

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-518372
(P2021-518372A)

(43) 公表日 令和3年8月2日(2021.8.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/7115 (2006.01)	A 6 1 K 31/7115	4 C 0 8 6
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 2 0 6
A 6 1 K 31/351 (2006.01)	A 6 1 K 31/351	
A 6 1 K 31/215 (2006.01)	A 6 1 K 31/215	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 33 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2020-550071 (P2020-550071)
 (86) (22) 出願日 平成31年3月21日 (2019. 3. 21)
 (85) 翻訳文提出日 令和2年10月21日 (2020. 10. 21)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2019/023463
 (87) 国際公開番号 W02019/183417
 (87) 国際公開日 令和1年9月26日 (2019. 9. 26)
 (31) 優先権主張番号 62/646, 901
 (32) 優先日 平成30年3月22日 (2018. 3. 22)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)

(71) 出願人 507042604
 ヤンセン バイオファーマ インク.
 アメリカ合衆国 94080 カリフォル
 ニア州 サウス サン フランシスコ グ
 ランド アベニュー 260-イー 2階
 (74) 代理人 100092783
 弁理士 小林 浩
 (74) 代理人 100120134
 弁理士 大森 規雄
 (74) 代理人 100110663
 弁理士 杉山 共永
 (74) 代理人 100104282
 弁理士 鈴木 康仁

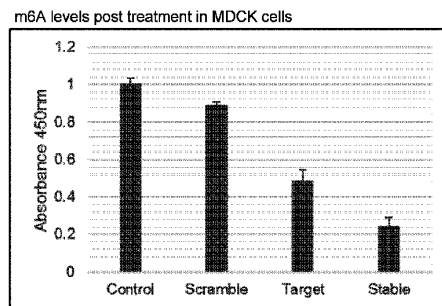
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 修飾オリゴヌクレオチド及び使用方法

(57) 【要約】

薬剤耐性を低減する方法及び組成物が記載される。m⁶A RNAのメチル化を減少させる剤が記載される。また、剤を含む組成物、当該剤の作製方法、及びそれを必要としている対象において薬物耐性を低減するため、又は免疫応答を刺激するために、当該剤を使用する方法も記載される。

Figure 7A



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

必要としている対象において薬物耐性を低減する方法であって、前記対象における N 6 - メチルアデノシン (m⁶ A) RNA メチル化のレベルを減少させ、それにより、前記対象において薬物耐性を低減する有効量の剤、好ましくはオリゴヌクレオチドを前記対象に投与すること、を含む、方法。

【請求項 2】

前記剤、好ましくは、前記オリゴヌクレオチドが、メチルトランスフェラーゼ様タンパク質 3 (METTL3)、METTL14、及びウィルムス腫瘍 1 関連タンパク質 (WTAP) のうちの少なくとも 1 つの阻害剤である、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記剤が、(RRACH) n (式中、少なくとも 1 つの R は、独立して、グアノシンであり、その他は、独立して、グアノシン又はアデノシンであり、A は、メチル化されているか又はメチル化されていないアデノシンであり、C は、シチジンであり、H は、独立して、アデノシン、シチジン、又はウリジンであり、n は、2 ~ 6 の整数である) のポリヌクレオチド配列を含む RNA オリゴヌクレオチドであり、任意選択で前記オリゴヌクレオチドにおける 1 つ以上のヌクレオチドが修飾されている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記 RNA オリゴヌクレオチドが、5' GGACUGGACUGGACUGGACU3' (配列番号 1) のポリヌクレオチド配列からなり、任意選択で前記オリゴヌクレオチドにおける 1 つ以上のヌクレオチドが修飾されている、請求項 3 に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記オリゴヌクレオチドが、5' GG / i 2 FA / CUGG / i 2 FA / CUGG / i 2 FA / CUGG / i 2 FA / CU3' (配列番号 2) (式中、i 2 FA は、2' - フルオロ - アデノシンを表す) のポリヌクレオチド配列からなる、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記対象に、抗インフルエンザ薬と組み合わせて有効量の前記剤を投与する、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記抗インフルエンザ薬が、ノイラミニダーゼ阻害剤である、請求項 6 に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記ノイラミニダーゼ阻害剤が、ザナミビル及びオセルタミビルからなる群から選択される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

必要としている対象における免疫応答を刺激する方法であって、前記対象における N 6 - メチルアデノシン (m⁶ A) RNA メチル化のレベルを減少させ、それにより、前記対象における免疫応答を刺激する有効量の剤、好ましくはオリゴヌクレオチドを前記対象に投与すること、を含む、方法。

【請求項 10】

前記剤、好ましくは、前記オリゴヌクレオチドが、メチルトランスフェラーゼ様タンパク質 3 (METTL3)、METTL14、及びウィルムス腫瘍 1 関連タンパク質 (WTAP) のうちの少なくとも 1 つの阻害剤である、請求項 9 に記載の方法。

40

【請求項 11】

前記剤が、(RRACH) n (式中、少なくとも 1 つの R は、独立して、グアノシンであり、その他は、独立して、グアノシン又はアデノシンであり、A は、メチル化されているか又はメチル化されていないアデノシンであり、C は、シチジンであり、H は、独立して、アデノシン、シチジン、又はウリジンであり、n は、2 ~ 6 の整数である) のポリヌクレオチド配列を含む RNA オリゴヌクレオチドであり、任意選択で前記オリゴヌクレオチドにおける 1 つ以上のヌクレオチドが修飾されている、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

50

前記RNAオリゴヌクレオチドが、5'GGACUGGACUGGACUGGACU3'
'(配列番号1)のポリヌクレオチド配列からなり、任意選択で前記オリゴヌクレオチド
における1つ以上のヌクレオチドが修飾されている、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

前記オリゴヌクレオチドが、5'GG/i2FA/CUGG/i2FA/CUGG/i
2FA/CUGG/i2FA/CU3'(配列番号2)(式中、i2FAは、2'-フル
オロ-アデノシンを表す)のポリヌクレオチド配列からなる、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

5'GG/i2FA/CUGG/i2FA/CUGG/i2FA/CUGG/i2FA
/CU3'(配列番号2)(式中、i2FAは、2'-フルオロ-アデノシンを表す)か
らなる、RNAオリゴヌクレオチド。

10

【請求項15】

請求項14に記載のオリゴヌクレオチドと、医薬的に許容される担体と、を含む、医薬
組成物。

【請求項16】

抗ウイルス活性剤、好ましくは、抗インフルエンザ薬を更に含む、請求項15に記載の
医薬組成物。

【請求項17】

必要としている対象における疾患を治療する方法であって、請求項15又は16に記載
の医薬組成物を前記対象に投与すること、を含み、前記疾患が、免疫応答の刺激が有益で
ある疾患である、方法。

20

【請求項18】

請求項14に記載のオリゴヌクレオチドと、抗ウイルス活性剤と、を含むキットであっ
て、前記オリゴヌクレオチドと前記抗ウイルス活性剤とが、同じ組成物又は異なる組成物
中に存在する、キット。

【請求項19】

前記抗ウイルス活性剤が、ノイラミニダーゼ阻害剤である抗インフルエンザ薬である、
請求項18に記載のキット。

【請求項20】

前記ノイラミニダーゼ阻害剤が、ザナミビル及びオセルタミビルからなる群から選択さ
れる、請求項19に記載のキット。

30

【請求項21】

薬物を投与された対象において薬物耐性を予防又は治療する方法であって、前記対象に
おけるN6-メチルアデノシン(m⁶A)RNAメチル化のレベルを減少させる有効量の
剤、好ましくはオリゴヌクレオチドを前記対象に投与すること、を含む、方法。

【請求項22】

前記剤、好ましくは、前記オリゴヌクレオチドが、メチルトランスフェラーゼ様タンパ
ク質3(METT L3)、メチルトランスフェラーゼ様タンパク質14(METT L14
)、及びウィルムス腫瘍1関連タンパク質(WTAP)のうちの少なくとも1つの阻害剤
である、請求項21に記載の方法。

40

【請求項23】

前記剤が、オリゴヌクレオチドである、請求項21に記載の方法。

【請求項24】

前記オリゴヌクレオチドが、RNAオリゴヌクレオチドである、請求項23に記載のオリ
ゴヌクレオチド。

【請求項25】

前記オリゴヌクレオチドが、立体ブロッカーである、請求項23に記載の方法。

【請求項26】

前記オリゴヌクレオチドが、(RRACH)_n(式中、少なくとも1つのRは、独立し
て、グアノシンであり、その他は、独立して、グアノシン又はアデノシンであり、Aは、

50

メチル化されているか又はメチル化されていないアデノシンであり、Cは、シチジンであり、Hは、独立して、アデノシン、シチジン、又はウリジンであり、nは、2～6の整数である)のポリヌクレオチド配列を含む、請求項23に記載の方法。

【請求項27】

前記オリゴヌクレオチドが、5'GGACUGGACUGGACUGGACU3'(配列番号1)のポリヌクレオチド配列からなる、請求項23に記載の方法。

【請求項28】

前記オリゴヌクレオチドにおける少なくとも1つのヌクレオチドが修飾されている、請求項23に記載の方法。

【請求項29】

前記修飾されたヌクレオチドが、2'フルオロ修飾を含む、請求項27に記載の方法。

【請求項30】

前記修飾されたヌクレオチドが、アデノシンである、請求項28に記載の方法。

【請求項31】

前記オリゴヌクレオチドが、5'GG/i2FA/CUGG/i2FA/CUGG/i2FA/CUGG/i2FA/CU3'(配列番号2)(式中、i2FAは、2'-フルオロ-アデノシンを表す)のポリヌクレオチド配列からなる、請求項23に記載の方法。

【請求項32】

前記薬物が、抗ウイルス剤である、請求項21に記載の方法。

【請求項33】

前記抗ウイルス剤が、抗インフルエンザ剤である、請求項32に記載の方法。

【請求項34】

前記インフルエンザ剤が、ノイラミニダーゼ阻害剤である、請求項33に記載の方法。

【請求項35】

前記ノイラミニダーゼ阻害剤が、ザナミビル及びオセルタミビルからなる群から選択される、請求項34に記載の方法。

【請求項36】

必要としている対象における免疫応答を刺激する方法であって、前記対象におけるN6-メチルアデノシン(m⁶A)RNAメチル化のレベルを減少させる有効量の剤、好ましくはオリゴヌクレオチドを前記対象に投与すること、を含む、方法。

【請求項37】

前記剤、好ましくは、前記オリゴヌクレオチドが、メチルトランスフェラーゼ様タンパク質3(METTL3)、METTL14、及びウィルムス腫瘍1関連タンパク質(WTAP)のうちの少なくとも1つの阻害剤である、請求項36に記載の方法。

【請求項38】

前記剤が、(RRACH)n(式中、少なくとも1つのRは、独立して、グアノシンであり、その他は、独立して、グアノシン又はアデノシンであり、Aは、メチル化されているか又はメチル化されていないアデノシンであり、Cは、シチジンであり、Hは、独立して、アデノシン、シチジン、又はウリジンであり、nは、2～6の整数である)のポリヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドである、請求項36に記載の方法。

【請求項39】

前記オリゴヌクレオチドが、5'GGACUGGACUGGACUGGACU3'(配列番号1)のポリヌクレオチド配列からなる、請求項38に記載の方法。

【請求項40】

前記オリゴヌクレオチドが、5'GG/i2FA/CUGG/i2FA/CUGG/i2FA/CUGG/i2FA/CU3'(配列番号2)(式中、i2FAは、2'-フルオロ-アデノシンを表す)のポリヌクレオチド配列からなる、請求項39に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

20

30

40

50

本開示は、2'-フルオロ-アデノシン修飾RNAオリゴヌクレオチドなどのオリゴヌクレオチドを含む剤、及び薬物で治療された対象において薬物耐性を低減する方法に関する。本発明は、更に、抗ウイルス活性剤で治療された対象において薬物耐性を低減する方法、及び免疫応答を刺激することによってI型免疫応答を伴う病態を治療する方法に関する。オリゴヌクレオチドを含むコンジュゲート又は組成物、オリゴヌクレオチドの作製方法、及び対象において薬物耐性を低減するため、又はI型免疫応答を伴う病態を治療するために、オリゴヌクレオチド、そのコンジュゲート又は組成物を使用する方法も記載される。

【0002】

(電子的に提出された配列表の参照)

本出願は、2019年3月21日付で作成された「ALP0057WOPCT1 Sequence Listing」というファイル名のASCII形式の配列表としてEFS-Webを介して電子的に提出された、4.0KBのサイズを有する配列表を含む。EFS-Webを介して提出された配列表は、本明細書の一部であり、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0003】

薬物耐性、特にウイルス感染を治療するために使用される薬物に対する耐性は、深刻な問題であり得る。ウイルス感染の治療における主要な問題は、感染後に薬剤耐性変異体が短時間で出現することである。インフルエンザは、重度の呼吸器疾患、臓器不全につながる炎症、及び最終的には死を引き起こし得るRNAウイルスである。インフルエンザ及び他のRNAウイルスは、RNAのエラーを修復する機構が存在しないことから高い変異速度を有し、季節性インフルエンザウイルスは、ウイルスポリメラーゼによって導入された変異を伴う抗原シフトと、ヒトにおける既存の抗体媒介免疫応答を回避するウイルスのヘマグルチニン(HA)及びノイラミニダーゼ(NA)タンパク質内で生成された抗原変異体を伴う抗原ドリフトとの組み合わせの結果として発生する(Iwasaki et al., Nature Reviews Immunology, 2014)。

【0004】

インフルエンザウイルスの治療標的としては、ポリメラーゼ複合体、すなわちPA、PB2及びPB1の構成要素；M2チャンネル；及びノイラミニダーゼNAが挙げられる。ノイラミニダーゼ阻害剤は、抗インフルエンザ医薬の主要な分類である。NAを標的指向する薬物の例としては、オセルタミビル及びザナミビルが挙げられる。ザナミビルは、NAタンパク質の活性部位に結合することによって機能し、インフルエンザウイルスがその宿主細胞から逃げられないようにするものであり、オセルタミビルは、NAの競合的阻害剤である。オセルタミビル及びザナミビルは、インフルエンザの治療において有効な治療薬であるが、いずれの薬物で治療されている患者においても薬物耐性が生じ得る(Colman, Annu. Rev. Biochem., 2009)。ノイラミニダーゼ阻害剤耐性インフルエンザウイルスによって引き起こされるパンデミックは、パンデミックに対する準備における防御の第一線が解除されるので、深刻な脅威である(Jaerhult, Acta Vet Scand. 2018 60(1):6)。

【0005】

N6-アデノシンメチル化(m⁶A)は、薬物耐性に影響を及ぼすと考えられるRNA構造及び機能に影響を及ぼす修飾である(Desrosiers et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 1974)。RNAのm⁶A修飾は、動的かつ可逆的である。哺乳類細胞では、m⁶A修飾は、メルトランスフェラーゼ様タンパク質3(METTL3)、METTL14、及びウィルムス腫瘍1関連タンパク質(WTAP)からなる複合体によって触媒され、m⁶A修飾は、デメチラーゼ脂肪量及び肥満関連タンパク質(FTO)、並びにAlkBホモログ5(ALKBH5)によって元に戻る(Brocard et al., Journal of General Virology, 2017)。したがって、m⁶Aのレベルは、宿主のメルトランスフェラー

10

20

30

40

50

ゼMETTL3及び宿主のデメチラーゼFTOによって制御される。

【0006】

m⁶Aメチル化RNAなどのメチル化RNAは、メチル化されていないRNAよりも免疫原性が有意に低い(McGuinness and McGuinness, Journal of Cancer Science and Clinical Oncology, 2014)。具体的には、m⁶Aメチル化RNAなどのRNAのメチル化は、自然免疫応答において重要な役割を果たすトル様受容体(TLR)の活性化を防ぐ。細菌、真菌、寄生虫、及びウイルスRNAなどのメチル化されていない病原体によるTLRの活性化は、一連のシグナル伝達事象を引き起こし、その結果、I型インターフェロン(IFN)、炎症性サイトカイン、及びケモカインが産生され、免疫応答が誘導される(Lichinchi et al., Cell Host and Microbiome, 2016; Narayan et al., Molecular and Cellular Biology, 1987; Kennedy et al., Journal of Virology, 2017)。最終的に、この炎症は適応免疫系も活性化させ、その結果、次いで、侵入した病原体及び感染した細胞がクリアランスされる。しかしながら、病原性RNAがメチル化される場合もあり、メチル化ウイルスRNAは、例えば、宿主TLRによる検出を逃れる。実際に、ウイルスRNAにおけるm⁶Aのレベルの増加は、ザナミビルなどの薬物によるA型インフルエンザ(IVA)ウイルスの治療に対する獲得耐性と相関する。更に、m⁶Aの化学阻害剤である3-デアザアデノシン(3DZA)でIVAを処理すると、薬物耐性が減少するが(Scholttissek and Mueller, Archives of Virology, 1991)、メクロフェナム酸(MA)によるm⁶Aの促進は薬物耐性を増加させる。

10

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

したがって、薬物で治療された対象において薬物耐性を効果的に低減することができる治療薬が依然として必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本開示は、抗ウイルス活性剤などの薬物で治療された対象において薬物耐性の発生を効果的に低減することができる治療薬の必要性を満たす。そのため、本開示は、N⁶-メチルアデノシン(m⁶A)RNAメチル化のレベルを減少させるRNAオリゴヌクレオチド分子などの剤を提供する。好ましくは、本開示のオリゴヌクレオチドは、安定性の向上のために修飾されたRNAオリゴヌクレオチドを含む。

30

【0009】

驚くべきことに、METTL3に結合し、その立体阻害剤として機能する本開示の実施形態によるオリゴヌクレオチド阻害剤は、宿主及びウイルスのRNAの両方においてm⁶Aメチル化を低減できることが見出された。更に、IVAなどのウイルス感染を阻害性オリゴヌクレオチドとザナミビルなどの抗ウイルス薬とで同時治療すると、ウイルスRNAにおけるm⁶Aレベルを阻害し、薬剤耐性ウイルスを低減できることが更に見出された。

40

【0010】

一般的な態様では、本開示は、抗ウイルス活性剤による治療を必要としている対象などの、それを必要としている対象において薬物耐性を低減する方法であって、当該対象におけるm⁶A RNAメチル化のレベルを減少させ、それにより、当該対象において薬剤耐性を低減する、有効量の剤、例えば、開示されたオリゴヌクレオチドを当該対象に投与すること、を含む、方法に関する。

【0011】

本出願の実施形態では、方法は、METTL3、METTL14、及びWTAPのうちの少なくとも1つの阻害剤を対象に投与すること、を含む。

【0012】

50

本出願の実施形態では、方法は、(RRACH)_n(式中、少なくとも1つのRは、独立して、グアノシンであり、その他は、独立して、グアノシン又はアデノシンであり、Aは、メチル化されているか又はメチル化されていないアデノシンであり、Cは、シチジンであり、Hは、独立して、アデノシン、シチジン、又はウリジンであり、nは、2～6の整数である)のポリヌクレオチド配列を含むRNAオリゴヌクレオチドを対象に投与すること、を含む。

【0013】

特定の態様によれば、開示されたオリゴヌクレオチドにおける1つ以上のヌクレオチドが修飾されている。

【0014】

特定の態様によれば、開示されたオリゴヌクレオチドは、5'GGACUGGACUGGACUGGACUGGACU3'(配列番号1)のポリヌクレオチド配列からなり、任意選択でオリゴヌクレオチドにおける1つ以上のヌクレオチドが修飾されている。

【0015】

特定の態様によれば、開示されたオリゴヌクレオチドは、5'GG/i2FA/CUGG/i2FA/CUGG/i2FA/CUGG/i2FA/CU3'(配列番号2)(式中、i2FAは、2'-フルオロ-アデノシンを表す)のポリヌクレオチド配列からなる。

【0016】

特定の態様によれば、対象に、抗インフルエンザ薬、好ましくは、ザナミビル又はオセルタミビルなどのノイラミニダーゼ阻害剤と組み合わせて、m⁶A RNAメチル化レベルを減少させる有効量の開示されたオリゴヌクレオチドを投与する。

【0017】

別の一般的な態様では、本開示は、必要としている対象における免疫応答を刺激する方法であって、当該対象におけるm⁶A RNAメチル化のレベルを減少させ、それにより、当該対象における免疫応答を刺激する、有効量の開示されたオリゴヌクレオチドを当該対象に投与すること、を含む、方法に関する。

【0018】

一般的な態様では、本開示は、5'GG/i2FA/CUGG/i2FA/CUGG/i2FA/CUGG/i2FA/CUGG/i2FA/CU3'(配列番号2)(式中、i2FAは、2'-フルオロ-アデノシンを表す)からなる、RNAオリゴヌクレオチドに関する。

【0019】

一般的な態様では、本開示は、5'GG/i2FA/CUGG/i2FA/CUGG/i2FA/CUGG/i2FA/CUGG/i2FA/CU3'(配列番号2)(式中、i2FAは、2'-フルオロ-アデノシンを表す)からなるRNAオリゴヌクレオチドと、医薬的に許容される担体と、を含む、医薬組成物に関する。

【0020】

特定の態様によれば、医薬組成物は、抗ウイルス活性剤、好ましくは、抗インフルエンザ薬、より好ましくは、ザナミビル又はオセルタミビルなどのノイラミニダーゼ阻害剤を更に含む。

【0021】

一般的な態様では、本開示は、5'GG/i2FA/CUGG/i2FA/CUGG/i2FA/CUGG/i2FA/CUGG/i2FA/CU3'(配列番号2)(式中、i2FAは、2'-フルオロ-アデノシンを表す)からなるRNAオリゴヌクレオチドと、抗ウイルス活性剤と、を含む、キットであって、当該オリゴヌクレオチドと当該抗ウイルス活性剤とが、同じ組成物又は異なる組成物中に存在し、当該抗ウイルス活性剤が、抗インフルエンザ薬、好ましくは、ザナミビル又はオセルタミビルなどのノイラミニダーゼ阻害剤である、キットに関する。

【0022】

開示された実施形態の他の態様、特徴、及び利点は、「発明を実施するための形態」及

10

20

30

40

50

びその好ましい実施形態を含む以下の開示、並びに添付の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】

【0023】

上述の要約、並びに以下の「発明を実施するための形態」は、添付図面と併せて読むとより深く理解されるであろう。本発明は、図面に示される実施形態そのものに限定されない点は理解されるべきである。

【0024】

図面は、以下のとおりである。

【図1A】耐性継代中に使用したザナマビル (Zanamavir) の用量を示す。 10

【図1B】ザナミビル継代されたインフルエンザ A / P C の E C 5 0 値を示す。

【図2】ザナマビル (Z a n R) による耐性継代の前及び後のインフルエンザ A / P C 及びインフルエンザ B / V i c のウイルス R N A における $m^6 A$ レベルの倍率変化を示す。

【図3】対照サンプル及び 3 D Z A 又は M A で処理されたサンプルにおける $m^6 A$ レベルを示す。

【図4】3 D Z A 又は M A で処理されたインフルエンザ A / P C 又はインフルエンザ A / P C / Z a n R 株における $m^6 A$ レベルを示す。

【図5】3 D Z A 又は M A で処理されたインフルエンザ A / P C 又はインフルエンザ A / P C / Z a n R 株の E C 5 0 値を示す。

【図6】ピオチン標識オリゴヌクレオチドの免疫沈降アッセイの概略 (左) 及び結果 (右) を示す。 20

【図7A】開示された R N A オリゴヌクレオチドによる処理後の M D C K 細胞における $m^6 A$ レベルを示す。

【図7B】本開示の開示された R N A オリゴヌクレオチドによる処理後の H E K 2 9 3 細胞における $m^6 A$ レベルを示す。

【図8】本開示の開示された R N A オリゴヌクレオチドによる処理後のインフルエンザ A / P C 又はインフルエンザ A / P C / Z a n R 株に感染した M D C K 細胞における $m^6 A$ レベルを示す。

【図9】本開示の開示された R N A オリゴヌクレオチドによる処理後のインフルエンザ A / P C 又はインフルエンザ A / P C / Z a n R 株の E C 5 0 値を示す。 30

【発明を実施するための形態】

【0025】

背景技術において、また、本明細書全体を通じて各種刊行物、論文及び特許を引用又は記載する。これら参照文献の各々はその全容が参照により本明細書に組み込まれる。本明細書に含まれている文書、操作、材料、デバイス、物品などの考察は、本発明のコンテキストを与えるためのものである。かかる考察は、これらの事物のいずれか又は全てが、開示又は特許請求されるいかなる発明に対しても先行技術の一部を構成することを容認するものではない。

【0026】

定義

別段の規定がない限り、本明細書で使用される技術用語及び科学用語は全て、本開示が属する技術分野の当業者に一般的に理解される意味と同一の意味を有する。そうでない場合、本明細書で使用される特定の用語は、本明細書に記載される意味を有するものである。本明細書に引用する全ての特許、公開された特許出願及び刊行物は、参照によって恰もその全体が本明細書に記載されているものと同様にして組み込まれる。本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される単数形「a」、「an」及び「the」は、特に文脈上明らかでない限り、複数の指示対象物を含むことに留意すべきである。 40

【0027】

本明細書で使用するとき、用語「減少する」、「低減する」、又は「阻害する」は全て、統計的に有意な量の減少を指す。本開示の特定の実施形態によれば、「減少する」、「 50

低減する」、又は「阻害する」は、基準レベルと比較して少なくとも10%の減少、例えば、基準レベルと比較して少なくとも約20%、又は少なくとも約30%、又は少なくとも約40%、又は少なくとも約50%、又は少なくとも約60%、又は少なくとも約70%、又は少なくとも約80%、又は少なくとも約90%、又は最大100%の減少、又は10~100%のいずれかの減少を意味する。

【0028】

本明細書で使用する時、用語「統計的に有意な」又は「有意に」は、統計的有意性を指し、概して、測定値の値における標準偏差の2倍又はより大きな差を意味する。この用語は、差があるという統計的根拠を指し、帰無仮説が実際に真であるときに帰無仮説を棄却するという判断をする確率と定義される。統計的有意性は、例えば、t検定によって又はp値を使用して判定することができる。

10

【0029】

本明細書で使用する時、用語「薬物で治療された対象」又は「活性剤で治療された対象」は、本開示の実施形態による m^6A RNAメチル化のレベルを減少させる剤、例えば、開示されたオリゴヌクレオチドの投与前、投与中、又は投与後に薬物又は活性剤で治療された対象を指す。本開示の特定の実施形態によれば、RNAオリゴヌクレオチドなどの m^6A RNAメチル化のレベルを減少させる剤を、現在薬物又は活性剤で治療されている対象に投与する。本開示の他の特定の実施形態によれば、RNAオリゴヌクレオチドなどの m^6A RNAメチル化のレベルを減少させる開示された剤を、将来薬物又は活性剤による治療を受ける対象に予防的に投与する。本開示の他の特定の実施形態によれば、RNAオリゴヌクレオチドなどの m^6A RNAメチル化のレベルを減少させる剤を、薬物又は活性剤による治療を以前に受けたことがある対象に投与する。

20

【0030】

本明細書で使用する時、用語「抗ウイルス活性剤」は、対象におけるウイルス感染を治療又は予防するために使用される任意の化合物を指す。本開示の特定の実施形態によれば、抗ウイルス活性剤は、その薬物耐性が m^6A RNAメチル化によって制御される任意のウイルス、例えば、インフルエンザウイルス、HIV、又はジカウイルスなどの二本鎖(ds)/一本鎖(ss)RNA又はDNAウイルスによる感染を治療又は予防するために使用される化合物である。

【0031】

本明細書で使用する時、用語「有効量」は、対象において所望の生物学的又は医薬的応答を惹起する活性成分又は構成成分の量を指す。有効量は、記載される目的に対して経験的及び/又は日常的な方法で決定することができる。例えば、インビトロアッセイを任意選択で用いて、最適な用量範囲を特定するのに役立つことができる。具体的な有効量の選択は、治療又は予防される疾病、伴う症状、患者の体重、患者の免疫状態、及び当業者に既知の他の因子を含むいくつかの因子の考慮に基づいて、当業者によって(例えば、臨床試験により)決定することができる。また、製剤に用いられる正確な用量は、投与経路及び疾患の重症度に依存し、医師の判断及び各患者の状況に従って決定されるべきである。有効量は、インビトロ又は動物モデル試験系から導かれる用量応答曲線から推定することができる。

30

40

【0032】

本明細書で使用する時、用語「N6-メチルアデノシン」、「 m^6A 」、又は「 m^6A 」は、細胞内のRNAの窒素-6位におけるアデノシン塩基のメチル化を指す。

【0033】

本明細書で使用する時、用語「被験体/対象」は、動物を指す。具体的な実施形態によれば、対象は、非霊長類(例えば、ラクダ、ロバ、シマウマ、ウシ、ブタ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ネコ、イヌ、ラット、ウサギ、モルモット又はマウス)、又は霊長類(例えば、サル、チンパンジー、又はヒト)を含む哺乳動物である。具体的な実施形態では、対象はヒトである。

【0034】

50

本明細書で使用するとき、用語「阻害剤」は、タンパク質の量又は活性を阻止又は減少させる化合物又は分子を指す。例えば、用語「阻害剤」は、タンパク質 mRNA の転写、タンパク質 mRNA の安定性、タンパク質 mRNA の翻訳、タンパク質ポリペプチドの安定性、タンパク質の翻訳後修飾、タンパク質の活性、タンパク質のシグナル伝達経路、又はこれらの任意の組み合わせを含むがこれらに限定されない、タンパク質の発現、安定性、又は活性を負に制御する化合物又は分子を指すことができる。METTL3、METTL14、又はWTAPの阻害剤としては、タンパク質の1つ以上に結合し、それを阻害する核酸阻害剤、又はタンパク質の1つ以上の発現を低減又は阻止するアンチセンス核酸などの核酸；タンパク質の1つ以上の活性を阻害する低分子阻害剤；タンパク質の1つ以上に選択的に結合し、その活性を阻害する抗体などの、タンパク質の1つ以上に結合し、活性を阻害するペプチド又はタンパク質；タンパク質の1つ以上のレベル又は活性を低減する炭水化物、脂質、又は任意の他の分子が挙げられるが、これらに限定されない。特定の態様によれば、阻害剤としては、例えば、タンパク質の1つ以上を（立体的に又はその他の方法で）阻害するオリゴヌクレオチド、タンパク質の1つ以上の転写物を標的指向する siRNA 分子、又はタンパク質の1つ以上の活性を阻害する抗体若しくは低分子が挙げられる。

10

【0035】

本明細書で使用するとき、N6 - アデノシン - メチルトランスフェラーゼ 70 kDa サブユニット又はMT-A70としても知られている、用語「メチルトランスフェラーゼ様タンパク質3」又は「METTL3」は、いくつかのRNAのN6位でアデノシン残基をメチル化し、概日時計、胚性幹細胞及び造血幹細胞の分化、皮質神経新生、DNA損傷に対する応答、T細胞の分化、並びに初代miRNAプロセッシングなどの様々なプロセスを制御するN6 - メチルトランスフェラーゼ複合体を形成する、METTL3 - METTL14ヘテロ二量体の構成要素を指す。METTL3の例としては、2038ヌクレオチド長のmRNA転写物によってコードされている580アミノ酸長のタンパク質であるヒトMETTL3 (NM_019852.4) が挙げられるが、これらに限定されない。例示的なヒトMETTL3のアミノ酸配列は、GenBankアクセッション番号NP_062826.2で表される。本明細書で使用するとき、用語「METTL3」は、カニクイザル (*Macaca Fascicularis*) 又はチンパンジー (*Pan troglodytes*) などの、ヒト以外の種由来のMETTL3のホモログを含む。本明細書で使用するとき、用語「METTL3」は、完全長野生型METTL3の変異、例えば、点変異、断片、挿入、欠失、及びスプライズバリエーションを含むタンパク質を含む。用語「METTL3」は、METTL3アミノ酸配列の翻訳後修飾も包含する。

20

30

【0036】

本明細書で使用するとき、KIAA1627としても知られている、用語「メチルトランスフェラーゼ様タンパク質14」又は「METTL14」は、上記のMETTL3 - METTL14ヘテロ二量体の構成要素を指す。METTL14の例としては、3520ヌクレオチド長のmRNA転写物によってコードされている456アミノ酸長のタンパク質であるヒトMETTL14 (NM_020961.3) が挙げられるが、これらに限定されない。例示的なヒトMETTL14のアミノ酸配列は、GenBankアクセッション番号NP_066012.1で表される。本明細書で使用するとき、用語「METTL14」は、カニクイザル (*Macaca Fascicularis*) 又はチンパンジー (*Pan troglodytes*) などの、ヒト以外の種由来のMETTL14のホモログを含む。本明細書で使用するとき、用語「METTL14」は、完全長野生型METTL14の変異、例えば、点変異、断片、挿入、欠失、及びスプライズバリエーションを含むタンパク質を含む。用語「METTL14」は、METTL14アミノ酸配列の翻訳後修飾も包含する。

40

【0037】

本明細書で使用するとき、KIAA1627としても知られている用語「ウィルムス腫瘍1関連タンパク質」又は「WTAP」は、上記のMETTL3 - METTL14 N6 - メチルトランスフェラーゼ複合体の制御性サブユニットを指す。WTAPの例としては

50

、2265ヌクレオチド長のmRNA転写物によってコードされている396アミノ酸長のタンパク質であるヒトWTAP (NM_004906.4)が挙げられるが、これらに限定されない。例示的なヒトWTAPのアミノ酸配列は、GenBankアクセッション番号NP_004897.2で表される。本明細書で使用するとき、用語「WTAP」は、カニクイザル (*Macaca Fascicularis*) 又はチンパンジー (*Pan troglodytes*) などの、ヒト以外のWTAP種のホモログを含む。本明細書で使用するとき、用語「WTAP」は、完全長野生型WTAPの変異、例えば、点変異、断片、挿入、欠失、及びスプライスバリエントを含むタンパク質を含む。用語「WTAP」は、WTAPアミノ酸配列の翻訳後修飾も包含する。

【0038】

本明細書で使用するとき、用語「オリゴヌクレオチド」は、複数の結合ヌクレオチド単位 (すなわち、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、又は両方) から形成されるポリヌクレオチドを指す。このようなオリゴヌクレオチドは、既存の核酸源から得ることもでき、又は合成方法によって生成することもできる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、各々、約10~約30個のヌクレオチド残基、好ましくは約10~約25個のヌクレオチド残基、より好ましくは約10~約20個のヌクレオチド残基を有する。特定の実施形態によれば、オリゴヌクレオチドのヌクレオチド間結合としては、ホスホジエステル結合、ホスホチオエート結合、及びこれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。

【0039】

本明細書で使用するとき、用語「併用される」は、対象への2つ以上の治療薬の投与との関連において、複数の治療薬の使用を指す。用語「併用される」の使用は、治療薬を対象に投与する順序について限定しない。例えば、第1の治療薬 (例えば、本明細書に記載される組成物) を、対象への第2の治療薬の投与前 (例えば、5分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、16時間、24時間、48時間、72時間、96時間、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、8週間、又は12週間前)、同時、又はその後 (例えば、5分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、16時間、24時間、48時間、72時間、96時間、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、8週間、又は12週間後) に投与することができる。あるいは、例えば、第1の治療薬及び第2の治療薬を、同じ組成物又は別個の組成物のいずれかで同時に投与してもよい。

【0040】

本明細書で使用するとき、用語「担体」は、任意の賦形剤、希釈剤、充填剤、塩、バッファー、安定剤、可溶化剤、油、脂質、脂質含有小胞、マイクロスフェア、リポソーム封入体、又は医薬製剤で使用するための技術分野では公知の他の材料を指す。担体、賦形剤又は希釈剤の特性は、特定の用途の投与経路によって決まる点は理解されよう。本明細書で使用するとき、用語「医薬的に許容される担体」は、本発明による組成物の効果又は本発明による組成物の生物活性を妨げない非毒性材料を指す。特定の実施形態によれば、本開示を考慮して、RNAオリゴヌクレオチドベースの医薬組成物で使用するのに好適な任意の医薬的に許容される担体を、本発明において使用してよい。

【0041】

本明細書で使用するとき、用語「誘導する」及び「刺激する」並びにこれらの変形は、細胞活性の任意の測定可能な増加を指す。免疫応答の誘導は、B細胞の増殖の増加、抗原特異的抗体の産生、抗原特異的T細胞の増殖の増加、樹状細胞の抗原提示の改善、並びに/又は特定のサイトカイン、ケモカイン、及び共刺激マーカーの発現の増加を含み得る。

【0042】

本明細書で使用するとき、用語「治療する (treat)」、「治療する (treating)」、及び「治療 (treatment)」は全て、免疫性の疾患、障害、又は病態などの免疫応答の刺激が有益である疾患に関連する少なくとも1つの測定可能な物理的パラメータの改善又は回復を指すことを意図するものであり、これは対象において必ずしも認識可能ではないが

10

20

30

40

50

、対象において認識可能である場合もある。用語「治療する (treat)」、「治療する (treating)」、及び「治療 (treatment)」はまた、疾患、障害、又は病態の退縮を生じる、その進行を防止する、又は少なくともその進行を遅らせることを指す場合もある。具体的な実施形態では、「治療する」、「治療する」、及び「治療」は、ウイルス感染又は癌を含む、免疫性の疾患、障害、又は病態などの免疫応答の刺激が有益である疾患に関連する1つ以上の症状の緩和、発症若しくは発病の阻止、又は期間の短縮を指す。具体的な実施形態では、「治療する」、「治療する」、及び「治療」は、疾患、障害、又は病態の再発の防止を指す。具体的な実施形態では、「治療する」、「治療する」、及び「治療」は、疾患、障害、又は病態を有する対象の生存率の向上を指す。具体的な実施形態では、「治療する」、「治療する」、及び「治療」は、対象における疾患、障害、又は病態の消失を指す。

10

【0043】

本明細書で使用するとき、「免疫応答の刺激が有益である疾患」は、免疫応答の刺激が対象に利益をもたらす任意の疾患を含む。例えば、免疫応答の刺激が有益である疾患は、免疫性の疾患、障害、又は病態を含み得る。具体的な実施形態によれば、治療される疾患、障害、又は病態は、炎症性の疾患、障害、若しくは病態、自己免疫性の疾患、障害、若しくは病態、又はウイルス感染などの病原体によって引き起こされる疾患、障害、若しくは病態である。具体的な実施形態によれば、免疫応答の刺激が有益である疾患は、RNA又はDNAウイルス、例えば、アデノウイルス、サイトメガロウイルス、A型肝炎ウイルス(HAV)；HBV、慢性HBVを含むヘパドナウイルス；黄熱病ウイルスを含むフラ

20

【0044】

薬剤耐性を低減する又は免疫応答を刺激する方法

30

一般的な態様では、本開示は、抗ウイルス剤などの薬物で治療された対象において薬物耐性を低減する方法であって、有効量の剤、例えば、開示されたオリゴヌクレオチドを当該対象に投与すること、を含む、方法に関する。ある実施形態では、開示されたオリゴヌクレオチドなどの剤は、対象における m^6A RNAメチル化のレベルを減少させ、それにより、当該対象において薬剤耐性を低減する。

【0045】

本開示はまた、薬物で治療された対象において薬物耐性を低減する方法であって、METTL3、METTL14、及びWTAPのうち少なくとも1つを阻害し、それにより、当該対象における N^6 -メチルアデノシン(m^6A) RNAメチル化のレベルを減少させる有効量の剤、例えば、核酸阻害剤を当該対象に投与すること、を含む、方法を目的とする。

40

【0046】

本開示は、更に、薬物で治療された対象において薬物耐性を低減する方法であって、有効量の(RRACH) n (式中、少なくとも1つのRは、独立して、グアノシンであり、その他は、独立して、グアノシン又はアデノシンであり、Aは、メチル化されているか又はメチル化されていないアデノシンであり、Cは、シチジンであり、Hは、独立して、アデノシン、シチジン、又はウリジンであり、 n は、2~6の整数である)のポリヌクレオチド配列を含むRNAオリゴヌクレオチドを当該対象に投与すること、を含み、任意選択で当該オリゴヌクレオチドにおける1つ以上のヌクレオチドが修飾されている、方法を目的とする。

50

【0047】

ある実施形態では、オリゴヌクレオチドのポリヌクレオチド配列は (G G A C U) n (式中、n は 2 ~ 6 である) である。

【0048】

ある実施形態では、オリゴヌクレオチドのポリヌクレオチド配列は、(G G / i 2 F A / C U) n (式中、i 2 F A は、2' - フルオロ - アデノシンを表し、n は 2 ~ 6 である) である。

【0049】

その薬物を対象に投与することによって引き起こされる当該対象において薬物耐性の存在又はレベル、及び薬剤耐性の存在又はレベルに対する剤、例えば、開示された核酸阻害剤の効果は、本開示を考慮して当該技術分野において既知の方法を使用して決定することができる。例示的な方法は、本明細書に、例えば、以下の実施例に記載される。

10

【0050】

本開示の特定の実施形態によれば、抗ウイルス活性剤は、抗インフルエンザ薬 (例えば、ノイラミニダーゼ阻害剤、例えば、ザナミビル、オセルタミビル、タミホスホル (Tamiphosphor)、ペラミビル)、抗 HIV 薬 (例えば、AZT、ddC、TiBO 誘導体、アシクロビル、アルファ - インターフェロン)、抗ジカ薬、又は免疫刺激物質若しくは免疫調節物質 (例えば、インターロイキン、サイトカイン) である。本開示の特定の実施形態によれば、抗ウイルス活性剤は、ザナミビル及びオセルタミビルから選択される抗インフルエンザ薬である。

20

【0051】

別の一般的な態様では、本発明は、必要としている対象における免疫応答を刺激する方法であって、有効量の剤、例えば、開示された核酸阻害剤を当該対象に投与すること、を含む、方法に関する。ある実施形態では、開示された核酸阻害剤は、対象における m⁶A RNA メチル化のレベルを減少させ、それにより、当該対象における免疫応答を刺激する。

【0052】

免疫応答の刺激は、本開示を考慮して、当該技術分野において既知の方法を用いて判定することができる。例示的な方法としては、例えば、サイトカイン及びケモカインに特異的な ELISA 若しくは抗体を使用して免疫応答を測定すること、開示された核酸阻害剤などの剤と接触させた免疫細胞 (例えば、リンパ球及び単球からなる末梢血単核球 (PBMC)) 若しくはレポーター細胞の応答を測定すること、又は開示された核酸阻害剤を注射した後の動物におけるサイトカイン誘導を測定することが挙げられる。

30

【0053】

対象における m⁶A RNA メチル化のレベル、及び対象における m⁶A RNA メチル化のレベルに対する剤、例えば、開示された核酸阻害剤の効果は、本開示を考慮して、当該技術分野において既知の方法を用いて決定することができる。例えば、m⁶A 修飾 mRNA に結合し、単離することができる ELISA 又は抗体を使用して m⁶A を測定して、その定量を可能にすることができる。例示的な方法は、本明細書に、例えば、以下の実施例に記載される。

40

【0054】

m⁶A RNA メチル化のレベルを減少させる剤、例えば、開示された核酸阻害剤に関して本明細書で使用するとき、有効量は、それを必要としている対象における m⁶A RNA メチル化のレベルを低減し、それにより、当該対象が抗ウイルス活性剤で治療されるウイルスの抗ウイルス薬物耐性を低減するか、又はそれを必要としている対象における免疫応答を誘導する剤、例えば、開示された核酸阻害剤の量を意味する。また、m⁶A RNA メチル化のレベルを減少させる剤、例えば、開示された核酸阻害剤に関して本明細書で使用するとき、有効量は、対象が抗ウイルス活性剤で治療されるウイルス感染を治療する、当該対象が抗ウイルス活性剤で治療されるウイルス感染の進行を阻止又は遅延させる、当該対象が抗ウイルス活性剤で治療されるウイルス感染に関連する症状を低減又は十分

50

に軽減する剤、例えば、開示された核酸阻害剤の量を意味する。また、 m^6A RNAメチル化のレベルを減少させる剤、例えば、開示された核酸阻害剤に関して本明細書で使用するとき、有効量は、免疫応答の刺激が有益である疾患、障害、又は病態を治療する、免疫応答の刺激が有益である疾患、障害、又は病態の進行を阻止又は遅延させる、免疫応答の刺激が有益である疾患、障害又は病態に関連する症状を低減又は十分に軽減する剤、例えば、開示された核酸阻害剤の量を意味する。

【0055】

具体的な実施形態によれば、有効量は、以下の効果のうちの1つ、2つ、3つ、4つ、又はそれ以上を達成するのに十分な治療薬の量を指す：(i)対象が抗ウイルス活性剤で治療されるウイルス感染若しくはそれに関連する症状の重症度を低下若しくは改善する、(ii)対象が抗ウイルス活性剤で治療されるウイルス感染若しくはそれに関連する症状の期間を短縮する、(iii)対象が抗ウイルス活性剤で治療されるウイルス感染若しくはそれに関連する症状の進行を阻止する、(iv)対象が抗ウイルス活性剤で治療されるウイルス感染若しくはそれに関連する症状の退縮を引き起こす、(v)対象が抗ウイルス活性剤で治療されるウイルス感染若しくはそれに関連する症状の発症若しくは発病を予防する、(vi)対象が抗ウイルス活性剤で治療されるウイルス感染若しくはそれに関連する症状の再発を予防する、(vii)対象が抗ウイルス活性剤で治療されるウイルス感染若しくはそれに関連する症状を有する対象の入院を低減する、(viii)対象が抗ウイルス活性剤で治療されるウイルス感染若しくはそれに関連する症状を有する対象の入院期間を短縮する、(ix)対象が抗ウイルス活性剤で治療されるウイルス感染若しくはそれに関連する症状を有する対象の生存率を増大させる、(xi)対象における、対象が抗ウイルス活性剤で治療されるウイルス感染若しくはそれに関連する症状を阻害若しくは軽減する、及び/又は(xii)別の治療薬の予防若しくは治療効果を強化若しくは改善する。

10

20

【0056】

他の具体的な実施形態によれば、有効量は、以下の効果のうちの1つ、2つ、3つ、4つ、又はそれ以上を達成するのに十分な治療薬の量を指す：(i)免疫応答の刺激が有益である疾患、障害、若しくは病態又はそれに関連する症状の重症度を低下又は改善する、(ii)免疫応答の刺激が有益である疾患、障害、若しくは病態又はそれに関連する症状の期間を短縮する、(iii)免疫応答の刺激が有益である疾患、障害、若しくは病態又はそれに関連する症状の進行を阻止する、(iv)免疫応答の刺激が有益である疾患、障害、若しくは病態又はそれに関連する症状の退縮を引き起こす、(v)免疫応答の刺激が有益である疾患、障害、若しくは病態又はそれに関連する症状の発症又は発病を予防する、(vi)免疫応答の刺激が有益である疾患、障害、若しくは病態又はそれに関連する症状の再発を予防する、(vii)免疫応答の刺激が有益である疾患、障害、若しくは病態又はそれに関連する症状を有する対象の入院を低減する、(viii)免疫応答の刺激が有益である疾患、障害、若しくは病態又はそれに関連する症状を有する対象の入院期間を短縮する、(ix)免疫応答の刺激が有益である疾患、障害、若しくは病態又はそれに関連する症状を有する対象の生存率を増大させる、(xi)免疫応答の刺激が有益である疾患、障害、若しくは病態又はそれに関連する症状を阻害又は低減する、及び/あるいは(xii)別の治療薬の予防又は治療効果を強化又は改善する。

30

40

【0057】

治療有効量又は投与量は、投与手段、対象の生理学的状態(例えば、年齢、体重、健康状態を含む)、対象がヒトであるか動物であるか、及び投与される他の医薬などの様々な要因によって変化し得る。治療用量は、安全性及び効能を最適化するために最適に漸増される。

【0058】

本開示の核酸阻害剤などの剤の治療的使用のための投与様式は、開示された核酸阻害剤などの剤を宿主に送達する任意の好適な経路であってよい。例えば、本明細書に記載する組成物は、非経口的投与、例えば皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻孔内、若しく

50

は頭蓋内投与に好適であるように製剤化することができ、又は、脳若しくは脊椎の脳脊髄液内に投与することができる。

【0059】

特定の実施形態によれば、対象が抗ウイルス活性剤で治療されるウイルス感染は、 m_6A RNAメチル化によって薬剤耐性が制御される任意のウイルスによる感染である。例えば、ウイルス感染は、インフルエンザウイルス、HIV、エボラ、HCV又はジカウイルスを含み得る。特定の実施形態によれば、ウイルス感染は、A型インフルエンザウイルス感染、B型インフルエンザウイルス感染、又はC型インフルエンザウイルス感染などのインフルエンザウイルス感染である。特定の実施形態によれば、ウイルス感染は、A型インフルエンザウイルス感染である。

10

【0060】

特定の実施形態によれば、剤は、METTL3、METTL14、及びWTAPのうちの少なくとも1つの阻害剤である。特定の実施形態によれば、阻害剤は、METTL3、METTL14、若しくはWTAP遺伝子のうちの1つ以上に結合するオリゴヌクレオチド、又はMETTL3、METTL14、若しくはWTAPの発現を低減若しくは阻止するアンチセンス核酸などの核酸である。特定の実施形態によれば、阻害剤は、METTL3、METTL14、又はWTAPに結合し、その活性を阻害する低分子、ペプチド、抗体、炭水化物、又は脂質である。特定の実施形態によれば、阻害剤は、タンパク質の1つ以上とN6-メチルトランスフェラーゼ複合体のコンセンサス配列、RRm₆ACH(式中、Rは、独立して、グアノシン又はアデノシンであり、Cは、シチジンであり、Hは、独立して、アデノシン、シチジン、又はウリジンである)との間の結合を遮断又は減少させる核酸阻害剤である。

20

【0061】

特定の態様によれば、核酸阻害剤は、METTL3に結合し、立体的に阻害するRNAオリゴヌクレオチドである。特定の態様によれば、核酸阻害剤は、(RRACH)_n(式中、少なくとも1つのRは、独立して、グアノシンであり、その他は、独立して、グアノシン又はアデノシンであり、Aは、メチル化されているか又はメチル化されていないアデノシンであり、Cは、シチジンであり、Hは、独立して、アデノシン、シチジン、又はウリジンであり、nは、2~6の整数である)のポリヌクレオチド配列を含むRNAオリゴヌクレオチドであり、当該オリゴヌクレオチドにおける1つ以上のヌクレオチドが修飾されている。特定の実施形態によれば、(RRACH)部分は、互いに隣接し、それらの間に他のヌクレオチドを有さない。特定の実施形態によれば、開示された核酸阻害剤は、GGACA、GGACC、GGACU、GAACA、GAACC、GAACU、AGACA、AGACC、AGACU、GGm⁶ACA、GGm⁶ACC、GGm⁶ACU、GAm⁶ACA、GAm⁶ACC、GAm⁶ACU、AGm⁶ACA、AGm⁶ACC、及びAGm⁶ACU、又はこれらの組み合わせのうちの1つ以上、例えば、GGACAGGACC GGACU GAACA、GAACCGAACU AGACAAGACC、(GGACA)₂(AGACU)₂、GAACU(AGACA)₃AGACCなどを含むRNAオリゴヌクレオチドである。特定の実施形態によれば、RNAオリゴヌクレオチドは、5'GGACUGGACUGGACUGGACU'3'(配列番号1)のポリヌクレオチド配列からなり、任意選択で当該RNAオリゴヌクレオチドにおける1つ以上のヌクレオチドが修飾されている。

30

40

【0062】

好ましくは、オリゴヌクレオチドにおける1つ以上のヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの安定性を増加させるように修飾されている。特定の態様によれば、RNAオリゴヌクレオチドは、当該技術分野において既知の化学を使用して、1つ以上の修飾によって安定化される。例示的なヌクレオチド修飾としては、糖及び/又はリン酸骨格修飾リボヌクレオチドが挙げられる。例えば、天然RNAのホスホジエステル結合は、窒素又は硫黄ヘテロ原子のうちの少なくとも1つを含むように修飾され得る。例示的な骨格修飾リボヌクレオチドでは、隣接するリボヌクレオチドに連結するホスホジエステル基のうちの少なく

50

とも1つが、ホスホロチオエート基、ホスホラミエート又はチオホスホラミデートなどの修飾基によって置換される。例示的な糖修飾リボヌクレオチドでは、糖の2'OH基は、H、R、OR、OROR、ハロ、SH、SR、NH₂、NHR、NR₂、又はONから選択される基によって置換され、各Rは、独立して、C₁~C₂アルキル、ハロアルキル、アルケニル又はアルキニルであり、ハロは、F、Cl、Br又はIである。特定の実施形態では、糖の2'OH基は、フルオロによって置換される。特定の実施形態では、糖の2'OH基は、フルオロによって置換される(2'フルオロ修飾)。特定の実施形態では、糖の2'OH基は、アデニン塩基を有するヌクレオチドにおけるフルオロによって置換される(2'-フルオロ-アデノシン修飾)。

【0063】

ある実施形態では、本開示のオリゴヌクレオチドにおける1つ以上のアデノシンは、2'-フルオロ、2'-O-メチル、2'-O-メトキシ、2'-O-エチル、又は2'-O-メトキシエチルで修飾されている。2'-糖置換基は、アラビノ(上)位又はリボ(下)位にあってよい。

【0064】

他の修飾としては、2'-アミノ及び/又は2'-チオ修飾を挙げることができるが、これらに限定されない。特定の修飾としては、2'-フルオロ-シチジン、2'-フルオロ-ウリジン、2'-フルオロ-グアノシン、2'-アミノ-シチジン、2'-アミノ-ウリジン、2'-アミノ-アデノシン、2'-アミノ-グアノシン、2,6-ジアミノプリン、4-チオ-ウリジン、及び/又は5-アミノ-アリル-ウリジンが挙げられる。

【0065】

糖変性リボヌクレオチドは、糖の他の位置、例えば5'位でも修飾され得る。更なる例示的な修飾としては、5-プロモ-ウリジン、5-ヨード-ウリジン、5-メチル-シチジン、リボ-チミジン、2-アミノプリン、2'-アミノ-ブチリル-ピレン-ウリジン、5-フルオロ-シチジン、及び5-フルオロ-ウリジンが挙げられる。更なる修飾残基としては、イノシン、N₃-メチル-ウリジン、N₆, N₆-ジメチル-アデノシン、シュードウリジン、プリンリボヌクレオチド、及びリバピリンが挙げられる。複数の化学修飾を同じ分子内で組み合わせることができることを理解すべきである。RNAオリゴヌクレオチドにおける任意の1つ以上のヌクレオチドが修飾され得ることも理解すべきである。

【0066】

特定の態様によれば、RNAオリゴヌクレオチドにおける1つ以上のヌクレオチドは、2'-フルオロ-アデノシン修飾によって修飾されている。ある実施形態では、ポリヌクレオチド配列は(GG/i2FA/CU)_n(式中、i2FAは、2'-フルオロ-アデノシンを表し、nは2~6である)である。特定の態様によれば、オリゴヌクレオチドは、5'GG/i2FA/CUGG/i2FA/CUGG/i2FA/CUGG/i2FA/CU3'(配列番号2)(式中、i2FAは、2'-フルオロ-アデノシンを表す)のポリヌクレオチド配列からなる。

【0067】

特定の実施形態によれば、本開示のオリゴヌクレオチドは、リンカーを介して標的指向化部分にコンジュゲートされ得る。特定の実施形態によれば、標的指向化部分は、安定性を増加させる及び/又はコンジュゲートされたオリゴヌクレオチドの送達を誘導する。

【0068】

本明細書で使用するとき、用語「リンカー」は、ヌクレオチドを標的指向化部分に結合させる化学部分を指し、用語「切断可能なリンカー」は、ヌクレオチド又はそれが結合している核酸分子を本質的に変化させることなく、必要に応じてヌクレオチドから増強部分を除去するために切断され得るリンカーを指す。切断は、結合の性質に応じて、例えば、酸又は塩基処理によって、結合の酸化又は還元によって、光処理(光退色)によって達成することができる。リンカーは、例えば、単一の共有結合、置換又は非置換アルキル、置換若しくは非置換のヘテロアルキル部分、ポリエチレングリコール(PEG)リンカー、

10

20

30

40

50

又は1つ、2つ、若しくは3つの脱塩基及び/若しくはリビトール基であってよい。

【0069】

本明細書で使用するとき、用語「標的指向化部分」は、そのコンジュゲートされたオリゴヌクレオチドの標的細胞への送達を安定化及び/又は誘導するのに好適な任意の部分を目指す。特定の実施形態によれば、標的指向化部分は、脂質部分である。本明細書で使用するとき、「脂質部分」は、親油性構造を含有する部分を目指す。コレステロール、トコフェロール、又は他の脂肪酸などの脂質部分は、核酸などの高度に親水性の分子に結合したとき、血漿タンパク質結合を実質的に強化し、結果として、親水性分子の循環半減期を延長することができる。

【0070】

具体的な実施形態によれば、標的指向化部分は、対象とする特定の標的細胞型に存在する受容体に結合する。標的指向化部分は、オリゴヌクレオチドが必要な標的部位を標的指向化するのに役立つ。標的指向化部分が送達を改善することができる1つの方法は、受容体によって媒介されるエンドサイトーシス活性によるものである。この取り込み機構は、膜構造の陥入を介した、又は送達系と細胞膜との融合による、膜受容体に結合したオリゴヌクレオチドの、膜に包囲された領域の内部への移動を伴い、これは、受容体への特異的リガンドの結合後に細胞表面又は膜受容体の活性化を介して開始される。ガラクトース、マンノース、マンノース-6-リン酸などの糖、トランスフェリン、アシアロ糖タンパク糖、ビタミンB12、インスリン、及び上皮成長因子(EGF)などのペプチド及びタンパク質を認識するものを含む、多くの受容体によって媒介されるエンドサイトーシス系が公知であり、研究されている。

【0071】

特定の態様によれば、対象に、抗インフルエンザ薬、抗HIV薬、又は抗ジカウイルス薬などの抗ウイルス活性剤と組み合わせて、有効量の開示された核酸阻害剤を投与する。特定の態様によれば、対象に、ザナミビル又はオセルタミビルなどの抗インフルエンザ薬と組み合わせて、有効量の開示された核酸阻害剤を投与する。他の特定の態様によれば、対象に、免疫調節物質又は抗炎症薬と組み合わせて、有効量の開示された核酸阻害剤を投与する。特定の態様によれば、対象に、TLR7又はTLR9のアゴニストなどの免疫調節物質と組み合わせて、有効量の開示された核酸阻害剤を投与する。

【0072】

開示された核酸阻害剤を、単回投与スケジュールで投与してもよく、又は1~10回の別個の投与を含む治療の一次過程に続いて、後続の時間間隔で、例えば、2回目の投与については1~4日、週、又は月間隔で与えられる他の投与、そして、必要に応じて、数日、数週間、又は数ヶ月後に次の投与を行う、複数回投与スケジュールとして投与してもよい。オリゴヌクレオチド、医薬組成物、及びキット

【0073】

ある実施形態では、(RRACH)_nのポリヌクレオチド配列は(GG/i2FA/CU)_n(式中、i2FAは、2'-フルオロ-アデノシンを表し、nは2~6である)である。実施形態では、核酸阻害剤は、5'GG/i2FA/CUGG/i2FA/CUGG/i2FA/CUGG/i2FA/CU3'(配列番号2)(式中、i2FAは、2'-フルオロ-アデノシンを表す)からなるオリゴヌクレオチドである。

【0074】

RNAオリゴヌクレオチドなどの開示された核酸阻害剤は、本開示を考慮して、当該技術分野において既知の方法を用いて作製することができる。例えば、開示されたRNAオリゴヌクレオチドは、固相合成により作製することができ、例えば、「Oligonucleotide synthesis, a practical approach」、M. J. Gait 編, IRL Press, 1984年; 「Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach」、F. Eckstein 編, IRL Press, 1991年(例えば、Chapter 1, Modern machine-aided methods of oligod

10

20

30

40

50

eoxyribonucleotide synthesis, Chapter 2, Oligoribonucleotide synthesis, Chapter 4, Phosphorothioate oligonucleotides, Chapter 5, Synthesis of oligonucleotide phosphorodithioates)を参照されたい。他の特に有用な合成手順、試薬、ブロッキング基、及び反応条件は、Martin, P., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504; Beaucage, S. L. and Iyer, R. P., Tetrahedron, 1992, 48, 2223-2311 and Beaucage, S. L. and Iyer, R. P., Tetrahedron, 1993, 49, 6123-6194、又はその中に参照されている参照文献に記載されている。特定の開示されたオリゴヌクレオチド及びそのモノマーは、商業的に入手することもできる。

10

【0075】

一般的な態様では、本開示は、5'GG/i2FA/CUGG/i2FA/CUGG/i2FA/CUGG/i2FA/CU3'(配列番号2)(式中、i2FAは、2'-フルオロ-アデノシンを表す)からなる核酸阻害剤と、医薬的に許容される担体と、を含む、医薬組成物に関する。

【0076】

具体的な実施形態によれば、本明細書に記載される組成物は、対象への想定される投与経路に好適であるように製剤化される。例えば、本明細書に記載される組成物は、静脈内投与、皮下投与、又は筋肉内投与に好適であるように製剤化することができる。好ましい実施形態によれば、本明細書に記載される組成物は、静脈内又は皮下への投与に好適であるように製剤化される。

20

【0077】

別の一般的な態様によれば、本出願は、本開示の核酸阻害剤などの剤と、抗ウイルス活性剤などの別の活性成分と、を含む、医薬組成物に関する。本出願の一実施形態では、医薬組成物は、(RRACH)_n(式中、少なくとも1つのRは、独立して、グアノシンであり、その他は、独立して、グアノシン又はアデノシンであり、Aは、メチル化されているか又はメチル化されていないアデノシンであり、Cは、シチジンであり、Hは、独立して、アデノシン、シチジン、又はウリジンであり、nは、2~6の整数である)のポリヌクレオチド配列を含むRNAオリゴヌクレオチドと組み合わせて、抗インフルエンザ薬、抗HIV薬、抗ジカウイルス薬、免疫刺激物質、又は免疫調節物質を含む。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドにおける1つ以上のヌクレオチドが修飾されている。特定の態様によれば、医薬組成物中の抗インフルエンザ薬は、ザナミビル又はオセルタミビルなどのノイラミニダーゼ阻害剤を含む。ある実施形態では、RNAオリゴヌクレオチドは、任意選択で1つ以上の修飾されたヌクレオチドを有する5'GGACUGGACUGGACUGGACU3'(配列番号1)のポリヌクレオチド配列を有し、好ましくは、5'GG/i2FA/CUGG/i2FA/CUGG/i2FA/CUGG/i2FA/CU3'(配列番号2)(式中、i2FAは、2'-フルオロ-アデノシンを表す)からなる。

30

【0078】

別の一般的な態様では、本開示は、剤又は核酸阻害剤を医薬的に許容される担体と組み合わせて医薬組成物を得ること、を含む、開示された核酸阻害剤などの剤を含む医薬組成物を作製する方法に関する。

40

【0079】

別の一般的な態様では、本開示は、本開示の医薬組成物を対象に投与すること、を含む、それを必要としている対象における疾患を治療する方法であって、当該疾患が、免疫応答の刺激が有益である疾患である、方法に関する。特定の態様によれば、疾患は、インフルエンザウイルス、エボラウイルス、ジカウイルス、HIV、ライノウイルス、HCV、及びHBVによる感染などの、ウイルス感染又は疾患、障害又は病態である。

【0080】

一般的な態様では、本開示は、開示された核酸阻害剤などの剤と、抗ウイルス活性剤な

50

どの別の活性成分と、を含むキットであって、当該開示された核酸阻害剤及び当該他の活性成分が、同じ組成物又は異なる組成物中に存在する、キットに関する。ある実施形態では、剤又は核酸阻害剤は、 m^6A RNAメチル化のレベルを減少させるのに有効である。本出願の一実施形態では、キットは、抗インフルエンザ薬、抗HIV薬、抗ジカウイルス薬、免疫刺激物質、又は免疫調節物質と、 $(RRACH)_n$ (式中、少なくとも1つのRは、独立して、グアノシンであり、その他は、独立して、グアノシン又はアデノシンであり、Aは、メチル化されているか又はメチル化されていないアデノシンであり、Cは、シチジンであり、Hは、独立して、アデノシン、シチジン、又はウリジンであり、nは、2~6の整数である)のポリヌクレオチド配列を含むRNAオリゴヌクレオチドと、を含み、当該オリゴヌクレオチドにおける1つ以上のヌクレオチドが修飾されている。特定の態様によれば、キットは、好ましくはザナミビル及びオセルタミビルから選択されるノイラミニダーゼ阻害剤である抗インフルエンザ薬と、任意選択で1つ以上の修飾されたヌクレオチドを有する5'GGACUGGACUGGACUGGACU3'(配列番号1)のポリヌクレオチド配列からなり、好ましくは、5'GG/i2FA/CUGG/i2FA/CUGG/i2FA/CUGG/i2FA/CU3'(配列番号2)(式中、i2FAは、2'-フルオロ-アデノシンを表す)からなるRNAオリゴヌクレオチドと、を含む。

10

【0081】

本出願全体で引用した全ての引用参考文献(論文参考文献、交付済み特許、公開された特許出願、及び同時係属の特許出願を含む)の内容は、参照により本明細書に明白に組み込まれる。

20

【0082】

実施形態

本発明は以下の非限定的な実施形態も提供する。

【0083】

実施形態1は、薬物で治療された対象において薬物耐性を低減する方法であって、当該対象における N^6 -メチルアデノシン(m^6A)RNAメチル化のレベルを減少させ、それにより、当該対象において薬物耐性を低減する有効量の剤を当該対象に投与すること、を含む、方法である。

【0084】

実施形態2は、当該剤が、メチルトランスフェラーゼ様タンパク質3(METTL3)、METTL14、及びウィルムス腫瘍1関連タンパク質(WTAP)のうちの少なくとも1つの阻害剤である、実施形態1に記載の方法である。

30

【0085】

実施形態3は、当該剤が、核酸、低分子、又は抗体若しくはその抗原結合断片などのポリペプチドである、実施形態1又は2に記載の方法である。

【0086】

実施形態4は、当該剤が、 $(RRACH)_n$ (式中、少なくとも1つのRは、独立して、グアノシンであり、その他は、独立して、グアノシン又はアデノシンであり、Aは、メチル化されているか又はメチル化されていないアデノシンであり、Cは、シチジンであり、Hは、独立して、アデノシン、シチジン、又はウリジンであり、nは、2~6の整数である)のポリヌクレオチド配列を含むRNAオリゴヌクレオチドであり、任意選択で当該オリゴヌクレオチドにおける1つ以上のヌクレオチドが修飾されている、実施形態1~3のいずれかに記載の方法である。

40

【0087】

実施形態5は、ポリヌクレオチド配列が、 $(GGACU)_n$ (式中、nは、2~6の整数である)である、実施形態4に記載の方法である。

【0088】

実施形態6は、当該オリゴヌクレオチドが、任意選択で1つ以上のヌクレオチド修飾を含有している、5'GGACUGGACUGGACUGGACU3'(配列番号1)のポ

50

リヌクレオチド配列からなる、実施形態 4 又は 5 に記載の方法である。

【0089】

実施形態 7 は、当該オリゴヌクレオチドにおける 1 つ以上のヌクレオシドが修飾されている、実施形態 4 ~ 6 のいずれか 1 つに記載の方法である。

【0090】

実施形態 8 は、当該オリゴヌクレオチドにおける 1 つ以上のヌクレオシドが、2' - フルオロ修飾を有し、好ましくは、当該オリゴヌクレオチドにおける 1 つ以上のアデノシン残基が、2' - フルオロ修飾を有する、実施形態 7 に記載の方法である。

【0091】

実施形態 9 は、当該オリゴヌクレオチドが、5' GG / i 2 F A / C U G G / i 2 F A / C U G G / i 2 F A / C U G G / i 2 F A / C U 3' (配列番号 2) (式中、i 2 F A は、2' - フルオロ - アデノシンを表す) のポリヌクレオチド配列からなる、実施形態 6 ~ 8 のいずれかに記載の方法である。

10

【0092】

実施形態 10 は、当該オリゴヌクレオチドが、リンカーを介して標的指向化部分にコンジュゲートしている、実施形態 4 ~ 9 のいずれかに記載の方法である。

【0093】

実施形態 11 は、当該オリゴヌクレオチドを、静脈内又は皮下投与する、実施形態 4 ~ 10 のいずれかに記載の方法である。

【0094】

実施形態 12 は、当該対象に、当該薬物と組み合わせて有効量の当該剤を投与する、実施形態 1 ~ 11 のいずれかに記載の方法である。

20

【0095】

実施形態 13 は、当該薬物が、抗ウイルス薬である、実施形態 1 ~ 12 のいずれかに記載の方法である。

【0096】

実施形態 14 は、当該抗ウイルス薬が、抗インフルエンザ薬である、実施形態 13 に記載の方法である。

【0097】

実施形態 15 は、当該抗インフルエンザ薬が、ノイラミニダーゼ阻害剤である、実施形態 14 に記載の方法である。

30

【0098】

実施形態 16 は、当該ノイラミニダーゼ阻害剤が、ザナミビル又はオセルタミビルである、実施形態 15 の方法である。

【0099】

実施形態 17 は、必要としている対象における免疫応答を刺激する方法であって、当該対象における N6 - メチルアデノシン (m⁶A) RNA メチル化のレベルを減少させ、それにより、当該対象における免疫応答を刺激する有効量の剤を当該対象に投与すること、を含む、方法である。

【0100】

実施形態 18 は、当該剤が、メチルトランスフェラーゼ様タンパク質 3 (METTL3)、METTL14、及びウィルムス腫瘍 1 関連タンパク質 (WTAP) のうちの少なくとも 1 つの阻害剤である、実施形態 17 に記載の方法である。

40

【0101】

実施形態 19 は、当該剤が、核酸、低分子、又は抗体若しくはその抗原結合断片などのポリペプチドである、実施形態 17 又は 18 に記載の方法である。

【0102】

実施形態 20 は、当該剤が、(RRACH)_n (式中、少なくとも 1 つの R は、独立して、グアノシンであり、その他は、独立して、グアノシン又はアデノシンであり、A は、メチル化されているか又はメチル化されていないアデノシンであり、C は、シチジンであ

50

り、Hは、独立して、アデノシン、シチジン、又はウリジンであり、nは、2～6の整数である)のポリヌクレオチド配列を含むRNAオリゴヌクレオチドである、実施形態17～19のいずれかに記載の方法である。

【0103】

実施形態21は、ポリヌクレオチド配列が、(GGACU)_n(式中、nは、2～6の整数である)である、実施形態20に記載の方法である。

【0104】

実施形態22は、当該オリゴヌクレオチドが、任意選択で1つ以上のヌクレオシド修飾を含有する、5'GGACUGGACUGGACUGGACU3'(配列番号1)のポリヌクレオチド配列からなる、実施形態21に記載の方法である。

10

【0105】

実施形態23は、当該オリゴヌクレオチドにおける1つ以上のヌクレオシドが修飾されている、実施形態20～22のいずれか1つに記載の方法である。

【0106】

実施形態24は、当該オリゴヌクレオチドにおける1つ以上のヌクレオシドが、2'-フルオロ修飾を有し、好ましくは、当該オリゴヌクレオチドにおける1つ以上のアデノシン残基が、2'-フルオロ修飾を有する、実施形態23に記載の方法である。

【0107】

実施形態25は、当該オリゴヌクレオチドが、5'GG/i2FA/CUGG/i2FA/CUGG/i2FA/CUGG/i2FA/CUGG/i2FA/CU3'(配列番号2)(式中、i2FAは、2'-フルオロ-アデノシンを表す)のポリヌクレオチド配列からなる、実施形態22～24のいずれかに記載の方法である。

20

【0108】

実施形態26は、当該オリゴヌクレオチドが、リンカーを介して標的指向化部分にコンジュゲートしている、実施形態20～25のいずれかに記載の方法である。

【0109】

実施形態27は、当該オリゴヌクレオチドを、静脈内又は皮下投与する、実施形態20～26のいずれかに記載の方法である。

【0110】

実施形態28は、当該対象に、薬物、好ましくは、抗ウイルス薬、抗炎症薬、又は免疫調節物質と組み合わせて、有効量の当該剤を投与する、実施形態18～27のいずれかに記載の方法である。

30

【0111】

実施形態29は、5'GG/i2FA/CUGG/i2FA/CUGG/i2FA/CUGG/i2FA/CUGG/i2FA/CU3'(配列番号2)(式中、i2FAは、2'-フルオロ-アデノシンを表す)からなる、RNAオリゴヌクレオチドである。

【0112】

実施形態30は、当該オリゴヌクレオチドが、リンカーを介して標的指向化部分にコンジュゲートしている、実施形態29に記載のオリゴヌクレオチドである。

【0113】

実施形態31は、実施形態29又は30に記載のオリゴヌクレオチドと、医薬的に許容される担体と、を含む、医薬組成物である。

40

【0114】

実施形態32は、抗ウイルス活性剤、好ましくは、抗インフルエンザ薬、より好ましくは、ノイラミニダーゼ阻害剤、例えば、ザナミビル又はオセルタミビルなどの薬物と、対象におけるN⁶-メチルアデノシン(m⁶A)RNAメチル化のレベルを減少させる剤と、を含む医薬組成物であって、好ましくは、当該剤が、(RRACH)_n(式中、少なくとも1つのRは、独立して、グアノシンであり、その他は、独立して、グアノシン又はアデノシンであり、Aは、メチル化されているか又はメチル化されていないアデノシンであり、Cは、シチジンであり、Hは、独立して、アデノシン、シチジン又はウリジンであり

50

、 n は、2～6の整数である)のポリヌクレオチド配列を含むRNAオリゴヌクレオチドであり、より好ましくは、当該剤が、5'GGACUGGACUGGACUGGACU3'(配列番号1)のポリヌクレオチド配列からなるRNAオリゴヌクレオチドであり、これは、任意選択で1つ以上のヌクレオチド修飾を含有しており、最も好ましくは、当該剤が、5'GG/i2FA/CUGG/i2FA/CUGG/i2FA/CUGG/i2FA/CU3'(配列番号2)(式中、i2FAは、2'-フルオロ-アデノシンを表す)からなるRNAオリゴヌクレオチドである、医薬組成物である。

【0115】

実施形態33は、必要としている対象における疾患を治療する方法であって、実施形態31又は32に記載の医薬組成物を当該対象に投与すること、を含み、当該疾患が、免疫応答の刺激が有益である疾患である、方法である。

10

【0116】

実施形態34は、抗ウイルス活性剤、好ましくは、抗インフルエンザ薬などの薬物と、対象におけるN6-メチルアデノシン(m^6A)RNAメチル化のレベルを減少させる剤と、を含むキットであって、好ましくは、当該剤が、(RRACH) n (式中、少なくとも1つのRは、独立して、グアノシンであり、その他は、独立して、グアノシン又はアデノシンであり、Aは、メチル化されているか又はメチル化されていないアデノシンであり、Cは、シチジンであり、Hは、独立して、アデノシン、シチジン又はウリジンであり、 n は、2～6の整数である)のポリヌクレオチド配列を含むRNAオリゴヌクレオチドであり、より好ましくは、当該剤が、5'GGACUGGACUGGACUGGACUGGACU3'(配列番号1)のポリヌクレオチド配列からなるRNAオリゴヌクレオチドであり、これは、任意選択で1つ以上のヌクレオチド修飾を含有し、最も好ましくは、当該剤が、5'GG/i2FA/CUGG/i2FA/CUGG/i2FA/CUGG/i2FA/CU3'(配列番号2)(式中、i2FAは、2'-フルオロ-アデノシンを表す)からなるRNAオリゴヌクレオチドである、キットである。

20

【0117】

実施形態35は、当該オリゴヌクレオチドと当該抗ウイルス活性剤とが、同じ組成物中に存在する、実施形態34に記載のキットである。

【0118】

実施形態36は、当該オリゴヌクレオチド及び当該抗ウイルス活性剤が、異なる組成物中に存在する、実施形態34に記載のキットである。

30

【0119】

実施形態37は、当該抗ウイルス活性剤が、ノイラミニダーゼ阻害剤である、実施形態34～36のいずれかに記載のキットである。

【0120】

実施形態38は、当該ノイラミニダーゼ阻害剤が、ザナミビル又はオセルタミビルである、実施形態37に記載のキットである。

【0121】

実施形態39は、薬物を投与された対象において薬物耐性を予防又は治療する方法であって、有効量の核酸阻害剤を当該対象に投与すること、を含む、方法である。

40

【0122】

実施形態40は、当該核酸阻害剤が、メチルトランスフェラーゼ様タンパク質3(METTL3)、メチルトランスフェラーゼ様タンパク質14(METTL14)、及びウィルムス腫瘍1関連タンパク質(WTAP)のうちの少なくとも1つの阻害剤である、実施形態39に記載の方法である。

【0123】

実施形態41は、当該核酸阻害剤が、オリゴヌクレオチドである、実施形態39又は40に記載の方法である。

【0124】

実施形態42は、当該オリゴヌクレオチドが、RNAオリゴヌクレオチドである、実施

50

形態 4 1 に記載の方法である。

【 0 1 2 5 】

実施形態 4 3 は、当該オリゴヌクレオチドが、立体ブロッカーである、実施形態 4 1 又は 4 2 に記載の方法である。

【 0 1 2 6 】

実施形態 4 4 は、当該オリゴヌクレオチドが、(R R A C H) n (式中、少なくとも 1 つの R は、独立して、グアノシンであり、その他は、独立して、グアノシン又はアデノシンであり、A は、メチル化されているか又はメチル化されていないアデノシンであり、C は、シチジンであり、H は、独立して、アデノシン、シチジン、又はウリジンであり、n は、2 ~ 6 の整数である) のポリヌクレオチド配列を含む、実施形態 4 1 ~ 4 3 のいずれかに記載の方法である。

10

【 0 1 2 7 】

実施形態 4 5 は、当該オリゴヌクレオチドが、任意選択で 1 つ以上のヌクレオシド修飾を含有する、5' G G A C U G G A C U G G A C U G G A C U 3' (配列番号 1) のポリヌクレオチド配列からなる、実施形態 4 4 に記載の方法である。

【 0 1 2 8 】

実施形態 4 6 は、当該オリゴヌクレオチドにおける 1 つ以上のヌクレオシドが修飾されている、実施形態 4 4 又は 4 5 に記載の方法である。

【 0 1 2 9 】

実施形態 4 7 は、当該オリゴヌクレオチドにおける 1 つ以上のヌクレオシドが、2' -フルオロ修飾を有し、好ましくは、当該オリゴヌクレオチドにおける 1 つ以上のアデノシン残基が、2' -フルオロ修飾を有する、実施形態 4 5 又は 4 6 に記載の方法である。

20

【 0 1 3 0 】

実施形態 4 8 は、当該オリゴヌクレオチドが、5' G G / i 2 F A / C U G G / i 2 F A / C U G G / i 2 F A / C U G G / i 2 F A / C U 3' (配列番号 2) (式中、i 2 F A は、2' -フルオロ - アデノシンを表す) のポリヌクレオチド配列からなる、実施形態 4 5 ~ 4 7 のいずれかに記載の方法である。

【 0 1 3 1 】

実施形態 4 9 は、当該薬物が、抗ウイルス薬である、実施形態 3 9 ~ 4 8 のいずれかに記載の方法である。

30

【 0 1 3 2 】

実施形態 5 0 は、当該抗ウイルス薬が、抗インフルエンザ薬である、実施形態 4 9 に記載の方法である。

【 0 1 3 3 】

実施形態 5 1 は、当該抗インフルエンザ薬が、ノイラミニダーゼ阻害剤である、実施形態 5 0 に記載の方法である。

【 0 1 3 4 】

実施形態 5 2 は、当該ノイラミニダーゼ阻害剤が、ザナミビル又はオセルタミビルである、実施形態 5 1 の方法である。

【 0 1 3 5 】

実施形態 5 3 は、必要としている対象における免疫応答を刺激する方法であって、有効量の核酸阻害剤を当該対象に投与すること、を含む、方法である。

40

【 0 1 3 6 】

実施形態 5 4 は、当該核酸阻害剤が、メチルトランスフェラーゼ様タンパク質 3 (M E T T L 3)、メチルトランスフェラーゼ様タンパク質 1 4 (M E T T L 1 4)、及びウィルムス腫瘍 1 関連タンパク質 (W T A P) のうちの少なくとも 1 つの阻害剤である、実施形態 5 3 に記載の方法である。

【 0 1 3 7 】

実施形態 5 5 は、当該核酸阻害剤が、オリゴヌクレオチドである、実施形態 5 3 又は 5 4 に記載の方法である。

50

【0138】

実施形態56は、当該オリゴヌクレオチドが、RNAオリゴヌクレオチドである、実施形態55に記載の方法である。

【0139】

実施形態57は、当該オリゴヌクレオチドが、立体ブロッカーである、実施形態55又は56に記載の方法である。

【0140】

実施形態58は、当該オリゴヌクレオチドが、(RRACH)_n(式中、少なくとも1つのRは、独立して、グアノシンであり、その他は、独立して、グアノシン又はアデノシンであり、Aは、メチル化されているか又はメチル化されていないアデノシンであり、Cは、シチジンであり、Hは、独立して、アデノシン、シチジン、又はウリジンであり、nは、2~6の整数である)のポリヌクレオチド配列を含む、実施形態55~57のいずれかに記載の方法である。

10

【0141】

実施形態59は、当該オリゴヌクレオチドが、任意選択で1つ以上のヌクレオシド修飾を含有する、5'GGACUGGACUGGACUGGACU3'(配列番号1)のポリヌクレオチド配列からなる、実施形態58に記載の方法である。

【0142】

実施形態60は、当該オリゴヌクレオチドにおける1つ以上のヌクレオシドが修飾されている、実施形態58又は59に記載の方法である。

20

【0143】

実施形態61は、当該オリゴヌクレオチドにおける1つ以上のヌクレオシドが、2'-フルオロ修飾を有し、好ましくは、当該オリゴヌクレオチドにおける1つ以上のアデノシン残基が、2'-フルオロ修飾を有する、実施形態59又は60に記載の方法である。

【0144】

実施形態62は、当該オリゴヌクレオチドが、5'GG/i2FA/CUGG/i2FA/CUGG/i2FA/CUGG/i2FA/CU3'(配列番号2)(式中、i2FAは、2'-フルオロ-アデノシンを表す)のポリヌクレオチド配列からなる、実施形態59~61のいずれかに記載の方法である。

【実施例】

30

【0145】

以下の本開示の実施例は、本開示の性質について更に説明するためのものである。以下の実施例は本開示を限定するものではなく、本開示の範囲は添付の特許請求の範囲によって定められることを理解すべきである。

【0146】

以下の実施例で使用される実験方法は、別途記載のない限り、全て常法である。以下の実施形態で使用される試薬は、別途記載のない限り、全て通常の試薬供給元から購入される。

【0147】

(実施例1)

40

材料及び方法

細胞RNA、ウイルスRNAの抽出、及びm⁶Aの定量

感染7日後にMDC K上清からウイルスを回収し、2500rpmで10分間回転させ、QiagenウイルスRNA抽出キット(カタログ#52904、Qiagen)を使用してRNAを抽出した。ナノドロップ(Thermo Fisher)を用いてRNA濃度を測定した。2000ngの総RNA m⁶A定量キット(カタログ番号AB185912、Abcam)を使用して、総m⁶Aレベルを測定した。細胞RNAを抽出するために、上清を除去し、細胞を氷冷PBSで1回洗浄し、製造業者の指示書に従ってRNA抽出キット(カタログ番号74104、Qiagen)を用いてRNAを抽出した。

【0148】

50

E C 5 0 の決定

96 ウェルフォーマットを用いて E C 5 0 を決定した。最高濃度（各薬物の E C 5 0 に依存）を、ディープウェルブロックにおいて逐次 1 / 3 希釈した。薬物の添加後、細胞を 24 時間インキュベートし、続いて、ウイルスを添加した。72 時間又は 120 時間のいずれかにわたってウイルスを細胞と共にインキュベートし、製造業者のプロトコルに従って、cell titer glow（カタログ番号 G 7 5 7 0、Promega）を用いて細胞生存率を求め、又は munana アッセイ（カタログ # 4 4 5 7 0 9 1、Thermo Fisher）を用いてウイルスレベルを求めた。

【0149】

トランスフェクション

リポフェクタミン 2000 を用いて、MDCK 細胞をトランスフェクトした。簡潔には、Lipofectamine 2000（カタログ番号 11668010、Thermo Fisher）を使用して、1 ウェル当たり 100 nM のオリゴヌクレオチドをトランスフェクトし（対照 RNA : 5' GGG CUG GGC UGG GCUG GGC U3'（配列番号 3）；標的 RNA : 5' GGACUG GACUG GACUG GACUG 3'（配列番号 1）；安定な RNA : 5' GG/i2FA/CUGG/i2FA/CUGG/i2FA/CUGG/i2FA/CU3'（配列番号 2））、24 時間インキュベートした後、培地を、10% FBS を含有する DMEM に置き換えた。IDT によってオリゴヌクレオチドを合成した。

【0150】

免疫沈降アッセイ及びウェスタンブロッティング

5' ビオチン標識オリゴを使用して、免疫沈降を行った。簡潔には、プロテアーゼ阻害剤（カタログ番号 78438、Thermo Fisher）を補給した NP40 溶解緩衝液（カタログ番号 FNN0021、Thermo Fisher）を使用して、 2.0×10^6 個の 293T 細胞を溶解させ、溶解物を 4 で 10 分間回転させ、上清を単離した。製造業者のプロトコルに従って BCA アッセイ（カタログ番号 23227、Thermo Fisher）を使用して、総タンパク質濃度を測定した。100 μ g の総溶解物を、プロテアーゼ及び RNAse 阻害剤（Cat # N8080119、Thermo Fisher）を補給した 100 nM ビオチン化オリゴと共に、ロッカー上にて 4 で 1 時間インキュベートし、次いで、ストレプトアビジンでコーティングされたビーズ（カタログ番号 11206D、Thermo Fisher）30 μ L を加え、更に 2 時間インキュベートした。ビーズを氷冷 NP40 溶解緩衝液で 3 回洗浄し、ビーズを SDS サンプル緩衝液と共に 100 で 10 分間煮沸した。

【0151】

（実施例 2）

ウイルス RNA のメチル化は、ザナミビル耐性 A 型インフルエンザウイルスと共に増加する。

【0152】

薬剤耐性 A 型インフルエンザウイルスを生成するために、IV A を MDCK 細胞において逐次継代した。 5×10^6 個の MDCK（カタログ番号 CC134、ATCC）細胞を 6 ウェルプレートに播種した。2 nM の IC50 で出発して、MOI 及びザナミビル（カタログ番号 SML0492、Sigma）で細胞に IV A / PC ウイルスを感染させた。細胞を目視検査し、有意な細胞変性効果が観察された後、ザナミビルの用量を増加させて次の継代を行った。約 415 nM まで、継代毎に用量を 2 倍増加させた（図 1）。野生型及び薬剤耐性 IV A 及び IV B ウイルスにおける m^6 A メチル化の可能な変化を評価するために、ウイルス RNA を抽出し、上記のように m^6 A 特異的 ELISA で m^6 A を測定した。各ウイルスにおいて、総 m^6 A の有意な増加が検出され（図 2）、これは、獲得された薬剤耐性における m^6 A の役割を示唆している。

【0153】

（実施例 3）

10

20

30

40

50

RNAメチル化の調節物質は薬物耐性を変化させる

3-デアザアデノシン(3DZA)を使用してRNAメチル化を変化させると、薬剤耐性IVA(Scholtissek and Mueller, Archives Of Virology, 1991)の生成が阻害されることが実証されている。この情報に基づいて、薬剤耐性の制御におけるRNA調節物質の役割を試験した。3DZA(250μM)を使用して、総細胞m⁶Aを阻害し、MA(50μM)を使用して、総細胞m⁶Aを増加させた(Fustin et al., Cell, 2013, Huang et al., Nucleic Acids Research, 2014)。図5に示すように、MAによる処理によってm⁶A RNAメチル化レベルを増加させると、ザナミビルに対するウイルス耐性が増強される。

10

【0154】

次に、3DZA又はMAのいずれかの存在下で、ザナミビルによる耐性継代を行った。5×10⁶個のMDCK(カタログ番号CC134、ATCC)細胞を6ウェルプレートに播種した。50μMの3DZA(カタログ番号D8296、Sigma)又は100μM MA(カタログ番号M4531、Sigma)で細胞を処理した。24時間後、培地を、0.3%FBS 10%PS及び1:5000 TPCKトリプシン(カタログ番号T1426、Sigma)を含むMEMに置き換え、各ウェルを様々なMOI及びザナミビル濃度(カタログ番号SML0492、Sigma)でIVA/PCウイルスに感染させた。細胞を目視検査し、有意な細胞変性効果が観察された後、ザナミビルの用量を増加させて次の継代を行った。m⁶A ELISAを使用して、m⁶Aのレベルを測定した。図5に示すように、MAではIC50の増加(1.68μM)が、3DZAでは、IC50の減少(0.0618μM)が観察された。

20

【0155】

MDCK細胞を3DZA及びMAで処理した後、ウイルスRNA中の総m⁶Aレベルを測定した。図3に示すように、MA処理細胞におけるm⁶Aの増加及び3DZA処理細胞におけるm⁶Aの減少が観察され、これは、宿主のメルトランスフェラーゼを標的指向化することも、ウイルスRNA中のm⁶Aレベルを変化させることを示唆している。ザナミビル耐性A型インフルエンザウイルスは、耐性を直接的に引き起こす変異を有することが示された。

【0156】

30

(実施例4)

オリゴヌクレオチド立体ブロックによるMETTL3の標的指向化

RNAメチル化調節物質MA及び3DZAを使用して薬剤耐性の変化が観察されたため、METTL3活性を競合的に阻害することができるGGACUの4回反復配列で構成されたオリゴヌクレオチド阻害剤を設計した(図6)。

【0157】

m⁶Aの阻害を判定するために、MDCK及び293細胞を、100nMの対照、標的又は安定なオリゴのいずれかでトランスフェクトした。トランスフェクションの72時間後にm⁶Aのレベルを測定した。安定なオリゴでトランスフェクトされたMDCK及び293細胞においてそれぞれ、m⁶Aレベルの80%又は50%阻害が観察された(図7)

40

【0158】

293総細胞溶解物中でインキュベートされた3'-ビオチン標識オリゴによるRNAプルダウンアッセイを使用して、標的配列がMETTL3に結合したかどうかを試験した。図6に示すように、本開示の実施形態によるRNAオリゴヌクレオチドは、インビボにおいてMETTL3に結合することができるが、METTL14に結合することはできない。

【0159】

(実施例5)

オリゴヌクレオチド立体ブロックによる宿主METTL3の標的指向化は、ザナミビ

50

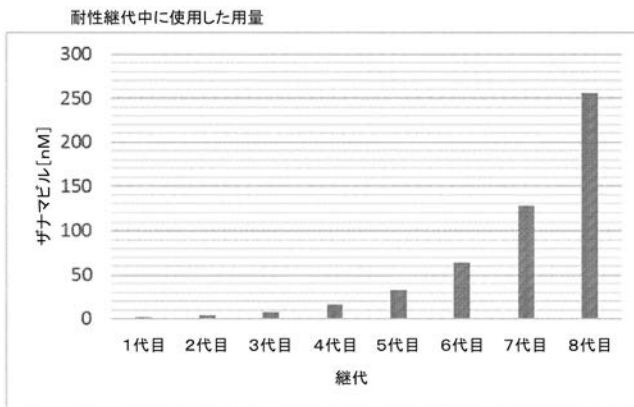
ル耐性を阻害する

効率的なMETTL3の結合及び宿主m⁶Aの阻害は、本開示の実施形態によるRNAオリゴヌクレオチドが、METTL3の立体ブロックとして機能することができ、薬物耐性を阻害するためにザナミビルなどの抗ウイルス活性剤と共に補助剤として使用できることを示唆した。これを試験するために、MDC K細胞を、単独で又はザナミビルと組み合わせて標的又は安定なオリゴ(図9)で処理し、10ラウンドの選択後にEC50レベルを求めた。図9に示すように、対照と比較して、標的又は安定なオリゴのいずれかで前処理された細胞による薬物耐性の低減(スクランブル: 337 nM対標的: 8 nM及び安定: 70 nM)が観察された。更に、対応するウイルスRNAにおけるm⁶Aメチル化の付随的な減少が観察され(図8)、これは、この変化がウイルスRNA m⁶Aレベルの変化によるものであることを示唆している。

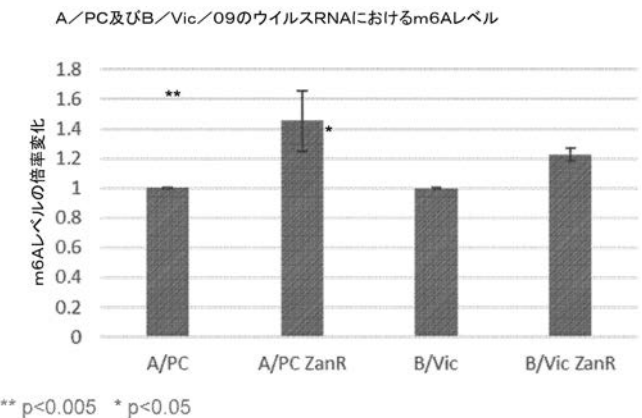
【0160】

以上、本発明を詳細に、その具体的な実施形態を参照して説明してきたが、本発明の趣旨及び範囲から逸脱することなく、本開示において様々な変更及び改変を行い得ることが当業者には明らかであろう。

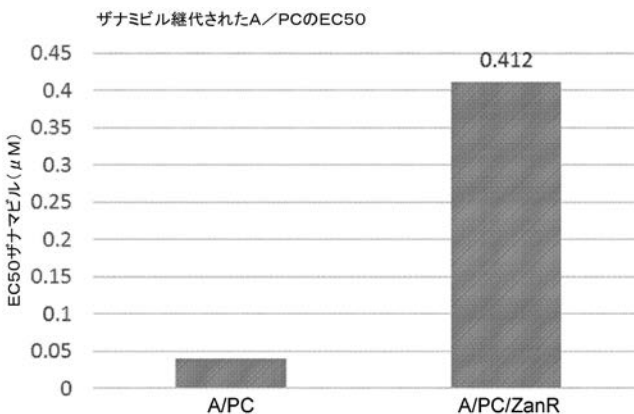
【図1A】



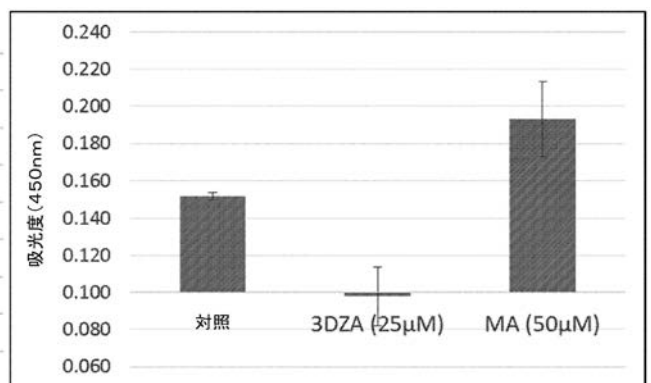
【図2】



【図1B】

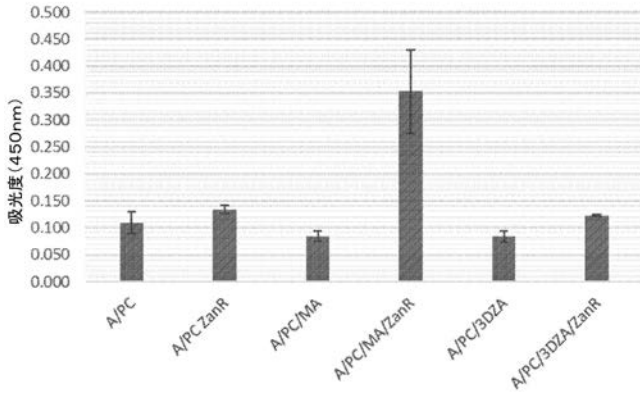


【図3】



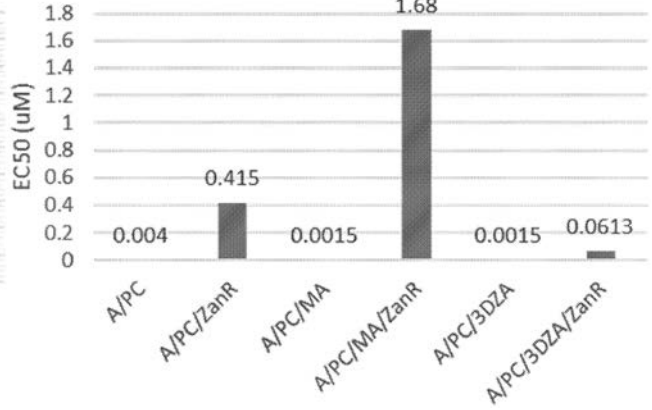
【 図 4 】

A/PC RNAiにおける総m6Aレベル



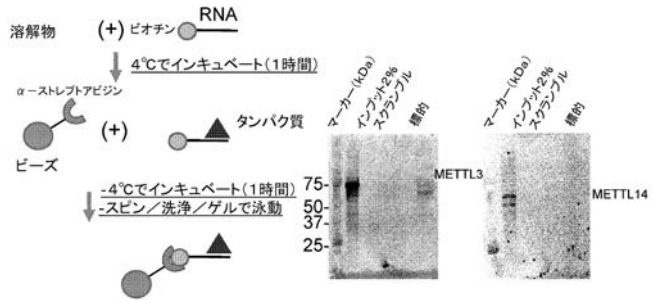
【 図 5 】

継代されたA/PCウイルスのEC50



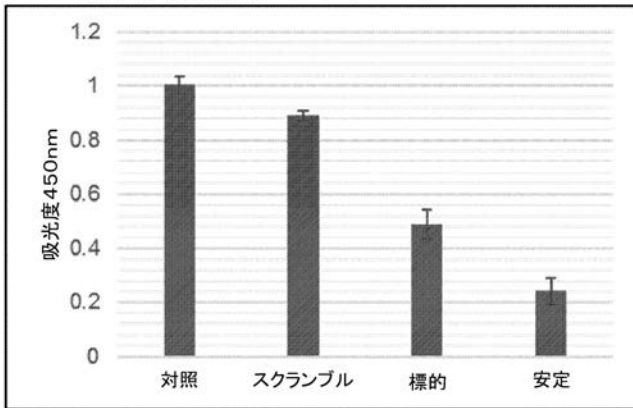
【 図 6 】

アプローチ:



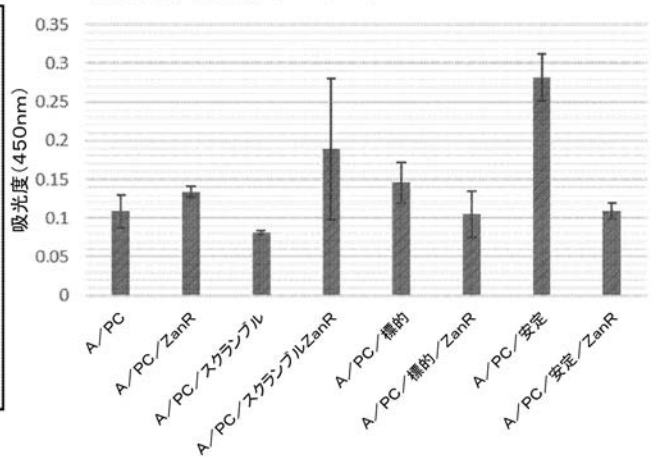
【 図 7 A 】

MDCK細胞における処理後のm6Aレベル



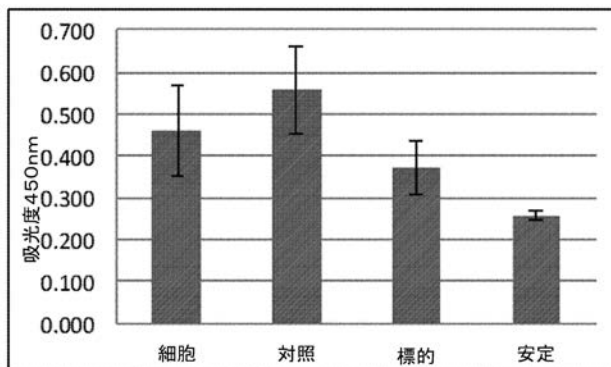
【 図 8 】

MDCK細胞における処理後のm6Aレベル



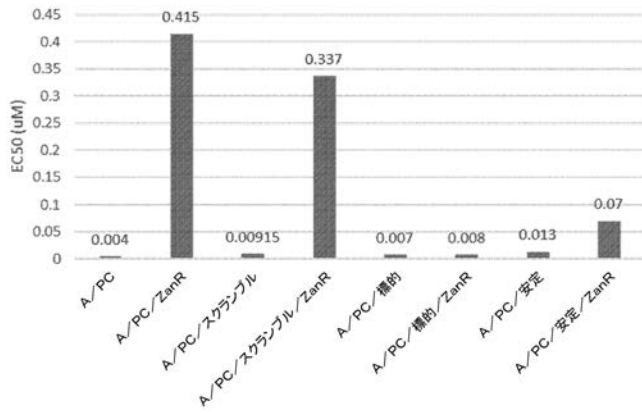
【 図 7 B 】

HEK293細胞における処理後のm6Aレベル



【 図 9 】

A/PCザナミビル耐性継代されたウイルスにおけるEC50レベル



【 配列表 】

2021518372000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2019/023463

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/113 A61K31/712 A61K31/351 A61K31/215 ADD. A61P31/16		
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, EMBASE, WPI Data, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KOSUKE TAKETO ET AL: "The epitranscriptome m6A writer METTL3 promotes chemo- and radioresistance in pancreatic cancer cells", INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY, vol. 52, 7 December 2017 (2017-12-07), pages 621-629, XP55596978, GR	1,2, 21-24
Y	ISSN: 1019-6439, DOI: 10.3892/ijo.2017.4219 the whole document ----- -/--	3,4, 25-27
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 18 June 2019		Date of mailing of the international search report 02/07/2019
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Andres, Serge

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2019/023463

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	XIANG WANG ET AL: "Structural basis of N6-adenosine methylation by the METTL3-METTL14 complex", NATURE, vol. 534, no. 7608, 25 May 2016 (2016-05-25), pages 575-578, XP55597337, London ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature18298 the whole document -----	3,4, 25-27
A	DAVID G. COURTNEY ET AL: "Epitranscriptomic Enhancement of Influenza A Virus Gene Expression and Replication", CELL HOST & MICROBE, vol. 22, no. 3, 1 September 2017 (2017-09-01), pages 377-386, XP55597020, NL ISSN: 1931-3128, DOI: 10.1016/j.chom.2017.08.004 the whole document -----	1-40
A	HSING-PANG HSIEH ET AL: "Strategies of Development of Antiviral Agents Directed Against Influenza Virus Replication", CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN, vol. 13, no. 34, 1 December 2007 (2007-12-01), pages 3531-3542, XP055093630, ISSN: 1381-6128, DOI: 10.2174/138161207782794248 the whole document -----	1-40
A	JIANZHAO LIU ET AL: "A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N6-adenosine methylation", NATURE CHEMICAL BIOLOGY, vol. 10, no. 2, 1 February 2014 (2014-02-01), pages 93-95, XP055544659, Basingstoke ISSN: 1552-4450, DOI: 10.1038/nchembio.1432 the whole document ----- ----- -/--	1-40

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2019/023463

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>YANG WANG ET AL: "N6-methyladenosine modification destabilizes developmental regulators in embryonic stem cells", NATURE CELL BIOLOGY, vol. 16, no. 2, 7 January 2014 (2014-01-07), pages 191-198, XP55597338, GB ISSN: 1465-7392, DOI: 10.1038/ncb2902 the whole document -----</p>	1-40

1

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード (参考)		
A 6 1 P 31/16 (2006.01)	A 6 1 P	31/16			
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1		

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

(72) 発明者 ジェクル, クリスチャン, アンドレアス
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 1 3 1, サン フランシスコ, 2 6 番 ストリート 4
 0 5 1

(72) 発明者 オゼス, アリ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 0 6 6, サン ブルーノ, ボードウォーク ドライブ
 2 0 9

F ターム(参考) 4C084 AA19 NA06 ZB33
 4C086 AA01 AA02 BA07 EA16 MA01 MA02 MA04 NA06 ZB33 ZC20
 4C206 AA01 AA02 GA02 GA30 KA17 MA02 MA04 NA05 ZB33