(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7698881号
(P7698881)

(45)発行日　令和7年6月26日(2025.6.26)

(24)登録日　令和7年6月18日(2025.6.18)

(51)国際特許分類

		FI		
C12N 15/113(2010.01)		C12N	15/113	ZZNA
C12N 15/12 (2006.01)		C12N	15/12	
C12Q 1/6869(2018.01)		C12Q	1/6869	Z
A61K 31/7125(2006.01)		A61K	31/7125	
A61P 43/00 (2006.01)		A61P	43/00	105

請求項の数　15　（全32頁）

(21)出願番号　特願2021-558932(P2021-558932)
(86)(22)出願日　令和2年4月2日(2020.4.2)
(65)公表番号　特表2022-527814(P2022-527814A)
(43)公表日　令和4年6月6日(2022.6.6)
(86)国際出願番号　PCT/EP2020/059369
(87)国際公開番号　WO2020/201406
(87)国際公開日　令和2年10月8日(2020.10.8)
審査請求日　令和5年3月16日(2023.3.16)
(31)優先権主張番号　1904709.1
(32)優先日　平成31年4月3日(2019.4.3)
(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)

(73)特許権者　517299054
プロキューアール セラピューティクス ツー ベスローテン フェンノートシャップ
オランダ国 2333 シーケー ライデン，ゼルニケドレーフ 9
(74)代理人　100092783
弁理士　小林 浩
(74)代理人　100120134
弁理士　大森 規雄
(72)発明者　トゥルネン，ジャンヌ ユハ
オランダ国 シーケイ ライデン 2333，ゼルニケドレーフ 9，プロキューアール セラピューティクス ツー ベスローテン フェンノートシャップ
(72)発明者　クレイン，バート

最終頁に続く

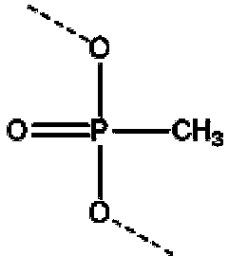
(54)【発明の名称】　ＲＮＡ編集のための化学修飾したオリゴヌクレオチド

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

標的核酸分子での標的ヌクレオシド、好ましくはアデノシンの脱アミノ化に使用するために、細胞内の前記標的核酸分子と二本鎖複合体を形成することができるアンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＯＮ）であって、前記標的ヌクレオシドに直接対向するＡＯＮでのヌクレオチドが、オーファンヌクレオチドであり、ヌクレオシド間結合の番号付けが、結合番号０が前記オーファンヌクレオチドからの５’結合となるようにし、オリゴヌクレオチドでの結合位置が、５’末端に向かって正（＋）に増分し、３’末端に向かって負に増分し、前記ＡＯＮが、結合位置０、－１、－２、－３、－４、－５、および／または－６で１つまたは複数のメチルホスホネート（methylphosphonate）（ＭＰ）結合を含み、ＭＰ結合が、以下の化学構造：

【化１】



を有する、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＯＮ）。
【請求項２】
前記オーファンヌクレオチドが、２’－ＯＭｅまたは２’－ＭＯＥリボース修飾を有さない、請求項１に記載のＡＯＮ。
【請求項３】
結合位置－０および／または－２でＭＰ結合を含む、請求項１または２に記載のＡＯＮ。
【請求項４】
前記ＭＰ結合が、ＤＮＡヌクレオシドを別のヌクレオシドと接続する、請求項１から３のいずれか一項に記載のＡＯＮ。
【請求項５】
前記ＭＰ結合が、ＤＮＡヌクレオシドをＤＮＡヌクレオシドと接続する、請求項４に記載のＡＯＮ。
【請求項６】
少なくとも１つのホスホロチオエート（phosphorothioate）もしくはホスホノアセテート（phosphonoacetate）ヌクレオシド間結合、および／またはアンロックド核酸（ＵＮＡ）リボース修飾を含む少なくとも１つのヌクレオチドをさらに含む、請求項１から５のいずれか一項に記載のＡＯＮ。
【請求項７】
リボースの２’位での置換を含む１つまたは複数のヌクレオチドをさらに含み、前記置換は、－ＯＨ；－Ｆ；置換または未置換、直鎖または分岐鎖の低級（Ｃ１～Ｃ１０）アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリル、アリル、またはアラルキル、１つまたは複数のヘテロ原子により中断され得る；－Ｏ－、Ｓ－、またはＮ－アルキル；－Ｏ－、Ｓ－、またはＮ－アルケニル；－Ｏ－、Ｓ－、またはＮ－アルキニル；－Ｏ－、Ｓ－、またはＮ－アリル；－Ｏ－アルキル－Ｏ－アルキル；－メトキシ；－アミノプロポキシ；－メトキシエトキシ；－ジメチルアミノオキシエトキシ；および－ジメチルアミノエトキシエトキシからなる群から選択される、請求項１から６のいずれか一項に記載のＡＯＮ。
【請求項８】
２’－ＯＭｅまたは２’－ＭＯＥリボース修飾を含む少なくとも１つのヌクレオチドを含み、前記オーファンヌクレオチドが、２’－ＯＭｅまたは２’－ＭＯＥリボース修飾を有さない、請求項１から７のいずれか一項に記載のＡＯＮ。
【請求項９】
細胞で、ヒトのＡＤＡＲ１またはＡＤＡＲ２などの、デアミナーゼ活性を有する酵素、好ましくはアデノシンデアミナーゼ活性を有する酵素を係合することが可能である、請求項１から８のいずれか一項に記載のＡＯＮ。
【請求項１０】
少なくとも１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、または３２ヌクレオチド長であり、１００ヌクレオチドより短く、好ましくは６０ヌクレオチドより短い、請求項１から９のいずれか一項に記載のＡＯＮ。
【請求項１１】
請求項１から１０のいずれか一項に記載のＡＯＮおよび薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物。
【請求項１２】
嚢胞性線維症、ハーラー症候群、α－１－アンチトリプシン（Ａ１ＡＴ）欠損症、パーキンソン病、アルツハイマー病、色素欠乏症、筋萎縮性側索硬化症、喘息、β－サラセミア、ＣＡＤＡＳＩＬ、シャルコー－マリー－ツース症候群、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、遠位脊髄性筋萎縮症（ＤＳＭＡ）、デュシェンヌ型／ベッカー型筋ジストロフィー、（栄養障害性）表皮水疱症、ファブリー病、第Ｖ因子ライデン関連障害、家族性腺腫性ポリポーシス、ガラクトース血症、ゴーシェ病、グルコース－６－リン酸脱水素酵素、血友病、遺伝性ヘモクロマトーシス、ハンター症候群、ハンチントン病、炎症性腸疾患（ＩＢ

Ｄ）、先天性多凝集症候群、レーバー先天性黒内障（例えば、ＬＣＡ１０）、レッシュ－ナイハン症候群、リンチ症候群、マルファン症候群、ムコ多糖症、筋ジストロフィー、Ｉ型およびＩＩ型筋強直性ジストロフィー、神経線維腫症、ニーマン－ピック病Ａ型、Ｂ型およびＣ型、ＮＹ－ｅｓｏ１関連がん、ポイツ－イェガース症候群、フェニルケトン尿症、ポンペ病、原発性線毛疾患、プロトロンビン突然変異関連障害（例えば、プロトロンビンＧ２０２１０Ａ突然変異）、肺高血圧症、（常染色体優性）色素性網膜炎、サンドホフ病、重症複合免疫不全症候群（ＳＣＩＤ）、鎌状赤血球貧血、脊髄性筋萎縮症、スタルガルト病、テイサックス病、アッシャー症候群（例えば、アッシャー症候群Ｉ型、ＩＩ型、およびＩＩＩ型）、Ｘ連鎖免疫不全、スタージ－ウェーバー症候群、ならびに、がんからなる群から好ましくは選択される、遺伝的障害の処置または予防での使用のための、請求項１から１０のいずれか一項に記載のＡＯＮ、または請求項１１に記載の医薬組成物。

【請求項１３】

インビトロまたはエクスビボで細胞内の標的ＲＮＡ分子に存在する少なくとも１つの標的ヌクレオシド、好ましくはアデノシンの脱アミノ化のための方法であって、

（ｉ）前記細胞に、請求項１から１０のいずれか一項に記載のＡＯＮまたは請求項１１に記載の医薬組成物を供給するステップ、

（ｉｉ）前記標的ＲＮＡ分子への前記ＡＯＮのアニーリングを可能にするステップ、

（ｉｉｉ）ヌクレオチドデアミナーゼ活性を有する哺乳動物酵素が、前記標的ＲＮＡ分子中の前記標的ヌクレオシドを脱アミノ化することを可能にするステップ、および

（ｉｖ）任意で、前記標的ＲＮＡ分子中の脱アミノ化した前記標的ヌクレオシドの存在を同定するステップ

を含む、方法。

【請求項１４】

ステップ（ｉｖ）が、

ａ）脱アミノ化した前記標的ヌクレオシドを含む、前記標的ＲＮＡ分子の領域をシークエンシングすること、

ｂ）前記標的ヌクレオシドが、ＵＧＡまたはＵＡＧ終止コドンに位置するアデノシンであり、脱アミノ化によってＵＧＧコドンに編集される場合、機能性、伸長型、全長および／もしくは野生型タンパク質の存在を評価すること、

ｃ）２つの標的アデノシンが、ＵＡＡ終止コドンに位置し、両方の標的アデノシンの脱アミノ化によってＵＧＧコドンに編集される場合、機能性、伸長型、全長および／もしくは野生型タンパク質の存在を評価すること、

ｄ）前記標的ＲＮＡ分子が、プレｍＲＮＡである場合、前記プレｍＲＮＡのスプライシングが、脱アミノ化により改変したかどうかを評価すること、または

ｅ）脱アミノ化後の前記標的ＲＮＡ分子が、機能性、全長、伸長型および／もしく野生型タンパク質をコードするものであり、機能的な読み出しを使用すること

を含む、請求項１３に記載の方法。

【請求項１５】

インビトロまたはエクスビボで標的ＲＮＡ分子に存在する少なくとも１つの標的ヌクレオシド、好ましくはアデノシンの脱アミノ化のための方法であって、

（ｉ）請求項１から１０のいずれか一項に記載のＡＯＮを供給するステップ、

（ｉｉ）前記標的ＲＮＡ分子への前記ＡＯＮのアニーリングを可能にするステップ、

（ｉｉｉ）ヌクレオチドデアミナーゼ活性を有する哺乳動物酵素が、前記標的ＲＮＡ分子中の前記標的ヌクレオシドを脱アミノ化することを可能にするステップ、および

（ｉｖ）前記標的ＲＮＡ分子中の脱アミノ化した前記ヌクレオシドの存在を同定するステップ

を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、医学分野に関する。特に、細胞のＲＮＡ分子をアンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＯＮ）により標的化して、標的ＲＮＡ分子に存在する標的ヌクレオチドを特異的に変化させる、ＲＮＡ編集の分野に関する。本発明は、デアミナーゼ活性を有する酵素を係合することによって、標的ＲＮＡ分子での疾患を起こし得る突然変異したヌクレオチドなどの特異的なヌクレオチドを補正することを目的とする。より具体的には、本発明は、インビボおよびインビトロでのその安定性を高め、それによりそのＲＮＡ編集能力を高めるのに好ましい位置で化学修飾されたＡＯＮに関する。

【背景技術】

【０００２】

ＲＮＡ編集は、真核細胞が、多くの場合、部位特異的で正確な方法で、そのＲＮＡ分子の配列を改変し、それにより、ゲノムをコードしたＲＮＡのレパートリーを数桁増加させる、自然なプロセスである。ＲＮＡ編集酵素は、動物界および植物界を通じて真核生物において記述されており、これらプロセスは、単純な生命体（例えば、カエノラブディティス・エレガンス（Caenorhabditis elegans））からヒトに至る後生動物での細胞恒常性を制御する、重要な役割を担っている。ＲＮＡ編集の例は、アデノシン（Ａ）からイノシン（Ｉ）への変換、およびシチジン（Ｃ）からウリジン（Ｕ）への変換であり、それぞれ、アデノシンデアミナーゼおよびシチジンデアミナーゼと言われる酵素により生じる。最も広く研究されているＲＮＡ編集システムは、アデノシンデアミナーゼ酵素を含むシステムである。

【０００３】

アデノシンデアミナーゼは、目的の酵素に依存して、触媒ドメインを含むマルチドメインタンパク質、および、２～３個の二本鎖ＲＮＡ認識ドメインである。各認識ドメインは、特異的二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）配列および／または構造を認識する。触媒ドメインの重要な機能は、核酸塩基の脱アミノ化により、標的ＲＮＡでの近傍の、およそ予め定義された位置において、ＡをＩに変換することであるが、触媒ドメインはまた、ｄｓＲＮＡらせんの部分を認識および結合する役割を担う。イノシンは、細胞の翻訳機構により、グアノシンとして読み込まれ、編集されたアデノシンが、ｍＲＮＡまたはプレｍＲＮＡのコード領域にある場合、タンパク質配列を再コードすることができる。ＡからＩへの変換はまた、元の開始点の上流に新規の翻訳開始点を作成する、標的ｍＲＮＡの５’非コード配列（Ｎ末端の拡張されたタンパク質を生じる）で起こるか、または、３’ＵＴＲもしくは転写の他の非コード部分（ＲＮＡのプロセッシングおよび／もしくは安定性に影響を与えることができる）で起こり得る。加えて、ＡからＩへの変換は、プレｍＲＮＡのイントロンまたはエクソンにおいてスプライスエレメントで起こり、それにより、スプライシングのパターンを改変し得る。その結果として、エクソンは、含まれ得るか、またはスキップし得る。アデノシンデアミナーゼは、ヒトデアミナーゼｈＡＤＡＲ１およびｈＡＤＡＲ２、ならびにｈＡＤＡＲ３を含む、ＲＮＡに作用するアデノシンデアミナーゼ（ＡＤＡＲ）として知られている酵素のファミリーの一部である。しかし、ｈＡＤＡＲ３に対して、デアミナーゼ活性は、未だに示されていない。

【０００４】

アデノシンデアミナーゼを適用する標的ＲＮＡを編集するオリゴヌクレオチドの使用が報告されている（例えば、Montiel-Gonzalez et al. PNAS 2013, 110(45):18285-18290、Vogel et al. 2014. Angewandte Chemie Int Ed 53:267-271、Woolf et al. 1995. PNAS 92:8298-8302）。Ｍｏｎｔｉｅｌ－Ｇｏｎｚａｌｅｚら（２０１３）によって記載された方法の不利な点は、切断された天然ＡＤＡＲタンパク質のアデノシンデアミナーゼドメインに遺伝的に融合した、バクテリオファージλＮタンパク質のｂｏｘＢ認識ドメインからなる融合タンパク質が必要なことである。主要な障害である融合タンパク質で形質導入されるか、または、標的細胞が、発現用の操作されたアデノシンデアミナーゼ融合タンパク質をコードする核酸構築物でトランスフェクトされるかのいずれかの標的細胞を必要とする。Ｖｏｇｅｌら（２０１４）に記載のシステムは、どのようにして、まずＡＤＡＲを遺伝子改変することなくシステムを適用し、続いて標的ＲＮＡを有する細

胞をトランスフェクトまたは形質導入して、細胞にこの遺伝子操作されたタンパク質を供給するかが明らかではないという点で、同様の欠点がある。明らかに、このシステムは、（例えば治療環境での）ヒトにおける使用に容易に適用することができない。標的ＲＮＡ配列に１００％相補的である、Ｗｏｏｌｆら（１９９５）のオリゴヌクレオチドは、細胞抽出物またはゼノプス類（Xenopus）の卵母細胞において、ミクロ注入により、唯一機能するようであり、特異性の重度の欠如に悩まされ、アンチセンスオリゴヌクレオチドに相補的であった標的ＲＮＡ鎖におけるほぼ全てのアデノシンを編集した。各ヌクレオチドが、２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）修飾を有する、オリゴヌクレオチド、３４ヌクレオチド長は、Ｗｏｏｌｆら（１９９５）が試験し、不活性であることを示した。ヌクレアーゼに対する安定性をもたらすために、５’末端および３’末端の５ヌクレオチドで、２’－ＯＭｅ修飾させ、ホスホロチオエート（phosphorothioate）（ＰＳ）結合で修飾させた、３４マーのＲＮＡも試験した。中央の非修飾領域のこのオリゴヌクレオチドが、エキソヌクレアーゼ分解に対する保護を実現する末端修飾で、内因性ＡＤＡＲによる標的ＲＮＡの編集を促進することができることが示された。しかし、このシステムは、標的ＲＮＡ配列における特異的な標的アデノシンの脱アミノ化を示さなかった。上述した通り、アンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて非修飾のヌクレオチドに対向するほぼ全てのアデノシンを編集した（したがって、アンチセンスオリゴヌクレオチドの５’末端および３’末端の５ヌクレオチドが修飾された場合での中央の非修飾領域のヌクレオチドに対向するほぼ全てのアデノシン、または、ヌクレオチドが修飾されなかった場合での標的ＲＮＡ鎖でのほぼ全てのアデノシン）。

【０００５】

ＡＤＡＲは、任意のｄｓＲＮＡで作用することができることが当該技術分野で知られている。「無作為編集（promiscuous editing）」と時に称されるプロセスによって、酵素は、ｄｓＲＮＡにおいて、多数のＡのものを編集する。ゆえに、このような無作為編集を回避し、治療適用可能である標的ＲＮＡ分子で特定のアデノシンのみを標的化する、方法および手段の必要性が存在する。Ｖｏｇｅｌら（２０１４）は、このような標的外編集が、編集すべきではないアデノシンに対向する位置でのオリゴヌクレオチドにおいて、２’－ＯＭｅ修飾させたヌクレオチドを使用することにより抑制することができ、標的ＲＮＡの特異的に標的化されたアデノシンに直接対向する非修飾ヌクレオチドを使用することができることを示した。しかし、標的ヌクレオチドでの特異的な編集効果は、ＡＯＮと共有結合する組換えＡＤＡＲ酵素を使用せずに、生じるということが示されなかった。

【０００６】

国際公開第２０１６／０９７２１２号パンフレットでは、ＲＮＡの標的化編集のためのアンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＯＮ）であって、標的ＲＮＡ配列に相補的な配列（以下、「標的化部分」と称す）、および好ましくは標的ＲＮＡに相補的ではないステム－ループ構造（以下、「動員部分」と称す）の存在によって特徴付けられるＡＯＮが開示される。このようなオリゴヌクレオチドは、「自己ルーピングＡＯＮ」と称す。動員部分は、細胞に存在する天然のＡＤＡＲ酵素を、標的配列と標的化部分のハイブリダイゼーションにより形成されるｄｓＲＮＡに動員する働きがある。動員部分があるため、コンジュゲートされる実体も、修飾された組換えＡＤＡＲ酵素の存在も必要としない。国際公開第２０１６／０９７２１２号パンフレットでは、動員部分は、天然基質（例えばＧｌｕＢ受容体）またはＡＤＡＲ酵素のｄｓＲＮＡ結合領域により認識されるとして知られているＺ－ＤＮＡ構造のいずれかを模倣するステム－ループ構造であると記載されている。ステム－ループ構造は、２つの別々の核酸鎖により形成される分子間のステム－ループ構造、または、単一の核酸鎖内に形成される分子内のステム－ループ構造であり得る。国際公開第２０１６／０９７２１２号パンフレットに記載の動員部分のステム－ループ構造は、ＡＯＮ自体内に形成され、ＡＤＡＲを引き付けることができる分子内のステム－ループ構造である。国際公開第２０１７／２２０７５１号パンフレットおよび国際公開第２０１８／０４１９７３号パンフレットでは、このような動員部分を含まないが、１つまたは複数のミスマッチを除いた標的化された領域、またはいわゆる「揺らぎ」もしくは膨らみに（ほぼ完

全に）相補的である、ＡＯＮが記載されている。唯一のミスマッチは、標的アデノシンに対向するヌクレオチドであり得るが、他の実施形態では、ＡＯＮは、標的配列領域を結合した場合、多数の膨らみおよび／または揺らぎに関して記載されていた。ＡＯＮの配列を、ＡＤＡＲを引き付けることができるように注意深く選択した場合、動員部分が欠乏するＡＯＮ、および内因性ＡＤＡＲ酵素で、インビトロ、エクスビボ、およびインビボでのＲＮＡ編集を達成することが可能であったと思われた。「オーファンヌクレオチド」は、標的ＲＮＡ分子での標的アデノシンに直接対向して位置するＡＯＮ内のヌクレオチドとして定義されるが、２’－ＯＭｅ修飾を有さなかった。オーファンヌクレオチドはまた、ＡＯＮの残りが糖物質（例えば２’－ＯＭｅ）での２’－Ｏ－アルキル修飾を有したＤＮＡヌクレオチド（糖物質が２’修飾を有さない）、またはＲＮＡ編集の効率性をさらに改善した、および／もしくはヌクレアーゼに対する耐性を高めた特定の化学修飾を含有する（もしくはＤＮＡであった）いわゆる「セントラルトリプレット（Central Triplet）」（＝ＡＯＮ内に２つの直接的な近接ヌクレオチドを有するオーファンヌクレオチド）内の、もしくはセントラルトリプレットを直接囲んでいるヌクレオチドでもあり得た。このような効果は、分解からＡＯＮを「保護する」センスオリゴヌクレオチド（ＳＯＮ）を使用することにより、さらに改善することさえできた（国際公開第２０１８／１３４３０１号パンフレットに記載）。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００７】

上記で概説した達成にもかかわらず、（内因性）細胞経路、および、デアミナーゼ活性を有する酵素、例えば、哺乳動物細胞に対して、生物全体に対してさえ、疾患を緩和するために内因性核酸を、より特異的に、より効果的に編集するために、天然に発現されるＡＤＡＲ酵素を利用することができる、改善した化合物の必要性は残る。

【課題を解決するための手段】

【０００８】

本発明は、標的核酸分子での標的ヌクレオチド、好ましくはアデノシンの脱アミノ化に使用するために、細胞内の標的核酸分子と二本鎖複合体を形成することができるアンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＯＮ）であって、標的ヌクレオチドに直接対向するＡＯＮでのヌクレオチドが、オーファンヌクレオチドであり、ＡＯＮが、１つまたは複数のメチルホスホネート（methylphosphonate）（ＭＰ）結合を含む、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＯＮ）に関する。したがって、本発明は、標的核酸分子での標的ヌクレオチド、好ましくはアデノシンの脱アミノ化のために構成された配列を含むＡＯＮを提供する。好ましくは、ＡＯＮは、脱アミノ化活性を有する酵素などの物質を係合することが可能であり、好ましくは、標的ヌクレオチドは、イノシンへと脱アミノ化する酵素により脱アミノ化されるアデノシンである。ヌクレオチド間結合の番号付けは、結合番号０がオーファンヌクレオチドからの５’結合となるようにし、オリゴヌクレオチドでの結合位置は、５’末端に向かって正（＋）に増分し、３’末端に向かって負に増分する。好ましくは、ＡＯＮは、結合位置０、－１、－２、－３、－４、－５、および／または－６で１つまたは複数のＭＰ結合を含み、より好ましくは、ＡＯＮは、結合位置－０および／または－２でＭＰ結合を含む。一実施形態では、ＡＯＮは、単一のＭＰ結合を含む。一実施形態では、オーファンヌクレオシドおよび／またはオーファンヌクレオシドの３’ヌクレオシドは、ＭＰ結合で、それぞれの３’近接ヌクレオシドに（すなわち、それぞれ、結合位置－１および－２で）結合させる。とりわけ好ましいのは、本明細書での非限定例で概説する通り、インビトロでの安定性アッセイと比較した場合、ＭＰ結合が、ＭＰ結合が欠乏するＡＯＮより安定なＡＯＮをもたらす態様である。好ましい一態様では、本発明のＡＯＮは、２’－ＯＭｅまたは２’－ＭＯＥリボース修飾を含む少なくとも１つのヌクレオチドを含み、オーファンヌクレオチドは、２’－ＯＭｅまたは２’－ＭＯＥリボース修飾を有さない。

【０００９】

一実施形態では、本発明は、本発明によるＡＯＮおよび薬学的に許容される担体を含む

医薬組成物に関する。

【００１０】

別の実施形態では、本発明は、遺伝的障害の処置または予防での使用のための、本発明によるＡＯＮまたは本発明による医薬組成物に関する。

【００１１】

本発明はまた、細胞内の標的ＲＮＡ分子に存在する少なくとも１つの標的ヌクレオチド、好ましくはアデノシンの脱アミノ化のための方法であって、細胞に本発明によるＡＯＮまたは医薬組成物を供給するステップ、標的ＲＮＡ分子へのＡＯＮのアニーリングを可能にするステップ、ヌクレオチドデアミナーゼ活性を有する哺乳動物酵素が、標的ＲＮＡ分子中の標的ヌクレオチドを脱アミノ化することを可能にするステップ、および任意で、標的ＲＮＡ分子中の脱アミノ化したヌクレオチドの存在を同定するステップを含む、方法に関する。

【００１２】

本発明はまた、標的ＲＮＡ分子に存在する少なくとも１つの標的ヌクレオチド、好ましくはアデノシンの脱アミノ化のための方法であって、本発明によるＡＯＮを供給するステップ、標的ＲＮＡ分子へのＡＯＮのアニーリングを可能にするステップ、ヌクレオチドデアミナーゼ活性を有する哺乳動物酵素が、標的ＲＮＡ分子中の標的ヌクレオチドを脱アミノ化することを可能にするステップ、および、標的ＲＮＡ分子中の脱アミノ化したヌクレオチドの存在を同定するステップを含む、方法に関する。

【００１３】

本発明の１つまたは複数の実施形態は、ここで、添付の図面を参照しながら単なる例として記載する。

【図面の簡単な説明】

【００１４】

【図１】２つのＤＮＡヌクレオチドに結合する、メチルホスホネート（methylphosphonate）（ＭＰ）修飾構造を示す。

【図２】上向きにポッピングする標的アデノシンを含む、５’から３’の標的マウスＩＤＵＡ遺伝子の配列（配列番号１）（両段とも上方鎖）を示す。標的配列の下では、配列は、下向きにポッピングする標的アデノシンに対向するヌクレオチドを含む、ＡＤＡＲ１０２－１（上段）およびＡＤＡＲ１０２－１３（下段）のアンチセンスオリゴヌクレオチド（両方ともに配列番号２）の（３’から５’）を示す。大文字で示される、オリゴヌクレオチドでの２つのヌクレオチドは、ＤＮＡである。ＡＤＡＲ１０２－１３での２つのヌクレオチドの下の＾は、これらのヌクレオシドがそれぞれの３’近接ヌクレオシドに接続するＭＰ結合修飾の存在を表す。アスタリスクは、各末端のＡＯＮの最大５つのヌクレオシド間の４つのホスホロチオエート（phosphorothioate）（ＰＳ）結合修飾を表す。

【図３】４つのＡＯＮを生化学アッセイにおいてエンドヌクレアーゼおよびエキソヌクレアーゼと混合し、その安定性を経時的に（０、３０、および１２０分で）モニタリングした、安定性アッセイの結果を示す。ＤＮＡヌクレオチドを含むが結合修飾を含まないＡＯＮ（ＡＤＡＲ１０２－１）、およびＰＳ結合により結合しているＤＮＡヌクレオチドを含むＡＯＮ（ＡＤＡＲ１０２－２５）が、インキュベートの３０分後に消失した一方、ＭＰ修飾させた結合により互いに結合させた２つのＤＮＡヌクレオチドを有するＡＯＮ（ＡＤＡＲ１０２－１３）は、糖部分での２’－ＯＭｅ修飾（２’－Ｈの代わり）、およびマウスＩＤＵＡ　ＲＮＡ標的分子での標的アデノシンに対向する２つのヌクレオチド間のＰＳ修飾を有するＡＯＮに同様に安定であるようだった。

【図４】ＡＤＡＲ１０２－１およびＡＤＡＲ１０２－１３で得られる、１時間にわたるＲＮＡ編集の百分率を示す。

【図５】ＡＯＮ配列に適用されるヌクレオチドおよび結合の番号付けを示す。ＡＯＮ配列の例は、図２に示すＩＤＵＡ配列の一部である。この特異的な配列は、ヌクレオチドおよび結合の番号付けシステムを実証する目的に対する例として提供されるのみである。ヌクレオチド配列の下に、ヌクレオチドの順番を記載し、「０」位置が、（すなわち、標的配

列で脱アミノ化された標的アデノシンに対向する）オーファンヌクレオチドを指す。ＡＯＮの５’末端に向かって、ヌクレオチドの番号付けは、＋１９に増えていく一方、ＡＯＮの３’末端に向かって、ヌクレオチドの番号付けは、－１２に減っていく。ゆえに、この例では、（潜在的にはより長いＡＯＮの）３２ヌクレオチド分を示す。結合の番号付けは異なり、ヌクレオチドの５’結合が、ヌクレオチドの番号に相当する。結合の番号付けは、最上行に記載する。理解できる通り、最上行の「０」と称される結合は、ヌクレオチド「０」の５’結合であり、結合の番号付けは、５’末端に向かって＋１９に増え、結合の番号付けは、３’末端に向かって－１２に減っていく。最大「結合」＋１９が、この特定の例では結合していないが、５’末端でより長い場合、任意の所与のＡＯＮでの次のヌクレオチドに結合することができることは理解すべきである。同様なことが３’末端でも真であり、追加のヌクレオチドが結合することができる。

【図６】ＭＰ修飾を有さないＡＯＮならびに結合位置０、－１、－２、および－３にＭＰ修飾を有するＡＯＮで実行した編集アッセイの結果を示す。結果は、平均編集活性および標準偏差を示す、２つの独立した実験からである。

【図７】ＭＰ修飾を有さないＡＯＮならびに結合位置－４、－５、および－６にＭＰ修飾を有するＡＯＮで実行した編集アッセイの結果を示す。結果は、１つの編集実験からである。

【図８】示した結合位置でＭＰ修飾を有するＡＯＮと比較して、ＭＰ修飾を有さないＡＯＮで実行した細胞内編集アッセイの結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【００１５】

標的ＲＮＡでの標的アデノシンの編集効率性に悪影響を及ぼさずに、ＲＮＡ編集アンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＯＮ、「編集オリゴヌクレオチド」または「ＥＯＮ」と時に称される）の薬物動態特性を改善する必要性が常に存在する。多くの化学修飾は、ＡＯＮの生成中に存在し、その特性は、効果的なＲＮＡ編集を改善する要望にいつも適合するとは限らない。より良好な薬物動態特性の探索において、全てではないが、いくつかのリボースの２’－Ｏ－メトキシエチル（または２’－メトキシエトキシ、または２’－ＭＯＥ）修飾が、驚くべきことに、効果的なＡＤＡＲの関与および編集に適合するようであったことが早期に見出された（国際公開第２０１９／１５８４７５号パンフレット）。同様にして、全てではないが、いくつかのヌクレオチド間結合でのホスホロチオエート（phosphorothioate）（ＰＳ）結合が、驚くべきことに、効果的なＡＤＡＲの関与および編集に適合するようであったことが早期に見出された（国際公開第２０１９／２１９５８１号パンフレット）。また、ＡＯＮにおいて、全てではないが、いくつかの位置でホスホノアセテート（phosphonoacetate）結合修飾および／またはアンロックド核酸（ＵＮＡ）リボース修飾が、ヌクレオチド脱アミノ化活性および続く脱アミノ化を有する酵素の効果的な関与に適合するようであったことが早期に見出された（ＰＣＴ／欧州特許第２０２０／０５３２８３号明細書、未刊）。ホスホノアセテート（phosphonoacetate）およびＵＮＡ修飾の特性が知られていた一方、ヌクレオチド脱アミノ化活性および脱アミノ化反応を有する酵素の関与に対するその適合性は知られていなかった。

【００１６】

本発明の発明者らは、ここで、ＡＯＮが、脱アミノ化活性を有する酵素を係合することがさらに可能であるようであり、重要だが標的ＲＮＡ分子で標的ヌクレオチドの脱アミノ化を起こすことが可能であるようであった一方、特定の種類のヌクレオシド間結合修飾の導入が、ＡＯＮでのオーファンヌクレオシドがこの特定の修飾された結合によりその３’近接ヌクレオシドに結合されるが、有意な様式で全体のＡＯＮの安定性を高めたことを解明している。これらの知見は、原則として、天然または組換えで、切断されたまたは全長であり、他のタンパク質に融合しているか否かである、例えば、ＡＤＡＲまたはＡＤＡＲデアミナーゼドメインに関与する合成オリゴヌクレオチドを利用する、塩基編集の任意の形態を使用することができる（例えば、Stafforst and Schneider, 2012, Angew Chem Int 51:11166-11169、Schneider et al. 2014, Nucleic Acids Res 42:e87、Monti

el-Gonzalez et al. 2016, Nucleic Acids Res 44:e157）。当業者は、ＡＤＡＲ１、ＡＤＡＲ２、ＡＰＯＢＥＣなどのヌクレオチドデアミナーゼ活性を有する様々な酵素、または標的化されたＲＮＡ結合などに対して他のタンパク質に融合されたこのような酵素の活性ドメインを含有する融合タンパク質などを承知している。本発明は、特に、メチルホスホネート（methylphosphonate）（ＭＰ）ヌクレオシド間結合修飾を含むＡＯＮに関する。ヌクレオチド間結合の番号付けは、結合番号０がオーファンヌクレオチドからの５’結合となるようにし、オリゴヌクレオチドでの結合位置は、５’末端に向かって正（＋）に増分し、３’末端に向かって負に増分する。ヌクレオチドの番号付けという点で、オーファンヌクレオチドは、位置０であり、ヌクレオチドの番号は、５’末端に向かって正（＋）に増分し、３’末端に向かって負に増分する。本発明の特定の実施形態では、ＡＯＮは、結合位置０、－１、－２、－３、－４、－５、および／または－６で１つまたは複数のＭＰ結合を含む。これらの位置で、ＭＰ結合は、編集活性を妨げずにＡＯＮを安定化するのに特に有効である。一実施形態では、ＡＯＮは、結合位置０、－１、－２、－３、－４、－５、および／または－６で、７、６、５、４、３、２、または１つのＭＰ結合を含む。好ましい実施形態では、ＡＯＮは、結合位置０、－１、－２、－３、－４、および／または－５で、結合位置０、－１、－２、－３、および／または－４で、結合位置０、－１、－２、および／または－３で、結合位置０、－１、および／または－２で、ＭＰ結合を含む。特に好ましい実施形態では、ＡＯＮは、位置０および／または－２で、ＭＰ修飾を含む。一実施形態では、ＡＯＮは、オーファンヌクレオシド（標的アデノシンと対向する）と、３’側（すなわち、結合位置－１）のＡＯＮの隣のヌクレオシドとの間のＭＰ結合を含む。一実施形態では、ＡＯＮは、全ての結合位置でＭＰ結合を含む。別の実施形態では、ＡＯＮは、単一のＭＰ結合を含む。特定の実施形態では、ＡＯＮは、位置０のみにＭＰ結合を含むＡＯＮ、結合位置－１のみにＭＰ結合を含むＡＯＮ、結合位置－２のみにＭＰ結合を含むＡＯＮ、結合位置－３のみにＭＰ結合を含むＡＯＮ、結合位置－４のみにＭＰ結合を含むＡＯＮ、結合位置－５のみにＭＰ結合を含むＡＯＮ、結合位置－６のみにＭＰ結合を含むＡＯＮ、ならびに結合位置－２および－４のみにＭＰ結合を含むＡＯＮから選択される。

【００１７】

ここで、ヌクレオチド脱アミノ化活性を有する酵素を係合し、標的ＲＮＡ分子での標的アデノシンのＲＮＡ編集を得る能力を維持しながら、ＡＯＮのより高い安定性を達成する問題を解決する。

【００１８】

ＡＯＮを安定化するためのＭＰの使用は、新規の概念ではないが（例えば、Agrawal et al. 1997. Proc Natl Acad Sci USA 94:2620-2625を参照）、標的ＲＮＡ分子での標的ヌクレオチドに対向するＲＮＡ編集ＡＯＮでのヌクレオチド内およびその周囲の修飾で先に見出された点で、オーファンヌクレオシドを近接ヌクレオシド、好ましくはその３’近接ヌクレオシドと接続する結合でＭＰ修飾を有することが、本明細書で示す通り、ＲＮＡ編集を依然として可能であったことを見出すことは極めて驚くべきことであった。少なくとも１つのヌクレオシド間結合がＭＰ結合を含む、好ましくはＭＰが標的ＲＮＡ分子での標的ヌクレオチドに対向するＡＯＮヌクレオシドをその３’近接ヌクレオシドと接続するヌクレオシド間結合に存在し、３’近接ヌクレオシドが別のＭＰ結合によりそれぞれの３’近接ヌクレオシドにさらに結合することができる限り、本発明が、標的ＲＮＡ分子に結合し、ヌクレオチド（アデノシンを含む）脱アミノ化活性を有する任意のタンパク質（天然に発現されるタンパク質、ならびに、異なるまたは同じ起源の融合タンパク質を含む外来タンパク質）を動員することができる任意のＡＯＮを包含することを理解すべきである。ゆえに、本発明は、ヌクレオシド間結合により結合しているヌクレオチドを含むＡＯＮであって、相補的標的核酸配列と結合することにより二本鎖核酸構造を形成する場合、ヌクレオチドデアミナーゼ活性を有する酵素を、相補的標的核酸配列での標的ヌクレオチドに動員することが可能であり、少なくとも１つのＭＰ修飾されたヌクレオシド間結合の導入により安定性に最適化されていることを特徴とする、ＡＯＮに関する。（本発明ではＤＮＡヌクレオシド間の）ＭＰ結合の化学構造は、図１に示す。この修飾の重要な役割は、ポリ

マーを、ヌクレアーゼ媒介の分解から保護することである。本発明の一態様では、少なくとも１つのヌクレオシド間結合は、ＭＰにより修飾されない場合、非修飾ホスホジエステル結合であり得る。ＭＰ修飾はまた、リボース２’基への修飾に加えて存在することができる。ＡＯＮでのリボース２’基は、独立して、２’－Ｈ（すなわち、ＤＮＡ）、２’－ＯＨ（すなわち、ＲＮＡ）、２’－ＯＭｅ、２’－ＭＯＥ、２’－Ｆ、または２’－４’結合（すなわち、ロックド核酸もしくはＬＮＡ）、または下記でさらに概説するような他の２’置換から選択することができる。２’－４’結合は、メチレンリンカーまたは拘束エチルリンカーなどの当該技術分野で知られているリンカーから選択することができる。全ての場合では、修飾は、オリゴヌクレオチドがＲＮＡ編集ＡＯＮとしてのその役割を果たすような編集に適合すべきである。ＡＯＮは、ヌクレオチドデアミナーゼ活性を有する酵素の編集活性に不適合である位置で少なくとも１つのアンロックド核酸（ＵＮＡ）リボース修飾を生成することにより、ヌクレオチド脱アミノ化活性を有する酵素への結合にさらに最適化することができる。ＵＮＡ修飾では、リボース２’および３’炭素原子間で、炭素－炭素結合が存在しない。したがって、ＵＮＡリボース修飾は、オリゴヌクレオチドでの局所的な柔軟性を高める。ＵＮＡは、分解に対する改善した耐性によって改善した薬物動態特性などの効果をもたらすことができる。ＵＮＡはまた、毒性を低減し、標的外効果を低減するのに関係し得る。ヌクレオチドデアミナーゼ活性を有する酵素との結合の妨害が著しいので、ＵＮＡリボース修飾は、好ましくは、オーファンヌクレオチドで回避すべきである（英国特許第１９０１８７３．８号明細書、未刊）。ＵＮＡリボース修飾は、ＡＯＮでのリボース修飾のみであり得るが、ＵＮＡ修飾は、ＵＮＡ修飾と異なる位置またはＵＮＡ修飾と同じ位置のいずれかで、リボース２’基への修飾に加えて存在することができる。ＡＯＮでのリボース２’基は、独立して、２’－Ｈ（すなわち、ＤＮＡ）、２’－ＯＨ（すなわち、ＲＮＡ）、２’－ＯＭｅ、２’－ＭＯＥ、２’－Ｆ、または２’－４’結合（すなわち、ロックド核酸もしくはＬＮＡ）、または下記でさらに概説するような他の２’置換から選択することができる。２’－４’結合は、メチレンリンカーまたは拘束エチルリンカーなどの当該技術分野で知られているリンカーから選択することができる。異なる２’修飾は、国際公開第２０１６／０９７２１２号パンフレット、国際公開第２０１７／２２０７５１号パンフレット、国際公開第２０１８／０４１９７３号パンフレット、国際公開第２０１８／１３４３０１号パンフレット、英国特許第１８０８１４６．３号明細書（未刊）、英国特許第１９０１８７３．８号明細書（未刊）、およびＰＣＴ／欧州特許第２０１９／０５３２９１号明細書（未刊）にさらに詳細に記載されている。全ての場合で、修飾は、オリゴヌクレオチドがＲＮＡ編集ＡＯＮとしてのその役割を果たすような編集に適合すべきである。本発明の全ての態様では、ヌクレオチドデアミナーゼ活性を有する酵素は、好ましくは、ＡＤＡＲ１またはＡＤＡＲ２である。高度に好ましい実施形態では、ＡＯＮは、プレｍＲＮＡまたはｍＲＮＡを標的とするＲＮＡ編集一本鎖ＡＯＮであり、標的ヌクレオチドは、好ましくは、標的ＲＮＡ中のアデノシンであり、アデノシンは、イノシンに脱アミノ化し、翻訳機構により、グアノシンとして読み込まれる。さらに好ましい態様では、アデノシンは、ＵＧＡもしくはＵＡＧ終止コドンに位置し、ＵＧＧコドンに編集されるか、または２つの標的ヌクレオチドは、ＵＡＡ終止コドンにおける２つのアデノシンであり、コドンは、両方の標的アデノシンの脱アミノ化によってＵＧＧコドンに編集され、オリゴヌクレオチドにおける２つのヌクレオチドは、標的核酸とミスマッチする。

【００１９】

本発明によるＡＯＮは、ＭＰリンカー修飾以外の、またはＭＰリンカー修飾に加えてヌクレオシド間結合修飾を含むことができる。一実施形態では、このような他の１つのヌクレオシド間結合は、ホスホノアセテート（phosphonoacetate）修飾された結合であり得る。別の実施形態では、ヌクレオチド間結合は、ホスホジエステルであり得、ホスホジエステルのＯＨ基は、アルキル、アルコキシ、アリール、アルキルチオ、アシル、－ＮＲ１Ｒ１、アルケニルオキシ、アルキニルオキシ、アルケニルチオ、アルキニルチオ、－Ｓ－Ｚ＋、－Ｓｅ－Ｚ＋、もしくは－ＢＨ３－Ｚ＋で置換されており、Ｒ１は、独立して、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、もしくはアリールであり、Ｚ＋は、アンモニウ

ムイオン、アルキルアンモニウムイオン、ヘテロ芳香族イミニウムイオン、もしくはヘテロ環イミニウムイオンであり、そのいずれかも一級、二級、三級、もしくは四級であるか、または、Ｚは、一価の金属イオンであり、好ましくはホスホロチオエート（phosphorothioate）（ＰＳ）結合である。

【００２０】

本発明のＡＯＮでは、オーファンヌクレオチドは、一般に、２’－ＯＨ基を有するリボース、または２’－Ｈ基を有するデオキシリボースを含み、好ましくは、２’－ＯＭｅ修飾を有するリボースを含まない。さらに、本発明のＡＯＮは、一般に、オーファンヌクレオチドに対してある種の位置で２’－ＭＯＥ修飾を含まず、さらに、ＡＯＮ内の他の位置で２’－ＭＯＥ修飾を含む。本発明のＡＯＮは、好ましくは、国際公開第２０１６／０９７２１２号パンフレットに記載の動員部分を含まない。本発明のＡＯＮは、好ましくは、分子内のステム－ループ構造を形成することができる部分を含まない。ＡＯＮは、好ましくは、５’末端Ｏ６－ベンジルグアニン修飾を含まない。ＡＯＮは、好ましくは、５’末端アミノ修飾を含まない。ＡＯＮは、好ましくは、ＳＮＡＰタグドメインに共有結合しない。

【００２１】

本発明は、細胞内の標的ＲＮＡ分子に存在する少なくとも１つの標的アデノシンの脱アミノ化のための方法であって、細胞に本発明の第一の態様によるＡＯＮまたは本発明の第二の態様による組成物を供給するステップ、ＡＯＮの細胞による取込みを可能にするステップ、標的ＲＮＡ分子へのＡＯＮのアニーリングを可能にするステップ、ヌクレオチドデアミナーゼ活性を有する哺乳動物酵素が、標的ＲＮＡ分子中の標的ヌクレオチドを脱アミノ化することを可能にするステップ、および任意で、標的ＲＮＡ分子中の脱アミノ化されたヌクレオチドの存在を同定するステップを含む、方法に関する。好ましくは、標的ＲＮＡ分子の存在は、（ｉ）標的配列をシークエンシングすること、（ｉｉ）標的アデノシンが、ＵＧＡもしくはＵＡＧ終止コドンに位置し、脱アミノ化によってＵＧＧコドンに編集される場合、機能性、伸長型、全長および／もしくは野生型タンパク質の存在を評価すること、（ｉｉｉ）２つの標的アデノシンが、ＵＡＡ終止コドンに位置し、両方の標的アデノシンの脱アミノ化によってＵＧＧコドンに編集される場合、機能性、伸長型、全長および／もしくは野生型タンパク質の存在を評価すること、（ｉｖ）プレｍＲＮＡのスプライシングが、脱アミノ化により改変したかどうかを評価すること、または、（ｖ）機能的な読み出しを使用することであって、脱アミノ化後の標的ＲＮＡが、機能性、全長、伸長型および／もしく野生型タンパク質をコードする、使用することのいずれかにより検出される。したがって、本発明はまた、終止コドンに存在するアデノシンをイノシンに改変する（Ｇとして読み込まれる）ために、（プレ）ｍＲＮＡに存在する早期停止終止コドン（ＰＴＣ）を標的化し、次いで、翻訳の間のリードスルー、および全長機能性タンパク質をもたらす、ＡＯＮに関する。特定の一実施形態では、本発明は、嚢胞性線維症（ＣＦ）の処置に使用するためのＡＯＮに関し、またさらに好ましい実施形態では、本発明は、ＣＦの処置に使用するためのＡＯＮであって、Ｇ５４２Ｘ（ＵＧＡＧ）、Ｗ１２８２Ｘ（ＵＧＡＡ）、Ｒ５５３Ｘ（ＵＧＡＧ）、Ｒ１１６２Ｘ（ＵＧＡＧ）、Ｙ１２２Ｘ（ＵＡＡ、両アデノシン）、Ｗ１０８９Ｘ、Ｗ８４６Ｘ、およびＷ４０１Ｘ突然変異などのＰＴＣが、ＲＮＡ編集によってコドンをコードするアミノ酸に修飾され、それにより翻訳が全長タンパク質で可能になる、ＡＯＮに関する。本発明の教示は、本明細書に概説した通り、ＡＯＮで標的化し得、ＲＮＡ編集によって処置することができる全ての遺伝的疾患に適用可能である。他の１つの特定の好ましい例は、ＵＳＨ２Ａ遺伝子での突然変異に起因するアッシャー症候群ＩＩ型である。

【００２２】

一態様では、本発明は、標的ＲＮＡ分子に存在する疾患関連スプライス突然変異での標的アデノシンの脱アミノ化に使用するために、細胞内の標的ＲＮＡ分子と二本鎖複合体を形成することができるＡＯＮであって、ＡＯＮでのオーファンヌクレオチド（標的アデノシンに対向する）が、２’－ＯＭｅ修飾を有さず、オーファンヌクレオチドからのヌクレオチド直接的５’および／または３’（オーファンヌクレオチドと共に、ヌクレオチドがセン

トラルトリプレットを形成する）が、ＲＮＡ編集により安定し、および／または、より効果的にＡＯＮをもたらす、糖修飾および／または塩基修飾を有し、好ましくはセントラルトリプレット内のＡＯＮでの少なくとも１つの結合が、ＭＰ修飾を有する、ＡＯＮに関する。好ましい実施形態では、セントラルトリプレットでの２つのヌクレオシドを接続する少なくとも１つのヌクレオシド間結合は、ＭＰ修飾を有する。別の好ましい態様では、オーファンヌクレオチドは、ＤＮＡであり、さらにより好ましい態様では、オーファンヌクレオチド、ならびに標的アデノシンに対向するヌクレオチドのヌクレオチド５’および／または３’は、ＤＮＡヌクレオチドであるが、ＡＯＮでのヌクレオチドの（ＤＮＡではない）残りは、好ましくは、２’－Ｏ－アルキル修飾されたリボヌクレオチドである。２つのヌクレオチドがＤＮＡである場合、他の全ては、ＲＮＡであり得、２’－ＯＭｅまたは２’－ＭＯＥ修飾され得る一方、特定の態様では、標的アデノシンに対向するセントラルトリプレットでの第三のヌクレオチドは、標的アデノシンに対向するヌクレオチドが、２’－ＯＭｅ修飾されていない限り、ＲＮＡであり得、修飾され得ない。好ましい実施形態では、本発明によるＡＯＮは、相補的な標的ＲＮＡ領域との、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個のミスマッチ、揺らぎ、および／または膨らみを含む。好ましくは、標的アデノシンに対向するヌクレオチドは、シチジン、デオキシシチジン、ウリジン、デオキシウリジンであるか、または脱塩基である。標的アデノシンに対向するヌクレオチドが、シチジンまたはデオキシシチジンである場合、ＡＯＮは、標的ＲＮＡ分子との少なくとも１つのミスマッチを含む。標的アデノシンに対向するヌクレオチドが、ウリジンまたはデオキシウリジンである場合、ＡＯＮは、１００％相補的であり得、標的ＲＮＡに関連して、いかなるミスマッチ、揺らぎ、または膨らみも有さない。しかし、好ましい態様では、１つまたは複数のさらなるミスマッチ、揺らぎ、および／または膨らみは、標的アデノシンに対向するヌクレオチドが、シチジン、デオキシシチジン、ウリジン、またはデオキシウリジンであろうと、ＡＯＮと標的ＲＮＡとの間に存在する。別の好ましい実施形態では、（セントラルトリプレットを形成するオーファンヌクレオチドと共に）オーファンヌクレオチドからのヌクレオチド直接的５’および／もしくは３’は、２’－ＯＨ基を有するリボース、または２’－Ｈ基を有するデオキシリボース、またはこれら２つの混合物を含む。次いで、セントラルトリプレットは、ＤＮＡ－ＤＮＡ－ＤＮＡ、ＤＮＡ－ＤＮＡ－ＲＮＡ、ＤＮＡ－ＲＮＡ－ＤＮＡ、ＤＮＡ－ＲＮＡ－ＲＮＡ、ＲＮＡ－ＤＮＡ－ＤＮＡ、ＲＮＡ－ＤＮＡ－ＲＮＡ、ＲＮＡ－ＲＮＡ－ＤＮＡ、またはＲＮＡ－ＲＮＡ－ＲＮＡからなり、中央のヌクレオチドは、（ＲＮＡの場合）２’－ＯＭｅ修飾を有さず、周囲のヌクレオチドのいずれかまたは両方とも２’－ＯＭｅ修飾を有さない。次いで、ＡＯＮでの他の全てのヌクレオチドが、２’－Ｏ－アルキル基、好ましくは２’－ＯＭｅ基、もしくは２’－ＭＯＥ基、または本明細書に開示される任意の修飾を有することが好ましい。本発明のＡＯＮは、少なくとも１つのＭＰ結合修飾を含む。標的配列との本発明のＡＯＮの揺らぎ、ミスマッチ、および／または膨らみは、標的ＲＮＡ配列へのオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを防げないが、標的アデノシンの位置で細胞に存在するＡＤＡＲによりＲＮＡ編集の効率性に加える。当業者は、生理学的条件下でのハイブリダイゼーションが依然として起こるかどうかを決定することができる。本発明のＡＯＮは、細胞に存在する哺乳動物のＡＤＡＲ酵素を動員（係合）することができ、ＡＤＡＲ酵素は、野生型酵素で発見されたその天然ｄｓＲＮＡ結合ドメインを含む。本発明によるＡＯＮは、内因性細胞経路および天然で利用可能なＡＤＡＲ酵素、または、標的ＲＮＡ配列での標的アデノシンを特異的に編集する（さらに未知のＡＤＡＲ様酵素であり得る）ＡＤＡＲ活性を有する酵素を利用することができる。本明細書に開示する通り、本発明の一本鎖ＡＯＮは、標的ＲＮＡ分子でのアデノシンなどの特異的な標的を脱アミノ化することができる。理想的に、ただ１つのヌクレオチドが脱アミノ化される。あるいは、１、２、または３個のさらなるヌクレオチドは脱アミノ化されるが、好ましくはただ１つである。本発明のＡＯＮは、様々なヌクレオチドデアミナーゼ酵素のために設計し、使用することができる。特定の例は、ＡＤＡＲである。ＡＤＡＲを例に取ると、ＡＤＡＲは、天然に発現するか、または（例えば、組換え発現またはタンパク質合成により）人工的に生成することができる。ＡＤＡＲは、野生型で

あり得るか、または修飾することができる。本発明のＡＯＮの特徴と合わせて、修飾された組換えＡＤＡＲ発現を必要としない。本発明のＡＯＮは、ＡＯＮに結合するコンジュゲートされた物質に関して特に限定されない。しかし、ＡＯＮに結合するコンジュゲートされた物質を必要としない。そのため、ＡＯＮに結合するコンジュゲートされた物質が欠乏するＡＯＮは、好ましい実施形態を形成する。本発明のＡＯＮは、標的ＲＮＡ配列に相補的ではない動員部分について特に限定されない。しかし、標的ＲＮＡ配列に相補的ではない長い動員部分の存在を必要としない。その結果、標的ＲＮＡ配列に相補的ではない長い動員部分が欠乏するＡＯＮは、好ましい実施形態を形成する。加えて、本発明のＡＯＮは、ＲＮＡ／ＡＯＮ複合体での他の場所での無作為編集の危険なしに、野生型酵素で発見された天然ｄｓＲＮＡ結合ドメインを含む、天然ヌクレオチドデアミナーゼ酵素による、標的核酸分子に存在する標的ヌクレオチドの特異的脱アミノ化を可能にする。

【００２３】

本発明は、標的核酸分子での標的ヌクレオチド、好ましくはアデノシンの脱アミノ化に使用するために、細胞内の標的核酸分子と二本鎖複合体を形成することができるアンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＯＮ）であって、標的ヌクレオチドに直接対向するＡＯＮでのヌクレオチドが、オーファンヌクレオチドであり、ＡＯＮが、１つまたは複数のメチルホスホネート（methylphosphonate）（ＭＰ）結合を含む、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＯＮ）に関する。本発明のＡＯＮは、細胞、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒト細胞に好ましくは内因的に存在する脱アミノ化活性を有する、物質、好ましくは酵素を係合して、標的核酸分子での標的ヌクレオチドの脱アミノ化をもたらすことが可能である。好ましい標的核酸分子は、ＲＮＡ分子である。二本鎖ＡＯＮ／標的核酸分子複合体は、ワトソン－クリック型塩基対によって相互作用する。好ましくは、オーファンヌクレオチドは、２’－ＯＭｅまたは２’－ＭＯＥリボース修飾を有さない。好ましくは、オーファンヌクレオシドおよび／またはオーファンヌクレオシドの３’ヌクレオシドは、ＭＰ結合で（すなわち、位置－１および－２で）、それぞれの３’近接ヌクレオシドに結合させる。より好ましくは、オーファンヌクレオシドおよびその３’近接ヌクレオシドの両方は、ＡＯＮ　ＡＤＡＲ１０２－１３（図２）に例示する通り、それぞれの３’近接ヌクレオシドとのＭＰ修飾された結合によって結合させる。本発明の特定の実施形態では、ＡＯＮは、ＩＤＵＡ１６３、ＩＤＵＡ１７０、ＩＤＵＡ１７６、ＩＤＵＡ１８２、ＩＤＵＡ２４７、ＩＤＵＡ２５０、およびＩＤＵＡ２５４（図６および７）に例示する通り、結合位置０、－１、－２、－３、－４、－５、および／または－６で１つまたは複数のＭＰ結合を含む。一実施形態では、ＡＯＮは、結合位置０、－１、－２、－３、－４、－５、および／または－６に、７、６、５、４、３、２、または１つのＭＰ結合を含む。好ましい実施形態では、ＡＯＮは、結合位置０、－１、－２、－３、－４、および／または－５で、結合位置０、－１、－２、－３、および／または－４で、結合位置０、－１、－２、および／または－３で、結合位置０、－１、および／または－２で、ＭＰ結合を含む。特に好ましい実施形態では、ＡＯＮは、ＩＤＵＡ１６３およびＩＤＵＡ１７６（図６）に例示する通り、位置０およびまたは－２で、ＭＰ結合を含む。一実施形態では、ＡＯＮは、全ての結合位置でＭＰ結合を含む。別の実施形態では、ＡＯＮは、単一のＭＰ結合を含む。特定の実施形態では、ＡＯＮは、位置０のみにＭＰ結合を含むＡＯＮ（ＩＤＵＡ１６３に例示する通り）、結合位置－１のみにＭＰ結合を含むＡＯＮ（ＩＤＵＡ１７０に例示する通り）、結合位置－２のみにＭＰ結合を含むＡＯＮ（ＩＤＵＡ１７６およびＩＤＵＡ２６４に例示する通り）、結合位置－３のみにＭＰ結合を含むＡＯＮ（ＩＤＵＡ１８２に例示する通り）、結合位置－４のみにＭＰ結合を含むＡＯＮ（ＩＤＵＡ２４７に例示する通り）、結合位置－５のみにＭＰ結合を含むＡＯＮ（ＩＤＵＡ２５０に例示する通り）、結合位置－６のみにＭＰ結合を含むＡＯＮ（ＩＤＵＡ２５３に例示する通り）、ならびに結合位置－２および－４のみにＭＰ結合を含むＡＯＮ（ＩＤＵＡ２６７およびＩＤＵＡ２６８に例示する通り）から選択される。好ましい実施形態では、ＭＰ結合は、ＤＮＡヌクレオシドを別のヌクレオシドと接続する。別の好ましい実施形態では、ＭＰ結合は、ＤＮＡヌクレオシドをＤＮＡヌクレオシドと接続する。本発明の重要な一態様では、インビトロでの安定性ア

ッセイと比較した場合、ＭＰ結合が、ＭＰ結合が欠乏するＡＯＮより安定なＡＯＮをもたらす。当業者は、本教示に基づいて、本明細書に例示する通り、ＭＰ修飾が、ＡＯＮでのある特定の選択された位置でＭＰ修飾が欠乏するＡＯＮより安定なＡＯＮをもたらすかどうかを、本発明の発明者らにより開示される時間設定したインビトロでの安定性アッセイを使用することにより決定することができ（ヌクレアーゼ緩衝剤およびヌクレアーゼを含まない水に混合した、ヒガシダイヤガラガラヘビ（Crotalus adamanteus）毒素由来のホスホジエステラーゼＩ、ＤＮａｓｅ　Ｉ、ＲＮａｓｅ　Ａ、およびヌクレアーゼＢＡＬ－３１を含むヌクレアーゼミックスを適用）、これは、安定性を研究所でどのように試験することができるかの非限定例として使用される。その位置でＭＰ修飾が欠乏するＡＯＮより安定なＡＯＮをもたらす、少なくとも１つのＭＰ修飾された結合を含むＡＯＮが、脱アミノ化活性を有する物質、例えば、脱アミノ化酵素、好ましくはＡＤＡＲ酵素を係合して、標的核酸分子に存在する標的ヌクレオチドのＲＮＡ編集を達成することができる、本発明の重要な態様でもある。ゆえに、好ましい実施形態では、標的ヌクレオチドの脱アミノ化をもたらすＡＯＮの能力は、１つまたは複数のＭＰ結合を欠乏するＡＯＮと比較して、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、または少なくとも６０％のレベルで維持される。安定性アッセイと同様に、当業者は、本教示に基づいて、ＲＮＡ編集を達成する能力のレベルを決定し、これを特定位置でＭＰ結合を欠乏するＡＯＮと比較することができる。好ましい態様では、ＡＯＮは、少なくとも１つのホスホロチオエート（phosphorothioate）（ＰＳ）もしくはホスホノアセテート（phosphonoacetate）ヌクレオチド間結合、および／またはアンロックド核酸（ＵＮＡ）リボース修飾を含む少なくとも１つのヌクレオチドをさらに含む。より好ましい態様では、ＰＳ結合は、各末端の最大５つのヌクレオシドに接続する、ＡＯＮの両末端に存在する。別の好ましい態様では、本発明のＡＯＮは、リボースの２’位での置換を含む１つまたは複数のヌクレオチドをさらに含み、置換は、－ＯＨ；－Ｆ；置換または未置換、直鎖または分岐鎖の低級（Ｃ１～Ｃ１０）アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリル、アリル、またはアラルキル、１つまたは複数のヘテロ原子により中断され得る；－Ｏ－、Ｓ－、またはＮ－アルキル；－Ｏ－、Ｓ－、またはＮ－アルケニル；－Ｏ－、Ｓ－、またはＮ－アルキニル；－Ｏ－、Ｓ－、またはＮ－アリル；－Ｏ－アルキル－Ｏ－アルキル；－メトキシ；－アミノプロポキシ；－メトキシエトキシ（２’－ＭＯＥ）；－ジメチルアミノオキシエトキシ；および－ジメチルアミノエトキシエトキシからなる群から選択される。さらにより好ましい実施形態では、本発明のＡＯＮは、２’－ＯＭｅまたは２’－ＭＯＥリボース修飾を含む少なくとも１つのヌクレオチドを含み、オーファンヌクレオチドは、２’－ＯＭｅまたは２’－ＭＯＥリボース修飾を有さない。最も好ましいのは、本発明のＡＯＮは、細胞で、物質、好ましくはデアミナーゼ活性を有する酵素、好ましくはアデノシンデアミナーゼ活性を有する酵素、例えばＡＤＡＲ１またはＡＤＡＲ２、より好ましくはＡＤＡＲ２を係合することが可能である。好ましくは、細胞でデアミナーゼ活性を有する酵素は、天然に生じる（内因的に存在する）ヒトデアミナーゼ酵素である。本発明によるＡＯＮは、好ましくは、少なくとも１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、または３２ヌクレオチド長である。また、好ましくは、ＡＯＮは、１００ヌクレオチドより短く、より好ましくは６０ヌクレオチドより短い。

【００２４】

別の実施形態では、本発明は、本発明によるＡＯＮおよび薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物に関する。薬学的に許容される担体は、当業者に知られている。

【００２５】

また別の実施形態では、本発明は、嚢胞性線維症、ハーラー症候群、α－１－アンチトリプシン（Ａ１ＡＴ）欠損症、パーキンソン病、アルツハイマー病、色素欠乏症、筋萎縮性側索硬化症、喘息、β－サラセミア、ＣＡＤＡＳＩＬ、シャルコー－マリー－ツース症候群、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、遠位脊髄性筋萎縮症（ＤＳＭＡ）、デュシェンヌ型／ベッカー型筋ジストロフィー、（栄養障害性）表皮水疱症、ファブリー病、第Ｖ因子

ライデン関連障害、家族性腺腫性ポリポーシス、ガラクトース血症、ゴーシェ病、グルコース－６－リン酸脱水素酵素、血友病、遺伝性ヘモクロマトーシス、ハンター症候群、ハンチントン病、炎症性腸疾患（ＩＢＤ）、先天性多凝集症候群、レーバー先天性黒内障（例えば、ＬＣＡ１０）、レッシュ－ナイハン症候群、リンチ症候群、マルファン症候群、ムコ多糖症、筋ジストロフィー、Ｉ型およびＩＩ型筋強直性ジストロフィー、神経線維腫症、ニーマン－ピック病Ａ型、Ｂ型およびＣ型、ＮＹ－ｅｓｏ１関連がん、ポイツ－イェガース症候群、フェニルケトン尿症、ポンペ病、原発性線毛疾患、プロトロンビン突然変異関連障害（例えば、プロトロンビンＧ２０２１０Ａ突然変異）、肺高血圧症、（常染色体優性）色素性網膜炎、サンドホフ病、重症複合免疫不全症候群（ＳＣＩＤ）、鎌状赤血球貧血、脊髄性筋萎縮症、スタルガルト病、テイサックス病、アッシャー症候群（例えば、アッシャー症候群Ｉ型、ＩＩ型、およびＩＩＩ型）、Ｘ連鎖免疫不全、スタージ－ウェーバー症候群、ならびに、がんからなる群から好ましくは選択される、遺伝的障害の処置または予防での使用のための、本発明によるＡＯＮまたは本発明による医薬組成物に関する。

【００２６】

別の実施形態では、本発明は、嚢胞性線維症、ハーラー症候群、α－１－アンチトリプシン（Ａ１ＡＴ）欠損症、パーキンソン病、アルツハイマー病、色素欠乏症、筋萎縮性側索硬化症、喘息、β－サラセミア、ＣＡＤＡＳＩＬ、シャルコー－マリー－ツース症候群、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、遠位脊髄性筋萎縮症（ＤＳＭＡ）、デュシェンヌ型／ベッカー型筋ジストロフィー、（栄養障害性）表皮水疱症、ファブリー病、第Ｖ因子ライデン関連障害、家族性腺腫性ポリポーシス、ガラクトース血症、ゴーシェ病、グルコース－６－リン酸脱水素酵素、血友病、遺伝性ヘモクロマトーシス、ハンター症候群、ハンチントン病、炎症性腸疾患（ＩＢＤ）、先天性多凝集症候群、レーバー先天性黒内障（例えば、ＬＣＡ１０）、レッシュ－ナイハン症候群、リンチ症候群、マルファン症候群、ムコ多糖症、筋ジストロフィー、Ｉ型およびＩＩ型筋強直性ジストロフィー、神経線維腫症、ニーマン－ピック病Ａ型、Ｂ型およびＣ型、ＮＹ－ｅｓｏ１関連がん、ポイツ－イェガース症候群、フェニルケトン尿症、ポンペ病、原発性線毛疾患、プロトロンビン突然変異関連障害（例えば、プロトロンビンＧ２０２１０Ａ突然変異）、肺高血圧症、（常染色体優性）色素性網膜炎、サンドホフ病、重症複合免疫不全症候群（ＳＣＩＤ）、鎌状赤血球貧血、脊髄性筋萎縮症、スタルガルト病、テイサックス病、アッシャー症候群（例えば、アッシャー症候群Ｉ型、ＩＩ型、およびＩＩＩ型）、Ｘ連結型免疫不全、スタージ－ウェーバー症候群、ならびに、がんからなる群から好ましくは選択される、遺伝的障害の処置のための医薬の製造における、本発明によるＡＯＮの使用に関する。

【００２７】

また別の実施形態では、本発明は、細胞内の標的核酸分子、好ましくはＲＮＡ標的分子に存在する少なくとも１つの標的ヌクレオチド、好ましくはアデノシンの脱アミノ化のための方法であって、細胞に本発明によるＡＯＮまたは本発明による医薬組成物を供給するステップ、標的核酸分子へのＡＯＮのアニーリングを可能にするステップ、ヌクレオチドデアミナーゼ活性を有する哺乳動物酵素が、標的核酸分子中の標的ヌクレオチドを脱アミノ化することを可能にするステップ、および任意で、標的核酸分子中の脱アミノ化したヌクレオチドの存在を同定するステップを含む方法に関する。本発明によるＡＯＮの使用によって係合されるヌクレオチドデアミナーゼ活性を有する哺乳動物酵素は、好ましくは、アデノシンデアミナーゼ酵素であり、標的核酸分子において標的ヌクレオチドを改変することが可能であり、次いで、標的ヌクレオチドは、好ましくは、イノシンに脱アミノ化されたアデノシンである。脱アミノ化されたヌクレオチドの存在を同定する任意のステップは、好ましくは、標的核酸分子の領域をシークエンシングすることであって、領域が、脱アミノ化された標的ヌクレオチドを含む、シークエンシングすること、標的ヌクレオチドが、ＵＧＡもしくはＵＡＧ終止コドンに位置するアデノシンであり、脱アミノ化によってＵＧＧコドンに編集される場合、機能性、伸長型、全長および／もしくは野生型タンパク質の存在を評価すること、２つの標的アデノシンが、ＵＡＡ終止コドンに位置し、両方の

標的アデノシンの脱アミノ化によってＵＧＧコドンに編集される場合、機能性、伸長型、全長および／もしくは野生型タンパク質の存在を評価すること、標的ＲＮＡ分子がプレｍＲＮＡである場合、プレｍＲＮＡのスプライシングが、脱アミノ化により改変したかどうかを評価すること、または機能的な読み出しを使用することであって、脱アミノ化後の標的核酸分子が、機能性、全長、伸長型および／もしく野生型タンパク質をコードする、使用することにより行われる。

【００２８】

また別の実施形態では、本発明は、標的核酸分子、好ましくは標的ＲＮＡ分子に存在する少なくとも１つの標的ヌクレオチド、好ましくはアデノシンの脱アミノ化のための方法であって、本発明によるＡＯＮを供給するステップ、標的核酸分子へのＡＯＮのアニーリングを可能にして、二本鎖核酸複合体を形成するステップ、ヌクレオチドデアミナーゼ活性を有する哺乳動物酵素が、標的核酸分子中の標的ヌクレオチドを脱アミノ化することを可能にするステップ、および、標的核酸分子中の脱アミノ化したヌクレオチドの存在を同定するステップを含む方法に関する。

【００２９】

別の実施形態では、本発明は、対象を、好ましくはそれを必要とする対象を処置する方法であって、対象は、アデノシン（例えばＰＴＣ）の出現に関与する突然変異に起因する遺伝的障害に罹患し、アデノシンのイノシンへの脱アミノ化は、疾患を緩和、予防、または改善し、本発明によるＡＯＮまたは医薬組成物を対象に投与するステップ、対象での細胞でその特異的に相補的な標的核酸とＡＯＮの二本鎖核酸複合体の形成を可能にするステップ、ｈＡＤＡＲ１またはｈＡＤＡＲ２などの脱アミノ化活性を有する内在的に存在する酵素の係合を可能にするステップ、および酵素が標的核酸分子での標的アデノシンをイノシンに脱アミノ化し、それにより遺伝的疾患を緩和、予防、または改善することを可能にするステップを含む、方法に関する。本方法にしたがって処置され得る遺伝的疾患は、好ましくは、限定されないが、本明細書に列挙された遺伝的疾患である（上記参照）。

【００３０】

定義

用語「アデニン」、「グアニン」、「シトシン」、「チミン」、「ウラシル」、および「ヒポキサンチン」（イノシンでの核酸塩基）とは、本明細書で使用される場合、それ自体で核酸塩基を指す。用語「アデノシン」、「グアノシン」、「シチジン」、「チミジン」、「ウリジン」、および「イノシン」とは、（デオキシ）リボシル糖に結合する核酸塩基を指す。用語「ヌクレオシド」とは、リン酸基を伴わない、（デオキシ）リボシル糖に結合する核酸塩基を指す。「ヌクレオチド」は、ヌクレオシドおよび１つまたは複数のリン酸基からなる。ゆえに、用語「ヌクレオチド」とは、それぞれの核酸塩基－（デオキシ）リボシル－ホスホリンカー（phospholinker）、ならびにリボース部分またはホスホ基の任意の化学修飾を指す。ゆえに、用語は、ロックドリボシル部分（メチレン基または任意の他の基を含む２’－４’架橋を含む）を含むヌクレオチド、アンロックド核酸（ＵＮＡ）、ホスホジエステル、ホスホノアセテート（phosphonoacetate）、ホスホトリエステル、ホスホロチオエート（phosphorothioate）（ＰＳ）、ホスホロ（ジ）チオネート（phosphoro(di)thioate）、メチルホスホネート（methylphosphonate）（ＭＰ）、ホスホロアミデート（phosphoramidate）のリンカーなどを含むリンカーを含むヌクレオチドを含む。時に、用語、アデノシンおよびアデニン、グアノシンおよびグアニン、シチジンおよびシトシン、ウラシルおよびウリジン、チミンおよびチミジン／ウリジン、イノシンおよびヒポキサンチンは、互換的に使用して、一方で対応する核酸塩基、および、他方でヌクレオシドまたはヌクレオチドを指す。時に、用語、核酸塩基、ヌクレオシド、およびヌクレオチドは、文脈が明らかに異なる必要がない限り、例えば、ヌクレオシドが近接ヌクレオシドに結合され、これらのヌクレオシド間の結合が修飾される場合、互換的に使用される。この場合、ヌクレオシドは、修飾されたリンカーであるか、またはヌクレオチドは、修飾されたヌクレオチドであるとみなすことができる。上述の通り、ヌクレオチドは、ヌクレオシドおよび１つまたは複数のリン酸基である。用語「リボヌクレオシド」

および「デオキシリボヌクレオシド」、または「リボース」および「デオキシリボース」は、当該技術分野で使用される通りである。「アンチセンスオリゴヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、または「ＡＯＮ」を参照する場合はいつも、文脈が別途指示しない限り、オリゴヌクレオチドおよびデオキシオリゴヌクレオチドの両方を意味する。「オリゴヌクレオチド」を参照する場合はいつも、塩基Ａ、Ｇ、Ｃ、Ｕ、またはＩを含み得る。「デオキシオリゴヌクレオチド」を参照する場合はいつも、塩基Ａ、Ｇ、Ｃ、Ｔ、またはＩを含み得る。

【００３１】

好ましい態様では、本発明のＡＯＮは、化学修飾を含み得るオリゴヌクレオチドであり、ある種の特定位置にデオキシヌクレオチド（ＤＮＡ）を含み得る。オリゴヌクレオチド、オリゴ、ＯＮ、オリゴヌクレオチド組成物、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ＡＯＮ、（ＲＮＡ）編集オリゴヌクレオチド、ＥＯＮ、およびＲＮＡ（アンチセンス）オリゴヌクレオチドなどの用語は、本明細書で、互換的に使用することができる。シトシンなどのオリゴヌクレオチド構築物中のヌクレオチドを参照する場合はいつも、５－メチルシトシン、５－ヒドロキシメチルシトシン、およびβ－Ｄ－グルコシル－５－ヒドロキシ－メチルシトシンを含み、アデニンを参照する場合はいつも、Ｎ６－メチルアデニン、および７－メチルアデニンを含み、ウラシルを参照する場合はいつも、ジヒドロウラシル、４－チオウラシル、および５－ヒドロキシメチルウラシルを含み、グアニンを参照する場合はいつも、１－メチルグアニンを含む。ヌクレオシドまたはヌクレオチドを参照する場合はいつも、２’－デソキシ、２’－ヒドロキシなどのリボフラノース誘導体、および２’－Ｏ－メチルなどの２’－Ｏ－置換バリアント、ならびに、２’－４’架橋バリアントを含む他の修飾を含む。オリゴヌクレオチドを参照する場合はいつも、２つのモノヌクレオチド間の結合は、ホスホジエステル結合、ならびにその修飾であり得、ホスホノアセテート、ホスホジエステル、ホスホトリエステル、ＰＳ、ホスホロ（ジ）チオネート（phosphoro(di)thioate）、ＭＰ、ホスホロアミデート（phosphor-amidate）のリンカーなどを含む。

【００３２】

用語「含む（comprising）」とは、「含む（including）」、ならびに「なる（consisting）」を包含し、例えば、「Ｘを含む」組成物は、排他的にＸからなり得るか、または、追加の何か、例えばＸ＋Ｙを含み得る。数値Ｘに関する用語「約」とは、任意であり、例えば、Ｘ±１０％を意味する。単語「実質的に」とは、「完全に」を排除せず、例えば、「Ｙを実質的に含まない」組成物は、Ｙを完全に含まない可能性がある。関連して、単語「実質的に」とは、本発明の定義から省略され得る。

【００３３】

用語「相補的」とは、本明細書で使用される場合、ＡＯＮが、生理学的条件下、標的配列にハイブリダイズするという事実を指す。この用語は、ＡＯＮのあらゆるヌクレオチドが、標的配列の対向するそのヌクレオチドと完璧な対形成を有することは意味していない。換言すると、ＡＯＮが、標的配列に相補的であり得ると同時に、生理学的条件下、細胞ＲＮＡ編集酵素が標的アデノシンを編集することができるように、ＡＯＮが標的配列に依然としてハイブリダイズしながら、ＡＯＮと標的配列との間にミスマッチ、揺らぎ、および／または膨らみが存在し得る。したがって、用語「実質的に相補的な」とは、ミスマッチ、揺らぎ、および／または膨らみの存在に関わらず、ＡＯＮが、生理学的条件下、標的ＲＮＡにハイブリダイズするように、ＡＯＮと標的配列との間に、十分にマッチするヌクレオチドを有することも意味する。本明細書に示す通り、ＡＯＮは、相補的であり得るが、ＡＯＮが、生理学的条件下、その標的にハイブリダイズする限り、標的配列との、１つまたは複数のミスマッチ、揺らぎ、および／または膨らみも含み得る。

【００３４】

核酸配列に関する用語「下流」とは、３’方向の配列に沿ってさらに遠いことを意味し、用語「上流」とは、逆を意味する。ゆえに、ポリペプチドをコードする任意の配列において、開始コドンは、センス鎖の終止コドンの上流であるが、アンチセンス鎖の終止コドンの下流である。

【００３５】
「ハイブリダイゼーション」に対する参照は、典型的には、特異的なハイブリダイゼーションを指し、非特異的なハイブリダイゼーションを排除する。特異的なハイブリダイゼーションは、選ばれた実験条件下、当該技術分野に周知の技術を使用して行って、プローブと標的との間の安定した相互作用の多くが、少なくとも７０％、好ましくは少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも９０％の配列同一性のプローブおよび標的である状態にあることを確保することができる。用語「ミスマッチ」とは、ワトソン－クリック型塩基対の規則による完璧な塩基対を形成しない二本鎖ＲＮＡ複合体における、対向するヌクレオチドを指すために、本明細書で使用される。ミスマッチしたヌクレオチドは、Ｇ－Ａ、Ｃ－Ａ、Ｕ－Ｃ、Ａ－Ａ、Ｇ－Ｇ、Ｃ－Ｃ、Ｕ－Ｕ対である。いくつかの実施形態では、本発明のＡＯＮは、４個未満のミスマッチ、例えば、０、１、または２個のミスマッチを含む。揺らぎの塩基対は、Ｇ－Ｕ、Ｉ－Ｕ、Ｉ－Ａ、およびＩ－Ｃ塩基対である。

【００３６】
本発明のＡＯＮは、標的ＲＮＡ分子に存在する標的ヌクレオチドに直接対向するヌクレオチドを含む。標的ヌクレオチドに直接対向するＡＯＮでのヌクレオチドは、本明細書で、「オーファンヌクレオチド」として定義される。「セントラルトリプレット」とは、オーファンヌクレオチド、ならびにその３’および５’近接ヌクレオチドからなるＡＯＮ内の領域として定義される（ゆえに、セントラルトリプレット＝中央にオーファンヌクレオチドを伴う３つのヌクレオチド）。

【００３７】
用語「スプライス突然変異」とは、プレｍＲＮＡをコードする遺伝子における突然変異に関し、スプライシング機構は、エクソンからのイントロンのスプライシングが分散し、異常なスプライシングにより、続く翻訳が、フレームから外れて、コードされたタンパク質の早期停止をもたらす、センスにおける機能不全である。多くの場合、このようなより短いタンパク質は、迅速に分解され、本明細書に記載するような任意の機能性活性を有さない。正確な突然変異は、ＲＮＡ編集に対する標的である必要はなく、スプライス突然変異の近接または近傍アデノシンが、標的ヌクレオチドであり、Ｉへの変換により、正常状態に戻るスプライス突然変異に修正される可能性がある。当業者は、スプライス突然変異の部位または領域内のアデノシンのＲＮＡ編集の後、正常なスプライシングが復元されるか否かを決定する方法を承知している。

【００３８】
本発明によるＡＯＮは、例えば、ヌクレオシドに２’－Ｏ－メチル化糖部分（２’－ＯＭｅ）、および／または２’－Ｏ－メトキシエチル糖部分（２’－ＭＯＥ）を供給することにより、ヌクレオシドのほとんどその全体で化学修飾され得る。しかし、オーファンヌクレオチドは、好ましくは、２’－ＯＭｅ修飾を含まず、またさらに好ましい態様では、少なくとも１つの近接ヌクレオチドが、好ましい態様では、標的アデノシンに対向する各ヌクレオチドを挟む２つの近接ヌクレオチドの両方が、２’－ＯＭｅ修飾をさらに含まない。ＡＯＮの全てのヌクレオチドが２’－ＯＭｅ修飾を有する完全な修飾は、ＲＮＡ編集（当該技術分野で知られている）を行う限り、非機能性オリゴヌクレオチドをもたらすが、その理由は、おそらく、標的化された位置でＡＤＡＲ活性を妨害するからである。一般に、標的ＲＮＡでのアデノシンは、２’－ＯＭｅ基で対向するヌクレオチドを生成することによるか、または、対向する塩基としてグアニンもしくはアデニンを生成することによる編集から保護することができ、これら２つの核酸塩基もまた、対向するアデノシンの編集を低減することができる。様々な化学的性質および修飾は、本発明にしたがって容易に使用することができるオリゴヌクレオチドの分野で知られている。ヌクレオチド間の正常なヌクレオシド間結合は、ホスホジエステル結合のモノまたはジチオエート化により改変して、それぞれ、ホスホロチオエートエステル、またはホスホロジチオエート（phosphorodithioate）エステルを得ることができる。アミド化およびペプチドリンカーを含む、ヌクレオシド間結合の他の修飾も可能である。ＭＰ結合は、例えば、Agrawal et al. 1997. Proc Natl Acad Sci USA 94:2620-2625に開示される公知の化学的性質を使用して形成することが

できる。好ましい態様では、本発明のＡＯＮは、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、または５０ヌクレオチドを含む。

【００３９】

ＲＮＡ編集物質（例えば、ヒトＡＤＡＲ酵素）が、いくつかの要因に依存して、特異性を変化させることでｄｓＲＮＡ構造を編集することは、当該技術分野で知られている。１つの重要な要因は、ｄｓＲＮＡ配列をもたらす二本鎖の相補性の度合いである。二本鎖の完璧な相補性は、通常、非特徴的な方法でアデノシンを脱アミノ化し、それが遭遇する任意のアデノシンと多かれ少なかれ反応する、ｈＡＤＡＲの触媒ドメインをもたらす。ｈＡＤＡＲ１および２の特異性は、化学修飾を導入すること、および／または、ｄｓＲＮＡでのいくつかのミスマッチを確保することにより高めることができ、おそらく、未だに明らかに定義されていない方法で、ｄｓＲＮＡ結合ドメインの位置付けを助ける。あるいは、脱アミノ化反応自身は、編集されるアデノシンに対向するミスマッチを含む、ＡＯＮを生成することにより向上することができる。ミスマッチは、好ましくは、編集されるアデノシンに対向するシチジンを有する、標的化部分を生成することにより作成される。代替として、また、ウリジンは、アデノシンに対向して使用することができるが、これは、当然のことながら、ＵとＡとの対により、「ミスマッチ」は起こらない。標的鎖でアデノシンを脱アミノ化すると、標的鎖は、最も生化学的なプロセスに対して、Ｇとして細胞の生化学的機構により「読み込まれる」イノシンを得る。ゆえに、ＡからＩへの変換の後、Ｉは、完璧に、本発明によるオリゴヌクレオチド構築物の標的化部分における対向するＣと塩基対形成することができるので、ミスマッチは解消される。編集によりミスマッチが解消された後、基質を放出し、オリゴヌクレオチド構築物－編集物質複合体を標的ＲＮＡ配列から放出し、次いで、スプライシングおよび翻訳などの、下流の生化学的なプロセスで利用可能となる。また、標的化したオリゴヌクレオチドが、標的ＲＮＡに非常に密に結合すべきではないので、オン／オフ比は重要である。標的ＲＮＡ配列を編集する特異性の所望のレベルは、標的ごとに依存し得る。本特許出願における指示にしたがって、当業者は、必要性にしたがってオリゴヌクレオチドの相補的な部分を設計することが可能であり、いくらかの試行錯誤をして、所望の結果を得ることが可能であろう。

【００４０】

細胞に存在するＲＮＡ編集分子は、通常、哺乳動物を含む、後生動物で見られるＡＤＡＲ酵素などの、天然でのタンパク質性である。好ましくは、細胞の編集物質は、酵素であり、より好ましくはアデノシンデアミナーゼまたはシチジンデアミナーゼ、さらにより好ましくはアデノシンデアミナーゼである。これらは、ＡＤＡＲ活性を有する酵素である。最も興味深いものは、ヒトＡＤＡＲ、ｈＡＤＡＲ１、およびｈＡＤＡＲ２であり、ｈＡＤＡＲ１　ｐ１１０およびｐ１５０などの、任意のそのアイソフォームを含む。当該技術分野に知られているＲＮＡ編集酵素は、本発明によるオリゴヌクレオチド構築物が適宜的に設計され得るが、ヒトまたはヒト細胞におけるｈＡＤＡＲ１およびｈＡＤＡＲ２などの、ＲＮＡで作用するアデノシンデアミナーゼ（ＡＤＡＲ）、ならびにシチジンデアミナーゼを含む。ヒトＡＤＡＲ３（ｈＡＤＡＲ３）は、先行技術に記載されているが、報告によると、デアミナーゼ活性は有さない。ｈＡＤＡＲ１が、２つのアイソフォーム、長い１５０ｋＤａの誘導型インターフェロン、およびより短い１００ｋＤａ型に存在し、通常のプレｍＲＮＡから代替的なスプライシングによって生成されることが知られている。その結果、細胞に存在する１５０ｋＤａアイソフォームのレベルは、インターフェロン、特にインターフェロンγ（ＩＦＮ－γ）の影響を受ける可能性がある。ｈＡＤＡＲ１はまた、ＴＮＦ－αに誘導される。これは、併用療法を開発する機会を提供し、それによりＩＦＮ－γまたはＴＮＦ－α、および本発明によるＡＯＮは、組合せ製品、または別々の製品のいずれかとして、同時に、または続いて、任意の順でのいずれかで、患者に投与される。ある種の疾患状態は、既に、患者のある種の組織における高いＩＦＮ－γ、またはＴＮＦ－αレベルと一致し得、病変組織に対してより特異的な編集を行うさらなる機会を作る。細胞

内の編集物質を他の標的部位に再配向する程度は、編集分子の認識ドメインに対する、本発明によるＡＯＮの親和性が変化することにより調節され得ることは、当業者なら理解されよう。正確な修飾は、いくらかの試行錯誤を通して、ならびに／または、ＡＯＮと編集分子の認識ドメインとの間の構造的相互作用に基づく計算方法によって決定することができる。加えて、またはあるいは、細胞に存在する編集物質を動員し、再配向する程度は、ＡＯＮの投与および投与レジメンにより調節され得る。これは、通常、第Ｉ相および／または第ＩＩ相の臨床試験において、（インビトロ）実験者または臨床医により決定されることである。

【００４１】

本発明は、真核細胞、好ましくは後生動物細胞、より好ましくは哺乳動物細胞、最も好ましくはヒト細胞における標的ＲＮＡ配列の修飾に関係する。本発明は、任意の臓器、例えば、皮膚、肺、心臓、腎臓、肝臓、膵臓、腸、筋肉、腺、眼、脳、血液などに由来する細胞で使用することができる。本発明は、（ヒト）対象の疾患状態に関与する細胞、組織、または臓器の配列を修飾するのに特に適している。細胞は、インビトロ、エクスビボ、またはインビボに位置することができる。本発明の一利点は、生体中のインシチュでの細胞で使用することができるが、培養下の細胞でも使用することができる。いくつかの実施形態では、細胞をエクスビボで処置し、次いで、生体内に導入する（例えば、本来由来する生物内に再導入する）。本発明はまた、いわゆる類器官内の細胞において、標的ＲＮＡ配列を編集するのに使用することができる。類器官は、３次元のインビトロ由来の組織と考えられるが、個別の単離された組織を生成する特定の条件を使用して駆動される（例えば、Lancaster & Knoblich, Science 2014, vol. 345 no. 6194 1247125を参照）。治療環境では、インビトロで患者の細胞に由来することができるので、類器官は、通常の移植より拒絶されにくい自己由来の物質として患者に再導入することができることから有用である。処置される細胞は、一般に、遺伝子突然変異を有する。突然変異は、ヘテロ接合またはホモ接合であり得る。本発明は、典型的には、ＮからＡへの突然変異（Ｎは、Ｇ、Ｃ、Ｕ（ＤＮＡレベルではＴ）であり得る）、好ましくはＧからＡへの突然変異、またはＮからＣへの突然変異（Ｎは、Ａ、Ｇ、Ｕ（ＤＮＡレベルではＴ）であり得る）、好ましくはＵからＣへの突然変異などの、点突然変異を修飾するのに使用される。

【００４２】

理論を拘束することは望まないが、ｈＡＤＡＲ１およびｈＡＤＡＲ２によるＲＮＡ編集は、転写もしくはスプライシングの間の核内、または、例えば、成熟ｍＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、もしくはｎｃＲＮＡを編集することができる細胞質の一次転写物で起こると考えられている。編集酵素の異なるアイソフォームは、例えば、核内で多く見られるｈＡＤＡＲ１ｐ１１０、および細胞質で多く見られるｈＡＤＡＲ１　ｐ１５０で示差的に局在化することが知られている。シチジンデアミナーゼによるＲＮＡ編集は、ｍＲＮＡレベルで起こると考えられている。

【００４３】

多くの遺伝的疾患は、ＧからＡへの突然変異により起こり、突然変異した標的アデノシンでのアデノシン脱アミノ化が、とりわけＰＴＣに関係する場合、突然変異を、機能性全長および／もしくは野生型タンパク質が発生するコドンに逆行させることから、これらは、好ましい標的疾患である。本発明によるオリゴヌクレオチドで予防および／または処置することができる遺伝的疾患の好ましい例は、標的ＲＮＡでの１つまたは複数のアデノシンの修飾が、（潜在的な）有益な変化をもたらす、任意の疾患である。とりわけ好ましいのは、アッシャー症候群およびＣＦであり、より具体的には、ＣＦＴＲ　ＲＮＡでの疾患誘導性ＰＴＣにおけるアデノシンのＲＮＡ編集が好ましい。ＣＦ突然変異の分野の技術を有する人は、１０００～２０００の突然変異が、Ｇ５４２Ｘ、Ｗ１２８２Ｘ、Ｒ５５３Ｘ、Ｒ１１６２Ｘ、Ｙ１２２Ｘ、Ｗ１０８９Ｘ、Ｗ８４６Ｘ、Ｗ４０１Ｘ、６２１＋１Ｇ＞Ｔ、または１７１７－１Ｇ＞Ａを含む、ＣＦＴＲ遺伝子で知られていることを認識する。

【００４４】

本発明による標的化編集が、所与の配列での突然変異したまたは野生型のヌクレオチド

であろうとなかろうと、任意のアデノシン（またはシトシン）に適用することができることは明らかであるべきである。例えば、編集は、異なる特性でのＲＮＡ配列を作成するのに使用することができる。このような特性は、コーディング特性（改変させたタンパク質の特性もしくは機能をもたらす、異なる配列もしくは長さを有するタンパク質を生じる）、または結合特性（ＲＮＡ自身もしくは標的もしくは結合パートナーの阻害もしくは過剰発現を起こす；発現経路全体が、標的ＲＮＡでｍｉＲＮＡもしくはその同族配列を記録することにより改変することができる）であり得る。タンパク質の機能または局在化は、機能性ドメインまたは認識モチーフにより、そのまま変化することができ、限定されないが、シグナル配列、標的化または局所化シグナル、タンパク質分解切断または翻訳に伴うもしくは翻訳後の修飾に対する認識部位、酵素の触媒部位、結合パートナーに対する結合部位、分解または活性化に対するシグナルなどが挙げられる。ＲＮＡのこれらおよびその他の形態、ならびにタンパク質「工学」は、疾患を予防、遅延、もしくは処置しようとしまいと、またはいかなる他の目的のために、医学または生物工学において、診断、予防、治療、調査ツールなどとして、本発明により包含される。

【００４５】

投与されるＡＯＮの量、投与量、および投与レジメンは、細胞の種類ごと、処置される疾患、標的集団、投与の様式（例えば、全身対局所）、疾患の重症度、および副活性の許容レベルで異なり得るが、これらは、インビトロ研究、前臨床試験、および臨床試験の間、試行錯誤により評価することができ、評価されるべきである。修飾された配列により容易に検出される表現型の変化が生じる場合、試験は、特に単純である。より高用量のＡＯＮが、細胞内で核酸編集物質（例えばＡＤＡＲ）に結合するために競合し、それにより、ＲＮＡ編集を行わない物質の量を消耗する可能性があるが、通常の投与試験により、所与のＡＯＮおよび所与の標的に対する任意のこのような効果が明らかになる。

【００４６】

１つの適した試験技術は、ＡＯＮを細胞株、または試験生物に送達すること、次いで、その後の様々な時点で生検サンプルを採取することを含む。標的ＲＮＡの配列は、生検サンプルで評価することができ、修飾を有する細胞の割合は、続いて容易に行うことができる。この試験を一旦行うと、その後、情報を保持することができ、生検サンプルの採取を必要とせずに、今後の送達を行うことができる。ゆえに、本発明の方法は、細胞の標的ＲＮＡ配列での所望の変化の存在を同定し、それにより、標的ＲＮＡ配列が修飾されることを検証するステップを含むことができる。このステップは、典型的には、上述の通り、標的ＲＮＡの関連する部分、またはそのｃＤＮＡコピー（もしくは、標的ＲＮＡがプレｍＲＮＡである場合、そのスプライシング生成物のｃＤＮＡコピー）をシークエンシングすることを含むので、配列変化は、容易に検証することができる。あるいは、変化は、タンパク質のレベル（長さ、グリコシル化、機能など）で、または、標的ＲＮＡ配列でコードされるタンパク質が、例えば、イオンチャンネルである場合、（誘導）電流などの、いくつかの機能的な読み出しにより、評価することができる。

【００４７】

ＲＮＡ編集が、細胞内で起こった後、修飾されたＲＮＡは、例えば、細胞分裂、編集されるＲＮＡの半減期の制限などにより、経時的に希釈することができる。ゆえに、実用的な治療の点で、本発明の方法は、十分な標的ＲＮＡを修飾して、患者に目に見える利点を提供する、および／または経時的に利点を維持するまで、ＡＯＮの繰り返す送達を含み得る。

【００４８】

本発明のＡＯＮは、特に、治療的使用に適しているので、本発明は、本発明のＡＯＮおよび薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を提供する。本発明のいくつかの実施形態では、薬学的に許容される担体は、単純に生理食塩水溶液であり得る。これは、特に肺内送達に対して、有用に等張性または高張性であり得る。本発明はまた、本発明の医薬組成物を含む、送達デバイス（例えば、シリンジ、吸入器、ネブライザー）を提供する。

【００４９】

本発明はまた、本明細書に記載の通り、哺乳動物、好ましくはヒト細胞での標的ＲＮＡ配列において変化させるための方法での使用のための、本発明のＡＯＮを提供する。同様に、本発明は、本明細書に記載の通り、哺乳動物、好ましくはヒト細胞での標的ＲＮＡ配列において変化させるための医薬の製造における、本発明のＡＯＮの使用を提供する。

【００５０】

本発明はまた、細胞内の標的ＲＮＡ配列に存在する、少なくとも１つの特異的な標的アデノシンの脱アミノ化のための方法であって、細胞に、本発明によるＡＯＮを供給するステップ、ＡＯＮの細胞による取込みを可能にするステップ、標的ＲＮＡ分子へのＡＯＮのアニーリングを可能にするステップ、野生型酵素で発見された天然のｄｓＲＮＡ結合ドメインを含む哺乳動物のＡＤＡＲ酵素が、標的ＲＮＡ分子中の標的アデノシンをイノシンに脱アミノ化することを可能にするステップ、および、任意で、ＲＮＡ配列中のイノシンの存在を同定するステップを含む、方法に関する。

【００５１】

好ましい態様では、ＡからＩへの変換の最大脱アミノ化効果に依存して、同定するステップは、標的ＲＮＡをシークエンシングすること、機能性、伸長型、全長および／もしくは野生型タンパク質の存在を評価すること、プレｍＲＮＡのスプライシングが、脱アミノ化により改変したかどうかを評価すること、または、機能的な読み出しを使用することであって、脱アミノ化後の標的ＲＮＡが、機能性、全長、伸長型および／もしく野生型タンパク質をコードする、使用することを含む。アデノシンのイノシンへの脱アミノ化により、標的位置での突然変異したＡにもはや悩まされることがないタンパク質をもたらすことができることにより、イノシンへの脱アミノ化の同定はまた、機能的な読み出し、例えば、機能的タンパク質が存在するかどうかの評価、または、さらに、アデノシンの存在により引き起こされる疾患が（部分的に）逆行することの評価であり得る。本明細書に記載の疾患の各々に対する機能的評価は、一般に、当業者に知られている方法にしたがう。標的アデノシンの脱アミノ化の後のイノシンの存在を同定する非常に適した方法は、もちろん、当業者に周知の方法を使用する、ＲＴ－ＰＣＲおよびシークエンシングである。

【００５２】

本発明によるＡＯＮは、水溶液、例えば、生理食塩水、または、１ｎｇ／ｍｌ～１ｇ／ｍｌ、好ましくは１０ｎｇ／ｍｌ～５００ｍｇ／ｍｌ、より好ましくは１００ｎｇ／ｍｌ～１００ｍｇ／ｍｌの範囲の濃度で、薬学的な使用に適合する、添加物質、賦形剤、または他の成分を任意で含む、懸濁液で、適切に投与される。投与量は、適切には、約１μｇ／ｋｇ～約１００ｍｇ／ｋｇ、好ましくは約１０μｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇ、より好ましくは約１００μｇ／ｋｇ～約１ｍｇ／ｋｇの範囲であり得る。投与は、吸入（例えば、ネブライザーによって）、鼻腔内、経口、注射または注入、静脈内、皮下、皮内、頭蓋内、硝子体内、筋肉内、気管内、腹腔内、直腸内などであり得る。投与は、固体形態、散剤、丸剤、ゲル剤、点眼剤の形態、またはヒトにおける薬学的な使用に適合する任意の他の形態であり得る。

【実施例】

【００５３】

[実施例１]

メチルホスホネート（methylphosphonate）（ＭＰ）結合修飾を含むアンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＯＮ）は、インビトロでの生化学分解アッセイを使用して、このようなＭＰ修飾が欠乏するＡＯＮより安定である

標的ＲＮＡ分子で標的アデノシンに対向するヌクレオチドの糖部分の２’－ＯＭｅ修飾の存在が、このような２’－ＯＭｅ修飾を有さないＡＯＮと比較して、特定の標的アデノシンのイノシンへの脱アミノ化を減らすことが知られている。残念なことに、この特定の位置でのこのような糖修飾が不在になると、ＡＯＮが不安定になる。本発明の発明者らは、このようなものが、代わりに２つのＤＮＡヌクレオチド間のヌクレオチド間結合修飾を有するにより解決することができるかどうかを疑った。これに対して、２つのメチルホスホネート（methylphosphonate）（ＭＰ）結合を、ＡＯＮで、２つのＤＮＡヌクレオシド（

その１つは、標的マウスＩＤＵＡ　ＲＮＡ分子に存在する標的アデノシンに対向する）とそれぞれの３’近接ヌクレオシドとの間に導入した。ＭＰ修飾されたＤＮＡ－ＤＮＡ結合の構造は、図１に示す。図２は、マウスＩＤＵＡ標的分子ならびに使用される相補的なＡＯＮの配列を示し、ＡＯＮ　ＡＤＡＲ１０２－１でのＤＮＡヌクレオシド（図２での大文字）間の修飾の不在、およびＡＤＡＲ１０２－１３での＾でマークされる２つのＤＮＡヌクレオシドとそれぞれの３’近接ヌクレオシドとの間のＭＰ修飾の存在を示す。ＡＤＡＲ１０２－２１の配列（ＡＯＮの全ての位置に２’－ＯＭｅ修飾、ならびにこのシチジンとその３’近接アデノシンとの間および２つの先行する５’結合におけるＰＳ修飾を有する）、ならびにＡＤＡＲ１０２－２５の配列（ＡＤＡＲ１０２－１と同じ位置にＡＤＡＲ１０２－２１と類似のＰＳ結合を有する２つのＤＮＡヌクレオシドを有する）は示さない。

【００５４】

４つ全てのオリゴヌクレオチド、ＡＤＡＲ１０２－１（２×ＤＮＡ、結合修飾を含まない）、ＡＤＡＲ１０２－２５（２×ＤＮＡ、ＰＳ修飾）、ＡＤＡＲ１０２－２１（ＰＳ修飾）、およびＡＤＡＲ１０２－１３（２×ＤＮＡ、ＭＰ修飾）を、生化学安定性アッセイで試験した。全てのオリゴヌクレオチドを、ヌクレアーゼを含まない水（Ａｍｂｉｏｎ）で２５μＭの濃度に希釈し、各オリゴヌクレオチド１０μｌを、３７℃で、肝臓溶解物１０μｌおよびヌクレアーゼミックス１０μｌでインキュベートした。肝臓溶解物を、以下の通り調製した：３．５ｇの野生型Ｃ５７ＢＩ／６Ｊマウス肝臓を、９ｍｌの１００ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ８、および１ｍＭ　ＭｇＯＡｃにおいて、４℃で、Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃｈ製のＧｅｎｔｌｅＭａｃｓホモジナイザーを使用してホモジナイズし、４０００ｒｐｍ、４℃で５分間遠心分離し、次いで、Ｐｉｅｒｃｅ　ＢＣＡタンパク質アッセイキットの１２ｍｇ／ｍｌのタンパク質濃縮液により決定された、アリコート１ｍｌ中にアリコートし、さらなる使用のために－８０℃で保管した。ヌクレアーゼミックスを、以下の通り調製した：ヒガシダイヤガラガラヘビ（Crotalus adamanteus）毒素由来のホスホジエステラーゼＩ（Ｓｉｇｍａ）５μｌ、ＤＮａｓｅ　Ｉ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　ＢｉｏＬＡｂｓ）５μｌ、ＲＮａｓｅ　Ａ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）５μｌ、およびヌクレアーゼＢＡＬ－３１（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　ＢｉｏＬＡｂｓ）５μｌを、ヌクレアーゼＢＡＬ－３１緩衝液（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　ＢｉｏＬＡｂｓ）３０μｌおよびヌクレアーゼを含まない水（Ａｍｂｉｏｎ）１０μｌ中で共に混合した。オリゴヌクレオチドのインキュベートを、同体積の変性サンプル緩衝液（８Ｍ尿素、２０ｍＭ　ＥＤＴＡ、５ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．５、３０％のグリセロール、０．００５％のキシレンシアノール、０．０１％のブロムフェノールブルー）を添加することにより所定の時間点（０、３０、および１２０分）で停止させた。その後、サンプルを、ＢｉｏＲａｄミニプロティアンＴｅｔｒａセルゲル電気泳動システムを使用して、変性の１５％ミニプロティアンＴＢＥ－尿素ゲル、１５ウェル、１５μｌ、ＢｉｏＲａｄに溶解した。ゲルを、トルイジンブルーＯ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）で３０分間染色し、水で脱染した。ゲルを、白色光変換スクリーンを備えたＢｉｏＲａｄ　Ｇｅｌ　Ｄｏｃ　ＸＲ＋撮像装置により撮像し、ＩｍａｇｅＪプログラムを使用することにより解析した。

【００５５】

結果は、図３に示し、（ＡＤＡＲ１０２－２５の）２つのＤＮＡヌクレオチド間のＰＳ結合の存在が、２つのＤＮＡヌクレオチドが試験した条件下、正常なホスホジエステル結合で結合するＡＤＡＲ１０２－１と比較した場合、さらなる安定性をもたらさないことを明らかに示す。上段は、２’－ＯＭｅ修飾ならびにＰＳ結合を有するＡＤＡＲ１０２－２１による結果を示し、実際に２’－ＯＭｅの存在が、オリゴヌクレオチドの安定性を増加させることを示す。驚くべきことに、オリゴヌクレオチドと同じ位置に２’－ＯＭｅ修飾を有さないオリゴヌクレオチドは、ＭＰ結合を導入したが、オリゴヌクレオチドに非常に安定であることをもたらし、この安定性アッセイで、２’－ＯＭｅ修飾されたオリゴヌクレオチドとほぼ同様に安定であるようであった。オリゴヌクレオチドでのＭＰ結合の導入が、２’－ＯＭｅ糖修飾と同等である安定性をもたらしたことが結論付けられた。

【００５６】

[実施例２]
安定するＭＰ結合修飾を有するＡＯＮによるＲＮＡ編集
本発明者らは、次に、ＭＰ修飾が、より安定なＡＯＮをもたらすが、ＡＯＮでのＤＮＡヌクレオチド間にＰＳ修飾を有するＡＯＮで観察されたＲＮＡ編集の低い効率性と同様に、ＲＮＡ編集を依然として予防するかどうかを疑った（データは示さず）。ゆえに、ＭＰ修飾が、ここではＡＯＮの安定性を高めたことで知られていたが、（安定性をもたらすが）ＲＮＡ編集に効果的ではないＡＯＮをもたらす２’－ＯＭｅ修飾に対して、ＲＮＡ編集を可能にするかどうかを探索した。
【００５７】
これに対して、ＡＤＡＲ１０２－１およびＡＤＡＲ１０２－１３を、以下のＲＮＡ編集アッセイと比較した。最初に、両ＡＯＮを、マウスＩＤＵＡ標的ＲＮＡにアニールした。アニーリングを、標的ＲＮＡ対ＡＯＮの比が１：３（編集反応の最終濃度６ｎＭのＡＯＮおよび２ｎＭの標的）で、緩衝液（５ｍＭ　Ｔｒｉｓ－Ｃｌ、ｐＨ７．４、０．５ｍＭ　ＥＤＴＡ、および１０ｍＭ　ＮａＣｌ）で行った。サンプルを、９５℃で３分間加熱し、次いで、室温まで緩やかに冷却した。次に、編集反応を行った。アニールした二本鎖ＡＯＮ／標的ＲＮＡを、プロテアーゼ阻害剤（ｃＯｍｐｌｅｔｅ、ミニ、ＥＤＴＡフリープロテアーゼＩ、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、ＲＮａｓｅ阻害剤（ＲＮａｓｉｎ、Ｐｒｏｍｅｇａ）、ポリＡ（Ｑｉａｇｅｎ）、ｔＲＮＡ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、および編集反応緩衝液（１５ｍＭ　Ｔｒｉｓ－Ｃｌ、ｐＨ７．４、１．５ｍＭ　ＥＤＴＡ、３％のグリセロール、６０ｍＭ　ＫＣｌ、０．００３％のＮＰ－４０、３ｍＭ　$MgCl_2$、および０．５ｍＭ　ＤＴＴ）と混合した。反応を、ＧｅｎＳｃｒｉｐｔにより生成された精製ＡＤＡＲ２を、最終濃度８ｎＭまで混合物に添加することにより開始し、所与の時間点（０、２、５、１０、２０、４０、および６０分）に対して３７℃でインキュベートした。反応を、沸騰水１９０μＬを添加することにより停止し、次いで、混合物を、９５℃で５分間インキュベートした。次いで、停止した反応混合物を、Ｍａｘｉｍａ逆転写酵素およびヘキサマー（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）を使用するｃＤＮＡ合成に対するテンプレートとして使用した。ｃＤＮＡを１０倍に希釈し、この希釈液１μＬを、デジタルドロップレットＰＣＲ（ｄｄＰＣＲ）に対するテンプレートとして使用した。核酸標的配列の絶対定量に対するｄｄＰＣＲアッセイを、ＢｉｏＲａｄのＱＸ－２００ドロップレットデジタルＰＣＲシステムを使用して行った。ＲＴ　ｃＤＮＡ合成反応から得られた希釈ｃＤＮＡ　１μｌを、ｄＵＴＰを含まないプローブ用のｄｄＰＣＲ　Ｓｕｐｅｒｍｉｘ（Ｂｉｏ　Ｒａｄ）を含む、反応混合の２０μｌの全混合物で使用し、以下のフォーワードおよびリバースプライマーを伴うＴａｑｍａｎ　ＳＮＰ遺伝子型アッセイは、以下の遺伝子特異的プローブと組み合わせた：
フォーワードプライマー：
５’－ＣＴＣＡＣＡＧＴＣＡＴＧＧＧＧＣＴＣ－３’（配列番号４）
リバースプライマー：
５’－ＣＡＣＴＧＴＡＴＧＡＴＴＧＣＴＧＴＣＣＡＡＣ－３’（配列番号５）
野生型プローブ（ＦＡＭ　ＮＦＱ標識化）：
５’－ＡＧＡＡＣＡＡＣＴＣＴＧＧＧＣＡＧＡＧＧＴＣＴＣＡ－３’（配列番号６）
突然変異型プローブ（ＨＥＸ　ＮＦＱ標識化）：
５’－ＡＧＡＡＣＡＡＣＴＣＴＡＧＧＣＡＧＡＧＧＴＣＴＣＡ－３’（配列番号７）
【００５８】
ｃＤＮＡを含む総体積２０μｌのＰＣＲミックスを、マルチチャンネルピペットを使用して、ｄｄＰＣＲカートリッジ（ＢｉｏＲａｄ）の中列に充填した。複製を、２つのカートリッジに分割した。下列は、プローブ用のドロップレット生成油（ＢｉｏＲａｄ）７０μｌで充填した。ラバーガスケットの置換の後、ドロップレットを、ＱＸ２００ドロップレット生成器で生成した。カートリッジの上列から油状乳化物４０μｌを、９６ウェルＰＣＲプレートに移した。ＰＣＲプレートを、ＰＸ１プレートシーラーを使用して、１７０℃で４分間、スズ箔で密封し、その後、以下のＰＣＲプログラムを行った：９５℃で１０

分間の酵素活性化を１サイクル、９５℃で３０分間の変性および６３．８℃で１分間のアニーリング／伸長を４０サイクル、９８℃で１０分間の酵素不活性化と続く８℃での保管を１サイクル。ＰＣＲの後、プレートを、ＱＸ２００ドロップレットリーダーで読み出し、解析した。

【００５９】

結果は、図４に示し、標的アデノシンと対向するＤＮＡヌクレオチド間に結合修飾を含まないＡＯＮ（ＡＤＡＲ１０２－１）と比較していくぶん低下するが、ＡＤＡＲ１０２－１３の使用は、最大３０％のＲＮＡ編集をもたらしたことを明らかに示す。これは、標的ＲＮＡ分子での標的アデノシンに対向する２つのＤＮＡヌクレオチドをそれぞれの３’近接ヌクレオシドと結合させるＭＰ修飾の存在が、ＲＮＡ編集を可能にしたことを明らかに示す。修飾によりＡＯＮの安定性が高まるという事実と共に、これら２つの特徴が、先行技術でこれまで実証されてきたものと比較して改善されたＲＮＡ編集ツールを提供すると考えられている。

【００６０】

[実施例３]

安定するＭＰ結合修飾を有するＡＯＮによるＲＮＡ編集

本発明者らは、次に、どこでＭＰ修飾が、ＡＯＮ内で実施され、ＲＮＡ編集を依然として可能にするかを疑った。オーファンヌクレオシドに対して結合位置０から－６でＭＰ修飾を有するＡＯＮを、合成して試験した。編集アッセイを、以下の変更を伴って、実施例２の通りに行った：最終濃度は、１ｎＭの標的ＲＮＡ、２４ｎＭのＡＯＮ、および３ｎＭのＡＤＡＲ２であり、３ｍＭ　$MgSO_4$を、編集反応緩衝液の３ｍＭ　$MgCl_2$の代わりに使用した。反応は、実施例２に記載の通りに行い、沸騰した３ｍＭ　ＥＤＴＡ溶液９５μｌを、反応物から得られるアリコート５μｌに添加することにより、時間点０秒、３０秒、１分、２分、５分、１０分、２５分、および５０分で停止させた。

【００６１】

次いで、停止させた反応混合物のアリコート６μｌを、標的ＲＮＡ特異的プライマー（５’－ＧＧＡＡＡＣＧＴＡＧＧＴＴＧＧＧＧＴＧＴＧ－３’、配列番号８）を伴うＭａｘｉｍａ逆転写酵素キット（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）を使用するｃＤＮＡ合成に対するテンプレートとして使用した。ＲＮＡの最初の変性を、９５℃で５分間、プライマーおよびｄＮＴＰの存在下で行い、続いて、１０℃まで穏やかに冷却した後、第一の鎖合成を、６２℃の伸長温度を使用して総体積２０μｌで製造業者の説明書にしたがって行った。

【００６２】

生成物を、製造業者の説明書にしたがってＡｍｐｌｉｔａｑ　Ｇｏｌｄ　３６０　ＤＮＡポリメラーゼキット（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を使用して、テンプレートとしてｃＤＮＡ　１μｌとのＰＣＲによるパイロシークエンシング解析のために増幅した。以下のプライマーを、濃度１０μＭで使用した：パイロ配列フォーワード２　ＩＤＵＡ、５’－ＡＧＴＡＣＴＣＡＣＡＧＴＣＡＴＧＧＧＧＣＴＣＡ－３’（配列番号９）、およびパイロ配列リバース２　ＩＤＵＡビオチン、５’－ＧＣＣＡＧＧＡＣＡＣＣＣＡＣＴＧＴＡＴＧＡＴ－３’（配列番号１０）。後者のプライマーはまた、パイロシークエンシング反応の間の自動処理の必要に応じて、その５’末端にコンジュゲートされるビチオンも含有する。ＰＣＲを、以下の熱サイクルプロトコルを使用して行った：９５℃で５分間の最初の変性、次に９５℃で３０秒間、６０℃で３０秒間、および７２℃で３０秒間を４０サイクル、ならびに７２℃で７分間の最終伸長。

【００６３】

逆転写反応でのｃＤＮＡ合成の間のシチジンとのイノシンの塩基対として、ＰＣＲの間の編集される位置に組み込まれるヌクレオチドは、グアノシンである。グアノシン（編集済み）対アデノシン（未編集）の百分率は、パイロシークエンシングにより定義された。ＰＣＲ生成物のパイロシークエンシングおよび以下のデータ解析は、ＰＣＲ生成物の１０μｌ入力、および４μＭの以下のシークエンシングプライマーで、製造業者の説明書にしたがってＰｙｒｏＭａｒｋ　Ｑ４８　Ａｕｔｏｐｒｅｐ機器（ＱＩＡＧＥＮ）により行った

：ＩＤＵＡ配列２、５’－ＴＧＧＧＧＣＴＣＡＴＧＧＣＣＣＴ－３’（配列番号１１）。この標的ＲＮＡ鎖に特異的に定義される設定は、２セットの配列情報を含んだ。第一のセットは、解析するための機器に対する配列を定義し、アデノシンまたはグアノシンのいずれかを含有する特定位置の可能性は、「／」で示す：５’－ＧＴＴＧＧＡＴＧＧＡＧＡＡＣＡＡＣ　ＴＣＴＡ／ＧＧＧＣＡＧＡＧＧＴＣＴＣＡＡ／ＧＡＧＧＣＴＧＧＧＧＣＴ－３’（配列番号１２）。２つの位置が、シークエンシングで解析されることは留意されたい：標的部位、および編集すべきではない対照部位（結果は標的部位のみを示す）。第二のセットは、各ヌクレオチドに対応するシークエンシング試薬が分配される順番を定義し、ブランク対照（すなわち、特定位置で組み込むべきではないヌクレオチド）も含み、これはバックグラウンドシグナルを定義する機器により使用される。分配順は、以下の通り、この解析に対して定義した：ＣＧＴＧＡＴＧＡＧＡＣＡＣＴＣＧＴＡＧＣＡＧＡＧＴＣＴＧＣＡＧＡＧＣＴＧＣＡ（配列番号１３）。機器により行われた解析は、その位置で検出されたアデノシンおよびグアノシンの百分率として選択されたヌクレオチドに対する結果を示し、したがって、選ばれた位置でのＡからＩへの伸長は、その位置でのグアノシンの百分率により測定される。

【００６４】

図６および図７での結果は、オーファンヌクレオチドに近接する領域でのヌクレオチドのいずれかの間にＭＰ結合を有するＡＯＮが、ＲＮＡ編集を可能にすることを示す。位置０および－２での修飾が、陽性対照のＡＯＮと同様のＲＮＡ編集特性をもたらすことを観察した。他の位置は、ＭＰを有し得る。これらは、達成される編集の最終レベルの点、または反応の動力学のいずれにおいても、ＲＮＡ編集にそれほど効果的ではないようである。

【００６５】

[実施例４]

安定するＭＰ結合修飾を有するＡＯＮによる細胞でのＲＮＡ編集

本発明者らは、次に、細胞で編集を行うＡＯＮの能力を探索したが、実施例２および３で使用される標的部位の配列を伴うＲＮＡは存在する。問題の細胞は、マウスの胚性線維芽細胞株であり、内因性Ｉｄｕａ遺伝子は、早期停止終止コドン（Ｗ３９２Ｘ）の形成をもたらす、ＧからＡへの突然変異（標的部位でＡを生じる）を有する。これらの細胞は、加えて、安定して組み込まれたｃＤＮＡ構築物からＩｄｕａ　Ｗ３９２Ｘ　ＲＮＡを過剰発現する。簡潔に言うと、１５０，０００個の細胞を、トランスフェクションの２４時間前に播種し、製造業者の説明書にしたがって１００ｎＭ　ＡＯＮおよびＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ２０００（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）で行った（Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ２０００　１μｌ対ＥＯＮ　１μｇの比で）。ＲＮＡは、製造業者の説明書にしたがってＤｉｒｅｃｔ－ｚｏｌ　ＲＮＡ　ＭｉｎｉＰｒｅｐ（Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）キットを使用してトランスフェクション４８時間後に細胞から抽出し、ｃＤＮＡは、ランダムヘキサマーおよびオリゴｄＴプライマーの組合せと共に、製造業者の説明書にしたがってＭａｘｉｍａ逆転写酵素キット（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）を使用して調製した。ｃＤＮＡを４倍に希釈し、この希釈液１μＬを、デジタルドロップレットＰＣＲ（ｄｄＰＣＲ）に対するテンプレートとして使用したが、これを、実施例２に詳述した通り、行った。

【００６６】

図８での結果は、ＭＰを含まないＡＯＮ（ＩＤＵＡ１０３）が、バックグラウンドから明らかに分化しない、変動する編集を示すことを示すが、これは、未処置（ＮＴ）細胞またはＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ２０００（模擬）でのみ処置される細胞のいずれかを有する対照サンプルにより定義される。対照的に、ＭＰ結合修飾を有するＡＯＮは、このバックグラウンドレベルを上回って、細胞での編集を促進することができる。これは、ヌクレアーゼ分解に耐えるＡＯＮの能力、ならびに内因性編集酵素を動員する能力を表す。

本発明は、以下の態様にも関する。

（１）標的核酸分子での標的ヌクレオチド、好ましくはアデノシンの脱アミノ化に使用するために、細胞内の前記標的核酸分子と二本鎖複合体を形成することができるアンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＯＮ）であって、前記標的ヌクレオチドに直接対向するＡＯＮ

でのヌクレオチドが、オーファンヌクレオチドであり、前記ＡＯＮが、１つまたは複数のメチルホスホネート（methylphosphonate）（ＭＰ）結合を含む、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＯＮ）。
（２）前記オーファンヌクレオチドが、２’－ＯＭｅまたは２’－ＭＯＥリボース修飾を有さない、上記（１）に記載のＡＯＮ。
（３）ヌクレオチド間結合の番号付けが、結合番号０が前記オーファンヌクレオチドからの５’結合となるようにし、オリゴヌクレオチドでの結合位置が、５’末端に向かって正（＋）に増分し、３’末端に向かって負に増分し、前記ＡＯＮが、結合位置０、－１、－２、－３、－４、－５、および／または－６で１つまたは複数のＭＰ結合を含む、上記（１）または（２）に記載のＡＯＮ。
（４）結合位置－０および／または－２でＭＰ結合を含む、上記（３）に記載のＡＯＮ。
（５）前記ＭＰ結合が、ＤＮＡヌクレオシドを別のヌクレオシドと接続する、上記（１）から（４）のいずれか一項に記載のＡＯＮ。
（６）前記ＭＰ結合が、ＤＮＡヌクレオシドをＤＮＡヌクレオシドと接続する、上記（５）に記載のＡＯＮ。
（７）少なくとも１つのホスホロチオエート（phosphorothioate）もしくはホスホノアセテート（phosphonoacetate）ヌクレオチド間結合、および／またはアンロックド核酸（ＵＮＡ）リボース修飾を含む少なくとも１つのヌクレオチドをさらに含む、上記（１）から（６）のいずれか一項に記載のＡＯＮ。
（８）リボースの２’位での置換を含む１つまたは複数のヌクレオチドをさらに含み、前記置換は、－ＯＨ；－Ｆ；置換または未置換、直鎖または分岐鎖の低級（Ｃ１～Ｃ１０）アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリル、アリル、またはアラルキル、１つまたは複数のヘテロ原子により中断され得る；－Ｏ－、Ｓ－、またはＮ－アルキル；－Ｏ－、Ｓ－、またはＮ－アルケニル；－Ｏ－、Ｓ－、またはＮ－アルキニル；－Ｏ－、Ｓ－、またはＮ－アリル；－Ｏ－アルキル－Ｏ－アルキル；－メトキシ；－アミノプロポキシ；－メトキシエトキシ；－ジメチルアミノオキシエトキシ；および－ジメチルアミノエトキシエトキシからなる群から選択される、上記（１）から（７）のいずれか一項に記載のＡＯＮ。
（９）２’－ＯＭｅまたは２’－ＭＯＥリボース修飾を含む少なくとも１つのヌクレオチドを含み、前記オーファンヌクレオチドが、２’－ＯＭｅまたは２’－ＭＯＥリボース修飾を有さない、上記（１）から（８）のいずれか一項に記載のＡＯＮ。
（１０）細胞で、ヒトのＡＤＡＲ１またはＡＤＡＲ２などの、デアミナーゼ活性を有する酵素、好ましくはアデノシンデアミナーゼ活性を有する酵素を係合することが可能である、上記（１）から（９）のいずれか一項に記載のＡＯＮ。
（１１）少なくとも１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、または３２ヌクレオチド長であり、１００ヌクレオチドより短く、好ましくは６０ヌクレオチドより短い、上記（１）から（１０）のいずれか一項に記載のＡＯＮ。
（１２）上記（１）から（１１）のいずれか一項に記載のＡＯＮおよび薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物。
（１３）嚢胞性線維症、ハーラー症候群、α－１－アンチトリプシン（Ａ１ＡＴ）欠損症、パーキンソン病、アルツハイマー病、色素欠乏症、筋萎縮性側索硬化症、喘息、β－サラセミア、ＣＡＤＡＳＩＬ、シャルコー－マリー－ツース症候群、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、遠位脊髄性筋萎縮症（ＤＳＭＡ）、デュシェンヌ型／ベッカー型筋ジストロフィー、（栄養障害性）表皮水疱症、ファブリー病、第Ｖ因子ライデン関連障害、家族性腺腫性ポリポーシス、ガラクトース血症、ゴーシェ病、グルコース－６－リン酸脱水素酵素、血友病、遺伝性ヘモクロマトーシス、ハンター症候群、ハンチントン病、炎症性腸疾患（ＩＢＤ）、先天性多凝集症候群、レーバー先天性黒内障（例えば、ＬＣＡ１０）、レッシュ－ナイハン症候群、リンチ症候群、マルファン症候群、ムコ多糖症、筋ジストロフィー、Ｉ型およびＩＩ型筋強直性ジストロフィー、神経線維腫症、ニーマン－ピック病Ａ型、Ｂ型およびＣ型、ＮＹ－ｅｓｏ１関連がん、ポイツ－イェガース症候群、フェニルケト

ン尿症、ポンペ病、原発性線毛疾患、プロトロンビン突然変異関連障害（例えば、プロトロンビンＧ２０２１０Ａ突然変異）、肺高血圧症、（常染色体優性）色素性網膜炎、サンドホフ病、重症複合免疫不全症候群（ＳＣＩＤ）、鎌状赤血球貧血、脊髄性筋萎縮症、スタルガルト病、テイサックス病、アッシャー症候群（例えば、アッシャー症候群Ｉ型、ＩＩ型、およびＩＩＩ型）、Ｘ連鎖免疫不全、スタージ－ウェーバー症候群、ならびに、がんからなる群から好ましくは選択される、遺伝的障害の処置または予防での使用のための、上記（１）から（１１）のいずれか一項に記載のＡＯＮ、または上記（１２）に記載の医薬組成物。

（１４）細胞内の標的ＲＮＡ分子に存在する少なくとも１つの標的ヌクレオチド、好ましくはアデノシンの脱アミノ化のための方法であって、

（ｉ）前記細胞に、上記（１）から（１１）のいずれか一項に記載のＡＯＮまたは上記（１２）に記載の医薬組成物を供給するステップ、

（ｉｉ）前記標的ＲＮＡ分子への前記ＡＯＮのアニーリングを可能にするステップ、

（ｉｉｉ）ヌクレオチドデアミナーゼ活性を有する哺乳動物酵素が、前記標的ＲＮＡ分子中の前記標的ヌクレオチドを脱アミノ化することを可能にするステップ、および

（ｉｖ）任意で、前記標的ＲＮＡ分子中の脱アミノ化した前記ヌクレオチドの存在を同定するステップ

を含む、方法。

（１５）ステップ（ｉｖ）が、

ａ）脱アミノ化した前記標的ヌクレオチドを含む、前記標的ＲＮＡ分子の領域をシークエンシングすること、

ｂ）前記標的ヌクレオチドが、ＵＧＡまたはＵＡＧ終止コドンに位置するアデノシンであり、脱アミノ化によってＵＧＧコドンに編集される場合、機能性、伸長型、全長および／もしくは野生型タンパク質の存在を評価すること、

ｃ）２つの標的アデノシンが、ＵＡＡ終止コドンに位置し、両方の標的アデノシンの脱アミノ化によってＵＧＧコドンに編集される場合、機能性、伸長型、全長および／もしくは野生型タンパク質の存在を評価すること、

ｄ）前記標的ＲＮＡ分子が、プレｍＲＮＡである場合、前記プレｍＲＮＡのスプライシングが、脱アミノ化により改変したかどうかを評価すること、または

ｅ）機能的な読み出しを使用することであって、脱アミノ化後の前記標的ＲＮＡ分子が、機能性、全長、伸長型および／もしく野生型タンパク質をコードする、使用すること

を含む、上記（１４）に記載の方法。

（１６）標的ＲＮＡ分子に存在する少なくとも１つの標的ヌクレオチド、好ましくはアデノシンの脱アミノ化のための方法であって、

（ｉ）上記（１）から（１１）のいずれか一項に記載のＡＯＮを供給するステップ、

（ｉｉ）前記標的ＲＮＡ分子への前記ＡＯＮのアニーリングを可能にするステップ、

（ｉｉｉ）ヌクレオチドデアミナーゼ活性を有する哺乳動物酵素が、前記標的ＲＮＡ分子中の前記標的ヌクレオチドを脱アミノ化することを可能にするステップ、および

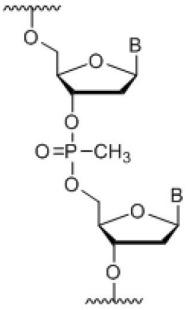
（ｉｖ）前記標的ＲＮＡ分子中の脱アミノ化した前記ヌクレオチドの存在を同定するステップ

を含む、方法。

【図面】

【図１】

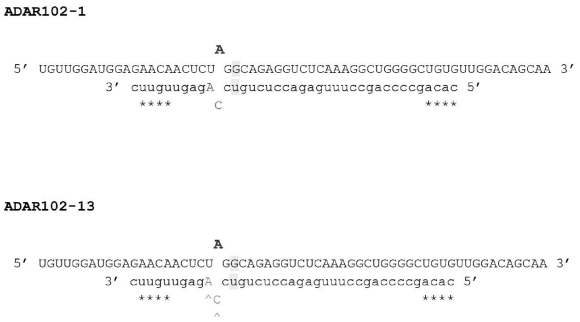
図 1



メチルホスホネート（methylphosphonate）DNA

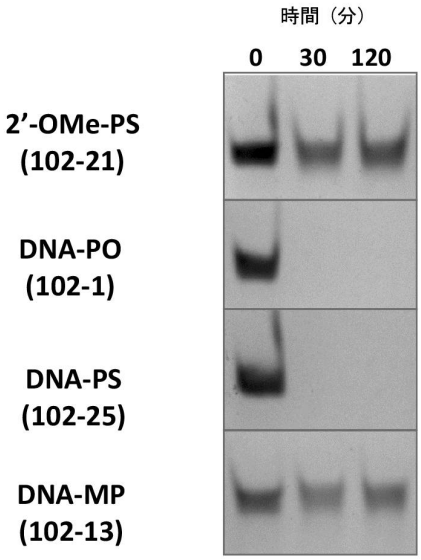
【図２】

図 2



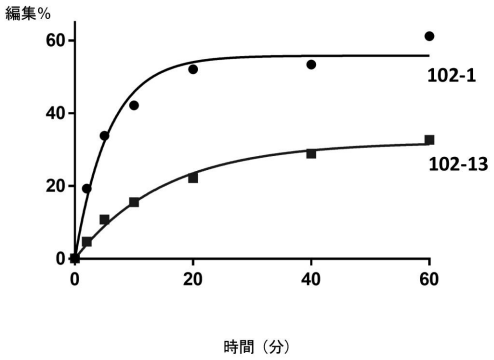
【図３】

図 3



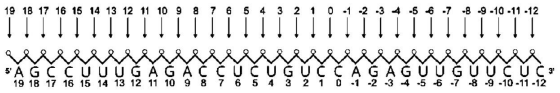
【図４】

図 4



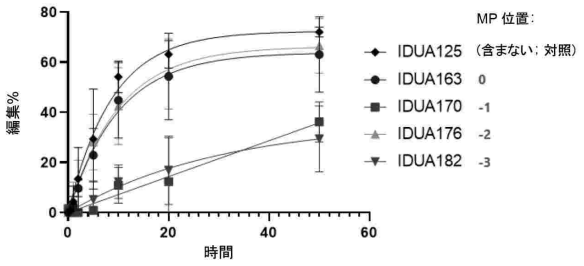
【図５】

図 5



【図６】

図 6



EER DNA IDUA125 g*c*c*c*c*a*g*c*c*u*uugagaccucugucCAGaguu*g*u*u*c*u
IDUA163 g*c*c*c*c*a*g*c*c*u*uugagaccucuguC^CAGaguu*g*u*u*c*u
IDUA170 g*c*c*c*c*a*g*c*c*u*uugagaccucugucC^AGaguu*g*u*u*c*u
IDUA176 g*c*c*c*c*a*g*c*c*u*uugagaccucugucCA^Gaguu*g*u*u*c*u
IDUA182 g*c*c*c*c*a*g*c*c*u*uugagaccucugucCAG^aguu*g*u*u*c*u

キー:

糖修飾:

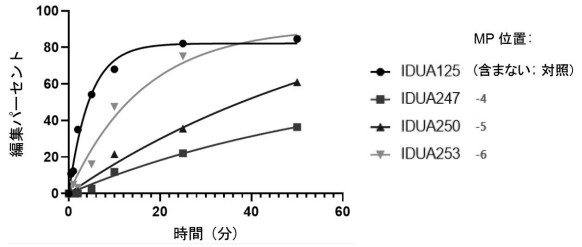
N	DNA
n	2'-OMe
<N>	2'-MOE
Cf	2'-F

結合修飾:

*	PS
N^	Me-ホスホネート(phosphonate)

【図７】

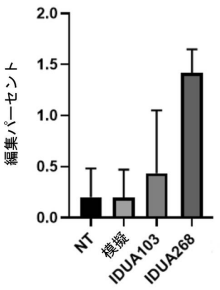
図 7



IDUA247 g*c*c*c*c*a*g*c*c*u*uugagaccucugucCAGA^guu*g*u*u*c*u
IDUA250 g*c*c*c*c*a*g*c*c*u*uugagaccucugucCAGAG^uu*g*u*u*c*u
IDUA253 g*c*c*c*c*a*g*c*c*u*uugagaccucugucCAGagT^u*g*u*u*c*u

【図８】

図 8



IDUA103 g*c*c*c*<CAGCCTTT*>g*a*g*a*c*c*u*c*u*g*u*cCAGagu<T>*g*u*u*c*u
IDUA268 g*c*c*c*<CAGCCTTT*>g*a*g*a*c*c*u*c*u*g*u*<C>CA^GA^g<T>u*g*u*u*c*u

【配列表】
0007698881000001.app

フロントページの続き

オランダ国 シーケイ ライデン ２３３３，ゼルニケドレーフ ９，プロキューアール セラピューティクス ツー ベスローテン フェンノートシャップ
(72)発明者 ヴァン シン フィエト，レンカ
オランダ国 シーケイ ライデン ２３３３，ゼルニケドレーフ ９，プロキューアール セラピューティクス ツー ベスローテン フェンノートシャップ
(72)発明者 アールト，アンティ
オランダ国 シーケイ ライデン ２３３３，ゼルニケドレーフ ９，プロキューアール セラピューティクス ツー ベスローテン フェンノートシャップ
(72)発明者 ケメル，チェリー ペイジ
オランダ国 シーケイ ライデン ２３３３，ゼルニケドレーフ ９，プロキューアール セラピューティクス ツー ベスローテン フェンノートシャップ
(72)発明者 ホーゲブーム，テス
オランダ国 シーケイ ライデン ２３３３，ゼルニケドレーフ ９，プロキューアール セラピューティクス ツー ベスローテン フェンノートシャップ
(72)発明者 ヴァン ワイセン，リザンヌ アリエダ
オランダ国 シーケイ ライデン ２３３３ ゼルニケドレーフ ９，プロキューアール セラピューティクス ツー ベスローテン フェンノートシャップ
審査官 井関 めぐみ

(56)参考文献
国際公開第２０１７／２２０７５１（WO，Ａ１）
国際公開第２０１６／０９７２１２（WO，Ａ１）
Paul J. FURDON et al.，“ RNase H cleavage of RNA hybridized to oligonucleotides containing methylphosphonate, phosphorothioate and phosphodiester bonds ”，Nucleic Acids Research，1989年，Vol. 17, No. 22，p.9193-9204，DOI: 10.1093/nar/17.22.9193

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １５／１１３
Ｃ１２Ｎ １５／１２
Ｃ１２Ｑ １／６８６９
Ａ６１Ｋ ３１／７１２５
Ａ６１Ｐ ４３／００
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）