

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2024-506296
(P2024-506296A)

(43)公表日 令和6年2月13日(2024.2.13)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11	Z Z N A 4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	C 1 2 N 15/864	1 0 0 Z 4 C 0 7 6
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113	Z 4 C 0 8 6
C 1 2 N 7/01 (2006.01)	C 1 2 N 7/01	4 C 0 8 7
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全64頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2023-547208(P2023-547208)
 (86)(22)出願日 令和4年2月4日(2022.2.4)
 (85)翻訳文提出日 令和5年8月28日(2023.8.28)
 (86)国際出願番号 PCT/US2022/015380
 (87)国際公開番号 WO2022/170146
 (87)国際公開日 令和4年8月11日(2022.8.11)
 (31)優先権主張番号 63/146,522
 (32)優先日 令和3年2月5日(2021.2.5)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)
 (31)優先権主張番号 PCT/US2021/016939
 (32)優先日 令和3年2月5日(2021.2.5)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)
 (81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA
 最終頁に続く

(71)出願人 522314061
 メイズ セラピューティクス, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, オイスター ポイント ブールバード 1 7 1, スイート 3 0 0
 (74)代理人 100107489
 弁理士 大塩 竹志
 (72)発明者
 グールド, カールトン ブロクター
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, オイスター ポイント ブールバード 1 7 1, スイート 3 0 0, メイズ セラピューティクス, インコーポレイテッド
 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 スタッファーポリヌクレオチド配列を含むベクター

(57)【要約】

本開示は、ベクタースタッファーポリヌクレオチド、ならびに発現構築物およびベクター（例えば、ウイルスベクター）を含むその組成物、ならびに治療剤（例えば、阻害性核酸）を哺乳動物に送達するかまたは疾患を処置する方法を提供する。アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターゲノムのサイズには、制約があることが公知であり、4.7 kb というおよそ天然のサイズであるベクターサイズは成功裡にパッケージングされているが、遙かにより大きなベクターゲノムは、機能的 AAV ベクターの生成が低減されやすい。

Position chr7:5,735,959-6,742,058 Reverse complement

Letters per line: 60 Default case: Upper Lower Subst:

Track Name	Toggle Case	Underline	Bold	Italic	Red	Green	Blue
Common SNPs(151)	<input type="checkbox"/>						
Conservation	<input type="checkbox"/>						
CpG Islands	<input type="checkbox"/>						
GTEx Gene	<input type="checkbox"/>						
Publications	<input type="checkbox"/>						
RepeatMasker	<input type="checkbox"/>						
UCSC Genes	<input type="checkbox"/>						
DNAse Clusters	<input type="checkbox"/>						
Txn Factor ChIP	<input type="checkbox"/>						
GTEx Combined eQTL	<input type="checkbox"/>						
NCBI RefSeq	<input type="checkbox"/>						
Master DNase HS	<input type="checkbox"/>						
Uniform DNase HS	<input type="checkbox"/>						
ENCODE 3 TFBS	<input type="checkbox"/>						
Uniform TFBS	<input type="checkbox"/>						
Other RefSeq	<input type="checkbox"/>						
Open Chrom. Synth	<input type="checkbox"/>						
Affy U95	<input type="checkbox"/>						
Affy U133	<input type="checkbox"/>						
Human ESTs	<input type="checkbox"/>						
All SNPs(151)	<input type="checkbox"/>						
Spliced ESTs	<input type="checkbox"/>						
GENCODE V31Ref37	<input type="checkbox"/>						
GENCODE Genes V19	<input type="checkbox"/>						
Broad ChromHMM	<input type="checkbox"/>						
CD34 DNaseI	<input type="checkbox"/>						
Chromosome Band (Ideogram)	<input type="checkbox"/>						
Ensembl Genes	<input type="checkbox"/>						
Genome Segments	<input type="checkbox"/>						
GWAS Catalog	<input type="checkbox"/>						
H3K9 Methylation	<input type="checkbox"/>						
H3K9 Methylation	<input type="checkbox"/>						

FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

約 1300 ~ 約 2300 ヌクレオチドの長さの核酸を含み、以下のうちのいずれか 1 つと少なくとも 75% 同一性を有するベクタースタッファー配列： 配列番号 45 ~ 51； 配列番号 13 ~ 16 のいずれか 1 つのヌクレオチド 489 ~ 2185、配列番号 17 のヌクレオチド 342 ~ 2222； 配列番号 18 のヌクレオチド 488 ~ 2177； 配列番号 19 のヌクレオチド 489 ~ 2177； 配列番号 20 のヌクレオチド 711 ~ 2187； 配列番号 21 のヌクレオチド 711 ~ 2187； 配列番号 22 のヌクレオチド 488 ~ 2177； 配列番号 23 のヌクレオチド 711 ~ 2187； 配列番号 24 のヌクレオチド 711 ~ 2187； 配列番号 25 のヌクレオチド 252 ~ 2132； 配列番号 26 のヌクレオチド 252 ~ 2132； 配列番号 27 のヌクレオチド 252 ~ 2132； 配列番号 28 のヌクレオチド 252 ~ 2132； 配列番号 29 のヌクレオチド 357 ~ 2237； 配列番号 30 のヌクレオチド 358 ~ 2195； 配列番号 31 のヌクレオチド 580 ~ 2187； 配列番号 32 のヌクレオチド 580 ~ 2196； 配列番号 33 のヌクレオチド 357 ~ 2237； 配列番号 34 のヌクレオチド 358 ~ 2195； 配列番号 35 のヌクレオチド 580 ~ 2187； 配列番号 36 のヌクレオチド 580 ~ 2196； 配列番号 37 のヌクレオチド 348 ~ 2228； 配列番号 38 のヌクレオチド 349 ~ 2229； 配列番号 39 のヌクレオチド 349 ~ 2186； 配列番号 40 のヌクレオチド 571 ~ 2178； 配列番号 41 のヌクレオチド 571 ~ 2178； 配列番号 42 のヌクレオチド 348 ~ 2228； 配列番号 43 のヌクレオチド 349 ~ 2186； 配列番号 44 のヌクレオチド 571 ~ 2178； 配列番号 78 のヌクレオチド 349 ~ 2229； 配列番号 79 のヌクレオチド 358 ~ 2238； 配列番号 80 のヌクレオチド 342 ~ 2222； および配列番号 81 のヌクレオチド 342 ~ 2222。

10

20

【請求項 2】

前記核酸は、約 1500 ~ 2000 ヌクレオチドの長さである、請求項 1 に記載のベクタースタッファー配列。

【請求項 3】

前記核酸は、約 1600 ~ 1900 ヌクレオチドの長さである、請求項 1 または 2 に記載のベクタースタッファー配列。

30

【請求項 4】

前記核酸は、以下のうちのいずれか 1 つと少なくとも 80% 同一性を有する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のベクタースタッファー配列： 配列番号 45 ~ 51； 配列番号 13 ~ 16 のいずれか 1 つのヌクレオチド 489 ~ 2185； 配列番号 17 のヌクレオチド 342 ~ 2222； 配列番号 18 のヌクレオチド 488 ~ 2177； 配列番号 19 のヌクレオチド 489 ~ 2177； 配列番号 20 のヌクレオチド 711 ~ 2187； 配列番号 21 のヌクレオチド 711 ~ 2187； 配列番号 22 のヌクレオチド 488 ~ 2177； 配列番号 23 のヌクレオチド 711 ~ 2187； 配列番号 24 のヌクレオチド 711 ~ 2187； 配列番号 25 のヌクレオチド 252 ~ 2132； 配列番号 26 のヌクレオチド 252 ~ 2132； 配列番号 27 のヌクレオチド 252 ~ 2132； 配列番号 28 のヌクレオチド 252 ~ 2132； 配列番号 29 のヌクレオチド 357 ~ 2237； 配列番号 30 のヌクレオチド 358 ~ 2195； 配列番号 31 のヌクレオチド 580 ~ 2187； 配列番号 32 のヌクレオチド 580 ~ 2196； 配列番号 33 のヌクレオチド 357 ~ 2237； 配列番号 34 のヌクレオチド 358 ~ 2195； 配列番号 35 のヌクレオチド 580 ~ 2187； 配列番号 36 のヌクレオチド 580 ~ 2196； 配列番号 37 のヌクレオチド 348 ~ 2228； 配列番号 38 のヌクレオチド 349 ~ 2229； 配列番号 39 のヌクレオチド 349 ~ 2186； 配列番号 40 のヌクレオチド 571 ~ 2178； 配列番号 41 のヌクレオチド 571 ~ 2178； 配列番号 42 のヌクレオチド 348 ~ 2228； 配列番号 43 のヌクレオチド 349 ~ 2186； 配列番号 44 のヌクレオチド 571 ~ 2178； および配列番号

40

50

78のヌクレオチド349～2229； 配列番号79のヌクレオチド358～2238； 配列番号80のヌクレオチド342～2222； および配列番号81のヌクレオチド342～2222。

【請求項5】

前記核酸は、以下のうちのいずれか1つと少なくとも85%同一性を有する、請求項1～4のいずれか1項に記載のベクタースタッフアー配列： 配列番号45～51； 配列番号13～16のいずれか1つのヌクレオチド489～2185； 配列番号17のヌクレオチド342～2222； 配列番号18のヌクレオチド488～2177； 配列番号19のヌクレオチド489～2177； 配列番号20のヌクレオチド711～2187； 配列番号21のヌクレオチド711～2187； 配列番号22のヌクレオチド488～2177； 配列番号23のヌクレオチド711～2187； 配列番号24のヌクレオチド711～2187； 配列番号25のヌクレオチド252～2132； 配列番号26のヌクレオチド252～2132； 配列番号27のヌクレオチド252～2132； 配列番号28のヌクレオチド252～2132； 配列番号29のヌクレオチド357～2237； 配列番号30のヌクレオチド358～2195； 配列番号31のヌクレオチド580～2187； 配列番号32のヌクレオチド580～2196； 配列番号33のヌクレオチド357～2237； 配列番号34のヌクレオチド358～2195； 配列番号35のヌクレオチド580～2187； 配列番号36のヌクレオチド580～2196； 配列番号37のヌクレオチド348～2228； 配列番号38のヌクレオチド349～2229； 配列番号39のヌクレオチド349～2186； 配列番号40のヌクレオチド571～2178； 配列番号41のヌクレオチド571～2178； 配列番号42のヌクレオチド348～2228； 配列番号43のヌクレオチド349～2186； 配列番号44のヌクレオチド571～2178； 配列番号78のヌクレオチド349～2229； 配列番号79のヌクレオチド358～2238； 配列番号80のヌクレオチド342～2222； および配列番号81のヌクレオチド342～2222。

【請求項6】

前記核酸は、以下のうちのいずれか1つと少なくとも90%同一性を有する、請求項1～5のいずれか1項に記載のベクタースタッフアー配列： 配列番号45～51； 配列番号13～16のいずれか1つのヌクレオチド489～2185； 配列番号17のヌクレオチド342～2222； 配列番号18のヌクレオチド488～2177； 配列番号21のヌクレオチド711～2187； 配列番号22のヌクレオチド488～2177； 配列番号23のヌクレオチド711～2187； 配列番号24のヌクレオチド711～2187； 配列番号25のヌクレオチド252～2132； 配列番号26のヌクレオチド252～2132； 配列番号27のヌクレオチド252～2132； 配列番号28のヌクレオチド252～2132； 配列番号29のヌクレオチド357～2237； 配列番号30のヌクレオチド358～2195； 配列番号31のヌクレオチド580～2187； 配列番号32のヌクレオチド580～2196； 配列番号33のヌクレオチド357～2237； 配列番号34のヌクレオチド358～2195； 配列番号35のヌクレオチド580～2187； 配列番号36のヌクレオチド580～2196； 配列番号37のヌクレオチド348～2228； 配列番号38のヌクレオチド349～2229； 配列番号39のヌクレオチド349～2186； 配列番号40のヌクレオチド571～2178； 配列番号41のヌクレオチド571～2178； 配列番号42のヌクレオチド348～2228； 配列番号43のヌクレオチド349～2186； および配列番号44のヌクレオチド571～2178； 配列番号78のヌクレオチド349～2229； 配列番号79のヌクレオチド358～2238； 配列番号80のヌクレオチド342～2222； および配列番号81のヌクレオチド342～2222。

【請求項7】

前記核酸は、以下のうちのいずれか1つと少なくとも95%同一性を有する、請求項1～

6のいずれか1項に記載のベクタースタッファー配列：配列番号45～51；配列番号13～16のいずれか1つのヌクレオチド489～2185；配列番号17のヌクレオチド342～2222；配列番号18のヌクレオチド488～2177；配列番号21のヌクレオチド711～2187；配列番号22のヌクレオチド488～2177；配列番号23のヌクレオチド711～2187；配列番号24のヌクレオチド711～2187；配列番号25のヌクレオチド252～2132；配列番号26のヌクレオチド252～2132；配列番号27のヌクレオチド252～2132；配列番号28のヌクレオチド252～2132；配列番号29のヌクレオチド357～2237；配列番号30のヌクレオチド358～2195；配列番号31のヌクレオチド580～2187；配列番号32のヌクレオチド580～2196；配列番号33のヌクレオチド357～2237；配列番号34のヌクレオチド358～2195；配列番号35のヌクレオチド580～2187；配列番号36のヌクレオチド580～2196；配列番号37のヌクレオチド348～2228；配列番号38のヌクレオチド349～2229；配列番号39のヌクレオチド349～2186；配列番号40のヌクレオチド571～2178；配列番号41のヌクレオチド571～2178；配列番号42のヌクレオチド348～2228；配列番号43のヌクレオチド349～2186；配列番号44のヌクレオチド571～2178；配列番号78のヌクレオチド349～2229；配列番号79のヌクレオチド358～2238；および配列番号80のヌクレオチド342～2222；配列番号81のヌクレオチド342～2222。

10

20

【請求項8】

前記核酸は、以下のうちのいずれか1つと少なくとも97%同一性を有する、請求項1～7のいずれか1項に記載のベクタースタッファー配列：配列番号45～51；配列番号13～16のいずれか1つのヌクレオチド489～2185；配列番号17のヌクレオチド342～2222；配列番号18のヌクレオチド488～2177；配列番号21のヌクレオチド711～2187；配列番号22のヌクレオチド488～2177；配列番号23のヌクレオチド711～2187；配列番号24のヌクレオチド711～2187；配列番号25のヌクレオチド252～2132；配列番号26のヌクレオチド252～2132；配列番号27のヌクレオチド252～2132；配列番号28のヌクレオチド252～2132；配列番号29のヌクレオチド357～2237；配列番号30のヌクレオチド358～2195；配列番号31のヌクレオチド580～2187；配列番号32のヌクレオチド580～2196；配列番号33のヌクレオチド357～2237；配列番号34のヌクレオチド358～2195；配列番号35のヌクレオチド580～2187；配列番号36のヌクレオチド580～2196；配列番号37のヌクレオチド348～2228；配列番号38のヌクレオチド349～2229；配列番号39のヌクレオチド349～2186；配列番号40のヌクレオチド571～2178；配列番号41のヌクレオチド571～2178；配列番号42のヌクレオチド348～2228；配列番号43のヌクレオチド349～2186；および配列番号44のヌクレオチド571～2178；配列番号78のヌクレオチド349～2229；配列番号79のヌクレオチド358～2238；配列番号80のヌクレオチド342～2222；および配列番号81のヌクレオチド342～2222。

30

40

【請求項9】

前記核酸は、以下のうちのいずれか1つを含むかまたはからなる、請求項1～8のいずれか1項に記載のベクタースタッファー配列：配列番号45～51；配列番号13～16のいずれか1つのヌクレオチド489～2185；配列番号17のヌクレオチド342～2222；配列番号18のヌクレオチド488～2177；配列番号21のヌクレオチド711～2187；配列番号22のヌクレオチド488～2177；配列番号23のヌクレオチド711～2187；配列番号24のヌクレオチド711～2187；配列番号25のヌクレオチド252～2132；配列番号26のヌクレオチド2

50

5 2 ~ 2 1 3 2 ; 配列番号 2 7 のヌクレオチド 2 5 2 ~ 2 1 3 2 ; 配列番号 2 8 のヌクレオチド 2 5 2 ~ 2 1 3 2 ; 配列番号 2 9 のヌクレオチド 3 5 7 ~ 2 2 3 7 ; 配列番号 3 0 のヌクレオチド 3 5 8 ~ 2 1 9 5 ; 配列番号 3 1 のヌクレオチド 5 8 0 ~ 2 1 8 7 ; 配列番号 3 2 のヌクレオチド 5 8 0 ~ 2 1 9 6 ; 配列番号 3 3 のヌクレオチド 3 5 7 ~ 2 2 3 7 ; 配列番号 3 4 のヌクレオチド 3 5 8 ~ 2 1 9 5 ; 配列番号 3 5 のヌクレオチド 5 8 0 ~ 2 1 8 7 ; 配列番号 3 6 のヌクレオチド 5 8 0 ~ 2 1 9 6 ; 配列番号 3 7 のヌクレオチド 3 4 8 ~ 2 2 2 8 ; 配列番号 3 8 のヌクレオチド 3 4 9 ~ 2 2 2 9 ; 配列番号 3 9 のヌクレオチド 3 4 9 ~ 2 1 8 6 ; 配列番号 4 0 のヌクレオチド 5 7 1 ~ 2 1 7 8 ; 配列番号 4 1 のヌクレオチド 5 7 1 ~ 2 1 7 8 ; 配列番号 4 2 のヌクレオチド 3 4 8 ~ 2 2 2 8 ; 配列番号 4 3 のヌクレオチド 3 4 9 ~ 2 1 8 6 ; および配列番号 4 4 のヌクレオチド 5 7 1 ~ 2 1 7 8 ; 配列番号 7 8 のヌクレオチド 3 4 9 ~ 2 2 2 9 ; 配列番号 7 9 のヌクレオチド 3 5 8 ~ 2 2 3 8 ; 配列番号 8 0 のヌクレオチド 3 4 2 ~ 2 2 2 2 ; および配列番号 8 1 のヌクレオチド 3 4 2 ~ 2 2 2 2 。

10

【請求項 1 0】

前記ベクターは、アデノ随伴ウイルス (A A V) ベクターであり、必要に応じて前記 A A V ベクターは、自己相補的である、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のベクタースタッファー配列。

【請求項 1 1】

前記ベクタースタッファー配列は、異種核酸配列を含む発現構築物に隣接する、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載のベクタースタッファー配列。

20

【請求項 1 2】

前記異種核酸配列は、治療剤をコードする、請求項 1 1 に記載のベクタースタッファー配列。

【請求項 1 3】

前記治療剤は、阻害性核酸をコードする核酸を含む、請求項 1 2 に記載のベクタースタッファー配列。

【請求項 1 4】

前記阻害性核酸は、s i R N A、m i R N A、s h R N A、または d s R N A を含む、請求項 1 3 に記載のベクタースタッファー配列。

【請求項 1 5】

前記阻害性核酸は、神経変性疾患関連遺伝子を標的化する m i R N A を含み、必要に応じて前記神経変性疾患は、脊髄小脳失調症 2 型、筋萎縮性側索硬化症、前頭側頭型認知症、原発性側索硬化症、進行性筋萎縮症、辺縁系優位型加齢性 T D P - 4 3 脳症、慢性外傷性脳症、レビー小体型認知症、大脳皮質基底核変性症、進行性核上性麻痺 (P S P)、グアム島の認知症パーキンソニズム A L S 複合 (G - P D C)、ピック病、海馬硬化症、ハンチントン病、パーキンソン病、またはアルツハイマー病である、請求項 1 4 に記載のベクタースタッファー配列。

30

【請求項 1 6】

前記神経変性疾患は、ポリグルタミン反復病である、請求項 1 5 に記載のベクタースタッファー配列。

40

【請求項 1 7】

前記阻害性核酸は、A T X N 2 を標的化する、請求項 1 3 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載のベクタースタッファー配列。

【請求項 1 8】

前記異種核酸は、

(a) 配列番号 1 ~ 4 および 7 1 から選択されるガイド配列 ;

(b) 配列番号 1 において提供されるガイド配列および配列番号 5 によって提供されるパッセンジャー配列 ; 配列番号 2 において提供されるガイド配列および配列番号 6 によって提供されるパッセンジャー配列 ; 配列番号 3 において提供されるガイド配列および配列番号 7 によって提供されるパッセンジャー配列 ; 配列番号 4 において提供されるガイド配

50

列および配列番号 8 によって提供されるパッセンジャー配列；もしくは配列番号 7 1 によって提供されるガイド配列および配列番号 7 2 によって提供されるパッセンジャー配列；または

(c) 配列番号 9 ~ 1 2 および 7 3 のうちのいずれか 1 つによって提供される配列、を含む人工 m i R N A をコードする、請求項 1 3 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載のベクタースタッファー配列。

【請求項 1 9】

前記発現構築物は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、終結シグナル、またはこれらの任意の組み合わせを含む、請求項 1 1 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載のベクタースタッファー配列。

10

【請求項 2 0】

前記プロモーターは、H 1 プロモーターであり、必要に応じてここで：

(a) 前記 H 1 プロモーターは、配列番号 5 2 ; 配列番号 1 3 ~ 1 6 および 1 8 ~ 2 4 のいずれか 1 つのヌクレオチド 1 1 3 ~ 3 4 3 を含む H 1 ロングプロモーターである；

(b) 前記 H 1 プロモーターは、配列番号 5 3 を含む H 1 プロモーターである；または

(c) 前記 H 1 プロモーターは、配列番号 5 4、または配列番号 1 7、2 5 ~ 2 8、および 3 7 ~ 4 4 のうちのいずれか 1 つのヌクレオチド 1 1 3 ~ 2 0 3 を含む H 1 ショートプロモーターである、

請求項 1 9 に記載のベクタースタッファー配列。

【請求項 2 1】

20

前記終結シグナルは、S V 4 0 終結シグナルであり、必要に応じてここで前記 S V 4 0 終結シグナルは、配列番号 7 7 によって提供される配列を含む、請求項 1 9 または 2 0 に記載のベクタースタッファー配列。

【請求項 2 2】

請求項 1 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載のベクタースタッファー配列を含む組換え A A V ベクター。

【請求項 2 3】

前記 A A V ベクターは、自己相補的である、請求項 2 2 に記載の組換え A A V ベクター。

【請求項 2 4】

前記 A A V ベクターは、前記発現構築物およびベクタースタッファー配列に隣接する 5 ' 逆方向末端反復 (I T R) および 3 ' I T R を含む、請求項 2 2 または 2 3 に記載の組換え A A V ベクター。

30

【請求項 2 5】

前記 5 ' I T R および 3 ' I T R は、A A V 1、A A V 2、A A V 5、A A V 6、A A V 6 . 2、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V R h 1 0、A A V 1 1、およびこれらのバリエーションからなる群より選択される。A A V 血清型から得られる、請求項 2 4 に記載の組換え A A V ベクター。

【請求項 2 6】

前記 5 ' I T R および 3 ' I T R のうちの一方は、機能的末端分解部位を欠いている、請求項 2 4 または 2 5 に記載の組換え A A V ベクター。

40

【請求項 2 7】

前記 5 ' I T R は、機能的末端分解部位を欠いている、請求項 2 6 に記載の組換え A A V ベクター。

【請求項 2 8】

(a) 前記 5 ' I T R は、配列番号 5 7、もしくは配列番号 1 3 ~ 2 4、2 9 ~ 4 4、および 7 8 ~ 8 2 のうちのいずれか 1 つのヌクレオチド 1 ~ 1 0 6 を含む；ならびに / または

(b) 前記 3 ' I T R は、配列番号 5 8 ; 配列番号 1 3 ~ 1 6 のうちのいずれか 1 つのヌクレオチド 2 1 9 2 ~ 2 3 5 8 ; 配列番号 1 7 のヌクレオチド 2 2 2 9 ~ 2 3 9 5 ; 配列番号 1 8 のヌクレオチド 2 1 8 4 ~ 2 3 5 0 ; 配列番号 1 3 ~ 1 6 のうちの

50

いずれか1つのヌクレオチド2214～2358、配列番号17のヌクレオチド2251～2395、配列番号18のヌクレオチド2206～2350、配列番号19のヌクレオチド2206～2350；配列番号20のヌクレオチド2216～2360；配列番号21のヌクレオチド2216～2360；配列番号22のヌクレオチド2206～2350；配列番号23のヌクレオチド2216～2360；配列番号24のヌクレオチド2216～2360；配列番号25のヌクレオチド2161～2305；配列番号26のヌクレオチド2161～2305；配列番号27のヌクレオチド2161～2305；配列番号28のヌクレオチド2161～2305；配列番号29のヌクレオチド2266～2410；配列番号30のヌクレオチド2224～2368；配列番号31のヌクレオチド2216～2360；配列番号32のヌクレオチド2225～2369；配列番号33のヌクレオチド2266～2410；配列番号34のヌクレオチド2224～2368；配列番号35のヌクレオチド2216～2360；配列番号36のヌクレオチド2225～2369；配列番号37のヌクレオチド2257～2401；配列番号38のヌクレオチド2258～2402；配列番号39のヌクレオチド2215～2359；配列番号40のヌクレオチド2207～2351；配列番号41のヌクレオチド2207～2351；配列番号42のヌクレオチド2257～2401；配列番号43のヌクレオチド2215～2359；配列番号44のヌクレオチド2207～2351；配列番号78のヌクレオチド2258～2402；配列番号79のヌクレオチド2267～2411；配列番号80のヌクレオチド2251～2395；配列番号81のヌクレオチド2251～2395；または配列番号82のヌクレオチド2187～2331を含む、請求項24～27のいずれか1項に記載の組換えAAVベクター。

【請求項29】

- (a) 配列番号13～24、29～44、および78～80のうちのいずれか1つのヌクレオチド配列；
- (b) ヌクレオチド344～481が目的のmiRNAをコードする配列で置換されている、配列番号13のヌクレオチド配列；
- (b) ヌクレオチド344～481が目的のmiRNAをコードする配列で置換されている、配列番号14のヌクレオチド配列；
- (c) ヌクレオチド344～481が目的のmiRNAをコードする配列で置換されている、配列番号15のヌクレオチド配列；
- (d) ヌクレオチド344～481が目的のmiRNAをコードする配列で置換されている、配列番号16のヌクレオチド配列；
- (e) ヌクレオチド204～335が目的のmiRNAをコードする配列で置換されている、配列番号17のヌクレオチド配列；
- (f) ヌクレオチド344～481が目的のmiRNAをコードする配列で置換されている、配列番号18のヌクレオチド配列；
- (g) ヌクレオチド344～481が目的のmiRNAをコードする配列で置換されている、配列番号19のヌクレオチド配列；
- (h) ヌクレオチド344～481が目的のmiRNAをコードする配列で置換されている、配列番号20のヌクレオチド配列；
- (i) ヌクレオチド344～481が目的のmiRNAをコードする配列で置換されている、配列番号21のヌクレオチド配列；
- (j) ヌクレオチド344～481が目的のmiRNAをコードする配列で置換されている、配列番号22のヌクレオチド配列；
- (k) ヌクレオチド344～481が目的のmiRNAをコードする配列で置換されている、配列番号23のヌクレオチド配列；
- (l) ヌクレオチド344～481が目的のmiRNAをコードする配列で置換されている、配列番号24のヌクレオチド配列；
- (m) ヌクレオチド213～350が目的のmiRNAをコードする配列で置換されて

- いる、配列番号 29 のヌクレオチド配列；
- (n)ヌクレオチド 213 ~ 350 が目的の miRNA をコードする配列で置換されている、配列番号 30 のヌクレオチド配列；
- (o)ヌクレオチド 213 ~ 350 が目的の miRNA をコードする配列で置換されている、配列番号 31 のヌクレオチド配列；
- (p)ヌクレオチド 213 ~ 350 が目的の miRNA をコードする配列で置換されている、配列番号 32 のヌクレオチド配列；
- (q)ヌクレオチド 213 ~ 350 が目的の miRNA をコードする配列で置換されている、配列番号 33 のヌクレオチド配列；
- (r)ヌクレオチド 213 ~ 350 が目的の miRNA をコードする配列で置換されている、配列番号 34 のヌクレオチド配列； 10
- (s)ヌクレオチド 213 ~ 350 が目的の miRNA をコードする配列で置換されている、配列番号 35 のヌクレオチド配列；
- (t)ヌクレオチド 213 ~ 350 が目的の miRNA をコードする配列で置換されている、配列番号 36 のヌクレオチド配列；
- (u)ヌクレオチド 204 ~ 341 が目的の miRNA をコードする配列で置換されている、配列番号 37 のヌクレオチド配列；
- (v)ヌクレオチド 204 ~ 341 が目的の miRNA をコードする配列で置換されている、配列番号 38 のヌクレオチド配列；
- (w)ヌクレオチド 204 ~ 341 が目的の miRNA をコードする配列で置換されている、配列番号 39 のヌクレオチド配列； 20
- (x)ヌクレオチド 204 ~ 341 が目的の miRNA をコードする配列で置換されている、配列番号 40 のヌクレオチド配列；
- (y)ヌクレオチド 204 ~ 341 が目的の miRNA をコードする配列で置換されている、配列番号 41 のヌクレオチド配列；
- (z)ヌクレオチド 204 ~ 341 が目的の miRNA をコードする配列で置換されている、配列番号 42 のヌクレオチド配列；
- (aa)ヌクレオチド 204 ~ 341 が目的の miRNA をコードする配列で置換されている、配列番号 43 のヌクレオチド配列；
- (bb)ヌクレオチド 204 ~ 341 が目的の miRNA をコードする配列で置換されている、配列番号 44 のヌクレオチド配列； 30
- (cc)ヌクレオチド 204 ~ 342 が目的の人工 miRNA をコードする配列で置換されている、配列番号 78 のヌクレオチド配列；
- (dd)ヌクレオチド 213 ~ 351 が目的の人工 miRNA をコードする配列で置換されている、配列番号 79 のヌクレオチド配列；
- (ee)ヌクレオチド 204 ~ 335 が目的の人工 miRNA をコードする配列で置換されている、配列番号 80 に示されるヌクレオチド配列；または
- (ff)ヌクレオチド 204 ~ 335 が目的の人工 miRNA をコードする配列で置換されている、配列番号 81 に示されるヌクレオチド配列を含む、請求項 22 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の組換え AAV ベクター。 40
- 【請求項 30】
- 請求項 22 ~ 29 のいずれか 1 項に記載の rAAV ベクターを含む、rAAV 粒子。
- 【請求項 31】
- 前記 rAAV 粒子は、キャプシドタンパク質を含む、請求項 30 に記載の rAAV 粒子。
- 【請求項 32】
- 前記キャプシドタンパク質は、血液脳関門を横断する能力がある、請求項 31 に記載の rAAV 粒子。
- 【請求項 33】
- 前記キャプシドタンパク質は、AAV9 キャプシドタンパク質である、請求項 31 または 32 に記載の rAAV 粒子。 50

【請求項 3 4】

治療剤を被験体に送達する方法であって、前記方法は、前記被験体に、請求項 2 8 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の r A A V 粒子を投与することを包含する方法。

【請求項 3 5】

被験体は、神経変性疾患を有するかまたは神経変性疾患を発生させるリスクがある、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記投与は、前記被験体の C N S への直接注射を含む、請求項 3 4 または 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記直接注射は、脳内注射、実質内注射、髄腔内注射、線条体内注射、軟膜下注射、またはこれらの任意の組み合わせである、請求項 3 6 に記載の方法。

10

【請求項 3 8】

前記直接注射は、前記被験体の脳脊髄液 (C S F) への直接注射であり、必要に応じてここで前記直接注射は、大槽内 (intracisternal) 注射、室内注射、および / または腰椎内注射である、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記神経変性疾患は、脊髄小脳失調症 2 型、筋萎縮性側索硬化症、前頭側頭型認知症、原発性側索硬化症、進行性筋萎縮症、辺縁系優位型加齢性 T D P - 4 3 脳症、慢性外傷性脳症、レビー小体型認知症、大脳皮質基底核変性症、進行性核上性麻痺 (P S P)、グアム島の認知症パーキンソニズム A L S 複合 (G - P D C)、ピック病、海馬硬化症、ハンチントン病、パーキンソン病、またはアルツハイマー病である、請求項 3 5 ~ 3 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

配列表に関する陳述

本出願と関連する配列表は、紙による写しの代わりにテキスト形式で提供され、本明細書に参考として援用される。その配列表を含むテキストファイルの名称は、6 3 0 2 6 4 _ 4 0 2 W O _ S E Q U E N C E _ L I S T I N G . t x t である。そのテキストファイルは、1 6 3 K B であり、2 0 2 2 年 2 月 4 日に作成され、E F S - W e b を介して電子提出されている。

30

【背景技術】

【0 0 0 2】

背景

アデノ随伴ウイルス (A A V) ベクターゲノムのサイズには、制約があることが公知であり、4 . 7 k b というおよそ天然のサイズであるベクターサイズは成功裡にパッケージングされているが、遙かにより大きなベクターゲノムは、機能的 A A V ベクターの生成が低減されやすい (W u ら , M o l e c u l a r T h e r a p y 2 0 1 0 1 8 (1) : 8 0 - 8 6) 。他方で、ベクターゲノムパッケージング限界より実質的に小さなベクターゲノムは、最適未満のパッケージングを生じ得る (D o n g ら , H u m a n g e n e t h e r a p y 1 9 9 6 7 : 2 1 0 1 - 2 1 1 2) 。また c i s プラスミドが、その意図された A A V ベクターゲノムにサイズに近い「骨格」配列 (例えば、代表的には、細菌の中でそのプラスミドを増殖させるために必要とされる、細菌の耐性の源泉および抗生物質耐性のエレメントをコードする) を有する場合、意図されない「逆パッケージング」配列の量が増加し得る (H a u c k ら , M o l e c u l a r T h e r a p y (2 0 0 9) 1 7 : 1 4 4 - 1 5 2) 。これらの理由から、プラスミド骨格中の物質として、および意図された A A V ペイロードが、天然の A A V パッケージングサイズよりかなり小さい状況における使用のために、パッケージングされた A A V にそれ自体では不都合な特性を付与しない「スタッパー配列」を含めることは、有益であり得る。不活性化

40

50

スタッファー配列の重要性は、Keiserら, Nature Medicine (2021) 27:1982-1989によって強調されており、それによって、スタッファー配列を有する「ペイロードのない」AAVが、非ヒト霊長類において実質的な毒性を誘導する能力があることが示された。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0003】

【非特許文献1】Wuら, Molecular Therapy 2010 18(1): 80-86

【非特許文献2】Dongら, Human gene therapy 1996 7: 2101-2112 10

【非特許文献3】Hauckら, Molecular Therapy (2009) 17:144-152

【非特許文献4】Keiserら, Nature Medicine (2021) 27:1982-1989

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

改善されたパッケージング特徴を有するAAVベクターが現在必要とされている。

【図面の簡単な説明】 20

【0005】

【図1-1】図1:塩基配列内の発現される領域、既知のもしくは推定される調節エレメントおよび反復エレメント(レトロウイルスエレメントおよび転位因子を含む)を特定するために、UCSCゲノムブラウザで選択されたトラック。

【図1-2】同上。

【図2A】図2A~2Bは、ピヒクルまたはscAAV9ベクターを静脈内に投与したマウスの処理済み血清を投与して13日後に測定した肝酵素機能試験(図2A)アスパラギン酸トランスアミナーゼ(AST; U/L)および(図2B)アラニントランスアミナーゼ(ALT; U/L)を示す。コントロールマウスと比較した場合、スタッファーのみのベクターは、ALTまたはASTのいずれにおいても有意な上昇を有しなかったのに対して、毒性陽性コントロール人工miRNAにおけるベクター発現は、肝酵素ALTおよびASTにおいて実質的かつ有意な上昇を誘発した(一元配置ANOVA、ダネットの多重比較検定)。全ての群は、毒性陽性コントロール(N=3)を除いてN=5であった。

【図2B】同上。

【図3A】図3A~3Hは、カラム精製したscAAV9ベクターDNAのFragment Analyzerトレースを示す。代表的なベクターを使用して、図3Aは、標準的な高分子量二重ピークを示し、その二重ピークは、mutITR(二重ピークは保持される; 図3B)またはwtITRs(ここでは単一のピーク; 図3C)の酵素切断に際して、上記二重ピークが全長集団を表すことを明らかに示す。図3Dは、精製されたscAAV9ベクターDNAのFragment Analyzerトレースの3つの構成要素: 最高の分子量において2つのピークによって表されるとおりの全長ベクター、次のピーク、またはmiR中心の短縮、および最後に、スタッファー配列内で起こる短縮、を表示する。図3Eでは、それぞれ、上のトレースおよび下のトレースにおける、scAAV9 H1 MCS構築物、PSG11_V1およびPSG11_V2についてのトレースである。図3Fで示されるトレースにおいて、重ね合わせた場合、PSG11_V2は、PSG11_V1と比較して、より高濃度の短縮を有する。図3Gでは、人工miRNA miR-1-1 XD-14792(XD-14792は本明細書で1784ともいわれる)が埋め込まれたPSG11_V1ベクター(上)およびPSG11_V2ベクター(下)のFragment Analyzerトレースである。図3Hは、図3Gにお 40 50

けるトレースの重ね合わせを示す。miR中心のピーク(矢印)のサイズによって証明されるように、miR中心の短縮は、PSG11_V2と比較して、PSG11_V1において低減される。

【図3B】同上。

【図3C】同上。

【図3D】同上。

【図3H】同上。

【図4A-1】図4A~4Bは、Mfoldウェブサーバーを使用して、PSG11_V1(図4A)およびPSG11_V2(図4B)の人工miRNAおよびターミネーターに隣接する200ヌクレオチドの推定される二次構造を示す。より低い負のGibbs(negative Gibbs)自由エネルギー値および二次構造の相対的欠如によって証明されるように、PSG11_V1は、PSG11_V2と比較して、人工miRNAに隣接したより望ましい推定DNA二次構造を有する。

10

【図4A-2】同上。

【図4B-1】同上。

【図4B-2】同上。

【図4B-3】同上。

【図5A】図5A~5Bは、ベクター構成試験の肝酵素値(図5A - AST; 図5B - ALT)を示す。

【図5B】同上。

20

【図6】図6は、H1ロングプロモーター、miR-100骨格のamiRNA 3330およびPSG11_V5スタッファー、を有する代表的ベクター(左)、ならびにH1ショートプロモーター、miR-1-1骨格のamiRNA 1784(本明細書で14792ともいわれる)およびPSG11_V5スタッファーを有する代表的なベクター(右)からの標準的RNAseqトレースを示す。

【図7】図7は、ベクター構成試験において試験した24の構築物の力価を示す。H1ロングプロモーター(左列)を含むベクターは、H1天然プロモーター(中央)およびH1ショートプロモーター(右)の両方と比較して、一貫してより高い力価を有した。

【図8A】図8A~8Cは、Fragment Analyzer平行キャピラリー電気泳動システムによって測定される場合のAMELY_V3およびPSG11_V5スタッファー配列を有するscAAV9ベクターについてのmiRおよびスタッファー短縮を示す。図8Aにおいて、全3種のプロモーターの状況、H1ロング(左パネル)、H1天然(中央パネル)、およびH1ショート(右パネル)、ならびにSV40ポリアデニル化配列なし(丸)およびあり(三角)の両方にわたって、miR100は、AMELY_V3およびPSG11_V5ベクターの両方において、miR1-1と比較してより少ないmiR短縮を有する。図8Bにおいて、H1ロングプロモーターを有する、SV40ポリアデニル化配列ありおよびなしの両方のベクターは、H1天然プロモーターおよびH1ショートプロモーターを有するベクターと比較して、より少ないスタッファー短縮を有する。図8Cにおいて、H1ロングプロモーターを有する、SV40ポリアデニル化配列ありおよびなしの両方のベクターは、H1天然プロモーターを有するベクターおよびH1ショートプロモーターを有するベクターと比較して、組み合わされたmiR/スタッファー短縮においてより少ない短縮を有する。

30

40

【図8B】同上。

【図8C】同上。

【発明を実施するための形態】

【0006】

詳細な説明

本開示をより詳細に示す前に、本明細書で使用されることになるある特定の用語の定義を提供することは、本開示の理解に助けになり得る。さらなる定義は、本開示全体を通じて示される。

50

【0007】

本説明において、任意の濃度範囲、パーセンテージ範囲、比の範囲、または整数範囲は、その記載される範囲内の任意の整数および適切な場合、別段示されなければ、その分数（例えば、整数の $1/10$ および $1/100$ ）の値を含むと理解されるべきである。また、任意の物理的特徴（例えば、ポリマーサブユニット、サイズまたは厚み）に関する本明細書で記載される任意の数値範囲は、別段示されなければ、その記載される範囲内の任意の整数を含むと理解されるべきである。本明細書で使用される場合、用語「約（about）」は、別段示されなければ、示された範囲、値、または構造の $\pm 20\%$ を意味する。用語「1つの、ある（a）」および「1つの、ある（an）」は、本明細書で使用される場合、その列挙される構成要素の「1またはこれより多い（one or more）」に言及することが理解されるべきである。選択肢（例えば、「または（or）」）の使用は、その選択肢のうちの一つ、両方、またはこれらの任意の組み合わせのいずれかを意味することが理解されるべきである。本明細書で使用される場合、用語「含む、包含する、が挙げられる（include）」、「有する（have）」および「含む、包含する（comprise）」は、同義的に使用され、これら用語およびその変形は、限定でないと解釈されることが意図される。

10

【0008】

本明細書で使用される場合、用語「核酸」または「ポリヌクレオチド」は、共有結合的に連結されたヌクレオチドサブユニット（例えば、ポリデオキシリボヌクレオチドまたはポリリボヌクレオチド）から構成される任意の核酸ポリマーに言及する。核酸の例としては、RNAおよびDNAが挙げられる。

20

【0009】

本明細書で使用される場合、「RNA」とは、1またはこれより多くのリボヌクレオチドを含む分子に言及し、2本鎖RNA、1本鎖RNA、単離されたRNA、合成RNA、組換えRNA、ならびに1またはこれより多くのヌクレオチドの付加、欠失、置換および/または変更によって天然に存在するRNAとは異なる改変されたRNAを含む。RNA分子のヌクレオチドは、標準的なヌクレオチドまたは非標準的なヌクレオチド（例えば、天然に存在しないヌクレオチドまたは化学合成されたヌクレオチド）を含み得る。

【0010】

本明細書で使用される場合、「DNA」とは、1またはこれより多くのデオキシリボヌクレオチドを含む分子に言及し、2本鎖DNA、1本鎖DNA、単離されたDNA、合成DNA、組換えDNA、ならびに1またはこれより多くのヌクレオチドの付加、欠失、置換および/または変更によって天然に存在するDNAとは異なる改変されたDNAを含む。DNA分子のヌクレオチドは、標準的なヌクレオチドまたは非標準的なヌクレオチド（例えば、天然に存在しないヌクレオチドまたは化学合成されたヌクレオチド）を含み得る。

30

【0011】

「単離された」とは、その天然の環境から単離されているかまたは人工的に生成されている物質に言及する。細胞に関して本明細書で使用される場合、「単離された」とは、その天然の環境から（例えば、被験体、器官、組織、または体液から）単離されている細胞に言及する。核鎖に関して本明細書で使用される場合、「単離された」とは、その天然の環境から（例えば、細胞、細胞小器官、または細胞質から）単離もしくは精製されているか、組換え生成されているか、増幅されているか、または合成されている核酸に言及する。実施形態において、単離された核酸は、ベクター内に含まれる核酸を含む。

40

【0012】

本明細書で使用される場合、用語遺伝子の「野生型」または「非変異体」形態とは、通常のまたは非病原性の活性と関連するタンパク質（例えば、変異（例えば、神経変性疾患の発生、開始、または進行のより高いリスクを生じる反復領域拡大）を欠いているタンパク質）をコードする核酸に言及する。

【0013】

50

本明細書で使用される場合、用語「変異」とは、遺伝子の構造、例えば、遺伝子配列における任意の変化であって、その遺伝子の変化した形態を生じるものに言及する。変異は、次世代に伝わってもよいし（遺伝性変異）、伝わらなくてもよい（体細胞変異）。遺伝子変異は、DNA中の1個の塩基の置換、挿入、または欠失、または遺伝子もしくは染色体の複数の塩基もしくはより大きな部分の置換、挿入、欠失、もしくは再構成（反復拡大を含む）を含む。

【0014】

本明細書で使用される場合、用語「阻害性核酸」とは、標的核酸（例えば、神経変性疾患標的RNA、mRNA、pre-mRNA、または成熟mRNA）の少なくとも一部分にハイブリダイズし、その発現または活性を阻害するガイド鎖配列を含む核酸に言及する。阻害性核酸は、標的核酸のタンパク質コード領域（例えば、エキソン）または非コード領域（例えば、5'UTR、3'UTR、イントロンなど）を標的化し得る。いくつかの実施形態において、阻害性核酸は、1本鎖または2本鎖の分子である。阻害性核酸は、別個の鎖上に（例えば、2本鎖の二重鎖（double stranded duplex））または同じ鎖の中に（例えば、1本鎖の自己アニーリング二重鎖構造）パッセンジャー鎖配列をさらに含み得る。いくつかの実施形態において、阻害性核酸は、RNA分子（例えば、siRNA、shRNA、miRNA、またはdsRNA）である。

【0015】

本明細書で使用される場合、「マイクロRNA」または「miRNA」とは、標的mRNAの切断、標的mRNAの翻訳抑制、標的mRNA分解、またはこれらの組み合わせによって標的遺伝子のサイレンシングを媒介する能力がある小さな非コードRNA分子をいう。代表的には、miRNAは、一次miRNA（pri-miRNA）ともいわれるヘアピンまたはステム-ループ（例えば、自己相補的1本鎖骨格を有する）二重鎖構造として転写され、これは、pre-miRNAへと酵素によりプロセッシングされる（例えば、Drosha、DGCR8、Pashaなどによって）。Pre-miRNAは、細胞質へとエクスポートされ、細胞質では、Dicerによって酵素によりプロセッシングされて、パッセンジャー鎖とともにmiRNA二重鎖を生成し、次いで、1本鎖成熟miRNA分子を生成し、これは、その後、RNA誘導性サイレンシング複合体（RISC）へとロードされる。miRNAへの言及は、合成または人工miRNAを含み得る。

【0016】

本明細書で使用される場合、「合成miRNA」または「人工miRNA」または「amiRNA」とは、内因性の、改変された、もしくは合成のpri-miRNAまたはpre-miRNA（例えば、miRNA骨格または足場）であって、ここでステム配列内の内因性miRNAガイド配列およびパッセンジャー配列が、標的化された遺伝子の高度に効率的なRNAサイレンシングを指示するmiRNAガイド配列およびmiRNAパッセンジャー配列で置き換えられているものに言及する（例えば、Eamensら、Methods Mol. Biol. (2014) 1062:211-224を参照のこと）。いくつかの実施形態において、ガイド配列およびパッセンジャー配列の相補性の性質（例えば、塩基数、ミスマッチの位置、バルジのタイプなど）は、合成miRNAが構築される内因性miRNA骨格におけるガイド配列およびパッセンジャー配列の相補性の性質と類似または異なり得る。

【0017】

本明細書で使用される場合、用語「マイクロRNA骨格」、「miR骨格」、「マイクロRNA足場」、または「miR足場」とは、pri-miRNAまたはpre-miRNA足場であって、そのステム配列が目的のmiRNAによって置き換えられ、目的のmiRNAによって標的化される遺伝子においてRNAサイレンシングを指示する機能的な成熟miRNAを生成することができるpri-miRNAまたはpre-miRNA足場に言及する。miR骨格は、5'隣接領域（5'miRコンテクストともいわれ、9ヌクレオチド）、miRNA二重鎖（ガイド鎖配列およびパッセンジャー鎖配列）を含むステム領域、ならびに基部ステム（basal stem）（5'および3'、各約4~13

ヌクレオチド)、末端ループを含む少なくとも1つのループモチーフ領域(末端ループについては10ヌクレオチド)、3'隣接領域(3'miRコンテキストともいわれ、9ヌクレオチド)、ならびに必要なに応じてステムにおいて1個もしくはこれより多くのバルジを含む。miR骨格は、野生型miRNA足場から完全にもしくは部分的に由来してもよいし、完全に人工配列であってもよい。

【0018】

本明細書で使用される場合、用語、阻害性核酸の「アンチセンス鎖配列」または「ガイド鎖配列」は、サイレンシングのために標的化される遺伝子のmRNAの約10~50ヌクレオチド(例えば、約15~30ヌクレオチド、16~25ヌクレオチド、18~23ヌクレオチド、または19~22ヌクレオチド)の領域に対して実質的に相補的(例えば、少なくとも45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%相補的)である配列に言及する。上記アンチセンス配列は、標的的特異的サイレンシングを指示するために、例えば、RNAi機構またはプロセスによって標的mRNAの破壊を誘発するために、標的mRNA配列に対して十分に相補的である。いくつかの実施形態において、上記アンチセンス配列またはガイド鎖配列とは、Dicerによる切断後に残っている成熟配列に言及する。

【0019】

本明細書で使用される場合、用語、阻害性核酸の「センス配列」または「パッセンジャー鎖配列」とは、標的mRNAに相同性であり、かつ阻害性核酸の上記アンチセンス鎖配列またはガイド鎖配列に対して部分的にもしくは完全に相補的である配列に言及する。阻害性核酸のアンチセンス鎖配列およびセンス鎖配列は、二重鎖構造を形成する(例えば、2本鎖の二重鎖または1本鎖の自己アニーリング二重鎖構造を形成する)ためにハイブリダイズされる。いくつかの実施形態において、上記センス配列またはパッセンジャー鎖配列とは、Dicerによる切断後に残っている成熟配列に言及する。

【0020】

本明細書で使用される場合、「二重鎖」とは、阻害性核酸に言及して使用される場合、二重鎖構造を形成するために一緒にハイブリダイズしている2つの核酸鎖(例えば、ガイド鎖およびパッセンジャー鎖)に言及する。二重鎖は、2つの別個の核酸鎖によって、または自己相補性の領域を有する単一の核酸鎖(例えば、ヘアピンまたはステム-ループ)によって、形成され得る。

【0021】

本明細書で使用される場合、用語「相補的」とは、ポリヌクレオチドが互いと塩基対を形成する能力に言及する。塩基対は、代表的には、アンチパラレルポリヌクレオチド鎖または単一の自己アニーリングポリヌクレオチド鎖におけるヌクレオチドサブユニット間の水素結合によって形成される。相補的ポリヌクレオチド鎖は、Watson-Crick様式(例えば、AとT、AとU、CとG)において、または二重鎖の形成を可能にする任意の他の様式において塩基対を形成し得る。当業者に明らかなように、DNAとは対照的にRNAを使用する場合、アデノシンに対して相補的であると考えられる塩基は、チミンではなくウラシルである。さらに、「U」が本発明の文脈において示される場合、別段述べられなければ、「T」を置き換えることができることが理解される。相補的はまた、改変されていない核酸塩基と改変された核酸塩基(例えば、シトシンの代わりに使用される5-メチルシトシン)との間でのWatson-Crick塩基対合を包含する。2つのポリヌクレオチド鎖間で完全な相補性(full complementarity)、完全な相補性(perfect complementarity)または100%相補性とは、1つのポリヌクレオチド鎖の各ヌクレオチドが、第2のポリヌクレオチド鎖のヌクレオチド単位と水素結合を形成し得る場合である。%相補性とは、整列させた参照配列(例えば、標的mRNA、パッセンジャー鎖)に対して相補的である核酸分子中の連続したヌクレオチド配列のヌクレオチド数を、全ヌクレオチド数で除算し、100を乗算したものに言及する。このようなアラインメントにおいて、塩基対を形成しない核酸塩基/ヌクレオチドは、ミスマッチと称される。挿入および欠失は、連続したヌクレオチド配列の%相補性を計算するにあたっては許

容されない。相補性を計算するにあたって、核酸塩基に対する化学的変化は、核酸塩基の Watson - Crick 塩基対合能力が保持される限りにおいて考慮されないことは、当業者によって理解される（例えば、5 - メチルシトシンは、%相補性を計算する目的ではシトシンと同じと見做される）。

【0022】

2つまたはこれより多くの核酸配列間の「パーセント同一性」とは、参照配列によって共有される核酸分子における連続したヌクレオチド配列のヌクレオチド割合（すなわち、%同一性 = 同一ヌクレオチドの数 / 整列させた領域におけるヌクレオチドの総数（例えば、連続したヌクレオチド配列）× 100）に言及する。挿入および欠失は、連続したヌクレオチド配列の%同一性を計算するにあたっては許容されない。同一性を計算するにあたって、核酸塩基に対する化学的変化は、核酸塩基の Watson - Crick 塩基対合能力が保持される限りにおいて考慮されないことは、当業者によって理解される（例えば、5 - メチルシトシンは、%同一性を計算する目的ではシトシンと同じと見做される）。

10

【0023】

本明細書で使用される場合、用語「ハイブリダイズすること (hybridizing)」または「ハイブリダイズする (hybridizes)」とは、アンチパラレル鎖上の塩基対間で水素結合を形成し、それによって二重鎖を形成する2つの核酸鎖に言及する。2つの核酸鎖間のハイブリダイゼーションの強度は、融解温度 (T_m) によって記載され得、その温度は、所定のイオン強度および pH において、標的配列の 50% が相補的ポリヌクレオチドにハイブリダイズする温度として定義される。

20

【0024】

本明細書で使用される場合、「発現構築物」とは、配列をコードする核酸の一部または全てが転写され得る前記核酸（例えば、導入遺伝子）を含む遺伝子構築物の任意のタイプに言及する。いくつかの実施形態において、発現は、例えば、生物学的に活性なポリペプチド生成物または阻害性 RNA（例えば、siRNA、shRNA、miRNA）を転写された遺伝子から生成するために、核酸の転写を含む。いくつかの実施形態において、上記導入遺伝子は、発現制御配列に作動可能に連結される。

【0025】

本明細書で使用される場合、用語「導入遺伝子」とは、天然にまたは遺伝子操作手段によって、別の細胞へと移入され、転写され、必要に応じて翻訳され得る外因性核酸に言及する。

30

【0026】

本明細書で使用される場合、用語「遺伝子発現」とは、核酸が核酸分子から転写され、ペプチドまたはタンパク質へとしばしば翻訳されるプロセスに言及する。上記プロセスは、転写、転写後制御、転写後修飾、翻訳、翻訳後制御、翻訳後修飾、またはこれらの任意の組み合わせを含み得る。「遺伝子発現」の測定への言及は、転写生成物（例えば、RNA または mRNA）、翻訳生成物（例えば、ペプチドまたはタンパク質）の測定に言及し得る。

【0027】

本明細書で使用される場合、用語「遺伝子の発現を阻害する」とは、遺伝子の発現を低減する、ダウンレギュレートする、抑制する、遮断する、減少させる、または停止させることを意味する。遺伝子の発現生成物は、その遺伝子から転写された RNA 分子（例えば、mRNA）またはその遺伝子から転写された mRNA から翻訳されたポリペプチドであり得る。代表的には、mRNA のレベルの低減は、そこから翻訳されるポリペプチドのレベルの低減を生じる。発現のレベルは、mRNA またはタンパク質を測定するための標準的技術を使用して決定され得る。

40

【0028】

本明細書で使用される場合、「ベクター」とは、核酸分子（例えば、阻害性核酸をコードする導入遺伝子）を細胞間で輸送し、適切な発現制御配列に作動可能に連結されている場合に、その核酸分子の発現をもたらすことができる遺伝子構築物に言及する。発現制御配

50

列としては、以下が挙げられ得る： 転写開始配列、終結配列（本明細書においてターミネーター配列ともいわれる）、プロモーター配列およびエンハンサー配列；スプライシングおよびポリアデニル化（ポリA）シグナルのような効率的RNAプロセッシングシグナル；細胞質mRNAを安定化させる配列；翻訳効率を増強する配列（すなわち、Kozakコンセンサス配列）；タンパク質安定性を増強する配列；および所望される場合、コードされる生成物の分泌を増強する配列。上記ベクターは、プラスミド、ファージ粒子、トランスポゾン、コスミド、ファージミド、染色体、人工染色体、ウイルス、ピリオンなどであり得る。適切な宿主細胞へといった形質転換されると、上記ベクターは、宿主ゲノムとは無関係に複製および機能してもよいし、場合によっては、ゲノム自体に組み込まれてもよい。

10

【0029】

本明細書で使用される場合、「宿主細胞」とは、目的の組成物（例えば、阻害性核酸）を含むか、または含む能力のある任意の細胞をいう。実施形態において、宿主細胞は、哺乳動物細胞（例えば、齧歯類細胞（マウスもしくはラット）または霊長類細胞（サル、チンパンジー、もしくはヒト））である。実施形態において、宿主細胞は、インビトロまたはインビボにあり得る。実施形態において、宿主細胞は、樹立細胞株または初代細胞に由来し得る。実施形態において、宿主細胞は、CNSの細胞（例えば、ニューロン、グリア細胞、星細胞、およびミクログリア細胞）である。

【0030】

本明細書で使用される場合、「神経変性疾患」または「神経変性障害」とは、病的状態としての神経細胞死を示す疾患または障害をいう。神経変性疾患は、慢性的な神経変性、例えば、数年間の期間にわたるゆっくりとした進行性の神経細胞死、または急性的な神経変性、例えば、突然の発生または神経細胞死を示し得る。慢性的な神経変性疾患の例としては、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、脊髄小脳失調症2型（SCA2）、前頭側頭型認知症（FTD）、および筋萎縮性側索硬化症（ALS）が挙げられる。慢性的な神経変性疾患は、TDP-43プロテノパチー（核から細胞質への誤った局在化、ユビキチン化および高リン酸化されたTDP-43の封入体への沈着、毒性のC末端TDP-43フラグメントの形成をもたらすタンパク質短縮、ならびにタンパク質凝集によって特徴づけられる）を特徴とする疾患を含む。TDP-43プロテノパチー疾患としては、ALS、FTD、原発性側索硬化症、進行性筋萎縮症、辺縁系優位型加齢性TDP-43脳症、慢性外傷性脳症、レビー小体型認知症、大脳皮質基底核変性症、進行性核上性麻痺（PSP）、グアム島の認知症パーキンソニズムALS複合（dementia Parkinsonism ALS complex of guam）（G-PDC）、ピック病、海馬硬化症、ハンチントン病、パーキンソン病、およびアルツハイマー病が挙げられる。急性の神経変性は、虚血（例えば、脳卒中、外傷性脳傷害）、脱髄または外傷による軸索離断（例えば、脊髄損傷または多発性硬化症）によって引き起こされ得る。神経変性疾患は、主に1つの種類のニューロンまたは複数の種類のニューロンの死を示し得る。

20

30

【0031】

本明細書で使用される場合、「被験体」、「患者」および「個体は、本明細書で交換可能に使用され、処置または治療のために選択された、生きている生物（例えば、哺乳動物）をいう。被験体の例としては、ヒトおよび非ヒト哺乳動物（例えば、霊長類（サル、チンパンジー）、ウシ、ウマ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ラット、マウス、モルモット、ブタ、およびこれらのトランスジェニック種）が挙げられる。

40

【0032】

スタッファー配列および発現構築物

AAVは、全長ゲノム、すなわち、天然のゲノムとほぼ同じサイズであり、多く過ぎも小さすぎもしないものを優先的にパッケージする。しかし、阻害性核酸配列をコードする発現カセットは、AAV全長ゲノムより実質的に小さい。フラグメント化されたゲノムのパッケージングを回避するために、スタッファー配列は、異種核酸配列を含む発現構築物に連結し、5' ITRおよび3' ITRによって挟んで、パッケージング可能なゲノム

50

を拡大することができ、その結果、上記 I T R 間の長さにおいてサイズがほぼ通常であるゲノムを生じた。一般に、A A V のパッケージング能力は、5' I T R と 3' I T R との間で約 4.7 kb である。自己相補的 A A V (s c A A V) ベクターに関しては、そのパッケージング能力は、5' I T R と 3' I T R との間で約 2.4 kb である。

【0033】

好ましくは、ベクタースタッパー配列を得るための出発配列は、哺乳動物起源（例えば、ヒト起源）のものである。スタッパー配列の長さは、ベクターゲノムが A A V キャプシドの（天然の）パッケージング限界であるかまたはその付近であるように調整され得る。さらに、ベクタースタッパー配列は、インビボでの遺伝子療法の文脈において有害作用を最小限にするように設計され得る。例えば、ヒトゲノムの領域は、ゲノム中の組み込みが起こる場合に最小限の影響を、および予測外の転写を開始する最小限のリスクを有する配列を特定することによって、ベクタースタッパー配列の供給源として特定され得る。従って、上記ゲノムの領域は、以下のものにおいて調べられ得る： i) 欠失および重複が集団において一般的でありかつ疾患関連表現型と関連しない（進化圧 (e v o l u t i o n a r y p r e s s u r e) の証拠がない）、ならびに / または ii) ヒト組織にわたる R N A 発現が低いか、または検出不能であった（強い固有のエンハンサー / プロモーターエレメントを欠いている）。さらに、ベクタースタッパー配列は、ベクター配列を不活性または安全にするために、1 またはこれより多くのエレメントを低減、最小化、除去、または欠如するように設計され得る。いくつかの実施形態において、ベクタースタッパー配列は、以下のように改変される： 発現された領域（例えば、両側にエキソン + 10 b p、ヒト E S T s）を低減または除去する； 調節エレメント（例えば、プロモーター配列、エンハンサー配列、リプレッサー配列、スプライシングドナーもしくはアクセプター、または導入遺伝子の転写に潜在的に影響を及ぼし得るヒトゲノムにおいて見出される他のシス作用性エレメント）を低減または除去する； 反復エレメント（例えば、マイクロサテライト反復、ジヌクレオチド反復、トリヌクレオチド反復）を低減または除去する； A T G コドン を低減、除去、または改変して、ペプチドが潜伏性開始コドンに起因してフィラー配列もしくはスタッパー配列から生成される可能性を低減または排除する； C p G ジヌクレオチドを低減または排除して、自然免疫応答を誘導する（細菌において生成される c i s プラスミドからの）非メチル化 C p G ジヌクレオチドの尤度を下げる； またはこれらの任意の組み合わせ。本開示は、前述の特徴のうちの 1 またはこれより多くのものを有し、以下のうちの 1 またはこれより多くのさらなる特徴： 高力価； 低毒性； ならびに m i R N A および / もしくはスタッパー配列における低減された短縮を有するベクタースタッパー配列を提供する。

【0034】

1 つの局面において、本開示は、約 1300 ~ 約 2300 ヌクレオチドの長さの、以下と少なくとも 75% 同一性を有する核酸を含むベクタースタッパー配列を提供する： 配列番号 13 ~ 16 のいずれか 1 つのヌクレオチド 489 ~ 2185； 配列番号 17 のヌクレオチド 342 ~ 2222； 配列番号 18 のヌクレオチド 488 ~ 2177； 配列番号 19 のヌクレオチド 489 ~ 2177； 配列番号 20 のヌクレオチド 711 ~ 2187； 配列番号 21 のヌクレオチド 711 ~ 2187； 配列番号 22 のヌクレオチド 488 ~ 2177； 配列番号 23 のヌクレオチド 711 ~ 2187； 配列番号 24 のヌクレオチド 711 ~ 2187； 配列番号 25 のヌクレオチド 252 ~ 2132； 配列番号 26 のヌクレオチド 252 ~ 2132； 配列番号 27 のヌクレオチド 252 ~ 2132； 配列番号 28 のヌクレオチド 252 ~ 2132； 配列番号 29 のヌクレオチド 357 ~ 2237； 配列番号 30 のヌクレオチド 358 ~ 2195； 配列番号 31 のヌクレオチド 580 ~ 2187； 配列番号 32 のヌクレオチド 580 ~ 2196； 配列番号 33 のヌクレオチド 357 ~ 2237； 配列番号 34 のヌクレオチド 358 ~ 2195； 配列番号 35 のヌクレオチド 580 ~ 2187； 配列番号 36 のヌクレオチド 580 ~ 2196； 配列番号 37 のヌクレオチド 348 ~ 2228； 配列番号 38 のヌクレオチド 349 ~ 2229； 配列番号 39 のヌクレオチド 349 ~ 2186；

配列番号 40 のヌクレオチド 571 ~ 2178 ; 配列番号 41 のヌクレオチド 571 ~ 2178 ; 配列番号 42 のヌクレオチド 348 ~ 2228 ; 配列番号 43 のヌクレオチド 349 ~ 2186 ; 配列番号 44 のヌクレオチド 571 ~ 2178 ; 配列番号 78 のヌクレオチド 349 ~ 2229 ; 配列番号 79 のヌクレオチド 358 ~ 2238 ; 配列番号 80 のヌクレオチド 342 ~ 2222 ; 配列番号 81 のヌクレオチド 342 ~ 2222 ; 配列番号 45 ; 配列番号 46 ; 配列番号 47 ; 配列番号 48 ; 配列番号 49 , 配列番号 50 ; または配列番号 51 。

【 0035 】

いくつかの実施形態において、上記ベクタースタッファー配列は、約 1500 ~ 2000 ヌクレオチドの長さの、以下と少なくとも 75% 同一性を有する核酸を含む： 配列番号 13 ~ 16 のいずれか 1 つのヌクレオチド 489 ~ 2185 ; 配列番号 17 のヌクレオチド 342 ~ 2222 ; 配列番号 18 のヌクレオチド 488 ~ 2177 ; 配列番号 19 のヌクレオチド 489 ~ 2177 ; 配列番号 20 のヌクレオチド 711 ~ 2187 ; 配列番号 21 のヌクレオチド 711 ~ 2187 ; 配列番号 22 のヌクレオチド 488 ~ 2177 ; 配列番号 23 のヌクレオチド 711 ~ 2187 ; 配列番号 24 のヌクレオチド 711 ~ 2187 ; 配列番号 25 のヌクレオチド 252 ~ 2132 ; 配列番号 26 のヌクレオチド 252 ~ 2132 ; 配列番号 27 のヌクレオチド 252 ~ 2132 ; 配列番号 28 のヌクレオチド 252 ~ 2132 ; 配列番号 29 のヌクレオチド 357 ~ 2237 ; 配列番号 30 のヌクレオチド 358 ~ 2195 ; 配列番号 31 のヌクレオチド 580 ~ 2187 ; 配列番号 32 のヌクレオチド 580 ~ 2196 ; 配列番号 33 のヌクレオチド 357 ~ 2237 ; 配列番号 34 のヌクレオチド 358 ~ 2195 ; 配列番号 35 のヌクレオチド 580 ~ 2187 ; 配列番号 36 のヌクレオチド 580 ~ 2196 ; 配列番号 37 のヌクレオチド 348 ~ 2228 ; 配列番号 38 のヌクレオチド 349 ~ 2229 ; 配列番号 39 のヌクレオチド 349 ~ 2186 ; 配列番号 40 のヌクレオチド 571 ~ 2178 ; 配列番号 41 のヌクレオチド 571 ~ 2178 ; 配列番号 42 のヌクレオチド 348 ~ 2228 ; 配列番号 43 のヌクレオチド 349 ~ 2186 ; 配列番号 44 のヌクレオチド 571 ~ 2178 ; 配列番号 78 のヌクレオチド 349 ~ 2229 ; 配列番号 79 のヌクレオチド 358 ~ 2238 ; 配列番号 80 のヌクレオチド 342 ~ 2222 ; 配列番号 81 のヌクレオチド 342 ~ 2222 ; 配列番号 45 ; 配列番号 46 ; 配列番号 47 ; 配列番号 48 ; 配列番号 49、配列番号 50 ; または配列番号 51 。

【 0036 】

いくつかの実施形態において、上記ベクタースタッファー配列は、約 1600 ~ 1900 ヌクレオチドの長さの、以下と少なくとも 75% 同一性を有する核酸を含む： 配列番号 13 ~ 16 のいずれか 1 つのヌクレオチド 489 ~ 2185 ; 配列番号 17 のヌクレオチド 342 ~ 2222 ; 配列番号 18 のヌクレオチド 488 ~ 2177 ; 配列番号 19 のヌクレオチド 489 ~ 2177 ; 配列番号 20 のヌクレオチド 711 ~ 2187 ; 配列番号 21 のヌクレオチド 711 ~ 2187 ; 配列番号 22 のヌクレオチド 488 ~ 2177 ; 配列番号 23 のヌクレオチド 711 ~ 2187 ; 配列番号 24 のヌクレオチド 711 ~ 2187 ; 配列番号 25 のヌクレオチド 252 ~ 2132 ; 配列番号 26 のヌクレオチド 252 ~ 2132 ; 配列番号 27 のヌクレオチド 252 ~ 2132 ; 配列番号 28 のヌクレオチド 252 ~ 2132 ; 配列番号 29 のヌクレオチド 357 ~ 2237 ; 配列番号 30 のヌクレオチド 358 ~ 2195 ; 配列番号 31 のヌクレオチド 580 ~ 2187 ; 配列番号 32 のヌクレオチド 580 ~ 2196 ; 配列番号 33 のヌクレオチド 357 ~ 2237 ; 配列番号 34 のヌクレオチド 358 ~ 2195 ; 配列番号 35 のヌクレオチド 580 ~ 2187 ; 配列番号 36 のヌクレオチド 580 ~ 2196 ; 配列番号 37 のヌクレオチド 348 ~ 2228 ; 配列番号 38 のヌクレオチド 349 ~ 2229 ; 配列番号 39 のヌクレオチド 349 ~ 2186 ; 配列番号 40 のヌクレオチド 571 ~ 2178 ; 配列番号 41 のヌクレオチド 571 ~ 2178 ; 配列番号 42 のヌクレオチド 348 ~ 2228 ; 配列番号 43 のヌクレオチド 349 ~ 2186 ; 配列番号 44 のヌクレオチド 571 ~ 2178 ; 配列番号 78 のヌクレオチド 349 ~ 2229 ; 配列番号 79 のヌクレオチド 358 ~ 2238 ; 配列番号 80 のヌクレオチド 342 ~ 2222 ; 配列番号 81 のヌクレオチド 342 ~ 2222 ; 配列番号 45 ; 配列番号 46 ; 配列番号 47 ; 配列番号 48 ; 配列番号 49、配列番号 50 ; または配列番号 51 。

ド 3 4 9 ~ 2 1 8 6 ; 配列番号 4 4 のヌクレオチド 5 7 1 ~ 2 1 7 8 ; 配列番号 7 8 のヌクレオチド 3 4 9 ~ 2 2 2 9 ; 配列番号 7 9 のヌクレオチド 3 5 8 ~ 2 2 3 8 ; 配列番号 8 0 のヌクレオチド 3 4 2 ~ 2 2 2 2 ; 配列番号 8 1 のヌクレオチド 3 4 2 ~ 2 2 2 2 ; 配列番号 4 5 ; 配列番号 4 6 ; 配列番号 4 7 ; 配列番号 4 8 ; 配列番号 4 9 , 配列番号 5 0 ; または配列番号 5 1 。

【 0 0 3 7 】

いくつかの実施形態において、上記ベクタースタッファー配列は、以下と少なくとも 8 0 % 同一性を有する核酸を含む： 配列番号 1 3 ~ 1 6 のいずれか 1 つのヌクレオチド 4 8 9 ~ 2 1 8 5 ; 配列番号 1 7 のヌクレオチド 3 4 2 ~ 2 2 2 2 ; 配列番号 1 8 のヌクレオチド 4 8 8 ~ 2 1 7 7 ; 配列番号 1 9 のヌクレオチド 4 8 9 ~ 2 1 7 7 ; 配列番号 2 0 のヌクレオチド 7 1 1 ~ 2 1 8 7 ; 配列番号 2 1 のヌクレオチド 7 1 1 ~ 2 1 8 7 ; 配列番号 2 2 のヌクレオチド 4 8 8 ~ 2 1 7 7 ; 配列番号 2 3 のヌクレオチド 7 1 1 ~ 2 1 8 7 ; 配列番号 2 4 のヌクレオチド 7 1 1 ~ 2 1 8 7 ; 配列番号 2 5 のヌクレオチド 2 5 2 ~ 2 1 3 2 ; 配列番号 2 6 のヌクレオチド 2 5 2 ~ 2 1 3 2 ; 配列番号 2 7 のヌクレオチド 2 5 2 ~ 2 1 3 2 ; 配列番号 2 8 のヌクレオチド 2 5 2 ~ 2 1 3 2 ; 配列番号 2 9 のヌクレオチド 3 5 7 ~ 2 2 3 7 ; 配列番号 3 0 のヌクレオチド 3 5 8 ~ 2 1 9 5 ; 配列番号 3 1 のヌクレオチド 5 8 0 ~ 2 1 8 7 ; 配列番号 3 2 のヌクレオチド 5 8 0 ~ 2 1 9 6 ; 配列番号 3 3 のヌクレオチド 3 5 7 ~ 2 2 3 7 ; 配列番号 3 4 のヌクレオチド 3 5 8 ~ 2 1 9 5 ; 配列番号 3 5 のヌクレオチド 5 8 0 ~ 2 1 8 7 ; 配列番号 3 6 のヌクレオチド 5 8 0 ~ 2 1 9 6 ; 配列番号 3 7 のヌクレオチド 3 4 8 ~ 2 2 2 8 ; 配列番号 3 8 のヌクレオチド 3 4 9 ~ 2 2 2 9 ; 配列番号 3 9 のヌクレオチド 3 4 9 ~ 2 1 8 6 ; 配列番号 4 0 のヌクレオチド 5 7 1 ~ 2 1 7 8 ; 配列番号 4 1 のヌクレオチド 5 7 1 ~ 2 1 7 8 ; 配列番号 4 2 のヌクレオチド 3 4 8 ~ 2 2 2 8 ; 配列番号 4 3 のヌクレオチド 3 4 9 ~ 2 1 8 6 ; 配列番号 4 4 のヌクレオチド 5 7 1 ~ 2 1 7 8 ; 配列番号 7 8 のヌクレオチド 3 4 9 ~ 2 2 2 9 ; 配列番号 7 9 のヌクレオチド 3 5 8 ~ 2 2 3 8 ; 配列番号 8 0 のヌクレオチド 3 4 2 ~ 2 2 2 2 ; 配列番号 8 1 のヌクレオチド 3 4 2 ~ 2 2 2 2 ; 配列番号 4 5 ; 配列番号 4 6 ; 配列番号 4 7 ; 配列番号 4 8 ; 配列番号 4 9 、 配列番号 5 0 ; または配列番号 5 1 。

いくつかの実施形態において、上記ベクタースタッファー配列は、約 1 , 3 0 0 ~ 2 , 3 0 0 ヌクレオチドの長さの、約 1 , 5 0 0 ~ 2 , 0 0 0 ヌクレオチドの長さの、または約 1 , 6 0 0 ~ 1 , 9 0 0 ヌクレオチドの長さの核酸を含む。

10

20

30

【 0 0 3 8 】

いくつかの実施形態において、上記ベクタースタッファー配列は、以下と少なくとも 8 5 % 同一性を有する核酸を含む： 配列番号 1 3 ~ 1 6 のいずれか 1 つのヌクレオチド 4 8 9 ~ 2 1 8 5 ; 配列番号 1 7 のヌクレオチド 3 4 2 ~ 2 2 2 2 ; 配列番号 1 8 のヌクレオチド 4 8 8 ~ 2 1 7 7 ; 配列番号 1 9 のヌクレオチド 4 8 9 ~ 2 1 7 7 ; 配列番号 2 0 のヌクレオチド 7 1 1 ~ 2 1 8 7 ; 配列番号 2 1 のヌクレオチド 7 1 1 ~ 2 1 8 7 ; 配列番号 2 2 のヌクレオチド 4 8 8 ~ 2 1 7 7 ; 配列番号 2 3 のヌクレオチド 7 1 1 ~ 2 1 8 7 ; 配列番号 2 4 のヌクレオチド 7 1 1 ~ 2 1 8 7 ; 配列番号 2 5 のヌクレオチド 2 5 2 ~ 2 1 3 2 ; 配列番号 2 6 のヌクレオチド 2 5 2 ~ 2 1 3 2 ; 配列番号 2 7 のヌクレオチド 2 5 2 ~ 2 1 3 2 ; 配列番号 2 8 のヌクレオチド 2 5 2 ~ 2 1 3 2 ; 配列番号 2 9 のヌクレオチド 3 5 7 ~ 2 2 3 7 ; 配列番号 3 0 のヌクレオチド 3 5 8 ~ 2 1 9 5 ; 配列番号 3 1 のヌクレオチド 5 8 0 ~ 2 1 8 7 ; 配列番号 3 2 のヌクレオチド 5 8 0 ~ 2 1 9 6 ; 配列番号 3 3 のヌクレオチド 3 5 7 ~ 2 2 3 7 ; 配列番号 3 4 のヌクレオチド 3 5 8 ~ 2 1 9 5 ; 配列番号 3 5 のヌクレオチド 5 8 0 ~ 2 1 8 7 ; 配列番号 3 6 のヌクレオチド 5 8 0 ~ 2 1 9 6 ; 配列番号 3 7 のヌクレオチド 3 4 8 ~ 2 2 2 8 ; 配列番号 3 8 のヌクレオチド 3 4 9 ~ 2 2 2 9 ; 配列番号 3 9 のヌクレオチド 3 4 9 ~ 2 1 8 6 ; 配列番号 4 0 のヌクレオチド 5 7 1 ~ 2 1 7 8 ; 配列番号 4 1 のヌクレオチド 5 7 1 ~ 2 1 7 8 ; 配列番号 4 2 のヌクレオチド 3 4 8 ~ 2 2 2 8 ; 配列番号 4 3 のヌクレオチド 3 4 9 ~ 2 1 8 6 ; 配列番号 4 4 のヌクレオ

40

50

チド 571 ~ 2178 ; 配列番号 78 のヌクレオチド 349 ~ 2229 ; 配列番号 79 のヌクレオチド 358 ~ 2238 ; 配列番号 80 のヌクレオチド 342 ~ 2222 ; 配列番号 81 のヌクレオチド 342 ~ 2222 ; 配列番号 45 ; 配列番号 46 ; 配列番号 47 ; 配列番号 48 ; 配列番号 49 , 配列番号 50 ; または配列番号 51 。
いくつかの実施形態において、上記ベクタースタッファー配列は、約 1 , 300 ~ 2 , 300ヌクレオチドの長さの、約 1 , 500 ~ 2 , 000ヌクレオチドの長さの、または約 1 , 600 ~ 1 , 900ヌクレオチドの長さの核酸を含む。

【0039】

いくつかの実施形態において、上記ベクタースタッファー配列は、以下と少なくとも 90% 同一性を有する核酸を含む： 配列番号 13 ~ 16 のいずれか 1 つのヌクレオチド 489 ~ 2185 ; 配列番号 17 のヌクレオチド 342 ~ 2222 ; 配列番号 18 のヌクレオチド 488 ~ 2177 ; 配列番号 19 のヌクレオチド 489 ~ 2177 ; 配列番号 20 のヌクレオチド 711 ~ 2187 ; 配列番号 21 のヌクレオチド 711 ~ 2187 ; 配列番号 22 のヌクレオチド 488 ~ 2177 ; 配列番号 23 のヌクレオチド 711 ~ 2187 ; 配列番号 24 のヌクレオチド 711 ~ 2187 ; 配列番号 25 のヌクレオチド 252 ~ 2132 ; 配列番号 26 のヌクレオチド 252 ~ 2132 ; 配列番号 27 のヌクレオチド 252 ~ 2132 ; 配列番号 28 のヌクレオチド 252 ~ 2132 ; 配列番号 29 のヌクレオチド 357 ~ 2237 ; 配列番号 30 のヌクレオチド 358 ~ 2195 ; 配列番号 31 のヌクレオチド 580 ~ 2187 ; 配列番号 32 のヌクレオチド 580 ~ 2196 ; 配列番号 33 のヌクレオチド 357 ~ 2237 ; 配列番号 34 のヌクレオチド 358 ~ 2195 ; 配列番号 35 のヌクレオチド 580 ~ 2187 ; 配列番号 36 のヌクレオチド 580 ~ 2196 ; 配列番号 37 のヌクレオチド 348 ~ 2228 ; 配列番号 38 のヌクレオチド 349 ~ 2229 ; 配列番号 39 のヌクレオチド 349 ~ 2186 ; 配列番号 40 のヌクレオチド 571 ~ 2178 ; 配列番号 41 のヌクレオチド 571 ~ 2178 ; 配列番号 42 のヌクレオチド 348 ~ 2228 ; 配列番号 43 のヌクレオチド 349 ~ 2186 ; 配列番号 44 のヌクレオチド 571 ~ 2178 ; 配列番号 78 のヌクレオチド 349 ~ 2229 ; 配列番号 79 のヌクレオチド 358 ~ 2238 ; 配列番号 80 のヌクレオチド 342 ~ 2222 ; 配列番号 81 のヌクレオチド 342 ~ 2222 ; 配列番号 45 ; 配列番号 46 ; 配列番号 47 ; 配列番号 48 ; 配列番号 49 , 配列番号 50 ; または配列番号 51 。
いくつかの実施形態において、上記ベクタースタッファー配列は、約 1 , 300 ~ 2 , 300ヌクレオチドの長さの、約 1 , 500 ~ 2 , 000ヌクレオチドの長さの、または約 1 , 600 ~ 1 , 900ヌクレオチドの長さの核酸を含む。

【0040】

いくつかの実施形態において、上記ベクタースタッファー配列は、以下と少なくとも 95% 同一性を有する核酸を含む： 配列番号 13 ~ 16 のいずれか 1 つのヌクレオチド 489 ~ 2185 ; 配列番号 17 のヌクレオチド 342 ~ 2222 ; 配列番号 18 のヌクレオチド 488 ~ 2177 ; 配列番号 19 のヌクレオチド 489 ~ 2177 ; 配列番号 20 のヌクレオチド 711 ~ 2187 ; 配列番号 21 のヌクレオチド 711 ~ 2187 ; 配列番号 22 のヌクレオチド 488 ~ 2177 ; 配列番号 23 のヌクレオチド 711 ~ 2187 ; 配列番号 24 のヌクレオチド 711 ~ 2187 ; 配列番号 25 のヌクレオチド 252 ~ 2132 ; 配列番号 26 のヌクレオチド 252 ~ 2132 ; 配列番号 27 のヌクレオチド 252 ~ 2132 ; 配列番号 28 のヌクレオチド 252 ~ 2132 ; 配列番号 29 のヌクレオチド 357 ~ 2237 ; 配列番号 30 のヌクレオチド 358 ~ 2195 ; 配列番号 31 のヌクレオチド 580 ~ 2187 ; 配列番号 32 のヌクレオチド 580 ~ 2196 ; 配列番号 33 のヌクレオチド 357 ~ 2237 ; 配列番号 34 のヌクレオチド 358 ~ 2195 ; 配列番号 35 のヌクレオチド 580 ~ 2187 ; 配列番号 36 のヌクレオチド 580 ~ 2196 ; 配列番号 37 のヌクレオチド 348 ~ 2228 ; 配列番号 38 のヌクレオチド 349 ~ 2229 ; 配列番号 39 のヌクレオチド 349 ~ 2186 ; 配列番号 40 のヌクレオチド 571 ~ 2178 ;

配列番号 4 1 のヌクレオチド 5 7 1 ~ 2 1 7 8 ; 配列番号 4 2 のヌクレオチド 3 4 8 ~ 2 2 2 8 ; 配列番号 4 3 のヌクレオチド 3 4 9 ~ 2 1 8 6 ; 配列番号 4 4 のヌクレオチド 5 7 1 ~ 2 1 7 8 ; 配列番号 7 8 のヌクレオチド 3 4 9 ~ 2 2 2 9 ; 配列番号 7 9 のヌクレオチド 3 5 8 ~ 2 2 3 8 ; 配列番号 8 0 のヌクレオチド 3 4 2 ~ 2 2 2 2 ; 配列番号 8 1 のヌクレオチド 3 4 2 ~ 2 2 2 2 ; 配列番号 4 5 ; 配列番号 4 6 ; 配列番号 4 7 ; 配列番号 4 8 ; 配列番号 4 9 , 配列番号 5 0 ; または配列番号 5 1 。

いくつかの実施形態において、上記ベクタースタッファー配列は、約 1 , 3 0 0 ~ 2 , 3 0 0 ヌクレオチドの長さの、約 1 , 5 0 0 ~ 2 , 0 0 0 ヌクレオチドの長さの、または約 1 , 6 0 0 ~ 1 , 9 0 0 ヌクレオチドの長さの核酸を含む。いくつかの実施形態において、上記ベクタースタッファー配列は、以下と少なくとも 9 7 % 同一性を有する核酸を含む :

配列番号 1 3 ~ 1 6 のいずれか 1 つのヌクレオチド 4 8 9 ~ 2 1 8 5 ; 配列番号 1 7 のヌクレオチド 3 4 2 ~ 2 2 2 2 ; 配列番号 1 8 のヌクレオチド 4 8 8 ~ 2 1 7 7 ; 配列番号 1 9 のヌクレオチド 4 8 9 ~ 2 1 7 7 ; 配列番号 2 0 のヌクレオチド 7 1 1 ~ 2 1 8 7 ; 配列番号 2 1 のヌクレオチド 7 1 1 ~ 2 1 8 7 ; 配列番号 2 2 のヌクレオチド 4 8 8 ~ 2 1 7 7 ; 配列番号 2 3 のヌクレオチド 7 1 1 ~ 2 1 8 7 ; 配列番号 2 4 のヌクレオチド 7 1 1 ~ 2 1 8 7 ; 配列番号 2 5 のヌクレオチド 2 5 2 ~ 2 1 3 2 ; 配列番号 2 6 のヌクレオチド 2 5 2 ~ 2 1 3 2 ; 配列番号 2 7 のヌクレオチド 2 5 2 ~ 2 1 3 2 ; 配列番号 2 8 のヌクレオチド 2 5 2 ~ 2 1 3 2 ; 配列番号 2 9 のヌクレオチド 3 5 7 ~ 2 2 3 7 ; 配列番号 3 0 のヌクレオチド 3 5 8 ~ 2 1 9 5 ; 配列番号 3 1 のヌクレオチド 5 8 0 ~ 2 1 8 7 ; 配列番号 3 2 のヌクレオチド 5 8 0 ~ 2 1 9 6 ; 配列番号 3 3 のヌクレオチド 3 5 7 ~ 2 2 3 7 ; 配列番号 3 4 のヌクレオチド 3 5 8 ~ 2 1 9 5 ; 配列番号 3 5 のヌクレオチド 5 8 0 ~ 2 1 8 7 ; 配列番号 3 6 のヌクレオチド 5 8 0 ~ 2 1 9 6 ; 配列番号 3 7 のヌクレオチド 3 4 8 ~ 2 2 2 8 ; 配列番号 3 8 のヌクレオチド 3 4 9 ~ 2 2 2 9 ; 配列番号 3 9 のヌクレオチド 3 4 9 ~ 2 1 8 6 ; 配列番号 4 0 のヌクレオチド 5 7 1 ~ 2 1 7 8 ; 配列番号 4 1 のヌクレオチド 5 7 1 ~ 2 1 7 8 ; 配列番号 4 2 のヌクレオチド 3 4 8 ~ 2 2 2 8 ; 配列番号 4 3 のヌクレオチド 3 4 9 ~ 2 1 8 6 ; 配列番号 4 4 のヌクレオチド 5 7 1 ~ 2 1 7 8 ; 配列番号 7 8 のヌクレオチド 3 4 9 ~ 2 2 2 9 ; 配列番号 7 9 のヌクレオチド 3 5 8 ~ 2 2 3 8 ; 配列番号 8 0 のヌクレオチド 3 4 2 ~ 2 2 2 2 ; 配列番号 8 1 のヌクレオチド 3 4 2 ~ 2 2 2 2 ; 配列番号 4 5 ; 配列番号 4 6 ; 配列番号 4 7 ; 配列番号 4 8 ; 配列番号 4 9 、配列番号 5 0 ; または配列番号 5 1 。

いくつかの実施形態において、上記ベクタースタッファー配列は、約 1 , 3 0 0 ~ 2 , 3 0 0 ヌクレオチドの長さの、約 1 , 5 0 0 ~ 2 , 0 0 0 ヌクレオチドの長さの、または約 1 , 6 0 0 ~ 1 , 9 0 0 ヌクレオチドの長さの核酸を含む。

【 0 0 4 1 】

いくつかの実施形態において、上記ベクタースタッファー配列は、以下を含むかまたはからなる :

配列番号 1 3 ~ 1 6 のいずれか 1 つのヌクレオチド 4 8 9 ~ 2 1 8 5 ; 配列番号 1 7 のヌクレオチド 3 4 2 ~ 2 2 2 2 ; 配列番号 1 8 のヌクレオチド 4 8 8 ~ 2 1 7 7 ; 配列番号 1 9 のヌクレオチド 4 8 9 ~ 2 1 7 7 ; 配列番号 2 0 のヌクレオチド 7 1 1 ~ 2 1 8 7 ; 配列番号 2 1 のヌクレオチド 7 1 1 ~ 2 1 8 7 ; 配列番号 2 2 のヌクレオチド 4 8 8 ~ 2 1 7 7 ; 配列番号 2 3 のヌクレオチド 7 1 1 ~ 2 1 8 7 ; 配列番号 2 4 のヌクレオチド 7 1 1 ~ 2 1 8 7 ; 配列番号 2 5 のヌクレオチド 2 5 2 ~ 2 1 3 2 ; 配列番号 2 6 のヌクレオチド 2 5 2 ~ 2 1 3 2 ; 配列番号 2 7 のヌクレオチド 2 5 2 ~ 2 1 3 2 ; 配列番号 2 8 のヌクレオチド 2 5 2 ~ 2 1 3 2 ; 配列番号 2 9 のヌクレオチド 3 5 7 ~ 2 2 3 7 ; 配列番号 3 0 のヌクレオチド 3 5 8 ~ 2 1 9 5 ; 配列番号 3 1 のヌクレオチド 5 8 0 ~ 2 1 8 7 ; 配列番号 3 2 のヌクレオチド 5 8 0 ~ 2 1 9 6 ; 配列番号 3 3 のヌクレオチド 3 5 7 ~ 2 2 3 7 ; 配列番号 3 4 のヌクレオチド 3 5 8 ~ 2 1 9 5 ; 配列番号 3 5 のヌクレオチド 5 8 0 ~ 2 1 8 7 ; 配列番号 3 6 のヌクレオチド 5 8 0 ~ 2 1 9 6 ; 配列番号 3 7 のヌクレオチド 3 4 8 ~ 2 2 2 8 ; 配列番号 3 8 のヌクレオチド 3 4 9 ~ 2 2 2 9 ; 配列番号 3 9 のヌクレオチド 3 4 9 ~

2186； 配列番号40のヌクレオチド571～2178； 配列番号41のヌクレオチド571～2178； 配列番号42のヌクレオチド348～2228； 配列番号43のヌクレオチド349～2186； 配列番号44のヌクレオチド571～2178； 配列番号78のヌクレオチド349～2229； 配列番号79のヌクレオチド358～2238； 配列番号80のヌクレオチド342～2222； 配列番号81のヌクレオチド342～2222； 配列番号45； 配列番号46； 配列番号47； 配列番号48； 配列番号49、配列番号50；または配列番号51。

【0042】

いくつかの実施形態において、上記ベクタースタッファー配列は、配列番号48、または配列番号13～16のいずれか1つのヌクレオチド489～2185を含むかまたはからなる。 10

【0043】

いくつかの実施形態において、上記ベクターは、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターであり、必要に応じて、ここで上記AAVベクターは、自己相補的である。

【0044】

いくつかの実施形態において、上記ベクタースタッファー配列は、異種核酸配列を含む発現構築物に隣接して(例えば、5'側または3'側に)配置される。いくつかの実施形態において、上記異種核酸配列は、治療剤をコードする。いくつかの実施形態において、上記治療剤は、治療用タンパク質をコードする核酸または阻害性核酸を含む。いくつかの実施形態において、上記阻害性核酸は、siRNA、miRNA、shRNA、またはdsRNAを含む。いくつかの実施形態において、上記阻害性核酸は、神経変性疾患関連遺伝子を標的化する、siRNA、miRNA、shRNA、または(of)dsRNAを含む。いくつかの実施形態において、上記神経変性疾患は、脊髄小脳失調症2型、筋萎縮性側索硬化症、前頭側頭型認知症、原発性側索硬化症、進行性筋萎縮症、辺縁系優位型加齢性TDP-43脳症、慢性外傷性脳症、レビー小体型認知症、大脳皮質基底核変性症、進行性核上性麻痺(PSP)、グアム島の認知症パーキンソンニズムALS複合(G-PDC)、ピック病、海馬硬化症、ハンチントン病、パーキンソン病、またはアルツハイマー病である。いくつかの実施形態において、上記神経変性疾患は、ポリグルタミン反復病(polyglutamine repeat disease)である。いくつかの実施形態において、上記阻害性核酸(例えば、siRNA、miRNA、shRNA、またはdsRNA)は、ATXN2を標的化する。ATXN2とは、ポリグルタミン(ポリQ、CAG反復)トラクトを含む、ATXN2遺伝子によってコードされるタンパク質をいう。ATXN2遺伝子または転写物は、ATXN2の通常のアレル(これは、代表的には、22回もしくは23回反復を有する)、または中程度(約24～32回反復)もしくはより長い反復拡大(約33回から>100回の反復)を有する変異したアレルに言及し得る。いくつかの実施形態において、ATXN2とは、ヒトATXN2を含む哺乳動物ATXN2に言及する。 20 30

【0045】

いくつかの実施形態において、上記発現構築物は、ATXN2を標的化する人工miRNAをコードする異種核酸を含む。ガイド配列およびパッセンジャー配列、ならびにATXN2を標的化する人工miRNAをコードする異種核酸の例は、表5に提供される。そのコードされるガイド配列、パッセンジャー配列、および人工miRNA配列のRNAフォーマットは、cisプラスミドおよびrAAVベクターへの挿入のためのDNAフォーマットと同様に提供される。いくつかの実施形態において、異種核酸は、ATXN2を標的化する人工miRNAをコードし、配列番号1～4および71から選択されるガイド配列を含む。いくつかの実施形態において、異種核酸は、配列番号1によって提供されるガイド配列および配列番号5によって提供されるパッセンジャー配列を含む人工miRNAをコードする。いくつかの実施形態において、異種核酸は、配列番号2によって提供されるガイド配列および配列番号6によって提供されるパッセンジャー配列を含む。いくつかの実施形態において、異種核酸は、配列番号3によって提供されるガイド配列および配列 40 50

番号7によって提供されるパッセンジャー配列を含む。いくつかの実施形態において、異種核酸は、配列番号4によって提供されるガイド配列および配列番号8によって提供されるパッセンジャー配列を含む。いくつかの実施形態において、異種核酸は、配列番号71によって提供されるガイド配列および配列番号72によって提供されるパッセンジャー配列を含む。いくつかの実施形態において、上記異種核酸は、miRNA骨格（または足場）に埋め込まれた、ガイド配列およびパッセンジャー配列を含む。いくつかの実施形態において、上記miRNA骨格は、miR-100またはmiR-1-1である。いくつかの実施形態において、上記異種核酸は、配列番号9~12および73のうちのいずれか1つによって提供される人工miRNA配列をコードする。ATXN2標的化ガイド配列、パッセンジャー配列、miR骨格、および人工miRNA配列のさらなる例は、PCT公開WO2021/159008（その全体において本明細書に参考として援用される）において提供される。

10

【0046】

いくつかの実施形態において、上記発現構築物は、上記導入遺伝子（例えば、人工miRNAをコードする核酸）と作動可能に連結された1またはこれより多くの発現制御配列（調節配列）をさらに含む。「作動可能に連結された」配列は、導入遺伝子と連続しているか、または導入遺伝子の発現を制御するためにその導入遺伝子からトランスでもしくは一定の距離において作用する発現制御配列を含む。発現制御配列の例としては、転写開始配列、終結配列、プロモーター配列、エンハンサー配列、リプレッサー配列、スプライス部位配列、ポリアデニル化（ポリA）シグナル配列、またはこれらの任意の組み合わせが挙げられる。

20

【0047】

いくつかの実施形態において、プロモーターは、内因性プロモーター、合成プロモーター、構成的プロモーター、誘導性プロモーター、組織特異的プロモーター（例えば、CNS特異的）、または細胞特異的プロモーター（ニューロン、グリア細胞、または星細胞）である。構成的プロモーターの例としては、ラウス肉腫ウイルス（RSV）LTRプロモーター（必要に応じて、RSVエンハンサーとともに）、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター（必要に応じて、CMVエンハンサーとともに）、SV40プロモーター、およびジヒドロ葉酸レダクターゼプロモーターが挙げられる。誘導性プロモーターの例としては、亜鉛誘導性ヒツジメタロチオネイン（MT）プロモーター、デキサメタゾン（Dex）誘導性マウス乳腺腫瘍ウイルス（MMTV）プロモーター、T7ポリメラーゼプロモーターシステム、エクジソン昆虫プロモーター、テトラサイクリン抑制性システム、テトラサイクリン誘導性システム、RU486誘導性システム、およびラパマイシン誘導性システムが挙げられる。使用され得るプロモーターのさらなる例としては、例えば、ニワトリ - アクチンプロモーター（CBAプロモーター）、CAGプロモーター、H1プロモーター、CD68プロモーター、JeTプロモーター、シナプシンプロモーター、RNA pol IIプロモーター、またはRNA pol IIIプロモーター（例えば、U6、H1など）が挙げられる。いくつかの実施形態において、上記プロモーターは、組織特異的RNA pol IIプロモーターである。いくつかの実施形態において、上記組織特異的RNA pol IIプロモーターは、ニューロン特異的発現を示す遺伝子に由来する。いくつかの実施形態において、上記ニューロン特異的プロモーターは、シナプシン1プロモーターまたはシナプシン2プロモーターである。

30

40

【0048】

いくつかの実施形態において、上記プロモーターは、H1プロモーターである。いくつかの実施形態において、上記H1プロモーターは、本明細書において「天然」H1プロモーターといわれるプロモーター（例えば、配列番号53に示される配列を含むかまたはからなるプロモーター）である。いくつかの実施形態において、上記プロモーターは、本明細書において「ショート」H1プロモーターといわれるプロモーター（例えば、配列番号54に示される配列または配列番号17、25~28、および37~44のうちのいずれか1つのヌクレオチド113~203を含むまたはからなるプロモーター）である。いく

50

つかの実施形態において、上記プロモーターは、本明細書において「ロング」H1プロモーターといわれるプロモーター（例えば、配列番号52に示される配列または配列番号13～16および18～24のうちのいずれか1つのヌクレオチド113～343を含むまたはからなるプロモーター）である。

【0049】

いくつかの実施形態において、上記終結配列は、SV40終結配列である。SV40終結配列の例は、配列番号77；配列番号20、21、23、および24のうちのいずれか1つのヌクレオチド489～710；配列番号31、32、35、および36のうちのいずれか1つのヌクレオチド358～579；配列番号40、41、および44のうちのいずれか1つのヌクレオチド349～570に示される。

10

【0050】

いくつかの実施形態において、本開示の阻害性核酸をコードする配列は、発現構築物の非翻訳領域に配置される。いくつかの実施形態において、本開示の阻害性核酸をコードする配列は、発現構築物のイントロン、5'非翻訳領域（5'UTR）または3'非翻訳領域（3'UTR）に配置される。いくつかの実施形態において、本開示の阻害性核酸をコードする配列は、上記プロモーターの下流側かつ発現される遺伝子の上流側のイントロンに配置される。

【0051】

ベクターおよび宿主細胞

別の局面において、本開示のベクタースタッファー配列を含むベクターが提供される。ベクターは、プラスミド、コスミド、ファージミド、細菌人工染色体（BAC）またはウイルスベクターであり得る。ウイルスベクターの例としては、ヘルペスウイルス（HSV）ベクター、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、レンチウイルスベクター、パキユロウイルスベクターなどが挙げられる。いくつかの実施形態において、レトロウイルスベクターは、マウス幹細胞ウイルス（mouse stem cell virus）、マウス白血病ウイルス（例えば、モロニーマウス白血病ウイルスベクター）、ネコ白血病ウイルス、ネコ肉腫ウイルス、またはトリ細網内皮症ウイルスベクターである。いくつかの実施形態において、レンチウイルスベクターは、HIV（ヒト免疫不全ウイルス（HIV 1型およびHIV 2型を含む））、ウマ伝染性貧血ウイルス、ネコ免疫不全ウイルス（FIV）、ウシ免疫不全ウイルス（BIV）、およびサル免疫不全ウイルス（SIV）、ウマ伝染性貧血ウイルス、またはマエディ-ビスナウイルスベクターである。

20

30

【0052】

いくつかの実施形態において、上記ベクターは、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター（例えば、組換えAAV（rAAV）ベクター）であり、これは、組換え法によって生成される。いくつかの実施形態において、上記rAAVベクターは、本開示のベクタースタッファー配列および異種核酸配列（例えば、阻害性核酸をコードする）を含む発現構築物を含む。上記ベクタースタッファー配列は、上記異種核酸を含む発現構築物の5'側または3'側のいずれかに隣接して配置され得る。

【0053】

AAVは、複製（rep）およびキャプシド（Cap）のためのタンパク質をコードし、2つのITR（これは、ウイルスゲノムの複製起点として働く）に挟まれたゲノムを有する、1本鎖のエンベロープのないDNAウイルスである。AAVはまた、パッケージング配列を含み、これは、AAVキャプシドへのウイルスゲノムのパッケージングを可能にする。組換えAAVベクター（rAAV）（rAAVベクターゲノム、またはrAAVゲノムともいわれる）は、野生型ゲノム（例えば、Rep、Cap）の全てまたは一部をAAVから除去するために分子的方法を使用し、それを非天然の核酸（例えば、異種核酸配列（例えば、阻害性核酸をコードする核酸分子））で置き換えることによって、AAVの野生型ゲノムから得られ得る。代表的には、AAVに関しては、逆方向末端反復（ITR）配列のうち的一方または両方が、rAAVベクターにおいて保持される。いくつかの実施

40

50

形態において、上記 r A A V ベクターは、発現構築物およびベクタースタッパー配列に隣接する 5' 逆方向末端反復 (I T R) および 3' I T R を含む。機能的 I T R 配列は、A A V ウイルス粒子の救済、複製およびパッケージングのために必要である。従って、r A A V ベクターは、ウイルスの複製およびパッケージングのためにシスで必要とされる少なくともそれらの配列 (例えば、機能的 I T R) を含むように本明細書で定義される。全ての他のウイルス配列は、トランスで供給され得る。いくつかの実施形態において、上記 r A A V は、上記ベクターによって効率的にパッケージングされ得る導入遺伝子のサイズを最大化するために、A A V ゲノムに由来する 5' I T R および 3' I T R を保持するのみである。いくつかの実施形態において、各 A A V I T R は、全長 I T R (例えば、およそ 145 b p の長さであり、機能的 R e p 結合部位 (R B S) および末端分解部位 (t r s) を含む) である。いくつかの実施形態において、上記 I T R のうちの一方または両方は、上記 I T R が機能的な救済、複製、及びパッケージングを提供することを条件として、例えば、挿入、欠失、または置換によって改変される。いくつかの実施形態において、改変された I T R は、機能的末端分解部位 (t r s) を欠いており、自己相補的 A A V ベクター (s c A A V ベクター) の生成のために使用される。いくつかの実施形態において、上記 r A A V ベクターは、5' 側に変異体 I T R (末端分解部位を欠いている) および 3' 側に野生型 A A V I T R を含む自己相補的 A A V ベクターである。末端分解部位を欠いている変異体 5' I T R の例は、配列番号 57、または配列番号 13 ~ 24、29 ~ 44、および 78 ~ 82 のうちのいずれか 1 つのヌクレオチド 1 ~ 106 に示される。いくつかの実施形態において、改変された I T R は、A I T R (D - 配列および T R S が欠失している) といわれる A A V 2 I T R の短縮型バージョンである

10

20

【 0 0 5 4 】

いくつかの実施形態において、上記 r A A V ベクターは、配列番号 57、または配列番号 13 ~ 24、29 ~ 44、および 78 ~ 82 のうちのいずれか 1 つのヌクレオチド 1 ~ 106 を含むかまたはからなる 5' I T R を含む。いくつかの実施形態において、上記 r A A V ベクターは、以下を含むかまたはからなる 3' I T R を含む： 配列番号 58、配列番号 13 ~ 16 のうちのいずれか 1 つのヌクレオチド 2192 ~ 2358、配列番号 13 ~ 16 のうちのいずれか 1 つのヌクレオチド 2214 ~ 2358、配列番号 17 のヌクレオチド 2229 ~ 2395、配列番号 17 のヌクレオチド 2251 ~ 2395、配列番号 18 のヌクレオチド 2184 ~ 2350、配列番号 18 のヌクレオチド 2206 ~ 2350； 配列番号 19 のヌクレオチド 2206 ~ 2350； 配列番号 20 のヌクレオチド 2216 ~ 2360； 配列番号 21 のヌクレオチド 2216 ~ 2360； 配列番号 22 のヌクレオチド 2206 ~ 2350； 配列番号 23 のヌクレオチド 2216 ~ 2360； 配列番号 24 のヌクレオチド 2216 ~ 2360； 配列番号 25 のヌクレオチド 2161 ~ 2305； 配列番号 26 のヌクレオチド 2161 ~ 2305； 配列番号 27 のヌクレオチド 2161 ~ 2305； 配列番号 28 のヌクレオチド 2161 ~ 2305； 配列番号 29 のヌクレオチド 2266 ~ 2410； 配列番号 30 のヌクレオチド 2224 ~ 2368； 配列番号 31 のヌクレオチド 2216 ~ 2360； 配列番号 32 のヌクレオチド 2225 ~ 2369； 配列番号 33 のヌクレオチド 2266 ~ 2410； 配列番号 34 のヌクレオチド 2224 ~ 2368； 配列番号 35 のヌクレオチド 2216 ~ 2360； 配列番号 36 のヌクレオチド 2225 ~ 2369； 配列番号 37 のヌクレオチド 2257 ~ 2401； 配列番号 38 のヌクレオチド 2258 ~ 2402； 配列番号 39 のヌクレオチド 2215 ~ 2359； 配列番号 40 のヌクレオチド 2207 ~ 2351； 配列番号 41 のヌクレオチド 2207 ~ 2351； 配列番号 42 のヌクレオチド 2257 ~ 2401； 配列番号 43 のヌクレオチド 2215 ~ 2359； 配列番号 44 のヌクレオチド 2207 ~ 2351； 配列番号 78 のヌクレオチド 2258 ~ 2402； 配列番号 79 のヌクレオチド 2267 ~ 2411； 配列番号 80 のヌクレオチド 2251 ~ 2395； 配列番号 81 のヌクレオチド 2251 ~ 2395； 配列番号 82 のヌクレオチド 2187 ~ 2331。いくつかの実施形態において、上記 r A A V ベクターは、以下を含む： 配列番号 57 を含むかまたはからなる 5

30

40

50

たはからなる 5' ITR および配列番号 32 のヌクレオチド 2225 ~ 2369 を含む
 かまたはからなる 3' ITR ; 配列番号 33 のヌクレオチド 1 ~ 106 を含むかまた
 はからなる 5' ITR および配列番号 33 のヌクレオチド 2266 ~ 2410 を含むか
 またはからなる 3' ITR ; 配列番号 34 のヌクレオチド 1 ~ 106 を含むかまたは
 からなる 5' ITR および配列番号 34 のヌクレオチド 2224 ~ 2368 を含むかま
 たはからなる 3' ITR ; 配列番号 35 のヌクレオチド 1 ~ 106 を含むかまたはか
 らなる 5' ITR および配列番号 35 のヌクレオチド 2216 ~ 2360 を含むかまた
 はからなる 3' ITR ; 配列番号 36 のヌクレオチド 1 ~ 106 を含むかまたはか
 らなる 5' ITR および配列番号 36 のヌクレオチド 2225 ~ 2369 を含むかまたは
 からなる 3' ITR ; 配列番号 37 のヌクレオチド 1 ~ 106 を含むかまたはからな
 る 5' ITR および配列番号 37 のヌクレオチド 2257 ~ 2401 を含むかまたはか
 らなる 3' ITR ; 配列番号 38 のヌクレオチド 1 ~ 106 を含むかまたはからなる
 5' ITR および配列番号 38 のヌクレオチド 2258 ~ 2402 を含むかまたはから
 なる 3' ITR ; 配列番号 39 のヌクレオチド 1 ~ 106 を含むかまたはからなる 5'
 ITR および配列番号 39 のヌクレオチド 2215 ~ 2359 を含むかまたはからなる 3'
 ITR ; 配列番号 40 のヌクレオチド 1 ~ 106 を含むかまたはからなる 5' ITR
 および配列番号 40 のヌクレオチド 2207 ~ 2351 を含むかまたはからなる 3'
 ITR ; 配列番号 41 のヌクレオチド 1 ~ 106 を含むかまたはからなる 5' ITR
 および配列番号 41 のヌクレオチド 2207 ~ 2351 を含むかまたはからなる 3' I
 TR ; 配列番号 42 のヌクレオチド 1 ~ 106 を含むかまたはからなる 5' ITR お
 よび配列番号 42 のヌクレオチド 2257 ~ 2401 を含むかまたはからなる 3' ITR
 ; 配列番号 43 のヌクレオチド 1 ~ 106 を含むかまたはからなる 5' ITR およ
 び配列番号 43 のヌクレオチド 2215 ~ 2359 を含むかまたはからなる 3' ITR
 ; a 配列番号 44 のヌクレオチド 1 ~ 106 を含むかまたはからなる 5' ITR およ
 び配列番号 44 のヌクレオチド 2207 ~ 2351 を含むかまたはからなる 3' ITR
 ; 配列番号 78 のヌクレオチド 1 ~ 106 を含むかまたはからなる 5' ITR およ
 び配列番号 78 のヌクレオチド 2258 ~ 2402 を含むかまたはからなる 3' ITR ;
 配列番号 79 のヌクレオチド 1 ~ 106 を含むかまたはからなる 5' ITR およ
 び配列番号 79 のヌクレオチド 2267 ~ 2411 を含むかまたはからなる 3' ITR ; 配
 列番号 80 のヌクレオチド 1 ~ 106 を含むかまたはからなる 5' ITR およ
 び配列番号 80 のヌクレオチド 2251 ~ 2395 を含むかまたはからなる 3' ITR ; 配
 列番号 81 のヌクレオチド 1 ~ 106 を含むかまたはからなる 5' ITR およ
 び配列番号 81 のヌクレオチド 2251 ~ 2395 を含むかまたはからなる 3' ITR ;
 あるいは配列番号 82 のヌクレオチド 1 ~ 106 を含むかまたはからなる 5' ITR およ
 び配列番号 82 のヌクレオチド 2187 ~ 2331 を含むかまたはからなる 3' ITR 。

10

20

30

40

50

【0055】

いくつかの実施形態において、上記 rAAV ベクターは、霊長類血清型 AAV ベクター
 またはヒト血清型 AAV ベクターを含む、哺乳動物の血清型 AAV ベクター（例えば、哺
 乳動物の血清型 AAV に由来する AAV ゲノムおよび ITR）である。いくつかの実施形
 態において、上記 rAAV ベクターは、キメラ AAV ベクターである。いくつかの実施形
 態において、上記 ITR は、以下の AAV 血清型から選択される： AAV1、AAV2
 、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV9
 .47、AAV9(hu14)、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh8
 、AAVrh10、AAV-DJ8、AAV-DJ、AAV-PHP.A、AAV-PHP
 .B、AAV-PHP.B2、AAV-PHP.B3、AAV-PHP.N/PHP.B-D
 GT、AAV-PHP.B-EST、AAV-PHP.B-GGT、AAV-PHP.B-AT
 P、AAV-PHP.B-ATT-T、AAV-PHP.B-DGT-T、AAV-PHP.B
 -GGT-T、AAV-PHP.B-SGS、AAV-PHP.B-AQP、AAV-PHP
 .B-QQP、AAV-PHP.B-SNP(3)、AAV-PHP.B-SNP、AAV-PHP
 .B-QGT、AAV-PHP.B-NQT、AAV-PHP.B-EGS、AAV-PHP

. B - S G N、A A V P H P . B - E G T、A A V P H P . B - D S T、A A V P H P . B - D S T、A A V P H P . B - S T P、A A V P H P . B - P Q P、A A V P H P . B - S Q P、A A V P H P . B - Q L P、A A V P H P . B - T M P、A A V P H P . B - T T P、A A V P H P . S / G 2 A 1 2、A A V G 2 A 1 5 / G 2 A 3、A A V G 2 B 4、A A V G 2 B 5、またはこれらのバリエーション。

【0056】

いくつかの実施形態において、上記異種核酸配列は、治療剤をコードする。いくつかの実施形態において、上記治療剤は、治療用タンパク質をコードする核酸または阻害性核酸を含む。いくつかの実施形態において、上記阻害性核酸は、s i R N A、m i R N A、s h R N A、またはd s R N Aを含む。いくつかの実施形態において、上記阻害性核酸は、神経変性疾患関連遺伝子を標的化する、s i R N A、m i R N A、s h R N A、または (o f) d s R N Aを含む。いくつかの実施形態において、上記神経変性疾患は、脊髄小脳失調症2型、筋萎縮性側索硬化症、前頭側頭型認知症、原発性側索硬化症、進行性筋萎縮症、辺縁系優位型加齢性T D P - 4 3脳症、慢性外傷性脳症、レビー小体型認知症、大脳皮質基底核変性症、進行性核上性麻痺 (P S P)、グアム島の認知症パーキンソンニズムA L S複合 (G - P D C)、ピック病、海馬硬化症、ハンチントン病、パーキンソン病、またはアルツハイマー病である。いくつかの実施形態において、上記神経変性疾患は、ポリグルタミン反復病である。いくつかの実施形態において、上記阻害性核酸 (例えば、s i R N A、m i R N A、s h R N A、またはd s R N A) は、A T X N 2を標的化する。いくつかの実施形態において、A T X N 2とは、哺乳動物A T N X 2 (ヒトA T X N 2を含む) をいう。

10

20

【0057】

いくつかの実施形態において、上記発現構築物は、A T X N 2を標的化する人工m i R N Aをコードする異種核酸を含む。ガイド配列およびパッセンジャー配列ならびにA T X N 2を標的化する人工m i R N Aを含む異種核酸の例は、表5において提供される。そのコードされるガイド配列、パッセンジャー配列、および人工m i R N A配列のR N Aフォーマットと同様に提供される。いくつかの実施形態において、異種核酸は、A T X N 2を標的化する人工m i R N Aをコードし、配列番号1~4および71から選択されるガイド配列を含む。いくつかの実施形態において、異種核酸は、配列番号1によって提供されるガイド配列および配列番号5によって提供されるパッセンジャー配列を含む人工m i R N Aをコードする。いくつかの実施形態において、異種核酸は、配列番号2によって提供されるガイド配列および配列番号6によって提供されるパッセンジャー配列を含む。いくつかの実施形態において、異種核酸は、配列番号3によって提供されるガイド配列および配列番号7によって提供されるパッセンジャー配列を含む。いくつかの実施形態において、異種核酸は、配列番号4によって提供されるガイド配列および配列番号8によって提供されるパッセンジャー配列を含む。いくつかの実施形態において、異種核酸は、配列番号71によって提供されるガイド配列および配列番号72によって提供されるパッセンジャー配列を含む。いくつかの実施形態において、上記異種核酸は、m i R N A骨格 (または足場) に埋め込まれたガイド配列およびパッセンジャー配列を含む。いくつかの実施形態において、上記m i R N A骨格は、m i R - 1 0 0またはm i R - 1 - 1である。いくつかの実施形態において、上記異種核酸は、配列番号9~12および73のうちのいずれか1つによって提供される人工m i R N A配列をコードする。A T X N 2を標的化するガイド配列、パッセンジャー配列、m i R骨格、および人工m i R N A配列のさらなる例は、P C T公開W O 2 0 2 1 / 1 5 9 0 0 8 (これはその全体において参考として援用される) において提供される。

30

40

【0058】

他の発現制御配列は、上記異種核酸 (例えば、阻害性核酸をコードする) に作動可能に連結される上記r A A Vベクター中に存在し得、それらとしては、転写開始配列、終結配列、プロモーター配列、エンハンサー配列、リプレッサー配列、スプライス部位配列、ポ

50

リアデニル化（ポリ A）シグナル配列、またはこれらの任意の組み合わせのうちの 1 またはこれより多くのものが挙げられる。

【 0 0 5 9 】

いくつかの実施形態において、r A A V ベクターは、H 1 プロモーターを含む。いくつかの実施形態において、上記 H 1 プロモーターは、天然 H 1 プロモーター（例えば、配列番号 5 3 に示される配列を含むかまたはからなるプロモーター）である。いくつかの実施形態において、上記プロモーターは、ショート H 1 プロモーター（例えば、配列番号 5 4 に示される配列、または配列番号 1 7、2 5 ~ 2 8、および 3 7 ~ 4 4 のうちのいずれか 1 つのヌクレオチド 1 1 3 ~ 2 0 3 を含むかまたはからなるプロモーター）である。いくつかの実施形態において、上記プロモーターは、ロング H 1 プロモーター（例えば、配列番号 5 2、または配列番号 1 3 ~ 1 6 および 1 8 ~ 2 4 のうちのいずれか 1 つのヌクレオチド 1 1 3 ~ 3 4 3 に示される配列を含むかまたはからなるプロモーター）である。いくつかの実施形態において、上記 H 1 プロモーターは、発現構築物において、特に、5 ' I T R が末端分解部位を欠いている場合に、5 ' から 3 ' 方向に配向される。

【 0 0 6 0 】

いくつかの実施形態において、上記 r A A V ベクターは、S V 4 0 終結配列を含む。S V 4 0 終結配列の例は、配列番号 7 7； 配列番号 2 0、2 1、2 3、および 2 4 のうちのいずれか 1 つのヌクレオチド 4 8 9 ~ 7 1 0； 配列番号 3 1、3 2、3 5、および 3 6 のうちのいずれか 1 つのヌクレオチド 3 5 8 ~ 5 7 9； 配列番号 4 0、4 1、および 4 4 のうちのいずれか 1 つのヌクレオチド 3 4 9 ~ 5 7 0 に示される。

【 0 0 6 1 】

r A A V ベクターは、全体的にまたは部分的に欠失される 1 またはこれより多くの A A V 野生型遺伝子を有し得る。いくつかの実施形態において、上記 r A A V ベクターは、複製欠損性である。いくつかの実施形態において、上記 r A A V ベクターは、機能的 R e p タンパク質および / またはキャプシドタンパク質を欠く。いくつかの実施形態において、上記 r A A V ベクターは、自己相補的 A A V (s c A A V) ベクターである。

【 0 0 6 2 】

いくつかの実施形態において、上記 r A A V ベクターは、5 ' I T R、A T X N 2 特異的人工 m i R N A をコードする異種核酸に作動可能に連結されたプロモーター、ベクタースタッファー配列、および 3 ' I T R を含む。いくつかの実施形態において、上記 5 ' I T R は、末端分解部位を欠くように改変される。いくつかの実施形態において、上記プロモーターは、5 ' から 3 ' 方向において配向される。

【 0 0 6 3 】

いくつかの実施形態において、上記 r A A V ベクターは、5 ' I T R から 3 ' I T R まで、配列番号 1 3 ~ 2 4、2 9 ~ 4 4、および 7 8 ~ 8 0 のうちのいずれか 1 つに示されるヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、上記 r A A V ベクターは、5 ' I T R から 3 ' I T R まで、配列番号 1 3 に示されるヌクレオチド配列を含み、ここでヌクレオチド 3 4 4 ~ 4 8 1 は、目的の人工 m i R N A をコードする配列で置換されている。いくつかの実施形態において、上記 r A A V ベクターは、5 ' I T R から 3 ' I T R まで、配列番号 1 4 に示されるヌクレオチド配列を含み、ここでヌクレオチド 3 4 4 ~ 4 8 1 は、目的の人工 m i R N A をコードする配列で置換されている。いくつかの実施形態において、上記 r A A V ベクターは、5 ' I T R から 3 ' I T R まで、配列番号 1 5 に示されるヌクレオチド配列を含み、ここでヌクレオチド 3 4 4 ~ 4 8 1 は、目的の人工 m i R N A をコードする配列で置換されている。いくつかの実施形態において、上記 r A A V ベクターは、配列番号 1 6 に示されるヌクレオチド配列を含み、ここでヌクレオチド 3 4 4 ~ 4 8 1 は、目的の人工 m i R N A をコードする配列で置換されている。いくつかの実施形態において、上記 r A A V ベクターは、配列番号 1 7 に示されるヌクレオチド配列を含み、ここでヌクレオチド 2 0 4 ~ 3 3 5 は、目的の人工 m i R N A をコードする配列で置換されている。いくつかの実施形態において、上記 r A A V ベクターは、配列番号 1 8 に示されるヌクレオチド配列を含み、ここでヌクレオチド 3 4 4 ~ 4 8 1 は、目

10

20

30

40

50

列で置換されている。いくつかの実施形態において、上記 r A A V ベクターは、5' I T R から 3' I T R まで、配列番号 4 1 に示されるヌクレオチド配列を含み、ここでヌクレオチド 2 0 4 ~ 3 4 1 は、目的の人工 m i R N A をコードする配列で置換されている。いくつかの実施形態において、上記 r A A V ベクターは、5' I T R から 3' I T R まで、配列番号 4 2 に示されるヌクレオチド配列を含み、ここでヌクレオチド 2 0 4 ~ 3 4 1 は、目的の人工 m i R N A をコードする配列で置換されている。いくつかの実施形態において、上記 r A A V ベクターは、5' I T R から 3' I T R まで、配列番号 4 3 に示されるヌクレオチド配列を含み、ここでヌクレオチド 2 0 4 ~ 3 4 1 は、目的の人工 m i R N A をコードする配列で置換されている。いくつかの実施形態において、上記 r A A V ベクターは、5' I T R から 3' I T R まで、配列番号 4 4 に示されるヌクレオチド 10 配列を含み、ここでヌクレオチド 2 0 4 ~ 3 4 1 は、目的の人工 m i R N A をコードする配列で置換されている。いくつかの実施形態において、上記 r A A V ベクターは、5' I T R から 3' I T R まで、配列番号 7 8 に示されるヌクレオチド配列を含み、ここでヌクレオチド 2 0 4 ~ 3 4 2 は、目的の人工 m i R N A をコードする配列で置換されている。いくつかの実施形態において、上記 r A A V ベクターは、5' I T R から 3' I T R まで、配列番号 7 9 に示されるヌクレオチド配列を含み、ここでヌクレオチド 2 1 3 ~ 3 5 1 は、目的の人工 m i R N A をコードする配列で置換されている。いくつかの実施形態において、上記 r A A V ベクターは、5' I T R から 3' I T R まで、配列番号 8 0 に示されるヌクレオチド配列を含み、ここでヌクレオチド 2 0 4 ~ 3 3 5 は、目的の人工 m i R N A をコードする配列で置換されている。いくつかの実施形態において、上記 r 20 A A V ベクターは、5' I T R から 3' I T R まで、配列番号 8 1 に示されるヌクレオチド配列を含み、ここでヌクレオチド 2 0 4 ~ 3 3 5 は、目的の人工 m i R N A をコードする配列で置換されている。

【 0 0 6 4 】

本開示の組換え A A V ベクターは、r A A V 粒子を形成するために 1 またはこれより多くの A A V キャプシドタンパク質によって被包され得る。「r A A V 粒子」または「r A A V ビリオン」とは、A A V タンパク質シェルを含み、目的の導入遺伝子（これは、5' A A V I T R および 3' A A V I T R が各側に隣接している）を含む r A A V ベクターを被包する感染性の複製欠損ウイルスに言及する。r A A V 粒子は、r A A V ベクター、A A V ヘルパー機能およびアクセサリ機能を指定する配列をその中に導入された適切な宿主細胞中で産生され、その宿主細胞が、上記 r A A V ベクター（目的の導入遺伝子配列を含む）を、その後の遺伝子送達のために感染性 r A A V 粒子へとパッケージングするために必要とされる A A V ポリペプチドをコードし得るようにする。 30

【 0 0 6 5 】

宿主細胞培養物を使用して A A V キャプシドタンパク質へと組換え A A V ベクターをパッケージングする方法は、当該分野で公知である。いくつかの実施形態において、上記 r A A V ベクターをパッケージングするために必要とされる構成要素のうちの 1 またはこれより多くのもの（例えば、R e p 配列、c a p 配列、および / またはアクセサリ機能）は、（例えば、ベクターによって）上記 1 またはこれより多くの必要とされる構成要素を含むように操作された安定な宿主細胞によって提供され得る。A A V パッケージングのためのその必要とされる構成要素の発現は、宿主パッケージング細胞において誘導性プロモーターまたは構成的プロモーターの制御下にあり得る。A A V ヘルパーベクターは、A A V 複製のために必要な、失っている A A V 機能を補完するために、トランスで機能する A A V r e p および / または c a p 遺伝子の一過性の発現を提供するために一般に使用される。いくつかの実施形態において、A A V ヘルパーベクターは、A A V I T R を欠いており、それら自体で複製もパッケージングもできない。A A V ヘルパーベクターは、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、ウイルス、またはビリオンの形態にあり得る。 40

【 0 0 6 6 】

いくつかの実施形態において、r A A V 粒子は、三重トランスフェクション法（例えば 50

、米国特許第 6,001,650 号（その全体において本明細書に参考として援用される）を参照のこと）を使用して生成され得る。このアプローチにおいて、上記 rAAV 粒子は、rAAV 粒子、AAV ヘルパーベクター、およびアクセサリ機能ベクターへとパッケージングされるために、宿主細胞を rAAV ベクター（導入遺伝子を含む）でトランスフェクトすることによって生成され得る。いくつかの実施形態において、上記 AAV ヘルパー機能ベクターは、いかなる検出可能な野生型 AAV ビリオン（例えば、機能的 rep および cap 遺伝子を含む AAV ビリオン）をも生成することなく、効率的 AAV ベクター生成を支援する。上記アクセサリ機能ベクターは、AAV が複製のために依存する非 AAV 由来ウイルスおよび/または細胞機能（例えば、「アクセサリ機能のためのヌクレオチド配列をコードする。上記アクセサリ機能は、AAV 複製のために必要とされるそれらの機能（AAV 遺伝子転写、ステージ特異的 AAV mRNA スプライシング、AAV DNA 複製、cap 発現生成物の合成、および AAV キャプシドアセンブリの活性化に関するそれらの部分が挙げられるが、これらに限定されない）を含む。ウイルスベースのアクセサリ機能は、公知のヘルパーウイルス（例えば、アデノウイルス、ヘルペスウイルス（単純ヘルペスウイルス 1 型以外）、およびワクシニアウイルス）のうちのいずれかに由来し得る。いくつかの実施形態において、二重トランスフェクション法（この場合、AAV ヘルパー機能およびアクセサリ機能は、単一のベクター上にクローニングされる）は、rAAV 粒子を生成するために使用される。

10

【0067】

AAV キャプシドは、rAAV 粒子のこれらの組織特異性を決定するに当たって重要なエレメントである。従って、キャプシド組織特異性を有する rAAV 粒子が選択され得る。いくつかの実施形態において、上記 rAAV 粒子は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV9.47、AAV9(hu14)、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh8、AAVrh10、AAV-DJ8、AAV-DJ、AAV-PHP.A、AAV-PHP.B、AAV-PHP.B2、AAV-PHP.B3、AAV-PHP.N/PHP.B-DGT、AAV-PHP.B-EST、AAV-PHP.B-GGT、AAV-PHP.B-ATP、AAV-PHP.B-ATT-T、AAV-PHP.B-DGT-T、AAV-PHP.B-GGT-T、AAV-PHP.B-SGS、AAV-PHP.B-AQP、AAV-PHP.B-QQP、AAV-PHP.B-SNP(3)、AAV-PHP.B-SNP、AAV-PHP.B-QGT、AAV-PHP.B-NQT、AAV-PHP.B-EGS、AAV-PHP.B-SGN、AAV-PHP.B-EGT、AAV-PHP.B-DST、AAV-PHP.B-DST、AAV-PHP.B-STP、AAV-PHP.B-PQP、AAV-PHP.B-SQP、AAV-PHP.B-QLP、AAV-PHP.B-TMP、AAV-PHP.B-TTP、AAV-PHP.S/G2A12、AAVG2A15/G2A3、AAVG2B4、AAVG2B5、およびこれらのバリエーションの AAV 血清型から選択されるキャプシドタンパク質を含む。いくつかの実施形態において、上記 AAV キャプシドは、血液脳関門を横断する能力のある血清型、例えば、AAV9、AAVrh.10、AAV-PHP-B、またはこれらのバリエーションから選択される。AAV9 キャプシド配列の例は、米国特許第 7,906,111 号（その全体において参考として援用される）において提供される。いくつかの実施形態において、上記 AAV キャプシドは、キメラ AAV キャプシドである。いくつかの実施形態において、上記 AAV 粒子は、異なる AAV 血清型に由来するキャプシドおよびゲノムを有する偽型化 AAV である。

20

30

40

【0068】

いくつかの実施形態において、上記 rAAV 粒子は、CNS の細胞を形質導入する能力がある。いくつかの実施形態において、上記 rAAV 粒子は、CNS の非ニューロン細胞またはニューロン細胞を形質導入する能力がある。いくつかの実施形態において、上記 CNS 細胞は、ニューロン、グリア細胞、星細胞、またはミクログリア細胞である。

【0069】

別の局面において、本開示は、本明細書に記載されるベクタースタッファー配列を含む

50

r A A V 粒子でトランスフェクトされた宿主細胞を提供する。いくつかの実施形態において、上記宿主細胞は、原核生物細胞または真核生物細胞である。いくつかの実施形態において、上記宿主細胞は、哺乳動物細胞（例えば、HEK293T、COS細胞、HeLa細胞、KB細胞）、細菌細胞（E. coli）、酵母細胞、昆虫細胞（Sf9、Sf21、Drosophila、蚊）などである。

【0070】

使用方法

別の局面において、本開示は、治療剤を被験体に送達する方法であって、上記方法は、本開示の組成物（例えば、本明細書で提供されるベクタースタッフアー配列および治療剤をコードする異種核酸配列を含む発現構築物を含むr A A Vベクターを含むr A A V粒子、）を投与することを包含する方法を提供する。いくつかの実施形態において、上記細胞は、CNS細胞である。いくつかの実施形態において、上記細胞は、CNSの非ニューロン細胞またはニューロン細胞である。いくつかの実施形態において、上記CNSの非ニューロン細胞は、グリア細胞、星細胞、またはミクログリア細胞である。いくつかの実施形態において、上記細胞は、インビトロにある。いくつかの実施形態において、上記細胞は、神経変性疾患の1もしくはこれより多くの症状を有するか、または神経変性疾患を有すると疑われる被験体に由来する。

10

【0071】

本明細書で使用される場合、用語「処置する」とは、神経変性疾患（例えば、ALS / FTD、アルツハイマー病、パーキンソン病など）の発生を防止もしくは遅らせること；神経変性疾患の重篤度を低減すること；神経変性疾患に特徴的な症状の発生を低減または防止すること；神経変性疾患に特徴的な症状の増悪を防止すること、またはこれらの任意の組み合わせに言及する。

20

【0072】

いくつかの実施形態において、被験体は、神経変性疾患を有するか、または神経変性疾患を発生させるリスクにある。神経変性疾患の例としては、脊髄小脳失調症2型、筋萎縮性側索硬化症、前頭側頭型認知症、原発性側索硬化症、進行性筋萎縮症、辺縁系優位型加齢性TDP-43脳症、慢性外傷性脳症、レビー小体型認知症、大脳皮質基底核変性症、進行性核上性麻痺（PSP）、グアム島の認知症パーキンソニズムALS複合（G-PDC）、ピック病、海馬硬化症、ハンチントン病、パーキンソン病、およびアルツハイマー病が挙げられる。

30

【0073】

いくつかの実施形態において、本開示の処置のための方法は、神経変性疾患に特徴的な1またはこれより多くの症状の発生または進行を低減、防止、または遅らせる。神経変性疾患に特徴的な症状の例としては、運動機能障害、認知機能障害、情動/行動機能障害、またはこれらの任意の組み合わせが挙げられる。麻痺、震え、不安定、硬直、痙攣、筋力低下、筋痙攣、筋硬直、筋萎縮症、嚥下困難、呼吸困難、発話および言語障害（speech and language difficulties）（例えば、不明瞭発語）、動作緩慢、歩行困難、認知症、うつ、不安、またはこれらの任意の組み合わせ。

【0074】

いくつかの実施形態において、本開示の処置のための方法は、神経変性疾患の処置のための単剤療法としての、または1またはこれより多くのさらなる治療との組み合わせでの投与を包含する。併用療法は、1またはこれより多くの治療と併せて、その前、引き続いている、被験体への本開示の組成物の投与を意味し得る。併用療法の同時の投与は、本開示の組成物およびさらなる治療が、同じ投与形態での投与のために製剤化されているか、または別個の投与形態において投与されることを意味し得る。

40

【0075】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法のうちのいずれかにおいて処置される被験体は、哺乳動物（例えば、マウス、ラット）、好ましくは霊長類（例えば、サル、チンパンジー）、またはヒトである。

50

【0076】

本明細書で記載される方法のうちいずれかにおいて、本開示の組成物は、任意の経路によって（経腸（例えば、経口）、非経口、静脈内、筋肉内、動脈内、髄内、髄腔内、軟膜下、実質内、線条体内、頭蓋内、大槽内、脳内、脳室内、眼内、室内（intraventricular）、腰椎内、皮下、経皮、皮内、直腸、腔内、腹腔内、局所（散剤、軟膏剤、クリーム剤、および/もしくは滴剤によるような）、粘膜、鼻、頬側（buccal）、舌下が挙げられる）；気管内滴注、気管支滴注、および/もしくは吸入によって；ならびに/または経口スプレー、鼻スプレー、および/もしくはエアロゾルとして、被験体に投与され得る。一般に、最も適切な投与経路は、薬剤の性質（例えば、消化管の環境におけるその安定性）、および/または被験体の状態を含む種々の要因に依存する。いくつかの実施形態において、組成物は、被験体のCNSへと直接注射される。いくつかの実施形態において、組成物は、髄腔内、軟膜下、実質内、線条体内、頭蓋内、大槽内、脳内、脳室内、眼内、室内、腰椎内投与、またはこれらの任意の組み合わせによって注射される。

10

【0077】

いくつかの実施形態において、本開示の組成物は、被験体のCNSへと直接注射される。いくつかの実施形態において、CNSへの直接注射は、脳内注射、実質内注射、髄腔内注射、線条体内注射、軟膜下注射、またはこれらの任意の組み合わせである。いくつかの実施形態において、CNSへの直接注射は、被験体の脳脊髄液（CSF）への直接注射であり、必要に応じて、ここで上記直接注射は、大槽内注射、室内注射、腰椎内注射、またはこれらの任意の組み合わせである。

20

【実施例】

【0078】

実施例

実施例1：ベクター「スタッパー」配列の設計

ベーススタッパー配列についての「必ずしも必要でない」ヒトゲノムDNAの選択

スタッパー配列のいかなる望ましくない影響をも最小限にするために、2つの意図した特性を有するヒトゲノムの「必ずしも必要でない」領域を特定した：（a）ゲノムにおける組み込みが起こる場合に最小限の影響を有する配列（しかし、これはAAVに関しては非常に希であると考えられる）；および（b）予測外の転写の開始の最小限のリスクを有する配列。従って、i）欠失および重複が集団において一般的であり、疾患関連表現型とは関連していない（進化圧の証拠がない）；ならびに/またはii）ヒト組織にわたるRNA発現が低いまたは検出不能である（強い固有のエンハンサー/プロモーターエレメントを欠いている）ゲノムの領域を調べた。この検索から、2つの領域を優先した：

30

【0079】

領域I：AMELY遺伝子領域（chrY：6,865,918-6,874,027, HG38）

多数の一連の証拠から、AMELY遺伝子領域は進化的選択の下にないことが示唆される。第1に、AMELY領域は、古来の重複事象から生じたものであり、選択下にあるX染色体上に機能的ホモログを有する（Lahn, & Page, Science (1999) 286, 964-967）。第2に、AMELY遺伝子は、最近の陽性選択の証拠はなく、予測されるより多くのタンパク質変化バリエーション（protein altering variant）（推定される機能喪失バリエーションを含む）を有する（Nature (2020) 581, 434-443; https://gnomad.broadinstitute.org/gene/ENSG00000099721?dataset=gnomad_r2_1）。第3に、AMELY領域の遺伝的バリエーションは、欠失または重複に関してヒトにおいて表現型的影響を有しないことが示されている。AMELYの重複は一般的であり、表現型を有しない（Hum Genet. (2015) 134:789-800）。第4に、欠失は一般的であり、検出可能な表現型を有しない（Hum Mol Genet (2007) 16:307-16）。さらに、

40

50

AMELYは、ヒトのいかなる希少疾患とも関連付けられていない(Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM.org.)。

【0080】

AMELY mRNAは、大部分のヒト組織において検出可能に発現されず(GTEX, The GTEx Consortium. (Science (2020) 369:1318-1330)、Y染色体キャリア(男性)にのみ存在する。さらに、AMELY(AMELYの機能的ホモログ)は、発生の際に歯のエナメル質に関与する(Front Physiol. (2017) 8:435)。

【0081】

領域II: PSG遺伝子領域(chr19:43,511,809-43,530,631, HG38)

同様に、多数の一連の証拠から、妊娠特異的糖タンパク質(PSG)は明確な進化的選択の下にないことが示唆される。第1に、PSGクラスターは、分節重複から生じた(Dumont and Eichler PLoS One (2013) 8:e75949)。第2に、上記領域が、予測されるより多くの機能喪失バリエーションが推定される進化的制約の下にあるという証拠は存在しない(Nature (2020) 581:434-443; https://gnomad.broadinstitute.org/gene/ENSG00000243130?dataset=gnomad_r2_1)。第3に、PSGクラスターは、ヒトのいかなる希少疾患とも関連付けられていない(Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM.org)。

【0082】

PSG領域は、代表的には、妊娠中に胎盤によってのみ高度に発現され、他の組織では、発現がない/低い(GTEX, The GTEx Consortium. (Science (2020) 369:1318-1330)。

【0083】

ベーススタッファー配列の改変

AMELY領域(chrY:6,865,918-6,874,027, HG38)およびPSG遺伝子領域(chr19:43,511,809-43,530,631, HG38)に由来するDNA配列を、配列を「不活性にする」、または何らかの発現される領域、公知もしくは推定される調節エレメントおよび反復エレメント(レトロウイルスエレメントおよび転位因子を含む)を欠くという目的で改変した。これらの変化を、パッケージされたベクターゲノムを含む領域において使用されることを意図したスタッファー配列に関して最も厳密に実施した。

【0084】

具体的には、塩基配列(chrY:6,865,918-6,874,027, HG38)および(chr19:43,511,809-43,530,631, HG38)を、以下の様式において改変した(図1を参照のこと):

i) 以下の発現される領域を除去する: 両側にエキソン+10bp(エキソンをGENCODE v19において遺伝子モデルを使用して定義した)、ヒト発現配列タグ(EST's: UCSCゲノムブラウザ上の「Human ESTs Including Unsplliced」トラックを使用して、Genbankデータに基づいて定義:(Nucleic Acids Res. (2004) 32(Database issue):D23-6.)。

ii) 調節エレメントを除去する: UCSCゲノムブラウザ上の以下のトラックを使用して、以下を定義した: CpGアイランド(CpG Islands)(J Mol Biol. (1987) 196(2):261-82)、ENCODE 3(Nature (2012) 489(7414):57-74.)からのChIP-seq(転写因子によって結合される配列)転写因子ChIP-seqピーク(Transcription Factor ChIP-seq Peaks)(129の細胞タイプにおけ

る340の因子)によって特定される領域、保存された転写因子結合部位(Transcription Factor Binding Sites)(HMR保存転写因子結合部位(HMR Conserved Transcription Factor Binding Sites)トラック)、VISTAエンハンサー(LBNL由来Vista HMR-保存非コードヒトエンハンサー(Vista HMR-Conserved Non-coding Human Enhancers from LBNL)トラック)、およびオープン調節アノテーション(Open Regulatory Annotation)「ORegAnno」(ORegAnnoトラックからの調節エレメント; (Nucleic Acids Res. (2016) 44(D1):D126-32.))。

10

iii) 反復エレメントを除去する: リピートマスクーによる反復エレメント(Repeating Elements by RepeatMasker)トラック(<http://www.repeatmasker.org>)を使用して、反復マスクエレメント(SINE、LINE、LTR、DNAエレメントを含む)、マイクロサテライト-ジヌクレオチドおよびトリヌクレオチド反復(Microsatellites - Dinucleotide and Trinucleotide Repeats)トラック(Nucleic Acids Res. (1999) 27(2):573-80)によって定義されるマイクロサテライト反復、ならびにリピートマスクー(RepeatMasker)(<http://www.repeatmasker.org>)によって定義される中断されたおよび単純な反復。

20

iv) 予測外の翻訳の尤度を低減するために、ATG残基を改変して、ATG配列の頻度を低減した。

v) CpGジヌクレオチドの編集。AAVにパッケージングされる場合に、自然免疫活性化を誘発する、細菌において生成されるcisプラスミドからの非メチル化CpGジヌクレオチドの尤度を下げるために、CGジヌクレオチドの存在を、塩基を編集することによって低減した。

【0085】

実施例2: スタッファーポリヌクレオチドを使用してパッケージングされたAAVベクターゲノムの安全性の評価

実施例1に従って記載されるスタッファー配列を、いかなるさらなる活性エレメント(例えば、miRNA)の包含もなしに組み込むベクターを、インピボで安全性に関して試験した。AMELYおよびPSG11に由来するスタッファーの各々の2つのバリエーションで4つのベクターのセットを設計した(配列番号25~28)。各ベクターは、左ITR(配列番号57)の直ぐ下流の5'側においてH1ショートプロモーターを含み、非miRNA制御配列を、上記H1ショートプロモーターの下流にmiRNAの代わりに含めた。Pol IIターミネーターを、制御配列の3'側に配置する。並行して、3つのコントロールを試験した: ビヒクル; H1プロモーターの制御下で、HeLaおよびU2OS細胞上で、レンチウイルスフォーマットで試験した場合に毒性を示すことが以前に示されたATXN2を標的化する人工miRNA配列をコードするベクター(scAAV_H1_miR16-2-1479_AMELY_V1(配列番号81)); およびAtxn2特異的miRNAおよびGFPをコードするベクター(scAAV_H1_miR1-1-XD-14792_Cbh_GFP_SV40p(配列番号82))。毒性を示すことが以前に示された人工miRNAを選択して、上記特異的人工miRNA配列のオフターゲット効果をおそらく介して、毒性に関する陽性コントロールとして供した。

30

40

【0086】

ベクターを、尾静脈を介して1.3E11全ウイルスゲノム(vg)を16週齢の野生型C57Bl/6マウスに静脈内投与した。カラム精製ベクターのDNA濃度に基づいて力価を決定した。この濃度を、ベクターゲノムqPCRによっても力価測定した、同様に精製したベクターの濃度と比較して、本実施例において記載されるスタッファーベクターについての相当する力価を計算した。血液を処理し、血清を、任意の肝毒性の代用物と

50

して、肝酵素、アラニントランスアミナーゼ (ALT) およびアスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST) の濃度に関して評価した。毒性の陽性コントロール人工 miRNA を発現するベクターは、肝酵素、ALT および AST の実質的上昇を誘発した。対照的に、スタッファー配列を有するベクターはいずれも、肝酵素の上昇を誘発しなかった (図 2 A ~ 2 B)。

【0087】

肝臓の組織学的評価を、任意の毒性を評価するために病理学者が行った。投与の 28 日後、動物 (n = 5 動物 / スタッファーベクター処置) を殺し、肝臓を、4% パラホルムアルデヒド中で 24 時間浸漬固定した。肝臓 1 つあたり 2 つの断面をパラフィン中に包埋し、5 ミクロン厚において切片化し、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色した。顕微鏡写真を、Olympus BX60 顕微鏡で撮影した。毒性陽性コントロール miRNA を投与した動物は、卵円形細胞過形成、肝細胞融合および多核化、リンパ組織球性肝炎、類洞線維症、組織球内色素、および希な単一細胞アポトーシス / 壊死を含む多くの病変を示した。スタッファー含有ベクターにおいて、組織学的所見は、付随的なバックグラウンド病変に限定され、処置関連傾向に従わず、複数の処置群にわたって認められた。所見は、肝の糖原病 (肝細胞グリコーゲン蓄積) および稀少な小肉芽腫におけるバリエーションを含んだ。所見は、化合物関連処置毒性を反映するとは見做されなかった。

【0088】

実施例 3 : 特異的スタッファー設計におけるベクターゲノム短縮の評価

rAAV ベクターゲノム調製物は、miRNA のようなヘアピン構造において最も顕著であるが、DNA 二次構造の他の領域においても顕著である短縮化ベクターゲノムを含むことが公知である。従って、スタッファー配列の異なる形態を含む rAAV の調製物における短縮化ゲノムの存在を、評価した。

【0089】

図 3 A ~ 3 C は、Fragment Analyzer 分析からの DNA トレースを示す。rAAV ベクター (scAAV9_H1_ロング_miR-100_3330_PSG11_V5 (配列番号 16)) 生成の後に、ベクター DNA を抽出し、カラム精製し (Zymo, P/N D3015)、Agilent Fragment Analyzer (HS NGS Fragment 1-6000 bp) で実行した。二重ピークトレースが認められ得 (図 3 A)、これらの二重ピークは、ITR を含む全長構造であることが決定された。なぜならそれらは、右側の野生型 ITR を除去する部位において制限消化によって分解されるからである。意図された全長生成物の左により小さなショルダー (より短い短縮化されたゲノムを示す) がまた、存在する。amiRNA を中心としたサブピーク (amiRNA において短縮化されたベクターゲノムの代表である) は、多くの調製物において見出される (図 3 D)。類似のピークは、コントロール配列が amiRNA の代わりに使用されるが、パリンドローム配列のような二次構造を含む場合に存在する。

【0090】

図 3 E ~ 3 F は、PSG11 に由来するスタッファー配列の 2 つのバージョン (PSG11_V1 (配列番号 45) および PSG11_V2 (配列番号 46)) のうちの一方を含む cis プラスミドに由来する 2 つの rAAV 調製物 (scAAV9_H1_MCS_PSG11_V1 (配列番号 27) および scAAV9_H1_MCS_PSG11_V2 (配列番号 28)) を比較する。これらの配列は構造的に類似であるが、ATG 部位を編集して、PSG11_V2 における ATG 配列を排除した。発現カセットに隣接するスタッファー配列の 5' 部分にいくらかの構造的差異が存在した (H1 プロモーターおよび amiRNA または図 3 E に示されるベクターにおいてのいずれか、制御配列)。トレースは、全長生成物の左にある「ショルダー」が、PSG11_V1 含有ベクターゲノム調製物ではより小さいことを示す (図 3 F)。これらのベクター調製物において、amiRNA は使用されなかった。

【0091】

図 3 G ~ 3 H は、スタッファー配列 PSG11_V1 (配列番号 45) または PSG11

10

20

30

40

50

1 __ V 2 (配列番号 4 6) のいずれかを含む c i s プラスミドに由来する 2 つの r A A V 調製物 (s c A A V 9 __ H 1 __ m i R - 1 - 1 - X D - 1 4 7 9 2 __ P S G 1 1 __ V 1 (配列番号 7 8) および s c A A V 9 __ H 1 __ n a t i v e __ m i R - 1 - 1 - X D - 1 4 7 9 2 __ P S G 1 1 __ V 2 (配列番号 7 9)) の類似のセットを比較する。この場合、両方のベクターが、H 1 プロモーターの下流に a m i R N A エlementを含む (P S G 1 1 __ V 2 含有ベクターのプロモーター配列においては、V 1 含有ベクターに対比して 3 ヌクレオチドが挿入されているが、他の点では、5 ' 配列は同一である)。フラグメントアナライザートレース (図 3 H) の精査によれば、a m i R N A 部位における短縮が、P S G 1 1 __ V 2 スタッファー配列を含むベクターにおいてかなり大きいことが認められ得る。
【 0 0 9 2 】

10

ここで記載されるもののような自己相補的 A A V (s c A A V) ベクターの複製は、野生型 I T R からの複製の開始を伴う。ここで記載される配列において、これは、c i s プラスミドにおいて 3 ' 側に存在する。従って、ポリメラーゼは、最初に、スタッファー配列を通して 3 ' から 5 ' へと a m i R N A に向かって通過して横切る。その短縮化生成物の増加に関する潜在的説明は、ポリメラーゼが a m i R N A のヘアピンの直前に遭遇し得る二次構造が、悪化した短縮化をもたらす鎖スイッチング活性を促進するということである。この仮説と一致して、a m i R N A の直ぐ 3 ' 側で、P S G 1 1 __ V 2 スタッファー配列 (配列番号 5 6 ; 図 4 B) に対比して P S G 1 1 __ V 1 スタッファー配列 (配列番号 5 5 ; 図 4 A) 内の D N A 配列の 2 0 0 ヌクレオチドの折りたたみを調べると、P S G 1 1 __ V 2 スタッファーにおいて推定二次構造の増加の領域が明らかになった。従って、P S G 1 1 __ V 1 配列構造は、都合がよかった。「P S G 1 1 __ V 5」スタッファー配列 (配列番号 4 8) は、P S G 1 1 __ V 1 配列に由来する都合の良い配列構造を使用することによって生成した。これは、短縮化ベクターゲノムが低減したベクター調製物を生じると想定される。低メチル化 C p G ジヌクレオチドまたは意図されないオープンリーディングフレームについての潜在性を低減するために、上記 __ V 5 スタッファーには、C G 配列および A T G 配列への編集を組み込んだ。

20

【 0 0 9 3 】

実施例 4 : A t x n 2 a m i R N A 発現カセットと組み合わせた場合のスタッファー配列の安全性のさらなる評価

種々のスタッファー配列を含む 2 4 の異なるベクター設計をインビボでの安全性に関して評価する実験を行った。H 1 プロモーターの 3 種の異なるバリエーション (H 1 ショート (配列番号 5 4) 、H 1 天然 (配列番号 5 3) 、H 1 ロング (配列番号 5 2)) 、2 種の異なる A T X N 2 標的化人工 m i R N A (3 3 3 0 または 1 4 7 9 2 (本明細書中で 1 7 8 4 ともいわれる)) / m i R 骨格 (m i R 1 . 1 . または m i R 1 0 0) の組み合わせ (m i R 1 0 0 __ 3 3 3 0 (配列番号 1 2 をコードする) ; m i R 1 . 1 __ 1 4 7 9 2 (配列番号 7 3 をコードする)) 、P o l - I I 転写ターミネーター S V 4 0 ポリアデニル化配列の存在または非存在、およびスタッファー配列の異なるバージョン (A M E L Y __ V 3 (配列番号 5 1) 、P S G 1 1 __ V 2 (配列番号 4 6) 、P S G 1 1 __ V 3 (配列番号 4 7) 、P S G 1 1 __ V 5 (配列番号 4 8)) を、種々の組み合わせにおいてアセンブルした (表 1 を参照のこと) 。以前の例にあるように、これらのベクターにおいて、H 1 プロモーターは、自己相補的 A A V ベクターとしてのパッケージングが意図された c i s プラスミドにおいて 5 ' から 3 ' へと配向され、ここで変異体 I T R (末端分解部位を欠いている) は 5 ' 側にあり (例えば、配列番号 5 7 または配列番号 1 3 ~ 2 4 、2 9 ~ 4 4 、および 7 8 ~ 8 2 のうちのいずれか 1 つのヌクレオチド 1 ~ 1 0 6) 、及び野生型 A A V I T R は 3 ' 側にある (例えば、配列番号 5 8 または配列番号 1 3 ~ 1 6 のうちのいずれか 1 つのヌクレオチド 2 2 1 4 ~ 2 3 5 8) 。このプロモーター配向を使用する理由は、m i R 中心の短縮が、末端分解部位を欠いている I T R を組み込むベクター (自己相補的 A A V ベクター) において可能であるからである。5 ' から 3 ' へのプロモーター配向において、m i R 中心の短縮を有するベクターは、プロモーターを含まないと思われるので、不活性であるはずである。プロモーターが 3 ' から 5 ' の配向にあるとすれば、プロモ

30

40

50

ーターは、m i R 中心の短縮を有するベクターに保持され得る。

【 0 0 9 4 】

r A A V ベクターを、これらの c i s プラスミドで生成し、ベクターを、12週齢の野生型 C 5 7 B 1 / 6 マウスに、体重によって調整した 3.21×10^9 ベクターゲノム / g マウスの用量 (平均全用量 8.5×10^8 ベクターゲノム) において尾静脈注射によって i . v . 投与した。ビヒクルコントロール動物に、0.001% P F - 6 8 を有する P B S を投与した。投与の2週間後に顎下採血によって血液を集め、肝酵素濃度 (アスパラギン酸トランスアミナーゼ (A S T) およびアラニントランスアミナーゼ (A L T)) (図 5 A ~ 5 B) を、種々のベクター設計を投与した動物において測定した。スタッフアー含有ベクターで処置した動物に関するほとんど全てのデータ点は、正常な参照範囲内であった。2つのデータ点は、A S T シグナルが参照を上回って上昇したことを示すが、溶血がこれらのサンプルにおいて注記され、1サンプルはビヒクル処置動物に由来した。この時点において上記ベクターフォーマットのうちのいずれかを投与した動物に由来する他のサンプルのうちのいずれにおいても、参照範囲を上回って A S T も A L T も上昇せず、これは、これらのスタッフアー配列をコードするベクターでの r A A V 投与に応答した急性の肝傷害の証拠が存在しなかったことを示唆する。

10

20

30

40

50

表 1: i.v. 投与したベクターあたりの評価した動物の概要 (肝臓組織像)

ベクター	プロモーター	miR	ターミネーター	スタッフアー	N
scAAV_HI_シオト_miR100_3330_SV40_AMELY_V3 [配列番号44]	H1.シオト	miR100-3330	SV40	AMELY_V3	1
scAAV_HI_シオト_miR100_3330_AMELY_V3 [配列番号42]	H1.シオト	miR100-3330	なし	AMELY_V3	1
scAAV_HI_シオト_miR1-1_1784_SV40_AMELY_V3 [配列番号40]	H1.シオト	miR1.1-1784	SV40	AMELY_V3	1
scAAV_HI_シオト_miR1-1_1784_AMELY_V3 [配列番号37]	H1.シオト	miR1.1-1784	なし	AMELY_V3	1
scAAV_HI_天然_miR100_3330_SV40_AMELY_V3 [配列番号35]	H1.天然	miR100.3330	SV40	AMELY_V3	1
scAAV_HI_天然_miR100_3330_AMELY_V3 [配列番号33]	H1.天然	miR100.3330	なし	AMELY_V3	1
scAAV_HI_天然_miR1-1_1784_SV40_AMELY_V3 [配列番号31]	H1.天然	miR1.1.1784	SV40	AMELY_V3	2
scAAV_HI_天然_miR1-1_1784_AMELY_V3 [配列番号29]	H1.天然	miR1.1.1784	なし	AMELY_V3	1
scAAV_HI_ロング_miR100_3330_SV40_AMELY_V3 [配列番号23]	H1.ロング	miR100.3330	SV40	AMELY_V3	1
scAAV_HI_ロング_miR100_3330_AMELY_V3 [配列番号22]	H1.ロング	miR100.3330	なし	AMELY_V3	1
scAAV_HI_ロング_miR1-1_1784_SV40_AMELY_V3 [配列番号20]	H1.ロング	miR1.1.1784	SV40	AMELY_V3	1
scAAV_HI_ロング_miR1-1_1784_AMELY_V3 [配列番号18]	H1.ロング	miR1.1.1784	なし	AMELY_V3	2
scAAV_HI_シオト_miR1-1_1784_SV40_PSG11_V3 [配列番号41]	H1.シオト	miR1.1.1784	SV40	PSG11_V3	1
scAAV_HI_シオト_miR1-1_1784_PSG11_V3 [配列番号38]	H1.シオト	miR1.1.1784	なし	PSG11_V3	1

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

ベクター	プロモーター	miR	ターミネーター	スタッフター	N
scAAV_H1_ロンダ_miR1-1_1784_PSG11_V2 [配列番号19]	H1.ロンダ	miR1.1.1784	なし	PSG11_V2	1
scAAV_H1_ショート_miR100_3330_PSG11_V5 [配列番号43]	H1.ショート	miR100.3330	なし	PSG11_V5	1
scAAV_H1_ショート_miR1-1_1784_PSG11_V5 [配列番号39]	H1.ショート	miR1.1.1784	なし	PSG11_V5	1
scAAV_H1_天然_miR100_3330_SV40_PSG11_V5 [配列番号36]	H1.天然	miR100.3330	SV40	PSG11_V5	1
scAAV_H1_ロンダ_miR1-1_1784_SV40_PSG11_V5 [配列番号21]	H1.ロンダ	miR1.1.1784	SV40	PSG11_V5	1
scAAV_H1_天然_miR100_3330_PSG11_V5 [配列番号34]	H1.天然	miR100.3330	なし	PSG11_V5	1
scAAV_H1_天然_miR1-1_1784_SV40_PSG11_V5 [配列番号32]	H1.天然	miR1.1.1784	SV40	PSG11_V5	1
scAAV_H1_天然_miR1-1_1784_PSG11_V5 [配列番号30]	H1.天然	miR1.1.1784	なし	PSG11_V5	1
scAAV_H1_ロンダ_miR100_3330_SV40_PSG11_V5 [配列番号24]	H1.ロンダ	miR100.3330	SV40	PSG11_V5	1
scAAV_H1_ロンダ_miR100_3330_PSG11_V5 [配列番号16]	H1.ロンダ	miR100.3330	なし	PSG11_V5	1

10

20

30

40

【0095】

スタッフター含有ベクターを静脈内投与した動物を、組織像によって肝毒性に関しても評価した。投与の3週間後に、0.5cm 左肝葉断片を連続して2枚、動物1匹あたりで採取し、パラフィン包埋し、5ミクロンへと切片化し、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色した。訓練された病理学者がスライドを評価した。表1に示されるように、1群あたりN = 1 ~ 2動物を評価した。評価後、試験物品の静脈内投与は、評価した全てのベクターに関して、試験した肝臓切片における変化と関連しているとは解釈されなかった。

【0096】

線条体内試験

50

【表 2】

表2: 線条体内投与したベクターあたりの評価した動物の概要(線条体組織像)

ベクター	プロモーター	miR	Pol II ターミネーター	スタッファー	N
	N/A(ナイーブ)				2
	N/A(偽注射、 針のみ)				2
	N/A(ビヒクル, PBS + .001% PF-68)				2
配列番号 37	H1.ショート	miR1.1.1784	なし	AMELY_V3	1
配列番号 29	H1.天然	miR1.1.1784	なし	AMELY_V3	1
配列番号 20	H1.ロング	miR100.3330	SV40	AMELY_V3	1
配列番号 22	H1.ロング	miR100.3330	なし	AMELY_V3	1
配列番号 18	H1.ロング	miR1.1.1784	なし	AMELY_V3	2
配列番号 19	H1.ロング	miR1.1.1784	なし	PSG11_V2	1
配列番号 43	H1.ショート	miR100.3330	なし	PSG11_V5	2
配列番号 36	H1.天然	miR100.3330	SV40	PSG11_V5	1
配列番号 34	H1.天然	miR100.3330	なし	PSG11_V5	1
配列番号 24	H1.ロング	miR100.3330	SV40	PSG11_V5	2
配列番号 16	H1.ロング	miR100.3330	なし	PSG11_V5	2

10

20

【0097】

これらのベクターを、8週齢の野生型 C57BL/6 マウスに1線条体あたり7.5 E9 ベクターゲノムの用量において、線条体への直接注射を介しても投与し、組織像観察によって毒性に関してベクターの部分セット(表2、上記)を評価した。投与後3週間の動物からの線条体の断片をパラフィン包埋し、5ミクロンブロックアドバンス(5 micron block advance)で切断した4枚の連続切片を、別個のスライドに載せた。3つのレベルからのステップセクションを含む2枚のスライドのセットを、含めた。切片を、ヘマトキシリンおよびエオシン、グリア線維性酸性タンパク質(GFAP)免疫組織化学、イオン化カルシウム結合アダプター分子1(IBA-1)免疫組織化学、ならびにfloro-jade Bで染色した。後者3つの染色を、それぞれ、星細胞反応性、ミクログリア反応性、およびニューロン死を評価するために使用し得る。

30

【0098】

i.v. 投与ベクターで処置した動物からの肝臓切片と同様に、試験物品の影響は、試験した脳切片において特定されなかった。いくつかの組織では、取り扱いによるアーチファクトが解釈を制限した。一般に、変化は、注射部位において観察され、軽いグリオーシス(H&E染色したスライドで特定)、わずかなミクログリオシス(GFAP標識スライドで特定)、および微妙なヘモジデリン色素を有する組織のわずかな破壊を含んだ。ヘモジデリン色素は、実質内注射に伴う一般的な変化である。試験物品は、任意の動物からの基底核/線条体のレベルにおいて試験した切片のいずれにおいても、実験手順と関連する増悪または変化を引き起こすとは解釈されなかった。

40

【0099】

転写分析

ベクターの安全性をさらに評価するために、上記のベクターを投与した動物からの線条体パンチ生検で配列決定分析を行った。線条体組織をカラム精製して、QiagenのAllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit(Qiagen, P/N 80004)を使用して(DNase処理後に)RNAを抽出した。Stranded RNA-seqライブラリーを、Stranded Total RNA Prep Ligation with Ribo-Zero Plusキット(Illum

50

ina, P/N 20040525) で調製し、続いて、Illumina NovaSeq 6000 システムでペアエンド 2×100 bp 配列決定を行った。次いで、これらのリードを、その動物に投与された rAAV をパッケージングするために使用したそれぞれの cis プラスミドに対して整列させた。別個に、DNA を、その配列決定した RNA を抽出するために使用した同じパンチ生検から精製し (Qiagen, P/N 80004)、ベクター曝露を確認した。表 3 は、ベクターとともに、試験した各サンプルについての曝露を列挙する。

【表 3】

表 3: stranded RNA-seq によって評価したサンプルにおけるベクター生体分布

曝露 (VG/二倍体ゲノム)	構築物
142	scAAV_H1_ロング_miR100_3330_AMELY_V3 [配列番号22]
101	scAAV_H1_ロング_miR100_3330_AMELY_V3 [配列番号22]
53	scAAV_H1_ロング_miR1-1_1784_AMELY_V3 [配列番号18]
85	scAAV_H1_ロング_miR1-1_1784_AMELY_V3 [配列番号18]
63	scAAV_H1_ロング_miR100_3330_PSG11_V5 [配列番号16]
71	scAAV_H1_ロング_miR100_3330_PSG11_V5 [配列番号16]
56	scAAV_H1_ショート_miR100_3330_AMELY_V3 [配列番号42]
80	scAAV_H1_ショート_miR100_3330_AMELY_V3 [配列番号42]
82	scAAV_H1_ショート_miR1-1_1784_SV40_AMELY_V3 [配列番号40]
60	scAAV_H1_ショート_miR1-1_1784_SV40_AMELY_V3 [配列番号40]
77	scAAV_H1_ロング_miR100_3330_SV40_PSG11_V5 [配列番号24]
65	scAAV_H1_ロング_miR100_3330_SV40_PSG11_V5 [配列番号24]
67	scAAV_H1_ショート_miR1-1_1784_AMELY_V3 [配列番号37]
52	scAAV_H1_ショート_miR1-1_1784_AMELY_V3 [配列番号37]
75	scAAV_H1_ショート_miR1-1_1784_PSG11_V3 [配列番号38]
106	scAAV_H1_ショート_miR1-1_1784_PSG11_V3 [配列番号38]
121	scAAV_H1_ショート_miR1-1_1784_PSG11_V5 [配列番号39]
28.9	scAAV_H1_ショート_miR1-1_1784_PSG11_V5 [配列番号39]
136	scAAV_H1_ロング_miR1-1_1784_PSG11_V2 [配列番号19]
36.6	scAAV_H1_ロング_miR100_3330_SV40_AMELY_V3 [配列番号23]
55	scAAV_H1_ショート_miR1-1_1784_SV40_PSG11_V3 [配列番号41]
70	scAAV_H1_ショート_miR1-1_1784_SV40_PSG11_V3 [配列番号41]
37.7	scAAV_H1_ロング_miR100_3330_SV40_AMELY_V3 [配列番号23]
147	scAAV_H1_ロング_miR1-1_1784_PSG11_V2 [配列番号19]

10

20

30

40

【0100】

図 6 は、代表的なベクターからのリードの集積 (pile up) を示す。驚くべきことに、PSG11_V5 スタッファー配列とともに、H1 ショートプロモーターおよび mi

50

R 1.1 骨格を使用すると、pri-miRNAの予測される転写の下流でcisプラスミドに整列するリードの数の増加がもたらされた。対照的に、PSG11 V5スタッパーとともにH1ロングプロモーターを使用すると、意図されない転写の有益な最小量ももたらされた。従って、エレメントのこの組み合わせは、非miRNA転写の望ましい低頻度を有するベクター構成を生じた。

【0101】

実施例5：異なるrAAVベクターフォーマットにおけるAtxn2 amiRNA発現カセットと組み合わせた場合のスタッパー配列の機能性の実証

実施例4に記載される24のベクター組み合わせのセットを投与した動物を、スタッパー、プロモーター、およびATXN2標的化人工miRNAの組み合わせの全ての機能性についても評価した。Atxn2のノックダウンを、i.v.投与(用量：3.21 E9 vg/グラム マウス)の3週間後に肝臓組織からRNAを抽出し、次いで、Atxn2およびコントロールプローブHprtを用いるRT-ddPCRを行うことによって評価した。Atxn2レベルを、これらのATXN2/コントロール転写物比の平均として計算し、ビヒクルを投与した動物に関して得られた比に対してさらに正規化した。ベクターゲノム曝露をまた、ベクターゲノムに対するプローブおよびマウスゲノムプローブ(Tert)を用いるddPCRを使用して測定した。表4に認められるように、強いAtxn2ノックダウンが、スタッパー配列およびmiRNAベクター構成要素の全ての組み合わせで処置した動物において起こった。

10

20

30

40

50

【表 4 - 1】

表 4: スタックアー配列を含む種々のベクターによる肝臓 *Axm2* ノックダウン

プロモーター	miR	ターミネーター	スタックアー	平均 比	SD 比	計数	平均 VG	SD VG
N/A (ビヒクル)				100	16.54	18	0.01	0.01
H1.ロング	miR1.1.14792	なし	AMELY_V3	8.68	2.88	3	6.65	1.07
H1.ロング	miR1.1.14792	なし	PSG11_V2	6.07	0.99	3	65	14.73
H1.ロング	miR1.1.14792	SV40	AMELY_V3	13.37	4.52	3	5.36	1.47
H1.ロング	miR1.1.14792	SV40	PSG11_V5	9.25	4.52	3	9.32	0.98
H1.ロング	miR100.3330	なし	AMELY_V3	15.99	1.91	3	8.93	2.07
H1.ロング	miR100.3330	なし	PSG11_V5	13.46	3.21	3	8.02	0.49
H1.ロング	miR100.3330	SV40	AMELY_V3	21.4	2.06	4	3.58	0.54
H1.ロング	miR100.3330	SV40	PSG11_V5	9.75	0.69	3	8.1	2.5
H1.天然	miR1.1.14792	なし	AMELY_V3	19.49	3.84	3	2.71	0.22
H1.天然	miR1.1.14792	なし	PSG11_V5	13.55	8.91	3	8.81	2.01
H1.天然	miR1.1.14792	SV40	AMELY_V3	31.65	38.34	4	3.24	0.66
H1.天然	miR1.1.14792	SV40	PSG11_V5	13.65	7.94	3	7.11	0.78
H1.天然	miR100.3330	なし	AMELY_V3	27.76	6.87	3	4.13	0.87
H1.天然	miR100.3330	なし	PSG11_V5	18.38	3.6	3	3.81	0.95
H1.天然	miR100.3330	SV40	AMELY_V3	30.61	4.02	3	3.05	0.47
H1.天然	miR100.3330	SV40	PSG11_V5	22.41	9.68	3	5.34	2.38
H1.ショート	miR1.1.14792	なし	AMELY_V3	13.64	1.64	2	3.19	0.3
H1.ショート	miR1.1.14792	なし	PSG11_V3	11.55	4.64	4	2.47	0.66
H1.ショート	miR1.1.14792	なし	PSG11_V5	8.99	2.36	3	7.2	4.27
H1.ショート	miR1.1.14792	SV40	AMELY_V3	11.71	1.76	3	4.35	0.36
H1.ショート	miR1.1.14792	SV40	PSG11_V3	11.81	4.12	4	4.38	1.48
H1.ショート	miR100.3330	なし	AMELY_V3	17.53	3.67	3	4.47	1.38

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

プロモーター	miR	ターミネーター	スタッファー	平均 比	SD 比	計数	平均 VG	SD VG
H1.ショート	miR100.3330	なし	PSG11_V5	9.34	0.76	3	6.47	0.77
H1.ショート	miR100.3330	SV40	AMELY_V3	18.45	0.13	3	2.93	0.17

10

20

30

40

【0102】

実施例 6：異なる rAAV ベクターフォーマットにおける ATXN2 amiRNA 発現カセットと組み合わせた場合のスタッファー配列の生成収量および短縮のさらなる評価

実施例 4 は、プロモーターの「H1 ロング」バリエーションを、プロモーターの「H1 ショート」バリエーションに対比して PSG11_V5 スタッファー配列の上流に挿入した場合に、人工 miRNA 配列の下流における転写活性を低減するという予測外の利点を示す。H1 ロングプロモーターおよび H1 ショートプロモーター、ならびに AMELY および PSG11 に由来するスタッファー配列の組み合わせの生成収量もまた、評価した。生成収量を、スタッファー領域に対して特異的なプライマー/プローブセットを使用して、ベクタ

50

ーゲノムの ddPCR によって評価した。一般に、AMELY__V3 (配列番号 51)、PSG11__V5 (配列番号 48)、PSG11__V3 (配列番号 47)、および PSG11__V2 (配列番号 46) を含む、評価されるスタッファー配列との H1 ロングフォーマットプロモーター (配列番号 52) の組み合わせを有する cis プラスミドの使用は、より高い生成収量を生じた (図 7)。ベクター短縮の分析 (図 8A ~ 8C) から、H1 ショートプロモーターと比較して、プロモーターの H1 ロングバージョンを上流に含めた場合に、短縮がより少ないことがさらに示唆された。まとめると、これらのスタッファー配列の上流に H1 ロングプロモーターを含めると、おそらく、rAAV 複製およびパッケージングに影響し得る局所的 DNA 二次構造エレメントに起因して、多くの驚くべき利益がある。

10

【0103】

実施例 7：人工 miRNA のさらなる組み合わせとともにスタッファー配列を組み込むベクターの生成

実施例 1 に従って作製し、実施例 4 に記載されるとおりのプロモーターおよび特異的スタッファー配列の組み合わせを含むスタッファー配列を、それらが、AAV ベクターゲノムの一部として、rAAV においてパッケージングされる能力に関して評価した。ベクターにおいて異なるペイロードの文脈において良好な生産性を一貫して達成する能力をも、これらのスタッファー配列に関して試験した。

【0104】

PSG11 イントロン領域に由来し、実施例 1 における設計規則に従って改変され、最適な H1 ロングプロモーターバリエーションを含むスタッファー配列を、種々の ATXN2 標的化人工 miRNA パッケージングカセットを含むベクターのセットにおいてパッケージングした。5' ITR から 3' ITR の cis プラスミド配列は、以下に示される：配列番号 13 (scAAV__H1__ロング__miR100__1755__PSG11__V5__ITR__to__ITR)、配列番号 14 (scAAV__H1__ロング__miR100__2586__PSG11__V5__ITR__to__ITR)、配列番号 15 (scAAV__H1__ロング__miR100__2945__PSG11__V5__ITR__to__ITR)、および配列番号 16 (scAAV__H1__ロング__miR100__3330__PSG11__V5__ITR__to__ITR)。amiRNA ガイド、パッセンジャー、および発現カセットの配列は、表 5 に記載される。

20

30

40

50

【表 5 - 1】

表 5: RNAおよびDNAフォアーマットにおける人工miRNA配列

ATXN2 標的化位置	miR 骨格	ガイド配列 (RNA/DNA)	ハセリン配列 (RNA/DNA)	人工 miRNA (RNA/DNA)
1755	miR-100	UCGGGUUGAAAUCUGAAGU GUG [配列番号1] TCGGGTTGAAATCTGAAAGT GTG [配列番号59]	CACACUCCAGCUUUCAAAC CGU [配列番号5] CACACTCCAGCTTTCAAAACC GT [配列番号60]	CCCAAAAGAGAGAAGAUUUGAGGCCUGUUUG CCACAUCCGGUUGAAAUCUGAAGUUGGUU UAGUCCCGCACACUCCAGCUUUCAAACCGUUUGU GUUCUUAGGCAUUCACGGACCUUGGGGCU UUUCUUUAUUGCC [配列番号9] CCCAAAAGAGAGAAGATATTGAGGCCTGTTGC CACATCGGGTTGAAATCTGAAAGTGTGTTAG TCCGCACACTCCAGCTTTCAAAACCGTTGTGCT GTTAGGCAATCTCACGGACCTGGGGCTTTGCTT ATATGCC [配列番号61]
2945	miR-100	UGUAGUAGAAGGUUUUGG UGA [配列番号2] TGTAGTAGAAGGCTTTGGCT GA [配列番号62]	UCAGCCCAAGACUUUAU ACU [配列番号6] TCAGCCCAAGACTTCTAATA CT [配列番号63]	CCCAAAAGAGAGAAGAUUUGAGGCCUGUUUG CCACAUUAGUAGAGAAGGUUUUGGCUAGAU UAGUCCGUCAGCCAAAGACUUUAUUGU UGUCUUAGGCAUUCACGGACCUUGGGG UUUGCUUAUUGCC [配列番号10] CCCAAAAGAGAGAAGATATTGAGGCCTGTTGC CACATGTAGTAGAAGGCTTTGGCTGATATTAG TCCGTACGCCCAAGACTTCTAATACTTGTGCT GTTAGGCAATCTCACGGACCTGGGGCTTTGCTT ATATGCC [配列番号64]
2586	miR-100	UAGAUUCAGAAAGUAGA ACU UGG [配列番号3] TAGATTCAGAAGTAGA ACT	CCAAUCCUAAUUCUGACU CUU [配列番号7] CCAAAGTCCTAATTCTGACTC	CCCAAAAGAGAGAAGAUUUGAGGCCUGUUUG CCACAUAGAUUAGAGAAGUAGAACUUUGGUU UAGUCCGCCAAAGUCCUAAUUCUGACU UUUCUUAGGCAUUCACGGACCUUGGGG UUUGCUUAUUGCC

10

20

30

40

50

【表 5 - 2】

3330	miR-100	TGG [配列番号65] UUGCUGAGACUGAAUUG UGG [配列番号4] TATGCTGAGACTGATAATGT GG [配列番号68]	TT [配列番号66] CCACAUCUCCGUCUCAAC AUU [配列番号8] CCACATCATCCGCTCAACA TT [配列番号69]	[配列番号11] CCCAAAAGAGAGAAGATATTGAGGCCCTGTTC CACATAGATTCAAGAGTGAAGCTTGGGTATTA GTCCGCCAAGTCTTAATCTGACTCTTTGTGCT GTTAGGCAATCTCAGGACCTGGGGCTTTGCTT ATATGCC [配列番号67] CCCAAAAGAGAGAAGAUUUAGGCCUUGUUG CCACAUUGCUGAGACUGAAUUGUGGUUUAU UAGUCCGCCACAUCCGUCUCAACAUAUUGU GUCUGUAGGCAAUUCACGGACCUGGGGCU UUGCUAUAUUGCC [配列番号12] CCCAAAAGAGAGAAGATATTGAGGCCCTGTTC CACATATGCTGAGACTGATAATGTGGGTATTAG TCCGCCACATCATCCGCTCAACATTTGTGCT GTTAGGCAATCTCAGGACCTGGGGCTTTGCTT ATATGCC [配列番号70] CAUGCAGACUCUCCUGCUUGGUACAGACCAA AGAGUAGUCGAAUUAUGGACCUUAAGCUA AUUAAACUACUUGUUGUUAACUCUAGGCCG GGACCUUCUCGCGCACUGAGGGGCACUCCA CACCACGGGGGCC [配列番号73] CATGCAGACTGCCTGCTTGGGTACAGACCAA GAGTAGTCGAATTAIGGACCTGCTAAGCTAAT AACTACTTTTGGTCTGAACTCAGGCCGGGACC TCTCTCGCCGCACTGAGGGGCACCTCCACACCAC GGGGGCC [配列番号76]
1784 [14792とも いわれる]	miR-1-1	AUUAAUCUACUCUUGGUCU GAA [配列番号71] ATTAACACTCTTTTGGTCTG AA [配列番号74]	UCCAGACCAAAUUAUUGUU AAU [配列番号72] TCCAGACCAAAATATTAATTA AT [配列番号75]	[配列番号11] CCCAAAAGAGAGAAGATATTGAGGCCCTGTTC CACATAGATTCAAGAGTGAAGCTTGGGTATTA GTCCGCCAAGTCTTAATCTGACTCTTTGTGCT GTTAGGCAATCTCAGGACCTGGGGCTTTGCTT ATATGCC [配列番号67] CCCAAAAGAGAGAAGAUUUAGGCCUUGUUG CCACAUUGCUGAGACUGAAUUGUGGUUUAU UAGUCCGCCACAUCCGUCUCAACAUAUUGU GUCUGUAGGCAAUUCACGGACCUGGGGCU UUGCUAUAUUGCC [配列番号12] CCCAAAAGAGAGAAGATATTGAGGCCCTGTTC CACATATGCTGAGACTGATAATGTGGGTATTAG TCCGCCACATCATCCGCTCAACATTTGTGCT GTTAGGCAATCTCAGGACCTGGGGCTTTGCTT ATATGCC [配列番号70] CAUGCAGACUCUCCUGCUUGGUACAGACCAA AGAGUAGUCGAAUUAUGGACCUUAAGCUA AUUAAACUACUUGUUGUUAACUCUAGGCCG GGACCUUCUCGCGCACUGAGGGGCACUCCA CACCACGGGGGCC [配列番号73] CATGCAGACTGCCTGCTTGGGTACAGACCAA GAGTAGTCGAATTAIGGACCTGCTAAGCTAAT AACTACTTTTGGTCTGAACTCAGGCCGGGACC TCTCTCGCCGCACTGAGGGGCACCTCCACACCAC GGGGGCC [配列番号76]

10

20

30

40

【0105】

H1プロモーター（「H1ロング」）（配列番号52または配列番号13～16のうちのいずれか1つのヌクレオチド113～343）を、ベクターに組み込んだ。これらのベクターのAAV生成からの収量を、表6に列挙する。

【表 6】

表 6. H1ロング - PSG11_V5スタッファー配列含有ベクターを伴うAAVの生成収量

ベクター	収量	キャプシド	カラム測定法	生成スケール
H1-miR100_1755_PSG11_V5 (配列番号13)	6.4E12 vg	AAV9	ddPCR, スタッファー配列に対するプローブ	3180 cm ²
H1-miR100_1755_PSG11_V5 (配列番号13)	4.3E11 vg	AAV-DJ	ddPCR, スタッファー配列に対するプローブ	636 cm ²
H1-miR100_2586_PSG11_V5 (配列番号14)	6.6E12 vg	AAV9	ddPCR, スタッファー配列に対するプローブ	3180 cm ²
H1-miR100_2586_PSG11_V5 (配列番号14)	4.7E11 vg	AAV-DJ	ddPCR, スタッファー配列に対するプローブ	636 cm ²
H1-miR100_2945_PSG11_V5 (配列番号15)	3.5E12 vg	AAV9	ddPCR, スタッファー配列に対するプローブ	3180 cm ²
H1-miR100_2945_PSG11_V5 (配列番号15)	3.7E11 vg	AAV-DJ	ddPCR, スタッファー配列に対するプローブ	636 cm ²
H1-miR100_3330_PSG11_V5 (配列番号16)	5.1E12 vg	AAV9	ddPCR, スタッファー配列に対するプローブ	3180 cm ²
H1-miR100_3330_PSG11_V5 (配列番号16)	4.6E11 vg	AAV-DJ	ddPCR, スタッファー配列に対するプローブ	636 cm ²

10

20

30

40

【 0 1 0 6 】

AMELYに由来するスタッファー配列を、いくつかのベクターにおいてパッケージングした。ATXN2 標的化人工miRNAカセットおよびAMELYスタッファー配列を含む5' ITRから3' ITRまでのベクター配列を、「H1__ショート__miR16-2-1755__AMELY__V1」(配列番号17)および「H1 - miR1-1__1784__AMELY__V3」(配列番号18)に提供する。これらのベクターにおいて、AMELYに関する註釈「__V1」または「__V3」は、AMELYスタッファー配列の異なるバージョンに言及し、ここで「__V3」バージョンではATG配列が編集され、CpGジヌクレオチドが編集され(配列番号51または配列番号18のヌクレオチド4

50

88 ~ 2177)、 「__V1」は、そのように改変されていない(配列番号49または配列番号17のヌクレオチド342 ~ 2222)。H1__ショートとは、H1プロモーターの91bp短縮化形態(配列番号54または配列番号17のヌクレオチド113 ~ 203)に言及する。これらのベクターの生成からの収量を、表7に列挙する。

【表7】

表7:AMELYスタッファー配列含有ベクターを伴うAAVの生成収量

ベクター	収量	力価測定法	生成スケール
H1_ショート_miR16-2-1755_AMELY_V1 [配列番号17]	0.55 E10	qPCR, スタッファー配列におけるプローブ	3180 cm ²
H1_ショート_miR16-2-3330_AMELY_V1 [配列番号80]	2.55 E11	qPCR, スタッファー配列におけるプローブ	3180 cm ²
H1_ロング_miR1-1_1784_AMELY_V3 [配列番号18]	1.77 E12	ddPCR, スタッファー配列におけるプローブ	3180 cm ²

10

【0107】

実施例8:さらなるamiRNAと組み合わせたスタッファーポリヌクレオチドを使用してパッケージされるAAVベクターゲノムの機能性の実証

20

本明細書に記載されるスタッファー配列およびさらなるamiRNAを組み込むベクターゲノムへと組み込まれる場合に、ペイロードの機能性を試験する実験を行った。これは、スタッファー配列とamiRNA発現カセットとの適合性をさらに確立する。上記で記載されるベクターは全て、ATXN2を標的化する人工miRNAを発現する;機能性を、ATXN2標的のノックダウンによって決定する。

【0108】

1つの実験において、表8に列挙されるベクターを、ヒト幹細胞由来運動ニューロンにおけるATXN2 mRNAのノックダウンに関して評価した。ベクターは、以下を含んだ: scAAV__H1__ロング__miR100__1755__PSG11__V5__ITR__to__ITR.gb(配列番号13)、scAAV__H1__ロング__miR100__2586__PSG11__V5__ITR__to__ITR.gb(配列番号14)、scAAV__H1__ロング__miR100__2945__PSG11__V5__ITR__to__ITR.gb(配列番号15)、およびscAAV__H1__ロング__miR100__3330__PSG11__V5__ITR__to__ITR.gb(配列番号16)。幹細胞由来運動ニューロンを、AAV-DJにパッケージされた、示されるベクターで処理し、形質導入の7日後に、RNAを採取し、ATXN2に対するプローブ、ならびにハウスキーピングプローブGUSBおよびB2Mを用いるRT-ddPCRを使用してノックダウンに関して評価した。平均ATXN2 mRNAシグナル(GUSBおよびB2Mプローブ、ならびに形質導入されていない細胞に対して正規化される)を、測定した。データを、3.16E4ベクターゲノム/細胞の用量で処理した細胞に関して列挙する。

30

40

【表 8】

表8: amiRNA/AAVベクター処理したヒト幹細胞由来運動ニューロンにおける *ATXN2* ノックダウン

ベクター	miR	平均 <i>ATXN2</i> 31600	SD	N
H1-miR-PSG11_V5	miR100_1755	13.96853215	2.13651083	6
H1-miR-PSG11_V5	miR100_2586	29.25180424	1.03259645	6
H1-miR-PSG11_V5	miR100_2945	26.83870303	2.60157362	6
H1-miR-PSG11_V5	miR100_3330	32.17946149	2.69980734	6

10

【0109】

別の実験において、AMELY_V3スタッパー（配列番号51または配列番号18のヌクレオチド488~2177）およびH1ロングプロモーターの制御下にあるATXN2標的化amiRNAを含むベクターを、成体雄性C57BL/6マウスへの静脈内投与および投与の3週間後に測定した標的ATXN2のノックダウンによって試験した。Atxn2のノックダウンを、肝臓組織からRNAを抽出し、Atxn2ならびにコントロールプロブHprtおよびGusbを用いるRT-ddPCRを行うことによって評価した。表9は、ピヒクル（PBS+0.001% PF-68）を投与した動物と比較して、ベクターを投与した3匹の動物から評価した肝臓組織における平均パーセントノックダウンを列挙する。投与した用量は、この試験では平均して 8.5×10^8 であり、マウスの体重に対して調整した。表9において認められ得るように、このベクターを投与した動物に由来する肝臓において実質的なノックダウンが存在し、これは、スタッパーでパッケージングされるAAVの機能性を示す。

20

【表 9】

表9: AAVベクター処置マウスの肝臓における *ATXN2* ノックダウン

ベクター	<i>Atxn2</i> mRNA, % ピヒクル	SD
H1_ロング_miR1-1_1784_AMELY_V3 (配列番号18)	8.67	2.33

30

【0110】

上で記載される種々の実施形態は、さらなる実施形態を提供するために組み合わせられ得る。本明細書中で言及されるならびに/または2021年2月5日出願の米国特許出願第63/146,522号および2021年2月5日出願のPCT出願番号PCT/US2021/016939を含む出願データシートの中に列挙される米国特許、米国特許出願公開、米国特許出願、外国特許、外国特許出願および非特許刊行物は、それらの全体において本明細書に参考として援用される。実施形態の局面は、その種々の特許、出願および刊行物の概念を使用してなおさらなる実施形態を提供するために必要であれば、改変され得る。

40

【0111】

これらのおよび他の変更は、上記の詳細な説明に鑑みて上記実施形態に対して行われ得る。一般に、以下の特許請求の範囲において、使用される用語は、その特許請求の範囲を、本明細書および特許請求の範囲において開示される具体的実施形態に限定すると解釈されるべきではなく、このような特許請求の範囲によって権利化される均等物の全範囲とともに、全ての可能な実施形態を含むと解釈されるべきである。よって、特許請求の範囲は

50

、本開示によって限定されない。

【 図面 】

【 図 1 - 1 】

位置 chrY:6,733,959-6,742,068 逆相補体

文字 / 行 60 デフォルトケース: ● 大文字 ○ 小文字 提示

トラック名	トグル ケース	下線	太字	斜体	赤	緑	青
共通 SNPs(151)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
保存	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
CpG アイランド	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
GTEx 遺伝子	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
パブリケーション	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
リピートマスク	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
UCSC 遺伝子	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
DNase クラスター	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
Txn ファクター ChIP	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
GTRx 結合 eQTL	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
NCBI RefSeq	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
マスター DNaseI HS	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
ユニフォーム DNaseI HS	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
ENCODE 3 TFBS	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
ユニフォーム TFBS	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
その他の RefSeq	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
Open Chrom Synth	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
Affy U95	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
Affy U133	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
ヒト ESTs	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
全 SNPs(151)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
スプライス ESTs	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
GENCODE V31リフト37	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
GENCODE 遺伝子V19	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
Broad ChromHMM	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
CD34 DnaseI	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
染色体バンド (表意文字)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
アンサンブル遺伝子	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
ゲノムセグメント	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
GWAS カタログ	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
HAIB メチル RRBS	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
HAIB メチル 450	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0

FIG. 1

【 図 1 - 2 】

位置 chrY:6,733,959-6,742,068 逆相補体

文字 / 行 60 デフォルトケース: ● 大文字 ○ 小文字 提示

トラック名	トグル ケース	下線	太字	斜体	赤	緑	青
中断 Rpts	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
ラミンB1 (Tig3)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
マイクロサテライト	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
NKI LADS Tig3)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
ORegAnno	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
分節重複	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
単純反復	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
SNPedia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
SUNY RIP 遺伝子 ST	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
SUNY RIP タイリング	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
SUNY スイッチギア	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
スイッチギア TSS	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
TFBS 保存版	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
TS miRNA 部位	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
UMass 5C	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
UNC FAIRE	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0
Vista エンハンサー	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	0	0	0

FIG. 1 (続き)

10

20

30

40

50

【 図 2 A 】

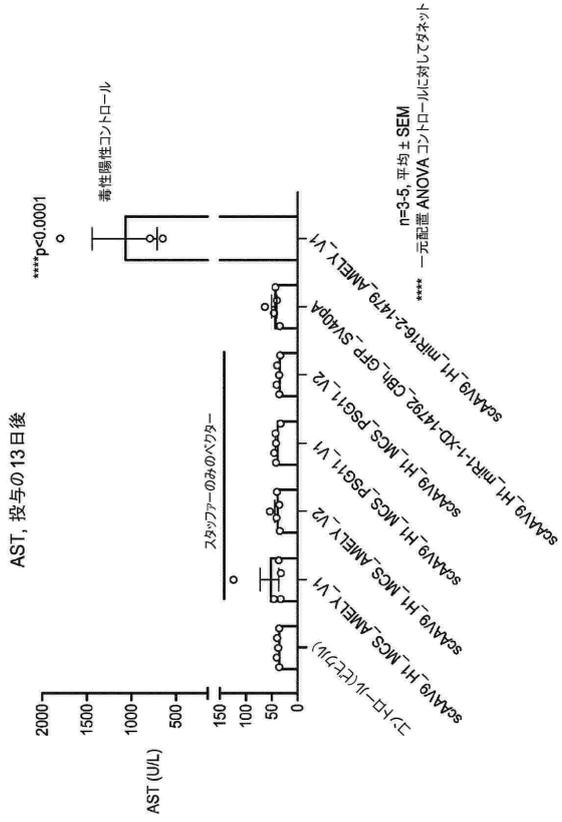


FIG. 2A

【 図 2 B 】

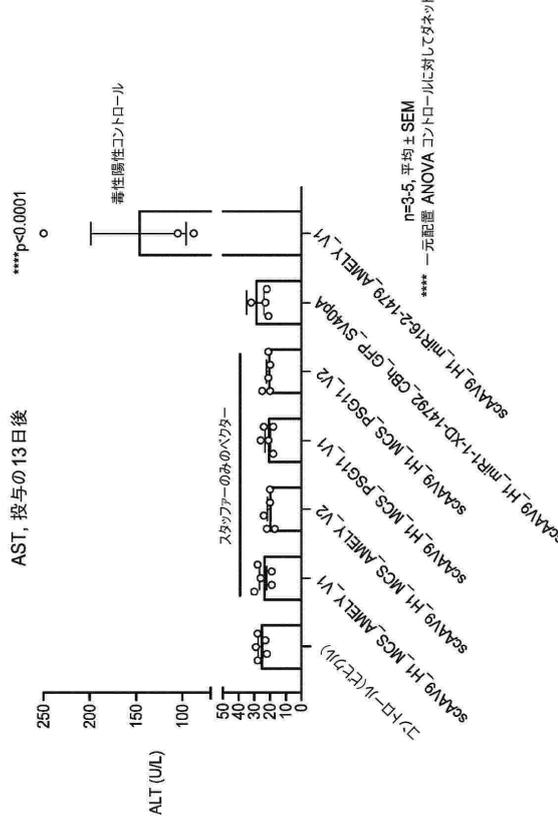


FIG. 2B

【 図 3 A 】

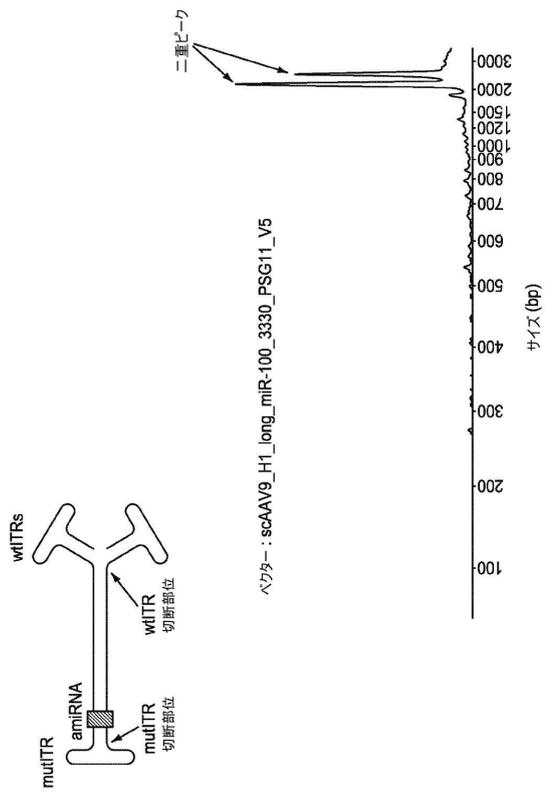


FIG. 3A

【 図 3 B 】

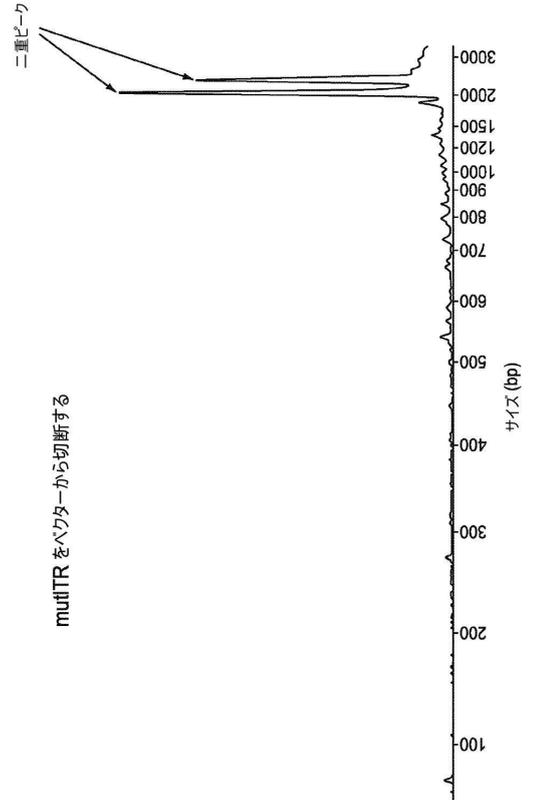


FIG. 3B

10

20

30

40

50

【 図 3 C 】

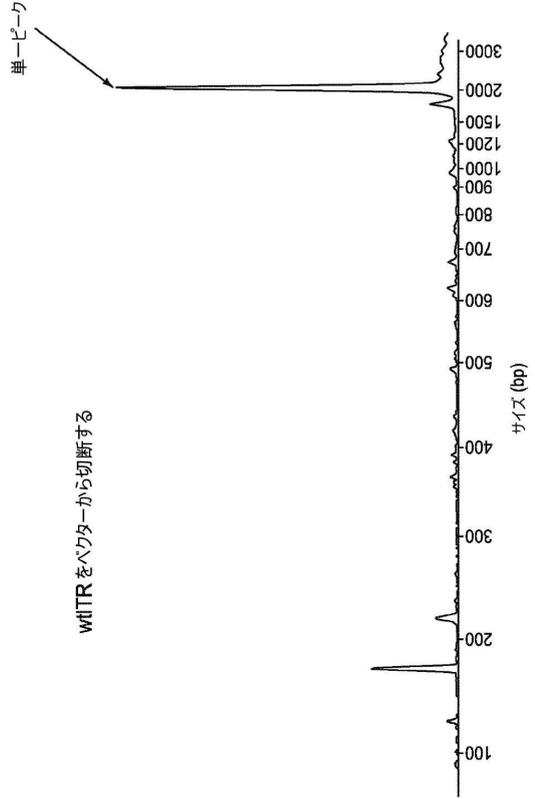


FIG. 3C

【 図 3 D 】

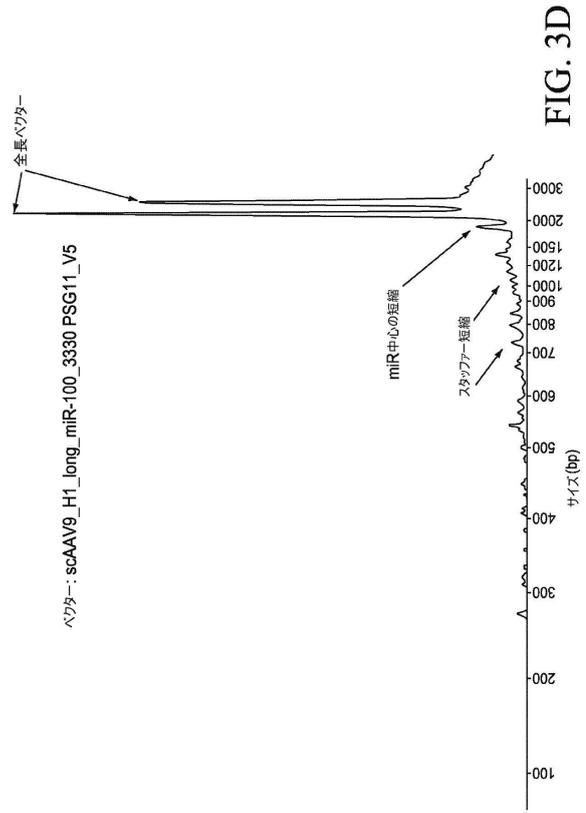


FIG. 3D

10

20

【 図 3 E 】

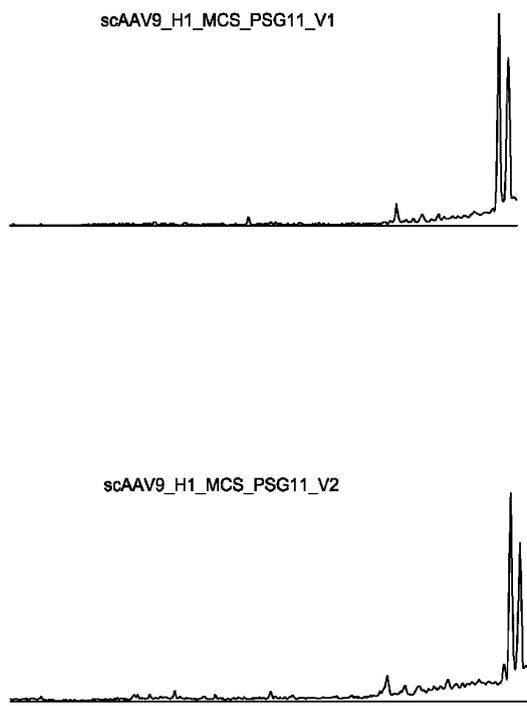


FIG. 3E

【 図 3 F 】

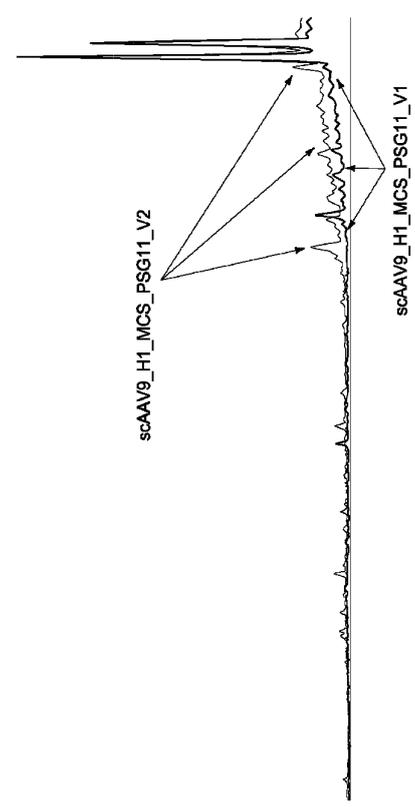


FIG. 3F

30

40

50

【 図 3 G 】

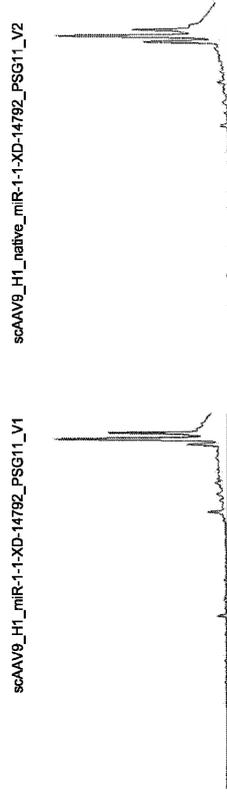


FIG. 3G

【 図 3 H 】

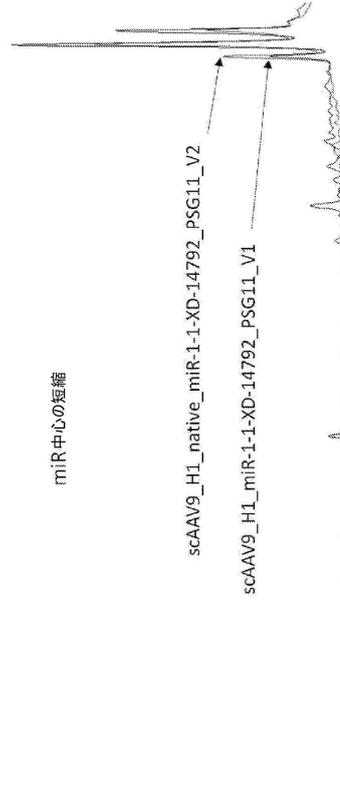


FIG. 3H

10

20

【 図 4 A - 1 】

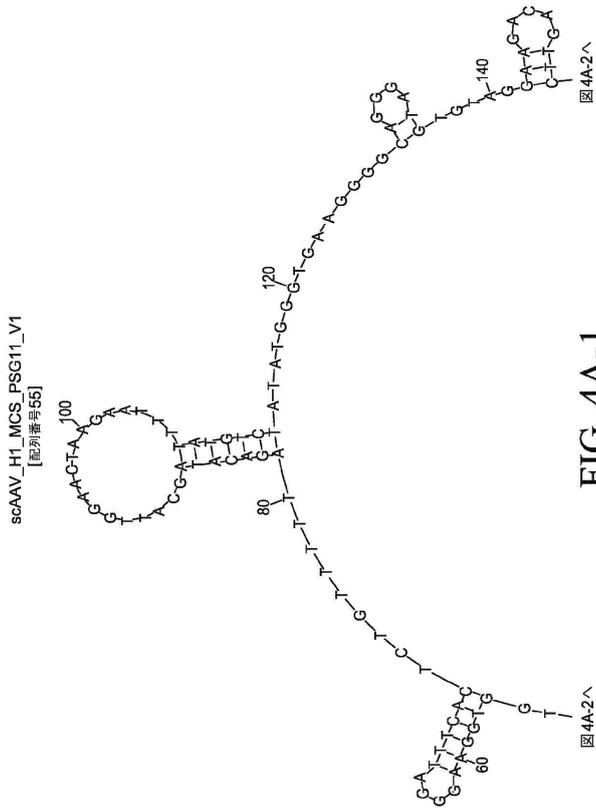
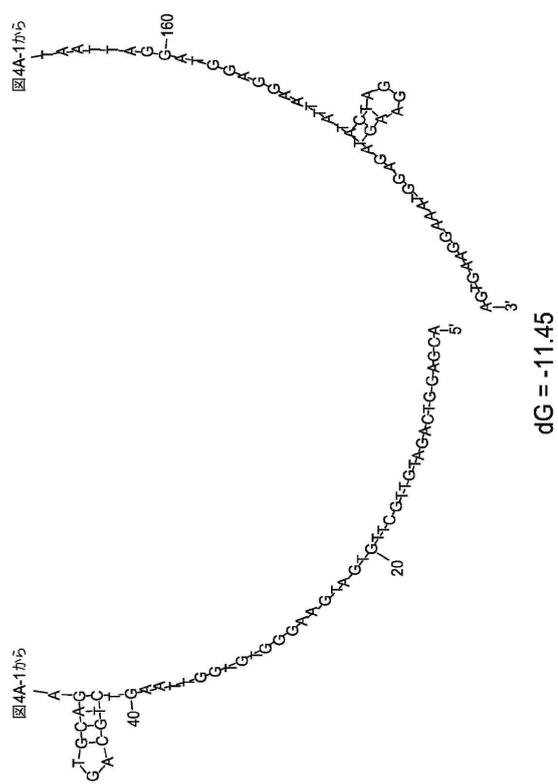


FIG. 4A-1

【 図 4 A - 2 】



dG = -11.45

FIG. 4A-2

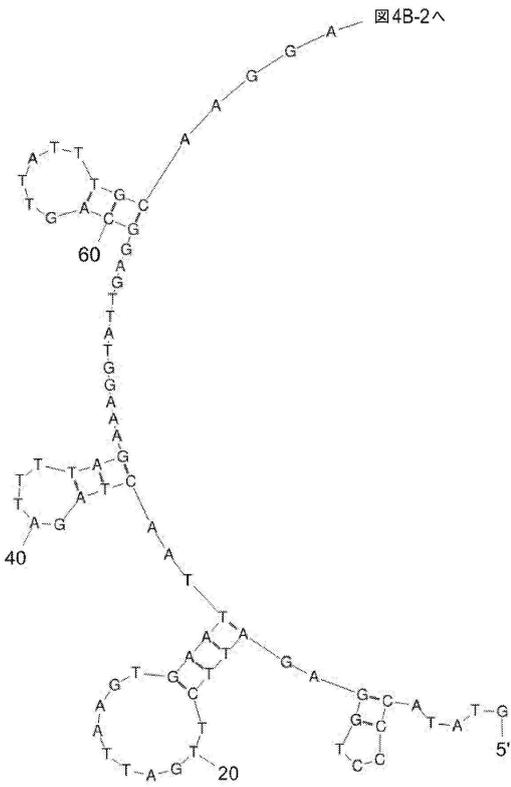
30

40

50

【 図 4 B - 1 】

FIG. 4B-1



【 図 4 B - 2 】

scAAV_H1_MCS_PSG11_V2
[配列番号56]

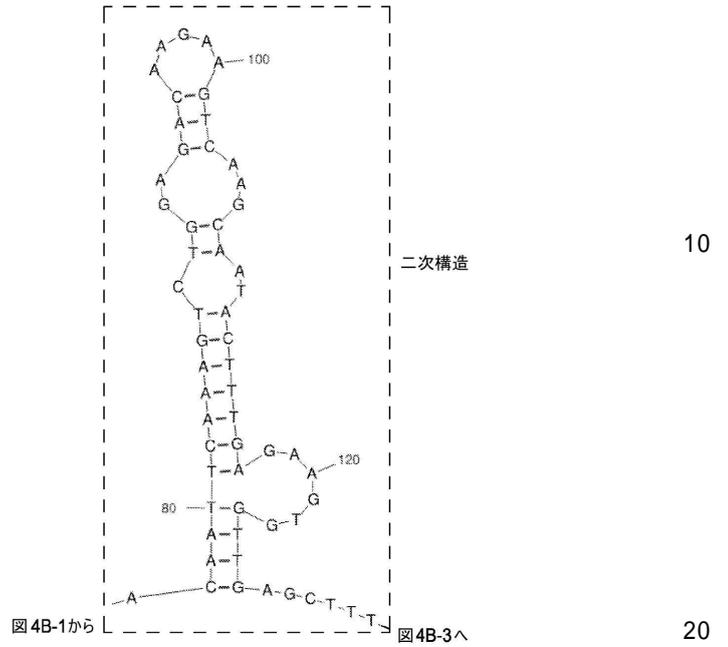
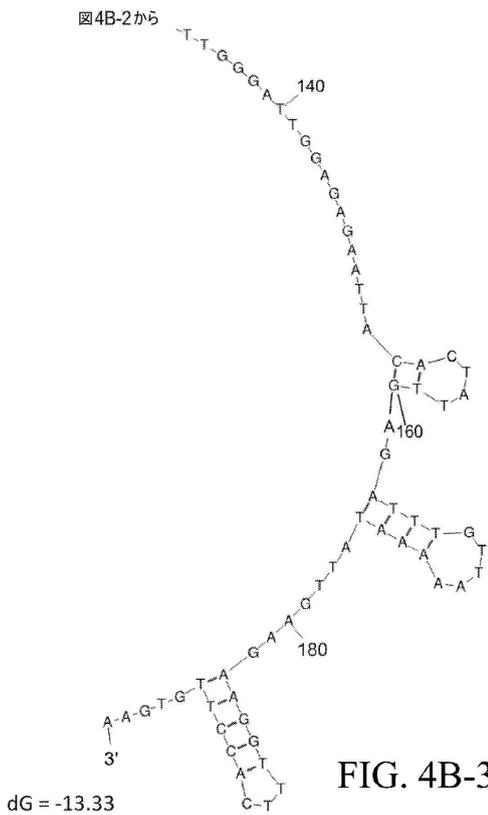


FIG. 4B-2

【 図 4 B - 3 】



【 図 5 A 】

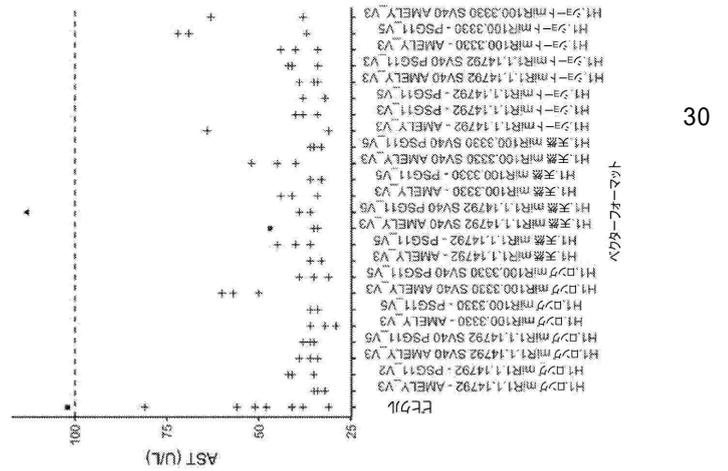


FIG. 5A

10

20

30

40

50

【 図 5 B 】

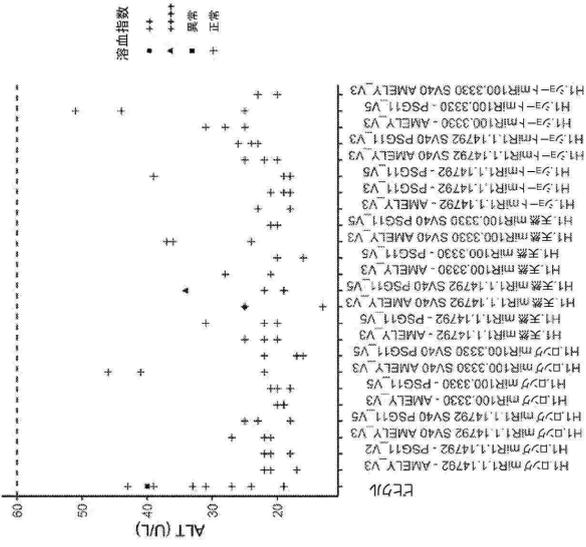


FIG. 5B

【 図 7 】

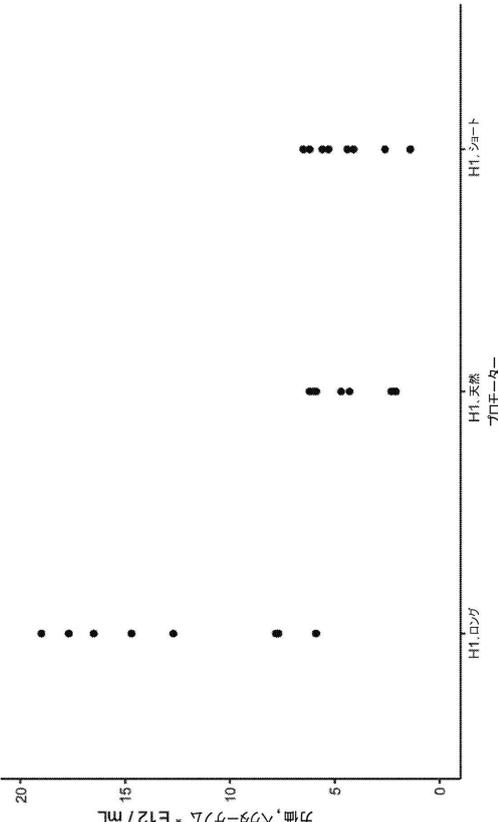


FIG. 7

【 図 6 】

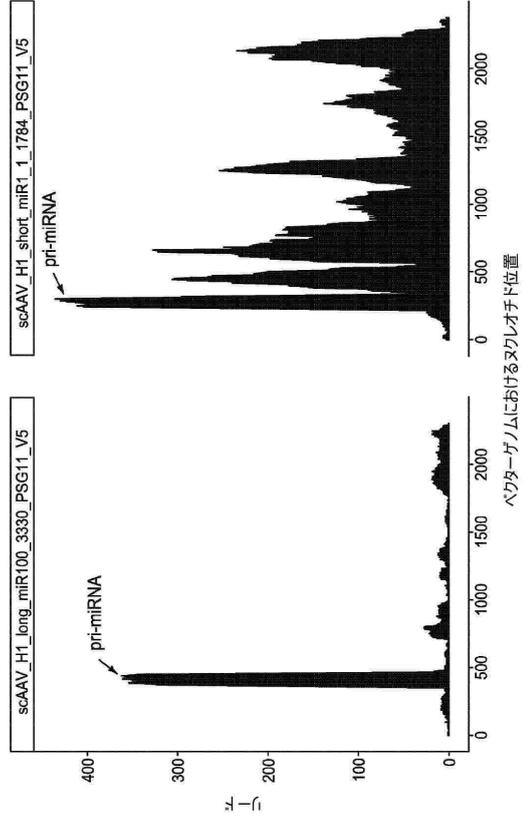


FIG. 6

【 図 8 A 】

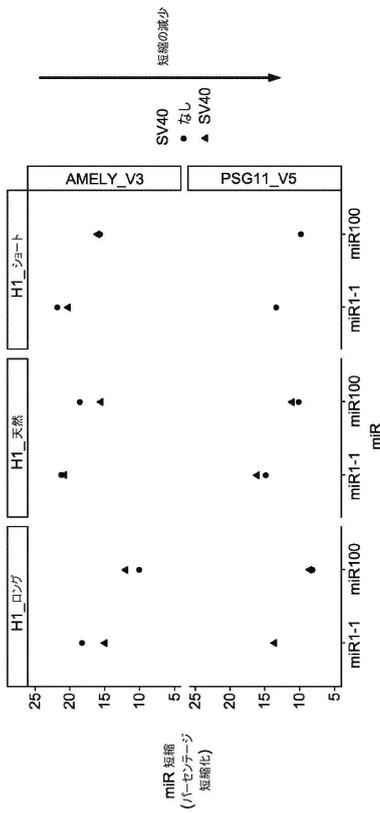


FIG. 8A

【 8 B 】

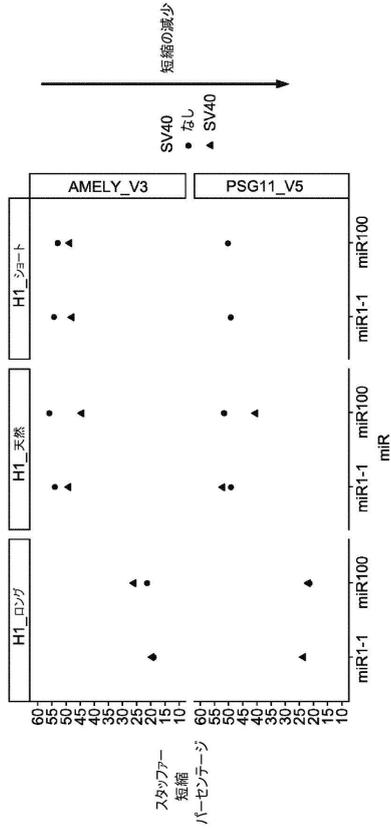


FIG. 8B

【 8 C 】

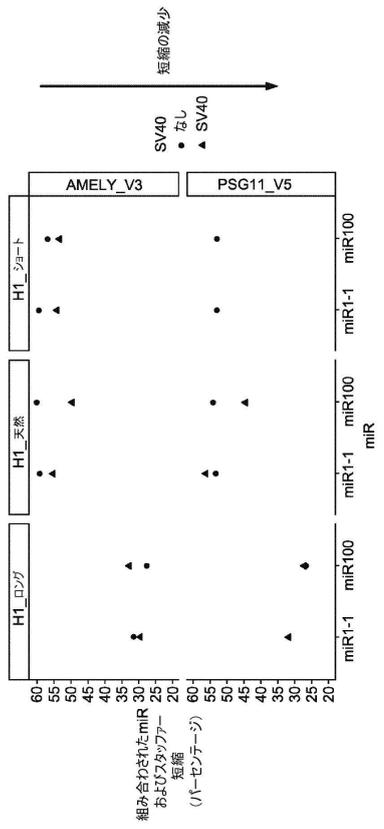


FIG. 8C

【 配列表 】

202450629600001.app

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US2022/015380
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/864 C12N15/113 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017/161273 A1 (THE CHILDREN'S HOSPITAL OF PHILADELPHIA [US]) 21 September 2017 (2017-09-21) claims 1-81; figure 1; example 1 the whole document	1-39
X	WO 2019/122403 A1 (SPARINGVISION [FR]; INST NAT SANTE RECH MED [FR] ET AL.) 27 June 2019 (2019-06-27) figure 3; example 4; sequence 10 the whole document	1-39
X	WO 2014/007858 A1 (UNIV IOWA RES FOUND [US]; DAVIDSON BEVERLY L [US] ET AL.) 9 January 2014 (2014-01-09) claims 1-10; figures 3, 4; example 1; sequences 1, 2 the whole document	1-39
----- -/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 21 April 2022		Date of mailing of the international search report 02/05/2022
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Spindler, Mark-Peter

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/015380

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014/144486 A2 (PHILADELPHIA CHILDREN HOSPITAL [US]) 18 September 2014 (2014-09-18) claims 1-54 the whole document -----	1-39
X	EP 3 613 856 A1 (STADSON BEIJING BIOPHARMACEUTICALS CO LTD [CN] ET AL.) 26 February 2020 (2020-02-26) claims 1-29; examples 4-8 the whole document -----	1-39

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/015380

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

10

a. forming part of the international application as filed:

in the form of an Annex C/ST.25 text file.

on paper or in the form of an image file.

b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

20

3. Additional comments:

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2022/015380

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2017161273 A1	21-09-2017	AU 2017234929 A1	04-10-2018
		CA 3018076 A1	21-09-2017
		EP 3429605 A1	23-01-2019
		US 2019071671 A1	07-03-2019
		WO 2017161273 A1	21-09-2017
WO 2019122403 A1	27-06-2019	AU 2018387826 A1	06-08-2020
		BR 112020012471 A2	24-11-2020
		CA 3086292 A1	27-06-2019
		CN 111742052 A	02-10-2020
		EP 3728610 A1	28-10-2020
		JP 2021508493 A	11-03-2021
		KR 20200107990 A	16-09-2020
		SG 11202006796R A	28-08-2020
		US 2020318138 A1	08-10-2020
		WO 2019122403 A1	27-06-2019
		WO 2014007858 A1	09-01-2014
BR 112015000161 A2	27-06-2017		
CA 2878401 A1	09-01-2014		
CN 104619832 A	13-05-2015		
EP 2870237 A1	13-05-2015		
ES 2703177 T3	07-03-2019		
HK 1210214 A1	15-04-2016		
JP 6366581 B2	08-08-2018		
JP 2015522280 A	06-08-2015		
RU 2015103901 A	27-08-2016		
US 2015184197 A1	02-07-2015		
US 2017306355 A1	26-10-2017		
WO 2014007858 A1	09-01-2014		
WO 2014144486 A2	18-09-2014	AU 2014229051 A1	10-09-2015
		BR 112015021884 A2	18-07-2017
		CA 2904156 A1	18-09-2014
		CN 105612253 A	25-05-2016
		EP 2970943 A2	20-01-2016
		HK 1220488 A1	05-05-2017
		JP 2016517278 A	16-06-2016
		KR 20160026841 A	09-03-2016
		RU 2015144047 A	27-04-2017
		US 2016032319 A1	04-02-2016
		WO 2014144486 A2	18-09-2014
EP 3613856 A1	26-02-2020	CN 110770344 A	07-02-2020
		EP 3613856 A1	26-02-2020
		SG 11201909136P A	30-10-2019
		TW 201837173 A	16-10-2018
		US 2021108197 A1	15-04-2021
		WO 2018177244 A1	04-10-2018

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K	31/7105(2006.01)	A 6 1 K	31/7105
A 6 1 K	31/713(2006.01)	A 6 1 K	31/713
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00
A 6 1 P	21/02 (2006.01)	A 6 1 P	21/02
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/28
A 6 1 P	25/16 (2006.01)	A 6 1 P	25/16
A 6 1 P	25/14 (2006.01)	A 6 1 P	25/14
A 6 1 K	9/48 (2006.01)	A 6 1 K	9/48
A 6 1 K	47/42 (2017.01)	A 6 1 K	47/42

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

気付

(72)発明者 グラム , ロバート アール .

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0 , サウス サンフランシスコ , オイスター ポイント
ブルバード 1 7 1 , スイート 3 0 0 , メイズ セラピューティクス , インコーポレイテッド
気付

(72)発明者 ジャンキ , ピーター

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0 , サウス サンフランシスコ , オイスター ポイント
ブルバード 1 7 1 , スイート 3 0 0 , メイズ セラピューティクス , インコーポレイテッド
気付

(72)発明者 チェン , ロナルド

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0 , サウス サンフランシスコ , オイスター ポイント
ブルバード 1 7 1 , スイート 3 0 0 , メイズ セラピューティクス , インコーポレイテッド
気付

(72)発明者 グリーン , エリック

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0 , サウス サンフランシスコ , オイスター ポイント
ブルバード 1 7 1 , スイート 3 0 0 , メイズ セラピューティクス , インコーポレイテッド
気付

F ターム (参考) 4B065 AA90Y AA93X AA95X AA95Y AB01 AC14 BA01 CA23 CA24 CA44
4C076 AA53 AA95 BB11 BB21 CC01 EE41H
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA04 MA05 MA37 MA56 MA66
NA03 NA05 NA13 ZA01 ZA02 ZA15 ZA16 ZA23
4C087 AA01 AA02 BC83 NA03 NA05 NA13 ZA01 ZA02 ZA15 ZA16
ZA23