

明 細 書

発明の名称：

化学修飾核酸を導入した安定型標的編集ガイドRNA

技術分野

[0001] 本発明は、化学修飾核酸を導入した安定型標的編集ガイドRNAに関する。

背景技術

[0002] ゲノム編集技術の開発をきっかけに、生物の設計図である遺伝情報、つまりは細胞内のDNA情報を改変することで生命現象をコントロールする方法が、疾患治療アプローチとして医療や創薬分野で用いられ始めている。DNAは細胞内で恒常的且つ不変的な分子であるため、DNA改変効果は対象細胞又は対象生物に永続的に残り続ける。一方、RNAは一過的な遺伝情報分子である。従ってRNA情報の改変は対象生物に永続的ではない一時的な遺伝情報改変効果を与えることができる。

[0003] RNA改変技術として、例えば、国際公開第2016/097212号には、標的RNAの一部に相補的なアンチセンス配列を含む標的指向性部分と、細胞に存在し、ヌクレオチドの編集を行うことができるRNA編集実体に結合してリクルートすることができるリクルート部分とを含む、標的RNA配列中のヌクレオチドの部位特異的編集のためのオリゴヌクレオチド構築物が記載されている。また例えば、国際公開第2017/010556号には、標的RNAと標的編集ガイドRNAとの複合体に二本鎖特異的アデノシンデアミナーゼ（ADAR）を作用させる部位特異的RNA変異導入方法が記載されている。またNature Biotechnology 37, 133-138（2019）には、ADARをリクルートするアンチセンスオリゴヌクレオチドに修飾核酸を導入することが記載されている。

[0004] RNA編集活性を有するアデノシンデアミナーゼとして、ADAR1及びADAR2のアイソフォームが知られており、これらは生体内において細胞

種特異的に発現していると考えられている。例えば、ADAR1は、ヒトの骨格筋細胞においてほとんど発現していないとされている。一方、ADAR2は、ヒトの骨髄細胞においてほとんど発現していないとされている。また、一般にヒト細胞内ではADAR1の方がより多く発現していると考えられている。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 細胞内でADAR1の編集活性を誘導することができれば、細胞種特異的なRNA編集が可能になると考えられる。また、ヒトの細胞においてより効率的なRNA編集が可能になると考えられる。したがって、本発明の一態様は、細胞内でADAR1の編集活性を誘導することができ、生体内における安定性に優れるオリゴヌクレオチドを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0006] 前記課題を解決するための具体的手段は以下の通りであり、本発明は以下の態様を包含する。

(1-1) 標的RNAを特定する第一オリゴヌクレオチドと、前記第一オリゴヌクレオチドの5'側に連結する第二オリゴヌクレオチドと、を含み、前記第一オリゴヌクレオチドは、前記標的RNA中のアデノシン残基に対応する標的対応ヌクレオチド残基と、前記標的対応ヌクレオチド残基の3'側に連結し、前記標的RNAに相補的な塩基配列を有する10から24残基のオリゴヌクレオチドと、前記標的対応ヌクレオチド残基の5'側に連結し、前記標的RNAに相補的な塩基配列を有する3から6残基のオリゴヌクレオチドとからなり、前記第二オリゴヌクレオチドは、その3'末端において前記標的RNAのヌクレオチド残基に対応するヌクレオチド残基が欠失しているか、前記標的RNAのヌクレオチド残基と相補対を形成しないヌクレオチド残基を有し、前記第二オリゴヌクレオチドは残基数が2から10であり、少なくともその3'末端以外のヌクレオチド残基が前記標的RNAと相補的な2本鎖構造を形成し、前記標的対応ヌクレオチド残基、並びにその3'側及

び5'側の各1残基からなるカウンタ領域から選択される少なくとも1残基は、天然型リボヌクレオチド残基以外のヌクレオチド残基であり、前記標的RNAに対する部位特異的編集を誘導するオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。

- [0007] (1-2) 前記第二オリゴヌクレオチドの残基数が4から8である(1-1)に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [0008] (1-3) 前記第二オリゴヌクレオチドの3'末端は、前記標的RNAのヌクレオチド残基に対応するヌクレオチド残基が欠失している(1-1)又は(1-2)に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [0009] (1-4) 前記部位特異的編集は、アデノシンデアミナーゼ1による酵素反応に起因する(1-1)から(1-3)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [0010] (1-5) 前記第一オリゴヌクレオチドと第二オリゴヌクレオチドの間に、アルキレンオキシ単位を含む連結部を含む(1-1)から(1-4)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [0011] (1-6) 前記第一オリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート結合を含む(1-1)から(1-5)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [0012] (1-7) 前記第一オリゴヌクレオチドは、2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基、2'-デオキシ-2'-フルオロリボヌクレオチド残基、架橋型ヌクレオチド残基、及び2'-デオキシリボヌクレオチドからなる群から選択される少なくとも1種の修飾ヌクレオチド残基を含む(1-1)から(1-6)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [0013] (1-8) 前記カウンタ領域は、ホスホロチオエート結合を含む(1-1)から(1-7)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [0014] (1-9) 前記標的対応ヌクレオチド残基が、ホスホロチオエート結合を含

む(1-1)から(1-8)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。

[0015] (1-10) 前記標的対応ヌクレオチド残基の3'側及び5'側の各1残基のうち少なくとも1残基は、2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基、又はデオキシヌクレオチド残基である(1-1)から(1-9)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。

[0016] (1-11) 前記第二オリゴヌクレオチドは、2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基、2'-デオキシ-2'-フルオロリボヌクレオチド残基、及び架橋型ヌクレオチド残基からなる群から選択される少なくとも1種の修飾ヌクレオチド残基を含む(1-1)から(1-10)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。

[0017] (1-12) 前記標的対応ヌクレオチド残基の3'側に連結するオリゴヌクレオチドが、2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチド残基と2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基とが交互に連結する塩基配列を有する(1-1)から(1-11)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。

[0018] (1-13) 前記標的対応ヌクレオチド残基の3'側に連結するオリゴヌクレオチドにおいて、前記標的対応ヌクレオチドから3'方向に数えて3番目のヌクレオチド残基が2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチド残基である(1-12)に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。

[0019] (1-14) 前記標的対応ヌクレオチド残基の3'側に連結するオリゴヌクレオチドが、架橋型ヌクレオチド残基と2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基とが交互に連結する塩基配列を有する(1-1)から(1-11)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。

[0020] (1-15) 前記標的対応ヌクレオチド残基の3'側に連結するオリゴヌクレオチドにおいて、前記標的対応ヌクレオチドから3'方向に数えて3番目のヌクレオチド残基が架橋型ヌクレオチド残基である(1-14)に記載の

オリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。

- [0021] (1-16) 前記標的対応ヌクレオチド残基の3'側に連結するオリゴヌクレオチドが、2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチド残基と架橋型ヌクレオチド残基とが交互に連結する塩基配列を有する(1-1)から(1-11)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [0022] (1-17) 前記標的対応ヌクレオチド残基の3'側に連結するオリゴヌクレオチドにおいて、前記標的対応ヌクレオチドから3'方向に数えて3番目のヌクレオチド残基が2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチド残基である(1-16)に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [0023] (1-18) 前記第一オリゴヌクレオチドにおいて、前記標的対応ヌクレオチド残基の5'側に連結するオリゴヌクレオチドが、2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基が連結する塩基配列を有する(1-1)から(1-17)のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [0024] (1-19) 前記第一オリゴヌクレオチドにおいて、前記標的対応ヌクレオチド残基の5'側に連結するオリゴヌクレオチドが、2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基と架橋型ヌクレオチド残基とが交互に連結する塩基配列を有する(1-1)から(1-17)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [0025] (1-20) 前記第一オリゴヌクレオチドにおいて、前記標的対応ヌクレオチド残基の5'側に連結するオリゴヌクレオチドが、2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基と2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチド残基とが交互に連結する塩基配列を有する(1-1)から(1-17)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [0026] (1-21) 前記第二オリゴヌクレオチドが、2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基が連結する塩基配列を有する(1-1)から(1-20)のい

ずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。

- [0027] (1-22) 前記第二オリゴヌクレオチドが、2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基と架橋型ヌクレオチド残基とが交互に連結する塩基配列を有する(1-1)から(1-20)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [0028] (1-23) 前記第二オリゴヌクレオチドが、2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基と2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチド残基とが交互に連結する塩基配列を有する(1-1)から(1-20)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [0029] (1-24) 前記標的RNAは、編集標的であるアデノシン残基の5'側にシチジン残基が連結し、前記第一オリゴヌクレオチドは、標的対応ヌクレオチド残基の3'側に連結するヌクレオチド残基が塩基としてヒポキサンチン残基を有する(1-1)から(1-23)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [0030] (1-25) 前記標的対応ヌクレオチド残基が、N-アルキルピリミジンヌクレオチド残基である(1-1)から(1-24)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [0031] (1-26) 前記第一オリゴヌクレオチド及び第二オリゴヌクレオチドのそれぞれは、ヌクレオチド残基がホスホロチオエート結合で連結されてなる(1-1)から(1-25)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [0032] (1-27) (1-1)から(1-26)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩を含有する遺伝性疾患治療剤。
- [0033] (1-28) (1-1)から(1-26)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩を活性成分として含有する医薬組成物。
- [0034] (1-29) 遺伝性疾患の予防、又は治療のための(1-28)に記載の医薬組成物。

- [0035] (1-30) 前記遺伝性疾患が、標的RNAにおけるアデノシン残基をイノシン残基に変換することにより治療されうる疾患である(1-29)に記載の医薬組成物。
- [0036] (1-31) 前記遺伝性疾患が、遺伝子におけるグアノシン残基からアデノシン残基への変異を原因とする遺伝性疾患である(1-29)に記載の医薬組成物。
- [0037] (1-32) 疾患の予防、又は治療のための医薬を製造するための(1-1)から(1-26)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩の使用。
- [0038] (1-33) 疾患の予防、又は治療における使用のための(1-1)から(1-26)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [0039] (1-34) (1-1)から(1-26)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬理上許容される塩の薬理学的有効量を温血動物に投与することによる疾患の予防、又は治療のための方法。
- [0040] (1-35) 前記疾患が遺伝性疾患である(1-34)に記載の方法。
- [0041] (1-36) 前記遺伝性疾患が、標的RNAにおけるアデノシン残基をイノシン残基に変換することにより治療されうる疾患である(1-35)に記載の方法。
- [0042] (1-37) 前記遺伝性疾患が、遺伝子におけるグアノシン残基からアデノシン残基への変異を原因とする遺伝性疾患である(1-35)に記載の方法。
- [0043] (1-38) 前記温血動物がヒトである(1-34)から(1-37)のいずれかに記載の方法。
- [0044] (1-39) 標的RNAを特定する第一オリゴヌクレオチドと、前記第一オリゴヌクレオチドの5'側に連結する第二オリゴヌクレオチドと、前記第一オリゴヌクレオチドと前記第二オリゴヌクレオチドとを連結し、アルキレンオキシ単位を含む連結部とを含み、前記第一オリゴヌクレオチドは、前記標

的RNA中のアデノシン残基に対応する標的対応ヌクレオチド残基と、前記標的対応ヌクレオチド残基の3'側に連結し、前記標的RNAに相補的な塩基配列を有する10から24残基のオリゴヌクレオチドと、前記標的対応ヌクレオチド残基の5'側に連結し、前記標的RNAに相補的な塩基配列を有する3から6残基のオリゴヌクレオチドとからなり、前記第二オリゴヌクレオチドは残基数が2から10であり、その3'末端において前記標的RNAのヌクレオチド残基に対応するヌクレオチド残基が欠失しているか、もしくは前記標的RNAのヌクレオチド残基と相補対を形成しないヌクレオチド残基を有し、少なくともその3'末端以外のヌクレオチド残基が前記標的RNAと相補的な2本鎖構造を形成しているか、又は前記標的RNAに相補的な塩基配列を有して前記標的RNAと相補的な2本鎖構造を形成し、前記標的対応ヌクレオチド残基、並びにその3'側及び5'側の各1残基からなるカウンタ領域から選択される少なくとも1残基は、天然型リボヌクレオチド残基以外のヌクレオチド残基であり、前記標的RNAに対する部位特異的編集を誘導するオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。

[0045] (2-1) 標的RNAを特定する第一オリゴヌクレオチドと、前記第一オリゴヌクレオチドの5'側に連結する第二オリゴヌクレオチドと、を含み、前記第一オリゴヌクレオチドは、前記標的RNA中のアデノシン残基に対応する標的対応ヌクレオチド残基と、前記標的対応ヌクレオチド残基の3'側に連結し、前記標的RNAに相補的な塩基配列を有する10から24残基のオリゴヌクレオチドと、前記標的対応ヌクレオチド残基の5'側に連結し、前記標的RNAに相補的な塩基配列を有する3から6残基のオリゴヌクレオチドとからなり、前記第二オリゴヌクレオチドは、その3'末端において前記標的RNAのヌクレオチド残基に対応するヌクレオチド残基が欠失しているか、前記標的RNAのヌクレオチド残基と相補対を形成しないヌクレオチド残基（以下、第二オリゴヌクレオチドにおける標的RNAのヌクレオチド残基と相補対を形成しないヌクレオチド残基と標的対応ヌクレオチド残基とを併せて「非相補ヌクレオチド残基」ともいう。）を有し、前記第二オリゴヌ

クレオチドは残基数が2から10であり、少なくともその3'末端以外のヌクレオチド残基が前記標的RNAと相補的な2本鎖構造を形成し、前記標的対応ヌクレオチド残基、並びにその3'側及び5'側の各1残基からなるカウンタ領域を有し、前記標的対応ヌクレオチド残基の3'側に連結するヌクレオチド残基が、2'-デオキシヌクレオチド残基であり、前記標的対応ヌクレオチド残基の3'側に連結するオリゴヌクレオチドにおいて、前記標的対応ヌクレオチドから3'方向に数えて3番目のヌクレオチド残基が2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチド残基であり、前記標的RNAに対する部位特異的編集を誘導するオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。

- [0046] (2-2) 前記第二オリゴヌクレオチドの残基数が4から8である(2-1)に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [0047] (2-3) 前記第二オリゴヌクレオチドの3'末端は、前記標的RNAのヌクレオチド残基に対応するヌクレオチド残基が欠失している(2-1)又は(2-2)に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [0048] (2-4) 前記部位特異的編集は、アデノシンデアミナーゼ1による酵素反応に起因する(2-1)から(2-3)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [0049] (2-5) 前記第一オリゴヌクレオチドと第二オリゴヌクレオチドの間に、アルキレンオキシ単位を含む連結部を含む(2-1)から(2-4)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [0050] (2-6) 前記第一オリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート結合を含む(2-1)から(2-5)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [0051] (2-7) 前記第一オリゴヌクレオチドは、2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基、2'-デオキシ-2'-フルオロリボヌクレオチド残基、架橋型ヌクレオチド残基、及び2'-デオキシリボヌクレオチドからなる群から選択される少なくとも1種の修飾ヌクレオチド残基を含む(2-1)から(

2-6) のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。

[0052] (2-8) 前記カウンタ領域は、ホスホロチオエート結合を含む(2-1) から(2-7) のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。

[0053] (2-9) 前記標的対応ヌクレオチド残基が、ホスホロチオエート結合を含む(2-1) から(2-8) のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。

[0054] (2-10) 前記標的対応ヌクレオチド残基の5' 側に連結するヌクレオチド残基が、2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基、又はデオキシヌクレオチド残基である(2-1) から(2-9) のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。

[0055] (2-11) 前記第二オリゴヌクレオチドは、2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基、2'-デオキシ-2'-フルオロリボヌクレオチド残基、及び架橋型ヌクレオチド残基からなる群から選択される少なくとも1種の修飾ヌクレオチド残基を含む(2-1) から(2-10) のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。

[0056] (2-12) 前記標的対応ヌクレオチド残基の3' 側に連結するオリゴヌクレオチドが、2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチド残基と2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基とが交互に連結する塩基配列を有する(2-1) から(2-11) のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。

[0057] (2-13) 前記標的対応ヌクレオチド残基の3' 側に連結するオリゴヌクレオチドが、架橋型ヌクレオチド残基と2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基とが交互に連結する塩基配列を有する(2-1) から(2-12) のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。

[0058] (2-14) 前記標的対応ヌクレオチド残基の3' 側に連結するオリゴヌクレオチドが、2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチド残基と架橋型ヌ

クレオチド残基とが交互に連結する塩基配列を有する(2-1)から(2-13)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。

[0059] (2-15) 前記第一オリゴヌクレオチドにおいて、前記標的対応ヌクレオチド残基の5'側に連結するオリゴヌクレオチドが、2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基が連結する塩基配列を有する(2-1)から(2-14)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。

[0060] (2-16) 前記第一オリゴヌクレオチドにおいて、前記標的対応ヌクレオチド残基の5'側に連結するオリゴヌクレオチドが、2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基と架橋型ヌクレオチド残基とが交互に連結する塩基配列を有する(2-1)から(2-15)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。

[0061] (2-17) 前記第一オリゴヌクレオチドにおいて、前記標的対応ヌクレオチド残基の5'側に連結するオリゴヌクレオチドが、2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基と2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチド残基とが交互に連結する塩基配列を有する(2-1)から(2-16)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。

[0062] (2-18) 前記第二オリゴヌクレオチドが、2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基が連結する塩基配列を有する(2-1)から(2-17)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。

[0063] (2-19) 前記第二オリゴヌクレオチドが、2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基と架橋型ヌクレオチド残基とが交互に連結する塩基配列を有する(2-1)から(2-18)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。

[0064] (2-20) 前記第二オリゴヌクレオチドが、2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基と2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチド残基とが交互に連結する塩基配列を有する(2-1)から(2-19)のいずれかに記載

のオリゴヌクレオチド、又はその薬学に許容される塩。

- [0065] (2-21) 前記標的RNAは、編集標的であるアデノシン残基の5'側にシチジン残基が連結し、前記第一オリゴヌクレオチドは、標的対応ヌクレオチド残基の3'側に連結するヌクレオチド残基が2'-デオキシイノシン残基である(2-1)から(2-20)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [0066] (2-22) 前記標的RNAは、編集標的であるアデノシン残基の5'側にウリジン残基が連結し、前記第一オリゴヌクレオチドは、標的対応ヌクレオチド残基の3'側に連結するヌクレオチド残基が2'-デオキシアデノシン残基である(2-1)から(2-20)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [0067] (2-23) 前記標的RNAは、編集標的であるアデノシン残基の5'側にアデノシン残基が連結し、前記第一オリゴヌクレオチドは、標的対応ヌクレオチド残基の3'側に連結するヌクレオチド残基がチミジン残基又は2'-デオキシウリジン残基である(2-1)から(2-20)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [0068] (2-24) 前記標的RNAは、編集標的であるアデノシン残基の5'側にグアノシン残基が連結し、前記第一オリゴヌクレオチドは、標的対応ヌクレオチド残基の3'側に連結するヌクレオチド残基が2'-デオキシイノシン残基である(2-1)から(2-20)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [0069] (2-25) 前記標的対応ヌクレオチド残基が、N-アルキルピリミジンヌクレオチド残基又は2'-デオキシシチジン残基である(2-1)から(2-24)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [0070] (2-26) 前記第一オリゴヌクレオチド及び第二オリゴヌクレオチドのそれぞれは、ヌクレオチド残基がホスホロチオエート結合で連結されてなる(2-1)から(2-25)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はそ

の薬学的に許容される塩。

[0071] (2-27) 前記第一オリゴヌクレオチドは、前記標的対応ヌクレオチドから3'方向に数えて10番目以降のヌクレオチド残基に、架橋型ヌクレオチド残基を有する(2-1)から(2-26)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。

[0072] (2-28) 前記第一オリゴヌクレオチドは、前記標的対応ヌクレオチドから3'方向に数えて10番目以降のヌクレオチド残基からなるオリゴヌクレオチドが、2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基と架橋型ヌクレオチド残基とが交互に連結する塩基配列を有する(2-27)に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。

[0073] (2-29) 前記第二オリゴヌクレオチドは、その3'末端のヌクレオチド残基から5'方向に数えて2番目以降のヌクレオチド残基に、架橋型ヌクレオチド残基を有する(2-1)から(2-28)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。

[0074] (2-30) 前記第二オリゴヌクレオチドは、その3'末端のヌクレオチド残基から5'方向に数えて2番目以降のヌクレオチド残基からなるオリゴヌクレオチドが、2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基と架橋型ヌクレオチド残基とが交互に連結する塩基配列を有する(2-29)に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。

[0075] (2-31) 以下の式のいずれかで表される(2-1)から(2-30)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。

$$\begin{aligned} & \text{U (M)} \wedge \text{T (L)} \wedge \text{G (M)} \wedge \text{A (L)} \wedge \text{U (M)} \wedge \text{G (F)} \wedge \text{A (F)} \\ & \wedge \text{C (M)} \wedge \text{C (M)} \wedge \text{c} \wedge \text{i} \wedge \text{G (M)} \wedge \text{U (F)} \wedge \text{G (M)} \wedge \text{G (F)} \\ & \wedge \text{C (M)} \wedge \text{A (F)} \wedge \text{U (M)} \wedge \text{C (F)} \wedge \text{A (M)} \wedge \text{G (L)} \wedge \text{U (M)} \\ & \wedge \text{T (L)} \wedge \text{G (M)} \quad (\text{AD1_ASS1.39}) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & \text{A (M)} \wedge \text{A (L)} \wedge \text{G (M)} \wedge \text{A (L)} \wedge \text{A (M)} \wedge \text{A (F)} \wedge \text{U (F)} \\ & \wedge \text{U (M)} \wedge \text{C (M)} \wedge \text{c} \wedge \text{a} \wedge \text{A (M)} \wedge \text{C (F)} \wedge \text{A (M)} \wedge \text{A (F)} \\ & \wedge \text{A (M)} \wedge \text{U (F)} \wedge \text{A (M)} \wedge \text{C (F)} \wedge \text{C (M)} \wedge \text{A (L)} \wedge \text{C (M)} \end{aligned}$$

M) ^ C (L) ^ U (M) (AD1__PANK2. 39)

A (M) ^ T (L) ^ G (M) ^ T (L) ^ C (M) ^ C (F) ^ A (F)
) ^ G (M) ^ U (M) ^ c ^ i ^ G (M) ^ A (F) ^ A (M) ^ U (F)
) ^ A (M) ^ U (F) ^ A (M) ^ A (F) ^ U (M) ^ T (L) ^ A (M)
) ^ C (L) ^ U (M) (AD1__NPHS2. 39)

G (M) ^ C (L) ^ A (M) ^ T (L) ^ C (M) ^ C (F) ^ U (F)
) ^ G (M) ^ C (M) ^ c ^ i ^ C (M) ^ A (F) ^ U (M) ^ A (F)
) ^ A (M) ^ A (F) ^ G (M) ^ G (F) ^ C (M) ^ A (L) ^ C (M)
) ^ C (L) ^ C (M) (AD1__GRIA2. 39)

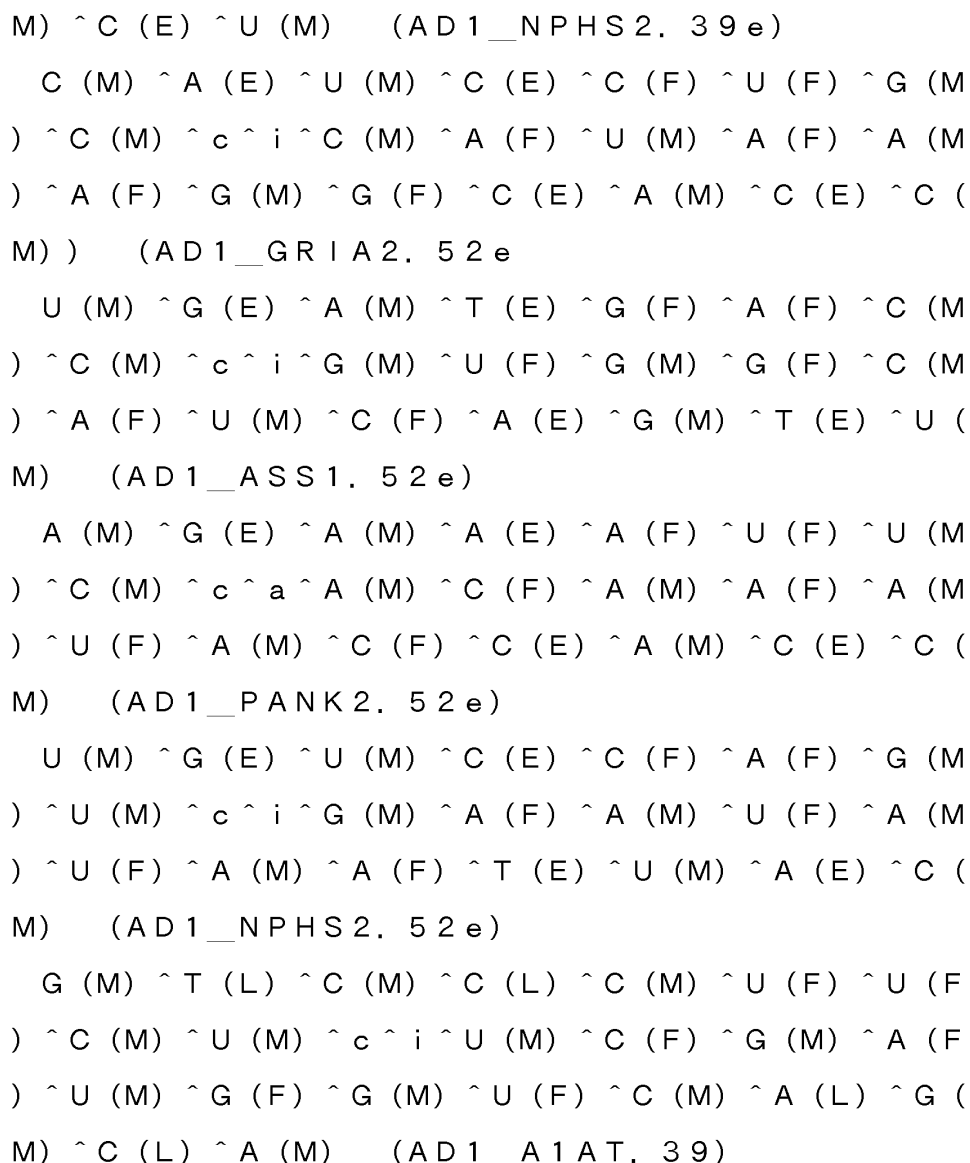
U (M) ^ G (L) ^ A (M) ^ U (L) ^ G (F) ^ A (F) ^ C (M)
) ^ C (M) ^ c ^ i ^ G (M) ^ U (F) ^ G (M) ^ G (F) ^ C (M)
) ^ A (F) ^ U (M) ^ C (F) ^ A (L) ^ G (M) ^ U (L) ^ U (M)
) (AD1__ASS1. 52)

G (M) ^ C (E) ^ A (M) ^ T (E) ^ C (M) ^ C (F) ^ U (F)
) ^ G (M) ^ C (M) ^ c ^ i ^ C (M) ^ A (F) ^ U (M) ^ A (F)
) ^ A (M) ^ A (F) ^ G (M) ^ G (F) ^ C (M) ^ A (E) ^ C (M)
) ^ C (E) ^ C (M) (AD1__GRIA2. 39e)

U (M) ^ T (E) ^ G (M) ^ A (E) ^ U (M) ^ G (F) ^ A (F)
) ^ C (M) ^ C (M) ^ c ^ i ^ G (M) ^ U (F) ^ G (M) ^ G (F)
) ^ C (M) ^ A (F) ^ U (M) ^ C (F) ^ A (M) ^ G (E) ^ U (M)
) ^ T (E) ^ G (M) (AD1__ASS1. 39e)

A (M) ^ A (E) ^ G (M) ^ A (E) ^ A (M) ^ A (F) ^ U (F)
) ^ U (M) ^ C (M) ^ c ^ a ^ A (M) ^ C (F) ^ A (M) ^ A (F)
) ^ A (M) ^ U (F) ^ A (M) ^ C (F) ^ C (M) ^ A (E) ^ C (M)
) ^ C (E) ^ U (M) (AD1__PANK2. 39e)

A (M) ^ T (E) ^ G (M) ^ T (E) ^ C (M) ^ C (F) ^ A (F)
) ^ G (M) ^ U (M) ^ c ^ i ^ G (M) ^ A (F) ^ A (M) ^ U (F)
) ^ A (M) ^ U (F) ^ A (M) ^ A (F) ^ U (M) ^ T (E) ^ A (M)



[0076] 上記式中、大文字はリボヌクレオチド残基、小文字は2'-デオキシリボヌクレオチド残基、N (M) は2'-O-メチル-リボヌクレオチド残基、N (F) は2'-デオキシ-2'-フルオロ-リボヌクレオチド残基、N (L) は、2'-O, 4'-C-メチレン化リボヌクレオチド残基、N (E) は、2'-O, 4'-C-エチレン化リボヌクレオチド残基を示し、「^」はヌクレオシドユニット間が-P (=S) (OH)-で結合していることを示す。

- [0077] (2-32) 前記オリゴヌクレオチド及びその薬学的に許容される塩は、5'末端又は3'末端において、G a l N A c、コレステロール及び脂肪酸を含むデリバリー分子がリンカー又はリン酸ジエステル結合（ホスホロチオエート結合を含む）を介して結合している（2-1）から（2-31）のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [0078] (2-33) (2-1) から（2-32）のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩を含有し、前記標的RNAに関連する疾患の治療に用いられる遺伝性疾患治療剤。
- [0079] (2-34) (2-1) から（2-32）のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩を活性成分として含有し、前記標的RNAに関連する疾患の治療に用いられる医薬組成物。
- [0080] (2-35) 遺伝性疾患の予防、又は治療のための（2-34）に記載の医薬組成物。
- [0081] (2-36) 前記遺伝性疾患が、前記標的RNAにおけるアデノシン残基をイノシン残基に変換することにより治療されうる疾患である（2-35）に記載の医薬組成物。
- [0082] (2-37) 前記遺伝性疾患が、遺伝子におけるグアノシン残基からアデノシン残基への変異を原因とする遺伝性疾患である（2-35）に記載の医薬組成物。
- [0083] (2-38) 前記標的RNAに関連する疾患の予防、又は治療のための医薬を製造するための（2-1）から（2-32）のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩の使用。
- [0084] (2-39) 前記標的RNAに関連する疾患の予防、又は治療における使用のための（2-1）から（2-32）のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [0085] (2-40) (2-1) から（2-32）のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩の薬理学的有効量を温血動物に投与することによる前記標的RNAに関連する疾患の予防、又は治療のための方

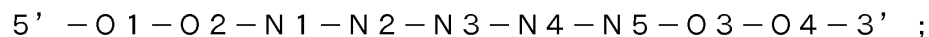
法。

- [0086] (2-41) 前記疾患が遺伝性疾患である(2-40)に記載の方法。
- [0087] (2-42) 前記遺伝性疾患が、標的RNAにおけるアデノシン残基をイノシン残基に変換することにより治療されうる疾患である(2-41)に記載の方法。
- [0088] (2-43) 前記遺伝性疾患が、遺伝子におけるグアノシン残基からアデノシン残基への変異を原因とする遺伝性疾患である(2-41)に記載の方法。
- [0089] (2-44) 前記疾患が、Ⅰ型シトルリン血症、血友病(血栓症)、ALS、パントテン酸関連神経変性疾患、ホモシスチン尿症、単状分節性糸球体硬化症、 $\alpha 1$ アンリトリプシン欠損症、フェニルケトン尿症、肥厚性皮膚骨膜炎、アレキサンダー病、原発性高シュウ酸尿症、Gilbert症候群、網膜色素変性症、遠位型ミオパチー及びヘモクロマトーシスからなる群から選択される少なくとも1つを含む(2-34)から(2-37)のいずれかに記載の医薬組成物。
- [0090] (2-45) 前記疾患が、Ⅰ型シトルリン血症、血友病(血栓症)、ALS、パントテン酸関連神経変性疾患、ホモシスチン尿症、単状分節性糸球体硬化症、 $\alpha 1$ アンリトリプシン欠損症、フェニルケトン尿症、肥厚性皮膚骨膜炎、アレキサンダー病、原発性高シュウ酸尿症、Gilbert症候群、網膜色素変性症、遠位型ミオパチー及びヘモクロマトーシスからなる群から選択される少なくとも1つを含む(2-38)に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩の使用。
- [0091] (2-46) 前記疾患が、Ⅰ型シトルリン血症、血友病(血栓症)、ALS、パントテン酸関連神経変性疾患、ホモシスチン尿症、単状分節性糸球体硬化症、 $\alpha 1$ アンリトリプシン欠損症、フェニルケトン尿症、肥厚性皮膚骨膜炎、アレキサンダー病、原発性高シュウ酸尿症、Gilbert症候群、網膜色素変性症、遠位型ミオパチー及びヘモクロマトーシスからなる群から選択される少なくとも1つを含む(2-39)に記載のオリゴヌクレオチド、

又はその薬学的に許容される塩。

[0092] (2-47) 前記疾患が、Ⅰ型シトルリン血症、血友病（血栓症）、ALS、パントテン酸関連神経変性疾患、ホモシスチン尿症、単状分節性糸球体硬化症、 $\alpha 1$ アンリトリプシン欠損症、フェニルケトン尿症、肥厚性皮膚骨膜炎、アレキサンダー病、原発性高シュウ酸尿症、Gilbert 症候群、網膜色素変性症、遠位型ミオパチー及びヘモクロマトーシスからなる群から選択される少なくとも1つを含む(2-40) から(2-43) のいずれかに記載の方法。

[0093] (3-1) 以下の式で表され、ヌクレオチド残基間の結合がホスホロチオエート結合を含む20から40残基を有し、標的RNAにおける編集標的であるアデノシン残基をイノシン残基に変換する遺伝子編集に使用されるオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩；



[上記式において、N1は2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基、リボヌクレオチド残基、2'-フルオロ-2'-デオキシリボヌクレオチド残基又は2'-デオキシリボヌクレオチド残基であり、

N2は塩基がシトシン若しくは3-メチルウラシルであるリボヌクレオチド残基、2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基又は2'-デオキシリボヌクレオチド残基であり、

N3は2'-デオキシリボヌクレオチド残基であり、

N4は2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基又は2'-フルオロ-2'-デオキシリボヌクレオチド残基であり、

N5は2'-フルオロ-2'-デオキシリボヌクレオチド残基であり、

O1は、存在しないか、又は2から10残基のオリゴヌクレオチドであって、少なくとも1つの架橋型ヌクレオチド残基を含み、架橋型ヌクレオチド残基以外は、2'-フルオロ-2'-デオキシリボヌクレオチド残基又は2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基であり、

O2は、2から10残基のオリゴヌクレオチドであって、2'-フルオロ

－2'－デオキシリボヌクレオチド残基及び2'－O－アルキルリボヌクレオチド残基からなり、

O3は、5から20残基のオリゴヌクレオチドであって、2'－フルオロ－2'－デオキシリボヌクレオチド残基及び2'－O－アルキルリボヌクレオチド残基からなり、

O4は、存在しないか、又は2から10残基のオリゴヌクレオチドであって、少なくとも1つの架橋型ヌクレオチド残基を含み、架橋型ヌクレオチド残基以外は、2'－フルオロ－2'－デオキシリボヌクレオチド残基又は2'－O－アルキルリボヌクレオチド残基である]；

前記オリゴヌクレオチドは、N2が編集標的であるアデノシン残基に対応し、O2が3'側から2から5番目の領域において、対応する標的RNAのヌクレオチド残基に対応するヌクレオチド残基が欠失しているか、対応する標的RNAのヌクレオチド残基と相補対を形成しないヌクレオチド残基を有し、

前記オリゴヌクレオチドの塩基配列は、N3の塩基が、編集標的であるアデノシン残基の5'側に隣接する塩基と相補的又は非相補的な塩基であってよく、N1、N4、N5、O1、O3及びO4の塩基が、標的RNAの対応するヌクレオチド残基の塩基と完全に相補的であり、

O2において、欠失しているヌクレオチド残基及び対応する標的RNAのヌクレオチド残基と相補対を形成しないヌクレオチド残基以外のO2の塩基が標的RNAの対応するヌクレオチド残基の塩基と完全に相補的である。

[0094] (3-2) 編集標的であるアデノシン残基の5'側のヌクレオチド残基とN3とが相補対を形成する場合、N3は2'－デオキシアデノシン残基、2'－デオキシイノシン残基（但し、編集標的であるアデノシン残基の5'側のヌクレオチド残基がアデノシン残基及びウリジン残基の場合を除く）、チミジン残基又は2'－デオキシウリジン残基（但し、編集標的であるアデノシン残基の5'側のヌクレオチド残基がグアノシン残基の場合を除く）であり、編集標的であるアデノシン残基の5'側のヌクレオチド残基とN3が相補

対を形成しない場合、N 3 は、2' -デオキシイノシン残基である（3 - 1）に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

- [0095] （3 - 3）前記標的RNAにおいて、編集標的であるアデノシン残基の5'側にシチジン残基が連結する場合、N 3 は2' -デオキシイノシン残基であり、編集標的であるアデノシン残基の5'側にウリジン残基が連結する場合、N 3 は2' -デオキシアデノシン残基であり、編集標的であるアデノシン残基の5'側にアデノシン残基が連結する場合、N 3 はチミジン残基又は2' -デオキシウリジン残基であり、編集標的であるアデノシン残基の5'側にグアノシン残基が連結する場合、N 3 は2' -デオキシイノシン残基である（3 - 1）に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [0096] （3 - 4）N 1 及びN 4 が、2' -O-アルキルリボヌクレオチド残基である（3 - 1）から（3 - 3）のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。
- [0097] （3 - 5）O 2 及びO 3 の少なくとも一方が、2' -フルオロ-2' -デオキシリボヌクレオチド残基と2' -O-アルキルリボヌクレオチド残基とが交互に配置されている配列を含む（3 - 1）から（3 - 4）のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。
- [0098] （3 - 6）O 3 が2' -フルオロ-2' -デオキシリボヌクレオチド残基と2' -O-アルキルリボヌクレオチド残基とが交互に配置されている配列からなる（3 - 1）から（3 - 5）のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。
- [0099] （3 - 7）O 1 及びO 4 の少なくとも一方は、1、2又は3個の架橋型ヌクレオチド残基を含む（3 - 1）から（3 - 6）のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。
- [0100] （3 - 8）架橋型ヌクレオチド残基同士が隣接しないように配置されていることを特徴とする（3 - 7）に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

- [0101] (3-9) O1及びO4の少なくとも一方は、架橋型ヌクレオチド残基と2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基とが交互に配置されている配列を含む(3-1)から(3-8)に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。
- [0102] (3-10) 前記架橋型ヌクレオチド残基が、D-リボフラノースにおいて2'-O, 4'-C-メチレン架橋されたヌクレオチド(LNA)残基又は2'-O, 4'-C-エチレン架橋されたヌクレオチド(ENA)残基である(3-1)から(3-9)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。
- [0103] (3-11) N2は、塩基がシトシンであって、リボヌクレオチド残基、2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基又は2'-デオキシリボヌクレオチド残基である(3-1)から(3-10)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。
- [0104] (3-12) ヌクレオチド残基間の結合が全てホスホロチオエート結合である(3-1)から(3-11)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。
- [0105] (3-13) 配列番号51、54、61、62又は63の塩基配列(但し、塩基配列中のUはTに置換されてもよい)を含む(3-1)から(3-12)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。
- [0106] (3-14) 以下に記載の式のいずれかで表される(3-1)に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

$$U(M) \wedge T(L) \wedge G(M) \wedge A(L) \wedge U(M) \wedge G(F) \wedge A(F) \wedge C(M) \wedge C(M) \wedge c \wedge i \wedge G(M) \wedge U(F) \wedge G(M) \wedge G(F) \wedge C(M) \wedge A(F) \wedge U(M) \wedge C(F) \wedge A(M) \wedge G(L) \wedge U(M) \wedge T(L) \wedge G(M) \quad (AD1_ASS1.39)$$

$$A(M) \wedge A(L) \wedge G(M) \wedge A(L) \wedge A(M) \wedge A(F) \wedge U(F) \wedge U(M) \wedge C(M) \wedge c \wedge a \wedge A(M) \wedge C(F) \wedge A(M) \wedge A(F) \wedge A(M) \wedge U(F) \wedge A(M) \wedge C(F) \wedge C(M) \wedge A(L) \wedge C(M)$$

M) ^ C (L) ^ U (M) (AD1__PANK2. 39)

A (M) ^ T (L) ^ G (M) ^ T (L) ^ C (M) ^ C (F) ^ A (F)
) ^ G (M) ^ U (M) ^ c ^ i ^ G (M) ^ A (F) ^ A (M) ^ U (F)
) ^ A (M) ^ U (F) ^ A (M) ^ A (F) ^ U (M) ^ T (L) ^ A (M)
) ^ C (L) ^ U (M) (AD1__NPHS2. 39)

G (M) ^ C (L) ^ A (M) ^ T (L) ^ C (M) ^ C (F) ^ U (F)
) ^ G (M) ^ C (M) ^ c ^ i ^ C (M) ^ A (F) ^ U (M) ^ A (F)
) ^ A (M) ^ A (F) ^ G (M) ^ G (F) ^ C (M) ^ A (L) ^ C (M)
) ^ C (L) ^ C (M) (AD1__GRIA2. 39)

U (M) ^ G (L) ^ A (M) ^ U (L) ^ G (F) ^ A (F) ^ C (M)
) ^ C (M) ^ c ^ i ^ G (M) ^ U (F) ^ G (M) ^ G (F) ^ C (M)
) ^ A (F) ^ U (M) ^ C (F) ^ A (L) ^ G (M) ^ U (L) ^ U (M)
) (AD1__ASS1. 52)

G (M) ^ C (E) ^ A (M) ^ T (E) ^ C (M) ^ C (F) ^ U (F)
) ^ G (M) ^ C (M) ^ c ^ i ^ C (M) ^ A (F) ^ U (M) ^ A (F)
) ^ A (M) ^ A (F) ^ G (M) ^ G (F) ^ C (M) ^ A (E) ^ C (M)
) ^ C (E) ^ C (M) (AD1__GRIA2. 39e)

U (M) ^ T (E) ^ G (M) ^ A (E) ^ U (M) ^ G (F) ^ A (F)
) ^ C (M) ^ C (M) ^ c ^ i ^ G (M) ^ U (F) ^ G (M) ^ G (F)
) ^ C (M) ^ A (F) ^ U (M) ^ C (F) ^ A (M) ^ G (E) ^ U (M)
) ^ T (E) ^ G (M) (AD1__ASS1. 39e)

A (M) ^ A (E) ^ G (M) ^ A (E) ^ A (M) ^ A (F) ^ U (F)
) ^ U (M) ^ C (M) ^ c ^ a ^ A (M) ^ C (F) ^ A (M) ^ A (F)
) ^ A (M) ^ U (F) ^ A (M) ^ C (F) ^ C (M) ^ A (E) ^ C (M)
) ^ C (E) ^ U (M) (AD1__PANK2. 39e)

A (M) ^ T (E) ^ G (M) ^ T (E) ^ C (M) ^ C (F) ^ A (F)
) ^ G (M) ^ U (M) ^ c ^ i ^ G (M) ^ A (F) ^ A (M) ^ U (F)
) ^ A (M) ^ U (F) ^ A (M) ^ A (F) ^ U (M) ^ T (E) ^ A (M)

M) ^ C (E) ^ U (M) (AD1__NPHS2. 39 e)

C (M) ^ A (E) ^ U (M) ^ C (E) ^ C (F) ^ U (F) ^ G (M)
) ^ C (M) ^ c ^ i ^ C (M) ^ A (F) ^ U (M) ^ A (F) ^ A (M)
) ^ A (F) ^ G (M) ^ G (F) ^ C (E) ^ A (M) ^ C (E) ^ C (M)
 M) (AD1__GRIA2. 52 e)

U (M) ^ G (E) ^ A (M) ^ T (E) ^ G (F) ^ A (F) ^ C (M)
) ^ C (M) ^ c ^ i ^ G (M) ^ U (F) ^ G (M) ^ G (F) ^ C (M)
) ^ A (F) ^ U (M) ^ C (F) ^ A (E) ^ G (M) ^ T (E) ^ U (M)
 M) (AD1__ASS1. 52 e)

A (M) ^ G (E) ^ A (M) ^ A (E) ^ A (F) ^ U (F) ^ U (M)
) ^ C (M) ^ c ^ a ^ A (M) ^ C (F) ^ A (M) ^ A (F) ^ A (M)
) ^ U (F) ^ A (M) ^ C (F) ^ C (E) ^ A (M) ^ C (E) ^ C (M)
 M) (AD1__PANK2. 52 e)

U (M) ^ G (E) ^ U (M) ^ C (E) ^ C (F) ^ A (F) ^ G (M)
) ^ U (M) ^ c ^ i ^ G (M) ^ A (F) ^ A (M) ^ U (F) ^ A (M)
) ^ U (F) ^ A (M) ^ A (F) ^ T (E) ^ U (M) ^ A (E) ^ C (M)
 M) (AD1__NPHS2. 52 e)

G (M) ^ T (L) ^ C (M) ^ C (L) ^ C (M) ^ U (F) ^ U (F)
) ^ C (M) ^ U (M) ^ c ^ i ^ U (M) ^ C (F) ^ G (M) ^ A (F)
) ^ U (M) ^ G (F) ^ G (M) ^ U (F) ^ C (M) ^ A (L) ^ G (M)
 M) ^ C (L) ^ A (M) (AD1__A1AT. 39)

[式中、大文字はリボヌクレオチド残基 (RNA)、小文字は2' -デオキシヌクレオチド残基 (DNA)、N (M) はD-リボフラノースが2' -O-メチル化されたりボヌクレオチド残基 (2' -O-メチル-リボヌクレオチド残基)、N (F) はD-リボフラノースの2' -デオキシ-2' -フルオロ化されたりボヌクレオチド残基 (2' -フルオロ-2' -デオキシリボヌクレオチド残基)、N (L) は、D-リボフラノースの2' -O, 4' -C-メチレン化されたりボヌクレオチド残基、N (E) は、D-リボフラノ

ースの2' - O, 4' - C - エチレン化されたりボヌクレオチド残基を示し、「^」はヌクレオシドユニット間が - P (= S) (OH) - で結合していることを示す。]

- [0107] (3-15) オリゴヌクレオチド及びその薬学的に許容される塩は、5' 末端又は3' 末端において、G a l N A c、コレステロール及び脂肪酸を含むデリバリー分子がリンカー又はリン酸ジエステル結合（ホスホロチオエート結合を含む）を介して結合している（3-1）から（3-14）のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [0108] (3-16) (3-1) から（3-15）のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩を有効成分として含有する医薬組成物。
- [0109] (3-17) (3-1) から（3-15）のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩を有効成分とする1塩基編集誘導剤。
- [0110] (3-18) 標的RNA中のアデノシン残基をイノシン残基に変換することにより予防又は治療され得る疾患を予防、又は治療するための（3-16）に記載の医薬組成物。
- [0111] (3-19) 前記疾患が遺伝性疾患である（3-18）に記載の医薬組成物
- [0112] (3-20) 前記疾患が、I型シトルリン血症、血友病（血栓症）、ALS、パントテン酸関連神経変性疾患、ホモシスチン尿症、単状分節性糸球体硬化症、 α 1アンリトリプシン欠損症、フェニルケトン尿症、肥厚性皮膚骨膜炎、アレキサンダー病、原発性高シュウ酸尿症、Gilbert症候群、網膜色素変性症、遠位型ミオパチー及びヘモクロマトーシスからなる群から選択される少なくとも1つを含む（3-19）に記載の医薬組成物。
- [0113] (3-21) (3-13) 又は（3-14）に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩を有効成分として含有する医薬組成物。
- [0114] (3-22) (3-13) 又は（3-14）に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩を有効成分とする1塩基編集誘導剤。
- [0115] (3-23) 標的RNA中のアデノシン残基をイノシン残基に変換することにより予防又は治療され得る疾患を予防、又は治療するための（3-21）

に記載の医薬組成物。

- [0116] (3-24) 前記疾患が遺伝性疾患である(3-23)に記載の医薬組成物
- [0117] (3-21) (3-13) 又は(3-14)に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩を有効成分として含有する医薬組成物。
- [0118] (3-22) (3-13) 又は(3-14)に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩を有効成分とする1塩基編集誘導剤。
- [0119] (3-23) 標的RNA中のアデノシン残基をイノシン残基に変換することにより予防又は治療され得る疾患を予防、又は治療するための(3-21)に記載の医薬組成物。
- [0120] (3-24) 前記疾患が遺伝性疾患である(3-23)に記載の医薬組成物
- [0121] (4-1) 標的RNAが、ASS1遺伝子のmRNAであり、編集標的はASS1 mRNAの1524番目のヌクレオチドであり、非相補ヌクレオチド及びN3を除くヌクレオチド配列がASS1 mRNAの1500から1540番目に含まれる連続する20から40塩基の領域と完全に相補的である、(3-1)から(3-15)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。
- [0122] (4-2) 標的RNAが、F5遺伝子のmRNAであり、編集標的はF5 mRNAの1696番目のヌクレオチドであり、非相補ヌクレオチド及びN3を除くヌクレオチド配列がmRNAの1672番から1712番目に含まれる連続する20から40塩基の領域と完全に相補的である、(3-1)から(3-15)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。
- [0123] (4-3) 標的RNAが、GRIA2遺伝子のmRNAであり、編集標的はGRIA2 mRNAの2135番目のヌクレオチドであり、非相補ヌクレオチド及びN3を除くヌクレオチド配列がGRIA2 mRNAの2111番から2151番目に含まれる連続する20から40塩基の領域と完全に相補的である、(3-1)から(3-15)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

- [0124] (4-4) 標的RNAが、PANK2遺伝子のmRNAであり、編集標的はPANK2 mRNAの1728番目のヌクレオチドであり、非相補ヌクレオチド及びN3を除くヌクレオチド配列がPANK2 mRNAの1704番から1744番目に含まれる連続する20から40塩基の領域と完全に相補的である、(3-1)から(3-15)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。
- [0125] (4-5) 標的RNAが、CBS遺伝子のmRNAであり、編集標的はCBS mRNAの1575番目のヌクレオチドであり、非相補ヌクレオチド及びN3を除くヌクレオチド配列がCBS mRNAの1551番から1591番目に含まれる連続する20から40塩基の領域と完全に相補的である、(3-1)から(3-15)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。
- [0126] (4-6) 標的RNAが、NPHS2遺伝子のmRNAであり、編集標的はNPHS2 mRNAの497番目のヌクレオチドであり、非相補ヌクレオチド及びN3を除くヌクレオチド配列がNPHS2 mRNAの473番から513番目に含まれる連続する20から40塩基の領域と完全に相補的である、(3-1)から(3-15)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。
- [0127] (4-7) 標的RNAが、SERPINA1遺伝子のmRNAであり、編集標的はSERPINA1 mRNAの1143番目のヌクレオチドであり、非相補ヌクレオチド及びN3を除くヌクレオチド配列がSERPINA1 mRNAの1119番から1159番目に含まれる連続する20から40塩基の領域と完全に相補的である、(3-1)から(3-15)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。
- [0128] (4-8) 標的RNAが、PAH遺伝子のmRNAであり、編集標的はPAH mRNAの896番目のヌクレオチドであり、非相補ヌクレオチド及びN3を除くヌクレオチド配列がPAH mRNAの872番から912番目に含まれる連続する20～40塩基の領域と完全に相補的である、(3-1

）から（３－１５）のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[0129] （４－９）標的RNAが、SLCO2A1遺伝子のpre-mRNAであり、編集標的はSLCO2A1 pre-mRNAの81034番目のヌクレオチドであり、非相補ヌクレオチド及びN3を除くヌクレオチド配列がSLCO2A1 pre-mRNAの81010番から81050番目に含まれる連続する20から40塩基の領域と完全に相補的である、（３－１）から（３－１５）のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[0130] （４－１０）標的RNAが、GFAP遺伝子のmRNAであり、編集標的はGFAP mRNAの2168番目のヌクレオチドであり、非相補ヌクレオチド及びN3を除くヌクレオチド配列がGFAP mRNAの2144番から2184番目に含まれる連続する20から40塩基の領域と完全に相補的である、（３－１）から（３－１５）のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[0131] （４－１１）標的RNAが、AGXT遺伝子のmRNAであり、編集標的はAGXT mRNAの550番目のヌクレオチドであり、非相補ヌクレオチド及びN3を除くヌクレオチド配列がAGXT mRNAの526番から566番目に含まれる連続する20から40塩基の領域と完全に相補的である、（３－１）から（３－１５）のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[0132] （４－１２）標的RNAが、UGT1A1遺伝子のmRNAであり、編集標的はUGT1A1 mRNAの229番目のヌクレオチドであり、非相補ヌクレオチド及びN3を除くヌクレオチド配列がUGT1A1 mRNAの205番から245番目に含まれる連続する20から40塩基の領域と完全に相補的である、（３－１）から（３－１５）のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[0133] （４－１３）標的RNAが、EYS遺伝子のmRNAであり、編集標的はE

Y S mRNAの8478番目のヌクレオチドであり、非相補ヌクレオチド及びN3を除くヌクレオチド配列がE Y S mRNAの8454番から8494番目に含まれる連続する20から40塩基の領域と完全に相補的である、(3-1)から(3-15)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[0134] (4-14) 標的RNAが、GNE遺伝子のmRNAであり、編集標的はGNE mRNAの924番目のヌクレオチドであり、非相補ヌクレオチド及びN3を除くヌクレオチド配列がGNE mRNAの900番から940番目に含まれる連続する20から40塩基の領域と完全に相補的である、(3-1)から(3-15)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[0135] (4-15) 標的RNAが、HFE遺伝子のmRNAであり、編集標的はHFE mRNAの1005番目のヌクレオチドであり、非相補ヌクレオチド及びN3を除くヌクレオチド配列がHFE mRNAの981番から1021番目に含まれる連続する20から40塩基の領域と完全に相補的である、(3-1)から(3-15)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

発明の効果

[0136] 本発明の一態様によれば、細胞内でADAR1の編集活性を誘導することができ、生体内における安定性に優れるオリゴヌクレオチドを提供することができる。

図面の簡単な説明

[0137] [図1A]細胞内におけるオリゴヌクレオチドによるモデル標的RNAに対する編集割合を示すグラフである。

[図1B]細胞内におけるオリゴヌクレオチドのRNA編集による発光強度変化を示すグラフである。

[図2A]細胞内におけるオリゴヌクレオチドによるモデル標的RNAに対する編集割合を示すグラフである。

[図2B]細胞内におけるオリゴヌクレオチドのRNA編集による発光強度変化を示すグラフである。

[図3]細胞内における内在性ADARに由来するオリゴヌクレオチドのRNA編集による発光強度変化を示すグラフである。

[図4A]細胞内におけるオリゴヌクレオチドによるhGAPDHに対する編集割合を示すグラフである。

[図4B]細胞内におけるオリゴヌクレオチドによるhGAPDHに対する編集割合を示すグラフである。

[図5]細胞内におけるオリゴヌクレオチドによるhGAPDHに対する編集割合を示すグラフである。

[図6]細胞内におけるオリゴヌクレオチドによるhGAPDHに対する編集割合を示すグラフである。

[図7A]細胞内におけるオリゴヌクレオチドによるhGAPDHに対する編集割合を示すグラフである。

[図7B]細胞内における内在性ADARに由来するオリゴヌクレオチドのhGAPDHに対する編集割合を示すグラフである。

[図8]オリゴヌクレオチドによる疾患由来配列を有するモデル標的RNAに対する編集割合を示すグラフである。

[図9]細胞内におけるオリゴヌクレオチドによる疾患由来配列を有するモデル標的RNAに対する編集割合を示すグラフである。

[図10]細胞内におけるオリゴヌクレオチドによるhGAPDHに対する編集割合を示すグラフである。

[図11]細胞内におけるオリゴヌクレオチドによるhGAPDHに対する編集割合を示すグラフである。

[図12A]細胞内におけるオリゴヌクレオチドによるhGAPDHに対する編集割合を示すグラフである。

[図12B]細胞内におけるオリゴヌクレオチドによるhGAPDHに対する編集割合を示すグラフである。

[図13A]細胞内におけるオリゴヌクレオチドによるh G A P D Hに対する編集割合を示すグラフである。

[図13B]細胞内におけるオリゴヌクレオチドによるh G A P D Hに対する編集割合を示すグラフである。

[図14A]細胞内におけるオリゴヌクレオチドによる疾患由来配列を有するモデル標的R N Aに対するA D A R 1存在下での編集割合を示すグラフである。

[図14B]細胞内におけるオリゴヌクレオチドによる疾患由来配列を有するモデル標的R N Aに対するA D A R 2存在下での編集割合を示すグラフである。

[図15A]細胞内におけるオリゴヌクレオチドによる疾患由来配列を有するモデル標的R N Aに対する編集割合を示すグラフである。

[図15B]細胞内におけるオリゴヌクレオチドによる疾患由来配列であるA S S 1遺伝子配列を有するモデル標的R N Aに対する編集割合を示すグラフである。

[図15C]細胞内におけるオリゴヌクレオチドによる疾患由来配列であるP A N K 2遺伝子配列を有するモデル標的R N Aに対する編集割合を示すグラフである。

[図15D]細胞内におけるオリゴヌクレオチドによる疾患由来配列であるN P H S 2遺伝子配列を有するモデル標的R N Aに対する編集割合を示すグラフである。

[図15E]細胞内におけるオリゴヌクレオチドによる疾患由来配列であるG R I A 2遺伝子配列を有するモデル標的R N Aに対する編集割合を示すグラフである。

[図16]細胞内におけるオリゴヌクレオチドによる疾患由来配列であるP A H . 2遺伝子配列を有するモデル標的R N Aに対する編集割合を示すグラフである。

[図17A]細胞内におけるオリゴヌクレオチドによる疾患由来配列であるA S S 1遺伝子配列を有するモデル標的R N Aに対する編集割合を示すグラフである。

[図17B]細胞内におけるオリゴヌクレオチドによる疾患由来配列である P A N K 2 遺伝子配列を有するモデル標的 R N A に対する編集割合を示すグラフである。

[図17C]細胞内におけるオリゴヌクレオチドによる疾患由来配列である N P H S 2 遺伝子配列を有するモデル標的 R N A に対する編集割合を示すグラフである。

[図18A]細胞内におけるオリゴヌクレオチドによる疾患由来配列である A S S 1 遺伝子配列を有するモデル標的 R N A に対する編集割合を示すグラフである。

[図18B]細胞内におけるオリゴヌクレオチドによる疾患由来配列である P A N K 2 遺伝子配列を有するモデル標的 R N A に対する編集割合を示すグラフである。

[図18C]細胞内におけるオリゴヌクレオチドによる疾患由来配列である N P H S 2 遺伝子配列を有するモデル標的 R N A に対する編集割合を示すグラフである。

[図18D]細胞内におけるオリゴヌクレオチドによる疾患由来配列である G R I A 2 遺伝子配列を有するモデル標的 R N A に対する編集割合を示すグラフである。

[図19]細胞内におけるオリゴヌクレオチドによる編集標的の 5' 側にグアノシン残基を有するモデル標的 R N A に対する編集割合を示すグラフである。

[図20]細胞内におけるオリゴヌクレオチドによる編集標的の 5' 側にアデノシン残基を有するモデル標的 R N A に対する編集割合を示すグラフである。

[図21A]細胞内におけるオリゴヌクレオチドによる編集標的の 5' 側にグアノシン残基を有するモデル標的 R N A に対する編集割合を示すグラフである。

[図21B]細胞内におけるオリゴヌクレオチドによる編集標的の 5' 側にアデノシン残基を有するモデル標的 R N A に対する編集割合を示すグラフである。

[図22]細胞内におけるオリゴヌクレオチドによる編集標的の 5' 側にグアノシン残基又はアデノシン残基を有するモデル標的 R N A に対する編集割合を

示すグラフである。

[図23A]細胞内におけるオリゴヌクレオチドによる疾患由来配列である A 1 A T 遺伝子配列を有するモデル標的 R N A に対する編集割合を示すグラフである。

[図23B]細胞内におけるオリゴヌクレオチドによる疾患由来配列である A 1 A T 遺伝子配列を有するモデル標的 R N A に対する編集割合を示すグラフである。

[図24]細胞内におけるオリゴヌクレオチドによる疾患由来配列である A 1 A T 遺伝子配列を有するモデル標的 R N A に対する修復を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0138] 本明細書において「工程」との語は、独立した工程だけではなく、他の工程と明確に区別できない場合であってもその工程の所期の目的が達成されれば、本用語に含まれる。また組成物中の各成分の含有量は、組成物中に各成分に該当する物質が複数存在する場合、特に断らない限り、組成物中に存在する当該複数の物質の合計量を意味する。さらに本明細書に記載される数値範囲の上限及び下限は、数値範囲として例示された数値をそれぞれ任意に選択して組み合わせることが可能である。以下、本発明の実施形態を詳細に説明する。ただし、以下に示す実施形態は、本発明の技術思想を具体化するための、オリゴヌクレオチド、医薬組成物及び疾患の予防又は治療のための方法を例示するものであって、本発明は、以下に示すオリゴヌクレオチド、医薬組成物及び疾患の予防又は治療のための方法に限定されない。

[0139] 標的編集ガイド R N A

標的 R N A に対する部位特異的編集を誘導するオリゴヌクレオチド（以下、標的編集ガイド R N A ; g R N A ともいう）は、標的 R N A を特定する第一オリゴヌクレオチドと、第一オリゴヌクレオチドの 5' 側に連結する第二オリゴヌクレオチドと、を含む。第一オリゴヌクレオチドは、標的 R N A 中のアデノシン残基に対応する標的対応ヌクレオチド残基と、標的対応ヌクレオチド残基の 3' 側に連結し、標的 R N A に相補的な塩基配列を有する 1 0

から24残基のオリゴヌクレオチドと、標的対応ヌクレオチド残基の5'側に連結し、標的RNAに相補的な塩基配列を有する3から6残基のオリゴヌクレオチドとからなっていてよい。第二オリゴヌクレオチドは、その3'末端において前記標的RNAのヌクレオチド残基に対応するヌクレオチド残基が欠失しているか、前記標的RNAのヌクレオチド残基と相補対を形成しないヌクレオチド残基を有していてもよい。また第二オリゴヌクレオチドは残基数が2から10であり、少なくともその3'末端以外のヌクレオチド残基が前記標的RNAと相補的な2本鎖構造を形成してよい。標的対応ヌクレオチド残基、並びにその3'側及び5'側の各1残基からなるカウンタ領域から選択される少なくとも1残基は、天然型リボヌクレオチド残基以外のヌクレオチド残基であってよい。

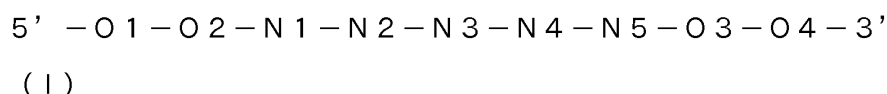
[0140] 標的編集ガイドRNAを構成する第二オリゴヌクレオチドは、標的RNAの1つのヌクレオチド残基が相補対を形成せず、そのヌクレオチド残基以外に対応するヌクレオチド残基が標的RNAと相補的な2本鎖構造を形成する塩基配列を有する。すなわち、第二オリゴヌクレオチドは標的RNAと不完全な2本鎖構造を形成する塩基配列を有する。このような特徴的な塩基配列を有する短鎖の第二オリゴヌクレオチドを、標的RNAを特定する第一オリゴヌクレオチドの5'側に有する標的編集ガイドRNAは、細胞内でADAR1の編集活性を優先的に誘導することができる。これは例えば、相補対を形成しないヌクレオチド残基の存在が、ADAR1のリクルートに対しては有利に働くためと考えることができる。また、カウンタ領域に天然型リボヌクレオチド残基以外のヌクレオチド残基を含むことで生体内における安定性に優れる。

[0141] 一態様において、標的編集オリゴヌクレオチドは、標的RNAを特定する第一オリゴヌクレオチドと、第一オリゴヌクレオチドの5'側に連結する第二オリゴヌクレオチドと、を含む。第一オリゴヌクレオチドは、標的RNA中のアデノシン残基に対応する標的対応ヌクレオチド残基と、標的対応ヌクレオチド残基の3'側に連結し、標的RNAに相補的な塩基配列を有する1

0から24残基のオリゴヌクレオチドと、標的対応ヌクレオチド残基の5'側に連結し、標的RNAに相補的な塩基配列を有する3から6残基のオリゴヌクレオチドとからなっていてよい。第二オリゴヌクレオチドは、その3'末端において前記標的RNAのヌクレオチド残基に対応するヌクレオチド残基が欠失しているか、標的RNAのヌクレオチド残基と相補対を形成しないヌクレオチド残基を有してよい。第二オリゴヌクレオチドは残基数が2から10であり、少なくともその3'末端以外のヌクレオチド残基が標的RNAと相補的な2本鎖構造を形成してよい。標的編集オリゴヌクレオチドは、標的対応ヌクレオチド残基の3'側に連結するヌクレオチド残基が、2'-デオキシヌクレオチド残基であってよく、標的対応ヌクレオチド残基の3'側に連結するオリゴヌクレオチドにおいて、標的対応ヌクレオチドから3'方向に数えて3番目のヌクレオチド残基が2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチド残基であってよい。

[0142] 標的編集オリゴヌクレオチドは、標的対応ヌクレオチド残基の3'側に2'-デオキシヌクレオチド残基を有し、標的対応ヌクレオチド残基の3'側に連結するオリゴヌクレオチドにおいて、標的対応ヌクレオチドから3'方向に数えて3番目に2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチド残基を有することで、生体内における安定性に優れ、細胞内でADARの編集活性をより効果的に誘導することができる。

[0143] 一態様において、標的編集オリゴヌクレオチドは、以下の式(1)で表され、ヌクレオチド残基間の結合がホスホロチオエート結合を含む20から40残基を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩であってよい。標的編集オリゴヌクレオチドの長さは、好ましくは20から30残基、より好ましくは21, 22, 23, 24, 25, 26, 27又は28残基であってよい。また、ヌクレオチド残基間の結合は、好ましくはすべてホスホロチオエート結合であってよい。標的編集オリゴヌクレオチドは、例えば、標的RNAにおける編集標的であるアデノシン残基をイノシン残基に変換する遺伝子編集に使用されてよい。



- [0144] 上記式(1)において、N1は2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基、リボヌクレオチド残基、2'-フルオロ-2'-デオキシリボヌクレオチド残基又は2'-デオキシリボヌクレオチド残基であってよく、好ましくは2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基、リボヌクレオチド残基又は2'-デオキシリボヌクレオチド残基であってよい。N2は塩基がシトシン若しくは3-メチルウラシルであるリボヌクレオチド残基、2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基又は2'-デオキシリボヌクレオチド残基であってよい。N3は2'-デオキシリボヌクレオチド残基であってよい。N4は2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基又は2'-フルオロ-2'-デオキシリボヌクレオチド残基であってよい。N5は2'-フルオロ-2'-デオキシリボヌクレオチド残基であってよい。
- [0145] O1は、存在しないか、又は2から10残基のオリゴヌクレオチドであってよい。O1は、少なくとも1つの架橋型ヌクレオチド残基を含み、架橋型ヌクレオチド残基以外は、2'-フルオロ-2'-デオキシリボヌクレオチド残基又は2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基であってよい。O2は、2から10残基のオリゴヌクレオチドであって、2'-フルオロ-2'-デオキシリボヌクレオチド残基及び2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基からなっていてよい。O2は、好ましくは3, 4, 5, 6, 7又は8残基、より好ましくは3又は4残基のオリゴヌクレオチドであって、2'-フルオロ-2'-デオキシリボヌクレオチド残基及び2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基からなっていてよい。O3は、5から20残基のオリゴヌクレオチドであって、2'-フルオロ-2'-デオキシリボヌクレオチド残基及び2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基からなっていてよい。O3は、好ましくは5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13又は14残基、より好ましくは6又は7残基のオリゴヌクレオチドであって、2'-フルオロ-2'-デオキシリボヌクレオチド残基及び2'-O-アルキルリボヌク

レオチド残基からなっていてよい。O4は、存在しないか、又は2から10残基のオリゴヌクレオチドであってよく、好ましくは2, 3, 4, 5, 6, 7又は8残基、より好ましくは4又は5残基のオリゴヌクレオチドであってよい。O4は、少なくとも1つの架橋型ヌクレオチド残基を含み、架橋型ヌクレオチド残基以外は、2'-フルオロ-2'-デオキシリボヌクレオチド残基又は2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基であってよい。

[0146] O2及びO3の少なくとも一方は、2'-フルオロ-2'-デオキシリボヌクレオチド残基と2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基とが交互に配置されている配列を含んでいてよく、好ましくは、2'-フルオロ-2'-デオキシリボヌクレオチド残基と2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基とが交互に配置されている配列からなる。O2において、2'-フルオロ-2'-デオキシリボヌクレオチド残基と2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基との連結の繰り返し数は、例えば1以上3以下であってよく、好ましくは1又は2であってよい。O3において、2'-フルオロ-2'-デオキシリボヌクレオチド残基と2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基との連結の繰り返し数は、例えば1以上10以下であってよく、好ましくは2以上6以下であってよく、より好ましくは3又は4であってよい。2'-デオキシリボヌクレオチド残基と2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基とが交互に連結する塩基配列は、2'-デオキシリボヌクレオチド残基から3'方向に交互に連結していてもよいし、2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基から3'方向に交互に連結していてもよい。O1及びO4の少なくとも一方は、1, 2又は3個の架橋型ヌクレオチド残基を含んでいてよく、この場合、架橋型ヌクレオチド残基同士が隣接しないように配置されていてよい。O1及びO4の少なくとも一方は、架橋型ヌクレオチド残基と2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基とが交互に配置されている配列を含んでいてよい。O1及びO4において、架橋型ヌクレオチド残基と2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基との連結の繰り返し数は、例えば1以上3以下であってよく、好ましくは2であってよい。2'-O-アルキルリボヌクレオチド

残基と架橋型ヌクレオチド残基とが交互に連結する塩基配列は、2'－O－アルキルリボヌクレオチド残基から3'方向に交互に連結していてもよいし、架橋型ヌクレオチド残基から3'方向に交互に連結していてもよい。

[0147] N 1 及び N 4 は、好ましくは2'－O－アルキルリボヌクレオチド残基であってよい。また、N 2 は、好ましくは塩基がシトシンであって、リボヌクレオチド残基、2'－O－アルキルリボヌクレオチド残基又は2'－デオキシリボヌクレオチド残基であってよい。

[0148] 標的編集オリゴヌクレオチドは、N 2 が編集標的であるアデノシン残基に対応し、O 2 が3'側から2から5番目の領域において、対応する標的RNAのヌクレオチド残基に対応するヌクレオチド残基が欠失しているか、対応する標的RNAのヌクレオチド残基と相補対を形成しないヌクレオチド残基を有してよい。

[0149] 標的編集オリゴヌクレオチドの塩基配列は、N 3 の塩基が、編集標的であるアデノシン残基の5'側に隣接する塩基と相補的又は非相補的な塩基であってよい。N 1、N 4、N 5、O 1、O 3 及びO 4 の塩基は、標的RNAの対応するヌクレオチド残基の塩基と完全に相補的であってよい。O 2 において、欠失しているヌクレオチド残基及び対応する標的RNAのヌクレオチド残基と相補対を形成しないヌクレオチド残基以外のO 2 の塩基が標的RNAの対応するヌクレオチド残基の塩基と完全に相補的であってよい。

[0150] 式(1)で表される標的編集オリゴヌクレオチドは、編集標的であるアデノシン残基の5'側のヌクレオチド残基とN 3 とが相補対を形成する場合、N 3 は2'－デオキシアデノシン残基、2'－デオキシイノシン残基（但し、編集標的であるアデノシン残基の5'側のヌクレオチド残基がアデノシン残基及びウリジン残基の場合を除く）、チミジン残基又は2'－デオキシウリジン残基（但し、編集標的であるアデノシン残基の5'側のヌクレオチド残基がグアノシン残基の場合を除く）であってよい。また、編集標的であるアデノシン残基の5'側のヌクレオチド残基とN 3 が相補対を形成しない場合、N 3 は、2'－デオキシイノシン残基であってよい。

- [0151] 標的編集オリゴヌクレオチドは、式（１）で表される構造を有していることで、生体内における安定性に優れ、細胞内でA D A Rの編集活性をより効果的に誘導することができる。
- [0152] 本実施形態の標的編集ガイドRNAにおいては、従来型の標的編集ガイドRNAと比較して長さが短い分、単純に製造コストが削減される。また、化学合成が容易になり、核酸医薬品開発等で用いられる既存の人工核酸等の修飾ヌクレオチドを標的編集ガイドRNAに適用することが容易になる。これにより、細胞内分解耐性の向上、細胞導入効率の向上等により、更なる高機能な標的編集ガイドRNAを提供することが可能になる。さらに標的編集ガイドRNAが編集誘導に必要な最小限残基数で構成されることで、標的RNAに対する特異性を維持しつつ、編集標的であるアデノシン残基以外の位置におけるオフターゲット編集を抑制することができる。
- [0153] 標的編集ガイドRNAは、例えば、標的編集を触媒するA D A RのうちA D A R 1を優先的に標的RNAにリクルートすることで、標的RNAに対する部位特異的編集を誘導する。A D A Rは二本鎖RNA中のアデノシン残基を加水分解的脱アミノ化反応によりイノシン残基に変換する酵素であり、哺乳動物の細胞に広く存在する。イノシン残基は構造がグアノシン残基と類似しているため、RNA情報の翻訳時にはグアノシン残基として翻訳され、その結果としてRNA情報が編集される。アミノ酸をコードしている部分にこのようなRNA編集が生じると、ゲノム上にDNA変異がないにも関わらずアミノ酸置換等が生じ、標的遺伝子の機能を制御できる。
- [0154] 標的編集ガイドRNAは、哺乳動物の細胞に導入されると、細胞中に存在するA D A R 1を優先的に標的RNAにリクルートして、標的RNAに対する部位特異的編集を誘導することができる。
- [0155] 本実施形態の標的編集ガイドRNAは、細胞内でA D A R 1優先的に編集活性を誘導することができる。A D A R 1優先的とは、例えば、i n v i t r oにおいては、A D A R 1に対する編集誘導活性のA D A R 2に対する編集誘導活性に対する比が1を超えることを意味し、好ましくは1.5以上

、2以上又は5以上であることを意味する。なお、細胞内におけるADAR1及びADAR2に対する編集誘導活性は、同一の発現ベクターを用いて構築したADAR1発現プラスミドとADAR2発現プラスミドとを用いて、細胞内に同一条件でトランスフェクションして発現させた場合に、同一の標的編集部位に対する編集誘導効率がADAR1の方が高い場合を言う。

[0156] 標的編集ガイドRNAが含む第一オリゴヌクレオチドは、標的RNAを特定する。標的RNAは、編集対象となるアデノシン残基を含むものであれば、特に制限はなく、細胞性RNA、ウイルス性RNAのいずれもよく、通常はタンパク質をコードするmRNA前駆体（pre-mRNAを含む）又はmRNAである。標的RNAにおける編集部位は、非翻訳領域、スプライス領域、エクソン、イントロン、又はRNAの安定性、構造もしくは機能に影響するいずれの領域に存在してもよい。また標的RNAは、修正又は変更すべき変異を含むものであってもよい。あるいは標的RNAはその配列が、天然型とは異なる表現型をコードするように変異されたものであってもよい。

[0157] 標的RNAは、タンパク質をコードするRNAであることが好ましい。コードされるタンパク質として具体的には、セロトニン受容体、グルタミン酸受容体、膜電位依存型カリウムチャネル、STAT3、NFκB1A、MAPK14等のシグナル伝達に関わるリン酸化タンパク質などを挙げることができる。

[0158] 標的編集ガイドRNAは、例えば遺伝性疾患の治療に適用することができる。遺伝性疾患は、例えば、標的RNAにおけるアデノシン残基をイノシン残基に変換することにより治療されうる疾患であってよい。また遺伝性疾患は、例えば、遺伝子におけるグアノシン残基からアデノシン残基への変異を原因とする遺伝性疾患であってよい。遺伝性疾患としては、例えば、嚢胞性線維症、白皮症、 α -1アンチトリプシン欠損症、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、喘息、 β -サラセミア、CADASIL症候群、シャルコー・マリー・トゥース病、慢性閉塞性肺（COPD）、遠位脊髄性筋萎縮症（DSMA）、デュシェンヌ／ベッカー型筋ジストロフィー、ジストロフィ

ー表皮水疱症、E p i d e r m y l o s i s 水疱症、ファブリー病、第V因子ライデン関連する障害、家族性腺腫、ポリポーシス、ガラクトース血症、ゴーシェ病、グルコースー6ーリン酸脱水素酵素欠損症、血友病、遺伝性ヘマクロマトーシス、ハンター症候群、ハンチントン病、ハーラー症候群、炎症性腸疾患（I B D）、遺伝性多凝集症候群、レーバー先天性黒内障、レッシュニャン症候群、リンチ症候群、マルファン症候群、ムコ多糖症、筋ジストロフィー、筋緊張型ジストロフィー型I 及びII、神経線維腫症、ニーマンピック病A、B 及びC型、N Y - e s o 1 関連膵臓癌、パーキンソン病、ポイツージェガース症候群、フェニルケトン尿症、ポンペ病、原発性毛様体病、プロトロンビンG 2 0 2 1 0 A 突然変異のようなプロトロンビン変異関連疾患、肺高血圧症、網膜色素変性症、サンドホッフ病、重症複合免疫不全症候群（S C I D）、鎌状赤血球貧血、脊髄性筋萎縮症、スタルガルト病、テイ・サックス病、アッシャー症候群、X連鎖免疫不全、癌の様々な形態（例えばB R C A 1 及び2 関連乳癌、卵巣癌等）などが挙げられる。

[0159] 遺伝性疾患の具体例としては、I 型シトルリン血症（A S S 1）、II 型シトルリン血症（S L C 2 5 A 1 3）、血友病（F a c t o r V L e i d e n）、原発性高シュウ酸尿症（A G X T）、遠位型ミオパチー（G N E）、嚢胞性線維症：c y s t i c f i b r o s i s（C F C F T R）、ホモシスチン尿症（C B S）、H u r l e r 症候群：ムコ多糖症（I D U A（S L C 2 6 A 1））、アレキササンダー病（G F A P）、網膜色素変性症（E Y S）、フェニルケトン尿症（P A H）、ヘモクロマトーシス（H F E）、ギルバート症候群（U G T 1 A 1）などを挙げるができる。なお、括弧内は標的遺伝子名である。

[0160] 遺伝性疾患の治療に適用される標的編集ガイドRNAは、例えば、配列番号49から55 及び配列番号60から63 からなる群から選択されるいずれかの塩基配列を含んでいてよく、好ましくは配列番号51、54、61、62 及び63 からなる群から選択されるいずれかの塩基配列を含んでいてよい。なお、標的編集ガイドRNAは、配列番号で特定される塩基配列中、Uが

Tに置換された塩基配列を含んでいてもよい。

- [0161] I型シトルリン血症の原因となるASS1遺伝子のc. 1168G>A変異(rs121908641)は、Homo sapiens argininosuccinate synthase 1 (ASS1), transcript variant 1, mRNA (GenBank Accession No: NM_000050.4)の1524番目のヌクレオチドのGからAへの変異である。一態様において、オリゴヌクレオチドは、当該アデノシン残基を標的とする。例えば、一態様において、オリゴヌクレオチドは、非相補ヌクレオチド残基およびN3を除くヌクレオチド配列が当該ASS1 mRNAの1500から1540番目に含まれる連続する20から40塩基の領域と完全に相補的であってよく、好ましくは、1504番から1534番目に含まれる連続する20から29塩基の領域と、より好ましくは1510番から1534番目に含まれる連続する20から25塩基の領域と完全に相補的であってよい。
- [0162] 血友病(血栓症)の原因となるFactor V遺伝子のc. 1601G>A変異(rs6025)は、Homo sapiens coagulation factor V (F5), mRNA (GenBank Accession No: NM_000130.5)の1696番目のヌクレオチドのGからAへの変異である。一態様において、オリゴヌクレオチドは、当該アデノシン残基を標的とする。例えば、一態様において、オリゴヌクレオチドは、非相補ヌクレオチド残基およびN3を除くヌクレオチド配列が当該F5 mRNAの1672番から1712番目に含まれる連続する20から40塩基の領域と完全に相補的であってよく、好ましくは、1676番から1706番目に含まれる連続する20から29塩基の領域と、より好ましくは1682番から1706番目に含まれる連続する20から25塩基の領域と完全に相補的であってよい。
- [0163] GRA2遺伝子の転写後修飾の異常は筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因となりうる。Homo sapiens glutamate ion

otropic receptor AMPA type subunit 2 (GRIA2), transcript variant 1, mRNA (GenBank Accession No: nm_000826.4) の 2135 番目のアデノシンにおける A-to-I RNA 編集の異常が当該転写後修飾の異常に該当しうる。一態様において、オリゴヌクレオチドは、当該アデノシン残基を標的とする。例えば、一態様において、オリゴヌクレオチドは、非相補ヌクレオチド残基および N3 を除くヌクレオチド配列が当該 GRIA2 mRNA の 2111 番から 2151 番目に含まれる連続する 20 から 40 塩基の領域と完全に相補的であってよく、好ましくは、2115 番から 2145 番目に含まれる連続する 20 から 29 塩基の領域と、より好ましくは 2121 番から 2145 番目に含まれる連続する 20 から 25 塩基の領域と完全に相補的であってよい。

[0164] パントテン酸関連神経変性疾患の原因となる PANK2 遺伝子の c. 1561 G>A 変異 (rs137852959) は、Homo sapiens pantothenate kinase 2 (PANK2), transcript variant 1, mRNA (GenBank Accession No: NM_153638.3) 上の G から A への変異である。一態様において、オリゴヌクレオチドは、当該アデノシン残基を標的とする。例えば、一態様において、オリゴヌクレオチドは、非相補ヌクレオチド残基および N3 を除くヌクレオチド配列が当該 PANK2 mRNA の 1704 番から 1744 番目に含まれる連続する 20 から 40 塩基の領域と完全に相補的であってよく、好ましくは、1708 番から 1738 番目に含まれる連続する 20 から 29 塩基の領域と、より好ましくは 1714 番から 1738 番目に含まれる連続する 20 から 25 塩基の領域と完全に相補的であってよい。

[0165] ホモシスチン尿症の原因となる CBS 遺伝子の c. 1330 G>A 変異 (rs28934891) は、Homo sapiens cystathionine beta-synthase (CBS), transcr

ipt variant 1, mRNA (GenBank Accession No: NM_000071.2) の1575番目のヌクレオチドのGからAへの変異である。一態様において、オリゴヌクレオチドは、当該アデノシン残基を標的とする。例えば、一態様において、オリゴヌクレオチドは、非相補ヌクレオチド残基およびN3を除くヌクレオチド配列が当該CBS mRNAの1551番から1591番目に含まれる連続する20から40塩基の領域と完全に相補的であってよく、好ましくは、1555番から1585番目に含まれる連続する20から29塩基の領域と、より好ましくは1561番から1585番目に含まれる連続する20から25塩基の領域と完全に相補的であってよい。

[0166] 単状分節性糸球体硬化症の原因となるNPHS2遺伝子のc. 413G>A変異(rs74315342)は、Homo sapiens NPHS2 stomatin family member, podocin (NPHS2), transcript variant 1, mRNA (GenBank Accession No: NM_014625.4) の497番目のヌクレオチドのGからAへの変異である。一態様において、オリゴヌクレオチドは、当該アデノシン残基を標的とする。例えば、一態様において、オリゴヌクレオチドは、非相補ヌクレオチド残基およびN3を除くヌクレオチド配列が当該NPHS2 mRNAの473番から513番目に含まれる連続する20から40塩基の領域と完全に相補的であってよく、好ましくは、477番から507番目に含まれる連続する20から29塩基の領域と、より好ましくは483番から507番目に含まれる連続する20から25塩基の領域と完全に相補的であってよい。

[0167] $\alpha 1$ アンリトリプシン欠損症の原因となるSERPINA1遺伝子のc. 1096G>A変異(rs28929474)は、Homo sapiens serpin family A member 1 (SERPINA1), transcript variant 1, mRNA (GenBank Accession No: NM_000295.5) の11

43番目のヌクレオチドのGからAへの変異である。一態様において、オリゴヌクレオチドは、当該アデノシン残基を標的とする。例えば、一態様において、オリゴヌクレオチドは、非相補ヌクレオチド残基およびN3を除くヌクレオチド配列が当該SERPINA1 mRNAの1119番から1159番目に含まれる連続する20～40塩基の領域と完全に相補的であってよく、好ましくは、1123番から1153番目に含まれる連続する20から29塩基の領域と、より好ましくは1129番から1153番目に含まれる連続する20から25塩基の領域と完全に相補的であってよい。

[0168] フェニルケトン尿症の原因となるPAH遺伝子のc. 782 G>A変異 (rs5030849) は、Homo sapiens phenylalanine hydroxylase (PAH), transcript variant 1, mRNA (GenBank Accession No: NM_000277.3) の896番目のヌクレオチドのGからAへの変異である。一態様において、オリゴヌクレオチドは、当該アデノシン残基を標的とする。例えば、一態様において、オリゴヌクレオチドは、非相補ヌクレオチド残基およびN3を除くヌクレオチド配列が当該PAH mRNAの872番から912番目に含まれる連続する20から40塩基の領域と完全に相補的であってよく、好ましくは、876番から906番目に含まれる連続する20から29塩基の領域と、より好ましくは882番から906番目に含まれる連続する20から25塩基の領域と完全に相補的であってよい。

[0169] 肥厚性皮膚骨膜症の原因となるSLCO2A1遺伝子のc. 940+1 G>A変異 (rs765249238) は、Homo sapiens solute carrier organic anion transporter family member 2A1 (SLCO2A1), mRNA (GenBank Accession No: NM_005630.3) のpre-mRNA上の81034番目のヌクレオチドのGからAへの変異である (編集標的は、3番染色体の133948892番目の(-))

鎖上に位置する)。一態様において、オリゴヌクレオチドは、当該アデノシン残基を標的とする。例えば、一態様において、オリゴヌクレオチドは、非相補ヌクレオチド残基およびN3を除くヌクレオチド配列が当該SLC02A1 pre-mRNAの81010番から81050番目に含まれる連続する20～40塩基の領域と完全に相補的であってよく、好ましくは、81014番から81044番目に含まれる連続する20から29塩基の領域と、より好ましくは81020番から81044番目に含まれる連続する20から25塩基の領域と完全に相補的であってよい。

[0170] アレキサンダー病の原因となるGFAP遺伝子のc. 716 G>A変異 (rs59565950) は、Homo sapiens glial fibrillary acidic protein (GFAP), transcript variant 1, mRNA (GenBank Accession No: NM_002055.5) の2168番目のヌクレオチドのGからAへの変異である。一態様において、オリゴヌクレオチドは、当該アデノシン残基を標的とする。例えば、一態様において、オリゴヌクレオチドは、非相補ヌクレオチド残基およびN3を除くヌクレオチド配列が当該GFAP mRNAの2144番から2184番目に含まれる連続する20から40塩基の領域と完全に相補的であってよく、好ましくは、2148番から2178番目に含まれる連続する20から29塩基の領域と、より好ましくは2154番から2178番目に含まれる連続する20から25塩基の領域と完全に相補的であってよい。

[0171] 原発性高シュウ酸尿症の原因となるAGXT遺伝子のc. 508 G>A変異 (rs121908529) は、Homo sapiens alanine--glyoxylate and serine--pyruvate aminotransferase (AGXT), mRNA (GenBank Accession No: NM_000030.3) の550番目のヌクレオチドのGからAへの変異である。一態様において、オリゴヌクレオチドは、当該アデノシン残基を標的とする。例えば、一態様において

、オリゴヌクレオチドは、非相補ヌクレオチド残基およびN3を除くヌクレオチド配列が当該AGXT mRNAの526番から566番目に含まれる連続する20から40塩基の領域と完全に相補的であってよく、好ましくは、530番から560番目に含まれる連続する20から29塩基の領域と、より好ましくは536番から560番目に含まれる連続する20から25塩基の領域と完全に相補的であってよい。

[0172] Gilbert症候群の原因となるUGT1A1遺伝子のc. 211G>A変異(rs4148323)は、Homo sapiens UDP glucuronosyltransferase family 1 member A1 (UGT1A1), mRNA (GenBank Accession No: NM_000463. 3)の229番目のヌクレオチドのGからAへの変異である。一態様において、オリゴヌクレオチドは、当該アデノシン残基を標的とする。例えば、一態様において、オリゴヌクレオチドは、非相補ヌクレオチド残基およびN3を除くヌクレオチド配列が当該UGT1A1 mRNAの205番から245番目に含まれる連続する20から40塩基の領域と完全に相補的であってよく、好ましくは、209番から239番目に含まれる連続する20から29塩基の領域と、より好ましくは215番から239番目に含まれる連続する20から25塩基の領域と完全に相補的であってよい。

[0173] 網膜色素変性症の原因となるEYS遺伝子のc. 7919G>A変異(rs527236066)は、Homo sapiens eyes shut homolog (EYS), transcript variant 1, mRNA (GenBank Accession No: NM_001142800. 2)の8478番目のヌクレオチドのGからAへの変異である。一態様において、オリゴヌクレオチドは、当該アデノシン残基を標的とする。例えば、一態様において、オリゴヌクレオチドは、非相補ヌクレオチド残基およびN3を除くヌクレオチド配列が当該EYS mRNAの8454番から8494番目に含まれる連続する20から40塩基の領域と完

全に相補的であってよく、好ましくは、8458番から8488番目に含まれる連続する20から29塩基の領域と、より好ましくは8464番から8488番目に含まれる連続する20から25塩基の領域と完全に相補的であってよい。

[0174] 遠位型ミオパチーの原因となるGNE遺伝子のc. 797 G>A変異 (rs121908622) は、Homo sapiens glucosamine (UDP-N-acetyl)-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE), transcript variant 1, mRNA (GenBank Accession No: NM_001128227.3) の924番目のヌクレオチドのGからAへの変異である。一態様において、オリゴヌクレオチドは、当該アデノシン残基を標的とする。例えば、一態様において、オリゴヌクレオチドは、非相補ヌクレオチド残基およびN3を除くヌクレオチド配列が当該GNE mRNAの900番から940番目に含まれる連続する20から40塩基の領域と完全に相補的であってよく、好ましくは、904番から934番目に含まれる連続する20から29塩基の領域と、より好ましくは910番から934番目に含まれる連続する20から25塩基の領域と完全に相補的であってよい。

[0175] ヘモクロマトーシスの原因となるHFE遺伝子のc. 845 G>A変異 (rs1800562) は、Homo sapiens homeostatic iron regulator (HFE), transcript variant 1, mRNA (GenBank Accession No: NM_000410.3) の1005番目のヌクレオチドのGからAへの変異である。一態様において、オリゴヌクレオチドは、当該アデノシン残基を標的とする。例えば、一態様において、オリゴヌクレオチドは、非相補ヌクレオチド残基およびN3を除くヌクレオチド配列が当該HFE mRNAの981番から1021番目に含まれる連続する20から40塩基の領域と完全に相補的であってよく、好ましくは、985番から1015番

目に含まれる連続する20から29塩基の領域と、より好ましくは991番から1015番目に含まれる連続する20から25塩基の領域と完全に相補的であってよい。

[0176] 第一オリゴヌクレオチドは、標的RNA中の編集標的となるアデノシン残基に対応する標的対応ヌクレオチド残基と、標的対応ヌクレオチド残基の3'側に連結し、標的RNAの対応する塩基配列に対して相補的な塩基配列を有する10から24残基の3'側オリゴヌクレオチドと、標的対応ヌクレオチド残基の5'側に連結し、標的RNAの対応する塩基配列に対して相補的な塩基配列を有する3から6残基の5'側オリゴヌクレオチドとからなる。標的対応ヌクレオチド残基の3'側と5'側にそれぞれ連結するオリゴヌクレオチドが、標的RNAと二本鎖構造を形成して、全体として相補鎖（以下、第一相補鎖ともいう）を形成することで、標的RNA及び標的RNAにおける編集標的部位が特定される。ここで、本明細書において相補的な塩基配列には、ワトソン・クリック型の塩基対を形成する塩基配列に加えて、例えば、G-U塩基対等の熱力学的に安定な非ワトソン・クリック型のゆらぎ塩基対を形成する塩基配列が含まれる。第一相補鎖を形成する塩基対は、標的対応ヌクレオチド残基を除いたすべてがワトソン・クリック型の塩基対であってもよく、少なくとも一部がゆらぎ塩基対であってもよい。第一相補鎖がゆらぎ塩基対を含む場合、その数は1又は2であってよい。以下、標的対応ヌクレオチド残基と、その5'側の1残基と、3'側の1残基の3残基からなる領域を便宜上、カウンタ領域と称し、第一オリゴヌクレオチドのカウンタ領域以外を非カウンタ領域と称することがある。

[0177] 一態様において、第一オリゴヌクレオチドにおける標的対応ヌクレオチド残基の3'側に連結する10から24残基の3'側オリゴヌクレオチドは、標的対応ヌクレオチド残基の3'側の1番目のヌクレオチド残基が、標的RNAの対応するヌクレオチド残基と相補対を形成しないヌクレオチド残基であり、それ以外のヌクレオチド残基が標的RNAの対応するヌクレオチド残基と相補対を形成して、標的RNAと二本鎖構造を形成してよい。具体的に

は、例えば標的RNAの編集標的であるアデノシン残基の5'側にグアノシン残基が連結している場合、標的対応ヌクレオチド残基の3'側の1番目のヌクレオチド残基が2'-デオキシイノシン残基であってよい。

[0178] 標的対応ヌクレオチド残基は、編集標的となるアデノシン残基に対応するヌクレオチド残基であり、例えばシチジン残基、グアノシン残基、アデノシン残基又はそれらの誘導体である。標的対応ヌクレオチド残基は、好ましくは編集標的となるアデノシン残基と塩基対を形成しない塩基であり、より好ましくはシチジン残基又はその誘導体であり、さらに好ましくはシチジン残基である。一態様において、標的対応ヌクレオチド残基は、N-アルキルピリミジンヌクレオチド残基であってよく、好ましくはN-アルキルシチジン残基、N-アルキル-2'-デオキシシチジン残基、N-アルキルウリジン残基又はN-アルキルデオキシウリジン残基であってよい。N-アルキルピリミジンヌクレオチド残基におけるアルキル基は、炭素数が1から6又は1から4のアルキル基であってよく、好ましくはメチル基又はエチル基であってよい。標的対応ヌクレオチド残基が、N-アルキルピリミジンヌクレオチド残基であることで、編集誘導活性が向上する場合がある。また、N-アルキルピリミジンヌクレオチド残基は、糖部分及びリン酸エステル結合部分の少なくとも一方が更に修飾されていてもよい。糖部分及びリン酸エステル結合部分の修飾については後述する。

[0179] 一態様において、標的対応ヌクレオチド残基は、2'-デオキシシチジン残基であってよい。2'-デオキシシチジン残基は、リン酸エステル結合部分が更に修飾されていてもよい。

[0180] 第一オリゴヌクレオチドにおいて、標的対応ヌクレオチド残基の3'側に連結し、標的RNAに相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの残基数は、10以上24以下であってよく、好ましくは11以上、12以上又は13以上であり、また好ましくは22以下、20以下、18以下、16以下又は15以下である。一態様において標的RNAに相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの残基数は12以上20以下、12以上18以下、1

2以上16以下、14以上18以下、又は14以上16以下であってよい。
また、一態様において標的RNAに相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの残基数は14であってよい。残基数が前記範囲であると、ADAR1に対する選択性がより向上する傾向がある。

[0181] 第一オリゴヌクレオチドにおいて、標的対応ヌクレオチド残基の3'側に連結する3'側オリゴヌクレオチドは、標的RNAに対してミスマッチ塩基対を含まない相補的な塩基配列を有してよい。その場合、標的RNAは編集標的となるアデノシン残基の5'側にグアノシン残基が連結していないことが好ましい。すなわち、標的RNAの編集標的であるアデノシン残基の5'側に連結する塩基が、アデノシン残基、シチジン残基又はウリジン残基である場合、第一オリゴヌクレオチドにおいて、標的対応ヌクレオチド残基の3'側に連結するオリゴヌクレオチドは、標的RNAに対してミスマッチ塩基対を含まない相補的な塩基配列を有することが好ましい。

[0182] 第一オリゴヌクレオチドにおいて、標的対応ヌクレオチド残基の3'側に連結する3'側オリゴヌクレオチドは、場合により、標的RNAの塩基配列に対して非相補的な塩基を含んでいてもよい。例えば、編集標的となるアデノシン残基の5'側にグアノシン残基が連結する標的RNAでは、編集誘導活性が低下する場合がある。その場合であっても、第一オリゴヌクレオチドが、そのグアノシン残基に対して非相補的な塩基を含む塩基配列を有することで編集誘導活性を向上させることができる。そのグアノシン残基に対して非相補的な塩基は、例えばグアノシン残基であってよい。すなわち、編集標的となるアデノシン残基の5'側にグアノシン残基が連結する標的RNAに対する標的編集ガイドRNAは、標的対応ヌクレオチド残基の3'側にグアノシン残基が連結してよい。

[0183] 第一オリゴヌクレオチドにおいて、標的対応ヌクレオチド残基の3'側に連結する3'側オリゴヌクレオチドは、場合により、対応する標的RNAのヌクレオチド残基と非ワトソンクリック型のゆらぎ塩基対を形成してもよく、また、標的対応ヌクレオチド残基の3'側に連結する3'側オリゴヌクレ

オチドは、場合により、2' -デオキシヌクレオチド残基であってよい。これにより、編集標的活性が向上する場合がある。

[0184] 例えば、標的RNAにおいて編集標的であるアデノシン残基の5'側にシチジン残基が連結している場合、第一オリゴヌクレオチドは標的対応ヌクレオチド残基の3'側に塩基としてヒポキサンチン残基を有するヌクレオチド残基が連結してよい。すなわち、編集標的であるアデノシン残基の5'側に連結するシチジン残基と、第一オリゴヌクレオチドの塩基としてヒポキサンチン残基を有するヌクレオチド残基とが、ゆらぎ塩基対を形成してもよい。塩基としてヒポキサンチン残基を有するヌクレオチド残基は、イノシン残基又は2' -デオキシイノシン残基であってよく、好ましくは2' -デオキシイノシン残基である。更に、塩基としてヒポキサンチン残基を有するヌクレオチド残基は、糖部分及びリン酸エステル結合部分の少なくとも一方が更に修飾されていてもよい。糖部分及びリン酸エステル結合部分の修飾については後述する。

[0185] 例えば、標的RNAにおいて編集標的であるアデノシン残基の5'側にウリジン残基が連結している場合、第一オリゴヌクレオチドは標的対応ヌクレオチド残基の3'側に塩基としてアデニル基を有するヌクレオチド残基が連結してよい。すなわち、編集標的であるアデノシン残基の5'側に連結するウリジン残基と、第一オリゴヌクレオチドの塩基としてアデニル基を有するヌクレオチド残基とが塩基対を形成してもよい。塩基としてアデニル基を有するヌクレオチド残基は、アデノシン残基又は2' -デオキシアデノシン残基であってよく、好ましくは2' -デオキシアデノシン残基である。更に、塩基としてアデニル基を有するヌクレオチド残基は、糖部分及びリン酸エステル結合部分の少なくとも一方が更に修飾されていてもよい。糖部分及びリン酸エステル結合部分の修飾については後述する。

[0186] 例えば、標的RNAにおいて編集標的であるアデノシン残基の5'側にアデノシン残基が連結している場合、第一オリゴヌクレオチドは標的対応ヌクレオチド残基の3'側に塩基としてピリミジニル基を有するヌクレオチド残

基が連結していてよい。すなわち、編集標的であるアデノシン残基の5'側に連結するアデノシン残基と、第一オリゴヌクレオチドの塩基としてピリミジニル基を有するヌクレオチド残基とが塩基対を形成してもよい。塩基としてピリミジニル基を有するヌクレオチド残基は、チミジン残基又は2'-デオキシウリジン残基であってよい。更に、塩基としてピリミジニル基を有するヌクレオチド残基は、糖部分及びリン酸エステル結合部分の少なくとも一方が更に修飾されていてもよい。糖部分及びリン酸エステル結合部分の修飾については後述する。

[0187] 例えば、標的RNAにおいて編集標的であるアデノシン残基の5'側にグアノシン残基が連結している場合、第一オリゴヌクレオチドは標的対応ヌクレオチド残基の3'側に塩基としてヒポキサンチン残基が連結していてよい。ヒポキサンチン残基は、2'-デオキシイノシン残基であってよい。更に、ヒポキサンチン残基は、糖部分及びリン酸エステル結合部分の少なくとも一方が更に修飾されていてもよい。糖部分及びリン酸エステル結合部分の修飾については後述する。

[0188] 第一オリゴヌクレオチドは、標的対応ヌクレオチド残基から3'方向に数えて10番目以降、好ましくは11番目以降のヌクレオチド残基に、架橋型ヌクレオチド残基の少なくとも1種を有してよい。架橋型ヌクレオチド残基は、D-リボフラノースの2'位と4'位間が架橋されていてよい。架橋型ヌクレオチド残基の具体例については後述する。架橋型ヌクレオチド残基は、2'-O, 4'-C-メチレン架橋されたヌクレオチド(LNA)及び2'-O, 4'-C-エチレン架橋されたヌクレオチド(ENA)の少なくとも一方を含んでいてよい。また、架橋型ヌクレオチド残基は、塩基部分及びリン酸エステル結合部分の少なくとも一方が更に修飾されていてもよい。塩基部分及びリン酸エステル結合部分の修飾については後述する。

[0189] 第一オリゴヌクレオチドは、標的対応ヌクレオチドから3'方向に数えて10番目以降、好ましくは11番目以降のヌクレオチド残基からなるオリゴヌクレオチドが、2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基と架橋型ヌクレ

オチド残基とが交互に連結する塩基配列を有してよい。2' - O - アルキルリボヌクレオチド残基と架橋型ヌクレオチド残基との連結の繰り返し数は、例えば1以上3以下であってよく、好ましくは2であってよい。2' - O - アルキルリボヌクレオチド残基と架橋型ヌクレオチド残基とが交互に連結する塩基配列は、2' - O - アルキルリボヌクレオチド残基から3' 方向に交互に連結していてもよいし、架橋型ヌクレオチド残基から3' 方向に交互に連結していてもよい。2' - O - アルキルリボヌクレオチド残基と架橋型ヌクレオチド残基の具体例については後述する。また、2' - O - アルキルリボヌクレオチド残基又は架橋型ヌクレオチド残基は、塩基部分及びリン酸エステル結合部分の少なくとも一方が更に修飾されていてもよい。塩基部分及びリン酸エステル結合部分の修飾については後述する。

[0190] 第一オリゴヌクレオチドにおいて、標的対応ヌクレオチド残基の5' 側に連結し、標的RNAに相補的な塩基配列を有する5' 側オリゴヌクレオチドの残基数は、3以上6以下であってよく、好ましくは3以上5以下、3以上4以下又は3である。残基数が前記範囲であると、ADAR1に対する選択性がより向上する傾向がある。

[0191] 第二オリゴヌクレオチドは、相補的塩基対を形成しないヌクレオチド残基を1個以上含む2本鎖構造（以下、第二相補鎖ともいう）を標的RNAと形成する。第二オリゴヌクレオチドの残基数は、2以上10以下又は4以上8以下であってよい。第二オリゴヌクレオチドの残基数は、例えば3以上であり、好ましくは4以上又は5以上であり、また例えば10以下であり、好ましくは9以下、8以下又は7以下である。一態様において第二オリゴヌクレオチドの残基数は6であってよい。残基数が前記範囲内であると、編集誘導がより増進する傾向がある。第二相補鎖における相補的塩基対を形成しないヌクレオチド残基の数は、例えば3個以下又は2個以下であり、好ましくは1個である。

[0192] 第二相補鎖において相補的塩基対を形成しないヌクレオチド残基は、標的RNA又は第二オリゴヌクレオチドの一方において、他方のヌクレオチド残

基に対応するヌクレオチド残基が欠失していることで、塩基対とならずに存在するヌクレオチド残基であってよい。また、第二相補鎖において相補的塩基対を形成しないヌクレオチド残基は、標的RNA及び第二オリゴヌクレオチドにおいて、対応するヌクレオチド残基からなる塩基対が互いに非相補的な核酸塩基を有するミスマッチ塩基対（非相補的塩基対）であることで、標的RNA及び第二オリゴヌクレオチドの双方に存在するヌクレオチド残基であってよい。1つの実施形態において、相補的塩基対を形成しないヌクレオチド残基は、標的RNA又は第二オリゴヌクレオチドの一方に存在する塩基対を形成しないヌクレオチド残基であってよく、好ましくは標的RNAに存在する塩基対を形成しないヌクレオチド残基であってよい。これにより編集誘導がより増進される傾向がある。ここでミスマッチ塩基対とは、標的RNA及び第二オリゴヌクレオチドにおいて、対応する2つのヌクレオチド残基が有する核酸塩基が、安定な塩基対を形成しない組み合わせであることを意味する。

[0193] 第二相補鎖における相補的塩基対を形成しないヌクレオチド残基の位置は、標的RNA上であって、第一相補鎖と第二相補鎖の結合位置から3'側の1残基目から3残基目のいずれかであることが好ましく、1残基目であることがより好ましい。また、第二相補鎖における相補的塩基対を形成しないヌクレオチド残基の位置は、第二オリゴヌクレオチド上であって、第一相補鎖と第二相補鎖の結合位置から5'側の1残基目から3残基目のいずれかであることが好ましく、1残基目であることがより好ましい。

[0194] 第二相補鎖における相補的塩基対を形成しないヌクレオチド残基は、標的RNAにおける第一相補鎖と第二相補鎖の結合位置から3'側の1残基目のヌクレオチド残基に対応するヌクレオチド残基が、第二オリゴヌクレオチドから欠失していることに由来するものであってよい。また、第二相補鎖における相補的塩基対を形成しないヌクレオチド残基は、標的RNAにおける第一相補鎖と第二相補鎖の結合位置から3'側の1残基目のヌクレオチド残基と、第二オリゴヌクレオチドの3'末端のヌクレオチド残基とから形成され

るミスマッチ塩基対に由来するものであってもよい。

- [0195] 第二オリゴヌクレオチドにおいて、標的RNAのヌクレオチド残基に対応するヌクレオチド残基が欠失している場合、第二オリゴヌクレオチドはヌクレオチド残基が欠失している部分を除いて、標的RNAと相補的な塩基配列を有してよい。また、第二オリゴヌクレオチドが、標的RNAのヌクレオチド残基に対応するヌクレオチド残基と相補対を形成しないヌクレオチド残基を有する場合、第二オリゴヌクレオチドは相補対を形成しないヌクレオチド残基を除いて、標的RNAと相補的な塩基配列を有してよい。
- [0196] 第二オリゴヌクレオチドは、その3'末端のヌクレオチド残基から5'方向に数えて2番目以降、好ましくは3番目以降のヌクレオチド残基に、架橋型ヌクレオチド残基の少なくとも1種を有してよい。架橋型ヌクレオチド残基は、D-リボフラノースの2'位と4'位間が架橋されていてよい。架橋型ヌクレオチド残基の具体例については後述する。架橋型ヌクレオチド残基は、2'-O, 4'-C-メチレン架橋されたヌクレオチド(LNA)及び2'-O, 4'-C-エチレン架橋されたヌクレオチド(ENA)の少なくとも一方を含んでいてよい。また、架橋型ヌクレオチド残基は、塩基部分及びリン酸エステル結合部分の少なくとも一方が更に修飾されていてもよい。塩基部分及びリン酸エステル結合部分の修飾については後述する。
- [0197] 第二オリゴヌクレオチドは、その3'末端のヌクレオチド残基から5'方向に数えて2番目以降、好ましくは3番目以降のヌクレオチド残基からなるオリゴヌクレオチドが、2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基と架橋型ヌクレオチド残基とが交互に連結する塩基配列を有してよい。2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基と架橋型ヌクレオチド残基との連結の繰り返し数は、例えば1以上3以下であってよく、好ましくは2であってよい。2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基と架橋型ヌクレオチド残基とが交互に連結する塩基配列は、2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基から5'方向に交互に連結していてもよいし、架橋型ヌクレオチド残基から5'方向に交互に連結していてもよい。2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基

と架橋型ヌクレオチド残基の具体例については後述する。また、2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基又は架橋型ヌクレオチド残基は、塩基部分及びリン酸エステル結合部分の少なくとも一方が更に修飾されていてもよい。塩基部分及びリン酸エステル結合部分の修飾については後述する。

[0198] 標的編集ガイドRNAの一態様は、標的RNAと第一相補鎖を形成する第一オリゴヌクレオチドが、標的対応ヌクレオチド残基としてのシチジン残基と、標的RNAの塩基配列と相補的な塩基配列を有し、標的対応ヌクレオチド残基の3'側に連結する残基数が12から18又は14から16の3'側オリゴヌクレオチドと、標的RNAの塩基配列と相補的な塩基配列を有し、標的対応ヌクレオチド残基の5'側に連結する残基数が3の5'側オリゴヌクレオチドとを含み、第二オリゴヌクレオチドが、標的RNAにおける第一相補鎖と第二相補鎖の結合位置から3'側の1残基目に対応するヌクレオチド残基を欠失し、2残基目以降に相補的な塩基配列を有し、残基数が4から8のオリゴヌクレオチドを含む。

[0199] 標的編集ガイドRNAを構成するヌクレオチドは、天然型リボヌクレオチド(RNA)、天然型デオキシリボヌクレオチド(DNA)、RNA/DNAのキメラ、これらの修飾体である修飾ヌクレオチドのいずれから選択されていてもよい。標的編集ガイドRNAを構成するヌクレオチドは、ヌクレオシドの糖部分の水酸基に結合するリン酸ジエステル結合によって互いに連結されうる。前記リン酸ジエステル結合は糖部分の2'位水酸基、3'位水酸基、又は5'位水酸基を利用して形成されうる。標的編集ガイドRNAを構成するヌクレオチドは、天然型である3'-5'リン酸ジエステル結合を形成しうる。標的編集ガイドRNAを構成するヌクレオチドの少なくとも1つは修飾ヌクレオチドであってよい。修飾ヌクレオチドとしては、糖部分が修飾されたもの、リン酸ジエステル結合が修飾されたもの、塩基が修飾されたもの、及びこれらの組合せが例示できる。

[0200] 糖部分の修飾としては、例えば、D-リボフラノースの2'-O-アルキル化リボヌクレオチド(例えば、2'-O-メチル化、2'-O-アミノエ

チル化、2'-O-プロピル化、2'-O-アリル化、2'-O-メトキシエチル化、2'-O-ブチル化、2'-O-ペンチル化、2'-O-プロパルギル化等)；

D-リボフラノースの2'位と4'位間が架橋された架橋型リボヌクレオチド(例えば、2'-O, 4'-C-エチレン化、2'-O, 4'-C-メチレン化、2'-O, 4'-C-プロピレン化、2'-O, 4'-C-テトラメチレン化、2'-O, 4'-C-ペンタメチレン化、2'-S, 4'-C-メチレン化、D-リボフラノースの2'-デオキシ-2'-C, 4'-C-メチレンオキシメチレン化体、S-cEt (2', 4'-constrained エチル)、AmNA等)；

3'-デオキシ-3'-アミノ-2'-デオキシ-D-リボフラノース；3'-デオキシ-3'-アミノ-2'-デオキシ-2'-フルオロ-D-リボフラノース；2'-デオキシ-2'-フルオロ-D-リボフラノース；D-デオキシリボースなどを挙げることができる。

[0201] リン酸ジエステル結合部分の修飾としては、ホスホロチオエート結合(リン原子の不斉に由来する光学活性体を含む)、メチルホスホネート結合、メチルチオホスホネート結合、ホスホロジチオエート結合、ホスホロアミデート結合などを挙げることができる。

[0202] 塩基部分の修飾としては、ハロゲン化；メチル化、エチル化、プロピル化、イソプロピル化、シクロプロピル化、ブチル化、イソブチル化、s-ブチル化、t-ブチル化、シクロブチル化等の炭素数1から6又は1から4のアルキル化；水酸化；アミノ化；脱アミノ化；デメチル化などが挙げられる。具体的には、シトシンの5-メチル化、5-フルオロ化、5-ブロモ化、5-ヨード化、N4-メチル化等；チミンの5-デメチル化(ウラシル)、5-フルオロ化、5-ブロモ化、5-ヨード化等；アデニンのN6-メチル化、8-ブロモ化等；グアニンのN2-メチル化、8-ブロモ化等；を挙げることができる。

[0203] 標的編集ガイドRNAでは、カウンタ領域から選択される少なくとも1残

基、少なくとも2残基、又は3残基すべてが、天然型リボヌクレオチド（RNA）残基以外のヌクレオチド残基であってよく、好ましくは、少なくとも1残基、少なくとも2残基、又は3残基すべてが修飾ヌクレオチド残基である。カウンタ領域における修飾ヌクレオチド残基は、糖部分及びリン酸ジエステル結合の少なくとも一方が修飾されていてよく、少なくとも糖部分が修飾されていてよく、少なくともリン酸ジエステル結合が修飾されていてよく、又は糖部分及びリン酸ジエステル結合が修飾されていてよい。例えば、標的対応ヌクレオチド残基は、ホスホロチオエート結合を有するシチジン残基であってよい。また例えば、標的対応ヌクレオチド残基の5'側又は3'側の各1残基は、糖部分及びリン酸ジエステル結合の少なくとも一方が修飾されていてよく、少なくとも糖部分が修飾されていてよく、少なくともリン酸ジエステル結合が修飾されていてよく、又は糖部分及びリン酸ジエステル結合が修飾されていてよい。カウンタ領域における糖部分の修飾は、例えば、2'-O-アルキル化、2'-デオキシ-2'-フルオロ化、2'-デオキシ化等であってよい。

[0204] 第一オリゴヌクレオチドのカウンタ領域以外のオリゴヌクレオチド残基（非カウンタ領域）の内、少なくとも1残基、少なくとも3残基、又は全残基において、糖部分及びリン酸ジエステル結合の少なくとも一方が修飾されていてよく、少なくとも糖部分が修飾されていてよく、少なくともリン酸ジエステル結合が修飾されていてよく、又は糖部分及びリン酸ジエステル結合が修飾されていてよい。非カウンタ領域における糖部分の修飾は、例えば、2'-O-アルキル化、2'-デオキシ-2'-フルオロ化、2'位と4'位間の架橋化、2'-デオキシ化（DNA化）等であってよい。第一オリゴヌクレオチドが複数の修飾ヌクレオチド残基を有する場合、複数の修飾ヌクレオチド残基は連続して配置されてよく、離隔されて配置されていてもよい。また、第一オリゴヌクレオチドは、すべてのヌクレオチド残基がホスホロチオエート結合で連結されて構成されていてもよい。

[0205] 第一オリゴヌクレオチドの標的対応ヌクレオチド残基の3'側に連結する

3' 側オリゴヌクレオチドは、2' -デオキシ-2' -フルオロヌクレオチド残基、2' -O-アルキルリボヌクレオチド残基及び架橋型ヌクレオチド残基からなる群から選択される2種の修飾ヌクレオチド残基が交互に連結する塩基配列を有していてもよい。すなわち、標的対応ヌクレオチド残基の3' 側に連結する3' 側オリゴヌクレオチドは、2' -デオキシ-2' -フルオロヌクレオチド残基と2' -O-アルキルリボヌクレオチド残基とが交互に連結する塩基配列を有してよく、架橋型ヌクレオチド残基と2' -O-アルキルリボヌクレオチド残基とが交互に連結する塩基配列を有してよく、2' -デオキシ-2' -フルオロヌクレオチド残基と架橋型ヌクレオチド残基とが交互に連結する塩基配列を有してよい。ここで使用される2種の修飾ヌクレオチド残基が交互に連結する塩基配列を有するとは、対象となるオリゴヌクレオチドが（ここでは、第一オリゴヌクレオチドの3' 側オリゴヌクレオチドが該当する）、2種の修飾ヌクレオチド残基が部分的に交互に連結した塩基配列を有していること、又は対象となるオリゴヌクレオチドの全体が2種の修飾ヌクレオチド残基が交互に連結した塩基配列を有していることの両方を意味し、本明細書の以下の説明でも同様の意味で使用される。

[0206] 第一オリゴヌクレオチドにおける3' 側オリゴヌクレオチドは、一部のヌクレオチド残基がホスホロチオエート結合で連結されて構成されていてもよく、すべてのヌクレオチド残基がホスホロチオエート結合で連結されて構成されていてもよい。

[0207] 第一オリゴヌクレオチドの3' 側オリゴヌクレオチドにおいては、標的対応ヌクレオチド残基から3' 方向に数えて3番目のヌクレオチド残基が、2' -デオキシ-2' -フルオロヌクレオチド残基、2' -O-アルキルリボヌクレオチド残基及び架橋型ヌクレオチド残基からなる群から選択される修飾ヌクレオチド残基であってもよい。さらに3' 側オリゴヌクレオチドにおいては、標的対応ヌクレオチド残基から3' 方向に数えて3番目のヌクレオチド残基が、2' -デオキシ-2' -フルオロヌクレオチド残基、2' -O-

ーアルキルリボヌクレオチド残基及び架橋型ヌクレオチド残基からなる群から選択される修飾ヌクレオチド残基であって、4番目のヌクレオチド残基が3番目のヌクレオチド残基とは異なる修飾ヌクレオチド残基であってもよい。ここで標的対応ヌクレオチド残基から3'方向に数えて3番目のヌクレオチド残基とは、標的対応ヌクレオチド残基自身を含まず、標的対応オリゴヌクレオチド残基の3'方向に隣接するヌクレオチド残基を1番目として3'方向に数えて3番目のヌクレオチド残基を示す。

[0208] 第一オリゴヌクレオチドの標的対応ヌクレオチド残基の5'側に連結する5'側オリゴヌクレオチドは、2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基が連続する塩基配列を有していてもよい。2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基が連続する塩基配列は、標的対応ヌクレオチド残基に隣接していてもよい。2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基が連続する塩基配列における残基数は、例えば2又は3であってよい。また、5'側オリゴヌクレオチドは、2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基と、2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチド残基又は架橋型ヌクレオチド残基とが連結する塩基配列を有していてもよい。

[0209] 第一オリゴヌクレオチドにおける5'側オリゴヌクレオチドは、一部のヌクレオチド残基がホスホロチオエート結合で連結されて構成されていてもよく、すべてのヌクレオチド残基がホスホロチオエート結合で連結されて構成されていてもよい。

[0210] 第二オリゴヌクレオチドは、それぞれ、少なくとも1残基、少なくとも3残基、又は全残基において、糖部分及びリン酸ジエステル結合の少なくとも一方が修飾されていてよく、少なくとも糖部分が修飾されていてよく、少なくともリン酸ジエステル結合が修飾されていてよく、又は糖部分及びリン酸ジエステル結合が修飾されていてもよい。第二オリゴヌクレオチドにおける糖部分の修飾は、例えば、2'-O-アルキル化、2'-デオキシ-2'-フルオロ化、2'位と4'位間の架橋化、2'-デオキシ化（DNA化）等であってよい。第二オリゴヌクレオチドが複数の修飾ヌクレオチド残基を有

する場合、複数の修飾ヌクレオチド残基は連続して配置されてよく、離隔されて配置されていてもよい。

[0211] 第二オリゴヌクレオチドは、2′-O-アルキルリボヌクレオチド残基が連続する塩基配列を有していてもよい。第二オリゴヌクレオチドは、2′-デオキシ-2′-フルオロヌクレオチド残基、2′-O-アルキルリボヌクレオチド残基及び架橋型ヌクレオチド残基からなる群から選択される2種が交互に連結する塩基配列を有していてもよく、2′-O-アルキルリボヌクレオチド残基と2′-デオキシ-2′-フルオロヌクレオチド残基とが交互に連結する塩基配列を有していてもよく、2′-O-アルキルリボヌクレオチド残基と架橋型ヌクレオチド残基とが交互に連結する塩基配列を有していてもよい。さらに、第二オリゴヌクレオチドは、A D A R 1 選択性の観点から、第二オリゴヌクレオチドの3′末端のヌクレオチド残基から5′方向に数えて2番目のヌクレオチド残基が2′-デオキシ-2′-フルオロヌクレオチド残基、2′-O-アルキルリボヌクレオチド残基及び架橋型ヌクレオチド残基からなる群から選択される1種であってよく、2′-O-アルキルリボヌクレオチド残基であってよい。ここで第二オリゴヌクレオチドの3′末端のヌクレオチド残基から5′方向に数えて2番目のヌクレオチド残基とは3′末端のヌクレオチド残基自身を含まず、3′末端のオリゴヌクレオチド残基の5′方向に隣接するヌクレオチド残基を1番目として5′方向に数えて2番目のヌクレオチド残基を示す。

[0212] 標的編集ガイドRNAは、第一オリゴヌクレオチドと第二オリゴヌクレオチドの間に、アルキレンオキシ単位を含む連結部を含んでいてもよい。連結部は、炭素数が1から8のアルキレンオキシ基を含んでいてもよく、炭素数が1から8のアルキレンオキシ単位からなるポリアルキレンオキシ基を含んでいてもよい。連結部は、第一オリゴヌクレオチドの5′側、及び第二オリゴヌクレオチドの3′側にそれぞれリン酸ジエステル結合、又は修飾されたりリン酸ジエステル結合してよい。すなわち、連結部は、第一オリゴヌクレオチドの5′末端の糖部分の水酸基と、第二オリゴヌクレオチドの3′末端の糖

部分の水酸基とそれぞれリン酸ジエステル結合、又は修飾されたリン酸ジエステル結合してよい。標的編集ガイドRNAは、連結部がアルキレンオキシ単位を含んでいる場合であっても、優れた標的編集活性を示すことができる。

- [0213] 連結部がポリアルキレンオキシ基を含む場合、ポリアルキレンオキシ基を構成するアルキレンオキシ単位の炭素数は、例えば、2から4、2から3、又は2であってよい。すなわち、アルキレンオキシ単位は、エチレンオキシ単位、プロピレンオキシ単位、又はブチレンオキシ単位であってよく、エチレンオキシ単位であってよい。ポリアルキレンオキシ基を構成するアルキレンオキシ単位の数、例えば、2から10、2から8、2から7、又は3から6であってよい。ポリアルキレンオキシ基を構成する各アルキレンオキシ単位は同一であっても、又は異なってもよい。
- [0214] 連結部がアルキレンオキシ基を含む場合、アルキレンオキシ基の炭素数は、例えば2から8、2から7、又は3から6であってよい。
- [0215] 一態様において標的編集ガイドRNAは、標的RNAを特定する第一オリゴヌクレオチドと、前記第一オリゴヌクレオチドの5'側に連結する第二オリゴヌクレオチドと、前記第一オリゴヌクレオチドと前記第二オリゴヌクレオチドとを連結し、アルキレンオキシ単位を含む連結部とを含み、前記第一オリゴヌクレオチドは、前記標的RNA中のアデノシン残基に対応する標的対応ヌクレオチド残基と、前記標的対応ヌクレオチド残基の3'側に連結し、前記標的RNAに相補的な塩基配列を有する10から24残基のオリゴヌクレオチドと、前記標的対応ヌクレオチド残基の5'側に連結し、前記標的RNAに相補的な塩基配列を有する3から6残基のオリゴヌクレオチドとからなり、前記第二オリゴヌクレオチドは残基数が2から10であり、その3'末端において前記標的RNAのヌクレオチド残基に対応するヌクレオチド残基が欠失しているか、もしくは前記標的RNAのヌクレオチド残基と相補対を形成しないヌクレオチド残基を有し、少なくともその3'末端以外のヌクレオチド残基が前記標的RNAと相補的な2本鎖構造を形成しているか、

又は前記標的RNAに相補的な塩基配列を有して前記標的RNAと相補的な2本鎖構造を形成し、前記標的対応ヌクレオチド残基、並びにその3'側及び5'側の各1残基からなるカウンタ領域から選択される少なくとも1残基は、天然型リボヌクレオチド残基以外のヌクレオチド残基であり、前記標的RNAに対する部位特異的編集を誘導するオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩であってよい。連結部を含む標的編集ガイドRNAを構成する第一オリゴヌクレオチド及び第二オリゴヌクレオチドは、既述の修飾ヌクレオチド残基から構成されていてもよい。

[0216] 一態様において標的編集ガイドRNAは、標的RNAを特定する第一オリゴヌクレオチドと、前記第一オリゴヌクレオチドの5'側に連結する第二オリゴヌクレオチドと、前記第一オリゴヌクレオチドと前記第二オリゴヌクレオチドとを連結し、アルキレンオキシ単位を含む連結部とを含み、前記第一オリゴヌクレオチドは、前記標的RNA中のアデノシン残基に対応する標的対応ヌクレオチド残基と、前記標的対応ヌクレオチド残基の3'側に連結し、前記標的RNAに相補的な塩基配列を有する10から24残基のオリゴヌクレオチドと、前記標的対応ヌクレオチド残基の5'側に連結し、前記標的RNAに相補的な塩基配列を有する3から6残基のオリゴヌクレオチドとからなり、前記第二オリゴヌクレオチドは残基数が2から10であり、前記標的RNAに相補的な塩基配列を有して前記標的RNAと相補的な2本鎖構造を形成し、前記標的対応ヌクレオチド残基、並びにその3'側及び5'側の各1残基からなるカウンタ領域から選択される少なくとも1残基は、天然型リボヌクレオチド残基以外のヌクレオチド残基であり、前記標的RNAに対する部位特異的編集を誘導するオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩であってよい。連結部を含む標的編集ガイドRNAを構成する第一オリゴヌクレオチド及び第二オリゴヌクレオチドは、既述の修飾ヌクレオチド残基から構成されていてもよい。

[0217] 一態様において標的編集ガイドRNAは、以下に記載の(AD1__ASS1.39)、(AD1__PANK2.39)、(AD1__NPHS2.39

)、(AD1__GRIA2.39)、(AD1__ASS1.52)、(AD1__GRIA2.39e)、(AD1__ASS1.39e)、(AD1__PANK2.39e)、(AD1__NPHS2.39e)、(AD1__GRIA2.52e)、(AD1__ASS1.52e)、(AD1__PANK2.52e)、(AD1__NPHS2.52e)及び(AD1__A1AT.39)からなる群から選択される式のいずれかで表されるオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩であってもよい。

[0218] (AD1__ASS1.39)

$$\begin{aligned} &U(M)^{\wedge}T(L)^{\wedge}G(M)^{\wedge}A(L)^{\wedge}U(M)^{\wedge}G(F)^{\wedge}A(F) \\ &)^{\wedge}C(M)^{\wedge}C(M)^{\wedge}c^{\wedge}i^{\wedge}G(M)^{\wedge}U(F)^{\wedge}G(M)^{\wedge}G(F) \\ &)^{\wedge}C(M)^{\wedge}A(F)^{\wedge}U(M)^{\wedge}C(F)^{\wedge}A(M)^{\wedge}G(L)^{\wedge}U(M) \\ &)^{\wedge}T(L)^{\wedge}G(M) \end{aligned}$$

[0219] (AD1__PANK2.39)

$$\begin{aligned} &A(M)^{\wedge}A(L)^{\wedge}G(M)^{\wedge}A(L)^{\wedge}A(M)^{\wedge}A(F)^{\wedge}U(F) \\ &)^{\wedge}U(M)^{\wedge}C(M)^{\wedge}c^{\wedge}a^{\wedge}A(M)^{\wedge}C(F)^{\wedge}A(M)^{\wedge}A(F) \\ &)^{\wedge}A(M)^{\wedge}U(F)^{\wedge}A(M)^{\wedge}C(F)^{\wedge}C(M)^{\wedge}A(L)^{\wedge}C(M) \\ &)^{\wedge}C(L)^{\wedge}U(M) \end{aligned}$$

[0220] (AD1__NPHS2.39)

$$\begin{aligned} &A(M)^{\wedge}T(L)^{\wedge}G(M)^{\wedge}T(L)^{\wedge}C(M)^{\wedge}C(F)^{\wedge}A(F) \\ &)^{\wedge}G(M)^{\wedge}U(M)^{\wedge}c^{\wedge}i^{\wedge}G(M)^{\wedge}A(F)^{\wedge}A(M)^{\wedge}U(F) \\ &)^{\wedge}A(M)^{\wedge}U(F)^{\wedge}A(M)^{\wedge}A(F)^{\wedge}U(M)^{\wedge}T(L)^{\wedge}A(M) \\ &)^{\wedge}C(L)^{\wedge}U(M) \end{aligned}$$

[0221] (AD1__GRIA2.39)

$$\begin{aligned} &G(M)^{\wedge}C(L)^{\wedge}A(M)^{\wedge}T(L)^{\wedge}C(M)^{\wedge}C(F)^{\wedge}U(F) \\ &)^{\wedge}G(M)^{\wedge}C(M)^{\wedge}c^{\wedge}i^{\wedge}C(M)^{\wedge}A(F)^{\wedge}U(M)^{\wedge}A(F) \\ &)^{\wedge}A(M)^{\wedge}A(F)^{\wedge}G(M)^{\wedge}G(F)^{\wedge}C(M)^{\wedge}A(L)^{\wedge}C(M) \\ &)^{\wedge}C(L)^{\wedge}C(M) \end{aligned}$$

[0222] (AD1__ASS1.52)

U (M) ^ G (L) ^ A (M) ^ U (L) ^ G (F) ^ A (F) ^ C (M)
) ^ C (M) ^ c ^ i ^ G (M) ^ U (F) ^ G (M) ^ G (F) ^ C (M)
) ^ A (F) ^ U (M) ^ C (F) ^ A (L) ^ G (M) ^ U (L) ^ U (M)

[0223] (AD1__GRIA2. 39 e)

G (M) ^ C (E) ^ A (M) ^ T (E) ^ C (M) ^ C (F) ^ U (F)
) ^ G (M) ^ C (M) ^ c ^ i ^ C (M) ^ A (F) ^ U (M) ^ A (F)
) ^ A (M) ^ A (F) ^ G (M) ^ G (F) ^ C (M) ^ A (E) ^ C (M)
) ^ C (E) ^ C (M)

[0224] (AD1__ASS1. 39 e)

U (M) ^ T (E) ^ G (M) ^ A (E) ^ U (M) ^ G (F) ^ A (F)
) ^ C (M) ^ C (M) ^ c ^ i ^ G (M) ^ U (F) ^ G (M) ^ G (F)
) ^ C (M) ^ A (F) ^ U (M) ^ C (F) ^ A (M) ^ G (E) ^ U (M)
) ^ T (E) ^ G (M)

[0225] (AD1__PANK2. 39 e)

A (M) ^ A (E) ^ G (M) ^ A (E) ^ A (M) ^ A (F) ^ U (F)
) ^ U (M) ^ C (M) ^ c ^ a ^ A (M) ^ C (F) ^ A (M) ^ A (F)
) ^ A (M) ^ U (F) ^ A (M) ^ C (F) ^ C (M) ^ A (E) ^ C (M)
) ^ C (E) ^ U (M)

[0226] (AD1__NPHS2. 39 e)

A (M) ^ T (E) ^ G (M) ^ T (E) ^ C (M) ^ C (F) ^ A (F)
) ^ G (M) ^ U (M) ^ c ^ i ^ G (M) ^ A (F) ^ A (M) ^ U (F)
) ^ A (M) ^ U (F) ^ A (M) ^ A (F) ^ U (M) ^ T (E) ^ A (M)
) ^ C (E) ^ U (M)

[0227] (AD1__GRIA2. 52 e)

C (M) ^ A (E) ^ U (M) ^ C (E) ^ C (F) ^ U (F) ^ G (M)
) ^ C (M) ^ c ^ i ^ C (M) ^ A (F) ^ U (M) ^ A (F) ^ A (M)
) ^ A (F) ^ G (M) ^ G (F) ^ C (E) ^ A (M) ^ C (E) ^ C (M)

M)

[0228] (AD1__ASS1. 52e)

U (M) ^ G (E) ^ A (M) ^ T (E) ^ G (F) ^ A (F) ^ C (M)
) ^ C (M) ^ c ^ i ^ G (M) ^ U (F) ^ G (M) ^ G (F) ^ C (M)
) ^ A (F) ^ U (M) ^ C (F) ^ A (E) ^ G (M) ^ T (E) ^ U (M)

[0229] (AD1__PANK2. 52e)

A (M) ^ G (E) ^ A (M) ^ A (E) ^ A (F) ^ U (F) ^ U (M)
) ^ C (M) ^ c ^ a ^ A (M) ^ C (F) ^ A (M) ^ A (F) ^ A (M)
) ^ U (F) ^ A (M) ^ C (F) ^ C (E) ^ A (M) ^ C (E) ^ C (M)

[0230] (AD1__NPHS2. 52e)

U (M) ^ G (E) ^ U (M) ^ C (E) ^ C (F) ^ A (F) ^ G (M)
) ^ U (M) ^ c ^ i ^ G (M) ^ A (F) ^ A (M) ^ U (F) ^ A (M)
) ^ U (F) ^ A (M) ^ A (F) ^ T (E) ^ U (M) ^ A (E) ^ C (M)

[0231] (AD1__A1AT. 39)

G (M) ^ T (L) ^ C (M) ^ C (L) ^ C (M) ^ U (F) ^ U (F)
) ^ C (M) ^ U (M) ^ c ^ i ^ U (M) ^ C (F) ^ G (M) ^ A (F)
) ^ U (M) ^ G (F) ^ G (M) ^ U (F) ^ C (M) ^ A (L) ^ G (M)
) ^ C (L) ^ A (M)

[0232] 式中、大文字はリボヌクレオチド残基 (RNA) を示す。小文字は2' -
 デオキシリボヌクレオチド残基 (DNA) を示す。N (M) はD-リボフラ
 ノースの2' -O-メチル化リボヌクレオチド残基を示す。N (F) はD-
 リボフラノースの2' -フルオロ-2' -デオキシリボヌクレオチド残基を
 示す。N (L) は、D-リボフラノースの2' -O, 4' -C-メチレン架
 橋化リボヌクレオチド残基を示す。N (E) は、D-リボフラノースの2'
 -O, 4' -C-エチレン架橋化リボヌクレオチド残基を示す。「^」は又

クレオシドユニット間が $-P(=S)(OH)-$ で結合していること、すなわちホスホロチオエート結合していることを示す。

- [0233] 標的編集ガイドRNAは、市販の合成機（例えば、パーキンエルマー社のホスホロアミダイト法によるモデル392）などを用いて、公知の文献（例えば、*Nucleic Acids Research*, 12, 4539（1984））参照）に記載の方法に準じて合成することができる。用いられるホスホロアミダイト試薬は、市販の試薬を用いてもよく、公知の文献に記載の方法に準じて適宜合成した試薬を用いてもよい。ホスホロアミダイト試薬をカップリング後、イオウ、テトラエチルチウラムジスルフィド（TETD、アプライドバイオシステム社）、Beaucage試薬（Glen Research社）、キサントヒドリドなどの試薬を反応させることにより、ホスホロチオエート結合を導入することができる（例えば、*Tetrahedron Letters*, 32, 3005（1991）, *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 1253（1990）, PCT/WO98/54198参照）。

- [0234] オリゴヌクレオチド（標的編集ガイドRNA）は、薬学的に許容できる塩の形態で用いてもよい。「薬学的に許容される塩」とは、オリゴヌクレオチドの塩である。そのような塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩のようなアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩のようなアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、鉄塩、亜鉛塩、銅塩、ニッケル塩、コバルト塩などの金属塩；アンモニウム塩のような無機塩、*t*-オクチルアミン塩、ジベンジルアミン塩、モルホリン塩、グルコサミン塩、フェニルグリシンアルキルエステル塩、エチレンジアミン塩、*N*-メチルグルカミン塩、グアニジン塩、ジエチルアミン塩、トリエチルアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、*N*, *N'*-ジベンジリエチレンジアミン塩、クロロプロカイン塩、プロカイン塩、ジエタノールアミン塩、*N*-ベンジルーフェネチルアミン塩、ピペラジン塩、テトラメチルアンモニウム塩、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン塩のような有機塩などのアミン塩；弗化水素酸塩、塩酸塩、

臭化水素酸塩、沃化水素酸塩のようなハロゲン化水素酸塩、硝酸塩、過塩素酸塩、硫酸塩、燐酸塩などの無機酸塩；メタンスルホン酸塩、トリフルオロメタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩のような低級アルカンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩のようなアリースルホン酸塩、酢酸塩、りんご酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、蔞酸塩、マレイン酸塩などの有機酸塩；グリシン塩、リジン塩、アルギニン塩、オルニチン塩、グルタミン酸塩、アスパラギン酸塩のようなアミノ酸塩などを挙げることができる。オリゴヌクレオチドの薬学的に許容できる塩の形態は、好ましくは、オリゴヌクレオチドのアルカリ金属塩、より好ましくは、ナトリウム塩である。これらの塩は、公知の方法で製造することができる。

[0235] また、オリゴヌクレオチド及びその薬学的に許容される塩は、溶媒和物（例えば、水和物）としても存在することがあり、そのような溶媒和物であってもよい。

[0236] オリゴヌクレオチド及びその薬学的に許容される塩には、リン原子の不斉に由来する光学活性体が存在することがあり、本発明のオリゴヌクレオチドには、そのような光学活性体も含まれる。そのような光学活性体は、公知の方法で合成することができる（例えば、Org. Lett., 114, 967 (2009)、Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 8, 2359 (1998) など）。

[0237] オリゴヌクレオチド及びその薬学的に許容される塩は、5' 末端又は3' 末端において、GalNAc、コレステロール、脂肪酸などのデリバリー分子がリンカー又はリン酸ジエステル結合（ホスホロチオエート結合を含む）などを介して結合していてもよい。そのようなデリバリー分子及びリンカーの例としては、Bioconjugate Chem. 2019, 30, 366に記載のものを挙げることができる。デリバリー分子が結合したオリゴヌクレオチド及びその薬学的に許容される塩は、公知の製造方法によって製造することができる。本明細書に記載されるオリゴヌクレオチド及びその

薬学的に許容される塩は、そのようなデリバリー分子が結合した形態も包含する。

[0238] オリゴヌクレオチド、その薬学的に許容される塩又は溶媒和物を、疾患の治療に使用する場合には、それ自体あるいは適宜の薬学的に許容される賦形剤、希釈剤などと混合し、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤若しくはシロップ剤などにより経口的に、あるいは、注射剤、坐剤、貼付剤若しくは外用剤などにより非経口的に投与することができる。

[0239] これらの製剤は、賦形剤（例えば、乳糖、白糖、葡萄糖、マンニトール、ソルビトールのような糖誘導体；トウモロコシデンプン、バイレショデンプン、 α 澱粉、デキストリンのような澱粉誘導体；結晶セルロースのようなセルロース誘導体；アラビアゴム；デキストラン；プルランのような有機系賦形剤；軽質無水珪酸、合成珪酸アルミニウム、珪酸カルシウム、メタ珪酸アルミン酸マグネシウムのような珪酸塩誘導体；燐酸水素カルシウムのような燐酸塩；炭酸カルシウムのような炭酸塩；硫酸カルシウムのような硫酸塩などの無機系賦形剤など）、滑沢剤（例えば、ステアリン酸；ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウムのようなステアリン酸金属塩；タルク；コロイドシリカ；ビーズワックス、ゲイ蠟のようなワックス類；硼酸；アジピン酸；硫酸ナトリウムのような硫酸塩；グリコール；フマル酸；安息香酸ナトリウム；DLロイシン；ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸マグネシウムのようなラウリル硫酸塩；無水珪酸、珪酸水和物のような珪酸類；上記澱粉誘導体など）、結合剤（例えば、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、マクロゴール、前記賦形剤と同様の化合物など）、崩壊剤（例えば、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、内部架橋カルボキシメチルセルロースナトリウムのようなセルロース誘導体；カルボキシメチルスターチ、カルボキシメチルスターチナトリウム、架橋ポリビニルピロリドンのような化学修飾されたデンプン・セルロース類など）、乳化剤（例えば、ベントナイト、ビーガムのような

なコロイド性粘土；水酸化マグネシウム、水酸化アルミニウムのような金属水酸化物；ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸カルシウムのような陰イオン界面活性剤；塩化ベンザルコニウムのような陽イオン界面活性剤；ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステルのような非イオン界面活性剤など）、安定剤（メチルパラベン、プロピルパラベンのようなパラオキシ安息香酸エステル類；クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェニルエチルアルコールのようなアルコール類；塩化ベンザルコニウム；フェノール、クレゾールのようなフェノール類；チメロサール；デヒドロ酢酸；ソルビン酸など）、矯味矯臭剤（例えば、通常使用される甘味料、酸味料、香料など）、希釈剤などの添加剤を用いて周知の方法で製造される。

[0240] オリゴヌクレオチド、その薬学的に許容される塩又は溶媒和物を含む治療剤は、0.1から250 $\mu\text{mol/L}$ のオリゴヌクレオチドを含有するとよく、好ましくは、1から50 $\mu\text{mol/L}$ 含有するとよい。また、所定量のオリゴヌクレオチド、その薬学的に許容される塩又は溶媒和物、0.02から10% w/v の炭水化物又は多価アルコール、及び0.01から0.4% w/v の薬学的に許容できる界面活性剤を含有させて治療剤を構成してもよい。

[0241] 上記炭水化物としては、単糖類及び2糖類の少なくとも1種が特に好ましい。これら炭水化物及び多価アルコールの例としては、グルコース、ガラクトース、マンノース、ラクトース、マルトース、マンニトール及びソルビトールが挙げられる。これらは、単独で用いても、併用してもよい。

[0242] また、界面活性剤の好ましい例としては、ポリオキシエチレンソルビタンモノからトリーエステル、アルキルフェニルポリオキシエチレン、ナトリウムタウロコラート、ナトリウムコラート、及び多価アルコールエステルが挙げられる。このうち特に好ましいのは、ポリオキシエチレンソルビタンモノからトリーエステルであり、ここにおいてエステルとして特に好ましいのは、オレエート、ラウレート、ステアレート及びパルミテートである。これら

は単独で用いても、併用してもよい。

[0243] オリゴヌクレオチド、その薬学的に許容される塩又は溶媒和物を含む治療剤は、更に好ましくは、0.03 Mから0.09 Mの薬学的に許容できる中性塩、例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム及び／又は塩化カルシウムを含有させておいてもよい。

[0244] オリゴヌクレオチド、その薬学的に許容される塩又は溶媒和物を含む治療剤は、更に好ましくは、0.002から0.05 Mの薬学的に許容できる緩衝剤を含有することができる。好ましい緩衝剤の例としては、クエン酸ナトリウム、ナトリウムグリシネート、リン酸ナトリウム、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンが挙げられる。これらの緩衝剤は、単独で用いても、併用してもよい。

[0245] さらに、上記の治療薬は、溶液状態で供給してもよい。しかし、ある期間保存する必要がある場合等のために、オリゴヌクレオチドを安定化して治療効果の低下を防止する目的で通常は凍結乾燥しておくことが好ましく、その場合は用時に溶解液（注射用蒸留水など）で再構成（*reconstruction*）して、即ち投与される液体状態にして用いればよい。従って、本発明の治療薬は、各成分が所定の濃度範囲になるよう溶解液で再構成して使用するための、凍結乾燥された状態のものも包含する。凍結乾燥物の溶解性を促進する目的で、アルブミン、グリシン等のアミノ酸を更に含有させておいてもよい。

[0246] オリゴヌクレオチド、その薬学的に許容される塩又は溶媒和物をヒトに投与する場合には、例えば、成人1日あたり約0.01 mg/kgから100 mg/kg（体重）、好ましくは0.1 mg/kgから20 mg/kg（体重）の投与量で、1回又は数回に分けて皮下注射、点滴静脈注射、又は、静脈注射するとよいが、その投与量や投与回数は、疾患の種類、症状、年齢、投与方法などにより適宜変更しうる。

[0247] 疾患の処置方法

疾患の処置方法は、上記治療剤を対象に投与する工程を含む。疾患の処置

方法は、上記治療剤の薬理学的有効量を対象に投与する工程を含んでいてよい。本明細書において用いられる「処置」とは、疾患について施される何らかの処置であればよく、例えば、疾患の治療、改善、進行の抑制（悪化の防止）、予防等（好適には、治療又は予防）が挙げられる。処置の対象は、ヒトを含む温血動物であってよく、非ヒト温血動物であってもよく、ヒトであってもよい。

[0248] 標的RNAの部位特異的編集方法

標的RNAの部位特異的編集方法は、標的RNAと、標的RNAに対する部位特異的編集を誘導するオリゴヌクレオチドである標的編集ガイドRNAとを、アデノシンデアミナーゼの存在下に、接触させる工程を含む。標的編集ガイドRNAが標的RNAと部分的に二本鎖を形成し、アデノシンデアミナーゼをリクルートすることで、標的RNAが含むアデノシン残基を部位特異的にイノシン残基に変換することができる。標的RNAの部位特異的編集方法は、標的編集ガイドRNAを準備する工程を更に含んでいてもよい。

[0249] 標的RNAの部位特異的編集方法は、例えば、標的RNAを有する真核細胞に、上述した標的編集ガイドRNAを導入することで行うことができる。標的編集ガイドRNAの真核細胞への導入方法には、核酸医薬で用いられる種々の手法から適宜選択して適用することができる。標的RNAの部位特異的編集方法は、インビトロで実施されてよく、インビボで実施されてもよい。

[0250] 本発明は、別の態様として、疾患（例えば、遺伝性疾患）の処置に用いられる医薬組成物の製造における標的編集ガイドRNAの使用、疾患（例えば、遺伝性疾患）の処置における標的編集ガイドRNAの使用、疾患（例えば、遺伝性疾患）の処置に使用される標的編集ガイドRNAをも包含する。

実施例

[0251] 以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

[0252] （参考例1）

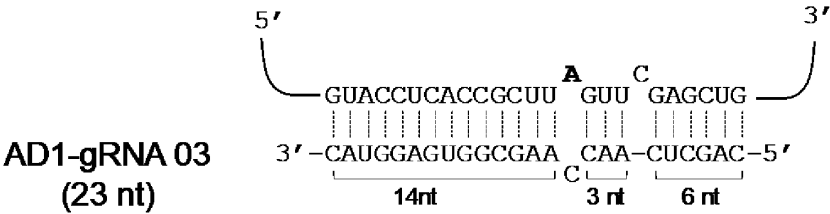
表 1 に示す配列（配列番号 1）を有し、すべてが天然型 RNA 残基からなるオリゴヌクレオチド（以下、AD1-gRNA03ともいう）を、ホスホロアミダイト法（例えば、Nucleic Acids Research, 12, 4539 (1984)、Nature Communications 6, Article number: 6317 (2015)参照）を用いて合成を行った。得られた化合物は、負イオンESI質量分析により同定した（実測値：7714.8）。

[0253] 表 1 中、下線部は第一オリゴヌクレオチド（ASR）に該当し、標的となるRNAは後述するRluc-sRNAである。参考例1のオリゴヌクレオチドは、例えば、標的RNAと以下のような構造を取り得ると考えられる。

[0254] [表1]

	配列	配列番号
AD1-gRNA03	<u>CAGCUCAACCAAGCGGUGAGGUAC</u>	1
Rluc_sRNA target part	GUACCUCACCGCUUAGUUCGAGCUG	2

[0255] [化1]



[0256] （参考例 2）

モデル標的RNAとして以下に配列を示すhGAPDH-sRNA02（配列番号3）を、後述するRluc-sRNAと同様にして調製した。このモデル標的RNAに対する標的編集ガイドRNAとして、以下に配列を示すオリゴリボヌクレオチドhGAPDH-AD1（配列番号4）をホスホロアミダイト法により調製した。なお、表中の下線は、編集標的のアデノシン残基を示す。

[0257]

[表2]

	配列	配列番号
hGAPDH_sRNA	GGGGCCUCUUCGCUAUUACGCCAGCUGGCGAAA GGGGGAUGUGCUGCAAGGCGAUUAAGUUGGGU AACGCCAGGGUUUCCAGUCACGACGUUGUA AAACGACGGCCAGUGAAUUCUCUCCCUCCUC ACAGUUGCCAUGUAGACCCCUUGAAGAGGGGA GGGGCCUAAGCUUGGCGUAAUCAUGGUCAUAG CUGUUUCC	3
hGAPDH_AD	UCAAGGGUCCACAUGGCAACUGUG	4

[0258] (実施例 1 から 3 2)

実施例 1 から 1 6 のオリゴヌクレオチドは参考例 1 のオリゴヌクレオチドの配列を元にして、表 3 に示すように修飾ヌクレオチドを導入して得られたものである。また実施例 1 7 から 3 2 のオリゴヌクレオチドは参考例 2 のオリゴヌクレオチドの配列を元にして、表 4 に示すように修飾ヌクレオチドを導入して得られたものである。これらのオリゴヌクレオチド化合物は参考例 1 と同様にホスホロアミダイト法で合成した。なお、配列中、「1 8」の部分合成する際には、DMT Hexaethylene Glycol phosphoramidite (ChemGenes、カタログ番号: CLP-9765) を用いた。「9」の部分合成する際には、DMT-Triethoxy-glycol phosphoramidite (ChemGenes、カタログ番号: CLP-1113) を用いた。「6」の部分合成する際には、DMT-hexane-Diol phosphoramidite (ChemGenes、カタログ番号: CLP-1120) を用いた。「3」の部分合成する際には、DMT-propane-Diol phosphoramidite (ChemGenes、カタログ番号: CLP-9908) を用いた。「2'-O-メチルヌクレオシド」の部分は、Nucleic Acids Research 17, 3373 (1989) に記載されたホスホロアミダイト体を用いて合成した。「DNA」の部分は、Nucleic Acids Research 11, 4539 (1984) に記載されたホスホロアミダイト体を用いて合成し

た。「2' - O, 4' - C - メチレンヌクレオシド」の部分は、国際公開第 99/14226 号に記載されたホスホロアミダイト体を用いて合成した。

「2' - デオキシ - 2' - フルオロヌクレオシド」の部分は、J. Med. Chem., 36, 831 (1993) に記載されたホスホロアミダイト体を用いて合成した。

[0259] [表3]

実施例	配列名称	配列 (5' - 3')	分子量
1	AD1-gRNA03_1	C(M)A(M)G(M)C(M)U(M)C(M)A(M)A(M)C(M)C(A)M)A(M)G(M)C(M)G(M)G(M)U(M)G(M)A(M)G(M)G(M)U(M)A(M)C(M)	8406.10
2	AD1-gRNA03_2	C(M)A(F)G(M)C(F)U(M)C(F)A(F)A(M)C(M)C(A)M)A(M)G(M)C(M)G(M)G(M)U(M)G(M)A(M)G(M)G(M)U(M)A(M)C(M)	8357.90
3	AD1-gRNA03_3	C(M)A(F)G(M)C(F)U(M)C(F)A(F)A(M)C(M)C(A)M)A(F)G(M)C(F)G(M)G(F)U(M)G(F)A(M)G(F)G(M)U(F)A(M)C(F)	8273.70
4	AD1-gRNA03_4	C(M)A(F)G(M)C(F)U(M)C(F)A(F)A(M)C(M)C(A)M)A(M)G(F)C(M)G(F)G(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(F)U(M)A(F)C(M)	8285.80
5	AD1-gRNA03_5	CAGCUC3AACCAAGCGGUGAGGUAC	7852.60
6	AD1-gRNA03_6	CAGCUCG3AACCAAGCGGUGAGGUAC	8198.10
7	AD1-gRNA03_7	CAGCUC9AACCAAGCGGUGAGGUAC	7927.00
8	AD1-gRNA03_8	CAGCUCG9AACCAAGCGGUGAGGUAC	8272.20
9	AD1-gRNA03_9	C(M)A(L)G(M)C(L)U(M)C(L)A(L)A(M)C(M)C(A)M)A(M)G(F)C(M)G(F)G(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(F)U(M)A(F)C(M)	8352.82
10	AD1-gRNA03_10	C(M)A(F)G(M)C(F)U(M)C(F)A(F)A(M)C(M)C(A)M)A(M)G(L)C(M)G(L)G(M)U(L)G(M)A(L)G(M)G(L)U(M)A(L)	8024.57
11	AD1-gRNA03_11	C(M)A(L)G(M)C(L)U(M)C(L)A(L)A(M)C(M)C(A)M)A(M)G(L)C(M)G(L)G(M)U(L)G(M)A(L)G(M)G(L)U(M)A(L)	8091.75
12	AD1-gRNA03_12	C(M)A(F)G(M)C(F)U(M)C(F)G(M)18A(F)A(M)C(M)C(A)M)A(M)G(F)C(M)G(F)G(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(F)U(M)A(F)C(M)	9025.15
13	AD1-gRNA03_13	C(M)A(F)G(M)C(F)U(M)C(F)G(M)9A(F)A(M)C(M)C(A)M)A(M)G(F)C(M)G(F)G(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(F)U(M)A(F)C(M)	8889.46
14	AD1-gRNA03_14	C(M)A(F)G(M)C(F)U(M)C(F)G(M)6A(F)A(M)C(M)C(A)M)A(M)G(F)C(M)G(F)G(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(F)U(M)A(F)C(M)	8857.34
15	AD1-gRNA03_15	C(M)A(F)G(M)C(F)U(M)C(F)G(M)3A(F)A(M)C(M)C(A)M)A(M)G(F)C(M)G(F)G(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(F)U(M)A(F)C(M)	8815.39
16	AD1-gRNA03_16	C(M)A(L)G(M)C(L)U(M)C(L)G(M)9A(L)A(M)C(M)C(A)M)A(M)G(L)C(M)G(L)G(M)U(L)G(M)A(L)G(M)G(L)U(M)A(L)	8695.38

[0260]

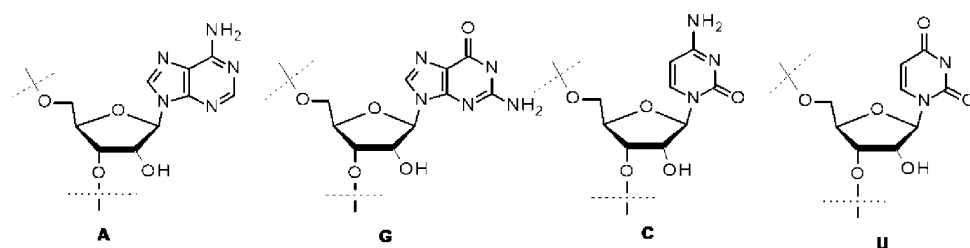
[表4]

実施例	配列名称	配列 (5'-3')	分子量
17	hGAPDH_AD1_4	U(M)Y(C)(F)Y(A)(M)Y(A)(F)Y(G)(M)Y(G)(F)Y(G)(F)Y(U)(M)Y(C)(M)Y(C)A(M)Y(C)(M)Y(A)(F)Y(U)(M)Y(G)(F)Y(G)(M)Y(C)(F)Y(A)(M)Y(A)(F)Y(C)(M)Y(U)(F)Y(G)(M)Y(U)(F)Y(G)(M)	8267.04
18	hGAPDH_AD1_17	U(M)Y(C)(F)Y(A)(M)Y(A)(F)Y(G)(M)Y(G)(F)Y(G)(F)Y(U)(M)Y(C)(M)Y(C)A(M)Y(C)(M)Y(A)(F)Y(U)(M)Y(G)(F)Y(G)(M)Y(C)(F)Y(A)(M)Y(A)(F)Y(C)(M)Y(U)(F)Y(G)(M)Y(U)(F)Y(G)(M)Y(A)(F)Y(G)(M)	8989.72
19	hGAPDH_AD1_18	U(M)Y(C)(F)Y(A)(M)Y(A)(F)Y(G)(M)Y(G)(F)Y(G)(F)Y(U)(M)Y(C)(M)Y(C)A(M)Y(C)(M)Y(A)(F)Y(U)(M)Y(G)(F)Y(G)(M)Y(C)(F)Y(A)(M)Y(A)(F)Y(C)(M)Y(U)(F)Y(G)(M)Y(U)(F)Y(G)(M)Y(A)(F)Y(G)(M)Y(G)(F)Y(A)(M)	9711.77
20	hGAPDH_AD1_19	U(M)Y(C)(F)Y(A)(M)Y(A)(F)Y(G)(M)Y(G)(F)Y(G)(F)Y(U)(M)Y(C)(M)Y(C)A(M)Y(C)(M)Y(A)(F)Y(U)(M)Y(G)(F)Y(G)(M)Y(C)(F)Y(A)(M)Y(A)(F)Y(C)(M)Y(U)(F)Y(G)(M)Y(U)(F)Y(G)(M)Y(A)(F)Y(G)(M)Y(G)(F)Y(A)(M)Y(G)(F)Y(G)(M)	10453.16
21	hGAPDH_AD1_20	T(L)Y(C)(F)Y(A)(L)Y(A)(F)Y(G)(M)Y(G)(F)Y(G)(F)Y(U)(M)Y(C)(M)Y(C)A(M)Y(C)(M)Y(A)(F)Y(U)(M)Y(G)(F)Y(G)(M)Y(C)(F)Y(A)(M)Y(A)(F)Y(C)(M)Y(U)(F)Y(G)(M)Y(U)(F)Y(G)(M)	8274.31
22	hGAPDH_AD1_21	T(L)Y(C)(F)Y(A)(L)Y(A)(F)Y(G)(L)Y(G)(F)Y(G)(F)Y(U)(M)Y(C)(M)Y(C)A(M)Y(C)(M)Y(A)(F)Y(U)(M)Y(G)(F)Y(G)(M)Y(C)(F)Y(A)(M)Y(A)(F)Y(C)(M)Y(U)(F)Y(G)(M)Y(U)(F)Y(G)(M)	8272.55
23	hGAPDH_AD1_22	U(M)Y(C)(F)Y(A)(M)Y(A)(F)Y(G)(M)Y(G)(F)Y(G)(F)Y(U)(M)Y(C)(M)Y(C)A(M)Y(C)(M)Y(A)(F)Y(T)(L)Y(G)(F)Y(G)(L)Y(C)(F)Y(A)(L)Y(A)(F)Y(C)(M)Y(U)(F)Y(G)(M)Y(U)(F)Y(G)(M)	8272.27
24	hGAPDH_AD1_23	U(M)Y(C)(F)Y(A)(M)Y(A)(F)Y(G)(M)Y(G)(F)Y(G)(F)Y(U)(M)Y(C)(M)Y(C)A(M)Y(C)(M)Y(A)(F)Y(U)(M)Y(G)(F)Y(G)(M)Y(C)(F)Y(A)(M)Y(A)(F)Y(C)(L)Y(U)(F)Y(G)(L)Y(U)(F)Y(G)(L)	8273.09
25	hGAPDH_AD1_24	U(M)Y(C)(F)Y(A)(M)Y(A)(F)Y(G)(M)Y(G)(F)Y(G)(F)Y(U)(M)Y(C)(M)Y(C)A(M)Y(C)(M)Y(A)(F)Y(T)(L)Y(G)(F)Y(G)(L)Y(C)(F)Y(A)(L)Y(A)(F)Y(C)(L)Y(U)(F)Y(G)(L)Y(U)(F)Y(G)(L)	8280.49
26	hGAPDH_AD1_25	T(L)Y(C)(F)Y(A)(L)Y(A)(F)Y(G)(M)Y(G)(F)Y(G)(F)Y(U)(M)Y(C)(M)Y(C)A(M)Y(C)(M)Y(A)(F)Y(U)(M)Y(G)(F)Y(G)(M)Y(C)(F)Y(A)(M)Y(A)(F)Y(C)(L)Y(U)(F)Y(G)(L)Y(U)(F)Y(G)(L)	8279.42
27	hGAPDH_AD1_26	T(L)Y(C)(F)Y(A)(L)Y(A)(F)Y(G)(L)Y(G)(F)Y(G)(F)Y(U)(M)Y(C)(M)Y(C)A(M)Y(C)(M)Y(A)(F)Y(U)(M)Y(G)(F)Y(G)(M)Y(C)(F)Y(A)(M)Y(A)(F)Y(C)(L)Y(U)(F)Y(G)(L)Y(U)(F)Y(G)(L)	8282.49
28	hGAPDH_AD1_27	T(L)Y(C)(F)Y(A)(L)Y(A)(F)Y(G)(M)Y(G)(F)Y(G)(F)Y(U)(M)Y(C)(M)Y(C)A(M)Y(C)(M)Y(A)(F)Y(T)(L)Y(G)(F)Y(G)(L)Y(C)(F)Y(A)(L)Y(A)(F)Y(C)(L)Y(U)(F)Y(G)(L)Y(U)(F)Y(G)(L)	8290.76
29	hGAPDH_AD1_28	T(L)Y(C)(F)Y(A)(L)Y(A)(F)Y(G)(L)Y(G)(F)Y(G)(F)Y(U)(M)Y(C)(M)Y(C)A(M)Y(C)(M)Y(A)(F)Y(T)(L)Y(G)(F)Y(G)(L)Y(C)(F)Y(A)(L)Y(A)(F)Y(C)(L)Y(U)(F)Y(G)(L)Y(U)(F)Y(G)(L)	8290.60
30	hGAPDH_AD1_29	U(M)Y(C)(F)Y(A)(M)Y(A)(F)Y(G)(M)Y(G)(F)Y(G)(F)Y(U)(M)Y(C)(M)Y(C)A(M)Y(C)A(M)Y(A)(F)Y(U)(M)Y(G)(F)Y(G)(M)Y(C)(F)Y(A)(M)Y(A)(F)Y(C)(M)Y(U)(F)Y(G)(M)Y(U)(F)Y(G)(M)	8232.90
31	hGAPDH_AD1_31	U(M)Y(C)(F)Y(A)(M)Y(A)(F)Y(G)(M)Y(G)(F)Y(G)(F)Y(U)(M)Y(C)(M)Y(C)A(M)Y(C)A(M)Y(A)(F)Y(U)(M)Y(G)(F)Y(G)(M)Y(C)(F)Y(A)(M)Y(A)(F)Y(C)(M)Y(U)(F)Y(G)(M)Y(U)(F)Y(G)(M)	8217.93
32	hGAPDH_AD1_32	U(M)Y(C)(F)Y(A)(M)Y(A)(F)Y(G)(M)Y(G)(F)Y(G)(F)Y(U)(M)Y(C)(M)Y(C)A(M)Y(C)A(M)Y(A)(F)Y(U)(M)Y(G)(F)Y(G)(M)Y(C)(F)Y(A)(M)Y(A)(F)Y(C)(M)Y(U)(F)Y(G)(M)Y(U)(F)Y(G)(M)	8231.97

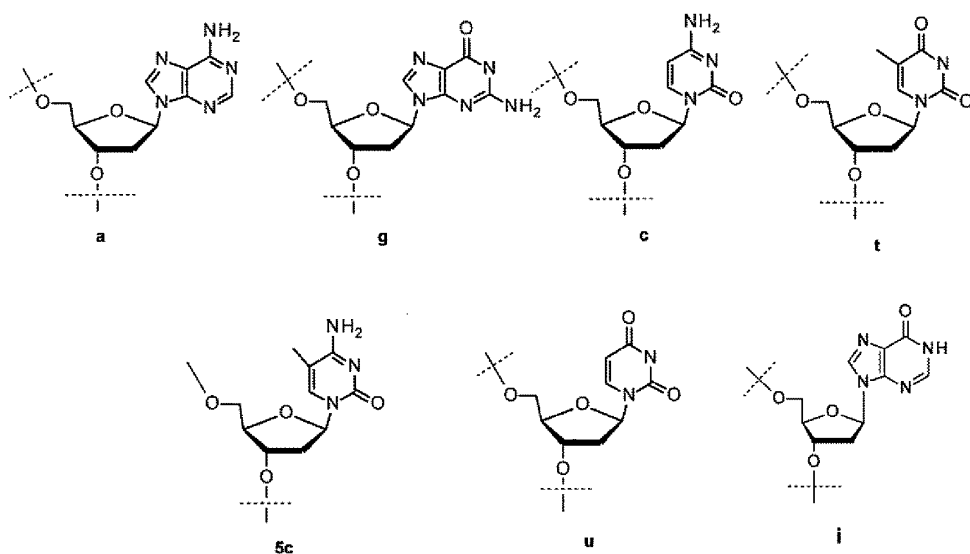
[0261] 表中の「分子量」は、負イオンESI質量分析による実測値を示す。表中の「配列」において大文字はRNA、小文字はDNA、N(M)はD-リボフラノースの2'-O-メチル化、N(F)はD-リボフラノースの2'-デオキシ-2'-フルオロ化、N(L)は、D-リボフラノースの2'-O, 4'-C-メチレン化、N(E)は、D-リボフラノースの2'-O, 4'-C-エチレン化を示す。「3」は-O(CH₂)₃O-、「6」は-O(CH₂)₆O-、「9」は-O(CH₂CH₂O)₃-、「18」は-O(CH₂

CH_2O)₆—で表されるリンカーを示す。「^」はヌクレオシドユニット間が—P(=S)(OH)—で結合したものを示す。特に記載のない場合は、ヌクレオシドユニット間、又はヌクレオシドユニットとリンカーが—P(=O)(OH)—で結合したものを示す。オリゴヌクレオチドの5'末端及び3'末端は、水素原子が化学式中の酸素原子と結合した水酸基となっている。以下にヌクレオシドユニットの構造を示す。なお、化学式中の破線部は結合部位を示す。

[0262] [化2]

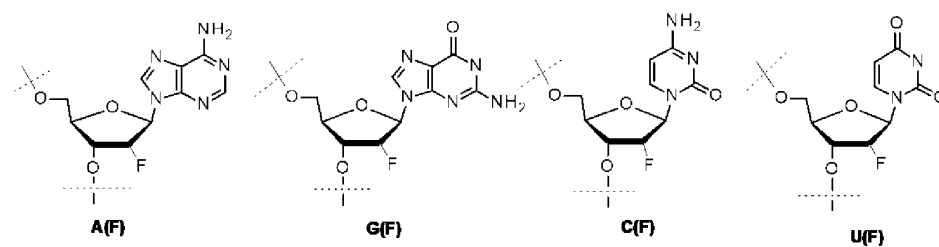


[0263] [化3]

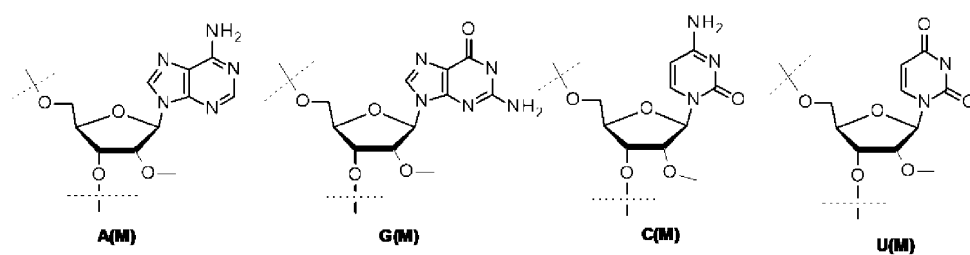


[0264]

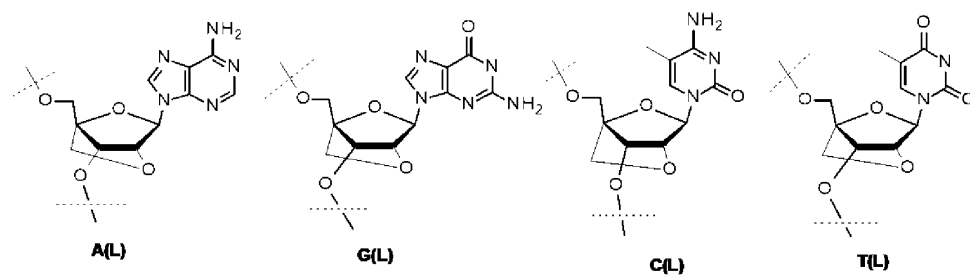
[化4]



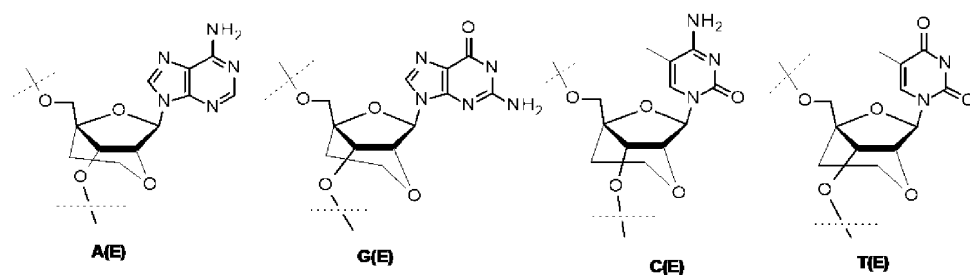
[0265] [化5]



[0266] [化6]

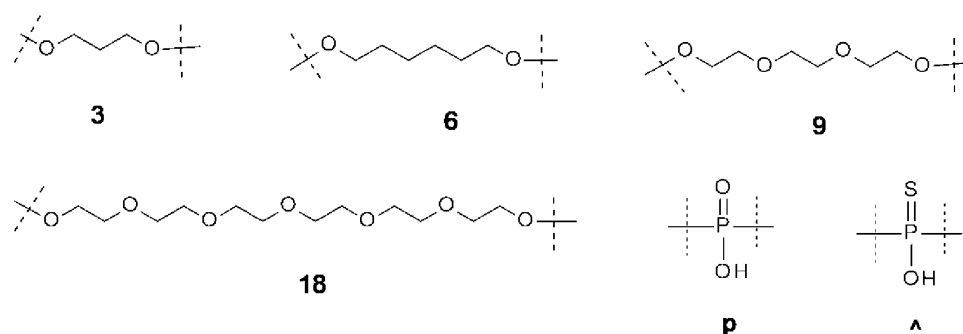


[0267] [化7]



[0268]

[化8]



[0269] (試験例1)

アデノシンデアミナーゼの調製

アデノシンデアミナーゼとして、組換えhADAR2及びhADAR1p110を、文献 (Macbeth, MR. and Bass, BL. Methods Enzymol. 424, 319-331 (2007)、Fukuda, M. et al. Sci. Rep. srep41478 (2017)) の記載に準じて、酵母発現系を用いて合成・精製して調製した。また、hADAR2、hADAR1p110及びhADAR1p150を発現するプラスミド (pcDNA3.1 (-) Hygro__ADAR2、pcDNA3.1 (-) Hygro__ADAR1p110、pcDNA3.1 (-) Hygro__ADAR1p150) を常法により調製した。

[0270] モデル標的RNAの調製：Rluc__sRNAの合成

psiCHECK™-2 Vector (プロメガ社) から、常法により転写して調製したRluc__WT RNA (配列番号5) を0.2nMになるように調製した。組み換えhADAR2を終濃度1μMとなるように加え、editing reaction buffer (20mM HEPES-KOH (pH7.5), 2mM MgCl₂, 100mM NaCl, 0.5mM DTT, 0.01% TritonX-100, 5% glycerol) 中において37℃で2時間インキュベートすることにより、in vitro編集反応を行なった。

[0271] 編集反応後のRluc__WT RNAをフェノール／クロロホルム抽出、エタノール沈殿により精製した。次いで、Primescript Rev

erse Transcriptase II (TaKaRa) を用いて、Rluc__WT__BamR01プライマー（配列番号6）によりcDNAを合成した。その後、Rluc__WT__EcoF01プライマー（配列番号7）及びRluc__WT__BamR01プライマー（配列番号6）、PrimeStar GXL DNA Polymerase (TaKaRa) を用いてPCR（30サイクル、変性：98℃，10秒、アニーリング：55℃，15秒、伸長：68℃，60秒）によりcDNAを増幅した。次いで、得られたcDNAをインサートDNAとして、以下のようにしてpUC19プラスミドにクローニングした。インサートDNA及びpUC19プラスミドをEcoRI (TaKaRa) 及びBamHI (TaKaRa) を用いて37℃で1時間の制限酵素消化を行なった後、フェノール／クロロホルム抽出、エタノール沈殿により、それぞれのDNAを精製した。制限酵素消化後のpUC19プラスミドとインサートDNAが1：3のモル比となるように混合し、DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (TaKaRa) を用いてライゲーション反応を行なった。得られたライゲーションサンプルをDH5 α に形質転換し、LB寒天プレートを用いて37℃で一晩培養した後、QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを抽出した。得られたプラスミドDNAの塩基配列解析を行い、Rluc__WTのA122がGに変異した配列（Rluc__K41R）及びRluc__K41RがクローニングされたプラスミドDNA（pUC19-Rluc__K41R）を得た。

[0272] pUC19-Rluc__K41Rを鋳型にして、5' 側断片をRluc__NheF01プライマー（配列番号8）とRL__W104X__RVプライマー（配列番号9）、3' 側断片をRluc__XhoR01プライマー（配列番号10）と RL__W104X__FWプライマー（配列番号11）を用いてPrimeStar GXL DNA Polymerase (TaKaRa) により1st PCR（30サイクル、変性：98℃，10秒、アニーリング：55℃，15秒、伸長：68℃，40秒）を行なった。次に、そ

それぞれのPCR産物を100倍希釈し、Rluc__NheF01プライマー及びRluc__XhoR01プライマーを用いてPrimeStar GXL DNA Polymerase (TaKaRa) により2nd PCR (30サイクル、変性：98℃, 10秒、アニーリング：55℃, 15秒、伸長：68℃, 60秒) を行ない、フェノール／クロロホルム抽出、エタノール沈殿により精製し、Rluc__K41RのG311をAに変異させた配列を有するDNA (Rluc__K41R__W104X) (配列番号14) を得た。

[0273] 得られたDNA (Rluc__K41R__W104X) 及びpsiCHECK™-2 Vector (promega) について、NheI (TaKaRa) 及びXhoI (TaKaRa) を用いて37℃で1時間の制限酵素消化を行なった後、フェノール／クロロホルム抽出、エタノール沈殿により、それぞれのDNAを精製した。制限酵素消化後のRluc__K41R__W104XとpsiCHECK™-2 Vectorを3:1のモル比となるように混合し、DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (TaKaRa) を用いてライゲーション反応を行なった。得られたライゲーションサンプルをDH5αに形質転換し、LB寒天プレートを用いて37℃で一晩培養した。選別したコロニーをLB液体培地にて37℃で一晩培養し、QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを抽出した。その後、塩基配列解析により得られたプラスミドの配列を確認した。

[0274] 配列を確認したプラスミドを鋳型に、T7__Rluc__sRNA__F01プライマー (配列番号12) 及びRluc__sRNA__R01プライマー (配列番号13)、PrimeStar GXL DNA Polymerase (TaKaRa) を用いてPCR (30サイクル (変性：98℃, 10秒、アニーリング：55℃, 15秒、伸長：68℃, 20秒)) により、in vitro転写反応用の鋳型DNAを増幅し、フェノール／クロロホルム抽出、エタノール沈殿により精製した。AmpliScribe T7

Kit (Epicentre Biotechnologies) を用いて *in vitro* 転写を行なって Rluc__sRNA (配列番号15) を得た。合成後の Rluc__sRNA について、8 M尿素を含む5 %ポリアクリルアミドゲルを用いて切り出し精製を行ない、以降の試験に用いた。

[0275] 以下に、Rluc__WT__RNA、Rluc__K41R__W104X及び Rluc__sRNAの配列、並びに上記で用いたプライマーの配列を示す。

なお、表中の下線は、編集標的のアデノシン残基を示す。

[0276] [表5]

	配列	配列番号
Rluc_WT_RNA	ACCAUGGCUCCAAGGUGUACGACCCGAGCAACGCAAACGCAUGAUCACUGG GCCUCAGUGGGGCGUCGUGCAAGCAAUGAACGUGCGACUCCUUAUCA ACUACUAUGAUCCGAGAAGCACGCCGAGAAGCGCCUGAUUUUUCUGCAUGGU AACGCGGCCUCCAGCUACCGUGGAGGCACGUCGUGCCUACAUCGACGCCGU GGCUAGAUGCAUCAUCCUGAUCUGAUCGGAUUGGGUAAGUCCGGCAAGAGCG GGAAUGGCUCAUAUCGCCUCCUGGAUCAUCAAGUACCUACCGCUUGGUUC GAGCUGCUGAACCUCCAAAGAAAAUCAUCUUUGUGGGCCACGACUGGGGGC UUGUCUGGCCUUUCACUACUCCUACGAGCACAAGACAAGAUCAAGGCCAUCG UCCAUGCUGAGAGUGUCGUGGACGUGAUCGAGUCCUGGGACGAGUGGCCUGA CAUCGAGGAGGAUAUCGCCUGAUAAGAGCGAAGAGGGCGAGAAAAUGGUG CUUGAGAAUAACUUCUUCGUCGAGACCAUGCUCCAGCAAGAUCAUCGGAA ACUGGAGCCUGAGGAGUUCGUGCCUACCGAGCAUUAAGGAGAGGGC GAGGUUAGACGGCCUACCCUCCUGGCCUGCGGAGAUCCUUCUGUUAAGGG AGGCAAGCCGACGUCGUCAGAUUGCCGCAACUACACGCCUACCUUCGGG CCAGCGACGAUCUGCCUAAGAUGUUAUCGAGUCCGACCCUGGGUUCUUUCC AACGCUAUUGUCGAGGGAGCUAAGAAGUCCUAAACCGAGUUCGUGAAGGU GAAGGGCCUCCACUUCAGCCAGGAGGACGCUCCAGAUAAAUGGGUAAGUACA UCAAGAGCUUCG	5

[0277] [表6]

プライマー	配列	配列番号
Rluc_WT_BamR01	GAAGGATCCTTACAGGTCCTCCTCTGAGATCAGC TTCTGCTC	6
Rluc_WT_EcoF01	GCAGAATTCACCATGGCTTCCAAGGTGTACGAC	7
Rluc_NheF01	GACGCTAGCACCATGGCTTCCAAGGTGTACGAC	8
RL_W104X_RV	CAGCTCGAACTAAGCGGTGAG	9
Rluc_XhoR01	GAAGTCGAGTTACAGGTCCTCCTCTGAGATCAGC TTCTGCTC	10
RL_W104X_FW	CTCACCGCTTAGTTCGAGCTG	11
T7_Rluc_sRNA_F01	CTAATACGACTCACTATAGGGCTGGACTCCTTCA TCAAC	12
Rluc_sRNA_R01	CCAGTCGTGGCCACAAAG	13

[0278] [表7]

	配列	配列番号
Rluc_K41R_W104X	ATGGCTTCCAAGGTGTACGACCCCCGAGCAACGCAAAACGCATGATCACTGGGC CTCAGTGTGGGCTGCTGCAAGCAAAAGAACGTGCTGGACTCCTTCATCAAC TACTATGATTCCGACAGAGCCAGCCGAGAAACGCCGTGATTTTTCACCTGTAA CGCTGCCTCCAGCTACCTGTGGAGGCACGCTGTCCTCAATCGAGCCCGTG GCTAGATGCATCATCCCTGATCTGATCGGAATGGGTAAGTCCGGCAAGAGCG GGAATGGCTCATATCGCCTCTGGATCACTACAAATACCTCACCGCTTAGTTC GAGCTGCTGAAACCTTCCAAGAAATCATCTTTGTGGCCACGACTGGGGGG CTGTGCTGGCCTTTCACCTACTCTACGACCAAGCAAGATCAAGGCCATC GTCCATGCTGAGAGTGTCTGGACGTGATCGAGTCTGGGACGAGTGGCCTG ACATCGAGGAGGATATCGCCTGTATCAAGCGCAAGAGGGCGAGAAATGG TGCTTGAGAATAACTTCTCTGTCGAGACCATGCTCCCAAGCAAGATCATGCGG AAATCTGGAACCTCGAGGAGTTCCTGCTACCTGGAGCCATTCAAGGAGAAAG GCGAGGTTAGCGGCCTACCTCTCTGCTGCGAGATCCCTCTCTGTTAG GGAAGCAAGCCCGACGTGCTCCAGATTGTCCGCAACTACAACGCTACCTTC GGGCCAGCGACGATCTGCCTAAGATGTTATCGAGTCCGACCTGGGTCTTT TCCAACGCTATTGTCGAGGGAGCTAAGAAGTCCCTAACACCGAGATTCTGTAA GGTGAAAGGCGCTCCACTTCAAGCAGGACGCTCCAGATGAATGGGTAA GTACATCAAGAGCTTCTGTGAGCGCGTGTGAAGAACGAGCATGAA	14
Rluc_sRNA	GGGCUGGACUCCUUAUCAUAACUACUAGUAGUCCGAGAGGCACGCCGAGAA CGCCGUGAUUUUUCUGCAUGGUAAACGCGGCCUCCAUCUACUGUGGAGGC ACGUCGUGCCUACAUCAGAGCCCGUGGCUAGAUAGCAUCAUCCUGAUCUG AUCGCAUUGGGUAAAGUCCGCAAGAGCGGGAAUUGGCUCAUAUCGCCUCCU GGAUCAUCAAGAUACCUACCCGCUUAGUUCGAGCUGCUGAAGCCUCCAA GAAAUCAUCUUGUGGGCCACGACUGG	15

[0279] 細胞培養

HeLa細胞を24-well Plateに 5.0×10^4 cells/wellとなるように継代し、48時間培養した。Lipofectamine 3000 (Thermo) を用いて50 ngの標的RNAを発現するプラスミド (psiCHECK2__Rluc__K41R__W104X)、350 ngのADARを発現するプラスミド (pcDNA3.1 (-) Hygro__ADAR2、pcDNA3.1 (-) Hygro__ADAR1p110又はpcDNA3.1 (-) Hygro__ADAR1p150)、10 nMの実施例1から16のオリゴヌクレオチドであるgRNAをトランスフェクションした。トランスフェクション後、48時間培養した後、細胞を回収した。

[0280] 編集解析方法

24-well Plateで培養した細胞から、セパゾール RNA
Isolation Reagent (ナカライ) を用いて total RNAを抽出し、R
Nase H (Takara) を用いて DNase

e 処理を行った後、フェノール／クロロホルム抽出、エタノール沈殿により精製した。PrimeScript II Reverse Transcriptase (TaKaRa)、Total RNA 0.5 μ g、0.25 μ M Oligo (dT) 17 (配列番号16)を用いた逆転写反応を行ない、cDNAを増幅した。PrimeStar GXL DNA polymerase (TaKaRa)、Rluc_F01プライマー (配列番号17)、3' -Adpプライマー (配列番号18)を用いて1st PCR (30サイクル (変性: 98°C, 10秒、アニーリング: 55°C, 15秒、伸長: 68°C, 60秒))を行った。1st PCR産物を200倍希釈したcDNAを鋳型に、PrimeStar GXL DNA polymerase (TaKaRa)、Rluc_F01プライマー (配列番号17)、Rluc_R01プライマー (配列番号19)を用いて2nd PCR (30サイクル (変性: 98°C, 10秒、アニーリング: 55°C, 15秒、伸長: 68°C, 60秒))を行い、Rlucフラグメントを増幅した。Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequence Kit (Thermo Fisher Scientific)、0.165 μ M Rluc_sRNA_F01プライマー (配列番号20)を用いてシーケンシング反応を行ない、Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific)により解析した。シーケンシングにより得られたクロマトチャートより、標的部位 (A311) のピーク高比 (G/(G+A)) から編集割合 (%) を算出した。

[0281]

[表8]

プライマー	配列	配列番号
Oligo(dT)17	GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTT TTTTTTTTT	16
Rluc_F01	CTAATACGACTCACTATAGGGACCATG GCTTCCAAGGTGTAC	17
3'-Adp	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	18
Rluc_R01	TTACTGCTCGTTCTTCAGCACG	19
Rluc_sRNA_F01	GCTGGACTCCTTCATCAAC	20

[0282] ルシフェラーゼレポーターアッセイ方法

Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を使用した。24-well Plate で培養した細胞に 100 μ L の Passive Lysis Buffer (Promega) を用いて細胞抽出液を得た。得られた細胞抽出液 20 μ L に LAR II 100 μ L を添加し、60 秒後、GloMax (R) 20/20 Luminometer (Promega) により Firefly Luciferase (Fluc) の発光強度を測定した。その後すぐに、Stop&Glo Reagent を 100 μ L 添加し、60 秒後に Renilla luciferase (Rluc) の発光強度を測定した。発光強度は、Fluc によりノーマライズした。

[0283] 実施例化合物 (AD1-gRNA03__1 から AD1-gRNA03__4) を用いた場合の編集割合 (%) を図 1 A に示した。ADAR1 を発現するプラスミドをトランスフェクトした場合、gRNA を用いなかった場合 (gRNA (-)) と比較して 30 % から 70 % 程度の編集割合を示した。ADAR2 を発現するプラスミドをトランスフェクトした場合、gRNA を用いなかった場合 (gRNA (-)) と比較して 40 % から 60 % 程度の編集割合を示した。実施例化合物 (AD1-gRNA03__1 から AD1-gRNA03__4) を用いた場合のルシフェラーゼレポーターアッセイの結果を図 1 B に示した。実施例化合物 (AD1-gRNA03__1 から AD1-gR

NA03__4)を用いた場合、gRNAを用いなかった場合(gRNA(—))と比較して高いルシフェラーゼ活性が認められた。

[0284] 実施例化合物(AD1—gRNA03__4、AD1—gRNA03__9からAD1—gRNA03__16)を用いた場合の編集割合(%)を図2Aに示した。ADARを発現するプラスミドをトランスフェクトした場合、AD1—gRNA03__4、AD1—gRNA03__9からAD1—gRNA03__16は、gRNAを用いなかった場合(gRNA(—))と比較して高い編集割合を示した。また、実施例化合物(AD1—gRNA03__4、AD1—gRNA03__9からAD1—gRNA03__16)を用いた場合、gRNAを用いなかった場合(gRNA(—))と比較して高いルシフェラーゼ活性が認められた。

[0285] (試験例2)

内在性ADARによる細胞内編集誘導能評価

ADARを発現するプラスミドを用いずに、レポータープラスミド25 ng、50 nMの実施例化合物であるgRNAのみをトランスフェクションしたこと以外は、上記と同様にして、実施例化合物(AD1—gRNA03__4、AD1—gRNA03__9からAD1—gRNA03__16)による細胞内編集誘導能を評価した。

[0286] 実施例化合物(AD1—gRNA03__4、AD1—gRNA03__9からAD1—gRNA03__16)を用いた場合のルシフェラーゼレポーターアッセイの結果を図3に示す。実施例化合物(AD1—gRNA03__4、AD1—gRNA03__9からAD1—gRNA03__16)を用いた場合、gRNAを加えなかった場合(gRNA(—))に比べ、ルシフェラーゼ活性の向上が認められた。また、編集割合についても調べたところ、実施例化合物(AD1—gRNA03__4、AD1—gRNA03__15)を用いた場合、それぞれ9.0±0.1%、4.1±2.3%の編集割合(±S.D.%)を示し、バックグラウンド(それぞれ1.3±1.4%、0.9±0.4%)より高い値を示した。

[0287] [表9]

	Target site		Background	
	ave.	S.D.	ave.	S.D.
gRNA(-)	0.5	0.2	0.8	0.4
AD1-gRNA03_4	9.0	0.1	1.3	1.4
AD1-gRNA03_15	4.1	2.3	0.9	0.4

[0288] (試験例3)

実施例化合物であるgRNAによるGAPDH遺伝子配列に対する細胞内編集誘導能評価

HEK293細胞を24-well Plateに 5.0×10^4 cells/wellとなるように継代し、48時間培養した。Lipofectamine 3000 (Thermo) を用いて500 ngのADARを発現するプラスミド (pcDNA3.1 (-) Hygro__ADAR2、pcDNA3.1 (-) Hygro__ADAR1 p110又はpcDNA3.1 (-) Hygro__ADAR1 p150)、50 nMの実施例化合物であるgRNAをトランスフェクションした。トランスフェクション後、48時間培養した後、細胞を回収した。

[0289] 編集解析方法

試験例1の編集解析方法に記載した方法と同様にcDNAを増幅した。PrimeStar GXL DNA polymerase (Takara)、GAPDH__FWプライマー (配列番号21)、GAPDH__RVプライマー (配列番号22) を用いてPCR (30サイクル (変性: 98℃, 10秒、アニーリング: 55℃, 15秒、伸長: 68℃, 60秒)) を行ない、GAPDHフラグメントを増幅した。Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequence Kit (Thermo Fisher Scientific)、0.165 μ M GAPDH__seqF01プライマー (配列番号23) を用いてシーケンシング反応を行ない、Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific

）により解析した。シーケンシングにより得られたクロマトチャートより、標的部位のピーク高比（ $G / (G + A)$ ）から編集割合（％）を算出した。

[0290] [表10]

プライマー	配列	配列番号
GAPDH_FW	CTCAAGATCATCAGCAATGCCTCCTGC	21
GAPDH_RV	GAGCACAGGGTACTTTATTGATGGTACATGACA AGG	22
GAPDH_seqF01	GTATGACAACGAATTTGGCTAC	23

[0291] 実施例化合物（hGAPDH__AD1__4、hGAPDH__AD1__17からhGAPDH__AD1__19）を用いた場合の編集割合（％）を図4Aに示した。ADAR1を発現するプラスミドをトランスフェクトした場合、gRNAを用いなかった場合（gRNA（－））と比較して15％から25％程度の高い編集割合を示した。ADAR2を発現するプラスミドをトランスフェクトした場合、gRNAを用いなかった場合（gRNA（－））と比較してやや高い編集割合を示した。

[0292] 実施例化合物（hGAPDH__AD1__4、hGAPDH__AD1__20からhGAPDH__AD1__28）を用いた場合の編集割合（％）を図4Bに示した。ADAR1を発現するプラスミドをトランスフェクトした場合、gRNAを用いなかった場合（gRNA（－））と比較して10％から30％程度の高い編集割合を示した。ADAR2を発現するプラスミドをトランスフェクトした場合、gRNAを用いなかったものと比較して高い編集割合を示した。

[0293] 実施例化合物（hGAPDH__AD1__4、hGAPDH__AD1__29、hGAPDH__AD1__31及びhGAPDH__AD1__32）を用いた場合の編集割合（％）を図5に示した。ADAR1を発現するプラスミドをトランスフェクトした場合、gRNAを用いなかった場合（gRNA（－））と比較して15％から30％程度の高い編集割合を示した。ADAR2を発現するプラスミドをトランスフェクトした場合、gRNAを用いなかった場合（gRNA（－））と比較して高い編集割合を示した。

[0294] (実施例 33 から 49)

実施例 33 から 49 のオリゴヌクレオチドは、参考例 2 のオリゴヌクレオチドの配列を元にして、表 11 に示すように修飾ヌクレオチドを導入することで得られたものである。これらのオリゴヌクレオチドは、参考例 1 と同様にホスホロアミダイト法で合成した。なお、配列中、「mU」の部分合成時には、N3-Methyl Uridine CED phosphoramidite (ChemGenes、カタログ番号: ANP-7451) を用い、「d」の部分合成時には、dSpacer CE Phosphoramidite (Glen Research、カタログ番号: 10-1914) を用い、「mc」の部分合成時には、N3-Methyl deoxy Cytidine CED phosphoramidite (ChemGenes、カタログ番号: ANP-3851) を用いた。また、「mt」の部分合成時には、N3-Methyl Thymidine CED phosphoramidite (ChemGenes、カタログ番号: ANP-6153) を用いた。その他の修飾ヌクレオチドの詳細については既述の通りである。

[0295]

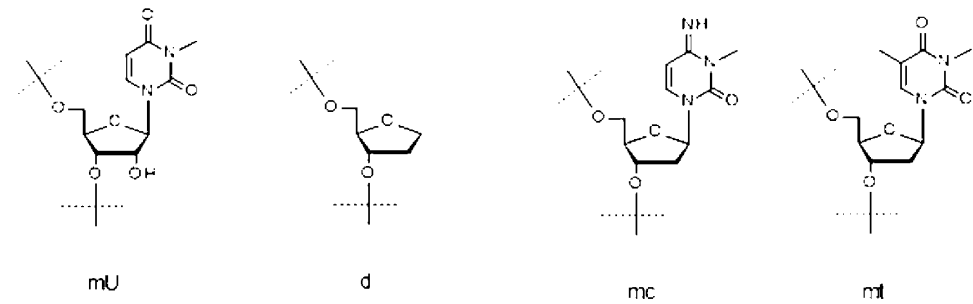
[表11]

実施例	配列名称	配列 (5' -3')	分子量
33	hGAPDH_AD1_33	U(M) [*] C(F) [*] A(M) [*] A(F) [*] G(M) [*] G(F) [*] G(F) [*] U(M) [*] C(M) [*] mU [*] a [*] C(M) [*] A(F) [*] U(M) [*] A G(F) [*] G(M) [*] C(F) [*] A(M) [*] A(F) [*] C(M) [*] U(F) [*] G(M) [*] U(F) [*] G(M)	8250.85
34	hGAPDH_AD1_34	U(M) [*] C(F) [*] A(M) [*] A(F) [*] G(M) [*] G(F) [*] G(F) [*] U(M) [*] C(M) [*] d [*] a [*] C(M) [*] A(F) [*] U(M) [*] G (F) [*] G(M) [*] C(F) [*] A(M) [*] A(F) [*] C(M) [*] U(F) [*] G(M) [*] U(F) [*] G(M)	8104.30
35	hGAPDH_AD1_35	U(M) [*] C(F) [*] A(M) [*] A(F) [*] G(M) [*] G(F) [*] G(F) [*] U(M) [*] C(M) [*] a [*] a [*] C(M) [*] A(F) [*] U(M) [*] G (F) [*] G(M) [*] C(F) [*] A(M) [*] A(F) [*] C(M) [*] U(F) [*] G(M) [*] U(F) [*] G(M)	8242.77
36	hGAPDH_AD1_36	U(M) [*] C(F) [*] A(M) [*] A(F) [*] G(M) [*] G(F) [*] G(F) [*] U(M) [*] C(M) [*] g [*] a [*] C(M) [*] A(F) [*] U(M) [*] G (F) [*] G(M) [*] C(F) [*] A(M) [*] A(F) [*] C(M) [*] U(F) [*] G(M) [*] U(F) [*] G(M)	8255.99
37	hGAPDH_AD1_37	U(M) [*] C(F) [*] A(M) [*] A(F) [*] G(M) [*] G(F) [*] G(F) [*] U(M) [*] C(M) [*] t [*] a [*] C(M) [*] A(F) [*] U(M) [*] G (F) [*] G(M) [*] C(F) [*] A(M) [*] A(F) [*] C(M) [*] U(F) [*] G(M) [*] U(F) [*] G(M)	8232.05
38	hGAPDH_AD1_38	U(M) [*] C(M) [*] A(M) [*] A(M) [*] G(M) [*] G(F) [*] G(F) [*] U(M) [*] C(M) [*] c [*] a [*] C(M) [*] A(F) [*] U(M) [*] A G(F) [*] G(M) [*] C(F) [*] A(M) [*] A(F) [*] C(M) [*] U(M) [*] G(M) [*] U(M) [*] G(M)	8264.13
39	hGAPDH_AD1_39	U(M) [*] C(L) [*] A(M) [*] A(L) [*] G(M) [*] G(F) [*] G(F) [*] U(M) [*] C(M) [*] c [*] a [*] C(M) [*] A(F) [*] U(M) [*] G (F) [*] G(M) [*] C(F) [*] A(M) [*] A(F) [*] C(M) [*] T(L) [*] G(M) [*] T(L) [*] G(M)	8294.71
40	hGAPDH_AD1_40	T(L) [*] C(M) [*] A(L) [*] A(M) [*] G(L) [*] G(F) [*] G(F) [*] U(M) [*] C(M) [*] c [*] a [*] C(M) [*] A(F) [*] U(M) [*] G (F) [*] G(M) [*] C(F) [*] A(M) [*] A(F) [*] C(L) [*] U(M) [*] G(L) [*] U(M) [*] G(L)	8276.42
41	hGAPDH_AD1_41	U(M) [*] C(F) [*] A(M) [*] A(F) [*] G(M) [*] G(F) [*] G(F) [*] U(M) [*] C(M) [*] mc [*] a [*] C(M) [*] A(F) [*] U(M) [*] A G(F) [*] G(M) [*] C(F) [*] A(M) [*] A(F) [*] C(M) [*] U(F) [*] G(M) [*] U(F) [*] G(M)	8231.57
42	hGAPDH_AD1_43	U(M) [*] C(F) [*] A(M) [*] A(F) [*] G(M) [*] G(F) [*] G(F) [*] U(M) [*] C(M) [*] mt [*] a [*] C(M) [*] A(F) [*] U(M) [*] A G(F) [*] G(M) [*] C(F) [*] A(M) [*] A(F) [*] C(M) [*] U(F) [*] G(M) [*] U(F) [*] G(M)	8241.94
43	hGAPDH_AD1_44	U(M) [*] C(L) [*] A(M) [*] A(L) [*] G(M) [*] G(F) [*] G(F) [*] U(M) [*] C(M) [*] mc [*] a [*] C(M) [*] A(F) [*] U(M) [*] A G(F) [*] G(M) [*] C(F) [*] A(M) [*] A(F) [*] C(M) [*] T(L) [*] G(M) [*] T(L) [*] G(M)	8315.83
44	hGAPDH_AD1_46	U(M) [*] C(L) [*] A(M) [*] A(L) [*] G(M) [*] G(F) [*] G(F) [*] U(M) [*] C(M) [*] mt [*] a [*] C(M) [*] A(F) [*] U(M) [*] A G(F) [*] G(M) [*] C(F) [*] A(M) [*] A(F) [*] C(M) [*] T(L) [*] G(M) [*] T(L) [*] G(M)	8329.59
45	hGAPDH_AD1_47	U(M) [*] C(L) [*] A(M) [*] A(L) [*] G(M) [*] G(F) [*] G(F) [*] U(M) [*] C(M) [*] c [*] a [*] C(M) [*] A(F) [*] U(M) [*] G (F) [*] G(M) [*] C(F) [*] A(M) [*] A(L) [*] C(M) [*] T(L) [*] G(M) [*] T(L) [*] G(M)	8306.03
46	hGAPDH_AD1_48	U(M) [*] C(L) [*] A(M) [*] A(L) [*] G(M) [*] G(L) [*] G(F) [*] U(M) [*] C(M) [*] c [*] a [*] C(M) [*] A(F) [*] U(M) [*] G (F) [*] G(M) [*] C(F) [*] A(M) [*] A(L) [*] C(M) [*] T(L) [*] G(M) [*] T(L) [*] G(M)	8317.56
47	hGAPDH_AD1_49	U(M) [*] C(L) [*] A(M) [*] A(L) [*] G(M) [*] G(F) [*] G(F) [*] U(M) [*] C(M) [*] c [*] a [*] C(M) [*] A(F) [*] U(M) [*] G (F) [*] G(M) [*] C(L) [*] A(M) [*] A(L) [*] C(M) [*] T(L) [*] G(M) [*] T(L) [*] G(M)	8331.43
48	hGAPDH_AD1_50	U(M) [*] C(L) [*] A(M) [*] A(L) [*] G(M) [*] G(L) [*] G(F) [*] U(M) [*] C(M) [*] c [*] a [*] C(M) [*] A(F) [*] U(M) [*] G (F) [*] G(M) [*] C(L) [*] A(M) [*] A(L) [*] C(M) [*] T(L) [*] G(M) [*] T(L) [*] G(M)	8341.79
49	hGAPDH_AD1_51	U(M) [*] C(L) [*] A(M) [*] A(L) [*] G(M) [*] G(L) [*] G(L) [*] U(M) [*] C(M) [*] c [*] a [*] C(M) [*] A(F) [*] U(M) [*] G (F) [*] G(M) [*] C(L) [*] A(M) [*] A(L) [*] C(M) [*] T(L) [*] G(M) [*] T(L) [*] G(M)	8351.90

[0296] 表中の「配列」において、「mU」は、N3-メチルウリジン、「d」は、1, 2-ジデオキシリボース、「mc」は、N3-メチル-2'-デオキシチジン、「mt」は、N3-メチルチミジンを示す。また、その他の略号については既述の通りである。なお、オリゴヌクレオチドの5'末端及び3'末端は、水素原子が図中の酸素原子と結合した水酸基となっている。

[0297]

[化9]



[0298] (参考例3から7)

疾患配列を標的とした標的編集ガイドRNAとして、以下に示す配列を有し、すべてが天然型RNA残基からなるオリゴヌクレオチドをホスホロアミダイト法により調製した。得られた化合物は、負イオンESI質量分析により同定した。

[0299] [表12]

参考例	配列名称	配列 (5'-3')	分子量	配列番号
3	AD1_AGXT	CAGAGUCCCCGAAGCCAUCAAGGG	7707.99	24
4	AD1_GNE	GCCCUUUUCCGCAUCACUCGAACC	7478.55	25
5	AD1_EYS	UGAUCCUCCACCCAGUGGUACAA	7568.23	26
6	AD1_HFE	CUCCACUGGCACGUAUAUCUCUGC	7522.82	27
7	AD1_UGT1A1	UAAAAUCUCCGUCUCUGAUGUACA	7557.97	28

[0300] (実施例50から64)

実施例50から64のオリゴヌクレオチドは、参考例3から7のオリゴヌクレオチドの配列を元にして、表13に示すように修飾ヌクレオチドを導入することで得られたものである。これらのオリゴヌクレオチドは、参考例1と同様にホスホロアミダイト法で合成した。なお、修飾ヌクレオチドの詳細については既述の通りである。

[0301]

[表13]

実施例	配列名称	配列 (5' -3')	分子量
50	AD1_AGXT.2	CAGAGUCCCCgAAGCCAUCAAGGG	7699.20
51	AD1_GNE.2	GCCCUUUUCGgCAUCACUCGAACC	7470.60
52	AD1_EYS.2	UGAUCCUUCGCaCCCAGUGGUACAA	7558.50
53	AD1_HFE.2	CUCCACUGGCgCGUAUAUCUCUGC	7511.60
54	AD1_UGT1A1.2	UAAAAUCUCGgUCUCUGAUGUACA	7544.50
55	AD1_AGXT.3	CAGAGUCCCCIAAGCCAUCAAGGG	7684.00
56	AD1_GNE.3	GCCCUUUUCGgCAUCACUCGAACC	7455.40
57	AD1_EYS.3	UGAUCCUUCGgCCCAGUGGUACAA	7559.50
58	AD1_HFE.3	CUCCACUGGCgCGUAUAUCUCUGC	7512.40
59	AD1_UGT1A1.3	UAAAAUCUCGgUCUCUGAUGUACA	7529.30
60	AD1_AGXT_30	C(M)*A(F)*G(M)*A(F)*G(M)*U(F)*C(F)*C(M)*C(M)*C*(A(M)*A(F)*G(M)*C(F)*C(M)*A(F)*U(M)*C(F)*A(M)*A(F)*G(M)*G(F)*G(M)	8242.29
61	AD1_GNE_30	G(M)*C(F)*C(M)*C(F)*U(M)*U(F)*U(F)*U(M)*C(M)*C*(A(M)*A(F)*U(M)*C(F)*A(M)*C(F)*U(M)*C(F)*G(M)*A(F)*A(M)*C(F)*C(M)	8010.77
62	AD1_EYS_29	U(M)*G(F)*A(M)*U(F)*C(M)*C(F)*U(F)*U(M)*C(M)*C*(A(M)*C(F)*C(M)*A(F)*G(M)*U(F)*G(M)*G(F)*U(M)*A(F)*C(M)*A(F)*A(M)	8116.86
63	AD1_HFE_29	C(M)*U(F)*C(M)*C(F)*A(M)*C(F)*U(F)*G(M)*G(M)*C*(A(M)*G(F)*U(M)*A(F)*U(M)*A(F)*U(M)*C(F)*U(M)*C(F)*U(M)*G(F)*C(M)	8067.40
64	AD1_UGT1A1_30	U(M)*A(F)*A(M)*A(F)*A(M)*U(F)*C(F)*U(M)*C(M)*C*(A(M)*C(F)*U(M)*C(F)*U(M)*G(F)*A(M)*U(F)*G(M)*U(F)*A(M)*C(F)*A(M)	8080.60

[0302] 表中の「配列」における略号については既述の通りである。なお、オリゴヌクレオチドの5'末端及び3'末端は、水素原子が図中の酸素原子と結合した水酸基となっている。

[0303] (試験例4)

実施例33から49で得られた化合物について、試験例3と同様にして、オリゴヌクレオチドによるhGAPDH遺伝子配列に対する細胞内編集誘導活性を評価した。

[0304] 実施例化合物(hGAPDH_AD1_4、hGAPDH_AD1_31、hGAPDH_AD1_33からhGAPDH_AD1_40)を用いた場合の編集割合(%)を図6に示した。ADAR1を発現するプラスミドをトランスフェクトした場合、gRNAを用いなかったもの(図中、gRNA(－))と比較して高い編集割合を示した。ADAR2を発現するプラスミドをトランスフェクトした場合、gRNAを用いなかったもの(図中、gRNA(－))と比較して高い編集割合を示した。特に、標的対応ヌクレオチ

ド残基をmUとした実施例33のhGAPDH__AD1__33は、高い編集割合を示した。また、標的RNAとの結合部位にLNAを4か所又は6か所に導入した実施例39及び実施例40（hGAPDH__AD1__39、hGAPDH__AD1__40）は、最も高い編集割合を示した。

[0305] さらに、ADAR1又はADAR2を発現するプラスミドをトランスフェクトせずに、実施例化合物であるgRNAのみを50nMの濃度になるようにトランスフェクトした場合の細胞内編集誘導評価したところ、実施例化合物（hGAPDH__AD1__39又はhGAPDH__AD1__40）を用いた場合、HeLa細胞においてそれぞれ13.6±1.7%、13.9±1.6%の編集割合（±S.D.%）を示し、バックグラウンド（5.0±0.9%）より明らかに高い値を示した。また、HEK293細胞においては、実施例化合物（hGAPDH__AD1__39又はhGAPDH__AD1__40）を用いた場合、それぞれ16.1±3.9%、16.2±1.0%の編集割合（±S.D.%）を示し、バックグラウンド（4.4±0.7%）より明らかに高い値を示した。

[0306] 実施例化合物（hGAPDH__AD1__4、hGAPDH__AD1__31、hGAPDH__AD1__39、hGAPDH__AD1__41、hGAPDH__AD1__43、hGAPDH__AD1__44、hGAPDH__AD1__46からhGAPDH__AD1__51）を用いた場合の編集割合（%）を図7Aに示した。ADAR1を発現するプラスミドをトランスフェクトした場合、gRNAを用いなかったもの（図中、gRNA（-））と比較して高い編集割合を示した。ADAR2を発現するプラスミドをトランスフェクトした場合、gRNAを用いなかったもの（図中、gRNA（-））と比較して高い編集割合を示した。特に、標的RNAとの結合部位にLNAを導入した実施例39及び43から49（hGAPDH__AD1__39、hGAPDH__AD1__44、及びhGAPDH__AD1__46からhGAPDH__AD1__51）は、高い編集割合を示した。

[0307] さらに、ADAR1又はADAR2を発現するプラスミドをトランスフェ

クトせずに、実施例化合物である gRNA のみを 50 nM の濃度になるようにトランスフェクトした場合の細胞内編集誘導評価した編集割合 (%) を図 7B に示した。実施例化合物 (hGAPDH_AD1_31、hGAPDH_AD1_39、hGAPDH_AD1_44、hGAPDH_AD1_47 から hGAPDH_AD1_51) を用いた場合、HEK293 細胞又は HeLa 細胞においてバックグラウンドより明らかに高い編集割合を示した。

[0308] (試験例 5)

AGXT 遺伝子配列を有するモデル標的 RNA に対する編集誘導能評価

(A) AGXT_RNA の合成

AGXT_FW (配列番号 29)、AGXT_RV (配列番号 30) のオリゴ DNA 及び NEBuffer 2 (NEB) を用いてアニーリング反応 (80℃で 3 min 加熱し、15 min かけて 25℃まで冷却) を行ない、インサートを作製した。pUC19 に対して EcoRI (Takara) 及び HindIII (Takara) を用いて 37℃で 1 時間反応を行なった後、フェノール／クロロホルム抽出、エタノール沈殿により精製した。インサート：プラスミドが 3：1 のモル比となるように加え、DNA Ligation Kit<Mighty Mix> (Takara) を用いてライゲーション反応を行なった。得られたライゲーションサンプルを DH5α に形質転換し、LB 寒天プレートを用いて 37℃で一晩培養した。選別したコロニーを、LB 液体培地を用いて 37℃で一晩培養し、QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを抽出した。得られたプラスミド 100 ng を Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequence Kit (Thermo Fisher Scientific)、0.165 μM の pUC19_seqFW プライマー (配列番号 31) 及び 0.165 μM の pUC19_seqRV プライマー (配列番号 32) を用いてシーケンシング反応を行ない、Applied Biosystems 3500 Genetic

Analyzer (Thermo Fisher Scientific) により配列解析を行ない、pUC19__AGXTプラスミドを合成できたことを確認した。pUC19__AGXTを鋳型に、T7__pUC19__FW (配列番号33) 及びM13__RVプライマー (配列番号34)、Prime Star GXL DNA Polymerase (Takara) を用いてPCR (変性: 98℃, 10秒、アニーリング: 55℃, 15秒、伸長: 68℃, 20秒) により、鋳型DNAを作製し、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿により精製した。AmpliScribe T7 Kit (Epicentre Biotechnologies) を用いて*in vitro*転写を行ない、8M尿素を含む5%ポリアクリルアミドゲルを用いて切り出し精製を行なって、モデル標的RNAとしてAGXT__RNAを合成した。

[0309] [表14]

プライマー	配列	配列番号
AGXT_FW	AATCCGTGCTGCAGCCCTTGATGGCTTC AGGGAACCTCTGCCACAGGTGAGCCTGA	29
AGXT_RV	AGCTTCAGGCTCACCTGTGGCAGAGTTCCC TGAAGCCATCAAGGGGCTGCAGCACGG	30
pUC19_seqFW	CAACTGTTGGGAAGGGCGATC	31
pUC19_seqRV	CGACAGGTTTCCCGACTGGAAG	32
T7_pUC19_FW	CTAATACGACTCACTATAGGGCCTCTTCGC TATTACGCCAG	33
M13_RV	GGAAACAGCTATGACCATGATTAC	34
T7proGGG	CTAATACGACTCACTATAGGG	35

[0310] (B) アニーリング反応

0.3 μ MのAGXT__RNAと、0.9 μ Mの実施例50、55 (AD1__AGXT, 2、AD1__AGXT, 3) 及び参考例3 (AD1__AGXT) の化合物 (以下、単にgRNAと表記することがある) とをアニーリング buffer (10mM Tris-HCl (pH7.6), 150mM NaCl) 中で、80℃, 3min加熱し、15minかけて25℃まで冷却した。

[0311] (C) *in vitro* 編集反応

アニーリング反応により AGXT_RNA が gRNA と完全に複合体を形成したと仮定し、以下の AGXT_RNA-gRNA 複合体濃度を計算した。ADAR2 を用いた編集反応は、*editing reaction buffer* (20mM HEPES-KOH (pH7.5), 2mM MgCl₂, 100mM NaCl, 0.5mM DTT, 0.01% TritonX-100, 5% glycerol) 中、5nM AGXT_RNA-gRNA 複合体に対して、組み換え hADAR2 を終濃度 12.5nM となるように加え、37℃で30分間インキュベートすることで行なった。ADAR1 を用いた編集反応は、*editing reaction buffer* (20mM HEPES-KOH (pH7.5), 2mM MgCl₂, 100mM NaCl, 0.5mM DTT, 0.01% TritonX-100, 5% glycerol) 中、5nM AGXT_RNA-gRNA 複合体に対して、組み換え hADAR1 p110 を終濃度 250nM となるように加え、37℃で30分間インキュベートすることで行なった。

[0312] (D) 編集解析方法

編集反応後の AGXT_RNA をフェノール／クロロホルム抽出、エタノール沈殿により精製し、*Primescript Reverse Transcriptase II* (TaKaRa) を用いて、M13_RV プライマー (配列番号34) により cDNA を合成した。その後、T7_pUC19_FW プライマー (配列番号33) 及び M13_RV プライマー (配列番号34)、並びに *PrimeStar GXL DNA Polymerase* (TaKaRa) を用いて PCR (変性: 98℃, 10秒、アニーリング: 55℃, 15秒、伸長: 68℃, 20秒) により、cDNA を増幅した。得られた cDNA の配列解析は T7 proGGG プライマー (配列番号35)、*Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequence Kit* を用いてシーケンシング反応を行ない、*Applied Biosystem 3500 Genetic Analyze*

r (Thermo Fisher Scientific) により解析した。シーケンシングにより得られたクロマトチャートより、標的部位のピーク高比 ($G / (G + A)$) から編集割合 (%) を算出した。

[0313] (E) 編集解析の結果

編集割合の結果を図8に示す。ADAR1 p110によるRNA編集効率は、すべてが天然型RNAからなる参考例3 (AD1__AGXT、図中では、AGXTのAD1g) と比較して、gRNA中、標的対応ヌクレオチドの3'側のグアノシンを2'-デオキシグアノシンにした実施例50 (AD1__AGXT、2、図中では、AGXTのAD1g、2) は、高い編集割合を示した。また、標的対応ヌクレオチドの3'側のグアノシンを2'-デオキシイノシンにした実施例55 (AD1__AGXT、3、図中では、AGXTのAD1g、3) は、さらに高い編集割合を示した。このことは、標的RNAにおいて編集標的であるアデノシン残基の5'側がシチジンの場合は、gRNA中の標的対応ヌクレオチドの3'側のヌクレオチド残基として、2'-デオキシイノシンを用いると高い編集割合を示すことを表している。

[0314] (試験例6)

GNE遺伝子配列を有するモデル標的RNAに対する編集誘導能評価

(A) GNE__RNAの合成

オリゴDNAとして、AGXT__FW及びAGXT__RVの代わりに、以下に示すGNE__FW (配列番号36) 及びGNE__RV (配列番号37) を用いたこと以外は、試験例5の(A) AGXT__RNAの合成に記載した方法と同様に行って、モデル標的RNAを発現するpUC__GNEプラスミドを合成し、これを用いてモデル標的RNAとしてGNE__RNAを合成した。

[0315] [表15]

	配列	配列番号
GNE_FW	AATTCAGCAAAGAGATGGTTCGAGTGATG CAGAAGAAGGGCATTGAGCATCATCCCA	36
GNE_RV	AGCTTGGGATGATGCTCAATGCCCTTCTTCT GCATCACTCGAACCATCTCTTTGCTG	37

[0316] (B) 編集誘導能評価とその結果

実施例 5 1、5 6 (AD 1 __ GNE. 2、AD 1 __ GNE. 3) 及び参考例 4 (AD 1 __ GNE) の化合物を用いて、試験例 5 の (B) から (D) と同様の方法を用いて編集誘導能を評価した。

[0317] (C) 編集解析の結果

編集割合の結果を図 8 に示す。ADAR 1 p 1 1 0 による RNA 編集効率、すべてが天然型 RNA からなる参考例 4 (AD 1 __ GNE、図中では、GNE の AD 1 g) と比較して、g RNA 中、標的対応ヌクレオチドの 3' 側のグアノシンを 2' -デオキシグアノシンにした実施例 5 1 (AD 1 __ GNE. 2、図中では、GNE の AD 1 g. 2) は、高い編集割合を示した。また、標的対応ヌクレオチド位の 3' 側のグアノシンを 2' -デオキシイノシンにした実施例 5 6 (AD 1 __ GNE. 3、図中では、GNE の AD 1 g. 3) は、さらに高い編集割合を示した。このことは、標的 RNA において編集標的であるアデノシン残基の 5' 側がシチジンの場合は、g RNA 中の標的対応ヌクレオチドの 3' 側のヌクレオチド残基として、2' -デオキシイノシンを用いると高い編集割合を示すことを表している。

[0318] (試験例 7)

EYS 遺伝子配列を有するモデル標的 RNA に対する編集誘導能評価

(A) EYS __ RNA の合成

オリゴ DNA として、AGXT __ FW 及び AGXT __ RV の代わりに、以下に示す EYS __ FW (配列番号 38) 及び EYS __ RV (配列番号 39) を用いたこと以外は、試験例 5 の (A) AGXT __ RNA の合成に記載した方法と同様に行って、モデル標的 RNA を発現する pUC __ EYS プラスミドを合成し、これを用いてモデル標的 RNA として EYS __ RNA を合成した。

[0319]

[表16]

	配列	配列番号
EYS_FW	AATCCACAGCTGCAATTGTACCACTGGGT AGAAAGGATCATTCTGCACAGAGACA	38
EYS_RV	AGCTTGTGCTCTGTGCAGAATGATCCTTTCT ACCCAGTGGTACAATTGCAGCTGTGG	39

[0320] (B) 編集誘導能評価とその結果

実施例52、57 (AD1__EYS. 2、AD1__EYS. 3) 及び参考例5 (AD1__EYS) の化合物を用いて、試験例5の(B) から(D) と同様の方法を用いて編集誘導能を評価した。

[0321] (C) 編集解析の結果

編集割合の結果を図8に示す。ADAR1 p110によるRNA編集効率では、すべてが天然g a型RNAからなる参考例5 (AD1__EYS、図中では、EYSのAD1 g) と比較して、g RNA中、標的対応ヌクレオチドの3' 側のグアノシンを2' -デオキシグアノシンにした実施例52 (AD1__EYS. 2、図中では、EYSのAD1 g. 2) は、高い編集割合を示した。また、標的対応ヌクレオチド位の3' 側のグアノシンを2' -デオキシイノシンにした実施例57 (AD1__EYS. 3、図中では、EYSのAD1 g. 3) は、さらに高い編集割合を示した。このことは、標的RNAにおいて編集標的であるアデノシン残基の5' 側がシチジンの場合は、g RNA中の標的対応ヌクレオチドの3' 側のヌクレオチド残基として、2' -デオキシイノシンを用いると高い編集割合を示すことを表している。

[0322] (試験例8)

HFE遺伝子配列を有するモデル標的RNAに対する編集誘導能評価

(A) HFE__RNAの合成

オリゴDNAとして、AGXT__FW及びAGXT__RVの代わりに、以下に示すHFE__FW (配列番号40) 及びHFE__RV (配列番号41) を用いたこと以外は、試験例5の(A) AGXT__RNAの合成に記載した方法と同様に行って、モデル標的RNAを発現するpUC__HFEプラスミ

ドを合成し、これを用いてモデル標的RNAとしてHFE__RNAを合成した。

[0323] [表17]

	配列	配列番号
HFE_FW	AATTCCTGGGGAAGAGCAGAGATATACG TACCAGGTGGAGCACCCAGGCCTGGATA	40
HFE_RV	AGCTTATCCAGGCCTGGGTGCTCCACCTG GTACGTATATCTCTGCTCTCCCCAGGG	41

[0324] (B) 編集誘導能評価とその結果

実施例53、58 (AD1__HFE. 2、AD1__HFE. 3) 及び参考例6 (AD1__HFE) の化合物を用いて、試験例5の(B) から(D) と同様の方法を用いて編集誘導能を評価した。

[0325] (C) 編集解析の結果

編集割合の結果を図8に示す。ADAR1 p110によるRNA編集効率、すべてが天然型RNAからなる参考例6 (AD1__HFE、図中では、HFEのAD1 g) と比較して、gRNA中、標的対応ヌクレオチドの3'側のグアノシンを2'-デオキシグアノシンにした実施例53 (AD1__HFE. 2、図中では、HFEのAD1 g. 2) は、高い編集割合を示した。また、標的対応ヌクレオチド位の3'側のグアノシンを2'-デオキシイノシンにした実施例58 (AD1__HFE. 3、図中では、HFEのAD1 g. 3) は、さらに高い編集割合を示した。このことは、標的RNAにおいて編集標的であるアデノシン残基の5'側がシチジンの場合は、gRNA中の標的対応ヌクレオチドの3'側のヌクレオチド残基として、2'-デオキシイノシンを用いると高い編集割合を示すことを表している。

[0326] (試験例9)

UGT1A1遺伝子配列を有するモデル標的RNAに対する編集誘導能評価

(A) UGT1A1__RNAの合成

オリゴDNAとして、AGXT__FW及びAGXT__RVの代わりに、以下に示すUGT1A1__FW (配列番号42) 及びUGT1A1__RV (配

列番号43)を用いたこと以外は、試験例5の(A)AGXT__RNAの合成に記載した方法と同様に行って、モデル標的RNAを発現するpUC__UGT1A1プラスミドを合成し、これを用いてモデル標的RNAとしてUGT1A1__RNAを合成した。

[0327] [表18]

	配列	配列番号
UGT1A1_FW	AATTCTGACGCCTCGTTGTACATCAGAGAC AGAGCATTTTACACCTTGAAGACGTAA	42
UGT1A1_RV	AGCTTTACGTCTTCAAGGTGTAAAATGCTCT GTCTCTGATGTACAACGAGGCGTCAG	43

[0328] (B) 編集誘導能評価とその結果

実施例54、59(AD1__UGT1A1、2、AD1__UGT1A1、3)及び参考例7(AD1__UGT1A1)の化合物を用いて、試験例5の(B)から(D)と同様の方法を用いて編集誘導能を評価した。

[0329] (C) 編集解析の結果

編集割合の結果を図8に示す。ADAR1p110によるRNA編集効率は、すべてが天然型RNAからなる参考例7(AD1__UGT1A1、図中では、UGT1A1のAD1g)と比較して、gRNA中、標的対応ヌクレオチドの3'側のグアノシンを2'-デオキシグアノシンにした実施例54(AD1__UGT1A1、2、図中では、UGT1A1のAD1g、2)は、高い編集割合を示した。また、標的対応ヌクレオチド位の3'側のグアノシンを2'-デオキシイノシンにした実施例59(AD1__UGT1A1、3、図中では、UGT1A1のAD1g、3)は、さらに高い編集割合を示した。このことは、標的RNAにおいて編集標的であるアデノシン残基の5'側がシチジンの場合は、gRNA中の標的対応ヌクレオチドの3'側のヌクレオチド残基として、2'-デオキシイノシンを用いると高い編集割合を示すことを表している。

[0330] (試験例10)

gRNAの培養細胞内におけるAGXT遺伝子配列を有するモデル標的RN

Aに対する編集誘導能評価

(A) 標的RNA発現プラスミドの合成

試験例5 (A) で得られたpUC19__AGXTを鋳型にして、DS__disease__XhoF01プライマー（配列番号44）及びDS__disease__KpnR01プライマー（配列番号45）、PrimeStar GXL DNA Polymerase (TaKaRa) を用いてPCR（30サイクル、変性：98℃、10秒、アニーリング：55℃、15秒、伸長：68℃、20秒）により、インサートDNAを作製し、フェノール／クロロホルム抽出、エタノール沈殿により精製した。インサートDNA、pcDNA3.1 (−) HygroをXhoI (TaKaRa) 及びKpnI (TaKaRa) を用いて37℃で1時間反応を行なった後、フェノール／クロロホルム抽出、エタノール沈殿により精製した。インサート：プラスミドが3：1のモル比となるように加え、DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (TaKaRa) を用いてライゲーション反応を行なった。得られたライゲーションサンプルをDH5αに形質転換し、LB寒天プレートを用いて37℃で一晩培養した。選別したコロニーを、LB液体培地を用いて37℃で一晩培養し、QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを抽出した。得られたプラスミド100ngをBig Dye Terminator v3.1 Cycle Sequence Kit (Thermo Fisher Scientific)、0.165 μMのpcDNA3__1pro__F01プライマー（配列番号46）及び0.165 μMのpcDNA31-seqR01プライマー（配列番号47）を用いてシーケンシング反応を行ない、Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) により配列解析を行ない、pcDNA3.1 (−) Hygro__AGXTを合成できたことを確認した。

[0331]

[表19]

プライマー	配列	配列番号
DS_disease_XhoF01	GTACTCGAGGGGCTCTTCGCTATTACGCC AG	44
DS_disease_KpnR01	GATGGTACCGGAAACAGCTATGACCATG	45
pcDNA3_1pro_F01	TGGCACCAAAATCAACGGG	46
pcDNA31-seqR01	GCTATTGTCTTCCCAATCCTCC	47
3-Adp	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	48

[0332] (B) 細胞培養

HEK293細胞を24-well Plateに 5.0×10^4 cells/wellとなるように播種し、48時間培養した。Lipofectamine 3000 (Thermo) を用いて10 ngのpcDNA3.1 (−) Hygro__AGXT、500 ngのADARを発現するプラスミド (pcDNA3.1 (−) Hygro__ADAR2、pcDNA3.1 (−) Hygro__ADAR1p110、又はpcDNA3.1 (−) Hygro__ADAR1p150) と、50 nMのgRNA (実施例60; AD1__AGXT, 30) をトランスフェクトし、48時間培養した。

[0333] (C) 編集解析

24-well Plateで培養した細胞から、セパゾール RNA Isolation Super G (ナカライ) を用いてtotal RNAを抽出し、Recombinant DNase I (TaKaRa) を用いてDNase処理を行った後、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿により精製した。PrimeScript II Reverse Transcriptase (TaKaRa)、Total RNA 0.5 μg、0.25 μM Oligo (dT) 17を用いた逆転写反応を行ない、cDNAを増幅した。PrimeStar GXL DNA polymerase (TaKaRa)、T7 proGGGプライマー (配列番号35)、3' - Adpプライマー (配列番号48) を用いて1st PCRを行った。1st PCR産物を200倍希釈したcDNAを鋳型に、PrimeStar

GXL DNA polymerase (TaKaRa)、DS__disease__XhoF01プライマー（配列番号44）、DS__disease__KpnR01プライマー（配列番号45）を用いて2nd PCRを行い、AGXTフラグメントを増幅した。Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequence Kit、0.165 μ M DS__disease__XhoF01プライマーを用いてシーケンシング反応を行ない、Applied Biosystem 3500 Genetic Analyzerにより解析した。シーケンシングにより得られたクロマトチャートより、標的部位のピーク高比（G／（G＋A））から編集割合を算出した。

[0334] (D) 編集解析の結果

実施例60の化合物（AD1__AGXT__30）を用いた場合の編集割合（%）を図9に示した。標的RNA発現プラスミド及び実施例化合物であるgRNAをトランスフェクトした場合、30%程度の高い編集割合を示した。標的RNA発現プラスミド及び実施例化合物であるgRNAを、ADAR2を発現するプラスミドとともにトランスフェクトした場合、60%程度の高い編集割合を示した。標的RNA発現プラスミド及び実施例化合物であるgRNAを、ADAR1 p110又はADAR1 p150を発現するプラスミドとともにトランスフェクトした場合、70%程度の高い編集割合を示した。

[0335] (試験例11)

gRNAの培養細胞内におけるGNE遺伝子配列を有するモデル標的RNAに対する編集誘導能評価

pUC19__AGXTの代わりに、試験例6（A）で得られたpUC19__GNEを鋳型にして標的RNA発現プラスミドを構築したことと、gRNAとして実施例61のAD1__GNE__30を用いたこと以外は、試験例10の（A）から（C）に準じて、gRNAの培養細胞内におけるGNE遺伝子配列の編集誘導能を評価した。

[0336] 実施例61の化合物(AD1__GNE__30)を用いた場合の編集割合(%)を図9に示した。標的RNA発現プラスミド及び実施例化合物であるgRNAをトランスフェクトした場合、10%程度の編集割合を示した。標的RNA発現プラスミド及び実施例化合物であるgRNAを、ADAR2を発現するプラスミドとともにトランスフェクトした場合、50%程度の高い編集割合を示した。標的RNA発現プラスミド及び実施例化合物であるgRNAを、ADAR1 p110又はADAR1 p150を発現するプラスミドとともにトランスフェクトした場合、60%程度の高い編集割合を示した。

[0337] (試験例12)

gRNAの培養細胞内におけるEYS遺伝子配列を有するモデル標的RNAに対する編集誘導能評価

pUC19__AGXTの代わりに、試験例7(A)で得られたpUC19__EYSを鋳型にして標的RNA発現プラスミドを構築したことと、gRNAとして実施例62のAD1__EYS__29を用いたこと以外は、試験例10の(A)から(C)に準じて、gRNAの培養細胞内におけるEYS遺伝子配列の編集誘導能を評価した。

[0338] 実施例62の化合物(AD1__EYS__29)を用いた場合の編集割合(%)を図9に示した。標的RNA発現プラスミド及び実施例化合物であるgRNAをトランスフェクトした場合、10%程度の編集割合を示した。標的RNA発現プラスミド及び実施例化合物であるgRNAを、ADAR2を発現するプラスミドとともにトランスフェクトした場合、40%程度の高い編集割合を示した。標的RNA発現プラスミド及び実施例化合物であるgRNAを、ADAR1 p110又はADAR1 p150を発現するプラスミドとともにトランスフェクトした場合、50%から60%程度の高い編集割合を示した。

[0339] (試験例13)

gRNAの培養細胞内におけるHFE遺伝子配列を有するモデル標的RNAに対する編集誘導能評価

pUC19__AGXTの代わりに、試験例8（A）で得られたpUC19__HFEを鋳型にして標的RNA発現プラスミドを構築したことと、gRNAとして実施例63のAD1__HFE__29を用いたこと以外は、試験例10の（A）から（C）に準じて、gRNAの培養細胞内におけるHFE遺伝子配列の編集誘導能を評価した。

[0340] 実施例63の化合物（AD1__HFE__29）を用いた場合の編集割合（%）を図9に示した。標的RNA発現プラスミド及び実施例化合物であるgRNAをトランスフェクトした場合、10%程度の編集割合を示した。標的RNA発現プラスミド及び実施例化合物であるgRNAを、ADAR2を発現するプラスミドとともにトランスフェクトした場合、40%程度の高い編集割合を示した。標的RNA発現プラスミド及び実施例化合物であるgRNAを、ADAR1 p110又はADAR1 p150を発現するプラスミドとともにトランスフェクトした場合、50%程度の高い編集割合を示した。

[0341] （試験例14）

gRNAの培養細胞内におけるUGT1A1遺伝子配列を有するモデル標的RNAに対する編集誘導能評価

pUC19__AGXTの代わりに、試験例9（A）で得られたpUC19__UGT1A1を鋳型にして標的RNA発現プラスミドを構築したことと、gRNAとして実施例64のAD1__UGT1A1__30を用いたこと以外は、試験例10の（A）から（C）に準じて、gRNAの培養細胞内におけるUGT1A1遺伝子配列の編集誘導能を評価した。

[0342] 実施例64の化合物（AD1__UGT1A1__30）を用いた場合の編集割合（%）を図9に示した。標的RNA発現プラスミド及び実施例化合物であるgRNAをトランスフェクトした場合、10%程度の編集割合を示した。標的RNA発現プラスミド及び実施例化合物であるgRNAを、ADAR2を発現するプラスミドとともにトランスフェクトした場合、40%程度の高い編集割合を示した。標的RNA発現プラスミド及び実施例化合物であるgRNAを、ADAR1 p110又はADAR1 p150を発現するプラ

スミドとともにトランスフェクトした場合、60%程度の高い編集割合を示した。

[0343] (参考例8から22)

疾患配列を標的とした標的編集ガイドRNAとして、以下に示す配列を有し、すべてが天然型リボヌクレオチド残基からオリゴヌクレオチドを、参考例1と同様にホスホロアミダイト法により合成した。表中の「分子量」は、負イオンESI質量分析による実測値を示し、「-」は未測定であることを示す。

[0344] [表20]

参考例	配列名称	配列 (5'-3')	分子量	配列番号
8	AD1_Factor V	CUGUAUCCUCGCCUGUCCAGGGAU	7576.65	49
9	AD1_PAH.1	GUGGAAACUCGGAAGGCCAGGCCA	7788.98	50
10	AD1_ASS1	UUGAUGACCCGUGGCAUCAGUUG	7680.78	51
11	AD1_GFAP	AUACUGGUGCGGAUCUCUUCAGG	7642.68	52
12	AD1_CBS	GGCGCCGGUCGAAGCCCUUCUCCC	7596.00	53
13	AD1_GRIA2	GCAUCCUGCCGCAUAAAGGCACCC	7611.00	54
14	AD1_SLC02A1	GGGUCAUUACGUUUAUGAAAUCC	7640.00	55
15	AD1g_RL_A287_GC	CUUGUAUGACCCAGGAGGCGAUAU	7688.30	56
16	AD1g_RL_A287_GG	CUUGUAUGACGCGAGGAGGCGAUAU	7733.63	57
17	AD1g_RL_A287_U	CUUGUAUGACUCAGGAGGCGAUAU	7689.64	58
18	AD1g_RL_A287_A	CUUGUAUGACACAGGAGGCGAUAU	7715.62	59
19	AD1_PAH.2	CUGUAGCCCCAAGUGAAAAGUUAU	7661.70	60
20	AD1_PANK2	AAGAAAUUCCAACAAAUACCACCU	-	61
21	AD1_NPHS2	AUGUCCAGUCGGAUAUAAUUACU	7624.00	62
22	AD1_A1AT	GUCCCUUCUCGUCGAUGGUCAGCA	-	63

[0345] 表中の「配列」において大文字はRNAを示す。参考例8から22のオリゴヌクレオチドの5'末端及び3'末端は、水素原子が酸素原子に結合して水酸基となっている。

[0346] (実施例65から136)

実施例65から136の化合物は、それぞれ参考例2、参考例8から22のオリゴヌクレオチドの配列を元にして、表21から表24に示すように修飾ヌクレオチドを導入することで得られたものである。これらのオリゴヌクレオチドは、参考例1と同様にホスホロアミダイト法で合成した。なお、配

列中、「ec」の部分合成時には、N3-Ethyl deoxy Cytidine CED phosphoramidite (Chem Gene、カタログ番号: ANP-3856) を用いた。「T」の部分合成時には、Ribo Thymidine CED phosphoramidite (ChemGene、カタログ番号: ANP-7511) を用いた。

[0347] [表21]

実施例	配列名称	配列 (5'-3')	分子量
65	AD1_Factor V.3	CUGUAUCCUCICCGUCCAGGGGAU	7551.0
66	AD1_PAH.1.3	GUGGAAACUCIGAGGCCAGGCCA	7762.0
67	AD1_ASS1.3	UUGAUGACCCIGUGGCAUCAGUUG	7656.0
68	AD1_GFAP.3	AUACUGGUGCiGAUCUCUUCAGG	7616.0
69	AD1_CBS.3	GGCGCCGGUCiAAGCCCUUCUCCC	7564.0
70	AD1_GRIA2.3	GCAUCCUGCCiCAUAAAGGCACCC	7580.0
71	AD1_SLC02A1.3	GGGUCAUUACiUUUAAUGAAAUCC	7608.0
72	AD1_PAH.2.29	C(M)U(F)G(M)U(F)A(M)G(F)C(F)C(M)C(M)C ^a A(M)G(F)U(M)G(F)A(M)A(F)A(M)A(F)G(M)U(F)U(M)A(F)U(M)	8198.39
73	AD1_PAH.2.41	C(M)U(F)G(M)U(F)A(M)G(F)C(F)C(M)C(M)C ^{mc} A(M)G(F)U(M)G(F)A(M)A(F)A(M)A(F)G(M)U(F)U(M)A(F)U(M)	8202.26
74	AD1_PAH.2.43	C(M)U(F)G(M)U(F)A(M)G(F)C(F)C(M)C(M)C ^{mt} A(M)G(F)U(M)G(F)A(M)A(F)A(M)A(F)G(M)U(F)U(M)A(F)U(M)	8211.25
75	AD1_ASS1.39	U(M)T(L)G(M)A(L)U(M)G(F)A(F)C(M)C(M)C ^g G(M)U(F)G(M)G(F)C(M)A(F)U(M)C(F)A(M)G(L)U(M)T(L)G(M)	8261.77
76	AD1_PANK2.39	A(M)A(L)G(M)A(L)A(M)A(F)U(F)U(M)C(M)C ^c A(M)C(F)A(M)A(F)A(M)U(F)A(M)C(F)C(M)A(L)C(M)C(L)U(M)	8171.84
77	AD1_NPHS2.39	A(M)T(L)G(M)T(L)C(M)C(F)A(F)G(M)U(M)C ^g G(M)A(F)A(M)U(F)A(M)U(F)A(M)A(F)U(M)T(L)A(M)C(L)U(M)	8226.35
78	AD1_GRIA2.39	G(M)C(L)A(M)T(L)C(M)C(F)U(F)G(M)C(M)C ^g C(M)A(F)U(M)A(F)A(M)A(F)G(M)G(F)C(M)A(L)C(M)C(L)C(M)	8204.44
79	AD1_ASS1.52	U(M)G(L)A(M)U(L)G(F)A(F)C(M)C(M)C ^g G(M)U(F)G(M)G(F)C(M)A(F)U(M)C(F)A(L)G(M)U(L)U(M)	7552.82
80	AD1_GRIA2.39e	G(M)C(E)A(M)T(E)C(M)C(F)U(F)G(M)C(M)C ^g C(M)A(F)U(M)A(F)A(M)A(F)G(M)G(F)C(M)A(E)C(M)C(E)C(M)	8255.48
81	AD1_ASS1.39e	U(M)T(E)G(M)A(E)U(M)G(F)A(F)C(M)C(M)C ^g G(M)U(F)G(M)G(F)C(M)A(F)U(M)C(F)A(M)G(E)U(M)T(E)G(M)	8318.39
82	AD1_PANK2.39e	A(M)A(E)G(M)A(E)A(M)A(F)U(F)U(M)C(M)C ^c A(M)C(F)A(M)A(F)A(M)U(F)A(M)C(F)C(M)A(E)C(M)C(E)U(M)	8227.84
83	AD1_NPHS2.39e	A(M)T(E)G(M)T(E)C(M)C(F)A(F)G(M)U(M)C ^g G(M)A(F)A(M)U(F)A(M)U(F)A(M)A(F)U(M)T(E)A(M)C(E)U(M)	8283.79
84	AD1_GRIA2.52e	C(M)A(E)U(M)C(E)C(F)U(F)G(M)C(M)C ^g C(M)A(F)U(M)A(F)A(M)A(F)G(M)G(F)C(E)A(M)C(E)C(M)	7547.10
85	AD1_ASS1.52e	U(M)G(E)A(M)T(E)G(F)A(F)C(M)C(M)C ^g G(M)U(F)G(M)G(F)C(M)A(F)U(M)C(F)A(E)G(M)T(E)U(M)	7606.87
86	AD1_PANK2.52e	A(M)G(E)A(M)A(E)A(F)U(F)U(M)C(M)C ^c A(M)C(F)A(M)A(F)A(M)U(F)A(M)C(F)C(E)A(M)C(E)C(M)	7548.20
87	AD1_NPHS2.52e	U(M)G(E)U(M)C(E)C(F)A(F)G(M)U(M)C ^g G(M)A(F)A(M)U(F)A(M)U(F)A(M)A(F)T(E)U(M)A(E)C(M)	7561.07

[0348]

[表22]

実施例	配列名称	配列 (5' -3')	分子量
88	AD1g_RL_A287_Gc	CUUGUAUGACcCAGGAGGCGAUUAU	7676.38
89	AD1g_RL_A287_Gg	CUUGUAUGACgCAGGAGGCGAUUAU	7715.88
90	AD1g_RL_A287_Gi	CUUGUAUGACiCAGGAGGCGAUUAU	7701.23
91	AD1g_RL_A287_Gt	CUUGUAUGACtCAGGAGGCGAUUAU	7690.51
92	AD1g_RL_A287_Gd	CUUGUAUGACdCAGGAGGCGAUUAU	7566.57
93	AD1g_RL_A287_u	CUUGUAUGACuCAGGAGGCGAUUAU	7674.20
94	AD1g_RL_A287_T	CUUGUAUGACTCAGGAGGCGAUUAU	7708.24
95	AD1g_RL_A287_5mc	CUUGUAUGAC5cCAGGAGGCGAUUAU	7688.22
96	AD1g_RL_A287_a	CUUGUAUGACaCAGGAGGCGAUUAU	7700.80
97	AD1g_RL_A287_Gi.39	C(M) ¹ T(L) ¹ U(M) ¹ G(L) ¹ U(M) ¹ A(F) ¹ U(F) ¹ G(M) ¹ A(M) ¹ c ¹ A ¹ C(M) ¹ A(F) ¹ G(M) ¹ G(F) ¹ A(M) ¹ G(F) ¹ G(M) ¹ C(F) ¹ G(M) ¹ A(L) ¹ U(M) ¹ A(L) ¹ U(M) ¹	8299.67
98	AD1g_RL_A287_Gu.39	C(M) ¹ T(L) ¹ U(M) ¹ G(L) ¹ U(M) ¹ A(F) ¹ U(F) ¹ G(M) ¹ A(M) ¹ c ¹ u ¹ C(M) ¹ A(F) ¹ G(M) ¹ G(F) ¹ A(M) ¹ G(F) ¹ G(M) ¹ C(F) ¹ G(M) ¹ A(L) ¹ U(M) ¹ A(L) ¹ U(M) ¹	8274.00
99	AD1g_RL_A287_Gt.39	C(M) ¹ T(L) ¹ U(M) ¹ G(L) ¹ U(M) ¹ A(F) ¹ U(F) ¹ G(M) ¹ A(M) ¹ c ¹ A ¹ C(M) ¹ A(F) ¹ G(M) ¹ G(F) ¹ A(M) ¹ G(F) ¹ G(M) ¹ C(F) ¹ G(M) ¹ A(L) ¹ U(M) ¹ A(L) ¹ U(M) ¹	8288.39

[0349] [表23]

実施例	配列名称	配列 (5' -3')	分子量
100	hGAPDH_AD1_42	U(M) ¹ C(F) ¹ A(M) ¹ A(F) ¹ G(M) ¹ G(F) ¹ U(M) ¹ C(M) ¹ ec ¹ a ¹ C(M) ¹ A(F) ¹ U(M) ¹ A(G) ¹ F) ¹ G(M) ¹ C(F) ¹ A(M) ¹ A(F) ¹ C(M) ¹ U(F) ¹ G(M) ¹ U(F) ¹ G(M) ¹	8242.45
101	hGAPDH_AD1_45	U(M) ¹ C(L) ¹ A(M) ¹ A(L) ¹ G(M) ¹ G(F) ¹ U(M) ¹ C(M) ¹ ec ¹ a ¹ C(M) ¹ A(F) ¹ U(M) ¹ A(G) ¹ F) ¹ G(M) ¹ C(F) ¹ A(M) ¹ A(F) ¹ C(M) ¹ T(L) ¹ G(M) ¹ T(L) ¹ G(M) ¹	8325.88
102	hGAPDH_AD1_52	C(M) ¹ A(L) ¹ A(M) ¹ G(L) ¹ G(F) ¹ G(F) ¹ U(M) ¹ C(M) ¹ c ¹ a ¹ C(M) ¹ A(F) ¹ U(M) ¹ A(G) ¹ F) ¹ G(M) ¹ C(F) ¹ A(M) ¹ A(F) ¹ C(L) ¹ U(M) ¹ G(L) ¹ U(M) ¹	7558.92
103	hGAPDH_AD1_53	A(L) ¹ A(M) ¹ G(L) ¹ G(F) ¹ G(F) ¹ U(M) ¹ C(M) ¹ c ¹ a ¹ C(M) ¹ A(F) ¹ U(M) ¹ A(G) ¹ F) ¹ G(M) ¹ C(F) ¹ A(M) ¹ A(F) ¹ C(L) ¹ U(M) ¹ G(L) ¹	6887.29
104	hGAPDH_AD1_54	T(L) ¹ C(L) ¹ A(L) ¹ A(L) ¹ G(L) ¹ G(F) ¹ G(F) ¹ U(M) ¹ C(M) ¹ c ¹ a ¹ C(M) ¹ A(F) ¹ U(M) ¹ A(G) ¹ F) ¹ G(M) ¹ C(F) ¹ A(M) ¹ A(F) ¹ C(L) ¹ T(L) ¹ G(L) ¹ T(L) ¹ G(L) ¹	8315.67
105	hGAPDH_AD1_55	C(L) ¹ A(L) ¹ A(L) ¹ G(L) ¹ G(F) ¹ G(F) ¹ U(M) ¹ C(M) ¹ c ¹ a ¹ C(M) ¹ A(F) ¹ U(M) ¹ A(G) ¹ F) ¹ G(M) ¹ C(F) ¹ A(M) ¹ A(F) ¹ C(L) ¹ T(L) ¹ G(L) ¹ T(L) ¹	7593.58
106	hGAPDH_AD1_56	A(L) ¹ A(L) ¹ G(L) ¹ G(F) ¹ G(F) ¹ U(M) ¹ C(M) ¹ c ¹ a ¹ C(M) ¹ A(F) ¹ U(M) ¹ A(G) ¹ F) ¹ G(M) ¹ C(F) ¹ A(M) ¹ A(F) ¹ C(L) ¹ T(L) ¹ G(L) ¹	6897.00
107	hGAPDH_AD1_57	C(L) ¹ A(L) ¹ A(L) ¹ G(L) ¹ G(F) ¹ G(F) ¹ U(M) ¹ C(M) ¹ c ¹ a ¹ C(M) ¹ A(F) ¹ U(M) ¹ A(G) ¹ F) ¹ G(M) ¹ C(F) ¹ A(M) ¹ A(F) ¹ C(L) ¹ T(L) ¹ G(L) ¹	7242.41
108	hGAPDH_AD1_58	C(L) ¹ A(L) ¹ A(L) ¹ G(L) ¹ G(F) ¹ G(F) ¹ U(M) ¹ C(M) ¹ c ¹ a ¹ C(M) ¹ A(F) ¹ U(M) ¹ A(G) ¹ F) ¹ G(M) ¹ C(F) ¹ A(M) ¹ A(F) ¹ C(L) ¹ T(L) ¹	6870.50
109	hGAPDH_AD1_59	C(L) ¹ A(L) ¹ A(L) ¹ G(L) ¹ G(F) ¹ G(F) ¹ U(M) ¹ C(M) ¹ c ¹ a ¹ C(M) ¹ A(F) ¹ U(M) ¹ A(G) ¹ F) ¹ G(M) ¹ C(F) ¹ A(M) ¹ A(F) ¹ C(L) ¹	6522.69
110	hGAPDH_AD1_60	A(L) ¹ A(L) ¹ G(L) ¹ G(F) ¹ G(F) ¹ U(M) ¹ C(M) ¹ c ¹ a ¹ C(M) ¹ A(F) ¹ U(M) ¹ A(G) ¹ F) ¹ G(M) ¹ C(F) ¹ A(M) ¹ A(F) ¹ C(L) ¹ T(L) ¹ G(L) ¹ T(L) ¹	7244.05
111	hGAPDH_AD1_61	A(L) ¹ G(L) ¹ G(F) ¹ G(F) ¹ U(M) ¹ C(M) ¹ c ¹ a ¹ C(M) ¹ A(F) ¹ U(M) ¹ A(G) ¹ F) ¹ G(M) ¹ C(F) ¹ A(M) ¹ A(F) ¹ C(L) ¹ T(L) ¹ G(L) ¹ T(L) ¹	6889.36
112	hGAPDH_AD1_62	U(M) ¹ C(L) ¹ A(M) ¹ A(L) ¹ G(M) ¹ G(F) ¹ G(F) ¹ U(M) ¹ C(F) ¹ c ¹ a ¹ C(M) ¹ A(F) ¹ U(M) ¹ A(G) ¹ F) ¹ G(M) ¹ C(F) ¹ A(M) ¹ A(F) ¹ C(M) ¹ T(L) ¹ G(M) ¹ T(L) ¹ G(M) ¹	8284.98
113	hGAPDH_AD1_63	U(M) ¹ C(L) ¹ A(M) ¹ A(L) ¹ G(M) ¹ G(F) ¹ G(F) ¹ U(M) ¹ c ¹ a ¹ C(M) ¹ A(F) ¹ U(M) ¹ A(G) ¹ F) ¹ G(M) ¹ C(F) ¹ A(M) ¹ A(F) ¹ C(M) ¹ T(L) ¹ G(M) ¹ T(L) ¹ G(M) ¹	8268.23
114	hGAPDH_AD1_64	U(M) ¹ C(L) ¹ A(M) ¹ A(L) ¹ G(M) ¹ G(F) ¹ G(F) ¹ U(M) ¹ C(L) ¹ c ¹ a ¹ C(M) ¹ A(F) ¹ U(M) ¹ A(G) ¹ F) ¹ G(M) ¹ C(F) ¹ A(M) ¹ A(F) ¹ C(M) ¹ T(L) ¹ G(M) ¹ T(L) ¹ G(M) ¹	8309.97
115	hGAPDH_AD1_65	U(M) ¹ C(L) ¹ A(M) ¹ A(L) ¹ G(M) ¹ G(F) ¹ G(F) ¹ U(M) ¹ C ¹ a ¹ C(M) ¹ A(F) ¹ U(M) ¹ A(G) ¹ F) ¹ G(M) ¹ C(F) ¹ A(M) ¹ A(F) ¹ C(M) ¹ T(L) ¹ G(M) ¹ T(L) ¹ G(M) ¹	8285.46
116	hGAPDH_AD1_66	U(M) ¹ C(L) ¹ A(M) ¹ A(L) ¹ G(M) ¹ G(F) ¹ G(F) ¹ U(M) ¹ C(M) ¹ c ¹ a ¹ C(M) ¹ A(F) ¹ U(M) ¹ A(G) ¹ F) ¹ G(M) ¹ C(F) ¹ A(M) ¹ A(F) ¹ C(M) ¹ T(L) ¹ G(M) ¹ T(L) ¹ G(M) ¹	8315.67
117	hGAPDH_AD1_67	U(M) ¹ C(L) ¹ A(M) ¹ A(L) ¹ G(M) ¹ G(F) ¹ G(F) ¹ U(M) ¹ C(F) ¹ c ¹ a ¹ C(M) ¹ A(F) ¹ U(M) ¹ A(G) ¹ F) ¹ G(M) ¹ C(F) ¹ A(M) ¹ A(F) ¹ C(M) ¹ T(L) ¹ G(M) ¹ T(L) ¹ G(M) ¹	8302.40

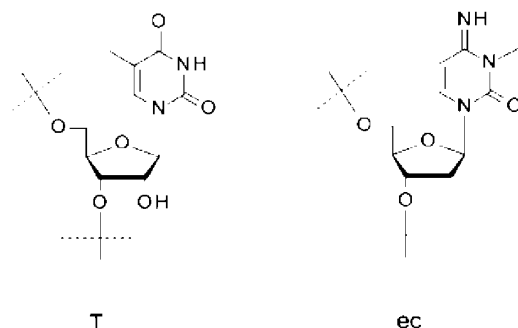
[0350] [表24]

実施例	配列名称	配列 (5'-3')	分子量
118	hGAPDH_AD1_68	U(M)YC(L)YA(M)YA(L)YG(M)YG(F)YG(F)U(M)YC(C)A(C)M)YA(F)U(M)YG(F)G(M)YC(F)YA(M)YA(F)YC(M)YT(L)YG(M)YT(L)YG(M)	8287.43
119	hGAPDH_AD1_69	U(M)YC(L)YA(M)YA(L)YG(M)YG(F)YG(F)U(M)YC(L)YC(A)C(M)YA(F)U(M)YG(F)YG(M)YC(F)YA(M)YA(F)YC(M)YT(L)YG(M)YT(L)YG(M)	8327.86
120	hGAPDH_AD1_70	U(M)YC(L)YA(M)YA(L)YG(M)YG(F)YG(F)U(M)YC(C)A(C)M)YA(F)U(M)YG(F)G(M)YC(F)YA(M)YA(F)YC(M)YT(L)YG(M)YT(L)YG(M)	8301.99
121	hGAPDH_AD1_71	U(M)YC(L)YA(M)YA(L)YG(M)YG(F)YG(F)U(M)YC(M)YC(F)A(C)M)YA(F)U(M)YG(F)YG(M)YC(F)YA(M)YA(F)YC(M)YT(L)YG(M)YT(L)YG(M)	8314.44
122	hGAPDH_AD1_72	U(M)YC(L)YA(M)YA(L)YG(M)YG(F)YG(F)U(M)YC(F)YC(F)A(C)M)YA(F)U(M)YG(F)YG(M)YC(F)YA(M)YA(F)YC(M)YT(L)YG(M)YT(L)YG(M)	8302.34
123	hGAPDH_AD1_73	U(M)YC(L)YA(M)YA(L)YG(M)YG(F)YG(F)U(M)YC(C)A(C)M)YA(F)U(M)YG(F)YG(M)YC(F)YA(M)YA(F)YC(M)YT(L)YG(M)YT(L)YG(M)	8284.99
124	hGAPDH_AD1_74	U(M)YC(L)YA(M)YA(L)YG(M)YG(F)YG(F)U(M)YC(L)YC(F)A(C)M)YA(F)U(M)YG(F)YG(M)YC(F)YA(M)YA(F)YC(M)YT(L)YG(M)YT(L)YG(M)	8325.69
125	hGAPDH_AD1_75	U(M)YC(L)YA(M)YA(L)YG(M)YG(F)YG(F)U(M)YC(C)A(C)M)YA(F)U(M)YG(F)YG(M)YC(F)YA(M)YA(F)YC(M)YT(L)YG(M)YT(L)YG(M)	8302.12
126	hGAPDH_AD1_76	U(M)YC(L)YA(M)YA(L)YG(M)YG(F)YG(F)U(M)YC(M)YC(L)A(C)M)YA(F)U(M)YG(F)YG(M)YC(F)YA(M)YA(F)YC(M)YT(L)YG(M)YT(L)YG(M)	8338.32
127	hGAPDH_AD1_77	U(M)YC(L)YA(M)YA(L)YG(M)YG(F)YG(F)U(M)YC(F)YC(L)A(C)M)YA(F)U(M)YG(F)YG(M)YC(F)YA(M)YA(F)YC(M)YT(L)YG(M)YT(L)YG(M)	8326.27
128	hGAPDH_AD1_78	U(M)YC(L)YA(M)YA(L)YG(M)YG(F)YG(F)U(M)YC(C)A(C)M)YA(F)U(M)YG(F)YG(M)YC(F)YA(M)YA(F)YC(M)YT(L)YG(M)YT(L)YG(M)	8308.04
129	hGAPDH_AD1_79	U(M)YC(L)YA(M)YA(L)YG(M)YG(F)YG(F)U(M)YC(L)YC(L)A(C)M)YA(F)U(M)YG(F)YG(M)YC(F)YA(M)YA(F)YC(M)YT(L)YG(M)YT(L)YG(M)	8351.75
130	hGAPDH_AD1_80	U(M)YC(L)YA(M)YA(L)YG(M)YG(F)YG(F)U(M)YC(C)A(C)M)YA(F)U(M)YG(F)YG(M)YC(F)YA(M)YA(F)YC(M)YT(L)YG(M)YT(L)YG(M)	8325.16
131	hGAPDH_AD1_81	U(M)YC(L)YA(M)YA(L)YG(M)YG(F)YG(F)U(M)YC(M)YC(M)A(C)M)YA(F)U(M)YG(F)YG(M)YC(F)YA(M)YA(F)YC(M)YT(L)YG(M)YT(L)YG(M)	8328.78
132	hGAPDH_AD1_82	U(M)YC(L)YA(M)YA(L)YG(M)YG(F)YG(F)U(M)YC(F)YC(M)A(C)M)YA(F)U(M)YG(F)YG(M)YC(F)YA(M)YA(F)YC(M)YT(L)YG(M)YT(L)YG(M)	8318.58
133	hGAPDH_AD1_83	U(M)YC(L)YA(M)YA(L)YG(M)YG(F)YG(F)U(M)YC(C)A(C)M)YA(F)U(M)YG(F)YG(M)YC(F)YA(M)YA(F)YC(M)YT(L)YG(M)YT(L)YG(M)	8298.95
134	hGAPDH_AD1_84	U(M)YC(L)YA(M)YA(L)YG(M)YG(F)YG(F)U(M)YC(L)YC(M)A(C)M)YA(F)U(M)YG(F)YG(M)YC(F)YA(M)YA(F)YC(M)YT(L)YG(M)YT(L)YG(M)	8342.90
135	hGAPDH_AD1_85	U(M)YC(L)YA(M)YA(L)YG(M)YG(F)YG(F)U(M)YC(C)A(C)M)YA(F)U(M)YG(F)YG(M)YC(F)YA(M)YA(F)YC(M)YT(L)YG(M)YT(L)YG(M)	8315.71
136	AD1_A1AT.39	G(M)YT(L)YC(M)YC(L)YC(M)U(F)U(F)YC(M)U(M)YC(U)M)YC(F)YG(M)YA(F)U(M)YG(F)YG(M)U(F)YC(M)YA(L)YG(M)YC(L)YA(M)	8171.07

[0351] 表中の「分子量」は、負イオンESI質量分析による実測値を示す。表中の「配列」において「T」は、リボチミジン、「e c」は、N3-エチル-2'-デオキシチミジンを示す。また、その他の略号については、既述の通りである。なお、オリゴヌクレオチドの5'末端及び3'末端は、水素原子が酸素原子と結合して水酸基となっている。

[0352]

[化10]



[0353] (試験例15) 実施例化合物であるgRNAの培養細胞内におけるGAPDH遺伝子配列の編集誘導能評価(3)

実施例化合物の編集誘導能評価の方法は、試験例3と同様の方法を用いた。実施例39、40及び102から106の化合物(hGAPDH_AD1__39、hGAPDH_AD1__40、hGAPDH_AD1__52からhGAPDH_AD1__56)を用いた場合の編集割合(%)を図10に示した。

[0354] ADAR1 p110又はADAR1 p150を発現するプラスミドをトランスフェクトした場合、gRNAを用いなかったもの(図中、gRNA(ー))と比較して高い編集割合を示した。特に、標的RNAとの結合部位にLNAを導入した実施例39、40及び102の化合物(hGAPDH_AD1__39、hGAPDH_AD1__40、hGAPDH_AD1__52)は、最も高い編集割合を示した。さらに、実施例化合物であるgRNAのみを50nMの濃度になるようにトランスフェクトした場合の細胞内編集誘導評価したところ、gRNA(ー)と比較して高い編集割合を示した。

[0355] 実施例39、100、101、105及び107から112の化合物(hGAPDH_AD1__39、hGAPDH_AD1__42、hGAPDH_AD1__45、hGAPDH_AD1__55、hGAPDH_AD1__57からhGAPDH_AD1__62)を用いた場合の編集割合(%)を図11に示した。

- [0356] ADAR1 p110又はADAR1 p150を発現するプラスミドをトランスフェクトした場合、gRNAを用いなかったもの（図中、gRNA（－））と比較して高い編集割合を示した。特に、標的RNAとの結合部位にLNAを導入した実施例39、105及び112の化合物（hGAPDH_AD1__39、hGAPDH_AD1__55、hGAPDH_AD1__62）は、最も高い編集割合を示した。さらに、実施例化合物であるgRNAのみを50 nMの濃度になるようにトランスフェクトした場合の細胞内編集誘導評価したところ、gRNA（－）と比較して高い編集割合を示した。
- [0357] 実施例化合物（hGAPDH_AD1__39、hGAPDH_AD1__62からhGAPDH_AD1__75）を用いた場合の編集割合（％）を図12Aに示した。
- [0358] ADAR1 p110又はADAR1 p150を発現するプラスミドをトランスフェクトした場合、gRNAを用いなかったもの（図中、gRNA（－））と比較して高い編集割合を示した。特に、標的対応ヌクレオチド残基としてデオキシヌクレオチド残基又はリボヌクレオチド残基を導入した実施例39、112、115から118、及び120の化合物（hGAPDH_AD1__39、hGAPDH_AD1__62、hGAPDH_AD1__65からhGAPDH_AD1__68、hGAPDH_AD1__70）は、特に高い編集割合を示した。さらに、実施例化合物であるgRNAのみを50 nMの濃度になるようにトランスフェクトした場合の細胞内編集誘導評価したところ、gRNA（－）と比較して高い編集割合を示した。
- [0359] 実施例化合物（hGAPDH_AD1__39、hGAPDH_AD1__76からhGAPDH_AD1__85）を用いた場合の編集割合（％）を図12Bに示した。
- [0360] ADAR1 p110又はADAR1 p150を発現するプラスミドをトランスフェクトした場合、gRNAを用いなかったもの（図中、gRNA（－））と比較して高い編集割合を示した。特に、標的対応ヌクレオチド残基として2'－O－Me－リボヌクレオチド残基を導入した実施例131から1

33、135の化合物（hGAPDH__AD1__81からhGAPDH__AD1__83、hGAPDH__AD1__85）は、特に高い編集割合を示した。

[0361]（試験例16）hGAPDH遺伝子配列を有するRNAに対する編集誘導能評価

（A）標的RNAの合成

操作は、試験例5の（A）AGXT__RNAの合成に記載した方法と同様に行った。但し、オリゴDNAは、以下のGAPDH__FW（配列番号64）及びGAPDH__RV（配列番号65）を用いた。

[0362] [表25]

	配列	配列番号
GAPDH_FW	AATTCTCTCCCCTCCTCACAGTTGCCATGTAG ACCCCTTGAAGAGGGGAGGGGCCTA	64
GAPDH_RV	AGCTTAGGCCCTCCCTCTTCAAGGGGTCT ACATGGCAACTGTGAGGAGGGGAGAG	65

[0363]（B）編集誘導能評価とその結果

実施例化合物の編集誘導能評価の方法は、試験例5の（B）から（D）と同様の方法を用いた。

[0364]（C）編集解析の結果

ADAR1 p110による編集割合の結果を図13A及び図13Bに示す。ADAR1 p110によるRNA編集効率は、gRNAを添加していない場合と比較して、実施例39、112から135の化合物（hGAPDH__AD1__39、hGAPDH__AD1__62から85）は、高い編集割合を示した。特に標的対応ヌクレオチド残基にデオキシリボヌクレオチド残基、リボヌクレオチド残基、2'-F-リボヌクレオチド残基又は2'-O-Me-リボヌクレオチド残基を用いたものは、高い編集割合を示すことを表している。

[0365]（試験例17）Factor V遺伝子配列を有するRNAに対する編集誘導能評価

(A) 標的RNAの合成

操作は、試験例5の(A) AGXT__RNAの合成に記載した方法と同様に行った。但し、オリゴDNAは、以下に記載したFactor V遺伝子配列を有するものを用いた。ここで用いるFactor V遺伝子配列は、GenBank accession no. NM_000130.45の1682番から1706番の塩基配列を有し、さらにc. 1601G>Aと呼ばれるヌクレオシドの変異(rs6025)を有している。

[0366] [表26]

	配列	配列番号
Factor V_FW	AATTCTGTAAGAGCAGATCCCTGGACAGGCA AGGAATACAGGTATTTGTCCTTGAA	95
Factor _RV	AGCTTTCAAGGACAAAATACCTGTATTCCTTG CCTGTCCAGGGATCTGCTCTTACAG	96

[0367] (B) 編集誘導能評価とその結果

実施例化合物の編集誘導能評価の方法は、試験例5の(B)及び(D)と同様の方法を用いた。

[0368] (C) 編集解析の結果

ADAR1 p110による編集割合の結果を図14Aに示す。ADAR1 p110によるRNA編集効率は、すべてが天然型リボヌクレオチド残基からなる参考例8の化合物(AD1__Factor V、図中では、Factor VのAD1g03)と比較して、gRNA中、標的対応ヌクレオチド残基の3'側のグアノシンを2'-デオキシイノシンにした実施例65の化合物(AD1__Factor V. 3、図中では、Factor VのAD1g03. 3)は、高い編集割合を示した。このことは、編集部位の5'側のヌクレオシドがシチジンの場合は、gRNA中、標的対応ヌクレオチド残基の3'側のヌクレオシドとして、2'-デオキシイノシンを用いると高い編集割合を示すことを表している。

[0369] ADAR2による編集割合の結果を図14Bに示す。ADAR2によるRNA編集効率は、すべてが天然型リボヌクレオチド残基からなる参考例8の

化合物 (AD1_Factor V、図中では、Factor VのAD1 g03) と比較して、gRNA中、標的対応ヌクレオチド残基の3'側のグアノシンを2'-デオキシイノシンにした実施例65 (AD1_Factor V、3、図中では、Factor VのAD1 g03、3) は、高い編集割合を示した。このことは、編集部位の5'側のヌクレオチドがシチジンの場合は、gRNA中、標的対応ヌクレオチド残基の3'側のヌクレオチドとして、2'-デオキシイノシンを用いると高い編集割合を示すことを表している。

[0370] (試験例18) CBS遺伝子配列を有するRNAに対する編集誘導能評価
(A) 標的RNAの合成

操作は、試験例5の(A) AGXT_RNAの合成に記載した方法と同様に行った。但し、オリゴDNAは、以下に記載したCBS遺伝子配列を有するものを用いた。ここで用いるCBS遺伝子配列は、GenBank accession no. NM_000071.2の1561番から1585番の塩基配列を有し、さらにc. 1330G>Aと呼ばれるヌクレオチドの変異(rs28934891)を有している。

[0371] [表27]

	配列	配列番号
CBS_FW	AATCCGAGATCCTCCGGGAGAAGGGCTTCA ACCAGGCGCCCGTGGTGGATGAGGCA	97
CBS_RV	AGCTTGCCTCATCCACCACGGGCGCCTGGTT GAAGCCCTTCTCCCGGAGGATCTCGG	98

[0372] (B) 編集誘導能評価とその結果

実施例化合物の編集誘導能評価の方法は、試験例5の(B)から(D)と同様の方法を用いた。

[0373] (C) 編集解析の結果

ADAR1 p110による編集割合の結果を図14Aに示す。ADAR1 p110によるRNA編集効率は、すべてが天然型リボヌクレオチド残基からなる参考例12の化合物(AD1_CBS、図中では、CBSのAD1 g

03)と比較して、gRNA中、標的対応ヌクレオチド残基の3'側のグアノシンを2'-デオキシイノシンにした実施例69の化合物(AD1__CBS. 3、図中では、CBSのAD1g03. 3)は、高い編集割合を示した。このことは、編集部位の5'側のヌクレオシドがシチジンの場合は、gRNA中、標的対応ヌクレオチド残基の3'側のヌクレオシドとして、2'-デオキシイノシンを用いると高い編集割合を示すことを表している。

[0374] ADAR2による編集割合の結果を図14Bに示す。ADAR2によるRNA編集効率は、すべてが天然型リボヌクレオチド残基からなる参考例12の化合物(AD1__CBS、図中では、CBSのAD1g03)と比較して、gRNA中、標的対応ヌクレオチド残基の3'側のグアノシンを2'-デオキシイノシンにした実施例69の化合物(AD1__CBS. 3、図中では、CBSのAD1g03. 3)は、高い編集割合を示した。このことは、編集部位の5'側のヌクレオシドがシチジンの場合は、gRNA中、標的対応ヌクレオチド残基の3'側のヌクレオシドとして、2'-デオキシイノシンを用いると高い編集割合を示すことを表している。

[0375] (試験例19) PAH遺伝子配列を有するRNAに対する編集誘導能評価
(A) 標的RNAの合成

操作は、試験例5の(A) AGXT__RNAの合成に記載した方法と同様に行った。但し、オリゴDNAは、以下に記載したPAH遺伝子配列を有するものを用いた。ここで用いるPAH遺伝子配列は、GenBank accession no. NM_000277. 3の882番から906番の塩基配列を有し、さらにc. 782G>Aと呼ばれるヌクレオシドの変異(rs5030849)を有している。

[0376] [表28]

	配列	配列番号
PAH.1_FW	AATTCTAACAGTGATAATAACTTTTCACTTAG GGCCTACAGTACTGCTTATCAGAGA	99
PAH.1_RV	AGCTTCTCTGATAAGCAGTACTGTAGGCCCT AAGTGAAAAGTTATTCACTGTTAG	100

[0377] (B) 編集誘導能評価とその結果

実施例化合物の編集誘導能評価の方法は、試験例5の(B)から(D)と同様の方法を用いた。

[0378] (C) 編集解析の結果

ADAR1 p110による編集割合の結果を図14Aに示す。ADAR1 p110によるRNA編集効率は、すべてが天然型リボヌクレオチド残基からなる参考例9の化合物(AD1__PAH. 1、図中では、PAHのAD1 g03)と比較して、gRNA中、標的対応ヌクレオチド残基の3'側のグアノシンを2'-デオキシイノシンにした実施例66の化合物(AD1__PAH. 1. 3、図中では、PAHのAD1 g03. 3)は、高い編集割合を示した。このことは、編集部位の5'側のヌクレオチドがシチジンの場合は、gRNA中、標的対応ヌクレオチド残基の3'側のヌクレオチドとして、2'-デオキシイノシンを用いると高い編集割合を示すことを表している。

[0379] ADAR2による編集割合の結果を図14Bに示す。ADAR2によるRNA編集効率は、すべてが天然型リボヌクレオチド残基からなる参考例9の化合物(AD1__PAH. 1、図中では、PAHのAD1 g03)と比較して、gRNA中、標的対応ヌクレオチド残基の3'側のグアノシンを2'-デオキシイノシンにした実施例66の化合物(AD1__PAH. 1. 3、図中では、PAHのAD1 g03. 3)は、高い編集割合を示した。このことは、編集部位の5'側のヌクレオチドがシチジンの場合は、gRNA中、標的対応ヌクレオチド残基の3'側のヌクレオチドとして、2'-デオキシイノシンを用いると高い編集割合を示すことを表している。

[0380] (試験例20) ASS1遺伝子配列を有するRNAに対する編集誘導能評価
(A) 標的RNAの合成

操作は、試験例5の(A) AGXT__RNAの合成に記載した方法と同様に行った。但し、オリゴDNAは、以下に記載したASS1遺伝子配列を有するものを用いた。ここで用いるASS1遺伝子配列は、GenBank accession no. NM__000050. 4の1510番から15

34番の塩基配列を有し、さらにc. 1168 G>Aと呼ばれるヌクレオシドの変異 (rs121908641) を有している。

[0381] [表29]

	配列	配列番号
ASS1_FW	AATTCTGATTATGAGCCAACTGATGCCACCA GGTTCATCAACATCAATCCCTCAGA	101
ASS1_RV	AGCTTCTGAGGGAATTGATGTTGATGAACCT GGTGGCATCAGTTGGCTCATAATCAG	102

[0382] (B) 編集誘導能評価とその結果

実施例化合物の編集誘導能評価の方法は、試験例5の(B)から(D)と同様の方法を用いた。

[0383] (C) 編集解析の結果

ADAR1 p110による編集割合の結果を図14Aに示す。ADAR1 p110によるRNA編集効率は、すべてが天然型リボヌクレオチド残基からなる参考例10の化合物(AD1__ASS1、図中では、ASS1のAD1g03)と比較して、gRNA中、標的対応ヌクレオチド残基の3'側のグアノシンを2'-デオキシイノシンにした実施例67の化合物(AD1__ASS1, 3、図中では、ASS1のAD1g03, 3)は、高い編集割合を示した。このことは、編集部位の5'側がシチジンの場合は、gRNA中、標的対応ヌクレオチド残基の3'側のヌクレオシドとして、2'-デオキシイノシンを用いると高い編集割合を示すことを表している。

[0384] ADAR2による編集割合の結果を図14Bに示す。ADAR2によるRNA編集効率は、すべてが天然型リボヌクレオチド残基からなる参考例10の化合物(AD1__ASS1、図中では、ASS1のAD1g03)と比較して、gRNA中、標的対応ヌクレオチド残基の3'側のグアノシンを2'-デオキシイノシンにした実施例67の化合物(AD1__ASS1, 3、図中では、ASS1のAD1g03, 3)は、高い編集割合を示した。このことは、編集部位の5'側のヌクレオシドがシチジンの場合は、gRNA中、標的対応ヌクレオチド残基の3'側のヌクレオシドとして、2'-デオキシ

イノシンを用いると高い編集割合を示すことを表している。

[0385] (試験例 21) G R I A 2 遺伝子配列を有する R N A に対する編集誘導能評価

(A) 標的 R N A の合成

操作は、試験例 5 の (A) A G X T _ R N A の合成に記載した方法と同様に行った。但し、オリゴ D N A は、以下に記載した G R I A 2 遺伝子配列を有するものを用いた。ここで用いる G R I A 2 遺伝子配列は、G e n B a n k a c c e s s i o n n o . N M _ 0 0 0 8 2 6 . 4 の 2 1 2 1 番から 2 1 4 5 番の塩基配列を有し、さらに 2 1 3 5 番目のアデノシンが、A L S の疾患において A D A R 2 の発現が低下した場合、イノシンへの編集効率が低下する部位となっている。

[0386] [表30]

	配列	配列番号
GRIA2_FW	AATTCCTGGTTTTCCTTGGGTGCCTTTATGCAG CAAGGATGCGATATTTGCGCAAGAA	103
GRIA2_RV	AGCTTTCTTGGCGAAATATCGCATCCTTGCTG CATAAAGGCACCCAAGGAAAACCAG	104

[0387] (B) 編集誘導能評価とその結果

実施例化合物の編集誘導能評価の方法は、試験例 5 の (B) から (D) と同様の方法を用いた。

[0388] (C) 編集解析の結果

A D A R 1 p 1 1 0 による編集割合の結果を図 1 4 A に示す。A D A R 1 p 1 1 0 による R N A 編集効率は、すべてが天然型リボヌクレオチド残基からなる参考例 1 3 の化合物 (A D 1 _ G R I A 2、図中では、G R I A 2 の A D 1 g 0 3) と比較して、g R N A 中、標的対応ヌクレオチド残基の 3' 側のグアノシンを 2' -デオキシイノシンにした実施例 7 0 の化合物 (A D 1 _ G R I A 2、3、図中では、G R I A 2 の A D 1 g 0 3、3) は、高い編集割合を示した。このことは、編集部位の 5' 側のヌクレオチドがシチジンの場合は、g R N A 中、標的対応ヌクレオチド残基の 3' 側のヌクレオシ

ドとして、2' -デオキシイノシンを用いると高い編集割合を示すことを表している。

[0389] ADAR2による編集割合の結果を図14Bに示す。ADAR2によるRNA編集効率は、すべてが天然型リボヌクレオチド残基からなる参考例13の化合物(AD1__GR1A2、図中では、GR1A2のAD1g03)と比較して、gRNA中、標的対応ヌクレオチド残基の3'側のグアノシンを2' -デオキシイノシンにした実施例70の化合物(AD1__GR1A2.3、図中では、GR1A2のAD1g03.3)は、高い編集割合を示した。このことは、編集部位の5'側のヌクレオシドがシチジンの場合は、gRNA中、標的対応ヌクレオチド残基の3'側のヌクレオシドとして、2' -デオキシイノシンを用いると高い編集割合を示すことを表している。

[0390] (試験例22) SLCO2A1遺伝子配列を有するRNAに対する編集誘導能評価

(A) 標的RNAの合成

操作は、試験例5の(A)AGXT__RNAの合成に記載した方法と同様に行った。但し、オリゴDNAは、以下に記載したSLCO2A1遺伝子配列を有するものを用いた。ここで用いるSLCO2A1遺伝子配列は、GenBank accession no. NM_005630.3の81020番から81044番の塩基配列を有し、さらにc. 940+1G>Aと呼ばれるヌクレオシドの変異(rs765249238)を有している。

[0391] [表31]

	配列	配列番号
SLCO2A1_FW	AATTCGGCTCCCTGGTGGATTTCATTAAACAT AACTGACCCCTACAGCCCTGGGTGGA	105
SLCO2A1_RV	AGCTTCCACCCAGGGCTGTAGGGTCAGTTAT GTTTAATGAAATCCACCAGGGAGCCG	106

[0392] (B) 編集誘導能評価とその結果

実施例化合物の編集誘導能評価の方法は、試験例5の(B)から(D)と同様の方法を用いた。

[0393] (C) 編集解析の結果

ADAR1 p110による編集割合の結果を図14Aに示す。ADAR1 p110によるRNA編集効率は、すべてが天然型リボヌクレオチド残基からなる参考例14の化合物(AD1__SLCO2A1、図中では、SLCO2A1のAD1g03)と比較して、gRNA中、標的対応ヌクレオチド残基の3'側のグアノシンを2'-デオキシイノシンにした実施例71の化合物(AD1__SLCO2A1, 3、図中では、SLCO2A1のAD1g03, 3)は、高い編集割合を示した。このことは、編集部位の5'側のヌクレオチドがシチジンの場合は、gRNA中、標的対応ヌクレオチド残基の3'側のヌクレオチドとして、2'-デオキシイノシンを用いると高い編集割合を示すことを表している。

[0394] ADAR2による編集割合の結果を図14Bに示す。ADAR2によるRNA編集効率は、すべてが天然型リボヌクレオチド残基からなる参考例14の化合物(AD1__SLCO2A1、図中では、SLCO2A1のAD1g03)と比較して、gRNA中、標的対応ヌクレオチド残基の3'側のグアノシンを2'-デオキシイノシンにした実施例71の化合物(AD1__SLCO2A1, 3、図中では、SLCO2A1のAD1g03, 3)は、高い編集割合を示した。このことは、編集部位の5'側のヌクレオチドがシチジンの場合は、gRNA中、標的対応ヌクレオチド残基の3'側のヌクレオチドとして、2'-デオキシイノシンを用いると高い編集割合を示すことを表している。

[0395] (試験例23) GFAP遺伝子配列を有するRNAに対する編集誘導能評価
(A) 標的RNAの合成

操作は、試験例5の(A) AGXT__RNAの合成に記載した方法と同様に行った。但し、オリゴDNAは、以下に記載したGFAP遺伝子配列を有するものを用いた。ここで用いるGFAP遺伝子配列は、GenBank accession no. NM_002055.5の2154番から2178番の塩基配列を有し、さらにc. 716G>Aと呼ばれるヌクレオチド

の変異 (rs59565950) を有している。

[0396] [表32]

	配列	配列番号
GFAP_FW	AATTCCTCACCGCAGCCCTGAAAGAGATCCA CACGCAGTATGAGGCAATGGCGTCCA	107
GFAP_RV	AGCTTGGACGCCATTGCCTCATACTGCGTGT GGATCTCTTTCAGGGCTGCGGTGAGG	108

[0397] (B) 編集誘導能評価とその結果

実施例化合物の編集誘導能評価の方法は、試験例5の(B)から(D)と同様の方法を用いた。

[0398] (C) 編集解析の結果

ADAR1 p110による編集割合の結果を図14Aに示す。ADAR1 p110によるRNA編集効率は、すべてが天然型リボヌクレオチド残基からなる参考例11の化合物(AD1__GFAP、図中では、GFAPのAD1g03)と比較して、gRNA中、標的対応ヌクレオチド残基の3'側のグアノシンを2'-デオキシイノシンにした実施例68の化合物(AD1__GFAP, 3、図中では、GFAPのAD1g03, 3)は、高い編集割合を示した。このことは、編集部位の5'側のヌクレオチドがシチジンの場合は、gRNA中、標的対応ヌクレオチド残基の3'側のヌクレオチドとして、2'-デオキシイノシンを用いると高い編集割合を示すことを表している。

[0399] ADAR2による編集割合の結果を図14Bに示す。ADAR2によるRNA編集効率は、すべてが天然型リボヌクレオチド残基からなる参考例11の化合物(AD1__GFAP、図中では、GFAPのAD1g03)と比較して、gRNA中、標的対応ヌクレオチド残基の3'側のグアノシンを2'-デオキシイノシンにした実施例68の化合物(AD1__GFAP、図中では、GFAPのAD1g03, 3)は、高い編集割合を示した。このことは、編集部位の5'側のヌクレオチドがシチジンの場合は、gRNA中、標的対応ヌクレオチド残基の3'側のヌクレオチドとして、2'-デオキシイノ

シンを用いると高い編集割合を示すことを表している。

[0400] (試験例24) ASS1遺伝子配列を有するRNAに対する編集誘導能評価

(A) 標的RNAの合成

操作は、試験例5の(A) AGXT__RNAの合成に記載した方法と同様に行った。但し、オリゴDNAは、試験例20に記載したASS1遺伝子配列を有するものを用いた。ここで用いるASS1遺伝子配列は、GenBank accession no. NM_000050.4の1510番から1534番の塩基配列を有し、さらにc. 1168G>Aと呼ばれるヌクレオチドの変異(rs121908641)を有している。

[0401] (B) 編集誘導能評価とその結果

実施例化合物の編集誘導能評価の方法は、試験例5の(B)から(D)と同様の方法を用いた。

[0402] (C) 編集解析の結果

実施例76(AD1__ASS1.39)を用いた編集割合の結果を図15Aに示す。ADAR1p110による、化学修飾された実施例76の化合物(AD1__ASS1.39)のRNA編集効率は、gRNAを添加していないものと比較して、高い編集割合を示した。本実施例の化合物は、変異したASS1遺伝子配列を修復できることを示している。

[0403] 実施例81の化合物(AD1__ASS1.39e)及び実施例85の化合物(AD1__ASS1.52e)を用いた編集割合の結果を図15Bに示す。ADAR1p110による、化学修飾された実施例81の化合物(AD1__ASS1.39e)及び実施例85の化合物(AD1__ASS1.52e)のRNA編集効率は、gRNAを添加していないものと比較して、高い編集割合を示した。本実施例の化合物は、変異したASS1遺伝子配列を修復できることを示している。

[0404] (試験例25) PANK2遺伝子配列を有するRNAに対する編集誘導能評価

(A) 標的RNAの合成

操作は、試験例 5 の (A) AGXT__RNA の合成に記載した方法と同様に行った。但し、オリゴ DNA は、以下に記載した PANK2 遺伝子配列を有するものを用いた。ここで用いる PANK2 遺伝子配列は、GenBank accession no. NM_153638.3 の 1714 番から 1738 番の塩基配列を有し、さらに c. 1561 G>A と呼ばれるヌクレオシドの変異 (rs137852959) を有している。

[0405] [表33]

	配列	配列番号
PANK2_FW	AATTCAAACATTAACCAGGTGGTATTTGTTAG AAATTTCTTGAGAATTAATACGATA	109
PANK2_RV	AGCTTATCGTATTAATTCTCAAGAAATTTCTAA CAAATACCACCTGGTTAATGTTTG	110

[0406] (B) 編集誘導能評価とその結果

実施例化合物の編集誘導能評価の方法は、試験例 5 の (B) から (D) と同様の方法を用いた。

[0407] (C) 編集解析の結果

実施例 76 の化合物 (AD1__PANK2.39) を用いた編集割合の結果を図 15A に示す。ADAR1 p110 による、化学修飾された実施例 76 の化合物 (AD1__PANK2.39) の RNA 編集効率は、gRNA を添加していないものと比較して、高い編集割合を示した。本実施例の化合物は、変異した PANK2 遺伝子配列を修復できることを示している。

[0408] また、実施例 82 の化合物 (AD1__PANK2.39e) 及び実施例 86 の化合物 (AD1__PANK2.52e) を用いた編集割合の結果を図 15C に示す。ADAR1 p110 による、化学修飾された実施例 76 の化合物 (AD1__PANK2.39) の RNA 編集効率は、gRNA を添加していないものと比較して、高い編集割合を示した。本実施例の化合物は、変異した PANK2 遺伝子配列を修復できることを示している。

[0409] (試験例 26) NPHS2 遺伝子配列を有する RNA に対する編集誘導能評価

(A) 標的RNAの合成

操作は、試験例5の(A)AGXT__RNAの合成に記載した方法と同様に行った。但し、オリゴDNAは、以下に記載したNPHS2遺伝子配列を有するものを用いた。ここで用いるNPHS2遺伝子配列は、GenBank accession no. NM_014625.4の483番から501番の塩基配列を有し、さらにc. 413G>Aと呼ばれるヌクレオシドの変異(rs74315342)を有している。

[0410] [表34]

	配列	配列番号
NPHS2_FW	AATTCGAGTATGAAAGAGTAATTATATTCCAA CTGGGACATCTGCTTCCTGGAAGAA	111
NPHS2_RV	AGCTTTCTTCCAGGAAGCAGATGTCCCAGTT GGAATATAATTACTCTTCATACTCG	112

[0411] (B) 編集誘導能評価とその結果

実施例化合物の編集誘導能評価の方法は、試験例5の(B)から(D)と同様の方法を用いた。

[0412] (C) 編集解析の結果

実施例77(AD1__NPHS2.39)を用いた編集割合の結果を図15Aに示す。ADAR1p110による、化学修飾された実施例77の化合物(AD1__NPHS2.39)のRNA編集効率は、gRNAを添加していないものと比較して、高い編集割合を示した。本実施例の化合物は、変異したNPHS2遺伝子配列を修復できることを示している。

[0413] また、実施例83の化合物(AD1__NPHS2.39e)及び実施例87の化合物(AD1__NPHS2.52e)を用いた編集割合の結果を図15Dに示す。ADAR1p110による、化学修飾された実施例77の化合物(AD1__NPHS2.39)のRNA編集効率は、gRNAを添加していないものと比較して、高い編集割合を示した。本実施例の化合物は、変異したNPHS2遺伝子配列を修復できることを示している。

[0414] (試験例27) GRIA2遺伝子配列を有するRNAに対する編集誘導能評

価

(A) 標的RNAの合成

操作は、試験例5の(A) AGXT__RNAの合成に記載した方法と同様に行った。但し、オリゴDNAは、試験例21に記載したGRIA2遺伝子配列を有するものを用いた。ここで用いるGRIA2遺伝子配列は、GenBank accession no. NM_000826.4の2121番から2145番の塩基配列を有し、さらに2135番目のアデノシンが、ALSの疾患においてADAR2の発現が低下した場合、イノシンへの編集効率が低下する部位となっている。

[0415] (B) 編集誘導能評価とその結果

実施例化合物の編集誘導能評価の方法は、試験例5の(B)から(D)と同様の方法を用いた。

[0416] (C) 編集解析の結果

実施例78の化合物(AD1__GRIA2.39)、実施例80の化合物(AD1__GRIA2.39e)及び実施例84の化合物(AD1__GRIA2.52e)を用いた編集割合の結果を図15Eに示す。ADAR1p110による、化学修飾された実施例78の化合物(AD1__GRIA2.39)、実施例80の化合物(AD1__GRIA2.39e)及び実施例84の化合物(AD1__GRIA2.52e)のRNA編集効率は、gRNAを添加していないものと比較して、高い編集割合を示した。本実施例の化合物は、変異したGRIA2遺伝子配列を修復できることを示している。本実施例の化合物は、変異したGRIA2遺伝子配列の2279番目のアデノシン部位をイノシンへの編集効率を向上できることを示している。

[0417] (試験例28) 実施例化合物であるgRNAの培養細胞内におけるPAH遺伝子配列の編集誘導能評価

以下のPAH遺伝子を発現する標的RNA発現プラスミドを構築したこと、gRNAとして実施例72から74の化合物を用いたこと、及びPAH遺伝子に対応するプライマーを用いたこと以外は、試験例10の(A)から(

C)と同様の方法を用いた。ここで用いるPAH遺伝子配列は、GenBank accession no. NM_001354304. 2の114638番から114662番の塩基配列を有し、さらにc. 1066-11G>Aと呼ばれるヌクレオシドの変異(rs5030855)を有している。

[0418] 実施例72から74の化合物(AD1_PAH. 2. 29、AD1_PAH. 2. 41、AD1_PAH. 2. 43)を用いた場合の編集割合(%)を図16に示した。標的RNA発現プラスミド及び実施例化合物であるgRNAをトランスフェクトした場合、5%程度の編集割合を示した。さらに標的RNA発現プラスミド及び実施例化合物であるgRNAを、ADAR2を発現するプラスミドとともにトランスフェクトした場合、10%から40%程度の高い編集割合を示した。一方、標的RNA発現プラスミド及び実施例化合物であるgRNAを、ADAR1 p110又はADAR1 p150を発現するプラスミドとともにトランスフェクトした場合、40%から60%程度のさらに高い編集割合を示した。本実施例の化合物は、変異したPAH遺伝子配列を修復できることを示している。

[0419] (試験例29) 実施例化合物であるgRNAの培養細胞内におけるASS1遺伝子配列の編集誘導能評価

以下のASS1遺伝子を発現する標的RNA発現プラスミドを構築したこと、gRNAとして実施例75、79、81及び85の化合物を用いたこと、及びASS1に対応するプライマーを用いたこと以外は、試験例10の(A)及び(B)と同様の方法を用いた。ここで用いるASS1遺伝子配列は、GenBank accession no. NM_000050. 4の1510番から1534番の塩基配列を有し、さらにc. 1168G>Aと呼ばれるヌクレオシドの変異(rs121908641)を有している。

[0420] 編集解析は、以下のように行った。24-well Plateで培養した細胞から、RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN)を用いてtotal RNAを抽出した。PrimeScript II

Reverse Transcriptase (TaKaRa)、Total RNA 0.5 μ g、0.25 μ M Oligo (dT) 17を用いた逆転写反応を行ない、cDNAを増幅した。PrimeStar GXL DNA polymerase (TaKaRa)、T7 proGGGプライマー（配列番号35）、3'-Adpプライマー（配列番号48）を用いて1st PCRを行った。1st PCR産物を200倍希釈したcDNAを鋳型に、PrimeStar GXL DNA polymerase (TaKaRa)、DS__disease__XhoF01プライマー（配列番号44）、DS__disease__KpnR01プライマー（配列番号45）を用いて2nd PCRを行い、ASS1フラグメントを増幅した。Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequence Kit、0.165 μ M DS__disease__XhoF01プライマーを用いてシーケンシング反応を行ない、Applied Biosystem 3500 Genetic Analyzerにより解析した。シーケンシングにより得られたクロマトチャートより、標的部位のピーク高比（G / (G + A)）から編集割合を算出した。

[0421] 実施例75及び実施例79の化合物（AD1__ASS1.39、AD1__ASS1.52）を用いた場合の編集割合（%）を図17Aに示した。標的RNA発現プラスミド及び実施例化合物であるgRNAをトランスフェクトした場合、5%から10%程度の編集割合を示した。さらに標的RNA発現プラスミド及び実施例化合物であるgRNAを、ADAR2を発現するプラスミドとともにトランスフェクトした場合、20%から50%程度の高い編集割合を示した。一方、標的RNA発現プラスミド及び実施例化合物であるgRNAを、ADAR1 p110又はADAR1 p150を発現するプラスミドとともにトランスフェクトした場合、さらに40%から80%程度のさらに高い編集割合を示した。本実施例の化合物は、変異したASS1遺伝子配列を修復できることを示している。

[0422] また、実施例81及び実施例85の化合物（AD1__ASS1.39e、

AD1__ASS1.52e)を用いた場合の編集割合(%)を図18Aに示した。標的RNA発現プラスミド及び実施例化合物であるgRNAをトランスフェクトした場合、5%程度の編集割合を示した。さらに標的RNA発現プラスミド及び実施例化合物であるgRNAを、ADAR2を発現するプラスミドとともにトランスフェクトした場合、20%から40%程度の高い編集割合を示した。一方、標的RNA発現プラスミド及び実施例化合物であるgRNAを、ADAR1p110又はADAR1p150を発現するプラスミドとともにトランスフェクトした場合、さらに40%から80%程度のさらに高い編集割合を示した。本実施例の化合物は、変異したASS1遺伝子配列を修復できることを示している。

[0423] (試験例30) 実施例化合物であるgRNAの培養細胞内におけるPANK2遺伝子配列の編集誘導能評価

以下のPANK2遺伝子を発現する標的RNA発現プラスミドを構築したこと、gRNAとして実施例76、82及び86の化合物を用いたこと、及びPANK2遺伝子に対応するプライマーを用いたこと以外は、試験例10の(A)及び(B)と同様の方法を用い、編集解析には試験例29に記載の編集解析の方法と同様の方法を用いた。ここで用いるPANK2遺伝子配列は、GenBank accession no. NM_153638.3の1714番から1738番の塩基配列を有し、さらにc. 1561G>Aと呼ばれるヌクレオシドの変異(rs137852959)を有している。

[0424] 実施例76の化合物(AD1__PINK2.39)を用いた場合の編集割合(%)を図17Bに示した。標的RNA発現プラスミド及び実施例化合物であるgRNAをトランスフェクトした場合、5%程度の編集割合を示した。標的RNA発現プラスミド及び実施例化合物であるgRNAを、ADAR2を発現するプラスミドとともにトランスフェクトした場合、20%程度の高い編集割合を示した。標的RNA発現プラスミド及び実施例化合物であるgRNAを、ADAR1p110又はADAR1p150を発現するプラスミドとともにトランスフェクトした場合、40%から50%程度の高い編集

割合を示した。本実施例の化合物は、変異したPANK2遺伝子配列を修復できることを示している。

[0425] また、実施例82の化合物(AD1__PINK2.39e)及び実施例85の化合物(AD1__PINK2.52e)を用いた場合の編集割合(%)を図18Bに示した。標的RNA発現プラスミド及び実施例化合物であるgRNAをトランスフェクトした場合、5%程度の編集割合を示した。標的RNA発現プラスミド及び実施例化合物であるgRNAを、ADAR2を発現するプラスミドとともにトランスフェクトした場合、10%から20%程度の高い編集割合を示した。標的RNA発現プラスミド及び実施例化合物であるgRNAを、ADAR1p110又はADAR1p150を発現するプラスミドとともにトランスフェクトした場合、30%から50%程度の高い編集割合を示した。本実施例の化合物は、変異したPANK2遺伝子配列を修復できることを示している。

[0426] (試験例31) 実施例化合物であるgRNAの培養細胞内におけるNPHS2遺伝子配列の編集誘導能評価

以下のNPHS2遺伝子を発現する標的RNA発現プラスミドを構築したこと、gRNAとして実施例77、83及び87の化合物を用いたこと、及びNPHS2遺伝子に対応するプライマーを用いたこと以外は、試験例10の(A)及び(B)と同様の方法を用い、編集解析には試験例29に記載の編集解析の方法と同様の方法を用いた。ここで用いるNPHS2遺伝子配列は、GenBank accession no. NM_014625.4の483番から501番の塩基配列を有し、さらにc.413G>Aと呼ばれるヌクレオシドの変異(rs74315342)を有している。

[0427] 実施例77の化合物(AD1__NPHS2.39)を用いた場合の編集割合(%)を図17Cに示す。標的RNA発現プラスミド及び実施例化合物であるgRNAを、ADAR2を発現するプラスミドとともにトランスフェクトした場合、10%程度の高い編集割合を示した。標的RNA発現プラスミド及び実施例化合物であるgRNAを、ADAR1p110又はADAR1

p 1 5 0を発現するプラスミドとともにトランスフェクトした場合、20%程度の高い編集割合を示した。本実施例の化合物は、変異したNPHS2遺伝子配列を修復できることを示している。

[0428] また、実施例83の化合物(AD1__NPHS2.39e)及び実施例87の化合物(AD1__NPHS.52e)を用いた場合の編集割合(%)を図18Cに示す。標的RNA発現プラスミド及び実施例化合物であるgRNAを、ADAR2を発現するプラスミドとともにトランスフェクトした場合、10%程度の高い編集割合を示した。標的RNA発現プラスミド及び実施例化合物であるgRNAを、ADAR1 p110又はADAR1 p150を発現するプラスミドとともにトランスフェクトした場合、20%程度の高い編集割合を示した。本実施例の化合物は、変異したNPHS2遺伝子配列を修復できることを示している。

[0429] (試験例32) 実施例化合物であるgRNAの培養細胞内におけるGRIA2遺伝子配列の編集誘導能評価

以下のGRIA2遺伝子を発現する標的RNA発現プラスミドを構築したこと、gRNAとして実施例78、80及び84の化合物を用いたこと、及びGRIA2遺伝子に対応するプライマーを用いたこと以外は、試験例10の(A)及び(B)と同様の方法を用い、編集解析には試験例29に記載の編集解析の方法と同様の方法を用いた。ここで用いるGRIA2遺伝子配列は、GenBank accession no. NM_000826.3の2265番から2289番の塩基配列を有し、さらに2279番目のアデノシンが、ALSの疾患においてADAR2の発現が低下した場合、イノシンへの編集効率が低下する部位となっている。

[0430] 実施例78の化合物(AD1__GRIA2.39)、実施例80の化合物(AD1__GRIA2.39e)及び実施例84の化合物(AD1__GRIA2.52e)を用いた場合の編集割合(%)を図18Dに示す。標的RNA発現プラスミド及び実施例化合物であるgRNAを、ADAR2を発現するプラスミドとともにトランスフェクトした場合、40%程度の高い編集割

合を示した。標的RNA発現プラスミド及び実施例化合物であるgRNAを、ADAR1 p110又はADAR1 p150を発現するプラスミドとともにトランスフェクトした場合、40%から60%程度の高い編集割合を示した。本実施例の化合物は、変異したGRIA2遺伝子配列の2279番目のアデノシン部位をイノシンへの編集効率を向上できることを示している。

[0431] (試験例33) 実施例化合物であるgRNAのモデル標的RNA (Rluc__sRNA) に対する編集誘導能評価

(A) 編集部位の5'側の隣の塩基配列がGであるRNAの合成

編集部位の5'側の隣の塩基配列がGであるものは、国際公開第2021/060527号の実施例10に記載のRluc__sRNAを用いた。また、編集部位の5'側の隣の塩基配列がAであるものは、以下に記載したオリゴDNAを用いて調製した。

[0432] (B) 編集部位の5'側の隣の塩基配列がAであるRNAの合成

常法により調製したpsiCHECK™-2__Rluc__W104Xを鋳型にして、5'側断片をRL__s01__G286A__EcoF1プライマー(配列番号64)とRluc__G286A__R01プライマー(配列番号65)、3'側断片をRluc__G286A__F01プライマー(配列番号66)とRL__s01__G286A__HinR1プライマー(配列番号67)を用いてPrimeStar GXL DNA Polymerase (Takara) により1st PCR (30サイクル、変性: 98℃、10秒、アニーリング: 55℃、15秒、伸長: 68℃、20秒) を行なった。次に、それぞれのPCR産物を100倍希釈し、RL__s01__G286A__EcoF1プライマー(配列番号64)及びRL__s01__G286A__HinR1プライマー(配列番号67)を用いてPrimeStar GXL DNA Polymerase (Takara) により2nd PCR (30サイクル、変性: 98℃、10秒、アニーリング: 55℃、15秒、伸長: 68℃、20秒) を行ない、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿により精製し、Rluc__K41R__W104XのG286をAに変

異させた配列と制限酵素サイトを有するDNA (R l u c _ K 4 1 R _ W 1 0 4 X _ G 2 8 6 A _ E c o / H i d) (配列番号72)を得た。pUC19及び得られたDNAをE c o R I (T a K a R a) 及びH i n d I I I (T a K a R a) を用いて37℃で1時間の制限酵素消化を行なった後、フェノール／クロロホルム抽出、エタノール沈殿によりそれぞれのDNAを精製した。制限酵素消化後のR l u c _ K 4 1 R _ W 1 0 4 X _ G 2 8 6 AとpUC19を1:3のモル比となるように混合し、DNA L i g a t i o n K i t <M i g h t y M i x> (T a K a R a) を用いてライゲーション反応を行なった。得られたライゲーションサンプルをDH5αに形質転換し、LB寒天プレートを用いて37℃で一晩培養した。選別したコロニーをLB液体培地にて37℃で一晩培養し、Q I A p r e p S p i n M i n i p r e p K i t (Q I A G E N) を用いてプラスミドを抽出した。その後、塩基配列解析により得られたプラスミドの配列を確認した。配列を確認したプラスミドを鋳型に、T 7 _ R l u c _ s R N A _ F 0 1 (配列番号68) 及びR l u c _ s R N A _ R 0 1 プライマー (配列番号69)、P r i m e S t a r G X L D N A P o l y m e r a s e (T a K a R a) を用いてPCR (30サイクル (変性: 98℃ 10秒、アニーリング: 55℃ 15秒、伸長: 68℃ 20秒)) により、i n v i t r o 転写反応用の鋳型DNAを増幅し、フェノール／クロロホルム抽出、エタノール沈殿により精製した。A m p l i S c r i b e T 7 K i t (E p i c e n t r e B i o t e c h n o l o g i e s) を用いて、i n v i t r o 転写を行なってR l u c _ s R N A _ G 2 8 6 A (配列番号73)を得た。合成後のR l u c _ s R N A _ G 2 8 6 Aは、8M尿素を含む5%ポリアクリルアミドゲルを用いて切り出し精製を行ない、以降の試験に用いた。

[0433]

[表35]

プライマー	配列	配列番号
RL_s01_G286A_EcoF1	GCAGAAATTCGGGCTGGACTCCTTCATCAAC	66
Rluc_G286A_R01	CTTGTAGTGATTACAGGAGGCGATATG	67
Rluc_G286A_F01	CATATCGCCTCCTGAATCACTACAAG	68
RL_s01_G286A_HinR1	CGTAAGCTTCCAGTCGTGGCCCAAAAG	69
T7_Rluc_sRNA_F01	CTAATACGACTCACTATAGGGCTGGACTCCTTCATCAAC	70
Rluc_sRNA_R01	CCAGTCGTGGCCCAAAAG	71

[0434] [表36]

	配列	配列番号
Rluc_sRNA_G286A_Eco/Hind	GCAGGATCCGGGCTGGACTCCTTCATCAACT ACTATGATTCCGAGAGGCACGCCGAGAACG CCGTGATTTTCTGCATGGTAACGCTGCCTCC AGCTACCTGTGGAGGCACGTCGTGCCTCACA TCGAGCCCGTGGCTAGATGCATCATCCCTGA TCTGATCGGAATGGGTAAGTCCGGCAAGAG CGGGAATGGCTCATATCGCCTCCTGAATCAC TACAAGTACCTCACCGCTTAGTTCGAGCTGCT GAACCTTCCAAAGAAAATCATCTTTGTGGGC CACGACTGGAAGCTTACG	72
Rluc_sRNA_G286A	GGGCUGGACUCCUUAUCAACUACUAUGAU UCCGAGAGGCACGCCGAGAACGCCGUGAU UUUUCUGCAUGGUAACGCUGCCUCCAGCUA CCUGUGGAGGCACGUCGUGCCUCACAUCG AGCCCGUGGCUAGAUGCAUCAUCCUGAU CUGAUCGGAAUGGGUAAGUCCGGCAAGAG CGGGAUUGGCUCAUAUCGCCUCCUGAAUC ACUACAAGUACCUACCCGCUUAGUUCGAGC UGCUGAACCUCCAAAGAAAAUCAUCUUUG UGGGCCACGACUGG	73

[0435] (C) 編集誘導能評価

国際公開第2021/060527号の実施例10に記載の方法に従って、編集誘導能を評価した。

[0436] (D) 編集解析の結果

編集部位の5'側隣のヌクレオシドがGであるRluc_sRNAに対する編集活性を、実施例88から96の化合物について評価した。その結果を図19に示す。国際公開第2021/060527号の実施例10に記載さ

れているAD1g__03__RL__A287及びAD1g__03__RL__A287__GGを、それぞれ参考例15及び16として比較した。参考例15の化合物は、図19の中でAD1g__RL__A287__GCと記載し、参考例16の化合物は、図19の中でAD1g__RL__A287__GGと記載している。参考例16の化合物は、参考例15の化合物よりも高い編集活性を示し、国際公開第2021/060527号の実施例10に記載に一致した。さらに、実施例88から96の化合物を評価したところ、編集部位の5'側隣のヌクレオシドのGに対して、2'-デオキシグアノシン、又は2'-デオキシイノシンとした実施例89及び90の化合物が、参考例16の化合物よりも高い編集活性を示した。特に、編集部位の5'側隣のヌクレオシドのGに対して2'-デオキシイノシンとした実施例90の化合物が最も高い活性を示した。

[0437] 編集部位の5'側隣のヌクレオシドがAであるRluc__sRNAに対する編集活性を、実施例88から96の化合物について評価した。その結果を図20に示す。実施例88から96の化合物を評価したところ、編集部位の5'側隣のヌクレオシドのAに対して、チミジン又は2'-デオキシウリジンとした実施例91及び93の化合物が、高い編集活性を示した。特に編集部位の5'側隣のヌクレオシドのAに対して2'-デオキシウリジンとした実施例93の化合物が最も高い活性を示した。

[0438] 編集部位の5'側隣のヌクレオシドがGであるRluc__sRNAに対する編集活性を、実施例90及び97の化合物について評価した。その結果を図21Aに示す。編集部位の5'側隣のヌクレオシドのGに対して2'-デオキシイノシンとした実施例90の化合物と同程度の効率で、すべてを化学修飾した実施例97の化合物が高い活性を示した。

[0439] 編集部位の5'側隣のヌクレオシドがAであるRluc__sRNAに対する編集活性を、実施例91、93、98及び99の化合物について評価した。その結果を図21Bに示す。編集部位の5'側隣のヌクレオシドのAに対して、チミジン又は2'-デオキシウリジンとした実施例91及び93の化

化合物と同程度以上の効率で、すべてを化学修飾した実施例 98 及び、99 の化合物が高い活性を示した。

[0440] (試験例 34) 実施例化合物である gRNA の培養細胞内における標的 RNA (Rluc__sRNA) の編集誘導能評価

(A) 編集部位の 5' 側の隣の塩基配列が G である RNA (GAN__RNA) 発現プラスミド (pcDNA3.1 (−) Hygro__Rluc__sRNA) 及び編集部位の 5' 側の隣の塩基配列が A である RNA (AAN__RNA) 発現プラスミド (pcDNA3.1 (−) Hygro__Rluc__sRNA__G286A) の合成

GAN__RNA 発現プラスミドの構築は、常法により調製した psiCHECK™-2__Rluc__W104X を鋳型とし、AAN__RNA 発現プラスミドの構築は、常法により調製した pUC19__Rluc__K41R__W104X__G286A を鋳型にした。鋳型に対して、Rluc__s01__BamF1 プライマー (配列番号 74) 及び RL__s01__G286A__HinR1 プライマー (配列番号 75)、PrimeStar GXL DNA Polymerase (TaKaRa) を用いて PCR (30 サイクル、変性: 98℃、10 秒、アニーリング: 55℃、15 秒、伸長: 68℃、20 秒) により、インサート DNA を作製し、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿により精製した。インサート DNA、pcDNA3.1 (−) Hygro を BamHI (TaKaRa) 及び HindIII (TaKaRa) を用いて 37℃ で 1 時間反応を行なった後、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿により精製した。インサート: プラスミドが 3: 1 のモル比となるように加え、DNA Ligation Kit<Mighty Mix> (TaKaRa) を用いてライゲーション反応を行なった。得られたライゲーションサンプルを DH5α に形質転換し、LB 寒天プレートを用いて 37℃ で一晩培養した。選別したコロニーを、LB 液体培地を用いて 37℃ で一晩培養し、QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを抽出した。得られたプラス

ミド100ngをBig Dye Terminator v3.1 Cycle Sequence Kit (Thermo Fisher Scientific)、0.165 μ MのpcDNA3_1pro_F01プライマー（配列番号76）及び0.165 μ MのpcDNA31-seqR01プライマー（配列番号77）を用いてシーケンシング反応を行ない、Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) により配列解析を行ない、pcDNA3.1 (−) Hygro_Rluc_sRNA及びpcDNA3.1 (−) Hygro_Rluc_sRNA_G286Aが合成できたことを確認した。

[0441] [表37]

プライマー	配列	配列番号
Rluc_s01_BamF1	GCAGGATCCGGGCTGGACTCCTTCATCAAC	74
RL_s01_G286A_HinR1	CGTAAGCTTCCAGTCGTGGCCCAAAAG	75
pcDNA3_1pro_F01	TGGCACCAAAATCAACGGG	76
pcDNA31-seqR01	GCTATTGTCTTCCCAATCCTCC	77

[0442] (B) 細胞培養

pcDNA3.1 (−) Hygro_AGXTの代わりに、cDNA3.1 (−) Hygro_Rluc_sRNA及びpcDNA3.1 (−) Hygro_Rluc_sRNA_G286Aを用いたこと、gRNAとして実施例97から99の化合物を用いたこと以外は、試験例10の(B)と同様の方法を用いた。

[0443] (C) 編集解析

24-well Plateで培養した細胞から、RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN) を用いてtotal RNAを抽出した。ReverTra Ace^(R) qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO)、Total RNA 0.5 μ gを用いた逆転写反応を行ない、cDNAを増幅した。PrimeStar GXL DNA polymerase (TaKa

Ra)、Rluc__sRNA__F01プライマー（配列番号78）、Rluc__sRNA__R01プライマー（配列番号79）を用いてPCRを行い、フラグメントを増幅した。Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequence Kit、0.165 μ M Rluc__sRNA__F01プライマーを用いてシーケンシング反応を行ない、Applied Biosystem 3500 Genetic Analyzerにより解析した。シーケンシングにより得られたクロマトチャートより、標的部位のピーク高比（G／（G＋A））から編集割合を算出した。

[0444] [表38]

プライマー	配列	配列番号
Rluc_sRNA_F01	GCTGGACTCCTTCATCAAC	78
Rluc_sRNA_R01	CCAGTCGTGGCCCAAAAG	79

[0445] (D) 編集解析の結果

編集部位の5'側隣のヌクレオシドがGであるRluc__sRNAに対して、実施例97の化合物を用いた場合の編集割合（%）を図22に示した。標的RNA発現プラスミド及び実施例化合物であるgRNAを、ADAR2を発現するプラスミドとともにトランスフェクトした場合、5%程度の高い編集割合を示した。標的RNA発現プラスミド及び実施例化合物であるgRNAを、ADAR1 p110又はADAR1 p150を発現するプラスミドとともにトランスフェクトした場合、10%から20%程度の高い編集割合を示した。

[0446] 編集部位の5'側隣のヌクレオシドがAであるRluc__sRNAに対して、実施例98及び99の化合物を用いた場合の編集割合（%）を図22に示した。標的RNA発現プラスミド及び実施例化合物であるgRNAを、ADAR2を発現するプラスミドとともにトランスフェクトした場合、5%程度の高い編集割合を示した。標的RNA発現プラスミド及び実施例化合物であるgRNAを、ADAR1 p110又はADAR1 p150を発現するプラスミドとともにトランスフェクトした場合、25%から35%程度の高い

編集割合を示した。

[0447] (試験例35) 実施例化合物であるgRNAの培養細胞内におけるA1AT遺伝子配列の編集誘導能評価

以下のA1AT遺伝子を発現する標的RNA発現プラスミドを構築したこと、gRNAとして実施例72から74の化合物を用いたこと、及びA1AT遺伝子に対応するプライマーを用いたこと以外は、試験例10の(A)及び(B)と同様の方法を用い、編集解析には試験例29に記載の編集解析の方法と同様の方法を用いた。ここで用いるA1AT(SERPINA1ともいう)遺伝子配列は、GenBank accession no. NM_000295.5の1129番から1153番の塩基配列を有し、さらにc.1096G>Aと呼ばれるヌクレオシドの変異(rs28929474)を有している。

[0448] 実施例136の化合物(AD1_A1AT.39)を用いた場合の編集割合(%)を図23Aに示した。標的RNA発現プラスミド及び実施例化合物であるgRNAを、ADAR2を発現するプラスミドとともにトランスフェクトした場合、20%程度の高い編集割合を示した。標的RNA発現プラスミド及び実施例化合物であるgRNAを、ADAR1p110又はADAR1p150を発現するプラスミドとともにトランスフェクトした場合、40%から50%程度の高い編集割合を示した。本実施例の化合物は、変異したA1AT遺伝子配列を修復できることを示している。

[0449] (試験例36) 実施例化合物であるgRNAの培養細胞内におけるA1AT遺伝子配列の編集誘導能評価

ここで用いるA1AT(SERPINA1ともいう)遺伝子配列は、GenBank accession no. NM_000295.5の塩基配列を有し、さらにZ-A1ATは、c.1096G>Aと呼ばれるヌクレオシドの変異(rs28929474)を有している。

[0450] (A) A1AT及びZ-A1AT発現プラスミドの合成

HepG2細胞から、セパゾール RNA i Super G (ナカライ

を用いてtotal RNAを抽出し、Recombinant DNase I (TaKaRa)を用いてDNase処理を行った後、フェノール／クロロホルム抽出、エタノール沈殿により精製した。PrimeScript II Reverse Transcriptase (TaKaRa)、Total RNA 0.5 μ g、0.25 μ M Oligo (dT) 17を用いた逆転写反応を行ない、cDNAを増幅した。PrimeStar GXL DNA polymerase (TaKaRa)、SERPINA1__CDS__XbaF1プライマー（配列番号80）、SERPINA1__CDS__HindR1プライマー（配列番号81）を用いてPCR（30サイクル、変性：98℃、10秒、アニーリング：55℃、15秒、伸長：68℃、1分30秒）を行ない、フェノール／クロロホルム抽出、エタノール沈殿により精製し、SERPINA1のCDS配列（SERPINA1__CDS）（配列番号88）を有するDNAを得た。pUC19及び得られたDNAをXbaI (TaKaRa)及びHindIII (TaKaRa)を用いて37℃で1時間反応を行なった後、フェノール／クロロホルム抽出、エタノール沈殿により精製した。インサート：プラスミドが3：1のモル比となるように加え、DNA Ligation Kit<Mighty Mix> (TaKaRa)を用いてライゲーション反応を行なった。得られたライゲーションサンプルをDH5 α に形質転換し、LB寒天プレートを用いて37℃で一晩培養した。選別したコロニーを、LB液体培地を用いて37℃で一晩培養し、QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)を用いてプラスミドを抽出した。得られたプラスミド100 ngをBig Dye Terminator v3.1 Cycle Sequence Kit (Thermo Fisher Scientific)、0.165 μ MのpUC19-seqF01プライマー（配列番号82）及び0.165 μ MのpUC19__seqR01プライマー（配列番号83）を用いてシーケンシング反応を行ない、Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Therm

o Fisher Scientific) により配列解析を行ない、pUC19__SERPINA1を合成できたことを確認した。

[0451] pUC19__SERPINA1を鋳型とし、5'側断片をSERPINA1__CDS__XbaF1プライマー(配列番号80)とSERPINA1__G1096A__R1プライマー(配列番号84)、3'側断片をSERPINA1__G1096A__F1プライマー(配列番号85)とSERPINA1__CDS__HinR1プライマー(配列番号81)を用いてPrimeStar GXL DNA Polymerase (TaKaRa) により1st PCRを行なった。次に、それぞれのPCR産物を100倍希釈し、SERPINA1__CDS__XbaF1プライマー(配列番号80)及びSERPINA1__CDS__HinR1プライマー(配列番号81)を用いてPrimeStar GXL DNA Polymerase (TaKaRa) により2nd PCR(30サイクル、変性: 98℃、10秒、アニーリング: 55℃、15秒、伸長: 68℃、1分30秒)を行ない、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿により精製し、SERPINA1のG1096をAに変異させた配列を有するDNA (SERPINA1__G1096A) (配列番号89)を得た。また、pUC19__SERPINA1を鋳型にして、SERPINA1__CDS__XbaF1プライマー(配列番号80)及びSERPINA1__CDS__HinR1プライマー(配列番号81)を用いてPrimeStar GXL DNA Polymerase (TaKaRa) によりPCR(30サイクル、変性: 98℃、10秒、アニーリング: 55℃、15秒、伸長: 68℃、1分30秒)を行ない、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿により精製し、SERPINA1のCDS配列(SERPINA1__CDS) (配列番号88)を得た。それら得られたDNA及びpcDNA3.1(-)HygroをXbaI (TaKaRa) 及びHindIII (TaKaRa) を用いて37℃で1時間反応を行なった後、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿により精製した。インサート: プラスミドが3:1のモル比となるように加え、

DNA Ligation Kit<Mighty Mix> (Takara) を用いてライゲーション反応を行なった。得られたライゲーションサンプルをDH5 α に形質転換し、LB寒天プレートを用いて37℃で一晩培養した。選別したコロニーを、LB液体培地を用いて37℃で一晩培養し、QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを抽出した。得られたプラスミド100ngをBig Dye Terminator v3.1 Cycle Sequence Kit (Thermo Fisher Scientific)、0.165 μ MのpcDNA3_1pro_F01プライマー（配列番号86）及び0.165 μ MのpcDNA3.1-seqR01プライマー（配列番号87）を用いてシーケンシング反応を行ない、Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) により配列解析を行ない、pcDNA3.1(-)Hygro_SERPINA1_G1096A及びpcDNA3.1(-)Hygro_SERPINA1を合成できたことを確認した。

[0452] [表39]

プライマー	配列	配列番号
SERPINA1_CDS_XbaF1	CGATCTAGAATGCCGTCTTCTGTCTCGTG	80
SERPINA1_CDS_HinR1	GCAAAGCTTTTATTTTGGGTGGGATTCACC	81
pUC19-seqF01	CAACTGTTGGGAAGGGCGATC	82
pUC19_seqR01	CGACAGGTTTCCCGACTGGAAAG	83
SERPINA1_G1096A_R1	GTCCCTTTCTTGTCGATGGTC	84
SERPINA1_G1096A_F1	GACCATCGACAAGAAAGGGAC	85
pcDNA3_1pro_F01	TGGCACCAAAATCAACGGG	86
pcDNA3.1-seqR01	GCTATTGTCTTCCCAATCCTCC	87

[0453]

[表40]

	配列	配列番号
SERPINA1_CDS	CGATCTAGAATGCCGTCTTCTGTCTCGTGGGGCATCCTCCTGCTGGCAGGCCT GTGCTGCCTGGTCCCTGTCTCCCTGGCTGAGGATCCCCAGGGAGATGCTGCC CAGAAAGACAGATACATCCACCATGATCAGGATCACCACCTTCAACAAGAT CACCCCCAACCTGGCTGAGTTCCGCTTCAGCCTATACCGCCAGCTGGCACAC CAGTCCAAACAGCACCAATATCTTCTTCTCCCACTGAGCATCGCTACAGCCTTT GCAATGCTCTCCCTGGGGACCAAGGCTGACACTCACGATGAAATCCTGGAGG GCCTGAATTTCAACCTCACGGAGATTCCGAGGCTCAGATCCATGAAGGCTTC CAGGAACTCCTCCGTACCTCAACCAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCTGACCA CCGGCAATGGCCTGTTCTCAGCGAGGGCCTGAAAGCTAGTGGATAAGTTTTG GAGGATGTTAAAAAGTTGTACCACTCAGAAGCCTTCACTGTCAACTTCGGGGA CACCGAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACGATTACGTGGAGAAAGGGTACTCA AGGGAAAAATTGTGGATTGTGTCAGGAGCTTGACAGAGACACAGTTTTTGCTC TGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGGCAATGGGAGAGACCCCTTTGAAGTCAAG GACACCGAGGAAGAGGACTTCCACGTGGACCAAGGTGACCAAGCTGAAGGTG CCTATGATGAAGCGTTTAGGCATGTTTAACATCCAGCACTGTAAGAAGCTGTCC AGCTGGGTGCTGCTGATGAAATACCTGGGCAATGCCACCGCCATCTTCTTCT GCCTGATGAGGGGAACTACAGCACTGAAAAATGAAGTCAACCCACGATATC ATCACCAAGTTCTCGAAAAATGAAGACAGAAAGGTCTGCCAGCTTACATTTACC CAAACTGTCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAGAGCGTCTGGGTCAAATGG GCATCACTAAGGTCTTACGCAATGGGGCTGACCTCTCCGGGGTACAGAGGA GGCACCCCTGAAGCTCTCAAAGGCCGTGCAAGGCTGTGCTGACCATCGAC GAGAAAGGGACTGAAGCTGCTGGGGCCATGTTTTAGAGGCCATACCCATGT CTATCCCCCCCCGAGGTCAAGTTCACAAACCCCTTTGTCTTCTTAATGATTGAAC AAAAATACCAAGTCTCCCCCTTTCATGGGAAAAAGTGGTGAATCCCAACCAAAAA TAAAGCTTTGC	88
SERPINA1_g1096A	CGATCTAGAATGCCGTCTTCTGTCTCGTGGGGCATCCTCCTGCTGGCAGGCCT GTGCTGCCTGGTCCCTGTCTCCCTGGCTGAGGATCCCCAGGGAGATGCTGCC CAGAAAGACAGATACATCCACCATGATCAGGATCACCACCTTCAACAAGAT CACCCCCAACCTGGCTGAGTTCCGCTTCAGCCTATACCGCCAGCTGGCACAC CAGTCCAAACAGCACCAATATCTTCTTCTCCCACTGAGCATCGCTACAGCCTTT GCAATGCTCTCCCTGGGGACCAAGGCTGACACTCACGATGAAATCCTGGAGG GCCTGAATTTCAACCTCACGGAGATTCCGAGGCTCAGATCCATGAAGGCTTC CAGGAACTCCTCCGTACCTCAACCAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCTGACCA CCGGCAATGGCCTGTTCTCAGCGAGGGCCTGAAAGCTAGTGGATAAGTTTTG GAGGATGTTAAAAAGTTGTACCACTCAGAAGCCTTCACTGTCAACTTCGGGGA CACCGAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACGATTACGTGGAGAAAGGGTACTCA AGGGAAAAATTGTGGATTGTGTCAGGAGCTTGACAGAGACACAGTTTTTGCTC TGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGGCAATGGGAGAGACCCCTTTGAAGTCAAG GACACCGAGGAAGAGGACTTCCACGTGGACCAAGGTGACCAAGCTGAAGGTG CCTATGATGAAGCGTTTAGGCATGTTTAACATCCAGCACTGTAAGAAGCTGTCC AGCTGGGTGCTGCTGATGAAATACCTGGGCAATGCCACCGCCATCTTCTTCT GCCTGATGAGGGGAACTACAGCACTGAAAAATGAAGTCAACCCACGATATC ATCACCAAGTTCTCGAAAAATGAAGACAGAAAGGTCTGCCAGCTTACATTTACC CAAACTGTCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAGAGCGTCTGGGTCAAATGG GCATCACTAAGGTCTTACGCAATGGGGCTGACCTCTCCGGGGTACAGAGGA GGCACCCCTGAAGCTCTCAAAGGCCGTGCAAGGCTGTGCTGACCATCGAC AAGAAAGGGACTGAAGCTGCTGGGGCCATGTTTTAGAGGCCATACCCATGT CTATCCCCCCCCGAGGTCAAGTTCACAAACCCCTTTGTCTTCTTAATGATTGAAC AAAAATACCAAGTCTCCCCCTTTCATGGGAAAAAGTGGTGAATCCCAACCAAAAA TAAAGCTTTGC	89

[0454] (B) 細胞培養

HEK293細胞を24-well Plateに10% FBSを含むDMEM (SIGMA) を用いて 1.0×10^5 cells/wellとなるように継代し、48時間培養した。PBS (-) (ナカライ) を用いて一度洗

浄し、0.2%FBSを含むDMEM (SIGMA) に培地を交換した。Lipofectamine 3000 (Thermo) を用いて50ngの標的RNAを発現するプラスミド (pcDNA3.1 (-) Hygro_SERPINA1__G1096A、又はpcDNA3.1 (-) Hygro_SERPINA1)、500ngのADARを発現するプラスミド (pcDNA3.1 (-) Hygro_ADAR1p110又はpcDNA3.1 (-) Hygro_ADAR1p150)、50nMの実施例化合物であるgRNAをTransfectionし、48時間培養した。

[0455] (C) 編集解析とその結果

24-well Plateで培養した細胞から、RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN) を用いてtotal RNAを抽出した。ReverTra Ace^(R) qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO)、Total RNA 0.5 µgを用いた逆転写反応を行ない、cDNAを増幅した。PrimeStar GXL DNA polymerase (TaKaRa)、SERPINA1__1stF01プライマー (配列番号90)、SERPINA1__CDS__HinR1プライマー (配列番号91) を用いて1st PCRを行った。1st PCR産物を400倍希釈したcDNAを鋳型に、PrimeStar GXL DNA polymerase (TaKaRa)、SERPINA1__2ndF01プライマー (配列番号92)、SERPINA1__2ndR01プライマー (配列番号93) を用いて2nd PCRを行い、SERPINA1フラグメントを増幅した。Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequence Kit、0.165 µM SERPINA1__editF01プライマー (配列番号94) を用いてシーケンシング反応を行ない、Applied Biosystem 3500 Genetic Analyzerにより解析した。シーケンシングにより得られたクロマトチャートより、標的部位のピーク高比 ($G / (G + A)$) から編集割合を算出した。

[0456] 実施例 136 の化合物 (AD1__A1AT, 39) を用いた場合の編集割合 (%) を図 23B に示した。標的 RNA (Z-A1AT) 発現プラスミド及び実施例化合物である gRNA をトランスフェクトした場合、5% 程度の高い編集割合を示した。また、標的 RNA 発現プラスミド及び実施例化合物である gRNA を、ADAR1 p110 を発現するプラスミドとともにトランスフェクトした場合、60% 程度の高い編集割合を示した。さらに、標的 RNA 発現プラスミド及び実施例化合物である gRNA を、ADAR1 p150 を発現するプラスミドとともにトランスフェクトした場合、80% 程度の高い編集割合を示した。本実施例の化合物は、変異した A1AT 遺伝子配列を修復できることを示している。

[0457] [表41]

プライマー	配列	配列番号
SERPINA1_1stF01	GGCATGTTTAACATCCAGCACTG	90
SERPINA1_CDS_HinR1	GCAAAGCTTTTATTTTGGGTGGGATTCACC	91
SERPINA1_2ndF01	CCATCTTCTTCCTGCCTGATG	92
SERPINA1_2ndR01	CATGAAGAGGGGAGACTTGG	93
SERPINA1_editF01	GAAC TCACCCACGATATCATCAC	94

[0458] (D) ELISA による A1AT 分泌量の解析とその結果

Transfection 後、48 時間培養した培地を回収し、4℃、3000×g で 10 分間遠心分離した。培地 50 μL 及び Human alpha 1 Antitrypsin (SERPINA1) ELISA Kit (abcam) を用いて、添付されているカンパニープロトコルに準じて、A1AT 分泌量を測定した。吸光度測定には、Nivo マルチモードマイクロプレートリーダー (PerkinElmer) を用いた。

[0459] 実施例 136 の化合物 (AD1__A1AT, 39) を用いた場合の培地中の A1AT 分泌量を図 24 に示した。ADAR1 p110 を発現するプラスミドとともに、標的 RNA (Z-A1AT) 発現プラスミドをトランスフェクトした場合、培地中に分泌された A1AT 量は、正常 A1AT を発現するプラスミドをトランスフェクトした場合に培地に分泌された A1AT 量の 3

0%程度であった。また、ADAR1 p110を発現するプラスミドとともに、標的RNA（Z-A1AT）発現プラスミド及び実施例136の化合物を同時にトランスフェクトした場合、培地に分泌されたA1AT量は、正常A1ATを発現するプラスミドをトランスフェクトした場合の培地に分泌されたA1AT量と同程度まで回復した。

[0460] さらに、ADAR1 p110及びADAR1 p150を発現するプラスミドとともに、標的RNA（Z-A1AT）発現プラスミドをトランスフェクトした場合、培地中に分泌されたA1AT量は、正常A1ATを発現するプラスミドをトランスフェクトした場合に培地に分泌されたA1AT量の30%程度であった。また、ADAR1 p110及びADAR1 p150を発現するプラスミドとともに、標的RNA（Z-A1AT）発現プラスミド及び実施例136の化合物を同時にトランスフェクトした場合、培地に分泌されたA1AT量は、正常A1ATを発現するプラスミドをトランスフェクトした場合に培地に分泌されたるA1AT量と同程度まで回復した。

[0461] （C）に示したRNA編集活性の結果及び（D）に示したA1AT分泌量の解析結果から考えると、実施例136の化合物は、細胞内でZ-A1ATのmRNAの変異を正常なA1AT mRNAに修復し、さらに、正常なA1ATタンパク質を、正常な量のレベルまで細胞から分泌させることができたと考えられる。

[0462] 日本国特許出願2020-203658号（出願日：2020年12月8日）、日本国特許出願2021-157151号（出願日：2021年9月27日）の開示はその全体が参照により本明細書に取り込まれる。本明細書に記載された全ての文献、特許出願、及び技術規格は、個々の文献、特許出願、及び技術規格が参照により取り込まれることが具体的かつ個々に記された場合と同程度に、本明細書に参照により取り込まれる。

請求の範囲

[請求項1]

標的RNAを特定する第一オリゴヌクレオチドと、

前記第一オリゴヌクレオチドの5'側に連結する第二オリゴヌクレオチドと、を含み、

前記第一オリゴヌクレオチドは、前記標的RNA中のアデノシン残基に対応する標的対応ヌクレオチド残基と、

前記標的対応ヌクレオチド残基の3'側に連結し、前記標的RNAに相補的な塩基配列を有する10から24残基のオリゴヌクレオチドと、

前記標的対応ヌクレオチド残基の5'側に連結し、前記標的RNAに相補的な塩基配列を有する3から6残基のオリゴヌクレオチドとからなり、

前記第二オリゴヌクレオチドは、その3'末端において前記標的RNAのヌクレオチド残基に対応するヌクレオチド残基が欠失しているか、前記標的RNAのヌクレオチド残基と相補対を形成しないヌクレオチド残基を有し、

前記第二オリゴヌクレオチドは残基数が2から10であり、少なくともその3'末端以外のヌクレオチド残基が前記標的RNAと相補的な2本鎖構造を形成し、

前記標的対応ヌクレオチド残基、並びにその3'側及び5'側の各1残基からなるカウンタ領域を有し、

前記標的対応ヌクレオチド残基の3'側に連結するヌクレオチド残基が、2'-デオキシヌクレオチド残基であり、

前記標的対応ヌクレオチド残基の3'側に連結するオリゴヌクレオチドにおいて、前記標的対応ヌクレオチドから3'方向に数えて3番目のヌクレオチド残基が2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチド残基であり、

前記標的RNAに対する部位特異的編集を誘導するオリゴヌクレオ

チド、又はその薬学的に許容される塩。

- [請求項2] 前記第二オリゴヌクレオチドの残基数が4から8である請求項1に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [請求項3] 前記第二オリゴヌクレオチドの3'末端は、前記標的RNAのヌクレオチド残基に対応するヌクレオチド残基が欠失している請求項1又は2に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [請求項4] 前記部位特異的編集は、アデノシンデアミナーゼ1による酵素反応に起因する請求項1から3のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [請求項5] 前記第一オリゴヌクレオチドと第二オリゴヌクレオチドの間に、アルキレンオキシ単位を含む連結部を含む請求項1から4のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [請求項6] 前記第一オリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート結合を含む請求項1から5のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [請求項7] 前記第一オリゴヌクレオチドは、2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基、2'-デオキシ-2'-フルオロリボヌクレオチド残基、架橋型ヌクレオチド残基、及び2'-デオキシリボヌクレオチドからなる群から選択される少なくとも1種の修飾ヌクレオチド残基を含む請求項1から6のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [請求項8] 前記カウンタ領域は、ホスホロチオエート結合を含む請求項1から7のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [請求項9] 前記標的対応ヌクレオチド残基が、ホスホロチオエート結合を含む請求項1から8のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [請求項10] 前記標的対応ヌクレオチド残基の5'側に連結するヌクレオチド残

基が、2'－O－アルキルリボヌクレオチド残基、又はデオキシヌクレオチド残基である請求項1から9のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。

〔請求項11〕 前記第二オリゴヌクレオチドは、2'－O－アルキルリボヌクレオチド残基、2'－デオキシ－2'－フルオロリボヌクレオチド残基、及び架橋型ヌクレオチド残基からなる群から選択される少なくとも1種の修飾ヌクレオチド残基を含む請求項1から10のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。

〔請求項12〕 前記標的対応ヌクレオチド残基の3'側に連結するオリゴヌクレオチドが、2'－デオキシ－2'－フルオロヌクレオチド残基と2'－O－アルキルリボヌクレオチド残基とが交互に連結する塩基配列を有する請求項1から11のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。

〔請求項13〕 前記標的対応ヌクレオチド残基の3'側に連結するオリゴヌクレオチドが、架橋型ヌクレオチド残基と2'－O－アルキルリボヌクレオチド残基とが交互に連結する塩基配列を有する請求項1から12のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。

〔請求項14〕 前記標的対応ヌクレオチド残基の3'側に連結するオリゴヌクレオチドが、2'－デオキシ－2'－フルオロヌクレオチド残基と架橋型ヌクレオチド残基とが交互に連結する塩基配列を有する請求項1から13のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。

〔請求項15〕 前記第一オリゴヌクレオチドにおいて、前記標的対応ヌクレオチド残基の5'側に連結するオリゴヌクレオチドが、2'－O－アルキルリボヌクレオチド残基が連結する塩基配列を有する請求項1から14のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。

- [請求項16] 前記第一オリゴヌクレオチドにおいて、前記標的対応ヌクレオチド残基の5'側に連結するオリゴヌクレオチドが、2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基と架橋型ヌクレオチド残基とが交互に連結する塩基配列を有する請求項1から15のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [請求項17] 前記第一オリゴヌクレオチドにおいて、前記標的対応ヌクレオチド残基の5'側に連結するオリゴヌクレオチドが、2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基と2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチド残基とが交互に連結する塩基配列を有する請求項1から16のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [請求項18] 前記第二オリゴヌクレオチドが、2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基が連結する塩基配列を有する請求項1から17のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [請求項19] 前記第二オリゴヌクレオチドが、2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基と架橋型ヌクレオチド残基とが交互に連結する塩基配列を有する請求項1から18のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [請求項20] 前記第二オリゴヌクレオチドが、2'-O-アルキルリボヌクレオチド残基と2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチド残基とが交互に連結する塩基配列を有する請求項1から19のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [請求項21] 前記標的RNAは、編集標的であるアデノシン残基の5'側にシチジン残基が連結し、
前記第一オリゴヌクレオチドは、標的対応ヌクレオチド残基の3'側に連結するヌクレオチド残基が2'-デオキシイノシン残基である請求項1から20のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。

- [請求項22] 前記標的RNAは、編集標的であるアデノシン残基の5'側にウリジン残基が連結し、
- 前記第一オリゴヌクレオチドは、標的対応ヌクレオチド残基の3'側に連結するヌクレオチド残基が2'-デオキシアデノシン残基である請求項1から20のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [請求項23] 前記標的RNAは、編集標的であるアデノシン残基の5'側にアデノシン残基が連結し、
- 前記第一オリゴヌクレオチドは、標的対応ヌクレオチド残基の3'側に連結するヌクレオチド残基がチミジン残基又は2'-デオキシウリジン残基である請求項1から20のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [請求項24] 前記標的RNAは、編集標的であるアデノシン残基の5'側にグアノシン残基が連結し、
- 前記第一オリゴヌクレオチドは、標的対応ヌクレオチド残基の3'側に連結するヌクレオチド残基が2'-デオキシイノシン残基である請求項1から20のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [請求項25] 前記標的対応ヌクレオチド残基が、N-アルキルピリミジンヌクレオチド残基又は2'-デオキシシチジン残基である請求項1から24のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [請求項26] 前記第一オリゴヌクレオチド及び第二オリゴヌクレオチドのそれぞれは、ヌクレオチド残基がホスホロチオエート結合で連結されてなる請求項1から25のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [請求項27] 前記第一オリゴヌクレオチドは、前記標的対応ヌクレオチドから3'方向に数えて10番目以降のヌクレオチド残基に、架橋型ヌクレオ

チド残基を有する請求項 1 から 26 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。

[請求項28] 前記第一オリゴヌクレオチドは、前記標的対応ヌクレオチドから 3' 方向に数えて 10 番目以降のヌクレオチド残基からなるオリゴヌクレオチドが、2' -O-アルキルリボヌクレオチド残基と架橋型ヌクレオチド残基とが交互に連結する塩基配列を有する請求項 27 に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。

[請求項29] 前記第二オリゴヌクレオチドは、その 3' 末端のヌクレオチド残基から 5' 方向に数えて 2 番目以降のヌクレオチド残基に、架橋型ヌクレオチド残基を有する請求項 1 から 28 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。

[請求項30] 前記第二オリゴヌクレオチドは、その 3' 末端のヌクレオチド残基から 5' 方向に数えて 2 番目以降のヌクレオチド残基からなるオリゴヌクレオチドが、2' -O-アルキルリボヌクレオチド残基と架橋型ヌクレオチド残基とが交互に連結する塩基配列を有する請求項 29 に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。

[請求項31] 以下の式のいずれかで表される請求項 1 から 30 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。

$$\begin{aligned} & \text{U (M)} \wedge \text{T (L)} \wedge \text{G (M)} \wedge \text{A (L)} \wedge \text{U (M)} \wedge \text{G (F)} \wedge \\ & \text{A (F)} \wedge \text{C (M)} \wedge \text{C (M)} \wedge \text{c} \wedge \text{i} \wedge \text{G (M)} \wedge \text{U (F)} \wedge \text{G (M)} \wedge \text{G (F)} \wedge \text{C (M)} \wedge \text{A (F)} \wedge \text{U (M)} \wedge \text{C (F)} \wedge \text{A (M)} \\ & \wedge \text{G (L)} \wedge \text{U (M)} \wedge \text{T (L)} \wedge \text{G (M)} \quad (\text{AD1_ASS1} \\ & \text{. 39}) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & \text{A (M)} \wedge \text{A (L)} \wedge \text{G (M)} \wedge \text{A (L)} \wedge \text{A (M)} \wedge \text{A (F)} \wedge \\ & \text{U (F)} \wedge \text{U (M)} \wedge \text{C (M)} \wedge \text{c} \wedge \text{a} \wedge \text{A (M)} \wedge \text{C (F)} \wedge \text{A (M)} \wedge \text{A (F)} \wedge \text{A (M)} \wedge \text{U (F)} \wedge \text{A (M)} \wedge \text{C (F)} \wedge \text{C (M)} \\ & \wedge \text{A (L)} \wedge \text{C (M)} \wedge \text{C (L)} \wedge \text{U (M)} \quad (\text{AD1_PANK} \\ & \text{2. 39}) \end{aligned}$$

$A(M) \wedge T(L) \wedge G(M) \wedge T(L) \wedge C(M) \wedge C(F) \wedge$
 $A(F) \wedge G(M) \wedge U(M) \wedge c \wedge i \wedge G(M) \wedge A(F) \wedge A(M)$
 $\wedge U(F) \wedge A(M) \wedge U(F) \wedge A(M) \wedge A(F) \wedge U(M)$
 $\wedge T(L) \wedge A(M) \wedge C(L) \wedge U(M) \quad (AD1_NPHS$
 2. 39)

$G(M) \wedge C(L) \wedge A(M) \wedge T(L) \wedge C(M) \wedge C(F) \wedge$
 $U(F) \wedge G(M) \wedge C(M) \wedge c \wedge i \wedge C(M) \wedge A(F) \wedge U(M)$
 $\wedge A(F) \wedge A(M) \wedge A(F) \wedge G(M) \wedge G(F) \wedge C(M)$
 $\wedge A(L) \wedge C(M) \wedge C(L) \wedge C(M) \quad (AD1_GR1A$
 2. 39)

$U(M) \wedge G(L) \wedge A(M) \wedge U(L) \wedge G(F) \wedge A(F) \wedge$
 $C(M) \wedge C(M) \wedge c \wedge i \wedge G(M) \wedge U(F) \wedge G(M) \wedge G(F)$
 $\wedge C(M) \wedge A(F) \wedge U(M) \wedge C(F) \wedge A(L) \wedge G(M)$
 $\wedge U(L) \wedge U(M) \quad (AD1_ASS1. 52)$

$G(M) \wedge C(E) \wedge A(M) \wedge T(E) \wedge C(M) \wedge C(F) \wedge$
 $U(F) \wedge G(M) \wedge C(M) \wedge c \wedge i \wedge C(M) \wedge A(F) \wedge U(M)$
 $\wedge A(F) \wedge A(M) \wedge A(F) \wedge G(M) \wedge G(F) \wedge C(M)$
 $\wedge A(E) \wedge C(M) \wedge C(E) \wedge C(M) \quad (AD1_GR1A$
 2. 39 e)

$U(M) \wedge T(E) \wedge G(M) \wedge A(E) \wedge U(M) \wedge G(F) \wedge$
 $A(F) \wedge C(M) \wedge C(M) \wedge c \wedge i \wedge G(M) \wedge U(F) \wedge G(M)$
 $\wedge G(F) \wedge C(M) \wedge A(F) \wedge U(M) \wedge C(F) \wedge A(M)$
 $\wedge G(E) \wedge U(M) \wedge T(E) \wedge G(M) \quad (AD1_ASS1$
 . 39 e)

$A(M) \wedge A(E) \wedge G(M) \wedge A(E) \wedge A(M) \wedge A(F) \wedge$
 $U(F) \wedge U(M) \wedge C(M) \wedge c \wedge a \wedge A(M) \wedge C(F) \wedge A(M)$
 $\wedge A(F) \wedge A(M) \wedge U(F) \wedge A(M) \wedge C(F) \wedge C(M)$
 $\wedge A(E) \wedge C(M) \wedge C(E) \wedge U(M) \quad (AD1_PANK$

2. 39 e)

A (M) ^ T (E) ^ G (M) ^ T (E) ^ C (M) ^ C (F) ^
A (F) ^ G (M) ^ U (M) ^ c ^ i ^ G (M) ^ A (F) ^ A (M)
^ U (F) ^ A (M) ^ U (F) ^ A (M) ^ A (F) ^ U (M)
) ^ T (E) ^ A (M) ^ C (E) ^ U (M) (AD1__NPHS
2. 39 e)

C (M) ^ A (E) ^ U (M) ^ C (E) ^ C (F) ^ U (F) ^
G (M) ^ C (M) ^ c ^ i ^ C (M) ^ A (F) ^ U (M) ^ A (F)
^ A (M) ^ A (F) ^ G (M) ^ G (F) ^ C (E) ^ A (M)
) ^ C (E) ^ C (M)) (AD1__GRIA2. 52 e)

U (M) ^ G (E) ^ A (M) ^ T (E) ^ G (F) ^ A (F) ^
C (M) ^ C (M) ^ c ^ i ^ G (M) ^ U (F) ^ G (M) ^ G (F)
^ C (M) ^ A (F) ^ U (M) ^ C (F) ^ A (E) ^ G (M)
) ^ T (E) ^ U (M) (AD1__ASS1. 52 e)

A (M) ^ G (E) ^ A (M) ^ A (E) ^ A (F) ^ U (F) ^
U (M) ^ C (M) ^ c ^ a ^ A (M) ^ C (F) ^ A (M) ^ A (F)
^ A (M) ^ U (F) ^ A (M) ^ C (F) ^ C (E) ^ A (M)
) ^ C (E) ^ C (M) (AD1__PANK2. 52 e)

U (M) ^ G (E) ^ U (M) ^ C (E) ^ C (F) ^ A (F) ^
G (M) ^ U (M) ^ c ^ i ^ G (M) ^ A (F) ^ A (M) ^ U (F)
^ A (M) ^ U (F) ^ A (M) ^ A (F) ^ T (E) ^ U (M)
) ^ A (E) ^ C (M) (AD1__NPHS2. 52 e)

G (M) ^ T (L) ^ C (M) ^ C (L) ^ C (M) ^ U (F) ^
U (F) ^ C (M) ^ U (M) ^ c ^ i ^ U (M) ^ C (F) ^ G (M)
^ A (F) ^ U (M) ^ G (F) ^ G (M) ^ U (F) ^ C (M)
) ^ A (L) ^ G (M) ^ C (L) ^ A (M) (AD1__A1AT
. 39)

[式中、大文字はリボヌクレオチド残基、小文字は2' -デオキシリ

ボヌクレオチド残基、N (M) は 2' - O - メチル - リボヌクレオチド残基、N (F) は 2' - フルオロ - 2' - デオキシリボヌクレオチド残基、N (L) は、2' - O, 4' - C - メチレン化リボヌクレオチド残基、N (E) は、2' - O, 4' - C - エチレン化リボヌクレオチド残基を示し、「^」はヌクレオシドユニット間が - P (= S) (OH) - で結合していることを示す。]

- [請求項32] 前記オリゴヌクレオチド及びその薬学的に許容される塩は、5' 末端又は 3' 末端において、G a l N A c、コレステロール及び脂肪酸を含むデリバリー分子がリンカー又はリン酸ジエステル結合（ホスホロチオエート結合を含む）を介して結合している請求項 1 から 31 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [請求項33] 請求項 1 から 32 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩を含有し、前記標的 RNA に関連する疾患の治療に用いられる遺伝性疾患治療剤。
- [請求項34] 請求項 1 から 32 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩を活性成分として含有し、前記標的 RNA に関連する疾患の治療に用いられる医薬組成物。
- [請求項35] 遺伝性疾患の予防、又は治療のための請求項 34 に記載の医薬組成物。
- [請求項36] 前記遺伝性疾患が、前記標的 RNA におけるアデノシン残基をイノシン残基に変換することにより治療されうる疾患である請求項 35 に記載の医薬組成物。
- [請求項37] 前記遺伝性疾患が、遺伝子におけるグアノシン残基からアデノシン残基への変異を原因とする遺伝性疾患である請求項 35 に記載の医薬組成物。
- [請求項38] 前記標的 RNA に関連する疾患の予防、又は治療のための医薬を製造するための請求項 1 から 32 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレ

オチド、又はその薬学的に許容される塩の使用。

- [請求項39] 前記標的RNAに関連する疾患の予防、又は治療における使用のための請求項1から32のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。
- [請求項40] 請求項1から32のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩の薬理学的有効量を温血動物に投与することによる前記標的RNAに関連する疾患の予防、又は治療のための方法。
- [請求項41] 前記疾患が遺伝性疾患である請求項40に記載の方法。
- [請求項42] 前記遺伝性疾患が、標的RNAにおけるアデノシン残基をイノシン残基に変換することにより治療されうる疾患である請求項41に記載の方法。
- [請求項43] 前記遺伝性疾患が、遺伝子におけるグアノシン残基からアデノシン残基への変異を原因とする遺伝性疾患である請求項41に記載の方法。
- [請求項44] 前記疾患が、Ⅰ型シトルリン血症、血友病（血栓症）、ALS、パントテン酸関連神経変性疾患、ホモシスチン尿症、単状分節性糸球体硬化症、 $\alpha 1$ アンリトリプシン欠損症、フェニルケトン尿症、肥厚性皮膚骨膜症、アレキサンダー病、原発性高シュウ酸尿症、Gilbert症候群、網膜色素変性症、遠位型ミオパチー及びヘモクロマトーシスからなる群から選択される少なくとも1つを含む請求項34から37のいずれか1項に記載の医薬組成物。
- [請求項45] 前記疾患が、Ⅰ型シトルリン血症、血友病（血栓症）、ALS、パントテン酸関連神経変性疾患、ホモシスチン尿症、単状分節性糸球体硬化症、 $\alpha 1$ アンリトリプシン欠損症、フェニルケトン尿症、肥厚性皮膚骨膜症、アレキサンダー病、原発性高シュウ酸尿症、Gilbert症候群、網膜色素変性症、遠位型ミオパチー及びヘモクロマトーシスからなる群から選択される少なくとも1つを含む請求項38に記

載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩の使用。

[請求項46] 前記疾患が、Ⅰ型シトルリン血症、血友病（血栓症）、ALS、パントテン酸関連神経変性疾患、ホモシスチン尿症、単状分節性糸球体硬化症、 $\alpha 1$ アンリトリプシン欠損症、フェニルケトン尿症、肥厚性皮膚骨膜症、アレキサンダー病、原発性高シュウ酸尿症、Gilbert症候群、網膜色素変性症、遠位型ミオパチー及びヘモクロマトーシスからなる群から選択される少なくとも1つを含む請求項39に記載のオリゴヌクレオチド、又はその薬学的に許容される塩。

[請求項47] 前記疾患が、Ⅰ型シトルリン血症、血友病（血栓症）、ALS、パントテン酸関連神経変性疾患、ホモシスチン尿症、単状分節性糸球体硬化症、 $\alpha 1$ アンリトリプシン欠損症、フェニルケトン尿症、肥厚性皮膚骨膜症、アレキサンダー病、原発性高シュウ酸尿症、Gilbert症候群、網膜色素変性症、遠位型ミオパチー及びヘモクロマトーシスからなる群から選択される少なくとも1つを含む請求項40から43のいずれか1項に記載の方法。