ミニサークルライゲーションにおけるエキソヌクレアーゼ耐性産

物の存在は、共有結合的に閉じたミニサークル産物の産生を示した（図１２Ｃ、図１２Ｄ、図１３Ｅ、図１３Ｆ）。

【０２０４】

ＭＣ及びＣＥＤＴ産物は、Ｔ５エキソヌクレアーゼ消化又はサイズ排除クロマトグラフィー（図３の方法Ｉ、ＩＩ、ＩＩＩ及びＩＶ、底部のゲル）の使用によって親プラスミド骨格から効率的に精製することができる。これらの２つの方法を使用すると、本発明者らは、このプロジェクトに妥当なコストで（５００ｂｐ未満のＭＣの約１．５ｍｇｓに対して約４００ドル、５００ｂｐ以上のＭＣの１００ｍｇに対して約５８０ドル）、生成したいＭＣ　ＡＣＥ－ｔＲＮＡ配列に迅速に対応することができる。

【０２０５】

ＣＥＤＴの産生がいくつかの方法で達成され得る場合（Ｗｏｎｇ，Ｓ．ｅｔ　ａｌ．Ｊ　Ｖｉｓ　Ｅｘｐ，５３１７７－５３１７７，ｄｏｉ：１０．３７９１／５３１７７（２０１６），Ｓｃｈａｋｏｗｓｋｉ，Ｆ．ｅｔ　ａｌ．Ｉｎ　ｖｉｖｏ（Ａｔｈｅｎｓ，Ｇｒｅｅｃｅ）２１，１７－２３（２００７），ａｎｄ　Ｈｅｉｎｒｉｃｈ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ｍｅｄｉｃｉｎｅ（Ｂｅｒｌｉｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）８０，６４８－６５４，ｄｏｉ：１０．１００７／ｓ００１０９－００２－０３６２－２（２００２））、本発明者らは、大腸菌由来のエンドトキシン汚染を減少させるために、組換え原核生物テロメラーゼ、バクテリオファージＮ１５のプロテロメラーゼＴｅｌＮを使用するｉｎ　ｖｉｔｒｏの手法を追求した。テロメア認識部位ｔｅｌＲＬ（５６ｂｐ）に作用して、プロテロメラーゼは環状プラスミドＤＮＡを効率的な一段階酵素反応で直鎖共有結合的に閉じたダンベル形状の分子に変換した。目的の遺伝子に隣接する発現プラスミドに２つのＴｅｌＲＬ部位を挿入すると、それを切断し、ＴｅｌＮ酵素（５’末端を３’末端にライゲートする）によって連結して、目的の遺伝子をコードする直鎖の閉端ミニＤＮＡスレッドを得た。この直接的な方法は、図３の方法ＩＩＩに概説されている。重要なことに、ｉｎ　ｖｉｔｒｏの方法Ｉ及びＩＶを使用して、大量のエンドトキシンを含まないＭＣ及びＣＥＤＴをそれぞれ精製することが可能である（Ｂｕｔａｓｈ，Ｋ．Ａ．，ｅｔ　ａｌ．，ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　２９，６１０－６１４，６１６，６１８－６１９，ｄｏｉ：１０．２１４４／００２９３　ｒｒ　０４（２０００））。方法ＩＩＩを使用して、本発明者らは、このプロジェクトに妥当なコストで様々なＡＣＥ－ｔＲＮＡ配列のＣＥＤＴを迅速に生成することができた（約１．５ｍｇｓのＣＥＤＴで約４００ドル、１００ｍｇのＣＥＤＴで約１０００ドル）。

【０２０６】

図１３Ａ、図１３Ｂ、図１３Ｃ及び図１３Ｄに示すのは、２００ｂｐのＣＥＤＴ（２つの２００ｂｐの連続するＡｒｇＴＧＡのＣＥＤＴセグメントを含有する６３４ｂｐのＰＣＲ産物を使用）、４００ｂｐのＣＥＤＴ（４００ｂｐのＣＥＤＴセグメントを含有する５７０ｂｐのＰＣＲ産物を使用）、９００ｂｐのＣＥＤＴ（１×ＡｒｇＴＧＡをコードする１０６５ｂｐのＰＣＲ産物を使用）及び９００ｂｐのＣＥＤＴ（４×ＡｒｇＴＧＡをコードする１０６５ｂｐのＰＣＲ産物を使用）を含む４つの例示的なＣＥＤＴの産生である。対応するＰＣＲ産物のそれぞれを陰イオン交換クロマトグラフィー（Ｍａｃｈｅｒｙ　Ｎａｇｅｌキット）によって精製した後、上記のようにＴｅｌＮで消化した。隣接する２つのＴｅｌＲＬ部位がＴｅｌＮ酵素によって連結されると、４つのＣＥＤＴは、それぞれ２６０ｂｐ、４５６ｂｐ、９５６ｂｐ、及び９５６ｂｐになる。図に示されるように、ＣＥＤＴ産物は、Ｔ５エキソヌクレアーゼ消化に対する耐性を示し、これは、ＴｅｌＮによる共有結合的に閉じた末端の産生を示す。しかし、制限酵素Ｂｓｕ３６Ｉによるエンドヌクレアーゼ切断後、各ＣＥＤＴ産物はＴ５エキソヌクレアーゼによる分解を受けやすかった。

【０２０７】

実施例３　ＡＣＥ－ｔＲＮＡをコードするＭＣ及びＣＥＤＴによるＰＴＣ抑制の有効性。

上記の実施例に記載されるＭＣ及びＣＥＤＴ　ＤＮＡベクターを、細胞の培養及びｉｎｖｉｖｏにおけるＰＴＣの抑制におけるそれらの有効性を検証するために調べた。手短に

言えば、ＰＴＣレポーターｃｍｖ－ＮＬｕｃ－ＴＧＡを安定的に発現したＨＥＫ２９３細胞への２００～１０００ｂｐのＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}のＭＣの等量（配列番号８、図４Ａ、白色バー）のトランスフェクションは、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}のプラスミドベースの発現に匹敵する強固なＰＴＣ抑制をもたらした（図４Ａ、灰色のバー）。ここで、ＭＣがＡＣＥ－ｔＲＮＡの強固な発現及びその後のＰＴＣ抑制を助けることが初めて示された。本発明者らの知る限り、これらは、報告された最小の機能的発現のＭＣ（＜３８３ｂｐｓ）に関する結果であった。

【０２０８】

次に、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}（配列番号８）をコードする７００及び４００ｂｐのＣＥＤＴベクターが、ＰＴＣレポーターｃｍｖ－ＮＬｕｃ－ＵＧＡ（図４Ｂ）を安定的に発現する１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞にトランスフェクトされた。ＭＣとは異なり、４００及び７００ｂｐのＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}のＣＥＤＴは強力なＰＴＣ抑制を助けた（図４Ｂ、白色バー）が、それらはプラスミドに基づくＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Ａｒｇ}{}_{ＵＧＡ}$（図４Ｂ、灰色のバー）よりも有効性が低く、有意なサイズの効果を示し、４００ｂｐのＣＥＤＴは７００ｂｐのＣＥＤＴの半分程度ＰＴＣ抑制に有効であった。ベクターのサイズのこの明らかな効果がＡＣＥ－ｔＲＮＡの転写の効率に起因するのか、又はこの差異がトランスフェクションに基づく送達による細胞侵入効率の差に起因するのかは不明である。異なるトポロジー及びサイズのＤＮＡは、異なる担体による送達効率に有意に影響を及ぼすことが報告されていた。

【０２０９】

本明細書に概説されるように、２００～１０００ｂｐのＭＣ及びＣＥＤＴのＰＴＣレポーター１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞へのエレクトロポレーションに基づく送達を行うことによって、細胞進入に対するＤＮＡのサイズの影響に対処するために、さらなるアッセイを行う。エレクトロポレーションでは、ＤＮＡベクターのサイズの減少が細胞侵入を促進すると予想され、したがって、２００～５００ｂｐのＣＥＤＴによる抑制活性のいずれかの観察された減少は、ＤＮＡトポロジーによって付与される非効率的な転写によって説明される可能性が高い。

【０２１０】

実施例４　ＡＣＥ－ｔＲＮＡを用いた内因性のＣＦＴＲ　ＰＴＣの救済

以前の研究の大部分は、ｃＤＮＡからコードされるＰＴＣを救済するためにサプレッサーｔＲＮＡを使用していた。有益ではあるが、これらの研究は、肺上皮におけるＣＦＴＲの低い内因性の転写、ｍＲＮＡの転写後プロセシング／調節及びナンセンスコドン介在的分解（ＮＭＤ）など、ｉｎ　ｖｉｖｏで遭遇する障害のすべてを提示したわけではなかった。この実施例では、ヒト細気管支上皮細胞株である１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞を使用して、内因性のゲノムランドスケープ内のＡＣＥ－ｔＲＮＡｓ　ＰＴＣ抑制活性を判定した。また、位置ｐ．Ｇ５４２Ｘ－、ｐ．Ｒ１１６２Ｘ－及びｐ．Ｗ１２８２Ｘ－ＣＦＴＲにＰＴＣを引き起こすＣＦを担持するように改変されたＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９である変異体１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞も使用した。細胞を使用して、ＣＦＴＲ及び気道上皮のバイオロジー（Ｃｏｚｅｎｓ，Ａ．Ｌ．ｅｔ　ａｌ．Ａｍｅｒｉｃａｎ　ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　ｒｅｓｐｉｒａｔｏｒｙ　ｃｅｌｌ　ａｎｄｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ｂｉｏｌｏｇｙ１０，３８－４７（１９９４））を研究した。

【０２１１】

手短に言えば、ＷＴ　１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞が、トランスフェクション効率を判定するために、ＴＲＡＮＳＷＥＬＬインサートでＧＦＰ発現プラスミドによりトランスフェクトされた。３６時間後、細胞を画像化し、トランスフェクション効率が１０％未満であることが見出された（図５Ａ）。低いトランスフェクション効率にもかかわらず、使用Ｕｓｓｉｎｇチャンバー測定を行った。

【０２１２】

最初に、Ｒ１１６２Ｘ－ＣＦＴＲ　ＨＢＥ１４ｏ細胞を、ＣＭＶ－ｈＣＦＴＲプラスミドでＴｒａｎｓｗｅｌｌインサートにトランスフェクトして、ｈＣＦＴＲの機能的救済の

「最良のシナリオ」を判定した。発現が強力なｐｏｌ　ＩＩプロモーターによって駆動されるにもかかわらず、ｈＣＦＴＲ　ｃＤＮＡトランスフェクションは、トランスフェクションの６日後に、たった約４％のＣＦＴＲチャネルの機能的救済をもたらした（図５Ｇ）。次に、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}（配列番号８）の５００ｂｐのＣＥＤＴを、同じ方法論を使用してＲ１１６２Ｘ－ＣＦＴＲ　ＨＢＥ１４ｏ細胞に送達した。注目すべきことに、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}５００ｂｐのＣＥＤＴは、ＣＦＴＲ機能の約３％の救済をもたらし（図５Ｇ）、ＣＭＶ－ｈＣＦＴＲ　ｃＤＮＡによる全遺伝子置換の値と同様の値であった。

【０２１３】

図５Ｂ、図５Ｃ及び図５Ｄにも示されているように、ｐ．Ｒ１１６２Ｘ－ＣＦＴＲ１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞へのＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Ａｒｇ}_{ＵＧＡ}$５００ｂｐのＣＥＤＴのトランスフェクションの６日後において、本発明者らは、驚くべきことに、フォルスコリン及びＩＢＭＸの添加（図５Ｂ及びＣ、ＷＴの約３％）後におけるＣＦＴＲ機能の緩やかな救済（図５Ｂ、青線）、並びに空のベクター（図５Ｂ、Ｃ＆Ｄ、「Ｒ１１６２Ｘ＋空」）のトランスフェクション後における測定可能なＣＦＴＲ機能を伴わないＩｎｈ１７２（図８Ｂ及びＤ、ＷＴの３％）による阻害を測定した。ＣＦＴＲ機能のわずか１０～１５％の救済で、肺におけるＣＦ症状を逆転させるのに十分であると推定されていることに留意すべきである（Ａｍａｒａｌ，Ｍ．Ｄ．Ｐｅｄｉａｔｒｉｃ　Ｐｕｌｍｏｎｏｌｏｇｙ　３９，４７９－４９１，ｄｏｉ：１０．１００２／ｐｐｕｌ．２０１６８（２００５））。

【０２１４】

本発明者らは次に、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ転写物のトランスフェクション後にＡＣＥ－ｔＲＮＡがＮＭＤを阻害するかどうかを調べた。興味深いことに、プラスチックにトランスフェクションを行うことにより、効率がはるかに高いことが分かった（約３０％、図５Ｅ）。ｑＰＣＲを、ｐ．Ｇ５４２Ｘ－（図５Ｆ、左から２番目のバー）、ｐ．Ｒ１１６２Ｘ－（図５Ｆ、左から４番目、５番目、６番目）ｐ．Ｒ１１６２Ｘ－及びｐ．Ｗ１２８２Ｘ－ＣＦＴＲ（図５Ｆ、右から４つのバー）から単離されたｍＲＮＡに対して行った。空のＤＮＡベクター又はＡＣＥ－ｔＲＮＡをコードするＤＮＡベクターのトランスフェクションの２日後の１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞。ＣＦＴＲｍＲＮＡ発現が有意に減少した（ＷＴの２５％未満）ことが見出された。４×ＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Ｇｌｙ}_{ＵＧＡ}$（配列番号５、図５Ｆ、左から３番目のバー）及び４×ＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Ａｒｇ}_{ＵＧＡ}$（図５Ｆ、水平線を有する左から５番目のバー）プラスミドのトランスフェクションは、定常状態のＣＦＴＲｍＲＮＡレベルの有意な増加をもたらし、それぞれ約１０％及び約１５％であった。さらに、ｐ．Ｒ１１６２Ｘ－ＣＦＴＲ１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞に対するＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Ａｒｇ}_{ＵＧＡ}$５００ｂｐのＣＥＤＴ及び８００ｂｐのＭＣ（図５Ｆ、左から６番目のバー、７番目のバー）の送達は、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Ａｒｇ}_{ＵＧＡ}$プラスミドと同様の定常状態のＣＦＴＲｍＲＮＡの増加（約１５％）をもたらしたことが見出された。

【０２１５】

ｐ．Ｗ１２８２Ｘ－ＣＦＴＲ１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞における４×ＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Ｔｒｐ}_{ＵＧＡ}$（配列番号１）プラスミドのトランスフェクションは、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Ｔｒｐ}_{ＵＧＡ}$がライブラリーの最も機能していないファミリーであったので、ＣＦＴＲｍＲＮＡの定常状態の発現に影響を及ぼさなかった（図５Ｆ、右から３本目の線付きバー）。Ｕｓｓｉｎｇチャンバー記録（Ｘｕｅ，Ｘ．ｅｔ　ａｌ．，Ｈｕｍａｎｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ｇｅｎｅｔｉｃｓ　２６，３１１６－３１２９，ｄｏｉ：１０．１０９３／ｈｍｇ／ｄｄｘ１９６（２０１７））について測定されたように、ＣＦＴＲ　ｐ．Ｗ１２８２（ｐ．Ｗ１２８２Ｌ）におけるロイシンが、約８０％のＷＴ　ＣＦＴＲ機能を与えるということが以前に示されていた。本発明者らのＡＣＥ－ｔＲＮＡライブラリーは本質的にアラカートライブラリーであるため、最良の１×ＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Ｌｅｕ}_{ＵＧＡ}$（配列番号４）プラスミドを選択し、それらをｐ．Ｗ１２８２Ｘ－ＣＦＴＲ１６ＨＢＥ　２４ｏ細胞にトランスフェクトすることができ、これにより、ＣＦＴＲ　ｍＲＮＡの定常状態発現が約１７％有意に増加した（図５Ｆ、右から２番目の縦線付きバー）。

【０２１６】
図５に示されている結果は、ＡＣＥ－ｔＲＮＡが内因性のＣＦＴＲ　ｍＲＮＡのＮＭＤを強力に阻害し、ＣＦがＰＴＣを引き起こすことを初めて実証したが、これは、先駆けとなるラウンドの翻訳を促進することによるものである可能性が最も高い。さらに、Ｔｒａｎｓｗｅｌｌではトランスフェクション効率がかなり低いにもかかわらず、ＣＥＤＴから発現されたＡＣＥ－ｔＲＮＡは、ｐ．Ｒ１１６２Ｘ－ＣＦＴＲ１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞において、内因性のＣＦＴＲの機能的レスキューを促進した。
【０２１７】
実施例５　ｉｎ　ｖｉｖｏでのＰＴＣのＡＣＥ－ｔＲＮＡ依存的リードスルー。
この実施例では、ｉｎ　ｖｉｖｏでのＰＴＣのＡＣＥ－ｔＲＮＡ依存的リードスルーを調べるためにアッセイを行った。
【０２１８】
最初に、ＣＭＶ－ＧＦＰをコードするｃＤＮＡプラスミドを、吸引後に電場を使用してマウスの肺に送達し、３日後に蛍光性顕微鏡法（図６Ａ）によって評価した。ＧＦＰ発現の定量は、遺伝子導入のエレクトロポレーション法が非常に効率的であり、すべての細胞型において肺の細胞の３３．２％±３．５％（複数のマウスからの複数の切片で１８から５２％）で発現が観察されることを示した。重要なことに、ＧＦＰ分布は、実質と比較して気道で優勢であるように見えた（図６Ａ、左挿入図）。
【０２１９】
次いで、効率的な送達がＰＴＣ抑制レポータープラスミドｐＮａｎｏＬｕｃ－ＵＧＡとＡＣＥ－ｔＲＮＡをコードするベクターとの同時送達によって達成され得るかどうかを判定するためにアッセイを行った。対照マウスにＰＴＣレポーターｐＮＬｕｃ－ＵＧＡプラスミドを投与して擬似ＰＴＣリードスルーを測定した。エレクトロポレーションの２日後、肺を解剖し、生理食塩水を灌流し、ビーズビーター装置内の溶解バッファー（ＰＲＯＭＥＧＡ）でホモジナイズした。溶解物を高速で回転させ、プレートリーダーを使用して上清をＮＬｕｃ活性について分析した。ＡＣＥ－ｔＲＮＡベクターの非存在下では、有意な発光は測定されなかった（図６Ｂ、左から１番目のバー）。ＡＣＥ－ｔＲＮＡＡｒｇ（配列番号８）プラスミド（図６Ｂ、左から２番目のバー）、５００ｂｐのＡＣＥ－ｔＲＮＡＡｒｇのＣＥＤＴ（図６Ｂ、中央のバー）、８００ｂｐのＡＣＥ－ｔＲＮＡＬｅｕ（配列番号４）ＭＣ（図６Ｂ、右から２番目のバー）及び８００ｂｐのＡＣＥ－ｔＲＮＡＡｒｇのＭＣ（図６Ｂ、右から１番目のバー）が、ｉｎ　ｖｉｖｏでマウスの肺においてＮＬｕｃ－ＰＴＣ救済を助けることが見出された。これらの結果は、（ｉ）ｐ．Ｇ５４２Ｘ－ＣＦＴＲ及びｐ．Ｗ１２８２Ｘ－ＣＦＴＲのマウスの気道上皮におけるプラスミド、ＭＣ及びＣＥＤＴＳをコードするＡＣＥ－ｔＲＮＡによるナンセンス抑制の有効性及び持続性、及び（ｉｉ）肺への送達後のＭＣ及びＣＥＤＴにコードされるＡＣＥ－ｔＲＮＡの効率及び持続性の原理の証明をもたらす。
【０２２０】
実施例６　ＴＥＬＳの同定
この実施例は、ＴＥＬＳを同定してｔＲＮＡ５’フランキング配列からのＡＣＥ－ｔＲＮＡ発現を増強するためのアッセイを記載する。Ｌｏｗｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ　２５，９５５－９６４，ｄｏｉ：１０．１０９３／ｎａｒ／２５．５．９５５（１９９７）に記載されている４１６個のｔＲＮＡ遺伝子のうちの１つ以上などのｔＲＮＡ遺伝子由来のｔＲＮＡ５’フランキング配列（約１ｋｂ）を使用することができる。
【０２２１】
哺乳動物細胞への送達後に発光を使用してＰＴＣ抑制のハイスループットクローニング（ＨＴＣ）及び定量的ハイスループットスクリーニング（ＨＴＳ）の両方を助けるオールインワンｃＤＮＡプラスミドに、各配列をクローニングする（図７Ｂ）。１ｋｂの５’フランキング配列を、ｇＢｌｏｃｋｓ（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）として、ＧＯＬＤＥＮ　ＧＡＴＥクローニングを使用して９６ウェル形式でＨ

ＴＣ部位にクローニングし、ｃｃｄＢネガティブ選択と対にして、約１００％のクローニング効率を得る。すべてのクローンをサンガー配列決定によって確認する。ＴＥＬ配列をＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Ａｒｇ}_{ＵＧＡ}$－（配列番号８、図７Ｂ）のすぐの５’側にクローニングし、ＮＬｕｃ－ＵＧＡ抑制効率を、プレートリーダーを用いて９６ウェル様式で読み取ると、ＰＴＣ抑制の増加はＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Ａｒｇ}_{ＵＧＡ}$の発現の増加を示す。最初のスクリーニングが完了した後、やはりｇＢｌｏｃｋ配列をクローニングすることによって、上位１０個の１ｋｂ配列を２５０ｂｐ配列に分割して転写増強の起源を同定する。ＡＣＥ－ｔＲＮＡの転写を増強又は阻害する１ｋｂリーダー配列を、多数の開発されたソフトウェアツール（Ｓｈａｒｏｖ，Ａ．Ａ．＆Ｋｏ，Ｍ．Ｓ．Ｈ．ＤＮＡ Ｒｅｓｅａｒｃｈ１６，２６１－２７３，ｄｏｉ：１０．１０９３／ｄｎａｒｅｓ／ｄｓｐ ０１４（２００９））[106]を用いて配列モチーフについて分析する。１つ又は複数のＴＥＬＳは、ＡＣＥ－ｔＲＮＡの発現を数倍増強して、あまり効率的でない送達を可能にし、強力なＰＴＣ抑制を維持することができると予想される。また、この研究からの結果から、ｔＲＮＡ転写の調節に対する洞察を得る。

【０２２２】

実施例７　ＤＴＳの同定

この実施例は、ミニベクター核局在化を駆動するＤＴＳを同定するためのアッセイを記載する。

【０２２３】

プラスミドを非分裂細胞の核に標的化するいくつかのＤＮＡ配列が同定されている。例えば、Ｄｅａｎ，Ｄ．Ａ．Ｅｘｐ．Ｃｅｌｌ Ｒｅｓ．２３０，２９３－３０２（１９９７）、Ｄｅａｎ，Ｄ．Ａ．，ｅｔ ａｌ．，Ｅｘｐ．Ｃｅｌｌ Ｒｅｓ．２５３，７１３－７２２（１９９９）、Ｖａｃｉｋ，Ｊ．，ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ６，１００６－１０１４（１９９９）、Ｙｏｕｎｇ，Ｊ．Ｌ．，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．Ｃｅｌｌ １０Ｓ，４４３ａ（１９９９）、Ｌａｎｇｌｅ－Ｒｏｕａｕｌｔ，Ｆ．．Ｊ Ｖｉｒｏｌ ７２，６１８１－６１８５（１９９８）、Ｍｅｓｉｋａ，Ａ．，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ ３，６５３－６５７．（２００１）、Ｄｅｇｉｕｌｉｏ，Ｊ．Ｖ．，ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ，ｄｏｉ：ｇｔ２００９１６６［ｐｉｉ］ １０．１０３８／ｇｔ．２００９．１６６（２０１０）、Ｓａｃｒａｍｅｎｔｏ，Ｃ．Ｂ．，ｅｔ ａｌ．，Ｂｒａｚｉｌｉａｎ ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｍｅｄｉｃａｌ ａｎｄ ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ ｒｅｓｅａｒｃｈ ４３，７２２－７２７（２０１０）、及びＣｒａｍｅｒ，Ｆ．ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ １９，６７５－６８３，ｄｏｉ：１０．１０３８／ｃｇｔ．２０１２．５４（２０１２）を参照されたい。これらの配列に共通する特徴は、それらが転写因子の結合部位を含むことである。興味深いことに、ＳＶ４０エンハンサーは、核局在化配列（ＮＬＳ）を含有する＞１０の遍在的に発現された転写因子の結合のために、すべての細胞型においてＤＴＳとして作用する。典型的な転写因子は、核内に輸送され、その調節ＤＮＡ標的配列に結合し、転写を活性化又は抑制する。しかし、転写因子結合部位を含有するＤＮＡが細胞質に存在する場合、細胞質転写因子は、核取り込み前にこの部位に結合し（図８）、ＤＮＡ－タンパク質複合体を核内に転位させ得る。

【０２２４】

本発明者らは、６０を超える強力な一般的及び細胞特異的プロモーターをスクリーニングし、７つのＤＴＳを見出した。これらのうち、２つは遍在的に機能するが、５つは細胞のサブセットで発現される特異的転写因子に結合する。発現プラスミドへのＤＴＳの組み込みは、微量注入及びトランスフェクトされた非分裂細胞における遺伝子発現を増加させ、本発明にとって重要なことは、プラスミドの核標的化及びその後のｉｎ ｖｉｖｏでの遺伝子発現を増加させるように作用することが見出された。ここで、本発明者らは、ＡＣＥ－ｔＲＮＡをコードするミニベクター親ｐＵＣ５７プラスミドが、細胞質マイクロインジェクション後に、非分裂細胞の核に輸送されないことを示した。プラスミド核局在化及びその後のＡＣＥ－ｔＲＮＡの発現を改善するために、プラスミドにＳＶ４０ ＤＴＳを

含めることができる。

【０２２５】

ＡＣＥ－ｔＲＮＡミニベクターの送達、発現、及び最終的にはナンセンス抑制を改善するために、核標的化においてＳＶ４０　ＤＴＳよりも効果的な、新しいＤＴＳを同定するためのスクリーニングを行うこともできる。すべての細胞のタイプにおいて作用するＤＴＳを同定することが好ましいので、遍在的に発現されるプロモーターをスクリーニングすることができる。マイクロアレイ、ＲＮＡｓｅｑ及び単一細胞シーケンシングによって同定されたハウスキーピング遺伝子の多数のデータベースが、例えば、Ｃｕｒｉｎａ，Ａ．ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅｓ　Ｄｅｖ　３１，３９９－４１２，ｄｏｉ：１０．１１０１／ｇａｄ．２９３１３４．１１６（２０１７）、Ｅｉｓｅｎｂｅｒｇ，Ｅ．＆Ｌｅｖａｎｏｎ，Ｅ．Ｙ．Ｔｒｅｎｄｓ　Ｇｅｎｅｔ　１９，３６２－３６５，ｄｏｉ：１０．１０１６／Ｓ０１６８－９５２５（０３）００１４０－９（２００３）、及びＥｉｓｅｎｂｅｒｇ，Ｅ．＆Ｌｅｖａｎｏｎ，Ｅ．Ｙ．Ｔｒｅｎｄｓ　Ｇｅｎｅｔ　２９，５６９－５７４，ｄｏｉ：１０．１０１６／ｊ．ｔｉｇ．２０１３．０５．０１０（２０１３）において公開されてきた。

【０２２６】

上位２０のハウスキーピング遺伝子のプロモーター配列は、公開された配列又は生物情報学的分析及びＤＢＴＳＳデータセット（ｄｂｔｓｓ．ｈｇｃ．ｊｐ）からの各プロモーターの転写開始部位の同定に基づいて同定することができる。これらのプロモーターは、典型的には５００～２０００ｂｐのサイズの範囲であり、ＣＭＶプロモーター由来のＧＦＰを発現するレポータープラスミド（ＤＴＳとして機能しない）に、ヒトゲノムＤＮＡからＰＣＲによってクローニングすることができる。このプラスミドはまた、三重鎖形成ペプチド核酸（ＰＮＡ）のための結合部位を担持して、ＤＮＡの蛍光性標識を可能にすることができる。Ｃｙ３標識ＰＮＡをプラスミドのこの部位にハイブリダイズさせることによって、高い量子収率の蛍光性標識プラスミドを生成して、核取り込みをリアルタイムで追跡することができる（Ｇａｓｉｏｒｏｗｓｋｉ，Ｊ．Ｚ．＆Ｄｅａｎ，Ｄ．Ｍｏｌ　Ｔｈｅｒ１２，４６０－４６７（２００５））。

【０２２７】

プラスミドをＣｙ３－ＰＮＡで直接標識する代替的な手法として、蛍光ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）を行って、注入されたＤＮＡを可視化することもできる。ＤＴＳ候補プラスミドを、微量注入されたＡ５４９肺上皮細胞において３０分～８時間にわたって核取り込み活性について試験することができる（Ｄｅａｎ，Ｄ．Ａ．Ｅｘｐ．Ｃｅｌｌ　Ｒｅｓ．２３０，２９３－３０２（１９９７），Ｄｅａｎ，Ｄ．Ａ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｅｘｐ．Ｃｅｌｌ　Ｒｅｓ．２５３，７１３－７２２（１９９９），ａｎｄ　Ｖａｃｉｋ，Ｊ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ　６，１００６－１０１４（１９９９））。本発明者らは、ＳＶ４０配列が３０分以内にプラスミドの核内取り込みを媒介することを見出したが、ＳＭＧＡプロモーターは、プラスミドが平滑筋細胞の核に局在するのに４時間を必要とする。この手法は、それらの核取り込み速度に基づいてＳＶ４０　ＤＴＳに対して配列をランク付けすることを可能にすることができる。ＤＴＳを含まないｐＵＣ５７プラスミドの陰性対照及びｐＵＣ５７－ＳＶ４０　ＤＴＳのポジティブコントロールもまた、注入後に細胞が生存可能なままであり、核内にＤＮＡを輸送する能力を有することを確実にするために注入することができる。

【０２２８】

細胞特異性を試験するために、候補ＤＴＳ含有プラスミドを、ＨＥＫ２９３、初代平滑筋細胞及び内皮細胞、並びにヒト線維芽細胞を含む複数の細胞型に、微量注入することができる。本発明者らの経験に基づいて、この画面から２～４つの一般的なＤＴＳを識別できると予測することができる。移入活性を示すプロモーター配列が同定されると、Ｍｉｌｌｅｒ，Ａ．Ｍ．＆Ｄｅａｎ，Ｄ．Ａ．Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ　１５，１１０７－１１１５（２００８）、Ｄｅｇｉｕｌｉｏ，Ｊ．Ｖ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ　１７，５４１－５４９，ｄｏｉ：１０．１０３８／ｇｔ．２００９．１６６（２０１０）、及

びＧｏｔｔｆｒｉｅｄ，Ｌ．，ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ ２３，７３４－７４２，ｄｏｉ：１０．１０３８／ｇｔ．２０１６．５２（２０１６）に記載されている方法で、核標的化を助ける最小配列の長さを同定するために、限られた数の切断型プロモーター（例えば、３～４）を作製することができる。次に、Ｄｅａｎ，Ｄ．Ａ．，ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ １０，１６０８－１６１５（２００３）、Ｍａｃｈａｄｏ－Ａｒａｎｄａ，Ｄ．ｅｔ ａｌ．Ａｍ Ｊ Ｒｅｓｐｉｒ Ｃｒｉｔ Ｃａｒｅ Ｍｅｄ １７１，２０４－２１１（２００５）、Ｍｕｔｌｕ，Ｇ．Ｍ．ｅｔ ａｌ．，Ａｍ Ｊ Ｒｅｓｐｉｒ Ｃｒｉｔ Ｃａｒｅ Ｍｅｄ １７６，５８２－５９０（２００７）、Ｚｈｏｕ，Ｒ．，ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ ｔｈｅｒａｐｙ １４，７７５－７８０，ｄｏｉ：１０．１０３８／ｓｊ．ｇｔ．３３０２９３６（２００７）、Ｙｏｕｎｇ，Ｊ．Ｌ．，ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ １１２１，１８９－２０４，ｄｏｉ：１０．１００７／９７８－１－４６１４－９６３２－８＿１７（２０１４）、及びＹｏｕｎｇ，Ｊ．Ｌ．ｅｔ ａｌ．，Ａｄｖ Ｇｅｎｅｔ ８９，４９－８８，ｄｏｉ：１０．１０１６／ｂｓ．ａｄｇｅｎ．２０１４．１０．００３（２０１５）に記載されているように、これらの最小ＤＴＳが、エレクトロポレーションによるマウスの肺への送達後のｉｎ ｖｉｖｏでのプラスミド核ターゲティングを助け、肺の薄い切片におけるｅＧＦＰ発現のためのＩＦによるプラスミドの核送達を定量化するかどうかを判定することができる。対照として、ＤＴＳ又はＳＶ４０ ＤＴＳを保有していないレポータープラスミドもマウスの肺に移入する。

【０２２９】

２～４個のプロモーターが培養細胞において一般的なＤＴＳ活性を示すことが予想される。したがって、マウスにおいて４つの潜在的ＤＴＳ及び２つの対照を試験することができる（ｎ＝６）。これを雄及び雌のＣ５７Ｂ６マウスで別々に試験し、実験を１回繰り返すこともできる。遺伝子導入の２日後、動物を安楽死させ、肺を灌流し、４％パラホルムアルデヒドで固定し、ショ糖溶液に通し、凍結薄切片化のためにＯＣＴに包埋する。ＧＦＰ陽性細胞を各細胞特異的マーカーと共にカウントして、各細胞型に対するＧＦＰ陽性細胞の数を判定する。アセチル化チューブリン（線毛気道上皮細胞）、ＣＣＳＰ（クラブ細胞）、Ｍｕｃ５ＡＣ（杯細胞）、ＣＤ３１（内皮細胞）及びＳＭＡＡ（平滑筋）に対する抗体を使用して、肺細胞型を同定することができる。本発明者らは、過去にこの手法を使用して、核移入の細胞特異性を判定した。次いで、最良の配列を本発明者らのＡＣＥ－ｔＲＮＡミニベクターに組み込んで、送達及び発現を最大化することができる。重要なことに、同定されたＤＴＳは、核標的化及び治療的導入遺伝子発現を増強するためのすべてのＤＮＡ治療手法に直接適用することができる。

【０２３０】

実施例８ ＤＴＳ及びＴＥＬＳを有するＭＣ及びＣＥＤＴ

この実施例では、５００ｂｐのＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Ａｒｇ}_{ＵＧＡ}$（配列番号８）ＭＣ及びＣＥＤＴへのＤＴＳ及びＴＥＬＳの組み込みが、核標的化、転写及びＰＴＣ抑制を改善するかどうかを調べるためにアッセイを行う。

【０２３１】

重要なことに、既存のＭＣ及びＣＥＤＴ技術は、細胞培養及びｉｎ ｖｉｖｏの両方で、ＰＴＣ抑制において効率的である（図４～図７及び図１０）。かく言うものの、ｔＲＮＡ転写因子（Ｐｏｌ ＩＩＩ転写エレメント）は、細胞質注入後にＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}のＭＣを核（図８Ｂ）の中にエスコートしなかった。したがって、核標的化、転写及びＰＴＣ抑制を改善するために、７２ヌクレオチドＳＶ４０ ＤＴＳ及び一般に活性なＤＴＳを有するＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Ａｒｇ}_{ＵＧＡ}$のＭＣ及びＣＥＤＴが生成されている。１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞へのこれらのベクターの細胞質及び核注入は、本明細書に記載されるのと同じ方法で行われる。

【０２３２】

ＤＮＡ局在化を、４時間後にＦＩＳＨを使用して判定する。以下に概説するように、ｐＮＬｕｃ－ＵＧＡ ＰＴＣレポータープラスミド（ＣＥＤＴ、ｎ＝８；ＣＥＤＴ－ＤＴＳ

、ｎ＝８；ＭＣ、ｎ＝８；ＭＣ－ＤＴＳ、ｎ＝８；男性４人及び女性４人）と同時エレクトロポレーションをしたＤＴＳを伴う又は伴わないＣＥＤＴ及びＭＣを用いた限定的マウスの肺エレクトロポレーション試験も実施する。ＳＶ４０　ＤＴＳ及び４つのＤＴＳを、ＭＣ又はＣＥＤＴあたり合計５つのＤＴＳについて試験する（９６匹のマウスを使用）。様々なＤＴＳの添加は、その核生物学的利用能を増加させることによってＡＣＥ－ｔＲＮＡ転写を大幅に増強し、その後ＰＴＣ抑制を増強すると仮定される。ＤＴＳ修飾を包含することは、ｉｎ　ｖｉｖｏのエレクトロポレーション研究において２倍を超えるＰＴＣ抑制をもたらし得ると予測される。

【０２３３】

実施例９　ミニベクターの細胞内ＰＴＣ抑制能力

この実施例は、１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞（ｐ．Ｇ５４２Ｘ、ｐ．Ｒ１１６２Ｘ及びｐ．Ｗ１２８２Ｘ）においてＰＴＣを抑制するミニベクターの能力を判定するための研究を記載する。ここで使用される送達方法は、ＬＯＮＺＡ　４Ｄ－ＮＵＣＬＥＯＦＥＣＴＯＲ（商標）Ｘシステムであり、溶液「ＳＧ」及びプログラムＣＭ－１３７は、１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞に対して既に最適化されている。

【０２３４】

ｐＲ１１６２Ｘ－ＣＦＴＲ１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞において、ベクターのサイズがＡＣＥ－ｔＲＮＡのＣＥＤＴ及びＭＣのＰＴＣ抑制に与える影響を、１２５、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００及び１０００ｂｐのＤＮＡミニベクターのスクリーニングを行うことによって調べる。ｐ．Ｒ１１６２Ｘ－ＣＦＴＲのレスキュー機能を、Ｕｓｓｉｎｇチャンバーの記録（ｎ＝４～６）及びその後のｑＰＣＲ分析を使用して判定して、定常状態のＣＦＴＲｍＲＮＡの発現を判定する（ｎ＝４～６）。Ｕｓｓｉｎｇチャンバーの記録の場合、本発明者らは、５ｍＭデキストロースを補充したＣｌ－勾配（１４０ｍＭのＣｌ－基底外側／４．８ｍＭのＣｌ－）及びその後のアミロライド（１００μＭ）の添加を用いてＥＮａＣ及びＤＩＤ（１００μＭ）をブロックしてＣａＣＣ活性をブロックする。その後、ＣＦＴＲはフォルスコリン（１０μＭ）及びＩＢＭＸ（３－イソブチル－１－メチルキサンチン、１００μＭ）によって活性化され、１０μＭのＩｎｈ１７２によって阻害される。ＣＦＴＲ活性のレスキューを、図５Ｂに記載されるように、Ｆ＆Ｉの前後及びＩｎｈ１７２の前後のブロックのΔI_{Cl}として分析する。

【０２３５】

最適なミニベクターの条件を使用して、ｐ．Ｗ１２８２Ｘ　１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞に送達されるＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Leu}_{UGA}$（配列番号４）をコードするＭＣ及びＣＥＤＴの機能を検証する。上記の例で同定された上位のＤＴＳ及びＴＥＬ配列は、最適のサイズのミニベクターに含まれる。ミニベクターのＰＴＣ抑制能を数倍に高めることが期待される。

【０２３６】

実施例１０　ＡＣＥ－ｔＲＮＡ発現ベクターは、マウスにおけるＣＦＴＲ　ｐ．Ｇ５４２Ｘ及びｐ．Ｗ１２８２Ｘを抑制する。

この実施例は、マウスの肺における、ＡＣＥ－ｔＲＮＡをコードするｃＤＮＡプラスミド、ＣＥＤＴ及びＭＣが、ＣＦＴＲのｐ．Ｇ５４２Ｘ及びｐ．Ｗ１２８２Ｘを抑制する能力を調べるための研究を記載する。ｐ．Ｇ５４２Ｘ及びｐ．Ｗ１２８２Ｘ－ＣＦＴＲのＰＴＣ変異を備えるマウスモデルが生成されている。例えば、ｐ．Ｇ５４２Ｘマウスは、ＭｃＨｕｇｈ，Ｄ．Ｒ．，ｅｔ　ａｌ．，ＰｌｏＳ　ｏｎｅ　１３，ｅ０１９９５７３，ｄｏｉ：１０．１３７１／ｊｏｕｒｎａｌ．ｐｏｎｅ．０１９９５７３（２０１８）において公表されている。これらのｐ．Ｇ５４２Ｘ及びｐ．Ｗ１２８２Ｘ－ＣＦＴＲマウスは、ＣＦＴＲ転写物の変化がヒトを細かく再現するので、ＰＴＣ治療を研究するために使用される。

【０２３７】

電界（エレクトロポレーション）法は、当技術分野で公知の方法を使用してＤＮＡベクターを肺に送達するために利用される。例えば、Ｄｅａｎ，Ｄ．Ａ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｇ

ｅｎｅ Ｔｈｅｒ １０，１６０８－１６１５（２００３）、Ｚｈｏｕ，Ｒ．＆Ｄｅａｎ，Ｄ．Ａ．Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ ｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ ｍｅｄｉｃｉｎｅ（メイウッド、ニュージャージー州）２３２，３６２－３６９（２００７）、Ｏ’Ｒｅｉｌｌｙ，Ｍ．Ａ．ｅｔ ａｌ．Ｔｈｅ Ａｍｅｒｉｃａｎ ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｐａｔｈｏｌｏｇｙ １８１，４４１－４５１，ｄｏｉ：１０．１０１６／ｊ．ａｊｐａｔｈ．２０１２．０５．００５（２０１２）、Ｍｕｔｌｕ，Ｇ．Ｍ．ｅｔ ａｌ．，Ａｍｅｒｉｃａｎ ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｒｅｓｐｉｒａｔｏｒｙ ａｎｄ ｃｒｉｔｉｃａｌ ｃａｒｅ ｍｅｄｉｃｉｎｅ １７６，５８２－５９０，ｄｏｉ：１０．１１６４／ｒｃｃｍ．２００６０８－１２４６ＯＣ（２００７）、Ｂｌａｉｒ－Ｐａｒｋｓ，Ｋ．，ｅｔ ａｌ．，Ｔｈｅ ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｇｅｎｅ ｍｅｄｉｃｉｎｅ ４，９２－１００（２００２）、ａｎｄ Ｂａｒｎｅｔｔ，Ｒ．Ｃ．ｅｔ ａｌ．，Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ ｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ ｍｅｄｉｃｉｎｅ（メイウッド、ニュージャージー州）２４２，１３４５－１３５４，ｄｏｉ：１０．１１７７／１５３５３７０２１７７１３０００（２０１７）を参照のこと。ここでは、ｃＤＮＡプラスミド並びに５００ｂｐのＣＥＤＴ及びＭＣを、３週齢（離乳）ホモ接合性ＣＦＴＲのｐ．Ｇ５４２Ｘ（ＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Ｇｌｙ}_{ＵＧＡ}$）及びｐ．Ｗ１２８２Ｘ（ＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Ｌｅｕ}_{ＵＧＡ}$）マウスの肺に、エレクトロポレーションにより送達する。スクランブルのｔＲＮＡ配列をコードするｃＤＮＡプラスミド（ＭＣ及びＣＥＤＴの両方に対して２．７ｋｂのｐｕｃ５７親プラスミド）を、エレクトロポレーションの効果、及び発現されたＡＣＥ－ｔＲＮＡが肺細胞生存率に与える可能な効果の対照として使用する。簡潔には、塩平衡溶液中の５０ｕｌのＤＮＡ（２ｍｇ／ｍｌ）をマウスの肺に吸引する。送達直後に、イソフルランを投与しながら、小児の皮膚ペースメーカー電極（ＭＥＤＴＲＯＮＩＣＳ）を使用して一連の８×１０ｍｓｅｃの方形波電気パルス（２００Ｖ／ｃｍ）を動物に投与する。電極は、コンダクタンスを助けるために、少量の外科用潤滑剤を使用して、胸部の両側に配置される。

【０２３８】

マウスを、送達の７、１４及び２１日後（ｄ）に分析する。腸閉塞のために、ホモ接合ｐ．Ｇ５４２Ｘ－及びｐ．Ｗ１２８２Ｘ－ＣＦＴＲマウスのわずか４０％しか４０日齢まで生存しなかったので、研究は、各群について、ｎ＝６を達成するよう大規模コホートのマウス（ｎ＝１２）から開始する。合計で、最低で３８４匹のマウスを使用してこの研究を完了している。適切な実験動物を実現するために、両方の性別を使用している。各時点で、マウスを安楽死させ、肺を取り出し、左右の肺葉に分離する。凍結させた切片のため、ＯＣＴに埋め込む前に、右葉を灌流し、４％パラホルムアルデヒド／３０％スクロースで膨張固定する。左葉をタンパク質（ウエスタンブロット、ＷＢ）及びＲＮＡ単離のために急速凍結する。肺の左葉を液体窒素下で粉砕し、肺粉末の１／８をＣＦＴＲｍＲＮＡについて分析する。残りの肺を、１５０ｍＭのＮａＣｌ、５０ｍＭのＴｒｉｓ、ｐＨ８．０を含有するバッファーの中で、ダウンス式にホモジナイズし、プロテアーゼ阻害剤及び２％のＣＨＡＰＳ（ｗ／ｖ）を補充する。グリコシル化ＣＦＴＲタンパク質を、小麦胚芽アグルチン（ＷＧＡ）結合アガロースビーズを使用して親和性精製し、洗浄し、２００ｍＭのＮ－アセチルグルコサミン（ＮＡＧ）で溶出する。試料を、抗ＣＦＴＲ抗体（１：１０００；米国ＭＩＬＬＩＰＯＲＥのＭ３Ａ７）を使用して免疫ブロットする。マウス由来の腸は、ＷＢ及びｑＰＣＲ分析のための未治療組織対照として機能する。右葉の切片を、上、中央、及び下を表す肺の３つの高さで切断し、ミニベクター及びＤＡＰＩに向かってＦＩＳＨ（Ｃｙ５又はＣｙ３）で染色する（図８）。気道の細胞は、どの細胞がトランスフェクトされているかを同定するために、連続的な切片で特異的抗体と共染色することによって、同定される。定量は、肺の各レベルからの１０の切片におけるＦＩＳＨ＋細胞／総細胞の数を数えることによって行う。

【０２３９】

共染色に使用される抗体には、ケラチン５（粘膜下の腺の基底細胞）、アセチル化チューブリン及びＦｏｘＪ１（染色に応じて線毛又は非線毛気道上皮細胞）、神経発育因子受容体、ケラチン１４、ｐ６３（気道の基底細胞）、及びＭｕｃ５ＡＣ（杯細胞）が含まれ

る。ＣＦＴＲは、マウスモノクローナルＣＦＴＲ－７６９を使用して免疫組織化学及び免疫蛍光法によって検出される。エレクトロポレーションはＤＮＡを気道上皮細胞（図６Ａ）に送達するのに非常に効率的であるので、本発明者らは、ＩＦによって検出するのに十分高いレベルである、気道上皮細胞におけるＣＦＴＲタンパク質の有意な救済（＞１０％）を予測している。

【０２４０】

炎症性サイトカインレベルを、マウスのサブセット（ｎ＝６）において、エレクトロポレーションの前及び直後に測定し、次いで、再度、肺採取時（７日の時点）に測定して、治療が炎症応答を引き起こしたかどうかを判定する。重要なことに、これは以前に、エレクトロポレーション後、ブタ又はマウスにおいて炎症性反応を示さなかった。ヘマトキシリン及びエオシン（Ｈ＆Ｅ）組織学的分析を行って、肺の形態の変化を検出する。

【０２４１】

実施例１１　ＷＴマウスの肺におけるＡＣＥ－ｔＲＮＡＡｒｇＵＧＡ発現ベクターの持続性

この実施例は、ＷＴマウスの肺におけるＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Arg}_{UGA}$（配列番号８）発現プラスミド、ＣＥＤＴ及びＭＣの持続性を判定するための研究である。

【０２４２】

４０日間生存したｐ．Ｇ５４２Ｘ及びｐ．Ｗ１２８２Ｘ－ＣＦＴＲマウスが非常に少ないため、おそらく、実施例１０ではＣＥＤＴ及びＭＣからのＡＣＥ－ｔＲＮＡ発現の完全な持続性を判定することが不可能であり得る。本発明者らは、６ヶ月齢を超えるマウスの肺における導入遺伝子の発現を実証した。したがって、本発明者らは、実施例１０）に以前に記載されたように、３週齢のＣ５７Ｂｌ／６雄ＷＴマウスの肺に、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Arg}_{UGA}$をコードするｃＤＮＡプラスミド（ＭＣ及びＣＥＤＴの両方について２．７ｋｂのｐｕｃ５７親プラスミド）、５００ｂｐのＣＥＤＴ及びＭＣを送達し、それらの送達効率及び持続性並びにＰＴＣ抑制効率を判定する。スクランブルのｔＲＮＡ配列をコードする親プラスミドを、エレクトロポレーションの効果、並びに発現されたＡＣＥ－ｔＲＮＡが７日間、１４日間及び１ヶ月、２ヶ月、６ヶ月及び１２ヶ月で肺細胞の生存率に与える可能な効果の対照として使用する。

【０２４３】

試験は、治療あたり１０匹のマウス（雄５匹／雌５匹）で開始し、エンドポイントは、合計２４０匹のマウスについて、試験のこの部分のために使用される。各エンドポイントの３日前に、短いユビキチンＣプロモーター（ｓｈＵｂＣ）の制御下でｎ末端血液凝集素（ＨＡ）エピトープタグ及びｃ末端ＦＬＡＧエピトープタグを有するＮＬｕｃ－ＵＧＡタンパク質を発現する核標的化のためのＳＶ４０－ＤＴＳを有する小型（３ｋｂ）ＰＴＣレポーターｃＤＮＡプラスミドの後続的な送達を行う（図９）。

【０２４４】

定められたエンドポイントで、肺を取り出し、ＩＦ及びＦＩＳＨ分析（右葉）並びにタンパク質生化学（左葉）について、上記のように治療する。ＰＴＣレポータープラスミドは、多機能性であり、ミンベクター（ｍｉｎｖｅｃｔｏｒ）とは完全に異なる配列を有し、したがって、プラスミドの共送達効率を判定するためにｃｏ－ＦＩＳＨによって同定することができる。ミニベクターとＰＴＣレポータープラスミドが共局在する場合、リードスルー効率は、ｉｎ　ｖｉｖｏイメージングを使用するＮＬｕｃ発光、外植された肺組織のプレートリーダー測定（図６Ｂ）、又はｃ末端ＦＬＡＧタグを使用する生化学的測定（左葉）によって、判定することができる。ＮＬｕｃタンパク質の発現の後に、ｎ末端ＨＡエピトープタグを使用してＩＦ又はＷＢを続けることができ、ＰＴＣが抑制された場合にのみ、明らかなＦＬＡＧシグナルが存在する。重要なことに、このＤＮＡコンストラクトは、ＰＴＣ抑制のための最良のＡＣＥ－ｔＲＮＡ配列を同定するために本発明者らのハイスループットスクリーニングで使用されるものと類似している。これは、バックグラウンドのリードスルーを低減して真正なＰＴＣ抑制を忠実に報告することによって、ノイズに高いシグナルを与えるように修正されている。

【０２４５】

この試験では、マウスで概説した実験の再現性を確実にするために、１バッチで、５．５ｇのエンドトキシンを不含有のＰＴＣレポーターｃＤＮＡプラスミドを作製した（ＡＬＤＥＶＲＯＮ）。５００ｂｐのミニベクターの送達は、（細胞の共ＦＩＳＨ標識によって判定されるように）３ｋｂのＰＴＣレポータープラスミドよりも効率的であり、したがってミニベクターのＰＴＣ抑制活性の過小評価を与えると予測される。本発明者らは、ミニベクターに対してＦＩＳＨを使用して、各エンドポイントでの肺におけるミニベクターの存在の持続性を判定し、ＰＴＣレポーターｃ末端ＦＬＡＧエピトープに対する発光及びＩＦを使用して、抑制作用の持続性を定量する。ＦＩＳＨと対にした実施例１０に詳述されているＩＦ抗体及び技術を使用して、どの細胞型が形質導入されているかを同定する。

【０２４６】

ＣＦＴＲの機能の測定を行うために、Ｇｒｕｂｂ，Ｂ．Ｒ．，ｅｔ ａｌ．，Ａｍ Ｊ Ｐｈｙｓｉｏｌ ２６７，Ｃ２９３－３００，ｄｏｉ：１０．１１５２／ａｊｐｃｅｌｌ．１９９４．２６７．１．Ｃ２９３（１９９４），１６０ Ｇｒｕｂｂ，Ｂ．Ｒ．ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ ３７１，８０２－８０６，ｄｏｉ：１０．１０３８／３７１８０２ａ０（１９９４）、及びＧｒｕｂｂ，Ｂ．Ｒ．，ｅｔ ａｌ．，Ａｍ Ｊ Ｐｈｙｓｉｏｌ ２６６，Ｃ１４７８－１４８３，ｄｏｉ：１０．１１５２／ａｊｐｃｅｌｌ．１９９４．２６６．５．Ｃ１４７８（１９９４）に記載されているように、気管を除去し、長手方向に半分に分割する。半分は、直径２ｍｍの開口チャンバーを有するＵｓｓｉｎｇチャンバー（ＰＨＹＳＩＯＬＯＧＩＣ ＩＮＳＴＲＵＭＥＮＴＳ）に分析のために取り付けられ、短絡電流は、Ｃｏｏｎｅｙ，Ａ．Ｌ．ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ４６，９５９１－９６００，ｄｏｉ：１０．１０９３／ｎａｒ／ｇｋｙ７７３（２０１８）、Ｃｏｏｎｅｙ，Ａ．Ｌ．ｅｔ ａｌ．，ＪＣＩ Ｉｎｓｉｇｈｔ １，ｄｏｉ：１０．１１７２／ｊｃｉ．ｉｎｓｉｇｈｔ．８８７３０（２０１６）、Ｍａｌｌ，Ｍ．，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｍｅｄ １０，４８７－４９３（２００４）、ａｎｄ Ｚｈｏｕ，Ｚ．ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｃｙｓｔ Ｆｉｂｒｏｓ １０ Ｓｕｐｐｌ ２，Ｓ１７２－１８２，ｄｏｉ：１０．１０１６／Ｓ１５６９－１９９３（１１）６００２１－０（２０１１）に記載されている方法で測定される。短絡電流の差は、図７Ｂ～図７Ｄで行われた実験と同様に、気管切片の基底外側に１０μＭのフォルスコリン及び１００μＭのＩＢＭＸを添加し、続いて１０μＭのＩｎｈ１７２を添加した後に計算される。残りの気管の切片を使用して、ＮＢＤ２ドメインに対するＣＦＴＲ７６９抗体を使用する免疫蛍光によって、気道におけるＣＦＴＲの発現を判定することができる。重要なことに、肺の切除された部分は、将来のＲＮＡｓｅｑ及びＲｉｂｏｓｅｑ研究のために積み立てられる。

【０２４７】

本明細書に記載されるいくつかの実験のために、本発明者らは、ＡＣＥ－ｔＲＮＡの持続的発現を外挿するためにＰＴＣ抑制プレートリーダー発光アッセイに依拠する。目標は、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ転写活性の直接的な測定を可能にする技術を創出することである。その目的のために、本発明者らは、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ：バーコード融合転写物をコードし、バーコード配列（ＡＢＳ）は内因性のｔＲＮａｓｅ Ｚによって切断され、ｑＰＣＲ定量化を可能にして相対的なＡＣＥ－ｔＲＮＡ発現を判定しながら、完全に機能的なＡＣＥ－ｔＲＮＡを得ることができる（図１０Ａ）。

【０２４８】

本発明者らは、マウスのゲノム配列と相同性のないランダムな２００ｂｐのバーコード配列を設計した。ＮＬｕｃ－ＵＧＡを安定して発現する１６ＨＢＥ１４ｏ－細胞にトランスフェクトされた場合、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Ａｒｇ}{}_{ＵＧＡ}$－及びＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Ｔｒｐ}{}_{ＵＧＡ}$－バーコードは、ｑＰＣＲによってモニターした場合にロバストな発現を示すが、非バーコード化ＡＣＥ－ｔＲＮＡは意義あるシグナルを与えなかった（図１０Ｂ）。しかし、１つの場合では、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ$^{Ａｒｇ}{}_{ＵＧＡ}$の抑制活性は、３’バーコード配列の存在によって妨げられた（図１０Ｃ）。ＡＣＥ－ｔＲＮＡ活性の欠損は、３’プロセシングが不十分であるためである可能性が最も高く、バーコード配列に対してプローブ探査されたノーザンブロットによって判定することができる。その配列がバーコード又は改変させた

バーコードリンカー配列としても作用して３’プロセシングを改善する３’ＨＤＶ自己切断リボザイムをコードすることによって、ＡＢＳ技術を改善するための作業を行うことができる。３’リボザイムの組み込みは、改善されたＡＣＥ－ｔＲＮＡの３’プロセシングをもたらし、それらのＰＴＣ抑制活性を増加させ得る。さらに、ＡＢＳ技術はＮＬｕｃ　ＰＴＣレポーターを補完するためのＡＣＥ－ｔＲＮＡ発現の測定を可能にする（図９）。

【０２４９】

別の実施形態では、本発明者らは、定常状態のＡＣＥ－ｔＲＮＡ転写活性の高分解能で直接的な測定を可能にする新規なＡＣＥ－ｔＲＮＡバーコードシステム技術を作り出した（図１１Ａ）。標準的なＲＮＡ－ｓｅｑ法は、広範な転写後修飾及び二次構造のために、ｔＲＮＡで実施することができない。Ｚｈｅｎｇ，Ｇ．ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　１２，８３５　ａｎｄ　Ｐａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｗｉｌｅｙ　Ｉｎｔｅｒｄｉｓｃｉｐ　Ｒｅｖ　ＲＮＡ　５，４６１－４８０，ｄｏｉ：１０．１００２／ｗｒｎａ．１２２４（２０１４）。さらに、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ配列は、１つ又は複数の内因性のｔＲＮＡと１つのヌクレオチドのみが異なり、したがって、ノーザンブロット、マイクロアレイ及び断片化ＲＮＡ－ｓｅｑは、外因性治療用ＡＣＥ－ｔＲＮＡ及び内因性のｔＲＮＡの発現レベルを識別することができない。したがって、本発明者らは、これらの問題を回避し、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ転写の信頼性の高い直接的かつ高感度のｑＲＴ－ＰＣＲ測定をもたらすバーコード技術を生成した。ここで、固有の３’バーコード配列は、ＨＤＶリボザイム（ｄｒｚ－Ｂｆｏ－２、６０ｂｐ）をコードする。（Ｗｅｂｂ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　３２６，９５３（２００９）、及びＷｅｂｂ　ｅｔ　ａｌ．，ＲＮＡ　Ｂｉｏｌ　８，７１９－７２７（２０１１））、転写後にＡＣＥ－ｔＲＮＡ本体から自身を効率的に切断する（９０％超）（図１１Ｂ）。ＡＣＥ－ｔＲＮＡの転写によって駆動されるＨＤＶの発現を、プローブベースのｑＲＴ－ＰＣＲを使用して定量する。重要なことに、バーコード化ベクターで発現されるＡＣＥ－ｔＲＮＡは、３’末端の２’、３’環状ホスフェート基修飾（Ｓｃｈｕｒｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ　３０，ｅ５６－ｅ５６，２００２）のために翻訳に関与することができず、したがってＰＴＣ抑制の結果を混同しない。

【０２５０】

実施例１２　Ｇ４１８及びＡＣＥ－ｔＲＮＡの内因性のＣＦＴＲのＰＴＣの救済

この実施例では、内因性のＣＦＴＲのＰＴＣの救済を調べ、従来のＰＴＣリードスルー剤（すなわち、Ｇ４１８）及びプラスミドに送達されたＡＣＥ－ｔＲＮＡと比較するために、試験が実行された。その目的のために、操作されたヒト細気管支上皮細胞株、１６ＨＢＥ１４ｇｅ－を使用した（Ｖａｌｌｅｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｃｙｓｔｉｃ　Ｆｉｂｒｏｓｉｓ，Ｖｏｌｕｍｅ　１８，Ｉｓｓｕｅ　４，Ｊｕｌｙ　２０１９，Ｐａｇｅｓ　４７６－４８３）。Ｇ４１８（Ｇｅｎｅｔｉｃｉｎ）は、リボソームの復号中心と相互作用し、近い同族ｔＲＮＡでＰＴＣの抑制を促進することによって作用し、したがって多くの場合誤ったアミノ酸を組み込む標準的なＰＴＣリードスルー剤である。その非特異的な性質のために、Ｇ４１８による救済は、ナンセンス突然変異からのミスセンス変異の生成をもたらす。対照的に、本明細書に開示されるようなＡＣＥ－ｔＲＮＡは、所望のアミノ酸に入れられる。

【０２５１】

アッセイを実施するために、Ｗ１２８２Ｘ－ＣＦＴＲ又はＲ１１６２Ｘ－ＣＦＴＲの変異を有する野生型１６ＨＢＥ１４ｇｅー細胞又は１６ＨＢＥ１４ｇｅー細胞は、（ｉ）１００ｕＭのＧ４１８又はビヒクルで処理するか、又は（ｉｉ）実施例４に記載の方法で、３つのＡＣＥ－ｔＲＮＡ（配列番号８、４及び１）、１×ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}、４×ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}、１×ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ｌｅｕ}、４×ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ｌｅｕ}、１×ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ｔｒｐ}及び４×ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ｔｒｐ}の１つ又は４つのコピーをコードする空のプラスミド又は様々なプラスミドで、トランスフェクトされた。４８時間後、対応するＣＦＴＲｍＲＮＡ発現レベルを次いで判定した。結果を図１４に示す。

【０２５２】

図に示されるように、プラスミドからコードされ、１６ＨＢＥ１４ｇｅ－細胞にトランスフェクトされたＡＣＥ－ｔＲＮＡは、アルギニン及びロイシンＡＣＥ－ｔＲＮＡを使用して、翻訳の先駆けとなるラウンドを促進することによって、Ｇ４１８よりも、ナンセンスコドン介在的分解過程の阻害において、有意に効果的であった。このデータの重要な態様はまた、本明細書に開示されるプラットフォームがアラカルトのＰＴＣ抑制を助けることである。予想外にも、ロイシンＡＣＥ－ｔＲＮＡは、トリプトファンＡＣＥ－ｔＲＮＡよりも効果的にＷ１２８２Ｘを抑制することが見出された。Ｗ１２８２Ｘの位置のロイシンは、ＷＴレベルのＣＦＴＲ機能を助ける（Ｘｕ　ｅｔ　ａｌ．，Ｈｕｍ　Ｍｏｌ　Ｇｅｎｅｔ．２０１７　Ａｕｇ　１５；２６（１６）：３１１６－３１２９）ので、本明細書に記載のＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ｌｅｕ}を使用して、変異ｐｆ　Ｗ１２８２Ｘ－ＣＦＴＲを救済又は抑制することができる。

【０２５３】

ＰＴＣは、（ａ）完全な機能喪失又は変化した機能を有する切断型タンパク質、及び（ｂ）ＮＭＤ経路によるｍＲＮＡ転写物の分解の両方をもたらすので、両方のフロントに対するＡＣＥ－ｔＲＮＡの効果を調べるために、追加のアッセイを設計し、実施した。より具体的には、図１５Ａに示すように、１６ＨＢＥ１４ｇｅ－細胞を作製して、ＰＴＣリードスルー・レポーターｐｉｇｇｙＢａｃ導入遺伝子を発現させた。導入遺伝子はＰＴＣを有するｍＮｅｏｎＧｒｅｅｎ（ｍＮＧ）タンパク質をコードするので、ＡＣＥ－ｔＲＮＡによるＰＴＣの抑制は、発現したｍＮＧタンパク質からの蛍光に基づくＦＡＣの選別によって、定量することができる。その目的に対して、蛍光の増加は、翻訳レベルでのＰＴＣの抑制を表す。

【０２５４】

これらの細胞は、１００ｕＭのＧ４１８で処理するか、又は上記の方法で４×ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}をコードするプラスミドでトランスフェクトされた。次いで、細胞を、発現したｍＮＧタンパク質からの蛍光について調べた。結果を図１５Ｂに示す。図に示すように、アルギニンＡＣＥ－ｔＲＮＡは、強固なＰＴＣ抑制及び完全長のｍＮｅｏｎＧｒｅｅｎタンパク質の生成を助けた。対照的に、Ｇ４１８は強固なＰＴＣ抑制を助けなかった。灰色のプロファイルは、非処理のＰＢ－ｍＮｅｏｎＧｒｅｅｎ－Ｒ１１６２Ｘ－１６ＨＢＥ１４ｇｅ－細胞についてのものであった。

【０２５５】

実施例１３　様々なフォーマットで送達されるＡＣＥ－ｔＲＮＡの内因性のＣＦＴＲのＰＴＣのレスキュー

この実施例では、内因性のＣＦＴＲのＰＴＣの救済を調べ、様々なフォーマット、例えば、プラスミド、ＣＥＤＴ及びＭＣで送達されるＡＣＥ－ｔＲＮＡに送達されたＡＣＥ－ｔＲＮＡと比較するために、アッセイが実行された。ＰＴＣリードスルー・レポーターｐｉｇｇｙＢａｃ導入遺伝子（図１５Ａ）を発現する上記の１６ＨＢＥ１４ｇｅ－細胞を使用した。より具体的には、細胞が、ＡＣＥ－ｔＲＮＡをコードするプラスミド、ＣＥＤＴ又はＭＣでトランスフェクトされた。次いで、細胞をＦＡＣＳによって選別し、ｍＲＮＡを非緑色細胞及び緑色細胞から単離した。標的化ＲＴ－ｑＰＣＲを使用して、ＣＦＴＲのｍＲＮＡ発現を定量した。

【０２５６】

いくつかの論文では、細胞が、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}及びＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ｌｅｕ}をコードするプラスミド（配列番号８及び４）でトランスフェクトされた。結果を図１６Ａ及び図１６Ｂに示す。図１６Ｂに示すように、プラスミドを介して送達されたＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}及びＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ｌｅｕ}の両方が、それぞれＲ１１６２Ｘ及びＷ１２８２Ｘ１６ＨＢＥ１４ｇｅ－細胞からＣＦＴＲｍＲＮＡを有意にレスキューした。このようなＣＦＴＲのｍＲＮＡの救済は、緑色細胞（ＧＦＰ＋）及び非緑色細胞（ＧＦＰ－）の両方で観察された。非緑色の細胞が依然としてＣＦＴＲのｍＲＮＡ発現の救済をしていた理由は、ＡＣＥ－ｔＲＮＡが、有意なレベルの翻訳ではなく、先駆けとなるラウンドの翻訳によって、ｍＲＮＡの発現を効果的にレスキューしていたためであった。これらの結果は

、ＮＭＤの阻害が強固な翻訳レスキューよりも達成が比較的容易であることを示唆した。

【０２５７】

他のアッセイでは、Ｒ１１６２Ｘ－ＣＦＴＲ及びＰＴＣリードスルー・レポーターｐｉｇｇｙＢａｃ導入遺伝子を有する１６ＨＢＥｇｅ細胞に、エレクトロポレーションによってＡＣＥ－ｔＲＮＡをコードするミニサークルがトランスフェクトされた。これらの細胞をｍＲＮＡ発現分析のためにＦＡＣＳによって選別せず、むしろ集団全体を分析した。図１７Ａに示すように、ミニサークルをコードするＡＣＥ－ｔＲＮＡは、大部分の細胞において強固なｍＮｅｏｎＧｒｅｅｎの発現を助けた。これらの結果は、ミニサークルを発現するＡＣＥ－ｔＲＮＡが、タンパク質レベルで定量可能なレベルまでＰＴＣの抑制を助けることを示した。この救済は、親プラスミド（約７．０ｋｂのサイズ）及びスクランブルの対照よりも有意に良好であった。また、ＡＣＥ－ｔＲＮＡの１つのコピーをコードする８５０ｂｐのＭＣ（「１×ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}８５０ｂｐのＭＣ」）及びＡＣＥ－ｔＲＮＡの４つのコピーをコードする８５０ｂｐのＭＣ（「４×ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}８５０ｂｐのＭＣ」）は、同様のレベルのＣＦＴＲｍのＲＮＡの発現をもたらした（図１７Ｂ）。しかし、後者は、はるかに多くのｍＮｅｏｎＧｒｅｅｎの発現細胞をもたらした（図１７Ａ、下２つのパネル）。これらの結果は、ＡＣＥ－ｔＲＮＡの量の増加がＮＭＤ阻害を増加させるようには見えなかったが、タンパク質の生成を増加させることを示唆した。このレベルのｍＲＮＡ発現救済は、前例のない新規なものであった。

【０２５８】

さらなるアッセイを、Ｗ１２８２Ｘ－ＣＦＴＲ及びＰＴＣリードスルー・レポーターｐｉｇｇｙＢａｃ導入遺伝子を有する１６ＨＢＥｇｅ細胞を使用して行った。これらのアッセイでは、細胞が、スクランブル対照、４コピーのＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ｌｅｕ}をコードするプラスミド（「４×ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ｌｅｕ}親プラスミド」）、又はエレクトロポレーションによって４コピーのＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ｌｅｕ}をコードする８５０ｂｐのＭＣ（「４×ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ｌｅｕ}８５０ｂｐのＭＣ」）でトランスフェクトされた。細胞をｍＲＮＡ発現分析のためにＦＡＣＳによって選別せず、むしろ集団全体を分析した。図１８Ａに示すように、ミニサークルは大部分の細胞で強固なｍＮｅｏｎＧｒｅｅｎ発現を助け、ミニサークルを発現するＡＣＥ－ｔＲＮＡがタンパク質レベルで定量可能なレベルまでＰＴＣ抑制を助けることを示した。この救済もまた、スクランブル対照及び親プラスミド（約７．０ｋｂのサイズ）よりも有意に良好であった。図１８Ｂを参照されたい。

【０２５９】

同様のアッセイを行って、ＣＥＤＴがまた、強固なタンパク質発現及びＲ１１６２Ｘ－ＣＦＴＲの救済の両方を助けたことを示した。より具体的には、Ｒ１１６２Ｘ－ＣＦＴＲ及びＰＴＣリードスルー・レポーターｐｉｇｇｙＢａｃ導入遺伝子を有する１６ＨＢＥｇｅ細胞に、スクランブル対照、４×ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}をコードするプラスミド、及びエレクトロポレーションによって１ｘ又は４×ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}をコードする異なるサイズの４つのＣＥＤＴが、トランスフェクトされた。図１９に示すように、２００ｂｐ、４００ｂｐ及び９００ｂｐのＣＥＤＴは、強固なＣＦＴＲ　ｍＲＮＡ（図１９Ｂ）及びｍＮｅｏｎＧｒｅｅｎタンパク質発現（図１９Ａ）を助けた。ＣＦＴＲ　ｍＲＮＡ発現及びｍＮｅｏｎＧｒｅｅｎタンパク質発現を救済するそれらの能力は、ＣＥＤＴのサイズによって影響されなかった。

【０２６０】

自然界では一過性であるトランスフェクションに加えて、ＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}の安定的なゲノムインテグレーションも調べた。それを行うために、ＰＢ－ドンキーシステム（図２０）を使用して、トランスポゾンリピート（ＴＲ）に隣接するＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}コード配列の複数のコピーを有するベクターを作製した。このベクターを使用して、ゲノムＤＮＡに安定的に組み込まれるＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}を有する１６ＨＢＥｇｅ細胞を作製した。これらの細胞を、ＣＦＴＲのｍＲＮＡの発現及びチャネル機能について、上記の様式で調べた。結果を図２１に示した。安定的に発現したＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}が内因性のＣＦＴＲの機能を救済することが見出された。定量的ＰＣＲ（ｑＰＣＲ）によ

るさらなる分析は、わずか１６個のＡＣＥ－ｔＲＮＡ^{Ａｒｇ}発現カセットが、野生型細胞についてのレベルの約６～７％でＲ１１６２Ｘ１６ＨＢＥ１４ｇｅ－細胞における強固なＣＦＴＲ機能を助けるのに十分であることを示した。

【０２６１】

好ましい実施形態の前述の例及び説明は、特許請求の範囲によって定義される本発明を限定するものとしてではなく、むしろ例示するものとして解釈されるべきである。容易に理解されるように、特許請求の範囲に記載の本発明から逸脱することなく、上記の特徴の多数の変形及び組み合わせを利用することができる。そのような変形は、本発明の範囲からの逸脱と見なされず、そのような変形はすべて、後続の特許請求の範囲に含まれることが意図される。本明細書で引用されるすべての参考文献は、その全体が参照により組み込まれる。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/036165

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/11 A61K31/7088
ADD. A61K48/00

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N A61K

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2019/090154 A1 (UNIV IOWA RES FOUND [US]; AHERN CHRISTOPHER [US]; LUECK JOHN D [US]) 9 May 2019 (2019-05-09) cited in the application tables 1-9 claims; examples -----	1-22
Y	HART STEPHEN L ET AL: "Genetic therapies for cystic fibrosis lung disease", CURRENT OPINION IN PHARMACOLOGY, vol. 34, 5 November 2017 (2017-11-05), pages 119-124, XP085291000, ISSN: 1471-4892, DOI: 10.1016/J.COPH.2017.10.006 the whole document -----	1-22
	-/--	

[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
16 September 2021	24/09/2021

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	Andres, Serge

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/036165

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2019/090169 A1 (WISTAR INST [US]; UNIV IOWA RES FOUND [US]) 9 May 2019 (2019-05-09) cited in the application page 14; table 1; sequence 1 claims; examples	1-22
A	WO 2017/201091 A1 (UNIV TEXAS [US]) 23 November 2017 (2017-11-23) sequences 3,4,13,19,20 paragraph [0089] - paragraph [0094] example 2	1-22
A	WO 2012/017210 A1 (TOUCHLIGHT GENETICS LTD [GB]; PORTER NEIL [GB]) 9 February 2012 (2012-02-09) cited in the application the whole document	1-22
A	LUECK JOHN D. ET AL: "Engineered transfer RNAs for suppression of premature termination codons", NATURE COMMUNICATIONS, vol. 10, no. 1, 822, 18 February 2019 (2019-02-18), pages 1-11, XP055779193, DOI: 10.1038/s41467-019-08329-4 Retrieved from the Internet: URL:http://www.nature.com/articles/s41467-019-08329-4> cited in the application the whole document	1-22

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2021/036165

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019090154 A1	09-05-2019	AU 2018360055 A1	04-06-2020
		AU 2018360065 A1	18-06-2020
		BR 112020008725 A2	30-03-2021
		BR 112020008733 A2	03-11-2020
		CA 3081692 A1	09-05-2019
		CA 3081737 A1	09-05-2019
		CN 111712248 A	25-09-2020
		CN 111818945 A	23-10-2020
		EP 3703701 A1	09-09-2020
		EP 3703762 A1	09-09-2020
		JP 2021502078 A	28-01-2021
		JP 2021508234 A	04-03-2021
		KR 20200083550 A	08-07-2020
		KR 20200090171 A	28-07-2020
		US 2020291401 A1	17-09-2020
		WO 2019090154 A1	09-05-2019
		WO 2019090169 A1	09-05-2019
WO 2019090169 A1	09-05-2019	AU 2018360055 A1	04-06-2020
		AU 2018360065 A1	18-06-2020
		BR 112020008725 A2	30-03-2021
		BR 112020008733 A2	03-11-2020
		CA 3081692 A1	09-05-2019
		CA 3081737 A1	09-05-2019
		CN 111712248 A	25-09-2020
		CN 111818945 A	23-10-2020
		EP 3703701 A1	09-09-2020
		EP 3703762 A1	09-09-2020
		JP 2021502078 A	28-01-2021
		JP 2021508234 A	04-03-2021
		KR 20200083550 A	08-07-2020
		KR 20200090171 A	28-07-2020
		US 2020291401 A1	17-09-2020
		WO 2019090154 A1	09-05-2019
		WO 2019090169 A1	09-05-2019
WO 2017201091 A1	23-11-2017	AU 2017268272 A1	29-11-2018
		BR 112018073671 A2	26-02-2019
		CA 3024135 A1	23-11-2017
		CN 109414451 A	01-03-2019
		EP 3458074 A1	27-03-2019
		JP 2019515016 A	06-06-2019
		US 2017354672 A1	14-12-2017
		US 2021023120 A1	28-01-2021
		WO 2017201091 A1	23-11-2017
WO 2012017210 A1	09-02-2012	CN 103080337 A	01-05-2013
		EP 2601312 A1	12-06-2013
		JP 6689726 B2	28-04-2020
		JP 2013535210 A	12-09-2013
		JP 2017035102 A	16-02-2017
		US 2013216562 A1	22-08-2013
		WO 2012017210 A1	09-02-2012

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

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）
Ａ６１Ｋ	*48/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00		
Ａ６１Ｐ	*3/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/02	１０２	
Ａ６１Ｐ	*7/04*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	7/04		
Ａ６１Ｐ	*7/06*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	7/06		
Ａ６１Ｐ	*13/12*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	13/12		
Ａ６１Ｐ	*5/50*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	5/50		
Ａ６１Ｐ	*13/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	13/02		
Ａ６１Ｐ	*21/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	21/00		
Ａ６１Ｐ	*17/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	17/00		
Ａ６１Ｐ	*25/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/00		
Ａ６１Ｐ	*27/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	27/02		
Ａ６１Ｐ	*27/16*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	27/16		
Ａ６１Ｐ	*35/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		
Ａ６１Ｐ	*31/04*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/04		
Ａ６１Ｐ	*43/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１１１	
Ａ６１Ｐ	*5/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	5/00		
Ａ６１Ｋ	*31/711*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/711		
Ａ６１Ｋ	*9/14*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/14		
			Ａ６１Ｐ	43/00	１０５	

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

ヴェニュー ６０１， ボックス ユーアールヴィー

(72)発明者 ソーントン， チャールズ エー．

アメリカ合衆国 １４６４２ ニューヨーク， ロチェスター， エルムウッド アヴェニュー ６０１， ボックス ユーアールヴィー

(72)発明者 コ， ウリ

アメリカ合衆国 １４６２３ ニューヨーク， ロチェスター， カウンティー フェア ドライブ ８， アパートメント ２０１

Ｆターム（参考） 4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AB01 BA01 CA23 CA44
4C076 AA29 AA65 BB24 CC10 FF70
4C084 AA13 MA38 MA43 NA14 ZA01 ZA33 ZA34 ZA53 ZA55 ZA81 ZA89 ZA94 ZB21 ZB26 ZB35 ZC06 ZC23 ZC35 ZC41
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 MA24 MA43 NA14 ZA01 ZA33 ZA34 ZA53 ZA55 ZA81 ZA89 ZA94 ZB21 ZB26 ZB35 ZC06 ZC23 ZC35 ZC41