

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-508685

(P2020-508685A)

(43) 公表日 令和2年3月26日(2020.3.26)

(51) Int.Cl.

C 12 N 15/113 (2010.01)
C 12 N 15/864 (2006.01)
C 07 K 19/00 (2006.01)
C 12 N 15/52 (2006.01)
C 07 K 14/56 (2006.01)

F 1

C 12 N 15/113
C 12 N 15/864
C 07 K 19/00
C 12 N 15/52
C 07 K 14/56

テーマコード(参考)

4 C 08 4
4 H 04 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 89 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-547704 (P2019-547704)
(86) (22) 出願日 平成30年3月2日 (2018.3.2)
(85) 翻訳文提出日 令和1年10月30日 (2019.10.30)
(86) 國際出願番号 PCT/US2018/020762
(87) 國際公開番号 WO2018/161032
(87) 國際公開日 平成30年9月7日 (2018.9.7)
(31) 優先権主張番号 62/466,961
(32) 優先日 平成29年3月3日 (2017.3.3)
(33) 優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31) 優先権主張番号 62/551,732
(32) 優先日 平成29年8月29日 (2017.8.29)
(33) 優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(71) 出願人 506115514
ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94607-5200, オークランド、フランクリン ストリート 1111, 5番 フロア
(74) 代理人 110002572
特許業務法人平木国際特許事務所
(72) 発明者 マリ, プラシャント
アメリカ合衆国 92093 カリフォルニア州, ラホヤ, メール コード: 9010, ギルマン ドライブ 9500, エーシー サンディエゴ

最終頁に続く

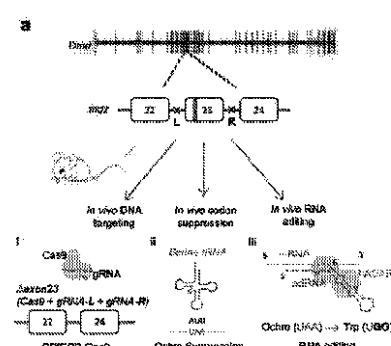
(54) 【発明の名称】サプレッサー tRNA 及びデアミナーゼによる変異の RNA ターゲティング

(57) 【要約】

本開示の態様は、改変型tRNAを使用する終止コドン中の変異によって引き起こされる疾患、障害又は状態のための遺伝子治療アプローチに関する。筋ジストロフィー(例えはデュシェンヌ型筋ジストロフィー)、一部のがん、ベータサラセミア、ハーラー症候群及び囊胞性線維症など、すべての遺伝性疾患の少なくとも10~15%がこのカテゴリーに分類される。理論に拘束されるものではないが、オフターゲット効果が最小限であり、ゲノムレベルの変化がないため、このアプローチはCRISPRアプローチより安全であると考えられる。

【選択図】図 17

FIGURE 17



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

その必要がある対象においてタンパク質をコードするRNA配列中に点突然変異を含むタンパク質の発現を回復する方法であって、点突然変異を含むコドンを認識するアンチコドン配列を有する1つ以上のtRNAをコードするベクターを対象に投与することを含み、任意的には点突然変異が未成熟終止コドンを生じる、上記方法。

【請求項 2】

点突然変異が、DNA配列TAA及びRNA配列UAAを有するナンセンス変異を生じる、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

tRNAが、点突然変異を含むコドンを認識する改変型アンチコドンシステムを有する内因性tRNAである、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項 4】

tRNAにセリンが装填される、請求項3に記載の方法。

【請求項 5】

tRNAが、非標準アミノ酸が装填された直交tRNA (orthogonal tRNA) である、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項 6】

ベクターが、対応するtRNAシンテターゼをさらに含む、請求項5に記載の方法。

【請求項 7】

非標準アミノ酸がピロリシンである、請求項5又は6に記載の方法。

【請求項 8】

対象の食餌にピロリシンを導入することをさらに含む、請求項7に記載の方法。

【請求項 9】

ベクターが、点突然変異を含むコドンを認識するアンチコドン配列を有する2つのtRNAをコードする、請求項1~8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 10】

遺伝子がジストロフィンである、請求項1~9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 11】

その必要がある対象において疾患、障害又は状態と関連する遺伝子をコードするRNA配列中の点突然変異の存在を特徴とする疾患、障害又は状態を処置する方法であって、点突然変異を含むコドンを認識するアンチコドン配列を有する1つ以上のtRNAをコードするベクターを対象に投与することを含み、任意的には点突然変異が未成熟終止コドンを生じる、上記方法。

【請求項 12】

点突然変異が、DNA配列TAA及びRNA配列UAAを有するナンセンス変異を生じる、請求項11に記載の方法。

【請求項 13】

tRNAが、点突然変異を含むコドンを認識する改変型アンチコドンシステムを有する内因性tRNAである、請求項11又は12に記載の方法。

【請求項 14】

tRNAにセリンが装填される、請求項13に記載の方法。

【請求項 15】

tRNAが、非標準アミノ酸が装填された直交tRNAである、請求項11又は12に記載の方法。

【請求項 16】

ベクターが、対応するシンテターゼをさらに含む、請求項15に記載の方法。

【請求項 17】

非標準アミノ酸がピロリシンである、請求項15又は16に記載の方法。

【請求項 18】

対象の食餌にピロリシンを導入することをさらに含む、請求項17に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 19】

ベクターが、点突然変異を含むコドンを認識するアンチコドン配列を有する2つのtRNAをコードする、請求項11～18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 20】

疾患、障害又は状態が、表1に列挙される疾患、障害及び状態、任意的にナンセンス変異及び／又は未成熟終止コドンの存在によって特徴づけられる疾患、障害及び状態、からなる群より選択される、請求項11～19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 21】

遺伝子がジストロフィンである、請求項11～20のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 22】

疾患、障害又は状態が筋ジストロフィーである、請求項21に記載の方法。

【請求項 23】

筋ジストロフィーがデュシェンヌ型筋ジストロフィーである、請求項22に記載の方法。

【請求項 24】

遺伝子をコードするRNA配列中に点突然変異を含むコドンを認識するアンチコドン配列を有する1つ以上のtRNAをコードするベクターであって、任意的に、点突然変異が未成熟終止コドンを生じる、上記ベクター。

【請求項 25】

点突然変異が、DNA配列TAA及びRNA配列UAAを有するナンセンス変異を生じる、請求項24に記載のベクター。

【請求項 26】

tRNAが、点突然変異を含むコドンを認識する改変型アンチコドンシステムを有する内因性tRNAである、請求項24又は25に記載のベクター。

【請求項 27】

tRNAにセリンが装填される、請求項26に記載のベクター。

【請求項 28】

tRNAが、非標準アミノ酸が装填された直交tRNAである、請求項24又は25に記載のベクター。

【請求項 29】

ベクターが、対応するtRNAシンテターゼをさらに含む、請求項28に記載のベクター。

【請求項 30】

非標準アミノ酸がピロリシンである、請求項28又は29に記載のベクター。

【請求項 31】

ベクターがAAVベクターである、請求項24～30のいずれか1項に記載のベクター。

【請求項 32】

ベクターがAAV8ベクターである、請求項31に記載のベクター。

【請求項 33】

ベクターが、点突然変異を含むコドンを認識するアンチコドン配列を有する2つのtRNAをコードする、請求項24～32のいずれか1項に記載のベクター。

【請求項 34】

遺伝子がジストロフィンである、請求項24～33のいずれか1項に記載のベクター。

【請求項 35】

その必要がある対象においてタンパク質をコードするRNA配列中に点突然変異を含むタンパク質の発現を回復する方法であって、ADARのための1以上のフォワードガイドRNA（「adRNA」）及びADARのための1以上の対応するリバースガイドRNA（「radRNA」）を含むADARに基づくRNA編集系をコードする1つ以上のベクターを対象に投与することを含み、ADARに基づくRNA編集系は点突然変異を特異的に編集する、上記方法。

【請求項 36】

点突然変異が、DNA配列TAA及びRNA配列UAAを有するナンセンス変異を生じる、請求項35に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 3 7】

ADARに基づくRNA編集系が、UAAをUIAに変換する、請求項36に記載の方法。

【請求項 3 8】

ADARに基づくRNA編集系が、UIAをUIIに変換する、請求項37に記載の方法。

【請求項 3 9】

ADARに基づくRNA編集系が、UAAをUAIに変換する、請求項36に記載の方法。

【請求項 4 0】

1つ以上のベクターが、アンバーコドンを標的とするtRNAをさらにコードする、請求項39に記載の方法。

【請求項 4 1】

10 タンパク質がジストロフィンである、請求項35～40のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 4 2】

点突然変異が、DNA配列CAG及びRNA配列CAGを有するミスセンス変異又はスプライス部位を生じる、請求項35に記載の方法。

【請求項 4 3】

ADARに基づくRNA編集系が、CAGをCIGに変換する、請求項42に記載の方法。

【請求項 4 4】

タンパク質がオルニチントランスカルバミラーゼである、請求項35、42又は43のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 4 5】

ADARに基づく編集系が、ADAR1、ADAR2、E488Q及びE100Q変異体各々、ADARの触媒ドメイン及びRNAヘアピンモチーフと会合するドメインを含む融合タンパク質、ADARの触媒ドメイン及びデッド型Cas9を含む融合タンパク質、又はADARの二本鎖結合ドメイン及びAPOBECを含む融合タンパク質をさらに含む、請求項35～44のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 4 6】

RNAヘアピンモチーフと会合するドメインが、MS2バクテリオファージコートタンパク質(MCP)及びN22ペプチドの群から選択される、請求項45に記載の方法。

【請求項 4 7】

内因性ADAR1発現を増強するための有効量のインターフェロンを投与することをさらに含む、請求項35～46のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 4 8】

インターフェロンがインターフェロンである、請求項47に記載の方法。

【請求項 4 9】

adRNAが、1つ以上のRNAヘアピンモチーフを含む、請求項35～48のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 5 0】

1つ以上のRNAヘアピンモチーフが、MS2ステムループ及びBoxBループの群から選択される、請求項49に記載の方法。

【請求項 5 1】

1つ以上のRNAヘアピンモチーフが、A-UをG-Cに置換することによって安定化される、請求項49に記載の方法。

【請求項 5 2】

adRNAが、adRNAの一方又は両方の末端に、2'-O-メチル、2'-O-メチル3'ホスホロチオエート、又は2'-O-メチル3'チオPACEのうちの1つ以上を組み込むことによって安定化される、請求項35～51のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 5 3】

その必要がある対象において疾患、障害又は状態と関連するタンパク質をコードするRNA配列中の点突然変異の存在による疾患、障害又は状態を処置する方法であって、ADARのための1以上のフォワードガイドRNA(「adRNA」)及びADARのための1以上の対応するリバースガイドRNA(「radRNA」)を含むADARに基づくRNA編集系をコードする1つ以上のベク

10

20

30

40

50

ターを対象に投与することを含み、ADARに基づくRNA編集系が点突然変異を特異的に編集する、上記方法。

【請求項 5 4】

点突然変異が、DNA配列TAA及びRNA配列UAAを有するナンセンス変異を生じる、請求項53に記載の方法。

【請求項 5 5】

ADARに基づくRNA編集系が、UAAをUIAに変換する、請求項54に記載の方法。

【請求項 5 6】

ADARに基づくRNA編集系が、UIAをUIIに変換する、請求項53に記載の方法。

【請求項 5 7】

ADARに基づくRNA編集系が、UAAをUAIに変換する、請求項54に記載の方法。

【請求項 5 8】

1つ以上のベクターが、アンバーコドンを標的とするtRNAをさらにコードする、請求項57に記載の方法。

【請求項 5 9】

タンパク質がジストロフィンである、請求項53～58のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 6 0】

点突然変異が、DNA配列CAG及びRNA配列CAGを有するミスセンス変異又はスプライス部位を生じる、請求項53に記載の方法。

【請求項 6 1】

ADARに基づくRNA編集系が、CAGをCIGに変換する、請求項60に記載の方法。

【請求項 6 2】

タンパク質がオルニチントランスカルバミラーゼである、請求項53、60又は61のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 6 3】

ADARに基づく編集系が、ADAR1、ADAR2、E488Q及びE100Q変異体各々、ADARの触媒ドメイン及びRNAヘアピンモチーフと会合するドメインを含む融合タンパク質、ADARの触媒ドメイン及びデッド型Cas9を含む融合タンパク質、又はADARの二本鎖結合ドメイン及びAPOBECを含む融合タンパク質をさらに含む、請求項53～62のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 6 4】

RNAヘアピンモチーフと会合するドメインが、MS2バクテリオファージコートタンパク質(MCP)及びN22ペプチドの群から選択される、請求項63に記載の方法。

【請求項 6 5】

内因性ADAR1発現を増強するための有効量のインターフェロンを投与することをさらに含む、請求項53～64のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 6 6】

インターフェロンがインターフェロンである、請求項65に記載の方法。

【請求項 6 7】

adRNAが、1つ以上のRNAヘアピンモチーフを含む、請求項53～66のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 6 8】

1つ以上のRNAヘアピンモチーフが、MS2ステムループ及びBoxBループの群から選択される、請求項67に記載の方法。

【請求項 6 9】

1つ以上のRNAヘアピンモチーフが、A-UをG-Cに置換することによって安定化される、請求項68に記載の方法。

【請求項 7 0】

adRNAが、adRNAの一方又は両方の末端に、2'-O-メチル、2'-O-メチル3'-ホスホチオエート、又は2'-O-メチル3'-チオPACEのうちの1つ以上を組み込むことによって安定化される、請求項50～69のいずれか1項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 7 1】

疾患、障害又は状態が、表1に列挙される疾患、障害及び状態からなる群より選択される、請求項53～70のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 7 2】

タンパク質がジストロフィンであり、疾患、障害又は状態が筋ジストロフィーである、請求項71に記載の方法。

【請求項 7 3】

筋ジストロフィーがデュシェンヌ型筋ジストロフィーである、請求項72に記載の方法。

【請求項 7 4】

対象に対するADARのための1以上のフォワードガイドRNA（「adRNA」）及びADARのための1以上の対応するリバースガイドRNA（「radRNA」）を含むADARに基づくRNA編集系をコードする1つ以上のベクターを含む組換え発現系であって、ADARに基づくRNA編集系が、タンパク質をコードするRNA配列中の点突然変異を特異的に編集する、上記組換え発現系。
10

【請求項 7 5】

点突然変異が、DNA配列TAA及びRNA配列UAAを有するナンセンス変異を生じる、請求項74に記載の組換え発現系。

【請求項 7 6】

ADARに基づくRNA編集系が、UAAをUIAに変換する、請求項75に記載の組換え発現系。

【請求項 7 7】

ADAR2に基づくRNA編集系が、UIAをUIIに変換する、請求項76に記載の組換え発現系。
20

【請求項 7 8】

ADAR2に基づくRNA編集系が、UAAをUAIに変換する、請求項75に記載の組換え発現系。

【請求項 7 9】

1つ以上のベクターが、アンバーコドンを標的とするtRNAをさらにコードする、請求項78に記載の組換え発現系。

【請求項 8 0】

タンパク質がジストロフィンである、請求項74～79のいずれか1項に記載の組換え発現系。

【請求項 8 1】

点突然変異が、DNA配列CAG及びRNA配列CAGを有するミスセンス変異又はスプライス部位を生じる、請求項74に記載の組換え発現系。
30

【請求項 8 2】

ADARに基づくRNA編集系が、CAGをCIGに変換する、請求項81に記載の組換え発現系。

【請求項 8 3】

タンパク質がオルニチントランスクカルバミラーゼである、請求項74、81又は82のいずれか1項に記載の組換え発現系。

【請求項 8 4】

ADARに基づく編集系が、ADAR1、ADAR2、E488Q及びE100Q変異体各々、ADARの触媒ドメイン及びRNAヘアピンモチーフと会合するドメインを含む融合タンパク質、ADARの触媒ドメイン及びデッド型Cas9を含む融合タンパク質、又はADARの二本鎖結合ドメイン及びAPOBECを含む融合タンパク質をさらに含む、請求項74～83のいずれか1項に記載の組換え発現系。
40

【請求項 8 5】

RNAヘアピンモチーフと会合するドメインが、MS2バクテリオファージコートタンパク質(MCP)及びN22ペプチドの群から選択される、請求項84に記載の組換え発現系。

【請求項 8 6】

adRNAが、1つ以上のRNAヘアピンモチーフを含む、請求項74～85のいずれか1項に記載の組換え発現系。

【請求項 8 7】

1つ以上のRNAヘアピンモチーフが、MS2ステムループ及びBoxBループの群から選択され
50

る、請求項86に記載の組換え発現系。

【請求項 88】

1つ以上のRNAへアピソモチーフが、A-UをG-Cに置換することによって安定化される、請求項86に記載の組換え発現系。

【請求項 89】

adRNAが、adRNAの一方又は両方の末端に、2'-O-メチル、2'-O-メチル3'-ホスホロチオエート、又は2'-O-メチル3'-チオPACEのうちの1つ以上を組み込むことによって安定化される、請求項74～88のいずれか1項に記載の組換え発現系。

【請求項 90】

タンパク質がジストロフィン又はオルニチントランスカルバミラーゼである、請求項74～89のいずれか1項に記載の組換え発現系。 10

【請求項 91】

請求項74～90のいずれか1項に記載の組換え発現系、及び内因性ADAR1発現を増強するための有効量のインターフェロンを含む組成物。

【請求項 92】

インターフェロンがインターフェロンである、請求項91に記載の組成物。

【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、35 U.S.C. 119(e)のもとで、その全体が本明細書に参照により組み込まれる、2017年3月3日出願の米国第62/466,961号、及び2017年8月29日出願の米国第62/551,732号に対する優先権を主張する。 20

【0002】

政府支援に関する声明

本発明は、国立衛生研究所(National Institutes of Health)により授与された助成金番号R01HG009285の下での政府支援によりなされた。政府は本発明に一定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

本開示の態様は、改変型tRNAを使用する終止コドン中の変異によって引き起こされる疾患、障害又は状態のための遺伝子治療アプローチに関する。筋ジストロフィー(例えばデュシェンヌ型筋ジストロフィー)、一部のがん、ベータサラセミア、ハーラー症候群及び囊胞性線維症など、すべての遺伝性疾患の少なくとも10～15%がこのカテゴリーに分類される。理論に拘束されるものではないが、オフターゲット効果が最小限であり、ゲノムレベルの変化がないため、このアプローチはCRISPR又はTALENアプローチより安全であると考えられる。

【発明の概要】

【0004】

本開示の態様は、その必要がある対象においてタンパク質をコードするRNA配列中に点突然変異を含むタンパク質の発現を回復する方法であって、対象に対して点突然変異を含むコドンを認識するアンチコドン配列を有する1つ以上のtRNAをコードするベクターを対象に投与することを含む、又は代替的にはそれから本質的になる、又はさらにはそれからなる方法に関し、任意的に、点突然変異が未成熟終止コドンを生じ、任意的に、点突然変異が未成熟終止コドンを生じる。いくつかの実施形態において、点突然変異は、DNA配列TAA及びRNA配列UAAを有するナンセンス変異を生じる。いくつかの実施形態において、tRNAは、点突然変異を含むコドンを認識する改変型アンチコドンシステムを有する内因性tRNAである。さらなる実施形態において、tRNAにセリンが装填される。いくつかの実施形態において、tRNAは、非標準アミノ酸が装填された直交tRNA(orthogonal tRNA)である。さらなる実施形態において、ベクターは、対応するtRNAシンテーゼをさらに含む。いくつか 40

50

の実施形態において、対応するシンテターゼは、大腸菌グルタミニル - tRNAシンテターゼである。直交tRNAを含むいくつかの実施形態において、非標準アミノ酸はピロリシンである。さらなる実施形態では、ピロリシンは、対象の食事に導入することによって対象に投与される。いくつかの実施形態において、ベクターは、点突然変異を含むコドンを認識するアンチコドン配列を有する2つのtRNAをコードする。いくつかの実施形態において、タンパク質はジストロフィンである。さらなる態様において、対象はヒトであり、任意的に小児患者である。

【0005】

さらなる方法の態様は、その必要がある対象において疾患、障害又は状態と関連するタンパク質をコードするRNA配列中の点突然変異の存在を特徴とする疾患、障害又は状態の処置に関するものであり、この方法は、対象に対して点突然変異を含むコドンを認識するアンチコドン配列を有する1つ以上のtRNAをコードするベクターを対象に投与することを含む、又は代替的にはそれから本質的になる、又はさらにはそれからなる方法であって、任意的に、点突然変異が未成熟終止コドンを生じる。いくつかの実施形態において、点突然変異は、DNA配列TAA及びRNA配列UAAを有するナンセンス変異を生じる。いくつかの実施形態において、tRNAは、点突然変異を含むコドンを認識する改変型アンチコドンシステムを有する内因性tRNAである。さらなる実施形態において、tRNAにセリンが装填される。いくつかの実施形態において、tRNAは、非標準アミノ酸が装填された直交tRNAである。さらなる実施形態において、ベクターは、対応するtRNAシンテターゼをさらに含む。いくつかの実施形態において、対応するシンテターゼは、大腸菌グルタミニル - tRNAシンテターゼである。直交tRNAを含むいくつかの実施形態において、非標準アミノ酸はピロリシンである。さらなる実施形態では、ピロリシンは、対象の食事中に導入される。いくつかの実施形態において、ベクターは、点突然変異を含むコドンを認識するアンチコドン配列を有する2つのtRNAをコードする。いくつかの実施形態において、疾患、障害又は状態は、任意的にナンセンス変異及び／又は未成熟終止コドンの存在によって特徴づけられる、表1に列挙される疾患、障害及び状態からなる群より選択される。いくつかの実施形態において、タンパク質はジストロフィンである。さらなる実施形態において、疾患、障害又は状態は、筋ジストロフィーである。さらに別の実施形態では、疾患、障害又は状態は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーである。いくつかの実施形態において、対象はヒトであり、任意的に小児患者である。

【0006】

本明細書に開示されているさらに別の態様は、タンパク質をコードするRNA配列中に点突然変異を含むコドンを認識するアンチコドン配列を有する1つ以上のtRNAをコードするベクターに関するものであり、任意的に、点突然変異が未成熟終止コドンを生じる。いくつかの実施形態において、点突然変異は、DNA配列TAA及びRNA配列UAAを有するナンセンス変異を生じる。いくつかの実施形態において、tRNAは、点突然変異を含むコドンを認識する改変型アンチコドンシステムを有する内因性tRNAである。さらなる実施形態において、tRNAにセリンが装填される。いくつかの実施形態において、tRNAは、非標準アミノ酸が装填された直交tRNAである。さらなる実施形態において、ベクターは、対応するtRNAシンテターゼをさらに含む。いくつかの実施形態において、対応するシンテターゼは、大腸菌グルタミニル - tRNAシンテターゼである。直交tRNAを含むいくつかの実施形態において、非標準アミノ酸はピロリシンである。いくつかの実施形態において、ベクターは、点突然変異を含むコドンを認識するアンチコドン配列を有する2つのtRNAをコードする。いくつかの実施形態において、ベクターはAAVベクターであり、任意的にAAV8ベクターである。いくつかの実施形態において、タンパク質はジストロフィンである。さらなる態様において、対象はヒトであり、任意的に小児患者である。

【0007】

別の態様において、本開示は、ADARのための1以上のフォワードガイドRNA（「adRNA」）及びADARのための1以上の対応するリバースガイドRNA（「radRNA」）を含むADARに基づくRNA編集系をコードする1つ以上のベクターを対象に投与することを含む、その必要があ

10

20

30

40

50

る対象においてタンパク質をコードするRNA配列中に点突然変異を含むタンパク質の発現を回復する方法に関するものであり、ADARに基づくRNA編集系は点突然変異を特異的に編集する。いくつかの実施形態において、点突然変異は、DNA配列TAA及びRNA配列UAAを有するナンセンス変異を生じる。いくつかの実施形態において、ADARに基づくRNA編集系は、U AAをUIAに変換し、任意的に、さらにUIAをUIIに変換する。いくつかの実施形態において、ADARに基づくRNA編集系は、UAAをUAIに変換する。いくつかの実施形態において、任意的にナンセンス又はミスセンス変異を含むもの、mRNA中で標的化されたRNAである。さらなる実施形態において、1つ以上のベクターは、アンバーコドンを標的とするtRNAをさらにコードする。いくつかの実施形態において、タンパク質はジストロフィンである。いくつかの実施形態において、点突然変異は、DNA配列CAG及びRNA配列CAGを有するミスセンス変異又はスプライス部位を生じる。いくつかの実施形態において、ADARに基づくRNA編集系は、CAGをCIGに変換する。いくつかの実施形態において、任意的にスプライス部位変異を含むもの、標的とされるRNAは、mRNA前駆体（pre-mRNA）である。いくつかの実施形態において、タンパク質はオルニチントランスクカルバミラーゼ（transcabamylase）である。いくつかの実施形態において、ADARに基づく編集系は、ADAR1、ADAR2、E488Q及びE100Q変異体各々、ADARの触媒ドメイン及びRNAヘアピンモチーフと会合するドメインを含む融合タンパク質、ADARの触媒ドメイン及びデッド型Cas9（dead Cas9）を含む融合タンパク質、又はADARの二本鎖結合ドメイン及びAPOBECを含む融合タンパク質をさらに含む。さらなる実施形態において、RNAヘアピンモチーフと会合するドメインは、MS2バクテリオファージコートタンパク質（MCP）及びN22ペプチドの群から選択される。いくつかの実施形態において、本方法は、内因性ADAR1発現を増強するための有効量のインターフェロンを投与することをさらに含む。さらに別の実施形態では、インターフェロンはインターフェロンである。いくつかの実施形態において、adRNAは、1つ以上のRNAヘアピンモチーフを含む。いくつかの実施形態において、1つ以上のRNAヘアピンモチーフは、MS2ステムループ及びBoxBループの群から選択され、及び／又はA-UをG-Cに置換することによって安定化される。いくつかの実施形態では、adRNAは、adRNAの一方又は両方の末端に、2'-O-メチル、2'-O-メチル3' ホスホロチオエート、又は2'-O-メチル3' チオPACEのうちの1つ以上を組み込むことによって安定化される。さらなる態様において、対象はヒトであり、任意的に小児患者である。

【0008】

さらなる方法の態様は、その必要がある対象において疾患、障害又は状態に関連するタンパク質をコードするRNA配列中の点突然変異の存在を特徴とする疾患、障害又は状態を処置する方法であって、対象に対してADARのための1つ以上のフォワードガイドRNA（「ad RNA」）及びADARのための1つ以上の対応するリバースガイドRNA（「radRNA」）を含むADARに基づくRNA編集系をコードする1つ以上のベクターを対象に投与することを含む、又は代替的にはそれから本質的になる、又はさらにはそれからなる方法に関し、ADARに基づくRNA編集系が点突然変異を特異的に編集する。いくつかの実施形態において、点突然変異は、DNA配列TAA及びRNA配列UAAを有するナンセンス変異を生じる。いくつかの実施形態において、ADARに基づくRNA編集系は、UAAをUIAに変換し、任意的に、さらにUIAをUIIに変換する。いくつかの実施形態において、任意的にナンセンス又はミスセンス変異を含むもの、mRNA中で標的化されたRNAである。さらなる実施形態において、1つ以上のベクターは、アンバーコドンを標的とするtRNAをさらにコードする。いくつかの実施形態において、タンパク質はジストロフィンである。いくつかの実施形態において、点突然変異は、DNA配列CAG及びRNA配列CAGを有するミスセンス変異又はスプライス部位を生じる。いくつかの実施形態において、ADARに基づくRNA編集系は、CAGをCIGに変換する。いくつかの実施形態において、任意的にスプライス部位変異を含むもの、標的とされるRNAは、mRNA前駆体（pre-mRNA）である。いくつかの実施形態において、タンパク質はオルニチントランスクカルバミラーゼである。いくつかの実施形態において、ADARに基づく編集系は、ADAR1、ADAR2、E488Q及びE100Q変異体各々、ADARの触媒ドメイン及びRNAヘアピンモチーフと会合するドメ

10

20

30

40

50

インを含む融合タンパク質、ADARの触媒ドメイン及びデッド型Cas9を含む融合タンパク質、又はADARの二本鎖結合ドメイン及びAPOBECを含む融合タンパク質をさらに含む。さらなる実施形態において、RNAヘアピングモチーフと会合するドメインは、MS2バクテリオファージコートタンパク質(MCP)及びN22ペプチドの群から選択される。いくつかの実施形態において、本方法は、内因性ADAR1発現を増強するための有効量のインターフェロンを投与することをさらに含む。さらに別の実施形態では、インターフェロンはインターフェロンである。いくつかの実施形態において、adRNAは、1つ以上のRNAヘアピングモチーフを含む。いくつかの実施形態において、1つ以上のRNAヘアピングモチーフは、MS2ステムループ及びBoxBループの群から選択され、及び/又はA-UをG-Cに置換することによって安定化される。いくつかの実施形態では、adRNAは、adRNAの一方又は両方の末端に、2'-0-メチル、2'-0-メチル3'ホスホロチオエート、又は2'-0-メチル3'チオPACEのうちの1つ以上を組み込むことによって安定化される。いくつかの実施形態において、疾患、障害又は状態は、表1に列挙される疾患、障害及び状態からなる群より選択される。さらなる実施形態では、タンパク質はジストロフィンであり、疾患、障害又は状態は筋ジストロフィーである。さらに別の実施形態では、疾患、障害又は状態は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーである。いくつかの実施形態において、対象はヒトであり、任意的に小児患者である。

【0009】

さらなる態様は、対象に対してADARのための1以上のフォワードガイドRNA(「adRNA」)及びADARのための1以上の対応するリバースガイドRNA(「radRNA」)を含むADARに基づくRNA編集系をコードする1つ以上のベクターを含む組換え発現系に関し、ADARに基づくRNA編集系は、タンパク質をコードするRNA配列中の点突然変異を特異的に編集するものである。いくつかの実施形態において、点突然変異は、DNA配列TAA及びRNA配列UAAを有するナンセンス変異を生じる。いくつかの実施形態において、ADARに基づくRNA編集系は、UAAをUIAに変換し、任意的に、さらにUIAをUIIに変換する。いくつかの実施形態において、ADARに基づくRNA編集系は、UAAをUAIに変換する。いくつかの実施形態において、任意的にナンセンス又はミスセンス変異を含むもの、mRNA中で標的化されたRNAである。さらなる実施形態において、1つ以上のベクターは、アンバーコドンを標的とするtRNAをさらにコードする。いくつかの実施形態において、タンパク質はジストロフィンである。いくつかの実施形態において、点突然変異は、DNA配列CAG及びRNA配列CAGを有するミスセンス変異又はスプライス部位を生じる。いくつかの実施形態において、ADARに基づくRNA編集系は、CAGをCIGに変換する。いくつかの実施形態において、任意的にスプライス部位変異を含むもの、標的とされるRNAは、mRNA前駆体(pre-mRNA)である。いくつかの実施形態において、タンパク質はオルニチントランスカルバミラーゼである。いくつかの実施形態において、ADARに基づく編集系は、ADAR1、ADAR2、E488Q及びE100Q変異体各々、ADARの触媒ドメイン及びRNAヘアピングモチーフと会合するドメインを含む融合タンパク質、ADARの触媒ドメイン及びデッド型Cas9を含む融合タンパク質、又はADARの二本鎖結合ドメイン及びAPOBECを含む融合タンパク質をさらに含む。さらなる実施形態において、RNAヘアピングモチーフと会合するドメインは、MS2バクテリオファージコートタンパク質(MCP)及びN22ペプチドの群から選択される。いくつかの実施形態において、adRNAは、1つ以上のRNAヘアピングモチーフを含む。いくつかの実施形態において、1つ以上のRNAヘアピングモチーフは、MS2ステムループ及びBoxBループの群から選択され、及び/又はA-UをG-Cに置換することによって安定化される。いくつかの実施形態では、adRNAは、adRNAの一方又は両方の末端に、2'-0-メチル、2'-0-メチル3'ホスホロチオエート、又は2'-0-メチル3'チオPACEのうちの1つ以上を組み込むことによって安定化される。さらなる態様において、対象はヒトであり、任意的に小児患者である。

【0010】

さらに別の態様は、本明細書に開示されるベクターのいずれか1つ以上、及び任意的に1つ以上の担体、例えば薬学的に許容可能な担体を含む組成物に関する。いくつかの実施形態において、組成物は、内因性ADAR1発現を増強するための有効量のインターフェロンを

10

20

30

40

50

さらに含む。さらに別の実施形態では、インターフェロンはインターフェロンである。

【0011】

本明細書中に開示されたいくつかの態様は、その必要がある対象においてタンパク質の発現を回復する方法であって、対象に対して該タンパク質をコードするRNA配列中の変異を認識するアンチコドン配列を有するtRNA、又は該tRNAの1つ以上をコードするベクターを対象に投与することを含む、又は代替的にそれから本質的になる、又はさらにそれからなる方法に関する。いくつかの実施形態において、変異はナンセンス変異であり、任意的に未成熟終止コドンである。いくつかの実施形態において、ナンセンス変異は、DNAにおけるTAA及びRNAにおけるUAAである。いくつかの実施形態において、tRNAは、標準アミノ酸が装填された改变型内因性tRNAである。いくつかの実施形態において、標準アミノ酸はセリンである。いくつかの実施形態において、tRNAは、非標準アミノ酸が装填された直交tRNAである。いくつかの実施形態において、直交tRNAは、対応するシンテターゼを有する。いくつかの実施形態において、対応するシンテターゼは、大腸菌グルタミニル-tRNAシンテターゼである。いくつかの実施形態において、非標準アミノ酸は、対象に導入されるか、又は投与され（例えば、食物を介して）、直交tRNA活性の誘導を可能にする。いくつかの実施形態において、非標準アミノ酸はピロリシンである。いくつかの実施形態において、tRNAは、アンバーコドンを標的とする。いくつかの実施形態において、tRNAはオーカーコドンを標的とする。いくつかの実施形態において、tRNAは、オパールコドンを標的とする。いくつかの実施形態において、タンパク質はジストロフィンである。さらなる態様において、対象はヒトであり、任意的に小児患者である。

10

20

30

40

【0012】

本明細書に開示されるさらなる態様は、その必要がある対象においてタンパク質欠損によって特徴づけられる疾患、障害又は状態の方法であって、該タンパク質をコードするRNA配列中の変異を認識するアンチコドン配列を有するtRNA、又は該tRNAの1つ以上をコードするベクターを対象に投与することを含む、又は代替的にそれから本質的になる、又はさらにそれからなる方法に関する。いくつかの実施形態において、変異はナンセンス変異であり、任意的に未成熟終止コドンである。いくつかの実施形態において、ナンセンス変異は、DNAにおけるTAA及びRNAにおけるUAAである。いくつかの実施形態において、tRNAは、標準アミノ酸が装填された改变型内因性tRNAである。いくつかの実施形態において、標準アミノ酸はセリンである。いくつかの実施形態において、tRNAは、非標準アミノ酸が装填された直交tRNAである。いくつかの実施形態において、直交tRNAは、対応するシンテターゼを有する。いくつかの実施形態において、対応するシンテターゼは、大腸菌グルタミニル-tRNAシンテターゼである。いくつかの実施形態において、非標準アミノ酸は、対象に投与又は導入され（例えば、食物を介して）、直交tRNA活性の誘導を可能にする。いくつかの実施形態において、非標準アミノ酸はピロリシンである。いくつかの実施形態において、tRNAは、アンバーコドンを標的とする。いくつかの実施形態において、tRNAは、オーカーコドンを標的とする。いくつかの実施形態において、tRNAは、オパールコドンを標的とする。いくつかの実施形態において、タンパク質欠損は、ジストロフィン欠損である。いくつかの実施形態において、疾患、障害又は状態は、筋ジストロフィーである。いくつかの実施形態において、筋ジストロフィーは、デュシェンヌ型筋ジストロフィーである。さらなる態様において、対象はヒトであり、任意的に小児患者である。

【0013】

他の態様は、タンパク質をコードするRNA配列中の変異を認識するアンチコドン配列を有する1つ以上のtRNAをコードするベクターに関する。いくつかの実施形態において、変異はナンセンス変異であり、任意的には未成熟終止コドンである。いくつかの実施形態において、ナンセンス変異は、DNAにおけるTAA及びRNAにおけるUAAである。いくつかの実施形態において、tRNAは、標準アミノ酸が装填された改变型内因性tRNAである。いくつかの実施形態において、標準アミノ酸はセリンである。いくつかの実施形態において、tRNAは、非標準アミノ酸が装填された直交tRNAである。いくつかの実施形態において、直交tRNAは、対応するシンテターゼを有する。いくつかの実施形態において、対応するシンテターゼを有する。

50

ゼは、大腸菌グルタミニル - tRNAシンテターゼである。いくつかの実施形態において、ベクターは、対応するシンテターゼをさらに含む。いくつかの実施形態において、非標準アミノ酸は、対象に導入されるか、又は投与され（例えば、食物を介して）、直交tRNA活性の誘導を可能にする。いくつかの実施形態において、非標準アミノ酸はピロリシンである。いくつかの実施形態において、tRNAは、アンバーコドンを標的とする。いくつかの実施形態において、tRNAは、オーカーコドンを標的とする。いくつかの実施形態において、tRNAは、オパールコドンを標的とする。いくつかの実施形態において、タンパク質はジストロフィンである。いくつかの実施形態において、変異はナンセンス変異であり、任意的に未成熟終止コドンである。いくつかの実施形態において、ベクターは、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターである。いくつかの実施形態において、AAVベクターは、AAV8ベクターである。

10

【0014】

本開示のさらなる態様は、治療用タンパク質、例えば限定されるものではないが、(i)インスリン；(ii)ウイルス（例えば、HIV、HCV、HPV、インフルエンザ）及び細菌（例えば、黄色ブドウ球菌（Staph Aureus）；薬物耐性株）に対する中和抗体など、のオンデマンドin vivo産生に関する。このような方法の態様は、その配列中に変異を有する治療用タンパク質をコードするベクター、及び治療用タンパク質をコードするRNA配列中の変異を認識するアンチコドン配列を有するtRNA又は該tRNAの1つ以上をコードするベクターを対象に投与することを含む。したがって、タンパク質をコードするRNA配列中の変異を認識するアンチコドン配列を有するtRNA、又は該tRNAの1つ以上をコードするベクターに関連して本明細書中で上に開示した方法及びベクターのいずれかを、同様にこの態様に適用することができる。

20

【0015】

本明細書に開示されるいくつかの態様は、ADAR2、ADAR2のための1つ以上のフォワードガイドRNA（「adRNA」）、及びADAR2のための1つ以上の対応するリバースガイドRNA（「r adRNA」）を含むADAR2に基づくRNA編集系を対象に投与することを含む、その必要がある対象においてタンパク質の発現を回復するための方法に関し、ADAR2に基づくRNA編集系は、タンパク質をコードするRNA配列、又は該ADAR2、adRNA、radRNAをコードする1つ以上のベクターにおける変異を特異的に編集する。いくつかの実施形態において、ADAR2に基づくRNA編集系は、アデノシン（A）をイノシン（I）に変化させ、これはグアノシン（G）として翻訳中に読み取られる。いくつかの実施形態において、変異はナンセンス変異である。いくつかの実施形態において、ナンセンス変異は、DNAにおけるTAA及びRNAにおけるUAAである。いくつかの実施形態において、ADAR2に基づくRNA編集系は、ナンセンス変異において1以上のアデノシン（A）に点突然変異を引き起こす。いくつかの実施形態において、ADAR2に基づくRNA編集系は、UAAをUIA（UGAとして読み取られる）に変換する。さらなる実施形態では、ADAR2に基づくRNA編集系は、UIA（UGAとして読み取られる）をUII（UGGとして読み取られる）に変換する。いくつかの実施形態において、ADAR2に基づくRNA編集系は、UAAをUAI（UAGとして読み取られる）に変換する。いくつかの実施形態において、本方法は、ADAR2編集配列によってコードされるコドンを認識する、上記に開示されたもののようなtRNAを投与することをさらに含む。いくつかの実施形態において、tRNAは、標準アミノ酸が装填された改变型内因性tRNAである。いくつかの実施形態において、標準アミノ酸はセリンである。いくつかの実施形態において、tRNAは、非標準アミノ酸が装填された直交tRNAである。いくつかの実施形態において、直交tRNAは、対応するシンテターゼを有する。いくつかの実施形態において、対応するシンテターゼは、大腸菌グルタミニル-tRNAシンテターゼである。いくつかの実施形態において、非標準アミノ酸は、（例えば、食物を介して）対象に導入され、直交tRNA活性の誘導を可能にする。いくつかの実施形態において、非標準アミノ酸はピロリシンである。いくつかの実施形態において、tRNAは、アンバーコドンを標的とする。いくつかの実施形態において、tRNAは、オーカーコドンを標的とする。いくつかの実施形態において、tRNAは、オパールコドンを標的とする。いくつかの実施形態において、タンパク質欠損は、ジストロフィン欠損である。いくつかの実

30

40

50

施形態において、疾患、障害又は状態は、筋ジストロフィーである。いくつかの実施形態において、筋ジストロフィーは、デュシェンヌ型筋ジストロフィーである。

【0016】

本明細書に開示されるさらなる態様は、ADAR2、ADAR2のための1つ以上のフォワードガイドRNA（「adRNA」）、及びADAR2のための1つ以上の対応するリバースガイドRNA（「radRNA」）を含むADAR2に基づくRNA編集系を対象に投与することを含む、その必要がある対象においてタンパク質欠損を特徴とする疾患、障害又は状態の方法に関し、ADAR2に基づくRNA編集系は、タンパク質をコードするRNA配列又は該ADAR2、adRNA、radRNAをコードする1つ以上のベクターにおける変異を特異的に編集する。いくつかの実施形態において、ADAR2に基づくRNA編集系は、アデノシン（A）をイノシン（I）に変化させ、これはグアノシン（G）として翻訳中に読み取られる。いくつかの実施形態において、変異はナンセンス変異である。いくつかの実施形態において、ナンセンス変異はTAAである。いくつかの実施形態において、ADAR2に基づくRNA編集系は、ナンセンス変異において1以上のアデノシン（A）に点突然変異を引き起こす。いくつかの実施形態において、ADAR2に基づくRNA編集系は、UAAをUIA（UGAとして読み取られる）に変換する。さらなる実施形態では、ADAR2に基づくRNA編集系は、UIA（UGAとして読み取られる）をUII（UGGとして読み取られる）に変換する。いくつかの実施形態において、ADAR2に基づくRNA編集系は、UAAをUAI（UAGとして読み取られる）に変換する。いくつかの実施形態において、本方法は、ADAR2編集配列によってコードされるコドンを認識する、上記に開示されたもののようなtRNAを投与することをさらに含む。いくつかの実施形態において、tRNAは、標準アミノ酸が装填された改変型内因性tRNAである。いくつかの実施形態において、標準アミノ酸はセリンである。いくつかの実施形態において、tRNAは、非標準アミノ酸が装填された直交tRNAである。いくつかの実施形態において、直交tRNAは、対応するシンテターゼを有する。いくつかの実施形態において、対応するシンテターゼは、大腸菌グルタミニル-tRNAシンテターゼである。いくつかの実施形態において、非標準アミノ酸は、（例えば、食物を介して）対象に導入され、直交tRNA活性の誘導を可能にする。いくつかの実施形態において、非標準アミノ酸はピロリシンである。いくつかの実施形態において、tRNAは、アンバーコドンを標的とする。いくつかの実施形態において、tRNAは、オーカーコドンを標的とする。いくつかの実施形態において、タンパク質欠損は、ジストロフィン欠損である。いくつかの実施形態において、疾患、障害又は状態は、筋ジストロフィーである。いくつかの実施形態において、筋ジストロフィーは、デュシェンヌ型筋ジストロフィーである。

【0017】

他の態様は、1つ以上のADAR2、ADAR2のための1つ以上のフォワードガイドRNA（「adRNA」）、及びADAR2のための1つ以上の対応するリバースガイドRNA（「radRNA」）を含む、ADAR2に基づくRNA編集系をコードする1つ以上のベクターを含む組換え発現系に関し、ここで、ADAR2に基づくRNA編集系は、タンパク質をコードするRNA配列中の変異を特異的に編集する。いくつかの実施形態において、ADAR2はアデノシン（A）をイノシン（I）に変化させ、これはグアノシン（G）として翻訳中に読み取られる。いくつかの実施形態において、1つのadRNA/radRNA対は、UAAのUIA（UGAとして読み取られる）への変換を誘導する。さらなる実施形態において、第2のadRNA/radRNA対は、UIA（UGAとして読み取られる）からUII（UGGとして読み取られる）への変換を誘導する。いくつかの実施形態において、1つのadRNA/radRNA対は、UAAのUAI（UAGとして読み取られる）への変換を誘導する。いくつかの実施形態において、1つ以上のベクター又は追加のベクターは、ADAR2編集配列によってコードされるコドンを認識する、上記に開示されたものなどのtRNAをさらにコードする。いくつかの実施形態において、tRNAは、標準アミノ酸が装填された改変型内因性tRNAである。いくつかの実施形態において、標準アミノ酸はセリンである。いくつかの実施形態において、tRNAは、非標準アミノ酸が装填された直交tRNAである。いくつかの実施形態において、直交tRNAは、対応するシンテターゼを有する。いくつかの実施形態において、対応するシンテターゼは、大腸菌グルタミニル-tRNAシンテターゼである。いくつかの

10

20

30

40

50

実施形態において、非標準アミノ酸は、（例えば、食物を介して）対象に導入され、直交tRNA活性の誘導を可能にする。いくつかの実施形態において、非標準アミノ酸はピロリシンである。いくつかの実施形態において、tRNAは、アンバーコドンを標的とする。いくつかの実施形態において、tRNAは、オーカーコドンを標的とする。いくつかの実施形態において、tRNAは、オパールコドンを標的とする。いくつかの実施形態において、タンパク質はジストロフィンである。いくつかの実施形態において、変異はナンセンス変異である。いくつかの実施形態において、ベクターは、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターである。いくつかの実施形態において、AAVベクターは、AAV8ベクターである。

【0018】

本開示のさらなる態様は、治療用タンパク質、例えば限定されるものではないが、(i)インスリン；(ii)ウイルス（例えば、HIV、HCV、HPV、インフルエンザ）及び細菌（例えば、黄色ブドウ球菌（*Staph Aureus*）；薬物耐性株）に対する中和抗体など、のオンデマンド *in vivo* 產生に関する。このような方法の態様は、その配列に変異を有する治療用タンパク質をコードするベクター、並びにADAR2、ADAR2のための1つ以上のフォワードガイドRNA（「adRNA」）、及びADAR2のための1つ以上の対応するリバースガイドRNA（「radRNA」）を含むADAR2に基づくRNA編集系を対象に投与することを含み、ここで、ADAR2に基づくRNA編集系は、タンパク質をコードするRNA配列中の変異、又はADAR2、adRNA、radRNAをコードする1つ以上のベクターを特異的に編集する。したがって、ADAR2に基づくRNA編集系に関連して上記で開示された方法及びベクターのいずれかは、タンパク質をコードするRNA配列中の変異、又は前記ADAR2、adRNA、radRNAをコードする1つ以上のベクターをコードするベクターを特異的に編集する。

10

20

20

【0019】

部分配列表

mU6, tRNA(U25C) アンバー

```
tcccggggtttccgccaTTTTTGGTACTGAGtCGCCCaGTCTCAGATAGATCCGACGCCGCCATCTCTAGGCCCGCGCC
GGCCCCCTCGCACAGACTTGTGGAGAAGCTCGGCTACTCCCCGCCCCGGTTAATTGCATATAATATTCCTAGTAAC
TATAGAGGCTTAATGTGCGATAAAAGACAGATAATCTGTTCTTTAATACTAGCTACATTTACATGATAGGCTTGGAT
TTCTATAAGAGATAAAACTAAATTATTATTTAAAAAACAGCACAAAAGGAAACTCACCTAACTGTAAAGTAATTG
TGTGTTTGAGACTATAATATCCCTGGAGAAAAGCCTTGGTTGggaaacctgatcatgttagatcgaaCggactCTAaa
tccgttcagccgggttagattccgggtttccgccaTTTTTCTAGACCCAGCTTCTTGTACAAAGTTGG
```

30

【0020】

mU6, tRNA(U25C) オーカー

```
tcccggggtttccgccaTTTTTGGTACTGAGtCGCCCaGTCTCAGATAGATCCGACGCCGCCATCTCTAGGCCCGCGCC
GGCCCCCTCGCACAGACTTGTGGAGAAGCTCGGCTACTCCCCGCCCCGGTTAATTGCATATAATATTCCTAGTAAC
TATAGAGGCTTAATGTGCGATAAAAGACAGATAATCTGTTCTTTAATACTAGCTACATTTACATGATAGGCTTGGAT
TTCTATAAGAGATAAAACTAAATTATTATTTAAAAAACAGCACAAAAGGAAACTCACCTAACTGTAAAGTAATTG
TGTGTTTGAGACTATAATATCCCTGGAGAAAAGCCTTGGTTGggaaacctgatcatgttagatcgaaCggactTTAaa
tccgttcagccgggttagattccgggtttccgccaTTTTTCTAGACCCAGCTTCTTGTACAAAGTTGG
```

30

【0021】

mU6, tRNA(U25C) オパール

```
tcccggggtttccgccaTTTTTGGTACTGAGtCGCCCaGTCTCAGATAGATCCGACGCCGCCATCTCTAGGCCCGCGCC
GGCCCCCTCGCACAGACTTGTGGAGAAGCTCGGCTACTCCCCGCCCCGGTTAATTGCATATAATATTCCTAGTAAC
TATAGAGGCTTAATGTGCGATAAAAGACAGATAATCTGTTCTTTAATACTAGCTACATTTACATGATAGGCTTGGAT
TTCTATAAGAGATAAAACTAAATTATTATTTAAAAAACAGCACAAAAGGAAACTCACCTAACTGTAAAGTAATTG
TGTGTTTGAGACTATAATATCCCTGGAGAAAAGCCTTGGTTGggaaacctgatcatgttagatcgaaCggactTCAaa
tccgttcagccgggttagattccgggtttccgccaTTTTTCTAGACCCAGCTTCTTGTACAAAGTTGG
```

40

【0022】

MmPyIRS (AfIII)

```
CAGCCTCCGGACTCTAGAGGATCGAACCCCTTAAGGCCaccATGGATAAGAAACCTTGAACACTCTCATTAGTGCACAG
GGCTCTGGATGTCCCGAACGGGACTATACACAAGATAAAACACCATGAGGTCTCAAGGAGCAAATCTATATCGAGATG
```

50

GCATGCGGCGACCATCTTGTGGAAATAATAGTAGGTCTCCAGGACGGCAAGAGCACTCCGACATCACAAGTACAGAAA
 AACCTGCAAACGGTGTAGGGTATCCGACGAAGACTTGAACAAATTGGACTAAGGCCAACGGAGGATCAAACCTCTGTCA
 AAGTGAAGTGGTTCTGCTCCTACCGAAGTAAGAAGGCCATGCCAAGTCCGGCAAGGGCACCAAGCCACTCGAA
 AATACTGAGGCCGCTCAGGCCAACCATCCGGTAGTAAGTTCAGTCCAGCCATACCCGTAAGTACCCAAAGAATCTGTCA
 TGTGCCGGCTCAGTTCCACATCTATAAGTTCAATTCTACAGGAGCGACGGCCTCCGCCCTCGTCAAGGGTAACACAA
 ACCCGATAACTTCTATGAGTGCCCCGTACAGGCATCCGACCCAGCACTGACGAAGTCTCAAACGTAGTGGAAAGTGC
 CTCTGAATCCGAAAGGACGAGATATCTTAACTCCGGTAAACCTTCCGGGAGCTGGAAAGTGAACCTCTCAGCCGGCG
 AAAAAAAGACCTCCAGCAAATTACGCAGAGGAAGGGAGAACTATCTGGGAAGTTGGAACGAGAGATACCCGATTCT
 TTGTCGATCGGGATTTGGAGATTAAGCCAATTCTCATCCCCCTGAATATATCGAACGAATGGGAATCGACAAT
 GATACGGAGTTGTCGAAGCAGATTTCCCGTAGACAAGAACCTTGTCTCGACCCATGCTCGCTCCGAACCTCTACAA
 TTACTTGAGAAAGTTGGACAGAGCGCTCCGGACCCGATCAAGATATTGAGATCGGTCTTGTATAGAAAGGAGAGT
 ATGGAAAAGAACACCTCGAAGAGTTACGATGCTGAACCTCTGCCAAATGGGTTCTGGCTGCACACGGGAGATCTCGA
 AGCATCATTACAGATTCCTAACCATCTGGGATAGACTTAAATAGTGGGTGACAGCTGTATGGTATACGGAGATAC
 CTTGGACGTAATGCACGGGATCTTGAGCTTCCCGCCGTGGTGGACCTATACCGTTGGACCGGGAGTGGGAATCG
 ACAAACCGTGGATAGCGCCGGTTCCGGCTTGAAAGACTCCTCAAAGTCAAGCATGATTCAAAAACATAAAACGGGCT
 GCTCGCTCCGAATCTTATTACAACGGTATAAGTACGAACCTGTGATAATAGCTTAAGGGTCGATCCCTACtGGTAGTA
 ATGAGTTA

10

【 0 0 2 3 】

20

tRNA

アンバー抑制：

ggaaacctgatcatgttagatcgaatggactctaaatccgttcagccgggttagattcccggtttccgcca

【 0 0 2 4 】

アンバー抑制（2）：

ggggggtgatcgaatagatcacacggactctaaattcgtgcaggccgggtgaaactccgtactcccgcca

【 0 0 2 5 】

オーカー抑制

ggaaacctgatcatgttagatcgaatggactttaaatccgttcagccgggttagattcccggtttccgcca

【 0 0 2 6 】

オパール抑制：

ggaaacctgatcatgttagatcgaatggacttcaaatccgttcagccgggttagattcccggtttccgcca

【 0 0 2 7 】

シンテターゼ：

ATGGATAAAAACCATTAGATGTTTAATATCTCGACCGGGCTCTGGATGTCCAGGACTGGCACGCTCCACAAATCAA
 GCACCATGAGGCTCAAGAAGTAAAATACATTGAAATGGCGTGTGGAGACCCTTGTGTGAATAATTCCAGGAGTT
 GTAGAACAGCCAGAGCATTCAAGACATCATAAGTACAGAAAAACCTGCAAACGATGTAGGGTTCTGGACGAGGATATCAAT
 AATTTCTCACAAGATCAACCGAAAGCAAAACAGTGTGAAAGTTAGGGTAGTTCTGCTCCAAAGGTCAAAAAGCTAT
 GCCGAAATCAGTTCAAGGGCTCCGAAGCCTCTGGAAAATTCTGTTCTGCAAAGGCATCAACGAACACATCCAGATCTG
 TACCTCGCCTGCAAATCAACTCCAAATTCTGCTGTTCCGCATGGCTCTGCTCCTTCACTTACAAGAAGCCAGCTT
 GATAGGGTTGAGGCTCTTAAGTCCAGAGGATAAAATTCTCTAAATATGGCAAAGCCTTCAGGGACTTGAGCCTGA
 ACTTGTGACAAGAAGAAAAACGATTTCAGCGGCTTACCAATGATAGAGAAGACTACCTCGTAAACTCGAACGTG
 ATATTACGAAATTTCGTAGACCGGGTTCTGGAGATAAGTCTCCTATCCTTATTCCGGCGGAATACGTGGAGAGA
 ATGGGTATTAATAATGATACTGAACCTCAAACAGATCTCCGGGTGGATAAAATCTGCTTGAGGCCAATGCTTGC
 CCCGACTCTTACAACATCTCGAAACACTCGATAGGATTTACCAGGCCAATAAAATTTCGAAGTCCGGACCTTGT
 ACCGGAAAGAGTCTGACGGCAAAGAGCACCTGGAAGAATTACTATGGTAGACTCTGTCAAGTGGGTTGGAGTGTACT
 CGGGAAAATCTTGAAGCTCTCATCAAAGAGTTCTGGACTATCTGGAATCGACTTCGAAATCGTAGGAGATTCTGTAT
 GGTCTTGGGGACTCTTGATATAATGCACGGGACCTGGAGCTTCTCGCAGTCGTGCGGGCAGTTCTTGTATA
 GAGAATGGGTATTGACAAACCATGGATAGGTGCAGGTTGGCTTGAACGCTTGCTCAAGGTTATGCACGGCTTAAA
 AACATTAAGAGGGCATCAAGGTCGAATCTTACTATAATGGGATTCAACCAACTGTAA

30

【 0 0 2 8 】

40

EGFP:

50

atggtagcaagggcgaggagctgtcacccgggtggtgcacatctggcagactggacggcactaaacggccacaagtca
 gctgtccggcgagggcgagggcgatgccacctaaggcaagctgaccctgaagttcatctgcaccacggcaagctgcccgtgcc
 ctggccacccctgtgaccacccctgacctaaggcgtcagtgcttcaaggcgtaccccgaccacatgaagcagcactttcaa
 gtccgecatgcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttcataaggacggcaactacaagacccggcgaggtgaagt
 tcgagggcgacaccctggtaaccgcattcagtgactgaaggcatcgacttcaaggaggacggcaacatctggggcacaagctgga
 gtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggccgacaaggcagaacggcatcaaggtaactcaagatccgcacaacat
 cgaggacggcagcgtcagctgcccaccactaccaggcagaacaccccatggcgacggccccgtgtgtcccgacaaccca
 ctaccitgagcaccctggtaaccgcatecgactgaaggcatcgacttcaaggaggacggcaacatctggggcacaagctgga
 ggatcactctggcatggacgagctgtacaagtaa

10

【 0 0 2 9 】

EGFP アンバー :

Atggtagcaagggcgaggagctgtcacccgggtggtgcacatctggcagactggacggcactaaacggccacaagtca
 gctgtccggcgagggcgagggcgatgccacctaaggcaagctgaccctgaagttcatctgcaccacggcaagctgcccgtgcc
 ctggccacccctgtgaccacccctgacctaaggcgtcagtgcttcaaggcgtaccccgaccacatgaagcagcactttcaa
 gtccgecatgcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttcataaggacggcaactacaagacccggcgaggtgaagt
 tcgagggcgacaccctggtaaccgcatecgactgaaggcatcgacttcaaggaggacggcaacatctggggcacaagctgga
 gtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggccgacaaggcagaacggcatcaaggtaactcaagatccgcacaacat
 cgaggacggcagcgtcagctgcccaccactaccaggcagaacaccccatggcgacggccccgtgtgtcccgacaaccca
 ctaccitgagcaccctggtaaccgcatecgactgaaggcatcgacttcaaggaggacggcaacatctggggcacaagctgga
 ggatcactctggcatggacgagctgtacaagtaatga

20

【 0 0 3 0 】

EGFP オーカー :

atggtagcaagggcgaggagctgtcacccgggtggtgcacatctggcagactggacggcactaaacggccacaagtca
 gctgtccggcgagggcgagggcgatgccacctaaggcaagctgaccctgaagttcatctgcaccacggcaagctgcccgtgcc
 ctggccacccctgtgaccacccctgacctaaggcgtcagtgcttcaaggcgtaccccgaccacatgaagcagcactttcaa
 gtccgecatgcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttcataaggacggcaactacaagacccggcgaggtgaagt
 tcgagggcgacaccctggtaaccgcatecgactgaaggcatcgacttcaaggaggacggcaacatctggggcacaagctgga
 gtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggccgacaaggcagaacggcatcaaggtaactcaagatccgcacaacat
 cgaggacggcagcgtcagctgcccaccactaccaggcagaacaccccatggcgacggccccgtgtgtcccgacaaccca
 ctaccitgagcaccctggtaaccgcatecgactgaaggcatcgacttcaaggaggacggcaacatctggggcacaagctgga
 ggatcactctggcatggacgagctgtacaagtaatga

30

【 0 0 3 1 】

EGFP オーパール :

40

Atggtagcaaggcgaggagctgttcacccgggtggtgcacatctggcagctggacggcgaegtaaacggccacaagtca
 gctgtccggcgaggcgaggcgatgcacactgaggcaagctgaccctgaagttcatctgaccacccgcaagetgeccgtgcc
 ctggcccacccctgtgaccacccctgacctaaccgcgtcagtgctcageccgtaccccgaccacatgaagcagcacgacttcaa
 gtccgcatgcggcaaggctacgtccaggagcgcaccatcttcaaggacgacggcaactacaagacccggcggaggtgaagt
 tcgagggcgacacctggtaacccgcatecgagctgaaggcatcgacttcaaggaggacggcaacatctgggcacaagctgga
 gtacaactacaacagccacaacgtcttatcatggccgacaageagaacggcatcaagggtgaacttcaagatccgcacaacat
 cgaggacggcagcgtgcagctgcggaccactaccagcagaacacccccatggcgcggcccgctgtgtccgacaacca
 ctacctgagcaccaggccctgagcaaagacccaaacgagaagcgcgatcacatggctctgtggagttcgtgaccggcggcgg
 ggateactctggcatggacgagctgtacaagtaatga

【 0 0 3 2 】

MbPy IRS

10	20	30	40	50	
MDKKPLDVLI SATGLWMSRT GTLHKIKHHE VSRSKIYIEM ACGDHLVVNN					
60	70	80	90	100	
SRSCRTARAF RHHKYRKTCR CRVSDEDIN NFLTRSTESK NSVKVRVVSA					
110	120	130	140	150	
PKVKKAMPKS VSRAPKPLEN SVSAKASTNT SRSVPSPAKS TPNSSVPASA					
160	170	180	190	200	
PAPSLTRSQL DRVEALLSPE DKISLNMAKP FRELEPELVT RRKNDFQRLY					
210	220	230	240	250	
TNDREDYLGK LERDITKFFV DRGFLEIKSP ILIPAEYVER MGINNDTELS					
260	270	280	290	300	
KQIFRVDKNL CLRPMЛАPTL YNYLRKLDRI LPGPIKIFEV GPCYRKESDG					
310	320	330	340	350	
KEHLEEFTMV NFCQMMSGCT RENLEALIKE FLDYLEIDFE IVGDSCMVYG					
360	370	380	390	400	
DTLDIMHGDL ELSSAVVGPV SLDREWGIDK PWIGAGFGLE RLLKVMHGFK					
410					
NIKRASRSES YYNGISTNL					

【 0 0 3 3 】

MmPy IRS (uniprot)

10

20

30

10	20	30	40	50	
MDKKPLNTLI SATGLWMSRT GTIHKIKHHE VSRSKIYIEM ACGDHLVVNN					
60	70	80	90	100	
SRSSRTARAL RHHKYRKTCR CCRVSDEDLN KFLTKANEDQ TSVKVKVVSA					
110	120	130	140	150	
PTRTKKAMPK SVARAPKPLE NTEAAQAQPS GSKFSPAIPV STQESVSVPA					
160	170	180	190	200	
SVSTSISISS TGATASALVK GNTNPITSMS APVQASAPAL TKSQTDRLEV					
210	220	230	240	250	
LLNPKDEISL NSGKPFRELE SELLSRRKKD LQQIYAEERE NYLGKLEREI					10
260	270	280	290	300	
TRFFVDRGFL EIKSPILIP EYIERMGIDN DTELSKQIFR VDKNFCLRP					
310	320	330	340	350	
LAPNLYNYLR KLDRALPDPI KIFEIGPCYR KESDGKEHLE EFTMLNFCQM					
360	370	380	390	400	
GSGCTRENLE SIITDFLNHL GIDFKIVGDS CMVYGDTLDV MHGDLELSSA					
410	420	430	440	450	
VVGPIPLDRE WGIDKPWIGA GFGLERLLKV KHDFKNIKRA ARSESYYNGI					

STNL

20

20

【 0 0 3 4 】

PyIT* (アンバー)

ggaaacctgatcatgttagatcgaaCggactCTAaatecgltcagccgggttagattcccggtttccgccaTTTTTT

【 0 0 3 5 】

PyIT* (オーカー)

ggaaacctgatcatgttagatcgaaCggactTTAaatccgtcagccgggttagattcccggtttccgccaTTTTTT

30

【 0 0 3 6 】

PyIT* (オパール)

ggaaacctgatcatgttagatcgaaCggactTCAaatccgtcagccgggttagattcccggtttccgccaTTTTTT

【 0 0 3 7 】

マウスU6プライマー

tcccggtttccgccaTTTTTGGTACTGAGtGCCCaGTCTCAGAT

CAAACAAGGCTTTCTCCAAGGGATAT

40

【 0 0 3 8 】

tRNA (U25C) アンバー_F:

CCTTGGAGAAAAGCCTGTTGggaaacctgatgttagatcgaaacggactCTAaatecgltcagccggg

【 0 0 3 9 】

共通リバース:

PyIT

ggaaacctgatcatgttagatcgaaatggactCTAaatccgtcagccgggttagattcccggtttccgcca

【 0 0 4 0 】

PyIT* (U25C)

ggaaacctgatcatgttagatcgaa**C**ggactCTAaatccgttcagccgggttagattcccggttccgcca

【 0 0 4 1 】

1. Arg tRNA (オパール) (E-カドヘリン論文)

GGCCGCGTGGCCTAATGGATAAGGCGTCTGACT**TCAG**ATCAGAAGATTGCAG
GTTCGAGTCCTGCCGCGGTG

2. Arg tRNA (オパール) (乾皮症(Xeroderma)論文)

GACCACGTGGCCTAATGGATAAGGCGTCTGACT**TCAG**ATCAGAAGATTGAGG
GTTCGAACATCCCTCGTGGTTA

10

3. セリン tRNA (アンバー)

GTAGTCGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACT**CTAAAATCCATTGGGGTTCC
CCGCGCAGGTTCGAATCCTGCCGACTACG**

4. ロイシン tRNA (アンバー)

GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAGACT**CTAGTTCTGGTCTCCAATG
GAGGCGTGGGTTCGAACATCCCACCTCTGACA**

20

【 0 0 4 2 】

フォワード:

TTGTGGAAAGGACGAAACACCGGTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAG

リバース:

ACAAGAAAGCTGGTCTAGGCTAGCAAAAAAA

【 0 0 4 3 】

tRNA_Leu_Am_F (ベクターと重複, 太字; アンチコドン配列, 太字下線):

TTGTGGAAAGGACGAAACACCGGTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAG
ACT**C**TAGTTCTGGTCTCCAATGG

30

【 0 0 4 4 】

tRNA_Leu_Oc_F (ベクターと重複, 太字; アンチコドン配列, 太字下線):

TTGTGGAAAGGACGAAACACCGGTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAG
ACT**T**TAGTTCTGGTCTCCAATGG

40

【 0 0 4 5 】

tRNA_Leu_Op_F (ベクターと重複, 太字; アンチコドン配列, 太字下線):

TTGTGGAAAGGACGAAACACCGGTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAAGGCGCCAG
ACT**T**CAGTTCTGGTCTCCAATGG

【 0 0 4 6 】

tRNA_Leu_R (ベクターと重複, 太字; アンチコドン配列, 太字下線):

ACAAGAAAGCTGGTCTAGGCTAGCAAAAAATGTCAGAAGTGGATTGAAAC
CCACGCCTCCATTGGAGACCAGAAC

50

【 0 0 4 7 】

tRNA_Ser_Am_F(ベクターと重複, 太字; アンチコドン配列, 太字下線):

TTGTGGAAAGGACGAAACACCGGTAGTCGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGA
CTCTAATCCATTGGGGTTCC

【 0 0 4 8 】

tRNA_Ser_Oc_F(ベクターと重複, 太字; アンチコドン配列, 太字下線):

TTGTGGAAAGGACGAAACACCGGTAGTCGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGA
CTTAAATCCATTGGGGTTCC

10

【 0 0 4 9 】

tRNA_Ser_Op_(ベクターと重複, 太字; アンチコドン配列, 太字下線)F:

TTGTGGAAAGGACGAAACACCGGTAGTCGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGA
CTICAATCCATTGGGGTTCC

20

【 0 0 5 0 】

tRNA_Ser_R(ベクターと重複, 太字; アンチコドン配列, 太字下線):

ACAAGAAAGCTGGGTCTAGGCTAGCAAAAAACGTAGTCGGCAGGATTGAAAC
CTGCGCGGGAAACCCAATGGATT

【 0 0 5 1 】

tRNA_Arg_Am_F(ベクターと重複, 太字; アンチコドン配列, 太字下線):

30

TTGTGGAAAGGACGAAACACCGGACCACGTGGCCTAATGGATAAGGCGTCTGA
CTTCAGATCAGAAGATTGAGGGTT

【 0 0 5 2 】

tRNA_Arg_Oc_F(ベクターと重複, 太字; アンチコドン配列, 太字下線):

TTGTGGAAAGGACGAAACACCGGACCACGTGGCCTAATGGATAAGGCGTCTGA
CTTAGATCAGAAGATTGAGGGTT

40

【 0 0 5 3 】

tRNA_Arg_Op_F(ベクターと重複, 太字; アンチコドン配列, 太字下線):

TTGTGGAAAGGACGAAACACCGGACCACGTGGCCTAATGGATAAGGCGTCTGA
CTICAGATCAGAAGATTGAGGGTT

【 0 0 5 4 】

tRNA_Arg_R (ベクターと重複, 太字; アンチコドン配列, 太字下線):

ACAAGAAAGCTGGGTCTAGGCTAGCAAAAAATAACCACGAAGGGATTCGAAC
CCTCAATCTTCTGATC

【 0 0 5 5 】

mU6_tRNA_ser_oc :

GTACTGAGtCGCCCaGTCTCAGATAGATCCGACGCCGCATCTCTAGGCCGCCGCCGCCCTCGCACAGACTTGTGGG
 AGAACGCTCGGCTACTCCCCGCTTAAATTGCATATAATATTCCTAGTAACTATAGAGGCTTAATGTGCGATAAA
 AGACAGATAATCTGTTCTTTAATACTAGCTACATTTACATGATAGGCTTGGATTCTATAAGAGATAACAAATACTAA
 ATTATTATTTAAAAAACAGCACAAAAGGAAACTCACCTAACTGTAAAGTAATTGTGTGTTTGAGACTATAAATATCC
 CTTGGAGAAAAGCCTGTTGGTAGTCGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACTTAAATCCATTGGGGTTCCCCGCGC
 AGGTTCGAATCCTGCCGACTACGTTTTT

10

【 0 0 5 6 】

mU6_tRNA_ser_oc_Nhe1_insert_F:

AATCCTGCCGACTACGTTTTGTACTGAGtCGCCCAGTCT

【 0 0 5 7 】

adRNA (未成熟終止コドン標的, 太字; 編集された塩基, 太字下線):

20

順次編集:

TTTGAAAGAGCAATAAAAT
CTTGAAAGAGCAATAGAA

二重編集:

TTTGAAAGAGCAATAAAT

【 0 0 5 8 】

radRNA (未成熟終止コドン標的, 太字; 編集された塩基, 太字下線):

30

順次編集:

AtaaAATGGCTTCAACTAT
AAtagAATGGCTTCAACTA

二重編集:

AAtaaAATGGCTTCAACTA

【 0 0 5 9 】

OTC 標的 (編集された塩基, 太字):

TCACAGACACCGCTCAGTTGT

40

【 0 0 6 0 】

adRNAの長さ及びADAR2リクルートドメインからの編集の距離の最適化 (adRNAの長さ - ADAR2リクルートドメインからの編集の距離):

16-5: atgccaccTGGggcaa

16-6: tgccaccTGGggcaag

16-7: gccaccTGGggcaagc

18-6: gatgccaccTGGggcaag

20-6: gcgatgccaccTGGggcaag

10

【 0 0 6 1 】

ADAR2リクルート領域 v1:

GGGTGGAATAGTATAACAATATGCTAAATGTTGTTATAGTATCCCACCT

【 0 0 6 2 】

ADAR2リクルート領域 v2:

GTGGAATAGTATAACAATATGCTAAATGTTGTTATAGTATCCCAC

【 0 0 6 3 】

ヘアピン (3') (図8): GGGCCCTTTCAGGGCCCTCTAGA

20

【 0 0 6 4 】

ヘアピン (3') (図10): atcgccctgaaaaag

【 0 0 6 5 】

トウホールド (5'): gccaccTGGgg

【 0 0 6 6 】

サプレッサーtRNA配列のリスト:

サプレッサー tRNAs	配列 (5'から3')
セリン	GTAAGTCGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGATGGACT <u>NNN</u> AATCCATTGG GGTTTCCCCCGCGCAGGTTCGAACCTGCCGACTACG
ロイシン	GTCAGGATGGCCGAGTGGTCTAACCGGCCAGACT <u>NNN</u> TTCTGGTC TCCAATGGAGGCCTGGGTTCGAACCCACTTCTGACA
アルギニン	GACCACGTGGCCTAACGGATAAGGCGTCTGACT <u>NNN</u> NGATCAGAAG ATTGAGGGTTCGAACCCCTCGTGGTTA

30

【 0 0 6 7 】

NNN - アンチコドン

内因性tRNAでは、tRNAは、本明細書で上記したNNN位置に相補配列を含めることにより、点突然変異を含むコドンを認識するように改変される。以下で詳しく説明するように、アンバー、オーカー及びオパールtRNA中のNNN配列は以下の通りである：アンバー：NNN=CTA；オーカー：NNN=TCA；オパール：NNN=TTA。

40

【 0 0 6 8 】

[0083]

次世代シーケンシング(NGS)解析のためのプライマーのリスト

名称	配列(5'から3')
NGS_DMD_F1	GTGTTACTGAATATGAAATAATGGAGGA
NGS_DMD_R1	ATTCTGGCATATTCTGAAGGTG
NGS_DMD_F2	CTCTCTGTACCTTATCTTAGTGTACTGA
NGS_DMD_R2	CTCTTCAAATTCTGACAGATATTCTGGC
NGS_OTC_F	ACCCTTCCTTCTTACACACACA
NGS_OTC_R	CAGGGTGTCCAGATCTGATTGTT
NGS_OTC_R2	CTTCTCTTAAACTAACCCATCAGAGTT

10

20

30

【0069】

in vivo RNA編集研究に使用されるadRNAアンチセンス配列と対応するADAR2リクルート骨格のリスト。いくつかの実施形態において、リクルート骨格v2(段落[0083]に開示)は、これらの配列とともに使用される。

名称	adRNAアンチセンス配列(3'から5')
OTC	TGTCTGTGGCGAG <u>CCAACAA</u> ACA
DMD	ACTTTCTCGTT <u>ACCTTACCG</u>

【0070】

MCP-リンカー-ADAR1-NLS(括弧内は任意配列)

MASNFTQFVLVDNGGTGDVTVAPSNFANGIAEWISSNSRSQAYKVTCSVRQSSA
 QNRKYTIKVEVPKGAWRSYLNMELTIPIFATNSDCELIVKAMQGLLKDGNIPIPS
 AIAANSGIYGGSGSGAGSGSPAGGGAPGSGGGSKAERMGFTEVTPVTGASLRRTML
LLSRSPEAQPKTLPLTGSTFHDQIAMLSHRCFNTLNSFQPSLLGRKILAAIJMKKDSE
DMGVVVSLGTGNRCVKGDSSLKGETVNDCHAEIISRRGFIRFLYSELMKYNQTAK

DSIFEPAGGEKLQIKKTVSFHYISTAPCGDGALFDKSCSDRAMESTESRHYPVFEN
PKQGKLRTKVENGEGTIPVESSDIVPTWDGIRLGERLRTMSCSDKILRWNVLGLQGA
LLTHFLQPIYLKSVTLGYLFSQGHLTRAICCRVTRDGSAFEDGLRHPFIVNHPKVGRV

SIYDSKRQSGKTKETSVNWCLADGYDLEILDGTRGTVDGPRNELSRVSKKNIFLLFK

KLCSFRYRRDLRLSYGEAKKAARDYETAKNYFKKGLKDMGYGNWISKPQEEKNF

YLCPVGSGSGGPKKRKV[AA]*

40

【0071】

MCP- リンカー-ADAR2 (括弧内は任意配列)

MGPKKKRKVAAGSGSGSMASNFTQFVLVDNGGTGDTVAPSNFANGVAEWISSN
 SRSQAYKVTCVRQSSAQKRKYTIKVEVPKVATQTVGVELPVAAWRSYLNME
LTIPIFATNSDCELIVKAMQGLLKDGNIPIPSAIAANSGIYGGSGGGSMHLHDQTP
SRQPIPSEGQLHLPQVLADAVSRLVLGKFGDLTDNFSSPHARRKVLAGVVMTTGT
VKDAKVISVSTGK CINGEYMSDRGLALNDCHAEIIISRRSLLRFLYTQLELYLNNKDD
QKRSIFQKSERGGFRLKENVQFHLYISTSPCGDARIFSPHEPILEEPADRHPNRKARGQ
LRTKIESGEGTIPVRSNASIQTWDGVLQGERLLTMCSSDKIARWNVVGIQGSLLSIFVE
PIYFSSIILGSLYHGDHLSRAMYQRISNIEDLPPLYTLNKPLLSGISNAEARQPGKAPNF
SVNWTVGDSAIEVINATTGKDELGRASRLCKHALYCRWMRVHGKVPSHLLRSKITK
PNVYHESKLAKEYQAAKARLFTAFIKAGLGAWVEKPTEQDQFSLT[P]*

10

【 0 0 7 2 】

N22p- リンカー-ADAR1-NLS (括弧内は任意配列)

MGNARRRERRRAEKQAQWKAANGGGTSGSGSPAGGGAPGSIGGSKAER
 MGFTEVTPVTGASLRRTMILLSRSPEAQPKTLPLTGSTFHDQIAMLSHRCFTNTNSF
QPSLLGRKILAAJIMKKDSEDMGVVVSLGTGNRCVKGDSSLKGETVNDCHAEIIISRR
GFIRFLYSELMKYNQTAKDSIFEPAKGGEKLQIKKTVSFHLYISTAPCGDGALFDKS
CSDRAMESTESRHYPVFENPKQGKLRTKVENGEGTIPVESSDIVPTWDGIRLGERLRT
MSCSDKILRNVLGLQGALLTHFLQPIYLKSVTLGYLFSQGHLTRAICCRVTRDGS
FEDGLRHPPFIVNHPKVRVSIYDSKRQSGKTETSVNWCLADGYDLEILDGTRGTVD
GPRNELSRVSKKNIFLLFKKLCFSFRYRRDLLRLSYGEAKKAARDYETAKNYFKKGLK
DMGYGNWISKPQEENFYLCPVSGSGSGPKKRKV[AA]*

20

【 0 0 7 3 】

核移行配列- リンカー-N22p- リンカー-ADAR2 (括弧内は任意配列)

[MG]PKKKRKVAAGSGSGSMGNARRRERRRAEKQAQWKAANGGGTSGSGSG
 SPAGGGAPGSIGGSMHLHDQTPSRQPIPSEGQLHLPQVLADAVSRLVLGKFGDLTD
NFSSPHARRKVLAGVVMTTGTDVDAKVISVSTGK CINGEYMSDRGLALNDCHAE
IIISRRSLLRFLYTQLELYLNNKDDQKRSIFQKSERGGFRLKENVQFHLYISTSPCGDAR
IFSPHEPILEEPADRHPNRKARGQLRTKIESGEGTIPVRSNASIQTWDGVLQGERLLT
MCS SDKIARWNVVGIQGSLLSIFVEPIYFSSIILGSLYHGDHLSRAMYQRISNIEDLPP
LYTLNKPLLSGISNAEARQPGKAPNFSVNWTVGDSAIEVINATTGKDELGRASRLCKHA
LYCRWMRVHGKVPSHLLRSKITKPNVYHESKLAKEYQAAKARLFTAFIKAGLGA
WVEKPTEQDQFSLT[P]*

30

【 0 0 7 4 】

40

MCP- リンカー-ADAR1 (E1008Q)-NLS (括弧内は任意配列)

MASNFTQFVLVDNGGTGDVTVAPSNFANGIAEWISSNSRSQAYKVTCSVRQSSA
 QNRKYTIKVEVPKGAWRSYLNMELTIPIFATNSDCELIVKAMQGLKDGNPIPS
 AIAANSGIYGGSGSGAGSGSPAGGGAPGSAGGSKAERMGFTEVTPVTGASLRRTML
LLSRSPPEAQPKTLPLTGSTFHDQIAMLSHRCNTLTNSFQPSLLGRKILAAIMKKDSE
DMGVVVSLGTGNRCVKGDSSLKGETVNDCHAEIISRRGFIRFLYSELMKYNQTA
DSIFEPAKGGEKLQIKKTVSFHLYISTAPCGDGALFDKSCSDRAMESTESRHYPVFEN
PKQGKLRKVENGQGTIPVESSDIVPTWDGIRLGERLRTMSCSDKILRWNVLGLQGA
LLTHFLQPIYLKSVTLGYLFSQGHLTRAICCRVTRDGSAFEDGLRHPFIVNHPKVRV
SIYDSKRQSGKTKECSVNWCLADGYDLEILDGTRGTVDGPRNELSRVSKKNIFLLFK
KLCFSFRYRRDLLRLSYGEAKKAARDYETAKNYFKKGLKDMGYGNWISKPQEEKNF
YLCPVGSGSGSGPKKRKV[AA]*

10

【 0 0 7 5 】

核移行配列- リンカー-MCP- リンカー-ADAR2 (E488Q) (括弧内は任意配列)

[MG]PKKKRKVAAGSGSGSMASNFTQFVLVDNGGTGDVTVAPSNFANGVAEWS
 NSRSQAYKVTCSVRQSSAQKRKYTIKVEVPKVATQTVGVELPVAAWRSYLN
MELTIPIFATNSDCELIVKAMQGLLKDGNIPIPSAIAANSGIYGGSGSGSMLHLDQT
PSRQPIPSEGQLQLHLPQVLADAJSRVLGKFGDLTDNFSSPHARRVLAGVVMTTG
DVKDAKVISVSTGTCINGEYMSDRGLALNDCHAEIISRSLLRFLYTQLELYLNNKD
DQKRSIFQKSERGGFRLKENVQFHLYISTSPCGDARIFSPHEPILEEPADRHPNRKARG
QLRTKIESGQGTIPVRSNASIQTWDGVLQGERLLTMSCSDKiarWNVVGIQGSLLSIF
VEPIYFSSIILGSLYHGDHLSRAMYQRISNIEDLPPPLYTLNKPLLGSISNAEARQPGKAP
NFSVNWTVGDSAIEVINATTGKDELGRASRLCKHALYCRWMRVHGKVPSHLLRSKI
TKPNVYHESKLAKEYQAAKARLFTAFIKAGLGAWVEKPTEQDQFSLT[P]*

20

【 0 0 7 6 】

N22p- リンカー-ADAR1 (E1008Q) (括弧内は任意配列)

30

MGNARTRRERRRAEKQAQWKAANGGGTSGSGSGPAGGGAPGSAGGSKAER
MGFTEVTPVTGASLRRTMLLSRSPEAQPKTLPLTGSTFHDQIAMLSHRCNTLTNSF
QPSLLGRKILAAIMKKDSEDMGVVVSLGTGNRCVKGDSSLKGETVNDCHAEIISRR
GFIRFLYSELMKYNQTAKSIFEPAKGGEKLQIKKTVSFHLYISTAPCGDGALFDKS
CSDRAMESTESRHYPVFENPKQGKLRKVENGQGTIPVESSDIVPTWDGIRLGERLRT
MSCSDKILRWNVLGLQGALLTHFLQPIYLKSVTLGYLFSQGHLTRAICCRVTRDGSA
FEDGLRHPFIVNHPKVRVSIYDSKRQSGKTKECSVNWCLADGYDLEILDGTRGTV
GPRNELSRVSKKNIFLLFKLCSFRYRRDLLRLSYGEAKKAARDYETAKNYFKKGLK
DMGYGNWISKPQEENFYLCPVVGSGSGSGPKKRKV[AA]*

40

【 0 0 7 7 】

核移行配列- リンカー-N22p- リンカー-ADAR2 (E488Q)

[MG]PKKKRKVAAGSGSGSMGNARRRERRAEKQAQWKAANGGGTSGSGSG
SPAGGGAPGSGGGSMLHLDQTPSRQPIPSEGQLQLHLPQVLADASVRLVLGKFGDLTD
NFSSPHARRKVLAGVVMTTGDVKDAKVISVSTGTKCINGEYMSDRGLALNDCHAE
IISRRSLLRFLYTQLELYLNNKDDQKRSIFQKSERGGFRLKENVQFHLYISTSPCGDAR
IFSPHEPILEEPADRHPNRKARGQLRTKJESGQGTIPVRSNASIQTWDGVLQGERLLTM
SCSDKIARWNVVGIQGSLLSIFVEPIYFSSILGSLYHGDHLSRAMYQRISNIEDLPPLY
TLNKPLLSGISNAEARQPGKAPNFSVNWTGDSAIEVINATTGKDELGRASRLCKHA
LYCRWMRVHGKVPSHLLRSKITKPNVYHESKLAKEYQAAKARLFTAFIKAGLGA
WVEKPTEQDQFSLT[P]*

10

【 0 0 7 8 】

核移行配列- リンカー-MCP- リンカー-hAPOPEC1

[MG]PKKKRKVAAGSGSGMASNFTQFVLVDNGGTGDVTVAPSNFANGVAEWISS
NSRSQAYKVTCSVRQSSAQKRKYTIKVEVPKVATQTVGGVELPVAAWRSYLN
MELTIPIFATNSDCELIVKAMQGLLKDGNPIPSAIAANSGIYGGSGSGGMSMTSEKGP
STGDPTLRRRIEPWEFDVYDPRELRKEACLLYEIKWGMSRKIWRSSGKNTTNHVEV
NFIKKFTSERDFHPSMSCSITWFLSWSPCWECSQAIREFLSRHPGVTLVIYVARLFWH
MDQQNRQGLRDLVNSGVTIQIMRASEYYHCWRNFVNYPPGDEAHWPQYPPLWMM
LYALELHCIILSLPPCLKISRRWQNHLTFRLHLQNCHYQTIPPHILLATGLIHPSVAWR

20

*

【 0 0 7 9 】

核移行配列- リンカー-MCP- リンカー-rAPOBEC1

[MG]PKKKRKVAAGSGSGMASNFTQFVLVDNGGTGDVTVAPSNFANGVAEWISS
NSRSQAYKVTCSVRQSSAQKRKYTIKVEVPKVATQTVGGVELPVAAWRSYLN
MELTIPIFATNSDCELIVKAMQGLLKDGNPIPSAIAANSGIYGGSGSGGMSSETGP
VAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELRKETCLLYEINWGGRHSIWRHTSQNTNKHVEV
NFIEKFTTERYFCPNTRCSITWFLSWSPCGECSRAITEFLSRYPHVTLFYIARLYHHAD
PRNRQGLRDLISSGVTIQIMTEQESGYCWRNFVNYSPSNEAHWPRYPHLWVRLYVLE
LYCILGLPPCLNILRRKQPQLTFFTIALQSCHYQRLPPPHILWATGLK*

30

【 0 0 8 0 】

dsRBD- リンカー-rAPOBEC1

MDIEDEENMSSSTDVKENRNLDNVSPKDGT~~PGPGE~~SQLSN~~GGGG~~GRKRP
 LEEGSNGHSKYRLKKR~~KTPGPVLPKNALMQ~~NEIKPGLQY~~TLLSQ~~GPVHAP
 LFVMSVEVNGQVFEGSGPTKKKAKLHAAEKALRSFVQFPNASEAH~~LAMGRT~~LS
 VNTDFTSDQADFPDTLFNGFETPDKAEP~~PFYVG~~SGNGDDSFSSG~~DLS~~ASPVPAS
 LAQPLPVLPFFPPPSGKNPVMILNELR~~PG~~LY~~D~~FLSES~~G~~ESHAKSFVMSVV~~VG~~
 QFFEGSGRNKKLAKARA~~AQS~~AAIFNGGSGGG~~MS~~SETGPVAVDPTLRRRIEP
 HEFEVFFDPRELRKETCLLYEINWGGRHSIWRHTS~~QNTNKH~~EVNFIEKFTTERYFCP
 NTRCSITWFLSWSPCGECSRAITEFLSRYPHVT~~F~~LYIARLYHHADPRNRQGLRDLI
SSGVTIQIMTEQESGYCWRNFVNYSPSNEAHWPRYPHLWVRLYVLE
YCILGLPPCLNILRRKQPQLTFFTIALQSCHYQRLPPPHILWATGLK*

40

【 0 0 8 1 】

50

dsRBD- リンカー-hAPOBEC1

MDIEDEENMSSSTDVKENRNLDNVSPKDGSTPGPGEQLSNGGGGPGRKRP
 LEEGSNGHSKYRLKKRRKTPGPVLPKNALMQLNEIKPGLQYTLLSQTPVHAP
 LFVMSVEVNGQVFEGSGPTKKAKLHAAEKALRSFVQFPNASEAHLAMGRTLS
 VNTDFTSDQADFPDTLFNGFETPDKAEPFYVGNSNGDDSFSSGDLSASPVPAS
 LAQPPPLPVLPFFPPPSGKNPVMILNELRPGLKYDFLSESGESHAKSFVMSVVVDG
QFEGSGRNNKKLAKARAQSALAAIFNGGSGGSGSMTSEKGPTGDPTLRRRIEP
WEFDVFYDPRELRKEACLLYEIKWGMSRKIWRSSGKNTTNHVEVNFIKKFTSERDFH
PSMSCSITWFLSWSPCWECQAIREFLSRHPGVTЛИYVARLFWHMDQQNRQGLRDL
VNSGVTIQIMRASEYYHCWRNFVNYPGDEAHWPQYPLWMMLYALELICIIISLP
PCLKISRRWQNHLTFFRLHLQNCHYQTIPPHILLATGLIHPVAWR*

10

【 0 0 8 2 】

MCP- リンカー-ADAR1-NES

MASNFTQFVLVDNGGTGDTVAPSNFANGIAEWISSNSRSQAYKVTCSVHQSSA
 QNRKYTIKVEVPKGAWRSYLNMELTIPIFATNSDCELIVKAMQGLKDGNPIPS
AIAANSGIYGGSGSGAGSGSPAGGGAPGSAGGSKAERMGTEVTPVTGASLRRTML
LLSRSPPEAQPKTLPLTGSTFHDQIAMLSHRCFNTLTSFQPSLLGRKILAAIIMKKDSE
DMGVVSLGTGNRCVKGDLSLKGTVNDCHAEIISRRGFIRFLYSELMKYNQTA
DSIFEPAKGGEKLQIKKTVSFHLYISTAPCGDGALFDKSCSDRAMESTESRHYPVFEN
PKQGKLRTKVENGEGTIPVESSDIVPTWDGIRLGERLRTMSCSDKILRWNVLGLQGA
LLTHFLQPIYLKSVTGYLFSQGHLTRAICCRVTRDGSAFEDGLRHPFIVNHPKVGRV
SIYDSKRQSGKTKETSVNWLADGYDLEILDGTRGTVDGPRNELSRVSKKNIFLLFK
KLCFSRYRRDLLRLSYGEAKKAARDYETAKNYFKKGLKDMGYGNWISKPQECKNF
YLCPVGSGSGSLPPLERLTL*

20

【 0 0 8 3 】

MCP- リンカー-ADAR2-NLS

MASNFTQFVLVDNGGTGDTVAPSNFANGIAEWISSNSRSQAYKVTCSVHQSSA
 QNRKYTIKVEVPKGAWRSYLNMELTIPIFATNSDCELIVKAMQGLKDGNPIPS
AIAANSGIYGGSGSGAGSGSPAGGGAPGSAGGSQQLHLPQLADA
TDNFSSPHARRKVLAGVVMTTGTDVDAKVISVSTGKCIINGEYMSDRGLALNDCH
AEIISRRSLLRFLYTQLELYLNNKDDQKRSIFQKSERGGFRLKENVQFHLYISTSPCGD
ARIFSPHEPILEPADRHPNRKARGQLRTKIESGEGTIPVRSNASIQTWDGVLQGERLI
TMSCSDKIARWNVVGIGQGSLLSIFVEPIYFSSIILGSLYHGDHLSRAMYQRISNIEDLPP
LYTLNKPLLSGISNAEARQPGKAPNFSVNWTGDSAIEVINATTGKDELGRASRLCK
HALYCRWMRVHGKVPShLLRSKITKPNVYHESKLAKEYQAAKARLFTAFAKAGLG
AWVEKPTEQDQFSLTGSGSGSPKKKRKV*

30

【 0 0 8 4 】

40

MCP- リンカー-ADAR2-NES

MASNFTQFVLVDNGGTGDTVAPSNFANGIAEWISSNSRSQAYKVTCSVRQSSA
 QNRKYTIKVEVPKGAWRSYLNMELTIPIFATNSDCELIVKAMQGLKDGNPIPS
 AIAANSGIYGGSGAGSGSPAGGGAPGSAGGSQLHLPQVLADAVSRLVLGKFGDL
TDNFSSPHARRKVLAGVVMTGTDVKDAKVVISVSTGTCINGEYMSDRGLALNDCH
AEIISRRSLLRFLYTQLELYLNNKDDQKRSIFQKSERGGFRLKENVQFHLYISTSPCGD
ARIFSPHEPILEPADRHPNRKARGQLRTKIESGEGTIPVRSNASIQTWDGVLOGERLL
TMSCSDDKIARWNVVGIQGSLLSIFVEPIYFSSIILGSLYHGDHLSRAMYQRISNIEDLPP
LYTLNKPLLSGISNAEARQPGKAPNFSVNWTVGDSAIEVINATTGKDELGRASRLCK
HALYCRWMRVHGKVPSHLLRSKITKPNVYHESKLAKEYQAAKARLFTAFIGLAGL
AWVEKPTEQDQFSLTGSGSGSLPPLERLTL*

10

【 0 0 8 5 】

MCP- リンカー-rAPOBEC1-NLS

MASNFTQFVLVDNGGTGDTVAPSNFANGIAEWISSNSRSQAYKVTCSVRQSSA
 QNRKYTIKVEVPKGAWRSYLNMELTIPIFATNSDCELIVKAMQGLKDGNPIPS
 AIAANSGIYGGSGAGSGSPAGGGAPGSAGGSQLHLPQVLADAVSRLVLGKFGDL
VDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELRKETCLLYEINWGGGRHSIWRHTSQNTNKHVEVNFI
EKFT
TERYFCPNTRCSITWFLSWSPCGECSRAITEFLSRYPHVTLFIYIARLYHHADPRNRQG
LRDLISSGVTIQIMTEQESGYCWRNFVNYSPSNEAHWPRYPHLWVRLYVLELYCIILG
LPPCLNILRRKQPQLTFFTIALQSCHYQRLPPHILWATGLKGSGSGSPKKRKV*

20

【 0 0 8 6 】

MCP- リンカー-rAPOBEC1-NES

MASNFTQFVLVDNGGTGDTVAPSNFANGIAEWISSNSRSQAYKVTCSVRQSSA
 QNRKYTIKVEVPKGAWRSYLNMELTIPIFATNSDCELIVKAMQGLKDGNPIPS
 AIAANSGIYGGSGAGSGSPAGGGAPGSAGGSQLHLPQVLADAVSRLVLGKFGDL
VDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELRKETCLLYEINWGGGRHSIWRHTSQNTNKHVEVNFI
EKFTTERYFCPNTRCSITWFLSWSPCGECSRAITEFLSRYPHVTLFIYIARLYHHADPR
NRQGLRDLISSGVTIQIMTEQESGYCWRNFVNYSPSNEAHWPRYPHLWVRLYVLEL
YCIILGLPPCLNILRRKQPQLTFFTIALQSCHYQRLPPHILWATGLKGSGSGSLPPLERL
TL*

30

【 0 0 8 7 】

MCP- リンカー-hAPOBEC1-NLS

40

MASNFTQFVLVDNGGTGDTVAPSNFANGIAEWISSNSRSQAYKVTCSVRQSSA
 QNRKYTIKVEVPKGAWRSYLNMELTIPIFATNSDCELIVKAMQGLKDGNPIPS
 AIAANSGIYGGSGAGSGSPAGGGAPGSAGGSQLHLPQVLADAVSRLVLGKFGDL
GDPTLRRRIEPWEFDVFYDPRELRKEACLLYEIKWGMSRKIWRSSGKNTTNHVEVNFI
IKKFTSERDFHPSMCSITWFLSWSPCWECQAIREFLSRHPGVTLVITYVARLFWHMD
QQNRQGLRDLVNSGVTIQIMRASEYYHCWRNFVNYPGPDEAHWPQYPPLWMMLY
ALELHCIILSLPPCLKISRRWQNHLTFFRLHLQNCHYQTIPPHILLATGLIHPSSVAWRGS
GSGSPKKRKV*

50

【 0 0 8 8 】

MCP- リンカー-hAPOBEC1-NES

MASNFTQFVLVDNGGTGDTVAPSNFANGIAEWISSNSRSQAYKVTCSVQSSA
 QNRKYTIKVEVPKGAWRSYLNMELEPIFATNSDCELIKAMQGLKDGNPIPS
 AIAANSGIYGGSGSGAGSGSPAGGGAPGSAGGGSETPGTSESATPESMTSEKGPST
GDPTLRRRIEPWEFDVFYDPRELRKEACLLYEIKWGMSRKIWRSSGKNTTNHVEVNFIKKFTSERDFHPSMCSITWFLSWSPCWEC
SQAIREFLSRHPGVTLVIVARLFWHMDQQNRQGLRDLVNSGVTIQIMRASEYYHCWRNFVNYPGDEAHWPQYPPPLWMMLY
ALELHCIILSLPPCLKISRRWQNHLTFFRLHLQNCHYQTIPPHILLATGLIHP
SVAWRGSGSLPPLERLTL*

10

【 0 0 8 9 】

別のスペーサー (GGSGGSGGS の替わりに使用し得る):

SGSETPGTSESATPES

【 0 0 9 0 】

3XNLS-4xLN-cdADAR2

MPKKKRKVDPKKKRKVDPKKRKVGSYPYDVPDYAGSNARTRRERRAEKQA
 QWKAANGGGGGGGGGGGGGSNARTRRERRAEKQAQWKAANGGGGGGGGGGGSNARTRRRE
RRAEKQAQWKAANLHLDQTPSRQPIPSEGQLQLHLPQLADAVSRLVLGKFGDLTD
NFSSPHARRKVLAGVVMTGTDVKDAKVISVSTGTCINGEYMSDRGLALNDCHAE
IISRRSLLRFLYTQLELYLNNKDDQKRSIFQKSERGGFRLKENVQFHLYISTSPCGDAR
IFSPHEPILEEPADRHPNRKARGQLRTKIESGEGTIPVRSNASIQTWDGVLQGERLLTM
SCSDKIARWNVVGIQGSLLSIFVEPIYFSSIILGSLYHGDHLSRAMYQRISNIEDLPPLY
TLNKPLLSGISNAEARQPGKAPNFSVNWTGDSAIEVINATTGKDELGRASRLCKHA
LYCRWMRVHGKVPSHLLRSKITKPNVYHESKLAKEYQAAKARLFTAFIKAGLGA
WVEKPTEQDQFSLTP

20

30

【 0 0 9 1 】

N22p-hAPOBEC1

MPKKKRKVDGSGNARTRRERRAEKQAQWKAANGGGTSGSGSGSPAGGGAG
PGSGGGSMTSEKGPSTGDPTLRRRIEPWEFDVFYDPRELRKEACLLYEIKWGMSRKI
WRSSGKNTTNHVEVNFIKKFTSERDFHPSMCSITWFLSWSPCWEC
SQAIREFLSRHPGVTLVIVARLFWHMDQQNRQGLRDLVNSGVTIQIMRASEYYHCWRNFVNYPGDEAHWPQYPPPLWMMLY
YALELHCIILSLPPCLKISRRWQNHLTFFRLHLQNCHYQTIPPHILLATGLIHP
SVAWR

40

【 0 0 9 2 】

3XNLS-4xIN-hAPOBEC1

**MPKKKRKVDPKKKRKVDPKKRKVGSYPYDVPDYAGSNARRRERRAEKQA
QWKAANGGGSGGGSGGGGSNARTRRRERRAEKQAQWKAANGGGSGGGG
GSGGGGSNARTRRRERRAEKQAQWKAANGGGSGGGGSNARTRRRE
RRAEKQAQWKAANMTSEKGPDPTLRRRIEPWEFDVFYDPRELKEACLLYEIK
WGMSRKIWRSSGKNTTNHVEVNFIKKFTSERDFHPSMCSITWFLSWSPCW
ECSQAIREFLSRHPGVTLVIYVARLFWHMDQQNRQGLRDLVNSGVTIQIMRASE
YYHCWRNFVNYPGDEAHWPQYPPLWMMLYALELHCILSLPPCLKISRRWQN
HLTFFRLHLQNCHYQTIPPHILLATGLIHP SVAWR**

10

【 0 0 9 3 】

C末端 ADAR2 (残基 1-138 が欠失)

MLRSFVQFPNASEAHLAMGRTLSVNTDFTSDQADFPDTLFNGFETPDKAEP
PFFYVGSNGDDSFSSSGDLSLSASPVPASLAQPPLPVLPPFPPPSGKN
PVMLNELRPGLKYDFLES ESGESHAKSFVMSVVVGQFFEGSGRN
KKLAKARAQAQSALAAIFNLHLDQTPSRQPI PSEGLQLHLPQVL
ADAVSRLVLGKFGDLTDNFSSPHARRKVLAGV
VMTTGTDVKDA KVIVSTGTCINGEYMSDRGLALNDCHAE
IIISRRSLLRFLYTQLELYLN
NKDDQKRS IFQKSERGGFRLKENVQFHLYISTSPCGDARIFSPHE
PILEEPADRHPNRKARGQLRTKI ESGEGTIPVRSNASIQTWD
GVLQGERLLTMSCSDKIARWN
VVGIQGSLLSIFVEPIYFS SIILGS
LYHGDHLSRAMYQRISNIEDL
PPLYTLNKPLLSGISNAEARQPGKAP
NFSVNW TVGDS
AIEVINATTGKDELGRASRLCKHALYCRW
MRVHGKVPSHLLRSKITKP
NVY HESKLA
AKEYQAAKARLFTA
FIKAGLGA
WVEKPTEQDQFSLTP*

20

【 0 0 9 4 】

MS2 -RNA:

单一:

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNggccAACATGAGGATCACCATGTCTGCAGggcc

二重:

aACATGAGGATCACCATGTcNNNNNNNNNNNNNNNNNaACATGAGGATCACCATGTc

30

【 0 0 9 5 】

BoxB RNA:

单一:

NNNNNNNNNNNNNNNNNNggccctgaagaaggccc

二重:

ggGCCCTGAAGAAGGGCccNNNNNNNNNNNNNNNggGCCCTGAAGAAGGGCcc

【 0 0 9 6 】

PP7 -RNA:

NNNNNNNNNNNNNNNNNccggagcagacgatatggcgtcgtccgg

40

【 0 0 9 7 】

二重ヘアピン RNA:

TGGAATAGTATAACAATATGCTAAATGTTAGTATCCACNNNNNNNNNNNNNTGGAATAGTATAACA
ATATGCTAAATGTTAGTATCCAC

【 0 0 9 8 】

adRNA における A-U から G-C 置換

【 0 0 9 9 】

10

20

dCas9Cj-NES- ソンガー-cdADAR2(E488Q)

MARILAFAGISSIGWAFSENDELKDCGVRIFTKVENPKTGESLALPRRLARSAR
 KRLARRKARLNHLKHLLIANEFKLNYEDYQSFDESLAKAYKGSLISPYELRFRAL
 NELLSKQDFARVILHIAKRRGYDDIKNSDDKEKGAILKAIKQNEEKANYQSVG
 EYLYKEYFQKFKEKSKEFTNVRNKESYERCIAQSFLKDELKLIFKKQREFGFSE
 SKKFEVEVLSVAFYKRALKDFSHLVGNCSFFTDEKRAPKNSPLAFMFVALTRIIN
 LLNNLKNTLEGILYTKDDLNALLNEVLKNGLTYKQTCKLLGLSDDYEFKGEKG
 TYFIEFKKYKEFIKALGEHNLSQDDLNEIAKDITLIKDEIKLKKALAKYDLNQNQ
 IDSLSKLEFKDHLNISFKALKLVTPMLMLEGKKYDEACNELNLKVAINEDKKDFL
 PAFNETYYKDEVTPVVLRAIKEYRKVLNALLKKYGVHKINIELAREVGKNHS
 QRAKIEKEQNEYKAKKDAELECEKLGLKINSKNILKRLFKEQKEFCAYSGEK
 IKISDLQDEKMLEDIAIPYSRSFDDSYMNVLFVFTKQNQEKLNQTPFEAFGNDS
 AKWQKIEVLAKNLPTKKQRILDKNYKDKEQKNFKDRNLNDTRYIARLVLYT
 KDYLDFLPLSDDENTKLNDTQKGSKVHVEAKSGMLTSALRHTWGFSAKDRNN
 HLHHAIADAVIIAYANNIVKAFSDFKKEQESNSAELYAKKISELDYKNKRKFFEPF
 SGFRQKVLDKIDEIFVSKPERKKPSGALHEETFRKEEEFYQSYGGKEGVLKALE
 LGKIRKVNGKIVKNGDMFRVDIFKHKKTNKFYAVPIYTMDFALKVLPNKAVER
 SKKGEIKDWILMDENEFCFSLYKDSLILIQTKDMQEPEFVYYNAFTSSTVSLIVS
KHDNKFETLSKNQKILFKNAKEVIAKSIGIQNLKVFEKYIVSALGEVTKAEFR
QREDFKKSGLPPLERLTLSGGGGSQLHLPQLADAVSRLVLGKFGDLTDNFSSPH
ARRKVLAGVVMTTGTDVKDAKVSVSTGTCINGEYMSDRGLALNDCHAEIISRRSL
LRFLYTQLELYLNNKDDQKRSIFQKSERGGFRLKENVQFHYIYSTSPCGDARIFSPHEP
ILEEPADRHPNRKARGQLRTKIESGQGTIPVRSNASIQTWDGVLQGERLLTMSCSDKI
ARWNVVGIQGSLLSIFVEPIYFSSIILGSLYHGDHLSRAMYQRISNIEDLPPLYTLNKPL
LSGISNAEARQPGKAPNFSVNWTVGDSAIEVINATTGKDELGRASRLCKHALYCRW
MRVHGKVPSSHLLRSKITKPNVYHESKLAKEYQAAKARLFTAFIKAGLGAWVEKPT
EQDQFSLT

10

20

30

【 0 1 0 0 】

单一及び二重ADAR2リクルートドメイン：

单一:

**GTGGAATAGTATAACAATATGCTAAATGTTGTTAGTATCCCACACAAACC
GAGCGGTGTCTGT**

二重 1:

**GTGGAATAGTATAACAATATGCTAAATGTTGTTAGTATCCCACCAACCG
AGCGGTGTCTGTGGAAATAGTATAACAATATGCTAAATGTTGTTAGTAT
CCCAC**

二重 2:

**GTGGAATAGTATAACAATATGCTAAATGTTGTTAGTATCCCACACTACAAAC
CGAGCGGTGTCTGGTGGAAATAGTATAACAATATGCTAAATGTTGTTAGTAT
CCCAC**

二重 3:

**GTGGAATAGTATAACAATATGCTAAATGTTGTTAGTATCCCACTTACAAA
CCGAGCGGTGTGGAAATAGTATAACAATATGCTAAATGTTGTTAGTATC
CCAC**

二重 4:

**GTGGAATAGTATAACAATATGCTAAATGTTGTTAGTATCCCACGTTTACA
AACCGAGCGGTGGTGGAAATAGTATAACAATATGCTAAATGTTGTTAGTAT
CCCAC**

二重 5:

**GTGGAATAGTATAACAATATGCTAAATGTTGTTAGTATCCCACACAAGTTTA
CAAACCGAGCGGTGGAAATAGTATAACAATATGCTAAATGTTGTTAGTAT
CCCAC**

【図面の簡単な説明】

【0 1 0 1】

【図 1】図1は、改変型の内因性又は直交tRNAの送達のために開発されたベクター構築物の概略である。

【図 2】図2A-Bは、tRNA構築物の抑制効率を示す：（図2A）アルギニン、セリン及びロイシンに由来するサブレッサーtRNAの、アンバー、オーカー及びオパール終止コドンに対する相対効率；代表的なイメージは、Ser tRNAアンバーの存在下におけるGFP発現の回復を示す。（図2B）2mM UAAの存在下における、單一又は二重ピロリジルtRNAの、アンバー、オーカー及びオパール終止コドンに対する抑制効率の比較；代表的なイメージは、2mM UA Aの存在下における、單一及び二重ピロリジルtRNAアンバーを使用した相対的なGFP回復を示す。

【図 3】図3は、種々のtRNA及びアミノ酸を用いたジストロフィンについてのGFPレポーターの結果を示す。

【図 4】図4は、mdxマウスにおいて実施したジストロフィン回復実験の結果を示す。

【図 5】図5は、ADAR2構築物を作製するために使用される配列を示す。

【図 6】図6は、ADAR2によって作製し得る、コドンへのRNAレベルの点突然変異の非限定的な例を示す。

【図 7】図7は、ADAR2に基づくRNA編集系において使用し得る構築物の例示的な概略を示す。

【図 8】図8は、adRNAの長さ及びADAR2リクルートドメインからの編集の距離の最適化の結果を示す。Y軸の各カテゴリーの短縮形の最初の数字はadRNAの長さであり、2番目の数字

10

20

30

40

50

(ダッシュに続く)はADAR2リクルートドメインからの編集距離である。ADAR2リクルート領域v2を有する20-6で最良の結果が得られた。

【図9】図9は、本明細書に記載の編集系を使用したGFP発現のin vitro回復を示す。

【図10】図10は、ミスマッチを有するヘアピンの最適化の結果を示す。Y軸の各カテゴリの短縮形の最初の数字はミスマッチの数であり、2番目の数字は標的からの塩基の数である。例えば、13は1つのミスマッチで、標的から3塩基離れている。

【図11】図11は、トウホールド、標的に対してミスマッチのないガイドRNA配列、の様々な長さの結果を示す。

【図12】図12A-Cは、(図12A)免疫染色、(図12B)ウエスタンプロット、及び(図12C)in vitroにおけるOTC mRNA編集アッセイの結果を示す。
10

【図13】図13は、Cas9に基づくアプローチと比較した、サプレッサーtRNAを用いたジストロフィン発現の回復を示すウエスタンプロットである。

【図14】図14は、正規化ジストロフィンmRNAレベルを示す。

【図15】図15は、免疫染色の結果を示す。

【図16】図16A-Dは、in vitro抑制及びGFPレポーターmRNAにおける終止コドンの編集を示す：(図16A)アンバー、オーカー及びオパール終止コドンを標的とするアルギニン、セリン及びロイシンサプレッサーtRNAの活性(n=3独立した複製)。(図16B)AAVベクターによって送達された1又は2コピーのピロリジルtRNAの存在下及び1mM N-Boc-L-リシンの存在下におけるアンバー、オーカー及びオパール終止コドンの直交tRNA/aaRS(MbPyIRS)に基づく抑制(n=3独立した複製)(それぞれp値0.022、0.002、0.027)。(図16C)1段階、2段階、又はサプレッサーtRNAと組み合わせた、アンバー及びオーカー終止コドンのADAR2に基づくRNA編集効率(n=3独立した複製)。(図16D)AAVベクターによって送達された1又は2コピーのadRNAの存在下における、アンバー及びオーカー終止コドンのADAR2に基づくRNA編集効率(n=3又は6独立した複製)(それぞれp値0.0003、0.0001、0.0015)。
20

【図17】図17A-Eは、ヒト疾患のモデルマウスにおけるin vivoでのRNAターゲティングを示す：(図17A)mdxマウスにおいてジストロフィン発現を回復するためのDNA及びRNAターゲティングアプローチの概略である：(i)二重gRNA-CRISPRに基づくアプローチは、エキソン23のインフレーム切除をもたらす；(ii)オーカーコドンのtRNA抑制；及び(iii)オーカーコドンのADAR2に基づく編集。(図17B)対照及び処置サンプルにおけるジストロフィン及びnNOSについての免疫蛍光染色(スケールバー：250 μm)。(図17C)対応する処置成体mdxマウスにおけるin vivoでのTAA-TGG/TAG/TGA RNA編集効率(n=3又は4匹のマウス)。(図17D)エキソン4の最後のスクレオチドにおけるミスセンス又はドナースプライス部位におけるG-A点突然変異を有するspf^{ash}マウスにおけるOTC遺伝子座の概略、並びにADAR2が媒介するRNA編集による変異型OTC mRNAの修正のためのアプローチ。(図17E)対応する処置成体spf^{ash}マウスにおけるin vivoでのA-G RNA編集効率(n=3又は4匹のマウス)。
30

【図18】図18A-Bは、in vitroでのtRNA抑制の評価及び最適化を示す：(図18A)オーカー及びオパール終止コドンに対する変型セリンサプレッサーtRNAの特異性(n=3独立した複製)。(図18B)3つの異なるaaRS：MbPyIRS、MmPyIRS及びAcKRS、並びに2若しくは4コピーのピロリジル-tRNA、又はセリンサプレッサーtRNA(すべてAAVベクターを使用して送達される)を使用するオーカー終止コドン抑制効率。MbPyIRS、MmPyIRS：1mM N-Boc-L-リシン；AcKRS：1又は10mM N-アセチル-L-リシン(n=3独立した複製)。
40

【図19】図19A-Cは、in vitroでのADAR2が媒介する部位特異的RNA編集の評価及び最適化を示す：(図19A)GFP発現は、adRNA/radRNAがオーカー終止コドン中の2つのアデノシンに対応する2つのミスマッチを有する場合に回復する。単一ミスマッチの存在は、アンバー又はオパール終止コドンの形成を生じる(n=3独立した複製)。(図19B)使用したadRNA設計のパネル。(図19C)adRNA設計1を使用したadRNAアンチセンス領域の最適化：長さ及びADAR2リクルート領域からの距離を体系的に変化させ、Sangerピーク高さの比G/(A+G)として編集効率を計算した(n=3独立した複製)。
50

【図20】図20A-Cは、サプレッサーtRNAを介したジストロフィンmRNAのin vivoターゲティングを示す：(図20A)AAV8-二重-セリン-オーカー-tRNAで処置したmdxマウスにおける、経時的なジストロフィン発現の漸進的に増加する回復。(図20B)AAV8-二重-ピロリシン-オーカー-tRNA-MbPyIRSで処置したmdxマウスにおけるUAA誘導性nNOS局在。(図20C)ジストロフィンについてのウエスタンプロットは、セリンtRNA オーカー、ピロリジル-tRNAオーカーで処置しUAAを投与したmdxマウス、並びにCas9/gRNAで処置したサンプルにおけるジストロフィン発現の部分的回復を示す。

【図21】図21A-Dは、ジストロフィン及びOTC mRNAのin vitro及びin vivoでの編集を示す：(図21A)HEK 293T細胞において発現されたmdxジストロフィンmRNAの断片におけるオーカー終止コドン(TAA TGG)の12.7%の編集を示す代表的なSanger配列決定プロット(NGSを使用して定量)。(図21B)処置mdxマウスのin vivoでのRNA編集解析の代表的な例(NGSを使用して定量)。(図21C)HEK 293T細胞において発現されたspf^{ash} OTC mRNAの断片における点突然変異の29.7%の修正を示す代表的なSanger配列決定プロット(NGSを使用して定量)。(図21D)処置spf^{ash}マウスのin vivoでのRNA編集解析の代表的な例(NGSを使用して定量)。

【図22】図22A-Bは、ADAR2-E488Qのin vitroでの編集効率を示す。ADAR2-E488Qにより、以下のin vitro編集におけるADAR2よりも高い効率が可能となる：(図22A)HEK293T細胞において発現されたspf^{ash} OTC mRNAの断片(n=3独立した複製)(p値0.037)、及び(図22B)HEK293T細胞において発現されたmdxジストロフィンmRNAの断片(n=3独立した複製)(それぞれp値0.048、0.012)。効率は、Sangerピーク高さの比G/(A+G)として計算した。

【図23-1】図23A-Dは、(図23A)ADAR1又はADAR2とのMCP又はN22融合物、(図23B)adRNAによるAPOBECのリクルート、(図23C)より一般的なadRNA構築、並びに(図23D)折りたたみ後のv2 adRNA骨格の構造、の概略を示す。

【図23-2】図23-1の続きである。

【図24】図24A-Bは、以下の最適な実施形態の概略を示す：(図24A)内因性ADAR2を、高い内因性ADAR2を有する組織、例えば脳、肺及び脾臓において、本明細書に開示の方法で使用し得る。(図24B)ADAR1及び/又はADAR2レベルは、低レベルの内因性ADAR1及びADAR2を有する組織で増加し得る。左から時計回りに、(1)adRNA及びADAR2の送達は高レベルのRNA編集をもたらし、(2)adRNA単独の送達は、低レベルの内因性ADAR1及びADAR2により、ほとんど又はまったく編集をもたらさない可能性が高く、(3)IFNで細胞を処理すると、ADAR1(p150)レベルが増加するが、adRNAの非存在下でRNA標的を編集することはほとんどない可能性があり、(4)adRNAを添加したIFNでの細胞の処理はADAR1(p150)のレベルの上昇につながり、adRNAの存在下では、高レベルの標的RNA編集につながる可能性があり、(5)adRNA及びADAR2を添加したIFNでの細胞の処理により、ADAR1の発現レベルが高くなり、RNA編集のレベルが高くなる。

【図25】図25は、UAAからUAGへの変換率を示す。UAAは、ADAR2に基づく編集によりUAGへと変換され、UAG終止コドンを標的とするサプレッサーtRNAの添加は、GFP発現の部分的な回復を導いた。

【図26】図26は、筋ジストロフィーのmdxマウスモデルにおけるin vivoでのNA編集の結果を示す。

【図27】図27は、無差別な(promiscuous)C末端ADAR2の使用から生じた編集された配列を示す。

【図28】図28は、安定化骨格の編集効率を示す。

【図29】図29は、单一対二重ADAR2リクルートドメインによる編集されたmRNAの画分と対応する配列を示す。

【図30】図30は、種々のMCP-ADAR骨格による編集されたmRNAの画分を示す。

【図31】図31は、OTCのオルタナティブスプライスバリアントを示し、Hodges, P. E. & Rosenberg, L. E.から取得した。spf^{ash}マウス：オルニチントランスカルバミラーゼ遺伝子におけるミスセンス変異もまた異常なmRNAスプライシングを生じる(Proc. Natl. Ac

ad. Sci. U. S. A. 86, 4142-4146 (1989))。

【発明を実施するための形態】

【0102】

別途定義されない限り、本明細書で使用される技術用語及び科学用語は全て、本発明が属する技術分野の技術者により通常理解されるものと同じ意味を有する。本明細書で提供されるすべてのヌクレオチド配列は、5'から3'方向に示される。本明細書に記載されるものと類似又は同等の任意の方法及び材料を本発明の実施又は試験に使用することができるが、好ましい方法、デバイス及び材料をここで説明する。本明細書で引用されたすべての技術刊行物及び特許刊行物は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。本明細書のいかなるものも、本発明が先行発明のおかげでそのような開示に先行する権利がないことを認めるものと解釈されるべきではない。

10

【0103】

本技術の実施は、特に明記しない限り、当業者の範囲内にある組織培養、免疫学、分子生物学、微生物学、細胞生物学及び組換えDNAの慣用的な技術を使用する。例えば、以下を参照のこと：Sambrook and Russell編 (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition; Ausubel et al.編のシリーズ (2007) Current Protocols in Molecular Biology; Methods in Enzymologyのシリーズ (Academic Press, Inc., N.Y.); MacPherson et al. (1991) PCR 1: A Practical Approach (IRL Press at Oxford University Press); MacPherson et al. (1995) PCR 2: A Practical Approach; Harlow and Lane編 (1999) Antibodies, A Laboratory Manual; Freshney (2005) Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 5th edition; Gait編 (1984) Oligonucleotide Synthesis; 米国特許第4,683,195号; Hames and Higgins 編 (1984) Nucleic Acid Hybridization; Anderson (1999) Nucleic Acid Hybridization; Hames and Higgins編 (1984) Transcription and Translation; Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press (1986)); Perbal (1984) A Practical Guide to Molecular Cloning; Miller and Calos編 (1987) Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Cold Spring Harbor Laboratory); Makrides編 (2003) Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells; Mayer and Walker編 (1987) Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Academic Press, London); and Herzenberg et al.編 (1996) Weir's Handbook of Experimental Immunology。

20

【0104】

本明細書での説明に使用される用語は、具体的な実施形態を説明するためだけのものであり、本発明を制限するものとは意図されない。本明細書で言及される刊行物、特許出願、特許及びその他の参考文献は全て、その全内容にわたって参照により組み込まれる。

30

【0105】

数値による指定、例えば範囲を含むpH、温度、時間、濃度、及び分子量は全て、必要に応じて増加分1.0若しくは0.1で、又は代わりに+/-15%、若しくは代わりに10%、若しくは代わりに5%、若しくは代わりに2%の変動で(+)又は(-)変動する近似値である。必ずしも明確に記述されるわけではないが、数値による指定は全て「約」という語に先行されることが理解されるべきである。必ずしも明確に記述されるわけではないが、本明細書に記載される試薬は例示的なものに過ぎず、このようなものの同等物が当技術分野で既知であることも理解されるべきである。

40

【0106】

文脈が別途示さない限り、本明細書に記載される本発明の各種特徴が、任意の組合せで使用可能であることが特に意図される。さらに本開示は、一部の実施形態において、本明細書で示される任意の特徴又は特徴の組合せが、除外されうる又は省かれうることも企図している。例示のため、複合体が成分A、B及びCを含むと明細書が記述する場合、A、B若しくはCのいずれか、又はそれらの組合せが、単独で又は任意の組合せで省かれ放棄されることが特に意図される。

【0107】

別途明確に示されない限り、指定される実施形態、特徴、及び語は全て、記述される実

50

施形態、特徴、又は語、及びその生物学的同等物の両方を含むことを意図する。

【0108】

定義

本明細書及び特許請求の範囲で使用される場合、文脈が別途明確に示さない限り、単数形「a」、「an」及び「the」は複数の参照を含む。例えば、「ポリペプチド」という用語は、複数のポリペプチド、例えばその混合物などを含む。

【0109】

「約」という語は、本明細書で使用される場合、量又は濃度などの測定可能な値に言及する場合、指定される量から20%、10%、5%、1%、0.5%、又はさらには0.1%の変動を包含することが意図される。

10

【0110】

本明細書で使用される場合、「～を含む」という語は、組成物及び方法が、記述される要素を含むがその他の要素を除外しないことを意味することを意図される。組成物及び方法を定義するために使用される場合、「～から本質的になる」は、意図する使用のために、組み合わせにとって本質的に重要な他の要素を除外することを意味する。したがって、本明細書で定義される要素から本質的になる組成物は、単離及び精製方法からの微量汚染物質、並びにリン酸緩衝生理食塩水、防腐剤などの薬学的に許容される担体を除外しない。「～からなる」は、その他の成分の微量元素及び本発明の組成物を投与するための実質的な方法ステップを超えるものを除くことを意味するものとする。これらの移行語それにより定義される実施形態は、本発明の範囲内である。

20

【0111】

診断又は処置の「対象」は、細胞、又は動物、例えば哺乳動物など、又はヒトである。診断又は処置の対象となる非ヒト動物は、感染症又は動物モデル、例えば、シミアン、ネズミ類、例えばラット、マウスなど、チンチラ、イヌ類、例えばイヌ、ウサギ類、例えばウサギ、家畜、スポーツ動物、並びにペットである。

【0112】

「タンパク質」、「ペプチド」及び「ポリペプチド」という語は、互換可能に、かつアミノ酸、アミノ酸アナログ又はペプチド模倣物の2つ以上のサブユニットの化合物を指すための最も広い意味で使用される。サブユニットはペプチド結合により連結されうる。別の実施形態において、サブユニットはその他の結合、例えば、エステル、エーテルなどにより連結されうる。タンパク質又はペプチドはアミノ酸少なくとも2つを含まなければならず、タンパク質又はペプチド配列を構成しうるアミノ酸の最大数に課される制限はない。本明細書で使用される場合、「アミノ酸」という語は、グリシン、並びにD及びL両方の光学異性体、アミノ酸アナログ並びにペプチド模倣物を含む、天然及び/又は非天然又は合成アミノ酸のいずれかを指す。本明細書で使用する場合、「融合タンパク質」という用語は、一般に各ドメインが異なる機能を果たす、複数の天然に存在するタンパク質又は組換えにより產生されたタンパク質からのドメインで構成されるタンパク質を指す。これに關して、「リンカー」という用語は、これらのドメインと一緒に連結するために使用されるタンパク質断片を指し、任意的に、融合タンパク質ドメインのコンフォメーションを維持し、及び/又はそれぞれの機能を損なう可能性のある融合されたタンパク質ドメイン間の好ましくない相互作用を防ぐためのものである。

30

【0113】

用語「ポリヌクレオチド」及び「オリゴヌクレオチド」は互換的に使用され、デオキシリボヌクレオチド若しくはリボヌクレオチド又はその類似体のいずれかの任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指す。ポリヌクレオチドは、任意の3次元構造を有することができ、既知又は未知の任意の機能を実行し得る。以下はポリヌクレオチドの非限定的な例である：遺伝子又は遺伝子断片（例えば、プローブ、プライマー、EST又はSAGEタグなど）、エキソン、インtron、メッセンジャーRNA(mRNA)、トランスクアーナ、リボソームRNA、RNAI、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離されたDNA、任意の配列の単離されたRNA、核酸

40

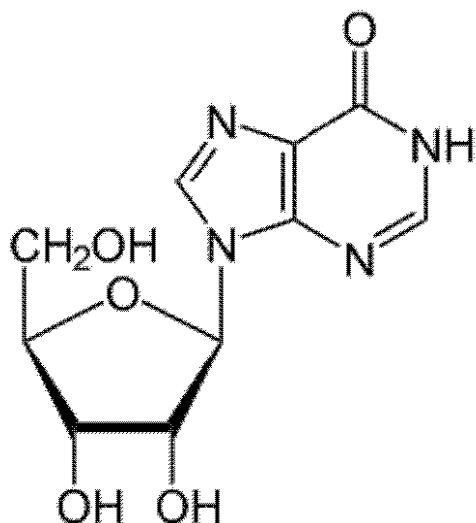
50

プローブ及びプライマー。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチド及びヌクレオチド類似体などの修飾ヌクレオチドを含むことができる。存在する場合、ヌクレオチド構造への修飾は、ポリヌクレオチドのアセンブリの前又は後に付与され得る。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分によって中断されてもよい。ポリヌクレオチドは、標識成分との結合などにより、重合後にさらに修飾され得る。この用語はまた、二本鎖及び一本鎖の分子の両方を指す。特に指定又は必要がない限り、ポリヌクレオチドである本発明の実施形態は、二本鎖形態と、二本鎖形態を構成することが知られている又は予測される2つの相補的一本鎖形態の各々の両方を包含する。

【0114】

ポリヌクレオチドは、4つのヌクレオチド塩基の特定の配列から構成される：アデニン(A)、シトシン(C)、グアニン(G)、チミン(T)、ポリヌクレオチドがRNAの場合にはチミンの代わりにウラシル(U)。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、ヒポキサンチンが-N9-グリコシド結合を介してリボフラノースに結合して形成され、以下の化学構造をもたらすヌクレオシドであるイノシン(I)など、1つ以上の他のヌクレオチド塩基を含むことができる：

【化1】



10

20

30

イノシンは、翻訳機構によってグアニン(G)として読み取られる。「ポリヌクレオチド配列」という用語は、ポリヌクレオチド分子のアルファベット表記である。このアルファベット表記は、中央処理装置を備えたコンピュータのデータベースに入力でき、機能ゲノミクスやホモロジー検索などのバイオインフォマティクス用途に使用できる。

【0115】

本明細書で使用される場合、「発現」とは、ポリヌクレオチドがmRNAに転写されるプロセス、及び/又は転写されたmRNAが次いでペプチド、ポリペプチド、若しくはタンパク質に翻訳されるプロセスを指す。ポリヌクレオチドがゲノムDNA由来である場合、発現は真核細胞におけるmRNAのスプライシングを含みうる。

【0116】

「同等物」又は「生物学的同等物」という語は、特定の分子、生物学的又は細胞物質に言及する場合に互換可能に使用され、それらが最小の相同性を有しつつ望ましい構造又は機能性を依然として維持していることを意図する。

【0117】

ポリヌクレオチドに適用される場合の「コードする」という語は、その天然の状況で、又は当業者に周知の方法により操作された場合に転写及び/又は翻訳されてポリペプチド及び/又はその断片のmRNAを産生することができる場合にそのポリペプチドを「コードす

40

50

る」と言われるポリヌクレオチドを指す。アンチセンス鎖はこのような核酸の相補体であり、コード配列はそこから推測されうる。

【0118】

本明細書で使用される場合、「機能性（機能的）」という語は、任意の分子、生物学的又は細胞物質を修飾するのに、これらが特定の、指定される効果を実現することを意図するため使用されうる。

【0119】

本明細書で使用される場合、「処置する」、「処置」などの用語は、所望の薬理学的及び/又は生理学的効果を得ることを意味するために本明細書で使用される。効果は、疾患、障害若しくは状態又はその兆候若しくは症状を完全又は部分的に予防するという点で予防的であり、かつ/あるいは障害及び/又は障害に起因する有害作用の部分的又は完全な治癒の観点で治療的であり得る。

10

【0120】

「投与」は、治療の過程を通して連続的又は断続的に一用量で達成することができる。最も効果的な投与手段及び投与量を決定する方法は、当業者に知られており、治療に使用される組成物、治療の目的、処置される標的細胞、及び処置される対象によって変動し得る。単回又は複数回の投与は、処置する医師によって選択された用量レベル及びパターンで実行され得る。適切な剤形及び薬剤を投与する方法が当技術分野で既知である。投与経路も決定することができ、最も効果的な投与経路を決定する方法は当業者に公知であり、処置に使用される組成物、処置の目的、処置される対象の健康状態又は疾患のステージ、並びに標的細胞又は組織によって異なり得る。投与経路の非限定的な例には、経口投与、経鼻投与、注射、及び局所適用が挙げられる。

20

【0121】

「有効量」という用語は、所望の効果を達成するのに十分な量を指す。治療的又は予防的適用の文脈において、有効量は、問題の状態の種類及び重症度、並びに一般的な健康、年齢、性別、体重、及び医薬組成物に対する抵抗性などの個々の対象の特徴に依存する。免疫原性組成物の文脈において、いくつかの実施形態では、有効量は、病原体に対する防御応答をもたらすのに十分な量である。他の実施形態では、免疫原性組成物の有効量は、抗原に対する抗体生成をもたらすのに十分な量である。いくつかの実施形態において、有効量は、それを必要とする対象に受動免疫を付与するために必要な量である。免疫原性組成物に関して、いくつかの実施形態では、有効量は、上記の要因に加えて、意図する用途、特定の抗原化合物の免疫原性の程度、及び対象の免疫系の健康/反応性に依存し得る。当業者は、これらの及び他の要因に応じて適切な量を決定することができるだろう。

30

【0122】

*in vitro*での適用の場合、いくつかの実施形態では、有効量は、問題の適用のサイズと性質に依存するだろう。また、*in vitro*標的の性質及び感受性、使用中の方法にも依存し得る。当業者は、これら及び他の考慮事項に基づいて有効量を決定することができるだろう。有効量は、実施形態に応じて、組成物の1回以上の投与を含み得る。

【0123】

「Cas9」という用語は、この名前で呼ばれるCRISPR関連エンドヌクレアーゼ（例えば、UniProtKB G3ECR1（CAS9_STRTR）、並びにエンドヌクレアーゼ活性を欠くデッド型Cas9又はdCas9（例えば、RuvC及びHNHドメインの両方に変異がある）を指す。「Cas9」という用語は、他の大きなCas9タンパク質を含むがこれに限定されず、少なくとも約60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、又は99%の同一性を有する参照Cas9の同等物をさらに指し得る。いくつかの実施形態において、Cas9はカンピロバクター・ジェジュニ（*Campylobacter jejuni*）又は1000アミノ酸以下の長さの別のCas9オーソログに由来する。

40

【0124】

「ベクター」という語は、複製又は発現され得る別の細胞に外来遺伝物質を人工的に運ぶために使用されるポリヌクレオチド（通常はDNA）を指す。非限定的なベクターの例には、プラスミド、ウイルスベクター、コスミド、及び人工染色体が含まれる。そのような

50

ベクターは、細菌及びウイルス供給源を含むさまざまな供給源に由来し得る。プラスミドの非限定的な例示的ウイルス源は、アデノ随伴ウイルスである。

【0125】

本明細書で使用される場合、「組換え発現系」という語は、組換えにより形成される特定の遺伝物質の発現のための遺伝構築物(1若しくは複数)を指す。これに関して「構築物」という用語は、本明細書で定義する「ベクター」という用語と互換的である。

【0126】

「アデノ随伴ウイルス」又は「AAV」という語は、本明細書で使用される場合、この名前に関連し、パルボウイルス科(Parvoviridae)のデpendoparvovirus)属に属するウイルスのクラスメンバーを指す。このウイルスの複数の血清型が遺伝子送達に適していることが知られており、既知の血清型は全て各種組織型由來の細胞に感染させることができる。順次付番される少なくとも11種が先行技術で開示されている。本明細書で開示される目的において有用な、非限定的な例示的血清型には、11種の血清型のいずれか、例えば、AAV2及びAAV8が含まれる。

10

【0127】

本明細書で使用される場合、「レンチウイルス」という用語は、この名前に関連し、レトロウイルス科、レンチウイルス属に属するウイルスのクラスのメンバーを指す。いくつかのレンチウイルスは疾患を引き起こすことが知られているが、他のレンチウイルスは遺伝子送達に適していることが知られている。例えば、Tomas et al. (2013) *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology: "Gene Therapy - Tools and Potential Applications," ISBN 978-953-51-1014-9, DOI: 10.5772/52534*を参照。

20

【0128】

本明細書で使用する場合、タンパク質の発現に関する「回復」という用語は、以前のタンパク質発現が変異により切断された場合の全長タンパク質の発現を確立する能力を指す。

【0129】

本明細書で使用される場合、「変異」という用語は、タンパク質のコンセンサス配列と比較したタンパク質をコードする核酸配列の変化を指す。「ミスセンス」変異により、あるコドンが別のコドンに置換される。「ナンセンス」変異は、特定のアミノ酸をコードするコドンから終止コドンにコドンを変更する。ナンセンス変異はしばしばタンパク質の切断された翻訳を生じる。「サイレント」変異とは、得られるタンパク質に影響を与えないものである。本明細書で使用される「点突然変異」という用語は、遺伝子配列内の1ヌクレオチドのみに影響を及ぼす変異を指す。「スプライス部位変異」とは、mRNA前駆体(イントロンを除去するプロセシングの前)に存在する変異であり、スプライス部位の誤った描写によるタンパク質の誤翻訳としばしば切断を生じる。

30

【0130】

「メッセンジャーRNA」又は「mRNA」は、DNAから転写され、続いてイントロンとして知られる非コード部分を除去するためにプロセシングされる核酸分子である。得られたmRNAは核(又はDNAが存在する別の場所)から輸送され、タンパク質に翻訳される。「mRNA前駆体(pre-mRNA)」という用語は、非コード部分を除去するためのプロセシングの前の鎖を指す。

40

【0131】

「トランスクアーリボ核酸」又は「tRNA」は、mRNAをタンパク質に翻訳するのを助ける核酸分子である。tRNAは、3つのヘアピンループを含む独特的の折りたたみ構造を有しており、これらのループの1つは、アンチコドンをコードする「ステム」部分を含む。アンチコドンは、mRNA上の対応するコドンを認識する。各tRNAには、mRNAコドンに対応するアミノ酸「が装填(charged with)」される。この「装填(charging)」は、tRNAシンテターゼ酵素によって達成される。アンチコドンに対応するコドンがtRNAで認識されると、tRNAはそれが装填しているアミノ酸を成長中のアミノ酸鎖に移動して、ポリペプチド又はタンパク質を形成する。内因性tRNAは、内因性tRNAシンテターゼによって装填され得る。した

50

がって、内因性tRNAには、典型的には、標準アミノ酸が装填される。外部供与源に由来する直交tRNAには、対応する直交tRNAシンテターゼが必要である。このような直交tRNAには、標準アミノ酸と非標準アミノ酸の両方が装填され得る。いくつかの実施形態において、tRNAが装填しているアミノ酸は、*in vivo*での検出を可能にするために検出可能に標識されていてもよい。標識のための技術は当技術分野で公知であり、限定されるものではないが、クリックケミストリー（非天然アミノ酸を含むアジド/アルキンが直交tRNA/シンテターゼの対によって追加され、したがってフルオロフォア又は他のそのような分子を含むアルキン/アジドを使用して検出できる）が含まれる。

【0132】

「終止コドン」という用語は、翻訳の終結を知らせるメッセンジャーRNA内の3つのヌクレオチドの連続した配列を意味する。非限定的な例には、RNAにはUAG、UAA、UGA、及びDNAにはTAG、TAA又はTGAが含まれる。特に断りのない限り、この用語には、未成熟終止コドンを導入し、結果として生じるタンパク質を異常に短くする、DNA又はRNA内のナンセンス変異も含まれる。様々な終止コドンに対応するtRNAは、アンバー（UAG）、オーカー（UAA）、及びオパール（UGA）という特定の名前で知られている。10

【0133】

「標準アミノ酸」とは、以下の表に、3文字の略語、1文字の略語、構造、及び対応するコドンを示す、ヒト体内に天然に見られる20のアミノ酸を指す：

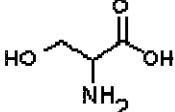
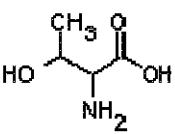
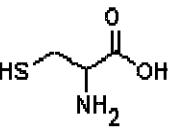
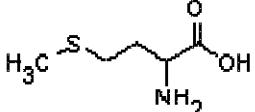
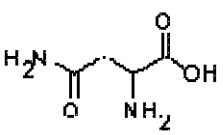
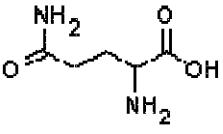
非極性脂肪族残基

グリシン	Gly	G		GGU GGC GGA GGG	
アラニン	Ala	A		GCU GCC GCA GCG	10
バリン	Val	V		GUU GUC GUA GUG	
ロイシン	Leu	L		UUA UUG CUU CUC CUA CUG	20
イソロイシン	Ile	I		AUU AUC AUA	
プロリン	Pro	P		CCU CCC CCA CCG	

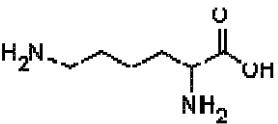
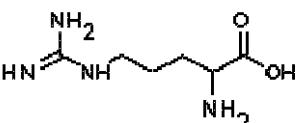
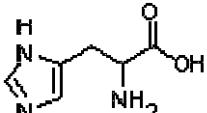
芳香族残基

フェニルアラニン	Phe	F		UUU UUC	30
チロシン	Tyr	Y		UAU UAC	
トリプトファン	Trp	W		UGG	40

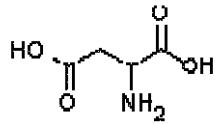
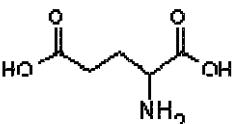
極性非電荷残基

セリン	Ser	S		UCU AGC	
スレオニン	Thr	T		ACU ACC ACA ACG	10
システイン	Cys	C		UGU UGC	
メチオニン	Met	M		AUG	20
アスパラギン	Asn	N		AAU AAC	
グルタミン	Gln	Q		CAA CAG	30

正電荷残基

リジン	Lys	K		AAA AAG	
アルギニン	Arg	R		CGU CGC CGA CGG AGA AGG	10
ヒスチジン	His	H		CAU CAC	

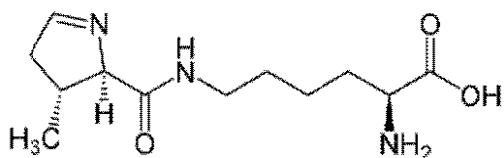
負電荷残基

アスパラギン 酸	Asp	D		GAU GAC	20
グルタミン酸	Glu	E		GAA GAG	

【0134】

「非標準アミノ酸」という用語は、典型的には標準アミノ酸の化学合成又は修飾（例えばアミノ酸類似体）によって生成される、このグループ外の合成又は修飾アミノ酸を指す。本開示は、本明細書に開示される方法及びベクターのいくつかにおいてタンパク質産生非標準アミノ酸を使用する。非限定的な非標準アミノ酸の例はピロリシン（Pyl又はO）であり、その化学構造を以下に示す：

【化2】



30

40

イノシン（I）は、tRNAで一般的に見られる別の非標準アミノ酸の例であり、「ウォブル（wobble）塩基対合」による適切な翻訳に必須である。イノシンの構造は上に提供される。

【0135】

本明細書で使用される場合、「ADAR」という用語は、RNA配列においてアデノシン（A）をイノシン（I）に変換することができるアデノシンデアミナーゼを指す。ADAR1及びADAR2は、in vivoでのmRNA編集に関するADARの2つの典型的な種である。ADAR1の非限定的な例示的配列は、以下の参考番号の下で見つけることができる：HGNC: 225；Entrez Gene: 103；Ensembl: ENSG 00000160710；OMIM: 146920；UniProtKB: P55265；及びGeneCards: GC01M154554、並びにその生物学的同等物。ADAR2の非限定的な例示的配列は、以下の参考

50

番号の下で見つけることができる：HGNC: 226；Entrez Gene: 104；Ensembl: ENSG00000197381；OMIM: 601218；UniProtKB: P78563；及びGeneCards: GC21P045073、並びにその生物学的同等物。触媒ドメインのさらなる非限定的な例示的配列は本明細書中上に提供されている。部位特異的ADAR編集を指示するために使用されるフォワード及びリバースRNAは、それぞれ「adRNA」及び「radRNA」として知られる。ADAR1及びADAR2の触媒ドメインは、本明細書中以下に示す配列に含まれる。

【0136】

ADAR1触媒ドメイン：

KAERMGFTEVTPVTGASLRRTM LLLSRSPEAQPKTLPLTGSTFHDQI AMLSHRCFTLTNSFQPSLLGRK I LAA I IMKKD
SEDMGVVSLGTGNRCVKGDLSLKGTVNDCHAE I ISRRGFIRFLYSELMKYNSQTAKDS I FEPAKGGEKLQ I KKTVSF
HLY I STAPCGDGALFDKSCSDRAMESTESRHYPVFENPKQGKLRTKVENGE GT I PVESSD I VPTWDG I RLGERLRTMSCS
DK I LRWNVLGLQGALLTHFLQP I YLKSVTGLYLF SQGHLTRA I CCRVTRDGSAFEDGLRHPF I VNHPKVGRVS I YDSKRQ
SGTKKETSVNWCLADGYDLE I LDGTRGTVDGPRNELSRVSKKN I FLLFKKLCFSFRYRRDLLRLSYGEAKKAARDYETAKN
YFKKGLKDMGYGNW I SKPQEEKNFYLCPV

10

【0137】

ADAR2触媒ドメイン：

QLHLPQVLADAVSRVLGKFGDLTDNFSSPHARRKVLAGVVMTTGTDVKDAKV I SVSTGTC I NGEYMSDRGLALNDCHA
E I ISRRSLLRFLYTQLELYLNNKDDQKRS I FQKSERGGFRLKENVQFHLY I STSPCGDAR I FSPHEP I LEEPADRHPNRK
ARGQLRTK I ESGEGT I PVRSNAS I QTWDGVLQGERLLTMSCSDK I ARWNVVG I QGSLLS I FVEP I YFSS I I LGSLYHGDH
LSRAMYQR I SN I EDLPPLYTLNKPLL SG I SNAEARQPGKAPNFSVNWTGDSA I EV I NATTGKDELGRASRLCKHALYCR
WMRVHGKVPSHLLRSK I TKPNVYHESKLAKEYQAAKARLFTAF I KAGLGAWVEKPTEQDQFSLT

20

【0138】

ADARの二本鎖RNA結合ドメイン(dsRBD)は、本明細書中以下に示す配列に含まれる。

【0139】

ADAR dsRBD：

MD I EDEENMSSSTDVKENRNLDNVSPKDGSTPGPEGSQLSNGGGGGRKRPLEEGSNGHSKYRLKKRKTPGPVLPK
NALMQLNE I KPGHQYTLLSQTGPVHAPLFVMSVEVNGQVFEGSGPTKKAKLHAAEKALRSFVQFPNASEAHLAMGRTLS
VNTDFTSQADFPDTLFNGFETPDKAEPFYVGSGNGDDSFSSSGDLSLSASPVPASLAQPPLPVLPPFPPPSGKNPVM I L
NELRPLKYDFLSESGESHAKSFVMSVVVDGQFFEGSGRNKKLAKARAQSAQALAA I FN

30

【0140】

ADAR及び/又はその様々なドメインの配列にさらなる変異を加えることができることが理解される。例えば、出願人は、ADAR1及びADAR2の両方のE488Q及びE1008Q変異体、並びにC末端の欠失に起因するADAR2の「無差別な(promiscuous)」バリアントを生成した。この「無差別な」バリアントは、AからGへの変換を示す標的配列に近い複数のAで編集された読み取りで乱雑性(promiscuity)を示したため(2つの異なる遺伝子座で検証)、そのように知られている。このバリアントの配列を以下に示す。

【0141】

「無差別な(promiscuous)」ADAR2バリアント：

MLRSFVQFPNASEAHLAMGRTLSVNTDFTSQADFPDTLFNGFETPDKAEPFYVGSGNGDDSFSSSGDLSLSASPVPASL
AQPPLPVLPPFPPPSGKNPVM I LNELRPLKYDFLSESGESHAKSFVMSVVVDGQFFEGSGRNKKLAKARAQSAQALAA I FN
NLHLDQTPSRQP I PSEGLQLHLPQVLADAVSRVLGKFGDLTDNFSSPHARRKVLAGVVMTTGTDVKDAKV I SVSTGTC
I NGEYMSDRGLALNDCHAE I ISRRSLLRFLYTQLELYLNNKDDQKRS I FQKSERGGFRLKENVQFHLY I STSPCGDAR I F
SPHEP I LEEPADRHPNRKARGQLRTK I ESGEGT I PVRSNAS I QTWDGVLQGERLLTMSCSDK I ARWNVVG I QGSLLS I FV
EPIYFSS I I LGSLYHGDHLSRAMYQR I SN I EDLPPLYTLNKPLL SG I SNAEARQPGKAPNFSVNWTGDSA I EV I NATTG
KDELGRASRLCKHALYCRWMRVHGKVPSHLLRSK I TKPNVYHESKLAKEYQAAKARLFTAF I KAGLGAWVEKPTEQDQF
SLTP*

40

理論に拘束されるものではないが、ADAR1におけるC末端欠失は同じ又は同様の効果を生じ得る。

【0142】

本明細書で使用される場合、「欠損」という用語は、特定の作用剤の通常より低い(生

50

理学的に許容される) レベルを指す。タンパク質の文脈では、欠損とは、全長タンパク質の正常レベルよりも低いことを指す。

【0143】

本明細書で使用される場合、「ジストロフィン」という用語は、その名前に対応し、遺伝子Dmdによってコードされるタンパク質を指す。その非限定的な例は、UniProt参照番号P11532(ヒト)及びP11531(マウス)に見られる。

【0144】

本明細書で使用される場合、「オルニチントランスカルバミラーゼ」又は「OTC」という用語は、その名前に対応し、遺伝子Otcによってコードされるタンパク質を指す。その非限定的な例は、UniProt参照番号P00480(ヒト)及びP11725(マウス)に見られる。OTC欠損症は、血中に高濃度のアンモニアを生じるX連鎖遺伝病である。いくつかの場合には、OTC欠損症は、エキソン4のドナースプライス部位のG Aスプライス部位変異によって引き起こされ、mRNA前駆体(pre-mRNA)の誤ったスプライシングが生じる。この変異により、伸長されたタンパク質又は点突然変異を伴うタンパク質が形成される。OTCタンパク質レベルは15~20倍減少する。図31(Hodges, P. E. & Rosenberg, L. E. The spfash mouse: a missense mutation in the ornithine transcarbamylase gene also causes aberrant mRNA splicing. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86, 4142-4146 (1989)から取得)は、生成されるオルタナティブ形態を示す。以下にその配列を示す:

10

OTC pre-mRNA (野生型):

.....CTCACAGACACCGCTCGTTTGTAAAAC~~T~~TTCTTC.....

20

OTC pre-mRNA (変異型):

.....CTCACAGACACCGCTAGTTTGTAAAAC~~T~~TTCTTC.....

OTC mRNA (不正確にスプライシング, 変異型):

.....CTCACAGACACCGCTA~~G~~TTTGTAAAAC~~T~~TTCTTC.....

OTC mRNA (正確にスプライシング, 変異型):

.....CTCACAGACACCGCTATGTCTTATCTAGCATGACA.....

OTC mRNA (正確にスプライシング, 野生型):

.....CTCACAGACACCGCTCGTTTATCTAGCATGACA.....

30

上に示すように、正確なスプライスバリエントは、変異が存在する場合に生成され得るが、そのような生成はミスセンス変異を生じ、これもまたOTC欠損症に寄与し得る。

【0145】

単独又は「モチーフ」と組み合わせて使用される用語「ヘアピン」、「ヘアピンループ」、「ステムループ」、及び/又は「ループ」は、オリゴヌクレオチドとの関連で使用され、反対方向の塩基対で読み取られたときに相補的であり、ヘアピン又はループに似た立体構造を有する領域を形成する一本鎖内の配列である場合に一本鎖オリゴヌクレオチドで形成される構造を指す。

【0146】

本明細書で使用される場合、「ドメイン」という用語は、タンパク質又はポリペプチドの特定の領域を指し、特定の機能に関連している。例えば、「RNAヘアピンモチーフと会合するドメイン」とは、1つ以上のRNAヘアピンに結合するタンパク質のドメインを指す。この結合は、任意的に特定のヘアピンに特異的なものであり得る。例えば、M2バクテリオファージコートタンパク質(MCP)は、MS2ステムループを含むがこれに限定されない特定のステムループ構造に特異的に結合することができる。例えば、Peabody, D.S., "The RNA binding site of bacteriophage MS2 coat protein." EMBO J. 12(2):595-600 (1993); Corrigan and Chubb, "Biophysical Methods in Cell Biology" Methods in Cell Biology (2015)を参照。同様に、本明細書で「N22ペプチド」と呼ばれるN22は、BoxBステムループを含むがこれに限定されない特定のステムループ構造に特異的に結合することができる。例えば、Cilley and Williamson, "Analysis of bacteriophage N protein and peptide binding to boxB RNA using polyacrylamide gel coelectrophoresis (PACE

40

50

).” RNA 3(1):57-67 (1997) を参照。MCP 及び MS2 ステムループと N22 ペプチド及び BoxB ループの両方の配列は、それぞれ ADAR (MCP、N22 ペプチド)との融合タンパク質及び adRNA (MS2 ステムループ、BoxB ループ)での使用の文脈で本明細書中上に提供される。

【 0 1 4 7 】

本明細書で使用される場合、「APOBEC」という用語は、mRNA 編集 (C から U への変換の触媒) に関する進化的に保存されたシチジンデアミナーゼのファミリー内に入る任意のタンパク質、及びその同等物を指す。いくつかの様態では、APOBEC という用語は、APOBEC1、APOBEC2、APOBEC3A、APOBEC3B、APOBEC3C、APOBEC3E、APOBEC3F、APOBEC3G、APOBEC3H、APOBEC4、又はそれらの各々の同等物のいずれか 1 つを指す。1 つ以上の APOBEC ドメインを含む融合タンパク質の非限定的な例示的配列は、ADAR ドメインに融合されるか、又は RNA 編集系での使用に適するようとする代替ドメインに融合されて本明細書で提供される。
この目的のために、APOBEC は ADAR と同等と見なすことができる。つまり、異なる変換による編集を触媒する。したがって、理論に拘束されるものではないが、出願人は、ADAR に基づく編集系で使用するために本明細書で企図されるすべての実施形態は、APOBEC に基づく RNA 編集系での使用に適合し得ると考える。

10

【 0 1 4 8 】

本明細書で使用する場合、「インターフェロン」という用語は、免疫応答に関連することが知られている一群のシグナル伝達タンパク質を指す。本出願の文脈では、対象のインターフェロンは、ADAR の発現の増強をもたらすものである。インターフェロン と ADAR1 の間の相関関係は周知であり、したがって、本開示は、内因性 ADAR1 発現を増加させる手段としてインターフェロン の使用を想定している。単離された又は組換えインターフェロン の商業的供給源には、Sigma-Aldrich、R&D Systems、Abcam、及び Thermo Fisher Scientific が挙げられるが、これらに限定されるものではない。あるいは、インターフェロン は、既知のベクター及び所定のタンパク質配列、例えば Q6QNB6 (ヒト IFNA) を使用して生成し得る。

20

【 0 1 4 9 】

明確な記述なしに、かつ別途意図されない限り、本開示がポリペプチド、タンパク質、ポリヌクレオチド又は抗体に関する場合、このようなものの同等物又は生物学的同等物は本開示の範囲内であることが意図されることが推測されるべきである。本明細書で使用される場合、「その生物学的同等物」という語は、参照タンパク質、抗体、ポリペプチド又は核酸に言及する場合、「その同等物」と同義であることを意図され、それらが最小の相同性を有しつつ望ましい構造又は機能性を依然として維持していることを意図する。本明細書で特に記述されない限り、本明細書で言及される任意のポリヌクレオチド、ポリペプチド又はタンパク質は、その同等物も含むことが企図される。例えば、同等物は少なくとも約 70% の相同性若しくは同一性、又は少なくとも 80% の相同性若しくは同一性、代わりに、又は少なくとも約 85%、又は代わりに少なくとも約 90%、又は代わりに少なくとも約 95%、又は代わりに 98% パーセントの相同性若しくは同一性を意図し、参照タンパク質、ポリペプチド又は核酸と実質的に同等の生物学的活性を示す。代わりに、ポリヌクレオチドに言及する場合、その同等物はストリンジェントな条件下で参照ポリヌクレオチド又はその相補体にハイブリダイズするポリヌクレオチドである。

30

【 0 1 5 0 】

出願者らは本明細書で、下記の遺伝子及びタンパク質の導入及び発現技術における使用のためのポリペプチド及び/又はポリヌクレオチド配列を提供している。必ずしも明確に記述されるわけではないが、本明細書で提供される配列は、発現産物、及び同じ生物学的特性を有するタンパク質を产生する実質的に同一の配列をもたらすために使用されうることが理解されるべきである。これらの「生物学的に同等の」又は「生物学的に活性な」ポリペプチドは、本明細書に記載される同等のポリヌクレオチドによりコードされる。これらは、デフォルト条件下で実行される配列同一性方法を使用して比較した場合に、参照ポリペプチドに対し少なくとも 60%、又は代わりに少なくとも 65%、又は代わりに少なくとも 70%、又は代わりに少なくとも 75%、又は代わりに少なくとも 80%、又は代わりに少な

40

50

くとも85%、又は代わりに少なくとも90%、又は代わりに少なくとも95%、又は代わりに少なくとも98%同一の一次アミノ酸配列を有しうる。特定のポリペプチド配列が、特定の実施形態の例として提供される。配列に対する、アミノ酸に対する、類似した電荷を有する代替のアミノ酸による改変。さらに、同等のポリヌクレオチドは、ストリンジェントな条件下で参照ポリヌクレオチド若しくはその相補体にハイブリダイズするポリヌクレオチドであり、又はポリペプチドに関しては、ストリンジェントな条件下で、ポリヌクレオチド若しくはその相補鎖をコードする参照にハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドである。代わりに、同等のポリペプチド又はタンパク質は、同等のポリヌクレオチドから発現されるポリペプチド又はタンパク質である。

【0151】

10

「ハイブリダイゼーション」は、1つ以上のポリヌクレオチドが反応して、ヌクレオチド残基の塩基間の水素結合を介して安定化した複合体を形成する反応を指す。水素結合は、Watson-Crick塩基対形成、Hoogstein結合によって、又は任意のその他の配列特異的様式で発生しうる。複合体は、二重鎖構造を形成する2本の鎖、複数鎖複合体を形成する3本以上の鎖、単一の自己ハイブリダイズした鎖、又はこれらのうちの任意の組合せを含みうる。ハイブリダイゼーション反応は、PC反応の開始、又はリボザイムによるポリヌクレオチドの酵素的切断などのより広範なプロセスにおけるステップを構成しうる。

【0152】

20

ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の例には、インキュベーション温度約25～約37、ハイブリダイゼーション緩衝液濃度約6x SSC～約10x SSC、ホルムアミド濃度約0%～約25%、及び洗浄溶液約4x SSC～約8x SSCが含まれる。中度のハイブリダイゼーション条件の例には、インキュベーション温度約40～約50、緩衝液濃度約9x SSC～約2x SSC、ホルムアミド濃度約30%～約50%、及び洗浄溶液約5x SSC～約2x SSCが含まれる。高ストリンジエンシー条件の例には、インキュベーション温度約55～約68、緩衝液濃度約1x SSC～約0.1x SSC、ホルムアミド濃度約55%～約75%、及び洗浄溶液約1x SSC、0.1x SSC、又は脱イオン水が含まれる。一般的に、ハイブリダイゼーションインキュベーション時間は5分～24時間であり、1、2、又はそれを超える洗浄ステップを有し、洗浄インキュベーション時間は約1、2、又は15分である。SSCは0.15M NaCl及び15mMクエン酸緩衝液である。その他の緩衝液系を使用するSSCの同等物が使用可能であることが理解される。

30

【0153】

「相同性」又は「同一性」又は「類似性」は、2つのペプチド間又は2つの核酸分子間の配列類似性を指す。相同性は、比較のためにアラインメントされうる各配列における位置を比較することにより決定可能である。比較された配列における位置が同じ塩基又はアミノ酸により占められていた場合、その分子はその位置において相同である。配列間の相同性の程度は、配列により共有される一致した又は相同な位置の数次第である。「無関係の」又は「非相同」配列は、本発明の配列のうち1つと40%未満の同一性、又は代わりに25%未満の同一性を共有する。

【0154】

40

本開示を実施する形態

点突然変異は多くの遺伝性疾患の根底にある。この点で、プログラム可能なDNAヌクレアーゼは突然変異の修復に使用されているが、遺伝子治療への使用には複数の課題がある。1つ目は、相同組換え効率が典型的に細胞中で低いこと、2つ目は、活性なヌクレアーゼは、永続的なオフターゲット変異を導入するリスクを示すこと、そして、3つ目は、一般的なプログラム可能なヌクレアーゼは、典型的には、*in vivo*免疫原性の可能性を高める非ヒト起源の要素を含むことである。これらに照らして、代わりに直接RNAを標的とするアプローチ、及び宿主に固有の分子機構の使用が非常に望ましいだろう。これに向けて、出願人は、コドン抑制でのtRNAの使用とRNA編集でのアデノシンデアミナーゼの使用に基づいて、本明細書で一緒にtRiADと呼ばれる2つの補完的アプローチを設計し、最適化した。具体的には、改変型内因性tRNA又はRNA編集酵素ADAR及び関連するガイドRNA(adRNA)

50

をアデノ随伴ウイルスを介して送達することにより、出願人は、ジストロフィン遺伝子にナンセンス変異を有するmdxマウスモデルの未成熟終止コドンのリードスループ及び修正を可能にした。さらに出願人は、オルニチントランスカルバミラーゼ(OTC)欠損症のspf^{a/s}マウスモデルの肝臓RNAにおける点突然変異のADAR2媒介修正を操作した。まとめると、本明細書に開示する結果は、in vivoでのRNAターゲティングのためのサプレッサーtRNA及びADAR2の使用を確立し、この統合されたtRiADアプローチは、エフェクターRNA及びヒトタンパク質を利用するため、強固で、ゲノム的に傷がなく、潜在的に非免疫原性である。

【0155】

本開示の態様は、tRNAに基づくタンパク質編集系、任意的に単独で、又は対象に対するADARのための1以上のフォワードガイドRNA(「adRNA」)及びADARのための1以上の対応するリバースガイドRNA(「radRNA」)を含むADARに基づくRNA編集系と組み合わせたtRNAに基づくタンパク質編集系に関し、ADARに基づくRNA編集系は、遺伝子をコードするRNA配列中の点突然変異を特異的に編集する。

10

【0156】

tRNAに基づくタンパク質編集系は、タンパク質のオフターゲット編集を防ぐために内因性改変型tRNA及び/又は直交tRNAを含み得る。これに関して、これらのtRNAを制御するための系を以下に開示する。

【0157】

ADARに基づくRNA編集系で使用するためのadRNA構築は比較的単純で、標的に相補的なRNAターゲティングドメインと、任意的に、種々のタンパク質のRNA結合ドメインをリクルートする1つ又は2つのリクルートドメイン(アプタマーとも呼ばれる)を含む。任意的なリクルートドメインは、RNAターゲティングドメインの5'及び/又は3'末端に配置される。そのmRNA標的に結合したadRNAの概略図を図23Cに示す。いくつかの実施形態において、adRNAはA-Cミスマッチを特徴としており、ADARの編集機能を促す。同様のフレームワークを使用して、核に存在するmRNA前駆体(pre-mRNA)をターゲティングするように骨格を適合させることにより、インtronプロセシングの前にmRNA前駆体をターゲティングし得る。このアプローチは、スプライス部位の変異を含むOTC欠損を含む非限定的な例示的方法で行われるが、mRNA編集アプローチは、ナンセンス変異を含むジストロフィン欠損を含む非限定的な例示的方法で行われる。

20

【0158】

出願人は、図19Cに示す一連の骨格を試験して、ADARのRNA結合ドメインをリクルートした。図示されている配列はリクルートドメインを表し、イタリック体のNは標的に相補的なヌクレオチドを表す。Cは、編集機能を促すミスマッチである。さまざまな長さとミスマッチ位置の配列を試験して、所望の標的に最良なadRNAを決定し得る。例えば、出願人が生成したadRNAのリクルートドメインの残基は、次のように改変した(5'-3')：

30

v1 : GGGTGGAATAGTATAACAATATGCTAAATGTTAGTATCCCACCT NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
v2 : GTGGAATAGTATAACAATATGCTAAATGTTAGTATCCCAC NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
v3 : GTGGAAGAGGAGAACAAATATGCTAAATGTTCTCGTCTCCAC NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
v4 : GGGTGGAAGAGGAGAACAAATATGCTAAATGTTCTCGTCTCCACCT NNNCNNNNNNNNNNNNNN
v5 : GGTGAAGACGGAGAACAAATATGCTAAATGTTCTCGTCTCCACC NNNNNNCNNNNNNNNNNNNN
v6 : GGTGAAGAGGAGAACAAATATGCTAAATGTTCTCGTCTCCACC NNNNNNNNNNNNNNNNNN
v7 : GTGGAAGAGGAGAACAAATAGGCTAACAGTTCTCGTCTCCAC NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
v8 : GGGTGGAAGAGGAGAACAAATAGGCTAACAGTTCTCGTCTCCACCT NNNCNNNNNNNNNNNNNN
v9 : GGTGAAGAGGAGAACAAATAGGCTAACAGTTCTCGTCTCCACC NNNNNNNNNNNNNNNNNN
v10: GGTGAAGAGGAGAACAAATAGGCTAACAGTTCTCGTCTCCACC NNNNNNNNNNNNNNNNNN
v11 : GGTGTCGAGAACAAATAGTATAACAATATGCTAAATGTTAGTATCCGACACC NNNNNNNNNNNNNNNN
v12 : GGTGTCGAGAACAAATATGCTAAATGTTCTCGTCTCCGACACC NNNNNNNNNNNNNNNNNN
v13 : GGTGTCGAGAACAAATAGGCTAACAGTTCTCGTCTCCGACACC NNNNNNNNNNNNNNNNNN

〔 0 1 5 9 〕

折りたたみ後のV2の構造を図23Dとして提供する。また対応するradRNAを以下のように作製した：

【 0 1 6 0 】

標的mRNAに対して得られるadRNA及びradRNA対の概要を図16Cに示す。

【 0 1 6 1 】

ターゲティングドメイン中のCミスマッチの位置を変化させながら（イタリック体のN）ターゲティングドメインのいずれかの末端における2つのADARリクルートドメイン（黒字）を用いた別の骨格フレームワークもまた出願人によって適用された。

TGGAATAGTATAACAATATGCTAAATGTTGTATAGTATCCCAC GTGGAAATAGTATAACAATA
TGCTAAATGTTGTATAGTATCCCAC

【 0 1 6 2 】

これらの非限定的な例示的な骨格は、特定の標的に対するadRNA及びradRNAの操作のための鑄型を提供し、本明細書に開示される例示的な方法に従って実施される比較有効性研究に基づいて最適化され得る。

[0 1 6 3]

いくつかの実施形態において、ADARに基づく編集系は、ADAR1、ADAR2、E488Q及びE100Q変異体各々、ADARの触媒ドメイン及びRNAヘアピンモチーフと会合するドメインを含む融合タンパク質、ADARの触媒ドメイン及びデッド型Cas9 (dead Cas9) を含む融合タンパク質、又はADARの二本鎖結合ドメイン及びAPOBECを含む融合タンパク質をさらに含む。さらなる実施形態において、RNAヘアピンモチーフと会合するドメインは、MS2バクテリオファージコートタンパク質(MCP)及びN22ペプチドの群から選択される。いくつかの実施形態において、adRNAは、1つ以上のRNAヘアピンモチーフを含む。いくつかの実施形態において、1つ以上のRNAヘアピンモチーフは、MS2システムループ及びBoxBループの群から選択される。

[0 1 6 4]

理論に拘束されるものではないが、出願人は、ADARからの二本鎖RNA結合モチーフがいくつかの二本鎖RNA配列に結合する可能性があり、したがって、オフターゲット効果が生じる可能性があると考えている。そのような効果を避けるために、出願人は、外因性タンパク質ドメインを使用してadRNAのRNAヘアピンモチーフを認識することを想定している。ADAR1とADAR2は両方とも、RNA結合ドメインと、アデノシンからイノシンへの変換を触媒する触媒ドメインからなる。触媒ドメインは、RNA結合ドメインから切り離すことができる。我々の目的は、オフターゲット効果を減らしながら標的アデノシンの高い編集効率を達成することであり、したがって、代替RNA結合ドメインを探索している。出願人は、ADAR1又はADAR2の触媒ドメインを、MCP、N22、又はデッド型CjCas9などの異なるRNA結合ドメイン（又はSaCas9、CRISPR-Cas13などからの他のRNAターゲティングCRISPR）に融合した。適切なガイドRNA（adRNA）を追加すると、融合タンパク質が標的にリクルートされ、アデノシンからイノシンへの変化をさらに触媒する。この場合、デッド型CjCas9（及び伸長によるその他のCRISPR）は、基本的にRNA結合ドメインとして機能し、これが順にエフェクターに繋がれ得る。

[0 1 6 5]

ドメインは、ADAR触媒ドメインに融合され、RNAへアピンモチーフを含む特定のadRNAを特異的にターゲティングするADARを生成する。例えば、出願人は、ADAR1又はADAR2の触媒ドメインとそれぞれの変異体E488Q及びE1008Qに融合したMS2バクテリオファージコートタンパク質（MCP）を使用し、RNAのMS2ステムループを使用して融合タンパク質をリクルートした（図23A）。この系と同様に、出願人は、boxBアプタマーを利用して融合タンパク質をリクルートしながら、ADAR1又はADAR2（及びその変異体）の触媒ドメインに融合したN22ペプチドも利用した。したがって、単一又は二重ヘアピン（MS2/BoxBループ）の追加に基づいて、ADARの1又は2コピーをリクルートすることができる（図23A）。PP7ヘアピンも同様に使用することが考えられる。

[0 1 6 6]

Cミスマッチがターゲティングドメイン内で変化する可能性のある、MCPに基づく融合タンパク質のリクルートのための非限定的なフレームワーク配列を本明細書中以下に示す（小文字は、下線付きヘアピンの安定化に役立つリンクマークを表す）：

単一リクルートドメイン（下線付き）

2つのリクルートドメイン（下線付き）：

別の非限定的なフレームワーク配列は、N22に基づく融合タンパク質のために提供される：

単一リクルートドメイン（下線付き）：

NNNNNNNNNNNNNNNNggccctgaagaagggcccc

2つのリクルートドメイン（下線付き）：

【 0 1 6 7 】

別のアプローチは、Cas9と関連するadRNAのリクルートドメインに対するものであり、デッド型Cas9をADAR触媒ドメインに結合し、これにより、特定のリクルートの同じ効果が得られる。リクルートのための非限定的なフレームワーク配列は、Cas9に基づく融合タンパク質のために提供される：

Psp dCas13a リクルート（ミスマッチ位置は変動し得る）

Cj dCas9 リクルート（ミスマッチ位置は変動し得る）

【 0 1 6 8 】

APOBECにはRNA編集機能もある（図23B）。したがって、ADARに基づく編集系の代わりに又はそれに加えて使用することができる。例えば、出願人は、標的化C-T RNA編集を操作するためにAPOBECとのMCP/N22ペプチド融合物を作製した。さらに、出願人はADAR2の二本鎖RNA結合ドメイン（dsRBD）をAPOBECと融合させ、その結果、adRNAによってAPOBECをリクリュートすることができた。

【 0 1 6 9 】

融合タンパク質への核移行シグナル（NLS）の付加は、核RNA（すなわちmRNA前駆体）のターゲティングを助けることができ、融合タンパク質への核輸送シグナル（NES）の付加は、本明細書に開示の実施形態のいずれかにおいて細胞質RNAのターゲティングを助けることができる。この方法は、スプライス部位の変異を編集する場合に役立ち、これにより、mRNA前駆体のイントロンが正しくプロセシングされないため、翻訳用のmRNAが不正確となる。異常なOTC発現の大部分は切断型OTCタンパク質をもたらすスプライス部位の変異に由来するため、OTC欠損はadRNA骨格でmRNA前駆体をターゲティングすることが有用な例である。RNA局在化（移行）タグをadRNAにさらに追加すると、特定の細胞区画にRNAをターゲティングできる。

【 0 1 7 0 】

adRNAが1つ以上のRNAヘアピンモチーフを含む場合のさらなる実施形態において、1つ以上のRNAヘアピンモチーフは、A - UをG - Cに置換することによって安定化される。いくつかの実施形態において、adRNAは、adRNAの一方又は両方の末端に、2'-O-メチル、2'-O-メチル3' ホスホロチオエート、又は2'-O-メチル3' チオPACEのうちの1つ以上を組み込むことによって安定化される。

【 0 1 7 1 】

より一般的には、adRNAのRNAターゲティングドメインは、標的アデノシンの位置にCミスマッチを含みながら標的mRNAに相補的であるように設計されていることが理解できる。adRNAのリクルートドメインは一定である。非限定的な例として以下がある：

標的例: OTC mRNA (変異 下線付き)

5' -AAAGTCTCACAGACACCGCTAGTTTGTAAAACTTTCTC-3'

adRNA v2 (ターゲティングドメイン長さ 20bp, 6 塩基後にミスマッチ位置):

5' -AAAGTCTCACAGACACCGCTAGTTTGTAAAACTTTCTC-3'

5' -GTGGAATAGTATAACAATATGCTAAATGTTGTTAGTATCCCACTGCTCGCCACCAAAAC-3'

10

adRNA v2 (ターゲティングドメイン長さ 21bp, 6 塩基後にミスマッチ位置):

5' -AAAGTCTCACAGACACCGCTAGTTTGTAAAACTTTCTC-3'

5' -GTGGAATAGTATAACAATATGCTAAATGTTGTTAGTATCCCACGTGCGGAAAAC-3'

radRNA v2 (ターゲティングドメイン長さ 20bp, 6 塩基後にミスマッチ位置):

3' -CTTCTTTCAAAATGTTGACTGCCACAGACACTCTGAAA-5'

20

5' -AACTTTACAAAACCCGGGGCCACCCTATGATATTGTTGTAAATCGTATAACAAATGATAAGGTG-3'

adRNA 二重(ターゲティングドメイン長さ 20bp, 5、14 塩基後にミスマッチ位置):

3' -CTTCTTTCAAAATGTTGACTGCCACAGACACTCTGAAA-5'

5' -
TGGAATAGTATAACAATATGCTAAATGTTGTTAGTATCCCACCCAAACCCGGGTGTGGTGGAATGTATAACAAA
TGCTAAATGTTGTTAGTATCCCAC-3'

30

adRNA MS2 (ターゲティングドメイン長さ 20bp, 14 塩基後にミスマッチ位置)

3' -CTTCTTTCAAAATGTTGACTGCCACAGACACTCTGAAA-5'

5' -CAAAACCCGGGGGGCCTTTGggccAAACATGAGGGATCACCCATGTGCAGggcc-3'

adRNA MS2 二重(ターゲティングドメイン長さ 20bp, 5、14 塩基後にミスマッチ位置)

3'-CTTCTTTCAAAATGTTGACTGCCACAGACACTCTGAAA-5'
 5'-aACATGAGGATCACCCATGTcAAACCCAGGGTGTCTGTaACATGAGGATCACCCATGTc-3'

adRNA BoxB (ターゲティングドメイン長さ 20bp, 14 塩基後にミスマッチ位置)

3'-CTTCTTTCAAAATGTTGACTGCCACAGACACTCTGAAA-5'
 5'-CAAACCGAGGGTGTCTGTGgggcctgaagaaggccc-3'

10

adRNA BoxB 二重(ターゲティングドメイン長さ 20bp, 5、14 塩基後にミスマッチ位置)

3'-CTTCTTTCAAAATGTTGACTGCCACAGACACTCTGAAA-5'
 5'-ggGCCCTGAAGAAGGGCccAAATCCCAGGGTGTCTGTggGCCCTGAAGAAGGGCcc-3'

20

【 0 1 7 2 】

オフターゲット効果を防ぐための調整又は代替アプローチは、内因性ADARを利用する事である。ADAR2は、脳、肺、脾臓などの組織で高度に発現しているが、ADAR1は遍在的に発現しており、一般的な発現レベルはADAR1よりも高い。したがって、出願人は、内因性ADARによるRNA編集を操作するために2つの方法を提案する。第1に、ADAR1の発現は、インターフェロン、例えばインターフェロンなどの分子によって刺激され得る。第2に、骨格はADAR1を動員（リクルート）するために特別に設計され、v1-v13骨格だけでなく、本明細書で上記に開示されたいくつかの化学修飾骨格で実験を行っている。過剰発現とは対照的に、内因性ADARを使用すると、オフターゲット効果を制限するのに役立ち得る。

【 0 1 7 3 】

組換え発現系及びベクター

本開示の態様は、ベクター及び組換え発現系に関する。

【 0 1 7 4 】

例えば、一部の態様は、タンパク質をコードするRNA配列中に点突然変異を含むコドンを認識するアンチコドン配列を有する1つ以上のtRNAをコードするベクターに関するものであり、任意的に、点突然変異が未成熟終止コドンを生じる。いくつかの実施形態において、点突然変異は、DNA配列TAA及びRNA配列UAAを有するナンセンス変異を生じる。いくつかの実施形態において、tRNAは、点突然変異を含むコドンを認識する改変型アンチコドンシステムを有する内因性tRNAである。さらなる実施形態において、tRNAにセリンが装填される。いくつかの実施形態において、tRNAは、非標準アミノ酸が装填された直交tRNAである。さらなる実施形態において、ベクターは、対応するtRNAシンテターゼをさらに含む。いくつかの実施形態において、対応するシンテターゼは、大腸菌グルタミニル-tRNAシンテターゼである。直交tRNAを含むいくつかの実施形態において、非標準アミノ酸はピロリシンである。いくつかの実施形態において、ベクターは、点突然変異を含むコドンを認識するアンチコドン配列を有する2つのtRNAをコードする。いくつかの実施形態において、ベクターはAAVベクターであり、任意的にAAV8ベクターである。いくつかの実施形態において、タンパク質はジストロフィンである。

30

【 0 1 7 5 】

さらなる態様は、対象に対してADARのための1以上のフォワードガイドRNA（「adRNA」）及びADARのための1以上の対応するリバースガイドRNA（「radRNA」）を含むADARに基づくRNA編集系をコードする1つ以上のベクターを含む組換え発現系に関する、ADARに基づくRNA編集系は、タンパク質をコードするRNA配列中の点突然変異を特異的に編集するものである。いくつかの実施形態において、点突然変異は、DNA配列TAA及びRNA配列UAAを有する、

40

50

ナンセンス変異、任意的には未成熟終止コドンを生じる。いくつかの実施形態において、ADARに基づくRNA編集系は、UAAをUIAに変換し、任意的に、さらにUIAをUIIに変換する。いくつかの実施形態において、ADARに基づくRNA編集系は、UAAをUAIに変換する。いくつかの実施形態において、点突然変異は、DNA配列CAG及びRNA配列CAGを有するミスセンス変異又はスプライス部位を生じる。いくつかの実施形態において、ADARに基づくRNA編集系は、CAGをCIGに変換する。さらなる実施形態において、1つ以上のベクターは、アンバーコドンを標的とするtRNAをさらにコードする。いくつかの実施形態において、ADARに基づく編集系は、ADAR1、ADAR2、E488Q及びE100Q変異体各々、ADARの触媒ドメイン及びRNAヘアピンモチーフと会合するドメインを含む融合タンパク質、ADARの触媒ドメイン及びデッド型Cas9を含む融合タンパク質、又はADARの二本鎖結合ドメイン及びAPOBECを含む融合タンパク質をさらに含む。さらなる実施形態において、RNAヘアピンモチーフと会合するドメインは、MS2バクテリオファージコートタンパク質(MCP)及びN22ペプチドの群から選択される。いくつかの実施形態において、adRNAは、1つ以上のRNAヘアピンモチーフを含む。いくつかの実施形態において、1つ以上のRNAヘアピンモチーフは、MS2ステムループ及びBoxBループの群から選択され、及び/又はA-UをG-Cに置換することによって安定化される。いくつかの実施形態では、adRNAは、adRNAの一方又は両方の末端に、2'-O-メチル、2'-O-メチル3'ホスホロチオエート、又は2'-O-メチル3'チオPACEのうちの1つ以上を組み込むことによって安定化される。

10

【0176】

概して、RNAなどの遺伝物質を1つ以上のベクターにパッケージングする方法は当技術分野で周知である。例えば遺伝物質を、パッケージングベクター及び細胞株を使用してパッケージングし、従来の組換え法により導入することができる。

20

【0177】

一部の実施形態において、パッケージングベクターとしては、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、及びアデノ随伴ウイルスベクター(任意選択でAAV8)が挙げられるがこれらに限定されない。パッケージングベクターは、遺伝物質の細胞への送達を促進する因子及び配列を含む。例えば、レトロウイルス構築物は、複製可能なヘルパーウイルスの產生なしに、複製不全レトロウイルスベクターをパッケージングするのに必要とされ、かつ高力価の複製不全レトロウイルスベクターをパッケージングすることができるビリオンタンパク質を產生するためのものであるビリオンタンパク質を全てトランスにコードする複製不全レトロウイルスゲノム由来の少なくとも1つのレトロウイルスヘルパーDNA配列を含むパッケージングプラスミドである。レトロウイルスDNA配列は、ウイルスのウイルス5'LTRの天然のエンハンサー及び/又はプロモーターをコードする領域を欠き、ヘルパーゲノムをパッケージングするのに関与するpsi機能配列、及び3'LTRの両方を欠くが、外来性のポリアデニル化部位、例えばSV40ポリアデニル化部位、並びにウイルス產生が望まれる細胞型における効率的な転写を導く外来性のエンハンサー及び/又はプロモーターをコードする。レトロウイルスは、モロニーマウス白血病ウイルス(MMLV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、又はテナガザル白血病ウイルス(GALV)などの白血病ウイルスである。外来性のエンハンサー及びプロモーターは、ヒトサイトメガロウイルス(HCMV)極初期(immediate early)(IE)エンハンサー及びプロモーター、モロニーマウス肉腫ウイルス(MMSV)のエンハンサー及びプロモーター(U3領域)、ラウス肉腫ウイルス(RSV)のU3領域、脾フォーカス形成ウイルス(SFFV)のU3領域、又は天然モロニーマウス白血病ウイルス(MMLV)プロモーターに結合したHCMV IEエンハンサーとすることができます。

30

【0178】

レトロウイルスパッケージングプラスミドは、プラスミドベースの発現ベクターによりコードされる2つのレトロウイルスヘルパーDNA配列からなっていてよく、例えば第1のヘルパー配列は、同種指向性MMLV又はGALVのgag及びpolタンパク質をコードするcDNAを含み、第2のヘルパー配列は、envタンパク質をコードするcDNAを含む。宿主範囲を決定するEnv遺伝子は、異種指向性、両種指向性、同種指向性、多指向性(ミンクフォーカス形成)

40

50

若しくは10A1マウス白血病ウイルスenvタンパク質、又はテナガザル白血病ウイルス(GAL V) envタンパク質、ヒト免疫不全ウイルスenv(gp160)タンパク質、水疱性口内炎ウイルス(VSV)Gタンパク質、ヒトT細胞白血病(HTLV)I型及びII型env遺伝子産物をコードする遺伝子、上述のenv遺伝子のうち1つ以上の組合せ由来のキメラエンベロープ遺伝子、又は上述のenv遺伝子産物の細胞質部及び膜貫通部をコードするキメラエンベロープ遺伝子、並びに望ましい標的細胞の特定の表面分子に対するモノクローナル抗体由来であってよい。同様のベクターベースの系では、スリーピングビューティーベクター(sleeping beauty vector)又はトランスポゾン因子などのその他のベクターを使用してもよい。

【0179】

次いで、生じるパッケージングされた発現系を、本明細書で開示される方法態様について詳細に論じられる適切な投与経路を介して導入することができる。

10

【0180】

組成物

さらなる態様は、本明細書に開示されるベクターのいずれか1つ以上を含む組成物に関する。いくつかの実施形態において、組成物は、内因性ADAR1発現を増強するための有効量のインターフェロンをさらに含む。さらなる実施形態において、インターフェロンはインターフェロンである。

【0181】

簡潔に言えば、特許請求の範囲に記載の組成物のいずれか1つを含むがこれに限定されない本開示の医薬組成物は、1つ以上の薬学的又は生理学的に許容される担体、希釈剤又は賦形剤と組み合わせて、本明細書に記載の標的細胞集団を含み得る。

20

【0182】

周知の担体の例には、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然及び修飾セルロース、ポリアクリルアミド、アガロース及び磁鉄鉱が含まれる。担体の性質は、本開示の目的のために可溶性又は不溶性のいずれかであり得る。当業者は、抗体に結合するための他の適切な担体を知っているか、又は慣用の実験を使用してそれを確認することができるだろう。

【0183】

そのような組成物は、中性緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水などの緩衝液；グルコース、マンノース、スクロース又はデキストラン、マンニトールなどの炭水化物；タンパク質；ポリペプチド又はグリシンなどのアミノ酸；抗酸化剤；EDTAやグルタチオンなどのキレート剤；アジュバント(例えば、水酸化アルミニウム)；防腐剤を含み得る。本開示の組成物は、経口、静脈内、局所、経腸、及び/又は非経口投与用に製剤化することができる。特定の実施形態では、本開示の組成物は、静脈内投与用に製剤化される。

30

【0184】

組成物の投与は、一用量で、処置過程を通して連続的に行うことができる。投与の最も有効な手段及び投与量を決定する方法は当業者に既知であり、療法に使用される組成物、療法の目的、及び処置を受ける対象によって変動するものである。処置を行う医師により選択される用量レベル及びパターンで、単回又は複数回投与が実施されうる。適切な剤形及び薬剤を投与する方法が当技術分野で既知である。さらなる態様において、本開示の細胞及び組成物を他の治療と組み合わせて投与することができる。

40

【0185】

ベクター、組換え発現系及び/又は組成物は、当該技術分野で公知の方法を使用して宿主に投与される。本開示の組成物の投与は、実験的及びスクリーニングアッセイのため、望ましい疾患、障害、又は状態の動物モデルを生成するために行われてもよい。

【0186】

簡潔に言えば、本開示の医薬組成物、例えば限定されるものではないが、特許請求の範囲に記載の組成物のいずれか1つは、1つ以上の薬学的に又は生理学的に許容される担体、希釈剤又は賦形剤と組み合わせて、本明細書に記載の1つ以上のベクター又は組換え発現系を含みうる。このような組成物は、中性緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水などの

50

緩衝液；グルコース、マンノース、スクロース又はデキストラン、マンニトールなどの糖；タンパク質；ポリペプチド又はグリシンなどのアミノ酸；抗酸化剤；EDTA又はグルタチオンなどのキレート剤；アジュバント（例えば、水酸化アルミニウム）；及び保存料を含みうる。本開示の組成物は、経口、静脈内、局所、経腸、及び/又は非経口投与用に製剤化されうる。ある特定の実施形態において、本開示の組成物は静脈内投与用に製剤化される。

【0187】

本開示の医薬組成物は、処置又は予防すべき疾患、障害又は状態に適当な方法で投与し得る。投与の量及び頻度は、患者の状態、並びに患者の疾患の種類及び重篤度などの要因により決定されるが、適当な用量は臨床試験により決定し得る。

10

【0188】

タンパク質発現の回復方法

本開示の態様は、タンパク質発現の回復方法に関する。

【0189】

例えば、本開示の一部の態様は、その必要がある対象においてタンパク質をコードするRNA配列中に点突然変異を含むタンパク質の発現を回復する方法であって、点突然変異を含むコドンを認識するアンチコドン配列を有する1つ以上のtRNAをコードするベクターを対象に投与することを含む方法に関し、任意的に、点突然変異が未成熟終止コドンを生じる。いくつかの実施形態において、点突然変異は、DNA配列TAA及びRNA配列UAAを有するナンセンス変異を生じる。いくつかの実施形態において、tRNAは、点突然変異を含むコドンを認識する改変型アンチコドンシステムを有する内因性tRNAである。さらなる実施形態において、tRNAにセリンが装填される。いくつかの実施形態において、tRNAは、非標準アミノ酸が装填された直交tRNA（orthogonal tRNA）である。さらなる実施形態において、ベクターは、対応するtRNAシンテターゼをさらに含む。いくつかの実施形態において、対応するシンテターゼは、大腸菌グルタミニル-tRNAシンテターゼである。直交tRNAを含むいくつかの実施形態において、非標準アミノ酸はピロリシンである。さらなる実施形態では、ピロリシンは、対象の食事に導入される。いくつかの実施形態において、ベクターは、点突然変異を含むコドンを認識するアンチコドン配列を有する2つのtRNAをコードする。いくつかの実施形態において、タンパク質はジストロフィンである。

20

【0190】

他の態様は、対象に対してADARのための1以上のフォワードガイドRNA（「adRNA」）及びADARのための1以上の対応するリバースガイドRNA（「radRNA」）を含むADARに基づくRNA編集系をコードする1つ以上のベクターを含む組換え発現系に関し、ADARに基づくRNA編集系は、タンパク質をコードするRNA配列中の点突然変異を特異的に編集するものである。いくつかの実施形態において、点突然変異は、DNA配列TAA及びRNA配列UAAを有するナンセンス変異、任意的には未成熟終止コドンを生じる。いくつかの実施形態において、ADARに基づくRNA編集系は、UAAをUIAに変換し、任意的に、さらにUIAをUIIに変換する。いくつかの実施形態において、ADARに基づくRNA編集系は、UAAをUAIに変換する。いくつかの実施形態において、任意的にナンセンス又はミスセンス変異を含むもの、mRNA中で標的化されたRNAである。さらなる実施形態において、1つ以上のベクターは、アンバーコドンを標的とするtRNAをさらにコードする。いくつかの実施形態において、タンパク質はジストロフィンである。いくつかの実施形態において、点突然変異は、DNA配列CAG及びRNA配列CAGを有するミスセンス変異又はスプライス部位を生じる。いくつかの実施形態において、ADARに基づくRNA編集系は、CAGをCIGに変換する。いくつかの実施形態において、任意的にスプライス部位変異を含むもの、標的とされるRNAは、mRNA前駆体（pre-mRNA）である。いくつかの実施形態において、ADARに基づく編集系は、ADAR1、ADAR2、E488Q及びE100Q変異体各々、ADARの触媒ドメイン及びRNAヘアピンモチーフと会合するドメインを含む融合タンパク質、ADARの触媒ドメイン及びデッド型Cas9を含む融合タンパク質、又はADARの二本鎖結合ドメイン及びAPOBECを含む融合タンパク質をさらに含む。さらなる実施形態において、RNAヘアピンモチーフと会合するドメインは、MS2バクテリオファージコートタン

40

50

パク質（MCP）及びN22ペプチドの群から選択される。いくつかの実施形態において、adRNAは、1つ以上のRNAへアピンモチーフを含む。いくつかの実施形態において、1つ以上のRNAへアピンモチーフは、MS2ステムループ及びBoxBループの群から選択され、及び／又はA-UをG-Cに置換することによって安定化される。いくつかの実施形態では、adRNAは、adRNAの一方又は両方の末端に、2'-O-メチル、2'-O-メチル3'-ホスホロチオエート、又は2'-O-メチル3'-チオPACEのうちの1つ以上を組み込むことによって安定化される。

【0191】

いずれの場合も、タンパク質発現が「回復」したかどうかの評価は、ベースラインと比較した場合のタンパク質定量化的手段によって達成される。ベースラインは、任意的には、対象の以前のレベルに基づいて、又は対象の年齢、民族性及びその他の関連する人口統計情報に合わせて調整された人口の通常レベルとして計算され得る。タンパク質発現を定量する技術は、当技術分野で周知であり、任意で、ベースライン値との比較のために対照又は閾値を利用してよい。そのような研究のために当技術分野で公知の方法には、限定されるものではないが、qRT-PCR、ELISA、ウエスタンプロット、タンパク質免疫染色、分光法及び／又は分光法に基づく方法、並びに対象からのサンプル中のタンパク質発現量を決定するために通常行われる他のアッセイが挙げられる。あるいは、「回復」効果は、臨床結果に基づいて決定されてもよい。例えば、異常なジストロフィンのレベルは、筋ジストロフィーの症状に関連している。したがって、発現の回復は、これらの症状の軽減又は逆転などの臨床的シグナルに基づいて外見上決定され得る。ジストロフィンにとって、筋力の改善はそのような指標の1つである。したがって、医師は結果を決定するために強度測定を実行し得る。別の例はオルニチントランスカルバミラーゼ（OTC）であり、異常なOTCレベルは、血液中のアンモニアの過剰な蓄積（窒素の蓄積による）をもたらす稀少なX連鎖遺伝性障害の結果である。したがって、関連する臨床結果は、血液又は尿などの生体サンプル中のアンモニアの減少であり得る。同様に、対象タンパク質に関する臨床シグナル及び対象タンパク質の下流のタンパク質の発現は、対象タンパク質が特定の経路に関与している「回復」の関連指標であり得る。

【0192】

処置（治療）の方法

点突然変異は、いくつかの疾患、障害及び状態に関与している。非限定的な例を以下の表1に提供する。

10

20

30

【表1】

表1

タンパク質/疾患、障害、又は症状	関連する点突然変異
GからAへの点突然変異又は未成熟終止コドン	
ジヒドロピリミジンデヒドログナーゼ欠損症	NM_000110.3(DPYD):c.1905+1G>A
ヌーナン症候群	NM_005633.3(SOS1):c.2536G>A (p.Glu846Lys)
リンチ症候群	NM_000251.2(MSH2):c.212-1G>A
乳房卵巣がん, 家族性 1	NM_007294.3(BRCA1):c.963G>A (p.Trp321Ter)
囊胞性線維症	NM_000492.3(CFTR):c.57G>A (p.Trp19Ter)
貧血、G6PD 欠乏による	NM_000402.4(G6PD):c.292G>A (p.Val98Met)
AVPR2 腎性尿崩症, X 連鎖	NM_000054.4(AVPR2):c.878G>A (p.Trp293Ter)
FANCC ファンコニ貧血, 相補群 C	NM_000054.4(AVPR2):c.878G>A (p.Trp293Ter)
FANCC ファンコニ貧血, 相補群 C	NM_000136.2(FANCC):c.1517G>A (p.Trp506Ter)
IL2RG X 連鎖重症複合免疫不全症	NM_000206.2(IL2RG):c.710G>A (p.Trp237Ter)
F8 先天性第 VIII 因子欠乏症	NM_000132.3(F8):c.3144G>A (p.Trp1048Ter)
LDLR 家族性高コレステロール血症	NM_000527.4(LDLR):c.1449G>A (p.Trp483Ter)
CBS ホモシスチン尿症, CBS 欠損による	NM_000071.2(CBS):c.162G>A (p.Trp54Ter)
HBB ベータサラセミア	NM_000518.4(HBB):c.114G>A (p.Trp38Ter)
ALDOB 遺伝性フルクトース尿症	NM_000035.3(ALDOB):c.888G>A (p.Trp296Ter)
DMD デュシェンヌ型筋ジストロフィー	NM_004006.2(DMD):c.3747G>A (p.Trp1249Ter)
SMAD4 若年性ポリポーラス症候群	NM_005359.5(SMAD4):c.906G>A (p.Trp302Ter)
BRCA2 家族性乳がん 乳房卵巣がん, 家族性 2	NM_000059.3(BRCA2):c.582G>A (p.Trp194Ter)
GRIN2A てんかん, 焦点型, 発話障害あり, 精神遅滞あり又はなし	NM_000833.4(GRN2A):c.3813G>A (p.Trp1271Ter)
SCN9A 無痛覚症, 先天性, 常染色体劣性	NM_002977.3(SCN9A):c.2691G>A (p.Trp897Ter)
TARDBP 筋萎縮性側索硬化症 10 型	NM_007375.3(TARDBP):c.943G>A (p.Ala315Thr)
CFTR 囊胞性線維症 遺伝性肺炎 提供なし ataluren 応答 - 効能	NM_000492.3(CFTR):c.3846G>A (p.Trp1282Ter)
UBE3A アンジェルマン症候群	NM_130838.1(UBE3A):c.2304G>A (p.Trp768Ter)
SMPD1 ニーマン・ピック病, A 型	NM_000543.4(SMPD1):c.168G>A (p.Trp56Ter)
USH2A アッシャー症候群, 2A 型	NM_206933.2(USH2A):c.9390G>A (p.Trp3130Ter)
MEN1 遺伝性がん素因症候群(cancer-predisposing syndrome)	NM_130799.2(MEN1):c.1269G>A (p.Trp423Ter)
C8orf37 網膜色素変性症 64	NM_177965.3(C8orf37):c.555G>A (p.Trp185Ter)
MLH1 リンチ症候群	NM_000249.3(MLH1):c.1998G>A (p.Trp666Ter)
TSC2 結節性硬化症 2 結節性硬化症症候群 46	NM_000548.4(TSC2):c.2108G>A (p.Trp703Ter)
NF1 神経線維腫症, 1 型	NM_000267.3(NF1):c.7044G>A (p.Trp2348Ter)
MSH6 リンチ症候群	NM_000179.2(MSH6):c.3020G>A (p.Trp1007Ter)
SMN1 脊髄性筋萎縮症, II 型 クーゲルベルグ・ウェランダー病	NM_000344.3(SMN1):c.305G>A (p.Trp102Ter)
SH3TC2 シャルコー・マリー・トゥース病, 4C 型	NM_024577.3(SH3TC2):c.920G>A (p.Trp307Ter)
DNAH5 線毛機能不全症候群	NM_001369.2(DNAH5):c.8465G>A (p.Trp2822Ter)
MECP2 レット症候群	NM_004992.3(MECP2):c.311G>A (p.Trp104Ter)
ADGRV1 アッシャー症候群, 2C 型	NM_032119.3(ADGRV1):c.7406G>A (p.Trp2469Ter)
AHI1 ジュベール症候群 3	NM_017651.4(AHI1):c.2174G>A (p.Trp725Ter)
PRKN パーキンソン病 2	NM_004562.2(PRKN):c.1358G>A (p.Trp453Ter)
COL3A1 エーラス・ダンロス症候群, 4 型	NM_000090.3(COL3A1):c.3833G>A (p.Trp1278Ter)
BRCA1 家族性乳がん 乳房卵巣がん, 家族性 1	NM_007294.3(BRCA1):c.5511G>A (p.Trp1837Ter)

10

20

30

40

MYBPC3 原発性家族性肥大型心筋症	NM_000256.3(MYBPC3):c.3293G>A (p.Trp1098Ter)
APC 家族性大腸腺腫症 1	NM_000038.5(APC):c.1262G>A (p.Trp421Ter)
BMPR2 原発性肺高血圧症	NM_001204.6(BMPR2):c.893G>A (p.W298*)
<u>T から C への点突然変異</u>	
ウィルソン病	NM_000053.3(ATP7B):c.3443T>C (p.Ile1148Thr)
白質ジストロフィー、ミエリン形成不全 (hypomyelinating), 2	NM_020435.3(GJC2):c.857T>C (p.Met286Thr)
アルポート症候群、X 連鎖劣性	NM_000495.4(COL4A5):c.438+2T>C
リー病	NC_012920.1:m.9478T>C
ゴーシェ病、1型	NM_001005741.2(GBA):c.751T>C (p.Tyr251His)
腎形成異常、網膜色素変性症、小脳性運動失調症 及び骨系統疾患	NM_014714.3(IFT140):c.4078T>C (p.Cys1360Arg)
マルファン症候群	NM_000138.4(FBN1):c.3793T>C (p.Cys1265Arg)
UDP グルコース-ヘキソース-1-リン酸ウリジリルト ランスフェラーゼの欠損症	NM_000155.3(GALT):c.482T>C (p.Leu161Pro)
家族性高コレステロール血症	NM_000527.4(LDLR):c.694+2T>C
エピソード性疼痛症候群、家族性、3	NM_001287223.1(SCN11A):c.1142T>C (p.Ile381Thr)
ナバホ族神経性肝障害	NM_002437.4(MPV17):c.186+2T>C
先天性筋ジストロフィー、LMNA 関連	NM_170707.3(LMNA):c.1139T>C (p.Leu380Ser)
先天性第 VIII 因子欠乏症	NM_000132.3(F8):c.5372T>C (p.Met1791Thr)
インスリン依存性糖尿病 分泌性下痢症候群	NM_014009.3(FOXP3):c.970T>C (p.Phe324Leu)
先天性第 IX 因子欠乏症	NM_000133.3(F9):c.1328T>C (p.Ile443Thr)
家族性乳がん、乳房卵巣がん、家族性 2、遺伝性がん素因症候群(cancerpredisposing syndrome)	NM_000059.3(BRCA2):c.316+2T>C
不整脈	NM_000238.3(KCNH2):c.1945+6T>C
タンジール病	NM_005502.3(ABCA1):c.4429T>C (p.Cys1477Arg)
拡張型心筋症 1AA	NM_001103.3(ACTN2):c.683T>C (p.Met228Thr)
精神遅滞 3、X 連鎖	NM_005334.2(HCFC1):c.-970T>C
肢帶型筋ジストロフィー、2B 型	NM_003494.3(DYSF):c.1284+2T>C
黄斑ジストロフィー、卵黄状、5	NM_016247.3(IMPG2):c.370T>C (p.Phe124Leu)
網膜色素変性症	NM_000322.4(PRPH2):c.736T>C (p.Trp246Arg)

10

20

30

【 0 1 9 3 】

さらなる非限定的な例には、オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症、ヌガレット夜盲症、アッシャー症候群、心房細動、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ウィルソン病、遺伝性チロシン血症、及びB-カテニンなどの遺伝子にA → G変異を含む一部のがんが挙げられる。

【 0 1 9 4 】

したがって、本開示の態様は、点突然変異を含む特定の疾患、障害及び状態の処置に関する。

【 0 1 9 5 】

例えば、一部の方法の態様は、その必要がある対象において疾患、障害又は状態と関連するタンパク質をコードするRNA配列中の点突然変異の存在を特徴とする疾患、障害又は状態の処置に関するものであり、この方法は、対象に対して点突然変異を含むコドンを認識するアンチコドン配列を有する1つ以上のtRNAをコードするベクターを投与することを含み、任意的に、点突然変異が未成熟終止コドンを生じる。いくつかの実施形態において、点突然変異は、DNA配列TAA及びRNA配列UAAを有するナンセンス変異を生じる。いくつかの実施形態において、tRNAは、点突然変異を含むコドンを認識する改变型アンチコドンシステムを有する内因性tRNAである。さらなる実施形態において、tRNAにセリンが装填される。いくつかの実施形態において、tRNAは、非標準アミノ酸が装填された直交tRNAである。さらなる実施形態において、ベクターは、対応するtRNAシンテターゼをさらに含む。いくつかの実施形態において、対応するシンテターゼは、大腸菌グルタミニル-tRNAシンテタ

40

50

ーゼである。直交tRNAを含むいくつかの実施形態において、非標準アミノ酸はピロリシンである。さらなる実施形態では、ピロリシンは、対象の食事中に導入される。いくつかの実施形態において、ベクターは、点突然変異を含むコドンを認識するアンチコドン配列を有する2つのtRNAをコードする。いくつかの実施形態において、疾患、障害又は状態は、任意的にナンセンス変異及び／又は未成熟終止コドンの存在によって特徴づけられる、表1に列挙される疾患、障害及び状態からなる群より選択される。いくつかの実施形態において、タンパク質はジストロフィンである。さらなる実施形態において、疾患、障害又は状態は、筋ジストロフィーである。さらに別の実施形態では、疾患、障害又は状態は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーである。

【0196】

10

さらなる方法の態様は、その必要がある対象において疾患、障害又は状態に関連するタンパク質をコードするRNA配列中の点突然変異の存在を特徴とする疾患、障害又は状態を処置する方法であって、ADARのための1つ以上のフォワードガイドRNA（「adRNA」）及びADARのための1つ以上の対応するリバースガイドRNA（「radRNA」）を含むADARに基づくRNA編集系をコードする1つ以上のベクターを対象に投与することを含む方法に関し、ADARに基づくRNA編集系が点突然変異を特異的に編集する。いくつかの実施形態において、点突然変異は、DNA配列TAA及びRNA配列UAAを有する、ナンセンス変異、任意的には未成熟終止コドンを生じる。いくつかの実施形態において、ADARに基づくRNA編集系は、UAAをUIAに変換し、任意的に、さらにUIAをUIIに変換する。いくつかの実施形態において、ADARに基づくRNA編集系は、UAAをUAIに変換する。いくつかの実施形態において、任意的にナンセンス又はミスセンス変異を含むもの、mRNA中で標的化されたRNAである。さらなる実施形態において、1つ以上のベクターは、アンバーコドンを標的とするtRNAをさらにコードする。いくつかの実施形態において、タンパク質はジストロフィンである。いくつかの実施形態において、点突然変異は、DNA配列CAG及びRNA配列CAGを有するミスセンス変異又はスプライス部位を生じる。いくつかの実施形態において、ADARに基づくRNA編集系は、CAGをCIGに変換する。いくつかの実施形態において、任意的にスプライス部位変異を含むもの、標的とされるRNAは、mRNA前駆体（pre-mRNA）である。いくつかの実施形態において、ADARに基づく編集系は、ADAR1、ADAR2、E488Q及びE100Q変異体各々、ADARの触媒ドメイン及びRNAヘアピンモチーフと会合するドメインを含む融合タンパク質、ADARの触媒ドメイン及びデッド型Cas9を含む融合タンパク質、又はADARの二本鎖結合ドメイン及びAPOBECを含む融合タンパク質をさらに含む。さらなる実施形態において、RNAヘアピンモチーフと会合するドメインは、MS2バクテリオファージコートタンパク質（MCP）及びN22ペプチドの群から選択される。いくつかの実施形態において、本方法は、内因性ADAR1発現を増強するための有効量のインターフェロンを投与することをさらに含む。さらに別の実施形態では、インターフェロンはインターフェロン α である。いくつかの実施形態において、adRNAは、1つ以上のRNAヘアピンモチーフを含む。いくつかの実施形態において、1つ以上のRNAヘアピンモチーフは、MS2ステムループ及びBoxBループの群から選択され、及び／又はA-UをG-Cに置換することによって安定化される。いくつかの実施形態では、adRNAは、a dRNAの一方又は両方の末端に、2'-O-メチル、2'-O-メチル3' ホスホチオエート、又は2'-O-メチル3' チオPACEのうちの1つ以上を組み込むことによって安定化される。いくつかの実施形態において、疾患、障害又は状態は、表1に列挙される疾患、障害及び状態からなる群より選択される。さらなる実施形態では、タンパク質はジストロフィンであり、疾患、障害又は状態は筋ジストロフィーである。さらに別の実施形態では、疾患、障害又は状態は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーである。

20

30

40

【0197】

当業者は、これらの方法において使用される用量及び投与経路が、対象、及び処置すべき疾患、障害又は状態に基づいて変化し得ることを理解している。当該技術分野の知識に基づいて、対象の年齢、民族性及び他の関連する人口統計学的要因に基づいて好適な用量及び経路を選択し得る。

【0198】

50

キット

特定の一態様では、本開示は、本明細書に開示の方法のいずれかを実施するためのキット、並びに本開示の方法を実施するための及び/又は本明細書に開示するベクター、組換え発現系、及び組成物を投与するための説明書を提供する。

【0199】

キットは、その中に含まれる成分の保存に必要な薬剤、例えば緩衝剤、保存剤又はタンパク質安定化剤も含むことができる。キットは、検出可能な標識を検出するのに必要な成分、例えば酵素又は基質をさらに含むことができる。キットには、アッセイし、試験サンプルと比較することができる、対照サンプル又は一連の対照サンプルを含めることもできる。キットの各成分は個別の容器に入れることができ、さまざまな容器はすべて、キットを使用して実行したアッセイの結果を解釈するための説明書とともに、単一のパッケージに入れることができる。本開示のキットは、キット容器の上又は中に書面製品を含んでもよい。書面製品には、キットに含まれる試薬の使用方法が記載される。

10

【0200】

受け入れられるように、これらの提案されたキット成分は、当業者による使用のために慣習的な方法で包装され得る。例えば、これらの提案されたキット成分は、溶液又は液体分散液などとして提供されてもよい。

【0201】

実施例

以下の実施例は、本開示を実施するにあたって各種例において使用可能な、非限定的かつ説明的な手順である。さらに、本明細書で開示される参考文献は全て、その全内容にわたって参照により組み込まれる。

20

【0202】

実施例1：tRNA構築物の設計

tRNA構築物は、ナンセンス変異TAAを認識するように図1の模式図に沿って設計した。改変型内因性及び直交tRNAの両方を作製した。これらの構築物は、ナンセンス変異を有するGFPを用いてin vitroで検証した。改変型内因性及び直交tRNAの両方のための各AAVベクターには2コピーのtRNAが含まれていることが判明した。直交tRNAに使用するためにMbPy1シンテターゼを選択した。AAVベクターは、tRNA及びGFP（並びに直交tRNAを使用する場合にはシンテターゼ）を含むものを作製した。これらの構築物で使用される配列は、上記の配列リスト（Sequence Listing）に提供される。

30

【0203】

実施例2：mdxマウスにおける全長ジストロフィンの回復

ヒトセリンtRNAのアンチコドンシステムはナンセンスコドン（TAA）を認識するように改変されている。内因性tRNAは終止コドンを認識できず、リボソームが終止コドンに達すると翻訳が終了する。mdxマウスは、ジストロフィンをコードする遺伝子にナンセンス変異（TAA）があり、その結果、全長ジストロフィン発現を欠く。AAVは、2コピーの改変型tRNAをマウスの筋肉に送達するために用いられ、これにより、全長ジストロフィンの発現を可能にする終止コドンのリードスルー（読み飛ばし）が可能になる。

40

【0204】

mdxマウスのふくらはぎの筋肉に、2コピーの改変型セリンtRNAとGFP遺伝子を有するAAV8の1E12粒子を注射した。その後、これらのマウスを1か月後に屠殺し、ふくらはぎの筋肉を採取した。筋肉を切片化し、ジストロフィンに対する抗体で染色した。ジストロフィン発現の明瞭な回復が見とめられた。加えて、筋形態も改善した。

【0205】

従って、出願人は、終止コドンを有するGFP遺伝子を用いて、in vitroでの出願人のベクターの活性を実証した。加えて、出願人は、mdxマウス筋肉におけるジストロフィン発現の回復を実証している。セリンtRNAを2コピー有するAAVをmdxマウスに注射してから1ヶ月以内に、出願人は免疫組織化学法により、ふくらはぎの筋肉におけるジストロフィン発現の回復を観察した。また出願人は、筋形態の改善を見とめた。

50

【0206】

この実験は、直交tRNAを用いてマウス飼料を介してピロリシンを導入して反復され、再度、より大規模なマウス集団において両方のtRNAで複製される。

【0207】実施例3：治療用タンパク質の食事規則性生産

出願人は、骨格筋による、(i)インスリン；(ii)ウイルス（例えば、HIV、HCV、HPV、インフルエンザ）及び細菌（例えば、黄色ブドウ球菌；薬剤耐性株）に対する中和抗体、のような治療薬のin vivoでのオンデマンド生産を達成することを目的とする。

【0208】

所望の導入遺伝子は、直交tRNA / tRNAシンテターゼ対とともにAAV（又はレンチウイルス）を介して筋肉に送達される。これらの導入遺伝子には、全長タンパク質の発現を妨げるような未成熟終止コドン（終止コドン）が含まれている。治療薬のオンデマンド合成のために、適切な非天然アミノ酸が食事中に消費され、それが順次、未成熟終止部位で直交tRNA / tRNAシンテターゼによって取り込まれ、所望の治療薬の合成を可能にする。

10

【0209】実施例4：ADAR2に基づくRNA編集

出願人は、ADAR2（RNAに作用するアデノシンデアミナーゼ）がmRNAレベルで変異を修正することを疑った。出願人は、ナンセンス変異を編集することにより、DMDのmdxマウスマodelにおけるジストロフィンの発現を回復させる試みにおいて、変異に酵素を誘導するADAR2並びにadRNA（フォワードADAR2ガイド）又はradRNA（リバースADAR2ガイド）を送達するために、アデノ随伴ウイルスを使用した。また出願人は、この技術を代謝性障害であるオルニチントランスカルバミラーゼ（OTC）欠損症のマウスマodelに応用した。

20

【0210】

ヌクレアーゼと比較して、ADARは、mRNAにおいて部位特異的なアデノシンからイノシン（A → I）への変化を作り出し、これは翻訳時にイノシンがグアノシン（G）として読まれ、それによって恒久的なオフターゲット効果を作り出すことが安全である。また、それらはmRNAレベルで編集を行うので、変化したタンパク質は一時的にしか発現しない。成体のOTC欠損マウスにおいてヌクレアーゼを用いると、大規模な欠失が生じ、動物に致死的であることが証明された。ADARの使用はこの問題を回避する可能性がある。これは、点突然変異を特徴とするいくつかの障害のための容易に翻訳可能な解決策となり得る。さらに、ADAR2の起源はヒトであり、それによってそれに対する体が生み出す免疫応答を最小限に抑える。また出願人は、tRNA抑制の考え方をADAR2に基づくRNA編集と組み合わせている。さらに、出願人はadRNA / radRNAの特異性を改善するのに役立つヘアピンループ（3'重複）及びトウホールド（5'重複）を設計した。また出願人は、効率的なA → I編集のためのadRNAの長さ並びにadRNA / radRNAのADAR2リクリートドメインの最適化を続けている。

30

【0211】

これまでの研究では、点突然変異に起因するDMD又はOTC欠損症の処置のために、ジストロフィン / OTC遺伝子の変異領域を欠失させ、機能的なコピーに置き換えるために、Cas9などのヌクレアーゼが利用されている。DMDに対する既存の治療法には、障害の症状を遅らせるコルチコステロイドの使用がある。他の戦略としては、アタルレン（Ataluren）又はゲンタマイシンのような薬物を使用することによる未成熟終止コドンのリードスルーがある。もう一つの戦略は、切断型タンパク質を生じるエキソンスキッピングの方法であるが、DMD表現型の重症度を低下させることができる。もう一つの方法はμ - ジストロフィン遺伝子の送達である。OTC欠損症に対する臨床試験は、患者にOTC cDNAを送達するためにアデノウイルスベクターを利用して試みられている。その他の治療手段としては、老廃窒素の排泄を増加させるのに役立つフェニル酪酸ナトリウムの使用が挙げられる。

40

【0212】

操作されたRNA編集酵素としてのADAR2の使用は、in vitroでのみ実証されている。

【0213】

出願人は、1つは標的配列に相補的であり、もう1つはADAR2リクリートドメインである2

50

つのドメインから構成されるadRNA及びradRNAを利用した。出願人は、これらのadRNA / radRNAをADAR2酵素と共に送達するためにAAVを利用した。mdxマウスはジストロフィンをコードする遺伝子にナンセンス変異(TAA)を有している。出願人は、adRNA / radRNAの2コピー又はadRNA / radRNA + tRNAの組み合わせをADAR2酵素と共にAAVにパッケージングし、それを前脛骨(TA)筋に送達した。出願人は、ジストロフィン発現を回復するために3つの代替戦略を利用した：

- (1) 両方の「TAA」のアデノシンをイノシンに編集できるadRNA / radRNA；
- (2) 最初のadRNA / radRNAがTAA TGAを変換し、次のadRNA / radRNAがそれをTGGに変換して発現を回復させるという逐次的なアプローチ；
- (3) それによりadRNA / radRNAがTAAをTAGに変換し、アンバーコドン(TAG)のtRNA抑制がジストロフィン発現を回復する、adRNA / radRNAとtRNAの組合せ。

【0214】

また出願人は、spf-ashマウスのOTC G A変異を標的とするadRNAの2コピーを、ADAR2とともに眼窩後方注射により肝臓に送達した。

【0215】

この系は、アデノシンをイノシン(翻訳の際にグアノシンとして読まれる)に編集することによって機能する。これは、未成熟終止コドンを編集することによって発現を回復させるだけでなく、点突然変異を修正するために用いることができる。図6中、A. アンバー終止コドンは1回の編集でトリプトファンコドンに変換できる。B. オーカー終止コドン - 両方とも1段階で編集される。C. オーカー終止コドン - 逐次編集。D. オーカー終止コドン - サプレッサーtRNAと併用したADAR2編集。

【0216】

以下の10ステップは、これらの構成物を試験するためのワークフローを表している：

1. ADAR2構築物の設計及びクローン - adRNA及びradRNA。
2. ナンセンス変異を有するGFPを用いた構築物のin vitroバリデーション。
3. 構築物の改変 - adRNA / radRNAの2コピーをクローニングする決定。adRNA / radRNAの1コピーとセリンサプレッサーtRNAの1コピーを有するベクターの作製。
4. ADAR2及びadRNA / radRNA又はサプレッサーtRNAを有するAAV8ベクターの生成。
5. mdxマウスのTA / 腹筋注射 - ADAR2をadRNA / radRNA又はサプレッサーtRNAと共に有するAAV8の1E12粒子を注射した。
6. 注射の6週間後にマウスを屠殺し、TA / 腹筋を採取した。ジストロフィンを検出するために免疫組織化学検査を実施する。ジストロフィンの回復に関する若干のエビデンス。
7. qPCR、ウェスタンプロット及びNGSを行った。
8. 効率を改善するためにベクターを最適化した。adRNAの長さを変化させ、編集位置を変化させた。
9. 最適化されたベクターでステップ4~8を繰り返す。

【0217】

出願人は、adRNA及びradRNAをGFPの未成熟終止コドンに対して設計し、発現の確実な回復を実証した(図5)。オーカー終止コドン(TAA)では、発現を回復させるために2つのA編集が必要である。出願人は、単一のAを逐次的に標的とする2つのad / radRNA又は両方のAを標的とする単一のad / radRNAを構築した。また、RNA編集とtRNA抑制を組み合わせたadRNA / radRNA + サプレッサーtRNAベクターも構築した。

【0218】

in vitroでのRNA編集は、ADAR2及びadRNA / radRNAを有するAAVがmdxマウスにおいてジストロフィンのナンセンス変異をターゲティングするために生成された後にGFP発現の強固な回復を示した。

【0219】

mdxマウスの前脛骨筋(TA)又は腹筋に、ADAR2及びadRNA / radRNAの2コピー又はadRNA / radRNAの1コピーとサプレッサーtRNAを有するAAV8の1E12粒子を注入した。これらのマウスを6週間後に屠殺し、適切な筋肉を採取した。筋肉を切片化し、ジストロフィンに対

10

20

30

40

50

する抗体で染色した。ジストロフィン発現の部分的回復が見とめられた。

【0220】

概して、出願人は免疫染色によるジストロフィン発現の部分的回復を見とめた。しかし、ウェスタンプロット及びNGSはジストロフィン発現の編集／回復のエビデンスを示さなかつた。

【0221】

この系の適用の可能性としては、DMD、OTC欠損症、ウィルソン病及び遺伝性チロシン血症(tyrosinemia)1型などの障害(ただし、これらに限定されない)の処置のための点突然変異のターゲティングが挙げられる。また、別の開始コドンをつくり、タンパク質とのN末端切断形態の共存を可能にするために使用することもできる。

10

【0222】

実施例5：マウスモデルにおけるADAR編集

急速に進歩した合成生物学ツールセットと組み合わせたゲノム工学の方法論は、機能の解読、新規機能のプログラミング、及び異常な機能の修復のためにゲノムを摂動させる強力な能力を可能にしている。特に、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、及びCRISPR-Casのようなプログラム可能なDNAヌクレアーゼは、広範囲な生物においてゲノムを操作するために広く使用されている。しかしながら、遺伝子治療におけるそれらの使用は、少なくとも3つの主要な課題を提起する：1つは、相同組換え対非相同末端結合の効率は、典型的には低く、特に成体の大部分を構成する有糸分裂後細胞においては低い；2つは、活性なヌクレアーゼは、恒久的なオフターゲット変異を導入する脅威を常にもたらし、従って、活性を損なうことなく、ヌクレアーゼ用量及び標的細胞における持続時間の厳密な調節を確実にすると共に、両方の操作上の精巧なヌクレアーゼ特異性において、驚くべき課題を提示する；3つは、一般的なプログラム可能なヌクレアーゼは、原核生物起源であるか、又はin vivo治療適用において免疫原性の重大なリスクを高める非ヒト起源のドメインを有する。最近の塩基編集アプローチの出現は、遺伝子ターゲティングのための刺激的な代替戦略を開いているが、実証されたアプローチは、原核生物起源のCRISPR-Cas系に依存している。従って、遺伝子変異を引き起こす疾患のようなタンパク質機能の変化をもたらすゲノム変異については、代わりに直接RNAを標的とするアプローチが非常に望ましいであろう。一本鎖RNAは二本鎖DNAと比較して、一般的にオリゴヌクレオチド媒介ターゲティングに対して、さらなる可能性タンパク質を必要とせずにアクセスしやすいという特徴を活用し、tRNA媒介コドン抑制及び遺伝コード拡張の進歩、並びにアデノシンデアミナーゼ媒介RNA編集の進歩を踏まえて、RNAターゲティングのための統合プラットフォームを操作し、最適化し、in vitro及びin vivo適用においてその有効性を実証している。

20

【0223】

ベクター設計及び構築

GFPレポーター-GFP-アンバー、GFP-オーカー及びGFP-オパールを構築するために、野生型GFPのY39残基をそれぞれ置換した「TAG」、「TAA」及び「TGA」で3つの遺伝子プロックを合成し、CAGプロモーターの下流にクローニングした。ヒトU6及びマウスU6プロモーターを含むAAVベクターに内因性サブレッサーtRNAの1、2又は4コピーをクローニングした。ピロリジルtRNA及びadRNA/radRNAは、それぞれMbPyIRS/MmPyIRS/AcKRS又はhADAR2の発現を駆動するCMVプロモーターとともに、ヒトU6及びマウスU6プロモーターを含むAAVベクターに同様にクローニングした。

30

【0224】

哺乳動物細胞培養及びトランスフェクション

全てのHEK 293T細胞を、10%FBS及び1%抗生物質-抗真菌薬(Thermo Fisher)を添加したダルベッコ改良イーグル培地で、37℃及び5%CO₂環境でインキュベーター中で増殖させた。すべてのin vitroトランスフェクション実験は、市販のトランスフェクション試薬Lipofectamine 2000(Thermo Fisher)を用いてHEK 293T細胞で実施した。すべてのin vitro抑制及び編集実験は、レポータープラスマド500ng及びサブレッサーtRNA/aaRSプラス

40

50

ミド又はadRNA / ADAR2プラスミド1000ngを用いて24ウェルプレートで実施した。細胞を30%のコンフルエンスでトランスフェクトした。抑制及び編集の定量化のために、それぞれトランスフェクションの48及び72時間後に細胞を回収した。UAA N -Boc-L-リシン (Chemimpex) 及びN -アセチル-L-リシン (Sigma) を、所望の濃縮で培地に添加した後、トランスフェクションした。

【 0 2 2 5 】

AAVベクターの作製

Salk Institute of Biological Studies (La Jolla, CA)において、遺伝子導入、ターゲティング（標的化）及び治療（GT3）コアからのプロトコールを用いてウイルスを調製した。AAV8ウイルス粒子を、HEK293T細胞を使用して三重トランスフェクション法により产生し、イオジキサノール勾配により精製した。トランスフェクション時のコンフルエンシーは約80%であった。トランスフェクション2時間前に、10%FBSを添加したDMEMをHEK 293T細胞に添加した。各ウイルスは、5x15cmプレートで、PEI (1x DPBS pH4.5中1 μg/ μL直鎖状PEI、HCl使用) をPEI:DNA質量比4:1で使用して、pXR-8 7.5 μg、組換え導入ベクター7.5 μg、及びpHelperベクター7.5 μgで各プレートをトランスフェクトして產生させた。混合物を室温で10分間インキュベートし、次いで滴下により細胞培地に加えた。ウイルスを72時間後に回収し、イオジキサノール密度勾配超遠心分離法を使用して精製した。次いでウイルスを、50mM NaCl及び0.0001%のPluronic F68 (Thermo Fisher) を添加した1x PBS (pH7.2) で、50kDAフィルター (Millipore) を使用して最終体積約1mLになるよう透析し、標準 (ATCC VR-1616) に対して、ITR領域に特異的なプライマーを使用するqPCRにより定量化した。

AAV-ITR-F: 5' -CGGCCTCAGTGAGCGA-3' 及び

AAV-ITR-R: 5' -GGAACCCCTAGTGATGGAGTT-3' 。

【 0 2 2 6 】

RNA単離及び次世代配列決定ライプラリの調製

製造者のプロトコルに従って、RNeasy Plus Universal Mini Kit (Qiagen) を使用して、mdxマウスの腓腹筋若しくはTA筋肉又はspf^{ash}マウスの肝臓からRNAを抽出した。次世代配列決定ライプラリは次のように調製した。Protoscript II First Strand cDNA合成キット (New England Biolabs) を使用して、cDNAを合成した。簡単に説明すると、KAPA HiFi HotStart PCR Mix (Kapa Biosystems) を使用して、対象部位の周囲150bpを増幅するプライマーを使用したPCRにより、500ngの投入cDNAを増幅した。PCR産物をゲル精製 (Qiagenゲル抽出キット) し、さらに精製 (Qiagen PCR精製キット) して副産物を除去した。ライプラリの構築は、NEBNEx Multiplex Oligos for Illumina kit (NEB) を使用して行った。10ngの投入DNAをインデックス付けプライマーで増幅した。その後、サンプルをプールし、5nM濃度でIllumina Miseq (150シングルエンドラン) にロードした。データ分析は、CRISPRessoを使用して実行した。

【 0 2 2 7 】

動物実験

AAV注射：動物手順は全て、University of California、San DiegoのInstitutional Animal Care and Use Committee (IACUC) によって承認されたプロトコルに従って実施した。マウスは全てJackson labsから入手した。AAVは、mdxマウス (6~10週齢) の腓腹筋又はTA筋に2.5E+12 vg/筋を用いて注射した。AAVは、spf^{ash} (10~12週齢) マウスに3E+12 vg/マウスを用いて後眼窩注射により注射した。

【 0 2 2 8 】

UAA投与：マウスに1ヶ月にわたり20mg/mlのN -Boc-L-リシン (Chemimpex) を含む水を与えた。また、マウスに週3回、IP注射により30mgのN -Boc-L-リシンを投与した。

【 0 2 2 9 】

免疫蛍光

回収した腓腹筋又はTA筋をOCT化合物 (VWR) を含む金型 (molds) に入れ、液体窒素中でフラッシュ凍結した。20 μm切片を前処理した組織学的スライド上に切断した。スライ

10

20

30

40

50

ドは4% パラホルムアルデヒドを用いて固定した。ジストロフィンは、ジストロフィンのN末端ドメインに対するウサギポリクローナル抗体（1：100、Abcam 15277）、続いてロバ抗ウサギAlexa 546二次抗体（1：250、Thermo Fisher）で検出した。

【0230】

統計解析

すべての統計解析は、ソフトウェアGraphpad Prismを用いて行い、p値を対応のない両側t検定により計算した。

【0231】

結果

出願人はまずナンセンス変異を標的とする系の確立に焦点を当てた。これは、ナンセンス変異が、遺伝性ヒト疾患を引き起こすことが記載されている全遺伝子病変の11%の原因であり、遺伝子のコード領域に影響を及ぼす疾患関連一塩基置換の20%近くが原因であるという事実に動機づけられた。具体的には、直接的にナンセンス変異を標的とする2つの独立した、しかし補完的なアプローチを探索した。第1に、出願人はサプレッサーtRNAを介した強固なナンセンスコドン抑制の操作に焦点を当てた。内因性ナンセンス変異の未成熟終止コドンリードスルーのためのサプレッサーtRNAの使用はマウスにおいて^{in vivo}で試みられているが、これらの先行研究はプラスミド送達のみに依存しており、強固で最適化された送達形式の使用は探索されなかった。さらに、疾患を引き起こす内因性ナンセンス変異の^{in vivo}での誘導性抑制に基づく非天然アミノ酸（UAA）の潜在的な使用も探求されていない。これに向けて、出願人は、最初に、セリン、アルギニン及びロイシンtRNAのアンチコドンシステムを改変して、3つ全ての終止コドンであるアンバー、オパール及びオーカーを標的とするサプレッサーtRNAを作製し、そして対応するナンセンス変異を有するGFPレポーターを使用して、細胞中でこれらの構築物を評価した。これらの中で、セリンサプレッサーtRNAは最も一貫した強固な結果（図16A、図18A）を実証した。また、UAAが媒介する誘導性コドン抑制を操作するために、次にメタノサルキナ・バルケリ（*Methanosa*cina barkeri）由来のピロリジル-tRNA/アミノアシルtRNAシンテターゼ（aaRS）対（MbPyIRS）^{32,33}を利用し、それをAAVベクターにクローニングした。これにより、終止コドンでのUAAのプログラム可能な取り込みが可能となった。特に、tRNAの第2のコピーを発現ベクターに付加すると、抑制効率が有意にブーストされることが、出願人により見出された（図18B）。出願人はさらに、メタノサルキナ・マゼイ（*Methanosa*cina mazei）由来の追加のアミノアシルtRNAシンテターゼ（MmPyIRS）³⁴及びN-アセチル-リシリ-tRNAシンテターゼ（AcKRS）を系統的に評価し、ベクター当たりのtRNAコピー数を最大4つまで変化させることも探索した（図18B）。

【0232】

サプレッサーtRNAに基づくアプローチは、他の非標的終止コドンのリードスルーを導くことができるので、同時に出願人は、アデノシンデアミナーゼ酵素による配列特異的標的化RNA編集のための系を操作した。具体的には、アデノシンからイノシン（AからI）への編集はRNA（ADAR）に作用するアデノシンデアミナーゼによって触媒される、RNAにおける一般的な転写後修飾である。イノシンはアデノシンの脱アミノ化形態であり、生化学的にグアニンと認識される。最近、複数の研究が^{in vitro}でADAR2媒介ターゲティングの操作を実証しており、研究もアフリカツメガエル卵母細胞におけるCFTRのナンセンス変異の修正を実証した。これに基づいて、本明細書では、ヒトADAR2酵素、及びその天然基質GluR2 mRNA前駆体（pre-mRNA）から操作された関連ADAR2ガイドRNA（adRNA）を利用して、^{in vitro}及び^{in vivo}で配列特異的標的化RNA編集のための系を操作した。このADAR2誘導（ガイド）RNAは、ADARリクルートドメインと、特定の標的RNA配列に相補的なプログラム可能なアンチセンス領域を含む。出願人は、まず、Y39にナンセンスアンバー又はオーカー変異を有するGFPレポーターを含む構築物を同時トランスフェクトすることにより、^{in vitro}でこの系のRNA編集効率を評価した。具体的には、オーカー終止コドン中の両アデノシンの編集を操作するために、両アデノシンが同時に編集される一段階メカニズム、又は編集が連続的に行われる二段階メカニズムの2つの編集アプローチを利用した。さらに、オーカー

10

20

30

40

50

カーコドンからアンバーコドンへの変換とそれに続くアンバー抑制によるGFP発現回復の可能性についても検討した。3つのアプローチはすべてGFP発現の回復を可能にした（図16C、図19A）。次に、ADAR2酵素とともにadRNA又はリバース配向adRNA（radRNA）を送達するためのAAVベクターを構築した。tRNA媒介コドン抑制と同様に、adRNA / radRNAの第2のコピーの追加は、ターゲティング効率を有意に改善した（図19D）。出願人はさらに、改変型ADARリカルートドメイン、並びに様々な長さ及び標的AとadRNA²⁻⁶のR / Gモチーフとを介在するヌクレオチドの数の一連のRNAターゲティングアンチセンス設計を系統的に評価し、効率的なadRNA設計のパネルを得た（図19B-C）。

【0233】

上記のin vitro最適化に基づき、次に出願人はin vivoでのRNAターゲティングのための系を試験した。出願人は、まず、ジストロフィン遺伝子のエクソン23にオーカー終止部位を有するデュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）³⁵のmdxマウスモデルに焦点を当てた。CRISPR - Cas9系を利用した最近の研究では、mdxマウスにおいてDNAレベルでエクソン23の変化を行うことにより、DMDの予防³⁸及び部分的機能回復において有望な結果が示されている。そこで、1つはナンセンスコドン抑制のための改変型内因性tRNA又はピロリジルtRNAに由来するサプレッサーtRNA、2つはナンセンス変異のADAR2に基づく修正、3つはRNAターゲティングアプローチをベンチマークするためのCRISPR Cas9に基づくゲノムターゲティング、の3つのアプローチを同時に評価した（図17A）。

【0234】

これに対応して、出願人はまず、オーカー終止コドンを標的とするセリンサプレッサーtRNAを2コピー有するAAVを設計し、mdxマウスの前脛骨筋（TA）又は腓腹筋に同じものを注入した。2、4及び8週後にマウス筋肉を採取した。漸進的に改善されたジストロフィン発現の回復が経時的に見られ、8週間後に採取されたマウスは最大の回復度を示した（図17B、図20A）。加えて、ニューロン一酸化窒素合成酵素（nNOS）活性は、変異ジストロフィンタンパク質におけるnNOS結合部位の欠如のためにmdxマウスには存在しない筋細胞膜で回復した（図17B）。さらに系を誘導可能にするために、オーカー終止コドンとMbPyIRSを標的とするピロリジル - tRNAを2コピー有するベクターも構築し、mdxマウスのTA又は腓腹筋に注入し、マウスを2群に分けた：ピロリシンUAAを投与した群と、投与しなかった対照群。予想通り、UAAを与えられたマウスのみが、筋細胞膜でnNOSの局在を示し（図20B）、ジストロフィン発現を回復した（図20C）。

【0235】

次に、出願人はこのマウスモデルにおいてADAR2に基づく部位特異的RNA編集アプローチを評価した。mdx DMD mRNAにおけるオーカー終止コドン中の両方のアデノシンの編集におけるこの系の有効性を試験するために、出願人は、まず、HEK293T細胞中のmdx DMD mRNAの断片を有するレポータープラスマミドを用いてin vitroで構築物を最適化した。サンガーパ配列決定及びNGS解析により、ターゲティングの成功が確認された（図21A）。次に出願人は、最適化した構築物をAAV8にパッケージングし、mdxマウスの前脛骨筋（TA）又は腓腹筋に注射した。注射8週後に、mdxマウス、野生型マウス、並びにadRNAターゲティング及び非ターゲティング対照で処置したマウスからTA及び腓腹筋を採取した。IHCによりジストロフィン発現の明瞭な回復が明らかになった（図17B）。さらに、nNOS活性も筋細胞膜で回復した（図17B）。0.5～0.7%のRNA編集率（TAA-TGG / TAG / TGA）が処置マウスで観察された（図17C、図21B）。また、mdxマウスはTAA-TGG変化を伴うmRNAを示さなかったが、処置マウスは0.42%までのTAA-TGG編集mRNAを示したことにも注目される。出願人は、公表されたin vivoターゲティング研究におけるCRISPR - Cas9を介した対応するDNA編集率が約2%であったことに注目している³⁹。tRiADアプローチをさらにベンチマークするために、また、ナンセンス変異のCRISPRに基づくゲノム編集を介してmdxマウスをターゲティングした。出願人は、エクソン23コドンを切り出すために二重gRNAを有するベクターを注入し、予想通り、これは筋肉細胞のサブセットにおけるジストロフィン発現の回復につながった（図17B）。

【0236】

10

20

30

40

50

最後に、ヒト疾患の独立マウスモデルにおいてADAR2媒介RNA編集アプローチも評価した。具体的には、オルニチントランスカルバミラーゼ(OTC)欠損症の雄疎毛(*spf^{ash}*)マウスマodelに焦点を当てた。*spf^{ash}*マウスはOTC遺伝子の第4エクソンの最後のヌクレオチドにG-A点突然変異を有し、これはOTC mRNA欠損と変異型タンパク質の産生を導く⁴³。最近の研究は、新生仔マウスにおけるこの変異の強固な修正のためのCRISPR Cas9及び相同組換えに基づく戦略の使用を実証している。しかし、成体マウスにおける相同組換え修復(homology-directed repair: HDR)を介した遺伝子修正は効率が悪く、標的マウスの肝機能を損なうために致死的であることが証明されたゲノム欠失をもたらした。*spf^{ash}* OTC mRNAにおける点突然変異の編集におけるこの系の有効性を試験するために(図17D)、出願人はまず、HEK293T細胞中の*spf^{ash}* OTC mRNAの断片を有するプラスミドを用いて出願人の構築物をin vitroで評価した。サンガーリードスルーティングと次世代配列決定(NGS)解析によって強固なRNA編集効率が確認された(図21C)。次に、出願人は、構築物を、高い肝臓指向性⁴⁴を有するAAV8にパッケージングし、10~12週齢の*spf^{ash}*マウスに注射した。注射の4週間後、出願人は、ADAR2ターゲティングベクター及び非ターゲティングベクターで処置した*spf^{ash}*マウス、野生型同腹仔、及び*spf^{ash}*マウスから肝臓サンプルを採取し、NGSにより編集効率を評価した。特に、0.8~4.2%の範囲の有意なRNA編集率がスプライシングOTC mRNAにおいて処置マウスで観察され(図17E、図21D)、成体マウスにおける内因性RNAのin vivo編集に対するこのアプローチの有用性をさらに確認した。

【0237】

総合すると、出願人の結果は、点突然変異のin vivo RNAターゲティングのための可能性ある戦略としてのサプレッサーtRNA及びADAR2の使用を確立する。具体的には、送達を最適化することによって、出願人はまず、サプレッサーtRNAの使用を介して強固かつ誘導可能な終止コドンリードスルーレを実証した。未成熟終止リードスルーレのための変型内因性サプレッサーtRNAの送達には、いくつかの潜在的な利点がある:ゲンタマイシンのようなリードスルーレ薬物に関連した毒性を欠き、有糸分裂後細胞において効率的な終止コドンリードスルーレをもたらすために使用することができる。また、内因性起源であるため、強い免疫反応を引き起こす可能性は低い。さらに、非天然ではあるが、UAAベースの系によって可能にされた誘導性は、遺伝子の発現に対する厳密な調節を提供し得る。標的筋肉へのUAAの局所注射は、今後の研究でこの系の効率をさらに改善するのに役立つ可能性がある。特に、出願人は、*mdx*を標的とした試験において、このアプローチを介した明白な毒性は観察しなかった。しかしながら、出願人は、リードスルーレ薬物と同様に、この方法の重要な注意点は、サプレッサーtRNAに基づくアプローチが他の非標的終止コドンのリードスルーレにつながることであることに注意を払う。この点に関して、出願人は、2つの独立したマウスマodelにおいて、RNA中の点突然変異のADAR2に基づく部位特異的修正も実証した。出願人は、トランスクリプトームがゲノムのごく一部のサブセットであるため、RNA中の潜在的なオフターゲットはDNAと比較して制限されることに注目する。第2に、オフターゲットが存在しても、酵素がオフターゲットA-G変化を作り出すためには、ターゲットウインドウ内にAの存在が必要である。最後に、オフターゲット効果は一過性となる。したがって、adRNAのアンチセンスドメインの酵素プロセッシビティ、乱雑性、及びオフターゲットハイブリダイゼーションを十分に研究する必要があるが、ADAR2のようなRNA編集酵素による全般的なオフターゲット効果は限定される可能性が高い。また、ヒト起源のADAR2は、免疫反応を誘発する可能性が低く、一方、サプレッサーtRNAアプローチと比較してRNAのより多くの部位特異的編集が可能である。

【0238】

また出願人は、上記のtRiADに基づくRNAターゲティングアプローチと比較して、CRISPRに基づくゲノムターゲティングアプローチは、現在、より迅速な動態及びより大きな程度の変異型タンパク質回復を示すことにも注目する。しかしながら、出願人は、ADAR2の系統的操作及び指向性進化が、その安定性を改善する手がかりを提供するADAR2の新規な調節因子を発見する研究からの洞察と相まって、特定の配列に対するADAR2の編集効率を改善し、また固有のバイアスを排除するのに役立つ可能性があると予想している。この点に

10

20

30

40

50

関して、出願人は、ADAR2 - E488Q変異体を試験し、*in vitro*で発現されるDMD及びOTC mRNA断片の両方について、野生型ADAR2よりも高い編集効率を可能にすることを指摘した(図22)。*in vivo*での部位特異的A G mRNA編集の実証は、シトシンデアミナーゼの標的化されたりクルートを介して将来の部位特異的C T編集への道を開くことになり、それによってRNA編集ツールのレパートリーを潜在的に拡大する。しかしながら、AAVのような非組込み型ベクターの使用を介して遺伝子治療のためにRNAをターゲティングする間の重要な考慮は、典型的には編集されたmRNAの半減期が限られているため、エフェクター構築物の定期的な再投与の必要性である。第2に、RNAの折りたたみ、固有の半減期、局在及びRNA結合タンパク質も、RNA内の標的部位への接近しやすさに影響を与える可能性がある。例えば、この実施例では、変異型ジストロフィンRNAの半減期が短いこと、及びOTCにおける一過性のmRNA前駆体を標的とする必要性は、全般的な編集効率にマイナスに影響する可能性がある。sgRNAに関する特異性研究⁴⁹、又は遮蔽タンパク質(shielding protein)のカッティング、又は最近実証されたプログラム可能なRNA結合タンパク質及びRNAターゲティングCRISPR-Cas系からの手がかりを得ながら、tRNA及びadRNAの化学的及び構造的改変は、RNAの安定性及び特異性を改善し、上記アプローチの効率を改善するのに役立つ可能性がある。進歩的な改良により、出願人は、この統合型tRItADツールセットが、応用生命科学並びに基礎研究の両方において広範な意味を持つことを期待している。

10

【0239】

実施例6：ADAR及びAPOBEC編集効果

20

ADAR2が過剰発現した細胞株において、ADARをリクルート(動員)する際の効果について、いくつかのADAR骨格(二重及び単一の両方)を試験した(図28及び図29)。MCP-ADAR融合骨格について更なる評価を行った(図30)。骨格v2を用いて内因性mRNA標的編集効率を評価した。

【0240】

【表2】

mRNA	標的	#1	#2	#3	平均
RAB7A	CGGAAATTCAGCTAGGGCA	32.0%	34.1%	30.2%	32.1%
RAB7A	GGGAAACTGTCTAGTTCCC	28.2%	27.5%	23.0%	26.7%
CCNB1	TATTGACTGGCTAGTACAG	29.6%	17.2%	21.1%	26.7%
CCNB1	GAGCTTTGCTAGRACTG	15.1%	18.4%	17.4%	17.0%

30

【0241】

均等物

別途定義されない限り、本明細書で使用される技術用語及び科学用語は全て、本技術が属する技術分野の技術者により通常理解されるものと同じ意味を有する。

【0242】

本明細書で説明的に記載される本技術は、本明細書で特に開示されない任意の单数又は複数の要素、单数又は複数の制限の非存在下で適切に実施されうる。したがって、例えば、「含む(comprising)」、「含む(including)」、「含む(containing)」などの語は、広範にかつ制限なしに読み取られるものとする。さらに、本明細書で使用される語及び表現は、記載のための語として使用され、制限のための語としては使用されておらず、このような語及び表現の使用にあたって、示され記載される特徴又はその部分の任意の同等物を除く意図はなく、請求項に係る本技術の範囲内で各種改変が可能であることが認識される。

40

【0243】

したがって、ここで提供される物、方法、及び例は好ましい態様を表し、例示的であり、本技術の範囲に対する制限としては意図されないことが理解されるべきである。

【0244】

本技術は、本明細書では広くかつ属名で記載されている。属についての開示内に入るよ

50

り狭い種及び亜属の群分けのそれぞれも、本技術の一部を形成する。これは、削除された物が本明細書で特に記述されているか否かに関わらず、属から任意の主題を除く但し書き又は否定的限定による、本技術の属についての記載を含む。

【0245】

それに加えて、本技術の特徴又は態様がMarkush群に関して記載される場合、本技術がそれにより、Markush群の任意の個々のメンバー又はメンバーの下位群に関しても記載されることを当業者は認識するものである。

【0246】

本明細書で言及される刊行物、特許出願、特許、及びその他の参考文献は全て、それぞれが個別に参照により組み込まれるのと同じ程度に、その全内容にわたって参照により明確に組み込まれる。矛盾する場合、定義を含めて本明細書が支配する。10

【0247】

他の態様は、以下の特許請求の範囲の範囲内で示される。

【0248】

参考文献

Welch, E. M. et al. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* 447, 87–91 (2007).

Mah, J. Current and emerging treatment strategies for Duchenne muscular dystrophy. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* Volume 12, 1795–1807 (2016).

Tabebordbar, M. et al. In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. *Science* (80.). 351, 407–411 (2016). 10

Nelson, C. E. et al. In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science* (80.). 351, (2016).

Cirak, S. et al. Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open label, phase 2, dose escalation study. *Lancet* 378, 595–605 (2011). 20

Malik, V. et al. Gentamicin induced readthrough of stop codons in Duchenne muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* 67, NANA (2010).

Wagner, K. R. et al. Gentamicin treatment of Duchenne and Becker muscular dystrophy due to nonsense mutations. *Ann. Neurol.* 49, 706–11 (2001).

Yang, Y. et al. A dual AAV system enables the Cas9-mediated correction of a metabolic liver disease in newborn mice. *Nat. Biotechnol.* 34, 334–338 (2016). 30

Wettengel, J. et al. Harnessing human ADAR2 for RNA repair – Recoding a PINK1 mutation rescues mitophagy. *Nucleic Acids Res.* gkw911 (2016).

Fukuda, M. et al. Construction of a guide-RNA for site-directed RNA mutagenesis utilising intracellular A-to-I RNA editing 1–49.

Hendel, A. et al.. Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells. *Nature Biotechnology*, 33(9), pp.985–989 (2015). 40

Jinek, M. et al. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* (80-). 337, 816–821 (2012).

Christian, M. et al. Targeting DNA Double-Strand Breaks with TAL Effector Nucleases. *Genetics* 186, 757–761 (2010).

Urnov, F. D. et al. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* 435, 646–651 (2005).

Urnov, F. D., Rebar, E. J., Holmes, M. C., Zhang, H. S. & Gregory, P. D. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat. Rev. Genet.* 11, 636–646 (2010). 10

Mali, P. et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339, 823–6 (2013).

Cong, L., Ran, F., Cox, D., Lin, S. & Barretto, R. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR / Cas Systems. *Science* (80-.). 319, (2013).

Mario, R. et al. Altering the genome by Homologous Recombination. *Sci. Virol. Sci. Theor. Appl. Genet. Arch. Tierz. Kexue Tongbao K. Ozato al. Cell Differ. Aquac. Trans. Am. Fish. Soc* 244, 1288–1292 (1989). 20

Takata, M. et al. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J.* 17, 5497–508 (1998).

Cho, S. W. et al. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res.* 24, 132–41 (2014). 30

Schaefer, K. A. et al. Unexpected mutations after CRISPR – Cas9 editing in vivo Digenome-seq web tool for profiling CRISPR specificity. *Nature* 14, 547–548 (2017).

Wang, D. et al. Adenovirus-Mediated Somatic Genome Editing of Pten by CRISPR/Cas9 in Mouse Liver in Spite of Cas9-Specific Immune Responses. *Hum. Gene Ther.* 26, 432–42 (2015). 40

Chew, W. L. et al. A multifunctional AAV-CRISPR-Cas9 and its host response. *Nat. Methods* 13, 868–874 (2016).

Komor, A. C., Kim, Y. B., Packer, M. S., Zuris, J. A. & Liu, D. R. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* 533, 420–424 (2016).

Gaudelli, N. M. et al. Programmable base editing of A.T to G.C in genomic DNA without DNA cleavage. (2017). doi:10.1038/nature24644

Kim, K. et al. Highly efficient RNA-guided base editing in mouse embryos. *Nat. Biotechnol.* 35, 12–15 (2017). 10

Capone, J. P., Sharp, P. A. & RajBhandary, U. L. Amber, ochre and opal suppressor tRNA genes derived from a human serine tRNA gene. *EMBO J.* 4, 213–21 (1985).

Geslain, R. & Pan, T. Functional analysis of human tRNA isodecoders.
doi:10.1016/j.jmb.2009.12.018

Panchal, R. G., Wang, S., McDermott, J. & Link, C. J. Partial Functional Correction of Xeroderma Pigmentosum Group A Cells by Suppressor tRNA. *Hum. Gene Ther.* 10, 2209–2219 (1999). 20

Buvoli, M., Buvoli, A. & Leinwand, L. A. Suppression of nonsense mutations in cell culture and mice by multimerized suppressor tRNA genes. *Mol. Cell. Biol.* 20, 3116–24 (2000).

Wang, L., Brock, A., Herberich, B. & Schultz, P. G. Expanding the Genetic Code of *Escherichia coli*. *Science* (80-.). 292, (2001). 30

Ernst, R. J. et al. Genetic code expansion in the mouse brain. 1–5 (2016).
doi:10.1038/nchembio.2160

Han, S. et al. Expanding the genetic code of *Mus musculus*. *Nat. Commun.* 8, 14568 (2017).

Melcher, T. et al. A mammalian RNA editing enzyme. *Nature* 379, 460–464 (1996). 40

Rueter, S. M., Burns, C. M., Coode, S. A., Mookherjee, P. & Emeson, R. B. Glutamate receptor RNA editing in vitro by enzymatic conversion of adenosine to inosine. *Science* 267, 1491–4 (1995).

Montiel-Gonzalez, M. F., Vallecillo-Viejo, I., Yudowski, G. A. & Rosenthal, J. J. C. Correction of mutations within the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by site-directed RNA editing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 18285–90 (2013).

Wettengel, J., Reautschnig, P., Geisler, S., Kahle, P. J. & Stafforst, T. Harnessing human ADAR2 for RNA repair – Recoding a PINK1 mutation rescues mitophagy. *Nucleic Acids Res.* gkw911 (2016). doi:10.1093/nar/gkw911

10

Fukuda, M. et al. Construction of a guide-RNA for site-directed RNA mutagenesis utilising intracellular A-to-I RNA editing. *Sci. Rep.* 7, 41478 (2017).

Mort, M., Ivanov, D., Cooper, D. N. & Chuzhanova, N. A. A meta-analysis of nonsense mutations causing human genetic disease. *Hum. Mutat.* 29, 1037–1047 (2008).

Bidou, L., Allamand, V., Rousset, J.-P. & Namy, O. Sense from nonsense: therapies for premature stop codon diseases. *Trends Mol. Med.* 18, 679–688 (2012).

20

Li, K. et al. OCHRE SUPPRESSOR TRANSFER RNA RESTORED DYSTROPHIN EXPRESSION IN MDX MICE. *Life Sci.* 61, PL205-PL209 (1997).

Kiselev, A. V. et al. Suppression of nonsense mutations in the Dystrophin gene by a suppressor tRNA gene | Ispol'zovanie gena supressornoi tRNK dlja ispravlenija nonsens-mutatsii v gene distrofina. *Mol. Biol.* 36, 43–47 (2002).

30

Gautier, A. et al. Genetically Encoded Photocontrol of Protein Localization in Mammalian Cells. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 4086–4088 (2010).

Chatterjee, A., Xiao, H., Bollong, M., Ai, H. & Schultz, P. G. Efficient viral delivery system for unnatural amino acid mutagenesis in mammalian cells. 110, 11803–11808 (2013).

Greiss, S. & Chin, J. W. Expanding the Genetic Code of an Animal. 2, 14196–14199 (2011).

40

Robinson-Hamm, J. N. & Gersbach, C. A. Gene therapies that restore dystrophin expression for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Hum. Genet.* 135, 1029–1040 (2016).

Bulfield, G., Siller, W. G., Wight, P. A. & Moore, K. J. X chromosome-linked muscular dystrophy (*mdx*) in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 1189–92 (1984).

Sicinski, P. et al. The molecular basis of muscular dystrophy in the *mdx* mouse: a point mutation. *Science* 244, 1578–80 (1989).

Long, C. et al. Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. *Science* (80-.). 345, 1184–1188 (2014). 10

Nelson, C. E. et al. In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science* (80-.). 351, (2016).

Tabebordbar, M. et al. In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. *Science* (80-.). 351, 407–411 (2016).

Long, C. et al. Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. *Science* (80-.). 351, 400–403 (2016). 20

Bengtsson, N. E. et al. Muscle-specific CRISPR/Cas9 dystrophin gene editing ameliorates pathophysiology in a mouse model for Duchenne muscular dystrophy. *Nat. Commun.* 8, 14454 (2017).

Hodges, P. E. & Rosenberg, L. E. The *spfash* mouse: a missense mutation in the ornithine transcarbamylase gene also causes aberrant mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 4142–4146 (1989). 30

Yang, Y. et al. A dual AAV system enables the Cas9-mediated correction of a metabolic liver disease in newborn mice. *Nat. Biotechnol.* 34, 334–338 (2016).

Kuttan, A. & Bass, B. L. Mechanistic insights into editing-site specificity of ADARs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, E3295–E3304 (2012).

Tan, M. H. et al. Dynamic landscape and regulation of RNA editing in mammals. *Nature* 550, 249–254 (2017). 40

Varani, G., Cheong, C. & Tinoco, I. Structure of an Unusually Stable RNA Hairpin. Biochemistry 30, 3280–3289 (1991).

Tuerk, C. et al. CUUCGG hairpins: Extraordinarily stable RNA secondary structures associated with various biochemical processes (hairpin stability/sequence analysis/reverse transcriptase). Biochemistry 25, 1364–1368 (1988).

Fu, Y., Sander, J. D., Reyon, D., Cascio, V. M. & Joung, J. K. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. Nat. Biotechnol. 32, 279–84 (2014). 10

Adamala, K. P., Martin-Alarcon, D. A. & Boyden, E. S. Programmable RNA-binding protein composed of repeats of a single modular unit. Proc. Natl. Acad. Sci. 113, E2579–E2588 (2016).

East-Seletsky, A. et al. Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection. Nature (2016). doi:10.1038/nature19802 20

Abudayyeh, O. O. et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. Science 353, aaf5573 1-9 (2016).

O'Connell, M. R. et al. Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9. Nature 516, 263–266 (2014).

Abudayyeh, O. O. et al. RNA targeting with CRISPR–Cas13. Nature (2017). 30
doi:10.1038/nature24049

Cox, D. B. T. et al. RNA editing with CRISPR-Cas13. Science eaaq0180 (2017).
doi:10.1126/science.eaaq0180

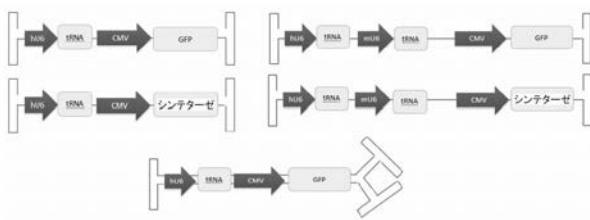
Gootenberg, J. S. et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. Science (80-.). 356, 438–442 (2017).

East-Seletsky, A., O'Connell, M. R., Burstein, D., Knott, G. J. & Doudna, J. A. RNA Targeting by Functionally Orthogonal Type VI-A CRISPR-Cas Enzymes. Mol. Cell 66, 373–383.e3 (2017). 40

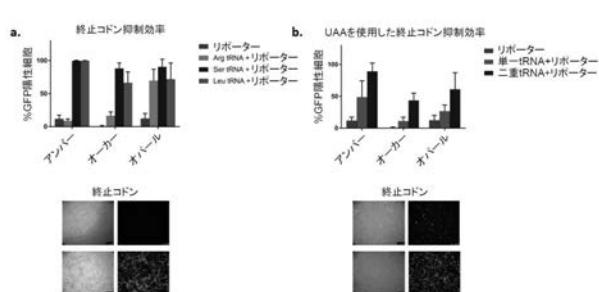
Grieger, J. C., Choi, V. W. & Samulski, R. J. Production and characterization of adeno-associated viral vectors. Nat. Protoc. 1, 1412–1428 (2006).

Analyzing CRISPR genome-editing experiments with CRISPResso. Nat. Biotechnol. 34, (2016).

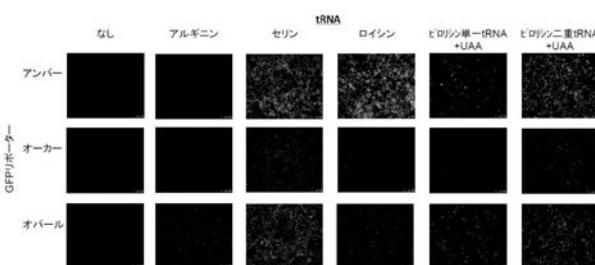
【図 1】



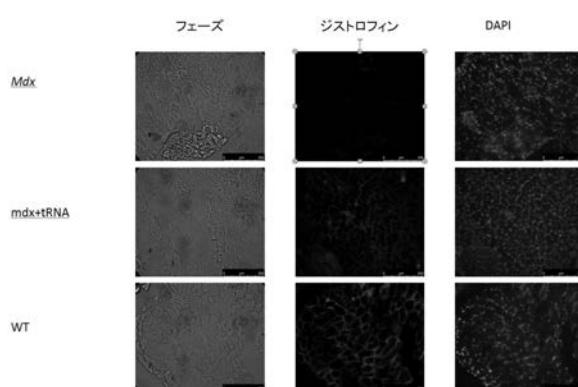
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【 四 5 】

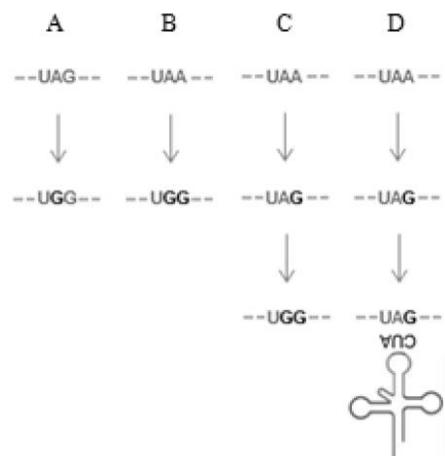
FIGURE 5

これはクローニングベクターTK_pA_Rの配列

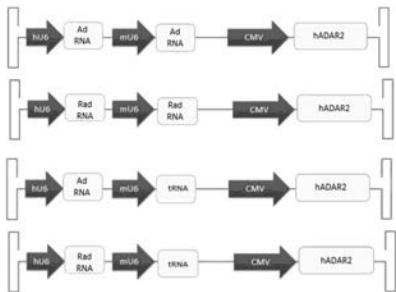
ADAR2構築物TK_pA_Rについて

ADAR2構築物pLK01_5

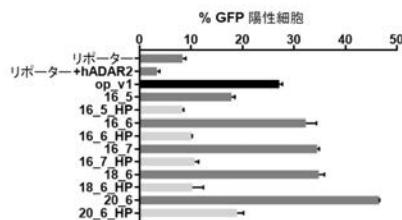
【 図 6 】



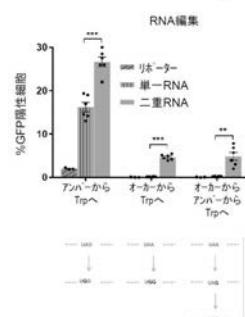
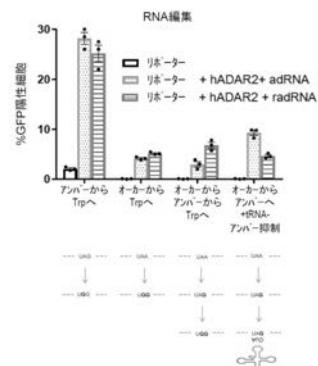
【図7】



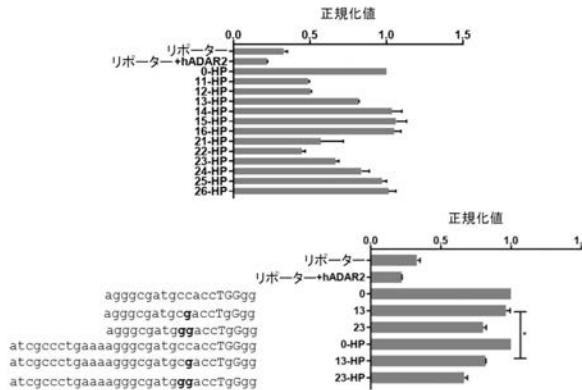
【 四 8 】



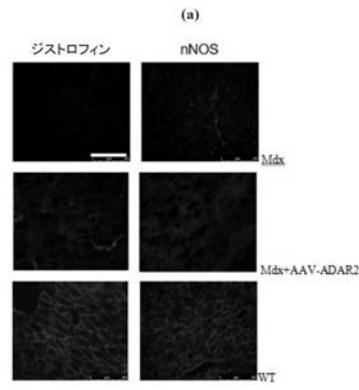
【 四 9 】



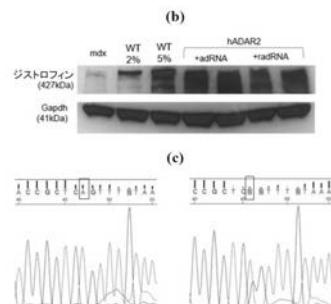
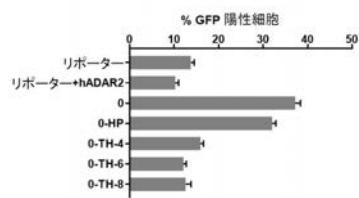
【図 1 0】



【図 1 2】



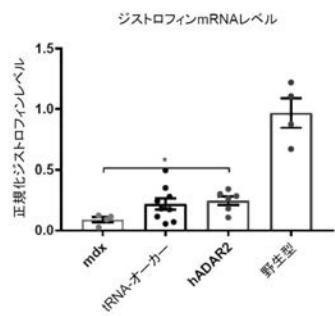
【図 1 1】



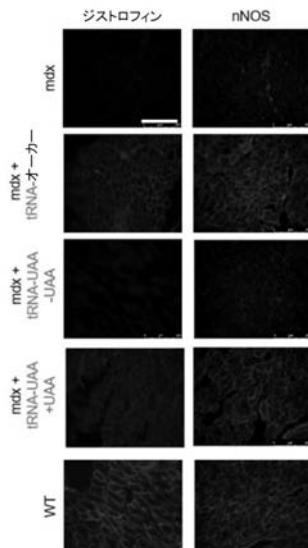
【図 1 3】



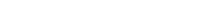
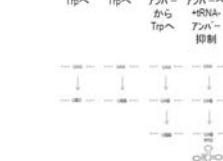
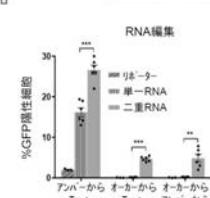
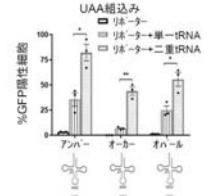
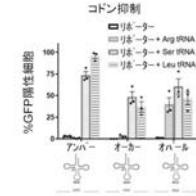
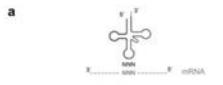
【図 1 4】



【図 1 5】



【図16】



【図17】



mdx → 22 → 23 → 24

In vivo DNA ターゲティング

CRISPR-Cas9

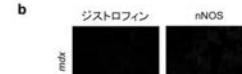
exon23 (Cas9 + gRNA-L + gRNA-R)

オーバー抑制

セリン tRNA

オーカー → Trp (TGG)

RNA編集



ジストロフィン nNOS

mdx

gRNA-AdAR2

mdx + AAV-AdAR2

WT

gRNA

AdAR2

RNA編集

In vivo RNA 編集

mdx

mdx + AdAR2

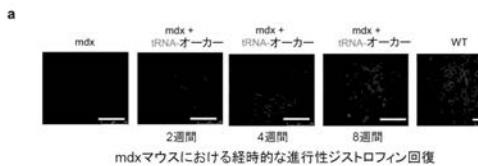
WT

RNA編集

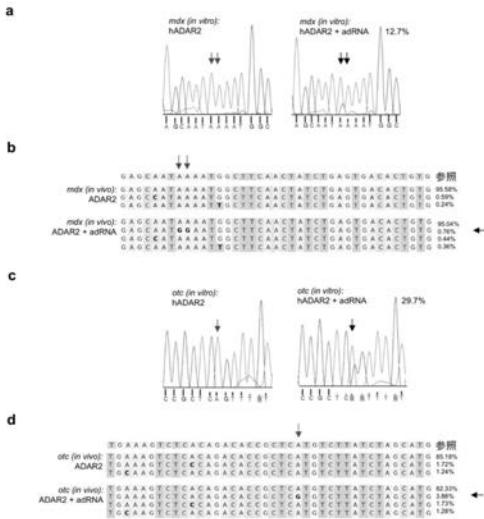
mdx

mdx + AdAR2

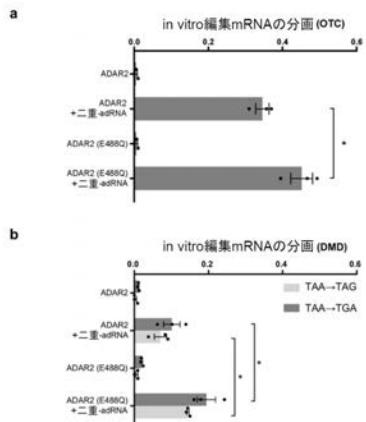
【図20】



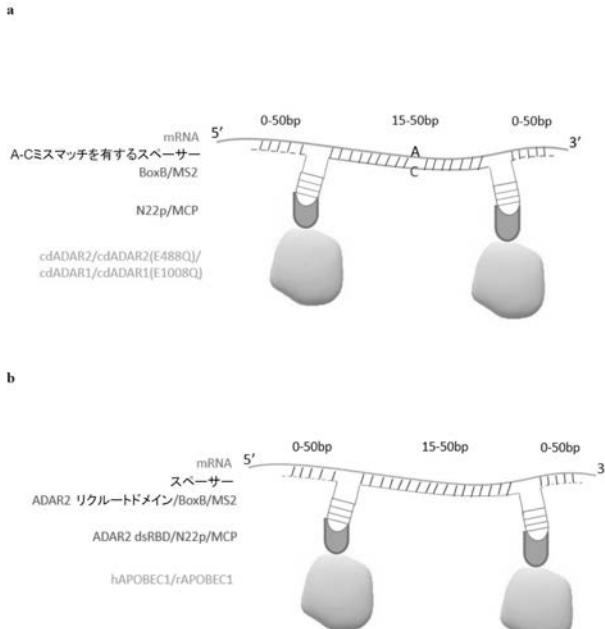
【図21】



【図22】

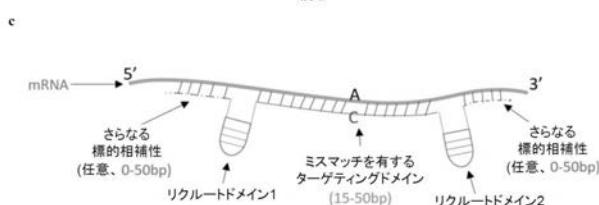


【図23-1】



【 図 2 3 - 2 】

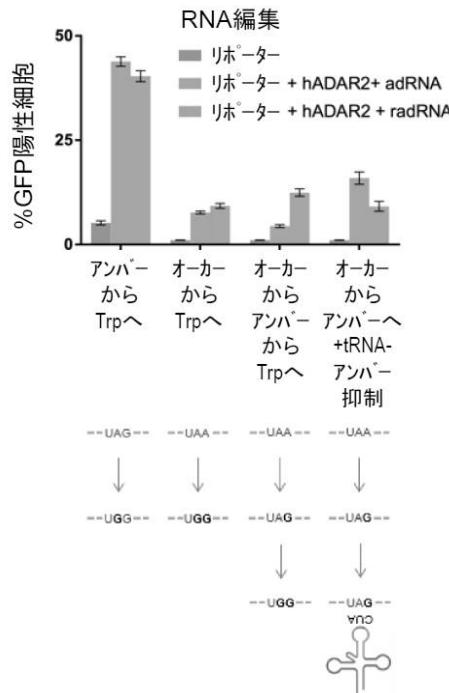
FIGURE 23
続き



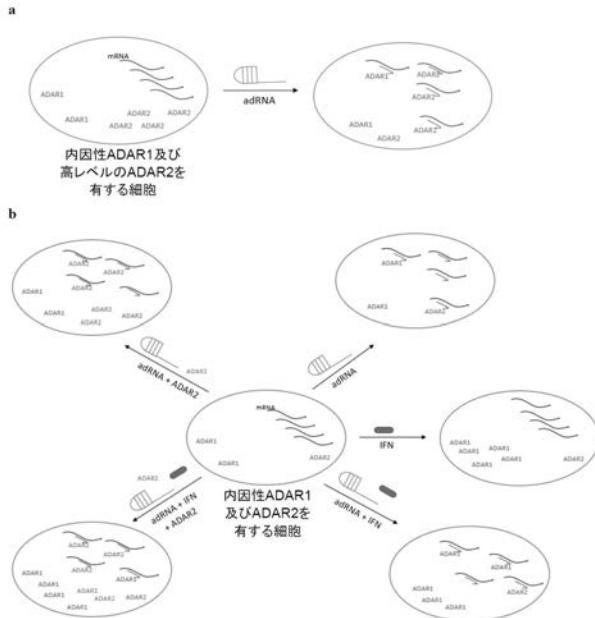
d



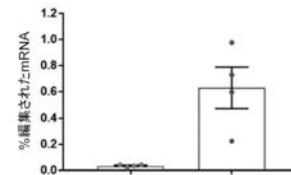
【図25】



【 図 2 4 】



【 図 2 6 】



【図27】

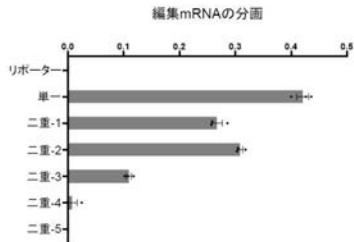
【図28】

```
v1 : GGTGGAATAGTATAACAAATATGCTAAATGTTTATAGTATCCCACACAAACCGAGGGGTGCTGT
v2 : GTGGAAATAGTATAACAAATATGCTAAATGTTTATAGTATCCCACACAAACCGAGGGGTGCTGTGGAAATAGTATAACAAATATG
v3 : GTGGAAATAGTATAACAAATATGCTAAATGTTTATAGTATCCCACACAAACCGAGGGGTGCTGTGGAAATAGTATAACAAATATG
v4 : GGTGGAATAGGAGGAGCACATATGCTAAATGTTTATAGTATCCCACACAAACCGAGGGGTGCTGTGGAAATAGTATAACAAATATG
v5 : GGTGGAATAGGAGGAGCACATATGCTAAATGTTTATAGTATCCCACACAAACCGAGGGGTGCTGTGGAAATAGTATAACAAATATG
v6 : GGTGGAATAGGAGGAGCACATATGCTAAATGTTTATAGTATCCCACACAAACCGAGGGGTGCTGTGGAAATAGTATAACAAATATG
v7 : GTGGAAAGAGGAGGAGCACATATGCTAAATGTTTATAGTATCCCACACAAACCGAGGGGTGCTGTGGAAATAGTATAACAAATATG
v8 : GGTGGAATAGGAGGAGCACATATGCTAAATGTTTATAGTATCCCACACAAACCGAGGGGTGCTGTGGAAATAGTATAACAAATATG
v9 : GGTGGAATAGGAGGAGCACATATGCTAAATGTTTATAGTATCCCACACAAACCGAGGGGTGCTGTGGAAATAGTATAACAAATATG
v10: GGTGGAATAGGAGGAGCACATATGCTAAATGTTTATAGTATCCCACACAAACCGAGGGGTGCTGTGGAAATAGTATAACAAATATG
```

【図30】



【図29】



【図31】

野生型 cDNA
Tyr Ala His
ACC GCT CG
Trp Ala Glu
ACC GTC TTA
Arg*** Phe cDNA
Tyr Ala Glu Phe Val Lys Leu Phe Leu Pro Lys Phe Ile Ser Asn Ser Asp Gly
ACC GCT GAG TTT GTC AAA CTT TTC CCA AAC TTT ATT TCA AAC TCT GAT GGG
Arg*** E cDNA
Tyr Ala Glu Phe Val Lys Leu Phe Leu Pro Lys Phe Ile Ser Asn Ser Asp Gly
ACC GCT GAG TTT GTC AAA CTT TTC CCA AAC TTT ATT TCA AAC TCT GAT GGG

单一:
GTGGAAATAGTATAACAAATATGCTAAATGTTTATAGTATCCCACACAAACCGAGGGGTGCTGTGGAAATAGTATAACAAATATG
二重1:
GTGGAAATAGTATAACAAATATGCTAAATGTTTATAGTATCCCACACAAACCGAGGGGTGCTGTGGAAATAGTATAACAAATATG
CTAAATGTTTATAGTATCCCAC
二重2:
GTGGAAATAGTATAACAAATATGCTAAATGTTTATAGTATCCCACACAAACCGAGGGGTGCTGTGGAAATAGTATAACAAATATG
CTAAATGTTTATAGTATCCCAC
二重3:
GTGGAAATAGTATAACAAATATGCTAAATGTTTATAGTATCCCACACAAACCGAGGGGTGCTGTGGAAATAGTATAACAAATATG
CTAAATGTTTATAGTATCCCAC
二重4:
GTGGAAATAGTATAACAAATATGCTAAATGTTTATAGTATCCCACACAAACCGAGGGGTGCTGTGGAAATAGTATAACAAATATG
CTAAATGTTTATAGTATCCCAC
二重5:
GTGGAAATAGTATAACAAATATGCTAAATGTTTATAGTATCCCACACAAACCGAGGGGTGCTGTGGAAATAGTATAACAAATATG
CTAAATGTTTATAGTATCCCAC

【配列表】

[2020508685000001.app](#)

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US18/20762
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - C12Q 1/68; C12N 15/09, 5/10, 15/79, 15/85 (2018.01) CPC - C12Q 1/6883; C12N 15/09, 5/10, 15/79, 15/8509		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <i>See Search History document</i>		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched <i>See Search History document</i>		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) <i>See Search History document</i>		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2002/0156042 A1 (PANCHAL, RG et al.) 24 October, 2002; paragraphs [0010]-[0011], [0013], [0015], [0039], [0069], [0076]; claims 14, 32; figures 1B-1C, 2A	1, 3/1, 4/3/1, 11, 13/11, 14/13/11, 24, 26/24, ~27/26/24
Y		2, 3/2, 4/3/2, 5/1-2, 8/5/1-2, 12, 13/12, 14/13/12, 15/11-12, 16/15/11-12, 25, 26/25, 27/26/25, 28/24-25, 29/28/24-25
Y	(GATTI) SMRT Compounds Correct Nonsense Mutations in Primary Immunodeficiency and Other Genetic Models. Annals of the New York Academy of Sciences. February, 2012; Vol. 1250; pages 1-13; figure 1; page 4, paragraph 3; DOI: 10.1111/j.1749-6632.2012.06467.x	2, 3/2, 4/3/2, 5/2, 6/5/2, 12, 13/12, 14/13/12, 15/12, 16/15/12, 25, 26/25, 27/26/25, 28/25, 29/28/25
Y	(BIDDLE, W et al.) Modification of Orthogonal tRNAs: Unexpected Consequences for Sense Codon Reassignment. Nucleic Acids Research. 23 October, 2016; Vol. 44, No. 21; pages 10042-10050; abstract; page 10043, column 1, paragraph 2; page 10044, column 2, paragraph 2; DOI: 10.1093/nar/gkw948	5/1-2, 6/5/1-2, 15/11-12, 16/15/11-12, 28/24-25, 29/28/24-25
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 17 June 2018 (17.07.2018)		Date of mailing of the international search report 01 AUG 2018
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/U.S., Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas <small>PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774</small>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US18/20762
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,759,833 A (SHIBA, K et al.) 02 June, 1998; claim 9	6/5/1-2, 16/15/11-12, 29/28/24-25
P, X	(KATREKAR, D et al.) In vivo RNA Targeting of Point Mutations via Suppressor tRNAs and Adenosine Deaminases. BioRxiv. 27 October, 2017; pages 1-25; whole document; DOI: 10.1101/210278	1-2, 3/1-2, 4/3/1-2, 5/1-2, 6/5/1-2, 11-12, 13/11-12, 14/13/11-12, 15/11-12, 16/15/11-12, 24-25, 26/24-25, 27/26/24-25, 28/24-25, 29/28/24-25

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US18/20762

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: 7-10, 17-23, 30-34, 45-52, 63-73, 84-92 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

-**- Please See Within the Next Supplemental Page-***-

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Group 1 Claims 1-6, 11-16 and 24-29

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US18/20762

***Continued from Box III Observations where unity of invention is lacking ***
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, Claims 1-6, 11-16 and 24-29 are directed toward a method for restoring expression of a protein comprising a point mutation, comprising administering to a subject a vector encoding one or more tRNA having an anticodon sequence that recognizes a codon comprising the point mutation; a vector therefor; and a method of treating a disease associated therewith.

Group II, Claims 35-44, 53-62, and 74-83 are directed toward a method for restoring expression of a protein comprising a point mutation in an RNA sequence encoding the protein comprising administering one or more vectors encoding an ADAR based RNA editing system comprising one or more forward guide RNAs for the ADAR ("adRNAs") and one or more corresponding reverse guide RNAs for the ADAR ("radRNAs") to a subject; and a recombinant expression system and method of treating a disease associated therewith.

The inventions listed as Groups I and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical features of Group I include a tRNA having an anticodon that recognizes a codon comprising a point mutation, not present in Group II; the special technical features of Group II include an ADAR based RNA editing system, not present in Group I.

Groups I and II share the technical features including: a method for restoring expression of a protein comprising a point mutation in an RNA sequence encoding the protein in a subject in need thereof comprising administering to the subject an encoding vector; a method of treating a disease, disorder, or condition characterized by the presence of a point mutation in an RNA sequence encoding a gene associated with the disease, disorder, or condition in a subject in need thereof comprising administering to the subject an encoding vector.

However, these shared technical features are previously disclosed by US 6,309,830 B1 to Panchal et al. (hereinafter 'Panchal').

Panchal discloses a method for restoring expression of a protein comprising a point mutation in an RNA sequence encoding the protein (completing translation of a protein product from a sequence comprising a nonsense mutation (a method for restoring expression of a protein comprising a point mutation in an RNA sequence encoding the protein); column 3, lines 21-30) in a subject in need thereof (in a patient (subject) with XP (in need thereof); column 14, line 61 - column 15, line 50) comprising administering to the subject an encoding vector (comprising administering to the subject an encoding vector; column 4, lines 1-12, column 21, lines 23-28); and a method of treating a disease, disorder, or condition characterized by the presence of a point mutation in an RNA sequence encoding a gene associated with the disease, disorder, or condition (a method of treating Xeroderma Pigmentosa (a disease, disorder, or condition characterized by the presence of a point mutation in an RNA sequence encoding a gene associated with the disease, disorder, or condition); column 4, lines 1-12, column 14, line 61- column 15, line 50) in a subject in need thereof (in a patient (subject) with XP (in need thereof); column 14, line 61 - column 15, line 50) comprising administering to the subject an encoding vector (comprising administering to the subject an encoding vector; column 4, lines 1-12, column 21, lines 23-28).

Since none of the special technical features of the Groups I and II inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Panchal reference, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00
A 6 1 P 21/04	(2006.01)	A 6 1 P 21/04
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 5
A 6 1 P 7/06	(2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1
A 6 1 P 13/02	(2006.01)	A 6 1 P 7/06
A 6 1 P 3/06	(2006.01)	A 6 1 P 13/02
A 6 1 P 25/08	(2006.01)	A 6 1 P 3/06
A 6 1 P 25/18	(2006.01)	A 6 1 P 25/08
A 6 1 P 21/02	(2006.01)	A 6 1 P 25/18
A 6 1 P 9/10	(2006.01)	A 6 1 P 21/02
A 6 1 P 27/02	(2006.01)	A 6 1 P 9/10
A 6 1 P 25/16	(2006.01)	A 6 1 P 27/02
A 6 1 P 9/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/16
A 6 1 P 9/12	(2006.01)	A 6 1 P 9/00
A 6 1 P 1/04	(2006.01)	A 6 1 P 9/12
A 6 1 P 1/16	(2006.01)	A 6 1 P 1/04
A 6 1 P 1/12	(2006.01)	A 6 1 P 1/16
A 6 1 P 3/10	(2006.01)	A 6 1 P 1/12
A 6 1 P 9/06	(2006.01)	A 6 1 P 3/10
A 6 1 K 38/02	(2006.01)	A 6 1 P 9/06
A 6 1 K 38/21	(2006.01)	A 6 1 K 38/02 A 6 1 P 43/00 1 2 1 A 6 1 K 38/21

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

(72)発明者 カトレカール, ドゥルヴァ

アメリカ合衆国 9 2 0 9 3 カリフォルニア州, ラホヤ, メール コード: 9 0 1 0 , ギルマ
ン ドライブ 9 5 0 0 , ユーシー サンディエゴ

F ターム(参考) 4C084 AA01 AA02 AA03 AA13 BA03 BA41 DA21 DA22 NA05 NA14
ZA021 ZA022 ZA061 ZA062 ZA181 ZA182 ZA331 ZA332 ZA361 ZA362
ZA381 ZA382 ZA421 ZA422 ZA551 ZA552 ZA681 ZA682 ZA731 ZA732
ZA751 ZA752 ZA811 ZA812 ZA941 ZA942 ZB211 ZB212 ZB261 ZB262
ZC331 ZC332 ZC351 ZC352 ZC411 ZC412
4H045 AA10 AA20 AA30 BA41 CA40 DA89 EA20 FA74