

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7672786号

(P7672786)

(45)発行日 令和7年5月8日(2025.5.8)

(24)登録日 令和7年4月25日(2025.4.25)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00

Z N A

A 6 1 K 9/107(2006.01)

A 6 1 K 9/107

A 6 1 K 9/14 (2006.01)

A 6 1 K 9/14

A 6 1 K 9/51 (2006.01)

A 6 1 K 9/51

A 6 1 K 31/711(2006.01)

A 6 1 K 31/711

請求項の数 23 (全83頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-514195(P2019-514195)

(86)(22)出願日 平成29年5月26日(2017.5.26)

(65)公表番号 特表2019-520422(P2019-520422
A)

(43)公表日 令和1年7月18日(2019.7.18)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/034723

(87)国際公開番号 WO2017/205767

(87)国際公開日 平成29年11月30日(2017.11.30)

審査請求日 令和2年5月22日(2020.5.22)

審判番号 不服2022-9361(P2022-9361/J1)

審判請求日 令和4年6月17日(2022.6.17)

(31)優先権主張番号 62/342,784

(32)優先日 平成28年5月27日(2016.5.27)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 518418980

トランスクリプティクス・インコーポレ
イテッドアメリカ合衆国、9 4 0 8 5、カリフォ
ルニア、サニーベール、アルマナー・ア
ベニュー・6 7 5

(74)代理人 100114188

弁理士 小野 誠

(74)代理人 100119253

弁理士 金山 賢教

(74)代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(74)代理人 100129713

弁理士 重森 一輝

(74)代理人 100137213

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 合成メッセンジャーRNAによる原発性纖毛機能不全症の治療

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

原発性纖毛機能不全症（PCD）を有しているまたは有する危険性がある被験体の治療において使用するための組成物であって、配列番号15の配列を含む核酸構築物を含み、前記核酸構築物が、前記被験体の細胞内での軸系ダイニン中間鎖1（DNAI1）タンパク質の発現を提供するコドンを含むまたはコードする、前記組成物。

【請求項2】

前記核酸構築物が、該核酸構築物に曝露されていない細胞内のレベルと比較して、軸系ダイニン中間鎖1（DNAI1）タンパク質を少なくとも約1.5倍増加した細胞内のレベルでコードする、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

前記核酸構築物が、該核酸構築物に曝露されていない細胞内のレベルと比較して、軸系ダイニン中間鎖1（DNAI1）タンパク質を少なくとも約5倍増加した細胞内のレベルでコードする、請求項1に記載の組成物。

【請求項4】

前記構築物が、3'または5'非コード領域を含み、前記非コード領域が前記被験体の細胞内での前記タンパク質の発現を増強する、請求項1～3のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項5】

前記コドン配列と前記3'非コード領域または前記5'非コード領域との間に少なくとも1つの中間配列領域をさらに含む、請求項4に記載の組成物。

【請求項 6】

前記構築物が、3'非コード領域を含み、前記3'非コード領域が3'キャップ非依存性翻訳エンハンサー(3'-CITE)を含む、請求項1~3のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 7】

前記構築物が、3'非コード領域を含み、前記3'非コード領域がヒストンタンパク質のヌクレオチド配列に由来する3'ステムループ領域を含む、請求項1~3のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 8】

前記構築物が、3'非コード領域を含み、前記3'非コード領域がポリアデノシン尾部を含み、前記ポリアデノシン尾部におけるアデノシンの数が前記軸系ダイニン中間鎖1(DNAI1)タンパク質の翻訳効率を改善する、請求項1~3のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項 9】

前記構築物が、3'非コード領域を含み、前記3'非コード領域がポリアデノシン尾部を含み、前記ポリアデノシン尾部におけるアデノシンの数が前記軸系ダイニン中間鎖1(DNAI1)mRNAの半減期を改善する、請求項1~3のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 10】

ポリアデノシン尾部の長さが多くとも200アデノシンを含む、請求項8または9に記載の組成物。

【請求項 11】

ポリアデノシン尾部のある割合がヌクレオチド類似体を含む、請求項8または9に記載の組成物。

20

【請求項 12】

ポリアデノシン尾部の核酸の20%未満がヌクレオチド類似体である、請求項8または9に記載の組成物。

【請求項 13】

前記構築物がある割合のヌクレオチド類似体を含む、請求項1~3のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 14】

前記ヌクレオチド類似体がプソイドウリジンである、請求項13に記載の組成物。

30

【請求項 15】

前記ヌクレオチド類似体が1-メチルプソイドウリジンである、請求項13に記載の組成物。

【請求項 16】

前記ヌクレオチド類似体が5-メトキシウリジンである、請求項13に記載の組成物。

【請求項 17】

前記ヌクレオチド類似体がプソイドウリジンおよび1-メチルプソイドウリジンである、請求項13に記載の組成物。

【請求項 18】

前記組成物が少なくとも1つの追加の核酸構築物をさらに含む、請求項1~3のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項 19】

少なくとも1つの追加の核酸構築物が、アルマジロリピート含有4(ARMC4)、21番染色体オープンリーディングフレーム59(C21orf59)、コイルドコイルドメイン含有103(CCDC103)、コイルドコイルドメイン含有114(CCDC114)、コイルドコイルドメイン含有39(CCDC39)、コイルドコイルドメイン含有40(CCDC40)、コイルドコイルドメイン含有65(CCDC65)、サイクリンO(CCNO)、ダイニン(軸系)アセンブリ因子1(DNAAF1)、ダイニン(軸系)アセンブリ因子2(DNAAF2)、ダイニン(軸系)アセンブリ因子3(DNAAF3)、ダイニン(軸系)アセンブリ因子5(DNAAF5)、軸系ダイニン重鎖11(

50

DNAH11)、軸系ダイニン重鎖5(DNAH5)、軸系ダイニン重鎖6(DNAH6)、軸系ダイニン重鎖8(DNAH8)、軸系ダイニン中間鎖2(DNAI2)、軸系ダイニン軽鎖1(DNAL1)、ダイニン調節複合体サブユニット1(DRC1)、失読症感受性1候補物1(DYX1C1)、成長停止特異的8(GAS8)、軸系中心対装置タンパク質(HYDIN)、ロイシンリッチリピート含有6(LRRC6)、NME/NM23ファミリーメンバー8(NME8)、口・顔・指症候群1(OFD1)、網膜色素変性症GTPアーゼ調節因子(RPGR)、ラジアルスポークヘッド1ホモログ(クラミドモナス)(RSPH1)、ラジアルスポークヘッド4ホモログA(クラミドモナス)(RSPH4A)、ラジアルスポークヘッド9ホモログ(クラミドモナス)(RSPH9)、精子関連抗原1(SPAG1)およびジンクフィンガーMYND型含有10(ZMYND10)からなる群より選択されるタンパク質をコードする、請求項18に記載の組成物。

10

【請求項20】

前記核酸構築物が、被験体への投与用にさらに製剤化される、請求項1に記載の組成物。

【請求項21】

前記製剤が、軸系ダイニン中間鎖1(DNAI1)をコードする前記核酸構築物の治療有効量を含む、請求項20に記載の組成物。

【請求項22】

ナノ粒子またはナノカプセルに製剤化される、請求項1～21のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項23】

カチオン性脂質、カチオン性ポリマーまたはナノエマルジョン中に製剤化される、請求項1～22のいずれか一項に記載の組成物。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれ、本発明者らが35 U.S.C. § 120の下で優先権を主張する、2016年5月27日に出願された米国仮特許出願第62/342,784号の継続出願である。

【背景技術】

30

【0002】

メッセンジャーRNA(mRNA)は、各々が糖、リン酸塩および塩基からなる多数の連結したヌクレオチドを含むポリマーである。各mRNAポリマーは、ヌクレオチド鎖に沿って遺伝情報を保管する。メッセンジャーRNAポリマーは、遺伝情報を細胞の核内のDNAからタンパク質が作られる細胞質へと伝達する。mRNA中のヌクレオチドの各トリプレットはコドンと呼ばれ、各々のコドンは翻訳されたタンパク質中のアミノ酸の同一性を規定する。

【0003】

細胞はまた、外因性RNAを取り込んで翻訳することもできるが、効率的な取込みと翻訳には多くの因子が影響を及ぼす。例えば、免疫系は、多くの外因性RNAを異物として認識し、それらのRNAを不活性化することを目的とする応答を誘発する。

40

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

本開示は、選択されたタンパク質をコードすることができるポリリボヌクレオチドおよびそれを含む組成物を提供する。一部の場合には、本開示は、原発性繊毛機能不全症を有しているまたは有する危険性がある被験体を治療する方法を提供し、この方法は、軸系ダイニン中間鎖1タンパク質またはその変異体をコードする核酸構築物を含む組成物を被験体に投与し、それによって原発性繊毛機能不全症を有しているまたは有する危険性がある被験体を治療することを含み、この核酸構築物は、被験体の細胞内での軸系ダイニン中間

50

鎖1タンパク質またはその変異体の異種発現または増強された発現を提供するコドンを含む。核酸構築物は、例えば相補的デオキシリボ核酸DNA鋳型であり得る。核酸構築物は、軸系ダイニン中間鎖1タンパク質またはその変異体をコードするコドンを含まない核酸構築物を含む組成物に曝露された細胞内のレベルと比較して、軸系ダイニン中間鎖1タンパク質またはその変異体を少なくとも約1.5倍、少なくとも約5倍または別の適切な量の倍数だけ高いレベルでコードし得る。一部の場合には、構築物のコドンは、ヒトなどの哺乳動物の軸系ダイニン中間鎖1 mRNAと少なくとも70%相同である。

【0005】

一部の場合には、構築物は、軸系ダイニン中間鎖1をコードするコドン配列に隣接する5'および／または3'非翻訳領域(UTR)を含み、この(1または複数の)非翻訳領域は、被験体の細胞内でのタンパク質の発現を増強する。3'非コード領域は、3'キャップ非依存性翻訳エンハンサー(3'-CITE)を含み得る。一部の場合には、3'非コード領域はまた、コドン配列と3'非コード領域もしくは5'非コード領域との間の少なくとも1つの中間配列領域、またはヒストンタンパク質のヌクレオチド配列に由来する3'ステムループ領域も含み得る。一部の場合には、コドン配列はオープンリーディングフレーム(ORF)を含む。コドン配列(例えばORF)に隣接する3'非コード領域は、ポリアデノシン尾部を含んでもよく、ポリアデノシン尾部のアデノシンの数は、軸系ダイニン中間鎖1 mRNAの翻訳効率を改善し、半減期を延長させる。一部の場合には、ポリアデノシン尾部の長さは多くとも200のアデノシンである。ポリアデノシン尾部は、ある割合の化学修飾されたヌクレオチドを含み得る。一部の場合には、ポリアデノシン尾部のヌクレオチドの20%未満が化学修飾されている。一部の場合には、構築物中の軸系ダイニン中間鎖1をコードするヌクレオチドの30%未満が化学修飾されている。ヌクレオチドが化学修飾されたヌクレオチドを含む場合、化学修飾されたヌクレオチドは、プソイドウリジン、1-メチルプソイドウリジン、2-チオウリジン、5-ヨードウリジン、5-メチルウリジン、5-メチルシチジンおよび5-ヨードシチジンからなる群より選択され得る。一部の場合には、化学修飾されたヌクレオチドは1-メチルプソイドウリジンである。一部の場合には、修飾されたヌクレオチドはプソイドウリジンである。別の場合には、修飾ヌクレオチドは、1-メチルプソイドウリジンとプソイドウリジンの組み合わせである。原発性纖毛機能不全症を有しているまたは有する危険性がある被験体を治療するためのポリリボヌクレオチドを含む組成物に加えて、一部の場合には、本開示は、アルマジロリピート含有4(ARMC4)、21番染色体オープンリーディングフレーム59(C21orf59)、コイルドコイルドメイン含有103(CCDC103)、コイルドコイルドメイン含有114(CCDC114)、コイルドコイルドメイン含有39(CCDC39)、コイルドコイルドメイン含有40(CCDC40)、コイルドコイルドメイン含有65(CCDC65)、サイクリンO(CCNO)、ダイニン(軸系)アセンブリ因子1(DNAAF1)、ダイニン(軸系)アセンブリ因子2(DNAAF2)、ダイニン(軸系)アセンブリ因子3(DNAAF3)、ダイニン(軸系)アセンブリ因子5(DNAAF5)、軸系ダイニン重鎖11(DNAH11)、軸系ダイニン重鎖5(DNAH5)、軸系ダイニン重鎖6(DNAH6)、軸系ダイニン重鎖8(DNAH8)、軸系ダイニン中間鎖2(DNAI2)、軸系ダイニン軽鎖1(DNAL1)、ダイニン調節複合体サブユニット1(DRC1)、失読症感受性1候補物1(DYX1C1)、成長停止特異的8(GAS8)、軸系中心対装置タンパク質(HYDIN)、ロイシンリッチリピート含有6(LRRC6)、NME/NM23ファミリーメンバー8(NME8)、口・顔・指症候群1(OFD1)、網膜色素変性症GTPアーゼ調節因子(RPGR)、ラジアルスポークヘッド1ホモログ(クラミドモナス(*Chlamydomonas*))(RSPH1)、ラジアルスポークヘッド4ホモログA(クラミドモナス)(RSPH4A)、ラジアルスポークヘッド9ホモログ(クラミドモナス)(RSPH9)、精子関連抗原1(SPAG1)およびジंकフィンガーMYND型含有10(ZMYND10)からなる群より選択されるタンパク質をコードする少なくとも1つの追加核酸構築物を含む組成物をさらに提供する。

10

20

30

40

50

【0006】

本開示は、軸系ダイニン中間鎖1をコードする核酸構築物を含む組成物を提供し、この核酸構築物は、原発性纖毛機能不全症を有しているまたは有する危険性がある被験体の細胞内での軸系ダイニン中間鎖1タンパク質またはその変異体の異種発現または増強された発現を提供するコドンを含む。本明細書に記載の組成物は、少なくとも4の、修飾ポリリボヌクレオチドのリン酸基のモル数に対するカチオン性ポリマーのアミン基のモル数の比を含み得る。一部の場合には、組成物は、ナノ粒子またはナノカプセルに製剤化される。別の場合には、組成物は、カチオン性脂質、カチオン性ポリマーまたはナノエマルジョンに製剤化される。組成物は、被験体への投与用に製剤化され得る。組成物中の核酸構築物は、原発性纖毛機能不全症を有しているまたは有する危険性がある被験体の細胞内での軸系ダイニン中間鎖1タンパク質またはその変異体の異種発現または増強された発現を提供するコドンを含み得る。一部の場合には、軸系ダイニン中間鎖1をコードするリボヌクレオチドの30%未満が化学修飾されたヌクレオチドである。一部の場合には、構築物のコドンは、ヒトなどの哺乳動物の軸系ダイニン中間鎖1 mRNAと少なくとも70%相同である。一部の場合には、構築物は、軸系ダイニン中間鎖1をコードするコドン配列に隣接する5'または3'非コード領域を含み、この非コード領域は、被験体の細胞内でのタンパク質の発現を増強する。別の場合には、構築物は、軸系ダイニン中間鎖1をコードするコドン配列に隣接する3'非コード領域を含み、この3'非コード領域は、3'キャップ非依存性翻訳エンハンサー(3'-CITE)を含む。3'非コード領域は、ヒストンタンパク質のヌクレオチド配列に由来する3'ステムループ領域を含み得る。3'非コード領域は、転移関連肺腺癌転写物1(MALAT1)のヌクレオチド配列に由来する3'三重らせん構造を含み得る。コドン配列に隣接する3'非コード領域は、ポリアデノシン尾部を含んでもよく、ポリアデノシン尾部のアデノシンの数は、軸系ダイニン中間鎖1タンパク質の翻訳効率を改善する。一部の場合には、ポリアデノシン尾部のアデノシンの数は、軸系ダイニン中間鎖1タンパク質の半減期を改善する。一部の場合には、ポリアデノシン尾部の長さは多くとも200のアデノシンである。一部の場合には、ある割合のポリアデノシン尾部は、化学修飾されたヌクレオチドを含む。一部の場合には、ポリ(A)尾部のアデノシンの20%未満が修飾されている。一部の場合には、構築物は、ある割合の化学修飾されたヌクレオチドを含む。一部の場合には、軸系ダイニン中間鎖1をコードするヌクレオチドの30%未満が化学修飾されている。化学修飾されたヌクレオチドが存在する場合、それらは、プソイドウリジン、1-メチルプソイドウリジン、5-メトキシウリジン、2-チオウリジン、5-ヨードウリジン、5-メチルウリジン、5-メチルシチジン、2'-アミノ-2'-デオキシシチジン、2'-フルオロ-2'-デオキシシチジンおよび5-ヨードシチジンからなる群より選択され得る。一部の場合には、化学修飾されたヌクレオチドは、プソイドウリジンまたは1-メチルプソイドウリジンである。一部の場合には、組成物は、少なくとも1つの追加の核酸構築物をさらに含む。この少なくとも1つの追加の核酸構築物は、アルマジロリピート含有4(ARMC4)、21番染色体オープンリーディングフレーム59(C21orf59)、コイルドコイルドメイン含有103(CCDC103)、コイルドコイルドメイン含有114(CCDC114)、コイルドコイルドメイン含有39(CCDC39)、コイルドコイルドメイン含有40(CCDC40)、コイルドコイルドメイン含有65(CCDC65)、サイクリンO(CCNO)、ダイニン(軸系)アセンブリ因子1(DNAAF1)、ダイニン(軸系)アセンブリ因子2(DNAAF2)、ダイニン(軸系)アセンブリ因子3(DNAAF3)、ダイニン(軸系)アセンブリ因子5(DNAAF5)、軸系ダイニン重鎖11(DNAH11)、軸系ダイニン重鎖5(DNAH5)、軸系ダイニン重鎖6(DNAH6)、軸系ダイニン重鎖8(DNAH8)、軸系ダイニン中間鎖2(DNAI2)、軸系ダイニン軽鎖1(DNAL1)、ダイニン調節複合体サブユニット1(DRC1)、失読症感受性1候補物1(DYX1C1)、成長停止特異的8(GAS8)、軸系中心対装置タンパク質(HYDIN)、ロイシンリッチリピート含有6(LRRC6)、NME/NM23ファミリーメンバー8(NME8)、口・顔・指症候群1(OFD1)、網膜色素変性症GTPアーゼ調節因子(RP

10

20

30

40

50

G R)、ラジアルスポークヘッド1ホモログ(クラミドモナス)(R S P H 1)、ラジアルスポークヘッド4ホモログA(クラミドモナス)(R S P H 4 A)、ラジアルスポークヘッド9ホモログ(クラミドモナス)(R S P H 9)、精子関連抗原1(S P A G 1)およびジンクフィンガーMYND型含有10(Z M Y N D 1 0)からなる群より選択されるタンパク質をコードする。

【0007】

本開示はまた、被験体への投与用に製剤化される核酸構築物、ベクターまたは単離された核酸も提供する。一部の場合には、製剤は、軸系ダイニン中間鎖1をコードする核酸構築物の治療有効量を含む。核酸構築物は、軸系ダイニン中間鎖1タンパク質もしくはその変異体、または上記の追加の核酸構築物のいずれか1つをコードするcDNA構築物であり得る。一部の場合には、本開示は、軸系ダイニン中間鎖1をコードする核酸構築物を含む組成物を提供し、この核酸構築物は、配列番号14~16のいずれか1つを含む。一部の場合には、本開示は、軸系ダイニン重鎖5をコードする核酸構築物を含む組成物を提供し、この核酸構築物は、配列番号17~18のいずれか1つを含む。

【0008】

本開示のさらなる態様および利点は、本開示の例示的な実施形態のみを示し、説明する、以下の詳細な説明から当業者には容易に明らかになるであろう。理解されるように、本開示は、他の異なる実施形態が可能であり、そのいくつかの詳細は、全て本開示から逸脱することなく、種々の明白な点において変更することができる。したがって、図面および説明は、本質的に例示的であるとみなされるべきであり、限定的とみなされるべきではない。

【0009】

参照による組み込み

本明細書中で言及される全ての刊行物、特許および特許出願は、個々の刊行物、特許または特許出願が、参照により組み込まれることが具体的および個別に示されているのと同程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

【0010】

本発明の新規な特徴は、添付の特許請求の範囲に詳細に記載されている。本発明の原理が利用される例示的な実施形態を説明する以下の詳細な説明および添付の図面を参照することにより、本発明の特徴および利点のより良い理解が得られるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】図1は、キャップされたおよびキャップされていないDNA I 1 RNAの産生を示すアガロースゲルである。

【図2】図2は、トランスフェクションの6時間後、24時間後および48時間後のHEK-293細胞におけるDNA I 1 mRNAの翻訳を示すウェスタンブロットである。

【図3】図3は、軸系ダイニン中間鎖1(DNA I 1)をコードする転写後にポリアダニル化されたRNA転写物のフラグメントアナライザデータを示す。

【図4】図4は、軸系ダイニン中間鎖1(DNA I 1)をコードする転写後にポリアダニル化されたRNA転写物のフラグメントアナライザデータを示す。

【図5】図5は、軸系ダイニン中間鎖1(DNA I 1)をコードするプラスミドのポリアダニル化尾部のサイズのPAGEデータを示す。

【図6】図6は、非修飾ヌクレオチドを含むインビトロで転写されたDNA I 1 mRNAのフラグメントアナライザデータを示す。

【図7】図7は、50%プソイドウリジン(Ψ)を含むインビトロで転写されたDNA I 1 mRNAのフラグメントアナライザデータを示す。

【図8】図8は、100%プソイドウリジン(Ψ)を含むインビトロで転写されたDNA I 1 mRNAのフラグメントアナライザデータを示す。

【図9】図9は、転写後にポリアダニル化された100%1-メチルプソイドウリジンを含む、インビトロで転写されたDNA I 1 mRNAのフラグメントアナライザデータを

示す。

【図10】図10は、ドットプロットによって検出された二本鎖RNA含量を示す。

【図11】図11は、非修飾ヌクレオチドで転写された、軸系ダイニン中間鎖1をコードするインビトロ転写された核酸構築物のHPLCに基づくヌクレオチド組成分析を示す。

【図12】図12は、50%Ψで転写された、軸系ダイニン中間鎖1をコードするインビトロ転写された核酸構築物のHPLCに基づくヌクレオチド組成分析を示す。

【図13】図13は、100%Ψで転写された、軸系ダイニン中間鎖1をコードするインビトロ転写された核酸構築物のHPLCに基づくヌクレオチド組成分析を示す。

【図14】図14は、HEK-293、A549およびMLE-15細胞におけるDNAI1タンパク質の相対発現レベルを示すグラフである。

【図15】図15は、DNAI1 mRNA変異体でトランスフェクトしたA549細胞におけるIL-6の誘導を示す。

【図16】図16は、DNAI1 mRNA変異体でトランスフェクトしたA549細胞におけるIL-6の誘導を示す。

【図17】図17は、HEK-293、A549およびMLE-15細胞におけるDNAI1タンパク質の相対発現を示すグラフである。

【図18】図18は、DNAI1転写物による、A549細胞におけるIL-6の誘導を示す。

【図19】図19は、DNAI1転写物による、A549細胞におけるIL-6の誘導を示す。

【図20】図20は、CellTiter-Gloアッセイを用いて測定した様々な量の各DNAI1 mRNAによるトランスフェクション後のA549細胞の細胞生存率を示す。

【図21】図21は、CellTiter-Gloアッセイを用いて測定した様々な量の各DNAI1 mRNAによるトランスフェクション後のA549細胞の細胞生存率を示す。

【図22】図22は、DNAI1転写物による、HepG2細胞におけるIP-10の誘導を示す。

【図23】図23は、CellTiter-Gloアッセイを用いて測定した様々な量の各DNAI1 mRNAによるトランスフェクション後のHepG2細胞の細胞生存率を示す。

【図24】図24は、HEK-293細胞における軸系ダイニン中間鎖1 (DNAI1) タンパク質または他の対照のピーク発現を示す。

【図25】図25は、完全に分化したヒト気道上皮細胞におけるDNAI1の発現を示す。

【図26】図26は、配列番号14のポリリボヌクレオチド (A) と比較した、配列番号15のポリリボヌクレオチド (B) を発現するDNAI1における全体的な品質改善を示す。

【図27】図27は、配列番号14のポリリボヌクレオチド (A) と比較した、配列番号15のポリリボヌクレオチド (B) のA549細胞における翻訳効率の全体的な改善を示す。

【図28】図28は、既知の濃度のポリ-ICと比較した、配列番号15のポリリボヌクレオチドの二本鎖RNA含量の分析を示す。

【図29】図29は、非修飾DNAI1 mRNAおよび100% m¹Ψ含有DNAI1 mRNAのHPLC精製を示す。

【図30】図30は、HPLC精製を用いて、A549細胞における完全長の非修飾mRNA転写物が富化された画分についての例示的翻訳活性および免疫原性を示す。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明の様々な実施形態を本明細書で示し、説明しているが、そのような実施形態が単なる例示として提供されることは、当業者には明らかであろう。本発明から逸脱すること

10

20

30

40

50

なく、多くの変形、変更および置換が当業者に想起され得る。本明細書に記載される本発明の実施形態の様々な代替物を使用し得ることが理解されるべきである。

【0013】

本明細書で使用される「被験体」という用語は、一般にヒトを指す。一部の場合には、被験体は、マウス、ラット、モルモット、イヌ、ネコ、ウマ、ウサギおよび他の様々な動物などの動物であってもよい。被験体は任意の年齢であってよく、例えば、被験体は、乳児、幼児、小児、青年前期個体、青年期個体、成体または高齢個体であり得る。

【0014】

本明細書で使用される「疾患」という用語は、一般に、疾病（例えば原発性纖毛機能不全症）または、例えば気道（下気道および上気道、洞、エウスタキオ管、中耳）の内層、様々な肺細胞、ファローピウス管における纖毛の活動、もしくは精子細胞の鞭毛の活動に欠陥を引き起こす別の異常などの、被験体の一部または全部に影響を及ぼす異常な生理学的状態を指す。

【0015】

本明細書で使用される「ポリヌクレオチド」または「核酸」という用語は、プリンおよびピリミジン塩基、プリンおよびピリミジン類似体、化学的にもしくは生化学的に修飾された、天然もしくは非天然の、または誘導体化されたヌクレオチド塩基を含む、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドのいずれかである、任意の長さのポリマー形態のヌクレオチドを指す。ポリヌクレオチドには、デオキシリボ核酸（DNA）、リボ核酸（RNA）またはリボ核酸のDNAコピー（cDNA）の配列が含まれ、これらは全て、組換え生産する、人工的に合成する、または天然源から単離および精製することができる。ポリヌクレオチドおよび核酸は、一本鎖または二本鎖として存在し得る。ポリヌクレオチドの骨格は、典型的にはRNAもしくはDNAに見出され得るように、糖類およびリン酸基を含み得るか、または類似体または置換された糖もしくはリン酸基を含み得る。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体などの、天然または非天然のヌクレオチドを含み得る。

【0016】

本明細書で使用される「ポリリボヌクレオチド」という用語は、一般に、リボ核酸を含むポリヌクレオチドポリマーを指す。この用語はまた、化学的に修飾されたリボヌクレオチドを含むポリヌクレオチドポリマーを指す。ポリリボヌクレオチドは、天然に見出され得るd-リボース糖で形成され得る。

【0017】

本明細書で使用される「ポリペプチド」という用語は、一般に、アミド結合（ペプチド結合）を介して一緒に連結されたアミノ酸残基モノマーからなるポリマー鎖を指す。ポリペプチドは、少なくとも3つのアミノ酸の鎖、タンパク質、組換えタンパク質、抗原、エピトープ、酵素、受容体もしくは構造類似体、またはそれらの組み合わせであり得る。本明細書で使用される場合、ポリペプチドを形成するL-エナンチオマーアミノ酸の略語は以下の通りである：アラニン（A、Ala）；アルギニン（R、Arg）；アスパラギン（N、Asn）；アスパラギン酸（D、Asp）；システイン（C、Cys）；グルタミン酸（E、Glu）；グルタミン（Q、Gln）；グリシン（G、Gly）；ヒスチジン（H、His）；イソロイシン（I、Ile）；ロイシン（L、Leu）；リシン（K、Lys）；メチオニン（M、Met）；フェニルアラニン（F、Phe）；プロリン（P、Pro）；セリン（S、Ser）；トレオニン（T、Thr）；トリプトファン（W、Trp）；チロシン（Y、Tyr）；バリン（V、Val）。XまたはXaaは任意のアミノ酸を示し得る。

【0018】

本明細書で使用される「操作された」という用語は、一般に、細胞内でポリヌクレオチドを提供するように遺伝的に設計され、操作されたポリヌクレオチド、ベクターおよび核酸構築物を指す。操作されたポリヌクレオチドは、インビトロで部分的または完全に合成することができる。操作されたポリヌクレオチドは、クローニングすることもできる。操

10

20

30

40

50

作されたポリリボヌクレオチドは、メッセンジャーRNA中に天然では存在しないリボヌクレオチドなどの、1つ以上の塩基または糖類似体を含むことができる。操作されたポリリボヌクレオチドは、転移RNA (tRNA)、リボソームRNA (rRNA)、ガイドRNA (gRNA)、核内低分子RNA (snRNA)、核小体低分子RNA (snoRNA)、SmY RNA、スプライストリーダーRNA (SL RNA)、CRISPR RNA、長鎖非コードRNA (lncRNA)、マイクロRNA (miRNA) または別の適切なRNAとして存在するヌクレオチド類似体を含み得る。

【0019】

概要

本開示は、タンパク質または（1もしくは複数の）タンパク質フラグメントをコードする核酸を用いて、繊毛の維持および機能に関連する状態を治療するための組成物および方法を提供する。多数の真核細胞は、しばしば繊毛または鞭毛と称される付属器を担持し、その内部コアは、軸系と呼ばれる細胞骨格構造を含む。軸系は、細胞骨格構造の骨格として機能することができ、構造を支持し、および一部の場合には、構造を屈曲させる。通常、軸系の内部構造は、繊毛および鞭毛の両方に共通である。繊毛は、気道、生殖器系ならびに他の器官および組織の内層にしばしば認められる。鞭毛は、繊毛と同様に、精子細胞などの細胞を前方に推進することができる尾状構造である。

【0020】

気道で繊毛が正常に機能しなければ、細菌が気道内に留まり、感染を引き起こし得る。気道において、繊毛は、粘液を咽喉の方へ動かすために協調的な方法で前後に動く。この粘液の動きは、流体、細菌および粒子を肺から排除するのに役立つ。繊毛および鞭毛の機能不全に罹患した多くの乳児は出産時に呼吸の問題を経験し、これは、繊毛が肺から胎児液を除去する上で重要な役割を果たすことを示唆する。幼児期から始まって、繊毛機能不全に罹患した被験体は頻繁な呼吸器感染症を発症し得る。

【0021】

原発性繊毛機能不全症は、慢性気道感染症、異常な位置の内臓器官、および子供を持つことができないこと（不妊症）を特徴とする状態である。この状態の徴候および症状は、異常な繊毛および鞭毛によって引き起こされる。原発性繊毛機能不全症に罹患している被験体は、しばしば一年中鼻詰まりおよび慢性の咳を有する。慢性気道感染症は、気管支拡張症と呼ばれる状態をもたらす可能性があり、これは、気管から肺に至る気管支と呼ばれる通路に損傷を与え、生命を脅かす呼吸障害を引き起こし得る。

【0022】

一部の場合には、本開示の核酸構築物、ベクターまたは組成物は、軸系ダイニン中間鎖1タンパク質またはその変異体をコードする1つ以上のヌクレオチド配列を含み、この配列は、被験体の細胞内での軸系ダイニン中間鎖1タンパク質またはその変異体の異種発現または増強された発現を提供する。一部の場合には、核酸構築物、ベクターまたは組成物は、以下に示すように、配列番号1～9の5'非翻訳領域(UTR)および3'UTRの遺伝暗号も含む。

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1	
UTR	DNA 配列 (5' から 3' へ)
α -グロビン 5' UTR (HBA1)	GGGAGACATAAACCCCTGGCGCGCTCGCGGCCCGGCACTCTTCTGGTCCCC ACAGACTCAGAGAGAAGCCACC (配列番号:1)
α -グロビン 5' UTR (HBA2)	GGGAGACATAAACCCCTGGCGCGCTCGCGGCCCGGCACTCTTCTGGTCCCC ACAGACTCAGAGAGAAGCCACC (配列番号:2)
α -グロビン 5' UTR	GGGAGACTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAAGCCACC (配列番号:3)
EMCV 5'-UTR の IRES	GTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACC TGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCTTTCCCTCTCGCCAA AGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAG CTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTGCAGGCAGCGGAAC CCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGA TACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCCAAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAG TTGTGGAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTG AAGGATGCCCAGAAGGTACCCCATTTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCG GTGCACATGCTTTACGTGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAACGTCTAGGCC CCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCTTTGAAAAACACGATGATAATATG GCCACAACC (SEQ ID NO: 4)
IRES of TEV 5'-UTR	AAATAACAAATCTCAACACAACATATACAAAACAAACGAATCTCAAGCA ATCAAGCATTCTACTTCTATTGCAGCAATTTAAATCATTTCTTTTAAAGCA AAAGCAATTTTCTGAAAATTTTACCATTACGAACGATAGCA (SEQ ID NO: 5)
ssRNA1 5'UTR	GGGAGACAAGAGAGAAAAGAAGAGCAAGAAGAAATATAAGAGCCACC (SEQ ID NO: 6)
ssRNA2 5'UTR	GGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGGCAATCCGGTAC TGTTGGTAAAGCCACC (配列番号:7)
ssRNA 3 + 天然 5' UTR	GGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTTCCTTTCCGGGCC GGCTGGGCGCGCCGAAGCGCCTTGGCTGCTGGTCGGTTGCTGGG TAACCGCGTCAGGGAGTTGATTCTATCCTGCAAGGGCACGGGGACCCAC AACGACGGCTGTCCCTAAAGAACCCTTGCCTGTAAGTGAAGTGGAA GAGAGTCCAGATTTCTTGTGTGTGGTCAAGGAGACGGACAACTTTTGT CTTCAGACGAGGGAGCGTTTTGTAGGCTCTCCAGGGTTGAG (配列番号:8)
TMV 3'-UTR	GGATTGTGTCCGTAATCACACGTGGTGCGTACGATAACGCATAGTGT TCCCTCCACTTAAATCGAAGGGTTGTGCTTGGATCGCGCGGGTCAAATG TATATGGTTCATATACATCCGACGGCACGTAATAAAGCGAGGGGTTGAA TCCCCCGTTACCCCGGTAGGGGCCCATTTGTCTTC (配列番号:9)
MALAT1 3'-UTR	TCAGTAGGGTCATGAAGGTTTTCTTTTCTGAGAAAACAACACGTATTGT TTTCTCAGGTTTTGCTTTTTGGCCTTTTCTAGCTTAAAAAAGC AAAATTGTCTTC (配列番号:10)

10

20

30

40

50

NEAT2 3'-UTR	TCAGTAGGGTTGTAAAGGTTTTCTTTTCCTGAGAAAACAACCTTTTGTTTCTCAGGTTTTGCTTTTTGGCCCTTCCCTAGCTTTAAAAAAAAAAAAAGCAA AATTGTCCTC (配列番号:11)
ヒストン クラスター2, H3c 3'-UTR	GAAGTGGCGGTTTCGGCCGGAGGTTCCATCGTATCCAAAAGGCTCTTTTCA GAGCCACCCATTGTCTTC (配列番号:12)
天然 3'-UTR	GGGGCTGGCCTCAGTCTCTGTCCCATCGCTTGAATACAGTACTCCTAGGGCTTGACCCTGGTACCCAGCCCAGCCTTAGCACCCAGCATGTGACCCCACTCCTGATCAGGTCCCAGCATCTTCCCTTCTTGTCTGTTCCTTAAGGTCCCA GCACCTTACCCAGGACTTGGTCTTCAACCACCATTACCCCTCTAACTTTG CACAAATAAACCTGTGTAGAAACCCACCCCAAAAAAA (配列番号:13)

10

【0023】

原発性繊毛機能不全症、関連状態およびその治療

本開示の方法、構築物および組成物は、原発性繊毛機能不全症候群またはカルタゲナー症候群としても知られる、原発性繊毛機能不全症（PCD）を治療する方法を提供する。PCDは、典型的には、気道（下気道および上気道、洞、エウスタキオ管、中耳）およびファローピウス管の内層の繊毛の活動において、ならびに精子細胞の鞭毛においてしばしば欠陥を引き起こす、まれな、繊毛病性の常染色体劣性遺伝性障害であると考えられている。

20

【0024】

原発性繊毛機能不全症を有する一部の個体は、胸部および腹部内に異常な位置を占める器官を有する。これらの異常は、身体の左右の側の相違が確立される胚発生の初期に生じる。原発性繊毛機能不全症を有する人々の約50%は、内臓の鏡像反転（完全内臓逆位）を有する。例えば、これらの個人では、心臓が体の左側ではなく右側にある。原発性繊毛機能不全症に罹患している人が完全内臓逆位を有する場合、しばしばカルタゲナー症候群を有すると言われる。

【0025】

原発性繊毛機能不全症を有する人々の約12%は、心臓、肝臓、腸または脾臓の異常を特徴とする、内臓錯位症候群または内臓錯位として知られる状態を有する。これらの器官は、構造的に異常であるかまたは不適切な位置に存在し得る。さらに、罹患した個人は、脾臓を持たない（無脾症）かまたは複数の脾臓を有し得る（多脾症）。内臓錯位症候群は、胚発生の間に身体の左右の側を確立する問題から生じる。内臓錯位の重症度は、罹患した個人によって大きく異なる。

30

【0026】

原発性繊毛機能不全症はまた、不妊症につながる可能性がある。精子細胞を雌性の卵細胞へと前進させるためには、鞭毛の激しい運動が必要となり得る。原発性繊毛機能不全症に罹患した被験体の精子は適切に動かないため、原発性繊毛機能不全症を有する男性は通常、子供の父親になることができない。不妊症は一部の罹患女性で起こり、通常はファローピウス管内の異常な繊毛に関連する。

40

【0027】

原発性繊毛機能不全症のもう1つの特徴は、特に幼児における再発性耳感染症（中耳炎）である。中耳炎は、治療しなければ永続的な聴力損失をもたらし得る。耳の感染症は、内耳の異常な繊毛に関連する可能性が高い。

【0028】

まれに、原発性繊毛機能不全症を有する個人は、おそらく脳内の異常な繊毛のために、脳に液体の蓄積がある（水頭症）。

【0029】

50

本開示のポリリボヌクレオチドは、例えば、原発性纖毛機能不全症またはその機能が纖毛の維持および機能に結びつく遺伝子の欠陥もしくは機能不全に関連する任意の他の状態を有しているまたは有する危険性がある被験体を治療するために使用することができる。原発性纖毛機能不全症に関連する遺伝子の非限定的な例には、アルマジロリピート含有4 (ARMC4)、21番染色体オープンリーディングフレーム59 (C21orf59)、コイルドコイルドメイン含有103 (CCDC103)、コイルドコイルドメイン含有114 (CCDC114)、コイルドコイルドメイン含有39 (CCDC39)、コイルドコイルドメイン含有40 (CCDC40)、コイルドコイルドメイン含有65 (CCDC65)、サイクリンO (CCNO)、ダイニン (軸系) アセンブリ因子1 (DNAAF1)、ダイニン (軸系) アセンブリ因子2 (DNAAF2)、ダイニン (軸系) アセンブリ因子3 (DNAAF3)、ダイニン (軸系) アセンブリ因子5 (DNAAF5)、軸系ダイニン重鎖11 (DNAH11)、軸系ダイニン重鎖5 (DNAH5)、軸系ダイニン重鎖6 (DNAH6)、軸系ダイニン重鎖8 (DNAH8)、軸系ダイニン中間鎖2 (DNAI2)、軸系ダイニン軽鎖1 (DNAL1)、ダイニン調節複合体サブユニット1 (DRC1)、失読症感受性1候補物1 (DYX1C1)、成長停止特異的8 (GAS8)、軸系中心対装置タンパク質 (HYDIN)、ロイシンリッチリピート含有6 (LRR6)、NME/NM23ファミリーメンバー8 (NME8)、口・顔・指症候群1 (OFD1)、網膜色素変性症GTPアーゼ調節因子 (RPGR)、ラジアルスポークヘッド1ホモログ (クラミドモナス) (RSPH1)、ラジアルスポークヘッド4ホモログA (クラミドモナス) (RSPH4A)、ラジアルスポークヘッド9ホモログ (クラミドモナス) (RSPH9)、精子関連抗原1 (SPAG1) およびジンクフィンガーMYND型含有10 (ZMYND10) が含まれる。

【0030】

一部の場合には、組成物は、軸系ダイニン中間鎖1 (DNAI1) をコードする核酸構築物を含み、被験体の細胞内で翻訳されると、この構築物は、原発性纖毛機能不全症を有しているまたは有する危険性のある被験体を治療するポリペプチドを生じる。DNAI1遺伝子は、ダイニンと呼ばれるタンパク質の群 (複合体) の一部であるタンパク質を作製するための指示を提供することができる。この複合体は纖毛内で機能する。纖毛の協調的な前後運動は、細胞または細胞周囲の液体を動かすことができ、ダイニンは纖毛が動くのに必要な力を生成する。纖毛のコア (軸系) 内で、ダイニン複合体は、それらの位置に依存してダイニン内腕 (IDA) およびダイニン外腕 (ODA) として知られる構造の一部である。ダイニンアームの協調運動は、軸系全体を前後に屈曲させる。IDAおよびODAは、重量によって重鎖、中間鎖または軽鎖として分類されるタンパク質成分 (サブユニット) の種々の組み合わせを有する。DNAI1遺伝子は、ODAに見出される中間鎖1を作製するための指示を提供する。他のサブユニットは、同じかまたは別個の組成物中で被験体に投与される種々の遺伝子から生成され得る。あるいは、他のサブユニットは、ダイニン内腕またはダイニン外腕の機能性成分をコードする単一の核酸構築物によって生成され得る。

【0031】

DNAI1遺伝子の少なくとも21の突然変異が、気道感染症、異常な器官配置および子供を持つことができないこと (不妊症) を特徴とする状態である、原発性纖毛機能不全症を引き起こすことが判明している。DNAI1遺伝子突然変異は、中間鎖1の欠落または異常な中間鎖1をもたらす。このサブユニットの正常なバージョンがなければ、ODAは適切に形成することができず、短縮され得るかまたは欠落し得る。結果として、纖毛は、前後に屈曲するのに必要な力を生成することができない。纖毛の欠陥は原発性纖毛機能不全症の特徴を導く。一部の場合には、本開示は、IVS1+2__3insT (219+3insT) 突然変異を含む内因性DNAI1タンパク質の機能に取って代わるかまたはこれを補うように操作された核酸を提供する。一部の場合には、本開示は、2番目に最も一般的なA538T突然変異を含む内因性DNAI1タンパク質の機能に取って代わるかまたはこれを補うように操作された核酸を提供する。

【0032】

一部の場合には、組成物は、軸系ダイニン中間鎖2 (DNAI2) をコードする核酸構築物を含み、被験体の細胞内で翻訳されると、この構築物は、原発性繊毛機能不全症を有しているまたは有する危険性のある被験体を治療するポリペプチドを生じる。DNAI2 遺伝子は、呼吸器繊毛および精子鞭毛のダイニン複合体の一部である。この遺伝子の突然変異は、運動性繊毛の異常、慢性炎症および気管支拡張症をもたらす呼吸器感染、ならびに精子尾部の異常を特徴とする障害である、原発性繊毛機能不全症9型に関連する。

【0033】

一部の場合には、組成物は、アルマジロリピート含有4 (ARMC4) をコードする核酸構築物を含み、被験体の細胞内で翻訳されると、この構築物は、原発性繊毛機能不全症を有しているまたは有する危険性のある被験体を治療するポリペプチドを生じる。ARMC4 遺伝子によってコードされるタンパク質は、アルマジロリピートモチーフ (ARM) 10個とHEATリピート1個を含み、繊毛軸系および呼吸細胞の繊毛基部に局在することが示されている。ARMC4 遺伝子の突然変異は、呼吸器繊毛の部分的なダイニン外腕 (ODA) 欠損を引き起こし得る。

【0034】

一部の場合には、組成物は、21番染色体オープンリーディングフレーム59 (C21orf59) をコードする核酸構築物を含み、被験体の細胞内で翻訳されると、この構築物は、原発性繊毛機能不全症を有しているまたは有する危険性のある被験体を治療するポリペプチドを生じる。C21orf59 遺伝子によってコードされるタンパク質は、ダイニン腕アセンブリおよび運動性繊毛機能において重要な役割を果たすことができる。この遺伝子の突然変異は原発性繊毛機能不全症をもたらすことができる。

【0035】

一部の場合には、組成物は、コイルドコイルドメイン含有103 (CCDC103) をコードする核酸構築物を含み、被験体の細胞内で翻訳されると、この構築物は、原発性繊毛機能不全症を有しているまたは有する危険性のある被験体を治療するポリペプチドを生じる。CCDC103 遺伝子によってコードされるタンパク質は、繊毛の運動性に必要なダイニン結合因子として機能することができる。

【0036】

一部の場合には、組成物は、コイルドコイルドメイン含有114 (CCDC114) をコードする核酸構築物を含み、被験体の細胞内で翻訳されると、この構築物は、原発性繊毛機能不全症を有しているまたは有する危険性のある被験体を治療するポリペプチドを生じる。CCDC114 遺伝子によってコードされるタンパク質は、繊毛細胞におけるダイニン外腕ドッキング複合体の構成要素として機能することができる。この遺伝子の突然変異は、原発性繊毛機能不全症20型を引き起こし得る。

【0037】

一部の場合には、組成物は、コイルドコイルドメイン39 (CCDC39) をコードする核酸構築物を含み、被験体の細胞内で翻訳されると、この構築物は、原発性繊毛機能不全症を有しているまたは有する危険性のある被験体を治療するポリペプチドを生じる。CCDC39 遺伝子によってコードされるタンパク質は、繊毛拍動を調節する、ダイニン調節およびダイニン内腕複合体のアセンブリとして機能することができる。この遺伝子の欠損は、原発性繊毛機能不全症14型 (CCDC39) の原因である。

【0038】

一部の場合には、組成物は、コイルドコイルドメイン含有40 (CCDC40) をコードする核酸構築物を含み、被験体の細胞内で翻訳されると、この構築物は、原発性繊毛機能不全症を有しているまたは有する危険性のある被験体を治療するポリペプチドを生じる。CCDC40 遺伝子によってコードされるタンパク質は、96ナノメートル (nm) のリピート長ならびに繊毛および鞭毛における成分の配置 (類似性による) を決定する分子定規を形成するためにCCDC39と共に機能することができる。CCDC40は、ダイニン外腕複合体のアセンブリには必要ないが、CCDC39の軸系動員に必要とされ得る

10

20

30

40

50

。一部の場合には、C C D 4 0 および C C D 3 9 は、同じかまたは別個の組成物中で被験体に投与される種々の遺伝子から生成され得る。あるいは、C C D 4 0 および C C D 3 9 は、ダイニン内腕またはダイニン外腕の機能性成分をコードする単一の核酸構築物によって生成され得る。C C D 4 0 遺伝子の欠損は、原発性繊毛機能不全症 1 4 型 (C I L D 1 4) の原因である。

【0039】

一部の場合には、組成物は、コイルドコイルドメイン含有 6 5 (C C D C 6 5) をコードする核酸構築物を含み、被験体の細胞内で翻訳されると、この構築物は、原発性繊毛機能不全症を有しているまたは有する危険性のある被験体を治療するポリペプチドを生じる。C C D C 6 5 遺伝子によってコードされるタンパク質は、精子細胞タンパク質として機能することができる。C C D C 6 5 は、成体精巣、精母細胞および精子細胞において高発現されることが示されている。このタンパク質は、ネキシナーダイニン調節複合体のアセンブリにおいて重要な役割を果たす。この遺伝子の突然変異は、原発性繊毛機能不全症 2 7 型に関連している。

【0040】

一部の場合には、組成物は、サイクリン O (C C N O) をコードする核酸構築物を含み、被験体の細胞内で翻訳されると、この構築物は、原発性繊毛機能不全症を有しているまたは有する危険性のある被験体を治療するポリペプチドを生じる。

【0041】

一部の場合には、組成物は、ダイニン (軸系) アセンブリ因子 1 (D N A A F 1) をコードする核酸構築物を含み、被験体の細胞内で翻訳されると、この構築物は、原発性繊毛機能不全症を有しているまたは有する危険性のある被験体を治療するポリペプチドを生じる。D N A A F 1 遺伝子によってコードされるタンパク質は、繊毛特異的であると考えられ、繊毛構造の安定性のために必要とされ得る。この遺伝子の突然変異は、原発性繊毛機能不全症 1 3 型に関連している。

【0042】

一部の場合には、組成物は、ダイニン (軸系) アセンブリ因子 2 (D N A A F 2) をコードする核酸構築物を含み、被験体の細胞内で翻訳されると、この構築物は、原発性繊毛機能不全症を有しているまたは有する危険性のある被験体を治療するポリペプチドを生じる。D N A A F 2 遺伝子によってコードされるタンパク質は、繊毛を賦活するダイニン腕複合体のプレアセンブリに関与し得る。この遺伝子の突然変異は、原発性繊毛機能不全症 1 0 型 (C I L D 1 0) に関連している。

【0043】

一部の場合には、組成物は、ダイニン (軸系) アセンブリ因子 3 (D N A A F 3) をコードする核酸構築物を含み、この構築物は、原発性繊毛機能不全症を有しているまたは有する危険性のある被験体を治療するポリペプチドを生じる。D N A A F 3 遺伝子によってコードされるタンパク質は、軸系ダイニンの内腕および外腕のアセンブリに必要とされ得、繊毛への輸送のためのダイニン複合体のアセンブリに役割を果たすことができる。この遺伝子の突然変異は、原発性繊毛機能不全症 2 型 (C I L D 2) に関連している。

【0044】

一部の場合には、組成物は、ダイニン (軸系) アセンブリ因子 5 (D N A A F 5) をコードする核酸構築物を含み、被験体の細胞内で翻訳されると、この構築物は、原発性繊毛機能不全症を有しているまたは有する危険性のある被験体を治療するポリペプチドを生じる。D N A A F 5 遺伝子によってコードされるタンパク質は、軸系ダイニン腕のプレアセンブリまたは安定性のために必要であると考えられ、運動性繊毛および鞭毛を有する生物においてのみ見出される。この遺伝子の突然変異は、原発性繊毛機能不全症 1 8 型に関連している。

【0045】

一部の場合には、組成物は、軸系ダイニン重鎖 1 1 (D N A H 1 1) をコードする核酸構築物を含み、被験体の細胞内で翻訳されると、この構築物は、原発性繊毛機能不全症を

10

20

30

40

50

有しているまたは有する危険性のある被験体を治療するポリペプチドを生じる。DNAH11遺伝子によってコードされるタンパク質は、繊毛ダイニン外腕タンパク質を生成することができる。DNAH11は、呼吸器繊毛の運動に参与する微小管依存性モーターATPアーゼであると考えられる。この遺伝子の突然変異は、原発性繊毛機能不全症7型(CILD7)および内臓錯位症候群に関連している。

【0046】

一部の場合には、組成物は、軸系ダイニン重鎖5(DNAH5)をコードする核酸構築物を含み、被験体の細胞内で翻訳されると、この構築物は、原発性繊毛機能不全症を有しているまたは有する危険性のある被験体を治療するポリペプチドを生じる。DNAH5遺伝子は、ダイニンと呼ばれるタンパク質の群(複合体)の一部であるタンパク質を作製するための指示を提供することができる。繊毛の協調的な前後運動は、細胞または細胞周囲の液体を動かすことができる。ダイニンは、繊毛が動くのに必要な力を生成することができる。DNAH5の80を超える突然変異が原発性繊毛機能不全症に関連している。この遺伝子の突然変異は、原発性繊毛機能不全症および内臓錯位症候群に関連している。

【0047】

一部の場合には、組成物は、軸系ダイニン重鎖6(DNAH6)をコードする核酸構築物を含み、被験体の細胞内で翻訳されると、この構築物は、原発性繊毛機能不全症を有しているまたは有する危険性のある被験体を治療するポリペプチドを生じる。

【0048】

一部の場合には、組成物は、軸系ダイニン重鎖8(DNAH8)をコードする核酸構築物を含み、被験体の細胞内で翻訳されると、この構築物は、原発性繊毛機能不全症を有しているまたは有する危険性のある被験体を治療するポリペプチドを生じる。DNAH8遺伝子によってコードされるタンパク質は、呼吸器繊毛の力生成タンパク質として機能することができる。DNAH8は、微小管のマイナス端に向かって力を生成することができる。ダイニンはATPアーゼ活性を有する；力を生成するパワー拍動はADPの放出時に起こると考えられる。DNAH8は、精子運動性および精子鞭毛アセンブリに参与し得る。DNAH8は、ATPアーゼおよびhdhc9としても知られる。

【0049】

一部の場合には、組成物は、軸系ダイニン軽鎖1(DNAL1)をコードする核酸構築物を含み、被験体の細胞内で翻訳されると、この構築物は、原発性繊毛機能不全症を有しているまたは有する危険性のある被験体を治療するポリペプチドを生じる。DNAL1遺伝子によってコードされるタンパク質は、呼吸器繊毛の力生成タンパク質として機能することができる。DNAL1は、ダイニン外腕複合体の成分として機能することができる。この複合体は、繊毛をATP依存的に動かす力を提供する分子モーターとして働く。この遺伝子の突然変異は、原発性繊毛機能不全症16型(CILD16)に関連している。

【0050】

一部の場合には、組成物は、ダイニン調節複合体サブユニット1(DRC1)をコードする核酸構築物を含み、被験体の細胞内で翻訳されると、この構築物は、原発性繊毛機能不全症を有しているまたは有する危険性のある被験体を治療するポリペプチドを生じる。DRC1遺伝子によってコードされるタンパク質は、呼吸器繊毛の力生成タンパク質として機能することができる。DRC1は、繊毛ダイニンのアセンブリを調節するネキシン-ダイニン複合体(N-DRC)の中心成分をコードすることができる。この遺伝子の突然変異は、原発性繊毛機能不全症21型(CILD21)に関連している。

【0051】

一部の場合には、組成物は、失読症感受性1候補物1(DYX1C1)をコードする核酸構築物を含み、被験体の細胞内で翻訳されると、この構築物は、原発性繊毛機能不全症を有しているまたは有する危険性のある被験体を治療するポリペプチドを生じる。DYX1C1遺伝子によってコードされるタンパク質は、呼吸器繊毛の力生成タンパク質として機能することができる。DYX1C1は、テトラトリコペプチドリピードメイン含有タンパク質をコードすることができる。コードされるタンパク質は、エストロゲン受容体な

10

20

30

40

50

らびに熱ショックタンパク質、H s p 7 0 および H s p 9 0 と相互作用することができる。この遺伝子の突然変異は、読み書きの欠損にも関連しており、この遺伝子を含む染色体転座は、発達性失読症に対する感受性に関連する。

【0052】

一部の場合には、組成物は、成長停止特異的 8 (G A S 8) をコードする核酸構築物を含み、被験体の細胞内で翻訳されると、この構築物は、原発性纖毛機能不全症を有しているまたは有する危険性のある被験体を治療するポリペプチドを生じる。

【0053】

一部の場合には、組成物は、軸系中心対装置タンパク質 (H Y D I N) をコードする核酸構築物を含み、被験体の細胞内で翻訳されると、この構築物は、原発性纖毛機能不全症を有しているまたは有する危険性のある被験体を治療するポリペプチドを生じる。H Y D I N 遺伝子によってコードされるタンパク質は、纖毛運動性において機能し得る。この遺伝子の突然変異は、原発性纖毛機能不全症 5 型 (C I L D 5) に関連している。

【0054】

一部の場合には、組成物は、ロイシンリッチリピート含有 6 (L R R C 6) をコードする核酸構築物を含み、被験体の細胞内で翻訳されると、この構築物は、原発性纖毛機能不全症を有しているまたは有する危険性のある被験体を治療するポリペプチドを生じる。L R R C 6 遺伝子によってコードされるタンパク質は、いくつかのロイシンリッチリピートドメインを含み、纖毛の運動性に関与すると考えられる。この遺伝子の突然変異は、原発性纖毛機能不全症 19 型 (C I L D 19) に関連している。

【0055】

一部の場合には、組成物は、N M E / N M 2 3 ファミリーメンバー 8 (N M E 8) をコードする核酸構築物を含み、被験体の細胞内で翻訳されると、この構築物は、原発性纖毛機能不全症を有しているまたは有する危険性のある被験体を治療するポリペプチドを生じる。N M E 8 遺伝子によってコードされるタンパク質は、呼吸器纖毛の力生成タンパク質として機能することができる。N M E 8 タンパク質は、N 末端チオレドキシンドメインおよび 3 つの C 末端ヌクレオシドニリン酸キナーゼ (N D K) ドメインを含む。この遺伝子の突然変異は、原発性纖毛機能不全症 6 型 (C I L D 6) に関連している。

【0056】

一部の場合には、組成物は、口・顔・指症候群 1 (O F D 1) をコードする核酸構築物を含み、被験体の細胞内で翻訳されると、この構築物は、原発性纖毛機能不全症を有しているまたは有する危険性のある被験体を治療するポリペプチドを生じる。O F D 1 遺伝子によって生成されるタンパク質の機能はよく理解されていないが、脳、顔、四肢および腎臓を含む身体の多くの部分の初期発生に重要な役割を果たす可能性がある。O F D 1 遺伝子の約 100 の突然変異が、この障害の最も一般的な形態である口・顔・指症候群 I 型の人々において見出されている。この遺伝子の突然変異は、原発性纖毛機能不全症およびジュベール症候群に関連している。

【0057】

一部の場合には、組成物は、網膜色素変性症 G T P アーゼ調節因子 (R P G R) をコードする核酸構築物を含み、被験体の細胞内で翻訳されると、この構築物は、原発性纖毛機能不全症を有しているまたは有する危険性のある被験体を治療するポリペプチドを生じる。R P G R 遺伝子によってコードされるタンパク質は、正常な視力および纖毛の機能にとって重要であり得る。この遺伝子の突然変異は、原発性纖毛機能不全症、X 連鎖性網膜色素変性症、進行性視力喪失、慢性呼吸器および副鼻腔感染症、再発性耳感染 (中耳炎) および難聴に関連している。

【0058】

一部の場合には、組成物は、ラジアルスポークヘッド 1 ホモログ (R S P H 1) をコードする核酸構築物を含み、被験体の細胞内で翻訳されると、この構築物は、原発性纖毛機能不全症を有しているまたは有する危険性のある被験体を治療するポリペプチドを生じる。R S P H 1 遺伝子によってコードされるタンパク質は、雄性減数分裂ならびに軸系中心

10

20

30

40

50

対およびラジアルスポークの構築において重要な役割を果たし得る。この遺伝子の突然変異は、原発性纖毛機能不全症24型（CILD24）に関連している。

【0059】

一部の場合には、組成物は、ラジアルスポークヘッド4ホモログA（RSPH4A）をコードする核酸構築物を含み、被験体の細胞内で翻訳されると、この構築物は、原発性纖毛機能不全症を有しているまたは有する危険性のある被験体を治療するポリペプチドを生じる。RSPH4A遺伝子によってコードされるタンパク質は、ラジアルスポークヘッドの成分であり得る。この遺伝子の突然変異は、原発性纖毛機能不全症11型（CILD11）に関連している。

【0060】

一部の場合には、組成物は、ラジアルスポークヘッド9ホモログ（RSPH9）をコードする核酸構築物を含み、被験体の細胞内で翻訳されると、この構築物は、原発性纖毛機能不全症を有しているまたは有する危険性のある被験体を治療するポリペプチドを生じる。RSPH9遺伝子によってコードされるタンパク質は、運動性纖毛および鞭毛におけるラジアルスポークヘッドの成分であり得る。この遺伝子の突然変異は、原発性纖毛機能不全症12型（CILD12）に関連している。

【0061】

一部の場合には、組成物は、精子関連抗原1（SPAG1）をコードする核酸構築物を含み、被験体の細胞内で翻訳されると、この構築物は、原発性纖毛機能不全症を有しているまたは有する危険性のある被験体を治療するポリペプチドを生じる。SPAG1遺伝子によってコードされるタンパク質は、纖毛ダイニン腕の細胞質アセンブリにおいて役割を果たし得る。この遺伝子の突然変異は、原発性纖毛機能不全症28型（CILD28）に関連している。

【0062】

一部の場合には、組成物は、ジンクフィンガーMYND型含有10（ZMYND10）をコードする核酸構築物を含み、被験体の細胞内で翻訳されると、この構築物は、原発性纖毛機能不全症を有しているまたは有する危険性のある被験体を治療するポリペプチドを生じる。ZMYND10によってコードされるタンパク質は、纖毛運動性のための適切な軸系構築のために、ダイニン内腕および外腕（それぞれIDAおよびODA）の軸系アセンブリにおいて機能することができる。この遺伝子の突然変異は、原発性纖毛機能不全症22型（CILD22）に関連している。

【0063】

治療は、被験体（例えば疾患を有する患者および／または状態を有する実験動物）を治療することを含み得る。一部の場合には、状態は、原発性纖毛機能不全症（PCD）またはカルタゲナー症候群である。一部の場合には、状態は、纖毛として知られる細胞構造内で機能する1つ以上のタンパク質の欠陥に広く関連する。一部の場合には、被験体はヒトである。治療は、疾患の臨床的発症前に被験体に提供され得る。治療は、疾患の臨床的発症後に被験体に提供され得る。治療は、疾患の臨床的発症の1分後もしくはそれ以降、5分後もしくはそれ以降、10分後もしくはそれ以降、30分後もしくはそれ以降、1時間後もしくはそれ以降、2時間後もしくはそれ以降、3時間後もしくはそれ以降、4時間後もしくはそれ以降、5時間後もしくはそれ以降、6時間後もしくはそれ以降、12時間後もしくはそれ以降、1日後もしくはそれ以降、1週間後もしくはそれ以降、6ヶ月後もしくはそれ以降、12ヶ月後もしくはそれ以降、または2年後もしくはそれ以降に提供され得る。治療は、疾患の臨床的発症後1分以上、10分以上、30分以上、1時間以上、2時間以上、3時間以上、4時間以上、5時間以上、6時間以上、12時間以上、1日以上、1週間以上、1ヶ月以上、6ヶ月以上、12ヶ月以上、2年以上の期間、被験体に提供され得る。治療は、疾患の臨床的発症後2年以内、12ヶ月以内、6ヶ月以内、1ヶ月以内、1週間以内、1日以内、12時間以内、6時間以内、5時間以内、4時間以内、3時間以内、2時間以内、1時間以内、30分以内、10分以内または1分以内の期間、被験体に提供され得る。治療はまた、臨床試験においてヒトを治療することを含み得る。

10

20

30

40

50

【0064】

本明細書に記載の操作されたポリリボヌクレオチドを含有する組成物は、予防的および／または治療的処置のために投与することができる。治療適用では、核酸構築物またはベクターは、原発性纖毛機能不全症などの疾患に既に罹患している被験体に、疾患の症状を治癒するまたは少なくとも改善するコードされたポリペプチドの量を提供するのに十分な量で投与することができる。核酸構築物、ベクター、操作されたポリリボヌクレオチドまたは組成物は、疾患を発症する、疾患に罹患するまたは疾患を悪化させる可能性を低減するために投与することもできる。この使用に有効な量は、疾患または状態の重症度および経過、（1もしくは複数の）核酸構築物、（1もしくは複数の）ベクター、（1もしくは複数の）操作されたポリリボヌクレオチドまたは（1もしくは複数の）組成物のトランスフェクションの効率、コードされるポリペプチドの標的分子に対する親和性、以前の治療、被験体の健康状態、体重、薬剤に対する応答、ならびに治療する医師の判断に基づいて異なり得る。

【0065】

一部の場合には、本開示のポリヌクレオチドは、アルマジロリピート含有4（ARMC4）、21番染色体オープンリーディングフレーム59（C21orf59）、コイルドコイルドメイン含有103（CCDC103）、コイルドコイルドメイン含有114（CCDC114）、コイルドコイルドメイン含有39（CCDC39）、コイルドコイルドメイン含有40（CCDC40）、コイルドコイルドメイン含有65（CCDC65）、サイクリンO（CCNO）、ダイニン（軸系）アセンブリ因子1（DNAAF1）、ダイニン（軸系）アセンブリ因子2（DNAAF2）、ダイニン（軸系）アセンブリ因子3（DNAAF3）、ダイニン（軸系）アセンブリ因子5（DNAAF5）、軸系ダイニン重鎖11（DNAH11）、軸系ダイニン重鎖5（DNAH5）、軸系ダイニン重鎖6（DNAH6）、軸系ダイニン重鎖8（DNAH8）、軸系ダイニン中間鎖2（DNAI2）、軸系ダイニン軽鎖1（DNAL1）、ダイニン調節複合体サブユニット1（DRC1）、失読症感受性1候補物1（DYX1C1）、成長停止特異的8（GAS8）、軸系中心対装置タンパク質（HYDIN）、ロイシンリッチリピート含有6（LRRC6）、NME／NM23ファミリーメンバー8（NME8）、口・顔・指症候群1（OFD1）、網膜色素変性症GTPアーゼ調節因子（RPGR）、ラジアルスポークヘッド1ホモログ（クラミドモナス）（RSPH1）、ラジアルスポークヘッド4ホモログA（クラミドモナス）（RSPH4A）、ラジアルスポークヘッド9ホモログ（クラミドモナス）（RSPH9）、精子関連抗原1（SPAG1）およびジンクフィンガーMYND型含有10（ZMYND10）などの、原発性纖毛機能不全症に関連するタンパク質に少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%または95%相同であるポリペプチドをコードすることができる。

【0066】

複数の核酸構築物、ベクター、操作されたポリリボヌクレオチドまたは組成物を、任意の順序でまたは同時に投与することができる。核酸構築物、ベクター、操作されたポリリボヌクレオチドまたは組成物は、同じ標的分子を標的とするポリリボヌクレオチドを含む単一包装中にまたは複数の包装中に、一緒にまたは別々に包装することができる。核酸構築物、ベクター、操作されたポリリボヌクレオチドまたは組成物の1つまたは全部を複数回で投与することができる。同時でない場合、複数の投与の間のタイミングは異なっているともよい。

【0067】

核酸構築物、ベクター、操作されたポリリボヌクレオチドまたは組成物は、症状の発症後できるだけ早く被験体に投与することができる。（1もしくは複数の）核酸構築物、（1もしくは複数の）ベクター、（1もしくは複数の）操作されたポリリボヌクレオチドまたは組成物は、疾患または状態の発症が検出されたまたは疑われた後実質的な範囲でできるだけ早く、疾患の治療に必要な期間、例えば約1ヶ月間、約6ヶ月間、約12ヶ月間、

約18ヶ月間、約24ヶ月間、または任意の適切な期間、投与することができる。治療期間の長さは各被験体によって異なり得る。

【0068】

転写物治療のためのmRNAの安定性を高めるためのコード領域における変化したヌクレオチド使用頻度

オリゴヌクレオチドの加水分解は、一本鎖(ss)RNA中の2つのリボヌクレオチドを連結するホスホジエステル結合の反応性がそれらのヌクレオチドの性質に依存することを示唆する。pH8.5では、ssRNAドデカマーに包埋された場合のジヌクレオチド切断感受性は、1桁程度変動し得る。ほぼ生理的条件下では、RNAの加水分解は、通常、5'-オキシアニオン脱離基の反対側の隣接するリン標的中心上の2'-酸素求核試薬によるS_N2型攻撃を伴い、2', 3'-環状リン酸および5'-ヒドロキシル末端を有する2つのRNAフラグメントを生じる。これらの段階での骨格は、隣接するホスホジエステル結合上の2'-OHによるS_N2型求核攻撃に必要とされる「インライン」コンフォメーションを最も容易にとることができるので、より反応性の高い切断可能なホスホジエステル結合は、5'-UpA-3' (1R=U₁, R₂=A) および5'-CpA-3' (1R=C, R₂=A) を含み得る。さらに、インターフェロン調節dsRNA活性化抗ウイルス経路は、RNAアーゼLエンドリボヌクレアーゼの活性化をもたらすアンキリンリピートに結合する2'-5'オリゴアデニル酸を生成する。RNAアーゼLは、UAおよびUUジヌクレオチドにおいてssRNAを効率的に切断する。最後に、Uリッチ配列は、Toll様受容体7および8ならびにRIG-Iを含むRNAセンサーの強力な活性化剤であり、全体的なウリジン含量の低減を、治療用mRNAの免疫原性を低下させるための潜在的に魅力的なアプローチにする。

【0069】

修飾mRNAのコドン内でおおよそコドンを越えて、より反応性の5'-U(U/A)-3'ジヌクレオチドの数を減少させることを目的とする変化したヌクレオチド使用頻度のスキームは、RNAの固有の化学的不安定性によって課される制限を部分的に緩和する。同時に、RNA転写物中のU含量を減少させることは、その免疫原性を低下させる。本開示は、変化したオープンリーディングフレーム(ORF)を含むRNA転写物に関する。特に、安定化された治療用mRNAをもたらすタンパク質コード領域内の5'-U(U/A)-3'ジヌクレオチドの実質的な減少を含む方法を提案する。

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2	
構築物	DNA 配列(5' から 3'へ)
DNAII GeneScript コドン	ATGATCCCAGCAAGCGCCAAGGCACCACACAAGCAGCCCCACAAGCAGA GCATCTCCATCGGCAGGGGCACAAGGAAGAGGGACGAGGATAGCGGAAC CGAAGTGGGAGAGGGAAACAGACGAGTGGGCACAGTCCAAGGCAACCGTG CGCCCACCTGACCAGCTGGAGCTGACAGATGCCGAGCTGAAGGAGGAGT TCACCAGGATCCTGACAGCCAACAATCCACACGCCCCCAGAACATCGTG CGCTACTCTTTCAAGGAGGGCACATATAAGCCAATCGGCTTTGTGAACCA GCTGGCCGTGCACTATACCCAAGTGGGCAATCTGATCCCCAAGGACTCCG ATGAGGGCCGGAGACAGCACTACAGGGACGAGCTGGTGGCAGGATCCCA GGAGTCTGTGAAAGTGATCTCTGAGACCGGCAATCTGGAGGAGGACGAG GAGCCAAAGGAGCTGGAGACCGAGCCAGGAAGCCAGACAGATGTGCCTG CAGCAGGAGCAGCAGAGAAGGTGACCGAGGAGGAGCTGATGACACCTAA GCAGCCAAAGGAGCGGAAGCTGACCAACCAGTTCAATTTTCCGAGAGA GCCTCTCAGACATACAACAATCCAGTGCGGGACAGAGAGTGCCAGACCG AGCCACCCCTAGAACCAACTTTTCCGCCACAGCCAATCAGTGGGAGATC TACGATGCCTATGTGGAGGAGCTGGAGAAGCAGGAGAAGACCAAGGAGA AGGAGAAGGCCAAGACACCCGTGGCCAAGAAGTCCGGCAAGATGGCCAT GCGGAAGCTGACCAGCATGGAGTCCCAGACAGACGATCTGATCAAGCTG TCTCAGGCCGCCAAGATCATGGAGAGAATGGTGAACCAGAATACCTATG ACGATATCGCCAGGACTTCAAGTACTATGACGATGCAGCAGACGAGTAC AGGGATCAAGTGGGCACACTGCTGCCTCTGTGGAAGTTTCAGAACGATAA GGCCAAGAGGCTGAGCGTGACCGCCCTGTGCTGGAATCCAAAGTACAGG GACCTGTTTCGAGTGGGATACGGATCTTATGACTTCATGAAGCAGAGCAG AGGCATGCTGCTGCTGTATTCCCTGAAGAACCCCTCTTTCCCTGAGTACAT GTTTAGCTCCAATTCCGGCGTGATGTGCCTGGACATCCACGTGGATCACC CCTACCTGGTGGCCGTGGGCCACTATGACGGCAACGTGGCCATCTACAAT CTGAAGAAGCCTCACTCTCAGCCCAGCTTCTGTTCTAGCGCCAAGAGCGG CAAGCACTCCGATCCCGTGTGGCAGGTGAAGTGGCAGAAGGACGATATG GACCAGAACCTGAATTTCTTTTCCGTGTCCTCTGATGGCAGGATCGTGTCT TGGACCCTGGTGAAGCGCAAGCTGGTGCACATCGACGTGATCAAGCTGA AGGTGGAGGGCAGCACCACAGAGGTGCCAGAGGGACTGCAGCTGCACCC AGTGGGATGCGGCACAGCCTTCGACTTTCACAAGGAGATCGATTATATGT TCCTGGTGGGCACCGAGGAGGGCAAGATCTACAAGTGTTCAGAGCTAT AGCTCCCAGTTTCTGGACACATATGATGCCACAAACATGAGCGTGGATAC CGTGTCTTGGAAATCCTTACCACACAAAGGTGTTTCATGAGCTGCTCTAGCG ACTGGACCGTGAAGATCTGGGATCACACCATCAAGACACCTATGTTTATC TATGACCTGAACTCCGCCGTGGGCGATGTGGCATGGGCACCATACTCCTC TACAGTGTTTCGAGCAGTGACCACAGACGGCAAGGCACACATCTTTGATC TGCCCATCAACAAGTACGAGGCCATCTGTAATCAGCCCGTGGCCGCCAAG AAGAACAGGCTGACCCACGTGCAGTTCAATCTGATCCACCCTATCATCAT CGTGGGCGACGATCGGGGCCACATCATCTCTCTGAAGCTGAGCCCCAACC TGAGAAAGATGCCTAAGGAGAAGAAGGGACAGGAGGTGCAGAAGGGAC

10

20

30

40

50

	CAGCAGTGGAGATCGCAAAGCTGGACAAGCTGCTGAATCTGGTGCGCGA GGTGAAGATCAAGACCTGA (配列番号:14)
DNAII 変化したヌク レオチド使用 頻度 1	ATGATCCCAGCAAGCGCCAAGGCACCACACAAGCAGCCCCACAAGCAGA GCATCAGCATCGGCAGGGGCACAAGGAAGAGGGACGAGGACAGCGGAA CCGAAGTGGGAGAGGGAACAGACGAGTGGGCACAGAGCAAGGCAACCG TGCGCCACCCGACCAGCTGGAGCTGACAGACGCCGAGCTGAAGGAGGA GTTCACCAGGATCCTGACAGCCAACAACCCACACGCCCCCAGAACATCG TGCCTACAGCTTCAAGGAGGGCACATACAAGCCAATCGGCTTCGTGAAC CAGCTGGCCGTGCACTACACCCAAGTGGGCAACCTGATCCCCAAGGACA GCGACGAGGGCCGGAGACAGCACTACAGGGACGAGCTGGTGGCAGGAA GCCAGGAGAGCGTGAAAGTGATCAGCGAGACCGGCAACCTGGAGGAGGA CGAGGAGCCAAAGGAGCTGGAGACCGAGCCAGGAAGCCAGACAGACGT GCCCCGAGCAGGAGCAGCAGAGAAGGTGACCGAGGAGGAGCTGATGAC ACCCAAGCAGCCAAAGGAGCGGAAGCTGACCAACCAGTTCAACTTCAGC GAGAGAGCCAGCCAGACATACAACAACCCAGTGCGGGACAGAGAGTGCC AGACCGAGCCACCCCCCAGAACCAACTTCAGCGCCACAGCCAACCAAGT GGAGATCTACGACGCCTACGTGGAGGAGCTGGAGAAGCAGGAGAAGACC AAGGAGAAGGAGAAGGCCAAGACACCCGTGGCCAAGAAGAGCGGCAAG ATGGCCATGCGGAAGCTGACCAGCATGGAGAGCCAGACAGACGACCTGA TCAAGCTGAGCCAGGCCGCCAAGATCATGGAGAGAATGGTGAACCAGAA CACCTACGACGACATCGCCCAGGACTTCAAGTACTACGACGACGCAGCA GACGAGTACAGGGACCAAGTGGGCACACTGCTGCCCCTGTGGAAGTTCC AGAACGACAAGGCCAAGAGGCTGAGCGTGACCGCCCTGTGCTGGAACCC AAAGTACAGGGACCTGTTCGCAAGTGGGATACGGAAGCTACGACTTCATG AAGCAGAGCAGAGGCATGCTGCTGCTGTACAGCCTGAAGAACCCAGCT TCCCCGAGTACATGTTTACGAGCAACAGCGGCGTGATGTGCCTGGACATC CACGTGGACCACCCCTACCTGGTGGCCGTGGGCCACTACGACGGCAACGT GGCCCTACTACAACCTGAAGAAGCCCCACAGCCAGCCCAGCTTCTGCAGCA GCGCCAAGAGCGGCAAGCACAGCGACCCCGTGTGGCAGGTGAAGTGGCA GAAGGACGACATGGACCAGAACCTGAACCTTCTTCAGCGTGAGCAGCGAC GGCAGGATCGTGAGCTGGACCCTGGTGAAGCGCAAGCTGGTGCACATCG ACGTGATCAAGCTGAAGGTGGAGGGCAGCACACAGAGGTGCCAGAGGG ACTGCAGCTGCACCCAGTGGGATGCGGCACAGCCTTCGACTTCCACAAGG AGATCGACTACATGTTTCTGGTGGGCACCGAGGAGGGCAAGATCTACAA GTGCAGCAAGAGCTACAGCAGCCAGTTCCTGGACACATACGACGCCAC AACATGAGCGTGGACACCGTGAGCTGGAACCCCTACCACACAAAGGTGT TCATGAGCTGCAGCAGCGACTGGACCGTGAAGATCTGGGACCACACCATC AAGACACCCATGTTTATCTACGACCTGAACAGCGCCGTGGGCGACGTGGC ATGGGCACCATAACAGCAGCACAGTGTTCGACAGCAGTGACCACAGACGGC AAGGCACACATCTTCGACCTGGCCATCAACAAGTACGAGGCCATCTGCAA CCAGCCCGTGGCCGCCAAGAAGAAGAGGCTGACCCACGTGCAGTTCAAC CTGATCCACCCCATCATCATCTGTTGGGCGACGACCGGGGCCACATCATCAG CCTGAAGCTGAGCCCCAACCTGAGAAAGATGCCCAAGGAGAAGAAGGGA CAGGAGGTGCAGAAGGGACCAGCAGTGGAGATCGCAAAGCTGGACAAGC TGCTGAACCTGGTGCAGGAGGTGAAGATCAAGACCTGA (SEQ ID NO: 15)
DNAII 変化したヌク レオチド使用 頻度 2	ATGATCCCAGCAAGCGCCAAGGCACCACACAAGCAGCCCCACAAGCAGA GCATCTCCATCGGCAGGGGCACAAGGAAGAGGGACGAGGACAGCGGAAC CGAAGTGGGAGAGGGAACAGACGAGTGGGCACAGTCCAAGGCAACCGTG CGCCACCTGACCAGCTGGAGCTGACAGATGCCGAGCTGAAGGAGGAGT TCACCAGGATCCTGACAGCCAACAATCCACACGCCCCCAGAACATCGTG CGCTACAGCTTCAAGGAGGGCACATACAAGCCAATCGGCTTCGTGAACCA

10

20

30

40

	GCTGGCCGTGCACTACACCCAAGTGGGCAATCTGATCCCCAAGGACTCCG ATGAGGGCCGGAGACAGCACTACAGGGACGAGCTGGTGGCAGGATCCCA GGAGTCTGTGAAAGTGATCTCTGAGACCGGCAATCTGGAGGAGGACGAG GAGCCAAAGGAGCTGGAGACCGAGCCAGGAAGCCAGACAGATGTGCCTG CAGCAGGAGCAGCAGAGAAGGTGACCGAGGAGGAGCTGATGACACCCA AGCAGCCAAAGGAGCGGAAGCTGACCAACCAGTTCAACTTCTCCGAGAG AGCCTCTCAGACATAACAATCCAGTGCGGGACAGAGAGTGCCAGACC GAGCCACCCCCCAGAACCAACTTCTCCGCCACAGCCAATCAGTGGGAGAT CTACGATGCCTACGTGGAGGAGCTGGAGAAGCAGGAGAAGACCAAGGAG AAGGAGAAGGCCAAGACACCCGTGGCCAAGAAGTCCGGCAAGATGGCCA TGCGGAAGCTGACCAGCATGGAGTCCCAGACAGACGATCTGATCAAGCT GTCTCAGGCCGCCAAGATCATGGAGAGAATGGTGAACCAGAACACCTAC GACGACATCGCCAGGACTTCAAGTACTACGACGATGCAGCAGACGAGT ACAGGGATCAAGTGGGCACACTGCTGCCTCTGTGGAAGTTCCAGAACGAC AAGGCCAAGAGGCTGAGCGTGACCGCCCTGTGCTGGAATCCAAAGTACA GGGACCTGTTTCGAGTGGGATACGGAAGCTACGACTTCATGAAGCAGAG CAGAGGCATGCTGCTGCTGTACTCCCTGAAGAACCCAGCTTCCCTGAGT ACATGTTTCAGCTCCAACCTCCGGCGTGATGTGCTGGACATCCACGTGGAT CACCCCTACCTGGTGGCCGTGGGGCCACTACGACGGCAACGTGGCCATCTA CAATCTGAAGAAGCCTCACTCTCAGCCCAGCTTCTGCAGCAGCGCCAAGA GCGGCAAGCACTCCGATCCCGTGTGGCAGGTGAAGTGGCAGAAGGACGA CATGGACCAGAACCTGAACCTTCTTCTCCGTGTCCTCTGATGGCAGGATCG TGAGCTGGACCCTGGTGAAGCGCAAGCTGGTGCACATCGACGTGATCAA GCTGAAGGTGGAGGGCAGCACCACAGAGGTGCCAGAGGGACTGCAGCTG CACCCAGTGGGATGCGGCACAGCCTTCGACTTCCACAAGGAGATCGACTA CATGTTCTTGGTGGGCACCGAGGAGGGCAAGATCTACAAGTGCAGCAAG AGCTACAGCTCCCAGTTCCTGGACACATACGATGCCCCACAACATGAGCTG GGACACCGTGTCTGGAATCCCTACCACACAAAGGTGTTTCATGAGCTGCA GCAGCGACTGGACCGTGAAGATCTGGGATCACACCATCAAGACACCCAT GTTTCATCTACGACCTGAACTCCGCCGTGGGCGATGTGGCATGGGCACCAT ACTCCAGCACAGTGTTCGACGAGTGACCACAGACGGCAAGGCACACAT CTTCGATCTGGCCATCAACAAGTACGAGGCCATCTGCAATCAGCCCGTGG CCGCCAAGAAGAACAGGCTGACCCACGTGCAGTTCAATCTGATCCACCCC ATCATCATCGTGGGCGACGATCGGGGCCACATCATCTCTGAAAGCTGAG CCCCAACCTGAGAAAGATGCCCAAGGAGAAGAAGGGACAGGAGGTGCA GAAGGGACAGCAGTGGAGATCGCAAAGCTGGACAAGCTGCTGAATCTG GTGCGCGAGGTGAAGATCAAGACCTGA (配列番号: 16)	10
		20
		30
DNAH5 変化したヌク レオチド使用 頻度 1	ATGTTCAGAATCGGCAGACGGCAGCTGTGGAAGCACAGCGTGACCAGAG TGCTGACCCAGCGGCTGAAGGGCGAGAAAGAGGCCAAGAGAGCCCTGCT GGACGCCCCGGCACAAcTACCTGTTTCGCCATCGTGGCCAGCTGCCTGGACC TGAACAAGACCGAGGTGGAAGACGCCATCCTGGAAGGCAACCAGATCGA GCGGATCGACCAGCTGTTTCGCCGTGGGCGGACTGCGGCACCTGATGTTCT ACTACCAAGACGTGGAAGAGGGCCGAGACAGGCCAGCTGGGAAGCCTGGG CGGAGTGAACCTGGTGAGCGGCAAGATCAAGAAACCCAAGGTGTTTCGTG ACCGAGGGCAACGACGTGGCCCTGACAGGCGTGTGCGTGTTCCTTCATCAG AACCGACCCCAGCAAGGCCATCACCCCCGACAACATCCACCAGGAAGTG AGCTTCAACATGCTGGACGCCGCCGACGGCGGCCCTGCTGAACAGCGTGCG GAGACTGCTGAGCGACATCTTCATCCCCGCCCTGAGAGCCACAAGCCACG GCTGGGGAGAGCTGGAAGGACTGCAGGACGCCGCCAACATCCGGCAGGA ATTCTGAGCAGCCTGGAAGGATTCTGTGAACGTGCTGAGCGGCGCCCAGG AAAGCCTGAAAGAAAAAGTGAACCTGCGGAAGTGCGACATCCTGGAAC	40

10

20

30

40

	GAAAACCTGAAAGAGCCCACCGACTACCTGACCCTGGCCAACAACCCC GAGACACTGGGCAAGATCGAGGACTGCATGAAAGTGTGGATCAAGCAGA CCGAACAGGTGCTGGCCGAGAACCAACCAGCTGCTGAAAGAAGCCGACGA CGTGGGCCCAAGAGCCGAGCTGGAACACTGGAAGAAGCGGCTGAGCAAG TTCAACTACCTGCTGGAACAGCTGAAGAGCCCCGACGTGAAGGCCGTGCT GGCCGTGCTGGCAGCCGCCAAGAGCAAACTGCTGAAAACCTGGCGCGAG ATGGACATCCGGATCACCGACGCCACCAACGAGGCCAAGGACAACGTGA AGTACCTGTACACCCTGGAAAAGTGTGCGACCCCCTGTACAGCAGCGAC CCCCTGAGCATGATGGACGCCATCCCCACCCTGATCAACGCCATCAAGAT GATCTACAGCATCAGCCACTACTACAACACCAGCGAGAAGATCACCAGC CTGTTCTGTAAAGTGACCAACCAGATCATCAGCGCCTGCAAGGCCTACAT CACCAACAACGGCACCGCCAGCATCTGGAACCAGCCCCAGGACGTGGTG GAAGAGAAGATCCTGAGCGCCATCAAGCTGAAGCAGGAATACCAGCTGT GCTTCCACAAGACCAAGCAGAAGCTGAAACAGAACCCCAACGCCAAGCA GTTCCGACTTCAGCGAGATGTACATCTTCGGCAAGTTCGAGACATTCCAC GGCGGCTGGCCAAGATCATCGACATCTTACCACCCTGAAAACATACAGC GTGCTGCAGGACAGCACCATCGAGGGCCTGGAAGACATGGCCACCAAGT ACCAGGGCATCGTGGCCACCATCAAGAAGAAAGAGTACAACCTTCTGGA CCAGCGCAAGATGGACTTCGACCAGGACTACGAGGAATTCTGCAAGCAG ACAAACGACCTGCACAACGAGCTGCGCAAGTTCATGGACGTGACCTTCGC CAAGATCCAGAACACCAACCAGGCCCTGCGGATGCTGAAGAAGTTCGAG AGACTGAACATCCCCAACCTGGGCATCGACGACAAGTACCAGCTGATCCT GGAAAACCTACGGCGCCGACATCGACATGATCAGCAAGCTGTACACAAAG CAGAAGTACGACCCCCCCTGGCCCCGAACCAGCCCCCATCGCCGGCAA AATCCTGTGGGCCAGACAGCTGTTCCACCGGATCCAGCAGCCCATGCAGC TGTTCCAGCAGCACCCCGCCGTGCTGAGCACAGCCGAGGCCAAACCCATC ATCCGGAGCTACAACCGGATGGCCAAGGTGCTGCTGGAATTCGAGGTGCT GTTCCACCGGGCCTGGCTGCGGCAGATCGAAGAGATCCACGTGGGACTG GAAGCCAGCCTGCTCGTGAAGGCCCCCGGAACCGGCGAGCTGTTCTGTA ACTTCGACCCCCAGATCCTGATCCTGTTCCGGGAAACCGAGTGCATGGCC CAGATGGGGCTGGAAGTGAGCCCCCTGGCCACCAGCCTGTTCCAGAAGC GGGACCGGTACAAGCGGAACCTCAGCAACATGAAGATGATGCTGGCCGA GTACCAGCGCGTGAAGAGCAAGATCCCCGCCGCCATCGAGCAGCTGATC GTGCCCCACCTGGCCAAAGTGGACGAGGCCCTGCAGCCAGGACTGGCCG CCCTGACATGGACCAGCCTGAACATCGAGGCCTACCTGGAAAACACATTC GCCAAAATCAAGGACCTGGAACCTGCTGCTGGACCGCGTGAACGACCTGA TCGAGTTCCGGATCGACGCCATCCTGGAAGAGATGAGCAGCACCCCCCTG TGCCAGCTGCCCCAGGAAGAACCCCTGACCTGCGAAGAGTTCCTGCAGAT GACCAAGGACCTGTGCGTGAACGGCGCCCAGATCCTGCACTTCAAGAGC AGCCTGGTGGAAGAAGCCGTGAACGAGCTCGTGAACATGCTGCTGGACG TGGAAGTGCTGAGCGAGGAAGAGAGCGAGAAGATCAGCAACGAGAACA GCGTGAACATAAGAACGAGAGCAGCGCCAAGCGGGAAGAGGGCAACTT CGACACCCTGACCAGCAGCATCAACGCCAGAGCCAACGCCCTGCTGCTGA CCACCGTGACCCGGAAGAAAAAAGAAACCGAGATGCTGGGCGAAGAGGC CAGAGAGCTGCTGAGCCACTTCAACCACCAGAACATGGACGCCCTGCTGA AAGTGACACGGAACACCCTGGAAGCCATCCGGAAGCGGATCCACAGCAG CCACACCATCAACTTCCGGGACAGCAACAGCGCCAGCAACATGAAGCAG AACAGCCTGCCCATCTTCCGGGCCAGCGTGACACTGGCCATCCCCAACAT CGTGATGGCCCCCGCCCTGGAAGACGTGCAGCAGACACTGAACAAGGCC GTGGAATGCATCATCAGCGTGCCCAAGGGCGTGCGGCAGTGGAGCAGCG AACTGCTGAGCAAGAAGAAGATCCAGGAACGGAATGGCCGCCCTGCA
10	
20	
30	
40	

10

20

30

40

	GAGCAACGAGGACAGCGACAGCGACGTGGAAATGGGCGAGAACGAGCT GCAGGACACACTGGAAATCGCCAGCGTGAACCTGCCCATCCCCGTGCAG ACCAAGAATACTACTACAAGAACGTGAGCGAAAACAAAGAAATCGTGAAGC TGGTGAGCGTGCTGAGCACCATCATCAACAGCACCAAGAAAGAAAGTGAT CACCAGCATGGACTGCTTCAAGCGGTACAACCACATCTGGCAGAAGGGC AAAGAAGAGGGCCATCAAGACCTTCATCACCCAGAGCCCCCTGCTGAGCG AGTTTCGAGAGCCAGATCCTGTACTTCCAGAACCTGGAACAGGAAATCAAC GCCGAGCCCCGAGTACGTGTGCGTGGGCGAGCATCGCCCTGTACACCGCCGA CCTGAAGTTTCGCCCTGACCGCCGAGACAAAGGCCTGGATGGTTCGTGATCG GCCGGCACTGCAACAAAAAGTACAGAAGCGAGATGGAAAACATCTTCAT GCTGATCGAGGAATTCAACAAGAAACTGAACCGGCCCATCAAGGACCTG GACGACATCAGAATCGCCATGGCCGCACTGAAAGAGATCAGAGAGGAAC AGATCAGCATCGACTTCCAAGTGGGCCCCATCGAGGAAAGCTACGCCCTG CTGAACAGATACGGACTGCTGATCGCCCGGGAAGAGATCGACAAGGTGG ACACCCTGCACTACGCCTGGGAGAAGCTGCTGGCCAGAGCCGGCGAGGT GCAGAACAACTGGTGAGCCTGCAGCCAGCTTCAAGAAAGAACTGATC AGCGCCGTGGAAGTGTTCCTGCAGGACTGCCACCAGTTCTACCTGGACTA CGACCTGAACGGCCCCATGGCCAGCGGCCCTGAAACCCAGGAAGCCAG GACCGGCTGATCATGTTCCAGAACCAGTTCGACAACATCTACCGGAAGTA CATCACCTACACAGGCGGCGAGGAACTGTTCCGGCCTGCCCGCCACACAGT ACCCCCAGCTGCTGGAAATCAAGAAGCAGCTGAACCTGCTGCAGAAGAT CTACACCCTGTACAACAGCGTGATCGAGACAGTGAACAGCTACTACGACA TCCTGTGGAGCGAAGTGAACATCGAGAAGATCAACAACGAACTGCTGGA ATTCCAGAACCGGTGCCGGAAGCTGCCCAGAGCACTGAAGGACTGGCAG GCCTTCTGACCTGAAGAAAATCATCGACGACTTCAGCGAGTGCTGCCC CCTGCTGGAGTACATGGCCAGCAAGGCCATGATGGAACGGCACTGGGAG AGAATCACCACTGACCGGCCACAGCCTGGACGTGGGCAACGAGAGCT TCAAGCTGCGGAACATCATGGAAGCCCCACTGCTGAAGTACAAAGAGGA AATCGAGGACATCTGCATCAGCGCCGTGAAAGAGCGGGACATCGAGCAG AAACTGAAACAAGTGATCAACGAGTGGGACAACAAGACCTTCACCTTCG GCAGCTTCAAGACCAGAGGCGAGCTGCTGCTGCGGGGCGACAGCACCAG CGAGATCATCGCCAACATGGAAGACAGCCTGATGCTGCTGGGCAGCCTGC TGAGCAACCGGTACAACATGCCCTTCAAGGCCCAGATCCAGAAATGGGT GCAGTACCTGAGCAACAGCACCGACATCATCGAGAGCTGGATGACCGTG CAGAACCTGTGGATCTACCTGGAAGCCGTGTTTCGTGGGCGGGCAGATCGC CAAGCAGCTGCCCCAAAGAGGCCAAGCGGTTTCAGCAACATCGACAAGAGC TGGGTCAAGATCATGACCAGAGCCCACGAGGTGCCAGCGTGGTGCAGT GCTGCGTGGGCGACGAAACACTGGGACAGCTGCTGCCCCACCTGCTGGAC CAGCTGGAAATCTGCCAGAAGAGCCTGACCGGCTACCTGGAAAAGAAAC GGCTGTGCTTCCCCCGTTCTTCTTCGTGAGCGACCCCGCCCTGCTGGAAA TCCTGGGCCAGGCCAGCGACAGCCACACAATCCAGGCCACCTGCTGAAC GTGTTTCGACAACATCAAGAGCGTGAAGTTCACGAGAAAAATCTACGACC GGATCCTGAGCATCAGCAGCCAGGAAGGCGAGACAATCGAGCTGGACAA GCCCCGTGATGGCCGAGGGAAACGTGGAAGTGTGGCTGAACAGCCTGCTG GAAGAGAGCCAGAGCAGCCTGCACCTCGTGATCAGACAGGCCGCCGCCA ACATCCAGGAAACCGGCTTCAGCTGACCGAGTTCTTGAGCAGCTTCCCA GCACAAGTGGGACTGCTGGGCATCCAGATGATCTGGACCAGAGACAGCG AAGAGGCCCTGAGAAACGCCAAGTTCGACAAGAAAATCATGCAGAAAAC AAACCAGGCATTCTGGAACCTGCTGAACACCCTGATCGACGTGACCACCC GGGACCTGAGCAGCACCGAGAGAGTGAAGTACGAGACACTGATCACCAT CCACGTGCACCAGCGGGACATCTTCGACGACCTGTGCCACATGCACATCA
--	--

10

20

30

40

50

	AGAGCCCCATGGACTTCGAGTGGCTGAAGCAGTGCAGGTTCTACTTCAAC GAGGACAGCGACAAGATGATGATCCACATCACCGACGTGGCCTTCATCTA CCAGAACGAGTTCCTGGGCTGCACCGACCGCCTCGTGATCACCCCCCTGA CCGACCGGTGCTACATCACACTGGCCCAGGCACTGGGCATGAGCATGGG AGGCGCACACGAGGACCCGCCGGCACAGGCAAGACCGAAACCACCAAG GACATGGGACGCTGCCTGGGCAAATACGTGGTGGTGTTCAACTGCAGCGA CCAGATGGACTTCCGGGGCCTGGGCCGGATCTTCAAGGGCCTGGCACAGA GCGGAAGCTGGGGCTGCTTCGACGAGTTCAACAGAATCGACCTGCCCCGTG CTGAGCGTGGCCGCACAGCAGATCAGCATCATCTGACATGCAAAAAAG AGCACAAGAAGAGCTTCATCTTCACCGACGGCGACAACGTGACCATGAA CCCCGAGTTCGGCCTGTTCTTGACAATGAACCCCGGCTACGCCGGACGGC AGGAACTGCCCGAGAACCTGAAGATCAACTTCCGGAGCGTGGCCATGAT GGTGCCCGACCGGCAGATCATCATCAGAGTGAAACTGGCCAGCTGCGGCT TCATCGACAACGTGGTGTCTGGCCCGGAAGTTCTTCACACTGTACAAGCTG TGCGAAGAACAGCTGAGCAAACAGGTGCACTACGACTTCGGCCTGAGGA ACATCTTGAGCGTGTGAGAACCTGGGAGCCGCCAAGCGGGCCAAACCC CATGGACACCGAGAGCACAATCGTGATGCGGGTGCTGCGGGACATGAAC CTGAGCAAGCTGATCGACGAGGACGAGCCCCCTGTTCTGAGCCTGATCGA GGACCTGTTCCCAACATCCTGCTGGACAAGGCCGGCTACCCCGAACTGG AAGCCGCCATCAGCAGACAGGTGGAAGAGGCCGGCCTGATCAACCACCC CCCCTGGAACTGAAAGTGATCCAGCTGTTTCGAGACACAGCGCGTGCGGC ACGGCATGATGACACTGGGACCCAGCGGAGCCGGCAAGACCACCTGCAT CCACACACTGATGCGGGCCATGACCGACTGCGGCAAGCCCCACCGCGAG ATGCGGATGAAC CCCAAGGCCATCACCGCCCCCAGATGTTTCGGCAGACTGGACGTGGCCAC CAACGATGGACCGACGGCATCTTCAGCACCCCTGTGGCGCAAGACCCTGC GGGCCAAGAAGGGCGAGCACATCTGGATCATCTTGACCGGCCCGTGA CGCCATCTGGATCGAGAACCTGAACAGCGTGCTGGACGACAACAAGACA CTGACCCTGGCCAACGGCGACCGGATCCCCATGGCCCCCAACTGCAAGAT CATCTTCGAGCCCCACAACATCGACAACGCCAGCCCCGCCACCGTGAGCA GAAACGGCATGGTGTTCATGAGCAGCAGCATCCTGGACTGGAGCCCCATC CTGGAAGGCTTCCTGAAGAAGCGGAGCCCCAGGAAGCCGAGATCCTGA GACAGCTGTACACCGAGAGCTTCCCCGACCTGTACCGGTTCTGCATCCAG AACCTGGAGTACAAGATGGAAGTGCTGGAAGCCTTCGTGATCACCCAGA GCATCAACATGTGTCAGGGCCTGATCCCCCTGAAAGAACAGGGCGGAGA AGTGAGCCAGGCCACCTGGGCAGACTGTTCTGTGTTCCGCCCTGCTGTGGA GCGCCGGCGCCGCCCTGGAAGTGGACGGAAGGCGGAGACTGGAAGTGTG GCTGCGGAGCAGACCCACCGGCACCTGGAAGTGGCCCCACCGCCGGA CCCGGCGACACCGCCTTCGACTACTACGTGGCCCCCGACGGCACCTGGAC CCACTGGAACACCCGGACCCAGGAATACCTGTACCCACGCGACACCACCC CCGAGTACGGCAGCATCCTGGTGCCCAACGTGGACAACGTGCGGACCGA CTTCTGATCCAGACAATCGCCAAGCAGGGAAAGGCCGTGCTGCTGATCG GCGAGCAGGGCACAGCCAAGACCGTGATCATCAAGGGCTTCATGAGCAA GTACGACCCCGAGTGCCACATGATCAAGAGCCTGAACTTCAGCAGCGCCA CCACCCCACTGATGTTCCAGCGGACCATCGAGAGCTACGTGGACAAGCGG ATGGGCACCACTACGGCCCCCAGCCGGCAAGAAAATGACCGTGTTTCAT CGACGAGTGAACATGCCATCATCAACGAGTGGGGCGACCAAGTGACC AACGAGATCGTGCGGCAGCTGATGGAACAGAACGGCTTCTACAACCTGG AAAAGCCCGGCGAGTTTACCAGCATCGTGGACATCCAGTTCTTGCCGCC ATGATCCACCCCGGCGGCGGAAGAAACGACATCCCCAGCGGCTGAAGC GGCAGTTCAGCATCTTCAACTGCACCTGCCAGCGAGGCCAGCGTGAC
10	
20	
30	
40	

10

20

30

40

50

	AAGATCTTCGGCGTGATCGGGCGTGGGCCACTACTGCACCCAGAGAGGCTT CAGCGAGGAAGTGCGGGACAGCGTGACCAAGCTGGTGCCCTGACAAGA CGGCTGTGGCAGATGACCAAGATCAAGATGCTGCCCACCCCGCCAAGTT CCACTACGTGTTCAACCTGCGGGACCTGAGCAGAGTGTGGCAGGGAATGC TGAACACCACCAGCGAAGTGATCAAAGAGCCCAACGACCTGCTGAAGCT GTGGAAGCACGAGTGCAAGAGAGTGATCGCCGACCGGTTACCCGTGAGC AGCGACGTGACATGGTTTCGACAAGGCCCTGGTGAGCCTGGTGGAAGAGG AATTCGGCGAAGAGAAGAACTGCTGGTGGACTGCGGCATCGACACCTA CTTCGTGGACTTCCTGCGCGACGCCCCGAAGCCGCGGCGAGACAAGCG AAGAGGCCGACGCCGAGACACCCAAGATCTACGAGCCCATCGAGAGCTT CAGCCACCTGAAAGAAAGGCTGAACATGTTCTGACGTGTACAACGAG AGCATCCGGGGAGCCGGCATGGACATGGTGTTCCTCGCCGACGCCATGGT GCACCTCGTGAAGATCAGCAGAGTGATCCGGACCCCCAGGGCAACGCC CTGCTCGTGGGAGTGGGAGGCAGCGGCAAGCAGAGCCTGACCAGACTGG CCAGCTTCATCGCCGGCTACGTGAGCTTCAGATCACCTGACCCGGAGC TACAACACCAGCAACCTGATGGAAGACCTGAAGGTGCTGTACCCGACAG CCGGCCAGCAGGGGAAGGGCATCACCTTCATCTTCACCGACAACGAGATC AAGGACGAGAGCTTCCTGGAGTACATGAACAACGTGCTGAGCAGCGGCG AGGTGAGCAACCTGTTGCCCCGGGACGAGATCGACGAGATCAACAGCGA CCTGGCCAGCGTGATGAAGAAAGAATTCCCCCGGTGCTGCCACAAACG AGAACCTGCACGACTACTTCATGAGCAGAGTGCGGCAGAACCTGCACATC GTGCTGTGCTTCAGCCCCGTGGGCGAGAAGTTCAGAAACCGGGCCCTGAA GTCCCCGCCCTGATCAGCGGCTGCACCATCGACTGGTTTCAGCCGGTGGC CCAAGGACGCCCTGGTGGCCGTGAGCGAGCACTTCCTGACCAGCTACGAC ATCGACTGCAGCCTGGAAATCAAGAAAGAGGTGGTGCAGTGATGGGCA GCTTCAGGACGGCGTGGCCGAGAAATGCGTGGACTACTTCAGCGGTTC CGGCGGAGCACCCACGTGACCCCCAAGAGCTACCTGAGCTTCATCCAGGG CTACAAGTTCATCTACGCGGAGAAAGCACGTGGAAGTGCGCACACTGGCC AACCGGATGAACACCGGCCTGGAAAAACTGAAAGAGGCCAGCGAGAGCG TGGCCGCCCTGAGCAAAGAAGTGAAGCCAAAGAAAAAGAACTGCAGGT GGCCAACGACAAGGCCGACATGGTGTGCTGAAAGAAGTGACCATGAAGGCC CAGGCCGCCGAGAAAGTGAAGCCGAGGTGCAGAAAGTGAAGGACCGG GCCCAGGCCATCGTGGACAGCATCAGCAAGGACAAGGCCATCGCCGAGG AAAAGCTGGAAGCAGCCAAGCCCGCCCTGGAAGAGGCAGAAAGCCGCCCT GCAGACCATCCGGCCCAGCGACATCGCCACAGTGCGGACCCTGGGAAGG CCCCCCCACCTGATCATGCGGATCATGGACTGCGTGCTGCTGCTGTTCCA GAGAAAGGTGAGCGCCGTGAAGATCGACCTGGAAAAAGCTGCACCATG CCCAGCTGGCAGGAAAGCCTGAAGCTGATGACCGCCGGCAACTTCCTGCA GAACCTGCAGCAGTTCCTCAAGGACACCATCAACGAGGAAGTGATCGAG TTCCTGAGCCCTACTTCGAGATGCCCGACTACAACATCGAAACCGCCAA ACGCGTGTGCGGCAACGTGGCCGACTGTGCAGCTGGACCAAGGCCATG GCCAGCTTCTTCAGCATCAACAAAGAGGTGCTGCCCCTGAAGGCCAACCT GGTGGTGCAGGAAAACCGGCACCTGCTGGCCATGCAGGACCTGCAGAAA GCCCAGGCCGAGCTGGACGACAAGCAGGCCGAGCTGGACGTGGTGCAGG CCGAGTACGAGCAGGCCATGACCGAGAAGCAGACCCTGCTGGAAGACGC AGAGCGGTGCAGACACAAGATGCAGACCGCCAGCACCTGATCAGCGGA CTGGCCGGCGAAAAAGAGCGGTGGACCGAGCAGAGCCAGGAATTCGCCG CCCAGACCAAGCGGCTCGTGGGAGACGTGCTGCTGGCCACCGCCTTCCTG AGCTACAGCGGCCCTTCAACCAGGAATTACAGGGACCTGCTGCTGAACGA CTGGCGGAAAGAGATGAAGGCCAGAAAGATCCCCTTCGGCAAGAACCTG AACCTGAGCGAGATGCTGATCGACGCCCCCACCATCAGCGAGTGGAACCT	10 20 30 40
--	---	---

40

	GCCATCGACGGCACCATCATCATGAGCGAGAACCTGCGGGACGCACTGG ACTGCATGTTTCGACGCCAGAATCCCCGCATGGTGGAAAAAGGCCAGCTG GATCAGCAGCACCTGGGCTTCTGGTTACCGAACTGATCGAGAGAAACA GCCAGTTCACCAGCTGGGTGTTCAACGGCAGACCCCACTGCTTCTGGATG ACCGGCTTCTTCAACCCACAAGGCTTCTGACAGCAATGCGCCAGGAAAT CACCAGAGCCAACAAGGGCTGGGCCCTGGACAACATGGTGCTGTGCAAC GAAGTGACCAAGTGGATGAAGGACGACATCAGCGCCCCCCCCACAGAGG GCGTGTACGTGTACGGCCTGTACCTGGAAGGCGCCGGATGGGACAAGAG AAACATGAAGCTGATCGAGAGCAAGCCCCAAGGTGCTGTTTCGAGCTGATG CCCGTGATCAGGATCTACGCCGAGAACAACACCTGAGGGACCCCCGGTT CTACAGCTGCCCCATCTACAAGAAACCCGTGCGCACCGACCTGAACTACA TCGCCGCCGTGGACCTGAGGACAGCCCAGACACCCGAGCACTGGGTGCT GAGAGGCGTGGAACCTGCTGTGCGACGTGAAGTGA (SEQ ID NO: 17)	10
DNAH5 変化したヌク レオチド使用 頻度 2	ATGTTTCAAGAATCGGCAGACGGCAGCTGTGGAAGCACAGCGTGACCAGAG TGCTGACCCAGCGGTGAAGGGCGAGAAAGAGGCCAAGAGAGCCCTGCT GGACGCCCGGCACAATTACCTGTTTGCATCGTGGCCAGCTGCCTGGACC TGAACAAGACCGAGGTGGAAGATGCCATCCTGGAAGGCAACCAGATCGA GCGGATCGACCAGCTGTTTGGCGTGGGCGGACTGCGGCACCTGATGTTCT ATTATCAAGACGTGGAAGAGGGCCGAGACAGGCCAGCTGGGATCTCTGGG CGGAGTGAATCTGGTGTCCGGCAAGATCAAGAAACCCAAGGTGTTCTGTG ACCGAGGGCAACGACGTGGCCCTGACAGGCGTGTGCGTGTCTTCATCAG AACCGACCCCAGCAAGGCCATCACCCCGACAACATCCACCAGGAAGTG TCCTTCAACATGCTGGATGCCGCCGATGGCGGCCTGCTGAATTCTGTGCG GAGACTGCTGAGCGACATCTTCATCCCCGCCCTGAGAGCCACATCTCACG GCTGGGGAGAGCTGGAAGGACTGCAGGACGCCGCCAATATCCGGCAGGA ATTCTGAGCAGCCTGGAAGGATTCTGTGAACGTGCTGTCTGGCGCCAGG AAAGCCTGAAAGAAAAAGTGAACCTGCGGAAGTGCGATATCCTGGAAC GAAAACCTGAAAGAGCCCACCGACTACCTGACCCTGGCCAACAACCT GAGACACTGGGCAAGATCGAGGACTGCATGAAAGTGTGGATCAAGCAGA CCGAACAGGTGCTGGCCGAGAACAACAGCTGCTGAAAGAAGCCGACGA CGTGGGGCCCAAGAGCCGAGCTGGAACACTGGAAGAAGCGGCTGAGCAAG TTCAACTACCTGCTGGAACAGCTGAAGTCCCCCGACGTGAAGGCCGTGCT GGCTGTGCTGGCAGCCGCCAAGAGCAAACCTGCTGAAAACCTGGCGCGAG ATGGACATCCGGATCACCGACGCCACCAACGAGGCCAAGGACAACGTGA AGTACCTGTACACCCTGGAAAAGTGCTGCGACCCCTGTACAGCAGCGAC CCTCTGAGCATGATGGACGCCATCCCTACCCTGATCAACGCCATCAAGAT GATCTACAGCATCAGCCACTACTACAACACCAGCGAGAAGATCACCAGC CTGTTCTGTGAAAGTGACCAATCAGATCATCAGCGCCTGCAAGGCCTACAT CACCAACAACGGCACCGCCAGCATCTGGAACCAGCCCCAGGATGTGGTG GAAGAGAAGATCCTGTCTGCCATCAAGCTGAAGCAGGAATACCAGCTGT GTTTTACAAGACCAAGCAGAAGCTGAAACAGAACCCCAACGCCAAGCA GTTTCGACTTCAGCGAGATGTATATCTTCGGCAAGTTCGAGACATTCCACC GGCGGCTGGCCAAGATCATCGACATCTTACCACCCTGAAAACATACAGC GTGCTGCAGGACAGCACCATCGAGGGCCTGGAAGATATGGCCACCAAGT ACCAGGGCATTGTGGCCACCATCAAGAAGAAAGAGTACAACCTCCTGGA CCAGCGCAAGATGGACTTCGACCAGGACTACGAGGAATTCTGCAAGCAG ACAAACGACCTGCACAACGAGCTGCGCAAGTTTATGGACGTGACCTTCGC CAAGATCCAGAACCAACCAAGGCCCTGCGGATGCTGAAGAAGTTTGAG AGACTGAACATCCCCAACCTGGGCATCGACGATAAGTACCAGCTGATCCT GGAAAACCTACGGCGCCGACATCGACATGATCAGCAAGCTGTACACAAAG CAGAAGTACGACCCCCCCTGGCCCGAATCAGCCTCCTATCGCCGGCAA	20 30 40

40

50

40

40

CGGCGGCTGCTGCTGATTAGAAAGCTGGTGTCGCCGACCGACAACTCGCCCA
GGCCCGCAAGTACATCGTGGATAGCATGGGAGAGAAGTACGCCGAGGGC
GTGATCCTGGACCTGGAAAAGACCTGGGAGGAAAGCGACCCCAGAACCC
CCCTGATCTGCCTGCTGAGCATGGGCTCCGACCCCACCGACAGCATTATC
GCCCTGGGCAAGAGACTGAAGATTGAGACAAGATACGTGTCCATGGGCC
AGGGCCAGGAAGTGCACGCTAGAAAAGCTGCTGCAGCAGACTATGGCCAA
TGGCGGCTGGGCCCTGCTGCAGAATTGTCACCTGGGGCTGGACTTCATGG
ACGAACTGATGGACATCATCATTGAGACAGAGCTGGTGCACGACGCCTTC
AGACTGTGGATGACCACCGAGGCCCATAAAGCAGTTTCCCATTACCCTGCT
GCAGATGAGCATCAAGTTCGCCAACGACCCCCCTCAGGGACTGAGAGCC
GGCCTGAAGAGAACCTACTCCGGCGTGTACACAGGATCTGCTGGACGTGTC
CTCTGGCAGCCAGTGGAAGCCTATGCTGTACGCCGTGGCATTCTTGCACA
GCACCGTGCAGGAACGGCGGAAGTTTGGCGCCCTGGGATGGAACATCCC
CTACGAGTTTAAACCAGGCCGACTTCAACGCCACTGTGCAGTTTATCCAGA
ACCATCTGGACGACATGGACGTGAAGAAAGGGGTGTCCTGGACAACCAT
CCGGTACATGATCGGAGAGATCCAGTACGGCGGCAGAGTGACCGACGAC
TACGACAAGAGGGCTGCTGAATACCTTCGCCAAAGTGTGGTTCTCCGAGAA
CATGTTTGGCCCCGACTTCAGCTTTTACCAGGGCTATAACATCCCCAAGTG
CTCCACCGTGGATAACTACCTGCAGTACATCCAGAGCCTGCCCCGCTACG
ACAGCCCTGAGGTGTTTCGGACTGCACCCCAACGCCGATATCACCTACCG
AGCAAACCTGGCCAAGGATGTGCTGGATACCATCCTGGGCATCCAGCCCAA
GGATACCAGTGGCGGAGGCGACGAAACCCGGGAAGCAGTGGTGGCTAGA
CTGGCCGACGACATGCTGGAAAAGCTGCCCCCGACTACGTGCCCTTTGA
AGTGAAAGAACGCCTGCAGAAGATGGGCCCTTCCAGCCTATGAACATCT
TCCTGAGGCAGGAAATCGACCGGATGCAGCGGGTGCTGTCTCTCGTGCGG
AGCACACTGACCGAGCTGAAACTGGCTATCGACGGCACCATCATCATGAG
CGAGAATCTGCGGGATGCACTGGACTGCATGTTTCGACGCCAGAATCCCCG
CATGGTGGAAAAAGGCCAGCTGGATCAGCTCTACCCTGGGCTTCTGGTTC
ACCGAACTGATCGAGAGAAACAGCCAGTTTACCAGCTGGGTGTTCAACG
GCAGACCTCACTGCTTCTGGATGACCGGCTTCTTCAATCCACAAGGCTTTC
TGACAGCAATGCGCCAGGAAATCACCAGAGCCAACAAGGGCTGGGCTCT
GGACAATATGGTGCTGTGTAACGAAGTGACTAAGTGGATGAAGGACGAC
ATCAGCGCCCCCTCCACAGAGGGCGTGTACGTGTACGGCCTGTACCTGGA
AGGCGCCGGATGGGACAAGAGAAACATGAAGCTGATCGAGAGCAAGCCC
AAGGTGCTGTTCGAGCTGATGCCCGTGATCAGGATCTATGCCGAGAACAA
CACCTGAGGGACCCCCGGTTCTACAGCTGCCCCATCTACAAGAAACCCG
TGCGCACCGACCTGAACTATATCGCCGCCGTGGACCTGAGGACAGCCCAG
ACACCTGAGCATTGGGTGCTGAGAGGCGTGGCACTGCTGTGCGACGTGAA
GTGA (配列番号: 18)

【 0 0 7 0 】

核酸構築物、ベクターおよび操作されたポリリボヌクレオチド

本開示は、関心対象の1つ以上のポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドなどの核酸分子を提供する。核酸という用語には、ヌクレオチドのポリマーを含有する任意の化合物および／または物質が含まれる。50%を超えるリボース塩基またはリボヌクレオチド類似体を含むヌクレオチドポリマーは、ポリリボヌクレオチドと称される。ヌクレオチドポリマーは、DNA I 1またはDNA H 5などのタンパク質またはその機能性フラグメントをコードする変化したヌクレオチド使用頻度を使用し得る。操作されたポリヌクレオチドの配列は、例えばDNA、RNA、mRNA転写物、ゲノムDNA、ミトコンドリアDNA、ミトコンドリアRNA、または関心対象の遺伝子の遺伝情報を含む別の適切な核酸に由来し得る。核酸構築物、ベクター、操作されたポリリボヌクレオチドまたは組成物は、変異した遺伝子および多型を保有する核酸に由来し得る。

【 0 0 7 1 】

4つの標準的なリボヌクレオチド、すなわちアデノシン、グアノシン、シチジンおよび

ウリジンに加えて、いくつかの細胞RNAはまた、多くの構造的に多様なリボヌクレオチドを含む。約100種類の構造的に異なるヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体が、転移RNA (tRNA)、リボソームRNA (rRNA)、メッセンジャーRNA (mRNA) および核内低分子RNA (snRNA) において同定されている。tRNAでは、いくつかのヌクレオチドが、アミノアシル化およびコドン認識の特異性および効率の重要な決定因子であり得る。そのような構造的に多様なリボヌクレオチドは、修飾リボヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体であり得る。一部の場合には、本開示のポリヌクレオチドは、リボヌクレオチド類似体を含むように操作される。

【0072】

一部の場合には、核酸構築物、ベクターまたはポリヌクレオチドは、4つの古典的リボヌクレオチドを含むように操作され、被験体に投与された後、転写後修飾され得る。例えば、一部の場合には、本開示は、軸系ダイニン中間鎖1をコードする核酸の30%未満がヌクレオチド類似体である、軸系ダイニン中間鎖1をコードする核酸構築物を含む組成物、ベクターまたは核酸構築物を提供する。別の場合には、軸系ダイニン中間鎖1をコードするヌクレオチドの27.5%未満、25%未満、22.5%未満、20%未満、17.5%未満、15%未満、12.5%未満、10%未満、7.5%未満、5%未満または2.5%未満がヌクレオチド類似体である。

【0073】

本開示のポリヌクレオチドを形成することができる例示的な核酸には、リボ核酸 (RNA)、デオキシリボ核酸 (DNA) またはそれらの雑種が含まれるが、これらに限定されない。本開示のポリヌクレオチドの少なくとも一部分を形成することができる例示的な修飾ヌクレオチドには、プソイドウリジン (Ψ) および1-メチルプソイドウリジン ($m^1\Psi$) が含まれるが、これらに限定されない。

【0074】

化学修飾は、1つ以上のヌクレオシド上または核酸分子の骨格上に位置し得る。それらは、ヌクレオシド上および骨格結合上の両方に位置することができる。修飾は、インビトロでポリヌクレオチドに組み込むことができる。修飾リボヌクレオチドおよび核酸類似体は、古典的リボヌクレオチドの共有結合修飾によって転写後に導入することもできる。

【0075】

本開示の核酸構築物、ベクターまたは操作されたポリリボヌクレオチドは、プリンおよびピリミジン類似体を含み得る。一部の場合には、本開示のポリリボヌクレオチドは、修飾されたウリジンなどの修飾されたピリミジンを含む。一部の場合には、ウリジン類似体は、プソイドウリジン (Ψ)、1-メチルプソイドウリジン ($m^1\Psi$)、2-チオウリジン (s^2U)、5-メチルウリジン (m^5U)、5-メトキシウリジン (mo^5U)、4-チオウリジン (s^4U)、5-ブロモウリジン (Br^5U)、2'-O-メチルウリジン ($U2'm$)、2'-アミノ-2'-デオキシウリジン ($U2'\frac{1}{2}NH_2$)-2'-アジド-2'-デオキシウリジン ($U2'N_3$) および2'-フルオロ-2'-デオキシウリジン ($U2'F$) から選択される。

【0076】

一部の場合には、(1もしくは複数の)核酸構築物、(1もしくは複数の)ベクター、(1もしくは複数の)操作されたポリリボヌクレオチドまたは(1もしくは複数の)組成物は、軸系ダイニン中間鎖1タンパク質またはその変異体を、軸系ダイニン中間鎖1タンパク質またはその変異体をコードするコドンを含まない核酸構築物を含む組成物に曝露された細胞内のレベルと比較して、少なくとも約1.5倍増加したレベルでコードする。一部の場合には、倍数は、少なくとも約1.1、少なくとも約1.2、少なくとも約1.3、少なくとも約1.4、少なくとも約1.5、少なくとも約2、少なくとも約3、少なくとも約4、少なくとも約5、少なくとも約10、少なくとも約20、少なくとも約30、少なくとも約40、少なくとも約50、少なくとも約60、少なくとも約70、少なくとも約80、少なくとも約90または少なくとも約100である。

【0077】

ポリリボヌクレオチドは、同じヌクレオチド類似体もしくは修飾ヌクレオチド、または異なるヌクレオチド類似体もしくは修飾ヌクレオチドの混合物を有し得る。ヌクレオチド類似体または修飾ヌクレオチドは、メッセンジャーRNAにおいて天然に存在するまたは天然には存在しない構造変化を有し得る。様々な類似体または修飾ヌクレオチドの混合物を使用することができる。例えば、ポリヌクレオチド内の1つ以上の類似体は天然の修飾を有することができ、また別の部分はmRNA中に天然では見出されない修飾を有する。さらに、いくつかの類似体または修飾リボヌクレオチドは塩基修飾を有することができ、一方他の修飾リボヌクレオチドは糖修飾を有する。同様に、全ての修飾が塩基修飾であるか、または全ての修飾が糖修飾であるもしくはそれらの任意の適切な混合物であることが可能である。

【0078】

ヌクレオチド類似体または修飾ヌクレオチドは、ピリジン-4-オンリボヌクレオシド、5-アザ-ウリジン、2-チオ-5-アザ-ウリジン、2-チオウリジン、4-チオ-プソイドウリジン、2-チオ-プソイドウリジン、5-ヒドロキシウリジン、3-メチルウリジン、5-カルボキシメチル-ウリジン、1-カルボキシメチル-プソイドウリジン、5-プロピニル-ウリジン、1-プロピニル-プソイドウリジン、5-タウリノメチルウリジン、1-タウリノメチル-プソイドウリジン、5-タウリノメチル-2-チオ-ウリジン、1-タウリノメチル-4-チオ-ウリジン、5-メチル-ウリジン、1-メチル-プソイドウリジン、4-チオ-1-メチル-プソイドウリジン、2-チオ-1-メチル-プソイドウリジン、1-メチル-1-デアザ-プソイドウリジン、2-チオ-1-メチル-1-デアザ-プソイドウリジン、ジヒドロウリジン、ジヒドロプソイドウリジン、2-チオ-ジヒドロウリジン、2-チオ-ジヒドロプソイドウリジン、2-メトキシウリジン、2-メトキシ-4-チオ-ウリジン、4-メトキシ-プソイドウリジン、4-メトキシ-2-チオ-プソイドウリジン、5-アザ-シチジン、プソイドイソシチジン、3-メチル-シチジン、N4-アセチルシチジン、5-ホルミルシチジン、N4-メチルシチジン、5-ヒドロキシメチルシチジン、1-メチル-プソイドイソシチジン、ピロロ-シチジン、ピロロ-プソイドイソシチジン、2-チオ-シチジン、2-チオ-5-メチル-シチジン、4-チオ-プソイドイソシチジン、4-チオ-1-メチル-プソイドイソシチジン、4-チオ-1-メチル-1-デアザ-プソイドイソシチジン、1-メチル-1-デアザ-プソイドイソシチジン、ゼブラリン、5-アザ-ゼブラリン、5-メチル-ゼブラリン、5-アザ-2-チオ-ゼブラリン、2-チオ-ゼブラリン、2-メトキシ-シチジン、2-メトキシ-5-メチル-シチジン、4-メトキシ-プソイドイソシチジン、4-メトキシ-1-メチル-プソイドイソシチジン、2-アミノプリン、2,6-ジアミノプリン、7-デアザ-アデニン、7-デアザ-8-アザ-アデニン、7-デアザ-2-アミノプリン、7-デアザ-8-アザ-2-アミノプリン、7-デアザ-2,6-ジアミノプリン、7-デアザ-8-アザ-2,6-ジアミノプリン、1-メチルアデノシン、N6-メチルアデノシン、N6-イソペンテニルアデノシン、N6-(シス-ヒドロキイソペンテニル)アデノシン、2-メチルチオ-N6-(シス-ヒドロキイソペンテニル)アデノシン、N6-グリシニルカルバモイルアデノシン、N6-トレオニルカルバモイルアデノシン、2-メチルチオ-N6-トレオニルカルバモイルアデノシン、N6,N6-ジメチルアデノシン、7-メチルアデニン、2-メチルチオ-アデニン、2-メトキシ-アデニン、イノシン、1-メチル-イノシン、ワイオシン、ワイプトシン、7-デアザ-グアノシン、7-デアザ-8-アザ-グアノシン、6-チオ-グアノシン、6-チオ-7-デアザ-グアノシン、6-チオ-7-デアザ-8-アザ-グアノシン、7-メチル-グアノシン、6-チオ-7-メチル-グアノシン、7-メチルイノシン、6-メトキシ-グアノシン、1-メチルグアノシン、N2-メチルグアノシン、N2,N2-ジメチルグアノシン、8-オキソ-グアノシン、7-メチル-8-オキソ-グアノシン、1-メチル-6-チオ-グアノシン、N2-メチル-6-チオ-グアノシンおよびN2,N2-ジメチル-6-チオ-グアノシンを含む群から選択され得る。

【0079】

一部の場合には、（１もしくは複数の）核酸構築物、（１もしくは複数の）ベクター、（１もしくは複数の）操作されたポリリボヌクレオチドまたは組成物の少なくとも約５％は、本明細書に記載のヌクレオチドのような天然には存在しない（例えば修飾された、類似体または操作された）ウリジン、アデノシン、グアニンまたはシトシンを含む。一部の場合には、組成物中の修飾ヌクレオチドの１００％が、１－メチルプソイドウリジンまたはプソイドウリジンのいずれかである。一部の場合には、（１もしくは複数の）核酸構築物、（１もしくは複数の）ベクター、（１もしくは複数の）操作されたポリリボヌクレオチドまたは組成物の少なくとも約１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％は、天然には存在しないウラシル、アデニン、グアニンまたはシトシンを含む。一部の場合には、（１もしくは複数の）核酸構築物、（１もしくは複数の）ベクター、（１もしくは複数の）操作されたポリリボヌクレオチドまたは組成物の多くとも約９９％、９５％、９０％、８５％、８０％、７５％、７０％、６５％、６０％、５５％、５０％、４５％、４０％、３５％、３０％、２５％、２０％、１５％、１０％、５％、１％は、天然には存在しないウラシル、アデニン、グアニンまたはシトシンを含む。

【００８０】

本開示の（１もしくは複数の）核酸構築物、（１もしくは複数の）ベクターまたは（１もしくは複数の）操作されたポリリボヌクレオチドは、１つ以上のプロモーター配列および任意の関連する調節配列を含み得る。プロモーター配列および／または関連する調節配列は、任意の数の修飾または非修飾ヌクレオチド、および任意の数の核酸類似体を含み得る。プロモーター配列および／または任意の関連する調節配列は、例えば少なくとも２塩基または塩基対、３塩基または塩基対、４塩基または塩基対、５塩基または塩基対、６塩基または塩基対、７塩基または塩基対、８塩基または塩基対、９塩基または塩基対、１０塩基または塩基対、１１塩基または塩基対、１２塩基または塩基対、１３塩基または塩基対、１４塩基または塩基対、１５塩基または塩基対、１６塩基または塩基対、１７塩基または塩基対、１８塩基または塩基対、１９塩基または塩基対、２０塩基または塩基対、２１塩基または塩基対、２２塩基または塩基対、２３塩基または塩基対、２４塩基または塩基対、２５塩基または塩基対、２６塩基または塩基対、２７塩基または塩基対、２８塩基または塩基対、２９塩基または塩基対、３０塩基または塩基対、３５塩基または塩基対、４０塩基または塩基対、５０塩基または塩基対、７５塩基または塩基対、１００塩基または塩基対、１５０塩基または塩基対、２００塩基または塩基対、３００塩基または塩基対、４００塩基または塩基対、５００塩基または塩基対、６００塩基または塩基対、７００塩基または塩基対、８００塩基または塩基対、９００塩基または塩基対、１０００塩基または塩基対、２０００塩基または塩基対、３０００塩基または塩基対、４０００塩基または塩基対、５０００塩基または塩基対、少なくとも１００００塩基または塩基対以上を含み得る。プロモーター配列および／または関連する調節配列は、任意の数の修飾または非修飾ヌクレオチド、例えば多くとも１００００塩基もしくは塩基対、５０００塩基もしくは塩基対、４０００塩基もしくは塩基対、３０００塩基もしくは塩基対、２０００塩基もしくは塩基対、１０００塩基もしくは塩基対、９００塩基もしくは塩基対、８００塩基もしくは塩基対、７００塩基もしくは塩基対、６００塩基もしくは塩基対、５００塩基もしくは塩基対、４００塩基もしくは塩基対、３００塩基もしくは塩基対、２００塩基もしくは塩基対、１００塩基もしくは塩基対、７５塩基もしくは塩基対、５０塩基もしくは塩基対、４０塩基もしくは塩基対、３５塩基もしくは塩基対、３０塩基もしくは塩基対、２９塩基もしくは塩基対、２８塩基もしくは塩基対、２７塩基もしくは塩基対、２６塩基もしくは塩基対、２５塩基もしくは塩基対、２４塩基もしくは塩基対、２３塩基もしくは塩基対、２２塩基もしくは塩基対、２１塩基もしくは塩基対、２０塩基もしくは塩基対、１９塩基もしくは塩基対、１８塩基もしくは塩基対、１７塩基もしくは塩基対、１６塩基もしくは塩基対、１５塩基もしくは塩基対、１４塩基もしくは塩基対、１３塩基もしくは塩基対、１２塩基もしくは塩基対、１１塩基もしくは塩基対、１０塩基もしくは塩基対、９塩基もしくは塩基対、８塩基もしくは塩基対、７塩基もしくは塩基対、６塩基もしくは塩基

10

20

30

40

50

対、5塩基もしくは塩基対、4塩基もしくは塩基対、3塩基もしくは塩基対、または2塩基もしくは塩基対を含み得る。

【0081】

一部の場合には、プロモーター配列または関連する調節領域中のヌクレオチドの全てよりも少ないヌクレオチドが、ヌクレオチド類似体または修飾ヌクレオチドである。例えば、一部の場合には、プロモーターまたは関連調節領域中のヌクレオチドの99%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%または5%以下。一部の場合には、プロモーターまたは関連調節領域中のヌクレオチドの全てが核酸類似体または修飾ヌクレオチドである。

10

【0082】

本開示の(1もしくは複数の)核酸構築物、(1もしくは複数の)ベクター、(1もしくは複数の)操作されたポリリボヌクレオチドまたは組成物は、操作された5'キャップ構造を含み得るか、または5'キャップが細胞内でポリリボヌクレオチドに付加され得る。mRNAの5'キャップ構造は、mRNAキャップ結合タンパク質(CBP)への結合に関与することができ、成熟擬似環状mRNA種を形成するためにCBPとポリ(A)結合タンパク質との結合を介して細胞におけるmRNAの安定性および翻訳能力の一因となる。5'キャップ構造はまた、核輸送、mRNA安定性の増加、およびmRNAスプライシングの間の5'近位イントロンの除去を助けることにも関与し得る。

【0083】

20

(1もしくは複数の)核酸構築物、(1もしくは複数の)ベクターまたは(1もしくは複数の)操作されたポリリボヌクレオチドは、5'末端でキャップされ得、mRNA分子の末端グアノシンキャップ残基と5'末端の転写されたセンスヌクレオチドとの間に5'-GpppN-3'-三リン酸結合を生成する。キャップ構造は、5'-5'三リン酸架橋を介して第1のヌクレオチドに連結された修飾または非修飾7-メチルグアノシンを含み得る。次いで、この5'-グアニル酸キャップは、メチル化されてN7-メチルグアニル酸残基(キャップ0構造)を生成することができる。mRNAの5'末端の末端および/または末端前の転写されたヌクレオチドのリボース糖は、2'-O-メチル化されていてもよい(キャップ1構造)。グアニル酸塩キャップ構造の加水分解および切断による5'キャップ除去は、分解のためにmRNA分子などの核酸分子を標的とし得る。

30

【0084】

一部の場合には、キャップは、mRNAの5'末端の最初の2つのリボース糖の2'ヒドロキシ基のメチル化を含む、さらなる修飾を含み得る。例えば、真核生物のキャップ1は、第1のリボース糖上にメチル化された2'-ヒドロキシ基を有し、一方キャップ2は、最初の2つのリボース糖上にメチル化された2'-ヒドロキシ基を有する。5'キャップは、RNA分子の3'末端と化学的に類似し得る(キャップリボースの5'炭素が結合し、ならびにキャップされた転写物の5'および3'の両末端の遊離3'-ヒドロキシル。そのような二重修飾は、5'エキソヌクレアーゼに対する顕著な耐性を提供し得る。操作されたポリリボヌクレオチドと共に使用できる5'キャップ構造の非限定的な例には、m⁷G(5')ppp(5')N('キャップ0)、m⁷G(5')ppp(5')N1mpNp('キャップ1)およびm⁷G(5')ppp(5')N1mpN2mp('キャップ2)が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0085】

本開示の修飾mRNAに対する修飾は、キャップ除去を防止する非加水分解性キャップ構造を生成し、それにより、効率的な翻訳を促進しながらmRNAの半減期を増加させ得る。キャップ構造の加水分解は5'-ppp-5'三リン酸結合の切断を必要とするので、修飾されたヌクレオチドをキャッピング反応の間に使用し得る。例えば、New England Biolabs(Ipswich, MA)のワクシニアキャッピング酵素を製造業者の指示に従ってグアノシンα-チオリン酸ヌクレオチドと共に使用して、5'-ppp-5'キャップにおけるホスホロチオエート結合を作製し得る。α-メチルホスホン酸お

50

よびセレノリン酸ヌクレオチドなどのさらなる修飾グアノシンヌクレオチドを使用し得る。さらなる修飾には、糖環の2'-ヒドロキシル基上のmRNAの5'末端および／または5'末端前ヌクレオチドのリボース糖の2'-O-メチル化が含まれるが、これに限定されない。複数の異なる5'キャップ構造を用いてポリリボヌクレオチドの5'キャップを生成することができる。

【0086】

修飾mRNAは、転写後にキャップされ得る。本開示によれば、5'末端キャップは、内因性キャップまたはキャップ類似体を含み得る。本開示によれば、5'末端キャップはグアニン類似体を含み得る。有用なグアニン類似体には、イノシン、N1-メチルグアノシン、2'-フルオログアノシン、7-デアザグアノシン、8-オキソグアノシン、2-アミノグアノシン、LNA-グアノシンおよび2-アジドグアノシンが含まれるが、これらに限定されない。

【0087】

さらに、(1もしくは複数の)核酸構築物、(1もしくは複数の)ベクターまたは(1もしくは複数の)操作されたポリリボヌクレオチドは、1つ以上の内部リボソーム進入部位(IRES)を含み得る。IRES配列は、5'キャップ構造の不在下でタンパク質合成を開始することができる。IRES配列はまた、唯一のリボソーム結合部位であり得るか、またはmRNAの複数のリボソーム結合部位の1つとして機能し得る。2つ以上の機能性リボソーム結合部位を含む操作されたポリリボヌクレオチドは、リボソームによって翻訳されるいくつかのペプチドまたはポリペプチド(「ポリシストロン性またはマルチシストロン性ポリヌクレオチド」)をコードし得る。本明細書に記載の操作されたポリヌクレオチドは、少なくとも1つのIRES配列、2つのIRES配列、3つのIRES配列、4つのIRES配列、5つのIRES配列、6つのIRES配列、7つのIRES配列、8つのIRES配列、9つのIRES配列、10のIRES配列を含み得るか、または別の適切な数が、操作されたポリリボヌクレオチド中に存在する。本開示に従って使用できるIRES配列の例には、限定されることなく、タバコエッチウイルス(tobacco etch virus)(TEV)、ピコルナウイルス(picornaviruses)(例えばFMDV)、ペストウイルス(pest viruses)(CFFV)、ポリオウイルス(polio viruses)(PV)、脳筋炎ウイルス(encephalomyocarditis viruses)(EMCV)、口蹄疫ウイルス(foot-and-mouth disease viruses)(FMDV)、C型肝炎ウイルス(hepatitis C viruses)(HCV)、古典的ブタコレラウイルス(classical swine fever viruses)(CSFV)、マウス白血病ウイルス(murine leukemia virus(MLV)、サル免疫不全ウイルス(simian immune deficiency viruses)(SIV)またはコオロギ麻痺ウイルス(cricket paralysis viruses)(CrPV)由来のものが含まれる。IRES配列は、例えばClontech(商標)、GeneCopoeia(商標)またはSigma-Aldrich(商標)から入手可能なIRES配列などの市販のベクターから誘導することができる。IRES配列は、例えば少なくとも150塩基もしくは塩基対、200塩基もしくは塩基対、300塩基もしくは塩基対、400塩基もしくは塩基対、500塩基もしくは塩基対、600塩基もしくは塩基対、700塩基もしくは塩基対、800塩基もしくは塩基対、900塩基もしくは塩基対、1000塩基もしくは塩基対、2000塩基もしくは塩基対、3000塩基もしくは塩基対、4000塩基もしくは塩基対、5000塩基もしくは塩基対、または10000塩基もしくは塩基対であり得る。IRES配列は、多くとも10000塩基もしくは塩基対、5000塩基もしくは塩基対、4000塩基もしくは塩基対、3000塩基もしくは塩基対、2000塩基もしくは塩基対、1000塩基もしくは塩基対、900塩基もしくは塩基対、800塩基もしくは塩基対、700塩基もしくは塩基対、600塩基もしくは塩基対、500塩基もしくは塩基対、400塩基もしくは塩基対、300塩基もしくは塩基対、200塩基もしくは塩基対、100塩基もしくは塩基対、50塩基も

10

20

30

40

50

しくは塩基対、または10塩基もしくは塩基対であり得る。

【0088】

本開示の（1もしくは複数の）核酸構築物、（1もしくは複数の）ベクターまたは（1もしくは複数の）操作されたポリリボヌクレオチドは、1つ以上の非翻訳領域を含み得る。非翻訳領域は、任意の数の修飾または非修飾ヌクレオチドを含み得る。遺伝子の非翻訳領域（UTR）は、ポリペプチドに転写されるが翻訳されない。一部の場合には、非翻訳配列は、核酸分子の安定性および翻訳の効率を高めることができる。UTRの調節特徴は、例えば分子の安定性を高めるために、本開示の修飾mRNA分子に組み込むことができる。特定の特徴は、それらが望ましくない器官部位に誤って差し向けられた場合に、転写物の制御された下方調節を確実にするために組み込むこともできる。一部の5'UTRは翻訳開始において役割を果たす。5'UTRは、リボソームが多くの遺伝子の翻訳を開始する工程に関与するコザック配列を含み得る。コザック配列は、コンセンサスGCC(R)CCAUGGを有することができ、Rは、開始コドン(AUG)の3塩基上流に位置するプリン(アデニンまたはグアニン)である。5'UTRは、翻訳伸長因子の結合に関与する二次構造を形成し得る。一部の場合には、特定の標的器官の豊富に発現される遺伝子に典型的に見出される特徴を操作することによって、本開示の操作されたポリヌクレオチド分子の安定性およびタンパク質産生を増加させることができる。例えば、アルブミン、血清アミロイドA、アポリポタンパク質A/B/E、トランスフェリン、αフェトプロテイン、エリスロポエチンまたは第VIEI因子などの肝臓で発現されるmRNAの5'UTRの導入は、肝臓における操作されたポリヌクレオチドの発現を増加させるために用いることができる。同様に、筋タンパク質(MyoD、ミオシン、ミオグロビン、ミオゲニン、ハークュリン)からの5'UTRの、内皮細胞(Tie-1、CD36)、骨髄細胞(C/EBP、AML1、G-CSF、GM-CSF、CD11b、MSR、Fr-1、i-NOS)、白血球(CD45、CD18)、脂肪組織(CD36、GLUT4、ACRP30、アディポネクチン)および肺上皮細胞(SPA/B/C/D)のための使用を、所望の細胞または組織における操作されたポリヌクレオチドの発現を増加させるために用いることができる。

【0089】

他の非UTR配列を、本開示のポリリボヌクレオチドの5'（または3'UTR）UTRに組み込むことができる。5'および/または3'UTRは、ポリリボヌクレオチドの安定性および/または翻訳効率を提供することができる。例えば、イントロンまたはイントロン配列の一部を、操作されたポリリボヌクレオチドの隣接領域に組み込むことができる。イントロン配列の組み込みも、ポリリボヌクレオチドの翻訳速度を高めることができる。

【0090】

3'UTRは、その中に埋め込まれた一続きのアデノシンおよびウリジンを含み得る。これらのAUリッチングネチャーは、代謝回転速度の高い遺伝子において特に広く認められる。AUリッチエレメント(ARE)は、それらの配列特徴および機能特性に基づき、クラスに分類することができる：クラスI AREは、Uリッチ領域内にAUUUAモチーフのいくつかの分散したコピーを含む。C-MycおよびMyoDはクラスI AREを含む。クラスII AREは、2つ以上の重複するUUAUUUA(U/A)(U/A)ノナマーを有する。このタイプのAREを含有する分子には、GM-CSFおよびTNF-αが含まれる。クラスIIIのAREはあまり明確には定義されていない。これらのUリッチ領域は、AUUUAモチーフを含まない。c-Junおよびミオゲニンは、このクラスの2つのよく研究された例である。AREに結合するタンパク質はメッセンジャーを不安定化し得るが、HuRなどのELAVファミリーのメンバーはmRNAの安定性を高め得る。HuRは、3つのクラス全てのAREに結合し得る。HuR特異的結合部位を操作によって核酸分子の3'UTRに組み込むことにより、HuR結合、したがってインビボでのメッセージの安定化をもたらすことができる。

【0091】

3'UTRのAUリッチエレメント(ARE)の操作は、操作されたポリリボヌクレオチ

10

20

30

40

50

ドの安定性を調節するために使用することができる。A R E の 1 つ以上のコピーを操作によってポリリボヌクレオチドに導入し、ポリリボヌクレオチドの安定性を調節することができる。A R E は、細胞内の安定性を高め、それによって得られるタンパク質の翻訳および産生を増加させるために同定する、除去するまたは変異させることができる。トランスフェクション実験は、操作されたポリリボヌクレオチドを用いて、関連する細胞株において実施することができ、タンパク質産生をトランスフェクション後の様々な時点でアッセイすることができる。例えば、種々の A R E 操作分子で細胞をトランスフェクトすることができ、関連するタンパク質に対して E L I S A キットを用いて、トランスフェクション後 6 時間、12 時間、24 時間、48 時間および 7 日目に産生されたタンパク質をアッセイすることができる。

【0092】

非翻訳領域は任意の数のヌクレオチドを含み得る。非翻訳領域は、約 1 ～ 約 10 塩基もしくは塩基対、約 10 ～ 約 20 塩基もしくは塩基対、約 20 ～ 約 50 塩基もしくは塩基対、約 50 ～ 約 100 塩基もしくは塩基対、約 100 ～ 約 500 塩基もしくは塩基対、約 500 ～ 約 1000 塩基もしくは塩基対、約 1000 ～ 約 2000 塩基もしくは塩基対、約 2000 ～ 約 3000 塩基もしくは塩基対、約 3000 ～ 約 4000 塩基もしくは塩基対、約 4000 ～ 約 5000 塩基もしくは塩基対、約 5000 ～ 約 6000 塩基もしくは塩基対、約 6000 ～ 約 7000 塩基もしくは塩基対、約 7000 ～ 約 8000 塩基もしくは塩基対、約 8000 ～ 約 9000 塩基もしくは塩基対、または約 9000 ～ 約 10000 塩基もしくは塩基対の長さを含み得る。非翻訳領域は、例えば少なくとも 1 塩基もしくは塩基対、2 塩基もしくは塩基対、3 塩基もしくは塩基対、4 塩基もしくは塩基対、5 塩基もしくは塩基対、6 塩基もしくは塩基対、7 塩基もしくは塩基対、8 塩基もしくは塩基対、9 塩基もしくは塩基対、10 塩基もしくは塩基対、20 塩基もしくは塩基対、30 塩基もしくは塩基対、40 塩基もしくは塩基対、50 塩基もしくは塩基対、60 塩基もしくは塩基対、70 塩基もしくは塩基対、80 塩基もしくは塩基対、90 塩基もしくは塩基対、100 塩基もしくは塩基対、200 塩基もしくは塩基対、300 塩基もしくは塩基対、400 塩基もしくは塩基対、500 塩基もしくは塩基対、600 塩基もしくは塩基対、700 塩基もしくは塩基対、800 塩基もしくは塩基対、900 塩基もしくは塩基対、1000 塩基もしくは塩基対、2000 塩基もしくは塩基対、3000 塩基もしくは塩基対、4000 塩基もしくは塩基対、5000 塩基もしくは塩基対、6000 塩基もしくは塩基対、7000 塩基もしくは塩基対、8000 塩基もしくは塩基対、9000 塩基もしくは塩基対、または 10000 塩基もしくは塩基対の長さを含み得る。

【0093】

本開示の操作されたポリリボヌクレオチドは、1 つ以上のイントロンを含み得る。イントロンは、任意の数の修飾または非修飾ヌクレオチドを含み得る。イントロンは、例えば少なくとも 1 塩基もしくは塩基対、50 塩基もしくは塩基対、100 塩基もしくは塩基対、150 塩基もしくは塩基対、200 塩基もしくは塩基対、300 塩基もしくは塩基対、400 塩基もしくは塩基対、500 塩基もしくは塩基対、600 塩基もしくは塩基対、700 塩基もしくは塩基対、800 塩基もしくは塩基対、900 塩基もしくは塩基対、1000 塩基もしくは塩基対、2000 塩基もしくは塩基対、3000 塩基もしくは塩基対、4000 塩基もしくは塩基対、または 5000 塩基もしくは塩基対を含み得る。一部の場合には、イントロンは、例えば多くとも 10000 塩基もしくは塩基対、5000 塩基もしくは塩基対、4000 塩基もしくは塩基対、3000 塩基もしくは塩基対、2000 塩基もしくは塩基対、1000 塩基もしくは塩基対、900 塩基もしくは塩基対、800 塩基もしくは塩基対、700 塩基もしくは塩基対、600 塩基もしくは塩基対、500 塩基もしくは塩基対、400 塩基もしくは塩基対、300 塩基もしくは塩基対、200 塩基もしくは塩基対、または 100 塩基もしくは塩基対を含み得る。

【0094】

一部の場合には、イントロン中のある割合のヌクレオチドが修飾されている。例えば、一部の場合には、イントロン中のヌクレオチドの 99 %、95 %、90 %、85 %、80

10

20

30

40

50

%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%または1%未満が修飾されている。一部の場合には、イントロン中のヌクレオチドの全てが修飾されている。

【0095】

本開示の操作されたポリリボヌクレオチドは、ポリA配列を含み得る。ポリA配列（例えばポリA尾部）は、任意の数のヌクレオチドを含み得る。ポリA配列は、約1～約10塩基もしくは塩基対、約10～約20塩基もしくは塩基対、約20～約50塩基もしくは塩基対、約50～約100塩基もしくは塩基対、約100～約500塩基もしくは塩基対、約500～約1000塩基もしくは塩基対、約1000～約2000塩基もしくは塩基対、約2000～約3000塩基もしくは塩基対、約3000～約4000塩基もしくは塩基対、約4000～約5000塩基もしくは塩基対、約5000～約6000塩基もしくは塩基対、約6000～約7000塩基もしくは塩基対、約7000～約8000塩基もしくは塩基対、約8000～約9000塩基もしくは塩基対、または約9000～約10000塩基もしくは塩基対の長さを含み得る。一部の例では、ポリA配列は、少なくとも約100、110、120、130、140、150、160、170、180、190または200ヌクレオチド長である。ポリA配列は、例えば少なくとも1塩基もしくは塩基対、2塩基もしくは塩基対、3塩基もしくは塩基対、4塩基もしくは塩基対、5塩基もしくは塩基対、6塩基もしくは塩基対、7塩基もしくは塩基対、8塩基もしくは塩基対、9塩基もしくは塩基対、10塩基もしくは塩基対、20塩基もしくは塩基対、30塩基もしくは塩基対、40塩基もしくは塩基対、50塩基もしくは塩基対、60塩基もしくは塩基対、70塩基もしくは塩基対、80塩基もしくは塩基対、90塩基もしくは塩基対、100塩基もしくは塩基対、200塩基もしくは塩基対、300塩基もしくは塩基対、400塩基もしくは塩基対、500塩基もしくは塩基対、600塩基もしくは塩基対、700塩基もしくは塩基対、800塩基もしくは塩基対、900塩基もしくは塩基対、1000塩基もしくは塩基対、2000塩基もしくは塩基対、3000塩基もしくは塩基対、4000塩基もしくは塩基対、5000塩基もしくは塩基対、6000塩基もしくは塩基対、7000塩基もしくは塩基対、8000塩基もしくは塩基対、9000塩基もしくは塩基対、または10000塩基もしくは塩基対の長さを含み得る。ポリA配列は、多くとも100塩基もしくは塩基対、90塩基もしくは塩基対、80塩基もしくは塩基対、70塩基もしくは塩基対、60塩基もしくは塩基対、50塩基もしくは塩基対、40塩基もしくは塩基対、30塩基もしくは塩基対、20塩基もしくは塩基対、10塩基もしくは塩基対、または5塩基もしくは塩基対の長さを含み得る。

【0096】

一部の場合には、ポリA配列中のある割合のヌクレオチドが修飾されている。例えば、一部の場合には、ポリA配列中のヌクレオチドの99%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%または1%未満が修飾されている。一部の場合には、ポリA中のヌクレオチドの全てが修飾されている。

【0097】

リンカー配列は、任意の数のヌクレオチドを含み得る。リンカーは、N-3またはC-5位置で修飾ヌクレオ塩基に結合され得る。ヌクレオ塩基に結合されるリンカーは、ジエチレングリコール、ジプロピレングリコール、トリエチレングリコール、トリプロピレングリコール、テトラエチレングリコール、テトラプロピレングリコール、二価アルキル、アルケニル、アルキニル部分、エステル、アミドまたはエーテル部分であり得る。リンカー配列は、約1～約10塩基もしくは塩基対、約10～約20塩基もしくは塩基対、約20～約50塩基もしくは塩基対、約50～約100塩基もしくは塩基対、約100～約500塩基もしくは塩基対、約500～約1000塩基もしくは塩基対、約1000～約2000塩基もしくは塩基対、約2000～約3000塩基もしくは塩基対、約3000～約4000塩基もしくは塩基対、約4000～約5000塩基もしくは塩基対、約5000～約6000塩基もしくは塩基対、約6000～約7000塩基もしくは塩基対、約70

00～約8000塩基もしくは塩基対、約8000～約9000塩基もしくは塩基対、または約9000～約10000塩基もしくは塩基対の長さを含み得る。リンカー配列は、例えば少なくとも1塩基もしくは塩基対、2塩基もしくは塩基対、3塩基もしくは塩基対、4塩基もしくは塩基対、5塩基もしくは塩基対、6塩基もしくは塩基対、7塩基もしくは塩基対、8塩基もしくは塩基対、9塩基もしくは塩基対、10塩基もしくは塩基対、20塩基もしくは塩基対、30塩基もしくは塩基対、40塩基もしくは塩基対、50塩基もしくは塩基対、60塩基もしくは塩基対、70塩基もしくは塩基対、80塩基もしくは塩基対、90塩基もしくは塩基対、100塩基もしくは塩基対、200塩基もしくは塩基対、300塩基もしくは塩基対、400塩基もしくは塩基対、500塩基もしくは塩基対、600塩基もしくは塩基対、700塩基もしくは塩基対、800塩基もしくは塩基対、900塩基もしくは塩基対、1000塩基もしくは塩基対、2000塩基もしくは塩基対、3000塩基もしくは塩基対、4000塩基もしくは塩基対、5000塩基もしくは塩基対、6000塩基もしくは塩基対、7000塩基もしくは塩基対、8000塩基もしくは塩基対、9000塩基もしくは塩基対、または少なくとも10000塩基もしくは塩基対の長さを含み得る。多くとも10000塩基もしくは塩基対、5000塩基もしくは塩基対、4000塩基もしくは塩基対、3000塩基もしくは塩基対、2000塩基もしくは塩基対、1000塩基もしくは塩基対、900塩基もしくは塩基対、800塩基もしくは塩基対、700塩基もしくは塩基対、600塩基もしくは塩基対、500塩基もしくは塩基対、400塩基もしくは塩基対、300塩基もしくは塩基対、200塩基もしくは塩基対、または100塩基もしくは塩基対の長さのリンカー。

【0098】

一部の場合には、リンカー配列中のある割合のヌクレオチドが修飾されている。例えば、一部の場合には、リンカー配列中のヌクレオチドの99%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%または1%未満が修飾されている。一部の場合には、リンカー配列中のヌクレオチドの全てが修飾されている。

【0099】

一部の場合には、(1もしくは複数の)核酸構築物、(1もしくは複数の)ベクターまたは(1もしくは複数の)操作されたポリリボヌクレオチドは、3'非翻訳領域(UTR)の前に少なくとも1つの終止コドンを含み得る。一部の場合には、(1もしくは複数の)核酸構築物、(1もしくは複数の)ベクターまたは(1もしくは複数の)操作されたポリリボヌクレオチドは、複数の終止コドンを含む。終止コドンは、TGA、TAAおよびTAGから選択され得る。終止コドンは、修飾されていてもよく、修飾されていなくてもよい。一部の場合には、(1もしくは複数の)核酸構築物、(1もしくは複数の)ベクターまたは(1もしくは複数の)操作されたポリリボヌクレオチドは、終止コドンTGAおよび1つのさらなる終止コドンを含む。一部の場合には、(1もしくは複数の)核酸構築物、(1もしくは複数の)ベクターまたは(1もしくは複数の)操作されたポリリボヌクレオチドは、TAA終止コドンの付加を含む。

【0100】

コードされるポリペプチド

一部の場合には、本開示は、原発性繊毛機能不全症を有しているまたは有する危険性がある被験体を治療する方法であって、軸系ダイニン中間鎖1タンパク質(DNAI1)、アルマジロリピート含有4(ARMC4)、21番染色体オープンリーディングフレーム59(C21orf59)、コイルドコイルドメイン含有103(CCDC103)、コイルドコイルドメイン含有114(CCDC114)、コイルドコイルドメイン含有39(CCDC39)、コイルドコイルドメイン含有40(CCDC40)、コイルドコイルドメイン含有65(CCDC65)、ダイニン(軸系)アセンブリ因子1(DNAAF1)、ダイニン(軸系)アセンブリ因子2(DNAAF2)、ダイニン(軸系)アセンブリ因子3(DNAAF3)、ダイニン(軸系)アセンブリ因子5(DNAAF5)、軸系ダイニン重鎖11(DNAH11)、軸系ダイニン重鎖5(DNAH5)、軸系ダイニン重

鎖 8 (DNAH8)、軸系ダイニン中間鎖 2 (DNAI2)、軸系ダイニン軽鎖 1 (DNAI1)、ダイニン調節複合体サブユニット 1 (DRC1)、失読症感受性 1 候補物 1 (DYX1C1)、軸系中心対装置タンパク質 (HYDIN)、ロイシンリッチリピート含有 6 (LRRC6)、NME/NM23 ファミリーメンバー 8 (NME8)、口・顔・指症候群 1 (OFD1)、網膜色素変性症 GTP アーゼ調節因子 (RPGR)、ラジアルスポークヘッド 1 ホモログ (クラミドモナス) (RSPH1)、ラジアルスポークヘッド 4 ホモログ A (クラミドモナス) (RSPH4A)、ラジアルスポークヘッド 9 ホモログ (クラミドモナス) (RSPH9)、精子関連抗原 1 (SPAG1) およびジンクフィンガー-MYND 型含有 10 (ZMYND10)、または前記のいずれかの変異体をコードする核酸構築物を含む組成物を被験体に投与することを含み、この核酸構築物が、被験体の細胞内での (1 または複数の) 前記タンパク質またはその変異体の異種発現または増強された発現を提供するコドンを含み、それによって原発性纖毛機能不全症を有しているまたは有する危険性がある被験体を治療する方法を提供する。

【0101】

コードされるポリペプチドは、アミド結合 (ペプチド結合) を介して一緒に連結されたアミノ酸残基モノマーからなるポリマー鎖である。アミノ酸は、L-光学異性体、D-光学異性体またはそれらの組み合わせであり得る。ポリペプチドは、少なくとも 3 つのアミノ酸の鎖、ペプチドミメティック、タンパク質、組換えタンパク質、抗体 (モノクローナルまたはポリクローナル)、抗原、エピトープ、酵素、受容体、ビタミンまたは構造類似体またはそれらの組み合わせであり得る。被験体の体内で翻訳されたポリリボヌクレオチドは、被験体の細胞内、組織内または多くの細胞および組織にわたって、特定のペプチドまたはタンパク質の十分な供給をもたらす得る。一部の場合には、ポリリボヌクレオチドは、(1 もしくは複数の) 特定の標的細胞型または標的組織の細胞質ゾル内でインビボで翻訳され得る。一部の場合には、ポリリボヌクレオチドをインビボで翻訳して、その遺伝子が原発性纖毛機能不全症に関連するタンパク質、その機能性フラグメント、またはヒト DNAI1 もしくはヒト DNAH5 タンパク質と少なくとも 70% 相同であるタンパク質を提供することができる。一部の場合には、ポリリボヌクレオチドは、様々な非標的細胞型または (1 もしくは複数の) 標的組織においてインビボで翻訳され得る。標的細胞または非標的細胞である細胞の非限定的な例には、a) 皮膚細胞、例えばケラチノサイト、メラノサイト、尿路上皮細胞; b) 神経細胞、例えばニューロン、シュワン細胞、乏突起膠細胞、星状細胞; c) 肝細胞、例えば肝実質細胞; d) 腸細胞、例えば杯細胞、腸細胞; e) 血球、例えばリンパ系細胞または骨髄細胞; ならびに f) 生殖細胞、例えば精子および卵が含まれる。組織の非限定的な例には、結合組織、筋肉組織、神経組織または上皮組織が含まれる。一部の場合には、標的細胞または標的組織は、癌性細胞、組織または器官である。

【0102】

ポリヌクレオチド配列は、1 つ以上の種に由来し得る。例えば、ポリヌクレオチド配列は、ヒト (ホモ・サピエンス (*Homo sapiens*))、マウス (例えば *Mus musculus*)、ラット (例えば *Rattus norvegicus*) もしくは *Rattus rattus*)、微生物 (例えば *Chlamydomonas* 属) または任意の他の適切な生物に由来し得る。ポリヌクレオチド配列は、1 つ以上の種の配列のキメラの組み合わせであり得る。

【0103】

一部の場合には、内因性翻訳機構は、コードされるペプチドに翻訳後修飾を加えることができる。翻訳後修飾には、膜局在化のためのポリペプチドを標的とすることができる疎水性基の付加、酵素活性の増加のための補因子の付加、またはより小さな化学基の付加が含まれ得る。コードされるポリペプチドはまた、他のペプチドまたはタンパク質部分の付加を受けるように翻訳後修飾され得る。例えば、ユビキチン化は、ユビキチンとコードされるポリペプチドとの共有結合をもたらすことができ、SUMO 化は、SUMO (低分子

10

20

30

40

50

ユビキチン関連修飾因子 (Small Ubiquitin-related Modifier)) とコードされるポリペプチドとの共有結合をもたらすことができ、ISG化はISG15 (インターフェロン刺激遺伝子15 (Interferon-Stimulated Gene 15)) の共有結合をもたらす得る。

【0104】

一部の場合には、コードされるポリペプチドは、他のタイプの構造変化を受けるように翻訳後修飾され得る。例えば、コードされるポリペプチドは、タンパク質分解的に切断され得、1つ以上のタンパク質分解フラグメントは、細胞内経路の活性を調節することができる。コードされるポリペプチドは、細胞内で折りたたまれ得る。一部の場合には、コードされるポリペプチドは、補因子および分子シャペロンの存在下で折りたたまれる。折りたたまれたポリペプチドは、二次構造および三次構造を有することができる。折りたたまれたポリペプチドは、他の折りたたまれたペプチドと結合して四次構造を形成することができる。折りたたまれたペプチドは、四量体四次構造を有する抗体分子などの機能性マルチサブユニット複合体を形成することができる。抗体のクラスまたはアイソタイプを形成する様々なポリペプチドをポリリボヌクレオチドから発現させることができる。

【0105】

コードされるポリペプチドは、コードされるアミノ酸の化学的性質を変化させるように翻訳後修飾され得る。例えば、コードされるポリペプチドは、アルギニンのシトルリンへの変換である、翻訳後シトルリン化または脱イミノ化を受けることができる。コードされるポリペプチドは、グルタミンのグルタミン酸への変換またはアスパラギンのアスパラギン酸への変換である、翻訳後脱アミド化を受けることができる。コードされるポリペプチドは、脱離、すなわちホスホトレオニンおよびホスホセリンのβ脱離、またはトレオニンおよびセリンの脱水ならびにシステインの脱カルボキシル化によるアルケンの変換を受けることができる。コードされるペプチドはまた、リシンのホモシトルリンへの変換であるカルバミル化を受けることもできる。コードされるペプチドは、ラセミ化、例えばプロリルイソメラーゼによるプロリンのラセミ化またはプロテイン-セリンエピメラーゼによるセリンのラセミ化を受けることもできる。一部の場合には、コードされるペプチドは、セリン、トレオニンおよびチロシンのリン酸化を受けることができる。

【0106】

ポリリボヌクレオチドによってコードされる分子によって、複数の生体分子の活性を調節することができる。コードされるポリヌクレオチドによって活性を調節することができる分子の非限定的な例には、アミノ酸、ペプチド、ペプチドミメティック、タンパク質、組換えタンパク質、抗体 (モノクローナルまたはポリクローナル)、抗体フラグメント、抗原、エピトープ、炭水化物、脂質、脂肪酸、酵素、天然産物、核酸 (DNA、RNA、ヌクレオシド、ヌクレオチド、構造類似体またはそれらの組み合わせを含む)、栄養素、受容体およびビタミンが含まれる。

【0107】

本開示のポリヌクレオチドの一部であり得るヌクレオチド配列の非限定的な例を表3に開示する。

【表3】

表 3	
名称	配列
軸系ダイニン中間鎖 1(DNAI1)	配列番号 14~16
軸系ダイニン重鎖 5(DNAH5)	配列番号 17~18

【0108】

ポリペプチド配列は、配列番号15~16の変化したコドン使用頻度または配列番号17~18の変化したコドン使用法などの、所望の変化したコドン使用を有するように操作

され得る。例えば、コンピュータソフトウェアを使用して、配列番号14のコドン使用頻度を生じさせることができる。ポリペプチド配列は、内因性ポリペプチドのアミノ酸配列と%相同性を共有することができる。ポリペプチド配列は、内因性ポリペプチドのアミノ酸配列と多くとも10%の相同性、多くとも20%の相同性、多くとも30%の相同性、多くとも40%の相同性、多くとも50%の相同性、多くとも60%の相同性、多くとも70%の相同性、多くとも80%の相同性、多くとも90%相同性、または多くとも99%の相同性を共有し得る。NCBI BLAST、Clustal W、MAFFT、Clustal Omega、AlignMe、Pralineまたは別の適切な方法またはアルゴリズムなどの、様々な方法およびソフトウェアプログラムを使用して、2つ以上のペプチド間の相同性を決定することができる。

10

【0109】

免疫原性

様々なサイズの分子（ポリヌクレオチド、タンパク質または酵素）を含む組成物を含有する多くの薬剤は、被験体に投与された場合、免疫応答を引き起こし得る。多くの場合、免疫系は組成物を異物として認識し、その薬学的作用を中和する。本開示のポリリボヌクレオチドおよび組成物は、低い免疫原性を有し得るかまたは非免疫原性であり得、それにより免疫系による小さな応答を誘発するかまたは全く免疫応答を誘発しない。

【0110】

免疫原性は、例えばTNF- α およびIL-8レベルならびにTLR-3、TLR-7、TLR-8およびヘリカーゼRIG-1への結合能の測定によっても決定することができる。ポリリボヌクレオチドが所望の低い免疫原性を有するかどうかを確認するために、ポリリボヌクレオチドの被験体への投与後に1つ以上の因子の量を測定することができる。ポリペプチドの免疫原性は、被験体へのポリペプチドの投与の際の白血球数の増加に関連して決定することができる。一部の場合には、被験体への組成物の投与の際に、被験体は、90%未満、80%未満、70%未満、60%未満、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、または10%未満の白血球の数の増加を示す。本開示のポリリボヌクレオチドは、最小限のまたは有意でない炎症反応または免疫学的反応を誘発し得る。

20

【0111】

ポリリボヌクレオチドの免疫原性を決定するために、様々な方法を用いることができる。非常に適切な方法は、ポリリボヌクレオチドの投与に対する反応としての、細胞中の炎症マーカーの測定または単純な白血球数の測定である。そのような方法を実施例に記載する。例えばTNF- α 、IFN- α 、IFN- β 、IP-10、IL-8、IL-6および／またはIL-12などの炎症に関連するサイトカインを測定することができる。樹状細胞活性化マーカーの発現も、免疫原性の評価に使用することができる。免疫学的反応のさらなる指標は、Toll様受容体TLR-3、TLR-7およびTLR-8ならびにヘリカーゼRIG-1への結合の検出であり得る。

30

【0112】

ポリリボヌクレオチドの免疫原性は、ポリリボヌクレオチドの投与前のレベルと比較して、炎症マーカーまたは白血球数のレベルの全体的な増加として測定することができる。例えば、修飾されていないまたは修飾されている操作されたポリリボヌクレオチドを細胞または被験体に投与することができ、ポリリボヌクレオチドの投与に対する反応として規定された時間間隔での炎症マーカーの分泌を測定することができる。

40

【0113】

組成物

一部の場合には、本開示は、軸系ダイニン中間鎖1をコードする核酸構築物を含む組成物を提供し、この核酸構築物は、軸系ダイニン中間鎖1をコードする相補的デオキシリボ核酸を含み、組成物は、被験体への投与のために製剤化される。一部の場合には、本開示は、軸系ダイニン中間鎖1をコードする核酸構築物を含む組成物を提供し、この核酸構築物は、原発性纖毛機能不全症を有しているまたは有する危険性がある被験体の細胞内での軸系ダイニン中間鎖1タンパク質またはその変異体の異種発現または増強された発現を提

50

供するコドンを含む。一部の場合には、本開示は、軸系ダイニン中間鎖1をコードする核酸構築物を含む組成物を提供し、ここで、軸系ダイニン中間鎖1をコードする核酸の30%未満は、プソイドウリジンまたは1-メチルプソイドウリジンなどの核酸類似体である。一部の場合には、これらの構築物のコード配列は、その安定性を高めるために、タンパク質コード領域における変化したヌクレオチド使用頻度を有するように操作される。

【0114】

一部の場合には、構築物のコドンは、哺乳動物またはヒトの軸系ダイニン中間鎖1タンパク質と少なくとも70%相同である。この構築物はまた、軸系ダイニン中間鎖1などの関心対象のタンパク質をコードするコドン配列に隣接する3'または5'非コード領域を含み得、この非コード領域は、被験体の細胞内でのタンパク質の発現を増強する。コドンに隣接する3'非コード領域は、3'キャップ非依存性翻訳エンハンサー(3'-CITE)またはヒストンタンパク質のヌクレオチド配列に由来する3'ステムループ領域または転移関連肺腺癌転写物1(MALAT1)のヌクレオチド配列に由来する3'三重らせん構造を含み得る。コドンに隣接する3'非コード領域はポリアデノシン尾部を含むことができ、ここで、ポリアデノシン尾部におけるアデノシンの数は、軸系ダイニン中間鎖1タンパク質などの関心対象のタンパク質の翻訳効率または半減期を改善する。一部の場合には、ポリアデノシン尾部の長さは多くとも200のアデノシンである。一部の場合には、ある割合のポリアデノシン尾部は、核酸類似体を含む。ポリアデノシン尾部における核酸の50%、40%、30%、20%、10%または5%未満は、核酸類似体であり得る。

【0115】

組成物がある割合のヌクレオチド類似体を含む場合、ヌクレオチド類似体は、プソイドウリジン、1-メチルプソイドウリジン、2-チオウリジン、5-メチルウリジン、5-メトキシウリジン、5-メチルシチジン、2'-アミノ-2'-デオキシシチジン、2'-フルオロ-2'-デオキシシチジンからなる群より選択され得る。一部の場合には、核酸類似体はプソイドウリジンまたは1-メチルプソイドウリジンである。一部の場合には、核酸類似体は5-メトキシウリジンである。

【0116】

一部の場合には、組成物は、軸系ダイニン中間鎖1コードする核酸および／または核酸類似体を含む。組成物は、少なくとも1つの追加の核酸構築物をさらに含んでもよい。この少なくとも1つの追加の核酸構築物は、アルマジロリピート含有4(ARMC4)、21番染色体オープンリーディングフレーム59(C21orf59)、コイルドコイルドメイン含有103(CCDC103)、コイルドコイルドメイン含有114(CCDC114)、コイルドコイルドメイン含有39(CCDC39)、コイルドコイルドメイン含有40(CCDC40)、コイルドコイルドメイン含有65(CCDC65)、ダイニン(軸系)アセンブリ因子1(DNAAF1)、ダイニン(軸系)アセンブリ因子2(DNAAF2)、ダイニン(軸系)アセンブリ因子3(DNAAF3)、ダイニン(軸系)アセンブリ因子5(DNAAF5)、軸系ダイニン重鎖11(DNAH11)、軸系ダイニン重鎖5(DNAH5)、軸系ダイニン重鎖8(DNAH8)、軸系ダイニン中間鎖2(DNAI2)、軸系ダイニン軽鎖1(DNAL1)、ダイニン調節複合体サブユニット1(DRC1)、失読症感受性1候補物1(DYX1C1)、軸系中心対装置タンパク質(HYDIN)、ロイシンリッチリピート含有6(LRRC6)、NME/NM23ファミリーメンバー8(NME8)、口・顔・指症候群1(OFD1)、網膜色素変性症GTPアーゼ調節因子(RPGR)、ラジアルスポークヘッド1ホモログ(クラミドモナス)(RSPH1)、ラジアルスポークヘッド4ホモログA(クラミドモナス)(RSPH4A)、ラジアルスポークヘッド9ホモログ(クラミドモナス)(RSPH9)、精子関連抗原1(SPAG1)およびジンクフィンガーMYND型含有10(ZMYND10)からなる群より選択されるタンパク質をコードし得る。

【0117】

組成物は、操作されたポリリボヌクレオチド、ベクターまたは核酸構築物を含み得る。「裸の」ポリヌクレオチド組成物は、担体、安定剤、希釈剤、分散剤、懸濁化剤、増粘剤

および／または賦形剤の助けを借りずに被験体に成功裏に投与され、被験体の細胞によって取り込まれ得る（Wolff et al. 1990, Science, 247, 1465-1468）。しかし、多くの場合、エンドサイトーシス取込みを増加させ得る製剤を用いたポリヌクレオチドのカプセル化は、本開示の組成物の有効性を高めることができる。この課題を克服するために、一部の場合には、組成物は、軸系ダイニン中間鎖1をコードする核酸構築物、ベクターまたは単離された核酸を含み、核酸構築物は、軸系ダイニン中間鎖1をコードする相補的デオキシリボ核酸を含み、組成物は、被験体への投与のために製剤化される。

【0118】

多細胞生物へのポリリボヌクレオチドの送達の基礎となる別の技術的課題は、被験体の細胞または組織内で翻訳されるポリリボヌクレオチドの高効率送達を提供する組成物を同定することである。裸の核酸の投与は極めて非効率的であり得、多細胞生物へのポリヌクレオチドの投与のための適切なアプローチを提供し得ないことが認識されている。

【0119】

この課題を解決するために、操作されたポリリボヌクレオチドを含む組成物を医薬担体と共にカプセル化または製剤化することができる。製剤は、ナノ粒子、ポリ（乳酸-コグリコール酸）（PLGA）ミクロスフェア、リポイド、リポブックス、リボソーム、ポリマー、炭水化物（単糖を含む）、カチオン性脂質、フィブリンゲル、フィブリンヒドロゲル、フィブリン糊、フィブリンシーラント、フィブリンノーゲン、トロンビン、急速排除脂質ナノ粒子（reLNP）およびそれらの組み合わせであり得るが、これらに限定されない。本明細書で開示される操作されたポリリボヌクレオチドを含む組成物は、約1重量／体積％～約99重量／体積％の担体系を含み得る。担体系に存在する担体の量は、製剤者によってなされるいくつかの異なる因子または選択、例えばポリリボヌクレオチドの最終濃度および可溶化剤の量に基づく。様々な担体が、種々のクラスの治療薬の送達において有用であることが示されている。これらの担体の中で、生体適合性ポリマーであるポリ（D，L-ラクチド-コグリコリド）（PLGA）およびポリラクチド（PLA）から製剤化された生分解性ナノ粒子は、種々の治療薬の持続的細胞内送達の潜在的可能性を示している。

【0120】

組成物中の操作されたポリヌクレオチドの負荷重量パーセントは、少なくとも0.05％、0.1％、0.2％、0.3％、0.4％、0.5％、1％、2％、4％、5％、6％、7％、8％、9％または10％であり得る。PLGAミクロスフェアにおける修飾mRNAのカプセル化効率は、少なくとも50％、少なくとも70％、少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも96％、少なくとも97％、少なくとも98％または少なくとも99％であり得る。

【0121】

本開示は、ポリヌクレオチド、一部の場合には操作されたポリリボヌクレオチドを細胞または組織に送達するために有用な、交互の非同一アルキレンアミン単位を含むオリゴ（アルキレンアミン）を含むナノ粒子、オリゴマー、ポリマーまたはリポイドを記載する。本明細書に開示される組成物は、少なくとも約1分間、5分間、10分間、30分間、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、12時間、1日間、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、9日間、10日間、2週間、4週間、6週間、8週間、10週間、12週間、3ヶ月間、4ヶ月間、5ヶ月間、6ヶ月間、7ヶ月間、8ヶ月間、9ヶ月間、10ヶ月間、11ヶ月間または1年間安定であり得る。本明細書に開示される製剤は、例えば少なくとも約0℃、5℃、10℃、15℃、20℃、25℃、30℃、35℃、40℃、45℃、50℃、60℃、70℃または80℃の温度で安定であり得る。本開示の組成物は、所望の密度を有することができる。組成物の密度は、組成物のレオロジーなどの、組成物の特性を改善することができる。

【0122】

ナノ粒子

本開示はまた、被験体への投与後に転移することができる、核酸構築物、操作されたポリリボヌクレオチドまたはベクターのナノ粒子に基づく製剤を提供する。一部の場合には、投与は肺経路であり、操作されたポリリボヌクレオチドは、投与部位から全身の血液供給へと能動的または受動的に無傷で移動し、その後、例えば乳房などの種々の細胞または組織に沈着することができる。例えば、軸系ダイニン中間鎖1 (DNAI1)、アルマジロリピート含有4 (ARMC4)、21番染色体オープンリーディングフレーム59 (C21orf59)、コイルドコイルドメイン含有103 (CCDC103)、コイルドコイルドメイン含有114 (CCDC114)、コイルドコイルドメイン含有39 (CCDC39)、コイルドコイルドメイン含有40 (CCDC40)、コイルドコイルドメイン含有65 (CCDC65)、サイクリンO (CCNO)、ダイニン (軸系) アセンブリ因子1 (DNAAF1)、ダイニン (軸系) アセンブリ因子2 (DNAAF2)、ダイニン (軸系) アセンブリ因子3 (DNAAF3)、ダイニン (軸系) アセンブリ因子5 (DNAAF5)、軸系ダイニン重鎖11 (DNAH11)、軸系ダイニン重鎖5 (DNAH5)、軸系ダイニン重鎖6 (DNAH6)、軸系ダイニン重鎖8 (DNAH8)、軸系ダイニン中間鎖2 (DNAI2)、軸系ダイニン軽鎖1 (DNAL1)、ダイニン調節複合体サブユニット1 (DRC1)、失読症感受性1候補物1 (DYX1C1)、成長停止特異的8 (GAS8)、軸系中心対装置タンパク質 (HYDIN)、ロイシンリッチリピート含有6 (LRRC6)、NME/NM23ファミリーメンバー8 (NME8)、口・顔・指症候群1 (OFD1)、網膜色素変性症GTPアーゼ調節因子 (RPGR)、ラジアルスポークヘッド1ホモログ (クラミドモナス) (RSPH1)、ラジアルスポークヘッド4ホモログA (クラミドモナス) (RSPH4A)、ラジアルスポークヘッド9ホモログ (クラミドモナス) (RSPH9)、精子関連抗原1 (SPAG1) およびジンクフィンガーMYND型含有10 (ZMYND10) またはその機能性フラグメントなどの治療用タンパク質をコードする操作されたポリリボヌクレオチドを含むナノ粒子のこの転移は、肺を越える活性医薬成分の非侵襲的全身送達を構成し、全身的にアクセス可能な非肺細胞または組織に機能性タンパク質の産生をもたらす。

【0123】

ナノ粒子は、約10ナノメートル (nm) ~ 5000 nm、10 nm ~ 1000 nm、または60 nm ~ 500 nm、または70 nm ~ 300 nmの粒径の粒子であり得る。一部の例では、ナノ粒子は、約60 nm ~ 225 nmの粒径を有する。ナノ粒子は、操作されたポリリボヌクレオチドであり得る、1つ以上のポリリボヌクレオチドをカプセル化するカプセル化剤 (例えばコーティング) を含み得る。ナノ粒子は、操作されたおよび/または天然に存在するポリリボヌクレオチドを含み得る。カプセル化剤は、PEIまたはPEGなどのポリマー材料であり得る。

【0124】

送達剤として使用し得るリポイドまたは脂質ナノ粒子には、C12-200、MD1、98N12-5、DLin-DMA、DLin-K-DMA、DLin-KC2-DMA、DLin-MC3-DMA、PLGA、PEG、PEG-DMG、PEG化脂質およびそれらの類似体からなる群より選択され得る脂質が含まれ得る。適切なナノ粒子は、1つ以上の脂質を様々な比率で含むことができる。例えば、本発明の組成物は、40:30:25:5の比率のC12-200:DOPE:コレステロール:DMG-PEG2000または40:20:35:5の比率のHGT5001:DOPE:コレステロール:DMG-PEG2000を含み得る。ナノ粒子は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10種の脂質または別の適切な数の脂質を含むことができる。ナノ粒子は、C12-200、MD1、98N12-5、DLin-DMA、DLin-K-DMA、DLin-KC2-DMA、DLin-MC3-DMA、PLGA、PEG、PEG-DMGからなる群から選択される任意の適切な比率の脂質で形成され得る。

【0125】

ナノ粒子製剤の平均サイズは、60ナノメートル (nm) ~ 225 nmの修飾mRNAを含み得る。修飾mRNAを含むナノ粒子製剤の多分散指数PDIは、0.03 ~ 0.1

5であり得る。ナノ粒子製剤の ζ 電位は、 $\text{pH } 7.4$ で $-10 \sim +10$ であり得る。修飾 mRNA の製剤は、融合誘導性脂質、コレステロールおよび PEG 脂質を含み得る。製剤は、モル比 $50 : 10 : 38.5 : 1.5 - 3.0$ (カチオン性脂質 : 融合誘導性脂質 : コレステロール : ポリエチレングリコール (PEG) 脂質) を有し得る。PEG 脂質は、PEG-c-DOMG、PEG-DMG から選択され得るが、これらに限定されない。融合誘導性脂質は DSPC であり得る。本開示の脂質ナノ粒子は、フィブリンシーラントなどの、しかしこれに限定されないシーラント中に製剤化することができる。

【0126】

オリゴ (アルキレンアミン基)

いくつかの製剤を用いたポリヌクレオチドのカプセル化は、組成物のエンドサイトーシス取込みを増加させることができるが、細胞によって取り込まれたポリヌクレオチドは細胞内で有効に翻訳されない可能性があることも認識されている。いくつかの製剤は、プラスミド DNA および / または siRNA 送達のために有効に使用され得るが、ポリリボヌクレオチドの送達における使用には実用的でない。本開示は、被験体へのポリリボヌクレオチド組成物の有効な送達および翻訳のために使用することができる製剤を提供する。

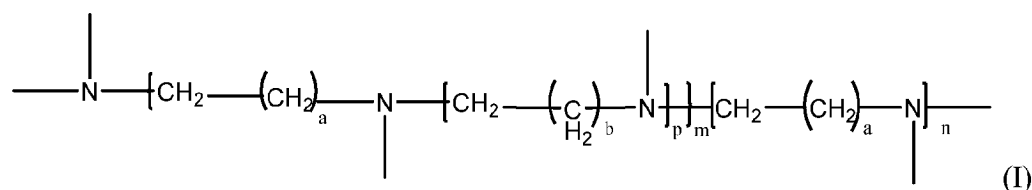
【0127】

本開示の組成物は、細胞内で有効に翻訳されるポリリボヌクレオチドを提供するように設計することができる。本開示の組成物は、3 単位以上の基における交互の長さのアルキレンアミン単位の配置を含み、細胞を任意のポリヌクレオチド、例えば操作されたポリリボヌクレオチドでトランスフェクトするために組成物中にエチレンアミン単位を含む。本開示の組成物は、非交互長のアルキレンアミン単位の類似の配置よりも、細胞へのポリリボヌクレオチドのより有効な送達を提供することができる。

【0128】

式 (I) :

【化 1】



【0129】

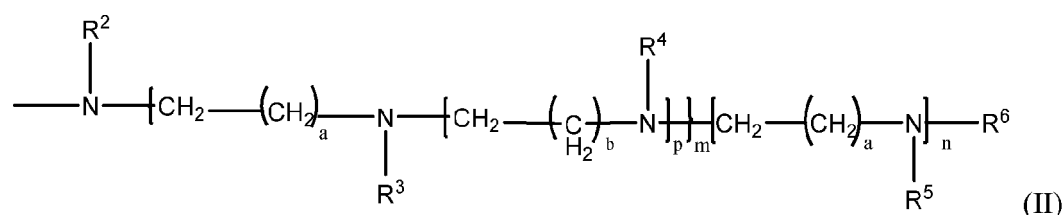
に示す共通の構造実体を共有するオリゴマー、ポリマーまたはリポイドが提供され得る。

【0130】

本開示の組成物は、以下から選択されるオリゴ (アルキレンアミン) を含み得る :

a) 式 (II) の複数の基を側鎖および / または末端基として含むオリゴマーまたはポリマー :

【化 2】



【0131】

【式中、変数 a, b, p, m, n および $\text{R}^2 \sim \text{R}^6$ は、複数のそのような基における式 (II) の各々の基について独立して、以下のように定義される :

a は 1 であり、b は 2 ～ 4 の整数であるか、または a は 2 ～ 4 の整数であり、b は 1 であり；

p は 1 または 2 であり；

m は 1 または 2 であり；n は 0 または 1 であり、m + n は 2 以上であり；ならびに

$R^2 \sim R^5$ は、互いに独立して、水素； $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{R}^7$ 、 $-\text{CH}(\text{R}^7)-\text{CH}_2-\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-\text{R}^7$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{C}=\text{O})-\text{NH}-\text{R}^7$ または $-\text{CH}_2-\text{R}^7$ 基（ここで、 R^7 は、C3 ～ C18 アルキルまたは 1 つの C-C 二重結合を有する C3 ～ C18 アルケニルから選択される）；アミノ基の保護基；およびポリ（エチレングリコール）鎖から選択され；

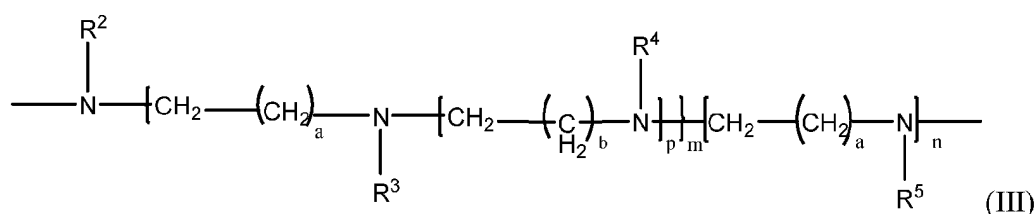
R^6 は、水素； $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{R}^7$ 、 $-\text{CH}(\text{R}^7)-\text{CH}_2-\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-\text{R}^7$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{C}=\text{O})-\text{NH}-\text{R}^7$ または $-\text{CH}_2-\text{R}^7$ 基（ここで、 R^7 は、C3 ～ C18 アルキルまたは 1 つの C-C 二重結合を有する C3 ～ C18 アルケニルから選択される）；アミノ基の保護基； $-\text{C}(\text{NH})-\text{NH}$ ；ポリ（エチレングリコール）鎖；および受容体リガンドから選択され；

ならびに式（I I）に示す窒素原子の 1 つ以上は、プロトン化されて式（I I）のカチオン性基を提供し得る】。

【0132】

b) 式（I I I）の複数の基を繰り返し単位として含むオリゴマーまたはポリマー：

【化 3】



【0133】

【式中、変数 a、b、p、m、n および $\text{R}^2 \sim \text{R}^5$ は、複数のそのような基における式（I I I）の各々の基について独立して、以下のように定義される：

a は 1 であり、b は 2 ～ 4 の整数であるか、または a は 2 ～ 4 の整数であり、b は 1 であり；

p は 1 または 2 であり；

m は 1 または 2 であり；n は 0 または 1 であり、m + n は 2 以上であり；ならびに

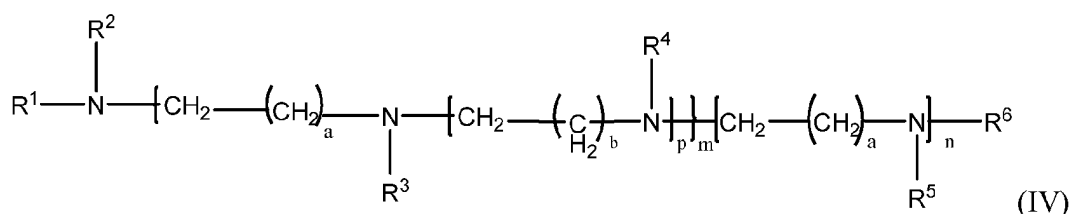
$\text{R}^2 \sim \text{R}^5$ は、互いに独立して、水素； $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{R}^7$ 、 $-\text{CH}(\text{R}^7)-\text{CH}_2-\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-\text{R}^7$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{C}=\text{O})-\text{NH}-\text{R}^7$ 、 $-\text{CH}_2-\text{R}^7$ または $-\text{CH}_2-$ 基（ここで、 R^7 は、C3 ～ C18 アルキルまたは 1 つの C-C 二重結合を有する C3 ～ C18 アルケニルから選択される）；アミノ基の保護基；およびポリ（エチレングリコール）鎖から選択され；

ならびに式（I I I）に示す窒素原子の 1 つ以上は、プロトン化されて式（I I I）のカチオン性基を提供し得る】。

【0134】

c) 式（I V）の構造を有するリポイド：

【化 4】



10

20

30

40

50

【0135】

[式中、変数 a 、 b 、 p 、 m 、 n および $R^2 \sim R^6$ は、以下のように定義される：

a は 1 であり、 b は 2～4 の整数であるか、または a は 2～4 の整数であり、 b は 1 であり；

p は 1 または 2 であり；

m は 1 または 2 であり； n は 0 または 1 であり、 $m+n$ は 2 以上であり；ならびに

$R^2 \sim R^6$ は、互いに独立して、水素； $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{R}^7$ 、 $-\text{CH}(\text{R}^7)-\text{CH}_2-\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-\text{R}^7$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{C}=\text{O})-\text{NH}-\text{R}^7$ または $-\text{CH}_2-\text{R}^7$ 基（ここで、 R^7 は、 $\text{C}3 \sim \text{C}18$ アルキルまたは 1 つの $\text{C}-\text{C}$ 二重結合を有する $\text{C}3 \sim \text{C}18$ アルケニルから選択される）；アミノ基の保護基；ポリ（エチレングリコール）鎖；および受容体リガンドから選択され、ただし、 $\text{R}^1 \sim \text{R}^6$ のうちの少なくとも 2 つの残基は、 $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{R}^7$ 、 $-\text{CH}(\text{R}^7)-\text{CH}_2-\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-\text{R}^7$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{C}=\text{O})-\text{NH}-\text{R}^7$ または $-\text{CH}_2-\text{R}^7$ 基（ここで、 R^7 は、 $\text{C}3 \sim \text{C}18$ アルキルまたは 1 つの $\text{C}-\text{C}$ 二重結合を有する $\text{C}3 \sim \text{C}18$ アルケニルから選択される）であり；

ならびに式（IV）に示す窒素原子の 1 つ以上は、プロトン化されて式（IV）のカチオン性基を提供し得る]。

【0136】

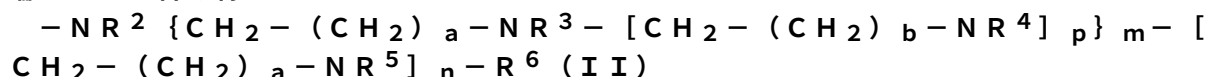
アルケニル基およびアルケニレン基の非限定的な例には、直鎖、分枝鎖および環状アルケニル基が含まれる。アルケニル基の 1 または複数のオレフィン、例えば E、Z、シス、トランス、末端またはエキソメチレンであり得る。アルケニレン基は、例えば、置換または非置換の $\text{C}2$ 、 $\text{C}3$ 、 $\text{C}4$ 、 $\text{C}5$ 、 $\text{C}6$ 、 $\text{C}7$ 、 $\text{C}8$ 、 $\text{C}9$ 、 $\text{C}10$ 、 $\text{C}11$ 、 $\text{C}12$ 、 $\text{C}13$ 、 $\text{C}14$ 、 $\text{C}15$ 、 $\text{C}16$ 、 $\text{C}17$ 、 $\text{C}18$ 、 $\text{C}19$ 、 $\text{C}20$ 、 $\text{C}21$ 、 $\text{C}22$ 、 $\text{C}23$ 、 $\text{C}24$ 、 $\text{C}25$ 、 $\text{C}26$ 、 $\text{C}27$ 、 $\text{C}28$ 、 $\text{C}29$ 、 $\text{C}30$ 、 $\text{C}31$ 、 $\text{C}32$ 、 $\text{C}33$ 、 $\text{C}34$ 、 $\text{C}35$ 、 $\text{C}36$ 、 $\text{C}37$ 、 $\text{C}38$ 、 $\text{C}39$ 、 $\text{C}40$ 、 $\text{C}41$ 、 $\text{C}42$ 、 $\text{C}43$ 、 $\text{C}44$ 、 $\text{C}45$ 、 $\text{C}46$ 、 $\text{C}47$ 、 $\text{C}48$ 、 $\text{C}49$ または $\text{C}50$ 基であり得る。

【0137】

式（II）、（III）および（IV）のオリゴ（アルキレンアミン）構造は、より短い（説明のために「S」とも称される）エチレンアミン単位（すなわち a または b が 1 である）とより長い（説明のために「L」とも称される）アルキレンアミン単位（すなわち a または b の他方が 2～4 の整数である）とを交互に組み合わせることができることを特徴とする。プロトン化可能単位のそのような配置は、ポリリボヌクレオチドを細胞内に送達するためのビヒクルを提供するための得られた基の適合性に関して利点を提供することができる。

【0138】

本開示の組成物は、式（II）の複数のオリゴ（アルキレンアミン）基を側鎖または末端基として含み得る：



[式中、変数 a 、 b 、 p 、 m 、 n および $R^2 \sim R^6$ は、複数のそのような基における式（II）の各々の基について独立して、以下のように定義される：

a は 1 であり、 b は 2～4 の整数であるか、または a は 2～4 の整数であり、 b は 1 であり；

p は 1 または 2 であり；

m は 1 または 2 であり； n は 0 または 1 であり、 $m+n$ は 2 以上であり；ならびに

$R^2 \sim R^5$ は、互いに独立して、水素； $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{R}^7$ 、 $-\text{CH}(\text{R}^7)-\text{CH}_2-\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-\text{R}^7$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{C}=\text{O})-\text{NH}-\text{R}^7$ または $-\text{CH}_2-\text{R}^7$ 基（ここで、 R^7 は、 $\text{C}3 \sim \text{C}18$ アルキルまたは 1 つの $\text{C}-\text{C}$ 二重結合を有する $\text{C}3 \sim \text{C}18$ アルケニルから選択される）；アミノ基の保護基； $-\text{C}(\text{NH})-\text{NH}_2-$ ；およびポリ（エチレングリコール）鎖から選択され；

R^6 は、水素； $-CH_2-CH(OH)-R^7$ 、 $-CH(R^7)-CH_2-OH$ 、 $-CH_2-CH_2-(C=O)-O-R^7$ 、 $-CH_2-CH_2-(C=O)-NH-R^7$ または $-CH_2-R^7$ 基（ここで、 R^7 は、 $C3\sim C16$ アルキルまたは1つの $C-C$ 二重結合を有する $C3\sim C16$ アルケニルから選択される）；アミノ基の保護基； $-C(NH)-NH$ ；ポリ（エチレングリコール）鎖；および受容体リガンドから選択される】。

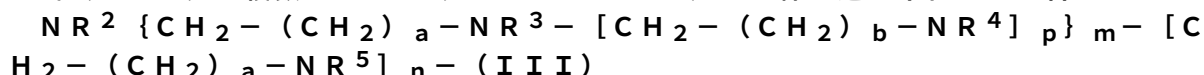
【0139】

一部の場合には、 $R^2\sim R^5$ は水素であり、 R^6 は、水素、アミノ基の保護基、 $-C(NH)-NH_2$ およびポリ（エチレングリコール）鎖から選択される。一部の場合には、 $R^2\sim R^6$ は水素である。一部の場合には、 R^7 は、 $C8\sim C18$ アルキルもしくは1つの $C-C$ 二重結合を有する $C8\sim C18$ アルケニル、または $C8-C12$ アルキルもしくは1つの $C-C$ 二重結合を有する $C8-C12$ アルケニル、または $C10\sim C12$ アルキルもしくは1つの $C-C$ 二重結合を有する $C10\sim C12$ アルケニルから選択される。本開示の組成物は、式（ⅠⅠ）～（ⅠⅤ）の1つまたは複数のアルキレン基を含み得る。

10

【0140】

一部の場合には、本開示に従う組成物において使用できるオリゴマーまたはポリマーは、式（ⅠⅠⅠ）の複数のオリゴ（アルキレンアミン）基を繰り返し単位として含む：



【式中、変数 a 、 b 、 p 、 m 、 n および $R^2\sim R^5$ は、複数のそのような基における式（ⅠⅠⅠ）の各々の基について独立して、以下のように定義される：

20

a は1であり、 b は2～4の整数であるか、または a は2～4の整数であり、 b は1であり；

p は1または2であり；

m は1または2であり； n は0または1であり、 $m+n$ は2以上であり；ならびに

$R^2\sim R^5$ は、互いに独立して、水素； $-CH_2-CH(OH)-R^7$ 、 $-CH(R^7)-CH_2-OH$ 、 $-CH_2-CH_2-(C=O)-O-R^7$ 、 $-CH_2-CH_2-(C=O)-NH-R^7$ 、 $-CH_2-R^7$ または $-CH_2-$ 基（ここで、 R^7 は、 $C3\sim C18$ アルキルまたは1つの $C-C$ 二重結合を有する $C3\sim C18$ アルケニルから選択される）；アミノ基の保護基； $-C(NH)-NH_2$ ；ポリ（エチレングリコール）鎖；およびエンドソームエスケープエフェクターおよび受容体リガンドから選択される】。一部の場合には、 $R^2\sim R^5$ は水素である。一部の場合には、 R^7 は、 $C8\sim C18$ アルキルまたは1つの $C-C$ を有する $C8\sim C18$ アルケニルから選択される。 R^7 は、 $C8\sim C12$ アルキルまたは1つの $C-C$ を有する $C8\sim C12$ アルケニルから選択され得る。別の方法として、 R^7 は、 $C10\sim C12$ アルキルまたは1つの $C-C$ を有する $C10\sim C12$ アルケニルから選択され得る。

30

【0141】

式（ⅠⅠⅠ）に示す窒素原子の1つ以上は、プロトン化されて式（ⅠⅠⅠ）のカチオン性基を提供し得る。

【0142】

式（ⅠⅠⅠ）の複数の基を繰り返し単位として含むオリゴマーまたはポリマーは、さらに、式（ⅠⅠ）の1または複数のオリゴ（アルキレンアミン）基を側鎖および／または末端基として含んでいてもよい。

40

【0143】

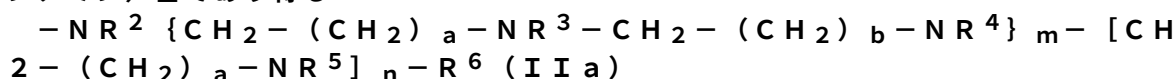
繰り返し単位としての式（ⅠⅠⅠ）の複数の基において、式（ⅠⅠⅠ）の基の2つ、3つまたはそれ以上をオリゴマーまたはポリマー中に含めることができる。一般に、2～9の繰り返し単位を含む物質を本明細書ではオリゴマーと称し、10以上の繰り返し単位を含む物質をポリマーと称する。したがって、式（ⅠⅠⅠ）の複数の基を繰り返し単位として含むポリマーには、10以上の式（ⅠⅠⅠ）の基が存在し得る。式（ⅠⅠⅠ）の基は、ポリマーまたはオリゴマー内に同じ構造を有し得るか、または式（ⅠⅠⅠ）の範囲内で2つ以上の異なる構造を有し得ることが理解される。一部の場合には、式（ⅠⅠⅠ）の複数

50

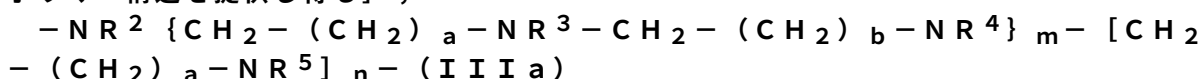
の基を繰り返し単位として含むオリゴマーまたはポリマーは、式 (I I I) の異なる基から制御された段階的な重合において調製される配列決定されたポリマーのライブラリの形態で提供され得る。

【0144】

上記の式 (I I) および (I I I) に従って、アルキレンアミン単位は、 $-S-L-L-S-$ または $-L-S-S-L-$ 型のオリゴ (アルキレンアミン) 部分が得られるように交互の鎖において1回繰り返されてもよく、ここで、Sはより短いエチレンアミン単位を表し、Lはより長いアルキレンアミン単位を表す。一部の場合には、式 (I I) および (I I I) の基は、より短いまたはより長い単位が対で現われないように、繰り返しが起こらないもの、すなわち p が1であるものである。式 (I I) の基は式 (I I a) のオリゴ (アルキレンアミン) 基であり得、式 (I I I) の基は (I I I a) のオリゴ (アルキレンアミン) 基であり得る：



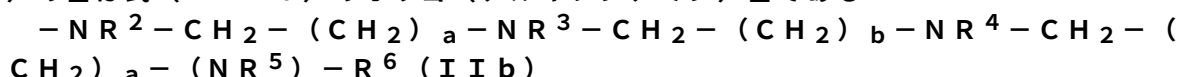
【式中、a、b、m、nおよび $R^2 \sim R^6$ は式 (I I) のように定義され、ならびに式 (I I a) に示す窒素原子の1つ以上は、プロトン化されてカチオン性オリゴマーまたはポリマー構造を提供し得る】；



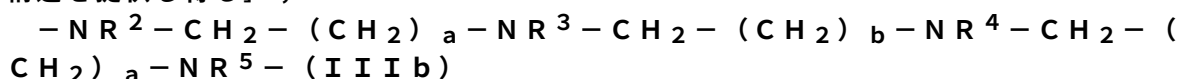
【式中、a、b、m、nおよび $R^2 \sim R^5$ は式 (I I I) のように定義され、ならびに式 (I I i a) に示す窒素原子の1つ以上は、プロトン化されてカチオン性オリゴマーまたはポリマー構造を提供し得る】。

【0145】

さらに、一部の場合には、式 (I I) および (I I I) のオリゴ (アルキレンアミン) 基は、1のnを有し得る。一部の場合には、mは1であり、nは1である。一部の場合には、式 (I I) の基は式 (I I b) のオリゴ (アルキレンアミン) 基であり、式 (I I I) の基は式 (I I I b) のオリゴ (アルキレンアミン) 基である：



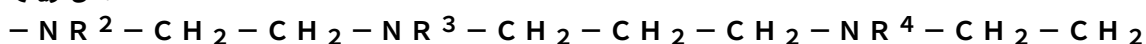
【式中、a、bおよび $R^2 \sim R^6$ は式 (I I) のように定義され、ならびに式 (I I b) に示す窒素原子の1つ以上は、プロトン化されてカチオン性オリゴマーまたはポリマー構造を提供し得る】；



【式中、a、bおよび $R^2 \sim R^5$ は式 (I I I) のように定義され、ならびに式 (I I I b) に示す窒素原子の1つ以上は、プロトン化されてカチオン性オリゴマーまたはポリマー構造を提供し得る】。

【0146】

式 (I I)、(I I a)、(I I b) および (I I I)、(I I I a)、(I I I b) のオリゴ (アルキレンアミン) 基におけるアルキレンアミン単位の長さに関して、交互の単位の1つはエチレンアミン単位であり得る (すなわち a または b のいずれかが1である)。他方の交互単位は、プロピレンアミン単位、ブチレンアミン単位またはペンチレンアミン単位であり得る (すなわち a または b の他方が2～4の整数であり得る)。一部の場合には、a または b の他方は2または3であり得、一部の場合には、a は1であり、b は2であるか、または a は2であり、b は1である。一部の場合には、式 (I I c) のオリゴ (アルキレンアミン) 基が、基 (I I) の代わりにもしくはそれに加えて使用され、および/または式 (I I I c) のオリゴ (アルキレンアミン) 基が、基 (I I I) の代わりにもしくはそれに加えて使用される。基 (I I c) および基 (I I I c) の式は以下の通りである：



—NR⁵—R⁶ (I I c)

〔式中、R²～R⁶は式 (I I) で定義された通りであり、R²～R⁶は水素であり、および式 (I I c) に示す窒素原子の1つ以上は、プロトン化されてカチオン性オリゴマーまたはポリマー構造を提供し得る〕；

—NR²—CH₂—CH₂—NR³—CH₂—CH₂—CH₂—NR⁴—CH₂—CH₂—NR⁵— (I I I c)

〔式中、R²～R⁵は式 (I I I) で定義された通りであり、および式 (I I I c) に示す窒素原子の1つ以上は、プロトン化されてカチオン性オリゴマーまたはポリマー構造を提供し得る〕。

【0147】

一部の場合には、式 (I I) 、 (I I a) 、 (I I b) および (I I c) におけるR²～R⁶の基または式 (I I I) 、 (I I I a) 、 (I I I b) および (I I I c) におけるR²～R⁵の基は、アミノ基の保護基であり得る。保護基の非限定的な例には、t-ブトキシカルボニル (B o c) 、 9-フルオレニルメトキシカルボニル (F m o c) またはカルボベンジルオキシ (C b z) が含まれる。

【0148】

一部の場合には、式 (I I) 、 (I I a) 、 (I I b) および (I I I c) におけるR¹～R⁶の基または式 (I I I) 、 (I I I a) 、 (I I I b) および (I I I c) におけるR²～R⁵の基は、Philipp and Wagner in 「Gene and Cell Therapy—Therapeutic Mechanisms and Strategy」, 3rd Edition, Chapter 15, CRC Press, Taylor & Francis Group LLC, Boca Raton 2009に記載されている受容体リガンドなどの受容体リガンドである。肺組織を標的とする受容体リガンドの例は、Pfeifer et al. 2010, Ther. Deliv. 1 (1) : 133—48に記載されている。受容体リガンドには、特定の細胞表面構造もしくは特定の細胞型への結合についてペプチドライブラリをスクリーニングすることに誘導されるような合成環状もしくは線状ペプチド、環状もしくは線状RGDペプチド、シアル酸、ガラクトースもしくはマンノースなどの合成もしくは天然炭水化物、または、例えばペプチドと炭水化物とを反応させることに由来する合成リガンド、細胞表面構造を特異的に認識する抗体、葉酸、上皮増殖因子およびそれに由来するペプチド、トランスフェリン、抗トランスフェリン受容体抗体、ナノボディおよび抗体フラグメント、細胞表面分子（例えば細胞表面受容体）に結合し得る承認された薬剤等が含まれ得る。

【0149】

式 (I I) 、 (I I a) 、 (I I b) および (I I c) におけるR¹～R⁶の基または式 (I I I) 、 (I I I a) 、 (I I I b) および (I I I c) におけるR²～R⁵の基のいずれかがポリ（エチレングリコール）鎖である限り、ポリ（エチレングリコール）鎖の分子量は、約100 g/mol～20,000 g/mol、約1,000 g/mol～10,000 g/molまたは約1,000 g/mol～5,000 g/molであり得る。

【0150】

一部の場合には、基 (I I) は、式 (I I d) のオリゴ（アルキレンアミン）基であり得る：

—NH—CH₂—CH₂—NH—CH₂—CH₂—CH₂—NH—CH₂—CH₂—NH—H (I I d)

〔ここで、式 (I I d) に示す窒素原子の1つ以上は、プロトン化されてカチオン性ポリマーまたは dendrimer 構造を提供し得る〕。一部の場合には、基 (I I I) は、式 (I I I d) のオリゴ（アルキレンアミン）基である：

—NH—CH₂—CH₂—NH—CH₂—CH₂—CH₂—NH—CH₂—CH₂—NH— (I I I d)

〔ここで、式 (I I I d) に示す窒素原子の1つ以上は、プロトン化されてカチオン性

10

20

30

40

50

ポリマーまたはデンドリマー構造を提供し得る】。

【0151】

リピドイド

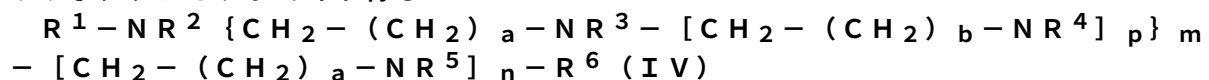
操作されたポリリボヌクレオチドは、リピドイド製剤中にカプセル化することができる。リピドイド製剤は、脂肪、ワックス、ステロール、脂溶性ビタミン（ビタミンA、D、EおよびKなど）、モノグリセリド、ジグリセリド、トリグリセリド、リン脂質などのような脂質の特性を有する任意の物質であり得る。例えば、脂質またはリピドイド製剤は、科学文献中でヘルパー脂質と称されるコレステロール、DOPE、DOPCもしくはDSPCなどの脂質および／またはPEG化脂質またはリポプレックスを調製するのに有用な任意の他の脂質を含み得る。操作されたポリリボヌクレオチドを含む製剤は、少なくとも1つの脂質を含み得るナノ粒子であり得る。リピドイド製剤は、脂質ナノ粒子であり得る。脂質は、DOPE、DOPC、DSPC、コレステロール、DLin-DMA、DLin-K-DMA、98N12-5、C12-200、DLin-MC3-DMA、DLin-KC2-DMA、DODMA、PLGA、PEG、PEG-DMGおよびPEG化脂質から選択され得るが、これらに限定されない。別の態様では、脂質は、DLin-DMA、DLin-D-DMA、DLin-MC3-DMA、DLin-KC2-DMAおよびDODMAなどのカチオン性脂質であり得るが、これらに限定されない。

【0152】

リピドイドを含む組成物は、約40～60%のリピドイド、約40～60%のコレステロール、および約5～20%のPEG-脂質（組成物の総重量に基づく重量パーセント）であり得る。リピドイドを含む組成物は、約50～60%のリピドイド、約40～50%のコレステロール、および約5～10%のPEG-脂質であり得る。リピドイドを含む組成物は、約50～75%のリピドイド、約20～40%のコレステロール、および約1～10%のPEG-脂質であり得る。リピドイドを含む組成物は、約60～70%のリピドイド、約25～35%のコレステロール、および約5～10%のPEG-脂質であり得る。組成物は、例えば、Akinc et al, 2007, Nat Biotech, 26, 561-569; Akinc et al, 2009, Mol Ther, 17, 872-9; Love et al, 2010, PNAS, 107, 1864-9; 米国特許第8, 450, 298号、国際公開第O2006/138380号に記載されている技術を用いて提供され得る。RNA／リピドイド複合体は、一本鎖RNAまたはmRNAなどのRNAの細胞への送達に有用な粒子を形成し得る。

【0153】

本開示の組成物は、式(IV)のリピドイドによってカプセル化された、操作されたポリリボヌクレオチドであり得る：



〔式中、変数a、b、p、m、nおよびR¹～R⁶は以下のように定義される：

aは1であり、bは2～4の整数であるか、またはaは2～4の整数であり、bは1であり；

pは1または2であり；

mは1または2であり；nは0または1であり、m+nは2以上であり；ならびに

R¹～R⁶は、互いに独立して、水素；-CH₂-CH(OH)-R⁷、-CH(R⁷)-CH₂-OH、-CH₂-CH₂-(C=O)-O-R⁷、-CH₂-CH₂-(C=O)-NH-R⁷または-CH₂-R⁷基（ここで、R⁷は、C₃～C₁₈アルキルまたは1つのC-C二重結合を有するC₃～C₁₈アルケニルから選択される）；アミノ基の保護基；-C(NH)-NH₂；ポリ（エチレングリコール）鎖；および受容体リガンドから選択され；ただし、R¹～R⁶のうちの少なくとも2つの残基は、-CH₂-CH(OH)-R⁷、-CH(R⁷)-CH₂-OH、-CH₂-CH₂-(C=O)-O-R⁷、-CH₂-CH₂-(C=O)-NH-R⁷または-CH₂-R⁷基（ここで、R⁷は、C₃～C₁₈アルキルまたは1つのC-C二重結合を有するC₃～C₁₈アルケニルから選択さ

れる)である]。

【0154】

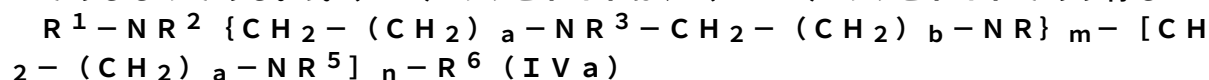
一部の場合には、 $R^1 \sim R^6$ は、独立して、水素； $-CH_2-C(OH)H-R^7$ または $-CH(R^7)-CH_2-OH$ （ここで、 R^7 は、 $C3 \sim C18$ アルキルまたは1つの $C-C$ 二重結合を有する $C3 \sim C18$ アルケニルから選択される）；アミノ基の保護基；およびポリ（エチレングリコール）鎖から選択され；ただし、 $R^1 \sim R^6$ のうちの少なくとも2つの残基は、 $-CH_2-C(OH)H-R^7$ または $-CH(R^7)-CH_2-OH$ 基（ここで、 R^7 は、 $C3 \sim C18$ アルキルまたは1つの $C-C$ 二重結合を有する $C3 \sim C18$ アルケニルから選択される）である。一部の場合には、 $R^1 \sim R^6$ は、独立して、水素；および $-CH_2-CH(OH)-R^7$ または $-CH(R^7)-CH_2-OH$ 基（ここで、 R^7 は、 $C3 \sim C16$ アルキルまたは1つの $C-C$ 二重結合を有する $C3 \sim C16$ アルケニルから選択される）から選択され；ただし、 $R^1 \sim R^6$ のうちの少なくとも2つの残基は、 $-CH_2-CH(OH)-R^7$ または $-CH(R^7)-CH_2-OH$ 基（ここで、 R^7 は、 $C3 \sim C18$ アルキルまたは1つの $C-C$ 二重結合を有する $C3 \sim C18$ アルケニルから選択される）である。一部の場合には、 R^1 および R^6 は、独立して、水素；および $-CH_2-CH(OH)-R^7$ または $-CH(R^7)-CH_2-OH$ 基（ここで、 R^7 は、 $C3 \sim C18$ アルキルまたは1つの $C-C$ 二重結合を有する $C3 \sim C18$ アルケニルから選択される）から選択され；ならびに $R^2 \sim R^5$ は、全て $-CH_2-CH(OH)-R^7$ または $-CH(R^7)-CH_2-OH$ 基（ここで、 R^7 は、 $C3 \sim C18$ アルキルまたは1つの $C-C$ 二重結合を有する $C3 \sim C18$ アルケニルから選択される）である。一部の場合には、 R^7 は、 $C8 \sim C16$ アルキルもしくは1つの $C-C$ 二重結合を有する $C8 \sim C18$ アルケニル、または $C8-C12$ アルキルもしくは1つの $C-C$ 二重結合を有する $C8 \sim C12$ アルケニル、または $C10 \sim C12$ アルキルもしくは1つの $C-C$ 二重結合を有する $C10 \sim C12$ アルケニルから選択される。

【0155】

式（IV）に示す窒素原子の1つ以上は、プロトン化されて式（IV）のカチオン性リピドイドを提供し得る。

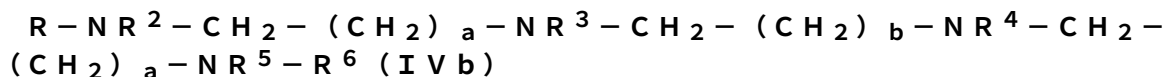
【0156】

上記の式（IV）に従って、アルキレンアミン単位は、 $-S-L-L-S-$ または $-L-S-S-L-$ 型のオリゴ（アルキレンアミン）部分が得られるように交互の鎖において1回繰り返されてもよく、ここで、 S はより短いエチレンアミン単位を表し、 L はより長いアルキレンアミン単位を表す。一部の場合には、式（IV）のリピドイドは、より短いまたはより長い単位が対で現われないように、繰り返しが起こらないもの、すなわち p が1であるものである。式（IV）のリピドイドは、（IVa）のリピドイドであり得る：



【式中、 a 、 b 、 m 、 n および $R^1 \sim R^6$ は式（IV）のように定義され、ならびに式（IVa）に示す窒素原子の1つ以上は、プロトン化されてカチオン性リピドイドを提供し得る】；

一部の場合には、リピドイドは式（IV）のリピドイドである。一部の場合には、「 n 」は、式（IV）のリピドイドにおいて1である。一部の場合には、式（IV）のリピドイドにおいて「 m 」は1であり、 n は1である。一部の場合には、式（IV）のリピドイドは、式（IVb）のリピドイドである：

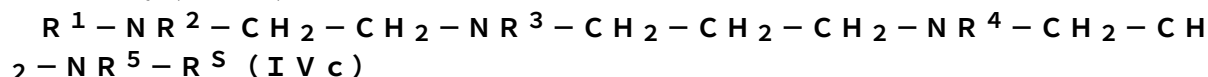


【式中、 a 、 b および $R^1 \sim R^6$ は式（IV）のように定義され、式（IVb）に示す窒素原子の1つ以上は、プロトン化されてカチオン性リピドイドを提供し得る】。

【0157】

式（IV）、（IVa）および（IVb）のリピドイド中のアルキレンアミン単位の長さに関して、交互の単位の1つはエチレンアミン単位である（すなわち a または b のい

れかが1である) 必要があることが理解される。他方の交互単位は、プロピレンアミン単位、ブチレンアミン単位、ペンチレンアミン単位、または別の適切な単位であり得る(すなわちaまたはbの他方が2~4の整数である)。一部の場合には、式(IV)のリピドイドは、式(IVc)のリピドイドである:



[式中、 $R^1 \sim R^6$ は式(IV)で定義された通りであり、および式(IVc)に示す窒素原子の1つ以上は、プロトン化されてカチオン性リピドイドを提供し得る]。

【0158】

一部の場合には、式(IV)、(IVa)、(IVb)および(IVc)における $R^1 \sim R^6$ の基は、アミノ基の保護基である。保護基の非限定的な例には、t-ブトキシカルボニル(Boc)、9-フルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)またはカルボベンジルオキシ(Cbz)が含まれる。

【0159】

式(IV)、(IVa)、(IVb)および(IVc)における $R^1 \sim R^6$ の基が、Philipp and Wagner in「Gene and Cell Therapy-Therapeutic Mechanisms and Strategy」, 3rd Edition, Chapter 15, CRC Press, Taylor & Francis Group LLC, Boca Raton 2009に記載されている受容体リガンドなどの受容体リガンドである限り。肺組織を標的とする受容体リガンドの例は、Pfeifer et al. 2010, Ther. Deliv. 1 (1): 133-48に記載されている。受容体リガンドには、特定の細胞表面構造もしくは特定の細胞型への結合についてペプチドライブラリをスクリーニングすることに誘導されるような合成環状もしくは線状ペプチド、環状もしくは線状RGDペプチド、シアル酸、ガラクトースもしくはマンノースなどの合成もしくは天然炭水化物、または、例えばペプチドと炭水化物とを反応させることに由来する合成リガンド、細胞表面構造を特異的に認識する抗体、葉酸、上皮増殖因子およびそれに由来するペプチド、トランスフェリン、抗トランスフェリン受容体抗体、ナノボディおよび抗体フラグメント、細胞表面分子(例えば細胞表面受容体)に結合し得る承認された薬剤等が含まれ得る。

【0160】

式(IV)、(IVa)、(IVb)および(IVc)における $R^1 \sim R^6$ の基がポリ(エチレングリコール)鎖である限り、ポリ(エチレングリコール)鎖の分子量は、約100g/mol~20,000g/mol、約1,000g/mol~10,000g/molまたは約1,000g/mol~5,000g/molであり得る。一部の場合には、PEG鎖の分子量は、所望の密度を有する組成物を提供することができる。

【0161】

複数のリピドイド分子を、操作されたポリリボヌクレオチドと結合することができる。例えば、組成物は、1つの操作されたポリリボヌクレオチド対100のリピドイド分子、1つの操作されたポリリボヌクレオチド対1,000のリピドイド分子、10の操作されたポリリボヌクレオチド対1,000のリピドイド分子、または100の操作されたポリリボヌクレオチド対10,000のリピドイド分子を含むことができる。操作されたポリリボヌクレオチドとリピドイドとの複合体は、粒子を形成することができる。粒子の直径は、例えば10ナノメートルから1200ナノメートルの範囲であり得る。一部の場合には、粒子の直径は10ナノメートルから500ナノメートルの範囲である。一部の場合には、粒子の直径は20ナノメートルから150ナノメートルである。

【0162】

被験体への投与

ポリヌクレオチド(例えばポリリボヌクレオチド、核酸構築物またはベクター)を被験体に投与するための方法をここでさらに説明する。ポリリボヌクレオチドは、ポリリボヌクレオチドをカプセル化するカプセル化剤を有する粒子またはカプセルなどの送達剤を介

して被験体に提供することができる。送達剤は治療薬であり得る。被験体は、疾患または状態（例えば原発性纖毛機能不全症（PCD）、カルタゲナー症候群または癌）に罹患したヒトなどのヒトであり得る。送達剤は、所定の投与量で被験体に投与することができ（例えば自己投与または医療提供者などの第三者による投与）、投与量は、時間と共に増加させる、時間と共に減少させる、または一定に維持することができる。投与量は、希少疾患または癌などの、被験体における疾患の進行または後退に基づいて変更することができる。

【0163】

本開示のポリリボヌクレオチドは、被験体に投与される1つまたは複数の薬学的に許容される担体と共に製剤化することができる。一部の場合には、ポリリボヌクレオチドは、標的細胞または細胞集団への標的化送達のために製剤化することができる。一部の場合には、ポリリボヌクレオチドは、細胞または細胞集団への非標的化送達のために製剤化することができる。次いで、ポリリボヌクレオチドのコードされたポリペプチド産物が転写され、レシピエント細胞内に蓄積する。

10

【0164】

組成物は、本明細書に記載の任意の操作されたポリリボヌクレオチドと、担体、安定剤、希釈剤、分散剤、懸濁化剤、増粘剤および／または賦形剤などの他の化学成分との組み合わせであり得る。組成物は、生物への化合物の投与を容易にする。医薬組成物は、例えば静脈内、皮下、筋肉内、経口、直腸、エアロゾル、非経口、眼、肺、経皮、膺、耳、鼻および局所投与を含む様々な形態および経路によって、医薬組成物として治療有効量で投与することができる。

20

【0165】

組成物は、局所的または全身的に、例えば臓器への化合物の直接注射によって投与ことができ、デポー製剤または徐放製剤として投与してもよい。医薬組成物は、急速放出製剤の形態、持続放出製剤の形態、または中間放出製剤の形態で提供することができる。急速放出製剤は、即時放出を提供することができる。持続放出製剤は、制御放出または遅延持続放出を提供することができる。

【0166】

吸入による投与の場合、活性化合物は、エアロゾル、ミスト、蒸気、スプレーまたは粉末の形態であり得る。医薬組成物は、適切な噴射剤、例えばジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素または他の適切なガスを使用して、加圧パックまたはネブライザからエアロゾルスプレーの形態で好都合に送達される。加圧エアロゾルの場合、用量単位は、計量された量を送達するためのバルブを提供することによって決定され得る。例えば、吸入器または注入器を使用するためのゼラチンのカプセルおよびカートリッジは、化合物の粉末混合物およびラクトースまたはデンプンなどの適切な粉末基剤を含有して製剤化することができる。

30

【0167】

眼は、視力の維持に重要な眼成分を供給するいくつかの構造的および機能的に異なる血管床を含む。これらの床は、それぞれ網膜の内側および外側部分を供給する網膜および脈絡膜血管系、ならびに角膜の周辺に位置する角膜縁血管系を含む。

40

【0168】

操作されたポリリボヌクレオチドを含む医薬組成物は、例えば局所、経口、全身、硝子体内、前房内、結膜下、結膜下、テノン嚢下、眼球後、眼内、後強膜近傍、眼周囲、網膜下および脈絡膜上投与を含む任意の適切な形態または経路によって眼に投与することができる。組成物は、前眼房、後眼房、硝子体腔（硝子体内）、網膜固有腔および／または網膜下腔を含む眼の任意の部分に製剤を注射することによって投与できる。組成物はまた、非侵襲的方法によって送達することもできる。製剤を投与する非侵襲的な方法には、無針注射装置を使用することが含まれ得る。医薬組成物の効率的な送達のために複数の投与経路を用いることができる。

【0169】

50

本開示の操作されたポリヌクレオチドは、例えば血管内皮細胞などの内皮細胞、網膜色素上皮（RPE）などの網膜の細胞、角膜細胞、線維芽細胞、星状細胞、グリア細胞、周皮細胞、虹彩上皮細胞、神経起源の細胞、毛様体上皮細胞、ミュラー細胞、外側直筋の細胞などの眼を取り囲む、眼に結合した筋肉細胞、眼窩脂肪細胞、強膜および上強膜の細胞、小柱網の細胞ならびに結合組織細胞を含む任意の適切な眼細胞に送達することができる。

【0170】

本明細書に開示される組成物は、被験体に投与されると、被験体の細胞による少なくとも約80%、90%または95%のトランスフェクション効率を有し得る。一部の場合には、カプセル化組成物のトランスフェクション効率は、被験体に投与されると、非カプセル化ポリリボヌクレオチドと比較して少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、200%、225%、250%、275%、300%、325%、350%、375%、400%、450%または500%である。一部の状況では、修飾ポリリボヌクレオチドを含む（一部の場合には非修飾ポリリボヌクレオチドも含む）組成物のトランスフェクション効率は、被験体に投与されると、非修飾ポリリボヌクレオチドだけを含む組成物と比較して少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、200%、225%、250%、275%、300%、325%、350%、375%、400%、450%または500%である。組成物のトランスフェクション効率は、組成物の外層に細胞浸透性ペプチドまたはカチオンコーティングなどの担体を添加することによって高めることができる。組成物のトランスフェクション効率は、組成物の密度によって調節することができる。

【0171】

本明細書に記載の操作されたポリリボヌクレオチドを含む組成物を調製するための方法は、固体、半固体または液体組成物を形成するために1つ以上の不活性な薬学的に許容される賦形剤または担体を用いて化合物を製剤化することを含む。固体組成物には、例えば散剤、錠剤、分散性顆粒、カプセル、カシェ剤および坐剤が含まれる。液体組成物には、例えば、化合物が溶解している溶液、化合物を含むエマルジョン、または本明細書で開示される化合物を含むリポソーム、ミセルもしくはナノ粒子を含有する溶液が含まれる。半固体組成物には、例えばゲル、懸濁液およびクリームが含まれる。組成物は、液体溶液もしくは懸濁液、使用前には液体中の溶液もしくは懸濁液に適した固体形態、またはエマルジョンであり得る。これらの組成物はまた、少量の非毒性の補助物質、例えば湿潤剤または乳化剤、pH緩衝剤、および他の薬学的に許容される添加剤も含み得る。

【0172】

薬学的に許容される賦形剤の非限定的な例は、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Nineteenth Ed (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1995); Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania 1975; Liberman, H. A. and Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, New York, N. Y., 1980; および Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Seventh Ed. (Lippincott Williams & Wilkins 1999)に見出すことができ、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。

【0173】

ポリヌクレオチド（例えばポリリボヌクレオチド）を含む組成物は、様々な用量で提供することができる。ポリヌクレオチドまたはポリリボヌクレオチドの用量は、約1 μg～約1000 μg、約1 μg～約500 μg、約1 μg～約1000 μg、約10 μg～約

500 μ g、約20 μ g～約500 μ g、約25 μ g～約500 μ g、約30 μ g～約500 μ g、約40 μ g～約500 μ g、約50 μ g～約500 μ g、約10 μ g～約250 μ g、約20 μ g～約250 μ g、約30 μ g～約250 μ g、約40 μ g～約250 μ g、約50 μ g～約250 μ g、約1 μ g～約200 μ g、約10 μ g～約200 μ g、約20 μ g～約200 μ g、約30 μ g～約200 μ g、約40 μ g～約200 μ g、約50 μ g～約200 μ g、約25 μ g～約50 μ g、約25 μ g～約100 μ g、約25 μ g～約150 μ g、約25 μ g～約200 μ g、約25 μ g～約250 μ g、約25 μ g～約300 μ g、約25 μ g～約350 μ g、約25 μ g～約400 μ g、約25 μ g～約450 μ g、約25 μ g～約500 μ g、約50 μ g～約750 μ g、または約25 μ g～約1000 μ gの操作されたポリリボヌクレオチドであり得る。一部の場合には、ポリヌクレオチドの用量は、約1mg～約100mg、約1mg～約50mg、約10mg～約50mg、約20mg～約50mg、約25mg～約50mg、約30mg～約50mg、約40mg～約50mg、約50mg～約100mg、約1mg～約25mg、約2mg～約25mg、約3mg～約25mg、約4mg～約25mg、約5mg～約25mg、約1mg～約20mg、約1mg～約20mg、約2mg～約20mg、約3mg～約20mg、約4mg～約20mg、または約5mg～約20mgの操作ポリリボヌクレオチドである。

【0174】

組成物中（例えばカプセル化剤の中）のポリリボヌクレオチドの割合は、0.25重量%ポリリボヌクレオチド、0.5重量%ポリリボヌクレオチド、0.75重量%ポリリボヌクレオチド、1重量%ポリリボヌクレオチド、1.25重量%ポリリボヌクレオチド、1.5重量%ポリリボヌクレオチド、1.75重量%ポリリボヌクレオチド、2重量%ポリリボヌクレオチド、2.25重量%ポリリボヌクレオチド、2.5重量%ポリリボヌクレオチド、2.75重量%ポリリボヌクレオチド、3重量%ポリリボヌクレオチド、3.25重量%ポリリボヌクレオチド、3.5重量%ポリリボヌクレオチド、3.75重量%ポリリボヌクレオチド、4重量%ポリリボヌクレオチド、4.25重量%ポリリボヌクレオチド、4.5重量%ポリリボヌクレオチド、4.75重量%ポリリボヌクレオチド、5重量%ポリリボヌクレオチド、5.25重量%ポリリボヌクレオチド、5.5重量%ポリリボヌクレオチド、5.75重量%ポリリボヌクレオチド、6重量%ポリリボヌクレオチド、6.25重量%ポリリボヌクレオチド、6.5重量%ポリリボヌクレオチド、6.75重量%ポリリボヌクレオチド、7重量%ポリリボヌクレオチド、7.25重量%ポリリボヌクレオチド、7.5重量%ポリリボヌクレオチド、7.75重量%ポリリボヌクレオチド、8重量%ポリリボヌクレオチド、8.25重量%ポリリボヌクレオチド、8.5重量%ポリリボヌクレオチド、8.75重量%ポリリボヌクレオチド、9重量%ポリリボヌクレオチド、9.25重量%ポリリボヌクレオチド、9.5重量%ポリリボヌクレオチド、9.75重量%ポリリボヌクレオチド、10重量%ポリリボヌクレオチド、10.25重量%ポリリボヌクレオチド、10.5重量%ポリリボヌクレオチド、10.75重量%ポリリボヌクレオチド、11重量%ポリリボヌクレオチド、11.25重量%ポリリボヌクレオチド、11.5重量%ポリリボヌクレオチド、11.75重量%ポリリボヌクレオチド、12重量%ポリリボヌクレオチド、12.25重量%ポリリボヌクレオチド、12.5重量%ポリリボヌクレオチド、12.75重量%ポリリボヌクレオチド、13重量%ポリリボヌクレオチド、13.25重量%ポリリボヌクレオチド、13.5重量%ポリリボヌクレオチド、13.75重量%ポリリボヌクレオチド、14重量%ポリリボヌクレオチド、14.25重量%ポリリボヌクレオチド、14.5重量%ポリリボヌクレオチド、14.75重量%ポリリボヌクレオチド、15重量%ポリリボヌクレオチド、15.25重量%ポリリボヌクレオチド、15.5重量%ポリリボヌクレオチド、15.75重量%ポリリボヌクレオチド、16重量%ポリリボヌクレオチド、16.25重量%ポリリボヌクレオチド、16.5重量%ポリリボヌクレオチド、16.75重量%ポリリボヌクレオチド、17重量%ポリリボヌクレオチド、17.25重量%ポリリボヌクレオチド、17.5重量%ポリリボヌクレオチド、17.75重量%ポリリボヌクレオチド、18重量%

10

20

30

40

50

ポリリボヌクレオチド、18.25重量%ポリリボヌクレオチド、18.5重量%ポリリボヌクレオチド、18.75重量%ポリリボヌクレオチド、19重量%ポリリボヌクレオチド、19.25重量%ポリリボヌクレオチド、19.5重量%ポリリボヌクレオチド、19.75重量%ポリリボヌクレオチド、20重量%ポリリボヌクレオチド、20.5重量%ポリリボヌクレオチド、21重量%ポリリボヌクレオチド、21.5重量%ポリリボヌクレオチド、22重量%ポリリボヌクレオチド、22.5重量%ポリリボヌクレオチド、23重量%ポリリボヌクレオチド、23.5重量%ポリリボヌクレオチド、24重量%ポリリボヌクレオチド、24.5重量%ポリリボヌクレオチド、または25重量%ポリリボヌクレオチド以上であり得る。あるいは、製剤中（例えばカプセル化剤の中）のポリリボヌクレオチドの割合は、約25%未満のポリリボヌクレオチド、24.5%ポリリボヌクレオチド、24%ポリリボヌクレオチド、23.5%ポリリボヌクレオチド、23%ポリリボヌクレオチド、22.5%ポリリボヌクレオチド、22%ポリリボヌクレオチド、21.5%ポリリボヌクレオチド、21%ポリリボヌクレオチド、20.5%ポリリボヌクレオチド、20%ポリリボヌクレオチド、19.5%ポリリボヌクレオチド、19%ポリリボヌクレオチド、18.5%ポリリボヌクレオチド、18%ポリリボヌクレオチド、17.5%ポリリボヌクレオチド、17%ポリリボヌクレオチド、16.5%ポリリボヌクレオチド、16%ポリリボヌクレオチド、15.5%ポリリボヌクレオチド、15%ポリリボヌクレオチド、14.5%ポリリボヌクレオチド、14%ポリリボヌクレオチド、13.5%ポリリボヌクレオチド、13%ポリリボヌクレオチド、12.5%ポリリボヌクレオチド、12%ポリリボヌクレオチド、11.5%ポリリボヌクレオチド、11%ポリリボヌクレオチド、10.5%ポリリボヌクレオチド、10%ポリリボヌクレオチド、9.5%ポリリボヌクレオチド、9%ポリリボヌクレオチド、8.5%ポリリボヌクレオチド、8%ポリリボヌクレオチド、7.5%ポリリボヌクレオチド、7%ポリリボヌクレオチド、6.5%ポリリボヌクレオチド、6%ポリリボヌクレオチド、5.5%ポリリボヌクレオチド、5%ポリリボヌクレオチド、4.5%ポリリボヌクレオチド、4%ポリリボヌクレオチド、3.5%ポリリボヌクレオチド、3%ポリリボヌクレオチド、2.5%ポリリボヌクレオチド、2%ポリリボヌクレオチド、1.5%ポリリボヌクレオチド、1%ポリリボヌクレオチド、0.5%ポリリボヌクレオチド、または0.1%ポリリボヌクレオチドであり得る。

【0175】

一部の場合には、本開示のカプセル化組成物は、被験体におけるポリリボヌクレオチド、医薬担体、カプセル化剤またはポリマー材料（例えばポリエチレングリコールもしくはポリエチレニミン）の血漿、血清または血中濃度を、装置の使用の約1秒～約30分、約1秒～20分、約1秒～10分、約1秒～5分、約1秒～2分、約1秒～1分、約1秒～約30秒、約30秒～30分、約30秒～20分、約30秒～10分、約30秒～5分、約30秒～2分、約30秒～約1分、約1分～約30分、約1分～約25分、約1分～約20分、約1分～約15分、約1分～約10分、約5分～約30分、約5分～約25分、約5分～約20分、約5分～約15分、約5分～約10分、約10分～約30分、約10分～約25分、約10分～約20分、または約10分～約15分以内に生じさせることができる。ポリリボヌクレオチド、医薬担体、カプセル化剤またはポリマー材料（例えばポリエチレングリコールもしくはポリエチレニミン）濃度の血漿、血清または血中濃度は、ピーク濃度または平均濃度であり得る。

【0176】

【実施例】

【実施例1】

DNAI1 RNA含有の作製

この実験は、DNAI1相補的デオキシリボ核酸構築物の作製を実証する。

【0177】

方法：DNAI1をGenScriptで合成した。pUC57／DNAI1をHindIIIおよびEcoRI HF制限酵素で消化した。さらに、消化したpVAX120

ベクターおよびDNAI1 cDNAをゲル精製し、連結した（DNAI1のORFはコドン最適化されている）。修飾されていないヌクレオチドを利用したRNA生成のために、標準的なインビトロ翻訳手順を用いた。ワクシニアウイルスキャッピングシステムおよびキャップ2'-O-メチルトランスフェラーゼを用いてキャッピング反応を実施した。図1は、キャップされたおよびキャップされていないDNAI1 RNAの生成を示すアガロースゲルである。この実験では、DNAI1 cDNAをpVAX120に連結して、ポリ（A）尾部を含む構築物を提供したことに留意されたい。

【0178】

〔実施例2〕

哺乳動物細胞におけるDNAI1リボ核酸の発現

この実験は、HEK-293細胞におけるDNAI1の発現（翻訳）を実証する。図2は、トランスフェクションの6時間後、24時間後および48時間後の293細胞におけるDNAI1 mRNAの翻訳を示すウェスタンブロットである。この実験のために、6ウェルプレート中の 5×10^5 293細胞／ウェルに、messenger maxトランスフェクション試薬3.75 μ lを用いてDNAI1 RNA 2.5 μ gをトランスフェクトした。トランスフェクションの6、24および48時間後、細胞をウェルから掻き取り、ペレット化し、ペレットをRIPA緩衝液に溶解した。このブロットを、Abcamの抗DNAI1 ab166912でプローブした。C末端FLAG標識DNAI1プラスミドDNAを対照としてトランスフェクトし、プラスミドとmRNAとのMWの差は、おそらくpENTRYベクター中のFLAGタグによるものである。

【0179】

〔実施例3〕

原発性纖毛機能不全症に罹患したヒト被験者の治療のための操作されたポリリボヌクレオチドを含む組成物の製剤化。

【0180】

組成物を以下のように製剤化する：

DNAI1遺伝子配列であるNCBI参照配列：NM_012144をコードする核酸構築物を、実施例1に記載したように調製する。分枝鎖ポリエチレンイミンをSigma Aldrich（商標）から購入する。直鎖インビボjetPEI（登録商標）（ポリエチレンイミン）をPolypplus transfection（登録商標）（Irlkirsch, France）から購入し、さらに精製することなく使用する。製造業者のプロトコルに従って、jetPEIを、製造業者によって提供された滅菌10%グルコース溶液およびSigma-Aldrich（St. Louis, MO）から購入したHPLCグレードの水を用いて5%グルコース（最終濃度）に希釈する。核酸構築物を5%グルコース（最終濃度）に希釈した後、RNAおよびjetPEI溶液を1：1の比率で組み合わせ／混合し、最終N／P比8とする。次いで、mRNAを鼻腔内滴下によって投与する。あるいは、核酸構築物を、リポプレックス製剤を噴霧するまたは嗅ぐことによる投与に製剤化することもできる。

【0181】

〔実施例4〕

RNA品質への転写後ポリアデニル化反応時間の影響

RNA品質への転写後ポリアデニル化反応時間の影響を試験した。インビトロ転写（IVT）後のポリアデニル化反応時間は、典型的には60～90分の長さであり、通常、多くとも約～200AsのポリA長を提供する。mRNAは加水分解を受けやすいため、転写後ポリアデニル化反応の間に経時的に分解されることが多い。DNAI1ポリA尾部の最適長を維持し、RNA品質を最大にするために、鋳型に既に含まれているポリA尾部を有する軸系ダイニン中間鎖1タンパク質またはその変異体をコードする核酸構築物を構築した。

【0182】

DNAI1 mRNAを作製するために使用した、ポリA配列を有するおよび有さない

10

20

30

40

50

DNAI1 遺伝子配列をコードする核酸構築物の概要を以下に示す：

【表 4】

表 4					
DNAI1 遺伝子配列をコードする核酸構築物	ベクター	線状化のための酵素	コドン最適化	ヌクレオチド組成	IVT 後のポリ(A)
DNAI1	pCMV6Entry	Pme I	なし	非修飾	あり
DNAI1(配列番号 14)	pVAX	NotI	あり、GenScript	非修飾	なし、鋳型内のポリ(A)配列

10

【0183】

図3は、0～60分の反応時間で転写後にポリアデニル化されたDNAI1-pCMV6Entryプラスミドから生成されたDNAI1 mRNAの長さを決定するためのフラグメントアナライザデータを示す。これは、より長いポリアデニル化反応時間で転写物の長さが増加することを実証する。図4は、0～60分の反応時間で転写後にポリアデニル化されたこれらのDNAI1 mRNAの品質を調べるためのフラグメントアナライザデータを示す。これらの結果は、より長い反応時間でのピーク%の減少およびプレピークスメア%の増加によって示されるように、ポリアデニル化反応が進行するにつれてRNAが分解を受けることを示す。図5は、8%PAGEによって決定したDNAI1-pVAXプラスミド鋳型中のポリA配列の長さを示す。

20

【0184】

【実施例5】

インビトロでのRNA作製および品質管理

種々の細胞型および免疫原性における翻訳効率への、様々な比率で特異的化学修飾ヌクレオチドを組み込むことの影響を比較するために、以下の実験を行った。

【0185】

実験は、1) 核酸構築物のインビトロ転写；2) 核酸構築物のインビトロキャッピング；3) 転写されたRNAの完全性の分析；4) dsRNAのイムノドットプロットアッセイ；および5) 転写されたRNAのヌクレオチド組成の分析を含んだ。いくつかの修正を加えて、インビトロ転写（IVT）およびRNAのキャッピングのための一般的なプロトコルに従った。DNAI1遺伝子をコードする核酸構築物のIVT反応を、20mM MgCl₂および7.5mMの各リボヌクレオチドの存在下に37℃で6時間実施した。

30

【0186】

表5は、軸系ダイニン中間鎖1をコードする核酸構築物からインビトロ転写された様々な特異的化学修飾ヌクレオチドを示す。

40

50

【表 5】

表 5						
	試料	インビトロ転写反応の修飾ヌクレオチド組成物	5' キャップ	ベクター骨格	5' UTR	3' UTR
2	DNAI1-RNA-002.2a(配列番号14)	非修飾	あり	pVAX	ベクター	ベクター
3	DNAI1-RNA-003.2a(配列番号14)	50%Ψ	あり	pVAX	ベクター	ベクター
4	DNAI1-RNA-004.2a(配列番号14)	100%Ψ	あり	pVAX	ベクター	ベクター
5	DNAI1-RNA-037.1a(配列番号14)	100% m1Ψ	あり	pVAX	ベクター	ベクター

10

【0187】

結果：

UV測定

【表 6】

表 6				
	試料	インビトロ転写反応の修飾ヌクレオチド組成物	mg/mL	260/280
2	DNAI1-RNA-002.2a	非修飾	0.944	2.22
3	DNAI1-RNA-003.2a	50%Ψ	0.971	2.16
4	DNAI1-RNA-004.2a	100%Ψ	0.940	2.13
5	DNAI1-RNA-037.1a	100% m1Ψ	1.092	1.94

20

【0188】

鋳型ポリ(A)長-フラグメントアナライザ

インビトロ転写のための鋳型として用いたDNAI1核酸構築物(配列番号5)のポリ(A)尾部の長さの分析は、元のクローニングベクター(pVAX-A120)と比較してA残基の数が維持されていることを示した。最初のベクターは120個のアデノシンヌクレオチドを含み、100~150bpのバンドがこの核酸構築物で検出された(図5)。鋳型をEcoRIおよびNotIで消化してポリ(A)フラグメントを除去した：12個の非ポリ(A)ヌクレオチドがフラグメントの一部であると予想される。G*AAATCtgca g-ポリ(A)-GC*GGCCGC=12ヌクレオチド+EcoRI/NotI生成フラグメント中のポリ(A)。

30

【0189】

RNAスミア分析-フラグメントアナライザ

DNAI1のために生成した全ての転写物について、約2,000ヌクレオチドのピークを検出した。フラグメントアナライザでのインビトロ生成転写物の評価は、キャップされた転写物が良好な完全性を維持することを示した：繰り返し実験においてスミア含量(RNA分解および/または加水分解の指標)の限られた検出を認めた。簡単に述べると、200ng/μLの試料2μLをフラグメントアナライザ(DNF-471標準感度RNA分析キット(15ヌクレオチドの下部マーカー))で分析した。データ解析はPROSize 2.0ソフトウェアを用いて行った。サイジング精度はおよそ±5%以内であり、サイジングの再現性は約5%CV以内であり、定量精度はおよそ±20%以内であり、および定量の再現性は約10%CVである。図6は、標準的なヌクレオチドのみ、すなわ

40

50

ちアデノシン 5' - ミリン酸、グアノシン 5' - ミリン酸、シチジン 5' - ミリン酸およびウリジン 5' - ミリン酸のみを含むインビトロ反応についてのフラグメントアナライザデータを示す。図 7 は、プソイドウリジンとウリジン 5' - ミリン酸の 50 % / 50 % 混合物を含むインビトロ反応についてのフラグメントアナライザデータを示す。図 8 は、100 % プソイドウリジン 5' - ミリン酸を含むインビトロ反応についてのフラグメントアナライザデータを示す。図 9 は、100 % 1 - メチル - プソイドウリジン 5' - ミリン酸を含むインビトロ反応についてのフラグメントアナライザデータを示す。表 7 は、RNA スメア分析の結果をまとめたものである：

【表 7】

表 7				
試料	プレピークス メア%	ポストピ ークス メア%	完全 長%	長さ
DNAI1-RNA-002.2a	24.9	3.9	71.2	2366
DNAI1-RNA-003.2a	18.5	2.5	79.0	2338
DNAI1-RNA-004.2a	16.4	3.0	80.6	2298
DNAI1-RNA-037.1a	17.7	0.4	81.9	2338

【0190】

ドットプロットによって検出された二本鎖 RNA 含量は、J2 抗体との反応性を示した。図 10 は、軸系ダイニン中間鎖 1 をコードする核酸構築物からのインビトロ転写 RNA のドットプロット分析によって検出された二本鎖 RNA 含量、ならびに表 5 に示す様々な特異的修飾を有する転写された DNAI1 構築物の二本鎖 RNA 含量を示す。

【0191】

ヌクレオシド組成分析

表 8 ~ 10 は、軸系ダイニン中間鎖 1 をコードする核酸構築物からのインビトロ転写 RNA のヌクレオチド組成分析を示す。様々な特異的ヌクレオチド修飾を表 5 に示す。図 11 ~ 13 は、転写物のヌクレアーゼ消化およびそれに続く脱リン酸化の後に得られた個々のリボヌクレオチドの対応する HPLC クロマトグラムを示す。

【0192】

表 8 は、非修飾ヌクレオチドを有する転写された軸系ダイニン中間鎖 1 をコードする核酸構築物からのインビトロ転写 RNA のヌクレオチド組成分析を示す。図 11 は、対応する HPLC クロマトグラムを示す。

【表 8】

表 8	
ヌクレオチド組成(非修飾)	予想存在率%[理論的]
A	28.9 [27.3]
C	26.9 [26.5]
G	26.6 [28.9]
U	17.7 [17.3]

【0193】

表 9 は、50 % プソイドウリジンを有する転写された軸系ダイニン中間鎖 1 をコードする核酸構築物からのインビトロ転写 RNA のヌクレオチド組成分析を示す。図 12 は、対応する HPLC クロマトグラムを示す。同一の逆相 HPLC 条件を用いた疎水性 1 - メチル - プソイドウリジンの保持時間は、平均すると約 9.5 分であり、検討した他の全てのリボヌクレオチドから十分に分離されている（データは示していない）。

【表 9】

表 9	
ヌクレオチド組成	予想存在率%
A	28.2
C	27.0
G	26.9
U	8.1
Ψ	9.7(ϵ_{262})*

*経験的吸収係数比 $\epsilon_{262}/\epsilon_{260}=1.001(\Psi)$ を用いて推定した濃度

10

【0194】

表10は、100%プソイドウリジンを含む転写された軸系ダイニン中間鎖1をコードする核酸構築物からのインビトロ転写RNAのヌクレオチド組成分析を示す。図13は、対応するHPLCクロマトグラムを示す。

【表10】

表 10	
ヌクレオチド組成	予想存在率%
A	28.8
C	26.5
G	26.9
Ψ	17.8(ϵ_{262})*

*経験的吸収係数比 $\epsilon_{262}/\epsilon_{260}=1.001(\Psi)$ を用いて推定した濃度

20

【0195】

[実施例6]

翻訳効率

上記DNA I 1 転写物の翻訳効率を3種の細胞株：1) HEK-293 ヒト胚性腎細胞；2) A549 腺癌ヒト肺基底上皮細胞；および3) MLE-15 マウス肺上皮細胞において評価した。各細胞株を3組重複して各DNA I 1 転写物でトランスフェクトし、得られた細胞抽出物をウェスタンブロット法でDNA I 1 タンパク質発現について分析した。簡単に述べると、ウェル当たり 1×10^6 (HEK-293、MLE-15) または 2×10^6 (A549) の細胞をプレーティングし、18時間後に6ウェルプレートでトランスフェクトした。1:37.5のRNA: Messenger Max比でMessenger Maxトランスフェクション試薬を使用して、約100ngの各RNAで細胞をトランスフェクトした。トランスフェクションの6時間後に細胞を採取し、RIPA緩衝液(50mM トリス-HCl pH8、150mM NaCl、1% Triton X-100、0.1% SDS、0.5% タウロコール酸ナトリウム)中で全細胞抽出物を調製した。各抽出物からの総タンパク質3.5μgを、2.5%β-メルカプトエタノールを含有する1×LD S試料緩衝液中で調製し、4~12% Bis-Tris SDS-PAGEゲルに負荷した。次いで、ゲルを30Vの定電圧で30分間、続いて150Vで1時間泳動させた。タンパク質を、10%メタノールを含有する1×NuPAGE転移緩衝液中25Vで1時間、PVDF膜に移した。転移後、抗DNA I 1抗体を用いたウェスタンブロットによってDNA I 1タンパク質を検出し、アルカリホスファターゼ化学発光基質を用いて発色させた。ウェスタンブロット値を、Sypro Ruby全タンパク質染色を負荷対照として用いて正規化し、非修飾RNAに対する相対的発現として表している。各データ点は、3つの生物学的(トランスフェクション)複製物の平均±標準偏差である。

30

40

【0196】

図14、15および16は、それぞれ、HEK-293、A549およびMLE-15

50

細胞におけるDNAI1タンパク質の発現を示す。DNAI1は、699アミノ酸、79.3 kDaのタンパク質として発現された。プソイドウリジン(Ψ)含有転写物は、非修飾RNAまたはそれ以上の発現レベルで、3種の細胞型全てにおいて良好に発現する。同様に、1-メチルプソイドウリジン(m¹Ψ)含有転写物は、A549およびMLE15細胞において非修飾RNAまたはそれ以上の発現レベルを生じた(HEK-293細胞における発現は、この転写物については試験しなかった)。重要な点として、各転写物の発現レベルおよびそれらの相対的順位は各細胞株において同様であり、DNAI1翻訳への細胞型特異的影響がないことを示した。図17は、HEK-293、A549およびMLE-15細胞におけるDNAI1タンパク質の相対的発現を示すグラフである。ウェスタンブロットのシグナル値を、全タンパク質染色を用いて正規化し、非修飾DNAI1 mRNAと比較して平均発現±標準偏差としてプロットした。

【0197】

表11は、上記の各細胞株におけるDNAI1タンパク質の相対的発現の要約である。

【表11】

表 11				
試料	修飾スクレオチド組成	HEK-293 細胞の相対的発現(%±標準偏差)。	A549 細胞の相対的発現(%±標準偏差)。	MLE15 細胞の相対的発現(%±標準偏差)。
DNAI1-RNA-002.2a	非修飾	100±9.57	100±11.09	100±5.35
DNAI1-RNA-003.2a	50%Ψ	152.21±31.21	120.36±12.40	125.18±35.84
DNAI1-RNA-004.2a	100%Ψ	97.52±23.12	127.57±12.90	100.26±15.71
DNAI1-RNA-037.3a	100%m ¹ Ψ	n.d.	126±3	164±17

【0198】

【実施例7】

インビトロでのヒトDNAI1をコードする核酸構築物の免疫原性

上記転写物の免疫原性を、2種の細胞株、すなわちA549腺癌ヒト肺胞基底上皮細胞およびHepG2ヒト肝癌細胞において、サイトカイン産生を測定することによって試験した。転写物に応答したIL-6の産生をA549細胞で測定し、IP-10の産生をHepG2細胞で測定した。各細胞株を、3組重複して、ある力価の各RNAでトランスフェクトした。簡単に述べると、ウェル当たり20,000(A549)または40,000(HepG2)細胞のいずれかをプレーティングし、24時間後に96ウェルプレートでトランスフェクトした。次いで、細胞をある力価の各転写物でトランスフェクトした：RNA：MessengerMax比1：1.5でMessengerMax試薬を用いて、非修飾、50%Ψおよび100%Ψ転写物についてはウェル当たり250ng～7ngならびに100%m¹Ψ mRNAについてはウェル当たり1000ng～32ng。

【0199】

トランスフェクションの18時間後に培養上清を採取した。代謝的に活性な細胞の指標としてATPレベルを測定するCellTiter-Gloアッセイキット(Promega)を用いて、上清採取直後に細胞生存率を測定した。IL-6検出のために、A549細胞培養上清をアッセイ緩衝液で1：20に希釈し、IL-6高感度ヒトELISAキット(Abcam ab46042)を用いてIL-6レベルを測定した。ヒトIP-10 ELISAキットSimpleStep(Abcam ab173194)を用いて、希釈していないHepG2細胞培養上清中でIP-10を検出した。

【0200】

図18および19は、DNA I 1 転写物で処理したA549細胞におけるIL-6の誘導を示す。図18に示すアッセイのために、細胞をRNA-Messenger Max複合体に18時間曝露し、図19に示すアッセイでは、RNA-Messenger Max複合体をトランスフェクションの2時間後に除去した。両方の場合に、ELISAによるIL-6の検出のために細胞培養上清を18時間で採取した。図20および21は、Cell Titer-Gloアッセイを用いて測定した、図18および19に示すアッセイの細胞生存率を示す。図22は、DNA I 1 転写物によるHep G2細胞におけるIP-10の誘導を示す。このアッセイのために、細胞をRNA-Messenger Max複合体に18時間曝露した。次いで、様々な量の各DNA I 1 mRNAによって誘導されたIP-10発現をELISAによって測定した。図23は、Cell Titer-Gloアッセイを用いて測定した、図22に示すアッセイの細胞生存率を示す。

10

【0201】

[実施例8]

HEK293細胞におけるDNA I 1 mRNAの翻訳

図24は、HEK293細胞における、軸系ダイニン中間鎖1 (DNA I 1) をコードする核酸または核酸対照のピーク発現を示す。図24に示すように、HEK293細胞では、HEK293細胞におけるDNA I 1 核酸構築物の翻訳は6時間でピークに達するが、48時間でもまだ存在する。

【0202】

[実施例9]

リポプレックス製剤化した100% m1Ψ含有DNA I 1 mRNAの投与後の、未分化および完全分化ヒト気道上皮細胞 (HAEC) およびマウス気管上皮細胞 (MTEC) におけるDNA I 1 タンパク質の発現。

20

【0203】

リポプレックス製剤化したDNA I 1-HA mRNAでの処理後の初代ヒト気道上皮細胞およびマウス気管上皮細胞におけるDNA I 1 タンパク質の発現をウェスタンブロットによって評価した。この実験に用いた100% m1Ψ含有転写物は、HAエピトープタグを含むDNA I 1 の交互のコドン使用鋳型 (配列番号15) から作製した。初代ヒト上皮細胞は、未分化培養物のために液内培養物中に維持するかまたは気-液界面で維持し、約3週間かけて完全に分化した繊毛上皮に分化させた。次に、12または24 μg のリポプレックス製剤化DNA I 1-HA mRNAを、完全に分化した培養の頂端側に適用するか、または未分化の液体培養物に直接適用した。細胞を、1回または2日連続して1日1回処理した。次いで、最終処理の24または48時間後に細胞を採取し、RIPA緩衝液 (50mM Tris-HCl pH8、150mM NaCl、1% Triton X-100、0.1% SDS、0.5% タウロコール酸ナトリウム) 中で全細胞抽出物を調製した。各抽出物からの全タンパク質を4~12% Bis-Tris SDS-PAGEゲル上で分離し、PVDF膜に移した。DNA I 1-HAタンパク質を、抗HA抗体を用いたウェスタンブロットによって検出し、増強化学発光基質を用いて発色させた。図25に示すように、DNA I 1-HAタンパク質は、未分化および完全に分化した繊毛を有するヒト気道上皮細胞およびマウス気管上皮細胞の両方において高レベルで発現された。

30

40

【0204】

[実施例10]

コード領域における変化したヌクレオチド使用頻度は、転写物治療のためのmRNAの安定性を高める。

【0205】

修飾mRNAのコドン内でおよびコドンを越えて、より反応性のジヌクレオチドの数を減少させることを目的とする変化したヌクレオチド使用頻度のスキームは、RNAの固有の化学的不安定性によって課される制限を部分的に緩和する。同時に、RNA転写物中のU含量を減少させることは、その免疫原性を低下させる。伝統的なコドン最適化 (CO) を、(+) 反応性ジヌクレオチドの除去および(+) U減少の前に実施することができ、

50

一般的にCO++と称されるORFを生じる。

【0206】

図26は、配列番号14のポリリボヌクレオチド(A)と比較した、配列番号15のポリリボヌクレオチド(B)を発現するDNAI1における全体的な品質改善を示す。全体的な品質の改善は、変化したコドン使用頻度戦略で操作されたポリリボヌクレオチドにおけるフラグメントアナライザトレースの主要RNAピーク%の増加によって判断される。さらに、CO++最適化オープンリーディングフレーム、すなわち変化したコドン使用頻度を特徴とするDNAI1 mRNAは、伝統的に最適化された転写物(CO)と比較した場合、トランスフェクトされたA549細胞における翻訳効率の改善を示す(図27参照)。ここでは、ウェル当たり 1.25×10^6 細胞をプレーティングし、18時間後に6ウェルプレートでトランスフェクトした。1:12のRNA:Messenger Max比でMessenger Maxトランスフェクション試薬を用いて、細胞を約100ngの各RNAでトランスフェクトし、トランスフェクションの6時間後に採取した。抗DNAI1抗体を用いたウェスタンブロット法によって、699アミノ酸、79.3kDaのタンパク質としてのDNAI1タンパク質の発現が明らかになった。相対的翻訳効率を3つの生物学的(トランスフェクション)複製物の平均として示す。

10

【0207】

図28に示すように、J2抗体センシング二本鎖RNA含量との反応性の変化が観察された。既知の濃度のポリ-ICとの比較に基づき、CO++ORFを特徴とする、DNAI1をコードするmRNAのdsRNA含量は平均39ngであり、一方CO ORFを有するRNAは、インビトロ転写mRNA 200ngをドットした場合、68ngのdsRNA夾雑物を含むと推定された。

20

【0208】

[実施例11]

非修飾および100% $m^1\psi$ 含有DNAI1 mRNAのHPLC精製。

【0209】

DNAI1 mRNAの逆相高速液体クロマトグラフィ(HPLC)を用いて、完全長RNAを精製し、T7 RNAポリメラーゼを用いたインビトロ転写の間に生成された長いdsRNAなどの夾雑物を除去した。イオン対形成剤としての酢酸トリエチルアンモニウム(TEAA)および漸増アセトニトリル含量を含む移動相と共に、非多孔性RNasep C18セミプレップ(100mm×21.2mm、カラム容積(CV)約2.4mL)カラムを用いて得られた分画および精製結果を図29に示す。精製画分のフラグメントアナライザ評価によって判断すると、セミプレップRNasepカラムを用いて全体的な品質改善および完全長RNA濃縮が観察された。この品質改善は、非修飾(A、B)および100% $m^1\psi$ 含有DNAI1 mRNA種(C、D)の両方で達成された。

30

【0210】

図30に示すように、翻訳活性の中等度の改善が、A549細胞における完全長非修飾mRNA転写物濃縮画分で観察された(AおよびB)。ここでは、ウェル当たり 1×10^6 のA549細胞をプレーティングし、18時間後に6ウェルプレートでトランスフェクトした。1:12のRNA:Messenger Max比でMessenger Maxトランスフェクション試薬を用いて、細胞を約100ngの各RNAでトランスフェクトし、トランスフェクションの6時間後に採取した。1:2000のウサギ抗DNAI1(AbCam ab166912、組換えDNAI1フラグメントに対するウサギモノクローナル抗DNAI1)抗体を用いたウェスタンブロット法によって、699アミノ酸、79.3kDaタンパク質としてのDNAI1タンパク質の発現が明らかになった(C)。相対的翻訳効率を、3つの生物学的(トランスフェクション)複製物の平均±標準偏差として示す。

40

【0211】

重要な点として、HPLCは、セミプレップ規模で遅く溶出するドットブロット反応種を容易に除去する。J2抗体と反応する検出可能な二本鎖RNA含量は、もっぱら、遅く

50

溶出する画分 F 7 および未精製対照転写物内でのみ観察されたが、他の全ての H P L C 精製 D N A I 1 m R N A 画分 F 1 ~ F 6 では検出できなかった (D)。非修飾の H P L C 精製転写物の免疫原性を、トランスフェクトされた m R N A に応答した I L - 6 の産生を観測することによって、A 5 4 9 細胞においてさらに試験した。各細胞株を、3 組重複して、ある力価の各 R N A でトランスフェクトした。簡単に述べると、ウェル当たり 2 0 , 0 0 0 細胞をプレーティングし、1 8 時間後に 9 6 ウェルプレートでトランスフェクトした。次いで、1 : 1 . 5 の R N A : M e s s e n g e r M a x 比で M e s s e n g e r M a x 試薬を用いて、ウェル当たり 2 5 0 n g ~ 7 n g で、細胞をある力価の各転写物でトランスフェクトした。最も高い相対的 D N A I 1 タンパク質レベルを生じる H P L C 精製画分 F 3 について、I L - 6 応答の減少が観察された (R N A 1 2 5 n g でトランスフェクトした細胞について、未精製参照 D N A I 1 m R N A : (7 2 7 ± 1 0 9 p g / m L) > F 3 (7 3 ± 3 0 p g / m L)) (E)。

【 0 2 1 2 】

本発明の好ましい実施形態を本明細書で示し、説明したが、そのような実施形態が単なる例示として提供されることは、当業者には明らかであろう。本発明は、本明細書中で提供される特定の実施例によって限定されるものではない。本発明を上述の明細書を参照して説明してきたが、本明細書の実施形態の説明および例示は、限定的な意味で解釈されることを意図しない。本発明から逸脱することなく、当業者には数多くの変形、変更および置換が想起されるであろう。さらに、本発明の全ての態様は、様々な条件および変数に依存する、本明細書に記載の特定の表現、形状または相対的比率に限定されないことを理解されたい。本明細書に記載される本発明の実施形態に対する様々な代替物を本発明の実施において使用し得ることが理解されるべきである。したがって、本発明は、そのような代替物、修正、変形または等価物も包含することが企図される。以下の特許請求の範囲は本発明の範囲を定義し、これらの特許請求の範囲内の方法および構造ならびにそれらの等価物がそれによって包含されることが意図されている。

本発明は一態様において、以下を提供する。

[項目 1]

原発性纖毛機能不全症を有しているまたは有する危険性がある被験体を治療する方法であって、軸系ダイニン中間鎖 1 タンパク質またはその変異体をコードする核酸構築物を含む組成物を前記被験体に投与することを含み、前記核酸構築物が、前記被験体の細胞内での前記軸系ダイニン中間鎖 1 タンパク質またはその変異体の異種発現または増強された発現を提供するコドンを含み、それによって原発性纖毛機能不全症を有しているまたは有する危険性がある前記被験体を治療する、方法。

[項目 2]

前記核酸構築物が相補的デオキシリボ核酸構築物である、項目 1 に記載の方法。

[項目 3]

前記核酸構築物が、軸系ダイニン中間鎖 1 タンパク質またはその変異体をコードする前記コドンを含まない核酸構築物を含む組成物に曝露された細胞内のレベルと比較して、軸系ダイニン中間鎖 1 タンパク質またはその変異体を少なくとも約 1 . 5 倍増加したレベルでコードする、項目 1 に記載の方法。

[項目 4]

前記倍数が少なくとも約 5 である、項目 3 に記載の方法。

[項目 5]

前記構築物の前記コドンが、哺乳動物の軸系ダイニン中間鎖 1 m R N A と少なくとも 7 0 % 相同である、項目 1 に記載の方法。

[項目 6]

前記構築物の前記コドンが、ヒトの軸系ダイニン中間鎖 1 m R N A と少なくとも 7 0 % 相同である、項目 5 に記載の方法。

[項目 7]

前記構築物が、前記軸系ダイニン中間鎖 1 をコードする前記コドン配列に隣接する 3 ' ま

たは5'非コード領域を含み、前記非コード領域が前記被験体の細胞内での前記タンパク質の発現を増強する、項目1に記載の方法。

[項目8]

前記構築物が、前記軸系ダイニン中間鎖1をコードする前記コドン配列に隣接する3'非コード領域を含み、前記3'非コード領域が3'キャップ非依存性翻訳エンハンサー(3'-CITE)を含む、項目7に記載の方法。

[項目9]

前記コドン配列と前記3'非コード領域または前記5'非コード領域との間に少なくとも1つの中間配列領域をさらに含む、項目7に記載の方法。

[項目10]

前記コドン配列がオープンリーディングフレーム(ORF)配列を含む、項目7に記載の方法。

[項目11]

前記構築物が、前記軸系ダイニン中間鎖1をコードする前記コドン配列に隣接する3'非コード領域を含み、前記3'非コード領域がヒストンタンパク質の前記ヌクレオチド配列に由来する3'ステムループ領域を含む、項目7に記載の方法。

[項目12]

前記コドン配列に隣接する前記3'非コード領域がポリアデノシン尾部を含み、前記ポリアデノシン尾部におけるアデノシンの数が前記軸系ダイニン中間鎖1タンパク質の前記翻訳効率を改善する、項目7に記載の方法。

[項目13]

前記コドン配列に隣接する前記3'非コード領域がポリアデノシン尾部を含み、前記ポリアデノシン尾部におけるアデノシンの数が前記軸系ダイニン中間鎖1 mRNAの前記半減期を延長させる、項目7に記載の方法。

[項目14]

前記コドン配列がオープンリーディングフレーム(ORF)配列を含む、項目12または13に記載の方法。

[項目15]

前記ポリアデノシン尾部の長さが多くとも200アデノシンである、項目12、13または14に記載の方法。

[項目16]

前記ポリアデノシン尾部のある割合がヌクレオチド類似体を含む、項目12、13または14に記載の方法。

[項目17]

前記ポリアデノシン尾部のヌクレオチドの20%未満がヌクレオチド類似体である、項目12、13または14に記載の方法。

[項目18]

前記構築物が非標準的ヌクレオチド類似体を含む、項目1に記載の方法。

[項目19]

軸系ダイニン中間鎖1をコードするヌクレオチドの30%未満がヌクレオチド類似体である、項目18に記載の方法。

[項目20]

前記ヌクレオチド類似体が、プソイドウリジン、1-メチルプソイドウリジンおよび5-メトキシウリジンからなる群より選択される、項目18に記載の方法。

[項目21]

前記ヌクレオチド類似体がプソイドウリジンである、項目18に記載の方法。

[項目22]

前記ヌクレオチド類似体が1-メチルプソイドウリジンである、項目18に記載の方法。

[項目23]

前記ヌクレオチド類似体が5-メトキシウリジンである、項目18に記載の方法。

10

20

30

40

50

[項目 2 4]

前記ヌクレオチド類似体がプソイドウリジンおよび 1-メチルプソイドウリジンである、項目 18 に記載の方法。

[項目 2 5]

前記組成物が、アルマジロリピート含有 4 (ARMC4)、21 番染色体オープンリーディングフレーム 59 (C21orf59)、コイルドコイルドメイン含有 103 (CCDC103)、コイルドコイルドメイン含有 114 (CCDC114)、コイルドコイルドメイン含有 39 (CCDC39)、コイルドコイルドメイン含有 40 (CCDC40)、コイルドコイルドメイン含有 65 (CCDC65)、サイクリン O (CCNO)、ダイニン (軸系) アセンブリ因子 1 (DNAAF1)、ダイニン (軸系) アセンブリ因子 2 (DNAAF2)、ダイニン (軸系) アセンブリ因子 3 (DNAAF3)、ダイニン (軸系) アセンブリ因子 5 (DNAAF5)、軸系ダイニン重鎖 11 (DNAH11)、軸系ダイニン重鎖 5 (DNAH5)、軸系ダイニン重鎖 6 (DNAH6)、軸系ダイニン重鎖 8 (DNAH8)、軸系ダイニン中間鎖 2 (DNAI2)、軸系ダイニン軽鎖 1 (DNAL1)、ダイニン調節複合体サブユニット 1 (DRC1)、失読症感受性 1 候補物 1 (DYX1C1)、成長停止特異的 8 (GAS8)、軸系中心対装置タンパク質 (HYDIN)、ロイシンリッチリピート含有 6 (LRRC6)、NME/NM23 ファミリーメンバー 8 (NME8)、口・顔・指症候群 1 (OFD1)、網膜色素変性症 GTP アーゼ調節因子 (RPGR)、ラジアルスポークヘッド 1 ホモログ (クラミドモナス) (RSPH1)、ラジアルスポークヘッド 4 ホモログ A (クラミドモナス) (RSPH4A)、ラジアルスポークヘッド 9 ホモログ (クラミドモナス) (RSPH9)、精子関連抗原 1 (SPAG1) およびジンクフィンガー MYND 型含有 10 (ZMYND10) からなる群より選択されるタンパク質をコードする少なくとも 1 つの追加の核酸構築物をさらに含む、項目 1 に記載の方法。

[項目 2 6]

前記組成物が、少なくとも 4 の、前記修飾ポリリボヌクレオチドのリン酸基のモル数に対するカチオン性ポリマーのアミン基のモル数の比を含む、項目 1 に記載の方法。

[項目 2 7]

前記組成物が、ナノ粒子またはナノカプセルに製剤化される、項目 1 に記載の方法。

[項目 2 8]

前記組成物が、カチオン性脂質、カチオン性ポリマーまたはナノエマルジョンに製剤化される、項目 1 に記載の方法。

[項目 2 9]

軸系ダイニン中間鎖 1 をコードする核酸構築物を含む組成物であって、前記核酸構築物が軸系ダイニン中間鎖 1 をコードする相補的デオキシリボ核酸を含み、前記組成物が被験体への投与用に製剤化される、組成物。

[項目 3 0]

軸系ダイニン中間鎖 1 をコードする核酸構築物を含む組成物であって、前記核酸構築物が、原発性纖毛機能不全症を有しているまたは有する危険性がある被験体の細胞内での前記軸系ダイニン中間鎖 1 タンパク質またはその変異体の異種発現または増強された発現を提供するコドンを含む、組成物。

[項目 3 1]

軸系ダイニン中間鎖 1 をコードする核酸構築物を含む組成物であって、軸系ダイニン中間鎖 1 をコードする前記ヌクレオチドの 30% 未満がヌクレオチド類似体である、組成物。

[項目 3 2]

前記構築物の前記コドンが、哺乳動物ヒト軸系ダイニン中間鎖 1 タンパク質と少なくとも 70% 相同である、項目 29、30 または 31 に記載の組成物。

[項目 3 3]

前記構築物の前記コドンが、ヒト軸系ダイニン中間鎖 1 タンパク質と少なくとも 70% 相同である、項目 32 に記載の組成物。

10

20

30

40

50

[項目 3 4]

前記構築物が、前記軸系ダイニン中間鎖 1 をコードする前記コドン配列に隣接する 3' または 5' 非コード領域を含み、前記非コード領域が前記被験体の細胞内での前記タンパク質の発現を増強する、項目 2 9、3 0 または 3 1 に記載の組成物。

[項目 3 5]

前記構築物が、前記軸系ダイニン中間鎖 1 をコードするコドン配列に隣接する 3' 非コード領域を含み、前記 3' 非コード領域が 3' キャップ非依存性翻訳エンハンサー (3' - C I T E) を含む、項目 2 9、3 0 または 3 1 に記載の組成物。

[項目 3 6]

前記構築物が、前記軸系ダイニン中間鎖 1 をコードする前記コドン配列に隣接する 3' 非コード領域を含み、前記 3' 非コード領域がヒストンタンパク質の前記ヌクレオチド配列に由来する 3' ステムループ領域を含む、項目 2 9、3 0 または 3 1 に記載の組成物。

10

[項目 3 7]

前記コドン配列に隣接する前記 3' 非コード領域がポリアデノシン尾部を含み、前記ポリアデノシン尾部におけるアデノシンの数が前記軸系ダイニン中間鎖 1 タンパク質の前記翻訳効率を改善する、項目 2 9、3 0 または 3 1 に記載の組成物。

[項目 3 8]

前記コドン配列に隣接する前記 3' 非コード領域がポリアデノシン尾部を含み、前記ポリアデノシン尾部におけるアデノシンの数が前記軸系ダイニン中間鎖 1 mRNA の前記半減期を改善する、項目 2 9、3 0 または 3 1 に記載の組成物。

20

[項目 3 9]

前記ポリアデノシン尾部の長さが多くとも 2 0 0 アデノシンである、項目 2 9、3 0 または 3 1 に記載の組成物。

[項目 4 0]

前記ポリアデノシン尾部のある割合がヌクレオチド類似体を含む、項目 2 9、3 0 または 3 1 に記載の組成物。

[項目 4 1]

前記ポリアデノシン尾部の核酸の 2 0 % 未満がヌクレオチド類似体である、項目 2 9、3 0 または 3 1 に記載の組成物。

[項目 4 2]

前記構築物がある割合のヌクレオチド類似体を含む、項目 2 9 または 3 0 に記載の組成物。

30

[項目 4 3]

軸系ダイニン中間鎖 1 をコードするヌクレオチドの 3 0 % 未満がヌクレオチド類似体である、項目 4 2 に記載の組成物。

[項目 4 4]

軸系ダイニン中間鎖 1 をコードするヌクレオチドの 2 0 % 未満がヌクレオチド類似体である、項目 4 2 に記載の組成物。

[項目 4 5]

前記ヌクレオチド類似体がプソイドウリジンである、項目 3 1 または 4 2 に記載の組成物。

40

[項目 4 6]

前記ヌクレオチド類似体が 1-メチルプソイドウリジンである、項目 3 1 または 4 2 に記載の組成物。

[項目 4 7]

前記ヌクレオチド類似体が 5-メトキシウリジンである、項目 3 1 または 4 2 に記載の組成物。

[項目 4 8]

前記ヌクレオチド類似体がプソイドウリジンおよび 1-メチルプソイドウリジンである、項目 3 1 または 4 2 に記載の組成物。

50

[項目 4 9]

前記組成物が少なくとも1つの追加の核酸構築物をさらに含む、項目 2 9、3 0 または 3 1 に記載の組成物。

[項目 5 0]

少なくとも1つの追加の核酸構築物が、アルマジロリピート含有 4 (ARMC4)、21 番染色体オープンリーディングフレーム 5 9 (C21orf59)、コイルドコイルドメイン含有 1 0 3 (CCDC103)、コイルドコイルドメイン含有 1 1 4 (CCDC114)、コイルドコイルドメイン含有 3 9 (CCDC39)、コイルドコイルドメイン含有 4 0 (CCDC40)、コイルドコイルドメイン含有 6 5 (CCDC65)、サイクリン O (CCNO)、ダイニン (軸系) アセンブリ因子 1 (DNAAF1)、ダイニン (軸系) アセンブリ因子 2 (DNAAF2)、ダイニン (軸系) アセンブリ因子 3 (DNAAF3)、ダイニン (軸系) アセンブリ因子 5 (DNAAF5)、軸系ダイニン重鎖 1 1 (DNAH11)、軸系ダイニン重鎖 5 (DNAH5)、軸系ダイニン重鎖 6 (DNAH6)、軸系ダイニン重鎖 8 (DNAH8)、軸系ダイニン中間鎖 2 (DNAI2)、軸系ダイニン軽鎖 1 (DNAL1)、ダイニン調節複合体サブユニット 1 (DRC1)、失読症感受性 1 候補物 1 (DYX1C1)、成長停止特異的 8 (GAS8)、軸系中心対装置タンパク質 (HYDIN)、ロイシンリッチリピート含有 6 (LRRC6)、NME / NM23 ファミリーメンバー 8 (NME8)、口・顔・指症候群 1 (OFD1)、網膜色素変性症 GTP アーゼ調節因子 (RPGR)、ラジアルスポークヘッド 1 ホモログ (クラミドモナス) (RSPH1)、ラジアルスポークヘッド 4 ホモログ A (クラミドモナス) (RSPH4A)、ラジアルスポークヘッド 9 ホモログ (クラミドモナス) (RSPH9)、精子関連抗原 1 (SPAG1) およびジンクフィンガー MYND 型含有 1 0 (ZMYND10) からなる群より選択されるタンパク質をコードする、項目 4 9 に記載の方法。

[項目 5 1]

前記核酸構築物が、被験体への投与用にさらに製剤化される、項目 3 0 または 3 1 に記載の組成物。

[項目 5 2]

前記製剤が、軸系ダイニン中間鎖 1 をコードする前記核酸構築物の治療有効量を含む、項目 5 1 に記載の組成物。

[項目 5 3]

前記核酸構築物が、軸系ダイニン中間鎖 1 タンパク質またはその変異体をコードする cDNA を含む、項目 2 9、3 0 または 3 1 に記載の組成物。

[項目 5 4]

項目 2 9、3 0 または 3 1 に記載の核酸構築物を含むベクター。

[項目 5 5]

項目 2 9、3 0 または 3 1 に記載の核酸構築物を含む単離された核酸。

[項目 5 6]

被験体において外因性にコードされたタンパク質を生成するための方法であって、前記被験体の細胞内の、アルマジロリピート含有 4 (ARMC4)、21 番染色体オープンリーディングフレーム 5 9 (C21orf59)、コイルドコイルドメイン含有 1 0 3 (CCDC103)、コイルドコイルドメイン含有 1 1 4 (CCDC114)、コイルドコイルドメイン含有 3 9 (CCDC39)、コイルドコイルドメイン含有 4 0 (CCDC40)、コイルドコイルドメイン含有 6 5 (CCDC65)、ダイニン (軸系) アセンブリ因子 1 (DNAAF1)、ダイニン (軸系) アセンブリ因子 2 (DNAAF2)、ダイニン (軸系) アセンブリ因子 3 (DNAAF3)、ダイニン (軸系) アセンブリ因子 5 (DNAAF5)、軸系ダイニン重鎖 1 1 (DNAH11)、軸系ダイニン重鎖 5 (DNAH5)、軸系ダイニン重鎖 8 (DNAH8)、軸系ダイニン中間鎖 2 (DNAI2)、軸系ダイニン軽鎖 1 (DNAL1)、ダイニン調節複合体サブユニット 1 (DRC1)、失読症感受性 1 候補物 1 (DYX1C1)、軸系中心対装置タンパク質 (HYDIN)、ロイシンリッチリピート含有 6 (LRRC6)、NME / NM23 ファミリーメンバー 8 (NM

10

20

30

40

50

E 8)、口・顔・指症候群 1 (O F D 1)、網膜色素変性症 G T P アーゼ調節因子 (R P G R)、ラジアルスポークヘッド 1 ホモログ (クラミドモナス) (R S P H 1)、ラジアルスポークヘッド 4 ホモログ A (クラミドモナス) (R S P H 4 A)、ラジアルスポークヘッド 9 ホモログ (クラミドモナス) (R S P H 9)、精子関連抗原 1 (S P A G 1) およびジンクフィンガー M Y N D 型含有 1 0 (Z M Y N D 1 0) からなる群より選択されるタンパク質をコードする核酸構築物を含む組成物を前記被験体に投与することを含み、前記核酸構築物のコドンが前記被験体の細胞内での前記タンパク質の発現のために最適化されており、翻訳時に前記構築物が前記被験体を治療するポリペプチドを生成する、方法。
[項目 5 7]

軸系ダイニン中間鎖 1 をコードし、配列番号 1 4 ~ 1 6 のいずれか 1 つを含む核酸構築物を含む組成物。

【図面】
【図 1】

【図 2】

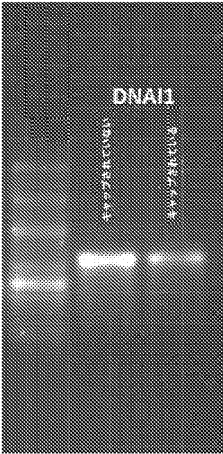


FIGURE 1

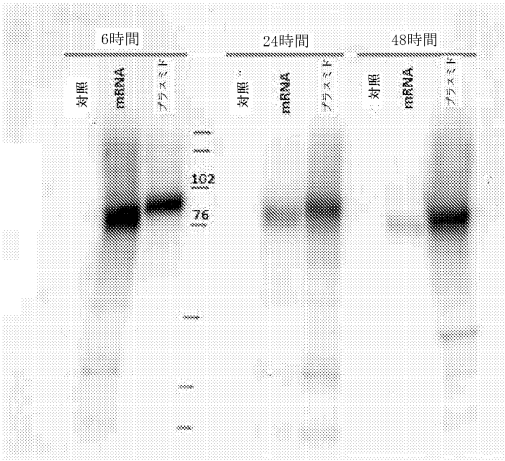


FIGURE 2

【図 3】

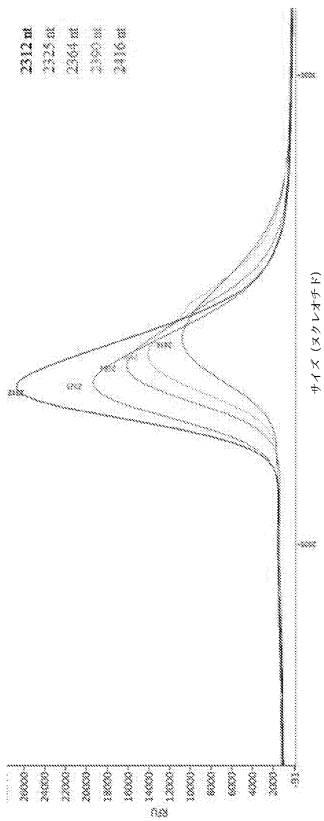


FIGURE 3

【図 4】

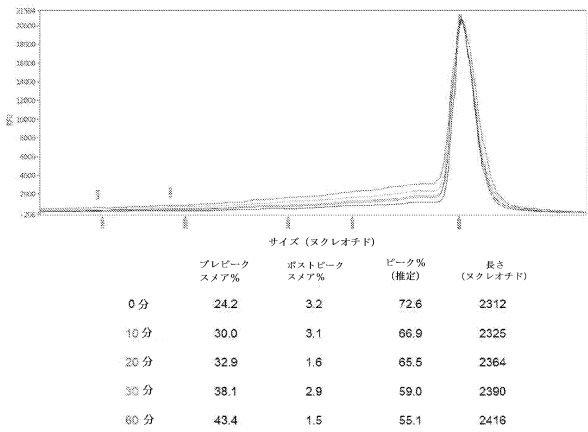


FIGURE 4

【図 5】

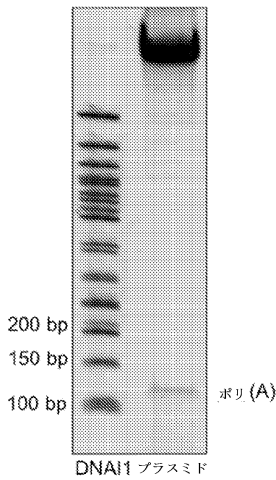


FIGURE 5

【図 6】

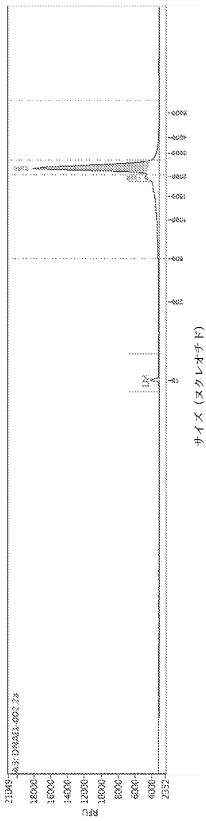


FIGURE 6

10

20

30

40

50

【図 7】

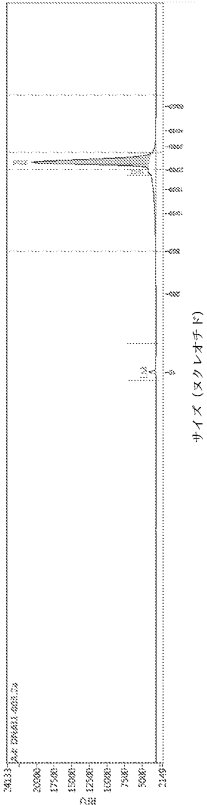


FIGURE 7

【図 8】

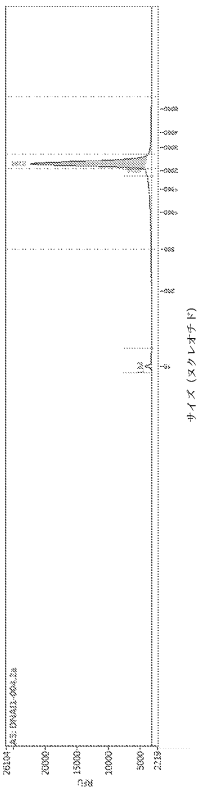


FIGURE 8

【図 9】

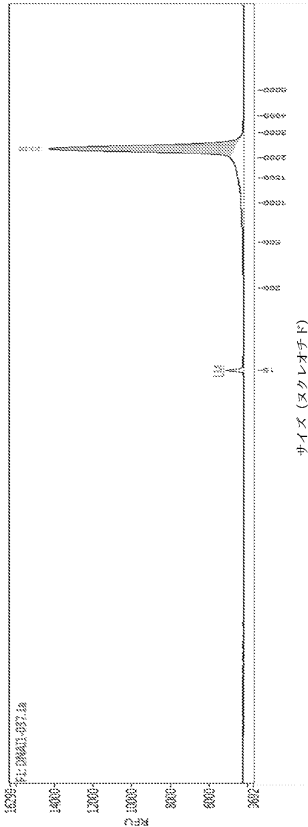


FIGURE 9

【図 10】

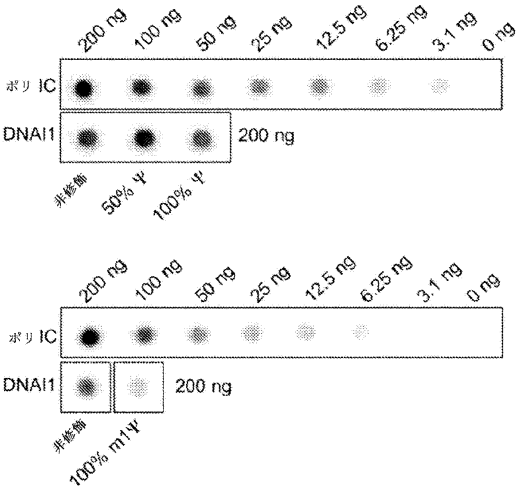


FIGURE 10

10

20

30

40

50

【図 1 1】

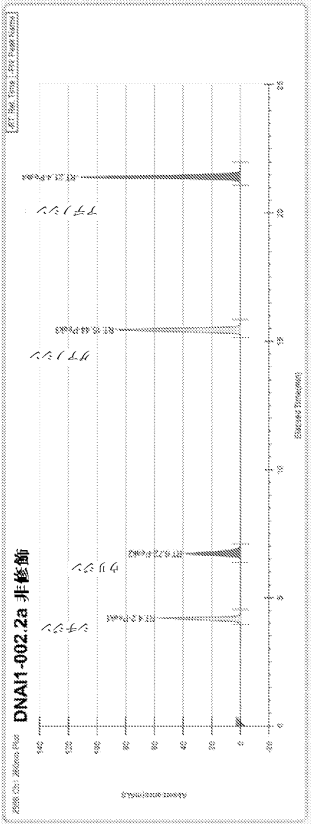


FIGURE 11

【図 1 2】

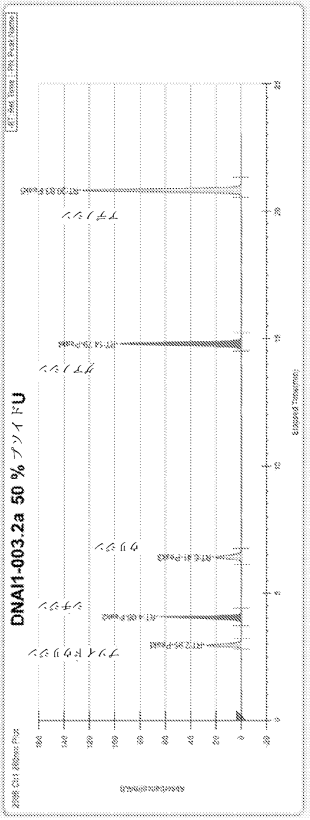


FIGURE 12

【図 1 3】

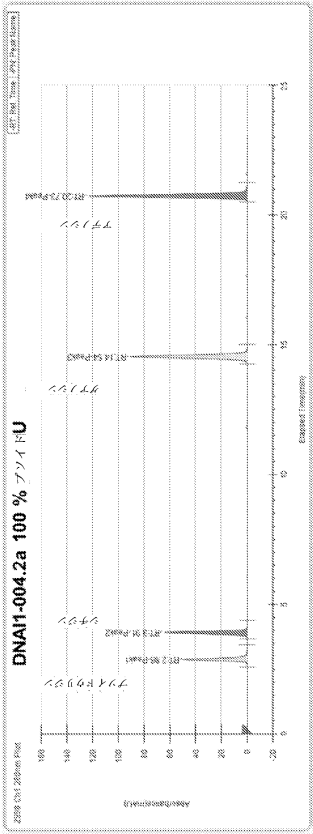


FIGURE 13

【図 1 4】

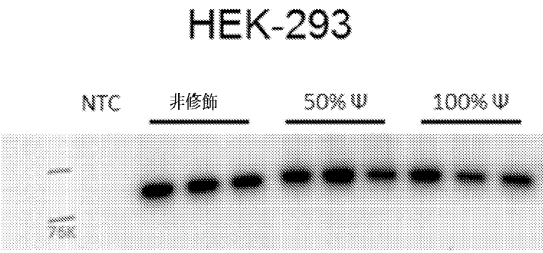


FIGURE 14

10

20

30

40

50

【図 1 5】

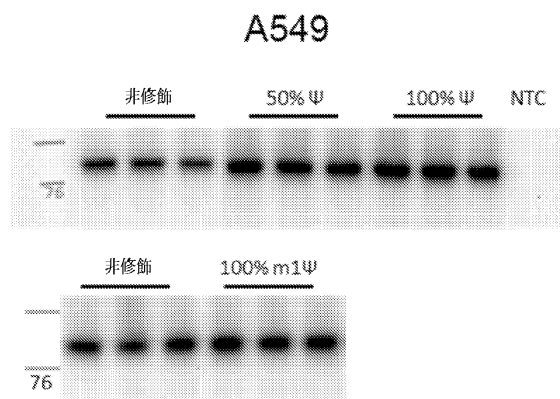


FIGURE 15

【図 1 6】

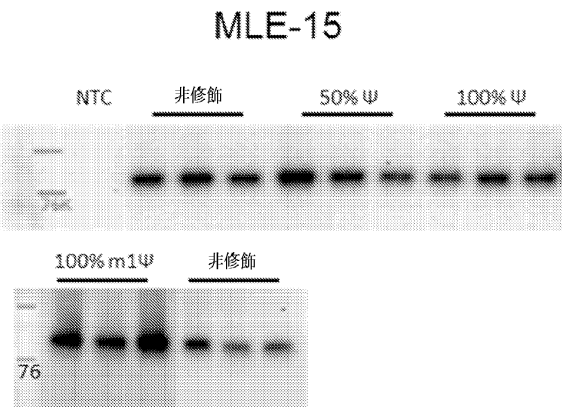


FIGURE 16

【図 1 7】

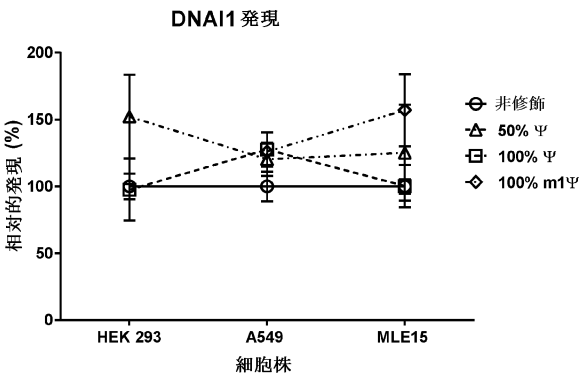


FIGURE 17

【図 1 8】

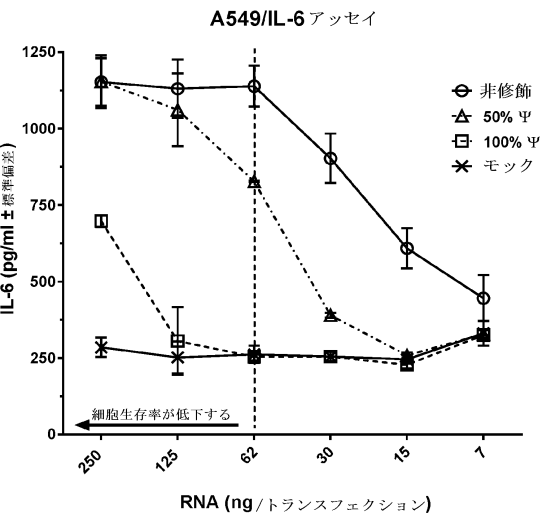


FIGURE 18

【図 19】

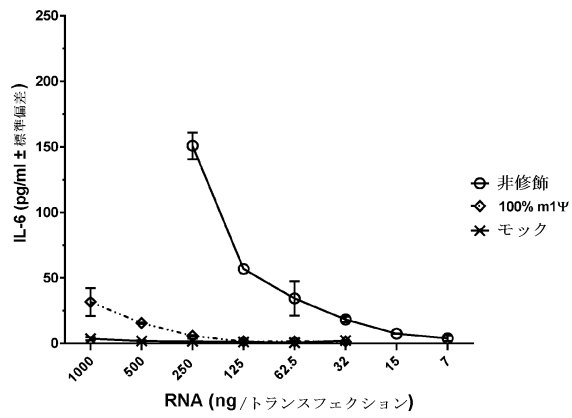


FIGURE 19

【図 20】

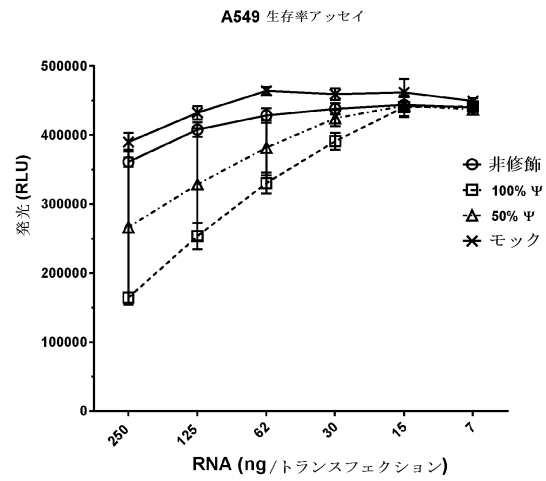


FIGURE 20

【図 21】

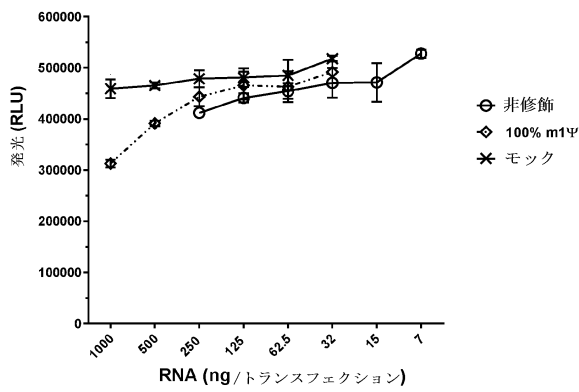


FIGURE 21

【図 22】

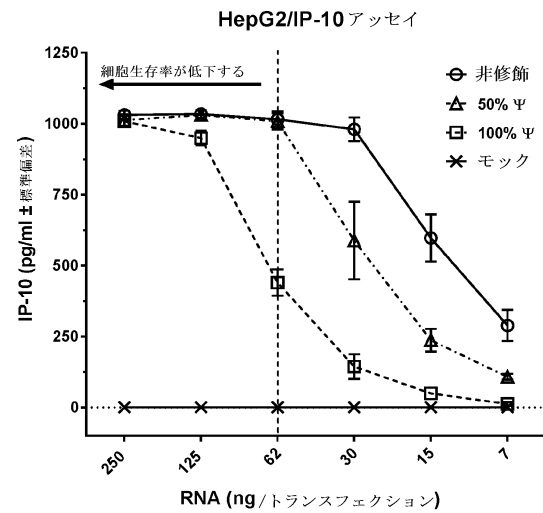


FIGURE 22

【図 2 3】

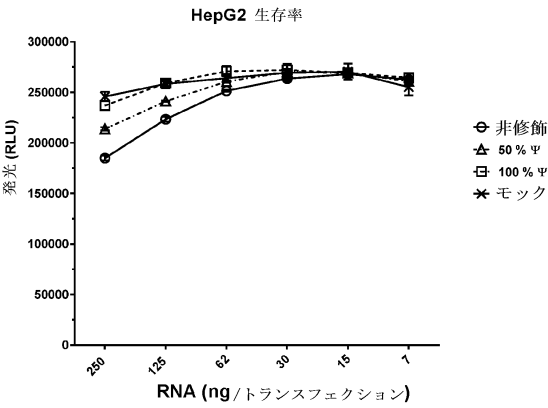
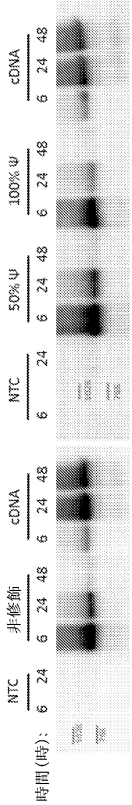


FIGURE 23

【図 2 4】



【図 2 5】

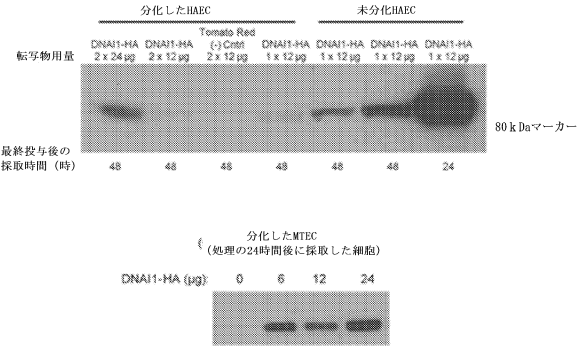


FIGURE 25

【図 2 6】

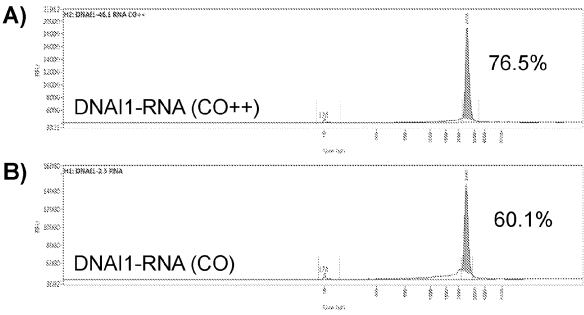


FIGURE 26

10

20

30

40

50

【図 27】

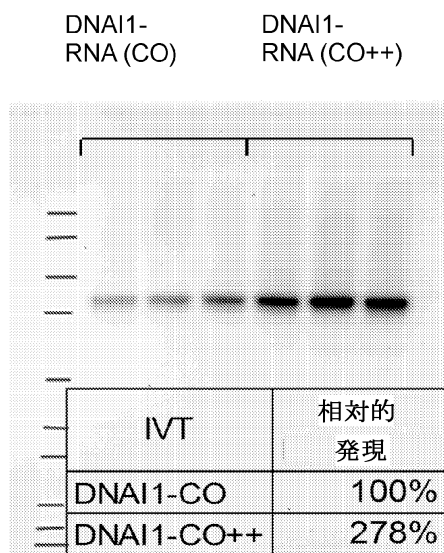


FIGURE 27

【圖 28】

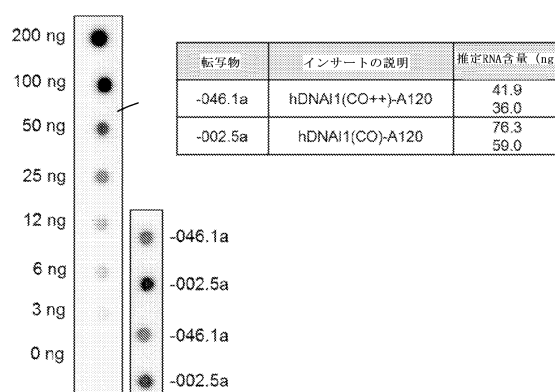


FIGURE 28

【圖 29】

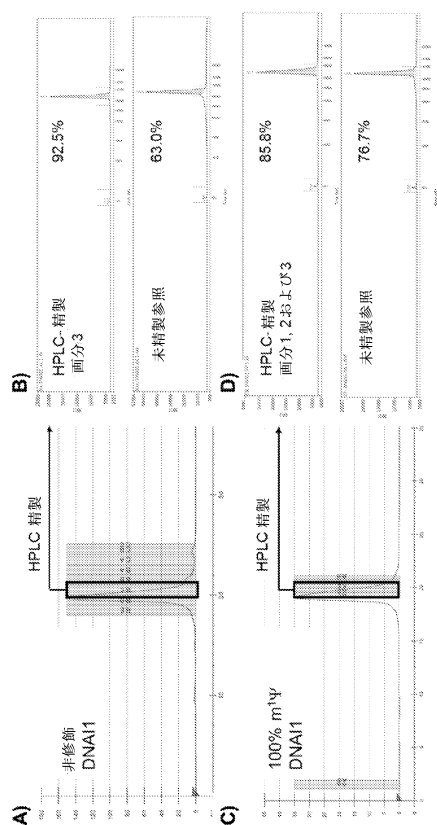


FIGURE 29

【図 30】

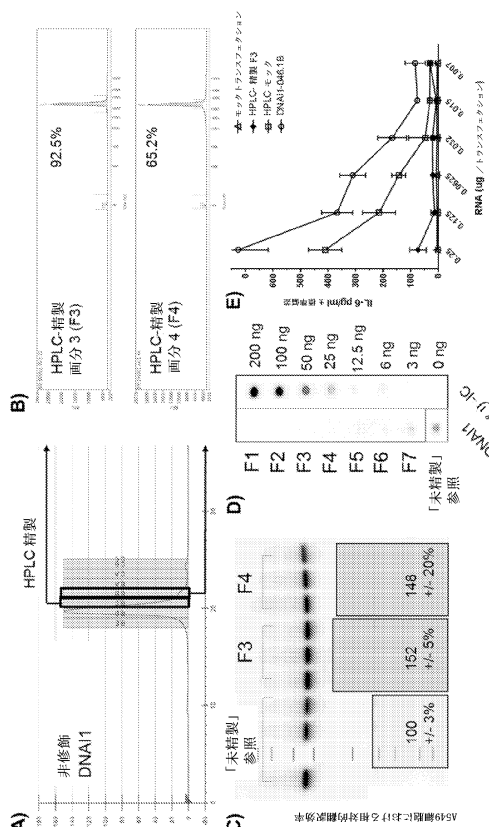


FIGURE 30

【配列表】

0007672786000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 K 31/7115(2006.01)
 A 6 1 P 11/00 (2006.01)
 A 6 1 P 15/08 (2006.01)
 A 6 1 P 43/00 (2006.01)
 C 1 2 N 15/09 (2006.01)
 C 1 2 N 15/12 (2006.01)
 C 1 2 N 15/63 (2006.01)

F I

A 6 1 K 31/7115
 A 6 1 P 11/00
 A 6 1 P 15/08
 A 6 1 P 43/00
 C 1 2 N 15/09 Z
 C 1 2 N 15/12
 C 1 2 N 15/63 Z

弁理士 安藤 健司

(74)代理人 100143823

弁理士 市川 英彦

(74)代理人 100183519

弁理士 櫻田 芳恵

(74)代理人 100196483

弁理士 川寄 洋祐

(74)代理人 100160749

弁理士 飯野 陽一

(74)代理人 100160255

弁理士 市川 祐輔

(74)代理人 100182132

弁理士 河野 隆

(74)代理人 100146318

弁理士 岩瀬 吉和

(74)代理人 100127812

弁理士 城山 康文

(72)発明者 ロックハート、デイビッド・ジェー

アメリカ合衆国、9 4 0 6 2、カリフォルニア、エメラルド・ヒルズ、レイクビュー・ウェイ・1 0 0 5

(72)発明者 ウストマン、ブランドン

アメリカ合衆国、9 2 1 0 3、カリフォルニア、サン・ディエゴ、フォート・ストックトン・ドライブ・2 0 2 0

(72)発明者 ヘニッヒ、ミルコ

アメリカ合衆国、9 4 0 8 7、カリフォルニア、サニーベール、カーライル・ウェイ・ナンバー1 2 2 ・8 6 5

(72)発明者 イシマル、ダニエラ

アメリカ合衆国、9 4 0 8 7、カリフォルニア、サニーベール、カーライル・ウェイ・ナンバー1 2 2 ・8 6 5

合議体

審判長 松波 由美子

審判官 岡山 太一郎

審判官 富永 みどり

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

CHHIN, B. et al., PLoS Genetics, 2009, Vol. 5, No. 3, Article No. e1000422, pp. 1-7

MAURO,VP. et al., Trends Mol Med, 201411, vol.20, p.604-613